[별지 19]

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

(뒷면)		(앞면)
	과제번호 112075-3 녹차씨앗추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재 개발 농림축산식품부	일반과제 과제번호 112075-3 녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발 (Development of Functional Food Ingredient for Antiobesity Effect from Green Tea Seed Extract) 전남대학교 농 림 축 산 식 품 부
주 의 (편집순서 8) (15 포인트 고딕계열) ↑ 6cm ↓		

편집순서 2

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 9 월 일

주관연구기관명 : 전남대학교
주관연구책임자 : 김 종 덕
연 구 원 : 김 민 용
신 태 선
서 효 진
협동연구기관명 : 전남식품산업연구원
협동연구책임자 : 위 지 향
협동연구기관명 : 바이오푸드스토리
협동연구책임자 : 신 유 림
협동연구기관명 : 명인신광수차
협동연구책임자 : 신 광 수

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발

(Development of Functional Food Ingredient for Antiobesity Effect from Green Tea Seed Extract)

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적

구분	특허				학술발표				기타 활용 자료		논문				총계		계획대비 달성도 (%)
	목표		실적		목표		실적		목표	실적	목표		실적		목표	실적	
	출원	등록	출원	등록	국내	국제	국내	국제			SCI	비SCI	SCI	비SCI			
1차년도	1			1	4	2	7	2			1	2	3	0	10	13	130
2차년도	1		1	1	4	2	5	4	2	2	2	2	3	1	13	17	130.8
3차년도	1		3	1	4	2	7	0	1	1	2	2	2	1	12	15	125
4차년도																	
5차년도																	
계	3	-	4	3	12	6	19	6	3	3	5	6	8	2	35	45	128.6

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

:비만 “은 건강을 해칠 정도로 체내 지방이 과도하게 축적된 상태’로, 사망률과 이환율을 증가시킬 뿐 아니라 사회적, 정신적으로도 장애를 일으키는 ‘만성질환’으로 인식되고 있다. WHO 자료에 의하면, 전 세계적으로 12억의 인구가 비만에 속하고, 2015년경에는15억 까지 증가 될 것이라고 그 심각성을 예측하였다. 우리나라도 19세 이상 성인에서 체질량지수 25 kg/㎡ 이상인 비만의 비율이 31.1%로, 최근 약 10년 동안 19.6%의 증가율을 보이는 것으로 나타났다. 이로 인해 작년 한해 국내에서 비만치료에 쓰인 비용은 1조 7923억원이었으며, 해마다 비용이 점차 증가하고 있는 것으로 조사 되었다. 또한 약 120 만 명의 한국인을 대상으로 한 역학연구에서도 체질량지수가 한국인의 사망률 증가와 연관이 있고, 동맥경화 및 심혈관 질환의 발생과 관련이 깊다고 보고하고 있다.이처럼 비만은 단순 질병을 넘어 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환, 제2형 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 퇴행성관절염, 일부 암질환 등 다양한 만성퇴행성 질환들의 원인으로 작용하여 사망률과 이환율을 증가시킬 뿐 아니라 사회적, 정신적으로도 장애를 일으키는 원인인 것이 밝혀지면서 세계적인 공중보건상의 과제가 되었다.

현재 시행되는 비만 치료법으로는 식이요법, 운동요법 등이 있으며, 고도의 비만으로 위험성이 높은 군에서는 약물요법이나 수술요법 등을 병행 시행하기도 한다. 그러나 약물요법이나 수술요법 등 단기간의 극단적인 체중감소는 오히려 신체적 부작용을 일으키는 사례들이 보고되고 있다. 미국식품의약청과 국내 식약청에서 승인을 얻어 많이 사용되었던 식욕억제 기작을 가진 리덕실(Sibutramine제제)은 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 변비 및 심혈관계 질환 등의 심각한 부작용이 보고되어 판매중지 및 회수 조치가 내려졌고, 소장에서 리파아제 활성억제를 통해 중성지방의 흡수를 차단시키는 킴으로써 체중감량효과를 나타내는 제니칼(Orlistat 제제)은 찔끔 지방변, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장관계 부작용이 보고되고 있다. 따라서 부작용은 없으면서 지방연소기능을 항진시키거나 섭취한 탄수화물이나 지방의 흡수를 낮추는 기능이 탁월하면서 안전한 기능성식품의 개발이 필요한 실정이다. 이에 최근에는 음식을 통해서 섭취되는 phytochemical, pigment 등의 식물 유래의 이차 대사산물, 천연 항산화 물질들의 기능성에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있으며, 이러한 천연물 유래 기능성물질들은 안전성과 기능성의 두 가지 요소를 다 만족시킬 수 있다는 장점이 있어 많은 연구가 진행 중에 있다.

녹차(*Camellia sinensis L*).는 차나무로 식품원료로 등재되어 있고, 녹차추출물의 경우는 이미 체지방 감소 효능을 가진 고시형 원료로 식약처에 등록 되어 있다. 녹차씨는 예로부터 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있다하여 민간요법이나 한방 치료적으로 왔으나. 우리나라에서는 최근 화장품의 원료로 일부 사용되고 있을 뿐 녹차 수확이 끝난 후 거의 폐기되고 있는 실정이다. 특히, 본 원료는 전남 순천 지역에서 집중적으로 생산되는 야생녹차 *(Camellia sinensis L).* 의 종자로 탄수화물 42.6%, 조지방 34.54%, 조단백질 18.0%, 수분 3.36% 회분 1.51% 식이섬유 8.73% 뿐만 아니라 양질의 지방, 특히, 불용성 식이섬유소 3.73%, 수용성 식이섬유소 5.0%, 사포닌 등 각종 천연화학성분들이 풍부하게 함유되어 있을 뿐만 아니라 항산화, 항암, 항고혈압 등에 대한 기능성 보고 들이 많고, 또 녹차추출물이 체지방개선 고시용 건강기능식품으로 등재 되어 있는 바, 체지방개선 기능성 소재로의 개발 접근성이 용이하다. 그럼에도 불구하고 우리나라 재래종 녹차산업은 일부 하향세를 걷고 있는 실정이다. 따라서, 재래종 야생녹차 *(Camellia sinensis L)* 부산물인 녹차씨박을 이용하여 경제성이 높고 차별화 된 메카니즘을 가진 고부가가치형 소재로 개발함으로써 하향하고 있는 녹차 씨 산업에 기폭제 역할을 할 수 있을 거라 생각되어 연구를 시작하게 되었다.

Ⅳ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 전남 순천 지역에서 자생하는 재래종 녹차씨를 활용하여 1차적으로는 개별인정형 기능성식품 개발 시 요구되는 자료인 원료표준화, 기준시험법, 안전성 자료 및 기능성 자료(전임상/임상) 자료를 확보하고, 2차적으로는 확보된 자료를 근거로 식약처에 체지방개선에 대

한 개별인정을 신청하고자 하였다. 따라서, 표준화 자료 확보를 위해서 원재료표준화-제조공정 표준화-기준규격설정- 기준시험법 개발-유통기한 설정 등에 관한 연구를 수행하였고, 안전성 자료확보를 위해서는 단회독성- 유전독성- In vitro 세포독성 등을 수행하였다. 기능성 자료 확보를 위해서는 고지방식이와 고탄수화물식이 동물모델을 활용하여 항비만에 대한 효능정도, 효능발현 메카니즘, 복용 시 안전성 등에 관한 연구를 수행하고, 논문화하여 5편의 전임상 자료를 확보하였다. 또한, 앞의 표준화와 전임상 단계에서 얻은 자료들을 기초로하여, 사람에서의 안전성과 유효성을 인체적용시험을 통하여 평가하였다. 이후 확보된 표준화-안전성-기능성 자료들과 기타 식약처 요구사항에 맞는 자료 수집과 분석을 통하여 식약처에 체지방개선 기능성원료 개별인정을 신청 하였고 현재 심사 중에 있다. 3년간의 연구기간을 통하여 도출된 자료들을 활용 하여 국내외 학술활동, 논문화, 인력양성, 특허등록 등의 활동을 수행하였다.
또한, 재래종 야생 녹차씨를 활용한 선도적 연구개발을 통해 고부가가치 건강증진식품 개발을 위한 새로운 방향과 신제품 적용기술 개발 및 녹차씨를 활용한 새로운 힐링 산업 구축을 위한 기반 확립 그리고 시장진출 수요-공급의 차원에서 안정적 원료공급 체계구축을 위해 원료 대량생산 공급체계 시스템 구축사업을 실시하였다

Ⅴ. 연구개발 결과

본 연구는 재래종 야생녹차씨를 대상으로 기능성식품 원료 개발시 요구되는 식품기능성 평가항목인 원료표준화, 기준시험법, 안전성평가, 비임상 및 임상 유효성 평가 시험을 수행하였다.

본 연구의 원료인 녹차씨박에 대한 표준화를 위해 먼저 원재료(녹차씨박)에 대한 표준화를 수행하였다. 그 결과, 채취시기 매년 9~12월 중순, 중과피 함량 10%, 볶음조건 110℃/10분 이내, 착유조건 600~650kg/cm, 보관온도 -5℃, 보관기간 2년 이내, 연수급 능력 5톤, 채취-건조-탈과피-볶음-착유-박의 원재료 표준화 조건을 확립하였다. 다음으로 원료표준화를 위해 녹차씨박에 존재하는 성분 중 물리화학적 조건에 비교적 안정하며, 항비만 및 항염증 기능성 등의 기능성을 가진 나린제닌(naringenin)을 지표물질로 선정하고, HPLC를 활용한 시험분석법(Atlantis C_{18}, FR 1.0ml/min, MP 10% MeCN in 0.1% TFA, 50% MeCN in 0.1% TFA)을 확립하였다.
제조공정 표준화 작업을 통하여 지표물질이 함량이 4.4~6.6(5.5mg/g의 80~120%) 되도록 원재료-추출(10배수, 95℃, 2h)-여과(55um 필터)-농축(80℃, 20 brix)- 건조(동결)-분말형 원료의 최적 제조공정을 확립하였다. 식품의약품안전처 고시 제 2012호-27호 규정에 부합되도록 유통기한(24개월), 중금속(납 1mg/kg 이하, 총비소 1mg/kg , 카드늄 0.5mg/kg 이하, 총수은 0.5mg/kg 이하) , 대장균(음성) 및 잔류농약(59종, 불검출)에 대한 기준규격을 확립하였다.

식약처 고시 제 2011-34호의 기준에 부합하는 안전성 자료 확보를 위해 “건강기능식품의 안전성평가 의사결정도”에 의한 안전성 제출 자료 범위를 결정하고, 국.내외 사용현황, 학술

DB 검색을 통해 생물학적 유용성 및 독성관련 자료, GLP 기관을 통해 단회 및 유전독성 실험을 실시하여 NOAEL 및 섭취량 자료를 확보하였고, 확보, 전임상 동물모델 및 인체 적용시험을 통하여 안전성 자료를 확보하였다.

식약처 건강기능식품법 제 15조 및 제 18조에 부합되는 기능성 자료 확보를 위해 학술 DB 검색하였고, 2편이상의 전임상 자료, RCT 디자인의 1편 이상의 인체적용시험 자료가 필요함을 확인하고, 기능성자료 확보 전략을 수립하였다. 식약처 제출 조건에 맞는 기능성 자료 확보를 위해 먼저, 3T3L-1를 이용한 In vitro 실험을 통하여 녹차씨박 추출물이 신생혈관억제(antiangiogenesis)에 의한 지방세포분화억제 및 지방축적 억제 기작을 통하여 항비만 효과를 가져온다는 것을 확인하였다. 다음으로, 고지방식이(High-fat diet) 및 고탄수화물(High-carbohydrate diet) 동물 모델을 확립하였다. 동물실험을 통하여 녹차씨박추출물의 항비만 효과는 지질대사 관련 효소(FSA, ACS1 및 GPAT)의 활성 및 신호전달체계의 조절, 지방세포에서 분비되는 에디포사이토카인(adiponectin 및 leptin)의 분비 조절, 식이로 섭취한 지방의 분변으로의 배출을 촉진시킴으로써 체지방 축척억제 및 체중증가율 감소 효과를 가지며, 특히 300mg/kg 투여 시 그 효과가 현저하였음을 확인하였다.

녹차씨박 추출물의 인체에서의 체지방 감소 효과를 평가하기 위하여 BMI 25~30의 과체중 피험자에서 무작위배정, 위약대조, 10주 간의 인체 적용시험을 실시하였다. 그 결과, 1차 유효성 평가항목인 체지방량, 체지방률 및 제지방량 변화 및 2차 유효성 평가항목인 신체계측지표(체중, 체질량지수, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이둘레비), 지질대사지표(총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤), free fatty acid 및 adiponectin 모든 항목에서 녹차씨박추출물섭취군과 플라세보군, 두 섭취군 간의 통계적 유의성은 얻지 못했다($p>0.05$). 그러나, 녹차씨박추출물을 10주간 섭취한 군에서는 섭취 전에 비하여 왼쪽팔의 체지방량($p=0.024$)이 유의하게 감소하였고, 전체 제지방량($p=0.031$)은 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 이상반응 발생, 진단검사의학적 분석 등 안전성마커의 분석을 통해 녹차씨박추출물의 인체내 섭취는 안전함을 확인 할 수 있었다.

지금까지의 연구를 통해 확보 된 표준화-안전성-기능성 자료 및 관련 DB를 통해 수집/분석된 자료를 근거로 하여 “건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정(식약처 고시 제 2011-24호, 2011.7.8.)” 에 준하는 개별인정신청을 위한 문서화 작업을 실시하였고, 현재 식약처 영양기능연구팀에 체지방개선 기능성 원료 개별인정 심의를 신청하였다.

V. 성과 및 활용계획

본 연구에서 순천일대에서 재래종 야생녹차씨박 열수추출물에 대한 원료표준화, 기준규격

설정 연구, 항비만 전임상 동물실험 및 인체적용시험을 통해 체지방개선 기능성 원료 개별인정에 대한 과학적 근거 자료를 확보하였고 개별인정 심의를 신청하였다. 또한, 3년간의 연구기간을 통하여 도출된 자료들을 활용 하여 국내외 학술활동, 논문화, 인력양성, 특허등록 등의 활동을 수행하였다. 따라서, 이러한 성과들을 활용하여 재래종 야생 녹차씨를 활용한 선도적 연구개발을 통해 고부가가치 건강증진식품 개발을 위한 새로운 방향과 신제품 적용기술 개발 및 녹차씨를 활용한 새로운 힐링 산업의 세계화를 위한 구축 기반 모델 사업 그리고 시장진출 수요-공급의 차원에서 안정적 원료공급 체계구축을 위해 원료 대량생산 공급체계 시스템 구축 사업을 실시 할 계획이다.

편집순서 4

SUMMARY

The aim of this study is to develop of health functional food ingredient for antiobesity effect using Green Tea Seed cake.

Camellia sinensis L. O. Kuntze has traditionally been used in Asian countries as a stimulant, a diuretic, and to prevent obesity. Studies in green tea are well documented in literature, though the potential of fruit from the plant has never been studied in details.

In the present study, an HPLC method for determination of naringenin was developed to standardize that as a marker compound in Green Tea Seed cake extract(GTE) as a functional health food. In the standardization process, we found that the naringenin content of GTSE was 5.5 mg/g, however, catechins were not detected. The effect of the hot water extract of defatted green tea seed cake (GTSE) on lipid metabolism and the underlying mechanisms of lipolysis in mature 3T3-L1 adipocytes were investigated. The intracellular lipid droplets were stained with Oil Red O dye and quantified. Compared to the control, lipid accumulation was significantly decreased by 52%, and intracellular triglyceride(TG) level was reduced by 33% after treatment with GTSE at a concentration of 40 μg/mL. To determine the mechanism of reduction in TG content, we determined the level of fatty acid synthase (FAS), phosphorylation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and acetyl-coenzyme A carboxylase(ACC) in the cell model. Incubation of the 3T3-L1 adipocytes with GTSE stimulated AMPK and ACC phosphorylation in a dose-dependent manner, and decreased the expression of FAS.

The anti-adipogenic effect of aqueous extract of green tea seed cake extract(GTE) were analysed in-vitro and the anti-obesity effects were determined *in-vivo* in murine model fed high-fat and high-carbohydrate diets. We found that GTE inhibited the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte and significantly lowered body weight, body fatpad weights, blood lipid, glucose, insulin, and leptin levels in mice fed high-fat and high-carbohydrate diets. GTE suppressed the expression of important adipogenic genes(PPARγ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin) and lipid metabolism genes(FAS). Furthermore, GTE induced the levels of adiponectin in serum and adipose tissue, as well as AMP-activated protein kinase(AMPK) in liver tissue. These results suggested that GTE ameliorates its antiobesity effect through multiple cells signaling pathways in diets induced obesity in mice.

In the last method for functional assessment, we conducted a randomized, double-blind trial registered under Clinical Trials to examine the effect and safety of green tea seed cake extract. A total of 90 obses subjects were randomly assigned to either a GTSE(2,000mg/day) or placebo group. The total

treatment time was 10 weeks. The main outcome were measured the rate of change of body fat mass measurements, and obesity related biomarkers including BMI, body weight, W/H raio, lipid profiles, adiponectin and hs-CRP. As a result, there was no difference in any other biomarkers except for the LAFM(left arm fat mass) and FFM (free fat mass) by a GTSE intake for 10 weeks. We also confirmed through this clinical study that the GTSE treatment also was safe among subjects without any side effects or adverse events. Then, Analyzing the collected data relating to GTSE so far, and create a separate authorization application was submitted to the KFDA.

편집순서 5

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 16
Section 1. Importance of economical and industral and necessity of this study ····· 16
Section 2. Performance goal of this study ····· 25

Chapter 2. State of Technology Development ····· 27
Section 1. Present state of technology of the inside and outside of the country based on patent ····· 27
Section 2. Anti-obbisity technology besed on present marcket ····· 28

Chapter 3. Research contents and Results ····· 33
Section 1. Development strategy ····· 33
Section 2. Standardization of materials ····· 45
Section 3. Functional and safety evaluation ····· 109
Section 4. Sample preparation for Clinical trial study ····· 129
Section 5. Performance and results of Clinical trial study ····· 145
Section 6. Application of results ····· 188

Chapter 4. Achievement and Contribution ····· 201
Section 1. Achievement· of research goal ····· 201
Section 2. Contribution for related area ····· 202

Chapter 5. Scheme for Application of the Results ····· 204
Section 1. Technical outcomes ····· 204
Section 2. Plan for application results ····· 208
Section 3. Expectations ····· 208

Chapter 6. Information of Scientific Technology from Abroad ····· 214
Section 1. Anti-obesity materials based on anti-angiogenesis ····· 214
Section 2. Anti-obesity effects of greentea saponin ····· 214
Section 3. Research for greentea resources ····· 214
Section 4. Current trends of obesity ····· 226
Section 5. Improvement of anti-inflammatory of NK cell ····· 227
Section 6. Change of paradigm for obesity ····· 229
Section 7. Obesity associated industry ····· 230
Section 8. Theory for dietary ····· 232
Section 9. New concept medical devices for obesity ····· 234

Chapter 7. States of research installation& equipment ····· 235

Chapter 8. Performance result of safety management for lab. ····· 236

Chapter 9. References ····· 242

<Supplements> ····· 263
Certification of individual approved functional material ····· 263
Evidential documents ····· 364

편집순서 6

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 16
제 1 절 연구개발과제의 개요 16
1. 최종목표 16
2. 개발 배경 및 필요성 16
가. 경제·산업적 중요성 16
나. 연구개발 기술의 중요성 17
다. 기술개발사업의 타당성 20
3. 연구수행 방법 22
가. 추진체계 22
나. 추진일정 22
4. 연구내용 및 범위 23
가. 1차 년도 23
나. 2차 년도 24
다. 3차 년도 24
제 2 절 연구개발과제의 성과 목표 25
1. 정량/정성적 목표 25
2. 파급적 성과목표 26

제 2 장 국내외 기술 개발 현황 27
제 1 절 지식재산권을 바탕으로 한 비만 관련 기술 27
1. 국가별 분석 27
제 2 절 시장 현황을 바탕으로 한 비만 관련 기술 28
1. 국내 시장 현황 28
가. 시장 흐름 현황 28
나. 제품생산 현황 29
2. 국외시장현황 29
가. 시장 흐름 현황 29
나. 제품생산 현황 30
3. 제품 및 시장현황 분석 결과 31

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 33
제 1 절 개발전략 33
1. 개 요 33
가. 개별인정형 건강기능성소재의 이해 33
2. 녹차씨 관련 자료/정보 수집 34
가. 개요 34
나. 자료/정보 수집 방법 34
다. 자료 수집 결과 35

3. 녹차씨 관련 자료 분석 및 가능성 검토 41
가. 안전성 자료의 분석 41
나. 기능성 자료의 분석 42
4. 녹차씨를 활용한 체지방 개선 개별인정형 기능성 소재 개발 전략 수립 43
가. 전략 개요 43
나. 단계별/ 항목별 추진전략 43
다. 최종 기능성 자료 확보 시놉시스 44
제 2 절 원료의 표준화 45
1. 원료의 전처리 45
가. 녹차씨의 기원에 관한 정보 45
나. 녹차씨의 수확방법 45
다. 원료 보관 방법 45
라. 원료 전처리 방법 46
마. 원재료의 잔류농약 분석 46
2. 원재료 및 제조공정 표준화 53
가. 녹차씨 압착박의 에탄올 농도별 추출 및 수율 53
나. 각 추출물의 플라보노이드 및 카테킨 함량 분석 54
다. 추출물에 대한 기능성 효능 평가 56
라. 녹차씨 압착박에 대한 최종 추출 공정의 확립 60
마. 녹차씨 압착박 중의 내피 함량에 따른 수율 및 기능성 효능평가 61
3. 지표성분 설정 및 시험법 검증 63
가. 녹차씨 압착박에 함유된 성분에 대한 검색 63
나. 카테킨 함량 분석 63
다. Kaempferol 및 Naringenin 분석 66
라 나린제닌에 대한 시험법 검증 73
4. 녹차씨앗 유효 성분분석 86
가. TLC에 의한 녹차씨앗 성분분석 86
나. HPLC에 의한 유효 성분 분석 87
다. 유효 효능 성분의 구조 결정 90
5. 유통기한 설정 99
가. 원료 및 성분에 대한 검토 99
나. 지표별 실험방법 99
다. 실험 시 저장조건 101
라. 가속실험 결과 101
마. 유통기한 설정 108
제 3 절 기능성 및 안전성 평가 109
1. 녹차씨앗 추출물의 항비만 기전 109
가. 세포독성 시험 109
나. 신생혈관형성억제 109
다. 신생혈관형성억제 기전 110
2. 항비만작용 규명 112
가. Adipocyte에 의한 항비만효과 112

나. 세포배양 ····· 112
다. Oil-red staining ····· 113
3. 동물실험 ····· 114
가. *in vivo* 체중 감소 동물실험 ····· 114
나. 체중 감소의 signal pathway 규명 ····· 115
다. signal pathway 작용 기전 분석 ····· 121
4. 녹차씨 압착박과 녹차 추출물의 체지방 감소 관련 기능성 평가 122
가. 녹차씨 압착박과 녹차 추출물의 제조 ····· 122
나. 추출물 중의 성분 비교 ····· 123
다. 추출물 간의 체지방 감소 관련 효능 평가 ····· 126
제 4 절 인체시험용 시료 제작 ····· 129
1. 대량생산 및 지표성분 함량 분석 ····· 129
가. 추출분말중의 지표성분 분석법 ····· 129
나. 1차 대량생산 ····· 130
다. 2차 대량생산 ····· 130
2. 녹차씨 추출물 유해물질에 대한 분석 ····· 131
3. 인체시험용 위약 및 주약의 제조 ····· 139
가. 녹차씨 추출물에 적합한 제형 대한 연구 ····· 140
제 5 절 인체시험 수행 및 결과 ····· 145
1. 인체적용시험을 통한 녹차씨박추출물의 체지방개선 유효성/안전성 평가 ····· 145
가. 개 요 ····· 145
나. 녹차씨박 열수추출물의 인체적용 시험을 위한 준비 작업 ····· 145
다. 녹차씨박 열수추출물의 유효성/안전성 평가 인체적용시험 수행 ····· 164
라. 녹차씨박 열수추출물의 임상결과 분석(첨부10, 임상결과보고서) ····· 171
2. 진행 컨설팅 ····· 182
가. 식약처 모둠토의 ····· 182
나. 방문토의 및 식약처 질의 응답 ····· 183
다. 과제 진행 회의 ····· 186
제 6 절 결과의 활용 ····· 188
1. 개별인정신청 ····· 188
가. 녹차씨박 열수추출물의 개별인정 신청 ····· 188
나. 신청서류 문서화 작업 ····· 197
다. 개별인정 신청 ····· 199
라. 수정/보완 작업 ····· 200

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 201
제 1절 연구개발목표의 달성도 ····· 201
1. 목표의 달성도 ····· 201
제 2 절 관련분야 기여도 ····· 202
1. 기술적 측면 ····· 202
2. 경제적 측면 ····· 202
3. 정책적 특성 ····· 203
4. 지역에 대한 기여도 ····· 203

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· **204**
제 1 절 기술적 성과 ····· 204
1. 지적재산권 ····· 204
2. 논문 ····· 205
3. 학술회의 ····· 206
제 2 절 성과활용 계획 ····· 208
1. 지적재산권에 성과 활용 ····· 208
2. 홍보마케팅의 활용 ····· 208
3. 상품개발에 대한 활용 ····· 208
제 3 절 기대효과 ····· 208
1. 매출 ····· 208
2. 홍보마케팅 ····· 209
3. 상품개발 ····· 209
4. 추가연구 및 타 연구에 대한 활용 계획 ····· 210
가. 신생혈관형성억제제 ····· 210
나. 항암 분야 ····· 210
다. 항균 분야 ····· 211
라. 고지혈증 분야 ····· 212
마. 항산화 분야 ····· 213

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· **214**
제 1 절 신생혈관형성억제제를 이용한 비만억제 및 항암제 ····· 214
1. 비만과 지방조직의 혈관신생 ····· 214
제 2 절 차 사포닌의 항비만효과 ····· 214
제 3 절 녹차를 소재로 한 연구 ····· 214
제 4 절 비만 관련 연구 경향 ····· 226
제 5 절 다이어트 요소를 통한 NK 세포의 항-종양 기능 향상 ····· 227
제 6 절 비만관련 패러다임의 변화 ····· 229
제 7 절 비만 관련 산업 ····· 230
1. 다이어트 시장 현황 ····· 230
가. 다이어트의 정의 ····· 230
나. 국,내외 시장현황 ····· 231
제 8 절 다이어트 관련 이론 ····· 232
1. 단식 ····· 232
2. 고단백질 저탄수화물 다이어트 ····· 233
3. 저탄수화물 다이어트 ····· 233
4. 고탄수화물 저지방 다이어트 ····· 234
제 9 절 새로운 컨셉의 비만관련 의료기기 ····· 234

제 7 장 연구시설·장비 현황 ····· **235**

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 ····· 236
제 1 절 주관기관 ····· 236
1. 연구실 정기 안전점검, 정밀안전진단 ····· 237
2. 연구실 공기질 측정 ····· 237
3. 연구실 안전교육 ····· 237
4. 연구활동종사자 건강검진 ····· 238
5. 연구활동종사자 안전공제 ····· 238
제 2 절 협동기관 ····· 240

[별첨 1] 연구개발보고서 초록 ····· 248
[별첨 2] 자체평가 의견서 ····· 249
[별첨 3] 연구성과 활용계획서 ····· 253
[별첨 4]연 구 성 과 ····· 255

<첨부> ····· 263
개별인정신청서 ····· 263
특허, 논문 및 학술발표 증빙서 ····· 364

제 1 장　연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발과제의 개요

1. 최종목표

가. 녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발

나. 야생녹차씨박 열수추출물에 대한 원료표준화, 기준규격 설정, 항비만 전임상 동물실험 및 인체적용시험을 통해 체지방개선 기능성 원료 개별인정에 대한 과학적 근거 자료를 확보하여 개별인정 심의를 신청

2. 개발 배경 및 필요성

가. 경제·산업적 중요성

(1) 비만은 '건강을 해칠 정도로 체내 지방이 과도하게 축적된 상태'로 정의할 수 있고, 과거 비만을 풍요로움의 상징으로 여긴 적도 있으나 비만[1)]이 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환, 제2형 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 퇴행성관절염, 일부 암질환 등 다양한 만성퇴행성 질환들의 원인으로 작용하여 사망률과 이환율을 증가시킬 뿐 아니라 사회적, 정신적으로도 장애를 일으키는 원인인 것이 밝혀지면서 반드시 치료되어져야 하는 '만성질환'이라는 인식이 확립되고 있음.

(2) 세계보건기구(WHO)에 따르면, 현재 전 세계적으로 과체중 혹은 비만에 해당되는 사람들의 숫자는 19억 명에 이르며 또한 미국의 경우 매년 약 30만 명이 비만과 관련된 질환으로 사망한다고 보고되고 있음.

(3) 비만이[2)] 여러 가지 질병에 미치는 영향은 매우 심각하여 전 세계 당뇨병 환자의 80%, 심장 질환의 21%가 비만이 원인인 것으로 알려져 있다. 이외에도 자궁암, 신장암, 유방암 등 각종 암도 비만과 직간접적으로 연관되어 있으며 비만이나 과체중의 경우 수면무호흡증, 골관절염, 담석증 등의 발병률도 정상인보다 높음.

(4) 사회, 경제적인 측면에서도 비만으로 인한 손실은 매우 큰데, 미국의 경우 비만으로 인해 매년 약 1170억 달러의 직간접 경비가 지출되고 있고, 최근 들어 우리나라에서도 비만인구는 32.4%(체질량지수 25% 이상)로 지난 10여 년 동안 1.6배 증가(여자 1.3배, 남자 2배 증가) 하였다. 특히, 소아비만은 우리나라 성인인구의 비만 비율을 좌우하게 되는데 최근 3년 사이에 초등학생 비만 비율은 2배 정도 증가해, 선진국에서 문제가 되었던 '비만 문제'가 우리나라에서도 심각하게 대두되기 시작하였음(보건복지부,2005).

(5) WHO는 2015년이면 전 세계 인구 중 39%가 비만(체질량 지수 30 이상)에 속할 것으로 예측하고 있으며, 또 향후 10년 동안 비만 인구가 지금보다 50% 증가할 것으로 내다보고 있음.

(6) 비만은 개인 차원이 아니라 사회 차원의 문제이며, 세계 비만 인구가 10억명에 달하

면서 심장질환이 사망률 1위 질환으로 떠올랐고, 관련 의료비 지출이 급증하는 추세이며, 재정부는 "비만인은 정상 몸무게인 사람에 비해 의료비가 36% 이상 추가로 지출된다"며 "비만은 국가 재정부담을 늘리고 생산성을 저하하는 요인"이라고 밝힌 바도 있음.

(7) 이에 따라 각국 정부가 비만을 유발하는 음식에 세금을 부과하는 사례가 늘고 있다. 헝가리는 소금, 설탕, 지방 함량이 높은 가공식품에 개당 약 55원의 부가가치세를 부과하는 일명 햄버거법을 도입했다. 덴마크도 포화지방 2.3% 이상인 식품에 대해 지방 kg당 약 3400원을 물리기 시작했다. 프랑스는 330㎖짜리 청량음료 한 캔당 0.02유로의 세금을 부과하고 있음.

(8) 우리나라도 세계적 추세대로 남성 비만이 급증하고 있다. 1998년 전체 중 26.2%(체질량 지수 25 이상 기준)였던 여성 비만은 24.8%로 감소한 반면 남성 비만은 같은 기간 25.1%에서 36.3%로 급증했음 (Fig. 1).

(9) 비만은 외모의 문제가 아니며, 비만과 연관된 신체질환이나 정신적 문제로, 성장하는 소아청소년의 건강을 위협하는 원인이며, 특히 소아와 청소년비만은 성인비만으로 이행할 가능성이 많고, 대사증후군, 심혈관 질환, 위장질환, 폐질환, 골관절 질환, 인슐린저항성 등의 합병증으로 성인기 건강에도 영향을 미침.

(10) 우리나라 소아청소년에서 대사증후군의 유병율은 전반적으로 6.1-10.4%까지 다양하게 보고되고 있음.

(11) 현재까지의 비만 치료제는 식욕을 억제시키는 제제(fenfluramine, sibutramine)와 지방의 대사를 촉진시키거나 lipogenesis를 억제하거나 대사활성을 증가시키는 제제(ephedrine, orlistat)로 크게 나눌 수 있음.

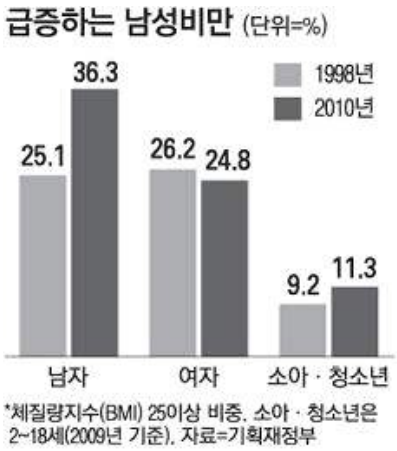


Fig. 1. Recent domestic obesity trend.

(12) 그러나 이런 약물들은 그 부작용 또한 많고 습관성의 문제도 대두되고 있음. 따라서 비만을 해결하기 위해 신생혈관형성 저해 작용[3)]을 하는 천연물질로부터 항비만을 해결하기 위한 방법이 필요함.

나. 연구개발 기술의 중요성

(1) 2011년 인정된 기능성 원료 총 24건 중 중 국내 개발 원료는 12건으로 국내 개발비중이 꾸준히 증가하는 추세임.

(2) 특히 2011년 인정된 기능성원료를 사용하여 제품화된 건강기능식품 중에서 체지방 감소 관련 기능성이 51품목으로 다른 기능성 관련 제품들보다 체지방 감소와 관련하여 많은 제품들이 개발되어지고 있는 실정이다(출처: 건강기능식품의 기능성 원료 현황. 식품의약품안전청 발행 2012. 2.).

(3) 혈관계의 발생은 크게 나누어 두 가지로 분류되며, 처음에는 내피세포로 분화하는 혈관모세포(angioblast)가 세포집단을 형성한 후, 관강 같은 구조물을 형성하는 과정(vasculogenesis)과 그리고 이렇게 해서 형성된 기존의 혈관총에서 **새로운 혈관이 생성되는 일련의 과정을 신생혈관이라 하며**(Fig. 2), 태아의 발생과 여성의 월경 및 상처치유과정 등의 정상적인 상황뿐 만 아니라 **암세포의 성장과 전이, 비만, 류머티즘 관절염 및 당뇨성 실명증 등의 여러 질병**[4]에서도 필수적으로 요구되는 것으로 알려져 있음.

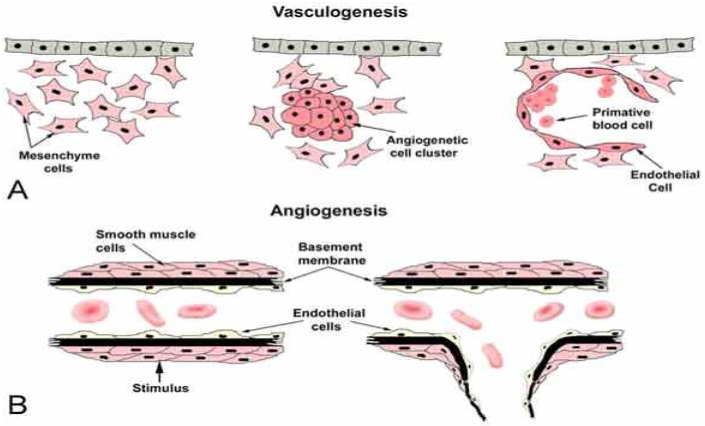


Fig. 2. Vasculogenesis and angiogenesis.

(4) 이러한 신생혈관 촉진인자는 현재까지 20가지 이상이 알려졌으며, 그중 **혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포 및 비만세포에서 분비되며, 동시에 가장 강력한 혈관형성 촉진인자**로 알려져 있음(Fig. 3).

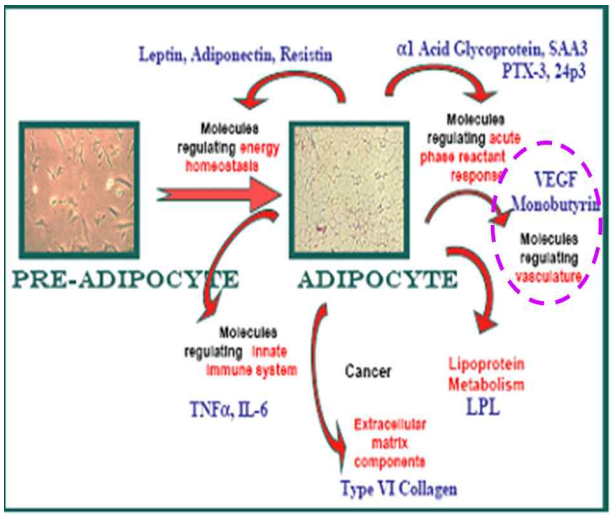


Fig. 3. Schematic overview of the altered secretory profile associated with terminal fat cell differentiation

(5) 신생혈관[5]의 형성을 억제할 수 있는 방법은, **1) endotherial cell에 지접적으로 작용하여 형성을 억제하는 것이며, 2) 신생혈관의 형성 시키는 VEGF등의 신호의 전달을**

blocking 하는 방법, 그리고, 3) extracellular matrix의 파괴를 막는 방법으로 볼 수 음.(Fig. 4).

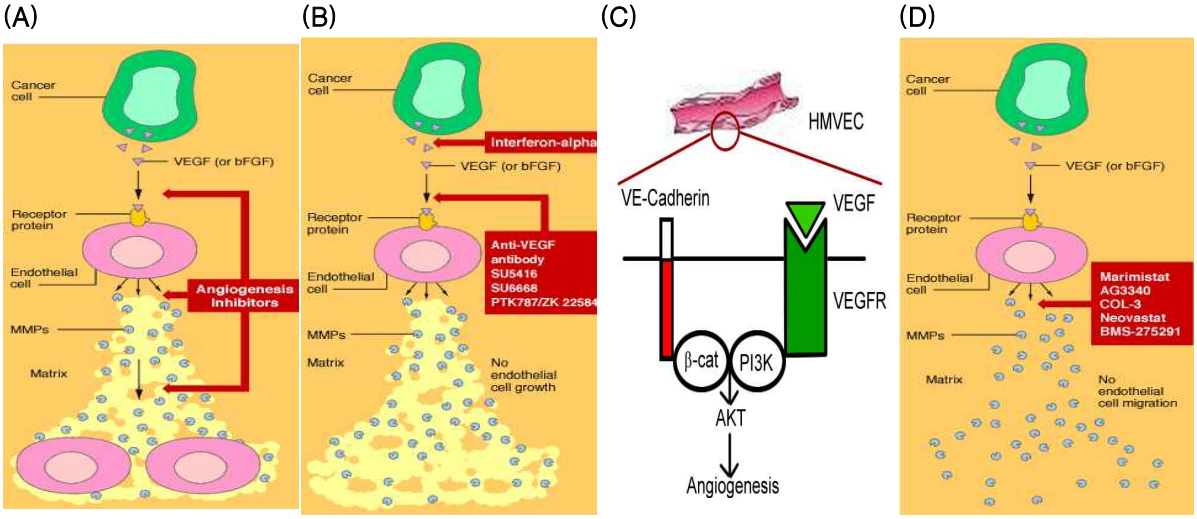
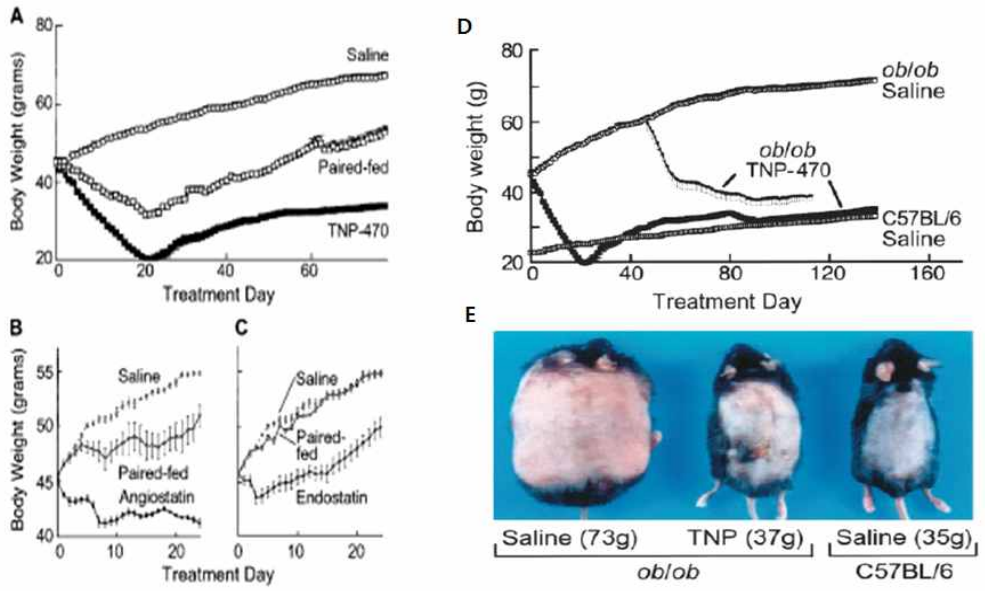


Fig. 4. Mode for anti-angiogenic process., angiogenesis inhibitor(A), inhibition of endotherial cell growth(B), signal cascade of molecule(C), and inhibition of endotherial cell migration(D).

(6)본 연구에서는 VEGF, VE-Cadherin, β-Catenin, PI3Kinase등의 신호전달 분자의 신호전달억제와 혈관내피세포의 형성과 종양전이 및 비만세포 증식에 중요한 역할을 하는 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1; CD54)과 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1; CD106), E-selectin등의 세포부착인자들의 발현을 억제하여 체내 조직이 비대해 지는 것을 막고자하며, 녹차씨앗 추출물로부터 이러한 신생혈관 형성 억제 물질을 찾아 비만세포에 작용할 수 있는 천연산물 항비만제를 찾고자 함.

(7) Harvard 대학의 Folkman등은 신생혈관형성억제물질인 TNP-40, angiostatin, endostatin, Bay-129566, 그리고 thalidomide등을 투여 했을 때 체중과 지방조직이 현저히 감소하는 것을 파악하였음. 이런 체중의 감소는 아마도 결핍된 body mass의 감소라기보다는 지방거대조직의 감소에 기인되는 것으로 판단하였음(Fig. 5).



M. Judah Folkman 10730–10735 | PNAS | August 6, 2002 | vol. 99 | no. 16

Fig. 5. Appetite of *ob/ob* mice treated with angiogenesis inhibitors.

(8) anti-angiogenic 물질 등은 내피세포의 증식을 억제하였고, apoptosis도 역시 증가시켰으며, 이런 효과들은 adipocyte의 존재하에서는 내피세포의 apoptosis를 경유하여 몸무게를 줄이는 leptin의 효과와 매우 유사하였음.

(9) Folkman의 그룹은 체중이 감소되는 과정중에 기초대사율을 산소의 소모량으로부터 구하였는데 anti-angiogenesis 물질이 기초대사량을 증가 시키고, 에너지 기질이 carbohydrate에서 fatty acid로 이동되는 것을 알았고, 보통성체 조직의 adipose tissue는 anti-angiogenesis 물질에 의하여 조절이 가능함을 제시하였음.

(10) 신생혈관의 형성을 억제 함으로써 어떠한 조직에 새로운 혈관의 형성을 억제 함으로써 조직이 비대해 지는 것을 막을 수 있다는 추론이 가능하고 이러한 신생혈관 형성을 억제하는 물질을 녹차씨앗 추출물로부터 찾아 항비만제로 이용하고자 함.

(11) 녹차씨앗 추출물로부터 시험관시험 및 동물시험을 통해 체중조절 관련 작용 기전을 규명하고 규명된 작용기전을 토대로 인체적용시험을 실시하여, 이를 토대로 건강기능식품 개별인정 획득을 위한 기초 자료를

다. 기술개발사업의 타당성

(1) 기능성식품 산업은 고부가가치 미래 핵심 산업의 하나로 2004년 건강기능식품법의 본격적인 시행 이후 국내 건강기능식품 시장은 크게 확대되어 2011년 식품의약품안전청에서 인정하고 있는 기능성 원료 인정 현황은 총 388건으로 이중 국내산 원료를 이용하여 기능성 원료인정 건수는 전체의 원료 인정건수의 약 27%정도를 차지하고 있음(2012년 식약청 건강기능식품의 기능성 원료인정 현황 자료 참고).

(2) 2011년 국내 건강기능식품의 기능성 내용을 보면 피로개선, 체지방 감소, 혈당 조절의

순으로 인정 건수가 많아 국내의 건강기능식품 기능성 연구의 대부분이 체지방 감소 관련 기술개발이 많이 진행되어지고 있는 실정임.

(3) 녹차씨앗[6]은 현재 식품원재료 검색을 실시해 보면 사용가능한 원료로 등록되어 있어 전통적인 방법으로 제조 가공하면 부가적인 독성시험 자료는 요구되지 않을 것으로 생각되어짐.

원재료명(영문명)	차나무
이명	녹차나무(Green Tea), 다목, Tea, 다엽
학명	*Camellia sinensis* L. *Thea sinensis* L.(이명)
생약명	다실(茶實)-열매, 산차아목(山茶亞木), 산차과(山茶科), 차속(茶屬)
기원	
식용가능여부	가능
공전등재여부	사용가능원료
용도(이용부위)	식용(잎, 꽃, 줄기, 씨앗), 약용
동*식물 분류	식물

(4) 녹차씨앗의 경우 다량의 페놀성 화합물[7] 등이 포함되어져 있는 것으로 보고되어져 있으나 현재는 대부분이 압착하여 식용유의 형태로 활용되고 있을 뿐 압착 후 남은 박은 폐기되어지고 있는 실정임.

(5) 녹차씨앗 추출물[8]을 대상으로 건강기능식품 산업화를 위하여 표준화 기술을 개발하고, 체지방 감소 관련 기능성을 뒷받침 할 수 있는 과학적인 근거자료 마련을 최종 목표로 함.

(6) 본 연구에서는 전남(보성, 순천)지역에서 많이 재배되어지고 있으나 활용이 잘 안되어지고 있는 녹차씨앗으로부터 추출물을 얻을 수 있는 조건을 확립하고 이 추출물의 동물 및 인체시험을 통한 체중조절 관련 기능성 효능을 확인하여 건강기능식품 개별인정을 받기 위한 기초적인 데이터를 확보하고 고부가 가치를 창출하고자 함.

(7) 전남지역의 대표 농산자원 중의 하나인 녹차를 이용한 체지방 감소 관련 건강기능식품을 개발하고자 함.

(8) 녹차추출물은 태평양화학등 7곳에서 사용하고 있으나 녹차씨앗 추출물은 개별인정을 받아 특정목적으로 사용되는 예가 없고, 녹차 잎 및 녹차씨앗의 구성성분 및 성분비의 차이가 있으므로 녹차씨앗을 이용하여 상품을 개발하고자 함.

(9) 녹차씨앗의 생산량은 건잎의 생산량 1,731톤의 기준으로 볼 때 녹차잎의 수확후에 열매가 형성되므로 건잎의 량보다는 많을 것으로 추정되며 2,000톤 정도로 추정 할 수 잇으

나 이를 응용하는 비율은 극히 낮을 것으로 보아 이룽 이용한 제푼의 개발은 필수적이라 볼 수 있음.

(10) 인체적용 시험을 통한 녹차씨앗 추출물의 체지방개선 대한 유효성/안전성 평가 및 원료 개별인정 신청

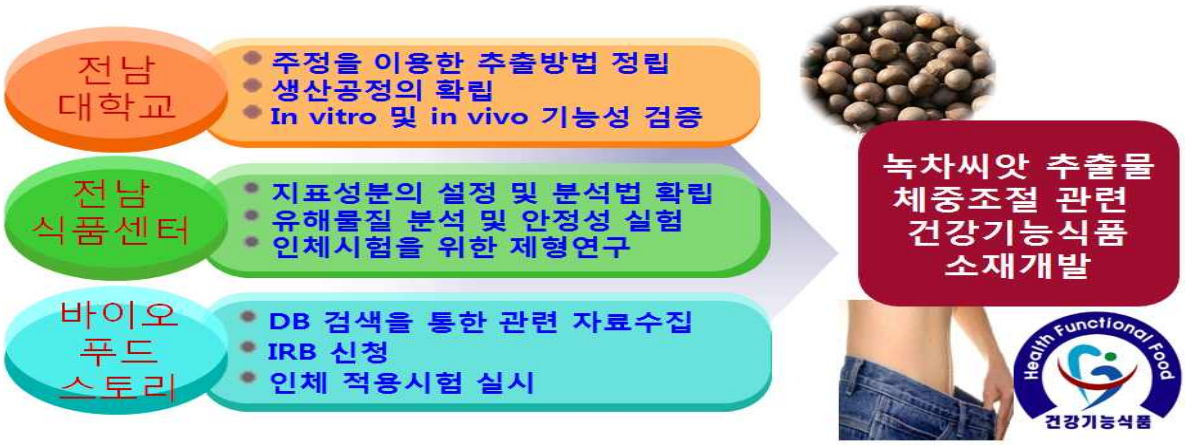
(11) 녹차씨앗 추출물의 안전성 기능성 자료 수집 분석 및 개별인정을 위한 전략 수립

(12) 녹차씨앗 추출물의 체지방 조절 효과에 대한 안전성 /유효성 평가 인체적용시험 실시

(13) 개별인정을 위한 임상자료 확보 및 문서화 작업

3. 연구수행 방법

가. 추진체계



나. 추진일정

4. 연구내용 및 범위

가. 1차 년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2012년	■ 녹차씨앗 추출물의 개별인정을 위한 자료분석 및 전략 수립	- DB 검색을 통해 현재까지 확보된 국내외 안정성 및 기능성 관련 자료 수집 - 수집된 자료의 체계적인 분석 및 현좌표 설정 - 국내·외 인정·허가 현황을 확인 함 - 국내·외 사용현황을 확인 함 - 개별인정을 위한 자료 확보 전략수립
		■ 녹차씨 추출물중의 지표성분 설정 및 분석법 확립	- 녹차씨앗 추출물에 함유된 성분분석 실시 및 문헌 조사 - 분석된 성분중에서 지표설정이 가능한 화합물을 선정 - 지표성분 분석을 위한 분석법 확립 - 설정된 지표성분에 대한 공인 분석법이 없을 경우 분석법 표준화 실시 - 녹차씨앗 추출조건의 확립
		■ 녹차씨앗 추출물의 항비만 작용에 대한 *in vitro* 시험 실시	- Oil Red O staining으로써 비만세포가 어떻게 감소되는지를 확인함 - 신호전달이 차단되면 NF-kB까지의 신호가 전달되지 않아 신생혈관의 형성은 억제되고 비만세포는 분화가 억제됨을 말함 - 조직세포로부터 RT-PCR을 이용하여 SREBP1, PPARγ 등의 신호전달 물질의 억제정도를 실험함 - 녹차씨앗 성분분석

나. 2차 년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2	2	■ 녹차씨앗 추출물의	- VEGFR2, PI3K, bata-catenin, VE-cadherin분자가 세포 표

차년도	013년	항비만 작용에 대한 *in vitro* 시험 실시	면으로부터 NF-kB까지의 신호전달 체계를 규명함 - SREBP1으로부터 lipogenesis가 억제되는지의 여부를 판단함 - PPAR γ 로부터 비만세포의 분화가 억제 되는지를 판단함
		■ 실험동물을 이용하여 항비만의 *in vivo* 기전을 규명함	- 녹차씨앗의 항비만 기능성 효과를 HUVECs을 사용하여 분석함 - 실험동물에 녹차씨앗 추출물을 투여하여 체중의 감소 여부를 판단함. 이때 positive control로써 orlistart를 사용함
		■ 제형연구	- 녹차씨앗 추출물에 적합한 제형연구 - 인체시험을 위한 위약 및 주약의 제조
		■ 추출물에 대한 유해성분 분석 실시	- 유해성분은 미생물, 납, 카드뮴, 수은, 비소 등 중금속의 함량 및 잔류농약 성분을 분석함
		■ 인체적용시험을 통한 효능검증 기술 개발	- 체중조절 관련 적정 Biomarker 개발 - 임상 Protocol/CRF 개발 - 임상시험 자료집 개발 - 시험제품(주약,위약) 제형 개발에 대한 컨설팅
		■ IRB 심의	- IRB 심의 신청

다. 3차 년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2014년	■ 추출물의 안정성 연구	- 유통기한 설정을 위한 온도 및 시간별 성분 분석 실시
		■ 추출물의 기준규격 설정	- 녹차씨앗 추출물 3 lot에 대한 성분 분석을 통한 기준규격 설정
		■ 인체적용시험 실	- IRB 심의 완료

		시	- 피험자 모집 - 임상시험 수행 및 진행관리(monitering) - 결과 분석 및 보고서 작성 - 식약청 대관 업무
		■ 원료 개별인정 신청을 위한 문서화 작업	- 해당소재에 해당하는 자료 수집 ①기원, 개발경위, 국내외인정 및 사용현황 등에 관한 자료 ② 제조방법 및 그에 관한 자료 ③ 원료 특성에 관한 자료 ④기능성분(지표성분)에 관한 규격 및 시험방법에 관한 자료, ⑤ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료, ⑥ 안전성에 관한 자료: 섭취근거자료, 안전성 정보자료, 섭취량 평가자료 ⑦기능성 내용 및 그에 관한 자료, ⑧ 섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료, ⑨ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 ⑩원료를 사용하여 제조하고자 하는 건강기능식품의 기준 및 규격에 관한 자료 - 해당소재에 해당하는 자료 제출범위에 따른 문서화 작업

제 2 절 연구개발과제의 성과목표

1. 정량/정성적 목표

구분	특허				학술발표				기타 활용 자료		논문				총계		계획대비 달성도 (%)
	목표		실적		목표		실적		목표	실적	목표		실적		목표	실적	
	출원	등록	출원	등록	국내	국제	국내	국제			SCI	비SCI	SCI	비SCI			
1차년도	1			1	4	2	7	2			1	2	3	0	10	13	130
2차년도	1		1	1	4	2	5	4	2	2	2	2	3	1	13	17	130.8
3차년도	1		3	1	4	2	7	0	1	1	2	2	2	1	12	15	125
4차년도																	
5차년도																	
계	3	-	4	3	12	6	19	6	3	3	5	6	8	2	35	45	128.6

2. 파급적 성과목표

가. 원료 수급의 원활화

- 녹차 농가의 녹차 씨앗을 공동 수매

나. 기능성분의 표준화기술

- 건강 기능식품, 천연물신약, 기타 기능성화장품 소재등의 개발

다. *in vivo* 질환모델 동물을 이용한 신속한 효능평가

- 체지방개선(식약처 원료 개별인증)을 위한 건강기능식품을 개발

라. 지역 특화 농산자원 유래 생리활성 물질의 독성시험 연구

- 물질의 안전성에 대한 자료 및 독성시험 연구 기반 기술을 확보

마. 대량공정 최적화 기술을 개발

- 국내·외의 시장에 접근할 수 있는 제품 표준화기술을 확보

바. 6차 산업으로의 활성화

- 관광 시설, 가공시설, 생산시설 현대화, 전문인력 양성 및 산업체 고용창출

사. 녹차 사포닌의 추출 방법 확보

- 기능성식품, 화장품, 팩, 음료등의 다양한 산업으로의 발전

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 지식재산권을 바탕으로 한 비만 관련 기술

1. 국가별 분석

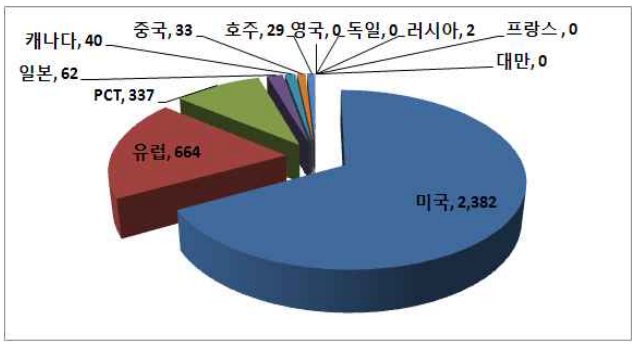
가. 비만에 관한 특허는 3556건 중에 67%가 미국의 특허이고, 19%가 유럽, PCT가 9%, 일본 1.7%, 캐나다 1.1%, 중국 0.9%, 호주 0.8%등의 순서로 나타남.

나. 녹차씨앗을 이용한 비만세포의 억제에 관한 특허는 총 421건으로 검색되고, 미국이 전체의 88%, 유럽이 12%를 차지하고 있고 나머지 나라에서는 검색되지 않음.

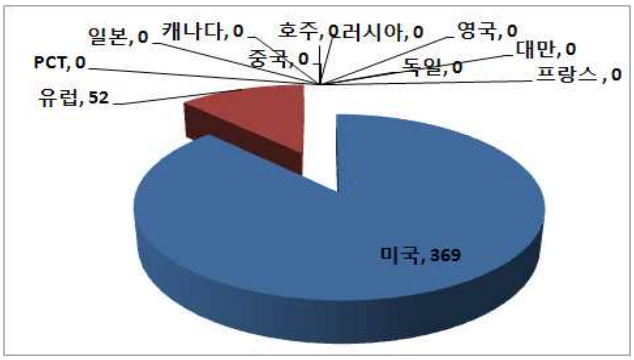
다. 녹차씨앗의 신생혈관형성억제작용에 기반한 항비만 제제는 전세계적으로 14건이 검색되고 있으며, 비만에 관한 관심으로 특허의 수는 많으나 녹차씨앗을 이용한 항비만 제제는 그 숫자가 별로 되지 않으며, 특히 녹차씨앗의 신생혈관형성억제 작용에 따른 항비만 제제의 특허는 거의 찾을 수가 없음.

라. 따라서 녹차씨앗 추출물로부터 항비만 제제의 개발은 거의 획기적일 수 밖에 없으며 지금이 상품화를 할 수 있는 최고의 적기라고 판단 됨

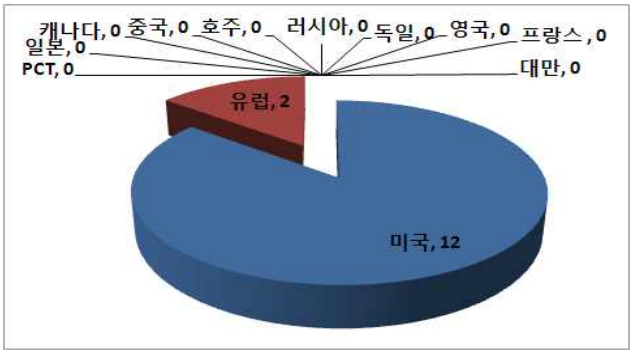
마. 세계 주요국의 특허를 keyword에 따라 분류해보면 유럽과 미국이 거의 대부분을 차지하는 것을 볼 수 있음.



obesity(3556)



green tea/seed/adipocyte/inhibition (421)



greentea*seed*antiangiogenesis*inhibitor*obesity

Fig. 6. Analysis of world patents with keywords on obesity.

바. 녹차를 이용한 항비만제제에 관한 논문은 560편 전후로 나타나고 있으며, 실제로 Exolise라는 비만제제가 시중에 나와 있기도 함.

사. 그러나 이 제제는 신생혈관형성억제에 기반을 둔 항비만제제는 아니며, 특히 녹차씨앗은 녹차잎에 비교하여 구성성분이나 그 농도의 차이가 많이 남.

아. 실제로 이 녹차씨앗에 대한 연구는 거의 보이지 않으며, 더구나 이를 이용한 신생혈관 형성억제에 기반을 두고 부작용이 적은 항비만 제제에 관한 논문은 찾아보기 어려움.

제 2 절 시장 현황을 바탕으로 한 비만 관련 기술

1. 국내 제품생산 현황

가. 시장 흐름 현황

(1) 국내에서는 원료를 수입하여 타정이나 기타 제제를 만들어 내기 때문에 국내에서 생산되는 항비만제제는 없다고 보는 것이 옳음.

(2) 원료의 대체나 수입 대체품의 제조를 위해서도 국내에서의 원료 개발은 이루어져야 한다고 생각함.

(3) 다음의 표에서 우리나라의 제약회사에서 생산되어 판매되고 있는 항비만제제를 볼 수 있음.

표 1. 국내 유통되는 식욕억제제 및 항비만치료제

제품명	성분	판매회사	구분	비고
제니칼 캅셀	orlistat	한국로슈	전문	
리덕틸 캅셀	sibutramine	일성신약	전문	
엑소리제 캅셀	green tea	구주제약	일반	
그린폰 캅셀	green tea, orthosiphonis	청계파마	일반	
나르민 캅셀	green tea, orthosiphonis ext.etc	초당약품	일반	
다이엔 캅셀	green tea, orthosiphonis ext.etc	대한뉴팜	일반	
디바 캅셀	green tea, orthosiphonis ext.etc	서울제약	일반	
로즈카나 캅셀	green tea, orthosiphonis	아주약품	일반	
로즈카 씨 캅셀	phenylpropanolamine	아주약품	전문	생산-수입중단
마론트 캅셀	norpseudoephedrine	신일제약	전문	
푸링가올 캅셀	ascoebic acid, phenylpropanolamine	에이치팜	전문	생산-수입중단
펜포렉스 캅셀	norpseudoephedrine	영일약품	미확인	생산-수입중단
푸링 정	phendimetrazine tartrate	에이치팜	전문	
프리셀 캅셀	calcium gluconate	영일약품	일반	

(4) Orlistat, Sibutramine, 그리오 엑소리제 등인데 모두 <u>외국에서 생산되는 것</u>임을 알 수 있고, 엑소리제, 그린폰, 나르민, 다이엔, 디바, 로즈카나등은 <u>녹차성분을 주로하고 있으나 원료는 프랑스의 아코파마사로부터 반제품을 수입</u>하여 완제품으로 만들어 판매하고 있는 실정임.

(5) 따라서 국내 천연산물을 이용하여 특히 새로운 생물학적 지표로써 <u>신생혈관 억제 작용과 장내</u>

세균 조절에 의한 천연산물로써 부작용이 적은 항비만제의 개발은 경제성 및 경쟁성에 있어 아주 유용한 점이 있는 것으로 판단됨.

나. 제품 생산 현황

(1) 국내의 비만치료제 시장은 성장기에도입된 것으로 판단되며, 세계 비만치료제 성장을 고려하여 2001년부터 2003까지의 자료를 근거로 연도별 시장규모를 로지시틱 모형으로 예측하면 2013년까지의 결과는 다음의 표로 나타낼 수 있음.

표 2. 연도별 국내 비만치료제의 수요 예측(억원)

연도별	수요	증가율(%)	연도별	수요	증가율(%)
2003년	356	-11.31	2008년	923	19.60
2004년	393	10.63	2009년	1,037	12.29
2005년	469	19.22	2010년	1,113	7.30
2006년	583	24.19	2011년	1,151	3.40
2007년	772	32.46	2012년	1,188	3.29

2010년까지는 10-20%씩 증가하여 2010년에는 1,113억원으로 될 것으로 예측하였음.

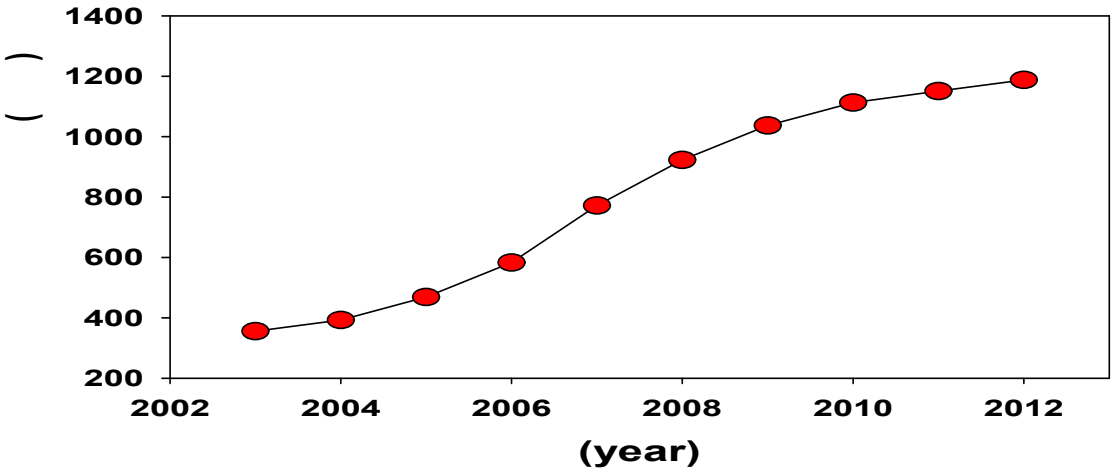


그림 7. 연도별 국내 비만치료제의 수요 예측(억원)

(2) 따라서, 우리나라의 원료로 개발하여 판매할 경우 incentive의 지출의 필요없이 고수익을 올릴 수 있을 것으로 판단됨.

2. 국외 시장 현황

가. 시장 흐름 현황

(1) 미국 식품의약국(FDA)에서 판매를 인가한 대표적인 비만 치료제는 독일 놀(Knoll)사가 개발한

Sibutramine과 Roche 사가 개발한 Orlistat 임.

(2) Sibutramine은-serotonin 재흡수 억제 기전을 가지고 있는 식욕 억제 효과를 가지는 제제로써 Meridia(미국)의 이름으로 시판 되었음.

(3) Orlistat은 지방을 분해하는 췌장 lipase(pancreatic lipase)의 작용을 억제하여 지방흡수를 억제하는 제제이며 Xenical의 상품명으로 시판되고 있으며 이 두가지의 제제가 항비만제제의 대표적 제품임.

(4) 물론 항비만제제는 **식용억제제, 음식물 흡수 억제제, 에너지 대사 촉진제, 호르몬 조절제, 펩타이드 제제(NPY,Nuropeptide-Y), 천연 물질 등**으로 나눌수 있음.

(5) 천연물질 제제를 제외한 나머지의 합성제제들은 부작용이 많은 단점을 가지고 있으며, 널리 쓰이고 있는 Sibutramine은 두통,입마름, 변비,식욕감퇴, 불면,비염등의 부작용이, Orlistat은 복부팽만, 지방변, 배변증가, 절박변, 지용성 비타민의 결핍등의 부작용을 가지고 있음.

(6) 뉴로젠사, 화이저, 시넵틱제약사 등은 식욕자극제인 NPY의 활동을 억제 시키는 뉴로펩티드 Y억제제를 개발하였고(기술뉴스브리프) 어고 사이언사는 신경전달 물질 유사물질인 브로모크립틴으로 지방의 생산량을 줄이는 제제를, 암젠사는 leptin을, 아스트라아커스사와 글락소 웰컴사는 CCK(콜레사이스토키닌)를 촉진하여 식욕감퇴제제를 목표로 개발하고 있음.

(7) 이들 제제의 대부분은 합성제제이거나 펩타이드, 호르몬제제이어서 생체에 투여시 부작용이 우려됨.

(8) 따라서 **자연에 존재하는 천연산물을 원료**로하여 개발 할 필요가 있음.

표 3. 국외 유통 항비만제제의 연구 정도, 판매 제품 및 부작용

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황	부작용
하바드 대학	신생혈관 억제작용을 이용한 항비만 연구(2002, Proc Natl Acad Sci)	개발과정	
워싱턴 대학	장내세균의 비만과 관련 연구 (2005, Science)	연구과정	
Roche 사 (Orlistat)	lipase 활성억제제 (지방흡수 억제제제)	상품화 (Xenical)	복부팽만, 지방변, 배변증가, 절박변
Knoll 사 (Sibutramine)	식욕억제제	상품화 Meridia Reductil	두통,입마름, 변비,식욕감퇴, 불면,비염

나. 제품 생산 현황

(1) 미국의 많은 제약 기업들이 차세대 비만치료용 제제를 개발하기 위하여 치열한 경쟁

을 펼치고 있으며, 실제로 100여종에 달하는 각종 체중감소제들이 제품화를 기다리고 있으며, 또한 칼로리를 연소시키는 약물에서부터 식욕을 조절하는 뇌내 케미컬 작용하는 약물, 포만감을 촉진하는 약물에 이르기까지 다양한 기전의 체중감소제제들이 개발되고 있음.

(2) 1996년 WHO가 비만을 질명으로 규정한바 있고, 전세계적으로 약 1억5천만 명이 건강위험요인인 비만을 경험한 바 있어 이에 따르는 수요는 많이 증가 될 것으로 예상됨.

(3) 시장 규모는 2000년도에 16억 달러에 이르고 있고, 이중 제니칼(오를리스타트)과 리덕틸(시부트라민)이 전체 시장의 81.7%인 13억 달러를 차지하고 있으며, 이 외에 펜터민, 마진돌, 펜디메트라진, 세로토닌계 약물, 리파제 저해제 등이 3억 달러 가량 형성하고 있음.

(4) 현재 개발 중인 신약의 대부분은 미국에서 먼저 발매되고(56%), 순차적으로 유럽(39%), 일본(6%)으로 판매될 것으로 예측되며, 당분간은 **제니칼 및 리덕틸이 주로 비만치료제 시장을 주도**할 것으로 보이나, 차츰 이 두가지의 부류에서부터 이 치료제의 **복용으로부터 실패한 환자**들이 다른 제제를 찾아 시장에서 **새로운 개념의 부작용 없는 제제**를 선호할 것으로 판단됨.

표 4. 비만치료제 세계 수요 동향

(단위 : $ millions)

제품	1999	2000	2005	2000-2005 (AAGR%)
Xenical	317	530	900	11.2
Reductil	500	810	1,350	10.8
Others	133	300	1,230	32.6
Total	950	1,640	3,480	16.2

(5) 표에서 예측하다시피 차츰 xenical등의 제제는 다른 제제들에 비교하여 그 증가폭이 적을 것으로 보이며, 또 **다른 특성과 기능성을 갖는 제제들이 시장의 중요 인자**로 등극할 것으로 보임.

3. 제품 및 시장현황 분석 결과

가. 국내 및 국외시장 분석결과 Xenical, Reductil등의 제품이 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 여러 가지의 **다양한 부작용(Xenical의 탈모작용 : 본 실험실 연구 결과)**등으로, 차츰 쇠퇴기에 접어들 것으로 판단되며, 본 연구과제에서는 확실한 Biomaker를 이용하여 그 효과를 소비자가 직접 확인 할 수 있도록 연구를 추진하여 건강식품등의 제품으로 개발하여 소비자들이 쉽게 다가설 수 있도록 할 것임.

나. 특히 항비만제제는 그 치료상 항비만제제에만 의존해서는 그 효과를 볼 수 없고 그 제

제를 투여하지 않으면 원상 회복되는 특성을 가지고 있으므로써 **저가이면서 공급을 원활**하게 할 수 있어야 하고 부작용이 없는 것이라야 함.

다. 지금의 대부분의 항비만제제는 지방대사억제제(Xenical) 및 식용억제제(Reductil)등이 대부분 시장을 장악하고 있어 그 효용성이 낮고, 실제로 눈으로 확인할 수 있는 Biomaker가 부적절함.

라. 신생혈관의 형성을 억제 할 수 있는 물질은 지방세포의 형성을 직접적으로 그 **제어 정도를 확인** 할 수 있기 때문에 쉽게 소비자에게 다가갈 수 있다고 판단함.

마. 신생혈관의 저해효과가 있는 성분은 부작용 없이 암의 치료도 병행할 수 있으므로 소비자들에게 훨씬 큰 기대감을 갖게 할 수 있어 시장개척에 다른 제제들보다 우위를 점할 수 있을 것으로 기대됨

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 개발전략

1. 개요

본 연구의 최종 목적인 '개별인정형 원료인증 획득'을 위해 연구의 시작 단계부터 『건강기능식품에 관한 법률』 제 14조 2항 및 제 15조 2항의 "건강기능식품기능성 원료 및 기준.규격 인정에 관한 규정(식약청 고시 제2013호-217호, 2013.9.11.)" 에 준하여 개발 초기 단계부터 법규에 맞는 추진 전략을 세워 진행함으로써 최종 3차년에 제출서류상의 미비점이 관찰되지 않도록 현 좌표를 분석하고, 보완 및 개발 자료의 범위 및 내용을 정립하여 체계적인 개발전략을 수립함을 의미 함.

가. 개별인정형 건강기능성소재의 이해[9)]

(1) 정의

건강기능식품 공전에 등재되지 않은 원료로, 식품의약품안전처장이 개별적으로 인정한 원료. 이 경우, 원료의 안전성, 기능성, 기준 및 규격 등의 자료를 제출하여 관련 규정에 따른 평가를 통해 기능성 원료로 인정을 받아야 하며, 인정받은 업체만이 동 원료를 제조 또는 판매할 수 있으며, 현재까지 236종의 기능성 원료가 개별인정을 획득하였음.

(2) 개별 인정 절차 및 제출서류

- 제출자료 범위 결정/수집/문서화 작업
  ① 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
  ② 제조방법 및 그에 관한 자료
  ③ 원료 특성에 관한 자료
  ④ 기능성분(지표성분)에 관한 규격 및 시험방법에 관한 자료,
  ⑤ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료,
  ⑥ 안전성에 관한 자료: 섭취근거자료, 안전성 정보자료, 섭취량평가자료 등
  ⑦ 기능성 내용 및 그에 관한 자료,
  ⑧ 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에

<개별인정현 원료 인정 절차, 식약처>

관한 자료,

⑨ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

⑩ 원료를 사용하여 제조하고자 하는 건강기능식품의 기준 및 규격에 관한 자료

⑪ 제출자료 전체의 총괄 요약본

(3) 신청 및 보완자료 제출

- 개별인정 신청(* 소요비용 1,900천원)

① 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서(전자문서로 된 신청서 포함)

② 제출자료 2부 (원본 1부 포함)

③ 제출자료 수록 CD 1개

④ 제품 또는 시제품 및 기능성분(또는 지표성분) 표준품

⑤ 국내 건강기능식품검사기관이 발행한 시험성적서

2. 녹차씨 관련 자료/정보 수집

가. 개요

- 식약처 건강기능식품법 제 15조 <원료의 인정>에 준한 자료수집.

기능성분, 원재료 또는 기타 관련물질에 대하여 알려져 있는 안전성 또는 독성 정보, 국내·외 에서 학술지에 게재된 자료와, 국내·외 정부보고서 또는 국제기구 보고서 그리고 관련 데이터베이스를 이용하여 현재까지 확보된 국내외 기능성/안전성 자료 수집.

나. 자료/정보 수집 방법

(1) 검색 키워드

국내- 녹차, 녹차씨, 녹차씨박, & /or 항비만, 체중감소, 체지방 감소, 기능성, 추출물..등

국외- Green tea, Camellia Sinensis, Thea Sinensis, &/or weight loss, obesity, efficacy..등

(2) 검색 data-base

☞ 검색 Data base

▷ PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)

▷ NAPRALERT (http://www.cas.org/ONLINE/DBSS/napralertss.html:STNEasy)

▷ Agency for Healthcare Research and Quality (http://www.ahrq.gov)

▷ Toxline (http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?TOXLINE)

▷ Toxcenter (http://www.cas.org/ONLINE/DBSS/toxcenterss.html:STNEasy)

▷ US FDA poisonous plant database (http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html)

▷ 한국학술문헌정보센터(KISS) (http://kiss.kstudy.com)

▷ WHO Monographs (http://whqlibdoc.who.int/publications)

▷ Australian Naturopath Network Monographs (http://www.ann.com.au/herbs/Monographs)
▷ Translation of the German Commission (http://www.herbalgram.org)
▷ Expanded German Commission (http://www.herbalgram.org)
▷ American Herbal Pharmacopoeia (http://www.herbal-ahp.org)
▷ American Herbal Products Association(AHPA)'s Botanical Safety Handbook (http://www.ahpa.org)
▷ European Scientific Cooperative on Phytotherapy(ESCOP) Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs (http://www.escop.com)
▷ Natural Medicine Comprehensive Database (http://www.naturaldatabase.com)
▷ Naturalstandard.com (http://www.naturalstandard.com)
▷ Physician's Desk References(PDR) for Herbal Medicines (http://www.pdrhealth.com)
▷ PDR for Nutritional Supplements (http://www.pdrhealth.com)
▷ Practical Guide to Natural Medicines (http://www.aphanet.org)

다. 자료 수집 결과

(1) 국.내외 사용현황에 관한 자료

(가) 국.내외 인정 관련 자료

① 국내

- 녹차 추출물의 카테킨의 경우 체지방감소, TEAVIGO(고순도 녹차 EGCG 90%이상)은 항산화 및 체지방 감소 고시형 기능성원료로, (녹차추출물: 식약처 건강기능식품 기능성원료, 2013, 식품의약품안전청, 제조 시 유의 사항: 카페인 함량이 50,000㎎/㎏ 이하이어야 함), 혈중 콜레스테롤개선으로 개별인정형 원료로 등재되어 있음. 그러나 녹차씨/**녹차씨박 추출물로 인정된 바는 없고 사용 또한 매우 미미함.**

- 유사원료 "녹차추출물" 건강기능식품 기능성원료로 인정[1)]

원재료명	인정번호	기능성 내용	일일 섭취량	비고(참고)
녹차추출물	제2013-15호 ('13.06.25) ((주)아모레퍼시픽)	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	카테킨으로써 0.3~1 g	(생리활성기능 2등급)
녹차추출물	제2008-62호	항산화 작용	카테킨으로써 0.3~1 g	2010년 고시형 전환

녹차추출물 (8건)	제 2010-34,49,61호 제 2011-4,5,8,9,18	체지방 감소	카테킨으로써 0.3~0.5 g	2012년 고시형 전환
녹차추출물/ 테아닌 복합물	제2010-51호 ('10.12.01) ((주)엘지 생활건강)	성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체에서의 확인이 필요함	녹차추출물 /테아닌 복합물로써 1680mg	(생리활성기능 3등급)
TREVIGO (고순도 녹차 EGCG 90%)	제 2008-62 호	항산화 작용	EGCG로써 300-330 mg	2010년, 고시형 전환

② 국외

- 녹차씨추출물은 외국에서는 주로 화장품, 향료의 원료(CTFA)로 사용되고 있으며, 일부 식품, 계면활성제, 또는 살충제의 원료로 사용되고는 있으나, 매우 소량이며, 특별히 제기된 부작용이나 독성은 없음.

- 녹차씨 오일은 화장품의 원료로 사용되며, 녹차의 카테킨만을 고농도로 축출하여 식이 보충제 또는 식품 첨가제로도 사용되고 있음.

- 녹차씨박 추출물을 이용한 제품은 전무.

(나) 국.내외 사용현황 관련 자료

①국내

- 국내에서 차나무는 대부분 녹차 가공품 또는 녹차추출물 형태로 이용되고 있음.

- 녹차씨는 기름을 짜서 식용유의 형태로 판매되고 있으나 유통량을 파악하기 힘들 정도로 가공・판매처가 적음

- 최근 녹차씨유는 화장품의 원료(아모레퍼시픽)로 주로 이용되고 있음.

② 국외

- 국외에서는 녹차씨 오일을 첨가한 드레싱이 판매되고 있으며, 화장품의 원료로 이용되고 있으나 그 사용예가 적음.

제품사진	제품명	제조사	구분	제조(판매)국	성분
	웰파인 그린C워터	식품 (기타가공품)	한국 (한국)	식이섬유 녹차씨추출분말	티트리오일 녹차씨오일
	그린티 라인	이니스프리	세럼, 크림, 오일	한국(한국)	녹차씨 오일성분 30%
	ARETTE GREEN TEA SEED OIL INFUSED WITH ROSEMARY & SENCHA GREEN TEA	식품	미국 (미국)	녹차씨오일 로즈마리	녹차수, 녹차추출물, 녹차씨 오일

(2) 안전성 관련 자료 수집

(가) 국내・외 안전성 자료

① 국내 안전성 자료[9),10)]

㉮ 원재료(녹차씨)에 대한 섭취 근거

- 원재료 “녹차씨”는 식품원재로 DB검색결과 “차나무(식용가능부위)”로 등재되어 있고, 식용가능 부위에 녹차씨가 포함되어 있어 식품원료로 사용 가능.

원재료명		차나무
이명		녹차나무(Green Tea), 다목, Tea, 다엽
학명		*Camellia sinensis* L. *Thea sinensis* L.(이명)
생약명		다실(茶實)-열매, 산차아목(山茶亞木), 산차과(山茶科), 차속(茶屬)
식용가능 여부	가능	잎 / 꽃 / 줄기 / 씨
	제한적	
	불가능	
원재료 분류		식물

이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2 3

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

- 식약처 민원회신 식품규격과-2345 [2005.08.11]에서 Tea seed oil(Camellia sinensis 씨앗 100%) 식품 원료로 사용함이 기재되어 있음.

- 한국과학식품회 식품과학사전에는 차나뭇과(Theaceae)의 상록 활엽 관목으로 어린눈

과 잎은 차 원료로, 열매는 기름을 짜서 사용하였고 한국, 일본, 중국, 인도 등지에 분포한다고 기재 되어 있음.

- 녹차가 건강기능식품 체지방 감소 기능성 고시형 원료로 등재 되어 있음.

㉯ 전통적 사용 내용

- 옛 문헌(출처,동의보감) 에 의하면 차씨는 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있어 민간요법이나 한방 치료적으로 사용되어져 왔음

㉰ 안전성(부작욕, 독성) DB 검색

- 식약처 식품 원재료의 독성물질 유무 data-base 검색결과 녹차의 경우는 소량의 카페인이 들어있어서 임신 중이나 수유중 에는 먹지 않는 것이 좋고, 신경장애나 심장이 좋지 않은 사람은 하루에 두 잔 이하를 권고하고 있고, 고량 복용하면 독성이 나타난다고 기록하고 있으나, 녹차씨추출물에 대한 직접적 부작용에 대한 언급은 없음.
- 한국학술문헌정보센터 (KISS) 검색결과 독성 자료 전무

: Key word: 녹차씨, 녹차씨 and 독성 or 안전성, green tea seed, camellia sinensis

② 국외 안전성 자료

- Toxline, Natural Medicines DB, PDR health, Pubmed 등의 DB 검색
- key word : green tea seed, camellia sinensis seed
- 녹차씨 혼합 추출물에 대한 독성 자료는 전무하며, 녹차씨 유래 사포닌에 대한 독성 자료로 1건이 검색 됨.

▶ 약물과 같이 복용시 급성 / mild 간독성 유발 관련 하여 전임상 2건, 임상 2건 검색됨.

Pharmacol Res. 2010 Sep;62(3):207-27. doi: 10.1016/j.phrs.2010.04.001. Epub 2010 Apr 22.

Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment.

Colalto C.

Specialization School of Pharmacology, Department of Pharmacology, Chemotherapy and Medical Toxicology, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy.
cristiano.colalto@gmail.com

Abstract

Many herbal medications are used to treat diseases but while they are often efficacious, their safety is rarely considered by physicians or users. One particular safety concern is the risk of interactions with drugs, which often lead to toxicity or loss of therapeutic efficacy. In order to assess this risk, it is important to consider all potential mechanisms of pharmacokinetic interference. A large number of in vivo and invitro experiments and clinical studies have cast light on the possible effects of botanical products and phytochemicals on the many enzymes and transporters involved in gastrointestinal drug absorption. This review gives an overview and assessment of the most widely sold herbal medicinal products, including liquorice, garlic, ginger, ginkgo, green tea, St. John's wort, saw palmetto, turmeric, valerian, milk thistle and echinacea, on the basis of the available scientific evidence. Sound knowledge of the mechanisms of herb-drug interactions is essential for clinical risk assessment, in turn vital to healthcare practitioners in their efforts to reduce minimise risk and ensure that taking herbal medicinal products is as safe as possible.

Copyright 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Aliment Pharmacol Ther. 2013 Jan;37(1):3-17. doi: 10.1111/apt.12109. Epub 2012 Nov 5.

Review article: herbal and dietary supplement hepatotoxicity.

Bunchorntavakul C, Reddy KR.

Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Medicine, Rajavithi Hospital, College of Medicine, Rangsit University, Bangkok, Thailand; Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Abstract

BACKGROUND: Herbal and dietary supplements are commonly used throughout the World. There is a tendency for underreporting their ingestion by patients and the magnitude of their use is underrecognised by Physicians. Herbal hepatotoxicity is not uncommonly encountered, but the precise incidence and manifestations have not been well characterised.

AIMS: To review the epidemiology, presentation and diagnosis of herbal hepatotoxicity. This review will mainly discuss single ingredients and complex mixtures of herbs marketed under a single label.

METHODS: A Medline search was undertaken to identify relevant literature using search terms including 'herbal', 'herbs', 'dietary supplement', 'liver injury', 'hepatitis' and 'hepatotoxicity'. Furthermore, we scanned the reference lists of the primary and review articles to identify publications not retrieved by electronic searches.

RESULTS: The incidence rates of herbal hepatotoxicity are largely unknown. The clinical presentation and severity can be highly variable, ranging from mild hepatitis to acute hepatic failure requiring transplantation. Scoring systems for the causality assessment of drug-induced liver injury may be helpful, but have not been validated for herbal hepatotoxicity. Hepatotoxicity features of commonly used herbal products, such as Ayurvedic and Chinese herbs, black cohosh, chaparral, germander, greater celandine, green tea, Herbalife, Hydroxycut, kava, pennyroyal, pyrrolizidine alkaloids, skullcap, and usnic acid, have been individually reviewed. Furthermore, clinically significant herb-drug interactions are also discussed.

CONCLUSIONS: A number of herbal medicinal products are associated with a spectrum of hepatotoxicity events. Advances in the understanding of the pathogenesis and the risks involved are needed to improve herbal medicine safety.

(나) 섭취량 정보

- 녹차씨 유래 사포닌의 NOAEL은 암,수 에서 150mg/kg., 녹차의 EGCG의 간세포독성 농도 1,000ug/ml이나 생물학적 유용성(bioavailability)은 매우 낮아 800 mg EGCG의 생물학적 유용성(bioavailability)은 매우 낮아 800 mg 씩 4주 섭취시도 안전.

『건강기능식품의 기준 및 규격』에서 제시한 녹차추출물의 섭취량은 카테킨으로서 300~1,000 mg에 해당.

Food Chem Toxicol. 1994 May;32(5):431-42.

Three-month oral repeated administration toxicity study of seed saponins of Thea sinensis L. (Ryokucha saponin) in rats.

Kawaguchi M, Kato T, Kamada S, Yahata A.

Rohto Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka-fu, Japan.

Abstract

Ryokucha saponin (RSP), which is one of the ingredients of green tea, was administered orally to rats for 3 months at dose levels of 50, 150 and 500 mg/kg/day to assess any toxic effects. As positive control, 1200 mg/kg/day of quillaia saponin (QSP), which contains saponins equivalent in amount to those in 500 mg RSP/kg/day, was administered. The no-effect level of RSP was 50 mg/kg/day and the lowest-observed-effect level of RSP was 150 mg/kg/day for both sexes, so that the true no-effect level of RSP was estimated to be between these dose levels. In addition, it was confirmed that the toxicity of RSP at 500 mg/kg/day was less than that of QSP at 1200 mg/kg/day and RSP was demonstrated to be safer than QSP, which is a permitted food additive.

Food Chem Toxicol. 2008 Jun;46(6):2224-9. doi: 10.1016/j.fct.2008.02.023. Epub 2008 Mar 4.

Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats.

Takami S, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Onose J, Hirose M.

Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-Ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Abstract

Green tea catechins (GTC), polyphenols extracted from the stalks and leaves of Camellia sinensis, are found in the different types of tea beverages and as antioxidant additives to many foods, snacks, fats and fatty oils. As a part of their safety assessment, subchronic toxicity was investigated in male and female F344 rats with dietary administration at concentrations of 0 (control), 0.3%, 1.25% and 5.0% for 90 days. The average daily intakes of GTC in each group were 180, 764 and 3525mg/kg body weight/day, respectively for males, and 189, 820 and 3542mg/kg body weight/day, respectively for females. No mortality or obvious clinical signs were observed throughout the experimental period but body weights were reduced from week 1 to the end of the experiment in 5.0% males. In serum biochemistry, alanine transaminase and alkaline phosphatase in 5.0% males and females and aspartate transaminase in 5.0% females were increased, together with the relative liver weights in both sexes receiving 5.0%. Although decreases were evident for total cholesterol in 0.3-5.0% males and triglycerides in 1.25% and 5.0% males and 5.0% females, these changes were not considered to be adverse. Hematology and histopathological observation revealed no GTC-related toxicological changes. Based on above findings the no observed adverse effect level (NOAEL) of GTC was estimated to be 1.25% (764mg/kg body weight/day for males and 820mg/kg body weight/day for females).

Food Chem Toxicol. 2009 Aug;47(8):1760-70. doi: 10.1016/j.fct.2009.04.033. Epub 2009 May 3.

Safety assessment of heat-sterilized green tea catechin preparation: a 6-month repeat-dose study in rats.

Morita O, Kirkpatrick JB, Tamaki Y, Chengelis CP, Beck MJ, Bruner RH.
Global R&D Safety Science, Kao Corporation, 2606 Akabane, Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi-ken 321-3497, Japan. morita.osamu@kao.co.jp

Abstract
Evidence suggests that the purported health benefits associated with green tea consumption are related to tea catechins. In the present study, potential adverse effects of a standardized heat-sterilized green tea catechin (GTC-H) preparation was investigated following gavage administration to rats at doses of 0, 120, 400, 1200 mg/kg/day for 6 months. A decaffeinated high-dose group (1200 mg/kg/day) (GTC-HDC), was included for comparison. A possibly test article-related clinical finding of intermittent increased activity was noted in the 400 and 1200 mg/kg/day GTC-H groups, but was not considered to be adverse. Lower body weight gains without any decrease in food consumption were noted in the high-dose (1200 mg/kg/day)-treated GTC-H and GTC-HDC females. In the high-dose male GTC-H group, a lower total motor activity count for the 60-min session was noted prior to dosing at the study week 25 evaluations compared to the control group. Similar changes were not observed in the GTC-HDC group. Based on the results of this study, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for GTC-H was 1200 mg/kg/day for males, the highest dose tested, and 400mg/kg/day for females based on reduced body weight gains. The NOAEL for GTC-HDC was 1200 mg/kg/day for males and could not be determined in females.

(3) 기능성 관련 자료 수집[11)]

(가) 국내・외 기능성 자료

① 국내 기능성 자료 요약 (본시료/유사시료)

- 녹차씨 : 기능성 관련 자료는 0 건
- 녹차 :관련 자료는 논문 18건, 특허 672, 보고서 27개. sub 자료는 vivo 동물 실험 6 건, 인체적용시험 5건.

② 국외 기능성 자료(본시료/유사시료)

- 녹차씨 : 기능성관련 자료는 30% 녹차씨 오일을 소재로 한 1건 검색 됨.
- 녹차씨 오일 : PPAR-γ 활성 억제를 통해 adipocyte 분화를 조절하고, high fat diet 로 유도 된 C57BL/6J 마우스의 체중 증가를 감소시킴.
- 녹차: 관련자료 논문 108건 중 임상 18건 , 전임상 27건 검색 됨

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험 (건)	비 고
신청원료	**0**	**0**	**0**	**0**	**녹차씨 박 열수추출물**
참고자료	2	1	1	0	녹차씨
	11	1	6	5	녹차

Pflugers Arch. 2008 Nov;457(2):293-302. doi: 10.1007/s00424-008-0537-y. Epub 2008 Aug 12.

Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6J mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.

Kim NH, Choi SK, Kim SJ, Moon PD, Lim HS, Choi IY, Na HJ, An HJ, Myung NY, Jeong HJ, Um JY, Hong SH, Kim HM.
Department of Pharmacology, Kyung Hee University, 1 Hoegi-Dong, Dongdaemun-Gu, Seoul, 130-701, Republic of Korea.

Abstract

Given that tea contains a number of chemical constituents possessing medicinal and pharmacological properties, green tea seed is also believed to contain many biologically active compounds such as saponin, flavonoids, vitamins, and oil materials. However, little is known about the physiologic functions of green tea seed oil. The aim of this study is to investigate the anti-obesity effects of green tea seed oil in C57BL/6J mice and in preadipocyte 3T3L-1 cell lines. In vivo, three groups of mice were fed with a standard diet, a high-fat diet containing 30% shortening, or 30% of green tea seed oil based on a standard diet for 85 days. The levels of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglyceride, glucose, and alanine aminotransferase in blood were analyzed at the end of the study. The mice given green tea seed oil gained less weight compared to mice given the shortening diet ($p < 0.01$). The plasma level of total cholesterol was decreased by a significant level of 32.4% in mice given the green tea seed oil compared to the mice given the shortening diet ($p < 0.01$). In addition, 3T3-L1 cells were treated for 2 days to evaluate effects of green tea seed oil on adipocyte differentiation. Green tea seed oil inhibited expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma(2) and CCAAT/enhancer binding protein-alpha in adipocytes and adipose tissue from the experimental animals. These results indicate that the anti-obesity effects of green tea seed oil might be, in part, through suppression of transcription factors related to adipocyte

(나) 기능성 자료 요약

자료의 90%이상이 기능성분으로 카테킨(특히 ,EGCG)을 기능성분으로 한 식욕억제, 지방 베타산화 촉진, 지방흡수 억제, 식욕억제 등의 메커니즘.

3. 녹차씨 관련 자료 분석 및 가능성 검토

가. 안전성 자료의 분석

(1) 안전성 자료 분석의 식약처 기준

- 식약처(관련규정 제 12조, 제 1항 제 7호 , 제 14조 제 7호) 기준인 [안전성 평가를 위한 의사 결정도]에 의해 분석하여, 안전성 자료 제출 범위 결정하고, 표준화 단계에서부터 “나 또는 다 항”에 해당 하도록 표준화 전략을 수립

(2) 녹차씨의 안전성 자료 분석 결과

(가) 안전성 평가 의사결정도에 따라 “나” 또는 “다” 항에 해당하는 제조공정 확립

(나) 따라서 제출서류는 섭취근거자료, 안전성 정보 자료, 섭취량 평가 자료를 제출해야 함.

(다) 기능성 검증을 목적으로 한 예상 복용량은 사포닌을 기준으로 사포닌을 기준으로 500mg/kg/day > 이하로 설정해야 안전 함.

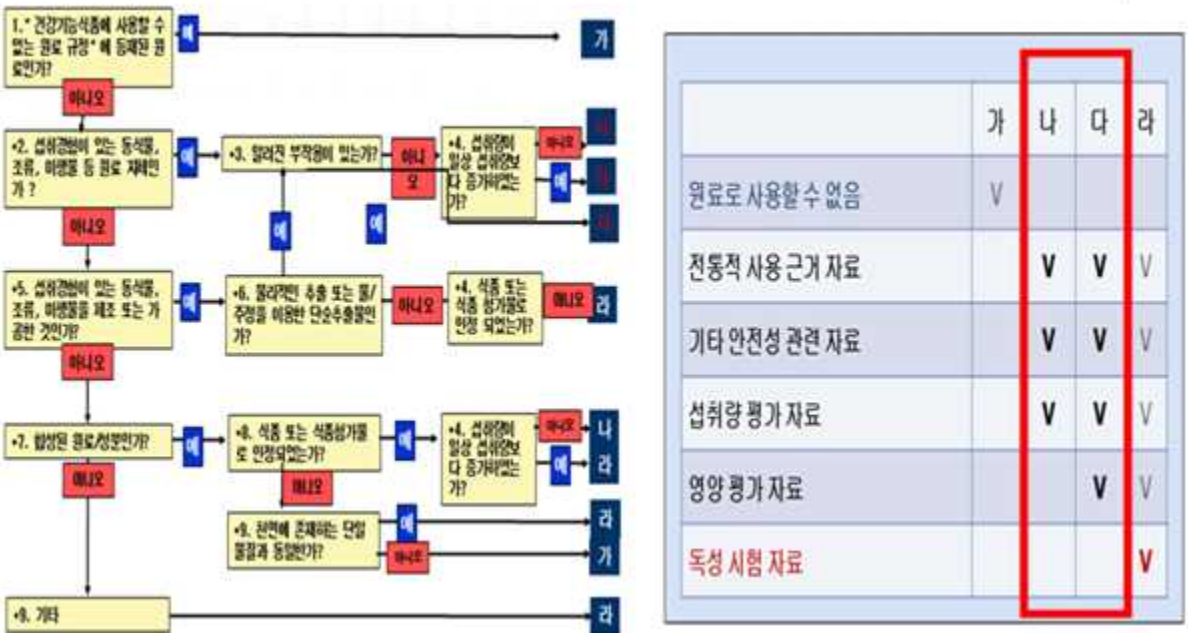


Fig. 8. 안전성 평가 의사결정도, 식품의약품안전처

나. 기능성 자료의 분석

(1) 기능성 자료 분석의 식약처 평가기준[12)]

- 건강기능식품에 기능성을 표시하기 위해서는, 식품의약품안전청(이하, 식약청)에서 그 원료의 기능성을 검토·평가하고 인정받는 것이 선행되어야 하며, 기능성 자료 분석은 식약처 기능성자료 분석 가이드라인에 따라 연구의 유형, 연구의 질, 연구의 양, 일관성, 활용성 등을 종합적으로 분석

1) 신청한 기능성 원료의 특성을 확인하고 이와 관련된 연구인지를 확인함
2) 기능성 원료(또는 성분)에 의해 기능성을 나타내는 것인지를 확인함
3) 개별 자료들을 연구의 유형에 따라 분류하고, 개별연구의 유형과 질을 평가함
4) 제출된 자료의 양, 일관성, 활용성을 종합적으로 검토하고, 기능성 표시를 정하기 위한 과학적 근거의 정도를 평가함

Fig. 9. 기능성 자료 평가 원칙, 식품의약품안전처, 2008

① 연구 유형의 검토-기반연구(유형4,5),관찰연구(유형 2,3),중재연구(유형 1,RCT)로 검토되며 신청 원료와의 동일성 및 바이오마커의 적절성등에 대한 검토

② 연구의 질적 검토-시험설계, 시험계, 시험물질, 식이조절, 목적, 바이오마커, 통계 등에 대한 적절성을 수준 1-3 으로 평가

③ 연구의 일관성 및 활용성 검토-전 자료를 통하여 적정한 바이오마커의 일관성 있는 유효도를 검토

(3) 녹차씨의 기능성 자료 분석 결과

① 본 연구시료인 녹차씨 박 추출물로 진행 된 자료 전무

② 따라서, 녹차 자료 활용 가능성을 위한 카테킨 함유량 분석 (제1협동)

③ 녹차씨 함유 기능/지표 후보 물징 재검색

④ 동일 시료 동일 기능성 자료 전무

⑤ 녹차씨 오일 Sub 자료 1건을 제외한 기능성 자료 전무

⑥ 체지방 감소에 대한 유효성 평가의 복용기간은 3-12주, 임상 최대 12주 이하

⑦ 기능성 검증을 목적으로 한 예상 복용량은 사포닌을 기준으로 사포닌을 기준으로 500mg/kg/day > 이하로 설정해야 안전 함.

4. 녹차씨를 활용한 체지방 개선 개별인정형 기능성 소재 개발 전략 수립

가. 전략 개요[13)]

- 등급에 따른 항목별 필요/충분 조건은 특정기능 및 생리기능변화와 관련된 마커를 사용한 유형2 이상, 질적 평가 수준이 중간이상의 인체적용연구가 소수이며, 일관된 결과를 내고 있으면 "기타기능 Ⅱ"의 인정이 가능하고, 자료의 질적 평가 수준이 중간 이상인 동물시험만 다수 있으며 일관성이 있는 결과를 내고 작용 기전을 잘 설명할 수 있거나, 또는 질적 평가 수준이 중간인 대조군이 설정되지 않은 인체적용 연구 또는 case-control study 등의 유형 3 에 해당하는 인체적용 연구 정도까지의 자료가 있으면 "기타기능Ⅲ"에 해당하는 기능성표시가 가능 함. (기능성평가자료가이드라인, 식약처, 2008)

나. 단계별/ 항목별 추진전략

(1) 표준화 전략

① 원재료에 대한 표준화 전략- 본 시료의 원료는 녹차씨박을 활용한 연구이므로, 원재료인 녹차씨의 채취부터 착유까지의 과정에 대한 원재료 표준화 과정을 확립해야함. (채취시기, 지역, 비율, 보관 온도..등)

② 지표물질 선정 전략- 유사기능성 원료인녹차 추출물에서의 지표/기능성분인 카테킨의 부재로 추가 후보물질 탐색(제1협동)이 필수. 후보물질로는 camperol>chlorogenic acid,> naringenin 순으로 분석작업 필요. 최종 지표물질의 80-120% 범위 안에서 기준규격 설정

③ 제조공정 표준화 전략- 전략적으로 독성시험 자료를 제출하지 않아도 되는 용매(물, 주정, 초임계의 제조공정 중 기능성이 가장 우수하며, 기능성분의 효율이 높은 제조공정 방법 선택. 표면반응분석법에 의하여 완성 된 후보 시료를 3T3L-1 전지방세포의 지방축척/ 지방세포로의 분화 효과 및 항산화 활성 실험을 통해 스크리닝 하여 최적 제조공정을 확립 함.

④ 기준규격 설정 전략- 중금속 4종(납, 총비소, 카드늄, 수은), 잔류농약검사 (59종), 미생물

검사 및 지표물질에 대한 기준규격 확립

(2) 안전성 자료 확보 전략

① 물, 또는 주정 추출 등 가능한 전통적으로 사용되어져온 제조공정 방법 우선 검토

② 섭취근거자료, 안전성 정보 자료, 섭취량 평가 자료 확보

③ 전임상 실험진행 과정에서 체중, 혈액학적 지표(ALT & AST), 식이섭취량 , 생육양상 등 독성관련 바이오마커들을 통해 간접적 자료 확보

④ “안전성평가 의사결정도”의 “나” 또는 ”다“ 에 해당하는 제조공정이 확립되어도 기본 독 성(단회, 유전독성 3종)를 통해 안전성 재확인 필요.

⑤ 인체적용시험을 통해 인체에서의 안전성 확인

⑥ 해당시료의 1일 섭취량에 대한 카페인 섭취 함량 분석 자료 확보 필요.

(3) 기능성 자료 확보 전략

① 전임상기능성 자료 확보 전략- 본 시료인 녹차씨박추출물로 진행된 항비만 전임상 자료가 전무하므로 최소 In vitro에서 기능성 메카니즘을 설명 해 줄 수 있는 자료 1건 이상, In vivo 동물 모델(고지방식이, 고탄수화물식이, 비만관련 유전자 조작 모델)을 통하여 , 항비만 효능 유무, 효능정도(multi-dose), 효능 발현 메카니즘, 섭취시의 안전성 등에 대한 자료 2건 이상 확보 필요.

② 임상자료 확보 전략- 체지방 개선 효과를 검증할 수 있으면서, 전임상과 임상자료에서 일관성을 가지는 바이오마커 선정, 피험자 순응도 및 지질개선 및 체지방개선 효과를 보일수 있는 임상 복용 기간(8-12주) 설정 및 GCP 가이드라인에 준하여 운영되는 임상 수행기관의 선정, 임상 용량, 피험자 수 등에 대한 자전 전략 수립 필요

다. 최종 기능성 자료 확보 시놉시스

○: 기 임상 자료

●:본 시료 추가 할 임상 자료,

▣: 기 동물실험

■: 본 시료 추가 할 동물실험

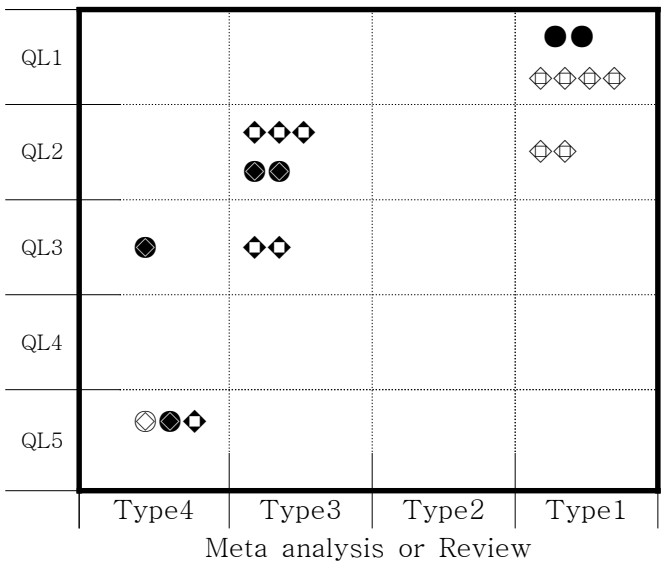
◇: 기 시험관 자료

◆:본 시료 추가 할 시험관자료.

◇ sub- 자료 임상

◆ sub-자료 전임상

◆ sub-자료 시험관 실험



제 2 절 원료의 표준화

1. 원료의 전처리

가. 녹차씨의 기원에 관한 정보(관련규정 제12조 제1항 제2호, 제14조 제2호)

원재료명	녹차씨박 추출물	비 고
학명	Camellia sinesis(녹차)	재래종 차나무
원산지	한국 (전남 순천)	명인신광수차
사용부위	종자의 박	채유 후 부산물
채취시기	9월 ~12월 중순	실화상봉수 (實花相逢樹)

※녹차씨의 특징

- 삼피과(껍질이 세 겹이다.)
- 외피와 중피를 제거 후 탈지(압착추출법이용)한 부산물(박)이용

나. 녹차씨의 수확방법

녹차씨 채취방법은 수작업 채취

- 녹차잎의 경우는 채엽기를 사용하여 채취하는 경우도 있음.
- 녹차씨는 수작업 채취만 가능하지만 녹차잎 채취대비 적은 인건비가 소요된다.
- 녹차씨는 1인당 1일 수확량은 약30kg 채취가능(30kg을 건조하여 오일은 약 1.5L, 종자박은 약 5~6kg 정도 확보 가능)

※ 녹차잎의 경우 채취시기별 잎의 크기 차이로 인해 선별하여 수작업 채취

다. 원료 보관 방법

원료의 보관 조건은 상온에서 보관할 경우 녹차씨가 발아되는 경우가 많아 다양한 조건 검토한 결과 일광 건조한 원료를 온도 습도가 30~40%인 -5℃의 저온저장고에 2년 이상 보관 가능.

- 중과피와 과육이 분리되도록 건조하여 보관하는 방법이 적합.

상온에서 보관된
발아된 녹차씨

녹차씨를 보관 중인 저장고
온도 -5℃ / 2년 보관

냉동 보관 중인 녹차씨
온도 -5℃ / 습도 30~40%

라. 원료 전처리 방법

마. 원재료의 잔류농약 분석

원재료의 형태는 아래 사진과 같은 형태로 잔류농약 분석을 하였음.

원료는 유기농산물 찻잎이 생산되는 차밭에서 생산되는 녹차씨를 가공하여 사용하므로 잔류농약이 검출되지 않아야함.

제 D2014020596 호

검 사 성 적 서

검체명		녹차열매압착박	제조일자 (유통기한)	2014-02-04
의뢰인	업체명	명인신광수차	성 명	신광수
	주소	전라남도 순천시 승주읍 승주괴목2길 25		
제조번호			접수년월일	2014-02-14
검사의뢰목적		참고용	검체접수번호	D2014020596

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
비에치씨(mg/kg)	불검출	김용수
비페스린(mg/kg)	불검출	김용수
카보후란(mg/kg)	불검출	김소영
클로르훼나피르(mg/kg)	불검출	김용수
클로로타로닐(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
싸이할로쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이프로디닐(mg/kg)	불검출	김용수
디디티(mg/kg)	불검출	김용수
다이아지논(mg/kg)	불검출	김용수
디크로보스(mg/kg)	불검출	김용수
디코폴(mg/kg)	불검출	김용수
엔도설판(mg/kg)	불검출	김용수
페나리몰(mg/kg)	불검출	김용수
페니트로치온(mg/kg)	불검출	김용수
펜프로파스린(mg/kg)	불검출	김용수
펜발러레이트(mg/kg)	불검출	김용수
플루디옥소닐(mg/kg)	불검출	김용수
이마자릴(mg/kg)	불검출	김용수
이프로디온(mg/kg)	불검출	김용수
이소프로치오란(mg/kg)	불검출	김용수
말라치온(mg/kg)	불검출	김용수
메소밀(mg/kg)	불검출	김소영
메티다치온(mg/kg)	불검출	김용수

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
파클로부트라졸(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온-메칠(mg/kg)	불검출	김용수
퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
펜토에이트(mg/kg)	불검출	김용수
포스메트(mg/kg)	불검출	김용수
피리미카브(mg/kg)	불검출	김용수
프로시미돈(mg/kg)	불검출	김용수
퀸토젠(mg/kg)	불검출	김용수
트리아디메폰(mg/kg)	불검출	김용수
트리프루미졸(mg/kg)	불검출	김용수
트리아조포스(mg/kg)	불검출	김용수
프로클로라즈(mg/kg)	불검출	김용수
메독시페노자이드(mg/kg)	불검출	김소영
보스칼리드(mg/kg)	불검출	김소영
아세타미프리드(mg/kg)	불검출	김소영
아족시스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
아트라진(mg/kg)	불검출	김용수
에치온(mg/kg)	불검출	김용수
이프로발리카브(mg/kg)	불검출	김용수
카바릴(mg/kg)	불검출	김소영
캡탄(mg/kg)	불검출	김용수
뮬크로포스메칠(mg/kg)	불검출	김용수
트리플루무론(mg/kg)	불검출	김용수
티아메톡삼(mg/kg)	불검출	김소영
펜헥사미드(mg/kg)	불검출	김소영
프로페노포스(mg/kg)	불검출	김용수
플루벤디아마이드(mg/kg)	불검출	김소영
플루페녹수론(mg/kg)	불검출	김소영
피라크로스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
피리메타닐(mg/kg)	불검출	김소영
피리미포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
헥사프루무론(mg/kg)	불검출	김소영

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.　　검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자

2014 년 2 월 19 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호(031)628-0400 FAX(031)628-0400-1

유기농산물 인증 항목에 녹차씨를 추가하였음.

인증정보검색

생산자명	신광수		
주 소	[개인정보보호]		
인증번호	15-03-1-1		
인증종류	유기농산물		
대표품목	녹차잎		
최초인증일자	2001-03-13		
인증기간	2013-11-02 ~ 2014-11-01		
재배면적	198,011 ㎡		
생산계획량	20,000 kg		
농장소재지	전라남도 순천시		
생산자구분	개인		
대표자성명	신광수		
구성원수	1명	이메일	[개인정보보호]
전화번호	[개인정보보호]	핸드폰번호	[개인정보보호]
사후관리결과	잔류농약분석 ▶2002년 ▶2007년		
사후관리결과	생산과정조사 ▶2013년		
농가홈페이지	www.jagsul.ne.kr	인증기관	국립농산물품질관리원 전남지원 순천·광양사무소(061-742-6060)

유기농 (ORGANIC) 농림축산식품부

목록 인쇄

인증품목정보

농가명	품목명	생산계획면적(㎡)	생산계획량(kg)
신광수	녹차씨	198011	10000
신광수	녹차잎	198011	10000

인증번호 : 제 28-1-125 호

인 증 서

≪생산자용≫

인증구분	유기농산물	유효기간	2014.12.12 ~ 2015.12.11
생 산 자	신광수	사업자등록 번호(생년월일)	1952년 5월 22일
주 소	전라남도 순천시 승주읍 선암사길 386		
사 업 장 소 재 지	전라남도 순천시 승주읍 죽학리 산 64 외 21필지 (유기)		
인증품목	녹차잎외 1품목	재배면적	105,371 ㎡
인 증 부가조건			

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제20조(제34조) 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제13조(제41조제1항)에 따라 위와 같이 ■유기농산물·임산물, □유기축산물, □무농약농산물, □무항생제축산물의 인증기준에 적합함을 인증합니다.

2014년 12월 12일

국립농산물품질관리원 지정 제 28호 인증기관

국 립 순 천 대 학 교 산 학 협 력 단 장

2014.12.12
0000000540 - 1

2. 원재료 및 제조공정 표준화

가. 녹차씨 압착박의 에탄올 농도별 추출 및 수율

1) 에탄올 농도별 추출물에 대한 수율 확인

녹차씨 압착박에 함유된 기능성분의 효율적인 추출방법을 확인하기 위해 추출용매의 농도별로 추출하여 얻어진 각 추출물에 함유된 화합물을 비교하고 이로부터 얻어지는 최종 건조물의 수율을 비교 검토하고자 하였다. 녹차씨 압착박을 Ethanol 농도(0%, 25%, 50%, 70%, 100% EtOH)별로 실온에서 하룻밤 방치하여 추출한 후, 각각의 추출물을 동결건조하여 얻어진 추출물의 최종 수율을 확인하였다.

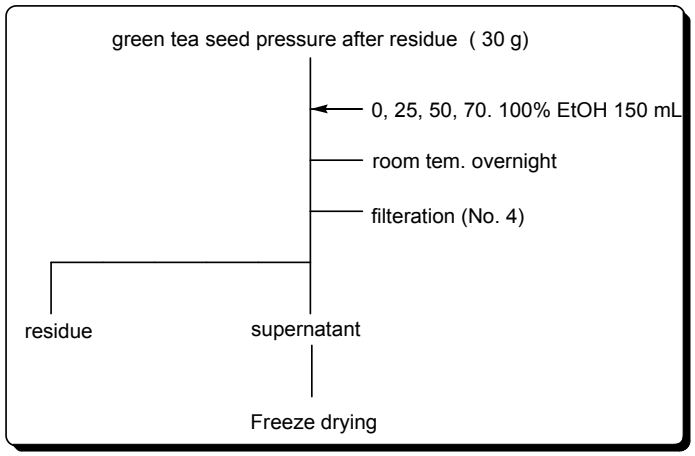


Fig. 10. 녹차씨 압착박 EtOH 농도에 따른 추출

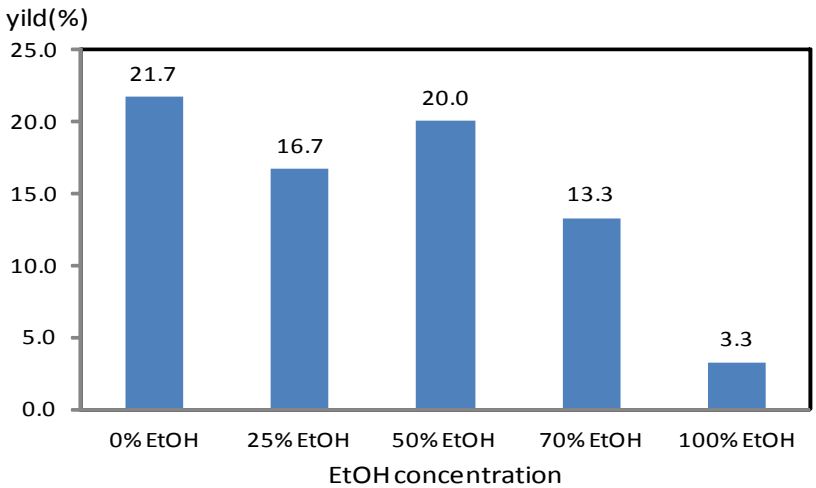


Fig. 11. EtOH 농도별 추출물 수율

녹차씨 압착박에 함유된 화합물의 효율적인 추출용매를 결정하기 위해 EtOH 농도별로 추출하여 얻어진 추출분말의 최종수율을 확인한 결과, 0% EtOH ext.은 약 21.7%로 가장 높은 추출수율을 나타났

으며, 70% EtOH와 100% EtOH으로 추출할 경우 추출 수율이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 실온에서 장시간 H_2O로 추출하였을 때 가장 높은 수율의 추출물을 얻었으므로 추출효율을 보다 빠르게 하기 위하여 열을 가하여 시간에 따른 추출효율을 확인하였다.

2) 열수 추출조건에서 추출시간에 따른 수율 측정

녹차씨 압착박 30 g에 증류수 5배수를 가하여 90℃에서 1, 2, 3, 5 hr 동안 추출하여 여과 후 동결건조 후 분말화하여 수율을 확인했다. 추출의 재현성을 확인하기 위하여 2회 반복 추출하였다.

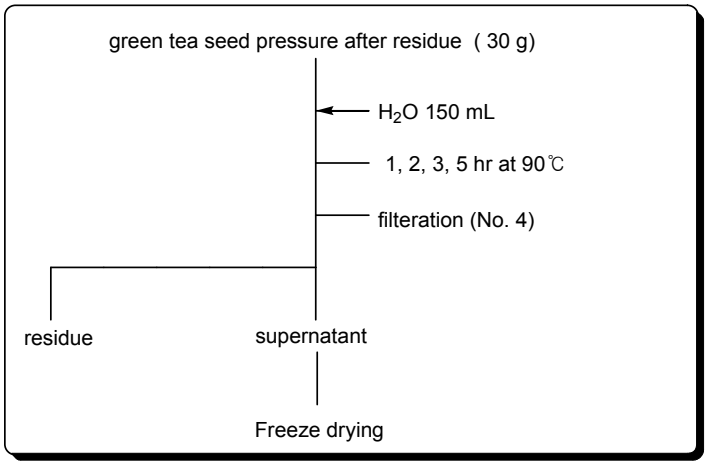


Fig. 12. 녹차씨 압착박 90℃에서 추출시간에 따른 추출

Table 5. 열수 추출시간에 따른 추출물의 수율

추출조건		1차 추출분말 수율(%)	2차 추출분말 수율(%)
열수추출 (H_2O, 90℃)	1 hr	18.3	19.0
	2 hr	18.3	20.0
	3 hr	23.3	23.0
	5 hr	20.0	23.3

열수 추출시간에 따른 추출물의 수율을 확인한 결과 3시간 추출 시 23.3%로 수율이 가장 높았으며 추출 수율에 대한 재현성을 확인하였다.

나. 각 추출물의 플라보노이드 및 카테킨 함량 분석

추출조건을 확립하기 위하여 상기에서 얻어진 각 추출물에 대하여 Flavonoid 계통의 화합물인 catechins 및 총플라보노이드 분석은 건강기능식품공전 상의 분석 방법[14]에 의해 실시하였다.

○ 총플라보노이드 분석

- 녹차씨 압착박 추출물 0.1 g을 정밀히 달아 90% EtOH를 4 mL에 녹인 후 원심분리(3,000 rpm, 10

min) 후 여액은 10 mL 정용플라스크에 넣고 잔사에 대해 80% EtOH 2 mL를 가하여 원심분리하여 여액을 10 mL 정용플라스크에 넣은 후 MeOH 10 mL로 정용한 용액을 시험용액으로 하였다.

- 표준용액은 Quercetin 1,000 ㎍/mL stock 용액을 희석하여 사용하였다.
- 시험용액 및 표준용액 500 uL에 EtOH 1,500 uL 및 10% 아질산알루미늄용액 100 uL, 1M 초산칼륨용액 100 uL, 증류수 2,800 uL를 순차적으로 넣고 실온에서 40 min 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

○ Catechins 분석

- 녹차씨 압착박 추출물 0.1 g을 정밀히 달아 MeOH 2 mL에 녹인 후 여과(0.45 um PTFE)하여 HPLC 분석을 진행하였다.
- 표준품은 에피갈로카테긴(EGC), 에피카테킨(EC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨 갈레이트(ECG)를 1000 ㎍/mL stock용액을 희석하여 사용하였다.
- HPLC condition
  - ·Detecter: UV detecter (280 nm)
  - ·Column: SP C_{18} (4.6× 150 mm, 5 um)
  - ·Column Oven: 30 ℃
  - ·Injection vol. 20 ㎕
  - ·Flow rate: 1.0 mL/min
  - ·Mobile phase: A, H_2O in 0.1% Acetic acid; B, MeCN

min	A (%)	B (%)
0	85	15
10	85	15
15	70	30
20	50	50

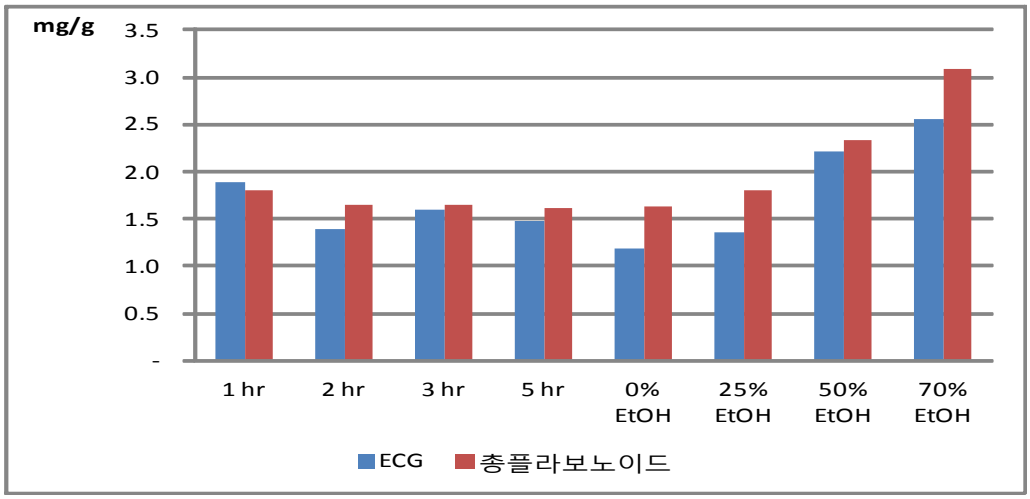


Fig. 13. EtOH 농도에 따른 추출물 및 열수추출 시간경과에 따른 추출물(1차 열수추출)의 ECG 함량 및 총플라보노이드 함량분석

EtOH 농도에 따른 추출물 및 열수추출 시간경과에 따른 추출물의 ECG 및 총플라보노이드 함량분석 결과, 녹차씨 압착박 50% EtOH ext., 녹차씨 압착박 70% EtOH ext.에서 높은 함량을 나타냈지만 수율을 고려했을 때 추출조건으로 적합하지 않다고 판단되었다. 열수추출조건에서는 추출시간에 따른 ECG 및 총플라보노이드 함량 차이가 거의 나타나지 않았다.

Table 6. 열수추출 시간별 추출분말의 총플라보노이드 함량 재현성 확인

추출조건		1차 추출분말		2차 추출분말	
		순도 (mg/g)	총함량 (mg)	순도 (mg/g)	총함량 (mg)
열수추출 (H_2O, 90℃)	1 hr	1.800	32.93	1.28	24.36
	2 hr	1.651	30.21	1.17	23.36
	3 hr	1.649	38.43	1.08	24.89
	5 hr	1.613	32.27	1.20	27.87

다. 추출물에 대한 기능성 효능 평가

- 3T3-L1 아지방세포

Mouse 배아에서 유래된 3T3-L1 아지방 세포는 항비만의 in vitro system에서 가장 많이 이용되고 있는 세포로서 4.5 g/L, 10% fetal bovine serum, Gibco 16170 , penicillin/streptomycin(100㎍/mL penicillin, Gibco 15140 and 100 ㎍/mL streptomycin in 0.85% saline), 1% 100uM sodium pyruvate을

함유한 DMEM, Lonza 12-604F 로 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

- 세포독성(toxicity test)

세포독성은 Lim 등의 방법[15]을 변형하여 측정하였다. 24 wells plate에 2 × 10^5 cells/well의 세포를 분주한 후 confluent 될 때까지 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 대상 시료가 용해된 serum이 3% 함유된 배지 1 mL을 분주하고 재 배양을 3, 6, 9일로 배지를 바꿔주며 배양 하였다. 9일 이후 각 well에 0.25 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 g PMS/mL of MEM without phenol red)을 첨가하고 다시 2시간 배양한다. 세포독성도는 formazan의 형성 정도를 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 향후 독성이 미치지 않는 범위 내에서 실험을 진행하였다.

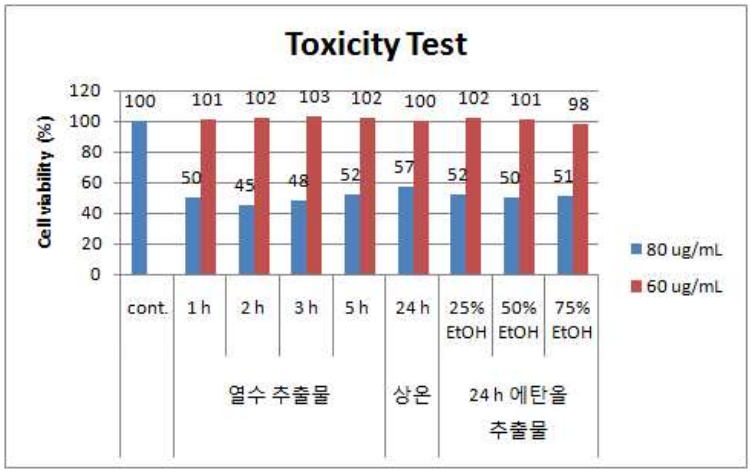


Fig. 14. 3T3-L1 cell toxicity test

녹차씨 압착박 추출물의 세포 독성을 확인해 보기 위해 각 추출물 분말의 세포 처리량을 60 ~ 1000 μg/mL 농도에서 확인한 결과, 80 μg/mL 이상의 농도에서는 독성이 있는 것으로 확인되어, 녹차씨 압착박 추출물을 60 μg/mL 이하 농도에서 항비만 관련 기능성 효능을 평가하는 최대 농도로 결정하였다.

- Oil red O

·3T3-L1 세포는 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된 세포주로서 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있다.

·adipocyt로 분화 시 단백질들의 분비가 촉진되는 등 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 많이 사용되고 있다.

·따라서, 분화 촉진 인자들에 의해 분화된 3T3-L1 세포는 세포 내 지방이 축적되며 지방과 관련된 콜레스테롤, 중성지방 등 지방세포로서의 형태 및 특성을 나타나게 된다.

·세포에 분화 촉진 후 완료 이후 세포내 지방구 생성을 확인하기 위해, 지방적(lipid droplets)의 지방에

특이적으로 반응하여 염색되는 Oil Red O 염색법을 수행하여 축적 중인 지방을 염색된 지방구를 흡광도를 이용하여 분석하였다.

·3T3-L1 아지방 세포의 지방세포로의 유도는 Chu 등의 방법[16]에 따라 실시하였다. 지방세포 유도는 세포 배양 well에 100% confluent 되고 이틀 후 100 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma I5879, 250 μM dexamethasone, Sigma D4902, 170 μM insulin (MDI), 을 함유한 배지로 지방세포로 유도하였으며 3일 후에 MDI 배지는 10% FBS와 170 nM insulin, Sigma I9278 을 함유한 DMEM 배지로 각 실험 날짜까지 이틀에 한번 교환하였다.

·3T3-L1 세포배양 중 각각 3, 6, 9일에 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)로 2번 세정하고 0.6%의 Oil Red O 용액을 준비한 후 약 2시간 동안 염색하고, PBS로 3번 세정한 후 isopropanol 1.5 mL을 넣어 oil red를 용출시켰다.

·용출시킨 용액을 500 nm에서 흡광도를 측정하였다

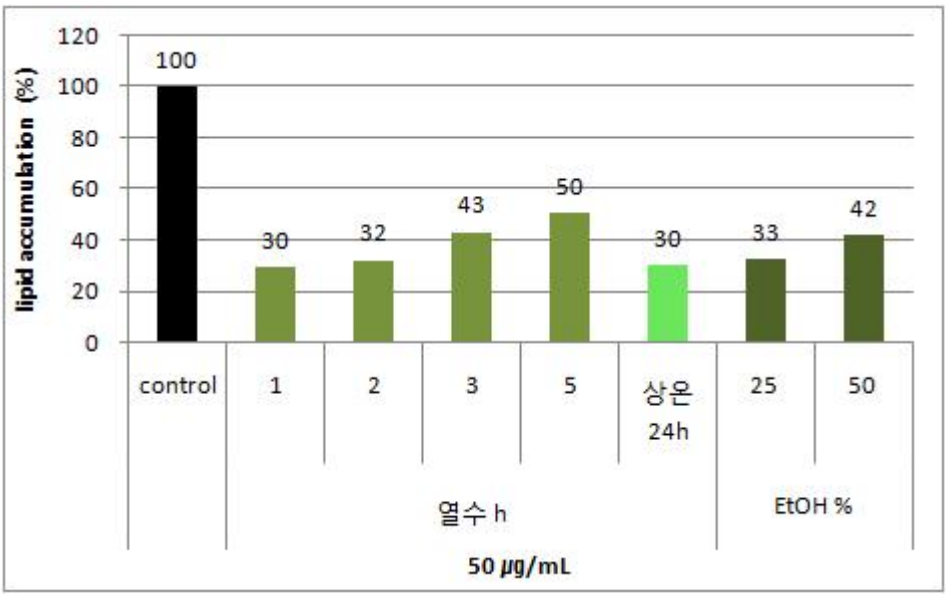


Fig. 15. 1차 열수 추출물 및 EtOH 추출물 Oil red O (50μg/mL)

항비만 기능성 효능평가 결과, 열수 1 시간 추출물 및 상온 24 시간 추출물에서 지방세포의 분화 억제 관련 활성이 가장 높았으며, 70% 에탄올 추출물은 독성 평가 시엔 독성이 없게 평가되었지만 분화 과정 중 분화시약과 함께 처리 시 독성 때문에 사멸하여 지방축적 억제능을 측정할 수 없어 농도를 더 낮춰 평가하였다.

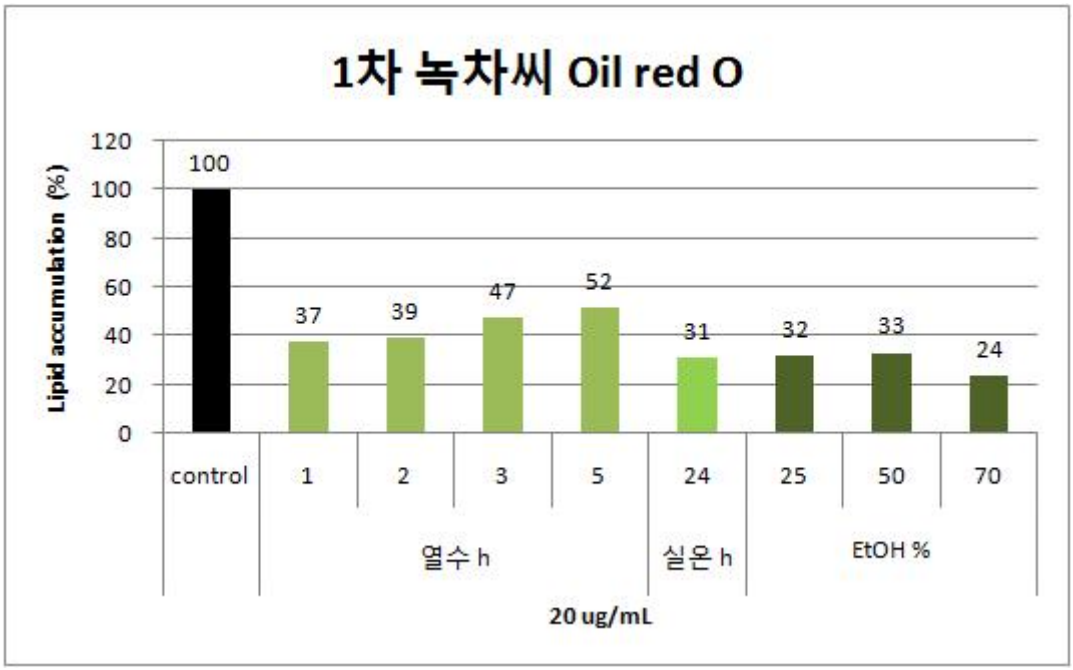


Fig. 16. 1차 열수 추출물 및 EtOH 추출물 Oil red O (20 ㎍/mL)

녹차씨 압착박 추출물의 처리 농도가 감소함에 따라 지방축적 억제율이 감소하는 경향을 보였다. 50 ㎍/mL에서 독성을 보인 70% 에탄올 추출물이 지방축적 억제율이 가장 높으나, 추출 공정 및 수율과 지표 성분 분석 평가 시 앞으로 시행될 연구 소재로 열수 추출물로 결정됨에 따라 2차 열수 추출물 지방축적 억제율 재현성 평가하였다.

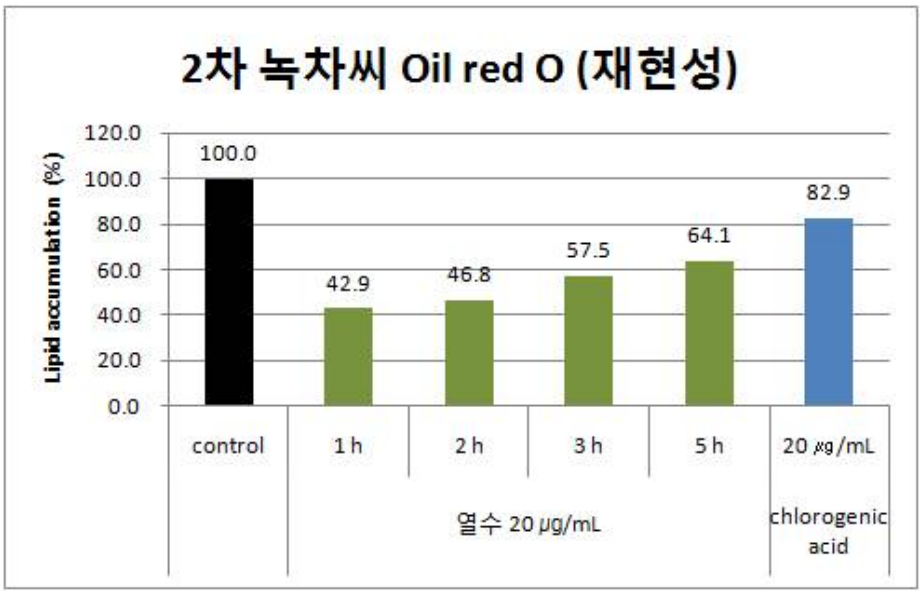


Fig. 17. 2차 열수 추출물 Oil red O (20 ㎍/mL)

2차 열수 추출물 재현성 항비만 기능성 평가시, 1차 평가 보다 지방축적 억제율 감소하나, chlorogenic acid (positive control) 보다 지방축적 억제율이 현저히 높았다.

라. 녹차씨 압착박에 대한 최종 추출 공정의 확립

(1)상기의 실험을 통하여 녹차씨 압착박 추출물의 수율, 총플라보노이드 함량 및 기능성효능 평가 결과 등을 고려하여, 녹차씨 압착박에 5배수의 증류수를 첨가하여 90℃, 1.5 hr 동안 추출하는 것으로 추출공정을 확립하였다.
확립된 추출공정에 의해 얻어진 녹차씨 압착박 열수추출물에 대하여 수율 및 조사포닌, 총플라보노이드 함량 및 체지방 분화억제효능을 평가하였다.

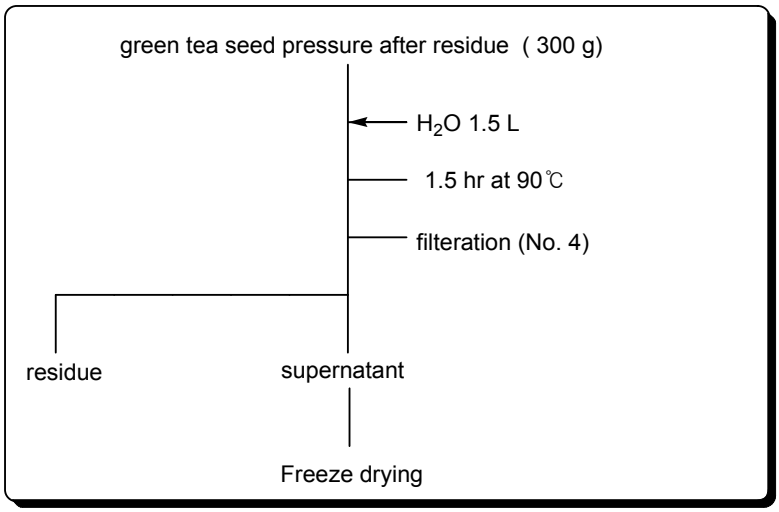


Fig. 18. 녹차씨 압착박 추출공정

(2)조사포닌 분석법

조사포닌 분석은 Kim 등의 방법[17]에 의해 실시하였다. 즉, 녹차씨 압착박 열수 추출물 5 g을 달아 플라스크에 취하고 Methanol 50 mL를 가하여 상온에서 약 1시간동안 교반 추출한 다음 농축플라스크에 여과한다. 잔류물에 대하여 위의 조작을 반복한 다음 여과지는 Methanol 50 mL로 세척한다. 합쳐진 Methanol을 감압농축한 후, 증류수 50 mL로 용해하여 분액여두에 넣고 여기에 수포화부탄올용액 50 mL을 가한 다음 격렬히 흔들어 물과 부탄올층이 완전 분리될 때까지 정치한다. 부탄올층을 따로 모으고 다시 물층에 대하여 수포화부탄올 추출조작을 위와 동일한 방법으로 2회 더 반복한다. 회수된 부탄올 용액 전액을 분액여두에 옮긴 후 증류수 50 mL 가하여 흔들어 물층과 부탄올층을 완전히 분리시킨다. 물층을 제거하고 부탄올층을 미리 항량된 농축플라스크에 옮겨 감압 농축 후 농축잔류물에 에테르 50 mL를 가하고 46℃ 수욕에서 30분간 환류냉각하고 에테르를 제거한다. 잔류물은 항량이 될 때까지 건조하고 데시케이터에서 방냉한 후 무게를 달아 계산식에 따라 조사포닌 함량을 구한다.

$$\text{조사포닌 (mg/g)} = \frac{\text{건조 후 수기 무게 (mg)} - \text{항량된 수기무게 (mg)}}{\text{시료 (g)}}$$

Table 7. 녹차씨 압착박 90℃, 1.5 hr 추출물의 수율 및 조사포닌, 총플라보노이드

추출조건	수율 (%)	조사포닌 함량 (%)	총플라보노이드 (mg/g)
열수추출 (H_2O, 90℃, 1.5 hr)	17.92	13.54	1.18

녹차씨 압착박 90℃, 1.5 hr 추출물의 수율은 17.92% 였으며, 총플라보노이드 1.18 mg/g, 조사포닌 13.54% 였다.

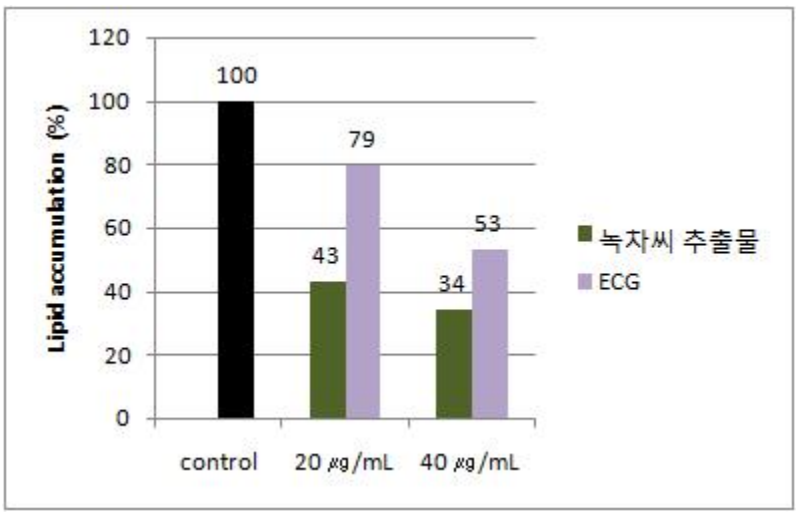


Fig. 19. 녹차씨 압착박 90℃, 1.5 hr 추출물의 Oil red O

항비만 기능성 평가 시, 2차 평가 시와 비슷한 지방축적 억제율을 보이며, ECG (positive control) 동일 농도 처리 시 지방축적 억제율이 현저히 높았다.

마. 녹차씨 압착박 중의 내피 함량에 따른 수율 및 기능성 효능평가

녹차씨를 수확한 후 씨에서 내,외피를 분리하는 과정중에 외피는 완전히 씨에서 분리가 가능하지만 내피는 완전히 녹차씨에서 제거하는게 어려워서 녹차씨 중에 내피를 함유하는 비율을 0%, 5%, 10% 정도로 설정하여 내피의 함유가 최종 녹차씨 압착박 추출물에 미치는 영향을 확인해 보기로 하였다.

이에 내피 함유량 0, 5, 10%의 녹차씨를 압착하여 기름을 제거한 후 얻어진 압착박을 대상으로 상기의 확립된 추출공정에 따라 추출 후 수율 및 기능성 효능평가를 진행하여 내피의 함량에 따른 차이 여부를 확인하였다.

Table 8. 내피함량에 따른 수율 및 조사포닌, 총플라보노이드 함량

내피함량	수율 (%)	조사포닌 함량 (%)	총플라보노이드 (mg/g)
0% 함유	17.92	13.54	1.18
5% 함유	17.34	14.70	1.88
10% 함유	17.50	12.33	1.32

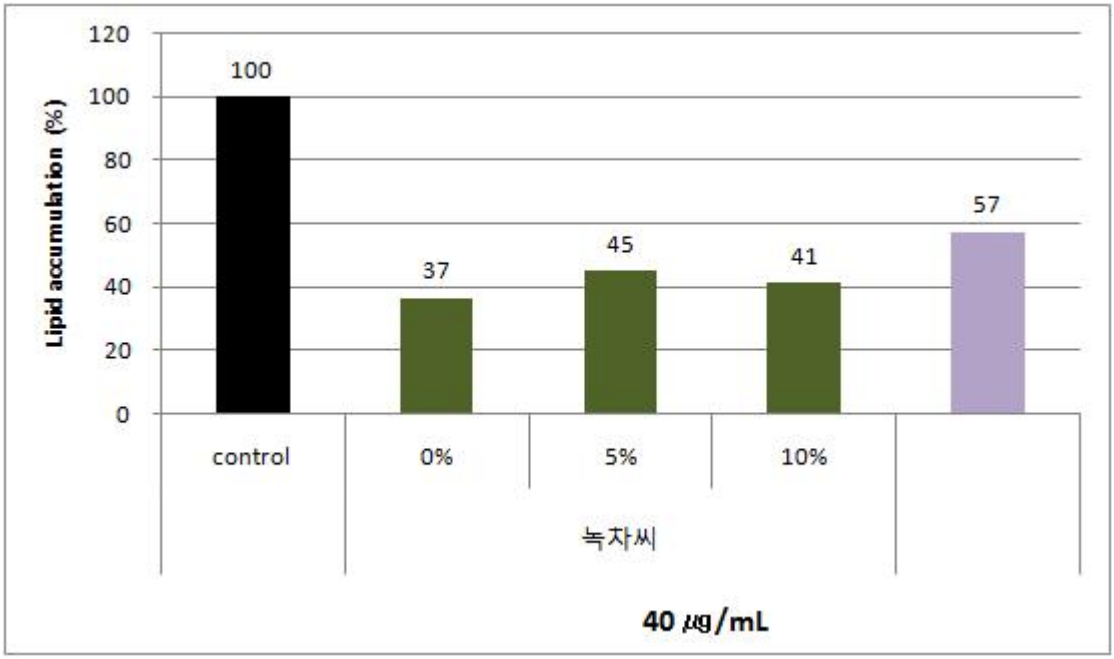


Fig. 20. 내피함량에 따른 각 추출물의 Oil red O (40 μg/mL)

녹차씨 압착박에 함유된 내피의 함량에 따른 차이를 확인하기 위하여 수율 및 기능성 효능평가를 확인해 본 결과, 수율은 내피함량에 따른 차이를 나타내지 않았으며, 5% 내피가 함유되어 있는 경우 조사포닌 및 총플라보노이드 함량이 각각 14.70%, 1.88 mg/g으로 가장 높았다. 기능성 효능 평가에서는 내피의 함량이 적을수록 지방축적 억제율이 높게 나타났으나 10% 정도의 내피가 함유되는 것으로는 녹차 압착 추출물의 수율 및 기능성 효능 부분에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

3. 지표성분 설정 및 시험법 검증

가. 녹차씨 압착박에 함유된 성분에 대한 검색

녹차씨는 녹차나무(*Camellia sinensis*)의 종자로 11월부터 다음해 1월까지 수확할 수 있는데, 녹차씨에는 지용성 비타민, 사포닌, 폴리페놀 및 불포화지방산이 많이 함유되어 항균, 항염증 등의 활성을 갖는다고도 알려져 있다. Hasegawa 등[18]의 연구에 의하면 녹차씨 메탄올 추출물중에 함유된 화합물을 확인해 보면 카페인과 naringenin glycoside가 함유되어 있는 것은 확인되지만, 카테킨은 존재하지 않는다고 보고하였으며, Park 등[19]의 보고에 의하면 녹차씨 추출물 중에서 2종의 kaempferol glycoside를 분리 동정하였으며, 효소가수분해에 의해 kaempferol aglycone을 확인하였다고 하였다. 이처럼 다양한 연구자들의 보고에 의하면 녹차씨 중에는 여러종류의 flavonoid와 카페인이 함유되어 있음을 알 수 있었고, 본 실험에 사용된 녹차씨 중에 이들 화합물이 함유되어져 있는지를 확인해 보고자 하였다.

나. 카테킨 함량 분석

녹차에 다량 함유되어 있다고 알려진 에피갈로카테긴(EGC), 에피카테킨(EC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨 갈레이트(ECG) 4종의 Catechin에 대해 분석을 진행하였다.

- HPLC condition

·Detecter: UV detecter (280 nm)

·Column: SP C_{18} (4.6× 150 mm, 5 um)

·Column Oven: 30 ℃

·Injection vol. 20 μL

·Flow rate: 1.0 mL/min

·Mobile phase: A, H_2O in 0.1% Acetic acid; B, MeCN

min	A (%)	B (%)
0	85	15
10	85	15
15	70	30
20	50	50

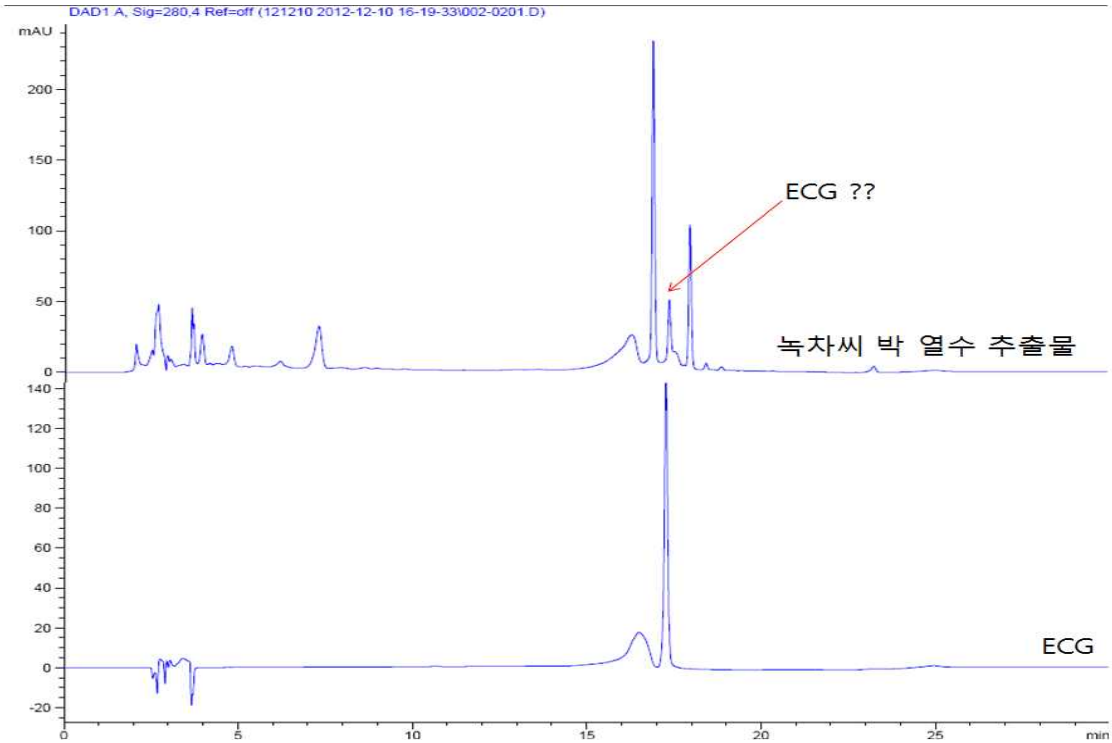


Fig. 21. 녹차씨 압착박 열수 추출물과 EGC chromatogram

분석결과, EGC, EC, EGCG는 녹차씨 압착박 열수 추출물에서 retention time이 일치하는 peak는 확인되지 않았으나,(raw data 미첨부). ECG와 retention time이 일치하는 peak가 확인되어 이 peak (Rt 17.56 min)가 ECG인지를 좀 더 확인해 보기 위해 HPLC분석조건을 달리하여 peak를 분리 후 UV spectrum을 통해 ECG를 재확인 해 보았다.

- 변경한 HPLC condition

·Detecter: UV detecter (280 nm)

·Column: SP C_{18} (4.6× 150 mm, 5 um)

·Column Oven: 30 ℃

·Injection vol. 20 μL

·Flow rate: 1.0 mL/min

·Mobile phase: A, H_2O in 0.1% Acetic acid; B, MeCN

min	A (%)	B (%)
0	85	15
35	30	70
40	30	70
45	0	100

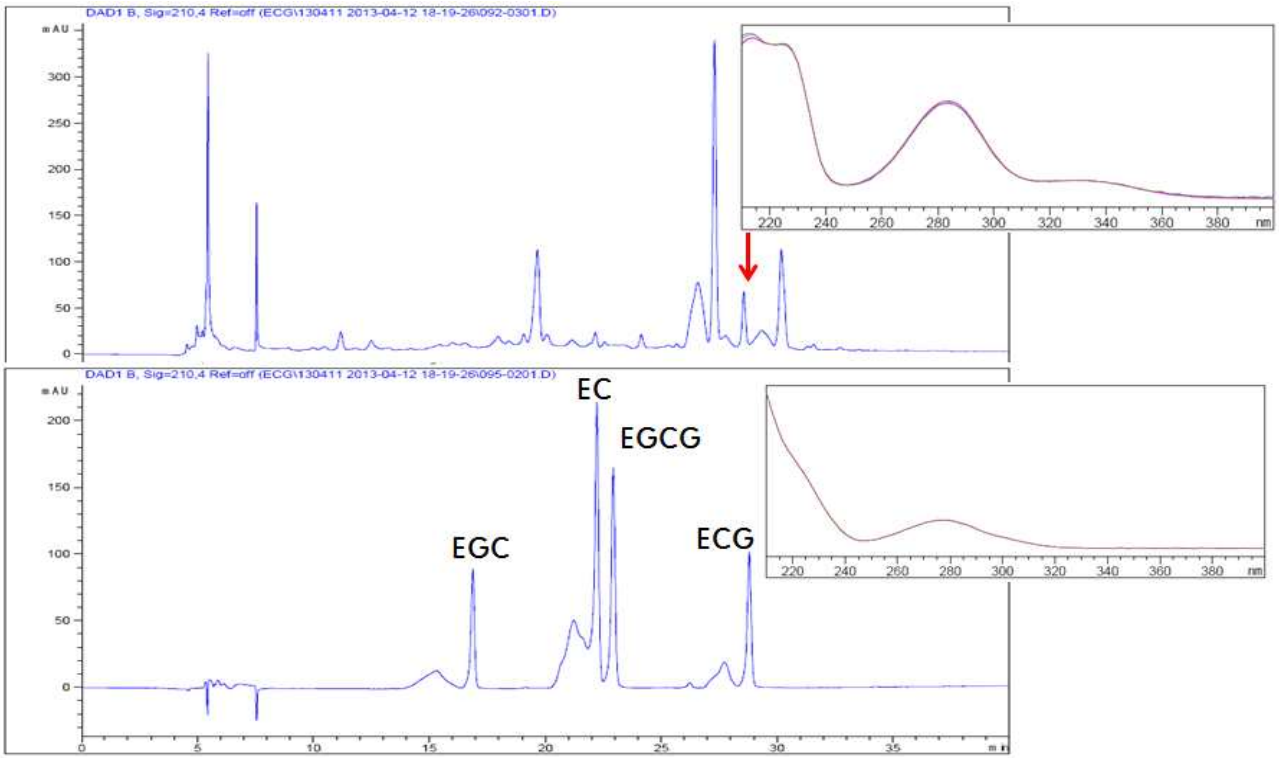
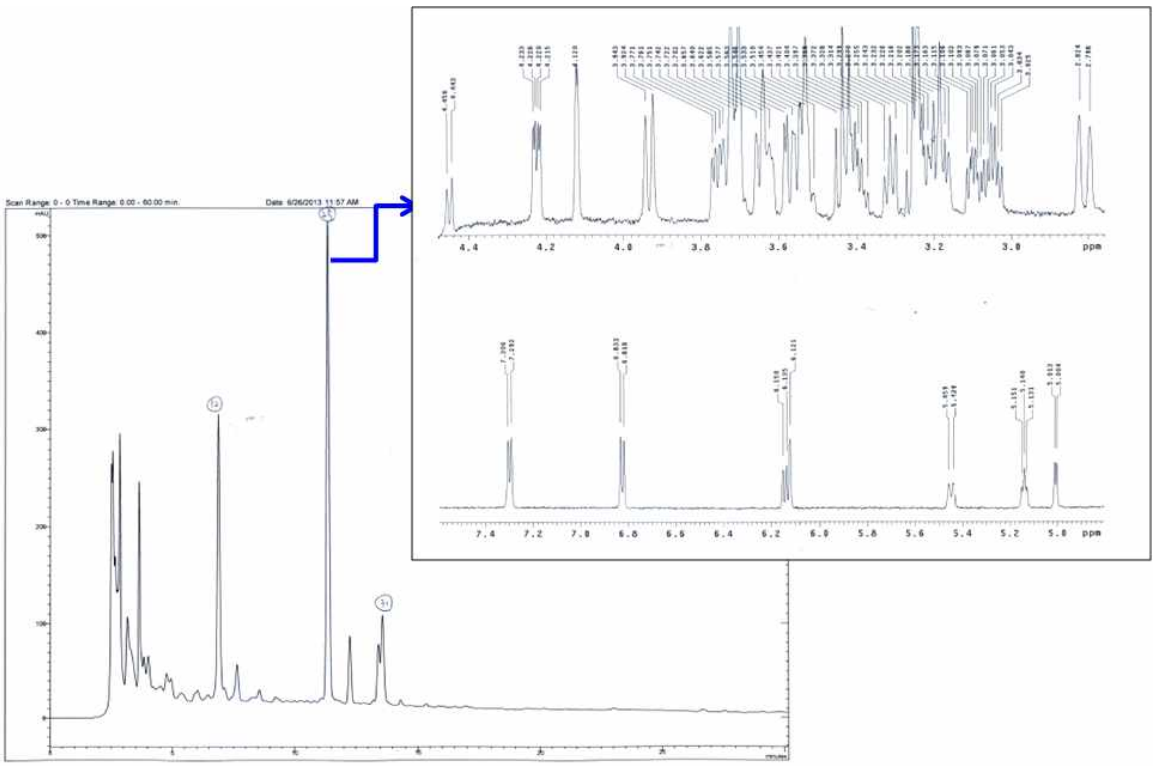
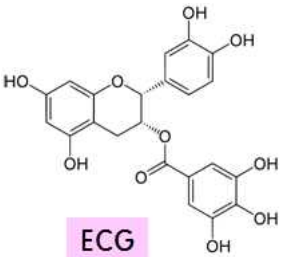
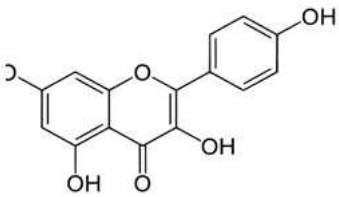


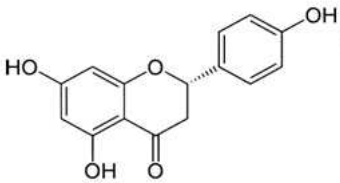
Fig. 22. 녹차씨 압착박 열수 추출물과 Catechin 4종 chromatogram 및 UV spectrum

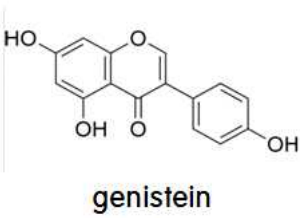
HPLC 분석조건을 변경하여 불순물 peak를 분리 후 UV spectrum을 확인한 결과, retention time은 일치하지만 PDA상에서의 spectrum을 비교해 보면 ECG 표준품과 시료가 220 nm 부근의 흡수영역이 서로 달라 이는 ECG가 아닌 것으로 확인되어 이 화합물에 대한 정확한 정보를 얻기 위해 LC-^{1}H NMR 분석을 실시하였다.











peak No. 25	H 위치	Epicatechin	Kaempferol	naringenin	genistein
6.143 (d, 9.0)	6	5.97 (br. S)	6.19 (d, 2.0)	5.94 (d, 2.04)	6.221 (d, 2.17)
		5.95 (br. S)			
6.121 (br. S, 8.4)	8	6.99 (br. S)	6.43 (d, 2.0)	5.90 (d, 1.80)	6.333 (d, 2.17)
7.29 (d, 8.4)	2'		8.05(2H, d, J=8.3)	7.38 (2H, d, 8.6)	7.36 (d, 8.73)
6.83 (d, 9.0)	3'	6.81 (t, 8.0)	6.95(2H, d, J=8.3)	6.88 (2H, d, 8.26)	6.84 (d, 8.72)
5.449 (d, 12)	5'	6.78 (t, 8.0)	6.95(2H, d, J=8.3)	6.88 (2H, d, 8.26)	6.84 (d, 8.72)
5.0 (d, 5.4)	6'	4.80 (br. S)	8.05(2H, d, J=8.3	7.38 (2H, d, 8.6)	7.36 (d, 8.73)
	2	4.17 (br. S)			8.05 (s)
2.81 (d, 15.6)	3a	2.86 (dd, 4.5, 17.0)		2.69 (d, 17.0)	
	3b	2.75(dd, 2.0, 17.0)		3.40 (dd, 17.0, 13.0)	

그 결과, LC에서의 Rt 11.4분에서 main peak가 확인되어 이 peak에 대한 ^{1}H-NMR을 분석 해 보았더니, δ 6.0 ~ 7.4에 나타나는 signal의 coupling constant 값 및 분열패턴으로부터 flavonoid 계통의 화합물임을 알 수 있었으며, δ 3.0 ~ 4.0에 나타나는 signal의 coupling constant 값 및 분열패턴으로 flavonoid에 당이 결합된 배당체 화합물임을 추측할 수 있었다.

다. Kaempferol 및 Naringenin 분석

녹차씨에 함유된 화합물과 관련된 논문을 검색한 결과, 녹차씨에는 kaempferol에 3개의 당이 결합된 배당체가 다량 함유되어 있다는 Park 등의 보고[20]가 있어 녹차씨 압착박 추출분말을 산, 효소에 의해 가수분해 한 후 화합물을 확인해 보기로 하였다.

(1) 녹차씨 압착밥 추출물의 산 가수분해 실시

녹차씨 압착박 추출물을 5% 황산이 함유된 50% MeOH을 넣어 산가수분해를 실시한 후 가 수분해 시간에 따른 kaempferol 생성여부를 확인하였다.

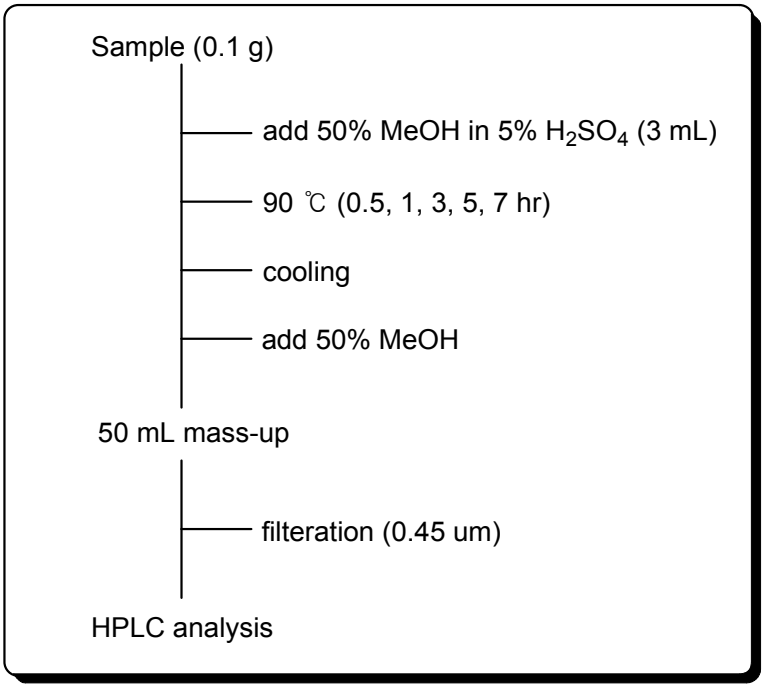


Fig. 23. 녹차씨 압착박 열수 추출물 산가수분해 조건

- HPLC condition

·HPLC: Agilent

·Detecter: UV DAD detecter

·Column: TSK gel ODS-120T (4.6 Φ ×250 mm) column

·Column Oven: 30 ℃

·Injection vol. 20 μL

·Flow rate: 0.7 mL/min

·Mobile phase: A, 0.2% Acetic acid 함유 30% MeOH;

B, 0.2% Acetic acid 함유 70% MeOH

min	A (%)	B (%)
0	100	0
30	0	100
40	0	100

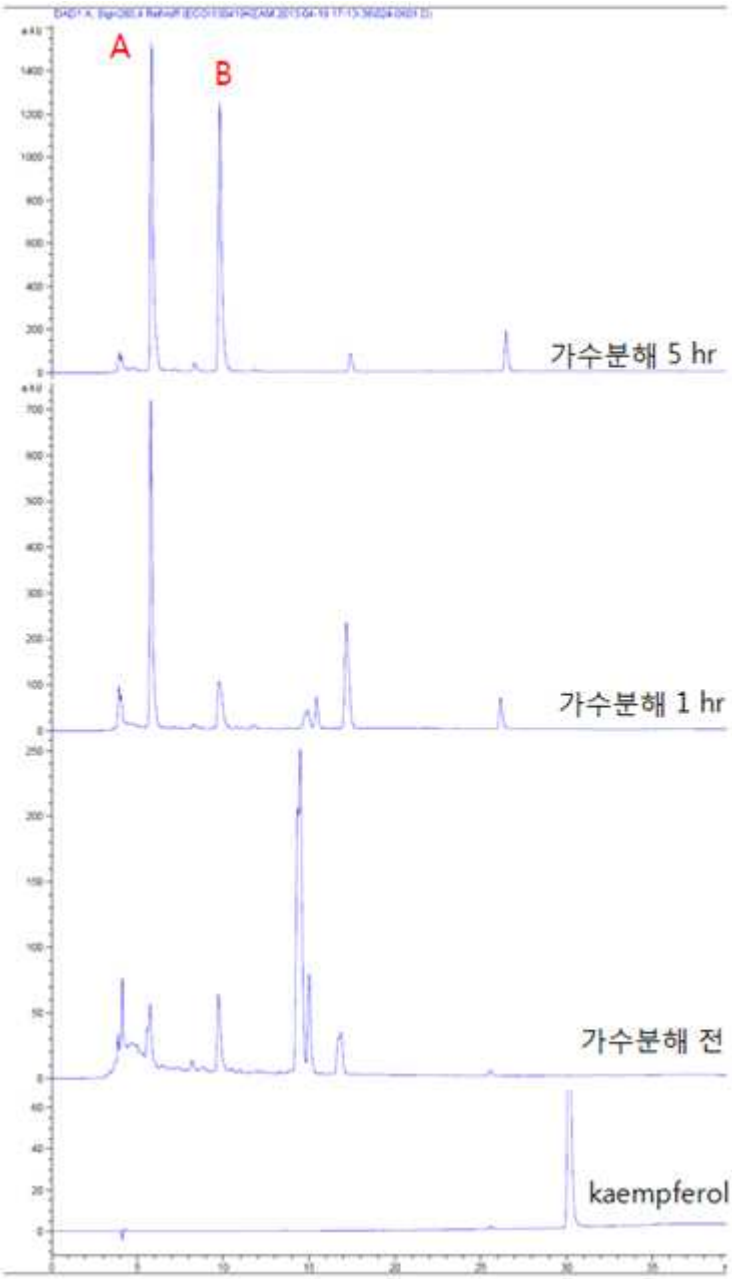
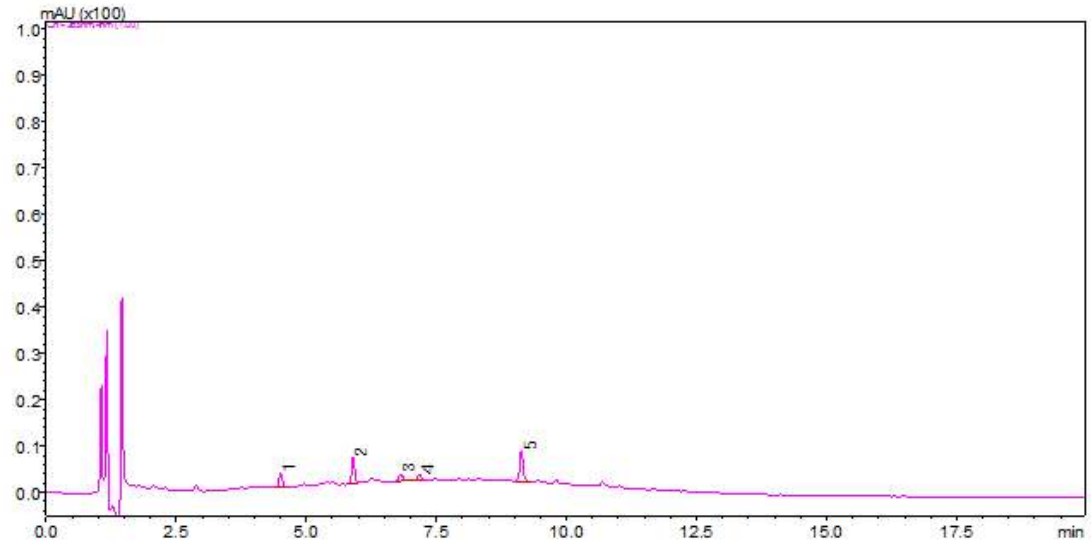
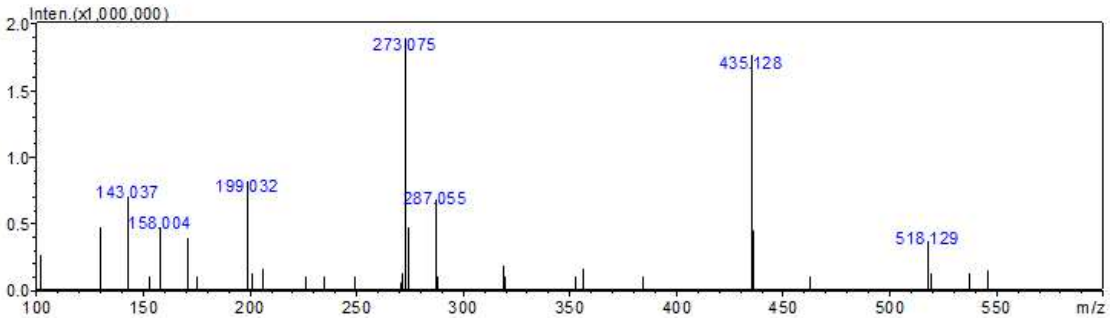


Fig. 24. 산가수분해 시간 경과에 따른 chromatogram

산에 의한 가수분해를 진행하면 Rt 30분 정도의 kaempferol peak가 시료에서 생성이 될 것이라는 예상으로 실험을 산 가수분해를 실시 한 후 가수분해 시간별로 HPLC 분석을 실시하였으나, 예상과 달리 Rt 30분정도에서는 가수분해에 의한 peak가 확인되지 않고, 오히려 Rt 시간이 앞으로 당겨진 A, B 두개의 피크가 확인되었다. 이는 산에 의해 플라보노이드 화합물에 결합된 당 부분이 떨어지는게 아닌 다른 반응이 일어나는 것으로 추측이 되어진다. 이에 이 화합물에 대한 분자량 등을 확인해 보기 위하여 LC-MS 분석을 실시하였다.



Rt 5.8분 peak의 MS 분석 결과



Rt 9.2분 peak의 MS 분석 결과

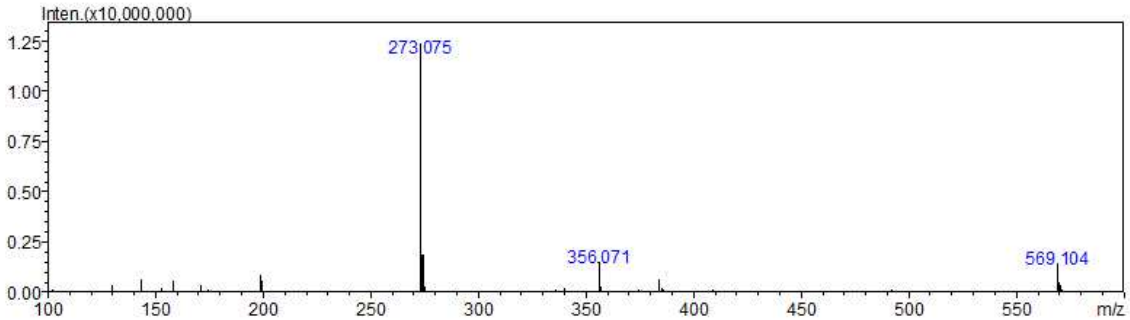


Fig. 25. 지표물질 분석을 위한 LC-MS chromatogram

황산 가수분해 한 화합물의 LC-MS 분석 결과, MS에서 분자량 273 ion peak가 두 개의 HPLC main peak에서 모두 확인되어 아마도 이 녹차씨 압착박 추출분말 중에는 분자량 273인 플라보노이드 화합물(M.W.: 273, naringenin)에 당이 결합된 구조의 화합물이 함유되어져 있을 것으로 추측할 수 있었다.

이에 이들 화합물을 가수분해하여 flavoanoid aglycone 화합물을 확인해 보기 위하여 효소에 의한 가수분해를 실시해 보기로 하였다.

(2) 효소 가수분해에 의한 Kaempferol 분석법 탐색

Park 등은 녹차씨에 함유된 다량의 kaempferol 배당체를 β-galactosidase와 Hesperidinase를 이용하여 가수분해를 실시하면 kaempferol aglycone을 얻을 수 있다고 보고되어져 있어 이들 둘 효소를 이용하여 가수분해를 실시해보았다.

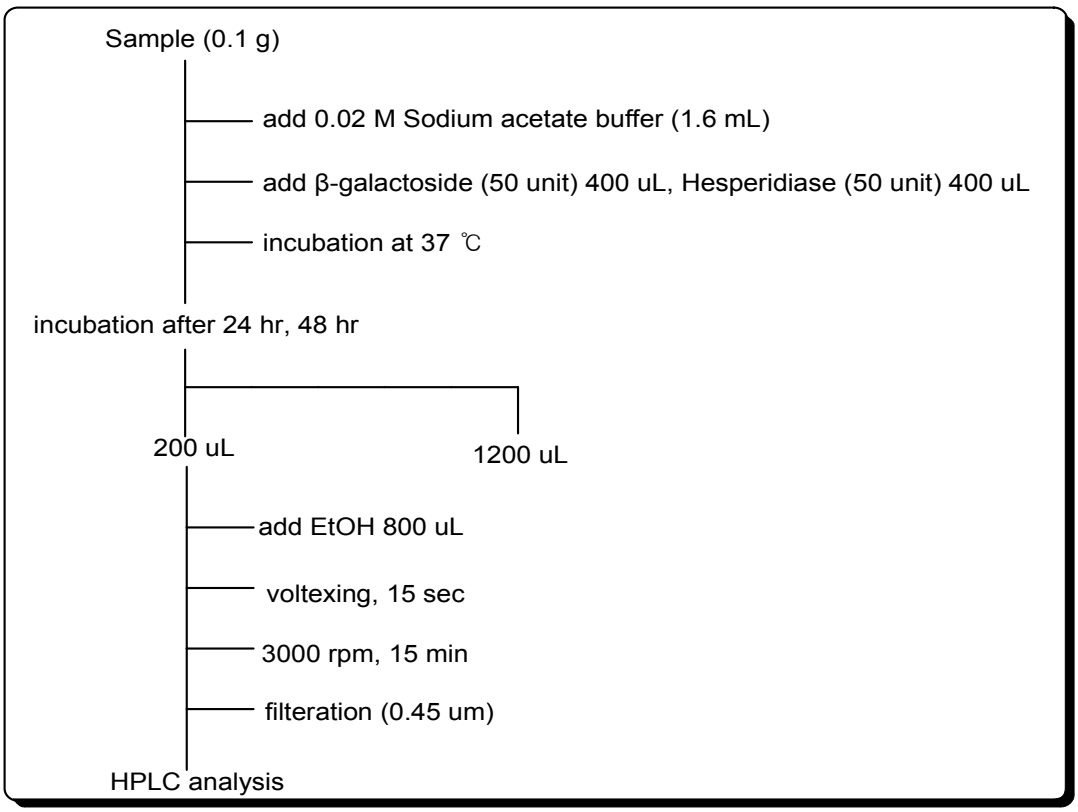


Fig. 26. 녹차씨 압착박 열수 추출물 효소 가수분해 조건

- HPLC condition

·HPLC: Agilent

·Detecter: UV DAD detecter

·Column: SP C18 MG II (5 um, 4.6 Φ × 250 mm) column

·Column Oven: 30 ℃

·Injection vol. 20 μL

·Flow rate: 1.0 mL/min

·Mobile phase: A, H2O; B, 0.2% Acetic acid 함유 70% MeOH

min	A (%)	B (%)
0	85	15
60	20	80

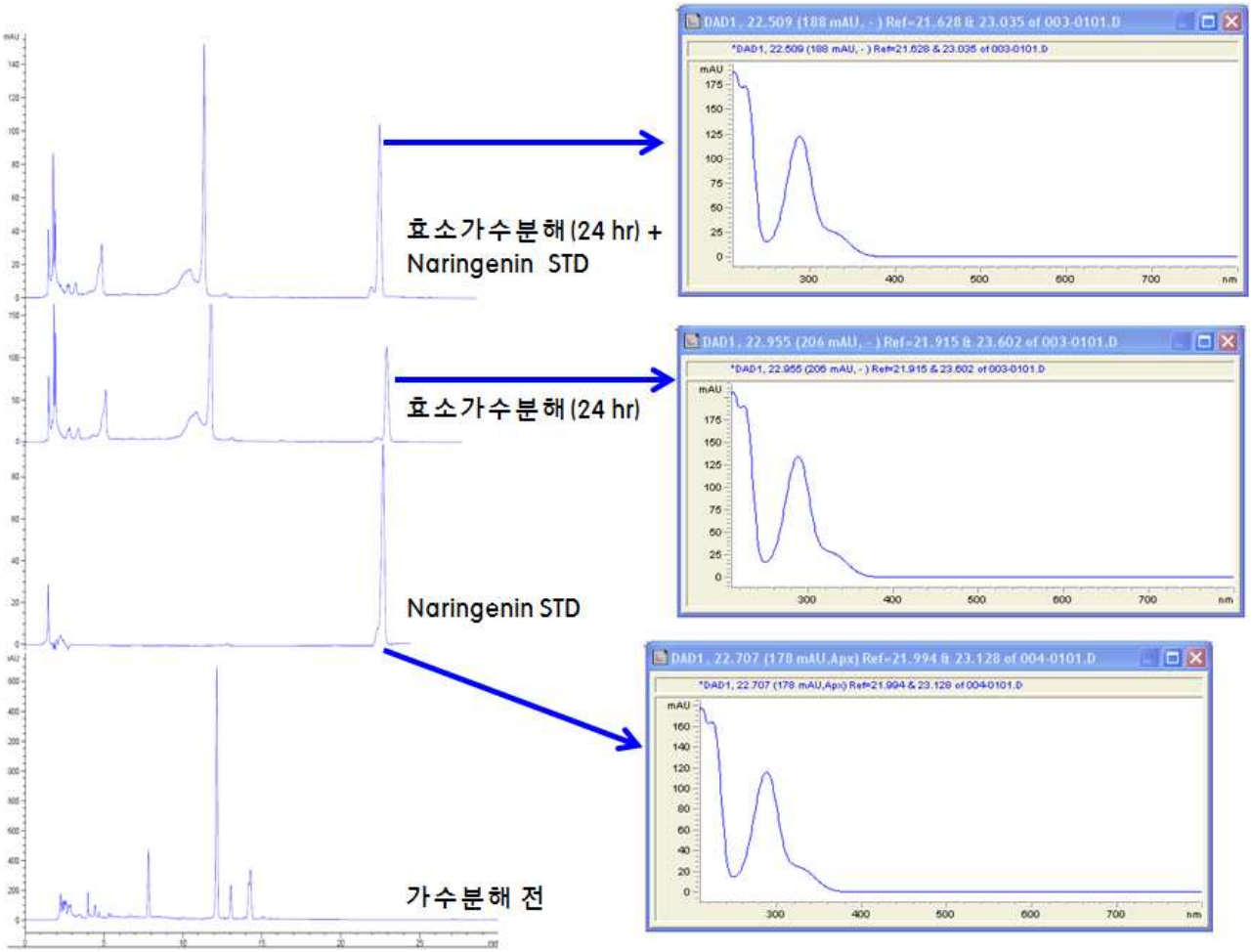


Fig. 27. 녹차씨 압착박 열수 추출물의 효소에 의한 가수분해 시간경과에 따른 화합물의 변화

녹차씨 압착박 열수추출물을 효소로 가수분해 시킨 후 얻어진 화합물이 naringenin인지의 여부를 확인해 보기 위하여 가수분해 후의 시료와 naringenin 표준품을 동일한 HPLC 조건에서 분석 한 결과, retention time과 PDA의 spectrum이 일치하는것을 확인할 수 있었다. 이에 이들 화화합물이 naringenin이 맞는지를 확인해 보기 위하여 LC-MS/MS 분석을 실시해 보았다.

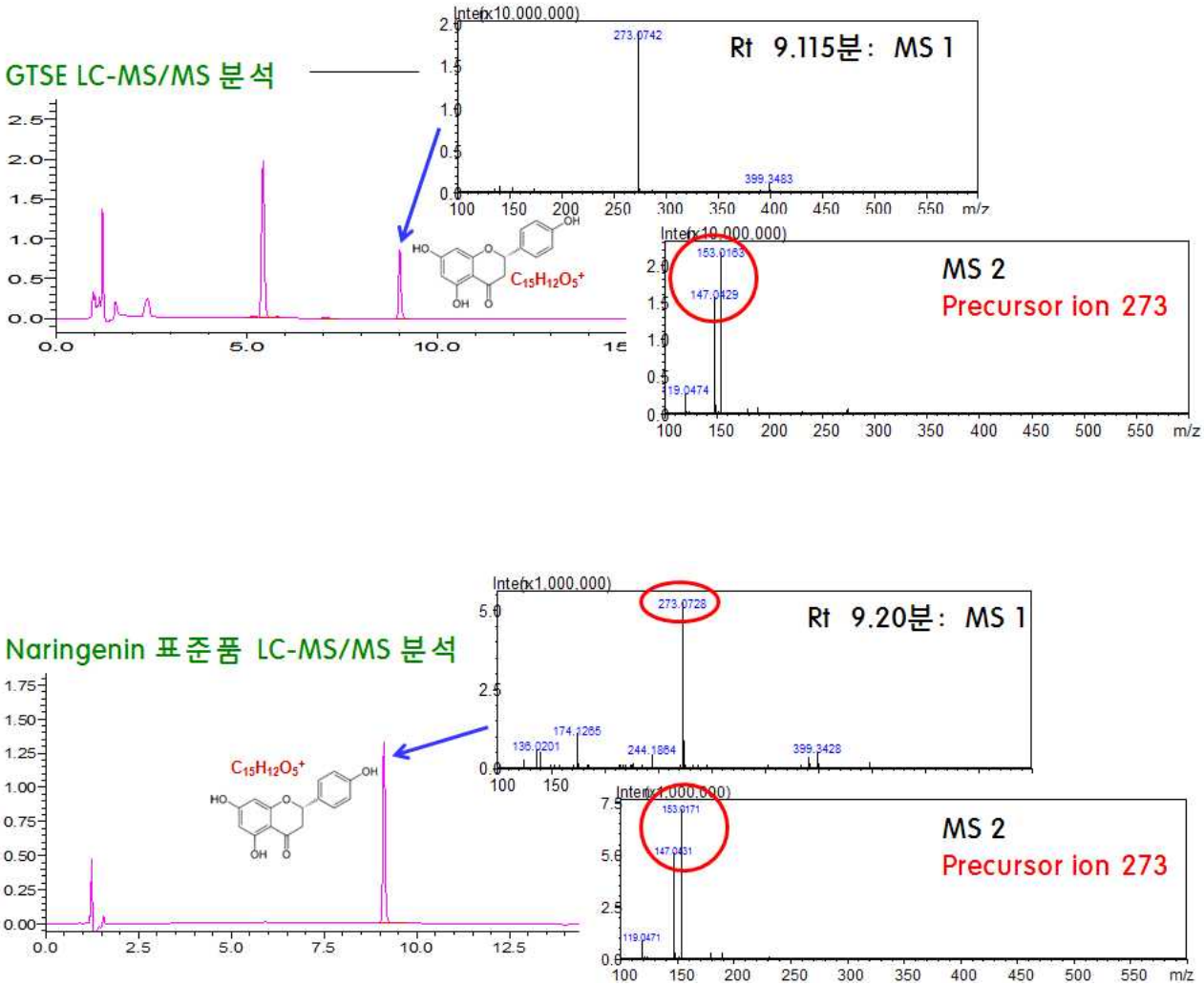


Fig. 28. 지표물질 LC-MS chromatogram

LC-MS/MS 분석 결과, naringenin 표준품과 효소 가수분해한 시료에서의 HPLC retentime, MS에서의 분자량 273과 fragment ion인 153, 147이 모두 완벽하게 일치되는것이 확인되어 효소가수분해 후 얻어지는 화합물은 naringenin인 것으로 확인되어, 녹차씨 압착박 추출물은 효소에 의한 가수분해를 실시하여 얻어지는 naringenin을 지표성분으로 설정하였다.

라. 나린제닌에 대한 시험법 검증

(1) 녹차씨 추출물 분말 중 Naringenin 함량을 확인하기 위하여 분석법의 유효성을 검증하였다. 설정된 방법으로 분석법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

Table 9. 녹차씨 추출분말 중 Naringenin 시험법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	- HPLC 분석 시 검출시간 (Retention time), spectrum, peak purity 검토 - HPLC/MS/MS를 분석을 통한 Naringenin의 확인	o 검출시간 : 약 30~32 분 o spectrum : $\lambda_{max.}$ 약 280 nm 표준용액과 시험용액 일치 o peak purity : 시험용액 중 Naringenin peak가 5 points일치, 단일물질로 확인됨 o LC MS/MS: TIC에서 동일한 시간대 peak 확인. Precursor ion (273 $[M-H]^+$ m/z) 및 product ion (153 $[M-H]^+$ m/z) 일치
직선성 (Linearity)	- 표준물질에 대한 4개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 35~250%에서 확인 (9.557~76.456 mg/L) o R^2 : 1.0000
	- 시료에 대한 4개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 50~150%에서 확인 o R^2 : 0.9919~0.9950
정밀성 (Precision)	- 3일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	o 실험실내 정밀성 함량 – 5.5579 mg/g RSD(%) - 4.58% o 반복정밀성 함량 – 5.3046~5.8138mg/g RSD(%) - 0.58~0.97%
정확성 (Accuracy)	- 시료 중 3개 농도로 표준물질 첨가하여 회수율 검토	o 검출된 표준물질 농도: 60 ug/ml 회수율: 99.37~105.29% RSD(%): 0.58~2.77%
범위 (Range)	- 직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	o 시험용액 4.45~6.67 ug/mL

(가) 분석방법

① 분석장비

◦HPLC system Agilent 1100 series, Agilent, USA
Quat Pump G1311A, Autosampler G1329,
Column Oven G1316A, Degasser G1322A

Agilent 1200 series, Agilent, USA
Quat Pump G1311A, Autosampler G1329,
Column Oven G1316A, Degasser G1322A

◦Shaking Incubator FH0103, DAIHAN Lab Tech CO., Korea

② 시약

㉮ Naringenin std.: Sigma, N5893, 95%

㉯ 일반시약

- Novozym® 33095: Novozymes
- Pectinex® Ultra SP-L: Novozymes
- Acetate buffer (pH 5.0)
- Ethanol: B&J, 4L, AH230-4
- Acetonitrile: B&J, 4L, AH015-4
- Trifluoroacetic acid (TFA): Samchun, 100 mL

③ 표준용액의 조제

◦표준물질 Naringenin 10 mg을 정밀히 달아 MeOH 10 mL (1000 ug/mL)에 녹인 후 1 mL 씩 분주하여 냉동보관 된 것을 사용함.

◦이를 MeOH로 희석하여 working solution으로 사용함.

④ 시험용액의 전처리

◦녹차씨 추출물 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 Acetate buffer(pH 5) 2 mL, novozym® 33095 1 mL, Pectinex® Ultra SP-L 1 mL를 첨가하여 Incubator(37℃, 150 rpm)에서 24시간 동안 효소 가수분해를 진행함.

◦가수분해가 종료된 용액 200 μL를 Ethanol 800 μL와 혼합하고 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 10 min)한 후 여액을 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 함.

⑤ 분석조건

- Instrument: HPLC system
- Detecter: UV detector DAD (280 nm)
- Column: Atlantis C_{18} (4.6 mm×150 mm, 3 ㎛), Waters, USA
- Column Oven: 30 ℃
- Injection vol.: 20 ㎕
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 10% MeCN in 0.1% TFA; B, 50% MeCN in 0.1% TFA

min	A (%)	B (%)
0	80	20
60	20	80

⑥ 계산

$$\text{Naringenin (mg/g)} = \text{시험용액 농도 (ug/mL)} \times \frac{1/0.2\ (\text{mL})}{\text{시료 (g)}} \times \text{Volume (mL)} \times \frac{1}{1000}$$

(나) 시험법 검증 (Method Validation) 결과

① 특이성(Specificity)

㉮ 녹차씨 추출물 중 Naringenin의 retention time과 peak 분리도 확인

◦Naringenin 표준물질과 녹차씨 추출물을 효소가수분해 전, 후로 전처리 하여 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak를 확인함

◦표준용액과 효소가수분해를 진행한 시험용액에서 약 30분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인함.

◦시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인함.

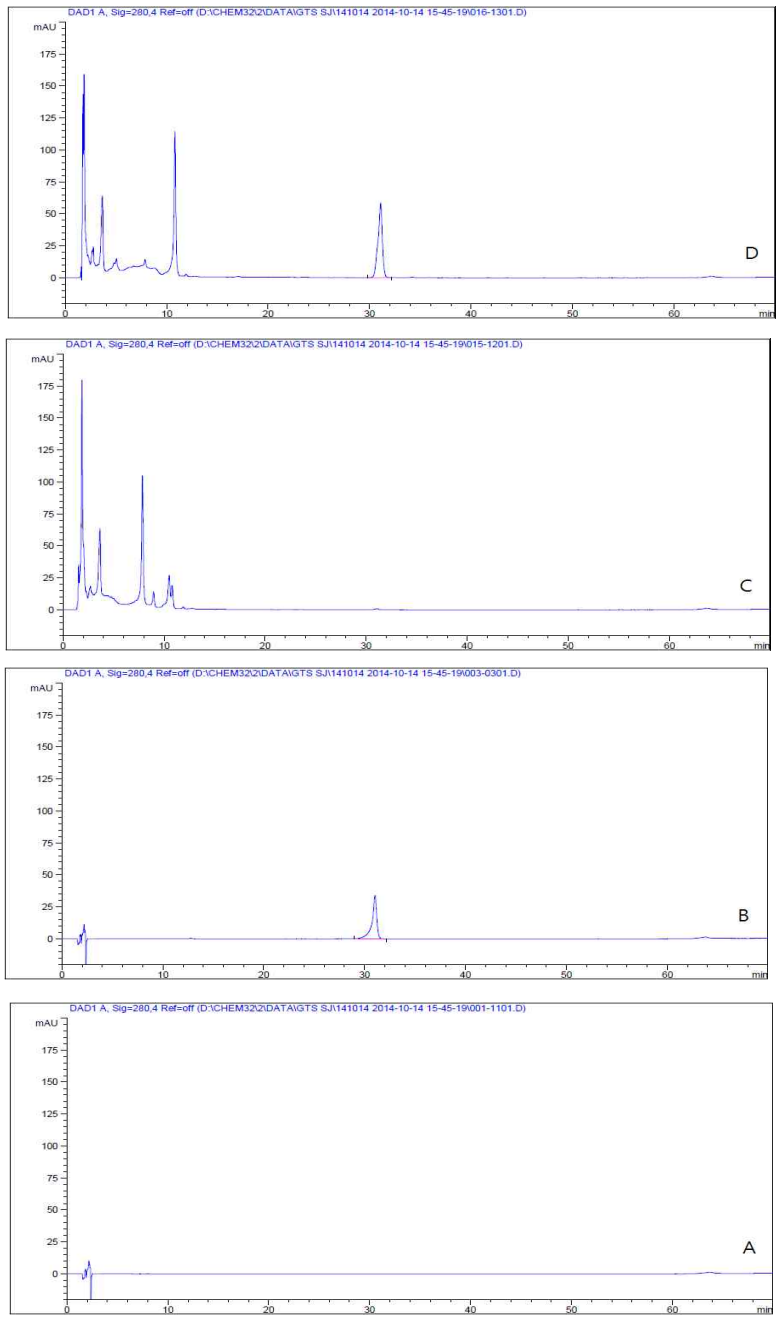


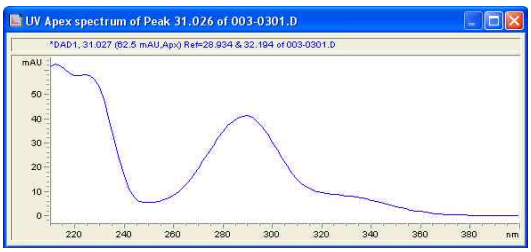
Fig. 29. 표준용액과 효소가수분해 전, 후 시험용액 중의 Naringenin의 Chromatogram
(A; Blank, B; Naringenin 표준용액, C; 효소가수분해 전 시험용액, D; 효소가수분해 후 시험용액)

㉯ 녹차씨 추출물 중 Naringenin의 spectrum과 peak purity 확인

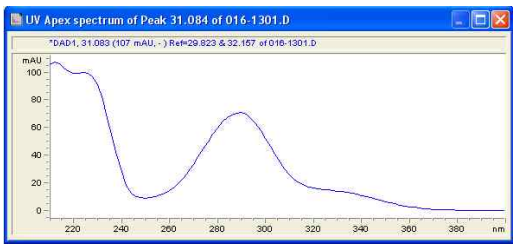
◦시험용액 중 검출된 Chromatogram이 표준용액인 Naringenin과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인함.

◦약 30분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 280 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인함.

◦시험용액의 Naringenin peak의 purity를 확인하기위하여 peak의 5 point spectrum이 모두 일치하여 Naringenin 단일물질임을 확인함.



[Naringenin]



[녹차씨 추출물 시험용액]

Fig. 30. Naringenin과 녹차씨 추출물 시험용액 UV spectrum

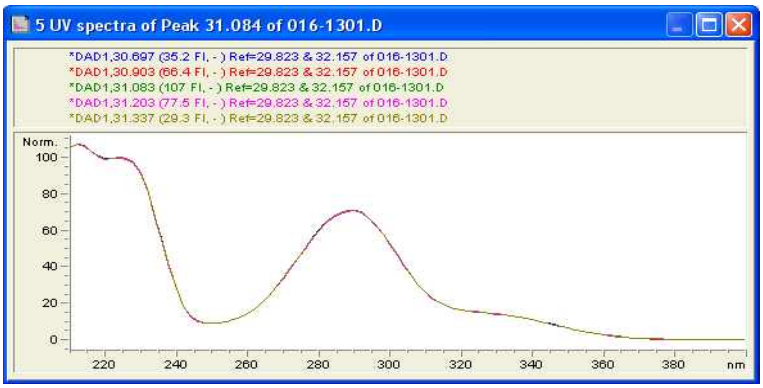


Fig. 31. peak purity test; 시험용액 중 Naringenin peak 각 5점 spectrum분석

㉰ LC/MS-MS를 이용한 녹차씨 추출물 중의 Naringenin 화합물 확인

◦녹차씨 추출물 중 Naringenin을 확인하기 위하여 LC/MS-MS에 적절한 분석조건을 설정하고, 표준용액과 시험용액 중의 Naringenin를 확인함.

① 실험방법

㉮. 시약 및 시액

㉠ Naringenin 표준품: Sigma, N5893, 95%

㉡ Acetonitrile: B&J, 4L, AH015-4

㉢ Formic acid(FA): Junsei, 1 kg

㉣ 3차 증류수

㉯. 표준용액의 제조

- Naringenin 표준품 5 mg을 정밀하게 달아 이를 MeOH 50 mL에 녹인 후 이를 stock solution으로 하여 사용 농도에 맞게 MeOH로 희석하여 표준액으로 함.

㉰ 시험용액의 제조

◦녹차씨 추출물 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 Acetate buffer(pH 5) 2mL, novozym® 33095 1 mL, Pectinex® Ultra SP-L 1 mL를 첨가하여 Incubator(37℃, 150 rpm)에서 24시간 동안 효소 가수분해를 진행함.

◦가수분해가 종료된 용액 200 μL를 Ethanol 800 μL와 혼합하고 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 10min)한 후 여액을 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 함.

㉱ 분석방법

◦Manual tuning mode에서 분석대상물질의 m/z $[M-H]^+$ 에 해당하는 peak를 확인한 후, 분석을 최적화(quantitative optimization) 과정을 수행하여 모분자(precursor ion/parent ion) 및 딸분자(product ion/daughter ion)를 확인함

㉲ LC/MS/MS 조건

- Instrument: SHIMADZU LC-20A series
- Detecter: UV detector (370 nm)
- Column: Shim-pack XR-ODS(2.2 um), 2.0×100 mm, SHIMADZU
- Column Oven: 50 ℃
- Injection vol.: 2 μL
- Flow rate: 0.25 mL/min
- Mobile phase: A, H_2O in 0.1% FA; B, MeCN in 0.1% FA

min	A (%)	B (%)
0	95	5
5	95	5
10	85	15
20	20	80
22	5	95
27	5	95

㉥ Mass 조건

- LC/MS: LC/MS-IT-TOF (hydrid MS)
- Ionization type: ESI/prove voltage (4.5 kV)
- MS range: 150~1,500 m/z
- N_2 gas flow: 1.5 L/min
- CDL temp.: 200℃
- Event time: 100 msec/repeat-1
- Ion accumulation: 20 msac

② 실험결과

◦녹차씨 추출물 중 Naringenin을 확인하기 위하여 LC/MS/MS을 이용하여 분석함..

◦ LC/MS/MS 분석 결과, 표준용액과 시험용액에서 TIC에서 동일한 retention time에서의 peak를 확인하였고, precursor ion (273 $[M+H]^+$ m/z) 및 product ion (119 $[M-C_8H_6O]^+$ m/z, 153 $[M-C_7H_4O_4]^+$ m/z)이 유사한 값을 가지므로 표준용액과 녹차씨 추출물 중의 Naringenin이 동일 성분임을 확인 할 수 있었으며, 녹차씨 추출물 중 Naringenin이 함유되어 있음을 확인함.

Table 10. Naringenin 분석을 위한 Retention time, Precursor ion 및 Product ion

Compound	RT (min)	MW	Precursor ion (MS, m/z)	Product ion (MS^2 m/z)
Naringenin	9.0~9.2	272.27	273.074 $[M+H]^+$	119, 153

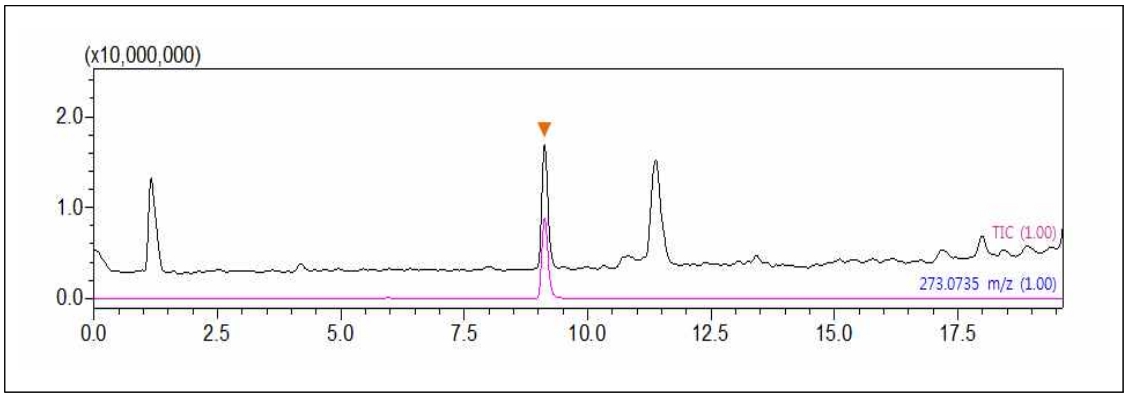


Fig. 32. Naringenin 표준용액 chromatogram 및 TIC

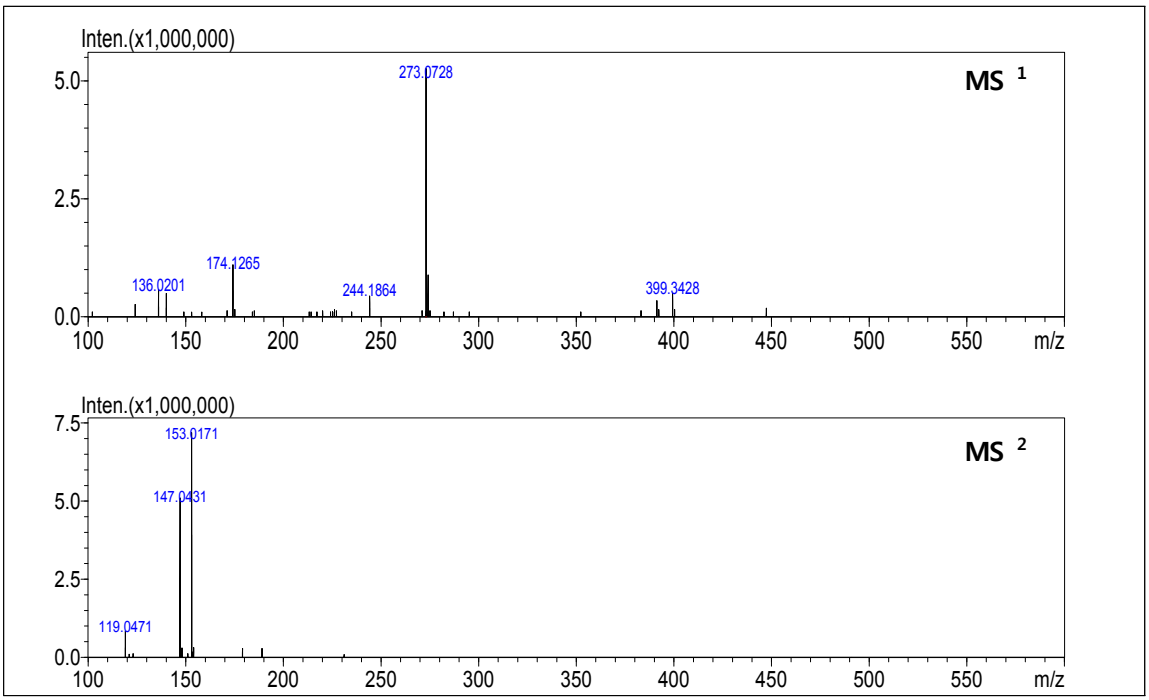


Fig. 33. Naringenin 표준용액 질량 스펙트럼

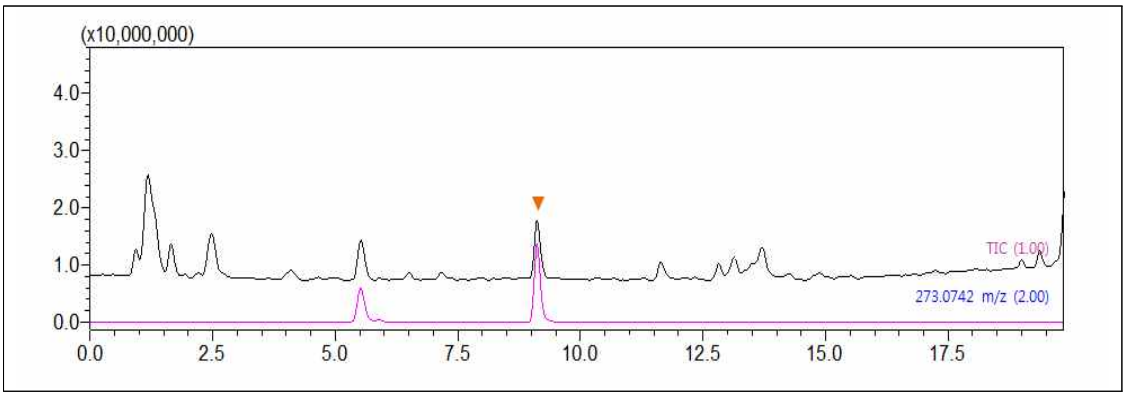


Fig. 34. 녹차씨 추출물 chromatogram 및 TIC

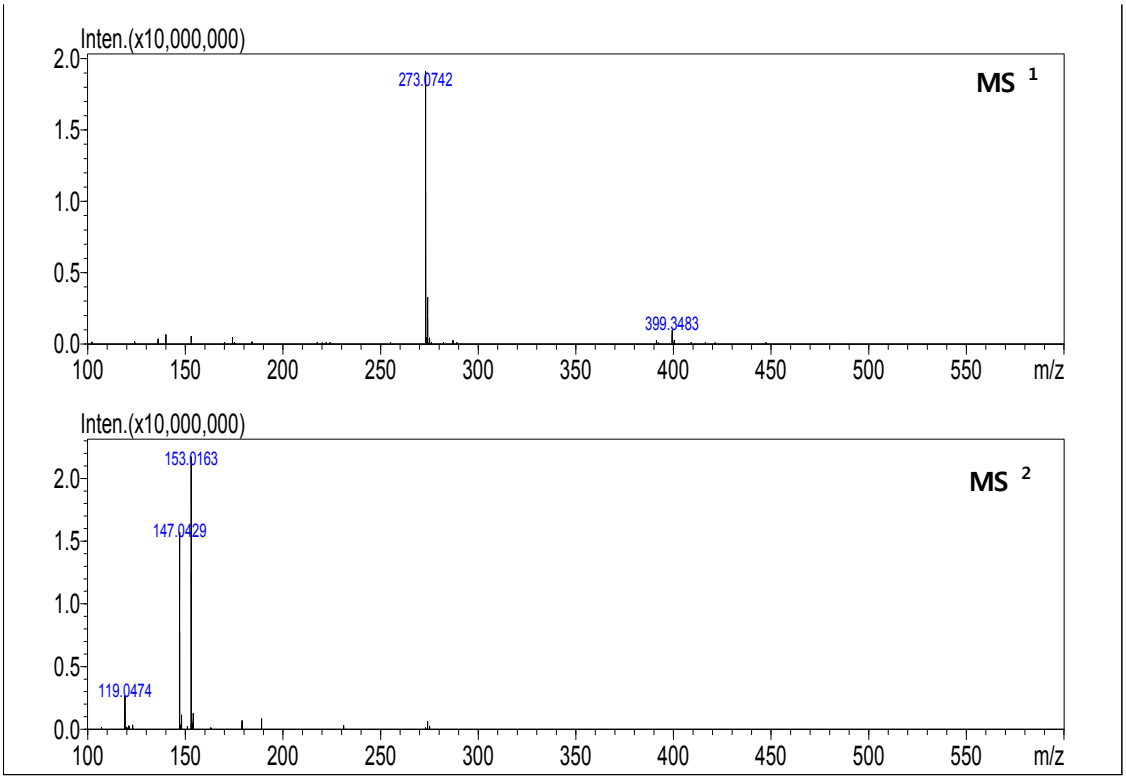


Fig. 35. 녹차씨 추출물 질량 스펙트럼

(2) 직선성 (Linearity)

(가) 표준물질에 대한 직선성

◦표준물질을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. Naringenin의 검출농도 약 28 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 35~280% 범위에서 3회 반복 평가함.

◦분석결과 농도별로 직선성을 확인되었으며, 기울기 값은 -48.0519~21.8284, R^2는1.000 으로 나타났다.

Table 11. Naringenin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

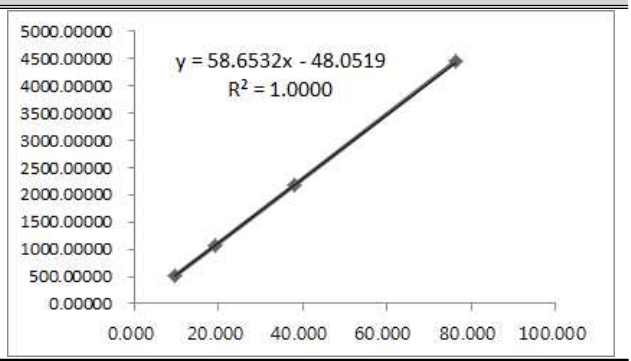
농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
35	9.557	522.43121	
70	19.114	1071.37927	
140	38.228	2179.25610	
280	76.456	4442.95459	
기울기	58.6532		
y 절편	-48.0519		
R2	1.0000		

Table 12. Naringenin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

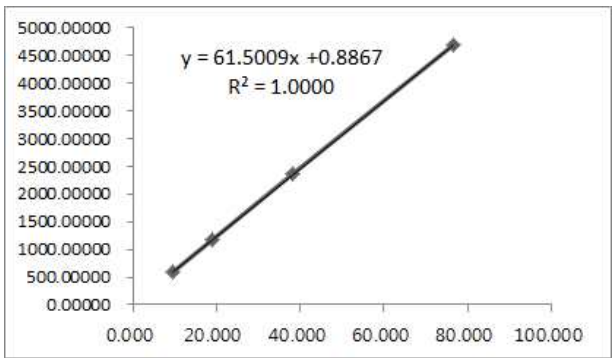
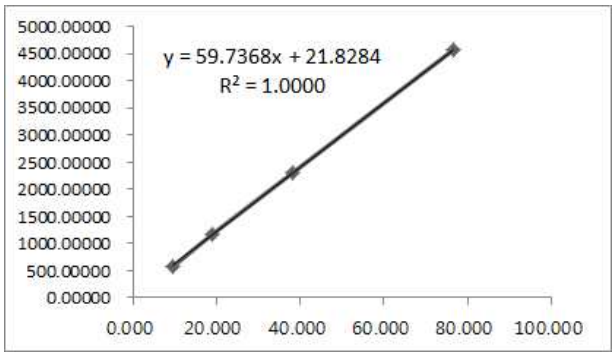
농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
35	9.557	584.26044	
70	19.114	1180.42065	
140	38.228	2353.61719	
280	76.456	4701.70947	
기울기	61.5009		
y 절편	0.8867		
R2	1.0000		

Table 13. Naringenin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
35	9.557	581.24915	
70	19.114	1171.01672	
140	38.228	2314.47461	
280	76.456	4584.14160	
기울기	59.7368		
y 절편	21.8284		
R2	1.0000		

(나) 시료에 대한 직선성

◦녹차씨 추출물을 중량별로 측정하여 전처리한 후 시료에 대한 직선성을 평가함

◦녹차씨 추출물 100 mg을 취해 Acetate buffer(pH 5.0) 2mL, novozym® 33095 1mL, Pectinex® Ultra SP-L 1mL를 넣고 24시간 효소반응 한 시험용액의 검출 농도 28 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 50~150% 범위에서 평가한 결과 농도별로 직선성을 확인함.

◦기울기 값은 10.1243~10.6276, R^2는 0.9919~0.9950으로 나타남.

Table 14. 녹차씨 추출물을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

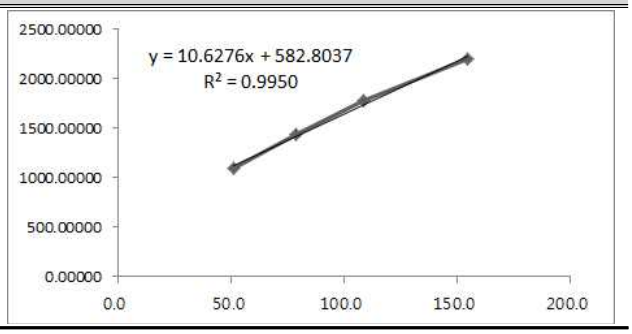
농도 (%)	녹차씨 추출물 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
50	51.2	1095.72961	
75	78.7	1439.86230	
100	108.8	1775.27637	
150	154.6	2200.16357	
기울기	10.6276		
y 절편	582.8037		
R^2	0.9950		

Table 15. 녹차씨 추출물을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

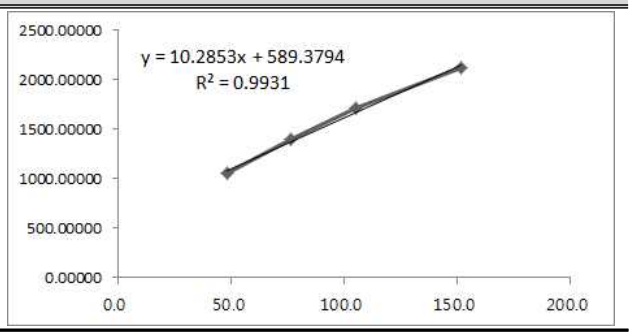
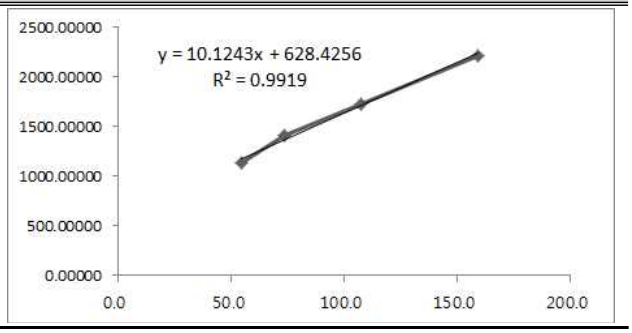
농도 (%)	녹차씨 추출물 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
50	48.5	1051.55457	
75	76.5	1403.67773	
100	105.3	1709.62585	
150	151.4	2118.56665	
기울기	10.2853		
y 절편	589.3794		
R2	0.9931		

Table 16. 녹차씨 추출물을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도 (%)	녹차씨 추출물 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
50	54.5	1131.77795	
75	73.3	1416.92310	
100	107.2	1734.70264	
150	159.0	2219.28467	
기울기	10.1243		
y 절편	628.4256		
R2	0.9919		

(3) 정밀성(Precision)

(가) 실험실내 정밀성 (Intermediate precision)

◦녹차씨 추출물 중 Naringenin 함량 분석 정밀성 시험을 위해 분석자와 분석 일자 및 분석 장비를 달리하여 분석을 진행하였으며, 결과는 시료를 6회 반복 전 처리한 후 실험하여 측정치를 비교하였고, 3일간 두 명의 시험자가 실험을 진행함.

◦분석결과 Naringenin 함량은 평균 5.5579 mg/g, 표준편차(SD) 0.2546 mg/g, 상대표준편차(RSD)는 4.58%로 나타났음.

Table 17. 분석일자, 분석자간의 Naringenin 함량

	일자	분석자	분석 장비	Naringenin 함량(mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	2014.09.17	A	Agilent 1100	5.5552	5.5579	0.2546	4.58
2	2014.09.23	B	Agilent 1100	5.8138			
3	2014.09.30	B	Agilent 1200	5.3046			

(나) 반복 정밀성 (Repeatability, Intra-assay precision)

◦녹차씨 추출물 중 Naringenin 함량 분석의 반복 정밀성을 확인하기 위해 한번 진행시 각각 6번의 전처리하여 분석을 진행함.

◦일자를 달리하여 측정한 결과 2.9612~3.3448 mg/g범위로 검출되었으며, 각 일자에서의 함량은 평균 5.3046~5.8138 mg/g, 표준편차(SD) 0.0335~0.0522 mg/g, 상대표준편차(RSD) 0.58~0.97 %로 분석됨.

Table 18. 분석일 9월 17일, 분석자 A, Agilent 1100 series

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Naringenin 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	0.1035	1,677.40100	28.5193	5.5110	5.5552	0.0522	0.94
2	0.1013	1,662.72937	28.2716	5.5818			
3	0.1006	1,661.44751	28.2499	5.6163			
4	0.1039	1,685.43604	28.6549	5.5159			
5	0.1019	1,680.06909	28.5643	5.6063			
6	0.1046	1,691.90125	28.7641	5.4998			

Table 19. 분석일 9월 23일, 분석자 B, Agilent 1100 series

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Naringenin 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	0.1005	1664.64905	29.2005	5.8110	5.8138	0.0335	0.58
2	0.1010	1689.13989	29.6180	5.8650			
3	0.1034	1,708.71326	29.9517	5.7934			
4	0.1017	1,691.73572	29.6623	5.8333			
5	0.1046	1,720.98059	30.1609	5.7669			
6	0.1015	1,682.38782	29.5029	5.8134			

Table 20. 분석일 9월 30일, 분석자 B, Agilent 1200 series

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Naringenin 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	0.1008	1,625.7714	26.8502	5.3274	5.3046	0.0513	0.97
2	0.1027	1,627.7357	26.8831	5.2353			
3	0.1010	1,637.3882	27.0446	5.3554			
4	0.1009	1,612.2518	26.6238	5.2773			
5	0.1040	1,658.8837	27.4045	5.2701			
6	0.1015	1,647.4198	27.2126	5.3621			

(4) 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

◦녹차씨 추출물 중 Naringenin의 정확성을 측정하기 위해 녹차씨 추출물(naringenin 5.56 mg/녹차씨 추출물 1 g; 정밀성 실험 결과)에 일정 농도의 표준용액을 첨가하여 표준용액 회수율을 구함으로써 정확성을 확인하고자 함.

◦즉, 녹차씨 추출물 각각을 60, 80, 100 mg씩 취한 후 naringenin 표준품을 0.06 mg씩 첨가한 후 동일한 방법으로 전처리하여 최종 반응액중의 naringenin 함량을 정량분석하여 회수율을 확인함으로써 분석의 정확성을 검증하고자 함.

◦ 상기의 실험을 농도별로 3회 반복하여 실시한 결과, 회수율 99.37~105.29%정도임이 확인되어 정확성이 검증됨.

Table 21. 녹차씨 추출물 정확성 및 회수율

이름	시료 수	검체 무게 (g)	Naringenin의 양			시험용액의 분석농도(ug/mL)		회수율 (%)
			sample유래 Naringenin		표준품 유래	기대치	실험치	
			mg/4mL	mg/0.2mL				
정확성 1	1	0.0611	0.3397	0.016986	0.06	76.99	81.06	105.29
	2	0.0625	0.3475	0.017375	0.06	77.38	77.79	100.54
	3	0.0638	0.3547	0.017736	0.06	77.74	77.93	100.25
정확성 2	1	0.0817	0.4543	0.022713	0.06	82.71	82.42	99.65
	2	0.0818	0.4548	0.022740	0.06	82.74	82.53	99.75
	3	0.0840	0.4670	0.023352	0.06	83.35	82.33	98.77
정확성 3	1	0.1065	0.5921	0.029607	0.06	89.61	88.22	98.45
	2	0.1024	0.5693	0.028467	0.06	88.47	87.91	99.37
	3	0.1028	0.5716	0.028578	0.06	88.58	88.15	99.51

(5) 범위(range)

◦녹차씨 추출물 중 Naringenin 함량을 정량하기 위한 분석법의 정량 범위는 직선성과 정밀도, 정확성을 고려하여, 22.4~33.6 μg/mL의 범위로 설정함.

◦이 농도는 녹차씨 추출물 0.1 g을 취하여 전처리 후 naringenin 힘량을 정량분석 하는 경우, 녹차씨 추출물의 Naringenin의 농도가 **4.45~6.67 mg/g**인 검체에 대해서 정확하고 정밀한 Naringenin 정량이 가능함을 확인함

4. 녹차씨앗 유효 성분분석

가. TLC에 의한 녹차씨앗 성분분석

녹차씨앗을 분취하여 TLC를 수행하였을 때 많은 량의 saponin을 함유함을 알 수 있었고, 이를 동정하였으며 구조를 밝힐 예정이다.

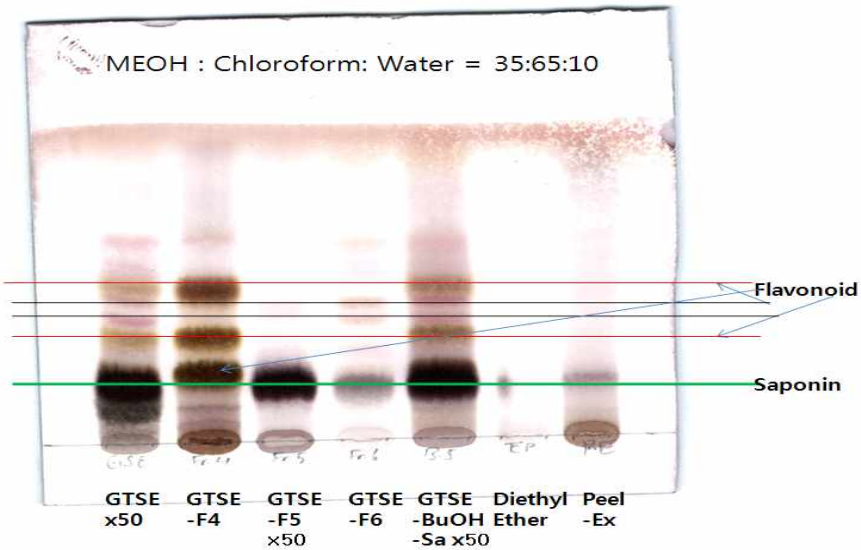


Fig. 36. 녹차씨앗추출물의 분취 후 수행된 TLC

분취 분액에 따라도 saponin이 들어 있는 것을 확인하였다. 또한, 순수 saponin만을 취할 수 있는 방법에 대해서도 연구하였다.

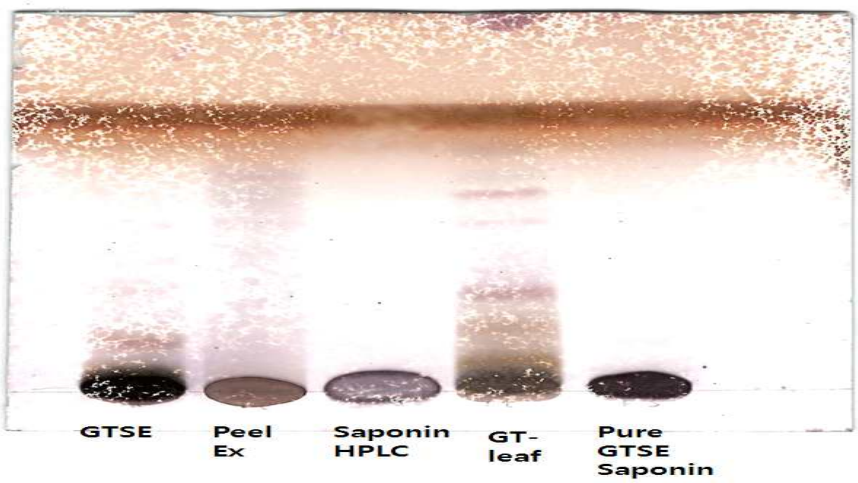


Fig. 37. 녹차관련 추출물의 TLC 형태

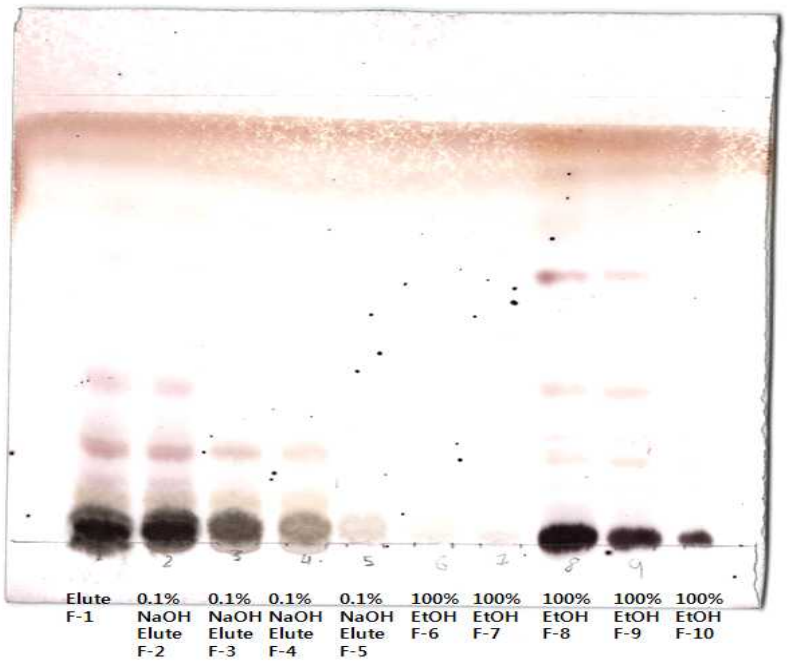


Fig. 38. 비드를 사용하여 순수 saponin을 정제하는 과정

분취된 분액으로 부어 순수 saponin의 분리를 수행하였다.

나. HPLC에 의한 유효 성분 분석

녹차씨의 ethanol 추출물 100g을 Shimadzu HPLC system을 이용하여 조사포닌을 분리 및 분획하였다.

■ HPLC 조건	
Pump	7mL, Shimadzu LC-6AD
Column	Phenomenex (21.2mm × 250 mm, 15μ)
Mobile phase	Methanol: Water(10:90) at 0min to Methanol: Water(80:20) at 40min, to Methanol: Water(100:0) at 50min
Detector	210nm, photodiode array detector, Shimadzu SPD-M20A
Degasser	Shimadzu DUG-20A$_3$
Oven	Shimadzu CTO-20A
Autosampler	200μL injection, Shimadzu SIL-20A
Fraction collector	Shimadzu FRC-10A
System controller	CBM-20A
Software	Shimadzu LCsolution (ver.1.22sp)
Column	Asahipak GS-310 (20 mm × 500 mm)
Valve	FCV-20AH2, FCV-20AH6

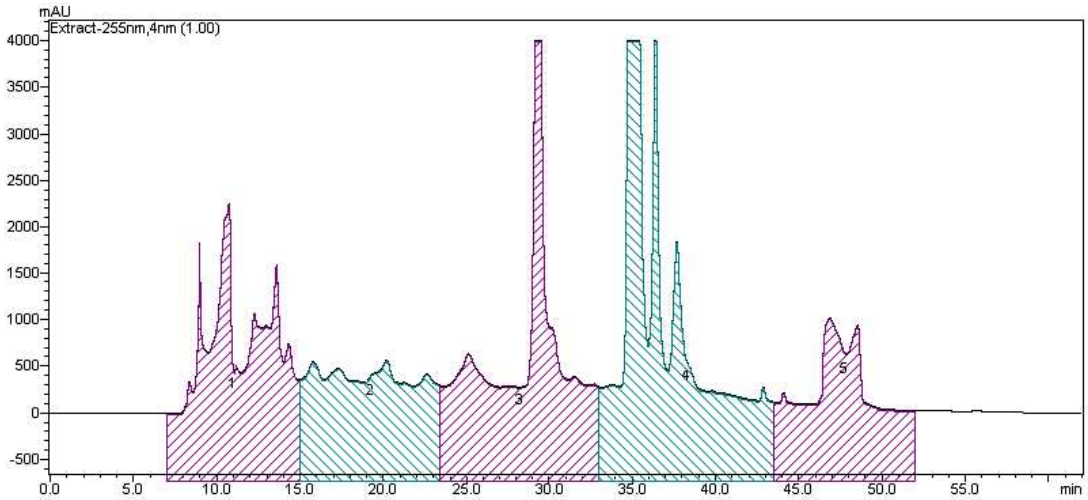


Fig. 39. HPLC에 의한 유효 성분 분석

Fr.1: 색소 (15g)

Fr.2: 탄수화물(당)-(24g)

Fr.3: phenolic compounds(16g)

Fr.4: Phenolic compounds((22g)

Fr.5: 조사포닌(23g)

상기 조사포닌을 23g을 다시 분획하여 잔존하는 phenolic compound를 제거하여 6개의 조사포닌을 분리하였다. HPLC 조건은 상기와 같으면 이동상의 조건은 다음과 같다.

■ HPLC 조건	
Mobile phase	Methanol:Water(74:26) at 0min to Methanol:Water(75:25) at 30min to Methanol: Water(100:0) at 45min
Column:	Phenomenex (21.2mm × 250 mm, 5μ)
Pump:	7mL, Shimadzu LC-6AD

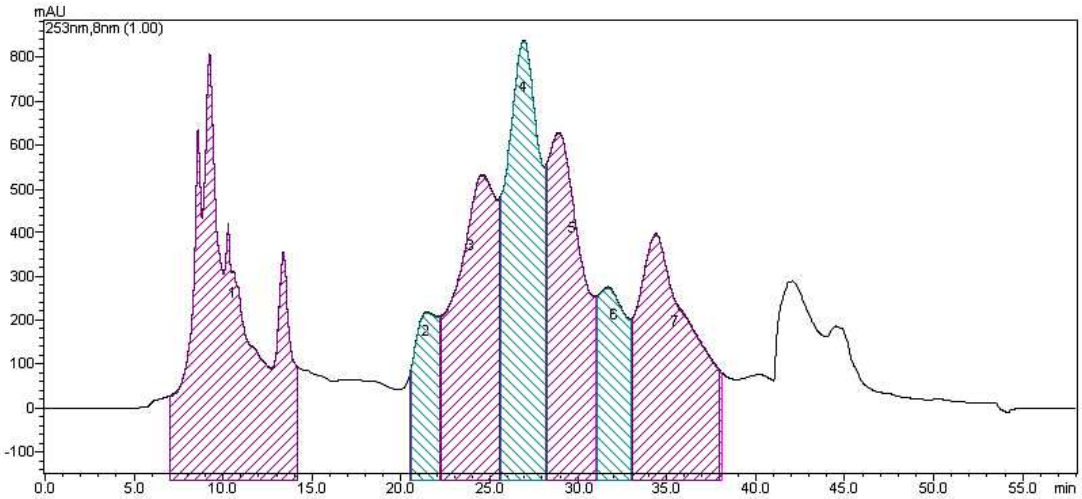


Fig. 40. HPLC에 의한 조 사포닌의 분석

Fr.1: Phenolic compounds(3.5g)

Fr.2: 사포닌 1.4g

Fr.3: 사포닌 2.1g

Fr.4: 사포닌 4.3g

Fr.5: 사포닌 2.5g

Fr.6: 사포닌 1.2g

Fr.7: 사포닌 2.4g

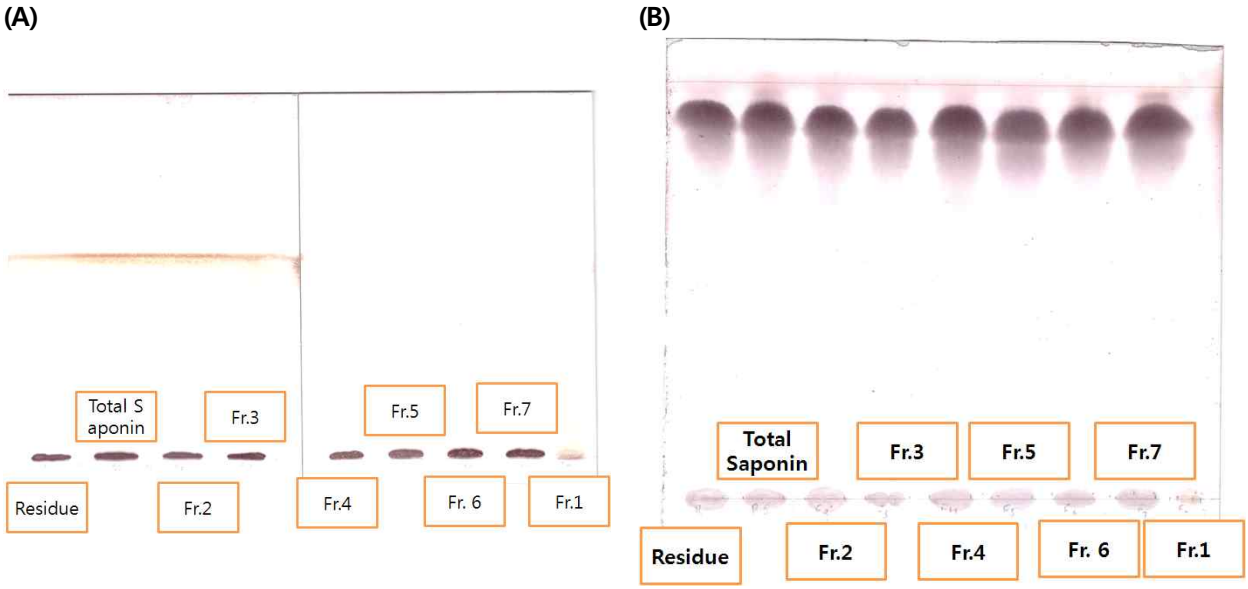


Fig. 41. 분취 분액의 분리된 saponin, A: normal phase plate, B: reverse phase plate

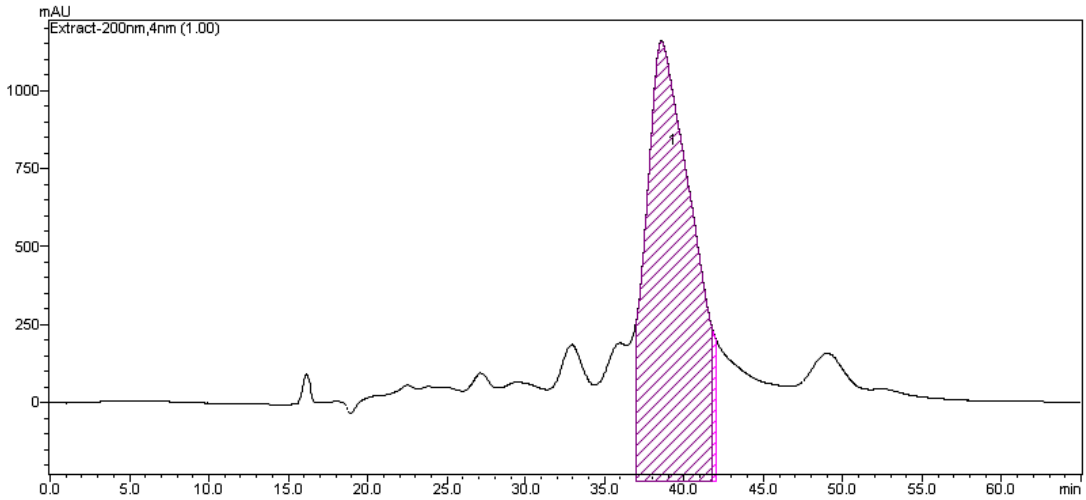


Fig. 42. HPLC에 의한 고 활성 사포닌의 분석

활성이 높은 사포닌을 4번 분획을 다음과 같은 조건으로 분획 중에 있다.

Mobile phase	Acetonitrile:Water(74:26) at 0min to Acetonitrile:Water(75:25) at 30min to Acetonitrile: Water(100:0) at 45min
Column:	Phenomenex (21.2mm × 250 mm, 5μ)
Pump:	7mL, Shimadzu LC-6AD

다. 유효 효능 성분의 구조 결정

(1) 정제된 유효 성분의 TLC 형태

HPLC로 정제한 것, FLASH로 정제한 것, 시판 Quezella saponin, 그리고 정제한 saponine등의 녹차 saponin을 정제하여 TLC를 하였을 때 거의 비슷한 형태를 볼 수 있었다.

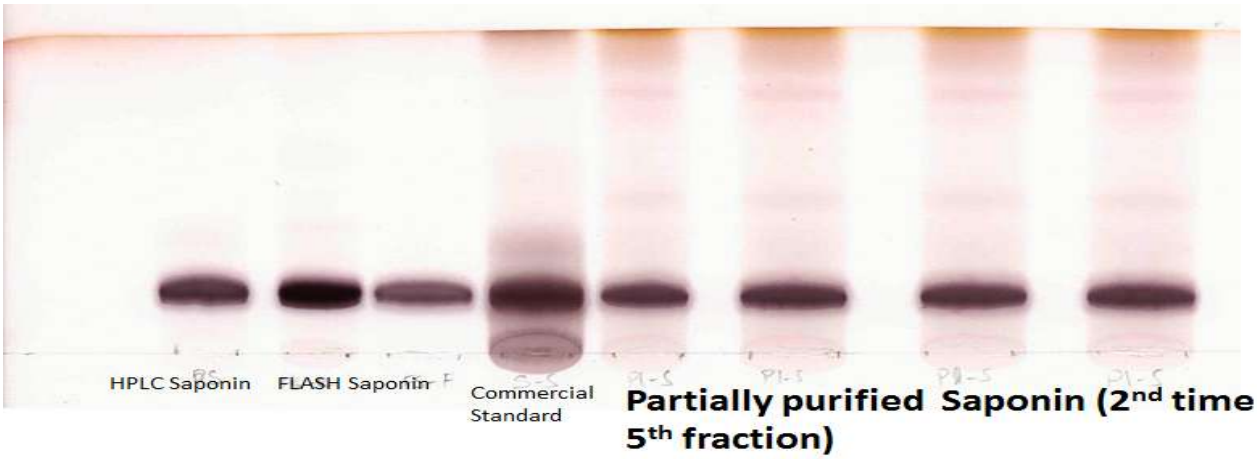


Fig. 43. 정제된 saponin의 TLC 형태

(2) HPLC에 의한 분취

이중의 saponin을 분액하였을 때 5종류의 분액을 얻었다.

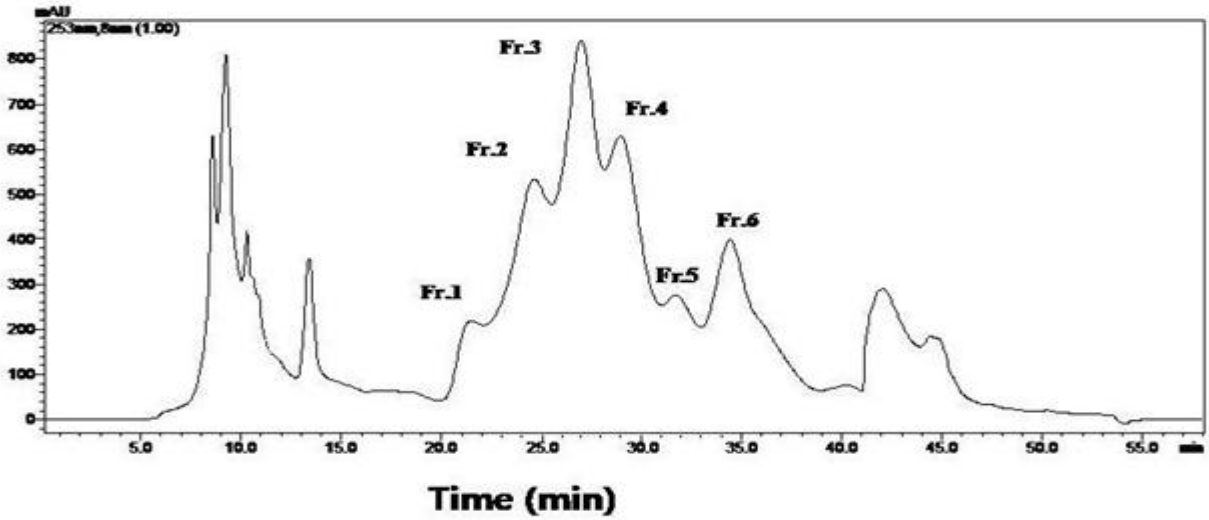
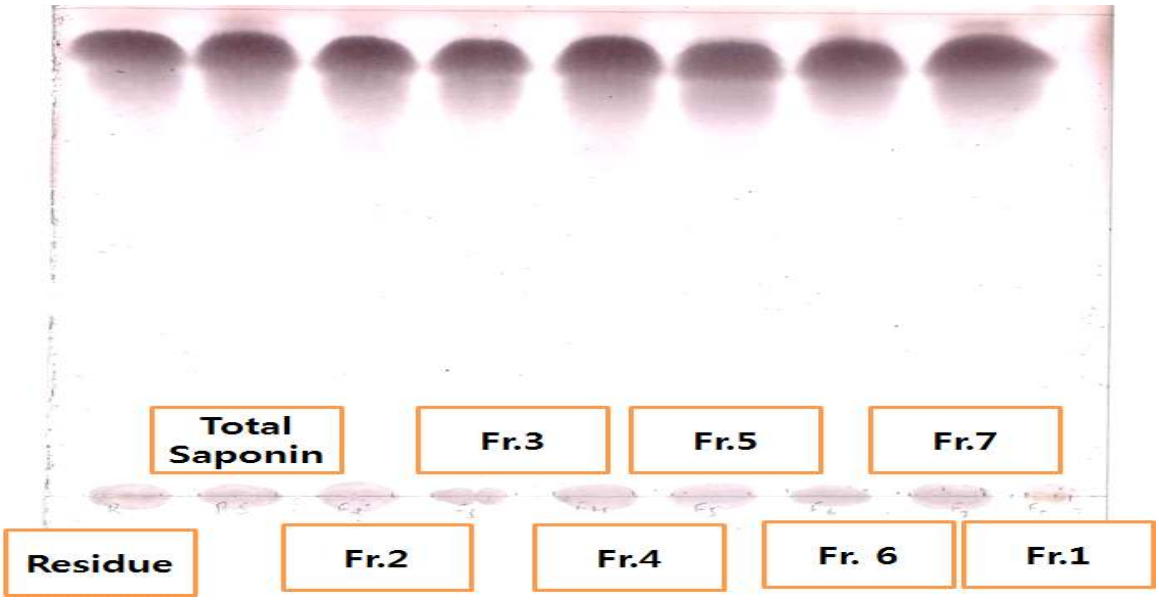


Fig. 44. HPLC chromatogram of tea saponin fractions. Preparative HPLC system Luna C18 (2) (250x21.2mm, 15 μm) column. Mobile Phase: A: Methanol B: 0.1% formic acid in Water. Fractions were eluted at 21.38 min (Fr. 1), 24.49 min (Fr. 2), 26.34 min (Fr. 3), 28.79 min (Fr. 4), 31.52 min (Fr. 5) and 34.22 min (Fr. 6).>

(3) 정제된 유효성분의 normal 및 recerse phase TLC

여기에서 얻은 분액의 각각의 부분을 reverse phase 및 normal phase TLC를 수행한 결과는 다음과 같으며, n-butanol: water: acetic acid (84: 14: 17)로 전개하였을 때의 Rf 치를 Table에 나타내었다.

(A)



(B)

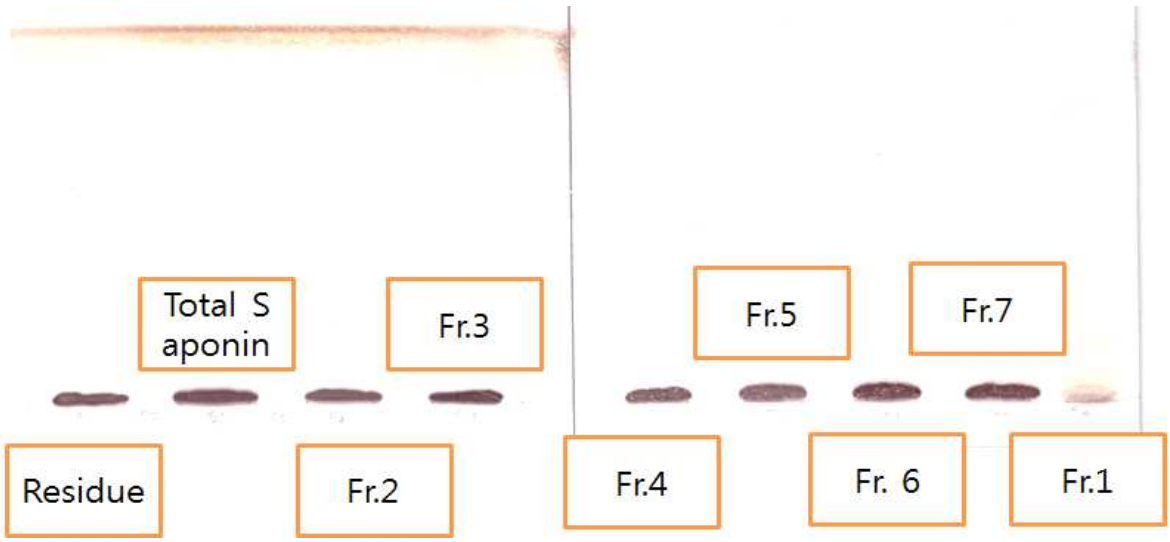


Fig. 45. 정제 saponin의 역상(A) 및 순상(B) TLC 형태

Table 22. **RF values of total saponin (TS) and saponin fractions based on thin layer chromatogram with different solvents: Solvent system: n-butanol: water: acetic acid (84: 14: 17) by spraying and dipping with 10 % H_2SO_4.Reversephase solvent system:methanol:water(4:1)bysprayingwith 10 % H_2SO_4**

Compound	Rf values (n-butanol: water: acetic acid (84: 14: 17))		Rf values (methanol: water (4:1))
	Spray	Dipping	
TS	0.14	0.5	0.88
Fr.1	0.14	0.45	0.88
Fr.2	0.14	0.45	0.86
Fr.3	0.17	0.50	0.88
Fr.4	0.17	0.50	0.88
Fr.5	0.20	0.50	
Fr.6	0.19	0.50	

(4) 유효성분의 구조의 결정

Fraction 1, 2,3의 구조 결정을 위하여 사용한 기기의 조건은 다음과 같다.

Thermo LTQ-orbitrap-XL
Column :Agilent Extend-C18 (5um 2.1*150mm)
Molile phase A:0.1% FA in Acetonitrile
B:0.1% FA in water

Gradient :

Time	A%	B%	flow(ml/min)
0.00	10.0	90.0	200
30.00	60.0	40.0	200
31.00	90.0	10.0	200
33.00	90.0	10.0	200
34.00	10.0	90.0	200
40.00	10.0	90.0	200

이에 따른 LC-MS의 형태는 표준품, 가수분해형, 녹차싸앗의 saponin을 행하였을 때 다음과 같은 형태를 보였다.

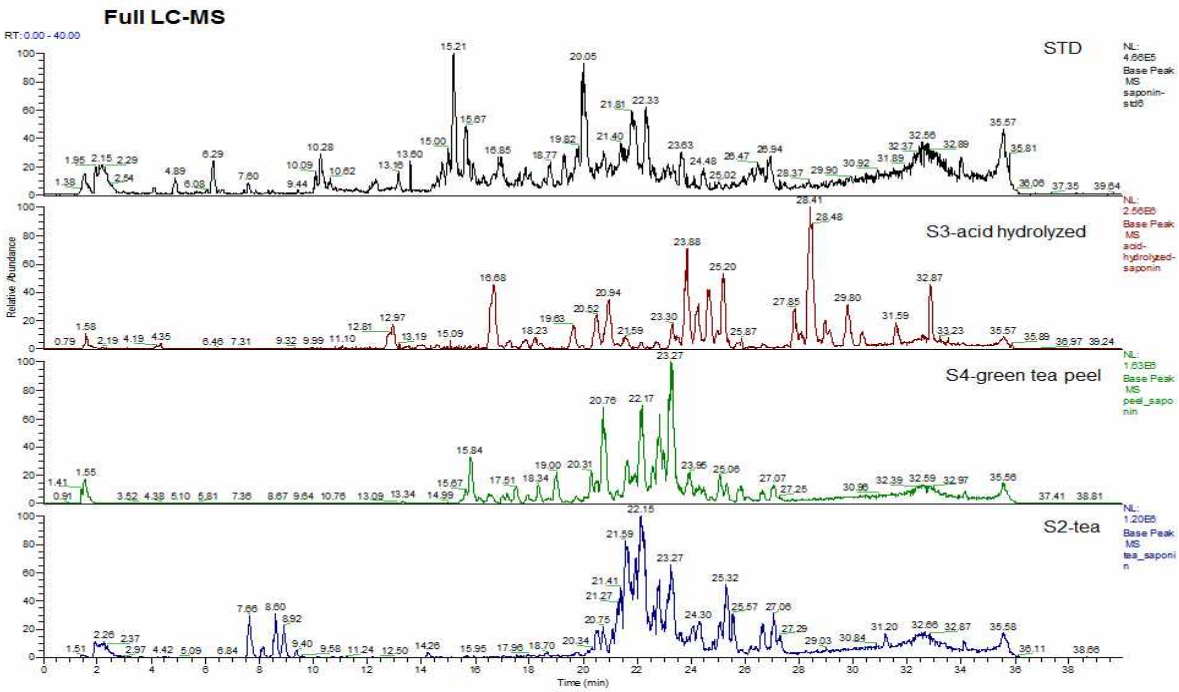


Fig. 46. LC-MS에 의한 녹차씨앗 사포닌의 패턴 분석

이를 바탕으로하여 Fraction 1, Fraction 2 및 Fraction 3의 구조 결정은 다음과 같이 이루어졌다.

1) Fraction 1

표 23. ^{13}C-NMR data of 551G3-1 in pyridine-d_5.

Position	551G3-1	Theasaponin C_1[a]	Position	551G3-1	Theasaponin C_1[a]
1	39.0	38.7	1′	104.4	104.1
2	25.8	25.5	2′	78.8)	78.5
3	83.3	83.1	3′		84.6
4	43.8	43.5	4′		71.0
5	48.4	48.2	5′		77.4

6	18.4	18.2	6″		172.0
7	33.1	32.8	1″	103.4	103.2
8	40.4	40.1	2″	74.0	73.8
9	47.3	47.0	3″	75.5	75.3
10	37.0	36.8	4″	70.4	70.1
11	24.1	23.9	5″	76.8	76.5
12	123.4	123.1	6″	62.2	61.9
13	144.0	143.7	1‴	101.9	101.7
14	41.9	41.6	2‴	82.6	82.3
15	35.4	35.2	3‴	73.7	73.4
16	70.4	70.1	4‴	68.6	68.3
17	45.1	44.8	5‴	66.9	66.6
18	41.2	40.9	1⁗	107.3	107.1
19	47.7	47.4	2⁗	76.2	75.9
20	32.3	32.1	3⁗	78.5	78.3
21	42.0	41.7	4⁗	71.1	70.8
22	73.3	73.0	5⁗	67.8	67.5
23	65.1	64.8	1′′′′′	168.3	168.0
24	13.9	13.6	2′′′′′	129.8	129.5
25	16.5	16.2	3′′′′′	136.9	136.6
26	17.2	16.9	4′′′′′	16.2	15.9
27	27.9	27.6	5′′′′′	21.3	21.0
28	63.9	63.6			
29	33.7	33.5			
30	25.5	25.2			

의 data를 나타내었으며 이에 따른 구조의 해석은 Teasaponin C1으로 결정되었다.

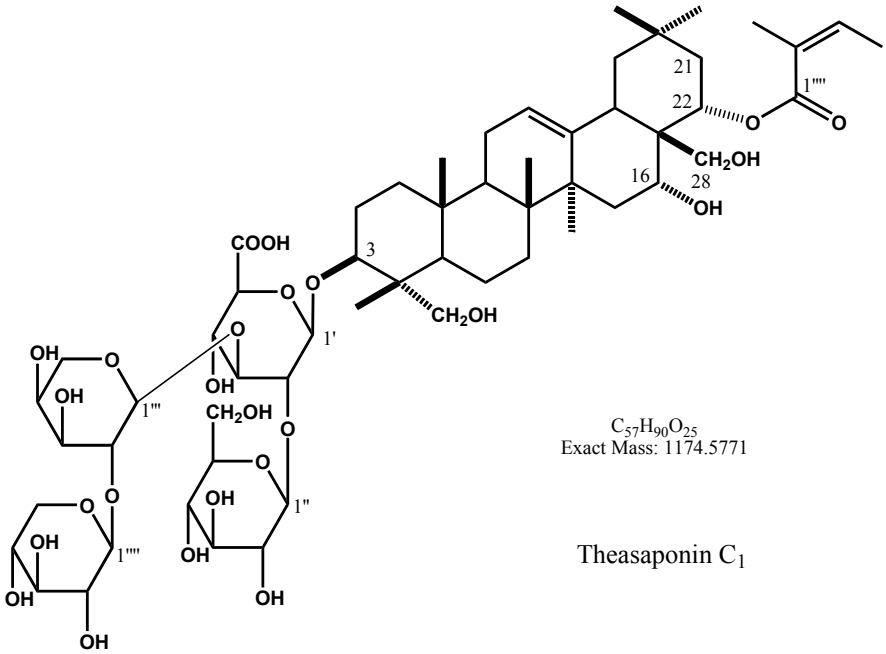


Fig. 47. Teasaponin C1 의 구조

2) Fraction 2

표 24. ^{13}C-NMR data of 544-3 in pyridine-d_5					
Position	544-3	Theasaponin E_3[a]	Position	544-3	Theasaponin E_3[a]
1	38.5	38.2	1′	104.5	104.2
2	25.6	25.3	2′	78.5	78.3
3	84.4	84.1	3′	84.9	84.5
4	55.5	55.2	4′	71.4	70.8
5	48.7	48.2	5′	77.5	77.3
6	20.7	20.4	6″	171.1	172.0
7	32.7	32.4	1″	103.6	103.3
8	40.6	40.3	2″	74.0	73.7
9	47.1	46.9	3″	75.7	75.4
10	36.4	36.2	4″	70.8	70.4
11	24.1	23.8	5″	76.9	76.5
12	123.4	123.1	6″	62.4	62.1
13	143.1	143.6	1‴	101.9	101.7
14	42.1	41.9	2‴	82.3	82.4
15	34.9	34.4	3‴	73.7	73.4
16	68.2	67.8	4‴	68.6	68.3
17	47.6	47.8	5‴	66.7	66.6
18	40.8	40.5	1⁗	107.4	107.1
19	47.4	47.0	2⁗	75.7	75.9

20	36.3	36.1	3''''	78.5	78.3
21	81.5	81.7	4''''	71.1	70.8
22	73.6	73.1	5''''	67.8	67.5
23	210.4	209.9	1'''''	168.9	168.7
24	11.4	11.1	2'''''	129.8	129.6
25	16.1	15.8	3'''''	136.3	136.0
26	17.3	16.9	4'''''	16.2	15.9
27	27.7	27.4	5'''''	21.4	21.1
28	66.3	66.0			
29	30.1	29.9			
30	20.6	20.4			

의 data를 나타내었으며 이에 따른 구조의 해석은 Teasaponin E3으로 결정되었다.

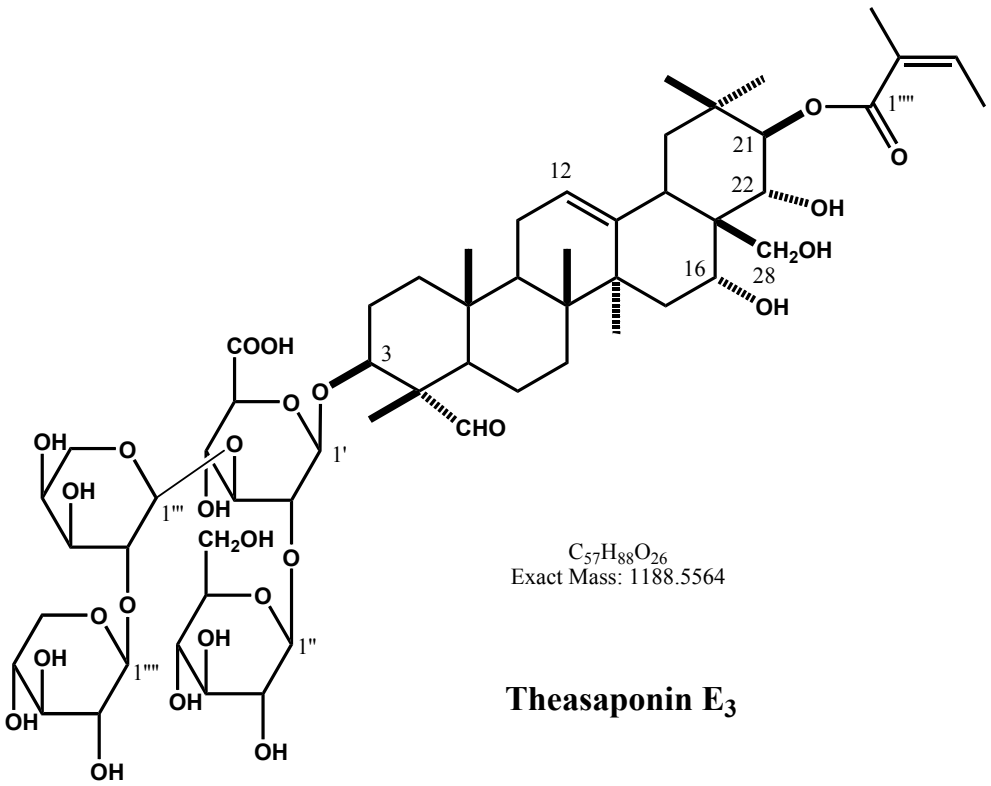


Fig. 48. Teasaponin E3 의 구조

3) Fraction 3

표 25. ^{13}C-NMR data of 544-4 in pyridine-d_5.					
Position	544-4	reference	Position	544-4	reference
1	38.5	38.3	1′	104.4	104.1

2	25.5	25.2	2′	78.6	78.4
3	84.8	84.5	3′	84.1	84.2
4	55.4	55.2	4′	71.2	70.8
5	48.7	48.4	5′	76.9	77.3
6	20.7	20.4	6″	171.3	171.8
7	32.7	32.5	1″	103.6	103.2
8	40.6	40.4	2″	74.0	73.7
9	47.1	46.8	3″	75.7	75.3
10	36.4	36.1	4″	70.8	70.5
11	24.1	23.8	5″	76.8	76.5
12	123.4	123.1	6″	62.4	62.1
13	143.3	142.9	1‴	102.0	101.7
14	42.0	41.8	2‴	82.3	82.3
15	34.9	34.6	3‴	73.8	73.4
16	68.2	68.1	4‴	68.7	68.4
17	48.3	48.0	5‴	66.5	66.1
18	40.4	40.2	1⁗	107.4	107.0
19	47.5	47.2	2⁗	76.3	75.9
20	36.6	36.3	3⁗	78.5	78.2
21	79.2	78.9	4⁗	70.8	70.8
22	74.6	74.5	5⁗	68.0	67.5
23	210.3	209.8	1′′′′′	168.2	167.9
24	11.4	11.0	2′′′′′	129.3	129.0
25	16.1	15.8	3′′′′′	137.5	137.0
26	17.1	16.9	4′′′′′	16.3	15.9
27	27.7	27.4	5′′′′′	21.4	21.0
28	64.1	64.0	1″″″	170.4	171.1
29	29.8	29.5	2″″″	21.2	20.9
30	20.6	20.3			

의 data를 나타내었으며 이에 따른 구조의 해석은 Teasaponin E1으로 결정되었다.

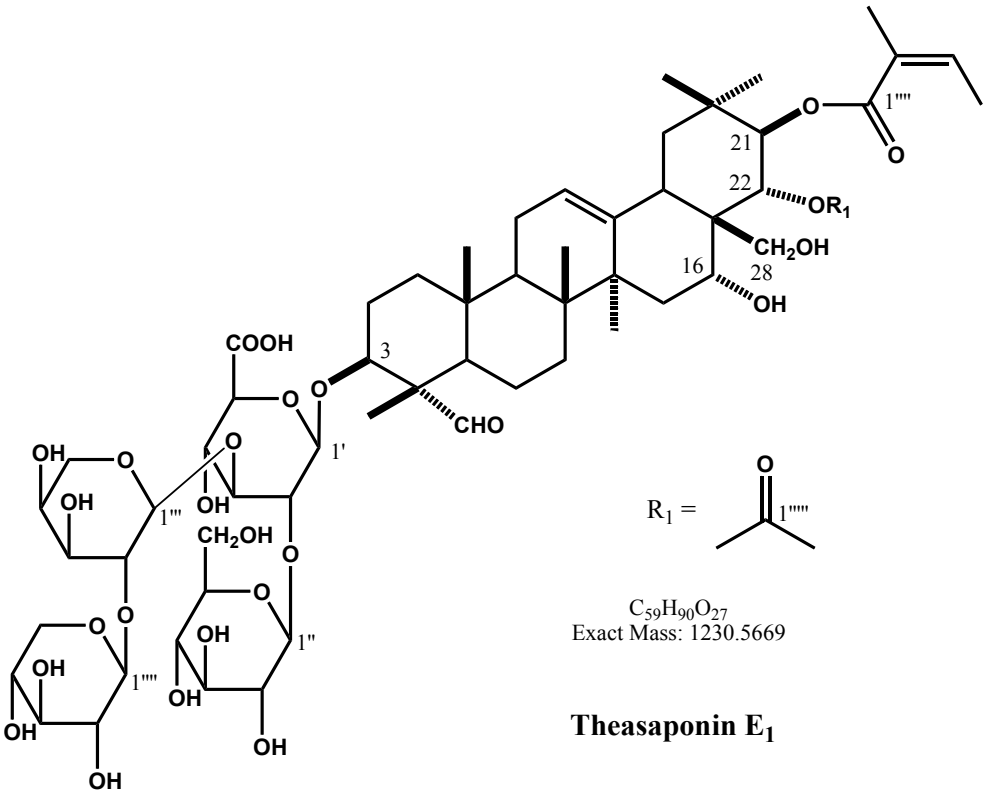


Fig. 49. Teasaponin E1 의 구조

5. 유통기한 설정

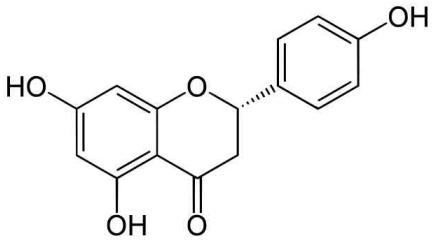
가. 원료 및 성분에 대한 검토

(1) 시험검체 제조

본 실험에 사용된 시험검체인 녹차씨 압착박은 명인 신광수차로부터 제공 받은 것으로, 녹차씨 압착박 시료에 일정량의 물을 첨가하여 95℃에서 2시간 동안 추출, 농축, 살균 후 동결건조 하여 얻어진 분말임. 시험 검체를 보관용기에 25g씩 넣어 포장하여 25±2℃, 30±2℃, 45±2℃에서 약 1개월 간격으로 총 4회 실험을 수행함.

(2) 품질지표 설정

(가) 지표별 규격 및 설정근거

품질 지표	품질 한계	근거
성상	진한 갈색의 분말	시험검체 제조 직후의 성상에 따름
대장균군	음성	고시 제2014-204호「건강기능식품의 기준 및 규격」의 내용에 따름
Naringenin (mg/g)	4.4 ~ 6.6 mg/g	 naringenin은 catechin 또는 quercetin과 같이 flavonoid의 기본구조를 가지고 있는 화합물이며 시험검체 제조 시 제조공정 표준화에 사용될 수 있는 안정적인 물질이면서 녹차씨 압착박 추출물에 함유되어 있는 지표성분이기에 품질지표로 설정하였음.

나. 지표별 실험방법

실험기간 : 2014년 1월 2일 ~ 2014년 4월 8일

품질지표		실험방법
이화학	Naringenin	Method validation 분석 방법에 따라 시험함.
미생물	대장균군	식품공전 제 9.일반시험법 3.미생물 시험법 3.7대장균군 3.7.1정성시험 나.BGLB 배지법

(1) 대장균군

녹차씨박 추출분말 10g을 멸균수 90ml에 넣어 녹인다. 이는 10배 희석액으로, 그 중 1 mL를 2개씩 BGLB 배지에 가한다. 시험용액을 넣은 BGLB 배지를 35~37℃에서 48±3시간 배양한 후 가스 발생을 인정하였을 때에는 완전시험을 실시해 대장균군 유무를 확인한다.

(2) Naringenin (mg/g)

녹차씨 추출분말의 지표성분으로 녹차씨 추출분말을 약 0.1 g 취하여 Acetate buffer (pH 5) 2 mL, novozym® 33095 1 mL, Pectinex® Ultra SP-L 1 mL를 첨가하여 Incubator(37℃, 150 rpm)에서 24시간 동안 효소 가수분해를 진행하고, 가수분해가 종료된 용액 200 μL를 Ethanol 800 μL와 혼합하여 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 10min)한 후 여액을 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

표준용액은 표준물질 Naringenin 10 mg을 정밀히 달아 MeOH 10 mL (1000 ug/mL)에 녹인 후 1 mL 씩 분주하여 냉동보관 된 것을 사용한다. 이를 MeOH로 희석하여 working solution으로 사용한다.

(가) 기기분석조건

- Instrument: HPLC system
- Detector: UV detector (280 nm)
- Column: Atlantis C_{18} (4.6 mm×150 mm, 3 ㎛), Waters, USA
- Column Oven: 30 ℃
- Injection vol.: 20 μL
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 10% MeCN in 0.1% TFA; B, 50% MeCN in 0.1% TFA

min	A (%)	B (%)
0	80	20
60	20	80

(나) 계산

$$\text{Naringenin (mg/g)} = \text{시험용액 농도 (ug/mL)} \times \frac{1/0.2\ (\text{mL})}{\text{시료 (g)}} \times \text{Volume (mL)} \times \frac{1}{1000}$$

다. 실험 시 저장조건

구분	실험조건	구분	실험조건
저장온도	25±2℃, 30±2℃, 45±2℃	저장기간	96일
		실험횟수	4회 (1회/1월)
유통온도	실온	실험반복수	3회

라. 가속실험 결과

(1) 실험결과

(가) 성상

저장기간 (일)	결과								
	보관온도 (25±2℃)			보관온도(30±2℃)			보관온도(45±2℃)		
0	적합 (진한 갈색의 분말)								
32	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
48	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
96	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

(나) 대장균군

저장기간(일)	결과								
	25±2℃			30±2℃			45±2℃		
0	음성								
32	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
48	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
96	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

(다) Naringenin

저장기간(일)	결과								
	25±2℃			30±2℃			45±2℃		
0	5.56								
32	5.31	5.38	5.35	5.45	5.49	5.47	5.42	5.49	5.45
48	5.38	5.38	5.38	5.58	5.52	5.54	5.45	5.51	5.49
96	5.10	5.12	5.11	5.01	5.00	5.00	5.07	5.09	5.08

(2) 실험결과 해석

(가) 성상 변화

시험 검체를 온도별로 저장하면서 성상을 확인한 결과 적합으로 판정되었다. 검체의 색의 변화, 냄새 등이 전혀 발생하지 않아 저장 중 성상에는 변화가 없는 것이 확인되었다.

(나) 대장균군

대장균군 검사 결과 제조 직후 및 모든 저장 기간과 저장 온도에서 대장균군이 검출되지 않아 미생물적으로 안전한 것이 확인되었다.

(다) naringenin 함량

저장기간 중 모든 저장 온도에서 본 제품의 지표성분으로 설정된 naringenin의 함량이 규격 범위 내에서 검출되었으며 분석 결과를 이용하여 회귀분석 및 Arrhenius 방정식을 적용하여 유통기한을 산출하고자 한다.

(3) 유통기한 산출

위에서 실시한 25±2℃, 30±2℃, 45±2℃ 가속시험에서 지표성분(naringenin)의 함량 분석 결과에 따라 “녹차씨압착박 추출분말”의 유통기한을 회귀분석과 Arrhenius 방정식에 적용하여 예측하였다.

(가) 회귀분석 결과

① 25±2℃ 저장 조건에서의 0차 및 1차 방정식 결과

0차			1차		
저장일	저장월	naringenin 함량 (mg/g)	저장일	저장월	naringenin 함량 (mg/g)
0	0.00	5.56	0	0.00	1.72

32	1.06	5.35	32	1.06	1.68
48	1.60	5.26	48	1.60	1.66
96	3.20	5.11	96	3.20	1.63

기울기	−0.0046	기울기	−0.0009
y 절편	5.5224	y 절편	1.7090
표준오차	0.1881	표준오차	0.0353
결정계수 (R^2)	0.9564	결정계수 (R^2)	0.9617

② 30±2℃ 저장 조건에서의 0차 및 1차 방정식 결과

0차			1차		
저장일	저장월	naringenin 함량 (mg/g)	저장일	저장월	naringenin 함량 (mg/g)
0	0.00	5.56	0	0.00	1.72
32	1.06	5.47	32	1.06	1.70
48	1.60	5.42	48	1.60	1.69
96	3.20	5.00	96	3.20	1.61

기울기	−0.0060	기울기	−0.0011
y 절편	5.6247	y 절편	1.7289
표준오차	0.2485	표준오차	0.0473
결정계수 (R^2)	0.9198	결정계수 (R^2)	0.9140

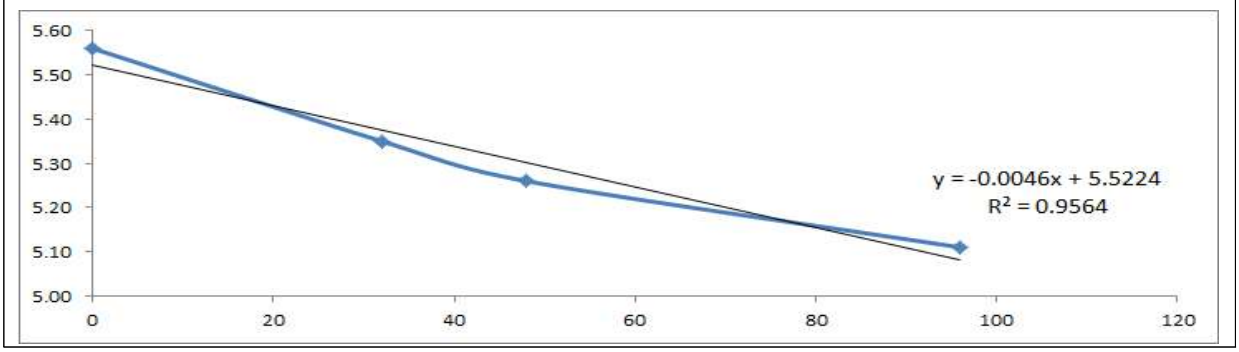
③ 45±2℃ 저장 조건에서의 0차 및 1차 방정식 결과

0차			1차		
저장일	저장월	naringenin 함량 (mg/g)	저장일	저장월	naringenin 함량 (mg/g)
0	0.00	5.56	0	0.00	1.72
32	1.06	5.46	32	1.06	1.70
48	1.60	5.36	48	1.60	1.68
96	3.20	5.08	96	3.20	1.63

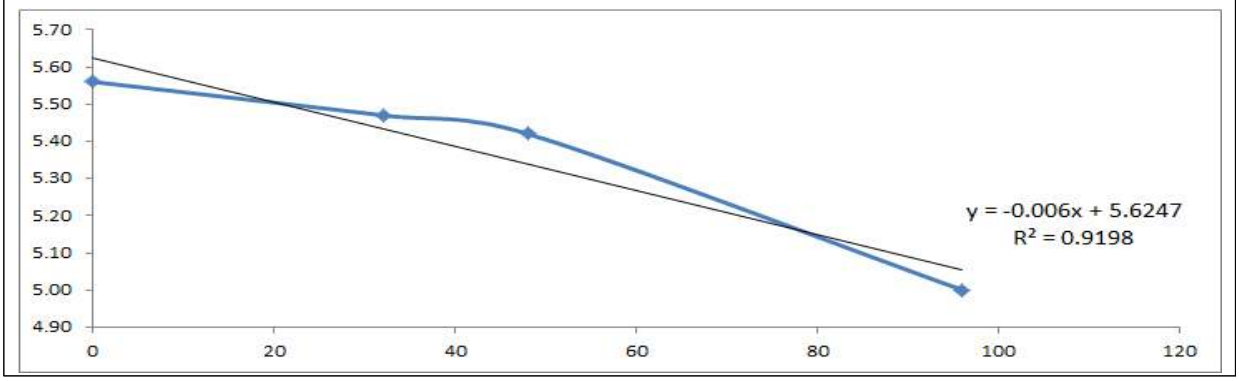
기울기	−0.0051	기울기	−0.001
y 절편	5.5901	y 절편	1.7217
표준오차	0.2068	표준오차	0.0390
결정계수 (R^2)	0.9795	결정계수 (R^2)	0.9763

(나) 추세선으로 예측한 저장기간에 따른 naringenin 함량 변화

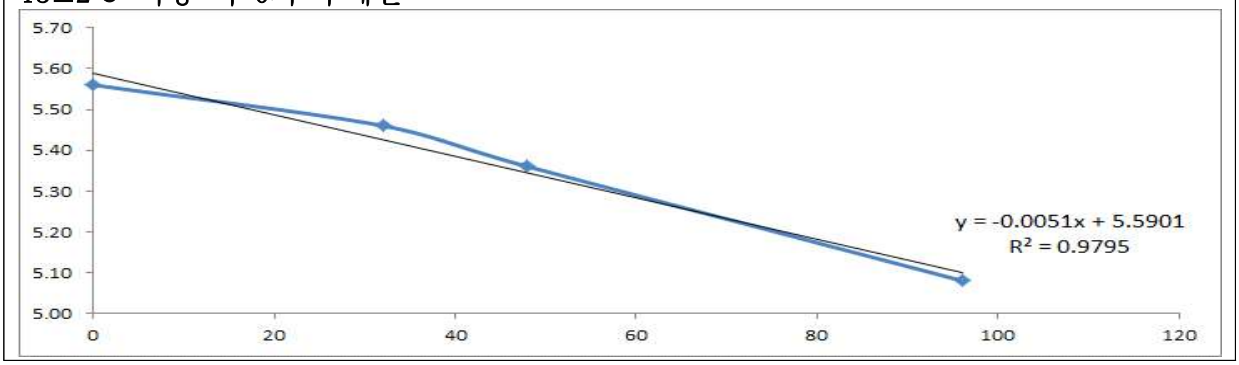
25±2℃ 저장 시 0차 추세선



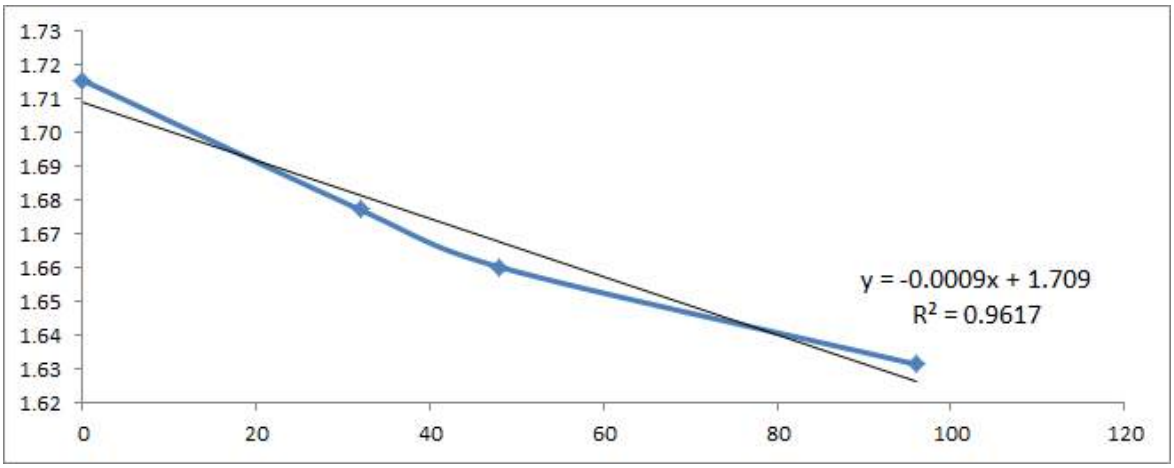
30±2℃ 저장 시 0차 추세선



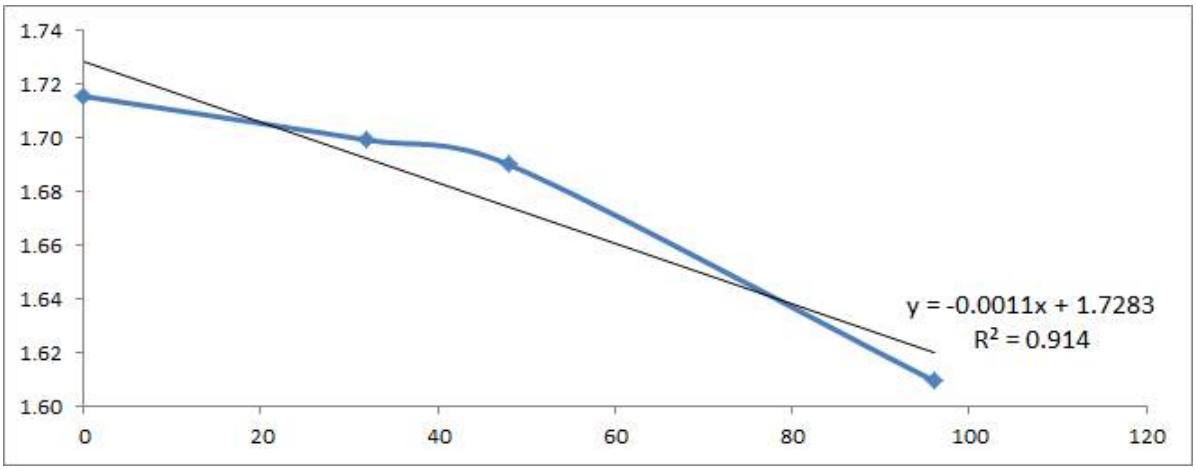
45±2℃ 저장 시 0차 추세선



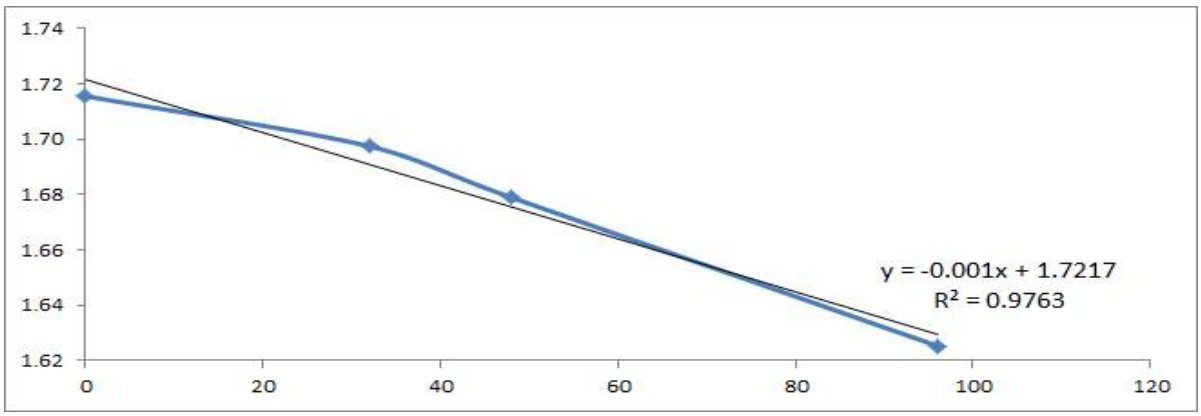
25±2℃ 저장 시 1차 추세선



30±2℃ 저장 시 1차 추세선



45±2℃ 저장 시 1차 추세선



(4) Arrhenius 식에 의한 유통기한 예측 결과

(가) 최소자승법에 의한 방정식 계산

① 0차 방정식

소실속도상수 k 산출	Y축 (k의 LN)	X축 (절대온도 역수)	최소자승법에 의한 방정식
y(25℃)=−0.0046X +5.5224 (k=0.0046)	−5.381699	0.0034	Y = −155.76X − 4.7499
y(30℃)=−0.0060X +5.6247 (k=0.0060)	−5.115996	0.0033	
y(45℃)=−0.0051X +5.5901 (k=0.0051)	−5.278515	0.0031	

② 1차 방정식

소실속도상수 k 산출	Y축 (k의 LN)	X축 (절대온도 역수)	최소자승법에 의한 방정식
y(25℃)=−0.0009X +1.7090 (k=0.0009)	−7.019116	0.0034	Y = −257.66X − 6.0694
y(30℃)=−0.0011X +1.7283 (k=0.0011)	−6.812445	0.0033	
y(45℃)=−0.0010X +1.7217 (k=0.0051)	−6.907755	0.0031	

(나) 각 온도 구간별 반응속도 산출

기상청 자료를 참조하여 7대 광역시와 강원도 지역의 월평균 기온을 근거로 유통온도를 산출하기 위해 실험하지 않은 각 온도 구간별 반응속도를 산출하였다. 2007년도 기상청 자료에 따르면 실온 유통 시 1년간 온도별 예상개월 10℃(4개월), 15℃(2개월), 20℃(2개월), 25℃(2개월), 30℃(2개월)을 반영하여 유통기한 산출의 근거로 사용하였다.

① 실험하지 않은 각 온도 구간별 반응속도 산출

	온도(℃)	온도(T)	1/T(X축)	LnK(Y축)	k
0차	10	283	0.0035336	−5.300289	0.004990
	15	288	0.0034722	−5.290733	0.005038
	20	293	0.0034130	−5.281504	0.005085

	25	298	0.0033557	−5.272585	0.005130
	30	303	0.0033003	−5.263959	0.005175
1차	온도(℃)	온도(T)	1/T(X축)	LnK(Y축)	k
	10	283	0.0035336	−6.979859	0.000930
	15	288	0.0034722	−60964053	0.000945
	20	293	0.0034130	−6.948786	0.000960
	25	298	0.0033557	−6.934031	0.000974
	30	303	0.0033003	−6.919763	0.000988

② 유통온도별 naringenin 함량의 연간 감소량

	온도 (℃)	온도별 유통기한 개월수 (A)	반응속도상수 (B)	연간감소량 (A*B)
0차	10	4	0.0049902	0.019861
	15	2	0.0050381	0.009925
	20	2	0.0050848	0.010373
	25	2	0.0051303	0.010107
	30	2	0.0051748	0.0101557
	누계	12	0.0254181	0.0608220
1차	온도 (℃)	온도별 유통기한 개월수 (A)	반응속도상수 (B)	연간감소량 (A*B)
	10	4	0.0009304	0.003703
	15	2	0.0009453	0.001862
	20	2	0.0009598	0.001958
	25	2	0.0009741	0.001919
	30	2	0.0009881	0.002016
	누계	12	0.0047976	0.0114578

③ 유통온도는 적용한 Arrhenius 식에 의한 유통기한 산출

0차	최초함량 (A)	규격 하한선 (B)	A−B	연간감소량 (C)	유통기한(일) [(A−B)/C] ×365	유통기한(월)
	5.56	5.00	0.56	0.060822	3301	109

1차	최초함량 (A)	규격 하한선 (B)	A−B	연간감소량 (C)	유통기한(일) [(A−B)/C] ×365	유통기한(월)
	1.72	1.61	0.11	0.011458	3319	109

마. 유통기한 설정

이 제품은 제조 직후 polyethylene에 차광, 밀폐 보관하여 제조 직후부터 25±2℃, 30±2℃, 45±2℃에서 96일 동안 저장하여 실험한 결과 성상, 대장균군 시험 결과 보두 규격에 적합하였다. 이 제품은 건강기능식품으로서 지표성분(naringenin)을 설정한 바, 저장기간 중 지표성분인 naringenin 함량을 저장 온도별로 시험하여 그 결과를 회귀분석하고 Arrhenius 방정식으로 유통기한을 산출하였다. 그 결과, naringenin 기준으로 하여 실온에서 유통기한이 109개월로 예측되었는데 이는 naringenin이 flavonoid 계열의 화합물로서 안정적이기 때문에 나타난 결과로 보인다.

본 제품에 사용한 모든 원료는 건강기능식품 기준에 적합한 원료를 사용하여 제조공정 표준화에 따라 위생적으로 엄격한 품질관리를 하고 차광 밀폐 보관하여 실온(1~35℃) 유통하는 점, 기존의 녹차추출물분말(건강기능식품, (주)네추럴에프앤피)의 유통기한이 24개월인 점을 고려하여 이 제품의 유통기한을 24개월로 설정하여 관리하고자 한다.

제 3 절 기능성 및 안전성 평가

1. 녹차씨앗 추출물의 항비만 기전

가. 세포독성 시험

세포독성시험은 MTT 법으로 수행하였으며, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100ug의 농도로 수행하였다.

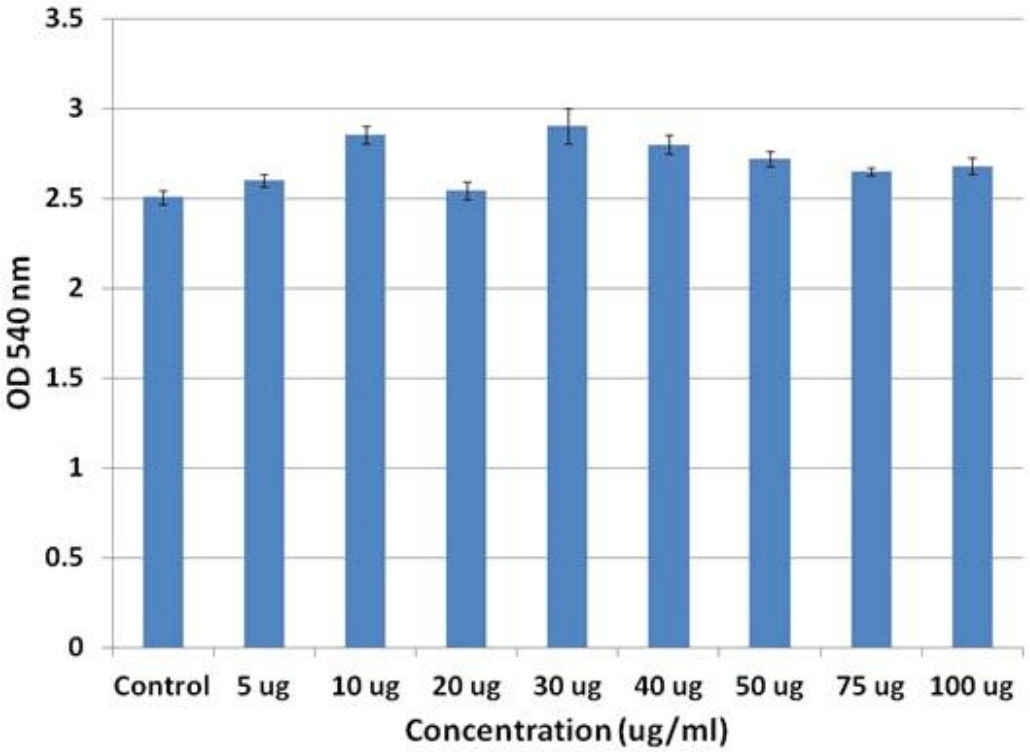


Fig. 50. MTT 분석법을 통한 녹차씨앗 추출물의 HUVECs에 대한 독성시험

HUVECs을 이용한 독성시험에서 100ug에서도 대조군에 비교하여 독성이 없는 것으로 나타났다.

나. 신생혈관형성억제[21)]

24 well culture plate에 150㎕의 matrigel로 coating한 후 배양한 HUVEC을 coating된 matrigel plate 당 25,000 cells/well이 되도록 재현탁 시키고, cell을 배양한 후 독성이 없는 최고의 녹차씨앗추출물(GTSE) 농도를 파악하여 투여한 후 37℃의 5% CO_2환경에서 4시간 배양함.. 형성된 tube 망의 길이는 현미경하에서 plate의 well을 불규칙적으로 5 군데로 나누어 디지털 카메라(Nikon, Coolpix)로 촬영하여 그 영상을 pixel로 전환시킨 후 NIH image 프로그램으로 분석함.

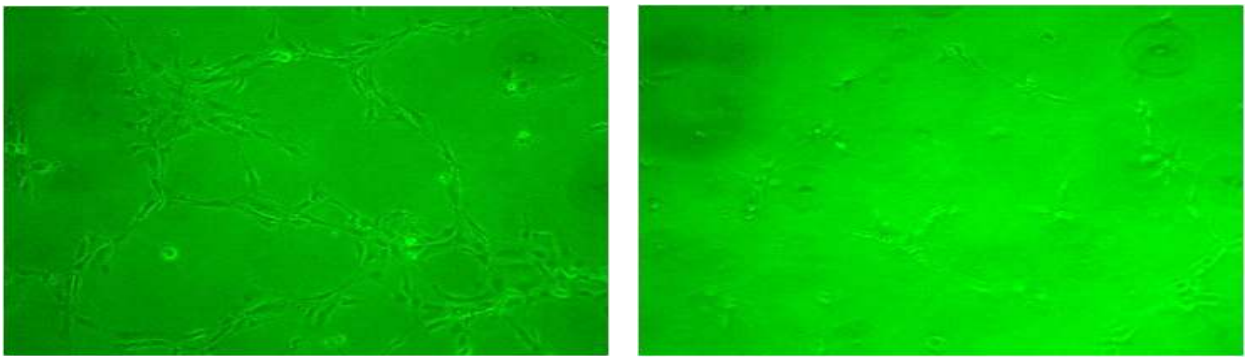


Fig. 51. GTSE에 의한 신생혈관형성 억제 작용

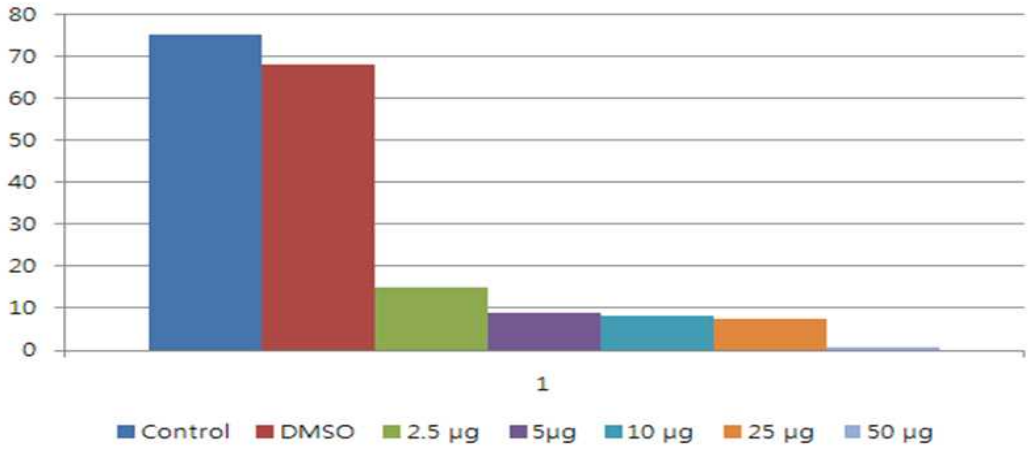


Fig. 52. GTSE의 농도에 따른 신생혈관형성 억제 작용

다. 신생혈관형성억제 기전

신생혈관형성억제의 기전[22]을 파악하기 위하여 HUVECs을 EBM-2 배지에 배양한 후, 총 RNA의 추출은 TRI 용액을 사용하여 추출하였다. DNA의 합성은 RevertAid Premium First Strand cDNA synthesis Kit를 사용하였고, 유전자의 발현은 PCR을 사용하였으며, 이 때 다음과 같은 primer를 사용하였다. 또한, PCR 반응[23]은 Takara ExTaq Hot Start Version (Takara, Japan)을 사용하였고, 반응은 94 ° C에서 3 min, 94 ° C 에서 30 sec, 60 ° C 에서 45 sec, 그리고 72 ° C 에서 1 분간, 또한,72 ° C 에서 7 분간 반응시켜 불완전하게 증폭된 것을 보완하였으며, 30 cycle을 반응시킨 후 1.5% agarose gel로 전개하였다.

표 26. 신호전달분자의 유전자 primer

Gene	Primer sequence	Gene Bank Accession No.	Size (bp)
VEGFR-2 (KDR)	F 5'-AGG TTG CGT GTT CTT CGA GT -3' R 5'-CCC AAA GTG CTG GGT TTT TA -3'	NM_002253.2	934
PI3K (PIK3CA)	F 5'-CGT GTG CCA TTT GTT TTG AC -3' R 5'-TCA AAC CCT GTT TGC GTT TAC -3'	NM_006218.2	536
VE-Cadherin (CDH 5)	F 5'-GGA AGG AGA CAC CAA GCT CA -3' R 5'-CTT GTC ATG CAC CAG TTT GG -3'	NM_001795.3	322
β-Catenin (CTNN B1)	F 5'-GGT GGG CTG GTA TCT CAG AA -3' R 5'-GGC AAC TGG TAA ACT GTC CAA -3'	NM_001098209.1	629
AKT-1	F 5'-CCG ATT CAC GTA GGG AAA TG -3' R 5'-AGC GTC GAA AAG GTC AAG TG-3'	NM_005163.2	529
NF-kB (RELA)	F 5'-TGG TCA GCT CCC TTC TCT GT -3' R 5'-GCC AGC TTG GCA ACA GAT -3'	NM_001145138.1	521
β-actin (ACTB)	F 5'-CTC CTG AGC GCA AGT ACT CC -3' R 5'-ACA TCT CAA GTT GGG GGA CA-3'	NM_001101.3	632

아래의 그림에서 세포 표면의 VEGFR2, PI3K, β-catenin 및 VE-cadherin의 분자[24]들의 신호가 핵내까지 신호가 전달되면 신생혈관이 형성되지만 도중에 신호가 차단되면 NF-κB까지 신호 전달이 일어나지 않아 신생형관이 형성되지 못한다.

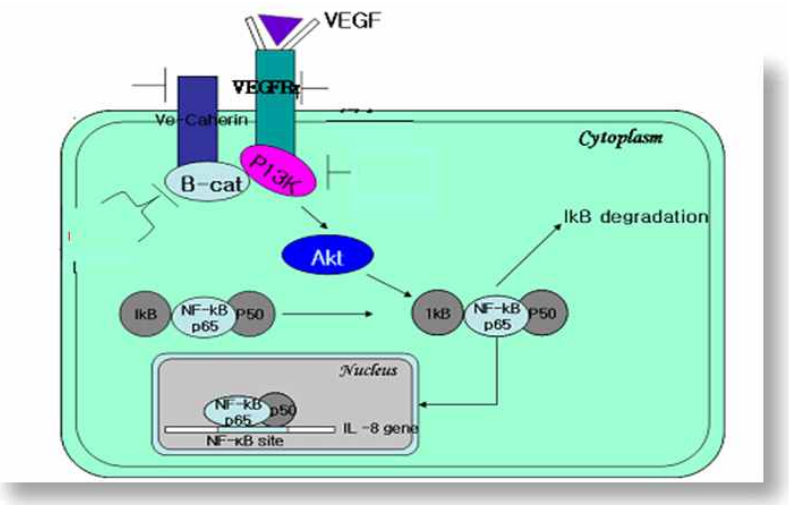


Fig. 53. 신생혈관형성을 위한 신호전달 경로

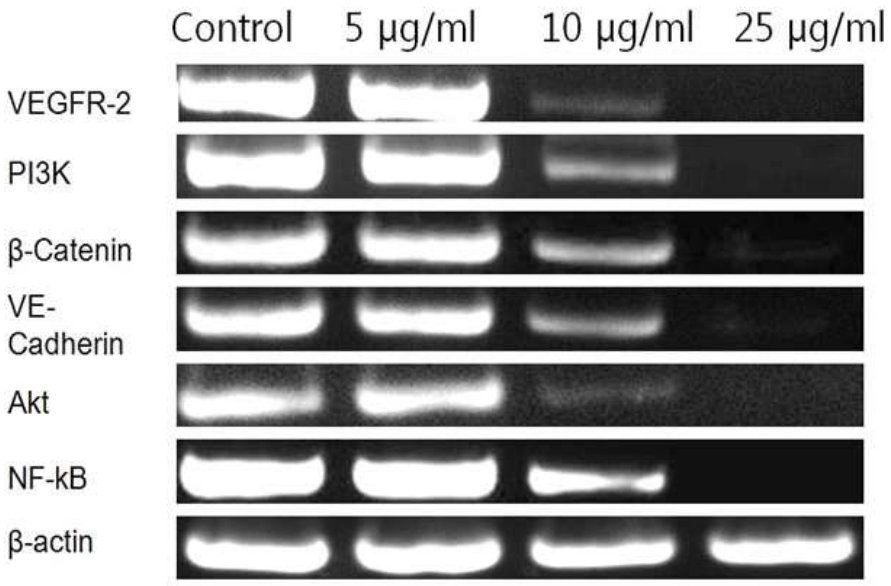


Fig. 54. RT-PCR을 통한 신호전달 분자들의 녹차씨앗추출물에 의한 유전자 발현의 억제

VEGFR2, PI3K, β-catenin 및 VE-cadherin의 신호 전달 분자[25], 그리고, 그 하위의 AKT 및 최종 전사인지인 NF-κB도 녹차씨앗추출물(GTSE)에 의하여 제어됨을 볼 수 있다. 따라서 GTSE는 신호전달분자의 신호전달을 억제함으로써 신생혈관형성을 억제하는 것으로 나타났다.

2. 항비만작용 규명

가. Adipocyte에 의한 항비만효과

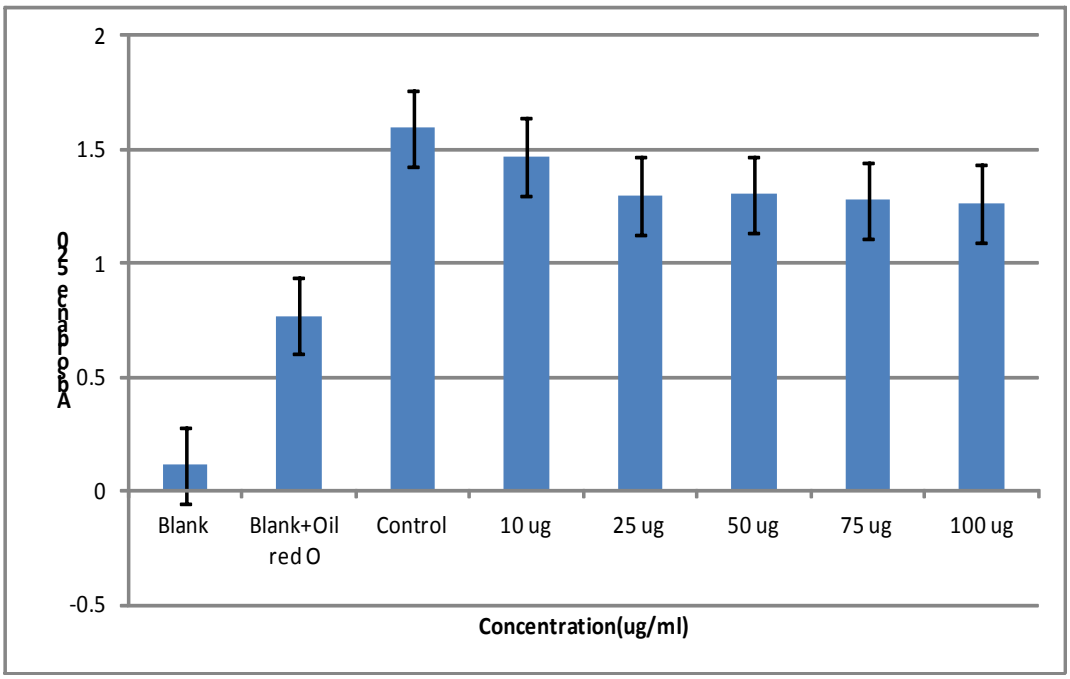
- 항비만효과는 3T3-L1 preadipocyte를 배양하여 confluent가 된 2일 후에 MDI로 처리하여 adipocyte로 분화시키고, 분화시에 <u>녹차씨앗 추추물(GTSE)</u>[26, 27]을 처리하여 지방세포의 분화억제 효과를 세포내 triglyceride 양을 측정하여 분석함. 효과가 있는 성분들은 관련 전사인자들의 발현조절을 Promoter luciferase assay 또는 Western-blot으로 분석하여 기능성 제제로서의 인가와 제품홍보를 위한 자료로 활용할 것임.

나. 세포배양

- 3T3-L1 preadipocyte를 DMEM/10% FBS 배지에서 배양하며, 아지방세포의 분화 유도는 아지방세포 (3T3-L1)를 배양 flask 바닥이 완전히 덮히도록 배양시킨 후 2일간 더 배양한 후에 유도배지 (MDI, 0.5 mM 3-isobuty-1-methylxanthine, 0.5 μM dexamethasone, 10 μg/mL insulin)를 넣어 배양하여 아지방세포가 지방세포가 되도록 분화를 유도함. 유도 후 3일 째 되는 날 정상적인 DMEM/10% FBS 배지로 교환하고 이후의 배양은 2 일에 한 번씩 교환하면서 7-10 일 동안 녹차씨앗과피 추출물의 처리에 의한 아지방세포의 지방세포로의 분화를 분석함.

다. Oil-red staining

- 분화 후 7-10일된 3T3-L1 adipocytes를 formalin으로 고정시킨 후 formalin을 제거하고 60% isopropanol로 씻은 후 흰 알갱이가 보일 때까지 말리도, Oil-red, working solution을 이용하여 염색시킨 후 염색액을 제거하고 증류수로 4 회 정도 씻어냄. 100% isopropanol로 비지방 부분의 염색액을 씻은 후 염색된 세포내 지방질을 현미경하에서 사진을 찍은 후 염색된 지방을 isopropanol로 추출하여 UV/visible spectrophotometer로 측정하여 지방의 양을 분석함[28].



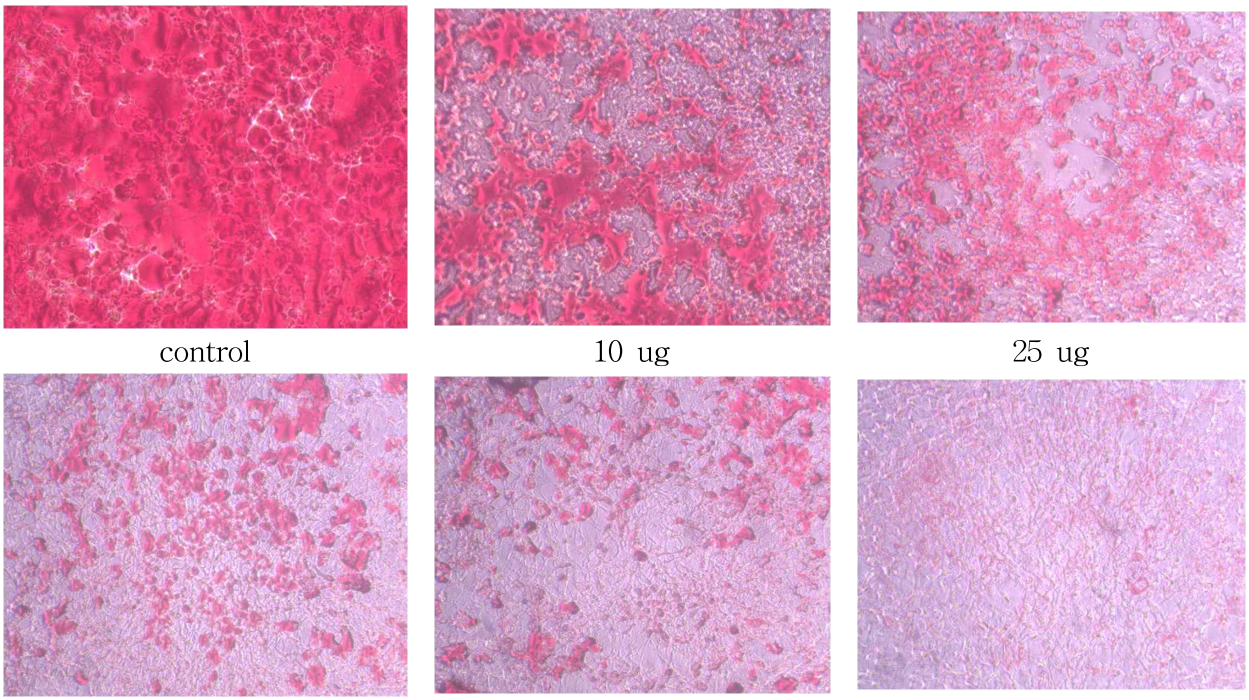


Fig. 55. GTSE의 농도에 따른 지방세포의 감소

3. 동물실험

가. *in vivo* 체중 감소 동물실험

동물실험은 6그룹으로 나누어 수행되었으며, 한 그룹당 6마리의 mice를 사용하였고, 식이는 무제한으로 하면서 5일간격으로 8주간 측정하였다. 제1그룹은 일반 식이 control 그룹, 제2그룹은 Hi-fat diet 대조군 그룹, 제3그룹은 hi-fat diet식이 하면서 GTSE 10 ug 투여군, 제4그룹은 hi-fat diet식이 하면서 GTSE 50 ug 투여군, 제5그룹은 hi-fat diet식이 하면서 GTSE 100 ug 투여군, 그리고 제 6그룹은 hi-fat diet를 통하여 체중을 늘인 다음 GTSE를 100 ug 투여 한 그룹이다.

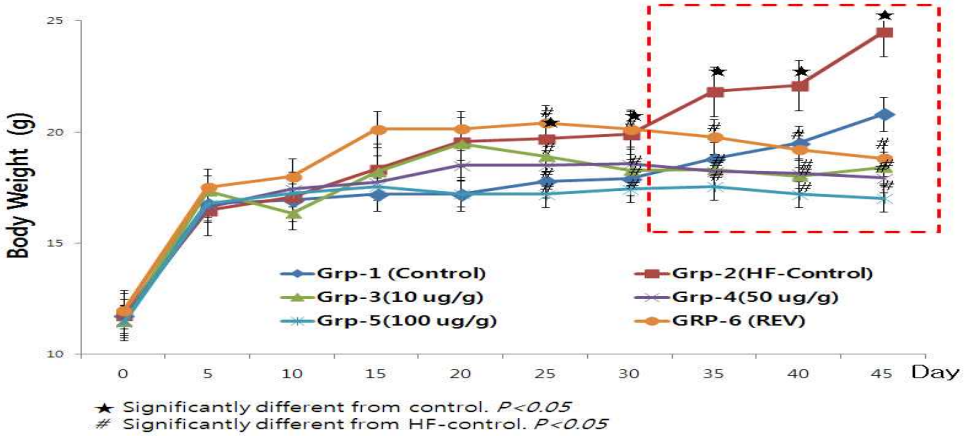


Fig. 56. mice를 이용한 체중 감소 실험

표 26. 동물실험을 통한 체중 감소 data

S.N	Date/groups	Grp-1 (Control)	Grp-2 (HF-Control)	Grp-3 (10 ug)	Grp-4 (50 ug)	Grp-5 (100 ug)	Grp-6 (REV)
0	13-03-05	11.72	11.75	11.47	11.54	11.432	11.956
1	13-03-12	16.77	16.47	17.33	16.60	16.76	17.524
5	13-03-18	16.93	17.08	16.34	17.43	17.24	17.992
10	13-03-23	17.2	18.34	18.22	17.74	17.54	20.12
15	13-03-28	17.20	19.56	19.46	18.50	17.22	20.14
20	13-04-02	17.79	19.70	18.92	18.50	17.20	20.40
25	13-04-07	17.90	19.90	18.28	18.56	17.43	20.12
30	13-04-12	18.80	21.82	18.30	18.23	17.54	19.77
35	13-04-17	19.50	22.10	18.01	18.14	17.20	19.21
40	13-04-22	20.80	24.50	18.40	17.94	17.01	18.82

10 ug을 투여한 그룹에서는 그다지 효과가 좋지 않았으며 50ug, 100ug 투여 그룹에서 일반대조군과 비교하여 각각, 23.7%, 38.6%의 감소가 일어났으며, hi-fat 대조군과 비교하였을 때, 각각, 45.7%, 56.3%의 체중감소가 일어나 체중감소에 좋은 효과를 나타낸 것으로 판단된다.

나. 체중 감소의 signal pathway 규명

(1) 실험동물

동물은 NIH의 동눌실험 가이드를 준용하였고, 전남대학교 동물실험윤리위원회의 인가를 받아 실시하였다(CNU IACUC-YS-2013-3). 8주령의 ICR계의 암컷 54마리(Taconic, Chungbuk, Korea)를 임의로 6마리씩 9그룹으로 나누고 1주일을 순치 시켰다. 시육조건은 12시간 간격으로 암/명암을 조절하였고 22℃, 상대습도는 50%±5%로 하였으며 물과 식이는 자유스럽게 취할 수 있도록 하였다. 대조군(①)은 일반식이(NC: NIH #31 M Rodent Diet, Taconic)를 시켰으며, 고지방식이 대조군(②)(high-fat diet control (HFC))은 45% fat 식이(D12451 Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)를 시켰다. 그리고 고 탄수화물그룹(③)(high-carbohydrate diet (high-carbohydrate diet control (HCC))은 70% carbohydrate 식이(TD.98090 Harlan Teklad, Seoul, Korea)를 이행하였다. 또한, positive 대조군(④)으로써는 고지방식이를 시키고 Orlistat® 50 mg/kg/day를 투여하였다(HF-O). 녹차씨앗 추출물을 투여한 그룹으로서는 고지방식이를 시키면서 100mg/kg/day의 녹차씨앗 추출물을 투여한 그룹(⑤)(HF-100), 그리고 고 지방식이에 300mg/kg/day의 녹차씨앗 추출물을 투여한 그룹(⑥)(HF-300)과 고 탄수화물 식이를 시키면서 100mg/kg/day의 녹차씨앗 추출물을 투여한 그룹(⑦)(HC-100) 및 300mg/kg/day의 녹차씨앗 추출물을 투여한 그룹(⑧)(HC-300)의 그룹으로 하였으며, 또 다른 그룹의 하나는 먼저 고지방식이를 4주간 시켜 비만을 유도한 뒤 킨 후 300mg/kg/day의 녹차씨앗 추출물을 투여한 그룹(⑨)(PHF-300)으로 디자인하였다. 모든 그룹의 시료투여는 하루 한번 경구투여하였으며 대조군은 시료없이 증류수를 공급하였다. 체중 및 섭취율을 그룹마다 일주일에 두 번 측정하였고, 10주 후에 하룻밤 단식 시키고 ether로 마취 시키고 대정맥으로부터 채혈하였고, Perirenal white adipose (WAT), epididymal WAT, mesenteric WAT 및 liver tissues을 분리하여 무게를 재었다. mesenteric adipose 및 liver tissues는 무균조건에서 분리하여 액체질소에 넣은 후 -80℃에 저장하여 RNA 및 단백질 추출에 사용하였다. 총단백질은 TRI 시약을 회사의 지시에 따라 채취하여 BCA protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA).으로 농도를 측정하였다. 혈청 시료는 분석시까지 -80℃에 보존하였다.

(가) 식이섭취 및 체중

10주후, HFC 및 HCC그룹의 체중은 NC그룹보다 현저히 높은 것으로 나타났다(Fig. 57A 및 3B).

HF-100 및 HF-300 그룹은 HFC 그룹과 비교하여 볼 때 아주 현저하게 감소된 것으로 나타났다. 4주동안 먼저 고지방식이[29]를 시켜 비만을 유도한 후 GTE 300mg/kg를 투여한 그룹인 PHF-300그룹의 체중은 1-10주에서 아주 현저히 감소된 것으로 나타났다. 그리고, 고 탄수화물

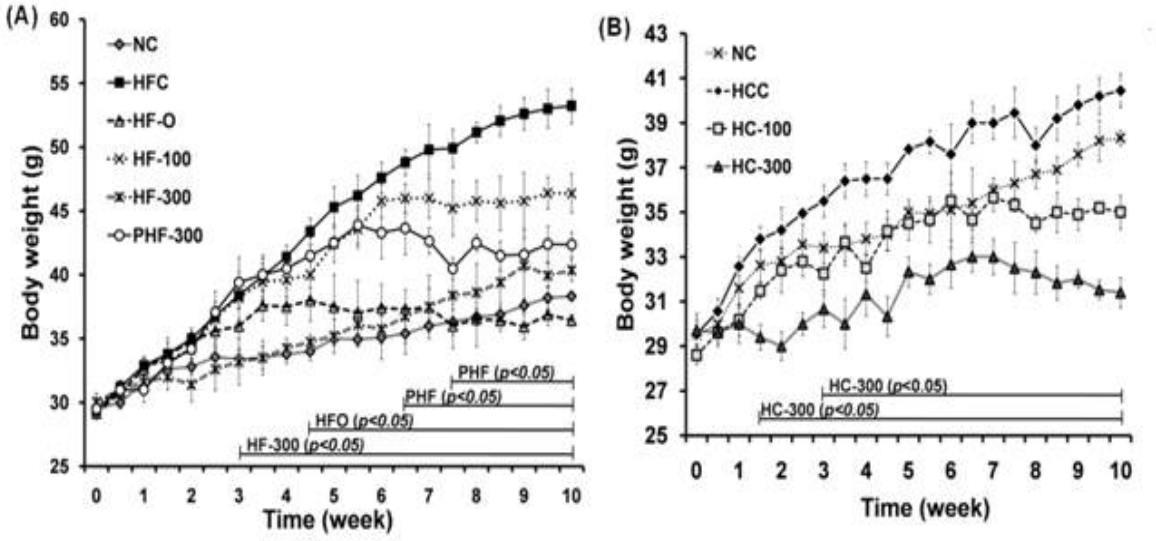
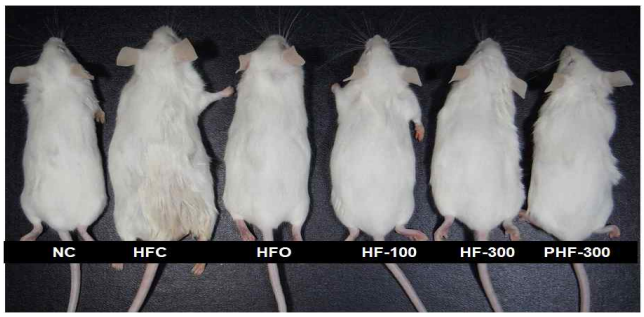


Fig. 57. Effect of GTE on body weight gain, adipose and liver tissue weight. The anti-obesity effect of GTE in mice fed (A) high-fat diet and (B) high-carbohydrate diet. (C, D) Representative picture of mice fed HFD and HCD. Effect of GTE on fat-pad weight (E, F) and liver weight (G,H). Data are expressed as mean±SEM (n=6). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$ and $***P < 0.001$ vs. control and $\#P < 0.05$ vs NC.

식이그룹에서 HC-100그룹은 3-10주사이, HC-300그룹은 2-10주동안 꾸준히 감소되는 것을 볼 수 있다.HFD 식이 시킨 쥐에 GTE의 처리는 전반적으로 더 많은 체중증가를 억제하였으며, HCD[30] 시킨 그룹에서 더 현저한 슬림밍 효과[31]를 나타내었다(Fig 58A 및 4B).

(A)



(B)

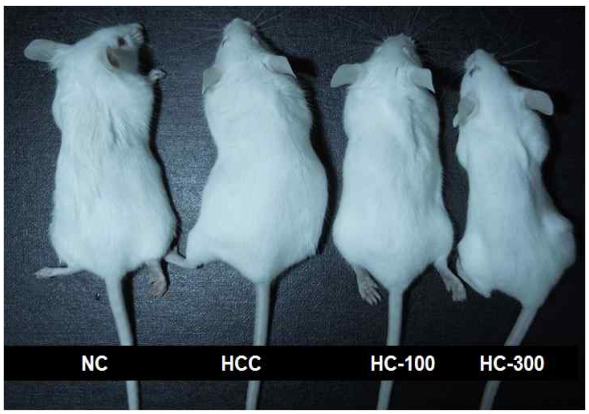


Fig. 58. Representative picture of mice fed HFD(A) and HCD(B)

(나) 간 및 지방조직의 무게 변화[32])

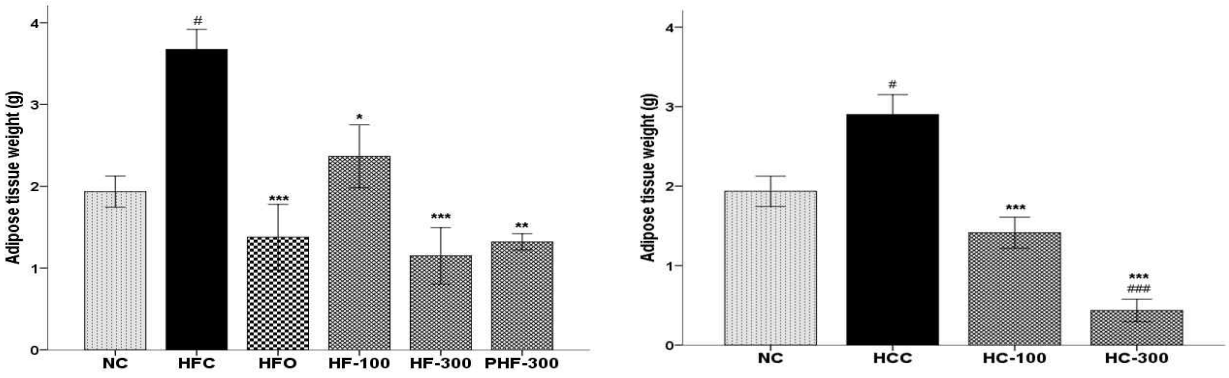


Fig. 59. Effect of GTE on fat-pad weight, (A) HFD group, (B) HCD group

흰지방조직의 무게는 녹차씨앗 추출물을 투여한 HFD의 그룹이 HFC(대조군) 그룹에 비하여 현저하게 감소된 것을 볼 수 있다(Fig. 59A). 또한, 고 탄수화물 식이를한 그룹에서는 대조군(HCC)에 대하여 HC-100 및 HC-300 그룹은 확실하게 줄어든 것으로 나타났다.(Fig. 59B)

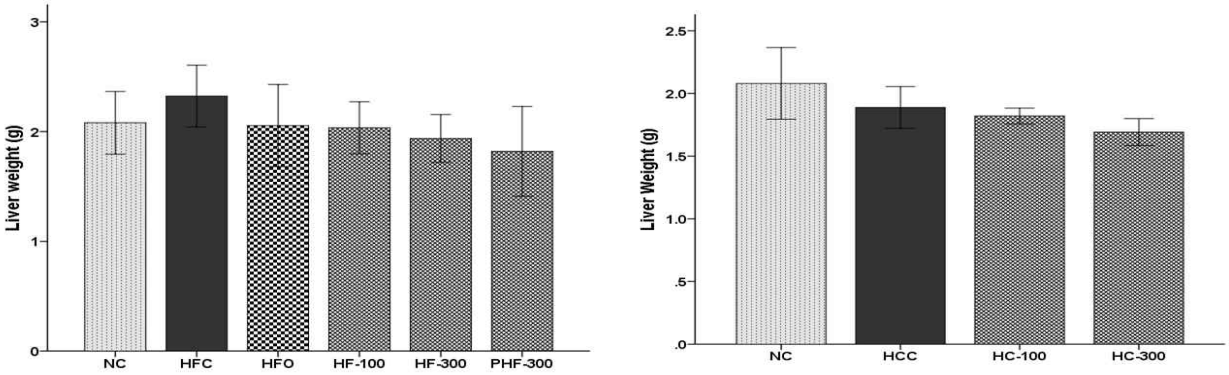


Fig. 60. Effect of GTE on liver weigh , (A) HFD group, (B) HCD

그리고, 실험동물 대조군인 HFC(Fig. 60A) 및 HCC(Fig. 60B)의 간의 무게[33]는 녹차 추추물을 처리한 그룹보다 조금 증가된 것으로나타났으나 통계적인 중요성을 나타나지 않았다

(다) 혈청 및 채변의 생화학적 인자

혈청의 생화학적인자들의 결과를 Table 27에 나타내었다.

Table 27 Effect of aqueous extract of green tea seed on food intake and serum biochemical parameters in HFD and HCD induced obesity in mice

Parameters	NC	HFC	HCC	HFO	HF-100	HF-300	PHF-300	HC-100	HC-300
Food intake (g/d)	24.75±2.15	20.57±1.16	21.68±0.39	21.90±0.21	19.68±1.61	18.35±1.96	21.15±.97	21.50±1.39	20.90±1.72#
TG (mg/dL)	186.93±25.73*#	537.15±26.20	439.56±69.39	340.09±21.53*	306.94±50.82*	200.94±28.31*	230.82±23.02*	279.85±37.03#	75.32±34.90#
TC (mg/dL)	69.27±2.41*#	145.83±18.59	106.48±7.63	85.24±5.23*	129.28±23.04	82.81±3.89*	93.28±2.50*	68.92±4.05#	66.26±1.83#
FFA (μEq/L)	179.35±26.54*#	247.98±28.52	216.07±38.66	154.02±12.66*	142.63±9.29*	133.76±21.90*	173.52±26.08*	145.81±21.10#	121.03±11.0
HDL (mg/dL)	49.14±2.68*#	36.93±4.12	39.38±3.40	48.60±5.62*	43.89±7.87*	48.97±3.95*	47.85±1.59*	45.51±7.32#	50.87±3.94#
LDL (mg/dL)	20.35 ±1.37*#	54.29±3.83	47.54±2.47	27.92±1.49*	43.24±5.27	24.29±3.47*	21.72±1.46*	20.84±1.36#	23.48±2.91#
Glucose (mg/dL)	207.75±11.66*#	366.85±32.68	369.45±20.59	230.34±9.95*	263.36±17.15*	132.68±1.26*	161.61±3.74*	186.11±19.89#	175.60±6.41#
ALT (IU/L)	36.86±3.34*#	87.73±8.65	57.86±9.56	40.80±3.95*	56.31±10.84*	49.09±5.63*	46.25±3.08*	42.67±3.08#	36.99±00.84#
AST (IU/L)	48.34±0.95*#	109.63±4.36	78.06±8.13	74.56±1.59*	56.23±1.05*	59.35±2.37*	55.38±5.75*	40.95±6.98#	31.46±0.60#
Insulin (pg/mL)	1240.19±64.97*#	2586.08±222.76	2586.08±102.10	1699.65±40.3.76*	1862.08±37.12*	998.86±204.20*	938.52±71.07*	785.37±92.82#	655.42±21.48
Leptin (pg/mL)	183.80±7.45*#	428.20±2.73	323.75±44.19	218.17±74.15*	284.91±49.55*	236.13±15.73*	200.75±39.94*	222.64±6.01#	124.88±4.37#
Adiponectin (pg/mL)	1007.96±103.51*#	856.56±270.00	910.61±174.70	1522.16±130.28*	1340.90±69.88*	1835±99.35*	1784.68±134.74*	1434±174.70#	2048±49.35#
IL-10 (pg/mL)	105.03±42.63*	336.51±35.99	135.58±47.124	125.15±0.73*	115.07±44.82*	59.00±2.19*	47.87±4.89*	58.349±5.66#	66.85±15.05#
IL-6 (pg/mL)	35.19±2.83*#	162.37±10.28	93.47±8.63	40.38±4.29*	78.93±7.48*	34.68±6.48*	59.01±10.38*	44.82±3.98#	26.48±2.94#
TNF-α (pg/mL)	0.56±0.07*#	1.68±0.13	1.05±0.11	0.86±0.03*	1.02±0.12	0.75±0.18*	0.86±0.03*	0.77±0.05#	0.42±0.02#

Data are expressed as mean±SEM (n=6). $^{*}P < 0.05$, significantly different from HFC. $^{\#}P < 0.05$, significantly different from HCC

TG, TC, FFA, LDL cholesterol, glucose, ALT 및 AST[34]의 혈청에서의 농도는 HFC 및 HCC그룹이 대조군 및 녹차씨앗 추출물 처치그룹보다 현저히 높게 나타났다. HDL cholesterol은 HFC 및 HCC그룹에서의 농도가 녹차씨앗 추출물을 처리한 그룹보다 감소한 것으로 나타났다[35].

고 지질식이 및 GTE(녹차씨앗 추출물)을 투여한 HF-300 group에서 TG, TC, FFA, LDL cholesterol, glucose, ALT 및 AST 농도는 각각 1.6-, 0.7-, 0.8-, 1.2-, 1.76-, 0.7- 및 0.8배로 감소하였다. 그리고, 먼지 고지방식이를 하여 비만을 유도한 후 GTE를 300mg/kg를 투여한 그룹인 PHF-300에서의 혈청의 TG, TC, FFA, LDLcholesterol, glucose, ALT 및 AST[36]의 농도는 1.3-, 0.5-, 0.4-, 1.4-, 1.2-, 0.8- 및 0.9배로 역전 현상을 나타내었다. 고 탄수화물 식이를 하고 GTE를 100mg/kg를 투여한 HC-100그룹에서의 TG, TC, FFA, LDLcholesterol, glucose, ALT 및 AST의 농도는 각각 4.8-, 0.6-, 0.7-, 1.0-, 1.1-, 0.5- 및 1.7배를 나타내었다. 그러나, HDL cholesterol은 가각의 대조군에 비교하여 HF-100 group (0.5배), HF-300 group (0.7배), PHF-300 group(0.8배), HC-300 group(0.4배) 및 HC-300 group(1.1배)로 증가된 것으로나타났다.

채변에서의 TG 및 TC는 3주간 채변하여 분석하였으며 실험의 시작과 끝날 무렵의 시료를 사용하였다(Table 28).

Table 28 Effect of GTE on fecal triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet.

Parameters	NC	HFC	HCC	HFO	HF-100	HF-300	PHF-300	HC-100	HC-300
TG (mg/g)									
Start (3 week)	22.09±6.49*#	46.22±2.99	29.68±2.00	56.34±3. 67*	47.38±4.14	48.26±2.21	47.62±4.20	26.50±3.06#	24.01±57.59#
Final (3 week)	30.81±14.48*	157.04±2.95	32.67±9.02	190.35±19.99*	181.17±13.79*	187.17±18.48*	202.42±21.18*	32.18±7.04	36.40 ± 10.01
TC (mg/g)									
Start (3 week)	12.73±2.95*	62.54±5.17	17.03±3.30	74.86±5.83*	78.95±12.39*	73.98±6.90*	59.95±2.35*	18.36±4.16	18.46±3.79
Final (3 week)	16.48±4.10*#	72.82±14.90	26.06±3.89	87.54±4.84*	89.05±3.26*	97.26±3.45*	86.75±2.44*	31.38±8.33#	34.25±2.58#

Data are expressed as mean±SEM (n=6). $^{*}P < 0.05$, significantly different from HFC. $^{\#}P < 0.05$, significantly different from HCC

변 중의 TG 및 TC는 마지막 3주간 GTE 처치한 그룹에서 HFC 및 HCC의 대조군과 비교해볼 때 아주 높게 나타나 GTE가 지방대사를 억제하는 것으로 사료된다[37].

(라) 혈청insulin, leptin, adiponectin, IL-10, IL-6 및 TNF-α에대한 GTE의 영향

GTE의 혈청insulin, leptin, adiponectin, IL-10, IL-6 및 TNF-α[38]에대한 GTE의 영향은 Table !에 나타내었다. HFC 및 HCC그룹에서의 이들의 농도는 NC 및 GTE 처리군과 비교하여 볼 때 현저히 증가된 것을 볼 수 있다. 또한, adiponectin은 GTE 처리 그룹이 HFC 및 HCC와 비교할 때 현저히 증가된 것도 알 수 있었다.

(마) 지방조직의 leptin, IL-6 및 adiponectin에 대한 GTE의 영향[39]

장간막의 지방조직에서의 leptin, IL-6 및 adiponectin의 농도는 Fig.61에 나타내었다.

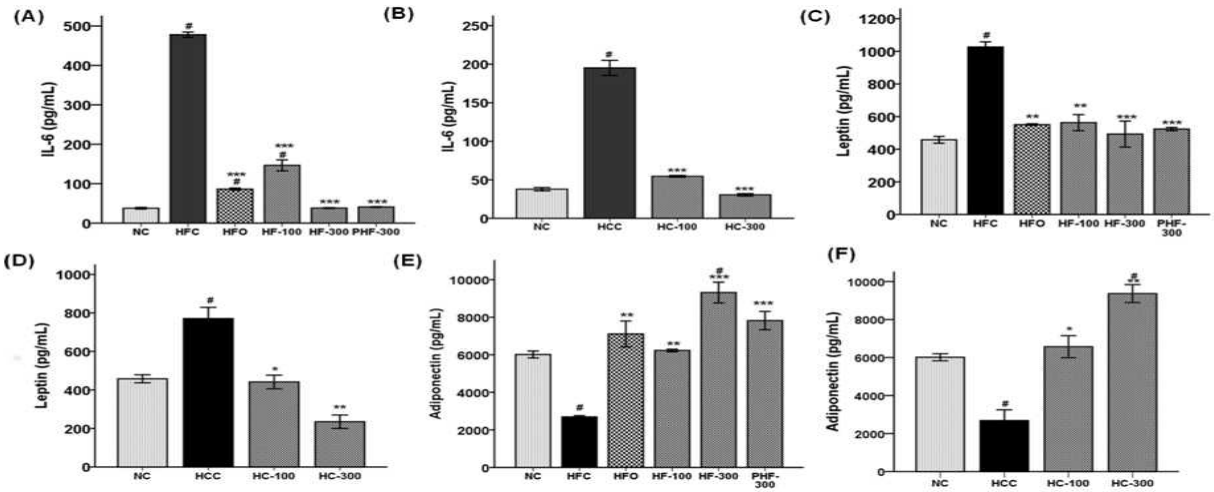


Fig. 61. Effect of GTE on adipose tissue adipokine levels in HFD and HCD induced obese mice. Data are expressed as mean±SEM (n=6). *$P < 0.05$, **$P < 0.005$ and ***$P < 0.001$ vs. control and #$P < 0.05$ vs NC.

HFD 및 HCD 식이 쥐에서 지방조직의 leptin 및 IL-6[40]가 일반 대조군에 비교하여 현저히 증가(P<0.01)된 것을 볼 수 있으며, GTE 처치군에서는 지방조직의 leptin 및 IL-6가 현저히 감소된 것으로 나타났다. 그리고 장간막의 흰지방조직에서의 adiponectin의 농도는 HFC와 비교하였을 때 고 지방식이를 하고 GTE를 농도별로 투여한 그룹인 HF-100, HF-300 및 PHF-300 group에서 각각 1.3-, 2.4- 및 1.9-배 증가하였고(Fig.61E), 고 탄수화물 식이를 하고 GTE를 농도별로 투여한 그룹인 HC-100 및 HC-300 group에서는 대조군인 HCC group과 비교하였을 때 1.4- 및 2.4배로 증가하였다(Fig. 61F).

(바) mRNA 발현에 관여하는 효소 및 전사인자에 대한 GTE의 영향

지방 및 에너지 대사에 관련되는 경로의 biomaker[41]에 GTE가 어떠한 영향을 미치는가를 평가하기 위하여 장간막 지방조직과 간 조직을 사용하였다. 간 조직에서 ACC-1(acetyl-CoA carboxylase), GPAT-1(Carnitine palmitoyltransferase-1)[42], FAS(fatty acid synthase) 및 MLYCD(malonyl-CoA decarboxylase)[43] mRNA등은 HFC 및 HCC등의 대조군과 비교하였을 때 GTE 처치그룹에서 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 62A).

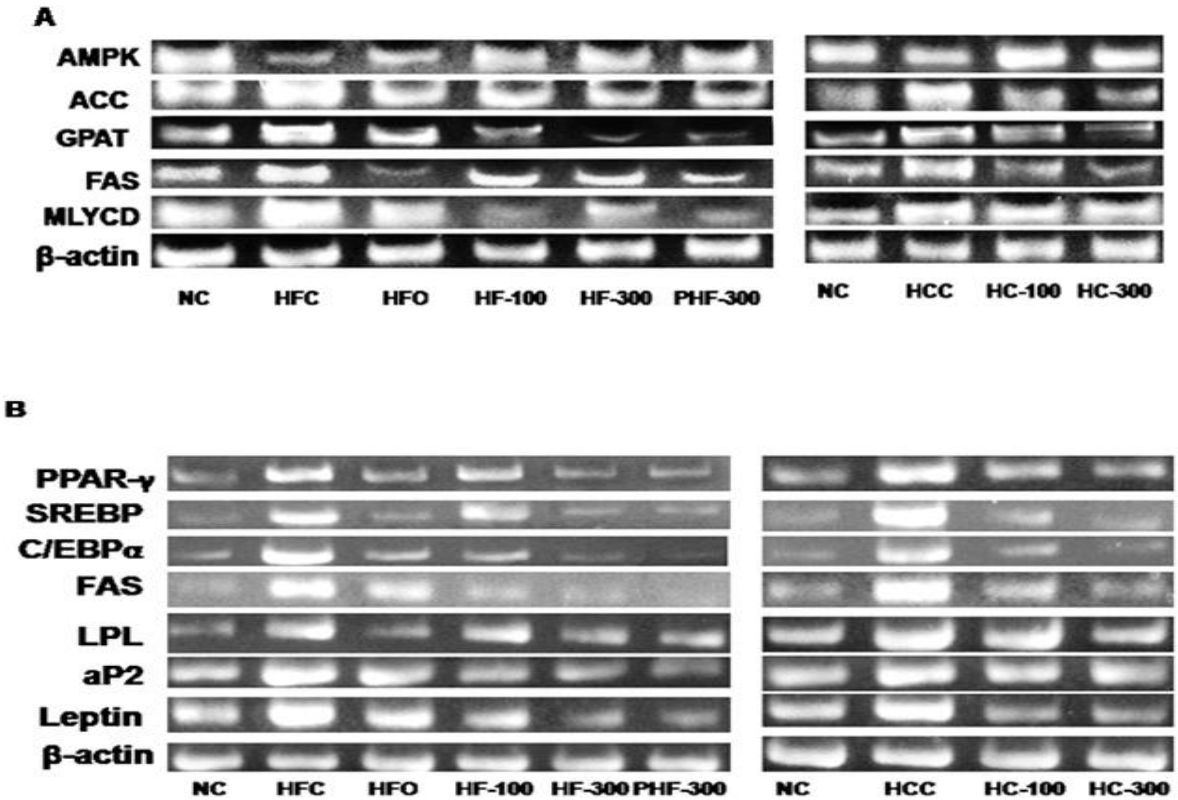


Fig. 62. Gene expression determined by RT-PCR analysis in the mesenteric adipose tissue and liver from mice fed HFD and HCD. (A) mRNA expression of genes related to energy metabolism. (B) mRNA expression of genes related to adipogenesis and lipogenesis

GTE는 간에서의 AMPK(Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase)의 발현[44]을 유도한다. Fig. 62B는 장간막 지방조직의 lipogenesis[45] 및 adipogenesis[46]에 관여하는 유전자의 발현을 나타내었다. PPARγ(peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBPα (CCAAT/enhancer-binding protein α) 및 SREBP(sterol regulatory element binding proteins)등은 HFC 및 HCC의 대조군에 비교하여 볼 때 GTE 처치 그룹에서 발현이 억제되는 것을 볼 수 있다. 장간막 WAT에 있어 lipogenesis 및 adipogenesis에 관련된 LPL(lipoprotein lipase), aP2(adipocyte protein 2) 및 leptin[47]은 농도 증가에 따라 감소되는 것으로 나타났다.

다. signal pathway 작용 기전 분석

신생혈관 형성은 생리학적 및 병리학적으로 중요한 역할을 한다. 다양한 신호전달 경로가 복합적으로 작용하며, 신생혈관형성인자들의 조절에 대해서도 많은 연구가 되고 있다. Phosphatidylinositol 3’-kinase (PI3K)/AKT는 VEGF(vascular endothelial growth factor) 와 같이 일반적으로 종양유전자 및 암억제인자의 신호전달에 관여한다. VEGF는 신생혈관형성에 가장 중요한 인자이며, 항암제 및 항비만제제를 개발하기위한 표적으로 이용되고 있다. ERK-2(Activation of extracellular signal-related kinase)의 활성은 VEGF 매개 세포 분화에 필수적이며 내피세포의 이동에도 중요한 역할을 한다. 내피세포의 이동, 분화, 성장 및 생존을 위해서는 두가지의 경로, 즉, PI3K-AKT 및 Raf-MEK-ERK 경로가 주요한 역할을 한다. 이 두가지의 경로는 신생혈관의 형성을 위한 필수적인 경로이며, NF-κB 및 c-Jun경로를 필요로 한다. 여기에서 GTE(녹차씨앗 추출물)은 농도 의존적으로 VEGFR-2, AKT, PI3K, VE-Cadherin, B-Catenin, NF-κB 및 ERK-2의 mRNA 발현을 제어한다(Fig. 2). 결과적으로 GTE는 AKT, ERK-2 경로의 제어를 통하여 신생혈관의 형성을 제어하는 것으로 판단된다. VE-Cadherin은 inhibits VEGF-유도 ERK 활성화 및 내피세포의 이동을 방해함으로써 신생혈관 형성을 제어한다.

식이는 비만을 유도하지만 천연산물은 식욕조절, 음식섭취, 지방산화, 지방형성 및 비만세포형성억제 등에 중요한 역할을 할 수 있다. 암세포와 같이, 지방조직의 성장과 확장에는 지방조직에 산소와 영양분을 제공하여 지방세포의 수와 사이즈를 크게하기 위하여 새로운 혈관의 형성(신생혈관형성)을 요구한다. 따라서, 신생혈관의 형성을 억제하면 지방세포수의 감소 및 지방량을 줄임으로써 비만세포의 성장을 억제한다. Oil red O 염색으로 GTE가 아지방세포의 형성을 억제하고 지방의 축적을 억제하는 것을 증명할 수 있었고(1차년도), *in vivo* 실험에서 GTE는 고 지방식이 및 고 탄수화물 식이에서 유도된 체중을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. 지방 조직 및 간의 무게는 GTE를 투여한 쥐의 몸무게와 연관되어 있었고, GTE 매개 체중감소는 식이의 섭취와는 독립적으로 지방조직의 감소에 공헌하였다. 또한 GTE는 대조군과 비교하였을 때 혈청의 지방과 당의 농도를 현저히 저하시켰고, 혈청 및 자의 지방 조직의 leptin 및

IL-6를 감소 시켰고, 반대로 adiponectin의 농도는 현저히 증가시킨 것을 볼 수 있었다.
그리고, AMPK의 활성은 글리세롤 지방의 형성을 약회시키고, MLYCD의 하위조절을 유도하는 GPAT-1의 활성을 하위조절하여 지방의 산화를 증가시킨다. GTE에 의하여 활성화된 AMPK는 Acetyl CoA가 malonyl CoA(MLYCD)로 순차적으로 하위조절하는 ACC-1을 하위조절한다. 그리고, PPARγ, C/EBPα 및 SREBP는 성장하고 있는 비만세포나 지방조직에 고도로 발현되는 adipogenesis 및 lipogenesis에 관여하는 아주 중요한 전사인자이다. 우리는 이 연구를 통하여 GTE가 이러한 전사인자들과 목표유전자(LPL, aP2 및 leptin)를 억제하는 것을 밝혔고, in vivo 실험에서 GTE는 동화작용 경로를 억제하고, 이화작용 경로를 자극하고, 식이섭취에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 전통적인 천연산물은 효과를 강화 시키는 동시에 부작용을 감소시키는 목적으로 사용되며, 녹차씨앗추출물(GTE)은 특히 고 탄수화물 식이에 300mg/kg를 투여하였을 때 아주 현격한 효과를 나타내었다.
우리의 연구결과는 GTE가 고도의 지질을 억제하고 지방덩이를 저하시키는 기전을 분자적 측면에서 밝혔고, 고지질 및 고 탄수화물식이를 시킨 쥐에서 지방의 억제 조절 및 병리적 염증반응에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 우리는 GTE가 신생혈관의 형성 및 지방세포의 분화를 억제함으로써 비만 관련 대사장애를 현저하게 저해하는 활성을 가지고 있고, 지방 덩이 및 혈청의 지방 농도를 감소시킴으로써 체중의 증가를 억제하는 효과를 가지고 있는 훌륭한 천연산물인 것을 밝힌다.

4. 녹차씨 압착박과 녹차 추출물의 체지방 감소 관련 기능성 평가

◦ 녹차는 체지방감소에 도움을 주는 소재로 이미 잘 알려진 소재이지만 녹차씨의 경우에는 체지방 감소와 관련된 과학적인 근거자료가 많이 부족한 실정임.

◦ 이에 본 과제에서는 녹차씨의 체지방 감소 효능을 과학적으로 구명하여 개별인정을 획득하고자 하는데, 녹차에 함유된 지표성분인 카테킨이 녹차씨에서는 확인되지 않아, 녹차와 녹차씨에 함유된 성분 및 체지방 감소 관련 기능성 효능을 상호 비교해 보기로 함.

가. 녹차씨 압착박과 녹차 추출물의 제조

◦ 녹차와 녹차씨를 동일한 조건에서 추출하여 얻어진 추출물중의 성분을 비교해 보기 위해 녹차와 녹차씨 일정량(200 g)을 취한 후 이들 각각에 5 배수의 물(1 L)을 첨가한 후 95℃에서 1시간 30분 동안 추출 후 여과하여 여액을 동결건조하여 분말화 하였음.

◦ 녹차 추출물과 녹차씨 추출물의 열수 추출후 동결건조하여 얻어진 수율은 각각 18.25%, 18.44%로 정도

로 거의 차이가 없었음.

Table 29. 녹차 추출물과 녹차씨 추출물의 수율 비교

시료	수율 (%)
녹차 추출물	18.25
녹차씨 추출물	18.44

나. 추출물 중의 성분 비교

◦ 녹차와 녹차씨 및 각 추출물의 성분을 비교하기 위하여 지표성분인 Naringenin과 녹차에 다량 함유되어 있다고 알려진 Catechin, 조사포닌, total phenol을 정량분석하였음.

(1) Naringenin

◦ 시료 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 Sodium acetate buffer 1 mL, Novozym 33095, Pectinex Ultra SP-L, Viscozyme 각각 1 mL를 첨가하여 Incubator(37℃, 150 rpm)에서 24시간 효소 가수분해 후 가수분해가 종료된 용액 200 μL를 Ethanol 800 μL와 혼합하고 원심분리(10000 rpm, 4℃, 10 min)한 후 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 용액을 HPLC로 분석함.

◦ 표준물질 Naringnin 10 mg을 정밀히 달아 MeOH 10 mL (1000 ug/mL)에 녹인 후 MeOH로 희석하여 working solution으로 사용하였음.

◦HPLC 분석조건은 아래와 같음.

항목	조건
□ Instrument	HPLC system
□ Detecter	UV DAD detector (280 nm)
□ Column	Atlantis C_{18} (4.6 mm×150 mm, 3 ㎛)
□ Column oven	30 ℃
□ Injection vol.	20 μL
□ Flow rate	1.0 mL/min
□ Mobile phase	A, 10% MeCN in 0.1% TFA B, 50% MeCN in 0.1% TFA

min	A (%)	B (%)
0	80	20
60	20	80

(2) 조사포닌

◦시료 일정량(5 g)을 플라스크에 취하고 Methanol 50 mL를 가하여 상온에서 약 1시간동안 교반 추출한 다음 농축플라스크에 여과함. 잔류물에 대하여 위의 조작을 반복한 다음 여과지는 Methanol 50 mL로

세척 후 합쳐진 Methanol을 감압농축한 후, 증류수 50 mL로 용해하여 분액여두에 넣고 여기에 수포화 부탄올용액 50 mL을 가한 다음 격렬히 흔들어 물과 부탄올층이 완전 분리될 때까지 정치함. 부탄올층을 따로 모으고 다시 물층에 대하여 수포화부탄올 추출조작을 위와 동일한 방법으로 2회 더 반복함. 회수된 부탄올 용액 전액을 분액여두에 옮긴 후 증류수 50 mL 가하여 흔들어 물층과 부탄올층을 완전히 분리시킴. 물층을 제거하고 부탄올층을 미리 항량된 농축플라스크에 옮겨 감압 농축 후 농축잔류물에 에테르 50 mL를 가하고 46℃ 수욕에서 30분간 환류냉각하고 에테르를 제거함. 잔류물은 항량이 될 때까지 건조하고 데시케이터에서 방냉한 후 무게를 달아 계산식에 따라 조사포닌 함량을 구함.

$$\text{조사포닌 (mg/g)} = \frac{\text{건조 후 수기 무게 (mg) - 항량된 수기무게 (mg)}}{\text{시료 (g)}}$$

(3) Total phenol

◦ 적당량의 시료를 정밀히 달아 물을 1 mL 넣은 녹인 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 시험용액으로 사용하였음.

◦ 시험용액(100 μl)에 정제수 900 μl를 혼합한 희석액 1 mL에 Folin-ciocalteu reagent(Fluka, 47641, Buchs, Switzerland)를 100 μl를 가하고 5분간 방치한 다음 7% (w/v) Na_2CO_3 용액을 1 mL 첨가 후 정제수 400 μl를 첨가해 잘 혼합한 후 90분간 실온에 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하여 분석함.

◦총 페놀 함량은 chlorogenic acid (0-1000 μg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 분석시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준검량선으로 부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였으며 시료 g 당 mg gallic acid equivalent로 나타내었음.

(4) Catechins 분석

◦ 식품공전에 의한 방법에 의하여 분석하였음.

◦ 시료 일정량(0.2 g)을 정밀히 달아 MeOH 50 mL에 녹인 후 여과(0.45 um PTFE)하여 HPLC 분석을 진행함.

◦ 표준품은 에피갈로카테긴(EGC), 에피카테킨(EC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨 갈레이트(ECG)를 1000 μg/mL stock용액을 희석하여 사용함.

◦HPLC 분석조건은 아래와 같음.

항목	조건
□ Instrument	HPLC system
□ Detecter	UV DAD detector (280 nm)
□ Column	sp column MG Ⅲ (5 μm, Φ 4.6×250 mm)
□ Column oven	40 ℃
□ Injection vol.	20 μL
□ Flow rate	1.0 mL/min
□ Mobile phase	A: 0.1% AcOH in Water B: Acetonitrile

min	A (%)	B (%)
0	85	13
10	85	13
15	70	30
20	50	50

◦ Naringenin은 녹차와 녹차 추출물 분말에서 검출되지 않았으며, 녹차씨와 녹차씨 추출물 분말에서만 각각 1.77 mg/g. 4.23 mg/g으로 분석됨.

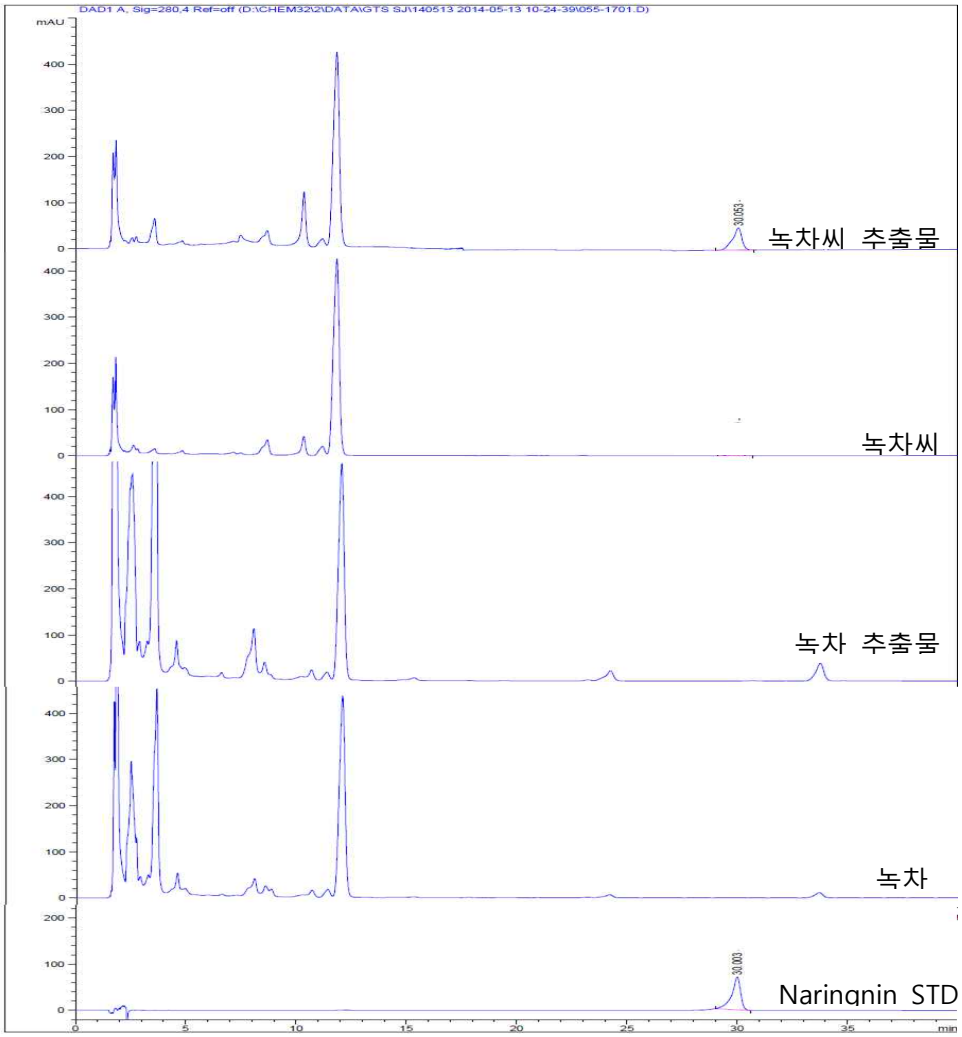


Fig. 63. 녹차, 녹차씨 및 각각 추출물의 Naringenin Chromatogram

◦ Catechin은 녹차씨와 녹차씨 추출물 분말에서 검출되지 않았으며, 녹차와 녹차 추출물 분말에서 각각 52.64 mg/g, 121.18 mg/g으로 분석됨.

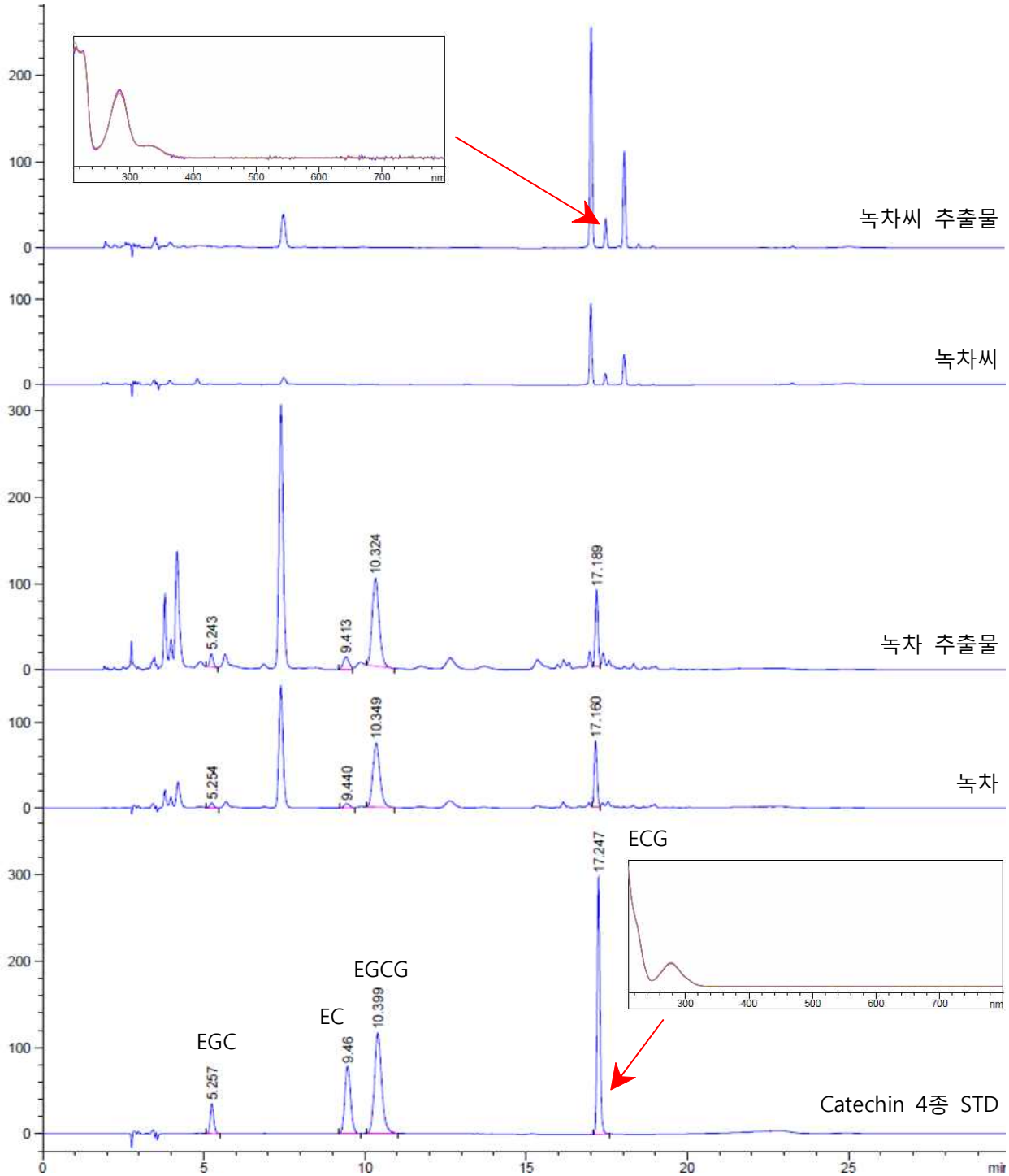


Fig. 64. 녹차, 녹차씨 및 각각 추출물의 Catechin류 Chromatogram

◦ total phenol은 녹차 추출물 분말 185.1 mg/g, 녹차 111.1 mg/g 순으로 높게 함유되어 있으며, 녹차씨와 녹차씨 추출물의 total phenol 함량은 각각 7.7 mg/g, 23.9 mg/g으로 녹차와 녹차 추출물 분말에 비하여 현저히 낮음을 확인.

◦ 조사포닌은 녹차 추출분말 31.59%로 가장 높게 함유되어 있으며, 녹차씨 13.02%, 녹차 11.45%, 녹차씨 추출물 9.44% 순으로 함유되어 있음을 확인

Table 30. 녹차와 녹차씨 및 각 추출물의 성분 비교

	Naringenin (mg/g)	총 Catechin (mg/g)	Total phenol (mg/g)	조사포닌 (%)
녹차	-	52.64	111.1	11.45
녹차 추출물 분말	-	121.18	185.1	31.59
녹차씨	1.77	-	7.7	13.02
녹차씨 추출물 분말	4.23	-	23.9	9.44

다. 추출물 간의 체지방 감소 관련 효능 평가

(1) 3T3-L1 cell 지방축적억제

(가) 3T3-L1 아지방세포

·Mouse 배아에서 유래된 3T3-L1 아지방 세포는 항비만의 in vitro system에서 가장 많이 이용되고 있는 세포로서 4.5 g/L, 10% fetal bovine serum, Gibco 16170, penicillin/streptomycin(100 μg/mL penicillin, Gibco 15140 and 100 μg/mL streptomycin in 0.85% saline), 1% 100 uM sodium pyruvate을 함유한 DMEM로 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양함.

(나) Oil red O

·3T3-L1 세포는 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있음.

·adipocyte로 분화 시 단백질들의 분비가 촉진되는 등 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 많이 사용됨.

·따라서, 분화 촉진 인자들에 의해 분화된 3T3-L1 세포는 세포 내 지방이 축적되며 지방과 관련된 콜레스테롤, 중성지방 등 지방세포로서의 형태 및 특성을 나타나게 됨.

·세포에 분화 촉진 후 완료 이후 세포내 지방구 생성을 확인하기 위해, 지방적(lipid droplets)의 지방에 특이적으로 반응하여 염색되는 Oil Red O 염색법을 수행하여 축적 중인 지방을 염색된 지방구를 흡광도를 이용하여 분석함.

·3T3-L1 아지방 세포의 지방세포로의 유도는 세포 배양 well에 100% confluent 되고 이틀 후 100 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma I5879, 250 μM dexamethasone, Sigma D4902, 170 μM insulin (MDI), 을 함유한 배지로 지방세포로 유도하였으며 3일 후에 MDI 배지는 10% FBS와 170 nM insulin, Sigma I9278 을 함유한 DMEM 배지로 각 실험 날짜까지 이틀에 한번 교환함.

·3T3-L1 세포배양 중 각각 3, 6, 9일에 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)로 2번 세정하고 0.6%의 Oil Red O 용액을 준비한 후 약 2시간 동안 염색하고, PBS로 3번 세정한 후 isopropanol 1.5 mL을 넣어 oil red를 용출시켰음.

·용출시킨 용액을 500 nm에서 흡광도를 측정함.

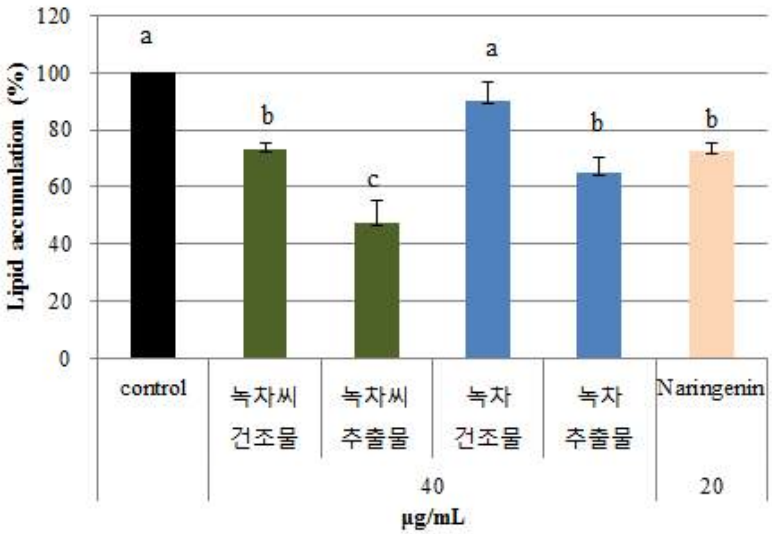


Fig. 65. 녹차, 녹차씨 및 각각 추출물의 지방세포 분화억제 효능

◦각 시료를 동일 농도(40 μg/mL)로 처리 시 녹차씨 추출물(47.7%)의 지방축적 억제활성이 유의차를 보이며 가장 높았으며, 녹차씨(73%)와 녹차추출물(65%)의 지방축적 억제활성은 유사하였으며, 녹차(89%)에서는 아무것도 처리하지 않은 control 군과 유의차를 보이지 않으며 지방축적 억제활성이 나타나지 않음을 확인.

◦본 실험에서는 일반적으로 체지방 감소에 효과가 있다고 잘 알려진 녹차 추출물 보다 녹차씨 추출물의 체지방 감소 효능이 더 높은 것으로 나타남. 녹차에 다량 함유되어 있으면서 기능성을 나타내는 성분으로도 잘 알려진 카테킨이 녹차씨 추출물에는 함유되어 있지 않지만, 녹차씨 추출물에 함유된 카테킨 이외의 다른 화합물들이 체지방 감소 관련 기능성에 큰 효능을 보이는 것으로 생각되어지며, 녹차에 함유되어 있지는 않으나 녹차씨에만 특이하게 함유된 naringenin도 활성에 영향을 미치는 것으로 추측되어 짐.

제 4 절 인체시험용 시료제작

1. 대량 생산 및 지표성분 함량 분석

- 참여기관인 명인 신광수 차로부터 착유과정을 통해 유지 성분(Oil)이 제거된 녹차씨 압착박을 제공받음
- 녹차씨 압착박에 약 15배수 정도의 물을 첨가하여 95℃에서 2시간 동안 추출을 실시하여 얻어진 추출액을 원심박막농축기를 사용하여 80℃, 500 rpm의 조건으로 약 19 brix까지 농축 한 후 동결건조기를 사용하여 건조시킨 후 최종 분말화하였으며, 이때 얻은 최종 분말의 수율은 약 17.98%임

가. 추출분말중의 지표성분 분석법

(1) 분석조건
- Instrument: HPLC system
- Detecter: UV detector DAD (280 nm)
- Column: Atlantis C_{18} (4.6 mm×150 mm, 3 ㎛), Waters, USA
- Column Oven: 30 ℃
- Injection vol.: 20 ㎕
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 10% MeCN in 0.1% TFA; B, 50% MeCN in 0.1% TFA

min	A (%)	B (%)
0	80	20
60	20	80

(2) 표준용액의 조제
- 표준물질 Naringenin 10 mg을 정밀히 달아 MeOH 10 mL (1000 ug/mL)에 녹인 후 1 mL 씩 분주하여 냉동보관 된 것을 사용함.
- 이를 MeOH로 희석하여 working solution으로 사용함.

(3) 시험용액의 전처리
- 녹차씨 추출물 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 Acetate buffer(pH 5) 2 mL, novozym® 33095 1 mL, Pectinex® Ultra SP-L 1 mL를 첨가하여 Incubator(37℃, 150 rpm)에서 24시간 동안 효소가수분해를 진행함.
- 가수분해가 종료된 용액 200 ㎕를 Ethanol 800 ㎕와 혼합하고 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 10min)한 후 여액을 0.45 ㎛ PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 함.

(4) 계산

$$\text{Naringenin (mg/g)} = \text{시험용액 농도 (ug/mL)} \times \frac{1/0.2\ (\text{mL})}{\text{시료 (g)}} \times \text{Volume (mL)} \times \frac{1}{1000}$$

나. 1차 대량생산

(1) 생산일시: 2014. 2. 11.

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	Naringenin 함량 (mg/g)
1) 원재료	녹차씨 압착박 150 kg	2.34
↓ 2) 추출	물 2,100 L 투여, 95℃, 2시간	0.13
↓ 3) 여과	10 ㎛ filter	
↓ 4) 농축	원심박막농축기, (70~80℃, 500 rpm)	1.64
↓ 5) 건조	동결건조	5.82
↓ 녹차씨 추출분말		

다. 2차 대량생산

(1) 생산일시: 2015. 3. 16.

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	Naringenin 함량 (mg/g)
1) 원재료	녹차씨 압착박 131.8 kg	2.69
↓ 2) 추출	물 2,100 L 투여, 95℃, 2시간	0.12
↓ 3) 여과	10 ㎛ filter	
↓ 4) 농축	원심박막농축기, (70~80℃, 500 rpm)	0.75
↓		

5) 건조 ↓ 녹차씨 추출분말	동결건조	4.49

2. 녹차씨 추출물 유해물질에 대한 분석

◦ 유해물질 규격은 『건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정』(식약처 고시 제 2013-10호)의 [별표 2] 유해물질 설정항목에 따라 분석 값과 섭취량을 고려하여 최소 함량으로 관리 될 수 있도록 설정함.

Table 31. 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

시 험 항 목		시 험 방 법
중금속	납 총비소 카드뮴	식품공전 제9.일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP법
	총수은	식품공전 제9.일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별 시험 (5) 수은
미생물	대장균군	식품공전 제9.일반시험법 8. 미생물시험법 5) 대장균군
잔류농약	Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicofol, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazlil, Iprodione, Iprovalicarb, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분-제2법
	Acetamipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Hexaflmuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법

Table 32. 녹차씨 추출물 Lot 별 미생물 및 중금속 분석결과

Lot No.		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)
중금속 (mg/kg)	납	1.0	0.0554
	총비소	1.0	0.0086
	카드뮴	0.5	0.0095
	총수은	0.5	0.0037
미생물	대장균군	음성	음성

Table. 33. 녹차씨 압착박 1차 대량생산 추출분말의 미생물 및 중금속 분석결과

Lot No.		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)
중금속 (mg/kg)	납	1.0	0.1206
	총비소	1.0	0.0286
	카드뮴	0.5	0.0607
	총수은	0.5	0.001
미생물	대장균군	음성	음성

Table 34. 녹차씨 압착박 1차 대량생산 추출분말의 잔류농약 59종 분석결과

시 험 항 목	분석결과	시 험 항 목	분석결과
BHC	불검출	Phenthoate	불검출
Bifenthrin	불검출	Phosmet	불검출
Cabofuran	불검출	Pirimicarb	불검출
Chlorfenapyr	불검출	Procymidone	불검출
Chlorothalonil	불검출	Quintozene	불검출
Chlorpyrifos	불검출	Triadimefon	불검출
Chlorpyrifos-methyl	불검출	Triflumizole	불검출
Cyhalothrin	불검출	Triazophos	불검출
Cypermethrin	불검출	Prochloraz	불검출
Cyprodinil	불검출	Methoxyfenozide	불검출
DDT	불검출	Boscalid	불검출

시 험 항 목	분석결과
Diazinon	불검출
Dichlorvos	불검출
Dicofol	불검출
Endosulfan	불검출
Fenarimol	불검출
Fenitrothion	불검출
Fenpropathrin	불검출
Fenvalerate	불검출
Fludioxonil	불검출
Imazalil	불검출
Iprodione	불검출
Isoprothiolane	불검출
Malathion	불검출
Methomyl	불검출
Methidathion	불검출
Paclobutrazol	불검출
Parathion	불검출
Parathion-methyl	불검출
Permethrin	불검출

시 험 항 목	분석결과
Acetamiprid	불검출
Azoxystrobin	불검출
Atrazine	불검출
Ethion	불검출
Iprovalicarb	불검출
Carbaryl	불검출
Captan	불검출
Tolclofos-methyl	불검출
Triflumuron	불검출
Thiamethoxam	불검출
Fenhexamid	불검출
Profenofos	불검출
Flubendiamide	불검출
Flufenoxuron	불검출
Pyraclostrobin	불검출
Pyrimethanil	불검출
Pirimiphos-methyl	불검출
Hexaflmuron	불검출

[녹차씨 압착박 1차 대량생산 추출분말의 지표성분, 중금속 및 미생물의 공인인증기관 성적서]

JBF
Jeonnam Bioindustry Foundation

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 | 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 | 전남식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1403-001 접수번호 : 1402-02-057

제 품 명	녹차씨 추출물 Lot.1			접수년월일	2014.02.17
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2014.02.25
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)식품산업연구원	업체대표자	신현경	의 뢰 인	위지향
유통기한	-	제조일자	2014.02.14	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0554	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0095	-
총비소	-(mg/kg)	0.0086	-
총수은	-(mg/kg)	0.0037	-
대장균군	-	음성	-
Naringenin	-(mg/g)	5.8231	

판정 : - 검사자 : 소선녀, 송현우

책임자 : 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 03월 05일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

[녹차씨 압착박 1차 대량생산 추출분말의 잔류농약분석 공인인증기관 성적서]

제 D2014020653 호

검 사 성 적 서

검체명		녹차씨추출물분말	제조일자 (유통기한)	2014-02-14
의뢰인	업체명	(재)전남생물산업진흥원식품산업연구원	성 명	신현경
	주소	전남 나주시 동수농공단지길 30-5 (동수동)		
제조번호			접수년월일	2014-02-17
검사의뢰목적		제출용	검체접수번호	D2014020653

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
비에치씨(mg/kg)	불검출	김용수
비펜스린(mg/kg)	불검출	김용수
카보후란(mg/kg)	불검출	김소영
클로르훼나피르(mg/kg)	불검출	김용수
클로로타로닐(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
싸이할로쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이프로디닐(mg/kg)	불검출	김용수
디디티(mg/kg)	불검출	김용수
다이아지논(mg/kg)	불검출	김용수
디크로보스(mg/kg)	불검출	김용수
디코폴(mg/kg)	불검출	김용수
엔도설판(mg/kg)	불검출	김용수
페나리몰(mg/kg)	불검출	김용수
페니트로치온(mg/kg)	불검출	김용수
펜프로파스린(mg/kg)	불검출	김용수
펜발러레이트(mg/kg)	불검출	김용수
플루디옥소닐(mg/kg)	불검출	김용수
이마자릴(mg/kg)	불검출	김용수
이프로디온(mg/kg)	불검출	김용수
이소프로치오란(mg/kg)	불검출	김용수
말라치온(mg/kg)	불검출	김용수
메소밀(mg/kg)	불검출	김소영
메티다치온(mg/kg)	불검출	김용수

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
파클로부트라졸(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온-메칠(mg/kg)	불검출	김용수
퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
펜토에이트(mg/kg)	불검출	김용수
포스메트(mg/kg)	불검출	김용수
피리미카브(mg/kg)	불검출	김용수
프로시미돈(mg/kg)	불검출	김용수
퀸토젠(mg/kg)	불검출	김용수
트리아디메폰(mg/kg)	불검출	김용수
트리프루미졸(mg/kg)	불검출	김용수
트리아조포스(mg/kg)	불검출	김용수
프로클로라즈(mg/kg)	불검출	김용수
메톡시페노자이드(mg/kg)	불검출	김소영
보스칼리드(mg/kg)	불검출	김소영
아세타미프리드(mg/kg)	불검출	김소영
아족시스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
아트라진(mg/kg)	불검출	김용수
에치온(mg/kg)	불검출	김용수
이프로발리카브(mg/kg)	불검출	김용수
카바릴(mg/kg)	불검출	김소영
캡탄(mg/kg)	불검출	김용수
틀크로포스메칠(mg/kg)	불검출	김용수
트리플루무론(mg/kg)	불검출	김용수
티아메톡삼(mg/kg)	불검출	김소영
펜헥사미드(mg/kg)	불검출	김소영
프로페노포스(mg/kg)	불검출	김용수
플루벤디아마이드(mg/kg)	불검출	김소영
플루페녹수론(mg/kg)	불검출	김소영
피라크로스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
피리메타닐(mg/kg)	불검출	김소영
피리미포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
헥사프루무론(mg/kg)	불검출	김소영

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자

2014 년 2 월 20 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호(031)628-0400 FAX(031)628-0400~1

[녹차씨 압착박 2차 대량생산 추출분말의 지표성분, 중금속 및 미생물의 공인인증기관 성적서]

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 | 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 | 전남식품산업연구원

발급번호 : 201504070 접수번호 : 1504-02-042

제 품 명	녹차씨 추출물 Lot.1			접수년월일	2015.04.20
식품유형	-	검사목적	기타	검사완료일	2015.04.22
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터	업체대표자	신현경	의 뢰 인	김숙정
유통기한	-	제조일자	-	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	기준(단위)	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.1206	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0607	-
총비소	-(mg/kg)	0.0286	-
총수은	-(mg/kg)	0.001	-
대장균군	-	음성	-
Naringenin	-(mg/g)	4.4885	-

판정 : - 검사자 : 송현우, 윤수경, 소선녀

책임자 : 윤수경, 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2015년 04월 23일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

3. 인체시험용 위약 및 주약의 제조

식품의약품안전처는 건전한 건강기능식품 유통구조를 확립하고 소비자에게 안전한 건강기능식품을 공급하기 위해 건강기능식품의 기준 및 규격 개정 (2008-64호; 2008년 9월 22일, 2010-86호; 2010년 11월 25일)을 통해 **'건강기능식품은 인체에 보건 목적의 유용한 효과를 얻기 위한 기능성 원료 또는 성분의 섭취를 주된 목적으로, 정제 · 캡슐 · 환 · 과립 · 액상 · 분말 · 편상 · 페이스트상 · 시럽 · 겔 · 젤리 · 바의 형태로 1회 섭취가 용이하게 제조 · 가공되어야 하며, 최종제품의 제조 시 기능성 원료의 특성이 변화될 수 있는 추출, 정제, 발효 등의 제조·가공을 하여서는 아니된다. 일반 식품 또는 식사를 대신할 수 있는 식품유형은「건강기능식품 기준 및 규격 인정에 관한 규정」에 따라 식품의약품안전처장의 인정을 받아야 한다.'** 로 수정하였으며 각 제형을 아래와 같이 정의하였다.

제품의 형태	정의
정제 (tablet)	일정한 형상으로 압축된 것
캡슐 (capsule)	캡슐기제에 충전 또는 피포한 것으로 경질캡슐과 연질캡슐 두종류가 있음
환 (pill)	구상(球狀)으로 만든 것
과립 (granule)	입상(粒狀)으로 만든 것
액상 (lipid)	유동성이 있는 액체상태의 것 또는 액체상태의 것을 그대로 농축한 것
분말 (powder)	입자의 크기가 과립제품보다 작은 것
편상 (flake)	얇고 편편한 조각상태의 것
페이스트상 (paste)	고체와 액체의 중간상태로 점성이 강한 유동성의 반고상의 것
시럽 (syrup)	고체와 액체의 중간상태로 점성이 약한 유동성의 반액상의 것
겔 (gel)	액상에 펙틴, 젤라틴, 한천 등 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 있는 고체나 반고체 상태의 것
젤리(jelly)	액상에 펙틴, 젤라틴, 한천 등 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 없는 고체나 반고체 상태의 것
바(bar)	막대형태의 것

- 정제: 정제는 건강기능식품을 일정한 형상으로 압축하여 만든 것이며 가장 생산량이 많은 제형 중의 하나이다. 정제는 1개의 계량 단위로서 취급하기 쉽고 섭취하기 용이하며 그 제법이 비교적 간단할 뿐만 아니라 쓴맛, 냄새, 자극에 대한 교정 및 건강기능식품원료의 안정화 등이 타 제형에 비해 용이하다.
- 캡슐: 캡슐은 건강기능식품을 캡슐에 충전하든가 또는 캡슐기계로 피포하여 성형하여 만든 것을 말하여, 경질캡슐과 연질캡슐 두 종류가 있다.
  - 경질캡슐: 보통의 캡슐에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 고르게 섞은

것 또는 적당한 방법으로 입상(粒狀)으로 한 것 또는 입상(粒狀)으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 만든다.

· 연질캡슐: 보통 캡슐에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 넣을 것을 젤라틴 등의 캡슐기제에 글리세린 또는 소르비톨 등을 넣어 소성을 높인 캡슐기제로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 만든다.

- 환: 환은 건강기능식품 또는 건강기능식품의 혼합물을 구형(球形)으로 만든 것으로 오래전부터 사용되어 온 제형이다. 환제품은 보통 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 넣어 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 구상으로 성형하여 만든다. 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를 하거나 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수 있다.
- 과립: 과립은 건강기능식품을 그대로 또는 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 넣어 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 입상(粒狀)으로 만들고 될 수 있는대로 입자를 고르게 한 것으로 필요에 따라 착향료, 교미제 등을 넣을 수 있다.

- 액상: 액상은 유동성이 있는 액체 상태의 것 또는 액체상태의 것을 그대로 농축한 것을 말한다. 식품원료를 그대로 사용하거나 필요에 따라 안정제, 교미제, 보존제 등 적당한 첨가제를 넣어 제조한 것을 말한다. 액상은 제형에 의한 분류에 가장 많은 색택과 성분을 가지며, 균질한 제조가 가능한 제형의 하나이다.

- 분말: 분말은 입자의 크기가 과립제품보다 작은 것으로 건강기능식품을 그대로 또는 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 첨가제를 넣어 적당한 방법으로 분말 또는 미립상으로 만든 것이며 필요에 따라 착색제, 방향제, 교미제 등을 넣을 수 있다.

- 상기 이외에도 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등의 형태로 1회 섭취가 용이하게 제조 가공된 건강기능식품을 개발 할 수 있다. 또한 제형의 자율화로 인해 일반 식품 또는 식사를 대신할 수 있는 건강기능식품을 소비자는 손쉽게 접할 수 있게 된다. 하지만 소비자가 건강기능식품을 일반식품으로 오인하거나 과다섭취를 하는 등 영양기능성분을 과잉으로 섭취하게 할 수 있으므로 이에 대한 예측과 관리방안도 같이 마련되어져야 할 것으로 보인다.

가. 녹차씨 추출물에 적합한 제형 대한 연구

◦ 주관기관인 전남대학교의 체지방 감소 관련 동물실험 결과를 바탕으로 하여 녹차씨 추출물(4.08 mg/g)의 섭취용량은 “2 g/일(1 g × 2회/일)“ 섭취하는 것으로 설정되었음.

◦ 상기의 1회 복욕량을 근거로 하여 녹차씨 추출분말을 대상으로 섭취하기에 용이하면서도 보관 및 취급

에 적합하면서도 건강기능식품에 관한 법률에서 사용할 수 있다고 정의된 제형 중 본 시료에 적절한 제형을 결정하기 위한 제형연구를 실시하였음.

(1) Tablet(정제) 제형 가능성 확인

◦ 녹차씨 추출물을 대상으로 tablet 제형의 가능성을 확인 해 본 결과, 녹차씨 추출분말이 tablet 전체 중량 대비 40% 이하로 함유되어야 마손도 및 경도가 안정한 제품의 생산이 가능한 것으로 확인 됨

[녹차씨 추출물 70% 함유]

[녹차씨 추출물 50% 함유]

[녹차씨 추출물 40% 함유]

Fig 66. 녹차씨 추출물의 tablet 제형

◦즉 녹차씨 추출물을 tablet 제형으로 생산하기 위해서는 60% 정도의 부형제가 첨가 되어야 하는데 녹차씨 추출물의 1일 섭취량 2 g을 만족시키기 위해서는 부형제 포함 총 5 g 정도의 tablet을 섭취하여야 함.

◦이는 500 mg tablet 10개 또는 800 mg tablet 6개 정도를 1일 섭취해야 하는 양으로 1일 복용량이 너무 많아져 섭취가 용이하지 않은 제형일 것으로 보여짐

(2) 경질캡슐 제형의 생산 가능성 여부 확인

◦ 경질캡슐 제형의 경우는 정제 제형처럼 많은 부형제를 첨가하지 않고 90% 이상의 녹차씨 추출물에 소량의 부형제를 첨가하여 입상(粒狀)으로 과립을 설정한 후 과립의 유동성이 양호하면 1일 섭취량이 정제 제형처럼 많지 않아도 될 것으로 보여짐.

◦ 200 mesh 이하로 분말화(분쇄)한 녹차씨 추출분말에 95% 발효주정 15% 넣은 후 연합, 건조(40℃, 30 min), 정립(40 mesh)한 녹차씨 추출분말에 부원료(이산화규소, stearate Mg)를 넣고 후혼합 한 후 capsule 충진을 시도한 결과 98%의 녹차씨 추출물에 2%정도의 부형제만 첨가하여도 capsule 충진이 가능하여 500 mg 경질캡슐을 1일 4개 정도만 섭취하면 1일 섭취권장량을 만족시키는 것으로 보여져, 피험자들의 제품 섭취가 용이한 것으로 판단됨

Table 35.녹차씨 추출분말의 경질캡슐 제조 배합비

원료	녹차씨 추출분말
녹차씨 추출물	98
stearate Mg.	1
이산화규소	1
합계	100

◦이에 녹차씨 추출물의 인체시험을 위한 제형은 경질캡슐로 결정하고 이와 동일한 제형의 위약 생산을 위한 위약 제조 배합비를 결정 하고자 함.

녹차씨 추출물 (원료) ⇨ 분쇄 ⇨ 연합 ⇨ 건조 ⇨ 정립 ⇨ 후혼합 ⇩ 충진 ⇦ 선별 ⇦ 포장

[capsule 충진]

[선 별]

[포 장]

Fig. 67. 녹차씨 추출물 capsule 제조공정

(3) 위약(대조식품) 배합비 결정

◦ 인체시험을 실시하고자 할 때에는 인체적용 대상자가 시험물질을 육안으로 보았을 때 두 물질이 서로 구별이 되지 않도록 최종 생산한 주약과 성상, 맛, 냄새 등이 동일하여 육안으로 구별할 수 없는 형태의 위약을 제작하여 시료로 제공하여야 함

◦이에 녹차씨 추출분말과 동일한 성상, 색, 냄새, 맛을 가지는 대조식품을 만들기 위해 녹차씨 추출물이 배제된 상태에서 유당, stearate Mg., 이산화규소, 색소등을 적절한 배합으로 다양하게 혼합하여 주약과 동일한 색상이 될 수 있도록 여러 배합조건으로 생산을 시도해 본 후 가장 적절한 배합비를 결정함(table 21 참고).

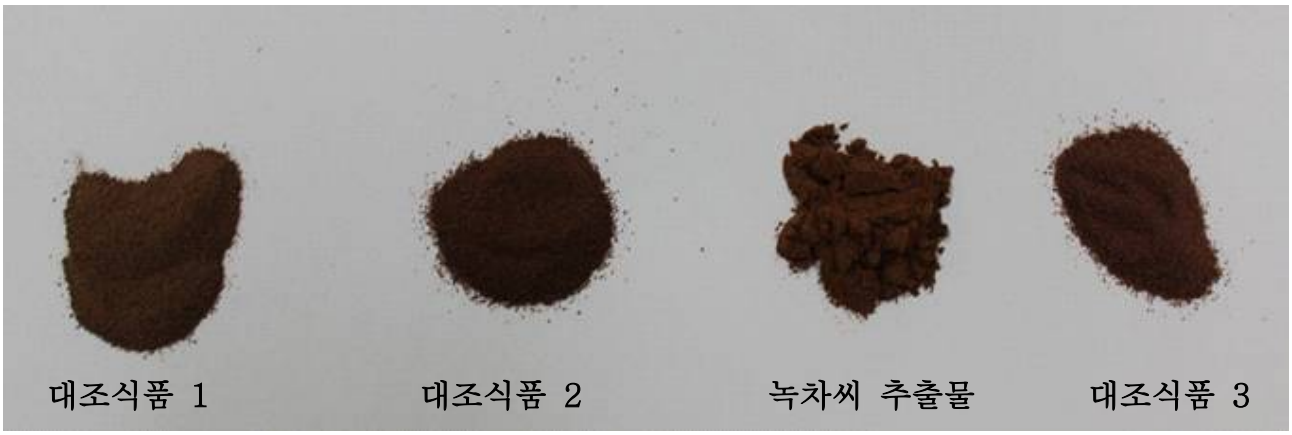


Fig. 68. 여러 배합조건으로 생산한 대조식품

Table 36. 녹차씨 추출분말 및 대조식품 배합비

원료	녹차씨 추출분말	대조식품
녹차씨 추출물	98	-
유당	-	85.7
카라멜색소	-	1.3
황색 5호	-	2.6
적색 2호	-	8.6
stearate Mg.	1	0.9
이산화규소	1	0.9
합계	100	100

[녹차씨 추출물] [대조 식품]

Fig. 69. 녹차씨 추출물과 대조식품

Fig. 70. 녹차씨 추출물과 대조식품 capsule 포장

(4) 인체시험용 시료중 1차방문 섭취 분량에 대한 녹차씨 추출분말 주약과 대조식품(위약)의 생산

◦ 인체적용시험 진행 시 5주 간격으로 총 2회에 거처 피험자가 시험식품을 받을 수 있도록 주약(녹차씨 추출물)과 대조식품을 Table. 23과 같은 배합비로 하여 생산을 진행함.

◦ 주약은 상기에서 추출하여 제조된 Lot 3 (Naringenin 함량: 4.06 mg/g)의 녹차씨 추출분말을 대상으로 하여 인체적용시험용 시험식품 경질캡슐을 생산하였음.

◦ 200 mesh 이하로 분말화(분쇄)한 녹차씨 추출분말에 95% 발효주정 15% 넣은 후 연합, 건조(40℃, 30 min), 정립(40 mesh)한 후 부원료(이산화규소, stearate Mg) 넣고 후혼합 한 후 500 mg 경질캡슐에 충진 후 블리스터 포장기를 이용하여 충진하였음.

◦ 위약(대조식품군)은 유당에 카라멜색소, 황색 5호, 적색 2호를 혼합 한 후 연합, 건조(40℃, 30 min), 정립(40 mesh)한 후 부원료(이산화규소, stearate Mg) 넣고 후혼합 한 후 500 mg 경질캡슐에 충진 후 블리스터 포장기를 이용하여 충진 하였음.

◦ 생산된 주약 및 위약 캡슐은 건강기능식품공전에 따라 붕해도를 시험한 결과, 30분 이내에 붕해됨으로써 적합하였음.

◦ 생산된 녹차씨 추출물과 대조식품군은 무작위로 배정 후 포장하여 피험자 80명이 1차 방문하여 5주 동안 1일 2 g씩 섭취 할 수 있는 양을 CRO에 전달하여 인체시험이 진행 될 수 있도록 시료를 제공하였음.

Fig. 71. 녹차씨 추출물과 대조식품 포장 및 라벨

제 5 절 인체시험 수행 및 결과

1. 인체적용시험을 통한 체지방개선 유효성/안전성 평가

가. 개 요

- 『건강기능식품에 관한 법률』 제 14조 2항 및 제 15조 2항의 “건강기능식품기능성 원료 및 기준 .규격 인정에 관한 규정(식약청 고시 제2013호-217호, 2013.9.11.)” 및 식약처 건강기능식품기능성 평가 가이드 북(발간등록번호 11-1470000-002749-01)에 준하여, 인체적용시험을 통한 녹차씨박 추출물의 유효성/ 안전성을 검증 작업을 수행하고, 차후 개별인정형 소재로 등록하기 위한 임상 자료를 확보 하는 과정 .

나. 녹차씨박 열수추출물의 인체적용 시험을 위한 준비 작업

(1) 임상수행기관 및 연구자 선정

(가) 임상시험수행기관의 선정

전북대학교병원기능성식품임상시험센터 연구 환경

전북대학교병원
기능성식품임상시험지원센터
Clinical Trial Center for Functional Foods
Chonbuk National University Hospital
CTC F2
Clinical Trial Center for Functional FoodS

Clinical Trial Center for Functional Foods
CTC F2
Clinical Trial Center for Functional FoodS

Facility
시설 및 장비

연구병실 Research Ward

- 집중적인 피험자 관찰을 위한 중앙 스테이션
- 원활한 인체적용시험을 위한 각종 시설과 장비, 피험자 휴게시설과 물품 마련
- 피험자용 전자동침대(30beds), Patient monitor system, Ambulatory blood pressure Holter monitoring system, Continuous glucose monitoring system

연구간호사실 CRC Room

- 피험자 모집, 증례기록서 작성, 인체적용시험 관련자료 및 문서관리 등의 업무 수행

진찰실 Physical Examination Room

- 피험자 대기시간을 축소시켜주는 인체적용시험 전용 진찰실(4실) 보유
- EMR(electronic medical record) System

약국 Pharmacy for Investigational Drugs

- 시험제품의 인수, 보관, 조제, 관리 및 반납업무 수행
- 항온항습기, 모바일랙, 자동온도기록장치, 클린벤치, 정제계수기

채혈실 Blood Collection Room

- 외래 피험자의 채혈, 채뇨 검사 수행
- Centrifuge, Deep freezer, 혈액전용냉동고, 일반샘플 냉장고, Sample banking system

자료보관실 Archiving Room

- 인체적용시험 관련 자료를 안전하게 보관
- 데이터베이스 서버 컴퓨터, 모바일랙, 소화시설

유전체분석실 Genom Analysis Room

- 대사효소의 유전적 다형성 분석, 장기간 검체보관
- 유전자분석장비, 전자동효소면역분석기, Pyrosequencing, RT-PCR

약동력학분석실 Pharmacodynamics Analysis Room

- 혈장,뇨,타액 등의 체액 내 지표성분 분석법 개발 및 정량분석
- LC-MS/MS, Gas Chromatography Flame Ionization Detector, HPLC

모니터실 Monitoring Room

- 인체적용시험 자료를 모니터링할 수 있는 전용공간(2실)

영상회의실 Video Conference Room

- 영상회의시스템 구축으로 국내외 기관과의 원활한 소통 도모, 내부세미나 개최
- 영상회의시스템, 무선인터넷

(나) 임상연구자 선정

- PI 및 임상 연구자 소개

① PI- 전북대학교 의학전문대학원 약리학 교실 채수완 교수

② SubI - 전북대학교 기능성식품임상시험지원센터 최은경 연구교수

(2) 자료집 개발[48] (첨부1 , 임상자료집)

(가) 전체자료의 총괄 요약본

1.1. 품목명

녹차씨추출물

1.2. 기능효과

체지방 감소

1.3. 섭취량 및 섭취방법

당해 원료로 2,000mg/day, 1일 2회 식후 30분 이내에 물과 함께 복용함.

1.4. 지표성분

나린제닌(naringenin)

1.5. 제조 기준 및 공정

▮ 제조공정 개요

① 제조공정	② 공정, 식품, 식품첨가물	③기능/지표성분 함량변화(mg/g)	④수율(kg)
		Naringenin	
1) 녹차씨	세척		
↓			
2) 외피, 과피, 중피의 제거	일광건조-외피제거 90%< 중피제거-골분쇄기		
↓			
3) 녹차씨 종자	과육분리-풍구		
↓			
4) 볶음	110℃, 10분		
↓			
5) 압착 착유	600~650 kg/cm^2,10~15분		- 녹차씨유100 L, - 압착박 420 kg
↓			
6) 원재료	**녹차씨 압착박**	1.3~1.9	100
↓			
7) 추출	95℃ 물, 2시간		
↓			
8) 여과	55 ㎛ filter	0.1~0.2	900~1200 (L)
↓			
9) 농축	원심박막농축기, (80℃)	1.0~1.4	80~120 (L)
↓			
10) 건조	동결건조		
↓			
원료	**녹차씨추출물분말**	**4.4~6.6**	**14~22**

▮ 원재료

전남 순천 일대에서 9~12월 사이에 채취한 야생녹차의 종자의 과피를 90% 이상 제거-착유 후 남은 압착 박

1.6. 기준 규격

▮ 성상: 갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 함.

▮ 지표(기능)성분: 나린제닌(naringenin)으로써 3.6 mg/g의 80 ~ 120%

▮ 납, 총비소: 1.0mg/kg 이하이어야 함.

▮ 카드뮴, 총수은: 0.5mg/kg 이하이어야 함.

▮ 대장균군: 음성이어야 함.

▮ 잔류농약: 「식품공전」에서 농약잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 원료로,「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」제 7조 에서 정하는 잔류농약 59종 검사 결과 비검출 됨

1.7. 안전성 내용

▮ 녹차(*Camellia sinensis L*)는 예로부터 섭취되어 온 식품으로 '차나무'라는 명칭으로 식품원재료로 등록되어 있고, 본 해당시료인 녹차 씨 또한 잎, 줄기, 꽃과 함께 가용 부위로 명기 되어 있음..

▮ 본 연구의 원료인 녹차씨는 예로부터 옛 문헌(출처,동의보감) 에 의하면 차씨는 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있어 민간요법이나 한방 치료적으로 사용되어져 왔음.

▮ 녹차씨추출물을 시료로 한 전임상 연구에서도 부작용에 대한 언급이 없으며, 식약처 안전성 의사결정도의 '"나"또는 "다" 에 해당되어 안전성에는 큰 문제가 없다고 판단 됨.

1.8. 기능성 내용

▮ 체지방감소에 도움을 줄 수 있음.

1.9. 일일섭취량 및 주의사항 등

▮ 1일 섭취량: 녹차씨추출물로써 2g/일

▮ 섭취시 주의사항

1) 해당시료의 지표 성분인 naringenin은 칼슘채널차단제(예, 딜티아잼)와의 병용 투여 시 칼슘채널 차단제의 절대적 생체이용율(absolute bioability)을 증가시킨다는 보고가 있으므로 병용투여 하지 않는 것이 바람직함.

(3) 임상계획서 및 증례기록서 개발

(가) 체중조절 관련 적정 Biomarker 개발[49] (*인체적용시험 계획서 참조)

- 식약처 건강기능식품 효능평가 가이드라인과 해당시료의 전임상 실험결과와의 바이오마커의 일관성 및 2차 자료로서의 활용도를 염두에 두고 최적바이오마커를 설정하였음.

① 최종선정 바이오마커

㉮ 1차 목적

체지방량 및 체지방률로 평가되는 체지방 감소에 대한 유효성 및 안전성을 DEXA를 통해 평가하였음.

㉯ 2차 목적

신체계측지표(허리와 엉덩이둘레 비, 체중, BMI 등) 지질대사 (총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산) 지표 및 생화학적 지표 등으로 체지방

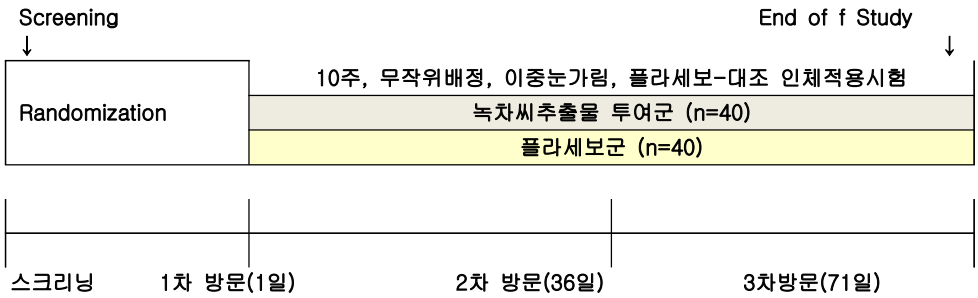
감소 효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하였음.

(나) 임상계획서 개발 (첨부2 , 임상계획서)

① 임상계획서 요약본[49)]

제 목	체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험
목 적	녹차씨추출물 또는 플라세보를 1일 2회 섭취할 때 나타나는 다음의 생체표지자의 변화를 관찰함으로써 그 유효성과 안전성을 비교 평가한다. ▮ 1차 목적 체지방량 및 체지방률로 평가되는 체지방 감소에 대한 유효성 및 안전성 평가 ▮ 2차 목적 신체계측지표, 지질대사 지표 및 생화학적 지표 등으로 평가되는 체지방 감소 효과에 대한 유효성 및 안전성 평가
시험계획서 번호	MSKS-BFS-GTSE(Version 1.2)
시험책임자	전북대학교병원 의학전문대학원 약리학교실 교수 채수완 M.D., Ph. D.
공동연구자	전북대학교병원 기능성식품 임상시험지원센터 최은경 M.D.
시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 소병옥, 정수진, 최민준, 정수영, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 임지희, 김순영, 김예리, 윤주랑, 박혜림, 박미현, 이소영, 김현숙, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선이, 정혜연
의뢰자/대표	명인신광수차 / 신광수
연구대상자 선정기준	1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 19 세 이상 65세 이하인 성인남녀 2) 스크리닝 검사 당시 BMI 25kg/㎡이상 30kg/㎡ 미만의 범위를 만족하는 3) 선정기준 1), 2) 항목을 만족하면서 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

연구대상자 제외기준	1) 스크리닝 검사 전 3개월 이내에 10% 이상 체중이 감소한 자 2) 최근 2개월 이내 비만, 지질대사개선 등과 관련된 약물 또는 건강기능식품을 복용하는 등 본 연구의 결과 해석에 영향을 줄 수 있는 경험이 있는 자 3) 유전성 고지혈증이 있거나 의심되는 자 4) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 자 5) 류마티스관절염, 자가면역질환 등의 국소 또는 전신 염증성면역질환이 있는 자 6) 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 단, 시험책임자의 판단에 따라 연구대상자의 상태를 고려하여 참여 할 수 있다. 7) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계질환 (예: 크론병)이나 위장관계수술 (단, 단순충수돌기절제술이나 탈장수술은 제외)을 받은 자 8) 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 9) 급/만성 신부전, 신증후군 등의 신장질환을 가진 자 10) 스크리닝 검사 전 2 개월 이내에 항정신병 치료를 받은 경험이 있는 자 11) 진단검사의학검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 연구책임자가 본 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자 ☞ AST, ALT > 정상범위 상한치의 2 배 ☞ 기타 임상적으로 유의한 진단검사의학검사 소견 12) 약물 또는 알코올 남용으로 진단 및 치료 병력이 있는 자 13) 임신 혹은 수유 중인 여성 14) 임신 가능성이 있는 가임 여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외) 15) 폐경 여성 또는 여성호르몬제를 복용하는 자
연구대상자 수	총 80 명 (녹차씨추출물 섭취군 40 명, 플라세보군 40 명)
시험방법	[A randomized double-blind, parallel, placebo-controlled study]

	자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(제 1 일)로부터 2 주 이내(제 -14 일~-1)에 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단 되는 자를 선정한 후, 1차 방문 시에 연구대상자 선정/제외기준 적합성 여부를 재평가 후 무작위배정을 시행한다. 무작위배정을 받은 연구대상자는 녹차씨추출물 또는 플라세보를 10주간 1일 2회, 아침, 저녁 식후 30분 이내에 섭취하며, 5주 간격으로 (제 1일, 제 36일, 제 71일) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 예정된 검사(활력징후, 약물투여력, 의학적 상태 및 이상반응 등)를 수행하여 총 10주간의 인체적용시험을 마친다. 시험자는 필요하다고 판단 시 연구대상자가 최종제품을 섭취 후, 혹은 조기 종료 방문 후 연구대상자 추적 관찰을 실시할 수 있다. 
섭취방법	다음 두 군 중 한 군에 무작위배정 되어 10 주 동안 시험용제품을 1 일 2 회, 아침, 저녁 식후 30분 이내에 경구 섭취한다. ▮ 녹차씨추출물 섭취군 : 1일 2회, 1회 2캡슐 경구섭취 (1일, 녹차씨추출물 2,000mg, 나린제닌으로써 7.2mg) ▮ 플라세보 섭취군 : 1 일 2 회, 1회 2캡슐 경구섭취 (1일, 플라세보 2,000mg)
유효성 평가	정해진 일정에 따라 다음 항목들을 평가한다. 1) 1 차 유효성 평가 ① 체지방량 및 체지방률 변화 2) 2 차 유효성 평가 ① 신체계측지표의 변화 체중, 체질량지수(BMI, kg/㎡), 허리둘레, 엉덩이 둘레, 허리-엉덩이 둘레 비, ② 혈중지질지표 및 기타지표의 변화 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 유리지방산, 에디

	포넥틴(Adiponectin)
안전성 평가	1) 자・타각 증상 등 이상반응(Adverse Events) 모니터링 2) 진단검사의학 검사 3) 활력징후 및 신체검진
통계방법	-분석에 사용할 프로그램은 Window 용 SAS 9.3 를 이용하고, 통계학적 유의수준은 p 값이 0.05 미만으로 설정한다. -집단간 동질성 검정과 baseline의 동질성 검정은 Chi-Square test 또는 Fisher’s exact test 와 Independent t-test 를 이용한다. -인체적용시험에 참여한 피험자의 연령, 신장, 체중 등의 인구학적 정보에 대하여 기술통계학적 분석을 한다. 시험군과 대조군 간 동질성 검정은 각 항목에 따라 변수의 특성상 연속형 변수인 경우 Independent t-test를 적용하고, 범주형 변수인 경우와 이분형 변수인 경우 Chi-square test 또는 Fisher’s exact test 를 적용하는 등 자료의 측정수준, 분포형태, 상관관계에 따라 적절한 통계기법을 적용한다. -유효성 평가는 평가 항목을 각 섭취군 내, 군간의 Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정한다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시한다. 섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군간의 RMANOVA/Linear mixed model 등을 적용한다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA 를 실시한다. 시점간 차이는 Contrast test 로 분석한다. -안전성 평가를 위해 이상반응의 발생 양상을 Chi-square test 또는 Fisher’s exact test 를 이용하여 검정하며, 진단검사의학검사, 활력징후 등은 시험군 내 변화를 paired t-test 또는 RM-ANOVA 를 이용하여 검정한다. 시험군 간의 차이는 각 항목의 변화량을 계산하여 Independent t-test 를 이용하거나 Linear mixed-effects model 을 이용하여 검정한다.

② 인체적용시험 일정요약표[49)]

Period	스크리닝 검사	투여기간			비고
Visit	스크리닝 방문	1차 방문	2차 방문	3차 방문	
Week	제-14~1일 (-2주이내)	제1일 (0주)	제43일 (6주)	제85일 (12주)	
Window period	-	±5	±5	±5	
서면동의서, 인구학적 조사[1a)], 병력 조사	●				
선정/제외기준 점검	●	●			
음주/흡연력 조사	●			●	
활력징후[2a)],약물투여력 조사,	●	●	●	●	

무작위 배정			●			
신체검진, 심전도 검사, 임신반응 검사, 진단검사의학 검사[3a)]		●			●	
식이섭취[4a)] 및 신체활동조사[5a),] 의학적 상태 변화			●	●	●	
유효성평가 검사	DEXA 촬영[6a)]		●		●	
	신체계측[7a)]	●		●	●	
	혈중지질 검사[8a),] adiponectin	●		●	●	
갑상선기능 검사[9a)]		●				
인체시험용제품 제공[10a)]			●	●		
이상반응 확인, 반납제품 회수, 순응도 평가				●	●	

1a) 인구학적 조사: 피험자의 성별, 연령, 생년월일.
2a) 활력징후를 측정한다 : 안정 시 좌위혈압, 맥박수, 체온
3a) 진단검사의학 검사:
- 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets count
- 혈액생화학적 검사: total bilirubin, ALP, AST, ALT, GGT, total protein, albumin, BUN, creatinine, uric acid, , glucose, adiponectin
- 뇨 검사 : Specific gravity, pH, protein, ketone, glucose, bilirubin, urobilinogen, nitrite, microscopic RBC/WBC

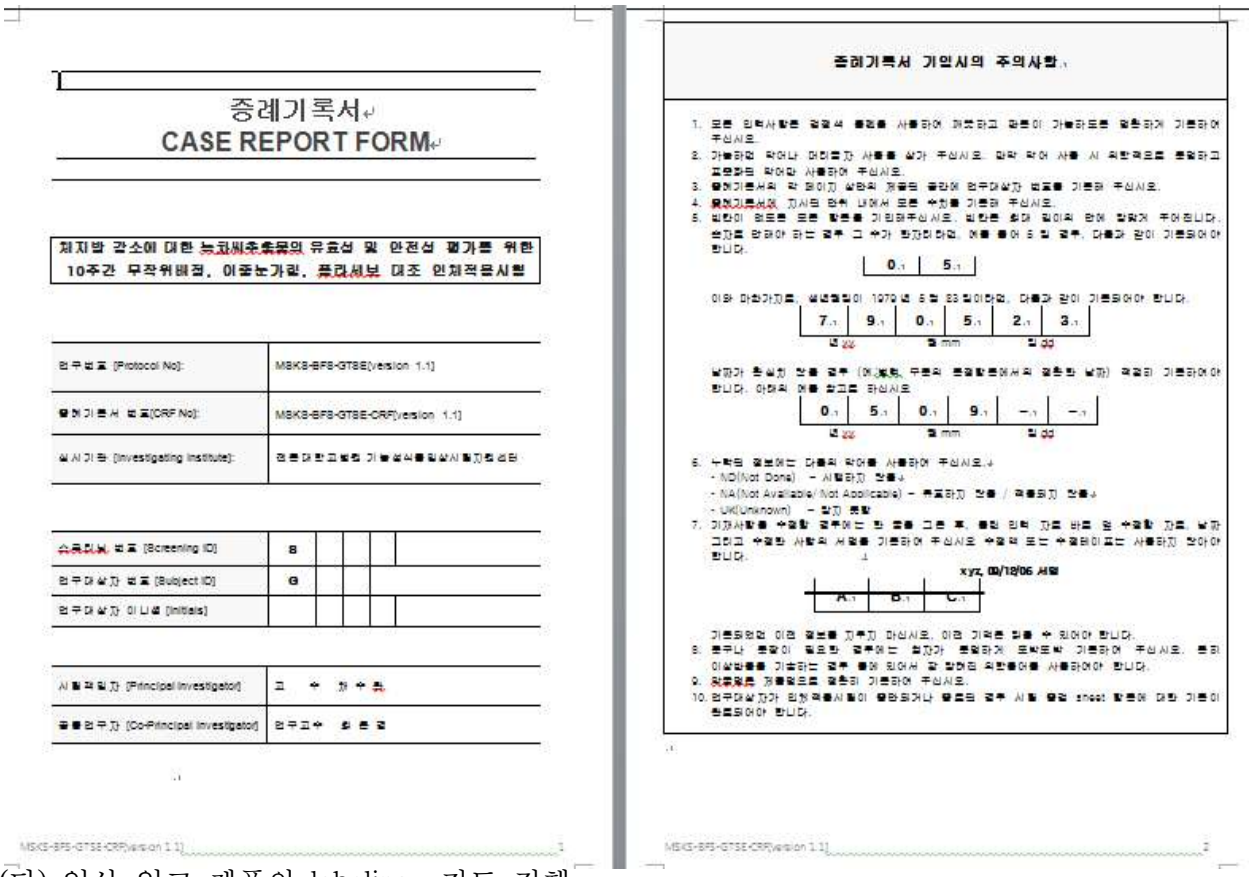
☞ 피험자는 채혈 당일 12시간 공복상태로 내원하여 위의 항목을 검사한다.
4a) 식이섭취조사는 식사기록법에 따르며 매 방문 전 3일간 (주중 2일, 주말 1일)의 식사기록지를 작성한다.
5a) 신체활동조사 : 국제신체활동도 설문(International Physical Activity Questionnaire: IPAQ)에 의한다.
6a) DEXA 촬영:이중에너지방사흡수계측법(Dual Energy X-ray Absorptiometry):체지방량,체지방율, 제지방량.
7a) 신체계측 : 신장, 체중, 체질량지수(BMI, kg/m2), 허리 및・엉덩이 둘레, 허리-・엉덩이 둘레 비(WHR).
8a) 혈중지질 검사 : 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, FFA
9a) 갑상선기능검사 : TSH, Free T4
10a) 인체적용시험용 제품은5일분의 여유분량 제품을 제공하며, 피험자의 방문 일은 방문예정일 전,후 5일까지 허용한다.
* 스크리닝 전 최근 1개월 이내의 심전도 및 진단검사 의학 검사는 본 시험의 결과로 대체할 수 있다.

(다) 증례기록서 개발[50)] (첨부3, 증례기록서(CRF))

(4) 임상시험용제품개발

(가) 제 1협동 과제인 전남식품산업연구센터의 표준화 자료를 근거로 유기적인 협조 체제를 통하여 임상시험용 제품 제형을 설정 함.

(나) 녹차씨추출물의 물리적 /화학적 성상 및 임상에서의 섭취용량 및 편리성, 순응도등의 변수를 고려하여 캡슐제품으로 최종 결정 함.



증례기록서
CASE REPORT FORM

체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

연구번호 (Protocol No):	MSKB-BFS-GTSE(version 1.1)
증례기록서 번호(CRF No):	MSKB-BFS-GTSE-CRF(version 1.1)
실시기관 (Investigating institute):	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터

스크리닝 번호 (Screening ID)	S				
연구대상자 번호 (Subject ID)	G				
연구대상자 이니셜 (Initials)					

시험책임자 (Principal Investigator)	고 수 가 수 화
공동연구자 (Co-Principal Investigator)	연구고수 화 은 경

MSKB-BFS-GTSE-CRF(version 1.1) 1

증례기록서 기입시의 주의사항

1. 모든 임력사항은 검정색 볼펜을 사용하여 깨끗하고 판독이 가능하도록 명확하게 기재하여 주십시오.
2. 가능하면 작아나 머리글자 사용을 삼가 주십시오. 만약 작어 사용 시 최한적으로 명확하고 표준화된 작어만 사용하여 주십시오.
3. 증례기록서의 각 페이지 상단의 개별번호 공란에 연구대상자 번호를 기재하 주십시오.
4. 증례기록서의 기시된 범위 내에서 모든 수치를 기재하 주십시오.
5. 빈칸이 없도록 모든 항목을 기입하주십시오. 빈칸은 최대 필요시 한에 항목에 주어진다. 숫자를 입력해야 하는 경우 그 수가 한자리라면, 예를 들어 5 일 경우, 다음과 같이 기재되어야 합니다.

0	5

이와 마찬가지로, 생년월일이 1970 년 5 월 23 일이라면, 다음과 같이 기재되어야 합니다.

7	9	0	5	2	3

년 yy 월 mm 일 dd

날짜가 존재치 않을 경우 (예:2월, 무릎의 관절활액에서의 결손한 날짜) 적절히 기재하여야 합니다. 아래의 예를 참고로 하십시오

0	5	0	9	–	–

년 yy 월 mm 일 dd

6. 누락된 정보에는 다음의 작어를 사용하여 주십시오.
   - ND(Not Done) – 시행하지 않음
   - NA(Not Available/ Not Applicable) – 무효하거 않음 / 적용되지 않음
   - UK(Unknown) – 알지 못함
7. 기재사항을 수정할 경우에는 한 줄을 그은 후, 올바른 인력 자료 바로 옆 수정할 자료, 날짜 그리고 수정한 사람의 서명을 기재하여 주십시오. 수정력 또는 수정테이프는 사용하지 않아야 합니다.

xyz, 00/12/06 서명

A	B	C

기재되었던 이전 정보를 지우지 마십시오. 이전 기록은 읽을 수 있어야 합니다.
8. 문구나 용량이 필요한 경우에는 화자가 명확하게 또박또박 기재하여 주십시오. 본의 이상함을 기재하는 경우 용어 외에서 각 항목의 최한용어를 사용하여야 합니다.
9. 약물명은 개발명으로 명확히 기재하여 주십시오.
10. 연구대상자가 피험약물이 투약되거나 투약되지 않은 경우 시험 담당 sheet 항목에 대한 기재이 완료되어야 합니다.

MSKB-BFS-GTSE-CRF(version 1.1) 2

(다) 임상 입고 제품의 labeling 지도 진행

<labeling guid>

① 인체적용시험용제품의 라벨에는 다음의 정보가 포함되어야 함.

인체적용시험용 제품입니다.	
제품의 코드명	
연구대상자 코드	G01 ~ G80
제조일자	2014. . .
제조번호 및 재검사일자	
유효기한	제조일로부터 24개월
저장방법	
제품제조업자의 상호	
"인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다" ▪ 사용방법: 1일 2회 1회 2캡슐, 아침 · 저녁 식후 30분 이내	

② 피험자 코드- 총 80명이기 때문에 **G01에서 G80번 까지** 기재 함.

③ 무작위 배정 - 육안으로는 차이가 관찰되지 않도록 무작위배정 되어야 함.
다음 사이트 참고 (http://www.randomization.com).

④ 제품의 포장 - 본 인체적용시험용제품은 기본적으로 각 5주(35일)씩 2회 방문 제공분량이나, 분실을 고려하여 여유분량 1차 방문 5일, 2차 방문 5일을 추가하여 각 40일분씩 2회 방문, 총 80일분 분량을 제공 하여야 함.

⑤ 1 캡슐씩 개별 포장 하여 1일 2회, 1회 2캡슐 섭취함.

<placebo> <녹차씨박추출물>

(5) IRB 승인(첨부4,, 보험증서)

(가) 임상진행을 위한 보험 가입

(나) IRB 신청 (첨부5, IRB 관련 서류)

① 신청서 및 기타 서류 제출

: 임상자료집, 임상계획서, 증례기록서, IRB 신청서, 보험가입증서

연구과제신청서

접수처 기재

접수번호		접수처확인		접수일	2014 년 03 월 일

심 사 구 분		■ 초기심의 □ 재심의 □ 기타 ( )					
연 구 과 제 명		최지방 광소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10 주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE	Version No.	1.0		
연구담당	책임연구자	소 속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채수완
		전화	개인정보보호	E-mail 개인정보보호			
	공동연구자	소 속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최은경
연 구 내 용	■ Human Trial	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )					
		연구 대상자	□ 건강인 ■ 준건강인 □ 환자				
		예상 연구대상자 수	60 명 (본 기관 배정 80 명)				
		연구대상자 동의 취득	■ 필요 □ 불필요 (불필요 시 사유서 첨부)				
		□연구자주도연구	□ 식약처 승인 대상(승인일:) □ 식약처 승인 제외 대상				
		■의뢰자주도연구	□ 학술용 ■ 국내 허가용(KFDA) (승인일:) □ 해외 허가용 (국가명:)				
	□ Nonhuman Study						
연구 예정 기간		2014 년 03 월 일 ~ 2015 년 02 월 일					
의 뢰 자	회 사 명	광인신광수차					
	대 표	직 위	대표이사	성 명	신 광 수		
	과제담당자	부 서	연구개발부	성 명	신 희 찬		
		직 위	과장	연락처	개인정보보호		
연구비		총 160,000 천원					

위와 같이 연구과제에 대하여 기능성식품연구윤리심의위원회 심사를 요청합니다

신청일자	2014 년 03 월 일		
신청부서	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실학교실	책임연구자	채 수 완

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회 귀하

② IRB 승인 得 (시정승인, 승인)

㉮ 심사결과 통지서

<시정승인 심사결과 통지서>

(별지 제 호 서식)

심사결과 통지서

수 신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE			Version No.	1.0
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상 시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일						
심사내용	■정식심사 □신속심사						
	■ 연구계획서 (■ 초기심의 □ 재심의) □ 심사의견에 대한 답변서 □ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구중지신청서 □ 중대한이상반응 □ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 ( )						
심사일시	2014 년 3 월 20 일			중간보고주기		개월	
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지/부결						
	1. 연구배경부분에 녹차에 관한 연구 이외의 녹차씨 연구에 관한 reference를 추가할 것 2. 칼슘채널차단제 복용 자를 제외기준에 추가할 것 3. 병용금지약물에 칼슘채널차단제 약품명을 추가할 것 4. 동의설명서에 자료에 대한 비밀보장 부분과 샘플채혈, 폐기부분 추가할 것 시정승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 20 년 월 일 ~ 20 년 월 일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.

※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.

※승인 유효기간은 승인일로부터 1 년으로 1 년에 1 회씩 연차지속심의 신청서를 제출해야 합니다.

※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1 년에 1 회 제출해야 합니다.

※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.

※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장

㉯ 시정승인 보완사항에 대한 답변서 작성

: 시정내용에 따라 임상계획서 및 기타 제출서류의 version-up(1.1)

(별지 제 2 호 서식)

심사의견에 대한 답변서

접수처 기재

접수번호	IRB-1094	접수처확인		접수일	2014 년 월 일

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10 주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE	Version No.	1.0		
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소 속	전북대학교 의학전문대학원약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소 속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간		2014 년 3 월 일 ~ 2015 년 2 월 일					
의 뢰 자	회 사 명		명인신광수차				
	과제담당자	부 서	연구개발부	성 명	신 희 찬 (인)		
		직 위	과장	연락처	개인정보보호		
심사의견에 대한 답변		1. 심의결과 답변서 ■ 별첨					

위와 같이 심사의견에 대한 답변서를 제출합니다.

신 청 일 자	2014 년 4 월 일		
신 청 부 서	전북대학교 의학전문대학원약리학교실	책임연구자	채 수 완 (인)

전북대학교병원 기능성식품연구윤리위원회 귀하

(별지 제 호 서식)

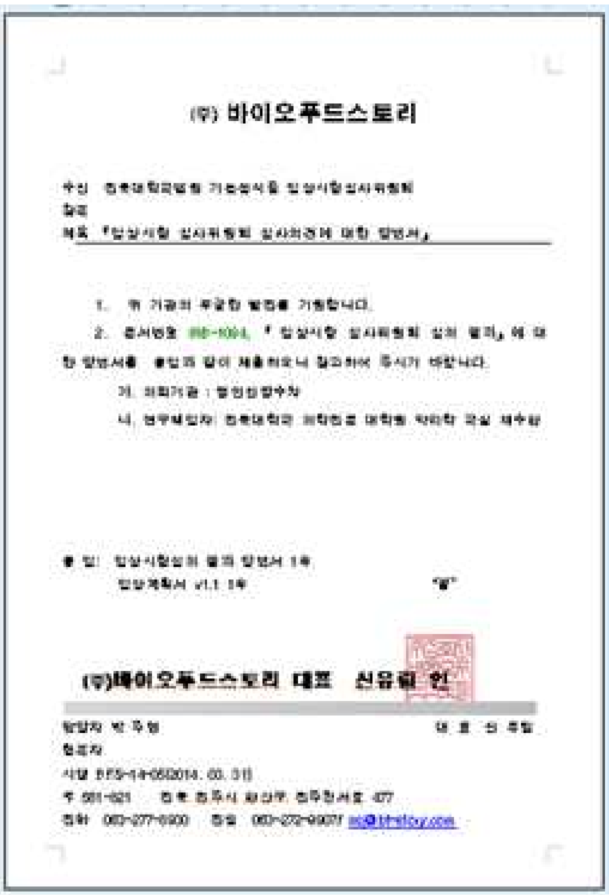
심사결과 통지서

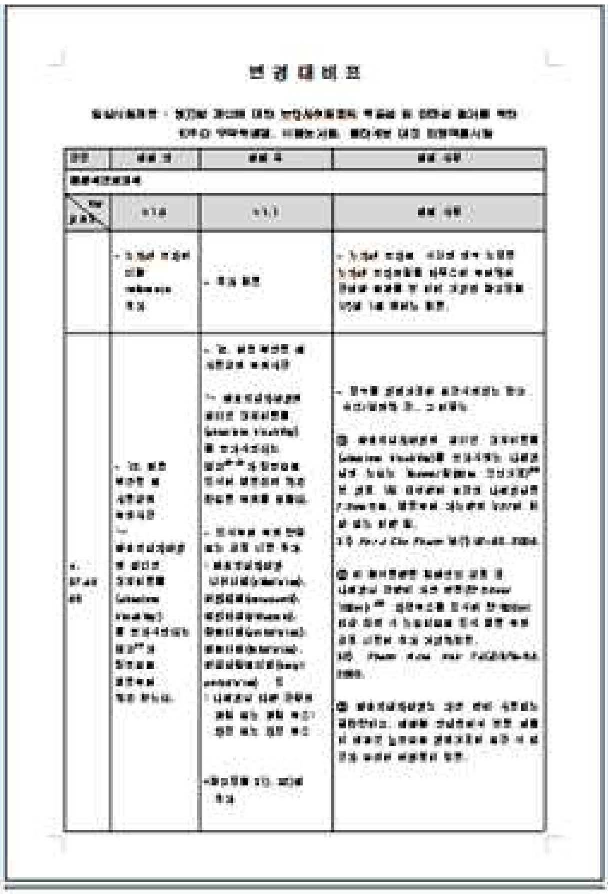
수 신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE	Version No.	1.1		
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간		2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일					
심사내용	□정식심사 ■신속심사						
	□ 연구계획서 (□ 초기심의 □ 재심의) ■ 심사의견에 대한 답변서 □ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구중지신청서 □ 중대한이상반응 □ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 ( )						
심사일시	2014 년 4 월 15 일			중간보고주기	개월		
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지/부결						
	승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 2014년 4 월 15 일 ~ 2015년 4월 14일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.
※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.
※승인 유효기간은 승인일로부터 1 년으로 1 년에 1 회씩 연차지속심의 신청서를 제출해야 합니다.
※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1 년에 1 회 제출해야 합니다.
※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.
※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장





㉰ 임상진행 중 임상계획서 및 기타 제출서류의 version-up (1.2)

연구계획변경신청서

접수처 기재

접수번호		접수처확인		접수일	년 월 일

심 사 구 분	■ 신속심의 (사소한 변경) □ 정식심의 (사소한 변경 이상 또는 연구대상자의 위험에 영향을 주는 변경)						
연 구 과 제 명	체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10 주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험						
	Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE	Version No.	1.1			
	IRB No.	2014-02-003					
연구담당	책임연구자	소 속	전북대학교 의학전문 대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채수완
	공동연구자	소 속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최은경
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014 년 03 월 일 ~ 2015 년 02 월 일						
의 뢰 자	회 사 명	명인신광수차					
	과제담당자	부 서	연구개발부	성 명	신 희 찬 (인)		
		직 위	과장	연락처	개인정보보호		
연구계획변경사항	변경대비표 ■ 별첨						
변 경 사 유	변경대비표 ■ 별첨						
첨 부 사 항							

위와 같이 연구계획변경에 대하여 기능성식품연구윤리심의위원회 심사를 요청합니다.

신 청 일 자	2014 년 10 월 일		
신 청 부 서	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	책임연구자	채 수완 (인)

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회 귀하

변 경 대 비 표

임상시험제목 : 체지방 개선에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

항목	변경 전	변경 후	변경 사유
임상시험계획서			
Ver / 페이지	V1.1	V1.2	변경 사유
p13,26,34	- 나린제닌 함량 3.6mg/1g 7.2mg/2g	- 나린제닌 함량 5.5mg/1g 11mg/2g	- lot 별 분석치 오기 수정 : 시험 분석치 오류로 기존 lab scale에서 pilot scale 로 변경함
p.58	- 인체적용시험 모니터 서현영(shy@bf-story.com), 노수미(nsm@bf-story.com)	- 인체적용시험 모니터 서현영(shy@bf-story.com), 최은영(cey@bf-story.com), 이길순(lks@bf-story.com)	노수미 CRA 퇴사 및 최은영, 이길순 CRA 신규 채용
인체적용시험 자료집			
Ver / 페이지	V1.1	V1.2	변경 사유
p.4,15,18,38,52	- 나린제닌 함량 3.6mg/1g 7.2mg/2g	- 나린제닌 함량 5.5mg/1g , 11mg/2g,	- lot 별 분석치 오기 수정 : 시험 분석치 오류로 기존 lab scale에서 pilot scale 로 변경함
p.4,16,18,21,2g	- 나린제닌 함량 범위 2.88 ~ 4.31	- 나린제닌 함량 범위 4.4 ~ 6.6	- 분석치 변경 (3.6 -> 5.5mg/g) 으로 80~120% 함량범위 변경
p.21,2g	- 3lot 값 변경 (3lot 3반복 값 및 평균값) 최종평균 3.4717	- 최종평균 5.4760	- lot 별 분석치 오기 수정 : 시험 분석치 오류로 기존 lab scale에서 pilot scale 로 변경함
증례기록서			
Ver / 페이지	V1.1	V1.2	변경 사유
p.7,27,37	- GGT (12 ~ 33 IU/L), AST (5 ~ 35 IU/L), ALT(남: 12 ~ 73 IU/L , 여: 8 ~ 49 IU/L)	- GGT (남: 12 ~ 73 IU/L , 여: 8 ~ 48 IU/L) AST (12 ~ 33 IU/L), ALT(5 ~ 35 IU/L)	- 정상범위 수치 오기로 정정

(별지 제 호 서식)

심사결과 통지서

수 신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명	체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험						
	Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE		Version No.	1.2		
	IRB No.	2014-02-003					
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상 시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일						
심사내용	□정식심사 ■신속심사						
	□ 연구계획서 (□ 초기심의 □ 재심의) □ 심사의견에 대한 답변서 □ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구종지신청서 □ 중대한이상반응 ■ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 ( )						
심사일시	2015 년 4 월 일			중간보고주기		개월	
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 종지/부결						
	승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 2014년 4 월 15 일 ~ 2015년 4월 14일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.
※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.
※승인 유효기간은 승인일로부터 1년으로 1년에 1회씩 연차지속심의 신청서를 제출해야 합니다.
※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1년에 1회 제출해야 합니다.
※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.
※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장

(6) 식약처 모듬토의를 통한 연구 진행완성도 중간점검

(가) 식약처 건강기능식품 심사 기준규격과에 모둠토의 신청(신청서 작성)

(첨부6, 모둠토의 신청서 참조)

(모둠토의 신청서 개요)

건강기능식품 『모둠토의』 신청서

일반사항

회사(기관)명	명인신광수 차	주소	전남 순천시 승주읍수주괴목 2길 25
		FAX	061-754-6165
신청인	신 유림		
참석자	신희찬(명인신광수차) 외 1인 김종덕(전남대학교) 외 1인 위지향 (전남식품산업연구센터) 외 1명 신유림 (바이오푸드스토리(주)) 외 1명		
기능성 원료명	녹차씨추출물(녹차씨박열수추출물)		
신청 기능성 내용	체지방감소에 도움을 줄 수 있음.(기타 II 등급)		

질의 및 토의사항

본 신청원료인 녹차씨추출물(녹차씨박열수추출물)은 "체지방 개선에 도움을 줄 수 있음"의 기능성으로 기타 II등급 원료개별인정을 받기 위해 연구를 진행하고 있으며, 현재, 두 동물모델(고지방, 고탄수화물)을 이용한 전임상 실험에서 의미 있는 결과를 얻어 SCI급 저널에 submit 중에 있습니다. 그리고 현재는 임상(RCT)을 진행하여 IRB 승인을 득한 상태입니다. 본 시료는 녹차추출물(체지방 개선 기타 2등급)과는 성분이 달라서 녹차의 많은 연구 자료를 sub 자료로 사용 할 수 없는 상황입니다.

Q1. 식약청 기능성자료 평가 가이드라인에서 양적, 질적 평가를 한다고 명시되어 있습니다. 그런데 본 원료는 비록 전임상 논문은 한편이지만 그 속에 충분히 가능 메카니즘, 기능성, 안전성 자료로서의 내용이 충실하고, 임상에서 기능성이 검증된다면 1편으로도 기타 2등급의 전임상 기능성자료로서 충분한지 알고 싶습니다.

Q2. 본.원료는 녹차추출물과는 다르게 카테킨이 전혀 들어 있지 않습니다. 따라서 본 시료에 들어 있는 여러 성분 중 지방세포 분해 및 체지방 감소에 대한 선행연구 자료가 있는 나린제닌을 지표물질로 설정하였으나, 실제 임상진행 복용량은 나린제닌의 선행연구들의 유효성 농도에는 미치지 못하는 소량입니다(함량은 0.36%, 7.2mg/day) 이럴 경우 나린제닌을 지표물질로 설정하여 원료 개별인정 기타 II 등급을 진행하는데 큰 무리가 없는지 알고 싶습니다.

현재 연구단계		(※ □에 V로 표시)
기준 규격	▪ 기능(지표)성분	■ 설정 ■ 분석법 확보 ■ 분석 완료
	▪ 유해물질	■ 기준·규격 설정 완료
안전성	▪ 기초 자료	■ 섭취근거자료 ■섭취량평가자료 ■ DB 검색 등을 통한 안전성 정보 자료 (부작용 등) ■ 영양평가자료 □생물학적 유용성자료 □인체시험자료
	▪ 독성시험	■자료확보 □ 설계 중 □ 실시 중 □ 시험완료
기능성	▪ 시험관 시험	□ 자료확보 □ 설계 중 □ 실시 중 ■시험완료
	▪ 동물시험	□ 자료확보 □ 설계 중 □ 실시 중 ■ 시험완료
	▪ 인체적용시험	□ 자료확보 □ 설계 중 ■ 실시 중 □시험완료

(나) 2014년 4월 22일 모둠토의 결과 (첨부7, 모둠토의 회의록 참조)

① 회의록

회 의 록

일 시	2014. 04. 22. 16:00 ~17:00	기 록	신유림
장 소	식품의약품안전처 건강기능식품 심사기준과(210호실)		
참 가 자	식품의약품안전처 건강기능식품기준과 오금순 연구관 외 7인		
회의목적	식약처 모둠토의(녹차씨추출물)		

회 의 내 용

1. 회의 소집 이유

- 녹차씨추출물의 개별인정형 기능성원료 등재를 위한 현재까지의 자료들을 식약처 해당부서와의 모둠토의를 통해 점검하여 차후 발생할 수 있는 RISK 를 최소화하고, 향후 목적에 부합되는 효율적인 연구 진행 방향을 모색하기 위함.

2. 회의내용

1) 회의성격: 모둠토의

2) 참석자: 총 7인
- 식품의약품안전처 건강기능식품기준과/오금순연구관, 장미란주무관, 고수일주무관
- 전남대학교 /김종덕 교수,
- 전남식품산업연구원/위지향 팀장
- 바이오푸드스토리(주) /신유림 대표
- 명인신팜수차 /신희찬 과장

3) 논의 내용(+ 모둠토의신청서 별첨)

(1) 모둠토의 신청서를 바탕으로 전체 연구 내용 및 진행 상황에 대한 구두 브리핑 (신유림)

(2) 식약청 모둠토의 신청서 상의 문의사항에 대한 논의

Q1. 현재까지의 전임상 연구 내용, 결과, 진행이 "체지방감소 기타 II 등급"획득을 위한 식약처의 전임상 기능성자료의 질적/양적 평가 기준에 부합되는 지 여부?

A1. 현재 revision 중인 논문 내용(바이오마커, 실험 결과 등등)을 검토 한 후 본 논문이 개재 확정 된다는 전제하에서 전임상 제출자료의 내용이 전임상 자료에서 보여줘야 할 조건들에 부합된다고 판단되어 임상이 유효성이 입증된다면 "체지방 감소 기타 2등급" 신청을 위한 전임상 제출자료로서는 무리가 없다고 대답 함(고수일,장미란)

회 의 내 용

Q2. 지표물질로 나린제닌을 선정하여 표준화를 진행하는 것이 "체지방감소 기타 II 등급 획득을 위한 진행으로 무리가 없다고 생각되는지 여부?

A2.연구 과정에서 지표물질이 카테킨-사포닌-캠페롤-나린제닌 으로 바뀌게 된 과정에 대한 설명을 듣고 난 후,
이미 녹차추출물(지표물질 카테킨) 이 체지방감소 고시형 원료로 등재되어 있으므로, 본 원료와 녹차씨 추출물과의 성분상의 차이점, 지표물질을 나린제닌으로 설정하기까지의 연구 과정들에 대한 내용을 차후 개별인정신청 서류에 자세하게 표기하여 심의 시 이해를 돕는다면 나린제닌을 지표물질로 선정한 것 자체는 무리가 없다고 판단 된다고 대답 함.(오금순연구관)

(3) 추가 질의 응답

Q1. 언제쯤 개별인정을 신청할 계획인지? 3/4분기쯤 가능한지?(오금순연구관)

A1. 현재 임상 진행중이고, 피험자가 80명이라 빨리 진행된다 해도 기능성원료 개별인정을 위한 서류는 2015년 3월 정도로 예상하고 있음(신 유림)

Q2. 기업이 건강기능식품 제조업이 가능한지? (오금순연구관)

A1. 현재는 건강기능식품판매업 허가만 되어 있으나, 개별인정신청 전까지는 제조업 허가를 득하도록 관련 하여 제반 업무를 진행 중임.(신희찬)

Q3. 임상에서의 체지방 측정 방법과 피험자군은?(오금순 연구관)

A1. 체지방은 DEXA로 측정하였고, 피험자군 BMI 25-30(신유림)

3. 회의 결과

1) 현재까지(표준화-전임상-임상계획서) 의 진행은 임상결과에서 유효성만 입증된다면 녹차씨추출물로 "체지방감소에 도움을 줄 수 있음, 기타 II 등급" 신청을 위한 진행과정은 합당하다는 의견을 받음.

2) 차후 개별인정서류 제출 시 가능 한 상세하게 작성하여 심위위원회의 이해를 도울 수 있도록 기록을 당부 받음.

4. 차후 진행

- 정기적인 진행 회의 및 식약처 담당부서와의 협의를 통해 성공적인 마무리가 되도록 노력하기로 함.

② 모둠토의 논의 내용 및 결과 개요

㉮ 문의 내용 개요

Q1. 녹차씨 자료를 활용할 수 없는 상황에서 개별인정형 기능성 원료 기타 2등급을 획득하기에 현 연구 자료들이 무리가 없는지?

A1. 현재까지의 기능성연구 결과가 “체지방 감소 기타 2등급” 신청을 위한 식약처 제출자료로서의 질적/양적 조건을 만족한다는 답변을 받았음.

Q2. 본 시료는 카테킨, 캠페롤 등 기존 등록된 녹차씨추출물이 가진 기능성분이 전혀 존재하지 않아 최종 지표물질로 나린제닌을 선정(함량은 0.36%, 7.2mg/day) 하였는데 지표물질을 나린제닌으로 진행하는데 무리가 없는지?

A2. 나린제닌이 지표물질로 표준화 하여 기준규격을 설정함에 무리가 없다는 답변을 받음.

㉯ 토의 결론

- 식약처 모둠토의를 통해 본 연구가 연구 최종목적에 부합되게 바람직하게 진행되고 있음을 확인하였음.
- 추가 보완자료 확보에 대한 진행일정 및 방법을 수립하였음.
- 사업화를 위한 행정적인 문제(건강기능식품 제조업 허가)에 대한 대책을 수립하고 진행하기로 하였음.
- 2차년도 연구 결과보고서 제출에 대한 진행 및 3차년도 연구 진행을 위한 사전 점검 일정에 대한 협의가 완료 되었음.

다. 녹차씨박 열수추출물의 유효성/안전성 평가 인체적용시험 수행

(1) 개시모임 실시

(가) 2014년 3월 23일 개시모임 실시 (첨부8. 개시모임 발표 자료)

① 개시모임 PT

② 개시모임 회의록

회의록(개시모임)

과 제 명	뉴칼리추출물의 체지방감소효과에 대한 유효성/안전성평가 임상적용시험	연구책임자	신 유 림
회의제목	임상시험 개시 모임		
회의내용	1. 임상시험자료집 혈소판응 차단제(고혈압약제) 복용자가 연구대상자로 참여할 경우 자율주스를 동시에 병용투여하지 않는다는내용 교육 요청 - 담당 CRC 2. protocol 및 CRF 수정/변경 - protocol 상 상기 내용(고혈압약제, 자율주스)를 제외기준에 포함하지 않고 식이섭취 및 약물섭취 제한기준으로 둔 이유 설명 ① 제품의 나린제닌 함유량이 7.2mg/일 으로 자율주스 내 나린제닌 양의 1/27에 해당하므로 극소량이므로 제외기준에 포함하지 않음. ② 과거병력조사의 기간을 6년에서 3년으로 통일 - CRF를 CRC가 기입하기 편한 양식으로 변경 ① 임신반응 검사에서 월경 주기의 '불규칙' 에 대한 명확한 기준 제시(월경주기가 21-35일의 범위에서 벗어나는 경우, 각 주기별 +-7일 이상 차이나는 경우를 불규칙으로 간주함) ② 의학적상태변화는 1차에만 검사하며 2,3차는 이상반응 확인으로 대신 함 ③ 각 방문별 약물투여력 조사시 투여/미투여만 체크하며 투여시 뒷부분에 판정법에 기입하도록 함. 3. 연구대상자에게 제공되는 동의서 개인정보 및 채혈한 혈액 폐기 관련 문구 추가 및 신체활동 설문지 변경(IPAQ -> GPAQ) 4. 연구대상자 선정시 가능하면 체지방량이 많은 40대 위주로, 남성보다는 여성 위주로 선정하는 방향으로 진행 할 것을 요청함. 5. 주제의 특성상 연구대상자에게 식이섭취기록 및 신체활동에 대한 사전 교육 및 관리를 철저히 할 것을 요청함. 6. 체온 측정시 주의 요함(같은 사람이 같은 기구로 같은 일이의 체온 측정) 체온계 구입 요청함 아 3개 구입하주기로 함.		
일 시	2014. 03. 28 오후 3:00	장 소	전북대학교병원 기능성식품임상시험센터
참 석 자	신유림, 박주현, 서원경, 최윤경, 노유희, 최재승, 김승경, 문주할, 박유희, 정윤수	소요경비	52,000 원

③ 개시모임 모니터링 보고서

BioFoods Story

개시 방문 보고서

과제번호	MSKS-BFS-GTSE
수행기관/연구책임자	전북대학교병원 기능성식품임상시험센터/ 채 수완 교수님
의뢰기관/담당자	명인신광수차/ 신 광 수
CRO/담당자	바이오푸드스토리(주)/신유림박사, 서현영 CRA
방문일/방문회차	개시방문 보고서

1. 임상시험 계획서와 관련된 사항

번호	문서제목	내 용
1	임상시험자자료집	임상시험용 건강기능성식품에 관한 최신의 과학적 정보를 시험자에게 제공하였고 안전성 관련자료를 확인하였다.
2	승인된 계획서, 증례기록서 서식	임상시험계획서 및 증례기록서를 확인하고 변경 및 수정사항에 관하여 논의하고 보완하기로 하였다.
3	피험자에게 제공되는 정보 • 동의서서식 및 대상자 설명서	동의서의 수정사항에 관하여 논의하고 보완하기로 하였다.

2. 물품 전달 사항

워크시트는 담당 CRC 선생님(윤주랑)과 상의 후 제작하여 피험자 스크리닝 전 모니터링 후 진행하기로 하였다.

CRF 는 약물투여력 및 Lab 결과 등 수정사항을 보완 후 추후 전달 하기로 하였다.

BioFoods Story

3. 시험제품 확인사항

시험제품은 2014 년 4 월 11 일(금) 입고 예정 중이며 전북대학교병원 임상시험센터 박은옥 선생님께 관련파일 전달 예정이다.

4. 기타 사전 협의 사항

1) 니린제닌을 포함한 식품(자몽 또는 자몽쥬스) 및 칼슘채널차단제 약물을 복용하는 연구대상자에게 임상시험용 제품과의 동시투여를 하지 않도록 주의깊은 설명을 하도록 한다.
2) 연구대상자 선정시 남성보다 여성을 주로 선정하도록 한다.
또한 전체 연구대상자의 80% 정도는 신규대상자 pool 을 구축하여 등록할 수 있도록 하며, 20-30 대 보다 근육량이 적고, 지방의 축적이 많은 40 대를 위주로 모집하기로 한다.
3) 식이일지 및 신체활동 기록지 작성시 연구대상자에게 식이일지 및 신체활동 기록지 작성법에 대해 교육하여 정확하고 자세한 자료를 얻을 수 있도록 한다.
4) 임상시험용제품(녹차씨추출물)과 유사식품으로 녹차를 음용하는 대상자는 연구의 결과에 영향을 주지 않을 것으로 사료되어 진행하되, 선정시 정확한 음용량을 확인하도록 한다.
5) Placebo 성분 중 유당의 함량이 92.9%임을 볼 때 유당불내증 환자의 경우는 제외하도록 하되, 계획서의 연구대상자 제외기준 항목에는 첨가하지 않고 선정시 포함하지 않도록 한다.
6) 체온은 연구대상자의 건강상태 확인 및 자료의 정확성을 보는 것으로 제품과의 관련성을 보지 않으나 추후 시험자와 상의 후 결정하도록 한다.
7) 스크리닝 방문시 이루어지는 Adiponectin 의 경우 스크리닝 탈락자는 폐기하도록 한다.
8) DEXA 촬영시 1 차 방문(V1) 및 3 차 방문(V3) 모두 금식하도록 한다.
9) LDL-cholesterol 농도 측정은 Friedewald 공식을 이용한 계산법으로 한다.
10) 임상시험계획서(Protocol) 수정 및 보완사항은 다음과 같다.
- 과거 병력 : 5 년 이내 → 3 년 이내
- 가족력(history) 확인 : Protocol 삭제
- 동의설명서 :
* 제공받은 제품은 당일 저녁식사부터 하루 2 회복용
→ 제공받은 제품은 하루 2 회복용(p70)
* 예측 효능,효과 및 부작용 항목의 하단부
알려지가 있는 자원자는 인체적용시험 참여가 금지됩니다. 또한, 인체적용시험 진행 ~
→ 알려지가 있는 자원자는 인체적용시험 참여가 금지됩니다.(p71)
- 신체활동설문지 :

(2) 피험자 모집

<홍보 포스터>

연구대상자 모집 공고

전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에서는 "녹차씨추출물"의 체지방 감소에 대한 유효성과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험에 참여할 대상자를 모집합니다.

연구제목

녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

1. 자격 요건

- 만 19 세 이상 65 세 이하의 성인남녀
- 체질량지수가 25kg/m² 이상 이거나 30kg/m² 미만의 조건을 만족하는 자 [체질량지수는 연구대상자의 체중(kg), 신장(m)을 측정하여 체중을 신장의 제곱으로 나눈값 (kg/m²)입니다]

2. 시험 일정

인체적용시험기간은 총 10 주이며 5 주 간격으로 3 회 방문 예정

3. 선정 방법

참여의사가 있는 자원자에게 연구의 목적과 방법에 대한 상세한 설명을 한 후, 동의서에 서명한 자원자를 대상으로 혈액・소변검사와 신체검진 등을 실시하여 본 연구에 적합한 사람을 대상자로 선정합니다.

4. 인체적용시험 참여시 기초건강검진을 받을 수 있으며, 일정 금액의 사례비가 지급됩니다.

5. 마감일 : 2014년 월 일

6. 지원방법 및 문의사항

상기 연구에 참여하고자 하는 사람은 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터(☎ **063-255-2541**)로 전화하시기 바랍니다. 자세한 정보를 원하시면 홈페이지(http://www.ctcf2.com)를 참고하거나 일과시간 (8시30분 ~ 5시30 분, 월~금) 중 상기 연락처로 문의하여 주시기 바랍니다.

- **찾아오시는 길 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터의 위치는 전북대학교병원 암센터 건물 5 층입니다.**

(3) 임상시험용 제품 인계

(가) visit 1

- 인계일 : 2015일 4월 15일
- 인계 내역 : 10ea*16pk/box, G1에서 G80까지 총 80box

(나) visit 2

- 인계일 : 2014년 5월 16일
- 인계 내역 : 10ea*16pk/box, G1에서 G80까지 총 80box

인 수 증

체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 인체적용시험

인체적용시험용 제품명	녹차씨추출물 플라세보
규격 및 제형	캅셀 16 pk (10 ea/pk) / Box
제조번호 또는 일련번호	1404
사용기한 (유효기간)	제조일로부터 24개월
인수량	G01 ~ G80 / V1
비고	

상기 인체적용시험에 사용되는 인체적용시험용제품을 정히 인수하였음을 확인합니다.

2014 년 4 월 15 일

인수자 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 박 은 옥

인계자 바이오푸드스토리 박 주 현

인 수 증

체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 인체적용시험

인체적용시험용 제품명	녹차씨추출물 플라세보
규격 및 제형	캅셀 16pk (10ea/pk) / Box
제조번호 또는 일련번호	1404
사용기한 (유효기간)	제조일로부터 24개월
인수량	G01 ~ G80 / V2
비고	

상기 인체적용시험에 사용되는 인체적용시험용제품을 정히 인수하였음을 확인합니다.

2014 년 5 월 16 일

인수자 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 박 은 옥

인계자 바이오푸드스토리 박 주 현

(4) 모니터링

(가) 전 연구 기간 동안 총 16회의 모니터링 실시

- 주기적인 모니터링을 통해 GCP 기준에 준하도록 임상시험의 질을 관리하였음.
- 총 22회의 중 개시모임 모니터링을 제외하고 현재 14회 수행하였으며 남은 모니터링 스케쥴은 래와 같음.

일 정	모니터링 항목	모니터링 내용
2015.08.19	CRF 점검/확인	CRF - Query 해결(서명,오류/정정사항)
2015.08.20	근거문서 점검/확인	근거문서(worksheet/식이기록지/검사결과지) - Query 해결
2015.08.24	시험제품/파일 점검	시험제품 반입/반출량 확인 시험제품 관리 파일 점검/확인 - Query 해결
2015.08.25	연구자파일 점검/확인	연구자파일 미비/보완 서류 확인
2015.09.04	연구자파일 점검/확인	연구자파일 미비/보완 서류 확인
2015.09.11	전자료 최종점검/확인	근거문서/시험제품파일/연구자파일 확인

녹차씨 모니터링 추후 스케쥴 보냅니다. | 관련편지검색

보낸사람 : 서현영 <s 개인정보보호 :om> 15.08.15 10:16 | 주소추가 | 수신차단
받는사람 : "박주현" · 개인정보보호 .com> 주소추가
참조 : "신숙정" · 개인정보보호 .com> 주소추가
보낸날짜 : 2015년 8월 15일 토요일, 10시 16분 57초 +0900
첨부파일 1개가 있습니다. 바로가기

안녕하세요. 선생님
녹차씨 모니터링 추후 스케쥴을 작성하여 보냅니다.
녹차씨 모니터링을 20회로 계획하였던 바, 현재 14회 진행하였고 추후 6회정도 더 진행할 예정입니다.
임상시험자료(CRF/근거문서), 시험제품/관리파일, 연구자 파일 등 임상시험 종료보고서 제출 전 최종 점검을 하고자 합니다.

모니터링 일정 및 사항은 다음과 같습니다.

일 정	모니터링 항목	모니터링 내용
2015.08.19	CRF 점검/확인	CRF - Query 해결(서명,오류/정정사항)
2015.08.20	근거문서 점검/확인	근거문서(worksheet/식이기록지/검사결과지) - Query 해결
2015.08.24	시험제품/파일 점검	시험제품 반입/반출량 확인 시험제품 관리 파일 점검/확인 - Query 해결
2015.08.25	연구자파일 점검/확인	연구자파일 미비/보완 서류 확인
2015.09.04	연구자파일 점검/확인	연구자파일 미비/보완 서류 확인
2015.09.11	전자료 최종점검/확인	근거문서/시험제품파일/연구자파일 확인

그에 따른 모니터링 추후 스케쥴을 첨부하여 보내드립니다.
궁금하시거나 수정할 사항이 있으시면 연락 부탁드립니다.
수고하세요.

일반 첨부파일 1개(13KB) 전체저장

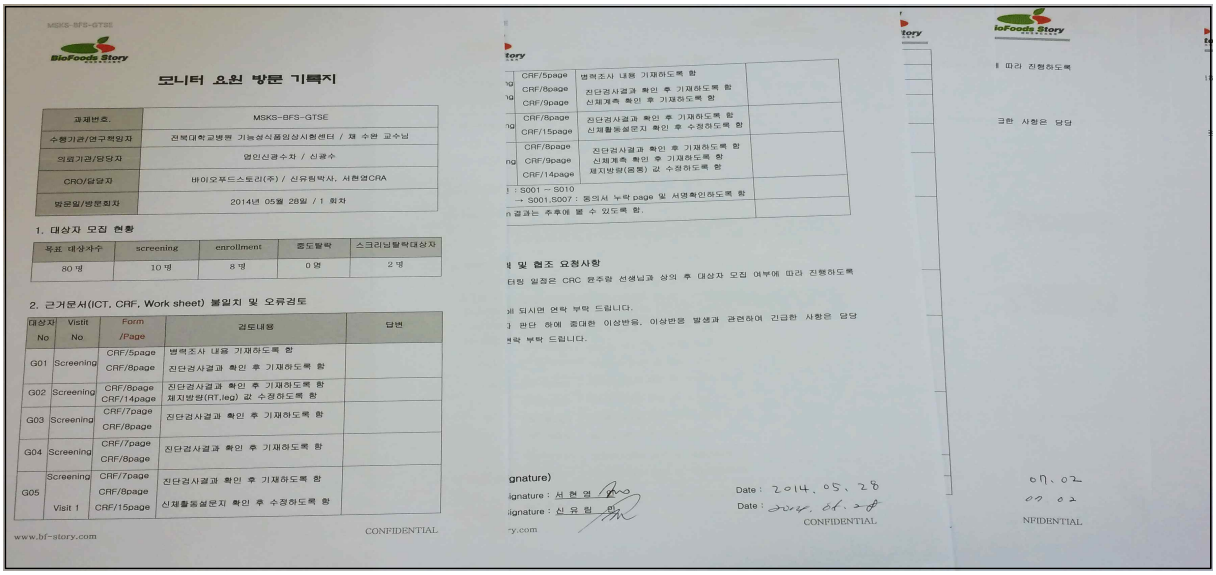
녹차씨 모니터링 스케쥴.hwp 13 KB 미리보기 | PC저장 | 삭제

① 모니터링 결과 인체적용시험 진행중 시험물질과 관련된 특별한 이상반응 및 Event 는 발생하지 않았음[51] (첨부9 모니터링 보고서 14부)

(모니터링 실시 내역 요약)

회차	일시	요약
1	2014.05.28	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인
2	2014.07.02	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인동의서 Query 해결
3	2014.08.06.	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인
4	2014.08.13	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인동의서 Query 해결. 종료피험자 확인
5	2014.09.17	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인CRF 및 워크시트 Query 해결.
6	2014.10.13.	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인CRF 및 워크시트 Query 해결.
7	2014.11.26	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인
8	2014.12.04	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인피험자별 전체 서류 및 시트 Query 해결.
9	2014.12.26	CRF 및 동의서 점검 후 누락 부분 기재 및 서명 확인 목표한 피험자 전체(80명) 등록 완료 확인
10	2015.01.14	CRF, 신체활동 설문지 점검 후 누락 부분 기재토록 함 피험자별 전체 서류 및 시트 Query 해결. 워크시트상 바이오마커 계산값 점검 및 PI 서명/서명일자 확인, 문서 보관 점검
11	2015.02.06	CRF 점검 후 누락 부분 기재토록 함 피험자별 전체 서류 및 시트 Query 해결.
12	2015.02.23	CRF 및 신체활동설문지 점검 후 누락 부분 기재토록 함 피험자별 전체 서류 및 시트 Query 해결.
13	2015.03.10	CRF 및 신체활동설문지 점검 후 누락부분 기재토록 함 피험자별 전체 서류 및 시트 Query 해결.
14	2015.03.11	피험자별 전체 서류 및 시트 Query 해결. 식이기록지 visit 별 확인 시험제품 및 시험제품파일 확인

(모니터링 기록지 사진)



모니터 요원 방문 기록지

과제번호.	MSKS-BFS-GTSE
수행기관/연구책임자	전북대학교병원 기능성식품임상시험센터 / 채 수완 교수님
의료기관/담당자	엠인신경수자 / 신광수
CRO/담당자	바이오푸드스토리(주) / 신유림박사, 서현영CRA
방문일/방문회차	2014년 05월 28일 / 1 회차

1. 대상자 모집 현황

목표 대상자수	screening	enrollment	중도탈락	스크리닝탈락대상자
80 명	10 명	8 명	0 명	2 명

2. 근거문서(ICT, CRF, Work sheet) 불일치 및 오류검토

대상자 No	Visit No.	Form /Page	검토내용	답변
G01	Screening	CRF/5page CRF/8page	병력조사 내용 기재하도록 함 진단검사결과 확인 후 기재하도록 함	
G02	Screening	CRF/8page CRF/14page	진단검사결과 확인 후 기재하도록 함 제지방량(RT.leg) 값 수정하도록 함	
G03	Screening	CRF/7page CRF/8page	진단검사결과 확인 후 기재하도록 함	
G04	Screening	CRF/7page CRF/8page	진단검사결과 확인 후 기재하도록 함	
G05	Screening Visit 1	CRF/7page CRF/8page CRF/15page	진단검사결과 확인 후 기재하도록 함 신체활동설문지 확인 후 수정하도록 함	

www.bf-story.com CONFIDENTIAL

CRF/5page CRF/8page CRF/9page	병력조사 내용 기재하도록 함 진단검사결과 확인 후 기재하도록 함 신체계측 확인 후 기재하도록 함	
CRF/8page CRF/15page	진단검사결과 확인 후 기재하도록 함 신체활동설문지 확인 후 수정하도록 함	
CRF/8page CRF/9page CRF/14page	진단검사결과 확인 후 기재하도록 함 신체계측 확인 후 기재하도록 함 제지방량(골격) 값 수정하도록 함	

: S001 – S010
→ S001,S007 : 동의서 누락 page 및 서명확인하도록 함
결과는 추후에 볼 수 있도록 함.

및 협조 요청사항

타팀 일정은 CRC 윤주람 선생님과 상의 후 대상자 모집 여부에 따라 진행하도록

시면 연락 부탁 드립니다.
판단 하에 중대한 이상반응, 이상반응 발생과 관련하여 긴급한 사항은 담당
부탁 드립니다.

gnature)
ignature : 서 현 영
ignature : 신 유 림
Date : 2014. 05. 28
Date : 2014. 07. 02
CONFIDENTIAL

따라 진행하도록
급한 사항은 담당
07. 02
07 02
NFIDENTIAL

② 식약처 모둠토의를 통한 바이오마커 점검

③ 임상수행기관과의 진행 회의를 통한 과제 진행 점검

라. 녹차씨박 열수추출물의 임상결과 분석(첨부10, 임상결과보고서)[52)]

(1) 분석 개요

- 통계 개요

① 분석프로그램- Window용 SAS 9.3

② 통계학적 유의수준은 *p*값이 0.05 미만으로 설정.

③ 집단간 동질성 검정과 baseline의 동질성 검정은 Chi-Square test 또는 Fisher’s exact test와 Independent t-test를 이용하였음

④ 총 80명의 피험자 중 7명이 탈락하고, 최종 73명이 인체시험을 완료하였음. (지원자의 91.25%가 시험에 끝까지 참여함)

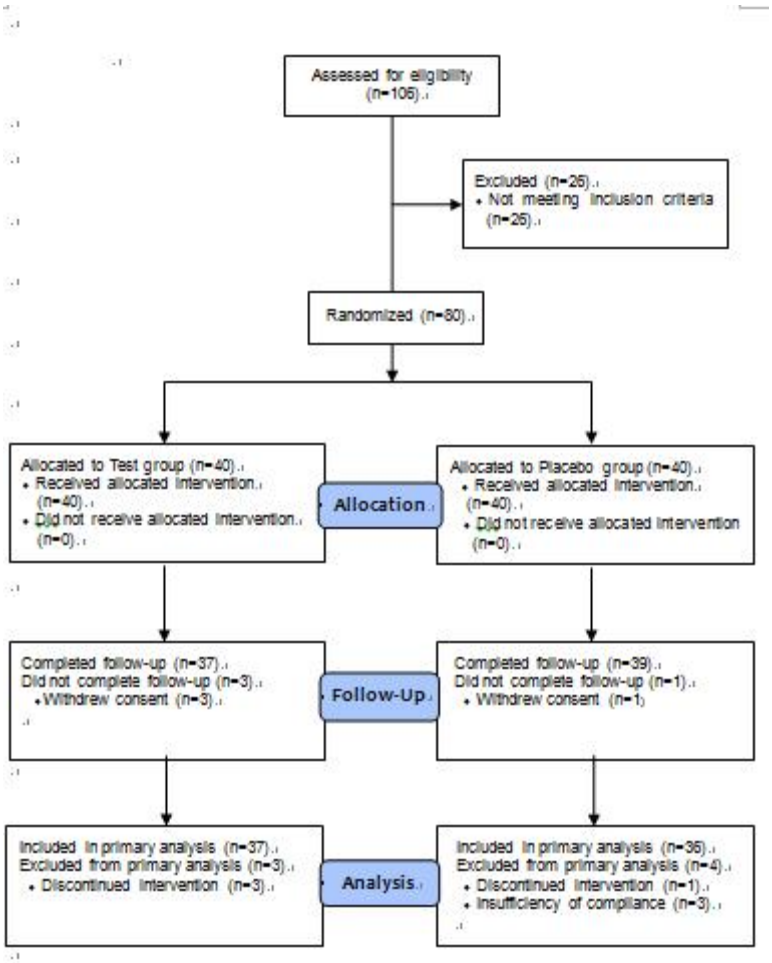


Figure 1. 연구대상자 참여실태

(2) 분석 결과

(가) 인구학적 자료 분석

① 분석 방법 요약 - 인구학적 정보(연령, 체중, 신장)대하여 기술통계학적 분석 시행. 시험군과 대조곤간의 동질성 검정은 연속형 변수인 경우 Independent t-test를 적용히였음.

범주형 변수인 경우와 이분형 변수인 경우 Chi-square test 또는 Fisher’s exact test 를 적용하는 등 자료의 측정수준, 분포형태, 상관관계에 따라 적절한 통계기법을 적용.

② 인구학적 자료 분석 결과

- 본 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 복용한 연구대상자, 즉 Safety 80명(녹차씨추출물군 40명, 플라세보군 40명)을 대상으로 인구학적 정보를 분석하였음.

	녹차씨추출물군 (n=40)	플라세보군 (n=40)	전체 (n=80)	*p*-value[1)]
나이(세)	40.2±6.45	39.63±7.17	39.91±6.78	0.707
성별(남/여)	14/26	14/26	28/52	>.999
신장(cm)	164.6±9.02	164.83±7.39	164.71±8.19	0.903
체중(kg)	74.1±10.25	73.21±7.77	73.65±9.05	0.666
체질량지수(kg/m^2)	27.23±1.45	26.88±1.31	27.05±1.38	0.261
수축기혈압 (mmHg)	122.18±11.62	117.33±10.36	119.75±11.21	0.052
이완기혈압 (mmHg)	77.85±8.62	76.38±6.94	77.11±7.81	0.402
맥박 (회/분)	74.38±7.75	72.7±7.89	73.54±7.82	0.341
체온 (℃)	36.46±0.24	36.41±0.25	36.44±0.25	0.392
음주자(Y/N)	21/19	24/16	45/35	0.499
음주량(unit)	3.33±3.43	4.18±4.6	3.78±4.08	0.494
흡연자(Y/N)	4/36	4/36	8/72	>.999
흡연량(개피/일)	5.25±3.40	7.75±2.63	5.78±3.63	0.724

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by Independent t-test

2) Analyzed by Chi-square test (Fisher’s exact test)

- 스크리닝 당시 전체 연구대상자 80명의 평균 연령은 39.91±6.78세(녹차씨추출물군 40.2±6.45세, 플라세보군 39.63±7.17세)이고, 성별은 남성이 28명, 여성이 52명(녹차씨추출물군 남성 14명, 여성 26명; 플라세보군 남성 14명, 여성 26명)으로 섭취군 간 평균 연령 및 성별 분포에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

- 평균 신장은 164.71±8.19 cm (녹차씨추출물군 164.6±9.02 cm, 플라세보군 164.83±7.39 cm), 평균 체중은 73.65±9.05 kg (녹차씨추출물군 74.1±10.25 kg, 플라세보군 73.21±7.77 kg), 평균 BMI (체질량지수)는 27.05±1.38 kg/m2(녹차씨추출물군 27.23±1.45 kg/m2,플라세보군 26.88±1.31 kg/m2)로 섭취군 간 평균 신장, 체중 및 BMI에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

- 음주자는 45명(녹차씨추출물군 21명, 플라세보군 24명)으로 전체의 56.25% 였으며 흡연자는 총 8명(녹차씨추출물군 4명, 플라세보군 4명)으로 전체의 10% 였으며 두 섭취군 간

음주 및 흡연에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이상의 결과를 종합할 때 전체 연구대상자의 무작위배정이 잘 이루어졌다고 판단하였다.

(나) 순응도분석

① 분석방법 요약 - 인체적용시험용제품의 투여상황에 대하여 매 방문마다 연구대상자가 지참하고 온 인체적용시험용제품의 잔여량을 반납 받고 순응도를 확인하였다. 평가방법은 아래와 같았다.

$$\text{섭취순응도}(\%) = \frac{\text{섭취한 제품 수}(C)}{\text{섭취해야 할 제품 수}(B)} \times 100$$

* 섭취한 제품 수 = 처방한 총 제품 수 - 반납한 제품 수

② 분석결과

- 순응도 미달로 탈락한 연구대상자는 3명으로 유효성 평가 분석에서 제외하였다.
- 본 연구기간 중 총 섭취해야 할 제품의 수는 평균 280.71±10.27개로 녹차씨추출물군과 플라세보군 간 차이가 없었으며(p=0.191), 연구대상자가 섭취한 제품 개수에도 섭취군 간 차이가 없었다(p=0.770). 제품순응도는 녹차씨추출물군 92.55±5.29%, 플라세보군 93.89±5.85%로 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.310).

Table 37. 순응도 (Compliance)

	녹차씨추출물군 (n=37)	플라세보군 (n=36)	전체 (n=73)	p-value[1)]
섭취해야 할 제품 수(개)	282.27±10.22	279.11±10.21	280.71±10.27	0.191
섭취한 제품 수(개)	260.81±16.78	259.28±26.58	260.05±22.02	0.770
순응도(%)	92.55±5.29	93.89±5.85	93.21±5.57	0.310

Compliance was calculated by total intakes by prescriptions.

[1)] Analyzed by Independent t-test

(다) 유효성 평가항목 분석

① 분석방법 요약 - 유효성 평가는 평가 항목을 각 섭취군 내, 군간의 Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정하였다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시하였다. 섭취군의 유효성 분석/안전성 분석반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군간의 RMANOVA/Linear mixed model 등을 적용하였다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA 를 실시하였다. 시점간 차이는 Contrast test 로 분석하였다.

② 유효성평가 항목 분석 결과

㉮ 1차 유효성 평가: 체지방량, 체지방률 및 제지방량 변화

- 체지방량(Body Fat Mass, BFM), 체지방률(Percent Body Fat, PBF) 및 제지방량(Fat Free Mass, FFM)을 평가하기 위해 섭취 전, 섭취 10주 후에 DEXA 촬영으로 확인하였으며, 분석결과를 Table 38에 요약하였다.

- 체지방량을 비교한 결과, 플라세보군 내의 왼쪽 다리, 오른쪽 다리에서 유의하게 감소하였으나(p=0.038, 0.011), 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05). 또한, 녹차씨추출물군 내의 왼쪽 팔, 플라세보군 내의 체지방량 전체에서 감소하는 경향이 있었으나(p=0.078, 0.069), 섭취 군 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

- 체지방률은 녹차씨추출물군 내의 왼쪽 팔에서 유의하게 감소하였으며(p=0.024), 플라세보군 내의 오른쪽 다리에서 유의하게 감소하였으나(p=0.013), 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05). 또한, 녹차씨추출물군 내의 왼쪽 다리, 플라세보군 내의 전체 체지방률에서 감소하는 경향이 있었으나(p=0.071, 0.093), 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05).

- 제지방량은 녹차씨추출물군 내의 전체 제지방량에서 유의하게 증가하였으나(p=0.031), 섭취군 간 유의한 차이는 없었다(p>0.05). 또한, 녹차씨추출물군 내의 몸통에서 증가하는 경향이 있었으나(p=0.079), 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05).

Table 38. 섭취전・섭취 10주후 체지방량, 체지방률, 제지방량

	녹차씨추출물군 (n=37)			플라세보군 (n=36)			p-value 2)
	Baseline	10 week	p-value 1)	Baseline	10 week	p-value 1)	
BFM_arm_left	1461.93 ±334.81	1413.49± 331.80	0.078	1518.17 ±371.26	1508.05 ±382.68	0.628	0.262
BFM_arm_right	1488.72 ±336.15	1472.67 ±321.02	0.484	1515.92 ±339.13	1504.10 ±371.71	0.661	0.904
BFM_leg_left	3532.45 ±840.60	3462.14 ±852.66	0.170	3877.22 ±1079.81	3697.66 ±1144.23	0.038*	0.262
BFM_leg_right	3606.85 ±902.77	3567.53 ±916.71	0.463	4043.28 ±1152.83	3876.68 ±1161.28	0.011*	0.121
BFM_trunk	13278.63 ±2024.98	13479.08 ±2242.01	0.188	13584.26 ±3045.72	13510.14 ±3185.64	0.650	0.216
BFM_total	24386.68 ±3732.45	24389.26 ±3861.64	0.990	25551.04 ±5478.14	25163.46 ±5598.72	0.069	0.193
PBF_arm_left	38.09 ±10.52	37.22 ±11.07	0.024*	40.85 ±10.70	40.58 ±11.08	0.410	0.227
PBF_arm_right	36.62 ±10.14	36.17 ±10.15	0.225	38.90 ±10.25	38.69 ±10.78	0.583	0.651
PBF_leg_left	32.92	32.41	0.071	35.52	34.95	0.050	0.887

	±8.14	±8.28		±9.02	±9.06		
PBF_leg_right	32.91 ±8.36	32.51 ±8.61	0.187	36.23 ±9.35	35.44 ±9.39	0.013*	0.370
PBF_trunk	35.20 ±5.28	35.20 ±5.25	>.999	36.43 ±6.56	35.94 ±6.83	0.181	0.297
PBF_total	33.97 ±6.01	33.79 ±6.10	0.463	35.78 ±7.06	35.32 ±7.30	0.093	0.438
FFM_arm_left	2500.89 ±841.25	2522.55 ±864.95	0.352	2272.09 ±677.58	2291.91 ±713.60	0.315	0.952
FFM_arm_right	2721.68 ±917.68	2745.95 ±911.61	0.309	2480.53 ±737.62	2493.25 ±800.72	0.674	0.762
FFM_leg_left	7363.49 ±1787.25	7390.24 ±1802.70	0.709	7073.86 ±1415.25	7012.99 ±1476.19	0.474	0.428
FFM_leg_right	7514.68 ±1819.57	7569.87 ±1825.11	0.455	7136.04 ±1398.22	7081.62 ±1463.85	0.519	0.326
FFM_trunk	24766.18 ±4800.80	25118.26 ±5089.22	0.079	23739.74 ±3930.44	24088.78 ±3941.59	0.112	0.992
FFM_total	48337.94 ±9969.75	48730.62 ±10166.75	0.031*	46166.99 ±7964.37	46433.70 ±8250.80	0.275	0.672

Abbreviation: BFM, Body Fat Mass; PBF, Percent Body Fat; FFM, Fat Free Mass

Values are presented as mean±SD, *p<0.05

[1] Analyzed by Paired t-test

[2] Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

㉯ 2차 유효성 평가: 신체계측지표 변화

- 2차 유효성 평가지표인 신체계측 지표(체중, 체질량지수, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레 비율)를 시험용제품 섭취 전, 섭취 5주 후, 섭취 10주 후에 측정하였다. 분석 결과를 Table 39,40에 요약하였다.

- 방문 별 분석 결과, 녹차씨추출물군 내의 허리둘레와 허리/엉덩이둘레비가 유의하게 감소하였으나(p=0.032, 0.043), 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.509, 0.647). 또한, 녹차씨추출물군 내의 체중과 체질량지수가 증가하는 경향을 나타냈으며(p=0.094, 0.078), 이외 항목 모두 섭취군 내, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

- 섭취 전, 섭취 10주 후 분석 결과, 녹차씨추출물군 내의 체질량지수가 유의하게 증가하였으나(p=0.046), 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.201). 또한, 녹차씨추출물군에서 체중은 증가하는 경향이 있었고(p=0.052), 허리둘레와 허리/엉덩이둘레비가 감소하는 경향을 나타냈으며(p=0.061, 0.060), 이외 항목 모두 섭취군 내, 섭취군

간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

Table 39. 방문별 신체계측지표

	녹차씨추출물군 (n=37)				플라세보군 (n=36)				p-value[2)]
	Baseline	5 week	10 week	p-value[1)]	Baseline	5 week	10 week	p-value[1)]	
체중 (kg)	74.30 ±10.58	74.62 ±10.7	74.88 ±10.87	0.094	73.16 ±7.37	73.08 ±7.60	73.29 ±7.79	0.627	0.364
체질량지수 (kg/m^2)	27.11 ±1.45	27.24 ±1.71	27.34 ±1.7	0.078	26.91 ±1.33	26.88 ±1.46	26.95 ±1.52	0.709	0.322
허리둘레 (cm)	91.69 ±5.88	91.76 ±5.62	90.9 ±5.42	0.032*	91.64 ±4.71	91.51 ±5.39	91.24 ±5.57	0.391	0.509
엉덩이둘레 (cm)	99.70 ±3.69	99.79 ±4.01	99.79 ±3.88	0.906	100.22 ±4.59	99.99 ±4.38	100.17 ±4.37	0.938	0.857
허리/엉덩이둘레비 (ratio)	0.92 ±0.05	0.92 ±0.04	0.91 ±0.04	0.043*	0.92 ±0.04	0.92 ±0.04	0.91 ±0.04	0.323	0.674

Values are presented as mean ± SD, *p<0.05

1) Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

Table 40. 섭취 전 · 섭취 10주 후 신체계측지표

	녹차씨추출물군 (n=37)			플라세보군 (n=36)			p-value[2)]
	Baseline	10 week	p-value[1)]	Baseline	10 week	p-value[1)]	
체중 (kg)	74.30 ±10.58	74.88 ±10.87	0.052	73.16 ±7.37	73.29 ±7.79	0.575	0.241
체질량지수 (kg/m^2)	27.11 ±1.45	27.34 ±1.7	0.046*	26.91 ±1.33	26.95 ±1.52	0.613	0.201
허리둘레 (cm)	91.69 ±5.88	90.9 ±5.42	0.061	91.64 ±4.71	91.24 ±5.57	0.250	0.475
엉덩이둘레 (cm)	99.70 ±3.69	99.79 ±3.88	0.752	100.22 ±4.59	100.17 ±4.37	0.882	0.743
허리/엉덩이둘레비(ratio)	0.92 ±0.05	0.91 ±0.04	0.060	0.92 ±0.04	0.91 ±0.04	0.283	0.470

Values are presented as mean ± SD, *p<0.05

1) Analyzed by Paired t-test,

2) Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

㉰ 2차 유효성 평가: 혈중지질지표 및 기타지표의 변화

- 2차 유효성 평가지표인 지질대사지표(Total cholesterol, Triglyceride, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol)와 FFA, Adiponectin을 시험용제품 섭취 전, 섭취 5주 후, 섭취 10주

후에 측정하였으며, 분석 결과를 Table 41, 42에 요약하였다. 분석결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

Table 41. 방문 별 혈중지질 및 기타 지표

	녹차씨추출물군 (n=37)				플라세보군 (n=36)				p-value 1)
	Baseline	5 week	10 week	p-value 1)	Baseline	5 week	10 week	p-value 1)	
TC (mg/dl)	184.76 ±32.51	179.41 ±26.26	183.22 ±28.22	0.312	183.92 ±37.80	183.83 ±38.07	185.94 ±39.25	0.723	0.515
TG (mg/dl)	138.49 ±73.72	132.54 ±69.8	141.41 ±75.75	0.639	104.97 ±56.35	109.33 ±61.45	109.58 ±58.80	0.785	0.660
HDL-C (mg/dl)	47.86 ±11.66	47.84 ±12.31	49.46 ±13.89	0.194	48.64 ±8.83	50.00 ±9.03	48.97 ±10.37	0.403	0.195
LDL-C (mg/dl)	109.24 ±28.31	105.11 ±22.87	105.54 ±25.17	0.474	114.25 ±30.99	111.94 ±30.29	115.03 ±31.85	0.464	0.611
FFA (uEq/L)	564.08 ±196.37	519.08 ±176.96	561.35 ±225.82	0.272	496.44 ±166.18	478.25 ±148.34	536.08 ±155.06	0.146	0.609
Adiponectin (ug/ml)	19.38 ±10.57	18.57 ±10.69	18.18 ±10.69	0.406	19.07 ±11.93	18.72 ±11.32	17.75 ±10.98	0.495	0.915

가. Abbreviation: TC, total cholesterol; TG, Triglyceride; HDL-C, High density lipoprotein cholesterol; LDL-C, Low density lipoprotein cholesterol; FFA, Free fatty acid

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

Table 42. 섭취 전 · 섭취 10주 후 혈중지질 및 기타 지표

	녹차씨추출물군 (n=37)			플라세보군 (n=36)			p-value 2)
	Baseline	10 week	p-value1)	Baseline	10 week	p-value1)	
TC (mg/dl)	184.76 ±32.51	183.22 ±28.22	0.706	183.92 ±37.8	185.94 ±39.25	0.501	0.482
TG (mg/dl)	138.49 ±73.72	141.41 ±75.75	0.743	104.97 ±56.35	109.58 ±58.8	0.506	0.881
HDL-C (mg/dl)	47.86 ±11.66	49.46 ±13.89	0.206	48.64 ±8.83	48.97 ±10.37	0.782	0.466
LDL-C (mg/dl)	109.24 ±28.31	105.54 ±25.17	0.380	114.25 ±30.99	115.03 ±31.85	0.758	0.363
FFA (uEq/L)	564.08 ±196.37	561.35 ±225.82	0.940	496.44 ±166.18	536.08 ±155.06	0.218	0.382
Adiponectin (ug/ml)	19.38 ±10.57	18.18 ±10.69	0.212	19.07 ±11.93	17.75 ±10.98	0.257	0.937

Abbreviation: TC, total cholesterol; TG, Triglyceride; HDL-C, High density lipoprotein cholesterol; LDL-C, Low density lipoprotein cholesterol; FFA, Free fatty acid

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by Paired t-test,

2) Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

(라) 안전성 평가 항목 분석

① 분석방법 요약 - 안전성 평가를 위해 이상반응의 발생 양상을 Chi-square test 또는 Fisher’s exact test 를 이용하여 검정하며, 진단검사의학검사, 활력징후 등은 시험군 내 변화를 paired t-test 또는 RM-ANOVA 를 이용하여 검정하였다. 시험군 간의 차이는 각 항목의 변화량을 계산하여 Independent t-test 를 이용하거나 Linear mixed-effects model 을 이용하여 검정하였다. 안전성 평가는 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자(Safety군) 80명을 대상으로 분석하였다.

② 안전성 항목 분석 결과

㉮ 자 · 타각 증상 등 이상반응

Table 43. 이상반응

	녹차씨추출물군 (n=40)	플라세보군 (n=40)	*p*-value[1]
이상반응 발생 (Y/N)	2/38	8/32	0.043*

Values are presented as number. *$p<0.05$.

[1] Analyzed by Chi-square test.

- 이상반응 발생률에 대한 결과를 Table 13에 요약하였다. 본 연구기간 동안 녹차씨추출물을 섭취한 40명 중 2명에서 3건(발목 염좌 1건, 감기 1건, 허리통증 1건), 플라세보를 섭취한 40명 중 8명에서 8건(감기 6건, 허리통증 1건, 속쓰림 1건)의 이상반응(총 11건)이 발생하였다. 이상반응의 중증도는 경도 또는 중등도 이었으며, 시험용제품 섭취와 인과관계가 없었다. 두 섭취군 간 이상반응 발생에 유의한 차이가 있었으나 (p=0.043), 인체적용시험용제품 섭취와 인과관계가 없어서 임상적 의미가 없는 차이라고 판단하였다.

㉯ 진단검사의학 검사

- 혈액학 검사와 혈액생화학 검사, 소변 검사로 이루어진 진단검사의학 검사를 섭취 전(스크리닝 방문)과 섭취 10주 후에 실시하였으며, 분석 결과를 Table 43 에 요약하였다. 진단검사의학 검사 항목 측정치에서 시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 10주 후 녹차씨추출물군 내의 AST, ALT, creatinine 항목에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 (p=0.046, p=0.022), 참고치 범위 내에서 일어난 임상적 의미가 없는 변화라고 판단하였다. 그 외 다른 항목에서는 섭취 군 내와 섭취 군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (p>0.05).

Table 44. 진단검사의학 검사 결과

	녹차씨추출물군 (n=40)			플라세보군 (n=40)			*p*-value[2)]
	Baseline	10 week	*p*-value[1)]	Baseline	10 week	*p*-value[1)]	
■ Hematology							
WBC (4.8~10.8×10^3/μL)	5.74±1.39	5.90±1.47	0.202	5.45±1.38	5.45±1.11	0.999	0.505
RBC (M:4.7~6.1×100^3/μL, F:4.2~5.4×100^3/μL)	4.61±0.45	4.62±0.45	0.782	4.50±0.43	4.51±0.40	0.611	0.591
Hemoglobin (M: 13~18g/dL, F: 12~16g/dL)	14.02±1.42	13.99±1.54	0.484	13.72±1.30	13.63±1.29	0.660	0.800
Hematocrit (M: 42~52%, F: 37~47%)	41.17±3.61	41.26±3.83	0.866	40.43±3.54	40.47±3.36	0.490	0.556
Platelet (130~450×10^3/μL)	264.15 ±60.52	268.03 ±66.10	0.113	247.43 ±43.61	255.15 ±48.71	0.083	0.967
■ Biochemistry							
ALP (45~129IU/L)	61.78±12.37	60.81±13.50	0.950	59.85±13.69	59.54±13.22	0.968	0.981
GGT (M: 12~73IU/L F: 8~48IU/L)	29.80±23.22	28.57±20.30	0.550	20.95±12.49	22.59±18.51	0.329	0.262
AST (12~33IU/L)	21.60±4.58	23.35±6.13	0.046*	20.78±4.22	21.46±6.12	0.262	0.455
ALT (5~35IU/L)	24.80±10.32	28.70±14.26	0.030*	20.95±8.04	23.18±11.05	0.067	0.495
Total bilirubin (0.2~1.2mg/dL)	0.90±0.39	0.82±0.29	0.090	0.86±0.36	0.79±0.31	0.124	0.739
Total protein (6.7~8.3g/dL)	7.41±0.41	7.32±0.38	0.056	7.33±0.36	7.34±0.43	0.657	0.116
Albumin (3.5~5.3g/dL)	4.44±0.23	4.41±0.20	0.378	4.36±0.17	4.39±0.22	0.397	0.222

BUN (8~23mg/dL)	12.73±2.85	13.38±3.06	0.159	12.93±3.03	13.00±2.92	0.646	0.505
Creatinine (0.7~1.7mg/dL)	0.68±0.16	0.65±0.15	0.022*	0.69±0.14	0.64±0.14	0.002*	0.752
Uric acid (M:3.0~8.0mg/dL, F: 2.5~6.3mg/dL)	5.65±1.64	5.57±1.69	0.566	5.12±1.33	5.10±1.32	0.899	0.759
Glucose (74~106mg/dL)	89.93±7.09	88.41±6.94	0.180	87.88±6.63	89.18±7.45	0.240	0.064
■ Urinalysis							
SG (1.005~1.030)	1.02±0.01	1.02±0.01	0.775	1.02±0.01	1.02±0.01	0.584	0.795
pH (4.5~9.0)	6.19±0.92	6.11±0.89	0.636	6.15±0.81	6.08±0.80	0.596	0.980

Values are presented as mean ± SD, *p<0.05

1) Analyzed by Paired t-test

2) Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

㉰ 활력징후

- 활력징후(수축기혈압, 이완기혈압, 맥박수)를 매 방문마다 측정하였으며, 분석 결과를 Table 44, 45에 요약하였다.

- 녹차씨추출물군과 플라세보군의 방문에 따른 활력징후를 평가한 결과, 임상적으로 의미가 있는 이상 수치가 없었으며, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이 또한 없었다(p>0.05).

Table 45. 방문 별 활력징후

	녹차씨추출물군 (n=40)			p-value[1)]	플라세보군 (n=40)			p-value[1)]	p-value[1)]
	Baseline	5 week	10 week		Baseline	5 week	10 week		
수축기혈압 (mmHg)	119.65 ±9.89	118.53 ±10.88	119.62 ±10.62	0.456	115.43 ±10.12	114.79 ±8.66	116.31 ±10.30	0.414	0.636
이완기혈압 (mmHg)	77.30 ±7.77	77.58 ±7.88	77.54 ±7.39	0.968	74.55 ±7.97	74.31 ±7.92	74.15 ±7.74	0.988	0.998
맥박수 (회/분)	73.70 ±7.65	73.79 ±8.49	75.78 ±8.25	0.069	72.33 ±6.49	71.26 ±6.82	71.44 ±6.02	0.502	0.085

체온 (℃)	36.42 ±0.24	36.39 ±0.27	36.32 ±0.24	0.081	36.36 ±0.21	36.35 ±0.26	36.33 ±0.20	0.767	0.528

Values are presented as mean ± SD

[1] Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

Table 46. 섭취 전 · 섭취 10주 후 활력징후

	녹차씨추출물군 (n=40)		*p*-value [1]	플라세보군 (n=40)		*p*-value [1]	*p*-value [2]
	Baseline	10 week		Baseline	10 week		
수축기혈압 (mmHg)	119.65±9.89	119.62±10.62	0.699	115.43±10.12	116.31±10.30	0.329	0.336
이완기혈압 (mmHg)	77.30±7.77	77.54±7.39	0.743	74.55±7.97	74.15±7.74	0.885	0.927
맥박수 (회/분)	73.70±7.65	75.78±8.25	0.043*	72.33±6.49	71.44±6.02	0.351	0.030*
체온 (℃)	36.42±0.24	36.32±0.24	0.027*	36.36±0.21	36.33±0.2	0.444	0.266

Values are presented as mean ± SD, *$p<0.05$

[1] Analyzed by Paired t-test,

[2] Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

(3) 결과보고서 요약

본 인체적용시험은 녹차씨추출물 섭취가 체지방 감소에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 10주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 연구이다.

본 인체적용시험의 종료목표 연구대상자 수는 64명이며, 총 106명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 총 80명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 이중눈가림 방법을 통해 녹차씨추출물군, 플라세보군에 1:1 무작위배정 되어 본 인체적용시험에 참여하였다. 시험자는 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, 체지방량, 체지방률 및 제지방량, 신체계측지표, 지질대사지표 등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다. 유효성 평가를 위한 주 분석군은 계획서순응연구대상자군(Per protocol Set)으로써 녹차씨추출물군 40명 중 3명, 플라세보군 40명 중 4명이 중도탈락함에 따라, 총 73명(녹차씨추출물군 37명, 플라세보군 36명)의 연구대상자를 대상으로 유효성 평가 분석을 시행하였다. 안전성 평가를 위한 주 분석군은 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자군(safety군) 이었다.

(가) 유효성 평가 결과

1차 유효성 평가항목인 체지방량, 체지방률 및 제지방량 변화에서 녹차씨추출물군과 플라세보군, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

2차 유효성 평가항목인 신체계측지표(체중, 체질량지수, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이둘레비), 지질대사지표(총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤), free fatty acid 및 adiponectin에서 녹차씨추출물군과 플라세보군, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

모든 연구대상자를 대상으로 식이섭취와 신체활동도 조사를 하였으며, 녹차씨추출물군과 플라세보군의 열량, 거대영양소 및 식이섬유 섭취량, MET value 및 활동소비열량에 있어서 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없어서($p>0.05$) 연구대상자들이 인체적용시험에 참여하는 동안 일상생활을 일정하게 유지하였음을 알 수 있었고, 식이섭취와 신체활동도가 본 시험 결과에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 판단하였다.

요약하면, 본 인체적용시험을 통해 녹차씨추출물 섭취가 체지방 감소에 유효함을 증명할 수 없었으며, 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 녹차씨추출물 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

(나) 안전성 평가 결과

안전성 평가를 위해 연구대상자 80명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학 검사(혈액학 검사, 혈액생화학 검사, 뇨검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 80명의 연구대상자 중 10명의 연구대상자에서 총 11건의 경도 또는 중등도의 이상반응이 발생하였다. 두 섭취군 간 이상반응 발생에 유의한 차이가 있었으나($p=0.043$), 인체적용시험용제품 섭취와 이상반응 사이에 인과관계가 없어서 임상적 의미가 없는 통계적 차이라고 판단하였다. 진단검사의학 검사, 활력징후에서는 통계적으로, 그리고 임상적으로 의미있는 변화가 없었다($p>0.05$).

2. 진행 컨설팅

가. 식약처 모둠토의

(1) 모둠토의 진행

일시 : 2014년 4월 22일 16:00

장소 : 식약처 세미나실 (신청서 및 회의록 상단 2절-2-(바) 참고)

(모둠토의 일정 확정 공문)

14 18:33 From: 05026045931, To: 0613369627 Page.001/001

장관	고치훈	지시	이경렬
일시	'14.4.15	결재·공람	
자료번호	845		
담당			

국민 눈높이로 다가가는 열린 정부, 국민과 함께 하겠습니다.

식품의약품안전처

식품의약품안전처

수신 전남식품산업연구센터
(경유)
제목 제2014년-9차 모둠토의 개최(녹차씨추출물)

1. 관련: 건강기능식품기준과-1344(2014.04.09)호

2. 귀 원에서 건강기능식품 기능성 원료로 개발 중인 "녹차씨추출물"에 대하여 우리 처 사전기술상담(모둠토의)을 신청하였기에 다음과 같이 모둠토의를 개최하니, 참석하여 주시기 바라며, 발표 자료는 2014.4.17(목)까지 우리 처[건강기능식품기준과(ffmfds@korea.kr)]로 송부하여 주시기 바랍니다.

가. 일 시 : 2014년 4월 22일(화), 16:00~17:00
나. 장 소 : 식품의약품안전처 연구심사A동 세미나실 210호(Gate 6)
다. 참 석 자 : 신광수(명인신광수차), 위지향(전남식품산업연구센터), 신유림(바이오푸드스토리(주)), 건강기능식품기준과
라. 토의 내용 : 원료의 기준·규격자료, 안전성, 기능성 자료의 타당성 등
마. 신청 기능성내용 : 체지방감소에 도움(생리활성 2등급)

붙임 : 제9차 모둠토의 신청서(명인신광수차). 끝.

식품의약품안전처장

주무관	고수일	연구관	오금순	건강기능식품기준과장	양창숙	전결 2014. 4. 14.

협조자

시행 건강기능식품기준과-1399 (2014. 4. 14.) 접수

우 363-700 충청북도 청원군 오송읍 오송생명2로 식품의약품안전처 건강기능식품기준과 / http://www.mfds.go.kr

전화번호 043-719-2455 팩스번호 043-719-2450 / siko@korea.kr / 비공개(6)

국민중심의 서비스 정부로 모두가 행복한 대한민국을 만들어 갑니다.

나. 방문토의 및 식약처 질의 응답

(1) 방문토의 진행 개요

(가)모둠토의 신청 후 업무의 효율을 위해 방문상담으로 재신청

① 표준화 : 원물의 수확시기에 따른 지표물질 성분 변화

② 개별인정

(나) 완료된 전임상 및 임상시험 결과를 바탕으로 한 개별인정 신청 및 획득 가능성 문의

(다) 추가·보완 해야 할 자료에 대한 코멘트 요청

(첨부 11, 모둠토의 신청서 : 2회차)

(모둠토의 2회차 신청서 개요)

- 모둠토의 날짜 확정 (6월 30일 오후 2시)

건강기능식품 『모둠토의』 신청서

<추가 신청>

일반사항

회사(기관)명	명인신광수 차	주소	전남 순천시 승주읍 수주괴목 2길 25
		FAX	061-754-6165
신청인	신 유림		
참석자	신희찬(명인신광수차) 외 1인 김종덕(전남대학교) 외 1인 위지향 (전남식품산업연구센터) 외 1명 신유림 (바이오푸드스토리(주)) 외 1명		
기능성 원료명	녹차씨추출물(녹차씨박열수추출물)		
신청 기능성 내용	체지방감소에 도움을 줄 수 있음.(기타 II 등급)		

질의 및 토의사항

- 작년 1차 모둠토의를 한 바 있는 프로젝트입니다.(2014년 4월 23일) 이후 임상시험이 순조롭게 진행 되어 7월 중 결과분석 예정이며, 개별인정을 위해 원료표준화, 전임상, 임상 전 과정을 다시 점검하던 중 아래와 같은 사안이 발생하여 모둠토의를 신청합니다.
- 원료 표준화와 관련하여 녹차씨를 수확 한 후 보관하면서 녹차씨유를 압착하여 얻어진 압착박을 대상으로 대량생산을 실시해 본 결과, 수확 후 보관시기가 길어질수록 지표성분의 함량이 점점 감소하는 경향을 보입니다.
- 이러한 경우 지표성분 설정의 기준값을 어떻게 설정하는 것이 적절한지 확인·검토 받아보고자 합니다.
- 지난 5월 15일 본 문서의 자료 및 질문으로 모둠토의 신청 이후, 인체적용시험 통계 분석 결과가 나와 문서의 하단에 첨부하였습니다. 현재 유효성 바이오마커 중 군간 유의성이 보인 바이오마커는 없고, PBF_arm_L, PBF_arm_R, FFM_Total, WC (cm), BMI (kg/m^2) 에서만 전후 유의성이 보였습니다.
- 이 인체적용시험 결과를 토대로 개별인정 3등급을 득할 수 있을지, 추가 보완자료가 필요하다면 어떤 것이 필요한지 궁금합니다.

현재 연구단계

(※ □에 V로 표시)

기준 규격	▪ 기능(지표)성분	☑ 설정 ☑ 분석법 확보 ☑ 분석 완료
	▪ 유해물질	☑ 기준·규격 설정 완료
안전성	▪ 기초 자료	☑ 섭취근거자료 ☑섭취량평가자료 ☑ DB 검색 등을 통한 안전성 정보 자료 (부작용 등) ☑ 영양평가자료 □ 생물학적 유용성자료

		☐ 인체시험자료
	▪ 독성시험	☑ 자료확보 ☐ 설계 중 ☐ 실시 중 ☐ 시험완료
기능성	▪ 시험관 시험	☑ 자료확보 ☐ 설계 중 ☐ 실시 중 ☐ 시험완료
	▪ 동물시험	☑ 자료확보 ☐ 설계 중 ☐ 실시 중 ☐ 시험완료
	▪ 인체적용시험	☐ 자료확보 ☐ 설계 중 ☑ 실시 중 ☐ 시험완료

안녕하세요. 식약처 영양기능연구팀입니다. | 관련편지검색

보낸사람 : 건강기능식품기준과 개인정보보호 15.05.15 10:44 | 주소추가 | 수신차단
받는사람 : "박주현" 개인정보보호 · 주소추가
보낸날짜 : 2015년 5월 15일 금요일, 10시 44분 08초 +0900

안녕하세요. 식약처 영양기능연구팀입니다.

신청하신 모둠토의 날짜를 7월 1일 수요일 오후 2시에서

6월 30일 화요일 오후 2시(연구심사동 210호)로 변경하여 예약 해드렸습니다.

모둠토의 전에 토의자료(PPT)를 이메일 개인정보보호 로 보내주시기 바랍니다.

감사합니다.

--------- 원본 메일 ---------

보낸사람 : "박주현" 개인정보보호
받는사람 : "건강기능식품기준과" 개인정보보호
받은날짜 : 2015년 5월 15일(금) 10:05:12
제목 : 모둠토의 신청

식약처 영양기능연구팀 모둠토의 담당 선생님께
안녕하세요, CRO 바이오푸드스토리 박주현입니다.

첨부와 같이 모둠토의 신청드리니 확인 후 날짜 회신 부탁드립니다.

즐거운 금요일 보내시고 환절기 감기 조심하세요!

박주현 드림.

- 모둠토의를 신청하여 6월 30일 오후 2시로 배정받았으나 과제 진행의 효율을 위하여 같은 날 방문상담으로 변경 신청함.

(방문상담 신청)

홈 > 상담예약

상담예약

민원인 이름	박주현	**확정상담장소**	식약처-민원실
예약등록일	2015-06-16 02:35	**희망상담일시**	2015-06-30 02:00
확정상담일시	2015-06-30 02:00	**확정상담부서**	영양기능연구팀
확정담당자	유광수	**상담구분**	방문상담

다. 과제 진행 회의

- 연구개발의 효율적인 진행을 위해 연구개발 회의를 진행함.

(1) 회의 진행 내역

외부회의록	2014-03-04 오후...	파일 폴더	
20130819 회의록	2013-12-23 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20130827 회의록	2013-12-27 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20131017 회의록	2013-12-27 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20131204 회의록	2014-08-06 오후...	한컴오피스 한글 ...	16KB
20131224 회의록	2013-12-27 오전...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140122 회의록	2014-01-22 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140210 회의록	2014-02-17 오전...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140224 회의록	2014-02-24 오전...	한컴오피스 한글 ...	14KB
20140304 회의록	2014-03-04 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140328 회의록 - 개시모임	2014-04-11 오후...	한컴오피스 한글 ...	16KB
20140414 회의록	2014-04-14 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140418 회의록	2014-04-25 오전...	한컴오피스 한글 ...	15KB
20140422 회의록(2)	2014-04-25 오전...	한컴오피스 한글 ...	17KB
20140422 회의록	2014-08-21 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140502 회의록	2014-07-16 오후...	한컴오피스 한글 ...	13KB
20140710 회의록	2014-07-10 오후...	한컴오피스 한글 ...	16KB
20140711 회의록	2014-07-11 오후...	한컴오피스 한글 ...	14KB
20140717 회의록	2014-07-18 오후...	한컴오피스 한글 ...	16KB

(2) 진행 성격

차수	횟수	성격
1차년	2012년 8월 24일부터 약 20회 가량	① 참여기관 전체 회의 : 과제 진행 점검 및 향후 일정 회의 (원료 표준화, 전임상) ② 소재 컨설팅 : 녹차씨 소재 특성 및 기능성 관련 외부 연구원 및 자문회의 ③ 임상 준비 : 임상시험실시기관 컨택 및 임상 디자인 회의
2차년	2013년 8월 19일부터 약 19회 가량	① 참여기관 전체 회의 : 과제 진행 점검 및 향후 일정 회의 (시험약 개발, 임상시험 진행) ② 소재 컨설팅 : 원료표준화 및 전임상시험 결과를 바탕으로한 소재의 특성 및 각종 분석 관련 자문 ③ 임상 설계 : 기 설정된 임상기관과의 시험 디자인 및 biomaker 및 증례기록서(CRF)개발과 임상 진행 일정에 관한 논의
3차년	2014년 10월 1일부터 약 23회 가량	① 참여기관 전체 회의 : 과제 진행 점검 및 향후 일정 회의 (임상 및 과제 마무리, 성과 관리) ② 임상 진행 : 임상시험 진행 단계에 따른 논의 및 마무리, 모니터링, 통계, 임상종료 보고 및 보고서 작성 전반에 관한 논의 ③ 개별인정 신청 : 연구 종료에 맞춰 녹차씨 소재의 식약처 원료 개별인정 신청과 관련한 자료 마련 및 자문 회의 진행
합계	약 62회 이상	

(3) 회의록 예

회 의 록

일 시	2013. 03. 18. 11:00~13:00	기 록	김윤정
장 소	전북대학교병원 기능성식품임상시험센타		
참 가 자	신숙정 외 5인 (바이오푸드스토리, CTCF2)		
회의목적	임상시험기관 선정을 위한 회의		

회 의 내 용

1. 회의 소집 이유
- 임상시험기관 선정을 위한 회의

2. 회의내용
1) 참석자 : 바이오푸드스토리(신숙정, 김윤정, 노수미)
전북대학교병원 기능성식품임상시험센터(최은경, 박수현, 오미라, 김소영, 김애리, 김순영)
2) 내용 및 결과 :
1. 임상시험기관 선정을 위한 논의

- **임상시험기관 P.I 이력 확인**
(채수완, 최은경 이력서 첨부)

- **비만관련 임상시험 경력 확인** : 2008년 이후 현재)까지 약 18건에 비만관련 임상시험 진행되었으며 현재는 연 2회의 비만관련 임상시험이 진행되고 있음.

- **현재 임상시험 진행 담당자**(비만관련)소개 : PM(박수현, 오미라)
CRC(김순영, 김애리, 김소영)

- **임상시험 진행시 진행 스케쥴 논의**
(2차년에 임상시험 진행시 차질 없음을 확인)

3. 차 후 진행
- 임상시험 선정에 적합할 것으로 보이며, 다음 회의시 현재 진행중인 비만관련 시험 일정과 중복되는 여부 확인, 임상시험 진행 시기 결정 및 협약 일정 논의

회 의 록

일 시	2013.12.20.	기 록	박주현
장 소	전남식품산업연구센터		
참 가 자	신숙정, 박주현, 위지향, , 김종덕, 신태선, 서효진, Narendrachaud, ,		
회의목적	연구진행회의		

회 의 내 용

1. 회의 소집 이유
- 연구진행회의

2. 회의내용
1) 회의성격 : 연구 진행 회의
2) 참석자 : 바이오푸드스토리(제 2세부,신숙정, 박주현)
전남식품센터 (제 1세부, 위지향, 정경옥)
전남대학교 (김종덕, 신태선, 김민용, 서효진, Narendrachaud)
명인신광수차 (신희찬)
3) 내용:
- 바이오마커별 동물실험 진행 논의
- 녹차씨 내 지표물질(Narigenin) 및 catechin 추출실험으로 지표물질 선정
- IRB 승인 및 샘플제작 일정 논의

3. 결과
- 녹차씨 추출물 동물실험결과 체지방 감소효과에 긍정적인 방향으로 결론
(특히 암컷에서 효과가 높은 편)
- 지표물질 narigenin 선정
- 1월 말 경 IRB 승인 올릴 예정, 샘플생산은 2월경
(1인 섭취량 1500~200mg/day, 주약 40명, 20weeks 분량)

4. 차 후 진행
- 1월 말 경 IRB 승인 올릴 예정, 샘플생산은 2월경
(1인 섭취량 1500~200mg/day, 주약 40명, 20weeks 분량)

제 6 절 결과의 활용

1. 개별인정신청

가. 녹차씨박 열수추출물의 개별인정 신청

(1) 개 요[9)]

식약처장이 별도로 인정하는 원료 또는 성분은 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식약청고시 제2011-34호, 2011.7.8)」제4조1호 및 2호에 따라 인정기준에 따라 법류에 부합하고, 안전성과 기능성이 과학적으로 입증될 수 있도록 관련서류를 규정에 맞게 문서화하였으며, 사전 모듬토의를 통해 기타 3등급 획득의 가능성을 기대하고 있음.

(가) 심사대상 및 제출자료 요건

- 심사대상(제 3조)

① 이 규정에 따른 기능성 원료 인정 심사대상은 다음 각 호의 어느 하나와 같다.

㉮ 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 고시되지 않은 원료

㉯ 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 고시된 기능성 원료에 대한 기능성 내용의 추가, 섭취량 또는 제조기준의 변경

㉰ 제9조제1항에 따른 기능성 원료 인정 사항의 변경 또는 추가

(나) 제출자료의 범위(제 12조)

① 기능성 원료로 인정받기 위한 제출 자료는 다음 각 호와 같다.

㉮ 제출자료 전체의 총괄 요약본

㉯ 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

㉰ 제조방법에 관한 자료

㉱ 원료의 특성에 관한 자료

㉲ 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서

㉳ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

㉴ 안전성에 관한 자료

㉵ 기능성 내용에 관한 자료

㉶ 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

㉷ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

② 제1항에도 불구하고 인정신청을 한 원료가 제3조제1항 제2호 또는 제3호에 해당하는 경우에는 추가 또는 변경되는 자료만 제출할 수 있다.

(2) 개별인정신청서류 문서화작업을 위한 자료수집/분류[53-54)]

(가) 원료의 기원 및 인정 및 사용 현황

① 기원

㉮ 차의 기원 : BC 59년 중국, 약 1,100년전 삼국시대 우리나라에 보급

㉯ 차나무의 열매인 차씨는 다자 혹은 다실로 기록되어 있으며 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있음.

<참고 : 중국전한시대 「동약」/ 삼국사기 제 10권 「흥덕왕」편 / 본초강목 / 속명가방선 / 동의보감 /의방적요>

원재료명	녹차씨	녹차씨열수추출물	비고(참고)
학명	*Camellia sinensis*(L)	*Camellia sinensis* seed	
원산지	전남 순천	전남 순천	
사용부위	녹차나무의 종자	**녹차씨열수추출물**	종자유 채유 후 부산물
채취시기	9월 ~12월 중순		

② 인정 및 사용 현황

㉮ 인정 현황

- 국내 식품원재료 DB : 차나무의 식용가능 부위에 녹차씨가 포함
- 국가생물종지식정보시스템에 ‘다자’로 기록되어 약용 사용례가 있음

▶ 어린 눈과 잎은 녹차, 홍차를 만드는데 사용하고 열매로는 기름을 짠다. ▶ 목재는 단추 만드는데 .....(중략)..... **(3)茶子(다자)** - ①성분 : 종자에는 saponin이 함유되어 있으며, 어린 싹에는 theanine이 함유되어 있다. ②약효 : 喘息咳嗽(천식해수-호습이 促迫(촉박)한 咳嗽(해수))를 치료한다. 祛痰(거담)의 효능이 있다.

- 녹차 및 녹차의 추출물 중 “차 카테킨”은 식품첨가물로 허용
- 유사원료인 녹차추출물이 건강기능식품 기능성원료(고시형, 개별인정형)으로 등재되어 있음.

㉯ 사용현황

<국내>

- 국내에서 녹차씨는 착유하여 그 기름을 직접 섭취하거나 화장품의 원료로 사용함
- 녹차를 활용한 건강기능식품 원료에 부재료로 첨가 한 기록이 있음

- 최근 녹차씨를 설탕과 함께 발효하여 녹차씨 효소나 녹차씨 식초로 활용하여 1일 1컵씩 2회정도 섭취
- 물티슈, 주방세제 등 일상제품에 녹차씨 오일이 첨가되어 있음
- 녹차씨를 활용한 식품

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
	메타그린	아모레퍼시픽	성인 기준 1일 3정	녹차추출물 : 항산화, 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음 비타민 C : 유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요	- 임신부, 수유부, 질병치료중,알레르기,특이체질인 경우 의사와 상담 - 카페인 함유(초조, 불면 유발가능)	식품 (건강기능식품)	2013년 기준 270억	
	녹차씨 발효액	다오티푸드영농조합법인	1회 1컵 1일 2회	녹차씨, 설탕	- 공복에 섭취	일반식품		
	녹차씨 식초	다오티푸드영농조합법인	1회 1컵 1일 2회	녹차씨, 설탕	- 공복에 섭취	일반식품		

- 녹차씨를 활용한 비식품

제품사진	제품명	제조사	구분	제조(판매)국	성분
	벨라지오 녹차	모나리자	물티슈	중국(한국)	티트리오일 녹차씨오일
	순샘 허브녹차	애경	주방세제	한국(한국)	보성 녹차씨 사포닌 성분 함유
	그린티씨드 트리트먼트 오일	아모레퍼시픽	화장품 (오일)	아모레퍼시픽	녹차씨오일 100%

	그린티 라인	이니스프리	세럼, 크림, 오일	한국(한국)	녹차씨 오일성분 30%
	그린티	시크릿키	화장품	한국(한국)	녹차수, 녹차추출물, 녹차씨 오일

<국외>

- 화장품의 원료나 식용 오일(샐러드 드레싱)의 형태로 시판 중임
- 국외 제품

상품	상품명	용도	제조(판매)국	성분
	ARETTE GREEN TEA SEED OIL INFUSED WITH ROSEMARY & SENCHA GREEN TEA	식품	미국(미국)	녹차씨오일 로즈마리
	Mariedean Green Tea Seed Oil Ultra-Nourishing Moisturizer	화장품	미국(미국)	정제수 쿠푸아수버터 녹차씨오일
	엘리자베스 아덴 그린티	향수, 바디로션, 스크럽 등	미국(미국)	녹차씨오일

③ 특허 및 지식재산권 검색 결과 (2015년 7월 기준)

번호	특허명	등록번호 /공개번호	출원인
1	녹차씨 껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 또는 항염 활성을 갖는 화장료 조성물 (Cosmetic composition comprising green tea seed coater extract having anti-oxidative or anti-inflammatory activity)	1007554270000	인제대학교 산학협력단

2	탈지된 녹차씨추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 또는 항암 조성물 (Composition comprising defatted green tea seed extract for preventing and treating inflammatory or cancer disease)	1011524790000	인제대학교 산학협력단
3	녹차씨추출물을 이용한 탈취제 및 그 제조방법 (DEODORIZER USING GREEN TEA SEED AND METHOD FOR PREPARATION THEREOF)	10100747640000	최하영
4	항산화 및 항염 활성을 갖는 녹차씨 껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물 (Composition comprising an extract of Green tea seed coat showing anti-oxidative and anti-inflammatory activity)	1007713990000	인제대학교 산학협력단
5	녹차씨추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 (A composition comprising an extract of green tea seed for treating and preventing thrombus involved diseases)	1008907750000	인제대학교 산학협력단
6	피부 탄력 증진 효과를 갖는 녹차씨 오일을 함유하는 화장료 조성물 (Cosmetic Composition comprising green tea seed oil forenhancing skin elasticity.)	1007554270000	주식회사 생그린 / 주식회사 바이오랜드
7	발아 녹차씨 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물 (Skin external composition comprising germinated Camellia sinensis seed extract)	1020130115482	㈜아모레 퍼시픽
8	콜레스테롤 저하 또는 항산화 활성을 갖는 녹차씨유를 포함하는 조성물 (Composition comprising the seed oil of Green Teahaving Cholesterol-lowering or antioxidant activity)	1006400940000	학교법인 인제학원
9	녹차씨에서 유래한 알레르기성 천식 완화용 조성물 (The composition for allergic asthma mitigation extracted from tea seed)	1020140092947	한림대학교 산학협력단 / (주)에이지아이

(나) 안전성자료 검색 및 요약

① 안전성 평가 의사결정도

㉮ 식약처 안전성 평가 의사결정도 ‘나’ 항에 해당

㉯ 섭취근거자료, 안전성정보자료, 섭취량평가자료를 제출해야 함

㉰ 독성시험은 불필요하나 ‘명인신광수차’에서 단회투여독성 및 유전독성실험을 실시

② 독성자료 검색

㉮ 녹차씨추출물에 대한 직접적 독성자료는 전무하나, 녹차씨 유래 사포닌에 대한 독성자료 1건 및 유사 시료인 녹차 및 녹차 카테킨에 대한 자료 2건이 검색 됨.

㉯ PubMed, Toxline, Drug Digest. The Longwood herbal Task Force, Drug Digest 등의 안전성 관련 자료 검색결과 녹차씨에 대한 심한 독성이나 부작용은 없음.

㉰ 안전성 자료 DB 검색 결과(2015년 8월)

출 처	검 색 결 과
The Longwood herbal Task Force	- GRAS로 인정되고 급성독성은 없음
PDR of Herbal Medicine	- 공복에 다량 복용시 mild 한 속쓰림이 발생 할 수 있음 - 녹차씨유래 사포닌의 NOAEL 150mg/kg
Drug Digest	- 칼슘 길항제와 병용 투여시 칼슘길항제의 생체이용율을 높일 수 있으므로 주의 요망

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
NAPRALERT	green tea seed camellia sinensis seed	x	x	
Agency for Healthcare Research and Quality				
Toxline				
US FDA poisonous plant database				
Essential Medicines and Health Products Information Portal				
Translation of the German Commission				
AHPA's Botanical Safety Handbook				
Natural Medicine Comprehensive Database				
Practical Guide to Natural Medicines				
Pubmed	green tea seed or camellia sinensis seed and safety or toxicity or adverse	x	x	
한국학술문헌정보센터(KISS)	녹차씨 녹차씨 and 독성 or 안전성 camellia sinensis, green tea seed	x	x	

㉱ 독성시험 결과 요약

시험종류		종 및 계통	투여 방법	투여 기간	시험물질, 용량	시험결과	비고
단회 투여	설치류	SD Rat (F 12)	경구	1회	· 녹차씨추출물 (본시료) · 300mg/kg B.W 2000mg/kg B.W.	· 1회 투여 후 14일간 관찰 · 사망동물 없음 · 2,000mg/kg B.W. 투여군 중 일부개체에서 연변 및 하복부 오염 · 300mg/kg B.W.에서 2개체, 2,000 mg/kg B.W.에서 1개체에서 체중 감소, 이외 모든 투여군에서 정상 체중 증가	- GLP급 - 요약서 - 보고서

						· 2000 mg/kg body weight < LD50 < 5000 mg/kg body weight	
유전독성	복귀돌연변이 (Ames test)	· *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98 TA1537 · *E.coli* WP2 *uvrA*		1회	· 녹차씨추출물 (본시료) · 투여량 5000, 2500, 1250, 625 및 313.5 μg/plate 농도로 음성 및 양성 대조군	· 대사활성화법 미적용 (S9-) 및 (S9+) 적용 모두 음성 대조군과 비교하여 각 농도별 시험물질 처리군에서의 집락 수는 증가 양상을 나타내지 않았음. · 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 사료됨	- GLP급 - 요약서 - 중간 보고서
	염색체이상시험	CHL cells		1회	· 녹차씨추출물 (본시료) · 투여량 최고농도 직접법 : 120 μg/mL 대사활성화법 : 100 μg/mL 이하 5단계 농도, 음성 및 양성 대조 시험	· 시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상을 가진 중기상의 출현 빈도는 음성대조군에 비해 시험물질 처리군의 농도에 따라 통계학적인 유의성이 없음. · CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료됨	- GLP급 - 요약서 - 중간 보고서
	소핵시험	ICR 마우스 골수세포 5마리		1회	· 녹차씨추출물(본시료) · 투여량 0, 125, 250, 500mg/kg B.W. · 양성대조물질 70mg/kg B.W. 단회 복강투여	· 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율은 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않음. · 개체 당 2000개의 다염성 적혈구 중 나타나는 소핵을 가진 다염성 적혈구의 수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군 에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않음. · 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료됨	- GLP급 - 요약서 - 중간 보고서

(다) 기능성 자료

① 기능성 자료 검색 결과

- 본 과제를 통한 논문을 포함하여 아래와 같은 신청자료 및 참고자료가 검색됨.

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험(건)
신청원료	5	2	2	1
참고자료	12	1	1	10

- 기능성 제출자료의 design을 시놉시스화 하고, abstract을 번역하여 별도 제출

No	시험물질 섭취량/섭취기간	문헌명	자료요건	연구유형	대상	섭취경로	바이오마커
1	신청원료 (녹차씨추출물)	Biotechnology and Bioprocess Engineering	○	In vitro	3T3-L1 preadipocytes	-	cell viability, 3T3-L1 differentiation(분화) 및 lipid accumulation
2	신청원료 (녹차씨추출물)	Korean Society of Food Science and Technology	○	In vitro	3T3-L1 preadipocytes	-	cell viability, 세포내 TG함량 및 Free glycerol
3	신청원료 (녹차씨추출물)	Biotechnology and Bioprocess Engineering	○	in vivo	8주령/ICR /F 고지방식이 비만유도모델	경구	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)
4	신청원료 (녹차씨추출물)	Biotechnology and Bioprocess Engineering	○	in vivo	8주령/ICR /F 고탄수화물 식이 비만유도 모델	경구	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)
5	신청원료 (녹차씨추출물)	인체적용시험	○	Clinical Trial	만 19-65세 성인남녀 / BMI 25~30kg/㎡	경구	체지방 체중, BMI, WHR, 혈중지질 및 에디포넥틴(Adiponectin)
6	유사원료 (녹차씨오일)	Pflugers Arch - Eur J Physiol		In vitro	3T3-L1 preadipocytes	-	adipocyte 분화, 세포내 TG 농도, PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA
7	유사원료 (녹차씨오일)	Pflugers Arch - Eur J Physiol		in vivo	C57BL/6J	경구	TC, LDL, HDL, TG, glucose, 알라닌 전이효소
8	녹차	J Med Food.		Clinical Trial	비만여성	경구	체지방, 기초대사, 신체구성성분 (RMR)
9	녹차 (티백)	The journal of Nutrition, Health &Aging		Clinical Trial	60세이상 대사증후군 진단 혹은 의심자	경구	체중, BMI 허리둘레
10	녹차 카테킨	British Journal of Nutrition		Clinical Trial	비만성인	경구	체중, 체지방량
11	녹차 EGCG	Alternative Medicine Review		Clinical Trial	25-65세 비만 및 2형 당뇨 환자	경구	지질 profile, 인슐린저항성 (HOMA-IR), HbA1c
12	녹차 카페인	J Hum Nutr Diet		Clinical Trial	과체중 유방암 생존자	경구	HDL, LDL, HOMA-IR 체중, 체지방량
13	녹차 카테킨	The journal of nutrition		Clinical Trial	과체중 혹은 비만 여성	경구	복부지방, 혈청 TG
14	녹차 EGCG	Clinical nutrition		Clinical Trial	BMI 27kg/m2 이상의 16세에서 60세 사이 여성	경구	체중, 체질량지수, 혈중지질지표 호르몬지표, (인슐린, HOMA-IR, 그렐린)

No	시험물질 섭취량/섭취기간	문헌명	자료요건	연구유형	대상	섭취경로	바이오마커
15	녹차	physiology & behavior		Clinical Trial	BMI 25 이상의 태국 남녀	경구	체중, BMI, 신체 조성, 휴식 에너지 소비, 산화력
16	녹차 EGCG	J Am Coll Nutr.		Clinical Trial	비만남성	경구	식전/후 에너지소비량, 지질산화도
17	녹차 (EGCG, 카페인)	OBESITY RESEARCH		Clinical Trial	과체중 및 중도비만 남녀	경구	체중, 허리둘레, 체지방, 호흡지수, 렙틴

<기능성 자료 시놉시스 일부>

학술지정보		j Hum Nutr Diet					
		Vol	23(6)	게재연도	2010	시작페이지	590
논문제목		Green Tea Improves Metabolic Biomarkers, not Weight or Body Composition: A Pilot Study in Overweight Breast Cancer Survivors					
연구목적		6개월간 매일 디카페인 녹차 섭취가 과체중 유방암 생존자의 체성분, 생체지표, 지질지표에 미치는 영향을 연구한 것이다.					
연구유형		인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계		무작위배정		이중눈가림		플라세보 대조	
대상자특징	대상자선정(제외)기준	- 선정기준 시험시작 12개월 이전 10년 이내에 3기 이내의 초기 유방암 진단을 받은 적이 있는 18-40세의 여성 중 BMI가 25-40사이인 대상자. 유방암 수술 이후 화학적 항암치료를 받아온 자 - 제외기준 최근 12개월이내 흡연력이 없고 현재 비흡연자, 당뇨병 심장병 등 만성질환자, 혈당 혹은 혈중지질 조절제를 복용중인 자, 유방암 치료 외에 다른 암 유병자, 다이어트중이거나 최근 6개월 이내 체중조절 보조제를 복용한 자					
	특징	- 54명의 피험자, 29명이 시험군 25명이 대조군 - 평균연령 57.1세 평균체중 80.2kg, BMI 30kg/m2, WHR 0.8, 화학적 항암치료력 100%, 방사선 항암치료력 56.4% - 시험군의 BMI31.0 대조군의 BMI 28.7					
시험물질		디카페인 녹차					
시험디자인	대조군	placebo	허브티백 (시트러스 베이스)				
		positive					
		negative					
	시험군	녹차 티백 : 550-700mg의 녹차 고형분, 58.91mg/bag의 카테킨, 32.21mg/bag 의 EGCG					
	디자인	- 각 군에 무작위배정된 피험자는 제공된 시험물질 혹은 placebo 티백을 240ml의 끓는물에 3분 이내로 우려내 마신다. - 1일 4회, 혹은 2티백에 500ml의 물로 2회를 섭취해도 된다. - 우려낸 티백은 제공된 백에 담아 시험자가 회수한다.			섭취량	녹차 고형분으로 550-700mg의 티백 1일 4회 섭취	
					섭취기간	6개월	
	식이조절						
바이오마커		키, 체중, BMI, 체지방율, 제지방량, WHR, 기초대사량, TC, TG, LDL, HDL, HOMA-IR					

통계처리	SPSS
시험결과	- 시험군의 시험 전 후 카페인 섭취량이 군간비교시 유의감소 (p=0.03) - 시험군에서 시험 전 후 에너지, 지방, 단백질, 탄수화물 섭취량 유의 감소 - 시험군에서(-1.2kg) 대조군(+0.2kg) 대비 체중이 감소하였으나 유의성은 없었음 - 시험군에서 HDL 콜레스테롤 수치가 유의적으로 증가(p=0.003) - HDL/LDL 비 및 HOMA-IR의 경우, 시험군에서 유의성이 없이 개선
비고	

(라) 과제 진행중 신규 진행된 유사시료에 대한 연구보고서 탐색 : 나린제닌

- 본 원료(녹차씨추출물)의 지표물질 나린제닌의 섭취량 : 국외 전임상 논문에서 섭취량 평가시 5-6weeks wistar rats 25mg/kg/일 BW, 7weeks C57BL6J mice에서 100mg/kg/day으로 임상 용량으로 환산시 각각 나린제닌 243.2mg/day, 486mg/kg/day 에 해당하며, 이는 녹차씨추출물(신청원료)로 환산시 44.2g/day, 88.36mg/kg/day 에 해당.

나. 신청서류 문서화 작업

(첨부12. 개별인정신청서 및 기능성자료 시놉시스)

(개별인정 신청시 제출 자료 체크리스트)

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		☑ 예 ☐ 아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내 · 외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	☑국내 ☐국외		
2.2	개발경위	☑국내 ☐국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	☑국내 ☑국외		
2.4	국내·외 사용 현황	☑국내 ☑국외		
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	☑ 예 ☐ 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	☑ 예 ☐ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	☑ 예 (모두, 일부) ☐ 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	☑ 예 ☐ 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	☑ 예 ☐ 아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	☑ 예 ☐ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	☑ 예 ☐ 아니오 ☐ 기능성분 ☑ 지표성분		
4.3	영양성분정보자료	☑ 예 ☐ 아니오		
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				

5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	☑ 예 ☐ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	☑ 예 ☐ 아니오		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도,구조동정,유효기간 등 정보 추가)	☑ 예 ☐ 아니오 ☑ 시판 표준품 ☐ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	☑ 예 ☐ 아니오 ☐ 공인 시험방법 ☑ 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)	추가함		

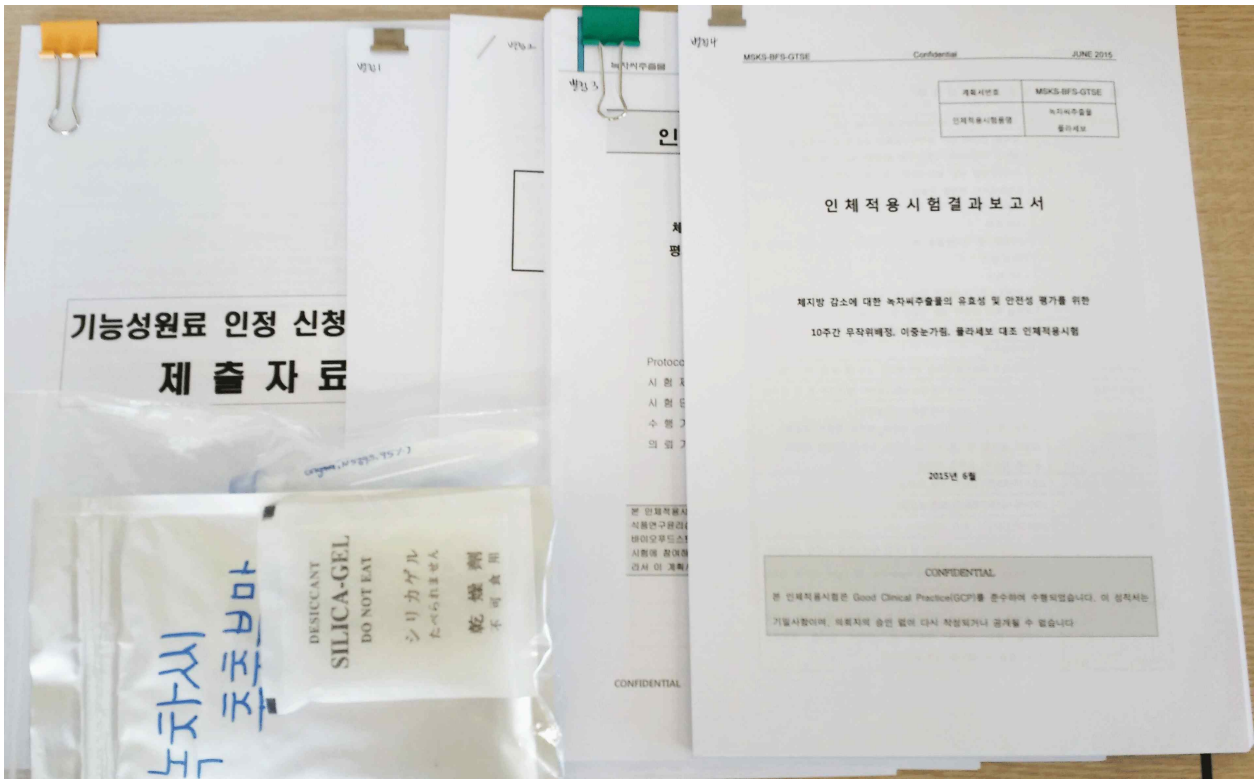
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	☑ 예 ☐ 아니오	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	☑ 예 ☐ 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	☑ 예 ☐ 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	☑ 예 ☐ 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	☑ 예 ☐ 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	☑ 예 ☐ 아니오	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : 나)			
7.1	섭취근거 정보	☑ 예 ☐ 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	☑ 예 ☐ 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보	☑ 예 ☐ 아니오	
7.4	영양평가, 생물학적유용성, 인체적용시험 정보	☑ 예 ☐ 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	☑ 예 ☐ 아니오
		3개월 반복투여독성시험	☐ 예 ☐ 아니오
		유전독성시험	☑ 예 ☐ 아니오
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	☐ 예 ☐ 아니오
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료			
8.1	시험관시험	☑ 신청원료 (논문 2편) * 시험기관 : 전남대학교, 전남식품산업연구센터	
		☑ 유사원료 (논문 1편) : 녹차씨 오일	
8.2	동물시험	☑ 신청원료 (논문 1편) * 시험기관 : 전남대학교	
		☑ 유사원료 (논문 1편) : 녹차씨 오일	
8.3	인체적용시험	☑ 신청원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 : 전북대학교 기능성식품임상시험지원센터	
		☑ 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 9 편)	

9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취량 및 근거	☑ 예 ☐ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	☑ 예 ☐ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	☑ 예 ☐ 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	2. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	☑ 예 ☐ 아니오	
10.2	3. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	☑ 예 ☐ 아니오	

다. 개별인정 신청

- 식약처 전자민원 online 신청 : 2015년 8월 4일자로 신청
- 신청수수료 1,900,000 원
- 제출자료 1부 및 첨부자료, 이를 수록한 CD 1매, 지표물질 표준품, 시제품을 우편 발송 : 2015년 8월 17일

(online 신청내역 및 발송자료 사진)



라. 수정/보완 작업

- 추후 식약처 수정/보완 요청시 이에 따른 자료를 제출키로 함.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발목표의 달성도

1. 목표의 달성도

연구목표	세부내용	달성도	비고
1. 개별인정 전략수립	1.녹차씨 관련 국내외 자료 및 정보수집 2.자료분석 및 현좌표 설정 3.개별인정 전략수립	100%	바이오푸드스토리 전남대학교 전남식품산업연구센터 명인신광수차
2. 표준화	1 원재료 및 원료 표준화 2. 제조공정 표준화 3. 지표성분 설정 및 시험법 검증 4. 기준규격 설정 5. 유통기한 설정	100%	전남식품산업연구센터 명인신광수차
3. 전임상 효능평가	1. 신생혈관형성억제 기전 2. 항비만작용 규명 3. *in vivo* 체중 감소 동물 실험 4. 비만관련 인자 규명 5. signal pathway 작용 기전 분석	100%	전남대학교 전남식품산업연구센터
4. 인체적용 시험 및 임상제품 개발	1. 수행기관 및 연구자 선정 2. 프로토콜 및 CRF개발 3. 자료집/임상제품 개발 4. IRB승인 5. 인체적용 시험 진행 및 모니터링 6. 인체적용 시험 결과확보	100%	바이오푸드스토리 전남식품산업연구센터
5. 개별인정 신청	1. 관련자료 수집 및 분석 2. 신청서류 문서화 작업 3. 개별인정 신청 4. 수정 보완 자료 작성	100%	바이오푸드스토리 명인신광수차

연구팀은 3년간의 연구목표를 성실히 추진하여 100% 달성하였음. 다만 기타 2등급의 기능성 인정은 인체적용시험에서 군간 유의성이 입증되지 않아 식약처 모듬토의를 통해 기타 3등급을 목표로 개별인정을 신청 하였음.

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 재래종 녹차씨 유래 생리활성 물질을 확보하고, *in vivo* 질환모델 동물을 이용한 효능평가로 신속하게 선별하여, 체지방개선(식약처 원료 개별인증)을 위한 건강기능식품을 개발하는 것으로, 단기간에 국내외적으로 기술 우위를 확보 할 수 있음.

- 천연물 추출 기능성분의 표준화기술: 다양한 천연물로부터 추출한 기능성 성분의 표준화 기술을 이용하여, 다른 타겟의 건강 기능식품, 천연물신약, 기타 기능성화장품 소재등의 개발에 활용 가능.

- 순수 재래종으로 순천에 자생하는 지역 특화 농산자원 유래 생리활성 물질을 확보하고, *in vivo* 질환모델 동물을 이용한 효능평가로 신속하게 선별하여, 체지방개선(식약처 원료 개별인증)을 위한 건강기능식품을 개발하는 것으로, 단기간에 국내외적으로 기술 우위를 확보 할 수 있음.

- 순수 재래종으로 순천에 자생하는 지역 특화 농산자원 유래 생리활성 물질의 독성시험 연구를 통해 물질의 안전성에 대한 자료 및 독성시험 연구 기반 기술을 확보할 수 있음.

- 기반기술, 평가기술 외에 실제 상용화단계로 대량공정 최적화 기술을 개발하여, 국내·외의 시장에 접근할 수 있는 제품 표준화기술을 확보함.

- 천연물로부터 기능성 식품소재의 개발은 산업화를 지향하는 연구주제 하에서 1차 원료로부터 고부가가치의 생물소재에 이르는 연구전반 기술을 향후 여타의 연구에 접목시킬 수 있는 기반을 제공하며 도 내외 기업 및 생산자 단체 등에도 기술을 이전하는 파급효과를 기대할 수 있음.

-원료 공급·가공·제품화의 One-Step 시스템화로 지역 농림자원의 안정적 공급시스템의 확립되고 고부가가치농림수산자원 제품화를 위한 농어업경영체와 기업체의 수요-공급 확대로 농민 부가소득 증가, 지역 경제 활성

2. 경제적 측면

- 건강기능식품사업의 특징은 고부가가치, 지식기반산업으로서 미래의 유망산업이며, 산업에서 창출되는 경제적 부가가치나 기술파급효과 등 산업적 측면에 미치는 영향이 매우 큼.

- 전후방산업 측면에서 보면, 본 프로젝트는 특화 농림자원의 안정적인 수급이 필요하므로 계약재배를 통한 농가의 안정적이고 부가가치를 높이는 1차 산업 구조를 만드는 효과가 있음.

- 특히, 향후 천연물을 활용한 생물제제 산업이 성장에 많은 파급효과가 있을 것으로 기대되며, 산업 및 경제적인 면에서 보건의료산업 등 전반에 미치는 파급효과가 매우 크다고 할 수 있음.

- 지역특화자원 전문생산단지화, 가공시설, 생산시설 현대화 지원 등으로 농산업체 경쟁력 향상과 그로인한 지역특화자원 고부가가치화 기술개발 전문인력 양성 및 산업체 고용창출

- 지역 농가의 고소득 부가가치 창출, 기업체 매출액 증대 효과

3. 정책적 특성
- 녹차산업/특히 재래종 녹차의 우수성 대한 정책적 추진 될 수 있는 근거를 마련함
- 재래종의 녹차씨앗의 주요성분의 함량이 일본산을 훨씬 능가하는 점을 규명함
- 사포닌의 대량 추출방법을 확보하므로써 기능성식품, 화장품, 팩, 음료등의 다양한 산업으로의 발전을 뒷받침할 수 있음

4. 지역에 대한 기여도
- 호남의 많은 지역에서 녹차를 생산하고 있으므로써 녹차씨앗의 공동 수매 및 관리가 가능함.
- 현재까지 녹차 씨앗은 버려지고 있는 실정이어서 이를 부가가치화 함으로써 지역의 경제 살리기에 좋은 테마가 될 수 있음.
- 녹차 및 녹차 씨앗의 응용은 많이 생산되는 호남에서 그 효용성과 효과를 인지하여 사업화할 필요가 있음
- 6차산업 및 경관 농업, 찾아오는 관광지로써의 조성이 가능할 것임

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 기술적 성과

1. 지적재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격), **신품종, 프로그램개발** 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로) 기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지적 재산권 1	녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물	PCT	전남대 산학 협력단	2013. 08.09	10-2013-0094999				
2	녹차씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 치료용 조성물	한국	전남대 산학 협력단	2014. 09.22	10-2014-0125524				
3	녹차 씨앗 사포닌을 유효성분으로 하는 항균용 조성물 및 그 용도	한국	전남대 산학 협력단	2015. 07.23	10-2015-0104634				
4	신생혈관형성 억제제 및 이를 이용한 천연산물 항비만제	미국	전남대 산학 협력단	2014. 04.30	14/266482				
5	Anti-Angiogenic Agents and Anti-Obesity Substances Applied with Anti-Angiogenesis from Natural Products	미국				전남대 산학 협력단	2014. 06.17	US8,753,694 B2	
6	녹차씨앗으로부터 사포닌의 추출 방법	한국				전남대 산학 협력단	2013. 07.10	10-1289077	
7	녹차씨앗과피추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물	한국				전남대 산학 협력단	2015. 02.04	10-1492092	

2. 논 문

논문(국내외 전문학술지) 게재3							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	HPLC fractionation and pharmacological assessment of green tea seed saponins for antimicrobial, anti-angiogenic, and hemolytic activities	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2016	Jong Deog KIM	21(1)	America	Springer	SCI (게제확정)
2	Anti-hyperlipidemic and Fat Pad Lowering Effect of Standardized Tea Seed Cake Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015	Jong Deog KIM	20(1)	America	Springer	SCI
3	Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway.	IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY 2014	Jong Deog KIM	36(3)	America	INFORMA HEALTHCARE	SCI
4	Theasaponin E1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects	BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY 2014	Jong Deog KIM	78(2)	Japan	JAPAN SOC BIOSCI BIOTECH N AGROCHEM	SCI
5	Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats	JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS 2014	Jong Deog KIM	7(1)	America	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI
6	Fermented Pu-erh Tea Increases In Vitro Anticancer Activities in HT-29 Cells and Has Antiangiogenetic Effects on HUVECs.	JOURNAL OF ENVIRONMENTAL PATHOLOGY TOXICOLOGY AND ONCOLOGY	Jong Deog KIM	32(4)	America	Begell House, Inc	SCI
7	Anti-angiogenesis and Anti-adipogenesis Effects of Anthrisci radix Extract	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2013	Jong Deog KIM	18(1)	America	Springer	SCI
8	Psoraleae semen extract inhibits angiogenesis and	Biotechnology and Bioprocess Engineering	Jong Deog	18(5)	America	Springer	SCI

	adipogenesis	2013	KIM				
9	Motor Neuron Disease and Stem Cell Approach for Its Remediation	KSBB Journal 2013	Jong Deog KIM	28(5)	한국	한국생물공학회	비 SCI
10	녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과	한국 식품과학회지 2015	위지향	47(4)	한국	한국 식품 과학회	비 SCI

3. 학술회의

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.-본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
국제 1	ECO2013 Tea-seed saponin E1 as an effective inbredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis	Jong deog KIM	20130512	Liverpool	UK
2	ECO2014 European Congress on Obesity Bioactive components of Camellia sinensis fruit peel ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats	Jong deog KIM	20140528	Sofia	Bulgaria
3	ECO2014 Molecular mechanisms underlying the anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of saponin from Camellia sinensis in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet	Jong deog KIM	20140528	Sofia	Bulgaria
4	ECO2014 Tea saponin inhibits adipogenesis and induces lipolysis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes	Jong deog KIM	20140528	Sofia	Bulgaria
5	IBS2012, International Biotechnology Society Anti-Obesity Mechanism of Korean Natural Products Based on Anti-Angiogenesis	Jong deog KIM	20120916	Daegu	Korea
6	Asian Conference on Refrigeration and Air conditioning Thermophysical Properties in Freezing Process to Determine Optimal Freezing Conditions for preservation of Sporothalli of the Genus Porphyra seriata, Undaria pinnatifida, Sargassum fulvellum	Jong deog KIM	20140520	Jezu	Korea
국내 1	한국생물공학회 춘계학술발표회 Molecular Mechanism of Angiogenesis and Obesity with Camellia sinensis Fruit Peel Extract	Jong deog KIM	20150415	여수	대한민국
2	한국생물공학회 춘계학술발표회 Novel Anti-Angiogenic and Anti-Cell Ahesion Materials from Halophilic Enterobacteria of the Trachurus japonicus based on ORP system value	”	20150415	여수	”
3	한국생물공학회 춘계학술발표회 Mechanism of Immunomodulating Effect of Tea Seed Saponin on T-cell	”	20150415	여수	”
4	한국생물공학회 춘계학술발표회 High-fat and High-carbohydrate Lowering Effect in Mice with Tea Seed Cake Extract	”	20150415	여수	”
5	한국생물공학회 춘계학술발표회	”	20150415	여수	”

	Anti-obesity Mechanism of Tea Seed Saponin with Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis				
6	한국생물공학회 추계학술발표회 Tea-Seed Saponin as an Ameliorates Obesity Ingredient	”	20141005	창원	”
7	한국생물공학회 춘계학술발표회 Anti-hyperlipidemic and Fat pad Lowering Effect of Standardized Green tea (Camellia sinensis L.) Seed Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet	”	20140409	경주	”
8	한국생물공학회 춘계학술발표회 Immunomodulatory Effect of Tea Saponin in Immune T-cells and T-lymphoma Cells via Regulation of Th1, Th2 Immune Response and MAPK/ERC Signaling Pathway	”	20140409	경주	”
9	한국생물공학회 춘계학술발표회 Molecular Study of Tea Saponin against Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes and Adiposity in Rat	”	20140409	경주	”
10	한국생물공학회 춘계학술발표회 Tea Saponin Induces Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells Via TRAIL Dependent Apoptotic Pathway	”	20140409	경주	”
11	한국생물공학회 춘계학술발표회 Computational Analysis of AKT Family Proteins	”	20130410	광주	”
12	한국생물공학회 춘계학술발표회 Tea-Seed Saponin E1 as an Effective Ingredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis	”	20130410	광주	”
13	한국생물공학회 춘계학술발표회 Screening of Food Secondary Metabolites and Investigation of Biological Activity	”	20131016	부산	”
14	한국생물공학회 추계학술발표회 Inhibition of NF-κB by Tea Saponin induces AGS Stomach Cancer Cells Apoptosis through Modulation of mTOR and ERK Signaling Pathway	”	20131016	부산	”
15	한국생물공학회 추계학술발표회 Anti-angiogenesis, Anti-microbial and Hemolytic Properties of Bioactive Tea Seed Saponins	”	20131016	부산	”
16	한국생물공학회 추계학술발표회 Anti-Hyperlipidemic and Fat-Pad Lowering Effect of Camellia sinensis Fruit Peel Extract in High-Fat Diet Fed Rats	”	20131016	부산	”
17	한국생물공학회 추계학술발표회 Cytokine Gene Expression and Erk2/ p38 MAPK Signaling in T-Lymphocytes and T-Lymphoma in Response to Adjuvanticity Effect of TheaSaponin E1	”	20131016	부산	”
18	한국생물공학회 추계학술발표회 Chemo Preventive Effect of Green Tea Fruit Peel Extract: Screening of Bioactive Compounds Based on Angiogenesis Assay	”	20131016	부산	”
19	한국생물공학회 추계학술발표회 Composition for Anti-Angiogenesis containing Tea-Saponin E 1 as an Effective Ingredient	”	20120919	대구	”

제 2 절 성과활용 계획

1. 지적재산권에 성과 활용

참여업체에 혜택이 돌아가야 할 것으로 생각하며, 제조 방법, 유효성분의 응용 등, 녹차에 관련되는 기술을 전수하여, 참여업체로 하여금 필요한 기술들을 협동조합형태 또는 기술을 전수하는 방법을 모색할 것이다.

농가에서 필요한 통상의 기술들은 재배 단체의 교육, 지도 등을 통하여 실시할 수 있으며, 특히 농업기술센터의 교육을 통하여 이전할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 홍보마케팅의 활용

홍보는 지자체의 도움을 얻어 실시할 수 있다. 지역의 특산품의 인증, 지자체가 주최하는 중소기업 홍보, 홈페이지에 제품의 효능, 필요한 자료의 열람이 가능토록 조치하며, 관광객을 통한 홍보, 외국인을 통한 홍보도 적극적으로 펼 수 있다.

3. 상품개발에 대한 활용

- 항비만 제제개발
- 신생혈관형성억제제
- 항암제제
- 항균제제
- 고지혈증제제
- 항산화제제

제 3 절 기대효과

1. 매출

소비자에게 친근하지만 흔하지 않은 소재이며 버려지는 녹차열매박을 이용하여 개발된 제품을 상품화하여 지속적이고 다양한 홍보마케팅을 활용하여 참여업체의 새로운 소득원이 되어 지역 내 고용창출에도 영향을 줄 것이며 나아가 사양산업인 녹차산업에도 지대한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

'차 산업 발전 및 차 문화 진흥에 관한 법률안'이 지난해 12월29일 국회 본회의를 통과함에 따라 차 산업 발전과 관련된 법적 근거를 마련되어 참여업체의 상품에 한층 더 긍정적인 효과를 기대해 볼 수 있다.

2. 홍보마케팅

가. 지속적인 국내외 전시회, 박람회에 홍보부스를 마련하여 참가한다.
(ex. 2015 국제뷰티엑스포코리아, 2015 팜엑스포 코리아, 2015 월드식품박람회 등)
나. 파워블로거 이용한 온라인 SNS 홍보마케팅을 활성화 한다.
다. 참여업체의 상품 판매를 원하는 외부기업과 함께 홍보마케팅을 진행한다.
라. 참여업체의 기존 홍보판매망을 이용한다.
마. 원재료(녹차열매)에서 파생되어 상품화되어 판매중인 녹차열매오일과 함께 홍보 판매한다.
바. 해외 수출 전문가의 컨설팅을 통하여 일본, 중국, 유럽 등으로 수출을 진행한다.

3. 상품개발

가. 개별인정에 의할 경우
(1) 원료의 수급
원료는 참여업체 명인신광수차에서 생산되는 녹차씨앗을 수확을 우선으로 하고 공급량이 부족할 경우 전라도권역 내에서 유기농으로 생산되는 녹차씨앗을 수매하여 냉동시설에 저장하여 사용하고, 해마다 생산되는 씨앗을 바로 착유한 박을 빠른 시일 내에 전남식품산업연구원으로 보내어 추출을 의뢰하여 진행한다.

(2) 유용성분의 추출
(가) 전남식품산업연구원에서 참여업체에서 전달 받은 대량의 원료를 파쇄한 후 90℃에서 추출하고, 농축, 건조한다.
(나) 건조된 원료로부터 지표물질을 함량을 확인한다.
(다) 참여업체에서 요구하는 제형(정제, 캡슐 등)으로 생산한다.

(3) 제품화
(가) 참여업체는 제품의 특성을 고려하여 용기와 내포장재를 준비한다.
(나) 제품의 용기와 내포장재의 특성에 맞게 외포장재 디자인을 개발한다.
(다) 포장재(병, 타브렛)에 맞게 분배하고 포장한다.

나. 독자적인 상품화
(1) 원료의 수급
식약청 건강기능식품 기능성 원료을 사용하며, 원료는 농번기를 지난 시점에 명인신광수차의 녹차 잎을 수확하여 사용한다.

(2) 유용성분의 추출

(가) 수확한 녹차 잎을 전남대학교에서 식약청 건강기능식품 기능성 원료 규격에 따라 추출한다.
(나) 녹차씨앗도 식약청 건강기능식품 기능성 원료 규격에 추출한다.

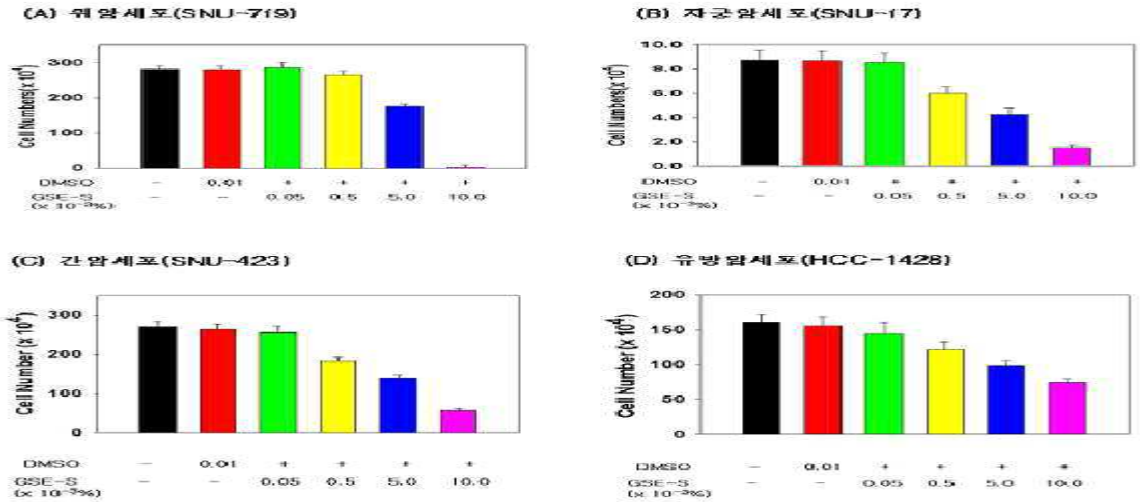
(3) 제품화
(가) 녹차의 추출물을 건조하여 분말화 하고, 일정량의 사포닌을 추가로 첨가한다.
(나) 필요한 형태로 제형화 한다.
(다) 상기와 동일하게 포장하여 제품화한다.

4. 추가연구 및 타 연구에 대한 활용 계획

가. 신생혈관형성억제제(특허 10-1132739호)
혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 생성되는 일련의 과정을 일컫는 용어로서, 태아의 발생, 여성의 월경, 상처 치유과정 등의 정상적인 상황, 및 암세포 및 비만세포의 성장과 류머티즘 관절염, 당뇨성 실명증 등의 여러질병에서도 필수적으로 요구되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이는 정상적인 조건하에서는 거의 일어나지 않는 매우 엄격히 조절되는 현상이다. 즉, 정상적인 상태에서 생체는 혈관신생을 유도하는 인자들과 억제하는 인자들이 평형을 이루고 있으나, 질환이 유발되는 상황에서는 혈관성장을 촉진하는 인자들이 증가하거나, 억제하는 인자가 제대로 작용하지 못하여 혈관신생이 자율적으로 조절되지 못하고 계속 성장함으로써 질환으로 발전한다. 혈관신생의 형성은 현재까지 20가지 이상의 혈관형성 촉진인자에 의해 촉진되는 것으로 알려졌으며, 그 중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포에서 분비되며, 동시에 가장 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다. 특히, 암 형성에 중요한 역할을 하는 혈관신생은 암 조직에 산소와 영양분을 빠른 시간 내에 공급함으로써 암조직의 성장을 직접적으로 도와준다. 따라서 신생혈관의 형성을 억제함으로써 어떠한 조직에 새로운 혈관의 형성을 억제하면 암 조직이 성장하는 것을 막을 수 있다. 녹차 씨앗 추출물로부터 분리 정제한 티—사포닌 E 1(tea—saponin E 1)의 신생혈관 형성 억제 기전과 효과를 확인하고, 상기 효과에 의한 암세포 증식 억제 효과를 암세포주 뿐 아니라 생체 내에서도 확인하고, 세포독성 역시 거의 없음을 확인함으로써, 티—사포닌 E 1을 신생혈관형성 억제 및 항암용 조성물의 유효성분으로 유용하게 상용할 수 있으며, 더욱 깊게 연구함으로써 그 쓰임새는 더 늘어날 것이다.

나. 항암 분야 (특허 10-1132739호)
위암(SNU-719), 간암(SNU-423), 유방암(HCC-1428) 및 자궁암(SNU-1005) 암세포를 6-7일 배양 후 배지를 제거하고세포를 플라스크에서 분리하고 0.4% 트리판블루 용액을 동량 처리하여 즉시 헤모사이토메터(hematocytometer)를 이용하여 살아있는 세포의 수를 측정하였을 때 그

결과, 위암, 자궁암, 간암 및 유방암 세포는 녹차씨앗의 농도가 $5x10^{-5}$%, $5x10^{-4}$%, $5x10^{-3}$%, $1x10^{-2}$%로 증가함에 따라 암세포의 성장이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 특히 위암 및 자궁암세포에 대하여 억제작용이 크게 나타났다. 그리고, in vivo 실험에서도 현저한 암괴의 축소가 일어남을 볼 수 있다.



암세포	투여전/표면적(mm²)	투여후/표면적(mm²)
위암(SNU-719)	97.5	56.0
간암(SNU-423)	127.2	103.6
자궁암(SNU-1005)	200.2	70.7
유방암(HCC-1428)	156.6	55.1

다. 항균 분야(특허출원번호 : 10-2013-0114296)

녹차 씨앗 총 사포닌 및 그의 분획들이 항균활성, 특히 충치유발균인 Streptococcus mutans 및 주요 식중독균인 살모넬라 균에 대한 항균활성을 갖는지 확인하기 위해 항균활성 분석을 수행하였을 때, 사포닌 분획들의 항균 특성의 스크리닝은 *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *S.*

typhimurium, S. enteritidis, S. gallinarum, S. choleraesuis, S. pullorum 및 *S. dublin*에 모두에 대하여 뛰어난 항균활성이 있음이 확인되었다.

	총사포닌		분획1		분획2		분획3		분획4		분획5		분획6		앰피실린	
	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC
S. mutans	11	0.45	11	0.6	11	0.45	10	0.6	10	0.6	10	0.4	10	0.45	32	0.0025
E. coli	13	0.45	11.5	0.5	12.25	0.45	13	0.6	12.5	0.75	11	0.45	11	0.45	29.3	0.005
S. typhimurium	10	0.45	10	0.5	10	0.45	10.5	0.6	10.5	0.75	10.5	0.45	10.5	0.45	30.9	0.005
S. enteritidis	9.5	0.6	10	0.7	9	0.5	9	0.6	10	0.75	9	0.45	9	0.45	23.05	0.005
S. gallinarum	11	0.45	11	0.5	11	0.5	9	0.6	11	0.75	10	0.45	11	0.45	33	0.01
S. choleraesuis	12.75	0.45	10.5	0.5	11.5	0.45	11.5	0.6	10	0.75	10.5	0.45	9	0.45	30	0.005
S. pullorum	11	0.45	12	0.5	10	0.45	10	0.6	11.5	0.75	11.75	0.45	12.25	0.45	28	0.005
S. dublin	10	0.45	11	0.5	11	0.6	11	0.6	10	0.75	12.75	0.45	13	0.45	33	0.005

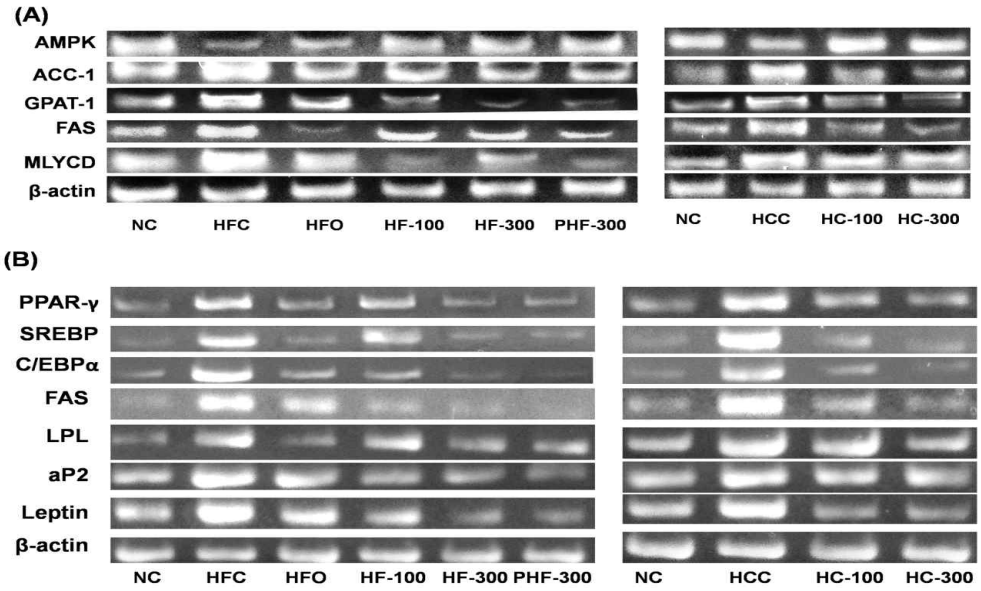
*Z=억제영역의 반경(mm); *MIC=최소억제농도(mg/ml)

녹차 씨앗 총 사포닌 및 그의 분획들은 종래의 항균제에 의한 항균효과가 떨어지는 것으로 알려진 *S. gallinarum* 및 *S. choleraesuis*와 같은 난치성 살모넬라 균에 대한 항균활성이 뛰어난 것으로 확인되었는데, 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 녹차 씨앗 총 사포닌 및 그의 분획물들이 살모넬라 균에 의해 발생하는 질병, 특히 가금류나 가축에서 빈번히 발생하는 설사병과 같은 질병의 치료 및 예방에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

라. 고지혈증 분야(특허출원번호 : 10-2014-0125524)

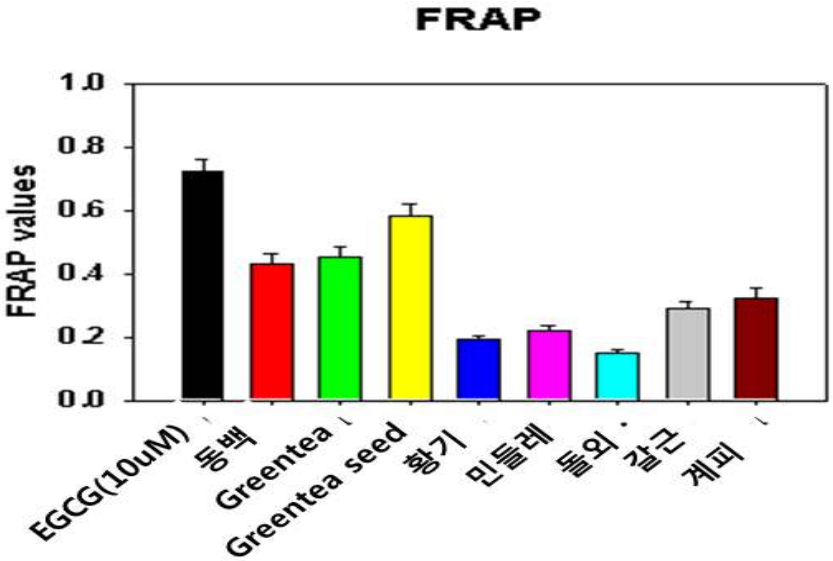
지질과 에너지 대사 경로 바이오마커로 GTE의 효과를 평가하기 위해 마우스의 장간막 지방과 간 조직으로부터 RNA를 분리하고 반-정량 RT-PCR 분석을 수행하였다.

간 조직에서 ACC-1, GPAT-1, FAS 및 MLYCD mRNAs의 발현 수준은 각각 HFC와 HCC 그룹을 비교하여 GTE 처리 그룹에서 감소하였고 장간막 지방 조직에서 지방생성과 지방세포 형성 경로와 관련한 전사 인자(PPARγ, C/EBPα, 및 SREBP)의 mRNA 발현 수준은 HFC 및 HCC 그룹에서 관찰된 것보다 GTE 그룹에서 하향 조절되었으며 장간막 WAT의 타겟 유전자 지방단백리파제(LPL), 지방세포 단백질 2(aP2), 지방생성의 렙틴 및 지방세포 형성 전사인자 또한 감소하였다. 녹차씨앗으로부터 추출한 추출물을 고지방식이 또는 고탄수화물 식이 실험동물을 대상으로 투여하여 중성지방 또는 콜레스테롤 함량감소, 혈관형성 억제 및 지방세포 형성 전사인자의 발현 감소 등 지방형성 억제효과로 인해 고지혈증의 예방 및 치료를 기대할 수 있다.



마. 항산화 분야(특허번호 : 10-1492029호)

항산화력은 2,4,6-트리[2-피리딜]-s-트리아진(TPTZ)(Fluka, Swisszland), 300mM 아세테이트 버퍼(pH 3.6), 40mM HCl, 20 mM 염화철을 사용하여 FRAP(ferric reducing ability assay of plasma)법으로 측정하였으며, 1unit은 mM Fe(II)/L 으로 나타낸 값이다. 다른 식물들과 더불어 항산화력을 측정한 결과, 녹차씨앗은 다른 식물들에 비해 항산화력이 뛰어났으며 녹차보다도 역시 우수한 것으로 나타났다.



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 신생혈관형성억제제를 이용한 비만억제 및 항암제

1. 비만과 지방조직의 혈관신생(Thromb Haemost. 2013 Oct;110(4):661-8)[55]

지방조직은 다세포를 갖는 생물중에서 가장 유연성있는 조직이며, 끊임없이 체중의 증가와 감소에 중요한 역할을 한다. 지방조직의 확장은 혈관신생의 형성을 동반하고, 체중의 감소는 혈관의 퇴화와 관련되어 있다. 따라서 지방조직은 이러한 조직들 사이에서 아주 높은 신생혈관의 잠재력을 가지고 있다. 혈관의 변화는 혈관과 지방세포와의 상호작용에 의하여 일어나면서 신생혈관의 인자들을 동반한다. 성장인자는 신생혈관의 형성및 퇴화에 관련되고 비만에도 직접적으로 관련되어 있다. 지방조직의 염증 및 인슐린 저항은 지방조직에서 신생혈관의 형성의 변화에 관련되어 있고, 이 지방조직의 신생혈관형성 및 억제는 대사질환과도 연관되어 있다.

제 2 절 차 사포닌의 항비만효과

일본 구마모또 대학의 오쿠다 등은 “차 사포닌의 항비만효과”라는 연구에서 차 사포닌이 인체의 췌장에서 분비되는 지질분해효소(lipase)의 활성을 억제하여 지방의 소화와 흡수를 저해함으로써 비만을 예방하는 효과가 있는 것으로 보고하였다.

일본 로토 제약회사(Rohto Phamaceutical Co.,Ltd)의 가와구찌 등은 차종자의 사포닌이 독성이 없음을 확인하였고 일본 니혼대학의 츠카모토 등은 차 사포닌이 알콜흡수를 저해하며 흡수한 알콜에 대한 간 보호작용을 한다고 발표하였으며. 일본 교토 약대의 모리가와 등은 차종자 사포닌이 술에 의해 손상된 위점막을 보호하는 효과가 있음을 보고하였다.

제 3 절 녹차를 소재로 한 연구

1. 녹차를 원료로 한 상품개발

녹차 추출물과 알파카시돌 혼합물의 뼈에 대한 효과 ※ 원문 번역에 오역이 있을 수 있음.

TITLE	Green tea extracts plus vitamin D may boost bone health
Published	2010-11-02
Source of news	The Journal of Nutritional Biochemistry
URL	http://www.nutraingredients-usa.com/Health-condition-categories/Bone-joint-health/Green-tea-extracts-plus-vitamin-D-may-boost-bone-health

출처: The Journal of Nutritional Biochemistry

원문) Combining green tea polyphenols and a form of vitamin D called alfacalcidol may boost bone structure and strength, according to a new study in mice.
The new research in mice suggests that supplementation with either green tea polyphenols or alfacalcidol (1-alpha-OH-vitamin D3) may reverse damage to bones caused by lipopolysaccharide induced chronic inflammation, while combining the ingredients may sustain bone micro-architecture and strength, according to new findings published in The Journal of Nutritional Biochemistry.

(해석) 녹차 폴리페놀과 알파카시돌로 알려진 비타민D 성분의 요소 결합물이 뼈 구조와 내구성을 증진시킨다는 연구결과가 나왔다.
The Journal of Nutritional Biochemistry에 게재된 새로운 연구 결과에 의하면 녹차 폴리페놀과 알파칼시돌 보충제 성분의 조합은 뼈의 미세 구조와 내구성을 지탱하는 반면, 만성적인 염증을 일으키는 지질다당류에 의한 골격 손상은 방지한다고 밝혀졌다.
택사스 공과대학 건강 과학 센터 박사 Chwan-Li Shen 연구원에 따르면, 이번 연구는 미세구조와 종양괴사인자의 표출구조의 조절억제를 통한 뼈의 개선을 보여준다. 더욱이 녹차 폴리페놀과 1-alpha-OH-vitamin D3(알파칼시돌)의 소염제가 골다공증의 위험을 줄여줄 수 있다는 점도 입증하였다.

골격 손실

만성적인 염증은 산화스트레스와 과도한 염증을 촉진시키는 분비물(유전자 종양 괴사인자-TNF와 같은) 을 통해 뼈 손실이 진행되고 뼈의 섬세한 구조가 악화되는 연관성이 있다.
녹차와 알파칼시돌, soy isoflavones과 같은 다양한 노화 방지제와 소염제의 혼합물은 종양괴사인자의 표출을 억제 시키는 역할을 한다. 연구원들은 종양괴사인자요인의 표출을 억제시킴으로써 염증을 방지하는 특정 혼합물은 만성적으로 유발되는 염증의 예방과 치료에 효과가 있을 것이라는 사실에 주목하였다. 특히 녹차(차나무)는 노화방지와 항염증 특성으로 인해 동물과 사람의 건강에 영향을 끼친다.
이전 연구를 통해 녹차는 염증성장질환, 콜라겐 유발 관절염과 지질다당류에 의한 잇몸 염증과 같은 다양한 염증성 질환에 이로운 영향을 가지는 것으로 보고되었다.
새로운 연구는 만성적인 염증을 가진 쥐에 대한 실험을 바탕으로 녹차 폴리페놀과 알피칼시돌이 뼈의 미세구조와 내구성에 미치는 영향을 조사하였다.

조절억제

연구원들은 이번 연구는 만성적인 지질다당류의 자극으로부터 알파칼시돌 투여, 녹차 폴리페놀 보충제와 이 두 개의 조합은 유발된 종양괴사인자의 표출을 상당히 조절억제 시킨다는 사실을 입증한다고 결론 지었다.
만성적인 염증을 가진 뼈의 미세구조 속에서 녹차 폴리페놀과 알파칼시돌의 방어적 영향은 종양괴사인자의 억제에 기여한다.
또한 연구원에 따르면, 연구는 미세구조와 종양괴사인자의 표출구조의 조절억제를 통한 뼈의 개선을 보여주고 더욱이 관절염의 위험을 줄여줌으로써 뼈 건강을 위한 녹차 폴리페놀과 1-alpha-OH-vitamin D3(알파칼시돌)의 항염증 역할에 결정적 증거를 보여준다. 그들은 뼈의 미세 구조에 미치는 방어적인 영향은 동일한 골퇴화 모델에 사용하는 soy isoflavones이나 건자두 폴리페놀과 같은 다른 노화방지제와 일치한다는 사실에 주목하였다.
Shen과 그 동료들을 미래의 연구는 ,만성적인 염증의 재생 과정에서 예방을 위한 녹차 폴리페놀과 알파칼시돌의 역할을 명확히 하기 위한 이론적인 부분에서 더 고심해야 할 것이다.' 라고 덧붙였다.

[출처] www.nutraingredients-usa.com/Research/Green-tea-extracts-plus-vitamin-D-may-boost-bone-health

녹차 추출물 카테킨 함유 식품 연구 자료 ※ 원문 번역에 오역이 있을 수 있음.

Food	Catechins Mg/serving	Catechins, Mg/100g food
Chocolate	23-30	46-61
Beans	70-110	35-55
Apricot	20-50	10-25
Cherry	10-44	5-22
Grape	6-35	3-17.5
Peach	10-28	5-14
Apple	20-86	10-43
Red raspberry	2-48	2-48
Strawberry	2-50	2-50
Blackberry	9-11	9-11
Green tea	20-160	10-80
Black tea	12-100	6-50
Red wine	8-30	8-30
Cider	8	4

2. 녹차를 소재로 한 제품

제품	구분	내용
	제품명	Rainbow USA Green Tea Beauty Soap 4pcs Gift Set
	소비자가	9 USD$
	제조업체	Rainbow USA
	브랜드	
	기타	(100gx4pcs)
		Apply on wet skin, lather and rinse. Make sure to lather up so that the foams can appear for deeper cleansing.

제품	구분	내용
	제품명	GREEN TEA EXTRACT 450 mg (6 Pack) Highest Possible EGCG (70%)
	소비자가	$101.70
	제조업체	Stop Aging Now
	브랜드	
	기타	einated, Made in the USA.

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Extract (100 Capsules)
	소비자가	$13.99
	제조업체	sunrisehealthandwellness
	브랜드	
	기타	catechin and polyphenols (98%)

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Phytosome (G.T.-EX) 60c by Thorne Research
	소비자가	$19.90
	제조업체	HYPO-ALLERGENIC
	브랜드	
	기타	Green Tea Phytosome (G.T.-EX) 60c by Thorne Research contains catechin polyphenols, the most important of which is epigallocatechin gallate (which comprises 35 percent of the extract).

제품	구분	내용
	제품명	Antioxidant Formula 60 Caps
	소비자가	$12.54
	제조업체	By Natures Way
	브랜드	
	기타	Catechin Extract L-Cysteine (HCl) 100MG

제품	구분	내용
	제품명	NOW Foods, Green Tea Extract 400 mg - 250 Capsules
	소비자가	$14.31
	제조업체	
	브랜드	
	기타	(min. 40% Catechins and 60% Polyphenols)

제품	구분	내용
	제품명	Irwin Naturals, Triple-Tea Fat Burner, 75 Liquid Filled Softgels
	소비자가	$13.57
	제조업체	
	브랜드	
	기타	Each of the teas is processed in a unique and different way, providing a variety of antioxidants and a blend of key nutritional compounds such as polyphenols, catechins and theaflavins that assist you in your weight loss program.

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea
	소비자가	$6.89
	제조업체	Jarrow Formulas
	브랜드	
	기타	Including 30% catechins

제품	구분	내용
	제품명	Catechin-Rich Green Tea Tablets
	소비자가	$37.49
	제조업체	miroku-usa
	브랜드	
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Fat Burner 식이 보충제, 90ct
	소비자가	
	제조업체	Jarrow Formulas
	브랜드	
	기타	• 액체타입의 부드러운 젤 타입 • 성분: 녹차 추출액, ECGC, 카페인, chromium picolate , Advantra Z • 무게: 약 0.18 kg • 제품 사이즈 (인치)(L x W x H):2.88 x 2.88 x 5.63

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Slim Life Tea 16 Bags
	소비자가	$4.09
	제조업체	Yogi Tea Company
	브랜드	
	기타	For best tea infusion, pour 8 oz. hot water (not boiling) over one Green Tea Slim Life tea bag and steep for 2 to 4 minutes. Gently squeeze the tea bag to fully release the active ingredients. For a stronger effect, use 2 tea bags. Drink throughout the day for up to 10 cups per day. If you are on a reduced calorie diet, this is an excellent way to maintain energy.

제품	구분	내용
	제품명	Energy Powder Lc Orange 14 srv
	소비자가	$12.39
	제조업체	FRS Company, The
	브랜드	
	기타	Catechins 50 mg

제품	구분	내용
	제품명	Quicktrim 14-day 122 Count
	소비자가	$34.99
	제조업체	Quick Trim, LLC
	브랜드	
	기타	(Providing 135 mg EGCG, 225 mg Catechins)

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Extract (120 Tablet, 500 mg) by Source Naturals
	소비자가	120캡슐 8달러
	제조업체	
	브랜드	SOURCE NATURALS
	기타	•500 mg 녹차 축출액의 120알의 식이 보충제는 카페인이 있지 않은 고농축 녹차 축출액을 제공한다. •특히 (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) 라고 알려진 Polyphenols을 제공함

제품	구분	내용
	제품명	Jarrow Formulas Green Tea
	소비자가	5$
	제조업체	JARROW
	브랜드	
	기타	•Jarrow Formulas Green Tea는 카페인이 없는 축출액이며 50%가 polyphenols이며 30%가 30% catechins, 약 15%의 EGCG 이다. •녹차에 있는 폴리페놀은 강력한 산화방지제이며 심장혈과과 면역에 도움을 준다. / 카페인없음 •100캡슐(채식주의자용으로 구성)

제품	구분	내용
	제품명	Schiff Green Tea Diet
	소비자가	11$
	제조업체	SCHIFF VITAMINS
	브랜드	
	기타	•지방을 태우는데 도움이 됨. • Schiff Green Tea Diet는 사람을 신경질적으로 만드는 성분이 있는 에페드린이 들어있지 않음(Ma Huang or Ephedra herb이 들어있지 않음) •녹차에 들어있는 산화방지와 산열성효과를 주는 활성화 성분이 있음(카테킨). •하루에 EGCG 270mg과 카페인 150mg 산열성과 지방대사를 시켜줌.

제품	구분	내용
	제품명	Energy Liquid Orange 32oz
	소비자가	$13.03
	제조업체	FRS Company, The
	브랜드	
	기타	Catechins 65 mg

제품	구분	내용
	제품명	VAZOOM Vitamin and Antioxidant Sugar Free Acai Pomegranate Blueberry Powder Go-Packs
	소비자가	$12.96
	제조업체	
	브랜드	
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	Energy Soft Chew Pom blbery30
	소비자가	$10.35
	제조업체	FRS Company, The
	브랜드	
	기타	Catechins 20 mg

제품	구분	내용
	제품명	Healthy Energy Rtd Chry Lim 12
	소비자가	$28.75
	제조업체	FRS Company, The
	브랜드	
	기타	Catechins 85 mg

제품	구분	내용
	제품명	Alvita 29460 Chinese Green Tea Caffine Free Fat Free
	소비자가	$15.00
	제조업체	
	브랜드	
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	Ito En Jasmine Japanese Green Tea, 16.9-Ounce Bottles (Pack of 12)
	소비자가	$23.08
	제조업체	Ito En
	브랜드	
	기타	Has a healthy dose of natural ?catechin? tea antioxidants and is also a good source of vitamin C

제품	구분	내용
	제품명	Slimquick Mixed Berry 26 Count
	소비자가	$19.99
	제조업체	Wellnx Life Sciences USA
	브랜드	
	기타	(95% Polyphenols, 75% Catechins, 45% EGCG),

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Energy 24 Packs
	소비자가	$17.22
	제조업체	
	브랜드	To Go Brand
	기타	provides 100 mg of the metabolism booster EGCG (Epigallocatechin gallate/Green Tea Catechin)
		EGCG (Epigallocatechin Gallate) 50 mg

제품	구분	내용
	제품명	Ito En Sencha Shot, 6.4-Ounce Cans (Pack of 30
	소비자가	$47.53
	제조업체	
	브랜드	Ito En
	기타	"catechin" tea

제품	구분	내용
	제품명	TrivanThin - European Weight Control System (Servings per Container: 28)
	소비자가	$120.00
	제조업체	Trivani International
	브랜드	
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	Next Gen GTL10 Green Tea Leaves Cat Litter 10L Bag
	소비자가	$15.59
	제조업체	Next Generation
	브랜드	
	기타	Kills bacteria and fights odor with Catechin. Catechin in each pellet kills bacteria and works to fight strong odor.Its Flushable: GREEN TEA LEAVES uses 100 percent all natural biodegradable natural ingredients.

제품	구분	내용
	제품명	DHC Film supplement Beauty Rosemint taste 24seats
	소비자가	$12.99
	제조업체	hotjapannow
	브랜드	
	기타	catechin 30% content

제품	구분	내용
	제품명	Energy Drink Lc Berry 11.5OZ24
	소비자가	$41.40
	제조업체	FRS Company, The
	브랜드	
	기타	Catechins 85 mg

제품	구분	내용
	제품명	MEMORIAL DAY SPECIAL!!!! TrivanThin - European Weight Control System (Servings per Container: 28)
	소비자가	$130.00
	제조업체	In Stock.
	브랜드	Trivani International
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	Pangea Organics Japanese Matcha Tea with Acai & Goji Berry Facial Mask, 4oz / 120ml
	소비자가	$29.95
	제조업체	wawabeauty Made in USA
	브랜드	
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	OptiAll 60 Caps
	소비자가	$18.29
	제조업체	By Natural Care
	브랜드	
	기타	Green Tea Extract at 90% Polyphenols/50% Catechins

제품	구분	내용
	제품명	Deeper Greens, 240g Powder
	소비자가	$45.90
	제조업체	
	브랜드	
	기타	

제품	구분	내용
	제품명	Lipton Superfruit White Mangosteen & Peach Green Tea Beverage, 20ct
	소비자가	
	제조업체	
	브랜드	
	기타	•무게: 1.32kg (2.91 파운드) •제품 사이즈: (L x W x H): 1.1 x 9.0 x 6.0 •All natural110mg protective antioxidants per serving Rainforest Alliance Certified

제품	구분	내용
	제품명	Derma E Vitamin A and Green Tea Crème
	소비자가	7.99$
	제조업체	
	브랜드	
	기타	- 성분: Water , Bentonite , Sodium Cocoyl Hydrolyzed Soy Protein , Glycerin , Camellia Sinensis Leaf Extract (Green Tea) , Caprylyl Glycol , Phenoxyethanol , Hexylene Glycol , FD&C Blue No. 1 (CI 42090) , FD&C Yellow No. 5 (CI 19140).

제품	구분	내용
	제품명	Jason Natural Tea Time Anti-Aging Moisturizing Crème
	소비자가	15$
	제조업체	
	브랜드	
	기타	- 인증받은 유기농 성분 사용 - Directions: 사용법: 얼굴이나 몸에 바른다. - 무게: 4 oz

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Cream Deodorant
	소비자가	11$
	제조업체	
	브랜드	
	기타	- 성분: 캐러웨이, 과일향이 나는 대황, 레몬, 오랜지향, 베르가못, 박하, 녹차, 자스민, 카네이션, 회향열매, 샐러리, 오크, 머스크

제품	구분	내용
	제품명	Green Tea Energizing Bath & Shower Gel
	소비자가	13$
	제조업체	
	브랜드	
	기타	-Size: 6.8 fl. oz.
		- 성분: 캐러웨이, 과일향이 나는 대황, 레몬, 오랜지향, 베르가못, 박하, 녹차, 자스민, 카네이션, 회향열매, 샐러리, 오크, 머스크,

제 4 절 비만 관련 연구 경향

지방이 섭취되었음을 뇌에 알려주는 메신저: NAPE(N-acylphosphatidylethanolamine) [56)]

출처, “N-acylphosphatidylethanolamine, a Gut- Derived Circulating Factor Induced by Fat Ingestion, Inhibits Food Intake“, Cell, Volume 135, Issue 5, 813-824, 28 November 2008.

내용요약

비만은 단순한 생활습관병을 넘어서 유행병으로 간주되고 있다. 세계적으로 약 3억 명의 성인들이 심각한 과체중 상태에 있으며, 이로 인하여 2형당뇨나 심혈관질환의 위협에 시달리고 있다. 비만은 에너지 섭취와 소비 간의 불균형으로 인하여 발생하며, 비만을 효과적으로 치료하기 위해서는 그 중에서도 에너지의 섭취를 제한하기 위한 새로운 경로를 개발하는 것이 시급하다. 이와 관련하여 미국 예일대 의대와 신시내티 대학의 연구진은 Cell 11월 26일호에 실린 논문에서, 동물의 지방 섭취를 억제하는 새로운 경로를 발견하였다고 발표하였다. 연구진에 의하면, “동물이 지방식을 먹는 경우 소장에서 NAPE(N-acylphosphatidylethanolamine)라는 화학적 메신저가 생성되며, 이것이 혈류로 들어가 뇌에 도달하여 허기신호(hunger signal)를 잠재운다“은 고 한다. NAPE는 혈액 중에 풍부하게 존재하는 혈장지질(plasma lipid)로서 종전에는 그 생리적 역할이 알려지지 않고 있었다. 연구진은 12시간 굶은 랫트의 혈액 중에는 저농도의 NAPE가 존재하는 것을 확인하였다. 그러나 랫트가 고지방 먹이를 먹은 후에는 NAPE의 농도가

40~50% 증가하였다. 더욱이 단백질이나 탄수화물만을 먹은 랫트의 경우에는 NAPE의 혈중농도가 증가하지 않았는데, 이는 NAPE가 음식 중에 포함된 지방의 양을 반영한다는 것을 의미한다.

연구진이 합성된 NAPE를 복강에 투여하거나 음식에 혼합해 보니 랫트의 식욕은 유의하게 감소하였다. NAPE의 섭취량이 많을수록 랫트의 먹이섭취량은 감소하였으며, 심지어 고용량의 NAPE를 섭취한 랫트는 12시간 동안 먹이를 먹지 않았다. 저용량의 NAPE[식사 후에 자연적으로 나타나는 NAPE의 증가(spike in NAPE)를 시뮬레이션한 양]를 섭취한 랫트는 대조군 랫트보다 25% 적은 먹이를 먹었으며, 개중에는 마치 방금 식사를 마친 것처럼 낮잠모드(siesta mode)에 빠져드는 것들도 있었다. 연구진이 소량(나노몰)의 NAPE를 직접 뇌에 투여한 결과 대용량의 NAPE를 혈류에 투여한 것과 동일한 효과를 볼 수 있었다. 이는 NAPE가 직접 뇌와 커뮤니케이션을 한다는 것을 시사한다. 연구진은 14C로 표지된 NAPE를 이용하여 분석한 결과, NAPE가 뇌혈류장벽(BBB)를 통과하여 공복감을 느끼는 중추(시상하부)로 들어간 다음 식욕촉진 뉴런을 진정시킨다는 결론을 얻었다. “NAPE는 위장관-뇌 축(gut-brain axis)을 구성하는 메신저이다. NAPE는 ‘에너지원이 섭취되었으니 음식섭취를 중단하라‘는 위장관의 메시지를 뇌에 전달한다.“고 연구진은 말했다. 한편 연구진은 NAPE의 장기투여에 의한 효과와 안전성을 알아보기 위하여, 22마리의 랫트에게 5일 동안 지속적으로 NAPE를 투여해 보았다. 그 결과 NAPE를 투여받은 랫트들은 대조군 랫트보다 먹이를 적게 먹고 체중이 10% 감소하였지만, 그밖의 건강상태에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 현재 알려져 있는 식욕억제 물질로는 렙틴(leptin)이 있다. 렙틴은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로 체내의 지방 수준에 대한 정보를 뇌에 전달함으로써 식욕을 억제하는 역할을 한다. 그러나 이번에 발견된 NAPE는 지방섭취에 반응하여 소장에서 생성되는 물질로서, 렙틴보다 신속히 작용하며 지방섭취만을 선택적으로 감지(感知)한다는 장점이 있다. 연구진은 현재 인간을 대상으로 하여 NAPE의 혈중농도를 모니터링하고 있으며, 향후 비인간 영장류(non-human primates)를 대상으로 NAPE가 식욕에 미치는 영향을 테스트할 예정인데, 이 테스트에서 랫트를 대상으로 한 연구와 동일한 결과가 나온다면 NAPE나 NAPE 유사화합물을 이용한 임상시험에 착수할 계획을 갖고 있다. 이번 연구는 NAPE라는 새로운 지방섭취 억제물질을 발견함으로써, 새로운 비만치료제의 개발을 촉진하는 계기가 될 것으로 기대된다.

제 5 절 다이어트 요소를 통한 NK 세포의 항-종양 기능 향상[57)]

출처, www.pnas.org> Current Issue > vol. 110 no. 30 > June Ho Shin, 12391-12396, doi: .1073/pnas.1302856110.Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor

내용요약

면역 세포 아형의 분화와 작용에서 에릴 하이드로카본 수용체 (aryl hydrocarbon receptor, AhR)의 역할로 인해 이 분자에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다. 그러나 자연 살해 (natural killer, NK) 세포에서의 작용은 아직까지 기술되지 않고 있었다. 미국 스탠포드 의대 암 연구소 (Stanford University, Stanford Cancer Institute)의 존 선우 (John B. Sunwoo) 교수 연구팀은 AhR 발현이 사이토카인 자극 즉시 생쥐의 NK 세포에서 유도된다고 보고하고 있다.

연구팀은 AhR 부재 시 NK 세포들은 정상적인 발달과 성숙 마커들을 갖고 있음에도 불구하고 생체 내에서 세포독성 작용이 감소하고 RMA-S 종양 형성을 조절하는 능력도 줄어드는 현상을 관찰해 냈다. AhR은 난분해성 유기 화합물인 다이옥신 (xenobiotic compound dioxin)에 부착되는 것으로 처음 동정되었지만, AhR 은 자연적으로 존재하거나 내인성적인 다양한 리간드에도 부착되는 것으로 현재 알려져 있다. 연구팀은 내인성 트리토팬 파생물질인 6-formylindolo[3,2-b]carbazole로 AhR을 활성화시키면 NK 세포의 인터페론 감마의 생산과 세포독성 작용이 증가하는 현상을 관찰했다. 또한 6- formylindolo[3,2-b]carbazole을 생쥐에 주사하면 NK 세포와 AhR에 의존적인 방식으로 종양을 조절하는 NK 세포의 능력을 향상시켰다. 마지막으로 NK 세포의 잠재성에 대한 유사한 효과는 AhR의 다이어트 리간드들에 의해서도 관찰되는 것으로 보아 다이어트와 NK 세포 기능 간의 관계성이 있는 것으로 설명된다. 이번 발견은 생체 내에서 NK 세포 작용을 향상시키는 또 다른 조절인자로 AhR의 역할을 밝혀냈다는데 그 의미가 있다.

NK 세포의 세포 독성은 개인적으로 차이가 있다는 것은 잘 알려져 있지만 이러한 차이의 근간이 되는 기작들은 잘 알려져 있지 않다. 이러한 차이는 부분적으로 유전적인 요소들로 인한 결과이지만 내인성 요소들이 NK 세포 기능에 상당한 영향을 준다는 증거들이 충분히 존재한다. 연구팀은 NK 세포의 항종양 작용을 조절하는 AhR 의 핵심적인 역할에 대해 기술하고 있다.

중요하게도 이 수용체는 다양한 환경적인 요소들에 부착될 수 있고 이러한 리간드들은 활성제나 길항제가 될 수 있다. AhR은 Per (period circadian protein)-Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein)-Sim (single-minded protein) (PAS) 슈퍼패밀리 단백질 계통으로 세포질 수용체이며 리간드가 부착되면 핵으로 이동하여 에릴 하이드로카본 수용체 핵 전사 위치 (aryl hydrocarbon receptor nuclear trans-locator, ARNT)에 부착된다. 이러한 AhR:ARNT의 이형 이합체는 DNA에 붙고 다이옥신 반응 요소 (dioxin response elements, DREs)로 알려진 난분해성 유기물 반응 요소 (xenobiotic-response elements, XREs)로 불리는 특정 cDNA 시퀀스의 유전자를 직접 전사한다. 반응 요소들의 이러한 명칭에서 암시되듯 AhR의 경우 초기에 잘 알려진 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)과 같은 환경적인 오염물질과 독성 물질에 대한 수용체로서의 역할이 연구되었다. 지난 30여 년간 연구를 통해 AhR 은 내인성적으로 발견되는 다이어트와 신진대사 물질의 다양한 자연 화합물에 부착되는 것이 분명하다.

면역 시스템에서 AhR 의 역할은 조절 T 세포 (regulatory T (Treg) 와 T helper 17 (Th17) 세포들의 분화와 발달에서 중요한 역할을 하고 있다는 것이 발견된 이후 최근 들어 관심의 집중을 받았다. AhR 리간드인 TCDD와 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)은 CD4 T 세포를 AhR 에 의존적인 방식을 통해 몇 가지 아형으로의 분화를 촉진시킨다. 다양한 조혈 모세포에서 AhR이 발현된다는 것은 이 수용체가 다른 면역 세포 아형의 작용에도 중요한 역할을 할 수 있는 가능성을 시사하고 있다. AhR 는 특별한 선천성 림프구 세포 (innate lymphoid cells, ILCs) 에서 최근 보고 되었고 내장의 ILCs 의 발달에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재까지 혈액 NK 세포들에서 AhR 의 기능적인 역할은 기술되지 않고 있다.

이번 논문에서 연구팀은 AhR 발현이 NK 세포 사이토카인으로 자극되자 비장의 NK 세포에서 발현되고 다이어트에서 발견되는 AhR 리간드들을 포함하는 AhR 작용에 영향을 주는 요소들이 NK 세포의 항종양 작용 기능을 조절할 수 있음을 보여주고 있다. 이러한 결과들은 개인마다 차이가 있는 NK 세포 독성의 차이를 설명하고 NK 세포의 항종양 기능을 향상시키기 위한 독특한 치료 전략을 제안하고 있다.

제 6 절 비만관련 패러다임의 변화 [58)]

출처, “신기술 바이오 분야 글로벌 산업동향으로 본 비만치료제 개발의 향후 전망” 문형석, BRIC 산업동향보고서,

내용요약

최근까지 허가 받거나 개발 중인 비만 치료제들은 대부분이 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제시키는 화학 조성물 (small molecular)이었다. 이들은 경구투여의 이점이 있음에도 미미한 체중 감소효과, 요요현상 및 심각한 부작용 등의 단점으로 인하여 극히 일부분의 비만 환자들만이 단기간만 사용하여 시장이 확대 되지 못하고 있다. 그러나 최근에 비만이 관한 비약적인 연구 및 아래와 같은 새로운 인하여 다양한 종류의 새로운 비만치료 약물들이 개발되고 있다.

기존	새 패러다임
중추신경계 작용	국소 (지방조직)
에너지흡수억제 - 식욕억제제(CNS) - 위장관 지방흡수억제(국소)	에너지소모증가제 - 지방세포 혈관생성저해제 - 발열반응증가 (갈색지방 증가) - 지방산 산화증가
저분자합성의약품 - 경구투여: 1일 1~3회	(합성) 펩타이드 - 피하주사: 1/day, 0.5~1/week
과체중 ~ 경도비만	고도비만 ~ 초고도비만 - 초고도 비만에 대한 수술대체 요법

<비만치료 패러다임의 변화>

첫째, 기존의 경구투여 화학 조성물 일변도에서 다양한 종류의 주사제 합성 펩타이드에 기반한 식욕 억제제들이 개발되고 있다. GLP-1(Glucagon-Like peptide) 펩타이드인 Exernatide (Byetta)와 Liraglutide (Victoza)는 이미 제2형 당뇨병 치료제로 허가 판매되고 있으며 포만감을 증가시켜 식욕을 억제하는 효과가 있다. 특히, 노보노디스크사는 2013년 12월에 Liraglutide를 1일 1회 주사하는 비만치료제로 허가를 신청하였다(http://www.zafgen.com/zafgen/our-approach/beloranib)

화학명(상표, 회사)	개발단계	작용기전	종류
Bupropion/naltrexone (Contrave;Orexigen)	NDA	식욕억제제	저분자화합물
Bupropion/zonisamide (Empatic, Orexigen)	Phase 2	식욕억제제	저분자화합물
Liraglutide (Victoza)	NDA	식욕억제제	(합성)펩타이드

<개발중인 비만 치료제들, BRIC 시장동향 보고서>

둘째, 경구투여 중추신경계작용 약물들에 나타나는 부작용을 회피하기 위하여 지방조직과 같은 국소조직에 작용하는 주사제 약물들이 개발되고 있다. 한국의 종근당에서 기술 이전하여 미국의 Zafgen사에서 임상 Phase 2 개발 중인 주사제 Belorinib은 지방 조직에서 혈관 생성을 저해하고 간에서 지방산의 합성을 저해하여 지방을 감소시킨다. 미국의 MD Anderson 암센터에서 임상 Phase 1 개발 중인 합성 펩타이드인 주사제 Adipotide는 백색지방세포에 작용하여 혈관생성을 저해시켜 지방조직을 감소시킨다. 이들 국소 지방조직에 작용하는 혈관생성 억제제들도 간접효과를 통하여 식욕억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다.(https://obetat.wordpress.com/therapeutic-approachpipeline). 셋째, Beloranib 및 펩타이드에 기반한 Irisin(http://www.businesswire.com/news/home/20120111005231/en/Ember-Therapeutics-, Adipotide(http://www.arrowheadresearch.com/adipotide), TatdMt(http://www.arrowheadresearch.com/adipotide)] 등이 새로운 타깃과 작용기전을 가진 안전하고 효과적인 차세대의 비만치료제로 개발되고 있다. 이들 물질들은 우수한 효과 및 기존의 중추신경계 비만약물에서 나타나는 부작용을 회피할 수 있는 장점이 있다 .

제 7 절 비만 관련 산업

1. 다이어트 시장 현황

가. 다이어트의 정의

다이어트는 살이 찌지 않도록 먹는 것을 제한하는 일 또는 건강을 증진시키거나 체중을 줄일 목적으로 음식물을 조절하여 섭취하는 행위로,

비만산업의 정의와 범위

▷ 비만산업은 적정한 체중 유지에 도움을 주는 약품, 제품 및 제반 서비스를 통칭

▷ 비만산업은 섭취, 서비스, 행동 변화를 통한 관리영역과 비만(관련)제품 영역으로 구분

- 섭취: 비만치료제나 건강보조식품산업
  서비스: 비만 전문 클리닉
  행동 변화: 피트니스 · 항노화 · 스트레스 산업

- 비만제품: 비만의료기기 사업
  비만 관련 제품: 체형 변화에 따른 의류 · 가구 관련 산업 등

나. 국.내외 시장현황

(1) 다이어트의 개념의 변화

<다이어트 개념의 시기별 흐름>

(2) 다이어트 시장규모[59, 60)]

㉮ 출처, ‘건강과 웰빙에 관한 글로벌 소비자 인식 보고서, 닐슨社

㉯ 자료 요약

세계다이어트 시장 규모는 2014년 기준 우리나라 돈으로 634조7870억원으로, 최근 5년 동안 연 평균 10.9%씩 성장을 거듭하고 있다. 국내 다이어트 시장 규모는 약 2조원으로 추정. 다이어트 상품이 시즌리스(Season-less · 시즌에 상관없는)가 되고 있다. “최근 다이어트 제품의 트렌드는 시즌이 따로 없다. 단백질 쉐이크, 보조제 시장↑=최근

다이어트 시장에 불고 있는 주요 트렌드는 '먹는 다이어트'다. 특히 탄수화물 함량이 적은 단백질 상품은 먹는 다이어트의 최대 수혜자다. 식약처가 조사한 품목별 건강기능식품 수입현황(2013년 12월 기준)에 따르면 단백질 수입량은 비타민, 오메가3 지방산 등에 이어 전체 건기식 중 4위를 기록하고 있다. 연중 수입액은 202억원으로 이는 전체 건기식의 5.2%에 달한다.

▼국내 다이어트 시장 규모. 한국소비자원

'운동녀(운동하는 여성)'가 유행하면서 단백질 시장은 더욱 호황. 현재 국내 식사대용 단백질 제품 시장에는 뉴트리션 전문기업 허벌라이프를 중심으로 각종 수입품, 중소업체 상품들이 출시된 상태다. 근육발달 헬스보충제의 매출은 2013년 5%(전년대비), 2014년 18%, 2015년(1월~5월) 12% 등 꾸준히 두자릿수 성장을 거듭하고 있다. 닭가슴살 역시 2014년 13% 매출이 신장한데 이어 올해 들어서 28% 매출이 늘었다.

간단한 알약 섭취로 지방, 칼로리 흡수량을 줄일 수 있는 '다이어트 보조제' 부상하고 있다. 소셜커머스 쿠팡에 따르면 지난 1일부터 16일까지 '다이어트 보조식품' 판매량은 전주(5월16일~5월31일) 동일 기간 대비 약 20% 증가한 것으로 조사됐다.

쿠팡 관계자는 "음식섭취를 줄이지 않고 스마트하게 체중관리를 하는 것이 요즘 떠오르는 트렌드"라며 "키토산을 주성분으로 체지방 감소에 도움을 줄 수 있는 상품, 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하는 칼로리 커트 상품 등이 인기"

(3) 비만산업의 범위의 확대

비만은 적정한 체중유지에 도움을 주는 약품, 제품 및 제반 서비스를 통칭하는 의미 비만산업은 섭취, 서비스,행동변화를 통한 관리영역과 비만 관련 제품 영역으로 구분 됨

제 8 절 다이어트 관련 이론

1. 단식

단식(fasting)은 물만 마시고 칼로리가 있는 음식물은 전혀 섭취하지 않는 다이어트 방법이다. 주로 생수, 녹차, 옥수수차, 결명자차 등 칼로리가 없는 음료수를 먹게 되는 데, 다이어트 초기에 급격하게 체중을 감소시킬 수 있다는 장점 때문에 과다 비만인 경우에는 단식을 선호하는 편이다. 또한 방법이 단순하고, 사전 준비가 필요업고, 비용이 들지 않는 다는 장점이 있다. 그러나 단식의 체중 감소 원인은 50% 이상이 수분 배설에 의한 것이다. 따라서 초기에 체중이 감소되더라도 단식을 중단하면 곧바로 체중이 다시 증가되는 요요현상이 나타나고, 장기적으로

보면 체중 감량의 효과는 거의 없다고 볼 수 있다. 음식을 섭취하지 않는 다이어트 방법이다 보니 당연히 모든 영양소가 부족하게 되고, 감량 단계에서는 체수분과 체단백질이 주 로손실된다. 하지만 다시 음식을 먹게 되면 체단백질보다는 체지방이 증가함에 따라 오히려 체지방 비율을 늘리게 된다.

2. 고단백질 · 저탄수화물 다이어트

저칼로리 식사 때 주로 나타나는 단백질 부족으로 인한 부작용을 예방하면서, 체중 감량을 효과적으로하기 위해 개발된 것이 고단백질 · 저탄수화물 다이어트이다. 단백질이 많은 육류, 생선, 닭고기, 달걀 위주로 식사하며, 우유와 치즈도 일부 섭취한다. 그러나 곡류와 과일, 채소 중에서 탄수화물이 많이 포함된 일부 식품은 철저히 금지된다. 이 다이어트에는 식품 형태의 고단백질 식사(앳킨스 다이어트, 덴마크 다이어트)와 액상 단백질 식사(식품을 사용하는 대신에, 우유나 달걀에서 추출한 액상 단백질을 하루에 3~5회 나누어 섭취하는 방법)가 있다. 시행 초기에는 체중 감량이 매우 크다. 이는 탄수화물 섭취가 극도로 제한되어 케톤증이 유발되면서 심한 이뇨현상에 의한 체액 손실 때문이다. 저칼로리 식사임에도 불구하고 공복감은 비교적 적게 느껴진다는 장점 때문에 이 다이어트를 선호하고 있다. 단점으로는 식품 섭취가 제한됨에 따라 비타민 무기질의 섭취가 부족해지고, 탄수화물 섭취량이 낮아 케톤증 뿐 아니라 체액의 산성화, 혈중 요산 증가, 메스꺼움, 피로, 탈수 등이 유발되기도 한다. 또한 고단백질 식사는 포화지방이나 콜레스테롤 함량이 많아, 심혈관질환의 위험도가 높고, 식품 비용이 높은 편이고, 쉽게 싫증이 나서 일정기간 지속하기가 힘들다. 특히, 칼로리 섭취의 70% 이상을 탄수화물에서 섭취하는 한국 사람의 경우, 탄수화물 식품을 엄격하게 제한하기 때문에 탄수화물 탐식증이 생겨서 오히려 먹고 싶은 갈망이 더욱 강해진다.

3. 저탄수화물 다이어트

고단백질 식사를 주로 섭취하나, 하루에 한기는 소량의 탄수화물이 포함되므로 탄수화물에 대한 끊임없는 갈망이 해소될 수 있다. 잡곡 등 복합 탄수화물이 들어있는 음식은 가능하시만, 설탕이나 포도당 등 단순 탄수화물이 들어 있는 과일, 과일주스, 빵, 파스타, 시리얼, 감자, 고구마, 카페인 음료와 스낵을 철저히 제한하고 있다.

가. 데이 미라클 다이어트 (Day Miracle diet)

- 혈액의 인슐린 농도를 일정하게 하여 탄수화물 탐식증을 없앤 다이어트 방법임.
- 혈당 지수 조절을 통한 체중 조절 효과를 제시하고 있음.
- 흰 밀가루와 단순 탄수화물 섭치를 금함.
- 아침식사 때는 통밀빵 같은 전분류와 달걀 흰자 등의 단백질을 섭취함. 아침식사 후 2시간 이내에 사과, 샐러리와 같이 단단하여 씹어 먹을 수 있는 간식을 섭취함. 저작 운동을 많이 해야 삼킬 수 있는 단단한 간식이 혈당을 천천히 높여줌.
- 가능하면 점심식사를 1시 이전에 하고, 단백질과 채소가 풍부한 식사를 함. 오후에는

한두 번의 간식을 하며, 간식의 간격은 3시간을 넘기지 않도록 함.
- 저녁 8시 이전에 저녁식사를 함. 단백질과 채소가 풍부한 식사를 함.
- 매일 45분정도 스트레칭을 하거나, 30분 정도 걸음.

4. 고탄수화물 · 저지방 다이어트

고탄수화물 · 저지방 다이어트는 지방 섭취량을 줄이고, 설탕이나 감미료를 제한하는 대신에 과일, 채소, 곡류 등의 수분이 많이 함유됨 고탄수화물 식품을 이용한다. 섬유소가 풍부하기 때문에 어느 정도 포만감을 얻을 수 있으며, 식사를 통해 공급되는 탄수화물이 체액의 전해질 손실을 예방하고 이뇨작용을 줄이므로, 기립성 저혈압을 예방할 수 있다. 가장 돋보이는 부분은 곡류음식 형태이어서 한국 사람의 식생활 습관에 적합하다는 점이다.

제 9 절 새로운 컨셉의 비만관련 의료기기

① 출처, http://Powerseed.com http://medtronic.com

② 상품요약

미국의 Power System 社가 식습관개선을 위한 식습관개선 효과가 있는 달걀크기의 보조기구를 50 달러에 출시, 30초간격의 발광신호에 맞춰 음식물을 한입씩 먹게하여 천천히 먹는,. 식품관 유도.

트랜스 뉴로믹스社, 소형기기를 흉곽아래에 삽입시켜 자극을 줌으로써 위벽을 팽창시켜 포만감을 주는 기기를 개발하여 임상시험을 실시, 700명에게 30개월 사용케 한 결과 40%의 체중감량 효과를 보여 FDA 승인 추진 중.

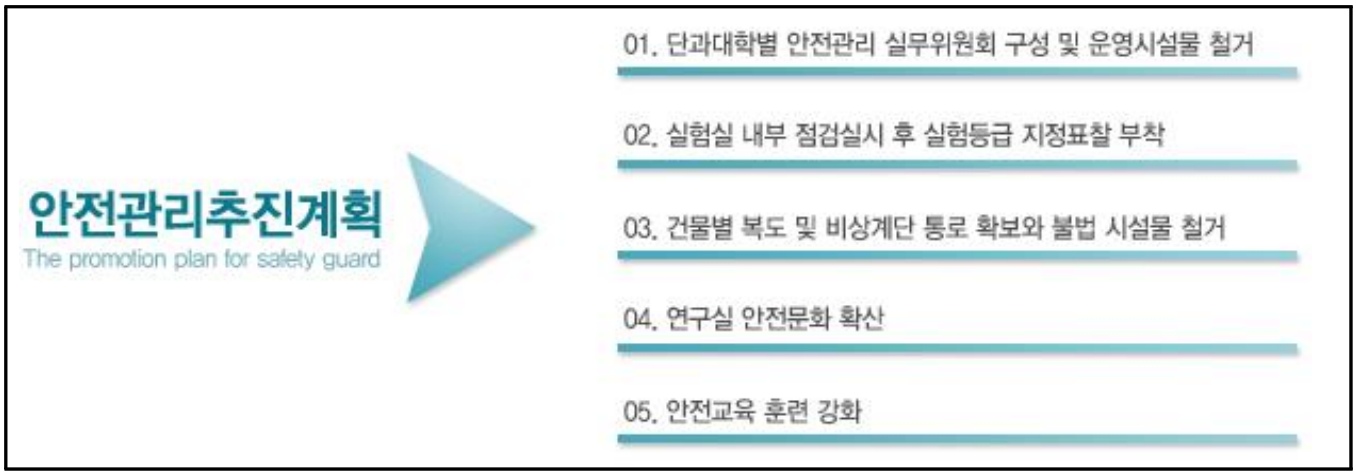
제 7 장 연구시설·장비 현황 : 해당사항 없음

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

제 1 절 주관기관

□ 전남대학교 연구실 안전관리 추진계획도



□ 전남대학교 연구실 안전관리 항목

항 목	적 용 범 위	시행기관	비고
연구실 정기 안전점검 (년 1회 이상)	- 과학기술분야 모든 연구실	전남대학교	
연구실 정밀 안전진단 (2년 1회 이상)	- 유해물질 및 유해인자 취급 연구실 - 정기점검 결과 추가점검이 필요한 연구실	전남대학교	
연구실 실내 공기질 관리 (매년 실시)	- 측정 및 분석 - 유해화학물질 사용, 유해인자 보유, 정밀진단 결과 4등급 연구실	전남대학교	
연구실 종사자에 대한 안전교육(매학기별 6시간이상)	- 과학기술분야 모든 연구활동종사자	전남대학교	
연구종사자 건강검진 (매년 실시)	- 과학기술분야 연구활동종사자	전남대학교	
연구활동종사자 안전공제 (매년 실시)	- 과학기술분야 연구활동종사자	전남대학교	

□ 전남대학교 연구실 안전환경관리자 현황

구 분	성 명	비 고
용봉캠퍼스	양우열, 송주현	
학동캠퍼스	윤찬	
여수캠퍼스	김홍식, 김현춘	

1. 연구실 정기 안전점검, 정밀안전진단

가. 대상 연구실

- 과학기술분야 모든 연구실
- 연구개발활동에「유해화학물질 관리법」제2조제7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실
- 연구개발활동에「산업안전보건법」제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실
- 연구개발활동에 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리

※ 관리위험등급의 지정

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

나. 2014년도 안점점검 및 진단 시행 일정

구 분	안전점검 시행시기	대상 연구실	비 고
정기점검	2014. 4 ~ 6월	여수캠퍼스 해당 연구실	
	2014. 4 ~ 6월	광주캠퍼스 해당 연구실	
정밀진단	2014. 11 ~ 12월	여수캠퍼스(100개소)+공기질(10개소)	
	2014. 11 ~ 12월	광주캠퍼스(200개소)+공기질(30개소)	

2. 연구실 공기질 측정

가. 실시 일정 및 내용 : 연구실 정기점검 및 정밀진단 실시와 함께 유해물질농도 측정관리, 환기대책수립

3. 연구실 안전교육

가. 교육대상

- 과학기술분야 연구실에 종사하는 연구활동종사자 전원
- 연구실(실험·실습실)을 출입하는 자(대학생, 대학원생, 연구원, 연구보조원)
  (대학원을 수료한 자라도 연구실을 출입하는 경우하는 교육을 이수하여야 함)
- 희망하는 교직원 및 창업보육센터 업체의 직원

나. 교육 횟수

- <u>매학기별 1회 6시간(6차시) 이수를 기본으로 함(총 년 2회-12시간이상)</u>

다. 전공특성별 안전교육 실시

- 연구활동종사자의 출입 실험실 위험등급에 따라 교육과정을 A,B,C로 편성
- 전공특성별 안전교육을 실시

- 연구활동종사자의 교육만족도 향상 및 실질적 안전교육이 될 수 있도록 함

교육 과정	분류 기준	비 고
공통과정	A,B,C공통 과정 - 연구실 안전 및 안전일반과정 : 연구실안전 및 일반적 위험성, 연구실 사고예방, 연구실 사고대처, 연구실 안전보건 - 화재 및 폭발 : 화재 및 폭발, 화재로 인한 신체피해, 소방안전설비 사용요령, 화재 시 행동요령 - 유해화학물질 취급과 관리 : 물질안전보건자료	
A과정	가스, 인화성시약, 유해화학물질, 생물 및 동물의 취급, 방사성동위원소	
B과정	일반시약, 소규모 인화성시약, 불연성 가스	
C과정	화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터	

※ 집합교육으로 순회안전교육 및 실험전 안전교육 실시하며, 전남대학교 연구환경안전망 홈페이지(http://safety.jnu.ac.kr)를 통해 사이버 교육 상시 실시

4. 연구활동종사자 건강검진

가. 검진대상자 및 검진대상 물질

- 과학기술분야 연구실의 연구활동종사자로서 위 물질을 취급하지 않더라도 건강검진을 원하는 연구활동종사자
- 산업안전보건법에 따른 유해인자 보유 연구실(메탄올외 176종)
- 상기 물질을 취급하여 연구에 종사하는 자

나. 건강검진 종류

- 학생 일반검진
- 유해인자별 건강검진 : 특수검진

다. 추진일정

- 기관별 유해인자 취급기준 설정(2014.07)
- **건강검진대상자 선정을 위한 조사표 작성 요청(2014.07-08)**
- 건강검진대상자 선정을 위한 유해인자 노출정도 분석 및 평가(2014.08)
- 건강검진대상자 선정 및 통지(2014.08)
- 건강검진 실시기관 선정(2014.09)
- **건강검진 실시(2014.09-10)**

5. 연구활동종사자 안전공제

가. 가입 대상자

- 과학기술분야 연구실에 종사하는 연구활동종사자 전원
- 실험·실습실을 출입하여 교육 또는 연구를 수행하는 자
  (대학생, 대학원생, 연구원, 연구보조원)

나. 안전공제 재가입

- 가입회사명 : 교육시설재난공제회

- 재가입 년월일 : 2014. 9. 18.

다. 보상기준 및 내용

구 분		내 용	비 고
보상기준		▪연구실에서 발생한 사고로 연구활동종사자가 부상·질병 -신체장해·사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상	
보상내용	사망	▪1인당 1억원 보상	
	후유장해	▪1억원을 한도로 후유장해등급별 정액 보상	
	부상	▪1천만원을 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상	

6. 추가 이행

구 분	내 용	비 고
▪실험실 안전장비 구입	실험실 사고 예방을 위한 안전보호장비와 안전수칙 등 설치	
▪연구실험실 안전점검시스템 구축	고도화된 안전점검시스템 업데이트 : 자가 일일점검시스템 업데이트 등 시스템 유지 보수	
▪GHS 안전표식 부착	실험실에 안전 표식 부착	

제 2 절 협동기관

(소방시설 점검)

점 검 용 역 계 약 서			계약번호 제 호 공고번호 제 호
계약자	발 주 처	여성기업종합지원센터 전북센터 주 소: 전주시 완산구 전주천서로 477 전화번호: 063) 272-9973	
	계 약 상 대 자	· 상호또는법인명칭: (유)삼성방재 · 법인등록번호: 210114-0049615 · 주 소: 전주시 완산구 인봉1길 48-8 · 대 표 자: 유 정 화 · 전화번호: (063) 286-2119	
계약내용	계 약 명	2015년도 소방시설 점검 용역	
	계 약 내 용	☑ 소방시설 작동기능점검	
	계 약 금 액	금 사십만--원정(₩400,000--)부가세포함	
	대 금 지 불	☑ 일시불 ☐ 월납 ☑ 결제방법 : 세금계산서발행	
	계 약 기 간	2015년 6 월 15일부터 2015년 월 일 붙임(계약내용서)의 점검 기간 참조	

계약발주자(갑)과 계약상대자(을)는 상호 대등한 입장에서 붙임의 계약문서에 의하여 위의 점검에 대한 계약을 체결하고 신의에 따라 성실히 계약상의 의무를 이행할 것을 확약하며, 이 계약의 증거로서 계약서를 작성하여 당사자가 기명 날인한 후 각각 1통씩 보관한다.

붙임 : 계약내용서 1부/ 소방시설관리업등록증 1부/ 법인사업자등록증 1부/ 법인인감증명 1부/ 사용인감계 1부/ 통장사본 1부.

2015년 월

발 주 자(갑) (재)여성기업종합지원센터 전북센터
한국여성경제인협회 전북지회
전주시 완산구 전주천서로 477
TEL:063-272-9973,9906 FAX:063-272-9974
560 - 821 송기순 (인)

계약상대자(을) (유) 삼 성 방 재 유 정 화 (인)

(화재보험 가입)

증권번호	60-20-015257	화재공제(일반)	청약일자 : 2014 년 11 월 06 일

계약사항

계 약 자	성명/법인명	신유림	주민등록번호 (사업자등록번호)	개인정보보호
	주 소	개인정보보호		
피 공 제 자	성명/법인명	신유림	주민등록번호 (사업자등록번호)	개인정보보호
	주 소	개인정보보호		
공 제 기 간	2014 년 11 월 06 일 16:00 부터 2015 년 11 월 06 일 16:00 까지			
공제가입금액	6,000 만원		공 제 료	44,220 원
공제목적물의 소재지	전라북도 전주시 완산구 전주천서로 477 3층 303호 (유)다이오푸드스토리(서신동)			

담보사항

부 호	공제의 목적 및 이들이 수용된 건물의 구조, 면적, 용도	공제가입금액(만원)
1	철근콘크리트조 슬라브즙(아스팔트 쉥글즙) 5층중 303호 32.1㎡	5,000
2	일반집기비품일체 - 부호1내 분산수용함	1,000
추가약관	※ 1. 날짜인식오류부보장 추가약관 / 2. 테러행위 면책 추가약관	

인가번호: 07-133 발행일자: 2014.11.06

조 합 명: 인후신협 발행사유: 신규발행

* 연구수행 기간 중 소속 기관의 연구실 안전관리 관련 규정에 따른 이행실적(자체양식)

제 9 장 참고문헌

1. Ahmad, N. et al., 1997. Green Tea Constituent Epigallocatechin-3-Gallate and Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Carcinoma Cells. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*,89(24),pp.1881-1886.

2. Alessi, M.-C. et al., Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*,33(5-6),pp.290-7.

3. Almajano, M.P. et al., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*,108(1),pp.55-63.

4. Bhavsar, S.K. et al., 2009. Effect of saponins from Helicteres isora on lipid and glucose metabolism regulating genes expression. *Journal of ethnopharmacology*,124(3),pp.426-33.

5. Cabrera, C., Artacho, R. & Giménez, R., 2006. Beneficial effects of green tea--a review. *Journal of the American College of Nutrition*,25(2),pp.79-99.

6. Cabrera, C., Giménez, R. & López, M.C., 2003. Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*,51(15),pp.4427-35.

7. Cao, Y. & Cao, R., 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*,398(6726),p.381.

8. Chen, Z.P. et al., 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Letters*,129(2),pp.173-179.

9. 식약처 건강기능식품 (http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/industry)

10. Pubmed

11. 식품원재료 데이터베이스, 식약처

12. 기능성 자료 평가 원칙, 식약처, 2008

13. 기능성 평가자료 가이드라인, 식약처, 2008

14. Health functional food standard codex, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon, Korea, 319-322, 326-328, 2015

15. Lim YM, Kim BR, Hong KY. Antioxidant effect of *Crataegi fructus* extract on the oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin fibroblasts. Kor. J. Ori. Physiol. Pathol., 22(1), 115-119, 2008

16. Chu CS, Kwon KR, Rhim TJ, Kim DH. The effects of hot pepper extract and capsaicin on adipocyte metabolism. J. Pharmacopunct., 11(1), 149-162, 2008

17. Kim KY, Shin JK, Lee SW, Yoon SR, Chung HS, Jeong YJ, Choi MS, Lee CM, Moon KD, Kwon JH. Quality and functional properties of red ginseng prepared with different steaming time and drying methods. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 494-499, 2007

18. Hasegawa, Akutsu T., Kishi K., Nakamura Y, Kouji, Constituents of the green tea seeds of *Camellia sinensis*, Natural product communications, 6(3), 371-374, 2011

19. Park JS, Yeom MH, Park WS, Joo KM, Rho HS, Kim DH, Chabng IS, Enzymatic hydrolysis of green tea seed extract and its activity on 5α-reductase inhibition, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70(2), 387-394, 2006

20. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS, Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity, *J. Agri. Food Chem.* 54(8), 2951-2956, 2006

21. Friedman, J.M., 2000. Obesity in the new millennium. *Nature*,404(6778),pp.632-4.

22. Gupta, S. et al., 2000. Growth Inhibition, Cell-Cycle Dysregulation, and Induction of Apoptosis by Green Tea Constituent (-)-Epigallocatechin-3-gallate in Androgen-Sensitive and Androgen-Insensitive Human Prostate Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*,164(1),pp.82-90.

23. Hardie, D.G., 2004. AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid

metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*,5(2),pp.119-25.

24. Hasegawa, T. et al., 2011. Constituents of the green tea seeds of Camellia sinensis. *Natural product communications*,6(3),pp.371-4.

25. Inoue, M. et al., 2001. Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: follow-up study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC), Japan. *Cancer letters*,167(2),pp.175-82.

26. Kaur, K. et al., 2005. In vitro bioactivity-guided fractionation and characterization of polyphenolic inhibitory fractions from Acacia nilotica (L.) Willd. ex Del. *Journal of Ethnopharmacology*,99(3),pp.353-360.

27. Kersten, S., 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*,2(4),pp.282-6.

28. KITAGAWA, I. et al., Structures of new acylated oleanene-type triterpene oligoglycosides, theasaponins E1 and E2, from the seeds of tea plant, Camellia sinensis (L.) O. KUNTZE. *Chemical and pharmaceutical bulletin*,46(12),pp.1901-1906.

29. Kopelman, P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*,404(6778),pp.635-43.

30. Lee, H.-B. et al., 2011. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalin synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *Journal of the science of food and agriculture*,91(13),pp.2315-21.

31. Matsui, Y. et al., 2009. Quantitative analysis of saponins in a tea-leaf extract and their antihypercholesterolemic activity. *Bioscience, biotechnology, andbiochemistry*,73(7),pp.1513-9.

32. McCarty, M.F., 2005. AMPK activation as a strategy for reversing the endothelial lipotoxicity underlying the increased vascular risk associated with insulin resistance syndrome. *Medical hypotheses*,64(6),pp.1211-5.

33. Murphy, D.A. et al., 2006. Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *The American journal of*

pathology,169(5),pp.1875-85.

34. Paschka, A.G., Butler, R. & Young, C.Y.-F., 1998. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (−)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Letters*,130(1),pp.1-7.

35. Pi-Sunyer, F.X., 2002. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity research*,10Suppl2,p.97S-104S.

36. Qin, D., Zheng, X. & Jiang, Y., 2013. Apelin-13 induces proliferation, migration, and collagen I mRNA expression in human RPE cells via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways. *Molecular vision*,19,pp.2227-36.

37. Ramos, J.W., 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,40(12),pp.2707-2719.

38. Rayalam, S. et al., 2008. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy research :PTR*,22(10),pp.1367-71.

39. Roodhart, J.M. et al., 2008. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Current clinical pharmacology*,3(2),pp.132-

40. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M., 2001. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry*,276(41),pp.37731-4.

41. Ruderman, N.B. et al., 1999. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *The American journal of physiology*,276(1Pt1),pp.E1-E18.

42. Syam, S. et al., 2013. β-Mangostin induces p53-dependent G2/M cell cycle arrest and apoptosis through ROS mediated mitochondrial pathway and NfkB suppression in MCF-7 cells. *Journal of Functional Foods*.

43. Tammela, T., Petrova, T. V. & Alitalo, K., 2005. Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends in Cell Biology*,15(8),pp.434-441.

44. Viollet, B. et al., 2007. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes & metabolism*,33(6),pp.395-402.

45. West, K.A., Sianna Castillo, S. & Dennis, P.A., 2002. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resistance Updates*,5(6),pp.234-248.

46. Winder, W.W. & Thomson, D.M., 2007. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cel lbiochemistry and biophysics*,47(3),pp.332-47.

47. Zhang, J. et al., 2011. Recent advances in antiangiogenic agents with VEGFR as target. *Mini reviews in medicinal chemistry*,11(11),pp.920-46.

48. 임상자료집

49. 인체적용시험 계획서

50. 인체적용시험 증례기록서

51. 모니터링 보고서

52. 인체적용시험 최종보고서

53. 식약처 원료 개별인정 신청서

54. 건강기능식품 기능성 평가 가이드 - (1) 체지방 감소에 도움 편, 식약처, 2012

55. Lemoine AY, Ledoux S, Larger E.,2013, Adipose tissue angiogenesis in obesity, Thromb Haemost.110(4):661-668

56. N-acylphosphatidylethanolamine, a Gut- Derived Circulating Factor Induced by Fat Ingestion, Inhibits Food Intake. *Cell*, Volume 135, Issue 5, 813-824, 28 November 2008

57. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United Stated of America (www.pnas.org)

58. 신기술 바이오분야 글로벌 산업동향으로 본 비만치료체 개발의 향후 전망, 문형석, 2015

59. 건강과 웰빙에 관한 글로벌 소비자 인식 보고서, 닐슨, 2015

60. 품목별 건강기능식품 수입현황, 식약처, 2013

61. Chun, K.-S. et al., 2003. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*, 24(9),pp.1515-24.

62. Ejaz, A. et al., 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *The Journal of nutrition*,139(5),pp.919-25.

63. FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*,226(1),pp.497-509.

64.Availableat:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690886[AccessedDecember26,2013].

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) Development of Functional Food Ingredient for Antiobesity Effect from Green Tea Seed Extract</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">전난대학교</td><td rowspan="2">주 관 연 구 책 임 자</td><td colspan="2">(소속) 전난대학교</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">바이오푸드스토리
명인신광수차</td><td colspan="2">(성명) 김 종 덕</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비

(800,000 천원)</td><td>계</td><td>800,000</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">201.08.08 .~2015.08.07.(3년 월)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>600,000</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>62</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>200,000</td><td>내부인원</td><td>62</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>0</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

- 녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발
- 개별인정을 식약청에 신청하였음.

○ 연구내용 및 결과

- 녹차씨앗 추출물의 항비만 기전의 규명
- 녹차씨앗 추출물의 원료 표준화
- 녹차씨앗 추출물의 식약청 원료 개별인정 신청
- 녹차씨앗 추출물의 원료화

○ 연구성과 활용실적 및 계획

□ 녹차씨앗 추출물은 비만을 이론적 근거를 바탕으로 비만에 좋은 효과를 나타내었음

□ 기술적 측면

- 녹차씨 추출 방법의 확립, 녹차 기능성 이용 항암제 및 항비만제제로 개발로 상품화, 기술 전수
- 건강기능식품 개발을 통한 기능성 물질의 분리 및 정제기술, 가공기술 등 바이오 관련 기술 발전
- 건기식 개발 기술과 유사한 천연물 신약 개발 분야에서 활성도 기대 증가

□ 경제적·산업적 측면

- 건강기능식품으로의 다양한 제품 개발로 수익성 증가
- 지역 상품으로 부가 가치 증진 및 국내산 농산물 활용을 이용한 가공산업과 중소기업 활성화
- 저렴한 비용으로 생산가능 및 수입제제 대체 효과로 사회적 가격 안정
- 항비만제 및 항암효과 동시 다발 효과
- 국산 농산물을 이용한 기능성 소재 개발함으로써 국내 농산물 활용 식품 제조, 가공산업 활성화 및 국내 우수 자원의 보존 및 활용도 증진

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야	고부가가치식품 기술개발사업	과제구분	□지정공모과제 ■자유응모과제	관리번호	112075-3
연구과제명	녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발				
주관연구기관	전남대학교				
연구담당자	주관연구책임자	김 종 덕			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	전남대학교	성 명	김 종 덕
		기관(부서)	전남식품산업연구원	성 명	위 지 향
		기관(부서)	바이오푸드스토리	성 명	신 유 림
		기관(부서)	명인신광수차	성 명	신 광 수
연구기간	총 기 간	2012.8.8.-2015.8.7.(3년)	당해년도기간	2014.8.8.-2015.8.7	
연구비(천원)	총 규 모	800,000	당해년도규모	306,666	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

□ 당초계획 이상으로 진행 ■ 계획대로 진행 □ 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

□ 예상외 성과 얻음 ■ 어느 정도 얻음 □ 얻지 못함

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타 연구활용 등)
										논문		학술발표					
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표	3	0	1	3	0	0	0	0	0	5	6	18	3	0	3	3	0
연구기간 내 달성실적	4	3	1	1	0	0	0	0	0	8	2	25	0	8	0	0	0
달성율(%)	130	300	100	30						160	33	138	0	800	0	0	0

3. 연구개발 성과 세부 내용

3-1 기술적 성과

- 항비만 기전을 분자 수준에서 규명
- 지표물질의 개발
- 원료의 표준화
- 체지방 개선 인체적용시험기술개발
- 식약처 ‘체지방개선 원료 개별인정 3등급 신청“

3-2 과학적 성과

- 항비만 기전을 분자 수준에서 규명할 수 있는 기술
- 지표물질의 동정
- 녹차씨박 추출물의 임상적 복용 안전성 및 유효성 자료 확보

3-3 경제적 성과

- 건강기능식품사업의 특징은 고부가가치, 지식기반산업으로서 미래의 유망산업임
- 녹차 씨앗의 안정적인 원료수급을 위한 수매제도 위상 정립
- 천연물을 활용한 보건의료산업 등의 생물제제 산업이 성장에 많은 파급효과
- 지역특화자원 고부가가치화 기술개발 전문인력 양성 및 산업체 고용창출

3-4 사회적 성과

- 비만의증가가 사회적 비용증가에 따른 이슈화에 대비
- 기존의 항비만 화학제제의 부작용 경고에 따른 비만관리의 사회적 관심 집중
- 부작용이 없는 녹차씨앗 추출물을 대안으로 제시

3-5 인프라 성과

- 녹차를 원료로하는 제제개발의 이슈화
- 원료 공급을위한 농가의 공동 수매 제시
- 항암, 항비만, 항산화, 신생혈관 형성억제, 고지혈증제제 등으로 응용부분의 다양화

4. 연구과정 및 성과가 농식품 기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

■ 공헌했음 □ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

5. 경제적인 측면에서 농식품 산업체의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

■ 공헌했음 □ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

6. 연구개발 착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

■ 없다 □ 약간 감소되었다 □ 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전 속도나 추세를 감안할 때 추가연구가 필요하다고 생각하십니까?

□ 없다 □ 약간 필요 ■ 매우 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

- 건강기능식품의 소재 특성상 임상시험의 제도 개선 필요

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

■ 만족 □ 보통 □ 미흡

(근거 : 연구에 따른 제품개발 확신)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

■ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

■ 충분 □ 보통 □ 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

■ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

■ 충분 □ 고려 중 □ 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

■ 확대 □ 동일 □ 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

□ 즉시 기업화 가능 ■ 수년 내 기업화 가능 □ 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	전남대학교	교수	김 종 덕 (인)
참여기업대표	명인 신광수차	대표	신 광 수 (인)

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제	분 야	고부가가치식품기술개발사업
연 구 과 제 명	녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발		
주관연구기관	전남대학교	주관연구책임자	김 종 덕

연 구 개 발 비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	600,000	200,000		800,000

연구개발기간	2012.8.8.-2015.8.7.(3 년)
주요활용유형	■산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 녹차씨앗 추출물의 항비만 기전 규명	분자적 수준에서 규명을 완료함
② 원료의 표준화	제조법 및 표준물질 동정
③ 인체적용시험 자료 확보 및 식약처 원료 개별 인정 신청	인체적용시험자료 확보 완료 되었고, 식약처 개별 인정을 신청하여 승인 여부 대기 중
④ 녹차씨앗의 원료화	수확한 원료의 지방제거 및 추출법 정립

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타 연구활용 등)
										논문		학술발표					
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표	3	0	1	3	0	0	0	0	0	5	6	18	3	0	3	3	0
연구기간 내 달성실적	4	3	1	1	0	0	0	0	0	8	2	25	0	8	0	0	0
달성율(%)	130	300	100	30						160	33	138	0	800	0	0	0

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	녹차씨앗 추출물의 항비만 기전 규명
②	원료의 표준화
③	인체적용시험 자료 확보 및 식약처 원료 개별 인정 신청
④	녹차씨앗의 원료화

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v			
②의 기술		v					v			
③의 기술		v					v			
④의 기술		v					v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	신생혈관형성억제, 항암, 항비만, 항산화, 고지혈증, 세포자살 등에 활용
②의 기술	건강기능식품 제조등의 제품화
③의 기술	인체적용시험결과 확보 및 개별인정신청
④의 기술	건강기능식품 제조등의 제품화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타 (타 연구활용 등)
										논문		학술발표					
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표	3	0	1	3	0	0	0	0	0	5	6	18	3	0	3	3	0
연구기간 내 달성실적	4	3	1	1	0	0	0	0	0	8	2	25	0	8	0	0	0
연구종료 후			1	1		1						2	1	1		1	

성과창출 계획																	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]	녹차씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 치료용 조성물		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	20,000 천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 ■협의결정 □기타( )		
이전소요기간	2년	실용화예상시기[3]	2년
기술이전시 선행조건[4]	자체 녹차씨앗 추출 시설 확보		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리

통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

[별첨 4]

연 구 성 과

가. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

성과목표		사업화지표									연구기반지표							
		지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
											논문		학술발표					
		출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표		3	0	1	3	0	0	0	0	0	5	6	18	3	0	3	3	
1차 년도	목표	1	0								1	2	6					
	실적	0	1								3	0	9					
2차 년도	목표	1	0								2	2	6					
	실적	1	1								3	1	9					
3차 년도	목표	1	0	1	3						2	2	6	3	0	3	3	
	실적	3	1	1	1						2	1	7	0	8	0	0	
소계	목표	3	0	1	3						5	6	18	3	0	3	3	
	실적	4	3	1	1						8	2	25	0	8	0	0	

* 단계별 연구성과 목표는 중간평가의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성

나. 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격), **신품종, 프로그램개발** 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로) 기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지적 재산권 1	녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물	PCT	전남대 산학협력단	2013.08.09	10-2013-0094999				
2	녹차씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 치료용 조성물	한국	전남대 산학협력단	2014.09.22	10-2014-0125524				
3	녹차 씨앗 사포닌을 유효성분으로 하는 항균용 조성물 및 그	한국	전남대 산학협력단	2015.07.23	10-2015-0104634				

	용도								
4	신생혈관형성 억제제 및 이를 이용한 천연산물 항비만제	미국	전남대 산학협력단	2014.04.30	14/266482				
5	Anti-Angiogenic Agents and Anti-Obesity Substances Applied with Anti-Angiogenesis from Natural Products	미국				전남대 산학협력단	2014.06.17	US8,753,694 B2	
6	녹차씨앗으로부터 사포닌의 추출 방법	한국				전남대 산학협력단	2013.07.10	10-1289077	
7	녹차씨앗과피추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물	한국				전남대 산학협력단	2015.02.04	10-1492092	

다. 논문게재 및 학술회의 발표

(1) 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재3							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	HPLC fractionation and pharmacological assessment of green tea seed saponins for antimicrobial, anti-angiogenic, and hemolytic activities	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2016	Jong Deog KIM	21(1)	America	Springer	SCI (게제확정)
2	Anti-hyperlipidemic and Fat Pad Lowering Effect of Standardized Tea Seed Cake Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015	Jong Deog KIM	20(1)	America	Springer	SCI
3	Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway.	IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY 2014	Jong Deog KIM	36(3)	America	INFORMA HEALTHCARE	SCI
4	Theasaponin E1 as an effective ingredient for	BIOSCIENCE BIOTECHNOL	Jong Deog	78(2)	Japan	JAPAN SOC	SCI

	anti-angiogenesis and anti-obesity effects	OGY AND BIOCHEMISTRY 2014	KIM			BIOSCI BIOTECH N AGROCHEM	
5	Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats	JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS 2014	Jong Deog KIM	7(1)	America	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI
6	Fermented Pu-erh Tea Increases In Vitro Anticancer Activities in HT-29 Cells and Has Antiangiogenetic Effects on HUVECs.	JOURNAL OF ENVIRONMENT A L PATHOLOGY TOXICOLOGY A N D ONCOLOGY	Jong Deog KIM	32(4)	America	Begell House, Inc	SCI
7	Anti-angiogenesis and Anti-adipogenesis Effects of Anthrisci radix Extract	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2013	Jong Deog KIM	18(1)	America	Springer	SCI
8	Psoraleae semen extract inhibits angiogenesis and adipogenesis	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2013	Jong Deog KIM	18(5)	America	Springer	SCI
9	Motor Neuron Disease and Stem Cell Approach for Its Remediation	KSBB Journal	Jong Deog KIM	28(5)	한국	한국생물공학회	비 SCI
10	녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과	한국 식품과학회지	위지향	47(4)	한국	한국 식품 과학회	비 SCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.-본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
국제 1	ECO2013 Tea-seed saponin E1 as an effective inbredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis	Jong deog KIM	20130512	Liverpool	UK
2	ECO2014 European Congress on Obesity Bioactive components of Camellia sinensis fruit peel ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats	Jong deog KIM	20140528	Sofia	Bulgaria
3	ECO2014 Molecular mechanisms underlying the anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of saponin from Camellia sinensis in mice fed high-fat	Jong deog KIM	20140528	Sofia	Bulgaria

	and high-carbohydrate diet				
4	ECO2014 Tea saponin inhibits adipogenesis and induces lipolysis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes	Jong deog KIM	20140528	Sofia	Bulgaria
5	IBS2012, International Biotechnology Society Anti-Obesity Mechanism of Korean Natural Products Based on Anti-Angiogenesis	Jong deog KIM	20120916	Daegu	Korea
6	Asian Conference on Refrigeration and Air conditioning Thermophysical Properties in Freezing Process to Determine Optimal Freezing Conditions for preservation of Sporothalli of the Genus Porphyra seriata, Undaria pinnatifida, Sargassum fulvellum	Jong deog KIM	20140520	Jezu	Korea
국내 1	한국생물공학회 춘계학술발표회 Molecular Mechanism of Angiogenesis and Obesity with Camellia sinensis Fruit Peel Extract	Jong deog KIM	20150415	여수	대한민국
2	한국생물공학회 춘계학술발표회 Novel Anti-Angiogenic and Anti-Cell Ahesion Materials from Halophilic Enterobacteria of the Trachurus japonicus based on ORP system value	”	20150415	여수	”
3	한국생물공학회 춘계학술발표회 Mechanism of Immunomodulating Effect of Tea Seed Saponin on T-cell	”	20150415	여수	”
4	한국생물공학회 춘계학술발표회 High-fat and High-carbohydrate Lowering Effect in Mice with Tea Seed Cake Extract	”	20150415	여수	”
5	한국생 Anti-obesity Mechanism of Tea Seed Saponin with Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis물공학회 춘계학술발표회	”	20150415	여수	”
6	한국생물공학회 추계학술발표회 Tea-Seed Saponin as an Ameliorates Obesity Ingredient	”	20141005	창원	”
7	한국생물공학회 춘계학술발표회 Anti-hyperlipidemic and Fat pad Lowering Effect of Standardized Green tea (Camellia sinensis L.) Seed Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet	”	20140409	경주	”
8	한국생물공학회 춘계학술발표회 Immunomodulatory Effect of Tea Saponin in Immune T-cells and T-lymphoma Cells via Regulation of Th1, Th2 Immune Response and MAPK/ERC Signaling Pathway	”	20140409	경주	”
9	한국생물공학회 춘계학술발표회 Molecular Study of Tea Saponin against Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes and Adiposity in Rat	”	20140409	경주	”
10	한국생물공학회 춘계학술발표회 Tea Saponin Induces Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells Via TRAIL Dependent Apoptotic Pathway	”	20140409	경주	”
11	한국생물공학회 춘계학술발표회 Computational Analysis of AKT Family Proteins	”	20130410	광주	”
12	한국생물공학회 춘계학술발표회	”	20130410	광주	”

	Tea-Seed Saponin E1 as an Effective Ingredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis				
13	한국생물공학회 춘계학술발표회 Screening of Food Secondary Metabolites and Investigation of Biological Activity	”	20131016	부산	”
14	한국생물공학회 추계학술발표회 Inhibition of NF-κB by Tea Saponin induces AGS Stomach Cancer Cells Apoptosis through Modulation of mTOR and ERK Signaling Pathway	”	20131016	부산	”
15	한국생물공학회 추계학술발표회 Anti-angiogenesis, Anti-microbial and Hemolytic Properties of Bioactive Tea Seed Saponins	”	20131016	부산	”
16	한국생물공학회 추계학술발표회 Anti-Hyperlipidemic and Fat-Pad Lowering Effect of Camellia sinensis Fruit Peel Extract in High-Fat Diet Fed Rats	”	20131016	부산	”
17	한국생물공학회 추계학술발표회 Cytokine Gene Expression and Erk2/ p38 MAPK Signaling in T-Lymphocytes and T-Lymphoma in Response to Adjuvanticity Effect of TheaSaponin E1	”	20131016	부산	”
18	한국생물공학회 추계학술발표회 Chemo Preventive Effect of Green Tea Fruit Peel Extract: Screening of Bioactive Compounds Based on Angiogenesis Assay	”	20131016	부산	”
19	한국생물공학회 추계학술발표회 Composition for Anti-Angiogenesis containing Tea-Saponin E 1 as an Effective Ingredient	”	20120919	대구	”

라. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

마. 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도

바. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용창출	R&D 기여율
1	녹차씨앗추출물(사포닌)	녹차씨앗 사포닌 추출물	명인 신광수차	예정	-	-	-	50%

사. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구 분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

아. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			2	1	5		8					7	1

자. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

차. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자

(2) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도

(3) 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역

카. 기타

(1) 국제화 협력성과

국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공

(2) 타 연구개발사업에의 활용

타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도

(3) 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관

<첨부> 특허, 논문 및 연구과정에서 도출된 각종 자료집/보고서

1. 개별인정신청서

2. 특허, 논문 및 학술발표 증빙서

기능성원료 인정 신청을 위한

제 출 자 료

1. 제출자료의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

(□최초, □변경[1])

회 사 명		명인 신광수차 (대표이사 : 신 광 수)			
영업허가(신고번호)		제조업☑	19950509290	수입업□	
주소 및 연락처		* 전남 순천시 승주읍 수주괴목 2길 25 * (연락처) 061-754-5235 (팩스) 061-754-6165			
		담당자	(이름) 박주현 (연락처)		
신청 원료명		**녹차씨추출물**			
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 ☑	신청 기능성	체지방 감소	
			신청 섭취량	당해 원료로 2,000mg/day	
		·기능성 추가 □ ·섭취량 변경 □ ·제조방법 변경 □ ·기준규격 변경 □ ·시험방법 변경 □	(변경 전) (변경 후)		
	고시된 원료	·기능성 추가 □ ·섭취량 변경 □ ·제조방법 변경 □ ·기준규격 변경 □ ·시험방법 변경 □	(변경 전) (변경 후)		
국내제조 □ 수입 □		수입인 경우	수리번호		수출국
			제조회사		
			소재지		
모둠토의 ☑		실시 날짜 : 2014.04.22. / 2015.06.30. (방문상담)			
품목설명회 □		희망 날짜 :			

1) **(최초)** 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료 **(변경)** 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		☑ 예 □ 아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내 · 외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	☑국내 □국외		
2.2	개발경위	☑국내 □국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	☑국내 ☑국외		
2.4	국내·외 사용 현황	☑국내 ☑국외		
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	☑ 예 □ 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	☑ 예 □ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	☑ 예 (모두, 일부) □ 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	☑ 예 □ 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	☑ 예 □ 아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	☑ 예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	☑ 예 □ 아니오 □ 기능성분 ☑ 지표성분		
4.3	영양성분정보자료	☑ 예 □ 아니오	그림1	
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	☑ 예 □ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	☑ 예 □ 아니오	그림2	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도,구조동정,유효기간 등 정보 추가)	☑ 예 □ 아니오 ☑ 시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	☑ 예 □ 아니오 □ 공인 시험방법 ☑ 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)	추가함		

연번	제출자료		제출여부	첨부번호
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료				
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거		☑ 예 ☐ 아니오	그림3
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함		☑ 예 ☐ 아니오	그림4
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료		☑ 예 ☐ 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)		☑ 예 ☐ 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함		☑ 예 ☐ 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법		☑ 예 ☐ 아니오	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : 나)				
7.1	섭취근거 정보		☑ 예 ☐ 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보		☑ 예 ☐ 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보		☑ 예 ☐ 아니오	
7.4	영양평가, 생물학적유용성, 인체적용시험 정보		☑ 예 ☐ 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	☑ 예 ☐ 아니오	GLP급 별첨1
		3개월 반복투여독성시험	☐ 예 ☐ 아니오	N/A
		유전독성시험	☑ 예 ☐ 아니오	GLP급 별첨2
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	☐ 예 ☐ 아니오	N/A
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료				
8.1	시험관시험	☑ 신청원료 (논문 2편) * 시험기관 : 전남대학교, 전남식품산업연구센터 (그림 5)		
		☑ 유사원료 (논문 1편) : 녹차씨 오일		
8.2	동물시험	☑ 신청원료 (논문 1편) * 시험기관 : 전남대학교		
		☑ 유사원료 (논문 1편) : 녹차씨 오일		
8.3	인체적용시험	☑ 신청원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 : 전북대학교 기능성식품임상시험지원센터		그림 6,7 별첨 3,4
		☑ 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 9 편)		
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료				
9.1	섭취량 및 근거		☑ 예 ☐ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거		☑ 예 ☐ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거		☑ 예 ☐ 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료				
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부		☑ 예 ☐ 아니오	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부		☑ 예 ☐ 아니오	

□ 전체 내용 요약

<table>
<tr><th>항 목</th><th colspan="2">주요 내용</th></tr>
<tr><td>1. 원료명</td><td colspan="2">녹차씨 추출물</td></tr>
<tr><td>2. 원재료</td><td colspan="2">녹차씨 (학명: Camellia sinensis L. 사용부위 : 녹차나무의 종자)</td></tr>
<tr><td>3.기능
(지표)성분</td><td colspan="2">지표성분 : 나린제닌(naringenin)</td></tr>
<tr><td>4. 제조
공정</td><td colspan="2">◦ 원료(녹차씨 압착박 1.3~1.9mg/g) → 물 추출 → 여과(0.1~0.2mg/g) → 농축(1.0~1.4mg/g) → 건조(4.4~6.6%) → “녹차씨추출물”
◦ 총 수율: 녹차씨추출물(18%)</td></tr>
<tr><td rowspan="3">5. 규격 및
시험방법</td><td colspan="2">1) 성상 : 갈색의 분말
2) 지표성분 : 나린제닌(naringenin) 4.4~6.6mg/g
3) 납(mg/kg) : 1.0 이하
4) 총비소(mg/kg) : 1.0 이하
5) 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하
7) 대장균군 : 불검출</td></tr>
<tr><td>기능(지표)
성분 시험법</td><td>자사시험방법
<주요 기기분석 조건>
▫ Instrument: HPLC system
▫ Detecter: UV DAD detector (280 nm)
▫ Column: Atlantis C_{18}(4.6mm×150 mm, 3 ㎛)
▫ Column oven: 30 ℃
▫ Injection vol.: 20 μL
▫ Flow rate: 1.0 mL/min
▫ Mobile phase: A, 10% MeCN in 0.1% TFA , B, 50% MeCN in 0.1% TFA</td></tr>
<tr><td>규격외
(잔류농약)</td><td>「식품공전」에서 농약잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 원료로,「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」제 7조 에서 정하는 잔류농약 59종 검사 결과 비검출 됨</td></tr>
<tr><td rowspan="2">6. 안전성</td><td>의사결정도</td><td>차나무의 잎, 줄기, 꽃과 함께 차나무의 가용 부위로 식품원재료 데이터베이스에 등록되어 있으며, 국가생물종지식정보시스템 및 문헌 등에 의한 섭취기록이 있는 녹차씨의 압착박을 추출한 것으로 의사결정도 “나”에 해당</td></tr>
<tr><td>섭취 근거</td><td><인정현황>
◦ 국내·외 : 없음
<사용현황>
◦ 국내 : 녹차씨는 식품원재료 DB 검색 결과 차나무의 식용가능부위로 잎, 꽃, 줄기와 함께 등재되어 있음. 또한, 옛 문헌(출처,동의보감) 에 의하면 차씨는 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있어 민간요법이나 한방 치료적으로 사용되어져</td></tr>
</table>

		왔음. ◦ 국외에서는 식용 오일로 시판 중임.
	안전성 정보	◦ 안전성 정보 DB - 녹차씨추출물에 대한 직접적 독성자료는 전무하나, 녹차씨 유래 사포닌에 대한 독성자료 1건 및 유사 시료인 녹차 및 녹차 카테킨에 대한 자료 2건이 검색 됨. - PubMed, Toxline, Drug Digest. The Longwood herbal Task Force, Drug Digest 등의 검색결과, 안전성 관련 자료 검색결과 녹차씨에 대한 심한 독성이나 부작용은 없음. ◦ 섭취시 주의사항으로 칼슘길항제와 병용 투여시 주의 : 칼슘채널 차단제 복용자는 나린제닌이 다량 함유된 과일 또는 과일주스(자몽 또는 자몽주스)와 본 시료(녹차씨추출물)을 동시에 복용하는 것을 주의해야 함.
	섭취량 평가	**◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 2,000mg/일** - 최대안전섭취량 녹차씨 유래 사포닌의 NOAEL 1,500mg/일 (신청원료 녹차씨 추출물로 환산시 15,000mg/일 • 녹차씨 오일의 약용 목적 섭취량 : 1ts(5ml)/일 (녹차씨 원료로 32g) • 본 원료(녹차씨추출물)의 지표물질 나린제닌의 섭취량 : 국외 전임상 논문에서 섭취량 평가시 5-6weeks wistar rats 25mg/kg/일 BW, 7weeks C57BL6J mice에서 100mg/kg/day 으로 임상 용량으로 환산시 각각 나린제닌 243.2mg/day, 486mg/kg/day 에 해당하며, 이는 녹차씨추출물(신청원료)로 환산시 44.2g/day, 88.36mg/kg/day 에 해당함. • 유사원료(녹차추출물, 고시형) 1일섭취량 : 카테킨으로써 0.3~1g/일 • 유사원료의 사용량 (건강기능식품) : 840~900mg/일 • 녹차씨 압착박 원물로 환산시, 11.1g/일에 해당 • 녹차 성인 1일평균섭취량: 23±5.5g(2013 국민건강영양조사) ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배 이내이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임
	인체적용시험	심각한 이상반응은 확인되지 않음 (2g/일 섭취 기준)
	독성 시험	◦ 의사결정도 결과 “나”로 별도의 독성시험이 불필요하나 단회투여독성 및 유전독성시험 실시 결과 독성이 발견되지 않았음. ◦ 본 시료로 진행된 전임상 동물실험 결과 특별한 독성이 발견되지 않았음.
	기타 사항	
	섭취시 주의사항	◦ 칼슘 길항제와 병용 투여시 칼슘 길항제의 생체이용율을 높일 수 있으므로 칼슘 길항제 투여자는 해당원료와 자몽 혹은 자몽주스를 동시에 병용하지 않도록 주의 *[근거]* Brantley SJ, Argikar AA, Lin YS, Nagar S, Paine MF. Herb-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions. *Drug Metab Dispos.* 2014 Mar;42(3);301-17.

7. 기능성	신청 기능성	체지방감소
	신청 일일 섭취량	녹차씨추출물로써 2g/일

시험관시험

시험물질	실험계	관련지표	결과	비고
녹차씨 열수 추출물 (해당시료)	3T3-L1 preadipocytes 세포	지방세포 분화	지방세포 분화 억제 분화된 지방세포 내 중성지방 생성/축적 억제	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015 vol 22 게재
녹차씨 열수 추출물 (해당시료)	3T3-L1 preadipocytes 세포	cell viability, 세포내 TG함량 및 Free glycerol	지방세포 분화 억제 및 TG 축적량 감소 배지 glycorol 양 증가 AMPK, ACC인산화 증가 및 FAS 발현 감소	Korean Society of Food Science and Technology 게재확정
녹차씨 오일 (유사시료)	3T3-L1 preadipocytes 세포	adipocyte 분화, 세포내 TG 농도, PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA	adipocyte 분화 저해 TG 농도의존적 감소 및 대조군 대비 PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA 발현 2-3배 억제	Pflugers Arch - Eur J Physiol 2008 vol 457

동물시험

시험물질	실험동물/모델	섭취량/섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차씨 열수 추출물 (해당시료)	8주령/ICR/Fn=6/group 고지방식이 비만유도 모델	100, 300 및 후처리 300 mg/kg /day. 10주/경구투여	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)	• B.W gain, Fat mass, TC, TG, LDL, leptin, IL-6, TNF-a, glucose, insulin, ALT, AST 수치가 고지방식이 대조군에 비해 100mg/kg 에서 감소 경향, 300mg/kg , 및 후처리 300mg/kg에서 유의적 감소 ($p<0.05$) • Adiponectin, HDL level 이 고지방식이 대조군에 비해 100mg/kg < 에서 농도 의존	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015 vol 22 게재

					적으로 유의적 증가 (p<0.05)	
	“	8주령/ICR/Fn=6/group 고탄수화물 식이 비만 유도 모델	100, 300 mg/kg /day. 10주/경구 투여	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)	• B.W gain, Fat mass, TC, TG, LDL, leptin, IL-6, TNF-a, glucose, insulin, ALT, AST 수치가 고지방식이 대조군에 비해 100mg /kg 에서 감소 경향, 300mg/kg 및 후처리 300mg/kg에서 유의적 감소 (p<0.05) • Adiponectin, HDL level 이 고지방식이 대조군에 비해 100mg /kg < 에서 농도 의존적 으로 유의적 증가 (p<0.05)	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015 vol 22 게재
	녹차씨 오일 (유사 시료)	C57BL/6J 녹차씨 오일 30% 식이	녹차씨 오일 30% 식이 (150g/kg food)	TC, LDL, HDL, TG, glucose, 알라닌 전이효소	• GT 군에서 체중증가량, 복부지방량, TC, LDL, TG, ALT 가 S군 대비 유의적으로 감소 • GT군의 adipose 조직에서 PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA의 발현이 유의적으로 억제	Pflugers Arch – Eur J Physiol. 2008 vol 457

		시험 물질	디자인	대상자	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과
	인체적용시험	녹차씨 추출물 (해당 시료)	RCT	19-65세 BMI 25~30 n=60	2,000mg /day 10주	1차: 체지방량 및 체지방률 2차: 체중, BMI, WHR, 혈중지질(TC,TG, HDL, LDL, FFA, 및 adiponectin	허리둘레, WHR, 왼쪽팔둘레 전후 유효성(*p<0.05*)
	기타 사항	-					

2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

2.1. 기원

▮ 차의 기원에는 여러 설이 있으나, 문헌적으로 보면 BC 59년(출처, 중국전한시대 「동약」)부터 사용되어 왔고, 우리나라에서의 차가 보급된 시기는 약 1,100년 전인 삼국시대 말기(출처, 「삼국사기」제 10권 「흥덕왕」편, 흥덕왕 3년인 828년) 중국으로부터 불교문화가 도입 되면서 부터 차의 형태로 널리 음용되었으나 조선시대 억불정책으로 점차 쇠퇴하였음[1]. 본 신청 원료인 녹차씨는 중국에서는 차씨로부터 기름을 추출하여 황실의 최고급 요리에 사용하였으나, 우리나라의 경우는 최근 화장품의 원료에 일부 이용되고 있을 뿐 그 사용 용도가 아직은 미미 함.

▮ 차나무의 열매는 다자(茶子, 본초강목) 혹은 다실(茶實, 속명가방선)이라 기록되어 있음.

▮ 옛 문헌(출처, 동의보감) 에 의하면 차씨는 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있고, 의방적요(醫方摘要)에 의하면 머리에서 벌레가 우는 것처럼 소리가 나는 증세에 다자(茶子)를 가루내어 콧속에 불어넣으면 효과가 있다고 기록되어 있어 민간요법이나 한방 치료적으로 사용한 것을 알 수 있음.

▮ <원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	녹차씨	녹차씨열수추출물	비고(참고)
학명	*Camellia sinensis*(L)	*Camellia sinensis* seed	
원산지	전남 순천	전남 순천	
사용부위	녹차나무의 종자	**녹차씨열수추출물**	종자유 채유 후 부산물
채취시기	9월 ~12월 중순		

2.2. 개발경위

▮ 녹차나무 (*Camellia sinensis* L.)는 다년생 상록 관목수로 북위 35° 이하 지방에서 주로 재배되어 차 잎을 수확한 후 가공되어 약용의 목적으로 널리 음용되어 왔으며, 건강 및 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 국내 재배면적도 2002년에 1830ha로 생산량은 1395M/T 로 계속 증가 추세에 있음.

▮ 옛 문헌에 의하면 차씨는 중국에서는 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창,

칼, 화살에 맞은 상처 치유등에 효과가 있어 민간요법이나 한방 치료적으로 사용하여 왔으나, 우리나라에서는 최근 화장품의 원료로 일부 사용되고 있을 뿐 녹차 수확이 끝난 후 거의 폐기되고 있는 실정이어서 녹차씨를 원료로 기능성 제품을 개발시 녹차 씨 산업에 기폭제 역할을 할 수 있을 거라 생각됨.

▮ 또한 녹차씨앗에는 탄수화물 42.6%, 조지방 34.54%, 조단백질 18.0%, 수분 3.36% 회분 1.51% 식이섬유 8.73% 뿐만 아니라 양질의 지방, 특히, 불용성 식이섬유소 3.73%, 수용성 식이섬유소 5.0%, 사포닌 등 각종 천연화학성분들이 풍부하게 함유되어 있어 식품 또는 건강기능식품으로 개발 가능성을 추측할 수 있음.

▮ 특히 본 원료는 전남지역에서 집중적으로 생산되는 야생녹차의 종자로 녹차의 항비만, 항산화, 항암, 항고혈압[4,14-17] 등 기능성에 대한 보고들이 많고, 또 녹차추출물이 체지방개선 고시용 건강기능식품 으로 등재되어 있는 바, 개발의 접근성이 용이하며, 실제 자체 실험을 통하여 녹차씨 박 열수추출물로 항비만 등에 대한 그 효능이 확인되어 녹차씨 박을 이용하여 경제성이 높고 차별화 된 메카니즘을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발하고자 시작하게 되었음.

2.3. 국내·외 인정·허가 현황

2.3.1. 국내

▮ 원재료 "녹차씨"는 식품원재로 DB검색결과 "차나무(식용가능부위)"로 등재되어 있고, 식용가능 부위에 녹차씨가 포함되어 있어 식품원료로 사용 가능.

원재료명		차나무
이명		녹차나무(Green Tea), 다목, Tea, 다엽
학명		*Camellia sinensis* L. *Thea sinensis* L.(이명)
생약명		다실(茶實)-열매, 산차아목(山茶亞木), 산차과(山茶科), 차속(茶屬)
식용가능 여부	가능	잎 / 꽃 / 줄기 / 씨
	제한적	
	불가능	
원재료 분류		식물

이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2 3

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

▮ 녹차씨는 국가생물종지식정보시스템 (http://www.nature.go.kr) 에 '차나무' 의 이용방안 중 '다자'로 기재되어 약용으로 사용된 기록이 있음.

▶ 어린 눈과 잎은 녹차, 홍차를 만드는데 사용하고 열매로는 기름을 짠다. ▶ 목재는 단추 만드는데 .....(중략)..... ⑶茶子(다자) - ①성분 : 종자에는 saponin이 함유되어 있으며, 어린 싹에는 theanine이 함유되어 있다. ②약효 : 喘息咳嗽(천식해수-호습이 促迫(촉박)한 咳嗽(해수))를 치료한다. 祛痰(거담)의 효능이 있다.

▮ 녹차씨는 중국에서는 천식이나 뇌명, 만성위장약, 산후회복, 수술 후와 창, 칼, 화살에 맞은 상처 치유 등에 효과가 있어 민간요법이나 한방 치료적으로 사용하여 왔음. 그러나 우리나라에서는 최근 녹차씨를 압착하여 그 기름을 섭취하거나 화장품의 원료로 일부 사용하고 있을 뿐 녹차 수확이 끝난 후 거의 폐기되고 있는 실정임.

▮ 녹차는 녹차의 물 또는 주정 추출물은 현재 국내외에서 식품의 원료로 널리 사용되고 있으며, 산화방지제의 용도로 식품첨가물로도 허용되어 있음. 또한 차에서 추출한 카테킨(함량: 70~110%)은 **"차 카테킨"으로 식품첨가물(#190) 로 허용**되어 있음.

▮ 녹차 추출물의 카테킨의 경우 체지방감소, TEAVIGO(고순도 녹차 EGCG 90%이상)은 항산화 및 체지방 감소 고시형 기능성원료로, (녹차추출물: 식약처 건강기능식품 기능성원료, 2013, 식품의약품안전청, 제조 시 유의 사항: 카페인 함량이 50,000㎎/㎏ 이하이어야 함), 혈중 콜레스테롤개선으로 개별인정형 원료로 등재되어 있음. 그러나 녹차씨/**녹차씨박 추출물로 인정된 바는 없고 사용 또한 매우 미미함.**

▮ 유사원료 "녹차추출물" 건강기능식품 기능성원료로 인정

원재료명	인정번호	기능성 내용	일일 섭취량	비고(참고)
녹차추출물	제2013-15호 ('13.06.25) ((주)아모레퍼시픽)	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	카테킨으로써 0.3~1 g	(생리활성기능 2등급)

녹차추출물	제2008-62호	항산화 작용	카테킨으로써 0.3~1 g	2010년 고시형 전환
녹차추출물 (8건)	제 2010-34,49,61호 제 2011-4,5,8,9,18	체지방 감소	카테킨으로써 0.3~0.5 g	2012년 고시형 전환
녹차추출물/ 테아닌 복합물	제2010-51호 ('10.12.01) ((주)엘지 생활건강)	성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체에서의 확인이 필요함	녹차추출물 /테아닌 복합물로써 1680mg	(생리활성기능 3등급)
TREVIGO (고순도 녹차 EGCG 90%)	제 2008-62 호	항산화 작용	EGCG로써 300-330 mg	2010년, 고시형 전환

2.3.2. 국외

▮ 녹차씨추출물은 외국에서는 주로 화장품, 향료의 원료(CTFA)로 사용되고 있으며, 일부 식품, 계면활성제, 또는 살충제의 원료로 사용되고는 있으나, 매우 소량이며, 특별히 제기된 부작용이나 독성은 없음.

: 출처,http://www.thegoodscentscompany.com/data/ex1602091.html

2.4. 국내·외 사용 현황

2.4.1. 국내

▮ 국내에서 차나무는 대부분 녹차 가공품 또는 녹차추출물 형태로 이용되고 있음.

▮ 녹차씨는 주로 오일의 형태로 식용으로 이용하거나 화장품의 원료로 사용 됨

▮ 또한, 녹차씨를 설탕과 함께 발효하여 효소나 식초에 사용하고, 일부 건강 기능식품에서 녹차추출물과 함께 사용되고 있으나 아직은 미미한 실정임.

<식품>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취 용도	유통량	기타
	메타 그린	아모레 퍼시픽	성인 기준 1일 3정	녹차추출물 : 항산화, 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음 비타민 C : 유해 산소로부터 세포를 보호하는데 필요	- 임신부, 수유부, 질병치료중,알레르기,특이체질인 경우 의사와 상담 - 카페인 함유(초조, 불면 유발가능)	식품 (건강 기능 식품)	2013년 기준 270억	
	녹차씨 발효액	다오티 푸드영 농조합 법인	1회 1컵 1일 2회	녹차씨, 설탕	- 공복에 섭취	일반 식품		
	녹차씨 식초	다오티 푸드영 농조합 법인	1회 1컵 1일 2회	녹차씨, 설탕	- 공복에 섭취	일반 식품		

<비식품>

제품사진	제품명	제조사	구분	제조(판매)국	성분
	벨라지오 녹차	모나리자	물티슈	중국(한국)	티트리오일 녹차씨오일
	순샘 허브녹차	애경	주방세제	한국(한국)	보성 녹차씨 사포닌 성분 함유
	그린티씨드 트리트먼트 오일	아모레 퍼시픽	화장품 (오일)	아모레퍼시픽	녹차씨오일 100%

	그린티 라인	이니스프리	세럼, 크림, 오일	한국(한국)	녹차씨 오일성분 30%
	그린티	시크릿키	화장품	한국(한국)	녹차수, 녹차추출물, 녹차씨 오일

2.4.2. 국외

상품	상품명	용도	제조(판매)국	성분
	ARETTE GREEN TEA SEED OIL INFUSED WITH ROSEMARY & SENCHA GREEN TEA	식품	미국(미국)	녹차씨오일 로즈마리
	Mariedean Green Tea Seed Oil Ultra-Nourishing Moisturizer	화장품	미국(미국)	정제수 쿠푸아수버터 녹차씨오일
	엘리자베스 아덴 그린티	향수, 바디로션, 스크럽 등	미국(미국)	녹차씨오일

2.4.3. 특허출원/등록 현황

번호	특허명	등록번호 /공개번호	출원인
1	녹차씨 껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 또는 항염 활성을 갖는 화장료 조성물 (Cosmetic composition comprising green tea seed coater extract having anti-oxidative or anti-inflammatory activity)	1007554270000	인제대학교 산학협력단
2	탈지된 녹차씨추출물을 유효성분으로 포함하는 항염 또는 항암 조성물 (Composition comprising defatted green tea seed extract for preventing and treating inflammatory or cancer disease)	1011524790000	인제대학교 산학협력단
3	녹차씨추출물을 이용한 탈취제 및 그 제조방법 (DEODORIZER USING GREEN TEA SEED AND METHOD FOR PREPARATION THEREOF)	10100747640000	최하영
4	항산화 및 항염 활성을 갖는 녹차씨 껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물 (Composition comprising an extract of Green tea seed coat showing anti-oxidative and anti-inflammatory activity)	1007713990000	인제대학교 산학협력단
5	녹차씨추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 (A composition comprising an extract of green tea seed for treating and preventing thrombus involved diseases)	1008907750000	인제대학교 산학협력단
6	피부 탄력 증진 효과를 갖는 녹차씨 오일을 함유하는 화장료 조성물 (Cosmetic Composition comprising green tea seed oil forenhancing skin elasticity.)	1007554270000	주식회사 생그린 / 주식회사 바이오랜드
7	발아 녹차씨 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물 (Skin external composition comprising germinated Camellia sinensis seed extract)	1020130115482	㈜아모레 퍼시픽
8	콜레스테롤 저하 또는 항산화 활성을 갖는 녹차씨유를 포함하는 조성물 (Composition comprising the seed oil of Green Teahaving Cholesterol-lowering or antioxidant activity)	1006400940000	학교법인 인제학원
9	녹차씨에서 유래한 알레르기성 천식 완화용 조성물 (The composition for allergic asthma mitigation extracted from tea seed)	1020140092947	한림대학교 산학협력단 / (주)에이지아이

3. 제조방법 및 그에 관한 자료

3.1. 원재료

▮ 녹차씨압착박

매년 9~12월 중순에 전남 순천 조계산 일대에서 채취한 녹차씨를 수세-건조-볶음-착유 과정을 거친 후, 남은 부산물.

▮ 과피함량 : 과육 양 대비 10% 이내

▮ 보관온도 : -5℃, 2년까지 보관

▮ 연 수급능력 : 5t/년

3.1.1. 원재료 조성비

성분	함량(%)	성분		함량(%)
수분	1.26	탄수화물		77.69
회분	8.37	(당류)		10.15
조단백	11.29	지표 물질	Naringenin	0.55
조지방	1.39			

3.2. 개요

▮ 9-12월 중순에 채취한 녹차씨를 수세-건조-볶음-착유 과정을 거친 후, 부산물로 남은 녹차씨 박에 5배수의 물을 가하여 90℃에서 1-2시간 추출, 55 ㎛ 필터로 여과함. 여과한 추출물을 80℃에서 16~18 Brix 로 농축하여 얻은 농축액을 동결 건조하여 분말 원료를 얻음.

3.3. 제조공정표

지표물질 : 나린제닌으로써 5.5 mg/g

① 제조공정	② 공정, 식품, 식품첨가물	③기능/지표성분 함량변화(mg/g)	④수율(kg)
		Naringenin	
1) 녹차씨	세척		
↓			
2) 외피, 과피, 중피의 제거	일광건조-외피제거 90%< 중피제거-골분쇄기		
↓			
3) 녹차씨 종자	과육분리-풍구		
↓			

4) 볶음	110℃, 10분		
↓			
5) 압착 착유	600~650 kg/cm^2, 10~15분		- 녹차씨유100 L, - 압착박 420 kg
↓			
6) 원재료	**녹차씨 압착박**	**1.3~1.9**	**100**
↓			
7) 추출	95℃ 물, 2시간		
↓			
8) 여과	55 ㎛ filter	0.1~0.2	900~1200 (L)
↓			
9) 농축	원심박막농축기, (80℃)	1.0~1.4	80~120 (L)
↓			
10) 건조	동결건조		
↓			
원료	**녹차씨추출물분말**	**4.4~6.6**	**14~22**

▮ 단계별 세부 공정

- Step 1. 녹차씨를 수확
- Step 2. 일광 건조, 골분쇄기, 풍구 등을 이용한 외피, 중피, 과피를 제거
  (약 90%정도의 중피, 과피가 제거 되고 약 10%정도는 종자에 혼입)
- Step 3. 녹차종자를 110℃, 10분 동안 타지 않도록 주의하며 솥에서 볶음
- Step 4. 600~650 kg/cm^{2}에서 10~15분 압착하여 착유
- Step 5. 녹차씨에 함유된 기름을 제거한 **압착박을 원재료로 준비**
- Step 6. 추출기에 원재료 투입
- Step 7. 추출기에 녹차씨 압착박 원재료의 약 10배에 해당하는 물을 첨가한 후 95℃에서 2시간동안 순환펌프를 사용하여 물을 순환시키면서 추출
- Step 8. 추출물을 분리하여 여과 (55 ㎛ 필터 사용)
- Step 9. 농축 (농축기로 약 20 brix까지 농축)
- Step 10. 동결건조 후 분말화

4. 원료의 특성에 관한 자료

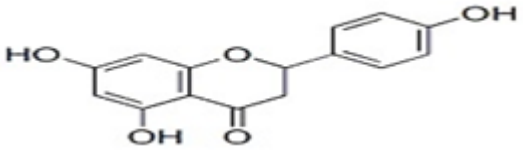
4.1. 원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등

4.1.1. 원료의 개요

○ 성상 : 녹차씨 압착박 열수 추출 분말로 이미, 이취가 없는 갈색의 분말

항목	관련사항	분석방법
제품명	녹차씨 압착박 열수 추출 분말	
제품형태	갈색의 분말	
안정성 관련 지표	color, naringenin	HPLC
지표물질 선정 안	naringenin	HPLC

○ 물성

일반명	naringenin
구조	
분자식	$C_{15}H_{12}O_5$
분자량	272.3
CAS No.	67604-48-2
녹는점	

4.2. 지표성분(또는 기능성분) 및 근거

▮ 지표성분 : 나린제닌(naringenin) 5.5mg/g의 80~120%인 4.4~6.6mg/g

▮ 나린제닌(naringenin) 은 항산화(antioxidant) 활성을 가진 flavonoid 구조로, 녹차씨 추출물 중에 naringenin이 함유되어 있다고[12] 알려져 있으며, 비만(antiobesity), 항염 (anti-inflammatory), 항당뇨(antidiabetic), 항암 (antitumor) 효과를 가진다고 보고되어 있음[2-4]. 특히, 항암효과는 본 시료의 체지방 감소 메카니즘인 apoptosis, antiangiogenesis 등에 의한 항암 효과가 보고되어 있으며, 항비만 관련 다수의 과학적 근거자료가 존재하고[7-11]. 미량으로도 관리가 가능하여 이를 지표 성분으로 설정함.

▮ 관련자료

출 처	내 용	비 고
Nutr Cancer. 2012;64(5):714-24	Swiss albino mice tumor bearing 모델에서 VEGF 를 downregulation 하여 angioinhibitory 및 antitumor 효과를 나타냄,	참문[2)]
Cancer Metastasis Rev. 2012 Jun;31(1-2):323-51	naringenin을 포함한 플라보노이드는 암세포에 대해 In vitro에서 anti-invasive activity를 In vivo에서 anti-metastatic 활성를 가짐.	참문[3)]
Int Immunopharmacol. 2011 Mar;11(3):295-309	나린제닌등 식품 속에 포함되어 있는 방향성 케톤체인 chalcones 은 inflammatory pathways, tumorigenesis 및 immune system 에 영향을 미침.	참문[4)]
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov 7;454(1):95-10	나린제닌을 매일 섭취하는 것은 비만 관련 질환의 예방에 효과가 있음	참문[7)]
Nutr Metab (Lond). 2015 Jan 13;12:1	난소절제 mice 모델에서 나린제닌을 식이 섭취시 대사장애를 완화함	참문[8)]

4.3. 영양성분정보자료

▮ 영양성분 분석 결과 : 시험기관 성적서 [그림 1]

[검사기관명: 전남식품산업연구센터]

성분	함량(%)	성분		함량(%)
수분	1.26	탄수화물		77.69
회분	8.37	(당류)		10.15
조단백	11.29	지표 물질	Naringenin	0.55
조지방	1.39			

■ 영양성분 분석 성적서 [그림 1]

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 | 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 | 전남식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1312-057 접수번호 : 1312-02-063

제 품 명	녹차씨 박 추출물			접수년월일	2013.12.26
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2013.12.30
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)식품산업연구원	업체대표자	신현경	의 뢰 인	위지향
유통기한	-	제조일자	-	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
열량	-(kcal/100g)	368.43	-
수분	-(g/100g)	1.26	-
회분	-(g/100g)	8.37	-
조지방	-(g/100g)	1.39	-
조단백	-(g/100g)	11.29	-
탄수화물	-(g/100g)	77.69	-
당류	-(g/100g)	10.15	-
성상	-	고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없었음	-

판정 : - 검사자 : 김숙정, 신지선

책임자 : 윤수경, 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2013년 12월 30일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

5.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

5.1.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격

▮ Naringenin: 5.5 mg/g의 80~120% 범위인 4.4~6.6 mg/g.

5.1.2. 설정근거

▮ 나린제닌(naringenin) 은 항산화(antioxidant) 활성을 가진 flavonoid 구조로, 녹차씨 추출물 중에 naringenin이 함유되어 있다고[12] 알려져 있으며, 비만(antiobesity), 항염 (anti-inflammatory), 항당뇨(antidiabetic), 항암 (antitumor) 효과를 가진다고 보고되어 있음[2-4]. 특히, 항암효과는 본 시료의 체지방 감소 메카니즘인 apoptosis, antiangiogenesis 등에 의한 항암 효과가 보고되어 있으며, 항비만 관련 다수의 과학적 근거자료가 존재하고[7-11]. 미량으로도 관리가 가능하여 이를 지표성분으로 설정함.

▮ 지표성분 규격에 대한 시험기관 성적서 [그림 2] (단위 : mg/g)

[검사기관명 : 전남식품산업식품연구원]

Lot No. 반복수	1 (Lot 1)	2 (Lot 2)	3 (Lot 3)	평균
1반복	5.8110	5.2818	5.3274	
2반복	5.8650	5.3549	5.2353	
3반복	5.7934	5.2595	5.3554	
평균	5.8231	5.2987	5.3060	5.4760

5.2. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보

○ 나린제닌(Naringenin)

■ 시판되는 표준품	표준품명	Naringenin
	제조·판매회사명	Sigma
	구조식	$C_{15}H_{12}O_5$
	CAS No.	67604-48-2

■ 지표성분 규격 성적서 [그림 2]

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 전남식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1403-001 접수번호 : 1402-02-057

제 품 명	녹차씨 추출물 Lot.1			접수년월일	2014.02.17
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2014.02.25
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)식품산업연구원	업체대표자	신현경	의 뢰 인	위지향
유통기한	-	제조일자	2014.02.14	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0554	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0095	-
총비소	-(mg/kg)	0.0086	-
총수은	-(mg/kg)	0.0037	-
대장균군	-	음성	-
Naringenin	-(mg/g)	5.8231	

판정 : - 검사자 : 소선녀, 송현우

책임자 : 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 03월 05일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 | 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 | 전남식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1403-002 접수번호 : 1402-02-058

제 품 명	녹차씨 추출물 Lot.2			접수년월일	2014.02.17
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2014.02.25
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)식품산업연구원	업체대표자	신현경	의 뢰 인	위지향
유통기한	-	제조일자	2014.02.14	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0566	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0106	-
총비소	-(mg/kg)	0.0133	-
총수은	-(mg/kg)	0.0020	-
대장균군	-	음성	-
Naringenin	-(mg/g)	5.2987	

판정 : - 검사자 : 소선녀, 송현우

책임자 : 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 03월 05일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 | 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 | 전남식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1403-003 접수번호 : 1402-02-059

제 품 명	녹차씨 추출물 Lot.3			접수년월일	2014.02.17
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2014.02.25
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)식품산업연구원	업체대표자	신현경	의 뢰 인	위지향
유통기한	-	제조일자	2014.02.14	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0509	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0126	-
총비소	-(mg/kg)	0.0217	-
총수은	-(mg/kg)	0.0030	-
대장균군	-	음성	-
Naringenin	-(mg/g)	5.3060	

판정 : - 검사자 : 소선녀, 송현우

책임자 : 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 03월 05일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

5.3. 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

□ 공인시험방법	출처:
□ 자사시험방법	□ 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료 제출 여부

<시험방법>

5.3.1. 장비와 재료

▮ 분석장비

① HPLC system

② UV DAD detector (280 nm)

③ Atlantis C18 (4.6 mm×150 mm, 3 ㎛)

▮ 시약 및 시액

① Naringenin: Sigma, N5893, 95%

② Novozym 33095: Novozymes

③ Pectinex Ultra SP-L: Novozymes

④ Acetate buffer (pH 5.0)

⑤ Eethanol: B&J, 4L, AH230-4

⑥ Aetonotrile: B&J, 4L, AH015-4

⑦ Trifluoroacetic acid (TFA): Samchun, 100 mL

▮ 표준용액의 조제

표준물질 Naringnin 10 mg을 정밀히 달아 MeOH 10 mL (1000 ug/mL)에 녹인 후 MeOH로 희석하여 working solution으로 사용한다.

▮시험용액의 조제

녹차씨 박 추출물 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 Sodium acetate buffer 1 mL, Novozym 33095, Pectinex Ultra SP-L을 각각 1 mL를 첨가하여 Incubator(37℃, 150 rpm)에서 24시간 효소 가수분해 한다. 가수분해가 종료된 용액 200 μL를 Ethanol 800 μL와 혼합하고 원심분리(10000 rpm, 4℃, 10 min)한 후 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

▮ 분석조건

▫ Instrument: HPLC system

▫ Detecter: UV DAD detector (280 nm)

▫ Column: Atlantis C_{18}(4.6mm×150 mm, 3 ㎛)

▫ Column oven: 30 ℃

▫ Injection vol.: 20 μL

▫ Flow rate: 1.0 mL/min

▫ Mobile phase: A, 10% MeCN in 0.1% TFA , B, 50% MeCN in 0.1% TFA

Naringenin: 5.5 mg/g의 80~120% 범위인 4.4~6.6 mg/g

Min	A (%)	B (%)
0	80	20
60	20	80

(5) 계산

$$\text{Naringenin (mg/g)} = \text{시험용액 농도 (ug/mL)} \times \frac{1/0.2\ (\text{mL})}{\text{시료 (g)}} \times \text{효소 반응 전 Volume (mL)} \times \frac{1}{1000}$$

○ 시험방법 밸리데이션 (고려사항)

▮ 녹차씨추출물 중 Naringenin의 함량을 확인하기 위하여 설정된 분석법의 타당성을 검증하기 위하여, 시험법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range)등의 항목을 검토하였다.

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time), spectrum, peak purity 검토 HPLC/MS/MS 를 분석을 통한 Naringenin 의 확인	o 검출시간 : 약 29~31 분 o spectrum : $\lambda_{max.}$ 약 280 nm 표준용액과 시험용액 일치 o peak purity : 시험용액 중 Naringenin peak 가 5 points 일치, 단일물질로 확인됨 o LC MS/MS: TIC 에서 동일한 시간대 peak 확인 precursor ion (273 $[M-H]^+$m/z)및 product ion (153 $[M-H]^+$m/z)일치
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 4 개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 34~273%에서 확인 9.56~76.46 mg/L o R^2:1.0000
	시료에 대한 4 개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 50~150%에서 확인 o R^2:0.99
정밀성 (Precision)	2 명의 시험자가 2 종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	o 실험실내 정밀성 함량 - 5.8883 mg/g RSD(%) - 1.64% o 반복정밀성 함량 - 5.2994~5.9627 mg/g RSD(%) - 0.58~1.95%
정확성 (Accuracy)	시료 중 3 개 농도로 표준 물질 첨가하여 회수율 검토	o 검출된 표준물질농도 - 77.79~88.22 ug/ml 회수율 - 98.45~105.29% RSD(%) - 0.54~2.77%
범위 (Range)	직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	o 시험용액 26.54~31.53 ug/mL

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

6.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

※ 시험성적서 및 분석 자료 포함 [그림 3]

- 납: 1 ppm 이하
- 총비소: 1 ppm 이하
- 카드뮴: 0.5 ppm 이하
- 총수은: 0.5 ppm 이하
- 대장균군: 음성

▮ 유해물질 규격은 『건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정』(식약처 고시 제 2013-10호)의 [별표 2] 유해물질 설정항목에 따라 분석값과 섭취량을 고려하여 최소 함량으로 관리될 수 있도록 설정하였다.

▮ 중금속은 가능한 최소한의 함량으로 관리되는 것이 바람직하므로 분석결과를 고려하여 권장 규격보다 낮은 함량인 납1 ppm 이하, 총비소 1 ppm 이하, 카드뮴 0.5 ppm 이하, 총수은 0.5 ppm 이하로 규격을 설정하였다.

▮ 식품위생검사 기관에서 「녹차씨추출물」의 중금속 함량을 분석한 결과, 설정 규격에 적합함을 확인하였다.

▮ 식품위생검사 기관에서 「녹차씨추출물」의 대장균군을 분석한 결과 음성임을 확인하였고, 규격을 음성으로 설정하였다.

6.2. 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료 [그림 4]

▮「수입식품등 검사에 관한 규정」(식품의약품안전처 고시 제2014 - 23호, 2014. 2.12, 개정) 별표 3. 정밀검사대상 잔류농약 검사항목에 대하여 시험결과와 분석자료 분석

▮「녹차씨추출물」의 원료인 “녹차씨”의 경우 농약의 잔류허용기준이 없지만 “녹차”는 농약의 잔류허용기준이 있으므로 잔류농약 59종을 분석하였으며 모두 불검출 된 것을 확인하였다.

6.3. 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

시험항목		시험방법
중금속	납 총비소 카드뮴	식품공전 제9.일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP 법
	총수은	식품공전 제9.일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별 시험 (5) 수은
미생물	대장균군	식품공전 제9.일반시험법 8. 미생물시험법 5) 대장균군
잔류농약	Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicofol, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazlil, Iprodione, Iprovalicarb, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분-제2법
	Acetamipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Hexaflmuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법

■ 시험성적서 요약표

[시험기관명 : 전남식품산업연구센터]

제안 기준 및 규격	시험항목		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
규격항목	성상		이미.이취가 없고 특유의 향미를 지닌 갈색의 분말	고유의 색택과 향미를 가지고 이미.이취가 없음		
	기능성분(지표성분)(mg/g)		4.4 ~ 6.6	5.8231	5.2987	5.3060
	중금속 (mg/kg)	납	1 이하	0.0554	0.0566	0.0509
		총비소	1 이하	0.0086	0.0133	0.0217
		카드뮴	0.5 이하	0.0095	0.0106	0.0126
		총수은	0.5 이하	0.0037	0.0020	0.0030
	미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
		세균수(cfu/g)	-	-	-	-
	곰팡이독소	독소명 기재	-	-	-	-
	잔류용매	용매명 :	-	-	-	-
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 :	-	-	-	-
	잔류농약	59종	불검출			
		5종	-			

■ 중금속의 1일 노출량

중금속명	실측치[a] (mg/kg)	최대 섭취량[b] (g)	제안규격[c] (㎍/g)	제안규격에 의한 일일 노출량[d](㎍)	중금속 1일 최대 노출허용량(㎍) (E)
납	0.0554	2	1	2	10.8
총비소	0.0086		1	2	150
카드뮴	0.0095		0.5	1	3.0
총수은	0.0037		0.5	1	2.1

※ 신청원료 중 중금속의 1일 노출량(D)이 1일 최대 노출허용량(E)보다 크지 않도록 규격을 설정하되 실측치를 고려하여 설정해야 함.

[a]실험치 : (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구원 3LOT 실측치의 평균값

[b]최대섭취량 : 신청원료 1일 최대섭취량 2g/일으로 설정

[c]제안규격 : 신청인이 제안한 규격

[d]제안규격에 의한 일일노출량 : b × c

■ 유해물질분석 시험 성적서 [그림 3]

검 사 성 적 서

친환경생물산업의 중심 첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자 전남식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1403-001 접수번호 : 1402-02-057

제 품 명	녹차씨 추출물 Lot.1			접수년월일	2014.02.17
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2014.02.25
우편번호	520-330	소 재 지	전남 나주시 동수농공단지길	세부주소	30-5
의뢰업체명	(재)식품산업연구원	업체대표자	신현경	의 뢰 인	위지향
유통기한	-	제조일자	2014.02.14	접 수 자	소선녀

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0554	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0095	-
총비소	-(mg/kg)	0.0086	-
총수은	-(mg/kg)	0.0037	-
대장균군	-	음성	-
Naringenin	-(mg/g)	5.8231	

판정 : - 검사자 : 소선녀, 송현우

책임자 : 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2014년 03월 05일

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

■ 잔류농약 시험분석 성적서 [그림 4]

제 D2014020653 호

검 사 성 적 서

검체명		녹차씨추출물분말	제조일자 (유통기한)	2014-02-14
의뢰인	업체명	(재)전남생물산업진흥원식품산업연구원	성 명	신현경
	주소	전남 나주시 동수농공단지길 30-5 (동수동)		
제조번호			접수년월일	2014-02-17
검사의뢰목적		제출용	검체접수번호	D2014020653

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
비에치씨(mg/kg)	불검출	김용수
비펜스린(mg/kg)	불검출	김용수
카보후란(mg/kg)	불검출	김소영
클로르페나피르(mg/kg)	불검출	김용수
클로로타로닐(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
싸이할로쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이프로디닐(mg/kg)	불검출	김용수
디디티(mg/kg)	불검출	김용수
다이아지논(mg/kg)	불검출	김용수
디크로보스(mg/kg)	불검출	김용수
디코폴(mg/kg)	불검출	김용수
엔도설판(mg/kg)	불검출	김용수
페나리몰(mg/kg)	불검출	김용수
페니트로치온(mg/kg)	불검출	김용수
펜프로파스린(mg/kg)	불검출	김용수
펜발러레이트(mg/kg)	불검출	김용수
플루디옥소닐(mg/kg)	불검출	김용수
이마자릴(mg/kg)	불검출	김용수
이프로디온(mg/kg)	불검출	김용수
이소프로치오란(mg/kg)	불검출	김용수
말라치온(mg/kg)	불검출	김용수
메소밀(mg/kg)	불검출	김소영
메티다치온(mg/kg)	불검출	김용수

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
파클로부트라졸(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온(mg/kg)	불검출	김용수
파라치온-메칠(mg/kg)	불검출	김용수
퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
펜토에이트(mg/kg)	불검출	김용수
포스메트(mg/kg)	불검출	김용수
피리미카브(mg/kg)	불검출	김용수
프로시미돈(mg/kg)	불검출	김용수
퓌토젠(mg/kg)	불검출	김용수
트리아디메폰(mg/kg)	불검출	김용수
트리프루미졸(mg/kg)	불검출	김용수
트리아조포스(mg/kg)	불검출	김용수
프로클로라즈(mg/kg)	불검출	김용수
메톡시페노자이드(mg/kg)	불검출	김소영
보스칼리드(mg/kg)	불검출	김소영
아세타미프리드(mg/kg)	불검출	김소영
아족시스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
아트라진(mg/kg)	불검출	김용수
에치온(mg/kg)	불검출	김용수
이프로발리카브(mg/kg)	불검출	김용수
카바릴(mg/kg)	불검출	김소영
캡탄(mg/kg)	불검출	김용수
톨크로포스메칠(mg/kg)	불검출	김용수
트리플루무론(mg/kg)	불검출	김용수
티아메톡삼(mg/kg)	불검출	김소영
펜헥사미드(mg/kg)	불검출	김소영
프로페노포스(mg/kg)	불검출	김용수
플루벤디아마이드(mg/kg)	불검출	김소영
플루페녹수론(mg/kg)	불검출	김소영
피라크로스트로빈(mg/kg)	불검출	김소영
피리메타닐(mg/kg)	불검출	김소영
피리미포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
헥사프루무론(mg/kg)	불검출	김소영

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자:김 천 희

시험항목	결과	검사담당자

2014 년 2 월 20 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번 [illegible] FAX(031)628-0400~1

7. 안전성에 관한 자료

▮ 안전성 평가 의사결정도에 따라 **“나”** 항에 해당.

▮ 따라서 제출서류는 **섭취근거자료, 안전성 정보 자료, 섭취량 평가 자료**를 제출해야 함.

7.1. 섭취근거 정보

1) “녹차씨”는 식품원재로 DB검색결과 “차나무(식용가능부위)”로 등재되어 있고, 식용가능부위에 녹차씨가 포함되어 있어 식품원료로 사용 가능하며,

2) 식약처 민원회신 식품규격과-2345 [2005.08.11]에서 Tea seed oil(Camellia sinensis 씨앗 100%) 식품 원료로 사용함이 기재되어 있고,

3) 한국과학식품회 식품과학사전에는 차나뭇과(Theaceae)의 상록 활엽 관목으로 어린눈과 잎은 차 원료로, 열매는 기름을 짜서 사용하였고 한국, 일본, 중국, 인도 등지에 분포한다고 기재 되어 있음.

4) 도서에 “재래종 차나무의 열매를 기름을 짜서 여러 용도로 다양하게 사용하거나 삶아서 땅콩이나 호두, 밤, 은행과 같은 견과류를 먹을 때 조금씩 같이 먹으면 열매의 쓴맛이 느끼함을 줄여주고 입맛을 개운하게 한다”고 쓰여있음. (신광수명인의 우리 차 이야기, 신광수, 혜안, 2014)

5) 2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황 참조

7.2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등)

1) 해당시료로 설치류 단회투여독성 및 유전독성검사를 실시한 결과 특별한 부작용은 관찰되지 않았음.

▮ 독성시험 성적서 **[별첨 1] 단회투여 독성 보고서, [별첨 2] 유전독성 중간보고서**

2) 녹차씨추출물에 대한 직접적 독성자료는 전무하나, 녹차씨 유래 사포닌에 대한 독성자료 1건 및 유사 시료인 녹차 및 녹차 카테킨에 대한 자료 2건이 검색 됨.

3) 식약처 식품 원재료의 독성물질 유무 data-base 검색결과 녹차의 경우는 소량의 카페인이 들어있어서 임신 중이나 수유 중에는 먹지 않는 것이 좋고, 신경장애나 심장이 좋지 않은 사람은 하루에 두 잔 이하를 권고하고 있고, 고량 복용하면 독성이 나타난다고 기록하고 있으나, 녹차씨추출물에 대한 직접적 부작용에 대한 언급은 없음.

▮ 본 시료의 g당 카페인 함량은 0.88mg 으로, 1일 섭취량(2g)으로 환산시 1.76mg, 식약처 카페인 1일 섭취 권장량인 400mg(성인기준) 약 1/227 배 수준임.

4) PubMed, Toxline, Drug Digest. The Longwood herbal Task Force, Drug Digest 등의 검색결과, 안전성 관련 자료 검색결과[14-19] 녹차씨에 대한 심한 독성이나 부작용은 없음.

▮ 검색결과 요약

출 처	검 색 결 과
The Longwood herbal Task Force	- GRAS로 인정되고 급성독성은 없음[14]
PDR of Herbal Medicine	- 공복에 다량 복용시 mild 한 속쓰림이 발생 할 수 있음[15]. - 녹차씨유래 사포닌의 NOAEL 150mg/kg[16]
Drug Digest	- 칼슘 길항제와 병용 투여시 칼슘길항제의 생체이용율을 높일 수 있으므로 주의 요망 [17]

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
NAPRALERT	green tea seed camellia sinensis seed	x	x	
Agency for Healthcare Research and Quality				
Toxline				
US FDA poisonous plant database				
Essential Medicines and Health Products Information Portal				
Translation of the German Commission				
AHPA's Botanical Safety Handbook				
Natural Medicine Comprehensive Database				
Practical Guide to Natural Medicines				
Pubmed	green tea seed or camellia sinensis seed and safety or toxicity or adverse	x	x	
한국학술문헌정보센터(KISS)	녹차씨 녹차씨 and 독성 or 안전성 camellia sinensis, green tea seed	x	x	

7.3. 섭취량 평가 정보

※ 신청원료의 제안 섭취량
- 일일 섭취량: 녹차씨추출물로써 2,000 mg/일
- 녹차씨박(원료)로 환산시 : 약11.1g (수율 ≒ 18 %)

▮ 전임상 자료 결과로써 486~3,000 mg/일
▮ 녹차씨 오일의 약용 목적 섭취량 : 1ts(5ml)/일 (녹차씨 원료로 32g)
⇒ 녹차씨추출물(본 시료)로 약 5.76g (총 수율 18%)
▮ 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 카테킨으로써 480
▮ 남·녀 평균 1일 녹차 섭취량 23±5.5g(2013, 국민영양조사)이나, 녹차씨 원재료 및 녹차씨 제품의 통상섭취량은 확인된 바 없으며, 녹차씨를 식용(약용)으로 섭취시 주로 오일 형태로써 사용함.
▮ 녹차씨 오일의 약용 목적 섭취량 : 1ts(5ml)/일 (일본의 "寿命を延ばすワザ百科" 에 소개되는 간장병의 간질환 참고) ⇒ 녹차씨 원료로 32g
▮ 녹차씨 유래 사포닌의 NOAEL(rat 150mg/kg = 임상용량 1,500mg/day)
⇒ 본 시료인 녹차씨추출물의 1일 섭취량 2,000mg/day 는 원재료 녹차씨 착유 압착박으로써 11.1g/day에 해당하며, 녹차씨 유래 사포닌으로써 200mg/day, 에 해당하는 양으로 통상 녹차씨 통상 섭취량의 약1/2, 녹차 사포닌 NOAEL의 1/7에 해당하여 국민 일상섭취량 또는 유통판매 섭취량보다 증가하지 않았음.
▮ 본 원료(녹차씨추출물)의 지표물질 나린제닌의 섭취량 : 국외 전임상 논문에서 섭취량 평가시 5-6weeks wistar rats 25mg/kg/일 BW[6], 7weeks C57BL6J mice에서 100mg/kg/day[7] 으로 임상 용량으로 환산시 각각 나린제닌 243.2mg/day, 486mg/kg/day 에 해당하며, 이는 녹차씨추출물(신청원료)로 환산시 44.2g/day, 88.36mg/kg/day 에 해당함.
▮ 차씨는 옛 문헌 (동의보감, 의방적요 등) 에 사용 기록이 있으나 복용법 및 복용량에 대한 정확한 사용 근거는 없음.

7.4. 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

1) 영양평가 정보

성분	함량(%)	성분		함량(%)
수분	1.26	탄수화물		77.69
회분	8.37	(당류)		10.15
조단백	11.29	지표물질	Naringenin	0.55
조지방	1.39			

▮ 칼슘길항제와 복용시 칼슘길항제의 생체 이용률에 영향을 미칠 수 있음.
⇒ 칼슘채널차단제 복용자는 나린제닌이 다량 함유된 과일 또는 과일주스(자몽 또는 자몽주스)와 본 시료(녹차씨추출물)을 동시에 복용하는 것을 주의해야 한다.

2) 인체적용시험 정보

▮ 안전성 평가 지표 : 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용 제품을 섭취한 연구대상자(safety군) 80명을 대상으로 분석

디자인	대상자	시험물질 섭취량/ 섭취기간	안전성지표	결과	비고
무작위 이중눈가림 위약대조	만 19-65세 남녀 BMI 25kg/㎡이상 30kg/㎡미만 80명 중 탈락률 8.8%	10주 녹차씨추출물 (본시료) 2,000mg/일	- 이상반응 - 진단검사의학 검사 - 활력징후	- 이상반응은 총11건이나 제품섭취와 무관 - 진단검사의학 검사 및 활력징후에는 의미있는 수치 없음	인체적용시험 계획서 **[별첨 3]** 보고서 **[별첨 4]**

평가지표	결과
자·타각 증상 등 이상반응 (Adverse Event)	- 녹차씨추출물을 섭취한 40명 중 2명에서 3건, 플라세보를 섭취한 40명 중 8명에서 8건의 경도 또는 중등도의 이상반응(총 11건)이 발생 - 이상반응의 종류는 발목 염좌, 감기, 허리통증, 속쓰림 등으로 시험용 제품 섭취와 인과관계가 없음
진단검사의학 검사	- 시험제품 섭취 전후 녹차씨추출물군 내 AST, ALT, creatinine 항목에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 (p=0.046, p=0.022), 참고치 범위 내에서 일어난 임상적 의미가 없는 변화라고 판단 - 다른 항목은 섭취군 전후/군간 유의한 차이가 없음
혈액학 검사, 혈액생화학 검사, 소변검사,	
활력징후	- 녹차씨추출물군과 플라세보군의 시험제품 섭취 전후 임상적으로 의미있는 이상 수치가 없음 - 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 없음
수축기/이완기 혈압, 맥박수	

7.5. 독성시험

▮ 안전성 평가 의사결정도에 따라 **“나”** 항에 해당하여 독성시험 불필요하나, 단회투여독성 및 유전독성시험을 실시하였음. **[별첨 1] 단회투여 시험성적서 [별첨 2] 유전독성 중간보고서**

시험종류		종 및 계통	투여 방법	투여 기간	시험물질, 용량	시험결과	비고
단회 투여	설치류	SD Rat (F 12)	경구	1회	・녹차씨추출물(본시료) ・300mg/kg B.W 2000mg/kg B.W.	・1회 투여 후 14일간 관찰 ・사망동물 없음 ・ 2,000mg/kg B.W. 투여군 중 일부개체에서 연변 및 하복부 오염 ・ 300mg/kg B.W.에서 2개체, 2,000mg/kg B.W.에서 1개체에서 체중감소, 이외 모든 투여군에서 정상 체중 증가 ・ 2000 mg/kg body weight < LD 50 < 5000 mg/kg body weight	- GLP급 - 요약서 **[표 1]** - 보고서 **[별첨 1]**
유전 독성	복귀돌연변이 (Ames test)	・*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98 TA1537 ・*E.coli* WP2 *uvrA*		1회	・녹차씨추출물 (본시료) ・투여량 5000, 2500, 1250, 625 및 313.5 μg/plate 농도로 음성 및 양성 대조군	・대사활성화법 미적용 (S9-) 및 (S9+) 적용 모두 음성 대조군과 비교하여 각 농도별 시험물질 처리군에서의 집락 수는 증가 양상을 나타내지 않았음. ・복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 사료됨	- GLP급 - 요약서 **[표 2]** - 중간 보고서 **[별첨 2]**
	염색체이상시험	CHL cells		1회	・녹차씨추출물 (본시료) ・투여량 최고농도 직접법 : 120 μg/mL 대사활성화법 : 100 μg/mL 이하 5단계 농도, 음성 및 양성 대조 시험	・시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 시험물질 처리군의 농도에 따라 통계학적인 유의성이 없음. ・CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료됨	- GLP급 - 요약서 **[표 2]** - 중간 보고서 **[별첨 2]**
	소핵시험	ICR 마우스 골수세포 5마리		1회	・녹차씨추출물(본시료) ・투여량 0, 125, 250, 500mg/kg B.W. ・양성대조물질 70mg/kg B.W. 단회 복강투여	・전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율은 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않음. ・개체 당 2000개의 다염성 적혈구 중 나타나는 소핵을 가진 다염성 적혈구의 수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군 에서 음성	- GLP급 - 요약서 **[표 2]** - 중간 보고서 **[별첨 2]**

						대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않음. ・마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료됨	

8. 기능성에 관한 자료

8.1. 제안된 기능성 내용 및 섭취량

▮ 기능성 내용 : 체지방 감소

▮ 일일 섭취량 : 녹차씨추출물로써 2,000mg/일

8.2. 기능성 제출자료

1) 녹차씨의 비만(체지방조절)과 관련된 국내 기능성 관련 자료는 2건

2) 녹차의 비만(체지방조절)과 관련된 국내 기능성 관련 자료는 논문 18건, 특허 672, 보고서 27개가 검색 됨. 이중 기능성 자료는 In vivo 동물 실험 6건, 인체적용시험 5건이 검색 됨[23-32].

3) 녹차씨의 비만(체지방조절)과 관련된 국외 기능성 관련 자료는 2 건이 검색 됨.

: 녹차씨 오일은 PPAR-γ 활성 억제를 통해 adipocyte 분화를 조절하고, high fat diet 로 유도된 57BL/6J 마우스의 체중 증가를 감소시킴[22].

4) 녹차씨 추출물(본 시료)의 지표물질인 나린제닌과 관련된 국내·외 기능성 자료는 7건[5-11]

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험(건)
신청원료	5	2	2	1
참고자료	12	1	1	10

<제출자료 요약>

No	시험물질 섭취량/섭취기간	문헌명	자료요건	연구유형	대상	섭취경로	바이오마커
1	신청원료 (녹차씨추출물)	Biotechnology and Bioprocess Engineering	○	In vitro	3T3-L1 preadipocytes	-	cell viability, 3T3-L1 differentiation(분화) 및 lipid accumulation
2	신청원료 (녹차씨추출물)	Korean Society of Food Science and Technology	○	In vitro	3T3-L1 preadipocytes	-	cell viability, 세포내 TG함량 및 Free glycerol
3	신청원료 (녹차씨추출물)	Biotechnology and Bioprocess Engineering	○	in vivo	8주령/ICR /F 고지방식이 비만유도모델	경구	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)
4	신청원료 (녹차씨추출물)	Biotechnology and Bioprocess Engineering	○	in vivo	8주령/ICR /F 고탄수화물 식이 비만유도	경구	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine

No	시험물질 섭취량/섭취 기간	문헌명	자료 요건	연구유형	대상	섭취 경로	바이오마커
					모델		(IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)
5	신청원료 (녹차씨추출물)	인체적용시험	○	Clinical Trial	만 19-65세 성인남녀 / BMI 25~30kg/㎡	경구	체지방 체중, BMI, WHR, 혈중지질 및 에디포넥틴(Adiponectin)
6	유사원료 (녹차씨오일)	Pflugers Arch - Eur J Physiol		In vitro	3T3-L1 preadipocytes	-	adipocyte 분화, 세포내 TG 농도, PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA
7	유사원료 (녹차씨오일)	Pflugers Arch - Eur J Physiol		in vivo	C57BL/6J	경구	TC, LDL, HDL, TG, glucose, 알라닌 전이효소
8	녹차	J Med Food.		Clinical Trial	비만여성	경구	체지방, 기초대사, 신체구성성분 (RMR)
9	녹차 (티백)	The journal of Nutrition, Health &Aging		Clinical Trial	60세이상 대사증후군 진단 혹은 의심자	경구	체중, BMI 허리둘레
10	녹차 카테킨	British Journal of Nutrition		Clinical Trial	비만성인	경구	체중, 체지방량
11	녹차 EGCG	Alternative Medicine Review		Clinical Trial	25-65세 비만 및 2형 당뇨 환자	경구	지질 profile, 인슐린저항성 (HOMA-IR), HbA1c
12	녹차 카페인	J Hum Nutr Diet		Clinical Trial	과체중 유방암 생존자	경구	HDL, LDL, HOMA-IR 체중, 체지방량
13	녹차 카테킨	The journal of nutrition		Clinical Trial	과체중 혹은 비만 여성	경구	복부지방, 혈청 TG
14	녹차 EGCG	Clinical nutrition		Clinical Trial	BMI 27kg/m2 이상의 16세에서 60세 사이 여성	경구	체중, 체질량지수, 혈중지질지표 호르몬지표, (인슐린, HOMA-IR, 그렐린)
15	녹차	physiology & behavior		Clinical Trial	BMI 25 이상의 태국 남녀	경구	체중, BMI, 신체 조성, 휴식 에너지 소비, 산화력
16	녹차 EGCG	J Am Coll Nutr.		Clinical Trial	비만남성	경구	식전/후 에너지소비량, 지질산화도
17	녹차 (EGCG, 카페인)	OBESITY RESEARCH		Clinical Trial	과체중 및 중도비만 남녀	경구	체중, 허리둘레, 체지방, 호흡지수, 렙틴

8.3. 기능성 자료[20)]

▮ 추측작용기전

GTSE(녹차씨추출물)의 투여는 lipogenesis, pathological inflammation 을 조절하여 adipogenesis를 억제하고, 결과적으로 체지방 감소, 체중감소, 혈중 lipid profile 개선 효과를 가져 옴.

8.3.1. 시험관시험

▮ 해당시료를 사용하여 2건의 In vitro 실험을 실시하여 동일한 결과를 얻어 논문화 하였고, 유사시료 (녹차씨오일)의 해외 논문 자료 1건의 결과와도 부합 됨.

▮ 실험 개요

시험 물질	실험동물/ 모델	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차씨 추출물 (본시료)	In vitro 3T3-L1 preadipocytes, MTT, Oil red O staining	0, 10, 25, 50, 75, 100 ㎍/mL	cell viability, 3T3-L1 differentiation (분화) 및 lipid accumulation	• GTE<200㎍/mL 처리시 세포 독성 없음 • 25<GTE<100㎍/mL 처리시 세포분화 및 지질축적 농도의존적 억제	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015 vol 22 **시놉시스1** **참고문헌 20**
녹차씨 추출물 (본시료) 및 녹차잎 추출물	In vitro 3T3-L1 preadipocytes, DMEM, Oil red O staining	2.5, 5, 10, 20, 40 ㎍/mL 의 녹차씨 추출물 및 녹차잎 추출물	cell viability, 세포내 TG함량 및 Free glycerol	• GTSE<1,000㎍/mL 처리시 세포 독성 없음 • 잎, 씨 추출물 처리군에서 대조군 대비 지방세포 분화 억제 및 TG 축적량 감소 (잎<씨) • 녹차씨추출물군의 배지 glycorol 양이 대조군 대비 3,6일째 유의 증가 • 잎, 씨추출물 군에서 AMPK, ACC인산화 증가 및 FAS 발현 감소(잎<씨)	Korean Society of Food Science and Technology 게재확정 **[그림 5]** 게재증명서 **시놉시스2** **참고문헌 21**

▮ 검색을 통한 유사 연구 자료

시험 물질	실험동물/ 모델	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차씨 오일	In vitro 3T3-L1 preadipocytes, MTT, Oil red O staining	0.1, 1μg/ml 의 녹차씨 오일	adipocyte 분화, 세포내 TG 농도, PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA	• 녹차씨 오일 처리시 adipocyte 분화 저해 • TG 농도가 녹차씨 오일 농도 의존적으로 유의 감소 • 녹차씨 오일 처리군에서 대조군 대비 PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 mRNA 발현이 2-3배 억제	Pflugers Arch - Eur J Physiol 2008 vol 457 **시놉시스3** **참고문헌 22**

▮ [표 3] 시놉시스 및 abstract 요약서

8.3.2. 동물시험

[동물시험자료 요약]

시험 물질	실험동물/ 모델	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차씨 추출물 (본시료)	8주령/ICR /F n=6/group 고지방식이 비만유도모델	100, 300 및 후처리300 mg/kg/day 10주 /경구투여	체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)	• B.W gain, Fat mass, TC,TG, LDL, leptin, IL-6, TNF-a , glucose, insulin, ALT, AST 수치가 고지방식이 대조군에 비해 100mg/kg에서 감소 경향, 300mg/kg , 및 후처리 300mg/kg에서 유의적 감소 (p<0.05) • Adiponectin, HDL level이 고지방식이 대조군에 비해 100mg/kg < 에서 농도의존적으로 유의적 증가 (p<0.05)	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015 vol 22 게재 **시놉시스 4-1 참고문헌 20**
녹차씨 추출물 (본시료)	8주령/ICR /F n=6/group 고탄수화물 식이 비만유도 모델	100, 300 mg/kg/day 10주 /경구투여	- 체지방량, 체중, 지질 프로파일, Fecal lipid concentration, Imflammatory cytokine (IL-6,IL-10, TNF-a) Adipocytokine (leptin, adiponectin)	• B.W gain, Fat mass, TC,TG. LDL, leptin, IL-6, TNF-a , glucose, insulin, ALT, AST 수치가 고지방식이 대조군에 비해 100mg/kg에서 감소 경향, 300mg/kg , 및 후처리 300mg/kg에서 유의적 감소 (p<0.05) • Adiponectin, HDL level이 고지방식이 대조군에 비해 100mg/kg < 에서 농도의존적으로 유의적 증가 (p<0.05)	Biotechnology and Bioprocess Engineering 2015 vol 22 게재 **시놉시스 4-2 참고문헌 20**

▮ 검색을 통한 유사 연구 자료

시험 물질	실험동물/ 모델	섭취량/ 섭취기간	바이오 마커	결과	비고
녹차씨 오일 (유사시료)	C57BL/6J 녹차씨 오일30%식이(GT)/ 정상식이(CON)/ 쇼트닝30%고지방 식이(S)	녹차씨 오일 30%식이 (150g/kg food)	TC, LDL, HDL, TG, glucose, 알라닌 전이효소	• GT 군에서 체중증가량, 복부지방량, TC, LDL, TG, ALT 가 S군 대비 유의적으로 낮게 나타남 • GT군의 adipose 조직에서 PPAR-γ2, C/EBP-α의 mRNA 의 발현 유의적으로 억제	Pflugers Arch - Eur J Physiol. 2008 vol 457 **시놉시스5 참고문헌 22**

▮ [표 3] 시놉시스 및 abstract 요약서

8.3.3. 인체적용시험

▮ 해당시료를 사용하여 임상연구 1건을 진행하였으며, 그 결과 시험군에서 PBF_arm_L, FFM_Total, 허리둘레, WHR이 시험 전/후 유의하게 변화하였으며, PBF_arm_R 이 시험군 및 대조군에서 의미있는 차이를 두고 변화한 결과를 얻을 수 있었음.

▮ 또한, 과체중 성인이 해당시료를 1일 2000mg 이상 섭취하는 것은 특별한 부작용이 없는 것으로 확인되었음.

[인체적용시험자료 요약]

시험 물질	디자인	대상자	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차씨 추출물 (본시료)	무작위 이중눈가림 위약대조	만 19-65세 성인남녀 / BMI 25kg/㎡이상 30kg/㎡미만	10주 녹차씨추출물 (본시료) 2,000mg/일	체지방 체중, BMI, WHR, 혈중지질 및 기타지표	시험군에서 PBF_arm_L, FFM_Total, 허리둘레, WHR 시험전후 유의 변화	인체적용시험 승인서 [그림 6] 종료보고서 [그림 7]
IRB 기관명	전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회					

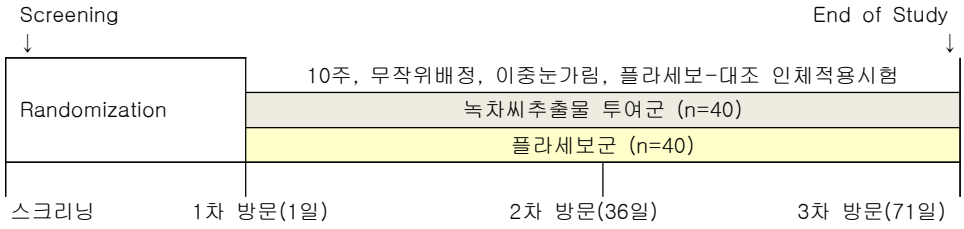
▮ 인체적용시험 계획서 [별첨 3]

▮ 인체적용시험 보고서 [별첨 4]

[인체적용시험 개요]

제 목	체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험
목 적	녹차씨추출물 또는 플라세보를 1일 2회 섭취할 때 나타나는 다음의 생체표지자의 변화를 관찰 함으로써 그 유효성과 안전성을 비교 평가한다. ▮ 1차 목적 체지방량 및 체지방률로 평가되는 체지방 감소에 대한 유효성 및 안전성 평가 ▮ 2차 목적 신체계측지표, 지질대사 지표 및 생화학적 지표 등으로 평가되는 체지방 감소 효과에 대한 유효성 및 안전성 평가
시험계획서 번호	MSKS-BFS-GTSE(Version 1.2)
시험책임자	전북대학교병원 의학전문대학원 약리학교실 교수 채수완 M.D., Ph. D.
공동연구자	전북대학교병원 기능성식품 임상시험지원센터 최은경 M.D.

시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 소병옥, 정수진, 최민준, 정수영, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 임지희, 김순영, 김예리, 윤주랑, 박혜림, 박미현, 이소영, 김현숙, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선이, 정혜연
의뢰자/대표	명인신광수차 / 신광수
연구대상자 선정기준	1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 19세 이상 65세 이하인 성인남녀 2) 스크리닝 검사 당시 BMI 25kg/㎡이상 30kg/㎡ 미만의 범위를 만족하는 자 3) 선정기준 1), 2) 항목을 만족하면서 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자
연구대상자 제외기준	1) 스크리닝 검사 전 3개월 이내에 10% 이상 체중이 감소한 자 2) 최근 2개월 이내 비만, 지질대사개선 등과 관련된 약물 또는 건강기능식품을 복용하는 등 본 연구의 결과 해석에 영향을 줄 수 있는 경험이 있는 자 3) 유전성 고지혈증이 있거나 의심되는 자 4) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 자 5) 류마티스관절염, 자가면역질환 등의 국소 또는 전신 염증성 면역질환이 있는 자 6) 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 단, 시험책임자의 판단에 따라 연구대상자의 상태를 고려하여 참여할 수 있다. 7) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계질환 (예: 크론병)이나 위장관계수술 (단, 단순충수돌기절제술이나 탈장수술은 제외)을 받은 자 8) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 9) 급/만성 신부전, 신증후군 등의 신장질환을 가진 자 10) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 치료를 받은 경험이 있는 자

	11) 진단검사의학검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 연구책임자가 본 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자 ☞ AST, ALT > 정상범위 상한치의 2 배 ☞ 기타 임상적으로 유의한 진단검사의학검사 소견 12) 약물 또는 알코올 남용으로 진단 및 치료 병력이 있는 자 13) 임신 혹은 수유 중인 여성 14) 임신 가능성이 있는 가임 여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외) 15) 폐경 여성 또는 여성호르몬제를 복용하는 자
연구대상자 수	총 80 명 (녹차씨추출물 섭취군 40 명, 플라세보군 40 명)
시험방법	[A randomized double-blind, parallel, placebo-controlled study] 자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(제 1 일)로부터 2 주 이내(제-14일~-1일)에 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단 되는 자를 선정한 후, 1차 방문 시에 연구대상자 선정/제외기준 적합성 여부를 재평가 후 무작위배정을 시행한다. 무작위배정을 받은 연구대상자는 녹차씨추출물 또는 플라세보를 10주간 1일 2회, 아침, 저녁 식후 30분 이내에 섭취하며, 5주 간격으로 (제 1일, 제 36일, 제 71일) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 예정된 검사(활력징후, 약물투여력, 의학적 상태 및 이상반응 등)를 수행하여 총 10주간의 인체적용시험을 마친다. 시험자는 필요하다고 판단 시 연구대상자가 최종제품을 섭취 후, 혹은 조기종료 방문 후 연구대상자 추적 관찰을 실시할 수 있다. 
섭취방법	다음 두 군 중 한 군에 무작위배정 되어 10 주 동안 시험용 제품을 1 일 2 회, 아침, 저녁 식후 30분 이내에 경구 섭취한다. ▌녹차씨추출물 섭취군 : 1일 2회, 1회 2캡슐 경구섭취 (1일, 녹차씨추출물 2,000mg, 나린제닌으로써 11mg)

	▌플라세보 섭취군 : 1 일 2 회, 1회 2캡슐 경구섭취 (1일, 플라세보 2,000mg)
유효성 평가	정해진 일정에 따라 다음 항목들을 평가한다. 1) 1 차 유효성 평가 ① 체지방량 및 체지방률 변화 2) 2 차 유효성 평가 ① 신체계측지표의 변화 체중, 체질량지수(BMI, kg/㎡), 허리둘레, 엉덩이 둘레, 허리-엉덩이 둘레 비, ② 혈중지질지표 및 기타지표의 변화 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 유리지방산, 에디포넥틴(Adiponectin)
안전성 평가	1) 자·타각 증상 등 이상반응(Adverse Events) 모니터링 2) 진단검사의학 검사 3) 활력징후 및 신체검진
통계방법	-분석에 사용할 프로그램은 Window 용 SAS 9.3 를 이용하고, 통계학적 유의수준은 p 값이 0.05 미만으로 설정한다. -집단간 동질성 검정과 baseline 의 동질성 검정은 Chi-Square test 또는 Fisher's exact test 와 Independent t-test 를 이용한다. -인체적용시험에 참여한 피험자의 연령, 신장, 체중 등의 인구학적 정보에 대하여 기술통계학적 분석을 한다. 시험군과 대조군 간 동질성 검정은 각 항목에 따라 변수의 특성상 연속형 변수인 경우 Independent t-test를 적용하고, 범주형 변수인 경우와 이분형 변수인 경우 Chi-square test 또는 Fisher's exact test 를 적용하는 등 자료의 측정수준, 분포형태, 상관관계에 따라 적절한 통계기법을 적용한다. -유효성 평가는 평가 항목을 각 섭취군 내, 군간의 Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정한다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시한다. 섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군간의 RMANOVA/Linear mixed model 등을 적용한다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA 를 실시한다. 시점간 차이는 Contrast test 로 분석한다. -안전성 평가를 위해 이상반응의 발생 양상을 Chi-square test 또는 Fisher's exact test 를 이용하여 검정하며, 진단검사의학검사, 활력징후 등은 시험군 내 변화를 paired t-test 또는 RM-ANOVA 를 이용하여 검정한다. 시험군 간의 차이는 각 항목의 변화량을 계산하여 Independent t-test 를 이용하거나 Linear mixed-effects model 을 이용하여 검정한다.

[인체적용시험 결과 요약]

- 시험군에서 허리둘레(p=0.03) 및 WHR(p=0.037)의 전후 유의 변화

	Test group (n=40)				Placebo group (n=40)				p-value[2]
	0 w	5 w	10 w	p-value[1]	0 w	5 w	10 w	p-value[1]	
Weight (kg)	74.10 ±10.25	74.54 ±10.57	74.88 ±10.87	0.080	73.21 ±7.77	72.99 ±7.88	73.11 ±7.98	0.851	0.241
WC (cm)	**91.76 ±5.80**	**91.78 ±5.55**	**90.90 ±5.42**	**0.030***	91.53 ±5.16	91.39 ±5.70	91.14 ±5.82	0.329	0.446
HC (cm)	99.98 ±3.86	99.79 ±3.95	99.79 ±3.88	0.904	99.91 ±4.62	99.74 ±4.43	99.87 ±4.42	0.981	0.893
WHR	**0.92 ±0.05**	**0.92 ±0.04**	**0.91 ±0.04**	**0.037***	0.92 ±0.04	0.92 ±0.04	0.91 ±0.04	0.294	0.619
BMI (kg/m²)	27.23 ±1.45	27.29 ±1.71	27.34 ±1.7	0.079	26.88 ±1.31	26.86 ±1.41	26.90 ±1.48	0.889	0.260

Values are presented as mean ± SD

[1] Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

- 시험군에서 PBF_arm_L(p=0.023) 및 FFM_total(p=0.003) 전후 유의적 변화 및 PBF_arm_R 군간 의미있는 차이를 보임(p=0.065)

	Test group (n=40)			Placebo group (n=40)			p-value[2]
	0 w	10 w	p-value[1]	0 w	10 w	p-value[1]	
PBF_arm_L	**38.53 ±10.32**	**37.22 ±11.07**	**0.023***	39.85 ±10.82	39.90 ±11.01	0.222	0.301
PBF_arm_R	**47.46 ±42.87**	**36.17 ±10.15**	0.135	37.95 ±10.29	42.81 ±28.27	0.295	**0.065**
PBF_leg_L	33.55 ±8.20	32.41 ±8.28	0.064	34.75 ±9.15	34.53 ±9.02	0.029*	0.857
PBF_leg_R	33.48 ±8.38	32.51 ±8.61	0.173	35.45 ±9.45	35.06 ±9.39	0.012*	0.406
FFM_trunk	24557.35 ±4677.83	25118.26 ±5089.22	0.074	23999.65 ±4029.48	24177.78 ±3961.63	0.126	0.869
FFM_Total	**47914.83 ± 9702.25**	**48730.62 ± 10166.75**	**0.003****	46668.33 ±8183.39	46566.33 ±8227.51	0.337	0.568

Values are presented as mean ± SD, *p<0.05

[1] Analyzed by Paired t-test,

[2] Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

▮ 게재예정 증명서 [그림 5]

KOSFOST

2015-31 호

논문게재예정증명서

제　　목 : 녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

저　　자 : 위지향*, 성혜미, 정경옥, 김숙정, 신유림[1], 박주현[1], 김종덕[2]

저자 소속 : (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터,
[1](주)바이오푸드스토리 식품생명공학과,
[2]전남대학교

위의 논문은 사단법인 한국식품과학회 발행
한국식품과학회 Vol. 47 No. 4 (2015년 8월 31일 발간예정)에 게재예정임을
증명합니다.

2015년 7월 30일

사 단 법 인　한 국 식 품 과 학 회
회　　장　노　　봉　　수

한국식품과학회 Korean Society of Food Science and Technology
135-703 서울특별시 강남구 테헤란로7길 22 한국과학기술회관 본관 605호 Tel.02-566-9937/Fax.02-553-8453/www.kosfost.or.kr
The Korea Science and Technology Center #605, 22, Teheran-ro 7-gil, Gangnam-gu, Seoul 135-703, Korea

■ 인체적용시험 승인서 [그림 6]

(별지 제 호 서식)

심사결과 통지서

수 신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE			Version No.	1.0
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상 시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일						
심사내용	■정식심사 □신속심사						
	■ 연구계획서 (■ 초기심의 □ 재심의) □ 심사의견에 대한 답변서 □ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구중지신청서 □ 중대한이상반응 □ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 ( )						
심사일시	2014 년 3 월 20 일			중간보고주기		개월	
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지/부결						
	1. 연구배경부분에 녹차에 관한 연구 이외의 녹차씨 연구에 관한 reference를 추가할 것 2. 칼슘채널차단제 복용 자를 제외기준에 추가할 것 3. 병용금지약물에 칼슘채널차단제 약품명을 추가할 것 4. 동의설명서에 자료에 대한 비밀보장 부분과 샘플채혈, 폐기부분 추가할 것 시정승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 20 년 월 일 ~ 20 년 월 일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.

※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.

※승인 유효기간은 승인일로부터 1 년으로 1 년에 1 회씩 연차지속심의 신청서를 제출해야 합니다.

※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1 년에 1 회 제출해야 합니다.

※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.

※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장

(별지 제　　호 서식)

심사결과 통지서

수　　신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE			Version No.	1.1
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일						
심사내용	□정식심사 ■신속심사						
	□ 연구계획서 (□ 초기심의 □ 재심의) ■ 심사의견에 대한 답변서 □ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구중지신청서 □ 중대한이상반응 □ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 (　　)						
심사일시	2014 년 4 월 15 일				중간보고주기	개월	
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지/부결						
	승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 2014년 4 월 15 일 ~ 2015년 4월 14일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.

※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.

※승인 유효기간은 승인일로부터 1 년으로 1 년에 1 회씩 연차시속심의 신청서를 제출해야 합니다.

※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1 년에 1 회 제출해야 합니다.

※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.

※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장

연구계획변경신청서

접수처 기재

접수번호		접수처확인		접수일	년 월 일

심 사 구 분	■ 신속심의 (사소한 변경) □ 정식심의 (사소한 변경 이상 또는 연구대상자의 위험에 영향을 주는 변경)						
연 구 과 제 명	체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10 주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험						
	Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE	Version No.	1.1			
	IRB No.	2014-02-003					
연구담당	책임연구자	소 속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채수완
	공동연구자	소 속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최은경
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014 년 03 월 일 ~ 2015 년 02 월 일						
의 뢰 자	회 사 명	명인신광수차					
	과제담당자	부 서	연구개발부	성 명	신 희 찬 (인)		
		직 위	과장	연락처	[redacted]		
연구계획변경사항	변경대비표 ■ 별첨						
변 경 사 유	변경대비표 ■ 별첨						
첨 부 사 항							

위와 같이 연구계획변경에 대하여 기능성식품연구윤리심의위원회 심사를 요청합니다.

신 청 일 자	2014 년 10 월 일		
신 청 부 서	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	책임연구자	채 수완 (인)

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회 귀하

변 경 대 비 표

임상시험제목 : 체지방 개선에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

항목	변경 전	변경 후	변경 사유
임상시험계획서			
Ver / 페이지	V1.1	V1.2	변경 사유
p13,26,34	- 나린제닌 함량 3.6mg/1g 7.2mg/2g	- 나린제닌 함량 5.5mg/1g 11mg/2g	- lot 별 분석치 오기 수정 : 시험 분석치 오류로 기존 lab scale에서 pilot scale 로 변경함
p.58	- 인체적용시험 모니터 서현영(shy@bf-story.com), 노수미(nsm@bf-story.com)	- 인체적용시험 모니터 서현영(shy@bf-story.com), 최은영(cey@bf-story.com), 이길순(lks@bf-story,com)	노수미 CRA 퇴사 및 최은영, 이길순 CRA 신규 채용

인체적용시험 자료집			
Ver / 페이지	V1.1	V1.2	변경 사유
p.4,15,18,38,52	- 나린제닌 함량 3.6mg/1g 7.2mg/2g	- 나린제닌 함량 5.5mg/1g , 11mg/2g,	- lot 별 분석치 오기 수정 : 시험 분석치 오류로 기존 lab scale에서 pilot scale 로 변경함
p.4,16,18,21,29	- 나린제닌 함량 범위 2.88 ~ 4.31	- 나린제닌 함량 범위 4.4 ~ 6.6	- 분석치 변경 (3.6 -> 5.5mg/g) 으로 80~120% 함량범위 변경
p.21,29	- 3lot 값 변경 (3lot 3반복 값 및 평균값) 최종평균 3.4717	- 최종평균 5.4760	- lot 별 분석치 오기 수정 : 시험 분석치 오류로 기존 lab scale에서 pilot scale 로 변경함
증례기록서			
Ver / 페이지	V1.1	V1.2	변경 사유
p.7,27,37	- GGT (12 ~ 33 IU/L), AST (5 ~ 35 IU/L), ALT(남: 12 ~ 73 IU/L , 여: 8 ~ 48 IU/L)	- GGT (남: 12 ~ 73 IU/L , 여: 8 ~ 48 IU/L) AST (12 ~ 33 IU/L), ALT(5 ~ 35 IU/L)	- 정상범위 수치 오기로 정정

(별지 제　　호 서식)

심사결과 통지서

수　　신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE			Version No.	1.2
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일						
심사내용	□정식심사　■신속심사						
	□ 연구계획서 (□ 초기심의 □ 재심의) □ 심사의견에 대한 답변서 ■ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구중지신청서 □ 중대한이상반응 □ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 (　　)						
심사일시	2014 년 10 월 일				중간보고주기	개월	
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지/부결						
	승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 2014년 4 월 15 일 ~ 2015년 4월 14일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.

※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.

※승인 유효기간은 승인일로부터 1 년으로 1 년에 1 회씩 연차지속심의 신청서를 제출해야 합니다.

※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1 년에 1 회 제출해야 합니다.

※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.

※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장

■ 인체적용시험 종료 승인서 [그림 7]

(별지 제 호 서식)

심사결과 통지서

수 신	의 뢰 기 관	명인신광수차
	책임연구자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 채수완

연 구 과 제 명		체지방 감소에 대한 녹차씨추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주간 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험					
		Protocol No.	MSKS-BFS-GTSE			Version No.	1.2
		IRB No.	2014-02-003				
연구담당	책임연구자	소속	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실	직 위	교수	성 명	채 수 완
	공동연구자	소속	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	직 위	연구교수	성 명	최 은 경
		소속		직 위		성 명	
연구내용	■ 기능성식품 (식품명: 녹차씨추출물) □ 기구 □ 기타 ( )						
연구 예정 기간	2014년 03월 일 ~ 2015년 02 월 일						
심사내용	□정식심사 ■신속심사						
	□ 연구계획서 (□ 초기심의 □ 재심의) □ 심사의견에 대한 답변서 □ 연구변경계획서 □ 연구중간보고서 □ 연구중지신청서 □ 중대한이상반응 ■ 연구종료(결과)보고서 □ 기타 ( )						
심사일시	2015 년 4 월 일				중간보고주기	개월	
심사결과	■ 승인/시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지/부결						
	승인						
	승인 유효기간 (승인일로부터 1년) : 2014년 4 월 15 일 ~ 2015년 4월 14일						

※보완을 요하는 "보완", "시정승인"시에는 1주일 이내에 심사의견에 대한 답변서를 제출하시기 바랍니다.

※인체시험이 시작 시(개시모임 기준) 연구개시보고서를 제출해야 합니다.

※승인 유효기간은 승인일로부터 1년으로 1년에 1회씩 연차지속심의 신청서를 제출해야 합니다.

※중간보고주기에 맞추어 연구진행현황을 보고해야 합니다. 중간보고주기가 12 개월인 경우 별도로 중간보고서를 제출하지 않고, 연차지속심의 신청서를 1년에 1회 제출해야 합니다.

※피험자 모집 종료 시에는 연구종료보고서를, 연구 종료 시에는 연구결과보고서를 작성하여 제출해야 합니다.

※연구 중에 중대한 이상반응(Severe Adverse Event)발생시 책임연구자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.

전북대학교병원 기능성식품연구윤리심의위원회위원장

■ 유사연구

해당시료를 사용하여 선행 연구된 인체적용시험 자료는 체지방 감소 뿐 아니라 기타 기능성에서도 전무하며, 유사 시료인 녹차추출물에 대한 임상연구는 녹차추출물이 300-1,000mg/day 농도로 복용 시 '체지방감소' 효과가 입증되어 기능성이 고시된 원료로 총 다수의 참고 임상연구 자료가 존재함.

■ 인체적용시험 자료 요약

시험 물질	디자인	대상자	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차	이중눈가림 위약대조	비만여성	4주	체지방, 기초대사, 신체구성성분 (RMR)	녹차섭취 및 저항력훈련 병행 그룹에서 가장 크게 RMR 증가, 근육량 및 근강도 증가 체지방, 중성지방, 허리둘레 감소.	시놉시스6 참고문헌23
녹차 (티백)	무작위 위약대조	60세이상 대사증후군 진단 혹은 의심자	1.0g 녹차티백 일일 3회, 60일	체중 BMI 허리둘레	GTG 그룹에서 체중 및 허리둘레가 통계적으로 유의하게 감소됨.(대조군 대비, $p<0.05$) 결론적으로 MS노인에 긍정적 효과를 가짐.	시놉시스7 참고문헌24
녹차 카테킨	선별 무작위	비만성인	카테킨이 풍부한 녹차 (650mg), 이눌린 6주	체중 체지방량	녹차 및 이눌린 섭취그룹에서 3주차 이후 체중 및 체지방 감소 효과가 보임. 최소 3주 이상 병행 투여 시 체중관리에 도움이 됨.	시놉시스8 참고문헌25
녹차 EGCG	무작위 이중눈가림 위약대조	25-65세 비만 및 2형 당뇨 환자	녹차 추출물 1500mg EGCG로 856mg 16주	지질 profile 인슐린저항성 (HOMA-IR) HbA1c	16주 후 HbA1c를 제외한 바이오마커들은 카페인을 제거한 GTE와 위약 그룹 간의 차이가 없었음	시놉시스9 참고문헌26
녹차 카페인	무작위 이중눈가림 위약대조	과체중 유방암 생존자	디카페인 녹차 960ml 6개월	HDL, LDL HOMA-IR 체중, 체지방량	매일 카페인 녹차 섭취 시 HDL 수치, HDL / LDL 비율, HOMA-IR 유효 개선, 그러나 체중 및 체성분량은 변화 없음.	시놉시스10 참고문헌27
녹차 카테킨	무작위 이중눈가림 위약대조	과체중 혹은 비만 여성	카테킨 625mg (카페인 39mg)	복부지방 혈청 TG	12주간의 카테킨 음료의 섭취는 복부지방과 혈정 TG를 통계적으로 유의하게 감소시킴.	시놉시스11 참고문헌28

			12주		(대조군 대비, p<0.05)	
녹차 EGCG	무작위 이중눈가림 위약대조	BMI 27kg/m2 이상의 16세에서 60세 사이 여성	녹차 추출물 400mg (EGCG로 31.5%, cellulose 46.6%)	체중 체질량지수 혈중지질지표 호르몬지표 (인슐린, HOMA-IR, 그렐린)	GTE 12주 섭취군에서 0.3% 체중 감소(0.15kg) 전후 비교시 녹차추출물군에서 LDL, TG 유의 감소 HDL, adiponectin, ghrelin 의미있게 증가	시놉시스12 참고문헌29
녹차	무작위 단일눈가림 위약대조	BMI 25 이상의 태국 남녀	녹차 3회/1일 12주	체중, BMI, 신체 조성, 휴식 에너지 소비, 산화력	8주부터 체중감소, 12주 소변 VMA에 통계적 유의성 보임. (대조군 대비, p<0.05) 녹차는 비만 태국남자에서 지방산화와 에너지소비를 증가시켜 비만 개선.	시놉시스13 참고문헌30
녹차 EGCG	무작위 이중눈가림 위약대조	비만남성	EGCG 300mg 2일	식전/후 에너지소비량 지질산화도	Resting EE 는 차이가 없고, 호흡계수(respiratory quotient ,RQ) 는 유의하게 감소됨. (대조군 대비, p<0.05) 녹차 EGCG의 섭취는 지방 산화를 촉진시켜 비만 효과를 가지나, 좀 더 많은 연구대상자를 대상으로 한 연구 필요	시놉시스14 참고문헌31
녹차 (EGCG, 카페인)	선별 무작위 위약대조 이중눈가림 평행군	과체중 및 중도비만 남녀	GT 카페인 혼합물 EGCG 270 mg +카페인 150 mg 3개월	체중, 허리둘레, 체지방, 호흡지수, 렙틴	녹차는 남성연구대상자의 체중, 허리, 호흡 지수와 체지방을 감소. 열 생산과 지방 산화를 통해 체중 유지 및 여성의 렙틴과 체중 감소에 효과를 보임.	시놉시스15 참고문헌32

■ [표 3] 시놉시스 및 abstract 요약서

▲ 해당시료(녹차씨추출물)　　▼ 유사시료

	Type5	Type4	Type3	Type2	Type1
QL1					▲▼▼ ▼▼▼ ▼
QL2	▲▲▼	▲▼			▼▼▼
QL3					▼

시놉시스 번호	점수	첨부번호 (참고문헌)
1	12	20
2	11	21
3	9	22
4	11	20
5	8	22
6	21	23
7	19	24
8	18	25
9	19	26
10	23	27
11	24	28
12	20	29
13	22	30
14	9	31
15	23	32
본임상	23	별첨 4

9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

9.1. 섭취량

▮ 녹차씨추출물 2,000mg/day (나린제닌으로 11mg/day)

9.2. 섭취방법

▮ 1일 2 회, 식사와 함께 또는 식후 30분 이내, 물과 함께 복용

9.3. 섭취량 설정 근거

▮ 원재료 "녹차씨"는 식품원재로 DB검색결과 "차나무(식용가능부위)"로 등재되어 있고, 식용가능 부위에 녹차씨가 포함되어 있으나, 해당시료로 수행된 기자료는 전무 함. 따라서 본 연구에서는 유사 시료인 녹차씨 오일과 녹차 추출물로 수행된 연구결과들을 참고자료로 하고, 해당시료(녹차씨추출물)로 본 연구팀에서 수행한 전임상 자료 및 녹차씨 유래 사포닌의 안전성 자료를 바탕으로 하여 섭취량을 설정하였음.

▮ 국외 논문자료에서 F344 rats에 13주간 녹차씨유래 사포닌을 구강 투여 하여 그 안전성을 평가한 결과 녹차씨유래 사포닌의 NOAEL은 암,수 공통으로 150mg/kg 이었으며, 이는 본 시료의 사포인 함량이 10%임을 감안할 때 본 녹차씨추출물로는 1500mg/kg, 원물(녹차씨박)로는 약 9.4g/kg 을 복용한 것과 같으며, 외삽법[34-35]에 의해 임상용량으로 환산시15,000 mg/day에 해당됨. 또한 본 시료로 실시된 전임상 자료에서 시험계간의 농도 및 정도의 차이는 있었으나, 3건의 전임상 효능평가를 통해 100~300 mg/kg 에서 항비만 효능이 확인되었고, 특히 고지방식이로 비만을 유도한 후 시료 300mg/kg/day 용량에서 통계적 유의성이 확인되었음. 이는 인체적용시험에서 과체중 연구대상자를 대상으로 하는 시험디자인과 유사하므로 본 임상연구의 섭취량은 본 시료의 전임상자료(300mg/kg/day) 결과 (임상 환산 농도 1,500mg/day)와 녹차씨 유래 사포닌의 안전성자료의 허용용량(임상 15,000 mg/day) 결과 및 기타 지표물질에 대한 임상/전임상자료[5-11,14-33]들을 고려하여 2,000mg/kg으로 설정하였음.

9.4. 섭취 시 주의 사항.

▮ 정제형태의 제품이므로 섭취 시 흡수를 위하여 충분한 물과 함께 복용

10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

10.1. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부

▮ 녹차씨추출물은 「건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 관한 규정」제2조에 1항에 의거 적합한 원료임, 즉, 별표 1~별표 4에 있는 원료가 아님.

10.2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

▮ 녹차씨추출물은 「건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 관한 규정」제3조에 적합 함. 즉, 「기성한약서에 대한 잠정규정」(보건복지가족부 고시)에서 정한 기성한약서와 「한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정」(보건복지가족부 고시)에서 정한 한약조제지침서에서 수재된 품목으로 원료의 종류 및 함량이 동일하지 않음.

『참고문헌』

1. 우리 차 세계의 차 바로 알고 마시기」서원, 1999, 23-26.

2. Anand K, Sarkar A, Kumar A, Ambasta RK, Kumar P. Combinatorial antitumor effect of naringenin and curcumin elicit angioinhibitory activities in vivo. *Nutr Cancer.* 2012;64(5):714-24. 2012 .

3. Weng CJ, Yen GC.Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* Jun;31(1-2):323-51,2012.

4. Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and cancer.*Int Immunopharmacol.* Mar;11(3):295-309. ,2011

5. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. Adv Nutr. 2014 Jul 14;5(4):404-17

6. Priscilla DH, Roy D, Suresh A, Kumar V, Thirumurugan K. Naringenin inhibits α-glucosidase activity : A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Interact*. 2014 Mar 5;210:77-85

7. Yoshida H, Watanabe H, Ishida A, Watanabe W, Narumi K, Atsumi T, Sugita C, Kurokawa M. Naringenin suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Nov 7;454(1):95-10

8. Ke JY, Kliewer KL, Hamad EM, Cole RM, Powell KA, Andridge RR, Straka SR, Yee LD, Belury MA. The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutr Metab (Lond)*. 2015 Jan 13;12:1

9. Richard AJ, Amini-Vaughan Z, Ribnicky DM, Stephens JM. Naringenin inhibits adipogenesis and reduces insulin sensitivity and adiponectin expression in adipocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:549750

10. Goldwasser J, Cohen PY, Yang E, Balaguer P, Yarmush ML, Nahmias Y. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit

flavonoid naringenin- role of PPARalpha, PPARgamma and LXRalpha. *PLoS One*. 2010 Aug 25;5(8):e12399.

11. Yoshida H, Watanabe W, Oomagari H, Tsuruta E, Shida M, Kurokawa M. Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J Nutr Biochem*. 2013 Jul;24(7):1276-84

12. Hasegawa T, Akutsu K, Kishi Y, Nakamura K. Constituents of the green tea seeds of Camellia sinensis. *Nat Prod Commun*. 2011 Mar;6(3):371-4.

13. 신광수. 신광수명인의 우리차이야기. 혜안. 2014

14. Takami S, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Onose J, Hirose M. Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2008 Jun;46(6):2224-9.

15. Kawaguchi M, Kato T, Kamada S, Yahata A. Three-month oral repeated administration toxicity study of seed saponins of Thea sinensis L. (Ryokucha saponin) in rats. *Food Chem Toxicol*. 1994 May;32(5):431-42.

16. Shord SS, Shah K, Lukose A. Drug-botanical interactions: a review of the laboratory, animal, and human data for 8 common botanicals. *Integr Cancer Ther.* 2009 Sep;8(3);208-27.

17. Brantley SJ, Argikar AA, Lin YS, Nagar S, Paine MF. Herb-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions. *Drug Metab Dispos.* 2014 Mar;42(3);301-17. .

18. Sarma DN, Barrett ML, Chavez ML, Gardiner P, Ko R, Mahady GB, Marles RJ, Pellicore LS, Giancaspro GI, Low Dog T. Safety of green tea extracts : a systematic review by the US Pharmacopeia. *Drug Saf.* 2008;31(6):469-84.

19. C. Bunchorntavakul & K. R. Reddy. Review article: herbal and dietary supplement *Hepatotoxicity.Aliment Pharmacol Ther* 37: 3--17. 2013.

20. Narendra Chaudhary, Jyoti Bhardwaj, Jae-Ho Hwang, Hyo-Jin Seo, Min-Yong Kim, Tai-Sun Shin, Ji-Hyang Wee, Yu-Lim Shin, Jong-Deog Kim. Anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of standardized tea seed cake extract in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. February 2015, Volume 20, Issue 1, pp 157-167

21. 위지향, 성혜미, 정경옥, 김숙정, 신유림, 박주현, 김종덕 녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과. *Korean Society of Food Science and Technology.* Vol.47 No.4 게재 예정

22. Kim NH, Choi SK, Kim SJ, Moon PD, Lim HS, Choi IY, Na HJ, An HJ, Myung NY, Jeong HJ, Um JY, Hong SH, Kim HM. Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6J mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Pflugers Arch*. 2008 . 457(2):293-302.

23. The effects of green tea consumption and resistance training on body composition and resting metabolic rate in overweight or obese women. 2013 *J Med Food.* Feb;16(2):120-7.

24. Effect of green tea (Camellia sinensis) consumption on the components of metabolic syndrome in elderly. 2012. J Nutr Health Aging. 16(9):738-42.

25. Beneficial effects of catechin-rich green tea and inulin on the body composition of overweight adults. 2012. *The British journal of nutrition* 107(5), 749-754 .

26. Does supplementation with green tea extract improve insulin resistance in obese type 2 diabetics? A randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. 2011. *Altern Med Rev*. Jun;16(2):157-63.

27. Green tea improves metabolic biomarkers, not weight or body composition: a pilot study in overweight breast cancer survivors. 2010. *J Hum Nutr Diet*. Dec;23(6):590-60.

28. Green tea catechin consumption enhances exercise-induced abdominal fat loss in overweight and obese adults. 2009. *Nutr.* Feb;139(2):264-70.

29. Effect of green tea extract on obese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. 2008 *Clin Nutr.* Jun;27(3):363-7.

30. Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: A randomized, controlled trial. 2008. *Physiol Behav.* Feb 27;93(3):486-91.

31. The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study. 2007. *J Am Coll Nutr.* Aug;26(4):389S-395S.

32. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and

green tea supplementation. 2005 *Obes Res.* Jul;13(7):1195-204.

33. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. 2006 *Eur J Med Res.* Aug 30;11(8):343-50.

34. Ali Abdel-Rahman, Njwen Anyangwe, Steve Casper, Rebecca P. Evaristus Enongene, et al.The Safety and Regulation of Natural Products Used as Foods and Food Ingredients. 2011 *TOXICOLOGICAL SCIENCES,* 123(2), 333--348.

35. Center for Drug Evaluation And Research,Center for Biologics Evaluation Research. (2002) Estimating the safe starting dose in clinical trials for ther apeutics in adult healthy volunteers,U.S. *Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA.*

36. Shannon Reagan-Show, "Minakshi Nihal, Nihal Ahmad, "Dose translation from animal to human studies revisited". *The FASEB Journa*l. 2007;22:659-661.

[표 1] 단회투여 독성시험 요약서

단회투여독성시험자료요약서(설치류)

민원번호:	☐ 필수 ☑ 선택

1. 원료명	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물)								
2. 시험기관	한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소								
3. 자료의 요건	☑ GLP 기관보고서 ☐ 논문 ☐ 기타								
4. 시험물질 (배합비 포함)	차열매 추출 분말(본 시료, 녹차씨추출물), 부형제 : 멸균증류수 1st · 2nd : 30mg/mL 3rd · 4th : 200mg/mL								
5. 시험동물	종	☐ 마우스 ☑ 랫드 ☐ 기니픽 ☐ 기타 ( )							
	계 통	SD rat		주 령	1st 3rd 9주령 2nd 4th 10주령				
	동물수	수 컷		암 컷	12 / 각 3마리씩				
6. 투여경로	☑ 경구 ☐ 식이 ☐ 기타 ( )								
7. 관찰 기간	☑ 14일 ☐ 기타 ( )일								
8. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)	
	투여용량 (mg/kg)	300		300		300		300	
	실험동물	암	수	암	수	암	수	암	수
	군당 동물수	3		3		3		3	
	사망동물수	-		-		-		-	
9. 평가항목	☑ 사망 개체 수 ☐ 임상증상 ☑ 체중측정 ☑ 육안적 소견 ☐ 병리조직학적검사 ☐ 기타 ( )								
10. 시험결과 (치사량 포함)	- 2000 mg/kg B.W. (3rd , 4th step) 일부개체에서 관찰된 연변 및 하복부 오염 증상이 일시적으로 관찰 - 300 mg/kg B.W. (1st step)와 2000 mg/kg B.W. (3rd step) 체중 감소 - 부검 결과 이상소견 없음 - 2000 mg/kg body weight < LD50 < 5000 mg/kg body weight								
11. 시험자결론	-연변 및 하복부 오염 증상은 시험물질 투여에 의한 것으로 사료되며 체중감소는 해당 개체의 체중이 일시적으로 감소하여 나타난 우발적인 체중 변화로 사료됨.								
12. 검토의견									

[표 2] 유전독성시험 요약서

유전독성시험자료요약서
-복귀돌연변이시험

민원번호:	☐ 필수 ☑ 선택

1. 원료명	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물)					
2. 시험기관	한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소					
3. 자료의 요건	☐ GLP 기관보고서 ☐ 논문 ☑ 기타 : GLP 기관 중간 보고서					
4. 시험물질 (배합비 포함)	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물) 멸균 증류수 용해 처리					
5. 시험계	균 주		종 류			
	Salmonella typhimurium		TA100, TA1535, TA98, TA1537			
	Escherichia coli		WP2*uvrA*			
6. 실험내용	처리 농도		5000, 2500, 1250, 625 및 313.5 μg/plate			
	시 험 법		Ames test			
	처리 시간		24-72hrs			
7. 대조군	S9mix	균주	양성대조군	용량 (㎍/ plate)	음성대조군	용량 (㎍/ plate)
	(+)	*Salmonella typhimurium 4종*	V	5000, 2500, 1250, 625, 313.5	V	5000, 2500, 1250, 625, 313.5
		Escherichia coli	V		V	
	(-)	*Salmonella typhimurium 4종*	V	5000, 2500, 1250, 625, 313.5	V	5000, 2500, 1250, 625, 313.5
		Escherichia coli	V		V	
8. 시험결과	*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537과 *Escherichia coli* WP2*uvrA*의 5 균주에 대해 대사활성화법 미적용 (S9-) 및 (S9+) 적용 모두 음성 대조군과 비교하여 각 농도별 시험물질 처리군에서의 집락 수는 증가 양상을 나타내지 않음					
9. 시험자결론	복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 사료됨.					
10. 검토의견						

유전독성시험자료요약서
-소핵시험

민원번호:	☐ 필수 ☑ 선택

1. 원료명	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물)					
2. 시험기관	한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소					
3. 자료의 요건	☐ GLP 기관보고서 ☐ 논문 ☑ 기타 : GLP 기관 중간 보고서					
4. 시험물질 (배합비 포함)	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물)					
5. 시험동물	종	☑ 마우스 ☐ 랫드 ☐ 기타( )				
	계 통	ICR			주 령	6주령
	동물수	5마리	수 컷		암 컷	
6. 처리농도	0, 125, 250, 500 mg/kg B.W					
7. 투여경로	☑ 경구 ☐ 피하 ☐ 정맥 ☐ 복강 ☐ 근육 기타( )					
8. 실험내용	대조군	음성대조군			용 량	
		양성대조군	단회 복강투여		용 량	70 mg/kg B.W.
	처리시간	1일 1회 2일				
	판정기준	최종 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수집 하여 소핵유발과 세포독성을 평가				
9. 시험결과	- 다염성 적혈구의 비율은 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않음 - 개체 당 2000개의 다염성적혈구 (Poly chromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵을 가진 다염성 적혈구 (Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군 에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않음					
10. 시험자결론	마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료됨					
11. 검토의견						

유전독성시험자료요약서
-염색체이상시험

민원번호:	☐ 필수 ☑ 선택

1. 원료명	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물)					
2. 시험기관	한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소					
3. 자료의 요건	☐ GLP 기관보고서 ☐ 논문 ☑ 기타 : GLP 기관 중간 보고서					
4. 시험물질 (배합비 포함)	차열매 추출 분말 (본 시료, 녹차씨추출물) 멸균 증류수 조제					
5. 시험계	세포주	☐ CHO ☑ CHL ☐ V79				
6. 실험내용	처리 농도	직접법 120 μg/mL 대사활성화법 100 μg/mL 를 최고농도로 하여 최고농도 이하 5단계				
	시 험 법	직접법 (-S9 Mix)과 대사활성화법 (+S9 Mix)				
	처리 시간					
	세포수거시간					
7. 대조군	S9mix	세포주	양성대조군	용량 (㎍/ml)	음성대조군	용량 (㎍/ml)
	(+)	CHL	V	최고농도 이하 5단계 시험농도	V	최고농도 이하 5단계 시험농도
	(-)	CHL	V	최고농도 이하 5단계 시험농도	V	최고농도 이하 5단계 시험농도
	확인시험군		최고농도를 100 μg/mL으로 하여 24시간 처리			
8. 시험결과	시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 시험물질 처리군의 농도에 따라 통계학적인 유의성은 없음.					
9. 시험자결론	CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료됨					
10. 검토의견						

[표 3] 기능성 시놉시스

Synopsis #1-In vitro①

학술지정보	Biotechnology and Bioprocess Engineering					
	Vol	22	게재연도	2015	시작페이지	157
논문제목	Anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of standardized tea seed cake extract in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet					
연구목적	3T3-L1 preadipocytes (In vitro)의 anti-adipogenic effect 평가					
연구유형	In vitro					
시험계	In vitro: 3T3-L1 preadipocytes, MTT, Oil red O staining					
시험물질	녹차씨 박 열수추출물(tea seed cake extract) : 녹차씨를 압착하여 Oil을 분리/제거한 후, 남은 박을 1.8L, 90도씨에서 1시간 30분 열수추출-여과-농축-동결건조한 powder 형태의 갈색추출물.					
대조군	▣ control ▣ positive control (EGCG) ☐ negative control					
시험군	3T3-L1 preadipocytes에 0, 10, 25, 50, 75, 100 ㎍/mL 의 GTE (녹차씨박 열수추출물) 및 ECCG 50㎍/mL 를 처리하여 배양 후, Oil-red-O staining 하여 흡광도를 측정.					
바이오마커	① Cytotoxicity(세포독성) : 3T3-L1 cell viability ② Anti-adipogenic effect: 3T3-L1 differentiation(분화) 및 lipid accumulation					
통계처리	SPSS 21(One-way ANOVA) 활용,P values<0.05					
시험결과	① Cytotoxicity(세포독성) : GTE<200㎍/mL 처리는 3T3-L1 cell 세포독성 없음. ② Anti-adipogenic effect : 25<GTE<100㎍/mL의 GTE 처리는 3T3-L1 세포의 분화 및 세포내 TG 축적을 농도 의존적으로 억제하였으며, 100 ㎍/mL 농도에서는 양성 대조군인 EGCG 50 ㎍/mL(p<0.001) 와 동등한 수준의 effect 를 보임.					
비고	- 개요 : Synopsis #4-1, 4-2 참조					

Synopsis #2-In vitro②

학술지정보	한국식품과학회지					
	Vol	47	게재연도	2015	시작페이지	
논문제목	녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과					
연구목적	녹차씨추출물이 3T3-L1 의 지방세포 분화 및 지방 축적에 미치는 영향					
연구유형	In vitro					
시험계	In vitro: 3T3-L1 preadipocytes, DMEM, Oil red O staining					
시험물질	녹차씨 박 열수추출물(tea seed cake extract) : 녹차씨를 압착하여 Oil을 분리/제거한 후, 남은 박을 1.8L, 90도씨에서 1시간 30분 열수추출-여과-농축-동결건조한 powder 형태의 갈색추출물.					
대조군	▣ control ▣ positive control (녹차잎추출물, naringenin) ☐ negative control 3T3-L1 preadipocytes에 2.5, 5, 10, 20, 40 ㎍/mL 의 GTLE(녹차잎추출물) 및 나린제닌 5,10,20㎍/mL 를 처리					
시험군	3T3-L1 preadipocytes에 2.5, 5, 10, 20, 40 ㎍/mL 의 GTSE(녹차씨 박 열수추출물) 처리하여 배양 후, Oil-red-O staining 하여 흡광도를 측정.					
바이오마커	① Cytotoxicity(세포독성) : 3T3-L1 cell viability ② 지방축적량: 3T3-L1 내 중성지방(TG)함량, Free glycerol 함량					
통계처리	SAS 및 ANOVA(one-way) 활용, P values<0.05					
시험결과	① Cytotoxicity(세포독성) : GTSE<1,000㎍/mL 처리는 3T3-L1 cell 세포독성 없음. ② 지방 축적량 - 나린제닌 처리군에서 농도 의존적으로 지방세포 분화 억제 - 대조군 대비 GTLE(녹차추출물)군(34%) 및 GTSE군(52%)에서 지방세포 분화 억제 (GTSE군의 20, 40㎍/mL 농도에서 GTLE군 보다 강한 활성을 나타냄) - lipid droplet 내 중성지방 축적량의 경우 GTLE 및 GTSE 처리군에서 농도의존적으로 유의한 효과를 보였으며, GTLE군 보다 GTSE군의 중성지방 함량이 더 낮게 나타남. - 3,6,9일차 배지의 glycerol 양 측정 결과 분화 3,6일째 GTSE군의 glycerol 분비량이 대조군 대비 유의 증가하였고, 9일째에는 대조군과 거의 유사한 수준의 배지 free glycerol 이 존재. - GTLE 및 GTSE 군에서 AMPK, ACC의 인산화 증가 및 FAS 발현 감소, GTLE 보다 GTSE에더 서 크게 나타남.					
비고						

<개 요>

본 연구는 녹차씨박열수추출물(GTSE)이 성숙한 3T3-L1 지방세포의 지방대사 및 지방 분해 미치는 영향 및 작용기작을 알아보기 위하여 시행되었다. GTSE 은 5.5 mg/g의 나린제닌을 함유하고 있었으나, 카테킨은 전혀 없었다. 세포내 지방구의 함량은 Oil Red O 염색법으로 정량 평가 하였다. GTSE 처리 시, 지방 축척율은 대조군의 52%로 현저하게 감소되었고, 40 μg/mL의 GTSE 처리로 세포내 중성지방의 함량 또한 대조군에 비해 33% 감소되었다. 이러한 GTSE 의 세포내 중성지방 감소 작용기작을 알아보기 위하여, 세포 수준에서 FAS, AMPK, ACC 변화를 측정하였다. 그 결과, GTSE의 처리는 농도의존적으로 AMPK 및 ACC 인산화가 촉진되었고, FAS 발현은 감소되었다.

<Abstract>

The effect of hot water extract from the defatted green tea seed cake (GTSE) on lipid metabolism and underlying mechanisms of lipolysis in mature 3T3-L1 adipocytes were investigated. In this study, we found that the naringenin content of GTSE was 5.5 mg/g however, the catechins were not detected. The intracellular lipid droplets were stained with Oil Red O dye and quantified. Compared to the control, lipid accumulation was significantly decreased by 52%, and Intracellular triglyceride (TG) level was also reduced by 33% with the treatment of GTSE at the concentration of 40 μg/mL. To determine the mechanism for the reduction in TG content, we measured fatty acid synthase (FAS), phosphorylation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) in the cell model. Incubation of the 3T3-L1 adipocytes with GTSE stimulated AMPK and ACC phosphorylation in a dose-dependent manner, and decreased the expression of FAS.

Synopsis #3-In vitro③

학술지정보	Pflugers Arch - Eur J Physiol					
	Vol	457	게재연도	2008	시작페이지	293
논문제목	Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6J mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor-γ					
연구목적	3T3-L1 세포에서 녹차씨 오일 처리군의 adipocyte 변화에 대해 관찰					
연구유형	in vitro					
시험계	3T3-L1 preadipocyte, MTT, Oil red O staining					
시험물질	녹차씨 오일 0.1, 1μg/ml					
대조군	▣ control ☐ positive control ☐ negative control					
시험군	- 3T3-L1 preadipocyte에 녹차씨 오일을 최종 농도 0.1, 1μg/ml 이 되도록 첨가하고, 48시간 배양 후, Oil red O staining 하여 흡광도를 측정한다.					
바이오마커	- adipocyte 분화율, 세포 내 TG 농도, PPAR-γ2 및 C/EBP-α의 발현					
통계처리	SPSS , p value<0.05					
시험결과	- 녹차씨 오일의 처리는 1. 3T3-L1 전지방세포에 세포독성(cell viability, 24시간 처리)이 없음. 2. 3T3-L1 전지방세포의 분화를 농도 의존적으로 억제 하였음(각각 p<0.05. p<0.01) 3. 3T3-L1 전지방세포의 중성지방 축척을 농도의존적으로 감소되었음(p<0.05). 4. PPAR-γ2 및 C/EBP-α,의 mRNA 발현이 대조군의 1/2~1/3수준으로 유의하게 억제되었음 (p<0.01).					
비고	- 개요 : Synopsis #5 참조					

Synopsis #4-1, In vivo①

학술지정보	Biotechnology and Bioprocess Engineering					
	Vol	22	게재연도	2015	시작페이지	157
논문제목	Anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of standardized tea seed cake extract in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet					
연구목적	고지방 및 고탄수화물 식이 유도 동물 모델에서 녹차씨박추출물의 체지방 감소 기전 연구 및 효과의 평가					
연구유형	동물실험					
Species	mice		Age	8주령		
Strain	ICR		Sex	☐ male ☐ female		
시험물질	녹차씨 박 열수추출물 : 녹차씨를 압착하여 Oil을 분리/제거한 후, 남은 박을 1.8L, 90도씨에서 1시간 30분 열수추출-여과-농축-동결건조한 powder 형태의 갈색추출물.					
투입형태	☐ 식이 ☐ 음료 ▣ 강제경구 ☐ 기타					
시험디자인	대조군	placebo	정상식이(NC) 고지방식이(HF-C)			
		positive	Orlistat을 50mg/kg/day 투여한 고지방식이(HF-O)			
		negative				
	시험군	① HF-100: 고지방 식이 + GTE 100 mg/kg/day 투여군 ② HF-300: 고지방식이 + GTE 300 mg/kg/day 투여군 ③ PHF-300: 4주 동안 비만유도 후 300 mg/kg/day 투여군				
	디자인	개요: 45% 고지방식이 유도 마우스모델을 활용하여 GTE 10주 동시 처리 및 4주간 비만 유도 후 GTE 처리에 대한 항비만 효과 평가. 양성대조군으로는 Orlistat을 50mg/kg/day 비교 평가. 사육환경: 12시간 일광주기, 22℃,습도 50±5%,		섭취량	1일 1회 제시한 량만큼 증류수에 녹여 존대 투여	
				섭취기간	10주 PHF-300 군은 6주투여	
	식이조절	con : 정상식이 / 고지방식이(45%fat) 4주간 고지방 식이를 한 비만유도모델 (PHF300) 사료 및 식수량 자유				
바이오마커	체중, 체지방량, 혈청 내 lipid profile(TG, TC, FFA, HDL, LDL) glucose, ALT, AST, 분변 내 TG, TC, Adipocytokine,(leptin,adiponectin), Inflammatory cytokine(IL-6, 10, TNF-a)					
통계처리	2-way ANOVA(SPSS 21 SW)					
시험결과	1. NC 대조군에 비해 고지방 대조군(HF-C)에서 체중 및 백색지방량 유의적 증가($p<0.05$) 2. HFC 그룹에 비해 시험물질 섭취군 HF-100, 300 및 PHF-300 에서 유의적 체중 감소($p<0.05$) 그러나, 식이효율에는 영향이 없음. 3. HFC 그룹에 비해 시험물질 섭취군 HF-100($p<0.05$), 300($p<0.001$) 및 PHF-300($p<0.005$))에서 백색지방량 유의적 감소. 4. 양성대조군 HF-O 그룹에서도 체중($p<0.05$) 및 체지방량($p<0.001$)이 유의적으로 감소하였으나, 지방변 및 묽은변과 같은 side effect가 관찰 됨. 5. 고지방 대조군(HF-C)에 비해 HF-100, 300 및 PHF-300 군에서 혈청 내 TG, TC, FFA, LDL, Glucose, ALT, AST level 유의적으로 감소하였고, HDL level은 유의적 증가($p<0.05$). 6. 고지방식이 대조군(HF-C)에 비해 HF-300, PHF-300 및 HF-O의 분변 내 중성지방 배출량이 유의적으로 증가하였고, 분변 내 TC배출량은 GTE 투여 모든군에서 유의적으로 증가하였음.($p<0.05$) 7. 혈청 내 adipokine (leptin 및 adiponectin) 분비량을 측정한 결과, 고지방 대조군(HF-C)에 비해 HF-O군 및 GTE 투여군(HF-100, 300, PHF-300)에서 leptin 량은 농도의존적으로 감소하고, adiponectin level 은 통계적으로 유의하게 증가하였으며, IL-6,10 및 TNF-a					

	level 이 유의적 감소하였음(p<0.05) , 8. 지방조직 내 IL-6, leptin level은 고지방 대조군(HF-C)에 비해 유의적으로 감소하였고, adiponectin level 은 유의적으로 증가하였음.(p<0.05) 9. adipogenesis 및 lipogenesis 관련한 유전자들의 RNA expression 분석 결과 GTE의 투여는 adipogenesis 관련한 PPArR-r,C/EBPa 및 SREBP 발현을 억제하였고, lipogenesis 관련한 LPL.FAS aP2 의 transcription factor들의 발현을 농도의존적으로 억제시켰음. 10. 또한, GTE 투여 모든군에서 간조직 내 p-AMPK 활성이 증가 되었음.
결 론	- 녹차씨박 추출물의 투여군 adipogenesis 및 lipogenesis 관련한 유전자 및 효소등의 발현 조절을 통한 분변으로의 Tc, TG 배출, adipokine 분비 조절 등 multiple signalling pathway 를 통하여 항비만 효과를 나타 냄.
비고	

Synopsis #4-2, In vivo②

학술지정보	Biotechnology and Bioprocess Engineering					
	Vol	22	게재연도	2015	시작페이지	157
논문제목	Anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of standardized tea seed cake extract in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet					
연구목적	고지방 및 고탄수화물 식이 유도 동물 모델에서 녹차씨박추출물의 체지방 감소 기전 연구 및 효과의 평가					
연구유형	동물실험					
Species	mice			Age	8주령	
Strain	ICR			Sex	☐ male ☐ female	
시험물질	녹차씨 박 열수추출물 : 녹차씨를 압착하여 Oil을 분리/제거한 후, 남은 박을 1.8L, 90도씨에서 1시간 30분 열수추출-여과-농축-동결건조한 powder 형태의 갈색추출물.					
투입형태	☐ 식이 ☐ 음료 ▣ 강제경구 ☐ 기타					
시험디자인	대조군	placebo	정상식이(NC) 고탄수화물식이(HC-C)			
		positive				
		negative				
	시험군	① HC-100: 고지방 식이 + GTE 100 mg/kg/day 투여군 ② HC-300: 고지방식이 + GTE 300 mg/kg/day 투여군				
	디자인	개요: 70% 고탄수화물식이 유도 마우스모델을 활용하여 GTE 10주 투여 전 후의 항비만 효과 평가. 사육환경:12시간 일광주기, 22℃,습도 50±5%,		섭취량	1일 1회 제시한 량만큼 증류수에 녹여 존대 투여	
				섭취기간	10주	
	식이조절	con : 정상식이 / 고탄수화물식이(70%, carbohydrate) 사료 및 식수량 자유				
바이오마커	체중, 체지방량, 혈청 내 lipid profile(TG, TC, FFA, HDL, LDL) glucose, ALT, AST, 분변 내 TG, TC, Adipocytokine,(leptin,adiponectin), Inflammatory cytokine(IL-6, 10, TNF-a)					
통계처리	2-way ANOVA(SPSS 21 SW)					
시험결과	1. NC 대조군에 비해 고탄수화물 대조군(HC-C)에서 체중 및 백색지방량 유의적 증가($p<0.05$) 2. HCC 그룹에 비해 시험물질 섭취군 HC-100, 300 에서 농도의존적으로 유의한 체중 및 백색지방 감소<0.05 그러나, 식이효율에는 영향이 없음. 3. 고탄수화물 대조군(HC-C)에서 HC-100, 300 군에서 혈청 내 TG, TC, FFA, LDL, Glucose, ALT, AST level 유의적으로 감소하였고, HDL level은 유의적 증가($p<0.05$). 4. 고탄수화물 대조군(HC-C)에 비해 HC-300, PHF-300의 분변 내 중성지방(TG) 및 콜레스테롤(TC)배출량이 농도의존적으로 유의 증가($p<0.05$) 되었음. 5. 혈청 내 leptin level 은 고탄수화물투여군(HC-C)에 비해 농도전으로 줄고, adiponectin level 은 통계적으로 유의하게 증가하였음<0.05) , 6. 지방조직 내 IL-6, leptin level은 고탄수화물투여군(HC-C)에 비해유의적으로 감소하였고, adiponectin level 은 유의적으로 증가하였음.($p<0.05$) 7. adipogenesis 및 lipogenesis 관련한 유전자들의 RNA expression 분석 결과 GTE의 투여는 adipogenesis 관련한 PPArR-r,C/EBPa 및 SREBP 발현을 억제 하였고, lipogenesis 관련한 LPL.FAS aP2 의 transcription factor들의 발현을 농도의존적으로 억제시켰음. 8. 또한, GTE 투여 모든군에서 간조직 내 p-AMPK 활성은 증가되었음.					
결 론	- 녹차씨박 추출물의 투여군 adipogenesis 및 lipogenesis 관련한 유전자 및 효소등의 발현 조절을 통한 분변으로의 Tc, TG 배출, adipokine 분비 조절 등 multiple signalling pathway를 통하여 항비만 효과를 나타 냄.					
비고						

<개 요>

Camellia sinensis L(녹차)는 예로부터 자극제, 이뇨제, 비만예방제로 아시아 국가에서 널리 사용되어져 왔다. 녹차에 대해서는 문서화 된 많은 연구자료들이 있으나, 녹차의 열매(씨)에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.본 연구에서는 In vitro 실험을 통해서 녹차씨박열수추출물의 anti-adipogenic effect를 분석하였고, 고지방식이 및 고탄수화물식이로 유도된 마우스 모델을 이용하여 In vivo 항비만 효과를 평가하였다. 실험 결과, 녹차씨박열수추출물(GTE)의 처리는 3T3-L1 지방세포에서 지질 축적을 저해하였고, 고지방 및 고탄수식이 동물모델에서 체중, 피하지방, 혈중지질, 혈당, 인슐린, 렙틴 농도를 유의하게 개선시켰다. 또한, 녹차씨박열수추출물(GTE)은 주요 adipogenic gene (PPARɣ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin)와 지질대사 gene (FAS:Fatty Acid Synthase, 지방산 합성 효소)의 발현을 억제하였다. 나아가 GTE는, 혈장 adiponectin, adipose 세포, 간의 AMP-activated protein kinase (AMPK) 의 발현을 촉진시켰다. 이러한 실험 결과들을 통하여 식이유도 비만 mice 모델에서 GTE의 섭취는 다수의 세포 및 신호전달을 조절하여 항비만효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

Camellia sinensis L. O. Kuntze has traditionally been used in Asian countries as a stimulant, a diuretic, and to prevent obesity. Studies in green tea are well-documented in literature, though the potential of fruit from the plant has never been studied in details.

In the present study, the anti-adipogenic effect of aqueous extract of green tea seed cake extract (GTE) were analysed in-vitro and the anti-obesity effects were determined in-vivo in murine model fed high-fat and high-carbohydrate diets. We found that GTE inhibited the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte and significantly lowered body weight, body fat-pad weights, blood lipid, glucose, insulin, and leptin levels in mice fed high-fat and high-carbohydrate diets. GTE suppressed the expression of important adipogenic genes (PPARɣ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin) and lipid metabolism genes (FAS). Furthermore, GTE induced the levels of adiponectin in serum and adipose tissue, as well as AMP-activated protein kinase (AMPK) in liver tissue. These results suggested that GTE ameliorates its anti-obesity effect through multiple cells signaling pathways in diets induced obesity in mice.

Synopsis #5-In vivo ③

학술지정보	Pflugers Arch - Eur J Physiol					
	Vol	457	게재연도	2008	시작페이지	293
논문제목	Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6J mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor-ɣ					
연구목적	C57BL/6J mice에서 녹차씨 오일의 항 비만 효과를 연구					
연구유형	동물시험					
Species	mice			Age		
Strain	C57BL/6J			Sex	☐ male ☐ female	
시험물질	녹차씨 오일					
투입형태	▣ 식이 ☐ 음료 ☐ 강제경구 ☐ 기타					
시험디자인	대조군	placebo	정상식이(CON) 30% 쇼트닝 고지방식이(S, (150g/kg food))			
		positive				
		negative				
	시험군	- 녹차씨 오일 30%식이 (150g/kg food)				
	디자인	- 각 10마리씩 정상식이, 30%쇼트닝식이, 30%녹차씨오일식이로 나눔 - 85일 후 식이섭취량 및 바이오마커 전후 변화 측정		섭취량	자율섭취	
				섭취기간	85일	
	식이조절	녹차씨 오일 30%식이 (150g/kg food) / 정상식이(CON), 30% 쇼트닝 고지방식이(S, (150g/kg food))				
바이오마커	TC, LDL, HDL, TG, glucose, 알라닌 전이효소					
통계처리	SPSS					
시험결과	1. 정상식이군(CON)에 비해 고지방식이군(S)에서 85일 후 식이섭취량이 유의적으로 증가(p<0.05) 2. 시험완료 후 고지방식이군(S)에 비해 녹차씨오일식이군(GT)에서 체중증가가 유의적으로 적게 나타남(p<0.05) 3. Feed Gain ratio 의 경우 정상식이군(CON) 대비 고지방식이군(S)에서서 2배 높게 나타남 4. 고지방식이군(S)에 비해 녹차씨오일식이군(GT)에서 복부지방량이 유의적으로 낮게 나타남(p<0.01) 5. 고지방식이군(S)에 비해 녹차씨오일식이군(GT)에서 TC가 유의적으로 감소함(p<0.01) 6. 정상식이군(CON)에 비해 고지방식이군(S)에서 LDL이 3배 높게 나타났으며, 고지방식이군(S)에 비해 녹차씨오일식이군(GT)에서 LDL이 36.9% 정도 낮게 나타남(p<0.05) 7. HDL의 경우 전 군에서 유의적 변화가 관찰되지 않았음. 8. TG의 경우 고지방식이군(S)에서 정상식이군(CON)보다 65.8% 높게 나타났으며 녹차씨오일식이군(GT)보다는 60.4% 높게 나타남(p<0.01) 9. glucose 농도는 세 그룹 모두 비슷하였음 10. ALT의 경우 고지방식이군(S)에서 정상식이군(CON)보다 36.8% 높게 나타났고, 녹차씨오일식이군(GT)에 비해서는 약 40.0% 높게 나타남(p<0.01) 11.녹차씨오일식이군(GT)에서 고지방식이군(S) 보다 adipose 조직에서의 PPAR-ɣ2 및 C/EBP-α,의 mRNA의 발현이 유의적으로 억제됨.					
비고	Feed gain ratio : 식이섭취량 대비 체중증가량					

< 개 요>

녹차에는 들어있는 많은 화학적 성분은 의학적, 약리적 작용을 포함하고 있다. 녹차씨 또한 많은 사포닌, 플라보노이드, 비타민, 오일 등과 같은 생체활성 화합물들이 포함되어있다. 그러나, 녹차씨오일의 생리적 기능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 본 연구는 preadipocyte 3T3L-1 세포와 C57BL/6J mice에서 녹차씨 오일의 항비만 효과를 평가하기 위해 실시 되었다. 동물실험으로는, mice를 정상식이, 30%의 쇼트닝이 포함된 고지방식이, 30%의 녹차오일이 포함된 정상식이의 3그룹으로 나누어 85일간 실험을 진행했다. 바이오마커로 TC, LDL, HDL, TG, glucose, 알라닌 전이효소를 시험시작 전 및 완료 후에 측정하였다. 실험 결과, 녹차오일을 포함한 식이 그룹에서 쇼트닝 고지방식이 그룹에 비해 체중증가량이 적게 측정되었고($p<0.01$), 혈장 TC 또한 녹차오일 식이그룹에서 쇼트닝 식이그룹에 비해 32.4% 유의적으로 감소되었다($p<0.01$). 시험관 실험에서는 3T3-L1 세포를 녹차씨오일로 2일간 처리하여 adipocyte 의 분화에 미치는 영향을 관찰하였다. 녹차씨오일은 실험동물의 지방세포 및 지방조직에서 PPAR-r2 와 CCAAT/enhancer binding a-proteind의 발현을 억제하였다. 이러한 결과들은 녹차씨 오일은 항비만 효과를 가지고 있으며, 이러한 항비만 효과는 부분적으로는 지방세포 분화와 관련된 전사인자들의 발현억제를 통해서 이루어짐을 알 수 있었다.

<Abstract>

Given that tea contains a number of chemical constituents possessing medicinal and pharmacological properties, green tea seed is also believed to contain many biologically active compounds such as saponin, flavonoids, vitamins, and oil materials. However, little is known about the physiologic functions of green tea seed oil. The aim of this study is to investigate the anti-obesity effects of green tea seed oil in C57BL/6J mice and in preadipocyte 3T3L-1 cell lines. In vivo, three groups of mice were fed with a standard diet, a high-fat diet containing 30% shortening, or 30% of green tea seed oil based on a standard diet for 85 days. The levels of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglyceride, glucose, and alanine aminotransferase in blood were analyzed at the end of the study. The mice given green tea seed oil gained less weight compared to mice given the shortening diet ($p < 0.01$). The plasma level of total cholesterol was decreased by a significant level of 32.4% in mice given the green tea seed oil compared to the mice given the shortening diet ($p < 0.01$).

In addition, 3T3-L1 cells were treated for 2 days to evaluate effects of green tea seed oil on adipocyte differentiation. Green tea seed oil inhibited expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma(2) and CCAAT/enhancer binding protein-alpha in adipocytes and adipose tissue from the experimental animals. These results indicate that the anti-obesity effects of green tea seed oil might be, in part, through suppression of transcription factors related to adipocyte differentiation.

Synopsis #6-Clinical Trial ①

학술지정보	J Med Food.					
	Vol	16(2)	게재연도	2013	시작페이지	120
논문제목	The effects of green tea consumption and resistance training on body composition and resting metabolic rate in overweight or obese women.					
연구목적	1단계비만 혹은 과체중 여성에게서 저항 트레이닝법을 동반한 녹차의 소비가 체성분 조성 및 기초대사량에 미치는 효과 규명					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	이중눈가림		플라세보대조			
대상자특징 대상자선정(제외)기준	- 선정기준 20-40세의 여성 중 BMI가 25-35kg/m2 인 자 - 제외기준 갑상선질환, 흡연, 알콜중독, 임부 및 수유부, 운동선수, 다이어트 약물이나 보조제를 복용중인 자, 기타 시험에 적합하지 않은 신체상태인 자					
대상자특징 특징						
시험물질	녹차 믹스 파우더					
시험디자인 대조군	placebo	그룹2 플라세보 섭취, 그룹4 플라세보 섭취 및 저항트레이닝 운동 병행				
	positive					
	negative					
시험디자인 시험군	그룹1, 녹차섭취, 그룹3 녹차섭취 및 저항트레이닝 운동 병행					
시험디자인 디자인	1. 4주간 일 1200kcal를 섭취하는 식이 적응기글 가짐 후,. 2. 4그룹으로 나누어져 각 시험물질 혹은 플라세보 10g+200ml 의 냉수에, 오전 10시, 오후 4시에 1일 2회 20g을 섭취 함.. 3. 운동을 병행하는 군(3,4군)은 저항 트레이닝 운동을 함.			섭취량	20g의 녹차믹스 파우더 1회 10g을 200ml의 물에 섞어 1일 2회 섭취	
				섭취기간	8주	
시험디자인 식이조절	1200kcal 의 식이를 유지한다. 식이기록지 작성					
바이오마커	체중, 허리둘레, BMI, 체지방량, 체지방률, 제지방량, 기초대사량, 근력, 혈액학적 검사, (3,4그룹에서만 1RM : 최대부하량)					
통계처리	SAS					
시험결과	1. 그룹1에서 체중, BMI, 허리둘레, 체지방률이 감소하였고, 제지방량은 소폭 증가하였으며 기초대사량은 유의 감소. 2. 그룹2에서 비만관련 물리적 지표는 개선되지 않았으며, 기초대사량이 유의 감소. 3. 그룹3에서는 허리둘레 및 체지방량, 체지방률이 타그룹 대비 유의 감소하였고 제지방량이 타그룹 대비 유의 증가.. 기초대사량은 유의 증가하여 시험 마지막에 4그룹 중 가장 높았음. 혈액학적 검사 결과 triacylglycerol이 그룹4에 비해 유의 감소되었음. 4. 그룹4에서는 제지방량, 체지방량 및 체지방률이 소폭 개선되었으나 유의성은 없었으며 비만관련 물리적인 다른 바이오마커는 변화하지 않았음. 기초대사량은 유의 증가하였음.					
비고	운동 - 벤치프레스, back pull down, 레그프레스(45도) 무게를 점점 올려감. 1RM: 1회 최대 들 수 있는 정도, 힘					

<개요>

녹차는 항 비만 및 발열성이 있는 특징을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 사람의 체중 감량, 특히 여성의 체중 감량에 대한 녹차의 효과를 연구하는 것은 매우 중요한 일이다. 본 연구에서는 과체중 혹은 비만(1단계) 여성에게서 저항 트레이닝법을 동반한 녹차의 소비가 체성분 조성 및 기초대사량에 미치는 효과를 연구하였다. 36명의 여성 피험자는 4주간 식이 적응기를 진행 후 4 그룹으로 나누었다. (그룹1 녹차, 그룹2 플라세보, 그룹3 녹차+저항트레이닝, 그룹4 플라세보+저항트레이닝) 이 시험은 아중눈가림 및 플라세보대조 시험으로 진행되었다. 기초대사량, 체성분 검사는 모든 피험자에게서 측정되었고, 그룹 3,4에 속한 피험자는 혈핵학적 검사 및 1RM (최대부하량)을 추가로 측정하였다. 각 피험자는 프로토콜에 따라 추가 8주간 식이를 유지하며, 주기적으로 평가 관리되었다.1그룹에서 체중감소를 동반하여 기초대사량이 유의 감소하였고, 제지방량은 유지되었으며 허리둘레 및 BMI가 감소되었다. 2그룹에서는 신체계측 및 혈행학적 검사에서는 변화가 없었으며 기초대사량이 유의 감소되었다. 3그룹에서는 기초대사량, 제지방량, 근력이 유의 증가하였고, 체지방, TG, 허리둘레가 4그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 1그룹에서 체중감소를 동반하여 기초대사량이 유의 감소하였고, 제지방량은 유지되었으며 허리둘레 및 BMI가 감소되었다. 2그룹에서는 신체계측 및 혈행학적 검사에서는 변화가 없었으며 기초대사량이 유의 감소되었다. 3그룹에서는 기초대사량, 제지방량, 근력이 유의 증가하였고 체지방, TG, 허리둘레가 4그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 이상의 결과로 저항트레이닝을 병행한 녹차의 섭취는 제지방량, 근력의 증가를 동반한 체지방, 허리둘레, TG 수치의 감소를 가져올 잠재성이 높은 것으로 생각된다.

<Abstract>

Green tea has been shown to have thermogenic and antiobesity properties. Therefore, it is important to investigate its effect on weight loss in humans, especially in women.

We investigated the effects of green tea consumption combined with resistance training on the body composition and the resting metabolic rate (RMR) in women who were overweight or obese (grade I). After 4 weeks on an adaptive diet, 36 women were divided into four groups (group 1 green tea; group 2 placebo; group 3 green tea plus resistance training; group 4 placebo plus resistance training). The study was double-blinded and placebo-controlled. The RMR and body composition were ascertained for each volunteer, blood tests were performed, and subjects in groups 3 and 4 were tested for their one repetition maximum. Each subject followed the protocol and continued the diet for eight additional weeks, and periodic evaluations were administered.

The mean RMR of group 1 decreased significantly and was accompanied by weight loss, maintenance of lean body mass, and decreases in both waist circumference and body mass index. Group 2 showed no variations in anthropometric or blood variables and significantly decreased their mean RMR. Group 3 showed significant increases in RMR, lean body mass, and muscle strength, and significant decreases in body fat, triglycerides, and waist circumference as compared to group 4. Green tea combined with resistance training its potential is increased with decreasing body fat, waist circumference, and triacylglyceride levels and by increasing lean body mass and muscle strength.

Synopsis #7-Clinical Trial ②

<table>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">학술지정보</td><td colspan="6">The journal of Nutrition, Health &Aging</td></tr>
<tr><td>Vol</td><td>16 No.9</td><td>게재연도</td><td>2012</td><td>시작페이지</td><td>738</td></tr>
<tr><td colspan="2">논문제목</td><td colspan="6">Effect of green tea(Camellia sinensis) consumption on the components of metabolic syndrome in elderly</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구목적</td><td colspan="6">녹차의 소비가 고령의 대사질환자들에게 있는 효과를 규명</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구유형</td><td colspan="3">인체적용시험</td><td colspan="2">IRB 구성 및 승인</td><td>Y</td></tr>
<tr><td colspan="2">실험설계</td><td colspan="2">무작위배정</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">대상자특징</td><td>대상자선정
(제외)기준</td><td colspan="6">- 선정기준
60세 이상 대사증후군 진단자나 그에 준한자
- 제외기준
조절이 안 되는 고혈압, 갑상선, 신장, 간 질환자, 지질조절약물 투여자, 최근3개월간 항고혈압 혹은 항당뇨제제 투여자, 치매 진단자, 녹차를 꾸준히 섭취해온 자</td></tr>
<tr><td>특징</td><td colspan="6">- 시험군 Green tea 그룹 (n=24, 남2 여22)
- 대조군 Control 그룹 (n=21, 남5 여16)</td></tr>
<tr><td colspan="2">시험물질</td><td colspan="6">녹차</td></tr>
<tr><td rowspan="6">시험디자인</td><td rowspan="3">대조군</td><td>placebo</td><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td>positive</td><td colspan="5">시험약 없음</td></tr>
<tr><td>negative</td><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td>시험군</td><td colspan="6">녹차 티백1g</td></tr>
<tr><td>디자인</td><td colspan="3" rowspan="2">- GT 그룹은 1일 3회, 1회 1g의 녹차 티백을 70℃ 물 200ml에 우려 아침과 점심 식후 및 저녁 식전에 60 동안 섭취.
- 연구기간동안 식이섭취 및 일상생활은 유지
- 식이섭취조사 및 순응도 조사 실시
- 시험 전/후 바이오마커 비교 분석</td><td>섭취량</td><td>1g을 매일 아침, 점심 식사 이후 및 저녁 식전 총 3회, 총 3g 섭취</td></tr>
<tr><td>섭취기간</td><td>60일</td></tr>
<tr><td>식이조절</td><td colspan="6">없음</td></tr>
<tr><td colspan="2">바이오마커</td><td colspan="6">BMI, 허리둘레, 혈압, TC, TG, HDL, LDL, 공복혈당</td></tr>
<tr><td colspan="2">통계처리</td><td colspan="6">SPSS ver 17.0</td></tr>
<tr><td colspan="2">시험결과</td><td colspan="6">- BMI(p=0.032)와 허리둘레 (p=0.002) 가 시험군과 대조군 사이에 통계적으로 유의하게 차이를 보임
- 다른 바이오마커의 유의성은 없었음</td></tr>
<tr><td colspan="2">비고</td><td colspan="6"></td></tr>
</table>

<개 요>

본 연구는 녹차의 구성물질이 고령의 대사증후군 환자에게 미치는 영향을 알아보기 위함한 중재연구로 샘플은 Rio Grande do Sul 의 Geriatric Service of Hospital São Lucas of Pontifical Catholic University에서 선택되었다. 피험자는 고령의 대사증후군 환자 45명이 등록되어, 각각 녹차 섭취군(n=24) 대조군(n=24)으로 나누어 배정되었다. 시험군은 1g 녹차가 들어있는 티백을 물에 우려 1일 3개씩 60일간 먹었으며, 대조군은 특별히 섭취하는 물질 없이 일상생활을 수행하였다. 피험자의 '대사증후군' 진단 기준은 국제 당뇨 연맹에 따랐으며, 시험 전 후 지질지표 및 Glycemic 지표를 측정하고, 신체계측을 하였다. 시험 결과, 녹차 섭취그룹에서 체중(p<0.001), BMI(P=0.032), 허리둘레(P=0.002)가 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 시험군의 다른 생체지표의 변화는 없었다. 이상의 결과로 녹차의 섭취는 고령의 대사증후군 환자의 체중 감소 유도, BMI 및 허리둘레 감소에 영향이 있는 것으로 생각된다.

<Abstract>

OBJECTIVE: To evaluate the effect of the consumption of green tea on components of MS in the elderly.

DESIGN: Intervention study.

SETTING: The sample was selected from the Geriatric Service of Hospital São Lucas of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

PARTICIPANTS: 45 elderly with MS were enrolled and allocated into two groups: green tea group (GTG, n= 24), who drank green tea and control group (CG, n= 21) without intervention.

INTERVENTION: The GTG received sachets of 1.0 g of green tea, and should drink three cups per day for 60 days and the CG was instructed not to make changes in their lifestyle.

MEASUREMENTS: The diagnostic criteria for MS used were the International Diabetes Federation. The lipidic and glycemic profile, and anthropometric measurements were evaluated before and after intervention.

RESULTS: There was a statistically significant weight loss only in GTG [71.5±12.6 kg to 70.3±12.6 kg (p<0.001)]. A statistically significant decrease in BMI [−0.5±0.4 kg/m2 in GTG and −0.2±0.6 kg/m2 in CG (P=0.032)] and waist circumference [−2.2±2.0 cm in GTG and − 0.3±1.8 cm in CG (P=0.002)] were observed. The intake of green tea did not change the biochemical parameters.

CONCLUSION:

The consumption of green tea was effective in inducing weight loss, reducing BMI and waist circumference in the elderly with MS.

Synopsis #8-Clinical Trial ③

학술지정보	British Journal of Nutrition					
	Vol	107	게재연도	2012	시작페이지	749
논문제목	Beneficial effect of catechin-rich green tea and inulin on the body composition of overweight adult					
연구목적	녹차잎의 카테킨과 이눌린의 조합이 비만 성인의 체지방 및 체중에 미치는 영향					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	선별 무작위배정					
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	- 선정기준 BMI 24kg/m² 이상의 20~50세 성인 남녀 - 제외기준 기타 건강보조식품을 섭취중인 자, 시험시작 1주 전까지 차를 섭취해온 자, 폐경여성, 순환계, 간, 신장, 소화기계 질병이 있는 자					
	특징	- 나이, 성별, BMI에 따라 층화 Randomizing, 각 15명씩 2그룹 총 30명					
시험물질	녹차잎 추출물 (camellia sinensis)					
시험디자인	대조군	placebo				
		positive	녹차잎 8.5g 의 추출물			
		negative				
	시험군	녹차잎 28g의 추출물 및 18g의 이눌린 파우더				
	디자인	- 각 군에 배정된 피험자는 일상생활 및 3끼 식이를 유지하며 - 6주간 매일 각 녹차잎 28g + 이눌린파우더 18g, 녹차잎 8g 의 추출물을 650ml, 70도씨 물에 타서 2회에 나누어 각 325ml씩 섭취		섭취량	녹차잎 28g 추출물 티백 및 이눌린파우더 18g	
				섭취기간	해당 용액을 1일 2회 나누어 6주간 섭취	
	식이조절	카테킨, 폴리페놀, 카페인이 포함된 다른 식품 섭취는 금지				
바이오마커	체중, BMI, 체지방량, 제지방량, 허리둘레, 힙둘레, 혈압, 혈중 지질, 심폐기능검사					
통계처리	X^2test, $p<0.05$					
시험결과	(군간 차이) - 체중과 BMI는 시험군 및 대조군에서 유의한 차이를 가지고 감소 - 허리둘레 및 힙둘레는 통계적으로 유의하지는 않지만 의미 있게 감소 (허리 p=0.07, 힙 p=0.06) (전후 차이) - 혈압 및 혈당은 시험군에서 시험종료(6주 섭취)후 유의적 감소 - 혈중 지질은 변화 없음					
비고						

<개 요>

녹차의 카테킨은 항비만효과가 있는 것으로 알려져 왔다. 본 연구의 목적은 카테킨이 풍부한 녹차와, 이눌린의 조합이 비만 성인의 체중 및 체지방량에 미치는 영향을 규명하는 것이다. 총 30명의 피험자가 시험군 및 대조군 2그룹으로 나누어 배정되었고, 시험군은 카테킨이 풍부한 녹차에 이눌린을 혼합한 시험물질을 일 650ml 섭취하였다. 시험 결과, 6주후 시험군에서 체중(-1.29(SEM 0.35)kg) 및 체지방(0.82(SEM0.27)kg)이 감소되었고, 별다른 이상반응은 발견되지 않았다. 또한, 시험 종료 후 2주간의 추가관찰 결과 체중 및 체지방 감소효과가 지속되었다. 이 시험을 통해 카테킨이 풍부한 녹차, 이눌린을 조합하여 지속적으로 섭취하는 것은 최소 3주부터 체중 조절에 긍정적인 영향을 줄 수 있다는 결론을 얻었다.

<Abstract>

Green tea catechin has been proposed to have an anti-obesity effect. The aim of the present study was to investigate whether the effect of catechin-rich green tea in combination with inulin affects body weight and fat mass in obese and overweight adults. A total of thirty subjects were divided into a control group and an experimental group who received 650 ml tea or catechin-rich green tea plus inulin. A reduction of body weight (- 1·29 (sem 0·35) kg) and fat mass (0·82 (sem 0·27) kg) in the experimental group was found after 6 weeks, and no adverse effects were observed. After refraining from consumption for 2 weeks, sustained effects on body weight and fat mass were observed. We conclude that continuous intake of catechin-rich green tea in combination with inulin for at least 3 weeks may be beneficial for weight management.

Synopsis #9-Clinical Trial ④

학술지정보	Alternative Medicine Review					
	Vol	16(2)	게재연도	2011	시작페이지	157
논문제목	Does supplementation with green tea extract improve insulin resistance in obese type 2 diabetics? A randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial					
연구목적	디카페인 녹차(매일 856mg의 EGCG 섭취)가 비만인 2형 당뇨 환자에 미치는 영향 연구					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인		
실험설계	무작위배정		이중눈가림		플라세보대조	
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	- 선정기준 BMI 25kg/m² 이상이며, 1년이상 2형 당뇨를 앓아온 20-65세 사이의 중국인 - 제외기준 ALT>80IU/L, creatinine>20mg/dL, 임신부 및 수유부, 허혈성 심질환, 심부전, 뇌졸중 및 기타 심각한 질병을 진단 받은 자, 기타 임상에 적합지 않은 컨디션의 대상자					
	특징	- 시험군 : 남12명 여23명, 2형당뇨 가족력 6년, 평균연령 50.5세, 당뇨병력 4년, 키 160cm, 체중 77.8kg - 대조군 : 남12명 여21명, 2형당뇨 가족력 4년, 평균연령 52.2세, 당뇨병력 4.3년, 키 159cm, 체중 73.8kg					
시험물질	디카페인 녹차					
시험디자인	대조군	placebo	셀룰로오스 캡슐			
		positive				
		negative				
	시험군	디카페인 녹차 추출물 캡슐				
	디자인	- 피험자는 16주간 매일 3회 식사 30분 후 캡슐을 복용 하며, 평상시 식이 및 일상생활을 수행		섭취량	1회 500mg 녹차추출물 (57.12%의 EGCG) 1일 3회 총 1500mg	
				섭취기간	16주	
	식이조절	- 별도로 없으나, 저혈당(당뇨약) 복용은 유지하되 저혈당 증세가 오면 녹차 복용량을 즉시 줄이기로 함.				
바이오마커	체중, BMI, 허리둘레, 혈압(수축기,이완기), 혈당, HbA1c, 혈중인슐린, HOMA-IR, leptin, adiponectin, ghrelin, 공복 TG, TC, HDL, LDL, ALT, creatinine, 뇨산					
통계처리	SPSS					
시험결과	- BMI, 허리둘레, 혈압, 공복혈당, HbA1C, 공복 인슐린, 렙틴, 애디포넥틴, 그렐린, 혈중지질, ALT, creatinine, 뇨산, HOMA-IR 모두 감소하였으나 군간 유의성은 없었음 - 시험군에서 허리둘레, Hb1AC, HOMA-IR, 인슐린이 시험 전후 유의 변화하였으며, 그렐린의 경우 시험군 및 대조군 모두에서 시험 전후 유의 증가					
비고						

<개 요>

녹차는 세계적으로 가장 많이 알려진 음료의 하나로 제 2형 당뇨를 비롯하여 많은 질병을 예방/치료에 유익한 효과가 있다고 믿어져 왔다. 본 연구의 목적은 디카페인 녹차(매일 856mg의 EGCG 섭취)가 비만한 2형 당뇨 환자에 미치는 영향을 규명하려는 것이다. 본 인체적용시험은 2007.12 부터 2008.11 까지 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조로 실시 되었다. 피험자는 무작위 배정되어 1,500mg의 디카페인 녹차추출물 혹은 플라세보를 섭취하며, 16주 동안 시험에 참여하게 된다. 80명의 피험자는 20~65세, BMI 25kg/m2 이상, 2형 당뇨를 1년 이상 앓고 있었으며, 68명이 이 시험을 끝까지 완료하였다. 인슐린 저항능을 측정하는 HOMA-IR을 1차 바이오마커로 결정하였고, 각 그룹에서 실험 참여 전/후 신체계측, 공복혈당, 당화혈색소(HbA1C), 호르몬 펩타이드, 혈장중 지단백 수치를 측정하였다. 군간 유의 유의적 차이를 보인 바이오마커는 없었다. 군내비교에서는 GTE 섭취 그룹에서 HbA1C(0.4%)가 통계적으로 유의하게 감소하였고, 허리둘레, HOMA-IR index, 인슐린농도가 유의적으로 감소, ghrelin 농도가 유의적으로 증가하였다. ghrelin 농도는 플라세보 그룹에서도 유의적으로 증가하였다. 본 연구에서 두그룹간 바이오마커의 유의적인 차이가 없었으나, 각 군의 전후 비교에서는 몇몇 유의성을 보인 바이오마커들은 있었다. 따라서, EGCG 표준화 디카페인 녹차가 2형 당뇨를 가진 비만인에게 미치는 임상적 유용성을 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

<Abstract>

BACKGROUND:

Green tea is one of the most popular beverages in the world. It is believed to have beneficial effects in the prevention and treatment of many diseases, one of which is type 2 diabetes. The aim of the study is to examine the effect of a decaffeinated green tea extract (GTE) providing a daily dose of 856 mg of epigallocatechin gallate (EGCG) on obese individuals with type 2 diabetes.

MATERIALS AND METHODS:

The clinical trial was a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial conducted from December 2007 through November 2008. The subjects were randomly assigned to either receive 1,500 mg of a decaffeinated GTE or placebo daily for 16 weeks. Sixty-eight of 80 subjects, ages 20-65 years with BMI > 25 kg/m2 and type 2 diabetes for more than one year, completed this study. Homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was used as the major outcome measurement. At baseline and after 16 weeks of treatment, anthropometric measurements, fasting glucose, hemoglobin A1C percent (HbA1C), hormone peptides, and plasma lipoproteins were measured from both groups.

RESULTS:

No statistically significant differences were detected between the decaffeinated GTE and placebo groups in any measured variable. A statistically significant within-group 0.4-percent reduction in HbA1C (from 8.4 to 8.0%) was observed after GTE treatment compared to baseline. Within-group comparison also revealed that the GTE group had significant reductions in waist circumference (WC), HOMA-IR index, and insulin level, and a significant increase in the level of ghrelin. Within-group comparison of those in the placebo group showed a significant increase in the level of ghrelin.

CONCLUSIONS:

This study found no statistical difference in any measured variable between the decaffeinated GTE and placebo groups; however, there were some statistically significant within-group changes detected. More research is required to determine whether a decaffeinated GTE standardized for EGCG content will provide any clinical benefits in obese individuals with type 2 diabetes. Clinical Trial Registration NO: NCT00567905.

Synopsis #10-Clinical Trial ⑤

학술지정보	j Hum Nutr Diet					
	Vol	23(6)	게재연도	2010	시작페이지	590
논문제목	Green Tea Improves Metabolic Biomarkers, not Weight or Body Composition: A Pilot Study in Overweight Breast Cancer Survivors					
연구목적	6개월간 매일 디카페인 녹차 섭취가 과체중 유방암 생존자의 체성분, 생체지표, 지질지표에 미치는 영향을 연구한 것이다.					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	무작위배정		이중눈가림		플라세보 대조	
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	- 선정기준 시험시작 12개월 이전 10년 이내에 3기 이내의 초기 유방암 진단을 받은 적이 있는 18-40세의 여성 중 BMI가 25-40사이인 대상자. 유방암 수술 이후 화학적 항암치료를 받아온 자 - 제외기준 최근 12개월이내 흡연력이 없고 현재 비흡연자, 당뇨병 심장병 등 만성질환자, 혈당 혹은 혈중지질 조절제를 복용중인 자, 유방암 치료 외에 다른 암 유병자, 다이어트중이거나 최근 6개월 이내 체중조절 보조제를 복용한 자					
	특징	- 54명의 피험자, 29명이 시험군 25명이 대조군 - 평균연령 57.1세 평균체중 80.2kg, BMI 30kg/m2, WHR 0.8, 화학적 항암치료력 100%, 방사선 항암치료력 56.4% - 시험군의 BMI31.0 대조군의 BMI 28.7					
시험물질	디카페인 녹차					
시험디자인	대조군	placebo	허브티백 (시트러스 베이스)			
		positive				
		negative				
	시험군	녹차 티백 : 550-700mg의 녹차 고형분, 58.91mg/bag의 카테킨, 32.21mg/bag 의 EGCG				
	디자인	- 각 군에 무작위배정된 피험자는 제공된 시험물질 혹은 placebo 티백을 240ml의 끓는물에 3분 이내로 우려내 마신다. - 1일 4회, 혹은 2티백에 500ml의 물로 2회를 섭취해도 된다. - 우려낸 티백은 제공된 백에 담아 시험자가 회수한다.		섭취량	녹차 고형분으로 550-700mg의 티백 1일 4회 섭취	
				섭취기간	6개월	
	식이조절					
바이오마커	키, 체중, BMI, 체지방율, 제지방량, WHR, 기초대사량, TC, TG, LDL, HDL, HOMA-IR					
통계처리	SPSS					
시험결과	- 시험군의 시험 전 후 카페인 섭취량이 군간비교시 유의감소 (p=0.03) - 시험군에서 시험 전 후 에너지, 지방, 단백질, 탄수화물 섭취량 유의 감소 - 시험군에서(-1.2kg) 대조군(+0.2kg) 대비 체중이 감소하였으나 유의성은 없었음 - 시험군에서 HDL 콜레스테롤 수치가 유의적으로 증가(p=0.003) - HDL/LDL 비 및 HOMA-IR의 경우, 시험군에서 유의성이 없이 개선					
비고						

<개 요>

유방암 치료 후 여성의 과체중상태는 유방암의 재발 및 조기 심질환 발병을 증가시킬 수 있다. 녹차는 체중감소 및 포도당, 인슐린, 혈중지질 조절에 긍정적인 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 탐색적 인체적용시험은 과체중 유방암 생존자를 대상으로 6개월간 매일 디카페인 녹차를 섭취가 체성분, 생체지표, 지질지표에 미치는 영향을 연구 한 것이다. 과체중 유방암 생존자가 매일 디카페인 녹차를 섭취할 때 체중, 체성분 구성, 기초대사율, 에너지 섭취, 포도당, 인슐린, HOMA-IR- 및 지질을 개선하는데 미치는 영향을 평가하였다. 피험자의 표준체중은 80.2kg, BMI는 30.1 kg m^{-2}, 체지방률은 46.4% 이며, 피험자는 무작위 배정되어 6개월간 960ml 의 디카페인 녹차 또는 플라세보를 섭취하였다. 녹차 섭취그룹의 방문 완료자(39명)은 주당 평균 5,952ml의 시험물질을 섭취 했는데,(표준편차 1176ml), 녹차 섭취군에서 에너지원 섭취량이 유의적으로 감소하였고(p=0.02), 시험군에서(-1.2kg) 대조군(+0.2kg)에 비해 체중이 감소하였으나, 통 계적 유의성은 없었다. 또한, 녹차 섭취군에서 HDL 콜레스테롤 수치가 유의적으로 개선 되었고.(p=0.003, HDL/LDL 비 및 HOMA-IR (-1.1 ± 5.9: green tea; +3.2 ± 7.2: herbal) 수치는 개선은 되었으나, 통계적으로 유의성은 없었다. 결론적으로, 과체중인 유방암 생존자의 6개월간의 디카페인 섭취는 약간의 체중감소, HDL 및 glucose homeostasis 개선을 가져올 수 있다..

<Abstract>

BACKGROUND:

Overweight status after breast cancer treatment may increase a woman's risk for recurrent disease and/or early onset cardiovascular disease. Green tea has been proposed to promote weight loss and favourably modify glucose, insulin and blood lipids. This pilot study tested the effect of daily decaffeinated green tea consumption for 6 months on weight and body composition, select metabolic parameters and lipid profiles in overweight breast cancer survivors.

METHODS:

The effect of daily decaffeinated green tea intake on weight, body composition and changes in resting metabolic rate, energy intake, glucose, insulin, homeostasis model assessment--insulin resistance (HOMA-IR) and lipids was evaluated in overweight breast cancer survivors. Participants had a mean weight of 80.2 kg; body mass index (BMI) 30.1 kg m^{-2}; and body fat 46.4%. Participants (n = 54) were randomised to 960 mL of decaffeinated green or placebo tea daily for 6 months.

RESULTS:

Mean (SD) tea intake among study completers (n = 39) was 5952 (1176) mL $week^{-1}$ and was associated with a significant reduction in energy intake (P = 0.02). Change in body weight of -1.2 kg (green tea) versus +0.2 kg (placebo) suggests a weight change effect, although this was not statistically significant. Decaffeinated green tea intake was associated with elevated high-density lipoprotein (HDL) levels (P = 0.003) and nonsignificant improvements in the HDL/LDL ratio and HOMA-IR (-1.1 ± 5.9: green tea; +3.2 ± 7.2: herbal).

CONCLUSIONS:

Intake of decaffeinated green tea for 6 months was associated with a slight reduction in body weight and improved HDL and glucose homeostasis in overweight breast cancer survivors.

Synopsis #11-Clinical Trial ⑥

학술지정보	The journal of nutrition					
	Vol	139	게재연도	2009	시작페이지	264
논문제목	Green tea catechin consumption enhances exercise-induced abdominal fat loss in overweight and obese adults.					
연구목적	운동으로 체중감량중인 비만 성인에게 녹차의 카테킨이 체성분 및 체지방 분해에 미치는 영향					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	무작위배정	이중눈가림	대조군			
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	-선정기준 활동량이 많지 않은 건강한 남성 또는 여성 21-65세 사이, 허리둘레 87cm 이상(여) 90cm 이상(남), TC 5.2mmol/L - 제외기준 임부 및 수유부, 시험진행기간 중 임신 계획이 있는 자 BMI가 25보다 작거나 40보다 큰 자, 최근에 4.5kg 이상의 체중이 감량된 자, 체중조절 처방을 받았거나 보조제 섭취 및 프로그램 참여자, 체중 감소 수술(시술)을 받은 자, 식이장애					
	특징	- 132명이 최종 등록되어 67명이 시험군에, 65명이 대조군에 배정됨 - 시험군 : 남 32명 여 33명, 평균연령 47세, BMI 32.2kg/m2, 체중 95.1kg, 키 171.3cm, 허리둘레 108.2cm, 체지방량 37kg, 제지방량 56.7kg - 대조군 : 남 35명 여 28명, 평균연령 49세, BMI 32.2kg/m2, 체중 95.1kg, 키 171.5cm, 허리둘레 108.9cm, 체지방량 38.1kg, 제지방량 55.7kg					
시험물질	녹차 추출물					
시험디자인	대조군	placebo	카페인, 인공향 등이 첨가된 음료			
		positive				
		negative				
	시험군	녹차 음료 (EGCG로 214.4mg/500mLm 카테킨으로 625mg/500mL, 카페인으로 39mg/500mL)				
	디자인	- 각 군에 배정된 피험자는 시험약 혹은 대조약 500mL을 하루 중 언제라도 섭취지속시간이 30분을 넘기지 않게 섭취 - 시험약 혹은 대조약을 복용한 내용과 다른 카페인음료를 복용한 내용을 기록 - 식사량은 그대로 유지하며, 각 군 배정 이후로 '당뇨예방프로그램'에 따른 운동을 시작함 - 시험기간중 중중도의 운동을 수행하는 시간을 일 180분 이상을 목표로 하여 계속하여 운동 레벨을 높여가며 적어도 주 3회 이상 시행 - 식사 및 운동일지 작성 - 체중, 허리둘레, 안정시 좌위혈압을, DEXA, TG, TC, HDL, LDL, 공복혈당, hs-CRP, FFA, B-hydoxybutyrate, GbA1c, 혈장MDA를 측정			섭취량	500mL의 음료
					섭취 기간	12주
	식이조절	1일 2잔 이상의 카페인 음료를 섭취하지 않고, 카페인 관련 약이나 처방을 받지 않아야 함				
바이오마커	체중, 허리둘레, 안정시 좌위혈압, DEXA, TG, TC, HDL, LDL, 공복혈당, hs-CRP, FFA, B-hydoxybutyrate, GbA1c, 혈장MDA					
통계처리	SAS, ANCOVA					

시험결과	- 순응도 : 시험군 97% 대조군 92% - 신체활동점수는 두 그룹이 비슷함 (시험군 219.4 대조군 225.4) - 일 카페인 섭취량 또한 두 그룹이 비슷함 (115.3mg/일) - 시험군에서 체중의 의미있는 감소세가 보였으나 군간 유의성은 없음 - 복부지방, TG, FFA 의 경우 시험군에서 통계적으로 유의한 감소를 보임
비고	DXA : Dual energy x-ray absorptiometry MDA : malondialdehyde

<개 요>

본 연구는 녹차의 카테킨이 운동으로 체중감량중인 비만 성인의 체성분 및 체지방 분해에 미치는 영향을 연구한 것이다. 132명의 피험자는 625mg의 카테킨 및 39mg의 카페인이 함유된 음료 혹은 플라세보(39mg의 카페인, no 카테킨)그룹에 무작위 배정되어 해당 시험약/대조약을 12주간 섭취한다.

모든 피험자는 시험기간 중 식이섭취는 그대로 유지하고, 주 3회, 총 180분 이상 중증도의 활동을 한다. 바이오마커로 체성분(DEXA), 복부지방 및 진단의학검사를 시험시작 전 및 12주 후 측정했다.

시험 결과, 카테킨 섭취군에서 대조군 대비 더 많은 체중 감소(p=0.079)를 보였다. : 95%신뢰수준, 연령, 성별의 base 값 보정,- 체중 감소치는 각각 -2.2 (-3.1, -1.3)과d -1.0 (-1.9, -0.1) kg,이었다.

체지방의 경우 두 군간 통계적 유의성은 없었지만, 대조군에 비해 카테킨 섭취 군에서 복부지방, 복부피하지방 및 공복 시의 TG 값이 더 많이 감소하였다. 이상의 실험결과들로 녹차 카테킨 섭취와 운동의 병행은 복부지방 및 혈장 TG에 영향을 주는 것으로 생각된다.

<Abstract>

This study evaluated the influence of a green tea catechin beverage on body composition and fat distribution in overweight and obese adults during exercise-induced weight loss.

Participants (n = 132 with 107 completers) were randomly assigned to receive a beverage containing approximately 625 mg of catechins with 39 mg caffeine or a control beverage (39 mg caffeine, no catechins) for 12 wk. Participants were asked to maintain constant energy intake and engage in >or=180 min/wk moderate intensity exercise, including >or=3 supervised sessions per week.

Body composition (dual X-ray absorptiometry), abdominal fat areas (computed tomography), and clinical laboratory tests were measured at baseline and wk 12. There was a trend (P = 0.079) toward greater loss of body weight in the catechin group compared with the control group; least squares mean (95% CI) changes, adjusted for baseline value, age, and sex, were -2.2 (-3.1, -1.3) and -1.0 (-1.9, -0.1) kg, respectively. Percentage changes in fat mass did not differ between the catechin [5.2 (-7.0, -3.4)] and control groups [-3.5 (-5.4, 1.6)] (P = 0.208). However, percentage changes in total abdominal fat area [-7.7 (-11.7, -3.8) vs. -0.3 (-4.4, 3.9); P = 0.013], subcutaneous abdominal fat area [-6.2 (-10.2, -2.2) vs. 0.8 (-3.3, 4.9); P = 0.019], and fasting serum triglycerides (TG) [-11.2 (-18.8, -3.6) vs. 1.9 (-5.9, 9.7); P = 0.023] were greater in the catechin group. These findings suggest that green tea catechin consumption enhances exercise-induced changes in abdominal fat and serum TG.

Synopsis #12-Clinical Trial ⑦

학술지정보	clinical nutrition					
	Vol	27	게재연도	2008	시작페이지	363
논문제목	Effect of green tea extract on obese women : a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial					
연구목적	비만 여성에게 미치는 녹차추출물의 효과 및 녹차추출물과 비만 관련 호르몬 peptide와의 상관관계를 규명					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	무작위배정		이중눈가림		플라세보대조	
대상자특징	대상자선정(제외)기준	- 선정기준 BMI 27kg/m2 이상의 16세에서 60세 사이 여성 - 제외 내분비계 질환자(갑상선, 뇌하수체, 성호르몬 등), 심장병 질환자(부정맥, 심부전, 심근경색, 동방결절 이상 등), 알러지 및 면역계 질병, 흡장 아미노산 및 creatinine 수치 이상, 임부 및 수유부, 최근 6개월이내에 출산한 자, 뇌졸중 및 기타 운동관련 질환자, 최근 3개월이내 체중조절 경험이 있는 자, 기타 임상 참여에 부적합한 상태인 자					
	특징	평균 연령 43.4세, 키 158.2cm, 체중 77.5kg, BMI 20.8kg/m2					
시험물질	녹차추출물					
시험디자인	대조군	placebo	microcrystalinel cellulose 100%			
		positive				
		negative				
	시험군	녹차추출물 400mg (EGCG로 31.5%, cellulose 46.6%)				
	디자인	- 시험군 및 대조군에 배정된 피험자는 1일 3회, 1회 400mg의 시험물질 혹은 플라세포 캡슐을 매 식후 30분에 섭취 - 시험시작전, 진행중 4주마다 체중, BMI, 허리둘레 및 혈액학적 지표, Hormone 지표를 측정		섭취량	1일 3캡슐, 1캡슐 400mg		
				섭취기간	12주	
	식이조절	없음, 별도의 다이어트 금지.				
바이오마커	체중, BMI, 허리둘레, 힙둘레, 혈액학적검사(혈당, creatinine, aspartate 전달효소, alanine 전달효소, 요산, 혈중지질(TG,TC,HDL, LDL)), 호르몬지표(인슐린, 애디포넥틴-HOMA-IR-, 렙틴, 그렐린)					
통계처리	SPSS					
시험결과	- GTE를 12주간 섭취한 그룹에서 0.3%의 체중 감소율(0.15kg)이 보였으며, 체중, BMI, 허리둘레에서 시험군과 대조군간의 통계적으로 유의한 차이는 없음 - 전후 비교에서 녹차추출물 그룹이 LDL, TG가 유의적으로 감소하였으며 HDL, adiponectin, ghrelin 이 의미있게 증가하였다. 대조군에서는 TG만이 유의 감소하였으며 ghrelin 이 의미있게 증가 - 특별한 이상반응은 없음					
비고						

< 개 요>

본 연구는 녹차추출물이 비만여성에게 미치는 효과와 녹차추출물과 비만 관련 호르몬 peptide와의 상관관계를 규명하기 위해 수행 되었다..본 연구는 타이완 Taipei 병원에서 2006.06-2007.07 에 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조로 실시 되었다. 시험은 16세~60세, BMI 27kg/m2 이상 여성 중 시험시작 전 3개월 이내 체중조절 경험이 없는 피험자 100명을 대상으로 3개월간 진행되었으며, 피험자 중 78명이 방문을 완료하였다. 피험자는 녹차추출물 섭취군인 A(n=41)와 셀룰로오스 플라세보 섭취군인 B(n=37)로 무작위 배정되어 각각 400mg의 캡슐을 하루에 3회, 12주간 섭취하였다. 바이오마커로 시험 시작시점 및 12주 후 체중, BMI, 허리둘레를 측정하였으며, 결과는 변화율(%로)로 비교하였다..

.시험결과, GTE를 12주간 섭취한 시험군에서 0.3%의 체중 감소율(0.15kg)이 보였으며, 체중, BMI, 허리둘레에서 시험군과 대조군간의 감소율(%)의 통계적으로 유의성은 없었다. 전후 비교에서 시험군인 GTE 그룹에서 LDL, TG가 전후 유의적으로 감소하였으며, HDL, adiponectin, ghrelin 이 의미있게 증가하였다. 대조군에서는 TG만이 유의 감소하였으며, ghrelin 이 의미있게 증가하였다. 반면에 플라세보 섭취군에서는 TG만이 전후 유의하게 감소하였으며, 그렐린이 의미있게 증가하였다. 12주간 시험을 진행한 결과, 녹차추출물 섭취군과 플라세보 섭취군 간의 체중, 체지방, 허리둘레 감소율의 통계적 유의성은 확인하지 못하였으나, 녹차추출물을 12주간 섭취하는 것(EGCG 302mg을 포함하는 카테킨으로 491mg)이 안전하다는 결론을 얻었다.

<Abstract>

AIMS: To examine the effect of green tea extract (GTE) on obese women and to explore the relationship between GTE and obesity-related hormone peptides.

METHODS:

A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was conducted from July 2006 to June 2007 in Taipei Hospital, Taiwan. Seventy-eight of 100 obese women aged between 16 and 60 years with BMI>27 kg/m(2) and who had not received any other weight control maneuvers within the last 3 months completed this study.

The subjects were randomly divided into Groups A and B. Group A (n=41) received GTE while Group B (n=37) took cellulose as a placebo, one capsule (400mg) three times each day for 12 weeks. The body weight (BW), body mass index (BMI) and waist circumflex (WC) were measured at the beginning of the study and after 12 weeks of treatment with GTE. The data were compared and expressed as % reduction.

RESULTS:

There was only a 0.3% reduction in BW (0.15 kg) after 12 weeks of treatment with GTE. There was no statistical difference in % reduction in BW, BMI and WC between the GTE and placebo groups. Within group comparison revealed that the GTE group had significant reduction in LDL-cholesterol and triglyceride, and marked increase in the level of HDL-cholesterol, adiponectin and ghrelin. On the other hand, the placebo group showed significant reduction in triglyceride only, and a marked increase in the level of ghrelin alone.

CONCLUSIONS:

This study showed no statistical difference in % reduction in BW, BMI and WC between the GTE and placebo groups after 12 weeks of treatment. The intake of GTE (491 mg catechins containing 302 mg EGCG) for 12 weeks is considered safe as shown by the results.

Synopsis #13-Clinical Trial ⑧

학술지정보	physiology & behavior					
	Vol	93	게재연도	2008	시작페이지	486
논문제목	Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais : A randomized, controlled trial					
연구목적	녹차가 thai 비만인의 체중 감소에 미치는 영향을 연구					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	무작위배정		대조군		단일눈가림	
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	- 선정기준 40-60세의 남녀 여성의 경우 폐경 후 1년이 지났고 BMI가 25kg/m2인 자 - 제외기준 당뇨 및 갑상선질환, 쿠싱증후군 같은 대사성 질환자, 심장, 신장, 간 질환자, 항정신/항우울/항비만제 처방복용자, 정기적으로 운동을 하거나 평균 에너지소비량이 8373.6kJ/일 이상인 자, 차나 카페인에 민감반응이 있는 자					
	특징	18명의 남성, 42명의 여성 BMI의 경우 1형 비만으로 분류, 식이 섭취 및 신체활동에 유의적 차이가 없음 시험군 : 남 9 여 21, 평균연령 48.53세, 평균키 1.61m, 체중 69.3kg, BMI 27.42kg/m2, 체지방률 39.47%, 허리둘레 88.06cm, 힙둘레 102.4cm 대조군 : 남 9 여 21, 평균연령 48.95세, 평균키 1.59m, 체중 71.9kg, BMI 28.00kg/m2, 체지방률 39.69%, 허리둘레 92.23cm, 힙둘레 106.2cm					
시험물질	녹차잎 추출물					
시험디자인	대조군	placebo	cellulose 캡슐			
		positive				
		negative				
	시험군	녹차잎 추출물 캡슐 250mg EGCG 33.58mg, 카페인 28.86mg)				
	디자인	- 각 군은 아침, 점심, 저녁에 각각 250mg의 캡슐을 12주간 섭취한다. - 12주간 sringarind 병원에서 제공하는 3끼의 thai식 식사를 하며 일상생활을 유지한다. - BMI, 체성분, 기초대사량, 기질산화도를 시험시작, 4,8,12주에 측정한다. - urine VMA 및 렙틴은 시험시작시 및 12주에 측정한다		섭취량	250mg/회, 3회/일		
				섭취기간	12주	
	식이조절	sringarind 병원에서 제공하는 탄수화물65%, 단백질15%, 지방20% 구성의 3끼 thai식				
바이오마커	- BMI, 체성분(=WHR), 기초대사량, 기질산화도, urine VMA, 렙틴					
통계처리	STATA, ANOVA					
시험결과	- 시험군에서 체중, 체지방량, 허리둘레, 식이섭취량(이상 $p<0.05$), BMI, RQ(이상 $p<0.001$)이 8주후 군간 유의성있게 감소 - 시험군에서 체중, BMI, 체지방, 허리둘레, WHR, RQ, 식이섭취량이 8주에 전후 유의 감소 - 대조군에서 RQ가 8주에 전후ㅠ 유의 감소 - 12주차에 시험군에서 체중, Urine VMA가 군간 유의 감소 및 체중, 렙틴, Urine VMA가 전후 유의 감소 - 12주차에 대조군에서 렙틴이 전후 유의 감소					
비고	- VMA : Vanillylmadelic acid - RQ :respiratory quotient					

< 개 요>

본 연구는 녹차가 thai 비만인의 체중 감소에 미치는 영향을 연구한 것으로, BMI 25이상인 60명의 thai 비만인을 대상으로 한 무작위배정, 대조군대비 인체적용시험이다. 피험자는 12주간 sringarind 병원에서 제공하는 탄수화물65%, 단백질 15%, 지방 20% 구성의 3끼의 thai식 식사를 하였으며, 바이오마커 중 체중, BMI, 체성분, 기초대사량, 기질산화도는 시험시작전 및 4, 8, 12주에 측정하였고, 혈장 렙틴농도 및 urine VMA는 시험시작 전 및 12주 후 측정하였다. 시험 완료 후 , 두 그룹(녹차 혹은 플라세보)간의 차이는 2-factor ANOVA 프로그램을 이용하여 통계처리 하였다. 시험 결과, 두 그룹간 체중감량은 4주차에 2.7kg, 8주차에 5.1kg, 12주차에 3.3kg의 차이를 보였고, 8주와 12주에 체중 감량에서 군간 유의성이 나타났다.(P<0.05) 8주차에는 기초대사량이 183.38 kJ/day 변화되었고,(P<0.001) 호흡도가 0.02 변화(P<0.05) 되었으며, 포만도, 음식 섭취, 물리적 활동에는 유의적 차이가 없었다. Urine VMA는 12주에 유의적으로 변화되었다.(P<0.05) 본 연구를 통해 녹차의 섭취가 기초대사량 및 지질산화율을 높혀 비만인의 체중 감량에 유효할 수 있다는 결론을 얻었다.

<Abstract>

This study was undertaken to investigate the effects of green tea on weight reduction in obese Thais. A randomized, controlled trial involving 60 obese subjects (body mass index, BMI > 25 kg/m2) was conducted.

All subjects consumed a Thai diet containing 3 meals (8373.6 kJ/day) for 12 weeks, prepared by the Nutritional Unit at Srinagarind Hospital. The diet contained 65% carbohydrates, 15% protein, and 20% fat. Body weight, BMI, body composition, resting energy expenditure, and substrate oxidation were measured at baseline, and during weeks 4, 8, and 12 of the study. Serum levels of leptin and urine VMA were measured at baseline and during the 12th week.

Differences over time and between the treatments (green tea or placebo) over time were determined using two-factor ANOVA with repeated measures.

In comparing the two groups, differences in weight loss were 2.70, 5.10, and 3.3 kg during the 4th, 8th, and 12th weeks of the study, respectively. At the 8th and 12th weeks of the study, body weight loss was significantly different (P < 0.05).

At the 8th week, the difference in resting energy expenditure was 183.38 kJ/day (P < 0.001), the difference in the respiratory quotient was 0.02 (P < 0.05), and no significant differences existed in satiety score, food intake, or physical activity. Urine VMA was significantly different in the 12th week of the study (P < 0.05).

We conclude that green tea can reduce body weight in obese Thai subjects by increasing energy expenditure and fat oxidation.

Synopsis #14-Clinical Trial ⑨

학술지정보	J Am Coll Nutr.					
	Vol	26(4)	게재연도	2007	시작페이지	389
논문제목	The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study					
연구목적	녹차의 EGCG가 성인남성의 지질대사에 미치는 영향을 규명					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	무작위배정		이중눈가림		플라세보대조	
대상자특징	대상자선정(제외)기준	- 일반적인 생활패턴을 가진 6명의 비만 혹은 과체중 남성				
	특징	- 평균 연령 40세, BMI 29.9kg/m2				
시험물질	EGCG					
시험디자인	대조군	placebo	플라세보 캡슐 150mg			
		positive				
		negative				
	시험군	EGCG 캡슐 150mg				
	디자인	- 피험자는 각각 시험군 대조군에 배정되어 시험 전일 오후 6시에 임상시험센터에 도착한다. - 도착 1시간 후 일반적인 저녁식사 후 12시간동안 휴식을 취하고 다음날 오전 7시 공복에 해당 캡슐(150mg)을 2개 섭취한다. - 검사는 누운상태에서 진행되며, 공복 및 섭취후의 에너지소비량, 호흡률, 기질산화도를 측정하기 위한 호흡량(산소흡입 및 이산화탄소배출)을 측정한다. - 캡슐 섭취1시간 후 2시간의 공복 대사율을 측정하며 30분 휴식후 다시 2시간 측정을 반복하였다. - 식사시간 30분 및 휴식시간 30분은 측정하지 않았다.		섭취량	150mg EGCG 캡슐 2개	
				섭취기간	2일	
	식이조절	- 식이는 체중 kg당 5kcal 제공, 탄수화물:지질:단백질=50:35:15 비율로 제공				
바이오마커	- 에너지소비량, 호흡률, 기질산화도					
통계처리						
시험결과	- 휴식중 에너지소비량은 두 군 모두 변화가 없었다. - 식사 직후 에너지소비량은 두 그룹 모두 초기에 크게 증가했다가 끝으로 갈수록 천천히 감소되었다. - 플라세보 그룹에서, 공복 호흡률은 0.87로 90분간 거의 변화 없이 유지되었다가 다시 공복일 때 0.79로 감소하였다. 식후 호흡률은 0.97로 증가하여 570분간 유지되다가 시험 종료인 공복시 다시 초기 상태로 거의 돌아왔다. - EGCG섭취군에서 호흡률은 90분간 0.87 전후로 변동되다가 소폭 감소하여 0.81, 식후 0.84를 420분간 유지했으며 시험이 끝날 때 까지 유지되었다. - 첫 번째 식후 검사에서 호흡률은 EGCG군에서 플라세보군 대비 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.					
비고	-					

Abstract

<개 요>

비만의 진행은 지방조직의 증가로 특징지을 수 있는데, 이러한 지방조직의 증가는 고혈압, 당뇨, 관상동맥질환에 이르는 큰 질병을 야기시키는 거의 모든 기관의 부수적인 기능변화를 가져온다. 최근 인체시험 결과를 보면, 녹차 혹은 녹차추출물의 지속적 섭취는 식후 발열작용을 통한 체중, 체지방 감소 및 지질 산화에 도움을 준다. 그러나, 인체시험에서는 차 카테킨이나 EGCG가 인체대사에 미치는 영향을 규명한 자료는 부족한 실정이다. 본 연구는 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조, cross-over 파일럿 인체적용시험으로 6명의 과체중 남자에게 1일 300mg의 EGCG를 2일간 공급하여 공복 및 식후의 에너지 소비량 변화 및 기질산화도를 측정 한 연구이다. 그 결과, 기초대사량은 EGCG 및 플라세보 섭취군 사이에 유의적 변화가 없었으나, 첫 번째 식후 검사에서 EGCG군의 호흡률이 플라세보군 대비 유의하게 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 을 통해 EGCG의 섭취는 남성의 지질산화도를 증가시키며 이와 관련하여 녹차의 항비만 효과에도 긍정적인 영향을 줄 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 그러나, 많은 피험자 수, 넓은 범위의 연령대 및 BMI를 가진 피험자들로 EGCG의 최적 섭취량을 규명하기 위한 추가 연구가 필요하다고 생각 된다.

<Abstract>

OBJECTIVES:

The development of obesity is characterized by an increase in adipose tissue mass and by concomitant and profound changes in almost all organ functions leading to diseases such as hypertension, diabetes mellitus and coronary heart disease. Recent data from human studies indicate that the consumption of green tea and green tea extracts may help reduce body weight, mainly body fat, by increasing postprandial thermogenesis and fat oxidation. However, human studies investigating the metabolic effects of the most predominant tea catechin, EGCG, alone are absent.

METHODS:

In a randomized double blind, placebo-controlled, cross-over pilot study, six overweight men were given 300 mg EGCG/d for 2d. Fasting and postprandial changes in energy expenditure (EE) and substrate oxidation were assessed.

RESULTS:

Resting EE did not differ significantly between EGCG and placebo treatments, although during the first postprandial monitoring phase, respiratory quotient (RQ) values were significantly lower with EGCG compared to the placebo.

CONCLUSIONS:

These findings suggest that EGCG alone has the potential to increase fat oxidation in men and may thereby contribute to the anti-obesity effects of green tea. However, more studies with a greater sample size and a broader range of age and BMI are needed to define the optimum dose.

Synopsis #15-Clinical Trial ⑩

학술지정보	OBESITY RESEARCH					
	Vol	13(7)	게재연도	2005	시작페이지	1195
논문제목	Body Weight Loss and Weight Maintenance in Relation to Habitual Caffeine Intake and Green Tea Supplementation					
연구목적	녹차 카페인 혼합물의 정기적 섭취가 체중감량 후 유지중인 중증도 비만 환자에게 영향					
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y	
실험설계	선별무작위배정		플라세보대조		이중눈가림 및 평행군	
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	- 선정기준 18-60세, BMI 25-30kg/m2의 건강상태가 양호한 중증도 비만자, 술은 적당히 가능 - 제외기준 흡연자, 기타 약물 복용중이거나 처치중인자				
	특징	- 67명의 피험자가 나이, 성별, BMI, 식습관, 기초대사량, 평소 카페인섭취량에 따라 선별 무작위 배정, 저카페인그룹 : <300mg/일, 고카페인그룹 >300mg/일 - 저카페인-시험약, 고카페인-시험약, 저카페인-플라세포, 고카페인-플라세보 총 4그룹으로 나누어짐. - 체중 85.0-85.1kg, BMI 29.5-29.6kg/m2, 허리둘레 94.0-94.2cm, 체지방률 37.3-37.7%, 기초대사량 6.9-7.1MJ/일				
시험물질	녹차-카페인 혼합물					
시험디자인	대조군	placebo	식물성 오일			
		positive				
		negative				
	시험군	녹차-카페인-식물성오일 혼합물 450mg				
	디자인	- 피험자는 4주간 제공되는 저열량 식이로 약 4kg의 체중을 감량 한 후 - 배정된 캡슐을 식전 2개, 1일 3회 섭취하며 3개월간 체중을 유지한다.		섭취량	1회당 EGCG 45mg, 카페인 25mg, 식물성오일 380mg 의 캡슐 1회 2개씩1일 3회 총 6캡슐	
				섭취기간	3개월	
	식이조절	- 체중감량 기간에 제공되는 밀크쉐이크, 푸딩, 수프, 무슬리 등을 포함한 열량 2.1MJ, 탄수화물50g 단백질52g, 지방7g 으로 구성된 식사를 3회에 나누어 물에 타먹는다				
바이오마커	체중, BMI, 체지방량, 제지방량, 허리둘레, 기초대사량, 호흡률, 혈당, 인슐린, BHB, TG, 렙틴, 지질산화도					
통계처리	ANOVA					
시험결과	- 저카페인 그룹(151mg/일)에서 고카페인 그룹에 비해 카페인의 소비가 유의 감소되었다. (고카페인 그룹 524mg/일) - 여성 피험자의 경우 카페인 일상섭취량과 관련하여 렙틴이 감소하였다. - 체중감량기간에는 고카페인그룹에서 저카페인그룹에 비해 체중을 유의적으로 많이 감량 ($p<0.001$), 이는 BMI, 허리둘레, 체지방량, 체지방률도 마찬가지임 ($p<0.01$) - 또한, 고카페인그룹에서 기초대사량과 지질산화도가 감소하였으며, 체중감소율은 두 시험군간 유의적 차이가 없었음 - 체중유지기간동안 저카페인-녹차 섭취군에서 체중, 허리둘레, 호흡률 및 체지방량이 감소하였고 플라세보군에 비해 기초대사량은 증가 - 시험군 중 고카페인섭취군에서는 체중유지기간동안 별다른 변화가 없었음					
비고	BHB, B-hydroxy-butyrate					

<개 요>

본 연구는 평소 일상에서 카페인을 섭취하고 있는 중증도 비만환자의 체중감량 후의 체중유지에 녹치-카페인 혼합물 섭취가 미치는 영향 보기위하여 수행되었다. 본 연구는 플라세보대조, 이중눈가림, 무작위배정, 평행설계로 진행 되었으며, 76명의 중증도 비만(BMI 25-30)인이 성별, 나이, BMI, 키, 체질량으로 정리하고, 평소 카페인 섭취량에 따라 분류되었으며, 이를 시험군-대조군으로 무작위배정하였다. 피험자는 4주간 저열량 식이 후 3개월간 체중을 유지하며(WM, weight maintenance, 체중유지기간) 체중 유지기간(WM)에는 녹차-카페인 혼합물(EGCG 270mg+카페인 150mg / 일) 혹은 플라세보를 섭취한다. 시험 결과, 피험자들의 체중 5.9kg가 감량되었고(p<0.001), 시험 시작시점에 비해 식욕이 감소되었으며, 여성 피험자의 카페인 일상섭취와 관련하여 렙틴이 감소하였다(체중감량기간 중) 고 카페인 그룹에서 저 카페인 그룹에 비해 체중, 체지방, 허리둘레가 감소하였으며, 체중 감량기간에 기초대사량 및 호흡률이 더욱 감소하였다.(p<0.01) 체중유지기간의 저 카페인 그룹-녹차추출물 섭취군에서 체중, 허리둘레, 호흡률 및 체지방량이 계속 감소하였고 이에 반해 기초대사량은 플라세보군에 비해 증가하였다.(p<0.01) 시험군 중 고 카페인 섭취군에서는 체중유지기간동안 비만관련 지표에 별다른 변화가 없었다. 결론적으로 여성에게서 고용량의 카페인 섭취는 렙틴억제와 더불어 발열, 지질산화를 통한 체중감소를 가져오며, 평소 카페인을 적게 소비하는 사람이 녹차-카페인 혼합물을 섭취하는 것은 발열/지질산화와 관련한 체중 유지에 도움이 되는 것으로 생각된다.

<Abstract>

OBJECTIVE:

Investigation of the effect of a green tea-caffeine mixture on weight maintenance after body weight loss in moderately obese subjects in relation to habitual caffeine intake.

RESEARCH METHODS AND PROCEDURES:

A randomized placebo-controlled double blind parallel trial in 76 overweight and moderately obese subjects, (BMI, 27.5 +/- 2.7 kg/m2) matched for sex, age, BMI, height, body mass, and habitual caffeine intake was conducted. A very low energy diet intervention during 4 weeks was followed by 3 months of weight maintenance (WM); during the WM period, the subjects received a green tea-caffeine mixture (270 mg epigallocatechin gallate + 150 mg caffeine per day) or placebo.

RESULTS:

Subjects lost 5.9 +/-1.8 (SD) kg (7.0 +/- 2.1%) of body weight ($p < 0.001$). At baseline, satiety was positively, and in women, leptin was inversely, related to subjects' habitual caffeine consumption ($p < 0.01$).

High caffeine consumers reduced weight, fat mass, and waist circumference more than low caffeine consumers; resting energy expenditure was reduced less and respiratory quotient was reduced more during weight loss ($p < 0.01$).

In the low caffeine consumers, during WM, green tea still reduced body weight, waist, respiratory quotient and body fat, whereas resting energy expenditure was increased compared with a restoration of these variables with placebo ($p < 0.01$). In the high caffeine consumers, no effects of the green tea-caffeine mixture were observed during WM.

DISCUSSION:

High caffeine intake was associated with weight loss through thermogenesis and fat oxidation and with suppressed leptin in women. In habitual low caffeine consumers, the green tea-caffeine mixture improved WM, partly through thermogenesis and fat oxidation.

2. 특허, 논문 및 학술발표 증빙서

가. 특허

1. 녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만예방 및 치료용 약학적 조성물(PCT)

14fpo-08-001

2/4

PCT 출원서

원본(제출용)

III-1	출원인 및/또는 발명자	
III-1-1	이사람은	오직 발명자 (inventor only)
III-1-3	우측 지정국에 관한 발명자	
III-1-4ko	성명	김종덕
III-1-4en	Name (LAST, First):	KIM, Jong Deog
III-1-5ko	주소	대한민국 550-774 전라남도 여수시 [redacted]
III-1-5en	Address:	[redacted] 2 [redacted] 2-ro Yeosu-si Jeollanam-do 550-774 Republic of Korea
IV-1	대리인 또는 개표자	
	아래에 기재된 개인 또는 단체가 국제기관에 대하여 우측에 표시된 지정국으로 출원인을 대리하는 것으로 선언되었다.	대리인
IV-1-1ko	성명	이원희
IV-1-1en	Name (LAST, First):	LEE, Won Hee
IV-1-2ko	주소	대한민국 135-910 서울시 강남구 테헤란로 1[redacted]
IV-1-2en	Address:	8[redacted] Il [redacted] Gangnam-gu Seoul 135-910 Republic of Korea
IV-1-3	전화번호	82-2-[redacted]
IV-1-4	팩스번호	82-2-3[redacted]
IV-1-5	이메일 주소	ip@wonpat.com
IV-1-5(a)	이메일 사용동의 우리나라 특허청, 국제조사기관, 국제사무국, 우측에 지정된 지정국의 권한 있는 지 이 이메일 주소를 사용하여 이 국제 출원과 관련된 의 통지를 보내도 좋다.	서면 통지서에 앞서 선람용 사본 송부
IV-1-6	대리인 코드	9-1998-000385-9
V	지정국	
V-1	본 국제출원의 제출일, 규칙 4.9(a)에 따라, 상세한 지정을 하지 않은 출원인 선언 보호를 유하여, 그리고 해당하는 경우 지역특허 및 국내특허 모두를 위하여 상세 국제출원서에 PCT 제7조제1호 모든 체약국이 지정된다.	
V-2	V-2(이 출원서 제출시 또는 규칙 26.2.1에 의해 그 이후 출원서 제6기재란에 의 특정 관련 체약국의 국내 선출원에 대한 특허라도 수여 포함되어 있는 경우 상세 체약국의 국내법에 의해 해당 국내 선출원의 효력이 상실되는 것을 방지하기 위한목적으로 특정 체약국의 지정을 취하하는 하여도 사용될 수 있다.(지정 철회서 이외 최소 불가능)	KR

14fpo-08-001

1/4

PCT 출원서

원본(제출용)

0 0-1	수리관청 전용 국제출원번호	
0-2	국제출원일자	
0-3	수리관청 명칭 및 "PCT 국제출원"	
0-4	서식 PCT/RO/101 - PCT 출원서	
0-4-1	우측에 기재된 버전 같이 작성되었다.	PCT-SAFE [EASY mode] 버전 3.51.062.238 MT/FOP 20140401/0.20.5.21
0-5	신청 아래 서명인은 본 국제 출원서가 특허협력조약에 의해 처리될 것을 청구합니다.	
0-6	출원인이 지정한 수리관청	대한민국 특허청 (RO/KR)
0-7	출원인 또는 대리인의 지불참조기호	14fpo-08-001
I	발명의 명칭	녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물
II	출원인	
II-1	이사람은	오직 출원인 (applicant only)
II-2	우측 지정국에 관한 출원인	모든 지정국 (all designated States)
II-4ko	성명	전남대학교 산학협력단
II-4en	Name:	INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY
II-5ko	주소	대한민국 500-757 광주시 북구 용봉로 77
II-5en	Address:	77, Yongbong-ro Buk-gu Gwangju 500-757 Republic of Korea
II-6	국적	대한민국 KR
II-7	거주국	대한민국 KR
II-8	전화번호	82-2-3453-0507
II-9	팩스번호	82-2-3453-8155
II-10	이메일 주소	ip@wonpat.com
II-10(a)	이메일 사용동의 우리나라 특허청, 국제조사기관, 국제사무국, 우측에 지정된 지정국의 권한 있는 지 이 이메일 주소를 사용하여 이 국제 출원과 관련된 의 통지를 보내도 좋다.	서면 통지서에 앞서 선람용 사본 송부
II-11	출원인 코드	2-2004-036577-5

2. 녹차씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 치료용 조성물

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자	2014.09.22
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2014-0125524 (접수번호 1-1-2014-0894205-18)
출원인 명칭	전남대학교산학협력단(2-2004-036577-5)
대리인 성명	한윤호(9-2007-000728-3)
발명자 성명	김종덕
발명의 명칭	녹차씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 치료용 조성물

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr>특허마당>PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원일을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [진자적고환히가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

9G007000728910111010000024500000000

특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 전남대학교 산학협력단

【출원인코드】 2-2004-036577-5

【대리인】

【성명】 한윤호

【대리인코드】 9-2007-000728-3

【포괄위임등록번호】 2011-024914-1

【발명의 국문명칭】 녹차씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 치료용 조성물

【발명의 영문명칭】 Composition for treating hyperlipidemia comprising greentea seed extracts

【발명자】

【성명의 국문표기】 김종덕

【성명의 영문표기】 KIM, Jong-Deog

【주민등록번호】 5

【우편번호】 550-260

【주소】 전라남도 여수시 여서동 [illegible]

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【공지예외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 학술단체 서면발표

【공개일자】 2013.10.16

【학술연구 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

2-1

3. 녹차 씨앗 사포닌을 유효성분으로 하는 항균용 조성물 및 그 용도

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자	2015.07.23
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2015-0104634 (접수번호 1-1-2015-0718764-69)
출원인 명칭	전남대학교산학협력단(2-2004-036577-5)
대리인 성명	한윤호(9-2007-000728-3)
발명자 성명	김종덕
발명의 명칭	녹차 씨앗 사포닌을 유효성분으로 하는 항균용 조성물 및 그 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호

3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식

4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.

5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허, 실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출일을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환하가서(PTO/SB/39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

9200700072831011101000022850000000

특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 전남대학교 산학협력단

【출원인코드】 2-2004-036577-5

【대리인】

【성명】 한윤호

【대리인코드】 9-2007-000728-3

【포괄위임등록번호】 2011-024914-1

【발명의 국문명칭】 녹차 씨앗 사포닌을 유효성분으로 하는 항균용 조성물 및 그 용도

【발명의 영문명칭】 An antimicrobial composition comprising green tea seed saponin

【발명자】

【성명의 국문표기】 김종덕

【성명의 영문표기】 KIM, Jong-Deog

【주민등록번호】

【우편번호】 550-260

【주소】 전라남도 여수시

【국적】 KR

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

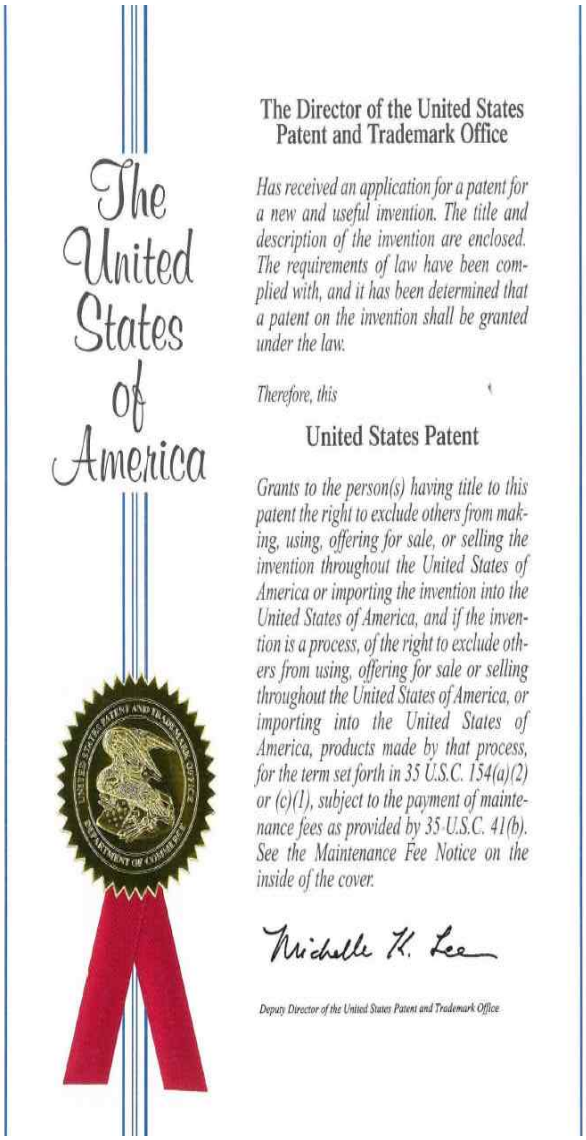
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1125075-3

【부처명】 농림축산식품부

2-1

4. 신생혈관형성 억제제 및 이를 이용한 천연산물 항비만제



The United States of America

The Director of the United States Patent and Trademark Office

Has received an application for a patent for a new and useful invention. The title and description of the invention are enclosed. The requirements of law have been complied with, and it has been determined that a patent on the invention shall be granted under the law.

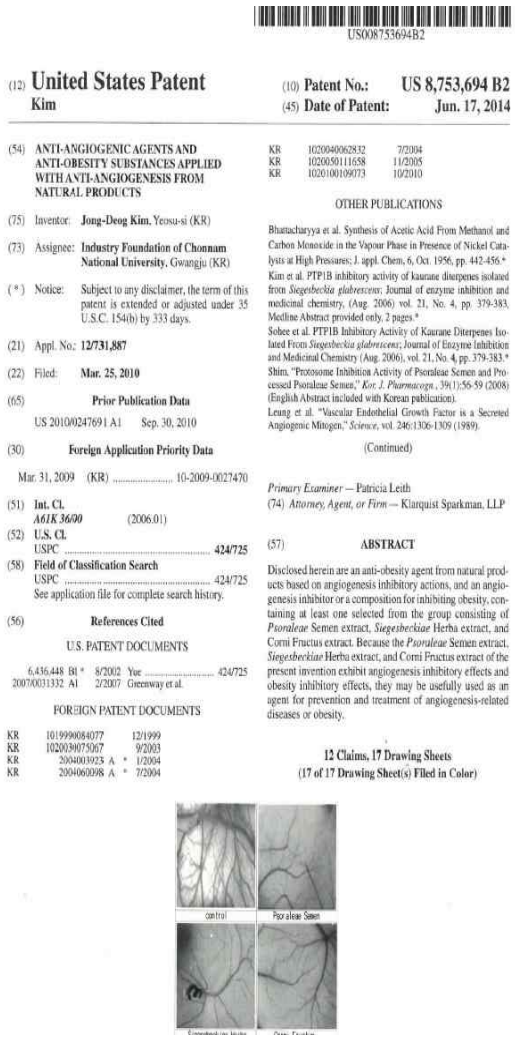
Therefore, this

United States Patent

Grants to the person(s) having title to this patent the right to exclude others from making, using, offering for sale, or selling the invention throughout the United States of America or importing the invention into the United States of America, and if the invention is a process, of the right to exclude others from using, offering for sale or selling throughout the United States of America, or importing into the United States of America, products made by that process, for the term set forth in 35 U.S.C. 154(a)(2) or (c)(1), subject to the payment of maintenance fees as provided by 35 U.S.C. 41(b). See the Maintenance Fee Notice on the inside of the cover.

Michelle K. Lee

Deputy Director of the United States Patent and Trademark Office



US008753694B2

(12) **United States Patent**
Kim

(10) **Patent No.: US 8,753,694 B2**
(45) **Date of Patent: Jun. 17, 2014**

(54) **ANTI-ANGIOGENIC AGENTS AND ANTI-OBESITY SUBSTANCES APPLIED WITH ANTI-ANGIOGENESIS FROM NATURAL PRODUCTS**

(75) Inventor: **Jong-Deog Kim**, Yeosu-si (KR)

(73) Assignee: **Industry Foundation of Chonnam National University**, Gwangju (KR)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 333 days.

(21) Appl. No.: **12/731,887**

(22) Filed: **Mar. 25, 2010**

(65) **Prior Publication Data**
US 2010/0247691 A1 Sep. 30, 2010

(30) **Foreign Application Priority Data**
Mar. 31, 2009 (KR) 10-2009-0027470

(51) **Int. Cl.**
A61K 36/00 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**
USPC **424/725**

(58) **Field of Classification Search**
USPC 424/725
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

6,436,448 B1 * 8/2002 Yue 424/725
2007/0031332 A1 2/2007 Greenway et al.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

KR 1019990084077 12/1999
KR 1020039075067 9/2003
KR 2004003923 A * 1/2004
KR 2004060098 A * 7/2004
KR 1020040062832 7/2004
KR 1020050111658 11/2005
KR 1020100109073 10/2010

OTHER PUBLICATIONS

Bhattacharyya et al. Synthesis of Acetic Acid From Methanol and Carbon Monoxide in the Vapour Phase in Presence of Nickel Catalysts at High Pressures; J. appl. Chem, 6, Oct. 1956, pp. 442-456.*
Kim et al. PTP1B inhibitory activity of kaurane diterpenes isolated from *Siegesbeckia glabrescens*; Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, (Aug. 2006) vol. 21, No. 4, pp. 379-383, Medline Abstract provided only, 2 pages.*
Sobee et al. PTP1B Inhibitory Activity of Kaurane Diterpenes Isolated From *Siegesbeckia glabrescens*; Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (Aug. 2006), vol. 21, No. 4, pp. 379-383.*
Shim, "Protosome Inhibition Activity of Psoraleae Semen and Processed Psoraleae Semen," *Kor. J. Pharmacogn.*, 39(1):56-59 (2008) (English Abstract included with Korean publication).
Leung et al. "Vascular Endothelial Growth Factor is a Secreted Angiogenic Mitogen," *Science*, vol. 246:1306-1309 (1989).

(Continued)

Primary Examiner — Patricia Leith
(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Klarquist Sparkman, LLP

(57) **ABSTRACT**

Disclosed herein are an anti-obesity agent from natural products based on angiogenesis inhibitory actions, and an angiogenesis inhibitor or a composition for inhibiting obesity, containing at least one selected from the group consisting of *Psoraleae* Semen extract, *Siegesbeckiae* Herba extract, and Corni Fructus extract. Because the *Psoraleae* Semen extract, *Siegesbeckiae* Herba extract, and Corni Fructus extract of the present invention exhibit angiogenesis inhibitory effects and obesity inhibitory effects, they may be usefully used as an agent for prevention and treatment of angiogenesis-related diseases or obesity.

12 Claims, 17 Drawing Sheets
(17 of 17 Drawing Sheet(s) Filed in Color)

5. Anti-Angiogenic Agents and Anti-Obesity Substances Applied with Anti-Angiogenesis from Natural Products(분할 출원)

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MAY 2, 2014

PTAS

KARRI BRADLEY, KLARQUIST SPARKMAN, LLP
121 SW SALMON ST., SUITE 1600
ONE WORLD TRADE CENTER
PORTLAND, OR 97204

502791335

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 05/01/2014 REEL/FRAME: 032799/0794
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 7037-84967-02

ASSIGNOR:
KIM, JONG-DEOG DOC DATE: 03/20/2010

ASSIGNEE:
INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM
NATIONAL UNIVERSITY
77 YONGBONG-RO, BUK-GU
GWANGJU, KOREA, REPUBLIC OF 500-757

APPLICATION NUMBER: 14266482 FILING DATE:
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: ANTI-ANGIOGENIC AGENTS AND ANTI-OBESITY SUBSTANCES APPLIED WITH ANTI-ANGIOGENESIS FROM NATURAL PRODUCTS

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 - WWW.USPTO.GOV

PTO/AIA/14 (12-13)
Approved for use through 01/31/2014. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	7037-84967-02
	Application Number	
Title of Invention	ANTI-ANGIOGENIC AGENTS AND ANTI-OBESITY SUBSTANCES APPLIED WITH ANTI-ANGIOGENESIS FROM NATURAL PRODUCTS	

The application data sheet is part of the provisional or nonprovisional application for which it is being submitted. The following form contains the bibliographic data arranged in a format specified by the United States Patent and Trademark Office as outlined in 37 CFR 1.76.
This document may be completed electronically and submitted to the Office in electronic format using the Electronic Filing System (EFS) or the document may be printed and included in a paper filed application.

Secrecy Order 37 CFR 5.2

☐ Portions or all of the application associated with this Application Data Sheet may fall under a Secrecy Order pursuant to 37 CFR 5.2 (Paper filers only. Applications that fall under Secrecy Order may not be filed electronically.)

Inventor Information:

Inventor 1 Remove

Legal Name

Prefix	Given Name	Middle Name	Family Name	Suffix
	Jong-Deog		Kim	

Residence Information (Select One) ○ US Residency ● Non US Residency ○ Active US Military Service

City	Jeollanam-do	Country of Residence i	KR

Mailing Address of Inventor:

Address 1	#6-1102 Kumho Apt.		
Address 2	Yeoseo-dong Yeosu-si		
City	Jeollanam-do	State/Province	
Postal Code	550-774	Country i	KR

All Inventors Must Be Listed - Additional Inventor Information blocks may be generated within this form by selecting the **Add** button. Add

Correspondence Information:

Enter either Customer Number or complete the Correspondence Information section below.
For further information see 37 CFR 1.33(a).

☐ An Address is being provided for the correspondence Information of this application.

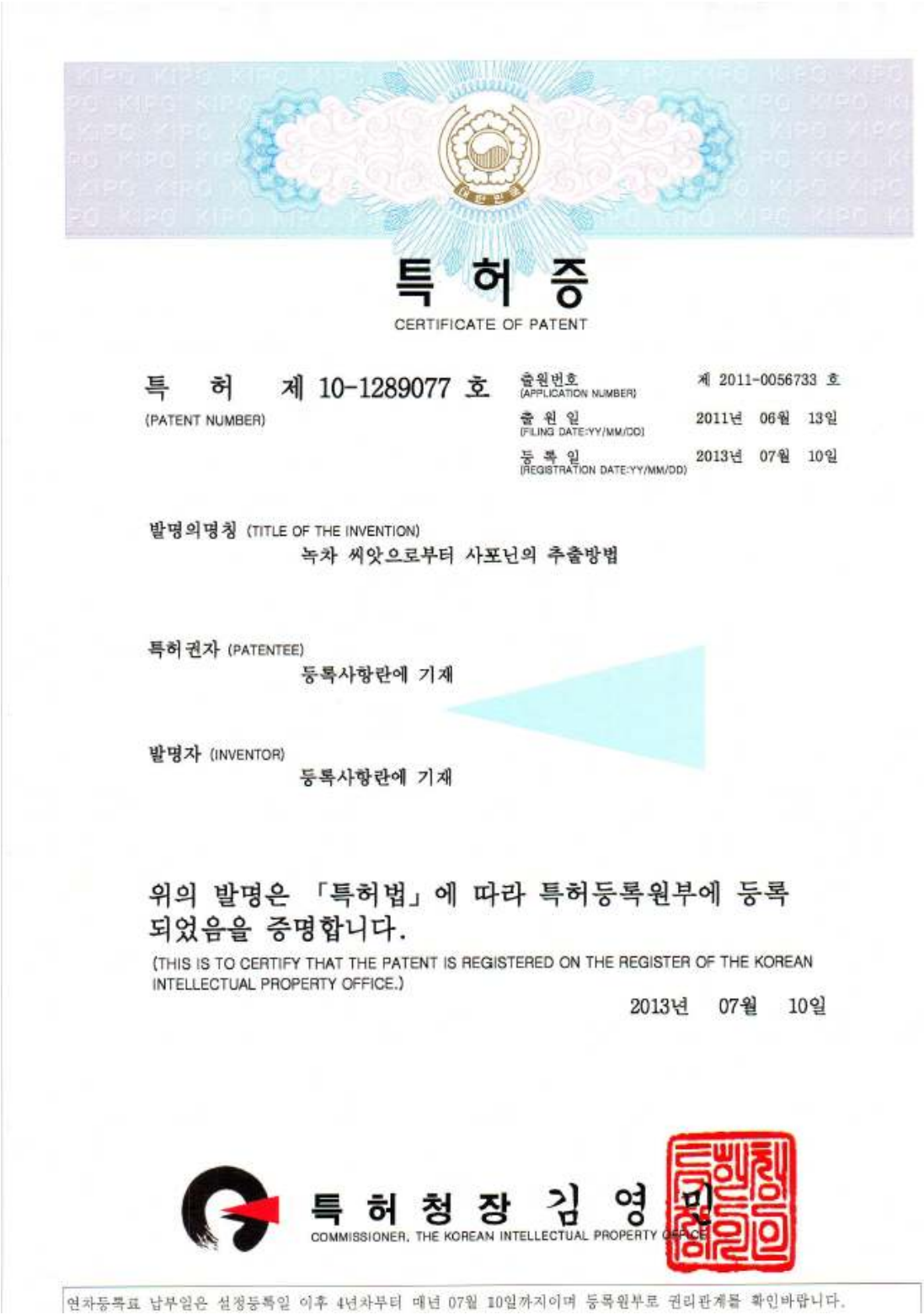
Customer Number	24197		
Email Address	docketing@klarquist.com	Add Email	Remove Email

Application Information:

Title of the Invention	ANTI-ANGIOGENIC AGENTS AND ANTI-OBESITY SUBSTANCES APPLIED WITH ANTI-ANGIOGENESIS FROM NATURAL PRODUCTS		
Attorney Docket Number	7037-84967-02	Small Entity Status Claimed	☒
Application Type	Nonprovisional		
Subject Matter	Utility		
Total Number of Drawing Sheets (if any)	17	Suggested Figure for Publication (if any)	

EFS Web 2.2.11

6. 녹차씨앗으로부터 사포닌의 추출 방법



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1289077 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2011-0056733 호

출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2011년 06월 13일

등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2013년 07월 10일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
녹차 씨앗으로부터 사포닌의 추출방법

특허권자 (PATENTEE)
등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 07월 10일

특허청장 김 영 민

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

연차등록료 납부일은 설정등록일 이후 4년차부터 매년 07월 10일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

7. 녹차씨앗과피추출물을 유효성분으로 함유하는 비만예방 및 치료용 약학적 조성물

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 Patent Number	제 10-1492092 호
출원번호 Application Number	제 10-2013-0094999 호
출원일 Filing Date	2013년 08월 09일
등록일 Registration Date	2015년 02월 04일

발명의 명칭 Title of the Invention
녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물

특허권자 Patentee
전남대학교산학협력단(206371-0******)
광주광역시 북구 용봉로 77

발명자 Inventor
김종덕 ******)

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2015년 02월 04일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

나. 논문 증빙서

1. HPLC fractionation and pharmacological assessment of green tea seed saponins for antimicrobial, anti-angiogenic, and hemolytic activities

BBE Biotechnology and Bioprocess Engineering

Korea Science and Technology Center #815
Yeogsam-dong, Kangnam-ku
Seoul 135-703, Korea
TEL: +82-2-556-2164 FAX: +82-2-557-2164
E-mail:editor@bbe.or.kr Web: www.bbe.or.kr

August 20, 2015

Dr. Jong Deog KIM
Department of Biotechnology
Chonnam National University
Yeosu 550-749, Korea

Ref.: [BBEN-D-15-00538]
HPLC fractionation and pharmacological assessment of green tea seed saponins for antimicrobial, anti-angiogenic, and hemolytic activities
Jong Deog KIM*, Muhammad Imran Khan, Jin Hyuk SHIN, Moon Geon LEE,
Hyo Jin SEO, Tai Sun SHIN, Min Yong KIM

Dear. Jong Deog KIM

Your manuscript has been accepted for publication and is tentatively scheduled for publication in a Vol.21 No.1 (February 2016) issue of *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.

Thank you.

Kind regards,

Ik-Hwan Kim
Editor in Chief
Biotechnology and Bioprocess Engineering

2. Anti-hyperlipidemic and Fat Pad Lowering Effect of Standardized Tea Seed Cake Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet

Biotechnology and Bioprocess Engineering 20: 157-167 (2015)
DOI 10.1007/s12257-014-0487-5

RESEARCH PAPER

Anti-hyperlipidemic and Fat Pad Lowering Effect of Standardized Tea Seed Cake Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet

Narendra Chaudhary, Jyoti Bhardwaj, Jae-Ho Hwang, Hyo-Jin Seo, Min-Yong Kim, Tai-Sun Shin, Ji-Hyang Wee, Yu-Lim Shin, and Jong-Deog Kim

Received: 10 July 2014 / Revised: 11 November 2014 / Accepted: 13 November 2014
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2015

Abstract *Camellia sinensis* L. O. Kuntze has traditionally been used in Asian countries as a stimulant, a diuretic, and to prevent obesity. Studies in green tea are well-documented in literature, though the potential of fruit from the plant has never been studied in details. In the present study, the anti-adipogenic effect of aqueous extract of green tea seed cake extract (GTE) were analysed *in-vitro* and the anti-obesity effects were determined *in-vivo* in murine model fed high-fat and high-carbohydrate diets. We found that GTE inhibited the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte and significantly lowered body weight, body fat-pad weights, blood lipid, glucose, insulin, and leptin levels in mice fed high-fat and high-carbohydrate diets. GTE suppressed the expression of important adipogenic genes (PPARγ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin) and lipid metabolism genes (FAS). Furthermore, GTE induced the levels of adiponectin in serum and adipose tissue, as well as AMP-activated protein kinase (AMPK) in liver tissue. These results suggested that GTE ameliorates its anti-obesity effect through multiple cells signaling pathways in diets induced obesity in mice.

Keywords: green tea seed cake, high-fat diet, high-carbohydrate diet, anti-obesity, adipose tissue, AMPK

Narendra Chaudhary†, Jyoti Bhardwaj†, Hyo-Jin Seo, Jong-Deog Kim
Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

Jae-Ho Hwang
College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

Min-Yong Kim
Department of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

Tai-Sun Shin
Division of Food Nutrition Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Ji-Hyang Wee
Jeonnam Biofood Technology Center, Naju 520-330, Korea

Yu-Lim Shin
Biofood Story Inc., Jeonju 560-821, Korea

Jong-Deog Kim*
Research Center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea
Tel: +82-61-659-3305; Fax: +82-61-659-3305
E-mail: pasteur@chonnam.ac.kr

†These authors have contributed equally to the present work.

1. Introduction

Obesity is a complex, multi-factorial metabolic disorder that requires long term management. It is commonly associated with type II diabetes mellitus, hypertension, coronary heart disease, and cancer [1,2]. Obesity results from the excessive growth and expansion of adipose tissue due to an imbalance between energy intake and expenditure. Excess energy is stored in fat cells that enlarge or increase in number [3,4]. Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) plays an important role in regulating glucose metabolism, including glucose transport, lipogenesis, gluconeogenesis, and lipolysis [5]. AMPK is a serine-threonine kinase that is activated in response to increase in the intracellular AMP/ATP ratio within the cell and the activation of AMPK has been characterized on liver metabolism [6]. Binding of AMP with AMPK allosterically phosphorylates and activates AMPK, which in turn inactivates anabolic pathways involved in fatty acid and cholesterol synthesis and activates catabolic pathway regulating the enzymes of

3. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway.

Immunopharmacology and Immunotoxicology

http://informahealthcare.com/ipi
ISSN: 0892-3973 (print), 1532-2513 (electronic)
Immunopharmacol Immunotoxicol, Early Online: 1–9
© 2014 Informa Healthcare USA, Inc.
DOI: 10.3109/08923973.2014.909849

informa healthcare

RESEARCH ARTICLE

Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells *via* regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway

Jyoti Bhardwaj[1]*, Narendra Chaudhary[1]*, Hyo-Jin Seo[1], Min-Yong Kim[2,3], Tai-Sun Shin[3,4], and Jong-Deog Kim[1,3]

[1]*Department of Biotechnology,* [2]*Department of Refrigeration Engineering,* [3]*Research Center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), and* [4]*Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, Republic of Korea*

Abstract

The anti-cancer activity of saponins and phenolic compounds present in green tea was previously reported. However, the immunomodulatory and adjuvanticity activity of tea saponin has never been studied. In this study, we investigated the immunomodulatory effect of tea saponin in T-lymphocytes and EL4 cells *via* regulation of cytokine response and mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway. Quantitative analysis of mRNA expression level of cytokines were performed by reverse transcription polymerase chain reaction following stimulation with tea saponin, ovalbumin (OVA) alone or tea saponin in combination with OVA. Tea saponin inhibited the proliferation of EL4 cells measured in a dose-dependent manner. No cytotoxicity effect of tea saponin was detected in T-lymphocytes; rather, tea saponin enhanced the proliferation of T-lymphocytes. Tea saponin with OVA increased the expression of interleukin (IL)-1, IL-2, IL-12, interferon-γ and tumor necrosis factor (TNF)-α and decreased the expression level of IL-10 and IL-8 in T-lymphocytes. Furthermore, tea saponin, in the presence of OVA, downregulated the MAPK signaling pathway *via* inhibition of IL-4, IL-8 and nuclear factor kappaB (NF-κB) in EL4 cells. Th1 cytokines enhancer and Th2 cytokines and NF-κB inhibitor, tea saponin can markedly inhibit the proliferation and invasiveness of T-lymphoma (EL4) cells, possibly due to TNF-α- and NF-κB-mediated regulation of MAPK signaling pathway.

Keywords

Adjuvant, EL4, mitogen-activated protein kinases, T-lymphocytes, tea saponin

History

Received 5 January 2014
Revised 11 March 2014
Accepted 24 March 2014
Published online 23 April 2014

Immunopharmacology and Immunotoxicology Downloaded from informahealthcare.com by Chonnam National University on 04/23/14
For personal use only.

Introduction

T-lymphoma is one of the most common malignancies worldwide. Structural and functional abnormalities in lymphocytes, a type of white blood cell that fights infection, causes lymphoma. Over time, these cancerous cells multiply and they impair the immune system. The risk of developing lymphoma increases throughout life. The incidence of lymphoma is projected to increase in the coming years[1]. Despite of vaccination and other chemotherapeutic strategies, the incidence of T-lymphoma is still on the rise. In recent years, anti-tumor drugs derived from plants have drawn attention because of their strong pharmacological effects and low toxicities and hemolytic activity[2]. Epidemiological studies have shown that the consumption of green tea is associated with reduced risk of some cancers, notably gastric, esophagus and pancreas cancers[3].

Cultivation of tea (*Camellia sinensis*) plant has a long history of medicinal use in Asian countries such as China, Japan, India and Thailand. Tea is the most widely consumed beverage, next only to water, with a per capita worldwide consumption of approximately 0.12 liter per day[4]. Tea seeds and leaves contain many biological active compounds like polyphenols, saponins, vitamins, oil mineral and trace elements[5]. Saponins have the pharmacological potential such as lowering of serum cholesterol level[6], immunomodulatory potential by regulating the cytokine expression[7], cytotoxic effect on tumor cells and adjuvant properties for vaccines[8].

Immunological adjuvants are used in combination with specific antigen that produces more robust immune response than antigen alone[9]. Mostly, oil and aluminum adjuvants are used in vaccine, but these adjuvants fail to increase the immunogenicity of weak antigens[10,11]. However, saponin-based adjuvant possess the ability to modulate the cellular and humoral immune responses[12]. QS-21, a triterpene saponin derived from the bark of *Quillaja saponaria*, has been shown to be a potent adjuvant for induction of cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) and prolifenative T-cell response with HIV-1 env antigen[13,14]. Ginseng extract has also been reported to enhance the ovalbumin (OVA)-specific IgG and IgG_1, IgG_{2a} antibody levels in serum as compared to OVA

*These authors contributed equally to this work.

Address for correspondence: Jong-Deog Kim, Department of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea. Tel/Fax: +82-61-659-7305. E-mail: pasteur@chonnam.ac.kr

RIGHTSLINK

4. Theasaponin E1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014
Vol. 78, No. 2, 279–287

JSBA

Theasaponin E_1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects

Jong-Deog Kim[1,4,*], Narendra Chaudhary[1], Hyo-Jin Seo[1], Min-Yong Kim[2,4] and Tai-Sun Shin[3,4]

[1]Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Korea; [2]Department of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yeosu, Korea; [3]Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Korea; [4]Research Center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Korea

Received February 27, 2013; accepted November 14, 2013
http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2014.893183

Theasaponin E_1 (TSE_1) has been suggested to have higher biological activity than other saponins present in tea seed. Saponins have recently been considered as a potential chemotherapeutic agent for treating cancer. We examined the anti-angiogenic and anti-obesity properties of TSE_1 contributing to anti-cancer efficacy. Treating with a 10 μg/mL concentration of TSE_1 completely inhibited tube formation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). TSE_1 showed toxicity toward cancer cells and inhibited *in vivo* growth of the tumor. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor complex was suppressed, leading to the inhibition of protein kinase B (Akt) expression and down-regulation of nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation. The differentiating 3T3-L_1 cells treated with TSE_1 had decreased lipid droplet formation measured by Oil Red O staining. Reduced weight was measured in mice fed with a TSE_1 plus high-fat diet. The results taken together, and particularly the NF-kB inhibition, suggest that TSE_1 may have multi-target action for treating cancer as a novel chemotherapeutic agent.

Key words: anti-angiogenesis; anti-obesity; theasaponin E_1; VEGF; NF-kB

Food and natural bioactive compounds, referred as functional ingredients are of growing interest in the field of nutrition and complementary medicine to prevent chronic illness or as a treatment. Relevant information has been accumulated in the last few decades pointing to the critical role of tea components in having various biological and pharmacological functions ranging from weight loss to cancer.[1–3] These health benefits have resulted in tea products and compounds derived from them gaining significant attention, both by the scientific and consumer communities. Green tea (*Camellia sinensis*) contains many biologically active compounds like saponins, flavonoids, vitamins, and oil minerals, other than polyphenols.[4] Tea seed contains more than 10% in dry weight of saponins having various physiological functions including anti-microbial and anti-inflammatory activities.[5–7] Kawaguchi et al.[8] have reported that tea seed saponin had a 2.4 times lower cytotoxic effect than quillaja saponin, which is a permitted food additive, and that tea seed saponin showed no cytotoxic effect at a dose levels of 50 mg/kg/d in mice. The anti-lipogenic effect of tea saponin has been observed in mice models as inhibiting the pancreatic lipase activity without hemolysis of erythrocytes when orally administered.[9]

Neoadipogenesis is accompanied by an angiogenic response (endothelial cell proliferation and vessel sprouting). Therefore, the anti-angiogenic agents constitute a novel therapeutic option for preventing and treating disorders associated with human obesity and angiogenesis.[10–15] Angiogenesis involves the formation of new blood vessels by the process of sprouting from pre-existing vasculature. It is an essential component of the metastatic pathway and is controlled under normal physiological process. It occurs in the healthy body to heal wounds and restore blood flow to tissue after injury, during embryonic development, and development of the corpus luteum. Blood vessels are essential to carry oxygen, nutrients, and hormones.[16] Angiogenesis and inflammation are necessary for the development of variety of disease conditions such as the proliferation and metastasis of cancer cells, rheumatoid arthritis, and diabetic blindness.[17] The vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most common angiogenic factors regulating normal physiological and tumor angiogenesis.[18] VEGFR-2 (KDR/Flk-1) controls endothelial cell morphogenesis and when activated, regulates numerous processes

*Corresponding author. Email: pasteur@chonnam.ac.kr

Abbreviations: Akt, Protein kinase B; ALT, Alanine transaminase; AST, Aspartate transaminase; FGF-2, Basic fibroblast growth factor; GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HDL, High density lipoprotein; HGF, Hepatocyte growth factor; HUVECs, Human umbilical vein endothelial cells; LDH, Lactate dehydrogenase; NF-kB, Nuclear factor-kappaB; PI3 K, Phosphoinositide 3-kinase;VE-cadherin, Vascular endothelial-cadherin; TGF-beta, Transforming growth factor beta; TSE_1, Theasaponin E_1; VEGF, Vascular endothelial growth factor; VEGFR-2, Vascular endothelial growth factor receptor-2.

© 2014 Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

5. Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats

JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS 7 (2014) 479–486

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats

Narendra Chaudhary[a,1], Jyoti Bhardwaj[a,1], Hyo Jin Seo[a], Min Yong Kim[b,d], Tai Sun Shin[c,d], Jong Deog Kim[a,d,*]

[a]Department of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea
[b]Department of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea
[c]Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea
[d]Research Center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 13 February 2014

Keywords:
Anti-angiogenesis
Anti-hyperlipidemic
Green tea
Leptin
White adipose tissue

ABSTRACT

Tea fruit peel is an agricultural waste of tea manufacturing industry that contains phenols with high antioxidant activities. This study examined the effect of green tea fruit peel extract (PE) against angiogenesis and obesity. We found that PE significantly inhibited the tubular formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC) and saponin were the functional components present in PE that contributed to significant anti-angiogenesis effect. Administration of PE (100 mg/kg/d) significantly decreased the body weight in rats fed high-fat diet (HFD) whereas the food intakes between HFD and PE treatment groups were not significantly different. White adipose tissue fat-pad weights were markedly reduced in rats fed HFD plus PE compared to those in HFD group. These results showed the potential of green tea fruit peel extract in preventing angiogenesis and obesity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neoadipogenesis is accompanied by an angiogenic response (characterized by endothelial cell proliferation, vessel sprouting). Therefore, anti-angiogenic agents constitute a novel therapeutic option for the prevention and treatment of human obesity and angiogenesis-associated disorders (Cao, 2007; Christiaens & Lijnen, 2010; Hausman & Richardson, 2004; Neels, Thinnes, & Loskutoff, 2004; Voros et al., 2005). Angiogenesis and inflammation are necessary for the development of a variety of disease conditions, such as the proliferation and metastasis of cancer cells, rheumatism arthritis, and diabetic blindness (Zetter, 1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most common angiogenic factors

* Corresponding author at: Department of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam 550-749, Republic of Korea. Tel./fax: +82 61 6597305.
E-mail address: pasteur@chonnam.ac.kr (J.D. Kim).
[1] These authors contributed equally to this work.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.008
1756-4646/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

6. Fermented Pu-erh Tea Increases In Vitro Anticancer Activities in HT-29 Cells and Has Antiangiogenetic Effects on HUVECs.

Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 32(4):275-288 (2013)

Fermented Pu-erh Tea Increases *In Vitro* Anticancer Activities in HT-29 Cells and Has Antiangiogenetic Effects on HUVECs

Xin Zhao,[1,2] Jia-Le Song,[1] Jong-Deog Kim,[3] Jong-Suk Lee,[4] Kun Young Park[1]

[1]Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan, Korea; [2]Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing, PR China; [3]Department of Biotechnology, Research Center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yosu, Chonnam, Korea; [4]Gyeonggi Biocenter, Gyeonggi Institute of Science and Technology Promotion (GSTEP), Suwon, Gyeonggi-do, Korea

* **Address all correspondence to:** Prof. Kun Young Park, PhD, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, 30 Jang Jun-dong, Keum Jung-ku, Busan 609-735, Korea; Tel.: Tel: (82) 51-510-2839; Fax: (82) 51-514-3138; kunypark@pusan.ac.kr.

ABSTRACT: Pu-erh tea is produced in China and known to possess medicinal properties. The anticancer and antiangiogenesis effects of fermented Pu-erh tea on HT-29 colon cancer cells and human umbilical vein endothelial cells, respectively, were examined. Two kinds of unfermented and fermented Pu-erh tea (Seven-son tea cake Pu-erh tea and Xiaguan bowl tea [X]) and green tea were used. An MTT assay showed fermented Pu-erh tea X (85% inhibition) possessed more potent anticancer activities than unfermented Pu-erh tea X (67% inhibition) and green tea (53% inhibition) ($P < 0.05$). Moreover, fermented Pu-erh tea X increased the number of apoptotic bodies determined through DAPI staining and flow cytometric analysis. Fermented Pu-erh tea X induced apoptosis indicated by increased expression of *Bax*, caspase-9, and caspase-3 messenger RNA and decreased expression of Bcl-2. Fermented Pu-erh tea X also had an anti-inflammation effect, shown in decreased expression of nuclear factor-κB-p65, inducible nitric oxide synthase, COX-2 messenger RNA and increased expression of IκB-α. Further, fermented Pu-erh teas showed stronger antiangiogenesis effects than the 2 other types of tea. After fermentation, the concentrations of gallic acid, resorcylic acid, quercetin, and kaempferol in Pu-erh tea were increased. These results collectively indicated that fermented and unfermented Pu-erh teas possess stronger anticancer and antiangiogenesis effects than green tea. Furthermore, fermented Pu-erh tea showed stronger functional activities than unfermented Pu-erh tea.

KEY WORDS: *Camellia sinensis*, fermented Pu-erh tea, green tea, anticancer, antiangiogenesis

I. INTRODUCTION

Tea is a beverage consumed worldwide. Green tea (*Camellia sinensis*) has been used in traditional Chinese medicine and has gained considerable attention because of its antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive, antidiabetic, and antimutagenic properties.[1] Chinese Pu-erh tea, named after Pu-erh City in the Yunnan province of China, is one of the most famous Chinese teas.[2] This tea is made from the large leaves of *C. sinensis* O. kuntze var. assamica Kitamura. Pu-erh tea leaves are approximately 10–26 cm in length, the longest of its kind. These leaves are processed using a special fermentation procedure based on the chemical components of raw or nonfermented Pu-erh tea. With the action of extracellular enzymes that occurs because of the dampness and heat in the tea heap, the tea polyphenols undergo a series of complex and dramatic chemical changes that result in the special flavor and taste of Pu-erh tea.[3–5] Many types of food undergo fermentation processes that increase their medicinal effects. For example, fermented soybeans (doenjang) and fermented cabbage (kimchi) have been shown to exert stronger anticancer effects than raw or unfermented products.[6,7] Microorganisms predominantly found in Yunnan Pu-erh tea undergoing fermentation are *Aspergillus niger*, *Aspergillus gloucu*, and species of *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, and *Bacterium*. *A. niger* is most predominant, followed by *Saccharomyces* spp. and then by only a few *Bacillus* spp.[8,9] Because the quality of Pu-erh

0731-9989/13/$35.00 © 2013 Begell House, Inc. www.begellhouse.com

7. Anti-angiogenesis and Anti-adipogenesis Effects of Anthrisci radix Extract

Biotechnology and Bioprocess Engineering 18: 164-172 (2013)
DOI 10.1007/s12257-012-0470-y

RESEARCH PAPER

Anti-angiogenesis and Anti-adipogenesis Effects of *Anthrisci radix* Extract

Jae-Ho Hwang, Si-Woo Lee, Kyeong-Ho Han, Hyo-Jin Seo, and Jong-Deog Kim

Received: 17 July 2012 / Revised: 25 July 2012 / Accepted: 25 July 2012
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2013

Abstract Natural products in Chonnam, the Republic of Korea were screened *via* anti-angiogenesis experiments, and one candidate product of *A. radix* extract (ARE) was identified. *A. radix* extract (ARE) exerted dose-dependent inhibitory effects against angiogenesis, adipogenesis, and cell adhesion. ARE exhibits an angiogenesis inhibitory effect superior to that of the EGCG from the green tea leaves. The expression level of angiogenesis and adipogenesis-related signal molecules in the Western blotting was reduced by increasing the amount of added ARE. Moreover, a diet supplemented with ARE was deemed more effective in inducing weight loss in LB mice than a representative synthetic diet drug, orlistat, which incidentally caused the side effects of denuding the mice of their hair. These results indicate that ARE may prove to be a useful anti-adipogenic compound, and the *in vitro* results may be reflected at a later time under *in vivo* conditions.

Keywords: *anthrisci radix*, anti-angiogenesis, anti-adipogenesis, cell adhesion, orlistat

1. Introduction

Overweight and obesity are both conditions characterized by abnormal or excessive fat accumulation sufficient to present a risk to health; these conditions are known to be major risk factors for a number of chronic diseases, including diabetes, cardiovascular diseases, and cancer [1]. According to WHO statistics on overweight and obesity in 2008, more than 1.4 billion adults were overweight. Of these, over 200 million men and nearly 300 million women were obese [2]. The WHO further projects that by 2015, approximately 2.3 billion adults will be overweight, and more than 700 million will be obese. The fundamental cause of obesity and overweight is an energy imbalance between calories consumed and calories expended.

Angiogenesis is the formation of new blood vessels. Angiogenesis is, thus, a necessary requirement for a variety of disease conditions, such as proliferation and metastasis in cancer cells, rheumatism arthritis, and diabetic blindness [3]. A substantial body of evidence shows that neoplastic and non-neoplastic tissue growth is dependent on angiogenesis [4]. Neovascularization and adipogenesis are temporally and spatially coupled processes occurring during prenatal life, and they continue to interact reciprocally throughout adult life, *via* paracrine signaling systems [5]. Activated adipocytes generate multiple angiogenic factors, including leptin, angiopoietins, HGF, GM-CSF, VEGF, FGF-2, and TGF-beta, which either alone or collectively stimulate neovascularization during fat mass expansion. Moreover, neoadipogenesis is preceded or accompanied by an angiogenic response (endothelial cell proliferation, and vessel sprouting) [5-10]. Thus, the antiangiogenic agents constitute a novel therapeutic option for the prevention and treatment of human obesity and its associated disorders [5].

Although alimentotherapy, exercise, and habit amendment should all be part of the routine method to suppress obesity, there have also been advances in the development of chemically synthesized drugs to treat obesity [11]. These drugs can be largely divided into two categories. One class

Jae-Ho Hwang, Si-Woo Lee, Kyeong-Ho Han
College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea

Hyo-Jin Seo, Jong-Deog Kim
Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea

Jong-Deog Kim*
Research Center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea
Tel: +82-61-659-3305; Fax: +82-61-659-3305
E-mail: pasteur@chonnam.ac.kr

8. Psoraleae semen extract inhibits angiogenesis and adipogenesis

Biotechnology and Bioprocess Engineering 18: 942-949 (2013)
DOI 10.1007/s12257-013-0379-0

RESEARCH PAPER

Psoraleae semen Extract Inhibits Angiogenesis and Adipogenesis

Jae-Ho Hwang, Sung-Ju Rha, Jae-Kwon Cho, Tai-Sun Shin, Min-Yong Kim, and Jong-Deog Kim

Received: 14 April 2013 / Revised: 3 June 2013 / Accepted: 3 June 2013
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2013

Abstract Ethanol extracts of *Psoraleae semen* (PSE) are used in Korean folk medicine for tuberculostasis, nycturia, sarcoma, inflammation, and cancer. We investigated the utility of *P. semen* extract for the suppression of angiogenesis and adipogenesis. Eighteen natural products were screened using anti-angiogenesis experiments, and one candidate product was identified. *Psoraleae semen* provided dose-dependent inhibition of angiogenesis, adipogenesis, and cell adhesion *in vitro* and weight loss in mice *in vivo*. The anti-angiogenenic efficacy of PSE was superior to that of epigallocatechin gallate (EGCG) obtained from green tea leaves. The expression of angiogenesis and adipogenesis-related signal molecules was reduced by increasing the doses of PSE. A diet supplemented with PSE provided more effective weight loss in LB mice than did orlistat, a representative synthetic diet drug, which also caused hairloss in LB mice. *P. semen* may be a useful anti-adipogenic compound if these *in vitro* results are replicated under *in vivo* conditions.

Keywords: *Psoraleae semen*, anti-angiogenesis, anti-adipogenesis, cell adhesion, orlistat

Jae-Ho Hwang, Sung-Ju Rha
College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea

Jae-Kwon Cho
Southwest Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Yosu 556-823, Korea

Tai-Sun Shin
Division of Food Nutrition Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Min-Yong Kim
Department of Refrigeration & Air-Conditioning Engineering, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea

Jong-Deog Kim
Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea

Jong-Deog Kim*
Research Center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea
Tel: +82-61-659-3305; Fax: +82-61-659-3305
E-mail: pasteur@chonnam.ac.kr

1. Introduction

Obesity is characterized by abnormal or excessive fat accumulation sufficient to present a health risk; obesity and excess weight are major risk factors for a number of chronic diseases, including diabetes, cardiovascular diseases, and cancer [1]. According to the World Health Organization (WHO) statistics, more than 1.4 billion adults were overweight in 2008. Of these, over 200 million men and nearly 300 million women were obese [2]. WHO projects that by 2015, approximately 2.3 billion adults will be overweight, and more than 700 million will be obese. The fundamental cause of obesity and excess weight is an energy imbalance between calories consumed and calories expended.

Angiogenesis is the formation of new blood vessels and is an essential component of a variety of disease conditions, such as cancer cell proliferation and metastasis, rheumatoid arthritis, and diabetic blindness [3]. A substantial body of evidence has demonstrated that neoplastic and non-neoplastic tissue growth is dependent on angiogenesis [4]. Neovascularization and adipogenesis are temporally and spatially coupled prenatal processes that continue to interact reciprocally throughout adult life *via* paracrine signaling [5]. Activated adipocytes generate multiple angiogenic factors, including leptin, angiopoietins, HGF, GM-CSF, VEGF, FGF-2, and TGF-beta, which alone or collectively stimulate neovascularization during fat mass expansion. Neoadipogenesis is preceded or accompanied by an

9. Motor Neuron Disease and Stem Cell Approach for Its Remediation

Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 28(5): 269-274 (2013)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2013.28.5.269

총설

Motor Neuron Disease and Stem Cell Approach for Its Remediation

Jong Deog KIM[1*], Jyoti Bhardwaj[2], Narendra Chaudhary[2], and Hyo Jin SEO[2]

접수: 2013년 5월 4일 / 게재승인: 2013년 10월 21일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Motor neuron disease (MND) is a fatal neurodegenerative disorder caused by progressive and selective degeneration of motor neurons (MNs). Because of the versatile nature, stem cells have the potential to repair or replace the degenerated cells. In this review, we discussed stem cell based therapies including the use of embryonic stem cells (ESCs), neural stem cells (NSCs), induced pluripotent stem cells (iPSCs) and genetically engineered cells to produce the neurotrophic factors for the treatment of MND. To achieve this goal, the knowledge of specificity of the cell target, homing and special markers are required.

Keywords: Embryonic stem cells, Induced pluripotent stem cells, Motor neuron diseases, Neural stem cells, Superoxide dismutase

INTRODUCTION

Motor neuron disease (MND) is a fatal neurodegenerative disorder caused by progressive and selective degeneration of motor neurons (MNs). The pathological feature of MND is characterized by the degeneration of upper motor neurons (giant cells of Betz and corticospinal tracts) and lower motor neurons (ventral horn, laminae IX of the spinal cord and directly innervate striated muscle of the axial skeleton in both upper and lower limbs) or both. Upper and lower motor neurons are the final effectors leading to all voluntary movements of the body [1]. MND is used synonymously with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), primary lateral sclerosis (PLS) and progressive muscular atrophy (PLS). ALS is the most common motor neuron disease.

The pathogenesis of the disease appears to be multi-factorial, resulting from the interaction of unknown susceptibility gene and environmental factors as well as physiological cellular ageing. Majority of MND cases are sporadic (sporadic ALS, sALS) i.e., only about 5-10% of all cases show familial inherited form of the disease (familial ALS, fALS) [2,3]. The inherited forms of this disease are associated with mutations in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) [4,5]. The mutant SOD1 protein leads to motor neuron degeneration and accumulation of free radicals by a toxic gain of function which is likely to have multiple elements including oxidative stress, mitochondrial dysfunction, excitotoxicity and protein misfolding [6]. *AV4* gene mutation was most commonly found in North America up to 50% of SOD1 cases. In such a way different region and countries have different mutation which directly or indirectly affect SOD1 gene. For instance, *H46R* gene mutation is commonly determined in Japan. *D90A* mutation is associated with the slow progression of ALS found in the people of Scandinavian [1].

Mutations in the *TARDBP* and *FUS* genes account for another 8% of all fALS cases and a small percentage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis cases [7]. *TARDBP* encodes the protein TDP-43 which is involved in splicing regulation and mRNA biogenesis. Mislocalisation and accumulations of ubiquitinated TDP-43 has been shown to be the cause in many patient. Mutation or deletion of survival motor neuron (SMN1) has been determined in the majority of spinal muscular atrophy (SMA) cases [8]. *TARDBP* mutation was not determined in Finnish patients [9]. Also, about one third of patients have addition in a gene called *C9orf72* and abnormality of this gene develops

[1]Research Center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, San 96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu 550-749, Korea
Tel: +82-61-659-7305, Fax: +82-61-659-7305
e-mail: pasteur@jnu.ac.kr

[2]Department of Biotechnology, Chonnam National University, San 96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu 550-749, Korea

10.녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

KOSFOST

2015-31 호

논문게재예정증명서

제　　목 : 녹차씨 압착박 열수 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

저　　자 : 위지향*, 성혜미, 정경옥, 김슬정, 신유림[1], 박주현[1], 김종덕[2]

저자 소속 : (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터,
[1](주)바이오푸드스토리 식품생명공학과,
[2]전남대학교

위의 논문은 사단법인 한국식품과학회 발행
한국식품과학회 Vol. 47 No. 4 (2015년 8월 31일 발간예정)에 게재예정임을
증명합니다.

2015년 7월 30일

사 단 법 인　한 국 식 품 과 학 회
회　　장　노　　봉　　수

한국식품과학회 Korean Society of Food Science and Technology
135-703 서울특별시 강남구 테헤란로7길 22 한국과학기술회관 본관 605호 Tel.02-566-9937/Fax.02-553-8453/www.kosfost.or.kr
The Korea Science and Technology Center #605, 22, Teheran-ro 7-gil, Gangnam-gu, Seoul 135-703, Korea

나. 학술발표 증빙서

(1) 국제학회 학술발표

1. ECO2012: Tea-seed saponin E1 as an effective inbredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis

HTP.003

Prediabetes in Danish overweight and obese children and youths included in a paediatric chronic care tertiary center

Kloppenborg J., Bille D.S., Jensen L.V., Fonvig C.E., Holm J.C

The Children's Obesity Clinic, Department of Pediatrics, Copenhagen University Hospital, Holbaek, Denmark

Objective: To investigate the prevalence of prediabetes and describe the metabolic profile in Danish overweight and obese children and youths at the time of inclusion in a childhood obesity chronic care treatment.
Methods: This retrospective study included 763 children and youths (344 boys) from The Children's Obesity Clinic. Data were measured at the time for inclusion and included values of body mass index (BMI) standard deviation score (SDS), blood pressure, gender, and biochemical measures, including the fasting concentrations of blood glucose, serum insulin, HbA1c, and serum lipids. The BMI SDS was median 2.64 (range 1.33–5.10) and the age was median 11.6 (range 2.4–24.7) years. Prediabetes was classified as a fasting blood glucose ≥5.6 and <6.9 mmol/L. The Mann-Whitney-Wilcoxon test was used for the analyses.
Results: Prediabetes was present in 97(47 boys) patients. These patients were older, age median 12.29 vs. 11.50 years (p=0.015), had a higher BMI SDS median 2.74 vs. 2.61 (p= 0.005), an increased fasting HbA1c median 36 vs. 34 mmol/mol (p<0.0001), an increased fasting serum insulin median 110.5 vs. 64 pmol/L (p<0.0001), and an increased median HOMA-IR 5.01 vs 2.34 (p< 0.0001), respectively, compared to the patients with a fasting plasma glucose <5.6 mmol/L. No differences were found in any of their fasting serum lipid levels or blood pressure (p>0.05).
Conclusion: In this large group of overweight and obese children prediabetes is prevalent. Thus it seems important to identify obese subjects with prediabetes early in the childhood obesity treatment in order to prevent the development of diabetes.

HTP.004

Satiety differences between a meal based on palaeolithic-inspired nutrition compared with a calorie matched modern-day reference meal

Bligh H F J[1], Murray P[2], Hunter K J[1], MacAulay K[1], Hyllands D[1], Talbot D[1], Casey J[1], Frost G[2], Mulder T[3], Berry M J[1]

[1]Unilever Discover, Colworth Park, Shambrook, United Kingdom, [2]Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, Imperial College, London, United Kingdom, [3]Unilever R and D, Clinicals, Vlaardingen, Netherlands

Introduction: We investigated whether Paleolithic-type meals rich in fruit and vegetables provide improved glucose metabolism and satiety over a modern-day reference meal.
Method: Three meals were given to healthy volunteers in a three-way random crossover exploratory study. A reference meal (REF) was broadly based on WHO recommendations (15% protein, 60% carbohydrate 25% fat, 383 KCals). Two Palaeolithic-inspired meals, PAL1 and PAL2, were rich in fruit and vegetables (selected for high fibre and polyphenol content); PAL2 was matched to REF for protein, fat and calorie-content while PAL1 was a larger meal with 41% carbohydrate and 29% protein, (553 Kcals). All meals were matched for available carbohydrate. Outputs measured included visual analogue scales (VAS) for subjective feelings of hunger, and gut hormone PYY.
Results: Satiety Quotients (175 min) based on VAS scores for "How hungry are you?" and energy were 0.049 for PAL1, 0.073 for PAL2 and 0.019 for REF (p=0.0137 PAL1, p<0.0001 PAL2 compared to REF). Postprandial serum concentrations of PYY were also significantly higher for both PAL meals compared to REF. Mean iAUCs for 185 mins for PYY were 414.5 ±114.9 min.pmol/l for PAL 1, 328.4 ±111.1 min.pmol/l for PAL 2 and −54.2 ±111.2 min.pmol/l for REF (PAL1 v REF p <0.0001, PAL2 v REF p<0.0002).
Conclusions: Improved satiety in high fruit and vegetable based meals designed using principles of Palaeolithic-type diet is reflected by PYY response and Satiety quotient; most surprisingly this seems to be independent of the caloric value of the meal.

HTP.005

Tea-seed saponin E1 as an effective ingredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis

KIM JongDeog[1], Chaudhary Narendra[1], SEO Hyojin[1], KIM MinYong[2], SHIN TaiSun[3]

[1]Department of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Republic of Korea, [2]Department of Refrigeration Engineering, RCAOHC, Chonnam National University, Yeosu, Republic of Korea, [3]Department of Food Science and Nutrition, RCAOHC, Chonnam National University, Yeosu, Republic of Korea

Introduction: Natural products are growing interest in the field of nutrition and complementary medicine to prevent chronic illness or as treatment. We investigated the anti-cancer and anti-obesity properties of Green Tea seed saponin E_1 ($GTSSE_1$) on cancer cells and high fat diet induced obese mice, focusing the functional importance of $GTSSE_1$.
Methods: The anti-angiogenesis effect of $GTSSE_1$ in HUVECs was examined to elucidate the effect on anti-cancer and anti-obesity process that develops through a mechanism of angiogenesis. Cytotoxicity in HUVECs and cancer cell proliferation were measured by MTT assay. Anti-cancer and anti-obesity effect was investigated by using in-vitro and in-vivo system. Western blot analysis was also performed to evaluate the effect of $GTSSE_1$ in angiogenic protein expression.
Results: $GTSSE_1$ has least toxic effect on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in comparison to other saponins and significantly inhibited the proliferation of cancer cell lines. It inhibited the HUVECs cell tube formation through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. The differentiating 3T3-L1 cells treated with various concentration of $GTSSE_1$ had a visible decrease in lipid droplets formation measured by Oil Red O staining. Experiments in mice showed that $GTSSE_1$ inhibits pancreatic lipase activity without hemolysis of erythrocytes, when administered orally. Also, it reduces the size of tumor in nude mice.
Conclusion: Green Tea Seed Saponin E_1 ($GTSSE_1$) is a natural effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effect. From our investigation, we found $GTSSE_1$ has anti-cancer and anti-obesity properties. At dose-dependent concentration, it exerts pharmacological properties.

HTP.006

How mothers cook in Chile: An experimental exercise to use food labels to control portion sizes

Gregori Dario[1], Ballali Simonetta[2], Vecchio Maria Gabriella[2], Valenzuela Contreras Luis Marcel[3], Baeza Correa Jorge[3], Bahamonde Perez Cecilia[4], Barrera Luengo Jorge[5], Moyano Edgardo[5], Arrieta Mauricio[6], Gutierrez Angelo[6]

[1]Unit of Biostatistics,Public Health and Epidemiology,Dept. Cardiology,Thoracic and Vascular Sciences,University of Padov, Padova, Italy, [2]Prochild ONLUS, Trieste, Italy, [3]Universidad Católica Silva Henríquez, Santiago de Chile, Chile, [4]Facultad de Ciencias Médicas., Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile, [5]Colegio Santo Domingo Savio, Santiago de Chile, Chile, [6]Colegio Camilo Ortuzar Montt, Santiago de Chile, Chile

Portion size of food and drink products is an important consideration when providing nutrition information for food labeling purposes. The present study was conducted in order to understand more about consumer attitudes and understanding of portion size information on food and drink products. An experimental trial was performed on mothers and one of their relative. The participants were asked to prepare two meals (one meant for a child, one for an adult), with ingredients measured only with kitchen tools. Participants were stratified by portion size information in two groups, one with labels bearing the "100 gr" and one with "per portion". Subsequently, every participant was interviewed on the basis of a questionnaire assessing nutritional and portioning knowledge. When measured the total Kcal of prepared meals after the simulation, an increase of calories was recorded in the group of subjects who prepared foods bearing the 100 g label, although not statistically significant (p =0.842). Portion size use seemed to be a more intuitive and therefore

2. ECO2014 European Congress on Obesity: Bioactive components of Camellia sinensis fruit peel ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats

T1:PO.103

Gut microbiota, zonulin and incretin axis activity in obese and normal weight subjects

Piotr Kocełak[1], *Agnieszka Żak-Gołąb*[2], *Małgorzata Aptekorz*[3], *Maria Zientara*[3], *Gayane Martirosian*[3], *Jerzy Chudek*[2], *Magdalena Olszanecka-Glinianowicz*[1]

[1]Health Promotion and Obesity Management Unit, Department of Pathophysiology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland, University of Silesia, Katowice, Poland
[2]Pathophysiology Unit, Department of Pathophysiology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland, University of Silesia, Katowice, Poland
[3]Department of Medical Microbiology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland University of Silesia, Katowice, Poland

Introduction: Dysfunction of incretin axis in obese is considered as the important cause of decreased postprandial insulin secretion and satiety sensation. Changes of gut microbiota composition and the local inflammation are potential factors that impairs incretin axis activity. The aim of the study was an assessment of circulating glucagon-like peptide-1(GLP-1) and gastric inhibitory peptide (GIP) in relation to gut microbiota composition and zonulin (marker of intestinal permeability) in obese and normal weight subjects.
Methods: Fasting circulating GLP-1, GIP and zonulin levels were measured in addition to semi-quantitative analysis of gut microbiota composition in 50 obese and 30 normal weight subjects without concomitant diseases.
Results: A bacterial colony count did not differ between groups. Higher plasma zonulin levels were found in the obese subjects [8.2 (7.1–8.4) vs. 5.4 (4.8–6.8) pg/ml]. There were no differences in fasting GLP-1 and GIP between obese and normal weight groups [1.2 (1.0–1.4) vs. 1.2 (1.0–1.4) and 3.0 (2.4–4.0) vs. 3.3 (2.7–3.9), respectively]. No correlation between GLP-1 or GIP and zonulin levels and gut microbiota composition was shown.
Conclusion: Fasting levels of incretin axis hormones are not associated with gut microbiota composition and zonulin levels.

T1:PO.104

Adipokines in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism in patients with obesity

Tatyana Sentsova, Olga Kirillova, Ilya Vorozhko, Kamilla Gapparova, Yulya Chekhonina
Institute of Nutrition RAMS

Introduction: Has been argued that obesity revealed an imbalance in the synthesis of adipokines, which exacerbates metabolic disorders.
Methods: The study involved 90 patients aged 18 to 66 years. Diagnosis of obesity was based on body mass index (BMI). Thirty-one patients had 1st grade of obesity (BMI=30–35 kg/m²), 25 patients – 2nd grade (BMI=36–40 kg/m²), and 34 patients had 3rd grade of obesity (BMI>40 kg/m²). The content of adipokines and oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) examined by ELISA. Serum lipid and carbohydrate status was examined by turbodimetric method on spectrophotometer analyzer Konelab 60i.
Results: We identified that obese patients have imbalance in the content of adipokines. Patients with 1st obese had statistically significant ($p < 0.05$) decrease of adiponectin (5,94 ± 0,90 mkg/ml vs 15,34 ± 0,45 mkg/ml) and ghrelin (215,50 ± 10,45 pg/ml vs 540,67 ± 0,76 pg/ml) in serum compared with the control group, the content of resistin was above normal values (7,34 ± 0,12 ng/ml vs 5,12 ± 0,22 ng/ml, $p<0,05$). There was an inverse correlation between the content of adiponectin, ghrelin and BMI in overweight patients. The study of character the relationship between the concentrations of adipokines and lipids have shown an inverse correlation of adiponectin concentration and triglyceride levels, low-density lipoprotein (LDL), cholesterol, oxLDL. Adipokines Induce of insulin resistance that exercise as increasing concentrations of glucose, insulin in obese patients rather than in the control group.
Conclusion: Integrated approach to the assessment of metabolic abnormalities and synthesis of adipokines in obesity can optimize diagnosis of insulin resistance and cardiovascular diseases as well as personalize diet therapy.

TRACK 5 – Clinical Management and Translation

T5 – Guided Posters

T5:PO.001

Bioactive components of *Camellia sinensis* fruit peel ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats

Jyoti Bhardwaj[1], *Narendra Chaudhary*[1], *Hyo Jin Seo*[1], *Min Yong KIM*[2], *Tai Sun Shin*[3], *Jong Deog KIM*[4]

[1]Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South
[2]Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South
[3]Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South
[4]Department of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South

Introduction: Tea fruit peel is the main by-product of tea manufacturing industry that contains phenols with high antioxidant activities. The present study was conducted to examine the bioactive components of green tea fruit peel extract (PE) against angiogenesis and obesity.
Methods: Tea fruit peel extract was fractionated by preparative HPLC to investigate the bioactive constituents of PE on the basis of angiogenesis assay. Further, we investigated the effect of PE on adipogenesis, gene expression levels in 3T3-L1 adipocyte and on body weight gain and adiposity in rats fed high-fat diet.
Results: Bioactive components of PE that contributed to significant anti-angiogenesis and anti-adipogenesis effect were epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC) and saponin glycosides. Administration of PE (100 mg/kg/d) significantly decreased the body weight in rats fed high-fat diet (HFD) whereas the food intakes between HFD and PE treatment groups were not significantly different. White adipose tissue fat-pad weights were markedly reduced in rats fed HFD plus PE compared to those in HFD group. Tea fruit peel significantly lowered serum cholesterol and expression of PPARγ, CEBPα and SREBP, the key transcription factors in adipogenesis and lipogenesis.
Conclusion: These results showed the potential of green tea fruit peel extract in preventing angiogenesis and obesity.

T5:PO.002

Effect of alpha-lipoic acid supplementation on anthropometric indices, food intake, hs-CRP, IL-6, and hypertension in male patients with spinal cord injury

Shahryar Eghtesadi[1], *Vida Mohammadi*[2], *Shima jazayeri*[3], *Hooshang Saberi*[4], *Mahmoud Reza Gohari*[5], *Mohamad Khalili*[1], *Maryam Eghtesadi*[6]

[1]Iran University of Medical Sciences, School of Public Health, Tehran, Iran
[2]Iran Universty of Medical Sciences, School of Public Health,Tehran, Iran
[3]Iran University of Medical Sciences, School of Public Health.Tehran,Iran
[4]Tehran University of Medical Sciences,Brain and Spinal Injury Research Center,Tehran ,Iran
[5]Iran University of Medical Sciences, School of Management and Bioinformatics,Tehran, Iran
[6]Azad University, School of Medicine,Tehran, Iran

Intoduction: Weight gain, changes in body composition and the increasing risk of chronic diseases are the complications of the spinal cord injury.

...oaded by: ...am National University ...11.222.220 - 6/3/2015 6:04:58 AM

3. ECO2014: Molecular mechanisms underlying the anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of saponin from Camellia sinensis in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet

Present study investigated the effects of supplementation with alpha – lipoic acid on anthropometric parameters, dietary intake, blood pressure, hs-CRP and IL6 in men with chronic spinal cord injury.

Methods: This study is a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Following approval by University Ethics Committee for Human Studies fifty-eight men with chronic spinal cord injury were divided into two groups who received 600 mg of supplemental alpha – lipoic acid (n = 28) or placebo (n = 30). The duration of intervention was 12 weeks. At the beginning and the end of the study, IL-6 and hs-CRP were measured by ELISA and turbidimetry methods, respectively. Weight, height, knee height and weist circumference were measured. Food intakes were collected by 24 h food recall. Dietary intakes and other data were processed by N4 and SPSS16 softwares respectively.

Results: At the end of the study no significant changes were observed in IL-6 and hs-CRP levels. Significant changes were observed in mean weight, BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, energy, carbohydrate, protein and fat intakes ($P < 0.05$). No significant changes were observed in micronutrients intake (vitamins E, C, A_1, selenium and zinc).

Conclusions: Alpha-lipoic acid supplementation reduces anthropometric indices, blood pressure and dietary intake in male patients with chronic spinal cord injury. .

T5:PO.003

Molecular mechanisms underlying the anti-hyperlipidemic and fat pad lowering effect of saponin from *Camellia sinensis* in mice fed high-fat and high-carbohydrate diet

Narendra Chaudhary[1], Jyoti Bhardwaj[1], Hyo Jin Seo[1], Min Yong KIM[2], Tai Sun Shin[3], Jong Deog KIM[4]

[1]Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South
[2]Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South
[3]Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South
[4]Department of Biotechnology,Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu, Korea, South

Introduction: Obesity is a complex, multi-factorial metabolic disorder that requires long term management. Obesity results from the excessive growth and expansion of adipose tissue due to an imbalance between energy intake and expenditure.

Methods: ICR mice were fed with high-fat diet and high-carbohydrate diet and saponin was administered orally for 10 weeks. After completion of treatment period, changes in serum biochemical parameters, cytokine levels and expression levels of genes related to adipogenesis and lipogenesis were measured.

Results: Saponin significantly lowered the body weight gain, body fat-pad weights, blood lipid, glucose, insulin, and leptin levels of mice fed high-fat diet and high-carbohydrate diet. Saponin suppressed the expression of important adipogenic genes (PPARγ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin) and lipid metabolism genes (ACC, GPAT, FAS and MLYCD). Furthermore, saponin induced the levels of adiponectin in serum and adipose tissue, as well as AMP-activated protein kinase (AMPK) in liver tissue.

Conclusion: Our finding demonstrated that saponins are beneficial for suppressing excessive body weight gain prevalence to diets, improving hyperlipidemia and hyperglycemia and reducing the expression levels of genes related to adipogenesis and lipogenesis.

T5:PO.004

Predictors for mortality following Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery

Sigrid Bjerge Gribsholt[1], Reimar Wernich Thomsen Thomsen[2], Elisabeth Svensson[2], Bjørn Richelsen[1], Henrik Toft Sørensen[2]

[1]Aarhus University Hospital, Department of Endocrinology and Internal Medicine
[2]Aarhus University Hospital, Department of Clinical Epidemiology

Introduction: Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) results in pronounced weight loss in severely obese people but may also be associated with various complications and mortality. Population-based follow-up data on this issue are sparse. We therefore examined age, gender, baseline comorbidity, and calendar year of surgery as predictors of mortality within the first 2–3 years following RYGB.

Methods: We conducted a nationwide cohort study of all RYGB surgery patients in Denmark from 2006 through 2010 (N=9,855 patients). Data on age, gender, surgical procedure, preoperative comorbidity level assessed by the Charlson Comorbidity Index (CCI), and mortality were obtained from the Danish National Registry of Patients covering all Danish hospitals and the Danish Civil Registration System.

Results: After 2–3 years of follow-up, 75 patients had died, corresponding to 0.76% cumulative mortality. The hazard ratio was higher for men compared with women: 1.52 (95% confidence interval (CI): 0.93; 2.49). The 2–3-year hazard ratio of death for patients undergoing RYGB with a CCI score of 1–2, compared with those with a CCI score of 0, was 2.16 (95% CI: 1.31; 3.58). For patients with a CCI score >3, the hazard ratio was highly increased at 4.92 (95% CI: 2.16; 11.21). The hazard ratio of death for patients undergoing surgery earlier in the study period (2006–2007), compared with the most recent year (2010), was 2.64 (95% CI: 1.34; 5.19).

Conclusion: Our population-based data show that male gender, baseline comorbidity, and surgery early in the the study period predicted increased mortality in a large nationwide Danish cohort of patients undergoing RYGB.

T5:PO.005

Noninsulinoma Pancreatogenous Hypoglycemia Syndrome: A Rare Complication Of Roux-en-Y Gastric Bypass

Luís Cardoso[1], Dírcea Rodrigues[2], Paulo Donato[3], Patrícia Oliveira[1], Luísa Ruas[1], Joana Saraiva[1], Carolina Moreno[1], Daniela Guelho[1], Rosa Dantas[4], Nuno Vicente[1], Francisco Carrilho[1]

[1]Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal
[2]Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal and Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
[3]Department of Radiology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal and Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
[4]Department of Endocrinology, Centro Hospitalar do Baixo Vouga, Aveiro, Portugal

Introduction: Noninsulinoma Pancreatogenous Hypoglycemia Syndrome (NIPHS) is a late complication of Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). Its rarity and diagnostic dilemma impose a major clinical challenge.

Case Report: A 36-year-old Caucasian woman reported hypoglycemic episodes, with neuroglycopenic symptoms, mostly postprandial, 18 months after undergoing RYGB for class III obesity. Three of these episodes culminated with loss of consciousness. Dietary modifications didn't decrease the frequency or severity of hypoglycemic episodes. Fasting GLP-1 was 14.7 pmol/L (2.8–10.5). 72-hour fast was negative. Prolonged 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) revealed glucose nadir of 34 mg/dL at 90 minutes, with corresponding insulin of 10 μUI/mL (<30) and

4. ECO2014: Tea saponin inhibits adipogenesis and induces lipolysis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes

Tea saponin inhibits adipogenesis and induces lipolysis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes

Jong Deog KIM [1], Narendra Chaudhary [2], Hyo Jin Seo [2], Min Yong KIM [3], Tai Sun Shin [4]

[1] *Department of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, Korea, South*

[2] *Department of Biotechnology,Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, Korea, South*

[3] *Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, Korea, South*

[4] *Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, Korea, South*

Introduction

Adipose tissue is crucial for energy storage and lipid homeostasis but the growth and expansion of adipose tissue leads to obesity. Obesity is a multi-factorial disorder resulting from various causes, including genetic, medicinal, metabolic rate, endocrine function, nutritional and other environmental factors.

Methods

We investigated the effect of tea saponin on adipocyte differentiation and gene expression involved in lipid and energy metabolism in 3T3-L1 adipocytes and apoptosis and lipolysis in mature adipocytes.

Results

At the molecular level, tea saponin suppressed adipogenesis by downregulating SREBP, CEBPα and PPARγ gene expression. Also, the gene expression levels of acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase and lipoprotein lipase (LPL) were downregulated. In mature adipocytes, tea saponin induces apoptosis and lipolysis via upregulation of TNF-α.

Conclusion

The suppression of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis in mature adipocytes by tea saponin may have potential effect in lowering body fat gain.

Research relating to this abstract was funded by the Korean Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (112075-3).

5. IBS2012,: International Biotechnology Society : Anti-Obesity Mechanism of Korean Natural Products Based on Anti-Angiogenesis

Reference No. : Temp_O-S1-ST3-0191

IBS 2012

Anti-Obesity Mechanism of Korean Natural Products Based on Anti-Angiogenesis

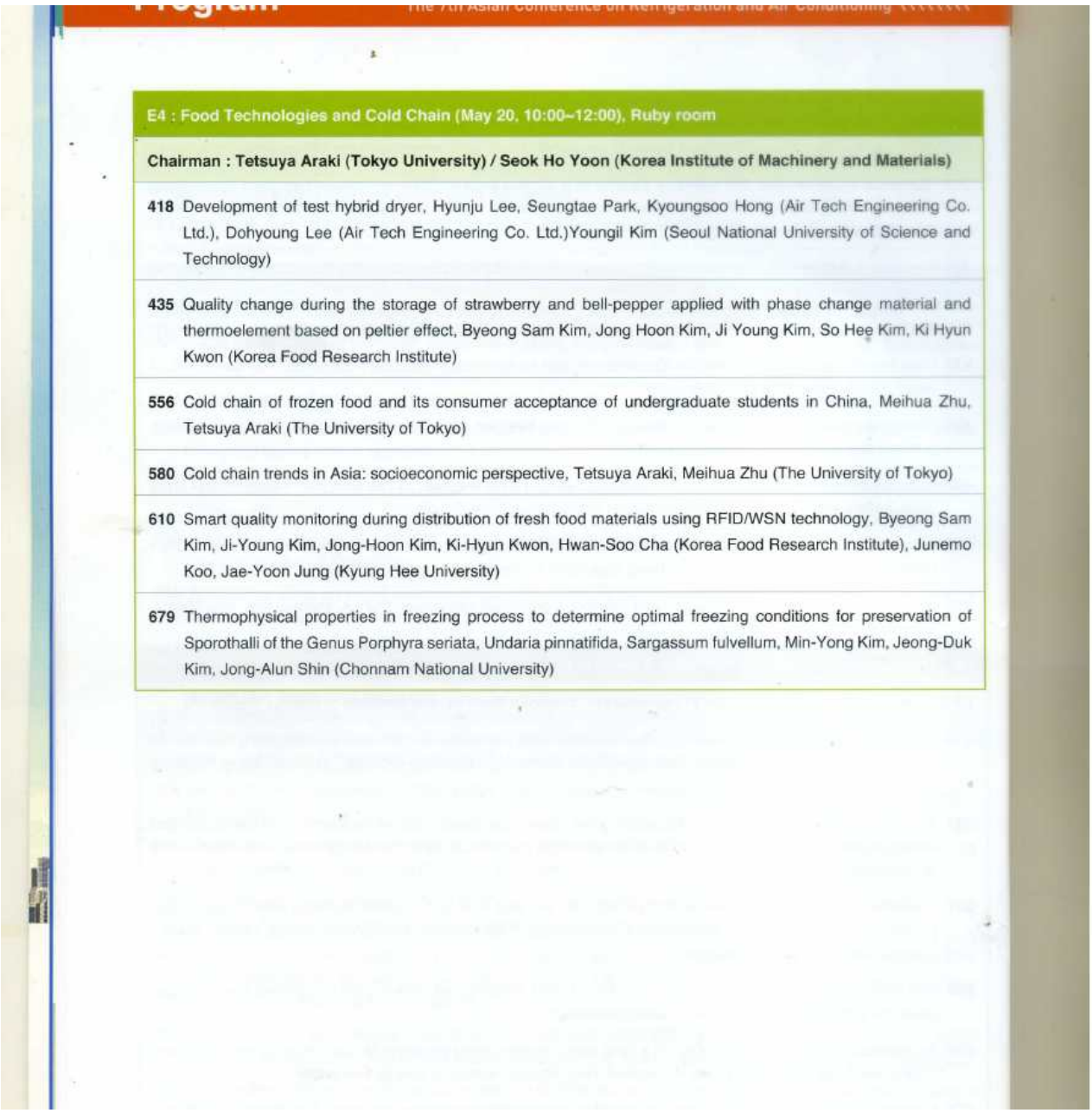
Jong Deog KIM [1,5], Jin Hyuk SHIN [1], Hyo Jin SEO[1], Jae Ho Hwang[2], Tai Sun SHIN [3] and Min Yong KIM [4,5]

[1]Dept. Biotechnol., [2]Dept. Culture Biotechnol., [3]Dept.Food Science and Nutrition, [4]Dept. Refrigeration Eng., Chonnam Natl. Univ., [5]Research center on Anti-Obesity & Health Care(RCAOHC), Chonnam Natl. Univ., Korea

*pasteur@chonnam.ac.kr

Angiogenesis caused on VEGF and cell adhesion is an important factors for obesity, Greentea seed extract(GSE) showed higher anti-obesity effect based on anti-angiogenesis resulting in blocking pathway from VEGFR2, VE-cadherin, PI3K and β-catenin to NF-kB. When both U937 cell and HUVECs were pretreated with GSE, the adhesion of U937cells to IL-1β-stimulated HUVECs was completely suppressed by 57.1, 94.2, 100.0 and 105.7% at different concentration of 5.0, 12.5, 25.0, 50.0 x 10^{-5}%, respectively. And 4 kinds of Korean natural products were investigated for anti-angiogenic effects for applying anti-obesty agents. Cell adhesion molecules, VCAM-1 was suppressed with the order of P. radix (0.2 ppm, 125%) > P. semen (0.5 ppm, 100%) > S. hebra (5.0 ppm, 114%) > C. furctus (5.0 ppm, 111.8%), ICAM-1 was inhibited by P. radix (0.25 ppm, 130%) > P. semen (0.5 ppm, 100%) > S. hebra (5.0 ppm, 138%) > C. furctus (5.0 ppm, 66.7%), E-Selectin was also suppressed P. radix (0.25 ppm, 100%) >P. semen (1.0 ppm, 128%) > S. hebra (5.0 ppm, 120%) > C. furctus (5.0 ppm, 100.7%). The adhesion of U937 cells to IL-1β-stimulated HUVECs was completely suppressed by 204%, 239%, 252%, and 276% at different concentraton of A. Radix 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2ppm, respectively. And signal molecules, VE-cadherin was suppressed by P. radix and S. hebra, β-catenin was inhibited by P. radix, and Akt was suppressed all these natural products, also showed the possibility of anti-obesity agents based on anti-angiogenesis. The protein expression level of the adipogenesis-mediated signal molecule, PPARγ was reduced with the addition of each 4 kinds of natural product extracts(4NPEs). 3T3-L1 was completely differentiated and treated with different concentrations of these natural products. The protein isolated from the 3T3-L1 was subjected to western blotting using the adipogenesis-mediated signal molecules, SREBP-1 and PPARγ. In the adipogenic signal pathway, the protein expression levels of SREBP-1 and PPARγ began to decrease upon the addition of 4NPEs. Additionally, the protein levels of SREBP-1 and PPARγ were reduced in a dose-dependent manner after these natural product extracts, regardless of differentiation. Therefore, the results demonstrated that these 4 natural products were more effective in suppressing adipogenesis in the adipocytes rather than the preadipocytes via the

6. Asian Conference on Refrigeration and Air conditioning: Thermophysical Properties in Freezing Process to Determine Optimal Freezing Conditions for preservation of Sporothalli of the Genus Porphyra seriata, Undaria pinnatifida, Sargassum fulvellum



E4 : Food Technologies and Cold Chain (May 20, 10:00~12:00), Ruby room

Chairman : Tetsuya Araki (Tokyo University) / Seok Ho Yoon (Korea Institute of Machinery and Materials)

418 Development of test hybrid dryer, Hyunju Lee, Seungtae Park, Kyoungsoo Hong (Air Tech Engineering Co. Ltd.), Dohyoung Lee (Air Tech Engineering Co. Ltd.)Youngil Kim (Seoul National University of Science and Technology)

435 Quality change during the storage of strawberry and bell-pepper applied with phase change material and thermoelement based on peltier effect, Byeong Sam Kim, Jong Hoon Kim, Ji Young Kim, So Hee Kim, Ki Hyun Kwon (Korea Food Research Institute)

556 Cold chain of frozen food and its consumer acceptance of undergraduate students in China, Meihua Zhu, Tetsuya Araki (The University of Tokyo)

580 Cold chain trends in Asia: socioeconomic perspective, Tetsuya Araki, Meihua Zhu (The University of Tokyo)

610 Smart quality monitoring during distribution of fresh food materials using RFID/WSN technology, Byeong Sam Kim, Ji-Young Kim, Jong-Hoon Kim, Ki-Hyun Kwon, Hwan-Soo Cha (Korea Food Research Institute), Junemo Koo, Jae-Yoon Jung (Kyung Hee University)

679 Thermophysical properties in freezing process to determine optimal freezing conditions for preservation of Sporothalli of the Genus Porphyra seriata, Undaria pinnatifida, Sargassum fulvellum, Min-Yong Kim, Jeong-Duk Kim, Jong-Alun Shin (Chonnam National University)

(2) 국제학회 학술발표

1. 한국생물공학회 춘계학술발표회
Molecular Mechanism of Angiogenesis and Obesity with Camellia sinensis Fruit Peel Extract: 20150415

P0831 Molecular Mechanism of Angiogenesis and Obesity with Camellia sinensis Fruit Peel Extract

Jong Deog KIM[1,4], Imran KHAN[1], Tai Sun SHIN[2], Min Yong KIM[3]

[1]Department of Biotechnology, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea,, [2]Department of Food Science and Nutrition, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea, [3]Dept. of Refrigeration Engineering, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea, [4]Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea

This study examined the effect of green tea fruit peel extract (PE) against angiogenesis and obesity. We found that PE significantly inhibited the tubular formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with molecular based analysis. Epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC) and saponin were the functional components present in PE that contributed to significant anti-angiogenesis effect. Green tea fruit peel extract (PE) inhibits angiogenesis. Effect of PE and peel saponin on endothelial tubular structure formation. HUVECs (2.5 · 104 cells per well) were plated on Matrigel pre-coated 24-well plates and treated with varying concentration of samples for 4 h. The network of tubular structure formation was quantified by measuring the length of tubular network in five photomicrograph randomly obtained from each well. Effect of green tea fruit peel extract on angiogenic gene expression. Representative RT-PCR analysis of VEGFR-2, b-Catenin and VE-cadherin, (B) PI3K, AKT and NF-kB. HUVECs were seeded in 6-well plates at a density of 9.6 · 104 cells per well, and 70% confluent cells were treated with different concentrations of samples for 24 h. Total RNA was extracted and the gene expression level was analyzed by RT-PCR using gene specific primers. Quantitative analysis of adipocyte differentiation measured by Oil red O staining. Green tea fruit peel extract (PE) inhibits the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. PE was added to differentiating cells in induction medium (1mM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine and 10 lg/mL insulin) and maintenance medium (10 lg/mL insulin) for 0–8 days. Also, Green tea fruit peel extract attenuated the expression of PPARc, C/EBPa, and SREBP during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Total RNA was extracted at day 9 and the level of adipogenic genes were analyzed by RTPCR.

Keywords : Camellia sinensis, Fruit Peel Extract, VEGFR-2, β-Catenin, VE-cadherin, PI3K, AKT, NF-kB

References

1. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway,IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY, 36(3), 202-210, 2014
2. Theasaponin E1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects,BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 78(2), 279-287, 2014
3. Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats, JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS,7(1), 479-486,2014

2. 한국생물공학회 춘계학술발표회

Novel Anti-Angiogenic and Anti-Cell Ahesion Materials from Halophilic Enterobacteria of the Trachurus japonicus based on ORP system value: 20150415

D202 Novel Anti-Angiogenic and Anti-Cell Ahesion Materials from Halophilic Enterobacteria of the Trachurus japonicus based on ORP system value

Jong Deog KIM[1,2], Jong Kwon LIM[1,2]

[1]*Department of Biotechnology, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea,* [2]*Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea*

A new method have been required for antioxidative capacity with simple and accuracy. Currently, some methods occupied for measuring antioxidative capacity are complexity, time consuming and pretreatment of sample. This report will be suggested simple and accurate method for any kinds of samples, especially, colored samples like natural product extracts for measuring antioxidative capacities. We applied for identifying new anti-angiogenic and anti-cell adhesion material from The halophilic enterobacteria, Enterobacteria cancerogenus, was isolated from the intestines of the fusiform fish (Trachurus japonicus) to yield a protein-like material termed PLM-f74. PLM-f74 was characterized by strong inhibition ratios to angiogenesis (82.8% at the concentration of 18.5 μg/ml) and elevated antioxidative capacities with low toxicity. The PLM-f74 is a glycoprotein comprised of saccharides and amino acids. PLM-f74 inhibited cell adhesion that non-activated U937 monocytic cell adhesion to HUVECs activated with IL-1β by 78.0%, and the adherence of U937cells treated with the PLM-f74 and stimulated with IL-1β to unstimulated HUVECs decreased by 102%. When both cell types were pretreated with PLM-f74, the adhesion of U937 cells to IL-1β-stimulated HUVECs was completely suppressed by 121% at a concentration of 18.5 μg/ml. PLM-f74 blocked signal pathways from VEGFR2, PI3K, β-catenin, and VEcadherin to NF-kB, based on western bolt analysis. It also inhibited IL-1-stimulated HUVEC expression of the adhesion molecules, ICAM-1 by 40%, VCAM-1 by 60%, and Eselectin by 70% at the same concentration noted above. New anti-angiogenic and anti-cell adhesion materials showing elevated antioxidative capacities, and non-toxicity may be expected from these results.

Keywords : Anti-angiogenesis, antioxidative capacity, cytotoxicity, fusiform fish, cell adhesion, protein-like material (PLM)

References

1. Lim, J. K., S. Y. Lee, I. D. Heo, M. G. Song, J. H. Sun, E. O. Kim, H. J. Seo, M. Y. Kim, and J. D. Kim (2005), Optimum Growth Conditions for λ-28 Bacterium Bearing Anti-Angiogenesis Effects, KIBB. 17, 335-339
2. J. K. Lim., H. J. Seo, J. H. Shin, S. Y. Lee, M. Y. Kim, and J. D. Kim (2005), Anti-Cell Adhesion Effect of PLM-f74 with U937 Cell from Hallophilic Enterobacteria and Identification of strain, KIBB. 17, 406-411

P0830 Mechanism of Immunomodulating Effect of Tea Seed Saponin on T-cell

Jong Deog KIM[1,2], Jyoti BHARDWAJ[1]

[1]*Department of Biotechnology, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea,* [2]*Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea*

Tea seed saponins have known to increasing human's vitality including anti-cancer and anti-obesity effects. We investigated the immunomodulatory effect of saponinin T-lymphocytes and EL4 cells via regulation of proinflammatory, Th1 and Th2 cytokine response and regulatory effect in Mitogen-activated protein kinases(MAPK) signaling pathway. Quantitative analysis of cytokines((IL)-1,-2,-4,-8,-10,-12, interferonγ(IFN-alpha), tumor necrosis factor α(TNF-alpha) mRNA expression and NF-kB, MAPK signal pathway was performed byRT-PCR following stimulation with tea saponin, ovalbumin alone or tea saponinin combination with ovalbumin. Tea saponin inhibited the proliferation of EL4 cells measured by MTT assay and LDH assay in dose dependent manner. No cytotoxicity effect of tea saponin was detected in T-lymphocytes rather tea saponin enhanced the proliferation of T-lymphocytes with cytokines. Finally NF-kB inhibitor tea saponin with ovalbumin can markedly inhibit the proliferation and invasiveness of T-lymphoma (EL4) cells, possibly due to TNF-alpha and NF-kB mediated regulation of MAPK signaling. This tea saponin will be utilized to anti-cancer and immunomodulator agents for human's wellbeing.

Keywords : Tea Seed Saponin, Immunomodulate, MAPK, EL4, NF-kB

References

1. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway,IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY, 36(3), 202-210, 2014
2. Theasaponin E1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects,BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 78(2), 279-287, 2014
3. Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats, JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS,7(1), 479-486,2014

P0631 High-fat and High-carbohydrate Lowering Effect in Mice with Tea Seed Cake Extract

Jong Deog KIM[1,2], Narendra CHAUDHARY[1], Hyo Jin SEO[1]

[1]Department of Biotechnology, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea, [2]Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea

Tea seed cake of Camellia sinensis L. O. Kuntze has traditionally been used in Asian countries as a stimulant, a diuretic, and to prevent obesity. Anti-adipogenic effect of aqueous extract of green tea seed cake extract(GTE) were analysed in-vitro and the anti-obesity effects were determined in-vivo in murine model fed high-fat and high-carbohydrate diets. We also tried molecular mechanisms of action mechanism of signal molecules. We found that GTE inhibited the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte significantly lowered body weight, body fat-pad weights, blood lipid, glucose, insulin, and leptin levels in mice fed high-fat and high-carbohydrate diets. GTE suppressed the expression of important adipogenic genes (PPARγ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin) and lipid metabolism genes (FAS) with RT-PCR. Furthermore, GTE induced the levels of adiponectin in serum and adipose tissue, as well as AMP-activated protein kinase (AMPK) in liver tissue. GTE ameliorates its anti-obesity effect through multiple cell signaling pathways in diets induced obesity in mice.

Keywords : Tea Seed Cake Extract, High-fat and high-carbohydrate diets, Adipogenic gene, AMPK

References

1. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway,IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY, 36(3), 202-210, 2014
2. Theasaponin E1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects,BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 78(2), 279-287, 2014
3. Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats, JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS,7(1), 479-486,2014

P0630 Anti-obesity Mechanism of Tea Seed Saponin with Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis

Jong Deog KIM[1,2], Narendra CHAUDHARY[1]

[1]*Department of Biotechnology, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea,* [2]*Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea*

Tea seed saponins have key role in anti-angiogenesis, and anti-hyperlipidemic effect in rats. Adipose tissue is crucial for energy storage and lipid homeostasis but the growth and expansion of adipose tissue leads to obesity. Obesity is a multi-factorial disorder resulting from various causes, including genetic, medicinal, metabolic rate, endocrine function, nutritional and other environmental factors. We investigated the effect of tea saponin on adipocyte differentiation and gene expression involved in lipid and energy metabolism in 3T3-L1 adipocytes and on apoptosis and lipolysis in mature adipocytes. Also, the molecular level, tea saponin suppressed adipogenesis by downregulating SREBP, CEBPα and PPARγ gene expression. In mature adipocytes, tea saponin induces apoptosis and lipolysis via upregulation of TNF-α. The suppression of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis in mature adipocytes may have potential effect in lowering body fat gain in rats fed a high-fat diet.

Keywords : Tea Seed Saponin, Adipogenesis, Lipolysis, Apoptosis, CEBPα, PPARγ

References

1. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway,IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY, 36(3), 202-210, 2014
2. Theasaponin E1 as an effective ingredient for anti-angiogenesis and anti-obesity effects,BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 78(2), 279-287, 2014
3. Camellia sinensis fruit peel extract inhibits angiogenesis and ameliorates obesity induced by high-fat diet in rats, JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS,7(1), 479-486,2014

6. 한국생물공학회 추계학술발표회
Tea-Seed Saponin as an Ameliorates Obesity Ingredient: 20141005

Tea-Seed Saponin as an ameliorates obesity ingredient

Jong Deog KIM[†1,4], Hyo Jin SEO[1], Jin Hyuk SHIN[1], Min Yong KIM[2,4] Tai Sun SHIN[3,4]
[1]Department of Biotechnology, [2]Department of Refrigeration Engineering, [3]Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea,
[4]Research center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
TEL & FAX: +82-61-659-7305, pasteur@jnu.ac.kr

Abstract:

Tea seed saponins are growing interest in the field of nutrition and complementary medicine to prevent chronic illness or as treatment. We investigated anti-obesity properties of Green Tea seed saponins(GTSS) form green tea seed and fruit peel extract. They showed high fat diet induced obese mice with anti-angiogenesis effect of saponins was examined on HUVECs. Anti-obesity effect was investigated by using in-vitro and in-vivo system. Western blot analysis was also performed to evaluate the effect of saponins in angiogenic protein expression.Green tea seed saponins(GTSS) have least toxic effect on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in comparison to other saponins and significantly inhibited the proliferation of cancer cell lines. It inhibited the HUVECs cell tube formation through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. The differentiating 3T3-L1 cells treated with various concentration of GTSS had a visible decrease in lipid droplets formation measured by Oil Red O staining. Experiments in mice showed that GTSS inhibits pancreatic lipase activity without hemolysis of erythrocytes, when administered orally. Also, from our investigation, we found GTSS has anti-obesity properties. At dose-dependent concentration, it exerts pharmacological properties.

7. 한국생물공학회 춘계학술발표회

Anti-hyperlipidemic and Fat pad Lowering Effect of Standardized Green tea (Camellia sinensis L.) Seed Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet: 20140409

학술행사
Conference

정기학술대회
- 학술대회안내
- 프로그램
- 사전등록
- 사전등록 확인
- 초록 제출
- 초록 확인
- 숙박 및 교통
- 협찬지원안내
역대학술대회
후원 및 전시
생물화공심포지움
갤러리

정기학술대회

home 학술행사 > 정기학술대회

수정 목록

발표방법	포스터발표
발표분야	기능성바이오 및 융합소재공학
Title	**Anti-hyperlipidemic and Fat pad Lowering Effect of Standardized Green tea (*Camellia sinensis L.*) Seed Extract in Mice Fed High-fat and High-carbohydrate Diet.**
Author(s)	Chaudhary NARENDRA[1], Bhardwaj JYOTI[1], Hyo Jin SEO[1], Tai Sun SHIN[2], Min Yong KIM[3], Jong Deog KIM[1] [1]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [2]Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [3]Dept. of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea
Abstract	*Camellia sinensis* L. O. Kuntze has traditionally been used in Asian countries as a stimulant, a diuretic, and to prevent obesity. Studies in green tea are well-documented in literature, though the potential of fruit from the plant has never been studied in details. In the present study, the anti-angiogenesis and anti-adipogenic effect of green tea seed extract (GTE) were analysed *in-vitro* and the anti-obesity effects were determined *in-vivo* with murine model fed high-fat diet and high-carbohydrate diet. We found that the aqueous extract of green tea seed significantly inhibited the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte and tubular structure formation in human umbilical vein endothelial cells by the regulation of AKT and ERK-2 pathways. Green tea seed extract significantly lowered body weight, body fat-pad weights, blood lipid, glucose, insulin, and leptin levels of mice fed HFD and HCD. GTE suppressed the expression of important adipogenic genes (PPARγ, C/EBPα, SREBP, LPL, aP2 and leptin) and lipid metabolism genes (ACC-1, GPAT-1, FAS and MLYCD). Furthermore, GTE induced the levels of adiponectin in serum and adipose tissue, as well as AMP-activated protein kinase (AMPK) in liver tissue. GTE inhibits angiogenesis in HUVECs and ameliorates obesity induced by high-fat and high-carbohydrate diet in mice.
keyword(s)	Green tea seed, high-fat diet, high-carohydrate diet, anti-obesity, adipose tissue, AMPK
References	Cabrera, C., Artacho, R. & Giménez, R., 2006. Beneficial effects of green tea--a review. Journal of the American College of Nutrition, 25(2), pp.79–99. Cabrera, C., Giménez, R. & López, M.C., 2003. Determination of tea components with antioxidant activity. Journal of agricultural and food chemistry, 51(15), pp.4427–35. Cao, Y. & Cao, R., 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature, 398(6726), p.381.
첨부파일	Naren Conference-poster.doc

한국생물공학회 ©Copyright 2013. 한국생물공학회 (The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering) 개인정보처리방침 | 이메일무단수신거부 |

8. 한국생물공학회 춘계학술발표회

Immunomodulatory Effect of Tea Saponin in Immune T-cells and T-lymphoma Cells via Regulation of Th1, Th2 Immune Response and MAPK/ERC Signaling Pathway : 20140409

학술행사
Conference

정기학술대회
- 학술대회안내
- 프로그램
- 사전등록
- 사전등록 확인
- 초록 접수
- 초록 확인
- 숙박 및 교통
- 참사지원안내
역대학술대회
후원 및 전시
생물화공심포지움
갤러리

정기학술대회

home 학술행사 > 정기학술대회

수정 목록

발표방법	포스터발표
발표분야	기능성바이오 및 융합소재공학
Title	Immunomodulatory Effect of Tea Saponin in Immune T-cells and T-lymphoma Cells via Regulation of Th1, Th2 Immune Response and MAPK/ERK2 Signalling Pathway.
Author(s)	Bhardwaj JYOTI[1], Chaudhary NARENDRA[1], Hyo Jin SEO[1], Tai Sun SHIN[2], Min Yong KIM[3], Jong Deog KIM[1] [1]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [2]Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [3]Dept. of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea
Abstract	The anticancer activity of saponins and phenolic compounds present in green tea was previously reported. In present study, we investigated the immunomodulatory effect of saponin in T-lymphocytes and EL4 cells via regulation of proinflammatory, Th1 and Th2 cytokine response and regulatory effect in *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) signaling pathway. Quantitative analysis of cytokines ((IL)-1, -2, -4, -8, -10, -12, interferon γ (IFNγ), tumor necrosis factor α (TNFα)) mRNA expression and NF-kB, MAPK signal pathway was performed by RT-PCR following stimulation with tea saponin, ovalbumin alone or tea saponin in combination with ovalbumin.Tea saponin inhibited the proliferation of EL4 cells measured by MTT assay and LDH assay in dose dependent manner. No cytotoxicity effect of tea saponin was detected in T-lymphocytes rather tea saponin enhanced the proliferation of T-lymphocytes. Tea saponin with ovalbumin increased the expression of IL-1, IL-2, IL-12, IFNγ, TNFα and decreased the expression of IL-10 and IL-8 in T-lymphocytes. Also, tea saponin with ovalbumin downregulated the MAPK pathway via inhibition of IL-4, IL-8 and NF-kB in EL4 cells.Th1 cytokine enhancer and Th2 cytokine, antiapoptotic and NF-kB inhibitor tea saponin with ovalbumin can markedly inhibit the proliferation and invasiveness of T-lymphoma (EL4) cells, possibly due to TNFα and NF-kB mediated regulation of MAPK signaling.
keyword(s)	Adjuvant, EL4, mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kB, T-lymphocytes, Tea saponin
References	1. Lindsay MM, Sophia SW, Susan SD, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. Blood 2006; 107: 265-276. 2. Ji Y, Ji C, Yue L, et al. Saponins isolated from Asparagus induce apoptosis in human hepatoma cell line HepG2 through a mitochondrial-mediated pathway. Curr Oncol 2012; 19: eS1-eS9. 3. Inoue M, Tajima K, Hirose K, et. al. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan. Cancer Causes Control 1998; 9: 209-216. 4. Pastore RL and Fratellone P. Potential health benefits of green tea (Camellia sinensis): A narrative review. EXPLORE-NY 2006; 6: 531-539.
첨부 파일	Jyoti Conference-poster.doc

한국생물공학회 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

©Copyright 2013. 한국생물공학회 (The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering)

135-703 서울시 강남구 테헤란로 7길 22(역삼동 635-4) 한국과학기술회관 신관 815호 | Tel: +82-2-556-2164 | Fax: +82-2-557-2164 | E-mail: ksbb@ksbb.or.kr

개인정보취급방침 | 이메일무단수신거부 |

9. 한국생물공학회 춘계학술발표회

Molecular Study of Tea Saponin against Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes and Adiposity in Rat: 20140409

학술행사
Conference

정기학술대회
- 학술대회안내
- 프로그램
- 사전등록
- 사전등록 확인
- 초록 접수
- 초록 확인
- 숙박 및 교통
- 협찬기업안내
역대학술대회
후원 및 전시
생물화공심포지움
갤러리

정기학술대회

home 학술행사 > 정기학술대회

수정 목록

발표분야	생물공정공학
Title	**Molecular Study of Tea Saponin against Adipogenesis, Lipolysis and Apoptosis in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes and Adiposity in Rats.**
Author(s)	Chaudhary NARENDRA[1], Bhardwaj JYOTI[1], Hyo Jin SEO[1], Tai Sun SHIN[2], Min Yong KIM[3], Jong Deog KIM[1] [1]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550749, Korea, [2]Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [3]Dept. of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea
Abstract	Adipose tissue is crucial for energy storage and lipid homeostasis but the growth and expansion of adipose tissue leads to obesity. Obesity is a multi-factorial disorder resulting from various causes, including genetic, medicinal, metabolic rate, endocrine function, nutritional and other environmental factors. We investigated the effect of tea saponin on adipocyte differentiation and gene expression involved in lipid and energy metabolism in 3T3-L1 adipocytes and on apoptosis and lipolysis in mature adipocytes. At the molecular level, tea saponin suppressed adipogenesis by downregulating SREBP, CEBPα and PPARγ gene expression. In mature adipocytes, tea saponin induces apoptosis and lipolysis via upregulation of TNF-α. The suppression of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis in mature adipocytes may have potential effect in lowering body fat gain in rats fed a high-fat diet.
keyword(s)	Tea saponin, Apotosis, Lipolysis, 3T3-L1, High-fat diet
References	Ahmad, N. et al., 1997. Green Tea Constituent Epigallocatechin-3-Gallate and Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Carcinoma Cells. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 89(24), pp.1881–1886. Bhavsar, S.K. et al., 2009. Effect of saponins from Helicteres isora on lipid and glucose metabolism regulating genes expression. Journal of ethnopharmacology, 124(3), pp.426–33.
첨부 파일	Naren Conference-oral.docx

한국생물공학회

©Copyright 2013. 한국생물공학회 (The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering)

135-703 서울시 강남구 테헤란로 7길 22(역삼동 635-4) 한국과학기술회관 신관 815호 | Tel: +82-2-556-2164 | Fax: +82-2-557-2164 | E-mail: ksbb@ksbb.or.kr

개인정보처리방침 | 이메일무단수집거부 |

10. 한국생물공학회 춘계학술발표회

Tea Saponin Induces Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells Via TRAIL Dependent Apoptotic Pathway: 20140409

학술행사
Conference

정기학술대회
- 학술대회안내
- 프로그램
- 사전등록
- 사전등록 확인
- 초록 제출
- 초록 확인
- 숙박 및 교통
- 행사지역안내
역대학술대회
후원 및 전시
생물화공심포지움
갤러리

정기학술대회

home 학술행사 > 정기학술대회

수정 목록

발표방법	학생구두발표
발표분야	기능성바이오 및 융합소재공학
Title	Tea Saponin Induces Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells Via TRAIL Dependent Apoptotic Pathway
Author(s)	Bhardwaj JYOTI[1], Chaudhary NARENDRA[1], Hyo Jin SEO[1], Tai Sun SHIN[2], Min Yong KIM[3], Jong Deog KIM[1] [1]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [2]Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea, [3]Dept. of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea
Abstract	We have previously demonstrated that the crude saponin of Korean green tea seed extracts exerts cytotoxic effect in several human cancer cells. We investigated the action mechanism of saponin due to which its posses anti-tumorigenicity effect. Sequential gene expression levels of TRAIL dependent pathway were investigated by RT-PCR method. Inhibition of bcl-2 and NF-kB by tea saponin activates caspase-3, 8 protein expressions. Furthermore, expression level of TNF-α, FAS, and DISC protein were also increased. Down-regulation of C-FLIP and survivin protein expression with continuous activation of death ligands leads us to conclude that tea saponin induces apoptosis by TRAIL dependent signaling pathway. Modulation of apoptosis by tea saponin provides opportunities for further chemoprevention studies with specific molecular targets.
keyword(s)	Apotosis, Green tea saponin, TRAIL, NF-kB, Gene expression, Cancer cells
References	1. Coppola, D. et al. (2008) Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. Cancer 113, 2665–2670 Duckworth, C.A. and Pritchard, D.M. (2009) Suppression of apoptosis, crypt hyperplasia, and altered differentiation in the colonic epithelia of bak-null mice. Gastroenterology 136, 943–952 Russo, A. et al. (2005) The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. J. Clin. Oncol. 23, 7518–7528
첨부 파일	Jyoti Conference-oral.doc

©Copyright 2013. 한국생물공학회 (The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering)

개인정보취급방침 | 이메일무단수신거부 |

11. 한국생물공학회 춘계학술발표회
Computational Analysis of AKT Family Proteins : 20130410

PSP05 **Computational Analysis of AKT Family Proteins**

Narendra CHAUDHARY, Permendra KUMAR[1], Chiranjib CHAKRABORTY[1], Jyoti BHARDWAJ[2], Hyo Jin SEO[2] and Jong Deog KIM[3]
Department of Biotechnology, Chonnam National University, San 96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]School of Biosciences and technology, VIT University, Vellore -632014, Tamilnadu, India.
[2]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

AKT protein family plays vital role in signal transduction by modification of substrate activity in regulation of metabolism, cell cycle progression, transcription, cell survival, motility, apoptosis, differentiation, angiogenesis and insulin responses. AKT protein family includes AKT1, AKT2 and AKT3 whereas AKT2 and AKT3 have one isomer each. In insulin signaling process, the insulin downstream action causes insulin receptor phosphorylation and subsequently insulin receptor substrate proteins formation. In the present study, we have performed phylogenetic analysis and conservation domain analysis for these AKT family members. We applied a pioneer and fast approach to study the structural, functional and phylogenetic relationship among the AKT family member. Our study shows a rapid way to calculate amino acid sequences in terms of evolutionary conservation rates and provides vital information about regions of structural and functional importance.

Keywords : AKT kinase , Insulin , In-silico analysis , conserved domains

PSP06 **Growth of *Phaeodactylum tricornutum* in Various Conditions: Investigation of Change in Fatty Acid Content**

Dong-Woo SHIN, Z-Hun KIM, Seong-Joo HONG and Choul-Gyun LEE
Department of Biological Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea.

Recently, microalgae have been considered as a feedstock for various types of alternative biofuel production (e.g. biohydrogen, bioethanol, biodiesel), because of their ability to accumulate high oil in their body and rapid growth rate by photosynthetic apparatus. Especially, marine microalgae also have the unique physiological characteristics to thrive under the diverse marine environments, so they are attractive sources for researchers to study new useful compounds and chemicals. Among marine microalgae, *Phaeodactylum tricornutum* is not only satisfied with high biomass productivity as well as reasonable oil content, but also a superior producer of PUFA (poly-unsaturated fatty acid) such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5w3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6w3). In order to maximize biomass productivity as well as eliminate light inhibition and limitation, specific light uptake rate was examined. Then, obtained value of specific light uptake rate was used effectively during the experiment. The other conditions (temperature, light intensity, nitrate depletion) were also altered to investigate their effects on production of fatty acid. The variation in fatty acids quantity and quality were analyzed by gas chromatograph. Under nitrate depletion with 2 days, the accumulated total fatty acids in cell body were increased from 14.0% to 39.4%. In contrast, under low light condition (at 50 mE/m^2/s), nitrate depletion had no significant effect on fatty acid content. Also, a dramatic increase in PUFA (from 63.1% to 71.4% of the total fatty acid, during 4 days) was observed under low temperature. The result of this study is the strong evidences that support the potential of improving biodiesel and bioactive compound production from microalgae by manipulating growth conditions.

Keywords : Phaeodactylum , fatty acid , nitrate

PSP07 **An Optical Biosensing System for the Osteoarthritis Diagnosis based on the Quantitative Analysis of Biomarkers in Serum and Urine**

Yoo Min PARK, Su Jin KIM, Jae Ho YOON and Hyun C. YOON
Department of Applied Chemistry & Biotechnology, Ajou University.

An optical biosensor for the osteoarthritis (OA) diagnosis based on the quantification of OA biomarker in human serum and urine was developed. In the OA progresses, the substances of joint such as cartilage protein are degraded and secreted into serum and urine. These cartilage degradation proteins such as C-telopeptide of type II collagen (CTX-II) are used as significant OA biomarker. The CTX-II is classified as serum CTX-II (sCTX-II) and urine CTX-II (uCTX-II) according to its existence site. Due to the structural differences between sCTX-II (homo-dimer) and uCTX-II (monomer), two different types of immunoassays such as competitive immunoassay for uCTX-II and sandwich assay for sCTX-II are employed. For the simultaneous quantification analysis of these markers, we developed a fluoromicrobead-based multiplex guiding chip [1]. On the chip interface, CTX-IIs are bio-specifically captured and its aspect is appeared as formation of fluorescent dot. By counting the number of bead on sensing surfaces, the concentrations of CTX-II were quantified. The obtained optical signal showed good correlation with sCTX-II concentration from 6.3 to 250 pg/ml and uCTX-II concentration from 1.4 to 10 ng/ml.

Keywords : biosensor , biochip , osteoarthritis

PSP08 **Efficient Secretory Production of Recombinant Antibody Fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum***

Sung Sun YIM, Seul Ji AN, Jae Woong CHOI and Ki Jun JEONG
Dept. of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon, 305-701.

Recombinant antibodies are high value biomolecules which have been widely used for research, diagnostic and therapeutic purposes. Among these, single chain variable fragment (scFv), a fusion protein of the variable regions of the heavy and light chains of immunoglobulins, is the smallest active fragment and has several advantages over other antibody fragments, such as cheaper and faster production, higher penetration and clearance due to smaller molecular weight, etc. In recent years, *C. glutamicum* has been demonstrated as industrial protein factory because of its ideal attributes for production of proteins, such as secretion of few endogenous proteins, low level of extracellular proteolysis, capability of high cell density cultivation, etc. Here, we demonstrated *C. glutamicum* as potential recombinant antibody fragment manufacturer. Codon optimization of a scFv gene was introduced, and several expression systems with strong promoters and efficient 5' and 3' UTR sequences were examined. Also, fed-batch cultivation conditions were optimized for higher scFv productivity, and significantly improved productivity of scFv in extracellular medium could be achieved.

Keywords : Secretion , Corynebacterium glutamicum , scFv , Antibody

12. 한국생물공학회 춘계학술발표회

Tea-Seed Saponin E1 as an Effective Ingredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis: 20130410

OP47 TOXICITY ASSAY USING LYSOSOMAL RESPONSES IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ngoc Tu NGUYEN, Jihee YOON, Yang Hoon KIM[1] and Jiho MIN
Bioprocess Engineering, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756.
[1]Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763.

This research describe a new monitoring tool capable of concurrently evaluation of two kinds of chemical: reactive oxygen species (ROS) and non-oxidative stress-making (NOSM) compound based on lysosomal response in the *Saccharomyces cerevisiae*. Exposure of some organisms to oxidative stresses due to toxins alters lysosomal enzymes, thus we used intracellular lysosomes in *S. cerevisiae* as a biomonitoring tool to detect oxidative stresses by pesticides (glyphosate and methidathion) and heavy metals (sodium meta-arsenite and cadmium nitrate). Beside this, the effects of tetracycline and aspirin were evaluated simultaneously to examine NOSM compounds influence. The lysosomes ability to detect toxicity was evaluated by using confocal microscopy after staining lysosomes with LysoTracker. Treatment of *S. cerevisiae* with toxins increased the number of conspicuous and red lysosome-like organelles surrounding *S. cerevisiae* nucleic. The ROS levels were determined synchronously by staining the yeast cells with carboxy-H_2-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (carboxy-H_2-DCFDA). The results indicated that each chemical has an optimal concentration at which the quantity of lysosomes reach the peak while the growth of yeast were not affected. It means that our method can detect the sublethal concentrations which do not inhibit the cells growth of these chemicals.

Keywords : lysosomes , biomonitoring , reactive oxygen species

OP48 Tea-Seed Saponin E_1 as an Effective Ingredient for Anti-Cancer and Anti-Obesity Based on Anti-Angiogenesis

Narendra CHAUDHARY, Hyo Jin SEO[1], Min Yong KIM[2], Tai Sun SHIN[3] and Jong Deog KIM[4]
Department of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[4]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care (RCAOHC), Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

Natural products are growing interest in the field of nutrition and complementary medicine to prevent chronic illness or as treatment. We investigated the anti-cancer and anti-obesity properties of Green Tea seed saponin E_1 ($GTSSE_1$) on cancer cells and high fat diet induced obese mice, focusing the functional importance of $GTSSE_1$. The anti-angiogenesis effect of $GTSSE_1$ was examined on HUVECs. Anti-cancer and anti-obesity effect was investigated by using in-vitro and in-vivo system. Western blot analysis was also performed to evaluate the effect of $GTSSE_1$ in angiogenic protein expression $GTSSE_1$ has least toxic effect on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in comparison to other saponins and significantly inhibited the proliferation of cancer cell lines. It inhibited the HUVECs cell tube formation through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. The differentiating 3T3-L1 cells treated with various concentration of $GTSSE_1$ had a visible decrease in lipid droplets formation measured by Oil Red O staining. Experiments in mice showed that $GTSSE_1$ inhibits pancreatic lipase activity without hemolysis of erythrocytes, when administered orally. Also, it reduces the size of tumor in nude mice. From our investigation, we found $GTSSE_1$ hasanti-cancer and anti-obesity properties. At dose-dependent concentration, it exerts pharmacological properties.

Keywords : Tea-seed saponin , Anti-cancer , Anti-obesity , Anti-angiogenesis

OP49 Enhanced bioethanol production from seaweed, Gelidium amansii, using yeasts acclimated to high salt concentration

Hye young CHO
Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea.

Gelidium amansii, red seaweed, has advantage of high carbohydrate contents converted to fermentable sugar such as glucose and galactose. In spite of these advantages, seaweed has problem with high salinity over 10 %. High salt concentration in the hydrolysate from G. amansii repressed fermentation process of yeasts. Therefore, acclimation of high salt concentration to yeasts is required to resolve the problem.In this study, pretreatment for the saccharification of Gelidium amansii was performed with 16 % (w/v) seaweed slurry, 1 % (v/v) H2SO4 and autoclave at 121℃ for 45 min. To obtain glucose, enzymatic saccharification was carried out using 8.4 EGU/ml of Celluclast 1.5 L and 1.2 FBG/ml of Viscozyme L for 2 days. As a result of saccharification, the galactose of 35.1 g/l and the glucose concentration of 16.8 g/l were obtained. Fermentation was performed with Candida tropicalis KCTC 7212 and Saccharomyces cerevisiae KCCM 1129 acclimated to high salt concentration, respectively. Using acclimated C. tropicalis and S. cerevisiae, ethanol concentrations of 27.6 g/l and 22.1 g/l were produced, respectively.

Keywords : Gelidium amansii , ethanol fermentation , acclimation

OP50 Cultivation and Lipid Production of Yeast Cryptococcus Curvatus Using Pretreated Microalgae Supernatant

Yeong Hwan SEO, Shin HAN and Jong-In HAN
Dept. of civil and environmental engineering, KAIST, Daejeon, 305-701.

Oleaginous yeast has become some of the most promising feedstock for biodiesel production due to their high production efficiency [1]. However, high cost of cultivation, especially substrate cost, hinders rapid commercialization of yeast-based biodiesel [2]. In this study, microalgae (Chlorella), which is rich in nutrients and organic matters, was examined as an economic substitute for organic substances [3], and Cryptococcus curvatus, which was isolated from a fermented seafood, was used for biodiesel production. To be efficiently bioavailable, microalgae must be pretreated. Hydrodynamic cavitation reaction time and pH were identified as experimental factors, whereas growth rate was selected as response parameter. The experimental factors were optimized employing Response Surface Methodology (RSM). Growth rate of 0.605 /h was optimized at reaction time 6.88 min and pH 9.47. When Chlorella supernatant pretreated under these optimal conditions was used as a complete nutrient, 7.47. g of biomass was obtained in three days and lipid was accumulated up to 27% of dry weight.

Keywords : Cryptococcus curvatus , Microalgae supernatant , Hydrodynamic cavitation

KSBB, Abstracts of Current Biotechnology and Bioengineering(XXXII) : October, 2013

P0805 **Inhibition of NF-κB by Tea Saponin induces AGS Stomach Cancer Cells Apoptosis through Modulation of mTOR and ERK Signaling Pathway**

Narendra CHAUDHARY, Jyoti BHARDWAJ, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]
Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

We have previously demonstrated that the crude saponin of Korean green tea exerts cytotoxic effect in several human cancer cells specially stomach cancer cells. We investigated the action mechanism of saponin due to which its posses anti-tumorigenicity effect. Sequential gene expression levels of mTOR and ERK pathways were investigated by RT-PCR method. Inhibition of NF-κB by tea saponin activates caspase 3 expression. Furthermore, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt expression levels were also suppressed. Down-regulation of mTOR expression with continuous activation of ERK1/2 leads us to conclude that tea saponin induces apoptosis by modulation of mTOR and ERK signaling pathways. Modulation of apoptosis by tea saponin provides opportunities for further chemoprevention studies with specific molecular targets.

Keywords : Apotosis , Green tea saponin , NF-kB , Gene expression , Cancer cells

P0806 **Screening of Food Secondary Metabolites and Investigation of Biological Activity.**

Jyoti BHARDWAJ, Narendra CHAUDHARY, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]
Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health care (RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

The purpose of this study was to screen the bioactive compound present in food or its by-product. Nine food samples that are regularly consumed as normal diet were chosen for screening. Saponins, flavonols and phenolics acids were detected by thin layer chromatography as bioactive compounds. The anti-oxidant capacities of samples were determined by FRAP assay. The result showed that saponins, flavonols and phenolics compounds are regularly consumed as diets. Higher concentration of saponin and flavonols glycosides were found in green tea with higher anti-oxidant capacity among tested samples. Food saponins and flavonols also showed inhibitory effect against *Bacillus thuringiensis, B. amyloliquefaciens, Klebsiella aerogenes, E. coli (DH5a), E. coli (N.L.F), E. faecilis, S. aureus* and *Clostridium difficile*. Our study shows that food and food byproducts are good source of natural bioactive compounds with anti-oxidant capacity and anti-bacterial activity.

Keywords : Anti-bacterial , Anti-oxidant , Green tea , Saponin , Flavonoid

P0807 **The comparison of mixing methods in Ag-nanowire synthesis reaction**

Eun Chae YIM, Seong Jun KIM[1] and Chang Doo KEE[2]
Interdisciplinary program of graduate school for bioenergy and biomaterials, Chonnam National University, Gwangju, 500-757.
[1]Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju, 500-757.
[2]School of Mechanical Systems Engineering, Chonnam National University, Gwangju, 500-757.

Silver nanowires(AgNWs) have been attracting attention because of their electrical, optical, and mechanical properties. AgNWs are considered as very promissing candidates in flexible electronics. However, there are problems of easy aggregation and low yield during the synthetic process. The different adding methods of AgNO3 solution and PVP (polyvinlypyrrolidone) were examined in the study. As a result, different reaction patterns appeared in terms of shape and aggregationthe of the synthesized nanowires. SEM image showed that mixing with pipette was most good shape with little agglomeration of the nanowires, but that irregular and flocculation phenomenon in case of using the syringe pump appeared, suggesting impropriety of using the syringe pump in the synthesis of nanowires. It was thought that exisiting of a large amount of reducing agent (PVP) helped the continuous growing of silver particles from the early stages of the reaction. The result maybe contribute to yield enhancement in various nanoparticle synthesis.

Keywords : Silver nanowire , aggregation , synthesize , PVP

P0808 **Preparation and characterization of extruded ethosomal nanoparticles containing iodixanol as macrophage-targeted contrast agents for CT imaging**

NA BOMIN, Namhee PARK[1], Byoungwook CHOI[1] and Bumsang KIM
Dept. of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul, 121-791.
[1]Dept. of Radiology & Research institute of radiological science, Yonsei University, Seoul, 120-749.

The computed tomography (CT) is the most widely used clinical imaging and it needs contrast agents in order to get a more definitive image. Iodine compound is used as CT contrast agents commonly but it has some problems such as short imaging times and renal toxicity. To overcome these limitations, we have developed ethosomal contrast agents containig iodixanol that could be taken up easily by the macrophage which is abundant in the liver, spleen and atherosclerotic plaques. In this study, the ethosomal nanoparticles containing iodixanol were synthesized using a mini-extruder. The effects of extrusion conditions such as extrusion cycle, pore size of membrane and iodixanol concentration of the dispersion medium on the particle size and CT density of the ethosomes were investigated. In addition, we evaluated cell viability and phagocytosis by the macrophage. The ethosomal contrast agents with a size range of 100-400 nm and CT density 1000±50 HU were synthesized. They were taken up by the macrophage and showed no cytotoxicity. In conclusion, the extruded ethosomal nanoparticles containing iodixanol have a good diagnostic potential as macrophage-targeted contrast agents for CT imaging.

Keywords : ethosome , extrusion , iodixanol , CT contrast agents , macrophage

14. 한국생물공학회 추계학술발표회

Inhibition of NF-κB by Tea Saponin induces AGS Stomach Cancer Cells Apoptosis through Modulation of mTOR and ERK Signaling Pathway: 20131016

P0805 Inhibition of NF-κB by Tea Saponin induces AGS Stomach Cancer Cells Apoptosis through Modulation of mTOR and ERK Signaling Pathway

Narendra CHAUDHARY, Jyoti BHARDWAJ, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]

Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

We have previously demonstrated that the crude saponin of Korean green tea exerts cytotoxic effect in several human cancer cells specially stomach cancer cells. We investigated the action mechanism of saponin due to which its posses anti-tumorigenicity effect. Sequential gene expression levels of mTOR and ERK pathways were investigated by RT-PCR method. Inhibition of NF-κB by tea saponin activates caspase 3 expression. Furthermore, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt expression levels were also suppressed. Down-regulation of mTOR expression with continuous activation of ERK1/2 leads us to conclude that tea saponin induces apoptosis by modulation of mTOR and ERK signaling pathways. Modulation of apoptosis by tea saponin provides opportunities for further chemoprevention studies with specific molecular targets.

Keywords : Apotosis , Green tea saponin , NF-kB , Gene expression , Cancer cells

P0806 Screening of Food Secondary Metabolites and Investigation of Biological Activity.

Jyoti BHARDWAJ, Narendra CHAUDHARY, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]

Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health care (RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

The purpose of this study was to screen the bioactive compound present in food or its by-product. Nine food samples that are regularly consumed as normal diet were chosen for screening. Saponins, flavonols and phenolics acids were detected by thin layer chromatography as bioactive compounds. The anti-oxidant capacities of samples were determined by FRAP assay. The result showed that saponins, flavonols and phenolics compounds are regularly consumed as diets. Higher concentration of saponin and flavonols glycosides were found in green tea with higher anti-oxidant capacity among tested samples. Food saponins and flavonols also showed inhibitory effect against *Bacillus thuringiensis, B. amyloliquefaciens, Klebsiella aerogenes, E. coli (DH5α), E. coli (N.L.F), E. faecilis, S. aureus* and *Clostridium difficile*. Our study shows that food and food byproducts are good source of natural bioactive compounds with anti-oxidant capacity and anti-bacterial activity.

Keywords : Anti-bacterial , Anti-oxidant , Green tea , Saponin , Flavonoid

P0807 The comparison of mixing methods in Ag-nanowire synthesis reaction

Eun Chae YIM, Seong Jun KIM[1] and Chang Doo KEE[2]

Interdisciplinary program of graduate school for bioenergy and biomaterials, Chonnam National University, Gwangju, 500-757.
[1]Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju, 500-757.
[2]School of Mechanical Systems Engineering, Chonnam National University, Gwangju, 500-757.

Silver nanowires(AgNWs) have been attracting attention because of their electrical, optical, and mechanical properties. AgNWs are considered as very promissing candidates in flexible electronics. However, there are problems of easy aggregation and low yield during the synthetic process. The different adding methods of AgNO3 solution and PVP (polyvinlypyrrolidone) were examined in the study. As a result, different reaction patterns appeared in terms of shape and aggregationthe of the synthesized nanowires. SEM image showed that mixing with pipette was most good shape with little agglomeration of the nanowires, but that irregular and flocculation phenomenon in case of using the syringe pump appeared, suggesting impropriety of using the syringe pump in the synthesis of nanowires. It was thought that exisiting of a large amount of reducing agent (PVP) helped the continuous growing of silver particles from the early stages of the reaction. The result maybe contribute to yield enhancement in various nanoparticle synthesis.

Keywords : Silver nanowire , aggregation , synthesize , PVP

P0808 Preparation and characterization of extruded ethosomal nanoparticles containing iodixanol as macrophage-targeted contrast agents for CT imaging

NA BOMIN, Namhee PARK[1], Byoungwook CHOI[1] and Bumsang KIM

Dept. of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul, 121-791.
[1]Dept. of Radiology & Research institute of radiological science, Yonsei University, Seoul, 120-749.

The computed tomography (CT) is the most widely used clinical imaging and it needs contrast agents in order to get a more definitive image. Iodine compound is used as CT contrast agents commonly but it has some problems such as short imaging times and renal toxicity. To overcome these limitations, we have developed ethosomal contrast agents containig iodixanol that could be taken up easily by the macrophage which is abundant in the liver, spleen and atherosclerotic plaques. In this study, the ethosomal nanoparticles containing iodixanol were synthesized using a mini-extruder. The effects of extrusion conditions such as extrusion cycle, pore size of membrane and iodixanol concentration of the dispersion medium on the particle size and CT density of the ethosomes were investigated. In addition, we evaluated cell viability and phagocytosis by the macrophage. The ethosomal contrast agents with a size range of 100-400 nm and CT density 1000±50 HU were synthesized. They were taken up by the macrophage and showed no cytotoxicity. In conclusion, the extruded ethosomal nanoparticles containing iodixanol have a good diagnostic potential as macrophage-targeted contrast agents for CT imaging.

Keywords : ethosome , extrusion , iodixanol , CT contrast agents , macrophage

15. 한국생물공학회 추계학술발표회

Anti-angiogenesis, Anti-microbial and Hemolytic Properties of Bioactive Tea Seed Saponins: 20131016

PSP21 **Anti-angiogenesis, Anti-microbial and Hemolytic Properties of Bioactive Tea Seed Saponins**

Jyoti BHARDWAJ, Narendra CHAUDHARY, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]

Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

Saponins are considered as potential chemotherapeutic agent because of their biological activities. Green tea seed saponin was separated into six fractions by reverse phase HPLC. *In-vitro* anti-angiogenesis, hemolytic and anti-bacterial effect of purified saponins were evaluated to determine the biological activities. Tea saponins showed potent anti-angiogenesis effect at concentration range of 2.5-25 μg/ml. Antimicrobial activity of saponin fractions were assessed by inhibition zones and minimum inhibition concentration (MIC) values against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella pullorum* and *Salmonella dublin*. All saponin fractions showed significant bactericidal activity in dose-dependent manner. Present study indicated that the green tea seed saponins possess diverse biological activity.

Keywords : Anti-angiogenesis , Anti-microbial , Green tea , Hemolytic , Saponin

PSP22 **Production of Ornithine by Metabolic Engineering of Corynebacterium glutamicum**

SeoYun KIM and SangYup LEE

Dept. of Chemical & Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon, 305-701.

Ornithine is an amino acid that plays a role in the urea cycle through the action of the enzyme arginase on L-arginine, creating urea. Therefore, ornithine is a central part of the urea cycle. Also, Ornithine is the starting point for the synthesis of polyamines, such as putrescine, and cocaine and then modified greatly by cytochrome. At present, L-Ornithine has been produced commercially from a citrulline-requiring mutant of a *Corynebacterium glutamicum*, which was obtained by classical mutagenesis. First, To produce L-Ornithine, three genes, proB(gamma-glutamyl kinase), argF(ornithine carbamoyltransferase), and argR(repressor of arginine pathway), on chromosome are deleted. And then we construct overexpression vector having arginine operon from mutant, which was obtained by mutagenesis. So we developed *C.glutamicum* enable to produce high concentration of L-Ornithine. Metabolic engineering has great potential to improve the production of L-Ornithine by employing recombinant DNA techniques for overcoming existing limiting steps in biosynthetic pathways.

Keywords : Metabolic Engineering , Corynebacterium glutamicum , Ornithine

PSP23 **Reconstruction of metabolic pathway of *Clostridium acetobutylicum* for enhanced production of butyric acid**

Ziwei LUO, Yu-Sin JANG and Sang Yup LEE

Dept. of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon, 305-701.

Currently, butyric acid is produced by chemical synthesis from petroleum. However, butyric acid production by fermentation of renewable resources has been receiving much attention as an alternative to petroleum-derived butyric acid because of the consumers' preference towards natural ingredients for food, pharmaceutical, animal feed supplement, and perfume. *Clostridium acetobutylicum* has been considered an attractive platform-host for biorefinery due to its metabolic diversity. Considering its capability to overproduce butanol through butyrate, it was thought that butyric acid can also be efficiently produced by this bacterium through metabolic engineering. The *pta-cftB*-deficient *C. acetobutylicum* CEKW, in which genes encoding phosphotransacetylase and CoA-transferase were knocked-out, was assessed for its potential as a butyric acid-producer in fermentations with four controlled pH-values at 5.0, 5.5, 6.0, and 6.4. Furthermore, the CEKW strain was further engineered by knocking-out the *adhE1* encoding aldehyde/alcohol dehydrogenase to prevent solvent-production. The simultaneous deletion of the *pta-cftB-adhE1* in *C. acetobutylicum* resulted in metabolic switch from biphasic to acidogenic fermentation, which enhanced butyric acid-production. [This work was supported by the Technology Development Program to Solve Climate Changes on Systems Metabolic Engineering for Biorefineries from the Ministry of Science, ICT and Future Planning (MSIP) through the National Research Foundation (NRF) of Korea (NRF-2012-C1AAA001-2012M1A2A2026556).]

Keywords : Clostridium acetobutylicum , butyric acid , metabolic engineering

PSP24 **Butyric acid Production from *Gelidium amansii* Hydrolysate by *Clostridium* sp. S1**

Kyung Min LEE, Okkyoung CHOI, Ki-Yeon KIM, Han-Min WOO, Yunje KIM, Sung Ok HAN[1] and Youngsoon UM

Clean Energy Research Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seongbuk-gu, Seoul 136-791, South Korea.

[1]School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, South Korea.

Because of the depletion of petroleum oil and increasing concern for global warming, there have been considerable efforts and progress in developing *renewable energy*. Biomass is regarded as a key resource because it can be used as a feed stock for microbial production of biofuels and biochemicals. Seaweed (macroalgae) is attractive as biomass feedstock because it does not encounter foodstuff and can grow in vast tracts of sea. Especially, red algae such as *Gelidium amansii* contain high level of carbohydrates (77.2 %), feasible for using as a feed stock for microbial fermentation. Galactose is a main carbohydrate in *G. amansii*. Here, we report a newly isolated bacterium, designated as *Clostridium* sp. S1, which is capable of producing butyric acid from galactose as a sole carbon source and the hydrolysate of *G. amansii*. In batch cultures, the strain S1 produced 7.0 g/L of butyric acid from 13.1 g/L of galactose in 48 hours. Interestingly, *Clostridium* sp. S1 simultaneously utilized glucose and galactose without catabolite repression. When *G. amansii* was hydrolyzed through dilute acid hydrolysis, 12.5 g/L of sugar was obtained from 40 g/L of *G. amansii* and *Clostridium* sp. S1 successfully produced 5.0 g/L of butyric acid as the only product using the hydrolysate of *G. amansii*. Since *Clostridium* sp. S1 was not inhibited by inhibitors generated during *G. amansii* hydrolysis process, additional detoxification step was not needed. To our knowledge, this study is the first report of butyric acid production using galactose and the hydrolysate of *G. amansii* with a high yield and selectivity.

Keywords : seaweed hydrolysate , butyric acid , Clostridium

16. 한국생물공학회 추계학술발표회

Anti-Hyperlipidemic and Fat-Pad Lowering Effect of Camellia sinensis Fruit Peel Extract in High-Fat Diet Fed Rats : 20131016

PSP05 Anti-Hyperlipidemic and Fat-Pad Lowering Effect of *Camellia sinensis* Fruit Peel Extract in High-Fat Diet Fed Rats

Narendra CHAUDHARY, Jyoti HHARDWAJ, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]
Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

In the present study, Green tea (*Camellia sinensis*) fruit peel extract (GTFPE) was evaluated for its anti-obesity effect in high fat diet fed rats. Administration of green tea fruit peel extract significantly decreased the total body weights, white adipose tissue fat-pads weights, serum glucose, total cholesterol, triglyceride, and leptin levels. Green tea fruit peel extract has significant effect on body fat reduction and anti-hyperlipidemic properties.

Keywords : Anti-obesity , Anti-hyperlipidemic , Green tea fruit peel extract , White adipose tissue

PSP06 Synergy Effect on Cartilage Regeneration Using the Gel of Combined Collagen-hyaluronic acid with Mesenchymal Stem Cells.

So Hyun KWON, Sun-Mi KIM, Mi Jin KIM and Yong-Soo CHOI
Dept. of Applied Bioscience, CHA University, Gyeonggi-do, 463-836.

Increase in the recovery of cartilage tissue which is hard to regenerate due to its weak inherent regenerative capacity and complex stratified architecture is a important issue of tissue engineering. Fortunately, previous studies found that mecenchymal stem cells (MSCs) have capable of self-replication to assist of cartilage regeneration and collagen which constructs extracellular matrix supports cells adhesion. Thus, the objective of the study was certification of increase cartilage regeneration to use the gel which was combined with collagen, hyaluronic acid (HA) and MSCs. First, the evaluation of collagen-HA gel was investigated by swelling, shrinking and enzyme stability. Then, MSCs which cultured cells in the collagen-HA gel were confirmed by proliferation test, confocal images in vitro and histologic analysis in vivo. Based on those results, we found that the best construction of the gel that ingredient was 3% collagen and 2% HA in the proportion 2:1 and was acceptable condition when we cultured umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs). Moreover, highly effect on cartilage recovery was increased to using the gel with UC-MSCs in vivo. Therefore, we suggest that collagen-HA gel is possible to apply MSCs therapy for cartilage regeneration.

Keywords : Mesenchymal Stem Cells , Cartilage , Collagen , Hyaluronic Acid

PSP07 Microfluidic System for Measuring Metabolism-Dependent Antioxidant Activity of Food Components

Jung-Woo LEE, Sang-Geun HA[1], In-Wook CHOI[1] and Jong-Hwan SUNG
Department of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul.
[1]Korea Food Research Institute, Sungnam-Si.

Various food components are known for their health-promoting effect. However, their actual in vivo effect can be significantly different due to the absorption and metabolism properties. Current assay systems for measuring the antioxidant activity does not reflect the actual in vivo activity. Here, we have developed a microfluidic system that can examine the antioxidant activity of flavonoids after going through the liver metabolism. In the microfluidic system, human liver microsome and human S-9 fraction were immobilized in poly(ethylene glycol) hydrogel to mimic the liver metabolism. The antioxidant activity of flavonoids after the metabolism was measured by the change of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl absorbance in continuous microfluidic channel. For real-time assay DPPH absorbancein the chip, we have developed a custom-made photometer system with LED light source and USB spectrometer. Antioxidant activity of quercetin after various types of liver metabolism was also measured and compared. We speculate that this microfluidic system can be used as a novel in vitro platform for predicting the antioxidant activity of various food components in a more physiologically realistic manner.

Keywords : DPPH , flavonoid , antioxidant activity , absorbance , liver microsome

PSP08 Marine Cultivation of Microalgae Using Flat-Bag Photobioreactors

Hanwool PARK, Dong-Woo SHIN, Z-Hun KIM, Sang-Min LIM and Choul-Gyun LEE
National Marine Bioenergy Research Center & Department of Biological Engineering, Inha University, Korea.

Commercial use of marine biomass has been limited due to the lack of economic large-scale cultivation methods. In this study, the flat-bag photobioreactor was developed to reduce the production cost of marine microalgal biomass by utilizing natural characteristics of the ocean. Compare to the existing terrestrial microalgae culture methods (e.g. open raceway ponds and photobioreactors), marine cultivation of microalgae requires less energy in temperature regulation, evaporation loss make up, and culture mixing. The flat-bag photobioreactors, made of polyvinyl chloride (PVC) and urethane, were used to cultivate native marine microalgae in the seawater of Youngheung Island, Incheon. Local seawater with extra nitrate, phosphate, and bicarbonate was used as the culture medium. The experiment was conducted for 17 days, and the maximum biomass concentration was 0.33±0.08 g/L. There was a long lagging phase for 13 days, and maximum specific biomass productivity of 0.20±0.06 g/L/day was observed from day 13 to day 14. Then, the culture entered death phase. Further studies will be on serial-cultivation to reduce the lagging phase and analysis of nutrients consumption of microalgae.

Keywords : Microalgae Cultivation , Marine Cultivation , Marine Photobioreactor , Marine Biomass , Marine Bioenergy

17. 한국생물공학회 추계학술발표회

Cytokine Gene Expression and Erk2/ p38 MAPK Signaling in T-Lymphocytes and T-Lymphoma in Response to Adjuvanticity Effect of TheaSaponin E1: 20131016

OP53 Identification of Putative Oxidoreductases from *Klebsiella pneumoniae* for Conversion of 3-Hydroxypropanealdehyde to 1,3-Propanediol

Somasundar ASHOK, Yeounjoo KO, Satish Kumar AINALA, Mugesh SANKARANARAYANAN and Sunghoon PARK
School of Chemical and Biomolecular Engineering, Pusan National University, Busan 609-735.

3-Hydroxypropionic acid (3-HP), a non-chiral carboxylic acid can be biologically synthesized by several microorganisms, among which *Klebsiella pneumoniae* has been regarded as a good host due to its ability to produce coenzyme B_{12} naturally. However, 3-HP production from glycerol by *K. pneumoniae* results in the production of large amount of 1,3-propanediol (1,3-PDO) which decreases the yield, titer and productivity of 3-HP. To avoid 1,3-PDO production *K. pneumoniae ΔdhaTΔyqhD* was developed by deleting aldehyde reductase (YqhD) and 1,3-propanediol oxidoreductase (1,3-PDOR). However, the deletion mutant still produced 1,3-PDO, indicating the presence of other unknown putative 1,3-PDOR. Here, the alkyl hydroperoxide reductase (AhpF) and a putative alchohol dehydrogenase (PaldH) were identified as potential 1,3-PDOR by sequence analysis and RT-qPCR. Heterologous expression in *E. coli* and enzyme activity demonstrate their ability to catalyze 1,3-PDO production. The crude cell activity of AhpF was >40 U/mg protein, whereas PaldH was of >7 U/mg protein. Based on these results a mutant strain *K. pneumoniae Δ dhaTΔyqhDΔahpFΔpaldH* was developed and 3-HP production from glycerol are under progress.

Keywords : Oxidoreductase , Klebsiella pneumoniae , 1,3-propanediol oxidoreductase , Alchohol dehydrogenase

OP54 Redox Optimized n-Butanol Production with Enhanced Utilization of Galactose by Engineered *Escherichia coli*

Hyun Gyu LIM, Jae Hyung LIM[1] and Gyoo Yeol JUNG[2]
Department of Chemical Engineering.
[1]School of Interdisciplinary Bioscience and Bioengineering.
[2]Department of Chemical Engineering and School of Interdisciplinary Bioscience and Bioengineering.

Microbial production of chemicals and fuels requires not only utilization of multiple carbohydrates and but also efficient production capability to satisfy economic purpose. As galactose is not preferred sugar to many microorganisms, its utilization rate is much lower than glucose and catabolite carbon repression limits simultaneous utilization of multiple sugars. On the other hand, one problem in biofuel production is imbalanced cellular redox state. (e.g. NAD/NADH) Here, we engineered an *Escherichia coli* to constitutively utilize galactose in presence of glucose and to optimize cellular redox state n-butanol production. Regulatory elements of enzymes on utilization of galactose and production of n-butanol pathways were redesigned for maximum expression with synthetic parts such as strong constitutive promoters, and optimized 5'-untranslated regions, terminators. And we found the optimal expression level of formate dehydrogenase, contributes to additional NADH supply, to obtain higher n-butanol productivity. This research was supported by grants from Marine Biotechnology Program and Advanced Biomass R&D Center (ABC) [ABC-2010-0029800] of the National Research Foundation of Korea.

Keywords : galactose , butanol , synthetic biology , metabolic engineering

OP55 Cytokine Gene Expression and Erk2/ p38 MAPK Signaling in T-Lymphocytes and T-Lymphoma in Response to Adjuvanticity Effect of TheaSaponin E_1

Jyoti BHARDWAJ, Narendra CHAUDHARY, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO, Min Yong KIM[2] and Jong Deog KIM[3]
Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.
[3]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

Saponins are bioactive compounds produced mainly by plants but also by some marine organisms and insects. Immunomodulatory activity of natural products is of key interest for anti-infective therapy because plant remedies are well known in traditional medicine. Based on the structure-activity relationships of isolated tea saponins, theasaponin E_1 induced immune response. In respose to theasaponin E_1, sequential gene expression of cytokines was investigated by reverse transcription-PCR method. The cytotoxic effect of tea saponin E_1 were also studied in two distinct lymphoma cell lines, T-lymphoma (EL4) and B lymphoma (A20) cells. Increased expression of immunomodulatory cytokines occurred and decreased phosphorylation level of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascades. The sequential genes, responsible for proliferation and survival of lymphoma were suppressed due to adjuvant effect of saponin. Results in all together suggest that anti-tumoral effects of theasaponin E_1 are related with the production of immunity-related cytokines.

Keywords : Anti-tumor , Cytokines , Immune response , Theasaponin E1 , T-lymphocytes

OP56 Effect of Harvesting Methods on Reuse of Water for Microalgae Cultivation and Biodiesel Quality

Wasif FAROOQ, Sanjiv K. MISHRA[1], Min S. PARK[2] and Ji-Won YANG[3]
Dept. of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon, 305-701.
[1]Advanced Biomass R&D Center,KAIST, Daejeon 305-701.
[2]Dept. of Chemical and Biomolecular Engineering and Advanced Biomass R&D Center,KAIST, Daejeon 305-701.

Algae biofuels may provide a sustainable alternative source of energy. Reuse of water used for microalgal cultivation after biomass harvesting is playing a significant role in microalgal industry due to cost associated with the price of water itself and the presence of residual nutrient after cultivation. However, harvesting methods and extracellular compounds from microalgae are key factors for reuse of water for algal growth. In this study, we have compared centrifugation and flocculation based harvesting using ferric chloride and alum as flocculant. Both, centrifugation and ferric chloride showed harvesting efficiency >90% within 10 min while, alum was not found effective. *Chlorella vulgaris* showed same growth as compared to control in case of reusage of water after centrifugation and ferric chloride based harvesting. Algal lipid contents were increased during reuse of water as compared to control. Lipids contents were 14%, 28% and 30% during first, second and third use of water, respectively. It can be concluded that the use of flocculants especially ferric chloride is cheap and competitive with centrifugation based harvesting in terms of cost, efficiency and time with no side effects on subsequent water reuse. However, flocculants based harvesting is highly dependent on growth conditions such as pH. Residual concentration of metals like iron in extracted lipids, biomass and biodiesel are also critical factor that needs attention. This work was supported by the Advanced Biomass R&D Center (ABC) of Korea Grant funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning (ABC-2010-0029728)

Keywords : harvesting , Biodiesel , resue of water

18. 한국생물공학회 추계학술발표회

Chemo Preventive Effect of Green Tea Fruit Peel Extract: Screening of Bioactive Compounds Based on Angiogenesis Assay: 20131016

OP41 **Chemo Preventive Effect of Green Tea Fruit Peel Extract: Screening of Bioactive Compounds Based on Angiogenesis Assay**

Narendra CHAUDHARY, Jyoti BHARDWAJ, Tai Sun SHIN[1], Hyo Jin SEO[2], Min Young KIM[3] and Jong Deog KIM[4]

Dept. of Biotechnoloty, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[1]Dept. of Food Science and Nutrition, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[2]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[3]Dept. of Refrigeration Engineering, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

[4]Dept. of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health care(RCAOHC), Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 550-749, Korea.

The purpose of this study was to screen the bioactive compound of green tea fruit peel (GTFPE) on the basis of anti-angiogenesis effect. Purified bioactive compound of GTFPE, (–)-epigallocatechin gallate (EGCG), (–)-epigallocatechin (EGC) and saponin were found to have significant inhibitory effect on tubular formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).The bioactive compounds were further evaluated for anti-oxidant activity, anti-adipogenesis effect, differentiation and gene expression involved in angiogenesis and obesity. EGCG and saponin showed highest inhibitory effect on gene expression in relation to angiogenesis and obesity. The differentiating 3T3-L_1 cells treated with GTFPE bioactive compounds had a decrease in lipid droplets formation measured by Oil Red O staining. Our findings suggest that GTFPE is a natural anti-oxidant source with potent ability to prevent angiogenesis and obesity related disorders. GTFPE possess bioactive compounds with medicinal and industrial value.

Keywords : Anti-angiogenesis , Anti-obesity , Anti-oxidant , Epigallocatechin gallate(EGCG) , Green tea fruit peel extract(GTFPE)

OP42 **Enhanced bioethanol production from seaweed, Gelidium amansii, using yeasts acclimated to high salt concentration**

Hye young CHO and Sung-Koo KIM

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea.

Gelidium amansii, red seaweed, has advantage of high carbohydrate contents converted to fermentable sugar such as glucose and galactose. In spite of those advantages, seaweed has problem with high salinity over 10 %. High salt concentration in the hydrolysate from G. amansii repressed fermentation process of yeasts. Therefore, acclimation of high salt concentration to yeasts is required to resolve the problem In this study, pretreatment for the saccharification of Gelidium amansii was performed with 16 % (w/v) seaweed slurry, 1 % (v/v) H2SO4 and autoclaved at 121℃ for 60 min. To obtain glucose, enzymatic saccharification was carried out using 8.4 EGU/ml of Celluclast 1.5 L and 1.2 FBG/ml of Viscozyme L for 2 days. As a result of saccharification, the galactose of 40 g/l and the glucose concentration of 23 g/l were obtained. Fermentation was performed with Candida tropicalis KCTC 7212, Kluyveromyces marxianus KCCM 1129 and Saccharomyces cerevisiae KCCM 1129 acclimated to high osmotic pressure, respectively. Using acclimated C. tropicalis, K. marxianus and S. cerevisiae, ethanol concentrations of 27.6 g/l, 32.2 g/l and 22.1 g/l were produced, respectively.

Keywords : Gelidium amansii , Bioethanol , acclimation

OP43 **Enhanced Lysosomal Capacity To Detect The Toxicity In *Saccharomyces Cerevisiae* Based On Proteomic Analysis Of Lysosomes**

Ngoc Tu NGUYEN, Jihee YOON[1], Yang Hoon KIM[2] and Jiho MIN

Department of Bioprocess Engineering, Chonbuk National University, Jeongju 561-756.

[1]School of Environmental Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712.

[2]Department of Microbiology, Chungbuk National University, Jeongju 361-763.

In this study we describe a new approach capable of evaluation of toxic compounds which can be classified in two kinds: reactive oxygen species (ROS) and non-oxidative stress-making (NOSM) compound. Exposure of some organisms to toxic compounds alters lysosomal enzymes, thus we used intracellular lysosomes in *S. cerevisiae* as a biomonitoring tool to detect toxicity. The lysosomes ability to detect toxicity was evaluated by using confocal microscopy after staining lysosomes with LysoTracker. Treatment of *S. cerevisiae* with toxins increased the number of conspicuous and red lysosome-like organelles surrounding *S. cerevisiae* nucleic. The results indicated that each chemical has an optimal concentration at which the quantity of lysosomes reach the peak while the growth of yeast were not affected. It means that our method can detect the sublethal concentrations which do not inhibit the cells growth of these chemicals. Additionally, the expressions of lysosomal enzymes of *S. cerevisiae* under the effects of two kinds of toxic compounds were examined using two-dimensional gel electrophoresis (2DE) method to discover some specific biomarkers which can provided a better awareness into toxic impact on cell.

Keywords : lysosomes , oxidative stress , toxicity monitoring , lysosomal proteomics , Saccharomyces cerevisiae

OP44 **Cellular Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol- and heat-induced stresses**

Ji-Min WOO, Se-Um KIM and Jin-Byung PARK

Department of Food Science & Engineering, Ewha Womans University, Seoul, 120-750.

Saccharomyces cerevisiae is an excellent ethanol producer, but is rather sensitive to high concentration of ethanol and high temperatures. Here, influences of ethanol and high temperature on cellular membrane integrity and carbon metabolism of *S. cerevisiae* were investigated to rationalize mechanisms involved in ethanol and heat stresses. Addition of 5% (v/v) ethanol did not significantly change the permeability of the cytoplasmic membrane of *S. cerevisiae* BY4741.[1] However, the addition of ethanol resulted in a marked decrease of the mitochondrial membrane potential and in increased concentrations of intracellular reactive oxygen species (ROS). The carbon flux was redistributed under these conditions from mainly ethanol production to the TCA cycle. On the other hand, increased temperature up to 42°C correlated with stimulated glucose uptake to produce not only the thermal protectant glycerol, but also ethanol and notably acetic acid.[2] The ROS was also increased with the cultivation temperature. Overall, it is assumed that the ethanol- and heat-induced stresses cause the ROS generated in the cells. The cell metabolism is oriented to efficiently remove the toxic metabolite ROS.

Keywords : Saccharomyces cerevisiae , ethanol- or heat-induced stresses , reactive oxygen species

OP01 Lipase Stabilization within Meso-Structured Onion-like Silica for Biodiesel Production

Seung-Hyun JUN, Jinwoo LEE[1], Taeghwan HYEON[2] and Jungbae KIM
Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea.
[1]Advanced Functional Nanomaterials Laboratory, Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Kyungbuk 790-784, Korea.
[2]National Creative Research Initiative Center for Oxide Nanocrystalline Materials and School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-744, Korea.

Lipase was immobilized and stabilized in a form of nanoscale enzyme reactors (NERs) within meso-structured onion-like silica (Meso-Onion-S), which has highly-curved meso-pores of 10 nm diameter in a multi-shell structure. NERs were prepared via a two-step process of enzyme adsorption and subsequent enzyme crosslinking, which effectively prevents the leaching of crosslinked enzyme aggregates from highly-curved mesopores of Meso-Onion-S. As a result, NERs in Meso-Onion-S significantly improved the enzyme stability as well as the enzyme loading. For example, NERs of lipase (NER-LP) was stable under rigorous shaking for 40 days, while the control sample of adsorbed LP (ADS-LP) with no enzyme crosslinking showed a rapid inactivation due to rigorous enzyme leaching under shaking. Highly stable NER-LP was successfully employed to produce biodiesels, fatty acid methyl esters, from the LP-catalyzed transesterification of soybean oil with methanol in isooctane. As a result, the specific activity of NER-LP was 23 and 10 times higher than those of free LP and ADS-LP, respectively, revealing the importance of LP stabilization in the form of NER-LP in the presence of organic solvents.

Keywords : meso-structured onion-like silica , enzyme immobilization , enzyme stabilization , biodiesel production

OP02 Transesterification in an Organic Solvent using Stabilized Subtilisin Carlsberg in Mesoporous Silica

Byoungsoo LEE, Ee Taek HWANG[1], Man Bock GU[1] and Jungbae KIM
Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul Rep. Korea.
[1]College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Rep. Korea.

Subtilisin Carlsberg (SC) from Bacillus licheniformis was immobilized and stabilized in magnetically-separable mesocellular silica (Mag-MSU-F), and used for the model synthetic reaction in an organic solvent. The SC stabilization was based on a ship-in-a-bottle approach, which consists of enzyme adsorption and crosslinking steps. In mesoporous silica with a bottle-neck pore structure, the crosslinked enzymes in larger mesocellular pores did not leach out through smaller window mesopores. As a result, crosslinked enzymes retained more than 66% of the initial activity even after ten times of reuse and for more than 15 days under rigorous shaking condition. On the other hand, free and adsorbed SC showed less than 1% and 2.8% of initial activities, respectively, under the same condition. Crosslinked SC were employed for the transesterification reaction of N-Ac-Phenylalanine ethyl ester with n-propanol in isooctane. Especially, the use of magnetically-separable mesoporous silica allowed for easy separation and recycled uses of immobilized enzymes, which is important for the practical applications of enzymes in fields.

Keywords : Enzyme stabilization , Transesterification , Organic solvent enzymology

OP03 Antibody-conjugated TiO_2 for Selective Photokilling of Target Bacteria

Min Young SONG, Hyoun Duk JUNG, Jongsoo JURNG and Byoung Chan KIM
Centre for Environment, Health and Welfare Research, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 136-791.

The titanium oxide (TiO_2), photocatalyst, has been widely used in the field of environment for degradation of many air and water pollutants. Additionally, TiO_2 photocatalysis has been intensively carried out to inactivate microorganisms. However, traditional studies of TiO_2 photocatalyst generally involved low antimicrobial activity and no selectivity for target microorganisms due to random attack of microorganisms. We established antimicrobial activity method of target microorganisms using antibody-conjugated TiO_2(TiO_2-Ab_E). To prepare for TiO_2-Ab_E we were combined bacteria-specific antibody using via EDC/NHS with PAA coated TiO_2 particles. We evaluated selective and efficient antimicrobial effect of TiO_2-Ab_E with target *E. coli*, and compared with the non-specific other bacteria. The results clearly showed that the effect of TiO_2-Ab_E on antimicrobial activity to *E. coli* was much greater than raw TiO_2 particles while other bacteria were no significant differences between raw TiO_2 and TiO_2-Ab_E. The TiO_2-Ab_E allows selective *E. coli* killing with low concentrations and short UV irradiation time compared to raw TiO_2 particles. This method might be used to remove selective target bacteria for very short time and prevent infection of various bacteria.

Keywords : Antibody-conjugated TiO2 , Selective Photokilling , antimicrobial activity

OP04 Composition for Anti-Angiogenesis containing Tea-Saponin E 1 as an Effective Ingredient.

Jong Deog KIM, Hyo Jin SEO[1] and Tai Sun SHIN[2]
Department of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeon, Chonnam, 550-749, Korea.
[1]Dept. of Biotechnology, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeon, Chonnam, 550-749, Korea.
[2]Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam Natational University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yeon, Chonnam, 550-749, Korea.

1.063 g/mL and 0.901 g/mL of saponins were obtained from 50 g (dry weight) of tea seed with/without sonication, respectively, with new-extraction methods for greentea seed saponin. Sonicated samples was enhanced by 15.23% than the untreated sample. The results of cytotoxicity of tea seed saponin by MTT assay with different concentration, so, it could be used for various purposes. The inhibitory effect of greentea seed saponin on breast cancer cells, cervical cancer, liver cancer and stomach cancer cells was observed more than 80% inhibition at 5 ppm, especially, stomach cancer cells showed completely supressed. Five kinds of strains by using antimicrobial test results, 5 kinds of strains that were significantly inhibited at 50 ppm of tea seed saponin extract. While ob mouse treated with a high fat diet and treated with tea seed saponin, and weight loss was investigated. As a result, compared to the control group appeared to be reduced by more than 30% weight, so it show that tea seed saponin is to be a good substance for anti-obesity. From the above results, Tea-saponin E1 from green tea seed extract was showed novel angiogenesis inhibitory effect and antitumor activity.

Keywords : Anti-angiogenesis , Greentea seed , Anti-obesity

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업(녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발)의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업(녹차씨앗 추출물을 이용한 체중조절 관련 건강기능식품 소재개발)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.