

발 간 등 록 번 호
11-1543000-001876-01

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

베타글루칸과 유산균을 이용한 면역강화용 글로벌 제품화 기술개발 최종보고서

2017. 11. 9.

주관연구기관 / 농업회사법인 선일바이오(주)
협동연구기관 / 한국생명공학연구원
(주)셀아이콘랩
남부대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “베타글루칸과 유산균을 이용한 면역강화용 글로벌 제품화 기술개발”(개발기간 : 2014. 08. 01. ~ 2017. 07. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11. 09.

주관연구기관명 : 농업회사법인 선일바이오(주) (대표자) 송 영 진 (인)

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 장 규 태 (인)

협동연구기관명 : (주)셀아이콘랩 (대표자) 성 민 규 (인)

협동연구기관명 : 남부대학교 산학협력단 (대표자) 정 상 원 (인)



주관연구책임자 : 송영진

협동연구책임자 : 김중수

협동기관책임자 : 성민규

협동기관책임자 : 유민정

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114007-3	해당단계 연구기간	2016.08.01.~ 2017.07.31	단계구분	1/1
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부 과제명	베타글루칸과 유산균을 이용한 면역강화용 글로벌 제품화 기술개발			
연구책임자	해당단계 참여 연구원 수	총: 15 명 내부: 15 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원	
	총 연구기간 참여 연구원 수	총: 15 명 내부: 15 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	농업회사법인 선일바이오(주) 기업부설연구소			참여기업명 (주)셀아이콘랩	
위탁연구	해당사항 없음			연구책임자: 송영진	
1. 순수 β 1,3/1,6-glucan을 생산하는 <i>A. pullulans</i> 변이균주 개발 2. β 1,3/1,6-glucan과 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 및 인체 적용시험 3. β 1,3/1,6-glucan과 유산균의 대량생산공정 기술 개발 4. β 1,3/1,6-glucan 함유 아우터뷰티 및 이너뷰티에 대한 <i>in vitro</i> 및 인체적용시험 5. β 1,3/1,6-glucan 함유 실버세대용 식품에 대한 시제품 제작 6. β 1,3/1,6-glucan 원료소재 제품화 기술 개발 7. β 1,3/1,6-glucan 함유 이너뷰티 시제품 제작 및 아우터뷰티 제품화 기술 개발				보고서 면수 : 562 페이지 (총 면수 : 579 페이지)	

〈 국문 요약 〉

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>[연구 목적]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>A. pullulans</i>가 생산하는 면역증강용 소재인 β 1,3 linkage를 갖는 순수한 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 이중면역시스템에 대한 <i>in vitro</i>, 전임상 및 인체적용시험을 통한 효능 규명 2. 면역 증강을 위한 시너지 효과가 규명된 면역 강화용 소재와 이를 활용한 <ol style="list-style-type: none"> ① 건강 지향형 면역강화용 제품군 개발 ② Nutricosmetics & Cosmeceuticals의 제품군 개발 ③ 면역강화용 건강지향형 제품과 Nutricosmetics의 융합형 제품군 개발 3. 국내 녹색기술 인증 및 녹색기술제품 인증, 미국 FDA의 NDI 인증을 통한 글로벌 시장 진출을 최종 목표로 함 <p>[연구 내용]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dectin-1 receptor와 Toll like receptor 2 & 4 기반 이중면역시스템을 이용한 면역력 증강용 소재의 기능성 규명 <ol style="list-style-type: none"> ① β 1,3/1,6-glucan을 이용한 <i>in vitro</i> 면역활성 시험 ② β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 이용한 <i>in vivo</i> 면역활성 시험 ③ β 1,3/1,6-glucan에 대한 독성시험 ④ 이중맹검을 이용한 인체적용시험 2. Dectin-1 receptor와 Toll like receptor 2 & 4 기반 이중면역시스템 활성 소재의 생산 공정 개발 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>A. pullulans</i> 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 ② Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 확보 및 대량 생산 공정 확립 ③ β 1,3/1,6-glucan을 이용한 Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 코팅 기술 3. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 제품 개발 <ol style="list-style-type: none"> ① β 1,3/1,6-glucan의 피부 콜라겐 합성 촉진능 및 콜라겐 발현조절 메커니즘 규명 ② β 1,3/1,6-glucan의 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 활용도 분석 ③ β 1,3/1,6-glucan의 독성 평가, <i>in vitro</i>, 전임상 및 인체적용 시험 ④ Nano화 기술 적용을 통한 효능 향상 ⑤ β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Cosmeceuticals-Nutricosmetics 4. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 실버식품 개발 <ol style="list-style-type: none"> ① 실버세대에 적합한 실버 식품 동향 조사, 분석 ② 천연 영양성분 구성 및 기호도 증진을 위한 부재료 선정 ③ 실버세대용 간식류, 저지방, 고단백 시제품 개발 ④ 개발 제품의 안전성 분석 	

<p>연구개발 성과</p>	<p>[연구 개발 성과]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>A. pullulans</i> 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주 개발 2. β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 및 인체적용시험을 통해 기능성 규명을 완료함 3. <i>A. pullulans</i> 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 개발을 완료함 4. Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 확보 및 대량 생산 공정 확립 5. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 제품 개발을 완료하고 사업화를 진행하고 있음 6. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 양갱, 음료 등의 실버식품 시제품 개발 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>[연구 개발 성과의 활용계획]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 베타글루칸과 유산균의 기능을 집중시켜, 인체 내 면역증진 강화로 다양한 상품개발 가능 <ol style="list-style-type: none"> ① 베타글루칸과 유산균을 활용한 이중 면역 증가 효능을 규명, 이를 활용한 질병예방 소재 활용으로 다양한 분야 적용 가능한 상품개발 추진 ② 건강기능성식품 제조업체와 전통식품 및 일반식품 등에 활용 가능한 분말형태로 상품 개발로 고부가가치 건강기능성 식품 및 식품 제품개발에 활용 ③ 인체에 흡수율 증대를 위한 액상 형태 소재개발로 의약품 및 화장품 신상품 개발 추진 2. 건강기능성 소재 및 고부가가치 식품, 의약품 등 연관산업 적용확대를 사업화추진 <ol style="list-style-type: none"> ① 그 동안 베타글루칸 및 유산균에 대해 국내·외에서 많은 연구가 이루어 졌으나, 단순히 건강기능성 소재 분야에 한정되어 활용. ② 대량생산 공정 개발 및 기능성 성분 규명을 통한 원료의 표준화식품, 소아·청소년층의 면역증진을 위한 프로바이오틱스유산균을 함유한 스틱형 유제품 개발첨가제, 이중 면역 시스템을이용한 중·장년층 면역력 강화용 건강 지향성 개발과 천연조미료, 식음료와 미용산업 등에 다양한 적용범위 확대를 통한 연관산업 발전기반 확대를 통한 단계별 사업화 추진 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>베타-1 수용체</p>	<p>이중 면역 시스템</p>	<p>건강 지향형 제품</p>	<p>식용 화장품</p>	<p>미국건강보조식품</p>

< SUMMARY >

	<ul style="list-style-type: none"> ① Identification of the ability of β 1,3/1,6-glucan to promote skin collagen synthesis and the mechanism of collagen expression regulation ② Nutricosmetics - Cosmeceuticals utilization analysis of β 1,3/1,6-glucan ③ Evaluation of toxicity of β 1,3/1,6-glucan, in vitro, preclinical and clinical trial ④ Improving efficacy by applying nanotechnology technology ⑤ Cosmeceuticals-Nutricosmetics containing β 1,3/1,6-glucan as an active ingredient materials <p>4. Development o silver food containing β 1,3/1,6-glucan as active ingredient</p> <ul style="list-style-type: none"> ① Research and analysis of silver food trend suitable for silver generation ② Selection of ingredients for natural nutrition composition and preference promotion ③ Development of snacks, low-fat, high protein prototype for silver households ④ Safety analysis of developed products
Results	<ul style="list-style-type: none"> 1. Development of pure β 1,3/1,6-glucan producing strain <i>A. pullulans</i> KSY-0516 mutant strain from <i>A. pullulans</i> strain 2. <i>In vitro</i>, <i>in vivo</i> and clinical trial studies using β 1,3/1,6-glucan and <i>lactobacillus</i> have completed functional identification 3. Completion of development of β 1,3/1,6-glucan production process using <i>A. pullulans</i> strain 4. Establishment of Toll like receptor 2 & 4 induction lactic acid bacteria and mass production process 5. Completed the development of Nutricosmetics - Cosmeceuticals products containing β 1,3/1,6-glucan as active ingredient and commercialization in progress 6. Developed prototype of silver food such as yanggaeng and beverage containing β 1,3/1,6-glucan as active ingredient
	<ul style="list-style-type: none"> 1. By concentrating the functions of beta-glucan and lactic acid bacteria, various products can be developed by strengthening immunity enhancement in human body. ① Identification of double immunity increase effect using beta-glucan and lactic acid bacteria, and development of products applicable to various fields by utilizing disease prevention material utilizing it

<p>Expected Contribution</p>	<p>② Development of high value-added health functional foods and food products by developing products in the form of powder that can be utilized by health functional food manufacturers and traditional foods and general foods.</p> <p>③ Development of new products for pharmaceuticals and cosmetics by development of liquid form material to increase absorption rate in human body</p> <p>2. Promoting expansion of application of related industries such as health functional materials and high-value foods and medicines</p> <p>① In the meantime, many studies have been conducted on beta-glucan and lactic acid bacteria both domestically and internationally, but they have been used only for health functional materials.</p> <p>② Development of mass production process and standardization of raw materials through functional ingredient identification, Probiotics for improving immunity of food of children and adolescents, Development of stick-type dairy product containing lactic acid bacteria, Development of health orientation for middle and senior immunity strengthening using dual immune system and promotion of step-by-step commercialization by expanding the range of application to natural seasoning, food and beverage and beauty industry</p>				
<p>Keywords</p>	<p>Dectin-1 receptor</p>	<p>Double immune system</p>	<p>Health supplements</p>	<p>Inner beauty</p>	<p>New Dietary Ingredient(NDI)</p>

〈Content〉

1. Overview of research project	1
2. Current trends in research	31
3. Research results	41
4. Accomplishments and expected contribution	515
5. Application of research results	517
6. Overseas scientific information collected during the study	518
7. Research securities	528
8. Status of research equipment registered at NTIS	528
9. Laboratory safety management performance	528
10. Representative research achievements	530
11. Other Matters	530
12. References	531

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	31
3. 연구수행 내용 및 결과	41
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	515
5. 연구결과의 활용계획 등	517
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	518
7. 연구개발성과의 보안등급	528
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	528
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	528
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	530
11. 기타사항	530
12. 참고문헌	531

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

본 사업은

1. *A. pullulans*가 생산하는 면역증강용 소재인 β 1,3 linkage를 갖는 순수한 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의활성을 유도하는 유산균의 이중면역시스템에 대한 *in vitro*, 전임상 및 인체적용시험을 통한 효능 규명
2. 면역 증강을 위한 시너지 효과가 규명된 면역 강화용 소재와 이를 활용한
 - ① 건강지향형 면역강화용 제품군 개발
 - ② Nutricosmetics & Cosmeceuticals의 제품군 개발
 - ③ 면역강화용 건강지향형 제품과 Nutricosmetics의 융합형 제품군 개발
3. 국내 녹색기술 인증 및 녹색제품인증, 미국 FDA의 NDI 인증을 통한 국내 및 글로벌 시장 진출을 최종 목표로 함

1-2. 연구개발의 필요성

1. 개발 대상 기술제품의 개요

- 점진적인 경제성장과 함께 건강에 대한 인식이 중요시되면서 현대사회에서 지속적인 성장산업으로 인하여 국내 건강기능성 식품산업도 동반 성장하고 있음
- 한국보건산업진흥원의 연구논문에서 언급된 부분을 살펴보면, 21세기 현대인의 생활을 질적으로 변화시킬 수 있는 새로운 패러다임으로써 앞으로의 연구 및 투자노력이 우리나라 건강지향성 식품 및 건강기능성 식품산업 분야가 선진시장으로 진입하는데 있어 매우 중요한 시기가 될 것임을 예견하고 있음
- 건강기능식품법에서는 ‘건강기능식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조, 가공한 식품’으로 정의하고 있는데 여기서 ‘기능성’이라는 말은 인체의 구조 및 기능에 대한 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 가지는 것을 의미함

- 건강보조식품의 목적은 인간이 인체에 유익한 영양소 섭취를 통해 인체 내 건강을 증진시키기 위한 식품으로 무공해 식품과 자연식품을 의미하며 이를 통해 균형 있게 영양소를 섭취하는데 그 목적이 있음.
- 따라서 건강 기능성식품의 의의는 현대인의 잘못된 식생활 등의 이유로 부족해지기 쉬운 영양 물질의 대체공급원의 역할과 함께 다른 한편으로는 공해(환경오염) 및 운동부족으로 인해 인체 내 영양불균형을 해소하기 위해서는 특정영양물질을 통해 보충함을 의미함
- 2012년 건강기능식품 시장규모(국내판매액+수출액)는 약 1조 4,091억 원으로 이는 전년대비 약 3% 오른 수치이다. 2008년부터 2011년까지 연평균 19.4%의 성장률에 비하면 비교적 성장률이 둔화되었다고 볼 수 있으며, 이러한 이유는 국내외 전반적인 경기 침체에 따른 것으로 보인다. 하지만 그 와중에서도 개별인정형 시장은 꾸준한 성장세를 유지하고 있음
- 2011년 기준 100억 원 이상의 시장규모를 형성하는 원료들의 최근 4년 간 시장규모를 살펴보면, 비타민 및 무기질, 프로폴리스추출물, 식이섬유, 개별 인정형 원료의 시장성장률이 높게 나타났다. 반면 인삼, 스피루리나/클로렐라는 시장규모가 감소한 것으로 나타났음
- 특히 개별인정형 건강기능식품의 경우 식약처의 보도자료에 의하면, 지난 해 시장규모가 1,807억 원으로 2011년에 비해 약 26% 증가한 것으로 나타났으며, 제품별로는 헛개나무과병추출분말이 전체 27.8%에 해당하는 502억 원을 기록하여 시장규모가 가장 큰 것으로 나타났고, 그 뒤를 당귀혼합추출물(245억 원), 그린마테추출물(147억 원), 밀크씨슬추출물(135억 원)이 있음
- 미국은 1991년 영양표시교육법(NLEA, Nutrition Labeling & Education Act, 1991)과 1994년 건강기능식품 건강 및 교육법(DSHEA, The Dietary Supplement Health & Education Act, 1994) 두 가지가 건강기능성 식품의 법률로서 영양표시교육법에서 규정한 건강강조표시는 특정영양소 및 질병 또는 건강상태 사이의 관계를 표현한 것이며, 식이보충제를 포함한 모든 식품이 인식되어 지는 과학적 증거에 의하여 과학적 경험과 지식을 가진 과학자집단 사이에 합의된 건강관련표현을 표시하는 제도가 있음

표. 건강기능식품 주요 원료별 시장규모 동향

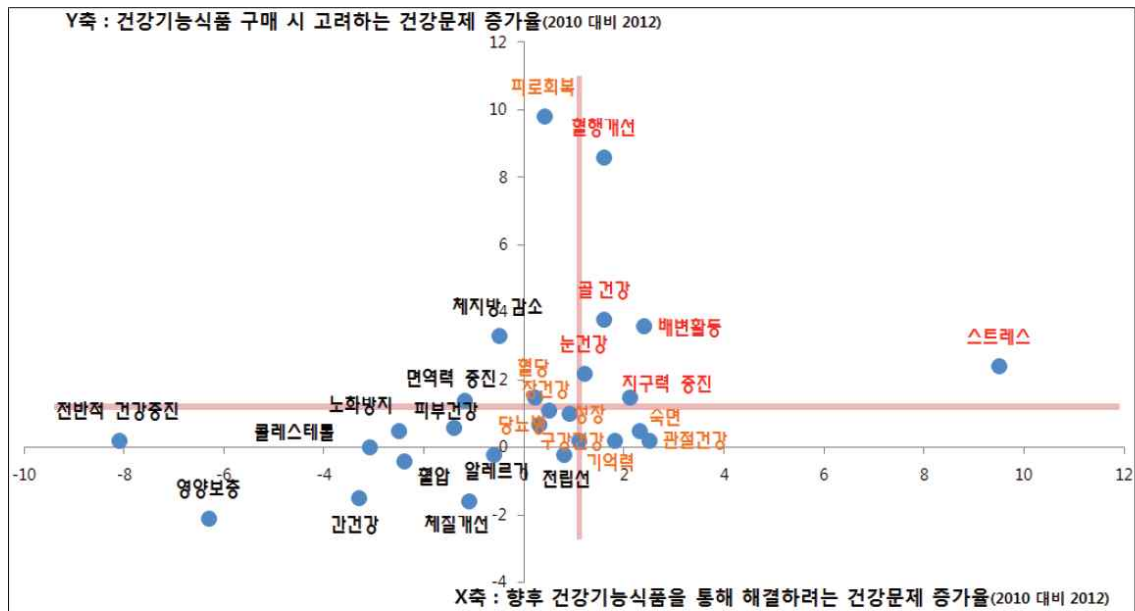
구 분	2008	2011	CAGR
비타민 및 무기질	53,114,467	156,102,278	43.24%
인삼	41,266,746	38,127,932	-2.60%
홍삼	418,394,393	719,064,925	19.78%
스피루리나/클로렐라	19,994,895	11,348,757	-17.20%
알로에	63,854,143	69,154,474	2.69%
프로폴리스추출물	4,916,944	11,380,995	32.28%
오메가-3 지방산 함유 유지	26,594,201	50,865,884	24.13%
감마리놀렌산 함유 유지	14,517,637	22,364,947	15.49%
식이섬유	120,831	11,551,365	357.25%
키토산/키토올리고당	8,621,070	10,616,673	7.19%
프로바이오틱스	19,015,722	40,487,779	28.65%
가르시니아캄보지아추출물	-	20,724,425	-
개별인정형	41,639,135	143,479,074	51.04%
전 체	803,067,010	1,368,187,564	19.43%

출처 : 식약처

- 식이보충제건강교육법(DSHEA)은 건강기능식품(Dietary Supplement)을 식물성분 - 비타민, 미네랄, 허브 또는 이 외의 식물성분, 아미노산, 식사 섭취량을 증가시키기 위한 음식물 또는 이들 성분의 농축대사물, 구성물질, 추출물 혹은 혼합물 중 한 가지 이상을 함유하면서 식사를 보충하는 식품으로서, 식이보충제의 형상은 정제 · 캡슐 · 분말 · 액상 등의 형태로 되어있는 일반적인 식이보충제 정의 및 표시 등을 확대한 것이며 통상 식품으로 사용되지는 않으며 건강 기능성식품의 인체구조 및 기능에 관한 표시가 있는 것으로 정의되어 있음
- 건강 기능성식품의 기능성 표시범위와 관련해서는 인체의 구조 및 기능에 대한 표시가 허용되고 있으며 건강 기능성식품의 국가적 감독 체계에 관해서는 사후관리형을 채택하여 운영하고 있음
- 식이보충제건강교육법은 영양강조에 대한 표현과 3가지 요건에 해당될 경우에만 식이보충제의

‘영양강조’ 표시를 할 수 있음. 먼저 영양강조에 대한 3가지 표현은 다음과 같다. 첫째 예로 부터 미국에서는 영양결핍으로 인한 질병과 이와 관련된 질병의 유용한 이점을 표현한 것, 둘째 신체의 구조 및 기능에 영향을 주는 식품성분 또는 영양의 작용에 대해 표현한 것, 셋째 영양 또는 식품성분이 신체의 구조 및 기능의 유지에 어떻게 작용하는 지 그 메커니즘에 대해 표현 하고 그 특징을 기술한 것으로 설명할 수 있음.

- 일본의 기능성식품은 법률로 정하고 있는 보건기능식품과 민간단체에서 품질을 인정하는 두 가지 경우로 나누어진다. 먼저 건강기능식품의 경우에는 별도의 기능성 식품에 대한 정의, 범위, 기준규격을 규정한 법률은 없지만 대체적으로 ‘영양성분을 보충하거나 특별용도에 적합한 것으로 판매되는 식품’으로 일본 건강·영양식품협회가 제정한 식품 안정성, 표시·광고, 제조관리 기준 등을 자율적으로 규격화하여 51개 품목군이 설정되어 있음



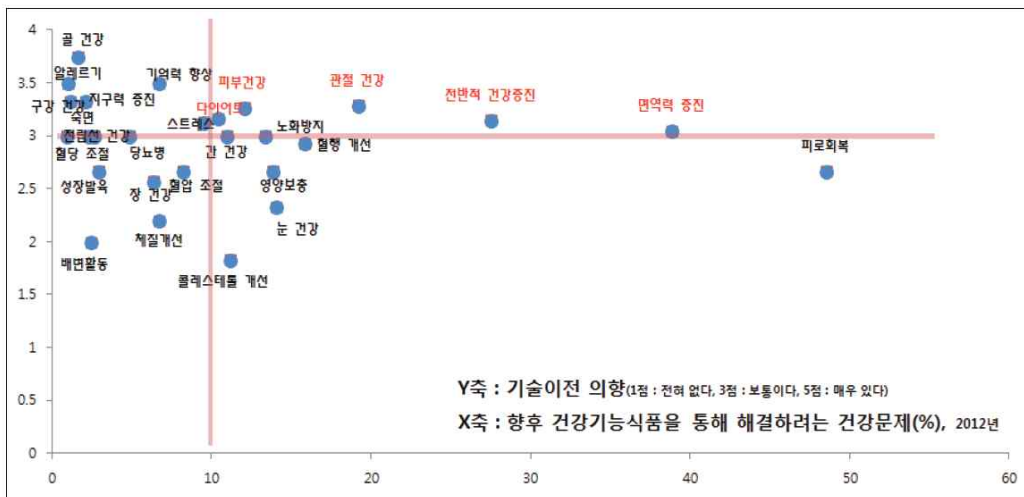
<사업화 유망 분야 매트릭스 분석>

건강기능식품 산업동향보고서(2013, 농업기술실용화재단)

- 기능성식품의 특성은 제3차 생체조절기능과 함께 영양기능과 감각기능이 중요하다는 인식으로 3가지 기능이 합쳐진 종합적인 기능으로 특정보건용식품을 제정하고 이에 대해서 ‘식생활에 있어서 특정의 보건목적으로 섭취하는 자에 대해서 해당 기능성식품의 섭취를 통해 해당 보건의 목적을 기대할 수 있다는 뜻을 표시한 식품’으로 정의 하였으며 제12조 특별용도식품 중

에 특정보건용식품을 91년에 신설 법제화하였음

- 중국의 경우 기능성식품에 대한 제도 정비를 조기에 확립한 국가이다. 식품위생법 제22조 「특별한 기능을 가진 식품에 대해서 제품과 설명서는 지방보건행정부에 의해 평가 및 인정되어야 한다. 위생기준과 이러한 제품의 제조와 판매관리는 지방보건행정부에 의해 공식화된다.」는 내용으로 중국의 경우 건강식품을 ‘특별한 기능을 가진 식품’이라는 관점에서 바라보고 있음. 다시 말하면 건강기능식품은 특별한 집단의 사람들이 소비하는데 적합한 것이다. 그리고 신체기능을 통제할 수 있는 기능이 있지만 치료를 위해 사용되지 않는다는 부분임



<연구개발 유망 분야 매트릭스 분석(단기)>

건강기능식품 산업동향보고서(2013, 농업기술실용화재단)

- 통계기관별로 다소 차이가 있으나 97년 650억불 규모였던 세계 기능성 식품시장은 2000년 1,380억불로의 높은 성장률을 나타내었으며, 2006년도까지 연평균 11.0%수준의 성장이 예상되고 있음
- 화장품 산업의 특징을 요약하면 국가의 문화의 척도를 가늠할 수 있는 산업분야로서 사회와 문화의 발달과 더불어 성장하는 산업이라고 할 수 있다. 기술적인 측면에서 보면 화장품 산업은 화학, 생물학, 생리학, 약학 등의 기초과학과 응용기술이 복합적으로 적용되는 분야로서 다품종, 소량생산의 전형적인 정밀화학공업의 한 분야로 화장품 산업은 기술 집약적이고 고부가가치의 산업이라 할 수 있음
- 국내의 화장품 자체만으로 약 3 조원의 시장을 이루고 있으며, 관련산업을 합치면 약 10 조원

정도로 추산되며 약 20 만 명 이상의 인력이 화장품 관련산업에 종사하는 것으로 조사되고 있음

- 최근 화장품 연구는 치유개념이 도입된 기능성 화장품 개발에 집중되어 있다고 할 수 있음. 특히 Cosmeceutical은 Cosmetics와 Pharmaceutical의 합성어로 기능성화장품으로 불리어지며, 크게 기능성을 갖는 활성성분의 연구, 효능물질의 경피 흡수 방법과 이를 포함한 제형의 연구 및 피부생리에 대한 기초연구에 집중하고 있음
- 기능성 화장품기술에서의 주된 관심 분야는 피부노화의 지연 연구, 자외선 및 공해물질 등 외부 환경으로부터의 피부 보호, 미백연구 외 새로운 피부세포의 생성을 촉진하는 주름방지, 향을 이용한 스트레스 완화, 피부 보습 등 기능성물질의 개발과 이들 물질의 효능 및 피부안전성 측정 방법 등에 대해서 연구하고 있고 향후에는 피부항상성에 관여하는 인자들에 대한 기작 연구에서 그 원인을 제거하는 세포 또는 유전자의 연구로 이어질 것으로 예상됨
- 또한 피부미용은 여러 수단에 의해 피부의 신진대사 및 생리활성을 촉진시키고, 영양공급을 통해 건강하고 아름다운 피부를 관리하는 행위이다. 피부에 직접적인 처리를 하는 화장품 분야와 피부에 도움이 되는 유효성분을 함유한 식품을 섭취함으로써 주름 개선을 비롯한 피부미용 효과를 얻으려는 ‘inner beauty’ 개념을 기반으로 하는 건강기능식품의 분야가 있음 (대한화장품학회지 29(2) 149-178)
- 피부미용 관련 건강기능식품은 피부를 구성하고 있는 표피, 진피, 피하조직을 유지하고, 나이에 따른 내인성 노화, 자외선에 의해 유발되는 외인성 노화를 개선하는 데 유효한 기능성 식품으로 피부미용 관련 건강기능식품 분야는 크게 발전하고 있는 기능성 화장품에 비해 관심이나 연구가 적은 편이지만, 표피의 개선으로는 한계가 있기 때문에 식품을 통한 섭취로 진피층을 유지함으로써 피부미용을 개선하는 이 분야의 전망은 밝다고 할 수 있음
- 특히, 미용식품시장이 크게 형성되어 있는 일본과는 달리 국내에서는 이제 미용식품시장이 형성되고 있는 시기라 할 수 있음
- 화장품회사의 대표적인 미용 식품 브랜드로는 태평양의 비비(V = B) 프로그램이 있음. 내부로부터 시작하는 건강한 아름다움이라 하는 브랜드 컨셉을 지닌 비비 프로그램은 여성의 건강을 위해 각종 영양소와 천연추출물을 공급하는 건강보조식품으로 vital line = beauty line으로 구성되

어 있으며, 이에 대한 임상 연구도 진행되고 있음

- β -glucan은 일반적으로 효모 세포벽, 버섯류, 곡류에 존재하는 물질로서 1941년 미국의 루이스 필레머(Louis Pillemer) 박사에 의해 효모 세포벽에서 비특이적인 면역 반응에 관여하는 물질을 발견, 자이모산(Zymosan)으로 명명하였다. 자이모산은 단순한 효모 추출물이었기에 β -glucan 이외에 단백질이나 지방을 다량으로 함유하고 있어 알레르기를 일으키는 부작용을 수반하기도 함

이너뷰티 인지도



[Base:전체, n=1,000, 단위:%]

	Base For %	인지	비인지
전체	(1,000)	46.4	53.6
남성 x 연령	19-24세 (100)	38.0	62.0
	25-29세 (100)	25.0	75.0
	30-34세 (100)	31.0	69.0
	35-39세 (100)	26.0	74.0
	40-44세 (100)	36.0	64.0
여성 x 연령	19-24세 (100)	64.0	36.0
	25-29세 (100)	78.0	22.0
	30-34세 (100)	70.0	30.0
	35-39세 (100)	54.0	46.0
	40-44세 (100)	42.0	58.0

인지 효과/효능



[Base:이너뷰티 인지자, n=464, 단위: 중독 %, 소수용답 비제시]

	Base For %	피부 수분 공급	피부 영양 공급	피부 노화 방지	피부 재생력 강화	피부 탄력 증진	피지 조절
이너뷰티 인지자	(464)	63.8	54.1	41.8	40.3	39.2	30.6
남성 x 연령	19-24세 (38)	71.1	55.3	36.8	36.8	39.5	44.7
	25-29세 (25*)	56.0	56.0	44.0	52.0	40.0	32.0
	30-34세 (31)	58.1	48.4	51.6	41.9	32.3	41.9
	35-39세 (26*)	53.8	53.8	57.7	50.0	50.0	30.8
	40-44세 (36)	58.3	72.2	52.8	61.1	52.8	38.9
여성 x 연령	19-24세 (64)	65.6	57.8	37.5	37.5	31.3	32.8
	25-29세 (78)	69.2	48.7	32.1	28.2	30.8	21.8
	30-34세 (70)	60.0	52.9	44.3	37.1	34.3	30.0
	35-39세 (54)	66.7	51.9	38.9	37.0	44.4	20.4
	40-44세 (42)	66.7	50.0	42.9	47.6	54.8	28.6

엠브레인트렌드모니터

10

* Too small base

이너뷰티 관련조사(리서치보고서, 2012, 2., 엠브레인트렌드모니터)

- 이러한 자이모산은 1960년대 초 미국의 니콜라스 딜루지오(Nicholas Diluzio) 박사에 의해 효모의 세포벽에서 추출한 고분자 다당을 β -glucan(β -glucan)이라 명명하면서 면역 활성화 물질임을 증명하였음

- β -glucan의 유래 : 버섯(Fungi), 효모(Baker's Yeast), 귀리(Oat) 등



○ 면역활성을 갖는 β -Glucan

- 포도당(glucose)이 β -1,3 화학결합을 중심으로 중합된 다당류를 총칭함.
- 버섯, 효모 등 미생물의 세포벽이나 세포외 다당류에서 분리함으로써 생산되는 미생물유래의 β -glucan과 보리, 귀리와 같은 곡물의 식이섬유에서 추출 생산되는 식물성 β -glucan이 있음.
- 버섯에서 알려진 항암활성은 주로 β -glucan의 면역기능 향상 효과에 기인하는 것으로 알려져 있음.
- 미국 식품의약국안전청(FDA)의 GRAS(General Recognized as Safe)로 승인을 얻어 식품첨가물로 널리 사용중임.
- 미국, 일본 등 전세계적으로 기능성 식품 및 화장품 등으로 널리 이용 중임.

○ β -Glucan의 종류

- 베타-1,3-글루칸 (β -1,3-Glucan)

- 포도당 분자간에 베타-1,3-결합을 이루는 고분자 다당류 물질임.
- *Agrobacterium* 속 및 *Acaligenes faecalis*와 같은 미생물의 발효에 의해 생산됨.
- 커드란(curdlan)으로 불리우기도 함.
- 화장품 보습제, 식품첨가제, 콘크리트 혼화제, 건강보조식품 등으로 이용되고 있음.

○ 베타 1,3/1,4-글루칸(β -1,3/1,4-Glucan)

- 포도당 분자간에 베타 1,3-결합 및 베타 1,4결합을 이루는 고분자 물질
- 귀리, 보리, 호밀 등 곡물들의 식이섬유질로부터 분리하여 생산됨.
- 수용성 식이섬유의 형태로 점질성을 갖고 있어서 낮은 농도에서 높은 점성을 나타냄.
- 빠르게 겔화됨으로 섭취시 불쾌한 mouthfeel을 갖기도 함.

○ 베타-1,3/1,6-글루칸(β 1,3/1,6-glucan)

- 포도당 분자간에 베타-1,3-결합으로 이루어진 주사슬에 베타-1,6결합으로 가지를 이루는 고분자 다당류 물질임.

- 버섯 균사체나 효모 세포벽으로부터 추출하거나, *Aureobasidium* 속 (흑효모 일종)의 미생물 발효에 의해 생산됨
 - 아가리쿠스, 영지, 운지버섯 등 여러 항암버섯의 주요 약리작용을 갖는 다당류임.
 - 무색, 무취이며 점도가 상대적으로 낮아 gel 화 되어도 이질감이 없어 섭취에 용이함.
 - 효모 유래의 β -1,3/1,4-glucan은 불용성이나 *Aureobasidium* 속의 β -1,3/ 1,6-glucan은 수용성 임.
- 미생물에서는 사용되는 당류의 종류에 따라 생성되는 β -1,3-Glucan의 종류가 다양하게 나타나며, 최근 버섯류에 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으며, 버섯의 종류에 따라 다양한 형태가 존재한다고 보고되고 있으며, β -1,3-Glucan의 임상 실험의 성과는 항암^(1,2), 고혈압⁽³⁾ 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있음
 - β -1,3-Glucan은 암세포를 직접 공격하지 않고 비특이적 면역반응으로 인간의 정상 세포의 면역 기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 대식세포(macrophage)를 활성화 시켜 암세포가 있는 체내로 들어가 여러 가지 사이토카인(Cytokine)의 분비를 촉진시킴으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 면역기능을 활성화시키는 것으로 알려져 있음
 - β -1,3-Glucan은 혈당강하 및 혈중 콜레스테롤 감소 효과가 우수하며, 지질대사를 개선하여 체지방 형성과 축적을 억제함으로써 항비만효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있음
 - 현재 건강보조제 및 면역증강제로 다양한 제품이 시판되고 있으며, 미생물을 이용한 β -1,3-Glucan의 대량생산 기술 역시 많이 연구되고 있음
 - 동물의 면역계에 대한 활성 증진력을 갖는 β -1,3-Glucan은 여러 가지 종류의 식용버섯, 효모, 보리, 귀리 등에 함유되어 있는 것으로서 알려져 있으며, 특히 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β -1,3-Glucan은 면역 증강 활성이 높고, 표고버섯 자실체로부터 추출되는 렌티난(lentinan)과 같은 폴리머는 의약품으로서 이용되고 있음⁽⁴⁾
 - 특히, β -1,3-Glucan은 최근 우수한 생체 조절의 기능적 측면이 부각되면서 그 특징으로써 지질 대사 개선작용, 성장작용, 혈당치 상승 억제 또는 항종양 효과나 면역 증강 효과 등이 밝혀짐에 따라 그 용도적 측면에서 주목받고 있는 소재임

- β -1,3-Glucan은 미생물류, 담자균류, 식물의 세포벽에 주로 포함되어 있으며, 이러한 생물체의 골격인 세포벽을 구성하는 성분으로서 존재함
- β -1,3-Glucan의 구조는 β -1,2/1,3/1,4/1,6-D-glucopyranose 결합이 적어도 2종류 이상을 갖는 글루코오스의 중합체를 주성분으로 함
- 이러한 다당류들은 크게 C-1 탄소원자와의 결합한 형태에 따라 크게 α -glucan과 β -glucan으로 나누어지며, α -glucan에는 amylose(α -1,4결합), amylopectin (α -1,4결합과 α -1,6결합), glycogen(α -1,4결합과 α -1,6결합), bacterial dextrin(α -1,6결합) 등이 있으며, β -glucan에는 대표적으로 cellulose(β -1,3결합), 갈조류의 laminaran(β -1,3결합), 지의류의 lichenan(β -1,3결합과 β -1,4결합)등이 존재하며, 이러한 glucan은 자연에서 미생물계, 식물계 및 동물계 등에 널리 분포
- 세포의 다당류(exopolysaccharide)의 합성에 관여하는 효소는 4개의 그룹으로 분류되며, 우선 첫 번째 그룹의 효소인 Hexokinase에 의해 glucose를 glucose-6-phosphate로 바꾸는 phosphorylation에 관여하게 됨. Hexokinase는 전이효소의 일종으로 포도당 등에 ATP로부터 인산기를 전이하여 대응하는 헥소스-6-인산의 생성반응을 촉매하는 효소로 작용하는데, ATP의 인산기를 다양한 종류의 6탄당에 전달하고, glucose와 결합하면서 구조적인 변화가 야기되며, phospho-glucomutase 1에 의해서 glucose-6-phosphate를 glucose-1-phosphate로 변화됨
- 두 번째 그룹의 효소인 UDP-glucose-pyrophosphorylase는 glucose-1-phosphate를 UDP-glucose로 변화시키는데, 여기에서 UDP-glucose는 exopolysaccharide polymer의 합성시 monosaccharide residues의 중요한 donor가 되되며, 세 번째 그룹의 효소들은 glycosyl transferases로 불리는데 이들은 UDP-glucose의 이동에 관여함.
- 이들은 다당류, 과당류 또는 고에너지 결합을 갖는 당 화합물 등에서 당을 전달하는 효소로 작용함. 마지막 네 번째 그룹으로 세포막이나 세포막 외에 존재하는 translocases나 polymerases임. 이들은 현재까지 완벽히 밝혀지지는 않았으나 polymerization에 관여하는 것으로 추측되며, 세포의 다당류는 세포의 표면으로부터 방출되어 polysaccharide capsule을 형성한다고 보고되고 있음.

- 이외에 β -glucan의 합성은 glucan synthase 효소들에 의하여 합성이 이루어지는데, **glucan synthase은 β -1,3-Glucan의 합성을 촉매하는 세포벽 생장의 중요 효소로 작용하며, 주로 소포에 의해 운반되어 장단의 원형질막에 삽입되며, UDP-glucose를 기질로 glucan을 합성하게 되고, 두 개의 subunit으로 구성되며 한쪽은 촉매부위, 다른 한쪽은 조절부위로 GTP가 결합 가능한 구조로 이루어져 있음**
- 최근에는 다당류의 기능에 대한 관심이 높아지면서 올리고당 및 다당류의 산업화를 위한 기술 개발 측면에 대하여도 많은 관심을 가지고 있으나, 다당류가 갖는 높은 점도, 구조적 다양성 및 복잡성으로 인한 대량배양과 분리·정제의 어려움 등의 문제점으로 인하여 다당류의 고부가가치화 및 산업화에 괄목할만한 성과가 이루어지지 못함
- 이러한 다당류들은 그 성질과 기능이 다양하여 식품과 화학 산업에서는 광범위하게 이용되며, **특히 이 두 가지 glucan(α -glucan과 β -glucan) 중, β 1.3 linkage를 갖고 있는 glucan은 최근에 그 효능의 우수성이 조금씩 알려지고 있음. 최근 중국 증지에서 수입되고 있는 β -glucan은 면역 효능을 나타내는 β 1.3 linkage를 갖는 β -glucan의 함량이 정확하지 않아 축산용 소재로서의 효능을 나타내지 못하고 있음**
- 더구나 국내에서도 β -1,3-Glucan에 대한 연구개발이 점차 활성화되고는 있으나, 주로 버섯이나 곰팡이 세포벽으로부터의 추출에 의존하고 있어 분리 정제의 문제점으로 인하여 그 생산 수율이 매우 낮으며, 용도에서도 건강보조식품의 첨가제 수준에 머물러 있는 실정임
- 일반적으로 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β -1,3-Glucan은 그 생육·재배 조건에 따라 포함되는 β -1,3-Glucan의 함량이나 분자량 등이 크게 차이가 있어 추출 결과로서 얻어지는 β -1,3-Glucan의 경우 고분자체와 저분자체가 혼재하는 등 품질이 일정하지 않아 실용화하기 어려운 단점을 지님
- 그러나 미생물 균체의 세포벽은 다량의 β -1,3-Glucan을 포함하고 있으며, 그로 인하여 β -1,3-Glucan의 공급원으로서 중요한 의미가 있으며, 효모 균체, 유산균 균체, *Aureobasidium* sp. 균체 등으로부터 추출한 β -1,3/16-glucan은 안전성이 우수하여 식품 소재로서 이용가치가 높은 물질임

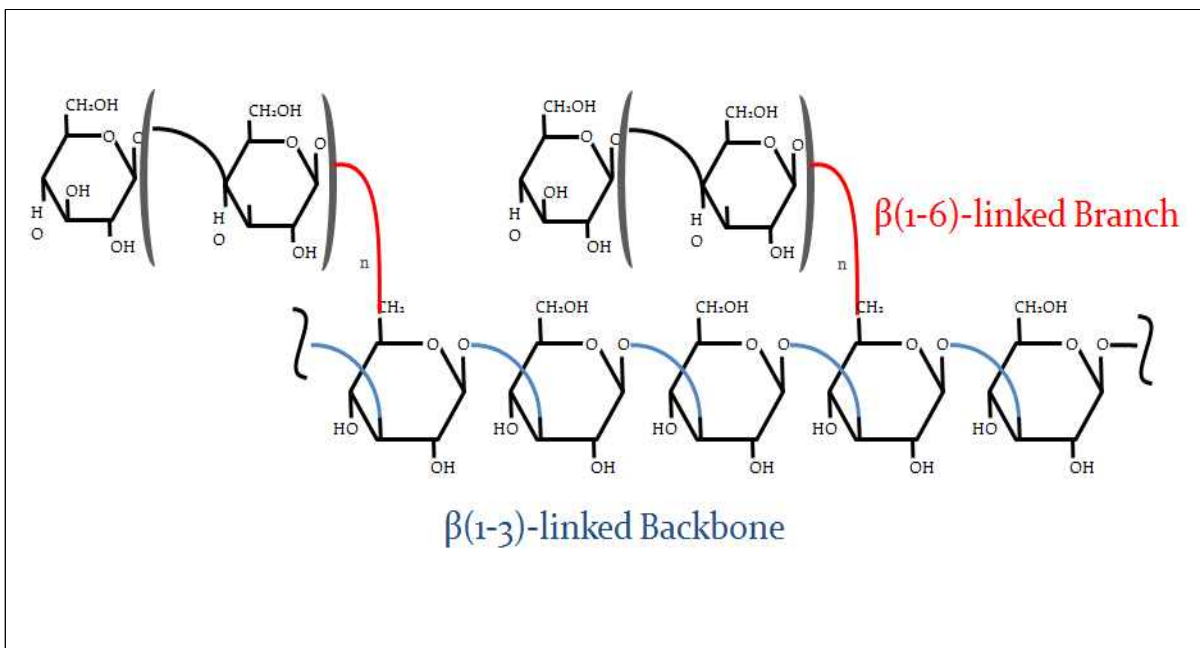


그림. β -1,3-Glucan 화학 구조

- 그러나, *S. cerevisiae*와 같이 미생물 균체의 세포벽에 함유되어 있는 β -1,3-Glucan의 경우 다양한 불순물도 포함하고 있어 분리, 정제에 어려움이 따르며, 또한 물에 불용성이기 때문에 효과가 높은 수용성의 β -1,3-Glucan을 제조에 어려움을 지님
- 이에 비하여, 균체 밖에 면역 증강 활성이 높은 수용성 β -1,3/1.6-glucan을 분비 생산하는 *A. pullulans*을 이용하여 β -1,3/1.6-glucan의 발효 생산은 균일하며 수용성의 고농도의 β -1,3/1.6-glucan을 얻는 것이 가능하여 매우 유효한 방법임
- 이렇듯 일반적인 β -1,3-Glucan과는 달리 *A. pullulans*가 생산하는 β -1,3/1.6-glucan은 이제까지 다양한 구조와 성질을 갖는 것이 밝혀져 왔고, 그 중에는 식물성 고분자에서 볼 수 없는 독특한 성질의 생리활성과 비교할 만한 물성적 특성을 갖는 특성을 지님

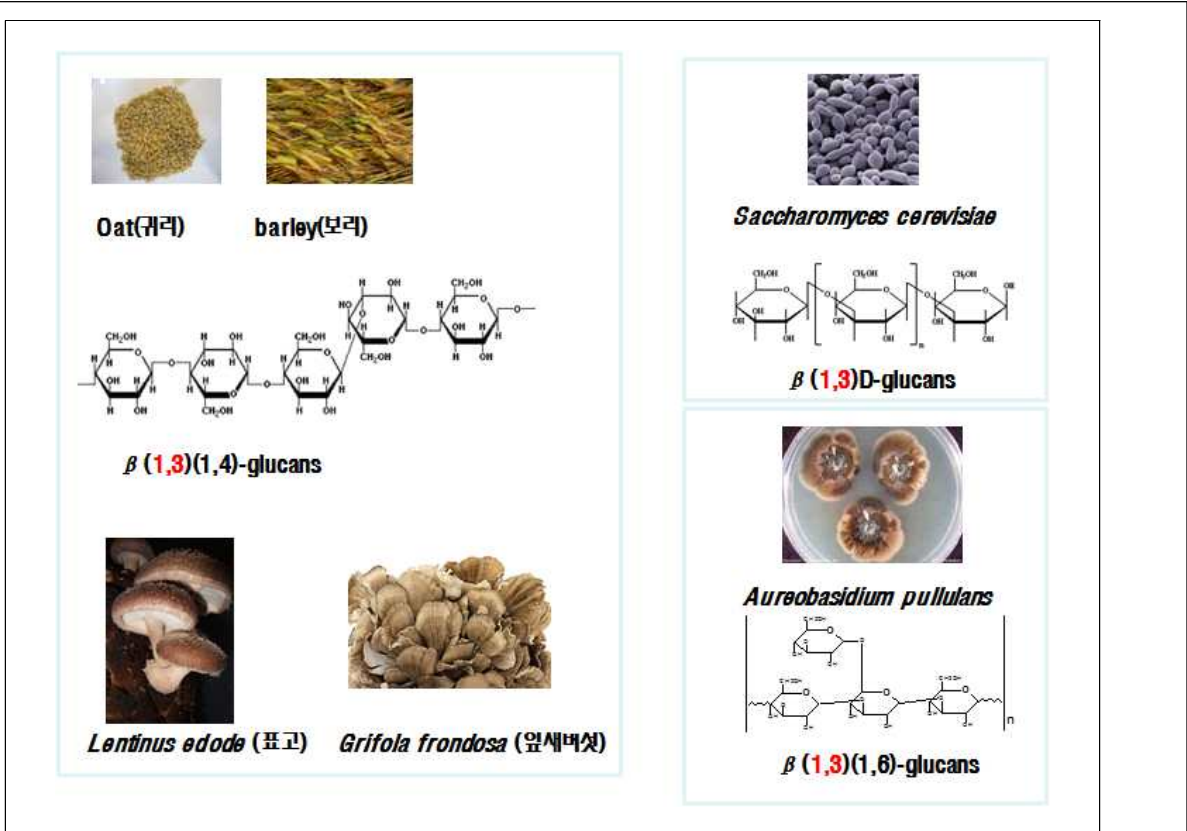


그림. 자연계에 존재하는 β -1,3-Glucan의 종류

- 특히 미생물 유래 β 1,3/1,6-glucan은 면역증강을 통한 다양한 암에 대한 항암활성 (Wagner 등, 1988), 항세균성 및 항바이러스 활성 (Bohn & BeMiller, 1995)이 우수함
- 또한, 상처 치료효과와 피부재생 효과가 (Jamas 등, 1991)가 탁월해 항염증 및 피부의 노화방지 효과가 확인되었으며, 이밖에, 혈압강하작용 (Chang & Miles, 1991), 혈당강하작용 (Chang & Miles, 1987) 등의 다양한 약리학적 효능이 여러 학회에 발표되어 의약품산업 및 건강보조식품, 화장품산업 등에의 응용이 기대됨
- 또한, 이들 β 1,3/1,6-glucan들은 점성, 젤 형성능, 열안정성, pH 안정성 및 유화활성 (Hamada, 1987)등이 뛰어나 식품, 화장품 및 다양한 공업 용도로서 주목되는 물질임
- 미생물 유래의 β -1,3-Glucan은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Bradhyzobium japonicum*, *Aureobasidium pullulans*, *Agrobacterium tumefaciens* 등과 같은 미생물이나 귀리, 보리, 버섯 등에 존재하나, 앞서 언급한 내용에서처럼 이중에서 면역 활성 물질로써 현재까지 주로 쓰이고 있는 β -1,3-Glucan은 버섯에서 추출되고 있으며, 그 구조가 동일한 β 1,3/1,6-glucan

에 속하는 다당류라 할지라도 단당의 결합수와 결합비율, 3차원의 입체구조에 의하여 생리활성이 크게 차이가 있다는 것이 밝혀짐

- 특히 β 1,3/1,6-glucan이 항종양, 알레르기 작용, 항 기생충 작용이 있다는 것은 비교적 오래 전부터 알려져 왔으나 추출 과정의 어려움과 비싼 버섯 가격으로 인하여 많은 제약이 있으며, 따라서 최근 국내·외의 연구진에 의하여 저하고 좀더 간편한 추출방법에 의하여 순수한 β 1,3/1,6-glucan을 얻고자 하는 연구가 진행 중

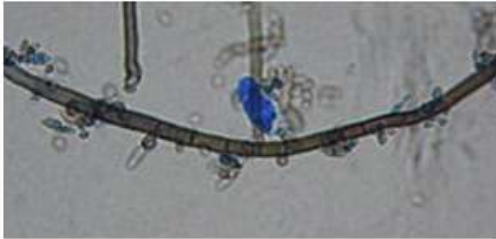
분류	균주명	제품명	응용분야
MUSHROOM (FUNGI)	<i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯)	β -immunan	항암제 (일양약품)
	<i>Phellinus linteus</i> (상황버섯)	Mesima	면역증강제 (한국신약)
	<i>Schizophyllum commune</i> (치마버섯)	Schizophyllan	기능성 화장품 소재 (태령양화학)
	<i>Coriolus versicolor</i> (구름버섯)	Krestin	항암제 (광동제약)
YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aureobasidium sp.</i>	CM-glucan Betagold	기능성 화장품 소재 (Mibelle AG) 면역증강제 (Immudyne Inc.) 면역증강제, 기능성화장품 소재
GRAIN	Barley, Oat	Ultracal	식이섬유음료, 건강보조식품
BACTERIA	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Agrobacterium sp.</i>	Curdlan Succinoglucan	면역증강제, 건강보조식품

그림. β -1,3-Glucan을 생산하는 생물 및 β -1,3-Glucan의 용도

- *Aureobasidium pullulans*이 생산하는 β 1,3/1,6-glucan의 특성

- *A. pullulans*는 흙, 공기, 음식 찌꺼기, 섬유, 샤워 커튼, 나무 등에서 서식하는 오염균의 일종으로 분리가 된다. 또한 곡식류의 잎이나 열대과일에서도 흔히 볼 수 있는 균류이다. 멜라닌을 생성하여 배양시 검게변하기 때문에 “흑효모(black yeast)”라고 불리우기도 하며, 이 균주는 식물의 조직을 연하게 하는 식물병원균으로 여겨져 왔으며, 다양한 형태로 생장을 함
- 균주의 성장 형태는 발아하는 효모의 형태나 균사체의 형태로 성장하며, 검은색을 띠는 chlamydo spores의 형성이라는 특이한 현상을 나타내고 있다. 초기 성장시 노란색, 옅은 핑크색

또는 밤색으로 나타나다 최종적 단계에서는 chlamydo-spores의 형성으로 검게 변한다. 균사는 투명하고 부드러우며 얇은 막으로 싸여 있음.



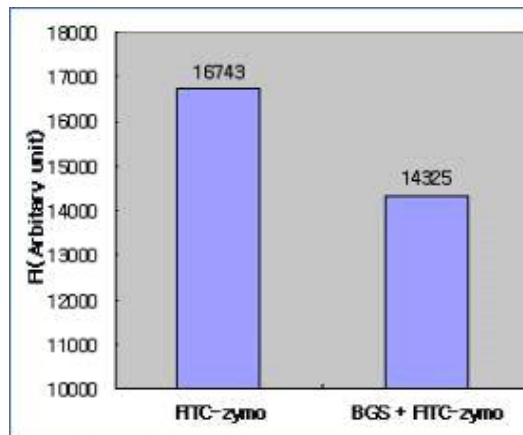
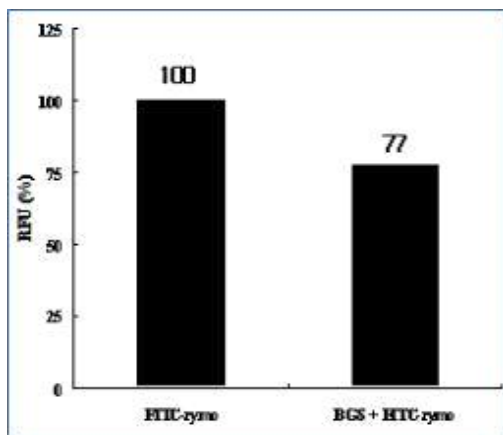
***Aureobasidium pullulans* is**

1. a ubiquitous yeast like fungus, black yeast
2. Formation of pink yeast-like colonies
3. biological control of plant diseases
4. high importance in biotechnology for the production of different enzymes
5. Production of α -glucan & β -glucan

그림. *Aureobasidium pullulans*의 배양체 및 특성

- 이 균주는 포도당이 연결되는 방법에 의해, α 와 β 1,3/1,6-glucan을 생성하며, 특히 β 1,3/1,6-glucan에 대한 연구가 활성화되기 이전에는 α -glucan으로 불리우는 pullulan 생산의 대표균주로 알려져있으며, 산업적으로 매우 중요한 균주로 이용이 되어져왔다. pullulan은 중성의 다당류로 약 20만의 분자량을 지니며, 무미, 무취, 비결정의 백색분말로 내열성, 내효소성, 내산, 내 염기성이 우수하여 각종 식품의 품질개량 또는 신제품 개발에 이용되고 있음
- 특히, 효모인 *A. pullulans*는 배양 중에 균체 밖으로 점도가 매우 높은 pullulan(α -glucan)과 β 1,3/1,6-glucan을 분비하며, 즉 *A. pullulans*에 의해 생성된 pullulan은 구조와 물리적 특성 때문에 접착제용, 성형제품, 코팅제, 필름, 식품고정화, 에스테르 유도물 등에 이용됨
- 또한 산소투과성이 낮기 때문에 식품산화를 최소화하기 위한 식품포장재로도 사용되고 있으나, β 1,3/1,6-glucan만을 생산할 수 없기 때문에 분리 및 정제과정에서 복잡하게 되므로 *A. pullulans*가 β 1,3/1,6-glucan만을 생산할 경우에는 항종양, 알레르기 작용, 항 기생충 작용이 우수한 β 1,3/1,6-glucan을 좀더 효율적이게 얻게 되고, 정제과정의 복잡함을 줄일 수 있는 장점을 지님

- β 1-3 glucan의 임상 실험의 성과는 항암, 고혈압 등에 효과가 있다고 보고되어 있고, 현재 건강보조제 및 면역증강제로 다양한 제품이 시판되고 있으며, 미생물을 이용한 β -1,3-Glucan의 대량생산 방법 역시 많이 연구되어져 있음
- 하지만 이러한 연구결과 및 제품들은 임상적인 실험에 의존적인 것이어서 β -1,3- glucan의 면역체계에 미치는 근본적인 영향에 대한 많은 의문점을 해결해 주지는 못하고 있는 실정임
- 최근 β -1,3-Glucan의 특이적 receptor인 Dectin-1(DC associated C-type Lectin-1)이 보고되면서 β -1,3-Glucan에 대한 면역학적 연구가 가속화되고 있는 추세임. 또한, Dectin-1은 β -1,3-Glucan의 특이적 receptor로 포유동물의 세포막에서 탄소화합물을 주로 인식하는 C-type Lectin 계통의 sub-family임
- 쥐의 epidermal DC-line에서 cDNA 분석을 통해 최초로 발견되었으며, 다양한 세포에서의 분석결과 DC 외에 macrophage, monocyte, neutrophils, NK cell, B-cell, T-cell 등의 면역 세포에서 발현이 확인되었으며, 또한 발현양은 크지 않지만 간(liver), 폐(lung), 흉선(thymus), 위(stomach), 비장(spleen), 소장(small intestine), 신장(kidney), 심장(heart)의 상피조직(epidermal)에서도 그 발현이 관찰되어 다양한 세포 및 조직에서 광범위하게 발현됨이 보고됨



* 꽃송이버섯 유래 수용성 β -1,3-Glucan의 Dectin-1과 TLR의 신호전달 기전 및 면역 조절 작용 규명 (하나바이오틱과 서울시립대 김하원교수)

- 또한 Dectin-1은 외부항원물질(pathogen)에 의해 생성된 β -1,3-Glucan 구조의 pattern을 인식하는 PRRs(pattern recognition receptors)에 속하며, 이같은 receptor에는 대표적으로 TLRs(toll-like receptors)가 있음

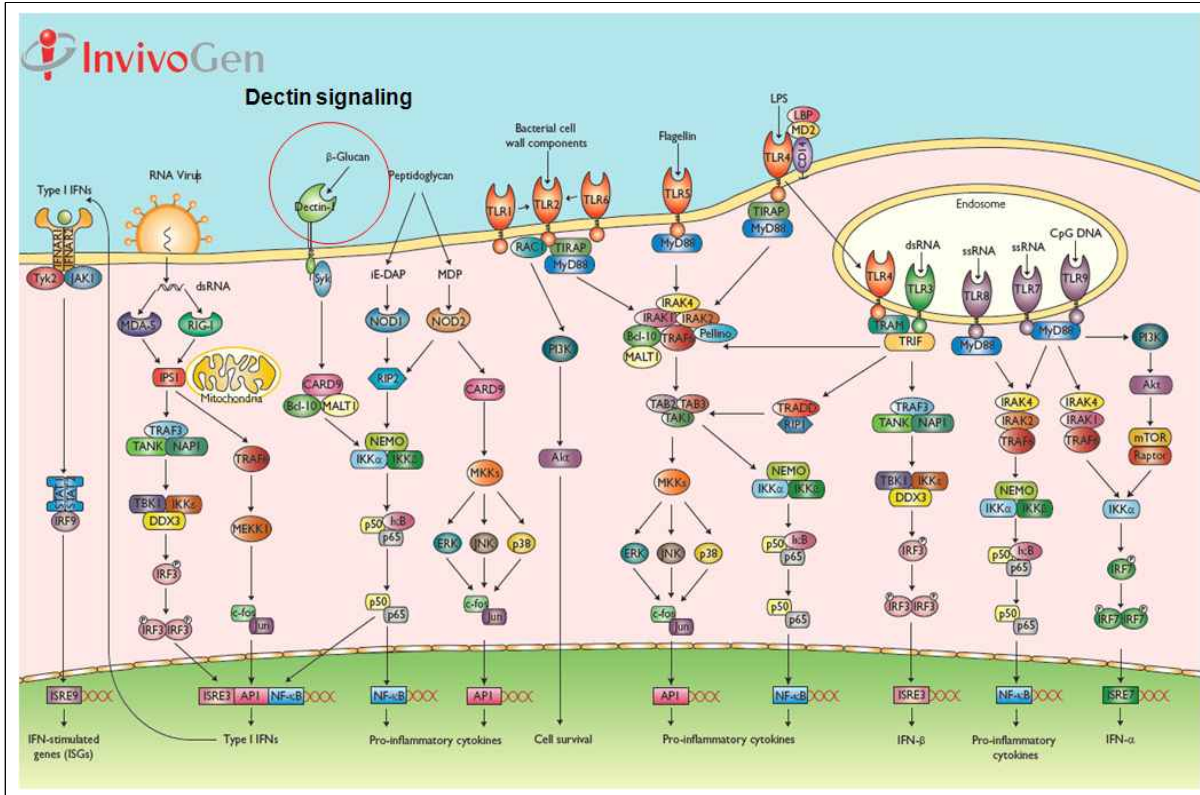


표 β -1,3-Glucan에 의한 Dectin-1(DC associated C-type Lectin-1) signal pathway

- PRRs는 항원의 특이적 구조만을 인식하며 결합하는 특징을 갖고 있어 항원이 갖는 종의 특성을 구별하지 않기 때문에 Dectin-1은 plant, bacteria, fungi 등 다양한 외부항원에서 생성되는 β -1,3-Glucan에 대한 인지가 가능함
- Dectin-1은 β -1,3-Glucan에 의해 extracellular에 위치한 CRD(carbohydrate recognition domain)의 glycosylation을 시작으로 intracellular에 위치한 C-terminal 부분의 cytosolic-tail에서 Src(sarc)에 의해 ITAM(Immunoreceptor tyrosin-based activation motif)과 Syk(spleen tyrosine kinase)가 차례로 phosphorylation 되면서 세포내 신호전달이 이루어지며, CARD9-MALT1- Bcl10 복합체 (CMB-complex)를 활성화하여, NF- κ B signal을 유도함
- 또한 Dectin-1의 신호전달 과정은 ROS(reactive oxygen species)의 활성을 유도하여 세포내 또 다른 Dectin-1에 의해 β -1,3-Glucan의 phagocytes와 degradation에도 영향을 미치며, 이때 Rac-1, cdc42 단백질이 관련되어 있다고 보고됨
- 하지만 Dectin-1과 관련된 세포내 신호전달은 아직 많은 부분이 알려지지 않았으며, myeloid 계통의 세포에서 앞서 언급된 CBM-complex의 관련 정도가 보고되어 있음

- 따라서 β 1,3/1,6-glucan의 생산수율이 우수하고 정제하기에 간편한 세포의 분비형 (exo-type)의 β 1,3/1,6-glucan을 생성하는 신균주를 발굴이 필요함. 따라서 신균주 발굴을 통하여 β 1,3/1,6-glucan의 생산수율이 우수하고, 정제하기에 간편한 세포의 분비형의 β 1,3/1,6-glucan을 생산하는 새로운 균주를 개발을 위한 연구를 수행함
- 실험에서 일반적으로 사용중인 zymosan을 이용하여 인간 면역세포에서 β -1,3 glucan이 면역 활성화에 미치는 영향을 세포수준에서 분석하고, 면역 활성물질로서의 효과를 높일 수 있는 방법을 찾고자 함
- 또한, 두 물질간의 상호작용이 면역세포의 세포내 신호전달체계에 미치는 영향을 분석하여 β 1-3 glucan에 의한 면역활성 및 조절 기능을 밝혀내어 β 1-3 glucan을 이용한 다양한 연구 및 개발에 새로운 정보를 제공하는 것에 목적을 둠

- β -1,3-Glucan (Beta-1,3-Glucan)의 안전성

- 효모의 세포벽으로부터 추출한 β -glucan은 미국에서 차세대기능성 건강식품으로 상당한 판매량을 보이고 있으며 1983년 미국 FDA가 규정하는 일반 안전 기준 (GRAS 규격 title 21, vol 3)에 기재되어 있음
- 빵효모(이스트균) 세포벽에서 순수 추출한 β -1,3-Glucan 분말은 안전하여 해가 없음. 그 이유는 순수 추출한 β -glucan은 이스트 알레르기의 원인이 되는 단백질이나 지방이 제거되어 있기 때문이며 β -1,3-Glucan 자체는 독성이나 과 섭취에 의한 해가 없기 때문임.
- 균류에 포함되어 있는 단백질이나 지방은 균독이라고 하여 시간이 지남에 따라 열화된 균단백이나 균지질이 남아 있으면 알레르기 등의 폐해를 일으키는 경우가 있기 때문에 β -1,3-Glucan을 식품으로서 섭취하기 위해서는 단백질이나 지방을 제거한 것이어야 함.
- β -1,3-Glucan의 안전성에 대한 대표적인 실증사례
 - 미국식품의약품 안전청(FDA) 인정

β -1,3-Glucan 1983년에 미국 FDA에서 안전한 식품으로 인정되어 FDA가 규정하는 일반안전기준 (GRAS 규격 Title 21, Vol.3)에 기재되어 있음
- FDA의 규격에 통과하기까지에는 방대한 자료와 안전검증이 필요하며, 이 규격을 만족하는 것은 빵효모 유래의 β -1,3-Glucan이 안전한 식품이라는 것을 미국 정부기관이 인정한 것이라 할 수 있음

○ 1994년에 미국에서 행하여진 치료시험에서의 안전성 검증 사례

β -1,3-Glucan의 안전성 검증 사례

참고 자료

• 여기에서는 PAHSE-2의 치료시험으로서 복수의 병원에서 67명의 외과치료환자를 대상으로 β -1,3-Glucan(베타1,3디 글루칸)의 감염증효과와 안전성에 대한 치료시험 보고를 행하여 β -1,3-Glucan의 안전성과 항감염증 효과에 대하여 정리한 자료의 하나이다.

ImmuNet#2711-0010S)
#2711-0010JS(번역문)

• PHASE-1,PHASE-2치료시험논문에서는 흉부 및 위장의 대수술을 받은 34인의 환자를 대상으로 β -1,3-Glucan(베타1,3디 글루칸)의 안전성과 효과를 검증하여 β -1,3-Glucan의 특성을 잘 설명해 주고 있다

ImmuNet#2711-0011S)
#2711-0011JS(번역문):

○ 본 연구를 통해 개발된 버섯류, 미생물 유래 바이오폴리머의 면역 증진능 등의 효능을 고려할 때, 이는 건강식품 및 의약품등의 용도로 활용될 수 있음

1-3. 연구개발 범위

[제1세부] 선일바이오

연구목표

제1세부(주관)에서는

1. *A. pullulans*가 생산하는 면역증강용 소재인 β 1,3 linkage를 갖는 순수한 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 이중면역시스템에 대한 *in vitro*, 전임상 및 인체적용시험을 통한 효능 규명
2. 한국산업기술진흥원의 녹색 기술 및 녹색 제품 인증 획득
3. 미국 시장 진출을 위한 FDA의 NDI(New Dietary Ingredient) 인증 취득
4. 이중면역 시스템에 의한 건강지향형 면역강화용 제품화 기술 개발 및 이를 이용한 글로벌 시장 진출을 최종 목표로 함

(가) 1차년도

① 시작품 제작

가) 500 L 규모의 발효시설 활용 β 1,3/1,6-glucan의 시작품 제작

: Pilot scale에서 생산된 β 1,3/1,6-glucan을 spray dryer 또는 freeze dryer를 통해 분말화 및 분말화된 β 1,3/1,6-glucan 1 ~ 5% 용액으로 액상화하여 시작품 제작

나) 500 L 규모의 발효시설 활용하여 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균의 시작품 제작

: Pilot scale에서 생산된 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 freeze dryer를 통해 건조하여 1×10^{10} CFU/g 규격으로 분말화하여 시작품 제작

다) 상기 생산된 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 액상형 β 1,3/1,6-glucan으로 coating하여 이를 freeze dryer를 통해 분말화하여 시작품을 제작하고, 제작된 시작품은 *in vitro*, 전임상 및 임상과 시제품 제작에 활용

② β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 *in vitro* 면역활성 시험

- 가) 대식세포의 활성화 측정
- 나) Natural killer cell 활성화 평가
- 다) SC-1/LP-BM5 세포주에서 virus 복제 억제능 측정

③ β 1,3/1,6-glucan에 대한 독성시험

- 가) 단회독성 시험
- 나) 반복 투여 독성 시험
- 다) 돌연변이 복귀시험, 소핵시험 등의 유전독성 시험을 수행하고, 이에 대한 시험성적서 확보

(나) 2차년도

① β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성화 유도 유산균을 이용한 *in vivo* 면역활성 시험

- 가) 실험동물의 선정
- 나) 실험 동물의 면역관련 장기무게 및 세포 수 측정
- 다) 실험 동물의 세포성 면역반응 분석
- 라) 실험 동물의 체액성 면역반응 분석

② β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성화 유도 유산균을 이용한 임상 시험

- 가) *in vitro*, 전임상 시험과 동등한 면역 기능의 마커 선정을 통한 임상시험
- 나) 면역 효능에 대한 임상 시험은 피험자 40 명 이상의, 8주 이상의 기간 동안 이중맹검의 방식을 기본으로 하여 시험을 수행

③ 녹색기술인증

- 가) 신청기술설명서 작성
- 나) “기능성분 생산 미생물 및 효소 이용기술” 분야 녹색기술 인증 신청 및 인증 획득
- 다) Life cycle assessment(LCA)를 분석
 - 전체 생산 공정에서의 에너지 절감, 환경오염 물질 발생을 최소화하고, 생산 공정 최적화를 통한 녹색 기술 인증 확보

④ β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성화 유도 유산균을 이용한 Probiotics 제형 개발

- 가) 최적 제형 개발 및 제형 내 물성 안정성 평가

나) 제형 안전성 및 안정성 평가

- 저장 기간 동안 시제품의 변성, 미생물 생육 등 시제품의 안전성 분석 및 유통 기한 설정 시험

(다) 3차년도

① 소아·청소년층의 면역 증진을 위한 β 1,3/1,6-glucan Probiotics 제품개발

가) β 1,3/1,6-glucan Probiotics 및 부형제의 최적 배합비 설정

- 혼합 장비로서 V-믹서와 더블콘믹서를 사용하여, 추출물의 분체 결집과 분리를 반복적으로 작용하는 V-믹서와 비산과 낙차를 이용하는 더블콘믹서를 이용

나) 유통 안정성 시험 및 저장 기간에 따른 품질 평가

- 저장 기간 동안 시제품의 변성, 미생물 생육 등 시제품의 안전성 분석 및 유통 기한 설정 시험

다) 제품에 대한 소비자 기호도 평가를 통한 시장성 분석 및 제품 개선

- 마케팅 및 리서치 조사 기관과의 협력을 통해 시제품 또는 최종제품에 대한 소비자의 기호도를 조사하여 제품 개선

② 녹색기술제품 인증

가) 녹색기술제품 확인 신청서 작성

나) 녹색기술 기반 녹색기술제품 인증 신청 및 획득

③ New Dietary Ingredient (NDI) 인증

가) β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 이용한 *in vivo* 면역활성 시험 및 독성 시험평가를 완료하고 이에 대한 자료를 근거로 하여 미국 FDA의 New Dietary Ingredient (NDI) 인증 및 허가 취득

④ 소아·청소년층의 면역 증진을 위한 β 1,3/1,6-glucan 함유 Probiotics 제품 사업화

가) 국내외 건강기능성 식품 및 화장품 소재 박람회 참가하여, 해외지역 바이어 홍보 및 시장 개척
나) 중국 유한공사에 연변 지역시장을 거점으로 한 제품 전시 및 홍보

⑤ Life cycle assessment(LCA)를 통한 경제성 분석 : LCA 분석을 통해 원료 수급에서부터 최종 제품 생산에 이르는 전체 생산 공정에서의 에너지 절감, 환경오염 물질 발생을 최소화하고, 생산 공정 최적화를 통해 경제성 확립

연구목표

제1협동에서는 *A. pullulans*가 생산하는 면역증강용 소재인 β 1,3 linkage를 갖는 순수한 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 이중면역시스템을 이용한 면역 증강 효능 규명 및 대량생산공정 개발을 목표로 함

(가) 1차년도

① *A. pullulans* 변이 균주의 안정성 확보

가) 순수 β 1,3/1,6-glucan 생산용 변이균주의 10세대 이상의 유전적 안정성 확보

나) 변이균주가 생산하는 β 1,3/1,6-glucan

② *A. pullulans* 균주로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석

가) β 1,3/1,6-glucan의 구성당 성분분석

○ β 1,3/1,6-glucan을 증류수에 용해하고, 동일분량의 2 M TFA를 첨가하여 121°C에서 1 시간 동안 단당으로 가수분해한 후, HPLC로 구성당의 성분 분석

나) 점도평균분자량 분석

○ 생산된 β 1,3/1,6-glucan 시료의 점도평균분자량 분석을 위하여 capillary viscometer를 이용하여 30±1°C에서 고유점도를 측정

다) β 1,3/1,6-glucan 시료 내 α -glucan 등의 불순물 함량 분석

○ β 1,3/1,6-glucan을 증류수에 용해하고, pullulan 분해효소인 pullulanase와 β -1,3/ β -1,6-glucan 분해효소인 laminarinase를 처리하여 24 시간 반응시킨 후 생성된 유리된 당 성분 및 을 HPLC로 분석

③ Toll-like receptor 2 & 4 기반 면역 증강용 유산균 확보 및 특성 분석

가) 발효식품으로부터 분리된 200여 종의 유산균을 이용하여 상피 세포의 Toll-like receptor 2 & 4에 반응하여 면역 증강 효능이 우수한 균주의 선별

○ Toll-like receptor 2 & 4를 수지상 세포에서 발현시켜 국내 발효 식품 유래 안전성이 확보된 유산균을 대상으로 면역 증강 효능이 우수한 균주 확보

나) 선별된 유산균의 생리적 특성 분석

○ 생균제로서의 내산성, 내열성, 항균활성 등의 생리적 특성 시험

(나) 2차년도

① *A. pullulans* 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 개발

○ *A. pullulans* 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 개발을 위한 반응기는 교반형 발효기 (Stirred type reactor, STR)를 이용하여 회분식 배양하고, 배양 후 비증식 수율(μ), 증식수율 ($Y_{x/suc}$), β 1,3/1,6-glucan 생성수율($Y_{glucan/suc}$), β 1,3/1,6-glucan 생산량($Y_{glucan/x}$), 최대 β 1,3/1,6-glucan 생산량(P), 비기질 이용율(q_{suc}), 비 β -glucan 생산율(q_{glucan}) 등 kinetic parameter 분석을 통해 생산성을 증진

가) 유기 또는 무기 질소원 농도 및 종류에 따른 β 1,3/1,6-glucan 증진 조건 확립

나) O_2 및 agitation에 따른 β 1,3/1,6-glucan 생산 증진 조건 확립

다) 산업용 배지 첨가에 따른 β 1,3/1,6-glucan 생산량 시험

○ 산업용 배지를 이용하여 탄소원 및 질소원으로서의 효능 분석

라) β 1,3/1,6-glucan 생산량 증진에 중요한 factor의 선정 및 Response Surface Method(RSM) 방법을 이용한 공정 최적화 수립

② β 1,3/1,6-glucan scale-up 및 후처리 공정 확립

가) 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 액상화, 분말화 및 품질 관리

나) 생산된 발효액을 대상으로 분말 제품 제조를 위한 원심분리 → β -1,3/1,6-glucan 침전 → 건조 → 제품화의 공정 최적화 실시

다) β 1,3/1,6-glucan 생산을 위한 STR 500 ~ 5,000 L 규모에서의 scale-up 시험

③ Toll-like receptor 2 & 4 기반 면역 증강용 유산균 대량 생산 공정 개발

가) Toll-like receptor 2 & 4 활성 유도 유산균 생산 공정 확립

○ 유기 또는 무기 질소원 농도 및 종류에 따른 생육 증진 조건 확립

○ O_2 농도 및 agitation 변화에 따른 유산균 생산 증진 조건 확립

- 산업용 배지를 이용하여 탄소원 및 질소원으로서의 효능 분석
- 회분식 배양 방식을 기준으로 하여 5 ~ 500 L의 pilot scale에서 생산공정 확립

④ Dectin-1 기반 β 1,3/1,6-glucan과 Toll-like receptor 2 & 4 기반 면역 증강용 유산균 혼합에 따른 면역 증진 효능 시험

- β 1,3/1,6-glucan과 면역 증강용 유산균의 혼합 농도 비율에 따른 면역 증진 효능 분석
- β 1,3/1,6-glucan과 면역 증강용 유산균의 혼합양에 따른 농도 의존적 면역 증진 효능 분석

(다) 3차년도

① *A. pullulans* 균주로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan을 이용한 유산균 coating 시험

가) 시험 생균제의 제조

- 선정된 유산균 MRS 배지에서 18 ~ 20 시간 배양하여 균체 회수
- 동결건조 보호제 선정

나) β 1,3/1,6-glucan coating 조건 확립

- β 1,3/1,6-glucan의 농도 및 분자량에 따른 coating 조건 확립
- Scanning electronic microscopy(SEM) 촬영을 통한 coating 여부 분석
- 동결 건조 중 유산균 생존율 분석

다) 저장 기간 동안 사멸율 분석

- 온도 조건별 저장 기간 동안 유산균 생존율 분석
- 코팅 조건에 따른 유산균 생존율 분석
- 50 kg과 200 kg 급 동결건조기에서 유산균의 대량 건조 공정 확립

② β 1,3/1,6-glucan 및 면역 증강용 유산균 생산 공정의 scale-up

가) 500 L와 5 톤 급 규모의 생산라인을 활용한 대량 생산공정 확립

나) Pilot 규모에서 유산균 생존능 증진을 위한 후처리 공정 확립

다) β 1,3/1,6-glucan을 이용한 면역 증강용 유산균의 coating 제품화 기술 확립

[제2협동] 셀아이콘랩

연구목표

제2협동은 건강지향형 식품 소재인 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하여 *in vitro*, 전임상 및 임상 시험을 통한 Nutricosmetics 제품 및 Cosmeceuticals 제품화 기술 개발을 목표로 함

(가) 1차년도

① β 1,3/1,6-glucan의 피부개선 관여 효능 평가 (*in vitro*)

- 가) β 1,3/1,6-glucan의 피부 콜라겐 합성 촉진 능력을 검증 (Type I Procollagen 합성촉진 효능)
- 나) 피부 콜라겐 발현조절 메커니즘 검토 (ERK 및 p-38 인산화 Western blot analysis)
- 다) Free radical 소거능: Vitamin C (IC₅₀:50 μ g/ml) 대비 효과 검증
- 라) 피부 섬유아 세포 (Dermal fibroblast) 세포 활성화 시험
- 마) β 1,3/1,6-glucan의 경피수분손실을 (TEWL) 및 Corneometer를 이용한 피부 전기부하량 측정

② β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가 시험

- 가) β 1,3/1,6-glucan의 *in vitro* 세포 독성 평가 (MTT assay)
- 나) β 1,3/1,6-glucan의 500 uM 농도 이상에서의 세포 무독성 여부 검토 (식약청 안전성 가이드라인에 의한 평가 (*Journal of Immunological Methods* (1983, 65: 55~63) 국제학술지 실험 방법 측정))

③ β 1,3/1,6-glucan을 활용한 기능성 화장품 시작품 제작

- 가) 최적 제형 개발
- 나) 제형 내 소재 안정성 (stability) 평가
- 다) 피부 안전성 (safety) 평가

(나) 2차년도

① β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics 제형 개발

가) 최적 제형 개발 (유효성분 함량의 최적비 결정)

나) 제형 안전성 및 안정성 평가

② β 1,3/1,6-glucan의 Nutricosmetics 제형 효능 평가 (*in vivo*)

가) 경구 투여 후 피부 수분 보유량 평가

나) Corneometer를 이용한 경구 투여 후 피부 표피 및 진피층 수분 함량 평가

다) Dermal torque meter를 이용한 피부 재생 및 탄력 개선 효능 평가

③ β 1,3/1,6-glucan의 Nano화 기술 적용 효능 향상 시작품 개발

가) β 1,3/1,6-glucan 나노화 공정 기술 개발

나) β 1,3/1,6-glucan의 나노화 기술 적용 시작품 개발

(다) 3차년도

① β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics 시작품 제작

가) β 1,3/1,6-glucan 및 핵심 유효성분의 배합비 설정

나) 유통 안정성 시험 및 저장 기간에 따른 품질 평가 (pH, 색도)

다) Nutricosmetics 시작품 후보 제형, 각 1 kg이상 개발 후 최종 시작품 2종 제작

② β 1,3/1,6-glucan Nutricosmetics 시작품 인체적용 평가

가) 인체적용 시험은 공식임상기관 ‘엘리드’ 에서 실시함

나) 피부 수분 보유량 개선 및 피부 재생효과 평가

다) 전문임상기관의 인체적용 임상보고서를 통한 평가

③ β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics & Cosmeceuticals 사업화 개시

가) β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Cosmeceuticals-Nutricosmetics 사업화 개시

[제3협동] 남부대학교

연구목표

제3협동에서는 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 실버식품을 개발하고자 한다. 실버푸드에 적합한 물성과 기호성의 개선을 통한 상품화 시제품을 개발을 목표로 함

가) 실버세대에 필요한 영양과 기호성을 증진하기 위하여 섭취가 편리한 간편 영양간식을 제조하고 하는데, 시중제품의 경우, 기호성에 맞춰진 고열량, 저열량 식품임.

나) 실버세대에는 천연물의 경우 섭취에 어려움이 있어 이를 가공한 가공제품이 필요한데 갱류는 섭취가 용이하고 실버세대에 친밀도가 높으며, β 1,3/1,6-glucan의 기능성을 유효성분화가 가능함.

다) 주관기관의 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 실버세대에 적합한 시제품 다양화에 기여할 것임.

- 저지방·고단백식품 등 편리하고 다양한 식품 개발
- 설탕 대체 감미료·저당·저나트륨 등 만성질환 발생 위험요소를 감소시킨 식품 개발
- 거동이 불편하거나 식품을 섭취하기 어려운 노인을 위한 특수 식품 개발

(가) 1차년도 (실버세대를 위한 저지방, 고단백식품의 제조)

① 실버세대에 적합한 간식류의 동향 조사

- 국내의 트렌드와 제품의 개호식에 대한 경향을 조사하여 전체적인 실버식품의 진행가능한 전략을 수립코자 함.

② 갱류 배합비의 선정

- β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4 활성 유도 유산균을 유효성분으로 하는 양갱의 배합비와 주요감미소재의 전환을 통한 실버건강소재화, 고단백소재의 적합화를 통한 최적배합비 산출

③ 일반물성의 확인 : 수분함량, pH, 산도 및 당도, 색도, 조직감(실버세대에 적합한 물성의 선택)

④ 관능검사를 통한 기호도의 보정

○ 실버세대에 적합도를 관능검사(실버세대 중심)를 실시, 물성, 기호를 보정

⑤ 실버세대를 위한 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 양갱 시제품의 생산

(나) 2차년도(실버세대를 위한 저지방, 고단백 점질형 음료의 제조)

① 국내 실버세대의 개호식 음료에 대한 조사

○ 연하도움과 관련한 국내 시장 조사가 없기에 관련 시장현황과 시장가능성을 확인할 필요가 있음.

② β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 2 종류의 점도 물질을 선택하고 β 1,3/1,6-glucan의 함량과 점도와의 관계를 최적화 결정하고 점도보정을 위한 소재의 선택.

③ 증량제가 아닌 점도의 미변화 기능성 소재의 첨가 선택

○ 일반음료 건강증진소재의 선정 및 최적화

④ β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 점질형 음료의 안정성 시험 및 유통기한 설정.

⑤ 점질형 음료의 시제품 제작 및 관능 평가와 기호도 보정

(다) 3차년도(실버세대를 위한 간편 영양식의 제조)

① 실버세대의 고영양, 저열량 식이 중에서 편의식 유형의 조사

○ 개호식과 환자식에서 편의식 형태로 소비되는 제품의 조사를 통하여 국내외 형성되는 제품군의 동향을 파악하고, 미래에 유용한 편의식 형태의 제품개발의 기초자료로 활용코자 함.

② 첨가곡물의 선택 : 시리얼에 적합한 영양을 제공하는 곡물을 선택하고 실버세대에 적합한 물성의 변환가능성을 측정, 선택함. 또한 이들 곡물변환물의 전체적인 영양(단백질, 탄수화물, 지방)의 구성비를 조정, 최적배합비를 구함.

③ 천연 영양성분의 구성 선택 : β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 유효성분으로 시리얼을 제조에서 기호부분을 증진시키는 여러 과실류와 영양, 열량을 고려 선정함.

- ④ 실버 편의식의 개념에서 기호의 부분, 기능의 부분을 충족하는 조합을 얻고자 기능성 중에서 과도한 당의 흡수율 조정 가능성을 타진하며 이의 최적화
- ⑤ 실버 편의식에 적합한 물성의 최적화
 - 실버세대의 저작기능에도 적합한 제품화에 타당한 기본물성의 확보와 최적화.
- ⑥ 기호도 시험 및 기호도 보정과 시제품 제작

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호 D-04

가. β -glucan의 제품화 사례

(1) 암 치료제에 적용

버섯종류	약품명	효능·효과
운지버섯	クレスチン Krestin (PSK)	- 재발성위암 항암제 Tegafur 경구 병용시 생명연장 - 수술불가위암 항암제 Tegafur 경구 병용시 생명연장
표고버섯	レンチナン Lentinan (LTN)	- 직장암의 치유절제후의 생명연장 - 위암 수술 후의 생명연장 - 결장암 치유절제 후의 생명연장 - 소세포암 생명연장
치마버섯	ソニフィラン Sizofiran (SPG)	- 자궁암 방사선 치료 직접효과의 증강

크레스틴 (PSK)	렌티난 (LTN)	시조필란 (SPG)
		

** Three antitumour polysaccharide agents that have been developed in Japan (Mizuno,1999)*

(2) 면역증강 건강기능식품에 적용

버섯명	제품명	제조사	제품 특징
-----	-----	-----	-------

꽃송이버섯	白宝璘 ハクホウリン	하나바이오텍(한국) Hanabiotech	- 白幻鳳凰제품 - 일본, 미국 수출 판매중 (12,600円)
	ヘルスビジョン ハ ナピラタケ	미나헬스(일본) ミナヘルス	- 꽃송이버섯 자실체 추출제품 - 일본 내수 판매중 (29,190円)
	白幻鳳凰	유니치카(일본) ユニチカ(株)	- 꽃송이버섯 분말 제품 - 일본 내수 판매중 (33,600円)
상황버섯	메시마 メシマ ピュア	한국신약(한국) 韓國新藥	- 상황버섯 균사체 추출제품 (의약품) - 일본수출 판매중 (36,750円)
앞새,표고, 영지버섯	AHCC	아미노업화학(일본) アミノアップ化学	- 6개 버섯 균사체 추출 제품 (Active Hemi Cellulose Compound) - 한국, 미국 수출 판매중 (36,750円)
아가리쿠스	센세이로 仙生露	교와아가리쿠스(일 본) 協和アガリクス	- 자실체 추출 ABMK-22의 배합 - 국내수입 판매중 (98,000円)
앞새버섯	MD-Fraction 舞茸フラクション	타나베제약(일본) 田辺製薬商事	- 앞새버섯 자실체 분말, D프랙션 제품 - 한국, 미국 수출 판매중 (10,290円)



그림. 면역증강 건강기능식품의 종류

(3) 기능성 화장품에 적용

제품명	제조사	이용버섯	비고
Doctor Kits 10-9	하나바이오텍	꽃송이버섯	- 일본 수출(비누, 기초)
네쥬럴 桑黃	잉스화장품	상황버섯	- 태평양 특허 이용
상황 NAG	나드리화장품	“	- 조성물 추출특허
桑黃美人	SH plus	“	- 태평양 특허 이용
汝美知	화장품랜드21	치마버섯	- 추출물 (SC-glucan)
아모레 자음생/ 마몽드	태평양	“	“
라미 모이스처 라이징	라미화장품	“	“
사로매	사임당화장품	“	- 추출물 첨가
바탕 진 에센스 탱크	한불화장품	앞새버섯	“
엠벨리아 엑스트랙트	한국메나도	영지버섯	“
예화선 약진방(藥珍方)	한국화장품	“	“
다나한 秀	소망화장품	“	“
탑뉴스 플러스	참존화장품	느타리버섯	- 추출물 (아스트린딜)
이셀린 노블	폴무원	흰목이버섯, 동충하초	- 추출물



기능성 화장품의 종류

(개발된 기능성화장품 원료)

제품/원료명	제조사	이용버섯	비고
오기단	로제화장품	영지, 동충하초	- 조성 추출특허 (노화방지)
렌티글루칸	“	표고버섯	- 추출특허 (피부재생)
SC-Glucan	태평양화학	치마버섯	- 추출특허 (피부면역, 콜라겐)
“	바이오랜드	“	- 추출특허
상황버섯 추출물	태평양화학	상황버섯	- 추출특허 (주름개선)
“	한불화장품	“	- 추출특허 (미백)
앞새버섯 추출물	“	앞새버섯	- 추출특허 (노화방지, 미백)
NanoBeta	하나바이오텍	꽃송이버섯	- 추출특허 (미백, 피부면역)

(4) 기타 식품 첨가원료에 적용

구분	제품명	제조사	기능성	비고
발모제	毛神30	모신바이오 텍	모낭 면역활성화	- 상황, 아가리쿠스, 영지, 표고, 노루궁뎅이버섯 추출물 첨가
비누	제주향기	건풍바이오	보습, 항피부염	- 상황, 영지 추출 β-glucan 함유
	토피 비누	아쿠아렉스	면역(가려움예방)	- β-glucan 첨가
식음료	불가리스프라임	남양유업	장 활력 증진	- Bio-M(양송이버섯 추출물)첨가
	아기랑 콩이랑	남양유업	면역 강화	- 효모유래 β-glucan 함유(면역)
	발아현미 우유	서울우유	“	- 상황버섯 균사체 추출물 함유
	MBP우유	“	조골세포 활성화	- 폴리칸(효모 β-glucan) 첨가
	맛있는 라면	삼양식품	기능성 원료	- β-glucan 첨가
	내몸에 흐를 류	롯데칠성	순환차	- 상황, 영지, 차가 첨가
주류	천년약속	천년약속	면역 강화	- 상황버섯 균사체 발효주
	견우와 직녀	진상	흡수율 제고	- 상황버섯추출 β-glucan 발효



기타 식품 첨가원료로 사용되고 있는 제품의 종류

나. 기존 제품(기술)의 문제점 및 개선 방안

- 현재까지 자연계로부터 발견된 수많은 다당(polysaccharide)의 종류에 비하여 산업화되어 사용되고 있는 다당의 종류는 극히 제한적임. 우리가 일상생활에서 섭취하고 있는 식품 성분 중에 몸에 좋은 성분은 다양하나 이 중에서 특히 면역 증강과 항암 효과가 있는 식품군은 지속적으로 관심의 대상이 되고 있음. 최근 들어 기능이 강화된 식품, 몸에 좋은 식품을 선호하는 추세가 확산되면서 β -glucan이란 소재가 주목을 받고 있는 상황임

(1) β -glucan의 2가지 인체흡수 조건 : ① 초미세화

- Submicron size Microparticulation

: 1마이크로미터 미만으로 초미세화되어야 흡수율이 높아짐

- β -glucan은 1미크론 이하로 작아지지않으면 작용하지않는다.

(R. Preston; International Institute of Nutritional Research)

- β -glucan 면역작용의 핵심세포인 대식세포는 직경 1~2마이크로 범위의 미립자를 선택적으로 흡수한다.

(K.W. Hunter Jr, R.A. Gault and M.D.; Berner Letters in Applied Microbiology)

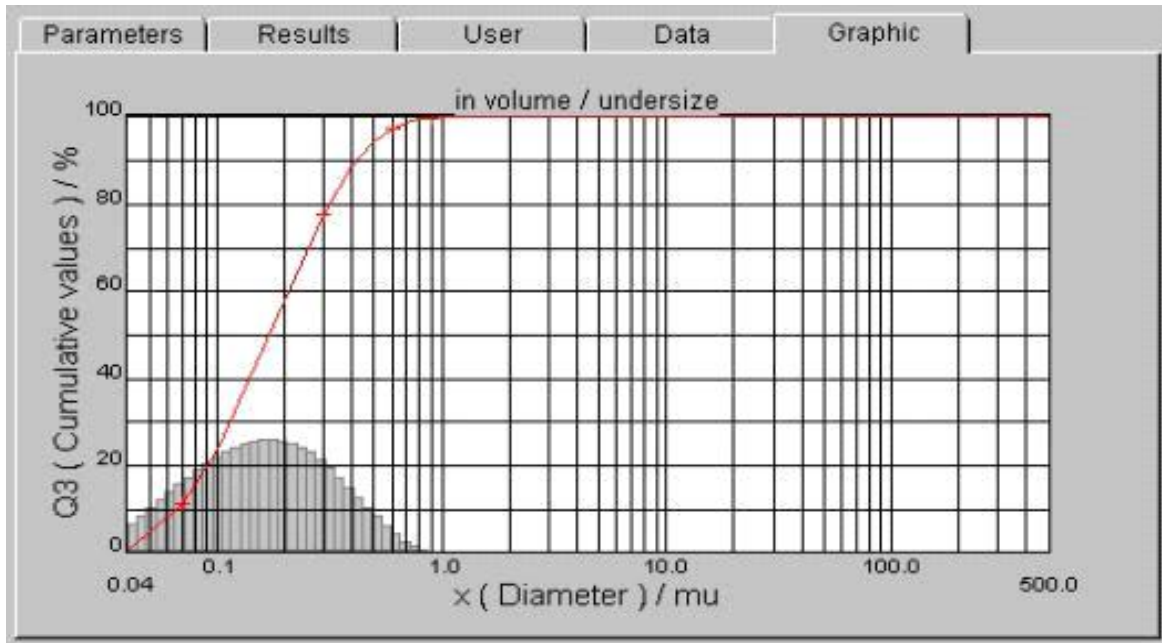
- 산처리, 알칼리 처리, 효소 처리 등을 하지 않고, 입체구조를 유지한 채로 β -glucan 응집체를 약 1000분의1(입자 지름 약 $0.2\mu\text{m}$)까지 초미립자화하는 기술이 개발되어 미립자화한 β -glucan은 경구섭취에 의해서도 항종양 효과를 발현한다는 것이 동물 실험에서도 확인되었다.

(식품면역치료연구회; 미립자 β -glucan의 항알러지 효과에 관한 리포트)

- 꽃송이버섯 유래 β -glucan은 100% 1미크론 이하 (하나비이오텍)

- 평균 $0.15\mu\text{m}$ (=150nm), 분포 $0.01\mu\text{m}$ ~ $0.98\mu\text{m}$ (10nm~980nm)

- Particle size Assay for water soluble Beta glucan from *Sparassis crispa*



(2) β -glucan의 2가지 인체흡수 조건 : ② 수용성

○ Solubilization for Absorption (흡수되기 위해 물에 녹아야 함)

- β -glucan이 흡수되는 곳인 페이어스패취의 M세포는 수용성 항원을 흡수하며, 바이러스, 박테리아와 미소구체 등과 같은 미립자를 식균한다.

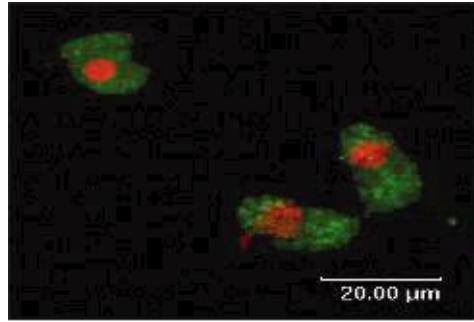
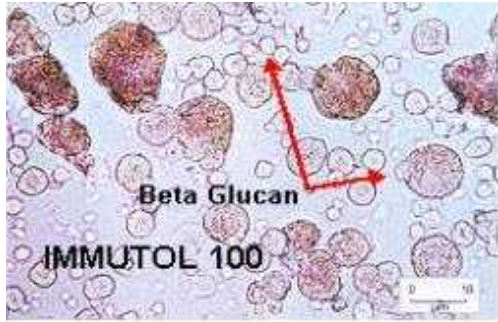
(Dr. Svein Steinsvoll; University of Oslo)

○ 수용성 β -glucan의 경구투여와 소화기내 흡수는 감염원에 대하여 저항을 증가시키도록 자극한다.

(Peter J. Rice 외; The J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics)

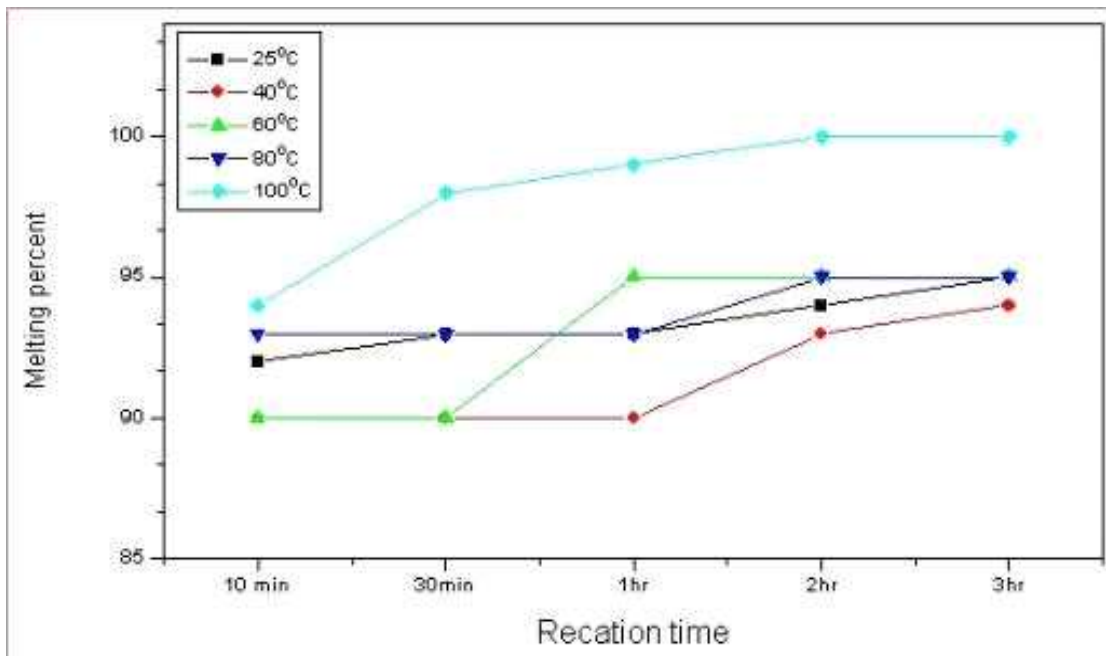
○ 수용체(덱틴-1)는 백혈구/대식세포 등에 BRM(생물학적반응조절자)인 수용성 베타 (1,3) 글루칸을 결합하여 내재화시킨다.

(Muller A., Rice P.J. 외; The Journal of Immunology)



○ 꽃송이버섯 유래 β -glucan의 수용성 : 90% 이상의 용해도, 상온(하나바이오텍)

- 꽃송이버섯 유래 β -glucan의 적정 용해온도 및 반응시간 분석



○ 해외 베타글루칸 원료를 사용한 국내건강기능식품 제품 분석

- “N사의 효모베타글루칸” - 웰문 / (β 1,3/1,6-glucan)



〈그림: N사의 면역력조절 건강기능식품 원료 웰분, 출처: N사 홈페이지〉

- 미국 Biothera사에서 3,000억을 투자하여 β 1,3/1,6-glucan을 효모에서 추출하는 공정법과 그 기능성을 연구, 규명함

[웰분 인체시험 내역]

김기, 스트레스, 알러지 등 12회의 인체시험 실시하여 저명한 학회 발표 및 저널 게재

대 상	참가자 수	측정항목	결 과	발 표	일 자
소방관	54	신체 스트레스, 건강 상태	-상기도감염 증상 발현 횟수 감소 -일반적인 건강 상태 개선	Medicine & Science in Sports & Exercise	2008.05
건강한 성인 남녀	40	감기 및 독감	-알러지 완화 효과 -골식/골근 밀수 감소	Journal of Applied Research	2009.07
마라토너	75	POMS (기분상태점수), 상기도 감염 증상	-마라톤 경기 후 상기도감염 예방 효과 -POMS 개선 (전반적인 건강 및 활력 개선)	Journal of Sports Science & Medicine	2009.12
건강한 성인 남녀	150	POMS(기분상태점수), 건강 상태	-상기도감염 횟수 감소 -POMS 개선 (전반적인 건강 및 활력 개선)	Agro Foods Industry Hi Tech	2010.02
운동량이 많은 성인 남녀	60	면역 바이오마커 측정	-운동 후 면역저하 모델에서 염증성 단백질 농도 증가 및 면역 물질 확인	British Journal of Nutrition	2012.05
의대생	100	상기도감염, 바이오마커	-상기도감염 기간 및 강도 감소	Nutrition	2012.06
스트레스 여성	77	상기도감염, POMS (기분상태점수)	-상기도 감염 증상 감소 -POMS 개선 (중산적/육체적 에너지 레벨 상승)	Journal of the American College of Nutrition	2012.09
알러지 보유자	50	알러지 증상, POMS (기분상태점수)	-알러지 시즌 중 알러지 환자들의 알러지 개선 -신체 건강/컨디션 개선	Food Science & Nutrition	2013.01
마라토너	그룹1:180 그룹2:50	그룹1: 마라톤 후 상기도 감염 증상 그룹2: 사이클링 후 타액 내 IgA	-운동 후 상기도감염 증상 감소 및 면역 능력 향상	Journal of Dietary Supplements	2013.09
아동 (브라운)	256	알러지 증상 (알레르기성 비염, 결막염, 천명, 기침, 습진, 무드러기)	-피부 및 호흡기 알러지 증상 개선	FASEB Journal	2014.04
아동 (중국)	310	바이오마커, 영양상태, 급성 호흡기 감염, 설사, 항생제 치료	-급성 호흡기 감염에 대한 회복 및 기간 감소 -항생제 사용 감소 -놀이방 결석 횟수 감소 -백혈구 수 증가 (항염증 작용)	Pediatrics	2014.05
건강한 노인	100	상기도감염, 바이오마커	-면역지표들을 증가로 인한 면역 반응에 도움	Southampton Translational Clinical Research Conference	2014.06

〈그림: 웰분의 임상시험 현황, 출처: N사 홈페이지〉

- 세계적 과학저널들 총 18종의 권위 있는 학술지에 게재된 베타 1,3/1,6 글루칸의 면역증진에 대한 연구결과들을 마케팅에 적극 활용함
- 국외시장에서의 미국 Biothera사의 경우 미국, 영국, 프랑스, 스위스, 캐나다 등 선진국을 중심으로 전세계 60개 이상의 국가에서 160개 이상의 제품으로 출시 중
- 국내에서는 미국 Biothera사의 웰분을 N사가 국내 면역조절 건강기능식품 개별인정을 신청 및 승인 받은 후, 웰분에 대한 국내 판권을 독점 계약을 체결함으로써, 웰분 (β 1,3/1,6-glucan)의 기능성에 대한 과학적 근거가 되는 data들을 바탕으로 공격적 마케팅을 활용하여 면역조절 건강기능식품 글루칸 원료시장을 선점 및 관련 제품을 생산하여 가장 높은 판매율을 보이고 있음.

[웰문 과학적 근거]

웰문의 면역증진에 대한 연구결과가 세계적인 과학저널 네이처(Nature), 이뮤놀로지(Immunology), 블러드(Blood) 등 총 18종의 세계적 권위의 학술지에 게재



<그림: 웰문이 마케팅에 활용중인 과학 저널, 출처: N사 홈페이지>



<그림: N사의 베타글루칸 제품>

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

선일바이오 [주관기관]

1. *A. pullulans*가 생산하는 β 1,3/1,6-glucan 시작품 제작

가. 실험방법

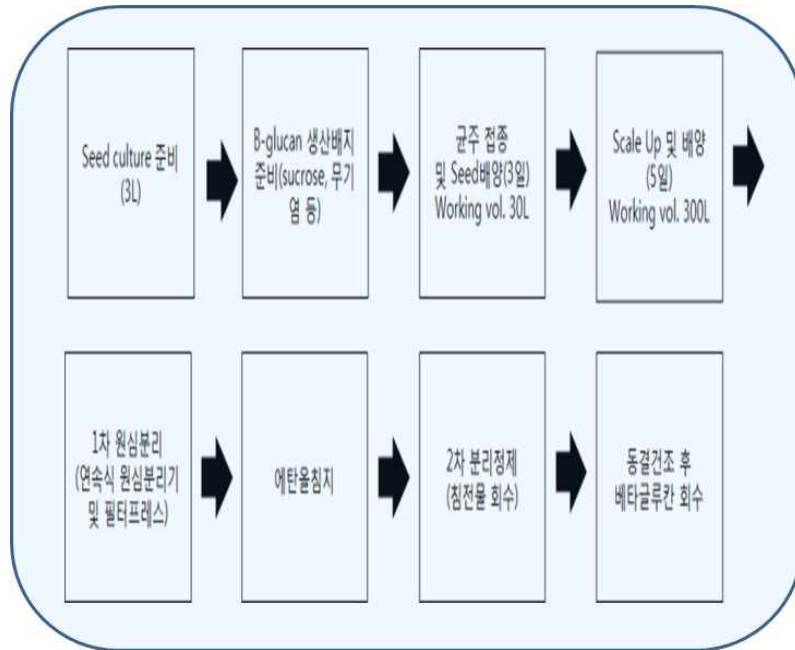


그림 1. 500 L 급 발효기에서 β 1,3/1,6-glucan 생산을 위한 Seed Culture.

- β 1,3/1,6-glucan 생산배지(Czapek)를 멸균하여 균주를 접종하고 Shaking incubator에 200 RPM /30°C /3day 조건으로 배양을 수행하였다.

표 1. *A. pullulans* KSY-0516 seed culture용 생산배지 조성표.

KNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	KCl	Oxalic acid	Sucrose
40 g/L	20 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	30 g/L

β 1,3/1,6-glucan production by *Aureobasidium pullulans*

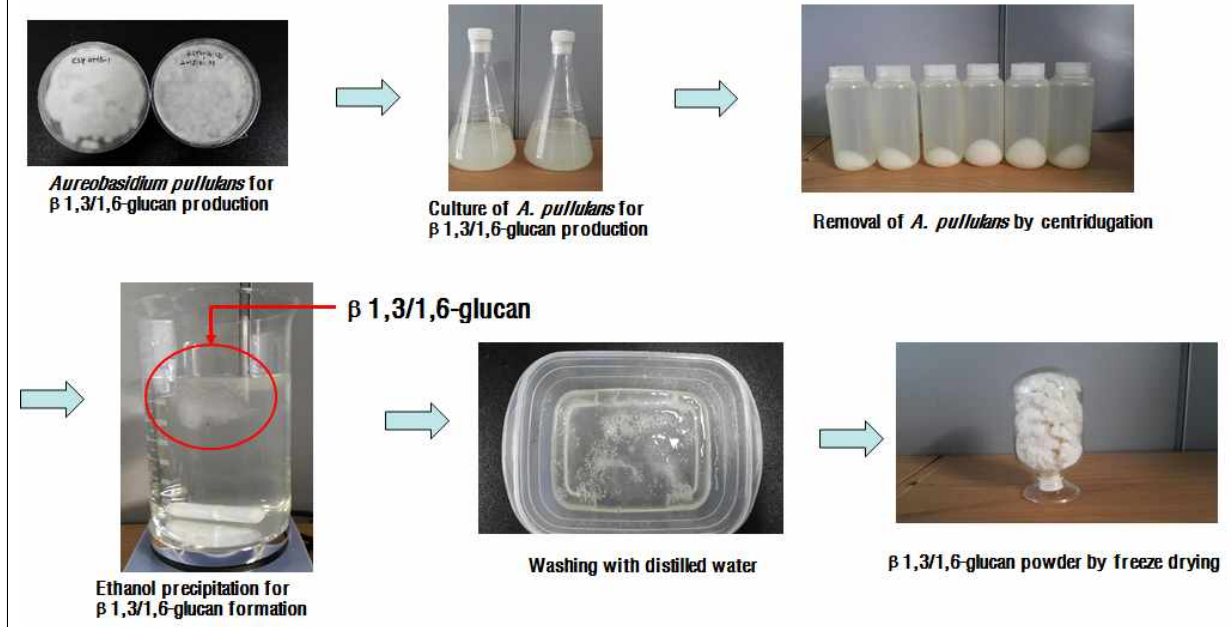


그림 2. β 1,3/1,6-glucan production by *A. pullulans* KSY-0516 in Lab scale.

- 이 배양액을 멸균된 배지를 포함하는 50 L STR 발효기에 접종 후 200 RPM, 30°C, 1 vvm 조건으로 3일 동안 배양하였다.



< 50L 발효기에 균주 접종 >

(1) β 1,3/1,6-glucan 생산을 위한 본 배양 (500 L 배양)

- 50 L 발효기에서 배양한 배양액을 멸균된 배지를 포함하는 500 L pilot 발효기에 접종 후 200 RPM, 30°C, 1 vvm 조건으로 3일 동안 배양한다.

(2) 분리 및 정제

■ 1차 원심분리 공정

- 연속식 원심분리기 및 필터프레스를 사용하여 β 1,3/1,6-glucan 배양액 균체를 제거한다.



< 연속식 원심분리기 >



< 필터프레스 >

■ 에탄올 침지

- β 1,3/1,6-glucan 배양액 : 에탄올 = 1 : 1 (v:v) 비율로 에탄올침지를 시행한다.



< 에탄올 침지 시행 전 >



< 에탄올 침지 시행 후 >

■ 2차 분리 정제

- 에탄올 침지 3시간 후 용해도 차이에 의해 분리된 β 1,3/1,6-glucan을 회수하여 증류수로 washing 하여 남아있는 에탄올을 제거한다.



< 2차 분리 정제 전 >



< 2차 분리 정제 후 >

- 2차 분리정제 작업을 한 후 회수된 β 1,3/1,6-glucan은 동결건조를 통해 분말화를 시켰다. 500 L 급 발효기에서 *A. pullulans* 변이균주 KSY-0516으로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 시제품을 하기와 같이 생산하였다.



그림 3. β 1,3/1,6-glucan의 동결건조 과정.



그림 4. *A. pullulans* KSY-0516에 의해 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 분말 시제품.

- 본 500 L 급 회분배양은 β 1,3/1,6-glucan 생산을 위하여 수행되었으며, 활성 다당류가 생산되는 stationary phase 후반부까지 유지시킬 목적으로 500 L 급 발효조에 접종원을 transfer한 후 총 312 시간 동안 발효를 수행하였다(Fig. 4). 발효가 진행되면서 발생하는 dissolved oxygen tension의 하강에 따라 통기량과 교반속도, 발효조 내 압력을 단계적으로 증가시켰고, 본 발효의 배양양상을 요약하면, 균사체 생산에 있어서 lag phase가 92 시간 동안 유지되었으며, 이후 균사체 농도는 급격히 증가하여 193 시간 경과 후 stationary phase에 진입하였다.
- stationary phase의 균사체 농도는 12.42 g/L이었으며, pH와 DOT는 동시에 상승하였고, 312 시간 경과 후 최종 volume은 장기간의 aeration으로 인해 230 리터로 감소되었으며, pH는 7.86, 생산된 균사체의 morphology는 1.5-3mm 직경을 가진 펠릿형이었으며 균사체 건조중량은 14.92 g/L, β 1,3/1,6-glucan 농도는 7.84 g/L이었다.

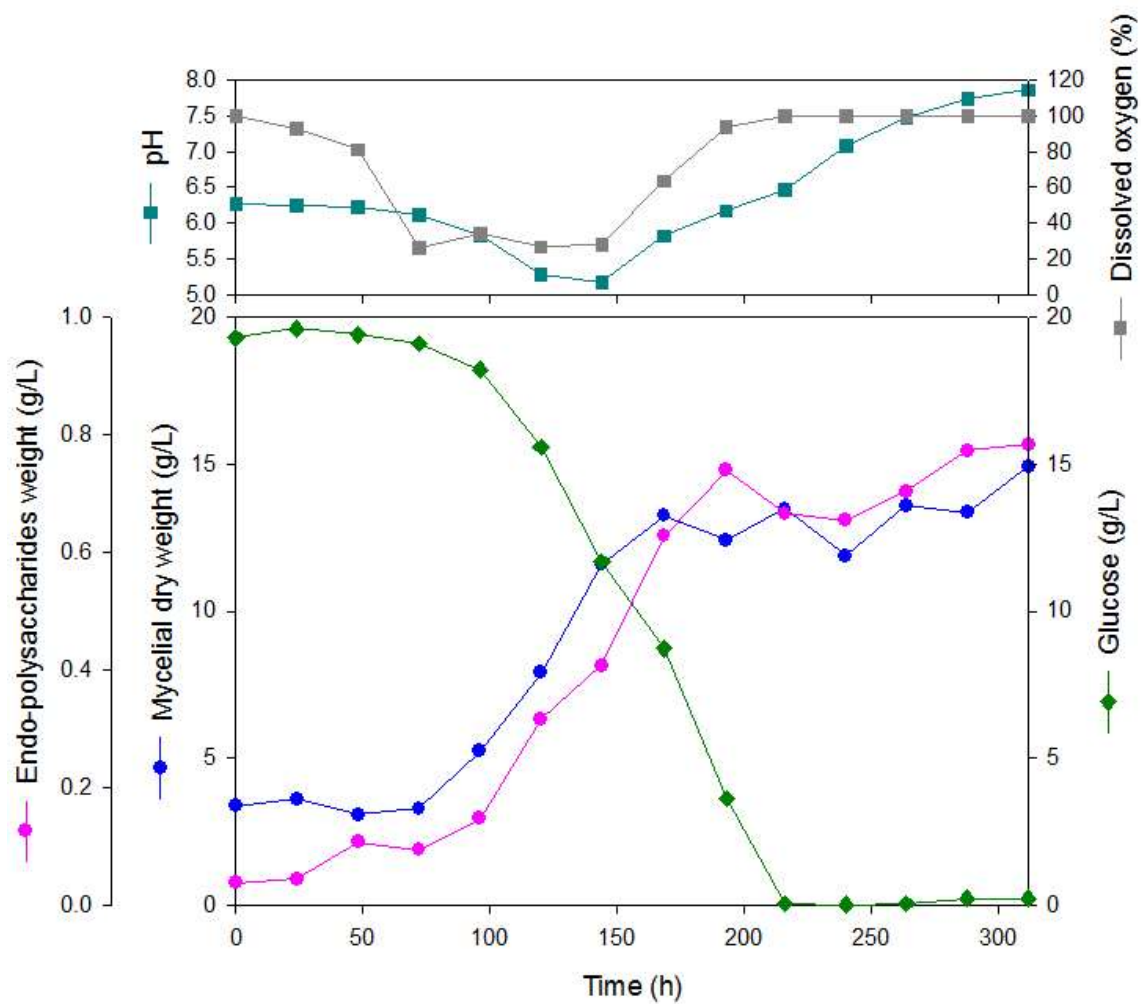


Fig. 5. Batch fermentation patterns of *A. pullulans* KSY-0516 in a 500 l pilot fermenter. The changes of dissolved oxygen (DO), pH and glucose concentration are also shown. The seed culture was conducted for 144 hr in 50 L fermenter.

500 ℓ 발효 및 농축 LINE 공정도

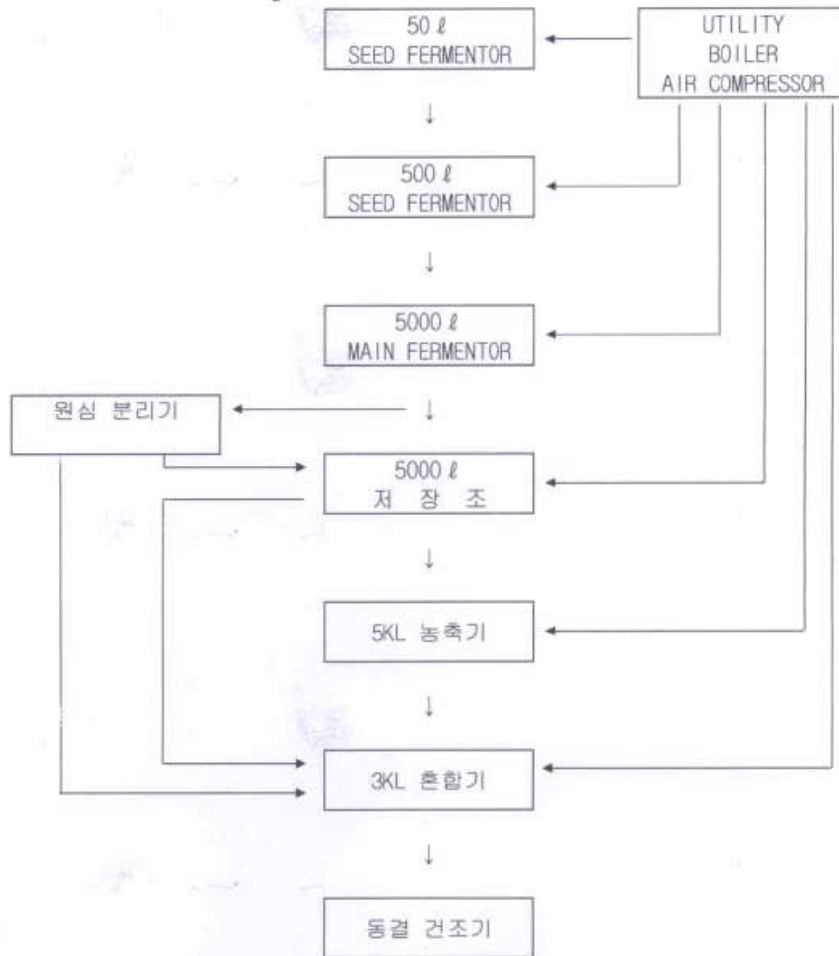


Fig. 6. Process chart for β 1,3/1,6-glucan production by *A. pullulans* KSY-0516.

2. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 *in vitro* 면역 활성 측정

가. 실험방법

(1) 세포 배양

- Yac-1 cell은 American Type Cultured Collection(ATCC; Rockville, MD, USA)에서 분양받아 실험하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)(Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L

penicillin-streptomycin (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), sodium pyruvate (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA)이 포함된 Roswell Park Memorial Institute medium 1640(RPMI1640), High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

(2) 동물 처리

- 본 실험에서는 6주령 Balb/C female 마우스를 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 명암은 12시간 (light/dark cycle), 온도는 23±2°C, 상대습도는 50±5%인 조건에서 1주 동안 적응기를 거쳐 실험에 이용하였다. 실험기간 동안 AIN-93G 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(3) 세포독성 실험 (WST assay)

- 96well plate에 분리한 splenocyte와 macrophage를 각 well당 1X10⁴ cells/well씩 분주한다. β 1,3/1,6-glucan을 농도(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간동안 배양하였다. EZ-cytox cell viability kit의 Ez-Cytox용액 20 ul를 첨가하고 ELISA reader (VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Yac-1 cell에 대한 Natural killer cell (NK cell) 활성화 평가 (LDH assay)

- 분리한 splenocyte를 96 well plate에 각 well당 5X10⁵ cells/well씩 분주한다. 표적 세포는 Yac-1 cell로 1X10⁴ cells/well씩 분주한다. β 1,3/1,6-glucan을 농도(0, 10, 50, 100, 200 ug/mL)로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 4시간동안 배양하였다. 배양 후 상층액 50ul을 새로운 plate에 분주하고 Cytotox 96 Non-radioactive Cytotoxicity assay kit(Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 이용하여 ELISA reader(VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 NK cell의 활성도를 측정하였다.

(5) 대식세포의 활성화 측정 (Phagocytosis assay)

- 분리한 macrophage를 96 well plate에 각 well당 8 X 10⁴ cells/well씩 분주한 후, β 1,3/1,6-glucan을 농도(0, 10, 50, 100, 200 ug/mL)로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간동안 배양하였다. Cytoselect 96-well phagocytosis assay(zymosan Substrate) kit (Cell Biolabs, INC, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대식세포의 활성도를 측정하였다.

(6) SC-1/LP-BM5 세포주에서 virus 복제억제능 측정

- SC-1/LP-BM5 세포주를 6 well에 8×10^4 cells/well씩 분주하여 4시간 안정화 후 β 1,3/1,6-glucan을 농도(0, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간동안 배양하였다. RNA 추출을 위하여 RNeasy extraction kit(Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 실험을 진행하였으며, cDNA 합성을 위하여 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 1과 같다. Real time PCR 반응은 총 20 μL 내에 cDNA 2 μL 와 2X SYBR mix 10 μL 첨가하였다. forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μL 를 1 μL 씩 첨가하였으며, 나머지는 H₂O로 채워주었다. 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였으며, 증폭 단계는 다음과 같다. Hot start를 위해 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 60°C에서 1분30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

Table 2. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH	F 5' CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA 3'
	R 5' GCG GCA CGT CAG ATC CA 3'
LP-BM5	F 5' CCA ATG TGT CCA TGT CAT TT 3'
	R 5' GCG ATG AGC AGA GAG AGA AAG 3'

(7) 통계처리

- 본 연구는 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 20 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 결과는 평균(mean) \pm 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다. 그룹간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성

의 여부를 검증하였다.

나. 실험결과

(1) 세포독성 실험(WST assay)

- β 1,3/1,6-glucan을 분리한 splenocyte와 macrophage에 24시간 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과는 Fig. 7과 Fig. 8과 같다.
- β 1,3/1,6-glucan을 50, 100, 200, 400 ug/mL을 처리한 결과, 0 ug/mL을 100%로 보았을 때 splenocyte에서는 각각 $117.278 \pm 0.863\%$, $113.518 \pm 2.897\%$, $107.789 \pm 3.662\%$, $113.787 \pm 2.437\%$ 로 cell viability가 오히려 증가하는 경향을 나타내었으며 세포독성이 나타나지 않았다. macrophage에서는 50, 100 ug/mL 처리한 결과 각각 $99.0424 \pm 0.316\%$, $97.674 \pm 1.881\%$ 로 0 ug/mL군과 유의적인 차이를 보이지 않았으며 200, 400 ug/mL에서는 $96.443 \pm 1.086\%$, $76.881 \pm 1.709\%$ 로 유의적인 차이를 보였다. 좀 더 정확한 결과분석을 위해 t-test 확인 결과 400 ug/mL에서 유의적인 차이를 보였으며 세포독성이 있는 것으로 확인하였다. 또한 200 ug/mL에서는 0 ug/mL과 비교하였을 때 오차범위가 약 4%로 크게 차이가 없어 독성이 나타나지 않은 범위로 보기에 무리가 없는 것으로 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 세포 독성이 나타나지 않은 범위인 200 ug/mL을 최대 농도로 이용하여 면역 활성 측정을 검증하였다.

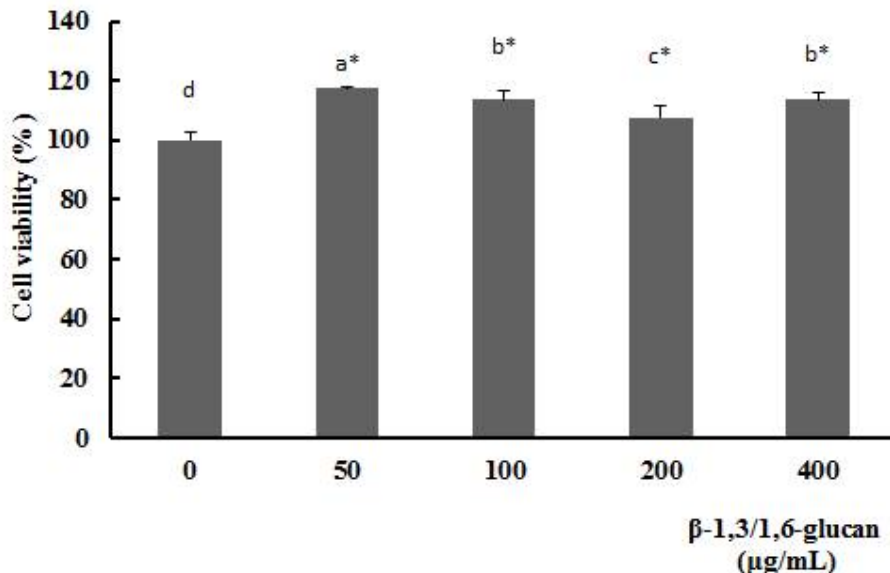


Fig. 7. Effect of β 1,3/1,6-glucan on cell viability in splenocyte.

Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of β -1,3/1,6-gucan, compared with untreated control(0 ug/mL) cells, taken as 100%. All data are presented as

mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Significantly different at $p<0.05$ compared with control by t-test.

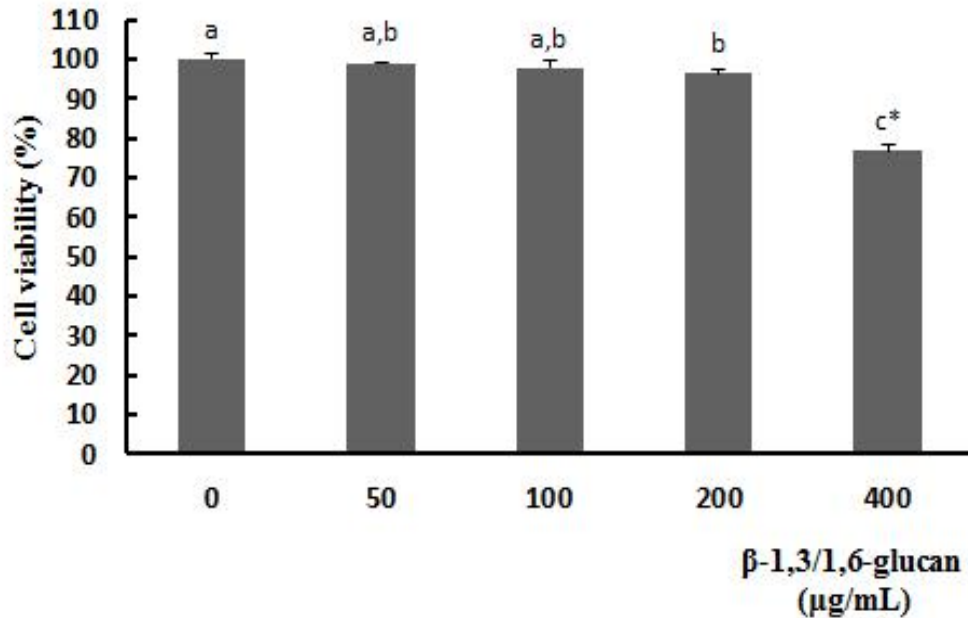


Fig. 8. Effect of β 1,3/1,6-glucan on cell viability in macrophage.

Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of β -1,3/1,6-glucan, compared with untreated control(0 $\mu\text{g/mL}$) cells, taken as 100%. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Significantly different at $p<0.05$ compared with control by t-test.

(2) Yac-1 cell에 대한 Natural killer cell (NK cell) 활성화 평가 (LDH assay)

- NK cell과 Yac-1 cell을 같이 배양하여 β 1,3/1,6-glucan의 처리에 따라 NK cell 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. β 1,3/1,6-glucan을 처리하지 않은 Control군에서는 Yac-1 cell에 대한 사멸정도는 $32.56 \pm 3.62\%$ 이었다. 반면 β 1,3/1,6-glucan을 처리한 군은 Control군에 비하여 농도 의존적인 결과를 보이지는 않았으나 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 군은 각각 $53.11 \pm 2.58\%$, $51.19 \pm 4.79\%$, $51.57 \pm 2.61\%$, $45.343 \pm 3.577\%$ 로 모두 Control군에 비해 유의적으로 높은 활성을 관찰하였다. 각각 10, 50, 100 mg/mL 로 처리한 군 사이에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 활성이 억제되는 것으로 확인하였다. 따라서 실질적인 효과는 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 포화된 상태임을 확인하였다.

(3) 대식세포의 활성화 측정 (Phagocytosis assay)

- β 1,3/1,6-glucan을 분리한 macrophage에 농도별로 처리하였을 때 대식세포의 탐식작용을 관찰한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Control군과 비교하였을 때 macrophage를 활성화 시키는 zymosan을 처리한 군에서는 활성이 현저히 증가하는 것으로 zymosan의 macrophage 탐식능 활성화를 확인하였으며 zymosan과 inhibitor를 같이 처리한 군에서는 zymosan군과 비교한 결과 탐식능이 억제되는 것으로 inhibitor작용을 확인하였다.

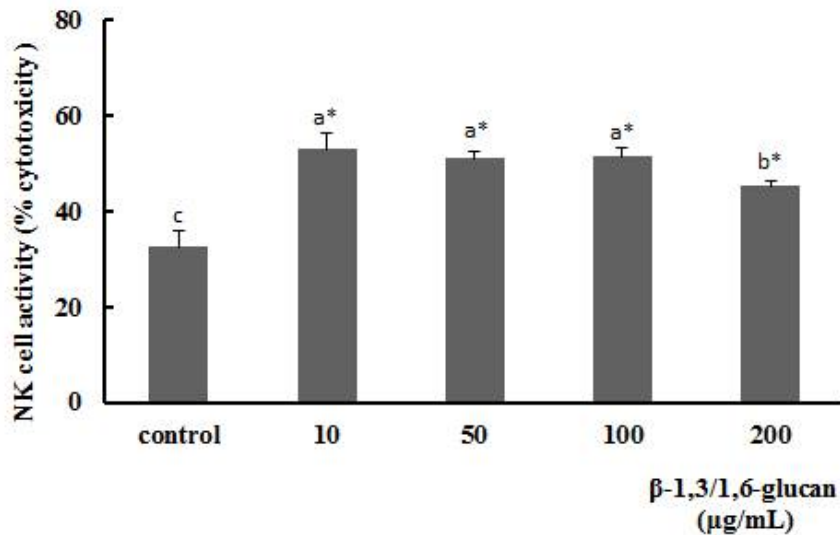


Fig. 9. Effect of β 1,3/1,6-glucan on NK cell activity.

All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Significantly different at $p < 0.05$ compared with control by t-test.

- zymosan을 처리한 군에서의 활성을 100%로 비교하였을 때 β 1,3/1,6-glucan 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 군은 각각 $115.10 \pm 0.79\%$, $117.27 \pm 1.38\%$, $120.03 \pm 1.14\%$, $121.52 \pm 0.87\%$ 로 유의적으로 높아졌음을 확인하였으며 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도의존적인 결과를 나타내었다. 그러나 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도 간에서는 유의적인 차이가 없었으며 실질적인 효능은 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 군에서 포화된 상태임을 확인하였다. 따라서 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 군에서 가장 대식세포 탐식능이 뛰어났지만 유의적인 차이가 없었으므로 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 이용하는 것이 산업적인 이용 가치 측면에서 상당한 우위를 점할 수 있을 것으로 판단된다.

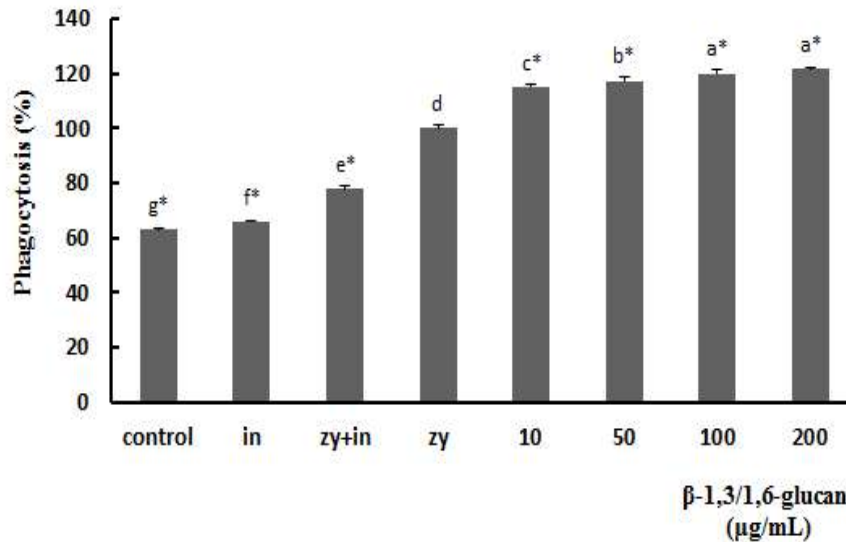


Fig. 10. Effect of β 1,3/1,6-glucan on phagocytic activity in peritoneal macrophage.

Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of β -1,3/1,6-gucan, compared with treated zymosan (cell+zy) cells, taken as 100%. All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Significantly different at $p < 0.05$ compared with control by t-test.

in: treated inhibitor, zy: treated zymosan.

(4) SC-1/LP-BM5 세포주에서 virus 복제억제능 측정

- SC-1/LP-BM5 세포주를 이용하여 β 1,3/1,6-glucan 처리시 LP-BM5 virus 복제 억제능 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Control군의 virus 복제억제능을 1로 보았을 때 이에 비해서 β 1,3/1,6-glucan 10, 50, 100, 200 ug/mL 처리한 군에서 각각 0.64 ± 0.00 , 0.51 ± 0.05 , 0.40 ± 0.00 , 0.26 ± 0.00 으로 유의적으로 발현이 감소하였으며 이는 농도의존적인 결과를 나타내었다. 따라서 virus 복제억제능이 가장 뛰어나 면역불균형을 초래하는 LP-BM5 virus 감염에 대한 방어막 효과로서 200 ug/mL이 가장 뛰어난 효과를 보였다.

3. β 1,3/1,6-glucan에 대한 단회 및 반복 독성시험

가. 실험방법

(1) 실험동물 및 식이공급

- 본 실험에서는 5주령 수컷 ICR 마우스(n=8), 암컷 ICR 마우스(n=8)를 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 이용된 ICR 마우스는 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 기초자료가 있어 선택하게 되었다. 실험기간 동안 AIN-93G 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, .명암은 12시간 (light/dark cycle), 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $50\pm 5\%$ 인 조건에서 1주 동안 적응기를 거쳐 실험에 이용하였다. 동물실의 환경에서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다. 암컷, 수컷 각각 4 마리씩 2군으로 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군을 분류하여 1군은 단회투여 독성검사, 1군은 반복투여 독성검사를 실시하였다.

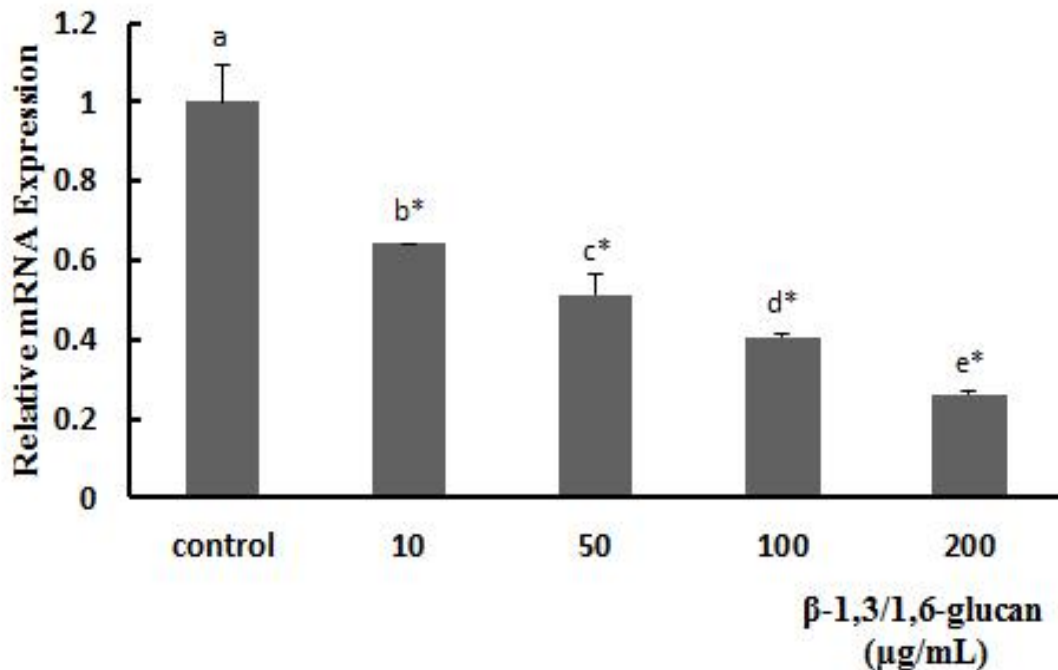


Fig. 11. Effect of β 1,3/1,6-glucan on genetic expression of LP-BM5 virus in SC-1 cell.

All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Significantly different at $p < 0.05$ compared with control by t-test.

(2) 단회투여 독성시험

- β 1,3/1,6-glucan 2 g/kg B·W 용량으로 하여 약 18 시간 절식 시킨 마우스에 경구 투여용 sonde를 장착 한 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여를 하였다. 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상 관찰을 실시하였으며 체중은 도입 시, 투여 후 7 일째에 측정하여 체중 변화를 관찰하

였다. 투여 후 7 일째 모든 생존 동물의 외관 검사를 실시한 후, 안와동맥을 통해 채혈한 뒤 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다. 혈액은 원심분리(14,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 혈청을 분리한 후, 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 분리한 혈청으로 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), glucose, creatine, urea는 enzyme assay kit(Biovision Inc. Mountain view, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

(3) 반복투여 독성시험

- β 1,3/1,6-glucan 2 g/kg B·W 용량으로 하여 약 18시간 절식 시킨 마우스에 경구 투여용 sonde를 장착 한 주사기를 이용하여 위내에 14일 동안 동일한 시간에 반복적으로 강제 투여를 하였다. 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상 관찰을 실시하였으며 체중은 도입 시, 투여 후 14일째에 측정하여 체중 변화를 관찰하였다. 투여 후 14일째 모든 생존 동물의 외관 검사를 실시한 후, 안와동맥을 통해 채혈한 뒤 부검하여 육안으로 장기를 검사하였다. 혈액은 원심분리(14,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 혈청을 분리한 후, 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 분리한 혈청으로 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), glucose, creatine, urea는 enzyme assay kit(Biovision Inc. Mountain view, CA, USA)를 이용하여 분석하였다

나. 실험결과

(1) 단회 투여 독성 시험

- β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가를 위해 2 g/kg B·W의 농도로 희석하여 1 회 경구 투여한 결과로 사망률 및 일반증상은 Table 3, 4에 나타내었다. 실험기간 중 β 1,3/1,6-glucan 투여에 의한 사망동물과 이상소견은 관찰되지 않았다. 생존동물에 대한 체중측정 결과는 Table 5에 나타내었으며 투여한 암수 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 혈액분석 결과는 Table 6에 나타내었으며 Charles River에서 참고한 ICR mice 독성기초자료는 Table 7에 나타내었다. 혈청 내 AST함량은 암수 각각 0.007 ± 0.000 , 0.020 ± 0.000 U/L로 기준범위 82.80 ± 39.8 U/L, 80.55 ± 6729 U/L 이하에서 관찰되었으며 ALT함량도 암수 각각 0.001 ± 0.000 , 0.001 ± 0.000 mU/mL로 기준범위 41.63 ± 13.91 , 45.08 ± 16.11 U/L 이하에서 관찰되었다. 또한 Glucos, Creatine, Urea함량도 암수 각각 0.011 ± 0.000 , 0.004 ± 0.000 uM/dL, 1.242 ± 0.331 , 1.632 ± 0.184 uM/dL, 0.007 ± 0.000 , 0.006 ± 0.000 uM/dL로 Table 3의 기준범위와 비교하였을 때 독성 범위 내에서 관찰되었다. 생존동물의 부검 소견결과는 Fig. 12와 Table 8에 나타내었으며 투여한 암수 모두 이상 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 단회 투여시 독성 반응은 나타나지 않았다.

Table 3. Mortality(n=4/group).

Dose	Sex	Mortality
2g/kg B · W	Female	0%(0/4)
	Male	0%(0/4)

Table 4. Clinical signs(n=4/group).

Dose	Sex	clinical signs
2g/kg B · W	Female	Normal
	Male	Normal

Table 5. Body weight(n=4/group).

Dose	Sex	Days after administration	
		0	7
2 g/kg B · W	Female	20.433±2.031 g	25.4±2.339 g
	Male	34.6±2.456 g	37.1±2.750 g

Table 6. Health surveillance on ICR mice.

	Female	male
AST (U/L)	82.80±39.85 (n=55)	80.55±67.29 (n=65)
ALT (U/L)	41.63±13.91 (n=54)	45.08±16.11 (n=65)
Glucose (mg/dL)	133.15±25.34 (n=54)	164.89±27.95 (n=64)
Creatine (mg/dL)	10.73±2.19 (n=55)	11.30±0.60 (n=61)
Urea (mg/dL)	12.80±3.81 (n=50)	14.68±3.99 (n=62)

Table 7. Acute toxicity of β -1,3/1,6-gucan on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group).

	Female	male
	2g/kg B · W	2g/kg B · W
AST (mU/mL)	0.007±0.000	0.020±0.000
ALT (mU/mL)	0.001±0.000	0.001±0.000
Glucose (μ M/uL)	0.011±0.000	0.004±0.000
Creatine (μ M/uL)	1.242±0.331	1.632±0.184
Urea (μ M/uL)	0.007±0.000	0.006±0.000

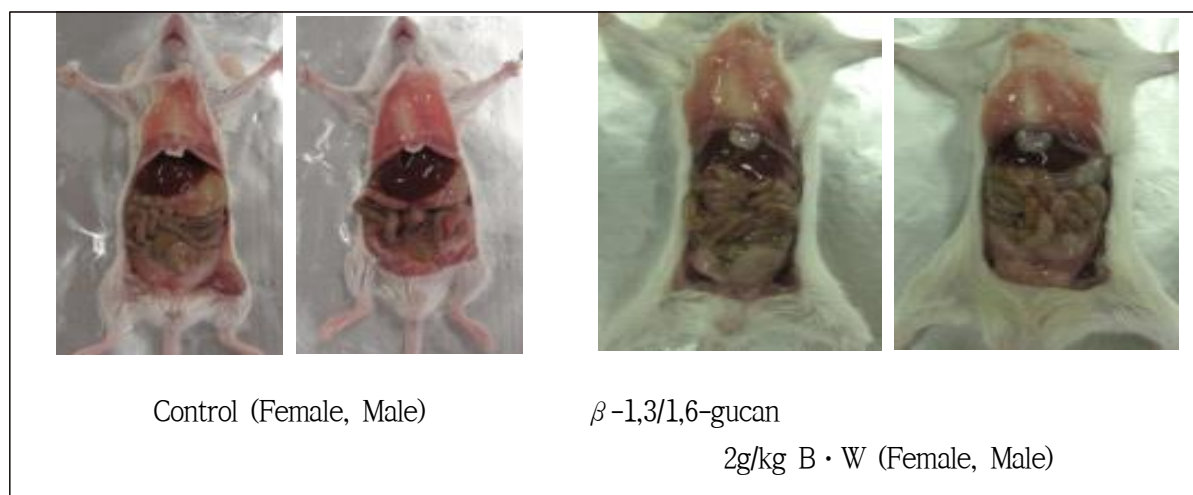


Fig. 12 Acute toxicity of β 1,3/1,6-gucan in ICR mice.

Table 8. Necropsy findings(n=4/group).

finding	2g/kg B · W	
	Female	Male
Number of animals	4	4
No gross findings (External findings)	4	4
No gross findings (Internal findings)	4	4

(2) 반복 투여 독성 시험

- β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가를 위해 2 g/kg B·W의 농도로 희석하여 14일 동안 반복적으로 경구 투여하여 사망률 및 일반증상 관찰 결과는 Table 9, 10에 나타내었다. 실험기간 중 β 1,3/1,6-glucan 투여에 의한 사망동물과 이상소견은 관찰되지 않았으며 생존동물에 대한 체중측정 결과는 Table 11에 나타내었다.
- 반복 투여한 암수 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 혈액분석 결과는 Table 12에 나타내었으며 Charles River에서 참고한 ICR mice 독성기초자료는 Table 6에 나타내었다. 혈청 내 AST함량은 암수 각각 0.007 ± 0.000 , 0.020 ± 0.000 U/L로 기준범위 82.80 ± 39.85 U/L, 80.55 ± 6729 U/L 이하에서 관찰되었으며 ALT함량도 암수 각각 0.001 ± 0.000 , 0.001 ± 0.000 mU/mL로 기준범위 41.63 ± 13.91 , 45.08 ± 16.11 U/L 이하에서 관찰되었다. 또한 Glucos, Creatine, Urea함량도 암수 각각 0.011 ± 0.000 , 0.004 ± 0.000 uM/dL, 1.242 ± 0.331 , 1.632 ± 0.184 u M/dL, 0.007 ± 0.000 , 0.006 ± 0.000 uM/dL로 Table 2의 기준범위와 비교하였을 때 독성 범위 내에서 관찰되었다. 생존동물의 부검 소견결과는 Fig. 13와 Table 13에 나타내었으며 투여한 암수 모두 이상 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 반복 투여시 독성 반응은 나타나지 않았다.

Table 9. Mortality(n=4/group).

Dose	Sex	Mortality
2g/kg B·W	Female	0%(0/4)
	Male	0%(0/4)

Table 10. Clinical signs(n=4/group).

Dose	Sex	clinical signs
2g/kg B·W	Female	Normal
	Male	Normal

Table 11. Body weight(n=4/group).

Dose	Sex	Days after administration	
		0	14
2g/kg B·W	Female	26.933 ± 0.681 g	29.533 ± 0.950 g
	Male	34.867 ± 1.115 g	37.733 ± 0.577 g

Table 12. Repeate toxicity of β -1,3/1,6-gucan on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group).

	Female	male
	2g/kg B · W	2g/kg B · W
AST (mU/mL)	0.007±0.000	0.007 0.000
ALT (mU/mL)	0.001±0.000	0.001±0.000
Glucose (μ M/uL)	0.396±0.037	0.330±0.330
Creatine (μ M/uL)	2.126±0.327	2.472±0.354
Urea (μ M/uL)	1.388±0.001	1.413±0.032



Control (Female, Male)

β -1,3/1,6-gucan
2g/kg B·W (Female, Male)

Fig. 13. Repeate toxicity of β 1,3/1,6-gucan in ICR mice.

Table 13. Necropsy findings(n=4/group).

finding	2g/kg B · W	
	Female	Male
Number of animals	4	4
No gross findings (External findings)	4	4
No gross findings (Internal findings)	4	4

4. β 1,3/1,6-glucan에 대한 유전독성 시험

가. 실험방법

(1) 복귀돌연변이시험 - 공인시험서 확보를 위해 KTR에서 시험 진행 중



시 험 계 획 서 (안)

TGW-0083-15

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)에 대한 박테리아를 이용한
복귀돌연변이시험

한국화학융합시험연구원장

1. 시험제목

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)에 대한 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험

2. 시험목적

살모넬라균 및 대장균을 이용한 복귀돌연변이시험을 실시하여 베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)의 변이원성을 확인하기 위하여 실시한다.

3. 시험기준

- 식품의약품안전처 고시 제2013-217호(2013-09-11) "건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정"
- OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 471 'Bacterial Reverse Mutation Test' (1997-07-21)

본 시험계획서에 명시된 사항 중 상기 기준에 규정되지 않은 경우에는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서에 따른다.

4. GLP 준수 및 신뢰성보증

4.1 GLP 준수

- OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"

4.2 신뢰성보증

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서(QAU)는 시험계획서의 점검 및 시험 중 정기적으로 시험의 기록과 검체의 보관에 관한 점검을 수행하며, 시험기초자료를 토대로 최종보고서에 대한 점검을 수행한다.

5. 시험일정 (예정)

시험개시일	: 2015-05-28
실험개시일	: 2015-05-28
용량설정시험일	: 2015-05-29
본시험일	: 2015-06-02
실험종료일	: 2015-06-05
최종보고서(초안) 제출일	: 2015-06-12
시험종료일	: 시험책임자 서명일

6. 재료 및 방법

6.1 시험물질 [SOP KG-APM-001]

물질명 : 베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)
 KTR 코드 : TS-00200
 보관조건 : 냉장 [(2 ~ 8) °C]
 공급원 : 농업회사법인 선일바이오(주)
 제조일 : 2015-04-06
 입수일 : 2015-04-09
 입수량 : 35.623 g (Gross)
 CAS No. : 53238-80-5
 Lot No. : 없음
 시험기간 중 보관조건 : 냉장 [(2 ~ 8) °C]
 유효기간 : 2017-04-05 (제조 후 2 년)
 외관 및 색상 : 백색 ~ 얼은 노란색을 띠는 스폰지 형태
 순도 : 93.2 %
 분자식(분자량) : 1000 ~ 2000 kDa
 비중 : 정보없음
 pH (농도, 온도) : 정보없음
 옥탄올분배계수(K_{ow}) : 정보없음
 수용해도 : 0.1 ~ 0.2 %
 잔여시험물질처리 : 반환
 취급/폐기 시 주의사항 : MSDS 참조

6.2 대조물질

6.2.1 음성대조물질(용매)

6.2.1.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	제 조 원	보 관 조 건
멸균증류수	대한약품공업(주)	상온 [(15 - 25) °C]

6.2.1.2 음성대조물질 선정이유

용매 검토 결과, 시험물질은 멸균증류수, DMSO에 50 mg/mL로 용해되지 않았다. 그러나 멸균증류수에 균질하게 현탁되었다. 또, 시험물질을 멸균증류수와 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없었다. 이러한 결과로부터, 본 시험물질의 용매(음성대조물질)에는 멸균증류수를 선택하였다.

6.2.2 양성대조물질

6.2.2.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	Lot No.	순도 (%)	사용기한 *	제조원	보관 조건
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	STQ3987	99.7	2018-11-12	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	실온
Sodium azide (NaN ₃)	BCBJ4642V	100.3	2018-06-30	Sigma-Aldrich Co.	실온
2-aminoanthracene (2-AA)	STBB1901V	97.5	2018-11-12		
9-Aminoacridine (9-AA)	09820CEV	99.4	2018-11-12		

* : Certification of analysis에 지정되어 있지 않을 경우 입수일로부터 5년

6.2.2.2 양성대조물질 선정이유

박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험에 넓게 사용되고 있으며, 적용 가이드라인에서 추천되어있다.

6.3 시험균주

6.3.1 시험균주 [SOP KG-AMT-002]

시 험 균 주	입 수 원(입 수 일)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535 TA98, TA1537	Molecular Toxicology, Inc. (2013-09-11)
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	

6.3.2 시험균주의 선택이유

박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험에 넓게 사용되고 있으며, 적용 가이드라인에서 추천되고 있다.

6.3.3 시험균주의 보관

6.3.3.1 조성

Nutrient broth 배지 중에서 37 ℃, 10시간 전배양을 실시한 균 현탁액 0.8 mL에 0.07 mL의 비율로 DMSO (Waco pure chemical industries Ltd.) 를 혼합했다.

6.3.3.2 보관방법

분주동결(분주량: 0.5 mL)

6.3.3.3 보관조건

-80 ℃ 이하(허용범위: -60 ℃ 이하)

6.3.3.4 보존일 및 사용기한

시 험 균 주	보 존 일	사 용 기 한
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA	최종보고서 기재	최종보고서 기재

6.3.4 시험균주의 유전적특성 [SOP KG-AMT-003]

6.3.4.1 유전적특성

시험균주	아미노산 요구성 ⁽¹⁾	자외선감수성 ⁽²⁾	막변이 ⁽³⁾	약제내성 ⁽⁴⁾
TA98	<i>his</i> - (frame-shift형)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1537	<i>his</i> - (frame-shift형)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
TA100	<i>his</i> - (염기치환형)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1535	<i>his</i> - (염기치환형)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trp</i> - (염기치환형)	Δ <i>uvrA</i>	Wild type	-

(1) *his*-는 히스티딘요구성, *trp*-는 트립토판요구성을 나타낸다.

(2) Δ *uvrA* 및 Δ *uvrB*는 DNA수복유전자가 결여되어 자외선 감수성을 보여준다.

(3) *rfa*는 세포벽의 lipopolysaccharide가 결실되어 crystal violet 감수성을 보여준다.

(4) +(pKM101)은 약제내성인자를 보유하여 Ampicillin 내성을 나타낸다.

6.3.4.2 유전적성질 확인

시험 균주의 유전적 특성을 확인했다. 시험에는 상기(6.3.4.1항)의 특성을 유지하고 있는 균주를 이용한다.

6.3.5 균 현탁액

6.3.5.1 배양

배양온도: 37 °C

배양시간: 10 시간

배양방법: 왕복 진탕(진탕 회수 : 120 회/분)

배양용기: 삼각플라스크(용량 : 50 mL)

배 양 액: Nutrient broth (15 mL)

균주 및 접종량: 보존 균주를 해동하여 0.03 mL 접종

6.3.5.2 균 현탁액의 균 농도

전배양하여 이용한 균액을 일부분 취해, 단계희석법으로 생균수를 측정하여 그 결과를 기록한다.

6.4 배지 [SOP KG-AMT-005]

6.4.1 Nutrient broth 조제

정제수 100 mL에 대하여 Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid사)를 2.5 g의 비율로 더해 용해한다. 이것을 121 °C에서 15 분간 autoclave멸균하고, 냉장 보관한다.

6.4.2 Top agar 조제

6.4.2.1 연한천 조제

정제수 100 mL에 대하여 Bacto-agar (Becton Dickinson and Company) 0.6 g 및 NaCl (Sigma-Aldrich Co.) 0.5 g의 비율로 합한다. 이것을 121 °C에서 15 분간 autoclave멸균하고, 약 (45 ± 5) °C에 보관한다.

6.4.2.2 Top agar조제

연한천에 아래의 수용액을 각각 사용 직전에 10 %로 첨가한다. Top agar는 사용 시 조제하

여 약 (45 ± 5) °C에 보온한다.

살모넬라균: 0.5 mmol/L Biotin · L-Histidine 혼합 수용액

대장균: 0.5 mmol/L L-Tryptophan수용액

6.4.2.3 Minimal glucose agar plate

시험시설에서 조제한다.

명 칭	제 조 원	등 급
Vogel-Bonner Medium (X10)	-	-
Glucose	Sigma-Aldrich Co.	≥ 99.5 % (GC)
Agar	Becton, Dickinson and Company	-

Composition: Vogel-Bonner Medium (X10) 10 %, 20 % Glucose solution 10 %, Agar 1.875 %

6.5 S9 mix [SOP KG-AMT-005]

6.5.1 S9

6.5.1.1 제조원

Molecular Toxicology, Inc. (USA)

6.5.1.2 제조방법

수컷 SD rat에 Aroclor1254를 500 mg/kg의 용량으로 단회 복강내 투여하여 효소를 유도한 후 5 일째에 간으로부터 조제되었다.

6.5.1.3 보존조건

-80 °C 이하(허용범위: -60 °C 이하)

6.5.1.4 사용기한

제조일로부터 24 개월로 한다.

6.5.1.5 S9 조제

동결건조 된 S9 1 vial에 멸균정제수 2.1 mL을 첨가하여 현탁한다.

6.5.2 Cofactor mix

6.5.2.1 명칭 및 제조원 등

명 칭	제 조 원	보 관 조 건
Cofactor-I	ORIENTAL YEAST Co., Ltd. (Japan)	냉장 [(2 - 8) °C]

6.5.2.2 조제

자체제조 또는 Cofactor-I에 멸균정제수 9 mL를 넣어 용해한 후, membrane filter (pore size: 0.45 µm) 로 여과한 것을 Cofactor mix로 한다. Cofactor mix는 사용 시 조제한다.

6.5.3 S9 mix

Cofactor mix 9 mL 당 S9 1 mL의 비율로 추가하여 S9 mix로 한다. S9 mix는 사용 시 조제 하고 사용할 때까지 빙냉 중에서 보존한다.

S9 mix 1 mL의 조성은 아래와 같다.

S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol
NADPH*	4 μmol
NADH**	4 μmol
Sodium phosphate buffer (pH 7.4)	100 μmol

* : Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form

** : Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form

6.6 시험물질용액 및 양성대조물질용액 조제

6.6.1 시험물질용액 조제 [SOP KG-APM-002]

(1) 일정량의 시험물질을 칭량하고 적당량의 용매를 넣어 진탕교반 및 마노를 이용하여 균질하게 현탁시켜, 50 mg/mL 용액으로 조제한다. 이 용액을 고압증기멸균하고, 일부를 용매로 단계 희석하여 각 농도의 시험물질 용액을 조제한다.

(2) 시험물질의 칭량, 용액의 희석, 분주 및 시험물질 처리를 포함한 모든 조작은 실온, 황색 등 밑에서 실시한다.

6.6.2 시험물질의 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않는다.

6.6.3 양성대조물질용액 [SOP KG-AMT-006]

6.6.3.1 양성대조물질용액 조제

양성대조물질용액은 아래에 따라 조제한 보존액을 사용 시 용해하여 시험에 사용한다.

(1) NaN₃는 멸균정제수(자체제조)에, AF-2, 9-AA 및 2-AA는 DMSO (Wako pure chemical industries, Ltd.)에 용해하였다.

(2) 이것을 같은 용매로 희석해 일정 농도의 양성대조물질용액으로 하였다.

6.6.3.2 보존방법

동결분주(분주량: 1.0 mL)

6.6.3.3 보존조건

-80 ℃ 이하(허용범위: -60 ℃ 이하)

6.6.3.4 조제농도 및 사용기한

명칭 및 농도(μg/mL)	조제일	사용기한
AF-2 0.1, 1	최종보고서 기재	최종보고서 기재
NaN ₃ 5		
9-AA 400		
2-AA 5, 10, 20, 100		

6.6.3.5 양성대조값의 확인 [SOP KG-AMT-004]

동결보존 한 양성대조물질용액에 대하여 pre-incubation method로 시험을 실시하여, 양성 대조 값이 적정 범위 내인 것을 확인하였다.

6.7 시험물질용량 및 양성대조물질용량

6.7.1 시험물질용량 [SOP KG-AMT-007]

6.7.1.1 용량설정시험

가이드라인에 따라 약 $\sqrt{10}$ 의 공비로 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고 용량으로 하여 이하의 용량을 설정한다.

시 험 균 주	용 량($\mu\text{g}/\text{plate}$)	
	S9 mix 미적용 및 적용	
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA	50, 150, 500, 1500, 5000	

6.7.1.2 본시험

용량설정시험의 결과를 기본으로, 아래와 같이 기준에 따라서 최고용량을 결정하여, 이하 적절한 간격(공비 혹은 공차)으로 5 용량 이상을 설정한다.

- (1) 균의 생육 저해가 없는 경우, 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고용량으로 한다.
- (2) 균의 생육 저해가 있는 경우, 확실한 생육저해가 있는 용량을 최고용량으로 한다.
- (3) 복귀돌연변이 콜로니수의 증가가 있는 경우, 용량의존성을 확인할 수 있는 용량을 최고용량으로 한다.

6.7.1.3 양성대조물질 용량 [SOP KG-AMT-004]

6.7.1.4 명칭 및 용량

시험균주	명 칭 및 용 량($\mu\text{g}/\text{plate}$)			
	S9 mix 미적용		S9 mix 적용	
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN ₃	0.5	2-AA	2
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA1537	9-AA	40	2-AA	2
WP2uvrA	AF-2	0.01	2-AA	10

6.7.1.5 양성대조물질 용량의 선택이유

이러한 용량은 각 시험 균주에 대해서 양성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

6.8 복귀돌연변이시험 [SOP KG-AMT-008]

6.8.1 시험법의 선택

시험은 pre-incubation method를 이용하고, S9 mix 미적용 및 적용에서 실시한다.

6.8.2 Pre-incubation Method

- (1) 각 용량에 대해 멸균한 시험관에 시험물질 용액, 음성(용매)대조물질 및 양성대조물질 용

액을 0.1 mL 첨가한다.

(2) S9 mix 미적용의 경우, 0.1 mol/L sodium-phosphate buffer (pH 7.4)을 0.5 mL 넣어 혼합하고, 균 현탁액을 0.1 mL 추가한다.

(3) S9 mix 적용의 경우, S9 mix 0.5 mL을 넣어 혼합하고, 균 현탁액을 0.1 mL 추가한다.

(4) 이 혼합액을 37 °C에서 20 분간 천천히 진탕(진탕 횟수: 120 회/분)하여 incubation한다 (pre-incubation).

(5) Pre-incubation 후, 이 혼합액에 top agar를 2 mL 넣어 minimal glucose agar plate 위에 중층한다.

(6) 중층한 top agar가 응고된 후, 37 °C에서 (48 ± 2) 시간 배양한다.

6.8.3 관찰 [SOP KG-AMT-009, 010]

침전물: 약 (48 ± 2) 시간 배양 후 육안으로 관찰한다.

균의 생육저해: 약 (48 ± 2) 시간 배양 후 현미경으로 관찰한다.

6.8.4 콜로니계수 [SOP KG-AMT-010]

육안으로 계수한다. 해당 plate를 특정할 수 있도록 raw data에 기록을 남겨 육안에 의해서 얻은 데이터인 것을 알 수 있도록 최종보고서에 기록한다.

6.8.5 Plate 수

용량설정시험 : 3 plate/용량

본 시험 : 3 plate/용량

6.8.6 결과의 집계

음성(용매)대조, 양성대조 및 시험물질의 각 처리에 대해서, 계측한 콜로니수의 평균값 및 표준 편차를 산출한다. 평균값 및 표준 편차는 소수점 이하를 사사오입하여 표시한다.

6.8.7 무균시험

최고용량의 시험물질용액 및 S9 mix에서 각각 1 매의 plate를 사용하여 시험마다 실시한다.

(1) 최고용량의 시험물질용액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL에 top agar 2 mL를 넣어 혼합한다.

(2) 각각 minimal glucose agar plate에 중층한다.

(3) 중층한 top agar가 응고한 후, 37 °C에서 (48 ± 2) 시간 배양하고 잡균의 혼입에 대해 육안으로 확인한다.

6.8.8 시험성립조건

아래의 조건을 모두 충족하는 경우에 성립한다. 아래 중 하나가 충족되지 않으면 해당 실험 조건 재시험을 실시한다.

(1) 음성(용매)대조치(평균값) 및 양성대조치(평균값)가 historical background data의 적정 범위 내에 있을 것.

(2) 양성대조치(평균값)가 대응하는 시험 균주의 음성(용매)대조치와 비교해 분명하게 2 배를 넘어 증가하고 있을 것.

(3) 생육저해의 없는 용량이 4 용량 이상 있고, 평가 가능한 용량이 5 용량 이상 있을 것.

(4) 본시험의 최고용량은 5000 µg/plate 또는 분명한 생육저해가 인정되는 농도일 것.

(5) 무균 시험의 결과, 잡균에 의한 오염이 없을 것.

(6) 시험 plate가 오염 혹은 다른 불가항력의 사태에 의해서 계측 불가능이 되어 없어지지 않을 것.

6.8.9 시험결과의 판정

대사활성계 적용 여부에 상관없이 최소 1 개 균주에서 평판 당 복귀돌연변이 집락수가 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다. 집락 수의 용량상관성 및 음성대조군에 비해 증가하는 정도 또한 고려한다. 시험 결과의 평가는 통계학적 검정을 실시하지 않는다.

6.8.10 재현성의 확인

결과의 재현성은 용량설정시험과 본시험으로 확인한다. 2 회의 시험으로 재현성을 얻을 수 없는 경우에는 확인시험을 실시한다.

7. 시험계획서의 변경 및 일탈 [SOP KG-GER-009]

7.1 시험계획서의 변경

시험책임자는 시험계획서의 승인 후 시험계획서의 변경이 필요한 경우에 운영책임자, 신뢰성보증담당자 및 시험의뢰자의 승인을 득한다.

7.2 시험계획서의 일탈

시험계획서의 일탈이 발생하는 경우, 시험책임자는 시험에 대한 영향을 평가하고 운영책임자, 신뢰성보증담당자 및 시험의뢰자에게 통보한다.

8. 최종보고서 [SOP KG-GER-013]

시험책임자는 최종보고서 초안을 작성하여 시험의뢰자 및 신뢰성보증담당자에게 송부하여 검토 요청한다. 시험의뢰자 및 신뢰성보증담당자의 검토의견을 반영하여 최종보고서를 작성하고 정본은 시험의뢰자에게 제출하며, 원본은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 보관한다.

9. 기록 및 자료 보관 [SOP KG-GER-011]

시험기간중에 발생한 모든 시험기초자료는 품목허가일로부터 3 년간 보관하며, 최종보고서 발급 후 5 년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따른다.

9.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록

(6) 최종보고서에 관한 기록

9.2 보관장소

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 자료보관실(Ⅰ), (Ⅱ)

(나) 체내 소핵시험 - 공인시험서 확보를 위해 KTR에서 시험 진행 중



시 험 계 획 서 (안)

TGW-0084-15

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)의 설치류 조혈세포를 이용한
체내 소핵시험

한국화학융합시험연구원장

1. 시험 제목

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)의 설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험

2. 시험목적

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)을 mouse에 투여하였을 때 골수의 다염성 적혈구에 대한 소핵의 유발성을 확인하기 위하여 실시한다.

3. 시험기준

- 식품의약품안전처 고시 제2013-217호(2013-09-11) "건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정"
- OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 471 'Bacterial Reverse Mutation Test' (1997-07-21)

본 시험계획서에 명시된 사항 중 상기 기준에 규정되지 않은 경우에는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서에 따른다.

4. GLP 준수 및 신뢰성 보증

4.1 GLP 준수

- OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"

4.2 신뢰성보증

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서(QAU)는 시험계획서의 점검 및 시험 중 정기적으로 시험의 기록과 검체의 보관에 관한 점검을 수행하며, 시험기초자료를 토대로 최종보고서에 대한 점검을 수행한다.

5. 동물윤리 [SOP KG-GER-003]

본 시험은 동물보호법 [시행 2015-01-20] [법률 제 13023호, 2015-01-20, 일부개정] 및 실험동물에 관한 법률[시행 2013-07-30][법률 제11987호(2013-07-30, 일부개정)]에 근거한 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물윤리위원회에 의해 승인된다.

6. 시험일정

시험개시일	: 2015-05-21
실험개시일	: 2015-05-21
예비시험	
실험동물도입일	: 2015-05-21
군분리일	: 2015-05-27
투여일	: 2015-05-27 ~ 28
본시험	
실험동물도입일	: 2015-05-28
군분리일	: 2015-06-03
투여일	: 2015-06-03 ~ 04
부검 및 표본제작일	: 2015-06-05
실험종료일	: 표관관찰 종료일
최종보고서 (초안) 제출일	: 2015-06-16
시험종료예정일	: 시험책임자 서명일

7. 재료 및 방법

7.1 시험물질

물질명 : 베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)
 KTR 코드 : TS-00200
 보관조건 : 냉장 [(2 ~ 8) ℃]
 공급원 : 농업회사법인 선일바이오(주)
 제조일 : 2015-04-06
 입수일 : 2015-04-09
 입수량 : 35.623 g (Gross)
 CAS No. : 53238-80-5
 Lot No. : 없음
 시험기간 중 보관조건 : 냉장 [(2 ~ 8) ℃]
 유효기간 : 2017-04-05 (제조 후 2 년)
 외관 및 성상 : 백색 ~ 옅은 노란색을 띠는 스펀지 형태
 순도 : 93.2 %
 분자식(분자량) : 1000 ~ 2000 kDa
 비중 : 정보없음
 pH (농도,온도) : 정보없음
 옥탄올분배계수(K_{ow}) : 정보없음
 수용해도 : 0.1 ~ 0.2 %
 잔여시험물질처리 : 반환
 취급/폐기 시 주의사항 : MSDS 참조

7.2 대조물질

7.2.1 음성대조물질 (용매)

7.2.1.1 명칭 및 제조원

명 칭	제조원	보관조건
멸균증류수	대한약품공업(주)	상온 [(15 ~ 25) ℃]

7.2.1.2 음성대조물질 선정이유

용매 검토 결과, 시험물질은 멸균증류수에 용해 및 현탁되었다. 또, 시험물질을 멸균증류수와 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없었다. 이러한 결과로부터, 본 시험물질의 용매(음성대조물질)에는 멸균증류수를 선택하였다.

7.2.2 양성대조물질

7.2.2.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	제 조 원	보 관 조 건
Cyclophosphamide monohydrate (CPA)	Sigma-Aldrich Co.	냉장 [(2 ~ 8) ℃]

7.2.2.2 양성대조물질 선정이유

소핵시험에서 널리 사용되고 있으며, 적용 가이드라인에 예시 및 권장되고 있다.

7.3 시험계 및 사육환경

7.3.1 시험계

계통 및 종	: CrljOri:CD1 (ICR), Mouse, SPF
공급원	: ㈜오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 화악산로 124번길 8)
도입 시 성별, 동물수	: 예비시험 (수컷 18 마리 이상), 본시험 (수컷 28 마리 이상)
도입 시 주령	: 6 주령, 평균체중 \pm 20 %
투여 시 주령	: 7 주령, 평균체중 \pm 20 %

7.3.1.1 시험계의 선정이유

본 시험에 사용되는 ICR mouse는 소핵시험에서 일반적으로 많이 사용되는 동물로서 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

7.3.1.2 검역 및 순화 [SOP KG-GTX-101]

실험동물 도입 시 모든 개체의 건강상태에 대한 외관검사를 실시하며, 검역 및 순화 기간을 거쳐 체중변화 및 일반 건강상태를 관찰한 후 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용한다.

7.3.1.3 개체식별 [SOP KG-MNT-002]

개체식별은 유성펜을 이용하여 꼬리에 표시하고, cage는 개체식별카드를 부착하여 식별한다.

7.3.1.4 군분리 [SOP KG-GTX-009]

순화 후 건강한 개체를 선별하여, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시한다.

7.3.1.5 잔여동물의 처리 [SOP KG-GTX-007]

군 분리 후 잔여동물은 부검 및 슬라이드 제작일에 안락사 한다.

7.3.2 사육환경 [SOP KG-ANC-008]

7.3.2.1 동물실번호

검역 및 순화	: 검역실
실험 및 관찰	: 청정동물 사육실 6

7.3.2.2 환경 및 사육조건

온도	: (22 ± 3) ℃
상대습도	: (50 ± 20) % R.H.
환기횟수	: (10 ~ 20) 회/h
조명주기	: 광조건 12 시간 (08:00 ~ 20:00) 암조건 12 시간 (20:00 ~ 08:00)
조도	: (150 ~ 300) Lux
Cage 종류	: Polysulfonate cage
Cage 크기	: (180W × 300D × 140H) mm
Cage당 수용마리 수	: 수컷 - 5 마리 이하

동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정되며, 조도 등의 환경조건은 표준작업지침서에 따라 측정한다.

7.3.2.3 사료 및 음수 공급

사료는 방사선 멸균된 Lab diet 5L79 [Lab diet, USA]를, 음수는 R/O수를 자유 섭취시킨다.

7.3.2.4 사료 및 음수 검사

사료는 제조업체의 정기적 검사에 따른 분석성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하며, 음수는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서에 따른 정기적 검사를 통해 확인한다.

7.3.2.5 깔짚

Beta chip [SILLIKER Inc, USA] 을 본 연구소에서 고압증기멸균 (121 ℃, 20 분)을 실시한 후 시험에 사용한다.

7.4 시험물질 조제 [SOP KG-APM-002]

시험물질은 투여당일 조제하여 사용한다.

- (1) 시험물질을 각각의 용량에 맞게 칭량하고 유발에 넣는다.
- (2) 유발 내에서 마쇄 후, 소량의 용매(부형제)를 넣고 현탁한다.
- (3) 현탁액을 volumetric flask에 넣는다.
- (4) 부형제를 넣어 mass up 한다.
- (5) 잘 혼합한 후 용기에 담는다.
- (6) 시험물질의 칭량, 용액의 희석 및 분주 등 모든 조작은 실온, 황색등 밑에서 실시한다.

7.5 시험물질의 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않는다.

7.6 대조물질 조제 [SOP KG-MNT-004]

7.6.1 양성대조물질 조제

투여 당일 황색등 아래에서 조제한다.

- (1) CPA 35 mg을 칭량한다.

(2) 멸균증류수 5 mL을 넣고 초음파 처리하여 용해한다 (7 mg/mL).

(3) 투여 시까지 실온, 차광 하에서 보존한다.

7.7 시험방법 [SOP KG-MNT-006, 008, 009, 010, 011]

7.7.1 투여

7.7.1.1 투여경로

강제 경구 투여한다. 단, 양성대조물질은 복강내 투여로 한다.

7.7.1.2 투여경로 선정 이유

소핵시험에 널리 이용되고 소핵 유발성의 평가에 적합한 처리 경로로 보고되고 있다. 또한 적용가이드라인에 예시되어 있다.

7.7.1.3 투여횟수

2회 투여 (24시간 간격) 한다. 단, 양성대조물질은 시험물질 2회차 투여일에 1회 투여한다.

7.7.1.4 투여횟수 선정 이유

1회의 표본 제작에서 소핵 유발의 피크를 확실히 잡기 위해 고안된 투여 횟수로서 적합하다.

7.7.1.5 투여액량

20 mL/kg B.W. 으로 통일한다

7.7.1.6 투여용량

예비시험의 결과를 토대로 하여 최고용량을 설정한다. 최고용량 및 그의 1/2 및 1/4의 용량으로 시험군을 구성한다.

7.7.1.7 투여방법

시험물질은 투여 전 약 4 시간 절식시킨 실험동물에 경구 투여용 sonde를 이용하여 위내에 강제 투여한다. 양성대조물질은 시험물질 2 회차 투여일에 복강내 투여한다.

7.7.2 군구성

7.7.2.1 예비시험

실험동물 암수 각각에 대하여 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군당 3 마리의 동물을 사용한다. 최종투여 후 24 시간까지 동물의 사망 유무를 확인한다.

성	군	투여군	투여횟수	투여경로	사 용 동 물 수 (동물번호)
	G1	음성대조군	2	경구	3 마리 (1101 ~ 1103)
	G2	500 mg/kg/day	2	경구	3 마리 (1201 ~ 1203)
Male	G3	1000 mg/kg/day	2	경구	3 마리 (1301 ~ 1303)
	G4	1500 mg/kg/day	2	경구	3 마리 (1401 ~ 1403)
	G5	2000 mg/kg/day	2	경구	3 마리 (1501 ~ 1503)

※ 사망동물 확인 시 해당농도의 한단계 아래농도로 본시험을 진행한다.

7.7.2.2 본시험

예비시험의 결과를 토대로 하여 암수 각각에 대하여 음성대조군 1군, 시험물질 투여군 3군

이상과 양성대조군 1군으로 군을 구성한다.

성	투여군	투여횟수	투여경로	표본제작시기	사용동물수
Male	음성대조군	2	경구	최종투여 후 24 시간	5 마리
	시험물질군(최저농도)	2	경구		5 마리
	시험물질군(중간농도)	2	경구		5 마리
	시험물질군(최고농도)	2	경구		5 마리
	양성대조군	1	복강		5 마리

7.7.3 관찰항목

7.7.3.1 일반증상관찰

투여 당일과 부검 당일 1회 관찰한다.

7.7.3.2 체중측정

실험동물 도입시, 군분리 전, 투여 전 및 부검 전 표준작업지침서의 방법에 따라 개별 체중을 측정한다.

7.7.4 표본 제작 및 관찰

7.7.4.1 표본제작시기

최종 투여 후 약 24 시간으로 한다.

7.7.4.2 표본제작시기 선정이유

복수 투여의 골수를 이용한 소핵 시험에서 소핵 유발 정점을 확실히 잡기 위해 고안된 표본 작성 시기로서 많이 사용하고 있다.

7.7.4.3 소핵시험 평가 이용 동물

사망동물이 없는 시험군에 대하여 평가한다.

7.7.4.4 표본의 제작

표본 제작은 평가에 이용하는 동물(7.7.4.3항)에 대해 실시한다.

- (1) Mouse를 경추탈골로 안락사 시킨 후 대퇴골을 적출한다.
- (2) 약 0.5 mL의 Fetal bovine serum (FBS, Gibco)로 골수 세포를 씻어내어 세포현탁액을 얻는다.
- (3) 세포현탁액을 1000 rpm에서 5 분간 원심분리한다.
- (4) 상등액을 제거한 후 골수 세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한다.
- (5) 건조 후 메탄올에 5 분간 고정한다.
- (6) 검체는 각 동물 당 2 매 이상 제작한다.

7.7.4.5 표본의 염색

메탄올로 고정된 표본을 Acridine orange액 (40 µg/mL) 으로 형광 염색한다.

7.7.4.6 표본의 관찰

7.7.4.6.1 표본코드화

- (1) 시험물질 처리군 및 대조군의 표본에 랜덤화한 번호를 부여해, slide 번호 지정 기록지를

작성한다 (표본 관찰자 이외의 사람이 실시).

(2) 표본 제작 시에, 각 표본에 (1)의 번호를 slide에 기재한다.

(3) 표본 관찰자는, (1)의 표를 보지 않고 관찰을 실시한다.

(4) 표본 관찰 종료 후, (1)의 표에 근거해 데이터를 집계한다.

7.7.4.6.2 표본관찰방법

표본의 관찰은 맹검법(blind method)으로 하되 400 배 배율의 형광현미경 또는 1000 배 배율의 현미경으로 관찰한다.

7.7.4.6.3 소핵의 판정기준

- 다염성 적혈구의 구별

관찰 시야에서 핵이 없이 적색 형광을 보이는 것으로 한다.

- 정염성 적혈구의 구별

관찰시야에서 다염성 적혈구의 크기로 형광을 전혀 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것으로 한다.

- 소핵의 판정기준

크 기 : 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2로, 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지로 한다.

형 태 : 주로 원형이나 기타 도너츠형, 반원형 등의 형태의 것을 포함시킨다.

색 깔 : 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광을 띠는 것으로 한다.

7.7.4.6.4 표본의 관찰

세포도말상태가 좋은 곳을 선택하여 다염성적혈구 (PCE) 2000 개에서 소핵을 갖는 세포를 계수한다. 또 전체 적혈구 (다염성적혈구 및 정염성 적혈구) 100 개 이상을 관찰하여 그 중 다염성 적혈구의 비율을 계측한다.

7.8 자료의 통계처리 [SOP KG-MNT-012]

SPSS program (Ver. 19)를 이용하여 통계 처리를 실시하고, 그 결과 $P < 0.05$ 인 경우에 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정한다.

소핵유발빈도에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군 간의 비교 : Kruskal-Wallis' H-test

소핵유발빈도에 있어서 음성대조군과 양성대조군의 비교 : Mann-Whitney's U-test

전체적혈구 중 다염성 적혈구의 비율 [(PCE/(PCE+NCE))]에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군의 비교 (양성대조군 포함) : ANOVA test와 Dunnett's test

전체적혈구 중 다염성 적혈구의 비율 [(PCE/(PCE+NCE))]에 있어서 음성대조군과 양성대조군의 비교 : Student's t-test (Lovell 등, 1989).

체중에 있어서는 부검 시 각 개체의 체중에 대하여 ANOVA test와 Dunnett's test를 실시하여 부검 시 구간 차이를 조사한다.

8. 시험계획서의 변경 및 일탈 [SOP KG-GER-009]

8.1 시험계획서의 변경

시험책임자는 시험계획서의 승인 후 시험계획서의 변경이 필요한 경우에 운영책임자, 신뢰성

보증담당자 및 시험의뢰자의 승인을 득한다.

8.2 시험계획서의 일탈

시험계획서의 일탈이 발생하는 경우, 시험책임자는 시험에 대한 영향을 평가하고 운영책임자, 신뢰성보증담당자 및 시험의뢰자에게 통보한다.

9. 최종보고서 [SOP KG-GER-013]

시험책임자는 최종보고서 초안을 작성하여 시험의뢰자 및 신뢰성보증담당자에게 송부하여 검토 요청한다. 시험의뢰자 및 신뢰성보증담당자의 검토의견을 반영하여 최종보고서를 작성하고 정본은 시험의뢰자에게 제출하며, 원본은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 보관한다.

10. 기록 및 자료 보관 [SOP KG-GER-011]

시험기간중에 발생한 모든 시험기초자료는 품목허가일로부터 3 년간 보관하며, 최종보고서 발급 후 5 년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따른다.

10.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

10.2 보관장소

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 자료보관실(I), (II)

(다) 체외 염색체이상시험 - 공인시험서 확보를 위해 KTR에서 시험 진행 중



시 험 계 획 서 (안)

TGW - 0085 - 15

베타 - 1,3/1,6 - 글루칸 (Beta - 1,3/1,6 - glucan)

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)의 포유류 배양세포를
이용한 체외 염색체이상시험

한국화학융합시험연구원장

1. 시험제목

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)의 포유류 배양세포를 이용한 체외 염색체이상시험

2. 시험목적

베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)의 포유류 배양세포에 대한 염색체이상 유발성을 검토한다.

3. 시험기준

- 식품의약품안전처 고시 제2013-217호(2013-09-11) "건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정"
- OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 471 'Bacterial Reverse Mutation Test' (1997-07-21)

본 시험계획서에 명시된 사항 중 상기 기준에 규정되지 않은 경우에는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서에 따른다.

4. GLP 준수 및 신뢰성 보증

4.1 GLP 준수

- OECD "Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)"

4.2 신뢰성보증

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서(QAU)는 시험계획서의 점검 및 시험 중 정기적으로 시험의 기록과 검체의 보관에 관한 점검을 수행하며, 시험기초자료를 토대로 최종보고서에 대한 점검을 수행한다.

5. 시험일정

시험개시일	: 2015-05-28
실험개시일	: 2015-05-29
실험종료일	: 표관관찰 종료일
최종보고서(초안) 제출일	: 2015-06-18
시험종료일	: 시험책임자 서명일

6. 재료 및 방법

6.1 시험물질

물질명 : 베타-1,3/1,6-글루칸 (Beta-1,3/1,6-glucan)
 KTR 코드 : TS-00200
 보관조건 : 냉장 [(2 ~ 8) ℃]
 공급원 : 농업회사법인 선일바이오(주)
 제조일 : 2015-04-06
 입수일 : 2015-04-09
 입수량 : 35.623 g (Gross)
 CAS No. : 53238-80-5
 Lot No. : 없음
 시험기간 중 보관조건 : 냉장 [(2 ~ 8) ℃]
 유효기간 : 2017-04-05 (제조 후 2 년)
 외관 및 색상 : 백색 ~ 옅은 노란색을 띠는 스폰지 형태
 순도 : 93.2 %
 분자식(분자량) : 1000 ~ 2000 kDa
 비중 : 정보없음
 pH (농도,온도) : 정보없음
 옥탄올분배계수(K_{ow}) : 정보없음
 수용해도 : 0.1 ~ 0.2 %
 잔여시험물질처리 : 반환
 취급/폐기 시 주의사항 : MSDS 참조

6.2 대조물질

6.2.1 음성대조물질(용매)

6.2.1.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	제 조 원	보 관 조 건
멸균증류수	대한약품공업(주)	상온 [(15 ~ 25) ℃]

6.2.1.2 음성대조물질 선정이유

용매 검토 결과, 시험물질은 멸균증류수, DMSO에 50 mg/mL로 용해되지 않았다. 그러나 멸균증류수에 균질하게 현탁되었다. 또, 시험물질을 멸균증류수와 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없었다. 이러한 결과로부터, 본 시험물질의 용매(음성대조물질)에는 멸균증류수를 선택하였다.

6.2.2 양성대조물질

6.2.2.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	제 조 원	보 관 조 건
Mitomycin C (MMC)	Sigma-Aldrich Co.	냉장 [(2 ~ 8) ℃]
Cyclophosphamide monohydrate (CPA)	Sigma-Aldrich Co.	

6.2.2.2 양성대조물질 선정이유

포유류 배양 세포를 이용하는 염색체이상시험에서 널리 사용되고 있다.

6.3 세포 [SOP KG-CHT-002]

6.3.1 세포

CHL/IU (female, Chinese Hamster Lung유래, ATCC CRL-1935™)

6.3.2 구입원

American Type Culture Collection (ATCC, USA)

6.3.3 구입일

2013-10-18

6.3.4 보존

최종 10 % (v/v)의 비율로 DMSO를 첨가한 배지에 세포를 부유시켜, 약 1 mL씩 분주하고, 2013-12-13에 동결한 후에 액체질소 보존용기로 옮겨 보존했다.

시험에 있어서는, 이것을 사전 또는 시험 기간 중에 해동 및 배양하고 다른 시험과 공통으로 사용한다.

6.3.5 특성검사

6.3.4항의 동결 세포에 대해서, 이하의 특성을 확인하였다.

염색체모드 (2n): 25

배가시간 : 14.9 시간

Mycoplasma : 음성

6.3.6 계대수

구입 시: 불명

동결 시: 2 (구입 시 0대로함)

사용 시: 해동 후 4 개월 이내

6.3.7 배양조건

용기 : 25cm² Cell culture flask, Canted neck (Corning)

온도 : 37 ℃

CO₂ 농도 : 5 %

습도 : 가습 조건

배양기 : CO₂ Incubator (Sanyo, MCO-19AIC)

6.3.8 세포 선택이유

염색체수의 모드가 25 개로 적고, 염색체가 비교적 크기 때문에 표본관찰 시 용이한 이점이 있고, 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서 널리 사용되고 있다. 또한 적용 가이드라인에서

추천되고 있다.

6.4 배지 [SOP KG-CHT-003]

MEM 및 MEM 배지는 사전 혹은 시험 개시 후에 구입, 조제한 것을 다른 시험과 공통으로 사용한다.

6.4.1 MEM

Minimum Essential Medium (MEM) (1×), liquid (Life Technologies Corp.)

6.4.2 MEM배지

MEM에 fetal bovine serum (Life Technologies Corp.) 10 % (v/v), Penicillin Streptomycin (Gibco) 1 % (v/v) 비율로 첨가한다.

6.5 S9 mix [SOP KG-CHT-008]

6.5.1 제조원

Molecular Toxicology, Inc. (USA)

6.5.2 S9 조제방법

SD계 수컷 랫트에게 Aroclor1254를 500 mg/kg의 용량으로 단회 복강 내 투여하여 효소를 유도한 후 5 일째에 간으로부터 조제한 후 동결 건조되었다.

6.5.3 보존조건

-80 ℃ 이하(허용범위: -60 ℃ 이하)

6.5.4 유효기한

제조일로부터 24 개월간

6.5.5 S9 조제

동결건조 된 S9 1 vial에 멸균증류수 2.1 mL을 첨가하여 현탁한다.

6.5.6 Cofactor mix

6.5.6.1 명칭 및 제조원 등

명 칭	제 조 원	보 관 조 건
Cofactor-I	ORIENTAL YEAST Co., Ltd. (Japan)	냉장 [(2 ~ 8) ℃]

6.5.6.2 조제

Cofactor-I에 멸균정제수 7 mL를 넣어 용해한 후, membrane filter (pore size: 0.45 μm) 로 여과한 것을 Cofactor mix로 한다. Cofactor mix는 사용 시 조제한다.

6.5.7 S9 mix의 조제 및 조성

Cofactor mix 4.9 mL에 조제한 S9 2.1 mL의 비율로 혼합한다. 사용일에 필요한 양을 조제하며, 사용 시까지 병냉에서 보존한다. S9 mix 1 mL중의 조성은 아래와 같다.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol
NADPH*	4 μmol
NADH**	4 μmol
Sodium phosphate buffer (pH 7.4)	100 μmol

* : Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form

** : Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form

6.6 시험물질용액 및 양성대조물질용액의 조제

6.6.1 시험물질용액 [SOP KG-APM-002]

- (1) 시험물질을 일정량 칭량한 후 용매를 넣고, 진탕교반 및 마노를 이용하여 균질하게 현탁한다.
- (2) 용매를 넣어 최고처리용량의 10 배 농도가 되는 용량으로 맞춘다.
- (3) 이 용액을 고압증기멸균한 후, 용액의 일부를 용매로 단계회석하고, 각 최종처리용량의 10 배 농도가 되도록 조제한다.
- (4) 시험물질의 칭량, 용액의 회석을 포함한 모든 조작은 실온, 황색등 밑에서 실시한다. 용액은 조제 후 신속하게 사용한다.

6.6.2 시험물질의 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않는다.

6.6.3 양성대조물질용액 조제 [SOP KG-CHT-003]

6.6.3.1 MMC용액 조제

- (1) 2 mg 함량의 vial병의 MMC에 멸균정제수(자체) 2 mL에 용해하였다.
- (2) 이것을 정제수로 단계회석하여 각 처리조건에 있어서의 처리용량의 10배 농도의 용액(단시간처리법: 1 μg/mL, 연속처리법: 0.5 μg/mL)으로 조제하였다.
- (3) 상기의 각 용액을 각각 약 1.5 mL씩 분주 후, 냉동고(허용범위: -25 ~ -15 ℃)에서 보존한다(사용기한: 조제 후 1 년).
- (4) 이 중 필요 수량을 사용 당일에 해동하여 사용한다.

6.6.3.2 CPA용액 조제

- (1) CPA 1 mg을 칭량한 후 멸균정제수(자체) 1 mL에 용해하였다.
- (2) 이것을 정제수로 단계 회석하여 처리 용량의 10 배 농도의 용액(50 μg/mL)을 조제하였다.
- (3) 상기 용액을 약 1.5 mL씩 분주 후, 냉동고(허용 범위: -25 ~ -15 ℃)에서 보존한다(사용 기한: 조제 후 1 년).
- (4) 이 중 필요 수량을 사용 당일에 해동하여 사용한다.

6.7 농도결정시험 [SOP KG-CHT-007]

6.7.1 처리조건

처 리 조 건	S9 mix	처리시간	회복시간	약 칭
염색체이상시험 (단시간처리법)	-	6	18	-S9 mix
	+	6	18	+S9 mix
염색체이상시험 (연속처리법)	-	24	0	24 시간처리

6.7.2 시험물질농도

처 리 조 건	처 리 농 도 (µg/mL)
-S9 mix	156, 313, 625, 1250, 2500, 5000
+S9 mix	156, 313, 625, 1250, 2500, 5000
24 시간처리	156, 313, 625, 1250, 2500, 5000

6.7.3 시험물질 농도설정이유

적용 가이드라인에 규정하고 있는 5000 µg/mL 또는 10mM을 최고용량으로 설정한다.

6.7.4 세포처리 [SOP KG-CHT-006, 007, 008, 009]

(1) 4×10^3 cells/mL로 조제한 세포 부유액을 25 cm² culture flask에 5 mL 접종하여 3일간 배양한다.

(2) MEM배지를 제거한 후, 시험물질용액, S9 mix 및 MEM배지를 아래와 같은 조성으로 culture flask에 첨가한다. 음성대조군의 경우 용매를 이용하여 동일하게 실시한다. 각 처리조건, 처리용량에 대하여 2 배의 culture flask를 사용한다.

처 리 조 건	시험물질용액 또는 용매	S9 mix	MEM배지
-S9 mix	0.5 mL	-	4.5 mL
+S9 mix	0.5 mL	0.5 mL	4.0 mL
24시간처리	0.5 mL	-	4.5 mL

(3) 단시간처리법에서 6 시간, 연속처리법에서 24 시간 세포를 처리한다.

(4) 단시간처리법에서 6 시간 처리 후, PBS (이하, PBS (-) 라고 생략한다) 로 세포표면을 2 ~ 3 회 세정하고, 새로운 MEM배지 5 mL을 첨가하여 18 시간 추가 배양한다.

(5) 처리개시 시 및 처리 종료 시에 시험물질의 침전 등의 유무를 육안으로 관찰한다.

6.7.5 세포증식율 측정 [SOP KG-CHT-006]

(1) 세포 표면을 Ca²⁺, Mg²⁺ free의 PBS (-) 로 세정한다.

(2) 0.25 % trypsin-EDTA (Life Technologies Corp.)로 37 °C에서 5 분간 처리한다.

(3) MEM배지를 넣고 피펫팅을 이용하여 세포를 박리한다.

(4) 생세포 계수기(BECKMAN COULTER, USA) 또는 Hemocytometer (Superior Ltd., Germany)로 세포를 계수 한다.

(5) 음성대조군의 측정값(평균)을 100 %로 하여 세포증식율을 산출한다.

6.7.6 50 % 세포증식억제용량의 산출

시험물질에 의한 50 % 이상의 세포 증식 억제가 인정되는 처리 조건에 대해서는 50 % 세포 증식억제 용량(IC₅₀)을 산출한다. IC₅₀은 세포증식율이 50 %를 사이에 두는 2 용량에 대하여 직선식으로 산출한다. 덧붙여 설정한 용량으로 세포증식율이 50 % 가 되었을 경우는, 그 용량을 IC₅₀으로 한다. 시험물질에 의한 50 % 이상의 세포증식억제가 인정받지 못한 처리조건에 대해서는 IC₅₀을 산출하지 않는다.

6.8 염색체이상시험

6.8.1 처리조건

-S9 mix, +S9 mix, 24 시간처리(연속처리)

우선, 단시간처리법만 실시한다. 단시간처리법 결과 판정이 음성일 경우는 연속처리법을 실시한다. 단시간처리법의 결과 판정이 양성이었을 경우는 연속처리법은 실시하지 않는다.

6.8.2 시험물질농도

(1) 농도결정시험에서 50 % 이상의 세포증식억제가 인정받지 못한 경우에는, 5000 µg/mL 또는 10mM을 최고용량으로서 공비 또는 공차로 3 용량 이상을 설정한다.

(2) 농도결정시험에서 50 % 이상의 세포증식억제가 인정되었을 경우에는, IC₅₀을 넘는 용량을 최고 용량으로 하여 공비 또는 공차로 3 용량 이상을 설정한다.

(3) 다만, 농도결정시험 결과, 세포 독성의 변화가 현저한 경우나 좁은 용량 범위에서 영향을 볼 수 있는 경우 등은 필요에 따라서 염색체이상 유발성을 판단하는데 적합한 공비 또는 공차로 용량 단계를 설정한다.

6.8.3 양성대조물질농도

처 리 조 건	양성대조 물질명	농도(µg/mL)
-S9 mix	MMC	0.1
+S9 mix	CPA	5
24 시간처리	MMC	0.05

6.8.4 양성대조물질농도의 설정이유

상기 농도로 염색체 이상을 유발하는 것이 알려져 있다.

6.8.5 세포처리

6.7.4항에 나타낸 방법으로 실시한다

양성대조군에 대해서는, 아래와 같은 조성으로 실시한다.

처 리 조 건	MMC용액	CPA용액	S9 mix	MEM배지
-S9 mix	0.5 mL	-	-	4.5 mL
+S9 mix	-	0.5 mL	0.5 mL	4.0 mL
24 시간처리	0.5 mL	-	-	4.5 mL

6.8.6 표본제작 [SOP KG-CHT-009]

(1) 처리종료 2 시간 전에 colcemid를 최종용량 0.2 µg/mL이 되도록 각 culture flask에 첨가하여 분열중기세포를 축적한다.

- (2) 처리 종료 후, 세포 표면을 PBS (-) 로 세정한다.
- (3) 0.25 % Trypsin-EDTA를 처리(37 °C, 5 분)하여 세포를 박리한다.
- (4) 세포부유액을 원심관에 회수해, 원심분리(1000 rpm, 5 분간; 이하 동일)하여 세포를 모은다.
- (5) 상등액을 제거 후, 각 원심관에 0.075 mol/L KCL 용액 4 mL을 넣고 저장처리(37 °C, 15 분)를 실시한다.
- (6) 냉각한 고정액(메탄올 : 빙초산 혼합액 [3 : 1, v/v]) 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 후, 원심분리하여 상등액을 제거한다.
- (7) 고정액 4 mL를 더해 혼합한 후에, 원심분리하여 상등액을 제거한다.
- (8) (7)의 조작을 재차 실시한다.
- (9) 적당량의 고정액으로 세포를 부유시킨다.
- (10) Slide tray 위에 둔 slide glass에 2 ~ 3 개소에 떨어뜨려 건조시킨다. Culture flask 당 2 매 이상의 표본을 제작한다.
- (11) 5 % (v/v)의 giemsa 용액으로 5 분간 염색 후, 수세 건조한다.

6.8.7 세포증식율 측정 [SOP KG-CHT-006]

- (1) 6.8.6 (3)항에서 얻은 세포부유액의 일부를 채취하여 생세포계수기 또는 Hemocytometer로 세포를 계수 한다. 이때 양성대조군은 계수하지 않는다.
- (2) 음성대조군의 측정값(평균)을 100 %로 하여 세포증식율을 산출한다.

6.8.8 관찰 [SOP KG-CHT-010]

6.8.8.1 관찰표본의 선정

6.8.7항의 세포 증식율이 50 % 미만이 되는 최저 용량을 최고로하여 3 용량 이상을 선택한다. 어느 용량에 대해서도, 세포증식율이 50 %이상인 경우는 최고 처리 용량으로부터 연속한 3 용량 이상을 선택한다.

또한, 아래의 이유 등으로 염색체 관찰을 할 수 없는 경우에는, 관찰 가능한 용량을 선택한다. 최고용량의 표본을 불채용으로 했을 경우는, 시험 가이드라인에 규정하는 최고 농도(세포 증식억제율이 50 %이상, 5 mg/L 또는 10 mM중 낮은 것)로의 영향이 평가 가능한가 판단한다. 평가를 할 수 없다고 판단되는 경우는, 적당한 용량을 추가로 설정하여 확인 시험을 실시한다[6.8.9.6.1(3)].

- 염색체 표본의 질이 열악한 등의 이유로 염색체 관찰을 할 수 없는 경우
- 세포 독성 때문에 플레이트 당 100 개의 분열 중기 세포를 관찰할 수 없는 경우

6.8.8.2 관찰

6.8.8.2.1 표본코드화

- (1) 시험물질 처리군 및 대조군의 표본에 랜덤화한 번호를 부여해, 그 slide 번호 지정기록지를 작성한다(표본 관찰자 이외의 사람이 실시).
- (2) 표본 제작시에, 각 표본에(1)의 번호를 slide에 기재한다.
- (3) 표본 관찰자는, (1)의 표를 보지 않고 관찰을 실시한다.
- (4) 표본 관찰 종료 후, (1)의 표에 근거해 데이터를 집계한다.

6.8.8.2.2 관찰 대상으로 하는 분열 중기 세포의 선택 기준

- (1) 염색체가 잘 퍼지고 있는 것.
- (2) 구조이상: 염색체수가 25 ± 2 인 것
- (3) 수적이상: 염색체수가 25 ± 2 또는 35 이상인 것

6.8.8.2.3 관찰 세포수

Culture flask 당 100 개(용량 당 200 개)

6.8.8.2.4 구조이상

- (1) 염색분체형절단
- (2) 염색분체형교환
- (3) 염색체형절단
- (4) 염색체형교환(이동원체, 환상염색체 등)
- (5) 단편화

6.8.8.2.5 Gap

Gap은 염색분체로 보여지는 비염색 부분의 폭이 염색분체의 폭보다 좁은 것으로 한다. 다른 이상과 구별해 기록하고, 구조 이상에는 포함하지 않는다.

6.8.8.2.6 수적이상

- (1) 동원체수가 35 이상의 배수성 세포
- (2) 핵내배가 세포

6.8.9 판정기준**6.8.9.1 염색체이상세포**

구조이상세포: 염색체구조이상을 1 개 이상 가지는 세포

수적이상세포: 염색체수적이상을 가지는 세포

6.8.9.2 데이터 채용 기준

관찰 가능한 분열 중기 세포수가 culture flask당 100 개(용량 당 200 개)의 표본의 데이터를 채용 데이터로 한다.

6.8.9.3 시험성립조건

아래의 기준을 만족 시키고 있는 경우에 시험 성립으로 한다. 아래의 기준을 만족하지 않는 경우, 그 처리 조건에 대해 재시험을 실시한다.

- (1) 음성대조군, 양성대조군 및 3 용량 이상의 시험물질 처리군에 대해서, 데이터 채용 기준을 만족시킬 것.
- (2) 음성 대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현 빈도가 5 % 미만일 것.
- (3) 양성 대조군의 경우 구조이상세포의 출현 빈도가 10 % 이상일 것.

6.8.9.4 판정기준¹⁾

1) Toshio Sofuni, editor. Data book of Chromosomal Aberration Test *In Vitro*: Revised Edition 1998. Tokyo, Life-science Information Center; 1999.

- 음성: 시험물질 처리군 중 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현 빈도가 5 % 미만인 것.
- 의양성: 시험물질 처리군 중 1 개 농도 이상에서 구조이상세포 또는 수적이상세포의 출현 빈도가 5 % 이상 10 % 미만인 것.
- 양성: 시험물질 처리군 중 1 개 농도 이상에서 구조이상세포 또는 수적이상세포의 출현 빈도가 10 % 이상이며, 용량의존적인 증가 경향이 인정된 것.

6.8.9.5 통계학적방법

판정에 통계학적 방법은 이용하지 않는다.

6.8.9.6 확인시험

6.8.9.6.1 확인시험 실시조건

염색체이상시험(본시험)의 결과가 아래의 경우에는, 해당하는 처리조건에 대해 확인시험을 실시한다.

- (1) 판정이 의양성일 경우
- (2) 염색체이상유발이 용량의존성이 인정되지 않는 경우
- (3) 염색체이상시험의 결과로부터 재검토가 필요하다고 생각할 수 있는 경우

6.8.9.6.2 확인시험의 설정농도

본시험의 결과에 근거해서 결정한다.

6.8.9.6.3 확인시험의 시험성립기준

6.8.9.3항에 따른다. 다만, (1)에 대해서는, 데이터 채용 기준을 만족시키고 있는 시험물질 처리군이 3 용량 미만인 경우도 시험 성립으로 한다.

6.8.9.6.4 확인시험의 판정기준

- 음성: 염색체이상 유발의 재현성이 인정되지 않는 경우
- 양성: 염색체이상 유발의 재현성이 인정되는 경우

7. 시험계획서의 변경 및 일탈 [SOP KG-GER-009]

7.1 시험계획서의 변경

시험책임자는 시험계획서의 승인 후 시험계획서의 변경이 필요한 경우에 운영책임자, 신뢰성보증담당자 및 시험의뢰자의 승인을 득한다.

7.2 시험계획서의 일탈

시험계획서의 일탈이 발생하는 경우, 시험책임자는 시험에 대한 영향을 평가하고 운영책임자, 신뢰성보증담당자 및 시험의뢰자에게 통보한다.

8. 최종보고서 [SOP KG-GER-013]

시험책임자는 최종보고서 초안을 작성하여 시험의뢰자 및 신뢰성보증담당자에게 송부하여 검토 요청한다. 시험의뢰자 및 신뢰성보증담당자의 검토의견을 반영하여 최종보고서를 작성하고 정본은 시험의뢰자에게 제출하며, 원본은 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에서 보관한다.

다.

9. 기록 및 자료 보관 [SOP KG-GER-011]

시험기간 중에 발생한 모든 시험기초자료는 품목허가일로부터 3년간 보관하며, 최종보고서 발급 후 5년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따른다.

9.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

9.2 보관장소

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 자료보관실(Ⅰ), (Ⅱ)

5. 요약

- β -glucan은 포도당이 β 결합으로 연결된 모든 다당체를 말한다. 주로 선천성 면역계를 자극하는데, 몸 안의 비특이적 면역 반응을 강화시키며 면역세포의 수용체와 결합하여 면역반응의 활성화를 돕는다. 본 연구에서는 β 1,3/1,6-glucan이 대식세포와 NK cell 활성화 효과와 면역 불균형을 초래하는 virus 복제 억제능에 효과가 있는지 알아보고자 하였다.
- 이에 앞서 β 1,3/1,6-glucan에 대한 안전성 평가를 위해 단회투여 독성시험과 반복독성시험을 실시하였다. ICR mice 암컷, 수컷을 이용하여 β 1,3/1,6-glucan의 2 g/kg B·W의 함량으로 각각 4마리씩 단회, 반복 투여하였다. 투여 후 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며 생존동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상유무를 검사하였다. 그 결과 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았으며 암수 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 또한 혈액학적 지표 모두 독성기준범위 이하에 나타남에 따라 β 1,3/1,6-glucan에 대한 독성은 없다고 사료된다.
- 외부 항원을 제거하는 대식세포 탐식능이 β 1,3/1,6-glucan을 처리한 후 현저하게 증가하였으며 100 ug/mL에서 효능의 포화상태를 보였다. 대식세포 활성화를 통한 다양한 화학적물질의 영향으로 활성화되는 NK cell은 β 1,3/1,6-glucan처리 시 Control군에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였으며 10 ug/mL에서 효능이 포화상태임을 확인하였다. 따라서 실질적인 산업적인 이용가치 면에서 대식세포와 NK cell 활성화에 모두 효과가 뛰어난 100 ug/mL농도를 이용하는 것이 유리할 것으로 사료된다. 또한 면역불균형을 초래하는 LP-BM5 virus 억제효과도 유의적으로 감소하는 경향을 관찰되어 이를 이용한다면 선천성 면역에 영향을 주어 면역 반응을 강화시키며 다양한 면역세포의 활성화를 도와 외부 항원이 침입할 때 빠르게 신체를 방어할 수 있을 것으로 사료된다.

6. β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성화 유도 유산균을 이용한 *in vivo* 면역 활성화 시험

- 면역 체계는 외부의 다양한 해로운 물질과 알레르겐, 감염원 등으로부터 인체를 보호하는 방어 체계로서 질병의 발생을 억제시키는 역할.
- 면역 억제와 증진의 작용으로 항상성을 유지하여 면역을 조절함.
- 면역 기능이 결핍되거나 저하된 상태에서는 면역 반응이 제대로 활성화 되지 못하고 체내의 이 물질에 대한 반응을 제대로 못하여 감염을 일으킴.

- 반대로 일부의 면역 반응이 과하게 반응하면 면역 체계가 불균형을 이루어 결과적으로 자가 면역질환, 알레르기 반응 등을 일으키게 됨.
- 따라서, 인체의 면역 반응은 균형을 이루어 조절이 정상적으로 되어야 건강함을 유지할 수 있음.
- 면역기능에 영향을 미치는 요인으로는 유전적 요인 및 환경적 요인, 노화, 성별, 육체적 및 심리적 스트레스, 영양상태, 식이습관, 질병 등이 있음.
- 이러한 요인에 의하여 체내 면역 세포 활성이 감소되거나 면역계 불균형이 일어나 질환을 유발 시킴. 노화는 면역반응에 있어 아주 중요하고 다양한 변화를 가져온다. Th1 세포 활성 IgG, IgA 등의 항체생성 능력은 감소하게 됨.
- 이러한 변화는 호르몬의 변화, 항원 노출의 축적 등 때문으로 추정되며, 세포성 면역의 감소로 이어짐. 극심한 영양결핍은 다양한 면역세포에 영향을 주고, 보체의 활성이 감소되고 대식세포의 탐식작용이 감소될 뿐만 아니라 항체 생성능력도 저하.
- “면역증강”이란 면역기능이 내부 또는 외부의 요인에 의해 저하된 상태를 정상적인 면역 기능을 유지할 수 있는 수준으로 증진시킨다는 의미. 면역결핍질환, 바이러스 감염, 영양실조, 종양, 신질환, 노화 등으로 인하여 감소된 면역반응을 증가시키는 조절작용임. 면역기능증강 건강기능식품이란 광범위하게는 면역반응의 이상을 정상화하는데 도움을 줄 수 있는 기능을 나타내는 식품이라고 정의할 수 있음.
- 하지만, 보다 직접적으로 저하된 면역기능을 증강시킬 수 있는 식품을 의미하고, 정상 면역기능을 증진시키는 경우도 포함함. 국내 소비자들은 면역능력과 관련하여 면역력증가(37.8%), 감기에 방(24.3%), 질병예방(15.3%) 등 기대효과를 예상하고 있는 것으로 조사되었음.
- 최근 사스(SARS, Severe Acute Respiratory Syndrome, 급성 중증 호흡기 증후군) 및 신종인플루엔자 A(Novel swine-origin influenza A(H1N1)) 등과 같은 질병이 발생하고 빠른 속도로 확산되면서 면역기능증진 관련 식품에 대한 관심이 더욱 증대되었으며, 이에 대한 필요성은 연령·성별 구분 없이 증가하고 있으므로 면역증강에 대한 체계적인 핵심기술 개발이 시급함.
- 산업화, 환경의 오염, 고령화 등으로 자가면역질환 등 면역질환 유병률의 급속한 증가, 심각한 만성, 난치성 질환환자가 많아지면서 면역력 저하 인구도 급증하고 있으므로 이에 따른 임상 및 기초연구가 전 세계적으로 진행되고 있으며, 그 필요성 또한 급증하고 있음.

- 하지만, 치료방법의 한계성 및 예방의학의 부족으로 자연스럽게 건강기능식품에 대한 관심이 고조되고 있으며 영양불량이 곧 면역 기능 저하와 직접적 관련이 있다는 연구결과 등 영양과 인체 면역기능 조절과의 긍정적 상관관계 규명에 따른 건강식품에 의한 인체 면역기능조절 관련 제품, 특히 면역기능증진제품에 대한 관심이 급증하고 있음.
- 최근 건강기능식품 업계에서는 새로운 소재를 개발함과 동시에 예산절감과 효율성 증대를 위해 기존의 소재에 대한 기능성 재평가와 기능성 범위 확대에 투자를 하는 경향을 보이고 있음. 이에 황칠 복합물을 이용한 면역조절 기능을 연구하는 것은 최근 업계의 트렌드와 부합됨.

가. 실험 방법

(1) 동물처리

- 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 20 g 내외의 4주령 암컷 C57BL/6 마우스를 공급받았으며, 명암은 12시간(light/dark cycle), 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $50\pm 5\%$ 인 조건에서 1주 동안 적응기를 거쳐 실험에 이용하였다. 적응기간 동안 AIN-93G 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 적응기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다.

(2) LP-BM5 바이러스 감염 및 식이 제작

- 면역과피 유발 동물 모델을 만들기 위하여 마우스에서 면역체계를 무너뜨리는 바이러스인 LP-BM5를 SC-1세포의 배양액으로부터 얻은 뒤, 병원균에 민감한 종류인 C57BL/6 마우스에 복강 내 주사하여 1차 감염시키고, 5일 후 동일한 방법으로 2차 감염시켜, LP-BM5 바이러스 감염을 유발시켰다. 바이러스에 감염되어 면역 체계가 붕괴 된 마우스를 12 주 동안 20% 주정 잿피 추출물이 함유된 식이를 제공하면서 식이량, 체중을 매주 2회씩 측정하고 12주 후 희생시켰다. 소재의 농도는 250 mg/kg의 body weight와 500 mg/kg body weight가 되도록 조절하여 제작하였다.

Table 14. Experimental design of animal.

(n=6/group)

Group	면역결핍	제공식이
NC	-	AIN 93G
LP-BM5	+	AIN 93G
RG	+	RedGinseng 200 mg/kg B.W. in AIN 93G
LI	+	<i>L. plantarum</i> 1 x 10 ⁹ CFU/kg B.W. in AIN 93G
BI	+	β 1,3/1,6-glucan 200 mg/kg B.W. in AIN 93G
LIBI	+	<i>L. plantarum</i> 1 x 10 ⁹ CFU/kg B.W. + β 1,3/1,6-glucan 200 mg/kg B.W. in AIN 93G
LIBh	+	<i>L. plantarum</i> 1 x 10 ⁹ CFU/kg B.W. + β 1,3/1,6-glucan 500 mg/kg B.W. in AIN 93G

(3) 혈청 및 조직 처리

- 실험동물은 12시간 절식하고 마취 후 개복하여 장기(비장, 간, 림프절)를 적출한 다음 중량을 측정하였다. 비장은 적출 즉시 Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)로 세척하여 0.45 μ m cell strainer (BD biosciences, San Diego, USA)을 사용하여 얻어진 세포 부유액을 Red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켰다. 분리된 비장세포를 Cytokine과 T, B 세포 증식능 측정에 이용하였다. 분리한 복강대식세포는 대식세포 활성화 측정에 이용하였다.

(4) 세포 증식능 측정

- 분리한 비장세포를 96 well plate에 각 well당 1X10⁶ cells/well로 분주하였으며, T 세포 Mitogen인 ConA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 5 μ g/mL과 B 세포 Mitogen인 LPS (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 5 μ g/mL을 처리한 후 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 48시간 후 Ez-Cytox (Dugen, Seoul, Korea)용액 20 μ L를 첨가하고 ELISA reader (VERSAMAXSL-20 Molecular Devices, Korea)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Cytokine 분비량 측정

- 분리한 비장세포를 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well씩 분주하였으며, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- γ 는 ConA를 각 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였다. IL-6, TNF- α 는 LPS를 각 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였으며, 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α 는 24시간 후, IL-12, IL-15는 48시간 후, IFN- γ 는 72시간 후에 상층액을 수거하여 DuoSet ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하여 ELISA reader로 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 혈청 Immunoglobulin 측정

- 분리한 혈청으로 Immunoglobulin G (IgG), Immunoglobulin A (IgA), Immunoglobulin E (IgE) mouse elisa kit (Abcam, Massachusetts, UK)를 이용하여 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

(7) 통계처리

- 본 연구는 SPSS (Statistical Package for the Social Science) version 22 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였음. 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 p<0.05 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

나. 실험 결과

- *in vivo* 면역 조절 효능 실험 전 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균 혼합물식이 농도 결정을 위하여 대식세포 활성능 측정한 결과 Fig. 14에 나타내었다. 실험 결과, NC군에 비하여 zymosan군에서 대식세포 활성능이 유의적으로 증가하였다. NC군에 비하여 inhibitor, zymosan+inhibitor군에서 대식세포 활성능이 유의적으로 차이가 없었으며, Lh+Bi군과 Lh+Bh군은 zymosan군에 비하여 유의적으로 대식세포 활성능이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 Lh+Bi군과 Lh+Bh군은 NC, inhibitor, zymosan+inhibitor군과 비교하여 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.
- 이러한 결과로 보았을 때 β 1,3/1,6-glucan과 *L. plantarum* 균주를 동시에 처리하였을 경우, 면역 증가율이 높아짐을 알 수 있었다. 향후 추가적으로 β 1,3/1,6-glucan과 *L. plantarum* KKY-135의 사용량에 따른 시험을 진행하여 β 1,3/1,6-glucan과 *L. plantarum* KKY-135의 처리에 따른 이중면역 효능을 진행해야 할 것으로 판단된다.

- β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 실험동물의 체중변화와 식이효율에 미치는 영향을 조사하였다. 실험기간 10주 동안 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 LP-BM5 murine AIDS virus에 감염된 면역 결핍동물 모델의 체중 변화와 식이효율에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 14에 나타내었다. 체중과 식이 효율을 측정한 결과, NC 군에 비해 모든 식이섭취군에서 유의적으로 차이가 없음을 확인하였다. 따라서 본 실험을 통해 얻어진 연구 결과의 경우, 실험 대상의 식이섭취에 따라 독성 여부 및 면역 활성화에 영향을 주지 않았음을 확인할 수 있었다.
- 또한 개상 실험동물의 장기무게 변화를 측정한 결과, 실험기간 10주 동안 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 LP-BM5 murine AIDS virus에 감염된 면역 결핍동물 모델의 장기 무게에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 2에 나타내었다. 비장(spleen)은 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군이 0.54 ± 0.01 g으로 바이러스 감염이 안 된 NC군 0.10 ± 0.03 g에 비해 유의적으로 증가하였으며, 바이러스가 감염된 Infection군에 비하여 식이를 섭취한 모든군에서 유의적으로 비장의 무게가 감소하였다. 림프절(Lymph node)는 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군이 1.70 ± 0.27 g으로 바이러스 감염이 안 된 NC군 0.02 ± 0.01 g에 비해 유의적으로 증가하였으나. 간(Liver)와 신장(Kidney)의 무게는 그룹 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

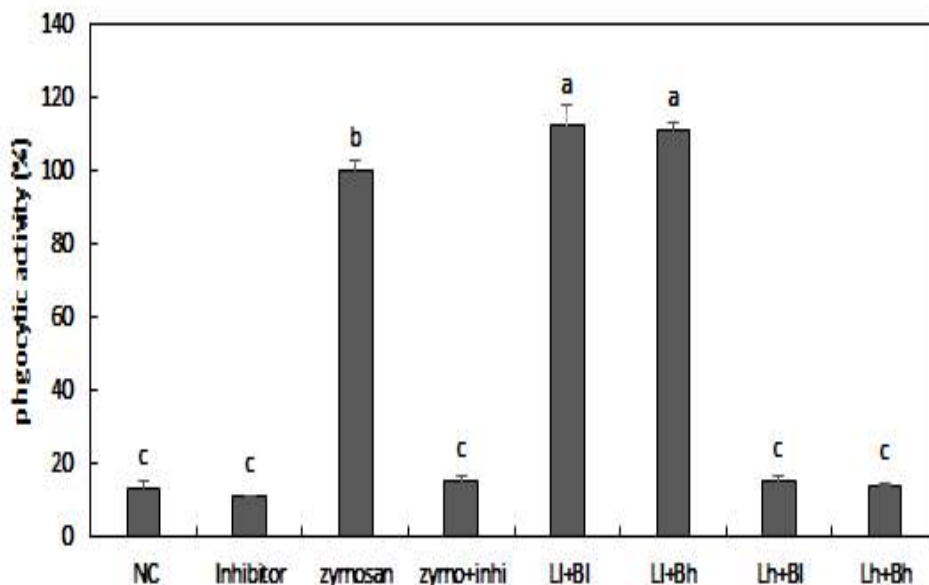


Fig. 14 Effect of β 1,3/1,6-glucan and *L. plantarum* on Phagocytic activity from macrophage in C87BL/6 mice. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of β -1,3/1,6-gucan, compared with treated zyosan (cell+zy) cells, taken as 100%. Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as

determined by Duncan' s multiple range test. NC; cell only, Inhibitor; cell + zymosan inhibitor, zymosan; cell + zymosan, zymo+inhi; cell + zymosan + zymosan inhibitor, Ll+Bl; *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU + β 1,3/1,6-glucan 10 μ g/mL, Ll+Bh; *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU + β 1,3/1,6-glucan 150 μ g/mL, Lh+Bl; *L. plantarum* 1 x 10¹⁰ CFU + β 1,3/1,6-glucan 10 μ g/mL, Ll+Bh; *L. plantarum* 1 x 10¹⁰ CFU + β 1,3/1,6- glucan 150 μ g/mL

Table 14. Mice body weight gain, food consumption and food efficiency rate of experimental groups for 10 weeks.

(n=6/group)

Group ¹⁾	Weight gain ²⁾ (g)	Food consumption ³⁾ (g/day)	FEF ⁴⁾ (Food efficiency rate)
NC	16.75 ± 1.59 ^a	2.97 ± 0.61 ^a	10.08 ± 0.96 ^a
LP-BM5	16.50 ± 1.25 ^a	2.67 ± 0.71 ^a	11.02 ± 0.84 ^a
RG	16.88 ± 3.96 ^a	3.16 ± 0.48 ^a	9.54 ± 2.24 ^a
Ll	19.77 ± 2.11 ^a	3.12 ± 0.52 ^a	11.31 ± 1.21 ^a
Bl	16.60 ± 2.54 ^a	3.16 ± 0.42 ^a	9.39 ± 1.44 ^a
Ll+Bl	17.92 ± 3.71 ^a	3.04 ± 0.37 ^a	10.52 ± 2.18 ^a
Ll+Bh	17.62 ± 3.33 ^a	3.05 ± 0.34 ^a	10.32 ± 1.95 ^a

Values are presented as means ± SD. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan' s multiple range test.

¹⁾NC : Normal control, LP-BM5 : LP-BM5 virus injection, RG : LP-BM5 virus injection + RedGinseng 200 mg/kg B.W., Ll : LP-BM5 virus injection + *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU/kg B.W., Bl : β 1,3/1,6-glucan 200 mg/kg B.W., Ll+Bl : LP-BM5 virus injection + *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU/kg B.W. + β 1,3/1,6-glucan 200 mg/kg B.W., Ll+Bh : LP-BM5 virus injection + *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU/kg B.W. + β 1,3/1,6-glucan 500 mg/kg B.W.,

²⁾Weight gain (g/10weeks) = final body weight (g) -initial body weight (g)

³⁾Food consumption (g/day) = food consumption (g/day)

⁴FER (Food efficiency rate) = {weight (g) / food intake (g) } * 100

⁵ns : no significant difference

Table 15. Liver, Kidney, Spleen, and Lymph node weight of experimental groups for 10 weeks.

Group ¹⁾	Liver(g)	Kidney(g)	Spleen(g)	Lymph node(g)
NC	1.32 ± 0.13 ^a	0.31 ± 0.02 ^b	0.08 ± 0.03 ^d	0.02 ± 0.01 ^d
LP-BM5	1.63 ± 0.14 ^a	0.32 ± 0.02 ^{ab}	0.53 ± 0.01 ^a	1.70 ± 0.27 ^a
RG	1.32 ± 0.44 ^a	0.33 ± 0.02 ^{ab}	0.43 ± 0.05 ^{bc}	0.78 ± 0.14 ^c
Ll	1.66 ± 0.17 ^a	0.31 ± 0.02 ^b	0.44 ± 0.07 ^b	0.95 ± 0.18 ^{bc}
Bl	1.31 ± 0.24 ^a	0.36 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.08 ^c	0.73 ± 0.08 ^c
Ll+Bl	1.57 ± 0.40 ^a	0.34 ± 0.04 ^{ab}	0.48 ± 0.04 ^b	1.12 ± 0.06 ^b
Ll+Bh	1.45 ± 0.28 ^a	0.31 ± 0.02 ^{ab}	0.47 ± 0.08 ^c	1.05 ± 0.11 ^b

Values are presented as means ± SD. Different letters show a significant difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

¹⁾NC : Normal control, LP-BM5 : LP-BM5 virus injection, RG : LP-BM5 virus injection + RedGinseng 200 mg/kg B.W., Ll : LP-BM5 virus injection + *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU/kg B.W., Bl : β 1,3/1,6-glucan 200 mg/kg B.W., Ll+Bl : LP-BM5 virus injection + *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU/kg B.W. + β 1,3/1,6-glucan 200 mg/kg B.W., Ll+Bh : LP-BM5 virus injection + *L. plantarum* 1 x 10⁹ CFU/kg B.W. + β 1,3/1,6-glucan 500 mg/kg B.W.,

○ 또한, T cell & B cell 세포 증식능 측정된 결과, 실험기간 10주 동안 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 LP-BM5 murine AIDS virus에 감염된 면역 결핍동물 모델의 T cell과 B cell의 세포증식능에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig 15에 나타내었다. T 세포 증식능 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 감소하였다.

○ 식이섭취군 모두에서 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 특히, Bl군, Ll+Bh군은

Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 감소된 T 세포 증식능을 증가시키는 것으로 나타났다. B 세포 증식능 측정 결과 바이러스 감염이 안된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 또한, 식이섭취군 모두에서 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하였음을 알 수 있었으며, 특히, LI군, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘 알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 증가된 B세포 증식능을 감소되었다.

- 실험 동물을 대상으로 Th1 cytokine 분비량 측정한 결과, 실험기간 10주 동안 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 LP-BM5 murine AIDS virus에 감염된 면역 결핍동물 모델의 Th1 type cytokine 분비량 결과는 Fig. 16에 나타내었다. IL-2 측정 결과 바이러스 감염이 안된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 감소하였다. BI군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으나 LI군과 LI+BI군에서는 Infection군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 특히, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 감소된 IL-2분비량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과로 보아 β 1,3/1,6-glucan+유산균 처리에 따른 면역 효능이 증가함을 확인할 수 있었다. IL-12 측정 결과 바이러스 감염이 안된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 감소하였으며, BI군과 LI+BI군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으나 LI군에서는 Infection군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.
- 특히, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 감소된 IL-12분비량을 증가시키는 것으로 보아 β 1,3/1,6-glucan+유산균 처리에 따른 이중 면역 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 감소된 IL-15분비량을 증가시켰으며, IFN- γ 측정 결과 바이러스 감염이 안된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 감소하였다.

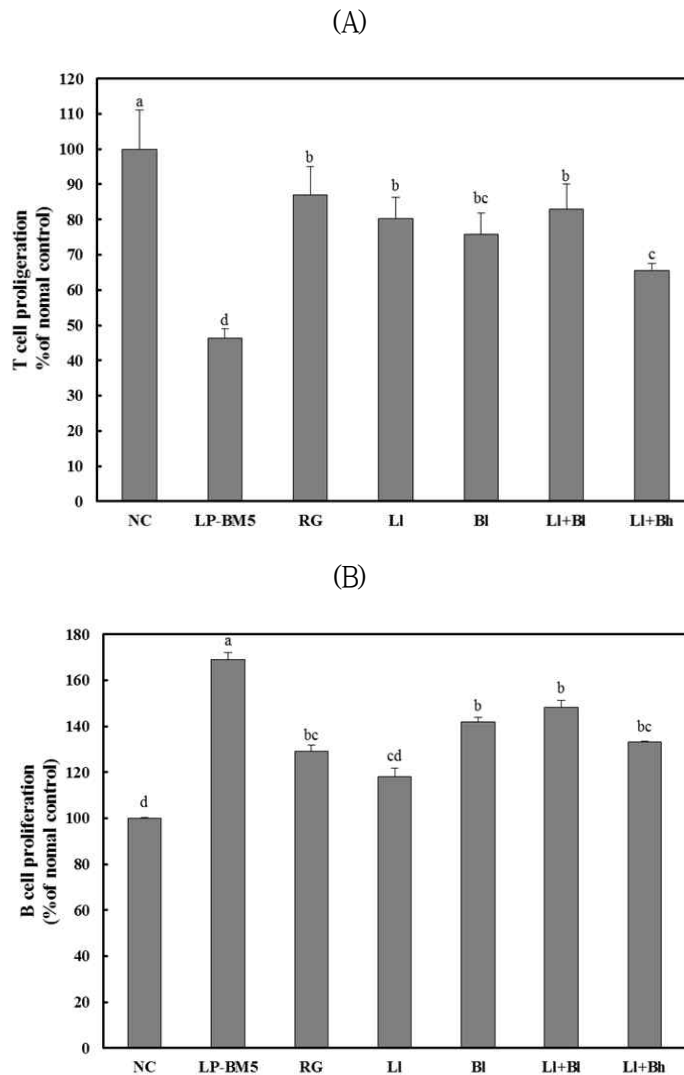
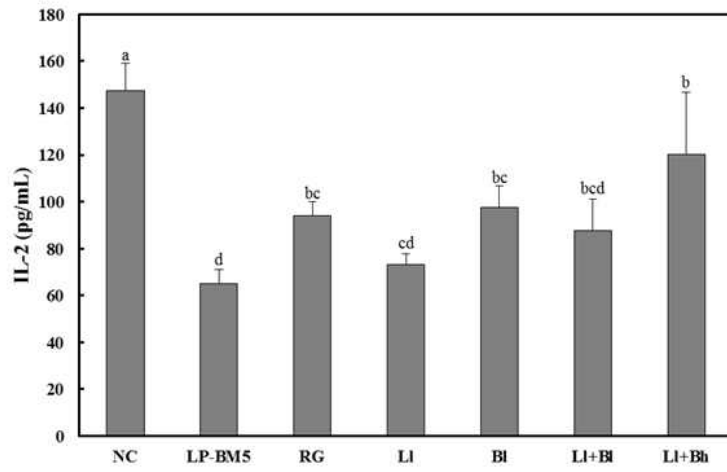


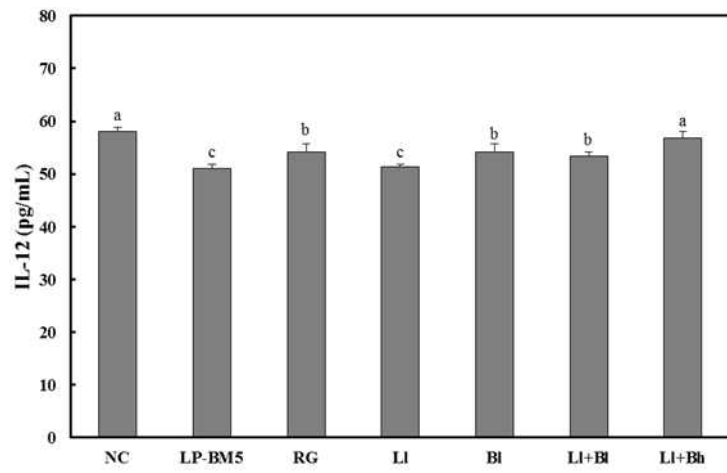
Fig. 15 Effect of β 1,3/1,6-glucan and *L. plantarum* on T and B cell proliferation from splenocytes in C87BL/6 mice with or without LP-BM5 virus. (A) T cell, (B) B cell.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. NC; Non Infection, LP-BM5; LP-BM5 virus infection, RG; LP-BM5 virus infection + Red Ginseng 200 mg/kg B.W, LI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W, BI; LP-BM5 virus infection + β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+BI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+Bh; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 500mg/kg B.W.

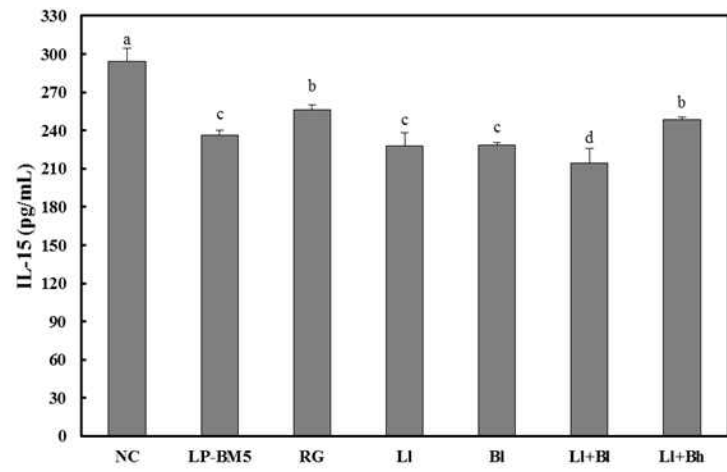
(A)



(B)



(C)



(D)

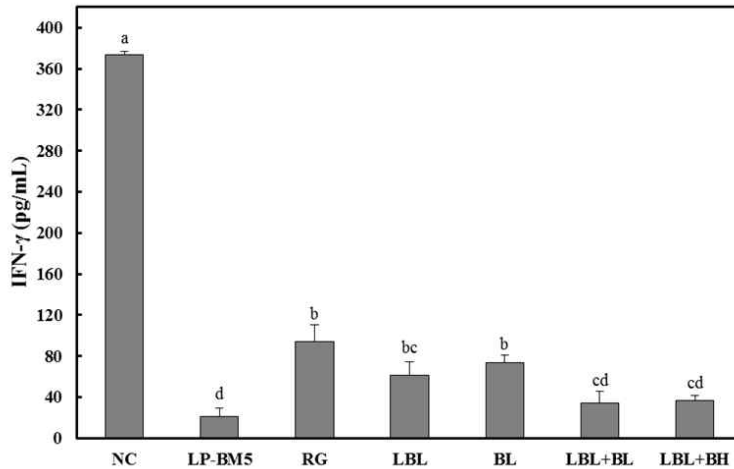


Fig. 16 Effect of β 1,3/1,6-glucan and *L. plantarum* on Th1 cytokines from splenocytes in C87BL/6 mice with or without LP-BM5 virus. (A) IL-2, (B) IL-12, (C) IL-15, (D) INF-gamma.

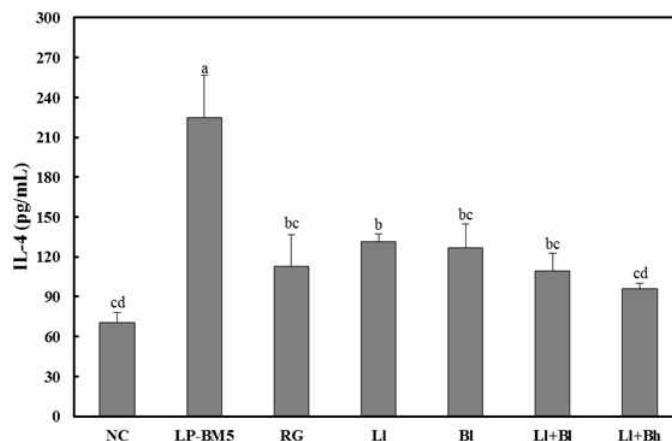
Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. NC; Non Infection, LP-BM5; LP-BM5 virus infection, RG; LP-BM5 virus infection + Red Ginseng 200 mg/kg B.W, LI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W, BL; LP-BM5 virus infection + β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+BL; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+Bh; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 500mg/kg B.W.

- Th2 cytokine 분비량 측정 결과, 실험기간 10주 동안 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 LP-BM5 murine AIDS virus에 감염된 면역 결핍동물 모델의 Th2 type cytokine 분비량 결과는 Fig 17에 나타내었다. IL-4 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였으며, 식이를 섭취한 모든군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 증가된 IL-4분비량을 감소시키는 것으로 나타났다.
- IL-6 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였으며, 식이를 섭취한 모든군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 특히, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘 알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 증가된 IL-6분비량을 감소시켰으며, IL-10 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였는 결과를 얻을 수 있었다. 특히, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 증가하였으며 면역조절로 잘알려진 RG군과 비교하여도 유의적

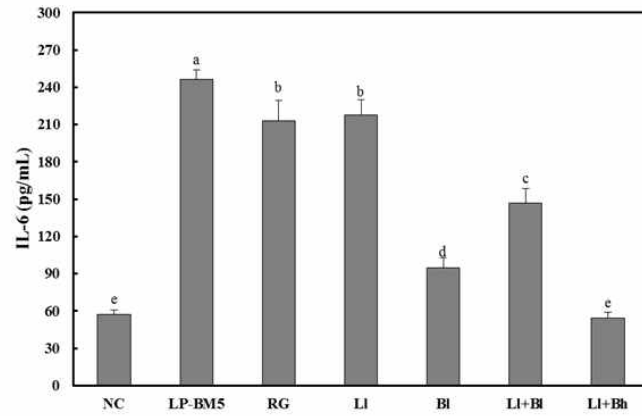
으로 증가된 IL-10분비량을 감소시키는 것으로 나타났다.

- TNF- α 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였으며, LI+BI군의 경우를 제외한 식이를 섭취한 모든군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하였다.
- 면역글로블린 분비량 측정의 결과, 실험기간 10주 동안 β 1,3/1,6-glucan, 유산균, β 1,3/1,6-glucan+유산균이 LP-BM5 murine AIDS virus에 감염된 면역 결핍동물 모델의 면역글로블린 분비량 측정 결과는 Fig 18에 나타내었다. IgE 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였다. 식이를 섭취한 모든군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하였다.
- 특히, LI군, LI+BL군, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하였으며 면역조절로 잘 알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 증가된 IgE분비량을 감소시켰다. IgA 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였으며, 식이를 섭취한 모든군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다.
- 특히, LI군, LI+BL군, LI+Bh군은 Infection군에 비하여 유의적으로 감소하였으며 면역조절로 잘 알려진 RG군과 비교하여도 유의적으로 증가된 IgA분비량을 감소시키는 것으로 나타내었다. IgG 측정 결과 바이러스 감염이 안 된 NC군에 비해 바이러스 주입 후 일반 AIN-93G 식이를 섭취한 Infection군의 증식능이 유의적으로 증가하였다.

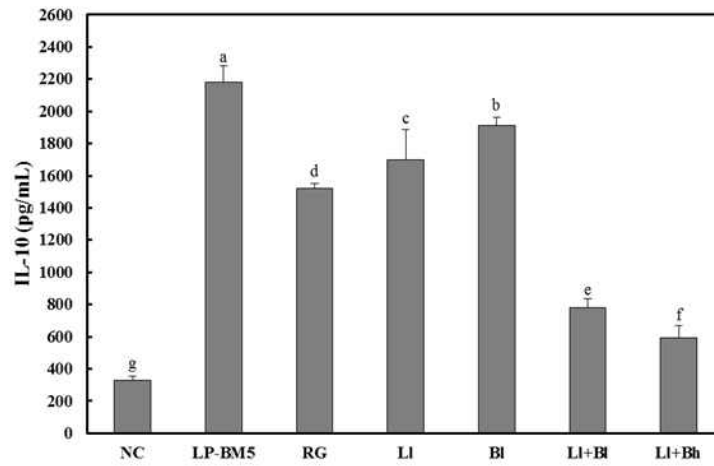
(A)



(B)



(C)



(D)

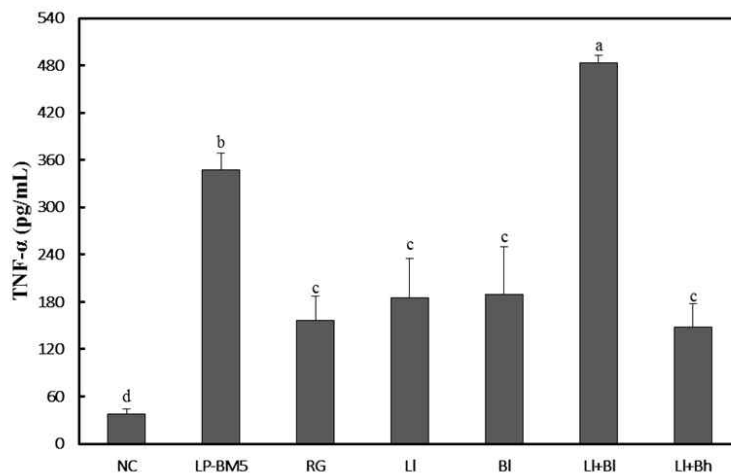
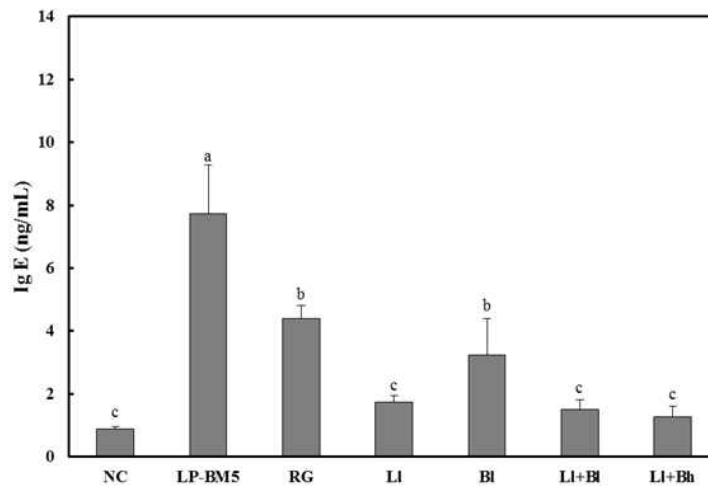


Fig. 17 Effect of β 1,3/1,6-glucan and *L. plantarum* on Th2 cytokines from splenocytes in C87BL/6

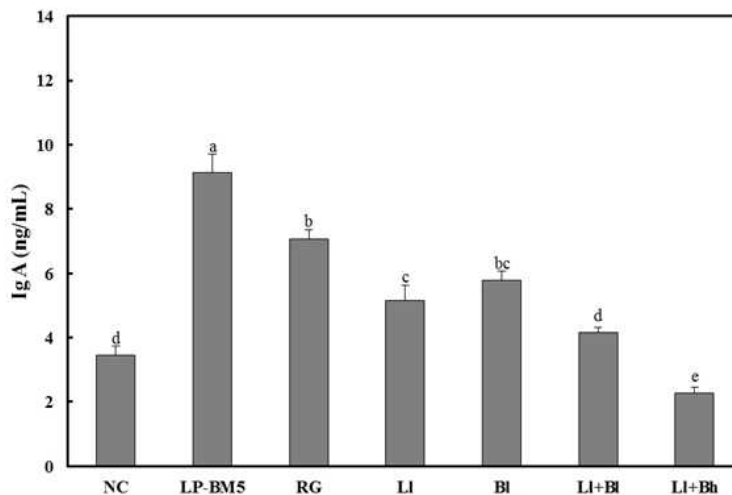
mice with or without LP-BM5 virus. (A) IL-4, (B) IL-6, (C) IL-10, (D) TNF-alpha.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. NC; Non Infection, LP-BM5; LP-BM5 virus infection, RG; LP-BM5 virus infection + Red Ginseng 200 mg/kg B.W, LI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W, BI; LP-BM5 virus infection + β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+BI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+Bh; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 500mg/kg B.W.

(A)



(B)



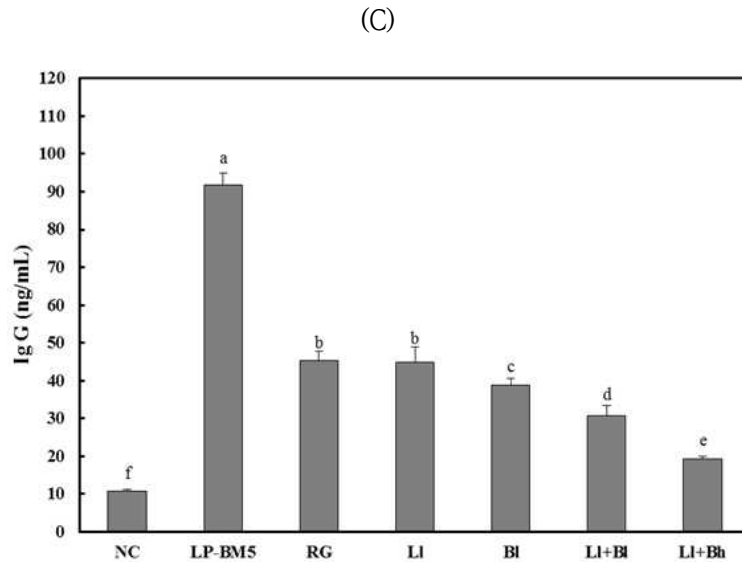


Fig 18 Effect of β 1,3/1,6-glucan and *L. plantarum* on Immunoglobulin E from serum in C87BL/6 mice with or without LP-BM5 virus. (A) Immunoglobulin E, (B) Immunoglobulin A, (C) Immunoglobulin G.

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. NC; Non Infection, LP-BM5; LP-BM5 virus infection, RG; LP-BM5 virus infection + Red Ginseng 200 mg/kg B.W, LI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W, BI; LP-BM5 virus infection + β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+BI; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 200mg/kg B.W, LI+Bh; LP-BM5 virus infection + *L. plantarum* 1×10^9 CFU/kg B.W and β 1,3/1,6-glucan 500mg/kg B.W.

임상시험계획서

건강한 대상자를 대상으로 베타글루칸 및 유산균 복합제의 면역 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험

Protocol No.; SUNIL_GLUPB_01

Approval Date: 2016. 05. 03, Version 1.0

기밀유지

임상시험계획서에 포함된 정보는 (주)선일바이오의 독점자산이며 시험기관장, 임상시험 책임자, 임상시험 담당자, 관련 행정기관, 임상시험기관의 생명윤리위원회(IRB)를 위한 것입니다. 본 계획서는 임상시험을 실시 또는 평가하기 위한 목적으로만 사용할 수 있으며, 이외의 목적으로 사용하고자 하는 경우에는, (주)선일바이오의 서면동의가 필요하며, 문서의 기밀사항은 유지되어야 한다.

의뢰자 서명 페이지

Document Identification:

본 임상시험 계획서를 (주)선일바이오가 검토하고 승인하였습니다.

Approved by:

서명

Date(YYYY/MM/DD)

성명: 조경현

직책: 연구소장

시험책임자 서명

본인은 의뢰자, 의뢰자의 대리인과 이 연구의 목적 및 이 임상시험계획서의 내용에 대해 충분히 논의를 했습니다.

본인은 이 임상시험계획서에 포함되거나 속한 정보가 기밀이며 의뢰자로부터 서면 허가 없이, 이 연구의 실행이나 윤리 심사에 직접적으로 관련된 사람들을 제외하고 다른 사람에게 공개하지 말아야 함을 알고 있습니다. 그러나 동의를 얻기 위해 피험자에게 정보를 제공하는 것은 허용됩니다.

본인은 의뢰자 직원, 의뢰자의 대리인들과 관련 규제 당국이 본인의 증례기록서에 기재한 자료를 확인하기 위해 본인 피험자들의 연구기록을 이용가능 하도록 하는데 동의합니다. 본인의 의뢰자가 부여한 바와 같은 시험책임자로서의 본인의 책임을 알고 있습니다.

본인은 임상시험이 국제임상시험관리기준인 ICH GCP(International Conference on Harmonisation Guideline for Good Clinical Practice)에 따라 진행되어야 함에 동의하고 헬싱키 선언에 근거한 원칙과 특히 생명윤리위원회(IRB), 피험자 서면동시에 관련된 의무를 받아들입니다. 또한 자료의 제공, 모니터링, 점검, 실태조사 등을 허락하며 비밀보장의 의무를 준수합니다.

Approved by:

서명

Date(YYYY/MM/DD)

성명: 김형준

소속: 세명대학교한방병원

임상시험계획서 요약

의뢰인(신청회사)	(주)선일바이오									
제품명(코드명)	베타글루칸+유산균									
시험제목	건강한 대상자를 대상으로 베타글루칸 및 유산균 복합제의 면역 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험									
시험목적	<p>유효성</p> <p>일차목적: 시험물질 투여 전 및 후 12주에 평가되는 혈액내 T cell 및 B cell (subset포함)의 변화</p> <p>이차목적:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화 2. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화 3. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화 4. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화 5. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화 6. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화 7. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화 <p>안전성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 이상반응 2. 활력징후 3. 임상실험실검사 									
시험디자인	플라세보대조, 임상시험									
임상시험용시험물질	<p>시험물질</p> <table border="1" data-bbox="491 1541 1375 1756"> <tr> <td>제조회사</td> <td>(주)선일바이오</td> </tr> <tr> <td>제품성상</td> <td>포</td> </tr> <tr> <td>성분</td> <td>베타글루칸+ 유산균</td> </tr> <tr> <td>저장방법</td> <td>기밀용기, 실온보관(1-30℃)</td> </tr> </table> <p>플라세보</p> <p>플라세보 (주성분을 제외한 성상은 시험물질과 동일)</p> <p>1일 1회 1회당 1포 복용 (아침식후 복용)</p>		제조회사	(주)선일바이오	제품성상	포	성분	베타글루칸+ 유산균	저장방법	기밀용기, 실온보관(1-30℃)
제조회사	(주)선일바이오									
제품성상	포									
성분	베타글루칸+ 유산균									
저장방법	기밀용기, 실온보관(1-30℃)									
유효성 평가변수	1차 유효성평가변수:									

	<p>Baseline으로부터 시험물질 투여 전 및 후 12주째의 평가되는 혈액내 T cell 및 B cell(subset포함)의 변화</p> <p>2차 유효성 평가변수:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화 2. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화 3. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화 4. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화 5. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화 6. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화 7. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화
안전성 평가변수	이상반응, 활력징후 및 임상적 실험실적 검사 결과
선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 만 18세 이상 70세 미만의 남, 여 피험자 2. 최근3개월 이내 상기도감염을 겪은 피험자 3. 스크리닝방문시 WBC 수치가 $6.0 \times 10^9/L$ 이하인 피험자 4. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 임상시험동의서에 서명하고 동의한 피험자
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 글루칸 및 유산균 성분에 알레르기가 있는 피험자 2. 스테로이드 체제를 사용하고 있는 피험자 3. 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 피험자 4. 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 피험자 5. 1개월 이내에 다른 임상시험 또는 임상시험에 참여한 피험자 6. BUN 수치가 정상치의 2 배이상인 피험자 7. 갑상선질환 피험자 8. Serum creatinine 이 1.5mg 이상인 피험자 9. 정신질환(우울증, 정신분열등) 피험자 10. 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 피험자 11. 임신 혹은 수유 중인 피험자 12. 임신 가능성이 있는 가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외) 13. 기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자
시험중지/탈락기준	<ol style="list-style-type: none"> ① 선정/제외기준에 위반 된 경우 ② 피험자 본인, 또는 그들의 법적 대리인이 자발적인 중지 요청이 있을 경우 ③ 시험 전 평가에서 발견하지 못한 중대한 증상이나 질환이 확인된 경우 ④ 피험자가 자의로 중단하고 연락이 안 되는 경우 ⑤ 결과에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경우 ⑥ 시험자나 피험자에 의해 시험계획을 위반하는 경우

	<p>⑦ 기타 시험담당자의 판단에 의해 시험 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우</p> <p>⑧ 의뢰자가 특별한 요청을 할 때</p> <p>⑨ 시험자가 시험의 지속이 피험자의 복지에 해를 끼칠 것이라고 판단한 경우</p>
목표 피험자 수	각 군당 목표 피험자 수는 20명(총 40명)이고, 탈락율 10%를 고려하여 본 임상시험에 필요한 피험자 수는 각 군당 23명으로 총 46명이 된다.
비용금지약물	<p>본시험의 비용금지약물은 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 면역억제제 2) Steroids제제 3) 건강기능식품(면역기능개선등) <p>그외 약물은 피험자의 건강상태를 고려하여 연구자가 판단하여 비용시 그 사유를 기록하도록 한다.</p>
임상시험 기간	첫번째 환자 모집일로부터 12개월
통계분석방법	<p>베타글루칸 및 유산균제제 투여 후 각 투여군에서의 면역개선효과를 플라세보군과 비교 검정하는 방법으로 투여 후에 면역기능개선에 대한 T cell 및 B cell의 증가율을 비교하여 두 군 사이에 차이가 있는지 카이제곱 검정 또는 Fisher's exact test를 이용하여 검정한다. 베타글루칸+유산균제제 투여군에서의 측정결과 T cell 및 B cell 개선율이 통계학적으로 유의하게 높다면 플라세보군에 비해 우월하다고 판정한다. 또한, 임상시험 개시 전과 개시 후의 T cell 및 B cell 수치의 변화량이 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하기 위하여 Student t-test 또는 비모수 검정법인 Mann-Whitney U test를 이용한다. 개시시점 대비 종료 시점 시 군내 변화량에 차이가 있는지는 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용한다.</p> <p>본 임상시험의 피험자로부터 얻어진 자료는 크게 ITT(intention to treat)분석법과 PP(per protocol)분석법의 두 가지 형태로 분석할 것이다. ITT 분석법은 최소한 한 번이라도 시험물질물을 투여 받은 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함한다. 이때 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 임상시험이 종료되기 전에 피험자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당 시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실시(Last Observation Carried Forward Analysis)하는 방법으로 분석한다. 본</p>

임상시험에서는 ITT 분석을 주분석으로 하고 PP 분석을 별도로 실시하여 ITT 분석 결과와 차이가 있는지 평가할 것이다.

임상시험일정표

시 험 항 목	Screening	Baseline	Treatment	Final V
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit
	첫 투여 전 14 일 이내	Week 0 (Day 0)	Week 6 (Day 42±3)	Week (Day84)
서면동의 ¹⁾	n			
인구학적 조사 ²⁾	n			
병력/약물력 조사 (시험참여4주이내)	n			
활력징후 ³⁾	n	n	n	n
신체검사 ⁴⁾	n	n	n	n
실험실 검사 ^{5, 6)}	n	(n)		n
T cell 및 B cell 검사 ^{5, 6)}	n	(n)		n
선정/제외기준 ⁷⁾	n	n		
무작위 배정		n		
임상시험물질 처방 및 교부		n	n	
임상시험물질 반납 및 순응도 평가			n	n
병용 약물 조사	n	n	n	n
이상반응 확인			n	n
임상시험 종료 평가				n

임상시험에 들어가기 전, 본 임상시험의 목적과 내용에 대하여 피험자 및 보호자(법적 대리인)에게 상세히 설명한 후 각각에 대하여 문서로서 동의를 받는다. 서면 동의 취득은 어떠한 임상시험 과정보다도 앞서서 이루어져야 하며 동의서는 피험자 및 보호자(법적 대리인)가 직접 서명 및 날짜를 기입하는 것을 원칙으로 한다.

- 1) 모든 동의를 취득한 이후에 성별, 나이, 체중등의 정보를 조사한다.
- 2) 좌위 수축기/이완기 혈압, 맥박 및 체온등을 측정한다.

- 3) 시험책임자 또는 시험담당자가 피험자에게 문진, 시진, 촉진, 청진 등의 검사를 통해 얻게 되는 정보이다 (신장/체중은 시험기간 중 동일한 자동측정기를 이용하고 신장은 첫 방문 시에만 측정하며 신을 벗고 cm 단위로 측정한다.
- 4) 피험자는 다음의 항목을 검사한다
 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono).
 T cell / B cell (subset 포함), NK cell
 혈액화학적 검사: BUN, creatinine
 뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose
 임신검사 : 가임기여성에 한하여 urine으로 측정한다.
 * 혈액화학/뇨검사/임신검사(해당하는경우)/T cell 및 B cell 검사는 실험실검사에서 선정기준에 적합한 경우에만 실시하도록 한다.
- 5) 피험자는 채혈하기 가능한 전날 8시간 이상 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다
- 6) 선정/제외기준은 Screening 방문 시에 확인한다. 기준에 적합한 피험자는 순차적으로 피험자 등록번호가 부여된다.
- 7) 시험자의 판단에 따라 시험물질 최종 투여 후 혹은 조기 투여 중지 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 4주 이내 다시 방문하도록 함.

목 차

의뢰자 서명 페이지	2
시험책임자 서명	3
임상시험계획서 요약	4
임상시험일정표	7
목 차	8
약어	11
1 시험의 명칭 및 단계	12

2	임상시험기관의 실시기관명 및 주소	12
3	시험의 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명	12
4	시험용 건강기능식품등을 관리자의 성명 및 직명	12
5	임상시험의 의뢰자명 및 주소	12
6	임상시험의 목적 및 배경	13
6.1	임상시험의 목적	13
6.2	임상시험의 배경	13
6.3	용량설정의근거	14
7	피험자 선정/제외 기준	14
7.1	선정기준	14
7.2	제외기준	14
7.3	중도탈락	15
7.3.1	시험중지 및 탈락기준	15
7.3.2	개별 피험자의 조기 종결	16
7.4	목표한 피험자의 수 및 그 근거	16
7.4.1	목표한 피험자의 수	16
8	임상시험물질	17
8.1	임상시험용 건강기능식품 및 플라세보	17
8.2	임상시험용 건강기능식품의 포장	17
8.3	임상시험용 시험물질의 공급 및 수불관리	18
9	임상시험의 방법	18
9.1	투여일정	18
9.2	임상시험의 기간	18

9.3	시험디자인	19
9.4	무작위배정 및 눈가림 방법	19
9.5	맹검해제 방법	19
9.6	임상시험일정표	19
10	관찰항목, 임상검사항목 및 관찰 검사방법	20
10.1	관찰검사방법	20
11	예측 이상반응 및 사용상의 주의사항	22
11.1	예측 이상반응	22
12	유효성 및 안전성 평가변수, 평가방법 및 해석방법	23
12.1	유효성 평가변수	23
12.2	안전성 평가변수	23
12.3	분석에 포함되는 피험자 집단 (Study Population)	23
12.3.1	FAS (Full Analysis Set)	23
12.3.2	PPS (Per-Protocol Set)	24
12.3.3	Safety Set	24
12.4	결측치 처리 방법	24
12.5	해석방법	24
12.5.1	인구통계학적 자료와 임상병력 자료	24
12.6	유효성 평가분석방법	24
12.7	안전성 평가분석방법	25
12.7.1	이상반응	25
12.7.2	실험실 검사 및 활력징후, 신체 검사	25
13	이상반응을 포함한 안전성 평가기준, 평가방법 및 보고방법	25
13.1	이상반응	25
13.2	중대한 이상반응	26
13.3	임신	26

13.4	실험실 평가	27
14	동의서, 보상규약, 임상시험 후 피험자 진료 및 치료기준	27
14.1	피험자 동의	27
14.2	보상에 대한 규약	27
14.3	임상시험 후 피험자 진료 및 치료기준	28
15	피험자의 안전보호에 관한 대책	28
16	임상시험 실시기관	28
16.1	임상시험계획서의 승인 및 수정	28
16.2	임상시험계획서의 숙지	28
16.3	임상시험의 동의	29
16.4	정확한 피험자의 선정	29
16.5	임상시험의 점검	29
16.6	임상시험 실시기관의 모니터링	29
16.7	피험자의 비밀유지	29
16.8	이상반응 발생 시 조치	30
17	기타 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항	30
17.1	임상시험용 시험물질 관리	30
17.2	시험책임자의무의 위임	30
17.3	임상시험의 종료	30
17.4	기록보존	31
17.5	점검	31
17.6	임상시험 결과의 문서화	31
18	참고문헌	33
Appendix 1. 피험자 설명서		34

Appendix 2. 피험자 동의서 양식40

Appendix 3. 피험자 보상에 대한 규약41

Appendix 4. 헬싱키선언42

약어

AE	Adverse Event
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT (GPT)	Alanine Aminotransferase (Glutamic-pyruvic Transaminase)
MAST	Multiple AllegroSorbent Test
ANOVA	Analysis of Variance
AST (GOT)	Aspartate Aminotransferase (Glutamic-oxaloacetic Transaminase)
BMI	Body Mass Index
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
FAS	Full Analysis Set
GCP	Good Clinical Practice
Hb	Hemoglobin
HCl	Hydrochloride
Hct	Hematocrit
HDL	High Density Lipoprotein
ICF	Informed Consent Form
ICH	International Conference on Harmonization
IRB	Institutional Review Board
ISF	Investigator's Study File
KGCP	Korean Good Clinical Practice
LDL	Low Density Lipoprotein
LOCF	Last Observation Carried Forward
PPS	Per Protocol Set
PT	Prothrombin Time

RBC	Red Blood Cell
SAE	Serious Adverse Event
SOPs	Standard Operating Procedures
TG	Triglyceride
VAS	Visual analog scale

1. 시험의 명칭 및 단계

건강한 대상자를 대상으로 베타글루칸+유산균추출물의 면역 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험

2. 임상시험기관의 실시기관명 및 주소

실시기관명	시험 기관 주소	대표전화
세명대학교한방병원	충북 제천시 세명로 65	043-645-1010

3. 시험의 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명

실시기관명	시험책임자	직명	시험담당자	직명
세명대학교한방병원 병원	김범준	교수	남은영	전공의
			이윤숙	coordinator

4. 시험용 건강기능식품등을 관리자의 성명 및 직명

소속 기관명	성명	직위
세명대학교한방병원병원	김형준, 남은영	임상시험시험물질 관리자

5. 임상시험의 의뢰자명 및 주소

의뢰자	(주)선일바이오
대표자	송영진
주소	전라남도 장흥군 장흥읍 산단1로 49
전화번호	061-434-0009
팩스번호	061-434-8228

6. 임상시험의 목적 및 배경

6.1. 임상시험의 목적

유효성

일차목적:

시험물질 투여 전 및 후 12주째에 평가되는 T cell 및 B cell (subset 포함)수치의 변화를 플라세보군과 비교평가 하고자 한다.

이차목적:

시험물질 투여 전 및 후 12주째에 평가되는 아래항목의 변화를 플라세보군과 비교평가 하고자 한다.

1. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
2. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
3. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
4. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화
5. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
6. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
7. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

(안전성)

1. 이상반응, 활력징후, 임상실험실검사의 변화를 측정한다.

6.2. 임상시험의 배경

인간 생활에의 질적 향상과 더불어 놀랄만한 과학의 발전에 그 동안 불치병으로 여겼거나 인류를 끊임없이 괴롭혀 오던 각종 질병에 대한 원인과 그에 대한 치료법이 연구되어지고 있지만 시간의 흐름 속에 신종 혹은 과거에 그 위험성을 간과해 오던 질병들이 다양한 진화를 거듭해 새로운 사안으로 대두되는 시점인 현대 사회에서 면역질환은 대단히 심각한 문제로 인식되어지고 있는 실정이다.

면역기능은 대부분의 사람에게는 외부 물질에 대해 인체의 방어능력으로 면역기능의 저하는 본래 우리 몸이 가지고 있는 자연치유 기능을 점차 약화시켜 아토피성 피부염, 알레르기 비염, 두드러기, 과민성 폐렴, 중이염, 허약체질, 식욕부진, 성장장애, 집중력 저하, 잦은 감기 등과 같은 다양한 질병발생의 주요 원인 중 하나이다.

영양불량이 곧 면역 기능 저하와 직접적 관련이 있다는 다양한 연구결과가 있으며, 이는 면역력은 개인별로 차이가 있어 보다 장기적인 관점에서 접근할 필요가 있다. 따라서 장기간 복용해도 무리가 없는 식품, 특히 천연식품의 섭취가 바람직한 방안으로 지목되고 있다.

이에 따라 본 임상시험에서는 선일바이오의 베타글루칸과 유산균제제의 섭취로 면역기능의 개선에 도움이 되는지 확인하고자 임상시험을 실시하게 되었다.

1.1

1.2

1.3 용량설정의근거

섭취량 선정방법으로는 단회독성 자료를 바탕으로 최대 무작용량(NOEL ; No Observed effect level) 값과 안전계수(safety factor)를 이용해 섭취량을 선정하였다. 베타글루칸+유산균의 최대무작용량은 2,000mg/kg/day 로 보고 있지만, 단회 독성 실험의 결과 rat 에서 2,000mg/kg/day 의 농도에서 무독한 것으로 나타났으므로 실제 최대무작용량은 2,000mg/kg/day 범위를 훨씬 우회할 것으로 사료된다. 최대 무작용량을 사람에게 적용하기 위해 안전계수 값을 도입하는데, 보통 실험동물과 사람과의 차이를 감안한 factor 10 과 사람과 사람 사이의 차이를 감안한 factor 10 을 곱하여 산출된 값으로 안전계수 값으로 100 을 적용한다. 또한 안전계수 100 과 더불어 안전도를 높이기 위해 안전계수 250 을 이용해 일일 섭취허용량을 함께 계산하여 섭취량을 산출하였다.

이 때 60kg 의 표준 체중을 기준으로 480-1,200mg 의 섭취량이 안전한 것으로 계산되며, 본 연구팀에서 실시한 동물실험에서 사용한 베타글루칸+유산균의 농도를 인체 적용 농도로 환산 시 이 범위 안에 포함되어 최종 시제품 제작시 시험식품 중 베타글루칸+유산균의 섭취량은 700mg 의 농도로 결정하였다.

1.1.

2 피험자 선정/제외 기준

7.1 선정기준

1. 만 18세 이상 70세 미만의 남, 여 피험자
2. 최근3개월 이내 상기도감염을 겪은 피험자
3. 스크리닝방문시 WBC 수치가 $6.0 \times 10^9/L$ 이하인 피험자
4. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 임상시험동의서에 서명하고 동의한 피험자

7.2 제외기준

1. 베타글루칸+유산균 성분에 알레르기가 있는 피험자
2. 스테로이드 제제를 사용하고 있는 피험자
3. 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 피험자
4. 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 피험자

5. 1개월 이내에 다른 임상시험 또는 임상시험에 참여한 피험자
6. BUN 수치가 정상치의 2 배이상인 피험자
7. 갑상선질환 피험자
8. Serum creatinine 이 1.5mg 이상인 피험자
9. 정신질환(우울증, 정신분열등) 피험자
10. 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 피험자
11. 임신 혹은 수유 중인 피험자
12. 임신 가능성이 있는 가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)
13. 기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자
기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

7.3 중도탈락

연구에 참여하는 모든 피험자의 시험 완료여부를 기록하고, 시험물질투여나 관찰이 중단된 경우에는 중단 이유 및 일자가 증례기록지에 기록되어야 한다. 아울러 시험자는 피험자가 시험에서 중단되었을 때 필요한 절차를 완료하도록 노력해야 한다. 피험자에게 시험물질 투여 이후에 바람직하지 않은 변화가 생겼을 때는 해당 피험자를 제외시킬 수 있다. 심각한 이상반응으로 인해 임상시험으로부터 제외된 피험자는 가능한 이상반응이 해결될 때까지 계속 추적 관찰하여야 한다.

7.3.1 시험중지 및 탈락기준

- ① 선정/제외기준에 위반 된 경우
- ② 피험자 본인, 또는 그들의 법적 대리인이 자발적인 중지 요청이 있을 경우
- ③ 시험 전 평가에서 발견하지 못한 중대한 증상이나 질환이 확인된 경우
- ④ 피험자가 자의로 중단하고 연락이 안 되는 경우
- ⑤ 결과에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경우
- ⑥ 시험자나 피험자에 의해 시험계획을 위반하는 경우
- ⑦ 기타 시험담당자의 판단에 의해 시험 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우
- ⑧ 의뢰자가 특별한 요청을 할 때
- ⑨ 시험자가 시험의 지속이 피험자의 복지에 해를 끼칠 것이라고 판단한 경우

7.3.2 개별 피험자의 조기 종결

피험자의 요청, 이상반응의 발생, 중대한 계획서 위반, 기타의 임상시험을 진행할 수 없는 경우에는 조기 종료될 수 있다. 이때 임상시험책임자는 이를 모니터요원에게 구두, 전화 및 서면으로 이를 알려야 한다. 그리고 이에 대한 기록을 증례기록지에 자세히 기록한다.

7.4 목표한 피험자의 수 및 그 근거

7.4.1 목표한 피험자의 수

본 임상시험은 대상 피험자에서 베타글루칸+유산균추출물의 안전성 및 유효성 평가를 위한 단일기관, 이중맹검, 플라세보대조, 무작위배정, 임상시험으로서 임상시험용 기능성식품 복용 후 12주째 면역인자의 개선 정도를 평가하여 대조용 기능성식품에 대한 시험용 기능성식품의 효과를 입증하기 위한 것이다. 그러나 베타글루칸+유산균추출물을 사용하여 진행된 선행연구를 찾을 수 없었다. 따라서 아래와 같이 가정하여 피험자 수를 산출하였다.

피험자 수를 구하기 위한 가설은 다음과 같다.

$$n = (1 + \lambda) \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2}{\lambda \Delta^2}$$

$Z_{1-\alpha/2}$	1.960	
Z_{β}	0.842	
σ	0.100	표준편차
Δ	0.090	균간차이
λ	1.000	
n	19.38568	산정수
n	20	최종분석필요예수

$$n^* = n / (1 - r)$$

탈락률	0.100
n^*	22.22222
n^*	23

n^* : 탈락률을 감안한 전체 피험자수
 n : 최종 분석 필요예수(군당), r : 예(0.10)

▶ 군 간 피험자 배정비= 1:1

	시험군	대조군	총 피험자수
유효성 평가 사례수	20	20	40
Drop-out(10%)을 포함한 사례수	23	23	46

검정력 80%, 유의수준 5%를 적용하여 피험자 수를 산출한 결과, 각 군당 20명이 요구되며, 중도 탈락률 10%를 고려하였을 때, 각 군당 23명으로 총 46명의 피험자가 본 임상시험에 요구된다.

3 임상시험물질

3.1 임상시험용 건강기능식품 및 플라세보

	건강기능식품	플라세보
성분	베타글루칸+ 유산균	플라세보
제품성상	파우더	시험물질과 동일한 성상
보관	기밀용기, 실온보관(1-30℃)	시험물질과 동일
제조사	(주)선일바이오	(주)선일바이오

제조회사	(주)선일바이오
제품성상	캡슐
성분/함량	베타글루칸+유산균
저장방법	기밀용기, 실온보관(1-30℃)

3.2 임상시험용 건강기능식품의 포장

임상시험용 시험물질은 시험물질임상시험관리기준 (식품시험물질안전청고시 제2007-34호, 2007.5.31) 제36조 및 제37조의 규정에 따라 임상시험의뢰자가 제조(또는 구입) 후, 임상시험기관의 관리약사에게 공급하여야 한다.

임상시험용시험물질 라벨의 기재는 약사법 시행규칙 제75조6항에 준하여 아래와 같이 기입한다.

<p>* 임상시험용 건강기능식품</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 임상시험계획서 번호 (Protocol No.; SUNIL_GLUPB_01) ■ 임상약물의 코드명 또는 주성분의 일반명: 베타글루칸+ 유산균 ■ 성상: 캡슐 ■ 제조번호: ■ 사용기한: ■ 저장방법: 기밀용기, 실온보관 (1~30℃) ■ 시험물질 제조업자: (주)선일바이오 <p>“임상시험의 시험 이외의 목적으로 사용할 수 없음”</p>

3.3 임상시험용 시험물질의 공급 및 수불관리

본 임상시험에서는 임상시험센터의 관리약사 혹은 시험책임자가 지정한 관리자에 의하여 관리될 것이며, 시험물질 관리자는 시험 전에 공급받은 모든 시험물질에 대하여 인수증을 발행하고 기록한다. 임상시험을 관할하는 연구자와 (주)선일바이오는 시험물질 관리자와의 원활한 의사소통과 주기적인 모니터링을 통하여 필요한 시기에 적절한 수량을 공급할 수 있도록 한다. 관리자는 임상시험용 시험물질에 대해 인수, 재고관리, 피험자별 투약 등의 업무를 수행하고, 관리대장에는 약품명 및 용량, 사용일 및 사용량 등을 기록하고 관리기록을 유지한다.

의뢰자는 임상시험의 중지 및 종료 또는 임상시험 담당자가 계획서에 따라 시험을 실시하지 않는 경우 미사용 시험물질을 회수하여 폐기하도록 한다. 이때 시험물질 관리 담당자는 시험책임자와 협의 후, 미사용된 시험물질을 의뢰자에게 반납하고 반납증을 보존하여야 한다. 반납된

시험물질은 의뢰사의 회사 내 규정에 따라 조치되거나 폐기된다.

4 임상시험의 방법

4.1 투여일정

임상시험용 시험물질의 투약은 피험자가 동의서에 서명하고 스크린을 통하여 선정/제외기준에 부합하는 피험자들을 시험군과 플라세보군으로 무작위 배정하여, 양쪽군 동일하게 시험물질인 베타글루칸+유산균추출물과 플라세보를 기준으로 투여한다.

4.2 임상시험의 기간

본 임상시험의 관찰기간은 투약 시작 후 12주며, 전체 임상시험기간은 피험자 등록 후 12개월로 계획되어 있다. 하지만 피험자 등록기간의 연장 등의 사유로 전체 임상시험 기간은 연장 될 수 있다.

4.3 시험디자인

본 시험은 베타글루칸+유산균제제와 플라세보간의 T cell 및 B cell의 수치변화 개선에 대한 안전성과 유효성을 비교 평가를 위한 단일 기관, 이중맹검, 플라세보대조, 무작위 배정 임상시험이다.

4.4 무작위배정 및 눈가림 방법

임상시험에 자의적으로 참여할 것을 동의하고, 동의서에 서명한 피험자 중 선정 및 제외기준을 만족하는 피험자는 시험용 시험물질 또는 대조용 시험물질 군에 무작위로 배정될 것이다.

본 임상시험은 이중맹검 시험으로 본 임상시험을 과학적이고 객관적으로 시행하기 위해 블록 무작위 배정(Stratified Block Randomization)방법에 의하여 무작위 배정표를 시험기관 별로 작성한다. 이 때 각 기관에 따라 미리 지정한 블록크기를 고려하여 충분한 크기의 무작위 배정표를 발생한다. 의뢰자/CRO는 사전에 각 시험기관별로 무작위배정봉투에 따라 준비하고 공급한다.

4.5 맹검해제 방법

응급상황이나 중대한 이상반응 등으로 피험자의 약물코드를 알아야 하는 경우, 연구자는 무작위배정봉투의 해당피험자봉투의 맹검을 해제 후 Un-blind report form에 피험자번호/사유등을 기재하여 의뢰자에 통보하고 다시 sealing하여 시험종료 시까지 보관한다.

4.6 임상시험일정표

임상시험일정표

- 1) 임상시험에 들어가기 전, 본 임상시험의 목적과 내용에 대하여 피험자 및 보호자(법적 대리인)에게 상세히 설명한 후 각각에 대하여 문서로서 동의를 받는다. 서면 동의

시험항목	Screening	Baseline	Treatment	Final Visit
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
	첫 투여 전 14일 이내	Week 0 (Day 0)	Week 4 (Day 28±3)	Week 8 (Day56±3)
서면동의 ¹⁾	●			
인구학적 조사 ²⁾	●			
병력,약물력 조사 (시험참여4주이내)	●			
활력징후 ³⁾	●	●	●	●
신체검사 ⁴⁾	●	●	●	●
실험실 검사 ^{5, 6)}	●	(●)		●
T cell 및 B cell 검사 ^{5, 6)}	●	(●)		●
선정/제외기준 ⁷⁾	●	●		
무작위 배정		●		
임상시험물질 처방 및 교부		●	●	
임상시험물질 반납 및 순응도 평가			●	●
병용 약물 조사	●	●	●	●
이상반응 확인			●	●
임상시험 종료 평가				●

취득은 어떠한 임상시험 과정보다도 앞서서 이루어져야 하며 동의서는 피험자 및 보호자(법적 대리인)가 직접 서명 및 날짜를 기입하는 것을 원칙으로 한다.

- 2) 모든 동의를 취득한 이후에 성별, 나이, 체중등의 정보를 조사한다.
- 3) 좌위 수축기/이완기 혈압, 맥박 및 체온등을 측정한다.
- 4) 시험책임자 또는 시험담당자가 피험자에게 문진, 시진, 촉진, 청진 등의 검사를 통해 얻게 되는 정보이다 (신장/체중은 시험기간 중 동일한 자동측정기를 이용하고 신장은 첫 방문 시에만 측정하며 신을 벗고 cm 단위로 측정한다.
- 5) 피험자는 다음의 항목을 검사한다
 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono).
 T cell / B cell (subset 포함), NK cell
 혈액화학적 검사: BUN, creatinine
 뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose
 임신검사 : 가임기여성에 한하여 urine으로 측정한다.
 * 혈액화학/뇨검사/임신검사(해당하는경우)/T cell 및 B cell 검사는 실험실검사에서 선정기준에 적합한 경우에만 실시하도록 한다.
- 6) 피험자는 채혈하기 가능한 전날 8 시간 이상 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다

7) 선정/제외기준은 Screening 방문 시에 확인한다. 기준에 적합한 피험자는 순차적으로 피험자 등록번호가 부여된다.

8) 시험자의 판단에 따라 시험물질 최종 투여 후 혹은 조기 투여 중지 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 4주 이내 다시 방문하도록 함.

5 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰 검사방법

5.1 관찰검사방법

1. 방문 1 : 시험물질 첫 투여 전 14일 이내 (Screening 방문)

동의서에 서명을 취득하고 시험물질투여가 시행되기 21일 이전에 다음의 자료가 수집되고 연구가 진행될 예정이다. 피험자는 채혈하기 전날 8시간 이상 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다.

1) 서면동의서 작성

2) 인구학적 조사(성별, 나이, 음주력 및 평균 음주량 등)

3) 병력•약물력 조사

4) 활력징후

5) 신체검사(신장, 체중)

6) 실험실검사

혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono)

7) 선정 및 제외기준 조사

8) 병용약물 조사

2. 방문 2 : 0주 (Baseline 방문)

Screening 방문에서 선정된 대상자에 대하여 두번째 방문을 실시하여 다음항목을 조사•확인 받아 시험물질 또는 플라세보를 투여받게 된다.

1) 활력징후

2) 신체검사(체중)

3) 실험실검사

혈액학검사 : T cell / B cell (subset포함), NK cell

혈액화학적 검사: BUN, creatinine

뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose

임신검사 : 가임기여성에 한하여 urine으로 측정한다.

5) 선정 및 제외기준 확인

6) 무작위배정

7) 임상시험용 건강기능식품 처방 및 교부

8) 병용약물 조사

9) 이상반응

3. 방문 3: 4주± 3일 (Treatment 방문)

두번째 방문시점으로부터 4주째인 세번째 방문에서는 다음항목을 조사 한다.

1) 활력징후

2) 신체검사(체중)

3) 임상시험물질 처방 및 교부

4) 임상시험물질 반납 및 순응도 평가

5) 병용약물 조사

6) 이상반응 조사

4. 방문 4: 12주± 3일 (Final 방문)

이전 방문시점으로부터 4주째에 종료방문을 실시하여 다음항목을 조사•확인한다.

1) 활력징후

2) 신체검사

3) 임상시험물질 반납 및 순응도 평가

4) 실험실검사

혈액학검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono)

T cell / B cell (subset포함), NK cell

혈액화학적 검사: BUN, creatinine

뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose

6) 임상시험물질 반납 및 순응도 평가

7) 병용약물 조사

8) 이상반응 조사

9) 임상시험 종료 평가

5. 중도탈락

예정된 12주간의 투약기간을 완료하지 못하고 탈락된 피험자는 투약종료 시에 시행되어야 하는 항목을 측정하도록 한다.

6. 병용금지약물

본시험의 병용금지약물은 다음과 같다.

- 1) 기타면역억제제
- 2) Steroids제제
- 3) 건강기능식품

그외 약물은 피험자의 건강상태를 고려하여 연구자가 판단하여 병용시 그 사유를 기록하도록 한다.

6 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

6.1 예측 이상반응

1. 다음 피험자에게는 투여하지 말 것

- 1) 베타글루칸+유산균추출물 및 추출물에 포함된 성분에 과민반응이 있는 환자
- 2) 면역기능관련 약물을 복용중인 피험자

2. 다음 환자는 신중히 투여할 것

- 1) 만성 활동성 간염 환자
- 2) 간경화 환자
- 3) 기타 만성질환
- 4) 심혈관 질환자

3. 이상반응

- 1) 아직까지 이상반응에 대한 보고와 연구는 이루어 지지 않았다.

4. 상호작용

- 1) 아직까지 상호작용에 대한 보고와 연구는 이루어 지지 않았다.

5. 임부 및 수유부에 대한 투여

임부 및 수유부에는 투여하지 않는다. 아직까지 투여보고 없음

6. 고령자에 대한 투여

일반적으로 고령자는 생리기능이 저하되어 있으므로 감량하는 등 신중히 투여한다.

7. 보관 및 취급상의 주의

- 1) 어린이의 손에 닿지 않는 곳에 보관한다.
- 2) 직사일광을 피하고 될 수 있으면 습기가 적고 서늘한 곳에 보관한다.
- 3) 시험물질을 원래 용기에서 꺼내어 다른 용기에 보관하는 것은 오용에 의한 사고발생이나 시험물질 품질 저하의 원인이 될 수 있으므로 원래의 용기에 넣고 꼭 닫아 보관한다.

7 유효성 및 안전성 평가변수, 평가방법 및 해석방법

7.1 유효성 평가변수

1. 1차 유효성 평가변수:

- 시험물질물 및 대조물질 투여 전후 T cell 및 B cell(subset)의 변화에 대한 차이

2. 2차 유효성 평가변수:

- 1) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
- 2) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
- 3) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
- 4) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화
- 5) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
- 6) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
- 7) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

7.2 안전성 평가변수

- 1) 이상반응
- 2) 활력징후
- 3) 임상실험실검사

7.3 분석에 포함되는 피험자 집단 (Study Population)

피험자로부터 얻어진 자료는 Safety Set, FAS (Full Analysis Set), ITTS (Intent to treatment set), PPS (Per- Protocol Set)으로 나뉜다.

본 임상시험의 주 분석 집단 (main population) 은 ITTS (Intent to Treatment Set)로 정의한다. FAS (Full Analysis Set) 군 분석도 함께하여 결과를 비교하되 크게 차이를 보이는 경우에는 각 분석 대상자의 결과를 예시한다.

7.3.1 FAS (Full Analysis Set)

ITT (Intention-To-Treat)원칙을 따르며 본 임상시험에 사용되는 시험물질을 한 번이라도 복용한 피험자 중 Baseline 이후에 적어도 한번 이상 1차 유효성 평가변수의 값이 측정된 피험자 군을 대상으로 한다.

7.3.2 PPS (Per-Protocol Set)

PPS (Per-Protocol Set)원칙을 따르며 임상시험계획서대로 임상시험을 완료한 피험자 군으로 다음에 해

당하는 경우를 제외시킨다.

- 1) 임상시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 임상시험에서 중도 탈락한 피험자
- 2) 병용 금지약물을 복용한 피험자
- 3) 그 외 중대한 계획서 위반을 한 피험자

7.3.3 Safety Set

본 임상시험에 등재한 모든 피험자 중 선정/제외 기준을 만족하고, 치료를 시작한 후 안전성관련 데이터를 최소한 한 번 이상 확인한 피험자에 한한다.

7.4 결측치 처리 방법

어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 임상시험이 종료되기 전에 피험자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실시한다(Last Observation Carried Forward; LOCF).

7.5 해석방법

7.5.1 인구통계학적 자료와 임상병력 자료

환자의 기저상태 특성을 시험군 별로 적절한 기술적 통계방법을 이용하여 요약한다. 연속형 자료는 평균, 표준편차, 최소, 최대치 등을 구하고, 범주형 자료는 빈도와 백분율을 계산한다. 두 군간에 비교는 자료의 정규성 여부에 따라 연속형 변수는 two-sample t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test에 의해 비교하며, 범주형 변수는 chi-square test 또는 fisher's exact test를 이용하여 비교한다.

7.6 유효성 평가분석방법

1차 유효성 평가변수

1차 유효성 평가변수인 시험물질물 투여 전 Tcell/B cell (subset포함)과 임상시험용 시험물질 복용 후 12주째 Tcell/B cell (subset포함)의 차이가 대조용 시험물질에 비해 시험용 시험물질이 우월함을 보이기 위함이므로, 주 분석방법은 two sample t-test 또는 wilcoxon's rank sum test를 시행하여, p-value가 양측유의수준 0.05보다 작음을 보일 것이다.

2차 유효성 평가변수

2차 유효성 평가변수 중 연속형 자료의 경우, 군간 비교는 two sample t-test 또는 wilcoxon's rank sum test를 시행한다. 범주형 변수의 경우, 군간 비교를 위하여 chi-square test 또는 fisher's exact test를 시행할 것이다.

7.7 안전성 평가분석방법

안전성 분석의 대상은 Safety Set 으로 하고 대상이 되는 자료는 시험물질을 1 회라도 복용한 후 새로이 발생한 이상반응과 각 방문 시 실시한 임상검사 및 실험실 검사 결과 등이다.

7.7.1 이상반응

각각의 이상반응에 대해 한 번 이상의 이상반응을 경험한 피험자 수 및 백분율을 시술한 임상시험용 시험물질 별로 나누어 기술하고, 이상반응의 중대성(Seriousness), 위중도(Severity), 임상시험용 시험물질과의 연관성, 재시술여부 및 그 결과에 대해서 복용한 임상시험용 시험물질 별로 구분하여 보고한 피험자 수 및 백분율을 정리한다.

7.7.2 실험실 검사 및 활력징후, 신체 검사

실험실 검사와 활력징후, 신체 검사의 결과는 연속형 자료의 경우 평균, 표준편차와 최소값, 최대값을 군별로 정리하고 군간 차이는 two-sample t-test 또는 wilcoxon' s rank sum test 를 시행하고, 군내 복용전과 후의 차이는 paired t-test 또는 wilcoxon' s signed rank test 로 검정한다. 또한 복용 전 후의 정상범주를 벗어난 피험자들의 빈도수 및 백분율을 구한다. 실험실검사 가운데 범주형 자료는 정상과 비정상으로 나누어서 군간 차이는 chi-square test 혹은 fisher' s exact test 를 사용하여 검정하고 투약 전후의 차이는 McNemar' s test 로 분석한다.

8 이상반응을 포함한 안전성 평가기준, 평가방법 및 보고방법

8.1 이상반응

이상반응이란 임상시험 관찰기간 동안 발생된 혹은 악화된, 바람직 하지 않고 의도되지 않은 모든 징후, 증상, 증후군 및 질환을 의미하며, 해당 임상시험용 시험물질과 반드시 인과관계를 가져가 하는 것은 아니다. 임상적으로 유의한 진단 시술상의 비정상적 결과들도, 임상 실험실 검사의 비정상조건(예, 시험으로부터 중도탈락을 초래하는 경우)을 포함하는 객관적 이상반응과 마찬가지로 이상반응으로 고려된다.

일반적으로 치료 중 징후 및 증상의 악화는 유효성변수에 의해 평가 될 것이다. 그러나, 만약 그 결과가 “중대한 이상반응” 의 정의에 해당되는 경우, 이는 ‘중대한 이상반응’ 으로 기록되어야 한다

이상반응은:

- A. 새로운 질환
- B. 병발질환의 악화
- C. 임상시험용시험물질에 의한 영향
- D. 임상시험 절차들에 대한 영향
- E. 상기 요인들 중 2개 이상의 조합

“이상반응”이라는 용어는 임상시험용 시험물질 혹은 임상시험자체와의 인과관계를 전제로 하지 않는다.

외과적 시술자체는 이상반응이 아니다. 이는 수술을 요하는 상태에 대한 치료방법이다. 만약 시험기간 중에 수술을 필요로 하는 상태가 발생하거나 발견된다면, 이는 이상반응에 해당된다. 만약 시험을 시작 하기 전에 이미 알고 있었던 상태라면, 임상시험계획서에 허용 되어있는 예정된 외과적 시술과 이 시술을 초래하게 된 상태는 이상반응이 아니다. 후자의 경우, 그 상태는 과거력으로서 보고 되어야 한다.

8.2 중대한 이상반응

중대한 이상반응 (SAE) 에 관한 모든 정보는 중대한 이상반응 보고양식 (SAE Report Form) 에 수집, 기록된다. 각각의 중대한 이상반응 (SAE) 은 환자의 안전을 확인하기 위해서 이상반응 발생을 인지한 후 24 시간 이내에 의뢰자/연구자로 보고한다. 중대한 이상반응은 불편한 증상, 징후 또는 다음과 같은 임상상태를 말한다.

1. 사망
2. 생명을 위협하는 경우
3. 입원이 필요하거나 입원기간을 연장해야 하는 경우
4. 지속적이거나 중대한 불구/무능력
5. 선천적 결함이 우려될 때
6. 의학적으로 위급한 상태, 다시 말해서 환자가 위태롭고 위에 명기한 사항들을 방지하기 위해 의학적 처치를 필요로 하는 경우

다음의 사항에 해당하는 입원은 중대한 이상반응 (SAEs) 에 해당하지 않는다.

1. 시험참여 전 예정된 입원

시험참여 이후부터 피험자의 시험 참여가 중단된 후 4 주 이내의 시점까지 발생한 모든 중대한 이상반응을 기록한다. 피험자의 시험 참여가 중단된 지 4 주 후에 발생한 중대한 이상반응은 시험물질 (또는 치료법) 과의 관계가 의심되는 경우에만 보고한다.

8.3 임신

환자가 임신을 한 경우, 자체가 중대한 이상반응이 아니더라도 중대한 이상반응을 통하여 보고되어야 하고, 자연 혹은 자발적 인공유산, 출산에 대한 상세한 설명, 선천적 결손이나 선천적 기형의 발생 유무 등의 결과를 보고하기 위한 추적조사가 이루어져야 한다.

시험에 참여한 도중에 나타난 모든 임신은 임상 시험 임신 보고서를 통하여 보고하여야 한다. 피험자의 안전을 보장하기 위해 발생이 인지된 시간부터 24 시간 이내에 연구자에게

보고해야 한다. 임신은 자연 혹은 자발적 인공 유산, 출산에 대한 상세한 설명, 선천적 결손이나 선천적 기형의 발생 유무, 산모나 신생아의 합병증 등의 결과를 보고하기 위해서 추적조사가 이루어져야 한다.

8.4 실험실 평가

시험기관은 방문 및 평가 일정에 따라 실험실 검사를 시행한다. 본 임상시험에서는 세명대학교한방병원병원에서 실시할 예정이다.

9 동의서, 보상규약, 임상시험 후 피험자 진료 및 치료기준

9.1 피험자 동의

임상시험책임자는 모든 환자가 임상시험의 성격, 목적, 잠재적 위험 및 이점에 관하여 충분한 구두 및 서면 정보를 얻도록 해야 한다. 환자들은 또한, 어느 시기에든 임상시험을 자유롭게 중단할 수 있음을 알아야 한다. 환자에게는 질문 기회와, 제공한 정보를 생각할 시간을 주어야 한다. 임상시험을 위한 절차를 수행하기 전에, 환자가 서명하고 일자를 기입한 서면 동의를 얻어야 한다. 시험책임자는 서명된 피험자 동의서 원본을 시험기관에 보관하며 서명된 피험자 동의서의 사본은 반드시 환자에게 주어야 한다. 시험책임자는 동의가 자유롭게 제공되며 환자가 언제든지 임상시험의 선택적인 부분을 자유롭게 중단할 수 있다는 사실을 이해하도록 설명할 책임이 있다.

별첨1: 연구 설명문

별첨2: 피험자 동의서 양식

9.2 보상에 대한 규약

임상시험자는 피험자를 등록하기 전에 각 피험자들의 건강상태를 면밀히 확인하고 임상시험에 참여할 수 있는 상태인지를 확인하여야 한다. 또한 시험자는 임상시험 과정에 대하여 충분히 숙지하여 피험자의 안전이 보장될 수 있도록 최선을 다하여야 한다. 그럼에도 불구하고 이상반응의 발생에 따른 피험자 손해가 생겼을 경우 피험자가 회복될 때까지 적절한 의료조치가 취해지고 피해자 보상규약에 따라 보상될 것이다. 이를 위한 보험가입이 이루어질 것이다.

별첨3: 피해자 보상에 대한 규약

9.3 임상시험 후 피험자 진료 및 치료기준

임상시험에서 탈락되거나 반응이 없는 피험자는 다른 적절한 치료를 받을 수 있도록 지도하며, 임상시험이 종료된 자는 기대하지 않았던 지연 이상반응에 대비하여 담당의사의 지시에 따라 언제든지 진료를 받을 수 있도록 한다.

10 피험자의 안전보호에 관한 대책

본 임상시험은 헬싱키 선언(별첨4)에 기초하고 International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use-Good Clinical Practice (ICH GCP)의 윤리적 원칙에 부합하도록 계획되고 수행된다. 본 임상시험은 site의 임상시험 심사위원회(IRB)의 승인을 받은 후 실시되며 주요한 변경사항이 발생할 경우도 마찬가지로 임상시험 심사위원회(IRB)의 승인을 받아야 한다.

11 임상시험 실시기관

실시기관의 장은 각 임상시험 단계 별로 해당 임상시험에 필요한 임상시험이실, 설비, 전문인력을 갖추고, 해당 임상시험이 적절하게 실시할 수 있는 준비에 만전을 기해야 한다.

11.1 임상시험계획서의 승인 및 수정

임상시험 시작 전에 임상시험계획서, 피험자동의서, 그리고 다른 적절한 문서들은 독립적인 IRB에 승인을 위해 접수되어야 한다. 임상시험을 시작하는데 필요한 모든 윤리적, 법적 필요사항에 대한 문서들이 시험책임자에게 전달된 후에 시험 약제들이 시험자에게 제공되어야 한다. IRB의 공식승인에서 임상시험 제목, 시험코드, 시험기관(혹은 적용되는 사법 관할지역 또는 지역), 임상시험 계획서 수정번호(해당되는 경우), 그리고 검토된 다른 모든 문서들도 언급되는 것이 바람직하다. 결정된 날짜를 언급해야 하고 위원회 위원들의 공식적인 서명도 있어야 한다. 첫 번째 피험자가 시험에 등록되기 전에, 모든 윤리적, 법적 필요사항들이 충족되어야 한다. 시험자는 IRB와 관련된 그리고 만약 적용된다면, 시험조정자와 IRB사이의 모든 의사소통 내용의 기록을 보관해야 한다. 또한 시험자(혹은 적용된다면 시험조정자)와 당국관계자와의 의사소통에 대한 기록에도 적용된다.

11.2 임상시험계획서의 숙지

시험책임자 및 담당자는 시험계획을 정확히 분석 숙지하고, 임상시험 대상 피험자의 문제점에 적극적으로 대응한다.

11.3 임상시험의 동의

임상시험에 등록되기 전에, 피험자는 임상시험의 성격, 범위, 그리고 가능한 결과에 대해 그들이 이해할 수 있는 형태로 설명을 들은 후 참여에 동의해야 한다. 시험에 관련된 정보와 동의 양식을 모두 포함한 피험자동의서는 피험자를 위해 준비되어 제공될 것이다. 동의서는 피험자가 이해할 수 있는 언어로 기술되어야 하며, 설명해주었는지 명시되어야 한다. 피험자동의를 피험자에 의해 기입된 서명에 의한 동의와 피험자동시에 대한 논의를 주도한

사람의 서명으로 확인되어야 한다. 만약 피험자가 내용을 읽을 수 없는 경우, 서면 환자동의서를 피험자에게 구두로 소개하고 설명해 주어야 하며 이것은 공정한 증인의 배석 하에 실시되어야 한다. 서명된 동의서의 복사본을 피험자에게 전달하여야 한다. 서명된 동의서 원본은 시험책임자가 보관하게 될 것이다.

11.4 정확한 피험자의 선정

본 임상시험에 앞서 피험자와의 충분한 면담 및 검사를 통하여 피험자의 적합여부에 대하여 철저히 평가한다.

11.5 임상시험의 점검

임상시험 책임자는 주기적으로 이상반응, 시험 진행, 상황, 결과에 대하여 보고하고, 의뢰자와 의뢰자가 지정한 기관에서 점검을 받을 수 있다.

11.6 임상시험 실시기관의 모니터링

피험자의 권리와 복지보호, 복사된 임상시험관련 자료가 근거 문서와 대조하여 정확하고 완전하며, 검증 가능한지 여부 확인, 임상시험이 승인된 계획서, KGCP의 규정에 따라 수행되는지를 확인하기 위하여 모니터링을 실시한다.

임상시험증례기록서의 완결성과 정확성을 점검하고 근거서류와의 일치성을 판단하기 위해 의뢰자대리인(임상시험 모니터)의 방문을 통하여 모니터링이 이루어진다. 모니터링 방문 외에도, 임상시험 모니터와의 잦은 의사소통(편지, 전화, 또는 팩스)을 통하여 임상시험이 계획서의 설계와 관련 규정에 따라서 수행될 수 있도록 한다. 임상시험 종료 절차는 임상시험 종료 시 임상시험 모니터에 의해 수행된다.

11.7 피험자의 비밀유지

피험자의 이름이 의뢰자에게 제공되어서는 안 된다. 오직 피험자의 번호와 이니셜만 증례 기록서에 기록되고, 만약 피험자의 이름이 다른 문서에 나타나게 된다면(예, 검사기록지), 문서의 복사본에서 이 부분을 지운다. 컴퓨터에 저장된 임상시험 결과들은 각 국가의 자료보호법에 따라 저장되도록 한다. 피험자는 의뢰자의 대리인, 독립적인 임상시험심의위원회(IRB) 혹은 허가 당국 관계자가 수집된 자료를 실사하기 위해 그들의 의료기록을 검사할 것이고 모든 사적인 정보는 그 국가 자료보호법에 따라 엄격한 기밀유지 속에서 다뤄질 것이라는 설명들 듣게 된다. 시험자는 개별 피험자의 기록을 알아보기 위해 피험자 식별 명단(피험자의 이름에 해당되는 피험자 번호)을 보관하게 된다.

11.8 이상반응 발생 시 조치

이상반응 발생 시 즉시 담당의사로부터 필요한 검사 및 치료를 받을 수 있도록 한다. 중대한

이상반응 발생 시에는 시험을 중지하고 신속하고 적절한 조치를 취한다.

12 기타 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

12.1 임상시험용 시험물질 관리

임상시험용 시험물질은 보관조건에 맞게 보관하며 시험책임자 및 관리담당자의 지시 없이는 사용할 수 없도록 한다. 임상시험물질은 시험책임자가 지정한 관리약사가 관리할 수 있다.

임상시험물질은 의뢰자로부터 관리약사에게 전달되어야 하며, 인수증을 받아 보존하여야 한다. 이때 시험물질에는 “임상시험용”이라는 표시가 있어야 한다.

관리약사는 시험물질 등이 임상시험 이외의 목적으로 사용되지 않도록 보관, 관리해야 한다.

시험책임자는 임상시험 실시 중 시험물질 등의 수량 및 보관상태 등을 확인하고 임상시험이 적절히 진행될 수 있도록 조치하여야 한다.

시험책임자는 임상시험의 중지 및 종료 또는 담당자가 계획서에 따라 시험을 실시하지 않는 경우 미사용 시험물질 등을 회수하여 폐기하도록 한다. 이 때 관리약사는 책임자와 협의 후, 미사용 시험물질을 의뢰자에게 반납하고 그 반납증을 보존하여야 한다.

12.2 시험책임자의무의 위임

시험책임자는 임상시험에 협조하는 모든 사람들이 적절한 자격을 갖추고 임상시험계획서와 임상시험계획서의 수정 내용 및 치료계획, 임상시험 관련 의무 사항 및 기능들에 대해 알고 있도록 해야 한다. 시험책임자는 중요한 임상시험관련 의무를 위임할 수 있고 위임받은 시험담당자 또는 다른 적절한 자격을 가진 사람들의 이력서를 보관해야 한다.

12.3 임상시험의 종료

임상시험이 완료되면 각 기관IRB에 종료보고 되어야 한다. 또한 시험자는 언제든지 임상시험을 종료할 권리가 있다. 가능한, 조기종료는 의뢰자와 협의 하에 수행되어야 한다. 조기종료 되는 경우에도 IRB에 보고하도록 한다.

12.4 기록보존

시험자는 모든 기록의 폐기 이전에 의뢰자로부터 서면 승인을 받도록 한다.

필수 문서들은 시험종료후 혹은 시험물질의 임상시험이 중지된 이래로 적어도 5년이 경과될 때까지 보관되어야 한다. 그러나 의뢰자의 요구에 따라 시험책임자는 더 긴 시간동안 자료의 보존을 할 수 있다.

필수 문서들에는 다음이 포함된다.

- 모든 피험자들의 서명된 환자동의서
- 피험자 식별 코드 명단, 스크리닝 기록(적용되는 경우) 그리고 등록일지

- 시험자와 IRB 간의 의사소통에 관한 모든 기록
- IRB의 구성
- 시험자와 의뢰자(혹은 임상시험수탁기관, CRO)간의 의사소통에 관한 모든 기록
- 시험자가 중요한 임상시험관련 의무를 위임한 공동 시험자와 다른 적절한 자격을 가진 사람의 명단과 시험에 있어서의 역할 및 서명
- 모든 피험자에 대한 임상증례기록서와 수정내용을 기록한 문서의 복사본
- 시험물질의 수불 장부 기록
- 기타 모든 근거서류(피험자 의무기록, 병원기록, 임상검사기록, 등)

정상적으로, 이러한 기록들은 시험자의 기록보관소에 보관될 것이다. 만약 시험자가 이 의무를 준수할 수 없을 때에 시험자는 다른 대안에 대한 승인을 의뢰자에게 요청해야 한다.

12.5 점검

의뢰자에 의해 권한이 위임된 점검자는 현장 점검 및 실사를 위해 모든 근거서류, 임상시험 증례기록지, 또한 다른 임상시험 서류들의 직접 열람을 요청할 수 있다. 이들 문서에 대한 직접 접근이 시험자에 의해 보장되어야 하고, 시험자는 이런 활동들을 언제든지 지원할 수 있어야 한다. 의무기록과 기타 임상시험 문서들은 점검 혹은 실사 도중 복사될 수 있으므로 비밀 보장을 위해 피험자의 이름이 지워진 복사된 자료를 제공하도록 한다. 본시험은 점검을 실시하지 않을 예정이다.

12.6 임상시험 결과의 문서화

- 임상증례보고서는 각 피험자마다 작성된다.
- 임상시험 기간 동안 수집된 모든 임상시험계획서에서 요구된 정보는 연구자에 의해 혹은 위임된 연구자, 연구간호사등에 의해 증례기록서에 기입되어야 한다. 의뢰자는 증례기록서의 완성과 수정에 관한 자세한 사항을 연구자에게 설명되어야 한다. 만약 연구자가 다른 사람에게 증례기록서를 기입할 수 있도록 하려면 그 사람의 이름과 직위, 서명, 그리고 이니셜을 의뢰자에게 제공하여야 한다.
- 연구자, 혹은 위임된 연구자, 연구간호사등은 정보가 수집된 후 가능한 빨리 증례기록서를 완성하도록 하고 가능하면 피험자가 검사 및 치료 또는 다른 시험 절차를 수행하기 위해 방문한 날에 기록되는 것이 권장된다. 어떤 미해결 내용의 기입도 최종 검사 후에는 즉시 완성되어야 한다. 모든 결측치에 대해서는 적절한 설명이 있어야 한다.
- 임상시험 시작 전에 근거서류를 결정하도록 한다. 이들 목록은 임상시험 Trial Master File과 연구자의 Investigator Study File에 정리되어야 하고 필요한 경우 갱신되도록 한다.
- 완성된 증례기록서는 임상시험계획서에 적힌 책임연구자나 위임된 연구자에 의해 검토되고 서명을 받아야 한다.
- 연구자는 모든 완성된 증례기록서의 사본을 보관한다.

13 참고문헌

1. 식품의약품 안전처 건강기능식품의 기능성원료인정현황
2. 식품의약품 안전처 기능성원료 및 기준/규격 인정에 관한 규정

Appendix 1. 피험자 설명서

임상시험제목

건강한 대상자를 대상으로 베타글루칸+유산균(Apios Americana Medik.)의 면역개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험

귀하에게 본 연구에 참여하여 주실 것을 요청 드립니다. 그러나 귀하가 본 연구에 참가하실 것을 결정하시기 전에 본 연구가 왜 실시되며 무엇을 어떻게 하게 될지 정확하게 이해하는 것이 중요합니다. 이 글은 귀하가 참여하실 수 있도록 설명드리는 본 연구에 관한 정보입니다.

아래의 내용은 이번 연구의 내용과 이 연구에 참여하실 경우, 귀하가 하실 역할과 연구의 진행과정 등에 대하여 설명 드리고자 마련된 것입니다. 시간을 가지고 충분히 심사숙고 하시어 읽으신 후, 원하신다면 가족이나 다른 사람과 상의하셔도 좋고, 또 궁금하신 사항이 있으시면 연구책임자나 다른 연구담당자에게 질문하셔도 좋습니다.

본 설명문을 주의 깊게 읽어주시기 바랍니다. 귀하가 갖고 있는 모든 질문을 할 수 있는 충분한 시간을 가지시길 바랍니다. 연구 담당자가 귀하가 명확히 이해하지 못하는 모든 단어 혹은 정보에 대해 설명해 드릴 것 입니다.

다음 내용은 본 연구의 목적, 절차, 이익, 위험성, 불편 및 주의사항에 대한 것입니다. 또한, 여기에는 귀하가 사용 할 수 있는 대체 절차 및 어느 때라도 연구를 중단 할 수 있는 귀하의 권리에 대해 설명하고 있습니다.

1. 연구의 배경 및 목적

인간 생활에의 질적 향상과 더불어 놀랄만한 과학의 발전에 그동안 불치병으로 여겼거나 인류를 끊임없이 괴롭혀 오던 각종 질병에 대한 원인과 그에 대한 치료법이 연구되어지고 있지만 시간의 흐름 속에 신종 혹은 과거에 그 위험성을 간과해 오던 질병들이 다양한 진화를 거듭해 새로운 사안으로 대두되는 시점인 현대 사회에서 면역질환은 대단히 심각한 문제로 인식되어 지고 있는 실정입니다.

면역기능은 대부분의 사람에게서는 외부 물질에 대해 인체의 방어능력으로 면역기능의 저하는 질병발생의 주요원인중 하나입니다.

이에 따라 본 임상시험에서는 베타글루칸+유산균의 섭취로 면역기능의 개선에 도움이 되는지 확인하고자 임상시험을 실시하게 되었습니다.

2. 연구기관 및 기간

본 연구는 1곳의 임상시험기관에서 46명의 피험자가 참여하게 됩니다. 예상 되는 연구기간은 약 12개월이며, 만약 귀하께서 적합한 피험자로 선정되신다면 12주 동안 본 연구에 참여하게 됩니다.

3. 연구방법

사용되는 시험물질은 베타글루칸+유산균입니다. 사용되는 대조물질은 베타글루칸+유산균(Apias)의 플라세보입니다. 본 시험물질은 베타글루칸+유산균에서 주성분만을 제외한 제품입니다. 시험에 참여하시면 귀하께서는 12주 동안 매일1회 1회당 1포 (하루중 아무때나 복용)의 시험물질 혹은 플라세보를 복용 하시게 됩니다.

각 방문마다 아래 표에 기재된 검사를 실시하게 됩니다.

스크리닝	시험물질 투여 전 14일 이내	(최초방문)서면동의, 인구학적 조사, 병력·약물력 조사, 활력징후, 신체검사, 실험실 검사, 선정/제외기준 검사)
선정방문	0주 (스크린 검사결과 선정된 경우방문)	활력징후, 신체검사, 실험실검사, 선정/제외기준확인, 약물배정 (무작위 배정), 병용약물 확인
치료기간	4주째	활력징후, 신체검사, 병용약물 확인, 이상반응 확인, 복약순응도, 복약순응도확인
종료방문	12주째	활력징후, 신체검사, 실험실검사, 병용약물 확인 임상시험 종료 평가, 복약순응도확인

귀하께서 동의서를 읽고 서명 한 후 본 연구에 참여하기로 동의 하셨다면, 스크리닝 방문 시 연구자는 과거 및 현재 복용 중인 약 뿐만 아니라 귀하의 병력에 관하여 질문을 할 것 입니다. 귀하의 키, 체중, 혈압, 심박수, 체온 등을 측정할 것입니다. 실험실 검사를 위해서 10~20ml의 혈액이 채혈될 것 입니다.

귀하가 선정기준에 적합하고 본 연구에 피험자로 선정 되면 그 다음 방문 시 어떤 군에 배정 될지

는 알 수 없습니다. 본 연구에 참여함으로써 시험군 또는 플라세보군에 배정될 확률은 동전 던지는 것과 같은 확률 50%입니다. 유효성검사는 실험실검사를 통해 면역기능과 관련된 요소를 측정하게 됩니다.

매 방문 시마다 신체검사, 활력징후를 측정하게 됩니다. 아울러 방문1, 2, 4에서는 실험실검사를 위한 채혈이 이루어 집니다. 일부 약물은 연구기간 동안 복용 할 수 없습니다. 다른 약을 복용하기 전에 연구자에게 연락하여 허락을 받은 후 복용해야 합니다. 어떤 질병이나 이상반응이 발생한 경우나 응급 상황인 경우, 귀하는 연구자에게 즉시 알리고 적절한 치료를 받으셔야 합니다.

귀하는 본 연구에 참여하는 동안 발생하는 이상반응 또는 새로운 건강상의 문제에 대해 귀하의 연구 담당의사에게 알려야 합니다.

4. 약물의 예견되는 효과 및 예상되는 이점

건강상, 치료상의 이점은 면역이 약해진 상태에서 건강기능식품의 복용으로 면역의 증진 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각하고 있습니다.

5. 약물 및 처치의 위험성

본 임상시험에 사용되는 시험물질은 베타글루칸+유산균또는 플라세보물질입니다. 시험물질의 예상되는 이상반응은 아래와 같습니다.

1. 다음 피험자에게는 투여하지 말 것

1) 베타글루칸+유산균에 과민반응이 있는 환자

2. 다음 환자는 신중히 투여할 것

1) 만성 활동성 간염 환자

2) 간경화 환자

3) 기타 만성질환

4) 심혈관 질환자

3. 이상반응

1) 아직까지 보고된 내용이 없음

4. 상호작용

1) 아직까지 상호작용에 대한 보고와 연구는 이루어 지지 않았다.

5. 임부 및 수유부에 대한 투여

임부 및 수유부에는 투여하지 않는다. 아직까지 투여보고 없음

6. 고령자에 대한 투여

일반적으로 고령자는 생리기능이 저하되어 있으므로 감량하는 등 신중히 투여한다.

7. 보관 및 취급상의 주의

- 1) 어린이의 손에 닿지 않는 곳에 보관한다.
- 2) 직사일광을 피하고 될 수 있으면 습기가 적고 서늘한 곳에 보관한다.
- 3) 시험물질을 원래 용기에서 꺼내어 다른 용기에 보관하는 것은 오용에 의한 사고발생이나 시험물질 품질 저하의 원인이 될 수 있으므로 원래의 용기에 넣고 꼭 닫아 보관한다.
이외의 예상되는 이상반응은 없습니다.

6. 대체 치료법

귀하께서 연구에 참여하지 않으시기로 결정하셨다면, 시험책임자가 적절한 대체 치료법을 선정하여 귀하에게 최적의 치료법을 결정할 수 있습니다.

통상적인 대체 치료법은 의료진이 선택하는 처치방법으로 임상시험물질의 중단과 이상반응의 치료에 대한 약물투여와 피부반응시 대증요법의 연고처치등을 받으실 수 있습니다.

7. 새로운 정보 제공

귀하의 안전과 관련하여 의미 있는 새로운 연구결과를 얻게 되면 연구자는 귀하에게 알릴 것입니다.

8. 피해발생시 보상대책

연구 중에 연구제품 투여로 인한 직접적인 결과로서 발생한 상해에 대해서는 필요한 의학적 처치가 이루어질 것이며 치료를 위해 발생한 진료비 및 적정 치료비는 의뢰자가 보상할 것입니다. 회사와 연구자는 연구와 관련 없는 사건에 대해서는 책임지지 않습니다.

9. 임상시험의 참여가 중지 되는 경우

다음의 경우에는 귀하의 동의와 관계없이 연구에서 탈락 됩니다.

- 선정/제외기준에 위반이 있었던 경우
- 피험자 본인, 또는 그들의 법적 대리인이 자발적인 중지 요청이 있을 경우
- 시험 전 평가에서 발견하지 못한 중대한 증상이나 질환이 확인된 경우
- 피험자가 자의로 중단하고 연락이 안 되는 경우
- 결과에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경우
- 시험자나 피험자에 의해 시험계획을 위반하는 경우
- 기타 시험담당자의 판단에 의해 시험 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우
- 의뢰자가 특별한 요청을 할 때
- 시험자가 시험의 지속이 피험자의 복지에 해를 끼칠 것이라고 판단한 경우

귀하가 연구를 완료하기 전에 중단하는 경우, 귀하는 귀하의 안전을 위해 적어도 연구의 최종 방문시에 실시하여야 하는 예정된 절차 등을 실시하도록 요청 받게 될 것입니다. 이후 귀하께 맞

는 의학적 치료를 연구자가 시행할 것입니다.

10. 연구 참여에 대한 보상

본 시험에 참여하시면, 연구 기간 동안 무상으로 시험물질이 제공됩니다. 또한, 본 임상시험 기간 동안 매 방문 때마다 관련된 여러 가지 검사를 받게 되며 이때 관련검사의 추가적인 비용은 없습니다.

본 시험에 참여 하시게 되면 교통비를 지급하여 드립니다. 교통비는 매 방문마다 2만원을 드립니다.

11. 비밀보장 및 허용 범위

본 임상연구 참여 중, 귀하의 담당의사는 귀하의 인구학적 자료나 귀하의 건강에 관한 자료를 수집할 것입니다. 수집된 귀하의 자료는 의뢰자에게 보고 될 것입니다. 의뢰자는 귀하의 자료를 전자 자료 처리 체계(시스템)에 저장하고 처리합니다. 귀하의 신원, 즉 귀하의 성명, 주소, 및 기타 정보는 기밀이 유지될 것입니다. 의뢰자의 보관자료에서, 귀하는 오직 코드번호와 이니셜(이름의 머리글자)로만 인식될 것입니다. 단지 시험기관 관계자만이 코드번호와 귀하의 성명을 연관 지을 수 있으며, 이 정보는 최소 3년간 유지될 것입니다.

연구 참여기록과 의무기록 등을 포함한 귀하의 개인정보는 이러한 정보 검토를 담당하는 관련자에게만 제공되도록 관리될 것입니다. 임상시험심사위원회를 포함한 관련 기관은 귀하의 자료를 열람하여 확인하고, 복사할 수도 있습니다. 모니터 요원, 점검자, 임상시험심사위원회와 식약청 등은 연구의 신뢰성을 위하여 귀하의 의무기록을 직접 열람할 수 있는 권한이 있습니다. 귀하는 이 동의서에 서명함으로써 이러한 자료의 직접열람을 허용함을 의미하게 됩니다.

연구결과는 차후 출판될 수 있으나 귀하의 이름과 다른 신상에 대한 정보는 기밀로 유지될 것입니다.

12. 참여 동의 철회

이 연구에 대한 귀하의 참여는 전적으로 자발적인 것입니다. 귀하는 언제라도 연구를 중단할 권리가 있습니다. 연구 참여를 거절하거나 연구를 중단한다고 해서 불이익을 받거나 귀하의 의료처치에 나쁜 영향을 미치지 않습니다.

13. 의뢰회사

본 연구는 (주)선일바이오의 의뢰를 받아 진행됩니다.

14. 문의사항

또한, 귀하가 연구 피험자로서 귀하의 권리에 관한 질문이 있는 경우, 귀하는 시험기관 또는 윤리위원회/임상시험 심사위원회에 연락할 수 있습니다.

연구자	김형준	
연구간호사	이윤숙	
생명윤리위원회		

귀하는 이 피험자 동의서 사본 한 부를 받게 될 것이며, 연구 기간 중 언제라도 귀하의 담당 의사에
게 추가 정보를 요청할 수 있습니다.

Appendix 2. 피험자 동의서 양식

피험자 동의서

임상시험 제목:

건강한 피험자를 대상으로 베타글루칸+유산균의 면역개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한
12 주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험

- ① 본인은 본 연구의 목적, 계획, 과정 및 위험에 관한 정보를 충분히 제공 받았습니디. 연구자는 연구와 관련된 손상의 경우뿐만 아니라 연구에 대한 어떠한 추가적인 정보라도 제공할 책임이 있다는 것을 본인은 알고 있습니다.
- ② 본인은 본 임상연구로부터 얻어진 연구 자료가 의뢰자에 의하여 지정된 모니터요원과 허가 당국 등에 비밀로 양도되는 것을 동의합니다. 본인은 임상 연구 절차 또는 자료의 검증을 위하여, 의뢰자가 비밀 유지를 위반하지 않으면서, 원본 의료 기록에 직접 접근하는 것에 동의합니다.
- ③ 본인은 언제라도 불이익 없이 연구를 중단 할 수 있음을 알고 있습니다.
- ④ 본 연구의 요구사항에서, 본인은 인종적 혈통에 관한 것을 포함하여 본 연구 중 수집된 자료들이 의뢰자 및 의뢰자를 대신하여 전산시스템으로 가공 처리 될 수 있다는 것에 동의합니다.
- ⑤ 본인의 성명 또는 연구 참가자로서 본인을 확인 할 만한 어떤 자료도, 관계 규정에서 요구되는 경우를 제외하고는, 본인의 서면 허가 없이는 공개 되지 않을 것입니다.
- ⑥ 본인은 의료 기왕력에 대한 모든 질문에 대하여 정직하게 답변하였고, 피험자로서의 준수사항을 지킬 것임을 선언합니다.
- ⑦ 본인은 자발적으로 연구 참여에 동의하며 서명된 본 동의서의 사본을 받을 것입니다.

나는 위의 나에게 제안된 치료에 대하여 그 부작용, 가능한 치료 효과에 대해 설명 받았으며 이에 그 치료를 승낙합니다.

[피험자]

성 명: _____ (서명)
 서 명 일: _____ 년 _____ 월 _____ 일
 [대리인/보호자] (필요시)
 성 명: _____ (서명)

서명일: 년 월 일

피험자와의 관계

본 임상시험의 책임자로서 위의 치료에 대하여 환자와 가족에게 그 부작용, 가능한 치료 효과에 대해 환자와 가족이 이해할 수 있는 표현으로 설명하였으며 환자와 가족이 이해하므로 아래에 서명합니다.

[시험 책임자] (또는 시험책임자의 위임을 받은 자)

성명: _____ (서명)

서명일: 년 월 일 년 월 일

Appendix 3. 피험자 보상에 대한 규약

1. 원칙

- 1) (주)선일바이오는 환자의 신체적인 손상(사망 포함)에 대하여 보상한다.
- 2) 손상의 원인이 의학 연구용 시험물질의 투여로 인해 발생하였을 경우 (주)선일바이오는 환자에게 보상한다.
- 3) 의학연구 시험물질에 의해 생긴 부작용이나 부작용 처치 과정에서 발생된 손상이 있는 경우, 의학 연구용 시험물질이 직접적인 원인이 된 손상에 대하여 보상한다.

2. 다음의 경우에는 보상하지 아니한다.

- 1) (주)선일바이오의 후원 하에 집행되지 않았거나 (주)선일바이오가 제공하지 않은 연구용 시험물질로 발생한 부작용에 의한 손상
- 2) 의학 연구용 시험물질 적응증에 대한 효과 또는 혜택을 제공하지 못한 데 대한 보상
- 3) 서로 합의한 연구계획서(protocol)에서 이탈함으로써 야기된 손상
- 4) 환자의 부주의에 의해 초래된 현상

3. 보상 평가 기준

- 1) 보상 수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수로 한다.
- 2) 보상 수준에 대해서 환자와 (주)선일바이오 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여야 한다.

폐사는 앞에서 언급한 여러 제반 내용을 참고하여, 환자가 본 연구에 의해 어떠한 불이익이라도 받지 않도록 주의하며, 만약 본 연구에 의해 문제점이 발생할 경우 피해자 보상 규약에 의거하여 책임을 질 것을 서약합니다.

날 짜: _____

의뢰회사: (주) 선일바이오

직 명: 대표이사

서 명: 송 영 진 (인)

Appendix 4. 헬싱키선언

헬싱키 선언문

인간을 대상으로 하는 의학연구에 있어서의 윤리 원칙

1964.6, 핀란드 헬싱키, 제 18 차 세계의사협회 총회에서 채택

1975.10, 일본 도쿄, 제 29 차 세계의사협회 총회에서 개정

1983.10, 이태리 베니스, 제 35 차 세계의사협회 총회에서 개정

1989.9, 홍콩, 제 41 차 세계의사협회 총회에서 개정

1996.10, 남아프리카 서머셋 웨스트, 제 48 차 세계의사협회 총회에서 개정

2000.10, 스코틀랜드 에딘버러, 제 52 차 세계의사협회 총회에서 개정

2002, 워싱턴, 제 53 차 세계의사협회 총회에서 개정(제 29 조 해설 추가)

2004, 도쿄, 제 55 차 세계의사협회 총회에서 개정(제 30 조 해설 추가)

2008.10, 서울, 제 59 차 세계의사협회 총회에서 개정

A. 서 론

1. 세계의사회(World Medical Association)는 인간을 대상으로 하는 신원확인이 가능한 인체시료 또는 데이터에 대한 연구를 포함하는 의학연구에 대한 윤리적인 원칙으로서 헬싱키선언을 발전시켜왔다.

이 선언은 각 조항의 내용이 다른 모든 관련 조항들의 고려 없이 적용되어서는 안되는 전문과 각 조항을 이해하도록 의도된 것이다.

2. 이 선언은 일차적으로 의사를 위한 것일지라도, 세계의사협회는 인체를 대상으로 하는 그 외의 의학연구 참여자들도 이 원칙들을 적용하도록 권고한다

3. 의학연구의 대상이 된 사람들을 포함하여 환자들의 건강을 증진시키고 보호하는 것이 의사의 의무이다. 의사의 지식과 양심은 이 사명의 수행을 위해 바쳐져야 한다.

4. 세계의사회의 제네바 선언은 “환자의 건강이 내가 고려할 최우선 사항이다” 라는 말로 의사의 임무를 촉구하고 있으며, 의료윤리에 관한 국제협약은 “치료 시 의사는 환자의 최대 이익을 고려해 행동해야 한다” 라고 선언하고 있다.

5. 의학적인 진보는 궁극적으로 인체를 대상으로 하는 실험에 일부분 그 근거를 두고 이루어진다. 의학연구에 있어서 실제보다 과소 표시되는 사람들에게 연구 참여에의 적절한 접근방법이 제공되어야 한다.
6. 인체를 대상으로 하는 의학연구에서는 개별 연구 대상자의 복지가 모든 다른 이익보다 우선 시 되어야 한다.
7. 인체를 대상으로 하는 의학연구의 주된 목적은 질병의 원인, 발달, 작용에 대한 이해를 증진시키고, 예방, 진단, 치료의 방법(수단, 절차, 처치)을 향상시키는 데 있다. 현재 최상의 치료법에 대해서도 연구를 통해 그 안전성, 효능, 효과, 용이성, 그리고 품질을 지속적으로 평가해야 한다.
8. 의료와 의학연구에서 수행되는 시술 대부분은 위험과 부담을 수반한다.
9. 의학 연구는 모든 인간 피험자를 존중하고 그들의 건강과 권리를 보호하는 윤리 기준에 적합해야 한다. 일부 연구대상 집단은 특히 취약한 상태이며 특별한 보호조치가 필요하다. 여기에는 스스로 동의를 승인 또는 거부할 능력이 없는 사람 또는 강요나 부적절한 압력을 받을 수 있는 사람이 포함된다.
10. 의사들은 인간대상 연구를 할 때 국제적 규범 및 기준과 더불어 각기 자국의 윤리적, 법적 규범 및 기준을 숙지하고 있어야 한다. 그 어떤 국가의 윤리적, 법적 요구와 규제 사항도 피험자의 보호를 위해 이 선언문에서 제시된 사항을 축소하거나 배제할 수 없다.

B. 모든 의학연구에 관한 기본 원칙들

11. 의학연구에 있어 피험자의 생명, 건강, 존엄성, 고결성, 자기결정권, 사생활, 그리고 개인정보를 보호하는 것은 의사의 의무이다.
12. 인간을 대상으로 하는 의학연구는 과학적 문헌과 적절한 정보에 대한 철저한 지식 및 적절한 연구실 내에서의 실험 및 동물실험에 근거하는 보편적으로 인정되고 있는 과학적 원칙에 따라 시행되어야 한다. 연구에 이용되는 동물의 복지(welfare)는 존중되어야 한다.

13. 환경에 영향을 줄 수 있는 연구를 수행함에 있어서 적절한 주의가 요구된다.
14. 인간 대상 연구의 계획과 수행과정을 연구계획서에 명확하게 기술해야 한다. 연구계획서에 윤리적 고려사항을 다루며, 이 선언에 명시된 윤리원칙을 따랐다는 점을 명시해야 한다. 연구계획서에 연구기금, 연구의뢰자, 소속기관, 이해관계의 상충, 피험자에 대한 장려, 연구 참여로 해를 입은 피험자에 대한 치료 및/또는 보상규정 등을 밝혀야 한다. 연구계획서에 연구 종료 후 피험자가 연구를 통해 유익성이 확인된 중재법이나 기타 적절한 치료나 혜택을 받을 수 있는 방법을 명시해야 한다.
15. 연구계획서는 연구를 시작하기 전에 심의, 논평, 지도 및 승인을 받기 위해 윤리 위원회에 제출해야 한다. 이 위원회는 연구자, 연구의뢰자 또는 다른 부당한 영향으로부터 독립적이어야 한다. 국제적 규범 및 기준과 더불어 연구가 시행되는 국가 또는 국가들의 법률과 규정을 고려해야 하지만, 피험자의 보호를 위해 이 선언문에서 제시된 사항을 축소하거나 배제해서는 안된다. 위원회는 수행되는 연구를 모니터링할 권리가 있다. 연구자는 중대한 이상반응을 포함한 모니터링 정보를 위원회에 제공해야 한다. 위원회의 심사 및 승인이 없이는 연구계획서를 수정할 수 없다.
16. 인간을 대상으로 하는 의학연구는 적절한 과학적 경험과 자격을 갖춘 자만이 수행해야 한다. 환자나 건강한 자원자에 대한 연구는 충분한 자격을 갖춘 의사나 기타 의료전문가의 감독 하에 실시되어야 한다. 피험자의 보호책임은 항상 의사나 의료전문가에게 있으며, 피험자가 동의했다라도 피험자에게 그 책임이 있는 것이 아니다.
17. 불리한 조건에 있거나 취약한 인구집단 또는 공동체를 대상으로 한 의학연구는 이 연구집단이나 공동체의 건강상 필요와 중요 사항을 해결하기 위한 연구이며, 이들이 연구결과로 혜택을 입을 타당한 가능성이 있을 경우에만 정당화될 수 있다.
18. 모든 인간 대상 의학연구의 수행에 앞서 개별 피험자와 공동체가 감수할 위험과 부담을 이들과 기타 개인이나 공동체가 얻을 예상 이익과 면밀히 비교하여 평가해야 한다.
19. 첫 피험자 모집 전에 모든 임상시험을 공개접근이 가능한 데이터베이스에 등록해야 한다.

20. 의사는 위험성이 적절하게 평가되고 충분히 관리될 수 있다고 확신할 때에만 인간대상 연구를 수행해야 한다. 의사는 잠재적 이익보다 위험이 더 크다고 판단하거나, 긍정적이며 유익한 결과가 나왔다는 결정적 증거가 나오면 연구를 즉시 중단해야 한다.
21. 인간을 대상으로 하는 의학연구가 지닌 중요성이 피험자가 감수할 내재적인 위험과 부담보다 월등히 높을 경우에만 이 연구를 수행한다.
22. 적절한 개인이 의학연구에 피험자로 참여할 때는 반드시 자발적이어야 한다. 가족이나 공동체 대표에게 적절하게 상의했다라도 자발적으로 동의하지 않은 경우에 이들을 연구 참여자로 등록해서는 안 된다.
23. 피험자의 사생활과 개인정보를 보호하며, 연구에 따른 육체적, 정신적, 사회적 영향을 최소화하기 위해 세심한 주의를 기울여야 한다.
24. 인간을 대상으로 하는 의학연구에서는 연구의 목적, 방법, 자금의 출처, 이해관계의 상충, 연구자의 소속기관, 예상되는 이익과 잠재적 위험, 연구에 수반되는 고통 등에 관해 피험자에게 충분히 알려야 한다. 피험자에게 언제라도 불이익 없이 연구 참여를 거부하거나 동의를 철회할 권리가 있음을 주지시켜야 한다. 개별피험자가 구체적으로 필요로 하는 정보와 정보를 전달하는 방법에 각별히 주의를 기울여야 한다. 피험자가 정보를 이해했음을 확인 한 후에 의사나 적절한 자격을 갖춘 자가 피험자에게서 충분한 설명에 근거한 자발적 동의를 받으며, 가능한 서면으로 받아야 한다. 만약 서면동의를 받을 수 없다면, 증인 입회하에 구두로 동의를 받아 기록해야 한다.
25. 개인 식별이 가능한 인체시료나 데이터를 이용한 의학연구의 경우, 의사는 통상적으로 수집, 분석, 저장 및/또는 재사용에 관한 동의를 구해야 한다. 동의 확보가 불가능하거나 비현실적인 경우, 또는 동의를 구함으로써 연구의 타당성이 위협을 받는 경우가 있다. 이때는 연구윤리위원회의 검토와 승인을 받은 후에 연구를 수행할 수 있다.
26. 연구참여에 대한 동의를 구할 때 피험자가 의사와 종속적인 관계에 있거나 강압 하에 동의를 하는 것은 아닌 지 각별한 주의를 기울여 한다. 이 경우라면 피험자와 독립된 위치에 있는 적절한 자격을 갖춘 자가 동의를 구해야 한다.

27. 잠재적 피험자가 무능력자인 경우, 의사는 법적 대리인으로부터 동의를 얻어야 한다. 이런 개인은 연구를 통해 혜택을 받을 가능성이 없다면 연구에 참여시켜서는 안 된다. 단, 그 개인이 대표하는 인구집단의 건강 증진에 기여하며, 적절한 사람을 대상으로 연구를 수행할 수 없으며, 최소한의 위험과 부담만이 수반되는 경우에는 연구대상자가 될 수 있다.
28. 무능력자로 간주되는 잠재적 피험자가 연구 참여 의사를 밝힐 수 있다면, 의사는 법적 대리인의 동의와 더불어 본인의 동의도 구해야 한다. 잠재적 피험자의 동의를 존중해야 한다.
29. 의식이 없는 환자와 같이 육체적 또는 정신적으로 동의 능력이 없는 개인을 대상으로 한 연구는 동의서를 받을 수 없는 육체적 또는 정신적 조건이 연구에 필요한 연구대상의 특징일 경우에만 이 연구를 수행할 수 있다. 이때 의사는 법적 대리인에게 충분한 설명에 근거한 동의를 구해야 한다. 법적 대리인이 없고, 연구를 지체해서는 안될 상황에서는 연구계획서에 피험자가 동의를 할 수 없는 상태에 대한 구체적인 사유가 명시됐고, 연구윤리위원회가 연구를 승인한 경우 동의 없이 연구를 진행할 수 있다. 피험자나 법적 대리인으로부터 가능한 빨리 연구에 계속 참여한다는 동의를 구해야 한다.
30. 저자, 편집자, 그리고 발행인 모두에게 연구결과 발표와 관련된 윤리적 책임이 있다. 저자는 인간피험자 연구결과를 공개할 의무를 지니며, 연구보고서의 완성도와 정확성을 책임져야 한다. 저자는 윤리적인 보고에 관한 공인된 지침을 준수해야 한다. 긍정적 결과만이 아니라 부정적 결과 및 효과를 입증하지 못한 결과도 발표하거나 기타 방식으로 공개해야 한다. 발표문에는 자금출처, 소속기관, 이해관계의 상충에 대해 밝혀야 한다. 본 선언서의 원칙을 준수하지 않은 연구보고서는 발표를 허용해서는 안 된다.

C. 치료를 겸한 의학연구에 관한 부가 원칙

31. 연구에 예방, 진단, 또는 치료적 가치가 충분히 있고, 피험자로 참여하는 환자의 건강에 유해한 영향을 미치지 않는다는 확신이 있는 경우, 의사는 의학연구와 치료를 결합시킬 수 있다.
32. 새로운 방법이 지닌 혜택, 위험, 부담, 효과를 현재 검증된 가장 좋은 치료법의 해당 사항들과 비교해 검사하도록 해야 한다. 단, 아래의 경우는 제외:

- 현재 검증된 치료법이 존재하지 않아 플라세보의 사용이나 무치료가 연구에 허용되는 경우이거나
- 치료법의 효능이나 안전성 판단에 플라세보 사용이 필요하다는 강력하고 과학적인 확실한 방법론적인 사유가 있고 플라세보나 무치료군에 속한 개인이 심각하거나 돌이킬 수 없는 해를 입을 위험이 없는 경우라야 한다. 이 선택사항을 남용하지 않도록 극도의 주의를 기울여야 한다.

33. 연구 종료 시, 연구에 참여한 환자에게 연구 성과에 대한 정보를 얻을 권리, 그리고 그 성과의 혜택을 받을 권리, 예를 들어 유익성이 확인된 시술이나 기타 적절한 치료나 혜택을 받을 권리를 부여한다

34. 의사는 환자에게 치료의 어떤 측면이 연구와 관련되는지 충분히 알려주어야 한다. 환자가 연구 참여를 거절하거나 참여 결정을 철회하여도 환자와 의사관계에 지장이 생겨서는 안 된다.

35. 환자 치료 과정에서 검증된 치료법이 존재하지 않거나 효과가 없는 경우, 의사가 검증되지 않은 치료법이 환자의 생명을 구하거나, 건강을 회복시키고, 고통을 경감시킬 수 있다고 판단한다면, 전문가 조언을 구한 후 환자나 법적 대리인으로부터 충분한 설명에 근거한 동의를 받아 이 치료법을 사용할 수 있다. 가능하다면, 이 치료법을 연구 대상으로 정해 안전성과 효능을 평가할 수 있도록 연구를 설계해야 한다. 모든 경우에 새로운 정보를 기록하고, 적절하다면 공개하도록 해야 한다.

다. 녹색기술 인증

- 본 연구를 통해 개발된 고생산성 및 고순도의 β 1,3/1,6-glucan에 대한 녹색기술인증을 신청 및 획득할 예정이며, 녹색기술 분류는 ‘신소재 - 농림수산자원 유래 천연 소재 - 기능성 바이오소재’ 분야이며, 인증대상의 녹색기술수준은 핵심(요소)기술은 ‘미생물 유래 기능성 성분 및 산업용 효소 생산기술’로서 기존 공정 대비 최소 생산효율 15% 이상 향상시킴과 동시에 임상시험결과를 바탕으로 녹색기술인증을 2017년 12월~2018년 01월 중에 신청 예정임

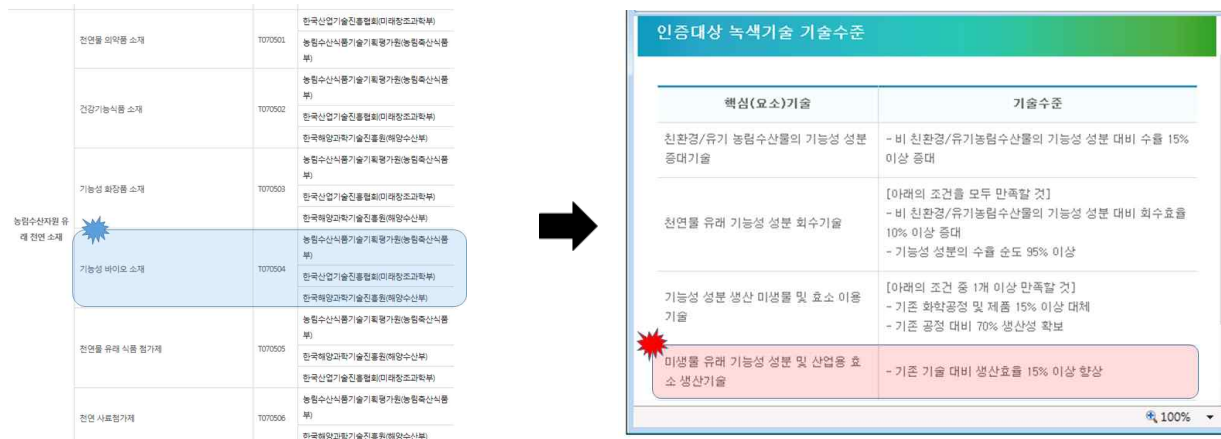


그림. 녹색기술인증 획득을 위한 녹색기술 분류 및 기술수준

라. NDI (New Dietary Ingredient) 인증

- 본 연구를 통해 개발된 핵심원료인 β 1,3/1,6-glucan을 NDI에 인증을 받기 위하여 독성시험, 기능성규명, 안전성시험, 임상시험자료(2018년 1월 종료 예정) 등을 통하여 다음과 같은 절차를 통해 진행 할 예정에 있음
- NDI는 1994년 10월 15일 이전에 미국 내에서 식이보충제로 판매된 적이 없는 원료를 말한다. 제품에 사용한 원료가 NDI 인지를 판단하는 첫 단계로, 해당 품목이 “식이원료” 인지를 검토하여야 한다. 즉 해당 품목이, 비타민, 무기질, 허브 또는 보태니컬, 아미노산, 총 식이 섭취를 증가함으로써 식사를 보충하기 위한 품목, 혹은 위 식이원료의 농축물, 대사산물, 구성성분, 추출물 혹은 이들의 혼합물 인지를 검토하고 이에 해당하지 않으면 NDI가 아니다. 의약품은 NDI가 될 수 없으므로 NDI로 신청하기 전에 의약품이 아닌지 확인해야 한다
- NDI를 식이보충제의 원료로 사용할 경우에는, 시판 75일 전에 FDA에 통지하여야 한다. FDA는 접수 후 90일 간, 접수 사실 자체와 제출된 정보를 기밀로 취급하며, 접수 후 90일 째에 모든 자료를 대중에게 공개한다. 단, 기업 비밀에 해당하는 정보는 제외된다. 통지문에는 아래와 같은 내용을 포함해야 한다.

- ① 제출자 성명과 주소
- ② 신규 식재료의 명칭 (허브나 보내니컬의 경우, 저자를 포함하여 라틴 이름을 포함함)
- ③ 신규 식재료가 들어있는 식이보충제 설명
 - 제품에 함유된 해당 신규 식품원료의 수준
 - 표지에 서술된, 해당 제품의 사용조건, 사용조건에 대한 서술이 없을 경우에는 일반적 사용조건
 - 사용역사 또는 해당 식재료를 제품 표지에서 권고하였거나 제안한 조건에서 사용하였을 때, 안전할 것으로 합리적으로 기대되는 안전성 근거자료
- ④ 담당자 사진

○ NDI의 안전성을 입증하기 위해 필요한 자료에 대해서는 현재 FDA의 지침이 없으며 기능성 입증에 위한 자료는 반드시 제출할 필요는 없으나 제출할 경우, 제안된 섭취량에서 안전하다는 것을 증명할 수 있으므로 NDI 등록 시 유리할 수 있다. 안전성 근거 자료로는 논문 또는 해당원료를 이용해 실시한 독성연구(유전 독성연구, 90일 독성연구, 이상반응을 관찰한 잘 설계된 임상시험) 자료가 이용된다

8. β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 이용한 Probiotics 제형 개발

가. 베타글루칸 제형을 위한 함량 분석

(1) 실험방법 및 결과

- 시료 약 2 ~ 10 g을 정밀히 달아 삼각플라스크에 취하고, (지방이 10%이상인 경우 탈지하고, 당을 많이 함유한 경우 85% 에탄올 용액으로 시료 1 g당 10 mL씩으로 세척하였다) 추가로 증류수 100 mL를 가하였다. 1 N 수산화나트륨용액을 이용하여 pH 6.9로 한 후, 20°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해 시켰다. 위의 용액에 0.1 N 염산용액으로 pH 5.0으로 맞추고 셀룰라아제 (50 unit)를 넣고, 37°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소 분해시켰다. 위의 용액에 프로테아제(10 unit) 약 15 ~ 80 mg을 넣고 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 7.5로 한 후 37°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소 분해 시킨다. 위의 용액에 아밀로글루코시다제(70unit) 약 20 ~ 100 mg을 넣고 0.1 N 염산용액으로 pH 4.8로 한 후 60°C에서 2시간 동안 진탕하여 효소 분해시켰다.
- 효소 분해물에 95% 에탄올 400 mL를 가하여 4°C에서 12시간 동안 침전 시킨다. 위의 용액을 원심분리 (10,000 rpm ,10분)하여 시료의 침전물을 취한다. 시료의 침전물에 80% 에탄올 500 mL를 가하여 4°C에서 1시간동안 침전시켰다. 위의 용액을 원심분리(10,000 rpm, 10분)하고, 원심분리된 침전물에 증류수 20 mL를 가한 후 침전물을 혼합 하여 균질화 시켰다.. 위의 용액을 증류수로 100 mL가 되도록 한 후, 이를 적정 농도가 되도록 희석하여 시험용액으로 한다. 25 mL 시

시험관을 농도별 표준용액과 시험용액(공시험포함)으로 구분하여 각각 5% 페놀용액 1 mL를 넣고, 위의 시험관에 농도별 표준용액을 각각 1 mL씩 가하고, 시험용액은 시험용액 0.1 mL과 증류수 0.9 mL를 가하였다. 공시험은 증류수 1 mL을 가하고, 이 용액들을 10 초간 잘 흔들어 섞은 후, 위의 시험관에 각각 황산 5 mL을 가하여 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켰다.

[분석및계산]

흡광도측정은 파장 470 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{베타글루칸함량(mg/g)} = C \times a/S \times 10 \times 1/1,000 \times 0.9$$

C : 시험용액중의글루코오스농도($\mu\text{g/mL}$)

a: 시험용액의전량(mL)

10: 희석배수

S: 시료채취량(g)

1/1,000: 단위환산계수

0.9: 베타글루칸전환계수(162/180)

선일바이오(주)에서 생산된 베타 1,3/1,6글루칸의 함량 : 85%로 계산됨

(2) Toll-like receptor 2 & 4 활성 유도 유산균 생산

- 협동기관 한국생명공학연구원에서 실험된 Toll-like receptor 2&4 활성 유도 유산균 대량생산법 (yeast extract 1%, sucrose 1.5%를 함유한 배지에 beef extract의 유기질소원의 농도를 1.5% 첨가)을 이용하여 임상시험용 Toll-like receptor 2&4 활성 유도 유산균을 대량생산 하였다. 유산균은 동결건조시 그 수가 줄어들 확률이 높아, 동결건조 보호제로써 젤라틴을 사용하여 균을 보호하였고, 최종 5 kg이 생산되어 이를 임상시험용 제품 생산에 사용하였다.

(3) 임상시험용 제품 제형 개발

- 총합량 : 2,000 mg (베타글루칸 200 mg, 유산균500 mg, 부형제1,300 mg)
- 베타글루칸(β -1,3/1,6 glucan) : 200 mg (분자량은 대략 1,000,000~3,000,000)
- 유산균(*Lactobacillus plantarum* SI-1309) : 500 mg (1포당 균수 1.25×10^9 cfu/g)
 - 실제 건기식에서 식용으로 사용될 수 있는 19가지 유산균중 하나에 속함
 - 원래 유산균 제조시 균수는 5.0×10^9 cfu/g 이었으나, 제품으로 만들었을 때는 1포 (2 g)에 500 mg 들어있으므로(1/4희석) 1.25×10^9 cfu/g 가 됨.

- 본 유산균은 젓갈에서 유래한 균주임

■ 부형제 : Dextrin



그림 19. 임상시험용 제품 제형화 및 생산

8. β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 이용한 임상시험

- IRB 승인서

세명대학교부속제천한방병원



임상시험심사위원회

SMJOH 15-1002

임상시험심사위원회 회의록

IRB SOP 제41조

Version 1.1

임상시험심사위원회 회의록

기안자	김기태	기안일시	2016년05월12일
결재자	김희택	결재일시	2016년05월19일
회의일자	2016년05월09일	회의장소	세미나실
회의시간	18:00 - 19:00	회의주재자	위원장 김희택
심사내용	임상시험 심사의뢰서	심사건수	1건
IRB File No.	2016-15	연구책임자	부인과 김형준
심사구분	정식심사	심사결과	승인

참석위원(평가위원)

No	성명	소속	직능	참석여부
1	김기태	세명대학교제천한방병원	원내의료직(행정간사)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
2	김형준	세명대학교제천한방병원	원내의료직(전문간사)	<input type="checkbox"/> 참석 <input checked="" type="checkbox"/> 불참
3	김희택	세명대학교제천한방병원	원내의료직(위원장)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
4	노정두	세명대학교제천한방병원	원내의료직(관리약사)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
5	고성권	세명대학교제천한방병원	원내의료직	<input type="checkbox"/> 참석 <input checked="" type="checkbox"/> 불참
6	배현하	천주교 원주교구	원외위축직(종교인)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
7	임강현	세명대학교	원외위축직(의료인)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
8	정진화	세명대학교	원외위축직(비의료인)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
9	최상진	(주)현대상화재보험	원외위축직(일반인)	<input checked="" type="checkbox"/> 참석 <input type="checkbox"/> 불참
10	박흥원	세명의원	원내의료직	<input type="checkbox"/> 참석 <input checked="" type="checkbox"/> 불참

연구과제명	건강한 피험자를 대상으로 베타글루칸+유산균의 면역개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험
심사내용	<p>본 회의에서는</p> <ol style="list-style-type: none"> 총 10명의 IRB위원중 7명이 참석하여 과반 수 이상 참석 하였습니다. <ul style="list-style-type: none"> - 불참위원 : 김형준, 고성권, 박흥원 - 김희택 위원장이 회의를 진행하였습니다. 참석한 7명의 위원중 3인의 원외위원이 포함되어 있습니다. 이해상충으로 사퇴한 의원 및 그밖의 사유로 인해 심의에서 면제된 위원은 없이 정족수를 충족 하였습니다. RISK : <ul style="list-style-type: none"> 아직 안정성과 유효성이 입증되지 않은 시험제품(글루칸+유산균제제)을 사용함으로 인해 발생 할 수있는 잠재적인 부작용이 예상되지만, IB자료를 검토한결과 대상자에 대한 위험은 최소위험을 상회하지 않을 것으로 판단



	<p>합니다.</p> <p>5. BENEFIT: 번역기능개선에 이익이 될것으로 기대됩니다.</p> <p>6. 본 과제에서는 의뢰기관의 모니터링 계획이 있음을 확인 하였습니다.</p> <p>7. 연구책임자(김형준교수)는 본 연구를 수행하기에 적절한 자격과 경험을 갖추었다고 판단합니다.</p> <p>상기 과제의 연구계획서 및 제출된 서류를 정식심사에서 검토한 결과, 효과 및 안전성이 완전히 입증되지 않은 시험제품으로 인한 잠재적인 부작용이 예상되지만, 대상자에게 부가되는 위험은 최소 위험을 상회하지 않고, 대상자에게 기대되는 직접이익이 위험을 상회한다고 단단합니다. 참석위원 7명중 5명이 "승인" 2명이 "시정승인"에 찬성하여 과자에의 최종심사의견을 "승인"으로 결정하며, 다음 사항에 대하여 시정을 해주시기 바랍니다.</p> <p>(시정사항)</p> <p>계획서</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 포장단위를 포로 수정하여 주시기 바랍니다. 2. 1일 복용용량을 명확하게 해주시기 바랍니다. <p>설명문</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 연구에 참여하는 보상부분에 교통비 금액을 구체적으로 밝혀주시기 바랍니다. 2. 연구자/공동연구자의 연락처를 추가하시기 바랍니다.
--	--

세명대학교부속제천한방병원
임상시험심사위원회



9. 베타글루칸 및 유산균 복합제를 이용한 임상시험

임상시험보고서

건강한 대상자를 대상으로 베타글루칸 및 유산균 복합제의 면역개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보대조 임상시험

- 임상시험 책임자 : 세명대학교한방병원 부인소아과 교수 김형준
- 임상시험 의뢰자 : 선일바이오(주)
- 시험용 건강기능식품명 : 베타글루칸 + 유산균 복합제
- CSR Version : 2.0
- Protocol No. : SUNIL_GLUPB_01
- 임상시험단계 : 건강기능식품 임상시험
- 시험시작일 : 2016. 05. 17
- 시험종료일 : 2016. 12. 18
- 보고서 제출일 : 2017. 04

대상자 수(계획된 수 및 분석에 포함된 수):

- 계획된 대상자 수
 - 스크리닝 레수: 70명
 - 무작위 배정레수: 46명
 - 유효성 분석레수: 46명
- 분석에 포함된 수
 - 무작위 배정번호 배정 대상자 수: 46명
 - Safety 분석 대상자 수: 46명
 - FAS 분석 대상자 수: 46명
 - PPS 분석 대상자 수: 46명

대상질환: 면역기능 개선을 원하는 대상자

선정 · 제외기준:

선정기준

- 1) 만 18세 이상 70세 미만의 남, 여 대상자
- 2) 최근3개월 이내 상기도감염을 겪은 대상자
- 3) 스크리닝방문시 WBC 수치가 $6.0 \times 10^9/L$ 이하인 대상자
- 4) 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 임상시험동의서에 서명하고 동의한 대상자

제외기준

- 1) 베타글루칸+유산균제제성분에 알레르기가 있는 대상자
- 2) 스테로이드 제제를 사용하고 있는 대상자

- 3) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 대상자
- 4) 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 대상자
- 5) 1개월 이내에 다른 임상시험 또는 임상시험에 참여한 대상자
- 6) BUN 수치가 정상치의 2 배이상인 대상자
- 7) 갑상선질환 대상자
- 8) Serum creatinine 이 1.5mg 이상인 대상자
- 9) 정신질환(우울증, 정신분열등) 대상자
- 10) 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 대상자
- 11) 임신 혹은 수유 중인 대상자
- 12) 임신 가능성이 있는 가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)
- 13) 기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

임상시험용제품의 용법 · 용량:

사용량

1일 1회 1회당 2포 하루 중 아침식사 후 복용

적용/관찰기간: 임상시험용 제품의 적용은 방문2에서 무작위배정을 받아 1일 1회 회당 2포 투여이며, 관찰기간은 12주다.

통계분석방법:

유효성 분석은 FAS 분석 결과를 주분석으로 하였다. 인구학적 자료는 FAS 로, 안전성에 대한 자료는 SS(Safety Set)으로 실시하였다.

<유효성 평가>

1. 주평가변수:

: 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 T cell 및 B cell(subset)의 변화에 대한 차이를 분석하였다.

2. 부평가변수

- ① 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 WBC 수치의 변화
- ② 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Neutrophile 수치의 변화
- ③ 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Lymphocyte 수치의 변화

- ④ 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Monocyte 수치의 변화
- ⑤ 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Basophile 수치의 변화
- ⑥ 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Eosinophile 수치의 변화
- ⑦ 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 NK cell 수치의 변화

<안전성 평가>

임상시험 투여 전 대비 투여 후 12주째 활력징후 및 실험실적검사 항목을 비교하였다. 또한, 임상시험 건강기능식품 투여후 발현한 이상반응을 군간 비교 평가하였다.

1. 요약 및 결론:

유효성 결과

(1) 주평가변수

임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 T cell 및 B cell(subset)의 변화

- Baseline에서 시험군의 T cell 평균값은 138.37 ± 12.58 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 141.58 ± 13.26 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 T cell 평균값은 138.82 ± 11.32 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 141.24 ± 12.46 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.
- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 T cell 평균값은 0.45 ± 1.26 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 -0.34 ± 0.79 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가되었으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.
- Baseline에서 시험군의 CD3 평균값은 70.03 ± 3.24 이었고, 대조군의 CD3 평균값은 72.74 ± 2.18 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD3 평균값은 70.38 ± 5.37 이었고, 대조군의 CD3 평균값은 72.54 ± 7.16 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.
- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD3 평균값은 0.35 ± 2.13 이었고, 대조군의 CD3 평균값은 -0.20 ± 4.98 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가되었으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.
- Baseline에서 시험군의 CD4 평균값은 40.17 ± 3.23 이었고, 대조군의 CD4 평균값은 43.25 ± 4.59 이고, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD4 평균값은 41.08 ± 7.85 이었고, 대조군의 CD4 평균값은 42.65 ± 8.67 이고, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD4 평균값은 0.91 ± 4.62 이었고, 대조군의 CD4 평균값은 -0.60 ± 4.08 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.
- Baseline에서 시험군의 CD8 평균값은 26.89 ± 7.51 이었고, 대조군의 CD8 평균값은 26.18 ± 6.08 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD8 평균값은 26.65 ± 8.76 이었고, 대조군의 CD8 평균값은 25.81 ± 7.05 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.
- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD8 평균값은 -0.24 ± 1.25 이었고, 대조군의 CD8 평균값은 -0.37 ± 1.71 로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 감소를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.
- Baseline에서 시험군의 B cell 평균값은 14.56 ± 3.45 이었고, 대조군의 B cell 평균값은 14.62 ± 1.40 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 B cell 평균값은 13.85 ± 6.57 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 13.92 ± 7.67 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.
- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 B cell 평균값은 -0.71 ± 5.17 이었고, 대조군의 B cell 평균값은 -0.70 ± 6.27 로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

(2) 부평가변수

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 WBC 수치의 변화
 - 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 WBC 평균값은 0.49 ± 0.91 이었고, 대조군의 WBC 평균값은 0.23 ± 0.80 으로, 대조군 대비 시험군에서 높은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.
- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Neutrophile 수치의 변화
 - 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Neutrophile 평균값은 1.93 ± 7.90 이었고, 대조군의 Neutrophile 평균값은 1.05 ± 6.21 로, 대조군 대비 시험군에서 높은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.
- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Lymphocyte 수치의 변화

- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Lymphocyte 평균값은 -2.30 ± 6.49 이었고, 대조군의 Lymphocyte 평균값은 -1.27 ± 5.20 으로, 대조군 대비 시험군에서 높은 감소를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Monocyte 수치의 변화

- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Monocyte 평균값은 0.03 ± 2.00 이었고, 대조군의 Monocyte 평균값은 0.63 ± 2.06 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Basophile 수치의 변화

- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Basophile 평균값은 0.02 ± 0.34 이었고, 대조군의 Basophile 평균값은 -0.02 ± 0.28 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Eosinophile 수치의 변화

- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Eosinophile 평균값은 0.31 ± 1.34 이었고, 대조군의 Eosinophile 평균값은 -0.40 ± 2.22 로, 대조군 대비 시험군에서 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 NK cell 수치의 변화

- 투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 NK cell 평균값은 0.37 ± 5.57 이었고, 대조군의 NK cell 평균값은 0.60 ± 2.66 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

안전성 결과

- 임상시험기간 동안 발현된 이상반응은 시험군에서 3명(13.04%), 4건이었고, 대조군에서 4명(17.39%) 5건으로 나타났으나 발현율에 군간 통계적 유의한 차이는 없었다. 시험용 건강기능식품과의 인과관계가 ‘관련성이 명백함’, ‘관련성이 많음’, ‘관련성이 의심됨’ 및 ‘평가불가능’ 평가된 이상약물반응은 시험군과 대조군 모두 1건도 없었으며, 중대한 이상반응은 없었

다

- 이상반응의 종류별 분포는 호흡기계 질환에서 5명(10.87%), 5건으로 가장 많이 발생되었고, 중추 및 말초신경계 장애가 2건의 순서로 발생되었고, 전신질환과 생식기능 장애(여성)에서 각각 1건씩 발생되었다. 세부 분류에서는 두통과 감기가 각각 2건으로 가장 많이 발생되었고, 다른 질환은 모두 1건씩 발생되었다

결론

본 임상시험을 통해 면역기능개선을 원하는 대상자에서 12주째 평가자에 의해 평가된 T cell 및 B cell에 대하여 투여 전 대비 12주 투여후 변화량에 군간 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않아 대조군 대비 시험군이 우월한 것은 확인하지 못하였다. 그러나, 임상적으로 유의할 만한 이상반응은 없었고, 그 밖의 안전성 평가항목에서 특별히 임상적으로 유의할 만한 결과는 없었다.

2. 보고서 목차

signature page 2

1. 요약 (Synopsis)4

2. 보고서 목차 11

Appendx 15

3. 약어 및 용어 정의 16

4. 윤리적 고려 17

5. 시험자 및 지원조직 18

5.1 임상시험책임자, 담당자의 성명 및 직명18

5.2 임상시험용 건강기능식품 관리자의 성명 및 직명18

5.3 의뢰자명, 통계분석기관, Audit등 연구지원조직18

6. 서론 19

7. 연구 목적	19
8. 임상시험 계획	20
8.1 전반적인 임상시험 방법	20
8.2 대상자의 선정	21
8.2.1 선정기준	21
8.2.2 제외기준	22
8.3 임상시험의 실시	22
8.3.1 병용금기약물	22
8.3.2 중지 및 탈락기준	23
8.4 유효성 및 안전성 연구자료의 평가항목	23
8.4.1 유효성 평가항목	23
8.4.2 이상반응을 포함한 안전성의 평가방법, 평가기준 및 해석방법	24
이상반응	24
중대한 이상반응	24
임신	25
8.6 통계분석방법	25
8.6.1 통계 분석	25
FAS (Full Analysis Set)	26
PPS (Per-Protocol Set)	26
Safety Set	26
8.6.2 목표한 대상자의 수 및 그 근거	27
8.6.3 임상시험의 수행 및 변경	29
9. 대상자	30
9.1 대상자의 임상시험 참여 상태	30
9.2 분석군 현황	31
10. 임상시험의 결과	31
10.1 분석에 포함할 대상자 군의 선정	31

10.2 대상자의 인구학적 정보 및 기타 시험 전 특성에 대한 정보31

10.2.1 대상자 인구학적 기초자료 32

10.2.2 대상자의 병력 33

10.2.3 병용약물 33

10.3 유효성 평가36

10.3.1 분석의 일반적인 원칙 36

10.3.2 유효성 평가변수 36

11. 안전성 평가 46

11.1 이상반응46

11.1.1 이상반응에 대한 요약 46

11.1.2 이상반응 세부 발현 현황 46

11.1.3 중대한 이상반응 47

11.2 기타 안전성 평가47

11.2.1 실험실적 검사 47

11.2.2 활력 징후 52

12. 고찰 및 결론 55

List of Tables(별첨)

테이블명	FAS	SS
인구학적 기초자료	Table 1	
기저 증상 및 징후	Table 2	
과거병력	Table 3	
수술력	Table 4	
병용약물	Table 5	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 T cell 변화량	Table 6	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 CD3 변화량	Table 7	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 CD4 변화량	Table 8	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 CD8 변화량	Table 9	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 B cell 변화량	Table 10	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 WBC 변화량	Table 11	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Neutrophile 변화량	Table 12	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Lymphocyte 변화량	Table 13	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Monocyte 변화량	Table 14	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Basophile 변화량	Table 15	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Eosinophile 변화량	Table 16	
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 NK cell 변화량	Table 17	
이상반응 발현 요약		Table 18
이상반응 발현내역		Table 19
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 RBC 변화량		Table 21

테이블명	FAS	SS
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Hemoglobin 변화량		Table 22
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Hematocrit 변화량		Table 23
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Platelet 변화량		Table 24
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 BUN 변화량		Table 25
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Creatinine 변화량		Table 26
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 pH 변화량		Table 27
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Specific gravity 변화량		Table 28
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 SBP 변화량		Table 29
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 DBP 변화량		Table 30
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Pulse 변화량		Table 31
건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Temperature 변화량		Table 32

3. 약어 및 용어 정의

AST	: ASpartate Transaminase
BUN	: Blood Urea Nitrogen
CRF	: Case Report Form
FAS	: Full Analysis Set
IRB	: Institute Review Board
LOCF	: Last Observation Carried Forward
PPS	: Per Protocol Set
RBC	: Red Blood Cell
WBC	: White Blood Cell
WHO ART	: World Health Organization Adverse Reactions Terminology
WHO ATC	: World Health Organization Anatomical Therapeutic Chemical Classification System

4. 윤리적 고려

본 임상시험은 임상시험관리기준에 따라 진행되었다. 또한 대상자의 권익과 안전을 우선으로 하는 헬싱키 선언문에 따라 본 임상시험을 실시하였다.

본 임상시험의 임상시험 계획서, 대상자 동의서 및 설명문, 기타 임상시험과 관련된 모든 사항은 임상시험실시기관의 임상시험심사위원회(IRB)로부터 승인을 받았으며, 시험계획을 변경한 경우 수정된 내용을 실시기관의 임상시험심사위원회에 통보하여 승인을 받은 이후에 실시하였다.

임상시험에 들어가기 전에 대상자에게 시험내용 및 시험용 건강기능식품의 효과, 이상반응 및 안전성에 대한 모든 사항을 설명한 후 환자 자신이 자발적으로 본 연구에 참여하겠다는 동의서를 받고 연구에 참여하였다. 대상자 동의는 시험담당자 및 대상자가 서명하여 확인하도록 하였으며, 대상자 동의서 양식은 시험의뢰자가 시험담당자에게 공급하였다. 시험담당자는

대상자로부터 동의를 얻기 이전에는 대상자에게 임상시험을 목적으로 특별히 필요한 검사를 할 수 없도록 하였다.

모든 대상자의 실명은 비밀로 유지되었고, 시험 참여와 함께 부여한 대상자 번호에 의해 기록 및 평가 시 대상자를 확인하도록 하였다. 대상자에게는 모든 시험자료가 컴퓨터에 저장되고 엄격히 비밀사항으로 다루어진다는 것을 알려주었다. 서명을 받은 동의서는 임상시험이 종료된 후, 실시기관의 임상시험 담당자가 보관하도록 하였다.

IRB 임상시험 계획서의 승인을 득한 후(최초 승인일: 2016.05.12), 2016년 05월 17일에 임상시험을 개시하였다.

5. 시험자 및 지원조직

5.1 임상시험책임자, 담당자의 성명 및 직명

임상시험 책임자:

세명대학교한방병원 부인소아과 교수 김형준

임상시험 담당자:

세명대학교한방병원	부인소아과	전공의	남은영
세명대학교한방병원	부인소아과	연구간호사	이윤숙

5.2 임상시험용 건강기능식품 관리자의 성명 및 직명

임상시험용 건강기능식품 관리자

세명대학교한방병원	부인소아과	전공의	남은영
-----------	-------	-----	-----

5.3 의뢰자명, 통계분석기관, Audit 등 연구지원조직

(1) 의뢰자명

(주)선일바이오 대표이사: 송영진

주소: 전라남도 장흥군 장흥읍 산단1호 49

(2) 임상시험수탁기관

(주)해밀턴CS, 오준환

주소 : 서울시 서초구 양재천로 23길 9 올림빌딩 4층

(3) 임상시험 Auditor

해당없음

6. 서론

임상시험의 배경

인간 생활에의 질적 향상과 더불어 놀랄만한 과학의 발전에 그 동안 불치병으로 여겼거나 인류를 끊임없이 괴롭혀 오던 각종 질병에 대한 원인과 그에 대한 치료법이 연구 되어지고 있지만 시간의 흐름 속에 신종 혹은 과거에 그 위험성을 간과해 오던 질병들이 다양한 진화를 거듭해 새로운 사안으로 대두되는 시점인 현대 사회에서 면역질환은 대단히 심각한 문제로 인식되어지고 있는 실정이다.

면역기능은 대부분의 사람에게는 외부 물질에 대해 인체의 방어능력으로 면역기능의 저하는 본래 우리 몸이 가지고 있는 자연치유 기능을 점차 약화시켜 아토피성 피부염, 알레르기 비염, 두드러기, 과민성 폐렴, 중이염, 허약체질, 식욕부진, 성장장애, 집중력 저하, 잦은 감기 등과 같은 다양한 질병발생의 주요 원인 중 하나이다.

영양불량이 곧 면역 기능 저하와 직접적 관련이 있다는 다양한 연구결과가 있으며, 이는 면역력은 개인별로 차이가 있어 보다 장기적인 관점에서 접근할 필요가 있다. 따라서 장기간 복용해도 무리가 없는 식품, 특히 천연식품의 섭취가 바람직한 방안으로 지목되고 있다.

베타글루칸 및 유산균제강장작용, 항산화작용, 세포활성화 작용, 면역조절작용, 항염작용, 건강기능개선 등 다양한 효능을 보이는 것으로 알려져 있다.

(주)선일바이오 연구팀에서는 베타글루칸+유산균제제를 이용한 다양한 *in vivo*, *in vitro* 실험을 진행하였다. 그 결과 베타글루칸+유산균제제는 대식세포주에 처리시 농도에 따라 의존적으로 NO 생성량 및 iNOS(inducible nitric oxide synthase)이 증가되는 것과 TNF- α , IL-6 및 IL-4 등의 사이토카인분비량이 증가되는 것을 확인할 수 있어 면역을 활성화 시킬 수 있는 소재임을 확인하였다. 또한 동물 실험을 통한 외부 자극에 의한 면역 조절 작용을 관찰한 결과, 자극으로 인한 과도한 면역 반응의 생성을 베타글루칸+유산균제제의 투여로 조절이 가능함을 확인할 수 있었다.

이에 따라 본 임상시험에서는 베타글루칸+유산균제제의 섭취로 면역기능의 개선에 도움이 되는지 확인하고자 임상시험을 실시하게 되었다.

7. 연구 목적

면역기능개선이 필요한 대상자를 대상으로 베타글루칸+유산균제제 또는 플라세보를 12주간 투여 후 각 군의 유효성 및 안전성을 평가하여 베타글루칸+유산균제제가 플라세보에 비해 우월함을

입증하고자 한다.

8. 임상 시험 계획

8.1 전반적인 임상시험 방법

투여일정

임상시험용 시험물질의 투약은 대상자가 동의서에 서명하고 스크린을 통하여 선정/제외기준에 부합하는 대상자들을 시험군과 플라세보군으로 무작위 배정하여, 양쪽군 동일하게 시험물질인 베타글루칸+유산균제제와 플라세보를 기준으로 투여한다.

임상시험의 기간

본 임상시험의 관찰기간은 투약 시작 후 12주며, 전체 임상시험기간은 대상자 등록 후 12개월로 계획되어 있다. 하지만 대상자 등록기간의 연장 등의 사유로 전체 임상시험 기간은 연장 될 수 있다.

임상시험일정표

시 험 항 목	Screening	Baseline	Treatment	Final Visit
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
	첫 투여 전 14일 이내	Week 0 (Day 0)	Week 4 (Day 28±3)	Week 8 (Day56±3)
서면동의 ¹⁾	●			
인구학적 조사 ²⁾	●			
병력·약물력 조사 (시험참여4주이내)	●			
활력징후 ³⁾	●	●	●	●
신체검사 ⁴⁾	●	●	●	●
실험실 검사 ^{5, 6)}	●	(●)		●
T cell 및 B cell 검사 ^{5, 6)}	●	(●)		●
선정/제외기준 ⁷⁾	●	●		
무작위 배정		●		
임상시험물질 처방 및 교부		●	●	
임상시험물질 반납 및 순응도 평가			●	●
병용 약물 조사	●	●	●	●
이상반응 확인			●	●
임상시험 종료 평가				●

1) 임상시험에 들어가기 전, 본 임상시험의 목적과 내용에 대하여 대상자 및 보호자(법적 대리인)에게 상세히 설명한 후 각각에 대하여 문서로서 동의를 받는다. 서면 동의 취득은 어떠한 임상시험 과정보다도 앞서서 이루어져야 하며 동의서는 대상자 및 보호자(법적 대리인)가 직접 서명 및 날짜를 기입하는 것을 원칙으로 한다.

2) 모든 동의를 취득한 이후에 성별, 나이, 체중등의 정보를 조사한다.

3) 좌위 수축기/이완기 혈압, 맥박 및 체온등을 측정한다.

4) 시험책임자 또는 시험담당자가 대상자에게 문진, 시진, 촉진, 청진 등의 검사를 통해 얻게 되는 정보이다 (신장/체중은 시험기간 중 동일한 자동측정기를 이용하고 신장은 첫 방문 시에만 측정하며 신을 벗고 cm 단위로 측정한다.

5) 대상자는 다음의 항목을 검사한다

혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono).T cell / B cell (subset 포함), NK cell

혈액화학적 검사: BUN, creatinine

뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose

임신검사 : 가임기여성에 한하여 urine으로 측정한다.

* 혈액화학/뇨검사/임신검사(해당하는경우)/T cell 및 B cell 검사는 실험실검사에서 선정기준에 적합한 경우에만 실시하도록 한다.

6) 대상자는 채혈하기 가능한 전날 8시간 이상 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다

- 7) 선정/제외기준은 Screening 방문 시에 확인한다. 기준에 적합한 대상자는 순차적으로 대상자 등록번호가 부여된다.
- 8) 시험자의 판단에 따라 시험물질 최종 투여 후 혹은 조기 투여 중지 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 4 주 이내 다시 방문하도록 함.

1. 8.2 대상자의 선정

8.2.1 선정기준

1. 만 18세 이상 70세 미만의 남, 여 대상자
2. 최근3개월 이내 상기도감염을 겪은 대상자
3. 스크리닝방문시 WBC 수치가 $6.0 \times 10^9/L$ 이하인 대상자
4. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 임상시험동의서에 서명하고 동의한 대상자

8.2.2 제외기준

1. 베타글루칸+유산균제제성분에 알레르기가 있는 대상자
2. 스테로이드 제제를 사용하고 있는 대상자
3. 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 대상자
4. 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 대상자
5. 1개월 이내에 다른 임상시험 또는 임상시험에 참여한 대상자
6. BUN 수치가 정상치의 2 배이상인 대상자
7. 갑상선질환 대상자
8. Serum creatinine 이 1.5mg 이상인 대상자
9. 정신질환(우울증, 정신분열등) 대상자
10. 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 대상자
11. 임신 혹은 수유 중인 대상자
12. 임신 가능성이 있는 가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)
13. 기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자
기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

2. 8.3 임상시험의 실시

8.3.1 병용금지약물

본시험의 병용금지약물은 다음과 같다.

- 1) 기타면역억제제
- 2) Steroids제제
- 3) 건강기능식품

그 외 약물은 대상자의 건강상태를 고려하여 연구자가 판단하여 병용시 그 사유를 기록하도록 한다.

8.3.2 중지 및 탈락기준

- ① 선정/제외기준에 위반 된 경우
- ② 대상자 본인, 또는 그들의 법적 대리인이 자발적인 중지 요청이 있을 경우
- ③ 시험 전 평가에서 발견하지 못한 중대한 증상이나 질환이 확인된 경우
- ④ 대상자가 자의로 중단하고 연락이 안 되는 경우
- ⑤ 결과에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경우
- ⑥ 시험자나 대상자에 의해 시험계획을 위반하는 경우
- ⑦ 기타 시험담당자의 판단에 의해 시험 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우
- ⑧ 의뢰자가 특별한 요청을 할 때
- ⑨ 시험자가 시험의 지속이 대상자의 복지에 해를 끼칠 것이라고 판단한 경우

3. 8.4 유효성 및 안전성 연구자료의 평가항목

8.4.1 유효성 평가항목

8.4.1.1 주평가변수

Baseline으로부터 시험물질 투여 전 및 후 12주째의 평가되는 혈액내 T cell 및 B cell(subset포함)의 변화

8.4.1.2 부평가변수

1. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
2. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
3. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
4. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화

5. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
6. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
7. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

8.4.1.3 안전성 평가변수

이상반응, 활력징후, 임상실험실적 검사에 대해 평가하였다.

8.4.2 이상반응을 포함한 안전성의 평가방법, 평가기준 및 해석방법

8.4.2.1 평가대상

Safety Set(SS): 본 임상시험에 등재한 모든 대상자 중 선정/제외 기준을 만족하고, 치료를 시작한 후 안전성 관련 데이터를 최소한 한 번 이상 확인한 대상자에 한한다.

8.4.2.2 평가방법

이상반응

이상반응이란 임상시험 관찰기간 동안 발생된 혹은 악화된, 바람직 하지 않고 의도되지 않은 모든 징후, 증상, 증후군 및 질환을 의미하며, 해당 임상시험용 시험물질과 반드시 인과관계를 가져가 하는 것은 아니다. 임상적으로 유의한 진단 시술상의 비정상적 결과들도, 임상 실험실 검사의 비정상소견(예, 시험으로부터 중도탈락을 초래하는 경우)을 포함하는 객관적 이상반응과 마찬가지로 이상반응으로 고려된다.

일반적으로 치료 중 징후 및 증상의 악화는 유효성변수에 의해 평가 될 것이다. 그러나, 만약 그 결과가 “중대한 이상반응”의 정의에 해당되는 경우, 이는 ‘중대한 이상반응’으로 기록되어야 한다

이상반응은:

- A. 새로운 질환
- B. 병발질환의 악화
- C. 임상시험용시험물질에 의한 영향
- D. 임상시험 절차들에 대한 영향
- E. 상기 요인들 중 2개 이상의 조합

“이상반응”이라는 용어는 임상시험용 시험물질 혹은 임상시험자체와의 인과관계를 전제로 하지 않는다.

외과적 시술자체는 이상반응이 아니다. 이는 수술을 요하는 상태에 대한 치료방법이다. 만약 시험기간

중에 수술을 필요로 하는 상태가 발생하거나 발견된다면, 이는 이상반응에 해당된다. 만약 시험을 시작 하기 전에 이미 알고 있었던 상태라면, 임상시험계획서에 허용 되어있는 예정된 외과적 시술과 이 시술을 초래하게 된 상태는 이상반응이 아니다. 후자의 경우, 그 상태는 과거력으로서 보고 되어야 한다.

중대한 이상반응

중대한 이상반응 (SAE) 에 관한 모든 정보는 중대한 이상반응 보고양식 (SAE Report Form) 에 수집, 기록된다. 각각의 중대한 이상반응 (SAE) 은 환자의 안전을 확인하기 위해서 이상반응 발생을 인지한 후 24 시간 이내에 의뢰자/주연구자로 보고한다. 중대한 이상반응은 불편한 증상, 징후 또는 다음과 같은 임상 상태를 말한다.

1. 사망
2. 생명을 위협하는 경우
3. 입원이 필요하거나 입원기간을 연장해야 하는 경우
4. 지속적이거나 중대한 불구/무능력
5. 선천적 결함이 우려될 때
6. 의학적으로 위급한 상태, 다시 말해서 환자가 위태롭고 위에 명기한 사항들을 방지하기 위해 의학적 처치를 필요로 하는 경우

다음의 사항에 해당하는 입원은 중대한 이상반응 (SAEs) 에 해당하지 않는다.

1. 시험참여 전 예정된 입원

시험참여 이후부터 대상자의 시험 참여가 중단된 후 4 주 이내의 시점까지 발생한 모든 중대한 이상반응을 기록한다. 대상자의 시험 참여가 중단된 지 4 주 후에 발생한 중대한 이상반응은 시험물질 (또는 치료법) 과의 관계가 의심되는 경우에만 보고한다.

임신

환자가 임신을 한 경우, 자체가 중대한 이상반응이 아니더라도 중대한 이상반응을 통하여 보고되어야 하고, 자연 혹은 자발적 인공유산, 출산에 대한 상세한 설명, 선천적 결손이나 선천적 기형의 발생 유무 등의 결과를 보고하기 위한 추적조사가 이루어져야 한다.

시험에 참여한 도중에 나타난 모든 임신은 임상 시험 임신 보고서를 통하여 보고하여야 한다. 대상자의 안전을 보장하기 위해 발생이 인지된 시간부터 24 시간 이내에 연구자에게 보고해야 한다. 임신은 자연 혹은 자발적 인공 유산, 출산에 대한 상세한 설명, 선천적 결손이나 선천적 기형의 발생 유무, 산모나 신생아의 합병증 등의 결과를 보고하기 위해서 추적조사가 이루어져야 한다.

4. 8.6 통계분석방법

8.6.1 통계 분석

8.6.1.1 분석군의 정의

대상자로부터 얻어진 자료는 Safety Set, FAS (Full Analysis Set), ITTS (Intent to treatment set), PPS (Per- Protocol Set)으로 나뉜다.

본 임상시험의 주 분석 집단 (main population) 은 ITTS (Intent to Treatment Set)로 정의한다. FAS (Full Analysis Set) 군 분석도 함께하여 결과를 비교하되 크게 차이를 보이는 경우에는 각 분석 대상자의 결과를 예시한다.

FAS (Full Analysis Set)

ITT (Intention-To-Treat)원칙을 따르며 본 임상시험에 사용되는 시험물질을 한 번이라도 복용한 대상자 중 Baseline 이후에 적어도 한번 이상 1차 유효성 평가변수의 값이 측정된 대상자 군을 대상으로 한다.

PPS (Per-Protocol Set)

PPS (Per-Protocol Set)원칙을 따르며 임상시험계획서대로 임상시험을 완료한 대상자 군으로 다음에 해당하는 경우를 제외시킨다.

- 1) 임상시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 임상시험에서 중도 탈락한 대상자
- 2) 병용 금지약물을 복용한 대상자
- 3) 그 외 중대한 계획서 위반을 한 대상자

Safety Set

본 임상시험에 등재한 모든 대상자 중 선정/제외 기준을 만족하고, 치료를 시작한 후 안전성관련 데이터를 최소한 한 번 이상 확인한 대상자에 한한다.

8.6.1.2 통계 분석 방법

인구통계학적 정보 및 기초정보

본 연구에 등록된 대상자들을 대상으로 인구학적 정보, 실험실 검사 등에 대한 기술 통계량을 산출할 것이다. 본 임상시험에 포함된 모든 대상자의 자료는 각 기관별로 기술통계(descriptive statistics)를 이용하여 요약 평가하였다. 연속형 자료는 평균, 표준편차, 최소값, 최대값, 중앙값 등을 이용하여 요약하고 범주형 자료는 절대빈도와 백분율을 이용하여 기술통계를 제시하였다.

유효성 분석

1 차 유효성 분석

1 차 유효성 평가변수인 시험물질물 투여 전 Tcell/B cell (subset 포함)과 임상시험용 시험물질 복용 후 12 주째 Tcell/B cell (subset 포함) 의 차이가 대조용 시험물질에 비해 시험용 시험물질이 우월함을 보이기 위함이므로, 주 분석방법은 two sample t-test 또는 wilcoxon' s rank sum test 를 시행하여, p-value 가 양측유의수준 0.05 보다 작음을 보일 것이다.

2 차 유효성 분석

2 차 유효성 평가변수 중 연속형 자료의 경우, 군간 비교는 two sample t-test 또는 wilcoxon' s rank sum test 를 시행한다. 범주형 변수의 경우, 군간 비교를 위하여 chi-square test 또는 fisher' s exact test 를 시행할 것이다.

안전성 평가 분석

이상반응

각각의 이상반응에 대해 한 번 이상의 이상반응을 경험한 대상자 수 및 백분율을 시술한 임상시험용 시험물질 별로 나누어 기술하고, 이상반응의 중대성(Seriousness), 위중도(Severity), 임상시험용 시험물질과의 연관성 및 그 결과에 대해서 복용한 임상시험용 시험물질 별로 구분하여 보고한 대상자 수 및 백분율을 정리한다.

실험실적검사

실험실 검사와 활력징후의 결과는 연속형 자료의 경우 평균, 표준편차와 최소값, 최대값을 군별로 정리하고 군간 차이는 two-sample t-test 또는 wilcoxon' s rank sum test 를 시행하고, 군내 복용전과 후의 차이는 paired t-test 또는 wilcoxon' s signed rank test 로 검정한다. 또한 복용 전 후의 정상범주를 벗어난 대상자들의 빈도수 및 백분율을 구한다. 실험실검사 가운데 범주형 자료는 정상과 비정상으로 나누어서 군간 차이는 chi-square test 혹은 fisher' s exact test 를 사용하여 검정하고 투약 전후의 차이는 McNemar' s test 로 분석한다.

8.6.2 목표한 대상자의 수 및 그 근거

본 임상시험은 대상 대상자에서 (베타글루칸+유산균제제(*Apios Americana Medik.*))추출물의 안전성 및 유효성 평가를 위한 단일기관, 이중맹검, 플라세보대조, 무작위배정, 임상시험으로서 임상시험용

기능성식품 복용 후 12주째 면역인자의 개선 정도를 평가하여 대조용 기능성식품에 대한 시험용 기능성식품의 효과를 입증하기 위한 것이다. 그러나 (베타글루칸+유산균제제(*Apios Americana Medik.*))추출물을 사용하여 진행된 선행연구를 찾을 수 없었다. 따라서 아래와 같이 가정하여 대상자 수를 산출하였다.

대상자 수를 구하기 위한 가설은 다음과 같다.

$$n = (1 + \lambda) \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2}{\lambda \Delta^2}$$

$Z_{1-\alpha/2}$	1.960	
Z_{β}	0.842	
σ	0.100	표준편차
Δ	0.090	군간차이
λ	1.000	
n	19.3856	산정수
n	8	
n	20	최종분석필요예수

$$n^* = n / (1 - r)$$

탈락률 0.100

n^* 22.2222
 n^* 23

▶ 군 간 대상자 배정비= 1:1

n^* : 탈락률을 감안한 전체 대상자수(군당),
 n : 최종 분석 필요예수(군당), r : 예상 중도탈락(0.10)

	시험군	대조군	총 대상자수
유효성 평가 사례수	20	20	40
Drop-out(10%)을 포함한 사례수	23	23	46

검정력 80%, 유의수준 5%를 적용하여 대상자 수를 산출한 결과, 각 군당 20 명이 요구되며, 중도탈락률 10%를 고려하였을 때, 각 군당 23 명으로 총 46 명의 대상자가 본 임상시험에 요구된다.

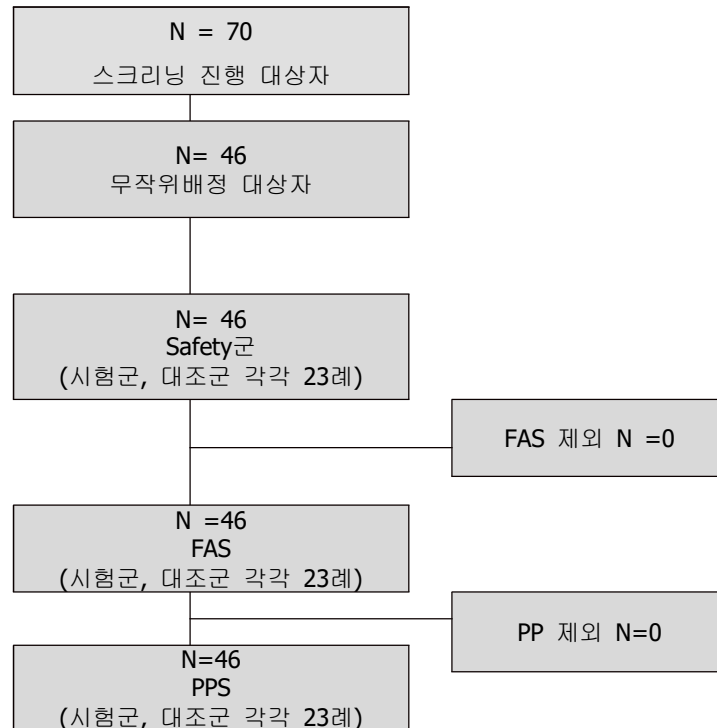
8.6.3 임상시험의 수행 및 변경

본 연구는 임상시험 계획서에 대해 임상시험실시기관의 ‘임상시험심사위원회’로부터 승인을 받은 이후에 연구가 진행되었다.

본 시험은 최초 인이후 변경은 없었다.

5. 9. 대상자

6. 9.1 대상자의 임상시험 참여 상태



[Fig 1. 대상자의 임상시험 참여 상태]

7. 9.2 분석군 현황

본 임상시험에 참가하기로 동의하고 스크리닝 기간을 거쳐 무작위 배정된 대상자는 총 46명 이었고, 이 중 46명이 최소한 1회 이상 임상시험용 건강기능식품을 적용하여 safety군은 46명 이었다. Safety군 가운데 유효성 주평가 변수 결과가 미기재 된 것으로 확인된 대상자는 없어, FAS은 46명이었다. FAS 가운데 임상중단 또는 PPS 제외기준에 해당하는 대상자는 1명도 없어, 최종적으로 계획서대로 임상시험을 종료한 대상자는 46명이었다(PPS). 이들을 분류하면 다음과 같다.

<임상시험계획서 위반 및 중도 탈락 대상자 분포>

구분		사유	(N=46)	
			N	(%)
FAS 기준 위반 ¹⁾		소계	0	(0.0%)
		주평가변수 미기재	0	(0.0%)
PP기준 위반	PP 탈락기준	임상시험 중단	0	(0.0%)
		소계	0	(0.0%)

8. 10. 임상시험의 결과

9. 10.1 분석에 포함할 대상자 군의 선정

본 임상시험에 등재된 모든 대상자 중 선정/제외기준에 적합하고 무작위배정되어, 임상시험용 건강기능식품을 1회 이상 적용 받은 대상자를 SS으로, SS 중 의료기기 적용 후 최소 1회 이상 유효성 주평가 변수 검사를 시행한 대상자를 FAS로, FAS 중 임상시험계획서에 맞게 종료한 대상자를 PPS로 하였다.

각 분석에 포함할 대상자 군은 임상시험 계획서에서 기술한 대로 적용되었다.

안전성 평가 자료는 SS으로, 인구학적 기초자료는 FAS로 실시하였고, 유효성 평가 자료는 FAS와 PPS를 모두 분석하되, FAS의 결과를 우선으로 하였다.

10. 10.2 대상자의 인구학적 정보 및 기타 시험 전 특성에 대한 정보

10.2.1 대상자 인구학적 기초자료

FAS 46명에서 남성은 시험군과 대조군에 모두 2명(8.70%), 여성은 21명(91.30%)으로 여성이 많았으며 군간 통계적 유의한 차이는 없었다.

평균 연령은 시험군에서 40.74±10.13세, 대조군에서 41.13±8.69로 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

평균 신장은 시험군에서 162.04±5.96cm이고, 대조군에서 162.47±6.11cm로 군간 통계적 유의한 차이는 없었다.

평균 체중은 시험군에서 57.06±6.83kg이고, 대조군에서 57.17±7.13kg으로 군간 통계적 유의한 차이는 없었다.

[Table 1. 인구학적 기초자료, FAS]

인구학적 자료	통계량	시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value
성별	남자, n(%)	2(8.70%)	2(8.70%)	4(8.70%)	1.0000*
	여자, n(%)	21(91.30%)	21(91.30%)	42(91.30%)	

연령(세)	N	23	23	46	0.8875
	Mean ± SD	40.74±10.13	41.13±8.69	40.93±9.34	
	Median	43.0	44.0	43.5	
	Min, Max	(22.00, 55.00)	(23.0, 52.00)	(22.00, 55.00)	
신장(cm)	N	23	23	46	0.8865
	Mean ± SD	162.04±5.96	162.47±6.11	162.25±5.97	
	Median	163.1	162.1	162.1	
	Min, Max	(152.10, 180.10)	(153.10, 174.80)	(152.10, 180.10)	
체중(kg)	N	23	23	46	0.9594
	Mean ± SD	57.06±6.83	57.17±7.13	57.11±6.90	
	Median	57.3	56.1	57.2	
	Min, Max	(45.10, 72.10)	(45.10, 77.20)	(45.10, 77.20)	

* Chi-square test, ** Fisher's exact test

Two-sample t-test

10.2.2 대상자의 병력

기저 증상 및 징후가 있는 대상자는 시험군과 대조군 모두 1명도 없었다.

[Table 2. 기저 증상 및 징후, FAS]

	시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value
예, n(%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	-
아니오, n(%)	23(100.00%)	23(100.00%)	46(100.00%)	

과거병력이 있는 대상자는 시험군에서 17명(73.91%)이었고, 대조군에서 16명(69.57%)이었고, 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 3. 과거병력, FAS]

	시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value
예, n(%)	17(73.91%)	16(69.57%)	33(71.74%)	0.7654*
아니오, n(%)	6(26.09%)	7(30.43%)	13(28.26%)	

* Chi-square test

현재병력이 있는 대상자는 시험군과 대조군 모두 1명도 없었다.

[Table 4. 수술력, FAS]

	시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value
예, n(%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	-
아니오, n(%)	23(100.00%)	23(100.00%)	46(100.00%)	

10.2.3 병용약물

대상자에 대하여, 병용약물을 복용한 대상은 시험군에서 5명(21.74%)이었고, 대조군에서 2명(8.70%)으로 시험군에서 더 많았으나 군간 통계적 유의한 차이는 없었다.

약제별 종류를 WHO drug ATC를 이용하여 분류하였고, 고혈압약물인 칼슘길항제 1건으로 조사되었다.

[Table 5. 병용약물, FAS]

	시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value
예, n(%)	5(21.74%)	2(8.70%)	7(15.22%)	0.4140**
아니오, n(%)	18(78.26%)	21(91.30%)	39(84.78%)	

** Fisher's exact test

Level 1 Level 5	시험군 (N=23)			대조군 (N=23)			총합 (N=46)		
	n	(%)	건수	n	(%)	건수	n	(%)	건수
ALIMENTARY TRACT AND METABOLISM	2	8.70%	6	1	4.35%	1	3	6.52%	7
famotidine	1	4.35%	2	0	0.00%	0	1	2.17%	2
itopride	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
metoclopramide	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
Multivitamins, plain	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
pantoprazole	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
trimebutine	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
ANTIINFECTIVES FOR SYSTEMIC USE	1	4.35%	2	2	8.70%	2	3	6.52%	4
amoxicillin and enzyme inhibitor	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
clarithromycin	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
moxifloxacin	1	4.35%	2	0	0.00%	0	1	2.17%	2
BLOOD AND BLOOD FORMING ORGANS	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
amino acids	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
CARDIOVASCULAR SYSTEM	0	0.00%	0	3	13.04%	3	3	6.52%	3
amlodipine	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
losartan	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
telmisartan and amlodipine	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
MUSCULO-SKELETAL SYSTEM	2	8.70%	4	2	8.70%	2	4	8.70%	6
Enzymes	0	0.00%	0	2	8.70%	2	2	4.35%	2
ketorolac	1	4.35%	2	0	0.00%	0	1	2.17%	2
naproxen	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
Propionic acid derivatives	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
NERVOUS SYSTEM	2	8.70%	8	2	8.70%	3	4	8.70%	11
gabapentin	1	4.35%	2	0	0.00%	0	1	2.17%	2
paracetamol	2	8.70%	2	2	8.70%	3	4	8.70%	5

tramadol	1	4.35%	3	0	0.00%	0	1	2.17%	3
tramadol, combinations	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
RESPIRATORY SYSTEM	1	4.35%	6	2	8.70%	8	3	6.52%	14
ambroxol	1	4.35%	2	0	0.00%	0	1	2.17%	2
codeine	1	4.35%	2	0	0.00%	0	1	2.17%	2
Expectorants	1	4.35%	1	1	4.35%	1	2	4.35%	2
levodropropizine	0	0.00%	0	2	8.70%	2	2	4.35%	2
montelukast	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
opium derivatives and expectorants	1	4.35%	1	1	4.35%	1	2	4.35%	2
Other respiratory system products	0	0.00%	0	2	8.70%	2	2	4.35%	2
Xanthines	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1

* WHO ATC

11. 10.3 유효성 평가

10.3.1 분석의 일반적인 원칙

본 임상시험에서 유효성 분석은 FAS과 PPS을 모두 대상으로 하되, FAS을 주분석으로 하였으며, PPS에서 제외된 대상자가 없어, PPS에 대하여 별도 분석하지 않았다.

10.3.2 유효성 평가변수

10.3.2.1 주평가변수

본 임상시험의 주평가변수는 임상시험용 건강기능식품 최종 투여 후 12주간 시험물질물 및 대조물질물 투여 전후 T cell 및 B cell(subset)의 변화에 대한 차이이다.

Baseline에서 시험군의 T cell 평균값은 138.37 ± 12.58 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 141.58 ± 13.26 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 T cell 평균값은 138.82 ± 11.32 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 141.24 ± 12.46 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 T cell 평균값은 0.45 ± 1.26 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 -0.34 ± 0.79 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가되었으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 6. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 T cell 변화량, FAS)

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
	N	23	23	46	
Baseline	Mean	138.37 ± 12.58	141.58 ± 11.72	140.97 ± 12.69	0.4564
	SD				
	Median	140.5	141.8	141.7	

	Min, Max	(1 1 1 . 4 0 , 164.10)	(1 1 8 . 0 0 , 165.50)	(1 1 1 . 4 0 , 165.50)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	138.82±11.32	141.91±11.98	140.92±12.17	0.5765
	Median	139.5	142.8	141.6	
	Min, Max	(1 1 7 . 0 0 , 160.40)	(1 1 0 . 6 0 , 163.80)	(1 1 0 . 6 0 , 163.80)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.45±1.26	-0.34±0.79	-0.05±5.41	0.5531
	Median	0.6	-0.8	-0.2	
	Min, Max	(-19.10, 14.40)	(-10.00, 8.10)	(-19.10, 14.40)	
* paired t-test		0.7366	0.5308	0.9546	

Baseline에서 시험군의 CD3 평균값은 70.03±3.24이었고, 대조군의 CD3 평균값은 72.74±2.18로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD3 평균값은 70.38±5.37이었고, 대조군의 CD3 평균값은 72.54±7.16으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD3 평균값은 0.35±2.13이었고, 대조군의 CD3 평균값은 -0.20±4.98으로, 대조군 대비 시험군에서 증가되었으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 7. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 CD3 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	70.03±3.24	72.74±2.18	72.14±6.69	0.2864
	Median	73.0	73.0	73.0	
	Min, Max	(56.20, 82.30)	(59.70, 85.00)	(56.20, 85.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	70.38±5.37	72.54±7.16	72.31±6.24	0.4564
	Median	72.5	73.7	73.1	
1 2 주 - Baseline	Min, Max	(61.40, 80.20)	(57.40, 84.30)	(57.40, 84.30)	
	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.48±3.53	-0.13±1.91	0.17±2.82	0.4864
	Median	0.4	-0.2	-0.1	
* paired t-test		0.5231	0.7378	0.6821	

Baseline에서 시험군의 CD4 평균값은 40.17±3.23이었고, 대조군의 CD4 평균값은 43.25±4.59이고, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD4 평균값은 41.08±7.85이었고, 대조군의 CD4 평균값은 42.65±8.67이고, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD4 평균값은 0.91±4.62이었고, 대조군의 CD4 평균값은 -0.60±4.08으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한

차이는 없었다.

[Table 8. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 CD4 변화량, FAS)

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	40.17±3.23	43.25±4.59	42.01±7.39	0.9054
	Median	40.3	42.6	42.1	
	Min, Max	(22.50, 58.90)	(27.60, 54.90)	(22.50, 58.90)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	41.08±7.85	42.65±8.67	42.42±7.37	0.8765
	Median	43.1	42.7	42.7	
	Min, Max	(20.50, 58.20)	(25.90, 55.10)	(20.50, 58.20)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.40±3.43	0.42±2.32	0.41±2.90	0.9863
	Median	0.2	-0.1	0.1	
	Min, Max	(-6.40, 7.80)	(-2.90, 4.40)	(-6.40, 7.80)	
* paired t-test		0.5860	0.3933	0.3440	

Baseline에서 시험군의 CD8 평균값은 26.89±7.51이었고, 대조군의 CD8 평균값은 26.18±6.08으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD8 평균값은 26.65±8.76이었고, 대조군의 CD8 평균값은 25.81±7.05로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD8 평균값은 -0.24±1.25이었고, 대조군의 CD8 평균값은 -0.37±1.71로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 감소를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 9. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 CD8 변화량, FAS)

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	26.89±7.51	26.18±6.08	26.81±6.08	0.7032
	Median	24.2	26.0	25.4	
	Min, Max	(14.30, 43.30)	(19.10, 36.60)	(14.30, 43.30)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	26.65±8.76	25.81±7.05	26.19±6.41	0.8934
	Median	23.8	26.2	25.8	
	Min, Max	(14.90, 45.90)	(17.30, 38.40)	(14.90, 45.90)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-0.24±1.25	-0.37±1.71	-0.63±1.76	0.4064
	Median	-0.5	-0.4	-0.4	
	Min, Max	(-3.40, 3.10)	(-5.30, 3.60)	(-5.30, 3.60)	
* paired t-test		0.2649	0.0352	0.0197	

Baseline에서 시험군의 B cell 평균값은 14.56 ± 3.45 이었고, 대조군의 B cell 평균값은 14.62 ± 1.40 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 B cell 평균값은 13.85 ± 6.57 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 13.92 ± 7.67 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 B cell 평균값은 -0.71 ± 5.17 이었고, 대조군의 B cell 평균값은 -0.70 ± 6.27 로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 10 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 B cell 변화량, FAS)

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	14.56±3.45	14.62±1.40	13.63±3.61	0.9054
	Median	14.0	13.8	13.8	
	Min, Max	(7.80, 20.30)	(8.10, 21.00)	(7.80, 21.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	13.85±6.57	13.92±7.67	13.78±3.96	0.9354
	Median	14.0	13.9	14.0	
	Min, Max	(6.40, 22.90)	(8.10, 21.60)	(6.40, 22.90)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-0.71±5.17	-0.70±6.27	0.15±2.22	0.8705
	Median	0.0	-0.2	-0.1	
	Min, Max	(-5.30, 5.80)	(-4.10, 3.90)	(-5.30, 5.80)	
* paired t-test		0.8429	0.6503	0.6490	

10.3.2.2 부평가변수

부평가변수는 아래와 같이 분석하였다. 부평가변수에 대해서 유의수준은 0.05(양측)로 통계분석을 진행하였다.

- ① 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
- ② 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
- ③ 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
- ④ 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화
- ⑤ 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
- ⑥ 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
- ⑦ 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

(1) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 WBC 평균값은 0.49 ± 0.91 이었고, 대조군의 WBC 평균값은 0.23 ± 0.80 으로, 대조군 대비 시험군에서 높은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 11. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 WBC 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	4.67±0.77	4.97±0.52	4.82±0.67	0.1345
	Median	4.7	4.8	4.8	
	Min, Max	(3.09, 5.97)	(4.00, 5.91)	(3.09, 5.97)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	5.16±1.05	5.21±0.98	5.18±1.01	0.8542
	Median	5.0	5.2	5.1	
	Min, Max	(3.67, 8.48)	(3.80, 7.84)	(3.67, 8.48)	
12주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.49±0.91	0.23±0.80	0.36±0.86	0.3234
	Median	0.4	0.2	0.3	
	Min, Max	(-1.10, 3.21)	(-1.05, 2.43)	(-1.10, 3.21)	
* paired t-test		0.0171	0.1753	0.0064	

(2) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Neutrophile 평균값은 1.93 ± 7.90 이었고, 대조군의 Neutrophile 평균값은 1.05 ± 6.21 로, 대조군 대비 시험군에서 높은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 12. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Neutrophile 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	48.80±8.06	55.46±7.26	52.13±8.30	0.0652
	Median	49.8	55.5	52.4	
	Min, Max	(29.50, 62.70)	(42.40, 69.80)	(29.50, 69.80)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	50.73±7.71	56.50±8.42	53.62±8.50	0.0595
	Median	51.4	54.3	53.3	
	Min, Max	(35.60, 67.20)	(43.30, 76.70)	(35.60, 76.70)	
12주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	1.93±7.90	1.05±6.21	1.49±7.04	0.6743

	Median	4.8	3.0	3.7
	Min, Max	(-14.40, 21.10)	(-14.50, 10.40)	(-14.50, 21.10)
	* paired t-test	0.2530	0.4272	0.1579

(3) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Lymphocyte 평균값은 -2.30 ± 6.49 이었고, 대조군의 Lymphocyte 평균값은 -1.27 ± 5.20 으로, 대조군 대비 시험군에서 높은 감소를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 13. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Lymphocyte 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	41.14±7.89	33.67±6.63	37.40±8.14	0.0011
	Median	39.9	34.7	37.9	
	Min, Max	(28.40, 56.00)	(19.80, 44.70)	(19.80, 56.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	38.85±7.48	32.40±7.17	35.62±7.94	0.0046
	Median	38.9	33.4	35.7	
	Min, Max	(23.80, 51.80)	(14.20, 42.10)	(14.20, 51.80)	
12주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-2.30±6.49	-1.27±5.20	-1.78±5.84	0.5556
	Median	-3.8	-2.9	-3.3	
	Min, Max	(-16.80, 10.30)	(-8.30, 8.60)	(-16.80, 10.30)	
	* paired t-test	0.1040	0.2560	0.0445	

(4) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Monocyte 평균값은 0.03 ± 2.00 이었고, 대조군의 Monocyte 평균값은 0.63 ± 2.06 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 14. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Monocyte 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	7.55±2.16	7.13±1.43	7.34±1.82	0.4347
	Median	6.8	7.2	7.2	
	Min, Max	(5.00, 13.90)	(4.80, 11.50)	(4.80, 13.90)	

12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	7.59±2.37	7.76±2.12	7.67±2.22	0.7992
	Median	7.1	6.9	7.1	
	Min, Max	(4.90, 15.20)	(4.80, 14.00)	(4.80, 15.20)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.03±2.00	0.63±2.06	0.33±2.03	0.3256
	Median	0.2	0.1	0.1	
	Min, Max	(-3.80, 6.40)	(-1.40, 8.20)	(-3.80, 8.20)	
* paired t-test		0.9344	0.1565	0.2728	

(5) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Basophile 평균값은 0.02 ± 0.34 이었고, 대조군의 Basophile 평균값은 -0.02 ± 0.28 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가를 보였으나 구간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 15. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Basophile 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.64±0.28	0.67±0.33	0.66±0.30	0.7381
	Median	0.6	0.6	0.6	
	Min, Max	(0.30, 1.50)	(0.20, 1.50)	(0.20, 1.50)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.66±0.33	0.66±0.34	0.66±0.33	0.9651
	Median	0.6	0.7	0.7	
	Min, Max	(0.20, 1.40)	(0.20, 1.80)	(0.20, 1.80)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.02±0.34	-0.02±0.22	0.00±0.28	0.6815
	Median	0.0	0.0	0.0	
	Min, Max	(-0.70, 0.70)	(-0.40, 0.60)	(-0.70, 0.70)	
* paired t-test		0.8074	0.7093	1.0000	

(6) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Eosinophile 평균값은 0.31 ± 1.34 이었고, 대조군의 Eosinophile 평균값은 -0.40 ± 2.22 로, 대조군 대비 시험군에서 증가를 보였으나 구간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 16. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Eosinophile 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	1.86±0.99	3.08±2.58	2.47±2.03	0.0403
	Median	1.6	2.4	1.9	
	Min, Max	(0.50, 4.10)	(0.60, 10.20)	(0.50, 10.20)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	2.17±1.67	2.68±1.88	2.43±1.77	0.3325
	Median	1.9	2.2	2.2	
	Min, Max	(0.00, 8.00)	(0.30, 7.00)	(0.00, 8.00)	
12주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.31±1.34	-0.40±2.22	-0.04±1.85	0.1994
	Median	-0.1	-0.1	-0.1	
	Min, Max	(-1.80, 4.80)	(-8.10, 4.00)	(-8.10, 4.80)	
* paired t-test		0.2821	0.4015	0.8739	

(7) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 NK cell 평균값은 0.37 ± 5.57 이었고, 대조군의 NK cell 평균값은 0.60 ± 2.66 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

[Table 17. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 NK cell 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	22.20±7.41	20.16±6.57	21.18±7.00	0.3298
	Median	22.5	19.2	20.8	
	Min, Max	(8.00, 36.60)	(8.40, 34.10)	(8.00, 36.60)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	22.56±8.52	20.76±7.50	21.66±7.99	0.4498
	Median	21.5	19.4	20.7	
	Min, Max	(10.50, 38.20)	(9.30, 41.90)	(9.30, 41.90)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.37±5.57	0.60±2.66	0.48±4.31	0.8586
	Median	-1.1	0.8	0.4	
	Min, Max	(-9.50, 15.80)	(-5.50, 7.80)	(-9.50, 15.80)	
* paired t-test		0.7559	0.2945	0.4541	

12. 11. 안전성 평가

이상반응을 포함한 안전성 평가는 선정/제외기준에 적합하고 무작위 배정되어, 임상시험용 건강기능식품을 1회라도 적용 받은 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다.

13. 11.1 이상반응

11.1.1 이상반응에 대한 요약

임상시험기간 동안 발현된 이상반응은 시험군에서 3명(13.04%), 4건이었고, 대조군에서 4명(17.39%) 5건으로 나타났으나 발현율에 구간 통계적 유의한 차이는 없었다.

시험용 건강기능식품과의 인과관계가 ‘관련성이 명백함’, ‘관련성이 많음’, ‘관련성이 의심됨’ 및 ‘평가불가능’ 평가된 이상약물반응은 시험군과 대조군 모두 1건도 없었으며, 중대한 이상반응은 없었다

[Table 18. 이상반응 발현 요약, SS]

	시험군 (N=23)		대조군 (N=23)		총합 (N=46)		p-value*
이상반응	3(13.04)	4	4(17.39)	5	7(15.22)	9	0.2930**
이상약물반응‡	0(0.00)	0	0(0.00)	0	0(0.00)	0	-

* Chi-square test **Fisher’s exact test

‡ 이상약물반응: 관련성이 명백함, 관련성이 많음, 관련성이 의심됨, 평가불가능

11.1.2 이상반응 세부 발현 현황

(1) 이상반응 종류별 분포

이상반응의 종류별 분포는 호흡기계 질환에서 5명(10.87%), 5건으로 가장 많이 발현되었고, 중추 및 말초신경계 장애가 2건의 순서로 발현되었고, 전신질환과 생식기능 장애(여성)에서 각각 1건씩 발현되었다. 세부 분류에서는 두통과 감기가 각각 2건으로 가장 많이 발현되었고, 다른 질환은 모두 1건씩 발현되었다.

[Table 19. 이상반응 발현내역, SS]

SOC PT	시험군 (N=23)		대조군 (N=23)		총합 (N=46)	
	n (%)	건수	n (%)	건수	n (%)	건수

중추 및 말초신경계 장애	1	4.35%	1	1	4.35%	1	2	4.35%	2
두통	1	4.35%	1	1	4.35%	1	2	4.35%	2
호흡기계 질환	2	8.70%	2	3	13.04%	3	5	10.87%	5
폐렴	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
감기	1	4.35%	1	1	4.35%	1	2	4.35%	2
상기도감염	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
목감염	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
전신 질환	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
등통증	0	0.00%	0	1	4.35%	1	1	2.17%	1
생식기능 장애(여성)	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1
월경통증	1	4.35%	1	0	0.00%	0	1	2.17%	1

11.1.3 중대한 이상반응

본 임상시험 기간 동안 중대한 이상반응은 발생하지 않았다.

14. 11.2 기타 안전성 평가

11.2.1 실험실적 검사

유효성 평가를 제외한 실험실적 검사의 혈액학적 검사 중, 군간 통계적으로 유의한 변화가 있었던 검사 항목은 하나도 없었다.

[Table 21. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 RBC 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	4.40±0.43	4.39±0.40	4.40±0.41	0.9126
	Median	4.3	4.4	4.4	
	Min, Max	(3.86, 5.62)	(3.68, 5.29)	(3.68, 5.62)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	4.35±0.42	4.33±0.40	4.34±0.40	0.8482
	Median	4.3	4.3	4.3	
	Min, Max	(3.82, 5.59)	(3.65, 5.42)	(3.65, 5.59)	
12주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-0.05±0.24	-0.06±0.18	-0.06±0.21	0.8774
	Median	0.0	-0.1	-0.1	
	Min, Max	(-0.67, 0.32)	(-0.43, 0.18)	(-0.67, 0.32)	
* paired t-test		0.2801	0.0941	0.0569	

[Table 22. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Hemoglobin 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	0.5839
	Mean ± SD	13.14±1.36	12.91±1.42	13.03±1.38	
	Median	12.6	12.9	12.9	
	Min, Max	(11.00, 16.30)	(10.00, 16.20)	(10.00, 16.30)	
12주	N	23	23	46	0.4520
	Mean ± SD	12.97±1.42	12.65±1.42	12.81±1.41	
	Median	12.9	12.6	12.8	
	Min, Max	(10.40, 16.40)	(9.80, 15.90)	(9.80, 16.40)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	0.6274
	Mean ± SD	-0.17±0.76	-0.27±0.47	-0.22±0.63	
	Median	-0.1	-0.3	-0.2	
	Min, Max	(-2.20, 1.20)	(-1.20, 0.40)	(-2.20, 1.20)	
* paired t-test		0.2854	0.0132	0.0221	

[Table 23. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Hematocrit 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	0.6308
	Mean ± SD	40.06±3.76	39.53±3.73	39.79±3.72	
	Median	38.5	39.6	39.3	
	Min, Max	(34.90, 49.40)	(32.40, 48.80)	(32.40, 49.40)	
12주	N	23	23	46	0.5474
	Mean ± SD	39.27±3.64	38.61±3.65	38.94±3.62	
	Median	39.1	38.0	38.9	
	Min, Max	(33.30, 48.40)	(31.70, 47.90)	(31.70, 48.40)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	0.8341
	Mean ± SD	-0.80±2.20	-0.91±1.52	-0.85±1.87	
	Median	-0.7	-0.8	-0.8	
	Min, Max	(-7.50, 3.30)	(-4.50, 1.50)	(-7.50, 3.30)	
* paired t-test		0.0964	0.0088	0.0033	

[Table 24. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Platelet 변화량, FAS]

a		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	0.1722
	Mean ± SD	237.74±52.70	265.52±80.25	251.63±68.58	
	Median	235.0	264.0	240.0	
	Min, Max	(1 0 0 . 0 0 , 339.00)	(1 7 0 . 0 0 , 547.00)	(1 0 0 . 0 0 , 547.00)	
12주	N	23	23	46	0.0833
	Mean ± SD	230.57±45.64	263.43±76.36	247.00±64.38	
	Median	242.0	253.0	248.0	
	Min, Max	(92.00, 297.00)	(1 6 5 . 0 0 , 547.00)	(92.00, 503.00)	

			503.00)		
1 2 주 -	N	23	23	46	
Baseline	Mean ± SD	-7.17±25.76	-2.09±20.72	-4.63±23.26	0.4645
	Median	-10.0	0.0	-5.0	
	Min, Max	(-57.00, 49.00)	(-44.00, 33.00)	(-57.00, 49.00)	
	* paired t-test	0.1954	0.6339	0.1837	

[Table 25. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 BUN 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	11.43±2.29	12.96±2.44	12.20±2.46	0.0347
	Median	11.0	13.0	12.0	
	Min, Max	(8.00, 16.00)	(10.00, 18.00)	(8.00, 18.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	11.83±3.17	12.35±4.13	12.09±3.65	0.6332
	Median	11.0	12.0	11.5	
	Min, Max	(7.00, 19.00)	(6.00, 19.00)	(6.00, 19.00)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.39±2.98	-0.61±4.00	-0.11±3.52	0.3414
	Median	0.0	-1.0	0.0	
	Min, Max	(-5.00, 6.00)	(-7.00, 7.00)	(-7.00, 7.00)	
	* paired t-test	0.5355	0.4729	0.8352	

[Table 26. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Creatinine 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.65±0.09	0.67±0.11	0.66±0.10	0.4110
	Median	0.6	0.6	0.6	
	Min, Max	(0.49, 0.86)	(0.50, 0.85)	(0.49, 0.86)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.68±0.10	0.68±0.11	0.68±0.11	0.9011
	Median	0.7	0.7	0.7	
	Min, Max	(0.51, 0.85)	(0.51, 0.90)	(0.51, 0.90)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.03±0.06	0.01±0.06	0.02±0.06	0.2097
	Median	0.0	0.0	0.0	
	Min, Max	(-0.07, 0.16)	(-0.09, 0.14)	(-0.09, 0.16)	
	* paired t-test	0.0178	0.4346	0.0221	

[Table 27. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 pH 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	

	Mean ± SD	5.54±0.89	5.48±0.78	5.51±0.83	0.7924
	Median	5.0	5.0	5.0	
	Min, Max	(5.00, 8.00)	(5.00, 7.50)	(5.00, 8.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	5.59±0.85	5.70±1.01	5.64±0.92	0.6943
	Median	5.0	5.0	5.0	
	Min, Max	(5.00, 7.50)	(5.00, 8.50)	(5.00, 8.50)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.04±1.24	0.22±1.31	0.13±1.27	0.6467
	Median	0.0	0.0	0.0	
	Min, Max	(-3.00, 2.50)	(-2.50, 3.50)	(-3.00, 3.50)	
	* paired t-test	0.8682	0.4356	0.4886	

[Table 28. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Specific gravity 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	1.02±0.01	1.02±0.01	1.02±0.01	0.4348
	Median	1.0	1.0	1.0	
	Min, Max	(1.01, 1.03)	(1.01, 1.03)	(1.01, 1.03)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	1.02±0.01	1.02±0.01	1.02±0.01	0.5374
	Median	1.0	1.0	1.0	
	Min, Max	(1.01, 1.03)	(1.01, 1.03)	(1.01, 1.03)	
12주- Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.00±0.01	0.00±0.01	0.00±0.01	0.9352
	Median	0.0	0.0	0.0	
	Min, Max	(-0.02, 0.02)	(-0.02, 0.03)	(-0.02, 0.03)	
	* paired t-test	0.5852	0.6331	0.4609	

11.2.2 활력 징후

활력 징후 중, 군간 통계적으로 유의한 차이가 있는 항목은 없었다.

[Table 29. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 SBP 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	115.00±9.53	112.39±10.29	113.70±9.90	0.3773
	Median	113.0	113.0	113.0	
	Min, Max	(101.00, 137.00)	(92.00, 133.00)	(92.00, 137.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	109.26±10.13	107.43±10.11	108.35±10.05	0.5437

	Median	107.0	108.0	107.5	
	Min, Max	(95.00, 131.00)	(92.00, 132.00)	(92.00, 132.00)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-5.74±9.70	-4.96±9.64	-5.35±9.57	0.7849
	Median	-6.0	-3.0	-5.5	
	Min, Max	(-26.00, 15.00)	(-24.00, 15.00)	(-26.00, 15.00)	
* paired t-test		0.0096	0.0219	0.0004	

[Table 30. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 DBP 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	70.65±7.32	70.26±7.69	70.46±7.43	0.8606
	Median	71.0	69.0	70.0	
	Min, Max	(61.00, 88.00)	(57.00, 85.00)	(57.00, 88.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	69.70±9.24	68.91±7.78	69.30±8.45	0.7574
	Median	66.0	69.0	68.0	
	Min, Max	(57.00, 86.00)	(55.00, 89.00)	(55.00, 89.00)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-0.96±7.04	-1.35±6.37	-1.15±6.64	0.8442
	Median	-3.0	-3.0	-3.0	
	Min, Max	(-13.00, 14.00)	(-10.00, 11.00)	(-13.00, 14.00)	
* paired t-test		0.5211	0.3214	0.2425	

[Table 31. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Pulse 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	78.57±11.57	78.65±9.14	78.61±10.31	0.9776
	Median	77.0	78.0	78.0	
	Min, Max	(56.00, 98.00)	(65.00, 98.00)	(56.00, 98.00)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	76.26±10.85	78.91±12.17	77.59±11.48	0.4395
	Median	78.0	78.0	78.0	
	Min, Max	(52.00, 93.00)	(55.00, 95.00)	(52.00, 95.00)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	-2.30±9.82	0.26±9.10	-1.02±9.45	0.3633
	Median	-2.0	-1.0	-1.5	
	Min, Max	(-17.00, 17.00)	(-20.00, 15.00)	(-20.00, 17.00)	
* paired t-test		0.2727	0.8919	0.4673	

[Table 32. 건강기능식품 투여 전 대비 12주 투여 후 Temperature 변화량, FAS]

Week		시험군 (N=23)	대조군 (N=23)	총합 (N=46)	p-value*
Baseline	N	23	23	46	

	Mean ± SD	36.60±0.13	36.55±0.16	36.58±0.15	0.2775
	Median	36.7	36.6	36.6	
	Min, Max	(36.40, 36.80)	(36.20, 36.80)	(36.20, 36.80)	
12주	N	23	23	46	
	Mean ± SD	36.63±0.11	36.62±0.13	36.63±0.12	0.8091
	Median	36.7	36.7	36.7	
	Min, Max	(36.40, 36.80)	(36.40, 36.80)	(36.40, 36.80)	
1 2 주 - Baseline	N	23	23	46	
	Mean ± SD	0.03±0.15	0.07±0.19	0.05±0.17	0.4472
	Median	0.0	0.0	0.0	
	Min, Max	(-0.30, 0.30)	(-0.30, 0.40)	(-0.30, 0.40)	
	* paired t-test	0.3475	0.0958	0.0551	

15. 12. 고찰 및 결론

본 임상시험은 임상시험관리규정(KGCP)과 헬싱키 선언에 따라 윤리적이고 과학적으로 진행되었다. 본 임상시험은 모든 기관의 임상시험심사위원회(IRB)의 사전 승인된 protocol에 따라 수행되었다. 임상시험에 참여한 모든 대상자는 사전에 충분한 설명과 자의에 의한 서면 동의 이후에 진행되었으며, 모든 임상시험 과정과 자료는 모니터에 의해 점검되었다.

본 임상시험을 통해 면역기능 개선을 원하는 대상자에서 12주째 평가된 T cell 및 B Cell의 변화 차이가 대조군 대비 시험군이 우월한 지 입증하고자 시행되었다.

임상시험의 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, 본 임상시험에 참가하기로 동의하고 스크리닝 기간을 거쳐 무작위 배정된 대상자는 총 46명이었고, 이 중 46명이 최소한 1회 이상 임상시험용 건강기능식품을 적용하여 safety군은 46명이었다. Safety군 가운데 유효성 주평가 변수 결과가 미기재 된 것으로 확인된 대상자는 없어, FAS은 46명이었다. FAS 가운데 임상중단 또는 PPS 제외기준에 해당하는 대상자는 1명도 없어, 최종적으로 계획서대로 임상시험을 종료한 대상자는 46명이었다(PPS).

둘째, 임상시험기간 동안 발현된 이상반응은 시험군에서 3명(13.04%), 4건이었고, 대조군에서 4명(17.39%) 5건으로 나타났으나 발현율에 군간 통계적 유의한 차이는 없었다.

시험용 건강기능식품과의 인과관계가 ‘관련성이 명백함’, ‘관련성이 많음’, ‘관련성이 의심됨’ 및 ‘평가불가능’ 평가된 이상약물반응은 시험군과 대조군 모두 1건도 없었으며, 중대한

이상반응은 없었다

이상반응의 종류별 분포는 호흡기계 질환에서 5명(10.87%), 5건으로 가장 많이 발생되었고, 중추 및 말초신경계 장애가 2건의 순서로 발생되었고, 전신질환과 생식기능 장애(여성)에서 각각 1건씩 발생되었다. 세부 분류에서는 두통과 감기가 각각 2건으로 가장 많이 발생되었고, 다른 질환은 모두 1건씩 발생되었다

셋째, 본 임상시험의 주평가변수는 임상시험용 건강기능식품 최종 투여 후 12주간 시험물질물 및 대조 물질 투여 전후 T cell 및 B cell(subset)의 변화에 대한 차이이다.

Baseline에서 시험군의 T cell 평균값은 138.37 ± 12.58 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 141.58 ± 13.26 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 T cell 평균값은 138.82 ± 11.32 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 141.24 ± 12.46 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 T cell 평균값은 0.45 ± 1.26 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 -0.34 ± 0.79 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가되었으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

Baseline에서 시험군의 CD3 평균값은 70.03 ± 3.24 이었고, 대조군의 CD3 평균값은 72.74 ± 2.18 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD3 평균값은 70.38 ± 5.37 이었고, 대조군의 CD3 평균값은 72.54 ± 7.16 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD3 평균값은 0.35 ± 2.13 이었고, 대조군의 CD3 평균값은 -0.20 ± 4.98 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가되었으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

Baseline에서 시험군의 CD4 평균값은 40.17 ± 3.23 이었고, 대조군의 CD4 평균값은 43.25 ± 4.59 이고, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD4 평균값은 41.08 ± 7.85 이었고, 대조군의 CD4 평균값은 42.65 ± 8.67 이고, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD4 평균값은 0.91 ± 4.62 이었고, 대조군의 CD4 평균값은 -0.60 ± 4.08 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

Baseline에서 시험군의 CD8 평균값은 26.89 ± 7.51 이었고, 대조군의 CD8 평균값은 26.18 ± 6.08 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 CD8 평균값은 26.65 ± 8.76 이었고, 대조군의 CD8 평균값은 25.81 ± 7.05 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 CD8 평균값은 -0.24 ± 1.25 이었고, 대조군의 CD8

평균값은 -0.37 ± 1.71 로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 감소를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

Baseline에서 시험군의 B cell 평균값은 14.56 ± 3.45 이었고, 대조군의 B cell 평균값은 14.62 ± 1.40 으로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었고, 투여 12주후 시험군의 B cell 평균값은 13.85 ± 6.57 이었고, 대조군의 T cell 평균값은 13.92 ± 7.67 로, 군간 통계적인 유의한 차이가 없었다.

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 B cell 평균값은 -0.71 ± 5.17 이었고, 대조군의 B cell 평균값은 -0.70 ± 6.27 로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

넷째, 부평가 변수의 분석결과를 정리하면 다음과 같다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 WBC 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 WBC 평균값은 0.49 ± 0.91 이었고, 대조군의 WBC 평균값은 0.23 ± 0.80 으로, 대조군 대비 시험군에서 높은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Neutrophile 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Neutrophile 평균값은 1.93 ± 7.90 이었고, 대조군의 Neutrophile 평균값은 1.05 ± 6.21 로, 대조군 대비 시험군에서 높은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Lymphocyte 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Lymphocyte 평균값은 -2.30 ± 6.49 이었고, 대조군의 Lymphocyte 평균값은 -1.27 ± 5.20 으로, 대조군 대비 시험군에서 높은 감소를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Monocyte 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Monocyte 평균값은 0.03 ± 2.00 이었고, 대조군의 Monocyte 평균값은 0.63 ± 2.06 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간

통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Basophile 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Basophile 평균값은 0.02 ± 0.34 이었고, 대조군의 Basophile 평균값은 -0.02 ± 0.28 으로, 대조군 대비 시험군에서 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 Eosinophile 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 Eosinophile 평균값은 0.31 ± 1.34 이었고, 대조군의 Eosinophile 평균값은 -0.40 ± 2.22 로, 대조군 대비 시험군에서 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

- 임상시험용 건강기능식품 투여 전 대비 투여 후 12주째 NK cell 수치의 변화

투여 전 대비 투여 12주후 변화량에 대하여 시험군의 NK cell 평균값은 0.37 ± 5.57 이었고, 대조군의 NK cell 평균값은 0.60 ± 2.66 으로, 대조군 대비 시험군에서 낮은 증가를 보였으나 군간 통계적인 유의한 차이는 없었다.

본 임상시험을 통해 면역기능개선을 원하는 대상자에서 12주째 평가자에 의해 평가된 T cell 및 B cell 에 대하여 투여 전 대비 12주 투여 후 변화량에 군간 통계적으로 유의한 차이가 확인되지 않아 대조군 대비 시험군이 우월한 것은 확인하지 못하였다. 그러나, 임상적으로 유의할 만한 이상반응은 없었고, 그 밖의 안전성 평가항목에서 특별히 임상적으로 유의할 만한 결과는 없었다.

10. β -1,3/1,6-glucan 및 유산균 제품화 기술 개발 및 글로벌 사업화

가. β 1,3/1,6-glucan 및 유산균 제품화와 기존 제품과의 차별성

- β 1,3/1,6-glucan의 제품화 공정은 액상형 제품 및 분말형 제품으로 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 최종 제품에 대한 생산 공정도 및 제품은 그림과 같이 나타내었다.



그림 20. 베타글루칸 분말 제품(1kg)



0.4% 액상 300ml



1.0% 액상 300ml



0.4% 액상 20L

그림 21. 베타글루칸 액상 제품

[기존 베타글루칸의 특징 및 문제점]

- 범용 유통중인 기존 타사 베타글루칸(베타-1,3/1,4 글루칸)의 특징
 - 귀리, 보리, 호밀등 곡물들의 식이섬유질로부터 분리하여 생산됨
 - 수용성 식이섬유의 형태로 점질성을 갖고 있어서 낮은 농도에서 높은 점성을 나타냄
 - 빠르게 gel화 됨으로써 섭취시 불쾌한 mouthfeel을 갖기도 함
 - 효모 유래 베타-1,3/1,4글루칸 불용성인 이유로 식품으로서의 이용이 없음
- K사의 표고버섯균사체 / 알파 1,3-글루칸(α -1,3 glucan)
 - 포도당 분자간의 알파-1,3 결합을 이루는 고분자 물질
 - 표고버섯 균사체를 배양한 액에 α -amylase, pectinase, protease등을 처리하여 살균, 동결건조 순으로 제조
 - 알파 1,3-글루칸 이외에도 부수 물질들이 많이 포함되어 있으며, 중량당 알파 1,3-글루칸이 20-40% 정도의 저농도로 함유되어 있음
 - 해당 소재 전량을 해외(일본)에서 전량 수입 유통하는 구조로 단가가 높음
- N사의 효모베타글루칸 / 베타-1,3/1,6글루칸(β -1,3/1,6 glucan)

- 효모세포벽으로부터 추출됨
- 아가리쿠스, 영지, 운지버섯 등 여러 항암버섯의 주요 약리작용을 갖는 다당류임
- 지표성분인 베타-1,3/1,6글루칸이 50%정도 함유되어 있음(저순도)
- 해당소재는 전량을 해외(미국)에서 수입 유통하는 구조로 단가가 높게 형성되어 있음
- 기존 타사 글루칸소재의 문제점
 - 베타 1,3 및 1,4 구조를 가지는 범용성 식품첨가용 및 산업용 베타글루칸의 경우 베타 1,6 결합의 부재로 기능성의 확보가 미비하며, 불용성으로서 식품으로의 접목 또는 자유롭지 못한 상황임. 당사가 생산하는 베타글루칸에 비하여 순도가 낮으며, 국내 생산은 수행하지 못하고 외국에서 독점 수입으로 제품생산고 유통사업을 수행하고 있는 상황으로, 높은 소재단가에 자사의 유통이윤까지 추가되어 글루칸시장의 제조사업에도 높은 단가책정이 조장되고 있는 상황으로, 시장경제에 있어 소비자 뿐만 아니라 제조업 시장에도 영향을 미치고 있음

[선일바이오에서 생산한 베타글루칸의 차별화 및 장점]

- 범용으로 사용되어지고 있는 베타-1,3 또는 베타1,3/1,4 글루칸이 아닌 미국 바이오세라사와 동일한 고순도의 베타-1,3/1,6 글루칸만을 생산
- 베타-글루칸의 인체 생리활성에 있어 필수 요소인 수용성의 물성을 지님
- 식품, 화장품, 의약품 적용에 용이한 백색의 색상을 지님
- 순수 베타-1,3/1,6글루칸만을 생산하는 확보균주를 이용한 공법을 활용하여 전세계 타사 원료들과 비교하여도 93%이상의 압도적 중량당 고순도, 베타글루칸 함량을 보임
- 본 연구를 통하여 기존 0.15%의 베타글루칸 수율에서 1.0%이상의 베타글루칸 수율 공정을 확립

국가	구분	베타글루칸함량
일본	미나헬스	43.6%
일본	유니치카	43.4%
일본	에츠고하나비라타케	42.4%
일본	아미노업 케미칼	37.5%
미국	바이오세라	78.5%
대한민국	하나바이오텍	46.3%
대한민국	선일바이오	93% 이상

비교항목	타사 베타글루칸	선일바이오(주) 베타글루칸
소재	효모 세포벽 추출형	효모 세포외 분비형
베타글루칸 타입	β -1,3 1,4 1,6 α -1,3 1,4	β -1,3/1,6
성상	노란색 분말	백색분말
수용성 여부	부분적 수용성	수용성
순도	50%이상	90% 이상
생산단가	500\$/kg(수입단가)	200\$/kg
가능 응용분야	화장품, 식품	식품, 화장품, 의약품

- 베타-1,3/1,6글루칸의 액상 및 분말 제품은 대량배양생산 공정법에 의해 Seed배양→100L배양→

1000L배양→5000L배양→원심분리→농축→주정회수→필터프레스→동결건조를 거쳐 각각 액상과 분말제품을 개발하였다.

- 액상은 0.4%, 1.0%로 구분되어지며, 제품은 규조토가 섞인 필터를 사용하여 불순물을 제거하고 배양기안에서 멸균을 실시하여 잔류된 균들을 제거하고 포장전 재균필터를 거쳐 공급된다. 분말은 필터프레스를 사용하지 않고 바로 멸균 후 동결건조 되어 공급된다.
- 액상 최소단위는 20kg, 분말 최소단위는 500g으로 설정
 분말 판매가 : 2,500,000원/kg, 액상 판매가 : 23,000원/0.4%/kg, 41,000원/1.0%/kg

[글로벌 제품화]

- 글로벌 제품화를 위한 마케팅 전략



< 국내 베타글루칸 시장 점유와 글로벌 제품화를 위한 전략 >

- 제품의 홍보 추진전략

1) 다당류를 이용한 면역조절 글로벌 건강식품의 국내외 인증을 통한 대외공신력 확보

- 국내 판매유통을 위한 건강기능성 물질의 식약처 개별 인증으로 통한 기능물질의 유관기관의 공신력 확보추진
- 미국 및 EU시장의 해외수출을 위한 해외인증인 NDI(New Dietary Ingredient) 획득으로 타겟시장(Target-Market)내 건강기능성 식품 생산 대기업 내 납품공급에 필수적인 인증 획득 추진
- 아시아 시장진출을 위한 중국 SFDA 인증획득을 통한 건강기능성물질 제품수출 추진

2) 글로벌 건강기능성 제품식품의 인터넷 온라인 탑재를 활용한 홍보추진

- 국내외 건강기능성 식품인증을 활용한 You Tube 광고 동영상 탑재, 국내외 소비자들에게 건강기능성 식품에 대한 인지도 확대 추진을 위한 에드버룬 홍보마케팅 추진(키워드 광고 : 영문 및 국문)
- 영어, 중국어 판의 글로벌 건강식품 홈페이지 및 전자책자 홍보물을 제작하여, 고비즈코리아를 통한 수출거래 포털 사이트를 활용하여 제품홍보로 해외네트워크 개척

3) 국내외 건강기능성 식품 및 화장품 소재 박람회에 참가하여, 해외지역의 바이어 홍보 및 시장개척

- 국내에서 매년 개최되는 국제 건강기능성 식품박람회의 국내 및 해외바이어들에게 건강기능성 식품의 인증과 특성을 홍보

○ 제품의 판로확보 전략

1) 베타글루칸의 항암보조제 등 의약품 산업 적용 판로확대

- 베타글루칸은 최근 10명중 4명이 당뇨, 고혈압 등의 자가면역질환이 확대되고 있어, 심각한 사회문제 대두의 해결수단으로 등장됨
- 베타글루칸의 건강기능성 물질의 자가면역 및 암치료제 활용추진으로 국내외 제약회사, 의약품업체에 판로 추진

2) 건강기능식품, 기능성음료 첨가제로 활용이 식음료 업체 소비촉진 추진

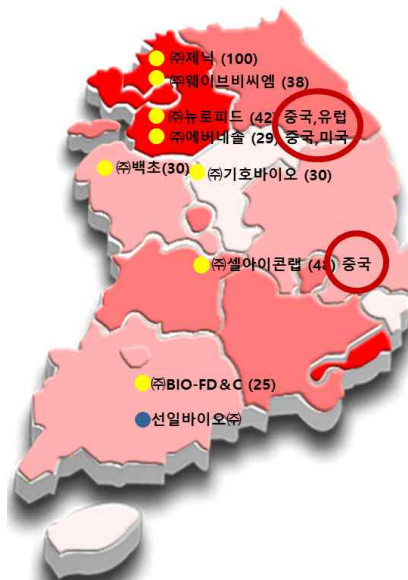
- 최근 소비자들의 안전한 먹거리, 웰빙트렌드 등 소비자 니즈 변화가 점차 확대되고 있음
- 베타글루칸의 경우 식품 및 음료에 첨가시 제품에 잘 흡수되지 못하는 단점이 있으나, 이를 극복할 수 있는 기술개발 시 식음료 업체 소비촉진 가능

3) 고기능성 미용제품 첨가제로 화장품 제품 생산업체 판매추진 가능

- 베타글루칸은 강력한 보습제와 피부 깊숙이 침투하여 콜라겐 합성을 촉진하고, 화상 입은 세포 재생 효과가 있음. 오래 바를수록 피부가 탄력있고, 부드러워짐
- 또한 피부주름 개선효과가 빨라 노화현상 진행속도를 늦추어, 이를 활용한 미용제품에 첨가 고기능성 제품으로서 판매 추진

○ 현재 국내외 판로 확보

- 국내 8곳 이상의 공급처와 그 공급처에 따른 판매처가 확보되어진 상태이며, 특히 (주)뉴로피드, (주)에버네슬, (주)셀아이콘랩에서는 화장품용, 식품용으로의 판매를 추진하고 있음



β-GLUCAN PRODUCTION PROCESS (Liquid)



그림 22. 액상형 제품 생산 공정도

β-GLUCAN PRODUCTION PROCESS (Powder)



그림 23 분말형 제품 생산 공정도

- 베타글루칸 액상 및 분말 제품 품목제조보고서

식품안전나라
식품안전정보서비스
식품안전정보서비스
201305210889
회원정보 관리
로그아웃


우리회사안전관리서비스
우리회사안전관리서비스 한눈에 보기 +
통합로그인 인허가번호 선택

우리회사 정보
우리회사정보관리
우리회사인원
생산실적보고
장모검색

우리회사인원

에스아이-베타글루칸(액상)

20130521088

품목제조 기본정보

성분명 및 원료명

제조방법

변경사항

품목제조 기본정보

허가(신고)번호

영업자정보

업체명	선일바이오(주)
업체소재지	전라남도 장흥군 신단1로 49

제품정보

품목보고번호	201305210889
식품의 유형	기타가공품
제품명	에스아이-베타글루칸(액상)
유통기한	제조일로부터 24개월
품질유지기한	제조일로부터 24개월
제품형태	
용도용법	원료성제품
상상	분말,액상
포장방법 및 포장단위	포장 방법 : PET /포장 단위 : 분말 100 g, 500 g, 1,000 g/ 액상 1 L, 20 L
포장재질	PET
보관 방법	냉장
기타	

※ 임상시험 재실시 진행중

- 섭취량 재설정과 피험자수를 증가시켜 소재의 기능성을 재확인하고 글로벌 제품화로 거듭나기 위하여 임상시험을 재실시하고 있음

제목 : 건강한 대상자를 대상으로 베타-1,3/1,6글루칸의 면역개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중눈가림 플라세보대조 임상시험

- 2017년 8월부터 피험자 모집이 시작되었으며, 현재 피험자 모집과 검사가 진행중

가. 요약

1) 의뢰인(신청회사) : 농업회사법인 선일바이오(주)

2) 제품명(코드명) : 베타-1,3/1,6글루칸

3) 시험제목 : 건강한 대상자를 대상으로 베타-1,3/1,6글루칸의 면역개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중눈가림 플라세보대조 임상시험

4) 시험목적

■ 유효성

- 일차목적 : 시험물질 투여전 및 후 12주에 평가되는 혈액내 T cell 및 B cell의 변화

- 이차목적 :

1. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
2. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
3. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
4. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화
5. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
6. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
7. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

■ 안전성

- 이상반응
- 활력징후
- 임상실험실검사

5) 임상시험용 시험물질

■ 시험물질 : 베타-1,3/1,6글루칸 (포), 기밀용기 및 실온보관(1-30℃)

■ 플라세보 : 주성분을 제외한 성상은 시험물질과 동일

1일 1회 1회당 1포 복용(아침식후 복용)

6) 유효성 평가변수

■ 1차 유효성평가변수:

Baseline으로부터 시험물질 투여 전 및 후 12주째의 평가되는 혈액내 T cell 및 B

cell(subset포함)의 변화

■ 2차 유효성 평가변수:

1. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
2. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
3. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
4. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화
5. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
6. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
7. 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

7) 안전성 평가변수

■ 이상반응, 활력징후 및 임상적 실험실적 검사 결과

8) 선정기준

1. 만 18세 이상 70세 미만의 남, 여 피험자
2. 최근3개월 이내 상기도감염을 겪은 피험자
3. 스크리닝방문시 WBC 수치가 $6.0 \times 10^9/L$ 이하인 피험자
4. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 임상시험동의서에 서명하고 동의한 피험자

9) 제외기준

1. 베타글루칸 성분에 알레르기가 있는 피험자
2. 스테로이드 제제를 사용하고 있는 피험자
3. 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 피험자
4. 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 피험자
5. 1개월 이내에 다른 임상시험 또는 임상시험에 참여한 피험자
6. BUN수치가 정상치의2배이상인 피험자
7. 갑상선질환 피험자
8. Serum creatinine이 1.5mg이상인 피험자
9. 정신질환(우울증, 정신분열등) 피험자
10. 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 피험자
11. 임신 혹은 수유 중인 피험자
12. 임신 가능성이 있는 가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임 수술을 받은 여성은 제외)
13. 기타 연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

10) 시험중지/탈락기준

- ① 선정/제외기준에 위반 된 경우
- ② 피험자 본인, 또는 그들의 법적 대리인이 자발적인 중지 요청이 있을 경우

- ③ 시험 전 평가에서 발견하지 못한 중대한 증상이나 질환이 확인된 경우
- ④ 피험자가 자의로 중단하고 연락이 안 되는 경우
- ⑤ 결과에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경우
- ⑥ 시험자나 피험자에 의해 시험계획을 위반하는 경우
- ⑦ 기타 시험담당자의 판단에 의해 시험 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우
- ⑧ 의뢰자가 특별한 요청을 할 때
- ⑨ 시험자가 시험의 지속이 피험자의 복지에 해를 끼칠 것이라고 판단한 경우

11) 목표 피험자 수

- 각 군당 목표 피험자수는 43명이고 탈락율 10%를 고려하여 본 임상시험에 필요한 피험자 수는 각 군당 43명으로 총 86명이 된다

12) 병용 금기약물

본시험의 병용금기약물은 다음과 같다.

1) 면역억제제

2) Steroids제제

3) 건강기능식품(면역기능개선등) 그외 약물은 피험자의 건강상태를 고려하여 연구자가 판단하여 병용시 그 사유를 기록하도록 한다.

13) 임상시험 기간

첫 번째 환자 모집일로부터 12개월

14) 통계분석방법

베타글루칸제제 투여 후 각 투여군에서의 면역개선효과를 플라세보군과 비교 검정하는 방법으로 투여 후에 면역기능개선에 대한 T cell 및 B cell의 증가율을 비교하여 두 군 사이에 차이가 있는지 카이제곱 검정 또는 Fisher's exact test를 이용하여 검정한다. 베타글루칸제제 투여군에서의 측정결과 T cell 및 B cell 개선율이 통계학적으로 유의하게 높다면 플라세보군에 비해 우월하다고 판정한다. 또한, 임상시험 개시 전과 개시 후의 T cell 및 B cell 수치의 변화량이 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하기 위하여 Student t-test 또는 비모수 검정법인 Mann-Whitney U test를 이용한다. 개시시점 대비 종료 시점 시 군내 변화량에 차이가 있는지는 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용한다. 본 임상시험의 피험자로부터 얻어진 자료는 크게 ITT(intention to treat) 분석법과 PP(per protocol) 분석법의 두 가지 형태로 분석할 것이다. ITT 분석법은 최소한 한 번이라도 시험물질물을 투여 받은 피험자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함한다. 이때 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 임상시험이 종료되기 전에 피험자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당 시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실시(Last Observation Carried Forward Analysis)하는 방법으로 분석한다. 본 임상시험에서는 ITT 분석을 주분석으로 하고 PP 분석을 별도로 실시하여 ITT 분석 결과와 차이가 있는지 평가할 것이다.

[임상시험일정표]

시험항목	Screening	Baseline	Treatment	Final Visit
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
	첫 투여 전 14일 이내	Week 0 (Day 0)	Week 6 (Day 42±3)	Week 12 (Day 84±3)
서면동의 ¹⁾	○			
인구학적 조사 ²⁾	○			
병력, 약물력 조사 (시험참여 4주 이내)	○			
활력징후 ³⁾	○	○	○	○
신체검사 ⁴⁾	○	○	○	○
실험실 검사 ^{5,6)}	○	○		○
T cell 및 B cell 검 사 ^{5,6)}	○	○		○
선정/제외기준 ⁷⁾	○	○		
무작위 배정		○		
임상시험물질 처방 및 교부		○	○	
임상시험물질 반납 및 순응도 평가			○	○
병용 약물 조사	○	○	○	○
이상반응 확인			○	○
임상시험 종료평가				○

1) 임상시험에 들어가기 전, 본 임상시험의 목적과 내용에 대하여 피험자 및 보호자(법적 대리인)에게 상세히 설명한 후 각각에 대하여 문서로서 동의를 받는다. 서면 동의 취득은 어떠한 임상시험 과정 보다도 앞서서 이루어져야 하며 동의서는 피험자 및 보호자(법적 대리인)가 직접 서명 및 날짜를 기입하는 것을 원칙으로 한다.

2) 모든 동의를 취득한 이후에 성별, 나이, 체중등의 정보를 조사한다.

3) 좌위 수축기/이완기 혈압, 맥박 및 체온등을 측정한다.

4) 시험책임자 또는 시험담당자가 피험자에게 문진, 시진, 촉진, 청진 등의 검사를 통해 얻게 되는 정보이다 (신장/체중은 시험기간 중 동일한 자동측정기를 이용하고 신장은 첫 방문 시에만 측정하며 신을 벗고 cm 단위로 측정한다.

5) 피험자는 다음의 항목을 검사한다 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono). T cell / B cell (subset포함), NK cell 혈액화학적 검사: BUN, creatinine 뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose 임신검사 : 가임기여성에 한하여 urine으로 측정한다. * 혈액화학/뇨검사/임신검사(해당하는경우)/T cell 및 B cell 검사는 실험실검사에서 선정기준에 적합한 경우에만 실시하도록 한다.

6) 피험자는 채혈하기 가능한 전날 8시간 이상 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다

7) 선정/제외기준은 Screening 방문 시에 확인한다. 기준에 적합한 피험자는 순차적으로 피험자 등록번호가 부여된다.

8) 시험자의 판단에 따라 시험물질 최종 투여 후 혹은 조기 투여 중지 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 4주 이내 다시 방문하도록 함.

나. 임상시험의 배경

인간 생활에의 질적 향상과 더불어 놀랄만한 과학의 발전에 그 동안 불치병으로 여겼거나 인류를 끊임없이 괴롭혀 오던 각종 질병에 대한 원인과 그에 대한 치료법이 연구되어지고 있지만 시간의 흐름 속에 신종 혹은 과거에 그 위험성을 간과해 오던 질병들이 다양한 진화를 거듭해 새로운 사안으로 대두되는 시점인 현대 사회에서 면역질환은 대단히 심각한 문제로 인식되어 지고 있는 실정이다. 면역기능은 대부분의 사람에게는 외부 물질에 대해 인체의 방어능력으로 면역기능의 저하는 본래 우리 몸이 가지고 있는 자연치유 기능을 점차 약화시켜 아토피성 피부염, 알레르기 비염, 두드러기, 과민성 폐렴, 중이염, 허약체질, 식욕부진, 성장장애, 집중력 저하, 잦은 감기 등과 같은 다양한 질병발생의 주요 원인 중 하나이다. 영양불량이 곧 면역 기능 저하와 직접적 관련이 있다는 다양한 연구결과가 있으며, 이는 면역력은 개인별로 차이가 있어 보다 장기적인 관점에서 접근할 필요가 있다. 따라서 장기간 복용해도 무리가 없는 식품, 특히 천연식품의 섭취가 바람직한 방안으로 지목되고 있다. 이에 따라 본 임상시험에서는 선일바이오의 베타-1,3/1,6글루칸의 섭취로 면역기능의 개선에 도움이 되는지 확인하고자 임상시험을 실시하게 되었다

다. 용량설정의 근거

○ 선일바이오(주)의 베타글루칸은 효모 세포외 분비형의 β -1,3/1,6glucan으로 기존 (주)네츄럴엔도텍에서 생산되는 베타글루칸보다 순도와 효능에서 월등하다는 전제로 시작된 바, 실제 연구내용에서 선일바이오(주)의 순도는 73%로 나타났고, 그 효능은 타사(N사)와 비교했을 때 20~30% 높은 효능차이를 보임 (경쟁사인 N사는 건기식 개별인정형 원료로 인정받을시 일일섭취량은 250 mg/day지만, 실제 제품에 함유된 베타글루칸의 함량은 아래 그림과 같이 195 mg으로 나타남

라. 임상시험의 방법

■ 투여일정

임상시험용 시험물질의 투약은 피험자가 동의서에 서명하고 스크린을 통하여 선정/제외기준에 부합하는 피험자들을 시험군과 플라세보군으로 무작위 배정하여, 양쪽군 동일하게 시험물질인 베타글루칸추출물과 플라세보를 기준으로 투여한다.

■ 임상시험의 기간

본 임상시험의 관찰기간은 투약 시작 후 12주며, 전체 임상시험기간은 피험자 등록 후 12개월로 계획되어 있다. 하지만 피험자 등록기간의 연장 등의 사유로 전체 임상시험 기간은 연장 될 수 있다.

■ 시험디자인

본 시험은 베타-1,3/1,6글루칸제제와 플라세보간의 T cell 및 B cell의 수치변화 개선에 대한 안전성과 유효성을 비교 평가를 위한 단일 기관, 이중맹검, 플라세보대조, 무작위 배정 임상 시험이다.

■ 무작위배정 및 눈가림 방법

임상시험에 자의적으로 참여할 것을 동의하고, 동의서에 서명한 피험자 중 선정 및 제외기준을 만족하는 피험자는 시험용 시험물질 또는 대조용 시험물질 군에 무작위로 배정될 것이다. 본 임상시험은 이중맹검 시험으로 본 임상시험을 과학적이고 객관적으로 시행하기 위해 블록 무작위 배정(Stratified Block Randomization)방법에 의하여 무작위 배정표를 시험기관 별로 작성한다. 이때 각 기관에 따라 미리 지정한 블록크기를 고려하여 충분한 크기의 무작위 배정표를 발생한다. 의뢰자/CRO는 사전에 각 시험기관별로 무작위배정봉투에 따라 준비하고 공급한다. 9.5 맹검해제 방법 응급상황이나 중대한 이상반응 등으로 피험자의 약물코드를 알아야 하는 경우, 연구자는 무작위배정봉투의 해당피험자봉투의 맹검을 해제 후 Un-blind report form에 피험자번호/사유등을 기재하여 의뢰자에 통보하고 다시 sealing하여 시험종료 시까지 보관한다.

마. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰 검사방법

■ 관찰검사방법

1. 방문 1 : 시험물질 첫 투여 전 14일 이내 (screening 방문)

동의서에 서명을 취득하고 시험물질투여가 시행되기 21일 이전에 다음의 자료가 수집되고 연구가 진행될 예정이다. 피험자는 채혈하기 전날 8시간 이상 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다.

1) 서면동의서 작성

2) 인구학적 조사(성별, 나이, 음주력 및 평균 음주량 등)

3) 병력•약물력 조사

4) 활력징후

5) 신체검사(신장, 체중)

6) 실험실검사 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono)

7) 선정 및 제외기준 조사

8) 병용약물 조사

2. 방문 2 : 0주 (Baseline 방문)

Screening 방문에서 선정된 대상자에 대하여 두번째 방문을 실시하여 다음항목을 조사·확인

받아 시험물질 또는 플라세보를 투여받게 된다.

1) 활력징후

2) 신체검사(체중)

3) 실험실검사 혈액학검사 : T cell / B cell (subset포함), NK cell 혈액화학적 검사: BUN, creatinine 뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose 임신검사 : 가임기 여성에 한하여 urine으로 측정한다.

4) 선정 및 제외기준 확인

5) 무작위배정

6) 임상시험용 건강기능식품 처방 및 교부

7) 병용약물 조사

8) 이상반응

3. 방문 3: 4주± 3일 (Treatment 방문)

두번째 방문시점으로부터 4주째인 세번째 방문에서는 다음항목을 조사 한다.

1) 활력징후

2) 신체검사(체중)

3) 임상시험물질 처방 및 교부

4) 임상시험물질 반납 및 순응도 평가

5) 병용약물 조사

4. 방문 4: 12주± 3일 (Final 방문)

이전 방문시점으로부터 4주째에 종료방문을 실시하여 다음항목을 조사•확인한다.

1) 활력징후

2) 신체검사

3) 임상시험물질 반납 및 순응도 평가

4) 실험실검사 혈액학검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono) T cell / B cell (subset포함), NK cell 혈액화학적 검사: BUN, creatinine 뇨검사 : pH, Blood, specific gravity, glucose

5) 임상시험물질 반납 및 순응도 평가

6) 병용약물 조사

7) 이상반응 조사

8) 임상시험 종료 평가

5. 중도탈락

예정된 12주간의 투약기간을 완료하지 못하고 탈락된 피험자는 투약종료 시에 시행되어야 하는 항목을 측정하도록 한다.

6. 병용금기약물 본시험의 병용금기약물은 다음과 같다.

1) 기타면역억제제

2) Steroids제제

3) 건강기능식품 그외 약물은 피험자의 건강상태를 고려하여 연구자가 판단하여 병용시 그 사유를 기록하도록 한다.

바. 유효성 및 안전성 평가변수, 평가방법 및 해석방법

■ 유효성 평가변수

1. 1차 유효성 평가변수:

- 시험물질물 및 대조물질 투여 전후 T cell 및 B cell(subset)의 변화에 대한 차이

2. 2차 유효성 평가변수:

- 1) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 WBC수치의 변화
- 2) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Neutrophile의 변화
- 3) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Lymphocyte의 변화
- 4) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Monocyte의 변화
- 5) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Basophile의 변화
- 6) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 Eosinophile의 변화
- 7) 시험물질 투여전 및 투여후 12주째의 NK cell의 변화

■ 안전성 평가변수

- 1) 이상반응
- 2) 활력징후
- 3) 임상실험실검사

■ 분석에 포함되는 피험자 집단 (Study Population)

피험자로부터 얻어진 자료는 Safety Set, FAS (Full Analysis Set), ITTS (Intent to treatment set), PPS (Per- Protocol Set)으로 나뉜다. 본 임상시험의 주 분석 집단 (main population) 은 ITTS (Intent to Treatment Set)로 정의한다. FAS (Full Analysis Set) 군 분석도 함께하여 결과를 비교하되 크게 차이를 보이는 경우에는 각 분석 대상자의 결과를 예시한다.

- FAS (Full Analysis Set) ITT (Intention-To-Treat)원칙을 따르며 본 임상시험에 사용되는 시험 물질을 한 번이라도 복용한 피험자 중 Baseline 이후에 적어도 한번 이상 1차 유효성 평가변 수의 값이 측정된 피험자 군을 대상으로 한다.

- PPS (Per-Protocol Set)

PPS (Per-Protocol Set)원칙을 따르며 임상시험계획서대로 임상시험을 완료한 피험자 군으로 다음에 해당하는 경우를 제외시킨다.

- 1) 임상시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 임상시험에서 중도 탈락한 피험자
- 2) 병용 금지약물을 복용한 피험자 3) 그 외 중대한 계획서 위반을 한 피험자

■ Safety Set

본 임상시험에 등재한 모든 피험자 중 선정/제외 기준을 만족하고, 치료를 시작한 후 안전성

관련 데이터를 최소한 한 번 이상 확인한 피험자에 한한다. 12.4 결측치 처리 방법 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 임상시험이 종료되기 전에 피험자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실시한다(Last Observation Carried Forward; LOCF).

■ 해석방법

- 인구통계학적 자료와 임상병력 자료 환자의 기저상태 특성을 시험군 별로 적절한 기술적 통계방법을 이용하여 요약한다. 연속형 자료는 평균, 표준편차, 최소, 최대치 등을 구하고, 범주형 자료는 빈도와 백분율을 계산한다. 두 군간에 비교는 자료의 정규성 여부에 따라 연속형 변수는 two-sample t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test에 의해 비교하며, 범주형 변수는 chi-square test 또는 fisher's exact test를 이용하여 비교한다.

■ 유효성 평가분석방법

- 1차 유효성 평가변수

1차 유효성 평가변수인 시험물질물 투여 전 Tcell/B cell (subset포함)과 임상시험용 시험물질 복용 후 12주째 Tcell/B cell (subset포함)의 차이가 대조용 시험물질에 비해 시험용 시험물질이 우월함을 보이기 위함이므로, 주 분석방법은 two sample t-test 또는 wilcoxon's rank sum test를 시행하여, p-value가 양측유의수준 0.05보다 작음을 보일 것이다.

- 2차 유효성 평가변수

2차 유효성 평가변수 중 연속형 자료의 경우, 군간 비교는 two sample t-test 또는 wilcoxon's rank sum test를 시행한다. 범주형 변수의 경우, 군간 비교를 위하여 chi-square test 또는 fisher's exact test를 시행할 것이다.

■ 안전성 평가분석방법

안전성 분석의 대상은 Safety Set으로 하고 대상이 되는 자료는 시험물질을 1회라도 복용한 후 새로이 발생한 이상반응과 각 방문 시 실시한 임상검사 및 실험실 검사 결과 등이다.

■ 이상반응

각각의 이상반응에 대해 한 번 이상의 이상반응을 경험한 피험자 수 및 백분율을 시술한 임상시험용 시험물질 별로 나누어 기술하고, 이상반응의 중대성(Seriousness), 위중도(Severity), 임상시험용 시험물질과의 연관성, 재시술여부 및 그 결과에 대해서 복용한 임상시험용 시험물질 별로 구분하여 보고한 피험자 수 및 백분율을 정리한다.

1. *A. pullulans* 변이 균주 확보 및 변이균주의 안정성 시험

- *A. pullulans*는 흙, 공기, 음식 찌꺼기, 섬유, 샤워 커튼, 나무 등에서 서식하는 오염균의 일종으로 분리가 된다. 또한 곡식류의 잎이나 열대과일에서도 흔히 볼 수 있는 균류이다. 멜라닌을 생성하여 배양시 검게 변하기 때문에 “흑효모(black yeast)”라고 불리우기도 하며, 이 균주는 식물의 조직을 연하게 하는 식물병원균으로 여겨져 왔으며, 다양한 형태로 성장한다. 균주의 성장 형태는 발아하는 효모의 형태나 균사체의 형태로 성장하며, 검은색을 띠는 chlamyospores의 형성이라는 특이한 현상을 나타내고 있다.
- 초기 성장시 노란색, 옅은 핑크색 또는 밤색으로 나타나다 최종적 단계에서는 chlamyospores의 형성으로 검게 변한다. 균사는 투명하고 부드러우며 얇은 막으로 싸여 있으며, *A. pullulans*는 포도당이 연결되는 방법에 의해, α 와 β 1,3/1,6-glucan을 생성하며, 특히 β 1,3/1,6-glucan에 대한 연구가 활성화되기 이전에는 α -glucan으로 불리우는 pullulan 생산의 대표균주로 알려져 있으며, 산업적으로 매우 중요한 균주로 이용이 되어져왔다.

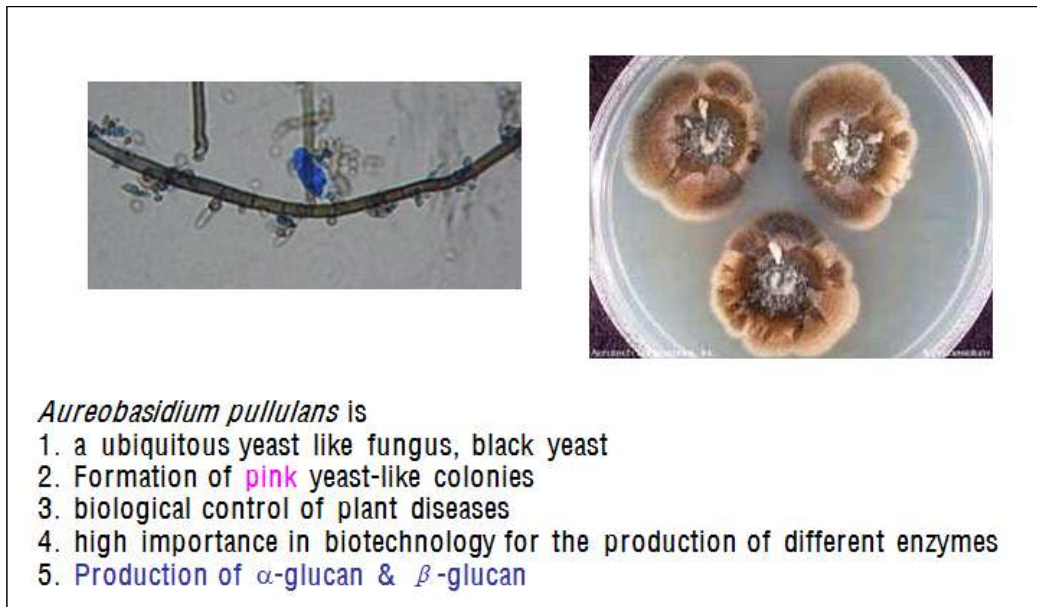


Fig. 24 Characteristics of *Aureobasidium pullulans*

가. 순수 β 1,3/1,6-glucan 생산용 변이균주의 확보

(1) 실험 방법

- 돌연변이 유발을 위한 첫째 방법으로는 *Aurebasidium pullulans* 모균주를 Czapek 액체 배지에 접종하고, 30°C 에서 20시간 배양하였다. 배양액을 멸균수로 10³배 희석하고, 희석액 100 μl를 고체 배양 접시에 도말하였다. 고체 배양 접시를 평판교반기에서 회전시켜 주면서, 광도 600μW/cm², 파장 250nm의 자외선 램프로 0 ~ 60분간 10분 단위로 조사하면서 돌연변이를 유발시켰다. 돌연변이의 유발은 *A. pullulans* 모균주에 자외선을 조사하지 않은 미생물의 수(CFU/ml)를 대조구로 하여 균주의 사멸된 정도가 95% 이상인 시간을 확인함으로써 돌연변이 유발 조건을 설정하였다.
- 돌연변이 유발을 위한 두 번째 방법으로, 화학적 돌연변이 유도법을 사용하였다. 이를 위해서 *A. pullulans* 모균주를 Czapek 액체 배지에 접종하고, 30°C 에서 20시간 배양하고, 상기 배양액 10 ml를 취하여 돌연변이원 (mutagen)으로서 ethylmethansulfonate (EMS)를 0 ~ 500 μl 첨가하여 3 시간 동안 처리하여 돌연변이를 유발하였다.

(2) 실험 결과

(가) 돌연변이 조건의 확립

- 상기 실험 방법에 따라 자외선 및 EMS를 사용하여 최적 돌연변이를 유발 조건을 확립하고, 그림 25과 26에 나타내었다. 그림 25에 나타난 바와 같이 *A. pullulans*의 경우 10분 이상 자외선을 조사하여도 사멸율은 크게 증가하지 않음을 확인할수 있었다. 따라서 *A. pullulans*의 돌연변이 유발 자외선 조사 시간조건은 10 분으로 확정하였다.
- 돌연변이원 (mutagen)으로서 ethyl methansulfonate (EMS)를 0 ~ 500 μl 첨가하여 3시간 동안 처리하여 돌연변이를 유발하였다. 그 결과, 그림 26에 나타난 바와 같이 *A. pullulans*의 경우 EMS의 사용량이 300 μl일 때 사멸율 93%로 확인되었으며, 그 이상의 농도에서는 사멸율에 큰 변화가 없음을 확인하였다.

(나) 순수 β 1,3/1,6-glucan 생산 균주 확보

- *A. pullulans* 모균주를 Czapek 액체 배지에 접종하고 30°C 에서 20시간 배양하였다. 배양액 10 ml을 취하여 돌연변이원 ethyl methansulfonate를 300 μl 첨가하고 3시간 동안 반응시키면서 1차 돌연변이를 유발한 후, 상기 반응액 100 μl를 고체 배양 접시에 도말하였다. 고체 배양 접시를 평판교반기에서 회전시켜 주면서 광도 600 μW/cm² 파장 250 nm의 자외선램프로 10분간 조사하

여 2차 돌연변이를 유발시켰다.

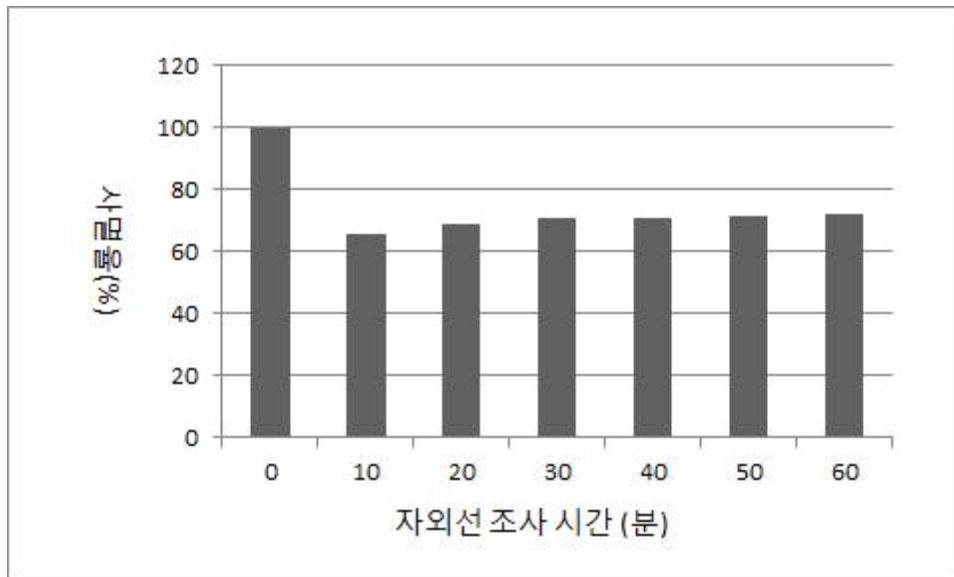


Fig. 25. Death rate by UV irradiation

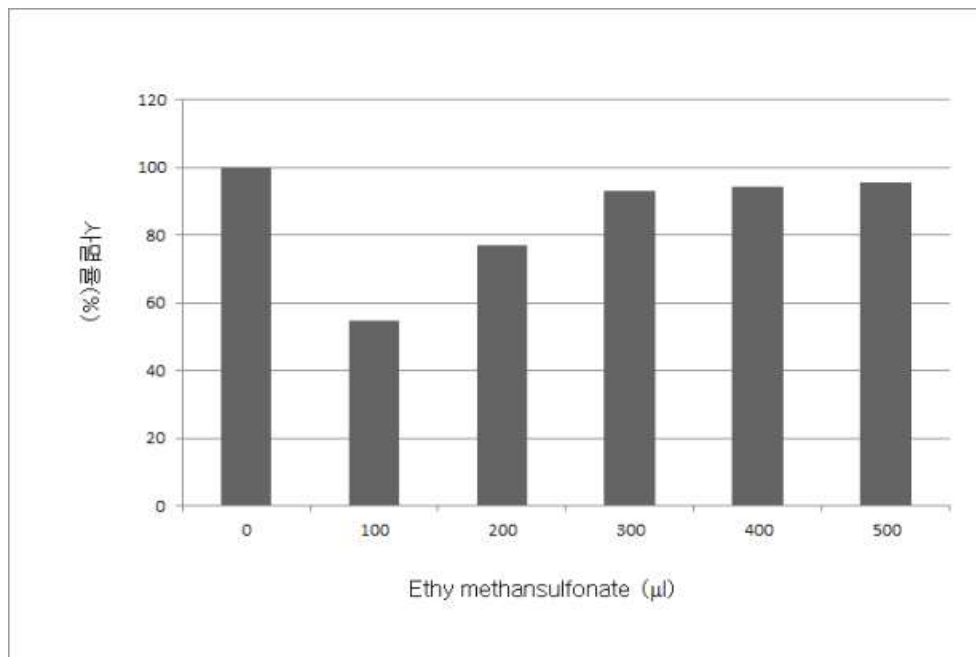


Fig. 26. Death rate by ethyl methansulfonate treatment

표 16. 돌연변이 균주로부터 생성된 pullulan 분해효소 pullulanase 처리 후 결과.

균주번호	생성물 농도(g/L)		균주번호	생성물 농도(g/L)	
	글루코스	말토티리오스		글루코스	말토티리오스
KSY-0011	0.2	0.2	KSY-0369	0.1	0.1
KSY-0035	-	-	KSY-0371	0.4	0.2
KSY-0069	0.1	0.2	KSY-0388	0.2	0.2
KSY-0070	0.2	0.2	KSY-0394	0.3	0.3
KSY-0085	-	-	KSY-0396	-	-
KSY-0185	0.4	0.4	KSY-0397	0.2	0.1
KSY-0188	0.4	0.4	KSY-0409	0.5	0.6
KSY-0197	0.2	0.3	KSY-0487	0.2	0.1
KSY-0205	-	-	KSY-0514	0.2	0.2
KSY-0236	0.2	0.3	KSY-0516	-	-
KSY-0245	0.3	0.3	KSY-0548	0.6	0.4
KSY-0255	-	-	KSY-0608	-	-
KSY-0268	0.2	0.4	KSY-0634	0.1	0.2
KSY-0297	0.4	0.4	KSY-0681	0.2	0.2
KSY-0302	-	-	KSY-0682	-	-
KSY-0345	0.6	0.6	KSY-0706	0.5	0.5

- 돌연변이를 유발한 후, 고체 배양 접시에 나타난 약 700개의 효모 군락(colony)를 Czapek 액체 배지 20 ml가 함유된 100 ml 삼각플라스크에 접종하여 30°C에서 72시간 배양하였다. 배양된 변이균주 10 ml을 각각 15 ml 원심분리용 튜브에 취하여 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 상등액 5 ml를 15ml 원심분리용 튜브에 취하였다. 여기에 5 ml의 에탄올을 첨가하여 1분간 진탕한 후, 상온에서 10분 동안 반응시키고, 반응액을 membrane filter로 여과하여 여과막에 존재하는 폴리머를 취하였다. 폴리머를 멸균수 10 ml에 현탁한 후, 각각의 시료에 pullulan 분해효소인 pullulanase를 1 µg 첨가하여 30°C에서 5시간 동안 반응시키면서 pullulan을 분해하였다. 순수하게 β 1,3/1,6-glucan만을 생산하는 돌연변이 균주의 확보를 위해, 하기 표 16에 나타난 바와 같이 pullulanase 처리 후 pullulan의 분해 생성물인 glucose와 maltotriose가 확인되지 않는 균주를 최종 돌연변이 균주로 확보하였다.

(다) 변이 균주의 안정성 확보

- 표 2에서 pullulanase 처리 후 생성물로서 glucose와 maltotriose가 생성되지 않는 순수 베타-글루칸 생산 변이균주 9종(KSY0035, KSY0085, KSY0205, KSY0255, KSY0302, KSY0396, KSY0516, KSY0608, KSY0682)에 대해 안정성을 확인하기 위해 10 세대에 이를 때까지 계대 배양을 계속하면서 각 3, 6 및 10 세대에서 시료를 취하여 pullulan 생성 여부를 확인하였다. Czapek 액체 배지 30 ml이 함유된 100 ml 삼각플라스크에 각 변이균주를 접종하여 30°C에서 72 시간 배양하였다.
- 각 변이균주 배양액 10 ml를 15 ml 원심분리용 튜브에 취하여 4,000rpm으로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 상등액 5 ml를 다시 15ml 원심분리용 튜브에 취하였다. 여기에 5 ml의 에탄올을 첨가하여 1분간 진탕한 후, 상온에서 10분간 반응시키고, 반응액을 멤브레인 필터로 여과하여 여과막에 존재하는 폴리머를 취하였다.
- 상기 변이 균주 9종에 대해 3, 6, 10 세대에서 확보된 시료를 pullulan 분해효소인 pullulanase에 의해 분해된 생성물로서 glucose와 maltotriose가 생성되지 않은 균주를 확인하여 최종 돌연변이 균주를 확보하였다(표3). 확보된 결과로 보아 본 발명에 제공된 균주는 유전적으로 순수 β 1,3/1,6-glucan 생산능이 안정된 상태인 것으로 알 수 있었다.

나. 변이균주가 생산하는 β 1,3/1,6-glucan 확인

(1) 실험 방법

- 모균주 *Aureobasidium pullulans* wild type과 돌연변이화된 신크균주 *Aureobasidium pullulans* KSY-0516을 Czapeck medium에 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후, 4,000rpm으로 원심분리하여 세포를 제거한 후 배양 상등액 1ml를 취하였다. 여기에 pullulan 분해효소인 pullulanase와 laminarinase를 처리하여 24시간 반응시킨 후 유리된 당 성분을 HPLC로 분석하였다.

(2) 실험 결과

- 모균주로부터 생산된 다당의 경우에는 pullulanase에 의한 반응 산물로서 maltotriose가 검출되었으나, 돌연변이화된 균주의 경우에는 pullulanase에 의한 반응 산물이 없는 것으로 보아 pullulan이 생산되지 않음을 확인하였다. 또한, 베타-1,3 결합을 특이적으로 자르는 laminarinase를 이용

하여 유리된 당 성분을 분석한 결과 glucose와 gentiobiose가 유리되는 것을 확인하였다. 이것은 변이주로부터 나온 다당이 β 결합으로만 이루어진 것을 확인한 것이었다(그림 27).

표 17. 선정된 9종의 돌연변이 균주를 10 세대 동안 계대 배양하여 알파 글루칸의 풀루란 분해효소 풀루라나아제 처리 후 결과

균주번호	3 세대		6 세대		10 세대	
	생성물 농도(g/l)		생성물 농도(g/l)		생성물 농도(g/l)	
	glucose	maltotriose	glucose	maltotriose	glucose	maltotriose
KSY0035	-	-	0.2	0.3	0.2	0.2
KSY0085	-	-	0.1	0.2	0.4	0.2
KSY0205	-	-	-	-	0.2	0.3
KSY0255	-	-	-	-	0.2	0.3
KSY0302	-	-	0.2	0.1	0.3	0.2
KSY0396	-	-	-	-	0.3	0.1
KSY0516	-	-	-	-	-	-
KSY0608	-	-	-	-	0.1	0.1
KSY0682	-	-	0.1	0.1	0.4	0.3

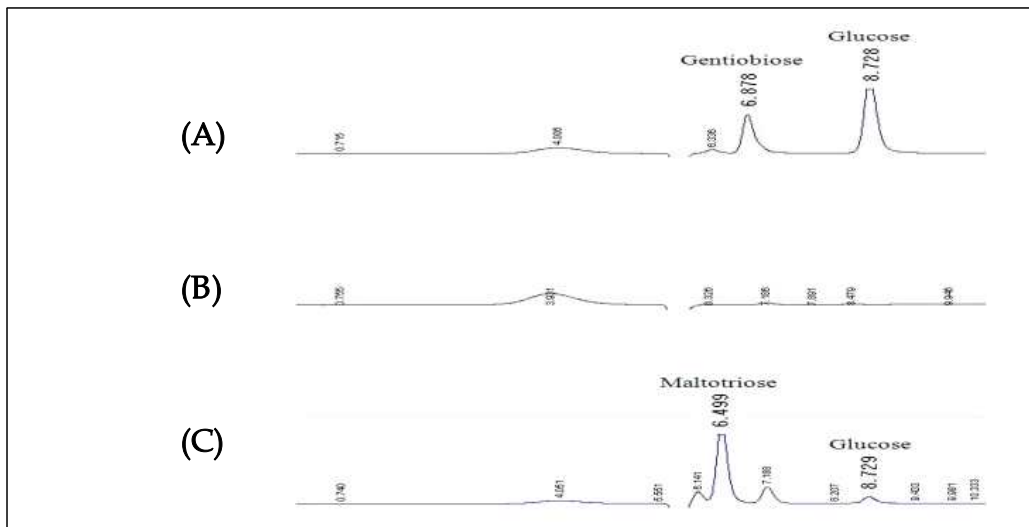


Fig. 27. After vacuum filtration, liberated carbohydrates were determined by HPLC analysis. Exopolysaccharide from KSY-0516 strain were treated with laminarinase (A) and pullulanase (B), Exopolysaccharide from wild type strain were treated with pullulanase (C).

2. *A. pullulans* 변이 균주로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석

가. β 1,3/1,6-glucan의 구성당 성분분석

(1) 실험 방법

- 동결 건조한 시료를 증류수에 용해하여 0.2% 용액(w/v)을 제조한 후 동일분량의 2 M Trifluoroacetic acid(TFA)를 첨가하여 121°C에서 1 시간 동안 가수분해하였다. 증류수에 재용해하여 얻어진 가수 분해물 일정량을 당 분석용 column (YMC-Pack Polymine II, 250 x 4.6 mm ID)에 5 μ l injection하였으며, 이동상으로는 H₂O를 사용하여 1.0 mL/min의 속도로 용출시키고, RI detector가 장착된 HPLC (Agilent Technologies 1200 series)로 분석하여, 당 표준품(Sigma)과의 용출시간을 비교하여 분석하였다.

(2) 실험 결과

- 동결 건조한 β 1,3/1,6-glucan을 증류수에 용해하여 0.2% 용액 (w/v)을 제조한 후 동일분량의 2M TFA를 첨가하여 121°C에서 1시간동안 가수분해하였다. 가수분해물을 원심분리 (15,000 xg, 30 min)하여 불순물을 제거한 다음 speed-vac에서 건조시켜 TFA를 제거하였다. 증류수에 재용해한 후 활성화된 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 소수성 물질을 제거하고 speed-vac에서 건조한 후 증류수에 재용해하여 얻어진 가수분해물 일정량을 당분석용 column (YMC-Pack Polyamine II, 250 x 4.6 mm ID)에 5 μ l injection하였다.
- 이동상으로는 H₂O를 사용하여 1.0 ml/min의 속도로 용출시키고, RI detector가 장치된 HPLC (Agilent Technologies 1200 series)로 분석하여, glucose 표준품 (Sigma, USA)과의 용출시간을 비교하여 분석한 결과 아래 그림에서 같이 glucose 단일물질로 구성되어 있음을 알 수 있다. HPLC를 이용하여 구성당 성분을 분석한 결과 glucose 단일성분으로 구성된 것으로 나타났다 (Fig. 28). 또한 FT-IR 분석을 통해 변이균주가 생산하는 β 1,3/1,6-glucan의 구조분석을 위하여 KBr-disc 방법을 이용한 IR spectrum에서 나타난 흡수피크는 891 cm⁻¹ 부근에서의 β -configuration, 3300 cm⁻¹ 부근에서의 -OH stretching, 1030 cm⁻¹ 부근에서의 -OH 또는 -CH stretching, 1570 cm⁻¹ 및 1740 cm⁻¹ 부근에서의 -CO stretching로 나타났으며(Fig 29), *Lentinus edodes*로부터 추출한 β 1,3/1,6-glucan과 유사한 경향을 보였으며, *A. pullulans* KSY-0516이 생산하는 exo-polysaccharide가 D-glucose의 β -configuration으로 구성된 β -glucan임을 알 수 있었다.

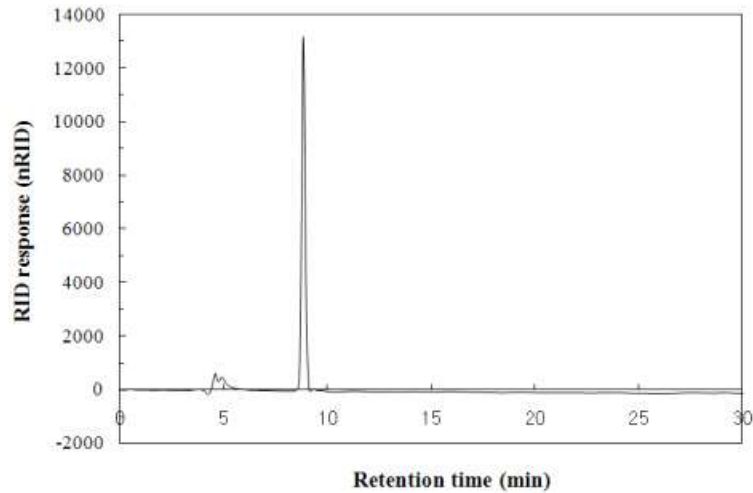


Fig. 28. Component determination of the exo-polysaccharide by HPLC analysis.
The peak at 8.856 min represents that of glucose.

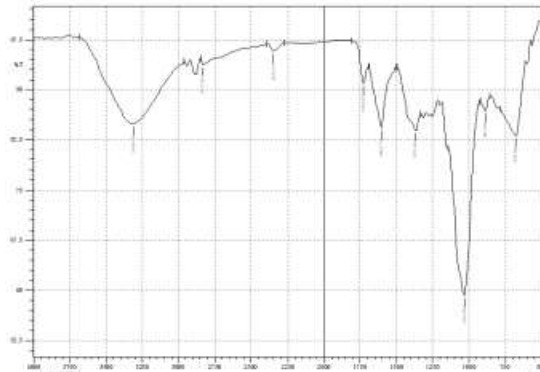


Fig. 29. Infrared spectra of β 1,3/1,6-glucan produced by *A. pullulans* KSY-0516

- NMR data를 얻기 위하여, 동결건조된 시료 2 g을 200 mL의 증류수에 용해한 후 1 M의 TFA 용액 200 mL을 혼합하였다. 50°C의 왕복진탕기에서 24 시간 반응시킨 후 원심분리 (12,000 xg, 30 min)하여 상등액을 감압 농축하였다. 농축액을 Bio-Gel P2 resin을 이용하여 유사분자량 범위를 분획하여 동결건조한 후 일정량을 D₂O에 용해하여 25°C에서 NMR (Varian, 300 MHz) 분석을 위한 시료로 사용하였다. *A. pullulans* KSY-0516이 생산하는 β 1,3/1,6-glucan의 구조분석을 위하여 실시한 ¹³C-NMR 결과는 (1→3)-linked β -D-glucosyl unit의 6 개의 탄소, δ 105.05 ppm (C1), 75.82 ppm (C2), 86.62 ppm (C3), 70.61 ppm (C4), 78.13 ppm (C5), 63.22 ppm (C6) 및 β -(1→3)-D-glucosyl residues에 branched 되어 있는 δ 72.11 ppm의 C-6의 signal을 분명하게 나타내고 있다 (Fig. 30). 본 연구에서는 저분자화된 시료를 대상으로 하여 ¹³C-NMR 분석을 행한 결과로 인하여 β -(1→3) 결합과 β -(1→6) 결합의 분지도를 파악할 수 없어 정확한 구조를 추정하기

는 어려우나 β 1,3/1,6-glucan으로서 상용되고 있는 lentinan 및 sclero-glucan과 유사한 구조를 가지고 있음을 알 수 있다.

- 저분자화 하지 않은 시료의 NMR data를 얻기 위하여 NaOD/D₂O 및 DMSO-*d* 등의 용매를 사용하고 측정 온도를 100°C로 높여 분석을 실시하였으나 만족할 만한 결과를 얻을 수 없었는데, 이는 거대분자가 가지는 분자량 또는 분자자체의 rigid conformation에 기인한 것으로 판단된다. 향후 거대한 생물고분자의 명확한 구조를 파악하기 위하여서는 저분자화하지 않은 상태에서도 ¹³C-NMR 분석이 가능한 기술개발이 필요한 것으로 생각된다.

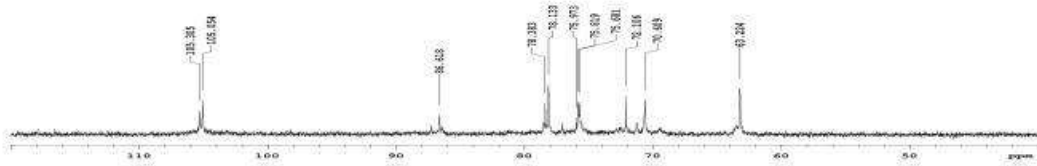


Fig. 30. ¹³C-NMR spectroscopy of β 1,3/1,6-glucan produced by *A. pullulans* KSY-0516

나. 점도평균분자량 분석

(1) 실험 방법

(가) 점도평균 분자량 분석

- 점도평균 분자량 분석을 위하여 동결 건조한 분말을 0.65 M의 NaCl 용액에 용해하여 0~0.4%의 용액을 제조한 후 Ubbelohde type의 capillary viscometer를 이용하여 30±1 °C에서 고유점도 (intrinsic viscosity)를 측정하였고, 고유점도를 측정하기 위한 기본함수로는 하기 표와 같은 조건에서 실험을 수행하였다. Intrinsic viscosity를 측정하기 위하여 0~0.4%의 β 1,3/1,6-glucan을 0.65 M의 NaCl에 용해하여 Ubbelohde type의 capillary viscometer를 이용하여 30±1°C에서 점도를 측정하였다. 각 시료의 점도평균분자량은 Carboxymethyl cellulose (CMC)를 표준물질로 사용하였고, 상기의 Huggin's equation과 Mark-Houwink equation을 이용하여 계산하였다

Relative viscosity : $t/t_0 = \eta / \eta_0 = \eta_r$

(η_0 : solvent viscosity, η : solution viscosity)

Specific viscosity : $(t/t_0) - 1 = (\eta / \eta_0) - 1 = \eta_r - 1 = \eta_{sp}$

Reduced viscosity : $\{ (t/t_0) - 1 \} / C = \{ (\eta / \eta_0) - 1 \} / C = (\eta_r - 1) / C$
 $= \eta_{sp} / C = \eta_{red}$

Inherent viscosity : $\ln \eta_r / C = \eta_{inh}$

Intrinsic viscosity : $\lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp} / C = \lim_{C \rightarrow 0} \ln \eta_r / C = [\eta]$ (Huggin's equation)

고분자의 Intrinsic viscosity는 분자의 크기 및 모양 등에 따라 다르게 나타날 수 있으나 Intrinsic viscosity는 Mark-Houwink equation에 의하여 분자량과 다음과 같은 관계에 있다. 여기서 K와 a는 고분자의 구조적 특성에 기인하는 상수이다.

Mark-Houwink equation ; $[\eta] = KM_w^a$ (K and a : constant)

(2) 실험 결과

- *A. pullulans* 변이균주가 생산하는 exo-polysaccharide의 intrinsic viscosity를 계산하기 위하여 Ubbelohde type의 capillary viscometer를 이용하여 0~0.4%의 농도에서 감소점도(reduced viscosity)를 측정하였다(Fig. 31). Carboxyl methyl cellulose (CMC)를 표준물질로 사용하고, Huggin's equation과 Mark-Houwink equation을 이용하여 측정한 점도평균분자량은 약 8.9×10^5 인 것으로 측정되었다. 또한 *Aureobasidium* sp.가 생산하는 β -glucan에 대한 연구가 보고되어 있으나 분자량에 관한 정보가 제공되지 않아 직접적인 비교가 어려우나, *Hericium erinaceus*로부터 추출한 β -glucan의 분자량 1.0×10^6 과 비슷하였으며, *Lentinus edodes*로부터 추출한 β 1/3-glucan의 분자량 5.2×10^5 에 비하여서는 다소 큰 분자량을 가지는 것으로 나타났다.

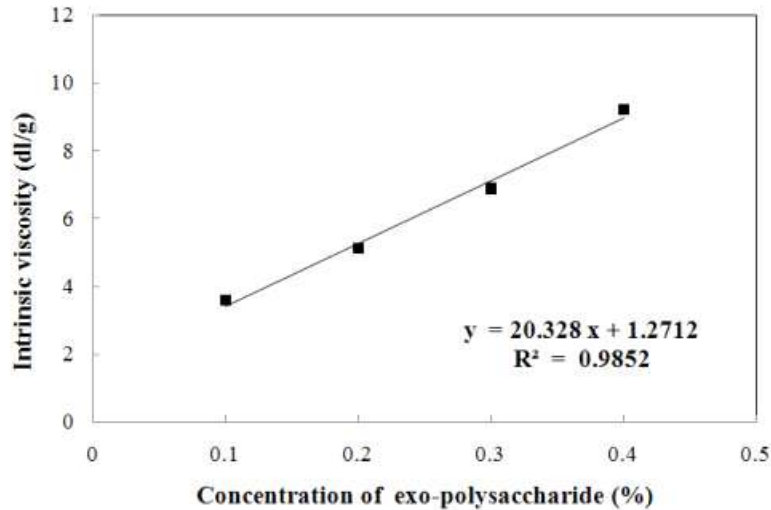


Fig. 31 Intrinsic viscosity of the exo-polysaccharide at the 0.65 M NaCl solution.

3. *A. pullulans* 변이 균주를 의한 β 1,3/1,6-glucan 생산능

가. *A. pullulans* 변이 균주를 의한 β 1,3/1,6-glucan 발효실험

(1) 실험 방법

- 발효조 배양의 경우, 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% Sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 72 시간 동안 200 rpm에서 배양하였으며, 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml를 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90 시간 동안 배양하였다. 3차 종균 배양은 20% sucrose 함유 Czapek 배지를 사용하였으며, 플라스크를 건열멸균한 후 sucrose를 제외한 Czapek 배지성분을 증류수에 용해하여 플라스크에 담은 채 가압증기 멸균하여 사용하였다. 멸균 후, 20% sucrose를 첨가하여 sucrose의 농도를 맞추었다. 배양조건은 30 $^{\circ}$ C의 온도와 pH 5.0을 유지하며 110 시간 동안 배양하였다. 다만 발효조 내의 균일한 배양조건을 유지하기 위하여 sucrose는 멸균 후 첨가하였으며, pH는 2.5 N NaOH와 2.5 N HCl을 이용하여 적절히 조절하였고, DO값은 교반조건을 달리하여 20~60%로 조절하였음
- 회분배양을 한 후에 비증식 수율(μ), 증식수율($Y_{x/suc}$), β -glucan 생성수율($Y_{glucan/suc}$), β -glucan 생산량($Y_{glucan/x}$), 최대 β -glucan 생산량(P), 비기질 이용율(q_{suc}), 비 β -glucan 생산율(q_{glucan})의 kinetic parameter를 구하였다 (Pirt, 1975).

- 회분배양 시에 일정 시간 (dt) 동안에 증가하는 균체량 (dx)은 그때에 존재하는 균체량 (x)에 비례한다. 이때 비례상수를 비증식 속도라 하며, 다음 식으로 구할 수 있다.

$$dt = \mu x dt \quad \text{[식 1]}$$

[식 1]로부터, 다음 식을 도출할 수 있다.

$$\mu = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{x_2}{x_1} \quad \text{[식 2]}$$

- x 는 균체량 (g l^{-1})을 t 는 시간 (h)을 나타낸다.
- 증식수율($Y_{x/suc}$)은 일정 시간 동안 소모된 기질량 ($dsuc$)과 증식한 균체량 (dx)이며 [식 3]과 같다.

$$Y_{x/suc} = - \frac{dx}{d_{suc}} \quad \text{[식 3]}$$

증식수율은 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$Y_{x/suc} = \frac{x - x_0}{suc_0 - suc} \quad \text{[식 4]}$$

- x_0 와 suc_0 는 초기 균체량과 기질의 농도이고, x 와 suc 는 배양이 이루어진 후의 균체량 및 기질의 농도를 나타낸다. β -glucan 생성수율은 사용된 기질 ($dsuc$)에 대한 생성된 산물 ($dglucan$)의 수율 ($Y_{glucan/suc}$)이며, [식 5]와 같다.

$$Y_{glucan/suc} = \frac{glucan - glucan_0}{s_0 - s} \quad \text{[식 5]}$$

$glucan$ 와 $glucan_0$ 는 각각 최종 및 초기 β -glucan 함량을 나타낸다.

- 일정 시간 동안 소모되는 sucrose의 양은 그때 존재하는 균체량에 비례하는데, 이때 비례 상수를 비sucrose 소모속도 (q_{suc})라고 하며, 단위는 $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ 이다.

$$d_{suc} = -glucan_{suc} x dt \quad \text{[식 6]}$$

[식 1]과 [식 3]으로부터 다음 식을 유도할 수 있다.

$$q_{suc} = \left(\frac{1}{Y_{x/suc}} \right) \mu \quad \text{[식 7]}$$

- 이와 유사하게, 균주의 생장에 따른 β -glucan의 생성정도를 구할 수가 있다.

$$d_{glucan} = q_{glucan} x dt \quad \text{[식 8]}$$

q_p 는 비 β -glucan 생성율을 뜻하며 [식 9]와 같이 표현할 수 있다.

$$q_{glucan} = (Y_{glucan/x}) \mu \quad \text{[식 9]}$$

(2) 실험 결과

- 모균주와 변이주 KSY-0516의 발효 동력학 분석을 수행하였으며, 모균주와 변이주 KSY-0516은 30 g/L의 sucrose 농도로, 35 L batch culture 실험을 수행하였으며, 30 °C에서 120 시간 동안 발효를 실시하여 아래와 같은 실험결과를 확보하였다. 실험의 결과 값은 모두 오차를 줄이기 위하여 3회 반복하여 실험을 실시하였으며, 측정된 실험치는 앞서 기술한 방법으로 total exopolysaccharide, β 1,3/1,6-glucan, DCW, 잔당을 측정하였다. 실험 결과 Fig. 32과 Table 18에서, 모균주와 변이주 KSY-0516은 total exopolysaccharide의 생산에서는 10 g/L와 1.7 g/L의 생산량을 보였으며, β 1,3/1,6-glucan의 생산량은 3 g/L와 1.7 g/L의 생산량을 보였다. 또한 생산된 변이주의 total exopolysaccharide는 모두 pullulan이 생산되지 않은 순수한 β 1,3/1,6-glucan임을 간접적으로 확인하였다.

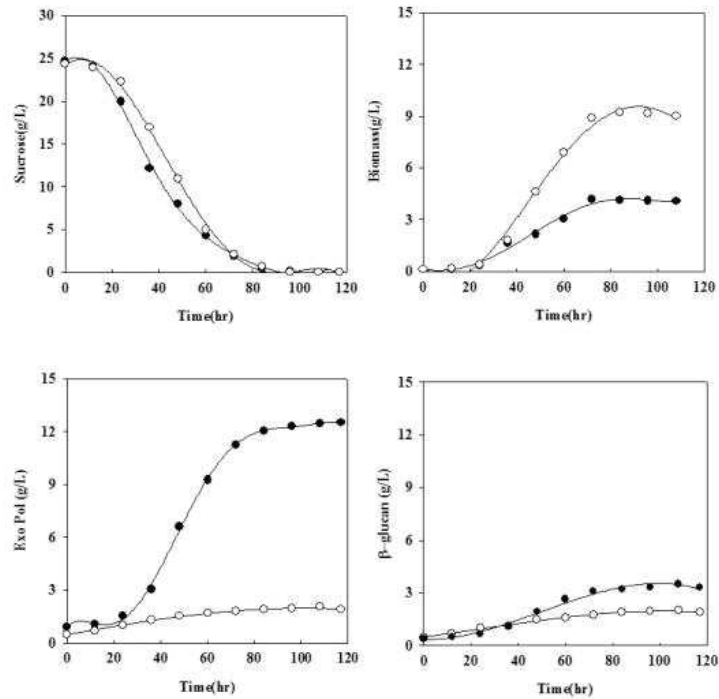


Fig. 32. Change of fermentation products in *A. pullulans* and *A. pullulans* KSY-0516.

Change of sucrose concentration, DCW and total exopolysaccharides in 35 L batch cultures of KSY-0516 (150 rpm, closed circle; 250 rpm, open circle; 350 rpm, closed triangle; 500 rpm, open triangle). Cell cultures in 30 g/L sucrose to 120 h were harvested every 12 h, and supernatants were used in polysaccharides assays.

⌘ 18. Comparison of kinetic parameters in *A. pullulans* and *A. pullulans* KSY-0516.

Strain	Description	$Y_{x/suc}$ ($g \cdot g^{-1}$)	$Y_{glucan/suc}$ ($g \cdot g^{-1}$)	$Y_{glucan/x}$ ($g \cdot g^{-1}$)	P ($g \cdot l^{-1}$)	μ (h^{-1})	q_{suc} ($g \cdot g^{-1} h^{-1}$)	q_{glucan} ($g \cdot g^{-1} h^{-1}$)
Wild type	Type strain	0.160	0.127	0.787	3.0	0.005	0.206	0.039
KSY-0516	$\Delta pullulan$	0.364	0.064	0.174	2.00	0.076	0.209	0.013

$Y_{x/suc}$ ($g \cdot g^{-1}$), Biomass yield; $Y_{glucan/suc}$ ($g \cdot g^{-1}$), β -glucan yield; $Y_{glucan/x}$ ($g \cdot g^{-1}$), β -glucan concentration; P, highest β -glucan concentration μ (h^{-1}), Specific growth rate; q_{suc} ($g \cdot g^{-1} h^{-1}$), Specific substrate uptake rate; q_{glucan} ($g \cdot g^{-1} h^{-1}$), specific β -glucan production rate.

4. Toll-like receptor 2 & 4 기반 면역 증강용 유산균 확보 및 특성 분석

가. 발효식품으로부터 유산균 확보

(1) 실험 방법

- 전국 각지에서 여러 종류의 김치 및 기타 전통 발효식품 등의 시료를 수집하고 밀봉하여 냉장 운반하였다. 수집 후, 24 시간 이내에 멸균된 생리식염수로써 10 배수로 연속 희석한 시료 100 μ l를 항진균제인 nystatin을 함유한 MRS, TSY, TES, LBS 등의 배지에 희석한 도말하여 균체가 나타날 때까지 30 $^{\circ}$ C 항온기에서 배양하였다. 젖산균의 형태학적 특성에 근거하여 일차적으로 젖산균을 분리하였다.

Seeding in MRS media (pH 6.8 ~ 7.0) overnight to the conc. of $10^9 \sim 10^{10}$ cell/ml

↓

Twice washing with DW after centrifuging at 10,000 rpm for 5 min.

↓

Suspending the pellet in same volume of DW

↓

Mixing 200 μ l of seed with 100 μ l of sterilized HCl (pH 2.0) to adjust pH 2.5

↓

Gently shaking incubation at 37 $^{\circ}$ C for 2 hr

↓

Adding 900 μ l of saline into the mixture

↓

Plating on BCP plate count agar by ten fold dilution with saline

↓

Incubation at 37 $^{\circ}$ C for 48 hr

↓

Observing the viable LAB as yellow color colonies

* Dilution Fold : 60

Overall procedure for determination of acid-tolerance of lactic acid bacteria isolates.

(2) 실험 결과

- 김치 시료는 수집 후, 즉시 냉장 보관하였고, 24 시간 이내에 0.85% 생리식염수로 10 배수씩 단계 희석한 후 0.1 ml 씩 각 배지에 도말 하였다. 김치로부터 젖산균을 분리하기 위하여 Table 1의 MRS, PES, HHD, LBS 배지를, dextran 생산 균주를 분리하기 위해서는 MRS에 sucrose를 첨가한 배지와 PES 배지를 사용하였다.
- PES 배지의 경우 20°C 에서 5 일간, sucrose가 첨가된 MRS 배지와 HHD 배지는 30°C 에서 3 일간 배양하여 dextran을 형성하는 젖산균 중 dextran 생성 상태와 colony 형태가 서로 다른 균주들을 선택하여 순수 분리하였다. 또한 김치 부재료 채소들에 멸균 증류수를 동량 첨가하여 Osterizer blender로 마쇄한 후 0.85% 식염수에 10 배수로 희석하고 0.1 ml 씩 각 배지에 도말하였다. 30°C 에서 3일간 배양한 후 colony 형태가 다른 균주를 중심으로 순수 분리하였다. 김치 부재료로 사용되는 생강, 파, 홍당무, 열무, 부추, 마늘로 부터 젖산균을 분리하기 위하여 다양한 젖산균의 생육에 적당한 TSY 배지를 사용하고 pH를 달리하여 colony의 형태가 서로 다른 균주를 선택하여 단일 균주로 분리하였다.
- pH 4.0, 4.5, 4.8, 5.5 조건의 TSY 배지에서 생강으로부터 총 12 주, 파로부터 20 주, 마늘에서 22 주 등의 총 105 주의 젖산균을 분리하였다 (Table 19). 맛김치, 열무김치, 포기김치, 총각김치, 백김치 등의 다양한 김치를 공장과 가정에서 수집하거나 직접 제조하여 TSY, MRS, LUSM, 김치 추출물 배지를 pH 4.5와 5.5로 조정하고 각각의 시료로부터 젖산균을 분리하여 맛김치로부터 64 균주, 열무김치에서 26 균주, 포기김치에서 36 균주, 총각김치에서 46 균주, 백김치에서 40 균주 등 총 212 균주를 분리하였으며 (Table 21) 김치 발효 온도를 5°C, 10°C, 15°C, 20°C로 달리하면서 발효 시간대별로 젖산균을 분리하여 총 600주를 분리하였다. 김치 및 김치 부재료로부터 분리한 젖산균은 MRS 고체배지에서 배양하여 20% glycerol 용액에 현탁시킨 후 -70°C 냉동고에 보관하였다.

나. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 항균 활성 특성 분석

(1) 실험 방법

- 시험균이 1% 함유된 MRS soft 한천 (0.7%) 배지에 직경 8 mm의 well을 만들고 일차적으로 분리된 젖산균의 배양액 100 μ l를 가하여 각 시험균의 최적 온도에서 18 시간 배양하여 well 주위의 나타나는 생육 저지환을 관찰하여 젖산균의 항균활성을 조사하였다. 항균활성을 나타내는 젖산균의 배양 상등액에 1 N NaOH를 가하여 중화하거나 α -chymotrypsin, trypsin, protease type IX 및 type XIV 등의 단백질 분해효소를 처리한 뒤, 시험균에 대한 항균활성을 조사하여 항균활성

물질이 젖산, 유기산 또는 단백질을 확인하였다.

Table 19. Isolation media for lactic acid bacteria.

Component	Amount (g/L)			
	MRS	PES	m-LBS	TSY
Proteose peptone	10	-	-	-
Trypticase peptone	-	5	10	-
Tryptone	-	-	-	5
Phytone peptone	-	-	-	-
Beef extract	10	-	-	-
Yeast extract	5	0.5	5	3
Dextrose	20	-	20	-
Sucrose	-	20	-	20
Tween 80	1	-	-	-
Ammonium citrate	2	-	2	-
Sodium acetate	5	-	15	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	0.244	0.575	-
MnSO ₄	0.05	-	0.12	-
Na ₂ HPO ₄	2	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	2	-	-
KH ₂ PO ₄	-	1	6	-
FeSO ₄	-	-	0.034	-
Phenylethyl alcohol	-	2.5	-	-
Sorbitan monooleate	-	-	1	-
Acetic acid	-	-	2.5	-
Agar	15	15	15	15
pH	6.2-6.6	6.8	5.5	6.8

Table 20. Numbers of lactic acid bacteria isolated from Kimchi minor ingredients.

Ingredients Medium	생강	파	홍당무	열무	부추	마늘	Total
	TSY pH 4.0	4	2	8	3	1	
TSY pH 4.5	5	2	8	2	2	8	27
TSY pH 4.8	2	8	2	5	5	4	26
TSY pH 5.5	1	8	7	4	4	10	3
Total	12	20	25	14	12	22	105

Table 21. Numbers of lactic acid bacteria isolated from various Kimchi.

Kimchi Media	맛김치	열무김치	포기김치	총각김치	백김치	Total
	TSY pH 5.5	6	8	2	2	
pH 4.5	2	2	4	2	4	14
MRS pH 6.2	8	4	4	4	4	24
pH 4.5	4	2	8	8	2	24
LUSM pH 5.5	20	4	6	20	6	56
pH 4.5	6	2	2	4	4	18
김치 pH 5.5	6	4	6	2	16	34
pH 4.5	12	-	4	4	-	20
Total	64	26	36	46	40	212

(2) 실험 결과

- 다양한 김치 및 부재료에서 일차적으로 분리한 총 600 주의 젖산균의 배양액을 대상으로 agar-well diffusion method를 이용하여 항균활성을 조사하였다. 40 종의 시험균이 각각 1% 첨가된 agar 배지에 직경 8 mm의 well을 만들고 MRS 액체배지에서 30°C로 1 일간 배양한 젖산균 배양액 100 μ l를 각 well에 가했다. 각 검정균의 최적온도에서 18 시간 배양하여, well 주위의 생육 저지환을 관찰하여 항균활성을 나타내는 젖산균을 선정하였다.
- 김치와 채소류로부터 여러 가지 배지를 이용하여 분리한 젖산균 총 600여 균주 중, 항균활성을 보이며 α -chymotrypsin, trypsin, protease type IX 및 type XIV 등의 단백질 분해효소의 처리함으로써 항균활성이 소실되어 단백질성 항균물질로 추측되는 젖산균 19주를 선별하였다. 이들의 여러 시험균에 대한 항균활성 범위를 Table 4에 나타내었다. 분리주 번호 13을 제외한 모든 젖산균 분리주는 여러 시험균에 대해 항균활성을 나타내었으며 분리주 번호 4는 항균범위가 가장 넓어 *Bacillus*와 *Listeria* 뿐 만 아니라 많은 다른 시험균에 대해서도 항균활성을 나타내었다. 젖산균 분리주 번호 24와 25, 34와 35, 61과 63과 1077 등은 서로 유사한 항균활성 범위를 나타내었다.

다. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 내산성 분석

(1) 실험 방법

- 항균활성 젖산균 분리주 19 주, 내산성 분리주 78 주와 함께 시판중인 야쿠르트에서 분리한 GG 균주를 대조구로 하여 산에 대한 내성을 조사하였다. 젖산균 배양액 1 ml을 원심분리하여 멸균수로 세척한 후, 동일 부피의 멸균수에 현탁한 배양액 200 μ l와 0.01 N HCl (pH 2.0) 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 2 시간 정치 배양하였다. 배양액에 멸균 식염수 1 ml를 첨가하여 연속 희석하고 0.01% bromocresol purple을 함유한 MRS 평판배지에 100 μ l 도말하여 나타나는 균락을 계수하여 젖산균의 생존율을 조사하였다.

(2) 실험 결과

- 젖산균 분리주 600 주를 대상으로 내산성 *Lactobacillus* 속을 선별하기 위하여, pH 3.5로 조정된 MRS 한천배지에 희석한 배양액을 도말하고 3 일간 30°C에서 배양하여 생존하는 colony를 선별하였으며 단일균주로 분리한 colony는 현미경 관찰에서 rod type임을 확인한 후 최종 분리 균주로 선정하였다. 총 600 주의 분리주 중, pH 3.0 에서도 성장할 수 있는 약 54 주의 내산성 *Lactobacillus*를 분리, 확보하였으며 선별균주에 대한 pH 3.8, 3.5, 3.3, 3.0에서의 생육정도를 조사하였다 (Table 22).

Table 22. Inhibition spectrum of lactic acid bacteria isolates(1).

Bacteriocin producer	BA4	13	24	25	26	27	34	35	61
Indicator strains									
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>mesenteroides</i>	+								
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	+++						+	+	
<i>Leuconostoc amelibiosum</i> KCTC3524									
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC3525	++								
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3526									
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC3528	++++						+++	+++	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> K3529	++								
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> 30	+5						+5	+5	
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	+5						+++	+++	
<i>Leuconostoc</i> KCTC3532									
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3099	+++		++	++		++	++	++	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> MT-13	+		++	++					+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3103			+	+					+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3104									
<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> KCTC3498									
<i>Lactobacillus confusus</i> KCTC3499									
<i>Lactobacillus hilgadii</i> KCTC3500	+5						+5	+5	
<i>Lactobacillus parabuchineri</i> KCTC3503	++++						+++	+++	
<i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC3504	++++						+++	+++	
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> KCTC3510									
<i>Lactobacillus</i> sp. 170-12	+5	+	+++	+++	+++	+++	+5	+5	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	++		++	++		+			++
<i>Lactobacillus delbrueckii-lactis</i> KCTC1058									
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC3101	+5		++	++		+	+++	+++	+++
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC3506	+5		+++	+++		+++	+++	+++	+++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC3507	+		++	++		+			++
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC32406									
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC3095			+++	+++	+++	++			+++
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC3444	++								
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1013	++								
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1014							+	+	
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1023									
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1823									
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 KCTC1916									
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC1928									
<i>Salmonella typhimorium</i> KCTC1926									
<i>Escherichia coli</i> KCTC1924									
<i>Escherichia coli</i> KCTC2191									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC1199									
<i>Candida albicans</i> KCTC1940									

Table 22. Inhibition spectrum of lactic acid bacteria isolates(2).

Bacteriocin producer Indicator strains	62	63	839	1077	1156	1160	1180	1262	W44	I-12 4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp.										
<i>mesenteroides</i>										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100			+							++
<i>Leuconostoc amelibiosum</i> KCTC3524										
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC3525										
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3526										
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC3528										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>cremoris</i> K3529										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>dextranicum</i> 30										+
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>										+
<i>Leuconostoc</i> KCTC3532										+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3099		++	++	++	+	+	+	++		
<i>Lactobacillus plantarum</i> MT-13		+		+						
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3103		+		+						
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3104										+
<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> KCTC3498										
<i>Lactobacillus confusus</i> KCTC3499										
<i>Lactobacillus hilgadii</i> KCTC3500										
<i>Lactobacillus parabuchineri</i> KCTC3503										+++
<i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC3504									+++	++
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> KCTC3510					+	++	+	+++		
<i>Lactobacillus</i> sp. 170-12	+	+++		+++					++++	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		++		++					++++	
<i>Lactobacillus delbrueckii-lactis</i> KCTC1058			++							
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC3101		+++		+++			+	+		
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC3506	+	+++		+++					++++	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC3507		++		++	++		++			
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC32406										
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC3095	+	+++		+++						
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC3444										
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1013										
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1014										
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1023										
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1823										
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 KCTC1916										
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC1928										
<i>Salmonella typhimorium</i> KCTC1926										
<i>Escherichia coli</i> KCTC1924										
<i>Escherichia coli</i> KCTC2191										
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC1199										
<i>Candida albicans</i> KCTC1940										

- 대부분의 균주들이 pH 3.0에서도 성장할 수 있는 균으로 조사되었으나 pH 3.8 보다 pH 3.0에서 성장이 활발한 호산성 (acidophilic) 균주는 관찰되지 않았다. 모든 균주는 pH 3.0 보다 pH 3.8의 조건에서 성장이 활발한 내산성 (acid tolerant) 젖산균으로 사료되었다. 그 밖의 배양학적인 특성들은 Table 23과 같았다. 또한 MRS 대신 PES 배지를 사용하여 내산성 *Lactobacillus* 속 분리 방법과 유사하게 내산성 *Leuconostoc* 균주의 분리도 시도하여 pH 3.5 에서도 생육할 수 있는 23 주의 *Leuconostoc*을 선별하였다 (Table 24). 우선적으로 dextran을 형성하는 균주를 분리하였으며, 이들 중 pH 4.0에서 생육할 수 있는 균주를 1차로 선별하고, 최종적으로 pH 3.5에서 성장하는 균주를 *Leuconostoc* 분리주로 선정하였다.

Table 23. Growth of acid tolerant *Lactobacillus* isolates at acidic condition.

Strain No.	Growth				Strains No.	Growth			
	pH 3.8	pH 3.5	pH 3.3	pH 3.0		pH 3.8	pH 3.5	pH 3.3	pH 3.0
KKY-1	++	++	++	+	KKY-131	+	+	+	+
4	++	++	++	-	133	+	+	+	+
5	++	++	++	-	134	+	+	+	+
7	++	++	++	+	135	+	+	+	+
8	++	++	++	-	139	+	+	+	+
10	++	++	++	-	140	±	±	±	±
16	+	+	+	±	141	+	+	+	+
19	+	+	+	-	142	±	±	±	±
22	+++	+++	+++	+	143	+	+	+	+
30	++	++	+	+	144	+	+	+	+
57	+	±	±	-	155	+	+	+	+
67	+	+	+	+	160	+	+	+	+
72	+	+	+	+	162	+	+	+	+
74	+	+	+	+	166	+	+	+	+
78	+	+	+	+	172	+	+	+	+
82	+	+	+	-	173	+	+	+	-
102	+	+	+	+	177	+	+	+	+
117	+	+	+	+	178	+	+	+	+
122	±	±	±	±	179	±	±	±	±
123	+	+	+	+	180	+	+	+	+
124	+	+	+	+	181	+	+	+	+
125	+	+	+	+	182	+	+	+	+
126	+	+	+	+	183	+	+	+	+
127	±	±	±	±	184	+	+	+	+
128	+	+	+	+	185	+	+	+	+
129	+	+	+	+	188	+	+	+	+
130	+	+	+	+	193	+	±	±	±

Table 24. Cultural characteristics of acid tolerant *Lactobacillus* isolates.

Characteristics Strain No.	Final pH	Final Acidity	Growth EtOH 10%	Gas Formation	Morphology	CaCO ₃ Clear zone
KKY-1	3.78	2.28	++	—	r	+
4	3.81	2.43	++	—	r	+
5	3.80	2.36	++	—	r	+
7	3.78	2.46	++	—	r	+
8	3.88	2.36	++	—	r	+
10	3.80	2.39	++	—	r	+
16	3.84	2.41	++	—	r	+
19	3.83	2.45	++	—	r	+
22	3.84	2.43	++	—	r	+
30	4.06	2.42	++	—	c	+
57	3.89	2.04	++	—	r	+
67	3.71	2.09	+	—	r	+
72	3.81	2.09	+	—	r	+
74	3.91	2.10	+	—	r	+
78	4.29	1.52	—	+	c	+
82	4.12	1.71	+	+(w)	r	+
102	3.96	2.1	++	—	r	+
117	4.06	1.58	+	—	r	+
122	1.02	1.70	+	—	r	+
123	3.93	1.91	+	—	r	+
124	3.93	2.05	+	—	r	+
125	3.94	2.03	+	—	r	+
126	3.91	1.92	+	—	r	+
127	3.91	1.96	+	—	r	+
128	3.91	1.97	+	—	r	+
129	3.94	1.96	+	—	r	+
130	3.94	1.93	+	—	r	+

Continued

Characteristics Strain No.	Final pH	Final Acidity	Growth EtOH 10%	Gas Formation	Morphology	CaCO ₃ Clear zone
KKY-131	3.93	2.00	+	—	r	+
133	3.91	2.04	+	—	r	+
134	4.01	2.02	+	—	r	+
135	3.89	2.07	+	—	r	+
139	3.84	2.00	+	—	r	+
140	3.89	2.00	+	—	r	+
141	3.84	2.01	+	—	r	+
142	3.91	1.98	+	—	r	+
143	3.91	2.00	+	—	r	+
144	3.93	1.98	+	—	r	+
155	3.99	1.94	+	—	r	+
160	3.96	2.15	+	—	r	+
162	4.07	1.89	+	—	r	+
166	3.98	1.91	+	—	r	+
172	3.92	1.94	+	—	r	+
173	3.92	2.05	+	—	r	+
177	3.98	2.12	+	—	r	+
178	3.93	2.07	+	—	r	+
179	3.91	2.02	+	—	r	+
180	3.89	2.19	+	—	r	+
181	3.85	2.18	+	—	r	+
182	3.88	2.14	+	—	r	+
183	3.93	2.30	+	—	r	+
184	3.87	2.13	+	—	r	+
185	3.89	2.13	+	—	r	+
188	3.90	2.16	+	—	r	+
193	3.92	2.13	+	—	r	+

Table 25. Growth of acid tolerant *Leuconostoc* isolates at acidic condition.

Strains No.	Growth					Final pH	Final Acidity	Dextran formation
	pH 4.8	pH 4.5	pH 4.0	pH 3.8	pH 3.5			
A2	+	+	+	+	+	4.57	1.20	+
A4	++	+	+	+	+	4.23	1.52	+
A5	++	++	+	+	+	4.20	1.59	+
A6	++	+	+	+	+	4.20	1.49	+
A8	++	++	+	+	+	4.11	1.59	+
A9	+	+	+	+	+	4.38	1.45	+
A10	++	++	+	+	+	4.27	1.32	+
A11	++	++	+	+	+	4.19	1.44	+
A12	++	+	+	+	+	4.24	1.38	+
A13	++	++	+	+	+	4.47	1.26	+
A14	+	+	+	+	+	4.40	1.15	+
A17	+	+	+	+	+	4.51	1.18	+
A19	+	+	+	+	+	4.47	1.17	+
A20	+	+	+	+	+	4.45	1.20	+
A21	+	+	+	+	+	4.35	1.20	+
A25	+	+	+	+	+	4.38	1.21	+
A28	++	++	+	+	+	3.88	1.93	+
A31	+	±	±	±	±	4.38	1.18	+
A32	+	±	±	±	±	4.36	1.23	+
A33	+	+	+	+	+	4.38	1.22	+
A35	+	+	+	+	+	4.38	1.19	+
A36	+	+	+	+	+	4.47	1.21	+
A37	+	+	+	+	+	4.49	1.13	+

- 단백질성 향균물질을 생산하는 젖산균 분리주 19 주, 내산성 *Leuconostoc* 분리주 23 주, 내산성 *Lactobacillus* 분리주 54 주 및 실험실에 보유하고 있는 젖산균 분리주 1 주 (Mheen 90) 등 총 97주를 대상으로 그림과 같은 방법으로 내산성 젖산균 분리주의 탐색을 시도하였다. 실험오차를 줄이기 위해 10 배수 단계 희석은 멸균 생리식염수 9 ml에 젖산균 희석액 1 ml를 가하여 실시하였다.
- 대조균으로 *L. acidophilus*를 사용하였으며 분리주들의 내산성 정도, 형태학적, 생리학적 특성을 기준으로 균주들을 분류한 결과, Table 25과 같았다. 내산성을 시험한 97 주 중 22 주는 시험조건에서 완전히 사멸하였으며 이 때, 향균활성을 나타낸 젖산균 분리주 19 주와 *Leuconostoc* 분리주 23 주 중 20 주는 아주 약한 내산성을 나타내었다. 그러나 *Lactobacillus* 분리주 24 주는 내산성이 우수하여 대조균으로 사용한 *L. acidophilus* 보다 높은 내산성을 보였다.
- 2차 탐색에서 내산성 균주로 판명된 *Lactobacillus* 분리주 24 주와 대조균으로서 시판중인 요구르트에서 분리한 GG 균주를 대상으로 그림의 방법을 이용하여 젖산균 희석액 200 μ l에 pH 1.5 염산 용액 100 μ l를 첨가하여 최종 현탁액의 pH를 2.0으로 하여 내산성 균주를 최종적으로 선별하였다. 분리주 24 주 중 내산성이 우수한 9 주와 GG 균주의 내산성 결과는 Table 9와 같이 나타났다.
- 젖산균 분리주 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135 등이 강한 내산성을 보였으며 대조균으로 사용한 GG 균주 보다 우수하였다. 따라서 위 4 균주를 최종적으로 선택하고 각 균주의 향균활성을 조사한 결과, 젖산균을 제외한 다른 세균에 대한 향균활성을 보였다 (표 23 ~25). 그러나, 배양 상등액을 1 N NaOH로 중화한 후, 향균활성을 조사한 결과 향균활성이 사라지는 것을 통해 향균활성 물질이 젖산임을 추측할 수 있었다.

라. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 내담즙성 분석

(1) 실험 방법

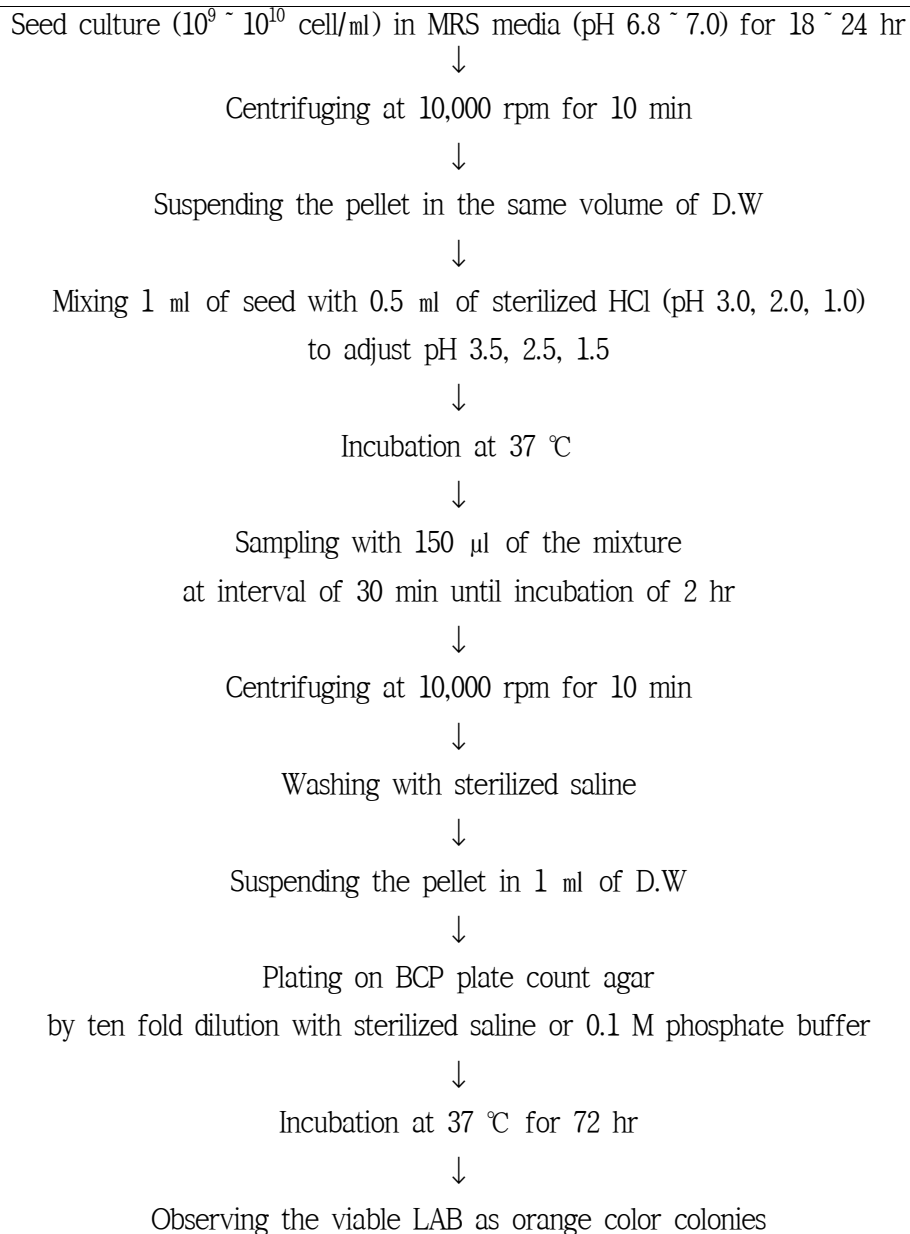
- 젖산균 분리주 97 주와 야쿠르트에서 분리한 GG 균주를 대조균으로 사용하여 담즙산에 대한 내성을 조사하였다. 내산성의 조사와 유사하게 멸균수로 세척한 젖산균 현탁액 200 μ l에 100 ~ 500 μ g/ml 농도의 ox gall 용액 100 μ l를 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치 배양하였다. 배양액에 멸균 식염수 1 ml를 첨가하여 연속 희석하고 0.01% bromocresol purple을 함유한 MRS 평판배지에 100 μ l 도말하여 나타나는 균락을 계수하여 젖산균의 생존율을 조사하였다.

Table 26. Grouping of LAB isolates according to their acid-tolerance.

	Acid-tolerance (pH 2.5)		
	Weak	Moderate	Strong
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		(1) Control,	
<i>Streptococcus mutans</i>	(1) BA4,		
<i>Lactococcus sp</i>	(2) W44, 1-124		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	(1) BA13,		
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	(6) BA24, BA25, BA61, BA62, BA63, AP1077		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(1) BA27,	(1) Mheen90	
<i>Leuconostoc sp.</i>	(1) AP839		
<i>Lactobacillus sp.</i>	(4) AP1045, AP1156, AP1180, AP1262,		
<i>Streptococcus sp.</i>	(3) BA5, BA34, BA35,		
Rod type	(15) KKY-4, KKY-30, KKY-72, KKY-82, KKY-117, KKY-122, KKY-123, KKY-125, KKY-134, KKY-162, KKY-166, KKY-173, KKY-178, KKY-180, KKY-181,	(12) KKY-7, KKY-10, KKY-19, KKY-22, KKY-67, KKY-74, KKY-126, KKY-131, KKY-140, KKY-172, KKY-179, KKY-183	(24) KKY-1, KKY-5, KKY-8, KKY-16, KKY-102, KKY-124, KKY-127, KKY-128, KKY-129, KKY-130, KKY-133, KKY-135, KKY-139, KKY-141, KKY-142, KKY-143, KKY-155, KKY-160, KKY-177, KKY-182, KKY-184, KKY-185, KKY-188, KKY-193
Coccus type	(3) A5, A10, A11,		
75	37	14	24

Table 27. Acid-tolerance of lactic acid bacteria isolates.

		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Viability
KKY-16	Control	-	-	-	>	52 85	4 8	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	75 89	5 7	0 2	-	-	-	
KKY-124	Control	-	-	-	>	79 67	6 7	-	10 ⁻¹ ~ 10 ⁻²
	Treatment	>	>	245 217	26 34	-	-	-	
KKY-133	Control	-	-	-	>	89 100	4 14	-	10 ⁻¹
	Treatment	>	>	>	112 123	-	-	-	
KKY-135	Control	-	-	-	378 448	72 38	9	-	10 ⁻¹
	Treatment	>	>	>	136 109	-	-	-	
KKY-177	Control	-	-	-	>	55 69	15 9	-	<10 ⁻³
	Treatment	385 379	35 31	3 4	0 3	-	-	-	
KKY-102	Control	-	-	-	614 633	51 77	10 9	-	10 ⁰ ~ 10 ⁻¹
	Treatment	>	>	>	140 136	-	-	-	
KKY-8	Control	-	-	-	>	61 57	15 7	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	131 288	8 x	14 0	-	-	-	
KKY-160	Control	-	-	-	>	105 123	16	-	<10 ⁻³
	Treatment	20	3	0	0	-	-	-	
KKY-182	Control	-	-	-	>	56 50	6 8	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	224 286	26 27	3 4	-	-	-	
GG 균주	Control	-	-	-	>	104 120	13 11	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	137 198	9 24	1 0	-	-	-	



* Dilution Fold : 60

Overall procedure for determination of bile-tolerance of lactic acid bacteria isolates.

(2) 실험 결과

- 내산성이 높아 최종적으로 선정된 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135 균주들의 담즙산에 대한 내성을 그림과 같은 방법으로 조사하였다. Ox gall의 최종 농도가 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml로 변화시키면서 37°C에서 2시간 처리한 후, 각 선정 젖산균의 생존수를 측정하였다. Table 28에 나타난 바와 같이 KKY-124와 KKY-135, KKY-102와 KKY-133은 서로 유사한 양상의 내성을 나타내었으며 KKY-102와 KKY-133의 경우 더 강한 내담즙성을 보였다.

마. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 내열성 분석

(1) 실험 방법

- 내산성이 우수한 젖산균 4주와 GG 균주를 MRS 배지에서 30°C, 24 시간 배양한 배양액 1 ml을 취하여 멸균수로 세척하고 50°C에서 20, 40, 60, 80 분간 정치한 후, 10 배씩 연속적으로 희석하여 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 희석한 배양액 100 μ l을 각각 MRS 한천배지에 도말하였으며 30°C 항온기에서 배양하여 나타나는 젖산균 군락을 계수하여 열에 대한 내성을 조사하였다.

(2) 실험 결과

- 선정 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135 4주의 열에 대한 내성을 조사하기 위하여, 4 균주를 각각 MRS 배지에서 24시간 배양하고 배양액 1 ml을 취하여 50°C에서 20, 40, 60, 80 분간 가열하였다. 정해진 시간 후 10^{-1} 의 희석배수로 연속적으로 희석하여 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 희석한 배양액 100 μ l을 각각 MRS 한천배지에 도말하고 30°C에서 배양하여 자라는 균체의 총 수를 열처리하지 않은 각각의 균주를 대조군으로 하여 백분율로 환산, 처리 시간에서의 생존율로 나타내었다.
- Fig. 4에서와 같이 4 균주 모두 열처리 시간이 증가함에 따라 사멸되는 세포수는 급격히 증가하였으나 KKY-135 균주는 50°C에서 60 분까지 사멸하는 세포 수가 급격히 증가한 후 60 분 이후에는 사멸하는 세포수가 적어지는 것으로 보아 50°C의 온도에 적응이 되는 것으로 사료된다. 또한 KKY-124와 KKY-133의 경우, 열처리 40 분 이후 사멸하는 세포수가 적은 것으로 보아 KKY-135보다 온도에 대한 내성이 높은 것으로 추정된다.
- 선정 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135 4주의 열에 대한 내성을 조사하기 위하여, 4 균주를 각각 MRS 배지에서 24시간 배양하고 배양액 1 ml을 취하여 50°C에서 20, 40, 60, 80 분간 가열하였다. 정해진 시간 후 10^{-1} 의 희석배수로 연속적으로 희석하여 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 희석한 배양액 100 μ l을 각각 MRS 한천배지에 도말하고 30°C에서 배양하여 자라는 균체의 총 수를 열처리하지 않은 각각의 균주를 대조군으로 하여 백분율로 환산, 처리 시간에서의 생존율로 나타내었다.

Table 28. Bile acid-tolerance of acid-tolerant lactic acid bacterial isolates.

		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	Viability
KKY-102	Control	-	-	-	-	>	65 55	7 3	$10^{-3} \sim 10^{-4}$
	100($\mu\text{g/ml}$)	-	-	95 102	11 8	1 0	0	-	
	200($\mu\text{g/ml}$)	-	>	79 93	8	0 1	-	-	
	300($\mu\text{g/ml}$)	>	90	8	1 0	-	-	-	
	400($\mu\text{g/ml}$)	-	-	4 10	1 0	0	0	-	
	500($\mu\text{g/ml}$)	-	13 10	1 2	0	0	-	-	
KKY-124	Control	-	-	-	-	>	74 81	4 3	10^{-5}
	100($\mu\text{g/ml}$)	-	-	60 61	10 6	2 0	0	-	
	200($\mu\text{g/ml}$)	>	38 44	7 1	1 2	-	-	-	
	300($\mu\text{g/ml}$)	-	12 16	3 5	2 0	0	-	-	
	400($\mu\text{g/ml}$)	-	11 19	2 1	1 0	0	-	-	
	500($\mu\text{g/ml}$)	-	-	4 1	0	0	0	-	
KKY-133	Control	-	-	-	-	>	61 72	5 3	$10^{-3} \sim 10^{-4}$
	100($\mu\text{g/ml}$)	-	-	>	83 94	4 11	1 0	-	
	200($\mu\text{g/ml}$)	-	-	17 30	5 2	1 0	0	-	
	300($\mu\text{g/ml}$)	>	144 164	22 13	3 2	-	-	-	
	400($\mu\text{g/ml}$)	-	12 16	3 5	2 0	0	-	-	
	500($\mu\text{g/ml}$)	-	11 19	2 1	1 0	0	-	-	
KKY-135	Control	-	-	-	-	>	56 35	4 3	10^{-4}
	100($\mu\text{g/ml}$)	-	-	200 223	29 22	2 0	0	-	
	200($\mu\text{g/ml}$)	-	-	5	2 0	0	0	-	
	300($\mu\text{g/ml}$)	200 184	19 14	3	0	-	-	-	
	400($\mu\text{g/ml}$)	-	10 17	2 3	0	0	-	-	
	500($\mu\text{g/ml}$)	-	7 11	0 2	0	0	-	-	

- Fig. 4에서와 같이 4 균주 모두 열처리 시간이 증가함에 따라 사멸되는 세포수는 급격히 증가하였으나 KKY-135 균주는 50℃에서 60 분까지 사멸하는 세포 수가 급격히 증가한 후 60 분 이후에는 사멸하는 세포수가 적어지는 것으로 보아 50℃의 온도에 적응이 되는 것으로 사료된다. 또한 KKY-124와 KKY-133의 경우, 열처리 40 분 이후 사멸하는 세포수가 적은 것으로 보아 KKY-135보다 온도에 대한 내성이 높은 것으로 추정된다.

바. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 점착성 조사

(1) 실험 방법

- 생균제 후보 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135와 bacteriocin 활성을 보유한 W-44 균주를 MRS 배지에서 24 시간 배양하고 PBS로 세척한 뒤, 4×10^8 cells/ml 농도의 젖산균 현탁액 0.5 ml과 DMEM 배지 0.5 ml을 혼합하여 준비하였다.
- PBS로 두 번 세척한 Caco-2 monolayer에 젖산균과 세포주 배양용 배지 (DMEM)의 혼합액 1 ml을 첨가하고 CO₂ incubator에서 90 분간 배양하였다. 처리한 Caco-2 monolayer를 PBS로 5 번 세척하고 methanol로 고정화한 뒤, Gram 염색하여 Caco-2 세포주에 부착된 젖산균을 현미경으로 관찰하여 점착성을 조사하였다.

(2) 실험 결과

- 생균제 후보균주인 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135 등과 추가로 bacteriocin 활성을 보유한 W-44 균주가 실제 가축의 장내에 부착되는 정도를 조사하기 위한 시도로 시험관 내에서 간접적으로 많이 사용되고 있는 colon cancer에서 유래된 Caco-2 세포주를 이용하였다. Caco-2 세포주는 DMEM (20% fetal bovine serum) 배지에서 배양하면서 매일 새로운 배지로 보충하였다. 지름 3.0 cm인 dish에 4×10^4 cells/cm²의 농도로 접종한 후 37℃, CO₂ 배양기에서 14 일간 배양하여 점착성 조사에 사용하였다.
- KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135, W-44 젖산균을 MRS 배지에서 24시간 배양하고 PBS로 세척하고 4×10^8 cells/ml 농도로 PBS에 현탁한 0.5 ml과 DMEM 0.5 ml을 혼합한 후 PBS로 두 번 세척한 Caco-2 monolayer에 처리하고 CO₂ incubator에서 90분간 배양하였다. 처리한 Caco-2 monolayer를 PBS로 5번 세척하고 methanol로 고정하고 그람염색을 한 후 부착된 젖산균을 현미경으로 관찰하였다. Fig. 33에서와 같이, 시료를 처리하지 않은 Caco-2 세포주에서는 부착된 균주가 전혀 없었으나 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135 및 W-44로 처리한 곳에서는 부착된 균체가 발견되었으며 그중에서 W44의 점착성이 가장 우수하였다(Fig. 33).

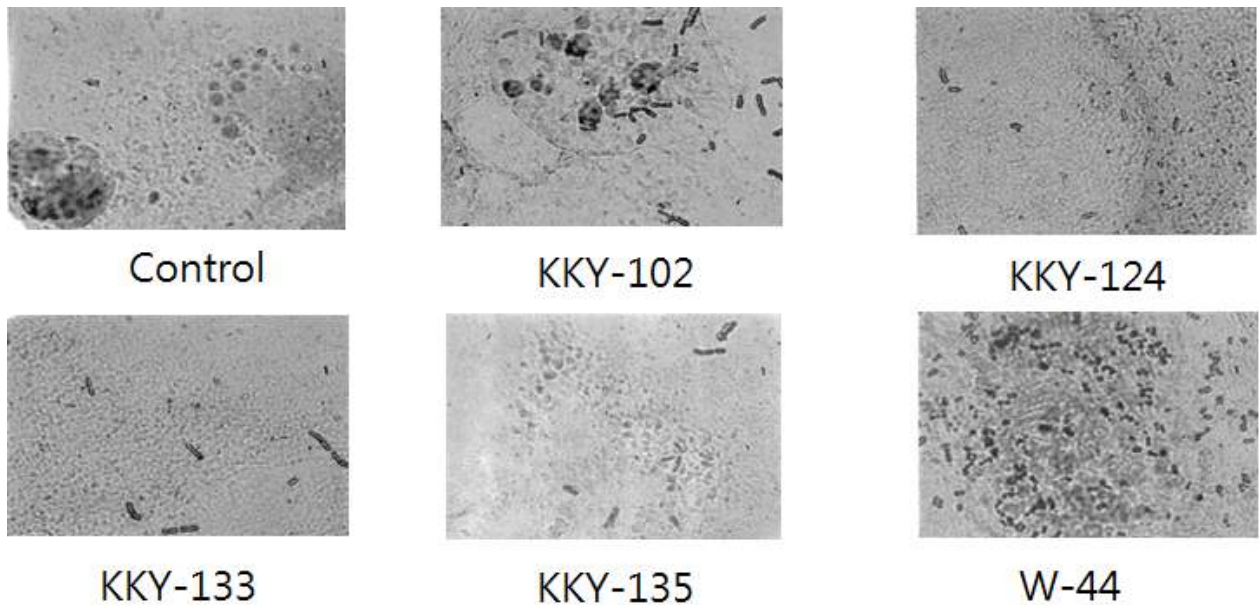


Fig. 33. Adhesion test of lactic acid bacteria on Caco-2 cell.

사. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 생리적 특성 분석

(1) 실험 방법 및 결과

- 최종적으로 선정된 내산성 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135의 동정을 시도하였다. 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성과 당발효능, catalase/oxidase test 등을 실시하여 type strain 인 *L. plantarum*의 특성과 비교하였다. 4 균주 모두 세포의 형태는 rod type이었고 dextran은 형성되지 않았으며 대부분의 형태학적 특성은 *L. plantarum*과 거의 일치하였다. 또한 사용한 모든 당을 이용할 수 있었으며, 4 균주 모두 45°C에서는 생육을 하지 못하였고, 15°C에서는 KKY-102와 KKY-124는 거의 자라지 못하였으나 KKY-133, KKY-135와 *L. plantarum*은 생육할 수 있었다.
- 기타 발효능, aesculin과 arginine 가수분해성, nitrate 환원력, 운동성, catalase/oxidase test 등의 결과는 모두 일치하였다 (Table 29). 따라서 젖산균 분리주 4주는 *L. plantarum*의 범주에 속할 가능성이 높은 것으로 조사되었다. 이 중 KKY-124와 KKY-135에 대해서는 더 자세히 동정을 실시하여 그 결과를 Table 30에 나타냈으며 전자현미경으로 관찰한 세포의 형태는 Fig. 34에 나타내었다. *L. plantarum*과 KKY-135는 arabinose와 rhamnose를 이용하지 못하였으나 KKY-124는 모두 이용하였다. 그 이외의 특성들은 3 균주 동일한 결과를 보였다. Fig. 24의 전자현미경 사진에 나타난 바와 같이 KKY-124와 KKY-135는 전형적인 rod type으로서 *Lactobacillus* sp.와 형태가 동일하였다.



KKY-124



KKY-135

Fig. 34 Scanning electron microscopic observation of KKY-124 and KKY-134 isolates.

Table 29. Taxonomical properties of acid-tolerant lactic acid bacteria isolates.

Characteristics \ LAB	KKY-102	KKY-124	KKY-133	KKY-135	L.P ^a
Shape/Gram	SR.R/+	SR.R/+.	SR.R/+	R/+	R/+
Spores	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-
Growth in air	+	+	+	+	+
Anaerobically	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-
Glucose(acid)	+	+	+	+	+
O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	F
Growth 15°C	W	W	+	+	+
Growth 45°C	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-
Car.acid from;					
arabinose	+	+	+	+	d
galactose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	+	+
melezitose.	+	+	+	+	+
melibiose	+	+	+	+	+
raffinose	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	+	+
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-

^a means *Lactobacillus plantarum*.

Table 30. Taxonomical properties of acid-tolerant KKY-124 and KKY-135.

Characteristics	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KKY-124	KKY-135
Gram's staining	Rod, +	Rod, +	Rod, +
Spores	-	-	-
Motility	-	-	-
Growth in air	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	+
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Glucose(acid)	+	+	+
OF	F(-/+)	F(-/+)	F(-/+)
Growth at 5°C	-		
Growth at 15°C	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-
Growth at 45°C	-	-	-
carbohygrates, acid from :			
arabinose	d	+	-
Cellulose	NT	-	-
Cellobiose	+	+	+
Esculin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Gluconate	+	-	-
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Raffinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Rhamnose	-	+	-
Salicin	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	d	+	+

Continued

Characteristics	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KKY-124	KKY-135
Aesculin hydrolysis	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-
Indole	-	-	-
VP	-	-	-
Dextran formation	-	-	-
Mol% G+C	44-46, 45	43	45
Growth in 10% ethanol	+	+	+
TGY + CaCO ₃	+	+	+
Final pH in Glucose broth			
DL-Lactic acid	+	+	+

5. *A. pullulans* 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 개발

- β -glucan은 일반적으로 효모 세포벽, 버섯류, 곡류에 존재하는 물질로서 1941년 미국의 루이스 펠레머(Louis Pillemer)박사에 의해 효모 세포벽에서 비특이적인 면역반응에 관여하는 물질을 발견하여 자이모산(Zyimosan)으로 명명하였다. 자이모산은 단순한 효모 추출물이었기에 β -glucan 이외에 단백질이나 지방을 다량으로 함유하고 있어 알레르기를 일으키는 부작용을 수반하기도 하였다.
- 이런 자이모산은 1960년대 초 미국의 니콜라스 딜루지오(Nicholas Diluzio)박사에 의해 효모의 세포벽에서 추출한 고분자 다당을 β -glucan이라 명명하면서 면역 활성화 물질임을 증명하였다. 초기 이런 β -glucan은 매우 고가에 판매가 이루어졌으며 분리 및 정제 시 세포벽 이외의 성분 제거에 많은 어려움을 겪게 되었다. 그럼에도 불구하고 미국 식품·의약품국(FDA)의 승인을 얻으며 식품일반 안전기준(GRAS)에 합치한 물질로 인정되어 식품첨가물로 널리 사용이 되어졌다.
- β -glucan은 D-glucose가 β -1,3결합, β -1,4결합, 또는 β -1,6결합 등으로 구성된 다당류로서, 그 구조는 Fig. 35와 같다. β -glucan은 *Saccharomyces cerevisiae*, *A. niger*, *Bradhyzobium japonicum*, *Aureobasidium pullulans*, *Agrobacterium tumefaciens* 등과 같은 미생물이나 귀리, 보리, 버섯 등에 존재한다.

- 하지만 이중에서 면역 활성 물질로써 현재까지 주로 쓰이고 있는 β -glucan은 버섯에서 추출되고 있으며, 그 구조가 동일한 β -1,3/ β -1,6 glucan에 속하는 다당류라 할지라도 단당의 결합수와 결합비율, 3차원의 입체구조에 의하여 생리활성이 크게 차이가 있다는 것이 밝혀지고 있다. 특히 β -1,3/ β -1,6 glucan이 항종양, 알레르기 작용, 항 기생충 작용이 있다는 것은 비교적 오래전부터 알려져 왔으나 추출 과정의 어려움과 비싼 버섯 가격으로 인하여 많은 제약이 있어왔다.

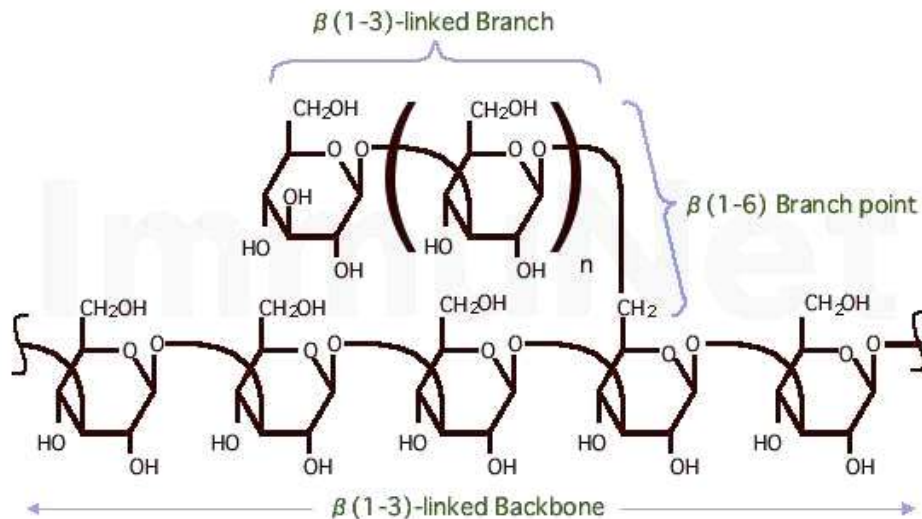


Fig. 35. Structure of β 1,3/1,6-glucan.

- *Aureobasidium pullulans*는 흙, 공기, 음식 찌꺼기, 섬유, 샤워 커튼, 나무 등에서 서식하는 오염균의 일종으로 분리가 된다. 또한 곡식류의 잎이나 열대과일에서도 흔히 볼 수 있는 균류이다. 멜라닌을 생성하여 배양시 검게변하기 때문에 “흑 효모(black yeast)”라고 불리우기도 하며, 이 균주는 식물의 조직을 연하게 하는 식물병원균으로 여겨져 왔으며, 다양한 형태로 생장을 한다.
- 이 균주의 성장 형태는 발아하는 효모의 형태나 균사체의 형태로 성장하며, 검은색을 띠는 chlamyospores의 형성이라는 특이한 현상을 나타내고 있다. 초기 성장시 노란색, 열은 핑크색 또는 밤색으로 나타나다 최종적 단계에서는 chlamyospores의 형성으로 검게 변한다. 균사는 투명하고 부드러우며 얇은 막으로 싸여있다.
- 또한 이 균주는 포도당이 연결되는 방법에 의해, α 와 β -glucan을 생성하며, 특히 β -glucan에 대한 연구가 활성화되기 이전에는 α -glucan으로 불리우는 ullulan 생산의 대표균주로 알려져있

으며, 산업적으로 매우 중요한 균주로 이용이 되어져왔다. pullulan은 중성의 다당류로 약 20만의 분자량을 지니며, 무미, 무취, 비결정의 백색분말로 내열성, 내효소성, 내산, 내 염기성이 우수하여 각종 식품의 품질개량 또는 신제품 개발에 이용되고 있다.



Figure 36. The photo of microscope in *Aureobasidium pullulans* KSY-0516.

가. 균주의 보관 및 분석 방법

(1) 실험 방법

(가) 시료의 처리 및 분석 방법

- 배양액으로부터 균체량, total polymer 및 β 1,3/1,6-glucan 함량을 구하기 위하여 시료를 채취하였다. 배양액을 얻어 즉시 OD₆₆₀ 값과 pH를 측정하였다. Cell OD는 UV/VIS Spectrophotometer(Amersham, USA)를 이용하여 배양액 1 ml을 측정하였고, pH는 DO-cu pH meter(Sartorius, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 그 외 분석을 위하여 채취한 시료는 sealing한 뒤 -20°C에 보관하였다. 모든 분석은 오차를 줄이기 위하여 3회 반복하여 실시하였다.

(나) 다당류 정량

- 배양액 50 ml을 10000 rpm에서 20분간 원심 분리한다. 상등액 10ml을 취하여 50ml Falcon tube에 에탄올 30 ml과 함께 넣은 후, 다당류가 침전될 때까지 vortexing 하였다. GF/C filter(Watman)으로 vacuum filtration하여 미리 무게를 잰 은박 접시에 담아 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 무게를 측정하였다.

(다) 건조 균체량 (DCW) 측정

- 건조 균체량을 측정하기 위하여 배양액 10 ml을 10000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 증류수로 두 세 번 씻어낸 뒤 다시 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고, 0.5N NaOH를 10 ml 첨가하여 resuspend 한 후 25°C 200 rpm에서 6시간동안 처리하여 다시 10000 rpm에서 20분간 원심 분리 하여 상등액을 제거하였다. 그리고 20ml의 0.85% NaCl로 washing 한 후 다시 10000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 105°C에서 sample을 항량이 될 때까지 건조하여 무게를 측정하였다.

(라) β 1,3/1,6-glucan 정량

- β 1,3/1,6-glucan의 정량은 pullulanase (Novozyme Co. Denmark)를 사용하여 측정한다. 30ml의 pullulan과 β 1,3/1,6-glucan가 섞여있는 상등액을 이용하여, 30 ml 50 mM Sodium acetate buffer(pH 5.0)와 pullulanase (32 unit in 50 mM sodium acetate buffer)와 90 ml of 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)를 mix한다. 혼합된 액을 25°C 200rpm에서 24시간동안 처리한 후, 3배 volume의 에탄올을 이용하여 다당류가 침전될 때까지 vortexing 한다. GF/C filter(watman)으로 vacuum filtration하여 미리 무게를 잰 은박 접시에 담아 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 무게를 측정한다.

(마) 당의 성분 분석

- 잔당의 측정은 상등액을 이용하여 Agilent high-performance liquid chromatography과 변동차로써 5 mM H₂SO₄(65°C,0.6ml/min)를 포함한Aminex HPX-87H column (Bio-Rad)을 이용하여 측정하였다. RI detector(굴절률 디텍터)를 이용하여 sucrose의 양을 확인하였으며, sucrose의 농도는 표준 용액을 통해 나온 calibration curve를 이용하여 계산하였다. 배양 상등액을 pore size 0.45 μ m의 filter로 여과하여, 시료 10 μ l를 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) organic acid column에 주입하고, 60°C에서 flow rate 0.6 ml min⁻¹ 으로 하여 이동상 0.025 N sulfuric acid를 흘려주었다. 성분 분석을 위한 효소의 처리는 풀루란(pullulan) 분해효소인 풀루라네이즈(pullulanse, Novozyme Co. Denmark)와 라미나리네이즈(laminarinase, Novozyme Co. Denmark)를 처리하여 5°C 200rpm에서 24시간동안 처리한 후 pore size 0.45 μ m의 filter로 여과하여, 시료 10 μ l를 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) organic acid column에 주입하고, 60°C에서 flow rate 0.6 ml min⁻¹ 으로 하여 이동상 0.025 N sulfuric acid를 흘려주어 반응 산물을 분석하였다.

(바) *Aureobasidium pullulans* 균주의 배양 및 보관

- *Aureobasidium pullulans* 균주의 배양에는 Czapek 배지를 사용하였고, 30°C로 5일간 배양한 후, 4°C에서 보관하였으며, 2주마다 계대배양하여 활성을 유지시키고, stock 보관을 위해 50 ml Czapek-Dox 배지(35 g/L, Difco Laboratories)를 포함한 200ml Flask에 교반 속도 150 rpm, 온도 30°C에서 72시간 배양 후, 40% glycerol 용액과 배양액을 1:1로 혼합하고 vortex를 이용하여 균일하게 혼합한 후 -70°C에서 동결 보관하였다.

(사) 종균배양

- 발효조 배양의 경우, 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% Sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30°C에서 72시간동안 200 rpm에서 배양 하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml을 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90시간동안 배양하였다. 3차 종균 배양은 20% sucrose 함유 Czapek 배지를 사용하였으며, 플라스크를 건열멸균 한 후 sucrose를 제외한 Czapek 배지성분을 증류수에 용해하여 플라스크에 담은 채 가압증기 멸균하여 사용하였다. 멸균 후, 20% sucrose를 첨가하여 sucrose의 농도를 맞춰주었다. 접종은 2차 종균배양액 20 ml을 10% 농도로 하였으며, 30°C에서 200rpm에서 90시간동안 배양하였다.

(아) Fermenter 회분배양

- *Aureobasidium pullulans*의 fermenter 회분배양에는 50 L 규모의 pilot plant (KF-50 L, Ko-Biotec)를 사용하였다. 배양배지는 sucrose 20% 함유 Czapek 배지를 사용하였으며, 90시간동안 배양한 3차 종균 배양액을 10% 농도로 접종하였다. 배양조건은 30°C의 온도와 pH 5.0 을 유지하며 110 시간동안 배양하였다. 다만 발효조 내의 균일한 배양조건을 유지하기 위하여 sucrose는 멸균 후 첨가 하였으며, pH는 2.5 N NaOH와 2.5 N HCl을 이용하여 적절히 조절하였고, DO값은 교반을 적절하게 조절하여 20~60%로 조절하였다.

나. Flask culture를 통한 배양 조건 최적화

(1) 실험 방법

(가) 탄소원의 영향

- 탄소는 세균의 증식에 있어서 그의 구성성분 뿐만 아니고, 증식에 필요한 주 에너지원으로 작용한다. 미생물의 대사과정에서 세포 내로 들어간 탄소원은 미생물의 증식을 위한 에너지를 생산하기 위해 산화되어 CO₂로 되거나 세포의 구성성분의 합성을 위한 전구체로 전환되어 세포의 형성에 이용되게 된다.
- 특히 균류에 있어서는 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균주의 성장에 필수적인 영양원으로 이용되고 있다. 이와 같이 미생물의 성장에 중요한 역할을 하며 세포의 구성성분의 합성에 영향을 미치는 탄소원은 각기 미생물에 따라 생리활성 물질의 생산량을 증대시키는 탄소원의 종류는 같은 종뿐만이 아니고, 심지어 같은 속내에서도 그 종류며 농도가 이용성에 따라 모두 다르다고 보고되어 있다.
- 그리고 버섯의 경우 세포의 다당류의 생산 경향은 균사생장과 더불어 증가하며, 이것은 탄소원이 세포의 다당류 생산수율을 향상시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다. 이와 마찬가지로 *Aureobasidium pullulans*의 성장에는 여러 가지 탄소원이 사용된다고 보고되어 있으며, 특히 pullulan의 생산을 위한 탄소원으로는 glucose, xylose, maltose, sucrose, lactose 등이 사용되고 있다. 그러나 β 1,3/1,6-glucan의 생산을 위한 탄소원으로는 현재 sucrose가 우수하다는 연구결과가 주로 보고되어 있으며, 이외에 glucose, mannose, lactose, dextrin, fructose, trehalose, starch 등이 이용되고 있다.
- 따라서 본 연구에서는 최적화를 위하여 탄소원(Carbon source)에 따른 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 조사하였다. 배양 조건의 최적화를 위한 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5% sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30 °C에서 72 시간 동안 200 rpm에서 배양하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml을 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90 시간 동안 배양하였다. 본 연구를 위해 사용한 탄소원으로는 sucrose, glucose, lactose, galactose, fructose, maltose 등 총 6가지 종류의 탄소원으로 실험을 실시하였으며, 탄소원을 3% 농도로 첨가한 후 종균의 전 배양액을 10%(v/v) 농도로 접종하고 30 °C에서 120 시간 동안 150 rpm으로 진탕배양 후 각 탄소원에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 이외의 배지 첨가 성분은 모두 *A. pullulans* KSY-0516 배양 배지인 Czapek 배지 조성을 동일하게 첨가하였다. 모든 실험구는 120 시간 동안 150 rpm, 30 °C에서 배양하였으며, 분석방법은 앞선 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.

(나) 질소원의 영향

- 질소원은 아미노산 합성에 이용되어 단백질의 구성 성분이 되기 때문에 질소원의 공급이 제한이 될 경우 단백질의 합성이 원활치 못한 만큼 질소를 함유하지 않은 각종 carbohydrate polymer가 축적된다. 즉 여유 탄소원을 에너지 균형이 맞는 각종 산물로 전환하여 축적된다. 탄소원이 충분히 존재하는 상태에서 질소원 제한의 전형적인 반응으로는 탄소원과 에너지를 세포내에 저장하기 위한 glycogene, lipides, PHB 등의 다당체와 polyphosphates 같은 물질을 합성하게 되며, 많은 미생물들이 질소원이 제한되었을 경우 capsules polysaccharides 등을 생산하게 된다. 따라서 질소원은 exopolysaccharides와 cell growth에 중요한 요인으로 작용하며 질소원의 종류와 농도에 따라 다른 영향을 가져오게 된다.
- 따라서 본 연구에서는 탄소원의 조건이 확립된 후 질소원의 최적화를 위하여 선별한 탄소원을 기초로 하여 무기질소원인 NaNO_3 , KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등 총 4개의 질소원을 이용하여 실험을 진행하였으며, 질소원을 0.3% 농도로 첨가였고, 질소원 이외의 배지 조성은 모두 *A. pullulans* KSY-0516 배양 배지의 조성으로 동일하게 실시하였다. 배양 조건의 최적화를 위한 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μl 를 취하여 5 ml의 5% sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30 °C에서 72 시간 동안 200 rpm에서 배양하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml을 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90 시간 동안 배양하였다. 종균의 전 배양액을 10%(v/v) 농도로 집중하고 30 °C에서 120 시간 동안 150 rpm으로 진탕배양 후 각 탄소원에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 모든 실험구는 120 시간 동안 150 rpm, 30 °C에서 배양하였으며, 분석방법은 앞의 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.

(다) Ascorbic acid의 영향

- *Aureobasidium pullulans*는 흑효모라 불리며 멜라닌계열의 색소가 생성되면서 검게 변하는 특성을 지닌다. 이를 방지하기 위해 많은 방법이 사용되어 왔으나, 주로 활성탄소를 이용한 다단계 탈색공정과 이온 여과 공정방법이 멜라닌색소 제거에 이용되어 왔다. 따라서 이를 대체하기 위한 방법으로 최근에 균주의 갈변현상을 방지하기 위해 산화제인 ascorbic acid가 사용되어지고 있으며, 특히 *Aureobasidium pullulans*를 Czapek's 배지에 배양하는 경우 ascorbic acid를 첨가할 경우 다당류의 생산량이 증가되고 biomass의 양도 증가된다는 결과도 보고되어져 있다. 또한 다당류의 생산량 증가를 가져오는 직접적인 원인이 ascorbic acid가 변환된 oxalic acid라는 보고도 나와 있으며, 0.03%의 oxalic acid의 첨가 시 β 1,3/1,6-glucan의 생산을 자극하여 생산량의 증가를 가져오게 된다고 보고되어 있으며, β 1,3/1,6-glucan 생산 미생물에 따라서 첨가하는 양도 0.01% ~ 0.1% 까지 다양하며, 그에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량 증가에 각기 다른 영향을 준다고 보고되어 있다.

- Ascorbic acid의 첨가에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량 확인을 위하여 선행된 실험을 통하여 선별한 탄소원과 질소원을 이용하여 *A. pullulans* KSY-0516 배양 배지성분을 동일하게 사용하며, 추가로 ascorbic acid와 변환된 oxalic acid를 이용하여 이미 보고된 농도별로 실험을 실시하였다. 배양 조건의 최적화를 위한 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 72 시간 동안 200 rpm에서 배양하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml를 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90 시간 동안 배양하였다. 종균의 전 배양액을 10%(v/v) 농도로 접종하고 30 $^{\circ}$ C에서 120 시간 동안 150 rpm으로 진탕배양 후 각 탄소원에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 모든 실험구는 120 시간 동안 150 rpm, 30 $^{\circ}$ C에서 배양하였으며, 분석방법은 앞의 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.

(2) 실험 결과

(가) 탄소원의 영향

- *A. pullulans* KSY-0516을 이용한 β 1,3/1,6-glucan의 생산에 대한 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 sucrose, glucose, lactose, galactose, fructose, maltose를 탄소원으로 사용하였다. 실험결과 최종 pH는 모든 실험구에서 5.2~5.8로 유사한 값을 나타내었으며, 실험에 사용한 탄소원 중 β 1,3/1,6-glucan의 생산(Fig. 37(a))은 sucrose에서 0.26 g/L로 최대값을 나타내었고, fructose에서는 0.25 g/L로 아주 미세한 차이의 β 1,3/1,6-glucan의 생산을 보였다. 또한 세포성장은 glucose에서 0.6 g/L 와 sucrose에서 0.56 g/L로 가장 높은 세포성장을 나타내었으며, β 1,3/1,6-glucan의 생산량이 많은 fructose의 경우 0.1 g/L의 세포성장을 보였다.(Fig. 37(b)). 실험 결과 β 1,3/1,6-glucan의 생산량은 탄소원별로 큰 차이를 보이지는 않았으나 세포의 성장에서는 많은 차이를 보였다. 즉, 대부분의 sucrose는 세포의 지수 성장기 전에 glucose와 fructose로 바뀌며, 먼저 glucose를 사용한 뒤 fructose를 사용하며 sucrose를 직접 transport system에 의해 이용하지는 않는다. 따라서 결과를 토대로 보면, *A. pullulans* KSY-0516의 경우 최대 β 1,3/1,6-glucan과 세포성장을 보이는 탄소원으로는 sucrose가 가장 우수하며, glucose와 fructose만으로는 β 1,3/1,6-glucan의 생산량에서 glucose와 fructose로 구성된 sucrose보다는 생산량이 미치지 못한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 β 1,3/1,6-glucan의 생산을 위한 최적의 탄소원으로는 sucrose임을 알 수 있었다.

(나) 질소원의 영향

- 먼저 선별된 탄소원 sucrose를 기본으로 하여 다음으로 질소원의 영향에 대하여 실험을 하였다.

일반적으로 미생물에 의한 다당류의 생산은 질소원의 제한을 받는다는 사실이 밝혀져 있으며, 질소원이 고갈되면서 그 시점부터 pullulan이 생산이 된다는 사실이 밝혀져 있다. 따라서 β 1,3/1,6-glucan의 생산성의 증진을 위해서는 무엇보다도 질소원의 선별이 중요하게 작용하기 때문에 질소원의 선별이 중요하다.

- 일반적으로 *Aureobasidium pullulans*에 대한 질소원의 영향에 대한 연구 논문은 주로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 대한 영향이 대부분으로 이루어져 있다. 따라서 이 외의 다른 질소원이 β 1,3/1,6-glucan의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NaNO_3 , KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 사용하였으며, 주 탄소원으로는 이미 선행된 실험에서 선별된 sucrose를 이용하였고, 이외의 배지성분은 일반 Czapek DOX broth(DIFCO)의 조성을 그대로 적용하였다.
- 실험을 진행하여 측정한 결과 우선 모든 실험구의 최종 pH는 5.2~5.5로 유사한 측정결과를 보였으며, 실험에 사용한 질소원에 대한 β 1,3/1,6-glucan의 생산량은 크게 차이를 보이지는 않았으나, 그중에서도 KNO_3 에서 탄소원만 선별한 결과값보다 0.3 g/L로 약 1.5배가량 함량이 증가함을 확인하였다. 선행된 연구 논문들과 비교하였을 때 *Aureobasidium pullulans*의 주 질소원으로 사용되는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 보다 더 높은 결과값을 얻게 되었고, 모든 질소원 실험구의 세포성장은 유사한 측정값을 나타내었다.

(다) Ascorbic acid에 의한 영향

- *Aureobasidium pullulans*는 검은 효모라 불리며, 멜라닌계열의 색소가 생성이 되면서 검게 변하는 특성을 지닌다. 따라서 갈변현상을 방지하기 위하여 산화제인 ascorbic acid가 사용된다. Ascorbic acid를 첨가 할수록 *Aureobasidium pullulans*의 exopolysaccharides의 함량이 증가된다는 여러 연구가 보고되어 있다. 또한 exopolysaccharides 뿐만이 아니라, 세포의 성장에도 영향을 준다고 발표되어 있으며, 그 영향으로는 ascorbic acid의 첨가로 인하여 배지의 pH가 낮아지게 되고, 최적 pH와 다른 조건하에 세포가 성장을 하면서 세포의 성장이 저해를 받은 것으로 보고되어 있다.
- 따라서 ascorbic acid와 그의 변환된 형태인 Oxalic acid를 첨가하여 그 영향에 대한 실험을 진행하였다. Figure 16을 보면, 대조구와 비교하여 ascorbic acid만을 첨가한 실험군의 경우 우선 배양 상태만으로 보아도 노란색을 띄며 점성 또한 매우 낮음을 확인할 수 있었다. 그리고 β 1,3/1,6-glucan의 생산량에서도 가장 낮은 측정값을 보였으며, 세포 성장 또한 가장 낮은 결과를 나타내었다. 그러나 Oxalic acid를 첨가한 실험군에서는 모두 대조군보다는 증가한 결과를 보였으며, 특히 0.03%의 Oxalic acid를 첨가한 결과 대조군보다 약 3배가량 β 1,3/1,6-glucan의 생산량이 증가하였다. 그러나 세포 성장에서는 대조군과 비슷한 세포의 성장을 보였으며, 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 보인 0.03%의 경우 세포 성장은 대조군보다 낮다는 것을 확인할 수

있었다.

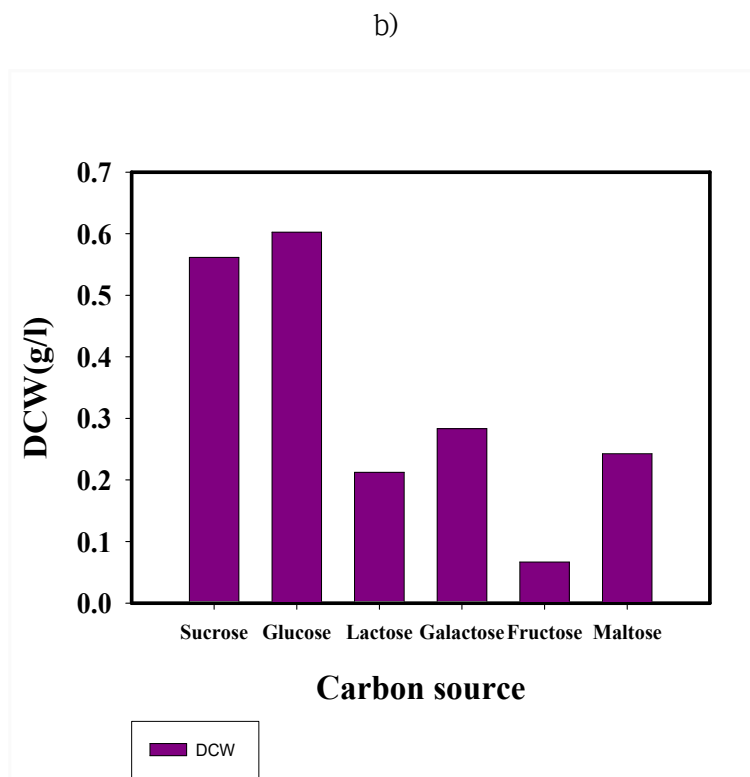
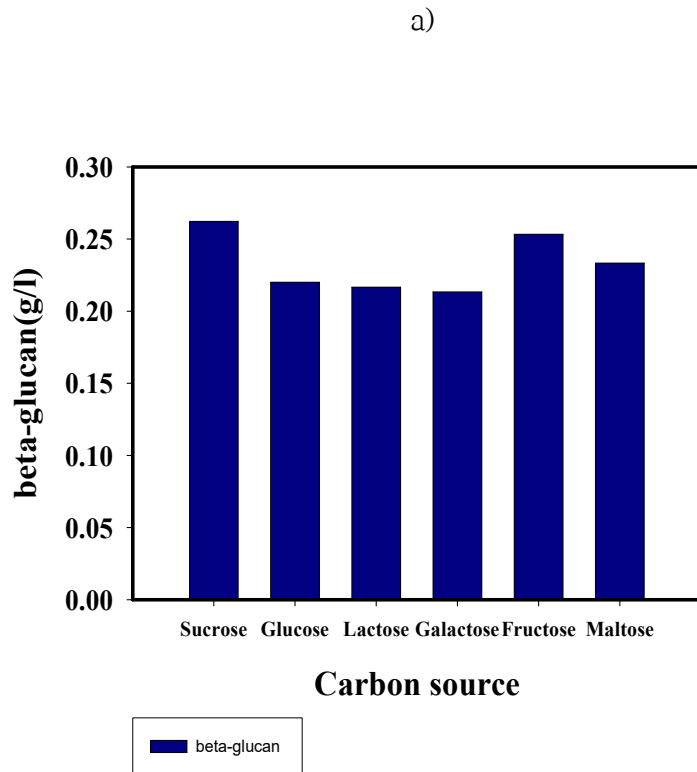
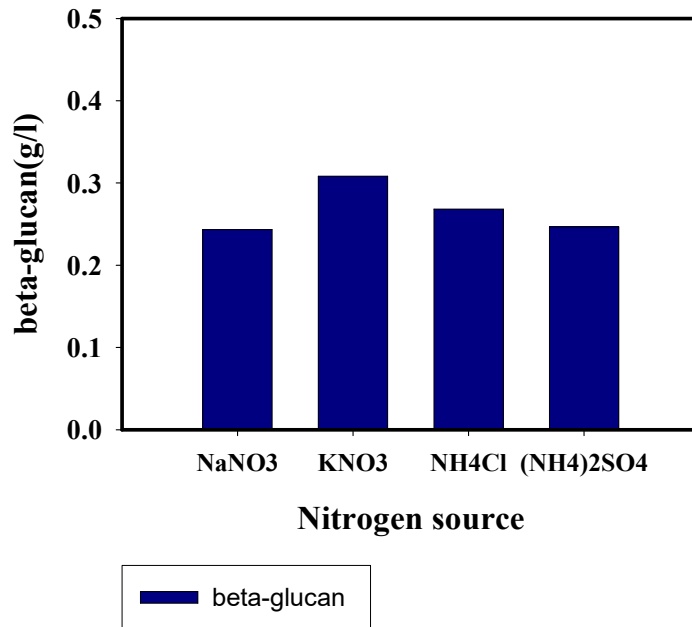


Fig. 36 β 1,3/1,6-glucan productivity and DCW by Carbon source in KSY-0516.

a)



b)

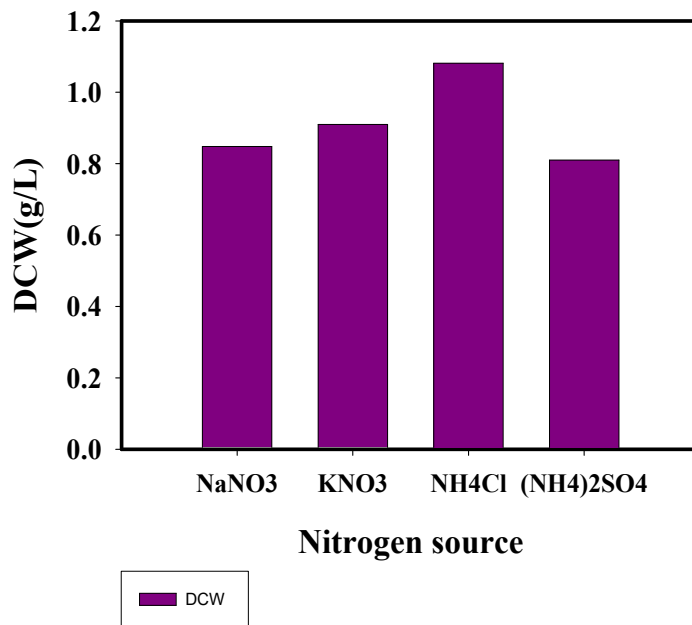
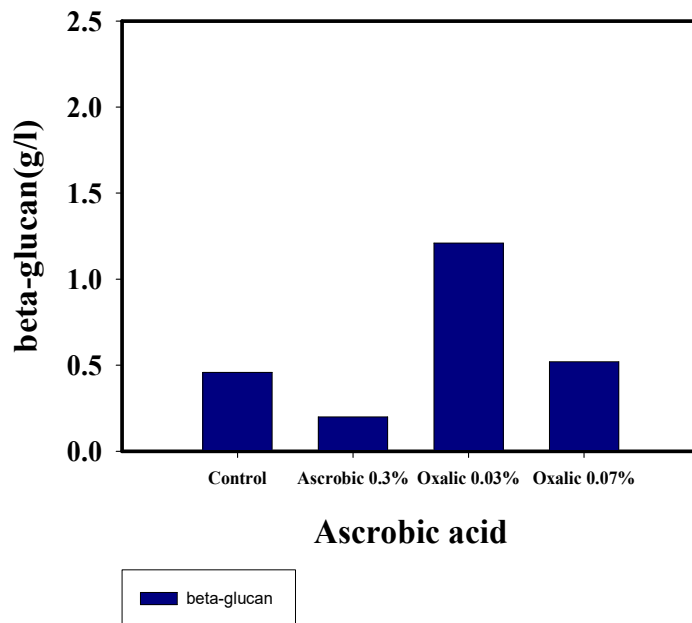


Fig. 37. β 1,3/1,6-glucan productivity and DCW by Nitrogen source in KSY-0516.

a)



b)

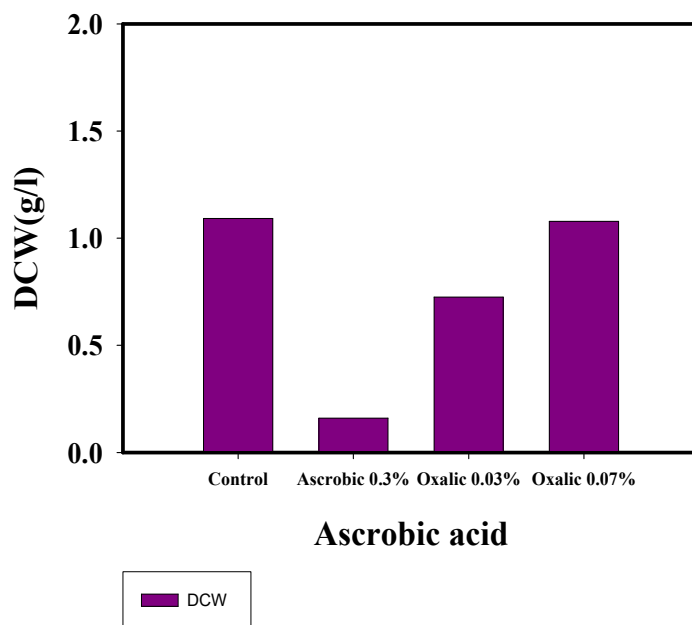


Fig. 38. β 1,3/1,6-glucan productivity and DCW by concentration in ascorbic acid in KSY-0516.

라. 교반형 발효기를 이용하여 *A. pullulans* KSY-0516 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정

(1) 실험 방법

(가) Kinetic 분석

- 발효조 배양의 경우, 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 72 시간 동안 200 rpm에서 배양하였으며, 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml를 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90 시간 동안 배양하였다. 3차 종균 배양은 20% sucrose 함유 Czapek 배지를 사용하였으며, 플라스크를 건열멸균한 후 sucrose를 제외한 Czapek 배지성분을 증류수에 용해하여 플라스크에 담은 채 가압증기 멸균하여 사용하였다. 멸균 후, 20% sucrose를 첨가하여 sucrose의 농도를 조정하였다. 배양조건은 30 $^{\circ}$ C의 온도와 pH 5.0을 유지하며 110 시간 동안 배양하였다.
- 다만 발효조 내의 균일한 배양조건을 유지하기 위하여 sucrose는 멸균 후 첨가하였으며, pH는 2.5 N NaOH와 2.5 N HCl을 이용하여 적절히 조절하였고, DO값은 교반조건을 달리하여 20~60%로 조절하였다.
- 회분배양을 한 후에 비증식 수율(μ), 증식수율($Y_{x/suc}$), β 1,3/1,6-glucan 생성수율($Y_{glucan/suc}$), β 1,3/1,6-glucan 생산량($Y_{glucan/x}$), 최대 β 1,3/1,6-glucan 생산량(P), 비기질 이용율(q_{suc}), 비 β 1,3/1,6-glucan 생산율(q_{glucan})의 kinetic parameter를 구하였다.
- 회분배양 시에 일정 시간 (dt) 동안에 증가하는 균체량 (dx)은 그때에 존재하는 균체량 (x)에 비례한다. 이때 비례상수를 비증식 속도라 하며, 다음 식으로 구할 수 있다.

$$dx = \mu x dt \quad \text{[식 1]}$$

[식 1]로부터, 다음 식을 도출할 수 있다.

$$\mu = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{x_2}{x_1} \quad \text{[식 2]}$$

○ x 는 균체량 ($g\ l^{-1}$)을 t 는 시간 (h)을 나타낸다.

증식수율($Y_{x/suc}$)은 일정 시간 동안 소모된 기질량 ($dsuc$)과 증식한 균체량 (dx)이며 [식 3]과 같다.

$$Y_{x/suc} = - \frac{dx}{d_{suc}} \quad [\text{식 3}]$$

증식수율은 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$Y_{x/suc} = \frac{x - x_0}{suc_0 - suc} \quad [\text{식 4}]$$

○ x_0 와 suc_0 는 초기 균체량과 기질의 농도이고, x 와 suc 는 배양이 이루어진 후의 균체량 및 기질의 농도를 나타낸다.

β 1,3/1,6-glucan 생성수율은 사용된 기질 ($dsuc$)에 대한 생성된 산물 ($dglucan$)의 수율 ($Y_{glucan/suc}$)이며, [식 5]와 같다.

$$Y_{glucan/suc} = \frac{glucan - glucan_0}{s_0 - s} \quad [\text{식 5}]$$

$glucan$ 와 $glucan_0$ 는 각각 최종 및 초기 β 1,3/1,6-glucan 함량을 나타낸다.

○ 일정 시간 동안 소모되는 sucrose의 양은 그때 존재하는 균체량에 비례하는데, 이때 비례 상수를 비sucrose 소모속도 (q_{suc})라고 하며, 단위는 $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ 이다.

$$d_{suc} = - glucan_{suc} x dt \quad [\text{식 6}]$$

[식 1]과 [식 3]으로부터 다음 식을 유도할 수 있다.

$$q_{suc} = \left(\frac{1}{Y_{x/suc}} \right) \mu \quad \text{[식 7]}$$

- 이와 유사하게, 균주의 생장에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생성정도를 구할 수가 있다.

$$d_{glucan} = q_{glucan} x dt \quad \text{[식 8]}$$

q_p 는 비 β 1,3/1,6-glucan 생성율을 뜻하며 [식 9]와 같이 표현할 수 있다.

$$q_{glucan} = (Y_{glucan/x}) \mu \quad \text{[식 9]}$$

(나) 반응표면분석법

① 실험계획법

- 실험계획법(experiments design)은 영국의 수학자 R.A. 피셔에 의한 농산물 품질의 양부나 비료 효과의 차이 등 농업시험의 계획과 그 자료에 대한 해석에서부터 발전한 방법으로써, 오늘날 생물학·의학·공학·심리학 등과 추측통계학이나 공장실험 등에 널리 이용되고 있다. 실험계획법은 실험의 특성에 영향을 미치는 여러 가지 인자를 선정하고 이들의 관계를 알아보기 위한 실험을 실시하여 자료를 얻고 이를 분석함으로써 최적 조건을 경제적으로 찾아내고자 하는 학문을 말한다. 따라서 실험계획법은 최소의 실험회수로부터 최대의 정보를 얻을 수 있도록 계획하는 것을 지칭하며, 하나의 실험계획법을 수립했다는 것은 해결하고자 하는 문제에 대하여 인자(factor)를 선정하고 실험방법을 택하였으며 실험순서를 정하고 실험 후 얻어지는 자료에 대한 최적분석 방법을 선택하였다는 의미로 해석할 수 있다. 일반적인 실험계획법의 순서는 실험 목적을 설정하고, 실험 특성치(반응량)를 선택하며, 인자(factor)의 수와 수준(level)을 정한 후 실험을 배치하여 이를 실시하며, 이후 실험을 통하여 얻어지는 데이터 값을 적절한 통계적 분석방법에 의해 분석하고, 결과를 해석하여 적절한 조치를 취함으로써 실험의 설계와 실시, 분석의 과정을 마치게 된다. 실험계획에서 주의할 점으로는 실험의 순서는 무작위로 배치되어야 하고, 또한 실험의 결과 값에 대한 재현성을 지녀야 실험계획법으로 진행된 결과가 인정을 받게 된다.

② 반응표면분석법을 이용한 배양 최적화

- 반응표면분석법(Response surface method, RSM)은 여러 가지 실험 인자들, 즉 독립 변수의 상호 작용에 따른 종속변수의 변화에 대하여 최대 반응치를 나타내는 최적조건을 찾아내기 위해 이용되는 통계적인 분석 방법 중 하나로, 주된 요인을 찾아내고 요인들 간의 상호작용이 있는가를 살펴 보면서 반응치에 미치는 요인들 가운데 어떠한 조합이 최대 반응치를 나타내는가를 알아내기 위하여 요인의 수준을 변경하면서 축차적으로 반복하여 실험하는 방법을 말한다. 즉, 반응표면분석법을 통하여 독립변수 값의 변화에 따라 반응량이 어떻게 달라지는가를 예측할 수 있고, 또한 어떤 독립변수의 값에서 반응량이 최적화 될 것인가를 찾아낼 수 있으며, 최종적으로 가장 적은 수의 실험으로 가장 좋은 결과를 주는 실험계획법이 무엇인가를 고찰하여, 데이터 분석을 통하여 추정되는 적합한 반응표면의 성질을 규명하는 방법을 의미한다.

- 반응표면에 대한 기본수식은 [식1]과 같이 나타낼 수 있다.

$$E(y) = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \dots \dots \dots [\text{식1}]$$

- 인자가 하나인 경우는 [식1]을 2차 곡선으로 표현하면 [식2]와 같은 회귀모형식이 되므로, 최대 또는 최소가 되는 점은 이 곡선의 추정식 [식3]을 구한 후 $\frac{\partial \hat{y}}{\partial x} = 0$ 을 만족하는 χ 가 된다.

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 \dots \dots \dots [\text{식2}]$$

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x + \hat{\beta}_2 x^2 \dots \dots \dots [\text{식3}]$$

- 인자가 둘인 경우에는 일반적으로 반응표면을 평면으로 나타내는 [식4]나 곡면으로 나타내는 [식5]를 실험 측정치에 적합시켜 최적조건을 구하게 된다.

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \dots \dots \dots [\text{식4}]$$

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \dots \dots \dots [\text{식5}]$$

- 여기에 곡면을 적합 시킬 경우 이의 추정식 [식6]에 대하여 $\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = 0, \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2} = 0$ 을 만족하는 점 (x_1, x_2) 을 반응표면의 정상점(stationary point)라 부르며, 정상점은 \hat{y} 가 최대가 되는점, 최소가 되는점, 최대도 최소도 아닌점 중 하나가 된다.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \hat{\beta}_{11} x_1^2 + \hat{\beta}_{22} x_2^2 + \hat{\beta}_{12} x_1 x_2 \dots \dots \dots [\text{식6}]$$

- \hat{y} 가 최대도 최소도 아닌 경우의 반응표면은 Figure. 5(b)와 같은 말안장 모양으로 이 점을 안장점(saddle point)이라 부른다.
- 2차 반응표면식 [식6]을 행렬로 표현하면 아래와 같다.

$$E(y) = \beta_0 + x'b + x'Bx, \quad x = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix}, \quad b = \begin{pmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \end{pmatrix}, \quad B = \begin{pmatrix} \beta_{11} & \beta_{12}/2 \\ \beta_{22} & \beta_{12}/2 \end{pmatrix}$$

- 이때의 정상점은 $x_0 = -B^{-1}b/2$ 이 된다. 여기에서 B^{-1} 은 B의 역행렬을 말한다. 정준분석이란 정상점이 최대, 최소, 최대도 최소도 아닌 점 중 어느 것에 속하는지를 분석하는 방법을 의미하며, 정준분석은 행렬 B의 고유값 들의 부호가 모두 양수일 경우 최대점, 모두 음수일 경우 최소점, 부호가 모두 다를 경우에는 안부점으로 판단하게 된다.^(60,61,62) 이렇듯 반응표면분석의 경우 최소의 실험으로 최적의 조건을 찾는 것이 주목적이므로, 실험점과 실험점의 수를 결정하는 것이 매우 중요하다. 반응표면분석의 종류로는 중심합성계획법(Central composite design), 회전계획법(Rotatable design), 회전중심합성계획법(Rotatable central composite design), Box-Behnken법 등이 있으며, 실험계획법의 실험점은 관심영역이라 불리는 $x_1^2 + x_2^2 \leq a^2$ 의 영역에 있으며, 상수 (a)는 일반적으로 1 또는 $\sqrt{2}$ 를 많이 사용한다.

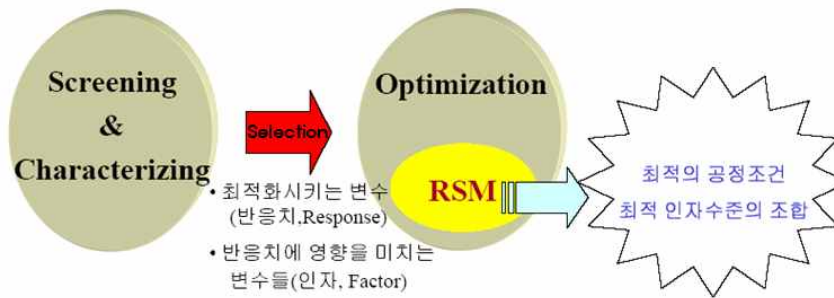
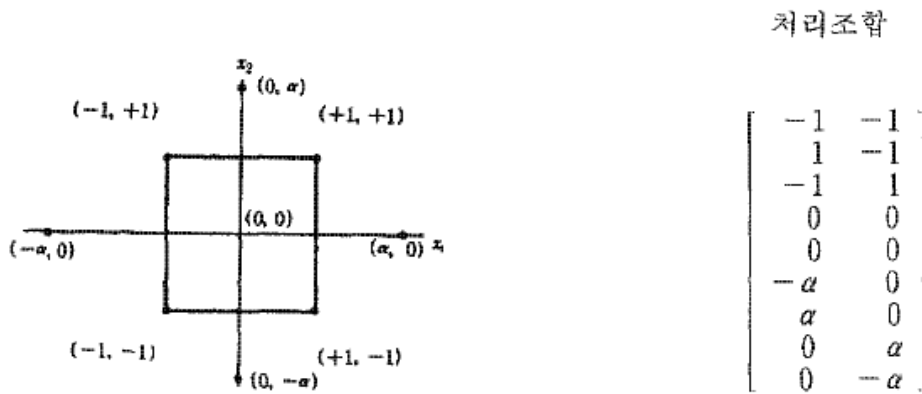


Fig. 39 Concept of Response surface method

③ 중심합성계획법

- 2차 모형의 경우 실험계획법에 적합 시키기 위해서는 각 인자가 최소한 3개 이상의 수준(level)을 가져야 하며, 이를 위하여 가장 널리 사용되는 반응표면실험계획이 중심합성계획(Central composite design)이다. 중심합성계획이란 변수의 수준변화에 따라 발생하는 반응량의 곡면적인 변화를 감지할 수 없는 다른 모델들의 단점을 보완하고 적은 횟수의 실험으로 곡면을 추정하기 위해 중심점과 축점을 2^k 요인 실험에 추가시킨 실험을 말하며, 중심점의 수는 제한이 없이 하나 이상으로써, 축점의 수가 2^k 가 된다. 또한 여기에서 상수 a의 값은 0이 아닌 양수의 값을 지녀야 하는 특성을 지닌다. 즉, 실험의 수는 $k > 2$ 인 경우 3^k 요인 실험보다 실험수가 훨씬 적게 되며, 중심합성계획을 사용할 경우 실험의 수를 줄일 수 있는 장점을 지니게 된다.
- 중심합성계획의 총 실험 수(N)는 $N = k^2 + 2k + c_p$ 가 되고, k 는 factor의 수, c_p 는 중심점의 수를 말한다. 또한 상수 a의 값은 변수의 수에 의존을 하며, 변수가 2개일 경우에는 1.41, 3개일 경우에는 1.68, 4개일 경우에는 2.00을 사용한다. 또한 실험의 모든 factor는 $(-a, -1, 0, 1, +a)$ 로써 총 5개의 수준(level)으로 진행한다.

a) Central composite plan($k=2$)



b) Central composite plan(k=3)

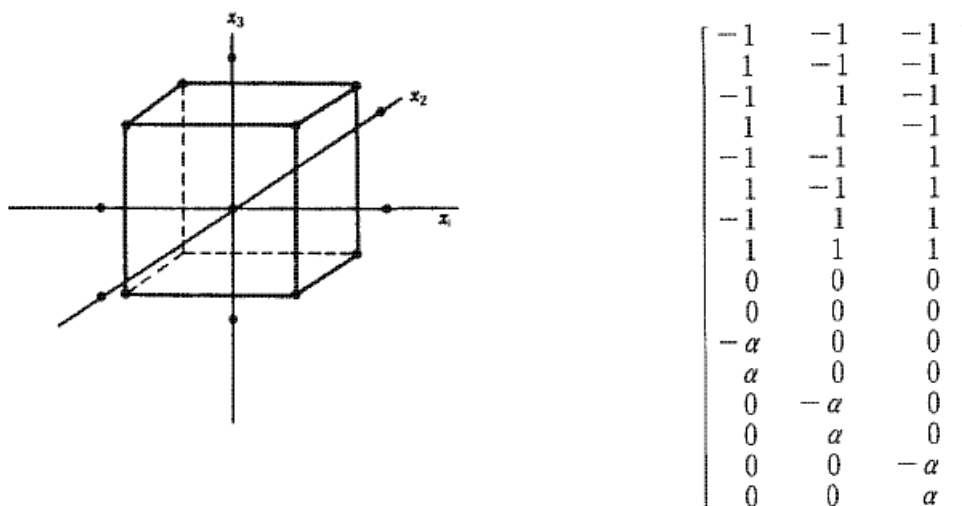


Fig. 40 Central composite plan for $k=2$ and $k=3$

(다) 반응표면분석을 이용한 실험 설정

- β 1,3/1,6-glucan의 생산량 증가를 위하여 β 1,3/1,6-glucan의 생산성 증가에 영향을 주는 탄소원과 질소원, Oxalic acid의 농도별 β 1,3/1,6-glucan의 생산량에 대한 실험을 RSM(response surface method)를 이용하여 실험을 계획하였다. 실험은 중심합성계획법(Central composite design)을 이용하였으며, 프로그램으로 SAS program 9.1을 이용하였다.
- 실험은 앞서 진행한 최적화 data를 기초로 하여 총 3개의 factor(x_1 , Sucrose; x_2 , KNO_3 ; x_3 , Oxalic acid)와 3개의 level로 진행하였고, 반응변수 Y 값(Y_1 , total polymer; Y_2 , beta-glucan; Y_3 , DCW(dry cell weight))은 총 3개 측정하였다. 또한 실험의 오차를 줄이기 위하여 중심점을 4개로

하여 실험계획을 실시하였다.

- 독립변수의 범위를 (-2, -1, 0, 1, 2)로 하여 실험계획을 작성하였으며, 배지성분은 선행된 실험의 결과를 기초로 하여 실험구의 측정 농도를 선정하였다. 또한 아래의 코드값 변환식[식 1~3]과 같이 변수변환을 하여 x_1 , x_2 , x_3 값을 결정하였다.

$$x_1 = \frac{\text{Sucrose} - 3}{2} \quad [\text{식 1}]$$

$$x_2 = \frac{\text{KNO}_3 - 0.3}{0.2} \quad [\text{식 2}]$$

$$x_3 = \frac{\text{Oxalic acid} - 0.05}{0.04} \quad [\text{식 3}]$$

- 실험구 이외의 배지 성분은 일반 *A. pullulans* 배양배지의 성분을 동일량 적용하여 사용하였으며, 실제 배지 성분의 실험구별 함량은 Table 4에 따라 적용하였다. 모든 실험구는 120시간동안 150 rpm, 30°C에서 배양하였으며, 분석방법은 3.11의 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.
- 최적화를 위하여 이미 선행된 실험의 결과들을 토대로 하여 온도에 따른 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 조사하였다. 배양 조건의 최적화를 위한 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% Sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30°C에서 72시간동안 200rpm에서 배양 하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml을 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90시간동안 배양하였다. 우선 온도에 따른 영향으로는 RSM 분석결과를 토대로 하여 배양 온도를 다르게 하여(25°C, 30°C, 37°C) 실험을 실시하였으며, RSM을 통한 결과를 기본으로 하여 배지를 만들어 멸균한 후 종균의 전 배양액을 10%(v/v) 농도로 접종하고 각 실험 온도에서 120시간동안 150rpm으로 진탕배양 후 각 온도에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 이외의 배지 첨가 성분은 모두 *A. pullulans* 배양 배지인 Czapek 배지조성을 동일하게 첨가하였다. 모든 실험구는 120시간동안 150rpm, 30°C에서 배양하였으며, 분석방법은 3.11의 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.

(2) 실험 결과

- 상기 실험에서 선정된 탄소원과 질소원 그리고 Oxalic acid의 농도를 독립변수로 하여 이들 변수 간의 농도에 대한 β 1,3/1,6-glucan의 생산성 최대화를 위하여 반응 표면 분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하여 배지에서의 탄소원과 질소원 그리고 Oxalic acid의 농도를 최적화시키 고자 하였다. Table 6에 따라서 3개의 factor에 대한 2개의 level로 실험을 계획하였고, 4개의 중심점 반복 실험을 포함하여 18개의 실험구로 실험을 진행하였다. 실험계획은 적은 실험 횟수로 각각의 독립변수에 대하여 실험을 진행할 수 있는 장점을 지니고 있으며, 그 결과를 이용하여 2차 다항회귀모형을 적합시키는데 적절하게 이용할 수 있다.
- 실험 결과는 SAS(Statistical Analysis System) 9.1 program을 이용하여 통계학적으로 분석되어 종속변수 즉 β 1,3/1,6-glucan 생산량에 대한 회귀방정식을 얻었으며, 회귀방정식으로부터 얻어진 반응조건에 대한 영향 및 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산을 위한 최적 농도 값을 예측하였다. Table 31은 반응표면 분석 디자인과 디자인에 따른 실험 결과값을 나타내고 있으며, β 1,3/1,6-glucan 생산에 대한 2차 회귀방정식은 Table 33과 같다.

Table 31. Code and experimental conditions for the central composite design

Factor	Symbol	Coded values				
		-2	-1	0	1	2
C-source (%, v/v)	x_1	1	2	3	4	5
N-source (%, v/v)	x_2	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
oxalic acid (%, v/v)	x_3	0.01	0.03	0.05	0.07	0.09

Table 32. The actual constitution of culture medium for RSM(response surface method)

	Sucrose	KNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	KCl	FeSO ₄	Oxalic
1	4	0.4	0.2	0.1	0.1	0.002	0.06
2	4	0.4	0.2	0.1	0.1	0.002	0.14
3	4	0.8	0.2	0.1	0.1	0.002	0.06
4	4	0.8	0.2	0.1	0.1	0.002	0.14
5	8	0.4	0.2	0.1	0.1	0.002	0.06
6	8	0.4	0.2	0.1	0.1	0.002	0.14
7	8	0.8	0.2	0.1	0.1	0.002	0.06
8	8	0.8	0.2	0.1	0.1	0.002	0.14
9	2	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
10	10	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
11	6	0.2	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
12	6	1.0	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
13	6	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.02
14	6	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.18
15	6	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
16	6	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
17	6	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1
18	6	0.6	0.2	0.1	0.1	0.002	0.1

○ 그리고 이들 결과값에 대한 분산분석 결과(ANOVA)는 Table 35에 나타나 있으며, 분산 분석 결과 전체 모형에 대한 유의확률($p > F$)은 0.05보다 작으면 가정된 모형반응이 자료에 적합하여 유의성이 있다 할 수 있으며, 실험의 결과값이 1차와 2차 곡선 모두 0.05보다 작으므로 상당히 유의성을 지니고 있다고 할 수 있다(Table 35(a)). 또한, 여기에서 결정계수(R-square)는 가정된 모형이 얼마나 잘 적합 되는지를 수량화한 통계량으로 결과에서 91.61%로 100%에 가까운 매우 높은 수치를 보였으며 이를 통하여 가정된 반응 모형이 자료에 잘 적합 됨을 알 수 있다. 변동계수(CV)는 반응변수의 평균값(Response Mean)에 대한 오차제곱합의 제곱근(Root MSE)값을 나타낸다(Table 35(b)).

Table 33. Central composite design and experimental results.

RUN	Variable levels			Response
	X_1	X_2	X_3	y
1	-1	-1	-1	0.73
2	-1	-1	1	0.96
3	-1	1	-1	0.94
4	-1	1	1	0.995
5	1	-1	-1	1.68
6	1	-1	1	1.41
7	1	1	-1	1.48
8	1	1	1	1.1
9	-2	0	0	0.77
10	2	0	0	1.48
11	0	-2	0	1.52
12	0	2	0	1.01
13	0	0	-2	1.22
14	0	0	2	1.12
15	0	0	0	1.82
16	0	0	0	1.8
17	0	0	0	1.76
18	0	0	0	1.77

Table 34. Polynomial equations calculated by RSM program for β 1,3/1,6-glucan productivity.

Predictive Model for GLUCAN

Coded Levels(-1,1):

$$\begin{aligned} \text{GLUCAN} = & 1.740833 + 0.216563*\text{SUCROSE} - 0.080312*\text{KNO3} - 0.035312*\text{OXALIC} \\ & - 0.177292*\text{SUCROSE}*\text{SUCROSE} - 0.094375*\text{SUCROSE}*\text{KNO3} \\ & - 0.116875*\text{SUCROSE}*\text{OXALIC} - 0.142292*\text{KNO3}*\text{KNO3} - 0.035625*\text{KNO3}*\text{OXALIC} \\ & - 0.166042*\text{OXALIC}*\text{OXALIC} \end{aligned}$$

Uncoded Levels:

$$\begin{aligned} \text{GLUCAN} = & 1.740833 + 0.216563*\text{SUCROSE} - 0.080312*\text{KNO3} - 0.035312*\text{OXALIC} \\ & - 0.177292*\text{SUCROSE}*\text{SUCROSE} - 0.094375*\text{SUCROSE}*\text{KNO3} \\ & - 0.116875*\text{SUCROSE}*\text{OXALIC} - 0.142292*\text{KNO3}*\text{KNO3} - 0.035625*\text{KNO3}*\text{OXALIC} \\ & - 0.166042*\text{OXALIC}*\text{OXALIC} \end{aligned}$$

Table 35. Result of ANOVA(Analysis of variance) for RSM.

- a) ANOVA(Analysis of variance) for response of dependent variables, b) R-square value for response of dependent variables c) Table Eigenvalues by RSM

a)

ANOVA for GLUCAN

Source	DF	Master Model				Predictive Model				
		SS	MS	F	Pr > F	DF	SS	MS	F	Pr > F
SUCROSE	1	0.750389	0.750389	30.75176	0.000544	1	0.750389	0.750389	30.75176	0.000544
KNO3	1	0.103202	0.103202	4.229313	0.073757	1	0.103202	0.103202	4.229313	0.073757
OXALIC	1	0.019952	0.019952	0.817637	0.392287	1	0.019952	0.019952	0.817637	0.392287
SUCROSE*SUCROSE	1	0.685796	0.685796	28.10469	0.000727	1	0.685796	0.685796	28.10469	0.000727
SUCROSE*KNO3	1	0.071253	0.071253	2.920031	0.125863	1	0.071253	0.071253	2.920031	0.125863
SUCROSE*OXALIC	1	0.109278	0.109278	4.478337	0.067221	1	0.109278	0.109278	4.478337	0.067221
KNO3*KNO3	1	0.441751	0.441751	18.10344	0.002781	1	0.441751	0.441751	18.10344	0.002781
KNO3*OXALIC	1	0.010153	0.010153	0.416086	0.536952	1	0.010153	0.010153	0.416086	0.536952
OXALIC*OXALIC	1	0.601524	0.601524	24.6511	0.0011	1	0.601524	0.601524	24.6511	0.0011
Model	9	2.132801	0.236978	9.71161	0.001951	9	2.132801	0.236978	9.71161	0.001951
(Linear)	3	0.873542	0.291181	11.9329	0.002531	3	0.873542	0.291181	11.9329	0.002531
(Quadratic)	3	1.068574	0.356191	14.59711	0.001311	3	1.068574	0.356191	14.59711	0.001311
(Cross Product)	3	0.190684	0.063561	2.604818	0.124058	3	0.190684	0.063561	2.604818	0.124058
Error	8	0.195212	0.024401			8	0.195212	0.024401		
(Lack of fit)	5	0.192937	0.038587	50.88448	0.004227	5	0.192937	0.038587	50.88448	0.004227
(Pure Error)	3	0.002275	0.000758			3	0.002275	0.000758		
Total	17	2.328012				17	2.328012			

b)

Fit Statistics for GLUCAN

	Master Model	Predictive Model
Mean	1.309167	1.309167
R-square	91.61%	91.61%
Adj. R-square	82.18%	82.18%
RMSE	0.15621	0.15621
CV	11.932	11.932

c)

Canonical Analysis: Eigenvectors for GLUCAN

Eigenvalues	SUCROSE	KNO3	OXALIC
-0.09964	-0.68619	0.57095	0.45074
-0.13491	0.14612	0.71519	-0.68348
-0.25107	0.71260	0.40313	0.57418

Table 36. Stationary point by canonical analysis and Predicted response value.

Canonical Analysis: Stationary point for GLUCAN

Stationary point:	Critical value is a Maximum
Predicted response at stationary point:	1.86217
Standard error of predicted value:	0.075531

Table 37. Critical value by canonical analysis.

Canonical Analysis: Critical value for GLUCAN

Factor Name	Coded	Uncoded
SUCROSE	0.86775	0.86775
KNO3	-0.52549	-0.52549
OXALIC	-0.35536	-0.35536

- 또한 결과값에서 t-value는 해당 변수를 0으로 놓을 수 있는지에 대한 검정 통계량으로 유의확률이 0.05보다 큰 값에 대한 회귀식은 모두 기각되었다. Table 37는 추출수율에 대한 정준분석 결과로 critical value는 정상점의 좌표이며, 정준분석 결과의 고유값(eigenvalues)이 모두 음수이면 최대점을 나타낸다. Table 35(c)에서 모두 음수값을 나타내었고, 이때의 결과값으로 1.86217은 최대 β 1,3/1,6-glucan 생산량을 나타낸다(Table 37). Fig. 17은 β 1,3/1,6-glucan 생산량에 대한 등고선을 나타내며, Figure 41는 각 변수에 대한 β 1,3/1,6-glucan의 생산량에 대한 반응 표면의 3차원도이다.

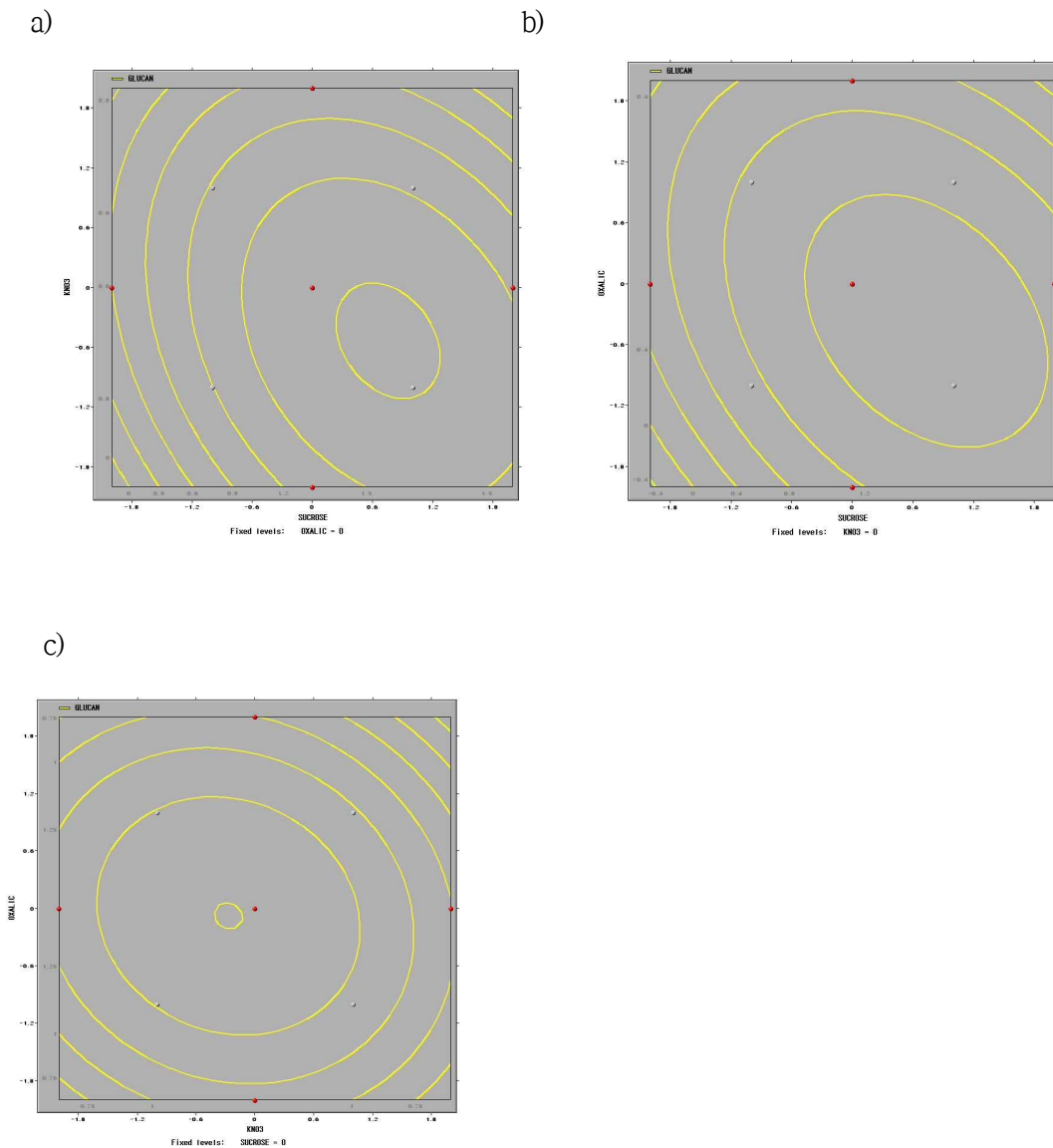
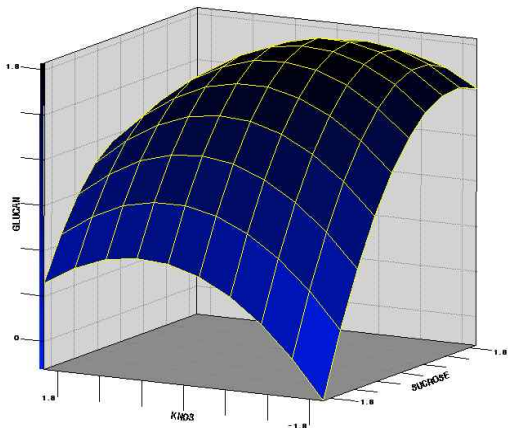


Fig. 41. Contour plots of β 1,3/1,6-glucan productivity.

- a) beta-glucan productivity by sucrose and KNO_3 concentration, b) beta-glucan productivity by oxalic acid and sucrose concentration, c) beta-glucan productivity by KNO_3 and oxalic acid concentration

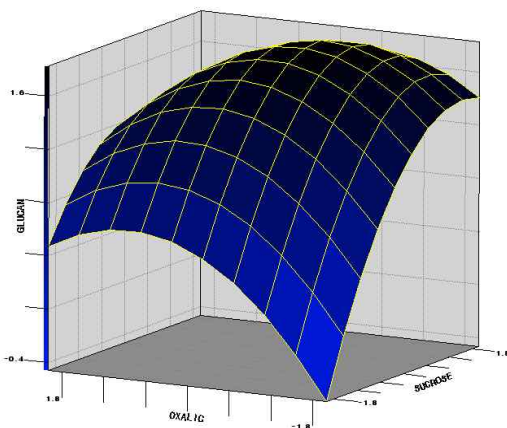
○ 각 변수에 대한 β 1,3/1,6-glucan 생산성 증진을 위한 최적값은 분석결과를 통하여 얻은 critical value(x_1, x_2, x_3) 값(Table 37)을 3.10.2의 변환식에 적용하였고, 그 결과 β 1,3/1,6-glucan의 최대 생산을 위한 탄소원과 질소원, 그리고 oxalic acid의 농도로써, 4.74% sucrose, 0.19% KNO_3 , 0.036% oxalic acid 값이 예측되었으며, 이때의 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량은 1.86217 g/L로 예측되었다.

a)



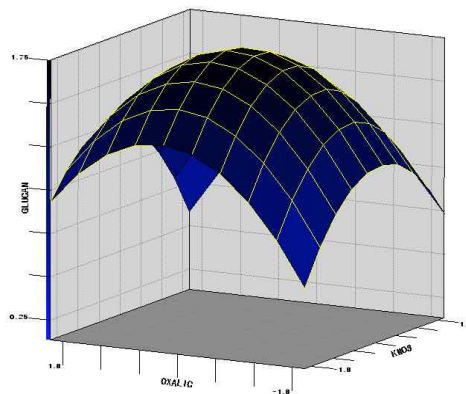
Fixed levels: OXALIC = 0

b)



Fixed levels: KNO3 = 0

c)



Fixed levels: SUCROSE = 0

Fig. 42 Response surface plots for β 1,3/1,6-glucan productivity

a) beta-glucan productivity by sucrose and KNO_3 concentration, b) beta-glucan productivity by oxalic acid and sucrose concentration, c) beta-glucan productivity by KNO_3 and oxalic acid concentration

마. 물리적 요인에 의한 β -1,3/1,6 glucan 생산 공정 개발

(1) 실험 방법

(가) 온도에 의한 영향

- 일반적으로 *Aureobasidium pullulans*의 균주를 이용한 다당류 생산의 증가를 위한 연구의 방법으로는 탄소원의 종류 및 농도, 질소원의 종류 및 농도, 탄소원과 질소원의 비율농도, 배지의 초기 pH와 pH 조절, 산소공급의 영향 등이 있다. 그러나 이러한 연구의 내용을 살펴보면 다당류의 생산량 증가를 위한 최적 온도에 대한 연구는 일반적으로 이루어지지 않고 있다. 이미 선행된 연구들의 결과를 보면 *Aureobasidium pullulans*의 균주 배양온도로 알려진 25-30°C에서 배양이 이루어지며, *Aureobasidium* 속 균주들의 배양온도를 그대로 적용하여 최적화를 수행하고 있다. 따라서 KSY-0516 균주로부터 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 가져오는 최적 온도를 찾기 위한 실험이 필요하다.
- 따라서 최적화를 위하여 이미 선행된 실험의 결과들을 토대로 하여 온도에 따른 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 조사하였다. 배양 조건의 최적화를 위한 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% Sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 30°C에서 72시간동안 200rpm에서 배양 하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml을 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90시간동안 배양하였다. 우선 온도에 따른 영향으로는 RSM 분석결과를 토대로 하여 배양 온도를 다르게 하여(25°C, 30°C, 37°C) 실험을 실시하였으며, RSM을 통한 결과를 기본으로 하여 배지를 만들어 멸균한 후 종균의 전 배양액을 10%(v/v) 농도로 접종하고 각 실험 온도에서 120시간동안 150 rpm으로 진탕배양 후 각 온도에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 이외의 배지 첨가 성분은 모두 *A. pullulans* KSY-0516 배양 배지인 Czapek 배지조성을 동일하게 첨가하였다. 모든 실험구는 120시간동안 150 rpm, 30°C에서 배양하였으며, 분석방법은 3.11의 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.

(나) pH에 의한 영향

- *A. pullulans*는 균주에 따라 세포의 성장과 다당류 생산에 대한 최적의 pH가 각각 다르다. McNeil은 pullulan과 세포 성장에 최적의 pH를 4.5라고 보고하였으며, Simon은 pH 5에서 가장 좋은 결과를 얻었다. 그러나 현재까지 β 1,3/1,6-glucan을 생산하기 위한 최적의 pH에 대한 연구 결과는 많이 발표되어 있지 않으며, 국내에서는 (주)글루칸에서 pH 5에서 가장 좋은 결과를 얻었다고 연구결과를 발표하였다. *A. pullulans*는 효모나 균사체와 같은 형태로 성장하다가

chlamydo spores를 형성하게 되는데 이때, pH는 효모형태의 세포의 비율에 영향을 주게 된다. 즉 pH가 올라가면 효모형태의 세포의 비율이 높아지고, 반대의 경우 균사체 형태의 세포 비율이 증가하게 된다. 이것에 대한 연구로는 Seviour가 pH 2.5에서는 다당류의 생산이 매우 부진한 반면, pH를 높였을 경우는 생산에 영향을 주지 않는다고 밝히고 있으며, pH 2.5에선 세포의 형태가 균사체이지만 pH 6.5에서는 효모형태의 세포가 지배적임을 관찰하였다.^(27,54) 또한 Heald 등은 배양액의 pH 조절에 대한 실험을 진행하였으며, Seviour와 같은 결과를 도출하였고, 최근에는 pH 조절을 통하여 pullulan의 분자량에도 큰 영향을 미친다고 보고된 바 있다. 따라서 효모 형태의 세포에서 다당류가 주로 생산됨이 밝혀져 있기 때문에 다당류의 생산에 있어서 최적의 pH를 밝히는 일이 무엇보다도 중요하다.

- 최적화를 위하여 이미 선행된 실험의 결과들을 토대로 하여 pH에 따른 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 조사하였다. 배양 조건의 최적화를 위한 1차 종균은 glycerol stock으로부터 100 μ l를 취하여 5 ml의 5% Sucrose 함유 Czapek 배지에 접종하여 25°C에서 72시간동안 200rpm에서 배양 하였다. 2차 종균 배양은 1차 종균의 배양액으로부터 2 ml을 취하여 18 ml의 동일한 배지에 접종하여 1차 종균과 같은 조건에서 90시간동안 배양하였다. RSM 분석결과를 토대로 하여 배양 초기 pH를 다르게 하여(2.5~8.5) 실험을 실시하였으며, 배양온도 또한 선행된 연구 결과를 토대로 25°C에서 배양을 실시하였다. RSM을 통한 결과를 기본으로 하여 배지를 만들어 멸균한 후 종균의 전 배양액을 10%(v/v) 농도로 접종하고 25°C에서 120시간동안 150 rpm으로 진탕배양 후 각 pH에 따른 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 이외의 배지 첨가 성분은 모두 *A. pullulans* 배양 배지인 Czapek 배지조성을 동일하게 첨가하였다. 모든 실험구는 120시간동안 150 rpm, 25°C에서 배양하였으며, 분석방법은 3.11의 방법을 기초로 하여 3회 반복 측정하였다.

(2) 실험 결과

(가) 온도에 의한 영향

- β 1,3/1,6-glucan 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 25°C, 30°C, 37°C의 온도에서 최적화된 배지를 사용하여 균을 배양한 후 균체의 세포성장과 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 측정하였다. 현재까지 알려진 *A. pullulans*의 최적 배양온도는 일반적으로 25°C와 30°C로 알려져 있으며, 특별하게 배양 온도에 대한 연구가 이루어져 있지는 않았다. 따라서 실험을 통한 결과는 Fig. 43과 같으며, 결과적으로 β 1,3/1,6-glucan의 생산량은 모균주의 배양온도인 25°C와 30°C에서 가장 높은 2.1 g/L와 1.82 g/L로 생산되었고, 특히 25°C에서 가장 높은 생산량을 보였다. 모든 실험구의 최종 pH는 4.0~4.7로 나타났으며, 세포성장은 25°C보다 30°C에서 더 높은 성장률을 보였다.

- 25°C에서 배양한 결과 세포성장은 30°C보다 낮게 나타났으나, 주목적인 β 1,3/1,6-glucan의 생산량에서는 약 0.3 g/L 더 많은 생산량을 보였으며 점성면에서도 높은 점성을 확인할 수 있었다. 따라서 β 1,3/1,6-glucan의 생산에 최적의 온도가 25°C임을 확인할 수 있었다. 또한 앞선 반응 표면분석법에 의한 예측값으로 30°C에서 배양한 결과 β 1,3/1,6-glucan의 생산량은 1.86217 g/L로 예측되었으며, 30°C에서 액체 배양한 β 1,3/1,6-glucan의 함량이 1.82667 g/L로써 앞선 반응 표면분석의 예측값과 실제 배양을 통한 측정값이 상당히 유효성을 지님을 확인할 수 있었다.

(나) pH에 의한 영향

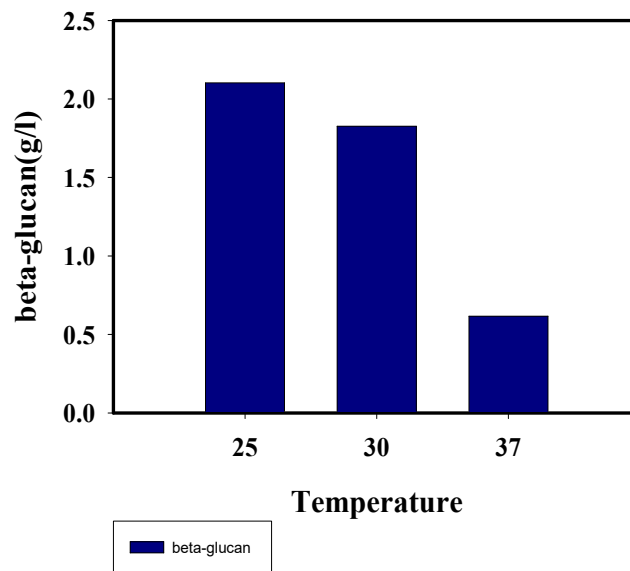
- 각 배양액의 초기 pH를 달리하여 *Aureobasidium pullulans*의 균체 성장 및 β 1,3/1,6-glucan 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 44). 5일간 배양한 결과, 초기 pH 3.5에서 3.07 g/L의 최대 β 1,3/1,6-glucan의 생산량을 보였다. 또한 최대 균체 생산은 pH 8.5에서 1.56 g/L로 가장 높은 생산량을 보였으며, pH 3.5에서도 다음으로 많은 양의 균체 성장을 보였다. McNeil에 따르면 *A. pullulans*는 성장 중 여러 번의 형태변화를 가지며, 효모형과 균사형으로 나타나는데, 즉, pH가 올라가면 효모형태 세포의 비율이 높아지고, 반대로 pH가 내려가면 균사체 형태의 세포의 비가 높아지게 된다. 또한 Seviour는 pH 2.5에서 다당류의 생산이 부진한 반면 pH를 높였을 경우 생산에 영향을 주지 않는다고 밝혔으며, pH 2.5에서는 세포의 형태가 균사체이지만, pH 6.5에서는 효모의 형태가 지배적임을 확인하였다. 따라서 실험을 한 결과 초기 pH가 2.5인 경우에는 세포의 성장이 심한 저해를 받아서 가장 적은양의 β 1,3/1,6-glucan과 세포성장을 보였으며, pH 5.5 ~ 8.5까지는 거의 변동이 없이 유사한 결과값을 보였다. 그러나 초기 pH가 3.5와 4.5인 경우 높은 수치의 β 1,3/1,6-glucan이 생산됨을 확인하였으며, 이전까지의 실험을 통한 β 1,3/1,6-glucan의 생산량보다 초기 pH를 3.5로 하여 배양한 결과 약 33% 생산량이 증가함을 확인하였다.

(다) 물리적인 요인인 O₂ tension의 조절을 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산성 증진

- 배지조성 및 이화학적 부분의 최적화 수행 후 물리적인 요인들 중 O₂ tension의 조절을 이용하여 변이주 KSY-0516의 β 1,3/1,6-glucan 생산성 증진을 위한 실험 수행하였다. 앞서 조사한 결과에 따르면 *A. pullulans*을 이용한 exopolysaccharide의 생산 시 O₂ tension에 의하여 생산량에 많은 변화가 발생한다는 보고가 나와 있었으며, 그에 따라 O₂의 조절을 통하여 β 1,3/1,6-glucan의 생산량 증진을 도모하기 위하여 실험을 실시하였다. 변이주 KSY-0516을 이용하여 Carbon source의 농도를 30 g/L로 고정하여 5L batch culture를 실시하였으며, 140 시간동안 culture를 하였다. 모두 동일한 조건하에 실시하였으며, 실험결과 Fig. 45와 Table 11.에서와 같이 변이주는 pullulan을 생산하지 않았으며, 500 rpm에서 모균주의 생산량보다 약 2.3배 높은

9.4 g/L의 최대 β 1,3/1,6-glucon을 생산하였음을 확인하였다. 따라서 O_2 tension의 조절을 통하여 선행된 연구결과에 따라 생산량이 증가함을 확인하였고, 기존의 변이주의 생산량보다 많은 양을 증가시키는 결과를 얻게 되었다.

a)



b)

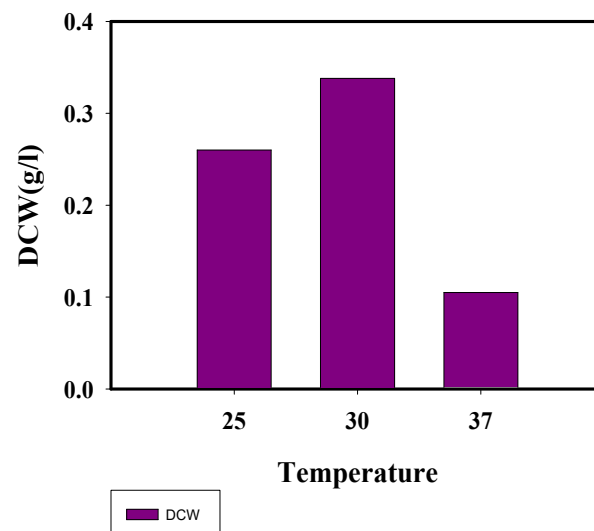
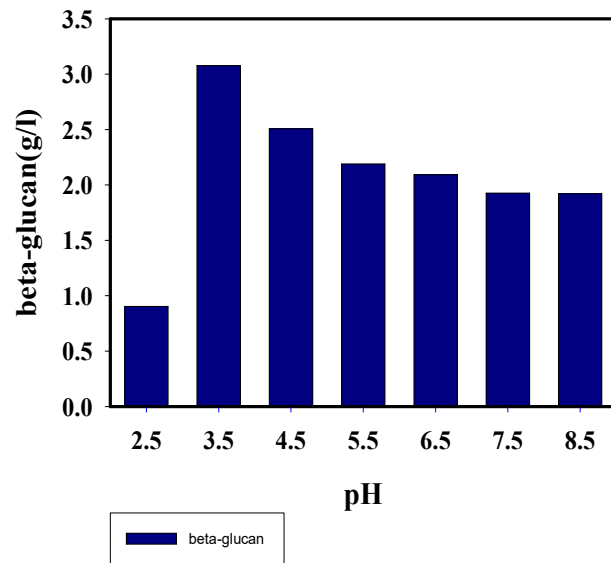


Fig. 43. β 1,3/1,6-glucon productivity and DCW by variation of culture temperature in KSY-0516

a)



b)

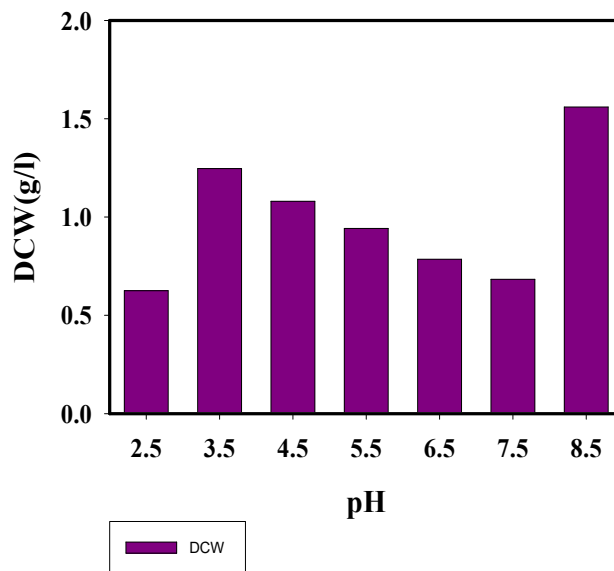
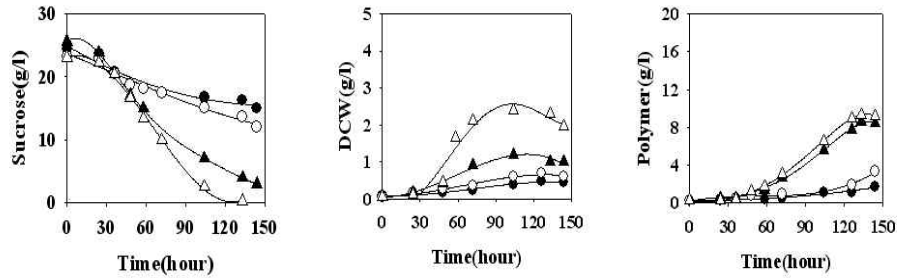


Fig. 44. β 1,3/1,6-glucan productivity and DCW by variation of initial pH in KSY-0516



Condition (rpm)	Description	$Y_{x/suc}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glucan/suc}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glucan/x}$ (g g ⁻¹)	P (g l ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	q_{suc} (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_{glucan} (g g ⁻¹ h ⁻¹)
150	<i>Apullulan</i>	0.043	0.151	3.50	1.7	0.015	0.349	0.053
250	<i>Apullulan</i>	0.058	0.277	4.77	3.4	0.021	0.362	0.100
350	<i>Apullulan</i>	0.051	0.367	7.24	8.5	0.024	0.471	0.174
500	<i>Apullulan</i>	0.104	0.399	3.84	9.4	0.032	0.308	0.123

Fig. 45. Change of fermentation products owing to difference of agitation.

Change of sucrose concentration, dry cell weight (DCW) and total exopolysaccharides in 5L batch cultures of KSY-0516 (150 rpm, closed circle; 250 rpm, open circle; 350 rpm, closed triangle; 500 rpm, open triangle). Cell cultures in 30 g·l⁻¹ sucrose to 140 h were harvested every 24 h, and supernatants were used in polysaccharides assays.

2. β 1,3/1,6-glucan 생산을 위한 scale-up 및 후처리 공정 확립

가. β 1,3/1,6-glucan 생산을 위한 scale-up

(1) 5 톤 발효조를 이용한 scale-up

- 실험실 스케일에서 최적화된 β 1,3/1,6-glucan 생산 조건에 따라 *A. pullulans* KSY-0516 유래 β 1,3/1,6-glucan의 산업적 생산을 위해 5 ton 규모의 발효조를 이용하여 β 1,3/1,6-glucan의 scale-up을 수행하였다. 5 ton 규모의 발효조를 이용한 스케일 업은 Fig. 46과 같이 5 L 종배양을 시작으로 50 L - 500 L - 5,000 L의 순서로 배양을 수행하였다, 각각의 종배양은 48 시간으로 하고 최종 5톤 규모의 본 생산에서는 72 시간 동안 발효를 수행하였다. 배지의 조성은 하기의 표와 같이 기본적인 최소 배지와 본 연구사업을 통해 최적화된 배지 조성을 사용하였다.

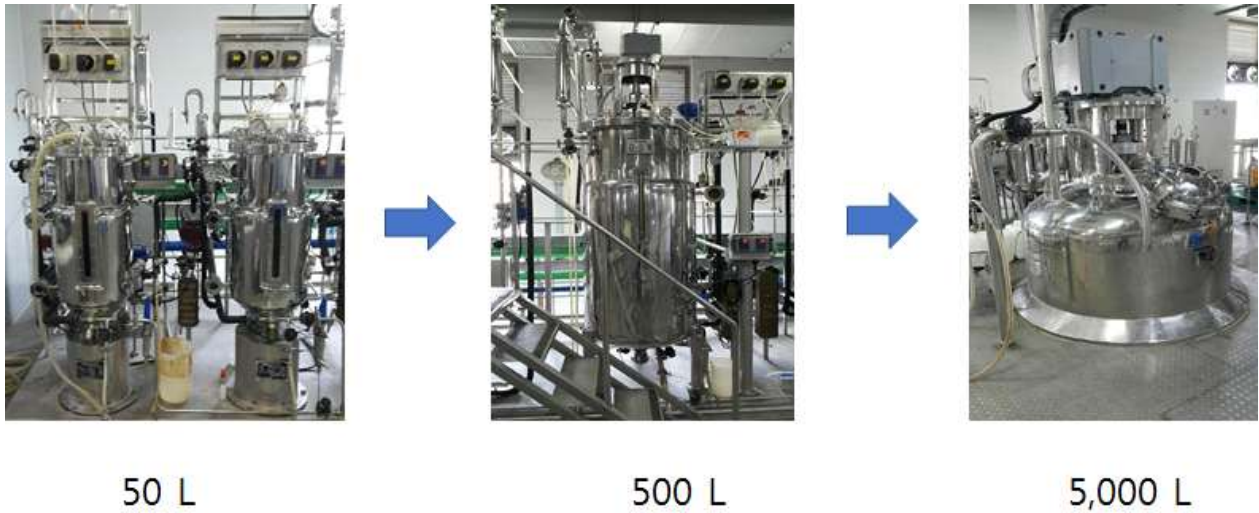


Fig. 46 Scheme for mass production of β 1,3/1,6-glucan

표 38. *A. pullulans* KSY-0516 seed culture용 생산배지 조성표

NaNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	KCl	FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sucrose
3 g/L	1 g/L	0.5 g/L	0.5 g/L	0.01 g/L	30 g/L

표 39. *A. pullulans*로부터 β 1,3/1,6-glucan 생산용 배지 조성표

KNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	KCl	Oxalic acid	Sucrose
40 g/L	20 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	30 g/L

- 본 배양의 5 ton 급 회분배양은 β 1,3/1,6-glucan 생산을 위하여 수행되었으며, β 1,3/1,6-glucan의 함량은 최대 4.5 g/L 까지 생산되었으며, 이는 Lab scale에서의 생산량과 유사한 함량인 것으로 나타났다. 따라서 *A. pullulans* KSY-0516 유래 β 1,3/1,6-glucan의 산업적 생산의 경우, fed-batch 등의 방법을 통해 고농도 배양 또한 가능할 것으로 판단되며, 향후, 가격 경쟁력 면에서도 우수할 것으로 예상된다.

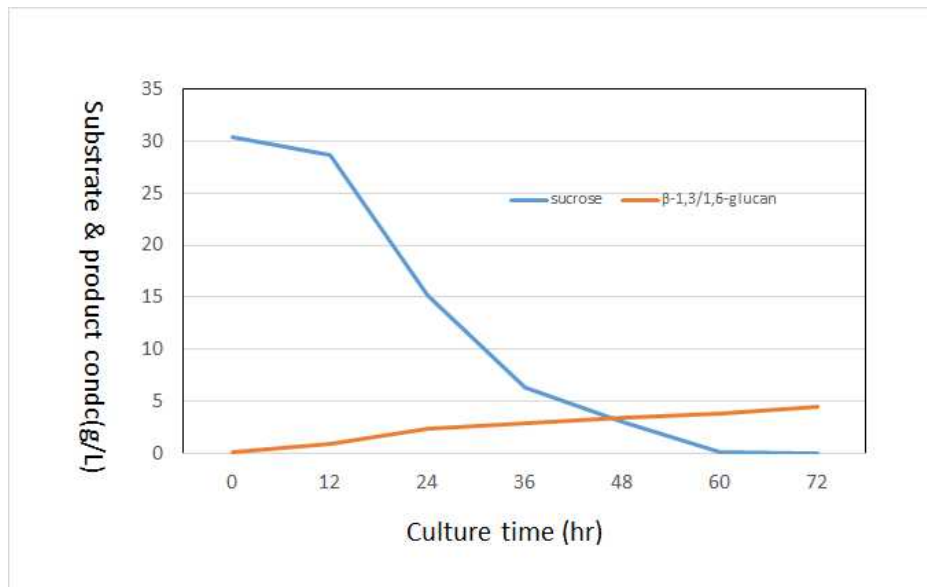


Fig. 47 Batch fermentation patterns of *A. pullulans* KSY-0516 in a 5,000 L pilot fermenter.

나. β 1,3/1,6-glucan 생산을 위한 후처리 공정

- 실험실 스케일에서 최적화된 β 1,3/1,6-glucan 분리 정제 조건에 따라 하기 Fig. 48과 같은 공정을 통해 β 1,3/1,6-glucan을 정제하였다.

β 1,3/1,6-glucan production by *Aureobasidium pullulans*

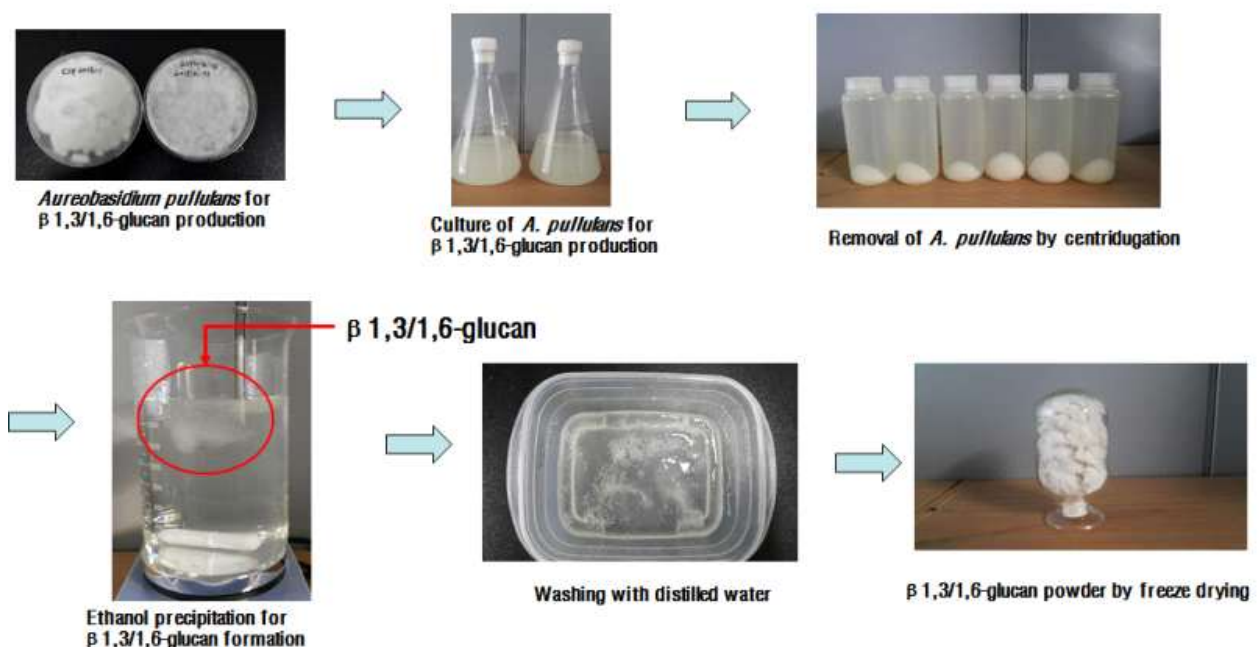


Fig. 48 β 1,3/1,6-glucan production by *A. pullulans* KSY-0516 in Lab scale.

- 5 톤 규모의 발효조에서 생산된 β 1,3/1,6-glucan을 상기 Lab scale에서 수행한 방법에 따라 분리, 정제 공정의 개선과 분말화, 액상화 등의 소재 제형화를 수행하였다.

■ 1차 원심분리

- 연속식 원심분리기 및 필터프레스를 사용하여 β 1,3/1,6-glucan 배양액 균체를 제거하였다.



< 연속식 원심분리기 >



< 필터프레스 >

■ 에탄올 침지

- β 1,3/1,6-glucan 배양액 : 에탄올 = 1 : 1 (v:v) 비율로 에탄올침지를 시행하였다.



< 에탄올 침지 시행 전 >



< 에탄올 침지 시행 후 >

■ 2차 분리 정제

- 에탄올 침지 3시간 후 용해도 차이에 의해 분리된 β 1,3/1,6-glucan을 회수하여 증류수로 washing 하여 남아있는 에탄올을 제거하였다.



< 2차 분리 정제 전 >



< 2차 분리 정제 후 >

- 2차 분리정제 작업을 한 후 회수된 β 1,3/1,6-glucan은 동결건조를 통해 분말화를 시켰다. 500 L 급 발효기에서 *A. pullulans* 변이균주 KSY-0516으로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 시제품을 하기와 같이 생산하였다.



Fig. 49 Freeze drying of β 1,3/1,6-glucan by Freeze dryer



Fi

Fig. 50 powder form of β 1,3/1,6-glucan produced by *A. pullulans* KSY-0516

6. Toll-like receptor 2 & 4 기반 면역 증강용 유산균 대량 생산 공정 개발

가. 발효식품으로부터 유산균 확보 및 동정 확인

(1) 실험 방법

(가) 발효식품으로부터 유산균 확보

- 전국 각지에서 여러 종류의 김치 및 기타 전통 발효식품 등의 시료를 수집하고 밀봉하여 냉장 운반하였다. 수집 후, 24 시간 이내에 멸균된 생리식염수로써 10 배수로 연속 희석한 시료 100 μ l를 항진균제인 nystatin을 함유한 MRS, TSY, TES, LBS 등의 배지에 희석한 도말하여 균체가 나타날 때까지 30 $^{\circ}$ C 항온기에서 배양하였다. 유산균의 형태학적 특성에 근거하여 일차적으로 유산균을 분리하였다.

(나) 균주의 동정

- Bergey's Manual of Determinative bacteriology의 방법에 따라 생화학적 특성 및 최적 생육온도, 그람염색, 운동성, catalase test, CO₂생성 유무를 확인하여 기존 유산균의 생화학적 특성과 비교, 분석하였다[10]. 또한 유산균으로 확인된 분리 균주의 1차 동정을 위하여 각각의 균주를 MRS 배지에서 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, API 50 CHL kit(Biomerieux, Lyan, France)를 이용하여 탄수화물의 발효양상을 분석하고, 이를 API LAB Plus Software version 4.0 database에 활용하여 1차적으로 동정하였다. 또한 분리 균주는 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 최종적으로 동정하였다. Genomic DNA는 Walter 등의 방법[26]에 따라 분리하였으며, primers로는 27F Primer(AGAGTTTGATCM TGGCTCAG)와 1492R Primer(TACGGYT ACCTTGTTACGACTT)를 사용하였고, PCR조건은 initial denaturation 5분, 그리고 94°C에서 45초간 denaturation, 55°C에서 60초간 annealing 및 72°C에서 60초간 extension의 cycle을 35회 하였다. 16S rRNA 염기서열 확인은 외부기관에 의뢰하여 확인하였다

Seeding in MRS media (pH 6.8 ~ 7.0) overnight to the conc. of $10^9 \sim 10^{10}$ cell/ml

↓

Twice washing with DW after centrifuging at 10,000 rpm for 5 min.

↓

Suspending the pellet in same volume of DW

↓

Mixing 200 μ l of seed with 100 μ l of sterilized HCl (pH 2.0) to adjust pH 2.5

↓

Gently shaking incubation at 37 °C for 2 hr

↓

Adding 900 μ l of saline into the mixture

↓

Plating on BCP plate count agar by ten fold dilution with saline

↓

Incubation at 37 °C for 48 hr

↓

Observing the viable LAB as yellow color colonies

* Dilution Fold : 60

Overall procedure for determination of acid-tolerance of lactic acid bacteria isolates.

(2) 실험 결과

- 김치 시료는 수집 후, 즉시 냉장 보관하였고, 24 시간 이내에 0.85% 생리식염수로 10 배수씩 단계 희석한 후 0.1 ml 씩 각 배지에 도말 하였다. 김치로부터 젖산균을 분리하기 위하여 Table 1 의 MRS, PES, HHD, LBS 배지를, dextran 생산 균주를 분리하기 위해서는 MRS에 sucrose를 첨가한 배지와 PES 배지를 사용하였다. PES 배지의 경우 20°C 에서 5 일간, sucrose가 첨가된 MRS 배지와 HHD 배지는 30°C 에서 3 일간 배양하여 dextran을 형성하는 젖산균 중 dextran 생성 상태와 colony 형태가 서로 다른 균주들을 선택하여 순수 분리하였다. 또한 김치 부재료 채소들에 멸균 증류수를 동량 첨가하여 Osterizer blender로 마쇄한 후 0.85% 식염수에 10 배수로 희석하고 0.1 ml 씩 각 배지에 도말하였다. 30°C 에서 3일간 배양한 후 colony 형태가 다른 균주를 중심으로 순수 분리하였다. 김치 부재료로 사용되는 생강, 파, 홍당무, 열무, 부추, 마늘로 부터 젖산균을 분리하기 위하여 다양한 젖산균의 생육에 적당한 TSY 배지를 사용하고 pH를 달리하여 colony의 형태가 서로 다른 균주를 선택하여 단일 균주로 분리하였다.
- pH 4.0, 4.5, 4.8, 5.5 조건의 TSY 배지에서 생강으로부터 총 12 주, 파로부터 20 주, 마늘에서 22 주 등의 총 105 주의 젖산균을 분리하였다 (표 4). 맛김치, 열무김치, 포기김치, 총각김치, 백김치 등의 다양한 김치를 공장과 가정에서 수집하거나 직접 제조하여 TSY, MRS, LUSM, 김치추출물 배지를 pH 4.5와 5.5로 조정하고 각각의 시료로부터 젖산균을 분리하여 맛김치로부터 64 균주, 열무김치에서 26 균주, 포기김치에서 36 균주, 총각김치에서 46 균주, 백김치에서 40 균주 등 총 212 균주를 분리하였으며 (표 5) 김치 발효 온도를 5°C, 10°C, 15°C, 20°C로 달리하면서 발효 시간대별로 젖산균을 분리하여 총 600주를 분리하였다. 김치 및 김치 부재료로부터 분리한 젖산균은 MRS 고체배지에서 배양하여 20% glycerol 용액에 현탁시킨 후 -70°C 냉동고에 보관하였다.

나. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 항균 활성 특성 분석

(1) 실험 방법

- 시험균이 1% 함유된 MRS soft 한천 (0.7%) 배지에 직경 8 mm의 well을 만들고 일차적으로 분리된 젖산균의 배양액 100 µl를 가하여 각 시험균의 최적 온도에서 18 시간 배양하여 well 주위의 나타나는 생육 저지환을 관찰하여 젖산균의 항균활성을 조사하였다. 항균활성을 나타내는 젖산균의 배양 상등액에 1 N NaOH를 가하여 중화하거나 α -chymotrypsin, trypsin, protease type IX 및 type XIV 등의 단백질 분해효소를 처리한 뒤, 시험균에 대한 항균활성을

조사하여 항균활성 물질이 젖산, 유기산 또는 단백질성인지를 확인하였다.

표 4. Isolation media for lactic acid bacteria.

Component	Amount (g/L)			
	MRS	PES	m-LBS	TSY
Proteose peptone	10	-	-	-
Trypticase peptone	-	5	10	-
Tryptone	-	-	-	5
Phytone peptone	-	-	-	-
Beef extract	10	-	-	-
Yeast extract	5	0.5	5	3
Dextrose	20	-	20	-
Sucrose	-	20	-	20
Tween 80	1	-	-	-
Ammonium citrate	2	-	2	-
Sodium acetate	5	-	15	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	0.244	0.575	-
MnSO ₄	0.05	-	0.12	-
Na ₂ HPO ₄	2	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	2	-	-
KH ₂ PO ₄	-	1	6	-
FeSO ₄	-	-	0.034	-
Phenylethyl alcohol	-	2.5	-	-
Sorbitan monooleate	-	-	1	-
Acetic acid	-	-	2.5	-
Agar	15	15	15	15
pH	6.2-6.6	6.8	5.5	6.8

표 5. Numbers of lactic acid bacteria isolated from Kimchi minor ingredients.

Ingredients Medium	생강	파	홍당무	열무	부추	마늘	Total
	TSY pH 4.0	4	2	8	3	1	
TSY pH 4.5	5	2	8	2	2	8	27
TSY pH 4.8	2	8	2	5	5	4	26
TSY pH 5.5	1	8	7	4	4	10	3
Total	12	20	25	14	12	22	105

표 6. Numbers of lactic acid bacteria isolated from various Kimchi.

Kimchi Media	맛김치	열무김치	포기김치	총각김치	백김치	Total
	TSY pH 5.5	6	8	2	2	
pH 4.5	2	2	4	2	4	14
MRS pH 6.2	8	4	4	4	4	24
pH 4.5	4	2	8	8	2	24
LUSM pH 5.5	20	4	6	20	6	56
pH 4.5	6	2	2	4	4	18
김치 pH 5.5	6	4	6	2	16	34
pH 4.5	12	-	4	4	-	20
Total	64	26	36	46	40	212

(2) 실험 결과

- 다양한 김치 및 부재료에서 일차적으로 분리한 총 600 주의 젖산균의 배양액을 대상으로 agar-well diffusion method를 이용하여 항균활성을 조사하였다. 40 종의 시험균이 각각 1% 첨가된 agar 배지에 직경 8 mm의 well을 만들고 MRS 액체배지에서 30°C로 1 일간 배양한 젖산균 배양액 100 µl를 각 well에 가했다. 각 검정균의 최적온도에서 18 시간 배양하여, well 주위의 생육 저지환을 관찰하여 항균활성을 나타내는 젖산균을 선정하였다. 김치와 채소류로부터 여러 가지 배지를 이용하여 분리한 젖산균 총 600여 균주 중, 항균활성을 보이며 α-chymotrypsin, trypsin, protease type IX 및 type XIV 등의 단백질 분해효소의 처리함으로써 항균활성이 소실되어 단백질성 항균물질로 추측되는 젖산균 19주를 선별하였다. 이들의 여러 시험균에 대한 항균활성 범위를 Table 4에 나타내었다. 분리주 번호 13을 제외한 모든 젖산균 분리주는 여러 시험균에 대해 항균활성을 나타내었으며 분리주 번호 4는 항균범위가 가장 넓어 *Bacillus*와 *Listeria* 뿐 만 아니라 많은 다른 시험균에 대해서도 항균활성을 나타내었다. 젖산균 분리주 번호 24와 25, 34와 35, 61과 63과 1077 등은 서로 유사한 항균활성 범위를 나타내었다.

다. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 내산성 분석

(1) 실험 방법

- 항균활성 젖산균 분리주 19 주, 내산성 분리주 78 주와 함께 시판중인 야쿠르트에서 분리한 GG 균주를 대조구로 하여 산에 대한 내성을 조사하였다. 젖산균 배양액 1 ml을 원심분리하여 멸균수로 세척한 후, 동일 부피의 멸균수에 현탁한 배양액 200 µl와 0.01 N HCl (pH 2.0) 100 µl를 혼합하여 37°C에서 2 시간 정치 배양하였다. 배양액에 멸균 식염수 1 ml를 첨가하여 연속 희석하고 0.01% bromocresol purple을 함유한 MRS 평판배지에 100 µl 도말하여 나타나는 균락을 계수하여 젖산균의 생존율을 조사하였다.

(2) 실험 결과

- 젖산균 분리주 600 주를 대상으로 내산성 *Lactobacillus* 속을 선별하기 위하여, pH 3.5로 조정된 MRS 한천배지에 희석한 배양액을 도말하고 3 일간 30°C에서 배양하여 생존하는 colony를 선별하였으며 단일균주로 분리한 colony는 현미경 관찰에서 rod type임을 확인한 후 최종 분리 균주로 선정하였다. 총 600 주의 분리주 중, pH 3.0에서도 성장할 수 있는 약 54 주의 내산성 *Lactobacillus*를 분리, 확보하였으며 선별균주에 대한 pH 3.8, 3.5, 3.3, 3.0에서의 생육정도를 조사하였다 (표 7). 대부분의 균주들이 pH 3.0에서도 성장할 수 있는 균으로 조사되었으나 pH 3.8보다 pH 3.0에서 생장이 활발한 호산성 (acidophilic) 균주는 관찰되지 않았다. 모든 균주는 pH 3.0 보다 pH 3.8의 조건에서 생장이 활발한 내산성 (acid tolerant) 젖산균으로 사료되었다. 그 밖

의 배양학적인 특성들은 표 8과 같았다.

표 6. Inhibition spectrum of lactic acid bacteria isolates(1).

Bacteriocin producer Indicator strains	BA4	13	24	25	26	27	34	35	61
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>mesenteroides</i>	+								
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100	+++						+	+	
<i>Leuconostoc amelibiosum</i> KCTC3524									
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC3525	++								
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3526									
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC3528	++++						+++	+++	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> K3529	++								
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> 30	+5						+5	+5	
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	+5						+++	+++	
<i>Leuconostoc</i> KCTC3532									
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3099	+++		++	++		++	++	++	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> MT-13	+		++	++					+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3103			+	+					+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3104									
<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> KCTC3498									
<i>Lactobacillus confusus</i> KCTC3499									
<i>Lactobacillus hilgadii</i> KCTC3500	+5						+5	+5	
<i>Lactobacillus parabuchineri</i> KCTC3503	++++						+++	+++	
<i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC3504	++++						+++	+++	
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> KCTC3510									
<i>Lactobacillus</i> sp. 170-12	+5	+	+++	+++	+++	+++	+5	+5	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	++		++	++		+			++
<i>Lactobacillus delbrueckii-lactis</i> KCTC1058									
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC3101	+5		++	++		+	+++	+++	+++
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC3506	+5		+++	+++		+++	+++	+++	+++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC3507	+		++	++		+			++
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC32406									
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC3095			+++	+++	+++	++			+++
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC3444	++								
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1013	++								
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1014							+	+	
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1023									
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1823									
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 KCTC1916									
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC1928									
<i>Salmonella typhimorium</i> KCTC1926									
<i>Escherichia coli</i> KCTC1924									
<i>Escherichia coli</i> KCTC2191									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC1199									
<i>Candida albicans</i> KCTC1940									

☒ 6. Inhibition spectrum of lactic acid bacteria isolates(2).

Bacteriocin producer Indicator strains	62	63	839	1077	1156	1160	1180	1262	W44	I-124
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp.										
<i>mesenteroides</i>										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC3100			+							++
<i>Leuconostoc amelibiosum</i> KCTC3524										
<i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC3525										
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC3526										
<i>Leuconostoc lactis</i> KCTC3528										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>cremoris</i> K3529										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>dextranicum</i> 30										+
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>										+
<i>Leuconostoc</i> KCTC3532										+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3099		++	++	++	+	+	+	++		
<i>Lactobacillus plantarum</i> MT-13		+		+						
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3103		+		+						
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3104										+
<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> KCTC3498										
<i>Lactobacillus confusus</i> KCTC3499										
<i>Lactobacillus hilgadii</i> KCTC3500										
<i>Lactobacillus parabuchineri</i> KCTC3503										+++
<i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC3504									+++	++
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> KCTC3510						+	++	+	+++	
<i>Lactobacillus</i> sp. 170-12	+	+++		+++					++++	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		++		++					++++	
<i>Lactobacillus delbrueckii-lactis</i> KCTC1058			++							
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCTC3101		+++		+++			+	+		
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC3506	+	+++		+++					++++	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC3507		++		++	++		++			
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC32406										
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC3095	+	+++		+++						
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC3444										
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1013										
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1014										
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1023										
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC1823										
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 KCTC1916										
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC1928										
<i>Salmonella typhimorium</i> KCTC1926										
<i>Escherichia coli</i> KCTC1924										
<i>Escherichia coli</i> KCTC2191										
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC1199										
<i>Candida albicans</i> KCTC1940										

- 또한 MRS 대신 PES 배지를 사용하여 내산성 *Lactobacillus* 속 분리 방법과 유사하게 내산성 *Leuconostoc* 균주의 분리도 시도하여 pH 3.5 에서도 생육할 수 있는 23 주의 *Leuconostoc*을 선별하였다 (표 9). 우선적으로 dextran을 형성하는 균주를 분리하였으며, 이들 중 pH 4.0에서 생육할 수 있는 균주를 1차로 선별하고, 최종적으로 pH 3.5에서 성장하는 균주를 *Leuconostoc* 분리주로 선정하였다.

표 7. Growth of acid tolerant *Lactobacillus* isolates at acidic condition.

Strain No.	Growth				Strains No.	Growth			
	pH 3.8	pH 3.5	pH 3.3	pH 3.0		pH 3.8	pH 3.5	pH 3.3	pH 3.0
KKY-1	++	++	++	+	KKY-131	+	+	+	+
4	++	++	++	-	133	+	+	+	+
5	++	++	++	-	134	+	+	+	+
7	++	++	++	+	135	+	+	+	+
8	++	++	++	-	139	+	+	+	+
10	++	++	++	-	140	±	±	±	±
16	+	+	+	±	141	+	+	+	+
19	+	+	+	-	142	±	±	±	±
22	+++	+++	+++	+	143	+	+	+	+
30	++	++	+	+	144	+	+	+	+
57	+	±	±	-	155	+	+	+	+
67	+	+	+	+	160	+	+	+	+
72	+	+	+	+	162	+	+	+	+
74	+	+	+	+	166	+	+	+	+
78	+	+	+	+	172	+	+	+	+
82	+	+	+	-	173	+	+	+	-
102	+	+	+	+	177	+	+	+	+
117	+	+	+	+	178	+	+	+	+
122	±	±	±	±	179	±	±	±	±
123	+	+	+	+	180	+	+	+	+
124	+	+	+	+	181	+	+	+	+
125	+	+	+	+	182	+	+	+	+
126	+	+	+	+	183	+	+	+	+
127	±	±	±	±	184	+	+	+	+
128	+	+	+	+	185	+	+	+	+
129	+	+	+	+	188	+	+	+	+
130	+	+	+	+	193	+	±	±	±

표 8. Cultural characteristics of acid tolerant *Lactobacillus* isolates.

Characteristics Strain No.	Final pH	Final Acidity	Growth EtOH 10%	Gas Formation	Morphology	CaCO ₃ Clear zone
KKY-1	3.78	2.28	++	-	r	+
4	3.81	2.43	++	-	r	+
5	3.80	2.36	++	-	r	+
7	3.78	2.46	++	-	r	+
8	3.88	2.36	++	-	r	+
10	3.80	2.39	++	-	r	+
16	3.84	2.41	++	-	r	+
19	3.83	2.45	++	-	r	+
22	3.84	2.43	++	-	r	+
30	4.06	2.42	++	-	c	+
57	3.89	2.04	++	-	r	+
67	3.71	2.09	+	-	r	+
72	3.81	2.09	+	-	r	+
74	3.91	2.10	+	-	r	+
78	4.29	1.52	-	+	c	+
82	4.12	1.71	+	+(w)	r	+
102	3.96	2.1	++	-	r	+
117	4.06	1.58	+	-	r	+
122	1.02	1.70	+	-	r	+
123	3.93	1.91	+	-	r	+
124	3.93	2.05	+	-	r	+
125	3.94	2.03	+	-	r	+
126	3.91	1.92	+	-	r	+
127	3.91	1.96	+	-	r	+
128	3.91	1.97	+	-	r	+
129	3.94	1.96	+	-	r	+
130	3.94	1.93	+	-	r	+

Continued

Characteristics Strain No.	Final pH	Final Acidity	Growth EtOH 10%	Gas Formation	Morphology	CaCO ₃ Clear zone
KKY-131	3.93	2.00	+	-	r	+
133	3.91	2.04	+	-	r	+
134	4.01	2.02	+	-	r	+
135	3.89	2.07	+	-	r	+
139	3.84	2.00	+	-	r	+
140	3.89	2.00	+	-	r	+
141	3.84	2.01	+	-	r	+
142	3.91	1.98	+	-	r	+
143	3.91	2.00	+	-	r	+
144	3.93	1.98	+	-	r	+
155	3.99	1.94	+	-	r	+
160	3.96	2.15	+	-	r	+
162	4.07	1.89	+	-	r	+
166	3.98	1.91	+	-	r	+
172	3.92	1.94	+	-	r	+
173	3.92	2.05	+	-	r	+
177	3.98	2.12	+	-	r	+
178	3.93	2.07	+	-	r	+
179	3.91	2.02	+	-	r	+
180	3.89	2.19	+	-	r	+
181	3.85	2.18	+	-	r	+
182	3.88	2.14	+	-	r	+
183	3.93	2.30	+	-	r	+
184	3.87	2.13	+	-	r	+
185	3.89	2.13	+	-	r	+
188	3.90	2.16	+	-	r	+
193	3.92	2.13	+	-	r	+

표 9. Growth of acid tolerant *Leuconostoc* isolates at acidic condition.

Strains No.	Growth					Final pH	Final Acidity	Dextran formation
	pH 4.8	pH 4.5	pH 4.0	pH 3.8	pH 3.5			
A2	+	+	+	+	+	4.57	1.20	+
A4	++	+	+	+	+	4.23	1.52	+
A5	++	++	+	+	+	4.20	1.59	+
A6	++	+	+	+	+	4.20	1.49	+
A8	++	++	+	+	+	4.11	1.59	+
A9	+	+	+	+	+	4.38	1.45	+
A10	++	++	+	+	+	4.27	1.32	+
A11	++	++	+	+	+	4.19	1.44	+
A12	++	+	+	+	+	4.24	1.38	+
A13	++	++	+	+	+	4.47	1.26	+
A14	+	+	+	+	+	4.40	1.15	+
A17	+	+	+	+	+	4.51	1.18	+
A19	+	+	+	+	+	4.47	1.17	+
A20	+	+	+	+	+	4.45	1.20	+
A21	+	+	+	+	+	4.35	1.20	+
A25	+	+	+	+	+	4.38	1.21	+
A28	++	++	+	+	+	3.88	1.93	+
A31	+	±	±	±	±	4.38	1.18	+
A32	+	±	±	±	±	4.36	1.23	+
A33	+	+	+	+	+	4.38	1.22	+
A35	+	+	+	+	+	4.38	1.19	+
A36	+	+	+	+	+	4.47	1.21	+
A37	+	+	+	+	+	4.49	1.13	+

- 단백질성 향균물질을 생산하는 젖산균 분리주 19 주, 내산성 *Leuconostoc* 분리주 23 주, 내산성 *Lactobacillus* 분리주 54 주 및 실험실에 보유하고 있는 젖산균 분리주 1 주 (Mheen 90) 등 총 97주를 대상으로 Fig. 1과 같은 방법으로 내산성 젖산균 분리주의 탐색을 시도하였다. 실험오차를 줄이기 위해 10 배수 단계 희석은 멸균 생리식염수 9 ml에 젖산균 희석액 1 ml를 가하여 실시하였다. 대조균으로 *L. acidophilus*를 사용하였으며 분리주들의 내산성 정도, 형태학적, 생리학적 특성을 기준으로 균주들을 분류한 결과, Table 8과 같았다. 내산성을 시험한 97 주 중 22 주는 시험조건에서 완전히 사멸하였으며 이 때, 향균활성을 나타낸 젖산균 분리주 19 주와 *Leuconostoc* 분리주 23 주 중 20 주는 아주 약한 내산성을 나타내었다. 그러나 *Lactobacillus* 분리주 24 주는 내산성이 우수하여 대조균으로 사용한 *L. acidophilus* 보다 높은 내산성을 보였다.
- 2차 탐색에서 내산성 균주로 판명된 *Lactobacillus* 분리주 24 주와 대조균으로서 시판중인 요구르트에서 분리한 GG 균주를 대상으로 Fig. 1의 방법을 이용하여 젖산균 희석액 200 μ l에 pH 1.5 염산 용액 100 μ l를 첨가하여 최종 현탁액의 pH를 2.0으로 하여 내산성 균주를 최종적으로 선별하였다. 분리주 24 주 중 내산성이 우수한 9 주와 GG 균주의 내산성 결과는 Table 9와 같았다. 젖산균 분리주 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309) 등이 강한 내산성을 보였으며 대조균으로 사용한 GG 균주 보다 우수하였다. 따라서 위 4 균주를 최종적으로 선택하고 각 균주의 향균활성을 조사한 결과, 젖산균을 제외한 다른 세균에 대한 향균활성을 보였다 (표 10 ~11). 그러나, 배양 상등액을 1 N NaOH로 중화한 후, 향균활성을 조사한 결과 향균활성이 사라지는 것을 통해 향균활성 물질이 젖산임을 추측할 수 있었다.

라. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 내담즙성 분석

(1) 실험 방법

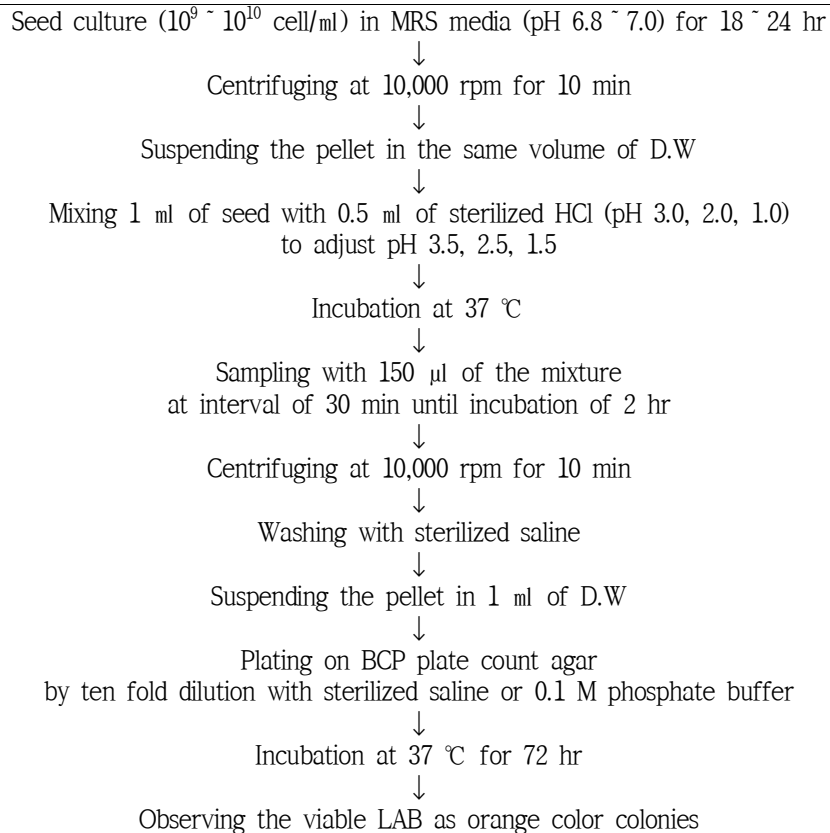
- 젖산균 분리주 97 주와 요구르트에서 분리한 GG 균주를 대조균으로 사용하여 담즙산에 대한 내성을 조사하였다. 내산성의 조사와 유사하게 멸균수로 세척한 젖산균 현탁액 200 μ l에 100 ~ 500 μ g/ml 농도의 ox gall 용액 100 μ l를 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치 배양하였다. 배양액에 멸균 식염수 1 ml를 첨가하여 연속 희석하고 0.01% bromocresol purple을 함유한 MRS 평판배지에 100 μ l 도말하여 나타나는 균락을 계수하여 젖산균의 생존율을 조사하였다.

⌘ 10. Grouping of LAB isolates according to their acid-tolerance.

	Acid-tolerance (pH 2.5)		
	Weak	Moderate	Strong
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		(1) Control,	
<i>Streptococcus mutans</i>	(1) BA4,		
<i>Lactococcus sp</i>	(2) W44, I-124		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	(1) BA13,		
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	(6) BA24, BA25, BA61, BA62, BA63, AP1077		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(1) BA27,	(1) Mheen90	
<i>Leuconostoc sp.</i>	(1) AP839		
<i>Lactobacillus sp.</i>	(4) AP1045, AP1156, AP1180, AP1262,		
<i>Streptococcus sp.</i>	(3) BA5, BA34, BA35,		
Rod type	(15) KKY-4, KKY-30, KKY-72, KKY-82, KKY-117, KKY-122, KKY-123, KKY-125, KKY-134, KKY-162, KKY-166, KKY-173, KKY-178, KKY-180, KKY-181,	(12) KKY-7, KKY-10, KKY-19, KKY-22, KKY-67, KKY-74, KKY-126, KKY-131, KKY-140, KKY-172, KKY-179, KKY-183	(24) KKY-1, KKY-5, KKY-8, KKY-16, KKY-102, KKY-124, KKY-127, KKY-128, KKY-129, KKY-130, KKY-133, KKY-135(SI-1309), KKY-139, KKY-141, KKY-142, KKY-143, KKY-155, KKY-160, KKY-177, KKY-182, KKY-184, KKY-185, KKY-188, KKY-193
Coccus type	(3) A5, A10, A11,		
75	37	14	24

☒ 11. Acid-tolerance of lactic acid bacteria isolates.

		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Viability
KKY-16	Control	-	-	-	>	52 85	4 8	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	75 89	5 7	0 2	-	-	-	
KKY-124	Control	-	-	-	>	79 67	6 7	-	10 ⁻¹ ~ 10 ⁻²
	Treatment	>	>	245 217	26 34	-	-	-	
KKY-133	Control	-	-	-	>	89 100	4 14	-	10 ⁻¹
	Treatment	>	>	>	112 123	-	-	-	
KKY-135(SI-1 309)	Control	-	-	-	378 448	72 38	9	-	10 ⁻¹
	Treatment	>	>	>	136 109	-	-	-	
KKY-177	Control	-	-	-	>	55 69	15 9	-	<10 ⁻³
	Treatment	385 379	35 31	3 4	0 3	-	-	-	
KKY-102	Control	-	-	-	614 633	51 77	10 9	-	10 ⁰ ~ 10 ⁻¹
	Treatment	>	>	>	140 136	-	-	-	
KKY-8	Control	-	-	-	>	61 57	15 7	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	131 288	8 x	14 0	-	-	-	
KKY-160	Control	-	-	-	>	105 123	16	-	<10 ⁻³
	Treatment	20	3	0	0	-	-	-	
KKY-182	Control	-	-	-	>	56 50	6 8	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	224 286	26 27	3 4	-	-	-	
GG 균주	Control	-	-	-	>	104 120	13 11	-	10 ⁻² ~ 10 ⁻³
	Treatment	>	137 198	9 24	1 0	-	-	-	



* Dilution Fold : 60

Overall procedure for determination of bile-tolerance of lactic acid bacteria isolates.

(2) 실험 결과

- 내산성이 높아 최종적으로 선정된 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309) 균주들의 담즙산에 대한 내성을 Fig. 2와 같은 방법으로 조사하였다. Ox gall의 최종 농도가 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml로 변화시키면서 37°C에서 2시간 처리한 후, 각 선정 젖산균의 생존수를 측정하였다. Table 12에 나타난 바와 같이 KKY-124와 KKY-135(SI-1309), KKY-102와 KKY-133은 서로 유사한 양상의 내성을 나타내었으며 KKY-102와 KKY-133의 경우 더 강한 내담즙성을 보였다.

마. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 내열성 분석

(1) 실험 방법

- 내산성이 우수한 젖산균 4주와 GG 균주를 MRS 배지에서 30°C, 24 시간 배양한 배양액 1 ml을 취하여 멸균수로 세척하고 50°C에서 20, 40, 60, 80 분간 정치한 후, 10 배씩 연속적으로 희석하

여 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 희석한 배양액 100 μ l을 각각 MRS 한천배지에 도말하였으며 30°C 항온기에서 배양하여 나타나는 젖산균 군락을 계수하여 열에 대한 내성을 조사하였다.

(2) 실험 결과

- 선정 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309) 4주의 열에 대한 내성을 조사하기 위하여, 4 균주를 각각 MRS 배지에서 24시간 배양하고 배양액 1 ml을 취하여 50°C에서 20, 40, 60, 80 분간 가열하였다. 정해진 시간 후 10^{-1} 의 희석배수로 연속적으로 희석하여 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 희석한 배양액 100 μ l을 각각 MRS 한천배지에 도말하고 30°C에서 배양하여 자라는 균체의 총수를 열처리하지 않은 각각의 균주를 대조군으로 하여 백분율로 환산, 처리 시간에서의 생존율로 나타내었다. Fig. 4에서와 같이 4 균주 모두 열처리 시간이 증가함에 따라 사멸되는 세포수는 급격히 증가하였으나 KKY-135(SI-1309) 균주는 50°C에서 60 분까지 사멸하는 세포 수가 급격히 증가한 후 60 분 이후에는 사멸하는 세포수가 적어지는 것으로 보아 50°C의 온도에 적응이 되는 것으로 사료된다. 또한 KKY-124와 KKY-133의 경우, 열처리 40 분 이후 사멸하는 세포수가 적은 것으로 보아 KKY-135(SI-1309)보다 온도에 대한 내성이 높은 것으로 추정된다.

바. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 점착성 조사

(1) 실험 방법

- 생균제 후보 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309)와 bacteriocin 활성을 보유한 W-44 균주를 MRS 배지에서 24 시간 배양하고 PBS로 세척한 뒤, 4×10^8 cells/ml 농도의 젖산균 현탁액 0.5 ml과 DMEM 배지 0.5 ml을 혼합하여 준비하였다. PBS로 두 번 세척한 Caco-2 monolayer에 젖산균과 세포주 배양용 배지 (DMEM)의 혼합액 1 ml을 첨가하고 CO₂ incubator에서 90 분간 배양하였다. 처리한 Caco-2 monolayer를 PBS로 5 번 세척하고 methanol로 고정화한 뒤, Gram 염색하여 Caco-2 세포주에 부착된 젖산균을 현미경으로 관찰하여 점착성을 조사하였다.

(2) 실험 결과

- 생균제 후보균주인 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309) 등과 추가로 bacteriocin 활성을 보유한 W-44 균주가 실제 가축의 장내에 부착되는 정도를 조사하기 위한 시도로 시험관 내에서 간접적으로 많이 사용되고 있는 colon cancer에서 유래된 Caco-2 세포주를 이용하였다. Caco-2 세포주는 DMEM (20% fetal bovine serum) 배지에서 배양하면서 매일 새로운 배지로 보충하였다. 지름 3.0 cm인 dish에 4×10^4 cells/cm²의 농도로 접종한 후 37°C, CO₂ 배양기에서 14

일간 배양하여 점착성 조사에 사용하였다.

표 12. Bile acid-tolerance of acid-tolerant lactic acid bacterial isolates.

		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Viability
KKY-102	Control	-	-	-	-	>	65 55	7 3	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴
	100(μg/ml)	-	-	95 102	11 8	1 0	0	-	
	200(μg/ml)	-	>	79 93	8	0 1	-	-	
	300(μg/ml)	>	90	8	1 0	-	-	-	
	400(μg/ml)	-	-	4 10	1 0	0	0	-	
	500(μg/ml)	-	13 10	1 2	0	0	-	-	
KKY-124	Control	-	-	-	-	>	74 81	4 3	10 ⁻⁵
	100(μg/ml)	-	-	60 61	10 6	2 0	0	-	
	200(μg/ml)	>	38 44	7 1	1 2	-	-	-	
	300(μg/ml)	-	12 16	3 5	2 0	0	-	-	
	400(μg/ml)	-	11 19	2 1	1 0	0	-	-	
	500(μg/ml)	-	-	4 1	0	0	0	-	
KKY-133	Control	-	-	-	-	>	61 72	5 3	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴
	100(μg/ml)	-	-	>	83 94	4 11	1 0	-	
	200(μg/ml)	-	-	17 30	5 2	1 0	0	-	
	300(μg/ml)	>	144 164	22 13	3 2	-	-	-	
	400(μg/ml)	-	12 16	3 5	2 0	0	-	-	
	500(μg/ml)	-	11 19	2 1	1 0	0	-	-	
KKY-135(SI-1309)	Control	-	-	-	-	>	56 35	4 3	10 ⁻⁴
	100(μg/ml)	-	-	200 223	29 22	2 0	0	-	
	200(μg/ml)	-	-	5	2 0	0	0	-	
	300(μg/ml)	200 184	19 14	3	0	-	-	-	
	400(μg/ml)	-	10 17	2 3	0	0	-	-	
	500(μg/ml)	-	7 11	0 2	0	0	-	-	

- KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309), W-44 젖산균을 MRS 배지에서 24시간 배양하고 PBS로 세척하고 4 X 10⁸ cells/ml 농도로 PBS에 현탁한 0.5 ml과 DMEM 0.5 ml을 혼합한 후 PBS로 두 번 세척한 Caco-2 monolayer에 처리하고 CO₂ incubator에서 90분간 배양하였다. 처리한 Caco-2 monolayer를 PBS로 5번 세척하고 methanol로 고정하고 그람염색을 한 후 부착된 젖산균을 현미경으로 관찰하였다. Fig. 23에서와 같이, 시료를 처리하지 않은 Caco-2 세포주에서는 부착된 균주가 전혀 없었으나 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309) 및 W-44로 처리

한 곳에서는 부착된 균체가 발견되었으며 그중에서 W44의 점착성이 가장 우수하였다.

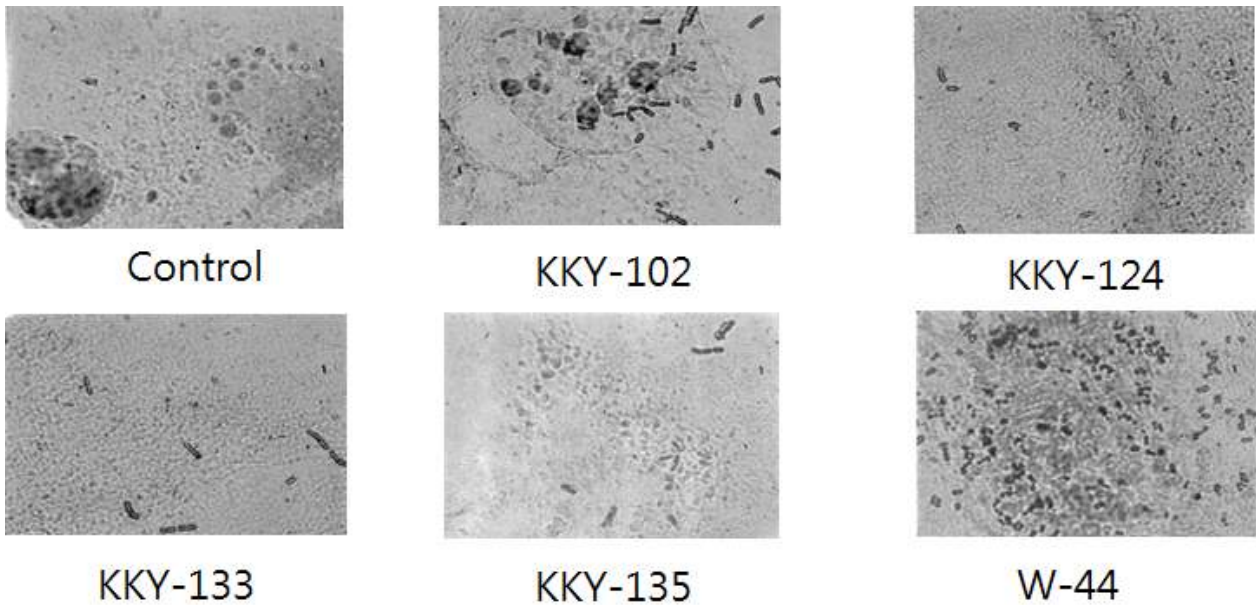


Fig. 23. Adhesion test of lactic acid bacteria on Caco-2 cell.

사. 발효식품으로부터 선별된 유산균의 생리적 특성 분석

(1) 실험 방법 및 결과

- 최종적으로 선정된 내산성 젖산균 KKY-102, KKY-124, KKY-133, KKY-135(SI-1309)의 동정을 시도하였다. 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성과 당발효능, catalase/oxidase test 등을 실시하여 type strain인 *L. plantarum*의 특성과 비교하였다. 4 균주 모두 세포의 형태는 rod type이었고 dextran은 형성되지 않았으며 대부분의 형태학적 특성은 *L. plantarum*과 거의 일치하였다. 또한 사용한 모든 당을 이용할 수 있었으며, 4 균주 모두 45°C에서는 생육을 하지 못하였고, 15°C에서는 KKY-102와 KKY-124는 거의 자라지 못하였으나 KKY-133, KKY-135(SI-1309)와 *L. plantarum*은 생육할 수 있었다. 기타 발효능, aesculin과 arginine 가수분해성, nitrate 환원력, 운동성, catalase/oxidase test 등의 결과는 모두 일치하였다 (표 13). 따라서 젖산균 분리주 4주는 *L. plantarum*의 범주에 속할 가능성이 높은 것으로 조사되었다. 이 중 KKY-124와 KKY-135(SI-1309)에 대해서는 더 자세히 동정을 실시하여 그 결과를 Table 17에 나타냈으며 전자현미경으로 관찰한 세포의 형태는 Fig. 6에 나타내었다. *L. plantarum*과 KKY-135(SI-1309)는 arabinose와 rhamnose를 이용하지 못하였으나 KKY-124는 모두 이용하였다. 그 이외의 특성들은 3 균주 동일한 결과를 보였다. Fig. 24의 전자현미경 사진에 나타난 바와 같이 KKY-124와

KKY-135(SI-1309)는 전형적인 rod type으로서 *Lactobacillus* sp.와 형태가 동일하였다.

표 13. Taxonomical properties of acid-tolerant lactic acid bacteria isolates.

Characteristics \ LAB	KKY-102	KKY-124	KKY-133	KKY-135(SI-1309)	L.P ^a
Shape/Gram	SR.R/+	SR.R/+.	SR.R/+	R/+	R/+
Spores	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-
Growth in air	+	+	+	+	+
Anaerobically	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-
Glucose(acid)	+	+	+	+	+
O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	F
Growth 15 ⁰ C	W	W	+	+	+
Growth 45 ⁰ C	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-
Car.acid from;					
arabinose	+	+	+	+	d
galactose	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	+	+
melezitose.	+	+	+	+	+
melibiose	+	+	+	+	+
raffinose	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	+	+
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-

^a means *Lactobacillus plantarum*.

㉔ 14. Taxonomical properties of acid-tolerant KKY-124 and KKY-135(SI-1309).

Characteristics	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KKY-124	KKY-135(SI-1309)
Gram's staining	Rod, +	Rod, +	Rod, +
Spores	-	-	-
Motility	-	-	-
Growth in air	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	+
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Glucose(acid)	+	+	+
OF	F(-/+)	F(-/+)	F(-/+)
Growth at 5°C	-		
Growth at 15°C	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-
Growth at 45°C	-	-	-
carbohydrates, acid from :	d	+	-
arabinose			
Cellulose	NT	-	-
Cellobiose	+	+	+
Esculin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Gluconate	+	-	-
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Raffinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Rhamnose	-	+	-
Salicin	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	d	+	+

Continued

Characteristics	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KKY-124	KKY-135(SI-1309)
Aesculin hydrolysis	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-
Indole	-	-	-
VP	-	-	-
Dextran formation	-	-	-
Mol% G+C	44-46, 45	43	45
Growth in 10% ethanol	+	+	+
TGY + CaCO ₃	+	+	+
Final pH in Glucose broth			
DL-Lactic acid	+	+	+



KKY-124



KKY-135

Fig. 24. Scanning electron microscopic observation of KKY-124 and KKY-134 isolates.

나. Toll-like receptor 2 & 4 활성화 유도 유산균 생산 공정 개발

(1) 실험 방법

(가) 탄소원의 설정

- 선별된 유산균 KKY-135 균주의 세포 성장을 위한 최적 배지조성을 결정하기 위해 탄소원의 이용성을 조사하였다. 1% yeast extract, 0.1% ammonium citrate 및 기타 무기염류를 함유한 기본 배지에 glucose, fructose, galactose, xylose, mannose, sucrose, sorbose, ribose 등의 당을 각각 0.5% 첨가하여 30°C에서 24 시간 배양한 후 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 각 유산균 KKY-135에 대해 세포성장이 가장 높은 당을 최적 탄소원으로 선정하였다. 또한 유산균 KKY-135 균주의 세포 성장을 위한 최적 탄소원 농도를 결정하기 위하여, 유기질소원 농도에 1% yeast extract를 함유한 기본 배지에 sucrose의 농도를 0~10% 첨가하고 유산균을 24 시간 배양한 후, 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 가장 높은 세포생육을 나타내는 sucrose의 최적 농도를 결정하였다.

(나) 질소원의 설정

- 선별된 유산균 KKY-135 균주의 세포 성장을 위한 최적 배지조성을 결정하기 위해 무기질소원의 이용성을 조사하였다. Yeast extract 1%, glucose 0.5%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 , 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% 등으로 구성된 기본 배지에 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 등의 무기질소원을 0.1% 각각 첨가하고 24 시간 배양한 후, 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과 세포성장을 비교하였다. 산균 KKY-135 균주의 세포 성장을 위한 최적 배지조성을 결정하기 위해 유기질소원의 이용성을 조사하였다. 1% Ammonium citrate, 0.5% glucose, 0.05% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.02% MgSO_4 등으로 구성된 기본 배지에 0.1%의 tryptone, Bacto-peptone, proteose peptone, malt extract, soytone, polypeptone, beef extract 등의 각종 유기질소원을 첨가하여 24 시간 배양한 후, 유기질소원을 첨가하지 않은 대조군과의 세포성장을 비교하였다. Yeast extract 1%, sucrose 2%를 함유한 기본배지에 유산균 후보 균주의 최적 유기질소원인 soytone, tryptone 및 beef extract 등의 유기질소원의 농도를 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3% 첨가하여 24 시간 배양한 후, 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 가장 높은 세포성장을 나타내는 유기질소원의 최적 농도를 결정하였다. 선정된 유산균 후보 균주에 대한 최적 유기질소원과 탄소원을 함유한 기본 배지에 yeast extract의 농도를 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5,

3.0% 씩 첨가하여 24 시간 배양한 후, 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 가장 높은 세포성장을 나타내는 yeast extract의 최적 농도를 결정하였다.

(다) 배양 조건의 확립

- 최종 선정된 유산균 KKY-135 균주의 대량 배양을 위한 기본적인 배양 조건으로서 MRS 배지의 초기 pH를 4 ~ 9로 적정한 후, 24 시간 동안 정치배양을 하면서 세포 성장, pH의 변화 및 glucose의 소모 양상을 관찰하여 유산균의 배양을 위한 최적의 초기 pH를 선정하였다. 최종 선정된 유산균의 대량 배양을 위하여, 최적화된 초기 pH로 적정한 MRS 배지를 기본으로 하여 초기 glucose의 농도를 20 ~ 60 g/L로 하여 24 시간 동안 정치배양을 수행하면서 세포 성장, pH의 변화 및 glucose의 소모 양상을 관찰하여 유산균의 배양을 위한 초기 glucose 농도를 선정하였다. 최적화된 glucose 농도 및 초기 pH 조건하에서 MRS 배지를 기본으로 하여 배양 온도를 20 ~ 42°C로 하여 24 시간 동안 정치배양을 수행하면서 세포 성장, pH의 변화 및 glucose의 소모 양상을 관찰하여 유산균의 배양을 위한 최적 배양 온도를 결정하였다.

(2) 실험 결과

(가) 탄소원 및 질소원의 설정

- 선별된 KKY-135 유산균의 세포 성장에 가장 중요한 요인인 탄소원을 결정하기 위하여, 1% yeast extract, 0.1% ammonium citrate, 0.05% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 등을 함유한 기본 배지에 glucose, fructose, galactose, xylose, mannose, sucrose, sorbose, ribose 등의 당을 탄소원으로 0.5% 첨가하여 24시간 배양한 후 세포 성장을 비교하였다(Fig. 52). KKY-135 유산균의 경우, xylose, sorbose, ribose와 같은 5 탄당이 포함된 배지에서는 성장하지 못하였고, 균주의 생육에는 단당이나 이당류가 적합하였으며, 그 중에서도 sucrose가 세포 성장에 가장 적합한 것으로 판명되었다. 또한, 세포 생육을 위한 최적 무기 질소원을 결정하기 위하여, 0.5% glucose, 1% yeast extract, 0.05% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 등을 함유한 기본 배지에 무기질소원으로서 0.5%의 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 등을 첨가하여 24 시간 배양한 후 세포 성장을 비교하였다(Fig. 53). KKY-135의 경우 특이적으로 무기질소원을 첨가하지 않은 배지에서 세포 성장이 우수한 특징을 나타내었다. 또한 최적 유기 질소원을 결정하기 위하여 0.1% ammonium citrate, 0.5% glucose, 0.05% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 등으로 구성된 기본 배지에 0.1%의 tryptone, Bacto-peptone, proteose peptone, malt extract, soytone, polypeptone, beef extract 등의 각종 유기질소원을 첨가하여 세포의 생육 정도 비교하였다(Fig. 54). 유기질소원으로는 beef extract가 타 유기질소원 대비 세포 성장에 가장 적합함을 확인하였다.

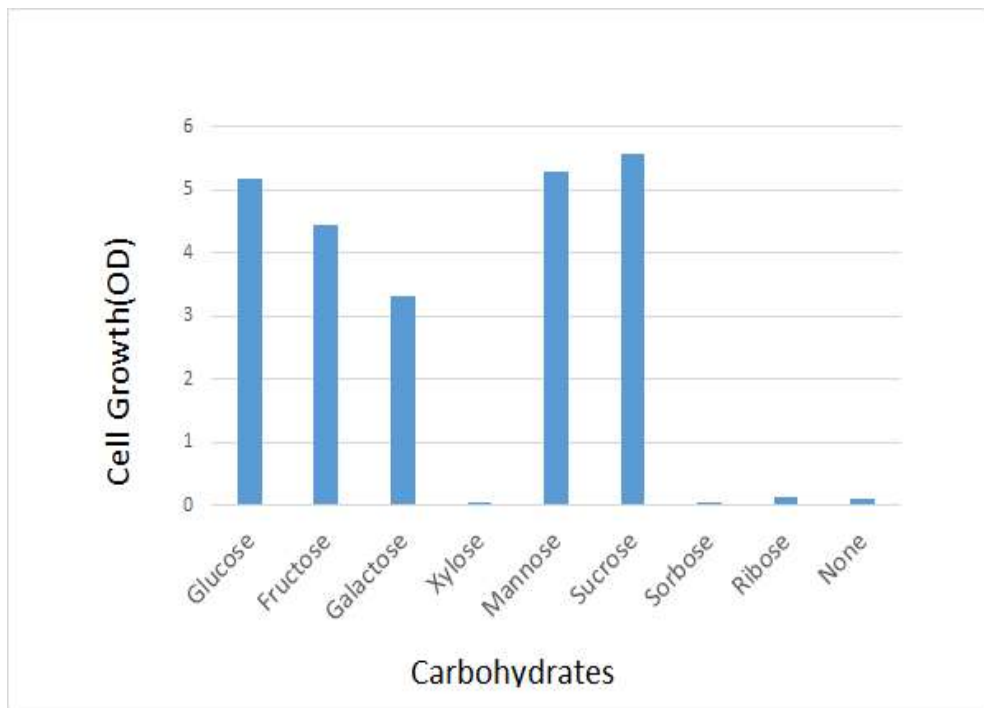


Fig. 52 Selection of an appropriate carbon source for cell growth of KKY-135.

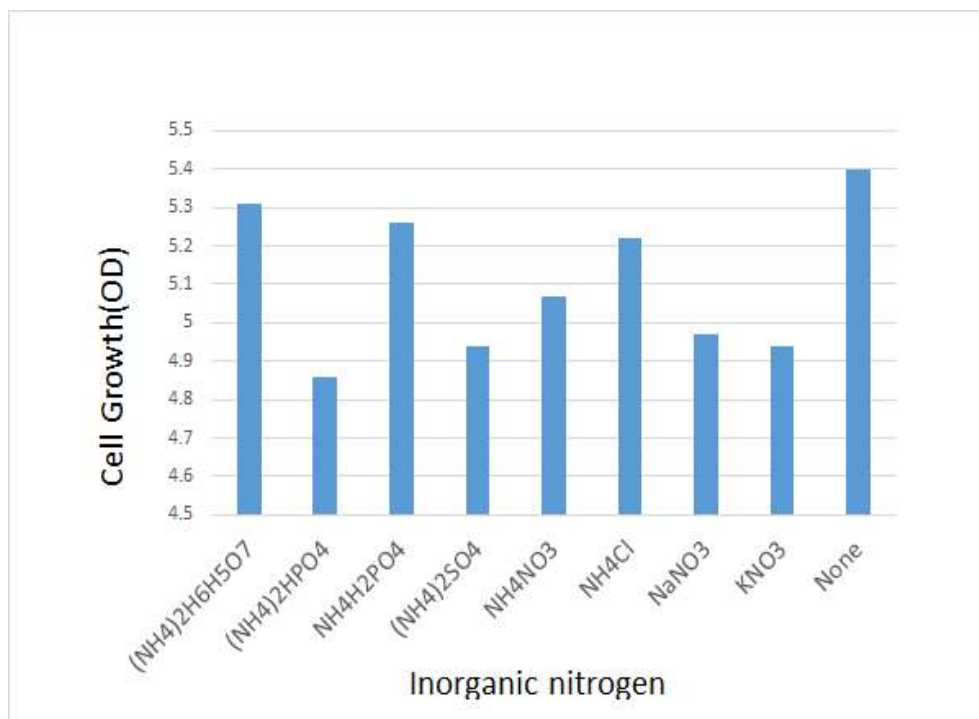


Fig. 53. Selection of an appropriate inorganic nitrogen source for cell growth of KKY-135.

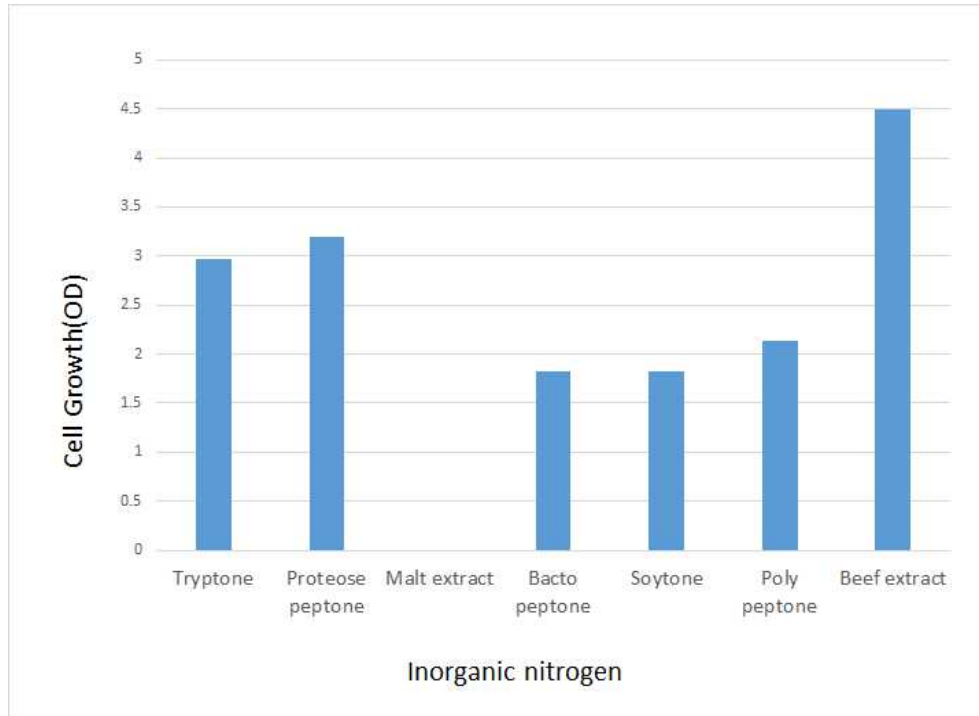


Fig. 54 Selection of an appropriate organic nitrogen source for cell growth of KKY-135. NG means no growth

(나) 최적 배지 농도 결정

- 위와 같은 연구 결과를 토대로 하여 본 연구에서는 KKY-135 유산균의 세포성장 증진을 위한 탄소원과 질소원의 농도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 유기질소원의 최적 농도를 결정하기 위하여, yeast extract 1%, sucrose 2%를 함유한 기본배지에 beef extract의 유기질소원의 농도를 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3% 첨가하여 24시간 배양한 결과, 1.5% beef extract가 세포 성장에 가장 적합하였다(Fig. 55). 또한 KKY-135 유산균의 세포성장 증진에 가장 적합한 것으로 확인된 sucrose의 최적 농도를 결정하기 위하여, 1.5% beef extract와 1% yeast extract를 함유한 기본 배지를 사용하여 sucrose의 농도를 다르게 첨가하여 24 시간 배양한 후, 세포 성장 정도를 측정하였다.(Fig 56) 또한 위와 같은 연구 결과에서 얻어진 최적 유기질소원과 탄소원의 농도를 함유한 배지에서 yeast extract의 농도를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% 첨가하여 KKY-135 균주의 성장에 대한 영향을 효과를 조사한 결과, yeast extract를 1% 첨가한 경우에서 세포 성장이 가장 우수하였다(Fig. 57).

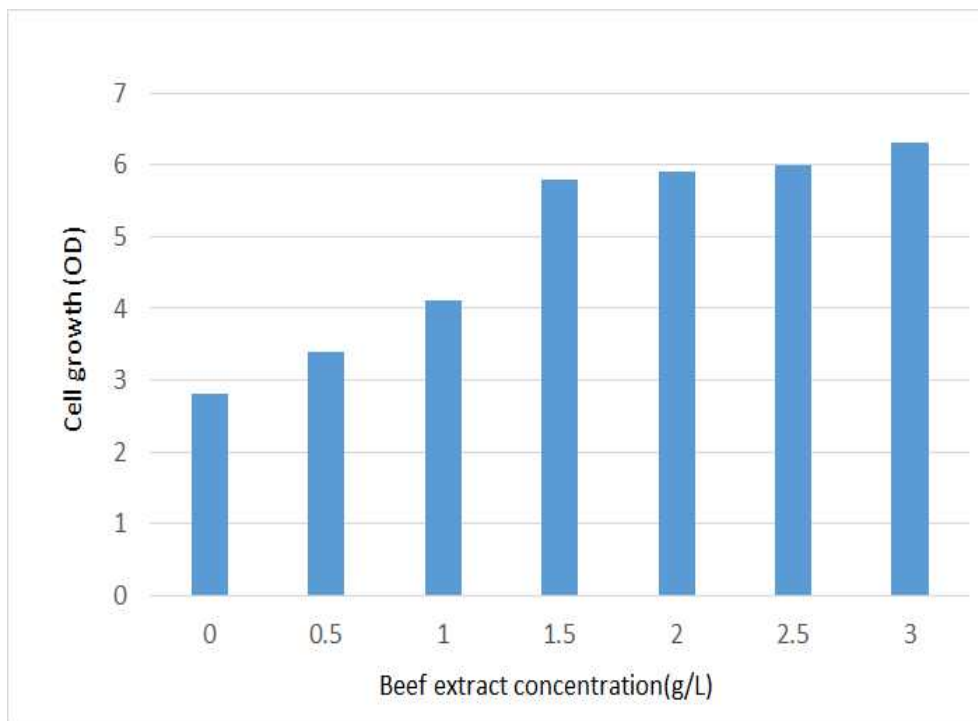


Fig. 55. Effect of initial concentration of organic nitrogen sources on cell growth of KKY-135.

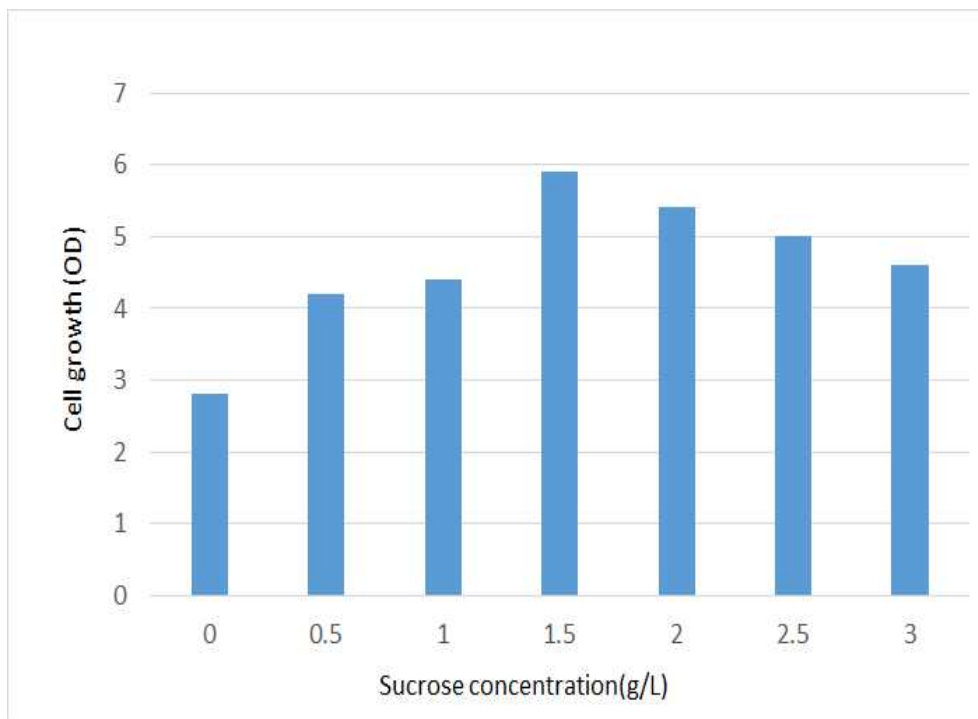


Fig. 56 Effect of various sucrose concentrations on cell growth of KKY-135.

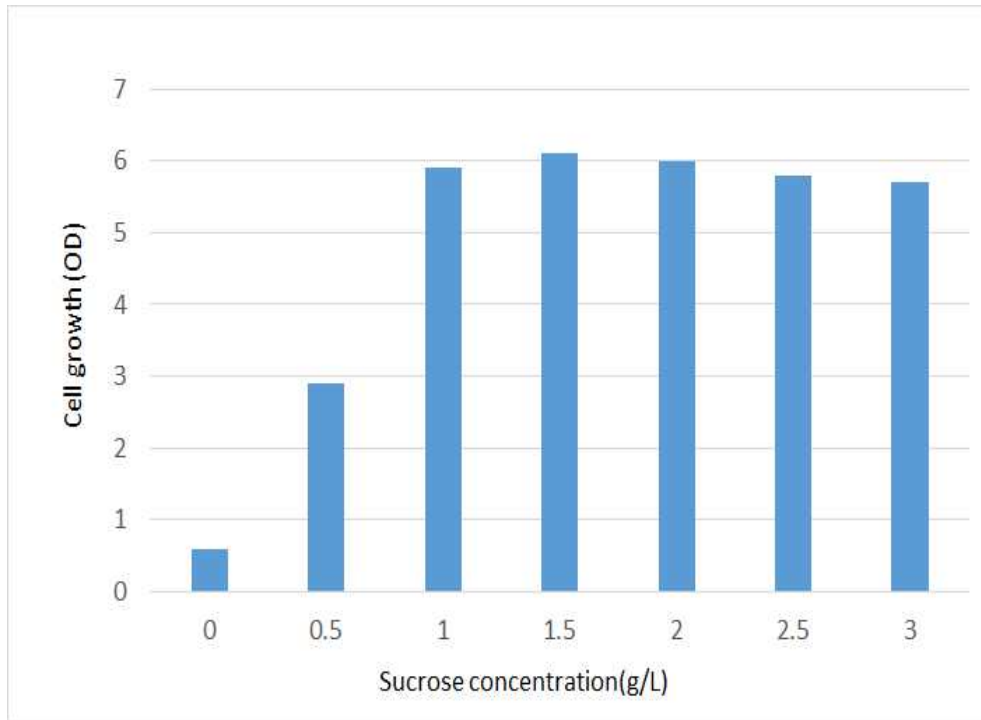


Fig. 57 Effect of various yeast extract concentrations on cell growth of KKY-135.

다. *Lactobacillus plantarum* KKY-135 유산균의 산업용 배지에서의 배양

(1) 실험 방법

(가) 산업용 배지의 검토

- 본 연구 사업을 통해 확보된 유산균 KKY-135 균주의 산업적 생산을 위해 경제성을 고려하여 corn steep liquor(CSL), molasses, whey 등의 산업용 배지를 사용하여 배지의 최적화 실험을 수행하였다. 질소원으로 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0% 농도의 CSL을 사용하여 24 시간 동안 배양하여 유산균 KKY-135 균주의 세포 성장 정도를 측정하였다. working volume 1 L의 발효조에서 배양하여 세포 성장 정도를 비교하였다. 또한 MRS 배지와 최적화된 산업용 배지에서의 유산균 KKY-135를 working volume 1 L의 발효조에서 배양하여 세포 성장 정도를 비교하였다.



그림 58. 산업용 배지 농도 별 발효조 내 실험

(2) 실험 결과

(가) 산업용 배지의 검토

- KKY-135 균주의 경우 4% CSL에서 생육이 가장 우수하였으나, 그 이상의 농도에서는 CSL에 함유되어 있는 유기산으로 인해 배지의 pH가 낮아져 세포의 성장이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 상대적으로 영양 성분이 높은 기본배지인 MRS(Difco) 배지보다는 낮은 성장률을 나타내었다.(Fig. 58). 또한 CSL 4%, whey 2%를 함유한 배지에 molasses의 농도를 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0% 첨가하여 24 시간 배양하면서 농도별 세포 성장, pH의 변화 정도를 비교하였다. Fig. 58에 나타난 바와 같이 molasses의 농도가 증가해도 세포 성장에는 큰 영향을 미치지 못하였으며, 그 원인은 배지 내 whey가 탄소원으로서는 충분히 공급되었기 때문으로 추정된다. 탄소원으로서는 whey의 이용 가능성을 확인하기 위하여 상기 실험에서 확립된 CSL 4%, molasses 2%를 함유한 배지 조건에서 whey의 농도를 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0% 첨가하여 24 시간 배양하면서 농도별 세포의 생육을 비교하였다. Fig. 58 나타난 바와 같이 molasses가 2 ~ 4%의 농도에서 최적의 성장을 보였으나, 그 이상의 농도에서는 세포 성장이 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 그 이유는 유산균이 당에 대한 내성이 낮기 때문으로 추정된다. 또한 배지 내 molasses가 있음에도 불구하고 whey가 첨가되지 않은 경우에 세포 성장이 낮은 이유는 유산균이 molasses의 주성분인 oligo-saccharide 보다는 whey의 주성분인 lactose를 탄소원으로 더 선호하

기 때문인 것으로 사료된다.

- 또한 MRS 배지와 상기 실험을 통해 최적화된 산업용 배지에서 24 시간 동안 배양 후 생균수를 측정된 결과 각각 1.48×10^{10} , 7.53×10^9 으로 나타났으며(Fig. 20), 이와 같은 실험결과는 본 연구의 목표인 10^9 cells/ml에는 도달하였으나, MRS 배지에서의 세포 성장 정도와 비교해 볼 때 64% 수준으로 나타났다. 전체적으로 최적화된 산업용 배지에서의 세포 성장은 낮아졌으나, 산업용 배지와 가격 경쟁력을 고려하였을 때, 약 10 배 이상의 가격 경쟁력을 나타내었다.

라. 유산균의 안정성 및 보존 시험

(1) 실험 방법

(가) 생균제의 제조와 보존성 조사

- 선정된 젖산균을 MRS 배지에서 18 ~ 20 시간 배양하고 원심분리하여 균체만 회수하였다. 이것을 안정제로 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate와 2% sucrose를 함유한 10% skim milk 용액과 10% whey에 각각 현탁한 뒤 동결건조하여 10^{10} CFU/g인 시험 생균제 원말을 제조하였다. 시험 생균제를 4°C와 30°C에서 각각 보관하면서 생존율로서 시험 생균제의 보존성을 조사하였다.

(나) 동결건조를 위한 보호제의 선정

- 각 후보 균주를 MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 18 ~ 20 시간 동안 정치 배양하여 젖산균의 농도가 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml이 되도록 하였다. 배양된 젖산균은 두 번 세척하고 젖산균의 농도가 10^{10} CFU/ml가 되도록 각각 10% sorbitol, 10% glycerol, 10% skim milk 또는 2% sucrose, 0.5% ascorbate와 0.5% glutamate를 함유한 10% skim milk를 첨가하고 균일하게 교반한 후 동결 건조하였다. 제조된 젖산균 분말은 각각 4°C와 30°C에서 보관하면서 생존율을 측정하였다.

(다) 기능성 생체 polymer 보호제의 선정

- MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 18 ~ 20 시간 동안 정치 배양하여 젖산균의 농도가 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml가 되도록 한 후, polymer를 첨가하여 젖산균을 각각 10% PEG, 2% gelatin, 2% starch, 2% dextran을 첨가하여 30 분간 교반하면서 젖산균을 coating하고 다시 0.5% ascorbate와 0.5% glutamate를 함유한 10% skim milk를 첨가하여 동결 건조하였다. 이와 같이 젖산균 코팅 방법에 의해 제조된 젖산균 분말은 각각 4°C와 30°C에서 보관하면서 생존율을 측정하였다.

(2) 실험 결과

(가) 동결 보호제의 선정

(1) 실험 방법

- 최종 선정된 유산균 KKY-135(SI-1309)를 생균제로 사용 가능성을 확인하기 위하여 분말 형태로 동결 건조할 때의 동결 보호제 선정과 저온 및 상온에서의 보존성에 관한 실험을 수행하였다. 유산균 KKY-135(SI-1309)를 각각 최적화된 산업용 배지에 접종하여, 30°C에서 18~20 시간 동안 정치 배양하여 젖산균의 농도가 약 10^{10} CFU/ml이 되도록 하였다. 배양된 유산균은 두 번 세척하고 동결 보호제를 첨가하여 균일하게 교반한 후 동결 건조하여 4°C에서 보관하면서 생존율을 측정하였다. 각각 배양한 KKY-135(SI-1309)을 나누어 A 그룹과 B 그룹으로 duplicate 실험을 진행하였다. 그 결과, KKY-135(SI-1309) glycerol이나 sorbitol 보다 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate와 2% sucrose이 함유된 skim milk를 사용하는 것이 효과적이었다.

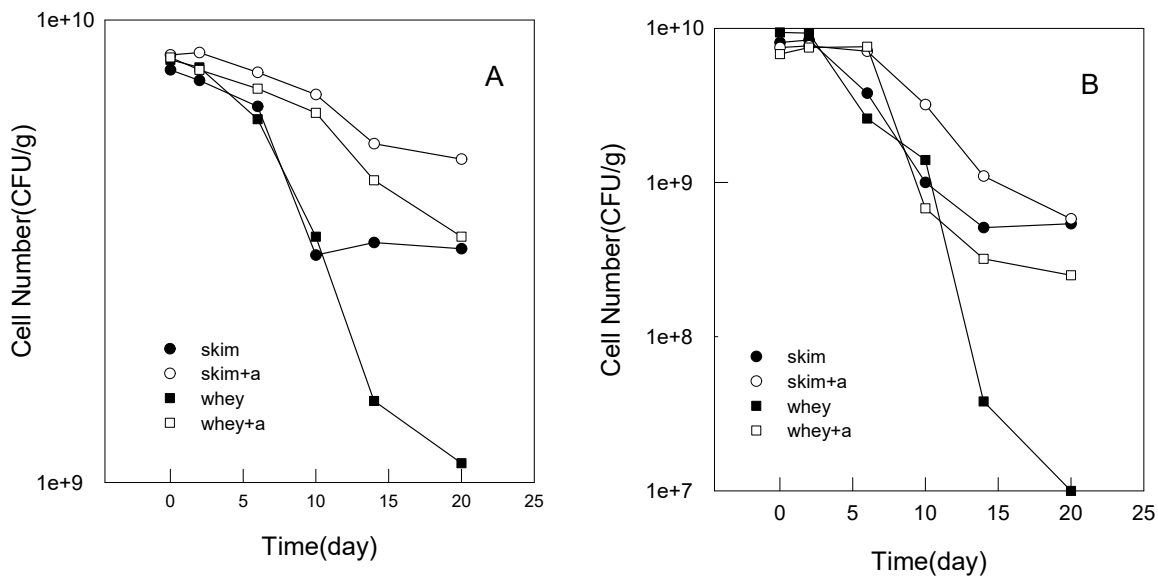


그림 59. Profiles of viable cells of *L. plantarum* KKY135(SI-1309) during the storage at different temperature. a means 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate and 0.2% sucrose.

(나) 코팅제의 선정

- 생균제의 보존 시 생존율을 증가시키기 위해 다양한 polymer를 첨가하여 분말 젖산균을 제조하

고 4°C에서 보관하면서 2 개월 동안 생존율을 측정한 결과, KKY-135(SI-1309)는 coating제로서 gelatin을 사용한 경우 2 개월 동안 95% 이상의 viability를 유지하였다.

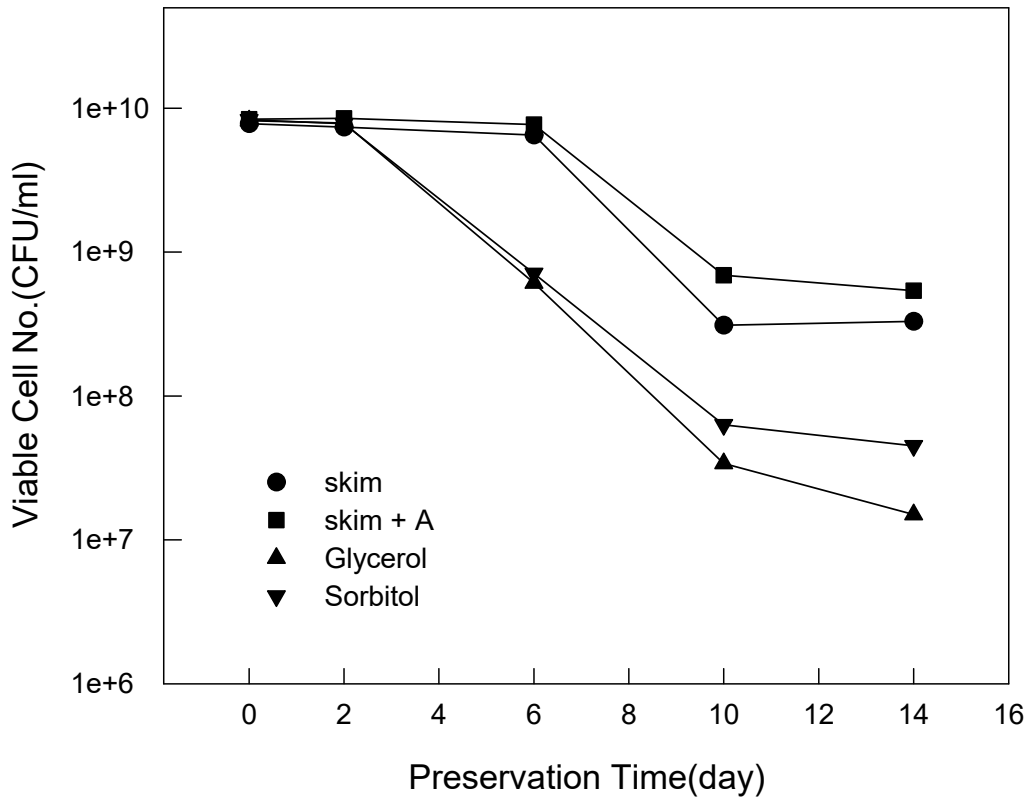


그림 60. Effect of various additives on survival of freeze-dried *Lactococcus* sp. W-44 during the preservation at 4°C.

A means 2% sucrose, 0.5% ascorbic acid and 0.5% glutamic acid.

(3) Gelatin과 PEG를 이용한 생균제의 대량 제제화

- MRS 배지에서 18~20 시간동안 배양한 젖산균을 2% gelatin이나 10% PEG를 첨가하여 젖산균을 coating하고 alginate 용액을 첨가하여 균일하게 혼합한 후, 100 mM CaCl₂ 용액에 떨어뜨려 bead 형태로 제조하여 동결건조하였다. 분말 제제를 저온(4°C) 및 상온(30°C)에서 6 개월 동안 보관하면서 젖산균의 생존율을 조사하였다. KKY-135(SI-1309)의 경우(Fig. 46), coating제로서 gelatin을 사용한 경우 6 개월 후 4°C에서는 약 80%, 30°C에서는 약 70% 젖산균이 생존하였으

다. 이와 같은 실험 결과에 근거하여 볼 때, 본 연구의 목표인 생균제 원말의 10^{10} cells/g (원말)의 제조 및 10^8 cells/g의 보존을 증진은 충분히 달성하였다.

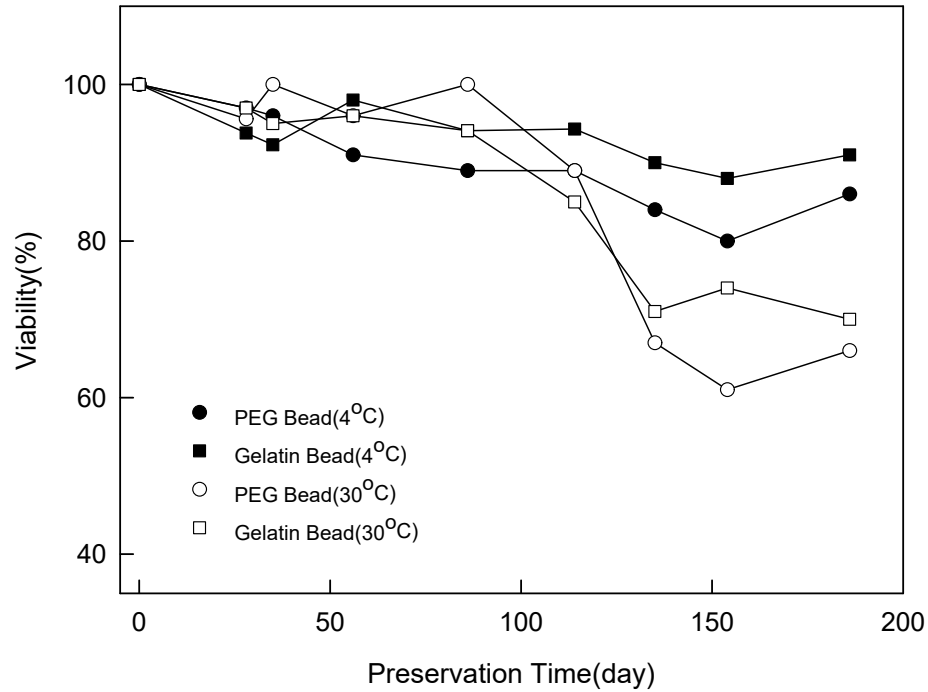


그림 61. The viability of freeze-dried *Lactococcus* sp. W-44 immobilized with polymer-incorporated Ca-alginate bead during the preservation at 4 and 30°C.

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **SUNILBIO Co., Ltd.**

SUNILBIO Co., Ltd.

50, Sandan 1-ro, Jangheung-eup, Jangheung-gun, Jeollanam-do 59315

Republic of Korea


I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Lactobacillus fermentum</i> SI-1309	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12843BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: [<input checked="" type="checkbox"/>] a scientific description [<input type="checkbox"/>] a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on June 11, 2015 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  PARK, Doo Sang, Director Date: September 22 2015

그림 62. *Lactobacillus fermentum* KKY-135(SI-1309) 기탁증

특허증

CERTIFICATE OF PATENT

특허

Patent Number

제 10-1746047 호

출원번호

Application Number

제 10-2015-0122716 호

출원일

Filing Date

2015년 08월 31일

등록일

Registration Date

2017년 06월 05일

발명의 명칭 Title of the Invention

톨 유사 수용체 2 매개된 면역 활성화 및 병원균에 대해 항균 활성을 갖는 젓갈 유래 락토바실러스 퍼멘텀 SI-1309 균주 및 이의 용도

특허권자 Patentee

농업회사법인 선일바이오 주식회사(205311-*****)
전라남도 장흥군 장흥읍 산단1로 49

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청

Korean Intellectual
Property Office

2017년 06월 05일

특허청장

COMMISSIONER,

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

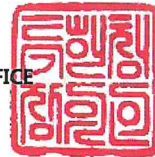


그림 63. *Lactobacillus fermentum* KKY-135(SI-1309) 특허등록증

(주)셀아이콘랩 [제 2협동]

1. β 1,3/1,6-glucan의 피부개선 관여 효능 평가 (*in vitro*)

- 콜라겐: 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로서 세포외 각질에 존재하고, 생체 단백질 총 중량의 30%를 차지하는 중요 단백질로 견고한 3중 나선구조를 가지고 있다. 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포분할과 분화 유도 등이 알려져 있다. 콜라겐은 피부 노화의 외적인 원인이 되는 자외선 노출에 의해서도 파괴되며, 자외선에 의한 변화는 자외선에 노출된 시간 축적에 비례하는 것으로 알려져 있다. 자외선은 피부 진피에서 탄력 섬유성 물질을 축적시키고 교원섬유를 변성시켜 피부에 주름이 생기게 만들고 탄력성을 저하시킨다.

가. β 1,3/1,6-glucan의 피부 콜라겐 합성 촉진 능력을 검증

(1) 실험 방법

- 본 시험의 검액 농도는 crystal violet assay 등을 이용한 예비실험을 통하여 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택한다. 다만, 효력을 나타내는 농도 3개 이상을 선정하여 효력의 농도의존성을 확인할 수 있어야 한다. 시험물질을 녹이거나 희석시킬 때는 혈청이 함유되지 않은 DMEM 배지를 사용한다.
- 다만 시험물질이 DMEM 배지에 녹지 않는 경우에는 에탄올 등 적당한 용매를 사용하여 녹인다. 실험 결과의 신뢰도 향상을 위하여 TGF- β 등을 양성대조 물질로 사용하였다. 또한 주름개선 인자인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 활성을 보기 위하여 세포주 CCD-986sk을 100 mm tissue culture dish에 분주한 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척해 주었다.
- Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가한 100 μ l로 용해해서 4°C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 μ l의 단백질을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell (Hofer, USA)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시킨 뒤, 다시 10분 간격으로

tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하고 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 세척한 후 LAS 4,000를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다

(2) 실험 결과

- β 1,3/1,6-glucan에 의한 콜라겐 생합성능을 측정한 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 측정한 결과 컨트롤 대비 각각 5, 10, 35% 증가함을 확인하였다. 주름개선인자인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 활성을 보기 위하여 세포주 CCD-986sk을 100 mm tissue culture dish에 분주한 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척해 주었다.
- Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가한 100 μl 로 용해해서 4°C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 μl 의 단백질을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell (Hofer,USA)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시킨 뒤, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하고 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 세척한 후 LAS 4,000를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.
- 세포를 100 mm culture dish에 cell seeding한 뒤 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 μl 를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μl 이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 μl 씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μl 와 멸균수 195 μl 를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다.
- Oligo (dT) 15 primer (500 $\mu\text{g/ml}$) 1 μl 추출한 RNA (2 μg)와 nuclease free water로 10 μl 를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl_2 , PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분,

70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 아래와 같다.

Gene	Primer	Sequence(5' → 3')
MMP-1	Forward	AGCGTGTGACAGTAAGCTAA
	Reverse	GTTTTTCCTCAGAAAGAGCAGCAT
β -actin	Forward	ATTGTTGCCATCAATGACCC
	Reverse	AGTAGAGGCAGGGATGAT

- PCR tube에 5×green GoTaq Flexi buffer, MgCl₂, PCR Nucleotide Mix (10 mM), primer, GoTaq DNA Polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. MMP-1은 94°C 30초, 56°C 60초, 72°C 1분(35 cycles)를 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

나. Free radical 소거능

(1) 실험 방법 및 결과

- 항산화 효과를 알아보기 위해 자유라디칼 소거활성시험(free radical scavenging activity test)을 실시하였다. 자유라디칼 소거 활성시험은 1,1-Diphenyl-2- Picryl-Hydrazyl (DPPH) 방법으로 수행하였다(Blois, M.S. Nature 181, 1190(1958)). DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서 라디칼 상태로 존재 시 517 nm에서 최대 흡광을 보이며 소거되면 흡광성을 잃는다. DPPH는 시그마(sigma)사의 것을 사용하였으며 0.15mM의 농도로 메틸알콜에 녹여 사용하였다. 먼저 농도별로 제조하여 각각 2mL 씩 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 10분간 방치한 뒤, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl, Sigma)을 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하였다. 0.2 mM DPPH 에탄올 용액을 제조하여 조제한 액을 여과지

(Whatman No.2)에 여과한 후 0~200 $\mu\text{g/ml}$ 사이의 농도로 제조 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시키고, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군으로는 정제수를 이용한 경우로 설정하였다. 그 뒤, 상기 흡광도를 이용하여 수학적 식 1에 따라 자유라디칼 소거율을 계산하고, 자유라디칼 소거율 측정은 5회 반복 시험하여 구하였다.

$$\text{자유라디칼 소거율(\%)} = \{100 - (\text{실험군} - \text{블랭크의 흡광도} / \text{대조군에서의 흡광도})\} \times 100$$

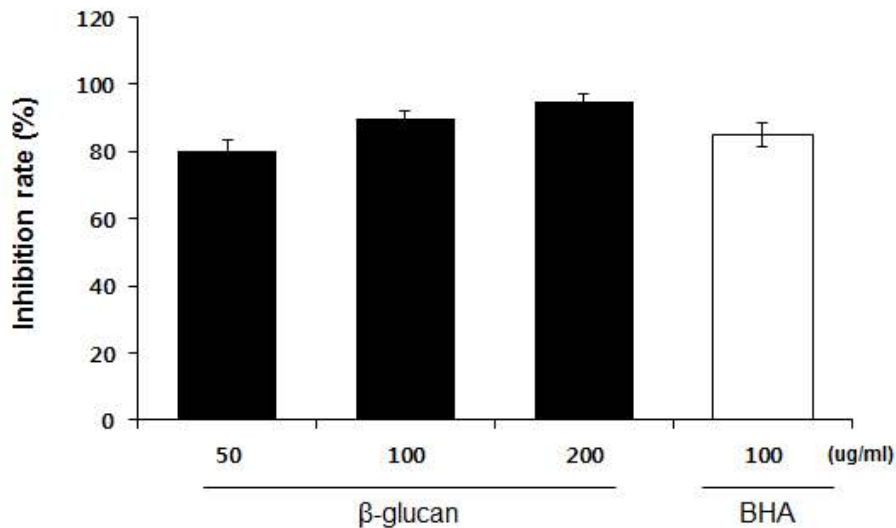


그림 59. β 1,3/1,6-glucan에 의한 라디칼 소거효과

- β 1,3/1,6-glucan의 항산화 작용을 확인하기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 BHA(butylated hydroxyanisole)를 이용하여 β 1,3/1,6-glucan과 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 90% 저해 활성을 나타내었고 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 95% 이상의 저해활성이 나타났다. 양성 대조군 BHA 와 비교하였을 때 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 5% 정도 높은 저해 활성이 나타났다. 이 결과로 미루어 봤을 때 β 1,3/1,6-glucan은 항산화 작용이 높고 피부에서 흔히 일어나는 활성 산소에 대한 노화를 방지하는데 큰 도움이 될 것으로 판단된다.

- ① 피부 콜라겐 발현조절 메커니즘 검토 (ERK 및 p-38 인산화 Western blot analysis)
- ② Free radical 소거능: Vitamin C (IC50:50 $\mu\text{g/ml}$) 대비 효과 검증
- ③ 피부 섬유아 세포 (Dermal fibroblast) 세포 활성화 시험
- ④ β 1,3/1,6-glucan의 경피수분손실율 (TEWL) 및 Corneometer를 이용한 피부 전기부하량 측정

2. β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가 시험

가. 시험 방법 및 결과

(1) 세포주 선택 및 세포배양

- 섬유아세포를 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 μ g/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37°C를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양하였다.
- MTT assay: 세포를 24-well plate에 well당 5×10^4 개로 분주한 후 세포배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 10% FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양한다. MTT용액 (0.5% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 well에 100 μ L씩 넣고, 4시간 동안 배양한다. 배양액을 제거한 다음 dimethylsulfoxide 용액 1000 μ L씩을 넣고 10분간 흔들어 준 다음 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{세포 생존율} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

- β 1,3/1,6-glucan을 0, 100, 250, 500 μ g/ml 농도로 세포에 처리하여 배양 했을 때 세포 독성을 측정한 결과 위와 같다. β 1,3/1,6-glucan을 500 μ g/ml 농도에서도 약 100%의 생존율을 나타내어 독성이 없음을 확인하였다.

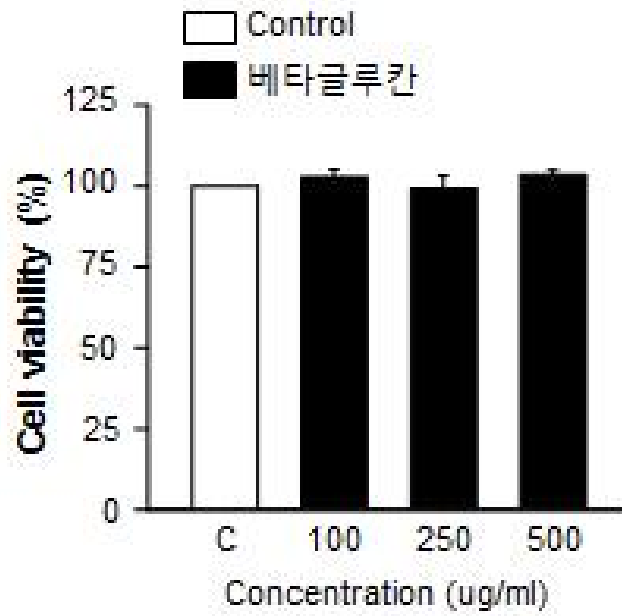


그림 60 β 1,3/1,6-glucan에 의한 세포 생존율

3. β 1,3/1,6-glucan을 활용한 기능성 화장품 시작품 제작

가. 코스메슈티컬 화장품에 가장 핵심원료를 이루는 펩타이드와 β 1,3/1,6-glucan 소재 생산



그림 61 기능성 화장품 소재인 펩타이드와 β 1,3/1,6-glucan

나. 펩타이드 합성기술

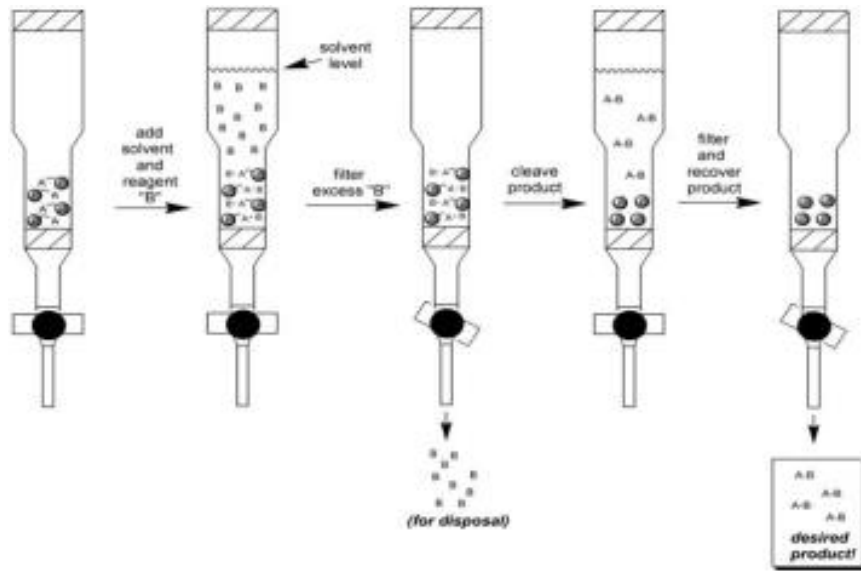


그림 62 고체상 펩타이드 합성(Solid Phase Peptide Synthesis) 방법.

- 위와 같은 방법으로 당사가 확보한 펩타이드 소재인 콜라겐 생성 촉진 펩타이드는 상용화시 대량생산 및 표준화가 용이한 저분자 소재로서 생체 친화적이며 인체 적용시 안전한 소재임

구분	국외 A사	국내 P사	(주)셀아이콘랩
반응기 형태	밀폐 수직형	개방 수평형	밀폐 수평형
반응 혼합 방식	Vortexing	Rocking	Rocking
구동 방식	전자동	반자동	수동
1회 제조 능력	수십 mg	수십 mg	수십~수백 g
아미노산 사용량 ¹⁾	20 당량	8 당량	2 당량
제조 원가 ²⁾	100	60	10
특수기술 적용	-	히팅/마이크로웨이브	마이크로웨이브 ³⁾
최적화 용도	연구용 소재	주문 생산용	화장품 원료

- 고체상 펩타이드 합성 (Solid phase peptide synthesis; SPPS) : Fmoc-chemistry 합성 방법으로 얻었으며, 레진에 아미노산의 로딩 ▶ 아미노산의 보호기 제거 ▶ 아미노산의 커플링 반응 ▶ 반응 여부 확인 (Kaiser test), 반응 용액 제거 및 레진 세척 ▶ 레진 및 보호기 제거로 총 6단계로 나누어지며, 전체 합성 과정 모식도는 아래와 같음.

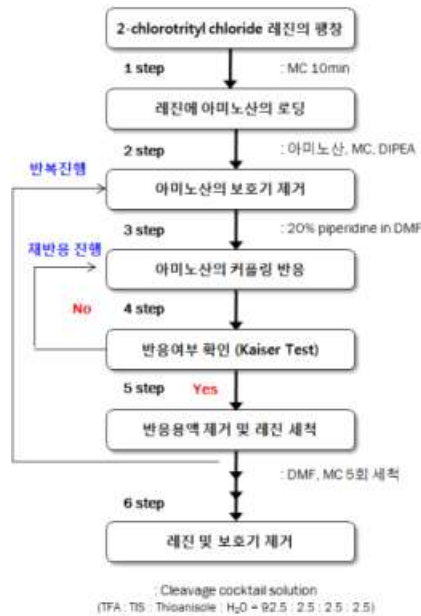


그림 63 펩타이드 합성 과정

- 기확보 해외 바이어를 활용한 제형 테스트 총 5차에 걸친 제형 테스트를 통해 핵심 소재와 잘 어우러지며 향과 발립성 부분을 중점적으로 평가하였다.

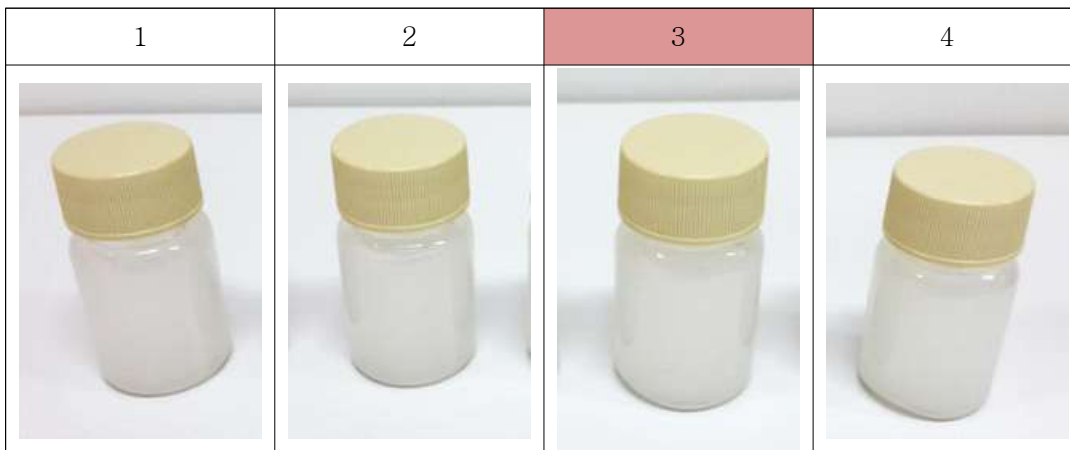


그림 64. 클린저의 제형

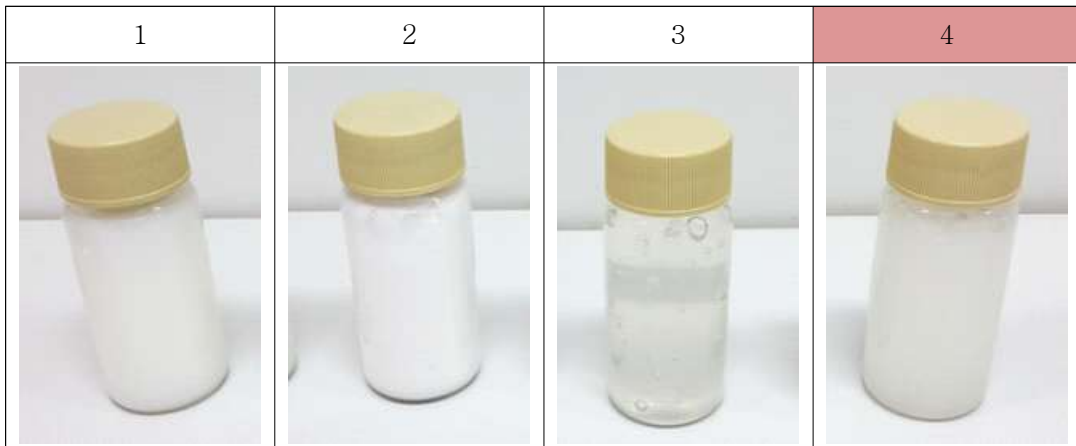


그림 65. 겔의 제형

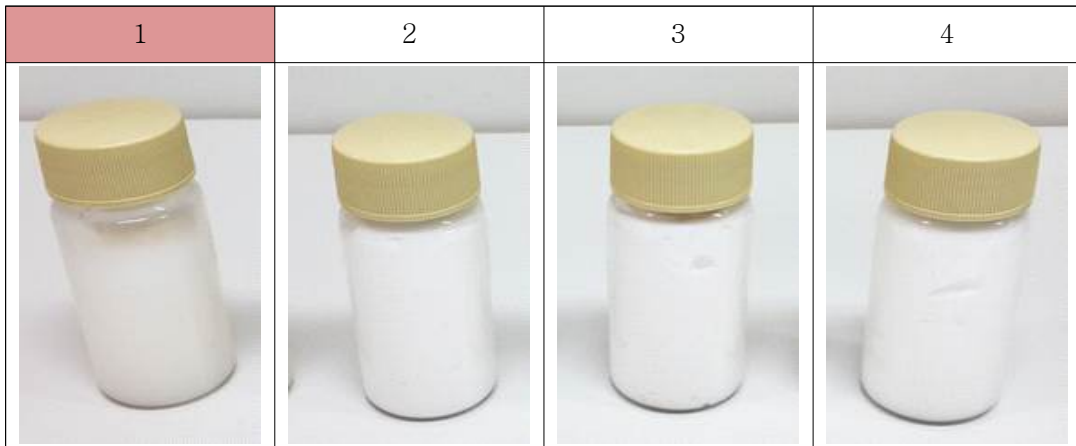


그림 66. 로션의 제형

- 홍콩의 화장품 전문가 집단을 활용하여 이메일을 통한 제형의 테스트 결과 공유. 수출 최적의 제형 테스트 바이어로 선정

Celliconlab ~ Yumei Refresh Series 2nd round comment

Overall

Item	Products	Comments
7	Face Serum (Type A)	Good moisturizing but a bit sticky, feel like cream more than serum. Plz rematch with the texture of "Pure Essence 原液".
8	Face Serum (Type B)	Good moisturizing but a bit sticky. Difficult penetration.
10	Face Cream (Type B)	Enough moisturizing but too sticky and difficult penetration.

Celliconlab ~ Yumei Moisturizing Series 3rd round comment

Overall

Item	Products	Comments	Remarks
4	Face Serum (semi-transparent)	Feel moisture and smooth after used but sticky.	Plz lower the viscosity and improve penetration
4-1	Face Serum (White)	Feel moisture but oily. Accept odor.	
5	Face Cream	Texture is OK. Absorbed quickly but does not fresh enough. Odor is too strong.	

Celliconlab ~ Yumei Moisturizing Series 4th round comment

Overall

1. Any items in this range contain alcohol, colorant & mineral oil?

Item	Products	Comments	Remarks
1	4-1, Face Serum (semi-transparent)	Feel moisture and smooth after used but sticky. Good penetration and moisturizing. Plz remove and remove the "film".	Plz lower the viscosity and improve penetration
<p>We maintain current odor of 4-1 serum. How about current penetration of 4-1 serum? need to lower the viscosity and improve penetration</p> <p>OK -> in my opinion, if we make lower film it is because Face Serum has 3 formulation, if we make Face Serum without film, I wonder its moisture effect is good or not. Anyway I will provide the new formulation without film. Please prepare it with before use!! Thank for your comment. could you also prepare a sample with same viscosity with red capsule but without film for our better comparison?</p>			
7	Face Cream 4-1	Texture is OK. Absorbed quickly but does not fresh enough. Odor is too strong. Good penetration and moisturizing. Plz remove and remove the "film".	
<p>!! How about moisture feeling? is cool</p> <p>!! Ac odor mentioned, not fresh-feeling due to strong odor? Or texture of formulation? texture of formulation</p> <p>OK -> Okay. We will remove the sample without "film". But some film could be maintain for moisturizing effect. Okay. We will compare after receiving your new sample.</p>			

그림 67. 해외 기획보 바이어를 대상으로 한 제형 테스트 결과





그림 68. 펩타이드와 β 1,3/1,6-glucan 함유 기능성 화장품 제품화

4. 제형 안정성의 확보

가. 장기보존 시험 방법 및 결과

(1) 로트의 선정

- 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다. 3로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다. 다만, 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있다. 단 신제품인 경우 6개월 이상의 데이터로 판단하고 이에 따라 장기보존 시험으로 재검증한다.

- 보관 조건

제품의 저장조건에서 적절한 시험기간 및 측정시기를 설정하여 시험한다.

온도 : $37 \pm 2^\circ\text{C}$ / 상대습도 : $75 \pm 10\%$

- 시험기간

6개월 이상 시험하는 것을 원칙으로 하나 필요 시 조정할 수 있다.

- 측정시기

0day, 1day, 2day, 3day, 4day, 5day, 6day, 1 2day, 30day, 90day, 180day, 210day, 2 40day, 2 70day

- 측정 결과

안정도 기간 설정		1	2	3	4	7	8	11
안정도/ (분리현상)	항온 35°C	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음
안정도 기간 설정		30	60	90	120	180	210	
안정도/ (분리현상)	항온 35°C	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	

5. 가속시험 시험 방법 및 결과

가. 로트의 선정

- 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다. 1로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다. 다만, 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있다. (포장용기가 정해지지 않을 경우 PET 샘플 병으로 대체한다.)

- 보관 조건

제품의 저장조건에서 적절한 시험기간 및 측정시기를 설정하여 시험한다.

온도 : $45 \pm 2^\circ\text{C}$ / 상대습도 : $75 \pm 10\%$

- 시험기간

0day, 1day, 2 day, 3day, 4day, 5day, 6day, 12day, 30day, 90day, 180day, 210day

- 측정시기

시험개시 때를 포함하여 최소 3번을 측정한다.

- 측정결과

안정도 기간 설정		1	2	3	4	7	8	11
안정도/ (분리현상)	항온 45℃	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음
안정도 기간 설정		30	60	90	120	180	210	
안정도/ (분리현상)	항온 45℃	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	

나. 가속시험 시험 방법 및 결과

(1) 로트의 선정

- 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다. 1로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다. 다만, 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있다.

- 시험기간

냉동-실온-45℃-실온-1번 순환으로 한다.(24hr)

- 측정 결과

시험	1	2	3
보관장소	냉동	실온	45℃
1번순환	분리없음	분리없음	분리없음
2번순환	분리없음	분리없음	분리없음
3번순환	분리없음	분리없음	분리없음
4번순환	분리없음	분리없음	분리없음
5번순환	분리없음	분리없음	분리없음
6번순환	분리없음	분리없음	분리없음
7번순환	분리없음	분리없음	분리없음
8번순환	분리없음	분리없음	분리없음

- 물리 화학적 비교: pH 변화 테스트를 위해 정제수에 희석한 10% solution 상태의 제형을 pH meter를 이용하여 항온 35°C, 45°C 에서 측정하여 6.0 ± 1.0 범위안에 들어오는 것을 안정성에 적합한 것으로 한다.
- 점도 테스트 VISCOMETER를 이용하여 (#4, 50rpm) 조건하에서 점도를 측정한다. 항온 35°C, 45°C 및 실온 25°C 에서 측정하며 10,000~20,000 범위 안에 들어오는 것을 안정성에 적합한 것으로 한다. VISCOMETER : BROOKFIELD의 DV-E VISCOMETER를 이용하여 측정하였다.

6. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics 제형 개발

가. 최적 제형 개발 (유효성분 함량의 최적비 결정)

(1) 최적 제형 개발을 위한 사전 선호도 및 기타 설문 조사

- β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 inner beauty 형태의 Nutricosmetics 신제품 개발을 위하여 소비자들이 선호도 조사를 수행하였다. 화장품시장에 있어서 신 시장 아이템을 inner beauty 으로 예측하고 있으나 결국 비즈니스의 성공은 기술 중심이 아니라 시장 중심, 즉 고객의 생각을 반영하는 것이라고 생각하기에 이에 당사가 미래 아이템으로 가고자하는 방향에 대한 타당성 검증이 필요함에 따라 구매자들에 대한 소비자 니즈 및 소비자 행동, 브랜드 선호 등의 특성을 정확히 파악하여 향후 본 연구사업을 통해 개발하고자 하는 제품의 유형, 사업화 가능성을 예측하고자 하였다.
- 따라서 하기 표 1과 같은 시장 분석 및 소비자 선호도 조사를 통한 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 inner beauty 형태의 Nutricosmetics 신제품 개발 방안을 설정하였다.
- 조사 방법은 국내외 화장품 시장 동향 분석을 기반으로 하여 시장의 현 이슈, 국가별 건강과 화장품 동향, 수출 장벽, 국내외 업체 동향을 분석하고 그에 따른 국내 소비자들의 선호도 조사를 수행하였다.

표. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 inner beauty 형태의 Nutricosmetics의 제품화 방안에 대한 소비자 조사 목록

■ 온라인 시장조사를 통한 소비자 구매의향 파악

(소비자구매경로, 인구 통계적 요인, 구매 포인트, 선호도, 구매이유, 재구매 등)

■ 시장조사 및 분석을 통한 구매 주요요인 파악

■ 요인 파악에 따른 향후 가능 목표 시장 선정

(가) 국내외 이너뷰티 시장

- inner beauty이란 피부에 좋은 성분을 알약이나 음료 등으로 간편하게 복용함으로써 피부를 아름답게 변화시키는 제품을 가리킴. 일본에서는 이미 시장 규모가 1조5천억원에 이를 정도로 확고하게 자리 잡았으며 국내에서도 유명 화장품회사는 물론 제약회사들까지 가세해 시장을 빠른 속도로 키워가고 있는 추세이다.
- inner beauty란 히알우론산, 콜라겐, 글로코실세라미드 등 피부에 좋은 성분을 알약이나 음료 등의 형태로 간편하게 만들어 복용함으로써 피부를 근본적으로 아름답고 건강하게 변화시키는 제품을 가리킴. 국내에서는 아모레퍼시픽, LG 생활건강, CJ제일제당 등 유명 화장품회사들이 앞장서서 시장을 키워가는 상황이다. 국내 시장규모는 2010년 500억 ~ 600억원에서 지난해 1천500억원으로 3 배 가량 성장한데 이어 올해에는 3천억원에 이를 것으로 예측하고 있다. ○ 중국에서는 미세먼지, 황사 등으로 호흡기 및 피부 질환 환자가 증가하면서 이너뷰티에 관한 중국인들의 관심도 증가하고 있는 추세이다. 중상정보왕(中商情報网)이 발표한 ‘중국 이너뷰티 산업 조사 및 발전 전망 분석 보고’에 따르면 이너뷰티 시장의 규모는 200억위안에 달하며, 매년 평균 20억씩 성장중에 있음을 알 수 있다.
- 따라서 본 연구사업에서 개발하고자 하는 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 inner beauty 형태의 Nutricosmetics 신제품 개발을 위하여 하기와 같이 총 200 명을 대상으로 소비자 선호도 조사를 수행하였다.

1. 시장조사설계

(가) 시장조사개요

① 조사 목적	- 이너뷰티 화장품 시장에 대한 소비자 니즈, 행동에 대한 파악을 통해 향후 마케팅 전략에 반영
② 조사 일정	- 조사준비: 4월 1일 ~ 4월 14일/ 본조사: 4월 15일 ~ 4월 25일/ 자료처리: 4월 28일 ~ 5월 7일
③ 조사 대상	- 온라인 소비자 대상(200명)/ 이너뷰티 유경험자: 50명, 무경험자: 150명 대상

과정	조사설계	측정문항 개발 및 구성	소비자 조사	DATA 분석	Report
목적	설문측정을 위한 대상선정	'이너뷰티 화장품'에 대한 소비자반응 및 구매의도에 대한 측정 문항 개발 및 구성	설문조사 실시 온라인200부 내외 조사	설문 DATA 분석 위한 DATA 처리	설문지
내용	조사대상자, 조사대상지 선정 지역, 연령, 학력 등을 고려한 조사대상자 선정	측정문항 개발 및 구성 이너뷰티 화장품 고객호감도 측정 항목 개발 소비자 구매의도 관련한 측정항목 개발 이너뷰티에 대한 기능별 측정 항목 개발	고객들을 대상으로 설문배포 및 조사실시함 일반 소비자 대상	코딩 문항을 DATA화 하기 위한 변환 과정 빈도분석, 요인분석, 교차분석 통한 분석 진행	분석결과 작성

○ 소비자 선호도 조사의 process는 하기와 같은 방법으로 조사를 수행하였다.

(나) 시장조사프로세스



- 설문 조사 대상의 인구 통계학적 자료는 다음과 같이 여성 80%, 남성 20%의 비율로 선정하였고, 주로 화장을 많이 소비하는 20 ~ 40 대의 연령층을 대상으로 조사를 수행하였다.
- 설문 조사는 구매동기, 가격, 브랜드 인지도, 피부 타입과의 적합성, 제품의 품질과 기능, 제품의 향, 시장 트렌드, 표시정보, 주변의 추천 등 10 여 개의 항목으로 조사하였다. 조사 결과, 하기의 그림과 같이 이너뷰티 화장품의 인지도는 76% 이상으로 나타났으나, 사용자의 경험은 25%로 상당히 낮은 것으로 나타났다. 이는 아직 이너뷰티 제품의 시장 형성이 낮은 수준임을 나타내는 지표라 할 수 있다.
- 또한 이너뷰티에 대한 사용자가 낮은 이유는 주로 먹는 ‘화장품에 대한 거부감’, ‘이너뷰티에 대해 몰라서’ 및 ‘특별한 효능이 없을 것 같아서’ 등의 답변을 주로 제시하였다. 이는 이너뷰티에 대한 홍보 및 효능의 입증을 통한 신제품 개발을 통해 가능할 것으로 예측된다.

시장조사결과 | 인구통계학적 분석결과

2. 시장조사결과

▪ 인구통계학적 분석 (설문 대상자 정보)

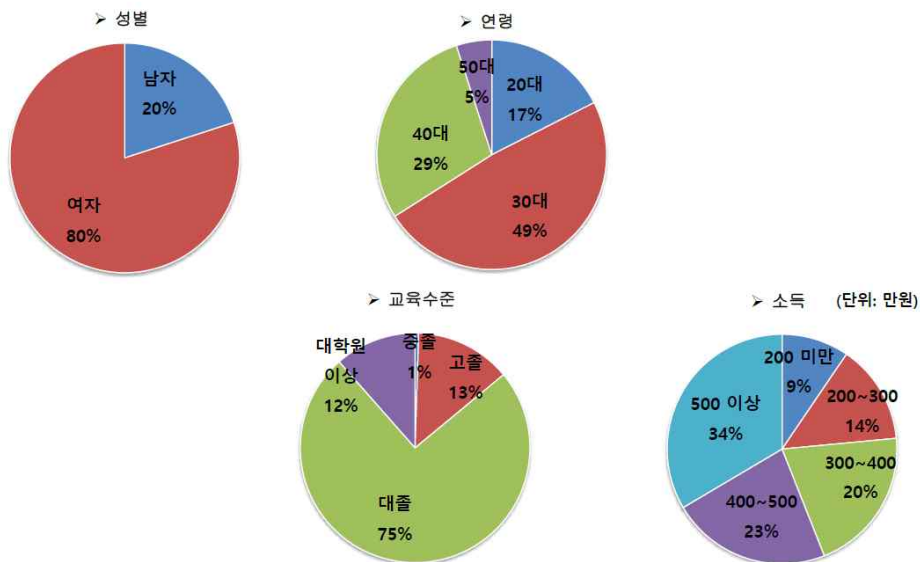


그림 69. 이너뷰티 제품의 인지도

• 이너뷰티를 사용한 이유(복수응답)



- 이너뷰티에 기대는 피부관리 효과, 간편한 피부관리 방법이고, 호기심 순으로 피부관리에 대한 관심은 상당히 높은 것으로 파악
- 이너뷰티 화장품은 효과성과 간편성으로 핵심 요소를 정해 개발 해야 함.

• 이너뷰티 화장품의 인지도

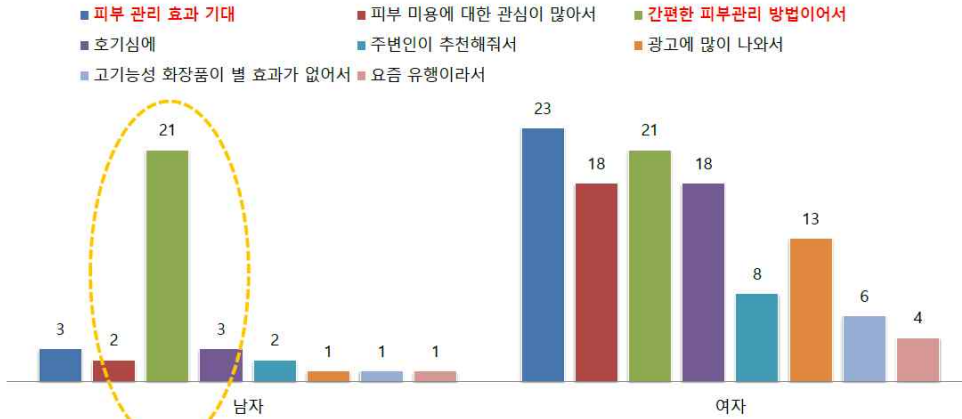


• 이너뷰티 화장품 사용 경험



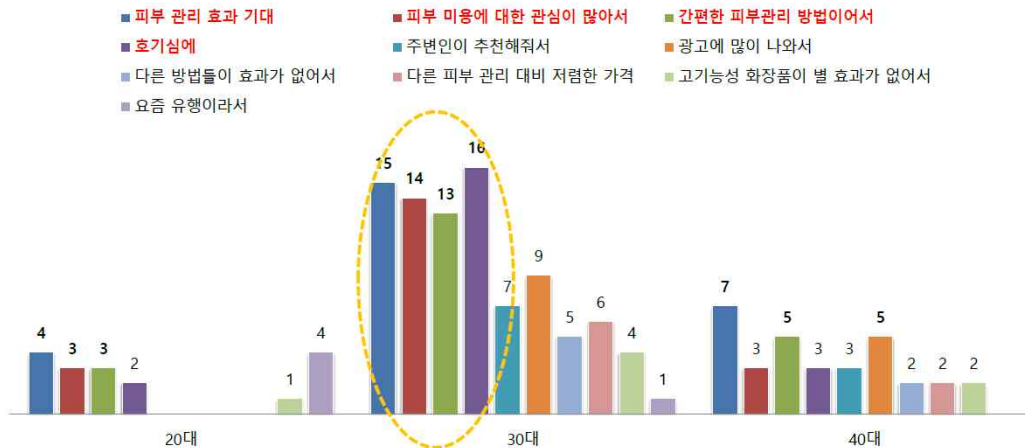
- 이너뷰티 화장품이 있다는 사실을 알고 있는지를 묻는 질문에 67%가 안다고, 33%가 모른다고 응답.
- 이너뷰티 화장품을 사용한 경험을 묻는 질문에 25%가 사용한 경험이 있고 75%는 사용하지 않는 것으로 나타남
- 대부분의 사람들이 이너뷰티의 존재를 알고는 있지만 이너뷰티의 사용경험은 상당히 낮음.
- 이너뷰티 화장품의 인지도를 높이고 실질적인 구매를 이끌기 위해서는 인지도 및 테스트 마케팅 등의 다양한 홍보가 필요.

▪ 이너뷰티를 사용한 이유(성별)



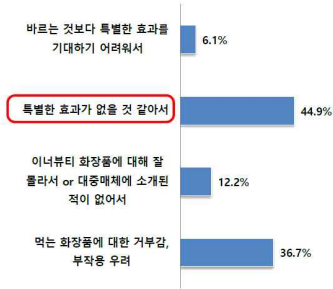
- <남자>
- 간편한 피부관리 방법이라는 응답이 가장 많음
- <여자>
- 피부관리 효과 기대, 간편한 피부관리의 방법 순으로 응답

▪ 이너뷰티를 사용한 이유(연령별)



- <20대>
- 피부관리 효과 기대, 피부 미용에 대한 관심이 많아서/간편한 방법이어서 순으로 응답
- <30대>
- 호기심, 피부관리 효과 기대, 피부미용에 대한 관심 순으로 응답
- <40대>
- 피부관리 효과 기대, 간편한 방법이어서/광고에 많이나와서 순으로 응답

• 이너뷰티 화장품의 효능 기대하지 않는 이유



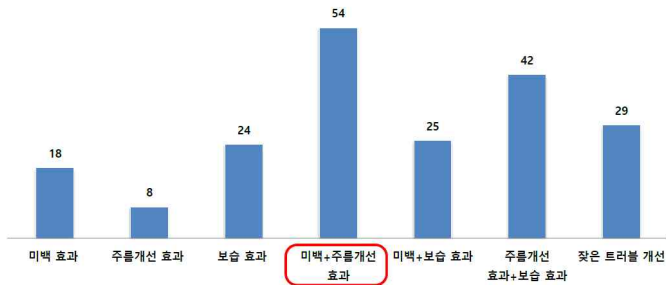
• 이너뷰티 화장품의 효능 기대하는 이유



- 이너뷰티의 효능을 기대하지 않는 이유를 묻는 질문에 특별한 효과가 없을 것 같다, inner beauty에 대한 거부감 등의 순
- 이너뷰티의 효능을 기대한다면 그 이유를 묻는 질문에 화장품 효능 관련 연구결과와 전문가의 추천 등의 순
- 이너뷰티 화장품의 홍보 시 전문가의 의견, 연구결과에 대한 자료를 프로모션 도구로 이용하는 것이 적절함.

○ 본 설문에 응답한 소비자들의 경우, 이너뷰티의 기능적 측면을 고려하였을 때, 미백과 주름 개선의 효과를 나타낼 수 있는 제품을 선호하는 것으로 나타났으며, 이는 동양인의 관심도가 미백 기능성에 있음을 시사하며, 나이가 들수록 보다 젊음을 유지할 수 있는 주름 개선에 관한 관심도가 높음을 시사하고 있다. 따라서, 본 연구를 통해 개발되어야 할 제품으로서는 면역 효능에 대한 기능성 외에 화장품으로서의 고유 기능을 갖는 복합 효능의 다기능성 제품 개발이 요구됨을 알 수 있었다.

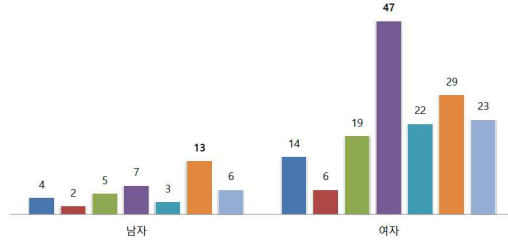
• 구입하고 싶은 이너뷰티의 효능 및 효과



- 이너뷰티를 구입할 경우 어떠한 효과의 이너뷰티를 사용할 것인지는 묻는 질문에 미백+주름개선 효과, 주름개선+보습효과의 순
- 향후 제품 신제품 개발 시 주요 효능으로 미백, 주름개선을 핵심 기능으로 개발해야 함.

• 구입하고 싶은 이너뷰티의 효능 및 효과(성별)

■ 미백 효과 ■ 주름개선 효과 ■ 보습 효과
 ■ 미백+주름개선 효과 ■ 미백+보습 효과 ■ 주름개선 효과+보습 효과
 ■ 잦은 트러블 개선



<남자>
 - 주름개선 효과+보습효과, 미백+주름개선 효과 순으로 응답
 <여자>
 - 미백+주름개선 효과, 주름개선 효과+보습효과 순으로 응답

(2) β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 최적 제형 개발 (Outer beauty 제형)

- 상기 설문 조사를 통해 소비자 선호도 조사를 통해 β 1,3/1,6-glucan의 효능을 극대화 하며, 수출에 최적화 된 제형 개발 → 다양한 제형을 테스트 함으로써 보관시 가장 안정한 제형 개발을 수행하였다.
- 베타글루칸과 자체 개발 펩타이드의 시너지 효과를 나타내기 위한 최적의 배합비 탐색하였으며, 최종 제형 개발 및 안전성 테스트 → 최종 제형의 안정성, 안전성 확보를 위해 시험 성적서 확보하였다.

표 42. 제형 개발 기술과제

시장 요구도	해결 기술과제
피부 환경 개선	베타글루칸 소재를 함유한 제형 개발로 노화 방지 및 주름 개선 효과 기대
사용 후 속효성	
보습 지속력 강화	사용 후 소비자가 인지 가능한 정도의 보습효과 유지



그림 70. 시제품 제작 순서

- 총 5차에 걸친 제형 테스트를 통해 핵심 소재와의 적합성을 분석하여 소비자 선호에 따른 향과 향후 outer-beauty의 제형화를 고려하여 1차적으로 크림 형태의 제형을 개발하였다.

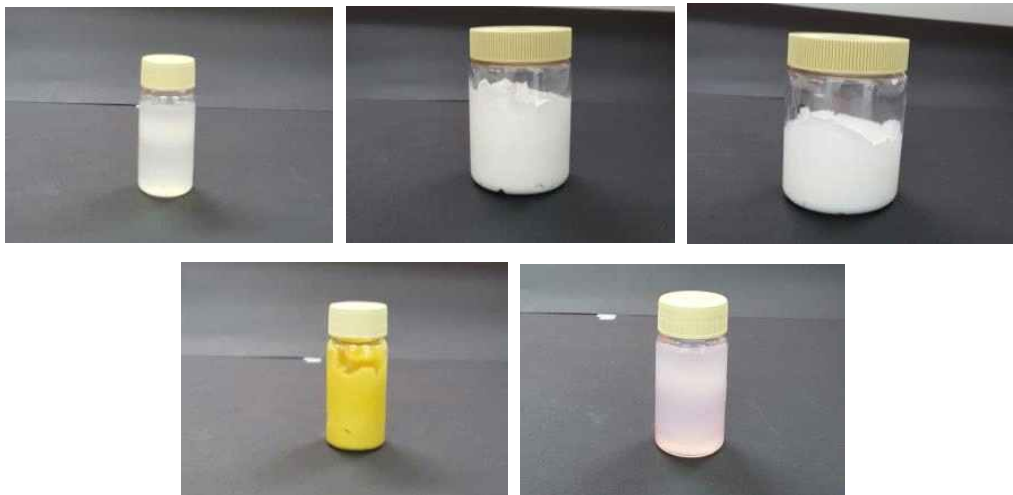


그림 71. 베타글루칸을 활용한 제형 개발



그림 72. 최종 확정 제형

* 1차 outer-beauty 제형의 제품의 성적서

제품 시험의뢰 및 성적서						
품 명	쥬디메르 인텐시브 리제네레이팅 아이크림					
제 조 번 호	M-20160509A	제 조 량	17kg	제 조 일 자	2016-05-09	
생 산 수 량	500 EA			포 장 일 자	2016-05-11	
시험의뢰부서	생산본부	시험의뢰일자	2016-05-11	시 험 의뢰 자	이영구	
검체 채취자	곽선미	검체 채취량/방법	3EA/Random	표 시 용 량	30mL	
시험항목	시험기준		시험결과	시험일자	시험자	
형상(디자인)	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
내 용 량	표시용량(중량)의 97%이상		적합	2016-04-26	곽선미	
Lot No. / 라벨 위치 상태	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
제조일자 표시	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
성 상	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
색 상	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
향 취	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
사 용 감	표준품과 동일		적합	2016-04-26	곽선미	
이 물 질	이물질이 있어서는 않된다		적합	2016-04-26	곽선미	
안 정 도	5℃, 37℃ 3일 경과시 안정		적합	2016-04-26	곽선미	
비 중	0.985 ± 0.05		0.995	2016-04-26	곽선미	
pH	6.5 ± 1.0		6.75	2016-04-26	곽선미	
점 도	110,000 ± 2,200 (4/6rpm)		113,000	2016-04-26	곽선미	
미 생 물	총호기성 생균(세균)수	100 CFU/ml이하	적합	2016-04-26	곽선미	
	총호기성 생균(진균)수	불검출	적합	2016-04-26	곽선미	
특이사항						
판 정	적합	판 정 일 자		작 성	검 토	승 인
				/	/	/

(주)셀아이콘랩

제품 시험의뢰 및 성적서

제품 시험의뢰 및 성적서						
품 명	쥬디메르 인텐시브 리제네레이팅 크림					
제 조 번 호	M-20160510A	제 조 량	70kg	제 조 일 자	2016-05-10	
생 산 수 량	500 EA			포 장 일 자	2016-05-11	
시험의뢰부서	생산본부	시험의뢰일자	2016-05-11	시 험 의 리 자	이영구	
검체 채취자	곽선미	검체 채취량/방법	3EA/Random	표 시 용 량	50mL	
시험항목	시험기준		시험결과	시험일자	시험자	
형상(디자인)	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
내 용 량	표시용량(중량)의 97%이상		적합	2016-05-11	곽선미	
Lot No. / 라벨 위치 상태	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
제조날짜 표시	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
성 상	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
색 상	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
향 취	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
사 용 감	표준품과 동일		적합	2016-05-11	곽선미	
이 물 질	이물질이 있어서는 않된다		적합	2016-05-11	곽선미	
안 정 도	5°C, 37°C 3일 경과시 안정		적합	2016-05-11	곽선미	
비 중	0.985 ± 0.05		1.034	2016-05-11	곽선미	
pH	6.5 ± 1.0		6.53	2016-05-11	곽선미	
점 도	110,000 ± 22,000 (4/6rpm)		126,000	2016-05-11	곽선미	
미 생 물	총호기성 생균(세균)수	100 CFU/ml이하	적합	2016-05-11	곽선미	
	총호기성 생균(진균)수	불검출	적합	2016-05-11	곽선미	
특이사항						
판 정	적합	판 정 일 자		작 성	검 토	승 인
				/	/	/
				/	/	/

(주)셀아이콘랩

(3) outer-beauty 제형의 안정성 확보

(가) 장기보존 시험 방법 및 결과

- 로트의 선정

- 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다. 3로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다. 다만, 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있다. 단 신제품인 경우 6개월 이상의 데이터로 판단하고 이에 따라 장기보존 시험으로 재검증한다.

- 보관 조건

제품의 저장조건에서 적절한 시험기간 및 측정시기를 설정하여 시험한다.

온도 : $37 \pm 2^\circ\text{C}$ / 상대습도 : $75 \pm 10\%$

- 시험기간

6개월 이상 시험하는 것을 원칙으로 하나 필요 시 조정할 수 있다.

- 측정시기

0day, 1day, 2day, 3day, 4day, 5day, 6day, 12day, 30day, 90day, 180day, 210day, 240day, 270day

- 측정 결과

안정도 기간 설정		1	2	3	4	7	8	11
안정도/ (분리현상)	항온 35°C	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음
안정도 기간 설정		30	60	90	120	180	210	
안정도/ (분리현상)	항온 35°C	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	

(나) 가속시험 시험 방법 및 결과

- 로트의 선정

- 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다. 1로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다. 다만, 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있다. (포장용기가 정해지지 않을 경우 PET 샘플 병으로 대체한다.)

- 보관 조건

제품의 저장조건에서 적절한 시험기간 및 측정시기를 설정하여 시험한다.

온도 : $37 \pm 2^\circ\text{C}$ / 상대습도 : $75 \pm 10\%$

- 시험기간

6개월 이상 시험하는 것을 원칙으로 하나 필요 시 조정할 수 있다.

- 측정시기

0day, 1day, 2day, 3day, 4day, 5day, 6day, 12day, 30day, 90day, 180day, 210day, 240day, 270day
시험개시 때를 포함하여 최소 3번을 측정한다.

- 측정결과

안정도 기간 설정		1	2	3	4	7	8	11
안정도/ (분리현상)	항온 45°C	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음
안정도 기간 설정		30	60	90	120	180	210	
안정도/ (분리현상)	항온 45°C	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	분리 없음	

(다) 가혹시험 시험 방법 및 결과

- 로트의 선정

- 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용한다. 1로트 이상에 대하여 시험하는 것을 원칙으로 한다. 다만, 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 경우에는 예외로 할 수 있

다.

- 시험기간

냉동-실온-45℃-실온-1번 순환으로 한다.(24hr)

- 측정 결과

시험	1	2	3
보관장소	냉동	실온	45℃
1번순환	분리없음	분리없음	분리없음
2번순환	분리없음	분리없음	분리없음
3번순환	분리없음	분리없음	분리없음
4번순환	분리없음	분리없음	분리없음
5번순환	분리없음	분리없음	분리없음
6번순환	분리없음	분리없음	분리없음
7번순환	분리없음	분리없음	분리없음
8번순환	분리없음	분리없음	분리없음

(라) 용기의 선정 조건

- 쥬디메르의 기존 이미지와 잘 어우러지는 용기 - 쥬디메르는 흰색 바탕에 검은색 글씨로써 코스 메슈티컬 전문 브랜드를 잘 나타내주고 있으며, 튜브 디자인을 통해 편의성 증대하고자 하였다.
- 기존 제품과 차별점을 부각시키기 위해 기본 튜브 용기는 제외하였으며, 기존 제품과는 다르게 고농도 베타글루칸 및 펩타이드를 활용 → 제형의 단가 상승 및 가격 증가로 인해 용기의 고급화가 매우 중요하다.



그림 73. 고급화 용기의 후보군

- 다섯가지 용기를 대상으로 설문조사를 실시 하였으며 프리미엄 제형과 가장 잘 어울리는 용기 선택 → 용기의 디자인 완료



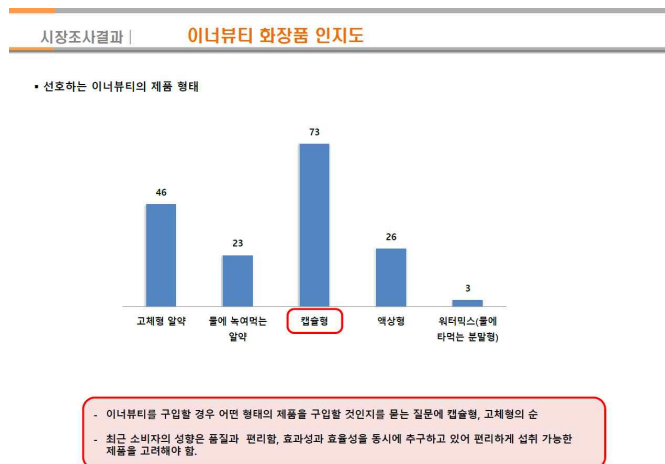
- 이밖에 용기 고급화와 더불어 단상자의 고급화도 매우 중요함 → 각종 디자인을 통해 다수의 바이어 등을 활용 선호도 조사 진행



그림 74. 고급화 단상자 시안

(4) β 1,3/1,6-glucon을 유효성분으로 하는 최적 제형 개발 (inner beauty 제형)

- β 1,3/1,6-glucon을 유효성분으로 하는 inner beauty 제형은 소비자 선호도 조사의 결과에 따라 소비자가 간편하게 섭취할 수 있는 제형인 캡슐형 또는 타정을 통한 알약의 형태로 제조할 예정이다. 캡슐형 또는 타정을 통한 알약은 전라남도 식품산업연구센터에 의뢰하여 제조하였다. 또한 타정 시 필요한 부형제의 경우, β 1,3/1,6-glucon의 폴리머의 물리적 특성과 20 ~ 40 대 여성층의 기호도에 따라서 부형제 및 가미 성분 등을 조정하였다.

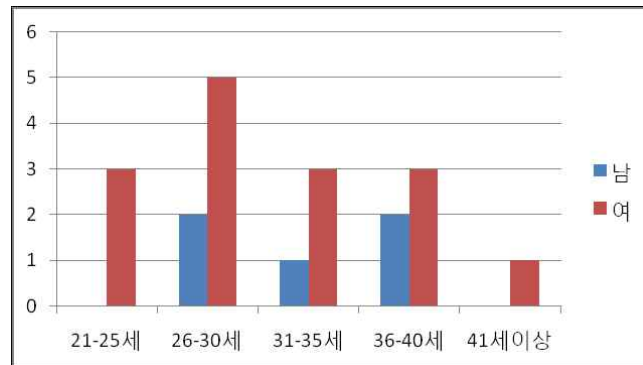


7. β 1,3/1,6-glucan의 Nutricosmetics 제형 효능 평가

가. outer beauty 제형의 효능 평가

- 최소한 1주전까지 항히스타민제제를 복용하고 있지 않았거나, 건선, 습진, 여드름 등과 같이 첩포 시험에 영향을 줄 수 있는 피부질환을 앓고 있지 않은 건강한 성인 20명 이었다. 연령과 성별의 분포는 아래와 같다.

	남	여
21-25 세	0	3
26-30 세	2	5
31-35 세	1	3
36-40 세	2	3
41 세이상	0	1
합계	5	15



(1) 실험 재료

- 본 연구에 사용된 재료로는 다음에 열거된 바와 같다.

- 1) Haye' s chamber
- 2) Micropore tape
- 3) Marking pen ; Oil ink pen
- 4) Cotton ball
- 5) 시료

(2) 연구 방법

- 피험자 모두에게 동일하게 시료를 도포하였다.

(3) 첩포 시험 후 판정 기준 및 결과 분석 방법

- 연구 대상의 배부 중 첩포 반응에 가급적 영향을 주지 않는 배부에 첩포를 부착하고 48시간이 지난 후 첩포를 제거하였다. 최소한 1시간 정도 안정을 취하도록 한 후에 첫 판독을 시행하였고, 96시간이 경과한 후에 2차 판독을 시행하였다. 판독 기준은 아래 기술되어 있는 Table 2.의 판정기준을 이용하여 피부 반응 결과를 판독하였다. 결과 판정 시 알레르기 반응과 자극성 반응을 분리하여 결과를 판정하였다.

표 42. 자극성 반응과 알레르기 반응의 판정기준.

	자극성 반응	알레르기성 반응
1.경계	명확하다.	퍼져나가는 듯한 모양
2.병변의 소실	빠르다.	느리다.
3.모양	화상 같은 모양	습진모양

(이런 기준을 바탕으로 48시간 판독 시와 96시간 판독 시를 비교하여 알레르기 반응을 판정) 알레르기 반응이 나온 것은 피부 반응도 검사에서 제외하기로 하였다.

표 43. 판정기준.

반응	가중치	판정의 기준
-	0.0	: 무반응
+/-	0.5	: 희미한 홍반
+	1	: 경계가 뚜렷하나 약한 홍반, 부종 및 구진
++	2	: 뚜렷한 홍반, 구진 및 수포
+++	3	: 대수포

- 48시간과 96시간째에 판독된 결과를 가지고 아래에 기술된 Table 4의 공식을 이용하여 대상군의 각 시료에 대한 평균 피부 반응도를 산출하였다.

표 44. 피부 평균 반응도 산출 공식.

$$\text{평균 피부 반응도} = \frac{\text{Grade} \times \text{No. of responses} \times 100 \times 1/2}{(\text{Maximum grade}) \times (\text{No. of Total Subjects})}$$

- 위에 기술된 공식에 의해서 산출된 피부반응도를 미리 정한 아래에 기술된 Table 5의 판정기준에 준거하여 각 시료의 반응도를 판정하였다.

표 45. 판정 기준

피부 평균 반응도	판정 기준
0.0 - 0.9	무자극
1.0 - 2.0	경자극
3.0 - 4.9	중자극
5.0 이상	강자극

(4) 결과분석

- 연구 대상 20명의 배부에서 시행한 첩포 시험에서 1차 outer beauty 제형에 대한 양성반응은 없는 것으로 나타났다.
- 또한 β -1,3/1,6 glucan가 함유된 1차 outer beauty 제형을 제조한 후, 피시험자 여성 10명을 대상으로 사용 효과를 시험한 결과, 하기 그림과 가에 나타난 바와 같이 β -1,3/1,6 glucan을 함유한 1차 outer beauty 제형을 사용할 경우 시간이 지남에 따라 보습력이 훨씬 증가하는 것을 확인하였음.

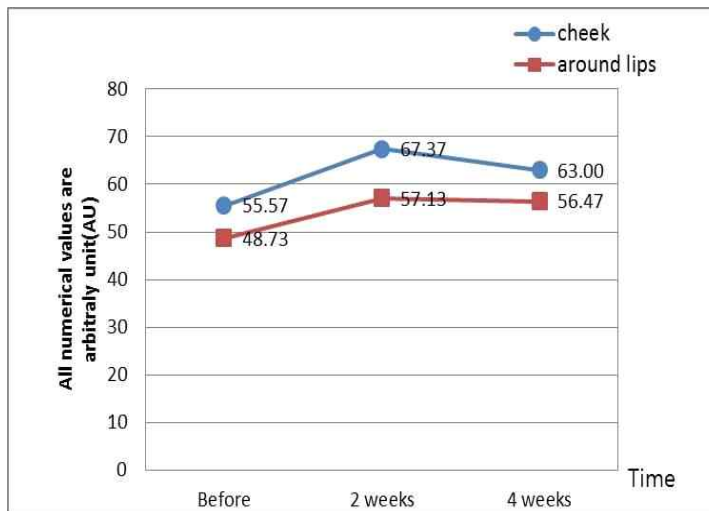
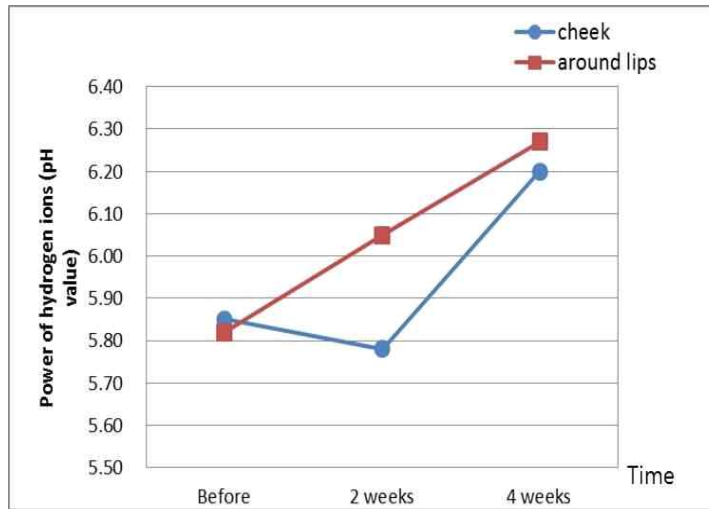


그림 75. β -1,3/1,6 glucan가 함유된 1차 outer beauty 제형의 보습 효능

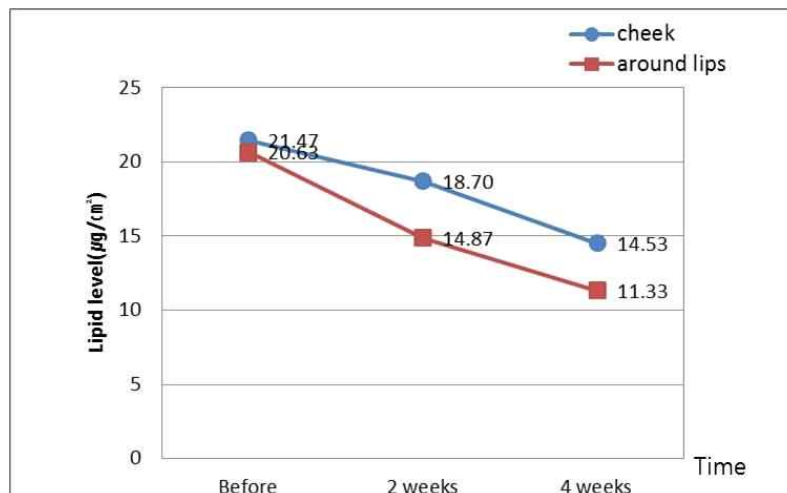


그림 76. β -1,3/1,6 glucan가 함유된 1차 outer beauty 제형의 유분도 감소 효과

- 또한 유래 β -1,3/1,6 glucan이 함유된 1차 outer beauty 제형을 제조한 후, 피시험자 여성 10명을 대상으로 4 주간 β -1,3/1,6 glucan이 함유된 1차 outer beauty 제형 사용에 따른 유분도 변화 (Skin oil, Sebum) 효과를 시험한 결과, β -1,3/1,6 glucan 1 % 함유된 제형을 사용할 경우 유분도가 감소하는 효과가 있음을 확인하였다.

8. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics 시작품 제작 및 제품화 기술 개발

가. β 1,3/1,6-glucan 및 핵심 유효성분의 배합비 설정

(1) 베타글루칸을 활용한 이너뷰티 제품의 최적 배합비 설정

표 46. 베타글루칸을 활용한 이너뷰티 제품의 최적 배합비 설정

원료	배합비(%)	중량 1 g
베타글루칸	59	590 mg
볶은현미분말	10	100 mg
유당	20	200 mg
말티톨	10	100 mg
이산화규소	1	10 mg
합계	100	1000 mg

- 건강기능식품에 대한 소비자들의 인식이 변화해 가는 가운데 ,이너뷰티란 화장품은 바르는 것에서 그치는 것이 아니라 이에 대한 상호보완제로 먹는다는 것인데 2002년 아모레퍼시픽이 ‘V=B 프로그램’ 으로 먹는 화장품에 처음 진출한 이후, 2006년 LG생활건강이 ‘청윤진’ 으로 경쟁에 합류하고, 2009년 CJ제일제당이 ‘이너비’ 를 출시하면서 이너뷰티 시장이 급격히 형성되기 시작함
- 화장품산업에 있어 선진시장에 해당하는 일본의 경우, 이너뷰티시장 이미 형성되어 발전하고 있는 추세. 일본 전체화장품 시장의 최근 3년간 성장률은 1.9%로 2%에도 미치지 못하고 있지만, 이너뷰티 시장의 대표적인 형태인 음료수(미용드링크)의 경우 2011년 6.5% 성장한데 이어 2012년 8.9%성장. 국내 전체 화장품 시장규모 대비 이너뷰티 시장의 규모가 일본과 비슷한 점과 국내화장품 시장규모가 최근 연간 8%씩 성장하는 것을 고려할 때, 국내 이너뷰티 시장은 향후연간

10%이상의 안정적인 성장세를 이어갈 것으로 판단

- 표적시장은 추천 의도가 높은 시장으로 이너뷰티와 아우터뷰티의 복합사용에 대한 기대효과가 가장 클것으로 예상하는 집단으로 이들의 구매를 이끌고 그 사용경험을 바탕으로 한 긍정적인 구전이 발생된다면 홍보에도 도움이 될 것으로 예상됨

시제품 제작 용역계약서

고부가가치식품기술개발사업을 수행하는 (주)셀아이론랩 (이하 "갑"이라 함)과 위탁업체 (주)남도농산 (이하 "을"이라 함)은 다음과 같이 용역계약을 체결하고 이를 성실히 이행할 것을 약정한다.

1. 용역계약기간 : 2017년 5월 4일부터 2017년 7월 3일 까지로 한다.

2. 용역명 : 베타글루칸을 함유한 이너뷰티 시제품 제작

3. 과업내용

○ 용역의 목적 :

- 연구과제 수행을 위한 시제품 제작
- 베타글루칸을 함유한 이너뷰티 시제품 제작

○ 용역 내용 :

- 순도가 우수한 베타글루칸을 활용하여 시제품 제작
- 시제품의 안전성 및 안정성 확보

○ 최종결과물 :

- 베타글루칸을 활용한 이너뷰티 시제품

원료	배합비(%)	중량 1g
베타글루칸	59	590mg
볶은현미분말	10	100mg
유당	20	200mg
말티톨	10	100mg
이산화규소	1	10mg
합계	100	1000mg

○ 갑은 필요하다고 인정할 경우에는 을의 의견을 들어 업무를 변경할 수 있다.

4. 용역대금

○ 용역대금은 총 11,000,000 원 (공급가액 : 10,000,000 원, 부가세 : 1,000,000 원)으로 한다.

○ 시제품 제작이 완료되면 "을"은 "갑"에게 공급하며 "갑"의 검수 후 이상이 없을 시 30일 이내 용역대금을 지급한다.

○ 용역대금의 지불방법은 "을"이 지정한 계좌에 VAT를 포함한 시제품 제작비 100% (₩ 11,000,000)를 지급한다.

2017년 5월 2일

(갑) 주 소 : 대전광역시 유성구 유성대로 1662 대전바이오벤처타운 304호

사업자등록번호 : 314-86-37832

성 명 : 성 민 규 (서명 또는 인)



(을) 주 소 : 전라남도 강진군 작천면 흥교로 173-12

사업자등록번호 : 415-81-23844

성 명 : 전 병 하 (서명 또는 인)



나. 최종 시제품 2종 (Cosmeceutical 1종 및 Nutricosmetics 1종) 제작

: 2차년도 선행 시장조사 결과 반영한 시제품 제작

(1) 베타글루칸을 활용한 이너뷰티 시제품 제작



(2) Cosmeceutical 시제품 제작 3종

- 본 연구과제의 결과물인 β -Glucan 및 펩타이드 화장품 소재를 활용하여 코스메슈티컬 화장품의 제형의 개발 완료하였다.
- 제형 개발에 앞서 화장품의 시장 요구도 분석 - 대부분의 사람들이 가장 선호하는 제형은 앰플 (에센스) 로 나타났으며, 앰플의 경우 펩타이드 및 베타글루칸 등 효능 성분을 활용한 고부가가치를 실현하기에 최적의 제형 형태임을 확인하였다. 또한 - 스킨, 로션은 에센스와 크림 사용 전 기초 제품으로 인식하고 있으며, 많은 효과를 기대하고 있지 않음 → 이를 활용해 스킨과 로션에 (주)셀아이콘랩의 기술을 적용하여 매우 효과가 우수한 제형을 개발함으로써 시장의 인지도 및 수출 경쟁력을 갖추었다.
- 제품 용기 및 포장 디자인 개발은 에센스 제품으로써 이미지와 잘 어우러지는 용기 선정이 매우 중요함. 시장분석을 통해 고가의 제품이 아닌 해외시장에서도 충분히 가능성이 있는 용기를 선

정하였다.

- 기존의 주디메르 디자인을 최대한 활용하되 현지에서 경쟁력 있는 디자인을 해서 효능을 강조한 마케팅 기획하였으며, 대한민국은 사계절이 뚜렷한 계절로써 수출을 고려했을 때 제형 개발에 많은 어려움이 따름 → 이에 따라 현지 기 확보 바이어 대상으로 많은 테스트를 진행하였다.
- 현재 획일화된 천연 추출물을 이용한 시장 상승으로 인해 소비자들이 새로운 것에 대한 요구도가 증가하고 있음. 정밀화학, 바이오 소재 전문 기업으로 홍보하고 국내외에 적극적인 홍보를 통해 시장 진입하면 경쟁력이 높음을 확인하였다. 또한 당사 펩타이드 이외 신규 소재인 β -glucan에 대한 기술적으로 자료를 바탕으로 이를 유효성분으로 하는 신제품 개발을 지속적으로 논의하고 있다.

제품명 주디메르 앰플 3종 스포이드 용기 디자인			
날짜 2016.08.30	사이즈 132 * 30 • 유리 스포이드 용기 (스포이드 금중착) 유리 용기에 투명하게 색상 코팅 • 용기에 실크, 금박 인쇄	인쇄컬러 용기 색상 <ul style="list-style-type: none"> PANYONE 2727 C PANYONE 107 C 화이트 (진한) 실크인쇄 <ul style="list-style-type: none"> 화이트 PANYONE Cool Gray 10 C 금박 	담당자 최수현 010-4948-6099



그림 77. 제품 포장 디자인

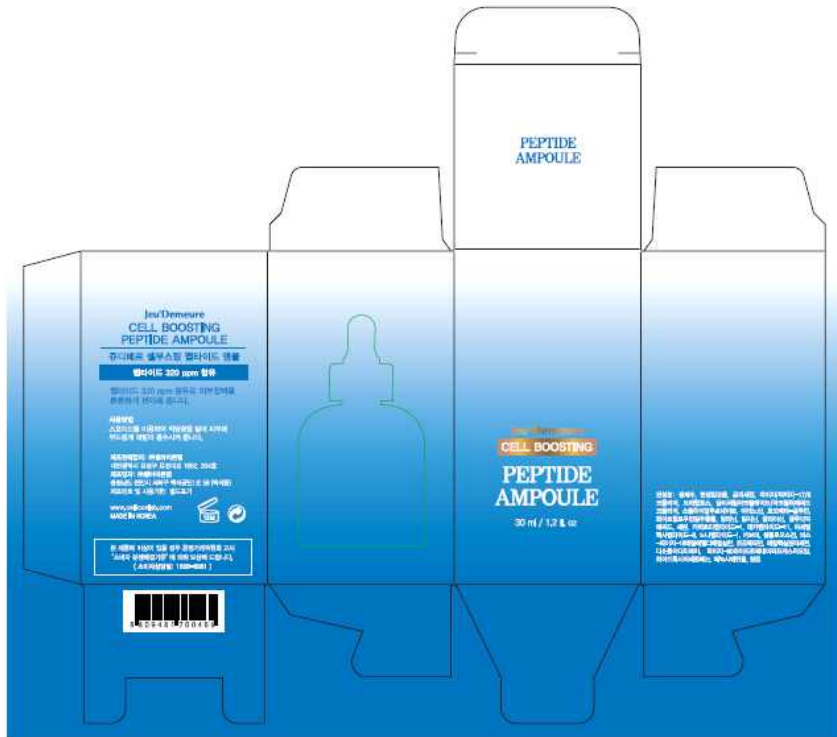
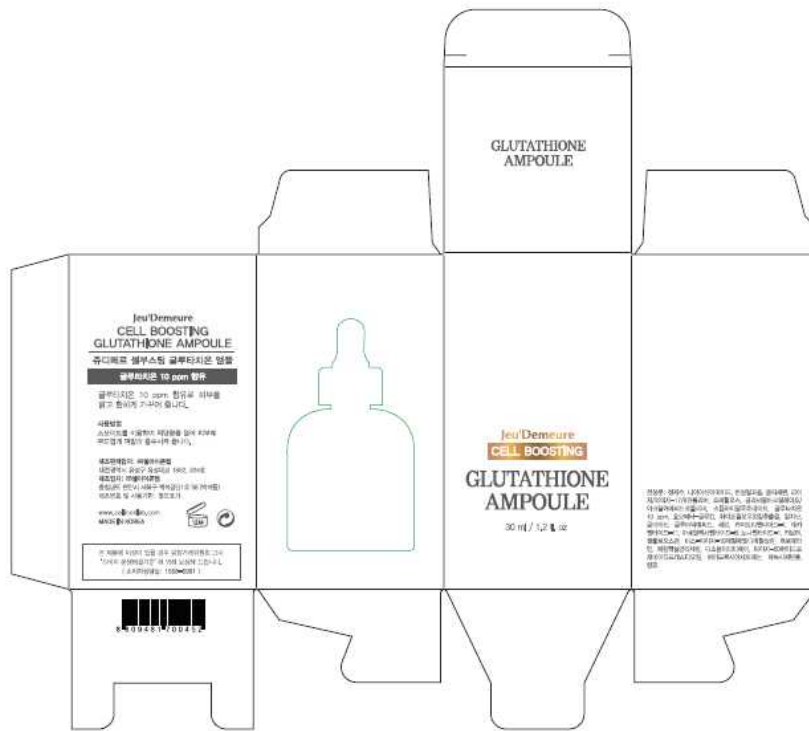


그림 78. 제품 포장 디자인



그림 79. 베타글루칸을 활용한 시제품

(3) Cosmeceutical 시제품 3종에 대한 시험성적서

제품 시험의뢰 및 성적서						
품 명	쥬디메르 셀부스팅 글루타치온 앰플					
제 조 번 호	M-20170510B	제 조 량	30kg	제 조 일 자	2017-05-10	
생 산 수 량	967 EA			포 장 일 자	2017-05-15	
시험의뢰부서	생산본부	시험의뢰일자	2017-05-15	시험 의뢰자	우은희	
검체 채취자	인예지	검체 채취량/방법	3EA/Random	표시 용량	30mL	
시험항목	시험기준	시험결과	시험일자	시험자		
형상(디자인)	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
내 용 량	표시용량(중량)의 97%이상	적합	2017-05-15	인예지		
Lot No. / 라벨 위치 상태	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
제조날짜 표시	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
성 상	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
색 상	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
향 취	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
사 용 감	표준품과 동일	적합	2017-05-15	인예지		
이 물 질	이물질이 있어서는 안된다	적합	2017-05-15	인예지		
안 정 도	5°C, 37°C 3일 경과시 안정	적합	2017-05-15	인예지		
비 중	1.015 ± 0.05	1.015	2017-05-15	인예지		
pH	6.5 ± 1.0	6.10	2017-05-15	인예지		
점 도	2,000 ± 800 (3/6rpm)	2,600	2017-05-15	인예지		
미 생 물	총호기성 생균(세균)수	100 CFU/ml이하	0 CFU/ml	2017-05-15	인예지	
	총호기성 생균(진균)수	불검출	불검출	2017-05-15	인예지	
특이사항						
판 정	적합	판 정 일 자	2017.05.22	작성	검 토	승 인
			5/22	인예지	/	

(주)셀아이콘랩

제품 시험의뢰 및 성적서

품 명	쥬디메르 셀부스팅 케모마일 앰플				
제 조 번 호	M-20170501A	제 조 량	30kg	제 조 일 자	2017-05-01
생 산 수 량	993 EA			포 장 일 자	2017-05-08
시험의뢰부서	생산본부	시험의뢰일자	2017-05-08	시험 의뢰 자	우은희
검체 채취자	인예지	검체 채취량/방법	3EA/Random	표 시 용 량	30mL

시험 항목	시험 기준	시험 결과	시험 일자	시험 자	
형상(디자인)	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
내 용 량	표시용량(중량)의 97%이상	적합	2017-05-08	인예지	
Lot No. / 라벨 위치 상태	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
제조날짜 표시	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
성 상	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
색 상	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
향 취	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
사 용 감	표준품과 동일	적합	2017-05-08	인예지	
이 물 질	이물질이 있어서는 안된다	적합	2017-05-08	인예지	
안 정 도	5°C, 37°C 3일 경과시 안정	적합	2017-05-08	인예지	
비 중	1.015 ± 0.05	1.015	2017-05-08	인예지	
pH	6.5 ± 1.0	6.54	2017-05-08	인예지	
점 도	8,000 ± 3,200 (3/6rpm)	10,000	2017-05-08	인예지	
미 생 물	총호기성 생균(세균)수	100 CFU/ml이하	0 CFU/ml	2017-05-08	인예지
	총호기성 생균(진균)수	불검출	불검출	2017-05-08	인예지

특이사항

판 정	적합	판 정 일 자	2017.05.15	작성	검 토	승 인
				인예지	/	
				5 / 15	/	5 / 15

(주)셀아이콘랩

제품 시험의뢰 및 성적서

제품 시험의뢰 및 성적서						
품 명	쥬디메르 셀부스팅 펩타이드 앰플					
제 조 번 호	M-20170510A	제 조 량	30kg	제 조 일 자	2017-05-10	
생 산 수 량	961 EA			포 장 일 자	2017-05-16	
시험의뢰부서	생산본부	시험의뢰일자	2017-05-16	시험의뢰자	우은희	
검체 채취자	인예지	검체 채취량/방법	3EA/Random	표시 용량	30mL	
시험항목	시험기준		시험결과	시험일자	시험자	
형상(디자인)	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
내 용 량	표시용량(중량)의 97%이상		적합	2017-05-16	인예지	
Lot No. / 라벨 위치 상태	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
제조날짜 표시	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
성 상	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
색 상	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
향 취	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
사 용 감	표준품과 동일		적합	2017-05-16	인예지	
이 물 질	이물질이 있어서는 안된다		적합	2017-05-16	인예지	
안 정 도	5℃, 37℃ 3일 경과시 안정		적합	2017-05-16	인예지	
비 중	1.015 ± 0.05		1.022	2017-05-16	인예지	
pH	6.5 ± 1.0		6.45	2017-05-16	인예지	
점 도	3,000 ± 1,200 (3/6rpm)		4,000	2017-05-16	인예지	
미 생 물	총호기성 생균(세균)수	100 CFU/ml이하	0 CFU/ml	2017-05-16	인예지	
	총호기성 생균(진균)수	불검출	불검출	2017-05-16	인예지	
특이사항						
판 정	적합	판 정 일 자	2017.05.22	작성	검 토	승 인
				인예지	/	
			5/22	/	5/22	

(주)셀아이콘랩

9. β 1,3/1,6-glucan Nutricosmetics 시제품에 대한 효능 시험

가. 시제품에 대한 *in vitro* 효능 시험

(1) 안전성 효능 평가 결과

- 피부 적용 시 안전성을 확보하기 위해 세포독성평가 (MTT assay)를 수행하였고, 베타글루칸 및 펩타이드 신소재 화장품 원료로써 사용 가능한 소재인지 안전성을 평가하기 위해 세포 내에서 원료 처리를 통한 세포 성장도 측정을 MTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 평가하였다.

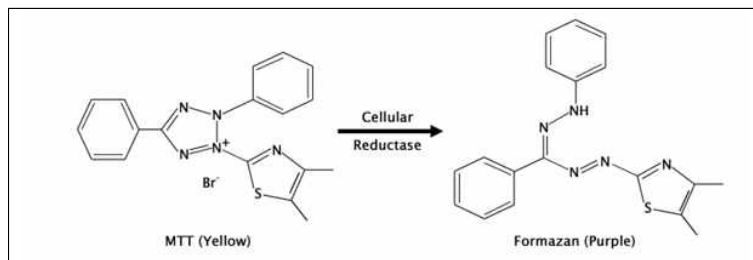


그림. MTT의 구조 변화에 따른 색상변화

- MTT assay는 특정 화합물이 세포에서 어느 정도의 독성을 나타내는지 확인하는 방법. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 물질을 살아있는 세포에 처리하면 세포의 미토콘드리아에 존재하는 reductase에 의해 MTT가 환원되어 Formazan이라고 불리는 crystal을 형성함. 이러한 formazan은 보라색을 띠는 물질로서, 570 nm에서 최대 흡광도에서 세포의 독성을 측정하는 방법임.

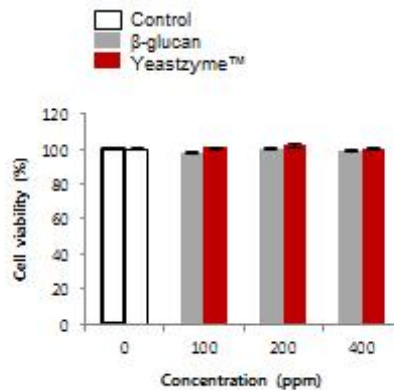


그림 80. 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)의 독성 평가

(2) 주름개선 효능 평가 결과

- 콜라겐 단백질 생성 촉진을 유도하는 펩타이드 신소재를 개발하기 위해 당사는 피부 주름 개선 효과의 평가지표로서 COL1A1 (collagen type I alpha 1) 및 Procollagen type I의 발현 및 생성량을 피부 재생의 척도로서, 피부 섬유아세포 (dermal fibroblast cell)를 이용하여 콜라겐 생성량을 측정하였다. 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)에 대한 콜라겐 합성 능력을 type I pro-collagen 합성 촉진 효과를 통해 확인하였고 이러한 확인은 ELISA 방법을 활용하여 측정하였다.
- 콜라겐 합성능이 증가할 것으로 예상되는 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)에 대한 효능을 확인하고자, 인간피부섬유아세포 (HDF, Human Dermal Fibroblast)를 활용하여 콜라겐 합성능을 확인할 수 있는 in vitro 실험을 진행함.
- 콜라겐 합성능을 확인하는 다양한 방법 중, 단백질 수준에서 높은 Sensitive를 가지는 대표적인 방법인 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)를 활용하여 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)의 효능을 입증할 수 있는 실험을 수행하였다.
- 피부는 세포외기질 (Extracellular matrix)과 섬유아세포 (Fibroblast)로 구성되어 있으며, 세포외기질은 피부 탄력성, 신진 대사 등에 관여하고 있으며, 콜라겐과 엘라스틴 등의 단백질로 이루어져 있음.

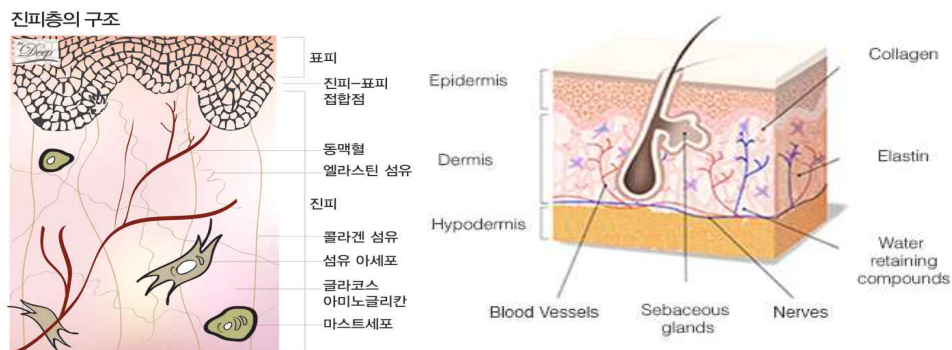


그림 81. 피부 진피층 구조 및 구성성분.

- 그 중, 콜라겐은 단단하게 엮여져 있는 3중 나선 (triplehelix)으로 구성된 단백질이며, 이러한 콜라겐은 진피 건조중량의 70-80%를 차지하고 있다. 콜라겐은 일차적으로 피부섬유아세포에서 수용성인 프로콜라겐으로 합성된 후, 세포 외로 분비된 후에 가수분해 과정을 통해 비수용성인 콜라겐 섬유 형태로 전환된다.

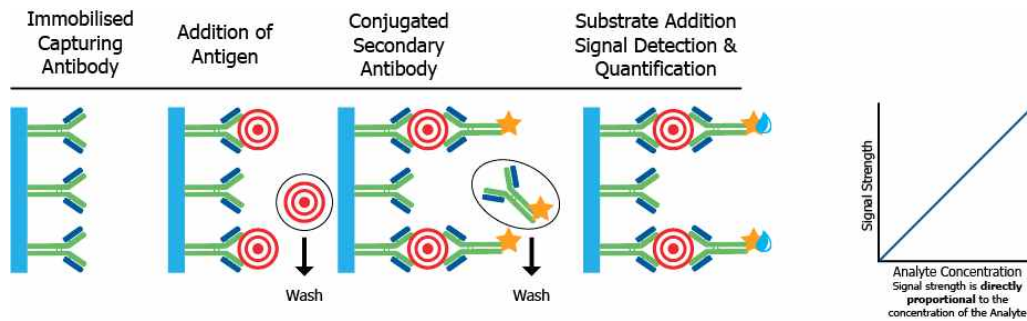


그림 82. ELSIA(효소면역측정법) 모식도.

- 따라서, 세포 외로 분비된 프로콜라겐의 합성량을 확인하기 위해서 Human pro-collagen ELISA법을 이용하여 콜라겐 합성량 측정을 진행하였다. 인간피부섬유아세포 (HDF, Human Dermal Fibroblast)를 활용하여 실험을 진행하였으며, HDF 세포를 24 well plate에 0.4×10^4 cells/well로 총 용적을 0.5 ml가 되도록 분주한 뒤에 37°C 에서 24시간 이상 정치시킨 후 사용하였다. 24시간 세포 정치 후에 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)을 각각 $50 \mu\text{g/ml} \sim 200 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 뒤에 37°C 에서 48시간 반응을 수행하였다. 48시간 반응 후에 모든 배양액을 회수하여 Human pro-collagen ELISA를 진행하여 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)의 프로 콜라겐 합성능을 확인하였다.

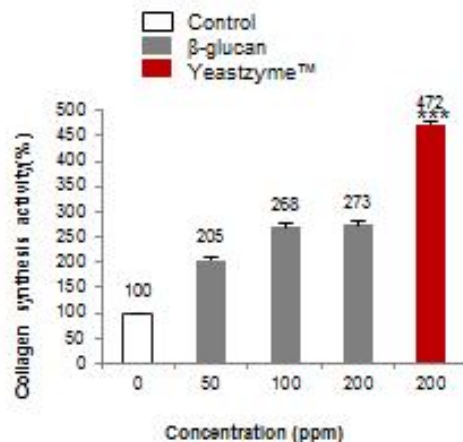


그림 83. 콜라겐 합성능 평가 결과

(3) MMP-1 저해능 효능평가

- 일반적으로 피부의 진피층은 다수의 콜라겐과 소량의 엘라스틴, 프로테오글리칸, 파이브로넥틴 등의 단백질로 구성되어 있다. MMP (MMPs, Matrix Metalloprotease)는 세포외기질과 기저막의 분해에 관여하는 효소로서 네 개의 종류로 나누어 지며, 그 중 MMP-1 (Matrix Metalloprotease-1, 세포외기질 금속함유 단백질분해효소)은 세포외기질에 존재하는 콜라겐 분해를 촉진하는 물질로서 콜라겐의 양과 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 정상적인 피부에서는 콜라겐의 합성과 MMP-1의 활성이 균형을 이루고 있으며, 이러한 균형이 깨지는 경우에 비정상적인 피부가 유발된다.

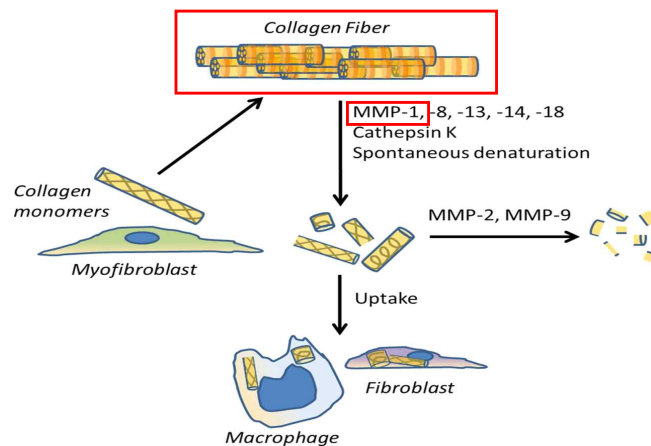


그림 84. Collagen 과 MMP-1 세포 내 기전.

- 따라서, 세포외기질에 존재하는 MMP-1의 합성량을 확인하기 위해서 Human total MMP-1 ELISA 법을 이용하여 측정하였다. 인간피부섬유아세포 (HDF, Human Dermal Fibroblast)를 활용하여 실험을 진행하였으며, HDF 세포를 24 well plate에 0.5×10^4 cells/well로 총 용적을 0.5 ml가 되도록 분주한 뒤에 37°C에서 24시간 이상 정치시킨 후 사용하였다. 24시간 세포 정치 후에 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)를 각각 $50 \mu\text{g/ml}$ ~ $200 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 뒤에 37°C에서 48시간 반응을 수행하였다. 48시간 반응 후에 모든 배양액을 회수하여 Human total MMP-1 ELISA를 진행하여 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzym™)의 MMP-1 저해능을 확인하였다.

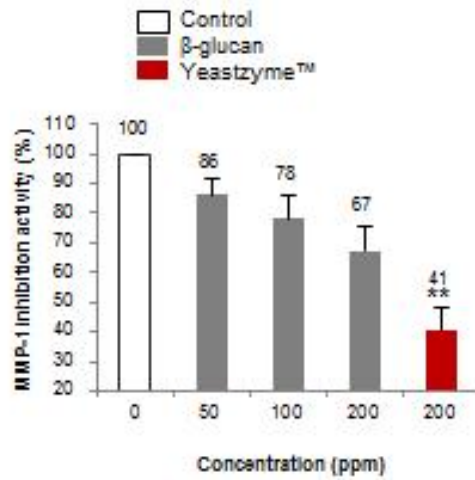


그림 85. MMP-1 저해능 평가

(4) 베타글루칸 및 펩타이드의 복합 소재(Yeastzyme™)의 피부 보습능 평가

- Corneometer를 활용한 보습 측정을 실시하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다. Corneometer를 활용한 보습 측정을 실시하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었음. 단시간 보습의 경우 대조군 대비 44%의 증가 효과를 나타냈으며, 장기간 피부 보습능을 측정한 결과 기존 보습 소재로 많이 알려진 히알루론산과 기존 베타글루칸 대비 우수한 효능을 나타냄을 알수 있었다.

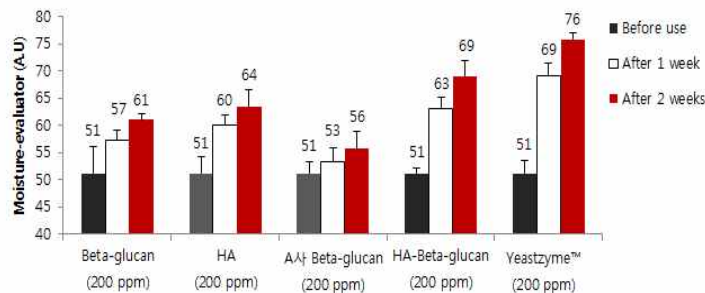
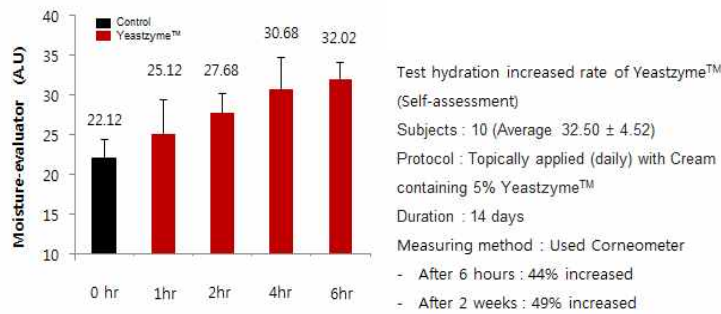


그림 86. 피부 보습능 평가 결과

나. 시제품에 대한 인체적용 효능 시험

(1) 시험계획서

- 이너뷰티 및 아우터뷰티 제품에 대한 인체적용 시험을 하기와 같이 실시하였다

연구 계획서

'아우터뷰티'와 '이너뷰티'의 보습 개선 외 시험계획서

연구기관 : 스킨메드 피부과학연구소

의뢰기관 : ㈜셀아이콘랩

2017년 06월 07일

SKINMED

《연구 계획서》

연구 제목	'아우터뷰티' 보습, 탄력, 주름, 안전성 시험 '이너뷰티' 보습, 탄력, 주름 시험		
연구 목적	'아우터뷰티'의 보습, 탄력, 주름 개선 및 안전성 여부를 평가한다. '이너뷰티'의 보습, 탄력, 주름 개선 여부를 평가 한다. (연구용)		
연구 기간	4주 (제품 사용 전/사용 2주 후/사용 4주 후)		
의뢰 기관	기관명: ㈜셀아이콘랩		
	주 소 : 대전광역시 유성구 유성대로 1662, 대전바이오벤처타운 304호		
	연락처 : 042-335-7942	담당자	정영필 부장
연구 기관	기관명: 스킨메드 피부과학연구소		
	주 소 : 서울시 강남구 테헤란로 624 오로라월드빌딩 4층		
	연락처 : 070-5118-8437 skinmedsslabs@daum.net	담당자	김인아 선임연구원
결과 보고일	시험 종료일로부터 10일(평일 기준)		
시험대상자	선정기준/제외기준을 만족하는 성인		
	선정기준	4주 시험 - 만 30세~55세의 여성	
		안전성 시험 - 만 20~50세의 남녀	
		시험에 자발적으로 참여한 자	
	제외기준	임신/수유 혹은 임신을 계획하고 있는 경우	
		아토피성 피부이거나 피부 질환을 가지고 있는 경우	
알레르기나 과민증이 있는 경우			
시험제품 I	제품명	아우터뷰티	
	사용방법	1일 2회 스킨케어 마지막 단계에서 적당량을 밀어 피부결을 따라 부드럽게 펴 발라 줍니다.	
시험제품 II	제품명	이너뷰티	
	사용방법	1일 1회, 용량에 맞게 섭취한다.	
참여 인원	인체 적용 시험 - 20명 / 피부 자극 테스트 - 30명 (탈락율을 고려하여 10% 증원하여 시험을 진행한다)		

<<‘아우터뷰티’ 측정항목>>

<보습, 탄력, 주름>	
대조군 설정	얼굴을 왼쪽/오른쪽 나누어 각각의 제품을 사용한다.
대조제품	유효성분은 제외한 시험제품과 동일한 제형의 크림
제품 배부	무작위배정
(1) 보습	사용 기기 : Moisturemeter SC 혹은 GP skin
	측정 부위 : 볼 부위
	측정 타임 : 제품 사용 전/2주 후/4주 후
	DATA : 제품 사용 전후의 수분량 수치 비교
(2) 탄력	사용 기기 : Ballistometer
	측정 부위 : 볼 부위
	측정 타임 : 제품 사용 전/2주 후/4주 후
	DATA : 제품 사용 전후의 탄성 회복력 수치 비교
(3) 주름	사용 기기 : Primos Lite
	측정 부위 : 눈가 부위
	측정 타임 : 제품 사용 전/2주 후/4주 후
	DATA : 제품 사용 전후의 주름 부위 피부 거칠기 수치 비교

<안전성(피부 자극 테스트)>		
연구 기간	3일	
방문 일정	-1/0/1 DAY (제품 철폐 전/철폐 24시간 후/철폐 48시간 후)	
설계	유형	시험 제품에서의 자극유무 확인
	규모	30명 (탈락율을 고려하여 10% 증원하여 시험을 진행한다.)
	특징	피부 자극이 없을 시 무자극 (비자극) 판정
측정 항목	(1) 전문가 육안평가 (2) 사진 촬영(DSLR)	

<<'이너뷰티' 측정항목>>

<보습, 탄력, 주름>	
(1) 보습	사용 기기 : Moisturemeter SC 혹은 GP skin
	측정 부위 : 볼 부위
	측정 타임 : 제품 복용 전/섭취 2주 후/섭취 4주 후
	DATA : 제품 복용 전후의 수분량 수치 비교
(2) 탄력	사용 기기 : Ballistometer
	측정 부위 : 볼 부위
	측정 타임 : 제품 복용 전/섭취 2주 후/섭취 4주 후
	DATA : 제품 복용 전후의 탄성 회복력 수치 비교
(3) 주름	사용 기기 : Primos premium
	측정 부위 : 눈가 주름 부위
	측정 타임 : 제품 복용 전/섭취 2주 후/섭취 4주 후
	DATA : 제품 복용 전후의 주름 부위 피부 거칠기 수치 비교

(2) 인체적용 시험 결과

EL-160913555A045

인체적용 시험 보고서

(주)셀아이콘랩

CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림의
눈가주름 및 피부탄력 개선효과
인체적용 시험에 관한 연구

2016년 11월 15일

㈜엘리드



목 차

제출문.....	3
신뢰성 보증 확인서.....	4
연구결과 요약서.....	5
연구내용.....	7
연구방법.....	9
연구결과.....	18
결론 및 요약.....	28
첨부 1. 평가결과에 대한 세부자료.....	29
첨부 2. 연구 대상자 유의사항.....	35
첨부 3. 연구 책임자의 약력 및 연구경력.....	37
첨부 4. 신뢰성 보증 책임자의 약력 및 연구경력.....	41
첨부 5. 연구자의 약력 및 연구경력.....	45
첨부 6. 연구기관의 주요설비.....	46
첨부 7. 인체적용 시험 사진자료.....	49
첨부 8. 전성분.....	59

제 출 문

㈜엘리트에서는 ㈜셀아이컨셉에서 의뢰한 CL-103(WrinkleFree J316™) 펩타이드 함유 크림의 눈가주름 및 피부탄력 개선효과에 관한 인체적용 시험 연구를 위탁 받고, 엘리트 기관생명윤리위원회 표준운영지침 (Ver. 3.0)에 의거하여 승인 후에 식품의약품안전처 화장품 인체적용시험 및 효력시험 가이드라인 (B1-2015-4-002) 및 ㈜엘리트 표준 운용 절차 (EL-P-7400)에 따라 연구를 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.

2016년 11월 15일

연구기관 : ㈜엘리트

연구기관장 : ㈜엘리트 대표이사 변경

연구 책임자 : 피부과 전문의

문태기



3

본 식별자는 ㈜엘리트의 보인문서로서 ㈜엘리트에 그 소유권이 있으며, 제8차에게 무단으로 양도, 도용, 공개 및 복사를 금합니다.

신뢰성 보증 확인서

연구제목: ㈜엘리드 CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림의 눈
가주름 및 피부탄력 개선효과 인체적용 시험에 관한 연구

보고번호: EL-160913555A045

본 연구는 표준작업지침서에 따라서 연구 책임자에게 보고서들 제출하였으며, 신뢰성 보증 업무 담당자가 점검하였다.

단계	날짜
시험계획서 승인일	2016년 09월 23일
기관생명윤리위원회 심의면제 통과	2016년 09월 23일
시험기간	2016년 09월 29일 ~ 2016년 10월 28일
데이터 점검	2016년 11월 04일
보고서 초안 접수	2016년 11월 11일
최종 보고서 접수	2016년 11월 15일
연구 책임자의 보고일	2016년 09월 23일, 2016년 10월 14일 2016년 11월 04일, 2016년 11월 15일

본 연구는 식품의약품안전처의 화장품 인체적용 시험 가이드라인에 따라서 실시하였고, ㈜엘리드의 시험 계획서 및 표준 작업 지침서 (EL-P-7400) 에 따라 시험을 정확하게 실시하였으며, 보고된 결과는 기초자료들 정확하게 반영하고 있음을 확인함.

2016년 11월 15일

신뢰성 보증 책임자

공학박사 김브리



연구결과 요약서

연구 제목	워렌아이콘랩 CL-103(WrinkleFree J316™)웬타이드 함유 크림의 눈가주름 및 피부탄력 개선효과 인체적용 시험에 관한 연구
보고 번호	EL-160913555A045
의뢰 기관	워렌아이콘랩 대전광역시 유성구 유성대로 1662
연구 기관	엘리트 경기도 성남시 분당구 황새울로 325 7층 및 8층
연구 기간	2016년 09월 23일 ~ 2016년 11월 15일
시료 명	CL-103(WrinkleFree J316™)웬타이드 함유 크림 (M-160913555A045)
연구 방법	<p>엘리트 표준 운용 절차 (EL-P-7400)에 따라 시험함.</p> <p>1) 연구 대상자: 22명 (최종 21명 시험완료, 평균 47.29±3.47세, 여성)</p> <p>2) 시험기간: 4주 (측정 시험: 적용 전, 적용 2주 후, 적용 4주 후)</p> <p>3) 시료 적용 방법: 1일 2회 (아침, 저녁) 세안 후 크림 단계에서 얼굴 전체에 도포 후 충분히 흡수시킴.</p> <p>4) 평가 방법:</p> <ul style="list-style-type: none"> - DSLR을 이용한 눈가주름 화상사진 촬영 - PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 평가 - Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 평가 - 연구 대상자에 의한 주관적 설문평가 - 피부과 전문의와 연구 대상자에 의한 이상반응 평가
연구 결과	<p>PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 부위의 Roughness 변수 별 측정값을 분석한 결과, Ra값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 3.756%, 6.306% 감소하였으며, Rq값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 3.494%, 6.249% 감소하였다. 또한, Rmax값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 4주 후 4.686% 감소하였다.</p> <p>따라서 CL-103(WrinkleFree J316™)웬타이드 함유 크림은 적용 2주 후, 적용 4주 후 눈가주름 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.</p> <p>Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 변수 별 측정값을 분석한 결과, R2값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 4주 후 2.232% 증가하였으며, R5값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 1.865%, 3.768% 증가하였다. 또한, R7값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 1.907%,</p>



	<p>3.456% 증가하였다.</p> <p>따라서 CL-103(WrinkleFree J316™)겔타이드 함유 크림은 적용 2주 후, 적용 4주 후 피부탄력 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.</p> <p>패셀아이론겔에서 의뢰한 CL-103(WrinkleFree J316™)겔타이드 함유 크림은 평가 기간 동안 특별한 피부 이상반응[itching (가려움) 등의 환자가 호소하는 증상과 vesicle (수포) 등의 인체적 징후]을 나타내지 않았다.</p>
보고서 작성일	2016년 11월 15일
연구책임자	피부과 전문의 분태기
실험책임자	공학박사 김보라
연구자	박혜경 / 강효은 / 손민아

연구내용

1. 연구목적

본 연구는 ㈜셀아이콘랩에서 의뢰한 CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림의 눈가주름 및 피부탄력 개선효과에 대한 4주간의 인체 효능을 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 연구기간

2016년 09월 23일 ~ 2016년 11월 15일
(시험일: 2016년 09월 29일 ~ 2016년 10월 28일)

3. 연구기관

㈜엘리드

주소 : 경기도 성남시 분당구 황새울로 325 7층 및 8층
E-mail : Homepage : www.ellead.com
Tel : 031-709-9070 (내선: 312) Fax : 031-703-9071
연구담당자 : 박혜경

4. 의뢰기관

㈜셀아이콘랩

주소 : 대전광역시 유성구 유성대로 1662
E-mail : Homepage : www.celliconlab.com
Tel : 042-335-7942 Fax : 042-335-7949
의뢰담당자 : 이기범

5. 시료정보

1) 시료명 및 제형

번호	시료명	성상
#1	CL-103(WrinkleFree J316™)렙타이드 함유 크림	크림

2) 시료 관리번호: M-160913555A045

3) 의뢰기관: ㈜셀아이콘랩

4) 전성분: 첨부 8.

5) 시료의 관리 및 보관

시료 수령 시 시료관리대장에 수령인, 수령일, 시료 번호 등의 정보를 기입하고 표준시료의 경우 시료보관실에 3년간 보관하며 연구 대상자에게 지급된 평가 시료는 시험 종료 후 모두 수거하여 별도의 보관기간 없이 폐기함.

6) 안전성: 의뢰기관은 시료의 연구 기간 동안에 발생한 이상반응에 대해 책임을 짐.

연구방법

1. 연구 대상자 선정

1) 연구 대상자 선정방법

(1) 선정기준

- 30~55세의 성인 여성 중 연구 대상자 제외기준에 포함되지 않는 자
- 피부과 전문의의 문진과 이학적 검사상 눈가에 주름이 있고 Global photodamage score가 2~6에 해당하는 자
- 연구의 목적, 내용 등에 대해 이해하고 자발적 참여의사를 밝힌 자
- 발생 가능한 이상반응에 대해 이해하고 서면 동의서에 서명한 자
- 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- 연구기간 동안 유사한 기능성 화장품 또는 의약품의 사용을 제한할 수 있는 자
- 연구 기간 동안 추적 관찰이 가능한 자원자

(2) 제외기준

- 습진성 피부질환 (습진, 아토피 피부염 등)이 있는 경우
- 감염성 피부질환이 있는 경우
- 알레르기성 특이 체질 (음식, 꽃가루 등)이거나 과민증이 있는 자
- 화장품, 의약품, 일상적 일광노출에 자극이나 알러지가 있는 경우
- 임신 중이거나 수유 중인 경우 또는 임신 계획 중인 경우
- 현저한 영양 장애자
- 약물이나 알코올 중독자
- 시험 부위에 점, 여드름, 문신, 흉터, 흉반, 모세혈관확장, 화상자극 등이 있어서 연구에 영향을 미치는 경우
- 동일한 연구에 참여한 뒤 3개월이 경과되지 않은 경우
- 그 외 연구 책임자의 판단으로 연구에 부적합하다고 생각되는 경우



(3) 연구 진행 중 연구 대상자 중도 탈락기준

- 개인 사정에 의해 추적관찰이 어려운 경우
- 인체적용 시험 중 피부질환의 발생으로 연구를 진행할 수 없는 경우
- 시료 적용 후, 심각한 피부 이상반응이 나타난 경우
- 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 한 경우
- 지나친 음주, 흡연 등으로 연구 결과에 영향을 미친 경우
- 특별한 이유 없이 연구 대상자가 적용방법이나 일정을 어긴 경우

2) 연구 대상자 선정

- (1) 연구 대상자 선정기준에 부합되고 제외기준 및 중도 탈락기준에 해당되지 않는 21명을 최종 인원으로 시료의 눈가꾸름 및 피부탄력 개선 효과에 대한 효능성을 평가하였다.
- (2) 연구 대상자 유의사항은 첨부 2와 같다.

2. 정보의 비밀 유지와 성실 의무

- 1) 본 연구에 참여한 연구 대상자의 비밀은 보장된다. 단, 의학적, 학술적 연구목적 또는 마케팅 목적으로 연구 대상자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 연구자료가 이용될 수 있다.
- 2) 연구 대상자는 본 연구를 통해 얻은 정보에 대하여 비밀을 유지해야 한다.
- 3) 연구 대상자는 성실하고 정직하게 자료를 작성하며 작성된 개인정보 관련 문서는 보안을 유지하며 필요 시 ㈜엘리드에서만 열람이 가능하다.



3. 인체적용 시험일정 및 연구 방법 개요

연구 대상자는 본 인체적용 시험기간 중 ㈜엘리드에 총 3회 (시료 적용 전, 적용 2주 후, 적용 4주 후) 방문하였다. 인체적용 시험 시작 1주 전부터 평가 결과에 영향을 미칠 수 있는 피부 개선을 목적으로 하는 치료제, 화장품 및 의약외품 등의 사용과 의학적 처치, 마사지 등의 시술을 금하고 방문 12시간 전부터 기초제품 사용 및 화장을 금지하였다. 모든 연구 대상자는 기존에 사용하던 기초 화장품을 사용하면서 의뢰업체에서 제공한 시험 시료를 4주간 적용하였다. 선크림을 포함한 기초 화장품은 기능성 성분이 없는 제품으로 제한하였다. 인체적용 시험은 공기의 이동이 없고 직사광선이 없는 항온항습 (20 ~ 24°C, 40 ~ 60% RH) 조건에서 시행하였으며, 세안 후 30분간 항온항습 조건에서 안경을 취하고 시험을 진행하였다. 연구 대상자의 좌, 우 안면 부위에서 random하게 측정하였으며, 아래와 같은 순서로 진행하였다.

1) 첫 번째 방문 (시료 적용 전): 첫 방문 시 연구 대상자는 연구자로부터 연구에 대한 및 인체적용 시험 참가에 따른 위험성과 피부 이상반응에 대하여 충분한 설명을 들은 후 자신의 인적 사항과 인체적용 시험 연구 동의서를 작성하고 성별, 연령, 연락처 및 병력과 같은 연구 대상자의 기초정보와 자신의 피부상태에 대한 설문지를 작성하였다. 측정은 아래와 같은 순서로 진행하였다.

- DSLR 을 이용한 눈가주름 화상사진 촬영
- PRIMOS High Resolution 을 이용한 눈가주름 평가
- Cutometer 를 이용한 볼 부위의 피부탄력 평가
- 시료 지급 및 시료 적용 방법 설명
 - 시료 적용 방법: 1일 2회 (아침, 저녁) 세안 후 크림 단계에서 얼굴 전체에 도포 후 충분히 흡수시켜준다.



2) 두 번째 방문 (적용 2주 후): 첫 번째 방문과 동일한 방법으로 시험을 진행하였다.

- DSLR 을 이용한 눈가주름 화상사진 촬영
- PRIMOS High Resolution 을 이용한 눈가주름 평가
- Cutometer 들 이용한 볼 부위의 피부탄력 평가
- 연구 대상자에 의한 주관적 설문평가
- 피부과 전문의와 연구 대상자에 의한 이상반응 평가

3) 세 번째 방문 (적용 4주 후): 첫 번째 방문과 동일한 방법으로 시험을 진행하였다.

- DSLR 을 이용한 눈가주름 화상사진 촬영
- PRIMOS High Resolution 을 이용한 눈가주름 평가
- Cutometer 들 이용한 볼 부위의 피부탄력 평가
- 연구 대상자에 의한 주관적 설문평가
- 피부과 전문의와 연구 대상자에 의한 이상반응 평가
- 시료 회수



4. 효능평가

1) DSLR을 이용한 화상촬영 및 PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 평가

(1) DSLR을 이용한 눈가주름 화상사진 촬영

DSLR과 조명세트를 이용하여 실내 조명의 밝기가 동일한 조건에서 눈가주름 사진을 촬영하였다. 표준화를 위하여 사진 촬영은 동일 연구자가 시행하고, 특수 제작된 장비를 통하여 촬영 조건 (측정 방향 및 위치)을 고정하여 눈가주름 부위를 촬영하였다.

(2) PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 측정

- PRIMOS (Phaseshift Rapid In vivo Measurement Of Skin high resolution, GF Messtechnik GmbH, Germany)를 이용하여 눈가주름을 측정하였다.
- 측정 부위의 수축 이완과 움직임을 방지하기 위하여 특수 제작된 PRIMOS 측정용 고정 장비 세트에 연구 대상자의 얼굴을 고정하였다.
- 매 측정 시 동일한 부위를 측정하기 위해 장비를 시험 부위에 일치하도록 고정하고 측정하였다.



그림 1. PRIMOS High Resolution

(3) Image analysis를 이용한 눈가주름 분석

PRIMOS software (PRIMOS version 5.8E)를 이용하여 분석하였다. PRIMOS의 3차원 측정은 피부에 투사된 parallel projection stripes가 피부 표면의 높이 차이에 따라 변화되고, 이렇게 변화된 정도는 컴퓨터에



의해 정량적으로 계산된다.

- PRIMOS에 의해 측정된 눈가주름 이미지를 3D matching을 이용하여 측정부위를 일치시켰다.
- Roughness 분석을 통한 눈가주름 변수 값은 다음과 같다.

- Ra (Average roughness): 단면의 거칠기 높이에 중심선을 그렸을 때 중심선에서 표면의 단면 곡선까지 길이의 절대값들의 평균
- Rq (Root mean square roughness): 단면의 거칠기 높이에 중심선을 그렸을 때 중심선에서 표면의 단면 곡선까지 길이의 제곱평균제곱근
- Rmax (Maximum roughness depth): 단일 측정 범위 내에 가장 높은 산과 가장 낮은 골의 차이 값

- Roughness 측정에 의해 분석된 변수 값이 작아지면 눈가주름이 개선됨을 의미한다.
- PRIMOS High Resolution에 의한 Roughness 변수 값의 감소율은 다음의 공식을 이용한다.

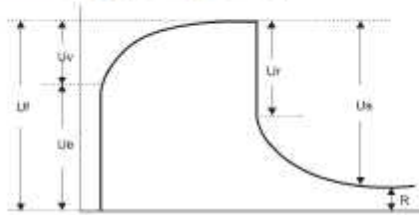
$$\text{감소율 (\%)} = \frac{\text{시료 적용 전 측정값} - \text{시료 적용 후 측정값}}{\text{시료 적용 전 측정값}} \times 100$$

2) Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 평가

Cutometer MPA580 (Courage and Khazaka, Germany)을 이용하여 연구 대상자의 볼 부위의 피부탄력을 평가하였다. 탄력을 측정하는 장비인 Cutometer MPA580은 지속적인 음압으로 측정시간 동안 probe속으로 피부가 빨려 들어 간 뒤 음압이 제거되면 피부가 원래의 모습으로 돌아가는 원리를 이용하여 피부탄력을 측정하며, 측정방법은 기기에 연결된 2 mm 직경의 probe를 피부에 밀착시켜 비침습적인 방법으로 측정한다. 본 시험에서는 측정조건으로 Mode 1을 사용하였으며, 일정하게 유지되는 450 mbar의 음



압, suction time 2초, relaxation time 2초의 조건으로 연속 3번 측정한 뒤 산술평균을 구하여 측정 결과를 얻었다. 피부탄력과 관련된 parameter는 R2, R5, R7이며, parameter의 설명은 다음과 같다.



- R2: U_a / U_f (gross elasticity)
- R5: U_r / U_e (net elasticity)
- R7: U_r / U_f (biological elasticity)

- 탄력 측정값 (R2, R5, R7)이 증가할수록 피부탄력이 증가함을 의미한다.
- 피부탄력 증가율은 다음의 공식을 이용하였다.

$$\text{증가율 (\%)} = \frac{\text{시료 적용 후 측정값} - \text{시료 적용 전 측정값}}{\text{시료 적용 전 측정값}} \times 100$$



그림 2. Cutometer

4) 시료 적용 전에 비하여 측정값이 증가 또는 감소된 연구 대상자의 비율 평가

시료 적용 전에 비하여 시료 적용 후 측정값이 증가 또는 감소된 연구 대상자 비율은 다음의 공식을 이용하였다.

- 눈가죽름 Roughness (Ra, Rq, Rmax) 측정값

$$\text{감소된 연구 대상자 비율 (\%)} = \frac{\text{시료 적용 전에 비하여 감소된 연구 대상자 수}}{\text{총 연구 대상자 수}} \times 100$$

- 피부탄력 (R2, R5, R7) 측정값

$$\text{증가된 연구 대상자 비율 (\%)} = \frac{\text{시료 적용 전에 비하여 증가된 연구 대상자 수}}{\text{총 연구 대상자 수}} \times 100$$

5. 연구 대상자에 의한 주관적 설문평가

시료 적용 2주 후, 적용 4주 후에 연구 대상자에게 시료의 일반적 평가 (적용감), 효능성 평가, 이상반응 평가, 시료에 대한 호감도 등을 설문조사 하였다.

6. 통계분석 방법

1) 눈가죽름과 피부탄력에 대한 통계분석은 정규성 검정 (Normality test)를 통하여 정규성을 만족하는 경우 Repeated measures ANOVA로, 정규성을 만족하지 않는 경우 Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test를 통해 95% 신뢰구간에서 시료 적용 전/후 간의 유의성 여부를 가설평균 차 5% ($p < 0.05$)로 확인하였다.

2) 통계 분석 프로그램은 SPSS Statistics 21 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였다.



7. 피부 이상반응 평가

피부과 전문의는 연구 대상자의 피부 이상반응 존재 여부를 면밀히 관찰하고 이상반응이 나타날 시 중증도에 따라 등급을 표시하였다. 이상반응에 대한 평가는 erythema (홍반), edema (부종), scaling (인설), itching (가려움), stinging (자뚱), burning (작열감), tightness (뻣뻣함), prickling (따끔거림) 등의 유무를 함께 판정하였다.

	없다 (0)	경증 (1)	중등증 (2)	중증 (3)
erythema (홍반)				
edema (부종)				
scaling (인설)				
itching (가려움)				
stinging (자뚱)				
burning (작열감)				
tightness (뻣뻣함)				
prickling (따끔거림)				

8. 기록의 보관

인체적용 시험에 대한 기초 자료, 연구 대상자 정보, 원본 데이터, 연구노트, 최종 보고서 (사본) 및 치료관련 기록은 쉐일리드에서 보관, 관리한다.

연구결과

1. 연구 대상자 기본정보

본 인체적용 시험에 참가한 사람은 최종 21명의 여성으로 연구 대상자의 기본정보 및 연령 분포는 다음과 같다. 2번 연구대상자는 자의 탈락하였다 (표 1, 2/그림 3).

표 1. 연구 대상자 기본 정보

등록 연구 대상자 (명)	22 명
중도 탈락한 연구 대상자 (명)	1 명
최종 완료 연구 대상자 (명)	21 명
평균연령 (표준편차)	47.29 (3.47)
성별	여

표 2. 연령 분포표

	40 대	50 대	합계
명 (%)	15 (71.43)	6 (28.57)	21 (100.00)

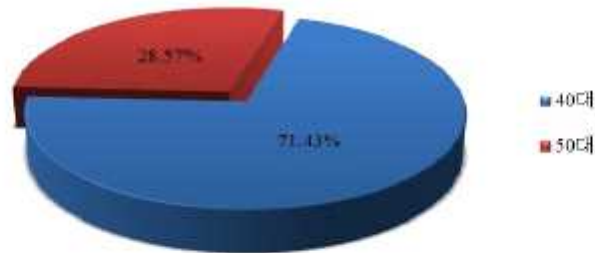


그림 3. 연구 대상자 연령별 구분

2. 효능

1) PRIMOS High Resolution를 이용한 눈가주름 평가

PRIMOS High Resolution를 이용한 눈가주름 부위의 Roughness 변수 별 측정결과, 감소율, 통계분석결과는 다음과 같다.

표 3. Ra값 측정결과 (μm) 및 통계분석 결과 (적용 전/후 비교)

표 3-1. 개체-내 효과 검정 결과

개체-내 효과	F	자유도	유의확률
Week	14.059	2, 40	< 0.001 ¹

1. 구형성 가정

표 3-2. 기술통계량 및 개체-내 대비 검정 결과

Mean±SD	적용 전	12.563±2.327
	적용 2주 후	12.075±2.261
	적용 4주 후	11.733±2.057
p-value	적용 전 - 적용 2주 후	0.004 **
	적용 전 - 적용 4주 후	< 0.001 ***

Probability p (Repeated measures ANOVA Contrast test, significant: **p<0.01, ***p<0.001)

표 4. 개인별 Ra 측정값의 감소율 (%)의 평균

	적용 2주 후	적용 4주 후
Ra	3.756	6.306

PRIMOS High Resolution를 이용한 눈가주름 부위의 Ra값에 대한 시료 적용 전 후 간의 개체-내 효과 검정을 실시한 결과, Ra값에 대한 Week 효과는 통계적으로 유의한 차이 ($p<0.05$)를 나타내었다.

개체-내 대비검정 (contrast test)을 실시한 결과, Ra값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 3.756%, 6.306% 감소하였다 (표 3, 4/그림 4)



표 5. 눈가주름 Roughness 변수 별 측정결과 (μm) 및 통계분석 결과

		적용 전	적용 2주 후	적용 4주 후
Rq	Mean \pm SD	15.488 \pm 2.812	14.938 \pm 2.787	14.490 \pm 2.582
	p-value	-	0.002 **	0.001 **
Rmax	Mean \pm SD	83.845 \pm 14.971	83.048 \pm 20.004	79.917 \pm 16.507
	p-value	-	0.281	0.039 *

Probability p (Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test, significant: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

표 6. 개인별 Roughness 변수 별 측정값의 증가율 (%)의 평균

	적용 2주 후	적용 4주 후
Rq	3.494	6.249
Rmax	1.391	4.686

PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 부위의 Roughness 변수 별 측정값을 분석한 결과, Rq값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 3.494%, 6.249% 감소하였으며, Rmax값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)으로 적용 4주 후 4.686% 감소하였다 (표 5, 6/그림 5, 6).

PRIMOS High Resolution에 의한 눈가주름 평가의 세부자료는 첨부 1, 표 11, 12와 같다.



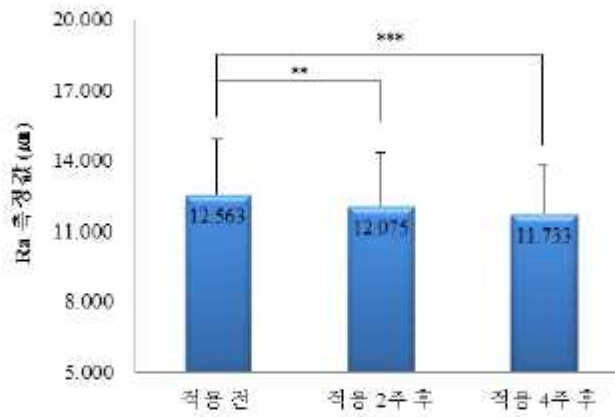


그림 4. Ra 측정결과

Probability *p* (Repeated measures ANOVA Contrast test, significant: ***p*<0.01, ****p*<0.001)

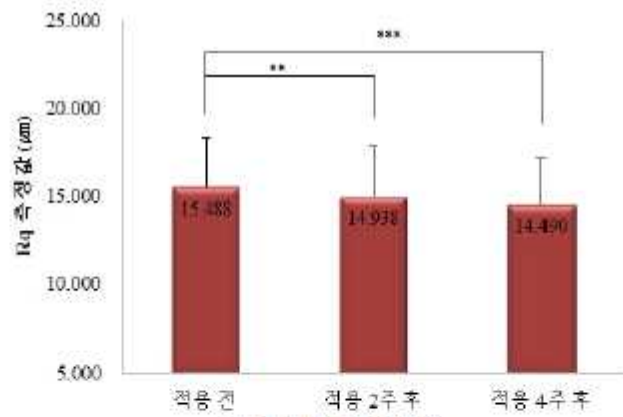


그림 5. Rq 측정결과

Probability *p* (Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test, significant: **p*<0.05, ***p*<0.01)



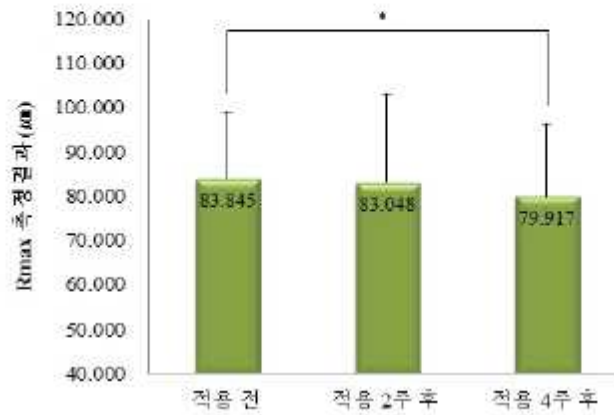


그림 6. Rmax 측정결과

Probability p (Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test, significant: *p<0.05)

표 7. 개인별 Roughness 변수 별 측정값이 감소된 연구 대상자 비율 (%)

	적용 2주 후	적용 4주 후
Ra	85.714	90.476
Rq	85.714	90.476
Rmax	61.905	66.667

눈가주름 Roughness 변수 별 측정값이 감소된 연구 대상자의 비율을 분석한 결과, 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 85.714%, 90.476%의 연구 대상자가 Ra값의 감소를 나타내었으며, 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 85.714%, 90.476%의 연구 대상자가 Rq값의 감소를 나타내었다. 또한 Rmax 측정값은 적용 4주 후 66.667%의 연구 대상자가 측정값의 감소를 나타내었다 (표 7).

3) Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 평가

Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 변수 별 측정결과, 증가율, 통계 분석결과는 다음과 같다.

표 8. 피부탄력 (A.U.) 측정결과 및 통계분석 결과 (적용 전/후 비교)

표 8-1. 개체-내 효과 검정 결과

개체-내 효과		F	자유도	유의확률
R2	Week	5.787	2, 40	0.006 ¹
R5		16.361	2, 40	<0.001 ¹
R7		9.233	2, 40	0.001 ¹

1. 구형성 가정

표 8-2. 기술통계량 및 개체-내 대비 검정 결과

R2	Mean±SD	적용 전	0.703±0.057
		적용 2주 후	0.712±0.062
		적용 4주 후	0.719±0.058
	p-value	적용 전 - 적용 2주 후	0.065
		적용 전 - 적용 4주 후	0.002 **
R5	Mean±SD	적용 전	0.518±0.059
		적용 2주 후	0.527±0.058
		적용 4주 후	0.537±0.061
	p-value	적용 전 - 적용 2주 후	0.005 **
		적용 전 - 적용 4주 후	<0.001 ***
R7	Mean±SD	적용 전	0.359±0.047
		적용 2주 후	0.365±0.047
		적용 4주 후	0.371±0.049
	p-value	적용 전 - 적용 2주 후	0.027 *
		적용 전 - 적용 4주 후	<0.001 ***

Probability p (Repeated measures ANOVA Contrast test, significant: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)



표 9. 개인별 피부탄력 변수 별 측정값의 증가율 (%)의 평균

	적용 2주 후	적용 4주 후
R2	1.181	2.232
R5	1.865	3.768
R7	1.907	3.456

Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 변수 별 측정값에 대한 시료 적용 전 후 간의 개체-내 효과 검정을 실시한 결과, R2, R5, R7값에 대한 Week 효과는 모두 통계적으로 유의한 차이 ($p<0.05$)를 나타내었다. 개체-내 대비검정 (contrast test)을 실시한 결과, R2값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 4주 후 2.232% 증가하였으며, R5값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 1.865%, 3.768% 증가하였다. 또한, R7값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 1.907%, 3.456% 증가하였다 (표 8, 9/그림 7~9).

Cutometer에 의한 피부탄력 평가의 세부자료는 첨부 1, 표 13, 14과 같다.

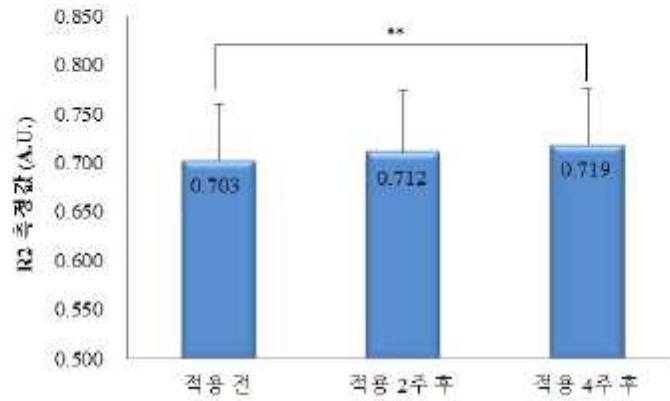


그림 7. R2 측정결과

Probability *p* (Repeated measures ANOVA Contrast test, significant: ***p*<0.01)

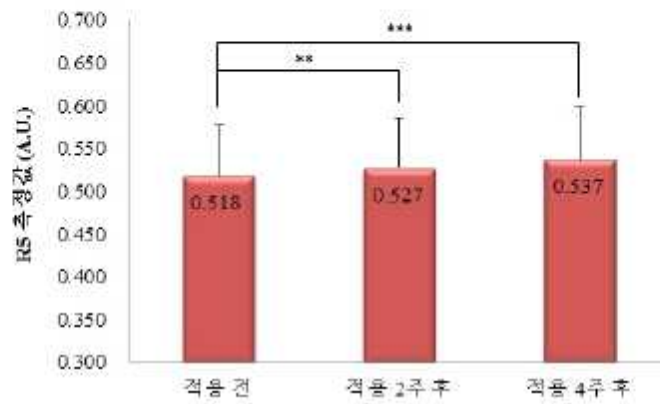


그림 8. R5 측정결과

Probability *p* (Repeated measures ANOVA Contrast test, significant: ***p*<0.01, ****p*<0.001)

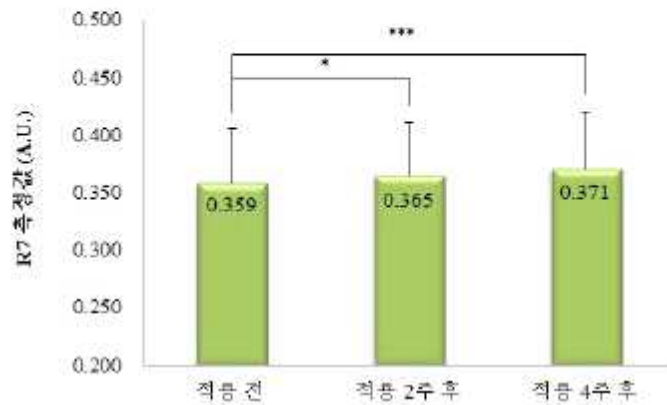


그림 9. R7 측정결과

Probability p (Repeated measures ANOVA Contrast test, significant: *p<0.05, **p<0.001)

표 10. 피부탄력 변수 별 측정값이 증가된 연구 대상자 비율 (%)

	적용 2주 후	적용 4주 후
R2	66.667	80.952
R5	66.667	90.476
R7	71.429	85.714

피부탄력 변수 별 측정값이 증가된 연구 대상자의 비율을 분석한 결과, 적용 4주 후 80.952%의 연구 대상자가 R2값의 증가를 나타내었고, 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 66.667%, 90.476%의 연구 대상자가 R5값의 증가를 나타내었다. 또한, 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 71.429%, 85.714%의 연구 대상자가 R7값의 증가를 나타내었다 (표 10).

3. 피부 이상반응

1) 피부과 전문의의 평가

피부과 전문의에 의한 이상반응 평가 결과, 연구기간 동안 피부 이상반응과 관련된 특별한 증상이 관찰되지 않았다.

2) 연구 대상자 설문평가

연구 대상자들을 통한 설문조사 결과, 연구기간 동안 피부 이상반응과 관련된 특별한 증상이 관찰되지 않았다.

결론 및 요약

썬엘리드에서는 썬셀아이콘랩 의뢰를 받아 최종 21명의 연구 대상자에게 CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림의 눈가주름 및 피부탄력 개선효과 인체적용 시험에 관한 연구를 수행하였다.

PRIMOS High Resolution 을 이용한 눈가주름 부위의 Roughness 변수 별 측정값을 분석한 결과, Ra값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 3.756%, 6.306% 감소하였으며, Rq값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 3.494%, 6.249% 감소하였다. 또한, Rmax값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 4주 후 4.686% 감소하였다. 따라서 CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림은 적용 2주 후, 적용 4주 후 눈가주름 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

Cutometer를 이용한 볼 부위의 피부탄력 변수 별 측정값을 분석한 결과, R2 값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 4주 후 2.232% 증가하였으며, R5값은 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 1.865%, 3.768% 증가하였다. 또한, R7값은 시료 적용 전에 비하여 통계적으로 유의한 수준 ($p<0.05$)으로 적용 2주 후, 적용 4주 후 각각 1.907%, 3.456% 증가하였다. 따라서 CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림은 적용 2주 후, 적용 4주 후 피부탄력 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.

썬셀아이콘랩에서 의뢰한 CL-103(WrinkleFree J316™)펩타이드 함유 크림은 평가 기간 동안 특별한 피부 이상반응[itching (가려움) 등의 환자가 호소하는 증상과 vesicle (수포) 등의 인체적용 징후]을 나타내지 않았다.

본 연구는 썬엘리드 SOP에 따라 수행되었으며, 그 결과와 최종보고서의 내용은 절차에 따라 감사 완료되었다.



첨부 7. 인체적용 시험 사진자료

1. PRIMOS High Resolution을 이용한 눈가주름 사진자료

연구 대상자 번호 1.



연구 대상자 번호 3.



연구 대상자 번호 4.



연구 대상자 번호 5.



연구 대상자 번호 6.



2. DSLR 을 이용한 눈가주름 사진자료

연구 대상자 번호 1.



연구 대상자 번호 3.



연구 대상자 번호 4.



연구 대상자 번호 5.



연구 대상자 번호 6.



10. 기능성소재를 이용한 러시아 임상시험 결과

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЙ ОТЧЕТ

О ПРОВЕДЕНИИ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРОТОКОЛУ

**Опыт применения комплексного препарата серии МУ АТО,
содержащего β - глюкан в терапии пациентов с атопическим дерматитом**

ИСПОЛНИТЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Олисова Ольга Юрьевна - д.м.н., профессор

Грабовская Ольга Валентиновна - к.м.н., доцент

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Клинический центр: - клиника кожных и венерических болезней Первого МГМУ им
И.М. Сеченова

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Изучить эффективность и безопасность применения препаратов серии «МУ АТО» в составе комплексной терапии у больных с атопическим дерматитом и ксерозом кожи.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Изучить эффективность применения топических средств линии «МУ АТО» увлажняющий лосьон и интенсивный крем для чувствительной кожи:
 - с помощью шкалы SCORAD, разработанной Европейской рабочей группой по проблемам атопического дерматита;
 - с помощью ДИКЖ (дерматологического индекса качества жизни).
 - с помощью ультразвукового сканирования кожи (УЗИ)
2. Изучить безопасность и переносимость препаратов серии у пациентов с атопическим дерматитом на основании учета всех возможных нежелательных явлений.

КРИТЕРИИ ВКЛЮЧЕНИЯ ПАЦИЕНТА В ИССЛЕДОВАНИЕ

1. Пациенты с установленным диагнозом атопический дерматит, сопровождающегося ксерозом кожи, легкой, средней и тяжелой степени тяжести в период обострения на момент исследования
2. Пациенты мужского и женского пола в возрасте старше 16 лет
3. Отсутствие у пациента других кожных заболеваний, за исключением АД или других атопических заболеваний (аллергический ринит, бронхиальная астма)
4. Наличие подписанного и датированного Информированного согласия пациента на участие в исследовании.

КРИТЕРИИ ИСКЛЮЧЕНИЯ

1. Любые тяжелые, декомпенсированные или нестабильные соматические заболевания или состояния, которые, по мнению исследователя, угрожают жизни больного или ухудшают прогноз заболевания (анемия, сахарный диабет и др.).
2. Другие сопутствующие заболевания, которые требуют назначения системных кортикостероидов, цитостатиков, иммуносупрессантов, антиметаболитов, антицитокиновых препаратов и/или местной терапии в ходе исследования
3. Беременность и кормление грудью
4. Гиперчувствительность к компонентам препаратов серии «МУ АТО»
5. Острая психотическая продуктивная симптоматика (психоз, галлюцинация, бред)
6. Участие в другом клиническом исследовании в последние 30 дней.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование вошли 30 пациентов с легким, средним и тяжёлым течением atopического дерматита, сопровождающимся ксерозом кожи, которые получали стандартную терапию (антигистаминные препараты и топические кортикостероиды) в комплексе с препаратами серии «МУ АТО» (2 раза в день) в течение 56 дней. Топические кортикостероиды назначали в течение от 5 до 7 дней в зависимости от тяжести кожного процесса.

1 визит (0 день) – осмотр больного с определением индекса SCORAD, дерматологического индекса качества жизни (ДИКЖ), УЗИ кожи

2 визит (14 день) - осмотр больного с определением индекса SCORAD, оценка переносимости препаратов

3 визит (28 день) - осмотр больного с определением индекса SCORAD, оценка переносимости препаратов

4 визит (56 день) - осмотр больного с определением индекса SCORAD, дерматологического индекса качества жизни (ДИКЖ), УЗИ кожи; оценка переносимости препаратов серии «МУ АТО».

МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ

Дерматологический осмотр

Тяжесть течения atopического дерматита оценивали по шкале SCORAD (scoring atopical dermatitis, 1994), основанной на объективных (интенсивность и распространённость кожных поражений) и субъективных (интенсивность дневного кожного зуда и нарушении сна) критериях. Каждый из шести объективных признаков (эритема, отёк / папулезные элементы, корки / мокнутие, эксфолиации, лихенизация / шелушение, сухость кожи) оценивались от 0 до 3 баллов уровневой шкалы:

0 - отсутствие, 1 - слабые, 2 - умеренные, 3 - сильные.

Индекс SCORAD рассчитывался по формуле:

$$\text{SCORAD} = A/5 + (3,5) \times B + C$$

Где А - распространённость поражения кожи, В - сумма уровней интенсивности клинических симптомов atopического дерматита, С - сумма оценок субъективных нарушений (зуд, бессонница) по визуальной аналоговой шкале.

Значения индекса могут варьироваться от 0 – (нет клинических проявлений) до 100 - максимально тяжёлое течение atopического дерматита. Индекс SCORAD определяли до лечения, через 14, 28 дней и по окончании лечения.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ

Оценка качества жизни больных проводилась при помощи специальной анкеты, разработанной F.Y.Finlay (Уэльский университет, Великобритания). Применяется дерматологами для оценки степени негативного влияния кожного заболевания на различные аспекты жизни больного, характеризующие в целом его качество жизни. ДИКЖ может быть использован как один из критериев оценки эффективности терапии кожного заболевания у конкретного больного.

Руссифицированная версия индекса Finlay, подготовлена и апробирована на валидность Кочергиным Н.Г. и Буровой Е.П. Цифровой индекс, получаемый в результате ответов на все вопросы анкеты, отражает степень негативного влияния симптомов болезни на

качество жизни больного: чем выше индекс - тем сильнее болезнь "ухудшает" качество жизни. Максимальный индекс равен 30.

Анкетирование проводили у всех пациентов до и после лечения.

Данная анкета состоит из 10 вопросов, которые показывают связь с различными аспектами жизни больного: профессиональные, бытовые, сексуальные, социальные, личные.

Вопросы пациентам для определения ДИКЖ:

1. Испытывали ли Вы зуд, жжение или болезненность на прошлой неделе?
2. Испытывали ли Вы ощущение неловкости или смущение в связи с состоянием Вашей кожи?
3. Как сильно Ваши проблемы с кожей мешали Вам заниматься уборкой дома или покупками?
4. Насколько сильно состояние Вашей кожи влияло на выбор Вашего гардероба на прошлой неделе?
5. Как сильно влияло состояние Вашей кожи на Ваш досуг и социальную активность на прошлой неделе?
6. На прошлой неделе состояние Вашей кожи мешало Вам заниматься спортом?
7. Пропускали ли Вы учёбу, отсутствовали на работе из-за состояния Вашей кожи? Если Вы ответили «нет», то насколько сильно Вас беспокоило состояние Вашей кожи, когда вы находились на работе или учёбе?
8. Влияло ли состояние Вашей кожи на Ваши отношения с родственниками, партнерами, друзьями на прошлой неделе?
9. Насколько сильно Ваши проблемы с кожей влияли на Вашу сексуальную жизнь?
10. На прошлой неделе насколько сильно лечение заболевания кожи причиняло Вам неудобства, отнимало время, создавало проблемы?

На каждый вопрос предлагается 4 варианта ответа, каждый из которых оценивается соответственно от 0 до 3 баллов. Максимальная сумма баллов может равняться 30, при этом качество жизни пациента обратно пропорционально сумме баллов.

Интерпретация значений ДИКЖ:

0-1 балл – нет влияния на жизнь пациента.

2-5 балла – заболевание оказывает незначительное влияние на жизнь пациента.

6-10 баллов – заболевание оказывает умеренное влияние на жизнь пациента.

11-30 баллов – заболевание оказывает очень сильное влияние на жизнь пациента.

21-30 баллов – заболевание оказывает чрезвычайно сильное влияние на жизнь пациента.

Дерматологический индекс качества жизни может быть использован как критерий оценки тяжести состояния больного и как критерий эффективности проводимой терапии. Снижение индекса в процессе лечения означает улучшение качества жизни больного.

Также в исследовании фиксировались все нежелательные явления (НЯ) при применении препаратов серии «МУ АТО».

Характеристика исследуемого препарата: см инструкцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика больных

В результате скринингового обследования в исследование вошло 30 больных atopическим дерматитом, сопровождающегося ксерозом, в возрасте от 16 до 42 лет.

При проведении скринингового обследования все больные перед включением в исследование находились в стадии обострения atopического дерматита и предъявляли жалобы на зуд различной интенсивности и высыпания.

- у 6 больных отмечалась легкая степень тяжести заболевания,
- у 19 больных – средняя степень,
- у 5 больных – тяжелая степень.

Нарушение сна вследствие наличия ночного зуда отмечали 25 больных, а сухость кожи – 30 пациентов.

- В целях получения объективных стандартизированных данных о характере и тяжести клинических проявлений дерматоза применялась система индекс SCORAD. Исходные значения SCORAD у всех пациентов в среднем составили $34,4 \pm 3,7$.

Результаты анализа динамики индекса SCORAD у больных АД показали, что проведение комплексной терапии с ежедневным применением препаратов серии «МУ АТО» (2 раза в день) способствовало достоверному снижению индекса с $34,4 \pm 3,7$ до $2,38 \pm 1,4$ баллов ($p < 0,05$), т.е. индекс уменьшился в 14,5 раз.

- Уменьшение выраженности основных клинических симптомов (сухость, шелушение, чувство стянутости кожи, зуд) подтверждается контрольными ультразвуковыми исследованиями кожи.

В результате проведенного лечения были достигнуты клиническая ремиссия – у 15 (50%) больных, значительное улучшение – у 11 (36,7%), улучшение – у 4 больного (13,3%), отсутствие эффекта и ухудшение не зарегистрировано.

Таким образом, у абсолютного большинства АД наблюдалось разрешение и снижение интенсивности высыпаний более чем на 75%, а отсутствие пациентов, имеющих либо слабый положительный ответ, либо ухудшение в результате проводимого лечения, отражало высокую эффективность комплексной терапии с использованием препаратов серии «МУ АТО» у больных АД и ксерозом кожи.

- Снижение качества жизни прослеживается у большинства больных с дерматозами. Наиболее выражено нарушение социальной адаптации и сексуальной жизни отмечается среди больных, у которых имеются дерматозы, сопровождающиеся зудом и высыпаниями на открытых участках кожи. Субъективная оценка влияния atopического дерматита и ксероза на жизнедеятельность больными проводилась в настоящем исследовании при помощи специально разработанного опросника и определения дерматологического индекса качества жизни (ДИКЖ).

Клинический центр: - клиника кожных и венерических болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

При оценке качества жизни у пациентов с атопическим дерматитом было установлено, что средние значения индекса ДИКЖ составили $21,17 \pm 4,65$ баллов, что отражало очень негативное влияние заболевания на жизнь больного и высокий уровень снижения социальной адаптации вследствие наличия дерматоза. Как правило, низкое качество жизни больных АД связано с сухостью кожных покровов, зудом, иногда мучительным, бессонницей.

После проведенного лечения средние значения ДИКЖ снизились до $4,2 \pm 0,9$ баллов, что указывало на улучшение качества жизни больных.

- Одним из критериев оценки эффективности лечения является неинвазивный метод диагностики - УЗИ-сканирование кожи, с помощью которого определяют структурные изменения в ней. В нашем исследовании УЗИ кожи проводили перед лечением и по окончании лечения (на 56 день).

В результате проведенного лечения отмечается уплотнение дермоэпидермального соединения и рядности клеток эпидермиса, усиление экзогенности эпидермиса и дермы.

Данные УЗИ		до лечения	после лечения	
Эхогенность эпидермиса (предплечье)	Основная группа	$0,089 \pm 0,03$	$0,112 \pm 0,03$	$P < 0,05$
	Контрольная Группа	$0,085 \pm 0,02$	$0,086 \pm 0,01$	$P < 0,05$
Дермоэпидермальное соединение	Основная группа	30 (50%)	40 (100%)	Четкое
	Контрольная группа	30 (50%)	30 (50%)	Не четкое
Эхогенность дермы	Основная группа	$0,194 \pm 0,02$	$0,216 \pm 0,01$	$P < 0,05$
	Контрольная группа	$0,193 \pm 0,01$	$0,194 \pm 0,02$	$P < 0,05$
Данные УЗИ		до лечения	после лечения	
Эхогенность эпидермиса (кисти)	Основная группа	$0,086 \pm 0,03$	$0,0993 \pm 0,03$	$P < 0,05$
	Контрольная Группа	$0,083 \pm 0,02$	$0,084 \pm 0,01$	$P < 0,05$
Дермоэпидермальное соединение	Основная группа	30 (50%)	40 (100%)	Четкое
	Контрольная группа	30 (50%)	30 (50%)	Не четкое
Эхогенность дермы	Основная группа	$0,195 \pm 0,02$	$0,222 \pm 0,01$	$P < 0,05$
	Контрольная Группа	$0,193 \pm 0,01$	$0,194 \pm 0,02$	$P < 0,05$

Клинический центр - клиника кожных и венерических болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Переносимость лечения препаратов была хорошей, отрицательной динамики, аллергических реакций и других нежелательных явлений не отмечалось. Больные отмечали хорошую текстуру препаратов, быстрое впитывание, отсутствие жирной пленки на поверхности, приятный запах, что очень важным было для больных. Со слов больных кожа после применения меньше шелушилась и становилась более гладкой.

Выводы:

Применение препаратов топической терапии серии «МУ АТО», содержащих Комплекс успокаивающих и увлажняющих пептидов TripleMComplex и CooperTripeptide-1 (увлажняющий лосьон и интенсивный крем), в комплексной терапии atopического дерматита и ксероза кожи способствует повышению эффективности лечения, что проявлялось выраженным клиническим улучшением или достижением ремиссии у 86,7% больных с редукцией средних значений индекса SCORAD на 93,08%, устранением дневного и ночного зуда и редукцией на 94,4% пациентов и улучшением качества жизни на 80,16%.

Эффективность применения топических препаратов серии «МУ АТО» (увлажняющий лосьон и интенсивный крем) подтверждена ультразвуковым сканированием кожи, которые проводились до и после проведения топической терапии, где достоверно отмечается улучшение показателей экзогенности эпидермиса и дермы и достоверное увеличение степени гидратации (по показателям динамики степени экзогенности структур эпидермиса и дермоэпидермального соединения).

Быстрое и стойкое устранение клинических симптомов atopического дерматита и ксероза кожи в виде зуда, шелушения, стянутости кожи, а также отсутствие нежелательных явлений при проведении лечения позволяет констатировать **высокую эффективность и безопасность топических препаратов серии «МУ АТО», Комплекс успокаивающих и увлажняющих пептидов Triple M Complex и CooperTripeptide-1 у больных АД с ксерозом кожи.**

11. 면역활성 연계 화장품소재로써의 기능성 제품개발을 위한 방안

○ 아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 신생아기에 많이 발생하는 태열(胎熱)이라고도 하며 민감성 피부 및 건조 피부의 대표적인 만성 알레르기 염증성 피부질환임.



<그림>아토피 피부염 증상 사진

○ 황사, 건조한 기후, 아파트 등 밀폐형 공간에서 공기오염, 식생활 및 체질 변화 등과 같은 자연 및 생활 환경의 변화로 아토피 피부염 질환이 증가하고 있음.

○ 우리나라의 경우 유·소아 15%, 성인의 10% 가량이 앓고 있으며, 치료법이 확실치 않아 끊임없는 연구가 진행되고 있으며 최근 더욱 증가 추세에 있음.

○ 아토피 피부 질환의 대표적인 4대 증상들로는 가려움, 상처, 염증, 및 각질화를 수반한 피부장벽 변형 등이 있음.

○ 기존 제품들은 4대 증상 중 각질화 부분의 해결방안이라 할 수 있는 보습기능만 제한적으로 해결 할 수 있음.

○ 아토피 피부염에서의 보습 기능 활용 제품은 일시적인 효과를 나타낼 수는 있으나 가려움, 상처, 염증과 같은 아토피 피부염을 더욱 악화 시키는 근본적인 Total Solution이 될 수 없음.

○ 해결책으로는 4대 증상을 동시에 완화 할 수 있는 제품 개발이 필요하며, 이 소재들을 활용하여 Total Solution 제공이 필요함.

○ 아토피 피부의 대표적인 증상 특징들과는 상관없이 세라마이드, 동백유 등 보습효과 위주로 제품화가 이뤄지고 있음.

○ 현재 아토피 관련 치료소재의 동향을 살펴보면 대부분 스테로이드 계열 및 지질 성분 계

열을 사용함으로써 효과가 미비하거나, 계면활성제 사용으로 문제성 피부 사용 시 부작용 발생 우려가 있음.

- 가려움, 상처, 염증, 각질화 4대 증상별 원인을 파악하여 아토피 피부염의 증상별 해결책을 제안하고자 함.
- 아토피 피부 질환의 대표적인 4대 증상들로는 가려움, 상처, 염증, 및 각질화를 수반한 피부장벽 변형 등이 있음.

증상	원인	소재
가려움	면역 활성 인자 과다로 인한 과민 증상	· 베타글루칸 소재를 활용 면역 활성 인자를 억제할 수 있는 소재
상처/염증	물리적 자극	· 콜라겐 합성 촉진 및 항염증 펩타이드 활용
각질화	피부장벽 손상으로 인한 수분 보유력 감소	· 친수/친유 생체 친화 소재 활용

- 코퍼펩타이드: 인체 유래 펩타이드로, 피부 재생 및 염증 완화 효과가 뛰어나 피부를 근본적으로 건강하게 가꾸어 줌

- CIL-J316TM : (주)셀아이콘랩에서 개발한 펩타이드로써 콜라겐 합성능력이 매우 뛰어나 피부 및 상처 재생에 매우 효과적임

- 나노에멀전 제형 세라마이드: 기존 마이크로에멀전 단위(μm) 보다 1/10 작게 만드는 나노에멀전 제조 기술을 이용하여 유효성분이 빠르게 흡수되게 도와주며, 피부 표면에 수분을 지켜주는 보호막을 형성하여 외부 유해 환경으로부터 피부를 보호함.

- 베타글루칸: *Aureobasidium pullulans* 유래 베타글루칸은 첨단 발효 기술을 활용해 만든 소재로써 친수성 소재로써 보습효과가 매우 뛰어나며, 피부 장벽 기능을 회복시켜줌. 면역 활성 인자를 억제함.

12. 러시아 트러블 기능성 임상결과

Clinical characteristics of the patients

As a result of screening checkup, 30 patients aged from 14 to 25 years (15 men and 15 women) with acne vulgaris were selected for the trial.

11 patients (36,7%) had mild level of severity, 19 patients (63,3%) – medium level of severity.

According to hydrometric trials, the skin's hydration level of patients with acne varied from 35 to 42 p.d.u. (average index – 38.4 ± 3.2), which indicated dehydration of the skin because normal moisture level is higher than 45 p.d.u.

After the therapy the moisture indexes gradually normalized and by the end of the course corresponded to the parameters of the physiological norm (see the table).

Before the therapy started it was noted that all patients had considerable increase compared to the norm of the sebumeter indexes, which indicated excessive sebum and oily skin.

After the therapy course the sebumeter indexes considerably improved (on forehead and chin) and mormalized (on cheeks), decreasing from 84 to 56 p.d.u. on forehead, from 61 to 48 p.d.u. on cheeks and from 77 to 56 p.d.u. on chin (see table).

As a result of the therapy the number of efflorescent elements of all patients decreased: if benign, the number of opened comedones decreased from 28.3 ± 5.2 to 8.4 ± 3.7 ; the number of closed comedones decreased from 16.6 ± 4.6 to 4.4 ± 2.1 ; the number of papule-pustule elements decreased from 21.5 ± 6.4 to 7.6 ± 3.4 .

Thus after the course of topical therapy, complete clarification of the skin surface was achieved in 14 patients (46.7%), considerable improvement – in 10 patients (33.3%), improvement – in 6 patients (20%). At the same time the clinical remission of all patients with the mild level of severity of the process was noted.

Having explored the Dermatology Life Quality Index of the patients with acne, it was determined that before the therapy the average index of the DLQI accounted to 19.4 ± 3.03 points, which, on the evaluating scale, means severe impacts of the disease on the patient's life. After the therapy conducted, the average index decreased to 4.03 ± 0.15 points which indicated considerable improvement in the patient's life quality. The

comparison of the indexes before and after the therapy showed statistically reliable differences between them (19.4 ± 3.03 against 4.03 ± 0.15 , $p < 0.05$).

Thus as a result of the therapy the index decreased by 4.8 times. Decrease of the life quality of the patients was directly linked to the fact that under this disease the efflorescence localizes on the opened areas of the skin's surface, i.e. on the face, rarely on the back and chest. This also deteriorates by the fact that in 85% the disease occurs during adolescent years.

Under microbiological analysis of the samples by the method of the prints of 30 patients, all 5 types of staphylococcus that are typical for the locus: in the 1st group *St. aureus* was discovered with the frequency of 53%, *St. epidermidis* – 17.6%, *St. intermedius* – 11.7%, *St. haemolyticus* – 11.7%, *St. saprophyticus* – 6%; although in the control group *St. aureus* occurred in 30% of the cases. Predominant type of the staphylococcus is *St. aureus* which allows us to place it under the causally significant types under inflammation. It has been discovered that all 3 types of propionibacteria occur on the skin of the patients in both groups and average population of *P. Acnes* in both groups accounted to $9.8 \cdot 10^3$ CFU/cm², *P. granulosum* – $3.3 \cdot 10^3$ CFU/cm², *P. avidum* – $1.7 \cdot 10^3$ CFU/cm². At the same time the values of population of different types of propionibacteria in both groups correlated. The local therapy with topical products containing antimicrobial peptide CIL-020, promotes normalization of pathological background of skin's bacterial load by 81.5% in 30 patients with mild and medium level of severity.

All patients tolerated the therapy well. While on the therapy none of the patients showed the signs of objectionable effects in the form of redness, swelling, itching, burning etc. On the survey, the patients noted fast absorption, light texture, good fragrance, fast eliminating of the skin's oiliness, good “drying effect” .

Conclusions

Topical products of the AC Control line of the cosmeceutical brand *Jeu' Demeure* (Cleansing Gel, Acno gel and Acno lotion) containing GDP-20 – granulysin-derived peptide, are effective products for treatment acne of mild and medium level of severity which is proved by the results of corneometry (hydrometry), sebumetry.

As a result of the therapy conducted, clinical remission was achieved in 14 patients (46.7%), considerable improvement – in 10 patients (33.3%), improvement – in 6 patients (20%). Best results were achieved in patients with mild level of severity.

The local therapy conducted with topical products containing antimicrobial peptide CIL-020, promotes normalization of pathological background of skin's bacterial load by 81.5% in 30 patients with mild and medium level of severity.

Topical products of the AC Control line of the cosmeceutical brand Jeu' Demeure (Cleansing Gel, Acno gel and Acno lotion) containing GDP-20 – granulysin-derived peptide, are easily used by the patients with acne: none of the patients was noticed to have signs of developing of objectionable effects.



7

그림. 러시아 피험자를 대상으로한 트러블개선 이미지

Динамика средних показателей гидрометрии:



Динамика средних показателей себуметрии:

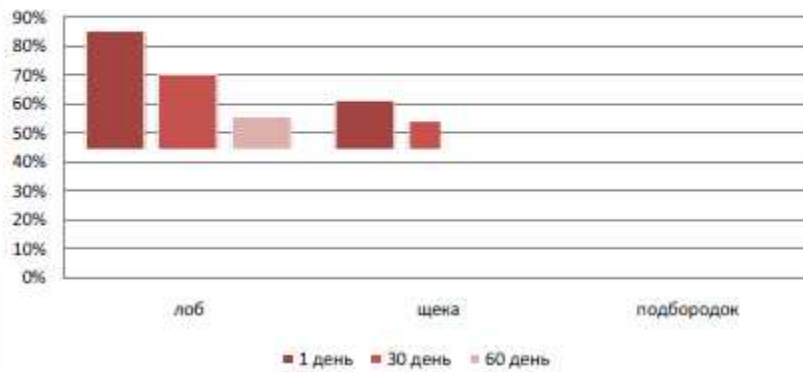


그림. 그림. 러시아 피험자를 대상으로한 트러블 개선율

남부대학교 [제 3협동]

1. 고령화세대의 식품동향 분석

가. 고령화 세대

- WHO에서는 노인의 연령기준을 정의하지 않았으나 각종 통계자료는 60세 이상을 기준으로 삼고 있다. 미국 국립보건원(NIH)은 65세부터 79세의 성인을 노인(adult, aged)로 정의하고, 80세 이상은 80세 이상 노인으로 사용.
- 우리나라는 의·약학 분야에서 노인을 일컬을 때는 65세 이상을 뜻하고 있다. 최근 우리나라는 생활수준의 향상과 보건의료 기술의 발달로 노인인구가 크게 늘어남.
- 우리나라는 2005년 11월 기준 65세 이상 노인인구가 337만 여명에 달해 전체 인구(4천5백98만명)의 7.3%로 고령화 사회(aging society)로 접어 들어섰다. 2005년에 전체인구의 9.3%, 2015년에는 전체 인구의 12.9%를 넘어서 고령사회(aged society)에 진입하고, 2030년 24.1%에도달하여 본격적인 초고령사회(post-aged society)가 예상되어, 그 속도는 OECD국가 중에서 가장 빠르며, 우리나라 전체 노인의 86.7%가 각종 만성 퇴행성 질환에 시달리고 있으며, 77.7%가 한 가지 이상의 의약품을 경구투여 중.



그림 1. 노인 인구 전망

- 통계청 자료(2006)에 따르면 우리나라의 평균 수명은 연간 0.5세씩 증가할 만큼 큰 상승률을 기록

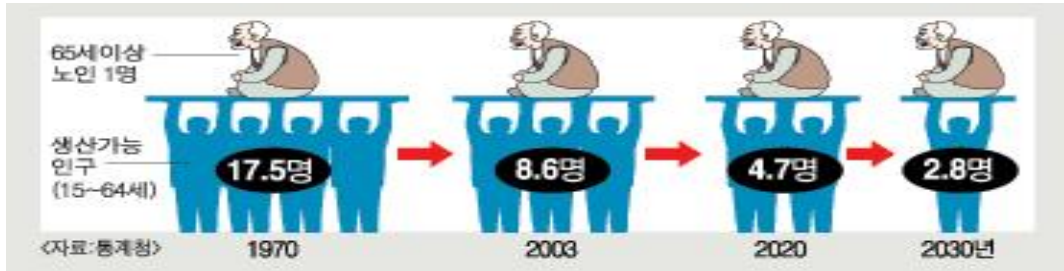
하고 있는데 또한, 이 자료에서 우리나라의 평균 수명은 91.1세를 기록했는데, 이는 OECD국가 평균 수명인 89.9세보다 0.2세 앞지른 수치이다. 이로써 1위인 일본(82.4세)과의 격차도 3.5세로 줄었다. 이러한 추세라면, 오래지않아 평균수명 100세가 실현되고 노인세상이 될 것임.

표 2. 주요 국가별 인구 고령화 속도



- 우리보다 먼저 고령화 사회에 진입하고 고령화 문제를 경험하고 있는 외국에서는 고령화에 대응하기 위한 효과적인 대안으로 연구개발의 필요성을 인지하고 관련 정책적 지원을 통해 체계적으로 연구 개발을 추진하고 있으나, 우리나라는 일부 연구기관에서 정부의 연구개발 지원을 통해 산발적이며 제한적으로 연구가 추진
- 인구고령화에 따른 노인의료비가 10년간 8배 이상 증가하고 있으며, 노인 1인당 건강보험 부담액도 2006년 현재 137 만5천원을 상회하여 인구고령화는 만성질환 및 장애 발생률을 증가시켜 의료 및 요양 등 재정 부담을 증대시키고 있다. 또한 표 3에서 보는 바와 같이 1970년에 노인 1명을 부양하는데 17.5명이 부담하였으나, 2003년 8.3명, 2030년에는 2.8명이 1명의 노인을 부담해야 하는 어려움이 처해 있어 이에 대한 체계적인 절박하게 준비해야 하는 문제를 안고 있음.
- 한국의 실버산업은 2008. 7. 1 ‘노인 장기요양 보험법’의 시행으로 본격적인 발전이 시작되어, 노인식의 내수용은 물론 세계 시장에서의 진출을 위하여, 전통 즉, 미음 등의 규격화 다양화는 물론 선진 제조기술을 도입한 제품 개발이 요구되고 있음.

표 3. 65세 이상 노인 1명 부양하기 위한 필요한 15~64세 인구



- 2010년부터 10년간 연평균 12.9% 성장할 것으로 전망되는 고령친화산업은 미래 성장 동력 산업으로 고령친화 제품 및 서비스를 통하여 노인 복지와 ‘삶의 질’ 향상을 목적.
- 고령친화산업 부문별로 기술개발 및 산업 육성을 위한 연구개발이 절실히 요구되고 있다. 특히 ‘삶의 질’ 유지에 가장 기본적인 음식을 씹고 삼키는 기능이 쇠퇴한 고령자들이 건강수명을 유지할 수 있는 복지 대책이 고령화 사회의 당면 과제.
- 고령자의 증가와 더불어 이들을 대상으로 하는 제품과 서비스 활동인 고령친화산업이 미래의 산업으로 주목받고 있다. 2005년 1월 대통령 자문기구였던 고령사회위원회의 주관으로 ‘고령친화산업 활성화 전략’이 보고되었으며, 2006년 12월에 고령친화산업진흥법이 제정·공표됨으로써 고령친화산업에 대한 기반이 조성되기 시작
- 고령친화산업진흥법의 목적인 “노인의 삶의 질 향상”의 필수적인 조건은 건강과 생명유지이다. 이는 일상적으로 섭취하는 ‘식품’의 본질적 목적과 일치한다. 따라서 고령친화산업에서 식품부문은 중추적인 역할을 할 것으로 예상된다. 이에 대비하기 위해서 고령친화식품시장 확대를 위한 지원, 법적지위 확보, 연구개발 등 고령친화식품제도의 도입과 체계적 관리가 필요한데, 이를 위해 무엇보다도 고령친화식품산업에 대한 전반적인 분석이 필요한 시점(진현정 외, 2011).
- 현재 고령화 사회에 대비한 많은 정책과 산업이 태동되어 활발하게 움직이고 있으나 본 자료조사에서는 고령친화식품산업의 범위와 산업구조 그리고 고령친화 식품산업중 본 과제와 관련성이 있는 식품류나 간식류에 대한 조사를 하고자 하였음.

나. 고령친화 산업의 정의와 범위

- 일반식품과 고령친화식품은 어떻게 구분되어야 하는가. 이에 대한 여러 가지 의견들이 있을 것으로 예상된다. 고령자는 면역기능 저하, 감각 및 신경조절기능의 저하, 식욕감퇴 및 소화기능의 저하, 근력, 골격의 약화 등 전반적으로 신체적 기능이 저하되고 성인병을 비롯한 노인성

질환에 취약해진다. 따라서 고령친화 식품이란 고령자의 신체 · 생리적 특성을 고려하여 질병예방 및 치료, 노화억제 및 영양과 건강상태 유지에 도움을 주도록 특별히 고안된 식품들을 말함.

- 이러한 식품들의 유형에는 1) 일반식품의 형태를 가지면서 고령자를 위해 고안된 식품군 2) 정상적인 섭취, 소화, 흡수가 어려운 환자들을 위해 특별히 제조가공 된 특수의료용 식품군 3)건강기능식품군이 있음.
- 위의 예에서 보듯 건강기능식품이나 특수의료용도 식품들이 고령친화식품의 중요한 부분을 차지하고 있으며 앞으로도 그 비중이 클 것은 분명하고 일반식품 형태라도 고령자를 배려한 성분이나, 다른 기능적 특성들이 포함시키는 것이 필요함.
- 건강기능식품산업의 활성화가 고령친화식품산업의 활성화에 중요한 비중을 차지한다고 간주할 때 건강기능식품의 개발 시 효능에 앞서 제형에 제한을 고집할 필요가 있는가도 고려할 문제로 판단됨.
- 고령친화식품의 개념 : 고령친화식품은 섭취기능 및 대사기능 저하, 영양성분 부족 등 일반적인 고령 소비자의 신체적 특징을 반영하고, 다양한 기호를 충족시킬 수 있는 식품을 의미함
- 현재 고령친화식품의 정의는 공식적으로 정립되어 있지 않았으나 노인들에게 부족한 칼슘, 비타민 A, 리보플라빈 등이 풍부한 식품, 후각·미각 기능 감소, 치아 부실 등을 겪는 노인의 기호에 맞는 맛·향·형태를 지닌 식품 등을 고령자용 식품이라 함
- 현재 시판중인 고령자용 식품 유형 분류하면 일반식품과 건강식품 2가지로 구분할 수 있으며, 일반식품은 1. 특수의료용도식품, 2. 즉석섭취식품, 3. 캔디류, 4. 식용유지류가 있으며 건강기능식품은 단백질보충, 식이섬유 보충, 텍스트린이 있음(김민아, 2013)
- 특수의료용도식품은 일반인, 건강한 고령자를 위한 식품이라기보다는 환자의 식사 일부를 대신할 목적으로 제조·가공된 식품이며, 식품유형으로는 환자용 균형영양식, 당뇨환자용 식품, 신장질환자용 식품, 장질환자용 가수분해 식품, 열량 및 영양공급용 의료용도식품 등 8가지로 구성되어 있음.

표 4. 국내 판매중인 고령자용 식품의 식품유형 사례

일반식품	건강기능식품
특수의료용도식품 즉석섭취식품 캔디류 식용유지류	단백질 보충 식이섬유 보충 텍스트린

* 출처: 한국보건산업진흥원(2011), 고령친화식품산업 활성화 지원방안

- 대부분 연하 기능 저하 환자를 고려한 파우더 또는 액상제품으로 고령소비자의 영양 및 저작기능을 고려한 제품은 거의 없으며, 주식개념보다는 영양보충식 개념의 식품이 대부분

표 5. 특수의료 용도등 식품

제품의 목적	제품형태	유용성	표시 섭취 형태
환자용 균형영양식	파우더, 액상	균형영양공급	경관, 경구
당노환자용 식품	파우더, 액상	당 조절 필요한 사람	경관, 경구
신장질환자용 식품	파우더, 액상	전해질, 수분제한, 섭취 필요한 사람	경관, 경구
장질환용 가수분해식품	파우더, 액상	장관 기능 개선이 필요한 사람	경관, 경구
열량 및 영양공급용 의료용도 식품	파우더, 액상	수술 전후 영양개선	경관, 경구
연하 기능곤란자용 점도증진식품	파우더, 액상	연하 기능능력에 따른 조절이 필요한 사람	경관, 경구

* 자료: 식품의약품안전평가원(2011), 노인대상 식품안전·영양 관리방안 연구

- 건강기능식품은 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소 또는 인체에 유용한 특별한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품으로 앞서 [표4]에서 본 바와 같이 단백질보충, 식이섬유보충 등 기능 보조식품으로 일반식품과는 다른 측면이 있음
- 위와 같은 배경에서 실질적으로 식사를 대신할 고령자용 식품에 해당하는 제품은 일반식품 중 즉석섭취식품과 캔디류, 식용유지류 등 이라고 판단되나 이러한 제품들에 관한 고령자용 식품 유형, 기준 및 규격이 부재하여 소비자가 제품 선택 시 정보제공과 안전성 관련 정보제공이 미흡한 현실임

3. 고령친화산업의 국내외 동향

- 고령친화산업 현황 분석을 통해 15개 산업 도출하였는데 고령친화산업 분류 현황을 종합하면 크게 15개 산업군으로 나타났고, 그 중 요양, 기기, 여가, 금융, 주거산업을 포함하는 경우가 높은 것으로 나타남
 - 제외국 : 금융, 여가, 요양(보건의료 포함), 주거분야를 주로 지원하고 있고, 일본의 경우 복지기기

분야도 지원하고 있음

- 고령친화산업진흥법 : 기기(용구·용품 또는 의료기기), 주거, 요양, 금융, 정보, 여가, 농업, 의약품, 화장품, 교통, 건강기능식품분야를 포함하고 있음
- 정부측 : 요양, 여가, 금융, 주거분야를 기본산업으로 하여, 14대 산업(요양, 기기, 정보, 여가, 금융, 주택, 한방, 농업, 교통, 식품, 의약품, 장묘, 의류, 교육)을 포함함
- 학계 : 요양, 기기, 정보, 여가, 주거분야를 포함하고 있음

○ 조정된 13개 산업군에서 고령친화산업진흥법, 주요분야 여부(요양, 기기, 여가, 금융, 주거), 산업통계 여부(산업 지원을 위한 데이터 수집 가능 여부) 및 최근의 제품·서비스 수요 및 정책 수요 등을 고려한 전문가 의견을 종합하여 고령친화산업을 9개 산업으로 분류함

○ 2005년, 2006년 고령친화산업 활성화전략(1,2)와 이번 연구에서 도출된 산업을 비교하면 10대 산업은 예전에 중복되는 범위 등을 재조정하여 9대 산업으로 체계화하고, 4대 산업은 향후 논의될 산업으로 이번 연구에서는 다루지 않음

라. 고령친화산업의 시장 현황

- 고령친화산업 시장규모는 요양, 의약품, 의료기기, 화장품, 식품, 여가, 금융, 주거, 용품 등 주요산업 9개 시장규모를 모두 합한 값을 고령친화산업 시장규모로 하며 2010년 산업별 시장규모를 모두 합한 고령친화산업 시장규모는 33조 2,241억 원이며, 2010년-2020년 연평균성장률(CAGR)은 14.2%로 나타남

표 6. 고령친화산업 분류 현황에 대한 비교분석

(: 법, : 정부측 보고서, : 학계)

No	산업 구분	참고문헌							선택 비중 (%)	비고	
		법	1	2	3	4	5	6			7
1	요양	요양	요양	요양		요양	재가복지 간병	요양	재가복지 서비스 요양	85,7	요양은 재가서비스, 시설서비스로 구분됨
2	기기	기기 용구 용품		기기		기기	생활용품	의료기기	용구, 용품기기	71,4	기기에는 의료, 생활, 주거, 여가 등 다양한 분야가 포함됨
3	정보	정보		정보		정보		정보		42,9	
4	여가	여가	여가	여가		여가	여가	여가	여가	85,7	
5	금융	금융	보험금융	금융		금융	금융보험	금융	금융보험	85,7	
6	주거	주택	주택	주택		주거	주거	주택	주거	85,7	
7	한방			한방		한방				28,6	의약품, 의료기기, 식품, 화장품, 생활용품 등 다양한 분야에서 한방 관련 항목을 추출
8	농업	농업		농업		농림				28,6	
9	교통	교통			교통					14,3	
10	식품	식품			식품					14,3	
11	의약품	의약품			의약품					14,3	
12	장묘				장묘					14,3	
13	의류				의류					14,3	
14	교육				교육					14,3	
15	화장품	화장품									

1) 고령친화산업 활성화 과제 개발, 고령친화산업분과별 실무추진위원회, 2004.12
 2) 고령친화산업 활성화(1) 전략, 대통령자문 고령화 및 미래사회위원회 2005.2
 3) 고령친화산업 활성화(2) 전략, 보건복지부 저출산고령사회위원회 2006.2
 4) 고령친화산업 중장기 실행전략 연구, 한국보건산업진흥원, 2005.10
 5) 고령사회대비에 따른 실버산업 발전방안, 황윤란, 2005
 6) 국내 실버산업의 성장성 전망 자료, 대한상공회의소, 2006.7.28
 7) 실버산업의 이해, 조경훈, 2008

표 7. 고령친화산업 시장규모 전망 및 세부산업별 시장규모 전망

(단위: 억 원, %)



구분	2010년		2015년		2020년		CAGR (10-20)
	시장규모	비중	시장규모	비중	시장규모	비중	
요양	25,675	7.7	62,234	9.2	125,188	10.0	17.2
의약품	30,486	9.2	57,464	8.5	108,315	8.7	13.5
의료기기	10,903	3.3	13,516	2.0	16,975	1.4	4.5
화장품	5,109	1.5	11,541	1.7	26,070	2.1	17.7
식품	48,990	14.7	90,128	13.3	165,810	13.3	13.0
여가	76,088	22.9	110,268	16.2	161,917	13.0	7.8
금융	105,663	31.8	301,711	44.4	610,404	48.8	19.2
주거	9,616	2.9	9,073	1.3	6,824	0.5	-3.4
용품	19,711	5.9	23,347	3.4	28,322	2.3	-3.7
전체	332,241	100.0	679,281	100.0	1,249,825	100.0	14.2

● 고령친화산업별 시장규모 및 전망

- 2010년 기준 고령친화 산업별 비중은 아래 그림과 같으며, 전체 고령친화산업 시장규모중 금융산업(31.8%) 및 여가산업(22.9%)이 높은 비중을 차지하고 있는 것으로 나타남
- 2020년 고령친화산업 중 가장 큰 비중 변화를 보이는 산업은 금융산업으로 전체 시장의 48.8%를 차지할 것으로 전망됨. 또한 요양산업(7.7%→10.0%) 및 화장품산업(1.5%→2.1%)의 비중이 2010년 보다 증가할 것으로 전망됨

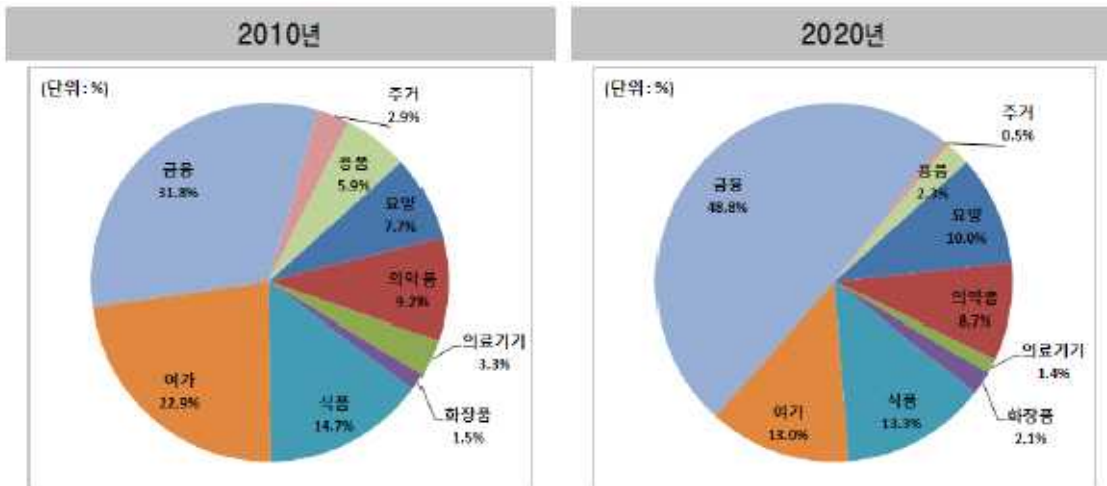


표 8. 고령친화산업별 비중 변화

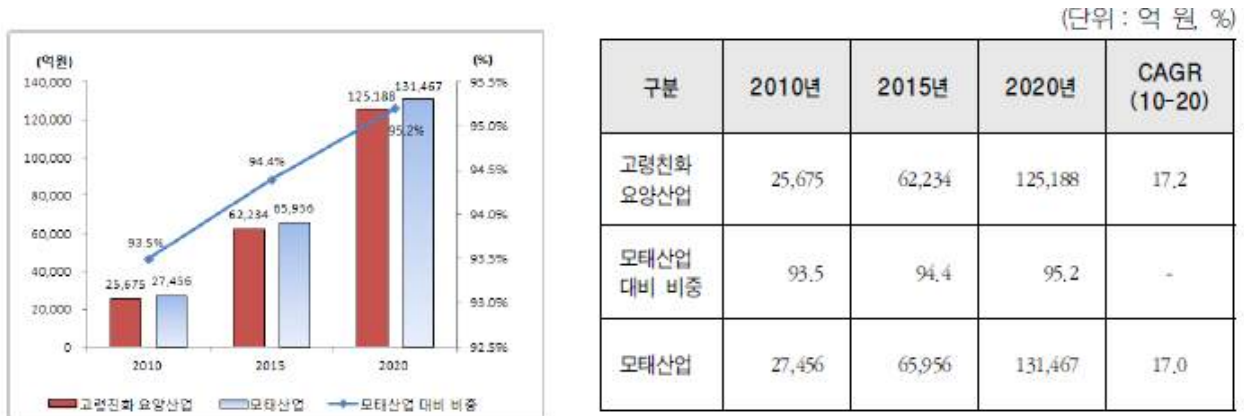
● 고령친화 세부산업별 시장규모 및 전망

1) 고령친화 요양산업

- 고령친화 요양산업의 시장규모는 2010년 2조 5,675억 원에서, 2020년에는 12조5,188억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 17.2%에 달할 것으로 전망됨
- 고령친화산업 요양산업은 장기요양보험2)을 기준으로 재가요양서비스 및 시설요양서비스로 구분

- 되며, 시장규모는 장기요양보험통계 중 65세 인정자의 총요양비를 이용함
- 시장규모 전망은 인정자수, 평균요양비 등 각각의 변수를 환산하여 전망함
 - 고령친화 요양산업으로 노인의료서비스 부분이 고려되었지만, 시장규모 분석에서 다루어지지 않음

표 9. 고령친화 요양산업 시장규모 전망



2) 고령친화 의약품산업

- 2010년 고령친화 의약품산업의 시장규모(3)는 3조 486억 원에서, 2020년에는 10조 8,315억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 13.5%(모태산업은 7.4%)에 달할 것으로 전망됨
- 고령친화산업 의약품산업은 건강보험통계를 이용하여 질병별 가중치(노인의 의료이용규모로 전체 환자에서 65세이상의 노인인구의 이용 비율)를 파악한 후 선정된 의약품약효군별 생산실적에 이 값을 적용하여 산출함
- 선정된 고령친화 의약품의 범위는 해열·진통·소염제, 근이완제 순환계용약, 기타의 중추신경용약, 대사성의약품, 중앙용제, 정신신경용제, 안과용제, 비노생식기관용제, 기타의 비노생식기관 및 항문용약 등임
- 고령친화 의약품산업은 2010년 모태산업 대비 약 21.5%에서 2020년 약 37.3% 전망되어 연평균성장률(CAGR)이 모태산업에 비해 상당히 높게 나타남

3) 고령친화 의료기기산업

- 2010년 고령친화 의료기기산업의 시장규모는 1조 903억 원에서, 2020년에는 1조6,975억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 4.5%(모태산업은 3.9%)로 전망됨
- 고령친화 의료기기산업은 전체 의료기기 품목 중 65세 이상 고령자의 사용 비중을 고려하여 구분하였으며, 각 품목별 시장규모(생산+수입+수출)에 사용 비율을 고려하여 시장규모를 추계함

* 고령친화 의료기기에 대한 기준이 현재는 없는 상태이며, 식품의약품안전청 고시 제 2010-91호 의 료기기품목 및 품목별등급에 관한 규정을 기준으로 65세 이상 노인 인구의 사용 비중을 예상 하여 고령친화의료기기 172개 품목을 선정함

- 모태 산업의 시장규모(생산+수입-수출) 연평균성장률('10 -' 20년)이 3.9%로 나타나, 고령친화 의 료기기산업 연평균성장률도 4.5%로 다소 낮게 나타남

4) 고령친화 화장품산업

o 2010년 고령친화 화장품산업의 시장규모는 5,109억 원에서, 2020년에는 2조 6,070억원으로 연평균 성장률(CAGR)이 17.7%(모태산업은 13.9%)로 전망됨

- 화장품 유형 중 어린이용 제품을 제외한 화장품 유형을 고령친화 화장품으로 각 유형별65세 이상 사용 비율을 고려하여 시장규모를 추계함

- 2010년 모태산업 대비 고령친화 화장품산업의 비중은 8.5%로 나타났으며, 2015년10.0%, 2020년 11.8%로 점차 비중이 증가함

표 10.고령친화 의료기기산업 시장규모 전망

(단위 : 억원, %)



구분	2010년	2015년	2020년	CAGR (10-20)
고령친화 의료기기산업	10,903	13,316	16,975	4.5
모태산업 대비 비중	27.9	28.6	29.7	-
모태산업	39,027	47,255	57,217	3.9

표 10. 고령친화산업 화장품산업 시장규모 전망

(단위 : 억원, %)



구분	2010년	2015년	2020년	CAGR (10-20)
고령친화 화장품산업	5,109	11,541	26,070	17.7
모태산업 대비 비중	8.5	10.0	11.8	-
모태산업	60,146	115,298	221,025	13.9

5) 고령친화 식품산업

- 2010년 고령친화 식품산업의 시장규모는 4조 8,990억 원에서, 2020년에는 16조5,810억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 13.0%(모태산업은 8.9%)로 전망됨
- 고령친화 식품산업 시장규모는 전체 식품 유형 중 건강기능식품 및 특수용도식품은 전체를 고령친화식품으로 분류하고, 이를 제외한 일반 식품에 대해서는 65세 이상 노인인구 비율을 고려하여 시장규모를 추계함
- 2010년 모태산업 대비 고령친화 식품산업의 비중은 13.7%로 나타났으며, 2015년 16.4%, 2020년 19.7%로 점차 비중이 증가함

표 11. 고령친화 식품산업 시장규모 전망

(단위 : 억원, %)



구분	2010년	2015년	2020년	CAGR (10-20)
고령친화 식품산업	48,990	90,128	165,810	13.0
모태산업 대비 비중	13.7	16.4	19.7	-
모태산업	358,241	549,433	842,663	8.9

6) 고령친화 여가산업

- 2010년 고령친화 여가산업(4)의 시장규모는 7조 6,088억 원에서, 2020년에는 16조 1,917억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 7.8%(모태산업은 4.1%)로 전망됨
- 고령친화 여가산업은 크게 문화(콘텐츠)산업, 스포츠산업, 여행관광산업으로 구분하여, 65세 이상 인구비율 및 각 산업의 세부 영역 매출액, 65세 이상 소비비율, 가중치 등을 고려하여 추계함
- 2010년 모태산업 대비 고령친화 금융산업의 비중은 6.1%로 나타났으며, 2015년 7.2%, 2020년 8.7%로 점차 비중이 증가함

7) 고령친화 금융산업

- 2010년 고령친화 금융산업의 시장규모는 10조 5,663억 원에서, 2020년에는 61조 404억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 19.2%(모태산업은 14.7%)로 전망됨
- 고령친화 금융산업은 퇴직연금, 개인연금, 민영의료보험, 주택연금 등으로 구분되며, 각 부분의 시장규모에 65세 이상 가입률을 적용하여 시장규모를 추계함
- 2010년 모태산업 대비 고령친화 여가산업의 비중은 4.8%로 나타났으며, 2015년

6.4%, 2020년 7.1%로 점차 비중이 증가함

- 2010년-2020년 연평균성장률(CAGR)은 19.2%로 고령친화산업 중 가장 높게 나타남

표 12. 고령친화 여가산업 시장규모 전망

(단위 : 억 원, %)



구분	2010년	2015년	2020년	CAGR (10-20)
고령친화 여가산업	76,088	110,268	161,917	7.8
모태산업 대비 비중	6.1	7.2	8.7	-
모태산업	1,243,768	1,525,698	1,858,075	4.1

표 13. 고령친화 금융산업 시장규모 전망

(단위 : 억 원, %)



구분	2010년	2015년	2020년	CAGR (10-20)
고령친화 금융산업	105,663	301,711	610,404	19.2
모태산업 대비 비중	4.8	6.4	7.1	-
모태산업	2,183,113	4,741,535	8,627,149	14.7

8) 고령친화 주거산업

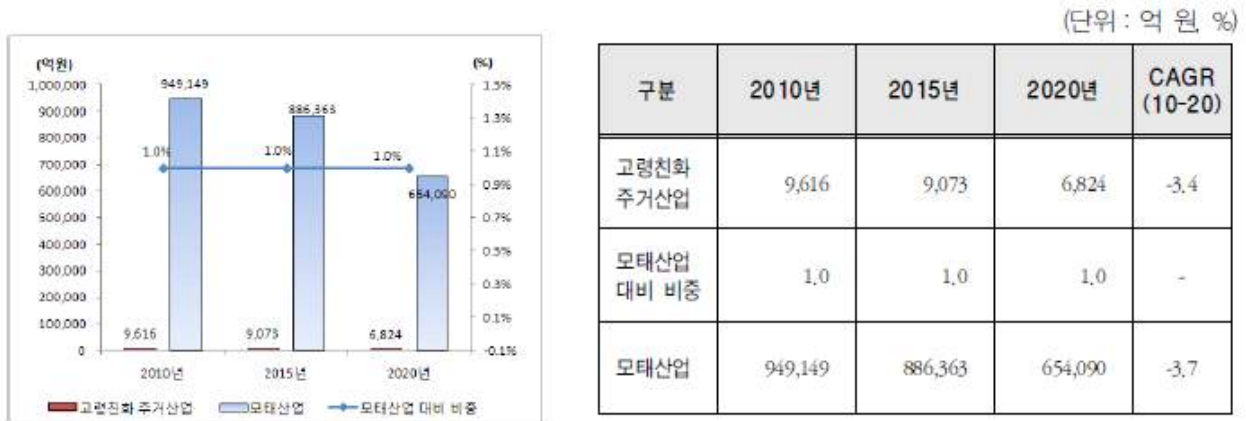
○ 2010년 고령친화 주거산업의 시장규모는 9,616억 원에서, 2020년에는 6,824억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 -3.4%(모태산업은 -3.7%)로 전망됨

- 고령친화 주거산업은 크게 신규주택시장과 주택리모델링시장으로 구분하여 시장 규모를 추계함

* 신규주택시장은 매년 신축되는 주택시장 규모를 추정하고, 고령자 가구가 구입하는 비율을 적용하여 시장규모를 분석함

- * 주택리모델링시장의 경우도 전체 주택개조시장을 추정하고, 고령자가 실시할 것으로 예상되는 시장을 고령친화 개조시장으로 파악함
- 2010년 모태산업 대비 고령친화 주거산업의 비중은 1.0%로 나타났으며, 신규주택 시장(9,441억 원)이 개조시장(175억 원)보다 상당히 큰 것으로 분석됨

표 14. 고령친화 주거산업 시장규모 전망



9) 고령친화 용품산업

- o 2010년 고령친화 용품산업의 시장규모는 1조 9,711억 원에서, 2020년에는 2조 8,322억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 3.7%로 전망됨
- 고령친화 용품산업은 통계청 장래인구추계 결과 중 65세 이상의 노인인구 수와 고령 친화용품산업체 매출액(판매+수출)을 활용하여 전망
- * 고령친화 용품산업 시장규모 추정방법은 구간추정으로 분석되었으며, 중간값을 이용함
- 고령친화 용품산업은 65세 이상 고령자를 대상으로 하는 산업으로 모태산업을 기준으로 고령친화산업 시장규모를 추정하는 타산업과는 달리 추계한 전체 시장규모가 고령친화 관련 시장규모로 분석됨

표 15. 고령친화 용품산업 시장규모 전망



마. 고령친화 식품산업의 국내외 동향

(1) 우리나라 고령친화 식품산업 현황

- 우리나라의 고령친화식품산업은 아직 명확한 정의가 없기 때문에 고령친화산업 활성화 전략에서 식품산업분야전략품목으로 제시한 특수의료용도식품 및 건강기능식품에 대해 설명하였다.

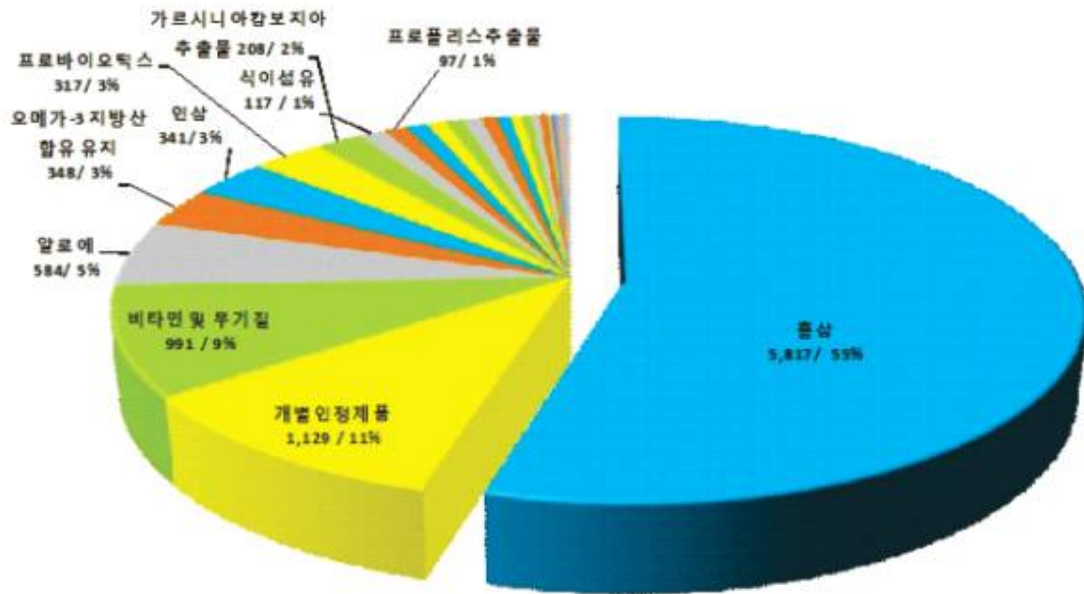
(가) 특수의료용도식품

- 특수의료용도식품은 식품의약품안전청 고시 제2007-31호(2007.5.23)를 통해 특수의료용도 등 식품 중 당뇨환자용 식품, 신장질환자용 식품, 연하곤란환자용 점도증진식품 등의 고령친화식품에 해당될 수 있는 식품유형들이 신설 됨.
- 고령사회에서 수요가 증가될 것으로 예상되는 특수의료용도식품은 초기 기술개발비용에 대한 부담으로 대부분 수입에 의존하고 있으며, 일부 기업에서 환자식 개념으로 헬스케어 제품을 판매하고 있기는 하나 아직은 활성화되지 못하고 있는 상황이며, 따라서 우리나라도 식품산업을 미래 성장동력으로 육성한다는 국가 전략적인 목표를 실현하기 위해서라도 선진국들의 이런 움직임에 보조를 맞출 필요가 있으며, 우리나라 식품산업의 다양성을 살려서 맞춤형·기능식 등 고령 소비자의 특성에 맞춘 특수의료용도식품을 전략적으로 개발할 필요가 있음.

(나) 건강기능식품

- 인간은 나이가 들어감에 따라 신체의 생리적인 노화가 진행되어 면역기능의 약화, 소화기능의 저하, 근골격의 약화 등으로 각종 질병이나 상해에 쉽게 노출되게 된다. 이러한 인체의 기능적인 쇠퇴를 최소화하고자 개발·판매되고 있는 다양한 건강기능식품은 일반식품에 비해 부가가치가 높을 뿐만 아니라 고령친화식품산업의 핵심적인 산업
- 건강기능식품의 경우 「건강기능식품에 관한 법률」에 근거하여 건강기능식품 인증제도 및 우수건강기능식품 제조 기준 제도가 운영되고 있다. 또한, 건강기능식품의 원료가 되는 기능성 원료는 크게 ‘고시형’ 과 ‘개별인정형’ 으로 구분되어지며, 고시형 기능성 원료는 비타민 및 무기질, 식이섬유, 필수지방산 등 총 62종이 고시되어 있다. 현재 건강기능식품 중에서 가장 많은 비중을 차지하고 있는 홍삼의 경우, 2008년 국민건강영양통계에 따르면 홍삼추출물을 섭취하는 인구 중 65세 이상의 섭취량 비율이 77.1%에 이를 정도로 주로 고령자 층에서 많이 소비되고 있는 상황이다. <표 16>은 건강기능식품 중 판매되어지는 상위 10개의 목록이다.

표 16. 건강기능식품 중 판매되어지는 상위 10개의 목록



- 고령화와 건강에 대한 관심이 높아지면서 건강기능식품에 대한 요구도 날로 커지고 있지만, 관련 규제가 많고 소비자들은 선호하는 제품이 편중되어 있어 고령자를 위한 다양한 기능성 소재의 개발 및 과학적인 검증자료가 요구

(다) 제 외국 고령친화산업 관련 제도 및 고령친화식품산업 현황

<일본>

1. 일본의 고령산업 관련제도

- 일본은 1963년 생활보호법에서 노인복지법을 분리하여 제정한 이래 소득보장, 보건의료보장, 거주, 교육 및 여가, 사회복지서비스 관련 분야의 일련의 법체계가 적절하게 입법화되어 노인복지 증진을 위한 정책성 일관성을 유지하고 있다. 또한, 일본은 1995년 급속한 고령화가 경제사회에 끼칠 영향을 고려하여 고령사회대책을 종합적으로 추진하고, 그로인해 경제사회의 건전한 발전 및 국민생활의 안전향상을 도모하기 위해 「고령사회대책기본법」을 제정하였다. 고령사회대책의 기본이념으로써 국민과 지방공공단체는 고령사회대책을 책정하고 실시할 책무가 있다고 하고 있으며, 국민의 노력에 대해서도 규정하고 있다. 국가가 강구해야 할 고령사회대책의 기본적인 시책으로 취업 및 소득, 건강 및 복지, 학습 및 사회참여, 생활환경등의 시책에 대해 정부가 국회에 고령사회대책에 대한연차보고서를 제출 할 것과 특별기관으로서 ‘고령사회대책회의’를 설치할 것을 정함.
- 후생노동성은 ‘노인복지 로드맵(‘90 골드플랜→’95 신골드플랜→’00 골드플랜21)’을 마련하여 요양서비스 기반을 확충하였고, 2000년 ‘공적개호보험제도’ 실시하였다. 이후 고령친화 산업이 급성장하였으며, 시장규모는 2001년 39조엔에서 2025년 155조엔으로 성장규모를 전망.
- 경상성은 1993년 연구개발에 관한 법·제도를 정비하여 복지용구실용화 기술개발을 지원하기 위해 「복지용구연구개발에관한법」을 마련하여 기술향상을 위한 재정·금융상의 우대조치를 제

공하고 있음.

- 이처럼 일본은 90년대 초반부터 복지와 산업육성 정책을 동시에 추진하였다. 초기에 정부는 법률제정 등 관련 제도를 마련하고, 개화기에 지자체는 입지혜택 등으로 민간의 참여를 촉진하였으며, 현재는 재단법인 중심의 민간 기업이 사업을 주도.

2. 일본의 고령친화 식품산업

개호식품

- 개호식품이란 고령, 질병 등으로 섭식기능이 저하된 고령자의 섭식기능에 맞게 안전성 면에서 물성을 조정하고 미각, 시각은 물론 영양도 고려한 식품을 말한다. 고령자가 먹기 쉽게 연하고 걸쭉하게 만든 식품으로 연하기능장애로 식사량이 감소해 생기는 영양실조, 탈수증상은 물론 오연에 의한 폐렴을 막기 위해 개발되었다. 개호식품은 연하식, 소프트식, 부드러운 식사 등 여러 가지 이름으로 개발되고 있고, 특별용도식품의 고령자용 식품, 유니버설 디자인 푸드, 연하 곤란자용 식품 등이 속함.

특별용도 식품

- 특별용도 식품이란 유아, 임신·수유부, 고령자 등 의학적, 영양학적인 배려가 필요한 대상자의 발육과 건강 유지·회복에 적절하다고 하는 특별한 용도의 표시가 허가 된 식품을 말한다. 2009년 2월 12일 “특별용도 식품의 표시 허가 등에 통지”(식안발저 0212001호)에 의거 새로운 특별용도 식품제도가 2009년 4월부터 시행되었다. 특별용도 식품은 ①병자용 식품: 허가 기준형(저단백질 식품, 알레르겐 제거식품, 무유당 식품, 종합영양식품), 개별평가형, ②임산부, 수유부용 분유, ③유아용 조제분유, ④연하 곤란자용 식품으로 분류되어 진다. 특별용도 식품의 표시를 하기 위해서는 건강증진법(제26조)에 근거하는 소비자청장(2009년 8월말일 까지 후생 노동대신)의 허가가 필요하며, 허가 기준이 있는 것에 대해서는 그 적합성을 심사하고 허가 기준이 없는 것에 대해서는 개별적으로 평가.

유니버설 디자인 푸드

- 유니버설 디자인푸드란 어떤 사람이라도 먹기 쉽게 만든 개호식품으로 이용자의 능력에 대응하여 섭취하기 쉽게 형상, 물성 및 용기등을 연구하여 제조된 가공식품 및 형상, 물성을 조정하기 위한 식품을 말한다. 씹는 힘이나 삼키는 힘이 약해진 사람도 먹기 쉽도록 단단한 정도를 4 단계로 구분해, 통상보다 작게 만들거나 페이스트 상태로 만들어 재료를 연하게 가공한 식품.
- UDF는 법률규제에 의한 표시가 아니라, 식품 업체가 작성한 자가기준에 따라서 운용되는 자주 규제 표시이며 판매는 일반식품과 같이 취급하며, 2002년 개호식품 제조업체를 중심으로 설립된 일본개호식품협회가 식품업체별 UDF의 구분을 통일하여 마크를 표시함으로써 소비자가 쉽게 선택하도록 하였음.

<미국>

3. 미국의 고령산업 관련 제도

- 1965년 노인복지법을 제정하여 Medicare(국영건강보험)를 통해 65세이상 노인, 장애자에 대한 의료 보험을 실시하였다. Medicare는 크게 병원보험(입원, 전문개호시설 이용 등을 전액 정부가 부담)과 의료보험(필요비용 보충)으로 구성되어, 요양시설, 재가기관 등의 서비스를 지원.
- 연방정부의 고령자대책정(Administration on Aging)과 각 주의 지역 고령화대책실은 민간주도형 복지시스템을 구축하여 민간단체가 노인복지서비스를 제공하도록 하고 있으며, 이 서비스의 내용 중 재택서비스와 지역서비스 분야에 급식서비스가 포함.
- 국립고령화연구소(NIA, '74, 생명의료과학)와 국립장애재활연구소(NIDRR, '78, 재활공학)를 중심으로 노인을 위한 보조기술 연구개발을 지원하고 있다. 노인들의 의식주 및 기본의료관리를 주목적으로 하는 노인촌락(CCRC:continuing Care Retirement Community)을 다양화하여 1900년 이전에 7개에서 1990년대 초 전국 600개를 넘어섰으며, CCRC의 종류는 독립생활시설, 간호보호시설, 전문요양시설, 통합형 연속 장기보호시설 등이 있으며, 미국은 정부정책에 의해 산업을 별도로 육성하기보다는 생명의료공학 및 재활기술을 노인의 건강과 기능향상에 적용.

4. 미국의 고령친화 식품산업

- 미국은 이미 고령화 사회에 접어들었고, 2015년에 고령사회 진입이 예상되고 있으며 현재 노인 소비자를 위한 실버산업이 크게 성장하고 있다. 미국 시장에서 고령친화식품은 노인 소비자의 영양 보충을 위한 제품 또는 특정 질환을 가진 노인 환자를 대상으로 하는 의료용 식품으로 볼 수 있겠다. 미국은 고령친화식품을 별도로 규정하지 않고 있으며, 우리나라의 특수용도식품과 유사한 개념의 의료용 식품(Mrdical Food)에 대한 정의를 두고 있음.
- 정의에 따르면 의료용 식품의 소비자는 의료서비스를 받고 있는 사람으로 정의하고 있으며, 일반 소비자를 위한 식품은 제외 된다고 볼 수 있겠다. 의무표시 규정은 없으나, 아래의 내용을 표시하는 방향으로 FAD의 지도가 이루어지고 있음.

-환자를 위한 식품의 표시

-제품의 내용량, 제조사, 소분자 또는 판매자의 명칭, 소재지, 성분리스트

-제품이 대상으로 하는 질환 및 목적

-의사의 감독 하에서 사용해야 할 것 등을 표시

- 또한 미국은 가장 개방적이고 전향적인 자세로 건강식품 뿐만 아니라 모든 식품에 유용성 표시방법을 구체적으로 제시하고 있으며, 제시된 범위 내에서는 사전허가 없이 제조·판매·표시 및 광고를 할 수 있다. 표시제도에 관한 미국 식품법의 기본 입장은 식품의 종류에 의하여 관리되는 것이 아니라 표시에 무엇을 강조(claim)하느냐에 따라 관리.
- 의료용 식품은 정의는 정해져 있지만 인정 또는 영양성분 등이나 표시, 유통 등에 관한 규제는 없

으며, 기업은 식품에 관한 일반법인 ‘미연방 식품 · 의약품 · 화장품법(the Federal Food, Drug and Cosmetic Act)’ 에 위반하지 않는 이상 자사의 제품을 의료용 식품으로서 자유롭게 판매할 수 있음.

<유럽연합(EU)>

5. EU의 고령산업 관련 제도

- 영국과 유럽국가들은 기존의 의료기관 중심 환자의 선택권과 이송을 지역사회 포괄서비스로 그 선택범주를 다 양화하고, National Health Care & Community Care Act(1990) 등 법 · 제도를 재조정하여 민간의료자원 참여와 민간단체 및 기관의 홈케어, 주간보호, 요양시설 등의 적극적 참여와 이용을 제도화 하고 있다. 장애인 · 노인을 위한 재활 및 보조기술 프로그램에서 출발하여 고령화 대응을 위한 사회적 · 산업적 두가지 목표를 추구하고 있다. 유럽은 장애인과 노인에게 필요한 제품 및 서비스 개발 · 적용을 통해 관련산업 분야 활성화 추구하고 노인의 사회 참여기회도 확대

6. EC의 고령친화 식품산업

- EC 역시 미국과 마찬가지로 고령친화식품에 대한 별도의 규정은 없으며, 특수영양용도 식품 중 일부가 고령 소비자를 위해 제공된다고 할 수 있겠다. 특수영양용도 식품은 특수한 조성 혹은 제조 공정에 의해 통상 섭취하는 식품과 분명하게 다른 식품을 의미하며, 표시된 영양 목적에 적절하고 그것을 나타내는 유통경로에서 판매되는 것(특수영양용도 식품에 관한 EU 이사회 규정에 의해)을 말한다. 주 대상자는 소화 과정이나 대사 과정에 문제가 있는 사람으로, 특수한 생리학적 상태에 있어 식품의 일부 성분의 섭취 관리를 실시하는 것에 의해 특별한 혜택을 입을 수 있는 사람이나 해당
- 특수영양용도 식품은 ①유아용 식품(젖먹이용 인공유, follow up milk, 곡물 가공 식품 및 이유식), ②감량을 위한 칼로리 제한식에 이용되는 식품(다이어트식), ③특수한 의료 목적을 위한 규정식(의료식), ④극도로 근육을 사용할 때 소비 에너지를 채우는 것을 목적으로 한 식품(스포츠식), ⑤탄수화물 대사 장애(당뇨병)의 환자를 위한 식품으로 분류.

2) 고령친화 식품산업 및 전망

- 2010년 고령친화 식품산업의 시장규모는 4조 8,990억 원에서, 2020년에는 16조 5,810억 원으로 연평균성장률(CAGR)이 13.0%(모태산업은 8.9%)로 전망되며, 고령친화 식품산업 시장규모는 전체 식품 유형 중 건강기능식품 및 특수용도식품은 전체를 고령친화식품으로 분류하고, 이를 제외한 일반 식품에 대해서는 65세 이상 노인인구 비율을 고려하여 시장규모를 추계하였으며, 2010년 모태산업 대비 고령친화 식품산업의 비중은 13.7%로 나타났으며, 2015년 16.4%, 2020년 19.7%로 점차 비중이 증가함

- 출산율 저하와 급속한 고령화로 인하여 우리나라의 노인1)인구는 2010년 기준으로 전체인구의 11.0%(5,357천명)를 차지하고, 노인인구는 향후 2026년도 20.8%, 2050년 38.2% 수준으로 증가하여 초고령사회로 진입할 것으로 예상되며2), 이는 일본 37.7%, 프랑스 25.9%, 미국 21.0% 등 OECD 주요국보다 높은 비율임
- 고령화 속도는 가속화되고 있지만, 사회적 요인(독거·저소득 등)과 소화기능 저하 등으로 ‘65세 이상’ 노인의 영양 및 식품섭취상태는 ‘50세~64세’에 비해 불량한 수준임
- 고령화 시대를 맞이하여 노인의 건강관리가 사회적 문제로 대두되면서 환자가 아닌 일반 고령자들을 대상으로 한 식품으로서 고령친화식품 개발의 필요성이 제기되었으며, 정부는 2011년 제2차 저출산·고령사회기본계획 「새로마지플랜2015」를 발표3)하면서 고령자용 식품산업의 기반조성이 추진과제로 반영하기 시작하였음.
- 2012년 고령친화산업 욕구조사에 따르면 국내 중고령자가 가장 필요로 하는 고령친화 관련 제품 및 서비스는 ‘노인을 위해 먹기 좋고 영양이 풍부한 식품’ (30.2%)으로 나타났으며, 고령자용 식품 구매의향에 대한 질문에 대해 응답자 전체의 82.8%가 구매의향이 있는 것으로 나타남
- 한 자료에 의하면 우리나라의 고령친화산업은 현재 기반 구축기에 있으며 향후 2008~2018년 사이에 급성장할 것으로 전망하고 있으며, 정부는 2008년 이후 국민연금 지급을 계기로 고령층을 신경계 소비계층으로 간주하고 고령친화산업 육성을 통해 국가발전의 신성장 동력으로 발전시켜 나갈 필요성을 강조하며 이를 위한 법적인 지원책을 마련하기 위해 산업자원부와 보건복지부 공동으로 ‘고령친화사업 진흥법’ 입법을 추진하여 2013.3.23.에 시행되었음.
- 대통령 직속 저출산 고령사회위원회에서 2006년 2월에 발간한 ‘고령친화산업 활성화 전략 보고서’에 선택과 집중 대상 고령친화산업 전략품목을 선정하였다. 이 표에서 보듯이 식품관련 산업품목으로는 1차의 한방분야 중 ‘항 노화 한방기능성 식품’, 2차의 식품분야 중 ‘특수의료용도식품’ 및 ‘건강기능식품’이 이에 선정되어 있음을 알 수 있다. 고령친화 식품산업이 앞으로 이등 전략품목을 중심으로 지원·육성될 것임.
- 정부는 고령친화산업을 미래 먹거리 창출과 고령자의 삶의 질향상을 위해 고령친화 제품(서비스)의 표준화 및 표시제도입, 고령친화 제품의 기술개발 및 클러스터링, 고령친화용품 대여 및 판매 시범사업 실시, 우수 신규개발 및 사업화 품목에 대한 인센티브 부여 등 활성화 여건 조성, 제조, 금융, 주택, 요양, 여가 등 각 분야별 전략 품목 발굴 등을 적극 실시해 나갈 방침
- 우리나라의 식품산업규모를 살펴보면 세계시장규모의 1%정도로 액수로는 280억 달러규모이며 세계 18위 수준이다. 이 중 고령친화식품의 중요부분을 차지하고 있는 건강 기능성 식품시장 규모는 그림에서 보는 바와 같이 10억불 정도를 점하고 있다. 세계 기능성식품 시장은 1997년 650불에서 2000년 1,380불로 빠른 속도로 성장해 왔으며 2007년에는 3,771억불로 급신장할 것으로 전망.

바. 고령친화 식품의 특징 및 개발동향

1) 시장규모

- 2011년 고령친화산업 실태조사 및 산업분석 자료에 따르면 향후 고령친화 식품산업의 시장규모를 추계하여 본 결과, 고령친화 식품산업의 시장규모는 2015년 9조 128억 원, 2020년 16조 5,810억 원 정도로 추정되며, 2010년 모태산업 대비 고령친화 식품산업의 비중은 13.7%인 것으로 나타났으며, 2015년 16.4%, 2020년 19.7% 정도의 비중으로 추정됨.

표 17. 고령친화 식품산업 시장규모 전망(예측)

(단위 : 백만원, %)

	2010년	2015년	2018년	2020년	CAGR(10-20)
고령친화 식품산업	4,898,952	9,012,755	12,993,023	16,581,048	13.0
비중	13.7	16.4	18.3	19.7	
모태산업	35,824,108	54,943,296	71,016,344	84,266,322	8.9

자료 : 한국보건산업진흥원, 2012년 고령친화산업실태조사 및 산업분석

2. 전략품목별 대표 제품

- 대표제품 선정기준은 2011년 고령친화산업 실태조사 및 산업분석에 의거 선정된 전략품목에 한해서 실시하였고, 7개 품목(특수의료용도용식품, 두부류/묵류, 장류, 김치류, 젓갈류, 절임식품, 건강기능식품)로서 총 140개 제품을 대표 제품으로 선정
 - 품목별 생산액 상위 업체 선정에는 자료원 : 식품-식품첨가물 생산실적보고(식품의약품안전청, 한국보건산업진흥원 2011년 기준)
- 선정된 업체를 대상으로 대표적인 고령친화제품 선정에는 업체 조사를 통해 고령자용 제품을 추천 받아 선정하였고, 추천 제품이 없는 경우, 고령자를 배려한 식품(부드럽고, 저염, 삼키기 좋고, 영양이 풍부 등)을 2배수로 조사/수집 후 대상 업체 선정의 다양성 및 공정성 도모를 위해 업체 별 생산실적을 감안하여 선정

표 18. 고령친화식품 사례조사 대상 및 조사내용

전략품목	조사대상 품목명 및 업체	조사대상		
		품목	제품	조사내용
특수의료용도용식품	생산 상위 20개사	특수의료용도용식품	20	<ul style="list-style-type: none"> - 식품의 특징 · 제품명, 식품의 유형, 원재료명, 성분명, 영양성분 등 - 건강기능식품의 특징 · 제품명, 내용량, 영양정보, 기능정보, 섭취량, 섭취방법 및 섭취시 주의사항, 원료명 - 기타 필요사항 · 주요수출국, 수입국 등
두부류 또는 묵류	생산 상위 20개사	두부 또는 묵류	20	
장류	생산 상위 20개사	장류	20	
김치류	생산 상위 20개사	김치류	20	
젓갈류	생산 상위 20개사	젓갈류	20	
절임식품	생산 상위 20개사	절임식품	20	
건강기능 식품	생산 상위 20개사	건강기능식품	20	

사. 고령친화용 식품의 제조 기술 동향

- 건일본의 경우 고령친화형 제품과 산업이 잘 발달해 있고 특히 식품관련 연구와 산업이 고르게 발달하여 우리에게 시사하는 바가 매우 커 이에 고령친화용 식품제조기술을 발취 소개함.

1. 고령자 식품의 특성과 현황

1. 고령자의 식사 관련 신체적 특성

- 노화(aging)란 비가역적이며 예측 가능하고 불가피한 진행과정이 사망까지 지속되고 모든 사람에게 보편적으로 진행되는 생물학적 과정이다. 정상적인 노화는 질환 없이 신체 각 기관계의 생리적 예비능 및 항상성 조절이 침해되는 것을 말한다. 노인은 노화로 인해 기관의 조직 및 기능의 감소와 체성분의 변화가 나타나는데 노화과정의 개인별 차이가 큰 것이 특징
- 고령자의 식사에 관련한 특성을 요약하면 ①식욕이 저하된다. ②혀의 미각세포가 줄어들어 짠맛과 단맛을 잘 느끼지 못하고 진한 맛을 좋아하게 된다., ③이가 약해지고 (1/3~1/4로 감소), 의치의 경우 딱딱한 것은 먹을 수 없다. ④마시는 힘이 약해진다. ⑤침의 분비가 적어진다(1/2로 감소) ⑥위의 점막이 위축되어 위액 분비가 저하된다. ⑦췌액 분비가 저하하여, 특히 지방의 소화능력이 떨어진다. ⑧장의 운동능력이 저하되어 소화기능이 쇠퇴하여 변비가 되기 쉽다.

2. 고령자용 식품에 필요한 영양성분

- 음식물의 맛이란 식품 본래의 식감과 조리가공, 상차림, 동석자, 식탁 분위기 등에 의하여 증폭되

는 일종의 쾌감이다. 음식을 먹는 행위는 인생의 종말을 맞을 때까지 최대의 즐거움이라고 하는데, 먹는 행위의 기능 장애는 식감 상실, 소화기능 저하, 영양실조, 오염성(잘못 삼킴) 폐렴 등의 리스크까지 미치는 경우가 있음.

- 섭식 연하(목넘김(기도로 유입되어 사래들리는 상황)장애는 뇌신경 장애나 기능 부전 등의 여러 가지 질환으로 발병되는데, 고령이 가장 큰 요인이다. 음식을 씹고 삼키는 기능이 쇠퇴한 고령자를 대상으로 한 식품을 저작(씹는 작용) 연하 곤란자용 식품이라 한다. 고령자의 식생활에서 가장 심각한 문제는 저작(음식물을 씹음)과 연하(삼켜 넘김)의 섭식장애.
- 고령자는 먹는 기능이나 소화 흡수하는 기능이 저하된다. 식사량이 줄고, 단백질이나 에너지가 부족한 상태인 저영양에 빠지기 쉽다. 저영양이 되면 몸의 저항력이 약해져, 오염성 폐렴을 시작으로 여러 가지 질병에 걸리기 쉽게 되어 영양개선이 필요.
- 단백질은 근육의 주성분으로 뼈나 혈, 피부 등 몸 전체를 구성하며, 단백질이 부족한 저영양 상태에서는 창상의 치료가 늦어지는 문제도 발생한다. 식사로 단백질을 섭취할 수 있어도 아연이 부족하면 단백질을 충분히 이용할 수 없다. 또 아연이 결핍하면 미각이상도 되기 때문에 식욕의 유지회복이라는 관점에서 중요한 영양소.
- 비타민B1은 당질을 에너지로 이용할 때에 필요한 비타민이고, 결핍증의 초기 증상으로 식욕부진이 나타난다. 비타민B1은 부족하기 쉬운 영양소이고, 특히 고령자는 적극적인 섭취가 요망된다. 고령자는 장의 기능이 저하하고, 운동량이 줄고, 식사량도 적어 변비가 되기 쉬운데, 식물섬유는 장의 운동을 활발하게 하여, 변비를 개선.

표 26. 고령자가 부족하기 쉬운 영양소

영양성분	섭취 이유	1일 필요량
칼슘	골밀도 저하	60-80mg
단백질	근육 유지, 계란, 육류, 어류, 콩	65g
식품섬유	변비, 고혈압, 고콜레스테롤, 생활습관병 예방	20-25g
비타민, 미네랄류	비타민A, B, C, D, E, 카로틴, Mg, 칼륨 등	녹황색 채소 100g, 달걀채소 200g
당질, 지질	킬로리 소비가 적은 고령자는 적게 섭취	설탕 20g이하, 유지류 20g이하
콜분	변비, 피로, 위독저하	
수분	목이 마르지 않게 자주 조금씩 마심	식사포함 2L
기능성분	폴리페놀	강한 항산화 작용. 식물엑소, 쓴맛 성분, 사과, 블루베리
	DHA, EPA	등푸른 생선의 불포화 지방산. DHA는 뇌와 신경조직을 유지하며 나쁜 콜레스테롤을 감소시키고, 노인성 치매 개선효과도 있다. EPA는 혈전을 녹이고 혈류를 원활하게 하여 동맥 경화를 방지한다.
	레스틴	뇌와 신경조직을 구성한다. 여분의 지방을 배출하여 동맥경화와 지방간을 방지한다. 기억력을 높이고 치매예방효과도 있다. 콩과 계란에 풍부하다.
	타우린	심장과 간장의 활동을 높이는 아미노산이다. 혈압이나 콜레스테롤을 낮추고 생활습관병을 예방한다. 문어, 오징어, 생선류, 조개 등에 많다.
	코린	체내에서 합성되는 수용성 비타민. 비타민B1의 흡수를 촉진하고 혈압을 낮추며 동맥경화를 방지한다. 가지, 참마 등에 풍부하다.

3. 특수용도 식품

- 우리나라 식품위생법에 의하면 특수용도식품(special dietary food)이라 함은 영·유아, 병약자, 노약자, 비만자 또는 임신·수유부 등 특별한 영양관리가 필요한 특정대상을 위하여 식품과 영양소를 배합하는 등의 방법으로 제조 가공한 영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용

곡류 조제식, 기타 영·유아식, 특수 의료용도 등 식품,

표 27. 특수용도 식품의 수입실적 (2007)

구분		중량(톤)	금액(1,000\$)
특수용도식품	영아용 조제식	13	180
	성장기용 조제식	98	642
	기타 영유아식	488	2,332
	환자용 등 식품	1,209	3,352
	제중조절용 조제식품	586	5,364
		2,394	11,869

- 국내 식품산업 품목군에서 차지하는 비율은 2004년 2.30%에서 2007년 0.99%로 매년 감소하였다. 더욱이 특수용도 식품은 국내에서 생산되는 것은 극히 적고, 거의 대부분 수입에 의존하고 있다.
- 일본의 경우, 특별용도식품이란 고혈압이나 신장질환을 앓고 있는 자를 위해 나트륨을 줄이거나, 단백질 제한을 필요로 하는 신장질환자를 위해 단백질을 저하시킨 식품 및 유아용, 임산부용, 고령자용 등 특별 용도에 적합하다는 표시를 후생노동대신이 허가한 식품을 가리킴.
- 종류로는 ①병자용 식품(허가기준형, 개별 평가형), ②임산부 및 수유부용분유, ③유아용 조제 분유, ④고령자용 식품, ⑤특정보건용 식품이 있으며, 이 중 고령자용 식품에는 저작(음식물을 씹음) 곤란자용 식품, 저작 및 연하 곤란자용 식품.
- 저출산고령사회위원회는 2005년 국내 실버시장 규모가 2010년 43.9조원에서 2020년 148.6조원에 이를 것이라고 전망했다. 베이비붐 세대들은 은퇴 이후 안정적인 현금 흐름을 위해 부동산보다 연금·보험 등 금융시장에 적극 투자하고 이를 바탕으로 의료·관광 산업에 가세할 것으로 예상.
- 대한상공회의소도 2006년 ‘국내 실버산업의 성장성 전망’ 연구보고서에서 2010~20년 고령 친화 산업의 성장률이 연평균 12.9%로 전체 산업 평균 성장률(4.7%)을 크게 웃돌 것이라고 전망.
- 산업별로는 요양(6.6%),의료기기(12.1%), 정보(25.1%), 여가(13.7%), 금융(12.9%), 주택(10.9%) 등이 고성장할 것으로 전망했다. 국내에서는 2008년부터 노인 장기요양보험의 실시로 요양시설이 급속히 늘고 있으나 저작 연하 곤란자들을 위한 식품의 연구, 개발은 미미한 편이고 주로 밥과 채소, 육류 등을 믹서에 갈아 제공하고 있는 실정이다. 물론 병원의 환자식으로 일부 기업에서 헬스케어 제품을 판매하고 있으나 저작 연하 곤란자들을 위한 식품 연구에 대기업의 참여가 절실

표 28. 식품산업 품목군별 출하액

(단위: 억원, %)

품목명	2005		2006		2007	
	출하액	비중	출하액	비중	출하액	비중
과자류	38591	15.95	39464	15.10	43071	15.14
당류	9262	3.83	10444	4.00	10306	3.81
어육제품	3819	1.58	3648	1.40	3954	1.46
식용유지류	9143	3.78	9945	3.80	10585	3.92
면류	19060	7.88	19416	7.43	18602	6.88
다류	12026	4.97	13948	5.34	15662	5.79
음료류	30394	12.56	29619	11.33	28756	10.64
특수용도식품	3266	1.35	2586	0.99	2503	0.93
조미식품	21868	9.04	25390	9.71	26019	9.63
김치절임식품	10010	4.14	10655	4.08	11243	4.16
일반가공식품	19326	7.99	22730	8.70	22909	8.48
기구용기포장지	28205	11.66	32625	12.48	33571	12.42
식품첨가물	6637	2.74	5642	2.16	5403	2.00
기타	30282	12.53	35276	13.48	35677	14.74
총계	241902	100.0	261388	100.0	270268	100.0

자료: 식약청, 식품 및 식품첨가물 생산실적

- 제단법인 일본건강영양식품협회에 따르면, 고령자용 식품은 2007년 3월 1일 기준으로 25개 품목(저작곤란자용 식품이 14품목, 저작 및 연하곤란자용 식품 11품목), 500여개 제품이 특별용도식품 표기 허가를 받았다. 허가절차는 보건소에 신청하면 후생노동성이 종합적으로 검토하여 허가한다.

4. 실버 시장의 규모

- 일본 국립사회보장인구문제연구소에 의하면, 향후 일본의 총 인구는 감소하는 가운데 65세 이의 인구는 반대로 증가할 것으로 예측하고 있다. 2005년 일본의 65세 이상의 인구는 자주생활자 83%(2075만명), 지원 필요자 3%(71만명), 개호 필요자 14%(357만명) 등 2500만명이다. 또한 2030년에는 3500만명에 달하고, 총인구의 약 30%가 65세 이상이 될 것이라고 본다. 3명 중 1명이 65세 이상, 50세 이상으로 실버세대의 기준연령을 낮추면 2명 중 1명이 실버세대에 해당하는 사회가 됨.
- 미국 일본 등 선진국의 실버시장의 규모는 매년 증가하고 있으며 특히, 일본의 개호용 식품 시장규모는 2006년 107억엔, 2008년 127억엔 2011년 133억엔으로 매년 10~20%씩 성장.
- 일본은 고령화 사회가 시작된 1990년대부터 저작 연하 곤란자용 식품 제조에 재택개호의 증가를 예측해 Kewpie, 메이지유업(明治乳業), Ajinomoto 등 식품대기업들이 참여하였고, 2000년 개호보험법이 시행된 후에는 진입 메이커도 증가해 슈퍼에서도 취급하고 있다. 일본의 식품시장은 성장 포화 상태이며, 건강식품도 더 이상의 성장이 기대되기 어려운 상황에서 개호식품 시장은 대폭적인 성장이 기대.
- 고령친화산업 부문중 우리나라는 아직 미성숙 단계로서 앞선 기술력을 가진 일본과 아시아 지역의 급속한 노령화에 대비하여야 한다. 고령자용식품은 내수용을 위해서라도 제품 개발이 필요

하고, 일본시장에의 진출은 물론 중국의 고령화(2010년 2억4천만 명, 2040년 4억 명에 달하는 노인)는 고령친화 산업의 중요한 판로가 될것임.

- 일본의 사망률 통계에서, 폐렴이 십수 년 이래 사망 원인의 4번째이다. 연령별 사망 원인은 렴으로 사망한 약 90%의 사람이 65세 이상이고, 고령자의 폐렴은 대부분 오연성 폐렴이라 한다.

표 29. 노인의 주요 사망원인 단위:명 (65세이상노인 10만명당)

구분	남자		여자	
	2003년	2005년	2003년	2005년
암				
뇌혈관질환	1,515	1,451	615	586
심장질환	809	645	703	550
만성하기도질환	307	245	160	187
당뇨병	238	213	214	190

자료: 통계청

5. 고령자용 식품 시장 동향

- 일본 (주)후지경제의 ‘2008 일본 고령자용 식품 식재서비스 시장 동향’에 의하면, - 병원·고령자 시설용 식재시장 : 병원 급식의 외부 위탁, 원 외 조리의 증가, 병상수의 감소 등에 의해 병원·진료소용 시장은 감소 추이를 보이고 있으나, 개호 노인 복지시설은 노인홈 등에 비해 비용이 낮아 입주 희망자가 대기자가 매우 많았다.
- 유료노인홈용 식재 시장은 시설 수의 급격한 증가와 함께 개호와 식사 내용이 시설 선택의 중요 포인트이기 때문에 식비 설정이 다른 시설보다 높아 크게 증가하고 있다. 고령자 전용 임대 주택은 시설 수의 성장은 크지만 식사 서비스 비율이 60% 정도이므로 식재 시장은 매우 작다. 그러나 고령자 전용 주택에서 식사 서비스가 매년 증가하고있어 식재시장으로서 유망할 것으로 보고 있음.
- 병자·개호식 시장 : 병자·개호식 시장은 상품 종류의 다양화와 품질 강화로 매년 확대되고 있다. 재택 개호의 장래가 주목을 받고 있어 이용자의 사용 편이성과 용도나 적합성 등 알기 쉬운 것이 중요한 요소가 되고 있다. 시장은 50% 가까이 차지하는 유동식은 소량 사이즈의 사용 확대 등으로 수요층이 확대될 전망이다. 개호식은 소프트 무스, 수분·영양 보충, 과자·디저트 등이며, 특히 소프트 무스식이 시설에서 중심으로 증가하고, 용량이 적고 영양소를 첨가한 고령자 전용 과자·디저트도 증가하고 있다. 2008년 개호식 시장은 전년대비 18.2% 증가한 127억 엔으로 추산.

- 택배·배식 서비스 시장 : 식재 택배는 전기 고령자의 이용이 많고 완성식 택배는 후기 고령자의 이용자가 많아지고 있다. 단순한 저가격이 아니라 식재의 구입이나 메뉴 결정, 조리 작업의 시간과 같은 조리에 관련된 시간, 작업을 경제 가격으로 환산한 경우의 메리트를 추구해야 할 것이다. 또한, 칼로리 컨트롤이나 라이프 스타일, 건강 상태에 맞춘 메뉴나 배송 형태, 서비스 내용 등을 개별적으로 준비하는 시스템을 만들어서 액티브 실버를 포함한 보다 광범위한 고령자가 이용할 수 있게 해야 할 것임.

6 주목되는 실버식품 시장

- 소프트 무스식; QOL의 향상과 연하 장애 방지로서 시설을 중심으로 사용되고 있으며, 2005년 이후 냉동식품 메이커가 참가해 시장이 확대되고 있다. 또한, 개호보험법 개정에 의해 영양 케어 관리 가산이 제정되어 개별영양 케어가 필요해져 각 시설에서 다양한 형태로 식사를 제공하기 시작하였다. 초기에는 병원, 고령자 시설에서 조리된 식품에 대한 저항감이 강했지만 냉동식품 기술이 향상되고, 상품 라인업이 증가하여 저항감이 서서히 없어지고 있다. 각사의 매출 규모는 수억 엔 정도로 작지만 연평균 20% 정도 확대되고 있음.
- 수분·영양 보충형 식품; 아이소닉 음료, 젤리 음료, 젤리, 무스, 아이스크림 등이 후생노동성의 특별 용도 상품의 분류 표시에 관해 고령자 상품으로도 진행하고 있다. 고령자는 일상 식사로는 충분한 영양소를 섭취하는 것이 곤란하므로 영양 보충형 상품은 더욱 수요가 확대될 것으로 보고 있다. 컵의 젤리나 블릭팩 상품은 컵의 필름을 떼어내기 어렵고 블릭백으로부터 빨대로 빨기가 어려운 등 개호 식품 용기에 불만이 있으나, 유니버설 디자인에 의한 포장이 점차 중요.
- 유료 노인홈용 식품·식재; 유료 노인홈에서는 식사내용을 고객이 선택할 수 있고, 식비는 자유롭게 설정할 수 있어 개호 보수에 좌우되지 않으며, 병원 급식의 까다로운 식사 제한이 필요 없는 사람이 많기 때문에 급식 사업자도 주력하고 있는 분야이다. 한편 외부 가공 공장에 조리된 식품 제조를 위탁해 시설 내에서 재가열하는 등의 간편한 조리에 머물러 식비를 저렴하게 설정해 이용자의 부담을 낮춰주는 시설도 있다. 유료 노인홈에서는 일반 식사를 즐기는 이용자가 많기 때문에 이벤트식이나 레스토랑을 설치하는 시설도 있음.

II. 고령자 식품의 제조 기술 동향

1. 경도 제어 기술

1) 동결함침법

- 식물조직 붕괴효소 급속 도입기술(특허출원 9건, PTC 1건; 동결감압효소 함침법; 凍結減壓浸法)은 동결 감압에 의하여 식품의 형상과 영양성분은 손상하지 않고, 저작 연하 곤란자에게 적합한 경도(硬度)를 비교적 낮은 코스트로 제조하는 것이다. 함침기술은 무기물에서 목재 등의 유기물까지 여러 가공재료의 표면 성상변화를 위하여 이용되고 있다. 예를 들면, 폴리에스테르 부직포나 목재의 수지함침에 의한 종이의 투명화, 초임계 유체를 이용한 백금, 팔라듐(Pd)

등 무기 입자의 함침 등.

- 효소나 조미료 등의 함침의 경우, 소재표면 세포 내외부 함침부위에 따라 가압법과 감압법이 있다. Trehalose 함침에 의한 침지 냉동내성의 부가기술, 저염 우메보시의 가공, 압력과 진공을 병용하여 식재내부에 조미액이나 초콜릿의 함침 등
- 동결함침법은 고속 함침법으로서 세포 간격뿐 만아니라 세포내부에 물질 주입이 가능하므로 응용 범위가 넓고, 전용 가공장치를 필요치 않아 원가 절감과 기술도입이 쉬운 장점이 있다. 효소 함침은 pectinase나 cellulase를 이용하여 당근, 호박, 감자, 강낭콩, 마늘 등의 강도 개선이 진행되고 있다. 동결함침 공정은 < -20℃ 동결 → 효소액 침지 → 해동 → 진공펌프 감압 5분 → 효소액에서 빼냄 → 효소 반응 → 목적 경도도달 → 가열 증숙 효소반응 정지>이다.
- 가열은 살균도 겸하기 때문에 가열조건은 목적에 맞게 설정하는데, 레토르트의 경우, 연화를 고려해야한다. 감압시간과 회수를 늘리면 중심부의 효소 농도가 증가하는데, 한입크기의 시료의 조직을 붕괴시키는데 1회 5분 40mmHg정도의 감압처리로서 충분
- 조직 내부의 함침효과 확인은 0.5%Blue-dextran수용액으로 검사한다. -20℃ 완만 동결한 감자의 중심부까지 Blue-dextran의 침투농도는, 급속 동결보다 완만 동결이 높고, 감압처리 횟수가 많을수록 높다. 브랜칭한 감자와 당근의 -20℃ 동결-감압처리(pectinase 0.5%+ 구연산)보다, 조직의 연화는 동결-해동-감압처리를 병용하는 것이 효과적
- 동결함침 과정에서 조직내부에서 격렬한 기포생성으로 세포간극의 일부손상과 연화를 일으켜 기체의 출구통로를 통하여 조직 내부에 효소가 침투되기 쉬운 것으로 보인다. 동결처리는 빙결정 생성에 따른 조직의 세포 간극부의 일부손상과 연화를 기대하는 것이지만, 세포벽 손상에 의한 품질저하 가능성이 있음
- 감자를 동결함침으로 조제한 단세포의 경우, 점도상승은 전혀 일어나지 않고, 같은 감자보다 양호한 소재를 얻을 수 있다. 같은 감자와 고물은 대표적인 단세포화 식품이다. 원래 동결함침법은 효소에 의한 단세포화의 연구과정에서 얻은 기술로서 영양성분을 손상하지 않고, 세포벽을 잔존시킨 식품 제조가 가능하며, 아밀로그래프에서 확인할 수 있다.

2) 색소와 향기 성분의 유지와 정도 조정

- 당근과 빨간 고구마를 동결함침법과 교반법으로 효소처리 후 anthocyanin 비교 결과, 교반법은 0.1%, 동결함침은 97% 잔존하였고, β -carotene은 큰 차이는 없었다. 동결함침법은 침투압 작용의 영향을 받지 않고 수용성이나 소수성에 상관없이 성분의 용출이 되지 않았다. 동결함침법으로 얻어지는 단세포에는 당근 본래의 휘발성 향기 성분인 β -caryophyllene, bisabolene, limonene, terpinolene, 등 테르펜계 탄화수소류는 잔존하고, β -ionone과 hexanal 등의 열화 성분은 생성이 억제된다. 이는 세포벽이 잔존하며 열을 적게 받기 때문이다. 비교적 질긴 소재인 우엉과 죽순에 대하여 시판되는 Pectinase활성효소제제 18종을 사용하여 연화에 적합한 효소 제제를 선택한 결과, 우엉에는 cellulose 등 6종, 죽순은 hemicellulase 등 3종이 유효하였다. xyloglucan 등 다당 구조를 가진 세포벽에는 pectinase, protopectinase,

hemicellulase가 복합 작용하는 것으로 보임.

- 동결함침 후 방치시간(반응)에 따라 중심부까지 효소가 함침되어 조직붕괴로서 경도가 저하되는데, ‘영양개선법’에 정한 저작 곤란자용 허가기준 5.0×10^4 N/m²이하까지 우영은 30분 죽순은 15분이 소요되었다. 효소 농도는 가급적 낮게 하여 처리후의 경도변화도 고려해야 한다. 콩은 장시간 가열하면 조직이 물러지지만, 저작 곤란자용 수준까지 연화되지 않는다. 표피가 있는 대두 등 쌍자엽 식물은 세포간격과 세포벽에 hemicellulose가 존재하므로 pectinase와 cellulase 활성 있는 효소 제제를 사용한다. 백화두(白花豆)를 표피만 건조(전체 2%)시켜 60분간 동결건조 후 ‘Macerozyme2A’ 1%완충액으로 함침 처리하여 50℃ 3시간 방치하면 경도 40%까지 연화.
- 가압가열과 동결함침을 병용하면 건강증진법의 저작 곤란자의 경도기준(104 N/m²)을 충족할 수 있다. 두류는 lectin과 같은 알칼로이드가 존재하므로, 효소 실효를 겸한 가열로서 알칼로이드도 제거된다. 연하 곤란자의 오염으로 인한 오염성 폐렴 등 위독한 경우를 방지하기 위하여, 크기 조절과 끈기제로서 점성을 부가할 필요가 있다. 생전분을 식물조직 붕괴효소와 동시에 함침하고 가열하여 호화시키면 경도조절과 함께 보수력을 유지할 수 있음.

3) 기능성 성분의 부가 및 응용

- 우영을 ‘cellulocin ME’로 처리하면, 불용성인 protopectin이 효소 분해되어 수용성 식물섬유가 증가하여 콜레스테롤의 흡수나 혈당치 상승을 억제하는 작용을 한다. 감자에 올리고당 생성효소를 동결함침하면 올리고당10%의 감자를 제조할 수 있음.
- 동결함침법은 제조공장뿐만 아니라 진공포장기를 이용하여 업무용 시설, 병원 가정에서도 사용될 수 있다. 동결 식재에 효소액 또는 효소제를 함유한 조미액을 분무 또는 부착시킨 후, 진공포장기로서 감압하고 가열하는 방식이 개발되었다. 효소와 조영제(造影劑)를 동시에 함침시키면 검사식의 씹고 넘기는 섭식 과정을 VF화상으로 볼 수 있으므로, 경도의 제어 및 식도 소화관 십이지장까지의 외과 영역에의 응용도 가능.

2. 개호식의 발달

- 일본은 고령화의 속도가 빨라, 1970년 고령화 사회, 1994년 고령사회에 도달, 2007년 고령자 비율은 21.5%로서, 초고령사회에 돌입했다. 개호식품의 시장규모는 2007년에 2000억 엔을 초과하여 10년 전의 약 10배 정도 증가하였고, 향후 연간 15%정도 높은 신장률로 예측되고 있다. 개호식품의 상품형태로 가장 많은 것은 상온유통이 가능한 용기포장 가압가열 살균 레토르트 식품으로, 개호식품협의회는 2002년 4월 사단법인 일본통조림협회의 회원기업으로 설립되었다. 개호(介護)용 가공식품을 ‘Universal design food’로 명명하고, 2003년 7월 로 그마크를 상표 등록.
- 1988년 ‘특별양호 노인 홈’ JunSeiEn(潤生園)에서 개발된 개호식이 ‘임상영양’에 소개되었다. 1989년 Seireisanbo(聖隷三方)가 개발한 ‘연하식(嚥下食)’이 「연하 장애」의 별책으로 소개

되었다. ‘개호식’이란 섭취 기능이 저하된 고령자를 위하여 감성과학의 관점에서 개발된 식사라 할 수 있다. 개호식은 고령자의 섭취 기능에 맞게 안전성의 면에서 texture가 조정된 식사로서, 고령자의 QOL(생활의 질)이란 관점에서 맛에 대한 배려와 미각과 시각은 물론 영양 면에서도 고려된 것이다. 개호식은 「연하식」, 「소프트식」, 「부드러운식사」 등 여러 가지 이름으로 독자적으로 개발되고 있고, 여러 식품기업이 참여하여 시판되고 있음.

1) 유니버설 디자인 푸드

- 자가 규격 유니버설 디자인 푸드란 이용자의 능력에 대응하여 섭취하기 쉽게, 형상, 물성 및 용기 등을 연구하여 제조된 가공식품 및 형상, 물성을 조정하기 위한 식품으로 정의하고 있음.
- 「겉쪽한 조제식품」 「건조타입」 「냉동타입」 「용기포장 가압가열 살균타입」 「기타 용기 포장타입」으로 분류하고, 상품의 「로고마크」의 표시방법으로, 크기, 구분수치표기, 형상표시 등을 정하고, 사용한 용기에도 「식별하기 쉬운 것」 「소지하기 쉬운 것」 등을 기술하고 있음.
- 유니버설 디자인 푸드는 제품의 경도와 점성을 지표로 정한 「구분 1~4」와 「겉쪽한 정도 조정」로 구성하고 있다. 구분은 1에서 순서대로 유연한 물성이 되도록 설정하고, 「겉쪽하기」는 마시거나 먹는 물건에 끈끈함을 넣어 마시기 쉽게 하기 위한 「겉쪽하기 조정식품」이나 일부의 「건조타입」을 포함하고 있다. 각 구분은 「쉽게 씹을 수 있다」 등의 「구분 형상」이나 「씹는 힘」 「삼키는 힘」이란 쉬운말로 표현하고, 「겉쪽한 정도 조정」은 「씹는 힘의 기준」, 「삼키는 힘의 기준」, 물성규격의 설정은 없다. 성상은 「식품에 첨가에 의해, 또는 용해수량에 따라서, 구분 1~4에 해당하는 물성에 조정할 수 있는 것」으로 하고 있다.
- 이용방법의 예를 들면, 전자는 물이나 차 등 음료에 직접 녹이거나, 또는 퍼서퍼서하거나 잘게 썬 음식물의 섭취를 돕기 위하여 고물로 사용하는 등의 용도가 있다. 후자는 물을 넣어 그대로 식사로 이용할 수 있는 제품.

표 30. 개호식품의 분류

분류	특성
수분고급형 식품	수분 보급젤리
양양보급형 식품	칼로리 섭취 목적, 성분 강화 목적
농후유동식	식사 대체
자작 연하 보조식품	겉쪽한 조정 식품, 고형화 보조식품

- 협회의 회원기업으로 설립되었다. 개호(介護)용 가공식품을 ‘Universal design food’ 로 명명하고, 2003년 7월 로그마크를 상표 등록하였다. 1988년 ‘특별양호 노인 홈’ JunSeiEn(潤生園)에서 개발된 개호식이 ‘임상영양’에 소개되었다. 1989년 Seireisanbo(聖隷三方)가 개발한 ‘연하식(嚥下食)’이 「연하 장애」의 별책으로 소개.
- ‘개호식’이란 섭식 기능이 저하된 고령자를 위하여 감성과학의 관점에서 개발된 식사라 할 수 있다. 개호식은 고령자의 섭식 기능에 맞게 안전성의 면에서 texture가 조정된 식사로서, 고령자의 QOL(생활의 질)이란 관점에서 맛에 대한 배려와 미각과 시각은 물론 영양 면에서도 고려된 것이다. 개호식은 「연하식」, 「소프트식」, 「부드러운식사」 등 여러 가지 이름으로 독자적으로 개발되고 있고, 여러 식품기업이 참여하여 시판.

2) 유니버설 디자인 푸드 자가 규격

- 유니버설 디자인 푸드란 이용자의 능력에 대응하여 섭식하기 쉽게, 형상, 물성 및 용기 등을 연구하여 제조된 가공식품 및 형상, 물성을 조정하기 위한 식품으로 정의.
- 유니버설 디자인 푸드는 제품의 경도와 점성을 지표로 정한 「구분 1~4」와 「겉쪽한 정도 조정」로 구성하고 있다. 구분은 1에서 순서대로 유연한 물성이 되도록 설정하고, 「겉쪽하기」는 마시거나 먹는 물건에 끈끈함을 넣어 마시기 쉽게 하기 위한 「겉쪽하기 조정식품」이나 일부의 「건조타입」을 포함하고 있다. 각 구분은 「쉽게 씹을 수 있다」 등의 「구분 형상」이나 「씹는 힘」 「삼키는 힘」이란 쉬운말로 표현하고, 「겉쪽한 정도 조정」은 「씹는 힘의 기준」, 「삼키는 힘의 기준」, 물성규격의 설정은 없다.
- 성상은 「식품에 첨가에 의해, 또는 용해수량에 따라서, 구분 1~4에 해당하는 물성에 조정할 수 있는 것」으로 하고 있다. 이용방법의 예를 들면, 전자는 물이나 차 등 음료에 직접 녹이거나, 또는 퍼석퍼석하거나 잘게 썬 음식물의 섭식을 돕기 위하여 고물로 사용하는 등의 용도가 있다. 후자는 물을 넣어 그대로 식사로 아용할 수 있는 제품.

3) 특별용도 식품과 유니버설 디자인 푸드

- 유후생노동성의 특별용도 식품은 건강 증진법을 근거로 병자 등의 용도에 한정된 식품으로 정의되고, 인가를 받은 상품은 특정의 병태(病態) 등에 따른 취지의 상품에 표시를 할 수 있다. 판매는 한정적인 루트(약국, 의사 등의 소개에 의한 의료용 방관의 이용이 전제. 일반 슈퍼 등의 판매는 금지)에서 판매.
- 유니버설 디자인 푸드는, 후생노동성의 인허가를 받지않고, 식품업체가 작성한 자가기준에 따라서 운용되며 판매는 일반식품과 같이 취급된다. 고령자나 저작 곤란자용 상품의 요구가 일반 시판 개호식품에서도 가능하게 되어, 유니버설 디자인 푸드 영역은 한층 더 넓어지고 있다.

표 31. 유니버설 디자인 푸드 (일본개호식품협의회)

구분	1	2	3	4	겉쪽하기조성식품	
형상	쉽게 씹을수있다	잇몸으로 으갠수 있다	혀로 으갠수있다	관계없다	겉쪽하기조성	
씹는 힘	딱딱하거나 큰것은 약간 먹기어렵다	딱딱하거나 큰것은 먹기어렵다	가늘거나부른것은 먹을수 있다	고형은 작더라도 먹기어렵다		
마시는 힘	보통으로 마실수 있다	마시기어려운 것도 있다	풀이나 차를 마시기 어려운데가 있다	풀이나 차를 마시기 어렵다		
물성 규격	경도 N/m ² 이하	5*10 ⁵	5*10 ⁴	sol:1*10 ⁴ gel:2*10 ⁴	sol:3*10 ⁴ gel:5*10 ⁴	
	점도 mPa·s이하			sol:1500	sol:1500	
성상 등			gel은 풀기가 많은 것. 고형물은 혀로 으갠수 있을 것	gel은 풀기가 많을것. 고형물이 없는 균질 상태일 것	음식물에 첨가하거나 용해수로서 1-4의 물성으로 조정 가능한 것	

4) 유니버설디자인푸드 생산 현황

- 회원기업의 생산량 출하금액은 각각 약 4,917톤·53억원(2007년 1~12월), 전년 대비 수량은 122.6%, 금액은 133.5%로 매년 증가되고 있다. 2008년 11월 현재 355 품목이 등록되었다. 일본의 개호식품은 고령자 급증에도 불구하고 시장은 미소하게 증가했으나, 2006년 개호보험법 개정으로 시설간호로부터 재택간호 중시 방향이 명시되어, 앞으로는 시판용 개호용 식품의 수요가 증가할 것으로 예상 된다.

표 32. 유니버설디자인푸드 생산통계

단위: 톤,백만엔, %

	구분	2007년		2006년		07/06년 대비	
		수량	금액	수량	금액	수량	금액
	1	310	341	157	151	197	226
	2	483	484	425	404	113	119
	3	1,726	1,507	1,269	1,037	136	145
	4	1,648	1,593	566	1,490	103	117
	겉쪽한식품	750	1,920	566	1,490	132	128
	합계	4,917	5,307	4,010	3,976	122	133

3. 고령자용 기능성 식품의 개발

1) 콜라겐의 용점을 개선한 소프트식 제조

- 고령자와 저작 연하 곤란자의 생체조절 기능을 갖는 식품 소재의 연구 개발이 크게 요망되고 있다. 미생물로부터 얻은 MTG (microbial-trans glutaminase)를 넣어 콜라겐의 용점을 변화시켜 가열해도 적당한 점성 갖는 젤라틴 겔(gelatin gel)을 만든다. 거기다 높은 영양가의 식육을 여러가지 처리(물리적, 효소 처리 등)를 하여 고령자도 저작, 연하가 쉬어 안심하고 먹을 수 있는 소프트소시지와 치킨로후를 개발하였다. MTG를 이용하여 축산물의 물성을 개선하여 입안에서 쉽게 붕괴되는 같은 고기를 사용한 것이 소프트식.
- 콜라겐(collagen)의 용점은 MTG 0.5%, 50℃, 10분간처리하면, 통상의 용점이 32℃에서 60~85℃까지 상승한다. 높은 온도에서 가열해도 용해되지 않는 식육 제품의 제조가 가능.

2) 소고기의 연화 처리

- 1cm 두께로 썰은 소고기를 연화처리기(meat tenderizer)로 처리하니 구운 고기와 및 삶은 고기의 모두 파단강도가 낮아졌다. 연화처리를 한 소고기와 연화처리하지 않은 고기에 화학적 처리(발효사과 용액, 와인효모 된장, 생간장류)를 한 결과, 발효사과용액은 고기의 섬유질을 팽윤시켜 식감을 부드럽게 하였고, 와인효모 된장은 와인 특유의 풍미가 고기의 생취를 마스킹하여 주었고, 생간장은 각종 효소의 활성이 살아있어 근육 단백질의 연화에 효과가 있음.
- 연화 처리를 한 고기는 구운 고기, 삶은 고기 모두 처리하지 않은 것보다 4-7 N 정도 파단강도가 떨어졌다. 특히 연화처리기로 처리한 것은 더욱 뚜렷하였다. 연화처리기로 처리한 후 발효사과용액 처리를 한 소고기가 가장 효과가 좋았다

3) 고령자용 소프트소시지의 제조

- 돼지고기를 난백 거품과 혼합하여 steam convection oven으로 제조하면 고기가 부드러워진다. 과열 증기로 가공하면 삶는 것에 비해 수분증발이 적으며 비타민이 증가되고, 지방과 칼로리는 떨어진다. 80℃, 30분 스팀 가열이 가장 적합하다. 전문가들의 평가 결과, 고기의 풍미는 좋고, 딱딱함은 보통, 조화감이 있고, 달라붙지 않고, 씹기 쉽고, 먹기 쉽고, 잔류물 및 육즙이 남지 않고, 종합평가도 우수하였다. 요양보건의실에서 소프트식을 먹는 22명(남8.여14, 평균 83.9세)의 시식결과, 의사소통이 어려운 한사람을 제외하고 모두 남김없이 먹었고, 맛도 19명이 좋다고 평가하였다.

4) 고령자용 소프트식의 제조

- 제조방법은 식재페이스트(믹서식)를 겔화제(젤라틴 등)를 넣고 80℃로 가열하여 그릇에 담아 냉각하면서 굳힌다. 고기와 생선에 달걀 감자 우영 등의 부형제를 넣는다. 시판하는 냉동 소프트식을 구입하여 찌거나 튀겨 조리한다. 소고기는 초저온분쇄장치로 만든다. 새우볼, 찌두유, 두부와 흰살 생선 삶은 것에 10% 닭고기 미분쇄육을 첨가하여 고령자용 소프트식을 만든다. 닭고기 미분쇄육을 사용한 경우, 파단강도, 부착성, 응집성 등이 고령자에게 적합하였고, 소프트릿치프린 및 삶은 두유의 파단강도는 혀로 으개지는 범위(1×10^4 N이하)이다. 미분쇄육을 넣은 삶은 두유가 계란두부에 비해 식감도 좋아 가장 좋은 평가를 받았다.

4. 고령자용 식품의 물성 측정기술

1) 식품의 역학 측정법

- 식품의 역학측정은 기초적 방법, 경험적 방법, 모의적 방법의 3종류로 대별된다. 기초적 방법은 객관적으로 정의되는 물리량(탄성률, 점성률)을 측정하는 방법으로, 극히 작은 변형을 가하여 만든 미소변형(微小變形) 영역의 측정과 파단(破斷)에 이르도록 큰 변형을 준 대변형(大變形) 영역의 측정이 있다. 미소변형 영역의 측정에는 정적점탄성(靜的粘彈性)시험이나 동적점탄성

시험이 있고, 대변형 영역의 측정으로서는 파단측정(주로 겔(gel)상 식품)이나 정상적인 점도 측정(주로 sol상 식품).

- 텍스처분석기(texture analyzer)나 크리프 미터(주로 gel상 식품의 정적점탄성 측정이나 파단측정), 플루이드 레오 미터(주로 gel상 식품의 파단측정), 및 공축이중(共軸二重) 원통회전 점도계(주로 sol상 식품의 정상적인 점도측정) 등이 있다. 경험적 방법은 객관적으로 정의할 수 있는 물리량이 아닌, 경험적으로 식품물성과 연관되는 특성치를 측정하는 것으로, 측정결과는 장치의 구조나 측정조건에 의존한다. 카드 미터(절단에 의한 변형)나 페네트로 미터(관입(貫入)에 의한 변형) 등이 대표적인 측정 장치이다. 과학적인 관점에서는 물리량으로 엄밀하게 정의되는 기초적 방법이 중요시 되지만, 불균질한 구조를 갖고, 성분적으로 다양한 식품에서는, 오히려 경험적 방법이 유익한 경우도 적지 않다. 엄밀한 물리량이 아니어도, 식품의 품질과의 관계가 경험적으로 알고 있는 지표로 있으면 실용적으로는 유용하다. 모의적(模擬的) 방법은 식품을 조리할 때의 교반조작이나 식품을 섭취할 때의 저작 동작을 재현, 모의해서 역학물성을 측정하는 방법으로서, 전분의 팽윤 호화 거동을 측정하는 Bravender viscograph 나 rapid visco analyzer(RVA), 소맥분 반죽의 특성치를 측정하는 Bravender parinograph 및 텍스처 특성치를 해석하는 texturometer 등이 대표적인 측정 장치이다.

2) 개호식품의 역학 측정법

- 개호식품의 연구개발은 다각도로 역학특성을 해석, 검증할 필요가 있다. 유니버설 디자인 푸드는 저작기능에 따라서 4단계의 경도구분이 설정되어 있다. 객관적인 경도는 1축압축(一軸壓縮) 시험기에 의한 압축응력으로 규정되어, 각 구분에서 경도의 상한치가 정해지고 있다. 또 어느 규격에 있어서도, sol상 시료의 「마시기 쉬움」의 지표로, 점도의 하한치가 정해져 있다. 점도 측정법 - 점도는 sol상 식품이 대상이고, 주로 B형점도계로 측정.
- 시료 중에 침적한 로터를 일정 속도로 회전시켜, 흐름에 대한 점성저항을 측정하는 것이다. 점성 저항치는 0~100의 수치로 표시하고, 로터 및 회전수에 따라 결정된 정수를 곱하는 것으로 점도를 산출한다. B형회전 점도계는 비교적 값싸고 조작성이 간단하여 실용성이 높다. 개호식품 점도는 로터 회전수 12 rpm, 로터 회전 개시에서 점성 저항치를 읽기까지의 시간간격 2분, 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 측정한다. 점도 측정시, 로터의 회전수에 주의해야 하며, 용기 크기까지 측정하는 방법이 바람직하다. 경도 측정법 - 경도는 sol상 및 gel상 식품을 측정대상으로, 1축압축 시험기에 의한 압축응력시험으로 규정.

표 33. 고령자용 식품 규격 (후생노동성; 2009.4 개정)

식품군		규격				
종별	형상	경도(입장속도압축저항(N/m ²))	고형물 비율(중량%)	sol경도 (mPa.s)	비고(경도, 먹기쉬운 느낌)	
저작 곤란자용 식품	sol	5*10 ² N/m ² 이하	-	-	관계없다	
	sol중 고형물*	고형물포함전체5*10 ² N/m ² 이하				
	gel	5*10 ² N/m ² 이하				허로 으갠수 있다
	gel중 고형물*	고형물포함전체5*10 ² N/m ² 이하				잇몸으로 으갠수 있다
	고형물*	5*10 ² N/m ² 이하				
저작 연하 곤란자용 식품	sol	5*10 ² N/m ² 이하	50%이하	1.5*10 ⁴ mPa.s 이상	관계없다	
	sol중 고형물*	고형물포함전체5*10 ² N/m ² 이하				
	gel	1*10 ² N/m ² 이하				허로 으갠수 있다
	gel중 고형물*	고형물포함전체5*10 ² N/m ² 이하				잇몸으로 으갠수 있다

*: 고형물의 크기; 입방체, 구형, 부정형의 덩어리 등은 1cm³ 이하, 납작하거나 가늘고 긴 것은 길이 2cm이하

- 1축압축 시험기는 기초적 측정에도 사용될 수 있는 것으로, 실용적 요소가 강한 B형 회전점도계 만큼 해석은 곤란하지 않다. 개호식품의 경도는, 직경 20 mm의 원주형플런저를 이용하여 온도20±2℃, 압축속도 10 mm/초에서 측정한 경우가 많다. sol상 시료의 경우는, 직경40mm, 높이15 mm의 용기에 시료를 충전 하고, 틈새5 mm로 압축한다.
- Texture Profile Analyzer (TPA) - TPA는 sol상 및 gel 상 식품을 대상으로, 1축압축형의 만능 시험기가 사용되는 경우가 많다. TPA는 1960년대에, 미국 제너럴 푸드사의 연구그룹에 의해 개발된 식품의 역학 측정법으로, 사람의 감각 특성 대응으로 사용된다. 저작을 모의한 2회 연속 압축으로 시료를 변형시켜, 얻은 시간(거리)-하중(응력) 곡선(TPA곡선)으로부터, 1차 특성치로 한 경도, 약함, 응집성, 부착성, 점성, 및 탄력성을, 2차 특성치로 껌성(경도×응집성) 및저작성(경도×응집성×탄력성)을 구한다. 새로운 특별용도 건강 제도에서, 연하곤란자용 식품에 종래의 경도에 가하여, 응집성 및 부착성의 규격치가 수재되었다. 동적 점탄성 - sol상 및 gel상 식품의 어느 것도 측정대상이다. 기본적으로 미소변형 영역에 대한 측정이므로 시료구조를 파괴하는 일 없이, 점탄성 특성 측정이 가능.
- ring법 - USDA에서는 consistometer라는 공정법으로, sol상 식품이 측정대상이다. 예를 들면, 유리용기에 시료를 충전 하고 동심원(同心圓)을 기재한 PET 필름시트의 중앙부에 배치한다. 1분간 정지 후, ring을 위로 뽑아 내, 시료를 자기중량에 의해 유동 시킨다. 동심원의 중심에서 시료의 바깥 가장자리의 거리를, 45도 조각으로 8방향으로 나누어 취해, 평균치를 구한다. 값이 큰 만큼 유동하기 쉽고, 보습성이 낮은 것을 나타낸다.

3) 젤리상 식품의 역학 측정

- 겔화제제(製劑), gel up J-3843 및 gel up J-4023의 제품은 젤라틴과 유사한 식감을 갖고, 넓은 온

도범위, 장기보존에서 물성의 변화가 적고, 이수가 적은 gel화제를 발상으로 개발한 것으로, 간호식용의 gel화제 기제(基劑)로 하여 우수한 기능성을 나타낸다. 용액 또는 sol상 시료에서는 회전점도계에 의한 점도, 고체 또는 gel상 시료에서는 1축압축시험에 의한 파단응력이 역학특성의 지표로 된다. 그러나 그 중간영역에 속하는 「약한 겔」에서는, 어느 방법에 있어서도 그 역학특성을 정확히 평가할 수 없고, 동적 점탄성 측정 같은 미소변형영역에서의 측정이 유효.

- 저작·연하 기능 저하자에 적합한 gel상 식품의 개발에는 gel up J-3843 및 gel up J-4023이 유효해서, 젤라틴gel의 역학특성에 가깝고, 또 보존이나 온도에 의한 변화가 적은 젤리상 식품을 조제하는 것이 가능하다. 젤리상 식품은 저작 연하 곤란자가 섭취하기 쉽고, 간호자도 취급하기 쉽다.

4) 결죽하기의 역학 판정

- 결죽하기 조정식품은, 액상식품이나 음료에 첨가하여 연하기능 저하자가 마시기 쉽도록 적당히 결죽하게 한 보조식품이다. 결죽하기 조정제에는 전분이나, 구아 검, 키산탄 검 등의 증점(增粘) 다당류, 정제 키산탄 검 등이 있다. 결죽함 조정식품에는 액상 타입과 분말-과립 타입이 있지만, 시판 제품은 분말, 과립 타입이 압도적으로 많다. 결죽함 조정식품에는 ①덩어리가 되지 않고, 상온에서 쉽게 분산, 용해하는 것 ②점도의 발현이 빨라, 경시변화가 빠른 것 ③대상 식품에 관계하지 않고, 안정하게 점도를 발현하는 것 ④점착성이 적어, 식괴 형성성(食塊形成性)이 높은 것 ⑤식품의 기호성을 손상하지 않는 것 등의 기능이 요구됨.
- 점도만으로 sol상 식품의 마시기 쉬움을 판단하는 것은 어렵고, 복수의 방법을 이용하여 역학적 특성을 해석, 검증할 필요가 있다. 이런 상황에서, 일본간호식품협회의 자가규격 위원회는, 결죽하기 조정식품의 역학 측정법으로 TPA의 유용성을 검토하고 있다. TPA 측정은, 가대(架台)속도를 10 mm/s로 하여, 실용의 첨가량 범위 (<5%)에서 TPA 측정한다. 경도-응집성의 2차원 plot에 대하여, 경도는 첨가량에 따라서 170~1,200 N/m²의 범위에서 증가하나, 경도와 부착성은 정(+)의 상관관계가 있고, 1차회귀식의 결정계수는 0.98이었다. 경도와 점도는 양의 상관관계가 있고, 1차회귀식의 결정계수는 0.99이었다. 경도는 ring법과 음(-)의 상관관계가 있고, 1차회귀식의 결정계수는 0.85이었다. TPA의 경도는 종래부터 사용되어 왔던 물성 지표와 높은 상관관계가 있다. 점도 측정시 사용한 용기의 형상은 보통 원추형이나 크기는 측정기관 간에 완전하게 통일되지 않아, 로터의 회전속도가 같을지라도 다른 속도로 점도를 평가될수 있다.
- 점도 규격을 설정할 때에는, 시료용기의 형상과 크기도 규정할 필요가 있다. 개호식을 개발한 운생원은 경도와 점도를 가장 중시하고, 그 측정은 고령자용 식품군별 허가 기준과 같은 방법으로 texture 측정기를 사용하고 있다. Plunger에서 음식물을 위에서 눌러서(혀로 누르거나, 이빨로 씹음), 그 수치를 texture 특성의 경도와 부착성(치아나 입 안의 끈기), 응집성으로 나타낸다. 「경도와 부착성」, 「경도와 응집성」의 관계를 각각 4개의 그룹으로 분류하여 ‘개

호식 핸드북'에 상세히 기록되어 있다. 경도와 부착성은 식품의 형태와 texture로서 4그룹으로 분류한다. 그룹A는 유동성이 있는 sol 상, B는 약간 부드러운 균질한 젤리 상, C는 약간 경도가 있는 부착성이 적은 불균질 gel 상, D는 부착성이 많은 불균질 gel 상이다. 저작 및 연하 곤란자용 식품의 경우, 경도·점성 등 역학적 물성 측정 방법으로서, sol 상 및 gel 상 식품의 팽윤·호화·식감 상태를 측정하는 기기로서 Bravender viscograph, rapid visco analyzer, Bravender parinograph, texturometer 및 texture profile analyzer(TPA)등이 사용되고 있다.

5. 뇌기능과 저작과학

- 뇌는 섭취과정의 음식물 인지와 저작운동을 기획과 실행을 감각 정보와 기억을 함께 종합 평가한다. 이러한 감각과 운동의 통합을 뇌기능과 연관시킨 것이 저작과학이다. 치아상태가 나빠서 저작과 연하기능이 떨어진 경우와 뇌혈관 장애, 두부외상, 파킨슨병 등 뇌 관련 질환, 근위축성경화증, 구강질환, 약물의 영향 등에 의해 섭취와 연하장애가 발생할 수 있음.
- 뇌의 생리학적 연구는 주로 동물을 대상으로 진행되어왔다. 동물의 뇌에 전기 자극을 주어 그때의 행동이나 근육 응답을 자극 파라미터로 비교하거나, 뇌의 일부를 파괴한 행동변화 관찰법 등이다. 20세기 후반, 미소 전극이 개발되어 뇌세포 1개 또는 집단을 자극하거나 활동 변화의 기록이 가능하다. 미소전극에 의한 전기 생리학적 연구는 신경세포 간 연락을 정확하고 상세하게 해명할 수 있으나, 500억 개에 달하는 신경세포를 모두 조사하는 것은 불가능하다.
- 사람이 관찰할 수 없는 고차 뇌기능은 환자의 병태를 극명하게 관찰 기록하고, 사후 해부로서 병리 현상을 비교함으로써 장애부위의 기능을 추측하여 왔다. 뇌 표면의 전기 자극은 수술부위 결정과 운동·감각 부위의 기능 소재는 매우 정확하게 기술되어 왔다.
- 최근 비침습(非侵襲) 뇌기능 해석법이 개발되어 일정 기능을 담당하는 뇌 영역의 소재와 뇌 국소간의 관계에 대하여 화상 해석이 가능해졌다. 신경계의 정보전달을 관찰하는 수법으로 종래의 전기 생리학적 수법이 부가되어 면역조직화학법·세포기능 가시화 해석법이 개발되어, 기능과 형태를 동시에 관찰할 수 있게 되어 뇌기능의 해명이 촉진되었다.
- 사람의 뇌기능을 측정법은 뇌파(EEG: electroencephalogram)법과, 최근 보급된 기능적 핵자기공명 영상법(뇌기능 영상법, MRI: functional magnetic resonance imaging), 포지트론단층촬영법(PET: positron emission tomography), 뇌 자 도 법(MEG: magneto encephalo gram), 근적외선 topography법(NIRS: near infrared spectroscopy) 등이 있다. PET는 트레이서(tracer)로서 혈중에 방사성 물질을 주입하여, 양전자가 발생하는 감마선을 측정하고, 트레이서의 위치와 농도를 단층 상으로 표시하는 방법이다. 뇌 신경활동이 높으면 그 부위에서 대사량이나 혈류량이 증대하기 때문에 채택하려는 지표에 맞추어 트레이서를 선정하면, 간접적으로 뇌 활동이 활발해진 부위를 특정할 수 있다.
- f-MRI는 뇌신경 활동에 따른 뇌 혈류변화를 MRI 신호로서 측정하여, 화상화한다. 과제 실행 시와 안정시의 화상을 비교하여 자기공명 신호의 변화를 통계적으로 분석함으로써 활동 부위를

추정한다. 혈행의 산소포화도와 완화 시간의 관계를 이용한 BOLD법이 가장 유명하다.

- MEG는 뇌신경의 활동에 따라 발생하는 자장을 계측하여 그 활동부위를 msec 단위의 시간 분해능으로 영상화하는 것으로, 신경 활동과 직결된 기록 방법이나 자장과 신경 활동에는 복잡한 계산식이 필요하다.
- NIRS는 근적외선(파장 800 nm)을 두피에서 비침습적으로 mapping하는 장치이다. 두피·두개골을 투과한 근적외선이 두개 내에서 반사한 반사광을 10~30 mm 떨어진 두피상의 점에서 계측하면, 뇌의 활동모양이 헤모글로 빈이나 산소의 교환정보에 수반하는 지표로 계측할 수 있는 원리를 응용한 것이다.
- PET, f-MRI, MEG, NIRS는 시간적·공간적 분해능에 큰 차이가 있다. 미소전극법은 세포 하나하나를 자극·기록할 수 있으나, 시간 분해능도 msec의 오더의 응용에는 한계가 있고, 공간 분해능이 우수한 반면, 거대한 실험결과의 통합적 해석에는 시간과 노력이 요구된다. MEG는 시간 분해능과 공간 분해능이 우수하다. 그러나 EEG처럼 개개의 피질 칼럼을 분석하기에는 충분한 공간 분해능을 갖고 있지 않다. PET와 f-MRI의 경우는 시간·공간 분해능이 낮다. 자장을 강하게 하면 f-MRI의 시간·공간 분해능은 개선되지만, 강자장의 영향은 아직 명확하지 않다. 정 자장의 경우, 약 10테슬라를 초월하는 강 자장에서 반자성체인 물은 moises effect에 의하여 자력에 따라 압출된다. MEG는 신경의 전기적 활동이 만든 미약한 자장을 뇌의 주위에서 검출한다. 뇌의 활동변화를 시시각각 추적 가능하나, 역 문제를 해결할 필요 때문에 정확한 활동원의 추정에는 한계가 있다. f-MRI는 역 문제를 해결하지 않고 기능소재를 영상화하는 것이 가능하지만, msec의 검출 감도를 가진 MEG에는 미치지 못한다.
- 뇌자도(MEG: magnetoencephalogram)는 1968년 미국David Cohen에 의하여 뇌의 자기장을 측정하는 SQUID superconducting quantum interference devices; 감도 10fT)의 개발부터 시작되어, 1990년대 중반 미국과 유럽, 일본 등에서 상용화되었다. 우리나라는 2005년 핀란드의 Elekta neuromag사의 MEG 장비가 최초로 도입되었다. MEG는 지각, 인지, 기억, 학습, 언어 등 뇌 활동을 밀리초 단위로 측정하여, fMRI나 PET의 뇌기능 영상장비에 비해 우수한 시간적 공간적 분해능으로 미세한 뇌신경 활동을 분석할 수 있는 4차원 뇌기능 영상장치로서 BCI(brain-computer interface) 등 휴먼 케어 과제 수행에 이용되고 있다.

6. 고령자용 식품의 포장

1) 소비자 관점의 포장 설계

- 포장의 기본기능은 내용물의 보호, 취급의 편리성, 정보의 제공이다. 최근 「사용의 쉬움」을 추구하게 되어, 유니버설 디자인 관점의 제품설계의 필요성으로 연결되는 것이다.
- 식품, 일용품 등의 패키지와 소비자의 관계는 상품의 흐름으로 보면, ①매장 등에서 상품을 선택, 구입하는 장면 ②상품을 사용하는 장면 ③상품을 보관하는 장면 ④포장을 분별 배출하는 장면으로 분류할 수 있다. 상품개발과 포장설계에 고령자의 신체적 시청각 및 운동기능 저하에 대한 배려가 중요하다.

2) packaging 5 원칙

- 원칙1. 필요한 정보의 알기 쉬운 표현 - 소비자가 알고싶은 정보(유효기간·원재료 표시 등)가 색 사용, 문자 크기, 배치, 엠보싱(embossing) 등 적절한 방법으로 인식하기 쉽게 표현하고 ‘분명히 오픈(open)’ 하고 있다. 개봉하는 곳을 한눈에 알 수 있도록 파우치의 노치(notch) 주위에 색 전면에서 모양이나 마크의 디자인 처리를 하거나 종이 카턴(carton)의 지퍼(zipper)의 손잡이에 색을 넣어알기 쉽게 한다.
- 원칙2. 간단하고 직감적인 사용성 - 경험, 지식, 지각능력 등에 관계없이 올바르게 사용법에 따를 수 있다. ‘엘보우 파우치’ 는 액체를 따라내는 부위의 형상을 고안한 것으로 외관에서 직감적으로 개봉하는 부분이 판별할 수 있다. 개봉 부위의 크기는 손가락으로 잡을 때 충분한 크기를 갖추게 설계되어, 가위 등을 쓰지 않고 손으로 바로 개봉할 수 있도록 특수 가공되고 있다.
- 원칙3. 사용 시의 유연성과 안전성 - 사용방법을 선택할수 있고, 소비자의 안전성을 배려하여 위험에 연결되지 않게 설계한다. 하이 컵(HI -CUP)은 이중 구조의 종이컵으로, 컵 내부와 외부 사이에 공기층을 설치해서, 뜨거운 물을 넣었을 때에도 손에 열이 전달되기 어려운 구조이고, 된장국이나 스프 등에서 채용되고 있다. 또 단열성을 활용하여 손의 열이 전달되지 않는 냉과패키지도 있다.
- 원칙4. 적절한 중량과 크기 - 여러 가지 크기 용량으로 운반, 보관, 취급이 자유롭다. 페트병은 휴대용, 가정용 등 소비자의 사용 과정이나 유통형태에 따라서 구분되고 있다. 한손으로 들기 쉬운 모양, 폐기 할 때 찌부러뜨리기 쉬운 얇은 형태의 병도 있다.
- 원칙5. 무리하지 않는 힘이나 동작으로 사용 - 부자연스러운 자세나 동작없이 무리하지 않는 힘으로 취급한다. 하트(heart) 피트(fit) 카턴(carton) 등은 개봉성을 향상시킨 종이 포장이다. 지퍼의 손잡이 부분과 본체의 사이에 틈새를 마련해, 지괘성(指掛性)을 향상시키고, 한번 연 뚜껑이 바로 돌아오지 않게, 뚜껑의 힌지(hinge)부분의 반발을 억제한 형상의 카턴도 있다. 또, 종래의 지퍼는 한쪽만 여는 구조이었으나, 쌍방향 지퍼는 왼손잡이라도 개봉 방향을 임의로 열수 있다. 하트 피트 카턴은 충전 라인이나 제함(製函) 라인의 큰 폭의 개선 없이, 유연한 대응이 가능한 종이용기의 설계를 취하고 있다.

3) 알기 쉬운 정보 제공

- 식품 포장의 표시에서 소비자가 「구입시 의식하는 항목」 중, 원산지, 원재료, 제조자, 알레르기 표시, 연락처, 제조책임 등을 원하는 사람이 늘어나고 있다. 조리를 필요로 하는 식품에서 조리방법을 삽화나 사진을 차례로 배치하여, 조리내용을 간결한 표현으로 설명한 것이, 냉동식품이나 가공식품에서 증가되었다. 표시해야 할 내용은 매년 증가하는 경향이고, 패키지 이면(裏面) 표시는 그 내용을 어떻게 소비자에 전달하기 쉬운 디자인으로 하는가하는 배려의 유무가 그 상품의 품질이나 기업의 신뢰도에 영향을 미침.
- 기업은 재료의 가격상승에도 환경을 배려한 패키지를 만들어, 또 안전성을 높이는 제조시스템과

검사공정이 필요하다. 포장에 추가 비용을 들여 개량하는 것은 매우 힘들지만, 중요한 것은 보다 많은 사람에게 즐겁게 사용할수 있는 패키지를 제공하는 것을 제일로 생각하는 것이다.

8. 참고문헌

1. 식품의약품안전청, “노인에 대한 의약품 적정사용 정보집(전문가용)” www.kfda.go.kr (2009)
2. 장현숙, 한국생명공학연구원, “고령화사회 대응 연구개발 추진 및 지원방안기획”, 한국보건산업진흥원, pp.13~31, (2007)
3. 통계청, “장래인구추계”, http://kostat.go.kr/nso_main
4. 생명공학정책연구센터, BT기술동향보고서 총서100권, “노화연구 및 활용기술”, pp.15~25, (2009)
5. 윤종률 등, “노인의 질병예방 및 건강증진행위 실천을 위한 예측모형 구축”, 보건복지가족부, (2001)
6. 저출산고령사회위원회 “저출산 고령사회 기본 계획”, 보건복지가족부, www.mw.go.kr
7. 정영희 “노인의 질환과 영양섭취실태조사에 의한 건강메뉴의 표준화 구축”, 한국보건산업진흥원, (2005)
8. 김준혁, “2008 일본 고령자용 식품 식재 서비스 시장 동향”, KIET해 외산업정보 <http://kiet.go.kr> (2009)
9. 최영욱 한국과학기술정보연구원, “경도제어에 의한 노인식의 개발”, www.resear.re.kr (2009)
10. 정갑택, 한국과학기술정보연구원, “유니버셜 디자인 푸드와 식품개발”, www.resear.re.kr (2009)
11. 최병길, 한국과학기술정보연구원, “일본간호식의 현상과 과제”, www.resear.re.kr (2009)
12. 최영욱, 한국과학기술정보연구원, “저작과 뇌에 관한 최신 연구동향”, www.resear.re.kr (2009)
13. 양경미, “경산시 노인의 영양섭취상태 및 건강관련인자에 관한 연구”, 식품영양학회지 34(7), pp.1018~1027, (2005)
14. 이병순, 광문각, “노인복지를 위한 노인영양관리”, (2009)
15. Jelly for endoscopic swallowing evaluation, WO2008013302 System for evaluating mastication function and artificial food mass, WO2008020588
16. Food for people having chewing and swallowing difficulties and method of producing the same, WO2008142853
17. 六車三治男, 黒田留美子, “高齢者用機能性ソフト食品の開発”, 食品加工技術, 29(1), pp.33~40 (2009)
18. 調所勝弘, “特別用途食品制度の見直しについて”, 食品衛生研究, 59(4), pp.15~20 (2009)
19. 船見孝博, “介護食品における物性側定”, 食品工業, 52(2), pp.41~52(2009)
20. 藤崎享 “ユニバーサルデザインフードについて”, 食品工業, 52(2), pp.27~34 (2009)
21. 吉田晴子, “ユニバーサルデザインの食品包装” 食品工業, 52(2), pp.53~57 (2009)

22. 김철민(2003), “산업연관분석을 이용한 식품산업의 성장과 구조 변화 요인분석,” 한국농촌경제연구원.
23. 법률지식정보시스템, “고령친화산업 진흥법,” <http://likms.assembly.go.kr>.
24. 식품의약품안전청(2013), “2012 식품의약품통계연보.”
25. 식품의약품안전청(2013), “2011년도 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계집.”
26. 이견직, 김수영, 문주석, 박세진, 이재관, 이신혜, 이필도, 장석인, 전병유, 정영호, 채창균 (2006), “고령친화산업 활성화 전략 II,” 저출산고령사회위원회, 보건복지부.
27. 이계임 · 한혜성 · 손은영(2007), “한국인의 식품소비 트렌드 분석,” 한국농촌경제연구원.
28. 이현동(2009), “산업연관분석을 이용한 수산식품산업의 경제적 파급효과분석,” 수산정책연구, 제3권 제1호, 13-37.
29. 진현정 · 김병용 · 김중학 · 신정섭 · 김진휘(2011), “고령친화식품산업 규모 전망,” 중앙대학교 산업경영연구소.
30. 진현정 · 우희동(2012), “고령친화식품산업의 성장과 규모 전망-건강기능식품과 특수용도식품을 중심으로,” 한국식품위생안전성학회지, 제27권 제4호, 339-348.
31. 최영욱(2010), “고령자용 식품의 제조 기술 동향,” 식품과학과산업, 제43권 제1호, 87-101.
32. 통계청(KOSIS), “장래인구추계,” <http://kosis.kr>.
33. 한국식품연구원(2009), “로하스, 기술융합 그리고 식품산업.”
34. 한국은행(2007), “산업연관분석해설.”
35. 한국은행(2011), “2009년 산업연관표.”

2. 갱류 배합비의 선정

- 우리나라는 지난 20년 동안 전체 인구에서 고령 인구가 차지하는 비율이 꾸준히 높아져 2000년에 고령인구가 전체 인구의 7.2%를 넘었고, 2010년도에는 11.0%에 도달했으며, 이런 추세로 증가하면 2026년에는 20.8%를 넘는 초고령 사회에 접어들 것으로 예측하고 있다(1). 이처럼 고령화가 빠르게 진행되면서 노인의 건강 문제는 사회적인 문제로 대두되고 있다. 노인의 건강은 노화 정도에 따른 신체 기능의 저하, 기능 장애 및 기능 상실과 병리적 변화 등이 나타난다고 한다(2).
- 이러한 변화는 치아건강에서도 나타나는데, 노인이 되어 치아를 상실하게 되면, 저작능력이 저하되어 섭취할 수 있는 음식물의 선택 범위가 좁아지고 식사의 양과 질 역시 저하됨에 따라 건강과 체력을 유지하기가 어려워진다(3). Kim과 Lee(4)에 의하면 65세 이상 노인의 저작능력은 절반

이상인 53%가 씹는 데에 불편함을 호소하고 있었다. 저작능력이 나쁜 고령자들은 음식을 주로 갈아서 먹는데, 이런 형태는 식욕을 불러일으키지 못하며 씹는 기회를 잃어 오히려 저작능력을 더 퇴화시킬 수 있다. 그러므로 노인의 건강증진을 위해서 균형 잡힌 열량 보충과 저작능력에 맞게 씹을 수 있는 형태의 고령자용 식품 개발이 절실히 요구되고 있다(5). 겔화제(gelling agent)를 이용한 식품은 부드럽고 씹기 쉬운 독특한 물성 때문에 어린이나 노약자용 식품으로 많이 개발되고 있다. 이러한 겔상 식품의 하나인 양갱은 한천, 팔랑금, 설탕 등을 이용하여 만드는 기호식품으로 특히 팔랑금의 재료인 적두는 saponin, isoflavone 등을 많이 함유하여 생리활성이 우수하며(6), 양갱에 많이 첨가하는 설탕을 프락토올리고당으로 대체하게 되면 조직감이 설탕첨가양갱과 비슷하면서도 열량을 낮춘 양갱제조가 가능한 것으로 보고된 바 있다(7).

- 구강건강이 악화되고 치아 손실이 큰 고령자들을 위한 저작능력에 맞는 물성을 가진 식품 제조에는 식품에 적당한 경도와 점도를 부여하는 겔화제의 선택과 첨가 농도가 중요하다. 식품개발에 사용되는 겔화제는 그 종류와 특징이 매우 다양한데, carrageenan은 증점제와 겔화제로서 식품 산업에 널리 사용되고 있으며, gellan은 한천(agar)과 유사한 텍스처를 가져 최근 고령자용 겔화제로 주목 받고 있다(8). Locust bean gum (LBG)은 결착제, 안정제, 팽윤제 등으로 식품가공 분야에서 다양하게 사용되는 검으로 자체로는 겔을 형성하지 않으나 carrageenan(9), xanthan(10) 등과 함께 겔을 형성하는 것으로 보고되었다. Glucomannan은 중성 다당류의 겔화제로 carrageenan, xanthan, gellan 등의 검류들과 혼합 사용할 경우 강하고 열에 가역적인 겔을 형성한다(11). Xanthan 또한 다른 검류와 마찬가지로 식품 산업에서 매우 효율적인 안정제로 사용되고 있는데, 단독으로 사용하는 경우보다 glucomannan 또는 carrageenan과 일정 비율로 혼합할 경우 강력한 겔을 형성하게 된다(12,13). 이러한 겔화제는 단독으로 사용할 경우 종종 응집성이나 결합력이 약하고 외관이 바람직하지 못하며 이수현상이 높고, 안정성이 좋지 못한 단점을 나타내나, 혼합하여 사용할 경우 이러한 단점을 극복하고 바람직한 특성을 나타내는 경우가 많다(14).
- 본 연구는 기존의 양갱 제조에 사용되었던 한천 대신 다양한 종류의 검류를 적절히 혼합하여 다양한 물성을 갖는 양갱을 제조하고 건강기능성이 이미 알려진 β -glucan을 혼화 적절한 물성을 갖는 양갱의 품질 특성을 알아보았다. 이는 앞으로 고령자들을 위한 다양한 물성단계를 갖는 식품제조에 필요한 겔화제의 선택 과 기능성 양갱을 제조하는데 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

가. 양갱의 제조용 실험 재료

- 양갱제조를 위한 저당팥앙금(Daedoo Foods, Co., Ltd., Seoul, Korea)과 올리고당(CJ CheilJedang, Seoul, Korea)은 광주시중 마켓에서 구입하였다. 분말형태의 한천, κ -carrageenan은 (주)엠에스씨(MSC, Yangsan, Kyungnam, Korea)에서 구입하였으며, xanthan (Keltrol), glucomannan (Baoji Konjac Chemical)은 (주)주피터인터내셔널(Jupiter Interantional, Co., Ltd., Seoul, Kore)에서, 그리고 β -glucan은 (주)선일바이오(Sunil Bio. Gangjin, Chonnam, Korea)에서 기증받은 것을 사용하였다. 또한 단백질을 풍부하게 하는 양갱개발을 위하여 젤라틴(Gelita AG, , Minden, Germany)을 제원인터내쇼날을 통하여 구입 사용하였다.

나. 양갱의 제조

- 시중에 판매되는 양갱의 조합비를 바탕으로 양갱을 제조하였으며 건강한 양갱을 제조하고자 강한 단맛의 앙금의 양을 조정하였다. 또한 제품화된 시판양갱의 조직감 특성을 분석하고 이를 바탕으로, 본 실험을 위한 겔화제의 종류와 첨가수준을 표 47과 같이 사용하였다. 양갱 제조를 위해 90°C 의 물에 겔화제를 조금씩 넣어주면서 충분히 분산시킨 후, 여기에 분량의 앙금을 넣고 20분간 약한 불에서 끓이면서 계속 저어 주었다. 이 후, 총 앙금량의 10%에 해당하는 양의 올리고당을 넣고 10분간 더 저어준 후, 완성된 양갱을 원형 틀에 넣고 실온에서 1시간 동안 굳힌 후 측정 시료로 사용하였다.

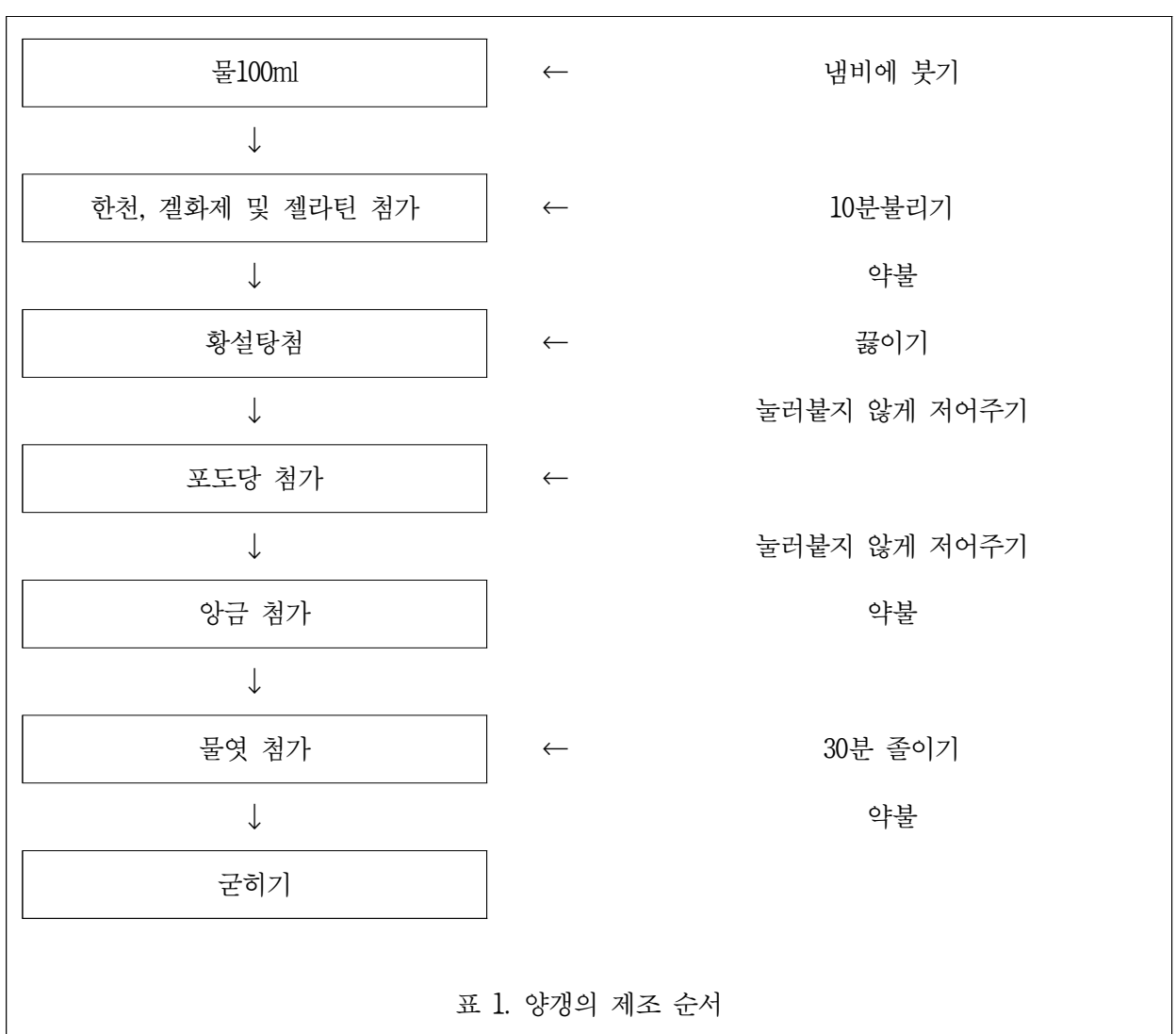
표 47. 겔화제를 첨가한 양갱의 제조.

		A ¹⁾	B	C	D	E	F	G
	Gel 1	3	2.5	2.8	2.6	2.6	2.6	2.6
Gel(%)	Gel 3	-	0.5	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2
	Gel 4	-	-	-	-	0.2	0.2	0.2

1) A: 한천 3%, B:한천 2.5%+ β -glucan 0.5%, C: 한천 2.8%+ β -glucan 0.2%, D:한천 2.6%+gelatin 0.4%, E:한천 2.6%+gellan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%, F:한천 2.6%+xanthan 0.2%+glucomannan 0.2%, G:한천 2.6%+glucomannan 0.2%+ κ

2) -carrageenan 0.2%,

¹⁾Concentration of gelling agents (w/w)



다. 일반물성의 확인 : 수분함량, pH, 산도 및 당도, 색도, 조직감

(1) 실험 방법

(가) 수분 손실량, pH 및 당도 측정

- Gel의 수분 손실량은 Verbeken 등(15)의 방법을 참고하여 제조된 2.5 g의 양갱을 응고 완료 직후 종이 타올에 감싼 후 30분이 지난 다음의 무게의 차이 값으로 나타내었다. 당도와 pH는 양갱과 증류수를 1:1로 균질기(IKA T 25 digital ULTRA-TURRAX, IKA Ltd., Staufen, Germany)를 사용하여 균질화한 후 당도계(Atago Pocket Refractometer Pal-1, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)와 pH meter (SevenEasy 520, Mettler-Toledo Ltd., Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였다.

(나) 색도 측정

- 양갱의 색도측정은 색차계(CR-300, Minolta Co, Osaka, Japan)을 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)값으로 표시하였다. 각 시료당 3회 반복 측정하여 그 평균값을 나타내었다.

(다) 조직감 측정

- 제조한 양갱의 조직감은 P/50R cylinder probe를 이용하여 Texture analyzer (TX-XT2, Stable Micro System, Haslemere, Surrey, UK)로 측정하였다. 시료의 크기는 가로, 세로, 높이 각각 12 mm 의 정육면체형태로 준비하였고, pre-test speed와 test speed, posttest speed는 2.0 mm/s, distance는 10.0 mm, trigger force는 5.0 g, compression mode로 측정하였다.

(2) 실험 결과

- 양갱의 수분 손실량, 당도, pH결과는 표 48에 제시되었다. 겔 형성에 관여하지 않고 남아있던 여분의 물은 gel 형성 이후 겔상의 matrix로부터 표면으로 방출되면서 흘러나오게 되는데, 이러한 현상은 겔에서 흔히 일어나는 현상으로, 겔강도(gel strength)가 낮으면 수분손실은 증가한다. 이는 결과적으로 겔을 축소시켜 질감의 변화를 야기할 수 있으므로 식품에서 바람직하지 않은 현상이다. 본 실험에서 gellan과 한천을 혼합하여 만든 양갱은 5.36% 정도의 가장 큰 수분손실을 보였으며, 다른 양갱들은 대조군과 유의적 차이가 없었다. 또한 β -glucan을 첨가한 군에서도 낮은 수분손실량을 보여 수분을 캡처하는 능력이 비슷한 것으로 보였고 제조과정에서도 β -glucan을 첨가한 그룹에서 농도와 비례하게 관계없이 점질성이 느껴졌다. Banerjee와 Bhattacharya(2011)의 연구결과도 0.5%의 gellan으로 제조한 겔은 10%에 가까운 수분 손실을 보인다고 하여 본 연구와 유사하였다.
- 두 가지나 이 이상의 겔을 혼합 하여 제조한 양갱에서는 겔들의 상호 보완작용으로 수분이 적게 달아나는 것으로 볼 수 있으며, 이는 carrageenan 겔의 경우 단독 사용 시 깨지지 쉽고 수분손실이 크지만 locust bean gum와 섞어 겔을 만들 경우 탄력이 증가하면서 수분 손실이 줄어든다고 보고한 Stanley(17)의 연구결과 와도 일치하는 것으로 볼 수 있다. Mao R et al(2001)에 따르면 Gellan은 음이온성 고분자전해질로서 첨가하는 양이온의 농도에 따라 부드럽고 탄력이 있거나 혹은 깨지지 쉬운 겔의 특성을 갖기 때문이라고 설명하고 있으며, gellan 겔의 특성을 보완하기 위해서는 음이온성 에 상대되는 양이온의 첨가량을 조절함으로써 물성을 보완이 가능할 것으로 보인다.

표 48. 겔화제와 β -glucan, gelatin의 차이에 따른 수분손실량, 당도, pH

	Water loss(%)	Sweetness(Brix)	pH
A	2.34 ^b	36.67 ^b	6.22
B	1.08 ^b	42.34 ^a	6.18
C	1.35 ^b	41.35 ^{ab}	6.07
D	1.36 ^b	39.44 ^{ab}	6.16
E	5.78 ^a	38.76 ^b	6.09
F	1.86 ^b	39.57 ^b	6.18
G	2.33 ^b	38.42 ^b	6.15

A: 한천 3%, B:한천 2.5%+ β -glucan 0.5%, C: 한천 2.8%+ β -glucan 0.2%, D:한천 2.6%+gelatin 0.4%,
 E:한천 2.6%+gellan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%, F:한천 2.6%+xanthan 0.2%+glucomannan 0.2%,
 G:한천 2.6%+glucomannan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%,

¹⁾Concentration of gelling agents (w/w)

- 겔화제의 종류에 따른 양갱의 pH는 시료간 유의적 차이는 보이지 않았다. Kim과 Lee(2009)는 agar, starch, gelatin을 각기 사용하여 gel을 제조하고, 그 pH를 측정한 결과에서도 겔화제의 종류에 따른 pH의 차이는 없음을 보고한 바 있다. 한편, Yamamoto F et al(2007)에 따르면, 한천이나 carrageenan과 같은 겔화제는 낮은 pH에서 겔을 형성하는 능력이 감소된다고 보고되고 있다. 그러나 본 연구에서 양갱의 pH는 6.00-6.22 사이의 값을 나타내며 겔 형성에 영향을 미치지 않은 것으로 보여져 서로가 배치되는 부분이 있어 본 겔화 형성에서 혼합하여 생성한 차이가 발현된 것으로 생각되어 진다. 또한 carrageenan과 glucomannan의 혼합도 이 pH의 범위에서 겔을 잘형성하는 것으로 알려져 있다(Williams PA(1993)). 당도는 β -glucan을 첨가한 그룹에서 가장 높은 값을 보였고, agar로 만든 대조군이 가장 낮은 값을 보였다. β -glucan이 첨가한 군에서는 당도가 유의하게 증가하였는데 이는 용해성인 β -glucan이 당도측정에 영향으로 미친 것으로 보여 진다.

(가) 겔 및 겔첨가 양갱의 색 특성

- 사용한 겔과 겔을 첨가해 만든 양갱의 색을 각각 측정한 결과는 표 49에 제시되었다.

- 겔 자체의 색을 측정할 결과 gellan첨가 겔과 gelatin 을 첨가한 겔이 가장 큰 백색도를 보였으며 xanthan, glucomannan과 glucomannan, κ -carrageenan은 유의성이 보이지 않았고, agar를 첨가한 대조군이 가장 낮은 백도를 보였다. 반면 붉은 정도를 나타내는 a값과 황색 정도를 나타내는 b값은 gellan겔이 가장 낮은 값을 보였다. 겔 자체가 위와 같은 색의 차이를 갖기 때문에 각각의 겔을 첨가하여 제조한 양갱의 색의 차이는 겔자체의 색도와 유사한 경향을 보였다. 양갱의 색이 짙어 육안으로는 각 양갱의 색을 구별하기 어려우나, 기계적 측정결과는 겔화제를 첨가한 식품의 색은 첨가된 겔 자체의 색 특성을 반영하는 것으로 나타났다.

표 49. 겔화제를 첨가한 양갱과 겔화제 자체의 색 특성

	Gel ¹⁾			양갱 ²⁾		
	L	a	b	L	a	b
A	45.83 ^c	1.98 ^b	2.85 ^b	25.18 ^a	7.13 ^b	4.32 ^{ab}
B	56.97 ^b	1.76 ^b	2.73 ^b	27.11 ^a	5.36 ^a	2.15 ^c
C	49.24 ^{bc}	1.96 ^b	2.76 ^b	26.87 ^a	6.15 ^{ab}	2.31 ^c
D	75.32 ^a	0.85 ^b	1.23 ^a	28.37 ^a	6.23 ^{ab}	4.98 ^a
E	76.48 ^a	0.65 ^a	3.56 ^{bc}	26.48 ^a	7.84 ^b	5.26 ^a
F	69.52 ^a	1.20 ^b	2.98 ^b	25.62 ^a	7.56 ^b	5.43 ^a
G	68.31 ^a	0.68 ^a	2.64 ^b	26.42 ^a	7.42 ^b	5.29 ^a

¹⁾겔형성 본체만 A: 한천 3%, B:한천 2.5%+ β -glucan 0.5%, C: 한천 2.8%+ β -glucan 0.2%, D:한천2.6%+gelatin 0.4%, E:한천 2.6%+gellan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%, F:한천 2.6%+xanthan 0.2%+glucomannan 0.2%, G:한천 2.6%+glucomannan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%, Concentration of gelling agents (w/w) Different letters (a, b, c) within a column are significantly different (p<0.05)

(나) 겔 첨가 양갱의 조직감 특성

- 다양한 종류의 겔화제를 이용하여 제조한 양갱의 조직감 측정결과는 표 50과 같다. 다양한 겔화제와 더불어 β -glucan 그리고 gelatin을 첨가한 군까지 총 3단계의 경도를 보였다. 한천에 gellan과 carrageenan 첨가양갱이 가장 경도가 높았으며, β -glucan을 첨가한 그룹이 β -glucan의 양에 따라 무른 것을 알수가 있었고, gelatin 에서도 유사한 낮은 경도를 보였다. Carrageenan의 경우, 강하면서도 깨지기 쉬우며 수분손실이 커서 겔의 부피가 축소되는 현상을 보완하기 위해 다른 겔과 혼합하여 사용하는 것이 일반적이다 라고 소개하고 있다(Stanley NF

(1990)).

- Hernández MJ et al(2001)에 따르면, locust bean gum와 혼합 사용하게 되면 탄성과 경도가 증가되면서 응집성이 증가하는 것으로 보고되고 있다. Murayama et al(1995)은 locust bean gum와 carrageenan을 동량 혼합하여 1% 이상으로 첨가하면 매우 단단하면서도 탄성이 큰 겔을 만들 수 있으며 두 겔의 상호작용으로 이수현상도 감소한다고 보고한 바 있다. 본 자료에서는 소개하고 있지 않지만 gellan 만을 겔형성시 매우 탄력적인 겔형성능을 보여 locust bean gum와 carrageenan을 사용한 겔형성과 유사성을 보였다. 본 연구에서도 gellan과 carrageenan을 혼합한 경우는 대조군보다 단단하면서 응집성과 씹힘성이 큰 양갱을 제조할 수 있었다.
- 한편 xanthan과 glucomannan을 사용할 경우 경도가 대조군의 약 1/2 정도로 매우 부드러운 양갱제조가 가능하였으며 이는 매우 쉽게 물러지는 특성을 보였다. 또한 경도와 응집성은 낮지만 탄력이 있는 특성을 갖는 것으로 평가되었다. Glucomannan을 첨가한 양갱의 경우 carrageenan 보다는 xanthan과 혼합했을 때 응집성, 씹힘성이 더 높은 것으로 측정되었다.

표 50. 겔화제를 달리한 양갱에서의 물성변화.

	Hardness(g)	Adhesiveness (g · s)	Springiness	Cohesiveness	Chewiness
A	658.39 ^b	38.42 ^b	0.68 ^c	0.31 ^b	122.54 ^c
B	538.56 ^{bc}	46.84 ^a	1.59 ^b	0.38 ^{ab}	153.47 ^b
C	483.24 ^c	43.21 ^a	1.33 ^b	0.31 ^b	148.22 ^{bc}
D	498.35 ^c	23.54 ^c	2.34 ^a	0.34 ^b	198.36 ^a
E	841.23 ^a	26.85 ^c	0.63 ^c	0.42 ^a	163.41 ^{ab}
F	567.29 ^b	27.43 ^c	0.84 ^c	0.31 ^b	126.54 ^c
G	586.37 ^b	26.19 ^c	0.62 ^c	0.32 ^b	145.43 ^{bc}

A: 한천 3%, B:한천 2.5%+ β -glucan 0.5%, C: 한천 2.8%+ β -glucan 0.2%, D:한천 2.6%+gelatin 0.4%,
 E:한천 2.6%+gellan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%, F:한천 2.6%+xanthan 0.2%+glucomannan 0.2%,
 G:한천 2.6%+glucomannan 0.2%+ κ -carrageenan 0.2%,

¹⁾Concentration of gelling agents (w/w)

- Glucomannan과 carrageenan 혼합양갱은 경도와 응집성이 낮은 부드러운 겔 특성을 보였다. 두 겔의 동량혼합은 carrageenan 분자들만이 형성하는 것보다 약한 junction zone을 형성하여 더 부드러운 겔형성이 가능하다는 결과가 보고된 바 있다(Kohyama K et al(1993), Murayama A et al(1995)). 본 연구에서 한천과 glucomannan과 carrageenan을 혼합 첨가한 양갱은 평가 시료 중 한천, glucomannan과 xanthan을 혼합한 양갱과 유사한 특성을 보였으나 응집성이 매우 낮은 것으로 평가되었다.
- 한편 Teshima T. A(2005)에 따르면, 고령자용 식품 제조에서 특히 주의할 것은 부착성이다 하였다. 입에 달라붙는 점착성성이 크면 식도에 넘어가는 도중에 머물름현상이 커서 기도를 차단할 가능성이 있어 질식상태를 유발할 수 있기 때문이다. 매우 조심해야 할 사항으로 소개하였다. 본 연구에서 경도가 가장 낮은 gellan 첨가양갱의 부착성이 가장 컸으며 glucomannan과 carrageenan을 혼합 첨가한 양갱 값이 가장 낮았다($p < 0.05$). 그 외 시료는 유의적 차이를 보이지 않았다. 이상과 같이 겔화제를 혼합 사용할 경우, 상호보완 효과를 내면서 다양한 물성을 갖는 겔이 형성되며 이러한 겔을 식품에 첨가할 경우 다양한 조직감 특성을 갖는 식품의 제조가 가능한 것으로 보여진다.

라. 관능검사를 통한 기호도의 보정

(1) 실험 방법

- 제조한 양갱을 최종제품에서는 노인을 대상으로 실시하여야 하나 본 실험 단계에서는 대학생 대상으로 모사실험을 하였다. 제공된 양갱의 전반적인 기호도, 단단함, 씹힘성, 질감성, 점착성 등에 대한 관능검사를 실시하였다. 기호도는 매우 싫다(1점)에서 매우 좋다(9점)까지로 측정하여 각 9점 척도법으로 평가하였다.

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균으로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package (Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

(2) 실험 결과

(가) 1차 대학생 대상 양갱의 관능적 특성

- 학생 30명을 대상으로 양갱시료의 관능검사를 측정한 결과는 Fig. 87에 나타나 있다. 전반적인 기호도는 한천에 β -glucan을 0.2% 넣은 그룹에서 기호도가 높게 나왔고, 이외의 씹힘성, 질감성 등이 우수하다는 평가를 하였다. 또한 젤라틴을 함유한 겔에서도 높은 전체적 기호도와 점

착, 질감, 경도 등에서 우수한 평가를 하여 향후 개발시 단백질원을 보강가능성이 있을 것으로 판단된다. 그러나 다른 여타의 겔 혼화제의 경우 기호도에서는 그리 높은 평가를 받지 못한 것으로 나타났다. 노인형 양갱을 개발을 목표로 하여 노인그룹의 평가에 앞서 젊은 층을 대상으로 평가가 이뤄져 적절하지 않은 평가가 분명히 존재하리라고 생각되며 추가적인 기호도 조사를 통하여 보완하고자 한다.

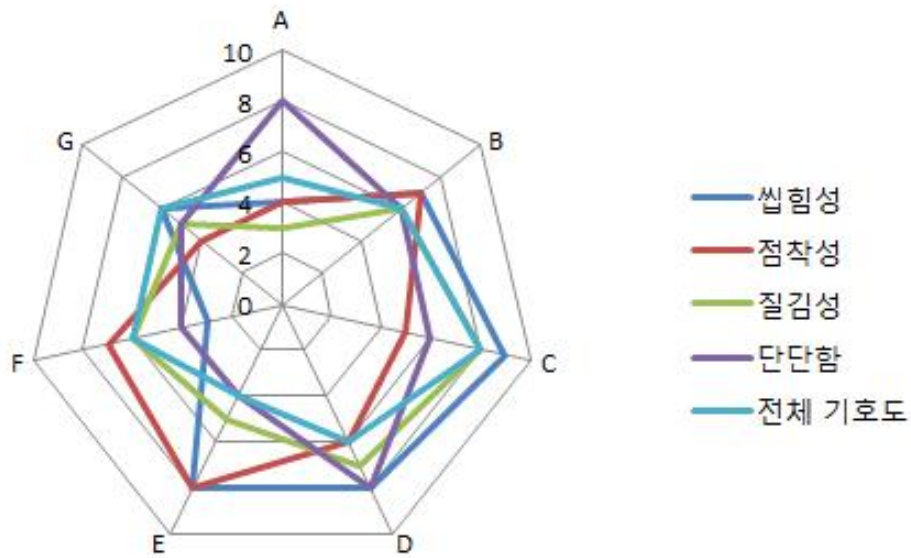


그림 87. 다양한 겔화제에 따른 양갱의 기호도 측정

3. 국내 실버세대의 개호식 음료에 대한 조사

가. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 점질형 음료 개발

(1) 실험 방법

(가) 실험 재료의 선정

- β -glucan을 포함하는 음료를 개발하는데 사용된 β 1,3/1,6-glucan은 (주)선일바이오(Sunil Bio. Gangjin, Chonnam, Korea)에서 기증받은 것을 사용하였고, 이소말토올라고당(CJ CheilJedang, Seoul, Korea)은 광주시중 마켓에서 구입하였다. 판젤라틴(Gelita AG, Minden, Germany), xanthan(Keltrol), 구아검(대명케미칼, 서울, 대한민국(공급자), κ -carrageenan은 (주)엠에스씨(MSC, Yangsan, Kyungnam, Korea)에서 구입하였으며, 이외의 재료에 대하여 지역마켓을 통해 설탕, 사과주스, 식혜 등을 통하여 구입 사용하였다.

(나) 음료의 제조를 위한 예비실험

- 노인 섭취가 가능한 점질형 음료를 제조하기 위하여 예비로 β 1,3/1,6-glucan과 어울리는 proto-type 음료조성물을 선정하였다. 노인형 음료를 목표로 하기 때문에 노인층에서 좋아하는 소재를 중심으로 첨가하는 β 1,3/1,6-glucan과의 혼화시 맛, 향, 기호도, 물성을 중심인 관능 평가하여 선정하였다. 음료는 크게 2가지의 점도로 구성되는데 일본의 유니버설 디자인 푸드의 구성표(11)에 따라 1,500 mPa·s로 구성되는 3, 4단계의 졸형 음료와 200-400 mPa·s를 이루는 저 점도의 졸형 음료로 구성되었다.
- 기본조성물을 선정하는데 첨가되는 물질로는 상용화된 제품과의 기호성이 떨어지지 않는 조건을 탐색하였으며 여기에는 식혜, 수정과, 주스(포도, 자몽, 오렌지, 사과), 이온음료(포카리스웨트)분말, 탄산수(스파클링), 럼주(40°)를 기호도와 물성을 평가하였다. 제일의 목표점은 기호성을 중심에 두고서 변화를 이끌어 최적의 조합을 선정하려 하였고 이에 대한 기호도 평가와 물성평가를 실시하였다.

(다) 제조된 음료의 물성측정

- 예비시험에서 선발된 시료의 중심조합으로 다시 물성과 기초특성을 확인하였다. 물성의 확인으

로는 당도는 당도계(Atago, Japan)을 이용하였고, pH는 pH meter(Thermo Orion, model 410, USA) 및 산도는 음료용액을 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH용액의 소비량을 acetic acid로 환산하여 측정하였다.

$$\text{Acidity(\%)} = 0.1\text{N NaOH 소비량(ml)} \times 0.6 / \text{시료채취량(ml)}$$

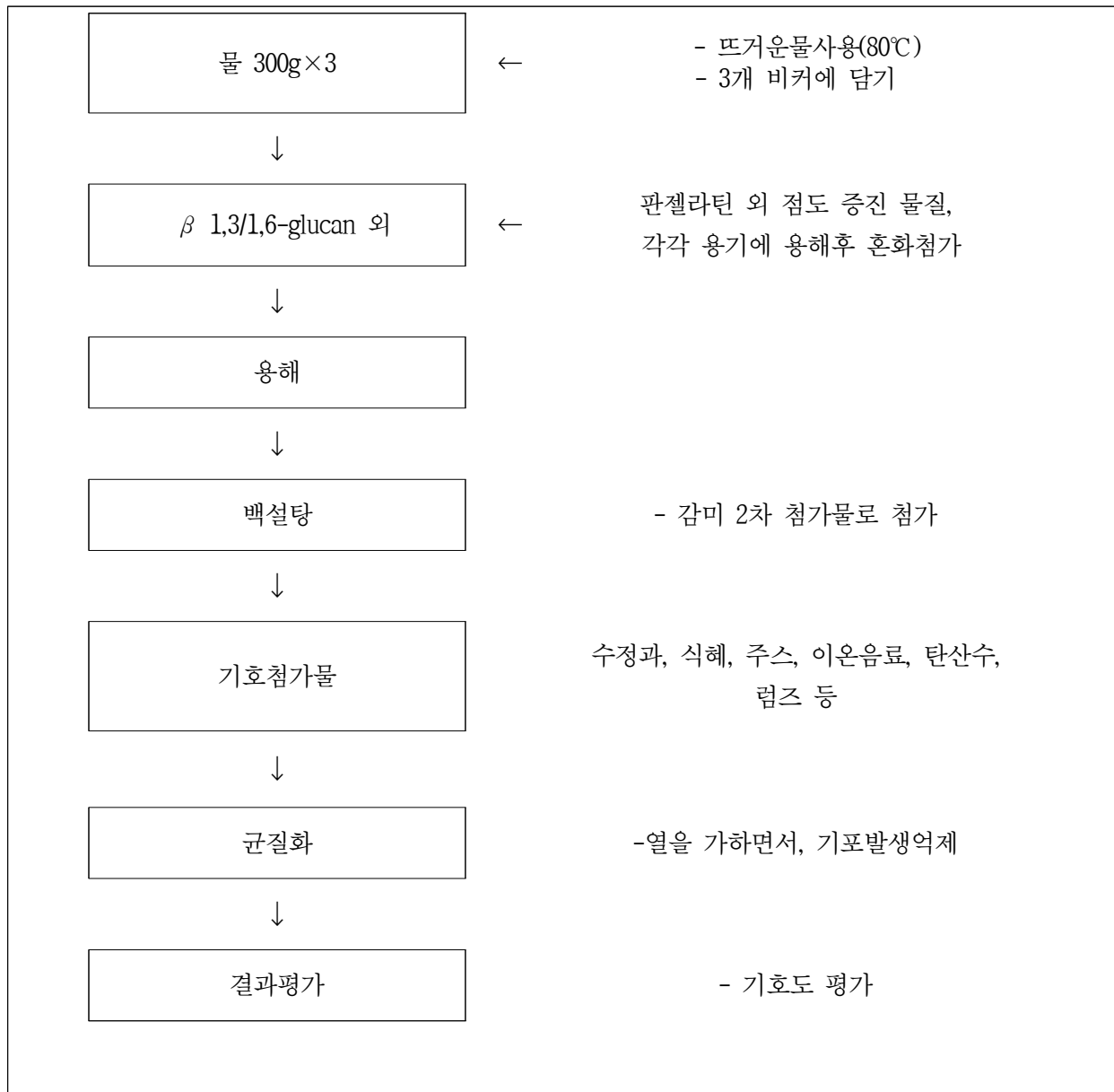


그림 1. 졸형 음료의 제조 순서

표 51. β 1,3/1,6-glucon을 첨가한 저점도 음료의 조합비

	저점도(g)								
	A ¹⁾	B	C	D	E	F	G	H	I
정제수	200	350	100	400	700	400	-	700	1,400
β 1,3/1,6-glucon	1	7	2	0.8	1.4	1.6	0.8	1.4	2.8
수정과	300	300	300	300	300	-	-	-	-
식혜	200	100	300	300	300	-	-	-	-
에탄올	-	-		40	40	40	20	20	-
미숫가루	-	-	-	-	180	60	30	-	-
뉴케어	-	-	-	-	200 ml	-	-	-	-
우유						400	400	-	-
오렌지주스	-	-	-	-	-	-	-	1,200	300
사과주스	-	-	-	-	-	-	-	-	300
포도주스	-		-	-	-	-	-	-	300
자몽주스	-	-	-	-	-	-	-	-	300
파래분말	-	-	-	-	-	-	-	-	-
이온음료분말 (포카리스웨트)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
럼주	-	-	-	-	-	-	-	-	-
백설탕	-	-	-	-	-	-	-	-	-
이소말토올리고당	-	-	-	-	60	30	15	-	-

3) A: 모든시료에 사용된 정제수는 정수기를 통해 제공된 물을 사용함.

표 52. β 1,3/1,6-glucan을 첨가한 고점도 음료의 조합비

	고점도(g)										
	A ^D	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
정제수	700	450	450	450	300	600	600	150	300	600	900
β 1,3/1,6-glucan	0.7	0.9	0.9	0.9	0.6	1.2	0.3	0.3	-	-	-
잔탄검	0.7	1.8	1.8	1.8	0.225	0.225	-	-	-	-	-
구아검	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-
젤라틴분말	-	-	-	-	-	0.225	5.6	0.3	20	16	18
로커스트빈 검	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
카라기난	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
수정과	300	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
이온음료분말 (포카리스웨트)	-	-	-	30	18	36	36	9	27	54	81
럼주	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	15
백설탕	-	-	-	-	-	-	-	-	40	40	30
이소말토올리고 당	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(라) 음료의 점도의 측정

- 두 종류의 음료를 개발하는데 점도의 차이를 가지고 만들고자 하여 최종적으로 점도를 확인하였다. 점도측정은 Brookfield 점도계(DV2T model D220, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

(마) 관능검사

- 제조한 음료에 대하여 2종류의 점도를 유지하도록 제조하였으므로 각각에 대하여 관능검사를 실시하였고 실제의 관능검사는 외부기관에 의뢰를 하기로 하였는데 남부대학교 식품영양학과 학생과 향장미용학과학생을 대상으로 panel을 구성하였고 모사실험을 하였다. 제공된 음료의 전반적인 기호도(overall acceptability), 질감(Texture), 색(color), 향(flavor), 맛(taste)의 5가지를 대상으로 특성을 조사하였고 평가척도는 9점 척도법으로 매우 싫다(1점)에서, 5점- 매우 좋아하기도 싫어하지도 않는다. 매우 좋다(9점)까지로 측정하여 기호도에 대하여 평가하였다. 최종의 기호도 평가는 제조와 공정이 확정된 시료에 대하여 외부기관에 의뢰하여 기호도 조사를 하고 상용화 가능성에 대한 평가를 받고자 하며, 과제의 마무리 단계에서 실시될 예정이다.

(바) 통계처리

- 모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균으로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS software package (Version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 각 처리군 간의 유의성에대한 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

(2) 실험 결과

(가) β 1,3/1,6-glucan의 용해도 시험

- β 1,3/1,6-glucan을 음료에 첨가하여 면역활성에 대한 건강기능성을 향상시키고자 음료에 조건으로서 요구되는 용해도를 확인하였다. 증류수에 0.1%에서 1.0%까지 녹이고 용해도를 향상시키기 위해서 80°C의 증류수에도 용해를 시켰으나 최대 표 53에서 보는 바와 같았다. 0.1%의 용액에서는 124.0 ± 10.4 , 0.3%용액에서는 244.7 ± 4.5 , 0.5%용액에서는 622.7 ± 189.2 mPa·s의 점도를 나타내어 비교적 유의하게 농도대비 점도가 상승한 것을 알수가 있었다.
- 그러나 0.5% 이후에는 β 1,3/1,6-glucan이 용해되는데 많은 시간이 소비되고 녹였다 하더라도

용액내에서 완전히 녹지 않은 상태로 잔존하여 있었고, 심지어는 침전되어 점질형성을 나타내기도 하였다. 또한 용액의 탁도가 증가(spectrophotometer 측정 data 미사용) 용해도가 떨어지는 것을 알수가 있었다.

- 건조물로서 제공받은 β 1,3/1,6-glucan의 양으로 생각할 때 부피가 차지하는 비율도 무시할 수 없는 수준이어서 최대 사용가능한 농도를 0.5%로 하여 사용하였고, 실제로는 우리가 본 과제에서 지향하는 점질형 음료로서 개발코자 하는 전형인 유니버설푸드의 4단계에서 3, 4의 기준이 되는 점도에 접근하고 있어 점질형 제품에 대한 기준으로 삼았다. 미국 patent US006143883A에 따르면 포유류의 면역활성에 작용하는 β 1,3/1,6-glucan은 저분자화, 용해성이 있고, 쉽게 흡수 가능성이 있어야 포유류에 면역활성에 기여가 가능하다고 적시(12)하여 이에 대한 용해도가 높은 상태의 β 1,3/1,6-glucan을 이용하는 것이 타당하다고 생각된다.

표 53. 물에 용해된 β 1,3/1,6-glucan의 점도의 변화

Conc.	β 1,3/1,6-glucan content(%)				
	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
점도 (mPa · s)	124. ±10.4	244.7 ±4.5	622.7 ±189.2	740.0 ±71.2	869.7 ±81.8

(나) β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 저점도 음료의 제조

① 노령층 적합조합물의 혼화가능성 확인

- β 1,3/1,6-glucan을 첨가하여 노인 섭취가 가능한 점질형 음료를 제조하기 위하여 예비로 β 1,3/1,6-glucan과 어울리는 proto-type 음료조성물을 선정하였다. 노인형 음료를 목표로 하기 때문에 노인층에서 좋아하는 소재를 중심으로 첨가하는 β 1,3/1,6-glucan과의 혼화시 맛, 향, 기호도, 물성을 중심으로 관능평가하여 선정하였다. 음료는 크게 2가지의 점도로 구성되는데 일본의 유니버설 디자인 푸드의 구성표(11)에 따라 1,500 mPa · s 이하로 구성되는 3, 4단계의 졸형 음료와 200-400 mPa · s를 이루는 저점도의 졸형 음료로 구성되었다.
- 표 53의 조성에서 보는 바와 같이 저점도의 경우 주요 점질구성물질이 β 1,3/1,6-glucan 0.2% 첨가를 중심으로 구성되어졌고, 고점도(1,500 mPa · s)를 이루는 점질형 음료의 경우 β 1,3/1,6-glucan이외에도 잔탄, 구아검, 카라기난, 젤라틴, 로커스트빈 검을 이용하여 점질물질을 구성하였다.

- 표 51에서 저점도를 중심으로 기호도를 높여가는 과정을 살펴보면, A, B, C의 경우 노인층에서 선호하는 풍부한 식혜, 수정과를 첨가하여 β 1,3/1,6-glucan과의 어울리는 형태를 확인하였다. 또한 첨가되는 β 1,3/1,6-glucan의 함량도 조절하여 적합성을 확인하였다. 아래 그림 1. 초기 β 1,3/1,6-glucan의 첨가량이 많아 탁한 상태와 충분한 점질형이 형성하지 못하는 음료로서의 과정을 보였다. 따라서 β 1,3/1,6-glucan의 함량을 0.2%를 중심으로 유지하는 것이 음료로서의 적합성을 확인하였다.

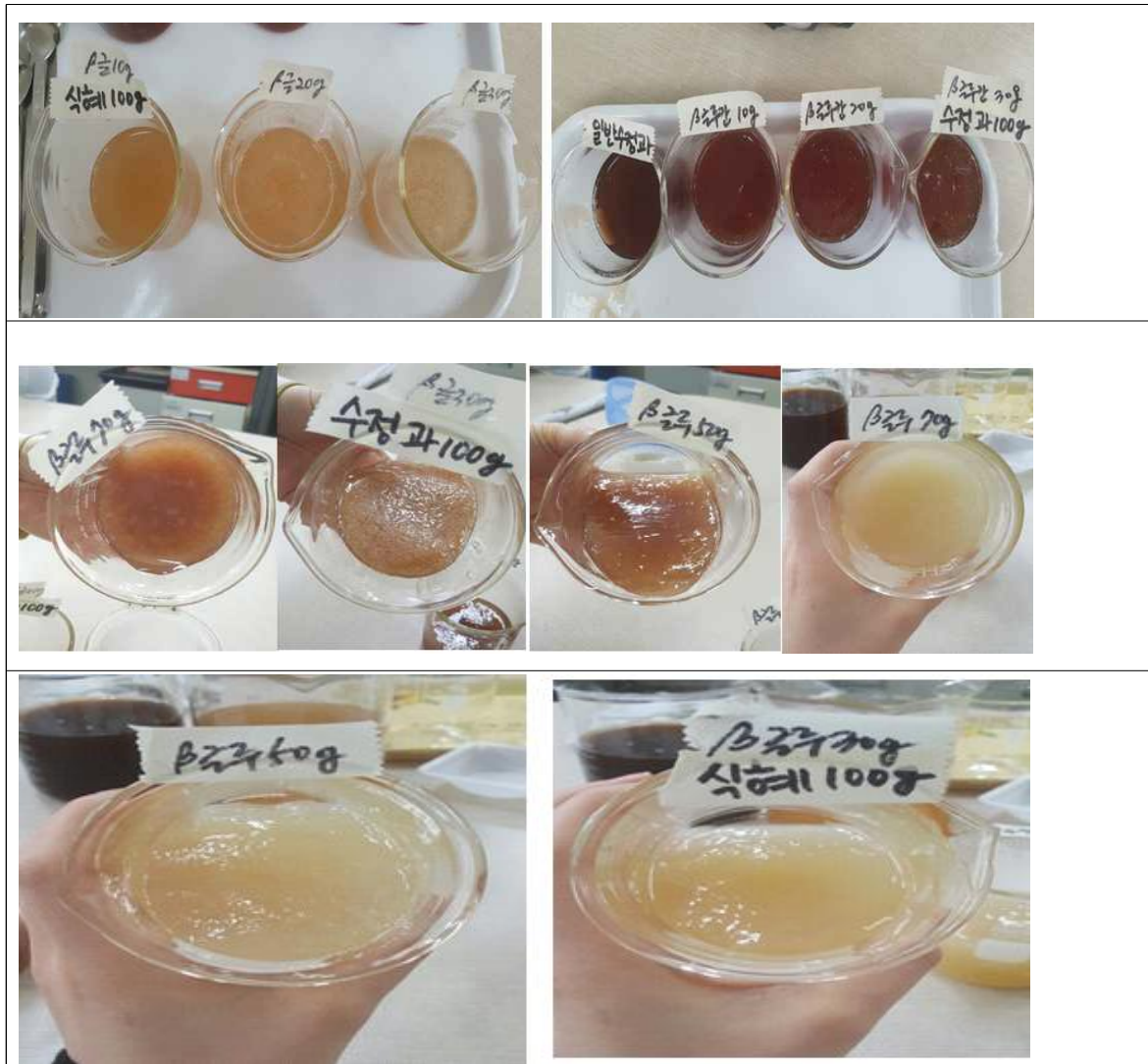


그림 88. 노인 친화형음료로서의 적성확인(식혜, 수정과 첨가)

② β 1,3/1,6-glucan 함량과 첨가물의 혼화 가능성 확인

- β 1,3/1,6-glucan의 농도를 높이는 것은 용해도가 감소하고 점질성이 증가하여 0.2%의 농도를 유지하면서 Table 1에서 D, E, F, G에서는 용해도 증가를 위하여 β 1,3/1,6-glucan을 용해하는

데 초기에 ethanol을 첨가 용해도를 증가시키도록 하였다. 모두 ethanol을 40 g을 첨가하였지만 10, 20 g을 첨가하여 용해시키는 것보다 40 g이 우수하였고(data was not shown) 더욱이 뜨거운 것보다 미지근한 ethanol에서 용해도를 증가시키는 것으로 확인되어 첨가하여 보았다. 한편 D, E, F, G의 시료의 경우 수정과, 식혜, 뉴케어(환자식으로 병원판매형 제품), 우유를 첨가하여 저 점도에 유동성이 있는 형태를 유지하였고, 박형수(14)에 따르면 우리나라보다 앞서 인구절벽과 고령화사회를 겪고 있는 일본에서 개호식품의 형태는 점차 다양화 되고 있지 만, 아직까지 유동 식과 점도조절제가 전체 개호식품 의 약 80%를 차지하고 있고, 최근에는 소프트식, 젤 리식, 무 스식 등이 점점 증가하고 있다(15).

- 예비실험의 결과로 β 1,3/1,6-glucan의 농도는 0.2%에서 큰 점도의 증가와 탁도의 증가 그리고 여타 첨가물질과의 반응들이 보이지 않아 우수한 첨가물질 농도로 확인되었고, 노인형 음료로 서 식혜, 수정과, 뉴케어 같은 물질도 전체적인 기호도가 크게 떨어지지 않아 최종의 확인부분 에서는 첨가하여 확인하기로 하였다.

(다) β 1,3/1,6-glucan과 주스류 첨가물의 혼화 가능성 확인

- β 1,3/1,6-glucan의 농도를 0.2%로 저점도를 유지하면서 이 점도에 노인형과 차별화되어지는 주스류를 첨가하여 저점질형으로 사용가능성을 타진하였다. 사용되어진 주스류로서는 table 1에 서 나타난 오렌지, 포도, 사과, 자몽주스로 유동성은 있으나 토마도와 같이 점질형과는 대별성이 있어 이와 같은 종류를 선택하였다.
- 주스형 음료에 β 1,3/1,6-glucan을 첨가하여 점질성을 강화한 것과는 동일한 내용이다. 기대했 던 주스에 약간의 점질성이 강화되기를 기대했지만 미량의 β 1,3/1,6-glucan으로도 원래의 오렌 지주스보다는 맛과 색이 얼어졌다. 또한 물에서 첨가하였을 때 느껴졌던 β 1,3/1,6-glucan의 점 질성이 각각의 음료에서 비교했을 때 농도차이가 없었고 걸쭉함이 잘 느껴지지 않았다. 이는 우리가 주스류를 일상적으로 접하고 있고 또한 일상에서 알고 있는 결정된 맛이나 향, 질감과 약간의 차이에서도 쉽게 알아낼수 있어 주스류의 경우 고도의 적합성을 맞춰야 하는 문제점을 가지고 있어 주스류에 첨가하여 최적화하는 데에는 문제점을 보이고 있다.
- 이상과 같이 저점도에서의 β 1,3/1,6-glucan을 함유한 음료의 적합한 조합으로는 β 1,3/1,6-glucan이 0.2%를 유지하여 점도를 200 ~ 300 mPa · s를 유지하면서 노령층에 기호도가 높은 첨가물인 식혜, 수정과, 뉴케어 등의 함량 조절로 최적화를 하고자 한다.



그림 89. 노인 친화형음료로서의 적성확인(점도 약화 및 노령 기호물질 첨가)

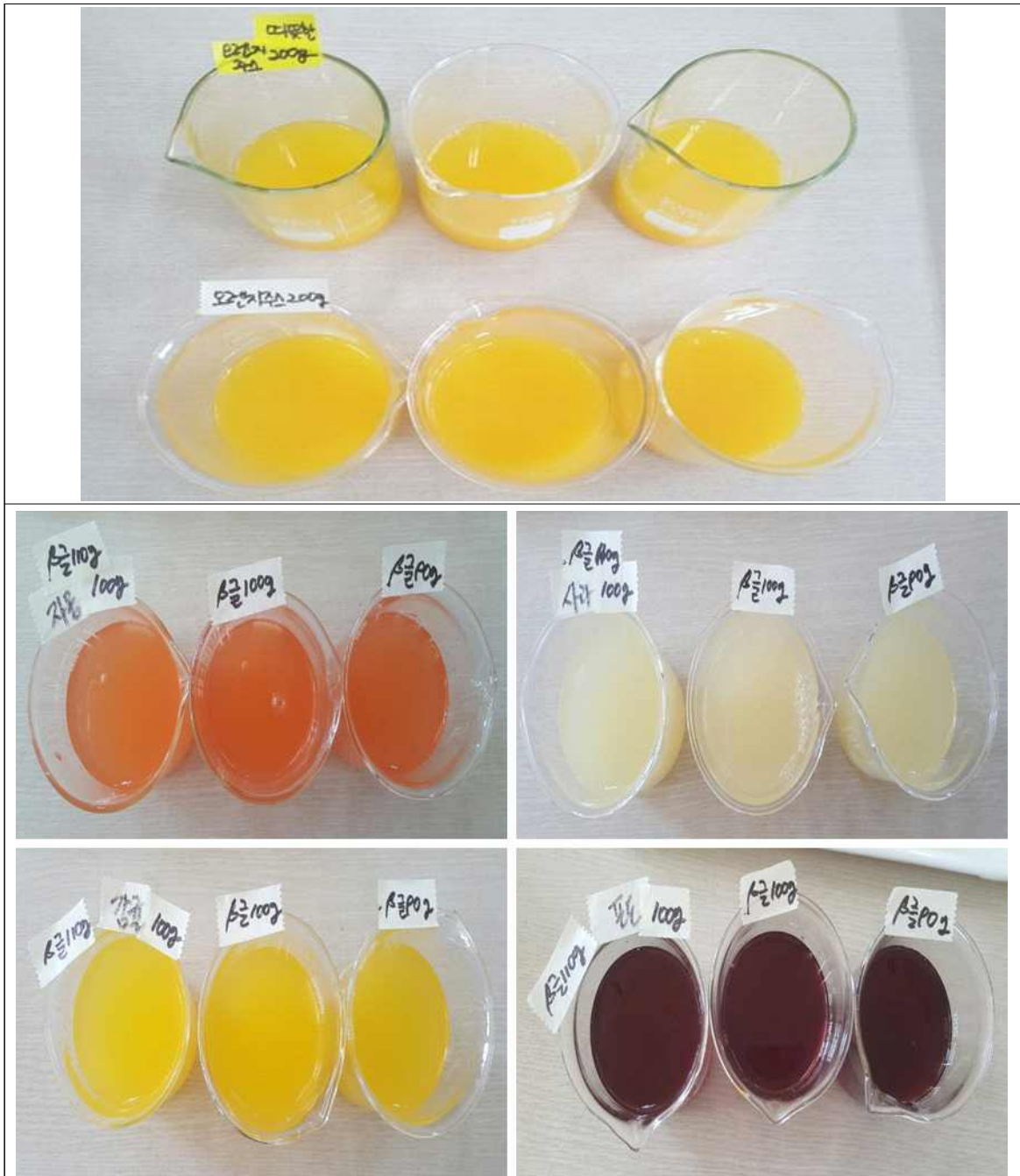


그림 90. 노인 친화형음료로서의 적성확인(주스 물질의 첨가)

(라) β 1,3/1,6-glucan과 주스류 첨가물의 혼화 가능성 확인

① 노령층 적합조합물의 혼화가능성 확인

- 특별용도식품은 질환으로 인해 연하가 곤란한 환자가 튜브식으로 음식을 공급받다가 구강을 통

하여 음식을 섭취할 경우, 초기에 연하훈련이 되지 않아 음식이 기도로 넘어가 위험해 지는 경우를 대비하여 음식을 잘 섭취할 수 있도록 섭취 및 연하 능력에 따라 ‘단계식’ 으로 개발된 식품이다. 연하곤란은 연하피라미드의 0~3단계에 해당된다. 연하식은 Level 0(연하훈련식), Level 1(연하 훈련식), Level 2(연하 훈련식), Level 3(연하식) 그리고 Level 4(개호식)으로 구분된다. 유니버설푸드에서 3, 4단계의 식품은 연하가 곤란하여 식품의 형상을 일부 유지하면서 걸죽한 죽 류형태로 고점도의 식품에서는 비교적 건강하나 가끔 목넘김이나 삼킴에서 어려움이 있는 노령층을 대상으로 음식의 형상을 유지하면서 무른 것으로 제조하여야 한다. 그러나 음료의 경우 친화형 및 건강증진 음료를 개발하고자 유니버설 푸드의 3, 4단계의 기준으로 고점도의 식품 특히 음료를 개발하고자 하였다.

- 앞서 저점도의 유지는 β 1,3/1,6-glucan의 농도를 0.2%를 유지하면서 다양한 기호도 증진 물질을 첨가하여 기호도를 증진시키는데 중점을 두었는데 고점도에서는 β 1,3/1,6-glucan이외에 점성물질을 첨가하여 점성의 적절한 발현, 안정성 그리고 산업화 가능성을 중심으로 음료로서의 적성을 검토하였다

② 노령층 점도보정물의 혼화가능성 확인

- Table 2에서 나타난 바와 같이 A, B, C, D의 경우 잔탄검을 점도 보조제로 첨가하여 점성을 보정하였는데 예비실험에서 잔탄검을 β 1,3/1,6-glucan 대신에 첨가하여 저점도를 형성시켜 봤다. 이때 잔탄검이 β 1,3/1,6-glucan에서 나타났던 당화물질이나 첨가물과의 응어리나 덩어리지는 현상이 매우 적게 발생하여 잔탄을 보정시켰으면 타당성이 있을 것으로 판단된다.
- 아래 그림 4에서 보는 바와 같이 잔탄과 β 1,3/1,6-glucan을 같이 첨가하였더니 점도는 증가하였다. B의 경우 잔탄의 농도를 증가하였던 음료물질의 향과 맛이 감소하는 경향을 보였고 또 점성의 증가가 녹이는 과정에서 거품형성을 일으키면 쉬게 제거되지 않아 새로운 문제점을 야기시켰다. 그러나 고점도를 형성하는데 잔탄검이 β 1,3/1,6-glucan을 상승시키는 효과가 있었다.

(마) 고점도 음료조성물로서 잔탄검 함유물 농도 확인

- 잔탄검의 함량을 0.2%~0.6%까지 농도를 달리하고 β 1,3/1,6-glucan을 0.2%하여 잔탄첨가에 대한 점도변화와 음료로서의 적성을 확인하였으나 0.2%이하에서도 적성을 확인하였는데 (그림 4. 아래) 0.05%~0.1%를 확인하였는데 비교적 낮은 농도에서 더 우수한 점질성 균질성이 나타났고, β 1,3/1,6-glucan과 조화를 잘 이뤘다는 평가를 받고 있다. 이를 근거로 table 2에 표시한 것처럼 이온성 음료를 점질성 음료화 해보고자 첨가하였는데 동일한 첨가물에 이온음료의 맛이 물

혀지는 현상이 확인되었다.

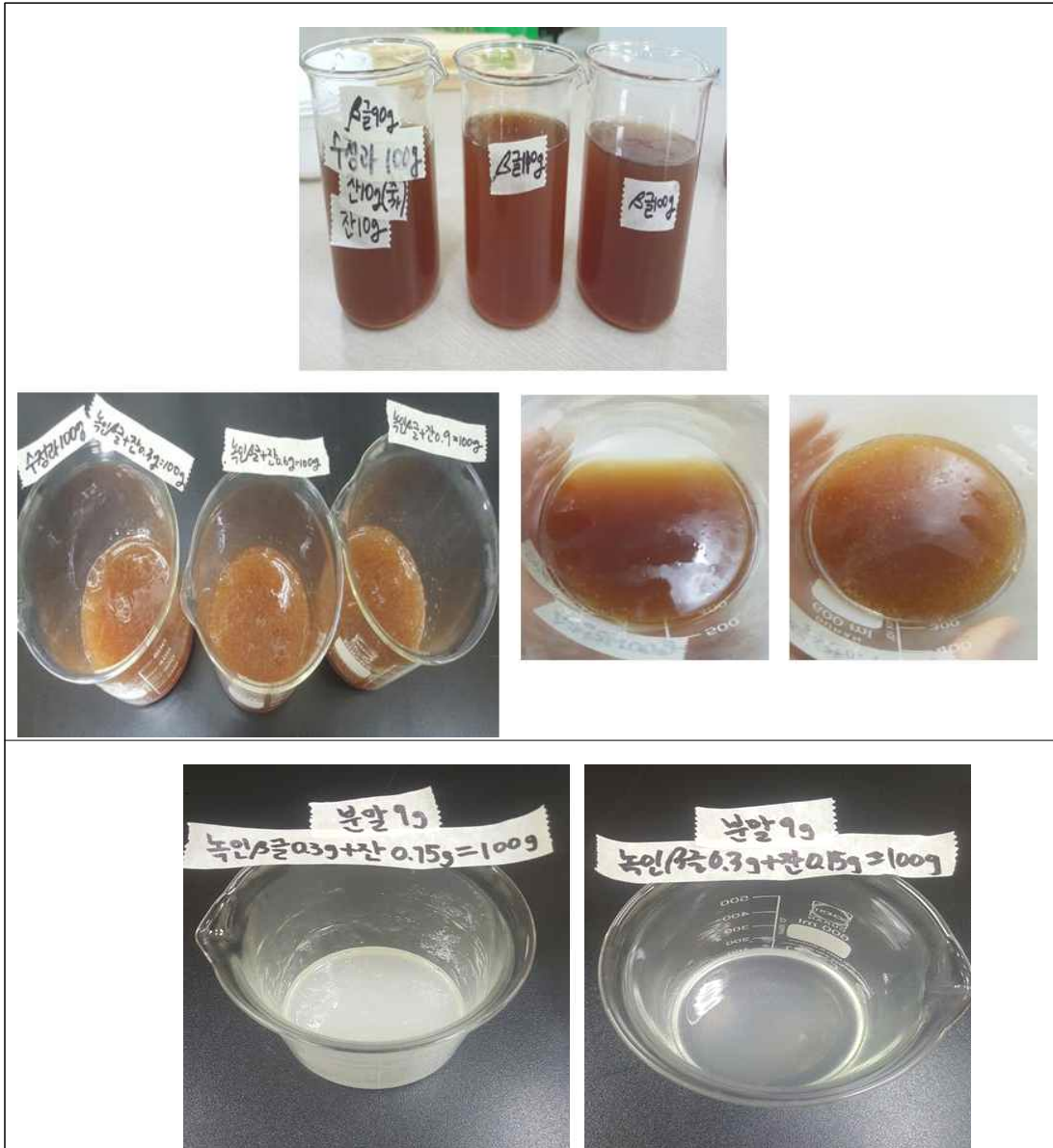


그림 91. β 1,3/1,6-glucan과 잔탄검을 이용한 고점도 음료로서의 적성 확인

- 젤라틴을 β 1,3/1,6-glucan과 함께 사용했을 때 액상으로 보관했을 때와 냉장상태에서 보관했을 때 독특한 겔의 파괴현상이 나타나 또 다른 식품으로 연계가 가능할수 있음을 확인하였다. 각기의 점질물질이 혼화되어 잔탄검이나 구아검같은 물질로 겔을 형성하고 보관상에서 온도의 변화가 겔을 연약하게 파괴가 가능하여 단순한 음료를 포함하는 점질식품이 아니라 반 겔형, 액상의 중간제품화가 가능하리라 평가한다.



그림 92. β 1,3/1,6-galactan과 젤라틴, 구아검(하)으로 고점도 음료로서의 적성 확인

(바) 고점도 음료 조성물에서 적합조합물의 혼화가능성 확인

- 고점도를 발현하는데 β 1,3/1,6-galactan과 잔탄검이외에도 구아검, 카라기난, 로커스트 빈검, 젤라틴을 사용가능한 조성물로서 확인하였다. 이중 냉장후 겔의 파손되어 독특한 물성을 제공할 수 있는 젤라틴에 적합한 기호조성물을 확인하고자 하였다. 아래 그림. 6에 나타난 바와 같이 젤라틴의 경우에서도 젤라틴자체는 물에 용해하기 어려우나 판형의 젤라틴이 쉽게 용해되는 특징을 가지고 있고 여기에는 자체의 분자량과 분말형에서 탈피한 판형의 제형이 용해도에 높은 기여를 하고 있다고 생각되어진다.

- 또한 럽주를 첨가물로 사용한 이유는 저점도 음료제조 초기에 에탄올을 첨가하여 용해를 시도 하였는데 실제로 에탄올 첨가가 β 1,3/1,6-glucan의 용해를 촉진시켜 쉽게 용해가 이뤄졌고, 에탄올은 가온과정에서 사라져 음료에서 느끼지 못하여 용해도 증진에 사용되었다. 럽주의 사용은 이에 기반하지만 럽주자체가 음료의 풍미를 증진시키고 더불어 용해도 상승에 도움이 되고 있어 간이 전체적 기호도에서 높은 선호도를 보였다. 이는 아마도 기호도 증진에 많은 기여를 한 것으로 평가되어진다. 이외에 단맛의 증진을 위하여 점도변화가 크게 작용하는 올리고당 대신에 설탕을 첨가하여 기호도 증진을 용이하게 하였다.

(사) β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 저, 고점도 음료의 물성 변화

- β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 음료의 제조과정중에 당도와 pH의 변화를 확인하였다. 이는 기호도는 높아지지만 음료로서의 물리적 적성에 크게 벗어나지 않는 수준을 가늠하기 위하여 문제점이 물리적 특성에 어떻게 반영되는 지를 확인하기 위해서 였다.
- 아래 표 54에서 보는 바와 같이 겔화제의 첨가는 당도에 영향을 미치는 것을 알수가 있었고 pH의 경우 저점도에서 과즙음료가 첨가된 균을 제외한 시료에서는 탄산과 산성물질이 첨가되지 않아 pH가 5.0 대에 이르고 있어 산성음료로 보기에는 어렵다.
- 이로서 pH가 낮아서 발생하는 치아우식증에는 관련성이 없을 것으로 판단되어지고 당도도 비교적 높은 편이나 흡수되는 당으로 작용하는 저분자 당은 백설탕과 과즙음료에서 첨가되는 물질, 그리고 식혜, 수정과, 미숫가루, 뉴케어(환자식 음료)를 제외한 다당체에서는 작용되지 않아 당과 관련한 GI Index를 높이지는 않을 것으로 판단된다. 또한 산성음료가 아니기 때문에 노령층에 적합한 점도와 삼킴 능력을 부여 할 것으로 생각된다.



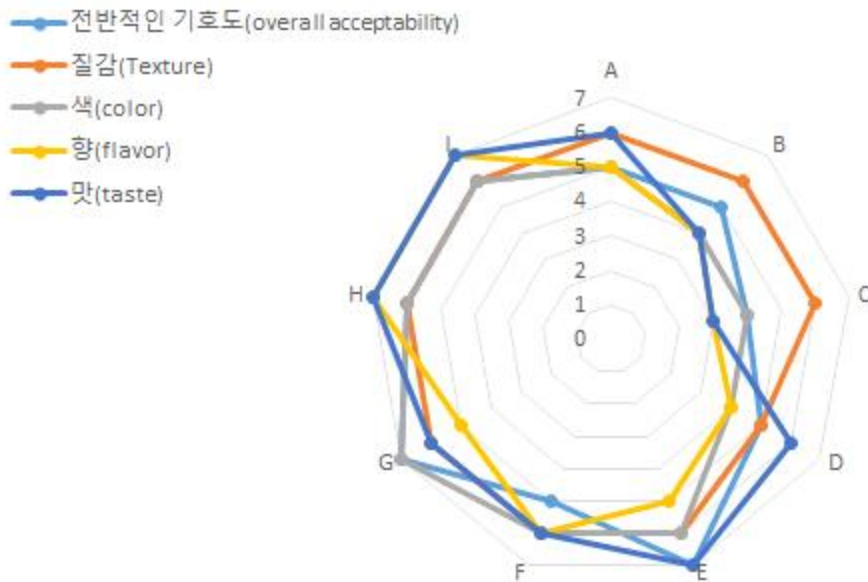
그림. 6. 젤라틴 농도변화와 첨가물의 변화에 따른 음료적성변화

표 54. 겔화제와 β 1,3/1,6-glucan, gelatin의 차이에 따른 당도, pH 의 변화

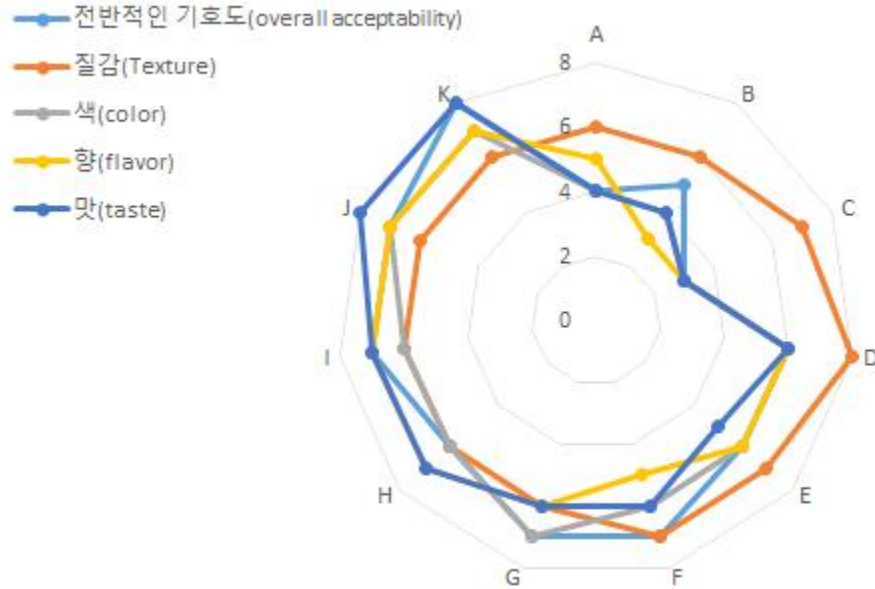
		pH	Sweetness(Brix)
저 점 도	A	5.8	22.1
	B	5.9	19.3
	C	5.9	24.1
	D	5.7	26.7
	E	5.7	35.8
	F	6.4	18.7
	G	5.2	18.2
	H	3.7	22.3
	I	3.2	21.8
고 점 도	A	5.6	16.5
	B	5.8	13.2
	C	7.4	12.0
	D	5.6	11.3
	E	5.8	12.2
	F	5.4	15.4
	G	5.6	20.8
	H	5.8	12.0
	I	5.6	14.8
	J	5.8	16.4
	K	5.2	16.2

(아) 1차 대학생 대상 음료의 관능적 특성

- 학생 15명을 대상으로 저점도와 고점도의 음료시료의 관능검사를 측정된 결과는 아래 그림 7에 나타나 있다. 저 점도 음료의 경우, 주스를 첨가한 측정군에서 전반적인 기호도, 맛, 향, 질감, 색에 대한 선호도가 높았다. 그리고 특히 점질물질을 함유한 군에서도 전체적인 기호를 나타내어 과제의 목표로 하였던 질감에 대한 기호도가 시료의 변화에 따라 지속적으로 상승하고 있어 우수한 점이라 평가할 수 있다.
- 고점도의 경우에서도 마찬가지로 시료의 개선과정이 진행함에 따라 전체적인 기호도가 높아지고 있어 이에 대한 개선으로 볼수 있다. 다만 기호도의 평가자들에게 노약자를 대상으로 하는 음료라는 점을 충분히 고지하고 모사실험을 하여 충분히 인지하였다고 생각하지만 실제의 노약자에게 정확하게 측정하기 위해서는 본 과제물이 완성단계에 있는 시료를 대상으로 실제 노약자 층을 대상으로 측정이 필요하다.



(A) 저점도



(B) 고점도

그림 93. 저점도 고점도 음료의 기호도 측정

4. 실버세대 적합한 영양 구성비의 최적화

가. 균형영양식 과일청의 개발 및 물리적 특성 조사

(1) 연구배경

- 실버세대의 균형건강식을 개발함에 있어 적합한 음료형태로 제공, 균형성을 맞추고자하였고, 전체영양이 아닌 일부의 영양을 채울수 있도록 한정된 균형영양을 목적으로 하였다.

(2) 실험재료 및 방법

- 실험재료는 과일청은 시중에서 판매하는 상아과일청(상아, 고창, 전복)을 사과, 딸기, 복분자 과일청을 대상으로 실험에 사용하였다.

(가) 당도, pH, 산도 그리고 색도의 측정

- 과일청의 당도는 디지털 굴절계(PR-32, Atago, Tokyo, Japan)를 사용하여 oBx를 측정하였고, pH는 pH meter (ISTEK, pH/ISE Meter pH-250L, Seoul, Korea)기를 이용하였으며, 총산도는 0.1 N NaOH로 적정하여 이 때의 소비된 NaOH 함량을 lactic acid (%)로 환산하여 계산하였다. 과일청의 색도는 색차계(Chroma meter, Minolta, CR-300, Japan)를 이용하여 측정하였다. 표준백판(L : 96.18, a : -0.01, b : 1.80)으로 보정한 후 측정하여 L, a, b값을 3회 반복 측정 하였다.

(나) 유기산의 분석

- 유기산분석은 Saidi와 Warthesen의 방법을 변형하여 분석하였다. 각각의 시료 5g을 채취하여 12% TCA 용액을 1 mL 첨가하고 5,000 g에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 상등액을 채취하여 0.2 μ m nylon membrane filter (GD/X, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)를 사용하여 여과한 후 HPLC system을 사용하여 분석하였다. 컬럼은 supelcogel C-610H (30 cm \times 7.8 mm, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고, dual- λ -absorbance detector (Waters Co., Milford, MA, USA)를 사용하여 214 nm에서 측정하였고, 이동상은 0.05 M phosphate acid를 사용하여 0.8 mL/min의 유속으로 10분간 분석하였다. 시험에 사용된 유기산 표준물질은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 분석에 사용하였다.

(다) 항산화 활성, 총페놀함량 측정

- 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil(DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)법에 의한 유리라디칼 소거능으로 측정하였다. 70% 에탄올수용액에 용해시킨 과일청 시료 1 mL에 0.2 mM DPPH 용액 1 mL를 가하여 교반하고, 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다. 총 페놀 함량은 Gutfinger법을 변형하여 분석하였다. 과일청 1 mL을 test tube에 가한 후 10% Folin-Ciocalteu 시약과 2% sodium carbonate 용액을 각각 1 mL 가한 다음 25 $^{\circ}$ C에서 한시간 동안 반응 시킨 후, microplate reader을 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid을 표준물질로 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하였으며, 실험 측정은 3회 반복하여 평균값을 사용하였다.

(라) 관능검사

- 남부대학교 식품영양학과 학생들과 광주보건대학교 식품영양학과 학생들 30명을 대상으로 과일청에 대한 보관한 요구르트를 23명의 검사원으로 색, 향, 맛, 입안의 느낌, 목넘김 및 전체적인 기호도를 9 level로 평가하였다. 이때 평가 요령은 각각의 평가항목에 대하여 “1: 대단히 나쁘다, 3: 나쁘다, 5: 보통이다, 7: 좋다, 9: 대단히 좋다” 로 표시하도록 하였다.

① 균형영양식 영양량 설정

- 균형영양식의 영양량 설정은 한국인영양권장량을 기준으로 하였으며 영양소의 섭취비율은 다음과 같았다.

표 55. 한국인 영양소 섭취기준 영양량.

영양소	19세 이상
탄수화물	55~70%
단백질	7~20%
지방	-
총지방	15~25%
n-6계 지방산	4~8%
n-3계 지방산	1% 내외
포화지방산	4.5~7%
트랜스지방산	1% 미만
콜레스테롤	300 mg/일 미만

- 균형영양식은 50~70세 성인여성의 1일 영양섭취기준을 기준으로 하였으며 1회 섭취시 1일 에너지 권장 섭취량의 25%를 충족시키면서 에너지 섭취비율이 균형을 이루도록 영양섭취기준에 적정한 범위로 탄수화물, 단백질, 지질에 대해 두 가지(A안, B안) 균형영양량을 설정하였다.

표 56. 균형영양소 비율 A안

열량	450kcal	E 환산	E 비율
단백질	11.25 g	45 kcal	10%
탄수화물	78.75 g	315 kcal	70%
지질	10 g	90 kcal	20%

표 57. 균형영양소 비율 B안

열량	450kcal	E 환산	E 비율
단백질	16.88 g	67.5 kcal	15%
탄수화물	78.75 g	315 kcal	70%
지질	7.5 g	67.5 kcal	15%

② 과일청의 제조

- 균형영양액은 식사대용으로 좋은 영양공급원이나 떡의 섭취를 더 용이하게 하기 위해 함께 섭취할 수 있는 음료를 함께 개발하였다. 음료의 원료는 과일을 이용하여 발효 숙성시킨 과일청과 식초를 사용하고자 하였으며 과일청을 숙성시켜 특성 조사를 실시하였다. 과일청은 사과, 자몽과 석류, 복분자를 깨끗이 세척하여 물기를 뺀 후 적당한 크기로 썰어 유리병에 담고 과일과 설탕을 1:1의 비율이 되게 설탕을 넣고 숙성시켜 시료로 사용하였다.

③ 과일청의 특성 조사

- 균형영양액 음료의 개발을 위하여 다양한 과일청(사과, 딸기, 복분자)의 특성을 측정한 결과, 당도의 경우 딸기청에서 가장 높은 당도를 나타냈으며, 사과청이 가장 낮은 당도를 나타냈다. 산도의 경우 딸기 청에서 가장 높은 값을 나타냈고 사과청에서 가장 낮은 산도를 나타냈다. 반면 pH의 경우 사과청에서 가장 높은 값을 나타냈다. 자몽과 석류는 과일 자체의 당도와 산도가 높고 사과는 산도 비교적 낮은 과일로 과일 자체의 당산도가 청의 당산도에 영향을 주었다고 생각하였다. 과일청의 색도를 측정한 결과, L값은 사과청이 가장 높았으나 딸기청과 크게 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 복분자청의 경우 사과청과 딸기청에 비하여 약 2~3배 낮은 값을 나타냈다. a값의 경우 복분자청이 사과청과 딸기청에 비하여 매우 높은 수치를 보였으며, b값 또한 복분자청이 사과청과 딸기청에 비하여 높은 수치를 나타냈다. a값의 경우 복분자의 원료 색이 red에 매우 가깝기 때문에 높은 수치를 나타낸 것으로 생각하였다. 과일의 색도 역시 과일 자체가 가지고 있는 색소가 청의 숙성 과정에서 수분과 함께 용출되어 나온 것을 알 수 있었다.

표 58. 과일청의 물리적 특성

	사과청	딸기청	복분자청	
당도(° Bx)	57.70±0.00	63.20±0.10	61.40±0.00	
산도	0.14±0.01	0.85±0.12	0.59±0.28	
pH	4.70±0.02	3.30±0.01	3.70±0.01	
색도*	L	46.26±1.77	45.44±1.97	17.96±4.98
	a	0.47±0.02	2.54±0.03	29.47±2.41
	b	4.27±0.72	2.25±0.72	15.13±2.23

*L: brightness, a: (+) red, (-) green, b: (+) yellow, (-) blue

④ 과일청의 숙성온도별 특성 조사

- 과일청의 저장온도별 특성을 측정한 결과, 세 과일청 모두 저장온도가 높을수록 산도, pH가 증가하여 청의 숙성온도가 높을수록 발효가 빠르게 진행됨을 알 수 있었다. 색도를 측정한 결과, 저장 온도가 높아짐에 따라 L, a, b값이 낮아지거나 혹은, 높아지는 경향을 나타냈다. 사과청과 딸기청은 저장온도가 높았을 때 L값, b값은 높아지고 a값은 낮아졌으며, 복분자는 반대로 L값, b값은 낮아지고 a값은 증가하였다. 그 중 b값의 경우 사과청과 딸기청의 경우 저장온도가 높을수록 수치가 증가하였다. 복분자의 경우 숙성 중 생성된 산에 의해 안토시아닌 색소가 붉은 색으로 변하면서 적색도가 증가하는 것으로 판단된다.

표 59. 과일청의 숙성온도별 특성

	사과청			딸기청			복분자청			
	4℃	15℃	35℃	4℃	15℃	35℃	4℃	15℃	35℃	
당도	57.60 ±0.20	57.70 ±0.00	58.00 ±0.10	60.50 ±0.00	63.20 ±0.20	60.70 ±0.10	61.40 ±0.40	61.40 ±0.00	61.90 ±0.10	
산도	0.10 ±0.00	0.14 ±0.01	0.15 ±0.03	0.79 ±0.16	0.85 ±0.12	0.86 ±0.25	0.57 ±0.01	0.59 ±0.28	0.65 ±0.15	
pH	4.70 ±0.02	4.70 ±0.02	4.60 ±0.01	3.40 ±0.02	3.30 ±0.01	3.40 ±0.02	3.60 ±0.01	3.70 ±0.01	3.60 ±0.01	
색도*	L	48.85 ±0.06	52.44 ±1.00	60.17 ±0.11	35.23 ±0.08	32.65 ±0.36	42.78 ±1.40	0.52± 0.02	0.41± 0.02	0.16± 0.04
	a	-4.02± 0.02	-3.65± 0.08	-3.40± 0.04	46.47 ±0.08	46.51 ±0.47	42.25 ±0.62	2.90 ±0.20	2.90± 0.20	0.88± 0.10
	b	1.86± 0.07	4.56± 0.72	4.79± 0.19	-2.42± 0.03	-0.40± 0.36	3.87± 0.90	0.69± 0.08	0.69± 0.08	0.24± 0.05

*L: brightness, a: (+) red, (-) green, b: (+) yellow, (-) blue

⑤ 과일청의 숙성기간별 특성 조사

- 과일청의 숙성기간별 특성을 측정한 결과, 당도의 경우 사과청 및 딸기청의 경우 초기 10일 보다 숙성기간이 길어질수록 당도가 감소하였으나, 사과레몬청의 경우 증가하는 경향을 나타냈다. 산도는 세 과일청 모두 숙성기간이 길어질수록 증가 하였으며, pH의 경우 사과청은 점점 낮아지는 반면 딸기청과 사과레몬청은 유지되거나 약간 증가 하였다. 색도를 측정한 결과, L값의 경우 사과청은 숙성기간이 길어질수록 수치가 감소하였으며, 딸기청 및 사과레몬청의 경우 오히려 수치가 증가 하였다. a값의 경우 전반적으로 세 시료 모두 숙성온도에 따라 일관적인 결과를 나타내지 않았으며, b값의 경우, 사과청은 숙성온도가 길어질수록 점차 감소한 반면, 딸기청과 사

과레몬청의 경우 숙성온도가 길어질수록 수치가 증가하는 경향을 나타냈다.

표 60. 과일청의 숙성기간별 특성

	사과청			딸기청			사과레몬청		
	10 일	30 일	60 일	10 일	30 일	60 일	30 일	60 일	
당도 (° Bx)	57.70 ±0.00	48.90 ±0.10	50.60 ±0.00	63.20 ±0.10	42.50 ±0.10	45.80 ±0.10	47.80 ±0.00	49.90 ±0.00	
산도	0.14 ±0.01	0.32 ±0.14	0.31 ±0.04	0.79 ±0.16	1.07 ±0.11	0.96 ±0.26	1.52 ±0.13	1.52 ±0.10	
pH	4.70 ±0.02	4.30 ±0.01	4.20 ±0.01	3.30 ±0.01	3.80 ±0.01	3.70 ±0.01	3.20 ±0.01	3.20 ±0.03	
색도*	L	52.44 ±1.00	44.22 ±0.33	51.24 ±0.06	32.65 ±0.36	49.39 ±1.31	50.89 ±0.52	60.54 ±0.20	76.39 ±0.10
	a	-3.65 ±0.08	-1.17 ±0.13	-0.61 ±0.03	46.51 ±0.47	25.67 ±1.59	20.97 ±0.31	-0.24 ±0.07	1.73 ±0.12
	b	4.56 ±0.72	29.17 ±0.08	33.28 ±0.07	-0.4 ±0.36	32.36 ±1.13	39.37 ±0.32	38.14 ±0.03	48.68 ±0.47

*L : brightness, a: (+) red, (-) green, b: (+) yellow, (-) blue

⑥ 과일청의 항산화 활성

- DPPH radical 소거활성의 경우 딸기청에서 가장 높은 DPPH 소거활성을 나타냈으며, 사과청>복분자청 순으로 활성을 나타냈다. 총 항산화 활성을 측정한 결과, 사과청과 복분자청에서 높은 총 항산화 활성을 나타냈다. 총 페놀함량을 측정한 결과, 앞의 실험결과와 유사하게 딸기청에서 높은 총 페놀함량을 나타냈으며, 사과청>복분자청 순으로 높은 총 페놀함량을 나타냈다.

표 61. 과일청의 항산화 활성

	DPPH radical scavenging(%) (100 mg)	Total antioxidant (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
사과청	56.60±0.24	5.20±0.10	0.14±0.02
딸기청	62.90±0.11	4.90±0.30	0.22±0.03
복분자청	51.70±0.05	5.10±0.40	0.12±0.02
ascorbic acid*	8.32	-	-

*Ascorbic acid : SC₅₀ value(ug/mL)

⑦ 과일청의 숙성온도별 항산화 활성

- 과일청의 숙성온도별 항산화 활성을 측정한 결과, 세 종류의 과일청 모두 숙성온도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능, total antioxidant, total phenol contents가 증가 하였으나 크게 유의적인 차이는 나타내지 않았다. Total phenol contents가 증가함에 따라 total antioxidant activity 와 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것을 알 수 있었다. 35℃에서 숙성시켰을 때 항산화활성은 가장 높았으나 미생물 오염 등 위생적인 면을 고려했을 때 15℃에서 숙성시키는 것이 바람직 할 것으로 예상된다.

표 62. 과일청의 숙성온도별 항산화 활성

		DPPH radical scavenging(%) (100 mg)	Total antioxidant (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
사과청	4 ℃	67.90±0.20	4.90±0.10	0.07±0.01
	15 ℃	70.90±0.10	5.20±0.10	0.11±0.02
	35 ℃	81.10±0.20	5.40±0.20	0.18±0.02
딸기청	4 ℃	85.10±0.20	4.90±0.10	0.21±0.03
	15 ℃	85.90±0.10	4.90±0.30	0.24±0.03
	35 ℃	90.10±0.10	5.60±0.10	0.36±0.04
복분자청	4 ℃	43.50±0.10	4.90±0.20	0.06±0.04
	15 ℃	52.70±0.10	5.10±0.40	0.09±0.04
	35 ℃	55.80±0.10	5.20±0.20	0.13±0.03
ascorbic acid*		8.32	-	-

*Ascorbic acid : SC₅₀ value(ug/mL)

⑧ 과일청의 숙성기간별 항산화 활성

- 과일청의 숙성기간별 항산화 활성을 측정한 결과, 세 종류의 과일청 모두 숙성기간이 증가함에 따라 DPPH radical 소거능, total antioxidant activity, total phenol contents 가 증가하였으며, 30 일 이후 항산화활성이 증가하여 60일과는 큰 차이가 나지 않았다.

표 63. 과일청의 숙성기간별 항산화 활성

		DPPH radical scavenging(%)(100 mg)	Total antioxidant (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
	10일	56.60±0.24	5.20±0.10	0.14±0.02
사과청	30일	71.80±0.10	6.60±0.03	0.06±0.03
	60일	77.10±0.10	6.70±0.09	0.16±0.02
	10일	62.90±0.11	4.90±0.30	0.22±0.03
딸기청	30일	73.10±0.10	6.60±0.07	0.18±0.02
	60일	77.60±0.20	6.70±0.09	0.20±0.04
	30일	63.00±0.10	6.50±0.07	0.06±0.03
복분자청	60일	71.70±0.50	6.70±0.09	0.10±0.02
	ascorbic acid*	8.32	-	-

*Ascorbic acid : SC₅₀ value(ug/mL)

⑨ 과일청의 숙성기간별 유기산 분석

- 사과청 및 딸기청, 복분자청의 유기산 및 비타민을 분석한 결과, 유기산 중 이노산 및 소화촉진을 원활하게 하는 malic acid의 경우 저장기간이 길어질수록 오히려 함량이 감소하는 경향을 나타냈으며, 사과청의 경우 복분자청 및 딸기 청에 비하여 적게는 5배에서 많게는 20배정도 많은 함량을 나타냈다. 이는 malic acid의 경우 사과 및 포도 등의 과일에서 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 항바이러스 효과가 있는 shikimic acid 및 항균효과를 가지는 acetic acid의 경우 세 과일청 모두 저장기간이 길어짐에 따라 감소하였으며, 딸기청이 사과청과 복분자청에 비하여 약 20배 높은 함량을 나타냈으며, citric acid의 경우 또한 저장기간이 길어질수록 함량이 감소하였고, 사과청에서는 citric acid가 검출되지 않았다.

표 64. 과일청의 숙성기간별 유기산 및 비타민 분석

저장기간		Organic acid (mg/kg)			
		Malic acid	Shikimic acid	Acetic acid	Citric acid
사과청	10 일	1748.24	5.10	189.59	0.00
	60 일	1397.82	2.07	58.41	0.00
딸기청	10 일	82.30	46.93	110.94	5508.37
	60 일	57.05	38.08	112.23	4749.57
복분자청	10 일	327.73	2.49	789.93	5790.25
	60 일	250.75	1.36	96.41	5331.69

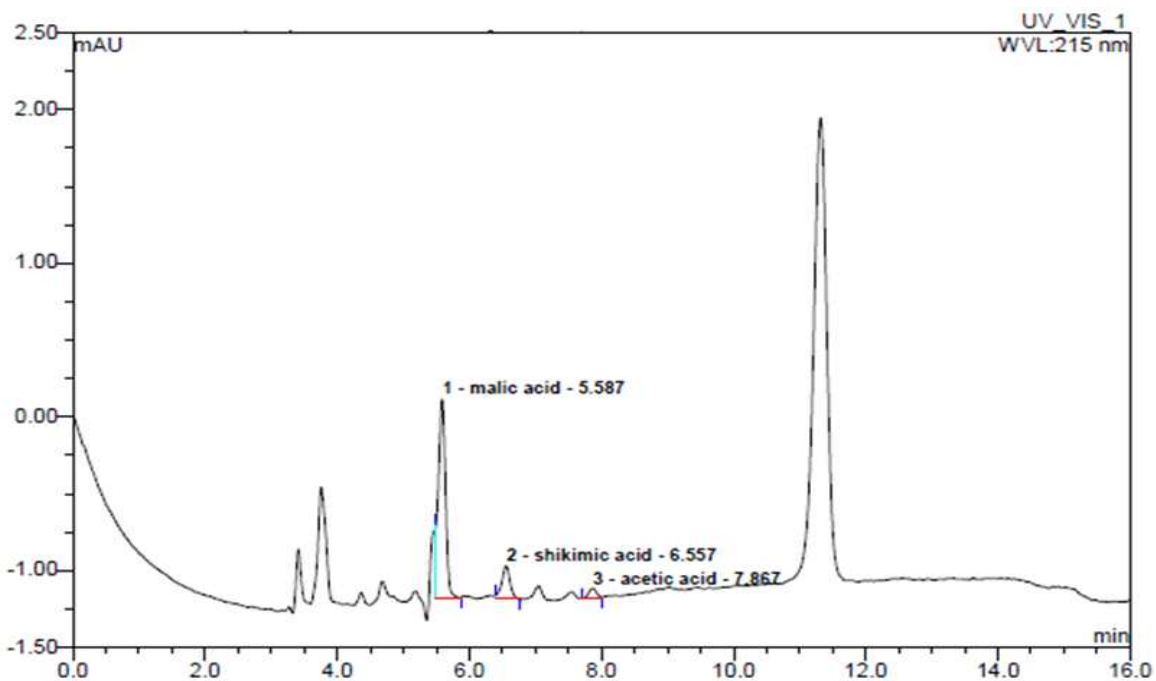


그림 95 사과청 10일의 organic acid chromatogram

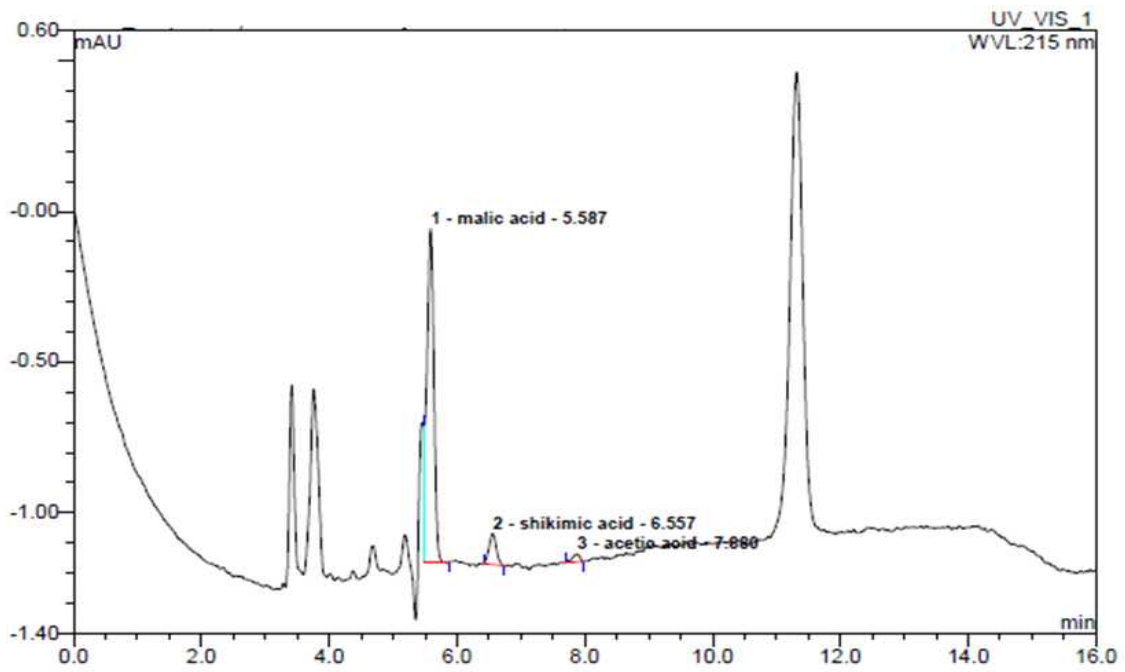


그림 96. 사과청 60일의 organic acid chromatogram

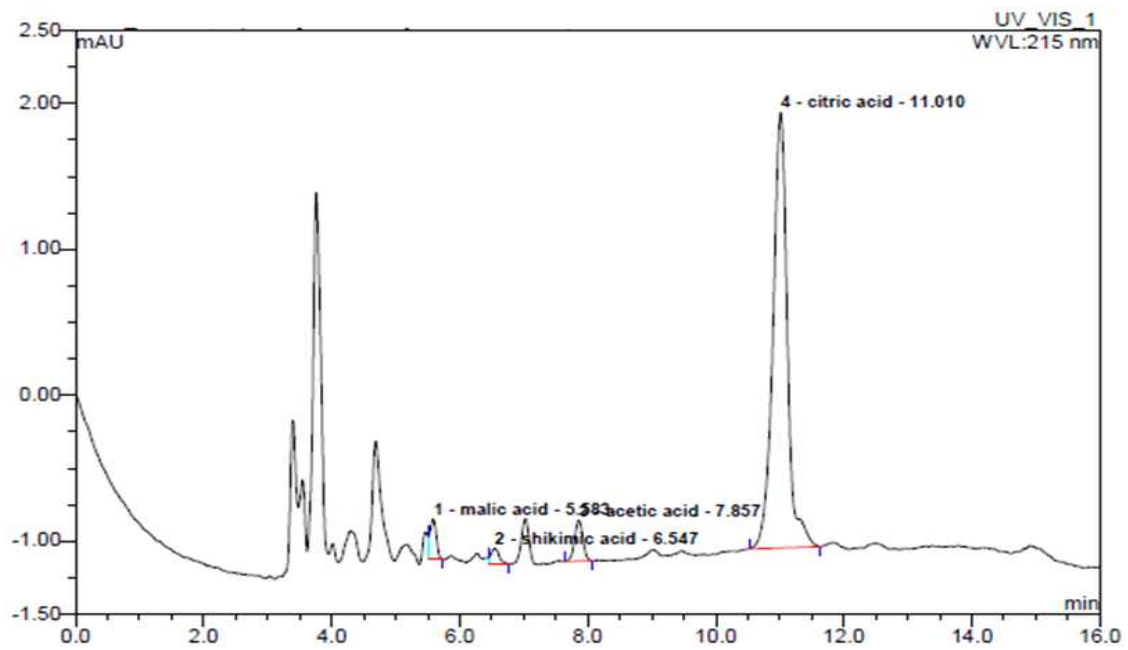


그림 97. 딸기청 10일의 organic acid chromatogram

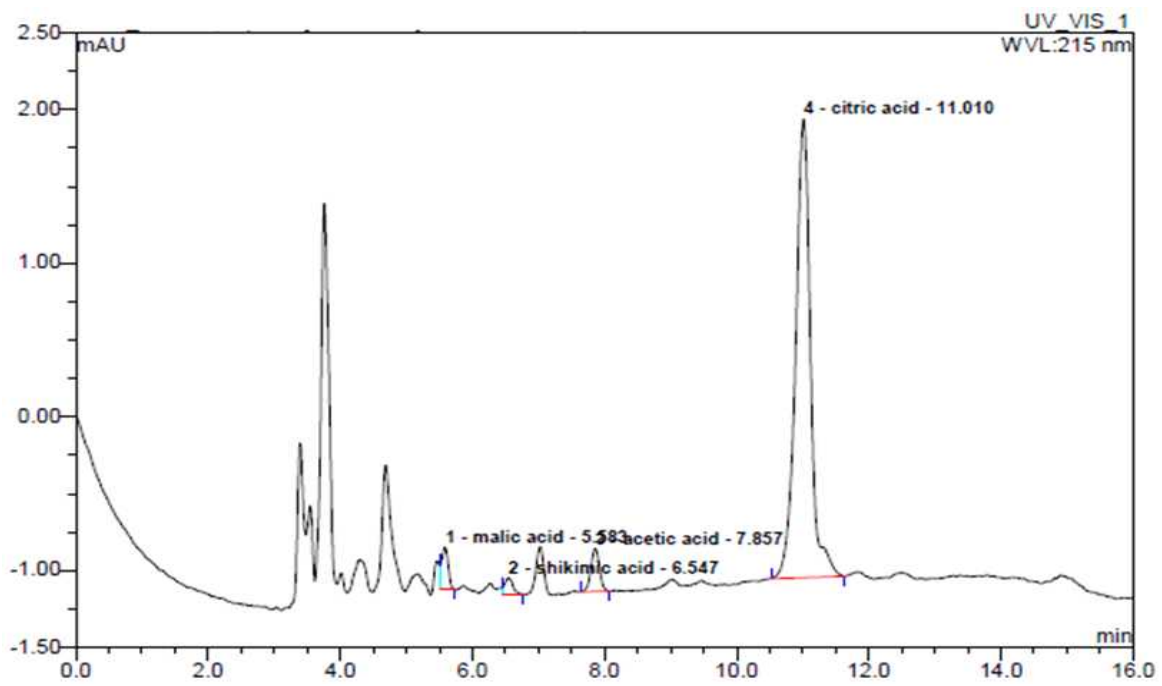


그림 98. 딸기청 60일의 organic acid chromatogram

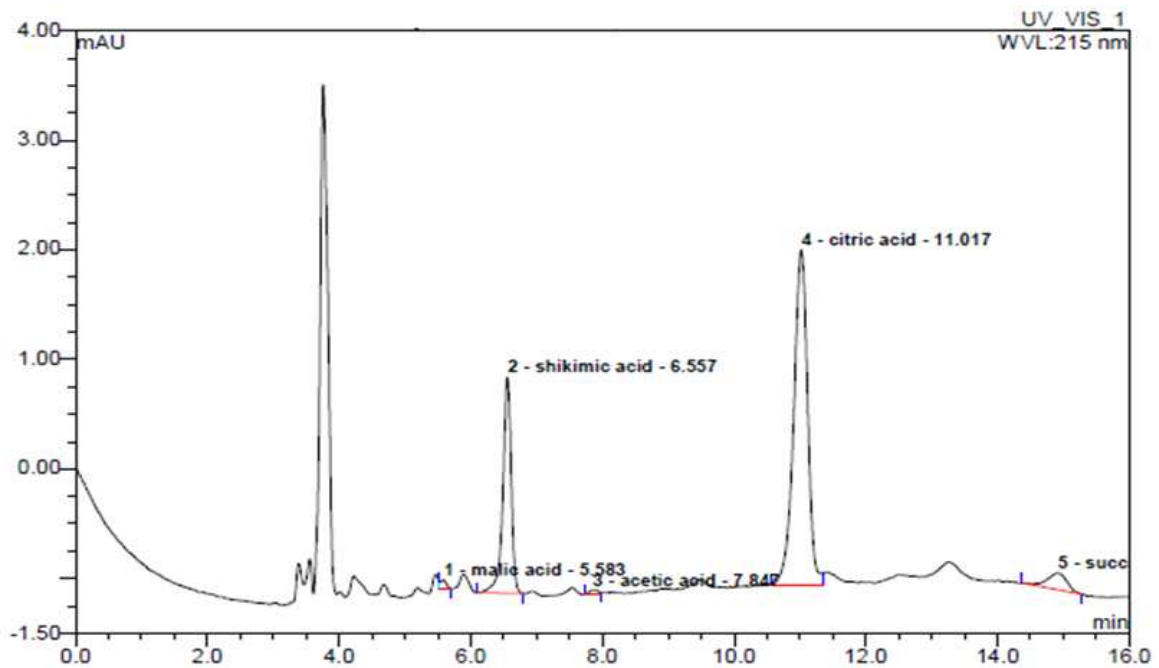


그림 99. 복분자청 10일의 organic acid chromatogram

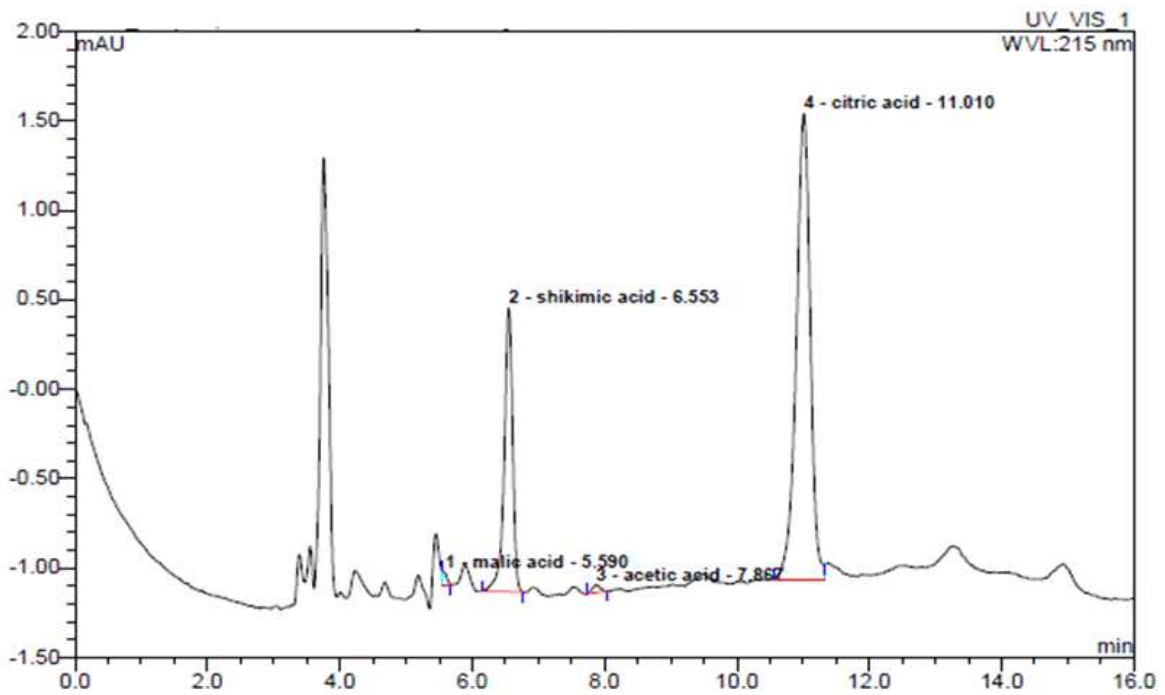


그림 100. 복분자청 60일의 organic acid chromatogram

⑩ 과일청의 숙성기간별 유기산 분석

○ 사과청 및 딸기청, 복분자청의 비타민 함량을 분석한 결과, 복분자청에서는 비타민C가 검출되지 않았으며, 사과청 및 딸기청의 경우 숙성기간이 길어질수록 오히려 비타민C 함량이 점차 감소하는 것을 나타냈으며, 특히, 딸기청의 경우 10일에 비하여 60일의 경우 약 3배정도 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 딸기청에서 가장 많은 비타민C 함량을 나타냈다. 비타민C 이외의 vitamin B₁₂, B₆, B₂, B₁ 을 분석하였으나 세 종류의 과일청에서는 모두 검출되지 않았다.

표 65. 과일청의 숙성기간별 유기산 및 비타민 분석

	숙성기간	Vitamin c (mg/kg)
사과청	10 일	1.05
	60 일	0.81
딸기청	10 일	26.17
	60 일	7.65
복분자청	10 일	-
	60 일	-

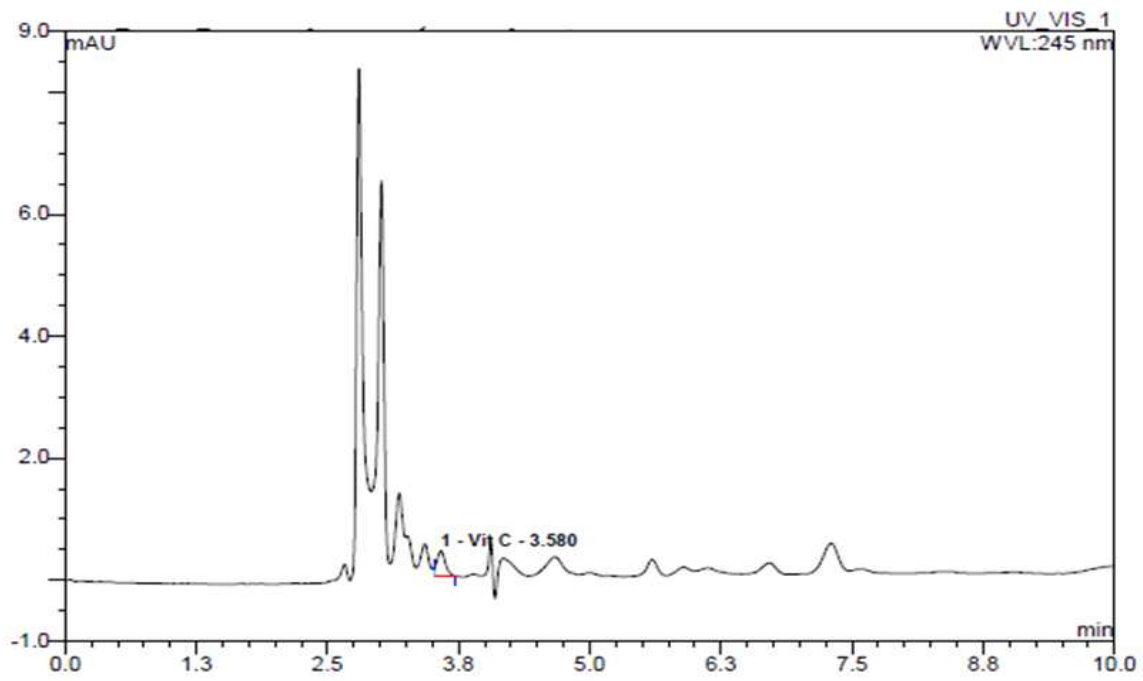


그림 101. 사과청 10일의 vitamin C chromatogram

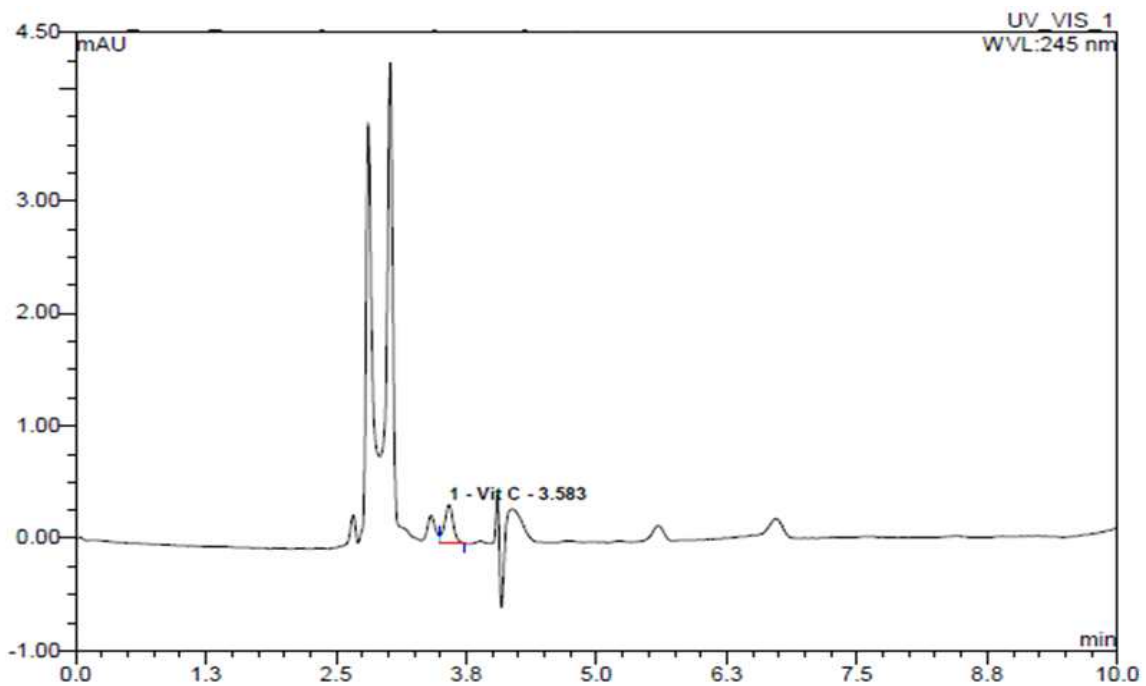


그림 102. 사과청 60일의 vitamin C chromatogram

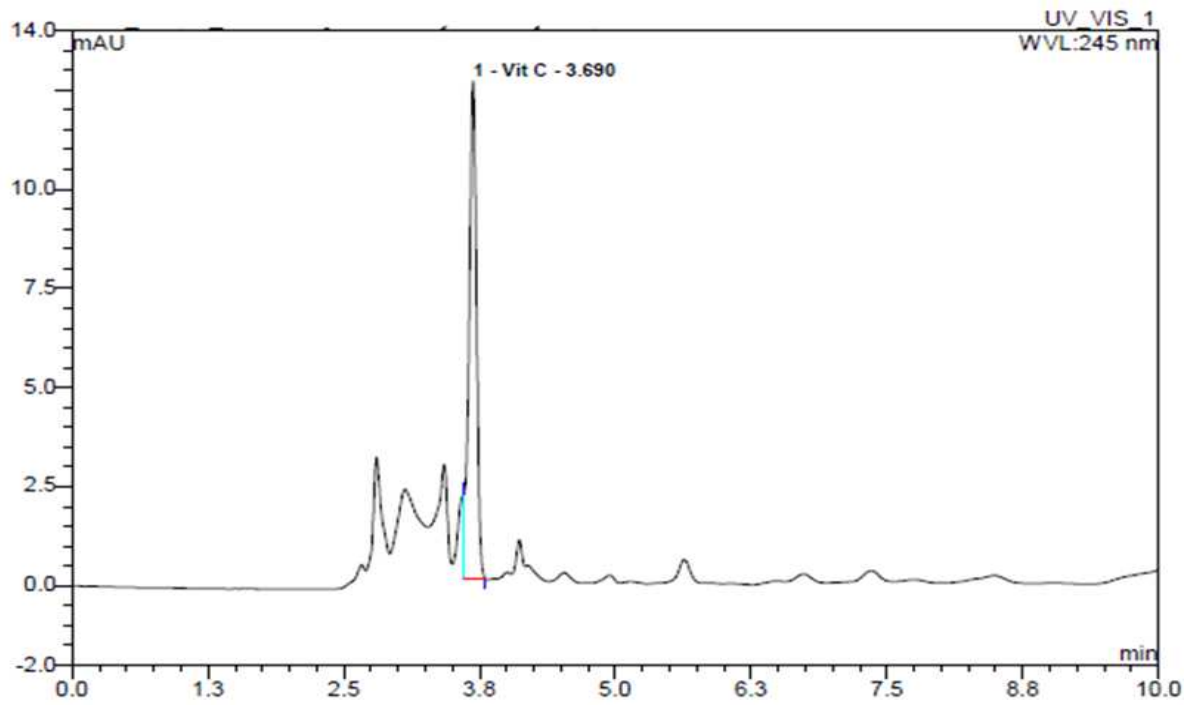


그림 103. 딸기청 10일의 vitamin C chromatogram

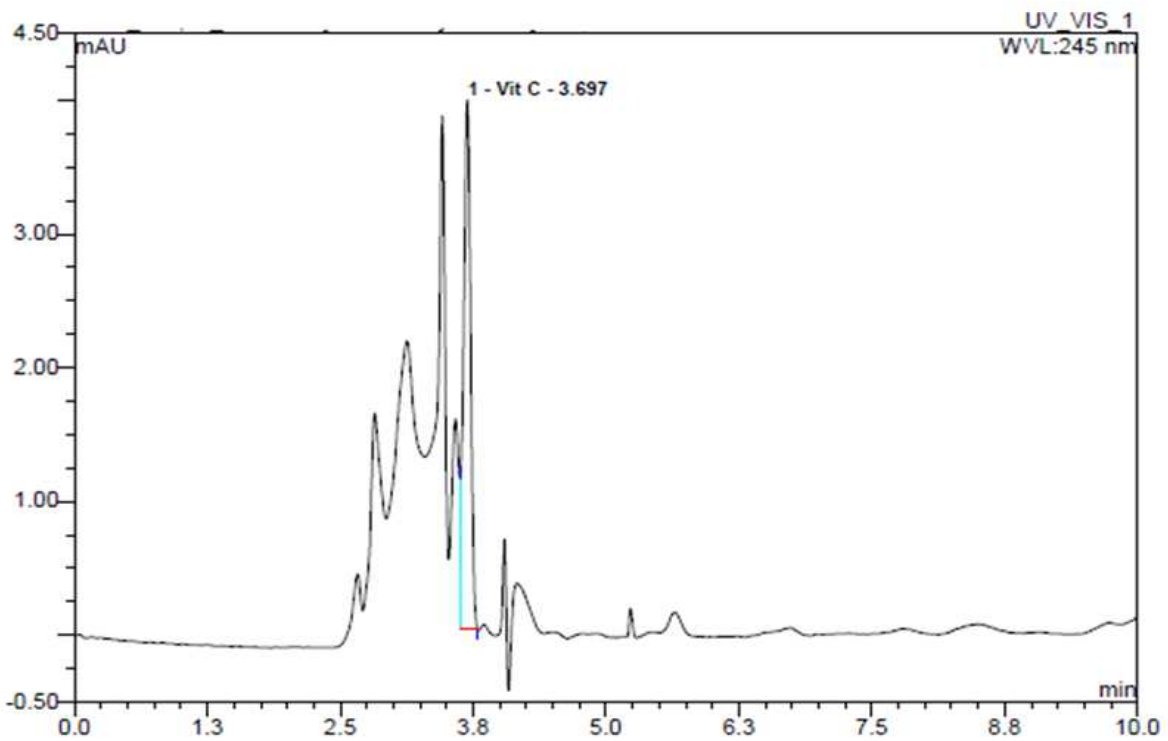


그림 104. 딸기청 60일의 vitamin C chromatogram

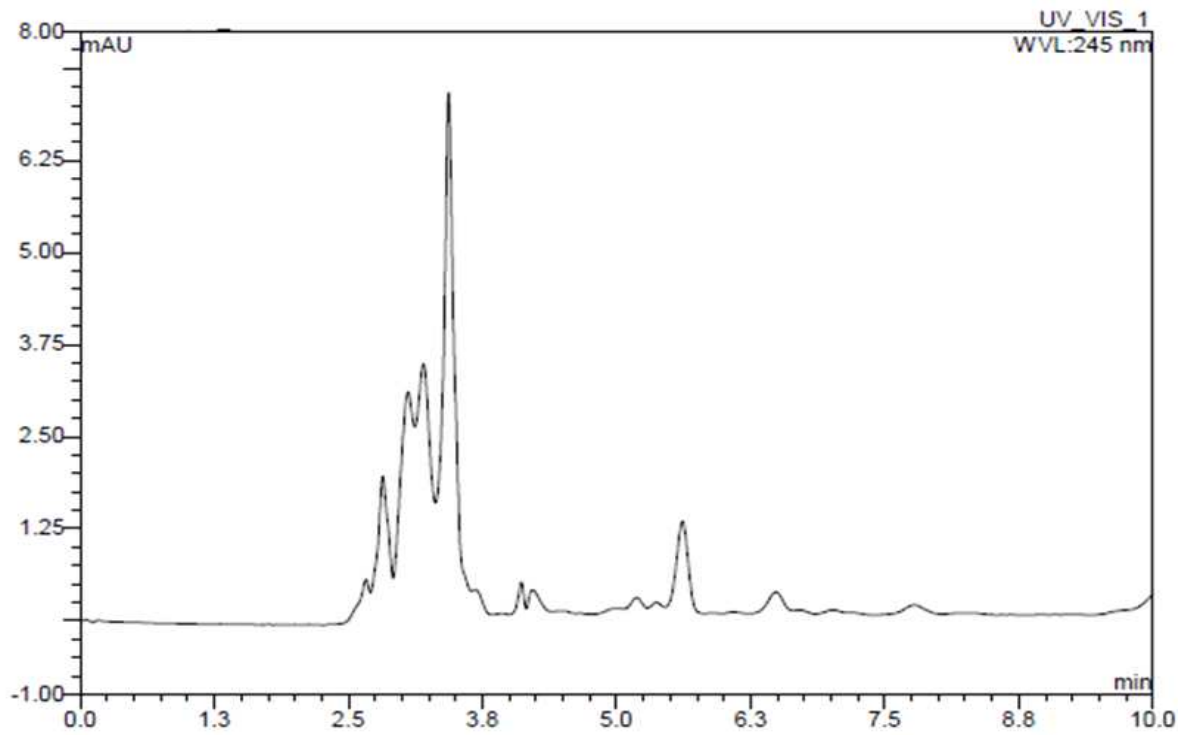


그림 105. 복분자청 10일의 vitamin C chromatogram

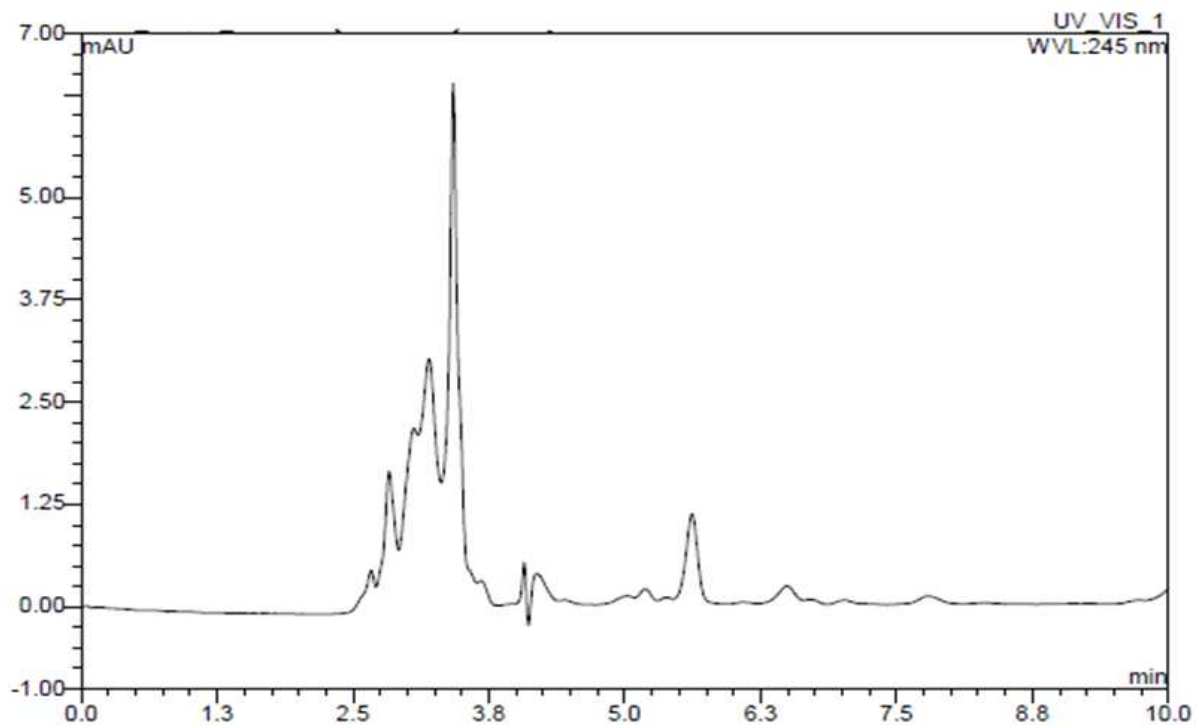


그림 106. 복분자청 60일의 vitamin C chromatogram

(3) 균형영양식 과일청 음료의 개발 및 물리적 특성 조사

① 과일청을 이용한 과일청 음료의 제조

- 사과 및 딸기, 복분자의 과일청을 이용하여 균형영양식 과일청 음료를 제조하여 물리적 특성 및 관능평가, 항산화 활성을 측정하였다.

표 66. 과일청 음료의 조성

	사과청 음료(g)	딸기청 음료(L)	복분자청 음료(g)
과일청	28.4	2.84	42.6
블루베리초, 레몬즙	18.2	-	13.1
사과농축액	7	-	-
석류초, 레몬즙	-	1.62	-
물	400	40.0	400

② 과일청을 이용하여 제조한 과일청 음료의 관능평가

- 과일청을 이용하여 제조한 과일청 음료의 관능평가를 측정한 결과, 복분자청 음료가 향을 제외한 모든 검사항목에서 가장 높은 수치를 나타냈으며, 특히 전체적인 기호도 및 떡과의 어울림에 있어 사과청과 딸기청에 비하여 높은 수치를 나타냈다.

표 67. 과일청을 이용하여 제조한 음료의 관능평가

	사과청 음료	딸기청 음료	복분자청 음료
색	5.57±1.19	6.00±1.63	6.14±1.35
향	6.57±1.51	5.57±1.13	5.57±1.51
맛	5.43±1.72	4.14±1.46	7.29±0.95
입안의 느낌	6.00±1.00	4.57±1.72	6.71±1.38
목넘김	6.57±1.62	5.57±0.98	7.00±0.82
전체적인기호도	5.43±2.23	4.71±1.80	7.43±1.13

③ 과일청 음료의 물리적 특성 측정

- 과일청 음료의 물리적 특성을 측정한 결과, 당도의 경우 복분자청 음료가 가장 높은 당도를 나타냈으며, 산도와 pH의 경우 사과청 음료가 가장 높았다. 관능검사 결과에서 맛 항목에서 특히 점수가 높을 것으로 보아 음료의 관능적 특성에 당도가 많은 영향을 미친 것으로 생각하였다. 색도의 경우 사과청 음료와 딸기청 음료가 복분자청 음료에 비하여 높은 수치를 나타냈으며, 두 시료의 경우 크게 차이를 보이지 않았다. a값의 경우 복분자청 음료가 사과청 음료와 딸기청 음료에 비하여 높은 수치를 나타냈으며, b값 또한 복분자청 음료가 높은 수치를 나타냈다.

표 68. 과일청을 이용하여 제조한 과일청 음료의 물리적 특성

	사과청 음료	딸기청 음료	복분자청 음료	
당도(° Bx)	3.70±0.00	2.70±0.00	5.00±0.0	
산도	1.60±0.28	0.30±0.04	0.30±0.02	
pH	3.60±0.01	3.00±0.03	3.10±0.01	
색도*	L	46.26±1.77	45.44±1.97	17.96±4.98
	a	0.47±0.02	2.54±0.03	29.47±2.41
	b	4.27±0.72	2.25±0.72	15.13±2.23

*L: brightness, a: (+) red, (-) green, b: (+) yellow, (-) blue

④ 과일청 음료의 항산화 활성 측정

- 과일청을 이용하여 제조한 과일청 음료의 항산화 활성을 측정한 결과, DPPH radical 소거활성의 경우, 딸기청 음료에서 가장 높은 DPPH 소거활성을 나타냈으며, 총 항산화 활성을 측정한 결과, 딸기청 음료에서 높은 총 항산화활성을 나타냈다. 총 페놀함량을 측정한 결과, 딸기청 음료에서 높은 총 페놀함량을 나타냈다. 항산화 활성의 결과는 음료의 원료인 과일청의 항산화활성과 같은 경향을 나타냈으며, 음료 제조시 희석 효과에 의해 활성이 낮아졌으나 원료로 사용된 청 자체의 항산화 활성이 음료 항산화활성에 영향을 주는 것으로 생각되었다.

표 69. 과일청을 이용하여 제조한 과일청 음료의 항산화 활성

	DPPH radical scavenging(%)(100 mg)	Total antioxidant (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
사과청 음료	53.40±0.0	6.00±0.20	0.06±0.01
딸기청 음료	58.10±0.0	6.50±0.20	0.10±0.01
복분자청 음료	46.90±0.1	5.60±0.10	0.05±0.01
ascorbic acid*	8.41	-	-

*Ascorbic acid : SC₅₀ value(ug/mL)

5. β-1,3/1,6-glucan과 유산균을 유효성분으로 하는 영양과자의 제조

가. 연구배경

- 치커리(*Cichorium intybus*)은 국화과(Asteraceae)에 속하는 한대성 1-2년생의 고산 초본식물이며 차와 잎을 샐러드로 이용을 위해 재배(Park CK et al. 2000) 되고 있고, 북유럽 전역, 중앙아시아, 캐시미르, 시베리아, 인도 및 지중해연안이 원산지인 식물이다. 치커리의 국내재배는 강원도 철원, 인제 등 설악산 부근과 충청북도 청원군, 전라북도 내장산지역 등이며 대부분 개인, 작목반 형태로 재배되고 있으며, 그 동안 대중들의 인지도가 부족하여 가공식품개발이 미흡 등으로 인하여 생산량도 적었고, 대중적으로 활성화 되지 못하였다.
- 치커리의 기능적 약리작용은 소화촉진, 혈액순환, 항암, 담석증, 간장질환, 당뇨병에 관한 효능을 갖고 있다고 알려져 있으며, 볶음치커리 치커리 물추출물은 흰쥐의 혈청 중성지방 저하작용 및 HDL-cholesterol상승작용을 가지고 있다는 것을 보고(Kim MH et al 1998) 하였고, 치커리 뿌리의 주요성분인 inulin이 건조중량의 약 70% 이상을 차지하고 있는데, Levart et al. (1991)는 치커리 inulin이 장내에 미네랄의 흡수를 촉진시키는 효과(3)를 보였다. 치커리 뿌리를 구성하고 있는 inulin 및 inulin-oligofructose는 수용성으로서 인체내 소화효소에 의해 가수분해 되지 않는 식이 섬유소이며 열량을 내지 않는 성질을 이용하여 다이어트 소재, 감미료 및 식품첨가물로서 이용 가치가 높은 식품으로 알려져 있다. 치커리 물추출물이 장내 유익균인 *Bifidobacteria* 와 *Lactobacilli*의 생육을 유의적으로 크게 증가시켜 장내 균총의 조성을 유익한 방향으로 개선시켰으며, (Roberfroid et al. 1998), (Bouhnik et al. 1996)은 치커리 inulin과 치커리 oligofructose에 의하여 장내미생물의 bifidogenic 효과를 나타낸다고 보고하였다.

- 함유성분으로서 inulin, intybin, chlorogenic acid, cichoralexin, cichoriolide A, B, C, cichorium intybus sterol, fructosan, sonchuside A, C 등이 보고되었다.(Varotto et al. 2000) 치커리를 이용하여 다양한 건강기능성 그리고 동물모델에서 식이에 따른 기능성 그리고 볶음처리과정에서의 화학적 변화 등을 보았다.

나. 연구목표

- 실버세대에 적합한 스낵을 제조하는데 유산균 생육에 도움이 되는 치커리를 첨가하여 식이섬유 기능성과 기호성 그리고 저장성에 관련한 변화를 보고자 하였다. 이를 통하여 β -1,3/1,6-glucan 과 유산균 그리고 유산균에 도움이 되는 치커리섬유소가 함유된 기호성이 증진된 치커리 함유 스낵의 제조방법을 확립하고자 하였다.

다. 실험 및 방법

(1) 실험재료 및 제조방법

- 실험에 사용된 β -1,3/1,6-glucan과 유산균은 주관기관으로 제공받아 사용하였고, 쌀가루, 밀가루, 버터, 슈가파우더, 소금 등은 광주 인근의 마트에서 구입하여 사용하였고, 조건을 동일하게 하기 위하여 쌀가루, 밀가루(박력분)을 기성제품으로 구입하였다. 본 연구에 사용된 치커리분말의 경우 치커리 화이버(FIBRULOSE F90)는 벨기에산으로 COSUCRA S.A사(Warcoing, Belgique) 제품을 사용하였고, 아래의 조성에 따라 control은 우리밀을 사용하였고, 치커리분말과 치커리분말대신에 가르시니아 캄보지아 또한 동량을 넣어 각각의 스낵을 제조하였다.

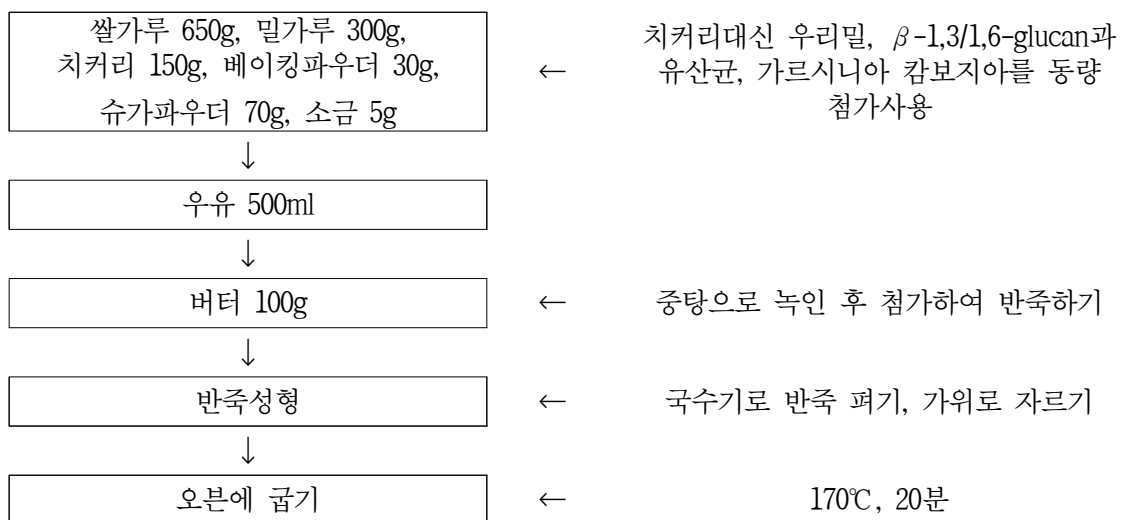


그림 107. 스낵의 제조과정

- 일반성분은 AOAC법(AOAC 1995)에 준하여 3회 반복실험을 통하여 측정하였다. 수분은 105℃ 상압가열건조법을 이용하였으며, 조단백질은 Kjeldahl법에 따라 Buchi B-339 auto Kjeldahl systems로 분하였다. 조지방은 Soxhlet 법을 사용하였으며, 조회분은 건식회화법, 탄수화물은 시료 전체 무게(%)에서 수분, 회분, 조지방, 조단백질을 뺀 나머지 값을 %로 표시하였다. 특히 조섬유는 조섬유는 섬유추출기(Dosi-Fiber, J.P. Selecta. S.A., Spain)를 이용하여 측정하였다.(AACC 2000)

(2) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

- 원료물질의 첨가에 따른 폴리페놀함량을 측정하였다. 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin-Denis 1912)을 응용하여 측정하였다. 각 시료 추출물 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고, 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin시약 2 mL을 첨가하고 3분간 방치한 후 10% Na₂CO₃ 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 gallic acid 검량선과 비교하여 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 총 플라보노이드의 분석은 Davis 변법(Davis WB. 1947)에 따라 동결건조 시료 1 g에 80% methanol 100 mL을 가하여 37 °C 항온수조에서 하룻밤 동안 추출한 후 이 검액 1.0 mL를 시험관에 취하고 1 mL의 diethylene glycol을 가하여 혼합한 후 혼합액에 1 N NaOH 0.1 mL를 혼합시켜 37 °C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid(Sigma Co.)를 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총플라보노이드 함량을 산출하였다.

(3) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성

- DPPH radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도 별로 희석한 희석액 800 μL와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 200 μL을 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성비교를 위하여 BHA를 사용하였다.(Blois M.S.(1958))

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(4) 색도 측정

- 시료의 색도는 색차계(CR-300, Minolta Co.,Japan)를 사용하여 시료 L(lightness), a(redness), b(yellowness) 값을 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 이때 사용한 표준 백색판 L값은 94.50, a값은 0.3032, b값은 0.3193이었다.

(5) Texture Profile Analysis(TPA)

- 치커리분말함유 스낵의 TPA를 위해서 texture analyzer(TMS-Pro, Food Technology Co., Sterling, VA, USA)를 사용하여 측정하였다. 치커리분말 등이 함유 스낵의 경도(hardness), 응집성(cohesiveness), 탄력성(springiness), 씹힘성(chewiness)과 같은 질감 특성에 대한 정보를 제공하였다. 1 cm(가로)×1 cm(세로)×0.4 cm(높이)의 일정한 크기로 자른 스낵을 texture analyzer에 놓은 후 프로브(probe)를 2회 시료 방향으로 반복 이동시켜 TPA 실험을 수행하였다. TPA에 이용된 프로브의 측정환경은 프로브 지름 0.5 cm, 이동거리 3 mm, 이동속도 10 mm/min로 설정하였다. 그림 123은 치커리분말함유 스낵의 전형적인 TPA 프로파일이며, 이 프로파일을 분석하여 시료의 경도, 응집성, 탄력성, 씹힘성에 대한 질감특성을 정량화 할 수 있었다. TPA는 3회 반복하여 수행되었다.

(6) 관능 평가

- 치커리분말 등을 첨가한 스낵제품의 기호도 평가 패널은 남부대학교 대학생(식품영양학과) 1~4학년 30명(남 : 10명, 여 : 20명)을 대상으로 선정하였다. 시료는 지름 4.5cm, 두께 0.2cm로 오븐에서 구운 스낵 제조 후 30분간 방냉 뒤 흰색 원형접시에 담아 제공하였다. 기호도 평가(Kim WJ ; Ku KH(2001)) 방법은 9점 기호척도(대단히 좋음 : 9점, 보통 : 5점, 대단히 싫음 : 1점)를 이용하여 평가하였으며, 평가 항목으로는 색(color), 향(aroma), 맛(sweetness), 질감(crispness), 전체적인 기호도(overall-acceptability)를 평가하였다.

(7) 통계처리

- 실험을 통해 얻은 자료들은 SAS(SAS 9.1, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test로 유의차를 검증하였다(SAS, 2005).

라. 결과 및 고찰

(1) 일반성분의 분석

- 본 실험에서 개발된 , 치커리분말스낵, 가르시니아 캄보지아, β -1,3/1,6-glucan과 유산균 첨가 스낵의 일반성분은 Table 2 와 같으며, 일반밀가루로 제조한 스낵을 대조군으로 놓고 비교하였다. 밀가루로 제조된 대조군의 조회분은 0.52%인 것으로 나타났으나, 치커리분말스낵과 가르시니아 캄보지아첨가 스낵의 회분은 함량은 0.52-0.53%를 나타내었다. 조탄수화물은 대조군의 63.3%에 비하여 치커리첨가 스낵과 가르시니아 캄보지아, β -1,3/1,6-glucan과 유산균첨가 스낵의 함량은 68.3-71.4%를 나타내어 대조군에 비하여 탄수화물이 증가하는 경향을 보였다. 조단백

질의 함량은 대조군이 15.03%인 것으로 나타났고, 치커리분말스넥과 가르시니아 캄보지아, β -1,3/1,6-glucan과 유산균첨가 스넥은 12.14%-13.15%를 나타냈다. 조지방의 함량은 대조군이 15.69%, 치커리분말스넥과 가르시니아 캄보지아, β -1,3/1,6-glucan과 유산균첨가 스넥은 15.34-15.26%의 함량으로 지방의 함량이 유사한 것으로 나타났다. 즉, 대조군에 비하여 치커리분말스넥은 조회분과 탄수화물이 비슷하였으나, 단백질과 조지방의 함량이 낮은 것으로 나타났다. 조단백의 양과 조지방의 양이 감소하는 이유는 밀가루의 첨가가 함유하고 있는 글루텐의 함량이 증가하기 때문으로 생각되어지고 치커리 분말첨가에는 조단백이나 지질의 증가는 나타나지 않아 단지 탄수화물 소재의 일부 증가하는 것으로 평가된다. (표 1).

표 70. 치커리함유 스넥 및 비교스넥의 일반성분 조성

(%)

Samples ¹⁾	Crude ash	Carbohydrates	Crude protein	Crude lipid
일반밀가루첨가(control)	0.52±0.1 ^a	63.3±2.6 ^a	15.03±0.4 ^a	15.69±0.4 ^a
치커리분말첨가	0.53±0.1 ^a	68.3±1.9 ^a	12.14±0.3 ^b	15.34±0.2 ^a
가르시니아 캄보지아 첨가	0.52±0.2 ^a	71.38±1.8 ^b	13.15±0.5 ^b	15.26±0.6 ^a
β -1,3/1,6-glucan과 유산균	0.51±0.2 ^a	70.76±1.2 ^b	13.04±0.4 ^b	14.97±0.5 ^a

¹⁾ All mean values are triplicate determinations. Results are shown as mean \pm standard deviation. ²⁾ Values in the same row that are followed by a different letter are significantly different(*p<0.05, *p<0.01) by Duncan's multiple range test.

(2) 총식이섬유의 변화

- 제조된 스넥의 총 식이섬유 함량은 그림. 2와 같다. 제조된 치커리 분말첨가 스넥의 총 식이섬유 함량은 3.6%이었고, 대조군으로 밀가루를 첨가군에서는 0.56%로서 큰차이를 보였고, 비교군인 가르시니아 캄보지아 첨가군에서 2.6%, β -1,3/1,6-glucan과 유산균군에서 3.7%로 치커리 분말 첨가군과 β -1,3/1,6-glucan군에서 식이섬유 첨가효과가 큰 것으로 나타났다. 식이섬유가 식이에 증가하면 장의 연동운동을 자극하여 배변을 촉진하고, 동시에 보수성이 강해 변을 부드럽게 하여 변비를 예방한다는 연구(Baik SO et al 2004)가 있다. 치커리분말을 첨가한 스넥 제조 시 식이섬유섭취로 인한 건강기능성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

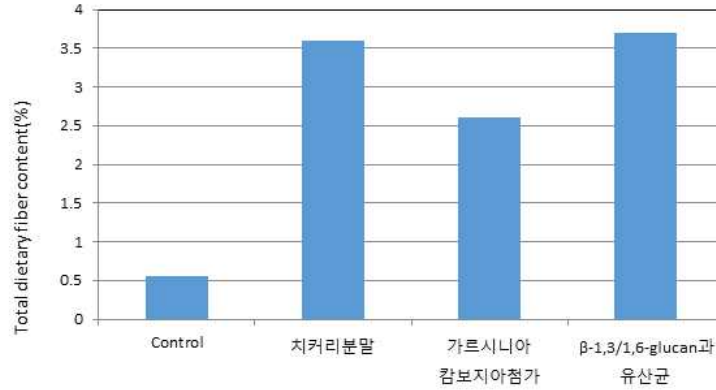


그림 108 치커리분말과 가르시니아 캄보지아 그리고 β -1,3/1,6-glucan과 유산균 첨가군에서의 식이섬유함량

(3) 첨가 함유스낵의 총페놀함량 및 총플라보노이드함량

- 치커리분말, 가르시니아 캄보지아, β -1,3/1,6-glucan과 유산균 첨가스낵의 총 페놀 함량을 측정 한 결과는 표 3과 같다. 총 페놀 함량은 일반적으로 항산화와 항암활성과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 식물체주에서 많은 페놀성 화합물과 플라보노이드 화합물을 생산하고 있다고 보고되었다(Lee et al. 2011, Yoo et al. 2011). 총 페놀 함량은 대조군이 6.25 mg gallic acid equivalents/100 g, 치커리분말첨가군과 가르시니아 캄보지아 첨가군이 각각 10.38, 8.34 mg, β -1,3/1,6-glucan과 유산균이 6.23 mg gallic acid equivalents/100 g인 것으로 나타났다. 이는 β -1,3/1,6-glucan과 유산균군에서는 밀가루에 함유되는 페놀성 화합물 이외에는 나타나지 않는 것으로 보인다. 일반 밀가루에서는 가공과정에서 페놀성 화합물이나 플라보노이드 성분들이 불순물로 취급되어 탈색, 가공과정에서 제거되어져 대조군에서는 낮은 농도를 보이고 있으나 치커리분말이나 가르시니아 캄보지아 첨가군에서는 첨가물에 페놀성 화합물, 플라보노이드 화합물을 함유하고 있는 것으로 보여진다. 또한 페놀성화합물과 플라보노이드 화합물은 건강 기능성을 높이는 소재이기도 하지만 저장성과 안정성을 높이는 소재이기도 하다.

표 71. 치커리분말 함유스낵의 총페놀함량 및 총플라보노이드함량

	Control	치커리분말	가르시니아 캄보지아 분말	β -1,3/1,6-glucan과 유산균
Total phenolic contents(μ g/mg)	6.25 \pm 0.57	10.38 \pm 0.63	8.34 \pm 0.47	6.23 \pm 0.31
Total flavonoid contents(μ g/mg)	8.69 \pm 1.38	24.35 \pm 1.85	14.34 \pm 1.66	8.38 \pm 2.63

(4) 치커리첨가 스낵에서의 (DPPH) radical 소거활성

- DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되며, 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(Lee S. G. 2008). 치커리분말 첨가 스낵과 대조군, 그리고 가르시니아 캄보지아 추출물을 첨가한 스낵에서의 DPPH radical 소거능은 Table 4에 나타내었고, DPPH radical을 50% 저해하는 시료의 농도를 RC₅₀값으로 표기하였다. 3가지 시료에서 치커리 추출물첨가군과 가르시니아 캄보지아 첨가군의 DPPH radical 소거능은 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 치커리분말 첨가군과 대조군에서는 유의적으로 높은 DPPH 소거능을 보였다. 치커리분말을 첨가한 그룹 중 DPPH RC₅₀값이 73.25 ± 1.5 μg/mg, 가르시니아 캄보지아 추출분말 첨가군이 71.38 ± 4.8 μg/mg, β-1,3/1,6-glucan과 유산균이 73.97 ± 8.64 μg/mg 으로 나타났고, 대조군은 153.27 ± 3.57 μg/mg으로 나타나 두 첨가그룹보다 유의적으로 낮았다. 즉 치커리첨가군과 가르시니아 캄보지아첨가군, 그리고 β-1,3/1,6-glucan과 유산균이 DPPH 소거능이 우수함을 알 수 있었다.

표 72. 치커리 추출물, 가르시니아 캄보지아첨가 스낵에서의 DPPH radical 50% 소거농도

Samples	DPPH RC ₅₀ ¹⁾ (μg/mg)
일반밀가루첨가(control)	153.27±3.57 ^b
치커리분말첨가	73.25±1.5 ^a
가르시니아 캄보지아 첨가	71.38±4.8 ^a
β-1,3/1,6-glucan과 유산균	73.97±8.64 ^a

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction.

²⁾Values are means of triplicate determinations ± SD.

³⁾Means with different letters are significantly different (p < 0.05).

⁴⁾t-Butylatedhydroxyanisole (BHA) were used as positive references.

(5) 색도의 측정

- 대조군, 치커리분말, 가르시니아 캄보지아, β-1,3/1,6-glucan과 유산균 첨가 제조한 스낵에서의 표면색도는 명도(L)와 황색도(b) 값은 각각 83.24, 85.37, 78.23, 85.56 그리고 24.08, 23.05, 24.78, 23.88로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 치커리분말 첨가군과 가르시니아 캄보지아 첨가군에서 각각 8.54와 14.55로 가르시니아 캄보지아군의 적색도(a)가 높은 것으로 나타났다. 이러한 색변화는 스낵의 굽는 과정에서 존재하는 flavonoid 색소성분이 색변화와 마이라르 반

응에 의해 발생하는 색변화에 기인하는 것으로 예상된다.

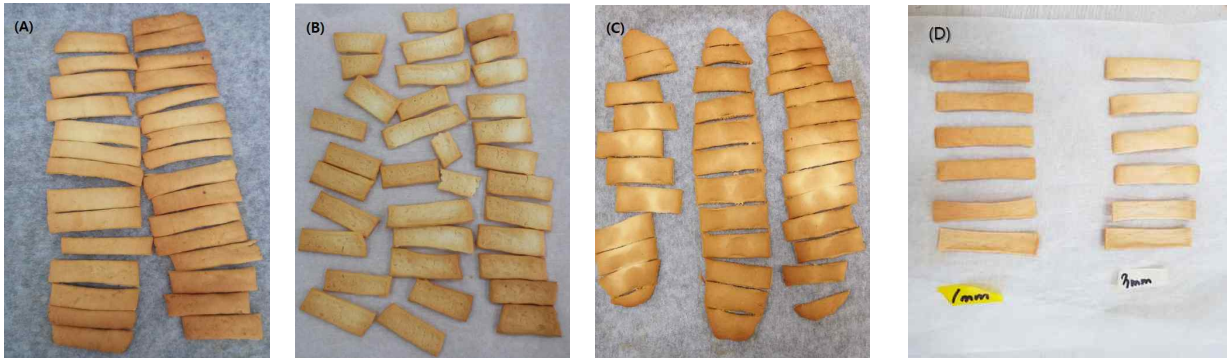


그림 109. 첨가물(밀가루, 치커리, 가르시니아 캄보지아 분말, β -1,3/1,6-glucan과 유산균)을 첨가 제조된 스낵

표 73. 치커리분말과 가르시니아 캄보지아분말, β -1,3/1,6-glucan과 유산균을 첨가하여 제조된 스낵의 색도변화.

Sample	Color		
	L	a	b
일반밀가루첨가(control)(A)	83.24±0.03 ^a	8.62±0.02 ^a	24.08±0.04 ^a
치커리분말첨가(B)	85.37±0.01 ^a	8.54±0.05 ^a	23.05±0.03 ^a
가르시니아 캄보지아 첨가(C)	78.22±0.02 ^{ab}	14.55±0.02 ^b	24.78±0.02 ^a
β -1,3/1,6-glucan과 유산균	85.56±0.02 ^a	8.55±0.01 ^a	23.88±0.03 ^a

Values (means±standard deviation) within a column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

(6) 치커리 함유 스낵의 물성의 측정

- 치커리분말을 함유한 스낵의 경도는 65.47 N이며, 대조구의 경우 98.01 N, 가르시니아 캄보지아 분말첨가구의 경우 43.43 N 그리고 β -1,3/1,6-glucan과 유산균군이 72.41 N 으로 측정되었다. 대조구의 경우 식이섬유성 소재가 첨가한 경우보다 매우 높은 경도를 보였는데 이는 밀가루에 함유하고 있던 글루텐과 탄수화물이 스낵의 형성과정에서 결합의 강도가 높게 작용한 것으로 풀

이된다. 대조구의 경도가 치커리, 가르시니아 캄보지아 첨가구보다 높게 측정된 이유는 이용된 곡류의 차이에 의한 단백질 함량의 차이 때문으로 보여진다(Kim et al., 2001). 또한 수분함량이 증가할수록 열을 이용하여 팽화시킨 팽화제품의 경도와 바삭성이 낮아진다고 알려져 있다 (Badrie & Mellowes, 1991). 응집성은 식품의 형태를 구성하는 내부적 결합에 필요한 힘으로 정의되고 있는데 대조군의 응집성은 0.58로 치커리분말 첨가군의 0.25와 가르시니아 캄보지아첨가군의 0.23, β -1,3/1,6-glucan과 유산균 0.24보다 유의적으로 높게 측정되었다. 탄성력은 외부의 힘에 의하여 변형된 물체가 외부의 힘이 제거되었을 때 본래의 상태로 되돌아가려는 성질로, 치커리첨가군이 0.43으로 높게 측정되었으며 다음으로 가르시니아 캄보지아 첨가군이 0.38, β -1,3/1,6-glucan과 유산균이 0.36 그리고 대조군은 0.31로 세 종류의 스낵에서 큰 유의적 차이가 있지는 않는 것으로 나타났다. 씹힘성은 고체식품을 삼킬 수 있는 상태까지 씹는데 필요한 힘으로 경도, 응집성, 탄력성과 관계가 있으며 대조군 스낵은 5.66으로 세 종류 중 가장 높은 것으로 측정되었으며, 비교시료들과 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 치커리분말 첨가 스낵의 물성적 특성 결과에서, 경도는 어린이들이 먹기에 적당한 스낵으로 적당한 수치가 측정되었다.

표 74. 첨가물분말을 첨가한 스낵의 물성분석

Parameter	일반밀가루첨가 (control)	치커리분말첨가	가르시니아 캄보지아 첨가	β -1,3/1,6-glucan 과 유산균
Hardness	98.69	65.47	43.43	72.41
Cohesiveness	0.58	0.25	0.23	0.24
Springiness	0.31	0.43	0.38	0.36
Chewiness	5.66	4.38	4.57	3.82

1) Means with different superscript letters are significantly different (p<0.05).

(7) 관능평가

- 남부대학교 식품영양학과 3학년, 1학년 대상으로 설문을 실시하였으며, 종합 9점 척도법으로 측정하여 아래 그림 110과 같이 나타났다. 밀가루를 첨가하여 제조한 대조구에 비하여 치커리분말 첨가군과 가르시니아 첨가군이 맛, 색, 향, 질감, 그리고 전체 기호도가 우수하였었고, 가르시니아 캄보지아첨가군과의 비교에서도 색과 맛만 동일한 값을 나타내고 모두 우수하여 치커리 분말 첨가군이 관능적인 면과 기호적인 면에서 우수성이 보였다.

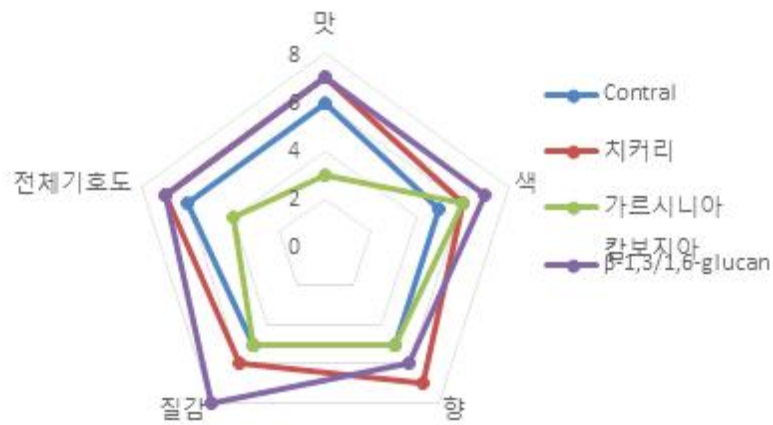


그림 110. 첨가물(밀가루, 치커리, 가르시니아 캄보지아 분말, β -1,3/1,6-glucan과 유산균)에 따른 기호도의 변화

본 실험에 결과로 제조된 영양과자에는 유산균과 유산균에 도움이 되는 치커리분말 등이 첨가되었으나 유산균은 분명히 과자의 제조과정 중에 사멸하여 우리가 얻고자 하는 유산균의 면역활성 증진에는 문제가 있을 것으로 판단되나, 최근의 연구결과에 따르면 김치유산균의 면역증진활성과 김치를 함유한 김치찌개물의 면역증진활성에 대한 연구가 Scientific Reports(2017.1)에 소개되었다. 이는 사멸된 유산균에서도 분명한 면역증진효과가 추가적으로 있는 것을 확인하였으며 유산균 자체보다는 떨어지지만 유의하지는 않은 것으로 보고하고 있다. 따라서 본 과제에서 제시하는 β -1,3/1,6-glucan과 유산균을 첨가하여 개발한 과자의 경우에서도 heat killed lactic acid bacteria에서도 동일한 결과를 예측하고 있다.

prebiotics로 작용하는 β -1,3/1,6-glucan과 probiotics로 작용하는 유산균의 동시에 면역활성을 기대하지만 열처리를 통한 사멸한 유산균에서도 유의한 면역증진효과를 기대한다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

- 가. 본 연구의 1차적인 목표는 *A. pullulans*가 생산하는 면역증강용 소재인 β 1,3 linkage를 갖는 순수한 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 이중면역시스템에 대한 *in vitro*, *in vivo* 및 인체적용시험을 통한 효능 규명에 있으며, 각 연구 목표는 외부기관 또는 외부공인시험기관을 통해 효능 규명을 완료하고, 주관기관에서는 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 및 분리 정제 공정 및 제품화 기술개발을 완료하였음
- 나. 협동기관 한국생명공학연구원에서는 순수 β 1,3/1,6-glucan을 생산하는 *A. pullulans* 변이균주를 개발하고, 이를 주관기관 (주)선일바이오에 기술이전을 완료하였으며, *A. pullulans*로부터 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 및 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 대량생산 공정 개발을 완료하였음
- 다. 협동기관 남부대학교에서는 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 다양한 실버푸드에 대한 시제품 개발을 완료하고 이의 특성 분석 및 기호도 조사를 통해 시제품 개선을 추진하였음.
- 라. 협동기관 (주)셀아이콘랩에서는 β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 아우터뷰티 및 이너뷰티에 대한 효능 시험 및 제품 개발을 완료하고 국내외 수출을 진행하는 성과를 도출하였음
- 마. 상기한 바와 같이 각각의 참여기관이 본 사업의 목표를 모두 완수하였음

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1. β 1,3/1,6-glucan과 유산균 시작품 제작	- β 1,3/1,6-glucan 및 3 kg 분말 이상 및 유산균 1 kg 분말 이상 시작품 제작 완료
2. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석 완료
3. β 1,3/1,6-glucan을 독성 시험	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 독성 시험 완료(외부공인시험기관, 한국화학융합시험연구원)
4. <i>in vitro</i> 면역 활성 분석	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석 완료
5. β 1,3/1,6-glucan 임상시험	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 인체적용시험(외부기관, 세명대학교부속한방병원)
6. 녹색 기술 및 녹색제품 인증	- 현재 진행 중
7. β 1,3/1,6-glucan 생산 공정	- 5 톤 발효조에서 β 1,3/1,6-glucan 생산 및 분리 정제 공정 개발 완료
8. TLR 2 & 4 활성 유산균 확보	- TLR 2 & 4 기반 면역활성 유산균 확보 - 특허 등록 1 건 및 기술이전 1 건
9. β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석 및 Spec. 확립	- β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석 및 제품화 Spec. 완료

10. 제품 생산 경제성 분석	- β 1,3/1,6-glucan 생산에 대한 경제성 분석 완료 및 제품화
11. β 1,3/1,6-glucan의 피부개선 효능 평가	- β 1,3/1,6-glucan의 피부개선 효능 평가 완료 (외부기관, 충남대학교)
12. β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가 시험	- β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가 시험 완료 (외부기관, 충남대학교)
13. β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 인체 적용 시험	- β 1,3/1,6-glucan 기반 nutricosmetic 인체 적용 시험 진행 중 (외부기관 스킨메드피부과학연구소)
14. β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 개발	- β 1,3/1,6-glucan 기반 nutricosmetic 3 종 개발 완료
15. 실버세대를 위한 시제품 개발	- 실버세대를 위한 양갱류, 음료 등 5 종 시제품 개발 완료

4-2. 관련분야 기여도

가. 기술적 기여도

- (1) β 1,3/1,6-glucan을 포함하여 면역활성을 갖는 다당체는 일반적으로 다양한 다당체들이 복합적으로 생산되기 때문에 제품화하는데 있어 어려움이 있었으나, 본 연구를 통해 순수 β 1,3/1,6-glucan을 생산하는 *A. pullulans* 변이균주를 개발함으로써 식품이나 화장품의 용도 개발에 용이한 기술 개발임
- (2) 인체 내에서 면역 효능을 증강시키기 위해서는 서로 다른 면역소재를 동시에 사용하는 것이 효율적인 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 dectin-1 receptor 기반 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균을 이용한 이중면역시스템을 통해 면역효능을 증가시키고자 하였으며, 이를 *in vitro*, *in vivo* 및 인체적용시험을 통한 효능 규명을 완료하였음
- (3) 또한 일반적으로 다당체의 대량생산 시 생산량의 한계가 있어 이를 사업화하는데 있어 경제성 문제가 대두되어 왔으나, 본 연구에서는 *A. pullulans*로부터 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정 및 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 대량생산 공정 개발을 완료함으로써 향후 사업적 측면에 기여한 것으로 판단됨

나. 경제적 기여도

- (1) Dectin-1 receptor 기반 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균에 대한 *in vitro*, *in vivo* 및 인체적용시험을 통한 효능 규명을 완료함으로써 이에 대한 건강기능성식품원료 소재 개별인정을 위한 기반을 확립하였고, 이를 통해 향후 기능성 식품시장의 진입 및 확대에 기여할 것으로 예상함
- (2) β 1,3/1,6-glucan과 유산균의 원료소재 사업화 및 이를 유효성분으로하는 식품, 건강기능성식품 및 화장품 등 고부가가치식품산업으로의 용도 개발이 가능할 것으로 판단됨

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>1. <i>A. pullulans</i> 변이균주가 생산하는 β 1,3/1,6-glucan의 활용 계획</p> <p>가. 주관기관 (주)선일바이오에서는 <i>A. pullulans</i> 변이균주가 생산하는 β 1,3/1,6-glucan을 액상 및 분말 형태의 제품 개발을 완료하여 이의 원료사업화를 진행하고 있음</p> <p>나. 참여기관 (주)셀아이콘랩에서는 β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Cosmeceuticals-Nutricosmetics 사업화를 진행하여 국내 판매뿐만 아니라 말레이시아, 러시아, 리투아니아, 우크라이나 등 해외수출을 진행하고 있으며, 주관기관 (주)선일바이오와 업무협약을 통해 β 1,3/1,6-glucan의 화장품 원료소재 사업화도 진행할 예정으로 있음</p> <p>다. 주관기관 (주)선일바이오와 참여기관 (주)셀아이콘랩에서 국내외 식품 및 화장품 전시회를 통해 다각적인 마케팅을 진행하고 있으며, 특히 최근에는 세계적인 전시회인 AMWC(Anti-aging Medicine World Congress)를 통해 러시아 시장용 제품을 런칭 완료를 했으며 자사 브랜드 홍보를 위해 다각도의 판매처 확보를 위해 노력하고 있음</p> <p>라. 주관기관 (주)선일바이오에서는 dectin-1 receptor 기반 β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균에 대한 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 및 인체적용시험을 통한 효능 규명을 완료함으로써 이에 대한 건강기능식품원료소재 개별인정을 위한 기반 기술을 확보하였고, 현재 인체적용시험을 추가적으로 진행하여 개별인정을 획득할 예정으로 있어 향후 기능성 식품시장의 진입하고자 노력하고 있음</p> <p>마. 이와 같이 본 사업을 통해 개발된 면역활성 소재인 β 1,3/1,6-glucan은 주관기관과 참여기관이 자체적인 사업화를 추진하고 있음</p> <p>2. TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균의 활용 계획</p> <p>가. 주관기관 (주)선일바이오에서는 TLR 2 & 4의 활성을 유도하는 유산균을 확보하고 이를 (주)남도농산에 기술이전을 완료하였음</p>	

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

1. β -glucan 포함 면역 활성을 갖는 다당체

- 동물의 면역계에 대한 활성 증진력을 갖는 대표적인 다당체는 α -mannan 및 β -1,3-Glucan은 여러 가지 종류의 식용버섯, 효모, 보리, 귀리 등에 함유되어 있는 것으로서 알려져 있으며, 특히 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β -1,3-Glucan은 면역 증강 활성이 높고, 표고버섯 자실체로부터 추출되는 렌티난(lentinan)과 같은 폴리머는 의약품으로서 이용되고 있음
- 일반적으로 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β -1,3-Glucan은 그 생육·재배 조건에 따라 포함되는 β -1,3-Glucan의 함량이나 분자량 등이 크게 차이가 있어 추출 결과로서 얻어지는 β -1,3-Glucan의 경우 고분자체와 저분자체가 혼재하는 등 품질이 일정하지 않아 실용화하기 어려운 단점을 지님

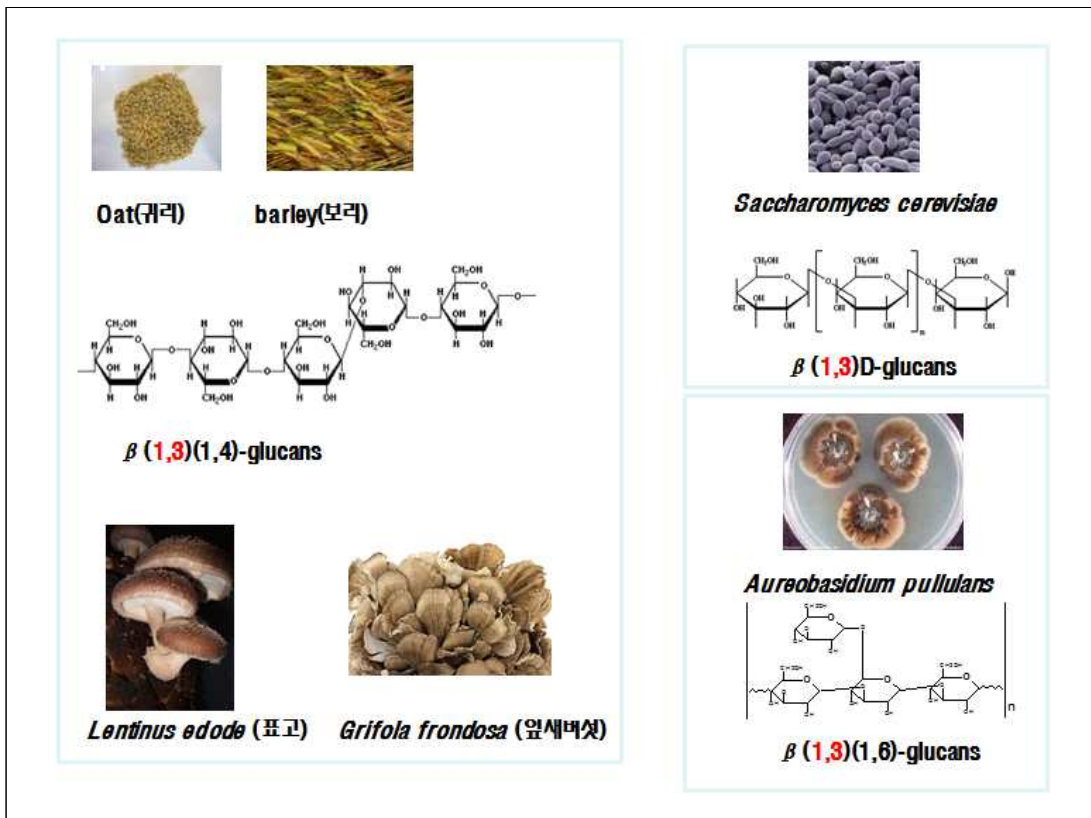


그림. 자연계에 존재하는 다당체 함유 천연소재의 종류

- 다양한 버섯 유래의 소재들이 많은 산업 분야에 응용되고 있으며 대표적으로는 상황버섯, 아가리

쿠스, 동충하초, 영지 버섯, 표고 버섯 등이 응용되고 있음. 그러나, 이들 버섯 유래의 물질들은 대부분 자실체 추출물로서 소량 응용되고 있는 것이 현실이었으며 최근 치마 버섯의 균사체로부터 얻어진 다당체로부터 화장품으로 응용 되기 시작하였음. 또한, 범용적인 소재로서 효모 유래의 베타 글루칸은 널리 알려진 물질이나 화장품의 응용에는 물질 자체의 난용성과 일부 다국적 회사에서 개발된 수용성 유도체를 직접 제품에 적용하기에는 가격적인 문제점을 가지고 있음.

표. 버섯류의 산업적 응용 분야

원 료 (Raw material)	기 능	업체명
상황버섯	노화억제, 미백	한불화장품(주)/ 나드리화장품(주)
치마버섯, 운지버섯, 동충하초, 상황버섯, 아가리쿠스	피부노화방지, 면역활성, 보습	태평양(주)
눈꽃동충하초	당뇨병치료, 항피로효과	이우양행(주)
느타리버섯, 노루궁뎅이버섯	면역기능, 당뇨병치료, 치매치료제	NC 바이오텍
천연송이 균사체	항암제	셀바이오텍
표고버섯	보습, 노화방지	바이오랜드
목질진흙버섯, 영지버섯	면역증강, 항산화, 미백, 보습, 항여드름	일양약품
흰목이버섯, 잎새버섯	당뇨병 예방	폴무원

- UkaiS(1972)등이 백목이 버섯으로부터 분리한 산성다당류를 동물 실험을 통하여 sarcoma180에 대한 항 종양활성을 실험한 결과, 원산지에 따라 37 ~ 64%의 활성을 나타낸다고 보고하였음. 또한, 백목이 버섯 추출물이 다이어트 및 콜레스테롤의 증가를 억제하는 작용이 있다는 결과도 보고되었음.
- 이와 같이 버섯류로부터 생산되는 다당체의 경우, 다양한 생리활성을 갖고 있으며, 특히 동물의

면역 증진에 큰 효능을 나타내고 있어 사료 산업에 있어 중요한 소재 중 하나임. 따라서 본 연구에서는 백목이 버섯 유래 다당체를 이용한 기능성 원료소재의 대량 생산 공정 개발을 통한 산업화가 필요함.

- Dectin receptor는 쥐의 epidermal DC-line에서 cDNA 분석을 통해 최초로 발견되었으며, 다양한 세포에서의 분석결과 DC 외에 macrophage, monocyte, neutrophils, NK cell, B-cell, T-cell 등의 면역 세포에서 발현이 확인되었으며, 또한 발현양은 크지 않지만 간(liver), 폐(lung), 흉선(thymus), 위(stomach), 비장(spleen), 소장(small intestine), 신장(kidney), 심장(heart)의 상피조직(epidermal)에서도 그 발현이 관찰되어 다양한 세포 및 조직에서 광범위하게 발현됨이 보고됨
- 또한 dectin-1은 외부항원물질(pathogen)에 의해 생성된 β -1,3-Glucan 구조의 pattern을 인식하는 PRRs(pattern recognition receptors)에 속하며, dectin-2 receptor는 α -mannan에 의해 유도되는 면역 체계임

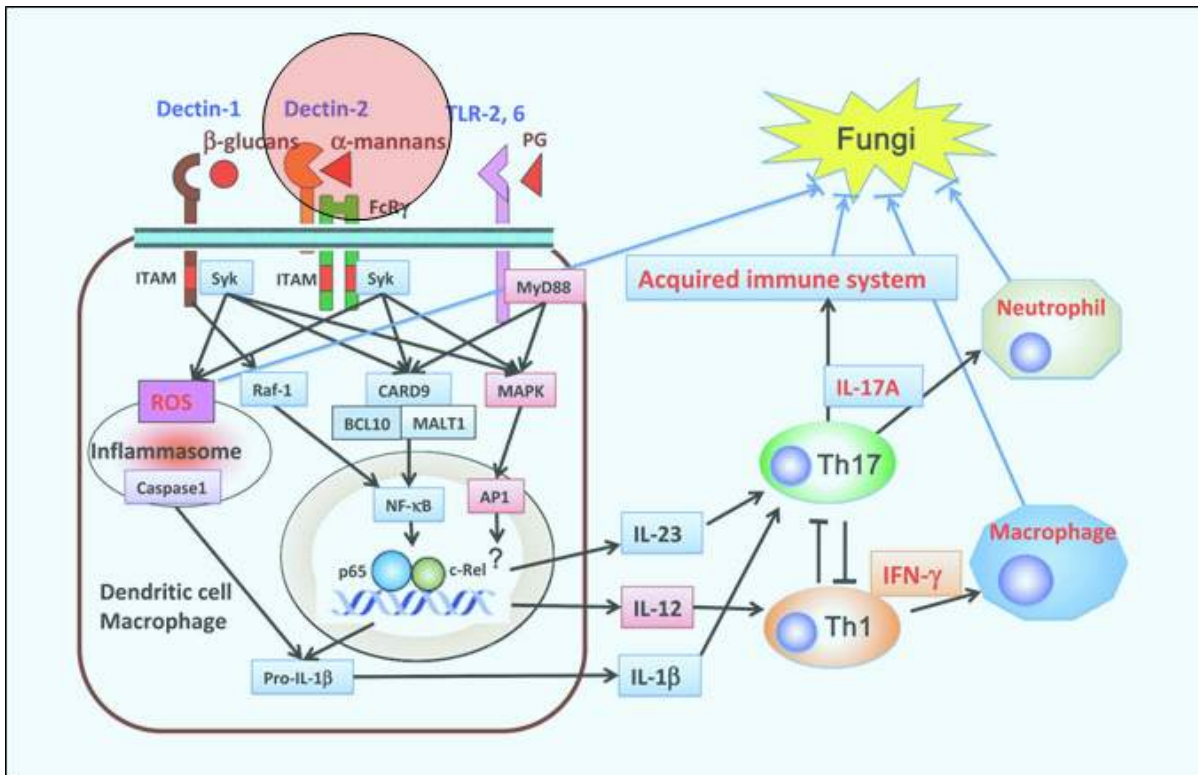


그림. 다당체 종류에 따른 면역 활성 수용체

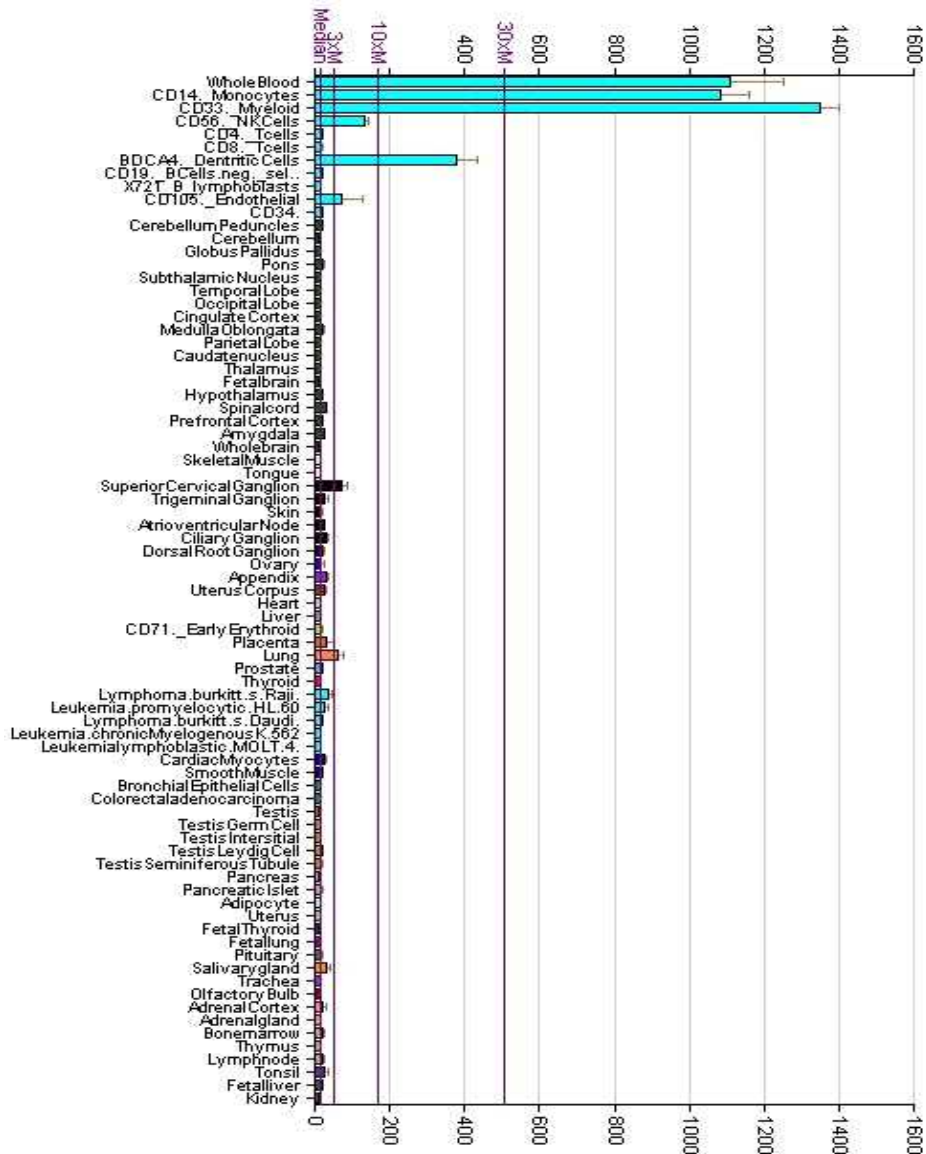


그림. Dectin receptor expressed in the cell and tissue.

- 또한 다당체에 의한 Dectin receptor의 신호전달 과정은 ROS(reactive oxygen species)의 활성을 유도하여 세포내 또 다른 Dectin-1에 의해 β -1,3-glucan의 phagocytes와 degradation에도 영향을 미치며, 이때 Rac-1, cdc42 단백질이 관련되어 있다고 보고되어 있음. 하지만 Dectin-1과 관련된 세포내 신호전달은 아직 많은 부분이 알려지지 않았으며, myeloid 계통의 세포에서 앞서 언급된 CBM-complex의 관련 정도가 보고되어 있음

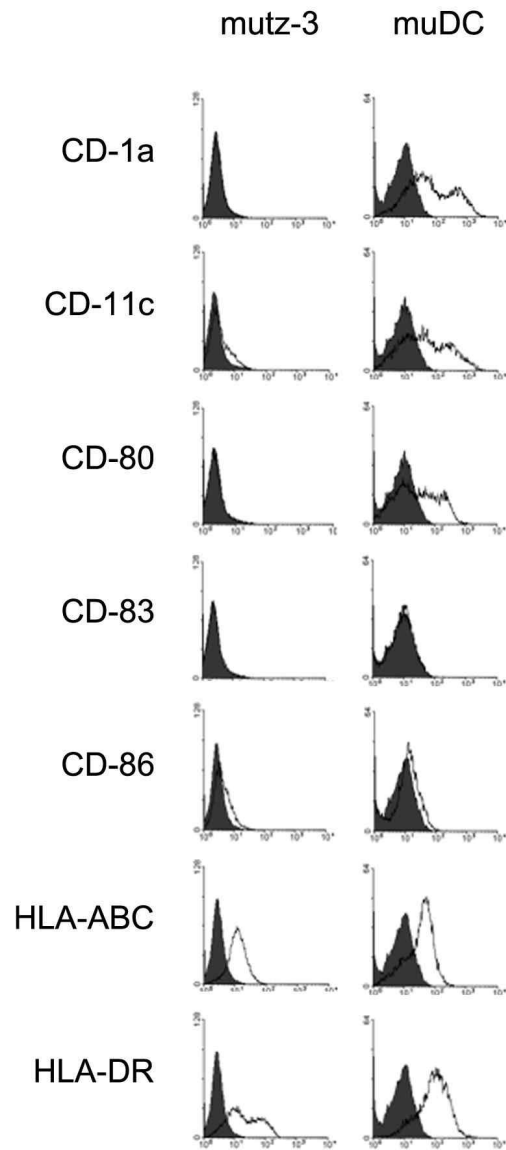
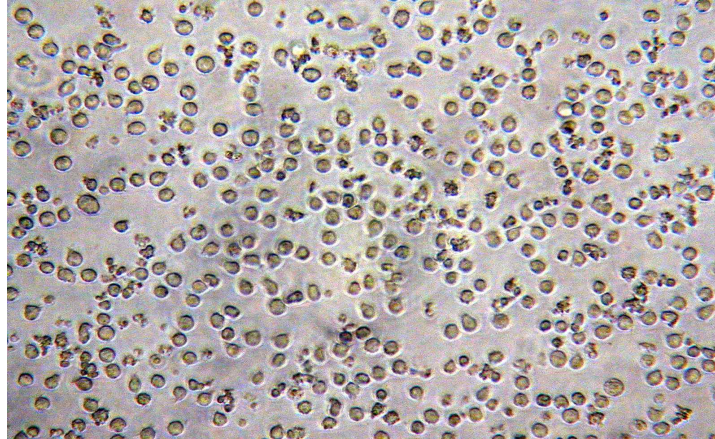
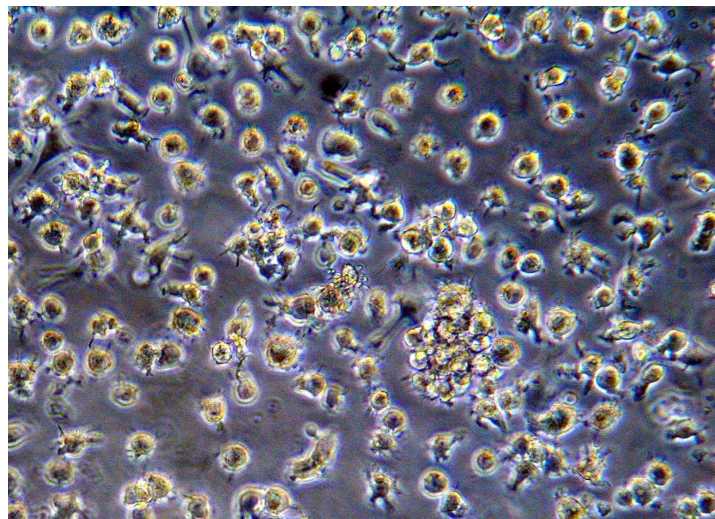


그림. Expression of dendritic cell surface marker. muDC was differentiated by GM-CSF, IL-4, TNF- α for 48hr.

- 분화 이전의 Mutz-3 세포주에서는 DC specific marker인 CD1a, CD11c가 발현되지 않았으며, MHC-classII인 HLA-DR, CD80, CD83, CD86, DC-sign 등 DC의 기능적 역할을 수행하는 단백질 역시 낮은 수준으로 발현되어 있거나 발현이 전혀 확인되지 않았으나, 분화 후 48시간 이후의 muDC에서는 CD1a, CD11c의 DC specific marker가 Mutz-3에 비하여 높은 수준으로 발현되고 있었으며, B7-molecule 중에서는 CD80의 발현이 확인됨



<Mutz-3>



<muDC>

그림. Difference of cell morphology between Mutz-3(Top) and muDC(48hr, Bottom).

- 세포 배양시 현미경 관찰에 의한 세포의 형태적인 변화 역시 관찰이 가능하였다. 분화 이전의 Mutz-3 세포는 monocytic 한 형태를 하고 있으나, 분화 후의 muDC에서는 dendritic한 형태로 변화되는 것이 확인되었으며, 세포의 크기 역시 증가하였다. 이는 분화시작 후 12시간 전, 후로 관찰이 가능하였음
- 특히 Chang(PLoS Pathog, 2017) 등은 single receptor-deficient DCs에서 dectin-1 또는 dectin-2 receptor의 결핍시키고, Clec4n^{-/-}, Clec7a^{-/-}, and Clec7a^{-/-} Clec4n^{-/-} mice의 cell을 이용하여 실험한 결과, NLRP3 inflammasome에서 Dectin-2가 primary receptor로 Dectin-2가 secondary receptor로 작용함을 확인하였음(그림)

- 또한 Chang(PLoS Pathog, 2017) 등은 dectin-1 또는 dectin-2 receptor 모두 Syk-JNK signal pathway에서 trigger되어 signal 1 (pro-IL-1 β synthesis) and signal 2 (activation of caspase-1)을 활성화시킨다는 사실을 보고하였음.

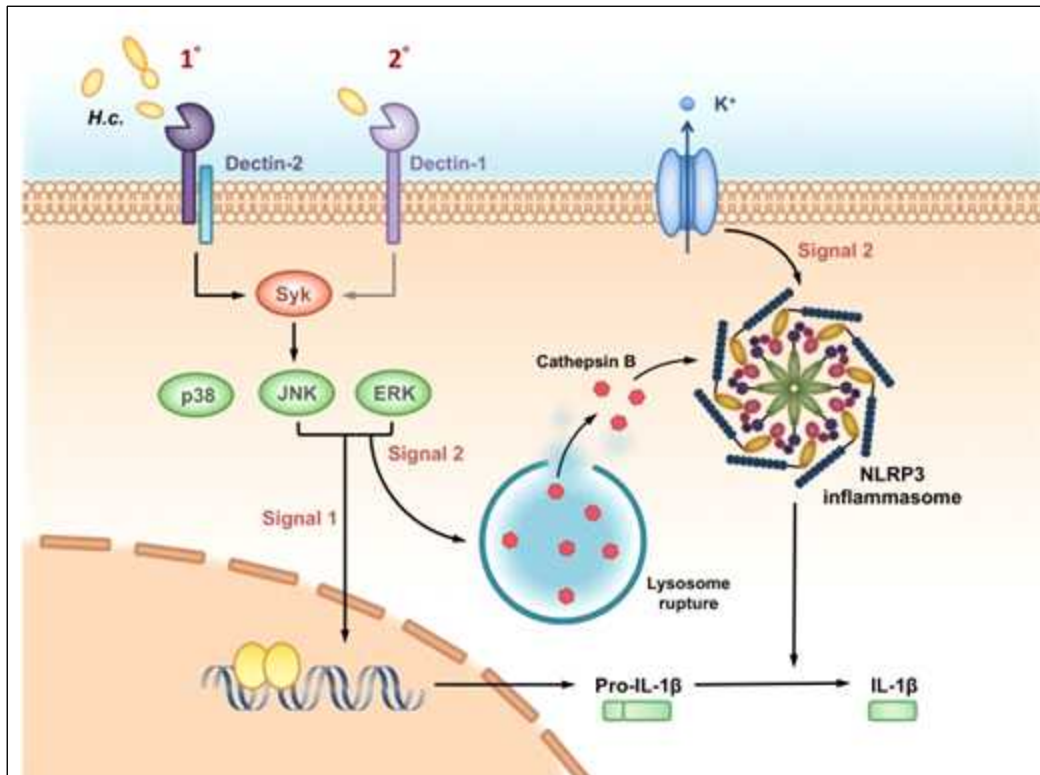


Fig. A working model—Dectin-2/Dectin-1 and their downstream signals regulate *H. capsulatum*-induced NLRP3 inflammasome activation.

Tzu-Hsuan Chang et al., PLoS Pathog. 2017 Jul; 13(7)

- Dectin-2 receptor는 C-type lectin이며, 수용체 내에 carbohydrate-recognition domain (CRD)을 갖고 있고 이는 면역 초기에 Fc receptor γ subunit와 상호작용을 하는 transmembrane sequence 에 link되어 있음. Dectin-2 receptor의 CRD는 mannose-linked α 1-2 또는 α 1-4 결합을 갖는 mannan에 의해 상당히 강한 결합을 형성함으로써 면역을 유도하는 것으로 밝혀졌음 (Hadar Feinberg et al., 2017, J Biol Chem)
- 또한 glycan array 분석을 통해 다양한 maannan 형태에 따라 dectin-2와 mannan- type

polysaccharides의 interaction을 실험한 결과, α 1-2 또는 α 1-4 linkage의 disaccharides 경우 각각 affinities K_d 가 2.6 and 3.1 mM로 가장 강한 결합을 유지하는 것으로 확인되었음

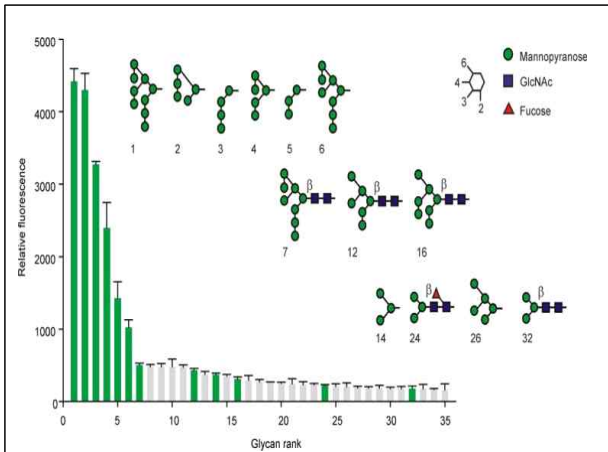


Fig. Glycan array analysis of dectin-2 binding to oligosaccharide ligands

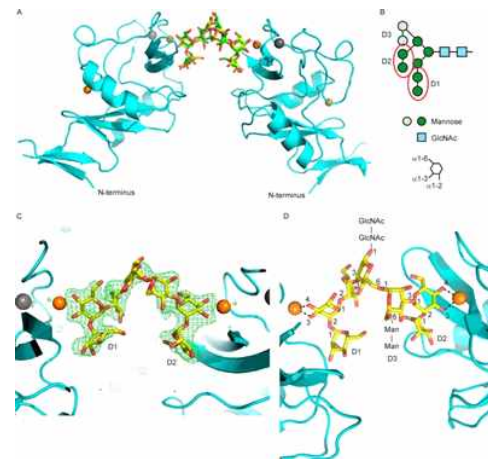


Fig. Arrangement of CRD and oligosaccharide ligand in dectin-2 crystals

Hadar Feinberg *et al.*, J Biol Chem. 2017 Aug 11; 292(32):

2. 미생물 및 미생물 유래 다당체의 고농도 배양 방안

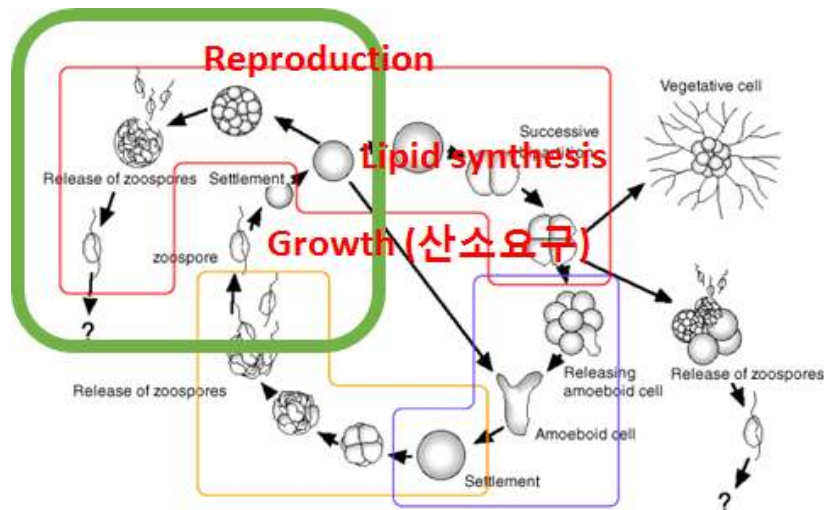
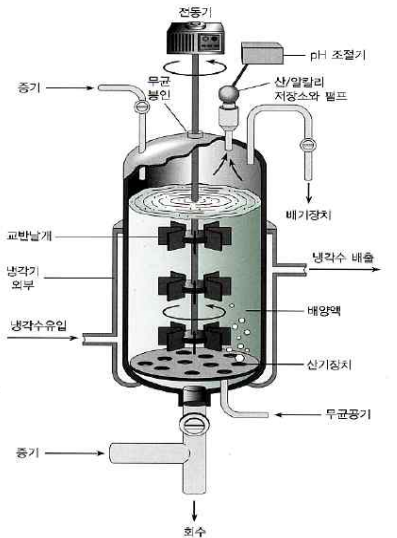


그림. 종속영양 미생물의 산소 요구도

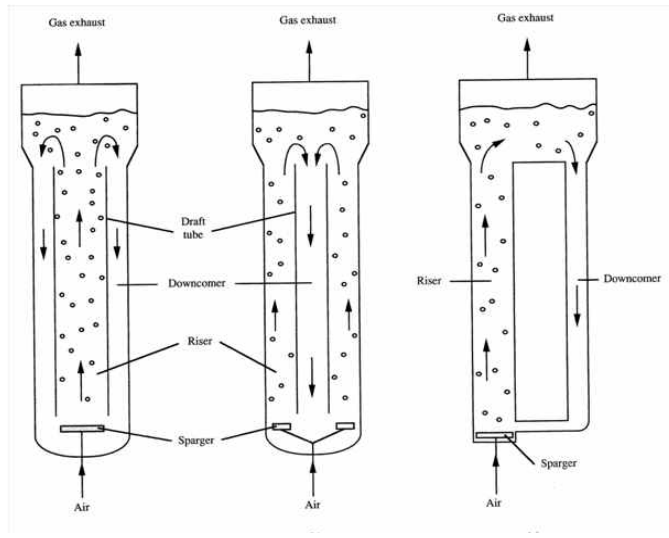
- 일반적으로 미생물 균체는 배양과정에서 발효조 내의 impeller에 의한 agitation이나 공기의 과도한 공급으로 인해 과쇄됨에 따라 세포의 성장과 생산물질의 감소를 유발함. 따라서 미생물의 고농도 배양과 product의 고농도 생산을 위해서는 단시간 배양을 통해 높은 생산량을 위해서는

배양기내 효율적인 산소공급이 매우 중요함 (Chang et al., Bioresource Technology, 142: 400-406, 2013). 일반적으로 교반(stir)형 배양기에서 고농도의 산소 공급을 위해서는 교반속도, 공기공급량을 높여야 하는데 이는 미세조류 배양 과정중 배양기 내의 전단응력의 증가로 균체가 쉽게 파괴되는 단점을 가지고 있음.

- 유용 물질 생산성 증가를 위한 미생물 배양의 경우, 생산성 증가를 통한 미세조류 배양의 경제성 확보 및 현재 보급되고 있는 배양장치의 낮은 산소전달효율로 인한 과잉 공기 공급에 따른 높은 에너지 비용 소모 문제의 해결을 통한 경제성 확보는 여전히 해결해야하는 문제 중 하나임.
- 균사체 배양 시 마이크로 버블 적용 및 산소전달효율 증가의 효과
 - 배양조 내 마이크로 버블 공급은 높은 산소전달효율을 가지는 마이크로 버블 특성으로 인해 미생물 배양에 소모되는 에너지 비용을 절감시킬 뿐만 아니라 product의 생산성 증가에 필요한 중요한 요인임



(a) 표준형 배양장치



(b) 기포탑 배양장치

그림. 표준형 배양장치 및 기포탑 배양장치 구조

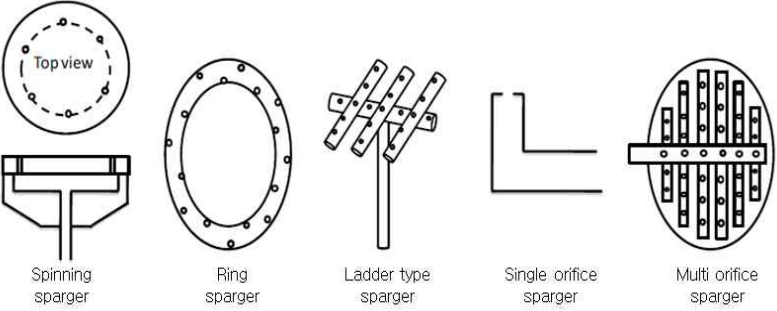
구분	표준형	ALB
Aeration 방식	<p>●아래와 같은 다양한 형태의 Sparger(공극: 1 ~ 20μm)에 의한 공기공급</p>  <p>Spinning sparger Ring sparger Ladder type sparger Single orifice sparger Multi orifice sparger</p>	
교반 방식	<p>●다양한 형태의 impeller에 의한 교반 - Disc turnin type, rushton type 등</p>	<p>●드래프트 튜브 통한 공기 순환에 의한 교반</p>

그림. 일반적인 배양장치의 공기공급 방식 및 교반 방식

(2) 국내외 미생물 배양 장치의 문제점

- Sparger에 의한 CO₂ 또는 공기(O₂)의 주입시 가스 전달 효율은 13%정도로 낮아 주입되는 가스량의 80% 이상은 성장에 사용되지 못하고 대기 중으로 방출됨으로, 미생물의 고속성장 및 고농도 배양위해 높은 산소전달률을 위한 효율적 공기 공급을 해야 됨.
→ 미생물 배양위한 에너지 비용의 증가 초래 및 과잉 주입된 공기에 의한 강한 교반에 의해 미생물 세포의 손상이 발생되기도 함
- 미생물 배양을 위한 배양 장치의 경우 교반과 공기의 공급이 독립적으로 이루어지는 표준형 (교반형) 배양장치(그림)와 전단응력에 민감한 세포의 배양을 목적으로 별도의 교반 설비 없이 공기의 순환을 통해 교반이 이루어지는 기포탑 배양장치 (그림)가 일반적으로 제작 판매되고 있음.
- 표준형 배양장치와 기포탑 배양장치 내 공기는 표 4에서 제시된 바와 같이 다양한 형태의 sparger를 이용하여 공급되고 (공급 버블 크기: 600 μ m 내외), 표준형 배양장치의 교반은 다양한 형태의 impeller를 이용하여 이루어지며(교반범위: 0 ~ 1,200 RPM), 기포탑 배양기의 교반은 드래프트 튜브(유리관)를 통한 공기의 순환에 의해 이루어짐.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류 일반과제	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>○ 본 사업과 관련하여 관련된 내용은 주관기관에서 관리하고 참여기관의 경우 자체 연구 보안지침에 따라 기술 유출 방지를 위해 노력함</p> <p>○ 본 사업과 관련하여 국가연구개발사업 공통 보안관리지침 (과학기술부 훈령 제238호)에 의거하여 연구개발사업의 결과에 대해 기술 유출을 방지함</p> <p>○ 동법 제 2장 6조에 근거하여 중소벤처기업 등 조직체계상 연구보안심의회의 운영이 어려운 연구기관에서는 연구기관의 장의 검토로 연구보안심의회의 기능을 대신 함</p> <p>○ 연구실 안전공제 보험에 가입하여 연구활동 중 발생된 사고에 대한 보상기준 및 조치 방안을 마련함</p> <p>○ 참여기관(한국생명공학연구원)의 경우, 2001년 이 규정은 “연구실 안전보건 관리규정” 을 신설하였음. 이 규정은 산업안전보건법과 동법 시행령 및 동법 시행규칙(이하 “법령” 이라 한다.)이 규정하는 바에 의하여 한국생명공학연구원(이하 “연구원” 이라 한다.)의 사고와 재해방지 및 사후 처리에 관한 사항을 정함으로써 직원의 생명과 건강을 보호하고 연구소의 재산을 보존함을 목적으로 하고 있음.</p>	

- 각 연구실의 최종 퇴실자는 연구실 내 가동 장비의 현황, 콘센트 전원 확인 연구실 이상 유무를 확인하고 이를 기록지에 점검 후 퇴실하며, 이에 대한 자료를 기반으로 매월 각 부서는 보안 및 안전점검 기록부를 확인하여 연구원에 제출함. 또한 전 직원은 매년 1회 이상의 연구실 안전관리에 대한 교육훈련을 의무적으로 받고 있으며, 각 연구실에는 기본적인 개인 안전장비 및 연구실 안전 장비를 확보하고 있음
- 또한 연구개발사업 보안관리지침에 따라 “국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정” 및 원규 “보안업무취급요령”에 의거하여 한국생명공학연구원(이하 “연구원”이라 한다)이 수행하는 연구개발사업의 보안 관리에 필요한 기준과 절차를 규정하고 있음
- 연구 보안책임자 “정”은 해당과제를 수행하는 연구책임자가 맡으며, 보안책임자 “부”는 참여 연구원 중에서 연구책임자가 지정한 연구원이 수행하며, 연구개발과제의 보안등급은 “국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정” 제24조의4(분류기준) 및 원규 “보안업무취급요령” 제23조에 의거 보안 등급을 분류함
- “연구원”은 국가연구개발사업과 관련된 중요 연구정보의 국외 유출을 방지하기 위하여 동 지침 제8조의2(보안등급에 따른 조치)에 따른 국가연구개발사업 보안관리 조치사항과 그 밖에 “연구원”이 필요하다고 인정하는 사항을 포함하여 자체 보안대책을 수립·시행하고 있음
- 또한 모든 과제의 비밀자료, 서류는 원규 “보안업무취급요령” 제3장에 의하여 관리하며, 연구책임자는 보안과제로 분류된 연구과제와 관련된 자료를 원규 “보안업무취급요령”에 따라 보관될 수 있도록 함
- 2014년 미래창조과학부 장관 서한(2014. 03. 11. 정보보안 및 개인정보 보호 조치 강화)에 따라 내부 정보 유출 방지 강화를 통한 기관 중요 정보 보호, 원내 정보시스템 및 업무용 PC 개인정보 보안사고 방지, 국정원 및 미래부 등의 정읍 보안 기준 강화 준수, 정보통신망법 및 개인정보보호법 등 법적의무 준수 등 정보 보안을 강화하고 있음
- 안전에 관한 사항의 입안 및 통제는 안전주관부서장이 보건에 관한 사항은 보건주무부서장이 담당하고, 부서장은 소관 작업장내 안전보건에 관한 책임을 지며, 모든 직원은 안전보건에 관한 규정과 지시를 준수함
- 원장은 법령에서 정한 자격이 있는 자 중에서 안전관리자를 임명하며, 안전관리자는 관리규정 5조 5항의 각 호에 해당되는 사항을 준수하여 실험실 안전 관리를 수행하고, 제 6 조의 화기책임자는

화재 및 폭발사고의 예방을 위하여 작업장마다 화기책임자 정, 부를 두되 책임자 “정”은 소속 부서장이 되고, “부”는 해당작업장에 근무하는 직원중에 부서장이 선임하여 제 6조 각 호의 해당되는 사항을 준수함

○ 제 7조의 안전유지담당자는 업무상 위대한 작업을 수행하는 부서장은 소관구역에서의 사고 또는 재해발생을 예방하기 위하여 소속직원 중에서 안전유지 담당자를 선임하여 안전주관부서장에게 통보하여야 하며, 안전유지 담당자는 안전관리에 관하여 소속부서장을 보좌하여 다음 제 7조 각 호의 사항을 담당함

○ 또한 관리규정 제 3 장 위해관리를 위해 전 직원은 위험물 및 유해물을 저장, 취급 및 처리한 구역내에서는 제 9조 각 호의 사항을 준수함

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	톨 유사 수용체2 매개된 면역 활성화 및 병원균에 대해 항균 활성을 갖는 젓갈 유래 락토바실러스 퍼멘텀 SI-1309 균주 및 이의 용도	선일 바이오(주)	주저자	한국	-	2017.06.05	단독	-
2	특허	콜라겐 합성 촉진 펩타이드 이의 제조방법 및 이를 함유하는 조성물	(주)셀아이 콘랩	주저자	한국	-	2015.12.14	단독	-
3	상표	Yeastzyme	(주)셀아이 콘랩	주저자	한국	-	2015.12.07	단독	-
4	상표	Gluzyme	(주)셀아이 콘랩	주저자	한국	-	2015.12.07	단독	-
5	논문	면역결핍 모델에서 β -1,3/1,6glucan과 유산균을 이용한 in vivo 면역 활성화 조절 효과	남부대	주저자	한국식품저장유통학회	-	예정	단독	비SCI
6	논문	반응표면분석법을 이용한 <i>Aureobasidium pullulans</i> KSY-0516균주의 β -1,3/1,6glucan의 생산 최적화	남부대	주저자	한국식품영양과학회	-	예정	단독	비SCI

11. 기타 사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

코드번호	D-14
1.	“Effects of water-soluble low-molecular-weight β -1,3-D-glucan(branch β -1,6) isolated from <i>Aureobasidium pullulans</i> 1A1 strain black yeast on restraint stress in mice“, Pharmaceutical press, 59, 1137-1144, 2007
2.	Inhibitory effects of water-soluble low-molecular-weight β -(1,3-1,6)-d-glucan purified from <i>Aureobasidium pullulans</i> GM-NH-1A1 strain on food allergic reactions in mice, International Immunopharmacology, 7(1), 963-972, 2007
3.	P. Manzi, L. Pizzoferrato, 2000. Beta-glucans in edible mushrooms, Food Chemistry, 68, 315-318.
4.	“Studies on the Rheological Properties of Sugar Derivative Sweeteners“, Korean J. Food Sci. Technol., 22(7), 852-857, 1990
5.	“Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food system“, Food Biotechnol., 4(1), 45-57, 1990
6.	T. Sakurai, T. Kaise, T. Yadomae, C. Matsubara, E. 1997. J. Pharmacol., Different role of serum components and cytokines on avelor macrophage activation by soluble fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, .334, 255-263.
7.	A. Margaritis, G. W. Pace, “Microbial polysaccharides’ in Comprehensive Biotechnology“, eds. M. Moo-young, Pergamon Press, New York, Vol.3, 1005-1044
8.	“Immunological actions of sophy β 1,3/1,6-glucan (β -1,3-1,6 glucan), currently available commercially as a health food supplement“, Microbiol. Immunology, 51(9), 861-873, 2007
9.	J. Sandula, G. Kogam, M. Kacuralcova, E. Machova, 1999. Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity, Carbohydrate Polymers, 38, 247-252.

10. John A., Bohn And James N. Bemiller, "(1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers ; a review of structure-functional activity relationships.", *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 3-14, 1995
11. E. J. Olson, JE standing, NM Griebl-Harper, O. A. Hoffman, and A. H. Limper, 1996. Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages, *Infect. Immun.*, 64(9), 3548-3554
12. Baba T., Ogama T., Okahashi N., Yakushiji T., Koga T., Morimoto M., Hamadas, 1986. Purification and characterisation of the extracellular D-glucosyltransferase from serotype c *streptococcus* mutans, *Carbohydrates Research*. 15(158), 147-55
13. "Homologous Subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *EuKaryotic cell.*", 6(2), 143-156, 2007
14. "Properties of the mouse peritoneal cells immunized with β 1,3/1,6-glucan produced by *Aureobasidium pullulans.*", *Journal of Kyushu University of Health and Welfare*, 5, 167-172, 2004
15. "Release of mixed linkage (1→3),(1→4)-β-d-glucans from barley by protease activity and effects on ileal effluent.", *Inter. J. Biol. Macromol.*, 21(4), 57-60, 1997
16. P. Manzi, L. Pizzoferrato, 2000. Beta-glucans in edible mushrooms, *Food Chemistry*, 68(3), 315-318.
17. "β-glucan의 특성과 식품에의 응용.", *Korea Food Science*, 48(3), 71-78, 2006
18. "건강 기능성 다당류 및 β-glucan의 개발", *Green Spirits*, 2(2), 10-11, 2006
19. McIntosh, M., B.A. Stone V.A. Stanisich. 2005. Curdlan and other bacterial (1-3)-beta-D-glucans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68. 163-173.
20. Stone, B.A. A.E. Clarke. 1992. *Chemistry and Biology of 1-3 beta-glucans*. La Trobe University

Press. Victoria , Australia.

21. Bouveng, Hans O.; Kiessling, Hans; Lindberg, Bengt; McKay, James. 1962. Polysaccharides Elaborated by *Pullularia pullulans*. Part I. The Neutral Glucan Synthesized from Sucrose Solutions 10.3891/acta.chem.scand. 16-0615
22. Zelensky, A.N. J.E. Gready. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *Febs. J.* **272**, 6179-6217.
23. Ariizumi K, et al. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275(20)**, 157-167.
24. Willment JA, et al. 2005. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur. J Immunol.* **35**, 1539-1547.
25. Janeway, C.A. Jr. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* **13** : 11-16.
26. Willment JA, Gordon S, Brown GD. 2001. Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 276(43) 818 - 823.
27. Underhill DM, Goodridge HS. 2007. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol* **28**, 66-73.
28. Ariizumi, K., G.L. Shen, S. Shikano, et al . 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **275**, 20157-20167.
29. Kato, Y., Y. Adachi N. Ohno. 2006. Contribution of N-linked oligosaccharides to the expression and functions of beta-glucan receptor, Dectin-1. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1580-1586.
30. Hara H, et al. 2007. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* **8**, 619-629.

31. Rogers NC, et al. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**, 507-517.
32. Underhill DM, Rosnagle E, Lowell CA, Simmons RM. 2005. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* **106**, 2543-2550.
33. Fuller GL, et al. 2007. The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **282**, 12397-12409.
34. Hu ZB, Ma W, Zaborski M, MacLeod R, Quentmeier H, Drexler HG. 1996. Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia*. 10:1025-1040.
35. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, et al. 2007. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med.* **204**, 3133-3146
36. Slack EC, et al. 2007. Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1600-1612.
37. Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR/., 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ Health* 5: 7.
38. Christian Raetz and Chris Whitfield, 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635-700
39. Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN, 2004. "The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin- 1-dependent mechanism". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287** (4): R759-66.
40. T. G. Boulton and M. H. Cobb, 1991. "Identification of multiple extracellular signal- regulated

kinases (ERKs) with antipeptide antibodies“ in Cell Regulation Volume 2, pages 357-571.

41. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166** : 557-580
42. N. Hamada, Y. Tsujisaka. 1983. The structure of the carbohydrate moiety of an acidic polysaccharide by *Aureobasidium* sp. K-1. Agric. Biol. Chem. **47(6)** : 1167-1172
43. N. Hamada, Y. Tsujisaka. 1993. Note ; Stimulation by ascorbic acid of production of a highly branched β -1,3-glucan by *Aureobasidium* sp. K-1. Biosci. biotech. Biochem. **57(8)** : 1348-1349
44. Finkelman MAJ, Vardanis A. 1982. Pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. **44** : 121-127
45. Cullen D., Yang V., Jeffries T., Bolduc J., Andrews J.H. 1991. Genetic transformation of *Aureobasidium pullulans*. J. Biotechnol. **21** : 283-288
46. Thomewell SJ, Peery RB, Skatud PL. 1995. Cloning and characterization of the gene encoding translation elongation factor 1α from *Aureobasidium pullulans*. Gene. **162** : 105-110
47. Altintas M.M., C.K. Eddy, M. Zhang, J.D. McMillan and D.S. Kompala. 2006. Kinetic modeling to optimize pentose fermentation in *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. **94** : 273-295
48. Lee, K. J., M. L. Skotniki, D. E. Tribe and P. L. Rogers. 1980. Kinetic studies on highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. **2** : 339-344
49. Y.C. Shin, Y.H. Kim, H.S. Lee, S.J. Cho, S.M. Buyn. 1987. Production of pullulan by a fed batch fermentation. Biotechnol. Letters. **9** : 621-624
50. D.P.F. Auer, R.J. Seviour. 1990. Influence of varying nitrogen on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32** : 637-644

51. P. J. Jeald and B. Kristiansen. 1985. Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Bioeng.* **27** : 1516-1519
52. YUN J.W., SUN C.K., and SEUNG K.S. 1996. Effect of nitrogen sources on the production of polyols by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* **6(1)** : 60-62
53. Y.C. Shin, Y.H. Kim, H.S. Lee, S.J. Cho, S.M. Buyn. 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by amixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **33** : 120-133
54. Y.C. Kim. 2001. Optimization of fermentation conditions for exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. Dep. of Chemical Engineering.
55. Hamada N, Deguchi K, Ohmoto T, Sakai K, Ohe T, Yoshizumi H. 2000. Ascorbic acid stimulation of production of a highly branched, beta-1,3- glucan by *A. pullulans* K-1-oxalic acid, a metabolite of ascorbic acid as the stimulating substance. *Biosci. Biotechnol Biochem.* **64(9)** : 1801-1806
56. N. Hamada, Y. Tsujisaka. 1993. Note ; Stimulation by ascorbic acid of production of a highly branched β -1,3-glucan by *Aureobasidium* sp. K-1. *Biosci. biotech. Biochem.* **57(8)** : 1348-1349
57. Seo H.P, Jo K.I., Son C.W., Yang J.K., Chung C.H., Nam S.W., Kim S.K., Lee J. W. 2006. Continous production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with feeding of high concentration of sucrose. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16(3)** : 374-380
58. Lee, J. H., Kim, J. H., Kim, M. R. 2002. Effect of Dissolved Oxygen Concentration and pH on the Mass Production of High Molecular Weight Pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of microbiology and biotechnology.* **12(1)** : 1-7
59. S. N. Yang, S.W. Beak, and N.K. Kim. 2000. Effect of aeration and agitation rates on pullulan

production. J. of The Korean Institute of Chemical Engineers. **38(4)** : 556-559

60. Gibbs PA, Seviar RJ. 1996. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture?. Appl. Microbio. Biotechnol. **46** : 503-510
61. Nevalainen D, Berte L, Kraft C, Leigh E, Picaso L, Morgan T. Evaluating laboratory performance on quality indicator with the six sigma scale. Arch Pathol Lab Med 2000, 124, 516-519
62. Riebling NB and Tria L,. Laboratory toolbox for process improvement, Six sigma at north shore-long island jewish health system. Lab Med 2008, 38, 7-14
63. Riebling N and Tria L,. Six sigma project reduces analytical errors in an automated Lab. MLO Med Lab Obs 2005, 37, 22-23
64. Rios-Hernandez, M., Dos-Santos, N. J., Silvia-Cardosa, Belle-Garciga, J. L., Pedrosa, M.: "Immunopharmacological studies of beta(1-3)glucan", Arch. Med. Res. 25 (2):179-180; 1994.
65. Schultz, et al: "Association of Macrophage Activation with Anti-tumor Activity by Synthetic and Biologic Agents". Cancer Res., 37:3338-3343; 1977.
66. Seljelid, R., Busund, L.T.: "The biology of macrophages: U. Inflammation and tumors," Euro. J. Haematol 5 2(1):1-12. 1994. Dept. of Exp. Pathoth. Inst. of Med. Diol. Univ. of Tromso, Norway.
67. Seljelid, R: "Tumour regression after treatment with aminated beta 1-3D polyglucose is initiated by circulatory failure," Scand. J. Immunol. 29(2):181-192; 1989.
68. Seljelid, R.: "Macrophage Activation" Scand. J. Rheumatology; Suppl. 76:67- 72; 1988

69. Adachi Y., Ohno N., Yacomae, T.: "Preparation and antigen specificity of an anti-(1→3)-beta-D-glucan antibody," *Bio. Pharm. Bull.* 17:1508-1512; 1994.
70. Adachi Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S., Yacomae, T.: "Macrophage activation in vitro by chemically cross-linked (1→3)-beta-D-glucans," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 38:988-992; 1990. Laboratory of Immunopharmacology of Microbial Products, Tokyo College of Pharmacy, Japan. Carrow, D. J.: "Beta-1,3-glucan as a Primary Immune Activator," *Townsend Letter*; 1996.
71. Jamas, S., Easson, D., Ostroff, G. R.: "Use of aqueous soluble glucan preparations to stimulate platelet production." U.S. Patent 5532223. Issued July 2, 1996.
72. Jamas, S., Easson, D., Ostroff, G. R.: "Method for producing neutral glucans for pharmaceutical applications," U.S. Patent 5322841. Issued June 21, 1994.
73. Poutsika, D. D., et al: "Cross-Linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production," *Blood* 82:3695-3700; 1993. Dept. of Med., New England Med. Ctr., Boston, MA.
74. Konopski, Z., Seljelid, R., Eskeland, T.: "A novel immunomodulator soluble aminated beta-1,3-D-glucan: binding characteristics to mouse peritoneal macrophages," *Biochem. Biophys. Acta.* 1221():61-65; 1994.
75. Konopski, Z., Seljelid, R., Eskeland, T.: "Cytokines and PGE2 modulate the phagocytic function of the beta-glucan receptor in macrophages," *Scand. J. Immunol.* 37:587-592; 1993
76. Konopski, Z., et al: "Phagocytosis of beta-1,3-D-Glucan-Derivatized Microbeads by Mouse Peritoneal Macrophages Involves Three Different Receptors," *Scand. J. Immunol.*, 33:297-306;

1991.

77. Williams, D. L., Browder, I., DiLuzio, N. R.: "Soluble phosphorylated glucan: methods and compositions for wound healing," U.S. Patent 4975421, Issued Dec 4, 1990.
78. Williams, D. L., Browder, I., DiLuzio, N. R.: "Methods and compositions for prophylactic and therapeutic treatment of infections," U.S. Patent 4900722, Issued Feb 13, 1990.
79. Williams, D. L., Sherwood, E. R., Browder, I. W., McNamee, R. B., Jones, E.L., Di Luzio, N. R.: "Pre-clinical Safety Evaluation of Soluble Glucan." International Journal Immunopharmac, 10:405-411; 1988.
80. Williams, D. L. et al: "Pre-clinical Safety Evaluation of Soluble Glucan," Int. J. Immunopharmac, Vol. 10, No. 4:405-414; 1988. Dept. of Phys. Tulane University, Sch. of Med., New Orleans, LA.
81. Wolk, M. and Danon, D.: "Promotion of Wound Healing by Yeast Glucan Evaluated on Single Animals," Medical Biology, 63:73-80; 1985.
82. Fred Zulli and Christine Saecher "CM-glucan, a new yeast polysaccharide for cosmetic use" Mibelle AG Cosmetics, Bolimattstr 1, 5033 Buchs, SW.
83. Goodson, William, Hohn, David, Hunt, Thomas K and Leung, Y.K: Augmentation of Some Aspects of Wound Healing by a Skin Respiratory Factor." Journal of Surgical Research, 21:123-129; 1996.
84. Kaplan J.: "Acceleration of Wound Healing by a Live Yeast Cell Derivative." Archives Surgery, 119:1005-1008; 1984.
85. Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., et al: "Retention of Saccharomyces cerevisiae cell wall proteins

through a phosphodiester-linked beta-1,3/beta-1,6-glucan heteropolymer," *Glycobiology* 6:337-345; 1996.

86. Institute of Molecular Cell Biology, University of Amsterdam, The Netherlands. Leibovich, S. I., et al: "Promotion of Wound Repair in Mice by Application of Glucan." *J. Reticuloendothel, Soc.* 27:1-11; 1980.

87. Lejeune, F. J., Vercaemmen-Granfjean, A., Mendes da Costa, P., Bron, D., Defleur, V.: "Supressor cell induction and reticuloendothelial cell activation produced in the mouse by beta(1-3)glucan," *Adv. Exp. Med. Biol.* 121(A):235-244; 1979.

88. Kenyon A.J. Delayed wound healing in mice associated with viral alteration of macrophages. *Am J Vet Res* (1983 Apr) 44(4):652-6.

89. Lovegrove, J A; Clohessy, A; Milon, H; Williams, C M: "Modest doses of beta-glucan do not reduce concentrations of potentially atherogenic lipoproteins ", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 49-55; 2000

90. Nicolosi, R; Bell, S J; Bistran, B R; Greenberg, I; Forse, R A; Blackburn, G L : " Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast ", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 208-212; 1999

91. Bell, S; Goldman, V M; Bistran, B R; Arnold, A H; Ostroff, G; Forse, R : "A Effect of beta-glucan from oats and yeast on serum lipids", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 189-202; 1999

92. Stacey Bell, Valerie M. Goldman, Bruce R. Bistran, Alissa H. Arnold, Gary H. Ostroff and R. Armour : "Effect of beta -Glucan from Oats and Yeast on Serum Lipids", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 189-202 ; 1999

93. Bourdon, I; Yokoyama, W; Davis, P; Hudson, C; Backus, R; Richter, D; Knuckles, B; Schneeman, B: “ Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan “, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 55-63 ; 1999
94. Pavel Bobek et al : “ Effect of oyster mushroom and isolated beta-glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet “, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8,469-471; 1997

13. 성과 및 투자

○ 고용 성과 및 추후 계획

기관명	고용인원(명)							
	2015		2016		2017		2018	
	연구직	생산직	연구직	생산직	연구직	생산직	연구직	생산직
선일바이오(주)	-	-	-	-	-	2	3	4
(주)셀아이콘랩	-	-	2	1	2	1	2	3

- 연구기간동안 총 6명의 인원을 고용하였으며, 2018년까지 14명의 고용 계획을 추진하고 있음

○ 매출 성과 및 추후 계획

기관명	매출내용	매출성과 (억원)							
		2017		2018		2019		2020	
		국내	수출	국내	수출	국내	수출	국내	수출
(주)셀아이콘랩	국내외 화장품 완제품 판매	1.39	1.26	6.40	4.00	10.0	6.00	25.0	10.0
합 계		2.65		10.00		16.00		35.00	

- 연구기간동안 총 2.65억원의 매출을 달성하였으며, 2020년도까지 35억원의 매출을 목표로 삼고 있음

- 매출성과를 이룬 제품 리스트

순번	제품화
1	데이바이데이4종
2	디멜라에센스
3	수연비8종 Set
4	슈프라코스2종
5	슈프라코스3종 Set
6	스킨피니티
7	유메이
8	팜트리
9	펩타이드 원료
10	펩타이드이펙터
11	Yeastzyme퓨어화이트7종 (Yumie)
12	쥬디메르 셀부스팅 글루타치온 앰플
13	쥬디메르 셀부스팅 캐모마일 앰플
14	쥬디메르 셀부스팅 펩타이드 앰플

○ β -1,3/1,6glucan과 유산균을 대량생산하기 위한 선일바이오(주)의 투자내용

- 총 제작비용 : 14.7억원
- 베타-1,3/1,6글루칸과 유산균을 대량생산하기 위하여 10톤 규모의 대량생산 시스템 설비가 2016년 4월 20일부터 제작되었으며, 제작 후 설치가 7월 초부터 시작되어 2016. 12월에 완공되었음

○ 설비내용

순번	설비 품명	단위	수량
1	Fermnetor	100 L	1
		1000 L	1
		5000 L	2
2	Storage tank	1000 L	1
		5000 L	1
3	Rotary storage tank	1500 L	1
		3500 L	1
4	Structure		1
5	Steam boiler	1000 kg/h	1
6	Air compressor	100 HP	1
7	Chiler system	40 RT	1
8	Cooling tower	150 RT	1
9	RO system	500 L/h	1

○ 배양설비의 활용방안

- 총 10톤 규모의 배양설비로 워킹볼륨은 7~8톤 규모가 될 것이며, 설비가 구축된 후 에는 월 4~5회 배양체제가 가능하며, 이는 연간 340~420톤의 배양액을 생산 할 수 있는 양산 체제를 갖추게 된다.
- 현재 시판되고 있는 베타글루칸의 대부분은 버섯으로부터 추출되어 사용되어 지고 있으며, 효모로부터 세포외 분비되는 대량생산체제로는 국내 최대가 될 것으로 예상된다.
- 생산된 베타글루칸은 식품, 화장품, 건강기능식품, 의약품 등의 소재로 활용 되며, 타 제품에 비하여 고품질의 베타글루칸을 생산하게 되며, 수요처가 늘어날 것으로 예상된다.



<선일바이오 장흥 공장내 대량생산시설 사진>

○ 기능성화장품 생산기반 확립을 위한 셀아이콘랩의 투자 확인서

투자 확인서				
투자유치자	사업장명	(주)셀아이콘랩	사업자등록번호	314-00-37832
	사업종류	제조업	대표자	성민규
	소재지	대전광역시 유성구 유성대로 1662 대전하이오벤처타운 301호	연락처	042-335-7942
	투자 유치금액	15 억원		
투자자	사업장명	비공개	사업자등록번호	비공개
	사업종류	비공개	대표자	비공개
	소재지	비공개	연락처	비공개
상기 사업장(셀아이콘랩)은 2016년 1월 15일 위 사항에 대해 투자 유치 하였음을 확인함				
2016년 03월 11일				
(주)셀아이콘랩 대표 성민규 (인)				

투자 확인서				
투자유치자	사업장명	(주)셀아이콘랩	사업자등록번호	314-00-37832
	사업종류	제조업	대표자	성민규
	소재지	대전광역시 유성구 유성대로 1660 사이언스타워 312호	연락처	042-335-7942
	투자 유치금액	5 억원		
투자자	사업장명	비공개	사업자등록번호	비공개
	사업종류	비공개	대표자	비공개
	소재지	비공개	연락처	비공개
상기 사업장(셀아이콘랩)은 2015년 8월 7일 위 사항에 대해 투자 유치 하였음을 확인함				
2016년 03월 11일				
(주)셀아이콘랩 대표 성민규 (인)				

14. 보완 사항

○ 글로벌 시장 타겟을 위한 후속 연구 및 제품화


1) 후속 연구


- 가격경쟁력 확보를 위하여 미생물 다당체 고농도 배양 연구
- β -1,3/1,6glucan과 유산균 복합물의 임상시험 연구 결과 필요
 - 이중면역 활성을 갖는 제품개발과, NDI 승인을 받기 위해서는 꼭 필요한 연구
 - 임상시험 종료 후 개별인정형원료 신청 진행
- 유산균 제품의 여러 가지 제형에서의 안정성
 - 인체 섭취시 안전하게 면역활성에 작용할 수 있는 제형의 연구 필요
- β -1,3/1,6glucan 함유 기능성 화장품의 임상시험 결과 필요
 - 뉴트리코스메틱 시장을 겨냥한 제품군의 임상시험 결과 필요
 - β -1,3/1,6glucan외 셀아이콘랩 천연추출물과의 혼합으로 아토피 예방 컨셉 화장품에 대한 안정성 및 임상시험 결과 필요
- β -1,3/1,6glucan 함유 기능성 화장품의 임상시험 결과 필요
 - 뉴트리코스메틱 시장을 겨냥한 제품군의 임상시험 결과 필요

2) 글로벌 제품화

- 가. β -1,3/1,6-glucan 소재화 제품
 나. β -1,3/1,6-glucan과 유산균 함유 기능성 식품 제품군
 다. β -1,3/1,6-glucan 함유 이너뷰티형 제품군
 라. 건강기능식품형 제품군과 이너뷰티형 제품군의 융합형 제품군



가. β -1,3/1,6-소재화 제품

나. β -1,3/1,6-과 유산균 함유 기능성 식품 제품군

(1) 범용성 제품



환형



스틱형



액상형



다 ㉓-1,3/1,6- ㉑㉒㉓㉔㉕㉖㉗㉘㉙㉚㉛㉜㉝㉞㉟㊱㊲㊳㊴㊵㊶㊷㊸㊹㊺㊻㊼㊽㊾㊿ 합유 이너뷰티형 제품군



화장품 및 이너뷰티의 융합형 제품군

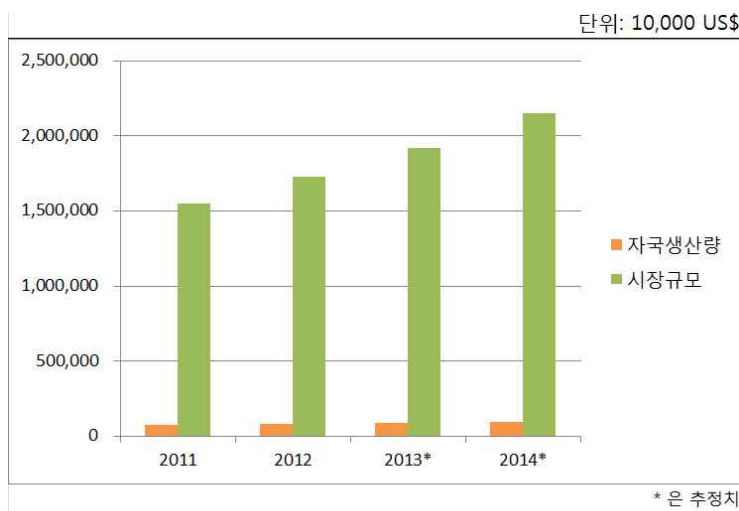
IT 융합형 제품군

라 ㉜㉝㉞㉟㊱㊲㊳㊴㊵㊶㊷㊸㊹㊺㊻㊼㊽㊾㊿ 능성식품 제품군과 이너뷰티형 제품군의 융합형 제품군



1) 홍콩 시장을 통한 중국 시장 진출 계획

- 홍콩 소비자들은 중국 소비자와 기호가 유사하여 홍콩 시장의 진출은 향후 중국 시장을 위한 신제품 개발에 중요한 자료가 될 것으로 판단됨.
- 또한, 홍콩과 중국이 체결한 포괄적 경제동반자 협정 ((CEPA, Comprehensive Economic Partnership Agreement)에 따른 중국인 개인 관광객의 홍콩 입국 허용 및 화장품 무관세 혜택으로 인하여 중국 시장보다 비교적 진출이 용이하고 향후 중국 시장으로 진출을 위한 교두보 시장으로서 홍콩 시장이 중요하게 작용함.



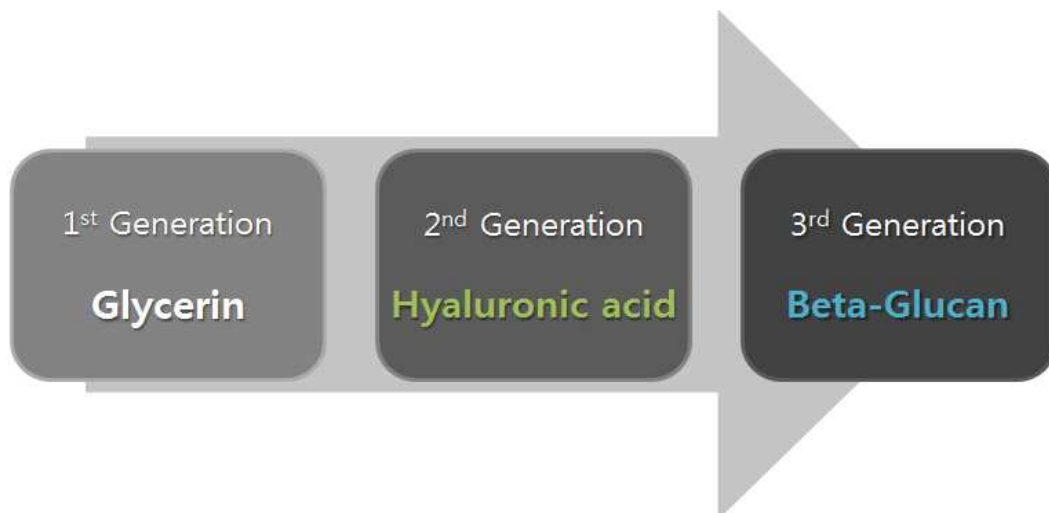
자료: Export.gov, 2012

<그림> 홍콩 화장품 시장 규모.

- 당사의 해외 수요처인 홍콩 Bonjour社は 홍콩을 비롯하여 중국에 유통채널을 가지고 있을 뿐만 아니라 오프라인 매장 50개를 가지고 있는 전문 유통업체로서 홍콩 및 중국 기후에 적합한 제형의 요구가 발생.
- 대한민국은 다양한 계절이 있는 기후로서 습한 지역에 맞는 제형 개발에 많은 어려움이 따름 → 이에 따라 해외 수요처인 홍콩 Bonjour社를 대상으로 하는 테스트를 통해 아열대 기후인 현지에 최적화된 제형을 개발.
- 현지 아열대 기후에 최적화된 제형 개발은 아열대 기후를 가지는 새로운 국가의 화장품 시장으로의 진출을 할 기회를 만들어줌.
- 실제로 항노화 바이오 화장품 7종 제품 제형 개발을 통해 당사는 동남아 지역인 말레이시아, 대만, 싱가포르에 제품을 수출할 수 있었음.
- 이처럼 현지 기후에 최적화된 제형 개발을 통해서 아열대 기후를 가지는 국가의 다양한 화장품 시장에 진출 할 수 있을 것으로 예상됨.

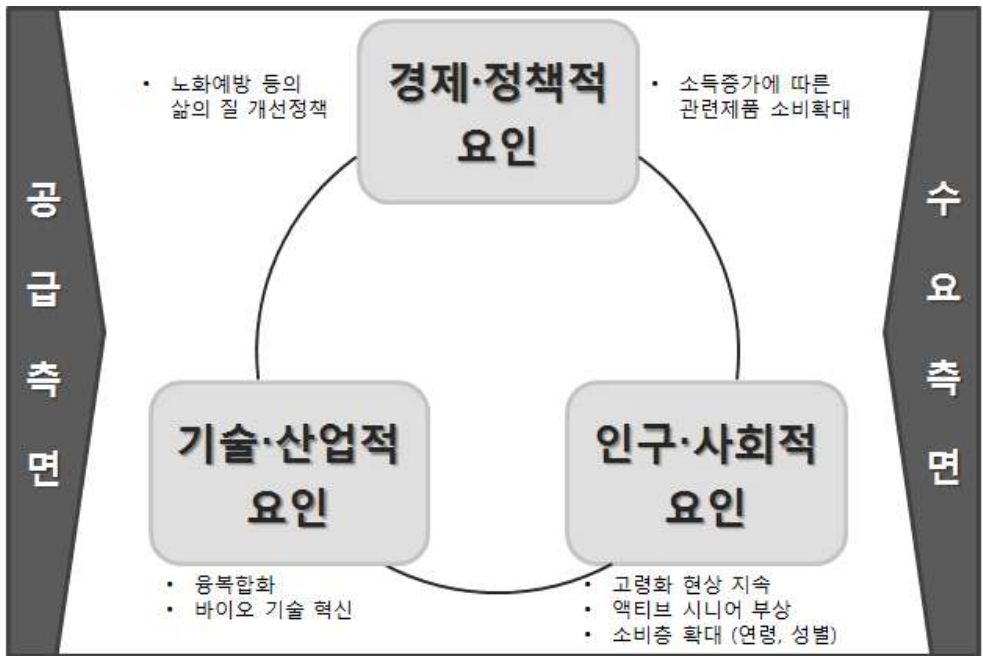
2) 산업적 효과

- 인구의 고령화는 빠르게 진행되고 있고 기대수명도 늘어나고 있는 현대 사회에서 첨단 바이오기술의 발전과 각종 노화방지 관리 서비스 산업의 발달로 항노화 산업이 거대한 블루오션으로 등장함.
- 노화를 방지하기 위해서 가장 중요한 부분은 피부세포의 수분 함유량을 유지 혹은 증가시키는 것이며, 기존의 보습 원료들을 대체할 수 있는 3세대 보습 핵심 원료로써 천연 유래 다당류인 베타글루칸을 활용함.



<그림 364> 화장품 보습원료의 세대.

- 과거 사회의 노화 방지의 목적이 “복귀/회복” 이었다면, 현대 사회는 “보호/예방” 으로 변화함에 따라 관련 제품의 주요 소비층이 확산되는 현상이 뚜렷하게 나타나고 있음.
- 이로 인하여 새롭게 제작되는 시제품과 함께 항노화 화장품 트렌드를 형성해 나갈 것으로 판단됨.
- 새로운 트렌드는 항노화 바이오 화장품 7종과 같은 현지 최적화된 제형을 통해서 더욱이 빠르게 형성될 수 있을 것으로 판단됨.



가. 해외 시장 공략을 위한 상담회 및 전시회 참가

- ▶ 문제성 피부 전문가로서 아토피 피부염 제품에 대한 해외 요구도 증가
- ▶ 다양한 해외 경험을 통해 바이어 리스트 확보
- ▶ 아토피 피부염의 4가지 문제점 극복 가능한 제품 부재
- ▶ 확대되고 있는 아토피 피부염 시장에 핵심 소재 및 기술력 홍보/마케팅



<그림> (주)셀아이콘랩의 해외 판로 개척 현황

○ (주)셀아이콘랩은 2014년도 18개국 수출상담회, 해외 전시회 16회를 진행하며 6개국 수출, 3개국에 계약 진행을 하고 있음.

○ 많은 해외 경험을 바탕으로 기능성 화장품 시장경쟁이 심화되고 있음을 확인하였으며, 품질 차별화를 위해 확보 제품을 꾸준히 개발하고 있음. 천연 추출물에 대한 인지도가 매우 높으며, 첨단 펩타이드 합성 및 발효 과학은 바이어들로부터 많은 요구도가 발생.

○ 문제성 피부 전문가 집단으로써 여드름 제품에 대한 수요가 매우 높으며, 이에 따라 아토피 피부염에 대한 요구도가 함께 증가하고 있음. 기확보 바이어를 대상으로 아토피 제품 홍보.

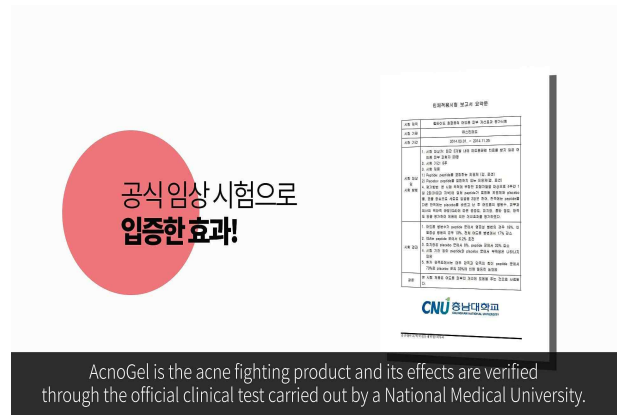
나. 해외 시장 공략에 따른 최적화된 수출 인프라 활용



○ 바이코리아, 고비즈코리아, EC21, ebay 등 기존 인프라를 활용하여 홍보 활동을 강화.

○ 제품 디자인 사전 마켓 테스트 진행 후 현지 시장선호도 조사를 통한 맞춤형 제품 디자인 제작을 하여 사업화에 반영. (포장용기, 제품 Set 구성)

- 현지인의 제품 이해도 향상을 위해 현지어 회사 카탈로그, 제품 브로셔 및 홍보 동영상 제작.



<그림> 기존 아크노겔 제품 홍보 동영상

- 수출 전담인력 확보로 인해 현지 문화를 이해하여 마케팅 방법의 다각화를 할 수 있음. (감성, 기호도, 홍보문구 등)

- 기 확보 채널의 해외 시장을 대상으로 소재를 적극 홍보함으로써 완제품 수출분야와 OEM/ODM 수출 증대 효과



<그림> 기 확보 유통 채널

다. 현지 제품 규격 인증 확보로 공격적 마케팅

- 한류의 영향으로 화장품 소비의 중심이 되고 있는 중국 시장 공략을 위해 중국 CFDA 인증에 관련된 지원 및 절차를 확보하여 공격적인 영업/마케팅 전략 수립

- 허가 및 인증을 통해 공신력을 확보하고, 기 확보 다양한 바이어에게 제품 홍보

라. 1~3세대 아토피 피부염 제품의 단점을 극복한 마케팅 포인트 제시

- 1세대 동물성 스테로이드 계열: 피부장벽의 손상 및 부작용이 심각하게 나타나며 피부가 얇아지고 혈관 확장 부작용이 나타남.
- 2세대 식물성 스테로이드 계열: 혼합물 형태로써 작용기전이 불확실하며, 효과적인 측면에서 개인차이가 두드러지게 나타남.
- 3세대 생리적 지질 성분 계열: 제형 안정화에 어려움이 따르며, 계면활성제 사용에 따라 문제성 피부에 부작용 발생 우려가 있음
- 4세대 친수/친유 융합소재를 활용: 피부구조를 고려한 차세대 소재로써 피부구조와 가장 유사한 소재의 형태를 나타냄. 생체 친화적 이중막 구조를 모방하였으며, 피부장벽 복원 및 항상성 유지를 통한 이상적인 치료 가능성 기대.

<표> 피부장벽 이상에 따른 문제성 피부의 치료 성분 소재의 발전

구 분	성분 소재	특 징
1세대	동물성 스테로이드 계열	<ul style="list-style-type: none"> • 빠른 증상완화 효과 탁월 • 피부장벽 손상 부작용 수반 • 병원 처방용 소재로만 제한적 사용
2세대	식물 및 한방 추출물 계열	<ul style="list-style-type: none"> • 천연성분으로 부작용 적음 • 혼합물 형태로 작용기전 불확실 • 유효성분은 대부분 스테로이드 계열 화합물 • 효과 측면에서 개인적인 차이 두드러짐
3세대	생리적 지질 성분 계열	<ul style="list-style-type: none"> • 세라마이드, 콜레스테롤, 지방산 지질성분 • 현재 상용화된 보습제들의 주요성분 • 피지분비 및 민감성 피부에는 제한적 사용
4세대	친수/친유 융합 소재	<ul style="list-style-type: none"> • 피부구조와 가장 유사한 소재 형태 • 가장 생체 친화적인 이중막(친수성+친유성) 구조 응용 • 피부장벽 복원 및 항상성 유지를 통한 이상적인 치료 소재 가능성 높음

마. 문제성 피부 개선 제품의 시장 확대

- 피부장벽 이상에 따른 여러 피부 이상 질환을 해결하기 위한 문제성 피부 개선 제품의 시장은 선후진국을 막론하고 확대되고 있으며, 이들 제품군들의 전세계 시장규모는 2005년에 약 250억 달러에서 2010년 약 500억 달러 정도이며, 매년 5%이상의 성장을 나타내고 있음.
- 문제성 피부 개선 제품의 국내시장은 2005년 약 400억 원에서 2010년 1,000억 원에 근접하는 시장규모를 나타내었고, 시장 증가율은 매년 10%이상의 높은 수치를 보임.

- 이상과 같이 최근 10년 동안의 시장 증가율을 꾸준히 성장하는 것으로 미루어보아 피부장벽 기능이상에 따른 문제성 피부 개선 제품의 성장은 계속될 것으로 판단됨.

<표> 문제성 피부 개선 제품의 국내외 시장 규모 및 성장률 예측
(단위 : 억원, 억달러)

구분	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년	CAGR
국내(억원)	800	880	1,000	1,100	1,200	10%
국외(억달러)	500	530	570	610	650	6.5%

※ 출처 또는 인용 : 한국기술거래소 연구보고서, 2009

바. 국내 온라인

- 제품개발 완료 되었으나 아토피 및 보습 제품은 하절기 판매가 매우 어려움 → 따라서 기본품 제작 및 샘플 제공을 통해 홍보 예정

- 비수기를 활용해 온라인에 많은 데이터 확보 및 가임상 결과를 확보하고자 적극적인 체험단을 진행 중 → 16. 9월부터 본격적인 매출 증대를 위해 전략적으로 접근하고자 함



블로그

민감하고 건조한 아기 피부엔, 마이아도 로션 & 크림 9월 전
민감성, 건조피부를 위한 마이아도 모이스처 로션 & 인텐시브 크림 우리 윤이는 걱정하던 아토피도 없고, 피부도 트러블없이 건강한편이라 피부 걱정은 많이 안하고 키웠었는데요 한달전부터 이유도 모른채, 러블리 유니♡ azurehr17.blog.me/220710437638 SmartEditor (GD)

[대표카페 지우맘] 민감하고, 건조한 우리아이 피부 마이아도... 9월 전
ㅋㅋㅋㅋㅋ 오늘도 민감하고 건조한 우리 아이 피부를 케어 할수 있는 로션과 크림을 좋은 기회에 사용해 볼수 있었습니다 ^^ 와 마이아도 모이스처 로션 후 마이아도 인텐시브 크림 제품 막스 옆면에는... END가 아닌 AND. blog.naver.com/kjszzang10?Redirect=... 블로그 내 검색

마이아도 로션+크림 :: 아토피/민감성피부에 좋은 펩타이드 화장품 4월 전
민이난이맘 꿀순이입니다^^ 오늘 제가 소개해드릴 제품은아토피/민감성피부에 좋은 펩타이드 화장품마이아도 로션+크림 입니다^^ 먼저 마이아도 크림부터 살펴보아요^^민감하고 건조한 피부에 효과적인... 민이난이맘 함께하는 행복한 일상 blog.naver.com/blue4082?Redirect=Lo... 블로그 내 검색

#펩타이드화장품 마이아도 후기: 9월 전
바로 주디메르 제품 중 마이아도로션이랑 크림이예요 아토피 뿐만 아니라 민감하고 건조한 피부에도 좋다고 하더라고요^^ 바르는 순서는 로션부터 바르고 크림을 발라주면 된답니다^^ 먼저 마이아도 로션은... 하얀영혼 blog.naver.com/amortali717?Redirect=... 블로그 내 검색

#성인아토피화장품추천::셀미이콘원 마이아도 로션&크림# 18시간 전
민감성피부 마이아도화장품 추천 오늘 소개할 제품은 "셀미이콘원"이란 회사에서 만든 마이아도란 기초화장품이다 과학시간이나 물어봤을만한 펩타이드 성분이 들어간 화장품인데 #펩타이드란? 언제... ㅁㅁㅁㅋㅋㅋ 주관적인 이모저모 blog.naver.com/wpftksuljr?Redirect=... 블로그 내 검색

블로그 더보기 >

무료샘플 제공을 통한 제품 홍보 이벤트 진행

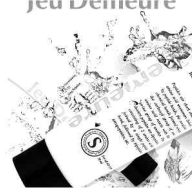
체험단 모집을 통한 제품 홍보 마케팅



jeudemeure_korea 팔로워

JeuDemeure cosmetic 주디메르 주디메르는 문제성 피부 전문 코스메슈티컬 화장품 브랜드입니다. JeuDemeure is the brand of Korean Innovative cosmeceuticals. www.cellconlab.com

게시물 73개 팔로워 920명 팔로우 1,177명



JeuDemeure 주디메르님이 새로운 사진 11장을 추가했습니다.
5월 10일 오전 2:30 · 남

[간질간질 민감성 건조 피부 모두 유효!]
민감성 건조 피부엔 #마이아토!
주변에 피부 트러블로 고생중인 친구들 소환 ㅋㅋ
♡사용하시고 불만족시 환불해 드립니다♡... 더 보기



좋아요 댓글 달기

<그림> 마이아토 홍보 실적 (인스타그램 및 페이스북)

- 제품 홍보를 통한 다양한 리뷰를 확보 했으며 체험단을 통한 가임상 결과 우수한 효능을 확인 할 수 있었음



아토피성 피부인지 증상이 심한 피부인지
 여를 처음 할것 같이 엄청 가렵고 긁으면 붉게 올라오고
 엄청 고생하는데
 마이아토 크림 사용하고 감쪽 놀랐네요.
 처음 받아서 너무 가려워서 크림 발라주고 저녁에 샤워하면서 말았어요. "내가 오늘 가려웠구나..." 하루종일 가려운걸
 모르고 지냈네요.
 아직 건조할 상태의 피부이지만, 짧은 시간 사용으로 이 정도로 변화가 보여서 아주~ 아주~~ 만족합니다.
 앞으로 꾸준히 사용해서 속속한 피부 되고 싶어요.



○ 기사를 통한 언론 홍보 진행 → 제품에 대한 신뢰도 향상을 기대할 수 있으며 제품이미지 향상에 큰 기여

<http://magazine.hankyung.com/business/apps/news?popup=0&nid=01&c1=1007&nkey=2016051899999048814&mode=sub_view>

사. JV를 통한 매출 (오가나셀)

○ 오가나 + (주)셀아이콘랩의 joint venture 구성 완료 → 현재 법인 등록 완료 했으며 오가나

에서 홍보, 마케팅 (주)셀아이콘랩에서 기술제공 및 완제품 제조 형태로 사업

- 현재 제품 5개 품목의 기획, 디자인, 제형 등 제품 생산에 필요한 부분은 완료 되었음 → 용기 생산중에 있으며 6월 중 제품 제조 및 생산에 따른 (주)셀아이콘랩 매출 0,000천원 예상
- 오가나셀 브랜드를 인터넷 및 미디어를 통해 노출하여 인지도 제고 → 채널A 뷰티캐스터를 통해 지속적 노출 예정



연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 베타글루칸과 유산균을 이용한 면역강화용 글로벌 제품화 기술 개발				
	(영문) Development of immunostimulating product using beta-glucan and probiotics				
주관연구기관	농업회사법인 선일바이오(주)		주 관 연 구	(소속) 농업회사법인 선일바이오(주)	
참 여 기 업	(주)셀아이콘랩		책 임 자	(성명) 송 영 진	
총연구개발비 1,200,000천원)	계	1,200,000	총 연 구 기 간	2014.08.01. ~ 2017.07.31.(3년)	
	정부출연 연구개발비	900,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	15
	기업부담금	300,000		내부인원	15
	연구기관부담 금	-		외부인원	-

○ 연구개발 목표 및 성과

- 가. β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의활성을 유도하는 유산균의 이중면역시스템에 대한 효능 규명 : in vitro, 임상시험을 통한 효능규명 완료
- 나. 면역 증강을 위한 시너지 효과가 규명된 면역 강화용 소재와 이를 활용한
 - (1) 건강지향형 면역강화용 제품군 개발
 - (2) Nutricosmetics & Cosmeceuticals의 제품군 개발
 - (3) 면역강화용 건강지향형 제품과 Nutricosmetics의 융합형 제품군 개발
- : β 1,3/1,6-glucan과 TLR 2 & 4의활성을 유도하는 유산균 복합체형 면역강화 제품을 개발하여 사
업화 완료
- 다. 국내 녹색 기술 인증 및 녹색제품인증, 미국 FDA의 NDI 인증을 통한 국내 및 글로벌 시장 진출 : 녹색기술인증을 통한 β 1,3/1,6-glucan 우수성 확인 및 사업화 실현

○ 연구 내용 및 결과

[연구 내용]

1. Dectin-1 receptor와 Toll like receptor 2 & 4 기반 이중면역시스템을 이용한 면역력 증강용 소재의 기능성 규명
 - 가. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 *in vitro* 면역활성 시험
 - 나. β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 이용한 *in vivo* 면역활성 시험
 - 다. β 1,3/1,6-glucan에 대한 독성시험
 - 라. 이중맹검을 이용한 인체적용시험

2. Dectin-1 receptor와 Toll like receptor 2 & 4 기반 이중면역시스템 활성 소재의 생산 공정 개발
 - 가. *A. pullulans* 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정
 - 나. Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 확보 및 대량 생산 공정 확립
 - 다. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 코팅 기술
3. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 제품 개발
 - 가. β 1,3/1,6-glucan의 피부 콜라겐 합성 촉진능 및 콜라겐 발현조절 메커니즘 규명
 - 나. β 1,3/1,6-glucan의 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 활용도 분석
 - 다. β 1,3/1,6-glucan의 독성 평가, *in vitro*, 전임상 및 인체적용 시험
 - 라. Nano화 기술 적용을 통한 효능 향상
 - 마. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Cosmeceuticals-Nutricosmetics
4. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 실버식품 개발
 - 가. 실버세대에 적합한 실버 식품 동향 조사, 분석
 - 나. 천연 영양성분 구성 및 기호도 증진을 위한 부재료 선정
 - 다. 실버세대용 간식류, 저지방, 고단백 시제품 개발
 - 라. 개발 제품의 안전성 분석

[연구 결과]

1. Dectin-1 receptor와 Toll like receptor 2 & 4 기반 이중면역시스템을 이용한 면역력 증강용 소재의 기능성 규명
 - 가. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 *in vitro* 면역활성 시험
 - (1) *A. pullulans* KSY-0516를 이용한 순수한 β 1,3/1,6-glucan 시제품을 생산하고, 이를 이용하여 세포 독성 실험을 완료함
 - (2) Yac-1 cell에 대한 Natural killer cell (NK cell) 활성화 평가를 통해 10 ug/mL에서 포화된 상태임을 확인하였음
 - (3) 대식세포의 활성화 측정실험 결과, 100, ug/mL 처리한 군에서 가장 대식세포 탐식능이 우수함을 확인함
 - (4) 면역불균형을 초래하는 LP-BM5 virus 감염에 대한 방어막 효과로서 200 ug/mL이 가장 뛰어난 효과를 보였음
 - 나. β 1,3/1,6-glucan 및 TLR-2 & 4 활성 유도 유산균을 이용한 *in vivo* 면역활성 시험
 - (1) 실험동물로부터 분리한 비장세포를 이용한 실험결과, β 1,3/1,6-glucan 과 *L. plantarum* 동시에 사용한 경우, 대식세포 활성화 증진능을 나타냄
 - (2) 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서 Th2 cytokine 분비량 측정 결과, β 1,3/1,6-glucan 과 *L. plantarum* 동시 사용군에서 유의적으로 증가된 IL-4분비량을 감소시키는 것으로 나타났음
 - 다. β 1,3/1,6-glucan에 대한 독성시험
 - (1) 단회 및 반복 독성 실험 결과 모두 독성 반응은 나타나지 않았음

라. 이중맹검을 이용한 인체적용시험

(1) 임상시험용 면역활성 유산균인 *L. plantarum* KKY135과 β 1,3/1,6-glucan 제품 제형 개발하고 이를 인체적용시험에 활용함

(2) 세명대학교부속한방병원에서 총 46명을 대상으로 인체적용실험을 수행하여, 주평가변수 T cell 평균값, CD3, CD4, CD8 평균값 및 B cell 평균값은 군간 통계적인 유의한 차이는 없었음

마. 제품화 기술 개발

(1) β 1,3/1,6-glucan의 제품화 공정 기술 개발을 완료하고 액상형 제품 및 분말형 제품화 완료 및 이의 품목제조보고를 완료하였음

2. Dectin-1 receptor와 Toll like receptor 2 & 4 기반 이중면역시스템 활성 소재의 생산 공정 개발

가. *A. pullulans* 균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 공정

(1) *A. pullulans* 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주를 개발하고, 변이균주로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan의 특성 분석을 완료함

(2) KSY-0516 변이균주를 이용한 5 톤 발효조에서 β 1,3/1,6-glucan의 함량은 최대 4.5 g/L 까지 생산됨을 확인함

나. Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 확보 및 대량 생산 공정 확립

(1) 국내 전통발효식품으로부터 분리된 600 여 종의 다양한 종류의 유산균을 분리하고 이의 특성 분석과 선별을 통해 Toll like receptor 2 & 4에 효능을 갖는 *L. plantarum* KKY135를 확보함

(2) 또한 유산균 대량배양을 위해 산업용배지 최적화 공정 개발을 통해 7.53×10^9 CFU/ml로 생산 가능함을 확인함

다. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균 코팅 기술

3. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 제품 개발

가. β 1,3/1,6-glucan의 피부 콜라겐 합성 촉진능 및 콜라겐 발현조절 메커니즘 규명

(1) β 1,3/1,6-glucan의 피부개선에 관여하는 항산화, MMP 분석 등을 통해 효능을 확인함

(2) β 1,3/1,6-glucan의 ERK 및 p-38 인산화 Western blot analysis을 통해 피부 콜라겐 발현조절 메커니즘을 확인하였음

나. β 1,3/1,6-glucan의 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 활용도 분석

(1) β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 Nutricosmetics - Cosmeceuticals 활용도 분석을 위한 구매자들에 대한 소비자 니즈 및 소비자 행동, 브랜드 선호 등의 특성에 대한 소비자 기호도 조사 완료함

다. β 1,3/1,6-glucan의 독성 평가, *in vitro*, 전임상 및 인체적용 시험

(1) 섬유아세포를 이용한 MTT 분석을 통해 독성시험 결과 안전성을 확인하고, 콜라겐 생합성능 및 항산화 활성 확인함 β 1,3/1,6-glucan의 피부개선에 관여하는 항산화, MMP 분석 등을 통해 효능을 확인함

(2) β 1,3/1,6-glucan 함유 제품에 대한 안정성 시험, 첩포시험 및 피부 보습, 탄력, 주름개선에 관한 인체적용시험 완료함(외부기관, 엘리트)

라. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Cosmeceuticals-Nutricosmetics 제품화

- (1) β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 제품에 대한 제형개발, 포장디자인 등을 완료함
- (2) β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 Cosmeceuticals 3 종, Nutricosmetics 3종을 제품화하고 이를 사업화하여 매출 성과 도출함

4. β 1,3/1,6-glucan을 유효성분으로 하는 실버식품 개발

가. 실버세대에 적합한 실버 식품 동향 조사, 분석

- (1) 고령화사회의 시대적 흐름 및 동향 분석과 이에 대한 실버산업의 다양한 발전 방향을 제시함
- (2) 향후 국내 실버산업에서 실버세대를 위한 기능성 식품의 종류 및 국내외 실버푸드의 개발 동향을 분석하고 실버푸드의 개발방안을 제시함

나. 천연 영양성분 구성 및 기호도 증진을 위한 부재료 선정

- (1) 실버세대를 위한 영양성분 및 기호도를 고려하여 실버푸드 개발을 위한 부재료 선정 완료

다. 실버세대용 간식류, 저지방, 고단백 시제품 개발

- (1) 실버세대용 간식류로서 양갱을 제조하고 이에 대한 겔 강도, 기호도 분석 등 특성 분석을 완료함
- (2) 1,3/1,6-glucan을 함유하는 저점도 음료로서 식혜, 수정과 등 다양한 음료를 제조하고 이에 대한 기호도 분석 등 특성 분석을 완료함

○ 연구성과 활용실적 및 계획

[연구 성과 활용실적]

1. *A. pullulans* 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주 개발

가. 협동기관 한국생명공학연구원에서는 *A. pullulans* 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주를 개발을 완료하고, 이를 주관기관 (주)선일바이오에 기술이전함

나. 주관기관 (주)선일바이오에서는 KSY-0516 변이균주로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan를 이용하여 *in vitro* 면역활성 시험, *in vivo* 효능 및 인체적용시험을 통해 면역효능을 확인함

다. 또한, 주관기관 (주)선일바이오에서는 β 1,3/1,6-glucan의 제품화 공정 기술 개발을 완료하고 액상형 제품 및 분말형 제품화 완료 및 이의 품목제조보고를 완료 및 사업화를 수행함

라. 또한 협동기관 (주)셀아이콘랩은 주관기관 (주)선일바이오와 ‘업무제휴에 관한 협약서’를 체결하고, 주관기관에서 생산하는 β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 아우터뷰티 및 이너뷰티의 제품화를 통해 매출성과를 도출함

2. Toll like receptor 2 & 4 유도 유산균의 제품화

- 가. 협동기관 한국생명공학연구원에서는 국내 전통발효식품으로부터 다양한 유산균을 확보하고, 이의 식품 용도로서 활용 가능한 유산균을 선별하고, 주관기관 (주)선일바이오에서는 선별된 유산균을 이용하여 *in vitro* 면역활성 시험, *in vivo* 효능 및 인체적용시험을 통해 면역효능을 확인함
- 나. 주관기관 (주)선일바이오에서는 면역활성 유산균에 관한 특허를 등록(10-1746047)하고, 이를 (주)남도농산에 기술이전함

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. *A. pullulans* 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주 개발

- 가. *A. pullulans* 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주를 개발을 완료하고, 이를 주관기관 (주)선일바이오에 기술이전함
- 나. 주관기관 (주)선일바이오에서는 KSY-0516 변이균주로부터 생산된 β 1,3/1,6-glucan를 이용하여 *in vitro* 면역활성 시험, *in vivo* 효능 및 인체적용시험을 통해 면역효능을 확인함
- 다. 또한, 주관기관 (주)선일바이오에서는 β 1,3/1,6-glucan의 제품화 공정 기술 개발을 완료하고 액상형 제품 및 분말형 제품화 완료 및 이의 품목제조보고를 완료 및 사업화를 수행함

[연구 성과 활용 계획]

1. *A. pullulans* 변이균주 KSY-0516이 생산하는 β 1,3/1,6-glucan

- 가. 주관기관 (주)선일바이오에서는 면역효능을 갖는 β 1,3/1,6-glucan의 건강기능성식품 원료소재에 대한 개별인정을 위한 추가적인 인체적용시험을 수행하고 있으며, 시험 완료 후 개별인정을 획득할 예정임
- 나. 주관기관 (주)선일바이오에서는 현재 β 1,3/1,6-glucan의 액상형 제품 및 분말형 제품에 대한 사업화를 진행하고 있으며, 향후 건강기능성식품 원료소재에 대한 개별인정 획득 후 보다 공격적인 마케팅을 통해 식품 시장을 확보할 예정임
- 다. 협동기관 (주)셀아이콘랩은 β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 아우터뷰티를 홍콩, 우즈베키스탄 등 해외 시장을 확보하고 있으며, 추가적으로 주관기관 (주)선일바이오에서 생산하는 β 1,3/1,6-glucan의 화장품 원료 사업을 해외로 확장할 계획임

2. 글로벌 제품화를 위한 마케팅 전략



< 국내 베타글루칸 시장 점유와 글로벌 제품화를 위한 전략 >

가. 제품의 홍보 추진전략

○ 다당류를 이용한 면역조절 글로벌 건강식품의 국내외 인증을 통한 대외공신력 확보

- 국내 판매유통을 위한 건강기능성 물질의 식약처 개별 인증으로 통한 기능물질의 유관기관의 공신력 확보추진
- 미국 및 EU시장의 해외수출을 위한 해외인증인 NDI(New Dietary Ingredient) 획득으로 타겟시장(Target-Market)내 건강기능성 식품 생산 대기업 내 납품공급에 필수적인 인증 획득 추진
- 아시아 시장진출을 위한 중국 SFDA 인증획득을 통한 건강기능성물질 제품수출 추진

○ 글로벌 건강기능성 제품식품의 인터넷 온라인 탑재를 활용한 홍보추진

- 국내외 건강기능성 식품인증을 활용한 You Tube 광고 동영상을 탑재, 국내외 소비자들에게 건강기능성 식품에 대한 인지도 확대 추진을 위한 에드버룬 홍보마케팅 추진(키워드 광고 : 영문 및 국문)
- 영어, 중국어 판의 글로벌 건강식품 홈페이지 및 전자책자 홍보물을 제작하여, 고비즈코리아를 통한 수출거래 포털 사이트를 활용하여 제품홍보로 해외네트워크 개척

○ 국내외 건강기능성 식품 및 화장품 소재 박람회에 참가하여, 해외지역의 바이어 홍보 및 시장개척

- 국내에서 매년 개최되는 국제 건강기능성 식품박람회의 국내 및 해외바이어들에게 건강기능성 식품의 인증과 특성을 홍보

나. 제품의 판로확보 전략

○ 베타글루칸의 항암보조제 등 의약품 산업 적용 판로확대

- 베타글루칸은 최근 10명중 4명이 당뇨, 고혈압 등의 자가면역질환이 확대되고 있어, 심각한 사회문제 대두의 해결수단으로 등장됨
- 베타글루칸의 건강기능성 물질의 자가면역 및 암치료제 활용추진으로 국내·외 제약회사, 의약품업체에 판로 추진

○ 건강기능식품, 기능성음료 첨가제로 활용이 식음료 업체 소비촉진 추진

- 최근 소비자들의 안전한 먹거리, 웰빙트렌드 등 소비자 니즈 변화가 점차 확대되고 있음
- 베타글루칸의 경우 식품 및 음료에 첨가시 제품에 잘 흡수되지 못하는 단점이 있으나, 이를 극복할 수 있는 기술개발 시 식음료 업체 소비촉진 가능

○ 고기능성 미용제품 첨가제로 화장품 제품 생산업체 판매추진 가능

- 베타글루칸은 강력한 보습제와 피부 깊숙이 침투하여 콜라겐 합성을 촉진하고, 화상 입은 세포 재생 효과가 있음. 오래 바를수록 피부가 탄력있고, 부드러워짐
- 또한 피부주름 개선효과가 빨라 노화현상 진행속도를 늦추어, 이를 활용한 미용제품에 첨가 고기능성 제품으로서 판매 추진

○현재 국내외 판로 확보

- 국내 8곳 이상의 공급처와 그 공급처에 따른 판매처가 확보되어진 상태이며, 특히 (주)뉴로피드, (주)에버네슬, (주)셀아이콘랩에서는 화장품용뿐만 아니라 식품용으로의 판매를 추진하고 있음

자체평가의견서

1. 과제 현황

	코드번호	D-15			
	과제번호	114007-3			
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	기능성식품	과제구분			
사업명	고부가가치식품기술개발사업				
총괄과제	-	총괄책임자			
과제명	베타글루칸과 유산균을 이용한 면역강화용 글로벌 제품화 기술 개발	과제유형			
연구기관	(주)선일바이오, 한국생명공학연구원, (주)셀아이콘랩, 남부대학교	연구책임자			
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.08.01.~ 2015.07.31	300,000	100,000	400,000
	2차년도	2015.08.01.~ 2016.07.31	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2016.08.01.~ 2017.07.31	300,000	100,000	400,000
	계		900,000	300,000	1,200,000
참여기업	(주)셀아이콘랩				
상대국	-	상대국연구기관	-		

2. 평가일 : 2017. 07. 31

3. 평가자(연구책임자) : 송영진

소속	직위	성명
(주)선일바이오	이사	송영진

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. *A. pullulans* 균주로부터 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산균주 KSY-0516 변이균주 개발과 유산균을 이용한 이중면역 효능을 확인 성과 결과 도출
2. β 1,3/1,6-glucan 함유 다양한 실버푸드의 개발 성과 우수하다고 판단됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 일반적으로 베타글루칸은 보리류, 효모 등에서 생산이 가능하나 다른 다당류와 혼재되어 있어 활용하는데 어려움이 있으나, 본 연구에서 개발된 β 1,3/1,6-glucan은 순수하게 생산되기 때문에 일반식품소재, 건강기능성 식품소재 및 아우터, 이너 뷰티 등 화장품 원료소재로서 다양한 산업 분야에 활용이 가능함

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 주관기관 (주)선일바이오에서는 β 1,3/1,6-glucan의 제품화 공정 기술 개발을 완료하고 액상형 제품 및 분말형 제품화 완료 및 이의 품목제조보고를 완료 및 사업화를 수행하고 있으며, 협동기관 (주)셀아이콘랩은 β 1,3/1,6-glucan을 함유하는 아우터뷰티를 사업화하였음. 또한 주관기관에서 β 1,3/1,6-glucan에 대한 건강기능성식품원료소재 개별인정을 획득하는 중으로 향후 식품 시장을 추가적으로 확보할 수 있을 것으로 예상됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 주관기관 및 참여기관이 연계하여 본 연구를 성공적으로 수행하기 위해 많은 노력을 기울였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 본 사업의 성과로는 특허 3 건, 논문 2 건, 홍보 57 건, 수상 2 건 등의 연구 성과와 이로 인한 고용 성과 5 명, 매출 성과 3.91억원 등의 연구개발성과를 도출하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. β 1,3/1,6-glucan과 유산균 시작품 제작	5	100	- β 1,3/1,6-glucan 및 3 kg 분말 이상 및 유산균 1 kg 분말 이상 시작품 제작 완료
2. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석	15	100	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석 완료
3. β 1,3/1,6-glucan을 독성 시험	10	100	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 독성 시험 완료(외부공인시험기관, 한국화학융합시험연구원)
4. <i>in vitro</i> 면역 활성 분석	-	100	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석 완료
5. β 1,3/1,6-glucan 임상시험	-	100	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 인체 적용시험(외부기관, 세명대학교부속한방병원)
6. 녹색 기술 및 녹색제품 인증	5	-	- 현재 진행 중
7. β 1,3/1,6-glucan 생산 공정	15	100	- 5 톤 발효조에서 β 1,3/1,6-glucan 생산 및 분리 정제 공정 개발 완료
8. TLR 2 & 4 활성 유산균 확보	15	100	- TLR 2 & 4 기반 면역활성 유산균 확보 - 특허 등록 1 건 및 기술이전 1 건
9. β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석 및 Spec. 확립	5	100	- β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석 및 제품화 Spec. 완료
10. 제품 생산 경제성 분석	15	100	- β 1,3/1,6-glucan 생산에 대한 경제성 분석 완료 및 제품화
11. β 1,3/1,6-glucan의 피부개선 효능 평가	10	100	- β 1,3/1,6-glucan을 함유한 cosmeceutical 제품의 피부개선 효능 평가 완료 (외부기관, 엘리트)
12. β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가 시험	-	100	- β 1,3/1,6-glucan을 함유한 cosmeceutical 제품의 안전성 평가 시험 완료 (외부기관, 충남대학교)
13. β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 인체 적용 시험	10	100	- β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 인체 적용 시험 진행 중(IRB 승인 대기중, 외부기관 스킨메드피부과학연구소)
14. β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 개발	10	100	- β 1,3/1,6-glucan 기반 cosmeceutical 9 종 개발 완료, nutri-cosmetic은 시제품 제작 완료
15. 실버세대를 위한 시제품 개발	-	100	- 실버세대를 위한 양갱류, 음료 등 5 종 시제품 개발 완료
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 면역활성을 갖는 다당체 β 1,3/1,6-glucan만을 생산하는 변이 균주를 개발 및 TLR 2 & 4에 작용하는 유산균을 이용한 면역활성 증진에 관한 연구를 목표 대비 충실히 수행하였으며, 특히 β 1,3/1,6-glucan은 주관기관에서 건강기능성식품 원료소재 개별인정을 위해 인체적용시험을 추가적으로 진행하고 있음
- TLR 2 & 4에 작용하는 유산균은 기술이전을 완료하였으며, β 1,3/1,6-glucan은 주관기관에서 제품화를 완료하여 마케팅을 진행하고 있으며, 협동기관 (주)셀아이콘랩에서는 β 1,3/1,6-glucan을 함유한 아우터 제품을 개발하여 국내뿐만 아니라 해외에 수출하는 성과를 도출하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 해당 사항 없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 해당 사항 없음

IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 해당 사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

- 해당 사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	베타글루칸과 유산균을 이용한 면역강화용 글로벌 제품화 기술 개발			
주관연구기관	농업회사법인 선일바이오(주)		주관연구책임자	송 영 진
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000,000	300,000,000		1,200,000,000
연구개발기간	2014. 08. 01 ~ 2017. 07. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1. β 1,3/1,6-glucan과 유산균 시작품 제작	- β 1,3/1,6-glucan 및 3 kg 분말 이상 및 유산균 1 kg 분말 이상 시작품 제작 완료
2. β 1,3/1,6-glucan을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석 완료
3. β 1,3/1,6-glucan을 독성 시험	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 독성 시험 완료 (외부공인시험기관, 한국화학융합시험연구원)
4. <i>in vitro</i> 면역 활성 분석	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 <i>in vitro</i> 면역 활성 분석 완료
5. β 1,3/1,6-glucan 임상시험	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 인체적용시험(외부기관, 세명대학교부속한방병원)
6. 녹색 기술 및 녹색제품 인증	- 현재 진행 중
7. β 1,3/1,6-glucan 생산 공정	- 5 톤 발효조에서 β 1,3/1,6-glucan 생산 및 분리 정제 공정 개발 완료
8. TLR 2 & 4 활성 유산균 확보	- TLR 2 & 4 기반 면역활성 유산균 확보 - 특허 등록 1 건 및 기술이전 1 건
9. β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석 및 Spec. 확립	- β 1,3/1,6-glucan의 물리, 화학적 특성 분석 및 제품화 Spec. 완료

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
10. 제품 생산 경제성 분석	- β 1,3/1,6-glucan 생산에 대한 경제성 분석 완료 및 제품화
11. β 1,3/1,6-glucan의 피부개선 효능 평가	- β 1,3/1,6-glucan을 함유한 cosmeceutical 제품의 피부개선 효능 평가 완료 (외부기관, 엘리트)
12. β 1,3/1,6-glucan의 안전성 평가 시험	- β 1,3/1,6-glucan을 함유한 cosmeceutical 제품의 안전성 평가 시험 완료 (외부기관, 충남대학교)
13. β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 인체 적용 시험	- β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 인체 적용 시험 진행 중(IRB 승인 대기중, 외부기관 스킨메드피부과학연구소)
14. β 1,3/1,6-glucan 기반 nutri-cosmetic 개발	- β 1,3/1,6-glucan 기반 cosmeceutical 9 종 개발 완료, nutri-cosmetic은 시제품 제작 완료
15. 실버세대를 위한 시제품 개발	- 실버세대를 위한 양갱류, 음료 등 5 종 시제품 개발 완료

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
											SCI	비SCI								
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	5	2	-	1	-	5	-	-	-	-	2	2	3	5	2		5			
연구기간 내 달성실적	3	1	1	1	30	16	265	126	5	2,470	11	-	2	4	7		57	2		
달성율(%)	60	100		100		320					550	0	67	80	350		1,140			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	1. <i>A. pulluans</i> 유래 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산 변이균주 개발 기술
②	2. <i>A. pulluans</i> 변이균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 및 분리 정제 기술
③	3. TLR 2 & 4 기반 면역활성 유산균 확보 기술
④	4. β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 이중면역 활성화 증진 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타 (자체 사업화)
①의 기술	V					V	V			V
②의 기술		V								V
③의 기술		V				V	V			V
④의 기술	V									V

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- <i>A. pulluans</i> 유래 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산 변이균주는 주관기관에 기술이전 완료
②의 기술	- 순수한 β 1,3/1,6-glucan 생산 변이균주를 이용한 β 1,3/1,6-glucan 생산 및 분리 정제 기술을 확립하여 주관기관에서 자체사업화
③의 기술	- TLR 2 & 4 기반 면역활성 유산균 확보 기술은 타 기업에 기술이전 완료
④의 기술	- β 1,3/1,6-glucan 및 유산균을 이용한 이중면역 활성화 증진 기술은 추가적인 연구 진행 필요

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균 IF			학술발표	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	10			15		10	15	20		20	10									
최종목표	5	2		1		5					2	2	3		5		2	5		
연구기간내 달성실적	3	1	1	1	30	16	265	126	5	2,470	11	-	2		4		7	57	2	
연구종료후 성과창출 계획	2	3				5	500	100			1	2	2		4					

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

- 해당사항 없음

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			