

발간등록번호

11-1543000-001879-01

# 복분자 부산물 기반 천연 항바이러스 소재 산업화 최종보고서

2017. 9. 13.

주관연구기관 / (주)에스앤디  
협동연구기관 / 덕성여자대학교  
위탁연구기관 / 고려대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “복분자 부산물 기반 천연 항바이러스 소재 산업화”(개발기간 : 2014.08.01 ~ 2017.07.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 09. 13.

주관연구기관명 : (주)에스앤디 대표이사 여 경 목  
협동연구기관명 : 덕성여대 산학협력단장  
참여기관명 : (주)에스앤디 대표이사 여경목



주관연구책임자 : 권 상 오  
협동연구책임자 : 정 미 숙

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	114014-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.08.01. ~2017.07.31	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	복분자 부산물 기반 천연 항바이러스 소재 산업화			
연구책임자	권 상 오	해당단계 참 여 연구원 수	총: 13 명 내부: 13 명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:150,000천원 민간:52,000천원 계:202,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 19 명 내부: 19 명 외부: 3 명	총 연구개발비	정부:450,000천원 민간:156,000천원 계:606,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)에스앤디 기업부설연구소 덕성여자대학교 산학협력단			참여기업명 (주)에스앤디	
위탁연구	고려대학교 산학협력단			연구책임자: 권 상 오	
<b>&lt;요약&gt;</b> 천연부산물의 세포 및 동물실험 기반 항바이러스 활성 검증, 비 임상 실험 (pre-clinical studies)의 효능평가 및 작용기전 (proof of mechanism) 연구를 수행하여, 항바이러스 소재 기술의 자체 개발로 인플루엔자 바이러스를 제어하는 천연부산물 소재 시제품 을 생산 및 산업화 ○복분자씨추출물의 항바이러스관련 기술의 객관적 검증을 위한 SCI논문 4편 게재 (Viruses 외 3개 학술지) ○복분자씨추출물의 항바이러스관련 기술의 성과를 알리기 위해 국.내외 학술대회 7회 발표 ○항바이러스 효능을 가지는 조성물에 관한 기술에 대하여 국내 특허 출원 2건 (항바이러스 기능을 가지는 복분자씨 추출물의 제 조방법 및 그 조성물 외 1건) ○항바이러스용 복분자씨 추출물의 제조표준화(제조밸리데이션) 기능성분의 시험법 검토서 1건 ○복분자씨추출물의 식품학적 안전성관련한 유해중금속, 잔류농 약등 시험성적서 확보 ○페렛(ferret)을 통한 비임상연구관련 시험보고서 자료 1건 확보 ○연구결과물의 사업전개를 위한 완제품업체와의 비밀유지계약체 결 및 공동제품개발				보고서 면수 123 면	

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>•지적재산권이 확보된 천연부산물의 세포 및 동물실험 기반 항바이러스 활성 검증, 비임상 실험 (pre-clinical studies)의 효능평가 및 작용기전 (proof of mechanism) 연구를 수행하여, 항바이러스 소재 기술의 자체개발로 인플루엔자 바이러스를 제어하는 천연부산물 소재 시제품을 생산하고자 함. 더 나아가 광범위 항바이러스 활성 검증을 통하여 글로벌 경쟁력을 갖는 바이러스 저해 첨단 천연소재로 산업화함으로써 국가 식품기술 발전에 공헌하고자 함.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Lab 및 pilot scale 생산에 따른 제조공정 확립.</li> <li>•인플루엔자 <i>in vivo</i> mouse 활성 결과물 확보.</li> <li>•인플루엔자 <i>in vivo</i> ferret 활성 결과물 확보</li> <li>•저해활성 천연부산물 10건. (LC/MS/MS 분석 결과물)</li> <li>•항바이러스 성분 추출물에 대한 유해중금속, 잔류농약 등 공인성적서 확보.</li> <li>•특허출원 2건 (Ellagic acid를 주성분으로 하는 항바이러스용 천연식품소재 제조방법, 항바이러스 기능을 가지는 복분자씨 추출물의 제조 방법 및 그 조성물 법)</li> <li>•연구결과물에 대한 SCI논문 5건 투고를 통하여 복분자씨추출물의 객관적 효능 검증.(Antiviral Effects of Black Raspberry(Rubus coreanus) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection 등)</li> <li>•복분자씨추출물의 항바이러스 효능에 대한 학술발표 7건을 통하여 관련 학문적 지식과 과학적 자료 등 정보공유.</li> <li>•제형설계 및 국내 기업 제품으로의 연계 응용화</li> </ul>				
<p>연구개발성과 의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•복분자 씨(부산물) 원료는 주스 및 와인 가공 후에 버려지는 부산물 waste를 항바이러스 소재로 개발하는 창조적 식품 고부가가치 기술이며, 개발되는 천연 소재는 농식품 자원의 재순환뿐만 아니라 친환경 소재 개발기술은 창조경제를 창출하는데 공헌할 것임.</li> <li>•천연물 기반 융합적 항바이러스 소재개발 플랫폼을 구축하고 광범위 (broad-spectrum) 항바이러스 천연소재 개발로 글로벌 경쟁력을 갖는 새로운 블루오션 시장 창출이 기대됨.</li> <li>•새로운 항바이러스 천연소재를 개발하여 산업적 적용성이 가능한 결과가 확보 되면 국내 혹은 국제특허를 출원함으로써 지적재산권을 확보하고, 실용화를 달성하여 식품산업에 기여할 것임.</li> <li>•항바이러스 천연 소재를 이용하여 제품 (예: 타블렛 및 시럽 첨가물)으로 개발 된다면 바이러스 예방용 백신구입으로 인한 막대한 경제적 손실을 막는데 크게 일조할 것임.</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>항바이러스 천연 소재</p>	<p>복분자 부산물</p>	<p>활성 및 효능 연구</p>	<p>비임상실험</p>	<p>인플루엔자</p>

## 〈 SUMMARY 〉

		D-02			
Purpose& Contents	<p>In order to produce anti-influenza materials derived from <i>Rubus coreanus</i> by-products, we plan to perform the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> antiviral studies including pre-clinical tests and the proof of mechanism studies using <i>Rubus coreanus</i> by-product. We will determine the broad-spectrum antiviral effects of the anti-influenza materials, to provide a basis for industrialization as natural materials, which will eventually achieve global competitiveness in viral infection control.</p>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Established production processes at the lab and pilot scales</li> <li>• Obtained results of anti-influenza effects from <i>in vivo</i> mouse experiments</li> <li>• Identified 10 polyphenol compounds derived from <i>Rubus coreanus</i> by-products (results of LC/MS/MS analyses)</li> <li>• Obtained a certified analysis of heavy metals and residual pesticides in the <i>Rubus coreanus</i> by-product</li> <li>• Published 2 patent (Production method for antiviral food material in which the main compound is ellagic acid, Methods of production and formulation of antiviral <i>Rubus coreanus</i> seed extracts)</li> <li>• Published 5 SCI paper (Antiviral effects of black raspberry (<i>Rubus coreanus</i>) seed and its gallic acid against influenza virus infection, etc. ) to demonstrate the strong antiviral activities by the <i>Rubus coreanus</i> by-product</li> <li>• Obtained results of anti-influenza effects from the <i>in vivo</i> ferret tests</li> <li>• Finalized the design and formulation of a potential dosage form</li> <li>• Presented 7 poster presentations at the national influenza and food conferences</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The <i>Rubus coreanus</i> seed by-product from wine and juice production can be developed as a creative natural antiviral materials with antiviral activities, which will contribute to repurposing food resources.</li> <li>• Development of a broad-spectrum natural antiviral material against influenza virus will resolve the serious public health problem through innovative research with global competitiveness.</li> <li>• By publishing domestic or international patents for anti-viral food materials, intellectual properties can be used to expand high-technology sector of food industry.</li> <li>• Development of tablet or syrup formations using antiviral <i>Rubus coreanus</i> seed extract can reduce substantial economical loss caused by purchasing influenza vaccine for elderly and infants.</li> </ul>				
Keywords	natural antiviral materials	<i>Rubus coreanus</i> by-product	activity/efficacy study	pre-clinical test	influenza

## <Contents>

Chapter 1. Introduction of the research project .....	1
Section1. Research propose .....	1
Section2. Research background .....	2
1. Present state of the research .....	2
A. Severity of viral disease .....	2
B. Characteristics of influenza disease .....	3
C. Influenza drug resistance and the need for natural materials .....	5
Section3. The research goal and contents .....	6
1. 1st detailed task: Validation and industrialization of anti-viral food materials .....	6
A. The research goal .....	6
B. Contents .....	6
2. 1st collaboration task: Activity and efficacy study of anti-viral food materials .....	6
A. The research goal .....	6
B. Contents .....	6
3. Commissioned task: Inhibition mechanism based on viral protein .....	7
A. The research goal .....	7
B. Contents .....	7
4. Fusion industrialization development system .....	7
Chapter 2. Present state of the research .....	10
Section 1. Domestic and overseas market status and outlook .....	11
1. Antiviral market status .....	11
A. World market status .....	11
B. Domestic market status .....	11
2. Domestic and overseas state of the research for anti-viral materials .....	12
Chapter 3. Contents and results .....	14
Section 1. The research goal and contents .....	14
Section 2. Result .....	16
1. Establish manufacturing technology of antiviral material .....	16
A. Stable supply of natural antiviral material .....	16
B. Study on extraction condition setting of raw materials .....	17

C. Production test of bokbunja seed by-products at pilot-scale level .....	27
D. Results of antiviral efficacy analysis on pilot-scale samples .....	28
2. Establishment of technology to verify inhibitory activity of food materials derived from cell and mouse-based natural products .....	29
A. Verification of cell line inhibition activity of antiviral material .....	29
B. Mouse adapted influenza virus use in vivo activity .....	34
3. Study of active ingredients of antiviral material .....	38
A. Research method .....	38
B. Result .....	38
4. Mechanism of inhibition mechanism based on viral protein structure .....	40
A. Large-scale expression and purification of influenza virus proteins in insect cells .....	40
B. Crystallization of recombinant HA protein .....	40
C. Measurement of HA binding activity based on DSF and membrane fusion inhibition using trypsin susceptibility assay .....	41
D. Identification of antiviral mechanism using confocal microscopy and electron transmission microscope .....	41
5. Pre-treatment studies to maintain the active ingredient contents of antiviral material .....	42
A. Standardization studies of raw materials .....	42
B. Study on manufacturing process improvement .....	44
C. Method for manufacturing anti-viral food material .....	49
D. Setting test of indicator material of bokbunja seed extract .....	51
6. Established technology for mass production of anti-influenza food materials .....	60
A. Standards-setting test for hazardous substances .....	60
B. Analysis of Nutritional Composition of Bokbunja Byproducts .....	62
C. Obtain food safety data of bokbunja byproducts .....	63
7. Verification of activity by pretreatment for mass production .....	64
8. A biomarker search for functional evaluation .....	67
9. Activity optimization and screening of antiviral materials .....	74
A. Expression, purification and crystallization of influenza virus recombinant HA protein .....	74
B. Determination of binding to recombinant protein HA - DSF and SPR	

analysis .....	75
C. Measurement of membrane fusion inhibition by influenza virus (syncytium assay) .....	76
D. Influence on influenza virus particles TEM analysis .....	77
10. Non-clinical studies for prototype production .....	77
가. Experiment preparation for ferret .....	77
나. Evaluation items .....	78
다. Result .....	79
라. Review and conclusions .....	81
11. Mass production and industrialization of antiviral materials .....	82
가. Establishment of mass production and monitoring technology .....	82
나. Formulation design and product diversification of antiviral food materials .....	86
12. Secure intellectual property rights and product marketing .....	94
A. Securing Intellectual Property .....	94
B. Comparative analysis and marketing with anti-viral food materials .....	94
13. Confirmation of inhibition activity of mass production material for industrialization .....	97
A. Activity of mass produced material .....	97
B. Stability study such as QC test index change .....	97
C. Identification and validation of effective substances in mass production process .....	99
D. Mechanism of active substances .....	103
14. <i>In vivo</i> test of prototype for functional efficacy evaluation .....	106
15. Status of research result .....	107
Section3. Commercialization plan .....	111
1. Commercialization prospect .....	111
2. Commercialization strategy .....	112
Chapter 4. Achievements and Contribution to related industry .....	114
Chapter 5. Practical use plan for field application .....	116
Chapter 6. Oversea gathering of information and technology .....	117
1. <i>in vitro</i> test summary .....	117
2. <i>in vivo</i> test summary .....	119
Chapter 7. Security rating of results .....	120
Chapter 8. Report of new research instrument .....	120

Chapter 9. Implementation of safety measures in accordance with R & D .....	120
Chapter 10. Representative research achievements of R & D .....	121
Chapter 11. ETC .....	121
Chapter 12. References .....	121

## < 목 차 >

제1장 연구개발과제의 개요 .....	1
제1절 연구개발의 목적 .....	1
제2절 연구개발의 필요성 .....	2
1. 국내·외 현황 .....	2
가. 바이러스 질병의 심각성 .....	2
나. 인플루엔자 질병의 특성 .....	3
다. 인플루엔자 제어 약제 내성과 천연소재의 필요성 .....	5
제3절 연구개발의 목표 및 내용 .....	6
1. 1세부과제: 항바이러스 천연식품소재 제조밸리데이션 확보와 산업화 .....	6
가. 연구개발 목표 .....	6
나. 연구개발 내용 .....	6
2. 제1 협동과제: 바이러스 제어 천연 식품소재의 활성 및 효능 연구 .....	6
가. 연구개발 목표 .....	6
나. 연구개발 내용 .....	6
3. 위탁과제: 바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전 연구 (1·2차년도 참여) .....	7
가. 연구개발 목표 .....	7
나. 연구개발 내용 .....	7
4. 세부, 협동 및 위탁의 융합적 산업화 개발체계 .....	7
제2장 국내외 기술개발 현황 .....	10
제1절 국내외 시장 현황 및 전망 .....	11
1. 항바이러스 관련 시장현황 .....	11
가. 세계 시장 현황 .....	11
나. 국내 시장 현황 .....	11
2. 국내외 항바이러스 연구개발현황 .....	12
제3장 연구수행 내용 및 결과 .....	14
제1절 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용 .....	14
제2절 연구수행결과 .....	16
1. 항바이러스 소재의 제조기술 구축 .....	16
가. 천연 항바이러스 소재(복분자씨) 안정적 공급 .....	16
나. 원료의 추출조건 설정 연구 .....	17
다. Pilot-scale 수준에서의 복분자씨부산물의 제조시험 연구 .....	27
라. Pilot-scale 제조한 시료에 대한 항바이러스 효능 분석결과 .....	28

2.	및 마우스 기반 천연 물 유래 식품소재의 저해활성 검증 기술구축 .....	29
가.	항바이러스 소재의 세포주 저해 활성 검증 .....	29
나.	Mouse adapted 바이러스 이용 in vivo 활성 분석 .....	34
3.	항바이러스 소재의 활성 성분 연구 .....	38
가.	연구방법 .....	38
나.	연구결과 .....	38
4.	바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전 연구 .....	40
가.	곤충세포에서의 인플루엔자 바이러스 단백질 대량 발현 및 정제 .....	40
나.	재조합 HA 단백질의 결정화 .....	40
다.	DSF기반 HA 결합활성 측정 및 trypsin susceptibility assay를 이용한 membrane fusion 저해연구 .....	41
라.	Confocal microscopy 및 전자투과현미경을 이용한 항바이러스 기작 확인 .....	41
5.	항바이러스성 소재의 유효성분 함량 유지를 위한 전처리 연구 .....	42
가.	원료의 표준화 연구 .....	42
나.	제조공정 개선연구 .....	44
다.	항바이러스용 식품소재의 제조방법 .....	49
라.	복분자씨추출물의 지표물질의 설정시험 .....	51
6.	항인플루엔자 식품 소재 대량생산 기반 기술 확립 .....	60
가.	유해물질에 대한 규격기준 설정 시험 .....	60
나.	부산물(과육+씨)과 복분자씨 (분쇄) 시료에 대한 영양성분 분석 .....	62
다.	복분자 부산물의 식품 안전성 자료 확보 .....	63
7.	소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 활성 검증 .....	64
8.	기능성 평가를 위한 biomarker 탐색 연구 .....	67
9.	항바이러스 소재의 활성 optimization과 선별 .....	74
가.	인플루엔자 바이러스 재조합 HA 단백질 발현, 정제 및 결정화 .....	74
나.	재조합 단백질 HA에 대한 결합도 측정 - DSF 및 SPR 분석 .....	75
다.	인플루엔자 바이러스에 의한 membrane fusion 저해도 측정 (syncytium assay) .....	76
라.	인플루엔자 바이러스 입자에 미치는 영향 TEM 분석 .....	77
10.	시제품 생산을 위한 비임상 연구 .....	77
가.	ferret 실험 준비 .....	77
나.	평가 항목 .....	78
다.	실험 결과 .....	79
라.	비임상시험연구자의 고찰 및 결론 .....	81
11.	항바이러스 소재의 대량생산과 산업화 .....	82
가.	대량생산과 활성모니터링 기술 확립 .....	82

나. 항바이러스 식품소재의 제형설계 및 제품 다양화 .....	86
12. 지적재산권의 확보 및 제품 마케팅 .....	94
가. 지적재산권 확보 .....	94
나. 항바이러스 천연식품소재와의 비교분석 및 마케팅 .....	94
13. 산업화를 위한 대량생산 소재의 저해활성 확인 .....	97
가. 대량생산 소재의 활성 .....	97
나. QC 테스트 지표변화 등 안정성 연구 .....	97
다. 대량생산공정 제품의 유효물질의 동정 및 효능 검증 연구 .....	99
라. 활성 유효물질의 기전탐색 .....	103
14. 기능성 효능평가를 위한 시제품별 in vivo 효능평가 .....	106
15. 연구성과 자료 현황 .....	107
제3절 사업화 계획 .....	111
1. 사업화 전망 .....	111
2. 사업화 전략 .....	112
제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도 .....	114
제5장 연구결과의 활용계획 .....	116
제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	117
제1절 시험관시험 자료 요약 .....	117
제2절 동물시험 자료 요약 .....	119
제7장 연구개발결과의 보안등급 .....	120
제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 .....	120
제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	120
제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	121
제11장 기타사항 .....	121
제12장 참고문헌 .....	121

# 제1장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적

지적재산권이 확보된 천연부산물의 세포 및 동물실험 기반 항바이러스 활성 검증, 비임상 실험 (pre-clinical studies)의 효능평가 및 작용기전 (proof of mechanism) 연구를 수행하여, 항바이러스 소재 기술의 자체개발로 인플루엔자 바이러스를 제어하는 천연부산물 소재 시제품을 생산하고자 함. 더 나아가 광범위 항바이러스 활성 검증을 통하여 글로벌 경쟁력을 갖는 바이러스 저해 첨단 천연소재로 산업화함으로써 국가 식품기술 발전에 공헌하고자 함.

■ 구체적으로는,

- ✓ 천연부산물의 세포 및 마우스 기반 항바이러스 효능 검증
  - 활성저해 대상 시료: 복분자 부산물
  - 대상 바이러스: 인플루엔자 바이러스 A/Brisbane/59/2007 (BR59) (H1N1), A/Korea/01/2009 (KR01) (2009pdm H1N1), A/Brisbane/10/2007 (BR10) (H3N2), B/Florida/4/2006 (FL04)
  - 세포 및 마우스 기반 천연 부산물 저해활성 검증 기술구축
  - 천연 식품부산물 구성성분 분리 및 동정: LC/MS/MS 저해활성 물질
  - 바이러스 단백질 구조기반 작용 기전 연구: membrane fusion 저해 기전 분석
  - Mouse adapted 바이러스 이용 *in vivo* 활성 분석: PR8, seasonal H1, H3, H7 마우스 적용 변이주
- ✓ 페렛을 이용한 비임상 실험 및 대량생산을 위한 부산물 후보 천연소재 선별
  - 천연 복분자부산물(씨)유래의 식품소재의 항바이러스 효능 평가
  - 항바이러스 부산물 유래 선도소재 optimization과 선별
  - 개별인증을 위한 biomarker 탐색연구: LC/MS/MS, 세포기반 실험
  - 선정된 항바이러스 식품소재 후보의 비임상실험: 항바이러스 효능 검증
- ✓ 시제품 대량생산을 위한 천연식품소재 제재화, 기술고도화, 산업화 추진
  - 선정된 항바이러스 천연 식품소재 제품 개발을 위한 대량생산 기반 기술 확립
  - 대량생산 천연소재의 활성 및 QC 테스트 지표변화 등 안정성 연구
  - 항바이러스 응용 제품군별 *in vivo* 시험에 의한 효능평가를 통한 검증
  - 지적재산권의 확보와 개별인증
  - 항바이러스 천연식품소재와의 비교분석 및 제품 마케팅

## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 국내·외 현황

#### 가. 바이러스 질병의 심각성

○ 신종 전염병 (emerging infectious diseases) 출현과 감염병의 재출현 (re-emerging infectious diseases)은 고령화와 함께 21세기 인류 보건복지에 심각한 문제이며, 기후, 환경 문제와 함께 세계적인 이슈임.

○ 자연 개발과 지구온난화에 따라 새로운 병원체 출현이 증가하여, 1940년 이래 새롭게 보고된 인체 감염병이 300 종이 넘고 있음.

○ Nature지 보고에 따르면 감염병은 세계적으로 어린아이에서 젊은 성인에 이르기까지 가장 치명적인 제1위 질병이며, 전 세계적으로 1,300만명의 목숨을 앗아가고 있음 (Nature 2011).

○ 개발도상국가에서 여전히 사망률 1위의 질병이며, 현재 매시간 1,500명이 감염병에 의하여 사망하고 있음. 감염병 사망률 1위는 AIDS 이며, 말라리아, 결핵, 간염 (hepatitis)이 뒤를 잇고 있음 (Fig. 1).

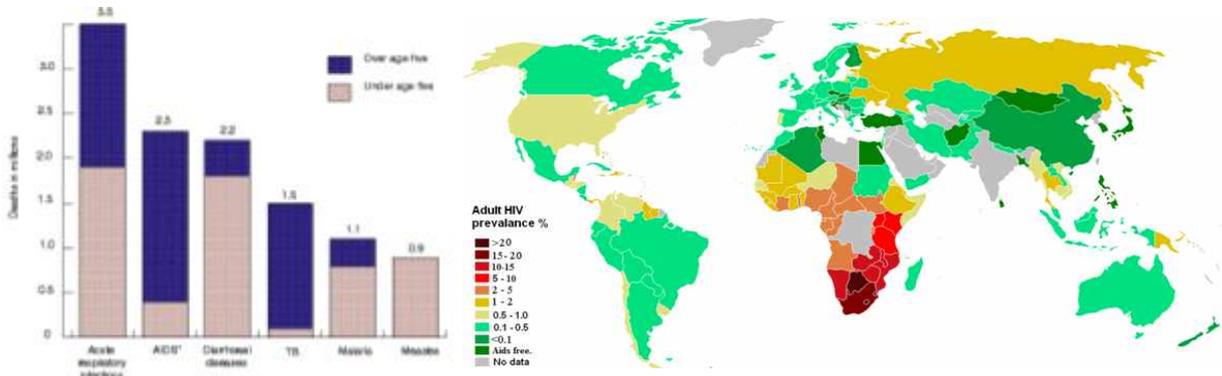


Fig. 1. 감염병에 의한 사망자수 (왼쪽)과 AIDS 감염분포 (오른쪽) Wikipedia (2011)

○ 인플루엔자의 경우, 1918년 4천만 명의 목숨을 앗아간 대유행 (pandemic) 이후 1957년 아시아 독감으로 150만 명, 1968년 홍콩 독감으로 100만 명의 사망자를 초래하는 등 수십 년 주기로 대유행이 나타났고 (Fig. 2), 최악의 가상 시나리오에 따르면 짧은 기간 안에 인류 전체의 30%를 감염시킬 수 있는 잠재력을 갖고 있음.

○ 2009년 돼지유래 신종 인플루엔자 pandemic으로 214개 국가에서 2만명 가까운 사망자가 발생하였으며, 국내는 확진환자 75만명, 252명 사망자, 발생 치사율은 0.017% 수준으로 집계되었음 (WHO, 질병관리본부, 2010. 07).

○ 수십 년 주기의 대유행 외에도 인플루엔자는 전 세계적으로 매년 25~50만 명의 사망자와 이를 훨씬 능가하는 환자를 발생시키고 있기 때문에 사회적 경제적 파급효과는 국가 경쟁력에 큰 위협이 되고 있는 호흡기 질환임.

○ 뿐만 아니라 2014년 3월 WHO에 따르면 고병원성 조류인플루엔자 (H5N1)는 2003년부터 664건의 인체 감염이 확인되었고 이 중 391명이 사망하여 약 60%의 치사율을 나타내고 있기 때문에, 주요 인수공통전염병으로 분류되고 있음 (Fig. 3).

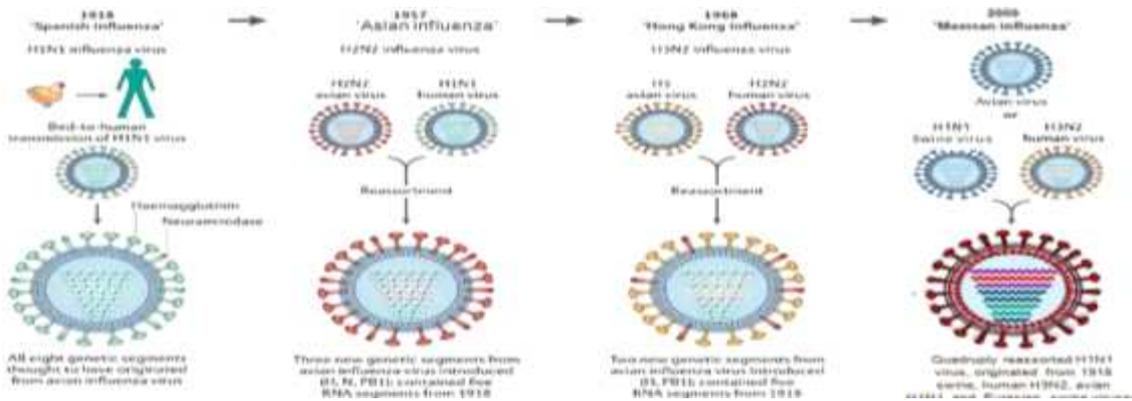


Fig. 2. 인플루엔자 바이러스의 재배열에 따른 pandemic 대유행 바이러스의 출현 (Modified from Nat Rev. Drug Discovery, 2006)

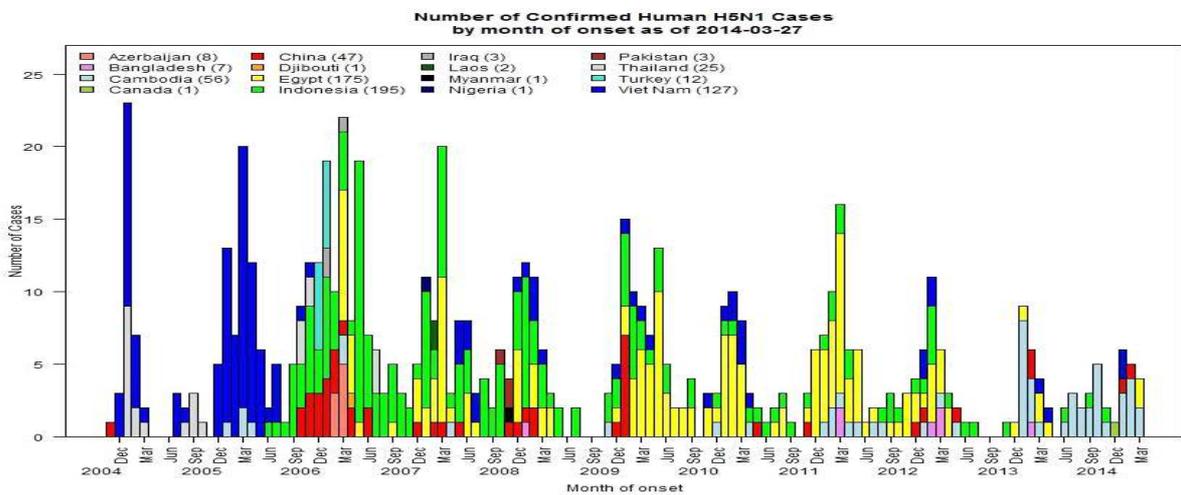


Fig. 3. 2003년 이후 고병원성 조류인플루엔자 H5N1의 인체 감염 현황 (WHO 2014. 03).

○ 국내에서는 아직 조류인플루엔자의 인체 감염사례는 발견되지 않고 있지만, 2013년 3월 31일 중국에서 고병원성 조류인플루엔자 바이러스인 H7N9의 인체 감염 환자가 3명 발생하였다는 세계보건기구 보고를 시작으로 총 133명의 인체 감염이 확인되었고 치사율은 22%로 나타났다 (WHO, 2014. 01).

○ 국내에서는 2003년, 2006년, 2008년 및 2013년의 네 차례에 걸쳐 고병원성 인플루엔자가 가금류에 발생하여 국내 산업에 수천억 원의 피해를 입혔음. 우리나라와 인적, 물적 교류가 활발한 중국과 동남아시아, 중앙아시아를 포함하여 전 세계적으로 조류인플루엔자의 인체 감염이 빈번히 발생하기 때문에 대책 마련이 시급한 실정임.

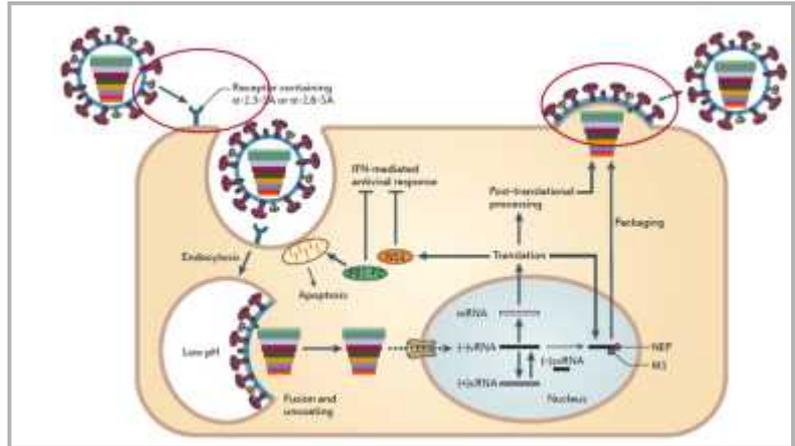
○ 인플루엔자 유행 (epidemic) 및 대유행에 대비할 수 있는 감시와 협력체계를 공고히 하기 위하여, 제4차 동아시아 정상회의 (EAS)가 2009년 10월 태국에서 ASEAN 회원국 정상들이 참석, 관계 장관회의를 통하여 인플루엔자 바이러스 질병을 비롯한 5개의 EAS 우선 협력분야가 선정되어 국가별 협력 사업이 구체화되고 있음.

○ 바이러스 질병을 예방하고 제어하기 위해서, 국가간 협력을 도모하는 가장 큰 이유는 바이러스의 인체 감염 가능성 외에, 대유행 신종 바이러스와 기존의 계절 바이러스의 재배열로 합쳐진 새로운 변종 출현으로 대재앙을 일으킬 가능성이 높기 때문임.

**나. 인플루엔자 질병의 특성**

○ 인플루엔자 바이러스는 A, B, C 형의 세 가지가 있으며, 인체 감염을 일으키는 인플루엔자 바이러스는 A, B 형으로 바이러스 표면의 hemagglutinin (HA)과 neuraminidase (NA) 항원 단백질에 의하여 바이러스 항원 변이가 결정됨.

○ 인플루엔자 바이러스의 life cycle은 Influenza virus의 life cycle은 1) 인체 세포 sialic acid (SA) 수용체 결합, 2) 세포 침입과 uncoating, 3) 세포 machinery를 이용한 전사 및 복제, 4)virus particle의 assembly, 5) 세포 밖으로 virus의 release 단계로 이루어지며, 인체 호흡기 세포에서 대략 2-3일 소요됨 (NSMB 2010).



○ Influenza virus A형은 8개의 negative strand RNA segment로 이루어져 있으며, 각각의 RNA segment는 하나 혹은 두 개의 단백질 유전자를 포함하고 있으며, mutation rate가 높아 진화속도가 빠름 (표 1).

표 1. 인플루엔자 바이러스 RNA segment와 단백질

RNA segment/ Protein name	Protein size (# of a.a)	Protein function	Infectivity
1 PB2	759	RNA polymerase, nuclear transport	virulence transmission
2 PB1	757	RNA polymerase	virulence
PB1-F2	87	Induce apoptosis	virulence
3 PA	716	polymerase complex	
4 HA	566	hemagglutinin, receptor binding, membrane fusion	virulence transmission
5 NP	498	nucleocapsid	
6 NA	454	neuraminidase	
7 M1, M2	252, 97	matrix protein, ion channel	
8 NS1, NS2	230, 121	interferon response, cytokine storm (NS1)	virulence

○ 인플루엔자 바이러스가 인체에 침입하기 위해서는 인체 상기도 (upper respiratory tract) 호흡기 점막에 많이 분포되어 있는 terminal 수용체인 SA 특이당에 결합해야 함. HA의 구조적 변화로 인하여 membrane fusion을 이루게 되고, 산성 pH 조건에서 endocytosis에 의하여 세포 내로 침입하지만, 세포 침입이 탄수화물 수용체 SA에만 의존하는 것은 아님.

○ 바이러스가 결합하는 SAα-2,6-Gal가 하기도 (lower respiratory tract)에 비하여 상기도에

상대적으로 많은 것이 관찰됨으로써, 인체 감염 전이를 위해서 인체 바이러스가 상기도에 감염되어야 하는 이유가 밝혀짐.

#### 다. 인플루엔자 제어 약제 내성과 천연소재의 필요성

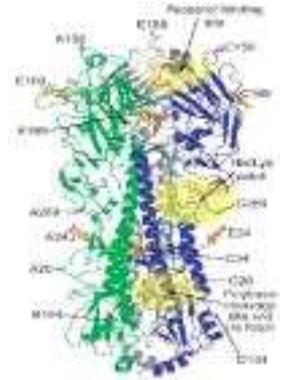
○ 특히 바이러스 표면 당단백질인 HA는 숙주세포의 면역시스템에 의한 selective pressure를 받아 다른 바이러스 단백질에 비하여 바이러스 진화가 높으며, 주요 항원인식 epitope 제공 단백질로 역할이 매우 중요함.

○ 인플루엔자를 타겟으로 하는 약제로는 (1) NA 저해제인 oseltamivir (타미플루)와 zanamivir가 있으며 둘 중 하나에 내성이 있더라도 다른 약제에 교차내성이 항상 생기지는 않음. (2) M2 단백질 억제제인 amantadine과 rimantadine은 일찍 개발되었으나, NA 저해제에 비하여 부작용이 심하며, 약제내성을 갖는 바이러스가 쉽게 발생하는 단점이 있어서 최근에는 매우 제한적으로 사용되고 있음.

○ 이는 국내 인플루엔자 바이러스 H1N1은 이미 oseltamivir 약제에 대한 내성을 갖고 있다는 의미이며, 미국, 이탈리아, 일본에서 이미 발견되고 있는 내성 바이러스에 비추어 예견된 결과임.

○ 국내에서도 2003년에서 2009년까지 발생한 계절성 인플루엔자에서 M2 유전자 1,943개를 수집하여 분석한 결과, 이 중 1,096개의 유전자가 내성 (56.4%)을 지니는 것으로 나타났으며, 특히 H3N2 바이러스에 내성률이 상대적으로 높았음 (질병관리본부, 2011).

○ 아직까지 인플루엔자에 대한 약제가 개발되지 않은 상태이며, 인플루엔자 유행의 가능성이 제기되기 이전에는 항바이러스 소재개발이 큰 관심을 얻지 못하였지만, 타미플루의 내성 한계가 보고되면서 기존의 NA 위주의 연구에서 벗어나 신규 항바이러스 타겟에 대한 연구가 활성화되고 있는 추세임.



#### 천연소재 개발의 세계적 추세

유럽을 비롯한 선진국 외에도 중국, 인도에서 천연물 소재로부터 새로운 유효 물질군을 개발하려는 노력이 진행 중이며, 새로운 항바이러스 천연물 소재 연구는 세계적으로 진입단계라고 판단됨.

국내에서도 천연물 소재로부터 항바이러스 화합물을 도출하려는 연구가 활발히 진행 중이나, 약효 최적화 및 약동력학적 성질 개선 등의 연구 개발이 효과적으로 이루어지지 않고 있음

- 플라보노이드계 소재를 이용한 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료에 관한 PCT 특허를 출원하였음.
- 녹차의 카테킨이 인플루엔자 바이러스 제어에 효과적이며, 김치 유산균이 바이러스성 질병에 치료 효과를 보인다는 결과가 제시되었음.
- 청국장의 바실러스균과 키토산 혼합물이 백신효과를 높이는 면역증가제로서의 효과가 제시되었음.

이 외에도 인삼, 녹차 및 녹차 부산물, 부추 등의 천연물을 이용한 인플루엔자 예방 및 치료제 등을 개발하는 연구가 진행되고 있는 실정이지만, 아직까지 실용화된 보고는 없음.

본 연구 과제에서 제안하는 버려지는 부산물인 복분자 천연부산물을 이용한 자원 순환형의 저가 소재를 이용한 활성이 매우 우수한 인플루엔자 저해 천연소재 개발은 시기적으로 매우 적절하다고 판단됨.

국내외적으로 천연 항균제 및 천연 소재의 요구는 크게 증가하고 있는데 반하여, 새로 발굴되는 천연소재는 한계를 갖고 있음. 따라서 바이러스를 제어하는 고부가가치 식품 천연소재를 선점함으로써 확보되는 경제적 산업적 가치는 매우 클 것임.

## 제2절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 제1세부과제: 항바이러스 천연식품소재 제조밸리데이션 확보와 산업화

#### 가. 연구개발 목표

- 복분자 부산물(복분자씨) 바이러스 저해 천연 식품소재 생산제조 조건 설정 및 산업화
- 천연 식품소재 유효성분 제조관리화를 위한 지표성분 밸리데이션 설정 및 제조 표준화 확립
- 소재의 응용화 증진을 위한 제품 다양화 및 향후 기능성 인증을 위한 자료 확보

#### 나. 연구개발 내용

- 인플루엔자 저해 활성 천연식품소재의 제조조건 설정을 Lab.-규모, pilot-scale 및 plant-scale에서의 제조표준화를 확립 및 복분자부산물의 상태에 따른 유효성분 함량 분석으로 원료 표준화 추진함.
- 원료소재의 안정적인 확보를 위하여 복분자 재배산지 또는 복분자주스 가공공장과의 원료공급 체결등 상호협력체재를 구축함.
- 항바이러스 천연식품소재 후보의 유효성분에 대한 지표물질의 밸리데이션 및 식품위생법에 근거한 유해물질에 대한 분석으로 식품 안전성과 관련한 연구업무 수행
- 천연식품소재의 바이러스와의 HA부착저해효과와 세포내의 membrane fusion저해에 대한 연구를 통하여 기존 항바이러스 소재(NA 타겟을 목표로 한 제제)와의 기술적 가치성을 제고함.
- 항바이러스 천연 식품소재의 물성, 제품의 용도별 소재 개발 위하여 응용화 연구를 통하여 소재의 산업적 활용 가치를 높임. [식품첨가물 품목제조 확보]
- 지적재산권의 확보와 향후 항바이러스성 건강기능성식품의 개별인증 획득을 위한 자료준비 및 관련 성적서등 확보
- 항바이러스 천연소재와의 비교분석 및 제품 마케팅 연구

### 2. 제1 협동과제: 바이러스 제어 천연 식품소재의 활성 및 효능 연구

#### 가. 연구개발 목표

- 항바이러스 소재의 세포 및 동물실험 기반 저해 활성 분석으로 바이러스 저해 효능평가

#### 나. 연구개발 내용

- 활성저해 대상 시료 : 복분자
- 대상 바이러스: 인플루엔자 바이러스 A/Brisbane/59/2007 (BR59) (H1N1), A/Korea/01/2009 (KR01) (2009pdm H1N1), A/Brisbane/10/2007 (BR10) (H3N2), B/Florida/4/2006 (FL04)
- 세포 및 마우스 기반 천연 식품소재의 저해활성 검증 기술구축
- 천연부산물 구성분 분리 및 동정: LC/MS/MS 저해활성 물질
- Mouse adapted 바이러스 이용 *in vivo* 활성 분석: PR8, seasonal H1, H3, H7 마우스 적용 변이주

- 천연 식품소재의 항바이러스 효능 평가
- 효능검증을 위한 biomarker 탐색연구: LC/MS/MS, 세포기반 실험
- 대량생산 천연소재의 활성화 시험
- QC 테스트 지표변화 등 안정성 연구
- 항바이러스 응용 제품군별 *in vivo* 시험에 의한 효능평가를 통한 검증

### 3. 위탁과제: 바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전 연구 (1·2차년도 참여)

#### 가. 연구개발 목표

- 인플루엔자 바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전 연구

#### 나. 연구개발 내용

- 바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전: membrane fusion 저해 기전 분석
- 항바이러스 부산물 유래 선도소재 optimization과 선별: 천연소재 선별과 기전 연구

### 4. 세부, 협동 및 위탁의 융합적 산업화 개발체계

- 제1 세부 주관연구기관에서 시료의 large-scale 생산 기술 확립, 제1 협동 천연물소재연구실의 세포 및 동물실험에 기반을 둔 천연 식품소재 선별, 위탁연구팀의 작용기전 연구의 융합된 개발 플랫폼을 구축하였음.
- 본 과제의 제1세부연구팀은 항균 소재를 대량생산하고 있으며 천연 소재 산업화를 위한 빈틈없는 기술을 보유한 중소기업임.
- 본 과제의 제1 협동연구팀은 천연 소재의 LC/MS/MS 분석으로 활성 구성성분의 주요 component 동정과 동시에 천연물, 세포 및 마우스 기반의 융합기술을 적용한 천연 소재 발굴 플랫폼과 *in-vivo* 실험을 위한 최신 individually ventilated cages system을 갖춘 specific pathogen free (SPF) 동물실험실을 구축하였음
- 위탁연구팀은 구조 분자기반 저해제 설계와 바이러스 감염병 제어를 위한 항바이러스 작용기전 연구에 오랫동안 집중하여 천연 부산물 소재의 인플루엔자 바이러스 저해 작용기전 연구를 위한 노하우를 축적하고 있음.
- 식품 부산물 추출물 구성분의 동정을 위하여 LC/MS/MS를 수행, 선별된 부산물 구성화합물은 다시 타겟 단백질의 DSF 특성 및 구조 기반 저해 작용기전 연구를 수행하고, *in vivo* 실험을 통하여 그 활성을 규명함으로써, 천연 부산물 소재를 개발함. 개발 소재에 대하여 페렛을 이용한 전임상 실험을 용역연구로 진행 한 후 1세부, 1협동 및 위탁 기술개발팀의 융합된 노력으로 대량생산 및 산업화를 가능하게 할 것임.
- 바이러스 저해 천연 식품소재 개발을 위한 융합적 기술을 적용하고 주관기업은 발굴된 소재의 제조기술을 자체 사업화하기 위하여 대량생산, 활성 검증작업을 상호 공동으로 수행함으로써 시너지 효과를 극대화하여 연구목표를 달성하고자 함.

## 연구개발팀의 융합적 산업화 개발체계



구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2014	[제1세부기관] ○ 항바이러스 소재의 안정적 공급 기술 고도화 ○ 항바이러스 소재의 제조기술 구축	○ 천연 항바이러스 소재(복분자씨) 안정적 공급 - 원료의 저장조건 (온도, 기간)에 따른 유효성분 함량 분석 ○ 천연물 유래 항바이러스 소재의 제조기술 구축 - 원료의 추출조건 설정 및 제조 (large-scale)
		[제1협동기관] ○ 세포 및 마우스 기반 천연물 유래 식품소재의 저해활성 검증 기술구축 ○ 항바이러스 소재의 활성 성분 연구	○ 항바이러스 소재의 세포주 저해 활성 검증 - 세포기반 분석 - 인삼, 오디, 판두라틴-A, 복분자 추출물(주스)과 복분자 부산물(복분자씨)의 효능비교 실험 ○ Mouse adapted 바이러스 이용 <i>in vivo</i> 활성 분석 - PR8, seasonal H1, H3, H7 마우스 적용 변이주 ○ 저해활성 항바이러스 소재의 구성성분 분리 및 동정 - LC/MS/MS 이용
		[위탁기관] ○ 바이러스 단백질 구조기반 작용 기전 연구	○ 바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전 분석 - 바이러스 단백질 발현 - DSF, 바이러스 단백질-천연소재 구조기반 분석 - 바이러스 단백질 구조기반 membrane fusion 저해 기전
2차 년도	2015	[제1세부기관] ○ 항바이러스성 소재의 유효 성분 함량 유지를 위한 전처리 연구 ○ 항인플루엔자 식품 소재 대량생산 기반기술 확립	○ 천연물 유래 항바이러스 식품소재의 제조공정 밸리데이션 자료 확보 - 제조과정중의 지표물질의 함량변화 분석 및 수율의 변화를 확인 ○ 선정된 항바이러스 천연소재의 유해중금속등 식품 안전성 자료 확보 - 공인기관에 의한 유해중금속등 안전성 자료 확보
		[제1협동기관] ○ 소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 활성 검증 ○ 기능성 평가를 위한 biomarker 탐색 연구	○ 천연소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 저해활성 검증 - LC/MS/MS를 이용한 활성 화합물 분석 - 세포 및 <i>in vivo</i> 활성 검증 ○ 개별인증을 위한 biomarker 탐색 연구 - LC/MS/MS 분석 - 세포기반 실험 - biomarker validation

		[위탁기관] ○ 항바이러스 소재의 활성화 optimization과 선별	○ 항바이러스성 천연물 유래 선도소재 optimization과 선별 - 천연물 소재의 선별과 작용기전 연구
3차 년도	2016	[제1세부기관] ○ 시제품 생산을 위한 비임상 연구 ○ 항바이러스 소재의 대량생산과 산업화  ○ 지적재산권의 확보 및 제품 마케팅	○ 천연물 유래 소재 시제품의 용량의존성 효능평가 - 후보 소재 페렛이용 용량의존성에 따른 효능평가 추진으로 최적 섭취량을 결정 ○ 항바이러스 식품소재의 제형설계 및 제품다양화 - 바이러스 식품소재의 캡슐등 제형설계 - 실용화를 위한 시제품제조(껌, 발효유, 다류) - 대량생산과 활성화 모니터링 기술 확립 ○ 지적재산권의 확보와 식품인증 추진 ○ 항바이러스 천연식품소재와의 비교분석 및 마케팅
		[제1협동기관] ○ 산업화를 위한 대량생산 소재의 저해활성 확인 ○ 기능성 효능평가를 위한 시제품별 in vivo 효능평가	○ 항바이러스 소재의 저해활성 검증 - 대량생산 천연소재의 활성화 - QC 테스트 지표변화등 안정성 연구 ○ 기능성 소재의 효능평가 실시 - 항바이러스 응용 제품군별 in vivo 시험에 의한 효능평가를 통한 검증

## 제2장 국내외 기술개발 현황

D-04

- 최근 인플루엔자 바이러스 계놈 전체 변이 분석의 중요함이 인식되고 있으며, 실제로 전체 RNA segment 계통분석을 통하여 인플루엔자 바이러스의 발생과 진화 및 전파패턴 등 바이러스 제어에 대한 이해가 높아지고 있음 (5).
- 현재 당면한 과제인 인플루엔자에 대한 해결책 마련을 위한 연구가 국내외에서 진행되고 있으며, 국내에서는 인플루엔자 바이러스 동정, 백신, 항바이러스 약제, 역학 및 유전적 특성 연구가 주로 이루어지고 있음.
- 인플루엔자 바이러스 약제는 NA와 M2 channel 단백질 저해제를 기반으로 하는 타미플루 (Tamiflu: oseltamivir)나 아만타딘 (amantadine)에 의존하고 있지만, 내성 바이러스 출현의 빈도가 높아지고 있으며 바이러스 아형 중에는 100% 내성 변이주가 발견되고 있음.
- 천연물 소재 개발은 해외에서도 매우 활발하고, 인플루엔자 바이러스 저해활성을 보유한 국내 고유 천연물 소재 개발이 활발하지만, 본 연구팀이 개발하고자 하는 부산물 항바이러스 친환경 신소재 개발은 이제까지 발굴된 천연 소재보다 활성이 탁월함.
- 본 연구를 통하여 인플루엔자 바이러스 타겟 고유 천연 부산물을 이용한 항바이러스 활성이 입증된다면 항바이러스 소재 개발 연구가 활성화 될 것이며, 고부가가치 식품산업의 국제적 경쟁력을 제고 할 수 있을 것임.

### 항바이러스 천연소재 개발의 당면과제

- 인플루엔자는 전부 144종의 아형이 가능하여 다양한 변종이 발생할 가능성이 높기 때문에 이미 내성을 보이고 있는 Tamiflu, amantadine의 적용은 쉽지 않을 뿐만 아니라, 바이러스 아형 중에는 100% 내성 변이주가 발견되고 있고, 고가 약제라는 점에서 단점이 보장되어야 함.
- 중년 이후 노인층과 어린이층의 인플루엔자 감염 취약성과 낮은 백신효능 때문에, 백신의 효능을 보충할 수 있는 천연 소재의 개발은 식품산업에서 고부가가치 소재로서 매우 유망함.
- 인플루엔자로 인한 사회경제적 비용과 간접비를 합친다면 지난 수년간 수조원에 달하는 비용의 손실이 있었으며, 인플루엔자 확산에 정확하게 대응하기 위해서는 보다 신속하고 유연성 있는 항바이러스 신소재 확보가 필수적임.

• 아래와 같은 요건을 갖춘 인플루엔자 제어 천연소재가 확보된다면 세계적으로 수요가 큰 저가의 친환경 항바이러스 소재로써 식품 고부가가치 산업의 성장동력이 될 것임.

- ▶ 탁월한 바이러스 저해활성을 갖는 천연 부산물의 자원순환형 저가 식품소재
- ▶ 인플루엔자 바이러스의 다양한 아형 변이주를 광범위하게 제어가능한 천연소재
- ▶ 천연물의 장점인 약제내성과 부작용이 적고, 인플루엔자 바이러스 단백질 타겟에 강력하며 선택적으로 작용하는 기작을 기반으로, 현재까지 개발된 약제의 기작과는 다른 신규 기전을 기반으로 하는 천연소재

# 제1절 국내외 시장 현황 및 전망

## 1, 항바이러스 관련 시장현황

### 가. 세계 시장 현황

바이오 활성소재 시장은 친환경에 대한 소비자 니즈요구가 확대됨에 따라 시장이 지속 확대될 전망이다. 바이오 활성소재 분야의 주요 품목으로는 천연 화장품 소재, 천연 항생제 및 항바이러스 소재, 건강기능성 식품 소재 등을 포함하며 최근 바이오 활성소재 분야 주요 품목의 2014년 세계시장 규모는 1,660억 44백만 달러로 연평균 5.45% 성장하여 2018년에는 2,053억 41백만 달러 규모를 형성할 것으로 전망된다. 바이오 활성소재 분야의 세계시장에서는 건강기능성 식품 소재 분야가 2014년 1,076억 62백만 달러로 가장 큰 시장 형성하였으며 천연 항생제 및 항바이러스 소재 분야는 2014년 466억 82백만 달러의 시장을 형성하고 있다.

바이오 활성소재 분야 주요 품목의 2014년 미국시장 규모는 461억 달러로 2013년부터 2018년까지 연평균 7.58% 성장하여 617억 80백만 달러 규모를 형성할 것으로 전망 바이오 활성소재 분야의 미국시장에서는 건강기능성 식품 소재 분야가 2014년 364억 30백만 달러로 가장 큰 시장 형성하고 있으며 바이오 활성소재 분야 미국시장은 2013년부터 2018년까지의 연평균 성장률 예상치는 천연 항생제 및 항바이러스 소재 분야가 12.01%로 가장 높은 성장을 보일 것으로 전망하고 있다 (Fig.4).



Fig.4. 국외 바이오 활성 소재 분야 동향

### 나. 국내 시장 현황

바이오 활성소재 분야 주요품목의 2014년 국내시장 규모는 4조 9,819억 원으로 2013년부터 2018년까지 연평균 10.59% 성장하여 7조 4,651억 원 규모로 성장할 것으로 전망하고 있다.

바이오 활성소재 분야의 국내시장은 2014년 기준 천연 화장품 소재 분야가 2조 7,772억 원으로 주요품목 중 가장 큰 시장 형성 그 외 품목의 2014년 시장 규모는 건강기능성 식품 소재 분야가 1조 8,397억 원, 천연 항생제 및 항바이러스 소재 분야가 3,650억 원 규모의 시장을 형성하고 있다 (Fig.5). 최근 국내에서는 메르스 코로나 바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome-Corona virus; MERS-CoV)나 지카 바이러스 (Zika virus)등 감염성 바이러스가 발생하면서 바이러스에 대한 관심이 높아졌지만 천연 항생제 및 항바이러스 소재의 연구는 다른 분야에 비해 미비한 실정이다.

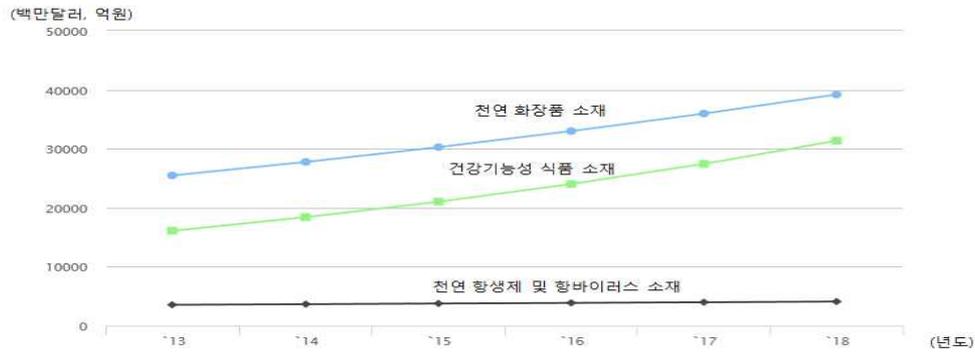


Fig.5. 국외 바이오 활성 소재 분야 동향

## 2. 국내의 항바이러스 연구개발현황

인플루엔자는 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 급성 호흡기 질환으로, 매년 크고 작은 유행을 일으켜 보건상의 문제와 사회 경제적인 피해를 가져온다. 국내외로 인플루엔자 바이러스에 감염되면 수주간 지속되는데 단기간에 많은 환자가 발생하며, 발열, 기침, 권태감 등의 증상이 나타난다. 젊은 성인에서는 대부분 후유증 없이 회복하지만, 합병증 발생의 위험이 높은 군(소아, 노년층 등)에서는 기저질환의 악화나 폐렴 등의 중증 합병증으로 사망에 이를 수 있다.

인플루엔자의 피해를 최소화하기 위해서는 백신 접종뿐 아니라 부작용이 없는 천연 항바이러스 제품을 개발이 시급한 실정이다. 천연 항바이러스 제품을 연구, 개발함으로써 이환기간, 합병증 발생을 줄이고 바이러스 증식을 억제하며 유행초기 질병의 확산을 지연하는 효과를 기대할 수 있다.

외막형 바이러스 (HIV [human immunodeficiency virus], 인플루엔자, Herpes 등)과 비피막 바이러스 (norovirus, HPV [human papillomavirus] 등)에 활성을 나타내는 천연 항바이러스 소재가 국내외에서 지속적으로 진행되고 있다 (표 2).

표 2. Broad spectrum natural antivirals against human viruses.

	Active ingredient	Source	Antiviral activity
human viruses	Fulvic Acid	Sucrose, Cellulose	Enveloped viruses
	Pomegranate Polyphenols, juice	<i>Punicagranatum</i> (Pomegranate)	Enveloped viruses, Food borne surrogate viruses
	Resveratrol+	Red vine leaves, Japanese knotweed	HIV (in comb. With nucleoside analogues), EBV
	Ethanol extract	<i>Warscewicziaoccines</i> (Vahl)Kl. (Rubiaceae)	HIV and HBV
human hepatitis viruses	Sesquiterpenoids and alkaloids	Roots of <i>Alangiumchinense</i>	HCV
	Oleanolic acid and ursilic acid	<i>FructusLigustriLucidi</i>	HCV
	Longumosides and amide alkaloids	<i>Piper Longum</i>	HBV
	epigallocatechin Lucidone	Green Tea	HBV
	Lectins	<i>Linderaerythrocarpa</i>	HCV
	3-hydroxy caruillignan	Red&Blue green algae	HCV, HCV

		Swieteniamacrophylla stems	
	Ladanein (BJ486K), a flavonoid	<i>Marrubiumperegrinum</i>	All HCV genotypes
	Hypercin	John's Wort	HCV
uman respira tory viruses	Cimifugin Carnosic acid	<i>Cimicifugafoetida, Rosmarinusofficinalis</i>	RSV
	Polybromocatechol	Rhidophyta, <i>Neorhodomelaaculeata</i>	Rhinovirus
	Sesquiterpenecoumarin	<i>Ferula assafoetida</i>	Influenza
	Herbal marine compound (HESA-A)	Herbal marine	Influenza
	Chalcones	Glycyrrhiza leaflets	Influenza
	Liquid extract	Elderberry	Influenza
	diarylheptanoids	<i>Alpiniaakatumadai</i>	Influenza
Picorn avirus es.	Diterpenoids, sesquiterpenoids	Roots of <i>Illicimmajus</i>	Coxsackie B3
	Sesquiterpenoids and alkaloids	Roots of <i>Alangiumchinense</i>	Coxsackie B3
	Polysaccharides	<i>Azadirachtaindica</i>	Poliovirus
	Gallic acid	<i>Woodfordiafruticosa</i> flowers	Enterovirus 71
	Raoulic acid	<i>Raouliaaustralia</i>	Picronaviruses
	Punicagalin		Enterovirus 71
human Herpes viruses	Sulfated galactans	<i>Cryptopleuraramosa</i> (red sea weed)	HSV-1 and HSV-2 replication <i>in vivo</i>
	Rhamnogalacturonan	Cell wall Pectin polysaccharides	HCMV cytotoxicity
	Chebulagic acid, punicalagin (HydrolyzableTannins)	<i>Terminaliacebula Retz</i> (driedfruits)	HSV-1 and HSV-2 entry and spread
	Verbascoside	Lepechinia species	HSV-1 and HSV-2
	Bark extract	<i>Azadirachtaindica</i> (Neem)	HSV-1
	Extract	Blackberry	HSV-1
HIV.	Griffithsin	<i>Griffithsia</i> (Red algae)	HIV clade C (in comb. With Tenofovir, maraviroc and enfuviridae)
	Quinoline alkaloids, Theaflavins	<i>Euodiaroxburghiana</i>	HIV entry
	Diterpenes, Extract	<i>ColeusForskohlii, Dandelion,</i> <i>Coleuparvifolius</i>	HIV replication, RT, HIV integrase
	Niruriside	Phyllanthum	HIV REV/RRE inhib.
	Coumarin&xanthone	Calophyllum	HIV RT
	Recombinant MAP 30	Bitter melon	HIV

### 제3장 연구수행 내용 및 결과

D-05

#### 제1절 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2014)	기반 천연 항바이러스 소재 산업화	○ 항바이러스 소 재의 제조기술 구축	○ 천연물 유래 항바이러스 소재의 제조기술 구축 : 수율 7% 이상 유지	○ 원료의 추출조건 설정 설계: 추 출온도, 추출용매농도, 추출시간대 별로 연구 - 수율 9.5% 확보
	바이러스 제어 천연 식품소재의 활성 및 효능 연구	○ 세포 및 마우 스 기반 천연 물 유래 식품 소재의 저해활 성 검증 기술 구축	○ 항바이러스 소재의 세포 주 저해 활성 검증 -세포기반 분석 -복분자 추출물(주스)과 복분자 부산물(복분자씨) 의 효능비교 실험 ○ Mouse adapted 바이러스 이용 <i>in vivo</i> 활성 분석 : PR8, seasonal H1, H3, H7 마우스 적용 변이주	○ 복분자 주스보다 RCS-F1의 인 플루엔자 바이러스 저해활성이 우 수 ○ BR59 인플루엔자 바이러스에 대 한 RCS-F1과 SD1 및 SD2 활성 이 차이가 없음을 확인 ○ RCS-F1이 PR8 및 mKR01 인 플루엔자 바이러스에 감염된 마우 스에 대하여 항바이러스 활성을 나타내었음
		○ 항바이러스 소 재의 활성 성 분 연구	○ 저해활성 항바이러스 소 재의 구성성분 분리 및 동 정 : LC/MS/MS 이용	○ 폴리페놀화합물 16건으로 RCS -F1분석하여, 주요성분 catechin, ellagic acid 및 cyanidin-3- rutinoside을 확인
2차 년도 (2015)	복분자 부산물 기반 천연 항바이러스 소재 산업화	○ 항바이러스성 소재의 유효성 분 함량 유지 를 위한 전처 리 연구	○ 천연물 유래 항바이러스 식품소재의 제조공정 벨리 데이션 자료 확보 -제조공정중의 지표물질의 함량변화 분석 및 수율의 변화를 확인	○ 항바이러스용 복분자씨추출물에 대하여 3Lot제조에 따른 제조벨리 데이션 자료에 따라 지표물질의 함량변화와 수율변화 자료 확보 (100% 달성) ○ 지표물질에 대한 설정 완료 및 지표물질의 배리데이션 자료 확보 (100% 달성)
		○ 항인플루엔자 식품 소재 대 량생산기반 기 술 확립	○ 선정된 항바이러스 천연 소재의 유해중금속등 식품 안전성 자료 확보 -공인기관에 의한 유해중 금속등 안전성 자료 확보	○ 항바이러스 천연식품 소재의 유 해중금속에 대한 규격기준 설정 완료 : 공인기관 시험성적서 확보 (100%달성) ○ 항바이러스용 식품소재인 복분 자씨추출물에 대한 잔류농약 규격 기준 설정 : 공인기관 시험성적서 확보 (100% 달성) ○ 항바이러스소재의 시품학적 영 양성분 분석에 따른 안전성 자료 확보 (100%)
	바이러스 제어 천연 식품소재의 활성 및 효능 연구	○ 소재 대량생산 을 위한 전처 리에 따른 활 성 검증	○ 천연소재 대량생산을 위 한 전처리에 따른 저해활성 검증 -LC/MS/MS를 이용한 활 성 화합물 분석	○ 전처리 공정에 따른 인플루엔자 바이러스/Brisbane/59/2007(H1N1) (BR59), pandemic A/Korea/01/ 2009(H1N1),(KR01),A/ Brisbane/ 10/2007(H3N2),(BR10), B/Florida/

			<p>-세포 및 <i>in vivo</i> 활성 검증</p>	<p>04/2006(FL04),A/Puerto Rico/1934(H1N1) (PR8)를 대상으로 plaque assay 자료 확보</p> <p>○세포 활성 검증: 대량생산 시료를 AQUITY Ultra Performance UPLC-PDA 및 Micromass Q-TOF Premier 시스템으로 분리, 동정, 분획 및 MDCK 세포 수준에서 실험을 위한 세포독성 자료 및 저해활성 자료 확보</p> <p>○대량생산 시료의 <i>in vivo</i> 활성 검증을 위한 50% mouse lethal dose (MLD<sub>50</sub>) 분석 결과 자료 확보</p>
	○기능성 평가를 위한 biomarker 탐색 연구	○개별인증을 위한 bio-marker 탐색 연구 -LC/MS/MS 분석 -세포기반 실험 -biomarker validation	<p>○LC/MS/MS 분석: 생명공학연구원 천연물 신약개발 연구팀과 공동연구로 시료내 다성분 동시분석을 위하여 분석조건을 설정 자료 확보</p> <p>○biomarker validation 자료 확보: 정밀분석을 위해 ① 표준물질과의 비교: peak 1-4, 11, 19의 6종 ② Tentative identification:질량 (<i>m/z</i>)값, 구성원소값 (element composition), 오차범위 (err), 고유 흡광도 (<math>\lambda_{max}</math>)값등 비교를 통해 분석 실시</p> <p>○세포기반 실험자료 확보: 지표물질인 ellagic acid를 포함하여 12종 물질에 대한 인플루엔자 A 및 B 바이러스에 대한 plaque assay 결과 자료 확보</p>	
바이러스 저해 작용기전 연구 단백질 구조기반	○항바이러스 소재의 활성 optimization과 선별	○ 천연물 소재의 optimization과 선별 -천연물 소재의 선별과 작용기전 연구	<p>○단백질 및 세포기반 작용기전 연구:DSF, SPR, TEM기법 등을 통한 결합 비교분석</p> <p>○복분자씨 추출물에 대한 인플루엔자 바이러스에 의한 membrane fusion 저해(syncytium assay) 활성 자료 확보</p>	
○복분자 부산물 기반 천연 항바이러스 소재 산업화	○시제품 생산을 위한 비임상 연구	○천연물 유래 소재 시제품의 용량의존성 효능평가 : 후보 소재 페렛이용 용량의존성에 따른 효능평가 추진으로 최적 섭취량을 결정	<p>○대량생산제품의 페렛(ferret)에서의 항바이러스 효능평가:50mg/kg의 경구투여에서 효능확인</p> <p>○펠렛시험결과 면역관련 사이토카인에서도 효과가 있는 것으로 나타남</p>	
	○항바이러스 소재의 대량생산과 산업화	○항바이러스 식품소재의 제형설계 및 제품다양화 : 캡슐등 제형설계, 시제품제조(겉, 발효유, 다류)	<p>○식품소재로의 활용을 위한 최적의 분말조건 설정 (25%함량)</p> <p>○기능성식품으로의 활용을 위한 제형설계 확립(캡슐, 차정, 발포정)</p> <p>○바이러스소재의 응용성 검토로</p>	

				검류, 다류, 발효유등에 사용 시제품 제조결과 원료혼합 제형, 기호성, 물성등의 적합성 확인
		○ 지적재산권의 확보 및 제품 마케팅	○ 항바이러스 천연식품소재와의 비교분석 및 마케팅	○ 기존의 시중에 유통되는 항균, 면역관련 제품들과 in vitro 분석결과 16 mg/kg 에서 면역관련 부문에서 뛰어난 결과 도출 확인 ○ 국내기업과의 바이러스 소재로의 제품화를 위한 비밀유지계약 체결 및 시제품화 진행중
바이러스 제어 천연 식품소재의 활성 및 효능 연구	○ 산업화를 위한 대량생산 소재의 저해활성 확인	○ 항바이러스 소재의 저해활성 검증: 대량생산 천연소재의 활성, QC 테스트 지표변화등 안정성 연구	○ 산업화를 위한 대량생산 소재의 저해활성, 안정성 연구 결과 2건의 자료를 확보	
	○ 기능성 효능평가를 위한 시제품별 in vivo 효능평가	○ 기능성 소재의 효능평가 실시: 항바이러스 응용 제품군별 in vivo 시험에 의한 효능평가를 통한 검증	○ 항바이러스 응용 제품군별 in vivo 시험에 의한 효능평가를 통한 검증 2건의 자료를 확보하여 100% 달성하였음.	

## 제2절 연구수행결과

### 1. 항바이러스 소재의 제조기술 구축

#### 가. 천연 항바이러스 소재(복분자씨) 안정적 공급

복분자씨의 안정적 공급을 위하여서는 복분자씨의 파생되는 경위부터 조사할 필요가 있다고 사료되어 복분자주스 가공업체인 고창복분자 영농조합과 협의한 결과 복분자씨는 복분자주스를 가공시에 파생되는 부산물로서 복분자주스를 제조시에만 발생한다고 한다. 현재 복분자는 매년 5~6월에 수확하여 냉동보관을 하고 있으며 냉동저장된 복분자는 복분자주스 가공시 필요량 만큼 출고하여 활용되고 있으며, 복분자주스는 1년내내 가공을 하는 실정으로 복분자씨부산물도 특정시기가 아닌 관련소재의 생산시 항상 공급이 가능한 것으로 조사되었다. 따라서 천연 항바이러스용 원료(복분자씨부산물)의 안정적 공급이 크게 문제가 되지는 않을 것으로 보인다.

#### ○ 원료의 저장조건 (온도, 기간)에 따른 유효성분 함량 분석

복분자씨부산물의 저장조건 설정은 복분자를 수확후 냉동보관후 주스 가공후 파생되는 시점을 기준으로 하여 수거한 다음 2가지의 원료처리 조건에 따라 조사하였다. 냉동보관과 건조후 건조품으로 보관하는 방법으로 저장조건중의 유효성분의 변화는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 2014년 11월에 구입한 복분자씨부산물에 있어서 원물은 냉동조건(-20℃ 이하), 70℃로 열풍건조한 건조복분자씨부산물은 항온항습기(온도 35℃, RH 65%)를 사용하여 시료의 저장안정성을 12개월로 조사하였다. 저장기간 10개월에 현재 저장중의 뚜렷한 변화가 없는 것으로 나타났다. 관리항목은 아래 표와 같이 설정하였으며, 유효성분의 경우에는 제조한 시료에 대하여 항바이러스 효능 검증을 Cell 시험을 통하여 실시하였다.(표 3)

표 3. 복분자씨부산물의 원료형태에 따른 저장 안정성 시험 결과

저장조건	관리항목		저장기간					
	항목	규격기준	Control	3개월	5개월	7 개월	9개월	11개월
냉동조건 (복분자씨 원물)	이취		○	○	○	○	○	○
	미생물		○	○	○	○	○	○
	추출액흡광도	1.62	○	○	○	○	○	○
	유효성분		○			○		
상온조건 (건조품)	수분함량	3.5% 이하	○	○	○	○	○	○
	미생물(cfu/g)	1,000 이하	○	○	○	○	○	○
	색 상		○	○	○	○	○	○
	유효성분		○			○		

\*복분자씨: 고창복분자영농조합에서 구입(원산지: 전남 고창군)

\*표시기준 : ○ - 양호, △ - 보통 × - 부적합

### 나. 원료의 추출조건 설정 연구

#### (1) Lab. 수준에서의 복분자씨부산물의 제조시험 (기존 방법)

기존 항바이러스 식품 신소재에 대하여 기존 대학에서 실시한 방법에 따라 Lab수준에서 제조하여 산업적 생산공정도 설계시에 장단점 파악 및 개선사항을 조사하기 위하여 연구를 수행하였다. 먼저 복분자씨부산물 건조한 다음 복분자씨와 과육부위를 분리하여 시료로 하였다. 복분자씨 5g을 70%주정과 함께 분쇄하여 Ultra sonic으로 추출한 다음 흡입여과하여 여과액을 취하였다. 이때 1차 상등액, 2차 상등액, 3차 상등액으로 분취하여 추출 횟수에 따른 추출액량과 흡광도 특성을 분석하였다.

복분자씨 원료 5g에 대하여 1차 상등액에서는 제조량이 0.29g (5.8%), 2 차 상등액 0.095g(1.5%), 3차 상등액은 거의 나타나지 않았다. 흡광도는 측정에 있어서는 530nm에서 1차 상등액은 0.56, 2차 상등액은 0.2 로 나타났으며, 3차 상등액에서는 0.1이하로서 색상을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보면 복분자씨 유래의 항바이러스 소재는 1차 추출조건에서 강하게 추출되는 특성을 가지고 있으며, 협동기관인 덕성여대에서 실시한 항바이러스 소재의 수율 5.0%와 유사한 결과를 보였다.(Fig. 6, 7)

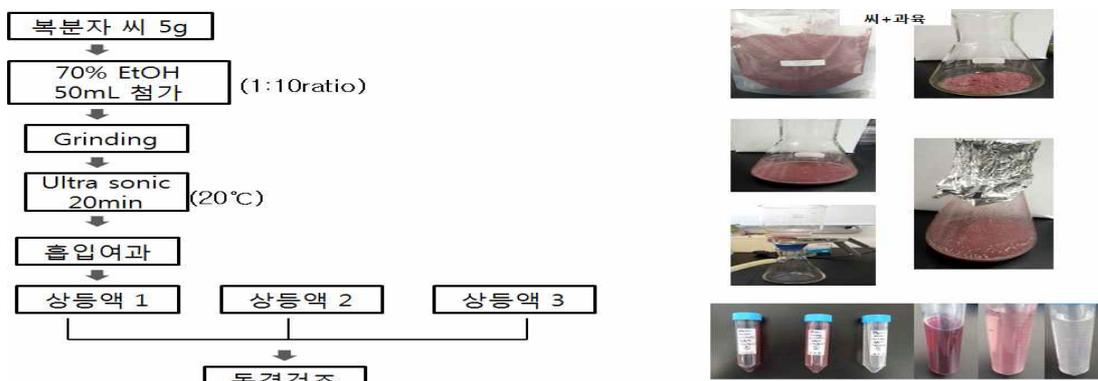


Fig. 6. 복분자씨부산물로부터 항바이러스 효능을 가지는 소재의 제조방법(기존방식)

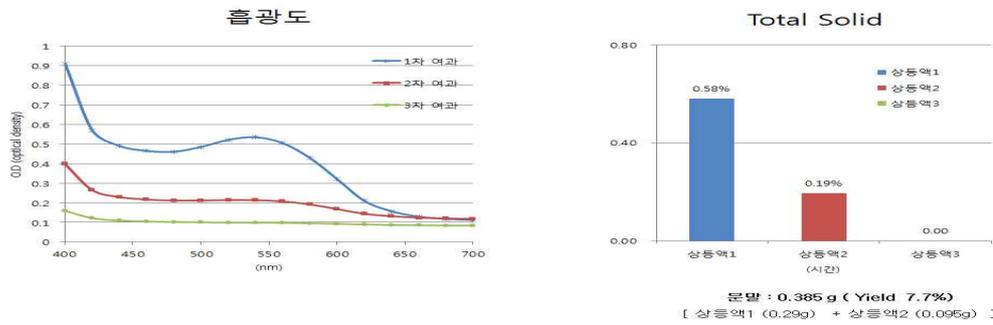


Fig. 7. 복분자씨로부터 제조한 항바이러스용 소재의 흡광도 분석결과

### (2) 복분자씨부산물의 원료추출조건 시험방법 설계

상기의 항바이러스성 소재의 제조공정으로 이용되고 있는 추출방법인 Ultra sonic 추출법은 산업적 생산공정에 있어서 적용하기가 다소 어려운 실정이며, 동일한 결과물은 생산하기 위한 대체방법으로 아래 표와 같이 원료의 전처리 공정과 추출조건 설정시 추출율에 크게 영향을 줄 것으로 예상되는 요소로서 추출용매(주정)농도, 추출온도, 추출시간등으로 분류할 수 있으며, 이들이 항바이러스 소재와의 상관관계를 가지도록 제조시험을 디자인하여 Lab.수준, pilot-수준, Plant-수준(대량생산)에서 제조하여 기존 공정대비 제조수율, 제조특성을 조사 및 항바이러스 효과를 분석하여 최적의 생산조건을 설정하고자 하였다.(Fig. 8)

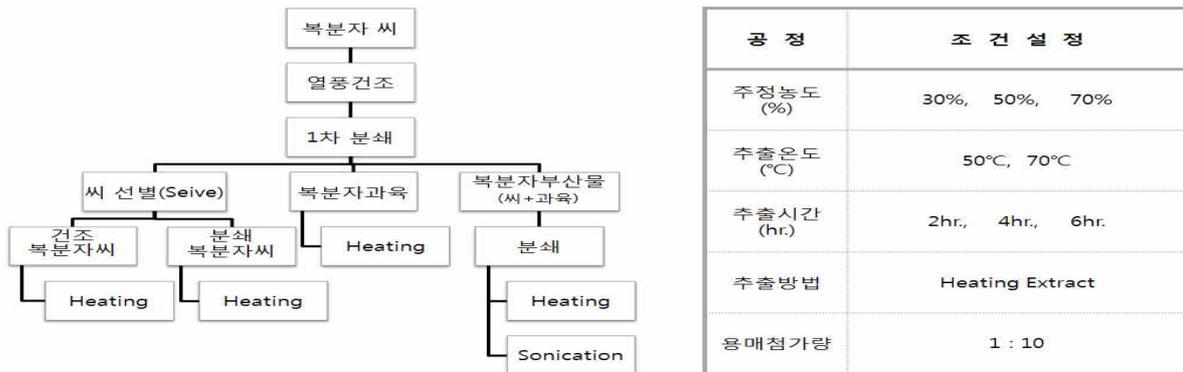


Fig. 8. 복분자씨추출물의 최적생산조건 설정 시험방법

### (3) 건조 복분자씨부산물의 원료에 대한 특성

본 연구과제의 항바이러스 신소재개발 위한 복분자씨부산물은 복분자를 이용한 주스를 가공한 다음 잔여부위로서 식품으로 사용가능으로 고창복분자영농조합(전남 고창군 소재)에서 구입하여 원료로 사용하였으며, 냉동된 미립 형태로서 복분자씨와 과육부위를 분리하기가 어려운 특성을 가지고 있다.

항바이러스성 소재를 제조하기 위하여 원료적 특성을 조사목적으로 복분자씨부산물 각각 부위별로

효능을 검증과 생산수율 등 제조공정상의 특성을 조사하기 위하여 냉동된 복분자씨부산물을 유효성분이 함유하도록 건조를 70°C의 열풍건조기를 사용하여 실시하여 각각 부위별로 100mesh 체를 이용하여 원료를 부위별로 분리하였다.

냉동 건조복분자씨 부산물의 건조한 다음 분리한 시료는 아래의 표와 같이 건조복분자씨(SD-1), 복분자씨부산물(SD-2), 분쇄복분자씨(SD-3), 복분자 과육(SD-4)로 구분하여 실시하였다. 이를 좀 더 상세히 설명하면 다음과 같다.

항목	원료명	원료에 대한 상세 설명	원료활용도
SD-1	건조복분자씨	복분자씨부산물을 건조하여 복분자과육을 제거한 부위	낮음
SD-2	복분자씨부산물	복분자씨부산물을 건조하여 사용	매우 높음
SD-3	분쇄복분자씨	복분자씨부산물로부터 복분자씨만 분리, 건조 분쇄한 것	매우 낮음
SD-4	복분자과육	복분자씨부산물을 건조하여 복분자씨를 제거한 부위	매우 낮음

#### (4) 추출온도를 50℃로 고정한 조건에서의 항바이러스성 소재의 특성 제조특성 연구

##### (가) 추출조건 설정

상기의 제조공정중의 추출온도를 50℃로 고정한 조건에서 복분자씨부산물의 추출용매인 주정의 농도를 30% 50% 70%로 하여 원료대비 10배수를 첨가하여 추출을 시작하였다. 복분자씨부산물의 Ultra sonic추출조건인 20min.에 해당하는 추출시간을 각각 2hr., 4hr., 6hr.로 각각 분류하여 추출작업을 진행하였다.



Fig. 9 Lab.수준에서 제조공정 흐름도(추출온도를 50℃로 고정)

##### (나)추출물들에 대한 흡광도 변화

추출물에 대한 흡광도 측정은 제조공정의 최적화 시험 설정을 위한 추출조건(추출시간, 주정농도, 추출온도)에 따라 공정중의 관리항목 설정을 위하여 지정 추진한 것으로 추출조건에 따른 변화를 보고자 추진하였다. 흡광도의 분석은 대량생산등의 표준화 공정에 있어서 제조과정에서 공정관리항목으로 설정하며, 2차년도에 유효성분(지표성분)에 대한 validation 확보 시에는 제조공정중의 지표물질과 함께 중요한 관리항목으로 설정해 나가고자 한다.

복분자씨추출액이 나타내는 흡광도 특성을 Elisa reader를 이용하여 400~800nm에 대하여 spectrum으로 sanner를 실시한 결과 아래와 같은 특성을 나타내었다.(Fig 10) 이 특성은 냉장 보관 저장에서도 안정성을 가지는 것으로 나타났다.

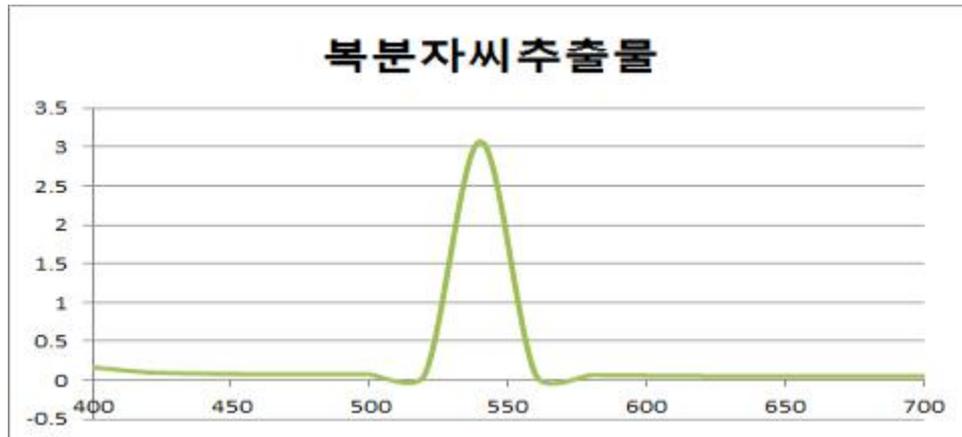


Fig. 10. 복분자씨추출물이 가지는 흡광도 특성

건조복분자씨의 경우에는 추출온도 50°C에서의 추출정도를 나타내는 530nm에서 흡광도를 분석한 결과 2, 4, 6hr의 추출시간에 있어서 70% 주정추출물이 가장 높은 추출정도를 나타내는 것으로 보이며, 추출 4hr. 이후에는 0.66으로 동일한 흡광도를 나타내었다. (Fig. 11)

분쇄복분자씨의 경우에는 추출시간에 따라서 30%의 주정농도에서 가장 강한 추출율을 보였으며, 추출물에 대한 흡광도가 2hr., 4hr., 6hr.에서 각각 1.2, 1.6, 1.6로 역시 건조복분자씨 보다는 2배 이상이 용출되는 것으로 나타났다. 50%의 주정농도에서는 흡광도(530nm)가 1.15 정도로서 추출시간 2hr.이후에는 지속적으로 유지되는 경향이며, 70%주정농도의 경우에는 4hr. 추출농도에서 1.6까지 높았으나 이후에는 1.2 정도로 유지하는 것으로 나타났다. 분쇄복분자씨의 경우에는 30% 주정농도로 추출한 경우 용출량이 높았으나 여과공정이 다소 어려울 것으로 보이며, 원인은 분쇄복분자씨가 다소 미립으로 이루어져 있어서 추출시에 물에 용해되는 많은 물질이 발생하여 나타난 현상으로 보인다. 50%, 70%의 주정추출물의 경우에는 여과등의 순조로이 이루어지는 것으로 나타났다.

복분자과육(복분자씨부산물을 열풍건조후 과육부분만 분리한 경우)은 추출온도 50°C, 추출시간이 4hr. 이후에는 30%, 50%, 70% 주정농도에서 추출물의 흡광도(530nm)에서 3.5이상으로 강하게 나타나는 현상을 보여주었다. 과육의 경우에는 30% 주정농도보다는 50%, 70%주정농도에서 강한 흡광도를 나타내고 있어 과육부분에 함유된 anthocyanin계통의 물질은 주정농도가 높을수록 강하게 용출되는 특성을 가지고 있는 것으로 보여진다.

복분자씨부산물(냉동 복분자씨부산물을 건조한 후 파쇄한 경우)의 경우에 있어서는 주정농도가 50%인 용매를 이용한 시험구에서 추출시간 2hr.에서는 1.28, 추출 4시간에서는 1.67로서 추출효과가 크게 증가하는 현상을 보였으나 추출시간 6hr.에서는 1.42로서 추출시간 4hr. 보다는 흡광도가 다소 낮게 나타났다. 여러 가지 복합적인 요소가 있을 것으로 추측되며 특히 4hr.이후에는 고형분이 강하게 증가되어 동량대비 흡광도가 다소 저하 된게 아닌가 보여진다. 주정농도 70%의 경우에도 4hr.에서 1.54이고 6hr.에서는 1.505로서 다소 감소하는 현상을 나타내는 것으로 나타났다. 특히 30%의 주정 추출물의 경우에는 2hr.에서 1.12였으나 4hr. 6hr.에서는 1.34와 0.9로서 4hr.이후에는 급격히 감소하는 현상을 보여주었다.

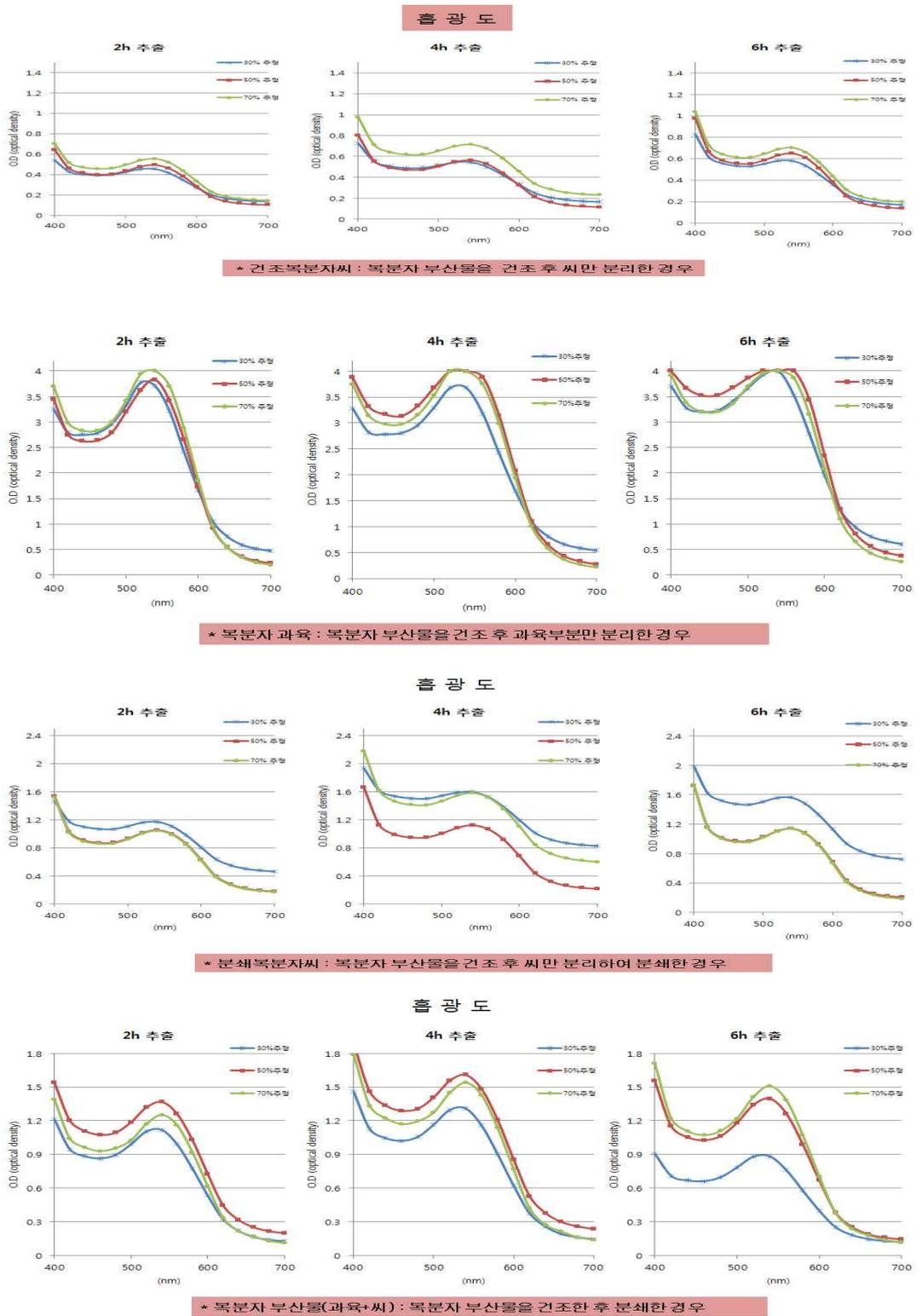


Fig. 11. 복분자씨추출물들에 대한 추출조건에 따른 부위별 흡광도 변화

**(다)복분자씨부산물의 추출물들에 대한 고형분 변화**

복분자씨추출물들의 부위별로 추출효과를 보기 위하여 추출물의 고형분 변화를 동일온도에 서의 추출시간, 주정농도별로 앞의 흡광도 분석과 동일한 조건으로 실시하였다.

건조복분자씨의 경우 추출온도 50℃에서 추출시간이 길어질수록 점차 생산수율이 증가하

는 것으로 나타났으며 6hr. 추출에서 주정농도가 30%, 50%, 70%일 경우에 고형분이 각각 0.85%, 0.77%, 0.90% 로 주정농도가 70% 일 때 가장 높은 고형분을 나타내었다. (Fig. 12)

분쇄복분자씨의 경우 추출고형분이 추출시간 4hr.에서 주정농도 30%, 50%, 70%에서 0.84%, 0.76%, 0.73% 였으나 6hr.에서는 0.86%, 0.81%, 0.73%로 4시간이후에는 큰 변화를 보이지 않았다.

건조복분자씨는 70%주정농도가 가장 높았던 것과는 달리 분쇄시료는 30%주정농도에서 쉽게 추출효과가 있는 것으로 파악되었다.

복분자과육 부위에서도 분쇄복분자씨 보다는 추출고형분이 40% 이상 높게 나타났으나 추출시간에 따른 변화에 있어 4hr. 6hr.에 있어서는 주정농도가 50%, 70% 수준에서는 큰 변화가 나타나지 않았다.

복분자씨부산물의 경우에는 추출시간에 따라 추출고형분이 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 주정농도가 50%, 70%인 경우가 30% 주정추출물보다 높은 경향이였다. 추출시간 4hr.에서 50%, 70% 의 추출물이 0.96%, 0.92% 였고 6hr.에서는 0.99%, 0.91% 로 큰 변화가 나타나지 않았다. 다만 70%의 주정보다는 50%가 다소 높았으며, 원인은 과육부위의 용출조건에 따른 차이로 보인다.

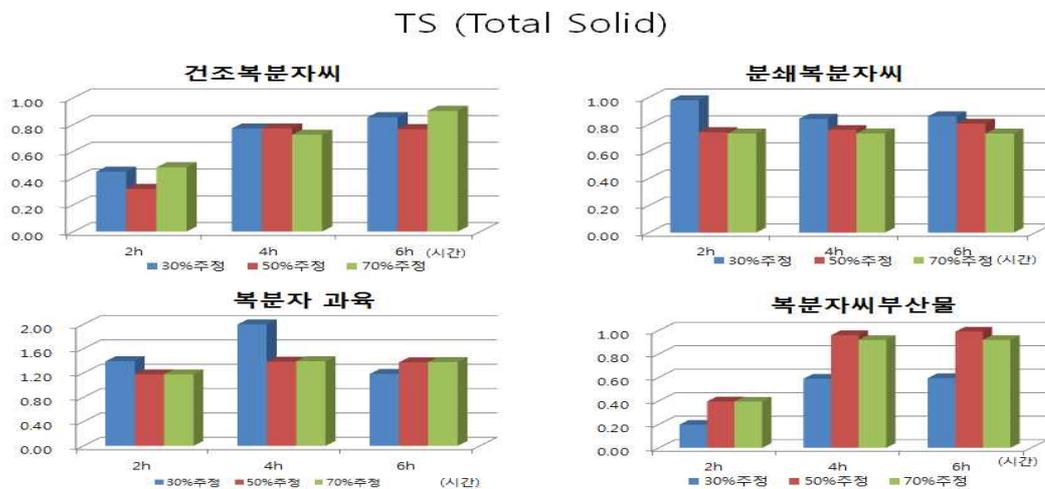


Fig 12. 복분자씨부산물의 동일 추출온도(50℃)에서 추출조건에 따른 추출물의 고형분 함량

### (라)복분자씨부산물의 추출물들에 대한 수율(yield) 변화

상기의 시험결과를 근거로 하여 복분자씨부산물에 대한 생산수율을 검토하고자 하였다. 복분자씨부산물의 각각의 부위별에 다른 제조시험을 추진하고자 하였으나, 복분자과립부위에 대한 항바이러스 효능은 복분자씨에 비교하여 다소 낮으며, 분쇄복분자씨의 경우에는 건조복분자씨 자체가 너무 미립하여 산업적으로 분쇄원료를 제조하기가 어려울 것으로 판단되어 배제하였다. 수율변화는 추출온도 50℃로 하고 주정농도 50%, 추출시간 6hr.으로 하여 진행하는 것으로 하였다.

건조복분자씨와 복분자씨부산물에 대하여 추출을 수행한 결과, 건조복분자씨는 5.38%였으나 복분자씨부산물의 경우에는 9.5% 로 상당히 높게 나타났다. (표 4)

대량생산 및 항바이러스 소재의 산업화를 위하여서는 제조공정의 원활한 작업성도 검토되어야 한바, 200g을 원료를 기준으로 pilot 생산 이전에 실시해 본 결과 추출과정중의 변화, 여과과정상의 여과불능, 농축과정중의 상변화(주정추출물의 경우 농축과정중 주정이 휘발시 영김성, 분리성)등에 대하여 관찰한 바 큰 문제가 없는 것으로 판단되면 농축후에도 유동성 등이 균일하게 이루어지는 것으로 나타났다.

표 4. 복분자씨부산물의 부위별 추출조건에 따른 수율 변화

공정	세부내역	제조-1	제조-4
원료	200 g	건조복분자씨	복분자씨부산물
추출용매	50% 주정	2,000 L	2,000 L
추출	추출온도 추출시간	50℃ 6hr.	50℃ 6hr.
여과	filter size	1um	1 um
농축	감압 온도 60℃ 이하	액량 271.4 g TS 4.32 %	액량 192.9 g TS 9.9 %
건조	동결건조	11.7 g (수율5.38%)	19.0 g (수율 9.50%)

(5) 추출온도를 70℃로 고정 한 조건에서의 항바이러스성 소재의 특성 제조특성 연구

(가) 추출조건 설정

상기의 제조공정중의 추출온도를 50℃로 고정 한 조건에서 복분자씨부산물의 추출용매인 주정의 농도를 30% 50% 70%로 하여 원료대비 10배수를 첨가하여 추출을 시작하였다. 복분자씨부산물의 Ultra sonic추출조건인 20min.에 해당하는 추출시간을 각각 2hr., 4hr., 6hr.로 각각 분류하여 추출작업을 진행하였다.(Fig. 13)



Fig. 13. Lab.수준에서 제조공정 흐름도(추출온도를 70℃로 고정)

(나)추출물들에 대한 흡광도 변화

건조복분자씨의 경우에는 추출온도 70℃에서의 추출율을 나타내는 530nm에서 흡광도를

분석한 결과 추출용매인 50%, 70%-주정으로 추출한 경우에는 추출시간이 길어질수록 점진적으로 흡광도가 높아지는 경향이었으며, 추출시간이 6hr.일 경우에는 30%, 50%, 70% 주정 추출물이 각각 1.503, 1.685, 1.620으로 50%-주정농도에서 가장 높게 나타났다. (Fig. 14.)

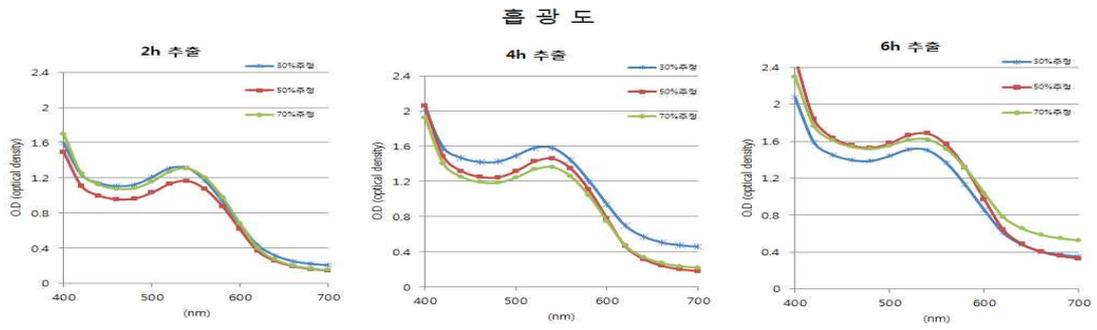
분쇄복분자씨의 경우에는 추출시간에 따라서 30%-주정추출물의 경우에는 2hr., 4hr., 6hr.에서 추출율을 보여주는 흡광도가 1.173, 1.209, 1.2513 으로 추출시간에 따라 큰 변화가 없었으며, 50%-주정추출물의 경우에는 1.1465, 1.3371, 1.4178로 추출시간이 많아질수록 증가하는 경향으로 6hr.추출에서 가장 높은 추출율을 보여 주었다. 분쇄복분자씨를 이용한 추출물은 추출온도 50℃의 경우처럼 30%-주정농도에서 여과가 다소 어려움이 나타났으며 50%, 70%-주정추출물의 경우에는 여과공정이 용이한 것으로 나타났다.

복분자과육(복분자씨부산물을 열풍건조후 과육부분만 분리한 경우)은 추출온도 70℃에서 추출시간이 2hr.이후에는 30%, 50%, 70% 주정의 농도에서 추출물의 흡광도(530nm)에서 3.5 이상으로 강하게 나타나는 현상을 보여주었다. 특히 추출시간 6hr.인 경우 600nm 이하에서는 흡광도( $\lambda=400\sim 600\text{nm}$ )가 모두 3.5 이상인 것으로 나타났다. 추출액의 색상이 다소 진갈색을 나타내고 있어 추출온도 70℃인 경우에는 과육부의 추출물질이 모두 강하게 용출된 것이 아닌가 보여진다. (Fig. 15)

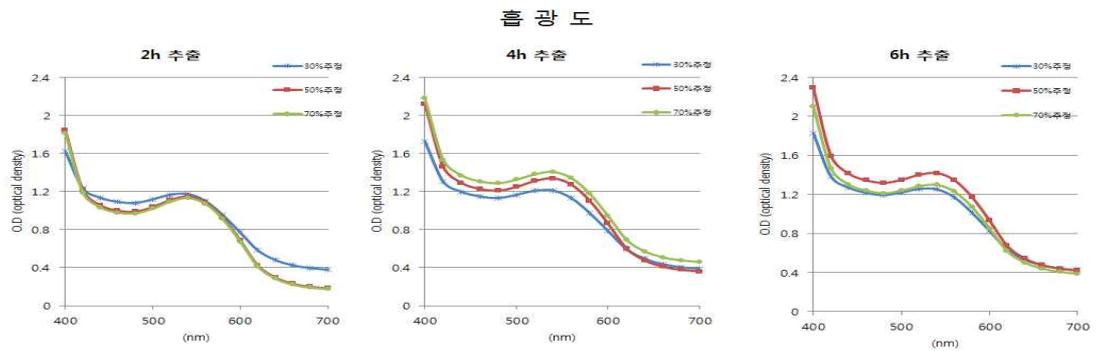
복분자씨부산물(냉동 복분자씨부산물을 건조한 후 파쇄한 경우)의 경우에 있어서는 주정농도가 30%인 용매를 이용하여 추출시간인 2hr.에서는 1.1423이고, 추출 4hr., 6hr.에서는 1.5364, 1.6322로서 추출시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 추출시간 4hr.에서 강하게 증가하였다. 추출시간 2hr., 4hr., 6hr.에서 주정농도가 50%인 경우에는 흡광도가 1.0209, 1.1611, 1.1706이었으며, 주정농도가 70%인 경우에는 0.9685, 0.9737, 1.047로서 낮은 추출율을 나타내었다. 이 같은 결과는 추출온도가 50℃에서는 추출용매인 주정농도가 50%, 70%에서 추출시간 4hr.이후 급격하게 증가하는 경향과는 상반대 결과로 복분자씨추출물의 경우 추출온도와 추출용매인 주정의 농도가 유효성분을 추출 용출하는데 있어서 상당히 중요하다는 것을 보여주었다.

#### (다)복분자씨부산물의 추출물들에 대한 고형분 변화

복분자씨추출물들의 부위별로 추출에 따른 생산수율과 연관한 고형분(TS)을 확인하기 위하여 추출온도 70℃, 추출시간 6hr.으로 하여 추출용매인 주정농도에 따라 복분자씨부산물의 각부위별로 시험을 수행한 결과를 보면, 건조복분자씨의 경우 추출온도 70℃에서 추출시간이 길어질수록 점차 생산수율이 증가하는 것으로 나타났으며 6hr. 추출에서 주정농도가 30%, 50%, 70%일 경우에 고형분이 각각 0.79%, 0.78%, 0.78% 로 주정농도가 70% 일때 0.9%를 나타내었던 추출온도 50℃의 경우와는 다른 경향을 보였다. (Fig. 16) 분쇄복분자씨의 경우 주정농도가 30%이고 추출시간 2hr., 4hr., 6hr.인 경우 고형분이 0.99%, 0.79%, 0.98% 로 나타나 2hr.에서 높게 나타난 것으로 보이나 이는 시험오차로 판단되어지며, 주정농도와 추출시간에 따라 0.73~0.86% 건조복분자씨 추출물에서 나타난 고형분함량과 유사한 결과를 보여주었다. 따라서 추출온도가 70℃인 경우에는 건조후 복분자씨의 분쇄공정이 생산수율에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 조사되었다.

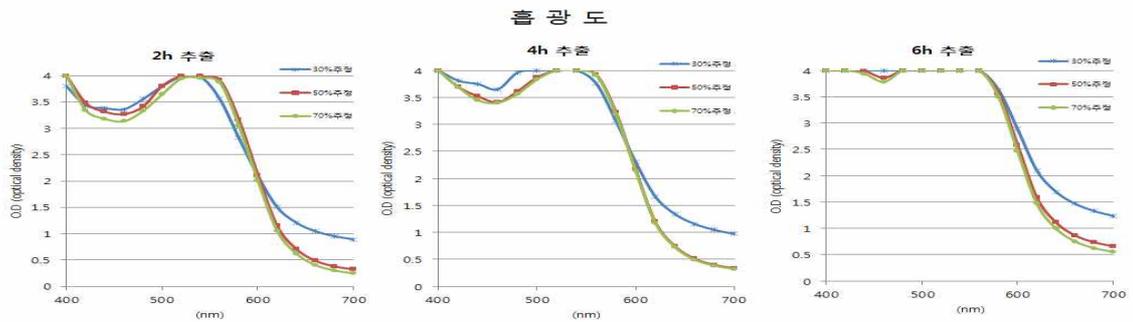


\* 건조복분자씨: 복분자 부산물을 건조 후 씨만 분리한 경우

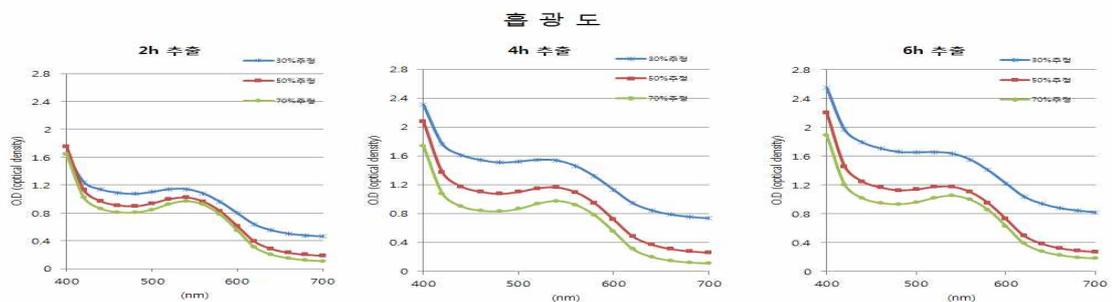


\* 분쇄 복분자씨: 복분자 부산물을 건조 후 씨만 분리하여 분쇄한 경우

Fig. 14. 복분자씨 추출물들에 대한 추출조건에 따른 부위별 흡광도 변화



\* 복분자 과육: 복분자 부산물을 건조 후 과육부분만 분리한 경우



\* 복분자 부산물(과육+씨): 복분자 부산물을 건조한 후 분쇄한 경우

Fig. 15. 복분자씨 추출물들에 대한 추출조건에 따른 부위별 흡광도 변화

복분자과육 부위에서도 분쇄복분자씨 보다는 추출고형분이 80% 이상 높게 나타났으나 추출시간에 따른 변화에 있어 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 추정농도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다.

복분자씨부산물의 경우에는 추출시간에 따라 추출고형분이 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 추정농도가 30%, 70%에서 50% 추정추출물 보다 다소 높게 나타났다. 추출시간 4hr.에서 30%, 50%, 70% 의 추출물의 고형분이 0.79%, 0.79%, 0.78% 이었으나 6hr.에서는 0.98%, 0.78%, 0.99%로 추정농도가 30%, 70%의 경우 크게 증가하는 경향이 나타났으나, 50%의 경우에는 큰 변화가 나타나지 않았다. 이는 추출온도 50℃, 50% 추정농도에서 고형분 0.99%로 가장 높았던 결과와는 다른 양상을 보여주었다. 따라서 복분자씨부산물의 경우 추출온도와 추출용매인 추정농도가 생산수율에 미치는 영향이 큰 인자로 사료되어진다.

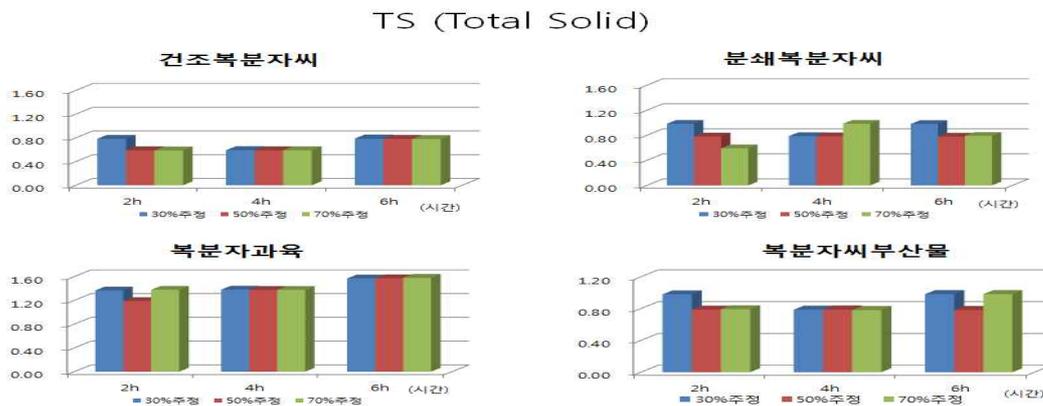


Fig. 16. 복분자 부산물의 동일 추출온도(70℃)에서 추출조건에 따른 추출물의 고형분 함량

**(라)복분자씨부산물의 추출물들에 대한 수율(yield) 변화**

상기의 시험결과를 근거로 하여 복분자씨부산물에 대한 생산수율을 검토하고자 하였다. 복분자씨부산물의 각각의 부위별에 다른 제조시험을 추진하고자 하였으나, 복분자과립 부위에 대한 항바이러스 효능은 복분자씨에 비교하여 다소 낮으며, 분쇄복분자씨의 경우에는 건조복분자씨 자체가 너무 미립하여 산업적으로 분쇄하기에는 상당히 어려움이 있다고 판단하여 추출온도가 70℃의 경우에는 건조복분자씨는 추정농도 50%, 추출시간 6hr. 조건으로 진행하고, 복분자씨부산물의 경우에는 추정농도 30%, 추출시간 6hr.의 조건으로 실시하였다. (표. 5)

건조복분자씨와 복분자씨부산물에 대하여 추출을 수행한 결과, 건조복분자씨는 5.02%였으나 복분자씨부산물의 경우에는 8.42% 로 건조복분자씨보다는 과육이 혼합된 원료의 경우에 수율이 더 증가하는 현상이 나타났는데 이는 과육부위로 인한 요인으로 사료된다.

대량생산 및 항바이러스 소재의 산업화를 위하여서는 제조공정의 원활한 작업성도 검토되어야 한바, 200g을 원료를 기준으로 pilot 생산 이전에 실시해 본 결과 추출과정중의 변화, 여과과정상의 filter에 막힘 현상이 다소 나타났으며 30%의 추정농도 추출물은 잦은 여과지 교체가 필요하였다. 농축과정중의 상변화(추정추출물의 경우 농축과정중 주정이 휘발시 영김성, 분리성)등에 대하여 관찰한 바 큰 문제가 없는 것으로 판단되면 농축 후에도 유동성 등

의 물성적인 측면에서는 큰문제가 나타나지 않았다.

표 5. 복분자씨부산물의 부위별 추출조건에 따른 수율 변화

공정	세부내역	제조-1	제조-4
원료	200 g	건조복분자씨	복분자씨부산물
추출용매	주정농도	주정 50%, 2,000 L	30%-주정, 2,000 L
추출	추출온도	70℃	70℃
	추출시간	6hr.	6hr.
여과	filter size	1um	1 um
농축	감압	액량 249.6 g	액량 169.2 g
	온도 60℃ 이하	TS 4.68 %	TS 10.2 %
건조	동결건조	110.2 g (수율5.02%)	16.84 g (수율 8.42%)

#### 다. Pilot-scale 수준에서의 복분자씨부산물의 제조시험 연구

Lab.수준에서 설정한 복분자씨부산물의 추출제조 조건에 따라서 대량생산 조건에 앞서 pilot scale-up 시험을 당사에서 보유하고 있는 100L 추출농축시스템(Fig.17)을 활용하여 건조복분자씨와 복분자씨부산물(과립+씨)에 대하여 각각 10kg에 대하여 시료를 제조하였다.



Fig. 17. 복분자씨부산물 제조용 추출농축기 전경(pilot설비)

제조조건은 아래의 공정에 따라 원료 10kg를 추출기에 투입한 다음 추출용매인 50% 주정을 10배수 가수하여 추출온도 50℃에서 6시간 추출하였다. 추출과정중에 흡광도 분석에 의하여 추출중의 변화를 확인하였으며, 추출 종료후에는 1차 여과포로 여과한 액을 1um-catridge filter로 여과하였다. 여과한 액은 농축기로 농축하여 동결건조기를 활용하여 건조를 하였다. 소량(농축액 500g)에 대하여서는 분무건조기를 사용하여 분말화 하였다. 분말화는 분무건조기, 동결건조기에서 원활하게 진행 되었다.(Fig. 18)

Pilot 설비를 이용하여 원료 10kg를 이용하여 항바이러스 효과를 나타내는 복분자씨부산물의 수율은 건조복분자씨의 경우 5.95%, 복분자씨부산물의 경우에는 9.21%를 나타내었다. 천연물 유래의 약리작용을 가지는 다른 제품과의 비교하여서도 다소 높은 것으로 보여진다. (표 6.)



Fig. 18. 복분자부산물의 pilot 생산설비를 활용한 최적 제조조건 설정

표 6. Pilot 수준의 복분자씨부산물의 제조공정중의 변화

공정	건조복분자씨 (SD-1)		복분자씨부산물(SD-2)	
	물질수지	분석항목	물질수지	분석항목
원료	10 kg		10 kg	
추출용매	50% 주정 100L		50% 주정 100L	
추출	추출온도 50°C 추출시간 6 hr.	Abs.: 0.6822	추출온도 50°C 추출시간 6 hr.	Abs.: 1.5813
여과	1차 여과포 여과 2차 1um-filter		1차 여과포 여과 2차 1um-filter	
여과액	여과박 17.9 kg 여과액 91.0 L		여과박 22.7 kg 여과액 83.2 L	
농축	농축액 13.7 kg	TS : 4.46 %	농축액 11.2 kg	TS 8.32%
분말화	5.95 kg (수율 5.95%)	수분 :2.1%	9.16 kg (수율 9.16%)	수분 : 2.25%

#### 라. Pilot-scale 제조한 시료에 대한 항바이러스 효능 분석결과

Pilot scale-up으로 진행한 시료 2가지의 influenza virus BR59에 대한 활성을 plaque assay로 분석한 결과, SD1(건조복분자씨), SD2(복분자씨부산물, 과피+씨) 50ug/ml에서 RCS-F1 50ug/ml과 같이 plaque 형성이 100% 저해되었다. (Fig. 19) 따라서 복분자 씨 또는 복분자 씨+과피의 활성이 같다고 볼 수 있다.

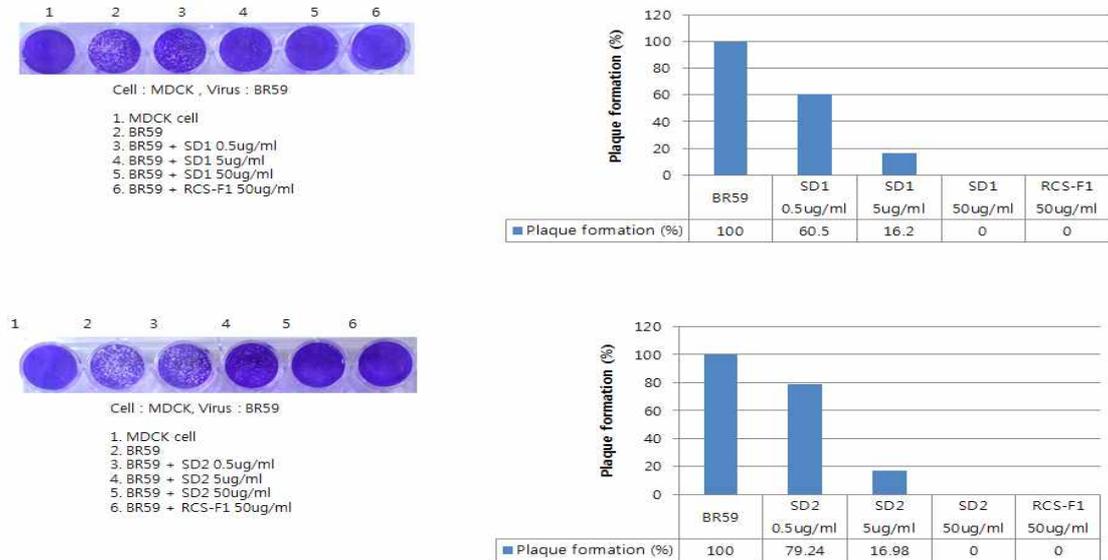


Fig. 19. 복분자씨부산물로 제조한 시료들에 대한 효능분석 결과(pilot수준제조)

1차년도에 추진한 복분자부산물 유래의 항바이러스 소재의 개발에 있어서 최종제품의 수율은 건조복분자씨의 경우에는 5.98%, 복분자씨부산물의 경우에는 9.21%로서 초기 연구 시작단계에서 많은 다소 불안하였던 항바이러스 소재의 효능 대비 제품가격에 있어서의 극복이 가능하다는 것을 판단하였으며, 부산물의 구입단격을 고려시 항바이러스 소재 제품으로 최종 목표 달성시 관련시장에서의 가격, 효능부문에서 경쟁적 우위 확보가 가능하리라 본다.

## 2. 세포 및 마우스 기반 천연 물 유래 식품소재의 저해활성 검증 기술구축

### 가. 항바이러스 소재의 세포주 저해 활성 검증

#### (1) 연구방법

##### (가) 복분자 주스, 씨 추출물 준비

- 복분자 1,000g은 거즈를 이용하여 손으로 짜서 주스 540ml을 얻었고, 이를 63°C shaking water bath에서 30분간 열처리한 후 3,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하였음. 상등액을 취하여 0.20 μm filter (Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd. Japan)에 여과한 복분자 주스 (RCJ)를 인플루엔자 저해 활성 실험 시료로 이용하였음.

- 복분자씨를 동결건조기로 건조하여 grinder로 간 후, 1 mm mesh에 통과시켜 powder를 제조함. 분말 상태의 복분자씨에 70% ethanol을 첨가하여 ultrasonic bath(50kHz, Hwashin Instrument, Korea) 에서 20분간 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취함. 상등액은 rotary evaporator로 농축한 후 동결건조하여 복분자씨추출물 (RCS) 파우더를 만듦. 또한 상등액을 1 kDa cut-off stirred ultrafiltration cell (Millipore Corporation, MA, USA)을 이용하여 여과시키고 여과된 액을 동결건조하여 RCS-F1을 제조하였음. RCS 및 RCS-F1은 PBS에 희석하여 항바이러스 활성 실험에 이용하였음.

##### (나) 인플루엔자 바이러스 및 세포

- 인플루엔자 바이러스 A/Brisbane/59/2007 (BR59) (H1N1), A/Korea/01/2009 (KR01)

(2009pdm H1N1), A/Brisbane/10/2007 (BR10) (H3N2), B/Florida/4/2006 (FL04), A//1934 (PR8) (H1N1) 및 mouse adapted A/Korea/01-2-9/2009 (H1N1)은 질병관리본부에서 분양받았음. Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였음.

#### (다) Plaque assay를 이용한 항인플루엔자 활성

- 복분자 주스(RCJ)의 인플루엔자 바이러스저해활성을 RCS 및 RCS-F1과 비교하기 위하여 time-of-addition 방법으로 실험하였음.

- Pre-treatment of virus:: 바이러스 (5 log<sub>10</sub> PFU/ml)와 동량의 RCJ (또는 RCS, RCS-F1)를 1시간 동안 실온에서 incubation시킴. 이 바이러스액을 DMED으로 10-fold serial dilution하여 24-well plate에 seeding 되어 있는 MDCK cell에 1시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 infection 시켰음. 바이러스액을 제거하고 PBS로 washing 후 TPCK trypsin이 함유된 L-15와 agarose를 1:1로 혼합하여 첨가하여 72시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켰음. 형성된 plaque은 4% formaldehyde로 fix하여 0.5% crystal violet으로 염색하여 counting하였음.

-Pre-treatment of cell: 24-well plate에 seeding되어 있는 MDCK cell에 RCJ(또는 RCS, RCS-F1)을 첨가하여 1시간동안 실온에서 incubation 한 후 바이러스를 제거하고 PBS로 washing 한 후, 바이러스를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 infection 시키고 그 다음 과정은 pre-treatment of virus와 동일하게 수행하였음.

Co-treatment: 바이러스를 감염시키는 1시간 동안 inhibitor를 동시에 처리하였으며, post-treatment는 바이러스 1시간 감염 후에 inhibitor를 1시간 처리하였고 그 다음 과정은 pre-treatment of virus와 동일하게 수행하였음. Sterilized distilled water는 negative control로 사용하였음. Ribavirin(100 µM)과 Oseltamivir(10 µM)은 viral polymerase inhibitor 및 neuraminidase inhibitor로 각각 사용하였음.

## (2) 연구결과

### (가) 항바이러스 소재의 세포주 저해 활성 검증

- 복분자 추출물 (주스)과 복분자 부산물 (복분자씨)의 효능비교 실험에서 복분자 주스(RCJ) 1%, 2% 및 4%는 pre-treatment of virus보다 co-treatment에서 KR01, BR10 및 FL04에 대한 plaque 형성 저해활성이 높게 나타났음(Fig. 20). Rabavirin은 oseltamivir와 동일하게 plaque 저해 활성이 나타나지 않았으며 Fig.에는 oseltamivir만 제시하였음.

- 복분자 씨추출물(RCS) 50 ug/ml는 pre-treatment of virus의 FL04를 제외하고 pre-treatment of virus 및 co-treatment에서 BR59, KR01, BR10 및 FL04에 대한 plaque 형성 저해활성이 90%이상 나타났음(Fig. 21). 또한 복분자 씨추출물 1kDa 이하 분획(RCS-F1)은 50 ug/ml 농도를 co-treatment하였을 때 BR59, KR01, BR10에 대하여 100% 저해활성을 보였고 FL04에 대하여도 97%의 저해를 나타내었음(Fig. 22).

- 따라서 복분자 주스(RCJ) 보다 RCS 및 RCS-F1의 인플루엔자 바이러스 저해활성이 매우 우수함.

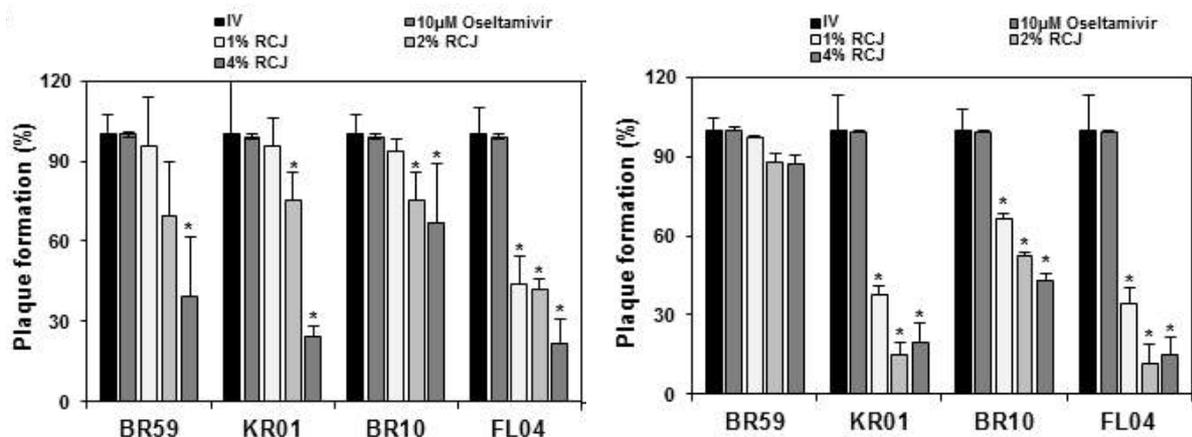


Fig. 20. 복분자 주스의 (왼쪽) pre-treatment of virus, (오른쪽) co-treatment에 의한 인플루엔자 바이러스 저해 활성

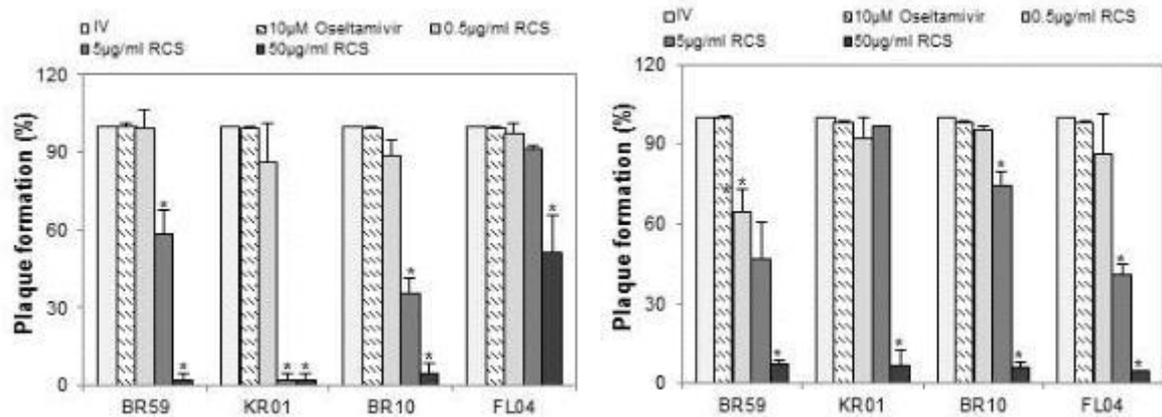


Fig. 21. 복분자 씨 추출물(RCS)의 (왼쪽) pre-treatment of virus, (오른쪽) co-treatment에 의한 인플루엔자 바이러스 저해 활성

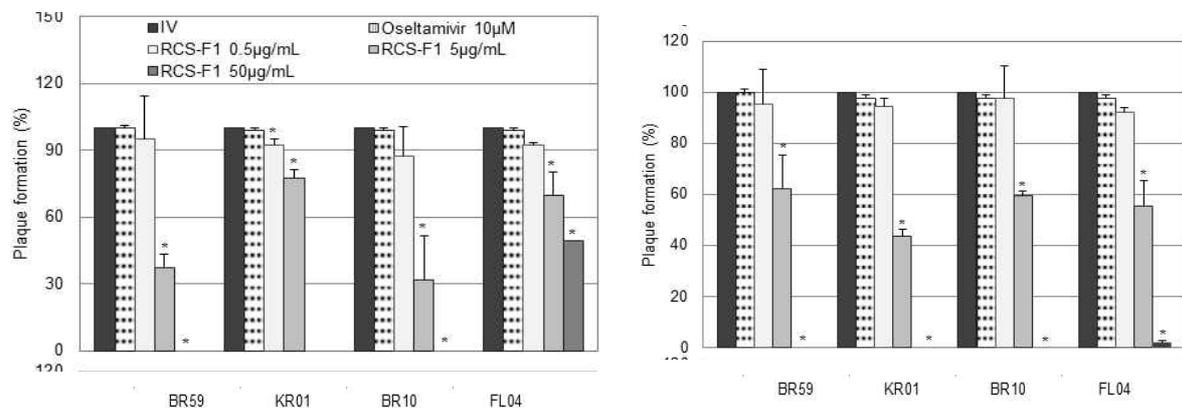


Fig. 22 복분자 씨 추출물 <1kDa 이하 분획 (RCS-F1)의 (A) pre-treatment of virus, (B) co-treatment에 의한 인플루엔자 바이러스 저해 활성

- 또한 주관기관에서 대량으로 제조한 복분자 씨추출물 (SD1)과 복분자 씨+과피 추출물

(SD2)의 인플루엔자 바이러스 저해활성을 RCS-F1과 비교하였음. 그 결과, BR59 인플루엔자 바이러스에 대한 RCS-F1과 SD1 및 SD2의 저해 활성이 동일하게 나타났음(Fig. 23).

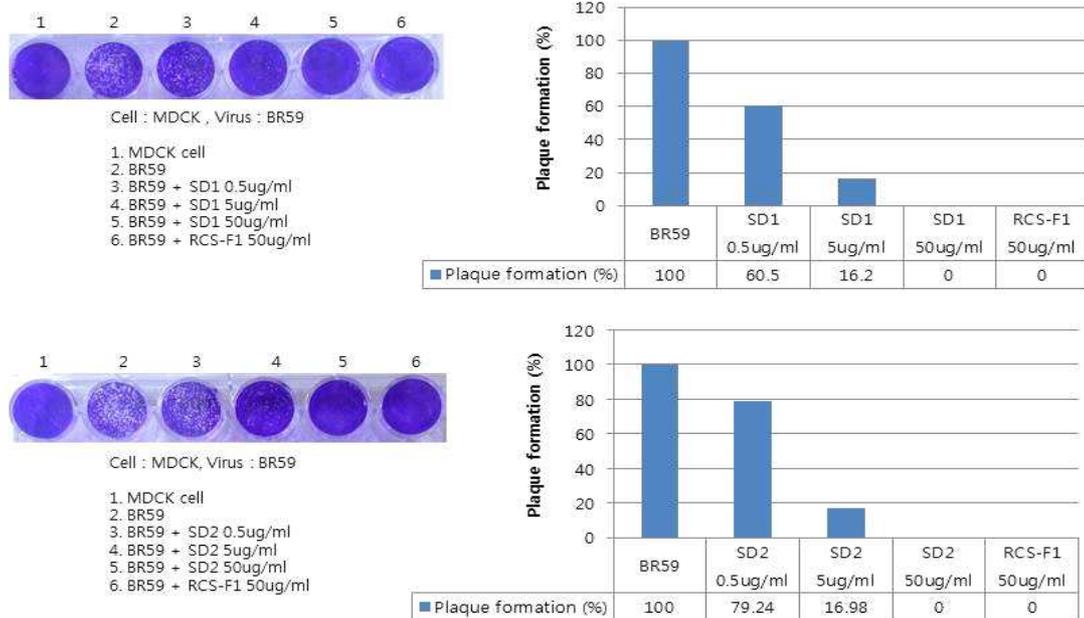


Fig. 23. 주관기관에서 대량으로 제조한 복분자 씨추출물 (SD1)과 복분자 씨+과피 추출물(SD2)의 인플루엔자 바이러스 저해활성을 RCS-F1과 비교

#### (나) RCS-F1의 인플루엔자 바이러스 attachment 및 penetration 억제 활성

- RCS-F1이 인플루엔자 바이러스의 숙주세포 감염 억제 작용을 분석하기 위하여 감염 초기 단계인 바이러스 attachment와 penetration 억제를 분석하였음 (Fig. 24). 96-well plate에 seeding된 MDCK cell에 바이러스(200 TCID<sub>50</sub>)와 RCS-F1(0.5-50µg/mL)을 1시간동안 4℃에서 처리하여 바이러스의 attachment는 이루어지고 penetration은 억제시킨 후 CPE 를 분석하였을 때, RCS-F1 농도가 증가함에 따라 cell viability가 증가하였음. 또한 바이러스의 attachment가 완전하게 이루어진 후, RCS-F1(0.5-50µg/mL)을 37℃에서 1시간동안 처리하여 penetration이 이루어지게 하였을 때에도 RCS-F1이 증가함에 따라 cell viability가 증가하였음.

#### (다) RCS-F1의 인플루엔자 바이러스 hemagglutination inhibition(HI)에 대한 효과

- 인플루엔자 바이러스 hemagglutinin(HA)에 대한 RCS-F1의 저해 효과를 확인하기 위하여, BR10, KR01, BR10 및 FL04의 4종 바이러스의 HA의 minimum inhibitory concentration(MIC)을 red blood cell을 이용하여 분석하였음. RCS-F1의 MIC는 BR59는 0.01, KR01과 FL04에 대하여는 0.05 그리고 BR10은 0.1 ug/ml로 나타났음. 따라서 RCS-F1은 매우 높은 인플루엔자 바이러스 HA 저해활성을 보였음(Fig. 25, Table 7).

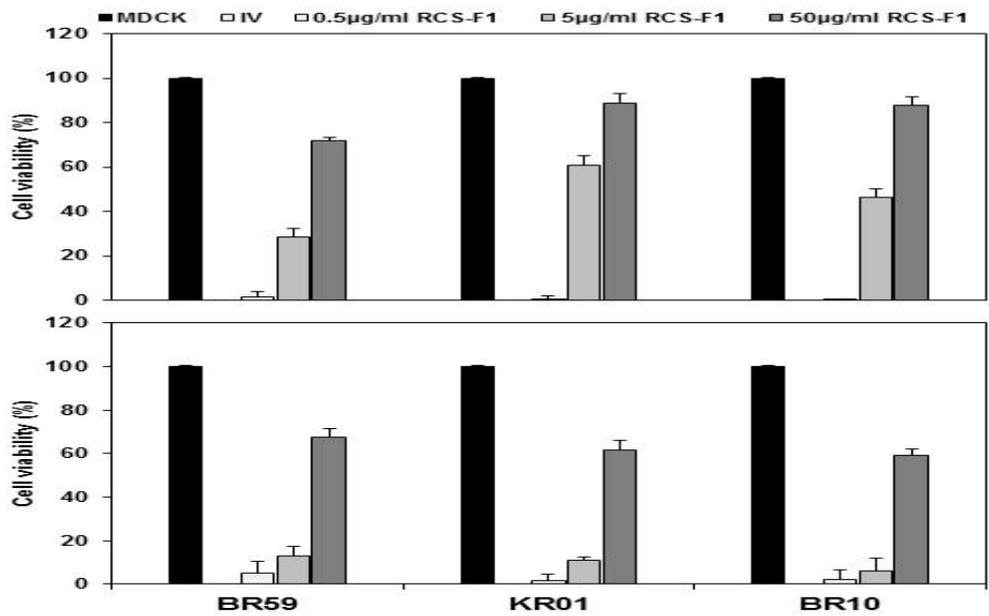


Fig. 24. RCS-F1의 인플루엔자 바이러스 (위)attachment 및 (아래)penetration 억제 활성.

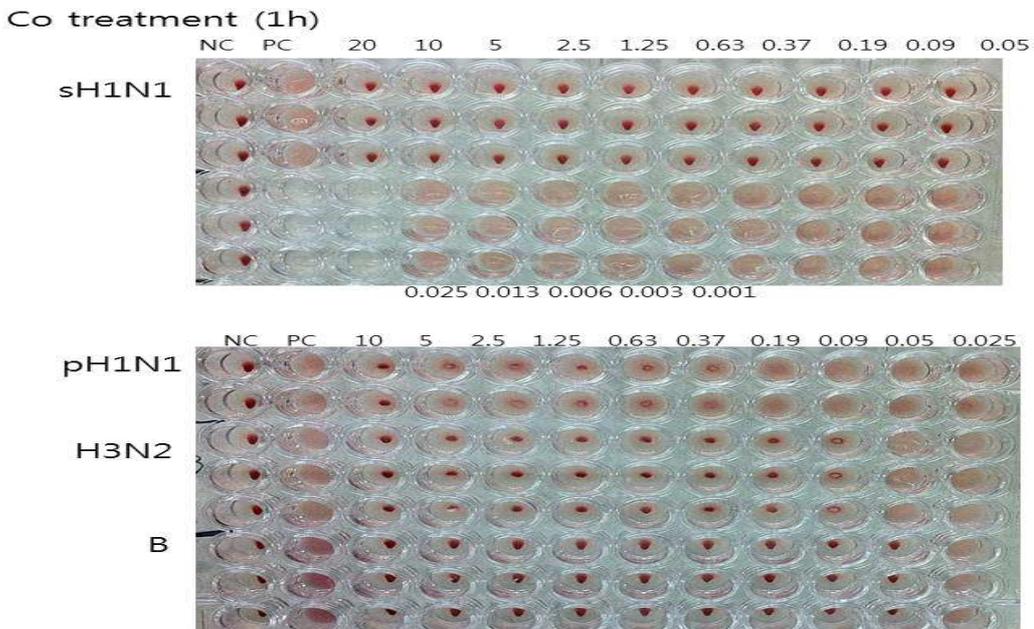


Fig. 25. RCS-F1의 인플루엔자 바이러스 hemagglutinin inhibition 활성.

(라) RCS-F1에 sialic acid 함유 확인을 위한 hemagglutination inhibition(HI) 및 cell viability 분석

- 인플루엔자 바이러스가 세포에 감염되기 위해서는 바이러스의 hemagglutinin이 숙주세포의 sialic acid와 결합하여야 함. 식물에는 sialic acid가 없다고 알려져 있음.
- RCS-F1에 sialic acid가 함유되었는지 분석하기 위하여, RCS-F1에 neuraminidase를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹으로 나누어 red blood cell을 이용하여 hemagglutination

inhibition(HI) assay 및 cell viability를 분석하였음 (Fig. 26).

- 그 결과, BR59, KR01, BR10의 3가지 인플루엔자 바이러스에 대하여 RCS-F1에 neuraminidase를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹 간의 HI 활성 차이가 나타나지 않았으며, cell viability 차이도 보이지 않았음. 따라서 RCS-F1는 인플루엔자 바이러스의 숙주세포 attachment는 저해하며, sialic acid는 함유하지 않았음을 확인하였음.

Table 7. 인플루엔자 바이러스 hemagglutination inhibition에 대한 RCS-F1 활성

	BR59	KR01	BR10	FL04
MIC of RCS-F1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$0.01 \pm 0.00$	$0.05 \pm 0.00$	$0.1 \pm 0.0$	$0.05 \pm 0.00$

The HI assay against BR59, KR01, BR10, and FL04 was performed using 64, 64, 64, and 1 HA units of virus per reaction, respectively. The concentration of RCS - F1 necessary to completely inhibit hemagglutination was calculated as the minimum inhibitory concentration (MIC). All measurements were performed in triplicate. PBS was used as a negative control.

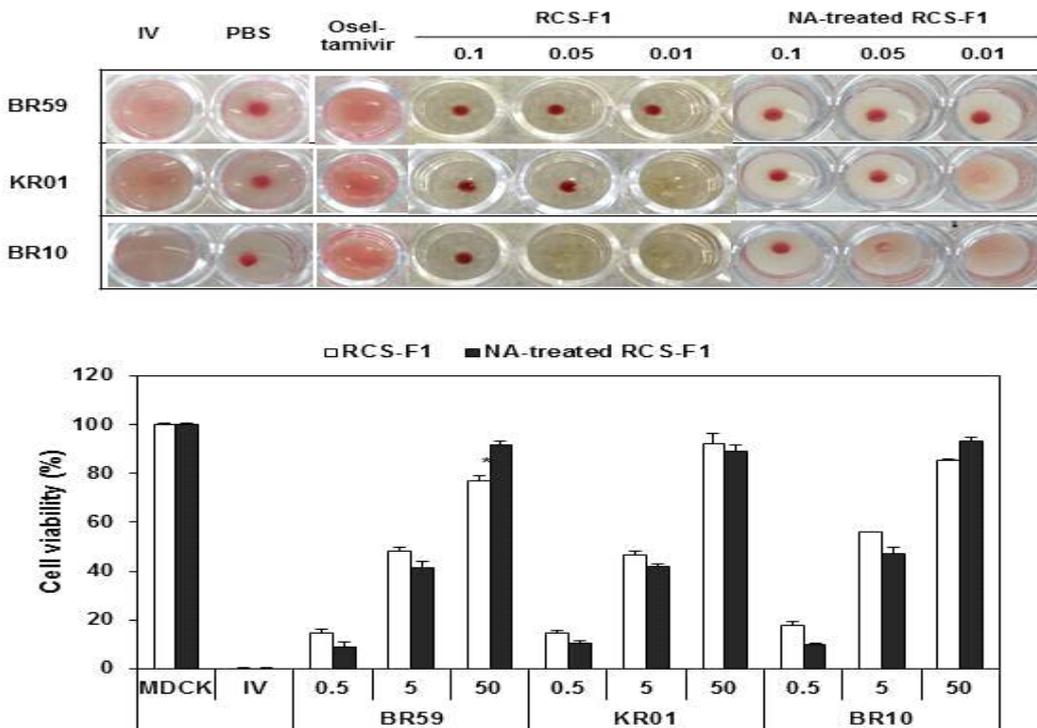


Fig. 26. RCS-F1에 sialic acid가 함유되었는지 확인하기 위한, (위)RCS-F1에 neuraminidase(NA)를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹으로 나누어 red blood cell을 이용하여 hemagglutination inhibition (HI) assay 및(아래) cell viability 분석.

## 나. Mouse adapted 인플루엔자 바이러스 이용 *in vivo* 활성 분석

### (1) 연구방법

Mouse adapted 바이러스의 *in vivo* 활성 실험은 덕성여자대학교 동물윤리위원회의 동물윤리 규정에 따라 수행하였으며, individually ventilated (IV) cage system에서 실시하였음.

**(가) *In vivo* toxicity**

- RCS-F1의 *in vivo* toxicity를 구하기 위하여 6주령 female BALB/c mouse (코아텍, 경기도)에 RCS-F1 (3.5, 15, 50 mg/kg/day)을 8일동안 존대를 이용하여 위내투여하면서 14일간 체중 변화 및 외관 관찰을 하였음.

**(나) 50% mouse lethal dose(MLD<sub>50</sub>) 측정**

- 6주령 female BALB/c mouse을 복강으로 마취시킨 후에 A/1934 (PR8) (H1N1) 또는 mouse adapted A/Korea/01-2-9/2009 (pandemic H1N1) 바이러스 50ul를 비강(intranasal; IN) 감염시키고, 감염 후 14일까지 체중을 측정하였음. 바이러스 농도별 각각 8마리 마우스를 동물보호를 위한 윤리 지침에 근거하여 마우스의 체중이 20%감소하면 사망한 것으로 처리하였음.

**(다) RCS-F1의 *in vivo* 활성**

- 3 또는 5 MLD<sub>50</sub> 농도의 A/1934 (PR8) (H1N1) 또는 mouse adapted A/Korea/01-2-9/2009 (pandemic H1N1) 바이러스 50ul를 6주령 female BALB/c mouse에 IN감염시키고, RCS-F1(1, 3.5 및 15 mg/kg)을 바이러스 감염 당일부터 5일간 위내투여 하였음. Oseltamivir phosphate (0.75 mg/kg/day; a positive control) 및 PBS (a negative control)도 RCS-F1과 마찬가지로 5일간 투여하였음. 바이러스 감염 후 14일까지 체중을 측정하면서 활성을 분석하였고, 바이러스 감염 후 3일(3 days of post infection; 3 dpi)에 각 그룹당 3마리 마우스를 희생시켜서 lung을 취하여 virus titer를 분석하였음.

**(2) 연구결과**

**(가) RCS-F1의 *in vivo* toxicity**

- 마우스를 대상으로 5일간 RCS-F1 (3.5, 15, 50 mg/kg/day)을 위내투여한 후 *in vivo* cytotoxicity를 분석한 결과, 50 mg/kg 에서도 마우스가 정상적인 체중 변화를 보였고, 외관도 정상적인 상태를 나타내어 RCS-F1 50 mg/kg에서 독성이 없는 것으로 확인되었음 (Fig. 27).

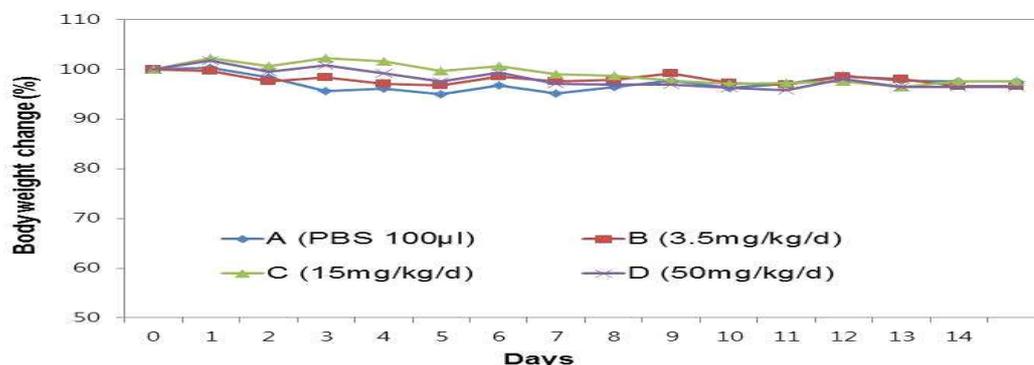


Fig. 27. RCS-F1의 *in vivo* toxicity

**(나) PR8 및 mKR01 인플루엔자 바이러스의 MLD<sub>50</sub>**

- PR8 인플루엔자 바이러스와 mKR01 인플루엔자 바이러스에 대한 50% mouse lethal dose (MLD<sub>50</sub>)를 분석한 결과, 10<sup>2</sup> PFU/mouse와 4×10<sup>3</sup> PFU/mouse로 각각 나타났음(Fig. 28).

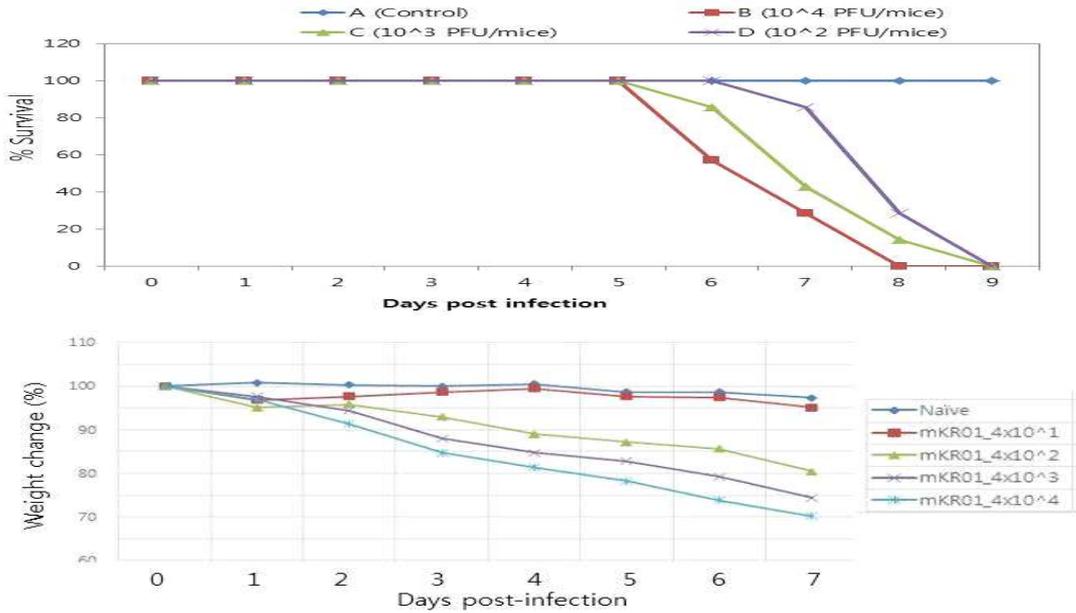


Fig. 28. Mouse-adapted 인플루엔자 바이러스 (위)PR8과 (아래)mKR01의 MLD<sub>50</sub>

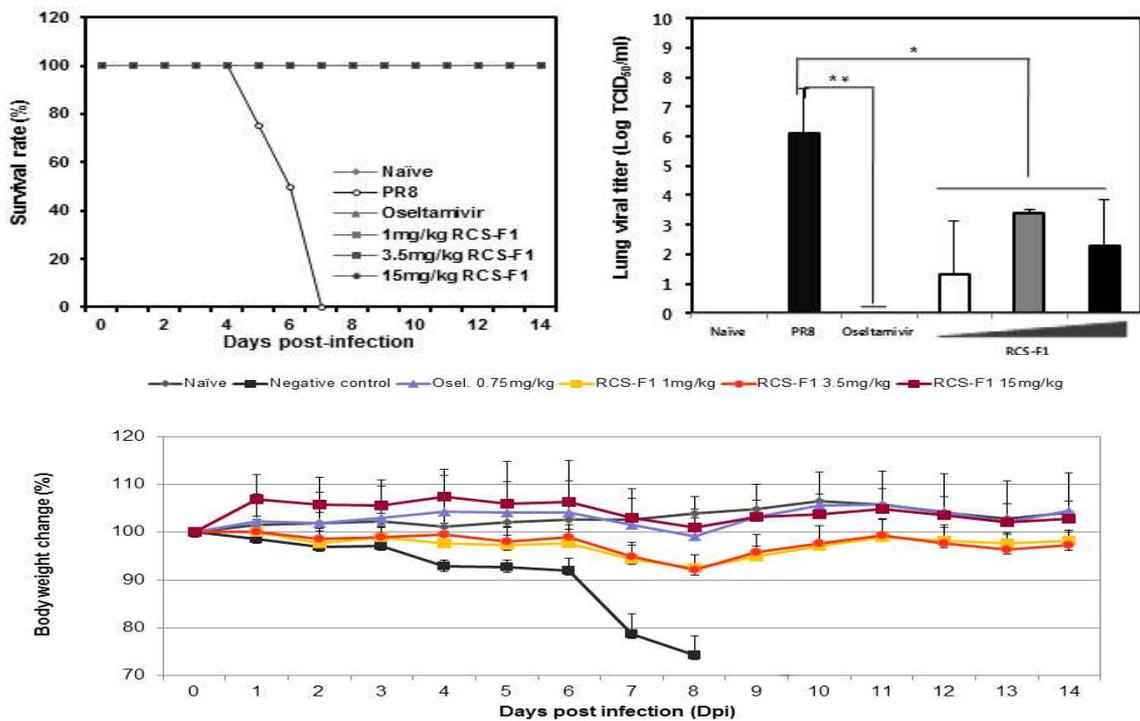


Fig. 29. PR8 감염된 마우스에서 RCS-F1의 저해 활성. (위 왼쪽) 생존율, (위 오른쪽) 바이러스 감염 후 3일의 마우스 lung virus titer 및 (아래) 체중변화.

(다) PR8 및 mKR01 인플루엔자 바이러스에 대한 RCS-F1의 활성

- PR8 인플루엔자 바이러스에 대한 RCS-F1 활성을 분석한 결과, 3 MLD<sub>50</sub> 농도의 PR8을 감염시킨 마우스에 대하여 RCS-F1 1, 3.5 및 15 mg/kg/day을 각각 5일간 위내 투여한 그룹 모두 체중 감소가 최대로 나타난 8 dpi에서도 10% 이내의 감소를 보이다가 정상범위로 회복되는 양상을 보였음. 특히 15 mg/kg/day 그룹은 체중 감소가 미미하게 나타났음 (Fig. 29).
- 특히, RCS-F1 15 mg/kg은 positive control 인 oseltamivir (Tamiflu) 0.75 mg/kg과 같은 수준의 저해 활성을 보였음. 또한 3dpi에 희생시킨 마우스의 lung virus titer는 바이러스만 감염시킨 PR8에 비하여 RCS-F1 투여 그룹에서 유의적으로 감소되었음 (Fig. 29). 따라서 RCS-F1이 PR8 인플루엔자 바이러스를 효과적으로 제어함을 알 수 있음.
- mKR01 인플루엔자 바이러스에 대한 RCS-F1 활성을 분석한 결과, 5 MLD<sub>50</sub> 농도의 mKR01 인플루엔자 바이러스가 감염된 마우스에 대하여 RCS-F1 1, 3.5 및 15 mg/kg/day을 5일간 위내 투여한 그룹 모두 8 dpi 이후에는 체중이 증가되면서 회복됨을 확인하였음. 특히, RCS-F1 1, 3.5 및 15 mg/kg의 세 개의 그룹 모두 positive control인 oseltamivir (Tamiflu) 0.75 mg/kg 보다 높은 저해 활성을 보였음 (Fig. 30).
- 따라서 RCS-F1이 PR8 및 mKR01에 감염된 마우스에 대하여 항바이러스 활성을 나타내었음.

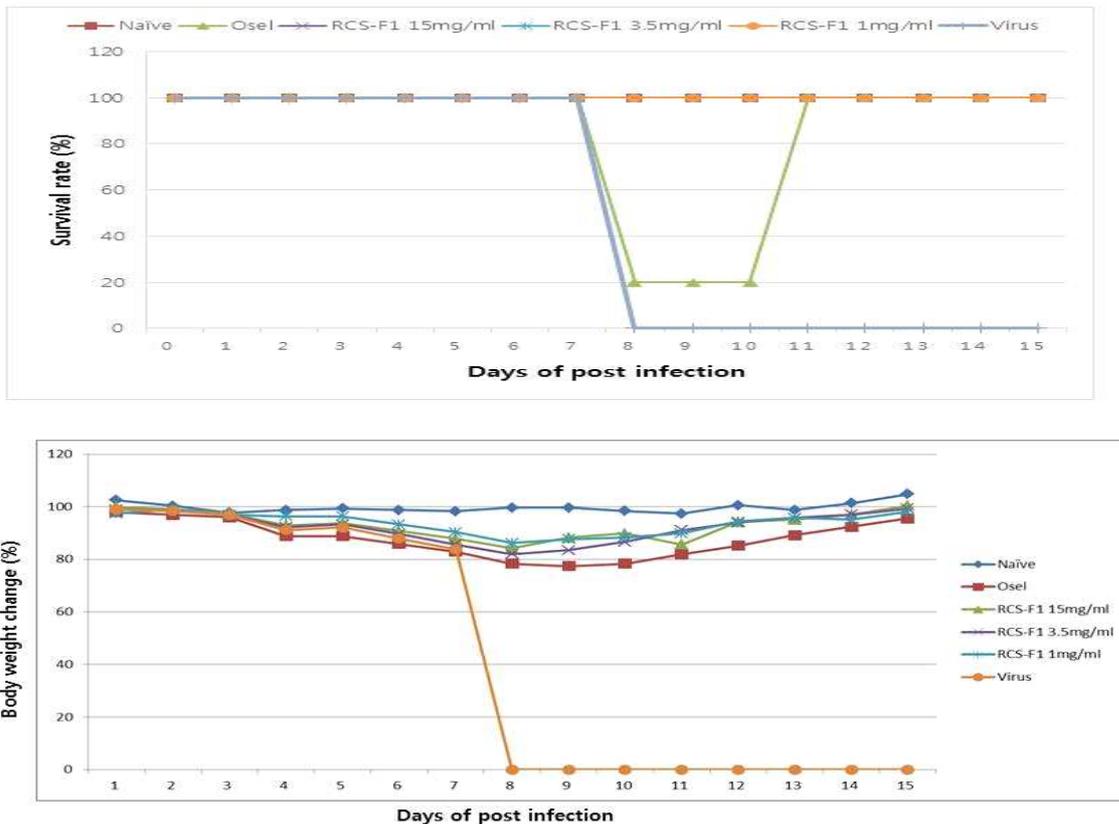


Fig. 30. Mouse-adapted 인플루엔자 바이러스 mKR01에 감염된 마우스에서 RCS-F1의 저해 활성 (위)생존율 및 (아래)체중변화.

### 3. 항바이러스 소재의 활성 성분 연구

#### 가. 연구방법

RCJ, RCS, and RCS-F1의 polyphenol화합물 분석은 LCMS-8050™ liquid chromatograph mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하였고 분석조건은 아래와 같음.

##### (1) 분석 조건

Electrospray ionization과 Nexera UHPLC system (Shimadzu)를 갖춘 phenyl-hexyl column (2.1 × 100 mm, 3.5 μm; Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고 mobile phase는 solvent A (0.1% formic acid) 및 solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile)를 이용하였고 95:5 (A:B) at 1.5 min; 65:35 at 8 min; 5:95 at 9 min; and 95:5 at 10 min의 gradient program으로 하면서 0.4 ml/min로 용출시켰고 column oven 은 40°C를 유지시켰음. Scan mode (254nm)로 분석 후 정량분석은 multiple reaction monitoring (MRM) mode를 이용하였음.

##### (2) Polyphenol standard 16종

사용된 standard는 caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, 3,4-dihydroxybenzoic acid, ellagic acid, epigallocatechin-3-gallate, *trans*-ferulic acid, gallic acid, myricetin, quercetin, quercetin-3-glucuronide, *trans*-resveratrol, 및 rutin의 16종으로 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였음.

#### 나. 연구결과

##### (1) 저해활성 소재의 구성성분 분리 및 동정

- LC/MS/MS 이용하여, RCJ, RCS 및 RCS-F1에 함유된 polyphenol 화합물을 분석하였음. 254nm에서 scan mode로 분석한 chromatogram과 TIC를 나타낸 chromatogram은 Fig. 31와 같음.

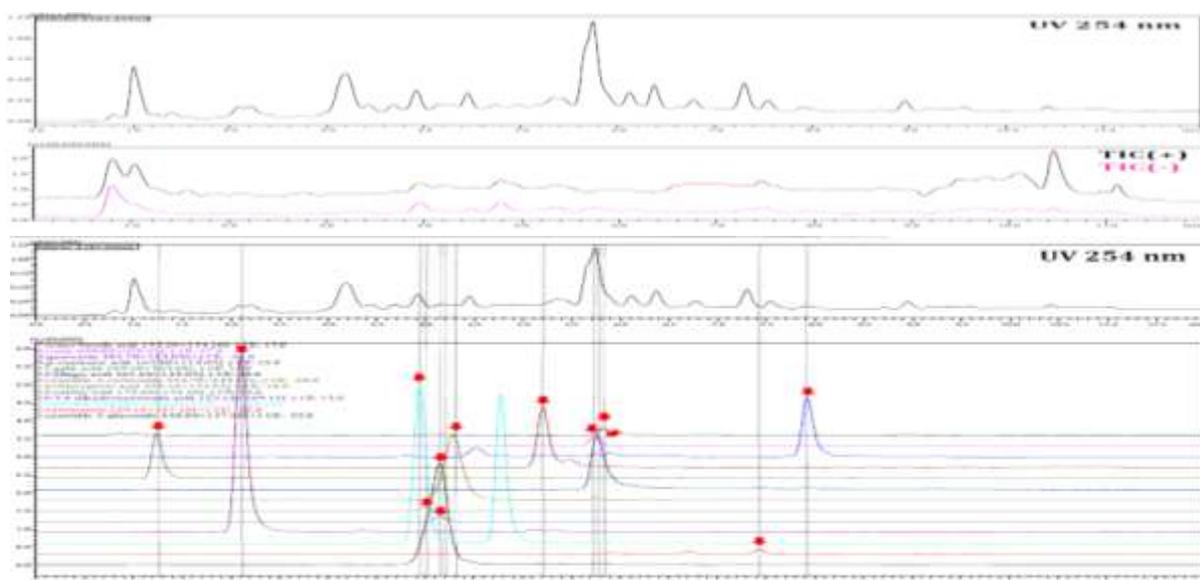


Fig. 31. RCS-F1의 (위)254nm에서 scan mode로 분석한 chromatogram, (중간)total ion current(TIC) 및 (아래)chromatogram에서 확인된 피크.

- Polyphenol 화합물 16종을 표준품으로 하여 분석한 결과 13개 성분이 함유되었음이 확인되었고, 이를 정량 분석한 결과는 Table 8과 같음. RCS-F1에 함유된 주요성분은 catechin 34.55 mg/ml, ellagic acid 11.43 mg/ml 및 cyanidin-3-rutinoside 8.5 mg/ml 으로 확인되었음.

**(2) RCS-F1 구성 화합물의 인플루엔자 바이러스 저해 활성**

- LC/MS/MS 분석으로 확인된 주요성분인 cyanidin-3-rutinoside(C3R) 100uM은 KR01 및 FL04에 대하여 plaque 형성 저해활성을 보이지 않았으며, ellagic acid, quercetin 및 cyanidin-3-glucoside도 FL04에 대한 저해 활성을 나타내지 않았음. 그러나 gallic acid는 FL04에 대하여 약한 저해활성을 보였음(Fig. 32).

Table 8. Contents of polyphenol compounds in RCJ, RCS, and RCS-F1 (mg/g)

Polyphenols			RCJ	RCS	RCS-F1
Class	Subclass	Compound			
Flavonoids	Anthocyanins	Cyanidin-3-glucoside	1.96±0.17	0.23±0.00	0.15±0.00
		Cyanidin-3-rutinoside	23.51±24.9	9.56±0.09	8.50±0.20
	Flavonols	Quercetin	0.14±0.02	0.09±0.01	0.27±0.01
		Myricetin	-	-	-
		Rutin	5.77±0.32	0.39±0.01	0.53±0.00
	Flavan-3-ols	Catechin	0.11±0.01	15.06±0.12	34.55±0.82
Hydrolyzable tannins	Epigallocatechin gallate	-	-	-	
	Ellagic acid	4.25±1.29	28.3±0.17	11.43±0.99	
Phenolic acids	Hydroxybenzoic acids	Gallic acid	1.62±0.24	0.79±0.01	1.30±0.04
		3,4-Dihydroxybenzoic acid	2.90±0.23	0.65±0.01	1.99±0.05
	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid	0.06±0.02	0.11±0.01	0.22±0.03
		<i>trans</i> -Ferulic acid	-	0.06±0.01	0.13±0.01
		<i>p</i> -Coumaric acid	0.19±0.04	0.18±0.00	0.44±0.00
		Chlorogenic acid	0.06±0.01	0.15±0.01	0.02±0.00
Stilbenoids	Stilbenes	<i>trans</i> -Resveratrol	-	0.01±0.00	0.02±0.00

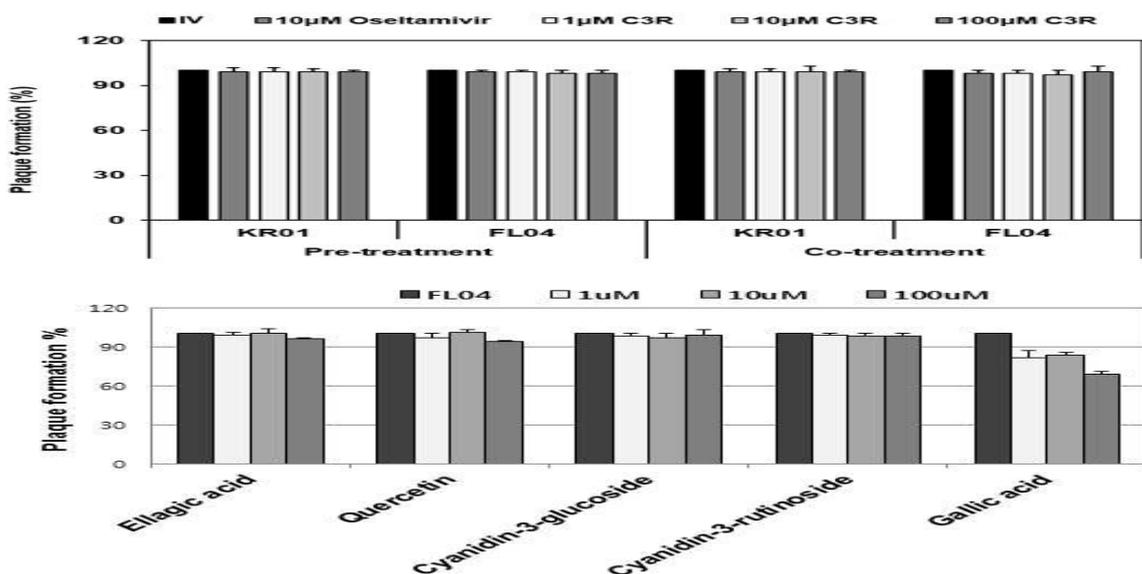


Fig. 32. LC/MS/MS 분석으로 확인된 (위)cyanidin-3-rutinoside(C3R)의 KR01, FL04에 대한 plaque형성 저해 활성 및 (아래) FL04에 대한 ellagic acid 등 화합물의 활성

#### 4. 바이러스 단백질 구조기반 저해 작용기전 연구

##### 가. 곤충세포에서의 인플루엔자 바이러스 단백질 대량 발현 및 정제

- A/Brisbane/59/2007 (BR59) (H1N1), A/Korea/01/2009 (KR01) (2009pdm H1N1), A/Brisbane/10/2007 (BR10) (H3N2) HA 단백질을 곤충세포 Bac-to-Bac 발현 시스템에서 pFastBac vector에 subcloning 한 후(Fig. 33), 재조합된 recombinant bacmid DNA를 얻은 후, sf9 곤충세포에 Cellfectin을 이용하여 transfection하여, Hi5 cell 기반 증폭하였음.
- HA 단백질 발현은 small scale 실험을 통하여 최적의 수율과 quality를 가진 단백질을 발현시키는 조건으로 설정한 후, large scale로 최적화된 조건 (MIO 2, 발현시간 72시간 이내)에서 3-4L 대량 발현하여, L당 약 3 mg의 재조합 HA단백질을 확보함.
- Hi5 cell로부터 HA 단백질이 secretion 된 배지에서 Ni-NTA 등 affinity chromatography를 통해 HA 단백질을 분리해 내고, trimer 상태의 활성형 HA 단백질을 확보함. 또는 thrombin 처리 후 HA0 전구체 HA 단백질로 얻었음.
- HA 전구체 및 활성형은 mono Q ion exchange chromatography, superdex gel filtration AKTA basic 단계를 거쳐 최종 정제하여 10-20 mg/ml 고순도 단백질로 확보, 분석에 이용하였음 (Fig. 34).

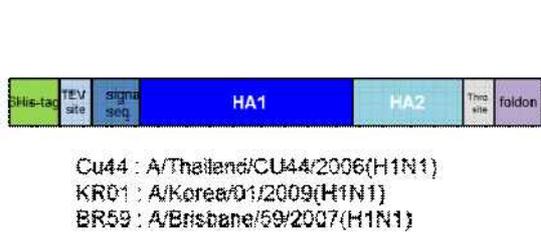


Fig. 33. HA construct 디자인

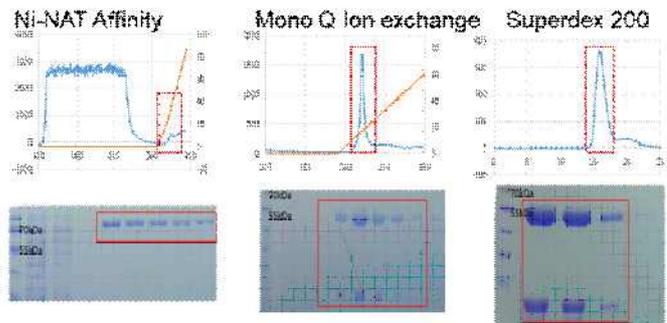


Fig. 34. 재조합 HA 단백질 정제 과정

##### 나. 재조합 HA 단백질의 결정화

- HA를 고농도로 농축하여, ORYX4 robot을 이용하여  $\mu$ l 단위의 hanging drop 방법으로 약 800종류의 commercial buffer 조건으로 initial screening을 수행한 후, 선별된 결정화 조건을 중심으로 pH, precipitant 농도 및 salt 농도에 따른 세분화 조건 탐색을 시도하여 단일 결정을 확보하였음.

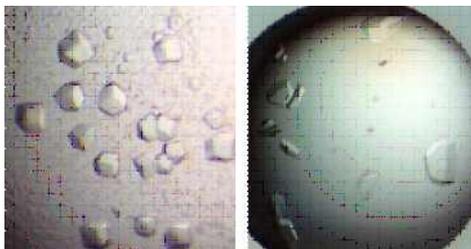


Fig. 35. HA 단백질 결정

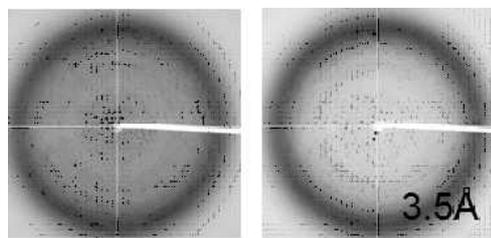


Fig. 36. HA 단백질의 X-ray diffraction images

- HA Native 결정을 포함 혹은 일본 가속기 빛을 이용하여 고해상도 자료를 수집함. 가속

기 빛은 fine-tuning되는 적절한 파장의 빛을 이용하여 (0.9 - 1.1 Å), -170 °C에서 고해상도 X-선 자료를 수집하였음. HA native 결정에 RCS-F1의 soaking을 시도, 구조 규명을 추진 중임 (Fig. 35-36).

**다. DSF기반 HA 결합활성 측정 및 trypsin susceptibility assay를 이용한 membrane fusion 저해연구**

- DSF기반 HA 결합활성 측정: RCS-F1의 결합에 따른 단백질의 폴딩 안정화를 통하여 단백질 thermal stability shift가 일어나는지 측정한 결과, RCS-F1은 단백질의 T<sub>m</sub>을 1-2°C 상승시켜서 HA 단백질과의 결합이 예상됨 (Fig. 37).

- Trypsin susceptibility assay를 이용한 membrane fusion 저해연구: RCS-F1이 HA0 전구체 단백질의 활성화를 저해하는 process와 (HA1+HA2)으로 활성화된 단백질이 membrane fusion을 위해 일어나는 conformational change를 저해하는지 확인한 결과, RCS-F1은 전구체 단백질의 활성화를 저해하지 않았고, *in vitro* trypsin susceptibility 실험에서 conformational change를 저해하지 않았음 (Fig. 38).

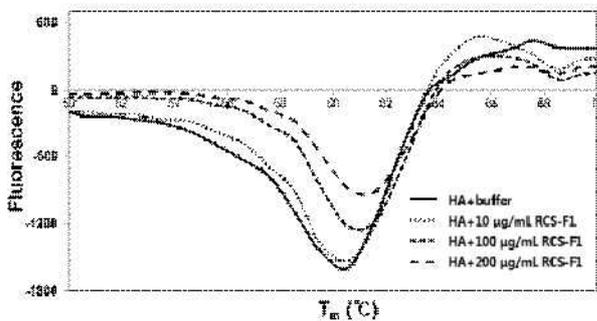


Fig. 37. RCS-F1의 첨가에 따른 HA의 T<sub>m</sub>상승

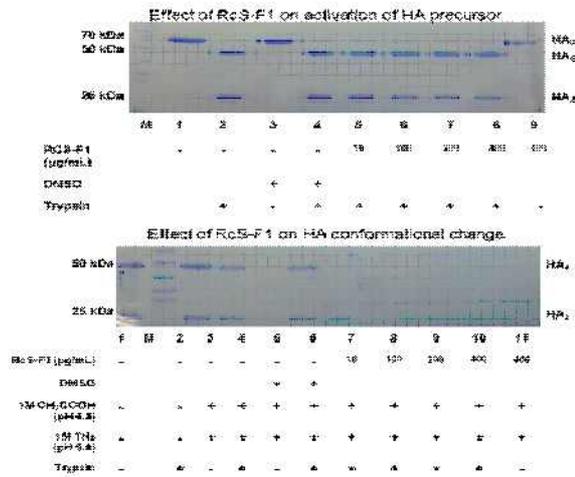


Fig. 38. HA Trypsin susceptibility assay

**라. Confocal microscopy 및 전자투과현미경을 이용한 항바이러스 기작 확인**

- 세포 수준의 작용기작을 바이러스와 1시간 동안 미리 처리한 후 MDCK 세포에 감염시킨 pre-treatment 및 세포에 바이러스를 감염시키는 1시간 동안 동시에 처리한 co-treatment의 시료를 3시간 후에 anti-NP 및 DAPI 염색을 한 후 confocal microscope image를 분석한 결과, pre- 및 co-treatment에서 저해 활성을 확인하였음 (Fig. 39).

- 바이러스에 대한 직접적인 영향을 전자투과현미경으로 관찰한 결과, RCS-F1 50µg/ml 농도로 1시간 처리한 그룹에서 바이러스의 입자가 영향을 받은 것을 확인하였음 (Fig. 40). RCS-F1의 항바이러스 효과는 바이러스에 대한 damage를 주는 것과, 부분적으로 cell receptor 결합을 저해하는 것으로 판단됨.

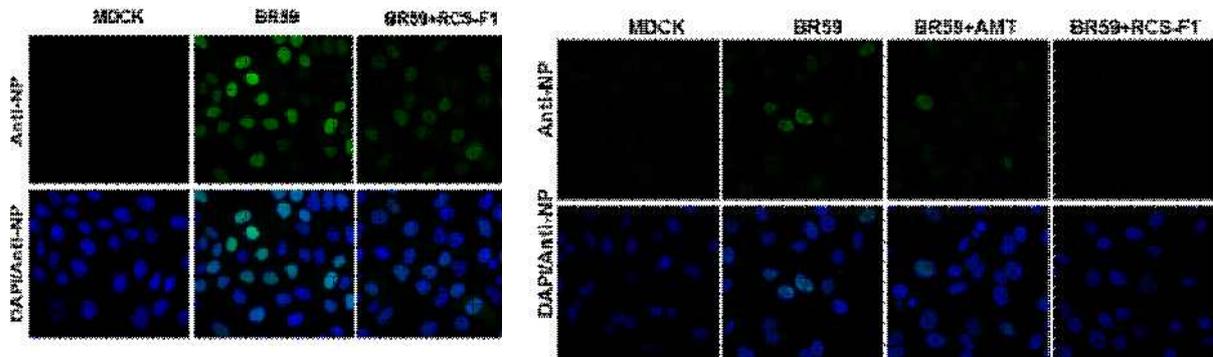


Fig. 39. Influenza virus BR59에 RCS-F1을 pre-treatment(왼쪽), co-treatment(오른쪽)하였을 때, nuclear protein(NP)에 미치는 효과의 images

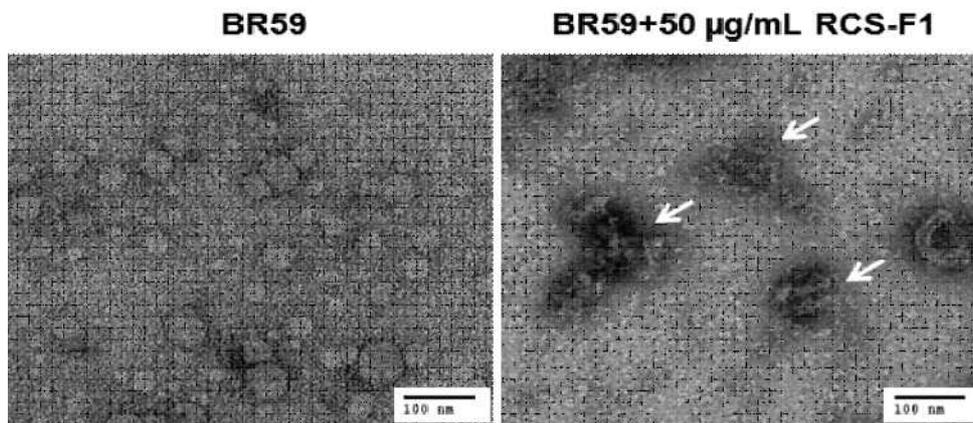


Fig. 40. Influenza virus BR59에 RCS-F1 무첨가(왼쪽) 및 첨가군(오른쪽)의 TEM image

## 5. 항바이러스성 소재의 유효성분 함량 유지를 위한 전처리 연구

### 가. 원료의 표준화 연구

항바이러스용 식품 소재로 활용하고자 하는 복분자부산물(이하, 복분자씨)은 원료복분자를 활용하여 복분자주스를 가공시 발생하는 부산물로서 크기가 5mm 이내의 미립자이고, 복분자씨에 일부 과립이 남아있는 상태로 순수하게 씨만을 분리하기 위하여서는 복분자씨를 건조하여 분쇄공정을 거쳐 분리하는 방법이 이용되고 있다. 이러한 순수건조씨의 분리는 대량 생산을 수행함에 있어서 많은 문제점을 가지고 있는 것으로 나타났다. 따라서 원료의 대량 생산을 위한 원료표준화가 필요한 실정이다.

원료에 함유되어 있는 공유한 성분의 변동을 최소화하여, 생산되는 배치 (batch)에 상관없이 일정한 품질을 유지하기 위해 원재료의 생산에서부터 제조과정 전반에 걸쳐 기능성을 표준화되게 관리하기 위한 지표성분 (marker compound)의 함량 등의 기준을 설정하고자 한다.

**(1) 건조와 생과 복분자씨부산물 시료의 검증**

지금까지는 복분자씨부산물 시료를 건조 및 분쇄 과정을 거치면서 많은 시간과 비용이 소비되었다. 하지만 건조 및 분쇄 과정을 생략할 수 있다면 대량 생산에 용이할 뿐만 아니라 시간과 비용을 절감할 수 있는 효과를 가져올 수 있다. 이러한 이유로 건조한 복분자씨부산물과 생과 상태인 복분자씨부산물의 추출 수율 및 물질의 변화를 확인하였다. (Fig. 41.)

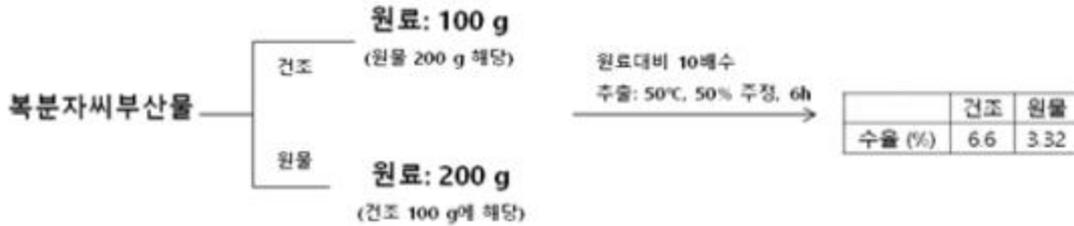


Fig. 41. 건조 복분자씨부산물과 생과 복분자씨부산물의 추출 수율 비교

생과 복분자씨부산물 200 g과 건조 복분자씨부산물 100 g으로 실험을 진행하였다. 그 이유는 생과 복분자씨부산물을 건조하면 약 50%의 수분이 포함되어 있기 때문에 2배의 양을 사용하였다. 추출은 원료대비 10배수의 50% 주정을 사용하였고 추출온도는 50°C, 추출시간은 6시간을 추출 하였고 진공건조기를 이용해 건조하였을 때 건조 복분자씨부산물은 6.6%, 생과 복분자씨부산물은 3.32%가 나왔고 이는 건조 유무에 따라 수율에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단하였다.



Fig.42. HPLC (Waters 2695), PDA(Photodiode array detector, Waters 996) 및 분석용 column

건조와 생과 복분자씨부산물 추출물의 물질 변화를 확인하기 위하여 당사가 보유하고 있는 분석용 HPLC를 이용하여 분석을 실시하였고 시료를 MeOH에 용해시켜 5 µg/ml 농도로 15 µl의 양을 사용하였다. (Fig. 42.)

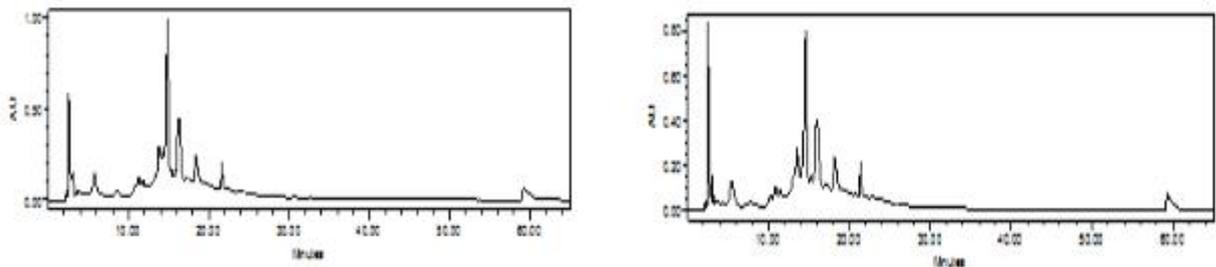


Fig. 43. 건조 복분자씨부산물 (왼쪽)과 생과 복분자씨부산물 (오른쪽)의 HPLC 분석 결과

분석 결과 건조와 생과 복분자씨부산물 모두 같은 pattern의 peak을 확인하였고 이는 건조하지 않은 시료를 사용해도 무방할 것으로 판단을 하였다. 생과 복분자씨부산물 시료를 사용함으로써 시간 및 비용 절감을 기대할 수 있다. (Fig. 43.)

**나. 제조공정 개선연구**

복분자씨로부터 추출한 물질의 항바이러스 효능을 증진시키기 위하여 복분자씨의 주정추출물에 대하여 분리, 정제 공정을 거쳐 항바이러스에 대한 활성 효과를 조사하였다.

**(1) Pilot-scale 수준에서의 복분자씨부산물의 여과 공정 개선**

전 실험에서 문제점이 발견된 여과 공정을 개선하기 위하여 다음과 같은 방법으로 여과를 시행하였다. (Fig. 44.)

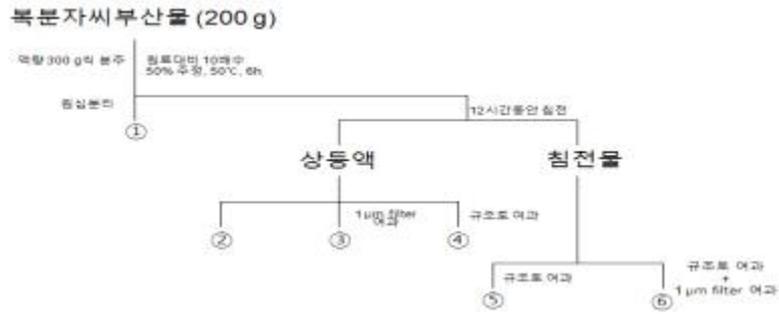


Fig. 44. 복분자씨부산물 시료의 여과 공정 방법

표 .9. 여과 공정에 따른 시료의 TS 측정

여과 조건	TS
1.추출액	0.6733
2.추출액+ 원심분리	0.3659
3.상등액	0.4575
4.상등액+1 μm filter paper 여과	0.3265
5.상등액+규조토 여과	0.4394
6.침전물+규조토 여과	0.4512
7.침전물+규조토 여과+1 μm filter paper 여과	0.3349

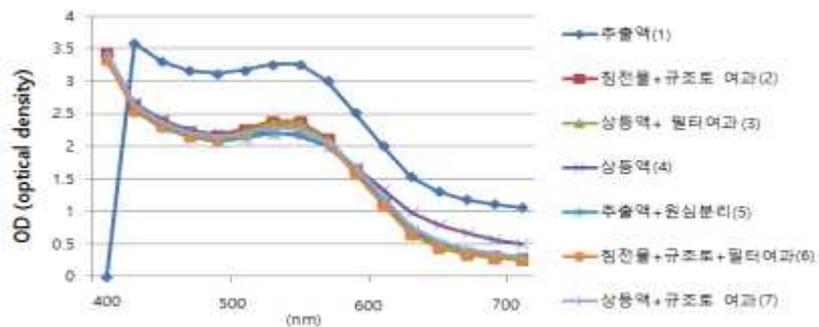


Fig. 45. 여과 공정에 따른 시료의 흡광도 측정

3차 입고된 복분자씨부산물 시료를 원료대비 10대수의 50%주정, 추출 온도 50°C, 6시간 동안 추출하였다. 이후 1차 여과로 120 mesh 체를 이용해 추출액과 박을 분리하였으며 6가지 방법으로 2차 여과를 실시하였다.

①원심분리

②침전물 가라앉힌 후 상등액만 취함

③침전물 가라앉힌 후 상등액만 취함+1  $\mu\text{m}$  filter paper 여과

④침전물 가라앉힌 후 상등액만 취함+규조토 여과

⑤침전물+규조토 여과

⑥침전물+규조토 여과+1  $\mu\text{m}$  filter paper 여과

여과 후 회전감압농축기를 이용하여 농축하였고 여과 정도를 관찰하기 위해 TS 및 흡광도를 측정하였다.

추출액을 1차 여과 후 2차 여과 전 정치시켰을 때 300 ml 샘플 중 약 1/7dl 침전되는 것을 확인하였다. 여과시 원심분리기를 이용하여 여과하였을 때 아주 미량의 가라앉는 물질을 확인할 수 있었다. 규조토 여과는 코팅 여과를 실시하였으며 여과기의 높이는 12.5 cm, 지름 11.5 cm의 유리 여과기에 규조토를 넣고 물로 washing 후 사용하였으며 규조토 여과 및 1  $\mu\text{m}$  filter paper 여과를 하였음에도 불구하고 아무 미량의 침전물이 생기는 것을 확인하였다. 원심분리, 규조토 여과 및 1  $\mu\text{m}$  filter paper 여과시 가라앉는 물질은 이물질이 아니고 아주 미립한 섬유질로 예상이 된다. 또한 온도가 낮아짐에 따라 상등액에서 멍침 현상을 확인하였고 이것은 120 mesh 체에서는 걸리지 않았다.

TS는 상등액을 1  $\mu\text{m}$  filter paper로 여과한 시료가 가장 낮은 값을 보였고 이는 가장 여과가 잘 났다는 것으로 해석할 수 있다. 또한 침전물을 규조토 여과와 1  $\mu\text{m}$  filter paper로 여과하였을 때도 비슷한 값을 얻었는데 이는 1  $\mu\text{m}$  filter paper를 통과시 가장 여과가 잘 된다는 것으로 생각할 수 있다. 흡광도는 400~700 nm 파장에서 측정을 하였고 400~500 nm 부분에서는 서서히 감소하였고 500~550 nm 구간에서는 정체 구간, 550~700 nm에서도 감소 구간을 나타내었다. 흡광도와 TS를 비교하였을 때 흡광도 역시 TS와 마찬가지로 상등액을 1  $\mu\text{m}$  filter paper로 여과한 시료가 가장 낮게 나온 것을 확인하였다. 하지만 침전물을 규조토 여과 과정 없이 1  $\mu\text{m}$  filter paper로 여과시 여과성이 좋지 않았다. 만약 침전물을 버리지 않고 수율을 위해 써야한다면 반드시 규조토 여과 과정을 거쳐야한다. 현장에서 1  $\mu\text{m}$  filter paper를 대체할 cartridge filter는 absolute 5  $\mu\text{m}$  cartridge filter paper를 사용해야 할 것이다. (Fig. 45.)

### (1) RP C<sub>18</sub>-resin을 이용한 복분자 부산물의 분획

앞서 1차년도에서 pilot 설비를 이용하여 생산한 복분자 부산물이 항바이러스 효능 (plaque assay) 결과 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 100% 저해되는 것을 확인하였고, 2 종류의 resin (RP C<sub>18</sub>과 diaion HP-20)을 이용한 분획이 항바이러스 효능에 미치는 영향을 알아보기 위해 복분자 부산물 분말 시료를 이용하여 실험을 실시하였다. 지름 5 cm, 높이가 40 cm인 유리 소재로 된 column에 RP C<sub>18</sub>-resin (Nacalai tesque, Japan) 150 g을 투입하여 100% MeOH부터 80,

60, 40, 20% MeOH을 순차적으로 용매를 흘려 resin을 세척하였다. 이 후 시료 6 g을 MeOH와 dH<sub>2</sub>O를 섞어 완전 용해시킨 후 동량의 resin (6 g)을 넣어 시료를 coating하였다. coating된 시료를 column안의 resin에 올리고 그 위를 탈지면으로 시료가 새나오지 않게 고정하였다. 이후 20, 40, 60, 80, 100% MeOH 각각 1 L씩 흘려 분획하였다 (Fig. 46.) 분획시에는 vacuum liquid chromatography (VLC) 방법을 이용하였으며 기존의 open column보다 빠르게 분획하기 위해 시행하였다.



Fig 4.6. RP-C<sub>18</sub> resin (왼쪽)과 vacuum liquid chromatography (오른쪽)

각각의 분획물 (Fr.1~5)은 감압여과기를 이용하여 일부 건조시켰으며 vial로 옮겨 speed vac을 이용해 시료를 완전 건조하였다. 이후 시료의 무게를 측정하였을 때 20% MeOH에서는 1.72 g, 40% MeOH에서는 0.29 g, 60% MeOH에서는 0.42 g, 80% MeOH에서는 0.85 g, 100% MeOH에서는 0.27 g을 회수하였다. 최종적으로 6 g의 시료를 투입하여 분획하였을 때 3.5 g을 회수하였으며 시료의 회수율은 58.3 %였다. (표 10.)

표 10. RP-C<sub>18</sub> resin을 이용한 복분자 부산물의 분획 결과

원료	sample	추출용매	추출용매량 (ml)	분말 (g)	수율 (%)	원료비율 (%)
6 g	Fr.1	20% MeOH	1000	1.72	28.6	49.1
	Fr.2	40% MeOH		0.29	4.8	8.3
	Fr.3	60% MeOH		0.42	7	12
	Fr.4	80% MeOH		0.85	14.2	24.3
	Fr.5	100% MeOH		0.27	4.5	7.7

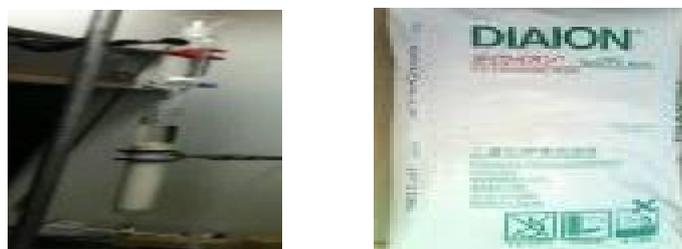


Fig. 47. diaion HP-20 resin (오른쪽)과 chromatography (왼쪽)

(2) Diaion HP-20 resin을 이용한 복분자 부산물의 분획

Pilot 설비를 이용하여 생산한 복분자씨부산물 분말 시료를 이용하여 resin을 이용한 분획시 항바이러스 저해 활성 변화여부를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 지름 5 cm , 높이가 40 cm인 유리 소재로 된 column에 diaion HP-20 (Mitsubishi chemical, Japan) 170 g을 투입하여 100% EtOH부터 70, 30%, 정제수를 순차적으로 흘려 resin을 세척하였다. 이 후 정제수에 5 g의 복분자 부산물 시료를 용해시켜 2.5 ml/min 으로 resin에 흡착시키고 정제수부터 20, 40, 60, 80, 100% EtOH을 각각 1500 ml씩 순차적으로 흘려 분획하였다. (Fig 47.)

분획물을 감압여과기를 이용하여 일부 건조시켰으며 vial로 옮겨 speed vac을 이용해 완전 건조하였가. 시료의 무게를 측정하였을 때 정제수에서 2.8 g, 20% EtOH에서는 0.3 g, 40% EtOH에서는 0.66 g, 60% EtOH에서는 0.22 g, 80% EtOH에서는 0.19 g, 100% EtOH에서는 0.08 g을 얻었다. 최종적으로 5 g의 시료를 투입하여 분획하였을 때 4.2 g을 회수하였으며 회수율은 80 %였다. (표 11 )

표 11. diaion HP-20 resin을 이용한 복분자 부산물의 분획 결과

원료	sample	추출용매	추출용매량 (ml)	분말 (g)	수율 (%)	원료비율 (%)
5 g	Fr.1	H <sub>2</sub> O	1500	2.8	56	66.7
	Fr.2	20% EtOH		0.3	5.9	7.1
	Fr.3	40% EtOH		0.66	13.3	15.7
	Fr.4	60% EtOH		0.22	4.5	5.2
	Fr.5	80% EtOH		0.19	3.7	4.5
	Fr.6	100% EtOH		0.079	1.6	1.9

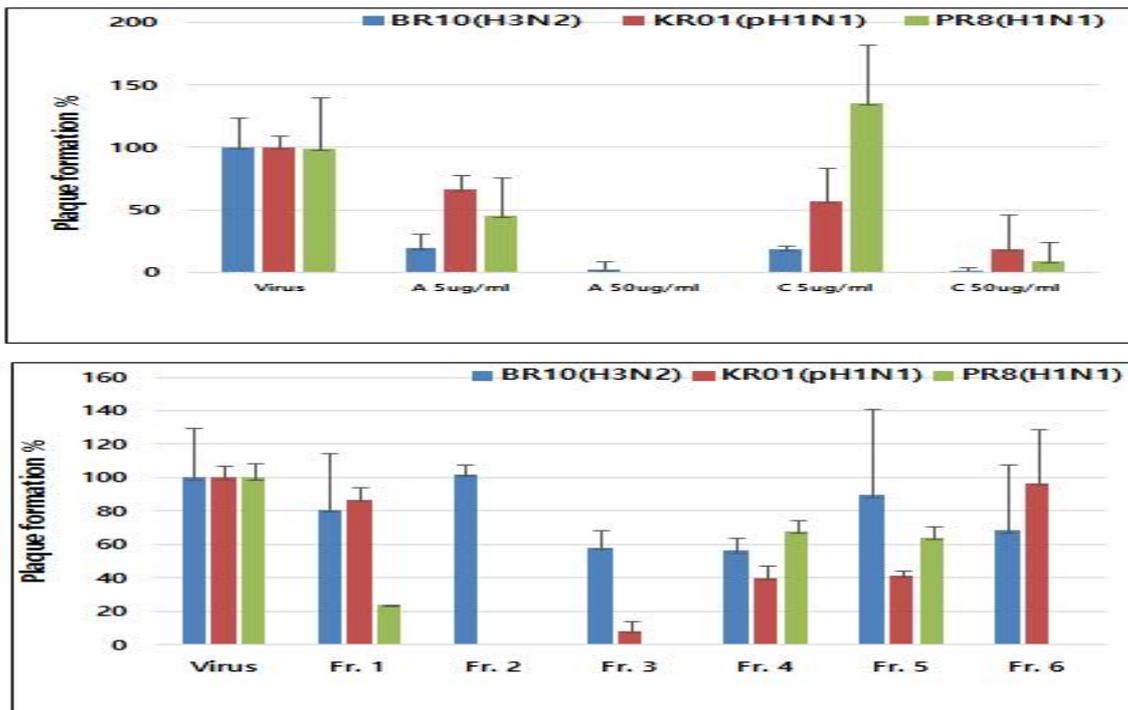


Fig. 48. SD2 (A)와 diaion HP-20 분획 시료 (Fr.1~6)의 plaque assay 결과

두 종류의 resin RP-C<sub>18</sub>과 diaion HP-20을 분획 수율을 비교하였을 때 약 20%의 차이로 diaion HP-20에서 분획 수율이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 또한 문헌 (KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. vol. 41. 2011)에서 diaion HP-20 (다공성 합성흡착제)이 여러 resin에서 회수율을 확인하였을 때 분획 시 가장 높은 수율을 나타낸다고 보고된 바 있다. 따라서 복분자 부산물에서 정제 공정을 실시할 시 resin 비용 및 효율성을 고려하였을 때 diaion HP-20 resin이 효과적이라고 사료된다.

### (3) 복분자 부산물 분획에 대한 항바이러스 효능 분석 결과

Pilot scale-up 시료로 진행한 diaion HP-20 분획물 6가지 시료 (Fr.1~6)를 3종의 influenza virus BR10 (H3N2), KR01 (pH1N1), PR8 (H1N1)에 대한 활성으로 plaque assay 실험을 실시한 결과 50 µg/ml 농도에서 Fr.2에서 KR01과 PR8 virus는 100%, Fr.3에서는 90, 100% plaque 저해 활성을 나타내었다. (Fig. 48.)

1차년도에 추진한 복분자 부산물 (과피+씨, SD2, A)과 비교하였을 때, diaion HP-20으로 분획한 분획물은 SD2보다 같은 농도에서 낮은 저해 활성을 나타내었다. 또한 BR10 (H3N2) virus를 SD2 시료를 같이 MDCK cell에 처리하고 현미경을 통해 cell의 상태를 확인하였다. MDCK cell에 virus만 감염시킨 것과 virus와 SD2 시료를 같이 처리한 것을 비교하였을 때 virus만을 처리하였을 때 cell의 수가 줄어든 반면에 virus와 SD2시료를 같이 처리하였을 때 SD2 시료가 virus를 저해하여 원래의 cell의 모양과 유사한 것을 확인하였으며 이는 SD2가 cell 수준의 실험에서 항바이러스 활성을 나타낸다고 생각된다. (Fig. 49.)



Fig. 49. 복분자 부산물 (SD2, A)로 제조한 시료의 *in vitro* 활성 평가 결과

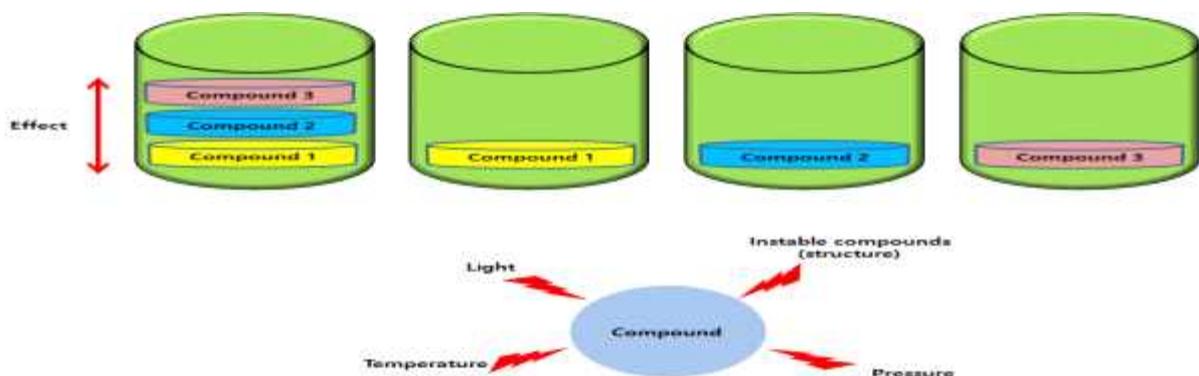


Fig. 50. 복분자 부산물 추출물과 분획물의 활성 차이를 보이는 원인

SD2 시료와 정제과정을 거친 6가지의 시료의 활성을 보이는 이유로서 2가지 이유로 생각할 수 있는데 첫 번째로는 분획 전 복분자 시료에 함유되어 있는 많은 물질들의 synerge 효과로 인해 저해 활성이 높을 수 있다고 생각된다. 두 번째는 분획 전에 안정했던 물질들이 분획 과정 중 활성 물질의 구조 변화나 여러 원인들 (ex. 빛, 온도)에 의해 분해되는 현상이 일어날 수 있어 분획 전의 추출한 복분자씨부산물 시료가 virus의 저해 활성이 높다고 판단된다. (Fig. 50.) 따라서 복분자 부산물에 대하여 분획 및 정제 과정을 거치지 않고 제품화하는 것이 공정 개선과 비용 및 항바이러스 활성 측면에서 유리하다고 사료된다.

**다. 항바이러스용 식품소재의 제조방법**

Lab.과 pilot-scale 수준에서 설정한 복분자 부산물의 추출제조 조건에 따라 당사가 보유하고 있는 1톤 교반추출탱크를 이용하여 제조 공정 후 수율 변화를 알아보기 위하여 복분자 부산물 (과립+씨) 시료 90 kg을 3 batch로 제조하였다. (Fig. 51.)



추출기

농축기

필터프레스

Fig. 51. 복분자씨의 대량생산공정에 따른 제조밸리데이션에 활용한 생산설비

표 12. 항바이러스용 복분자씨추출물의 제조공정별 지표물질의 변화 (Lot SD-BR-001)

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
원재료	복분자씨 90kg		0.1612	90
↓				
투입 및 세척	정제수 540 L	실온		
↓				
추출 및 분리	주정 50% 900 L	추출온도 50℃ 추출시간 6시간 120mesh 망	0.0108	835
↓				
여과	규조도여과 5um-휠타	45℃, 700mmHg	0.0109	801
↓				
농축	감압농축기	45℃, 700mmHg	0.8918	9.64
↓				
건조	진공건조기	inlet temp. 185℃		
↓				
포장	지대포장	1~20kg 등	1.3912	5.83

**(1) 개요**

원료인 복분자씨를 90kg에 50% 주정추출물을 10배수 투입한 다음 50℃, 5시간 추출하여, 120mesh여과, 규조토여과, 5um-막여과를 한다. 여과액을 진공농축기에서 농축한 다음 건조한 분말제품이다.

**(2) 원재료부터 단위공정별 제조방법 설명**

- ①원재료 : 복분자씨(고창군)를 엄선 선별하여 자가품질검사 규격에 적합한 원료를 사용함.
- ②투입 및 세척 : 원료를 칭량저울로 90kg 계량하여 추출탱크에 투입한 후 원료가 침지될 때까지 정제수 6배(540L)로 세척 후 즉시 정제수 제거함.
- ③추출 및 여과 : 복분자씨 원료의 10배인 900L에 해당하는 50% 식용주정을 투입한 다음 추출기 온도를 50℃±5로 가온(50℃ setting)하면서 추출액을 순환하며 6시간 추출을 실시한 후 추출액을 120mesh Screen망으로 분리를 실시함.
- ④여과 및 농축 : 분리된 액을 1차 규조토를 첨가하여 필터프레스로 여과한 후 5um-카트리지를 사용하여 최종 여과한다.
- ⑤농축 : 여과한 액은 감압농축기 700mmHg 압력으로 45℃에서 4~6시간 동안 농축을 실시함.
- ⑥건조: 정제 농축액을 진공건조기 또는 분무건조기를 이용하여 건조를 실시함. (분무건조 조건 Inlet-temp.:185~210℃, Outlet temp.:85~98℃)
- ⑦포장: 자가품질검사 결과 적합한 제품에 한하여 1~20kg 단위로 포장규격에 맞게 포장함.

표 13. 항바이러스용 복분자씨추출물의 제조공정별 지표물질의 변화 (Lot SD-BR-002)

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
원재료	복분자씨 90kg		0.1612	90
↓				
투입 및 세척	정제수 540 L	실온		
↓				
추출 및 분리	주정 50% 900 L	추출온도 50 ℃ 추출시간 6시간 120mesh 망	0.01341	825
↓				
여과	규조토여과 5um-휠타	45℃, 700mmHg	0.01384	794
↓				
농축	감압농축기	45℃, 700mmHg	0.9857	9.38
↓				
건조	진공건조기	inlet temp. 185℃		
↓				
포장	지대포장	1~20kg 등	1.4008	6.4

표 14. 항바이러스용 복분자씨추출물의 제조공정별 지표물질의 변화 (Lot SD-BR-003)

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
원재료	복분자씨 90kg		0.1612	90
↓				
투입 및 세척	정제수 540 L	실온		
↓				
추출 및 분리	주정 50% 900 L	추출온도 50 °C 추출시간 6시간 120mesh 망	0.0109	825
↓				
여과	규조토여과 5um-휠타	45°C, 700mmHg	0.0114	801
↓				
농축	감압농축기	45°C, 700mmHg	0.9412	9.67
↓				
건조	진공건조기	inlet temp. 185°C		
↓				
포장	지대포장	1~20kg 등	1.4097	6.44



Fig. 52. 복분자씨 (씨+과립), 복분자씨여과액 및 복분자씨추출분말

라. 복분자씨추출물의 지표물질의 설정시험

(1) 복분자 부산물의 지표물질 탐색을 위한 분획, 정제 및 구조동정

(가) 복분자 부산물의 분획

복분자 부산물 추출분말에서 지표물질 설정을 수행하기 위하여 RP-C<sub>18</sub> resin (Nacalai

tesque, Japan)을 이용하여 분획을 실시하였다. 분획은 시료 40 g을 dH<sub>2</sub>O과 MeOH을 이용하여 완전히 용해 후 동량의 C<sub>18</sub> resin을 넣어 dH<sub>2</sub>O과 MeOH를 감압여과기를 이용하여 완전히 건조하여 coating하였다. 지름 5 cm , 높이가 40 cm인 유리 소재로 된 column을 사용하였으며 sample (80 g, 복분자씨부산물 추출분말 40 g + resin 40 g)의 5배인 400 g의 resin을 채워 100%, 50%, 20% MeOH 순으로 흘러 washing하였다. Sample을 Coating 후 column 안에 resin 위에 올리고 탈지면으로 sample이 새나가지 않게 고정시켜 용매 농도별로 분획을 실시하였으며 상대적으로 극성인 20% MeOH 용매부터 40%, 60% MeOH는 각각 1 L씩 3회, 80%, 100% MeOH은 각각 1 L씩 2회를 순차적으로 VLC (vacuum liquid chromatography) 방법으로 수행하였다.

총 13가지의 Fraction으로 나누었고 이것을 그룹핑하기 위하여 RP-TLC plate (TLC silica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S-glass, Merck)을 사용하여 실시하였다. RP-TLC 조건은 분획물마다 용매 조건이 다르기 때문에 크게 두 가지 조건을 설정하였으며 Fr.1~9까지 60% MeOH, Fr.9~13까지는 85% MeOH을 이용하여 각각 전개하였다. RP-TLC는 각각의 시료를 약 1 mg씩 EP tube로 옮겨 건조시키고 10 mg/ml 농도로 시료를 제작하여 RP-TLC에 spot을 형성하여 전개하였다. (Fig. 53.)

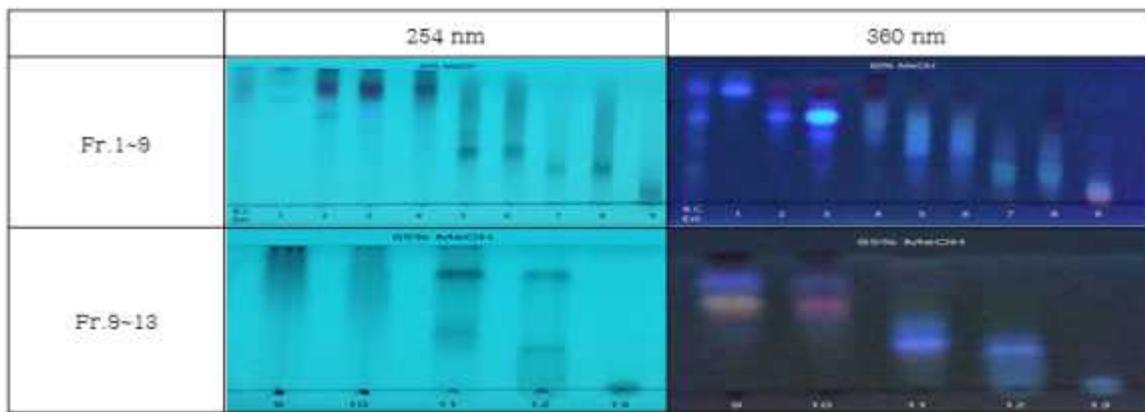
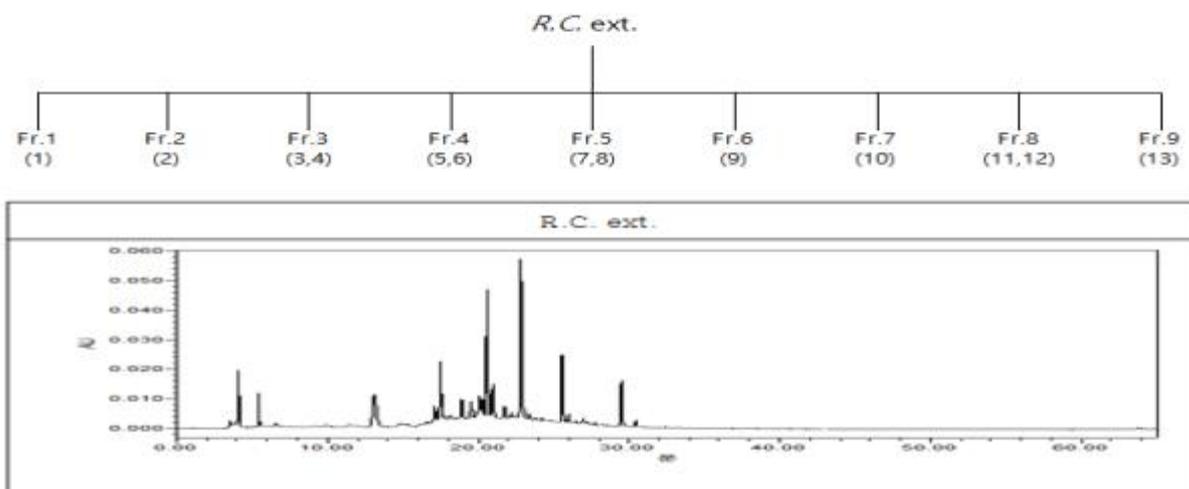


Fig. 53.복분자씨부산물 추출분말의 분획물에 대한 RP-TLC profile



-Fig. 54. 복분자씨추출분말 분획물에 대한 scheme과 분석용 HPLC spectrum

RP-TLC는 254 nm와 360 nm 파장에서 관찰하였으며 전개된 TLC plate을 확인한 결과 Fr.3과 4, 5와 6, 7과 8, 11과 12 분획물들이 유사한 패턴을 띄는 분획으로 판단하였고 이 분획들을 그룹화하였었다. 분획들을 한 vial에 모아 건조를 하였으며 최종적으로 9개의 fraction으로 나누었다.

표 15. 분석용 HPLC 분석조건

Parameters	Conditions
HPLC model	waters 2695 separation module
Column	shiseido capcell pak C18 UG 120 (5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)
Column temperature	30°C
Flow rate	0.7 ml/min
Injection	10 mg/ml, 10 $\mu$ l
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O
	B: acetonitrile

	time (min)	A (%)	B (%)
Gradient	0	90	10
	5	90	10
	50	0	100
	60	0	100
	65	90	10

Detector	Conditions
	waters 996 photodiode array (254 nm)

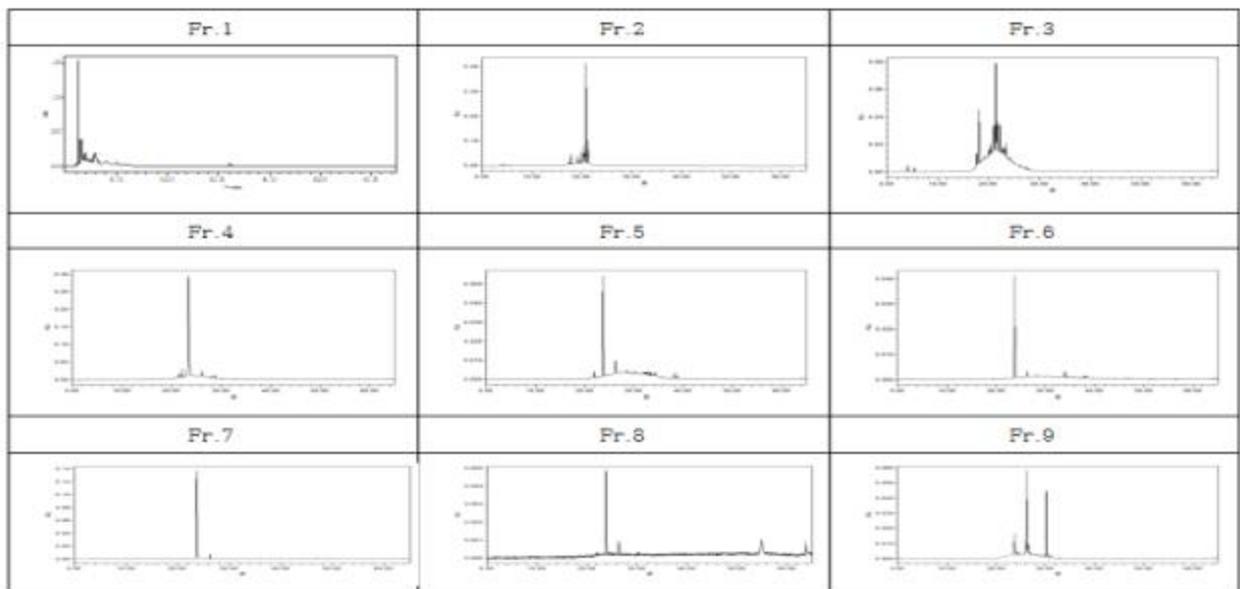


Fig. 55. 복분자 부산물 추출분말의 분획물에 대한 분석용 HPLC spectrum profiles

복분자 부산물 추출물과 분획물 fr.1~9을 차례대로 분석하였다. 분석은 waters 분석용 HPLC을 이용하였고 254 nm에서 흡수되는 파장의 spectrum을 표시하였다. 분석 조건은 유속 0.7 ml/min, injection 농도를 10 mg/ml, 10  $\mu$ l로 하였고 5분에서 50분까지 10% 아세토나이트릴 (acetonitrile, ACN)에서 100% ACN의 기울기(gradient)로 분석하였으며 10분간

100% ACN으로 세척하였다. detector는 PDA (photodiode array)로 확인하였고 254 nm 파장에서 관찰하였다. 분석 결과 대부분의 분획물에서 동일한 물질을 확인하였고 이는 복분자 부산물에서 주요 물질로 사료된다. (Fig. 54, 55.)

**(나) 복분자 부산물의 지표물질 정제**

복분자 부산물 추출분말에서 항바이러스 활성을 가지는 지표물질을 분리하기 위하여 semi-prep.용 HPLC를 이용하여 분리하였다. (Fig. 56.) 분리 조건은 semi-prep용 column (10 x 250 mm)을 이용하여 분리하였고 분리 조건은 유속 2 ml/min에서, injection 농도를 30 mg/ml, 30  $\mu$ l로 injection 하였으며, 0분에서 40분까지 23% ACN 등용리 (isocratic)로 분리하였고 40분부터 45분까지는 23%에서 100%로 45분부터 60분까지 세척 과정으로 분리를 진행하였다. 아래 spectrum과 같이 fr.4-1~3의 compound를 분리하였으며 fr.4-4 은 세척하여 보관하였다. (Fig. 57.)

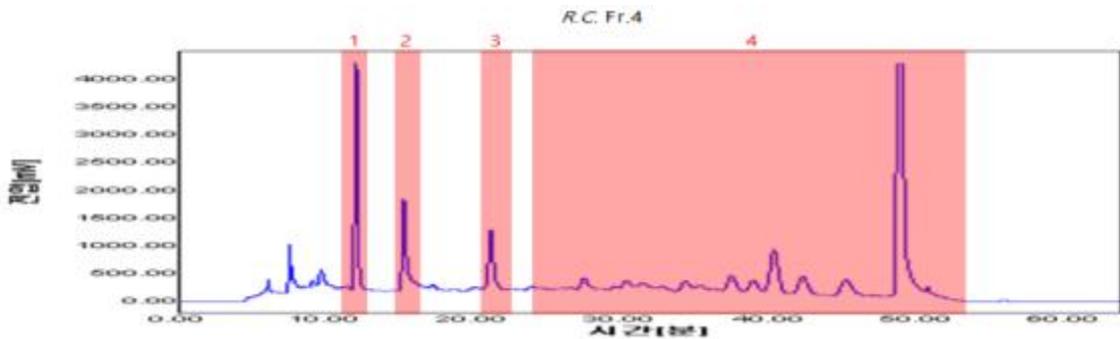


Fig. 56. 복분자 부산물 추출분말의 Fr.4에 대한 Prep.용 HPLC spectrum  
표 16. Prep.용 HPLC 분리조건

Parameters	Conditions
HPLC model	영린 ACME 9000
Column	YMC pak ODS C-18 (5 $\mu$ m, 10 x 250 mm)
Column temp.	30°C
Flow rate	2 ml/min
Injection	30 mg/ml, 30 $\mu$ l
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O B: acetonitrile
	time (min)      A (%)      B (%)
	0                    77                23
	40                   77                23
Gradient	45                   0                 100
	55                   0                 100
	60                   77                23
Detector	UV/Vis detector (254 nm)

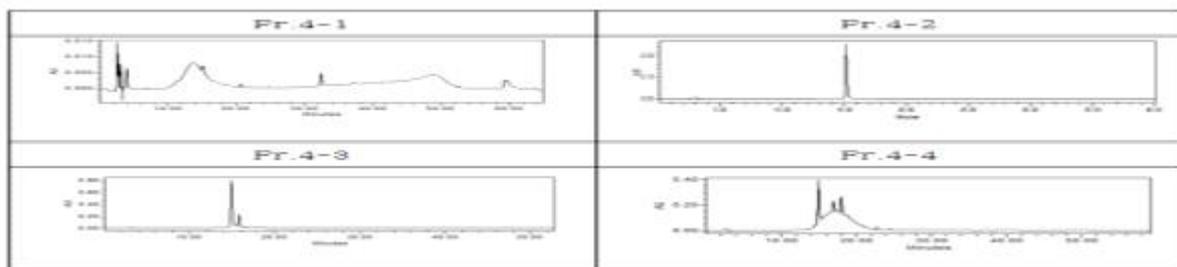


Fig.57. 복분자 부산물 추출 분말의 Fr.4-1~4에 대한 분석용 HPLC spectrum profiles

Fr.4-1에서는 대부분의 물질이 10분 이전에 모두 나왔고 13분 대에 있는 peak은 끌립현상이 생기는 것을 확인하였다. 따라서 acid (formic acid or trifluoroacetic acid)을 이용하거나 column을 교환하여 분리를 진행하고자 하였으나 분리 및 확인이 용이한 Fr. 4-2와 4-3을 분리하기로 하였다. Fr.4-2은 단일 물질로 확인되고 255, 354.9 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. Fr.4-3은 2가지 물질이 있는 것을 확인하였고 2가지 물질이 가까이 붙어 있기 때문에 정제가 쉽지는 않았지만 이동상의 dH<sub>2</sub>O의 양을 늘려 peak을 벌어지게 한 뒤 분리를 진행하였다.

**(다) 복분자 부산물의 분리된 단일물질 분석 및 구조동정**

Prep. HPLC로 정제한 Fr.4-2, Fr.4-3, Fr.5에 대하여 LC/MS를 측정하였다. LC/MS를 측정한 이유는 기존의 덕성여대에서 1차년도에 분석한 지표물질 trans-ferulic acid, rutin, quercetin, p-coumaric acid, myricetin, gallic acid, ellagic acid, EGCG, cyanidin-3-rutinoside, chlorogenic acid, cyanidin-3-o-glucoside, 3,4-dihydroxybenzoic acid, catechin, resveratrol, caffeic acid와 한국생명공학연구원 의 천연물의약연구소에서 보유한 지표물질과 비교하여 빠르게 지표물질을 찾고자 실시하였다.

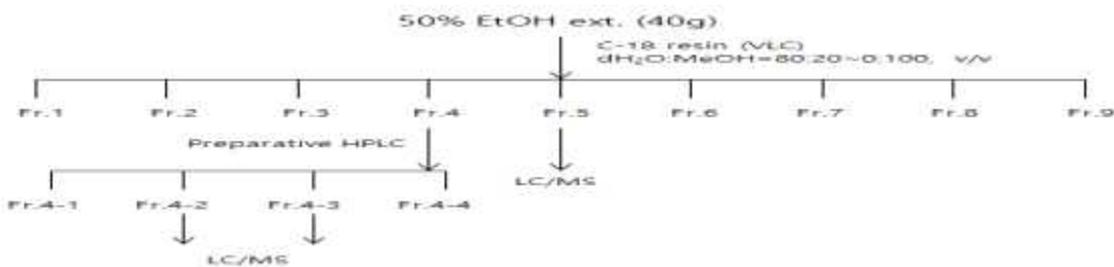


Fig. 58. 복분자 부산물로부터 3가지 정제 물질 분리 및 정제 scheme

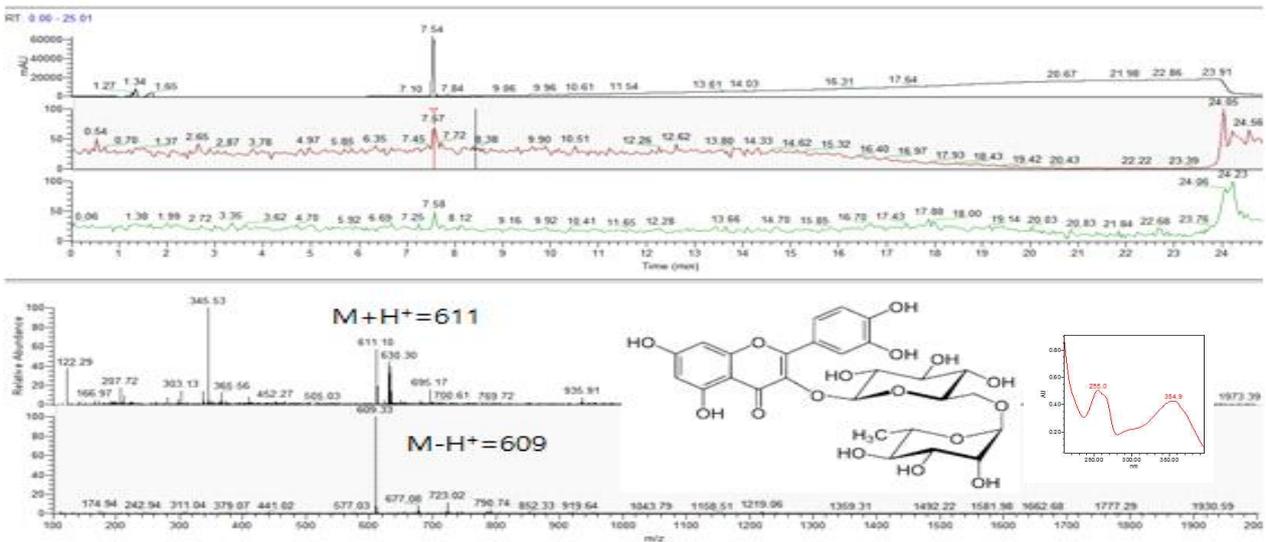


Fig. 59. fr.4-2의 LC/MS data, 구조 및 UV spectrum

복분자 부산물로부터 분리된 Fr.4-2의 UV spectrum은 255 nm와 354.9 nm에서 최대 흡수광을 나타내었다. LC/MS positive mode에서 H<sup>+</sup> ion이 결합되어 있었고 분자량이 m/z =

611 [M+H]<sup>+</sup>로 확인하였다. 또한 negative mode에서 H<sup>+</sup> ion이 결합되어 있었고 분자량이 m/z = 609 [M-H]<sup>-</sup>로 확인되었다. 따라서 이 물질의 분자량은 m/z = 610 으로 동정하였고 rutin과 분자량이 일치하였으며 위와 같은 구조로 동정하였다. (Fig. 59.)

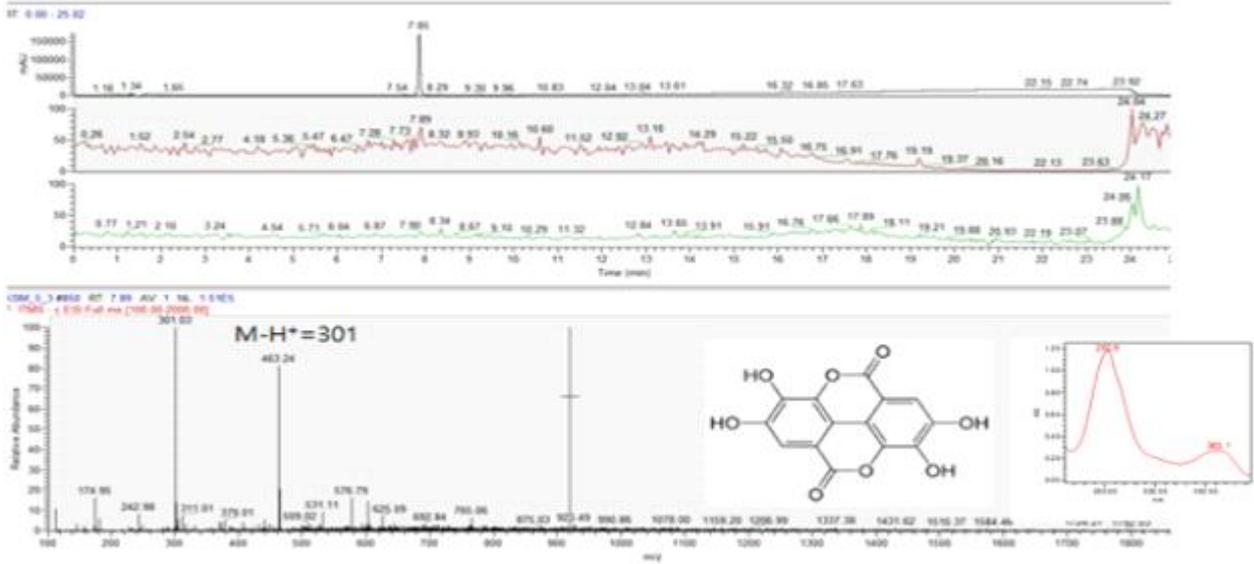


Fig.60. fr.4-3의 LC/MS data, 구조 및 UV spectrum

Fr.4-3의 UV spectrum은 252.6 nm와 362.2 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었으며 362.2 nm보다 252.6 nm에서 더 큰 흡수파장을 나타내었다. LC/MS positive mode에서는 이온화가 일어나지 않아 확인이 불가능하였으나 negative mode에서 H<sup>+</sup> ion이 결합되어 있었고 분자량이 m/z = 301 [M-H]<sup>+</sup>로 확인되었다. 따라서 이 물질의 분자량은 m/z = 302이며 ellagic acid로 구조 동정을 하였다. 대부분의 fraction에서 나타나는 물질로 복분자씨부산물 추출물에서는 가장 양이 많았고 문헌 (Food Eng. Prog., Vol. 18, No. 4, pp. 1~4)에서도 분석법 설정과 분석법 validation을 실시하여 ellagic acid가 차후 분석시 확인이 용이할 것으로 사료된다. (Fig. 60.)

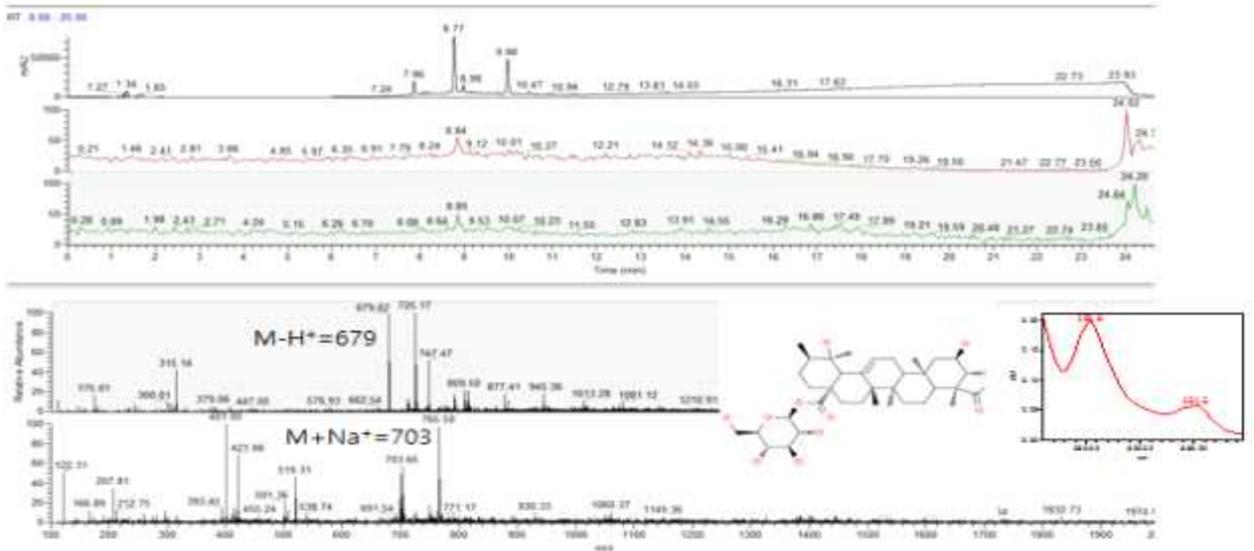


Fig.61. Fr.5의 LC/MS data, 구조 및 UV spectrum

표 17. LC/MS 분석조건

Parameters	Conditions																		
Desolvation gas	N <sub>2</sub>																		
Source voltage	+ 5 Kv																		
Capillary voltage	+ 18 V																		
Entrance capillary temperature	275°C																		
Tube lens voltage	+ 120°C																		
Mobile phase	positive																		
m/z range	100~1500 Da																		
Menu driven software	Xcalibur system (Ver. 2.2)																		
Parameters	Conditions																		
HPLC model	Thermo ultimate 3000																		
Column	waters HSS T3 column (2.1 × 150 mm, 2.5 μm)																		
Column temperature	30°C																		
Flow rate	0.3 ml/min																		
Injection	0.1 mg/ml, 2 μl																		
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O (0.1% formic acid) B: acetonitrile (0.1% formic acid)																		
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>21.5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	time (min)	A (%)	B (%)	0	95	5	15	0	100	20	0	100	21.5	95	5	25	95	5
time (min)	A (%)	B (%)																	
0	95	5																	
15	0	100																	
20	0	100																	
21.5	95	5																	
25	95	5																	
Detector	UV detector (254 nm)																		

Fr.5의 UV spectrum은 253.8 nm와 352.5 nm에서 최대 흡수과장을 나타내었다. LC/MS positive mode에서는 Na<sup>+</sup> ion이 결합되어 있었고 분자량이 m/z = 703 [M+Na<sup>+</sup>] 으로 확인하였다. Negative mode에서 H<sup>+</sup> ion이 결합되어 있었고 분자량이 m/z = 679 [M-H<sup>+</sup>]로 확인되었다. 따라서 이 물질의 분자량은 m/z = 680로 동정하였으며 이 물질은 한국생명공학연구원 구원에서 분석한 saponin 계열의 suavissimoside R1과 분자량이 일치하였으며 위와 같은 구조로 동정하였다. (Fig. 61.) 최종적으로 정제 단계에서 분리한 3종 (rutin, ellagic acid, suavissimoside R1) 중 함량이 가장 많은 ellagic acid를 지표물질로 선정하였다.

**(2) 복분자씨추출물의 지표물질 시험법 적합성 검토**

복분자 부산물에서 지표물질로 선정한 ellagic acid 분석은 분석용 HPLC를 이용하였으며 이동상으로는 0.05% phosphoric acid가 포함된 dH<sub>2</sub>O와 HPLC grade MeOH을 사용하였다. column은 shiseido capcell pak C18 UG 120 (5 μm, 4.2 x 250 mm)을 사용하였으며 각각의 batch에서 추출액, 여과액, 농축액, 분말 시료를 1 mg/ml 농도로 맞춰 제조하였고 10 μl을 injection, 유속은 1 ml/min으로 실시하였다. 표준원액 1 mg/ml을 제조하였고 MeOH로 희석하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 μg/ml 농도가 되도록 표준용액을 제조하였다. 복분자 부산물에 많은 물질 중 ellagic acid만을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는지를 확인하기 위해 ellagic acid 표준물질 (sigma, USA)과 비교하였을 때 retention time이 약 12분대에 검출되어 동일 물질임을 확인하였으며 복분자 부산물에서 다른 peak과 분리됨을 확인하였다. (Fig. 62.)

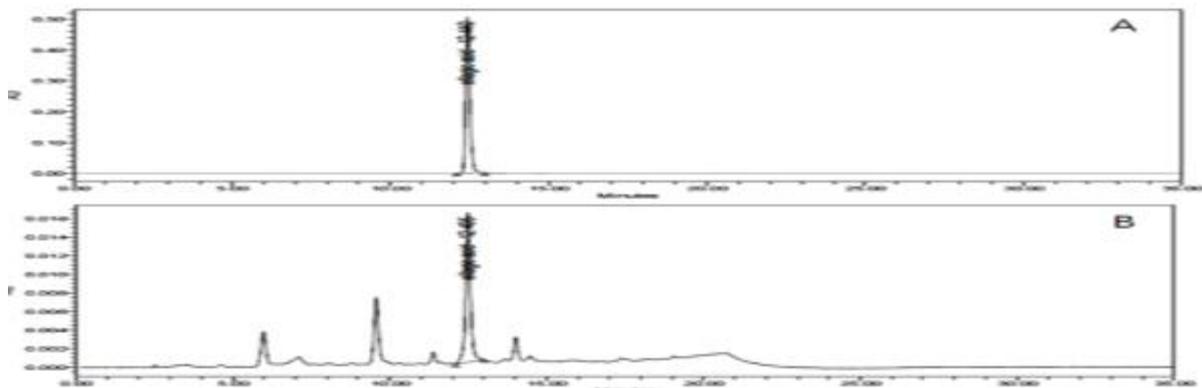


Fig. 62. ellagic acid의 표준물질(A)와 복분자 부산물 시료(B)

표 18. 분석용 HPLC 분석 조건

Parameters	Conditions		
HPLC model	waters 2695 separation module		
Column	shiseido capcell pak C18 UG 120 (5 $\mu$ m, 4.2 x 250 mm)		
Column temperature	30°C		
Flow rate	1.0 ml/min		
Injection	1 mg/ml, 10 $\mu$ l		
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O (0.05% phosphoric acid)		
	B: methanol		
Gradient	time (min)	A (%)	B (%)
	0	70	30
	8.5	65	35
	12	55	45
	15	45	55
	18	30	70
Detector	waters 996 photodiode array (254 nm)		

또한 직선성 및 검출, 정량한계를 알아보기 위하여 검체 중 일정 농도 범위에 있는 ellagic acid의 양에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지를 확인하기 위하여 ellagic acid 표준물질의 직선성을 평가하였다. 표준 검량선은 6.25-200  $\mu$ g/ml 농도에서 상관계수( $R^2$ )가 0.9999로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 0.6  $\mu$ g/ml, 정량한계는 1.9  $\mu$ g/ml이었다. 이는 시료에 적용할 경우 검출한계는 0.6  $\mu$ g/ml 수준까지 검출이 가능하고, 정량한계는 1.9  $\mu$ g/ml 수준까지 정량할 수 있는 분석 물질의 최저 농도를 의미한다. 앞의 문헌에서 ellagic acid 분석방법의 검증에서  $R^2$ 은 0.99998이었고, 검출한계와 정량한계가 각각 0.66  $\mu$ g/ml, 2.40  $\mu$ g/ml로 본 시험법이 검출한계와 정량한계 모두 낮은 수준까지 분석이 가능하여 지표성분 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증하였다. (Fig. 63.)

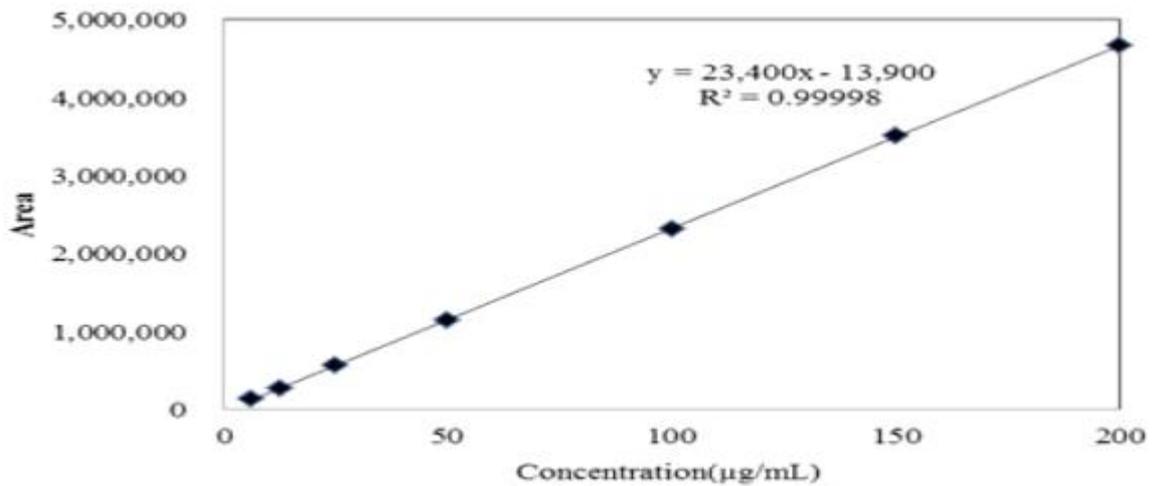


Fig. 63. ellagic acid 표준물질의 calibration curve

회수율과 정밀성을 확인하기 위하여 일정 양을 시료에 넣은 후 분석에 의해 회수되는 양을 확인하였다. (표 19.) ellagic acid의 회수율은 4.25 µg/ml 농도에서 97~100%, 8.5 µg/ml 농도에서 96~98%, 17 µg/ml 농도에서 89~95%의 범위의 회수율을 보였다. 문헌 (J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. Vol. 41, pp: 1554~1558)에서의 ellagic acid 분석방법 검증에서 89~97%의 회수율을 얻어 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

표 19. 농도별 ellagic acid의 회수율 검증 결과

Concentration (µg/ml)	Recovery (%)	
	Mean±SD	RSD
4.25	100.22±0.75	1.44
	98.54±3.53	3.62
	97.89±3.52	2.68
8.5	98.07±2.3	2.35
	97.58±2.21	2.39
	97.01±1.84	1.93
17	95.01±3.01	3.24
	93.19±2.13	2.44
	89.02±4.87	5.16

\*RSD: relative standard deviation

하나의 균일한 시료로부터 여러번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 반복 분석하였을 때, 분석물질에 대한 각각 측정치간의 근접성을 확인하였다. 반복성은 1일 3회로 나누어 일내 분석(inter-day)을 시행하였으며, 재현성은 1일 3회로 3일 동안 반복하여 일간 분석(intra-day)을 진행하였다. 재현성과 반복성의 정밀도 (RSD)를 측정한 결과 inter-day의 정밀도는 0.28~1.96%, intra-day의 정밀도는 0.69~2.49%이었다. (표 20)

표 20. ellagic acid의 정밀성 검증 결과

	precision(%)	
	Mean±SD (mg/g)	RSD (%)
Inter-day	9.02±0.03	0.28
	9.03±0.14	1.55
	9.07±0.12	1.32
	9.09±0.16	1.76
	8.57±0.08	0.93
	8.69±0.17	1.96
	8.48±0.14	1.65
	8.60±0.16	1.86
	8.90±0.12	1.35
	8.88±0.1	1.13
Intra-day	8.75±0.16	1.18
	8.73±0.07	0.8
	8.45±0.21	2.49
	8.08±0.18	2.23
	8.4±0.16	1.19
	8.69±0.06	0.69
	8.8±0.09	1.02
	8.92±0.12	1.35

\*Inter-day: one time analysis of ellagic acid per day for 3 days

\*Intra-day: three times per day

최종적으로 ellagic acid의 분석법을 확립하고 분석법에 대하여 특이성, 직선성 및 검출, 정량한계, 정확성, 정밀성, 회수율에 대하여 확인하였다. ellagic acid의 검량선은 R<sup>2</sup>은 0.99998으로 좋은 선형성을 보였고 검출한계와 정량한계가 각각 0.66 µg/ml, 2.40 µg/ml였다. 또한 복분자 부산물 내의 ellagic acid 함량은 최종 분말상태에서 3 lot 평균 1.4 mg/g (0.14%)이었다. 일간와 일내 분석에서 상대표준편차 (RSD)는 각각 1.96, 2.49% 미만으로 나왔으며, 회수율 측정결과에서는 4.25 µg/ml 농도에서 97~100%, 8.5 µg/ml 농도에서 96~98%, 17 µg/ml 농도에서 89~95%의 범위의 회수율을 보였고 RSD는 1.44~5.16%였다. 이상 결과를 토대로 복분자 부산물의 유효성검증을 통하여 복분자 부산물의 건강기능식품 기능성 원료로 인증받기 위한 지표물질로서 적합하다는 것을 확인하였다.

## 6. 항인플루엔자 식품 소재 대량생산 기반 기술 확립

### 가. 유해물질에 대한 규격기준 설정 시험

복분자 부산물 시료에 대한 유해물질 규격기준 설정을 위하여 식품의약품안전처에서 지정한 한국건강기능협회 산하 식품연구원에서 복분자씨추출물에 대하여 성상, 세균수, 대장균군, 유해중금속(납, 비소, 카드뮴, 총수은) 및 58종의 잔류농약검사를 실시하였고 결과는 표.13.와 같다.

표 21. 복분자 부산물 (과육+씨) 시료에 대한 기준규격 설정 결과

항목	분석치	허용기준	규격기준
성상	적자색분말		적자색분말
중금속	납 (mg/g)	0.1249	5
	비소 (mg/g)	1.1016	3
	카드뮴 (mg/g)	0.0268	0.3
	총수은 (mg/g)	0.002	0.2
일반세균수 (cfu/g 이하)	불검출		1000 이하
대장균군	음성		음성

\*검사기관 : 한국건강기능식품협회 식품연구원

복분자 부산물 시료의 성상은 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 적자색 분말로 일반세균에서 불검출, 대장균군에서 음성 결과로 확인되었다. 또한 중금속에서는 납, 비소, 카드뮴, 수은이 각각 0.1249, 1.1016, 0.0268, 0.002 mg/kg으로 식품의약품안전처의 허용기준보다 낮은 수치가 검출되었다.

표 22. 항바이러스용 복분자씨추출물의 잔류농약 분석결과

항목	분석치	허용기준치	비고	
잔류농약 58종	methoxyfenozide	0.0174	생과 1.0, 건조 6.0	적합
	boscalid	0.025	5	적합
	azoxystrobin	0.0047	3	적합
	flubendiamide	0.0018	0.05	적합
	pyraclostrobin	0.009	1	적합
	나머지	불검출		적합

\*검사기관 : 한국건강기능식품협회 식품연구원

Fig. 64. 성상, 일반세균, 대장균군, 중금속 및 잔류농약 (58종)에 대한 검사성적서

또 규격기준 이외의 성분인 수입식품 58종의 잔류농약 분석에서 methoxyfenozide, boscalid, azoxystrobin, flubendiamide, pyraclostrobin 5종이 검출되었으나 각각 0.0174, 0.025, 0.0047, 0.0018, 0.009 mg/kg으로 잔류농약 허용기준치 이하로 식품원료로서 적합한 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 항바이러스용 복분자씨추출물은 미생물, 중금속 및 잔류농약에 대하여 안전성이 검증되었으며 식품 소재로서의 이용이 가능하다고 판단되었다.

**나. 복분자 부산물(과육+씨)과 복분자씨 (분쇄) 시료에 대한 영양성분 분석**

복분자 부산물 (과육+씨)과 복분자씨 (분쇄) 시료를 식품의약품안전처에서 지정한 건국대학교 바이오식의약연구센터에서 9대 영양성분 (나트륨, 단백질, 당류, 열량, 조지방, 콜레스테롤, 탄수화물, 트랜스지방, 포화지방)분석의뢰를 실시하였고 결과는 다음과 같다. (표 23.)

복분자 부산물과 복분자씨를 비교하였을 때 당류, 콜레스테롤, 트랜스지방 및 포화지방은 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 복분자씨부산물의 나트륨, 단백질, 탄수화물의 함량은 복분자씨보다 각각 307, 13.6, 11.2 % 높은 수치를 나타내었으며 반대로 복분자씨의 열량, 조지방의 함량은 복분자씨부산물보다 각각 11.3, 650% 높은 수치를 나타내었다.

표 23. 복분자 부산물 (과육+씨)과 복분자씨 (분쇄) 시료 9대 영양성분 분석 결과

기준	나트륨	단백질	당류	열량	조지방	콜레스테롤	탄수화물	트랜스지방	포화지방
	mg/100 g	g/100 g	g/100 g	Kcal/100 g	g/100 g	기준없음	g/100 g	기준없음	g/100 g
복분자 부산물 (과육+씨)	6.32	11.81	1.59	397.85	2.13	불검출	82.86	0	0.04
복분자씨 (분쇄)	2.06	8.68	1.63	450.74	13.42	불검출	73.81	0.01	0.04
영양소 기준치 (%)	0	21	-	-	4	0	25	-	0

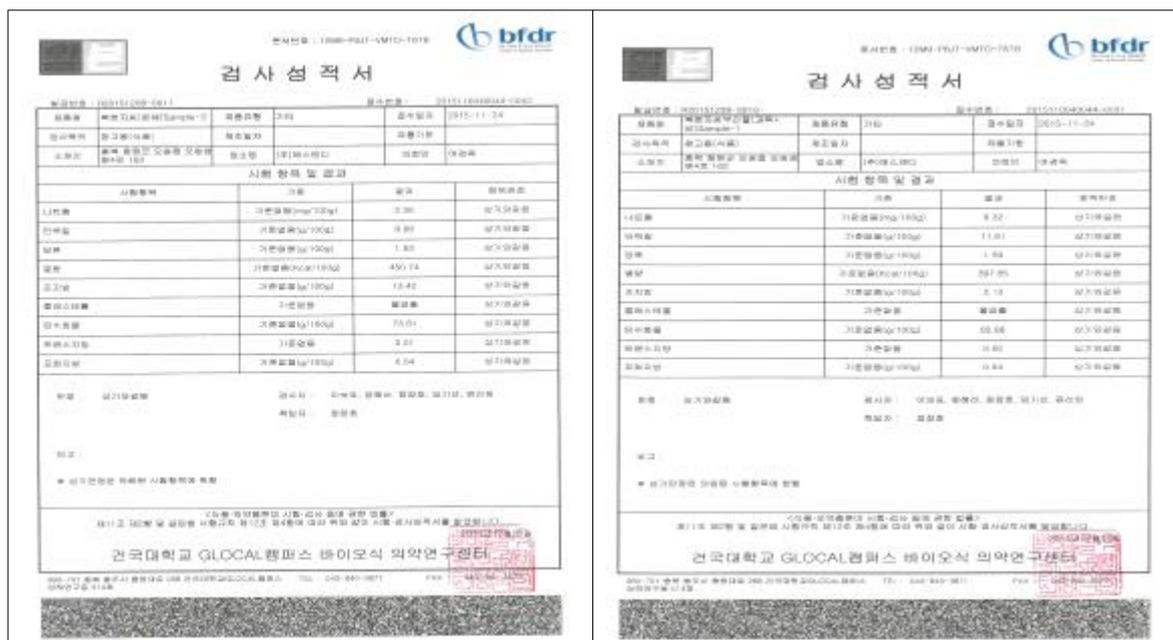


Fig. 65. 복분자 부산물 (씨+과육)의 9대 영양소 검사성적서

다. 복분자 부산물의 식품 안전성 자료 확보

(1) 기능성식품으로서 의사결정도

기능성원료에 대한 의사결정도는 처음 International Life Science Institute (ILSI) 유럽지부에 의해 제안되었다 (Kroes and Walker, 2004; Schilter et al., 2003). 여기에서는 원재료 또는 원료의 안전한 섭취 경험, 제조 또는 가공의 복잡성, 알려진 부작용 정보, 기존 섭취량과의 비교 등에 의해 독성 평가의 필요성이 달라지는 것을 인지하고 예상되는 노출량에 따라 달라지는 위해도 평가가 필요할 것으로 주장하며 이러한 과정을 검토할 수 있는 의사결정도를 제시하였다. 의사결정도는 섭취근거, 제조방법, 부작용 유무와 섭취량에 따라 안전성 평가 자료 요구도가 달라지고, 전통적 독성시험 자료 이외의 자료를 안전성 확보에 이용할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

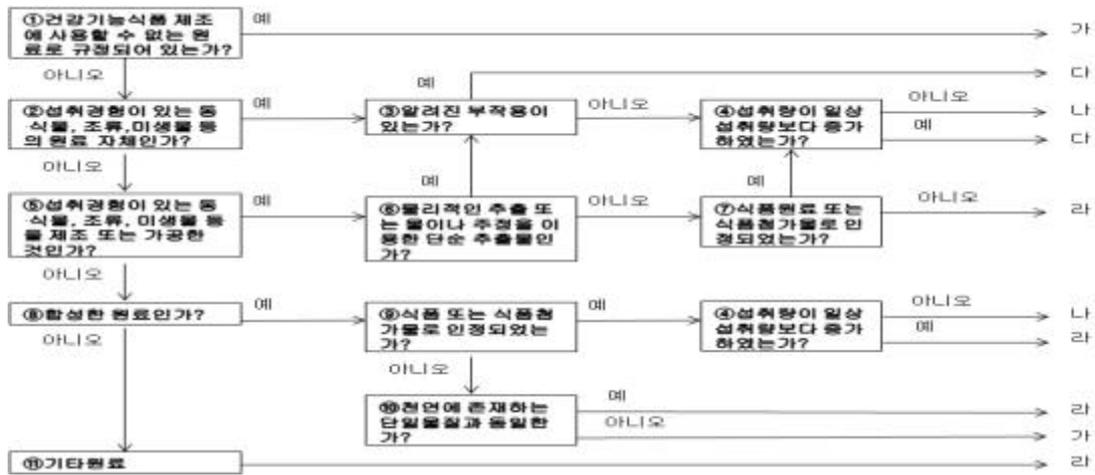


Fig. 66. 기능성원료에 대한 의사결정도

표 24. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 자료제출 범위 결정을 위한 의사결정도

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료		√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료		√	√	√
섭취량평가자료		√	√	√
영양평가자료, 생물학적 유용성자료, 인체적용시험자료			√	√
독성시험자료				√

표 25. 복분자를 이용한 건강기능성 식품 현황

구 분	복분자추출분말	복분자추출물
기 능 성	간 건강 간 건강에 도움	항산화 항산화에 도움
인정번호	제2006-24호	제2010-62호
인정등급	생리활성기능 2등급	생리활성기능 3등급
기능(지표)성분	ellagic acid	ellagic acid
일일섭취량	복분자추출분말로써 3,150 mg/day	-
주의사항	.	어린이, 임산부 및 수유부 섭취 주의

**(나) 복분자씨 원료의 식품사용 유무**

복분자는 식약처장이 별도로 인정한 원료로서 간 건강 (복분자추출분말)과 항산화 (복분자추출물)에 도움을 줄 수 있다고 명시되어있다. 복분자추출분말 (인정번호: 제 2010-62호)은 생리활성기능 2등급으로 기능(지표)성분은 ellagic acid, 일일섭취량은 복분자추출분말로서 3,150 mg/day로 되어있으며 복분자추출물 (인정번호: 제2006-24호)는 생리활성기능 3등급으로 기능(지표)성분은 ellagic acid이며 임산부, 수유기 여성 및 어린이는 섭취에 주의해야 한다고 명시되어 있다.

**■복분자 부산물 (복분자씨 식품원료 사용가능, 식약처 민원상담 결과)**

복분자 부산물 (과육+ 씨)에 대한 명시가 없으나 복분자딸기 (학명: *Rubus coreanus* Miquel)의 열매는 식용가능하며 일반적으로 씨앗을 제거하지 않고 섭취한다고 판단되는 바, 복분자딸기의 열매를 착즙한 후 발생하는 착즙박 (씨앗과 과육)은 규정 (“식용을 목적으로 채취, 취급, 가공, 제조 또는 관리되지 아니한 것”은 “식품의 제조, 가공 또는 조리 시 식품원료로 사용하여서는 아니 된다.”)에 따라 위생적으로 채취, 취급, 제조, 가공한 것에 한하여 식품의 원료로 사용이 가능하다고 한다.

**7. 소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 활성 검증**

- 1세부과제에서 복분자 껍질 및 씨를 50°C, 50% 주정으로 추출한 대량생산 시료를 1차년도 시료와 활성을 비교하였음(Fig. 67). 즉, MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 4종(BR59, pH1N1, PR8, H3N2)과 B 바이러스(B/FL04)을 감염시키면서 동시에 시료(50 ug/ml)를 각각 1시간 co-treatment한 후, 72시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 하면서 plaque 을 형성시켜 저해활성을 분석하였음, 대량생산 소재의 인플루엔자 바이러스 pH1N1, BR59, PR8, H3N2 및 B/FL04의 5종에 대한 저해활성이 1차년도 시료(SD)와 유사함을 확인하였음.

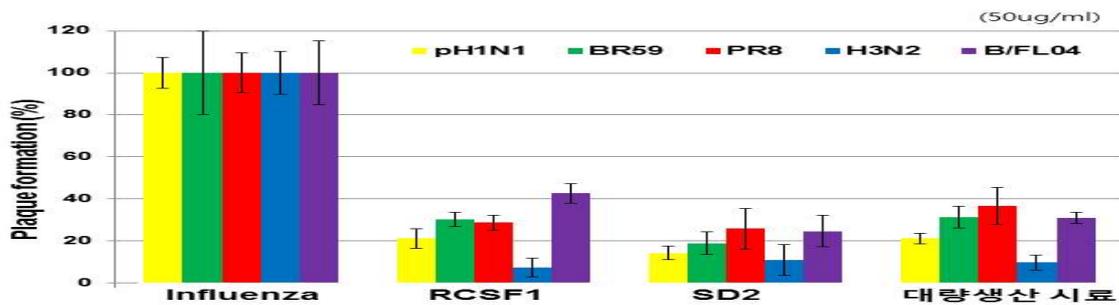


Fig. 67. 대량생산 시료와 1차년도 시료의 활성 비교 분석

- 복분자 대량생산 시료의 성분 동정을 위하여, 복분자 대량생산 시료를 80% Methanol 추출한 후 Armen spot prep liquid chromatography(YMC ODS AQ HG 220g resin, 25(h) x 2(d) cm column을 용매는 0-5 min 20% MeOH, 5-65 min 20-60% MeOH, 65-75 min 60-100% MeOH, 75-90 min 100% MeOH로 하였으며 유속은 분당 20 ml)로 분석하여 Fig. 68와 같은 prep LC 프로파일을 얻었음. 이를 Fig. 3과 같이 9개 분획으로 나누어 인플루엔자 바이러스 저해 활성을 분석함.

복분자 추출물(1g) 추출물- MPLC Chromatogram

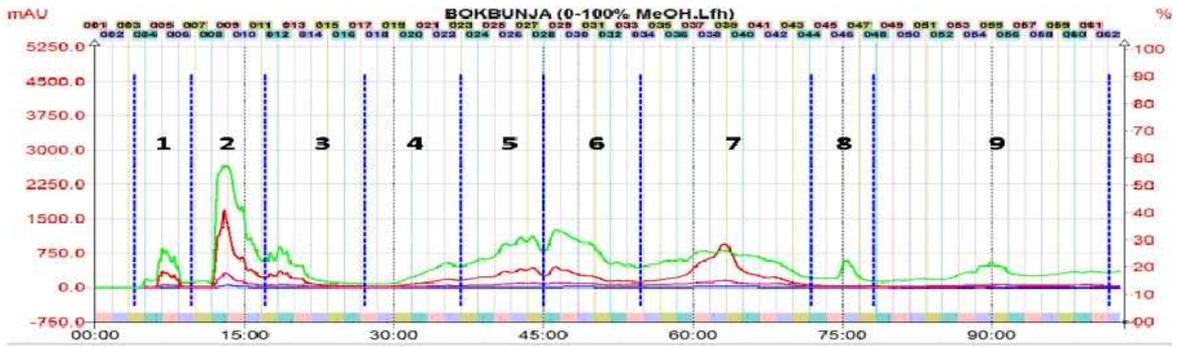


Fig. 68. 대량생산 시료 prep LC 프로파일

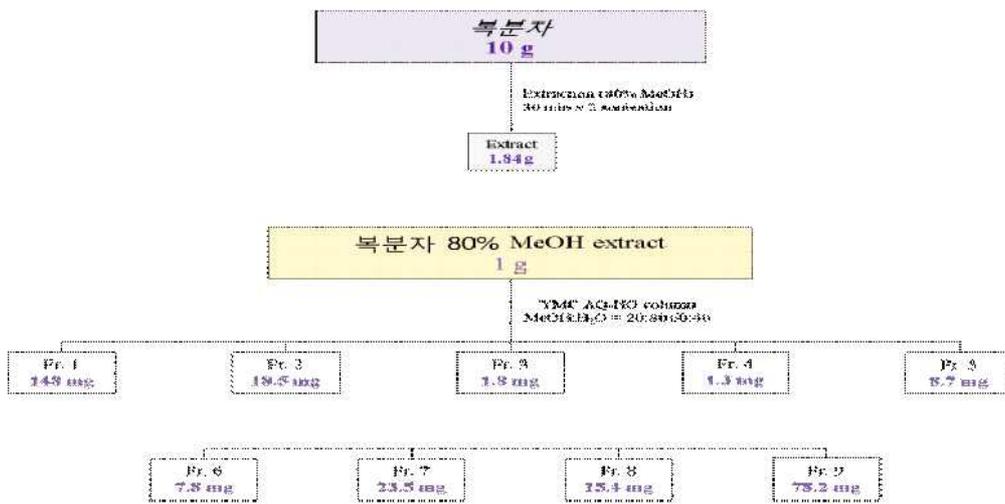


Fig. 69. 대량생산 시료 분획 모식도

- 세포 수준에서 대량생산 시료 분획의 인플루엔자 저해 활성 분석을 위하여, 먼저 MDCK에 대한 세포독성을 분석하였으며 그 결과, 100 ug/ml 농도 및 1-24시간에서 유의미한 세포독성을 나타나지 않았음 (Fig. 70).

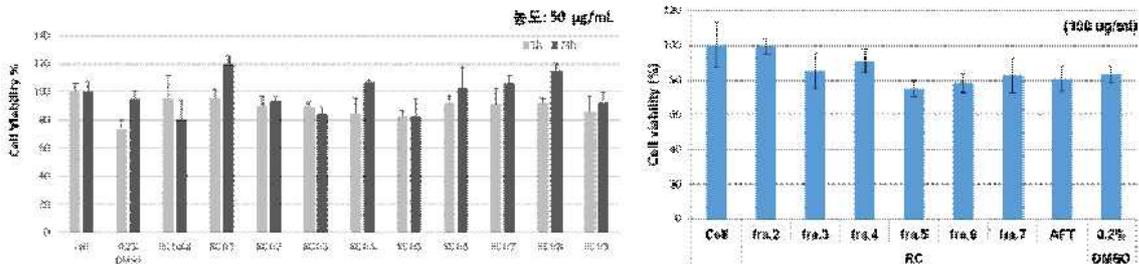


Fig. 70. 대량생산 시료 분획 1-9의 세포독성

- MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 4종(BR59, pH1N1, PR8, H3N2)과 B 바이러스 (B/FL04)을 감염시키면서 동시에 대량생산 시료의 분획 9종(50 ug/ml)을 각각 1시간

co-treatment한 후, 72시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켜 활성을 분석하였음. 그 결과, 인플루엔자 바이러스 A 및 B 바이러스에 대하여 분획 2-7이 저해활성을 보였음 (Fig. 71).

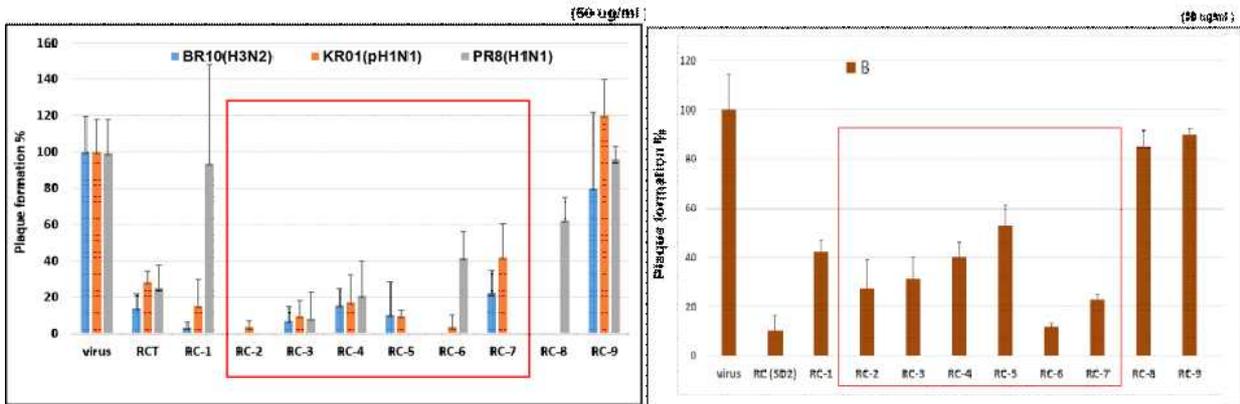


Fig. 71. 대량생산 시료 분획의 인플루엔자 A 및 B 바이러스 저해 활성

- 대량생산 시료에서 활성을 보인 분획 2-7의 농도의존적 저해활성을 분석하기 위하여 시료 농도 5, 50, 100 ug/ml에 대한 plaque reduction assay를 실시하였음. 인플루엔자 5종 바이러스 pH1N1, BR59, PR8, H3N2 및 B/FL04에 대하여 시료 분획 6에서 높은 dose-response 저해활성이 확인되었으며, 특히 분획 6의 100 ug/ml 농도에서 5종 바이러스의 매우 높은 저해활성이 나타났음 (Fig. 72). 현재, 분획 6에서의 활성 물질 규명을 위한 단일 성분 분리 실험을 진행하고 있음.

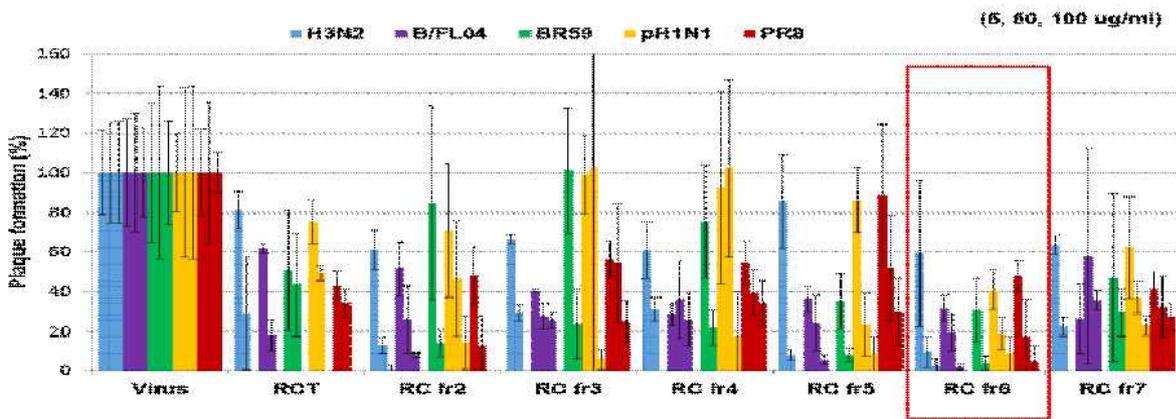


Fig. 72. 대량생산 시료 분획의 인플루엔자 A, B 바이러스 5종에 대한 dose-response 활성 분석

- PR8 바이러스의 MLD<sub>50</sub> 분석을 위하여, 덕성여자대학교 동물윤리위원회에 동물실험 승인을 받은 후 동물의 희생과 고통을 최소한으로 하며 실험하였음. BALB/C female 8주 mouse에 PR8 바이러스 1x10 plaque forming unit(PFU), 1x10<sup>2</sup>PFU, 1x10<sup>3</sup>PFU를 각각 intranasal infection 후 체중 감소를 측정하였음. Fig. 73의 위 Fig.과 같이 PR8 1x10<sup>3</sup> PFU/mouse를 감염시켰을 때, 7day post-infection(dpi)에서 30% 체중감소를 나타내었음.

- 대량생산 시료의 *in vivo* 활성 분석을 위하여, 일주일간 specific pathogen free 동물실험실의 individually ventilated cage에 일주일간 adaptation 시킨 BALB/C female 8주 mouse에 PR8 바이러스를 감염시키고 5일간 위내투여 방법으로 대량생산 시료를 투여한 후 바이러스 감염 후 14일까지 체중변화를 분석하였음. Fig. 73의 아래 Fig.과 같이 PR8 바이러스만 감염시킨 마우스는 8 dpi에 체중 33% 감소로 사망하였고, 대량생산 시료 (15 mg/kg) 투여그룹은 positive control인 oseltamivir (1.2 mg/kg)와 같은 수준으로 체중이 회복되었음. 따라서 대량생산 시료의 인플루엔자 바이러스 저해 활성이 oseltamivir와 유사한 수준임을 확인하였음.

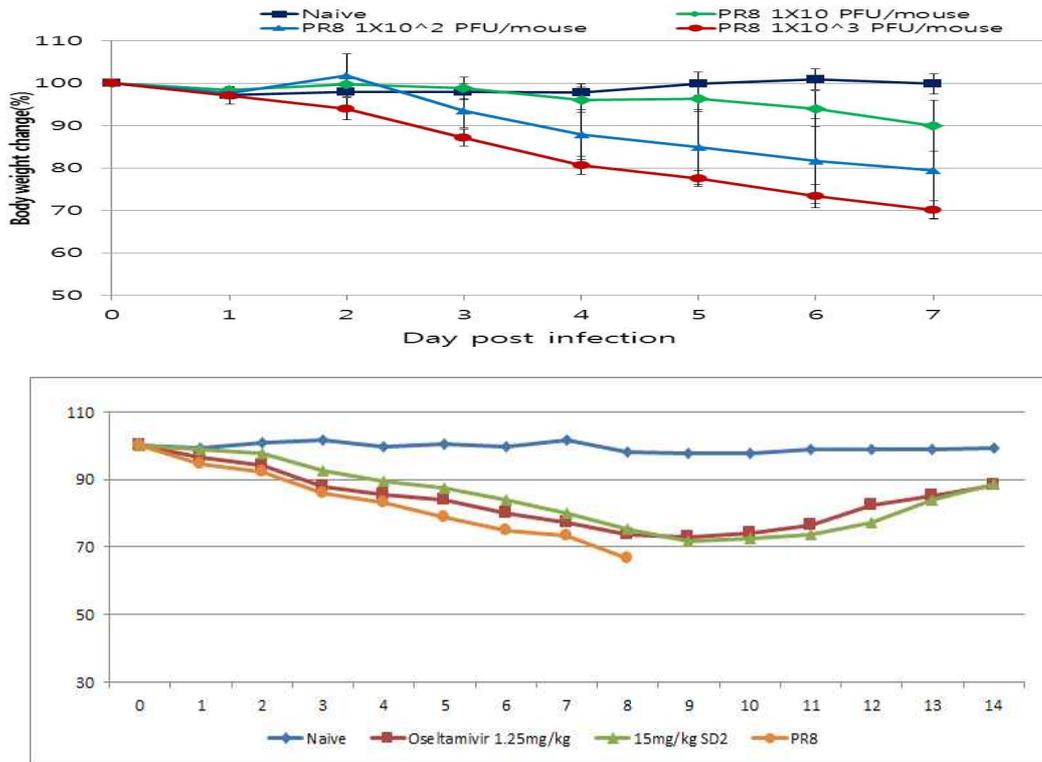


Fig. 73. PR8 바이러스의 MLD<sub>50</sub>(위), 대량생산 시료의 PR8 바이러스에 대한 *in vivo* 활성 (아래)

## 8. 기능성 평가를 위한 biomarker 탐색 연구

- 시료 내 다성분 동시분석을 위하여 분석조건을 확립하고, 안토시아닌, 플라보노이드, 사포닌 등을 동시 분석하는 조건을 이용하여 분석을 수행하였음. 에 ACQUITY UPLC HSS T3(1.8μm 2.1x 100mm) column으로 0.1-1% formic acid/DW 및 ACN 이동상 조건으로 UPLC(UPLC-PDA, Waters, AQUITY Ultra Performance LC) 및 Mass(Waters, Micromass Q-TOF Premier)AQUITY Ultra Performace UPLC-PDA 및 Micromass Q-TOF Premier 시스템으로 분리, 동정하였으며 용매 gradient 조건과 MS 분석 조건은 Fig. 74와 같음. 실험은 2회 반복 실험하였음. 정밀분석을 위해 질량(*m/z*)값, 구성원소값(element composition), 오차 범위(err), 고유흡광도값 등의 비교를 통해 신뢰도 높은 분석을 실시하였음.

③ Method - Gradient

Time(min)	Flow (mL/min)	%A	%B
(Initial)	0.400	95	5
1.00	0.400	95	5
5.00	0.400	80	20
8.00	0.400	60	40
12.00	0.400	2	98
13.40	0.400	2	98
13.50	0.400	95	5
15.00	0.400	95	5

④ Mass Conditions

구분	
Desolvation gas	N <sub>2</sub>
Desolvation flow rate	500 L/h
Desolvation temperature	350 °C
Source temperature	100 °C
Capillary voltage	2300 V
Cone voltage	50 V
Scan mode	Negative
m/z range	100-1500 Da

Fig. 74 다성분 동시분석을 위한 용매 gradient 및 MS 조건

- 대량생산 시료를 AQUITY Ultra Performance UPLC-PDA 및 Micromass Q-TOF Premier 시스템으로 분리, 동정하여 Fig. 75와 같은 결과를 얻었음. 맨 위부터 차례로, PDA λmax 크로마토그램, 안토시아닌 정밀분석을 위한 PDA 500nm 크로마토그램, 플라보노이드 및 탄닌 정밀분석을 위한 PDA 350nm 크로마토그램, 사포닌계열 정밀분석을 위한 TIC 크로마토그램, 맨 아래는 CAD 크로마토그램임.

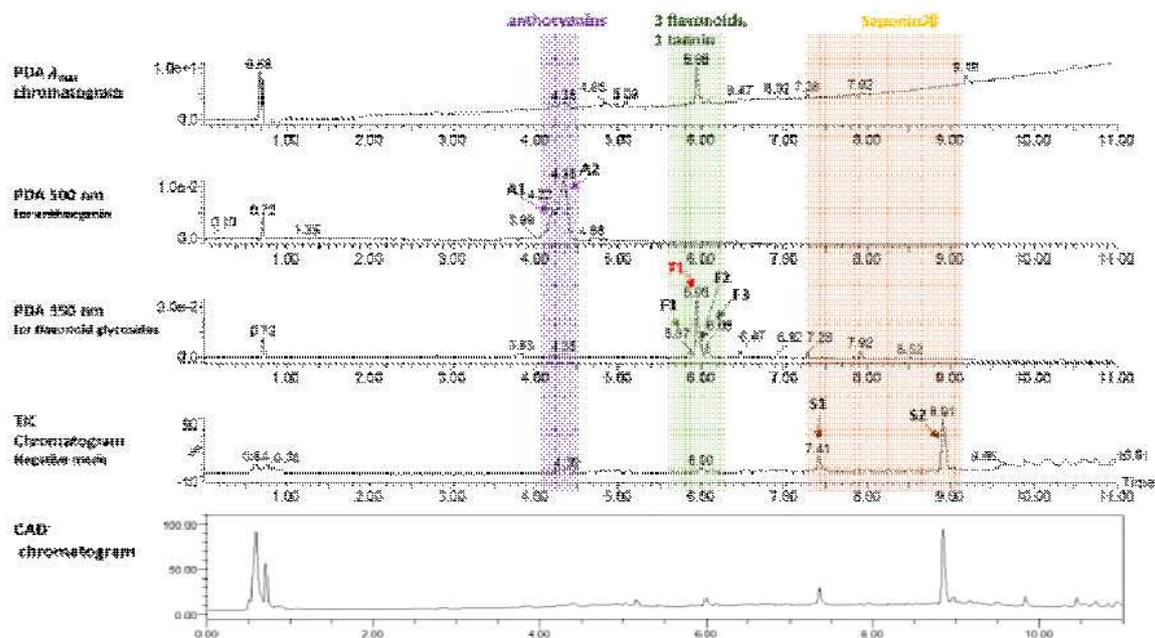


Fig. 75. 대량생산 시료 정밀분석 결과 프로파일

- 대량생산 시료의 PDA 500 nm 및 TIC 크로마토그램에서 나타난 피크 2개는 anthocyanin 정밀분석으로 cyanidin 3-O-glucoside 및 cyanidin 3-O-rutinoside 확인하였음 (Fig. 76).
- 대량생산 시료의 flavonoid, tannin 정밀분석으로 PDA 350 nm의 Rt 5.95 및 TIC Rt 5.99 피크는 ellagic acid로 확인되었으며, quercetin 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-glucoside를 확인하였음. 대량생산 시료의 지표물질은 peak T1인 ellagic acid 임(Fig. 77).

### Anthocyanin 정밀분석

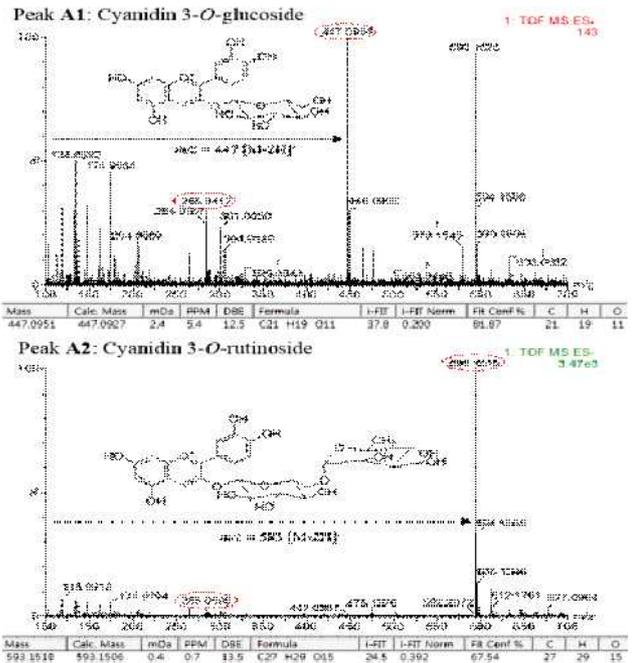
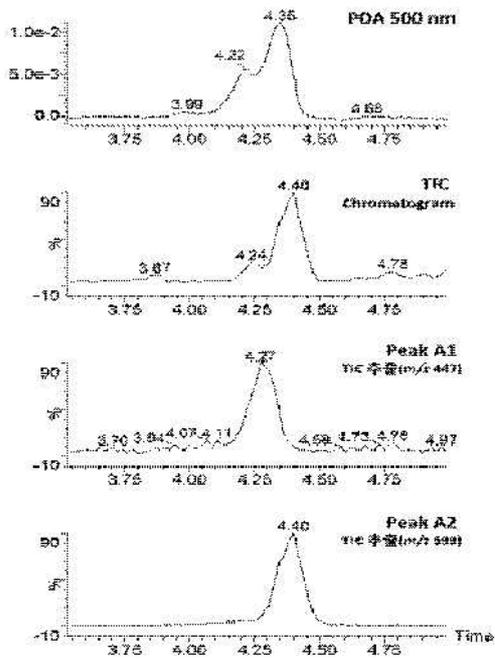


Fig. 76. 대량생산 시료의 anthocyanin 정밀분석

- 대량생산 시료의 saponin 정밀분석으로 TIC 크로마토그램의 피크 7.42 및 8.92는 각각 suavissimoside R1, coreanoside F1을 확인하였음(Fig. 12).

### Flavonoid, tannin 정밀분석

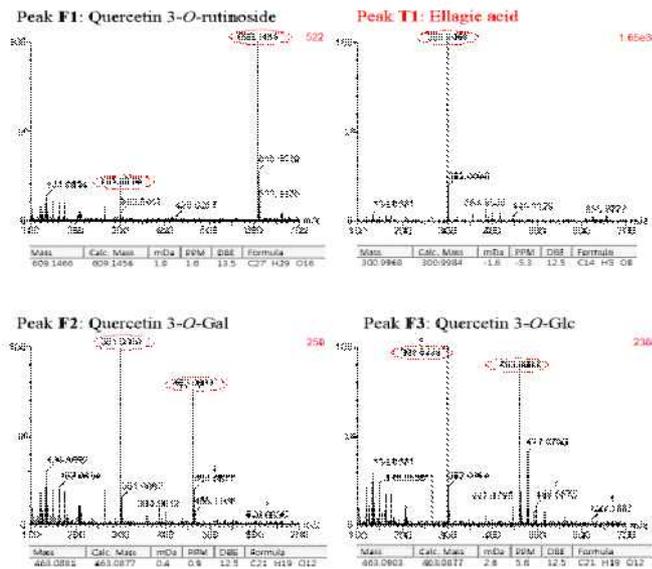
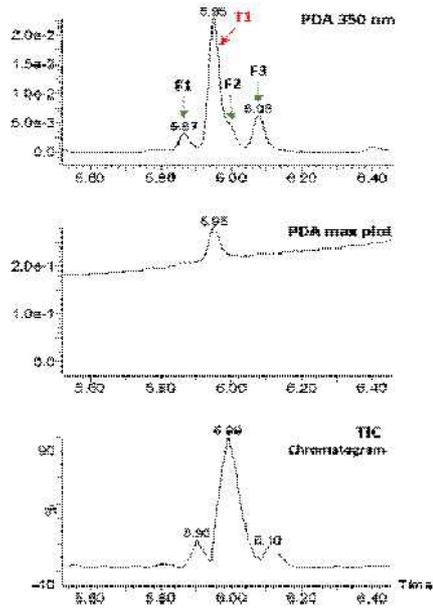


Fig. 77. 대량생산 시료의 flavonoid, tannin 정밀분석

Saponin 정밀분석 (peak 7.42, 8.92)

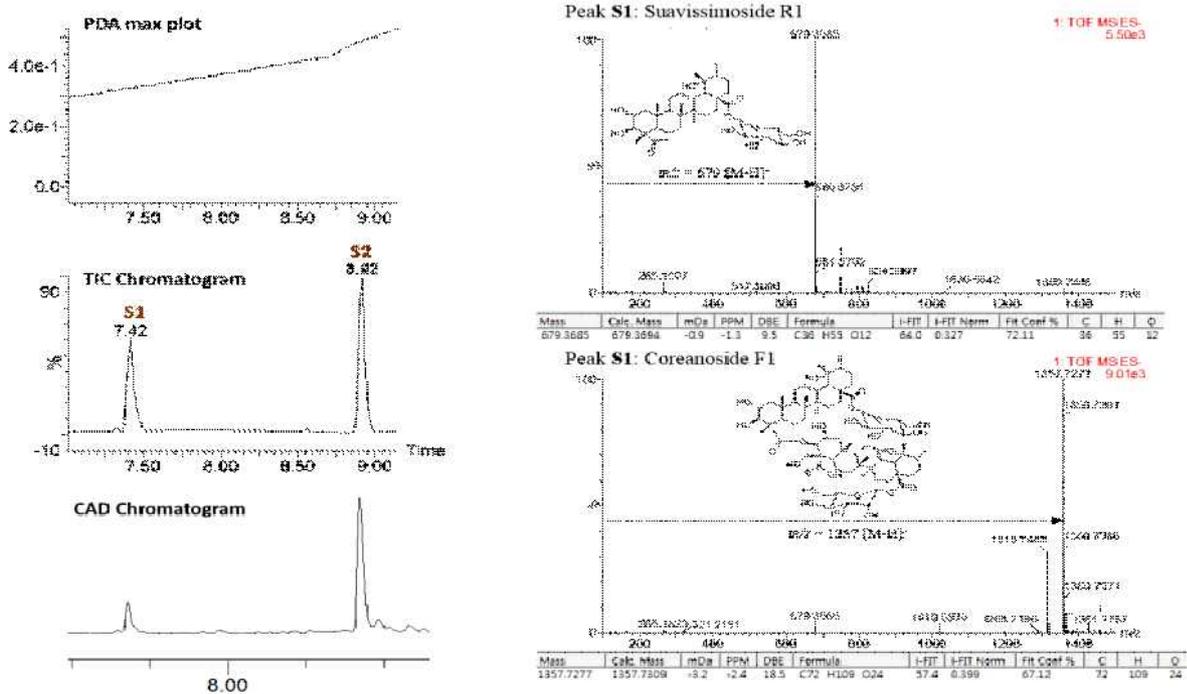


Fig. 78. 대량생산 시료의 saponin 정밀분석

Tannin, Flavonoid 추가 정밀분석

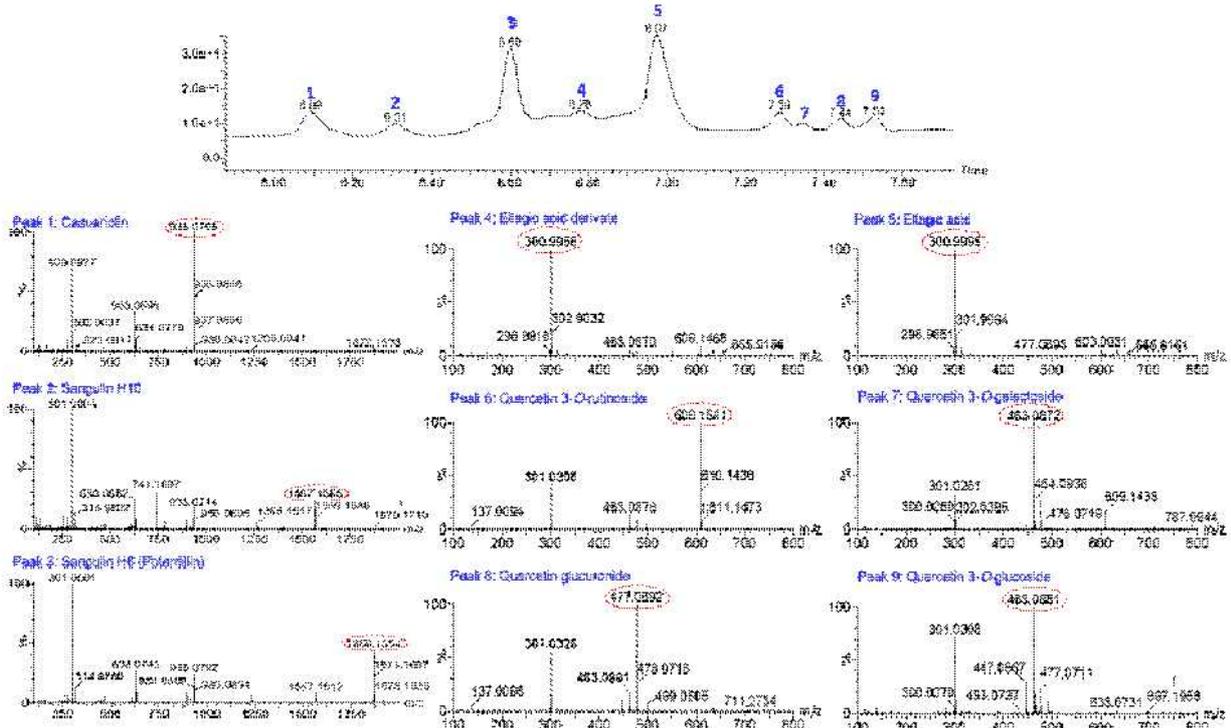


Fig. 79. 대량생산 시료의 tannin, flavonoid 추가 정밀분석

- Tannin 및 flavonoid는 AQUITY Ultra Performance UPLC-PDA 및 Micromass Q-TOF Premier 시스템의 동일한 분석 조건으로 추가로 정밀 분석을 수행하였고, ellagitannin계 (Casuarictin, Sanguin H10, Sanguin H6), flavonoid계 quercetin glucuronide로 밝혀졌음 (Fig. 79).
- 대량생산 시료를 UPLC-Q-TOF/MS 기기와 80% methanol (5% formic acid) 용매를 사용하여 추가 대량화 시료의 타겟 정밀 분석 결과, 1차 정밀 분석 결과와 유사하였음(Fig. 80). 즉 PDA  $\lambda_{max}$  크로마토그램에서는 피크 Rt 6.97이 주요 피크로 나타났고, TIC 크로마토그램에서는 Rt 9.26 및 10.99의 피크가 주요 피크로 나타났음. 크로마토그램의 Rt 6 - 10.31의 피크를 확대하여 피크 8번에서 피크 20번까지 확인할 수 있었음(Fig. 81).

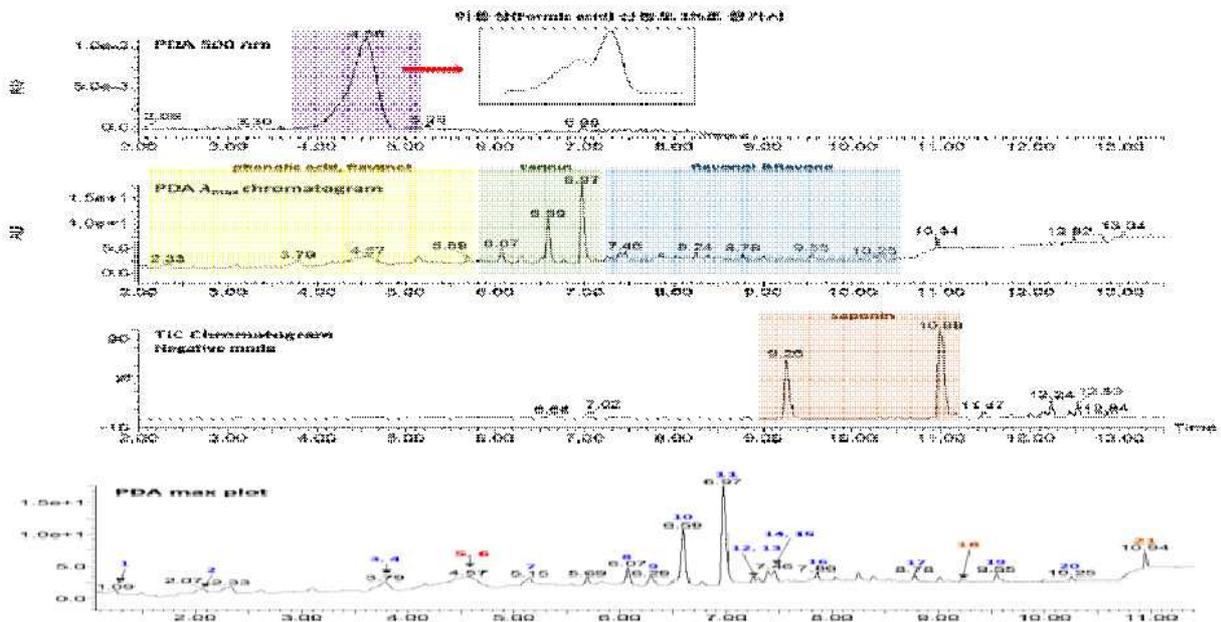


Fig. 80. 대량생산 시료의 2차 UPLC-Q-TOF/MS 정밀분석

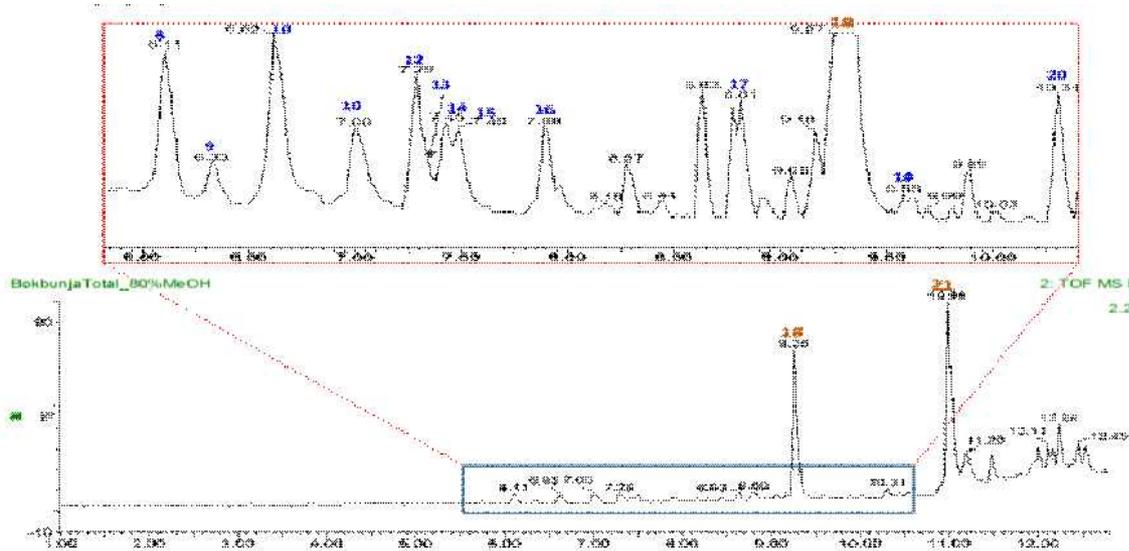


Fig. 81. 대량생산 시료의 2차 UPLC-Q-TOF/MS분석 크로마토그램의 Rt 6 - 10.31 피크 분석

- 이상의 분석 결과를 정리하면, UPLC-Q-TOF/MS를 이용한 대량생산 시료의 PDA  $\lambda_{max}$  크로마토그램에 나타난 피크 21종은 gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, catechin, chlorogenic acid, cyanidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-rutinoside, epicatechin, casuarictin, sanguin H10, sanguin H6, ellagic acid, quercetin 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-galactoside, quercetin glucuronide, quercetin 3-O-glucoside, orientin, acetyl orientin, suavissimoside R1, quercetin, malonyl orientin 및 coreanoside F1으로 확인하였음(Fig. 82).

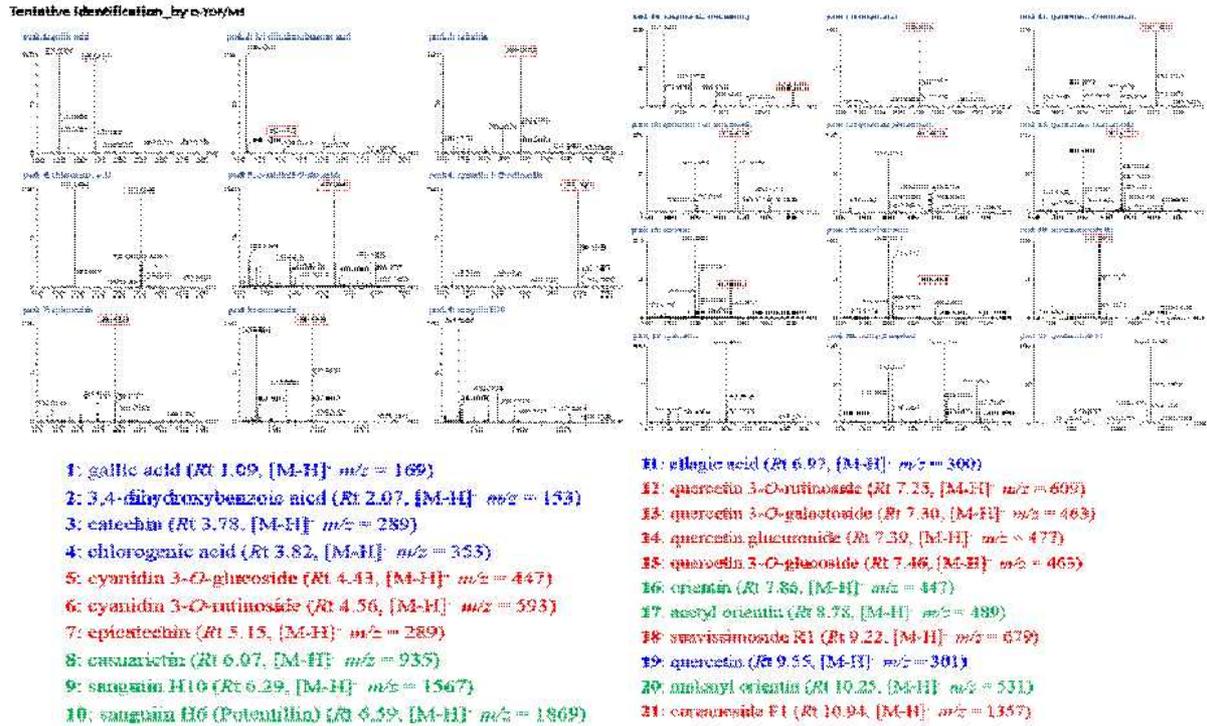


Fig. 82. PDA  $\lambda_{max}$  크로마토그램 피크 21종을 UPLC-Q-TOF/MS 분석으로 확인한 성분

- 대량생산 시료에는, 일반적인 UV 기반 분석에서는 ellagic acid(Rt 6.97)가 주요 지표성분으로 존재하였고, visible 영역 (500 nm 이상)에서는 cyanidin 3-O-glucoside 및 cyanidin 3-O-rutinoside의 anthocyanin 2종 (Rt 4.56)이 검출 되었으며, CAD 및 MS TIC 분석결과 suavissimoside R1, coreanoside F1의 saponin계 2종 (MS\_Rt 9.26, 10.99)의 주요 물질이 확인 되었음(Fig. 83).

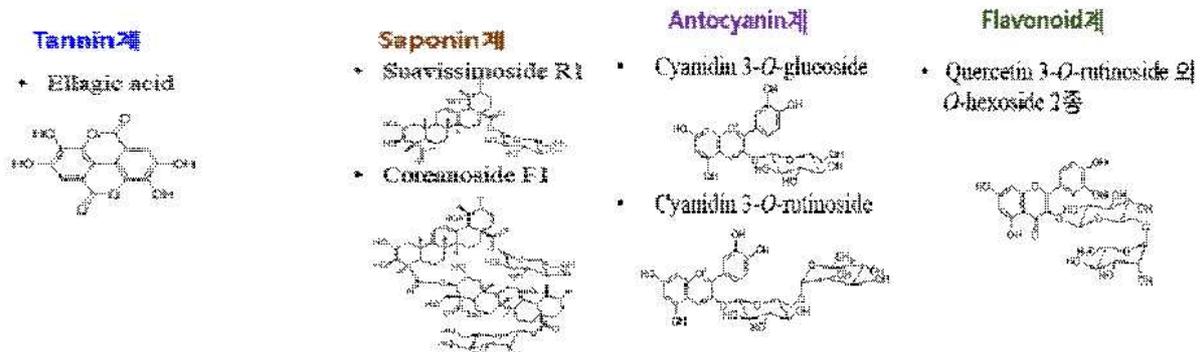


Fig. 83. 대량생산 시료 정밀 분석으로 확인된 주요 물질 구조

- 대량생산 시료에서 확인된 성분 등의 인플루엔자 저해활성을 확인하기 위하여, MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 BR59와 B 바이러스(B/FL04)를 감염시키면서 동시에 시료 1 uM, 10 uM 및 100 uM을 각각 1시간 co-treatment한 후, 72시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켜 저해활성을 분석하였음(Fig. 84).
- 지표물질인 ellagic acid 10 uM 및 100 uM은 인플루엔자 A 바이러스에 대하여 약 25%의 plaque 저해활성을 보였으나, 인플루엔자 B 바이러스에 대해서는 ellagic acid 100 uM 농도에서도 저해활성을 거의 나타내지 않았음. 그러나 시료 가운데 인플루엔자 A와 B 바이러스 모두에 대해서 저해활성을 나타낸 물질은 gallic acid 뿐이었음. Gallic acid 100 uM은 인플루엔자 A 및 B 바이러스에 대하여 각각 22 및 40% 저해활성을 보였음.

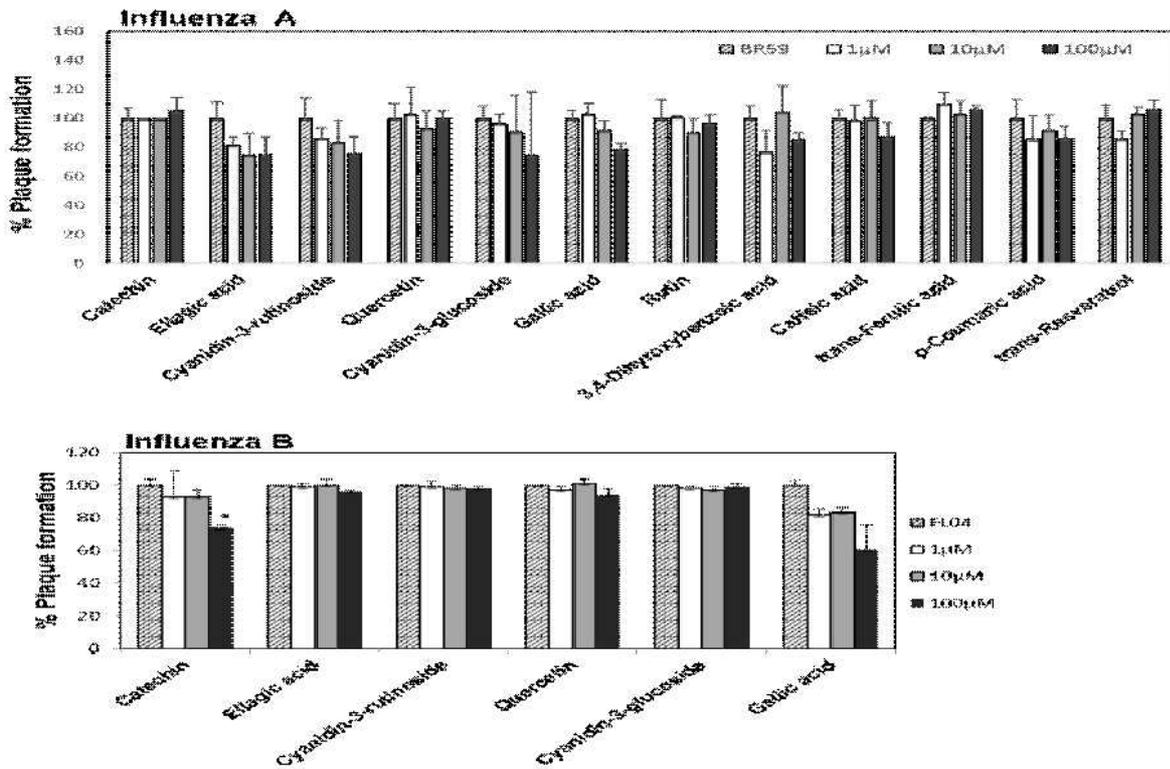


Fig. 84. 지표물질인 ellagic acid를 포함하여 12종 화합물의 인플루엔자 A 및 B 바이러스에 대한 저해 활성

- 인플루엔자 A 및 B 바이러스에 대하여 저해 활성이 있는 gallic acid의 농도의존적인 활성이 있는지 분석하기 위하여, 인플루엔자 바이러스 BR59, BR10, KR01 및 B의 4종에 대하여 1, 10, 100, 200 alc 400 uM농도를 1시간동안 co-treatment하여 plaque 형성 저해를 확인한 결과, 비교적 높은 농도인 400 uM에서 60-94%의 저해 활성이 확인되었음(Fig. 85).
- 대량생산 시료의 지표물질인 ellagic acid(분자량 302.197g)의 저해 활성을 100 uM 이상의 농도에서 분석하지 못한 이유는 ellagic acid의 solubility가 낮고, plaque assay를 이용한 세포 실험에서 인플루엔자 바이러스 저해활성을 확인하기 위하여 ellagic acid 10x 용액을 첨가해야 하는 이유로 gallic acid와 같은 높은 농도에서 실험을 하지 못하였음.

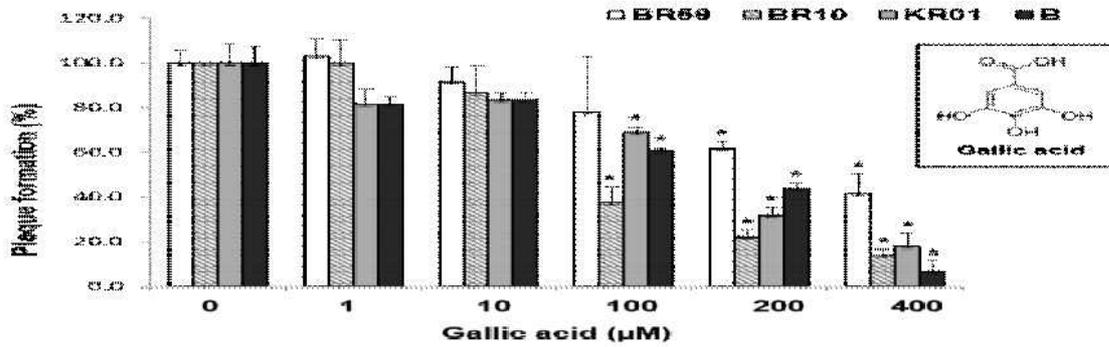


Fig. 85. 인플루엔자 바이러스 BR59, BR10, KR01 및 B에 대한 gallic acid의 농도별 저해 활성

### 9. 항바이러스 소재의 활성 optimization과 선별

#### 가. 인플루엔자 바이러스 재조합 HA 단백질 발현, 정제 및 결정화

- 1차년에 기 확보한 곤충세포 Bac-to-Bac 발현 시스템에서 인플루엔자 바이러스 단백질을 3-5 mg/L 수율로 고순도로 정제하여 (Fig. 86), complex 결정화를 통한 구조 분석 및 DSF, SPR기반 결합 활성 측정에 사용하였음.
- 재조합 HA는 A/Brisbane/59/2007 (BR59) (H1N1) 및 A/Thailand/CU44/2006(H1N1), A/Korea/01/2009 (KR01) (2009pdm H1N1), A/Brisbane/10/2007 (BR10) (H3N2) HA를 사용하였음.

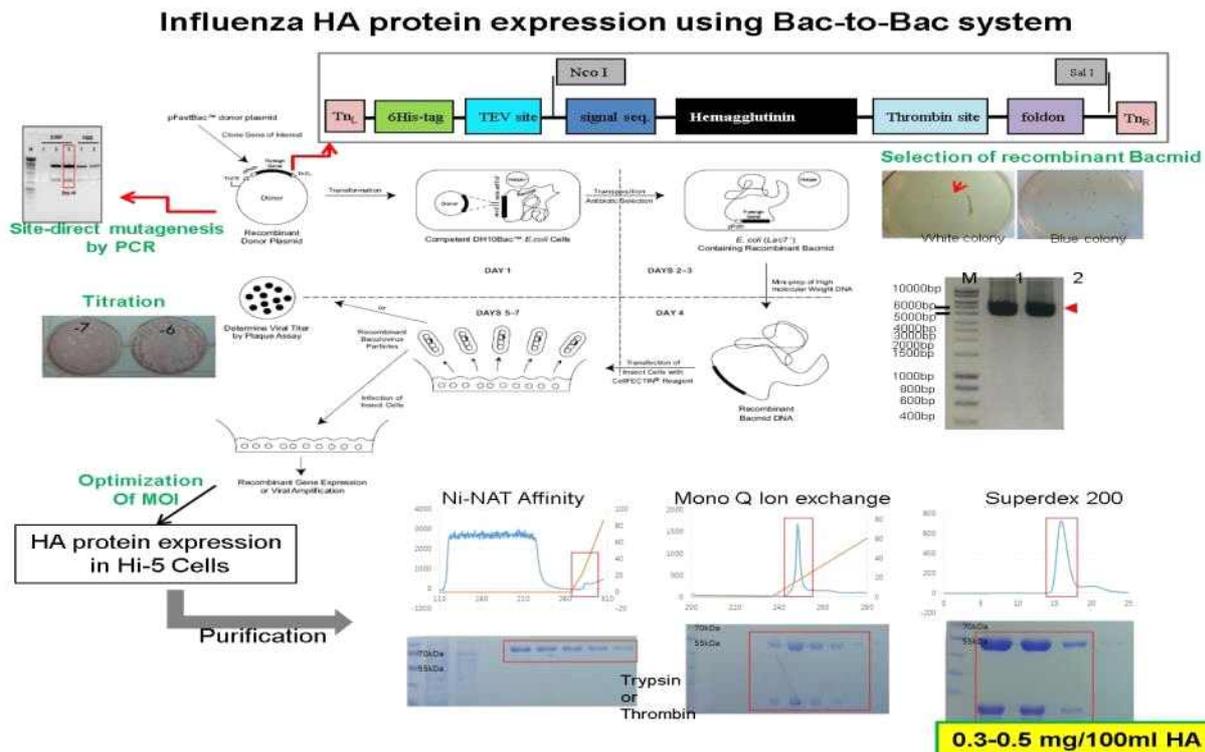


Fig. 86. 인플루엔자 재조합 HA 단백질을 얻기 위한 construct 디자인부터 곤충세포 발현 및 chromatography로 최종 정제하는 과정의 모식도.

-1차년도에 확보한 HA 단백질과의 결합도를 기반으로 HA 단백질 결정을 RCSF1에 soaking하여 complex 구조 규명을 시도하였음 (표 26, Fig. 87). Native 및 RCS-F1에 soaking한 결정의 X-ray diffraction 구조 결과 표와 같은 C2 Packing으로 관찰되었고, complex를 구조를 형성하지는 않았음.

표 26. 재조합 HA 단백질 Data statistics

	Wild type	RCS-f1
<b>Data statistics</b>		
Wavelength (Å)	0.98	0.98
Number of reflections (unique)	650,995 (106,990)	209,830 (67,869)
Resolution range (Å)	47.2-3.0 (3.1-3.0)	47.8-3.5 (3.6-3.5)
Completeness (%)	97.4 (92.2)	95.5 (90.4)
R <sub>merge</sub> (%)*	29.6 (154.0)	35.0 (124.8)
I/sigma	4.4 (1.0)	2.8 (0.9)
Space group	C121	C121
Unit cell parameter	a=215.74 b=124.28 c= 213.97 α=β=90°, γ=102.73°	a=216.28 b=124.83 c= 216.33 α=β=90°, γ=103.64°

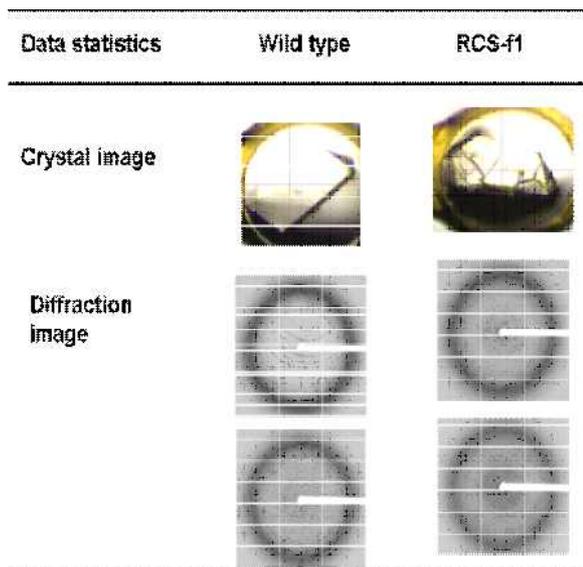


Fig. 87. 재조합 HA-RCSF1 결정 및 diffraction image

#### 나. 재조합 단백질 HA에 대한 결합도 측정 - DSF 및 SPR 분석

- 천연물 시료의 바이러스 단백질과의 결합력은 DSF(Differential scanning fluorimetry)의 T<sub>m</sub> shift로 1차 측정하고, Biacore2000으로 SPR(Surface plasmon resonance) 측정을 수행하였음.
- HA 단백질의 DSF 실험은 HA단백질을 50mM Tris buffer(pH 8.0)에 약 0.5mg/ml농도로 준비 한 후, 천연물 첨가 후, SYPRO Orange를 첨가해 주고, RT-PCR 기기를 이용하여 25°C에서부터 30 sec 당 0.5°C씩 온도를 증가시키면서 100 cycle 동안 fluorescence를 측정하였음. 이때 excitation wavelength는 492 nm, 그리고 emission wavelength는 610 nm로 하였고, MxPro QPCR software를 이용하여 derivative curve를 그리고 thermo stability (T<sub>m</sub>) 값을 구하였음. 천연물 무 첨가 시료의 T<sub>m</sub>값에 대한 첨가 시료의 T<sub>m</sub> shift를 측정하였음.
- SPR 측정은 HA 단백질을 고정화하여 제작한 Biosensor를 이용하여 한국기초과학지원연구원(서울) Biacore 2000으로 측정하였음. HA 단백질 (H1N1, pH1N1, H3N2, H1N1 Monomer)을 CM5 chip에 약 4,000-5,000 RU로 고정화 한 후, PBS-1% DMSO buffer에서 각 리간드를 injection하여 동일 농도 100 μM의 결합력을 비교하고, 각 리간드를 5-6농도로 injection하여 kinetics 프로그램을 통해 K<sub>D</sub>를 산출하였음.
- DSF T<sub>m</sub> shift 측정 실험에서는 H1N1 Strain 외에 곤충세포에서 발현한 KR01, BR10

HA와 monomer HA, 그리고 human 세포에서 발현한 HA에 대한 결합력을 측정하였으나, H1N1 CU44 HA 단백질 외에는 결합하지 않았음 (Fig. 88, 위).

- SPR 결합도는 immobilized HA 단백질에 RCSF1이 결합하였으나, 해리가 잘 일어나지 않는 패턴을 보여서, 정확한 결합 상수 산출에 어려움이 있었음. 즉,  $k_{on}$ 은 매우 강한 결합을 보이는데 반해서,  $k_{off}$ 는 매우 늦기 때문에 정확한  $K_D$  산출이 불가능하였음 (Fig. 3, 아래).

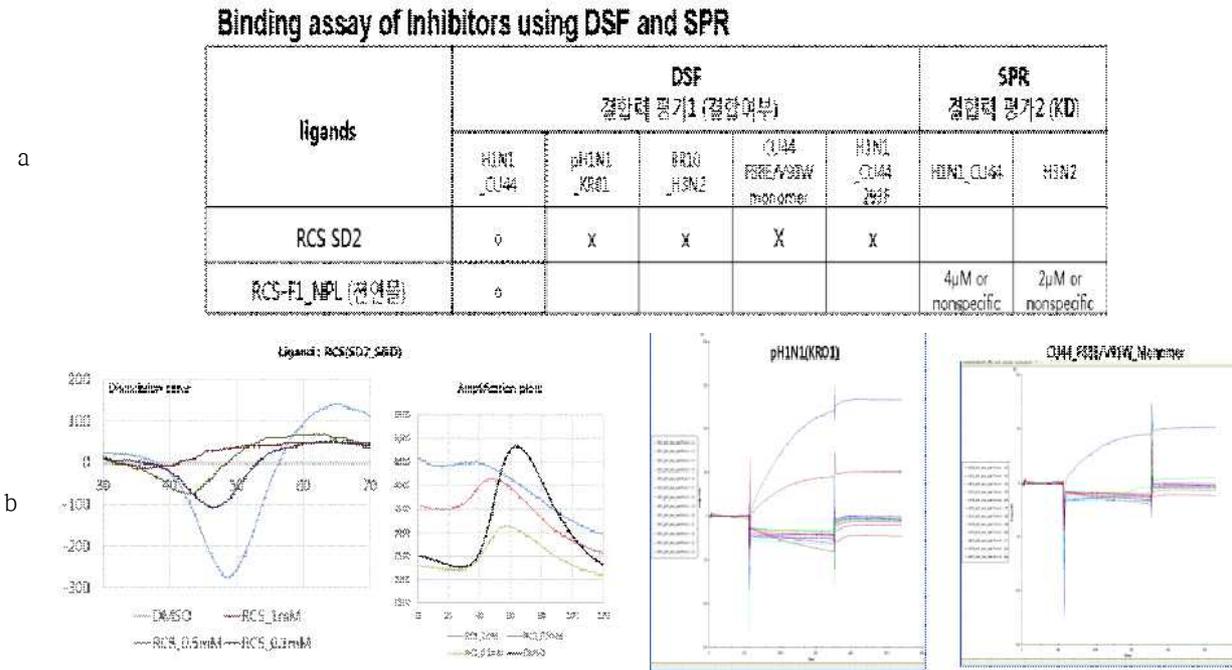


Fig. 88. DSF 및 SPR 결합도 측정

- 천연물 시료 특히 RCSF1을 대상으로 DSF 결합을 측정한 결과 대략 HA는 60도에서 transition temperature를 나타내며, RCSF1이 결합하였을 때, 농도에 따라 1-1.5 도 증가를 보였음 (Fig. 89). 이에 따라 RCSF1의 component 중의 한 천연화합물이 결합할 가능성을 시사함.

**다. 인플루엔자 바이러스에 의한 membrane fusion 저해도 측정 (syncytium assay)**

- RCSF1 및 대량화 시료를 높은 MOI influenza virus로 감염된 Vero cell에서 유도된 membrane fusion (syncytium formation)에 영향이 있는지 측정하였음. Vero cell에 PR8 Virus를 MOI 3이상으로 infection 시킨 후, 6시간 후에  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ 가 첨가된 PBS (pH5.0)에 5분 동안 노출한 후, 세포를 중성화 하고, FBS가 포함된 complete media를 첨가한 후 2시간 incubation하고 syncytium formation을 관찰하였음. 천연물 시료 첨가 유무에 따른 syncytium formation 차이를 비교하였으며, control로 HA와 결합하는 항체를 이용하였음. 세포는 Hema3 statpack staining kit로 fix, staining하였음.
- 실험 결과, RCS-F1 및 SD2를 처리한 group에서 membrane fusion 저해가 관찰되었음 (Fig. 90).

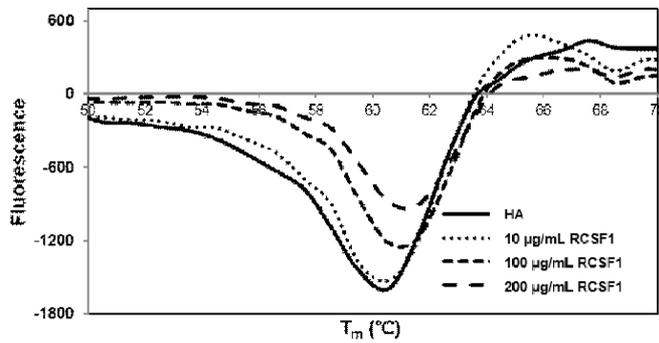


Fig. 89. RCSF1을 이용한 DSF 실험결과

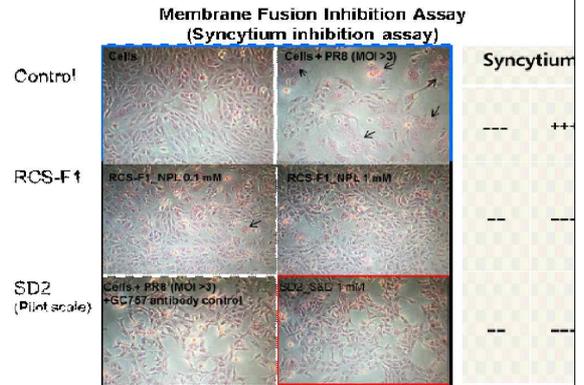


Fig. 90. Syncytium inhibition assay

### 라. 인플루엔자 바이러스 입자에 미치는 영향 TEM 분석

- 1차년도에 확보한 preliminary 데이터에서 더 나아가 RCSF1에 의한 인플루엔자 바이러스 particle에 대한 영향을 transmission electron microscope(TEM)으로 관찰함.
- BR59 바이러스 (6log<sub>10</sub>PFU/mL)를 RCSF1 등의 inhibitor와 상온에서 1시간 동안 처리한 후, carbon-coated grid에 시료를 올리고 1% uranyl acetate 용액으로 염색 한 후, Hitachi H7600 transmission electron microscope (TEM, Hitachi, Tokyou, Japan)으로 80kV에서 20,000배율로 관찰하였음.
- RCSF1으로 수행한 결과는 50 µg/mL 농도에서 인플루엔자 바이러스 particle에 damage를 주는 것으로 확인하였으며, 이는 농도에 의존하는 것으로 확인되었음 (Fig. 91).
- 더욱이 RCSF1의 주요 component인 gallic acid가 항인플루엔자 활성을 갖는 것이 제1협동기관에서 확인되었으며, gallic acid의 농도에 따른 바이러스 particle에 대한 영향을 아울러 TEM으로 확인하였음. 농도의존적으로 damage 영향을 보여주었으며, 특히 gallic acid의 바이러스 particle에 대한 detergent 역할이 주요기작으로 판단됨.

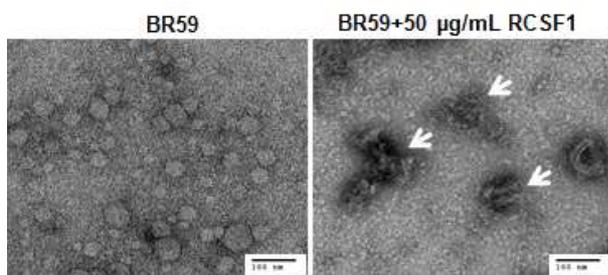


Fig. 91. RCS-F1 무첨가(왼쪽) 및 첨가군(오른쪽)의 TEM image

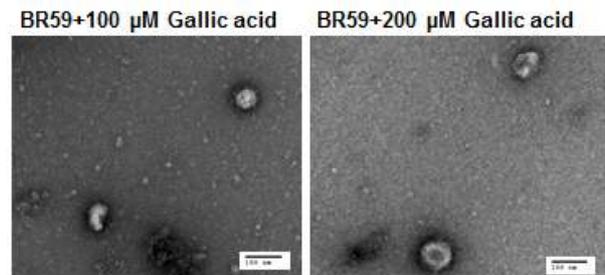


Fig. 92. Gallic acid의 농도에 따른 바이러스 particle에 대한 영향 TEM image

## 10. 시제품 생산을 위한 비임상 연구

### 가. ferret 실험 준비

제 1 협동과제에서 mice 동물실험을 통하여 세포 및 분자 수준에서 규명된 인플루엔자 항바이러스활성을 확인한 후, 후보 소재의 GLP 기관에서 ferret 대상 비임상 실험을 통하여 인플루엔자 저해 활성을 확인하였다.

Ferret 실험을 위하여 충북대학교 의과대학에 위치한 아이디 바이오(주)에서 실시하였으며, 16주령암컷 ferret (학명: Mustela putorius furo) 45마리를 \*\*에서 구입하였으며, 시험 기간 동안 일정한 온도 (21~23°C)와 습도 (50~60%)를 유지하였다. 사료는 ferret 전용 사료인 path valley farm (USA)을 사용하였으며, 식용 가능한 수돗물을 하루에 2번 급수하였다.

**(1) 시험군 설정**

시험군은 총 5 그룹으로 설정하였으며 그룹 1 (G1)은 negative ferret, 그룹 2 (G2)는 바이러스만 감염된 ferret, 그룹 3 (G3)는 바이러스 감염 + 타미플루 (tamiflu)를 투여한 ferret, 그룹 4 (G4) 바이러스 감염 + 복분자씨추출물 10 mg를 투여한 ferret, 그룹 5 (G5) 바이러스 감염 + 복분자씨추출물 50 mg를 투여한 ferret으로 각각의 그룹은 9마리의 ferret으로 구성하였다. 1일에 투여할 농도는 타미플루는 10 mg/kg, 복분자씨추출물은 10 mg/kg과 50 mg/kg으로 투여를 실시하였으며 각각의 ferret에 5일동안 구강 투여하였다.

그룹	상태	마리수
그룹 1 (G1)	무처리	9 마리/그룹
그룹 2 (G2)	바이러스 감염	
그룹 3 (G3)	바이러스 감염 + 타미플루 (tamiflu) 10 mg	
그룹 4 (G4)	바이러스 감염 + 복분자씨추출물 10 mg	
그룹 5 (G5)	바이러스 감염 + 복분자씨추출물 50 mg	

**(2) Ferret의 바이러스 감염 및 시험 물질 투여 실시**

Ferret에 타미플루 (10 mg)와 복분자씨추출물 (10 mg, 50 mg)을 각각의 ferret에 5일동안 구강 투여하였으며 2일째에 바이러스를 감염시켰다. 바이러스를 감염시키기 전 마취 (마취제: Zolazepam + tileramine [Zoletil®] 25 mg/kg + Xylazine [Rompun®] 10 mg/kg, I.M. 접종)를 실시하였고, 이 후 H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 인플루엔자 바이러스 1종을 1 x 10<sup>7</sup>EID<sub>50</sub>/ml로 양 쪽 비강 및 기관에 각 0.5 ml씩 1 ml을 접종하였다.

**나. 평가 항목**

**(1) 체중 변화**

바이러스 감염 전 및 후 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14일째 각 군의 개체 체중을 측정 후 평균 체중을 계산하여 평가하였다.

**(2) 체온 변화**

바이러스 감염 전 및 후 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14일째 각 군의 개체 직장 온도를 측정 후 평균 체온을 계산하여 평가하였다.

**(3) 비강 세척액 (nasal washing)에서의 인플루엔자 바이러스 역가 측정**

바이러스 감염 후 1, 3, 5, 7, 9일째 바이러스 챌린지 후 1, 3, 5, 7, 9일째 대조군 및 투여군에 항생제 (10% penicillin/streptomycin [Gibco-Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA])를 포함한 PBS용액 1 mL를 페렛 양쪽 비강에 주입하여 세척액을 채취하고, 채취된 샘플 내에서의 바

이러스 농도를 세포주 (MDCK : Madin-Darby Canine Kidney)를 이용하여 측정하였다.

항생제를 포함한 PBS용액 1 mL을 이용하여 비강 세척액을 채취, 원심 분리(12,000 rpm, 10분, 회) 후 상층액을 확보하여 96-well plate에 항생제를 포함한 PBS 180  $\mu$ L에 상층액 20  $\mu$ L를 넣은 후 10배씩 단계별로 희석하였다 ( $10^0$ - $10^{-7}$ ). 이렇게 희석된 상층액을 monolayer MDCK세포에 접종 및 72시간 배양하고 CPE (Cytopathic effect)를 육안으로 확인한 후, 상층액 50  $\mu$ L를 취하여 동량의 0.5% 적혈구와 혼합 후, 30분간 반응시킨 다음 혈구응집 반응 여부를 통해 바이러스 역가를 측정하였다. (Reed-Muench method)

#### (4) Ferret 폐조직에서의 사이토카인 측정

바이러스 챌린지 후 1, 3 일째 대조군 및 투여군의 페렛에서 폐 조직을 채취한 후, RNA를 분리하여 qPCR 시스템을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 분리된 RNA는 1 $\mu$ g으로 정량하여 10 pmole의 각각의 프라이머 (6 Set)와 함께 iQTM SYBRr Green Supermix (2X)를 사용하여 최종 반응물은 10  $\mu$ l 맞추었으며, 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분 (95 $^{\circ}$ C 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 10초, 72 $^{\circ}$ C 20초, 40 사이클), 95 $^{\circ}$ C에서 10초. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ 에 대한 프라이머를 사용하였다.

#### 다. 실험 결과

##### (1) Ferret을 이용한 복분자씨추출물의 경구 투여에 따른 항바이러스 효능

각 그룹의 ferret에 5일 동안 타미플루 (10 mg), 복분자씨추출물 (10 mg, 50 mg)을 각각 투여하면서 2일에 A/Puerto Rico/9/1934 (H1N1) 바이러스를 감염하였다. 바이러스를 감염시킨 후 몸무게와 체온변화, 비강세척액에서의 바이러스역가에 대한 결과는 Fig. 93과 같다. 바이러스 감염 후 각 그룹 ferret의 몸무게 변화 결과 모든 그룹의 ferret의 몸무게는 14일 동안 1~4% 증가하였다. 체온 변화를 측정된 결과 그룹 1의 ferret은 정상적인 체온 (37.7 $^{\circ}$ C)을 14일 동안 유지한 반면 그룹 2의 ferret은 감염 3일째에 평균 38.4 $^{\circ}$ C, 그룹 4의 페렛은 평균 38.2 $^{\circ}$ C로 다른 그룹에 비해 온도가 올라간 결과를 나타냈으며, 그룹 3과 5의 ferret은 평균 37.9 $^{\circ}$ C로 정상 범위의 체온을 유지하였다. 바이러스 감염 5일후부터는 그룹2와 그룹 4의 ferret의 체온도 정상범위를 나타내 모든 ferret이 14일까지 회복된 결과를 나타내었다.

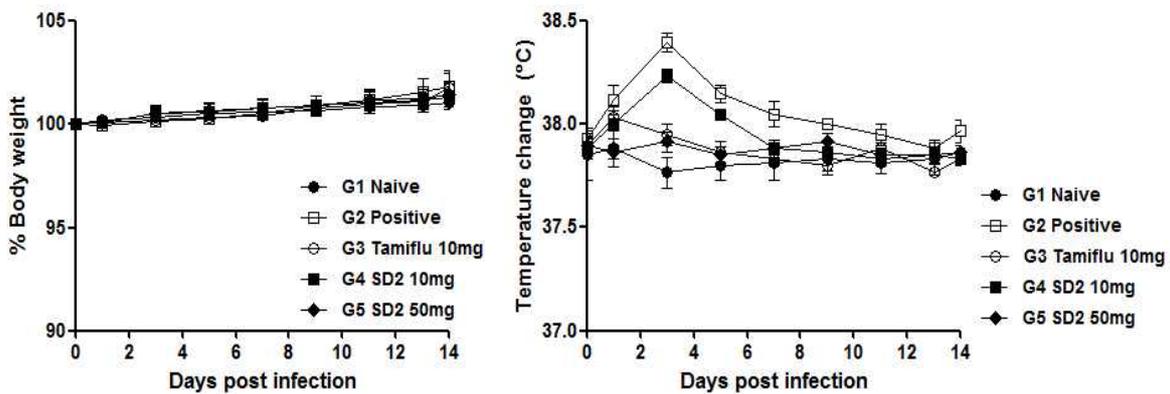


Fig. 93. 바이러스 감염 후 복분자씨추출물에 따른 체중 변화 (왼쪽)과 체온 변화 (오른쪽)

인플루엔자 바이러스 H1N1 감염 24시간 후 5그룹의 ferret의 비강세척액에서 바이러스 역가 (1, 3, 5, 7, 9 DPI)를 측정하였다 (Fig. 94). 감염 1일 후에는 그룹 1의 ferret을 제외한 다른 그룹 (G2-G5)의 ferret에서 바이러스 역가를 확인하였다. 특히, 그룹 2의 ferret의 바이러스 역가는  $4.0 \log_{10}TCID_{50}/ml$ 로 가장 높은 바이러스 역가를 나타냈으며, 그룹 3의 ferret에서는  $1.25 \log_{10}TCID_{50}/ml$ 로 낮은 역가를 나타냈다. 복분자씨추출물을 투여한 그룹 4, 5의 ferret의 바이러스 역가는 그룹 2의 ferret의 바이러스 역가보다 낮은 역가를 나타냈다. ( $2.63 \log_{10}TCID_{50}/ml$ ,  $1.5 \log_{10}TCID_{50}/ml$ ). 바이러스 감염 3일 후에는 그룹 2의 ferret에서  $3.1 \log_{10}TCID_{50}/ml$ 의 바이러스가 측정되었으며, 10 mg을 투여한 그룹 4의 ferret에서도  $1.41 \log_{10}TCID_{50}/ml$ 의 바이러스 역가를 나타냈다. 반면 타미플루를 투여한 그룹 3과 50 mg 복분자씨추출물을 투여한 그룹 5의 ferret에서는 바이러스 역가를 나타내지 않았다. 바이러스 감염 5일 후부터는 모든 그룹의 ferret에서 바이러스 역가가 나타나지 않아 회복된 상태를 보였다. 이러한 결과를 볼 때 ferret에서 복분자씨추출물 투여로 바이러스 증식억제가 나타나는 것을 알 수 있었다.

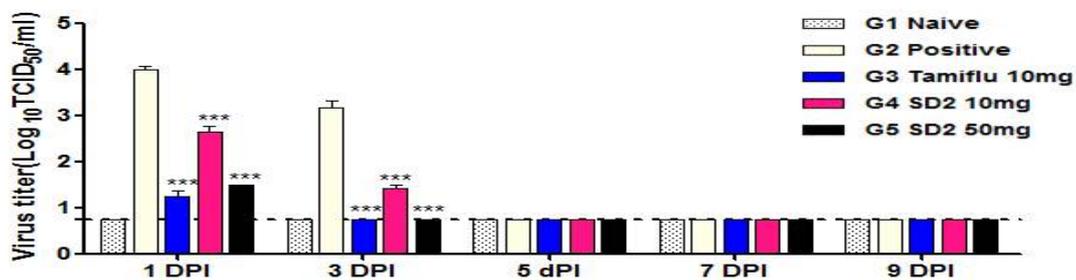


Fig. 94. 바이러스 감염 후 복분자씨추출물에 따른 바이러스 역가

## (2) 복분자씨추출물 투여에 따른 면역 반응 효능

Ferret을 A/Puerto Roco/8/1934 (H1N1) 바이러스를 감염시킨 후 1일, 3일에 Ferret의 폐조직을 채취하였다. qRT-PCR을 이용하여 6종류의 사이토카인 (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )을 측정하였다 (Fig. 95).

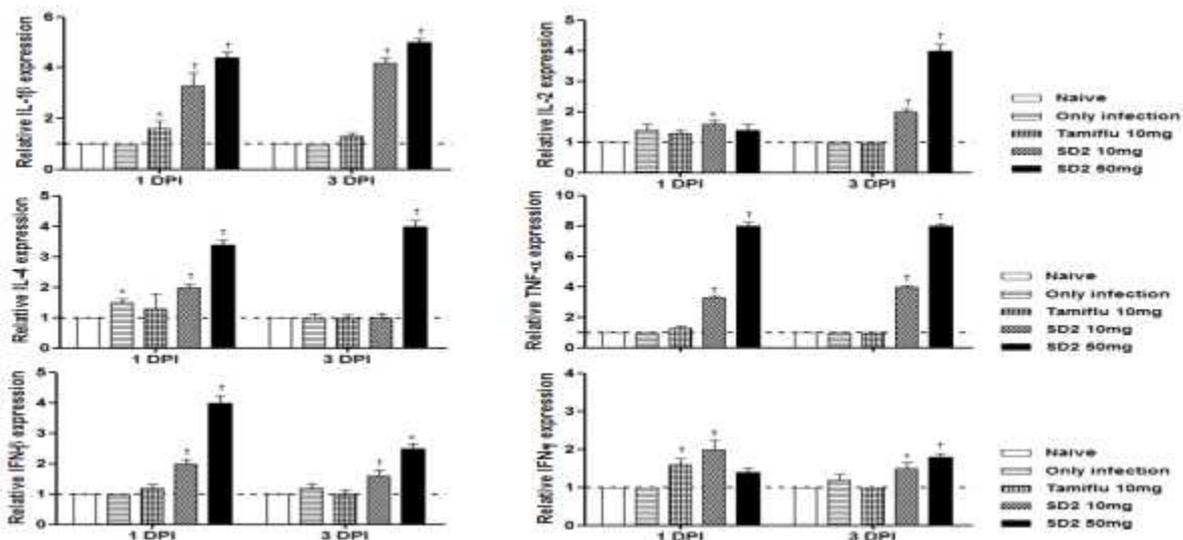


Fig. 95. 바이러스 감염 후 복분자씨추출물에 따른 사이토카인의 발현

IL-1 $\beta$  경우 그룹 1과 비교 분석한 결과 감염 후 1일에는 타미플루를 투여한 그룹보다 10 mg, 50 mg의 복분자씨추출물을 투여한 그룹에서 농도의존적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 감염 3일후에는 타미플루를 투여한 그룹에서 IL-1 $\beta$ 가 낮아졌지만 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G4, G5)은 1일보다 더 증가한 결과를 나타냈다.

IL-2 확인 결과 그룹 1과 비교 시 감염 후 1일에는 10 mg 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G4)을 제외한 나머지 그룹은 유의성있게 증가하지 않았으며 감염 3일 후에는 복분자씨추출물을 투여한 그룹에서 증가한 결과를 나타냈으며, 특히 50 mg 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G5)에서 가장 높게 증가하였다.

IL-4 경우 그룹 1과 비교 분석한 결과 감염 후 1일에는 타미플루를 투여한 그룹을 제외한 나머지 그룹은 증가한 결과를 나타냈다. 감염 3일후에는 50 mg 복분자씨추출물 (G5)을 투여한 그룹만 1일보다 증가하였으며, 다른 그룹은 낮아진 결과를 나타냈다. TNF- $\alpha$  와 IFN- $\beta$  확인 결과 바이러스 감염 1일에는 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G4, G5)만 유의성있게 증가하였으며, 3일까지도 두 그룹만 TNF- $\alpha$ 가 증가하는 결과를 나타냈다. 하지만 IFN- $\beta$  경우 감염 후 3일에는 감염 후 1일보다 복분자씨추출물 투여 그룹 모두 낮아진 것을 확인하였다.

IFN- $\gamma$  경우 감염 후 1일에는 타미플루를 투여그룹 (G3)과 10 mg 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G4)에서 유의성있게 증가하는 결과를 나타냈다. 하지만 감염 3일후에는 타미플루를 투여한 그룹과 10 mg 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G4)은 낮아졌지만 50mg 복분자씨추출물을 투여한 그룹 (G5)은 1일보다 증가한 결과를 나타냈다.

보는 바와 같이 복분자씨추출물은 Th-1 type 사이토카인 중 IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가시키거나 항바이러스와 관련된 IFN- $\beta$ , T 세포와 B 세포를 활성화시키는 IL-1 $\beta$ , Th-2 type 사이토카인인 IL-4를 유도하여 항바이러스 효능을 나타내는 것으로 판단된다.

#### 라. 비임상시험연구자의 고찰 및 결론

현재까지 인플루엔자 바이러스를 예방하기 위한 많은 백신이 개발되어 왔다. 신종 플루에 효과를 보인 타미플루에 대한 내성바이러스들은 점차 증가하여 이를 보완 할 수 있는 새로운 선택 제제 개발이 필요하며, 많은 연구들이 수행 중이다. 항 바이러스제의 개발 중 천연 식물의 성분에서 개발하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에서는 복분자씨추출물(SD2)의 ferret에서 항바이러스 효과를 확인하기 위해 5일 동안 구강투여를 했으며, 구강투여 2일째 H1N1 바이러스를 감염시켰다. 그 후 몸무게, 체온 변화와 비강세척액에서의 바이러스 역가를 측정했으며, 폐조직에서 사이토카인을 측정하였다. 몸무게 변화 결과 모든 그룹의 비슷하게 14일 동안 증가하는 결과를 나타냈으나 ferret의 체온 변화 결과 복분자씨추출물 10 mg 투여 그룹 (G4)은 타미플루 투여 그룹 (G3)에 비해 6일까지 높은 체온을 나타냈지만 50 mg 투여 그룹 (G5)은 타미플루 투여 그룹 (G3)과 비슷한 체온을 유지하였다. 또한 ferret의 비강세척액에서의 바이러스 역가 측정결과 복분자씨추출물 10 mg 투여한 그룹 (G4)은 감염만 진행한 그룹의 ferret (G2)에 비해 낮지만 감염 3일까지 바이러스 역가가 측정되었다. 복분자씨추출물 50 mg을 투여 한 그룹 (G5)의 결과 타미플루를 투여한 그룹과 같이 감염 3일부터 바이러스 역가가 측정되지 않았다. ferret 폐조직에서의 사이토카인 분석결과 복분자씨추출물은 Th-1 type 사이토카인 중 IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가시키거나 항바이러스와 관련된 IFN- $\beta$ , T 세포와 B 세포를 활성화시키는

IL-1 $\beta$ , Th-2 type 사이토카인인 IL-4를 유도하여 항바이러스 효능을 나타내는 것으로 보인다. 따라서 위의 결과를 토대로 복분자씨추출물은 항바이러스제로 개발 가능성이 있다고 판단된다. 향후 복분자씨추출물을 이용한 항바이러스제 개발 기술은 다른 많은 바이러스 질병 치료에 활용이 가능할 뿐만 아니라 수의약 산업 및 의약분야의 치료 및 백신 연구 분야에 파급효과가 클 것으로 예측된다.

## 11. 항바이러스 소재의 대량생산과 산업화

### 가. 대량생산과 활성모니터링 기술 확립

#### (1) 항바이러스 소재의 제품표준서 작성

항바이러스용 복분자씨추출물을 대량생산(원료300kg)을 통하여 추가 수행하여 대량생산에서의 생산설비의 보완 및 제품제조표준화를 위한 공정 설정 및 제조공종중의 제조QC등에 대하여 조건을 설정하였다.

원재료는 복분자씨 (고창선운산농협)를 엄선 선별하여 자가품질검사 규격에 적합한 원료를 사용하였다. 원료는 70°C에서 12시간동안 열풍건조 후 분쇄기를 이용하여 분쇄했고 칭량저울로 300 kg 계량하여 추출탱크에 투입한 후 원료의 10배수인 3000 L에 해당하는 50% 식용주정을 투입한 다음 추출기 온도를 50 ± 5°C로 가온하면서 추출액을 순환하며 6시간 추출을 실시한 후 추출액을 120 mesh screen망으로 분리를 실시하였다. 분리된 액을 1차 규조토를 첨가하여 필터프레스 (filterpress)로 여과한 후 5  $\mu$ m-카트리지 필터 (cartridge filter)로 최종 여과하였다.

표 27. 항바이러스용 복분자씨추출물의 제조공정별 지표물질의 변화 (Lot SD-BR-004)

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	물질수지(kg, L)
원재료	복분자씨 300kg		0.1853	300
↓				
투입	정제수 1500 L 주정 1500 L	실온		
↓				
추출 및 분리		추출온도 50 °C 추출시간 6시간 120mesh 망	0.0182	2,850
↓				
여과	규조토여과 5 $\mu$ m-filter		0.0179	2,735
↓				
농축	감압농축기	45°C, 700mmHg	0.3457	130.4
↓				
건조	진공건조기	inlet temp. 185°C		
↓				
포장	지대포장	1~20kg 등	1.5865	28.8

최종 여과한 액은 감압농축기 700 mmHg 압력으로 45°C 이하에서 농축을 실시하였으며 정

제 농축액을 85°C에서 15분간 살균 후 진공건조기를 이용하여 건조를 실시하였고 분말 시료 (SD-RC-004)를 제조하였다.

대량생산공정에 있어서는 제조과정중에 세척과정중을 생략하게 되었다. 복분자씨추출물의 원료산지를 방문 복분자 주스제조과정중 복분자씨로 부산물이 발생하는 단계에서 가열처리가 포함되어 있어 원료 유래의 유해미생물이 사멸하는 것으로 확인되었으며 또한 냉동보관 등 저장조건으로 보관되어 식품위생적으로 많은 문제점이 없는 것으로 나타났다.

대량생산공정으로 인하여 복분자씨추출물의 생산수율이 300kg 원료를 사용하여 최종제품 28.8kg로 수율이 9.6% 인 것으로 나타났다.

## (2)시료의 지표물질 (ellagic acid) 함량 및 기능물질 (gallic acid)과의 상관관계 규명

대량생산공정에서 기능성소장의 표준화 방안 수립과 대량생산공정에서 유효성분의 농도를 정확히 분석이 가능하도록 유효성분과 지성분간의 상관관계를 조사하여 생산공정에서의 활성모니터링 방안을 수립하고자 하였다.

제조한 복분자씨추출물 (SD-RC-004)의 지표물질 및 기능물질의 함량을 알아보기 위하여 2차년도에 설정한 분석방법과 동일하게 분석을 진행하였다.

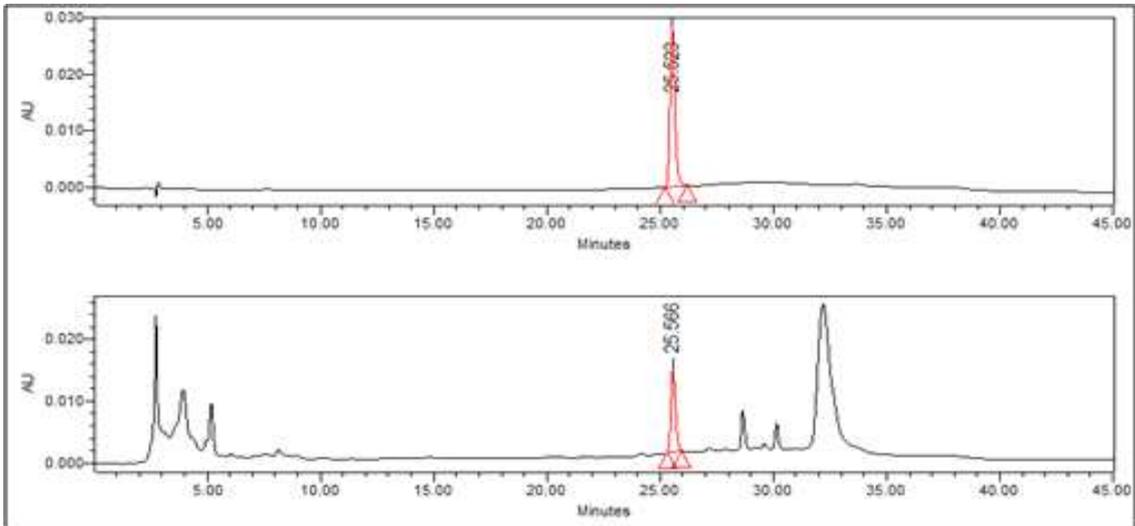


Fig .96. 표준물질 (위)과 시험물질 (아래)-

1,2차년도 연구결과, 복분자씨부산물에서 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 판단되는 기능물질 (gallic acid)은 분석용 HPLC을 이용하여 분석을 실시하였다. 이동상으로는 0.05% phosphoric acid가 포함된 dH<sub>2</sub>O와 HPLC grade MeOH을 사용하였다. column은 shiseido capcell pak C18 UG 120 (5 μm, 4.2 x 250 mm)을 사용하였으며 10 μl을 injection, 유속은 0.7 ml/min으로 실시하였다. 표준원액 1 mg/ml을 제조하였고 MeOH로 희석하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 μg/ml 농도가 되도록 표준용액을 제조하였다. 복분자 부산물에 많은 물질 중 gallic acid만을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는지를 확인하기 위해 gallic acid 표준물질 (sigma, USA)과 비교하였을 때 retention time이 약 10분대에 검출되어 동일 물질임을 확인하였으며 복분자 부산물에서 다른 peak과 분리됨을 확인하였다.

표 28. gallic acid 분석 조건

Parameters	Conditions																					
HPLC model	waters 2695 separation module																					
Column	shiseido capcell pak C18 UG 120 (5 μm, 4.2 x 250 mm)																					
Column temperature	30°C																					
Flow rate	0.7 ml/min																					
Injection	10 μl																					
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O (0.1% phosphoric acid) B: methanol																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	time (min)	A (%)	B (%)	0	90	10	5	90	10	15	80	20	20	0	100	25	90	10	30	90	10
time (min)	A (%)	B (%)																				
0	90	10																				
5	90	10																				
15	80	20																				
20	0	100																				
25	90	10																				
30	90	10																				
Detector	waters 996 photodiode array (220 nm)																					

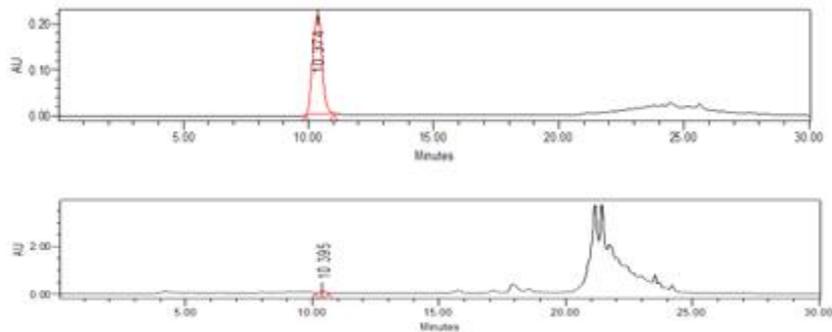


Fig. 97. 표준물질 (위)과 시험물질 (아래)-

Gallic acid는 ellagic acid의 함량에 비해 약 5배 (ellagic acid 함량: 3.3~3.8 mg/g, gallic acid 함량: 0.65~0.8 mg/g)가량 차이를 보였으며 이는 복분자씨추출물 제조시 gallic acid의 함량을 정확하게 확인할 수 없기 때문에 지표물질인 ellagic acid와의 상관관계를 통해 알 수 있을 것으로 판단된다.

Ellagic acid와 gallic acid의 상관관계 ( $R^2$ )를 알아보기 위하여 복분자씨추출물 시료를 1 mg/ml로 제조하여 MeOH로 0.7, 0.5, 0.3, 0.1 mg/ml로 각각 희석하여 분석을 진행하였다. 분석은 ellagic acid와 gallic acid 분석법으로 각각을 분석하였고 각각의 결과값으로 상관관계를 나타내었다.

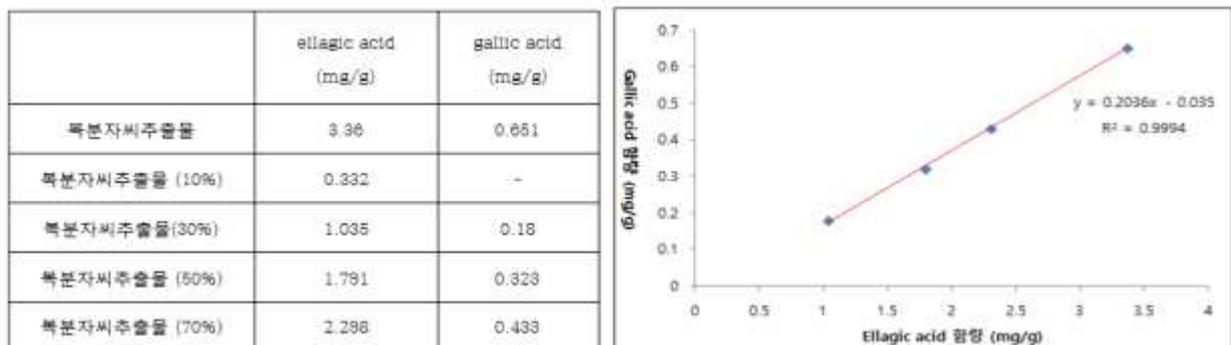
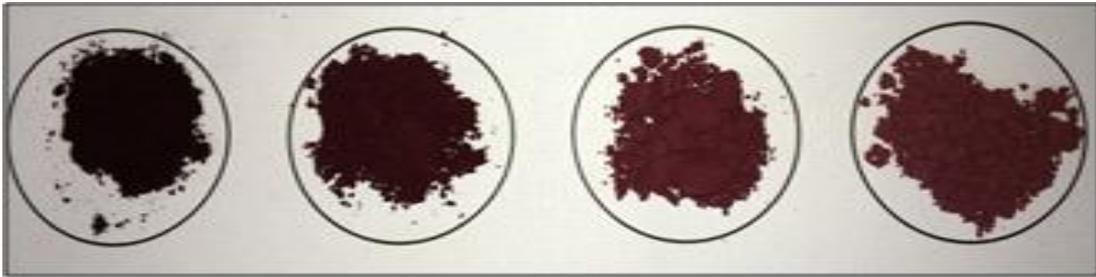


Fig. 98. 시료 농도별 ellagic acid와 gallic acid의 함량 (왼쪽)과 상관관계 (오른쪽)

위의 표는 ellagic acid와 gallic acid의 상관관계 함수로 각 농도별 함량을 표시하였다. 상관 계수인  $R^2$  ( $R^2$ 가 1에 가까울수록 두 물질 사이의 상관관계가 높다는 것을 의미)는 0.9994로 1에 매우 가까운 수치가 나왔으며 이는 지표물질인 ellagic acid와 gallic acid가 농도에 비례하여 함량의 차이가 나타나는 것으로 판단된다.

### (3) 복분자씨추출물의 식품소재로 활용을 위한 분말조건 설정

복분자씨추출물의 용해성 실험을 수행하기 위하여 50%, 30%, 20% 복분자씨추출물을 제조하였다. 50% 복분자씨추출물은 100% 복분자씨추출물 200 g과 부형제인 dextrin 200 g을 물과 혼합하여 70°C에서 교반하였다. 혼합액 (30 brix)을 자사가 보유하고 있는 소형 spray dryer을 이용하여 분말화하였고 30%와 20% 복분자씨추출물도 동일한 조건으로 시료를 제조하였다. (Fig. 99.)



복분자추출물-100%    복분자추출물-50%    복분자추출물-30%    복분자추출물-20%

Fig. 99. 복분자씨추출물 함량별 건조분말의 성상

다음과 같이 제조한 4가지 시료에 대한 용해도 실험을 진행하기 위해 50 ml cornical tube에 각각 1 g씩 분주하였다. 그 후 정제수 50 ml을 넣고 voltex를 이용하여 완전 용해한 후 2 시간 동안 냉장 (4°C)보관하였다. 그 결과 100%와 50% 복분자씨추출물에서는 소량의 침전물이 생성되었으며 30%, 20% 복분자씨추출물에서는 침전물이 생성되지 않았다.

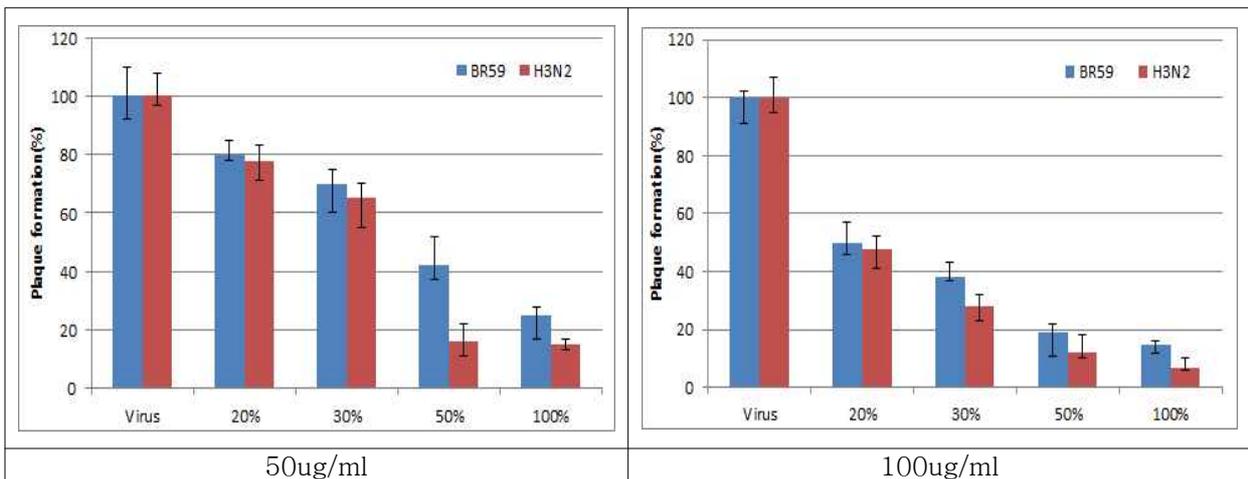


Fig. 복분자씨추출물 함량별 항바이러스 활성 평가

복분자씨추출물의 함량별 항바이러스 활성을 평가하기 위해 농도를 50, 100ug/ml 로 희석

하여 인플루엔자 A바이러스 2종(BR59, H3N2)을 감염시킨 MDCK 세포에 co-treatment하여 저해활성을 분석한 결과 함량에 따라 농도 의존적으로 활성이 나타났다. 산업적 응용을 위해서는 제품의 흐름성이 중요하며, 이를 고려하면 제품의 특성에 맞게 복분자씨추출물을 함량 별로 적용할 수 있음을 확인하였다.

#### 나. 항바이러스 식품소재의 제형설계 및 제품 다양화

항바이러스용으로 복분자씨추출물의 식품으로의 용도를 다양화 하기 위하여서는 대량생산 공정으로 제조된 복분자씨추출물에 대한 제형별 활용시에 지표물질이 확인되고 제품에 있어서의 물성적 변화가 없어야 한다. 따라서, 본 연구에서 복분자씨추출물의 제품별 제형화 시험을 통하여 활용도를 검증하고자 하였다.

##### (1) 바이러스 식품 소재의 캡슐등 제형설계

바이러스 식품 소재의 경우 용도에 있어서 특히 건강기능식품등 기능성 제품등에 활용도가 높을 것으로 보인다. 따라서 이러한 건강기능식품의 주제형인 캡슐, 타정등에 적용시험을 하였다.

- 건강기능식품의 제형은 정제, 캡셀제, 액제, 환제, 시럽제, 산제, 유동엑스제, 엘릭실제 등 다양한 형태로 존재하여 내용 액량 및 기능성분의 최종 전달 부위, 복용의 편의성 등을 고려하여 다양한 형태로 개발되어진다.

- 정제(Ttablet)의 경우 을 일정한 형상으로 압축하여 만든 것으로 복용하기 편하고, 정확한 양을 복용할 수 있다는 장점을 지니고 있고 당(糖)을 입혀서 약의 나쁜냄새와 맛의 마스킹이 가능한 당의정, 당대신 폴리머 형태의 얇은 필름을 씌운 필름코팅정, 장내에서 분해되는 소재로 코팅한 장용정, 설하정, 바칼정, 저작정, 다층정, 비등정 등으로 나눌 수 있다.

- 캡셀제(Capsule): 캡셀제는 의약품을 액상, 현탁상, 풀상, 분말상 또는 과립상 등의 형태로 캡셀에 채워 넣은 것 경질캡셀제(수분이 13~16%)와 연질캡셀제 등이 있다.

- 본 연구에서는 천연물 추출물의 적용이 가장 용이하고 실제 식품에성의 복용 편의성을 고려한 제형응용성을 검토하였다.

##### ○코팅정의 조성연구

주성분인 복분자씨추출물이 천연물 유래원료의 특성상 인습성, 불량한 유동성 및 타정성을 개선하기 위하여 다양한 부형제를 검토하여 최적의 고품 제재 처방을 검토하였다.

나정의 외관 성상을 개선하고 제품 안정성을 확보(수분 침투방지)하기 위해 다양한 코팅 기제를 평가 후 코팅기제로 오파드라이(별규)를 이용하여 방습코팅을 진행하였다. 이때 경도 4Kp, 마손도는 0.1%, 봉해도는 5분 이내였다.

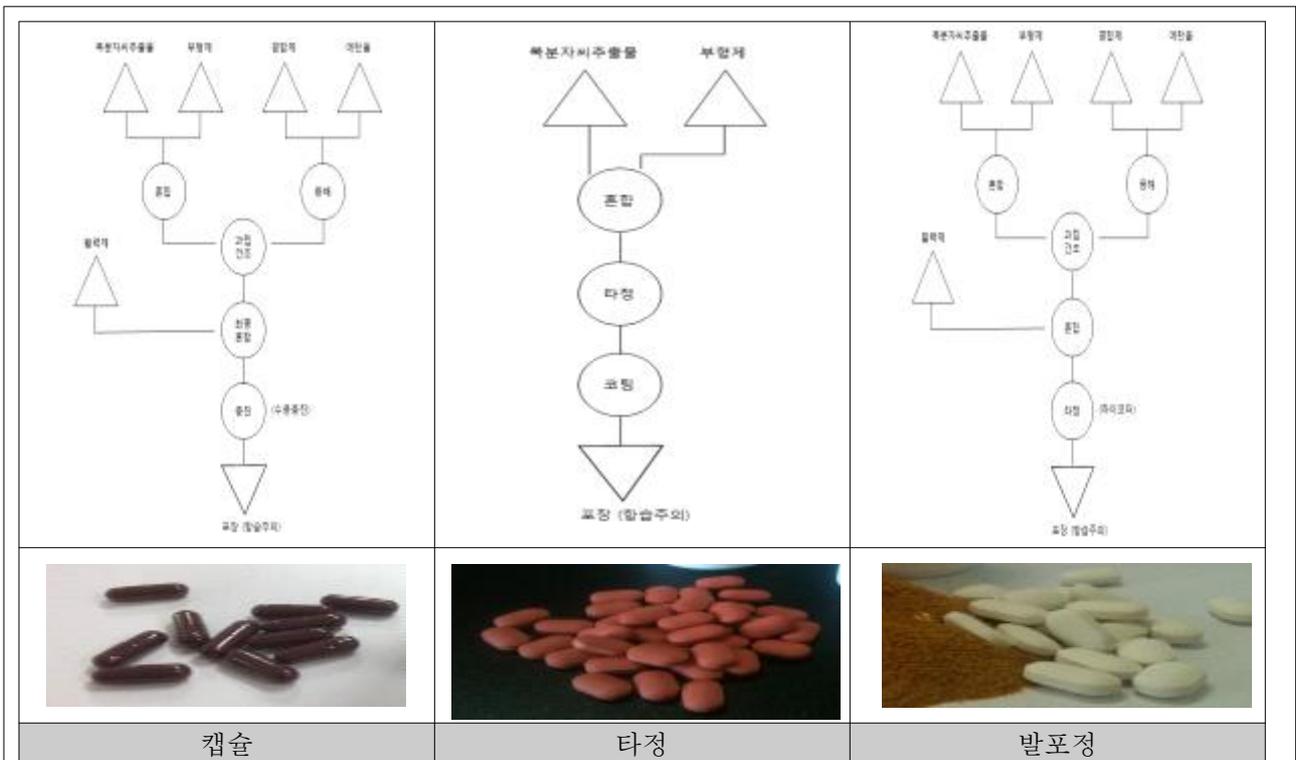


Fig. 100. 복분자씨추출물 제형 설계

○ 발포정 제형연구

복용이 간편한 발포정으로 제형화 하기 위하여 물에서 2분 이내에 녹을 수 있는 처방을 구성하기 위하여 제약에 사용되는 다양한 부형제를 검토하여 최적의 처방을 연구하였다.

부형제로는 유당(식첨), 미결정셀룰로오스(식첨), 무수인산수소칼슘(식첨), 옥수수전분(식첨), 경질무수규산(식첨), 주석산(식첨), 구연산(식첨) 및 붕해제로는 전분글리콜산나트륨(엔에프), 크로스카르멜로스나트륨(엔에프), 크로스포비돈 및 결합제로는 포비돈(약전), 코포비돈(이피), 히드록시프로필셀룰로오스(약전), 그리고 활택제로는 스테아린산마그네슘(약전), 탈크(약전) 등의 원료를 이용하여 제제연구를 진행하였다.

복분자씨추출물의 경우 인습성이 약하여 발포정으로서 효과가 많이 뛰어나는 현상을 확인할 수 있었으며, 주성분의 과일같은 맛과 향취로 인하여 복용하기 용이한 것으로 발포정 제형시 상품성에 있어 경쟁력이 있을 것으로 사료되었다.

표 29. 기능식품원료로서의 제품 제형별 배합비 현황

	용도	발포정		타정		캡슐	
		수량(mg)	비율(%)	수량(mg)	비율(%)	수량(mg)	비율(%)
복분자씨추출물	주성분	250	17.5%	250	41.7%	250	50.0%
영화일인산에스테르치아민		18.42	1.3%				
인산리보플라빈나트륨		20.03	1.4%				
유당							
미결정셀룰로오스	결합제			180	30.0%	100	20.0%
염산피리독신		10	0.7%			125	25.0%

0.1%		10	0.7%				
니코틴산아마이드		50	3.5%				
판토텐산칼슘		25	1.7%				
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	결합제					10	2.0%
이산화규소	고결방지제					5	1.0%
전분				130	21.7%		
비오틴		0.15					
아스코르빈산		250	17.5%				
경질무수규산	고결방지제			20	3.3%		
염산		0.4					
탄산칼슘(칼슘97.60mg)		243	17.0%				
스테아린산마그네슘	활택제			10	1.7%	5	1.0%
중탄산마그네슘(마그네슘49mg)	활택제	194	13.6%				
황산마그네슘(마그네슘 51mg)	활택제	328	22.9%				
구연산아연 삼수화물(아연10mg)		32	2.2%				
히드록시프로필메틸셀룰로오스	코팅제					4.5	0.9%
자당지방산에스테르	코팅제					0.5	0.1%
오피드라이	코팅제			10	1.7%		
합 계		1431	100.0%	600	100.0%	500	100.0%

## (2) 실용화를 위한 시제품제조(껌, 발효유, 다류등)

기능성식품소재의 경우 대상질환이나 타겟기능성에 효능성분에 근거를 두고 연구를 수행하며 제조공정중 추출은 대부분 용매(주정등)로 추출되어 기능성물질들이 기호학적·물성학적 측면에서 소재로서의 응용성에 많은 제한을 가지도록 한다. 본 연구의 항바이러스용 복분자씨추출물 역시 주정 추출물로서 식품에서의 응용성을 사전 실시하여 개선보완책을 추구하여 최종연구결과물의 식품학적 경쟁력을 확보하고자 하였다.

### (가)껌류에 적용 시험

항바이러스 효능을 가진 복분자씨추출물을 일상생활에서 쉽게 접할 수 있는 껌의 형태로 하여 사람들이 쉽게 섭취할 수 있도록 하였으며, 이때 복분자씨추출물이 껌의 원료로서 응용이 가능한지와 껌을 통하여 인체 내부로 섭취가 용이한 지에 대하여 조사하였다.

-껌의 제조 : 껌조성물은 먼저 껌베이스와 전분가수분해물, 포도당, 글리세린, 설탕분말을 예비 가열한 믹서에 넣어 혼합한 다음 믹서의 내부 온도를 55℃로 유지하면서 향료, 정제수 및 복분자씨추출물을 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%의 농도를 각각 넣은 다음 20분 동안 혼합하고 추출하여 압연하였다.

표 30. 껌제품 배합비 현황

원료명	배합비			
	껌S-1	껌S-2	껌S-3	껌S-3
복분자씨추출물	0.1 %	0.5%	1.0%	1.5%
껌베이스	20%	20%	20%	20%
설탕분말	54%	54%	54%	54%
포도당	10%	10%	10%	10%
전분가수분해물	10%	10%	10%	10%
글리세린	5%	5%	5%	5%
향료	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
정제수	적량	적량	적량	적량



Fig. 101. 복분자씨추출물 함유 껌

-섭취효과 : 복분자씨추출물로 제조한 껌조성물의 섭취 강도는 껌을 30분간 씹은 후 내부에 잔류하는 지표물질(elagic acid)을 분석하여 복분자씨추출물의 흡수정도를 분석하였다. 분석용 시료는 각 껌 10개에 대하여 각각 분석을 추진하였다.

껌을 씹기 전과 씹은 후의 비교 결과 껌에 첨가한 복분자씨추출물은 껌을 씹는 동안 모두 섭취가 가능함을 알 수 있었다.

표 30. 껌의 씹기 전후의 elagic acid의 함량 섭취 정도 분석결과

항 목	elagic acid (mg/g)			
	껌S-1	껌S-2	껌S-3	껌S-4
껌(원형)	0.014	0.036	0.07	0.106
껌(씹은후)	0	0	0	0

-검에 대한 관능 평가 : 패널 8명을 대상으로 5점 척도법으로 관능평가를 실시하여 복분자씨추출물 함유검의 만족도 조사를 실시하였다.

표 31. 복분자씨추출물 함유 검의 관능평가 결과

항 목	검S-1	검S-2	검S-3	검S-4
단맛	4.3	4.3	4.3	4.3
신맛	4.1	4.2	4.0	4.0
뽀은맛	4.0	4.0	3.8	3.8
전반적기호도	4.0	4.2	3.9	3.9

검 제품에 대한 관능평가 결과 추출물 함량이 증가함에 따라 신맛과 뽀은맛의 기호도가 감소함을 알 수 있었으며 검S-2 제품이 전반적인 기호도 면에서 가장 높은 점수를 얻었으며 제품 적용시 가장 적합할 것으로 판단된다.

**(나)발효유 적용시험**

복분자씨추출물의 용도다양화를 위하여 발효유등 유산균 관련한 관련된 제품등 마시는 음료용으로 사용이 가능한지를 알아보기 위하여 발효유를 자체적인 유산균을 사용하여 제조하여 물성과 유산균에 미치는 영향을 조사하였다. 발효유의 제조는 다음과 같은 공정으로 제조를 하였다.

- ① 2ℓ의 우유에 탈지분유 6g 용해한다.  
(지방=약 3.5g, 총고형분(TS) = 14.5%, 무지고형분(MSNF) = 11%)
  - ② 80~85℃에서 30분간 멸균한다. (살균과정)
  - ③ 42℃로 냉각한다.
  - ④ 0.4g의 동결건조종균을 접종한다.
  - ⑤ 냉각수에 담가 20℃이하로 냉각시킨다.
  - ⑥ 42℃에서 5시간 배양하여 pH4.2가 되도록 한다.
  - ⑦ 함량별 복분자씨추출물을 첨가하여 용해 혼합한다.
- 측정: 유산균 수를 배양시작 시와 종료 시에 한다.



Fig. 102. 복분자씨추출물 함유 발효유

발효유제품에 복분자씨추출물 적용시 첨가량에 따른 분산 정도 및 침전, 엉김현상을 육안으로 관찰하였을 때 각 첨가량별 특이점은 없었으며 골고루 분산됨을 알 수 있었다.

-점도 측정 : Brookfield 점도계(모델명 DV-II+ Pro)의 LV-2(62) 스피ن들을 사용하여 20RPM에서 측정하여 첨가량에 따른 점도 변화를 측정하였다.



Fig. 104. 복분자씨추출물 함유 발효유 점도 측정

표 33. 복분자씨추출물 첨가량에 따른 발효유의 점도 측정 결과

구 분	복분자씨추출물 첨가량			
	0%	0.067%	0.2%	0.333%
점도(cP)	316	317	317	319

점도측정 결과 복분자씨추출물 첨가가 점도에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타나 제품의 물성에 영향이 없이 사용 가능 할 것으로 판단된다.

-발효유에 대한 관능 평가 : 패널 8명을 대상으로 5점 척도법으로 관능평가를 실시하여 복분자씨추출물 함유 유제품의 만족도 조사를 하였다.

표 34. 복분자씨추출물 함유 발효유의 관능평가 결과

항 목	복분자씨추출물 첨가량			
	0%	0.067%	0.2%	0.333%
색상	3.5	4.1	4.2	4.1
단맛	3.8	4.0	4.0	4.0
신맛	3.8	4.1	4.0	4.0
뽀은맛	4.0	4.0	3.7	3.5
전반적기호도	3.8	4.2	4.0	3.9

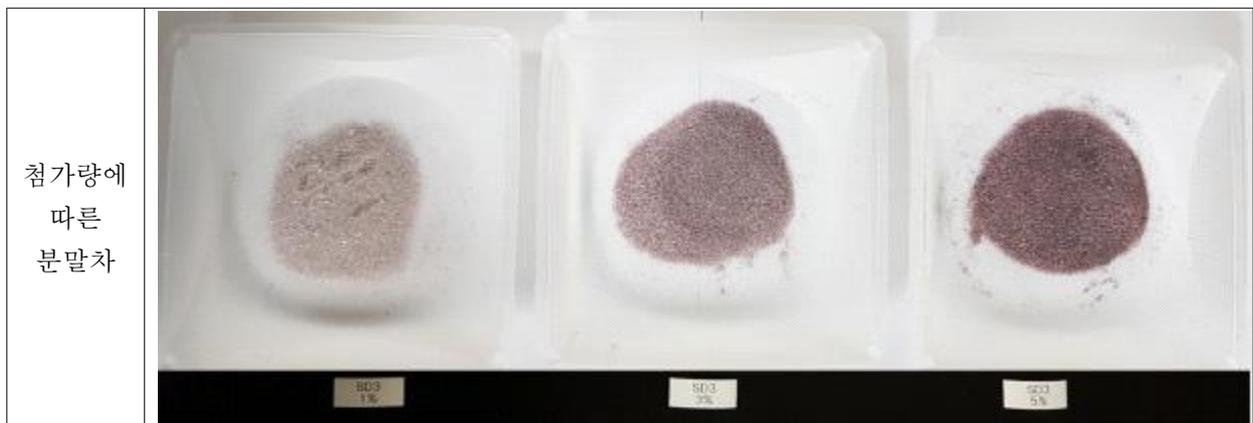
발효유 제품에 대한 관능평가 결과 추출물 함량이 증가함에 따라 색상에 기호도는 증가하고 있으나 뽀은맛에 대한 기호도가 감소함을 알 수 있었으며 복분자씨추출물 0.067% 첨가 제품이 전반적인 기호도 면에서 가장 높은 점수를 얻어 발효유 제품에 적용시 가장 적합할 것으로 판단된다..

**(다)다류 적용시험**

일상적인 섭취가 가능한 식품 중 분말형태의 다류 제품에 복분자씨추출물의 적용가능성을 검토하기 위해 분말차 배합비를 응용한 제품에 대한 가용성 및 관능을 평가하였으며 다류분말은 다음의 배합비로 제조하였다.

표 35. 다류제품 제품 배합비 현황

원료명	배합비(%)		
복분자씨추출물	1.0	3.0	5.0
세립당	31.0	29.0	27.0
정백당	64.1	64.1	64.1
블루베리향	0.7	0.7	0.7
구연산	2.1	2.1	2.1
구연산나트륨	0.3	0.3	0.3
비타민-C	0.8	0.8	0.8



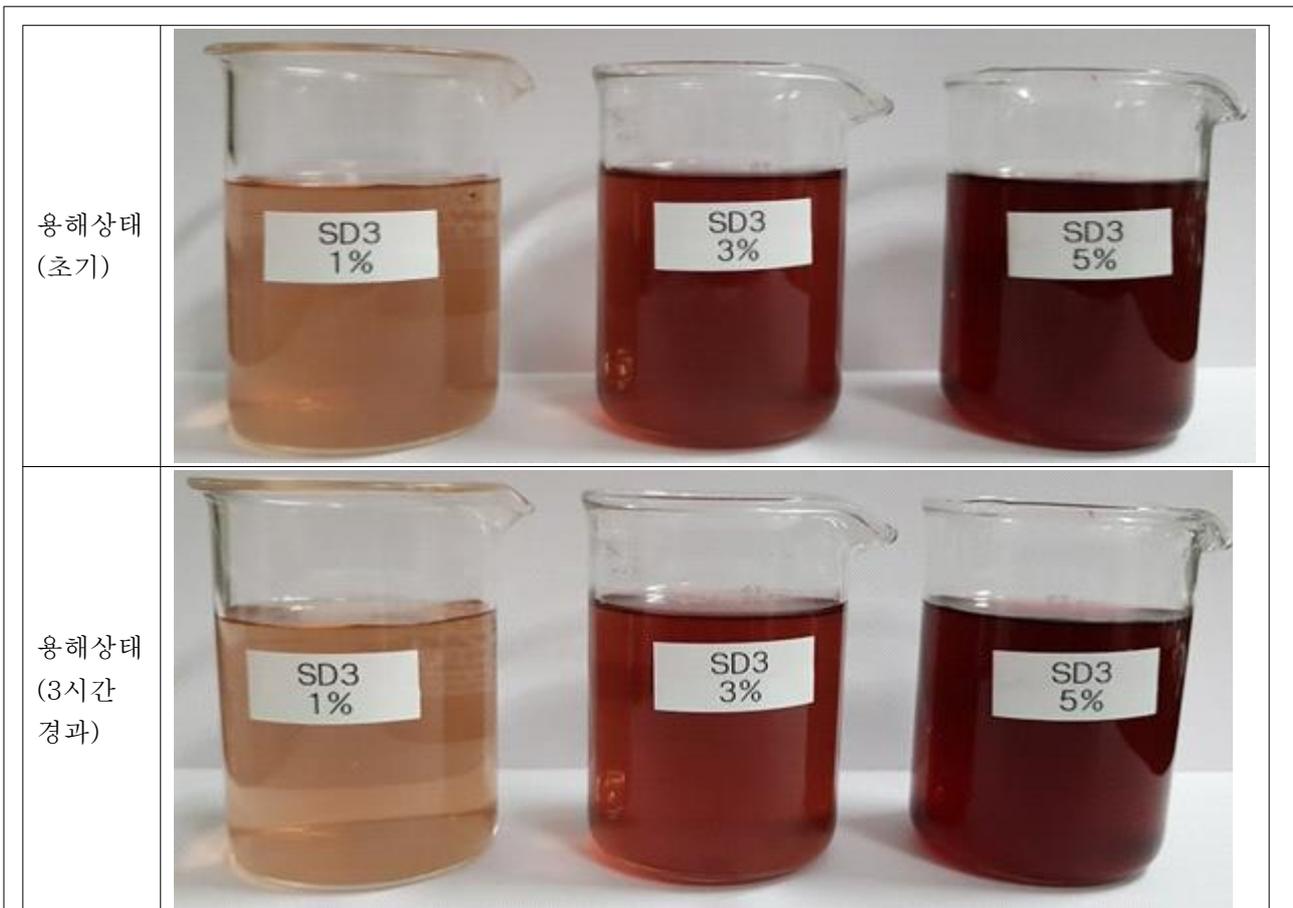


Fig. 104. 복분자씨추출물 적용 다류 제품

복분자추출물 첨가한 다류 제품 제조시 원료간 멍침 없이 골고루 잘 섞였으며 70℃ 온수를 이용한 용해 실험에서도 첨가량에 따른 제품별로 침전물 없이 전부 용해되었으며 3시간 방치 후에도 침전물 없이 안정하였다.

-다류 제품 관능 평가 : 제품 10g을 70℃ 온수 100ml에 용해시켜 패널 8명을 대상으로 5점 척도법으로 관능평가를 실시하여 복분자씨추출물 함유 다류 제품의 만족도 조사를 하였다.

표 36. 복분자씨추출물 함유 다류 제품 관능평가 결과

항 목	복분자씨추출물 첨가량		
	1%	3%	5%
색상	4.1	4.3	3.8
단맛	4.0	4.0	4.0
신맛	4.1	4.0	4.0
떫은맛	4.0	3.9	3.7
전반적기호도	4.2	4.0	3.9

다류 제품에 대한 관능평가 결과 추출물 함량에 따라 5% 첨가 제품의 경우 색상 및 떫은 맛은 기호도가 감소하였으며 3% 첨가 제품의 경우 색상에서 가장 높은 점수를 얻었다. 전반적인 만족도 부분에서는 1% 첨가군이 가장 높은 만족도를 나타내었다. 다류 제품에 적용시

색상, 맛 및 전반적인 기호도를 고려하면 1% 첨가 제품이 가장 적합할 것으로 판단된다.

## 12. 지적재산권의 확보 및 제품 마케팅

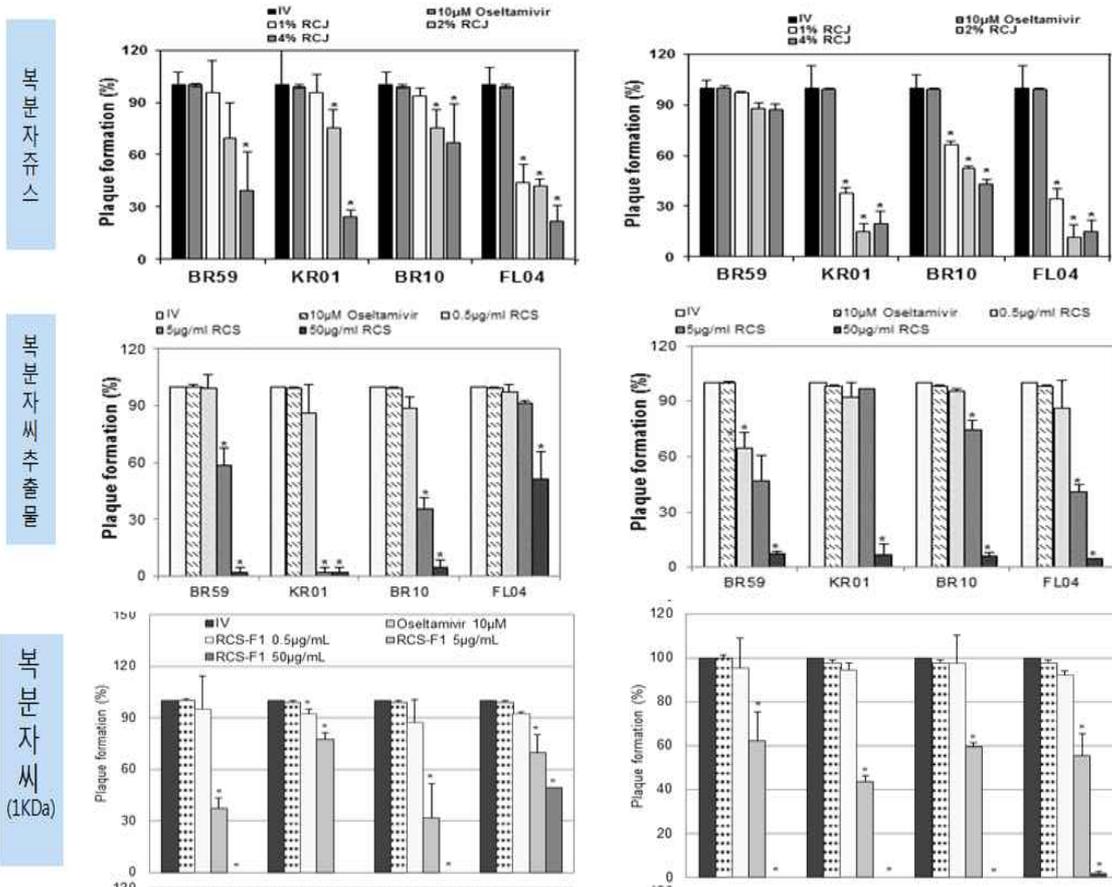
### 가. 지적재산권 확보

복분자씨추출물에 대한 연구수행에 따른 지적재산권확보를 위해 2건의 특허 출원(항바이러스 기능을 가지는 복분자씨 추출물의 제조방법 및 그 조성물(출원번호 : 10-2015-0090828), 엘라그산을 함유하는 복분자 추출물의 제조방법 및 엘라그산의 분리방법(출원번호 : 10-2016-0067311))을 진행하였다.

### 나. 항바이러스 천연식품소재와의 비교분석 및 마케팅

#### (1) 복분자 부위별 항바이러스 시험결과

복분자의 부위별로 항바이러스 효과를 분석한 결과 복분자주스보다는 복분자씨 추출물에서 바이러스에 대한 효과가 크게 증가하는 것을 알 수 있었다.



#### (2) 유사한 베리류 및 주스류와의 항바이러스 비교시험결과

복분자 주스, 크랜베리 주스, 포도 주스 및 오렌지 주스의 항바이러스 효과에 대한 비교 연구결과, 복분자 주스와 크랜베리 주스는 3%, 6%의 농도에서 플라크 형성을 감소시켰으

나 포도 주스와 오렌지 주스는 이러한 바이러스에 대한 억제 효과를 나타내지 않았다.

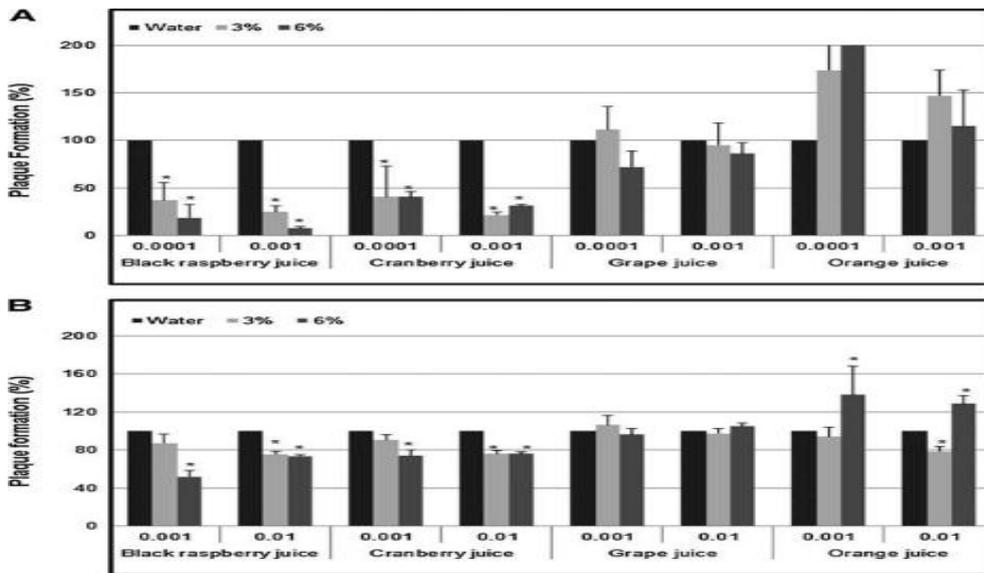


Fig. Inhibition of plaque formation by various fruit juices on murine norovirus-1 (MNV-1)(A) and feline calicivirus-F9(FCV-F9)(B) using co-treatment.

### (3) 기존 항바이러스 관련 기능성 식품류와의 비교시험결과

대량생산 복분자씨추출물을 기존 시중에서 많이 식품소재로 이용되고 있는 식품들과 면역 관련하여 비교분석을 실시하였다. 실시항목은 cell viability (MTT assay), NK cell activity, Phagocytic activity 측정, Virus DNA replication inhibition의 4가지를 추진하였다.

1) cell viability (MTT assay) cell suspension을 haemocytometer를 사용하여 counting한 다음, 96 well plate의 각 well에 원하는 적정농도의 cell 부유액 180 ul를 넣고, 측정하고자 하는 시료는 PBS에 녹인 후 농도별로 20ul씩 각 well에 첨가한 다음 원하는 시간만큼 incubation한다. 시료를 제거하고, 각 well에 MTT solution을 100ul씩 첨가한 후 4시간동안 incubation시킨 후 MTT 회색액을 처리하고, 100ul의 DMSO를 첨가하여 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

2) NK cell activity : \*NK cell의 세포 독성 능력을 보는 방법으로는 NK 세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포(NK-sensitive cell line)를 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법 (modified lactate dehydrogenase [LDH] release assay)를 이용.

3) Phagocytic activity 측정 (by Zymosan substrate)

RAW 264.7 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well씩 분주한 후 24시간동안 배양시켜 Cytoselect 96 well phagocytosis assay kit(Cell biolabs Inc., San Diego, CA,USA)를 이용. 처리한 다음 ELISA reader를 이용하여 흡광도 405 nm에서 측정.

4) Virus DNA replication inhibition : SC-1 세포를 6 well plate에  $5 \times 10^6$  cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 분주하여 12시간동안 안정화하여 시료를 농도별로 세포에 분주 4시간 후 trypsin 0.25% solution (Hyclone Laboratories)으로 세포를 수집하여

RNeasy extraction kit(Qiagen,Gaithersburg, Maryland, USA) RNA 추출하고 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성한 다음 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 Real-Time PCR을 사용하여 측정하고 Applied Biosystems에서 제공하는One step system software v2.1로 분석하였음

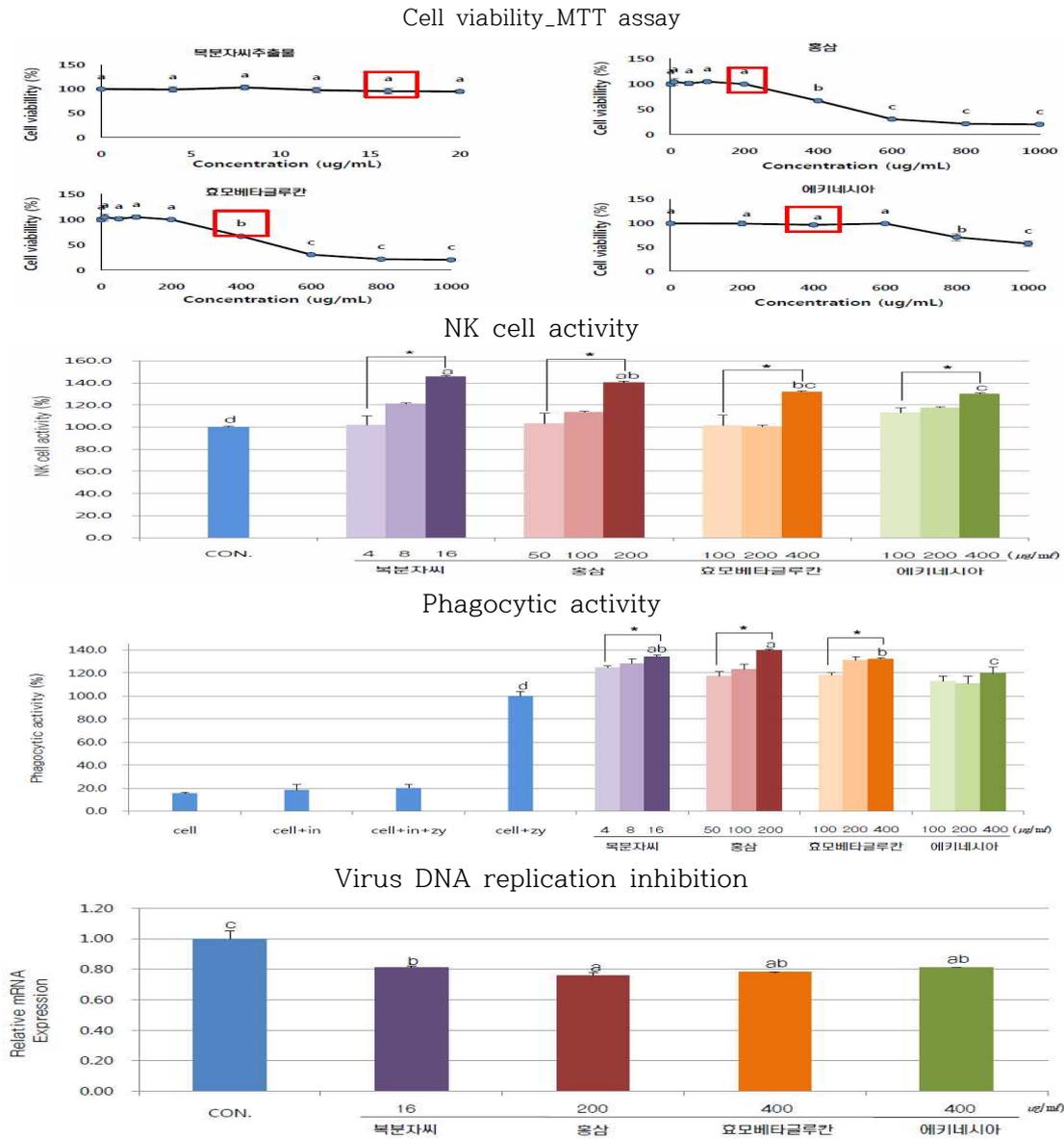


그림 복분자씨추출물의 면역증강관련 비교시험 결과

복분자씨추출물은 in vitro 스크리닝 결과, 대조군에 비해 NK Cell활성 45% 증가, 대식세포 활성 35%를 유의적으로 높일 뿐만 아니라 바이러스 감염에 대한 DNA복제를 약 20% 억제 함으로써 면역증강에 효과가 면역증강 기능성 소재인 홍삼과 유사하게 나타났으며, 효모베타글루칸과 에케네시아 보다 면역 세포의 활성 효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

### 13. 산업화를 위한 대량생산 소재의 저해활성 확인

#### 가. 대량생산 소재의 활성

■ 1 세부과제에서 생산한 복분자씨에 50% 주정을 10배수 첨가하여 50°C, 6시간 추출한 대량생산 시료 (SD-RC-004)를 PBS에 용해하여 최종농도가 50 µg/ml 되도록 희석함. MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 3종 (BR59, PR8, H3N2)과 B 바이러스 (B/FL04)을 감염시키면서 동시에 희석 시료를 각각 1시간 co-treatment한 후, 72시간 동안 37°C, 5% CO2 incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켜 저해활성을 분석하였음, 대량생산 소재 (SD-RC-004)의 인플루엔자 바이러스 BR59, PR8, H3N2 및 B/FL04의 4종에 대한 저해활성이 RCSF1, SD2, SD3와 유사함을 확인하였음 (Fig. 105).

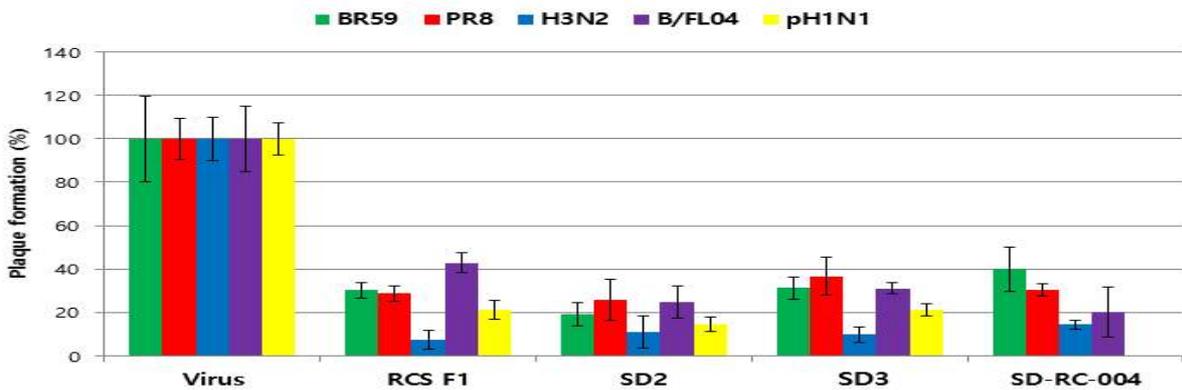


Fig. 105. 대량생산 시료 SD-RC-004와 RCSF1, SD2, SD3와의 활성 비교 분석

■ SD-RC-004의 최종농도를 5, 50, 100 µg/ml로 희석하여 MDCK세포에 시료를 각각 1시간 co-treatment한 후, 72시간 동안 37°C, 5% CO2 incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켜 농도의존성을 분석한 결과, 인플루엔자 바이러스 PR8, BR59 및 H3N2에 대하여 SD-RC-004는 농도의존적인 저해 활성을 보였음 (Fig. 106).

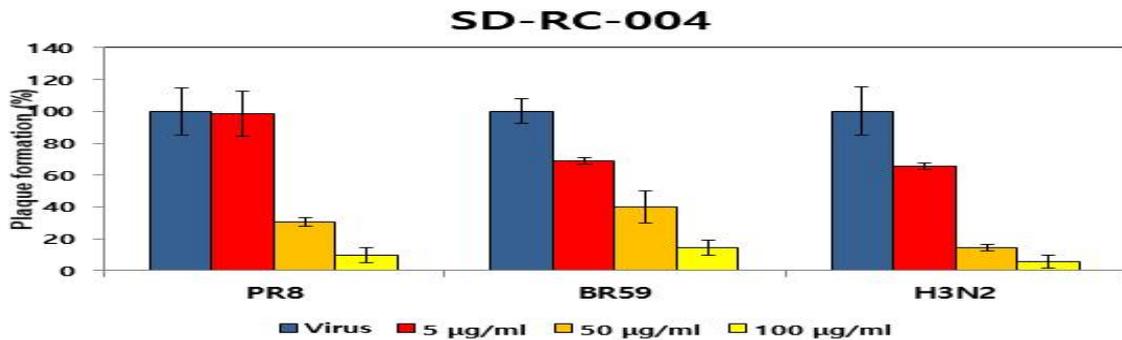


Fig. 106 SD-RC-004의 PR8, BR59 및 H3N2에 대한 농도 의존적인 저해활성

#### 나. QC 테스트 지표변화 등 안정성 연구

■ 대량생산시료 (SD3)의 온도 안정성 연구를 위하여 시료를 25°C 및 70°C incubator에 8주 또는 4주간 각각 저장하면서 0주, 4주, 8주차 (또는 0, 2, 4주차)에 시료를 취하였음. 시료는 Folin Ciocalteu's 방법으로 total polyphenol contents (TPC)를 분석하여 garlic acid equivalentents (GAE) per mL로 제시하였고, BR59 바이러스와 B 바이러스 (B/FL04)를 대상으

로 plaque assay를 수행하였음 (Fig. 107-109).

■ 실험 결과, 25°C에서 0-8주까지 저장한 시료와 70°C에서 0-4주의 TPC는 103-113 µg/ml 범위로 나타나 온도에 따른 저장기간에 의한 차이는 크게 나타나지 않았음 ( $p < 0.05$ ). 시료 100 µg/ml, 25°C 저장 4주와 8주의 BR59 바이러스 저해 활성은 각각 67%와 73%로 나타났으나 통계적인 유의차는 없으며 ( $p < 0.05$ ), B 바이러스 저해활성은 100%로 나타났음. 그러나 70°C에서 2주 및 4주간 저장한 시료 100 µg/ml의 BR59 저해활성은 각각 90% 및 84%, B 바이러스 저해활성은 각각 75%와 76%로 확인되었음. 즉 저장 온도에 따른 시료의 TPC는 차이가 없었으나, 시료를 고온에서 4주간 저장 시 인플루엔자 BR59 바이러스에 대한 저해활성이 약간 감소하였으나 유의차는 나타나지 않았음 ( $p < 0.05$ ).

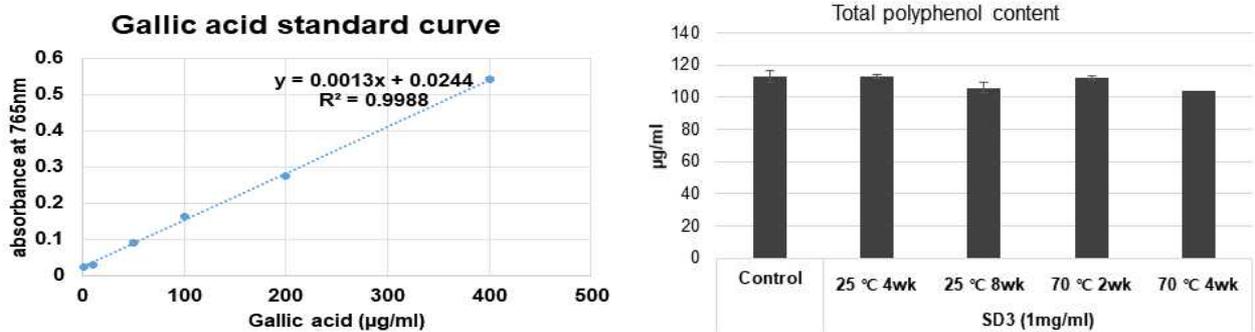


Fig. 107. Gallic acid standard curve (왼쪽)과 SD3의 온도별 저장기간에 따른 total polyphenol contents (gallic acid equivalents, µg/ml)

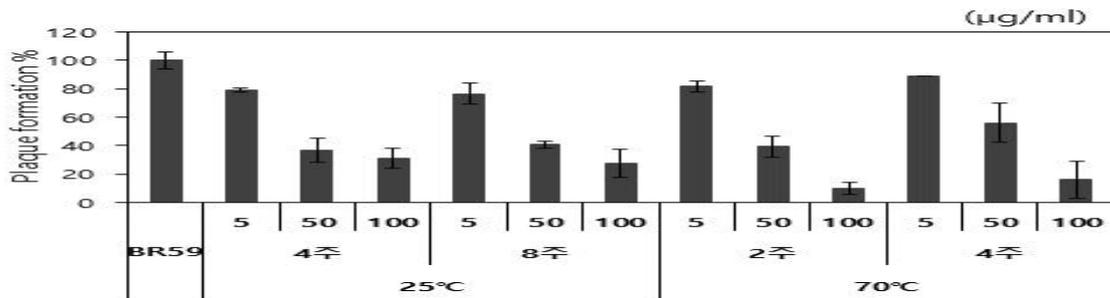


Fig. 108. 온도별 저장기간에 따른 SD3의 BR59 저해 활성 plaque assay

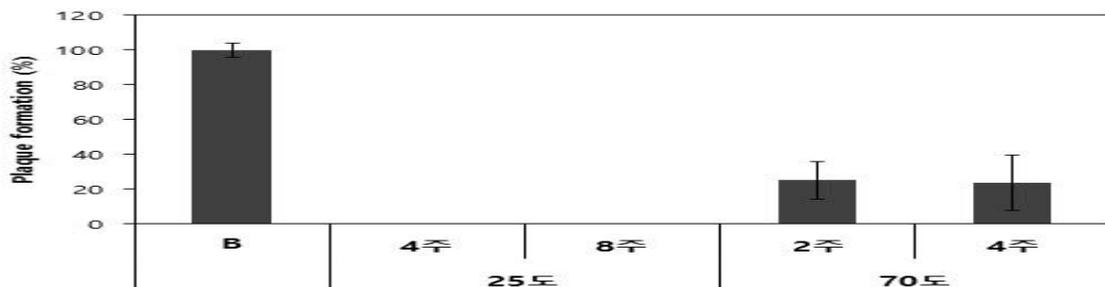


Fig. 109. 온도별 저장기간에 따른 SD3의 B virus 저해 활성 plaque assay

■ 대량생산시료 (SD3)의 pH 안정성 연구를 위하여 시료를 PBS 용액에 용해시킨 후 각각 pH 4, 7, 10로 맞춘 후 실온에서 1시간 incubation하고 중성으로 pH를 조절하였음.

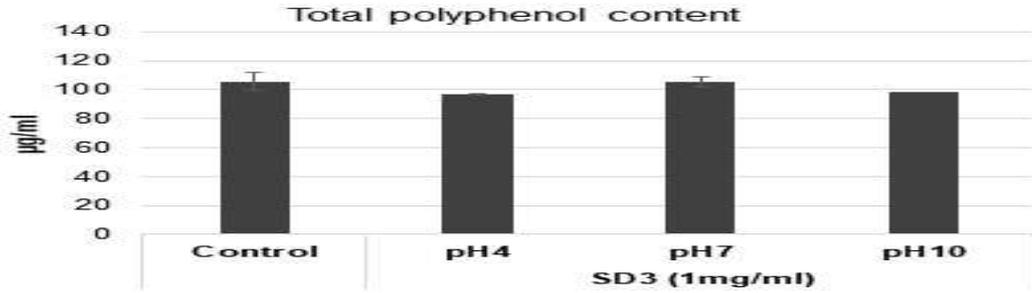


Fig. 110. SD3의 pH에 따른 total polyphenol contents (gallic acid equivalents, µg/ml)

각 시료는 Folin Ciocalteu's 방법으로 total polyphenol contents (TPC)를 분석하여 gallic acid equivalents (GAE) per mL로 제시하였고, BR59 바이러스와 B 바이러스 (B/FL04)를 대상으로 plaque assay를 수행하였음 (Fig. 110-112).

■ 실험 결과, 시료의 pH에 따른 TPC 함량은 97-105 µg/ml 로 큰 차이가 없음을 확인하였음. BR59 인플루엔자 바이러스에 대한 plaque formation 저해는 pH 4에서 97%로 가장 높았고, pH 7과 10에서는 90%로 확인되었음. 그러나 B 바이러스는 시료의 pH 처리에 관계없이 모두 100% 저해되었음.

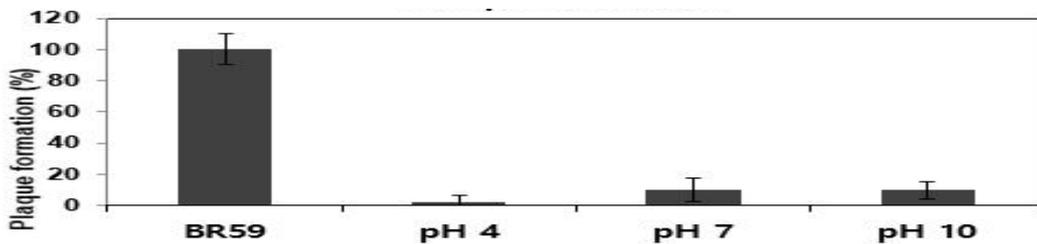


Fig. 111. pH에 따른 SD3의 BR59 저해 활성 plaque assay

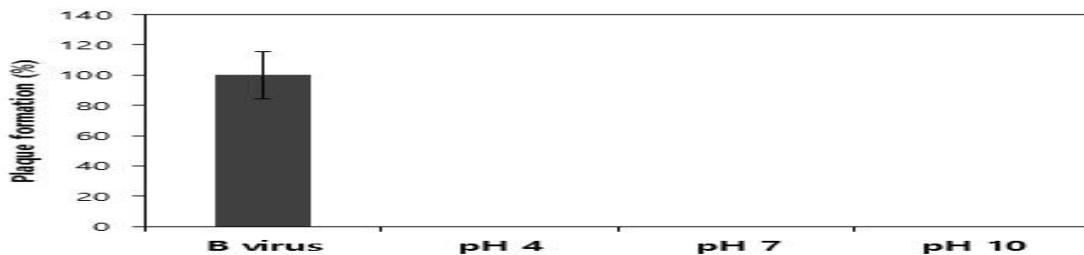


Fig. 112. pH에 따른 SD3의 B virus 저해 활성 plaque assay

#### 다. 대량생산공정 제품의 유효물질의 동정 및 효능 검증 연구

##### (1) LC/MS/MS를 이용한 대량생산 천연물 유효물질 동정

■ 2차년도 기술개발 결과, 평가위원의 의견에 따라 추가적인 유효물질 동정 및 효능 검증 연구를 수행하였음.

■ 복분자씨추출물을 ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8µm 2.1x 100mm) column으로 0.1-1% formic acid/DW 및 ACN 이동상 조건으로 UPLC (UPLC-PDA, Waters, AQUITY Ultra Performance LC) 및 Mass (Waters, Micromass Q-TOF Premier) 시스템으로 분리, 동정하

여, fractionation 후, plaque assay를 통하여 Fr.6 항바이러스 활성이 가장 높음을 2차년도에 보고한 바 있음.

■ 활성이 가장 높은 Fr. 6을 대상으로 flavonoid 정밀분석을 위해 UPLC (UPLC-PDA, Waters, AQUITY Ultra Performance LC) 및 Mass (Waters, Micromass Q-TOF Premier) 을 이용하여 질량(m/z)값, 구성원소값 (element composition), 오차범위, 고유흡광도값 등의 비교를 통해 신뢰도 높은 분석을 실시한 결과, quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-glucoside, 및 orientin을 확인하였음 (Fig. 113).

① Instrument

구분	Instrument
UPLC(UPLC-PDA)	[Waters] AQUITY™ Ultra Performance LC
Mass	[Waters] Micromass Q-TOF Premier™

② Solvents

구분	Solvent
Solvent A	0.1% Formic acid/D.W.
Solvent B	0.1% Formic acid/ACN

③ Method - Gradient

Time(min)	Flow (mL/min)	%A	%B
(Initial)	0.400	95	5
1.00	0.400	95	5
05.00	0.400	80	20
08.00	0.400	60	40
12.00	0.400	2	98
13.40	0.400	2	98
13.50	0.400	95	5
15.00	0.400	95	5

④ Mass Conditions (1 page 분석조건과 동일)

⑤ Column : ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7µm 2.1X100mm Column

⑥ Sample Concentration : 0.5 mg/mL

⑦ Injection Volume : 2 µL

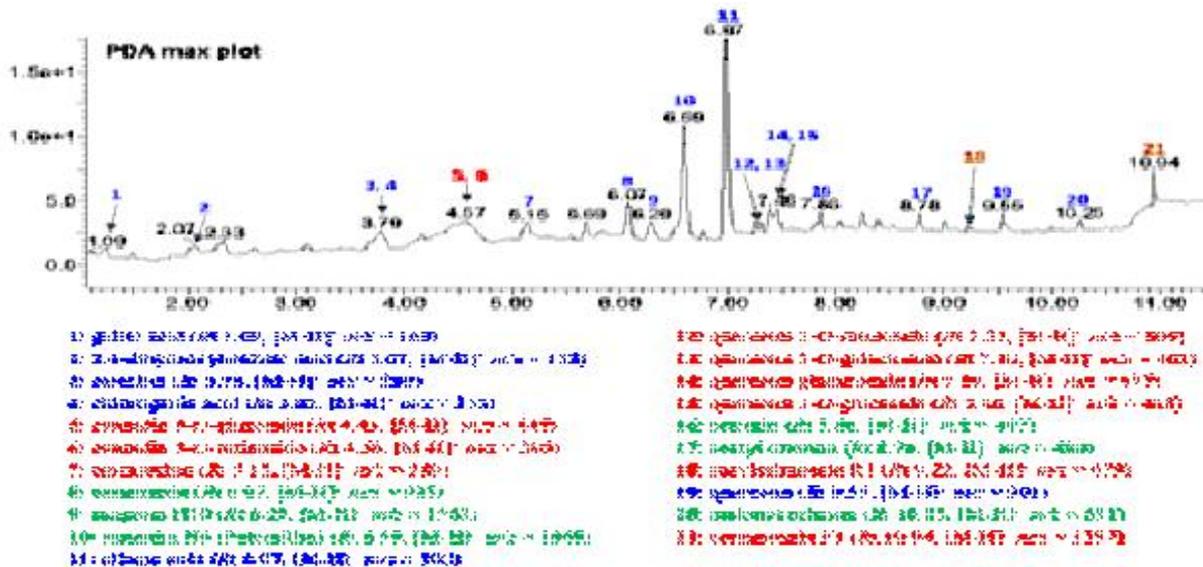


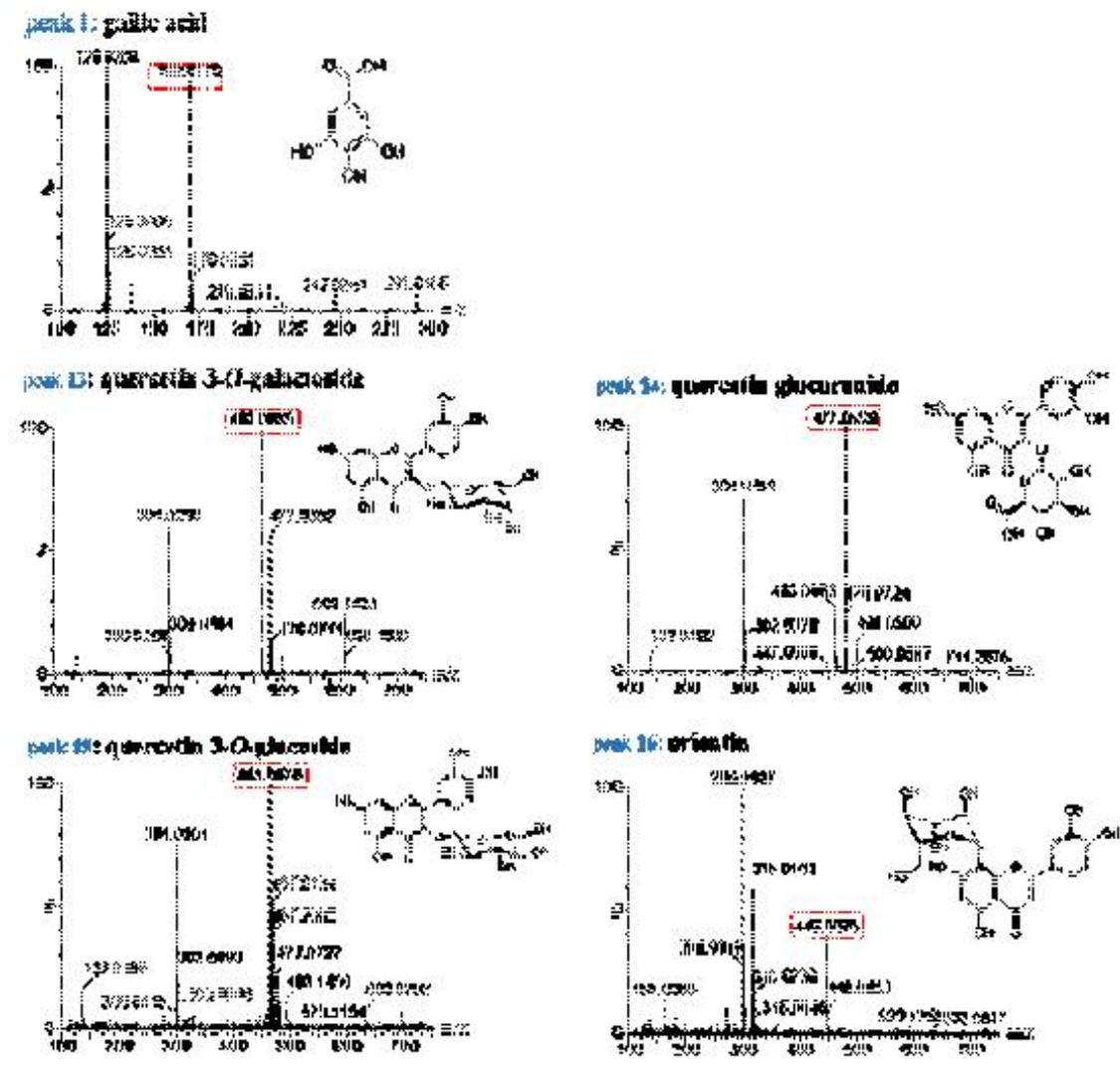
Fig. 113. 복분자 씨추출물 분획의 flavonoid 정밀분석 조건 및 결과

■ 3차년도 flavonoid 정밀분석을 UPLC (UPLC-PDA, Waters, AQUITY Ultra Performance LC) 및 Mass (Waters, Micromass Q-TOF Premier) 연구 결과, 복분자 씨추출물에서 출발한 분획 중에서 Fr. 6의 활성 화합물 동정을 통해서 quercetin 3-O-galactoside, quercetin

3-O-glucuronide, quercetin 3-O-glucoside, 및 orientin을 확인하였음. 또한 Fr. 1에서 gallic acid는 1차년도 Shimadzu UHPLC LC/MS 분석을 통해서 확인된 화합물임.

■ 따라서 유효물질 즉, Hit compound를 확인하기 위해서 이들 single chemical compound를 구입하여 실험을 수행하였음.

■ 유효분획으로부터 확인된 single chemical compounds



(2) 유효물질의 효능 검증

■ 2차년도에서 활성이 가장 높게 나타난 Fr.6를 복분자 씨추출물로부터 재분획하여 활성을 재분석하였음. MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 BR59 및 H3N2와 B 바이러스 (B/FL04)을 각각 감염시키면서 동시에 재 분획한 Fr.6의 5, 50, 100 µg/ml을 각각 1시간 co-treatment한 후, 72시간 동안 37°C, 5% CO2 incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켜 저해활성을 분석하였음. 그 결과, 재 분획된 Fr.6의 BR59 및 H3N2와 B 인플루엔자 바이러스 저해활성이 최초의 Fr.6의 저해활성과 동일하게 나타났으며, 농도 의존적인 활성을 보였음 (Fig. 114).

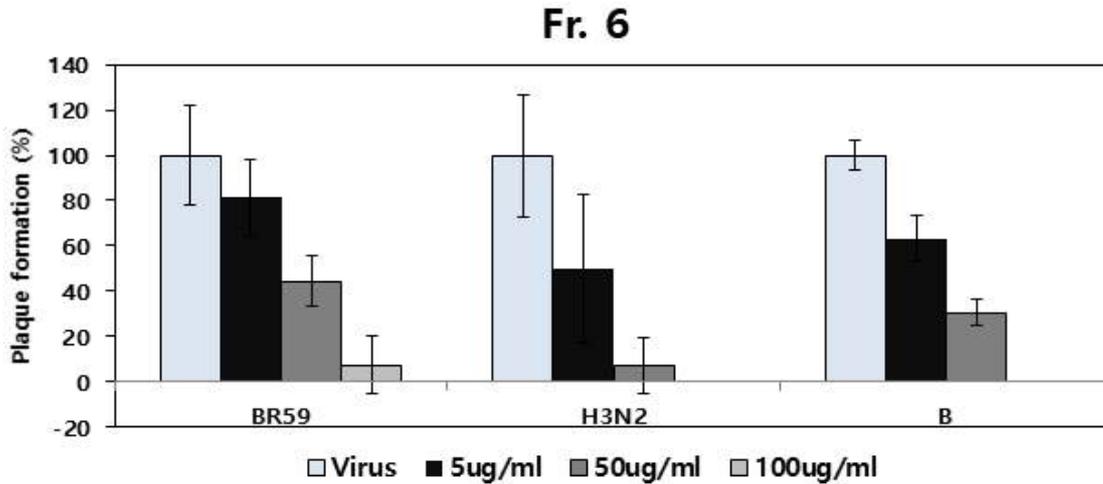


Fig. 114. 재분획된 Fr.6의 BR59, H3N2, B 바이러스에 대한 농도의존적 저해 활성

■ Fr. 6의 단일화합물인 quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-glucoside, 및 orientin를 이용하여, MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 BR59, B 바이러스(B/FL04)을 감염시키면서 동시에 단일 화합물 (1, 10, 100, 200, 400  $\mu$ M)을 각각 1시간 co-treatment한 후, 72시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 하면서 plaque을 형성시켜 활성을 분석하였음. 그 결과, quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside 및 orientin은 저해활성이 나타나지 않았고, quercetin 3-O-glucoside는 BR59에 대하여 농도의존적인 저해 활성을 나타내었음 (Fig. 115).

■ Fr. 6의 단일화합물인 quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-glucoside, 및 orientin를 이용하여, 인플루엔자 B 바이러스 (B/FL04)에 대한 저해 활성을 단일 화합물 1, 10, 100, 200, 400  $\mu$ M 농도에서 각각 1시간 co-treatment하여 분석한 결과, quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside 및 orientin은 저해활성이 나타나지 않았고, quercetin 3-O-glucoside는 농도의존적인 저해 활성을 나타내었음 (Fig. 116).

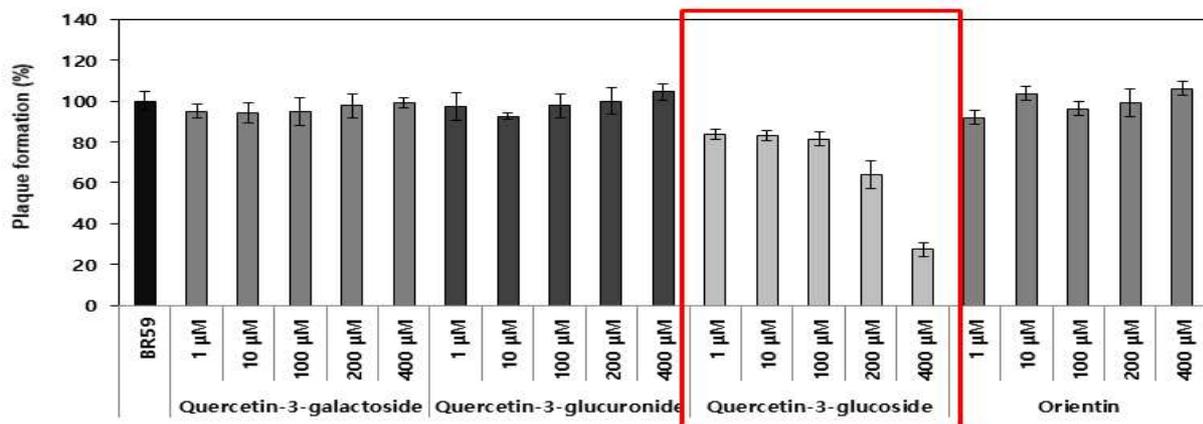


Fig. 115. Quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-glucoside, 및 orientin의 BR59 저해 활성

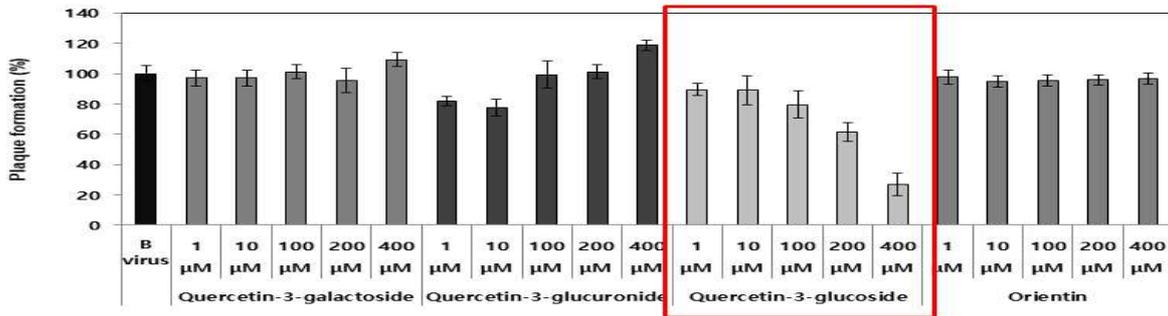
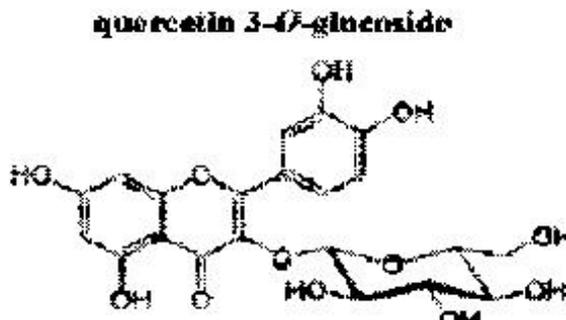
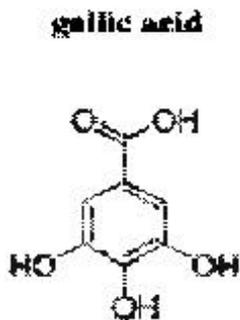


Fig. 116. Quercetin 3-O-glucuronide, quercetin 3-O-galactoside, quercetin 3-O-glucoside, 및 orientin의 B 바이러스 저해 활성

■ 따라서 1-3차년도 연구개발을 통해서 복분자 씨추출물을 분획하여 Fr. 1과 Fr. 6의 유효 물질 동정을 통해서 단일화합물인 gallic acid와 quercetin 3-O-glucoside를 확보하였음. 특히 gallic acid와 quercetin 3-O-glucoside는 복분자 씨추출물 구성성분의 polyphenols 중에서도 minor compound에 속하는 물질이기 때문에, 기전 연구에는 구입한 quercetin 3-O-glucoside를 이용하여 수행하였음 (Gallic acid 기전연구는 1차년도에 수행한 바 있음).

■ 항바이러스 활성 유효물질 single chemical compounds



라. 활성 유효물질의 기전탐색

■ 복분자 Fr.6와 quercetin-3-glucoside의 바이러스 단백질과의 결합력은 DSF (Differential scanning fluorimetry)의 T<sub>m</sub> shift로 측정하였음. 인플루엔자 바이러스 HA 단백질의 DSF 실험은 HA 단백질을 50 mM Tris buffer (pH 8.0)에 약 0.5 mg/ml 농도로 준비 한 후, 시료와 SYPRO Orange를 첨가해 주고, RT-PCR 기기를 이용하여 25°C에서부터 30 sec 당 0.5°C씩 온도를 증가시키면서 100 cycle 동안 fluorescence를 측정하였음. 이때 excitation wavelength는 492 nm, emission wavelength는 610 nm로 하였고, MxPro QPCR software를 이용하여 derivative curve를 그리고 thermo stability (T<sub>m</sub>) 값을 구하였음. 천연물 무 첨가 시료의 T<sub>m</sub> 값에 대한 첨가 시료의 T<sub>m</sub> shift를 측정하였음.

■ DSF T<sub>m</sub> shift 측정 실험에서는 H1N1 CU44 strain과 H3N2 GY684 strain의 HA에 대한 결합력을 측정하였으며, 실험 결과 Fr. 6는 H1N1 CU44와 결합하여 T<sub>m</sub> shift가 5, 50 μ

g/ml농도에서 각각 0.5°C 및 1.5°C 있었으며, H3N2 GY684의 HA에 약하게 결합하여 50 μg/ml농도에서 Tm shift가 0.5°C 있었으나 5 μg/ml, 500 μg/ml에서는 Tm shift가 나타나지 않았음 (Fig. 117, 위).

■ Fr.6의 단일성분으로 plaque assay에서 바이러스 저해활성을 보였던 quercetin-3-glucoside는 1-100 mM 농도에서 H1N1 CU44의 HA와 결합하지 않았으며, H3N2 GY684의 HA는 quercetin-3-glucoside 10 mM에서만 약하게 결합하여 Tm shift가 0.5°C 있었음. 즉 quercetin-3-glucoside는 인플루엔자 바이러스 HA에 결합하지 않는 것으로 예측됨 (Fig. 117, 아래).

■ SPR (Surface plasmon resonance) 결합도는 quercetin-3-glucoside의 인플루엔자 바이러스 단백질 HA와의 결합력 측정 DSF의 Tm shift 분석 결과, shift가 일어나지 않아 분석의 의미가 없으므로 진행하지 않았음.

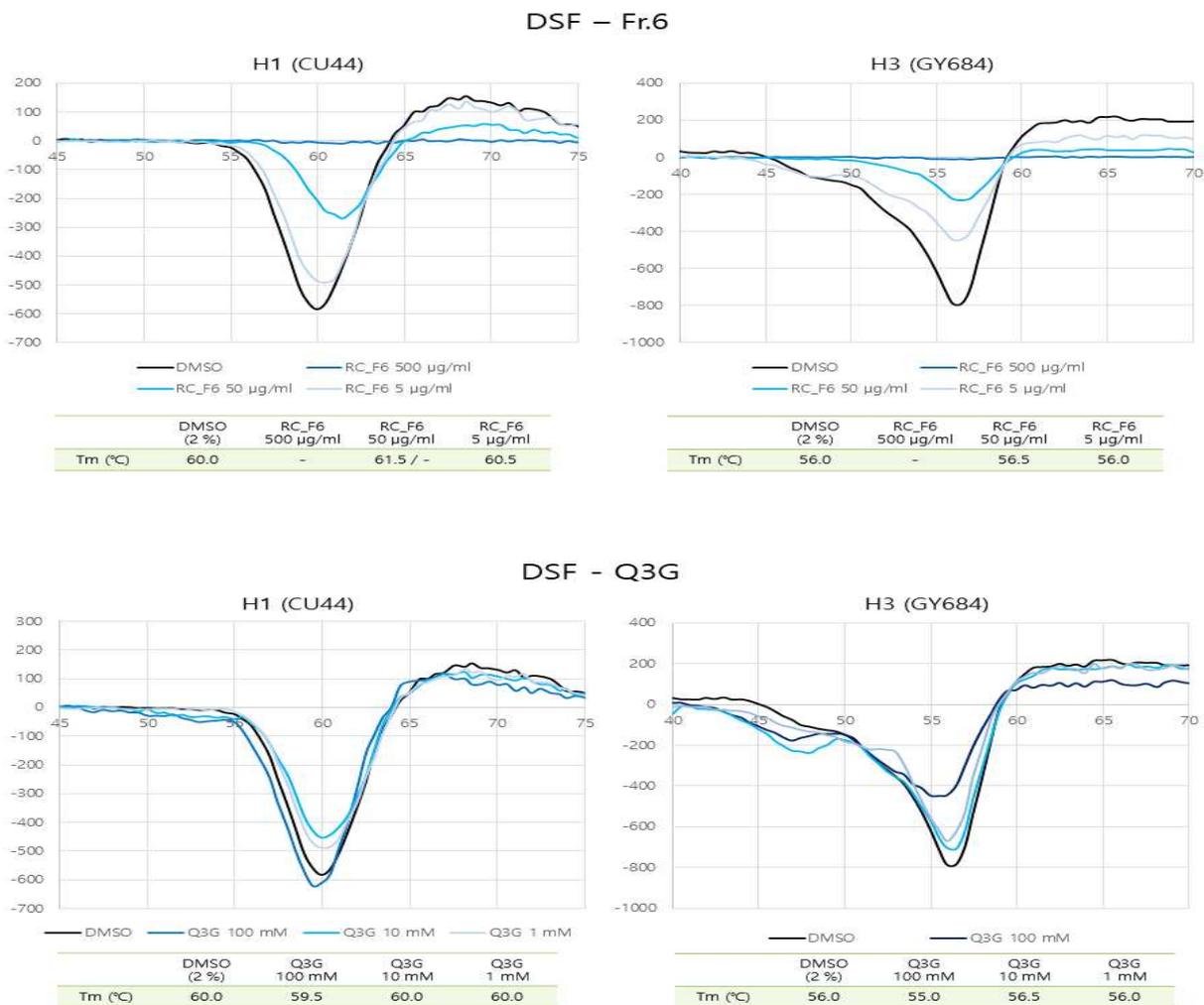


Fig. 117. 인플루엔자 H1과 H3 바이러스 HA에 대한 Fr.6 (위)와 quercetin-3-glucoside (Q3G) (아래)의 DSF 결합도 측정

■ 2차년도에 확보한 데이터에서 더 나아가 Fr.6와 quercetin-3-glucoside에 의한 인플루엔자 바이러스 particle에 대한 영향을 transmission electron microscope (TEM)으로 관찰하였음.

■ 인플루엔자 바이러스 (6 log<sub>10</sub>PFU/ml)에 Fr. 6 및 quercetin-3-glucoside를 각각 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, carbon-coated grid에 시료를 올리고 1% uranyl acetate 용액으로 염색 한 다음, Hitachi H7600 transmission electron microscope (TEM, Hitachi, Tokyuu, Japan)으로 80kV, 20,000 배율로 관찰하였음.

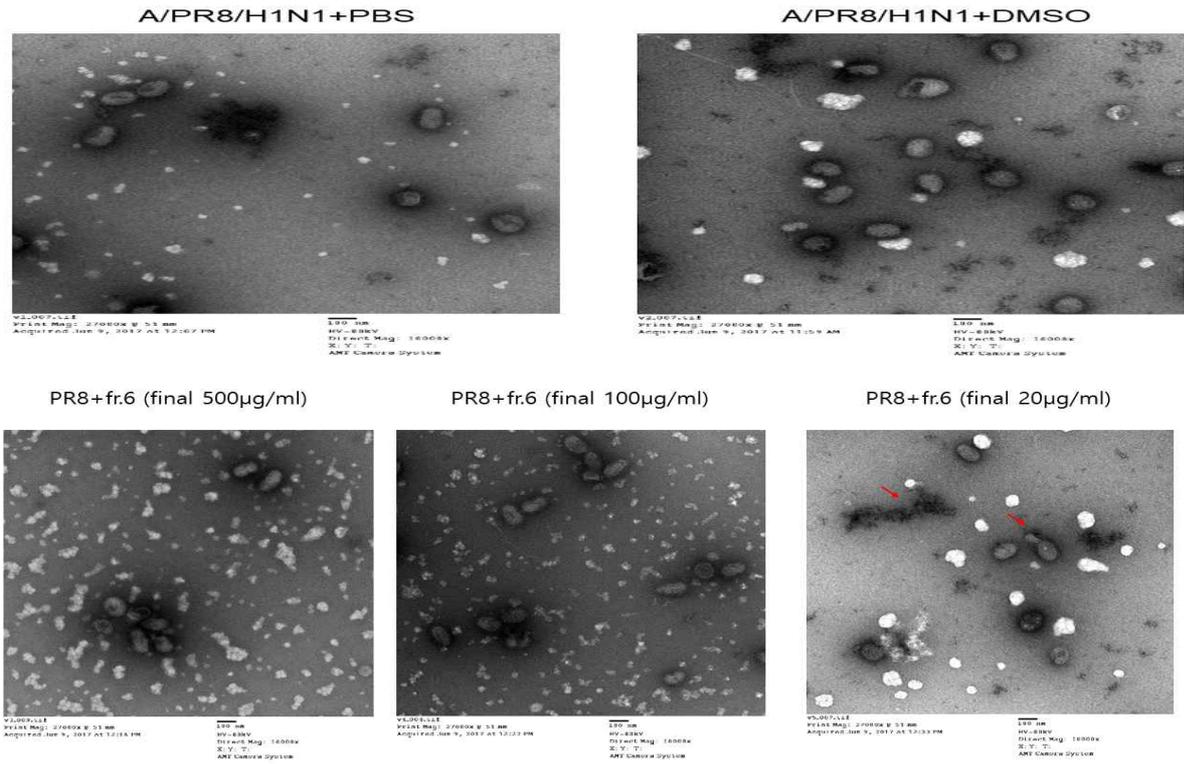


Fig. 118. PR8 바이러스 (위) 및 Fr. 6 (20-500 µg/ml)+PR8 (아래)의 TEM image

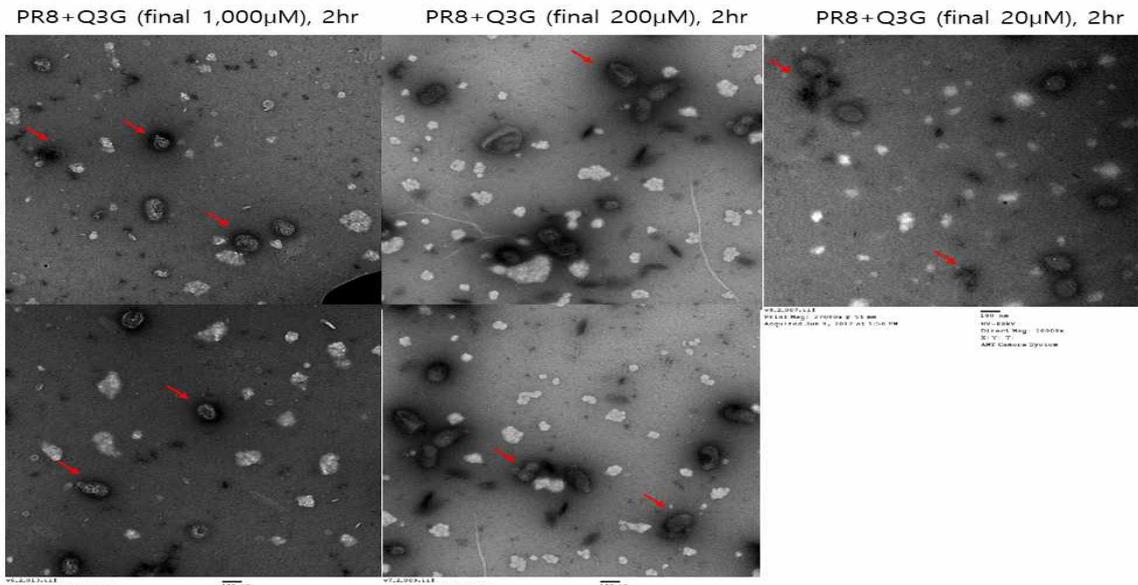


Fig. 119. Quercetin-3-glucoside(Q3G)의 PR8 바이러스에 미치는 영향 TEM image

■ Rf. 6로 수행한 결과는 20 µg/ml 농도에서 인플루엔자 바이러스 particle에 damage를 주어 바이러스 particle 수가 현저히 감소하며 흰색 덩어리가 많이 관찰되어, 이는 바이러스의 envelop이 없어진 양상으로 해석되었음. 또한 바이러스 particle에 미치는 Fr. 6의 영향은 농도에 의존하는 것으로 확인되었음 (Fig. 118 위, 아래).

■ Quercetin-3-glucoside는 농도 의존적으로 PR8 바이러스의 particle 수 감소, background의 debris 증가, virus envelop 모양의 손상을 증가시키는 실험결과를 얻었으며, quercetin-3-glucoside가 인플루엔자 바이러스 particle에 영향을 미친다고 예측됨 (Fig. 119).

#### 14. 기능성 효능평가를 위한 시제품별 in vivo 효능평가

■ 마우스 동물실험은 덕성여자대학교 동물윤리위원회에 동물실험 승인을 받은 후 동물의 희생과 고통을 최소한으로 하며 수행하였음. PR8 바이러스의 MLD<sub>50</sub> 분석을 위하여, BALB/C female 8주 mouse에 PR8 바이러스 1x10 plaque forming unit (PFU), 1x10<sup>2</sup> PFU, 1x10<sup>3</sup> PFU를 각각 intranasal infection 후 체중 감소를 측정하였음. 실험을 통하여 7 day post-infection (dpi)에서 30% 체중감소를 사망으로 간주하여 MLD<sub>50</sub>를 구하였음 (data not shown).

■ Fr.6의 in vivo 활성 분석을 위하여, specific pathogen free 동물실험실의 individually ventilated cage에서 일주일간 adaptation 시킨 BALB/C female 8주 mouse에 3MLD<sub>50</sub> PR8 바이러스를 intranasal infection 시키고 5일간 Fr.6 10 mg/kg을 위내투여하면서 바이러스 감염 후 14일까지 체중변화를 분석하였음. Fig. 120에 제시된 바와 같이 PR8 바이러스만 감염 시킨 마우스는 7 dpi에 체중 30% 이상 감소로 사망하였고, Fr.6 10 mg/kg 투여그룹은 14 dpi에 positive control인 oseltamivir (1.2 mg/kg)의 92% 체중회복 보다 높은 98% 수준으로 체중이 회복되었음. 따라서 Fr.6의 인플루엔자 바이러스 저해 활성이 마우스에서 높음을 확인하였음.

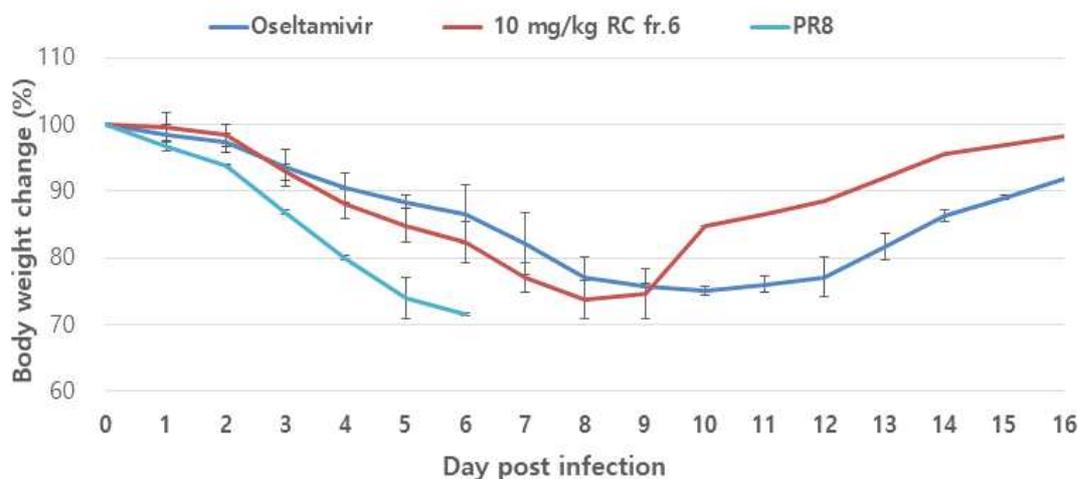


Fig. 120. Fr.6의 PR8 감염 마우스에 대한 저해 활성



SCI 논문게제 (5건) 및 학술발표 (7건)

**Crystal Structure of Dimeric Human Peroxiredoxin-1 C83S Mutant**  
 Mi-Joon Cho,<sup>1</sup> Hyeon Park,<sup>2</sup> Eunha Kim,<sup>2</sup> Ji-Hye Lee,<sup>2</sup> Seha Kim,<sup>2</sup> Jung Hyun Seok,<sup>2</sup> Yoon-Ho Chung,<sup>2</sup> Ai-Ri Cho,<sup>2</sup> Yungsook Cho,<sup>2</sup> Sang-Sik Chung,<sup>2</sup> and Kyong Hyun Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry & Biotechnology, Seoul University, Seongju 380-700, Korea  
<sup>2</sup>Department of Life Science, Korea University, Seoul 145-701, Korea  
<sup>3</sup>Department of Pharmacy, Inha University, Incheon, Seoul 222-702, Korea  
 Received December 22, 2014; Accepted January 26, 2015; Published online April 28, 2015

**Keywords:** Peroxiredoxin, Crystal structure, C83S mutant, Helix-to-loop conformational change, CHAPS

Peroxiredoxin (Prx) is a ubiquitous family of cysteine-based antioxidant peroxidases. Three proteins appear to have evolved from a dimeric Prx1/Prx2 ancestor.<sup>1</sup> Prx is an important water-soluble oxidoreductase induced by elevated levels of reactive oxygen species and reactive nitrogen species.<sup>2-4</sup> The primary role of Prx is to reduce hydroperoxide to the dehydrogenated form, regaining its self-oxidation.<sup>5-7</sup> Structure of Prx is dimeric. Prx1 and Prx2 share the dimeric structure of Prx, but Prx3 has a different structure. Prx is classified into three types: typical Prx1, atypical Prx1, and Prx3.<sup>8-10</sup> The typical Prx1 Prx has two cysteine residues located in catalytic Prx, one on the dimeric Prx1 and the other on the Prx2. Prx1 and Prx2 are classified into three types: typical Prx1, atypical Prx1, and Prx3.<sup>8-10</sup> The typical Prx1 Prx has two cysteine residues located in catalytic Prx, one on the dimeric Prx1 and the other on the Prx2. Prx1 and Prx2 are classified into three types: typical Prx1, atypical Prx1, and Prx3.<sup>8-10</sup>

**Protective effects of red wine and resveratrol for foodborne virus surrogates**  
 Mi-Oh <sup>1</sup>, Ji-Hye Lee <sup>1\*</sup>, Seon-Young Kim <sup>1</sup>, Jung-Hyun Seok <sup>2</sup>, Seha Kim <sup>2</sup>, Yoon-Ho Chung <sup>2</sup>, Kang-Bok Han <sup>3</sup>, Kyong-Hyun Kim <sup>1</sup>, Mi-Sook Chung <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea  
<sup>2</sup>Department of Biochemistry & Biotechnology, Seoul University, Seongju 380-700, Korea  
<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea  
 Received December 22, 2014; Accepted January 26, 2015; Published online April 28, 2015

**Keywords:** Food safety, Food control, Food safety, Food control, Food safety, Food control

Protective effects of red wine and resveratrol for foodborne virus surrogates. This study investigated the protective effects of red wine and resveratrol on foodborne virus surrogates. The results showed that red wine and resveratrol significantly reduced the infectivity of foodborne virus surrogates. The protective effects were more pronounced in the presence of red wine and resveratrol. The results suggest that red wine and resveratrol may be used as natural preservatives to prevent foodborne virus infection.

Crystal Structure of Dimeric Human Peroxiredoxin-1 C83S Mutant.(Bulletin of the Korean Chemical Society, (2015.05)

Protective effects of red wine and resveratrol for foodborne virus surrogates.(Food Control, 2015.03)

**Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates**  
 Ji-Hye Lee<sup>1</sup>, Seon-Young Kim<sup>1</sup>, Mi-Oh<sup>1</sup>, Jung-Hyun Seok<sup>2</sup>, Seha Kim<sup>2</sup>, Yoon-Ho Chung<sup>2</sup>, Goo-Gwan K<sup>1</sup>, Ji-Young Min<sup>1</sup>, Mi-Sook Chung<sup>1</sup> and Kyong-Hyun Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry & Biotechnology, Seoul University, Seongju 380-700, Korea  
<sup>2</sup>Department of Life Science, Korea University, Seoul 145-701, Korea  
 Received May 10, 2015; Accepted June 10, 2015

**Keywords:** Antiviral, Norovirus, Rubus coreanus, Seed extract, Polyphenolic compounds

Antiviral effects of black raspberry (Rubus coreanus) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. This study investigated the antiviral effects of black raspberry seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. The results showed that the seed extract and polyphenolic compounds significantly inhibited the infectivity of norovirus surrogates. The inhibitory effects were more pronounced in the presence of the seed extract and polyphenolic compounds. The results suggest that black raspberry seed extract and its polyphenolic compounds may be used as natural antiviral agents to prevent norovirus infection.

**Antiviral Effects of Black Raspberry (*Rubus coreanus*) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection**  
 Ji-Hye Lee<sup>1</sup>, Mi-Oh<sup>1</sup>, Seon-Young Kim<sup>1</sup>, Seha Kim<sup>2</sup>, Yoon-Ho Chung<sup>2</sup>, Goo-Gwan K<sup>1</sup>, Ji-Young Min<sup>1</sup>, Mi-Sook Chung<sup>1</sup> and Kyong-Hyun Kim<sup>1\*</sup>

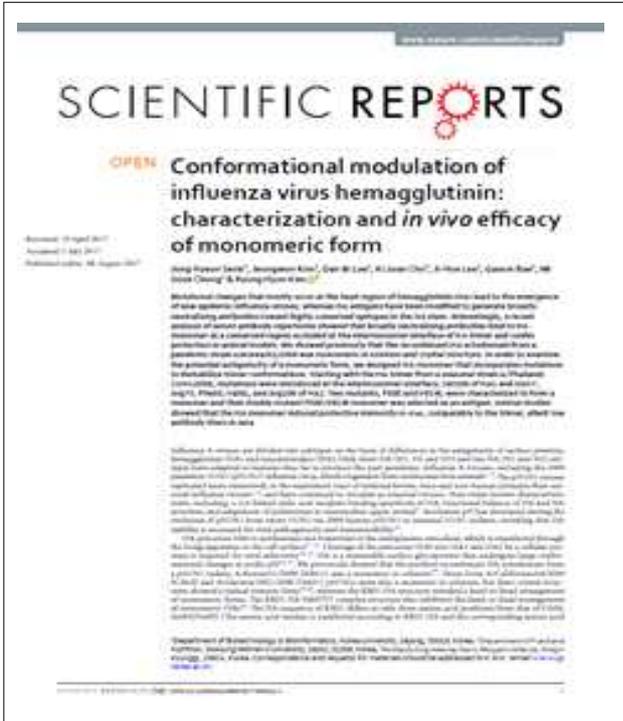
<sup>1</sup>Department of Biochemistry & Biotechnology, Seoul University, Seongju 380-700, Korea  
<sup>2</sup>Department of Life Science, Korea University, Seoul 145-701, Korea  
 Received May 10, 2016; Accepted June 10, 2016

**Keywords:** Antiviral, Influenza virus, Rubus coreanus, Seed, Gallic acid

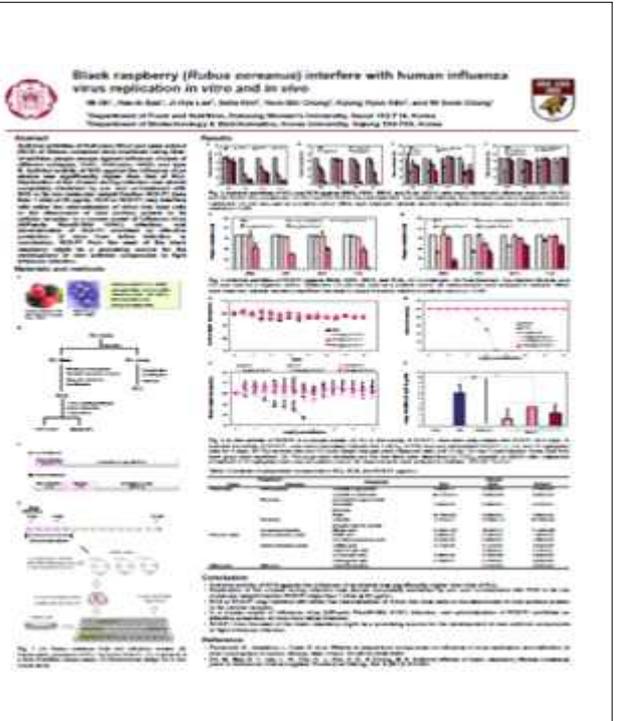
Antiviral Effects of Black Raspberry (Rubus coreanus) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection. This study investigated the antiviral effects of black raspberry seed and its gallic acid against influenza virus infection. The results showed that the seed and gallic acid significantly inhibited the infectivity of influenza virus. The inhibitory effects were more pronounced in the presence of the seed and gallic acid. The results suggest that black raspberry seed and its gallic acid may be used as natural antiviral agents to prevent influenza virus infection.

Antiviral effects of black raspberry (Rubus coreanus) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016.05)

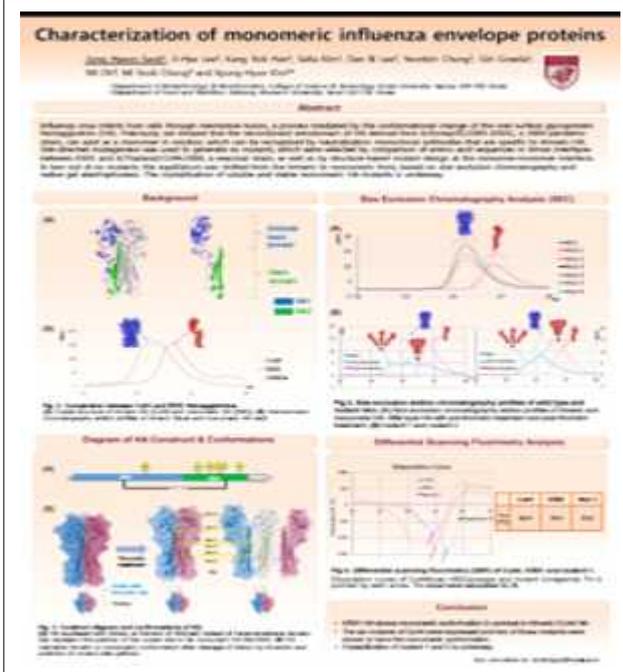
Antiviral Effects of Black Raspberry (Rubus coreanus) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection(Viruses,2016.06)



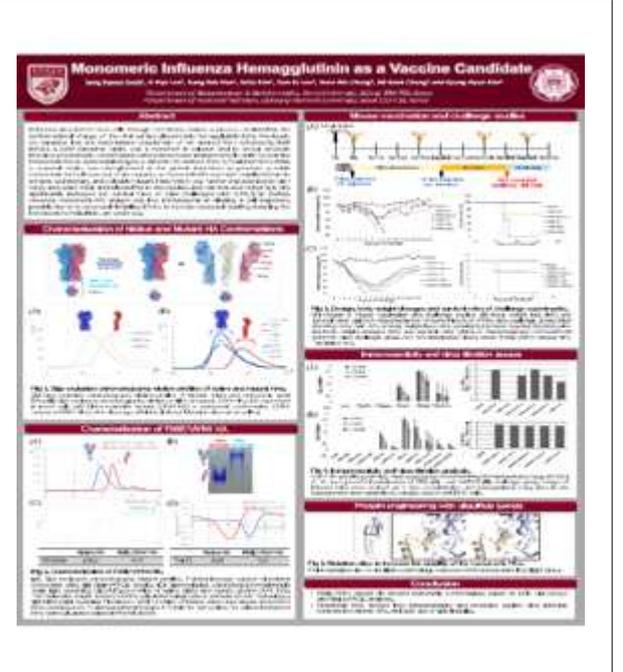
Conformational modulation of influenza virus hemagglutinin: characterization and in vivo efficacy of monomeric form. (Scientific Reports, 2017.08)



Black raspberry (*Rubus coreanus*) interfere with human influenza virus replication in vitro and in vivo. (식품과학회, 2014.8.25.)



Characterization of monomeric influenza envelope proteins. (한국구조생물학회, 2015.1.7.)



Monomeric Influenza Hemoagglutinin as a Vaccine Candidate. (한국구조생물학회, 2015.10.22.)

**PFM-8**

**Antiviral effects of black raspberry (Rubus coreanus) against influenza virus**

Garam Bae<sup>1</sup>, Jeongwon Kim<sup>2</sup>, Hyojin Kim<sup>1</sup>, Ji-Hye Lee<sup>1</sup>, Jong Hyeon Seok<sup>1</sup>, Dam Bi Lee<sup>1</sup>, Kyung Hyun Kim<sup>2</sup>, Mi Sook Chung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Dulsung Women's University  
<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University

*Rubus coreanus* (RC), which belongs to the Rosaceae family, is a species of black raspberry. RC and (RCS) which is before than one or two generations, contain large quantities of polyphenols. In this study, RCS was found to show antiviral activities against influenza type A and B viruses. Using force of infection plaque assay, viral replication was almost completely inhibited by simultaneous treatment with the RCS fractions of less than 1 kDa molecular weight (RCSF1). One of the polyphenols covered from RCSF1, gallic acid (GA), identified by liquid chromatography-mass spectrometry, showed antiviral effects against both influenza type A and B viruses, albeit at relatively high concentrations. RCSF1 was found to hemagglutinate protein, inhibit hemagglutination, specifically and disrupted viral particles, whereas GA was found to only disrupt the viral particles by transmembrane electron microscopy. In SCL-5 crude adherent virus adsorption assay, anti-adsorption of RCSF1 significantly suppressed the infection rate and reduced the viral titer at the lungs. Our results suggest that RCSF1 and GA, which showed antiviral effects at the early stage of the viral infection, can be developed as potential antiviral agents.

**Antiviral effects of black raspberry (Rubus coreanus) seed and gallic acid**

**ABSTRACT**

Influenza is a serious public health concern worldwide as it causes significant morbidity and mortality. The emergence of drug-resistant and novel influenza virus strains has increased the burden of influenza in the world. Black raspberry seed extract (RCS) is rich in polyphenols and has been shown to have antiviral activity against influenza virus. In this study, RCS was found to show antiviral activities against influenza type A and B viruses. Using force of infection plaque assay, viral replication was almost completely inhibited by simultaneous treatment with the RCS fractions of less than 1 kDa molecular weight (RCSF1). One of the polyphenols covered from RCSF1, gallic acid (GA), identified by liquid chromatography-mass spectrometry, showed antiviral effects against both influenza type A and B viruses, albeit at relatively high concentrations. RCSF1 was found to hemagglutinate protein, inhibit hemagglutination, specifically and disrupted viral particles, whereas GA was found to only disrupt the viral particles by transmembrane electron microscopy. In SCL-5 crude adherent virus adsorption assay, anti-adsorption of RCSF1 significantly suppressed the infection rate and reduced the viral titer at the lungs. Our results suggest that RCSF1 and GA, which showed antiviral effects at the early stage of the viral infection, can be developed as potential antiviral agents.

**MATERIALS AND METHODS**

**RESULTS**

**CONCLUSIONS**

Antiviral effects of black raspberry(Rubus coreanus) against influenza virus. (한국응용생명화학회, 2016.6.16.)

Antiviral effects of black raspberry(Rubus coreanus) seed and gallic acid. (Options IX for the Control of Influenza, 2016.8.24.)

**Modulation of monomer conformation of hemagglutinin and in vivo efficacy**

**ABSTRACT**

Influenza virus hemagglutinin (HA) is a major surface protein of the virus. HA is composed of two subunits, HA1 and HA2, which are linked by a disulfide bond. HA1 is responsible for receptor binding and membrane fusion, while HA2 is responsible for membrane fusion. In this study, we investigated the modulation of monomer conformation of HA1 and its effect on in vivo efficacy. We found that the modulation of monomer conformation of HA1 by PFM10104, a novel inhibitor, significantly reduced the in vivo efficacy of the virus. Our results suggest that PFM10104 can be developed as a potential antiviral agent.

**Characterization of HA1 type and monomer conformations**

**Characterization of PFM10104**

**Stability of HA with influenza virus**

**P12-045 Antiviral effects of black raspberry seed extract and its quercetin-3-glucoside against influenza virus**

Garam Bae<sup>1</sup>, Jeongwon Kim, Hyojin Kim, Ji-Hye Lee<sup>1</sup>, Jong Hyeon Seok<sup>1</sup>, Dam Bi Lee<sup>1</sup>, Kyung Hyun Kim<sup>2</sup>, Mi Sook Chung  
<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Dulsung Women's University, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University, Korea

Modulation of monomer conformation hemagglutinin and in vivo efficacy. (Options IX for the Control of Influenza, 2016.8.24.)

Antiviral effects of black raspberry seed extract and its quercetin-3-glucoside against influenza virus. (한국식품과학회, 2017.6.27.)

### 제3절 사업화 계획

#### 1. 사업화 전망

국내외 항바이러스 산업 분야는 간염 및 에이즈 치료제 개발, 간염 및 헤르페스, 에이즈, 인플루엔자등 바이러스성 질환에 대한 치료 기술 및 치료제, 의약품 원료 제조 및 활용 방법 등 항바이러스 치료제 원료물질 및 사용방법에 관한 기술개발이 활발히 이루어지고 있다.

관련 치료제제품에 대한 세계시장은 2005년 17,493백만 달러를 형성하였고, 연평균 15% 내외로 성장하여 2018년에는 61,780백만 달러의 시장규모로 성장을 예상하고 있다.

다만 현재 사용되는 항바이러스제는 내성의 발생 위험에서 자유롭지 못하며 특히 변이종 바이러스에 대하여 취약한 실정이다. 특히 최근 항바이러스제의 사용빈도가 증가됨에 따라 약제 내성 바이러스의 분리빈도가 증가하고 있는데, 특히, 2008년 1월 노르웨이에서 oseltamivir에 내성을 가진 계절 인플루엔자 A(H1N1)형 바이러스 분리가 보고된 이후 유럽, 미주, 서태평양 지역에서도 분리빈도가 급증하였다. 2009년 4월 이후 현재까지 계속 문제가 되고 있는 신종 인플루엔자 A(H1N1) 바이러스에서도 내성주 발생이 계속 보고되고 있다.

이에 의약품 수준 보다는 내성의 우려가 없고 장기간 섭취할 가능하고 넓은 범위의 항바이러스 효과를 가지는 식품 수준의 천연물 소재가 주목 받고 있다. 특히 식품원료의 특성을 가져 다양한 제품에 접목이 가능한 장점을 가지고 있어 본 과제의 결과물인 복분자씨추출물의 시장 전망 및 성공 가능성은 매우 높으며 in vitro 및 in vivo 결과를 토대로 식품 뿐만 아니라 사료로서의 접근이 가능함을 확인하여 향후 다양한 산업군에서 사용될 전망이다.

#### ○국의 제품생산 및 시장 현황

- 세계적으로 지난 18년간 감염병으로 인해서 발생한 경제적 피해규모가 천문학적임. 즉, SARS (500억달러), AI (300억달러), 구제역 (250억달러), 광우병 (130억달러) 등 감염병 대유행시 경제적 손실이 매우 큼.(Fig. 122)

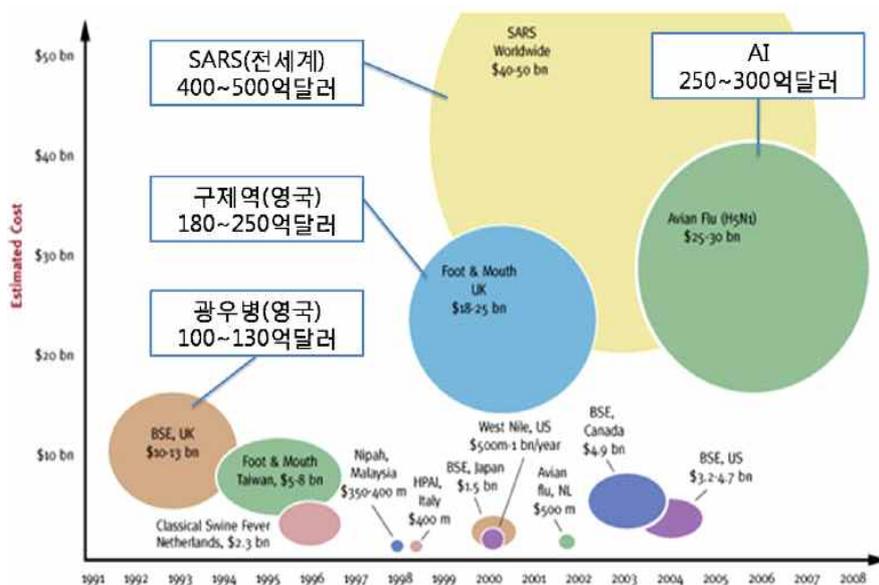


Fig. 122. 감염병으로 인해서 발생한 경제적 피해규모 (BIO-ERA(Bio Economic Research Associates, LLC))

- 2010년 항바이러스제 세계 시장 규모는 221억 달러였으며, 각종 감염성 질환 치료제 분야의 글로벌 마켓볼륨이 오는 2017년에 이르면 300억 달러에 이를 것이라는 전망과 함께, 질병 예방을 목적으로 하는 항바이러스제가 가장 괄목할만한 성장을 나타낼 것으로 알려져 있음 (GBI Research, “Antivirals market to 2017” , 2012).

- 인체 인플루엔자 치료 약제인 타미플루의 경우 2008 년 5.3 억달러의 매출을 올린 것으로 조사되었음. 인체에 대한 전체 항인플루엔자 시장은 연평균 21%의 성장률을 보이고 있고, 2010년에는 52 억 달러의 시장 규모가 될 것으로 예측됨 (김무웅, 국가생명공학정책연구센터, 3P 분석을 통한 인수공통 대유행성 신종 인플루엔자에 대한 기술 및 산업환경 분석, <http://www.bioin.or.kr>).

- 로슈는 연간 4 억 명 분량의 타미플루를 생산할 수 있도록 설비를 확장할 계획이며, 인도의 헤테로 제약 회사에 라이선스 생산을 허가 하여 이곳에서도 연간 10 억 명 분량의 생산이 가능하도록 하였음 (Mudur (2006) BMJ 7 332).

#### ○ 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 본 연구팀에서는 국내에서 다량 재배하여 주스 및 술 가공 후 버려지는 찌꺼기인 복분자 부산물을 이용하여 항인플루엔자 소재를 제조하여 산업화하고자 함.

- 현재까지 수행된 인플루엔자 바이러스와 관련된 연구는 인삼, 녹차, 부추 등이 있으나, 본 연구 과제에서 제안하는 버려지는 부산물이면서, 대량으로 얻을 수 있는 복분자 천연 부산물을 이용한 자원 순환형의 값 싼 소재를 이용한 인플루엔자 저해 활성이 매우 뛰어난 소재 개발은 처음임.

- 2016년을 기준으로 국내 복분자 생산량은 5,140톤이며, 본 연구소재 부산물의 주요 부분인 복분자 씨 (열매당 씨 함량 15% 내외)는 약 973톤 임.

- 본 연구를 통하여 개발된 항바이러스 소재는 인플루엔자 감염으로 복용하는 약물을 대체할 수 있을 것으로 판단되며, 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 발생하는 인플루엔자를 예방하기 위한 우수한 소재로 활용하여 국가 창조 경제에 일조하고자 함.

## 2. 사업화 전략

### ○ 대기업과 협업을 통한 사업화

복분자씨추출물의 적용 대상을 다양화함과 동시에 규모를 늘리기 위해 시장에서 마케팅과 유통능력이 큰 대기업과의 MOU 체결 및 협업을 통한 사업화 진행 계획을 가지고 있음

### ○ 관련 제품 출시 계획

- 일동후디스 : 어린이용 건강 제품적용 (인플루엔자 예방)
- 풀무원 : 항바이러스 기능성 제품개발 협업 진행
- CJ : 항바이러스 활성 및 면역 증강 제품 개발에 대한 비밀유지계약 체결  
관련 제품 개발 추진 계획

일정	사업화 추진 사항
2016년 07월	소재 제안, 관련 특허, 효능관련 논문 및 데이터 검토
2016년 10월	비밀유지 계약 체결
2018년 06월	자사 설비 증설에 따른 소재 시험 생산 진행
2018년 07월	제품 출시 - 타블렛, 캡슐, 기능성 음료제품 등 완제품에 적용   

- 복분자씨추출물의 제품화관련 예상판매가  
 -기능성 : 인플루엔자 바이러스 저해기능  
 -생산량 : 150kg 기준

년 도	생산량 (ton)	부산물 (ton)
2011	4,729	756
2012	4,204	714
2013	4,653	791
2014	5,324	905
2015	5,748	977
2016	5,140	973

<연간 복분자 생산량>

항 목		단가(원/kg)	수량(kg)	소요경비(원)	비고
원료비	복분자씨	1,000	3,000	3,000,000	
	주정	1,800	2,250	4,050,000	
	텍스트린	1,100	29	32,340	
제조 경비	분쇄비	1,000	1,500	1,500,000	
	추출농축비용	1,000,000	3	3,000,000	
	분말화비용	800,000	1	800,000	
일반관리비		제조경비의 15%		1,857,351	
이익		제조경비 10%		1,238,234	
제조원가				15,477,925	
제품판매가 (원/kg)				103,186	

※연간 생산가능 수량 : 77.8~80 ton/년

※일일섭취량 기준 단가 (500mg/일) : 52 원/일

※일일권장섭취량 ( 200~500mg)

현재 자사설비를 고려한 연간생산수량 및 그에 따른 생산 단가를 산정하였을 때 시중의 건강기능식품의 가격 구성(캡슐당 160원 ~ 1,300원대)과 비교시 항바이러스 기능을 가진 소재로서 경쟁력을 확보하고 있음

○제조기술 설비 보완 계획

- 복분자씨추출물 제조를 위한 전용생산 설비 구축

- 고도 정제물 제조를 위한 기술 개발
- 추가 기능성분에 대한 검증 연구 진행

일정	설비 관련 계획
2017년 11월	기능성 식품 관련 설비 증축 계획안 수립 (해당제품 : 복분자씨추출물(항바이러스소재), 쌀겨오리자놀(수면기능), MPGT(위기능개선소재))
2017년 12월	증축 설비에 대한 도면 및 Layout 결정
2018년 03월	설비구축 작업
2018년 06월	설비 증축 완료
2018년 06월	설비 시운전등 개선완료
2018년 07월	제조증축 설비 가동
2018년 07월	제품생산, 출시

\* 설비 증축 예산비용 : 건축비 포함 12~15억 소요 예정

○사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(백만원)	120			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	2	30	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0.07%	1%
국외		0	0.01%	0.05%	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	효소처리 및 정제를 통한 고순도 제품화 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	1	30	
	수 출	0	1	50	

## 제4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

	D-06
4-1 목표달성도	

세부연구개발 목표	가중치	연구수행방법 (이론적· 실험적 접근방법)	연구결과
•항바이러스 소재의 제조 기술 구축 결과물-수율 7% 이상 유지	15%	•Lab기준에서의 제조와 pilot-생산에 따른 제조 공정 확인.	•원료의 추출조건 설정 설계: 추출온도, 추출용매농도, 추출시간 대별로 연구 - 수율 9.5% 확보
•세포 기반 천연물 유래 식품소재의 저해활성 검증 기술구축 및 활성 분석	20%	•복분자 추출물 (주스)과 복분자 부산물 (복분자 씨)의 효능비교 결과물	•복분자 주스보다 RCS-F1의 인플루엔자 바이러스 저해활성이 우수 •BR59 인플루엔자 바이러스에 대한 RCS-F1과 SD1 및 SD2 활성이 차이가 없음을 확인
•마우스 기반 천연물 유래 식품소재의 저해활성 검증 기술구축 및 활성 분석	15%	•인플루엔자 <i>in vivo</i> mouse 활성 결과물 2건 이상	•RCS-F1이 PR8 및 mKR01 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스에 대하여 항바이러스 활성을 나타내었음
•항바이러스 소재의 활성 성분 연구	10%	•저해활성 천연부산물물의 폴리페놀화합물 10건 LC/MS/MS분석 결과물	•폴리페놀화합물 16건으로 RCS-F1분석하여,주요성분 catechin, ellagic acid 및 cyanidin-3-rutin- <i>oside</i> 을 확인
•소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 활성검증	15%	•천연소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 활성 검증 결과물	•천연소재 대량생산을 위한 전처리에 따른 활성 검증 결과물로 LC/MS/MS 분석, 세포 및 <i>in vivo</i> 활성 검증 결과를 제시하여 성과 목표를 100% 달성하였음.
•기능성 평가를 위한 biomarker 탐색 연구	10%	•개별인증을 위한 2종 이상의 biomarker 탐색 연구 결과물	•개별인증을 위한 2종 이상의 biomarker 탐색 연구 결과물로 LC/MS/MS 분석, 세포기반 실험 및 biomarker validation 검증 결과를 제시하여 성과 목표를 100% 달성하였음
•산업화를 위한 대량생산 소재의 저해 활성 확인	10%	•산업화를 위한 대량생산 소재의 저해활성, 안정성 연구 결과 2건	•인플루엔자 바이러스 PR8, BR59 및 H3N2에 대하여 SD-RC-004는 농도의존적, 온도별 저장기간별 저해 활성을 보였음
•기능성 효능평가를 위한 시제품별 <i>in vivo</i> 효능평가	10%	•항바이러스 응용 제품 군별 <i>in vivo</i> 시험에 의한 효능평가를 통한 검증 2건	•분획제품 qr5(gallica acid)와 qr6(Q3G)의 인플루엔자 바이러스 (PR8) 저해 활성이 마우스에서 높음을 확인 •펠렛(ferret)의 비임상연구에서 바이러스 억제효과를 확인함

○복분자씨추출물의 항바이러스 효능과 관련한 연구내용을 sci논문 2편 게재함.

○복분자씨추출물의 제조 및 용도관련한 특허를 1건 등록, 2건을 출원함.

○항바이러스 소재의 식품학적 안전성 관련 유해중금속, 잔류농약, 식품영양학적 특성을 공인기

관 시험성적서로 확인

- 항바이러스 소재의 펠렛(ferret)에 의한 비임상연구에서 복분자씨추출물의 50mg/kg 이 기준 바이러스치료약이 타미플루와의 비교시험에서 동등한 효능이 있음을 확인함
- 본 연구결과물의 기존 면역제품과의 비교시험에서 16mg/g의 적은 농도에서도 면역효과가 있음을 규명하였음

#### 4-2 관련분야 기여도

- 복분자씨 (부산물) 원료는 주스 및 와인 가공 후에 버려지는 부산물 waste를 항바이러스 소재로 개발하여 농식품자원의 재순환뿐만 아니라 친환경 소재 개발기술은 창조경제를 창출하는데 공헌함.
- 기존에 알려지지 ellagic acid와 gallic acid의 분석법을 개발함.
- 천연물 기반 융합적 항바이러스 소재개발 플랫폼을 구축하고 광범위 항바이러스 천연소재로 경쟁력을 갖는 새로운 블루오션 시장 창출이 기대됨.
- ferret 실험을 통해 타미플루와 유사한 효과를 가지는 천연 항바이러스 소재 복분자씨추출물을 이용한 항바이러스제 개발 기술은 다른 많은 바이러스 질병 치료에 활용이 가능할 뿐만 아니라 수의학 산업 및 의약분야의 치료 및 백신 연구 분야에 파급효과가 클 것으로 기대됨.

## 제5장. 연구결과의 활용계획

D-07

1. 복분자씨추출물의 항바이러스 효과를 in vitro, in vivo, 펠렛(ferret)을 이용한 비임상연구에서 바이러스 관련 유효성 평가에서 효과가 있음을 검증하였음.
2. 식품의 기능성 인증을 받기 위한 면역관련 기존 제품들과의 비교시험에서 면역관련 평가항목에서 소량(16mg/g)에서도 효과가 기존제품보다 우수함을 검증하였음.
3. 향후 면역관련 항목에 대하여 추가연구를 실시하여 건강기능식품의 면역소재로의 개발이 크게 기대되고 있는 실정임 (바이러스와 면역과는 연관성이 있음)
4. 복분자씨추출물을 이용한 기능성식품소재의 인플루엔자 예방소재로의 제품응용화를 추진할 계획임.
  - 현재 CJ헬스케어와 비밀유지계약에 따라 제품을 개발 진행중
  - 국내 건강기능식품의 면역, 인플루엔자 관련 제품의 개발시 사용하기 위한 샘플등 제공하여 개발 진행중임
5. 당사에서 자체적인 기능성식품의 제형화를 계획중임
6. 기존 당사의 해외수출관련 업체들과의 제품관련 소개 및 샘플을 일본에는 제공하였으며, 향후 바이러스 인자들에 대한 추가 자료를 정리하여 중국으로 제품화를 추진해 나갈 계획임
7. 복분자씨추출물의 사료첨가제로의 활용도를 높이기 위한 사료의 유형별 첨가량 확인시험 진행 계획

- 조류(닭, 오리등), 애완용(애완견, 고양이등), 축산용(돼지, 소등)

## 제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

### ○ 제 1 절 시험관 시험자료 요약

실험물질	실험계	실험방법	결과	비고
1. Compound T-705 2. Compound GS 4071 3. Amantadine 4. Ribavirin	<b>A. H1N1 virus</b> -PR/8/34 -FM/1/47 -NWS/33 -Yamagata/120/86 -Suita/1/89 <b>B. H2N2 virus</b> -Kaizuka/2/65 -Okuda/57 -Japan/305/57 -Takathuki/4/65 <b>C. H3N2 virus</b> -PortChalmers/1/73 -Aichi/2/68 -Ibaraki/1/90 -Kitakyushu/159/93 <b>D. B virus</b> -Nagasaki/1/87 -Guandong/5/94 -Mie/1/93 <b>E. C virus</b> -Taylor/1233/47 -Yamagata/3/96 -JJ/50	plaque reduction assays	1. Compound T-705는 influenza A, B, C virus에서 각각 IC <sub>50</sub> 가 0.013~0.48, 0.039~0.089, 0.03~0.057 µg/ml의 저해활성이 나타남. 2. Compound GS 4071 는 influenza A, B, C virus에서 각각 IC <sub>50</sub> 가 0.00017~0.68, 0.0063~0.031, >100 µg/ml의 저해활성이 나타남. 3. Amantadine는 influenza A virus에서 IC <sub>50</sub> 0.062~>50 µg/ml, influenza B에서 >50 µg/ml 의 저해활성이 나타남. influenza C virus는 test하지 않았음. 4. Ribavirin은 influenza A virus에서 IC <sub>50</sub> 1.6~13.8 µg/ml, influenza B에서 1.2~19 µg/ml 의 저해활성이 나타남. influenza C virus는 test하지 않았음.	In Vitro and In Vivo Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705. (2002)
Lignan Glycoside	-A/PR/8/34 (H1N1), -A/FM/1/47 (H1N1)	plaque reduction assays	1. A/PR/8/34 (H1N1) virus에 대한 IC <sub>50</sub> 는 18.7 µM으로 나타남. 2. human and avian influenza viruses (	In Vitro Anti-Influenza Virus Activities of a New

	<p>-A/Aichi/2/68 (H3N2)  -B/Lee/1940  -A/Duck/Guangdong/2009 (H6N2),  -A/Duck/Guangdong/1994 (H7N3)  -A/Chicken/Guangdong/1996 (H9N2),</p>		<p>influenza A [A/PR/8/34 (H1N1), A/FM/1/47 (H1N1) and A/Aichi/2/68 (H3N2)] and influenza B (B/Lee/1940)) 에서의 IC<sub>50</sub>는 13.4 ~39.8 <math>\mu</math>M로 나타남.</p> <p>3. A/Duck/Guangdong/2009 (H6N2), A/Duck/Guangdong/1994 (H7N3) and A/Chicken/Guangdong/1996 (H9N2)에서는 IC<sub>50</sub>가 &gt;138.1 <math>\mu</math>M 으로 나타남.</p>	<p>Lignan Glycoside from the Latex of <i>Calotropis gigantea</i>. (2014)</p>
<p>Kuraridin (<i>Sophora flavescens</i>)</p>	<p>reovirus type 1 (ATCC VR-230)  reovirus type 2 (ATCC VR-231)  reovirus type 3 (ATCC VR-824)</p>	<p>1.Hemagglutination inhibition activity  2.inhibition of reovirus replication</p>	<p>1. Hemagglutination inhibition activity  -HRV1~HRV3에서의 Hemagglutination inhibition 활성은 각각 40, 80, 20 <math>\mu</math>M로 나타남.</p> <p>2. Inhibition of reovirus replication.  -virus 감염 후 kuraridin을 treatment한 후 12시간 관찰  -HRV-1~3에서는 12시간이 지난 후 약 20, 40, 80%의 virus replication 저해 효과가 나타남.</p>	<p>In vitro anti-reovirus activity of kuraridin isolated from <i>Sophora flavescens</i> against viral replication and hemagglutination (2015)</p>
<p>Phlorotannin (<i>Ecklonia cava</i>)</p>	<p>PEDV (porcine epidemic diarrhea virus)</p>	<p>1.simultaneous-treatment assay  2.post-treatment assay</p>	<p>1.simultaneous-treatment assay  - IC<sub>50</sub>가 10.8~22.5 <math>\mu</math>M로 나타남.  - 약 36.6 <math>\mu</math>M에서 viral spike protein의 binding 저해 효과가 나타남.</p> <p>2. post-treatment assay  - 18~24시간에서 viral RNA와 viral protein 합성 저해에 효능이 있었음.</p>	<p>In vitro antiviral activity of phlorotannins isolated from <i>Ecklonia cava</i> against porcine epidemic diarrhea coronavirus infection and hemaggluti</p>

				nation (2013)

## 제 2 절 동물시험 자료 요약

시험 물질	실험동물	섭취량/ 섭취기간	바이오마커	결과	비고
propolis (AF-05~ 08, 17~20)	Female DBA/2 Cr mice (6 weeks old, 17-19 g)	10 mg/kg, 1-6 days	BALF (broncho-alveolar lavage fluids)	대조군 (virus 감염안함)에서는 체중 변화가 거의 없었으나 실험군 1 (virus 감염군)에서는 감염 3일이후로 체중이 감소추세를 나타내고 4일째 약 3 g의 체중이 감소함. 실험군 2 (virus +propolis)에서는 3일이후 체중감소 추 세가 있었으나 4일째 약 1 g의 체중이 감소함.	Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. (2008)
diarylhep tanoid (AO-000 2)	Female BALB/c mice (6 weeks old, 20-22 g)	100 mg/kg, 1-7 days	BALF (broncho-alveolar lavage fluids)	실험군 1 (virus감염군)에서는 감염 2일 이후로 체중이 감소추세를 나타내고 7 일째 약 5 g의 체중이 감소함. 실험군 2 (virus +AO-0002, 30 mg/kg) 에서는 3일 이후 체중감소 추세가 있었 으나 7일째 약 3.5 g의 체중이 감소함. 실험군 3 (virus +AO-0002, 100 mg/kg)에서는 3일째 약 0.5 g이 감소하 였으나 7일째 약 1 g의 체중이 감소함.	In vitro and in vivo anti-influenza virus activity of diarylhep tanoids isolated from Alpinia officinarum. (2010)
Ginseng extract	Female BALB/c mice (8-10 weeks old)	25mg/kg 60 days	BALF (broncho-alveolar lavage fluids)	-Ginseng extract를 섭취한 mice에 서 cytokine을 분석함 1. virus titer시 Ginseng extract을 섭취한 mice와 섭취하지 않은 mice 를 비교하였을 때 각각 2000, 3000 PFU/mouse의 결과가 나타남. 2. interleukin-4 (IL-4) 분석 결 과 섭취군과 비섭취군은 각각 40, 37 pg/ml로 나타남. 3. interleukin-5 (IL-5) 분석 결 과 섭취군과 비섭취군은 각각 12,	Antiviral activity of ginseng extract against respiratory syncytial virus infection (2014)

				<p>7.5 pg/ml로 나타남.</p> <p>4. interleukin-13 (IL-13) 분석 결과 섭취군과 비섭취군은 각각 22, 17 pg/ml로 나타남.</p> <p>5. tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>) 분석 결과 섭취군과 비섭취군은 각각 22, 27 pg/ml로 나타남.</p> <p>6. interferon-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>) 분석 결과 섭취군과 비섭취군은 각각 300, 830 pg/ml로 나타남.</p>	
--	--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

## 제7장. 연구개발결과의 보안등급

		D-09
○		

## 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		코드번호	D-11
○			

## 제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기 타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 / 특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	엘라그산을 함유하는 복분자 추출물의 제조방법 및 엘라그산의 분리방법	(주)에 스앤디		대한민국		2016.05.31		
2	특허	항바이러스 기능을 가지는 복분자씨 추출물의 제조 방법 및 그 조성물	(주)에 스앤디		대한민국		2016.06.24		
3	논문	Antiviral effects of black raspberry ( <i>Rubus coreanus</i> ) seed and its gallic acid against influenza virus infection	덕성여 자대학 교	주저자	스위스	3.465	2016.06.06		SCI
4	논문	conformational modulation of influenza virus hemagglutinin: characterization and in vivo efficacy of monomeric form	덕성여 자대학 교	주저자	영국	4.259	2017.08.08		SCI
5	계약	비밀유지계약서	(주)에스 앤디	-	-	-	2016.11.		제품공동 개발

## 제11장 기타사항

코드번호	D-13

## 제12장. 참고문헌

D-14
1. Alam I., Lee J.H., Cho K.J., Han K.R., Yang J.M., Chung M.S., Kim K.H. Crystal structures of murine norovirus-1 RNA-dependent RNA polymerase in complex with 2-thiouridine or ribavirin. <b>Virology</b> . 2012;426(2):143-151

2. Cho K.J., Lee J.H., Hong K.W., Kim S.H., Park Y., Lee J.Y., Kang S., Kim S., Yang J.H., Kim E.K., Seok J.H., Unzai S., Park S.Y., Saelens X., Kim C.J., Lee J.Y., Kang C., Oh H.B., Chung M.S., Kim K.H. Insight into structural diversity of influenza virus haemagglutinin. **Journal of General Virology**. 2013;94(8):1712-1722.
3. Kang Y.G., Ryu I.H., Kim S.B., Choi. C.M., Seo Y.J., Cho. H.B. A Study on the Inhibitory Effect and Mechanism of *Lonicera Japonica* on Type I Interferon. **The Journal of Oriental Obstetrics and Gynecology**. 2013;26(2):17-32.
4. Lee J.H., Alam I., Han K.R., Cho S., Shin S., Kang S., Yang J.M., Kim K.H. Crystal structures of murine norovirus-1 RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of General Virology**. 2011;92(7):1607-1616.
5. Lee D., Lee D.S. Antiviral activity of methanol extract from *Ephedra sinica* Stapf. **Korean Journal of Food Preservation**. 2014;21(5):735-739.
6. Lee J.H., Oh M., Seok J.H., Kim S., Lee D.B., Bae G., Bae H.I., Bae S.Y., Hong Y.M., Kwon S.O., Lee D.H., Song C.S., Mun J.Y., Chung M.S., Kim K.H. Antiviral Effects of Black Raspberry (*Rubus coreanus*) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection. **Viruses**. 2016;8(6):E157.
7. Liang-Tzung L., Wen-Chan. H., Chun-Ching. Lin. Natural Antivirals against Human Viruses. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. 2014;4(1):24 - 35.
8. Nagai T., Miyaichi Y., Tomimori T., Suzuki Y., Yamada H. In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase. **Antiviral research**. 1992;19(3):207-217.
9. Oh M., Lee J.H., Bae S.Y., Seok J.H., Kim S., Chung Y.B., Han K.R., Kim K.H., Chung M.S. Protective effects of red wine and resveratrol for foodborne virus surrogates. **Food Control**. 2015;47:502-505.
10. Sakagami H., Takeda M., Kawazoe Y., et al. Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. **In Vivo**. 1991;6(5):491-495.
11. Turan K., Nagata K., Kuru A. Antiviral Effect of *Sanicula europaea* L. Leaves Extract on Influenza Virus-Infected Cells. **Biochemical and biophysical research communications**. 1996;225(1):22-26.
12. Xu Z., Chen X., Zhong Z., Chen L., Wang Y. Ganoderma lucidum polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. **The American journal of Chinese medicine**. 2011;39(01):15-27
13. 권지웅, 이희권, 박희전, 권태오, 최혜란, 송지영. 복분자 에탄올 추출물의 생리활성 탐색. **한국약용작물학회지**. 2011;19(5):325-333.
14. 김윤정, 한송희, 전지영, 황민호, 임용진, 채수완, 김민걸. 고창 복분자의 기능성원료 표준화를 위한 지표성분으로서 Ellagic Acid의 분석법 개발. **한국식품영양과학회지**. 2012;41(11):1554-1558.
15. 서성숙, 정승기. 발효 금은화의 인플루엔자 바이러스 A 형에 대한 저해효과. **대한한방내과학회지**. 제. 2009;30(3).

16. 송원섭, 김은식, 부희옥, 최경민, 김숙희, 박은정. 감귤류 메탄올과 에탄올 추출물의 항바이러스 활성 검색. **한국자원식물학회 학술심포지엄**. 2012:145-145.
17. 신혜영, 장문희, 김윤철, 윤용갑, 박현. 상기생 물추출물이 대식세포 활성화와 Th1 반응에 미치는 효과. **동의생리병리학회지**. 2008;22(1):171-175.
18. 永井, 勝次, 박무현, 하상도, 김건희. 감기바이러스 (인플루엔자) 감염에 대한 마늘의 방어효과. **한국식품영양과학회지**. 2000;29(1):128-133.
19. 정명근, 임정대. 복분자 안토시아닌 분획의 항산화, 항암 및 면역증진 효과. **한국약용작물학회지**. 2012;20(4):259-269.
20. 정선식, 어성국, 김영소, 한성순. 잔나비겉상버섯 수용성물질의 항인플루엔자바이러스 작용과 인터페론과의 병용효과. **약학회지**. 1999;43:469-473.
21. 조정용, 김성자, 이형재, 김진영, 임익재, 강성구, 박근형, 문제학. 복분자 (*Rubus coreanus* Miquel) 와인의 ethyl acetate 분획으로부터 저분자 휘발성 화합물들의 분리 및 구조해석. **한국식품과학회지**. 2011;43(5):558-563.
22. 채규서, 손락호, 박송이, 김기안, 이태범, 권지웅. 복분자 추출물의 기능성 원료 표준화를 위한 지표성분 Ellagic acid 분석법. **산업식품공학**. 2014;18(4):1-4.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.