

발간등록번호

11-1543000-002006-01

미역취로부터 체지방감소 건강기능식품
개별인정 원료개발

(Development of Body Fat-reducing agent as an Individual
authorized Health Functional Food from *Solidago
virgaurea*)

한림대학교 산학협력단

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "미역취로부터 체지방감소 건강기능식품 개별인정 원료개발 "(개발기간 : 2014. 09. 25 ~ 2017. 09. 24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 한림대학교 산학협력단	(대표자) 최지평 (인)
협동연구기관명 : 성신비에스티(주)	(대표자) 홍원표 (인)
참여기관명 : 성신비에스티(주)	(대표자) 홍원표 (인)



주관연구책임자 : 임순성
 1세부연구책임자 : 임순성
 2세부연구책임자 : 이재용
 협동연구책임자 : 최지평
 참여기관책임자 : 최지평

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	114066-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.09.25 ~ 2017.09.24	단 계 구 분	3차년도/3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	미역취로부터 체지방감소 건강기능식품 개별인정 원료개발			
	세 부 과 제 명	1세부: 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가 2세부: 미역취추출물의 유효성분이 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해활성 효능 평가 1협동: 체지방감소에 도움을 주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구			
연구책임자	임순성	해당단계 참 여 연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:230,000천원 민간:230,000천원 계:460,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 49명 내부: 49명 외부: 명	총 연구개발비	정부:690,000천원 민간:390,000천원 계:1,080,000천원
연구기관명 및 소속부서명	1세부(주관기관) : 한림대학교 산학협력단 2세부 : 한림대학교 산학협력단 1협동 : 성신비에스티(주)			참여기업명 : 성신비에스티(주)	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수	
(1) 체지방 감소에 대한 검증된 효능을 바탕으로 SCI 논문 4편, 지식재산권(특허) 출원 5건 등록 2건 완료함.				138	
(2) 본 연구과제에 참여를 통해 미역취의 추출 및 유효 성분 분리법과 항비만에 대한 기능성 평가 기술에 대한 전문 인력 6명 배출함.					
(3) 국제식품산업대전에서 본 연구팀이 '미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법' 기술의 내용을 흥					

보함으로써 많은 농가를 포함한 농업조합, 항비만 관련 건강기능성식품제조 업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 울릉도 미역취 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있음.

(4) 출원 특허 “미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법”에 관하여 기술을 제공하고 독점적 전용실시권의 기술이전을 체결함.

(5) 미역취 추출물을 대상으로 체지방개선 임상연구 진행하였으며, 추후 건강기능식품 원료인정을 확보하면, 다양한 제형의 제품으로 품목신고를 통한 다양한 제품 개발이 가능 할 것임.

(6) 본 연구를 진행하면서 울릉도 미역취 소재의 체지방 감소 효능에 대한 연구 결과를 토대로 성신비에스티(주)가 주체로 “예기채” 시제품을 제작함. 타블렛 제조함으로써 미역취 소재의 고부가가치소재로서의 활용성 다양화를 추구함.

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구 목적 미역취로부터 체지방감소 건강기능식품 개별인정 원료 및 품목허가를 취득함으로써 (1) 새로운 개념의 비만예방 및 치료제의 기능성에 대한 국제적인 원천기술을 확보하고, (2) 미역취의 기능성이 과학적으로 입증된 고부가가치의 작물로서 승격시켜, 농업경제 활성화로 농가의 지속적인 수입 증대를 이룰 수 있는 기반을 마련하고, (3) 기능성 소재 발굴에 따른 새로운 건강기능식품 개발을 통하여 지속적인 소비와 생산을 유지 할 수 있게 함으로써, 지역산업의 활성화에 기여하고자 함.</p> <p>2. 연구 내용</p> <p>(1) 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 비만예방 또는 치료용 소재 탐색을 통한 미역취의 최적 추출 조건 확립 ② Active-principle에 의한 유효물질(기능성 성분)의 분리 정제, 구조 규명 및 분석 방법 확립 ③ 원재료 표준화(식물종 확정/재배 지역/사용부위/채취시기) 확립 ④ 기능성 원료 표준화 및 지표물질 설정 ⑤ 제조공정 표준화 ⑥ 지표성분 및 유효성분을 바탕으로 한 안정성연구 ⑦ 비만관련 효소활성 검색을 통한 지방의 소화·흡수·합성·분해 효능 평가 ⑧ 고지방식이 마우스를 사용한 체지방 감소 효능 검증 및 기전 연구 <p>(2) 미역취추출물로부터 체지방감소 효능검증 및 기전 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 미역취추출물의 3T3L-1 세포에서 분화를 억제하는 분자기전 연구 : PPAR-γ 연관 전사인자 및 AMPK 연관인자의 발현 분석연구 ② 고지방식이 섭취 SD Rat을 이용한 미역취추출물의 체지방감소 효능검증 및 기전 연구 ③ ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)를 사용한 미역취추출물의 체지방감소 효능검증 및 기전연구 <p>(3) 체지방감소에 도움을 주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화 (기능성 성분의 분리 정제 및 제조 공정 확립) ② 체지방감소에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정 위한 CRO 기관 선정 및 GLP기관 안전성 평가 ③ 임상시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설) ④ 임상시험을 위한 기능성식품인체시험심사위원회(Institutional Review Board : IRB) 신청/승인 및 임상시험 실시(CRO의 자료 수집) ⑤ 체지방감소 건강기능식품(개별인정) 기능성원료 신청 및 승인을 위한 자료 보완/품목신고 ⑥ 체지방감소 건강기능식품 시제품 개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립 		
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 체지방 감소에 대한 검증된 효능을 바탕으로 SCI 논문 4편, 지식재산권(특허)</p>		

	<p>출원 5건 등록 2건 완료함. 국내 비만 및 식품영양관련 학회(대한비만학회, 식품영양과학회, 한국응용생명화학회, 한국질량분석학회, 한국생약학회, 세계약물연구학회, 한국식품과학회) 참석, 국외(BEFE) 학회 참석, 총 12편의 학회 포스터 발표함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구과제에 참여를 통해 미역취의 추출 및 유효 성분 분리법과 항비만에 대한 기능성 평가 기술에 대한 전문 인력 6명 배출함. ○ 국제식품산업대전에서 본 연구팀이 ‘미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법’ 기술의 내용을 홍보함으로써 많은 농가를 포함한 농업조합, 항비만 관련 건강기능성식품제조 업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 울릉도 미역취 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있음. ○ 출원 특허 “미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법”에 관하여 기술을 제공하고 독점적 전용실시권의 기술이전을 체결함. ○ 미역취 추출물을 대상으로 체지방개선 임상연구 진행함. ○ 본 연구를 진행하면서 울릉도 미역취 소재의 체지방 감소 효능에 대한 연구 결과를 토대로 성신비에스티(주)가 주체로 “예기채” 시제품을 제작함. 타블렛 제조함으로써 미역취 소재의 고부가가치소재로서의 활용성 다양화를 추구함. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 과제에서 획득한 체지방 감소 효능을 가진 울릉도 미역취 소재 추출물 및 유효 성분을 이용하게 되면, 농업인의 농가 소득의 증가와 함께 지역 경제를 활성화시키고, 고부가가치 산업으로 육성 가능. ○ 울릉도 미역취 소재의 체지방 감소에 대한 검증된 효능을 참여기업에 기술이전 하였으며, 참여기업은 미역취추출물의 체지방개선을 위한 건강기능식품 개별인정 원료로 인정 원료의 상품화 홍보에 적극적으로 활용할 계획. ○ 과학적인 접근의 효능검증과 임상연구를 기반으로 특허 및 논문 등의 확보된 지식재산권을 이용하여 건강기능식품의 개별인정소재 신청하여, 미역취추출물 원료가 함유된 품목의 제품 품목신고를 거쳐 최종 제품이 개발/ 시판할 계획. 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>미역취</p>	<p>항비만</p>	<p>체지방</p>	<p>대사증후군</p>	<p>건강기능식품</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>Obesity is associated with an increase in adipogenesis and is becoming a serious health problem in modern society. The effects of various <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>gigantea</i> (SV) ethanolic aqueous extracts on anti-adipogenesis in 3T3-L1 cells were investigated. In addition, the effect of SV 10% ethanolic extract (SV10E) on preventing obesity was studied in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6 N) and SD rats. SV10E can be a potent functional food ingredient for preventing HFD-induced obesity by suppressing adipogenesis and lipogenesis.</p>					
Results	<ul style="list-style-type: none"> - SV10E showed the highest anti-adipogenic activity <i>in vitro</i> and reduced body weight gain, adipose tissue size, and liver weight, without affecting food intake <i>in vivo</i>. SV10E administration decreased the levels of total triacylglycerol and cholesterol in serum, and lipid metabolites in liver. Adipogenic and lipogenic genes such as PPAR-γ, C/EBP-α, aP2, FAS, SCD-1, SREBP-1c, and CD36 in white adipose tissue and liver were suppressed by SV10E administration. - Protocatechuic acid (PC), chlorogenic acid (CA), isolated from the SV extract, were quickly and efficiently separated using HPLC. - Extract from SV collected in April from the Ulleung Island produced over 106.89% inhibition of adipogenesis without cytotoxicity at 50 μg/ml. The developed HPLC method was found to be fast, accurate, precise, and reproducible and could be applied to qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds in SV extracts. - Orally treated SV10E extract has excellent anti-obesity effect against HFD-induced obesity of animal and it is tested on human subjects for the first time. 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - The SV extract collected in April from Ulleung Island can be used as a functional food ingredient preventing obesity. - SV10E can be a potent functional food ingredient for preventing HFD-induced obesity by suppressing adipogenesis and lipogenesis. 					
Keywords	<i>Solidago virgaurea</i>	anti-obesity	body fat	metabolic syndrome	health functional food	

6. 영문목차

< Contents >

1. Introduction of Research	9
2. Current Status of Domestic and Global Technical Development	18
3. Contents and Results of Research and Development	21
4. Level of Achievement and Contribution	126
5. Use Plan of research results	132
6. Obtained Global Scientific and Technical Information During The Research Process	133
7. Security Levels of Research Development Results	133
8. Current Status of Registered research facilities and Equipment on National Science and Technology Information System	134
9. Performance Lab Safety Management Implementation	134
10. Representative Research Project Results	135
11. Miscellaneous	137
12. References	138

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	18
3. 연구수행 내용 및 결과	21
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	126
5. 연구결과의 활용계획 등	132
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	133
7. 연구개발성과의 보안등급	133
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	134
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	134
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	135
11. 기타사항	137
12. 참고문헌	138

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

주관연구기관은 지난 2-3년 동안 식품을 포함한 천연물 추출물 자원 300여종을 대상으로 지방세포(3T3-L1)의 분화 억제능을 측정하여, 식품으로 가능하고, 지식재산권 확보가 가능한 비만예방 또는 체지방감소 기능의 건강기능식품 및 천연물의약품 신규소재인 미역취 (*Solidago virgaurea subsp. asiatica* Kitam. ex Hara)를 도출하였다. 본 연구과제는 현재 특허출원한 미역취를 대상으로 지표물질 및 유효물질 확보 및 구조 결정, 표준화연구, 안정성 평가, 동물실험을 통한 효능 평가, in vitro 및 in vivo를 통한 효능 기전연구, 전임상 안전성평가 및 인체적용시험을 통하여 순수국산의 자원으로부터 체지방감소 기능의 건강기능식품 개별인정 원료 및 기능성 식품소재로서의 가능성을 타진하고 기전적인 역할을 규명하여 건강기능성 식품으로 개발하고자 함.

궁극적으로 미역취로부터 체지방감소 건강기능식품 개별인정 원료 및 품목허가를 취득함으로써

- (1) 새로운 개념의 비만예방 및 치료제의 기능성에 대한 국제적인 원천기술을 확보하고,
- (2) 미역취의 기능성이 과학적으로 입증된 고부가가치의 작물로서 승격시켜, 농업경제 활성화로 농가의 지속적인 수입 증대를 이룰 수 있는 기반을 마련하고자 함.
- (3) 기능성 소재 발굴에 따른 새로운 건강기능식품 개발을 통하여 지속적인 소비와 생산을 유지 할 수 있게 함으로써, 지역산업의 활성화에 기여하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

○ 우리나라는 경제 발전과 함께 과학기술의 고도성장을 통하여 선진국형 고령화로 접어드는 동시에 성인병이 급격히 증가하고 있다. 원인으로서는 현대인들의 스트레스 가중과 식생활 습관이 서구화되고 과도한 영양섭취, 신체활동량의 감소를 들 수 있으며, 실제 비만을 동반한 합병증인 심장 및 뇌혈관성 질환 사망률이 1, 2위를 기록하고 있으며, **비만은 각종 성인병의 원인**으로 제시되고 있다.

○ 이와 같이 비만과 함께 수반되는 대사증후군이 관심사로 집중되면서 지방조직은 지방 저장소로서의 역할 뿐아니라, 대사조절을 하는 내분비기관으로써 연구 대상이 되고 있다. 지방조직에서 생성, 분비되는 adiponectin, leptin, 레지스틴(resistin), adipisin, 비스파틴(visfatin)과 같은 adipocytokines (adipokines)들이 속속 밝혀짐에 따라 많은 연구들이 이루어지고 있다.

○ 최근 보건복지가족부가 발표한 ‘2007 국민 건강영양 조사’에 따르면, **최근 2년 사이 우리 국민의 신체 활동량은 줄고 비만은 증가하는 것으로 나타남. BMI 25 이상인 비만자의 경우 특히 남성에서 36.2%로 1.5% 증가했으며, BMI 30 이상의 고도비만율도 4.1%로 0.6% 증가함. 소아 청소년 비만 유병률도 증가 추세며, 비만과 관련된 질환의 유병률도**

지속적으로 높아짐.

- 총 의료비 중에서 비만 관련 질환 의료비가 차지하는 비중이 높아지고 있으며 (보건복지부, 2006 비만 심포지움 자료), 우리나라에서 비만의 사회·경제적 비용은 2005년 기준으로 약 1조 8천억이었으며, 사회·경제적 비용 부담이 지속적으로 증가할 것으로 예상됨 (보건복지부, 2006 비만 심포지움 자료).
- 건강기능식품 소비자 요구도 및 기업체 연구 분야 우선순위에서 비만분야가 우위이며, 한국건강기능식품협회에서 소비자를 대상으로 건강기능식품 요구도 우선순위를 조사한 결과, 1위가 비만 38%, 2위가 면역력 증진 22%, 3위가 아토피 순으로 나타남. ‘2007년도 바이오 푸드 네트워크 사업보고서’에 의하면, 기업체의 우선 연구 분야로 비만, 면역기능, 콜레스테롤, 당뇨 등 대사질환분야가 우위를 차지함. 2003년부터 2008년까지의 개별 인정형 건강기능식품의 기능성 내용 중에서 1위가 체지방 감소임(표 1).

순위	기능성 내용	인정건수	농식품 원료 건수
1	체지방 감소	26	가르시니캄보지아(3) 대두배아(1)
2	항산화 효과	19	대나무잎(1) 복분자(1) 포도종자(1) 토마토(2)
3	관절 건강	14	로즈힙(2)
4	혈압 조절	14	
5	식후 혈당 조절	10	구아바잎(2) 달맞이꽃 종자(2) 콩발효물(4)
6	눈 피로 개선	8	빌베리(3)
7	눈 건강 (노화 기인)	8	
8	배변활동 원활	7	목이버섯(1) 분말한천(1) 대두올리고당(1)
9	혈중 콜레스테롤 개선	7	대나무잎(1) 아미인(1) 알로에(2)
10	전립선 건강 유지	5	쏘팔메토 열매(5)
계		118	34 (29%)

<개별 인정형 건강기능식품의 기능성 내용 순위>

1. 국내의 비만 현황

(1) 국내 비만 현황

- 통계청(2013 한국의 사회지표)자료에 따르면 2012년 19세 이상 인구의 비만 유병률(체질량지수 25이상)은 32.8%로 전년(31.9%)에 비해 0.9%p 증가하였으며, 성별로 보면 남녀 비만 유병률은 전년에 비해 각 0.9%p, 1.1%p 모두 증가하였다.

<2012년 19세 이상 인구의 비만 유병률(체질량지수 25이상)>

(단위 : %)

연도	비만 유병률 ¹⁾	남자	여자
2008	31.0	35.6	26.5
2009	31.9	36.2	27.6

2010	31.4	36.5	26.4
2011	31.9	35.2	28.6
2012	32.8	36.1	29.7

자료 : 질병관리본부, 「국민건강통계」 각년도

주 : 1) 체질량지수(kg/m²) 25 이상인 비율

○ 2011년 국민건강보험공단에 따르면 흡연, 음주, 비만으로 인한 건강보험 진료비 지출은 지난 2007년 4조6541억원에서 2011년에는 6조6888억원으로 43.7% 증가했고 이는 2011년 기준 건강보험 전체 진료비 46조2379억원의 14.5%에 해당하는 규모다. **음주와 비만으로 인한 건강보험 진료비 지출 규모가 흡연보다 더 큰 것으로 나타났다.**

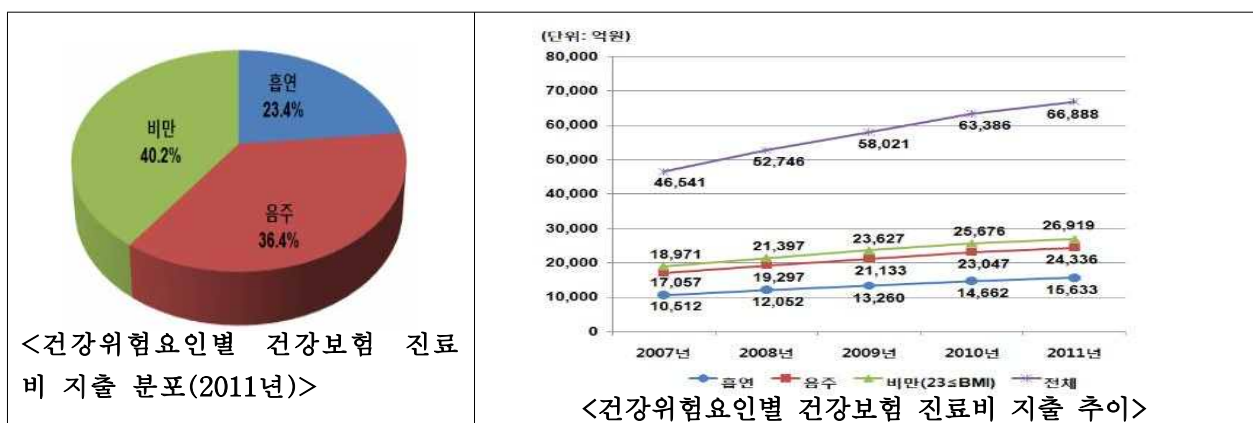
<건강위험요인별 건강보험 진료비 지출 규모>

(단위 : 백만원, %)

구분	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	연평균 증가율	2007년 대비 2011년 증가율
흡연	1,051,232 (22.6)	1,205,155 (22.8)	1,326,028 (22.9)	1,466,242 (23.1)	1,563,260 (23.4)	10.4	48.7
음주	1,705,709 (36.6)	1,929,682 (36.6)	2,113,310 (36.4)	2,304,677 (36.4)	2,433,640 (36.4)	9.3	42.7
비만*	1,897,109 (40.8)	2,139,720 (40.6)	2,362,741 (40.7)	2,567,643 (40.5)	2,691,852 (40.2)	9.1	41.9
전체	4,654,050 (100)	5,274,557 (100)	5,802,079 (100)	6,338,562 (100)	6,688,752 (100)	9.5	43.7

*BMI 23이상을 기준으로 함.

○ 2011년 건강위험요인으로 인한 건강보험 진료비 지출 중 **비만에 의한 지출이 40.2%로 가장 높았고** 다음으로 음주가 36.4%, 흡연이 23.4% 순으로 진료비 지출 비중이 높았다.



○ 비만(BMI 23 이상)으로 인한 건강보험 진료비 지출 규모는 2007년 1조8971억원에서 2011년 2조6919억원으로 41.9% 증가했고 이는 건강보험 전체 진료비의 5.8%에 해당하

는 규모다. 비만은 단지 개인의 건강상의 문제를 사회적 문제로서 발전하고 있는 것이 현실이다.

(2) 국외 비만 현황

○ 전 세계적으로 비만 환자는 현재 약 4억명 이상으로 추산되며, 비만으로 발전 될 가능성이 높은 과체중 환자가 17억명에 달하고 있어 비만 환자는 지속적으로 증가할 것이 확실시 되고 있으며, 비만으로 인하여 지출되는 의료비를 포함한 사회적 지출 비용도 기하급수 적으로 증가할 것으로 예상되고 있다.

○ 2008년 주요 7개 국가(5EU, 미국, 일본)에서 비만 성인은 1억 2,500만 명으로 집계 되었으며 이 수치는 2018년까지 1억 4,300만명으로 증가할 것으로 추정된다. 2008년 주요 7개 국가에서 시장 매출 규모는 5억1,370만 달러였고 향후 2018년 위의 비만 성인의 숫자를 미루어 보아 약 5억 6,000만 달러로 증가할 것으로 예상된다. <Datamonitor, "Pipeline and Commercial Insight: Obesity“(2009.7)에서 일부 발췌하여 요약한 내용임>

2. 비만 시장 현황 및 비만 치료제 현황

○ 주요 7개 국가(5EU, 미국, 일본) 시장은 2004-2008년에 걸쳐 연평균성장률(CAGR)은 2.2%로 5,190만 달러 더 성장하여 2008년 5억 1,370만 달러가 되었다.

<'08년 및 '18년 비만시장 매출규모>

국가	2008(a)			2018(f)		
	매출(\$)	CAGR('04~'08)	시장점유율(%)	매출(\$백만)	CAGR('04~'08)	시장점유율(%)
일본	520만 달러	-1.2%	1.0%	490만 달러	-0.5%	0.9%
5EU	2억 7510만 달러	6.6%	53.6%	1억 8560만 달러	-3.5%	33.1%
미국	2억 3340만 달러	-1.9%	45.4%	3억 6930만 달러	4.3%	66%
총 계	5억 1370만 달러	2.2%	100%	5억 5980만 달러	0.8%	100%

※단 a는MIDAS, IMS Health, 2009.4에서 나온 결과를 참조함
f는 예상 규모를 나타낸것임(Datamonitor 2009-2018 forecast)

○ 현재 국내 비만치료제 시장은 약 800억원 이상으로 추정되고 있는데 매년 10% 정도 성장하고 있다. 항비만 기능성 식품 시장에서 기능성에 대하여 과학적인 인정을 받은 물질로는 피루부산과 CLA(Conjugated Linolic Acid)가 있으며, CLA는 지방세포의 자살 기전 유도도 지방세포 수, 크기를 감소시킨다. CLA의 특허 권한이 외국에 있어 시중에 판

매되고 제품들은 외국에 로얄티를 지불하여 생산, 판매하고 있다. 따라서 항비만 기능성 신물질을 천연물에서 개발이 필요한 시점이다.

- 제니칼[(Xenical), 리덕틸(Reductil)등의 비만 치료제가 등장하면서 500억대 시장을 형성하면서 큰 인기를 가져왔지만, 심혈관질환, 대장점막의 손상과 착색 등 부작용이 발견되면서 판매가 금지되었다. Pancreatic lipase는 triglyceride를 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 분해하는 keyenzyme으로 작용한다. 대표적인 pancreatic lipase inhibitor는 *Streptomyces toxytricini*로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydrolipstatin (Orlistat,)으로서 섭취된 지방의 약 30%를 저해할 정도로 효능이 우수하며, 현재 의약품으로 시판 중에 있지만, 위장장애, 과민증, 담즙분비장애 등의 부작용이 있다.

<주요 비만치료제의 부작용>

제품명	주 성분명	부작용
리덕틸, 슬리머, 실크라민, 엔비유 제이칼 푸링, 펜티신	시부트라민 오르리스타트 펜티메트라진	심부전, 신부전, 위장관계 문제 간독성, 지방변, 변실금 마약류 분류, 불면증, 손떨림

- 따라서, 다양한 바이오 활성성분을 함유하고 있는 천연물로부터 유효성분을 분석하여 비만의 치료 및 예방을 위하여 부작용 없는 새로운 항비만 기능성식품 개발이 절실히 필요하다.

3. 건강기능식품

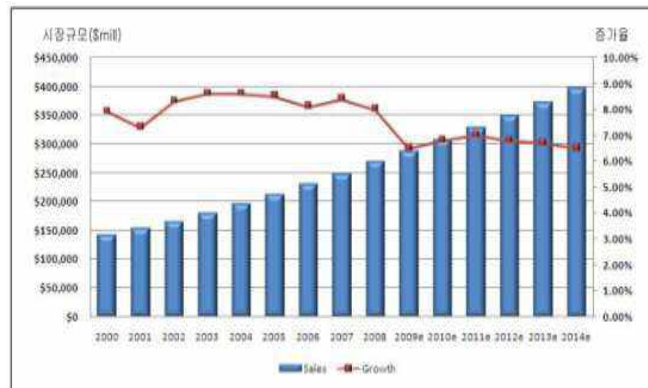
(1) 국내 건강기능식품생산 및 시장 현황

- 건강기능식품 업체들은 임상시험을 통한 안전성과 기능성이 검증된 제품을 개발하고, 차별화된 마케팅 전략으로 접근하며, 이처럼 과학적인 데이터가 뒷받침된 제품에 대한 소비자들의 신뢰와 관심이 급증하고 있는 추세임.
- 건강기능식품 시장의 2000년대 후반 이후 주목할 만한 변화는 삼양제넥스, KT&G, 매일유업, 농심, 웅진식품 등 대기업들의 건강기능식품 시장진출이 눈에 띄게 증가했으며, 대기업의 건강기능식품시장 진출이 향후 계속되어 관련 시장규모 확대에도 영향을 줄 것으로 판단됨.
- 한 조사에 따르면, 2030세대의 건강기능식품의 구입률이 증가하고 부모님을 위한 선물용으로 구입했던 과거와는 달리 젊은층의 경우 자신이 직접 섭취하기 위해 구입하는 사례가 꾸준히 늘고 있음. 따라서 건강기능식품이 노년층을 위한 식품이라는 인식에서 벗어나 연령에 상관없이 섭취할 수 있는 식품이라는 인식이 높아졌다고 판단됨.

(2) 국외 건강기능식품생산 및 시장 현황

○ 전 세계 건강기능식품 시장의 규모는 점진적으로 커지고 있으며, 2010년 3,000억불 정도로 추산되고 최근 성장률은 연간 7%정도에 달하고 있음(그림 1).

그림 1. 연도별 세계 건강기능식품 시장 현황



*자료출처 : Nutrition business journal 2010

○ 미국, 유럽, 일본 등이 세계시장의 약 85%를 차지하며, 이처럼 사업화된 선진 국가를 중심으로 건강기능식품 시장이 발달되어 있음(그림 2).

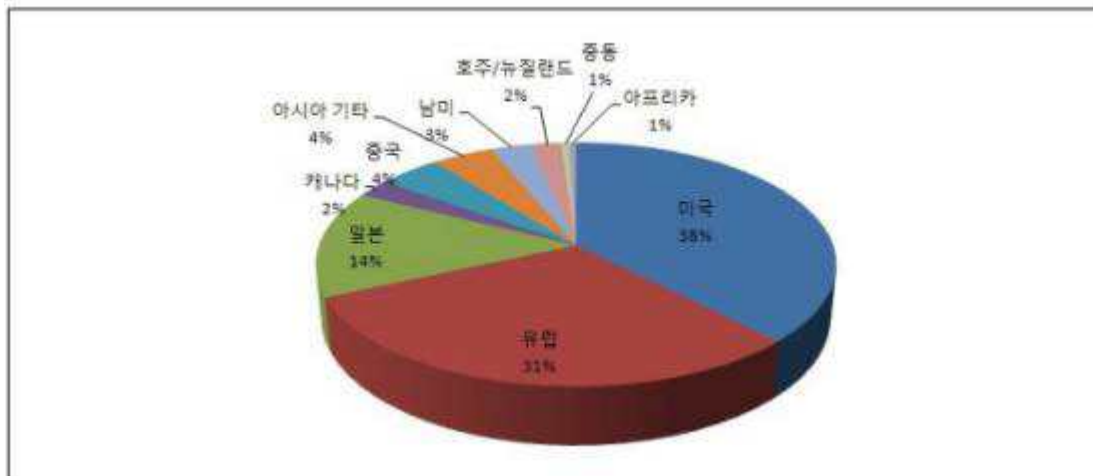


그림 2. 2010년 국가별 건강기능식품 시장 현황

○ 세계 건강기능식품 시장은 소비자들의 삶의 질 향상에 대한 욕구 증대, 식생활 변화에 의한 만성질환의 증가, 생활수준 향상과 고령화로 인한 건강지향 욕구 증대, 대체의학 및 예방의학의 관심증대에 의한 의료비 절감효과, 고부가가치 첨단 바이오공학기술사업의 발전, 기존 주력 제조업관련 산업의 성장한계로 새로운 돌파구 모색, 기능성 식품에 대한 각국의 활발한 법규지원 추세에 따른 필요 요구가 꾸준히 증가될 것으로 예측됨.

○ 비만과 이로 유발되는 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 심혈관계 질환 같은 대사성질환이 전

세계적으로 심각한 사회문제로 대두되고 있으며, 비만의 유병율에 있어서, 미국이 30%정도로 가장 높고, 캐나다와 유럽은 10~23% 정도, 동남아 지역에서도 20~30% (BMI 수치 25이상)으로 미국, 유럽의 빈도에 필적함.

- 선진국의 경우 총 국민의료비의 2~7%가 과체중 및 비만에 의해 발생하고 있으며, 비만으로 인한 생산성 저해 등의 간접비용과 비만으로 인한 삶의 질 저하, 질병으로 인한 고통 등의 무형요소를 포함시키면 비만이 차지하는 사회·경제적 비용은 더욱 높은 비율을 차지함.
- 비만의 해결은 세계적인 보건 문제 중의 하나로 인식되고 있음. 의학, 약학, 식품, 서비스업 등 산업계 전반에 있어서 비만 치료의 소재 및 방법에 대한 연구 및 투자가 활발하게 진행되고 있어, 향후 시장의 확장 가능성을 크게 시사하고 있으며, 그동안 비만 치료를 위해 개발된 합성 의약품은 효과에 비해 부작용이 심각하여, 종래의 약물에 의한 치료중심에서 예방중심으로 그 요구가 증대하고 건강기능식품에 대한 가치 부각됨.
- 항비만 효과는 높고 부작용이 적은 새로운 작용기전을 가진 식품 물질의 개발이 절실히 요구됨에 따라, 식품성분이 인체에 미치는 효능과 기능이 과학적으로 규명되고 있음. 체중 조절용 건강기능식품시장은 전 세계적으로 기능성 식품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 체중 조절용 건강기능식품 시장은 2008년을 기준으로 시장 규모가 75억불이며, 연간 성장률은 6.8%로 추산됨. 미국, 유럽, 일본이 체중 조절용 건강기능식품 세계시장의 대부분 차지하고, 다국적 기업의 성장세가 두드러지게 나타나고 있음. 체중 조절용 건강기능식품의 발전은 정체기에 들어선 식품산업의 새로운 발전 계기가 되어 세계 식품산업 전반에 걸쳐 커다란 영향을 주며, 미생물 균주 및 미생물의 대사물질 등을 이용하여 생체-적합성이 있고 대규모 생산이 가능한 건강기능식품 개발을 목적으로 하는 생명공학관련기술이 발전하고 있음.
- 향후 항비만 관련 분야에 있어서는 건강기능식품, 의약품, 및 치료방법의 개발과 더불어 개개인의 비만의 원인을 정확히 진단하는 기술이 발전해야 효과적인 비만 예방 및 치료가능할 것임. 개개인의 비만 요인에 대한 진단기법(유전자 검사, 식습관 검사, 개개인에 대한 비만 요인의 검사)의 개발이 요구됨.

4. 미역취 연구개발에 대한 배경 및 필요성

(1) 미역취

미역취(*Solidago virgaurea subsp. asiatica* Kitam. ex Hara)는 일지황화, 광과일지황화, 두메미역취, 돼지나물이라 불리기도 하는 국화과로 원산지는 한국과 일본이며, 전국의 산야에서 흔히 자생한다. 어린잎은 나물로 식용하고 민간에서 건위제, 이뇨제 따위로 쓴다.



원재료명	미역취
이명	돼지나물, 두메미역취, 일지황화, Japanese goldenrod
학명	<i>Solidago virgaurea subsp. asiatica</i> Kitam. ex Hara = <i>Solidago japonica</i> Kitam.
원재료 분류	식물
식용가능 여부	가능(어린순)

(식용 가능 : 식약청 식품원재료 검색 활용 http://fse.foodnara.go.kr/origin/search_ok.jsp)

(2) 국내 미역취 주 생산지인 울릉군의 지리적 특성 및 미역취 재배현황

(가) 위치 및 면적

○ 경상북도 울릉군은 동경130°47'40" ~ 131°52'22", 북위 37°27'44" ~ 37°33'31" 에 위치하고 있음

○ 울릉도의 동서 및 남북의 직선거리는 각각 10km, 9.5km이고 주위 둘레는 56.5km, 총면적은 72.558km².

(나) 지형

○ 제 3~4기초에 걸쳐 동해에 솟아난 거대한 화산의 정상부에 해당하며 현무암, 조면암 등의 알카리성 화산암으로 되어 있음.

○ 섬의 중앙부에는 울릉도 최고봉인 성인봉(성인봉:984m)이 솟아 있고 그 북부사면에는 성인봉의 칼데라 화구가 함몰하여 형성된 나리분지가 위치하고 있음.

○ 나리분지를 제외하면 울릉도의 평균 경사도는 25°로 평지가 거의 없음.

(다) 기온

○ 울릉지역의 연평균 기온은 12.3℃로 서늘해서 미역취 재배에 알맞으며, 해양성 기후이기 때문에 여름철인 6~8월에도 기온(월평균 26.5℃)이 상대적으로 높지 않아 고온에 의한 고사현상 등에 대한 우려가 적음.

○ 미역취 생육이 가장 왕성한 시기인 4월~9월의 기온(월평균18.3℃)으로 낮아 부드러운 잎의 생산이 가능함.

○ 미역취가 월동하는 겨울철 11월~2월(월평균 4.2℃)에도 비교적 온난하기 때문에 월동 중 어는 피해가 없음. (자료: 2006년 산림청-울릉군미역취, 지리적표시, 등록공고)



<울릉도 위치>

출처 : 2006년 산림청-울릉군미역취, 지리적표시, 등록공고>



<울릉도 미역취 재배지>

출처 : 울릉군농업기술센터>



<미역취 건채 포장지>

출처 : 2006년 산림청-울릉군미역취, 지리적표시, 등록공고>

(라) 미역취 재배현황 및 판매가격

국내의 미역취 주요재배지로는 **울릉도와 전남고흥이 국내 유통되는 대부분을 생산하는** 생산지이며 그 중에서도 울릉도가 70ha면적에서 연평균 200M/T정도로 전남고흥에 비하여 월등하게 많이 재배되는 것으로 알려져 있다(출처: 울릉군농업기술센터, 고흥군농업기술센터). 전남고흥의 경우 취나물작목반에서 참취, 곰취등과 함께 재배하여 유통된다. 미역취의 가격(산지출하기준)은 생체는 1,000~1,500원/kg이며 건조물의 경우 15,000원~19,000/kg에 거래 되고 있다(자료: 울릉군농협, **고흥취나물작목반**). 현재 미역취의 대부분은 건조물 형태로 유통되고 일부는 간장절임 등의 식품의 형태로만 유통되어 지고 있으며, 멜라닌 생성 억제 효과, 항염증효과, 조골세포의 활성화 등에 관한 연구가 보고되어 있다.

본 연구진은 미역취의 항비만 관련 연구가 보고되어 있지 않음을 확인하였으며(**항비만/ 체지방감소 기능의 특허 출원**), 항비만 활성 결과를 기반으로 미역취의 유효성분을 안정적으로 분리할 수 있도록 하는 최적의 추출조건을 확립하여 기능성 물질의 분리 정제를 통해 항비만 활성을 가지는 물질을 탐색 및 효능 평가 연구의 진행으로 고부가가치의 식재료 개발 및 기대가치가 큰 작물로서 농가소득의 증대를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

(1) 비만치료제 개발 현황

- ‘리덕틸’은 시부트라민을 주성분으로 하는 식욕억제제로 심혈관계 위험성 문제로 지난 2010년 퇴출된 뒤, 국내 비만치료제 시장은 급격히 위축되었다.
- 일동제약은 2012년 11월 아레나제약과 국내 독점 마케팅 및 공급 계약을 체결한 데 따라, 2015년 2월 로카세린염산염수화물 성분의 비만치료신약 ‘벨빅’을 출시했다. 이것은 폭식을 막는 세로토닌의 분비를 조절해 식욕을 억제하고 포만감을 높임으로써 비만치료에 도움을 주는 세로토닌 수용체 효능체(5-HT_{2C}, 항정신성 의약품)이다.
- 광동제약은 2015년 8월 오렉시젠 테라퓨틱스와 콘트라브에 대한 국내 판매 독점권 계약을 체결했으며, 이어 2016년 4월 식약처의 시판허가를 승인 받았다. 콘트라브는 우울증 및 니코틴 중독에 효과가 입증된 부프로피온과 알코올 및 마약중독 치료에 쓰이는 날트렉손을 결합한 복합제다. 시상하부 식욕중추에서 부프로피온이 도파민의 재흡수를 억제하고, 날트렉손이 POMC의 네거티브 피드백 작용을 차단해 부프로피온 효과를 지속시켜줌으로써 체중감량효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 즉, 콘트라브는 음식물 섭취와 에너지대사의 균형을 맞추고, 뇌의 보상신경회로(사람이나 동물에서 욕구가 만족됐을 때 혹은 만족될 것임을 알았을 때 활성화되는 신경계)에 작용해 섭취행동을 억제한다.
- 큐시미아는 식욕억제 성분인 펜터민과 뇌전증 치료성분인 토피라메이트를 결합한 복합제로, 2012년 7월 FDA로부터 시판승인을 획득했다.
- 삭센다는 리라글루타이드(당뇨치료제 제품명 ‘빅토자’) 성분의 비만치료제로, 2014년 12월 FDA 허가를 획득했다.
- 현재 개발 중인 비만치료제 중에는 중근당의 벨로라넵(CKD-732)이 가장 주목을 받고 있다. 벨로라넵은 중근당이 미국 자프젠에 기술 수출한 비만치료 신약으로, 지방조직의 혈관생성을 막는 것으로 알려졌다. (참조: 헬스포커스, 국내 비만치료제 시장, 2016.05)

(2) 건강기능식품 시장 현황

- 식품의약품안전처는 지난 해 건강기능식품 생산실적은 1조 8,230억원으로 '14년(1조 6,310억원)에 비해 11.8% 증가하였으며, 건강기능식품 생산은 '11년 이후 연평균 성장률 7.4%를 기록하며 지속적으로 성장하고 있다고 밝혔다.

※ 생산실적(억원): 13,682('11)→14,091('12)→14,820('13)→16,310('14)→18,230('15)

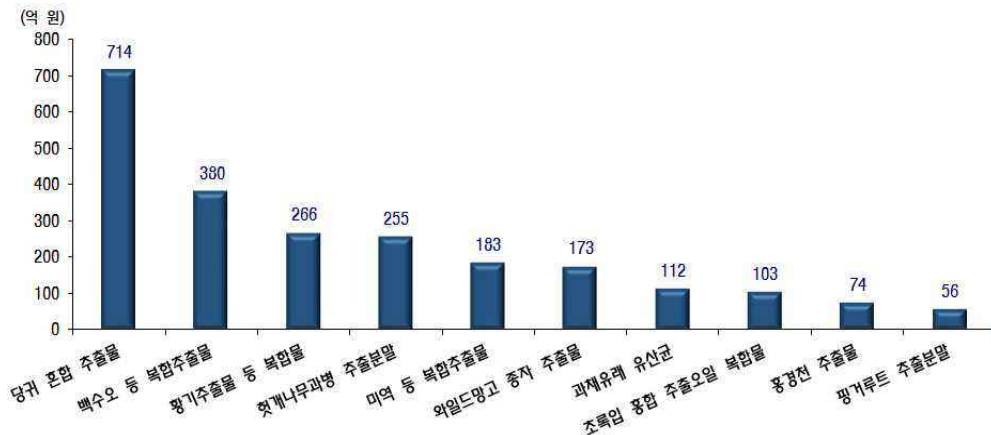
<국내 건강기능식품 생산실적 및 시장 규모("11~15")>



○ '15년 국내 건강기능식품 시장규모는 2조 3,291억원으로 '14년(2조 52억원)에 비해 16.2%가 증가하였으며, '11년 이후 지속적으로 성장하고 있다.

※ 국내 시장규모: 생산+ 수입-수출

※ 국내 시장규모(억원):16,855('11)→17,039('12)→17,920('13)→20,052('14)→23,291('15)

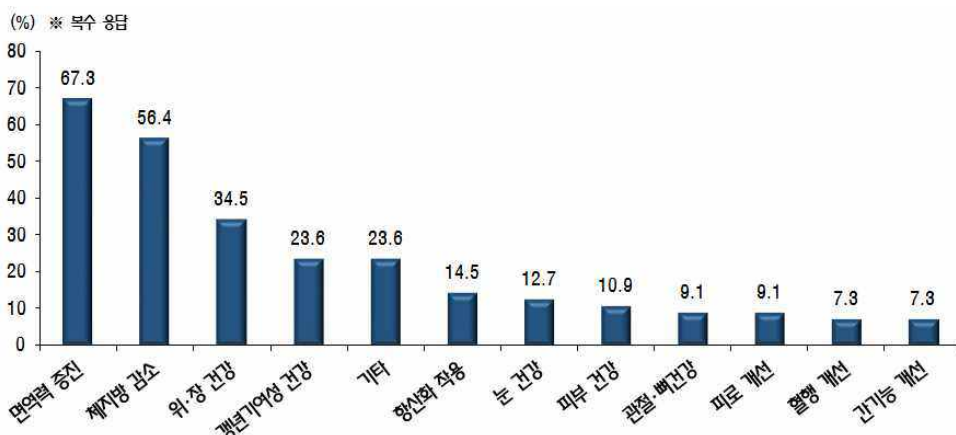


<개별인정형 품목별 생산실적(2015년)>

○ 다양한 개별인정형 제품 판매 중에 있으며, 지난 해 생산 실적 중 개별인정형 건강기능식품은 당귀혼합추출물(면역기능)이 714억원으로 1위(22.3%)를 차지하였으며, 백수오 등 복합추출물(갱년기 여성건강) 380억(11.9%), 황기추출물 등 복합물(키성장) 266억원(8.3%), 헛개나무과병추출분말(간 건강) 255억원(8.0%), 미역 등 복합추출물(체지방 감소) 183억(5.7%) 등의 순이었다. 미역 등 복합추출물(체지방 감소)이 190%('14년 63억→'15년 183억), 과채유래유산균(피부건강)이 96%('14년 57억→'15년 112억), 당귀혼합추출물(면역기능 개선)이 80%('14년 396억→'15년 714억)로 생산실적이 급성장하였다.(출처: 2016 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처)

(3) 건강기능식품 소비 현황

○ 한국건강기능식품협회에서 성인 남녀를 대상으로 실시한 수요 분야에 대한 설문 조사에서 가장 주목받을 건강기능식품의 기능성 내용을 묻는 질문에 응답자의 67.3%가 면역력 증진 기능을 꼽았으며 56.4%로 체지방 감소 기능, 위·장 건강 기능이 34.5%로 차지하였다.(출처: 건식투데이, 한국건강기능식품협회, 2016)



<2016년 주목받을 건강기능식품 기능>

(4) 체지방 감소 기능성 인정 현황

○ 가르시니아 캄보지아 추출물은 체지방 감소 기능성 원료 중 가장 큰 비중(점유율 47.1%)을 차지하고 있다. 공액리놀렌산은 가르시니아 캄보지아 추출물과 비슷한 효능을 가지고 있으나 상대적으로 가격이 비싸 가르시니아 캄보지아 추출물 출시 이후 점유율이 점차적으로 감소하고 있다. (출처 : 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2015, 2. 식품의약품안전처)

<체지방 감소 기능성 인정 현황>

구분	기능성 원료
인정형 (22개)	Lactobacillus gasseri BNR17, L-카르니틴 타르트레이트, 그린마테 추출물, 그린 커피빈 추출물, 갯잎 추출물, 대두배아 추출물 등 복합물, 돌외잎 주정 추출 분말, 락토펜린(우유정제 단백질), 레몬밤 추출물 혼합분말, 마테열수 추출물, 미역 등 복합 추출물(잔티젠), 발효식초 석류 복합물, 보이차 추출물, 식물성 유지 디글리세라이드, 와일드망고 종자 추출물, 중쇄지방산 함유 유지, 콜레우스포스콜리 추출물, 키토올리고당, 핑거루트 추출분말, 히비스커스등 복합 추출물, 서목태(쥐눈이콩) 펩타이드 추출물, 풋사과추출 폴리페놀
고시형 (5개)	가르시니아 캄보지아 껍질 추출물, 공액리놀렌산(트리글리세라이드), 공액리놀렌산(유리 지방산), 녹차 추출물, 키토산

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
<p>3-1. 연구내용</p>	
<p>1. 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가</p>	
<p>(1) 비만예방 또는 치료용 소재 탐색을 통한 미역취의 최적 추출 조건 확립 (2) Active-principle에 의한 유효물질(기능성 성분)의 분리 정제, 구조 규명 및 분석 방법 확립 (3) 원재료 표준화(식물종 확정/재배 지역/사용부위/채취시기) 확립 (4) 기능성 원료 표준화 및 지표물질 설정 (5) 제조공정 표준화 (6) 지표성분 및 유효성분을 바탕으로 한 안정성연구 (7) 비만관련 효소활성 검색을 통한 지방의 소화·흡수·합성·분해 효능 평가 (8) 고지방식이 마우스를 사용한 체지방 감소 효능 검증 및 기전 연구</p>	
<p>2. 미역취추출물로부터 체지방감소 효능검증 및 기전 연구</p>	
<p>(1) 미역취추출물의 3T3L-1 세포에서 분화를 억제하는 분자기전 연구 : PPAR-γ 연관 전사인자 및 AMPK 연관인자의 발현 분석연구 (2) 고지방식이 섭취 SD Rat을 이용한 미역취추출물의 체지방감소 효능검증 및 기전 연구 (3) ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)를 사용한 미역취추출물의 체지방감소 효능검증 및 기전연구</p>	
<p>3. 체지방감소에 도움을 주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구</p>	
<p>(1) 대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화 (기능성 성분의 분리 정제 및 제조 공정 확립) (2) 체지방감소에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정 위한 CRO 기관 선정 및 GLP기관 안전성 평가 (3) 임상시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설) (4) 임상시험을 위한 기능성식품인체시험심사위원회(Institutional Review Board : IRB) 신청/승인 및 임상시험 실시(CRO의 자료 수집) (5) 체지방감소 건강기능식품(개별인정) 기능성원료 신청 및 승인을 위한 자료 보완/품목신고 (6) 체지방감소 건강기능식품 시제품 개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립</p>	

3-2. 연구결과

1. 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가

(1) 비만예방 또는 치료용 소재 탐색을 통한 미역취의 최적 추출 조건 확립

가. 추출 용매 설정

- 식용이 가능하기 위하여 주정과 물을 이용한 추출을 진행하였다.

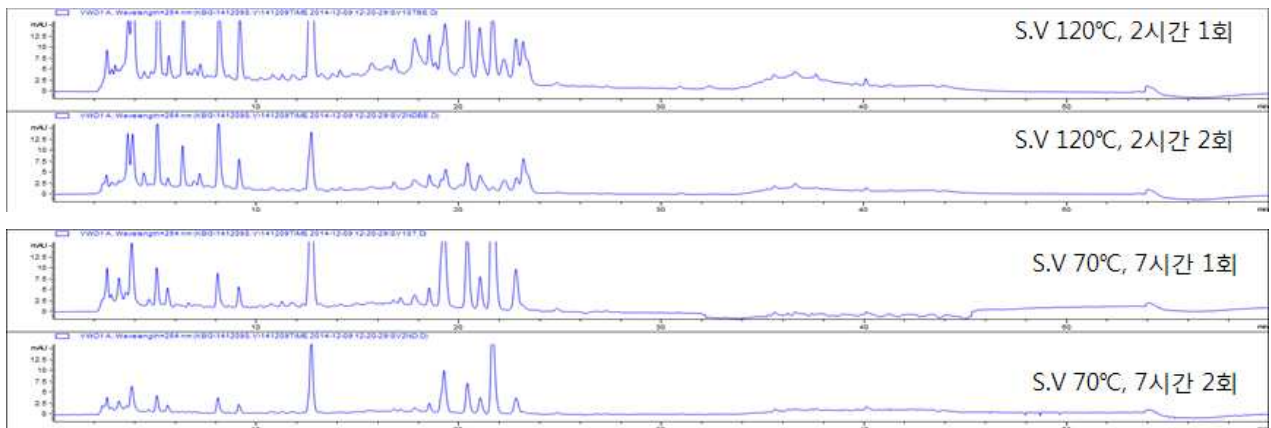
나. 추출 온도, 시간, 설정

- 저온(70°C)에서 장시간(7시간), 1~2회 추출과 고온(120°C)에서 단시간(2시간), 1~2회 주정 침출시켰다.

시료	온도(°C)	시간(h)	횟수	No.
미역취	70°C	7h	1회	S.V 70-1
			2회	S.V 70-2
	120°C	2h	1회	S.V 120-1
			2회	S.V 120-2

다. HPLC 분석

- 분석 칼럼은 Agilent Eclipse plus C18 (5µm, 4.6*250mm i.d.) flow rate 0.7 mL/min, 이동상 0.1% TFA water (A)와 Acetonitrile (B)을 사용하여 0분 A:B=100:0 15분 A:B=95:5 30분 A:B=60:40 40분 A:B=0:100 50분 A:B=0:100 60분 100:0 70분 100:0 로 분석하고 UV 254 nm 에서 검출하여 peak를 확인하였다.



- 추출은 고온에서 단시간을 할 경우 성분들이 열에 의해 깨지는 것을 확인 할 수 있었다.

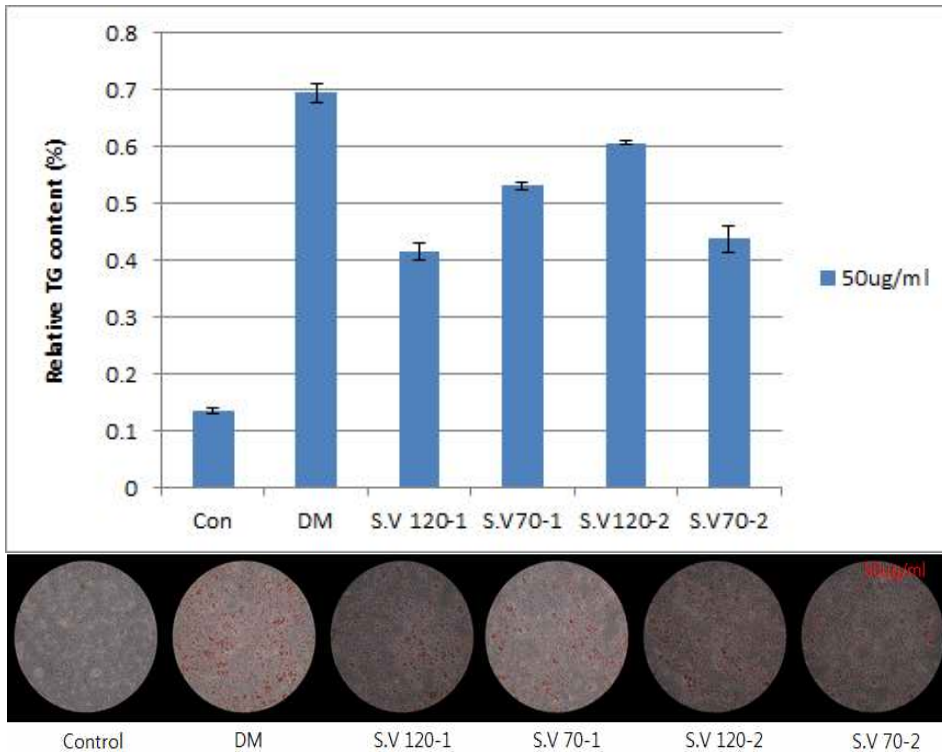
라. 3T3-L1을 이용한 항비만 효능평가

- 3T3-L1 세포를 24well plate에 배양하여 분화촉진 물질인 insulin, dexamethasone, IBMX (Differentiation Medium)와 추출물(추출 조건에 따른 4개 시료)을 처리하여 Oil

Red O 시약에 염색시켜 상대적인 TG의 OD값을 측정하였다. 염색된 세포를 위상차 현미경으로 100X배율로 촬영하였으며, 지질 방울은 이소프로판올에 용해시키고 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 540 nm에서 O.D값(흡광도)을 측정하였다. 상대적인 지질의 양 및 지방생성 억제율은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{상대적인 지질의 양(\%)} = (\text{시료의 O.D값} / \text{대조군의 O.D값}) \times 100\%$$

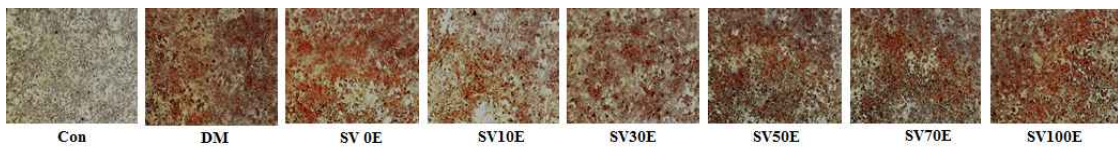
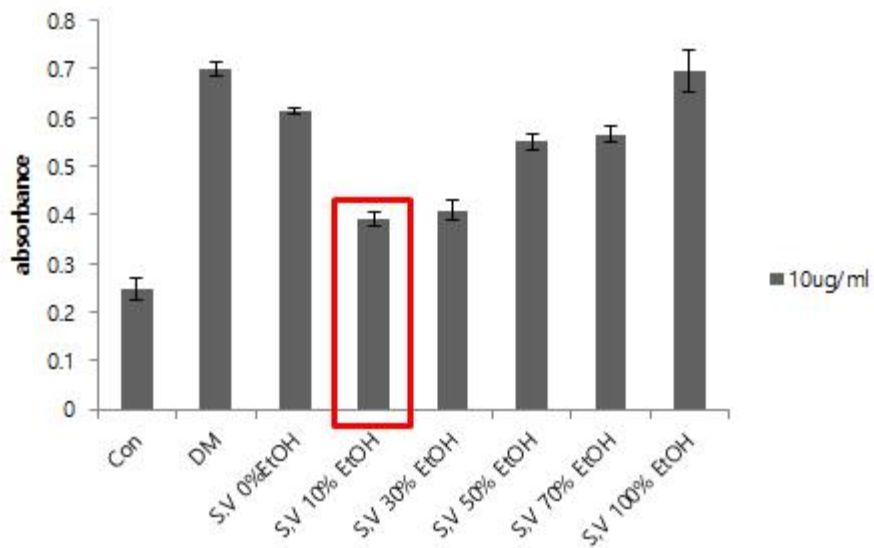
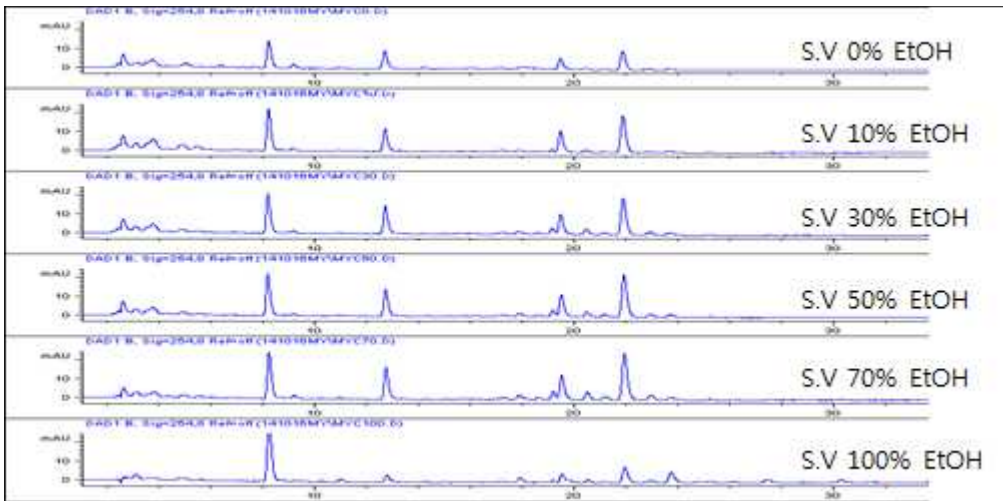
$$\text{지방생성 억제율(\%)} = \{1 - (\text{시료의 O.D값} - \text{대조군의 O.D값}) / (\text{음성대조군의 O.D} - \text{대조군의 O.D값})\} \times 100\%$$



- 각 추출물의 3T3-L1 adipocyte cell을 이용한 항비만 효능을 확인한 결과 S.V 120-1, S.V 70-2 조건에서 지방분화 억제력을 보였지만, S.V 120-1은 열에 의하여 성분 변화가 일어나 S.V 70-2로 선정하였다.

마. 추출 용매 비율 설정

- 70°C, 7h, 2회 추출조건으로 용매비율을 달리하여 10~100% 주정을 이용하여 추출을 진행하였고 3T3-L1 adipocyte cell을 이용한 항비만 효능 평가 한 결과 주정 농도별 울릉도 미역취 추출물을 처리한 지방세포는 분화유도제만 처리한 음성대조군보다 지방축적에 대하여 우수한 억제효과를 나타냈으며, 10% 주정에서 우수한 활성을 보였다.



바. 결론

- 10% 주정, 70°C에서 7시간, 2번 추출하는 것으로 최적의 추출 조건을 확립하였다.

(2) Active-principle에 의한 유효물질(기능성 성분)의 분리 정제, 구조 규명 및 분석 방법 확립

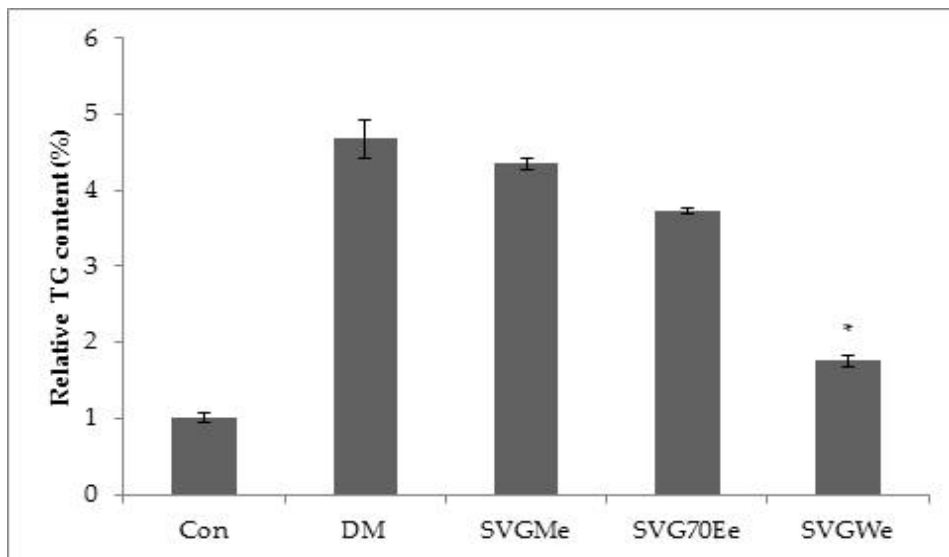
가. 미역취 추출 및 분획

- 미역취 (1.5 kg)를 메틸 클로라이드(MC)로 48h 동안 2번 추출하였다. 여과 후, 건조된 미역취를 70% 에탄올(EtOH)로 48h 동안 2번 추출하였다. 그 후, 건조된 잔류물을 100℃에서 2h 동안 물로 2회 추출하였다.
- 활성수 추출물을 증류수에 현탁시키고, 에틸아세테이트(EtOAc) 및 n-부탄올(n-BuOH), 물 분획로 분배하여 EtOAc 분획물(16.75g) 및 n-BuOH 분획물(26g), Water 분획물(25g)을 수득하였다.
- 활성 n-BuOH 분획은 5-100 % 메탄올 (MeOH)을 갖는 Diaion HP-20 수지를 사용하여(전개용매: 20%, 40%, 60%, 80%, 100% MeOH) 분획 1 (6.6 g), 분획 2 (2.1 g), 분획 3 (3.7 g), 분획 4 (3.8g) 및 분획 5 (1.5g)를 확보하였다.

나. 3T3-L1 지방 세포 분화 억제능 평가

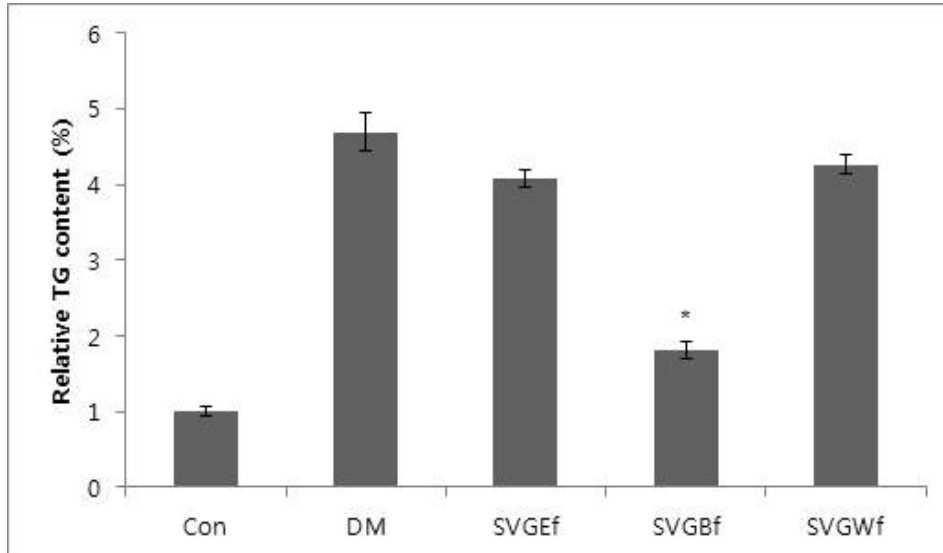
① 미역취 추출물의 3T3-L1 지방 세포 분화 억제능 평가

- 메틸 클로라이드 추출물(SVGMe), 70% 에탄올 추출물(SVG70Ee), 물 추출물(SVGWe)은 10µg/mL의 농도에서 측정된 결과 미역취 물 추출물에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다.



② 활성 분획물의 3T3-L1 지방 세포 분화 억제능 평가

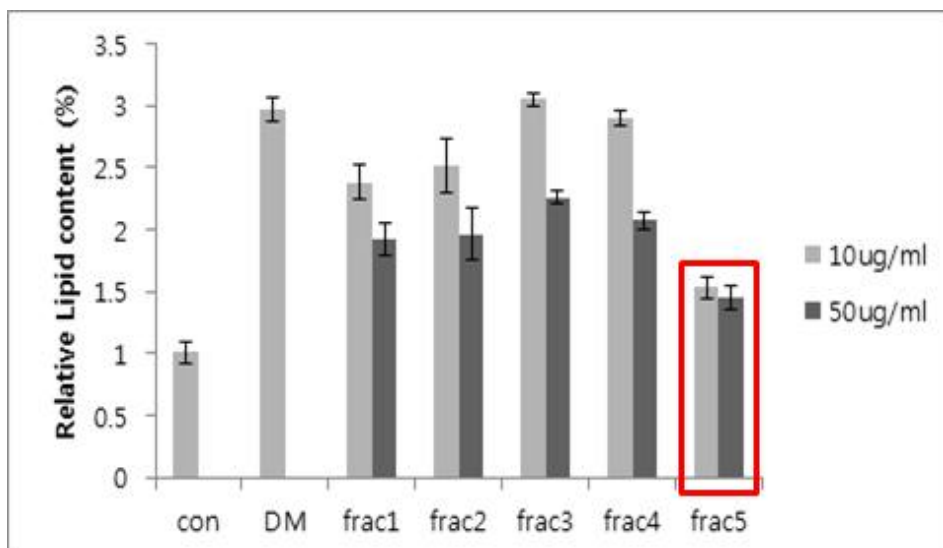
- 에틸아세테이트(SVGEf) 및 n-부탄올 (SVGBf), 물 분획물(SVGWf)은 10 μ g/mL의 농도에서 측정된 결과 미역취 n-부탄올 (SVGBf)에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다.



③ 활성 분획물의 open column 이용한 분획액(frac1~5)의 3T3-L1 지방 세포 분화 억제능 평가

- 미역취 n-BuOH 분획물은 10 μ g/mL에서 지방세포 분화 억제가 나타났다. open column에 Diaion HP-20 수지를 사용하여 미역취 n-BuOH 추출물을 분별하여, 5개의 분획을 얻었다.

- 분획 5 (frac5)에서 지방세포 분화 억제가 우수함을 확인하였다.



다. 미역취 분획액(frac1~5)의 분리 및 구조 동정

- 5개의 분획액(fraction)을 sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피 및 전개용매 50% 메탄올(MeOH)을 이용하여 분리하였다.

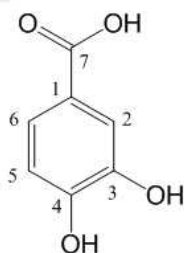
① 구조 동정

No.	compound (분자량(g/mol))
1	Protocatechuic acid (154.12)
2	Chlorogenic acid (354.3)
3	(1R,2S,3S,5R,7S)-methyl-2,3-dihydroxy-7-((((Z)-3-phenylacryloyl)oxy)methyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylate (366.36)
4	3,5-di-caffeoylquinic acid (516.45)
5	(1R,2S,3S,5R,7S)-2,3-dihydroxy-7-((((Z)-3-phenylacryloyl)oxy)methyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid (352.34)
6	1,3,5-tri-O-caffeoylquinic acid(678.60)
7	(1R,2S,3S,5S,7S)-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid (352.34)
8	Kaempferol-3-O-rutinoside (594.52)
9	(1R,2S,3S,5R,7S)-methyl-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid (366.36)
10	Hydrobenzoic acid (138.12)
11	gentisic acid (176.10)
12	Vanillic acid (168.14)
13	Caffeic acid (180.15)
14	p-Coumaric acid (164.13)
15	Ferulic acid (194.18)
16	Synapicacid (224.21)
17	Hyperin (464.38)
18	Isoquercetin (464.38)
19	Rutin (610.52)
20	Salicylic acid (138.12)
21	Quercetin (302.236)
22	Kaempferol (289.24)
23	4,5-di-O-caffeoylquinic acid (516.45)
24	3,4-di-O-caffeoylquinic acid (516.45)

1) Protocatechuic acid

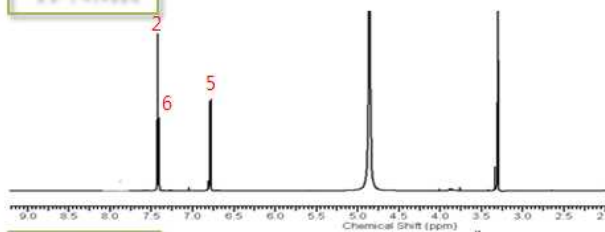
^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.43 (H-2, d, $J = 2.0$ Hz), 7.42 (H-6, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz), 9.79 (H-5, d, $J = 8.2$ Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 171.46 (C-9), 149.87 (C-4), 147.45 (C-3), 147.22 (C-7), 128.23 (C-1), 123.27 (C-6), 116.91 (C-5), 115.96 (C-8), 115.51 (C-2); EI-MS (m/z): 154 [M] $^+$.

Structure

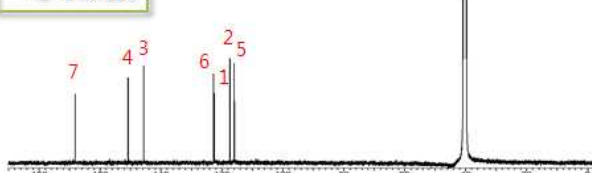


Protocatechuic acid

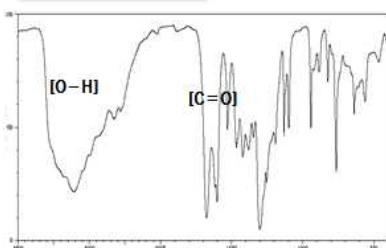
^1H -NMR



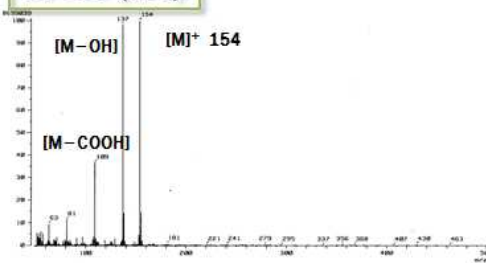
^{13}C -NMR



IR-spectrum



EI-MS (m/z)



UV-spectrum

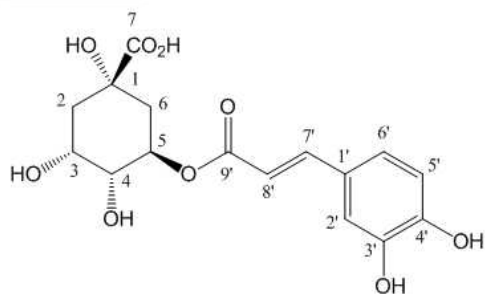


2) Chlorogenic acid

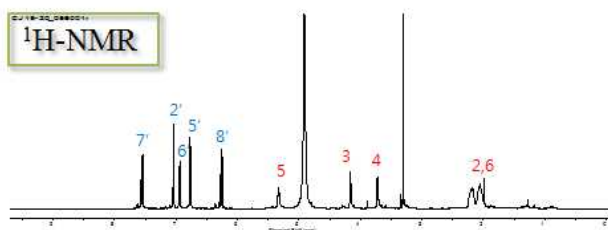
^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.55 (H-7', d, $J = 15.9$ Hz), 7.04 (H-2', d, $J = 1.8$ Hz), 6.94 (H-6', dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz), 6.77 (H-5, d, $J = 8.2$ Hz), 6.26 (H-8', d, $J = 15.9$ Hz), 3.72 (H-3, m), 2.21 (H-6, m), 2.05 (H-2, m); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 175.95 (C-7), 167.34 (C-9'), 148.15 (C-4'), 145.68 (C-7'), 145.39 (C-3'), 126.41 (C-1'), 121.59 (C-6'), 115.10 (C-8'), 113.9 (C-5'), 113.90 (C-5'), 113.82 (C-2'), 74.92 (C-1), 72.24 (C-3), 70.62 (C-4), 70.09 (C-5), 37.59 (C-6), 36.87 (C-2); MALDI-TOF MS (m/z): 377 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

chlorogenic acid

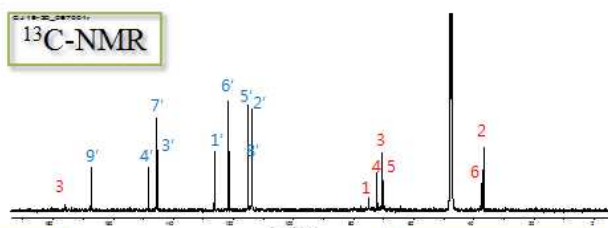
Structure



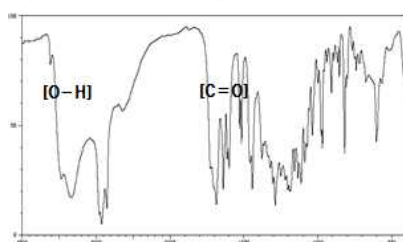
^1H -NMR



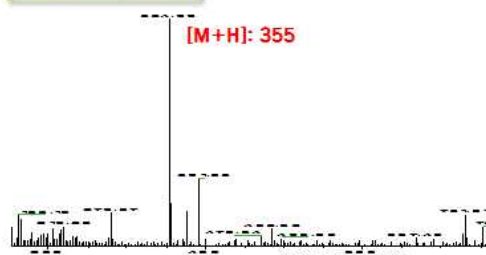
^{13}C -NMR



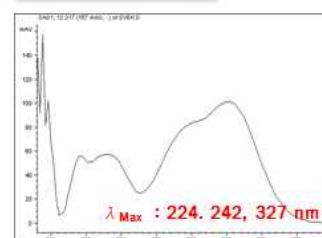
IR-spectrum



EI-MS (m/z)



UV-spectrum



3)(1R,2S,3S,5R,7S)-methyl2,3-dihydroxy-7-((((Z)-3-phenylacryloyl)oxy)methyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylate

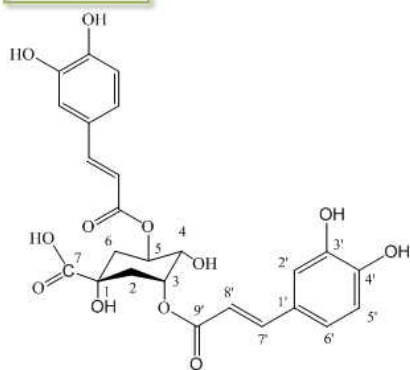
^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.59 (2H, m, C2-H, C6-H), 7.34 (3H, m, C3-H, C4-H, C5-H), 7.01 (1H, d, $J = 12.65$ Hz, C7-H), 6.00 (1H, d, $J = 12.66$ Hz, C8-H), 4.97 (1H, dd, $J = 8.29, 12.26$ Hz, C7'-a-H), 4.68 (1H, dd, $J = 3.10, 12.27$ Hz, C7'-b-H), 4.34 (1H, t, $mJ = 4.34$ Hz, C6'-H), 4.30 (1H, qui, $J = 3.82$ Hz, C5'-H), 4.13 (1H, t, $J = 4.66$ Hz, C4'-H), 4.00 (1H, t, $J = 4.96$ Hz, C3'-H), 3.79 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.29 (3H, d, $J = 4.71$ Hz, $-\text{CH}_3$).

4) 3,5-di-caffeoylquinic acid

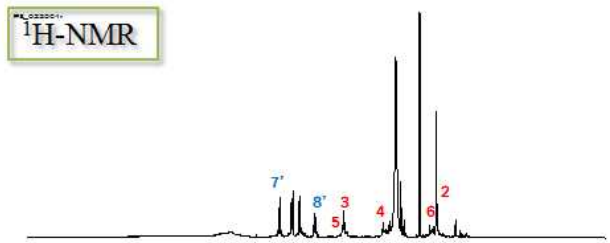
^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.58, 7.62 (each 1H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.05 (2H, d, $J = 1.3$ Hz), 6.95 (2H, dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz), 6.76 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.26, 6.33 (each 1H, d, $J = 15.9$ Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 177.42 (C-7), 168.87 (C-9'), 168.42 (C-9''), 149.43 (C-4''), 149.34 (C-4'), 147.19 (C-7''), 147.0 (C-7'), 146.51 (C-3', C-3''), 127.82 (C-1'), 127.70 (C-1''), 123.04 (C-6''), 122.97 (C-6'), 116.43 (C-5', C-5''), 115.46 (C-8'), 115.25 (C-2'), 115.15 (C-2''), 115.01 (C-8''), 74.77 (C-1), 72.56 (C-3), 71.91 (C-5), 70.81 (C-4), 35.97 (C-2), 37.73 (C-6); EI-MS (m/z): 539.12 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3,5-di-caffeoylquinic acid

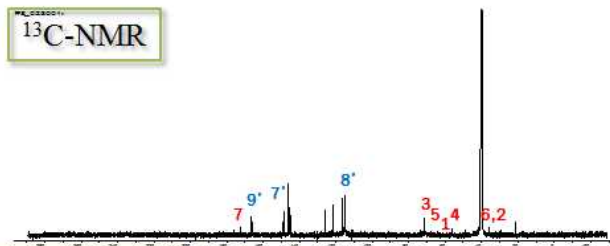
Structure



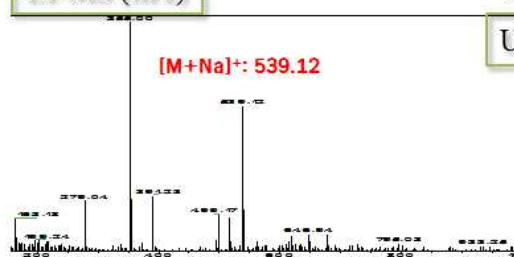
^1H -NMR



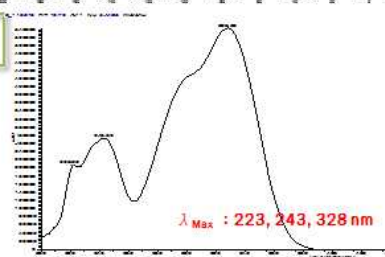
^{13}C -NMR



EI-MS (m/z)



UV-spectrum



5)(1R,2S,3S,5R,7S)-2,3-dihydroxy-7-((((Z)-3-phenylacryloyl)oxy)methyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.59 (2H, m, C2-H, C6-H), 7.34 (3H, m, C3-H, C4-H, C5-H), 7.01 (1H, d, J = 12.65 Hz, C7-H), 6.00 (1H, d, J = 12.66 Hz, C8-H), 4.97 (1H, dd, J = 8.29, 12.26 Hz, C7'-a-H), 4.68 (1H, dd, J = 3.10, 12.27 Hz, C7'-b-H), 4.46 (2H, m, C5'-H, C6'-H), 4.15 (1H, t, J = 4.35 Hz, C4'-H), 4.03 (1H, t, J = 4.84 Hz, C3'-H), 2.26 (3H, d, J = 4.86 Hz, -CH₃).

6) 1,3,5-tri-O-caffeoylquinic acid

¹H NMR (MeOD, 600 MHz) δ 7.6 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.6 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.55 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.12 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.97 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 6.96 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.82 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.75 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.75 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 6.65 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.65 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz), 6.54 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.32 (1H, d, J = 15.6 Hz), 6.22 (1H, d, J = 16.2 Hz), 6.16 (1H, d, J = 15.8 Hz), 5.53 (1H, td, J = 10.2, 4.2 Hz), 5.45 (1H, q, J = 3.3 Hz), 3.96 (1H, dd, J = 10.2, 3.3 Hz), 2.9 (1H, dt, J = 15.9, 3.3 Hz), 2.65 (1H, ddd, J = 13.2, 4.2, 3.3 Hz), 2.38 (1H, dd, J = 15.9, 3.3 Hz), 2.03 (1H, dd, J = 13.2, 10.2 Hz).

7)(1R,2S,3S,5S,7S)-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid

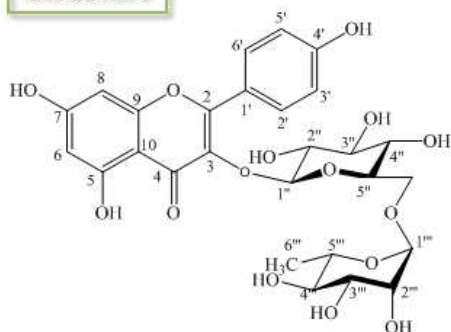
¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.71 (1H, d, J = 16.04 Hz, C7-H), 7.59 (2H, m, C2-H, C6-H), 7.40 (3H, m, C3-H, C4-H, C5-H), 6.55 (1H, d, J = 16.00 Hz, C8-H), 5.01 (1H, dd, J = 8.13, 12.24 Hz, C7'-a-H), 4.80 (1H, dd, J = 3.02, 12.20 Hz, C7'-b-H), 4.46 (2H, m, C5'-H, C6'-H), 4.15 (1H, t, J = 4.35 Hz, C4'-H), 4.03 (1H, t, J = 4.84 Hz, C3'-H), 2.26 (3H, d, J = 4.86 Hz, -CH₃).

8) Kaempferol-3-O-rutinoside

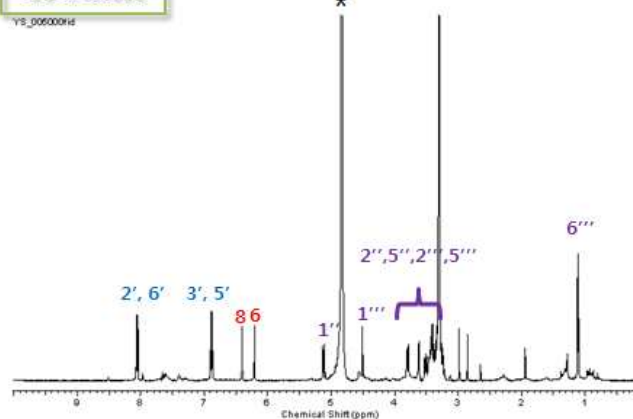
¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 6.21 (br s, H-6), 6.40 (br s, H-8), 8.06 (H-2', H-6', d, J = 9.0 Hz), 6.90 (H-3', H-5', d, J = 9.0 Hz), 5.11 (H-1'', d, J = 7.5 Hz), 4.52 (br s, H-1'''), 1.12 (H-6''', d, J = 6.0 Hz), 3.27-3.80 (H-2'' to H-6'', H-2'' to H-6'''); EI-MS (*m/z*): 539.12 [M-H]⁻.

Kaempferol-3-O-rutinoside

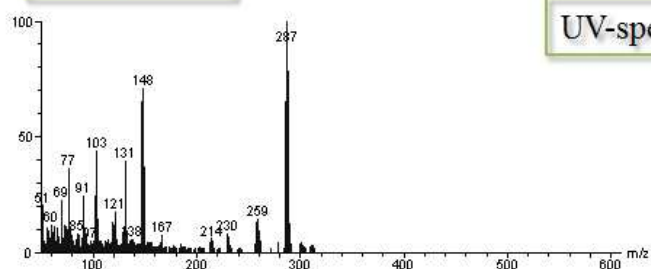
Structure



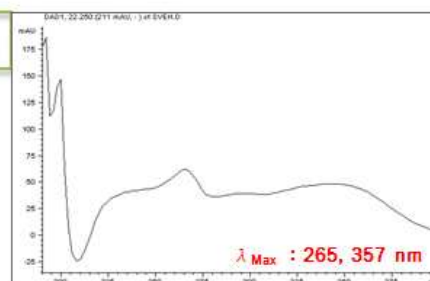
¹H-NMR



EI-MS (m/z)



UV-spectrum



9)(1R,2S,3S,5R,7S)-methyl-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo [3.2.1]octane-5-carboxylic acid

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.72 (1H, d, J = 16.14 Hz, C7-H), 7.60 (2H, m, C2-H, C6-H), 7.40 (3H, m, J = 12.65 Hz, C3-H, C4-H, C5-H), 6.55 (1H, d, J = 16.34 Hz, C8-H), 5.01 (1H, dd, J = 8.44, 12.34 Hz, C7'-a-H), 4.78 (1H, dd, J = 3.03, 12.22 Hz, C7'-b-H), 4.48 (1H, t, J = 4.35 Hz, C6'-H), 4.42 (1H, qui, J = 3.81 Hz, C5'-H), 4.15 (1H, t, J = 4.72 Hz, C4'-H), 4.02 (1H, t, J = 4.49 Hz, C3'-H), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 2.29 (3H, d, J = 5.1 Hz, -CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 168.25 (C-9'), 167.09 (C-9), 145.07 (C-7), 134.37 (C-1), 130.13 (C-4), 128.63 (C-3.5), 127.86 (C-2,6), 117.37 (C-8), 103.47 (C-2'), 79.66 (C-6'), 77.00 (C-5'), 68.11 (C-4'), 64.40 (C-3'), 63.30 (C-7'), 51.8 (-OCH₃), 38.96 (C-10').

10) Hydrobenzoic acid

^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ , 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz), 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz); ^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ , 170.5 (COOH), 115.7 (C-3,5), 163.6 (C-4), 133.3 (C-2,6), 122.4 (C-1) EI-MS (m/z): 138 $[\text{M}]^+$, 121, 93, 65; UV (MeCN, λ_{max} nm): 252.

11) Gentisic acid

^1H -NMR (MeOD, 400 MHz) δ 8.8 (H-2, s), 7.38 (H-2', 6', d, $J = 8.7$ Hz), 6.85 (H-3', 5', d, $J = 8.4$ Hz), 6.28 (H-8, d, $J = 2.1$ Hz), 6.19 (H-6, d, $J = 2.2$ Hz). ^{13}C -NMR (MeOD, 400 MHz) δ 153.17 (C-2), 122.24 (C-3), 180.73 (C-4), 161.78 (C-5), 98.52 (C-6), 166.37 (C-7), 94.06 (C-8), 94.13 (C-8), 157.82 (C-9), 105.46 (C-10), 94.13 (C-8), 125.09 (C-1'), 130.05 (C-2'), 115.77 (C-3'), 157.68 (C-4'), 115.81 (C-5'), 130.04 (C-6'); EI-MS (m/z) 270 $[\text{M}]^+$; UV (MeCN, λ_{max} nm) 261, 328.

12) Vanillic acid

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ H: 7.76 (H-6, dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz), 7.62 (H-2, s, $J = 1.5$ Hz), 6.92 (H-5, d, $J = 8.0$ Hz), 3.93 ($\text{CH}_3\text{O}-$, s); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 168.82 ($-\text{COOH}$), 151.46 (C-3), 147.51 (C-4), 124.23 (C-1), 122.04 (C-6), 114.68 (C-2), 112.72 (C-5), 55.65 ($-\text{OCH}_3$).

13) Caffeic acid

^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 6.8 (H-5, d, $J = 8.1$ Hz), 7.05 (H-2, d, $J = 2.0$ Hz), 6.95 (H-6, dd, $J = 8.1$ Hz and $J = 2.0$ Hz); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 171.5 (C-9), 115.94 (C-8), 147.25 (C-7), 116.92 (C-5), 115.49 (C-2), 123.27 (C-6), 128.23 (C-1), 147.43 (C-3), 149.88 (C-4); EI-MS (m/z) 180 $[\text{M}]^+$, 180 $[\text{M}-\text{COOH}]^+$; UV (MeCN, λ_{max} nm) 235, 323.

14) p-Coumaric acid

^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.68 (H-7, d, $J = 16.2$ Hz), 7.47 (H-2, 6, d, $J = 8.4$ Hz), 6.89 (H-3, 5, d, $J = 8.4$ Hz), 6.35 (H-8, d, $J = 16.2$ Hz); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 167.13 (C-9), 160.22 (C-4), 145.74 (C-7) 135.47 (C-1), 130.13 (C-2, 6), 116.52 (C-3, 5), 115.71 (C-8).

15) Ferulic acid

^1H -NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.85 (H-7, d, $J = 15.7$ Hz), 7.15 (H-2, d, $J = 2.1$ Hz), 6.8 (H-6, d, $J = 8.3, 2.1$ Hz), 6.7 (H-5, d, $J = 8.5$ Hz), 6.35 (H-8, d, $J = 15.1$ Hz), 3.8 ($3-\text{OCH}_3$, s). ^{13}C -NMR (MeOD, 400 MHz) δ 127.62 (C-1), 119.11

(C-2), 149.14 (C-3), 147.92 (C-4), 116.45 (C-5), 122.86 (C-6), 146.82(C-7), 114.84 (C-8), 171.45 (C-9), 56.1 (3-OCH₃); EI-MS (*m/z*) 194 [M]⁺; UV (MeCN, λ_{max} nm) 239, 323.

16) Sinapic acid

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.66 (H-7, d, J = 15.56), 6.87 (H-5, 6, s), 6.35(C-8, d, J = 15.56), 3.84(H-3, 5, s)

17) Hyperin

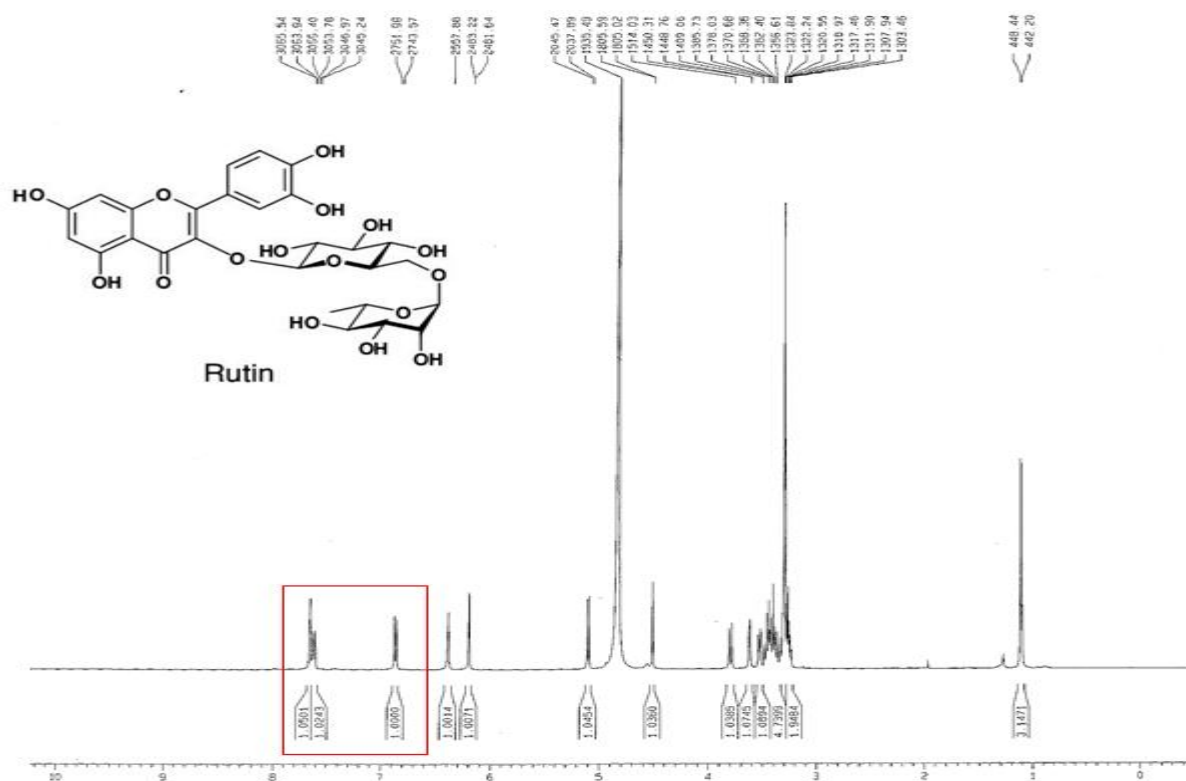
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.86 (H-2', d, J = 2.2 Hz), 7.55 (H-6', dd, J = 2.1, 8.5 Hz), 6.89 (H-5', d, J = 8.5 Hz), 6.4 (H-8, d, J = 2.1 Hz), 6.17 (H-6, d, J = 2.1 Hz), 5.19 (H-2'', d, J = 7.8 Hz); ¹³C-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 179.46 (C-4), 166.02 (C-7), 163.06 (C-5), 160.46 (C-9), 158.3 (C-2), 149.96 (C-4'), 145.77 (C-3'), 135.76 (C-3), 122.94 (C-1'), 122.05 (C-6'), 117.76 (C-5'), 116.06 (C-2'), 105.42 (C-1''), 104.04 (C-10), 99.93 (C-6), 94.72 (C-8), 77.27 (C-5''), 75.17 (C-3''), 72.96 (C-2''), 70.1 (C-4''), 61.91 (C-6''); EI-MS (*m/z*) 463 [M-H]⁺; UV (MeCN, λ_{max} nm): 206, 257, 360

18) Isoquercetin

¹H NMR (MeOH, 400 MHz) δ 6.06 (H-6, d, J = 2.0 Hz), 6.32 (H-8, d, J = 2.0 Hz), 6.8 (H-5', d, J = 8.0 Hz), 7.62 (H-6', dd, J = 2.0, 7.5 Hz), 7.74 (H-2', d, J = 2.0 Hz), 5.12 (H-1'', d, J = 7.7 Hz), 3.30-3.80 (m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''); ¹³C NMR (MeOH, 400 MHz) δ 178.94 (C-4), 167.4 (C-7), 163.25 (C-5), 158.63 (C-9), 158.04 (C-2), 149.56 (C-4'), 145.96 (C-3'), 135.07 (C-3), 123.04 (C-1'), 122.75 (C-6'), 117.38 (C-5'), 116.2 (C-2'), 105.25 (C-10), 101.42 (C-6), 101.33 (glc-1''), 95.4 (C-8), 77.51 (glc-5''), 76.84 (glc-3''), 74.37 (glc-2''), 70.32 (glc-4''), 61.32 (glc-6'')

19) Rutin

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7.6 (H-6', dd, J = 9.0, 2.1 Hz), 7.57 (H-2', d, J = 2.1 Hz), 6.88 (H-5', d, J = 8.4 Hz), 6.43 (H-8, d, J = 2.0 Hz), 6.15 (H-6, d, J = 2.2 Hz), 5.3 (H-1'', d, J = 7.8 Hz), 5.16 (H-1''', d, J = 1.6 Hz) 3.83-3.36 (sugar-H, m), 1.1 (H-6''', d, J = 6.2 Hz); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 178.26 (C-4), 164.32 (C-7), 161.46 (C-5), 157.1 (C-9), 156.73 (C-2), 148.67 (C-4'), 145.62 (C-3'), 134.06 (C-3), 121.88 (C-1'), 122.05 (C-6'), 116.52(C-5'), 116.06(C-2'), 104.24 (C-10), 101.42 (C-glc-1), 101.0 (C-rha-1), 98.93 (C-6), 93.92 (C-8), 76.67 (glc-3), 76.7 (glc-5), 74.9 (glc-2), 72.7 (glc-4), 71.4 (rha-4), 71.22 (rha-3), 70.77 (rha-2), 68.49 (rha-5), 67.31 (glc-6), 18.0 (rha-6); EI-MS (*m/z*) 610 [M]⁺, 465, 391, 303; UV (MeCN, λ_{max} nm) 361, 259.



20) Salicylic acid

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.85 (H-6, d, $J = 7.3$ Hz), 7.45 (H-4, t, $J = 7.4$ Hz), 7.13 (H-3, d, $J = 8.1$ Hz), 6.98 (H-5, t, $J = 7.3$ Hz), 12.11 (COOH, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 174.21(C=O), 162.0 (C-2), 136.43(C-4), 130.55(C-6), 119.42(C-5), 117.37(C-3), 111.51(C-1).

21) Quercetin

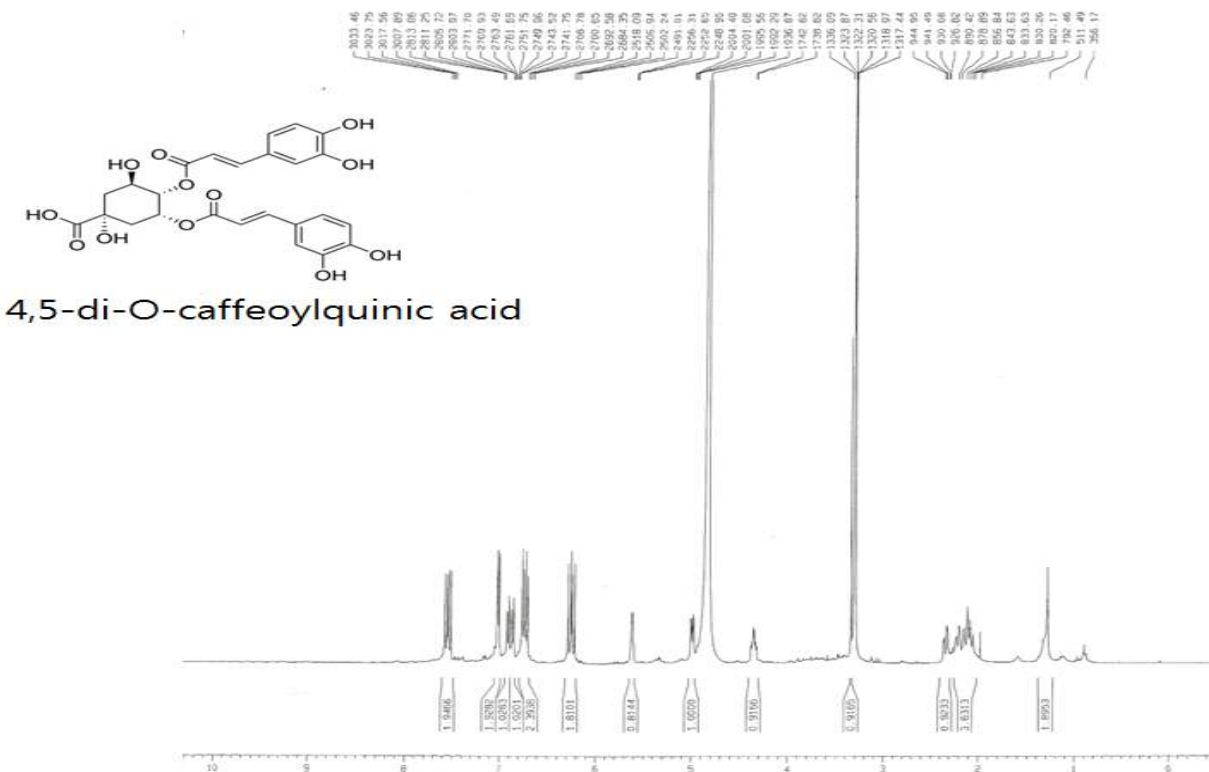
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 9.35 (OH-3, s), 12.46 (OH-5, s), 6.22 (H-6, d, $J = 2.0$ Hz), 10.73 (OH-7, s), 6.42 (H-8, d, $J = 2.0$ Hz), 7.67 (H-2', d, $J = 2.2$ Hz), 9.32 (OH-3', s), 9.32 (OH-4', s), 6.92 (H-5', d, $J = 8.5$ Hz), 7.5 (H-6', dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 147.92 (C-2), 135.8 (C-3), 176.04 (C-4), 160.81 (C-5), 98.33 (C-6), 164.16 (C-7), 93.52 (C-8), 156.37 (C-9), 103.14 (C-10), 122.12 (C-1'), 115.24 (C-2'), 145.2 (C-3'), 146.93 (C-4'), 115.7 (C-5'), 120.12 (C-6'); ESI-MS (m/z) 303 [M] $^+$; UV (MeCN, λ_{max} nm) 255, 372

22) Kaempferol

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (acetone-d, 400 MHz) δ 146.92 (C-2), 136.51 (C-3), 176.54 (C-4), 157.66 (C-5), 98.92 (C-6), 165.03 (C-7), 94.28 (C-8), 160.08 (C-9), 103.92 (C-10), 123.13 (C-1'), 130.26 (C-2',6'), 116.11 (C-3',5'), 161.9 (C-4')

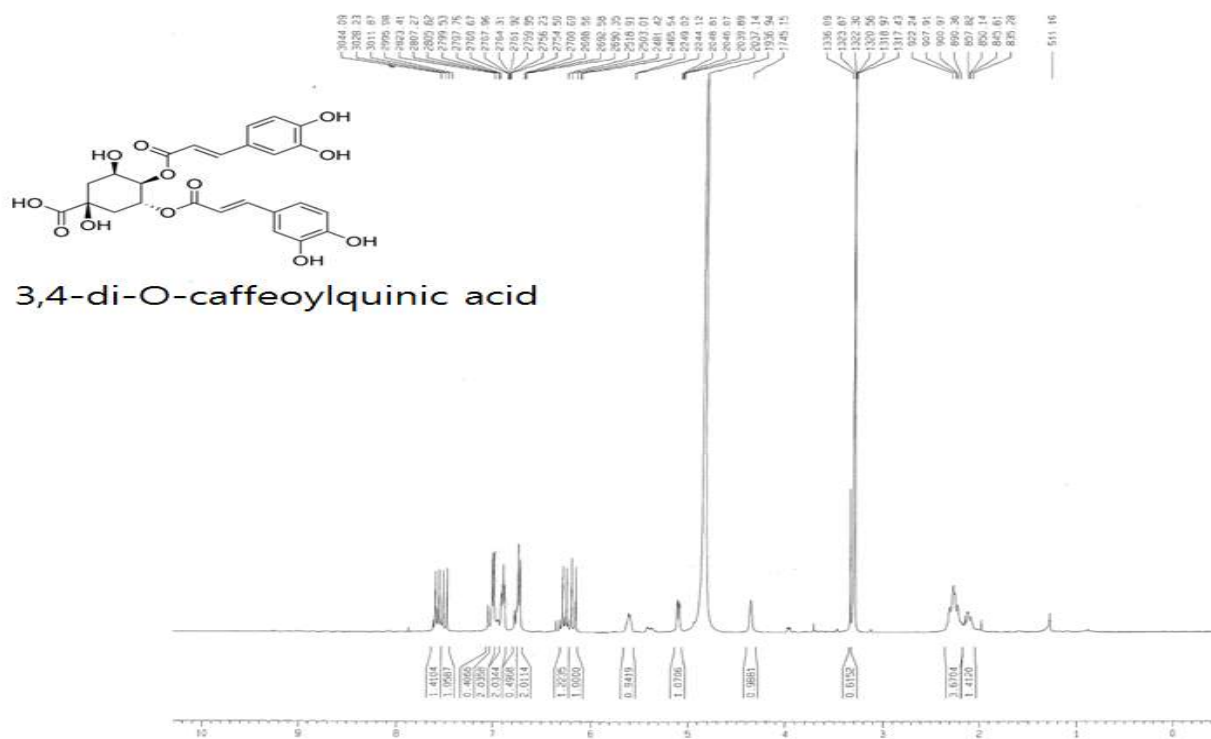
23) 4,5-di-O-caffeoylquinic acid

^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ 7.62 (H-7", d, J = 15.6 Hz), 7.58 (H-7', d, J = 15.6 Hz), 7.06 (H-2", d, J = 1.8 Hz), 7.06 (H-2', d, J = 1.8 Hz), 6.94 (H-6', dd, J = 7.8, 1.8 Hz), 6.99 (H-6'', dd, J = 7.8, 1.8 Hz), 6.8 (H-5', d, J = 7.8 Hz), 6.72 (H-5'', d, J = 7.8 Hz), 6.34 (H-8', d, J = 15.6 Hz), 6.21 (H-8'', d, J = 15.6 Hz), 5.11 (H-4, dd, J = 7.8, 3.2 Hz), 4.35 (H-3, q, J = 3.2 Hz), 2.10~2.42 (H-2, 6, m); ^{13}C NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 176.83 (C-7), 168.41 (C-9' and C-9''), 149.77 (C-4' and C-4''), 147.24 (C-7' and C-7''), 146.81 (C-3' and C-3''), 127.75 (C-1' and C-1''), 123.03 (C-6' and C-6''), 116.44 (C-5' and C-5''), 115.21 (C-2' and C-2''), 115.03 (C-8' and C-8''), 75.85 (C-1), 75.82 (C-4), 69.36 (C-3), 69.26 (C-5), 39.38 (C-6), 38.33 (C-2).



24) 3,4-di-O-caffeoylquinic acid

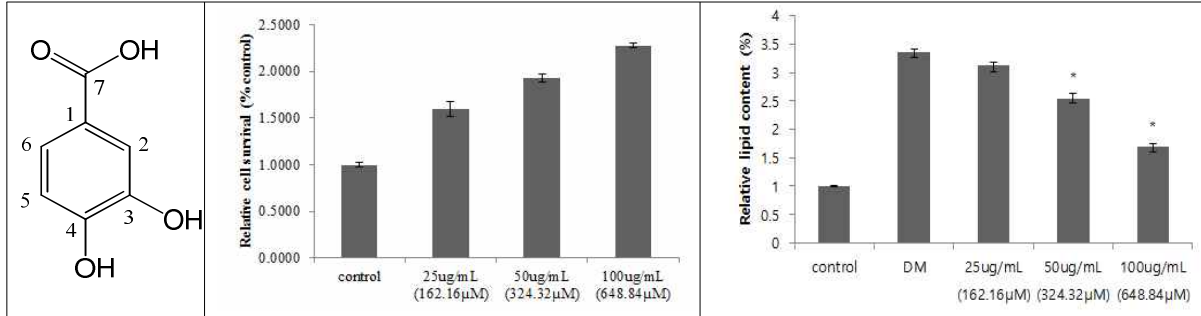
^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ 7.6 (H-7'', d, J=15.6 Hz), 7.53 (H-7', d, J=15.6 Hz), 7.08 (H-2'', d, J=1.8 Hz), 7.04 (H-2', d, J=1.8 Hz), 6.91 (H-6', dd, J=7.8, 1.8 Hz), 6.94 (H-6'', dd, J=7.8, 1.8 Hz), 6.75 (H-5', d, J=7.8 Hz), 6.77 (H-5'', d, J=7.8 Hz), 6.3 (H-8'', d, J=15.6 Hz), 6.29 (H-8', d, J=15.6 Hz), 5.66 (H-3, dt, J=12.6, 7.2 Hz), 5.13 (H-4, dd, J=10.8, 3.6 Hz), 4.35 (H-5, dt, J=6.0, 3.6 Hz), 3.75 (-OMe, s), 2.14~2.36 (H-2, 6, m); ^{13}C NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 176.43 (C-7), 168.57 (C-9' and C-9''), 149.53 (C-4' and C-4''), 147.62 (C-7' and C-7''), 146.6 (C-3' and C-3''), 127.51 (C-1' and C-1''), 123.14 (C-6' and c-6''), 116.27 (C-5' and C-5''), 115.06 (C-2' and c-2''), 115.02 (C-8' and C-8''), 76.45 (C-4), 75.41 (C-1), 70.33 (C-3), 66.2 (C-5), 52.6 (-OMe), 42.31 (C-6), 37.23 (C-2).



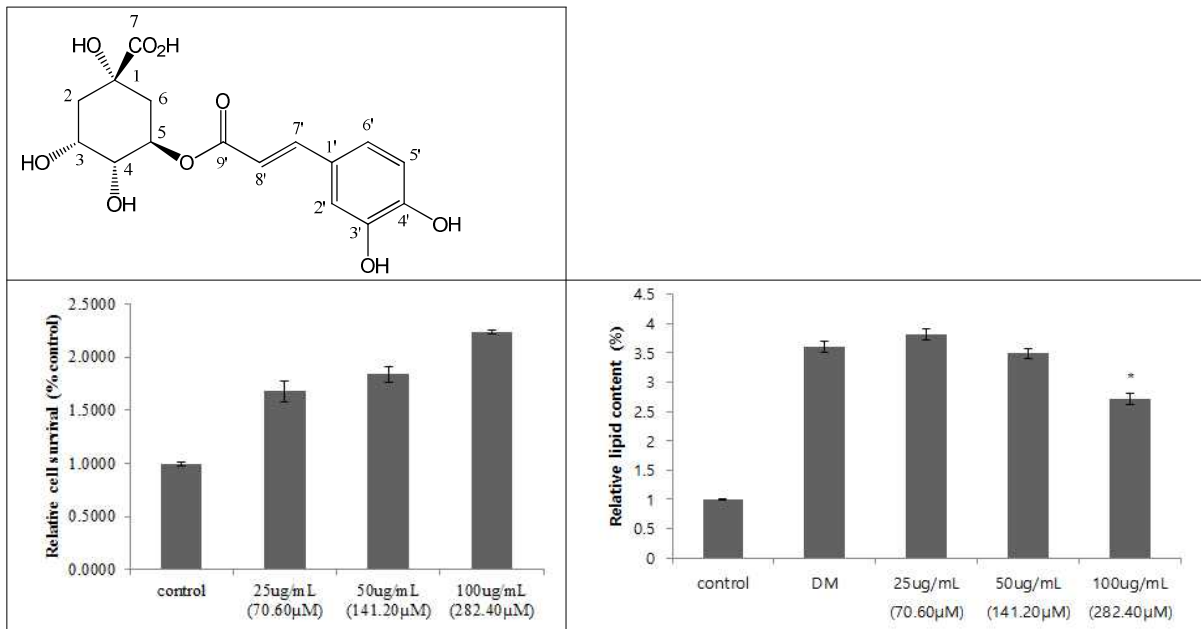
② 분리한 성분에서의 3T3-L1 지방 분화 억제능 평가

- 7개의 성분에서 억제능 확인되었다.

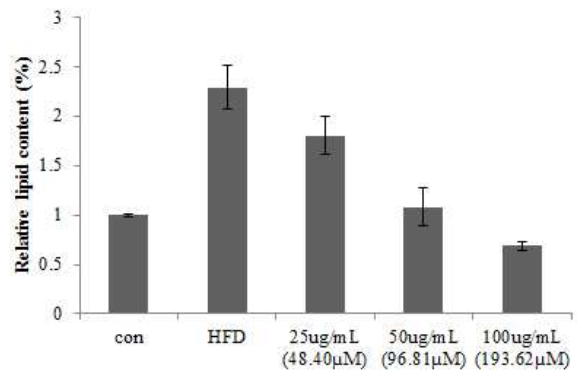
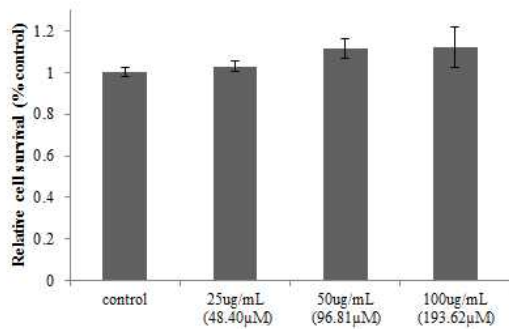
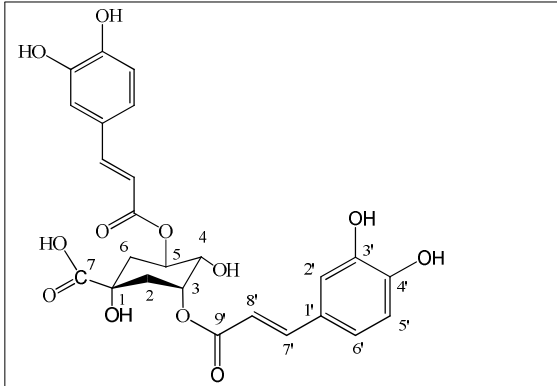
- protocatechuic acid



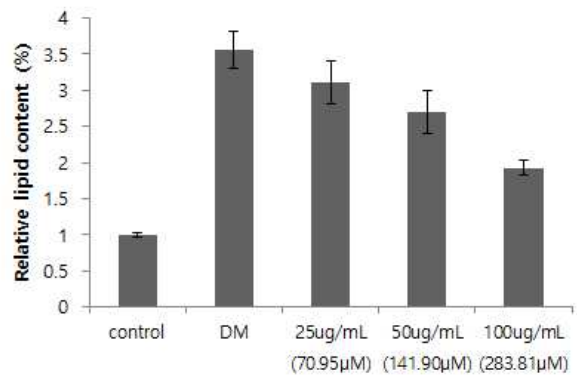
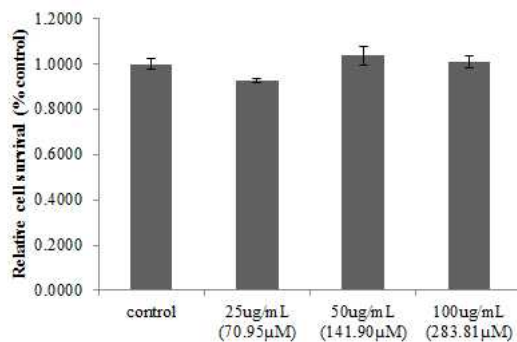
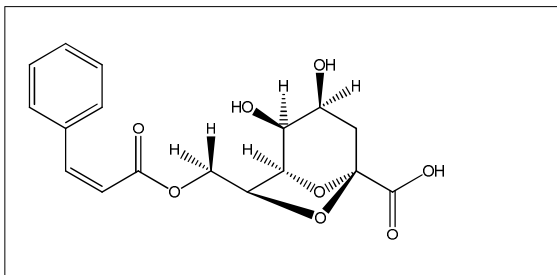
- Chlorogenic acid



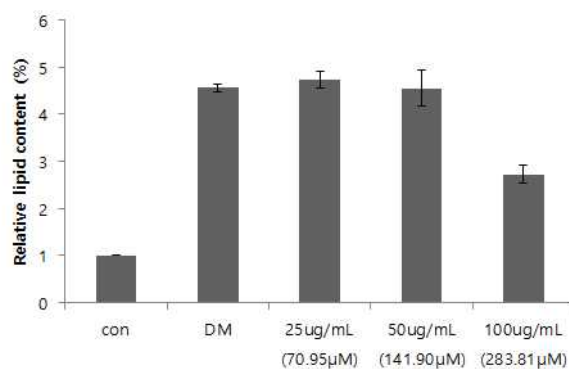
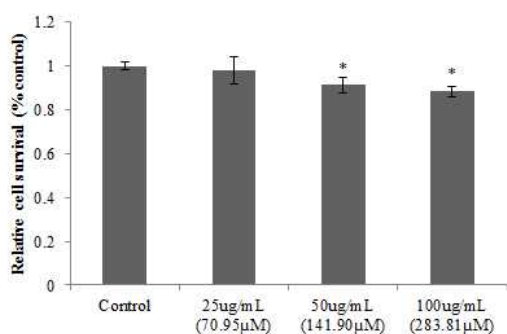
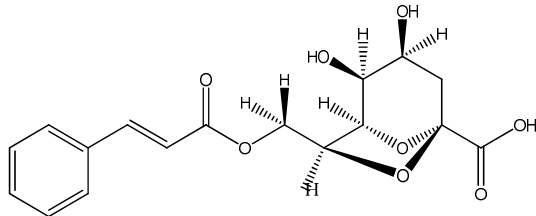
- 3,5-di-caffeoylquinic acid



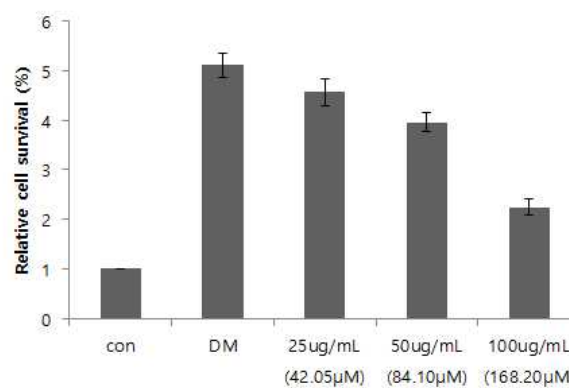
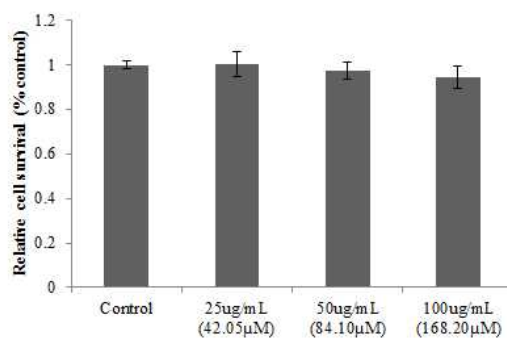
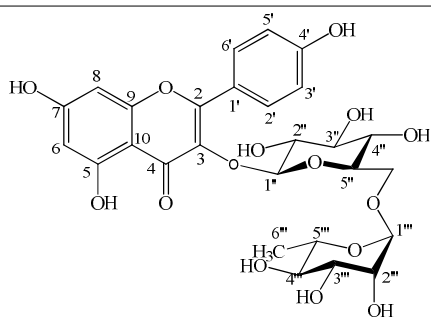
-(1R,2S,3S,5R,7S)-2,3-dihydroxy-7-(((Z)-3-phenylacryloyl)oxy)methyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid



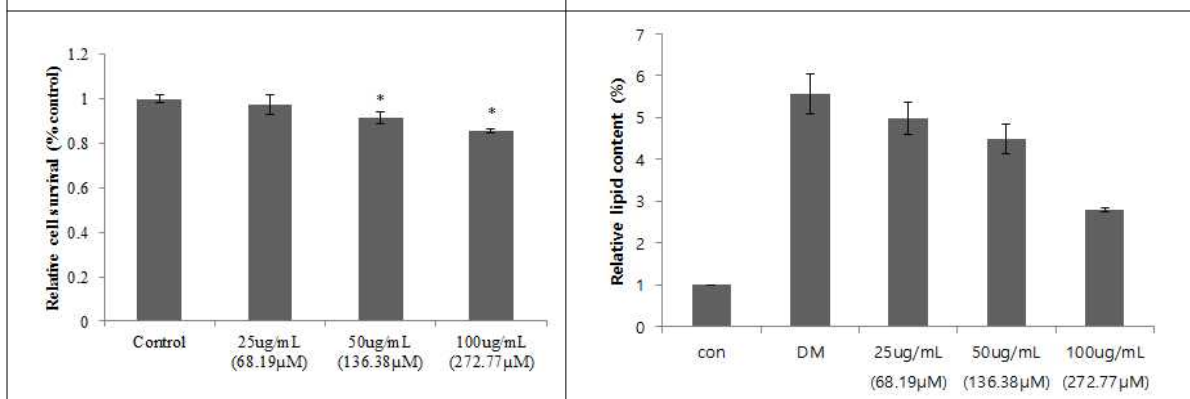
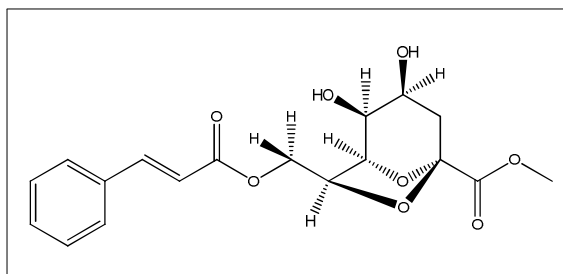
-(1R,2S,3S,5S,7S)-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid



- Kaempferol-3-O-rutinoside



-(1R,2S,3S,5R,7S)-methyl-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid



라. 결론

- chlorogenic acid 포함하여 24개의 성분 분리하였다.

- 그 중에 7개의 성분(protocatechuic acid, Chlorogenic acid, 3,5-di-caffeoylquinic acid,

(1R,2S,3S,5R,7S)-2,3-dihydroxy-7-(((Z)-3-phenylacryloyl)oxy)methyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid,

(1R,2S,3S,5S,7S)-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1] octane-5-carboxylic acid,

Kaempferol-3-O-rutinoside,

(1R,2S,3S,5R,7S)-methyl-7-((cinnamoyloxy)methyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylic acid에서 3T3-L1 지방 분화 억제능이 확인되었다. 분리 및 동정 확인하였고 기능성(지방 분화억제)도 확인하였다.

(3) 원재료 표준화(식물종 확정/재배 지역/사용부위/채취시기) 확립

가. 추출 방법

- 대한민국 내의 울산, 고성, 대관령, 거제, 한라산, 울릉도 및 외도, 미국의 각각 미역취를 확보하였다. 또한 이들 중 울릉도 미역취는 4월, 5월, 6월, 7월 및 8월에 대한 시기별로 각각 미역취를 채집하였다.
- 각 미역취를 건조한 후, 1.5kg의 건조 미역취를 분쇄한 뒤 10% 에탄올(15L)을 이용하여 7시간 동안 70℃에서 침출시켰다. 침출한 각각의 시료를 감압농축기를 이용하여 농축하였고, 그 다음 동결 건조하였다.
- 5월에 수확한 울릉도 미역취는 각 농도별 에탄올(10~100%)을 이용하여 상기와 같이 추출하였다.

① 지역별

지역	추출용매	시료명
울산	10% 에탄올	USE
고성	10% 에탄올	GSE
대관령	10% 에탄올	DGLE
거제	10% 에탄올	GJE
한라산	10% 에탄올	HLME
울릉도	10% 에탄올	ULIE
우도	10% 에탄올	WIE
미국	10% 에탄올	-

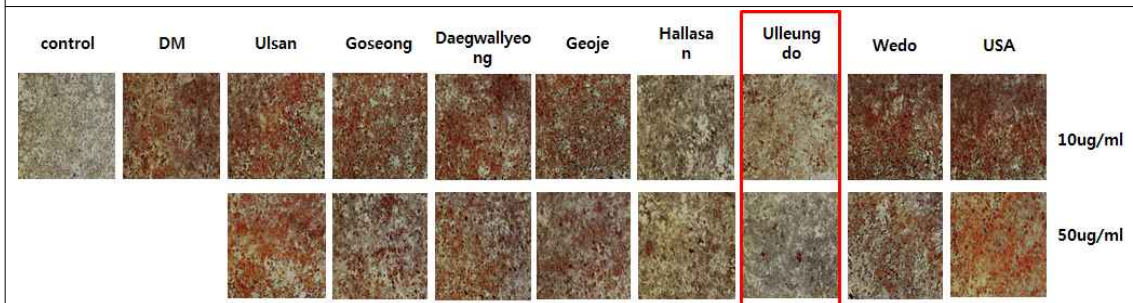
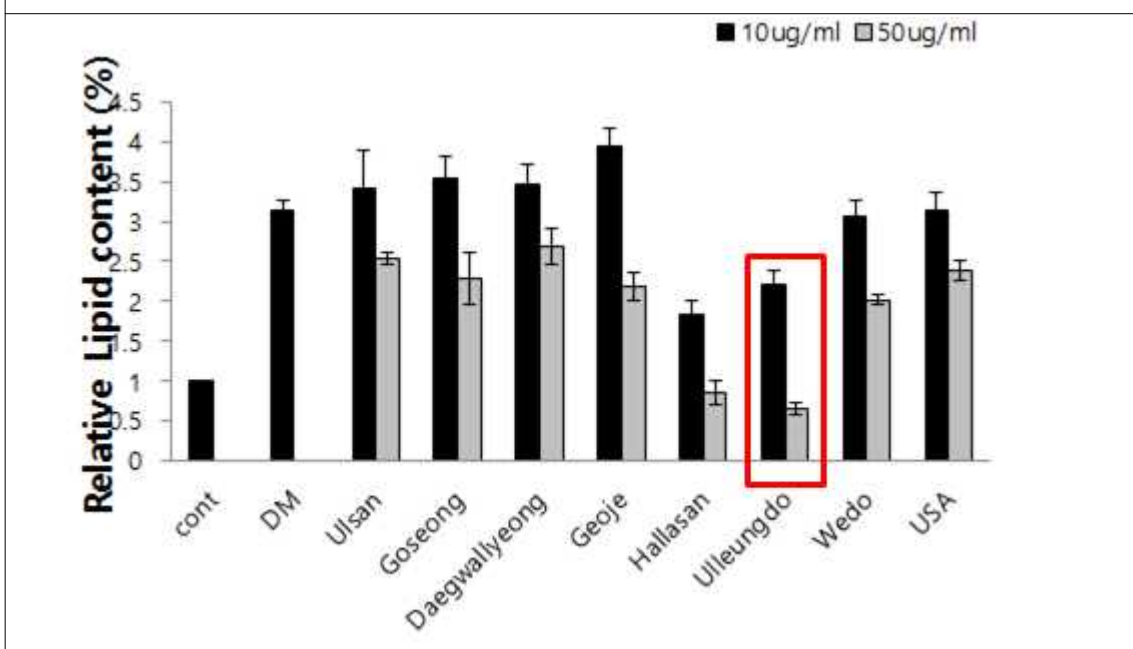
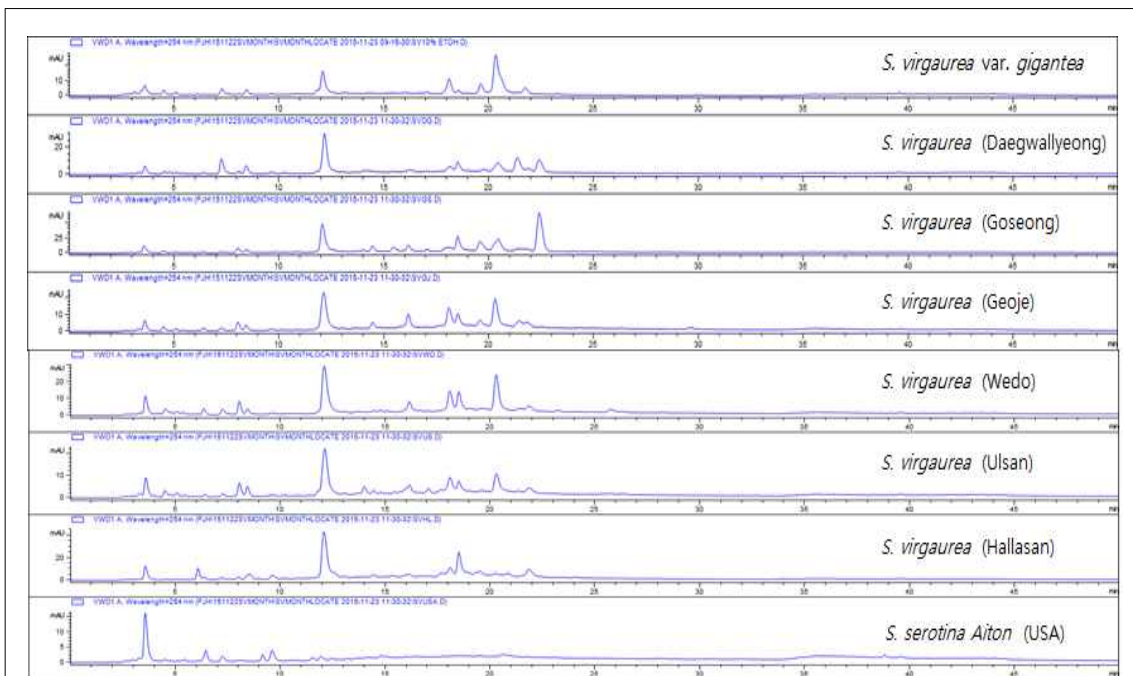
② 울릉도 미역취 채취 시기별

지역	시기	추출용매	시료명
울릉도	4월	10% 에탄올	APR-E
울릉도	5월	10% 에탄올	MAY-E
울릉도	6월	10% 에탄올	JUN-E
울릉도	7월	10% 에탄올	JUL-E
울릉도	8월	10% 에탄올	AUG-E

나. HPLC 분석 및 3T3-L1을 이용한 항비만 효능평가

- 분석 칼럼은 Eclipse XDB-C18 C18 (5 μ m, 4.6*250mm i.d.) flow rate 0.7 mL/min, 이동상 0.1% TFA water (A)와 Acetonitrile (B)을 사용하여 0분 A:B=95:5 15분 A:B=5:40 30분 A:B=40:60 40분 A:B=60:100 50분 A:B=100:0 60분 95:0 로 분석하고 UV 254 nm 에서 검출하여 peak를 확인하였다.
- 3T3-L1 세포를 24well plate에 배양하여 분화촉진 물질인 insulin, dexamethasone, IBMX (Differentiation Medium)와 추출물(추출 조건에 따른 4개 시료)을 처리하여 Oil Red O 시약에 염색시켜 상대적인 TG의 OD값을 측정하였다. 염색된 세포를 위상차 현미경으로 100X배율로 촬영하였으며, 지질 방울은 이소프로판올에 용해시키고 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 540 nm에서 O.D값(흡광도)을 측정하였다.
- MTS Assay는 3T3-L1에서의 미역취 추출물의 세포 독성 세포를 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS) assay kit (Promega, Madison, WI, USA) 세포 (5 × 10³ / well)를 96-well plate에 미역취 추출물 (10, 50 μ g/ml)으로 24h동안 처리하였다. 배양 후, 20 μ l/well의 MTS 용액을 배양하고 490nm에서 측정하였다.

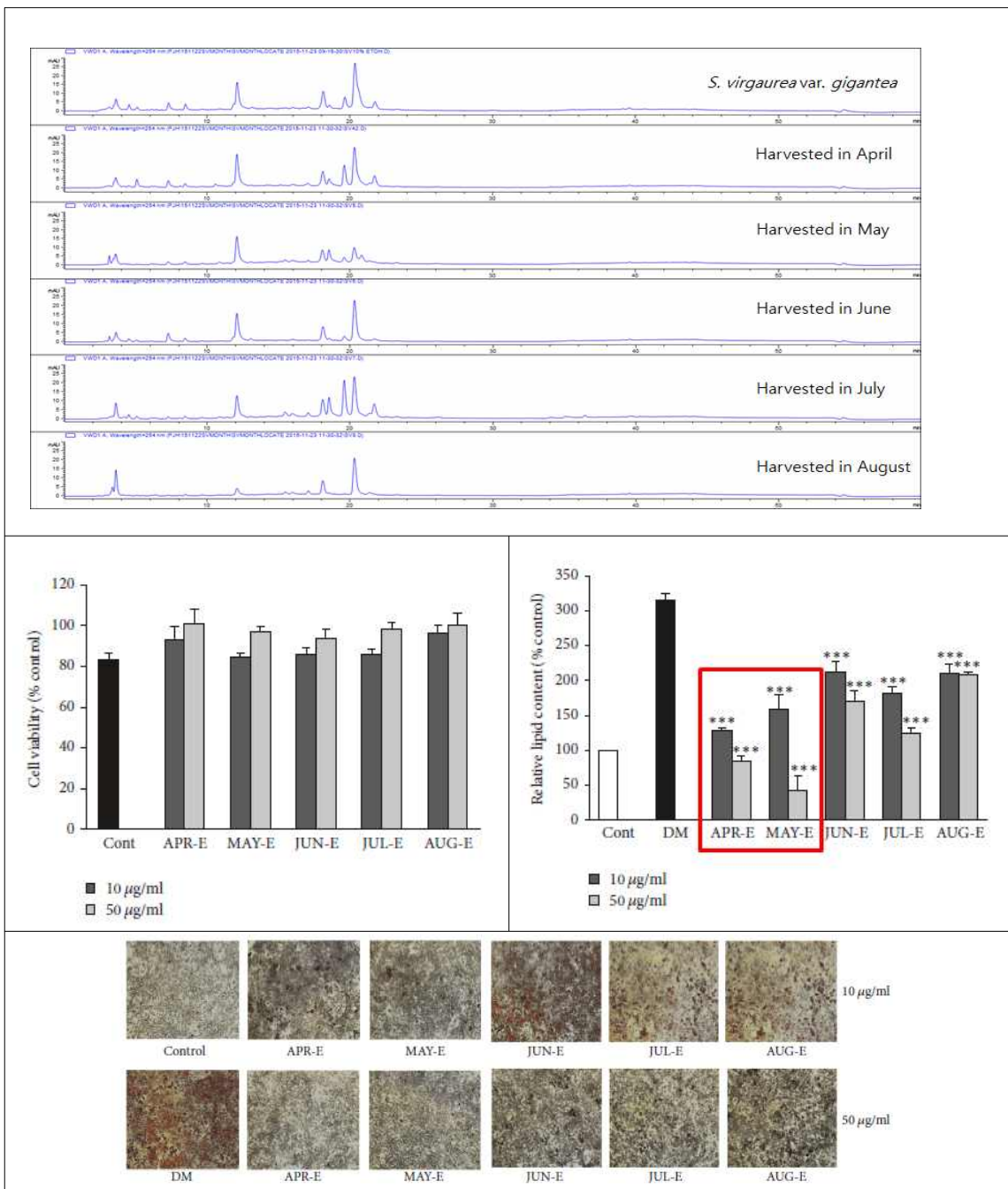
① 지역별



- 3T3-L1을 이용하여 8개의 지역별 미역취 추출물을 처리하여 유효활성 지역추출물을

검색하였다. 항비만 효능 평가 결과, 각 지역별 미역취 추출물을 10, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 지방세포는 분화유도제를 처리하지 않은 대조군을 기준으로, 분화유도제만 처리한 DM보다 지방 축적이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 특히, 한라산 및 울릉도 미역취 추출물을 처리한 지방세포는 분화유도제만 처리한 음성대조군보다 지방축적에 대하여 뛰어난 감소효과를 나타냈고, 한라산 미역취 추출물을 처리한 지방세포의 지방생성 억제율은 43.37%이며 울릉도 미역취 추출물을 처리한 지방세포의 지방생성 억제율은 106.89%를 나타내었다.

② 울릉도 미역취 채취 시기별



- 각 채취 시기별 미역취 추출물 10, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 지방세포는 아무런 처리도 하지 않은 대조군을 기준으로, 모두 독성이 없었다.
- 항비만 효능평가 결과 각 시기별 울릉도 미역취 추출물을 10, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 지방세포는 분화유도제를 처리하지 않은 대조군을 기준으로, 분화유도제만 처리한 음성대조군보다 지방 축적이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 3T3-L1 분화한 것(DM)에 비하여 4월, 5월, 6월, 7월, 8월 모두 분화가 억제되었다. 각 시기 중 4월 내지 5월에 채집한 울릉도 미역취 추출물을 처리한 지방세포는 분화유도제만 처리한 음성대조군보다 지방축적에 대하여 가장 탁월한 감소효과를 나타냈으며, 미역취 추출물을 처리한 지방세포의 지방생성 억제율은 10 μ g/ml에서 87.14%, 50 μ g/ml에서 110.70%를 나타내었다.

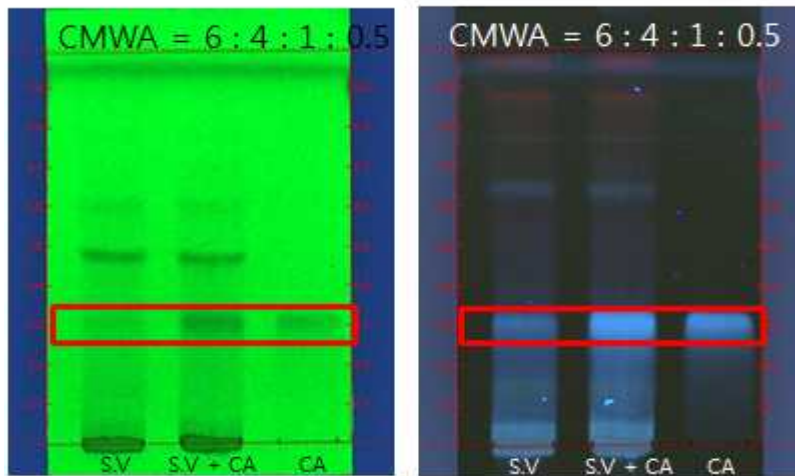
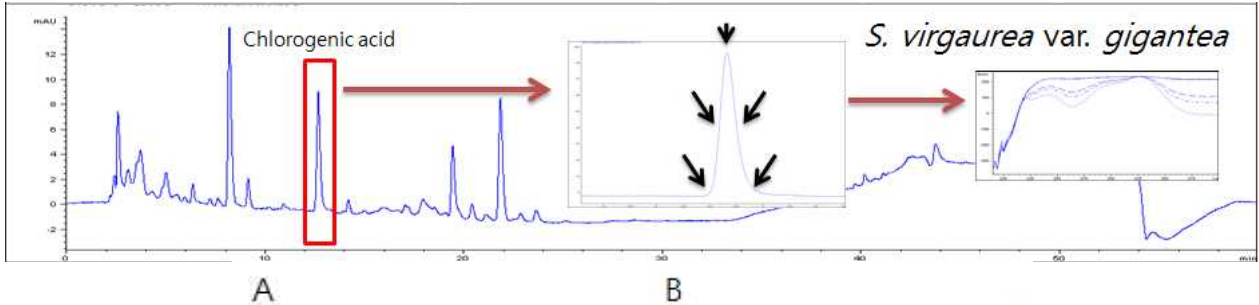
다. 결론

- 식물종은 울릉도 미역취, 지역은 울릉도, 사용부위는 전초, 채취 시기는 5월이지만, 원활한 수급을 위하여, 4~6월로 최종 확립하였다.

(4) 기능성 원료 표준화 및 지표물질 설정

가. 지표물질(또는 기능성 물질) 선정

- Protocatechuic acid (PC) 및 chlorogenic acid (CA)으로 설정하였다.



Absorbance: A) 254 nm, B) 366nm,
CMWA: Chloroform: MeOH: Water: Acetic acid,
S.V: *Solidago virgaurea*, CA: Chlorogenic acid

나. 표준 및 분석용 샘플 조제 방법

- 표준 PC 및 CA 용액은 4.85-485.00과 47.50-1900.00 농도로 MeOH에 녹여 사용하였다.
- 미역취 추출물은 10mg/ml 농도로 MeOH에 녹여 사용하였다. 각 샘플을 10분 동안 초음파 처리하였고, nylon membrane 사용하여 여과하여 사용하였다.

다. HPLC 분석 조건

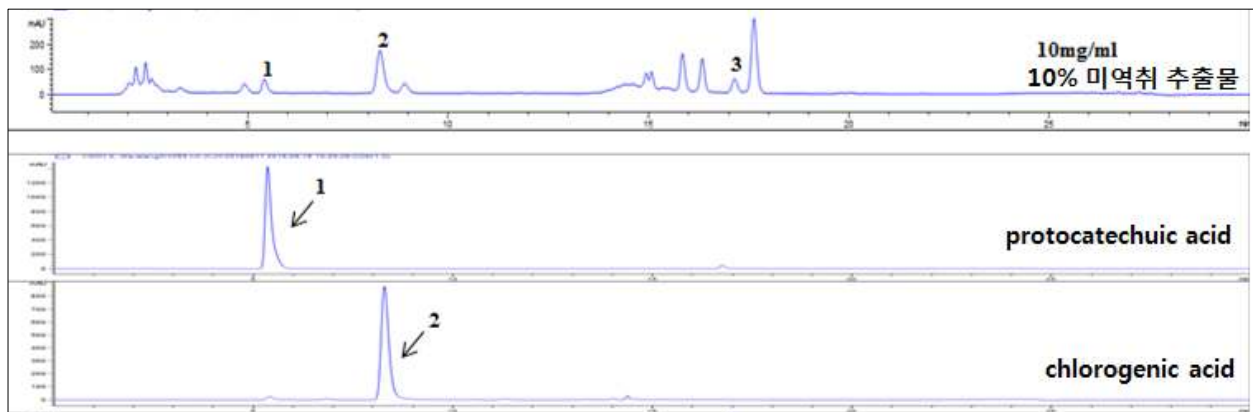
- 분석 칼럼은 Eclipse XDB-C18 C18 (5 μ m, 4.6*250mm i.d.) flow rate 0.7 mL/min, 이동상 0.1% TFA water (A)와 MeOH (B)을 사용하여 5-40% B (0-15분), 40-60% B (15-30분) 및 60-100% B (30-40분)로 분석하고 UV 254 nm 에서 검출하여 peak를 확인하였다.

라. 분석 방법 검증(Validation)

- 분석 방법은 단일 실험실 지침에 따라 특이성, 직선성, LOD, LOQ, 정밀성, 정확성, 회수율 검증하였다.

마. 울릉도 미역취(10% 주정 추출물) 표준화

① 특이성



- Protocatechuic acid (PC)과 chlorogenic acid (CA) 기준으로 특이성을 확보하였다.
 - 동일한 retention time을 가지는 peak를 얻을 수 있었으며 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인하였다.

② 직선성, 범위, LOQ, LOD

- 지표물질 2개의 농도별로 3회 반복 분석하여 검량선 및 직선성의 상관계수 확인하였다.
 - 계산해 본 결과 PC는 4.85-485.00 µg/ml, CA는 47.50-1900.00 µg/ml 범위에서 상관계수가 0.999이상인 직선성을 확보 할 수 있었다.
 - PC와 CA의 LOD는 각각 0.208 및 3.088 µg/ml 인 것으로 확인되었고, 이들 화합물의 LOQ는 0.630과 9.358 µg/ml이었다.

Parameters	Protocatechuic acid (PC)	Chlorogenic Acid (CA)
Retention time (min; n=4)	5.36 ± 0.002	8.22 ± 0.004
Regression equation ¹⁾	Y = 28.899x - 125.76	Y = 12.405x + 33.466
Correlation coefficient (R ²)	1.0000	0.9999
Linear range (µg/ml)	4.85-485.00	47.5-1900.00

LOQ($\mu\text{g/ml}$) ²⁾	0.630	9.358
LOD($\mu\text{g/ml}$) ³⁾	0.208	3.088

¹⁾X: concentration of tested compounds (1)-(2); Y: peak area at 254nm

²⁾LOQ : $10 \times (\text{Standard deviation of the response} / \text{Slope of calibration curve})$

³⁾LOD : $3.3 \times (\text{Standard deviation of the response} / \text{Slope of calibration curve})$

③ 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

- 세 가지 다른 농도에서의 일별 및 일간의 상대 표준 편차 (RSD)를 평가, 3일 동안 매일 3회 3가지 농도의 표준을 적용하였다.

Analyte compounds	Analyte concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Intra-day (n = 3)			Inter-day (n = 3)		
		Calculated concentration (mean \pm SD, $\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Accuracy (%)	Calculated concentration (mean \pm SD, $\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Accuracy (%)
Protocatechuic acid (PC)	18.92	19.02 \pm 0.01	0.07	99.48	19.02 \pm 0.04	0.23	99.46
	23.77	24.21 \pm 0.32	1.33	98.19	23.90 \pm 0.05	0.21	99.46
	62.57	64.25 \pm 0.08	0.12	97.38	64.17 \pm 0.08	0.12	97.50
Chlorogenic acid (CA)	253.07	249.58 \pm 1.45	0.58	101.4	251.08 \pm 0.03	0.01	100.79
	300.57	249.58 \pm 1.59	0.53	100.46	300.81 \pm 0.37	0.12	99.92
	680.57	661.17 \pm 1.62	0.24	102.93	662.99 \pm 0.65	0.10	102.65

④ 회수율

- PC 및 CA 회수율은 101.32 내지 103.30%, 95.82 내지 100.25%로 확인되었다.

Analyte compounds	Theoretical ($\mu\text{g/ml}$)	Found (mean \pm SD, $\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)	Recovery (mean \pm SD, %)
Protocatechuic acid	4.85	4.95 \pm 0.87	0.87	102.12 \pm 0.00
	9.70	9.83 \pm 0.05	0.21	101.32 \pm 0.51

(PC)	48.50	50.10 ± 0.08	0.12	103.30 ± 0.16
Chlorogenic acid	47.50	45.51 ± 0.03	0.07	95.82 ± 0.07
	95.00	95.24 ± 0.37	0.39	100.25 ± 0.39
(CA)	475.00	457.63 ± 0.65	0.14	96.30 ± 0.14

바. 미역취 지역별(10% 주정 추출물)에 따른 PC 및 CA함량

Regions	Contents in extracts (mean ± SD, mg/g)	
	Protocatechuic acid (PC)	Chlorogenic acid (CA)
Ulsan (USE)	1.46 ± 0.00	12.43 ± 0.06
Goseong (GSE)	0.97 ± 0.00	33.62 ± 0.08
Daegwallyeong (DGLE)	4.70 ± 0.00	7.28 ± 0.04
Geoje (GJE)	1.04 ± 0.80	3.28 ± 0.01
Halla Mountain (HLME)	1.99 ± 0.04	78.71 ± 0.26
Ulleung Island (ULSE)	3.17 ± 0.03	26.25 ± 0.01
Wi Island (WIE)	3.37 ± 0.00	36.24 ± 0.12

- PC함량은 DGLE(4.70mg/g) > WIE(3.37mg/g) > ULIE(3.17mg/g) > HLME(1.99mg/g) > USE(1.46mg/g) > GJE(1.04mg/g) > GSE(0.97mg/g)으로 확인되었다.
- CA 함량은 HLME(78.71mg/g) > WIE(36.24mg/g) > GSE(33.62mg/g) > ULIE(81.47mg/g) > USE(776.90mg/g) > DGLE (310.62mg/g) > GJE (103.20mg/g)으로 확인되었다.

사. 울릉도 미역취(10% 주정 추출물)의 채취 시기별(4~8월)에 따른 PC 및 CA 함량

Periods (month)	Contents in extracts (mean \pm SD, mg/g)	
	Protocatechuic acid (PC)	Chlorogenic acid (CA)
April (APR-E)	2.77 \pm 0.04	35.54 \pm 0.03
May (MAY-E)	4.38 \pm 0.01	23.45 \pm 0.00
June (JUN-E)	3.80 \pm 0.00	25.82 \pm 0.04
July (JUL-E)	1.09 \pm 0.01	15.49 \pm 0.04
August (AUG-E)	-	0.42 \pm 0.01

- 5개의 상이한 기간의 울릉도 미역취 추출물의 PC 및 CA 함량이 다르게 나타났다. 울릉도에서 4월에 수집된 것이 비만 예방 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

아. 결론

- 본 분석방법을 통해 지역별, 시기별 Protocatechuic acid (PC) 및 chlorogenic acid (CA)의 함량을 분석함으로써 원료표준화 및 지표성분을 설정하였다.

(5) 지표성분 및 유효성분을 바탕으로 한 안정성연구

- Lot 1~3개의 25℃ ± 2(상온)과 40 ± 2 ℃, 상대습도 75 ± 5 %로 제품 등의 안정성에 미치는 영향을 평가하기 위해 12개월 동안 시험을 실시하였다.

가. chlorogenic acid 함량 변화

CA (chlorogenic acid)		25℃ (상온)	CA (chlorogenic acid)		40℃ (가속)
날짜	횟수	함량 (mg/g)	날짜	횟수	함량 (mg/g)
2016년 10월	1차	14.053	2016년 10월	1차	14.076
	2차	13.915		2차	12.951
	3차	14.007		3차	12.524
	평균	13.991		평균	13.184
	표준편차	0.071		표준편차	0.803
2017년 1월	1차	14.007	2017년 1월	1차	13.487
	2차	14.058		2차	13.214
	3차	13.823		3차	12.804
	평균	13.963		평균	13.168
	표준편차	0.124		표준편차	0.343
2017년 4월	1차	14.571	2017년 4월	1차	12.997
	2차	13.508		2차	12.450
	3차	13.639		3차	13.253
	평균	13.906		평균	12.901
	표준편차	0.580		표준편차	0.409
2017년 7월	1차	12.843	2017년 7월	1차	12.887
	2차	13.349		2차	12.015
	3차	14.145		3차	12.149
	평균	13.446		평균	12.351
	표준편차	0.656		표준편차	0.469
2017년 10월	1차	12.719	2017년 10월	1차	11.137
	2차	13.674		2차	11.650
	3차	13.561		3차	11.516
	평균	13.317		평균	11.433
	표준편차	0.522		표준편차	0.267
	총평균	13.724		총평균	12.606
	표준편차	0.317		표준편차	0.738

나. protocatechuic acid 함량 변화

PC (protocatechuic acid)		25℃ (상온)	PC (protocatechuic acid)		40℃ (가속)
날짜	횟수	함량 (mg/g)	날짜	횟수	함량 (mg/g)
2016년 10월	1차	1.958	2016년 10월	1차	1.749
	2차	1.771		2차	1.711
	3차	1.848		3차	1.766
	평균	1.859		평균	1.744
	표준편차	0.094		표준편차	0.028
2017년 1월	1차	1.958	2017년 1월	1차	1.777
	2차	1.716		2차	1.711
	3차	1.727		3차	1.716
	평균	1.799		평균	1.733
	표준편차	0.138		표준편차	0.039
2017년 4월	1차	1.909	2017년 4월	1차	1.716
	2차	1.689		2차	1.766
	3차	1.722		3차	1.700
	평균	1.771		평균	1.727
	표준편차	0.121		표준편차	0.033
2017년 7월	1차	1.661	2017년 7월	1차	1.782
	2차	1.804		2차	1.645
	3차	1.584		3차	1.700
	평균	1.683		평균	1.711
	표준편차	0.110		표준편차	0.072
2017년 10월	1차	1.502	2017년 10월	1차	1.634
	2차	1.628		2차	1.749
	3차	1.705		3차	1.810
	평균	1.612		평균	1.733
	표준편차	0.105		표준편차	0.088
	총평균	1.744		총평균	1.727
	표준편차	0.099		표준편차	0.011

라. 결론

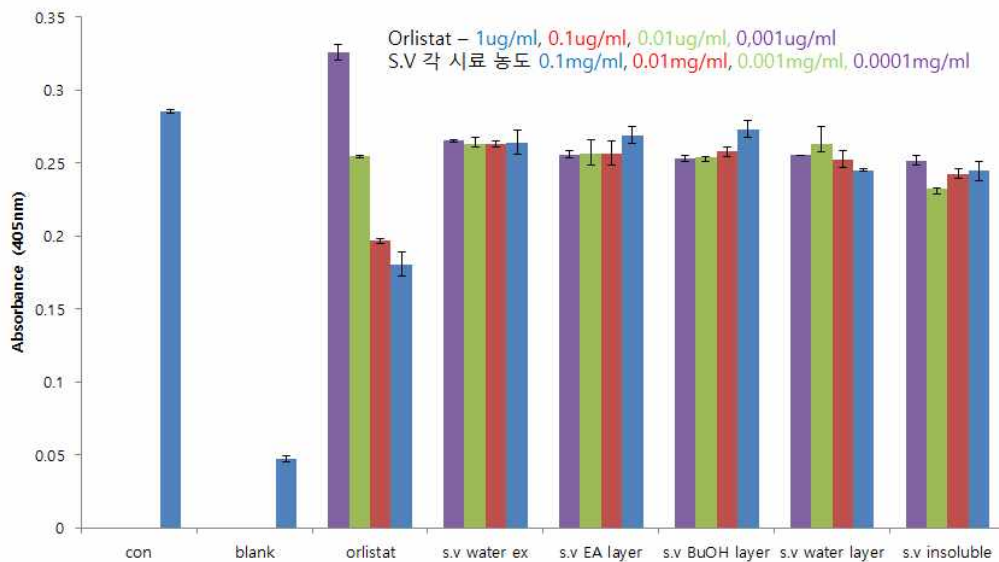
- 본 시험은 실온, 가속조건이 제품 등의 안정성에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험으로 12개월 동안 실험이 진행하였으며, 각 실험기간 동안 분석한 시료의 Protocatechuic acid (PC)의 평균 함량은 실온 1.744mg/g, 가속 1.727mg/ml, chlorogenic acid (CA)의 평균 함량은 실온 13.724mg/g, 가속 12.606mg/ml 으로 확인되었다.
- 안전성 평가를 통한 12개월의 유통기한으로 설정이 가능한 것으로 확인되었다.

(6) 비만관련 효소활성 검사를 통한 지방의 소화·흡수·합성·분해 효능 평가

가. pancreatic lipase 억제 활성 측정

- Pancreatic lipase는 식품을 섭취했을 때 지방인 triacylglycerol를 2-mono acylglycerol과 fatty acid로 가수분해하는 효소이다. 일부의 2-monoacylglycerol과 fatty acid는 소장의 점막세포에서 흡수되어 에너지와 인체내구성성분으로 사용되며 대부분은 다시 triacylglycerol로 합성되어 체내의 지방세포에 축적되어 비만을 유발한다. 이 때 지방대사의 key enzyme으로 작용하는 pancreatic lipase의 활성을 저해하면 triglyceride가 분해되지 못하고 배설되어 체내의 지방축적을 예방하여 비만을 예방할 수 있다.

- enzyme buffer (10 mM morpholine propane sulphonic acid, 1 mM EDTA, pH 6.8)에 porcine pancreatic lipase를 용해한 효소 용액에 Tris buffer (100 mM tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7)에 시료(활성 분획 추출물, EtOAc, n-BuOH)를 첨가하여 혼합한 후 substrate solution 10 mM p-nitrophenylbutyrate 첨가하고, 37°C 15분 동안 반응시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 orlistat을 사용하였다.

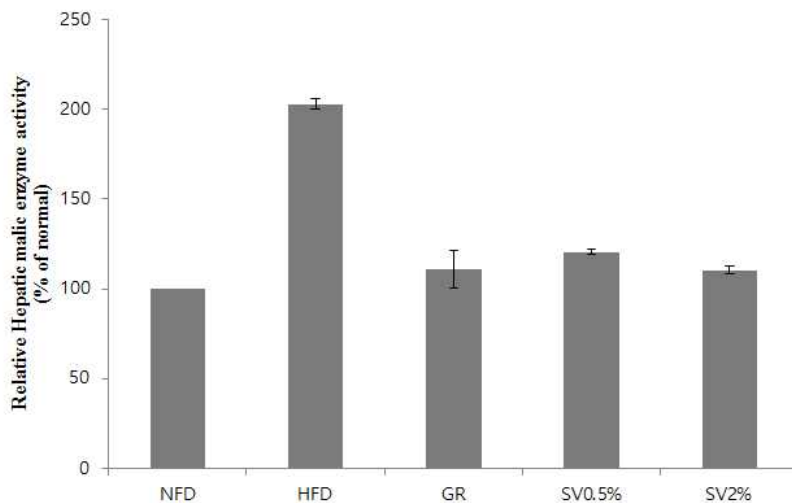


- 활성 분획 추출물(EtOAc, n-BuOH)의 4개의 농도(0.1, 1, 10, 1000µg/ml)에서 모두 활성이 나타나지 않았다.

나. malic enzyme 활성 측정

- Malic enzyme은 malate를 pyruvate로 전환시킴으로 당신생합성(gluconeogenesis)을 촉진하는 기능을 가지고 있으며, pyruvate 생성과정에서 만들어지는 NADPH는 지방산(fatty acid)을 합성하는데 사용된다. 조직에서 malic enzyme 활성이 감소하면 지방산합성 저하 효과가 있는 것으로 판단할 수 있다.

- 간 조직을 균질화한 후 600 g, 4°C, 10분간 원심 분리하여 cell debris를 제거하고, 상층액을 10,000 g, 4°C에서 20분간 원심 분리하였다. 다시 상층액을 취하여 105,000 g, 4°C에서 1시간 초고속 원심분리하고 얻어 진 Cytosolic 상층액을 분리하여 효소원으로 사용하였다. 경우 반응혼합액이 0.4M tri-ethanolamine (pH 7.4), 30mM L-malate, 0.12M MnCl₂ 및 3mM NADP를 넣고 조직 내에서 추출한 효소원을 혼랍 후 37°C에서 90초간 반응 후 분광광도계를 이용하여 340nm에서 3분간 측정하여 1분 반응당 단백질 1 mg이 생성하는 NADPH의 양(nmol/min/mg protein)으로 나타내었다.

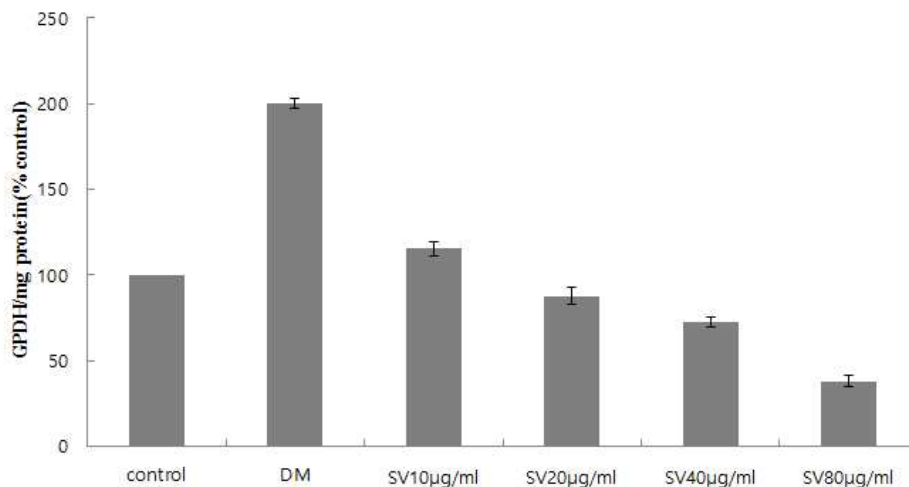


- normal fat diet (NFD), high-fat diet (HFD), HFD에 0.5% (5g/kg)의 미역취 추출물 포함 SV10E (SV0.5), HFD에 2% (20g/kg)의 미역취 추출물 포함 SV10E (SV2), HFD에 1% (10g/kg) 미역취 추출물에 60% (-)-hydroxycitric acid (GR; ESFood, Gunpo, Korea) 포함 것으로 대조물로 사용하였다.

- 0.5%, 2%의 미역취가 포함된 고지방 식이를 먹인 쥐로부터 적출한 간 조직에서의 malic enzyme 활성이 40.7%, 45.2% 억제함을 확인하였다.

다. Glucose-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성 측정

- GPDH는 세포분화의 지표가 되는 효소로 GPDH의 활성을 측정함으로써 지방세포의 분화 정도를 측정한다.
- 지방분화 된 세포주를 사용하였다. 분화 된 지방세포에 미역취 10% 추출물을 4개의 농도(10, 20, 40, 80 μ g/ml)로 처리하였다.
- lysis buffer(0.25M 수크로오스, 1mM EDTA, 5mM tris-base, 1mM dithiothreitol)을 첨가하고 얼음위에서 균질화하여, 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 cytosol을 분리해낸다. 상층액의 단백질 함량을 측정한다. 1-5 μ g의 단백질이 함유된 상층액을 상온에서 1ml 반응액에 넣고 340nm에서 흡광도를 측정한다. 처음 1분은 10초 간격, 그 후 60분은 매 1분마다 흡광도를 측정하여 소비된 NADH의 양을 측정함으로써 GPDH의 활성을 측정하였다. GPDH 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 생성된 NADPH의 nmole로 나타내었다.

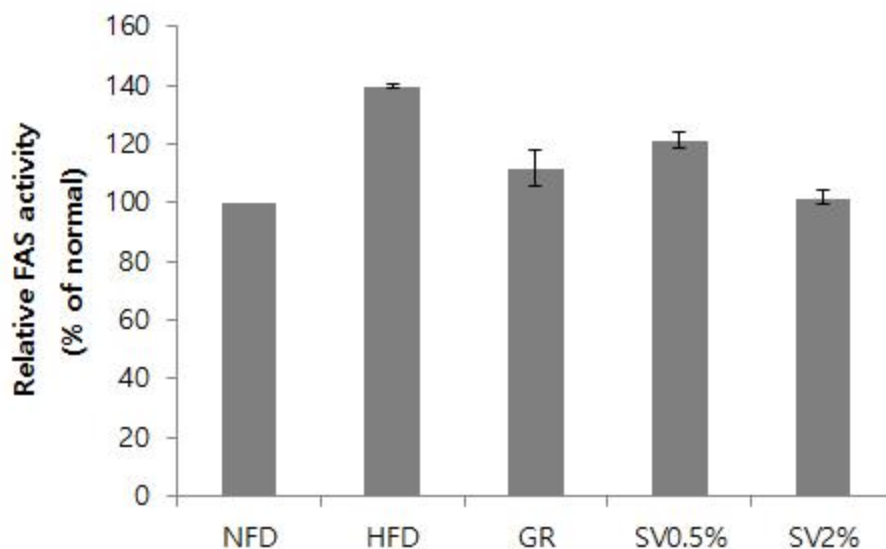


- 미역취 10% 추출물을 4개의 농도(10, 20, 40, 80 μ g/ml)로 처리된 3T3-L1에서 분리된 GPDH의 활성이 분화된 3T3-L1 대비 42.5%, 56.2%, 63.8%, 81.1%로 농도 의존적으로 억제하였다.
- 3T3-L1세포에 미역취 추출물의 농도에 따라 GPDH의 활성이 점차 감소하는 것을 확인되어, 이로써 미역취 추출물이 세포분화를 억제하는 것으로 확인되었다.

라. Fatty acid synthase (FAS) 활성 측정

- Fatty acid synthase (FAS)는 acetyl CoA와 malonyl CoA, NADPH를 사용하여 긴 사슬 지방산(long chain fatty acids)을 합성하는 주요한 효소이다. 즉, FAS에 의하여 malonyl-CoA에 acetyl-CoA가 결합되는 과정이 7번 반복되면서 1분자의 palmitic acid가 만들어지게 된다. FAS의 활성이 감소되면 중성지방 합성에 필요한 지방산 이용에 제한이 생기게 된다. 즉, 조직 중 FAS의 활성이 감소는 지방합성(lipogenesis)에 영향을 미칠 것으로 판단할 수 있다.

- 적출한 간 조직을 잘게 조각을 낸 후, 차가운 균질화 완충용액(homogenization buffer)를 넣고 균질기를 사용하여 균질화하고, 600 g, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 cell debris를 제거하였다. 상층액을 10,000 g, 4°C에서 20분간 원심 분리하고, 다시 상층액을 취하여 105,000 g, 4°C에서 1시간 초고속 원심 분리하였다. Cytosolic 상층액을 분리하여 효소원으로 사용하였다. 20mM EDTA, 20mM β-mercaptoethanol, 165μM acetyl-CoA 500μM malony-CoA, 500μM NADPH, 효소원을 넣고, 분광광도계를 이용하여 340nm에서 4분간 흡광도를 측정하였고, 효소활성은 1분당 단백질 1 mg이 생성하는 NADPH의 양(nmol/min/mg protein)으로 나타내었다.

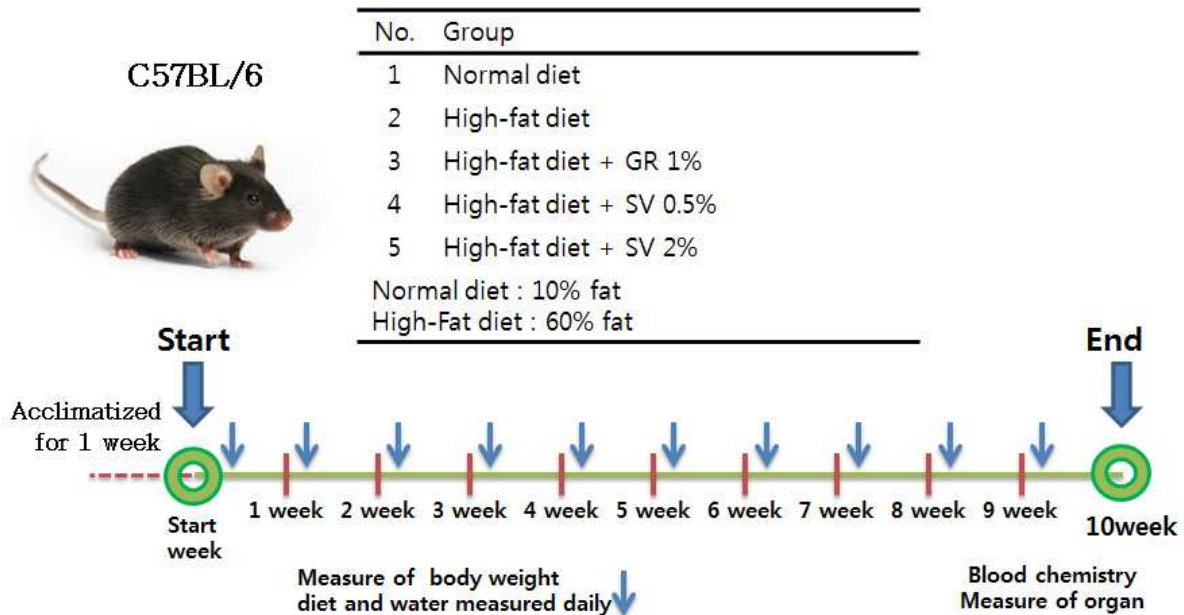


- 고지방식을 먹인 쥐로부터 적출한 간 조직 대비 0.5%, 2%의 미역취가 포함된 고지방식을 먹인 쥐로부터 적출한 간에서의 FAS 활성이 13.13%, 27.21% 억제하였다.

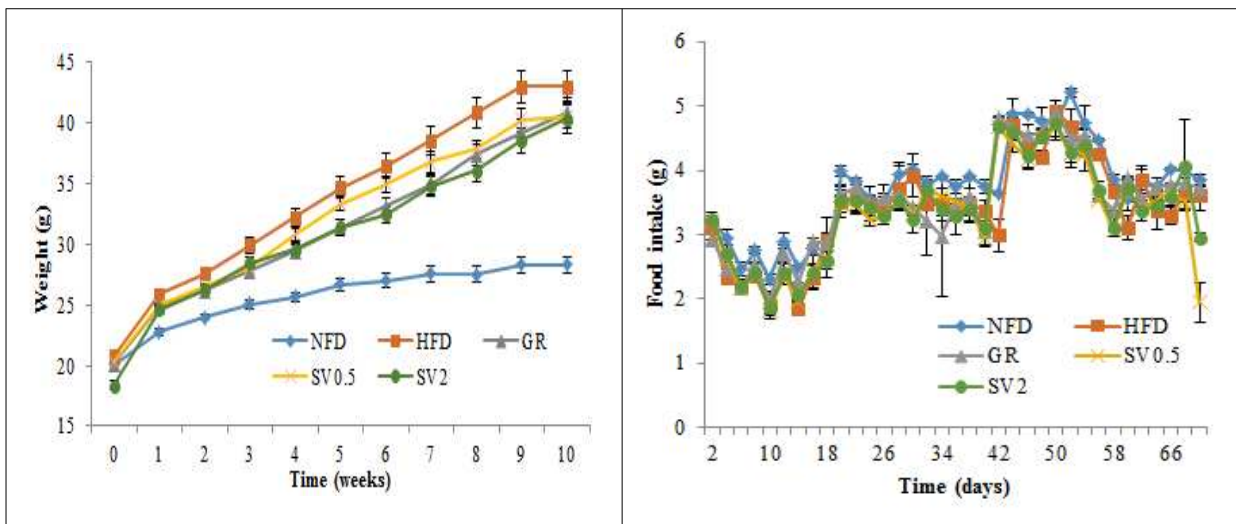
(7) 고지방식이 마우스를 사용한 체지방 감소 효능 검증 및 기전 연구

가. 고지방식이 마우스를 사용한 체지방 감소 효능 검증

- 6주령의 C57BL/6 mice 사용하였고, 12 h 빛 / 12 h 암주기, 실온 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) 및 습도($60 \pm 5\%$)에 1주간 적응기간을 주었다. 정상대조군(10% 지방 식이; NFD), 음성 대조군(60% 고지방식이; HFD), 비교군(1%의 가르시니아 추출물이 포함된 고지방식이; GR), 실험군1(0.5%의 미역취 추출물이 포함된 고지방식이; SV0.5) 그리고 실험군2(2%의 미역취 추출물이 포함된 고지방식이; SV2)을 무작위로 군당 10 마리씩 나누어 10주간 2 일 간격으로 같은 시간 (오후 2시경)에 주었다. 매주 체중, 음용수 및 사료 섭취량을 측정하였다.



① 체중, 사료섭취량 측정



Groups	NFD	HFD	GR	SV0.5	SV2
Body weight gain(g/10 weeks)	8.29 ± 0.74	24.05 ± 1.28	19.27 ± 1.28	20.28 ± 1.35	21.54 ± 1.68
Food intake (g/day)	3.74 ± 0.13	3.41 ± 0.13	3.51 ± 0.13	3.33 ± 0.13	3.40 ± 0.13
FER	2.22 ± 0.20	7.06 ± 5.49	5.49 ± 0.36	6.09 ± 0.41	6.34 ± 0.50

NFD, normal-fat diet control; HFD, high-fat diet control; GR, HFD + 1% Garcinia cambogia extract of 60% (-)-hydroxycitric acid; SV0.5, HFD + 0.5% SV10E; SV2, HFD + 2% SV10E; FER food efficiency ratio = Body weight gain (g/day)/Food intake (g/day).

- 10주간 사료섭취량은 차이가 없었으며, 음성대조군에 비하여 미역취 추출물을 섭취하였을 때 체중감소 효과를 보였다.

② 지방 세포 크기와 조직 무게 측정

Groups	NFD	HFD	GR	SV0.5	SV2
Epididymal white adipose tissue weight (g)	1.00 ± 0.16	2.31 ± 0.16	2.18 ± 0.16	2.53 ± 0.28	2.36 ± 0.08
Liver weight (g)	1.27 ± 0.19	1.65 ± 0.38	1.19 ± 0.07	1.34 ± 0.09	1.18 ± 0.04

NFD, normal-fat diet control; HFD, high-fat diet control; GR, HFD + 1% Garcinia cambogia extract of 60% (-)-hydroxycitric acid; SV0.5, HFD + 0.5% SV10E; SV2, HFD + 2% SV10E; FER.

- SV10E의 체중 감량 효과가 체지방 감소로 인한 것인지를 확인하기 위해 지방 세포 크기와 조직 무게를 측정하였다. HFD군의 부고환 백색 지방 조직의 무게는 NFD군의 비교군과 비교하여 유의하게 증가하였다.

③ 혈액 내 지방 및 콜레스테롤 인자들의 분석

- 모든 마우스는 혈액 채취 전 12시간 동안 금식하고, 혈액은 심장에서 채취하였다. 혈액은 5,000 rpm에서 5분 원심 분리하여 혈청을 -20℃에 보관하였고, 혈청 내의 Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL)과 간독성을 확인하기 위한 ALT(serum alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase) 및 신장독성을 확인하기 위한 BUN(blood urea nitrogen), CREA(creatinine)을 ELISA kit (Thermo Electron Corporation, Finland)에 의해 측정하였다.

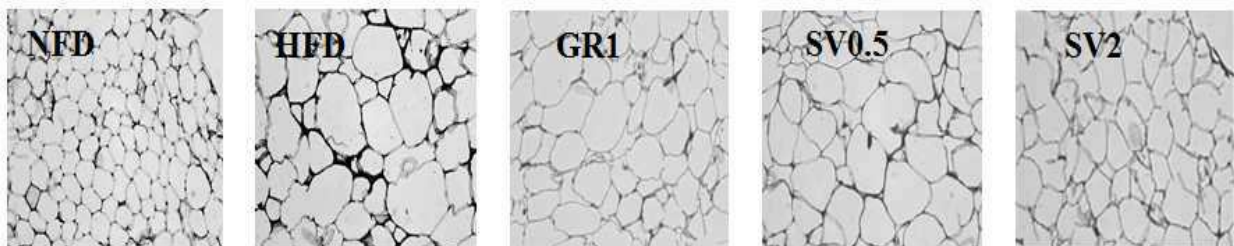
Group	NFD	HFD	GR	SV0.5	SV2
Serum TG (mg/dL)	115.50 ± 11.60 ^b	120.90 ± 13.70 ^b	120.30 ± 8.40 ^b	114.20 ± 8.70 ^b	79.90 ± 8.00 ^a
Serum Total-cholesterol (mg/dL)	53.52 ± 4.23 ^a	118.10 ± 5.67 ^b	127.12 ± 8.30 ^b	133.51 ± 6.47 ^b	64.02 ± 3.33 ^a
Serum HDL-cholesterol (mg/dL)	43.17 ± 2.79 ^a	78.81 ± 3.16 ^b	79.45 ± 2.38 ^b	83.44 ± 3.37 ^b	42.51 ± 1.65 ^a
HTR	0.81 ± 0.02 ^c	0.70 ± 0.01 ^b	0.66 ± 0.02 ^b	0.67 ± 0.01 ^b	0.66 ± 0.01 ^b
AST (U/L)	66.54 ± 15.29 ^{ab}	79.61 ± 15.78 ^{ab}	113.69 ± 15.75 ^{bc}	135.98 ± 16.67 ^c	43.63 ± 5.15 ^a
ALT (U/L)	31.85 ± 7.75 ^{ab}	89.52 ± 22.90 ^{bcd}	70.43 ± 11.76 ^c	132.72 ± 22.03 ^d	21.86 ± 1.75 ^a
BUN (mg/dL)	22.55 ± 0.78 ^c	17.49 ± 0.32 ^b	17.73 ± 0.47 ^b	19.30 ± 0.86 ^b	6.76 ± 0.72 ^a
CREA (mg/dL)	0.41 ± 0.02 ^{bc}	0.45 ± 0.01 ^c	0.42 ± 0.01 ^{bc}	0.41 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.00 ^a

Results are presented as mean ± SE (n = 6). Values within a row with different letters are significantly different from each other (p < 0.05). NFD, normal-fat diet control; HFD, high-fat diet control; GR, HFD + 1% Garcinia cambogia extract of 60% (-)-hydroxycitric acid; SV0.5, HFD + 0.5% SV10E; SV2, HFD + 2% SV10E; TG, triacylglycerol; HDL, high-density lipoprotein; HTR, HDL-cholesterol/Total cholesterol ratio; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine.

- 음성대조군에 비하여 미역취 추출물을 섭취한 실험군에서 HDL, TC 그리고 TG의 측정값이 낮게 나타나는 것을 확인하였다.
- 정상대조군과 비교하였을 때 미역취를 섭취한 실험군의 혈액에서 ALT, AST, BUN, CREA의 측정값이 낮게 나타나는 것을 확인하였다.

④ 부고환 지방 조직의 지방세포 비교

- 부고환 지방의 일부를 10% 포르말린에 고정한 다음 파라핀 포매 후 5 µg의 연속 절편하여 H&E Staining을 실시하고 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

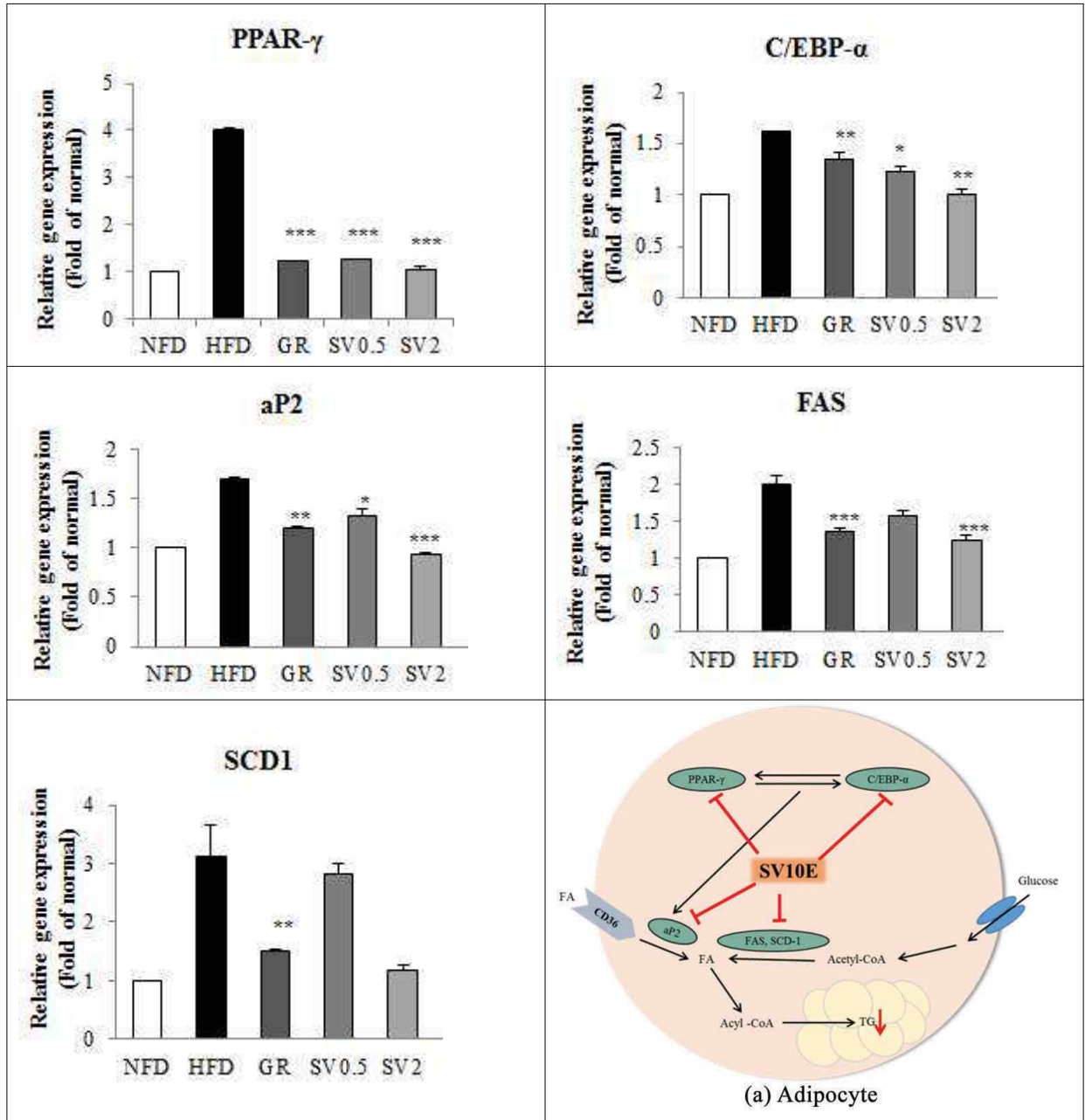


- 음성대조군과 비교하였을 때 미역취 추출물을 섭취한 실험군의 지방세포 크기는 감소하는 것을 관찰하였다.

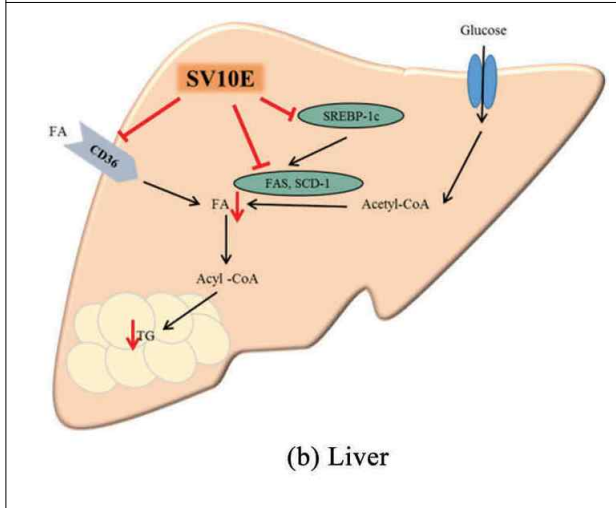
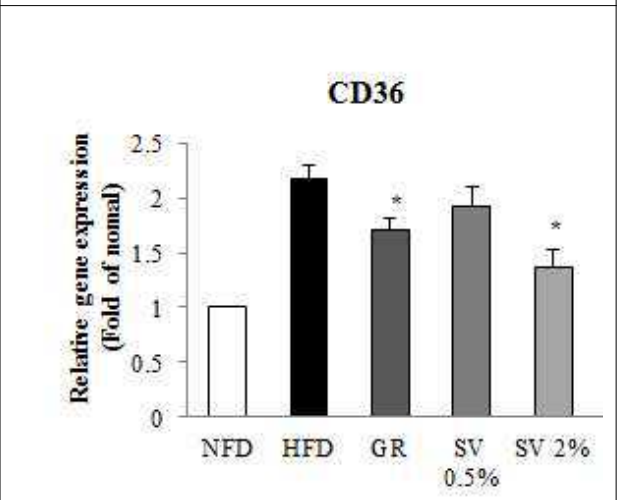
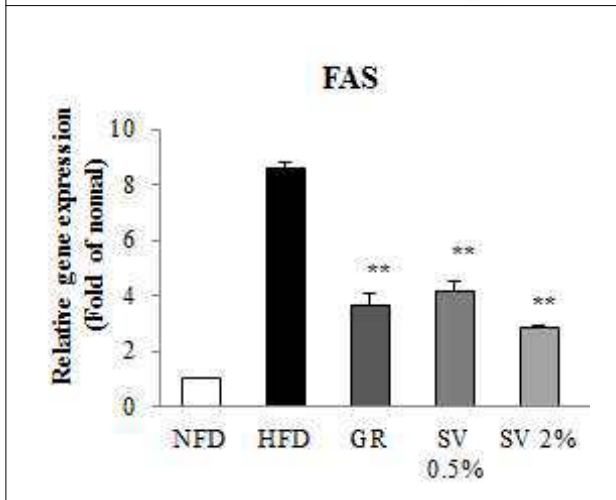
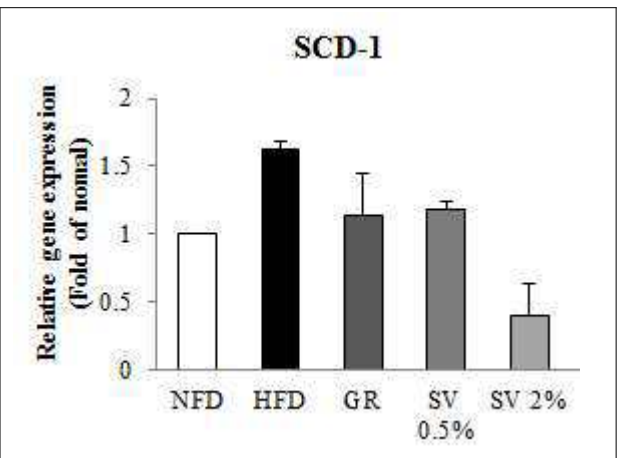
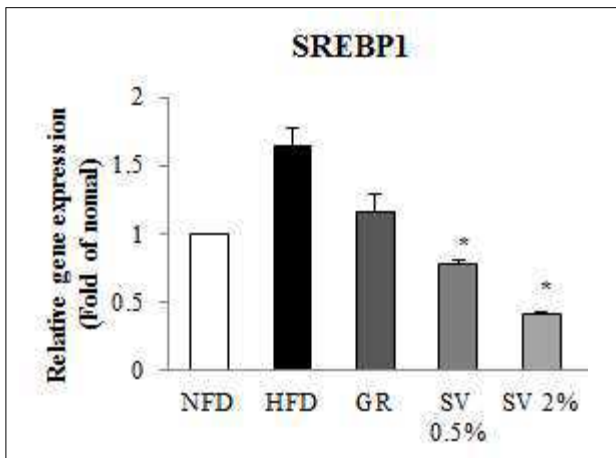
⑤ 간과 지방 조직의 유전자 발현량 분석

- 조직에서 총 RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다. 물층에 있는 RNA는 isopropanol을 이용하여 침전시켜 분리하여 260nm 및 280nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 총 RNA 1 µg을 Moloney

murine leukemia virus transcriptase와 Oligo (dT) 15primers (Promega, Medison, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen)에 의해 실시간 중합 효소 연쇄반응 기기 (Corbett Research, Sydney, Australia)로 측정하였다.



- 지방 세포 크기의 SV10E- 유도 된 감소를 더 평가하기 위해, 우리는 그것들을 지방 생성 및 지방 형성과 관련된 마커의 RNA 표현을 측정하였다. SV10E를 고농도로 보충하면 PPAR- γ , C / EBP- α 및 지방산 결합 단백질-4 (aP2)와 같은 지방 생성 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰다. lipogenic mRNA, FAS, stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)의 발현 역시 SV10E에 의해 하향 조절되었다.



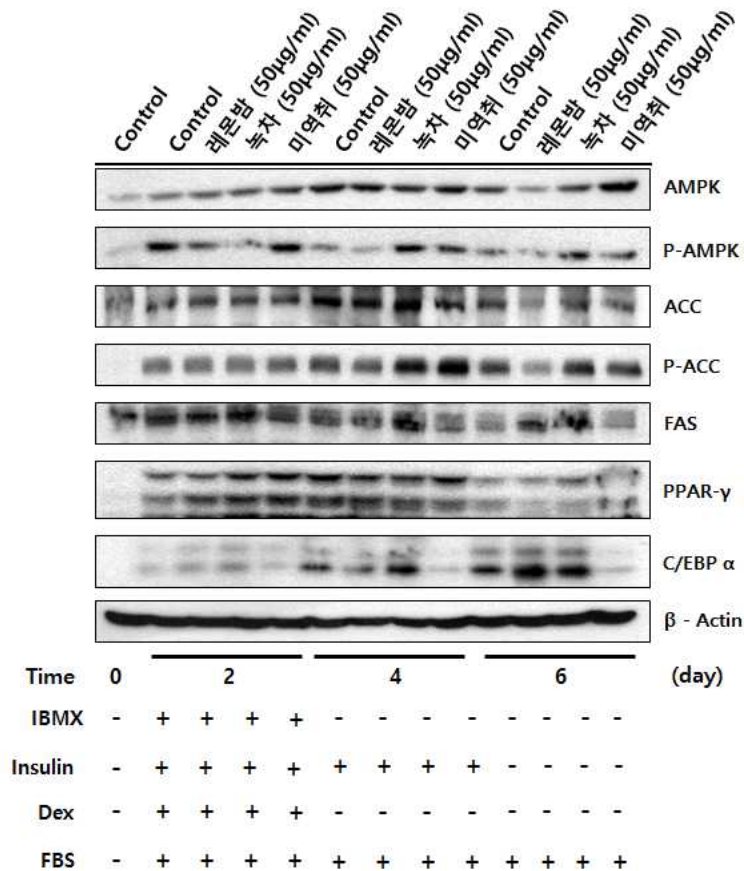
- 미역취 섭취가 간 조직 내에서의 지질 축적에 관련된 마커의 mRNA 발현을 측정하였다. SV10E 섭취는 SREBP-1c, FAS, SCD-1의 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰다.

2. 미역취추출물로부터 체지방감소 효능검증 및 기전 연구

(1) 미역취추출물에 의한 3T3L-1 세포 분화억제의 분자기전 연구

가. 3T3-L1 세포의 지방분화 과정동안 미역취 추출물에 의한 지방세포 분화억제 분자기전 연구

- 3T3-L1 세포를 이용하여 분화유도 물질 (IBMX, Insulin, Dex)를 처리함과 동시에 레몬밤, 녹차, 미역취 추출물을 같이 처리해 주었다. 지방세포 분화 억제 기전을 확인하기 위해 Western Blotting 기법을 사용하여 단백질의 발현양상을 확인하였다.

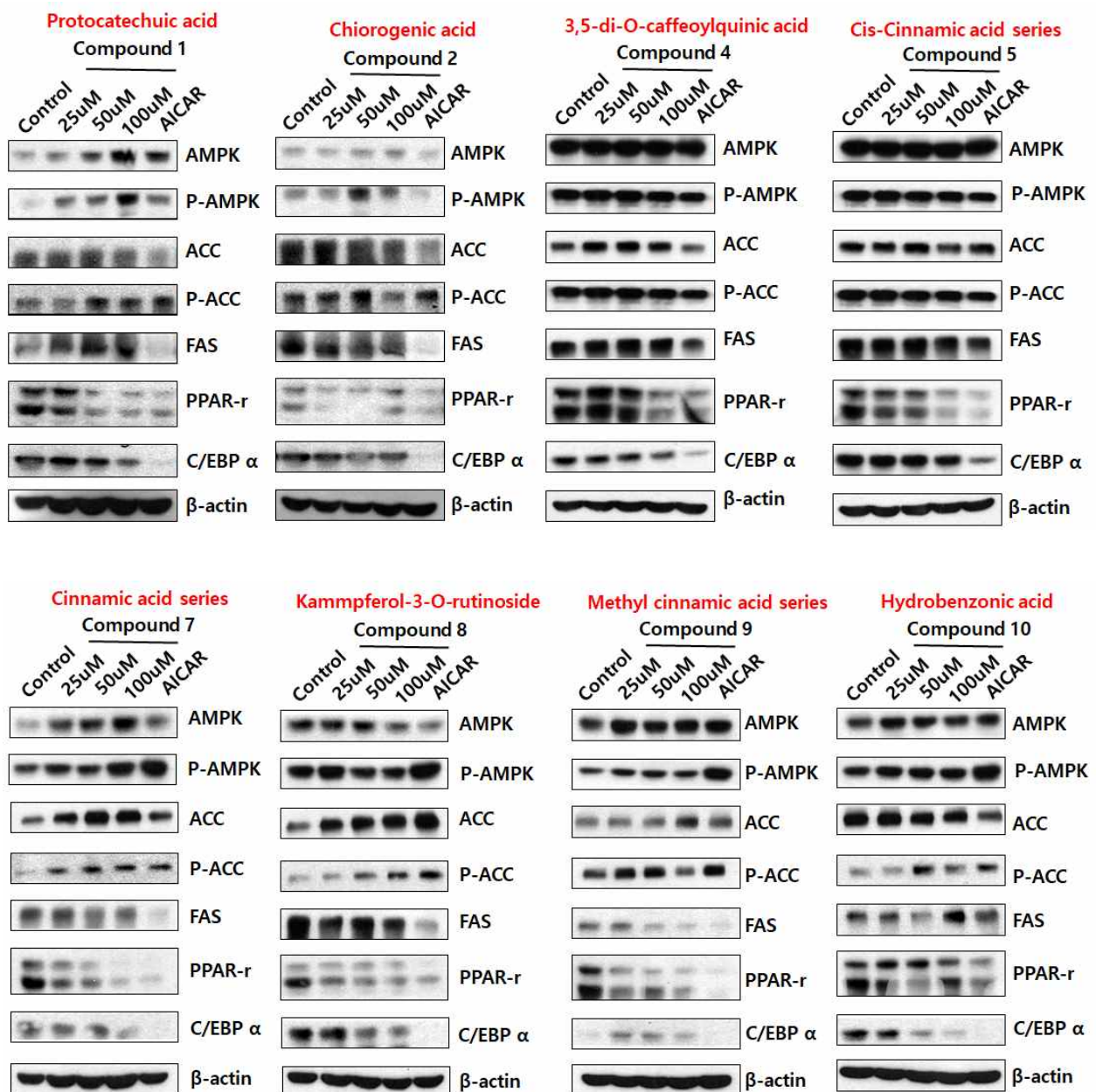


- 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시키는 동안 미역취 추출물과 레몬밤, 녹차 추출물 처리하여 지방세포로의 분화를 억제하는지 관찰하였다.

- 미역취 추출물이 레몬밤, 녹차 추출물에 비해 AMPK의 인산화가 증가되었고, AMPK의 영향으로 ACC의 인산화가 증가되었으며, 지방 분화에 관련된 PPAR- γ 와 FAS, C/EBP- α 의 단백질 수준이 감소됨을 알 수 있었다.

나. 3T3-L1 세포의 지방분화 동안에 미역취로부터 분리한 Compound들을 처리하였을 때, 지방세포 분화억제 효과를 나타내는 Compound의 선별과 지방 분화를 억제하는 분자기전 연구

- 3T3-L1 세포를 이용하여 분화유도 물질 (IBMX, Insulin, Dex)를 처리함과 동시에 미역취 추출물로부터 분리된 Compound들을 같이 처리해 주었다. 지방세포 분화 억제 기전을 확인하기 위해 Western Blotting 기법을 사용하여 단백질의 발현양상을 확인하였다.

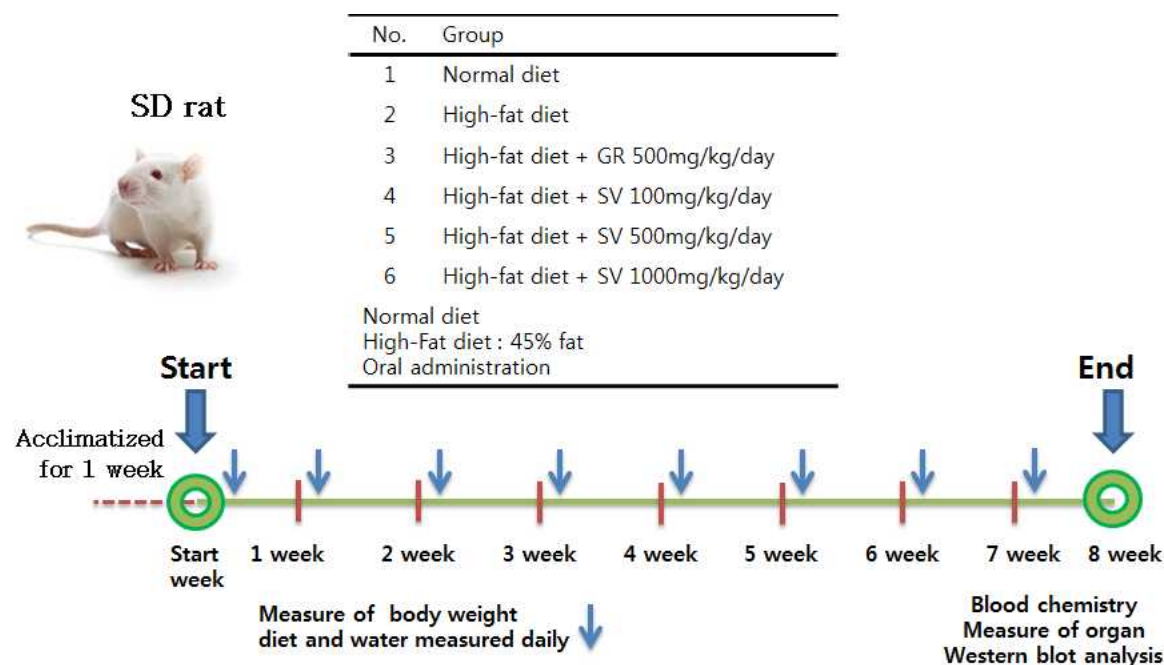


- 미역취로부터 분리한 Compound들을 3T3-L1세포의 지방분화 과정 동안에 처리하여 지방세포분화를 억제하는 Compound를 선별하였다. 지방세포 분화억제 효과를 나타내는 Compound의 경우 AMPK의 활성을 증가시킴을 알 수 있었고, 활성화된 AMPK는 ACC의 인산화를 유도하여 PPAR- γ 와 C/EBP α 의 단백질 양을 감소시키고 FAS의 양도 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

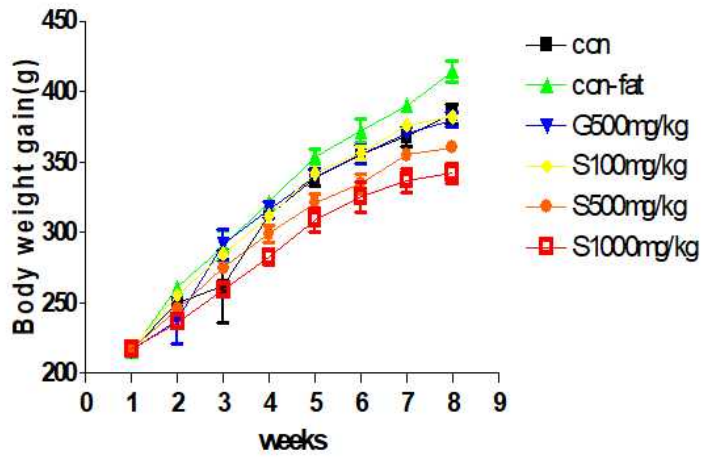
(2) 고지방식이섭취 SD Rat에 미역취추출물 투여에 의한 체지방감소 효능검증 및 기전연구

가. 고지방식이섭취 SD Rat에 미역취추출물 투여에 따른 몸무게 변화

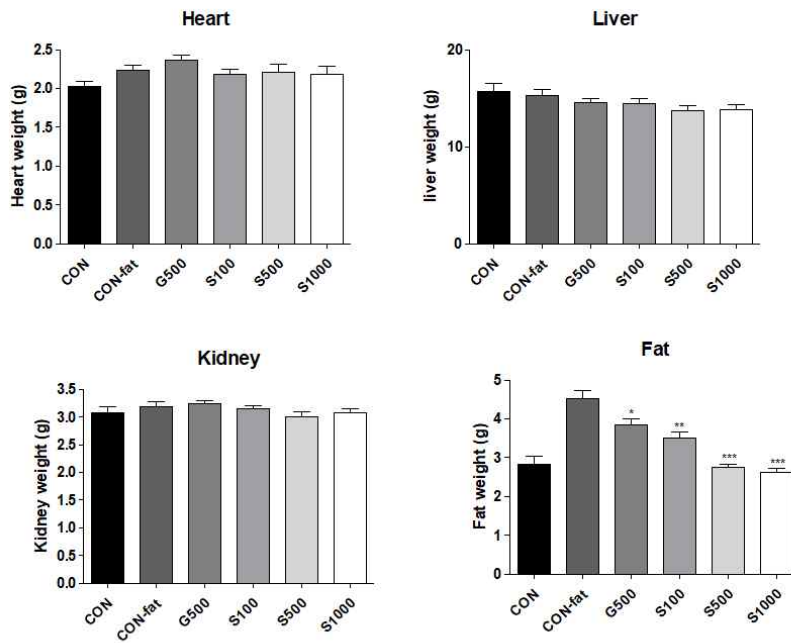
- 6주령의 SD-Rat을 5그룹(12마리), 1그룹(10마리)로 나눈 후, 5그룹은 고지방 사료를 8주간 투여하고, 1그룹은 정상식을 투여하였다. 이와 동시에 각 실험군은 가르시니아 (500mg/kg)와 미역취추출물을 농도별(100, 500, 1000mg/kg)로 존데를 이용하여 매일 오후 2시 같은 시간에 위내 투여하였다.



(A)



(B)

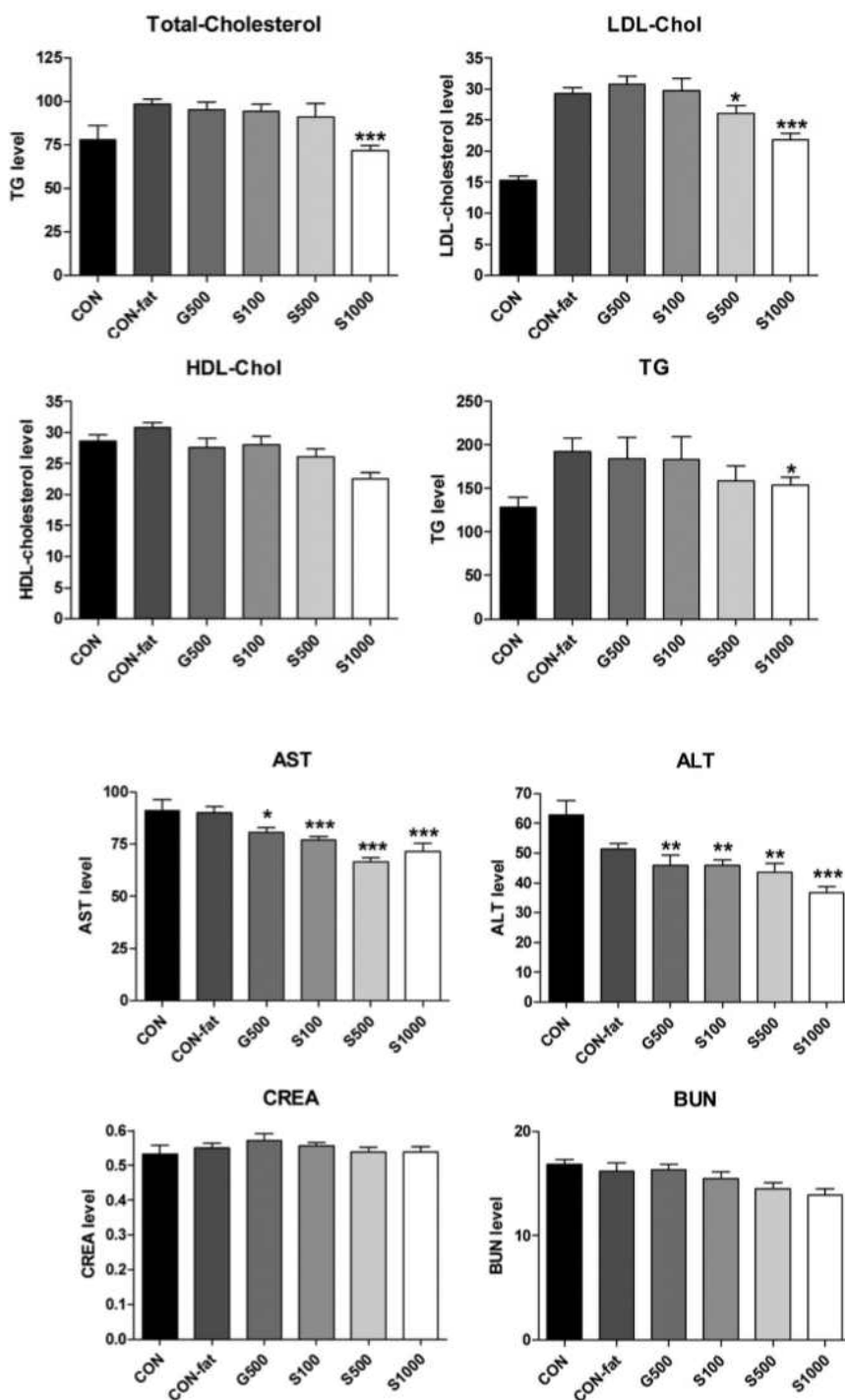


(G: 가르시니아, S: *Solidago virga-aurea* extract)

- 8주 동안의 몸무게와 지방 무게의 변화량이 대조군으로 사용한 가르시니아 보다 미역 취추출물을 투여하였을 때 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

나. 고지방 식이 섭취 SD Rat에 미역취추출물 투여에 따른 혈액생화학 분석

- 8주간 고지방 사료를 섭취한 SD Rat을 개복하고 복대 정맥에서 혈액을 채취한 후 혈청을 얻었다. 획득한 혈청을 이용하여 Cholestrol, LDL, HDL, TG, AST, ALT 측정키트를 이용하여 측정하였다.

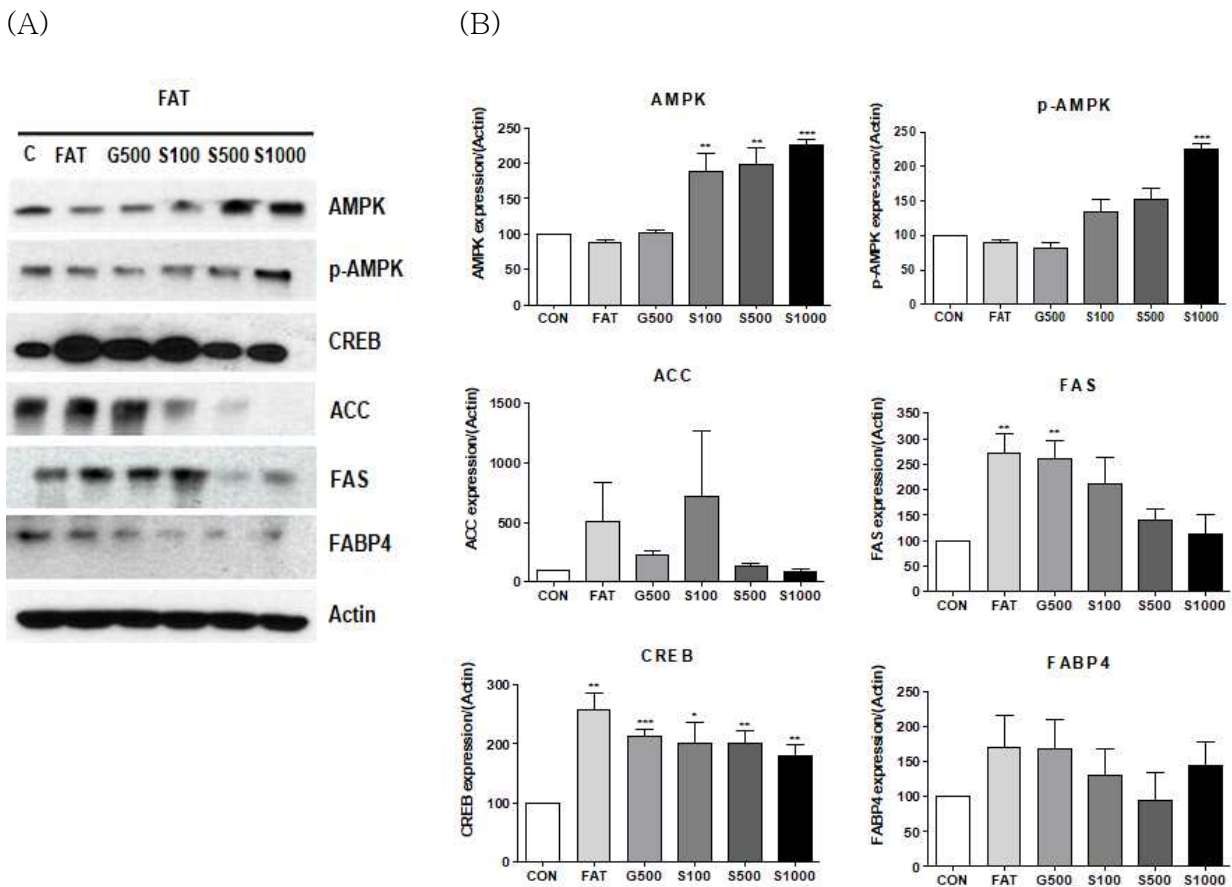


(G;가르시니아, S; Solidago virga-aurea extract)

- 정상식이를 섭취시킨 그룹에 비해 고지방 식이를 섭취시킨 SD-Rat의 경우 Cholesterol 수치와 TG값이 증가한 것을 확인하였다.
- 간 독성 수치인 ALT와 AST의 수치가 높게 나타나지 않아 미역취 추출물에 의한 독성은 보이지 않았음. 미역취 추출물을 투여하였을 때, 고지방 사료만 먹인 그룹에 비해 TG값이 유의성 있게 떨어지는 것을 볼 수 있었다.

다. 고지방 식이를 섭취시킨 SD Rat에서 미역취 추출물을 투여하였을 때 지방분 화에 관여하는 단백질들 발현양상 분석

- 8주간 고지방 식이를 섭취한 SD Rat을 개복하여 부고환지방을 채취하여 단백질을 얻고, 지방세포 분화 억제 기전을 확인하기 위해 Western Blotting 기법을 사용하여 단백질의 발 양상을 확인하였다.



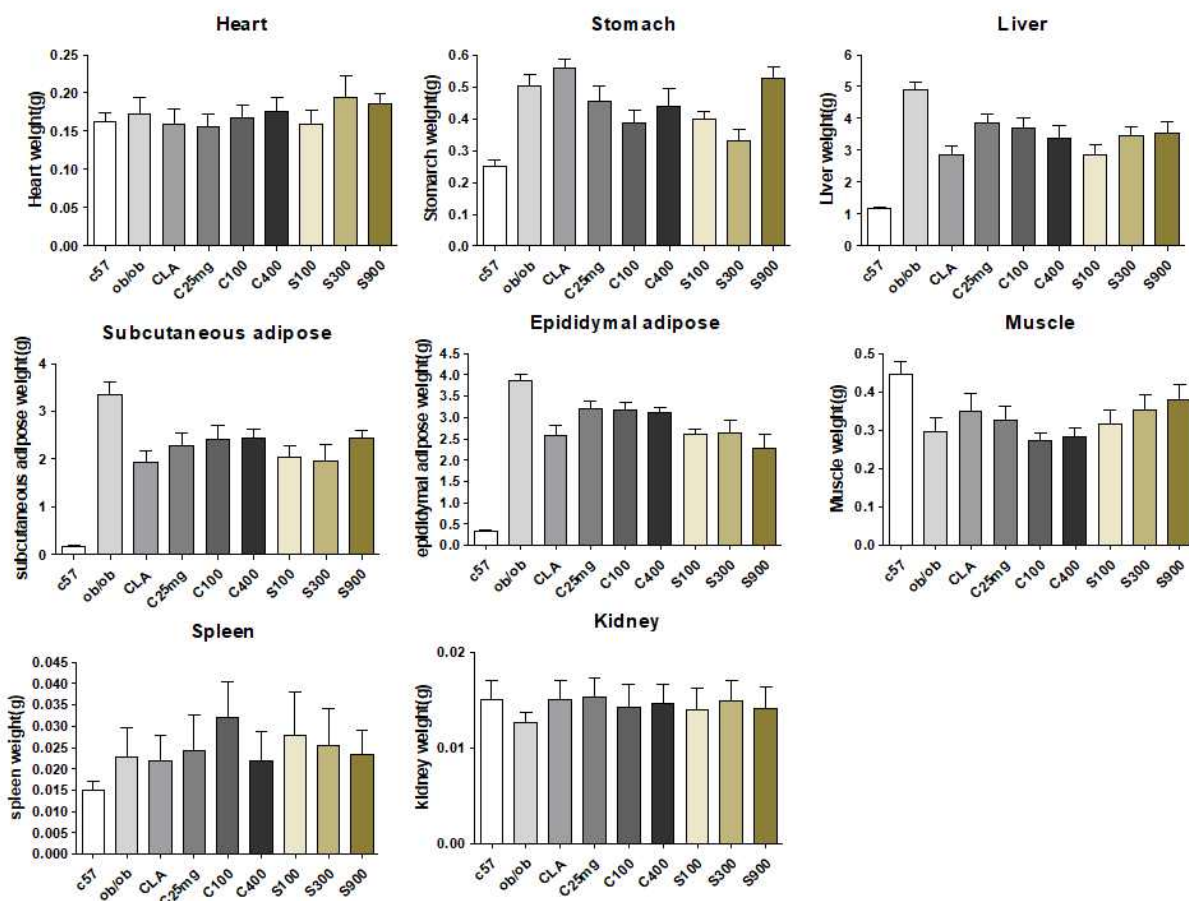
(G;가르시니아, S; Solidago virga-aurea extract)

- 고지방 식이를 섭취한 SD Rat의 지방조직에서 지방 분화와 관련이 되어있는 ACC, FAS, FABP4, CREB의 단백질의 발현이 증가되어있음을 관찰하였다.
- 미역취 추출물을 농도별로 고지방 사료를 섭취시킨 SD Rat에 투여하였을 때, AMPK의 활성이 증가된 것을 확인하였고, 그로 인해 ACC의 활성이 감소하며 일련의 지방 분화에 관여하는 단백질들의 발현양상이 감소하는 것을 확인하였다.

(3) ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)를 사용한 미역취추출물의 체지방감소 효능검증 및 기전연구

가. ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에 미역취 추출물을 투여하였을 때 장기무게의 변화

- 6주령의 ob/ob 마우스를 8그룹(10마리), C57BL/6 정상마우스 1그룹(10마리)로 나누었다. 각 실험군은 CLA(500mg/kg), 미역취로부터 분리된 Compound7 농도별(25, 100mg) 그리고 미역취추출물 농도별(100, 300, 900mg/kg)로 존대를 이용하여 매일 오후2시 같은 시간에 위내 투여하였다.



(C; Compound 7(cinnamic acid series), S; Solidago virga-aurea extract)

- ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에 매일 오후2시 같은 시간에 미역취 추출물과 미역취로부터 분리된 compound7, 양성대조군으로 사용한 CLA를 12주 동안 투여하여 지방 감소효과를 확인하였다.

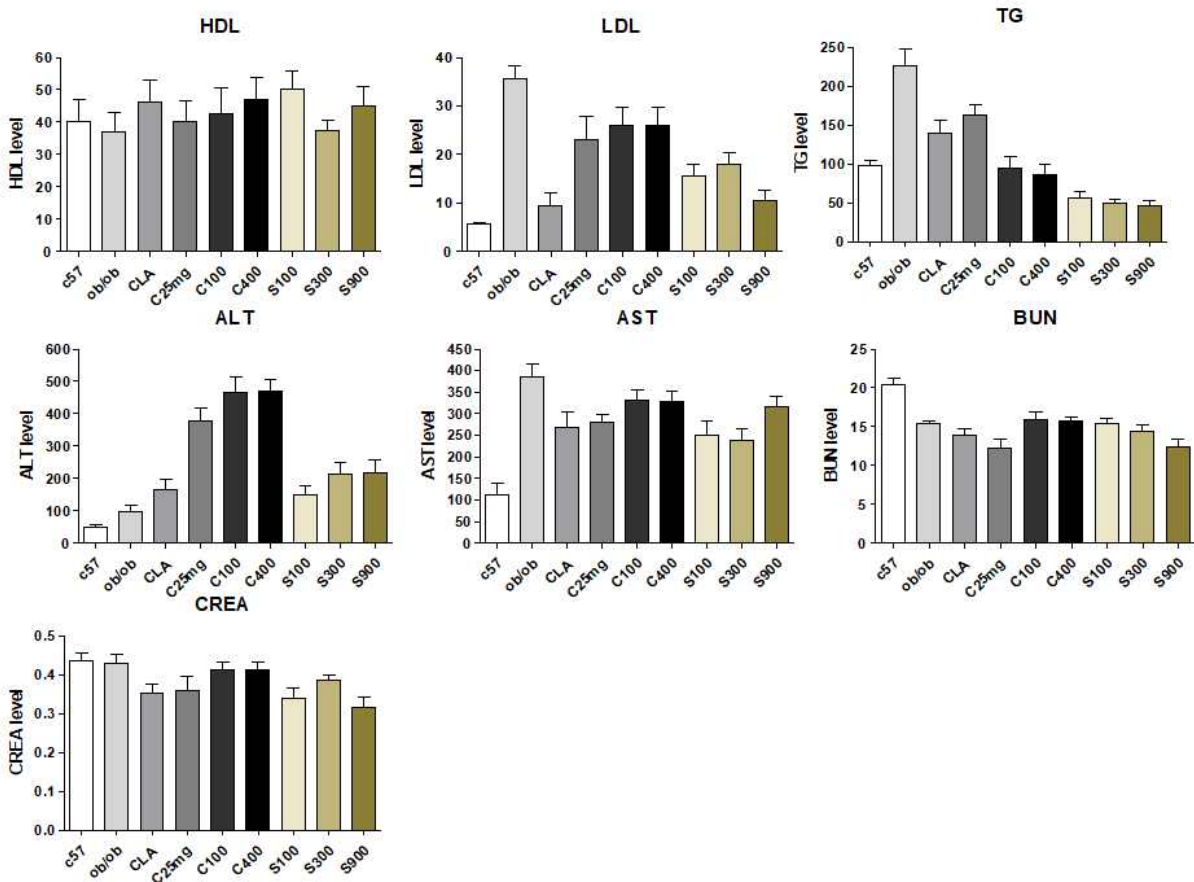
- 정상군 C57에 비해 ob/ob 마우스에서 지방의 축적과 장기의 무게가 증가한 것을 확인

할 수 있었다.

- 미역취 추출물과 Compound7을 투여한 그룹에서 양성대조군 CLA를 투여한 그룹과 동일하게 지방(부고환 및 복부 지방)의 무게가 감소하였으며, 장기의 무게가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

나. ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에 미역취추출물 및 compound7의 투여에 따른 혈액생화학 분석

- 12주간 실험을 진행한 ob/ob마우스와 C57BL/6마우스를 개복하고 복대 정맥에서 혈액을 채취한 후 혈청을 얻었다. 획득한 혈청을 이용하여 Cholesterol, LDL, HDL, TG, AST, ALT 측정키트를 이용하여 측정하였다.



(C; Compound 7(cinnamic acid series), S; Solidago virga-aurea extract)

- 정상군 C57마우스 그룹에 비해 ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)의 경우 Cholesterol 수치와 TG값이 증가한 것을 확인하였다. Compound7의 경우 간 독성 수치인 ALT와 AST의 수치가 높게 나타나 독성이 있는 것으로 사료되며, TG값이 감소됨을 관찰하였다.

- 미역취추출물의 경우 ALT, AST 수치가 높지 않아 Compound7에 비해 독성은 보이지

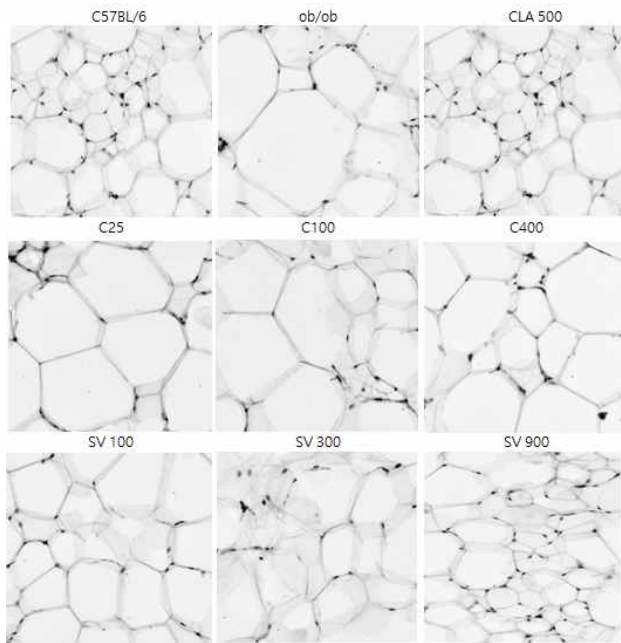
않았다.

- 미역취 추출물을 투여하였을 때, ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에 비해 TG값이 유의성 있게 떨어지는 것을 보아 미역취 추출물이 지방분화 억제효능이 있는 것으로 확인되었다.

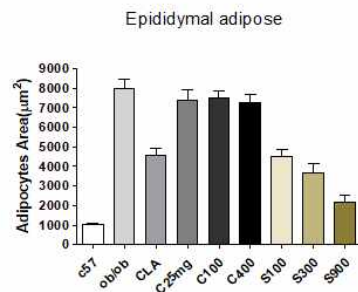
다. ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에 미역취추출물 및 compound7 투여에 따른 지방사이즈 분석

- 12주간 실험을 진행한 ob/ob마우스와 C57BL/6마우스의 복부지방과 부고환 지방을 채취하여 파라포름알데하이드에 고정시키고 파라핀으로 블록을 제작하여, 파라핀 색션을 통해 재료를 얻었다. 이후 H&E 염색을 통해 복부지방과 부고환지방의 크기를 현미경을 통해 확인하여 그래프를 제작하였다.

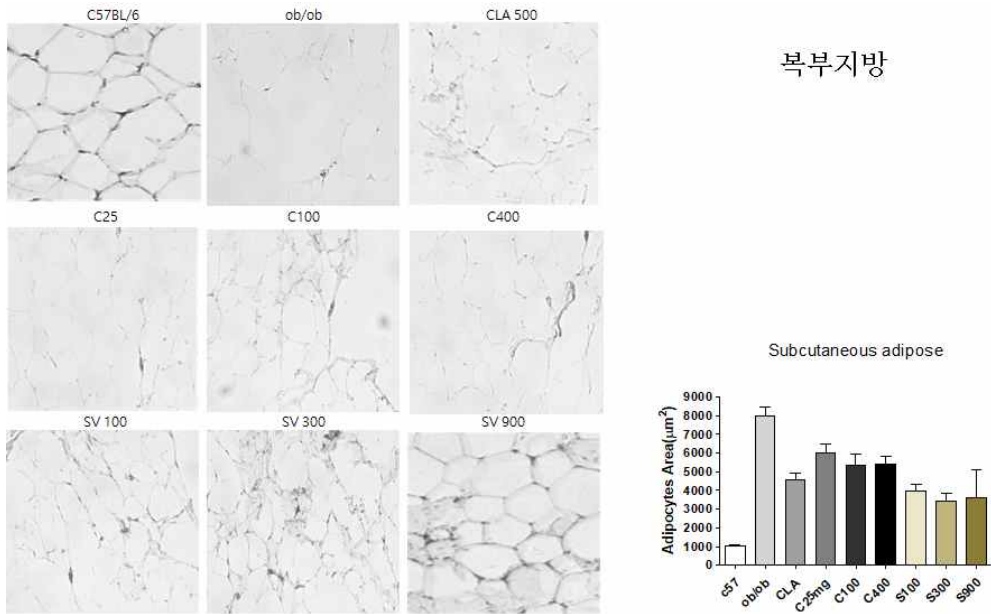
(A)



부고환지방

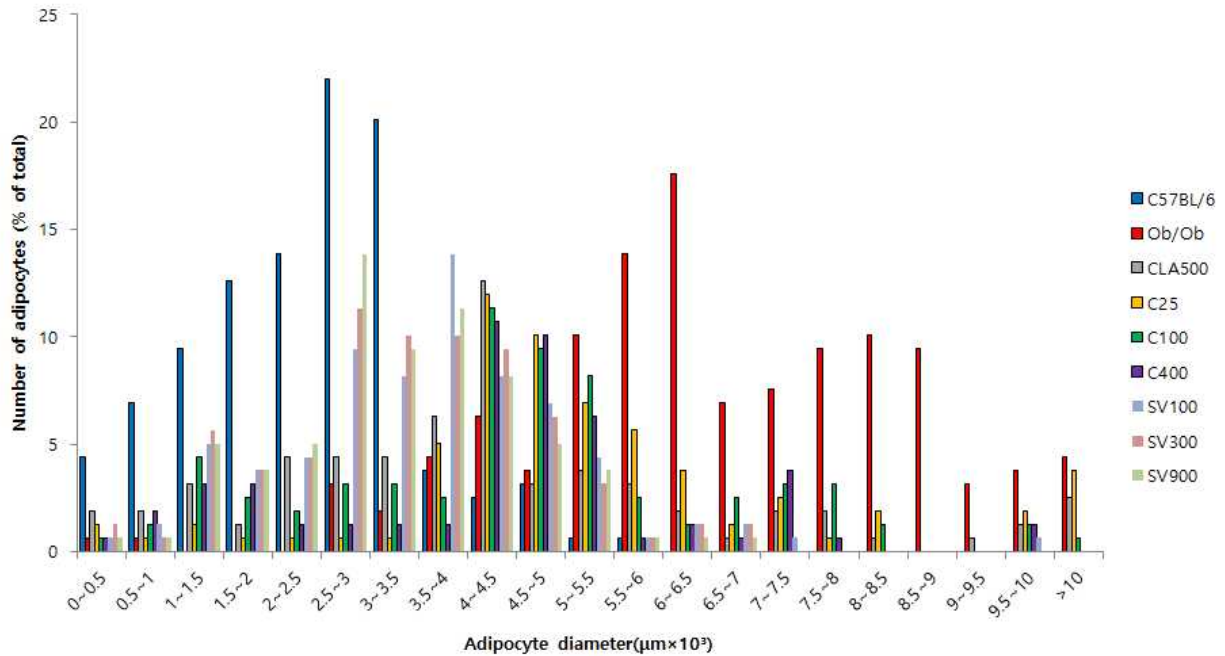


(B)



(C; Compound 7(cinnamic acid series), S; Solidago virga-aurea extract)

(C)



(C; Compound 7(cinnamic acid series), S; Solidago virga-aurea extract)

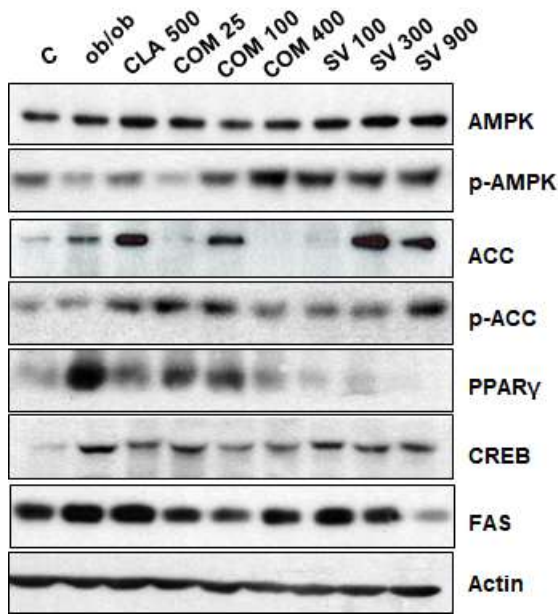
- 정상군 C57 마우스에 비해 ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에서 지방의 사이즈가 증가되어있는 것을 확인할 수 있었다.
- ob/ob 마우스에서 미역취 추출물과 Compound를 농도별로 투여하였을 때, 양성 대조군

CLA를 투여한 그룹과 비슷한 정도로 지방의 사이즈가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다.

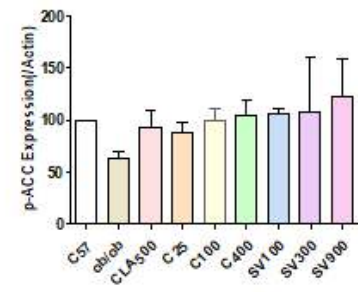
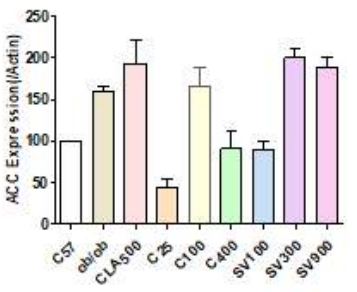
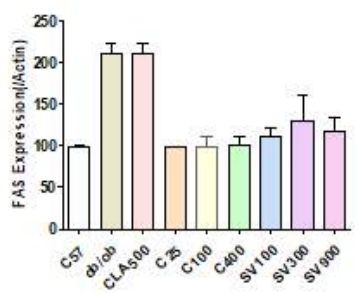
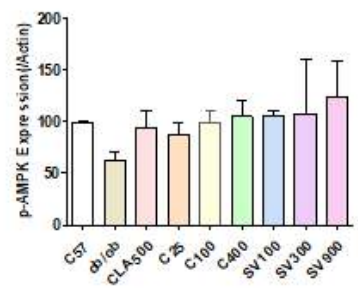
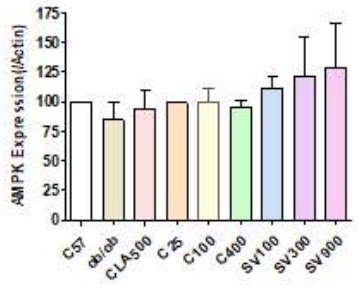
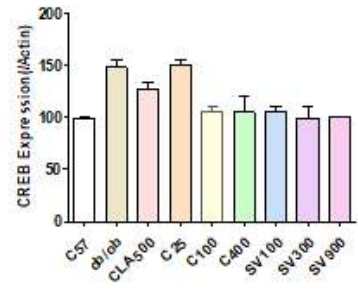
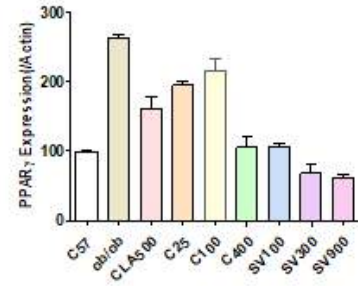
라. ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)에서 미역취 추출물과 Compound를 투여하였을 때 지방 분화에 관여하는 단백질들 발현양상 분석

- 12주간 실험을 진행한 ob/ob 마우스와 C57BL/6마우스의 부고환지방을 채취하여 단백질을 얻고, 지방세포 분화 억제 기전을 확인하기 위해 Western Blotting 기법을 사용하여 단백질의 발 양상을 확인하였다.

(A)



(B)



(C; Compound 7(cinnamic acid series), S; Solidago virga-aurea extract)

- ob/ob 마우스(렙틴수용체 유전자결손)의 지방조직에서 지방 분화와 관련이 되어있는 ACC, FAS, PPAR- γ , CREB의 단백질의 발현이 증가되어있음을 관찰하였다.
- 미역취 추출물을 농도별로 ob/ob 마우스에 투여하였을 때, AMPK의 활성이 증가된 것을 확인하였고, 그로 인해 ACC의 활성이 감소하며 ACC의 타겟 단백질인 PPAR- γ 의 발현양이 감소하고 FAS를 비롯한 지방 분화에 관여하는 단백질들의 발현양상이 감소하는 것을 확인하였다.

3. 체지방감소에 도움을 주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구

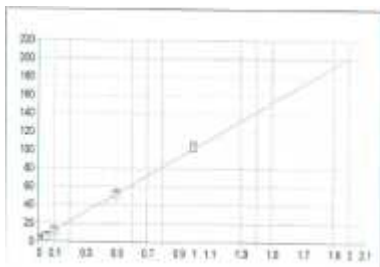
(1) 원재료 안전성 검사 및 대량생산 최적화

가. 원재료(울릉미역취) 중 유해물질(중금속)의 「식품의 기준 및 규격」 적합성 검토

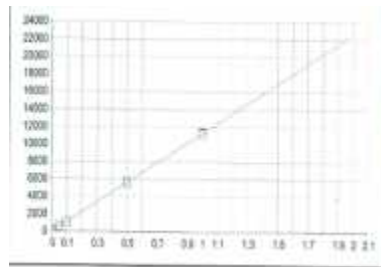
- 관련규정 : 「식품의 기준 및 규격」 제2. 5. 식품일반의 기준 및 규격 5) 중금속 기준
 - 농산물의 중금속 기준(울릉미역취는 엽채류에 해당함.)

대상 식품	납(mg/kg)	카드뮴(mg/kg)
곡류	0.2 이하	0.1 이하(밀, 쌀은 0.2 이하)
서류	0.1 이하	0.1 이하
콩류	0.2 이하	0.1 이하(대두는 0.2 이하)
과일류	0.1 이하	0.05 이하
엽채류	0.3 이하	0.2 이하
엽경채류	0.1 이하	0.05 이하
근채류	0.1 이하	0.1 이하
과채류	0.1 이하	0.05 이하
버섯류	0.3 이하	0.3 이하
참깨	0.3 이하	0.2 이하

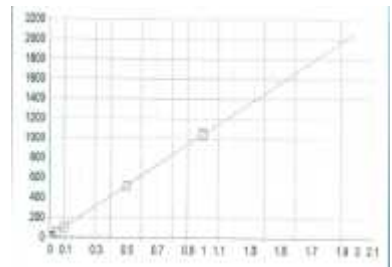
- 시험항목 : 총 수은, 총 비소, 납, 카드뮴
- 시험방법
 - 원 재 료 : 울릉미역취(건조물)
 - 시험기관(공인지위) : (재)금산국제인삼약초연구소(농산물안전성시험기관)
 - 분 석 법
 - 납, 카드뮴, 비소 : 「식품의 기준 및 규격」 제9. 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1 중금속 시험에 의거, 원재료(울릉미역취)를 마이크로웨이브법으로 시료를 조제하고 유도결합플라즈마법(ICP)으로 측정
 - 수은 : 「식품의 기준 및 규격」 제9. 7. 7.1.2.4 금속별 시험(수은)에 의거, 금아말감법으로 측정
- 검량곡선



비소



카드뮴



납

○ 시험결과(울릉미역취 건조물 기준)

중금속	함유량(mg/kg)	중금속	함유량(mg/kg)
납(Pb)	0.41±0.01	총 비소(As)	불검출
카드뮴(Cd)	0.61±0.01	총 수은(Ag)	0.01±0.01

○ 울릉미역취(생물) 중 중금속 함유량 산출

검 사 항 목	울릉미역취		기 준 (생물기준)	비 고
	건조(시험)	생물(산출)*		
납(mg/kg)	0.41±0.01	0.05	0.3 이하	
카드뮴(mg/kg)	0.61±0.01	0.07	0.2 이하	
총 비소(mg/kg)	불검출	-	-	
총 수은(mg/kg)	0.01±0.01	0.001	-	정량한계

- 산출방법(근거 : 2014년 자주하는 질문(FAQ)집[식품] ‘건조 김’)

$$\begin{aligned}
 \text{생물 중 중금속}(mg/kg) &= \frac{100 - \text{생물 중 수분함량}}{100 - \text{건조물 중 수분함량}} \times \text{건조물 중 중금속}(mg/kg) \\
 &= \frac{100 - 89.3}{100 - 11.7} \times 0.41 \pm 0.01 mg/kg \\
 &= 0.005 \pm 0.01 mg/kg
 \end{aligned}$$

○ 결과검토

- 울릉미역취에 함유된 중금속(납, 카드뮴)은 「식품의 기준 및 규격」 농산물의 중금속 기준 이하
- 건조물 중 총 수은 함량은 0.01 mg/kg이나 생물 중 함량(산출)은 0.001 mg/kg으로 검출한계
- 「식품의 기준 및 규격」 농산물의 중금속 기준에는 납, 카드뮴의 기준만 설정되었음. 울릉미역취(생물) 중 납, 카드뮴의 함량은 기준 이하이고 총 수은의 함량은 정량한계이며 총 비소는 불검출 되었음.
- 따라서, 울릉미역취(건조)의 유해물질(중금속) 함량은 「식품의 기준 및 규격」에 적합함.

나. 원재료(울릉미역취) 중 유해물질(잔류농약)의 「식품의 기준 및 규격」 적합성 검토

○ 관련규정

- 「식품의 기준 및 규격」에는 취나물의 농약 잔류허용기준만 있고 미역취 또는 울릉미역취의 농약 잔류허용기준은 없음.
- 취나물의 농약 잔류허용기준

농약명	허용기준 (mg/kg)	농약명	허용기준 (mg/kg)
(4) 나프로파마이드	0.10	(228) 아족시스트로빈	3.00
(26) 디페노코나졸	5.00	(230) 크레속심메틸	30.00
(31) 마이클로부타닐	2.00	(237) 피메트로진	1.00
(61) 비펜트린	3.00	(248) 아바멕틴	0.70
(66) 사이퍼메트린	5.00	(249) 에마멕틴 벤조에이트	0.20
(101) 이미다클로프리드	3.00	(290) 인독사카브	10.00
(110) 카두사포스	0.20	(337) 티아메톡삼	10.00
(141) 트리아디메놀	3.00	(349) 노발루론	5.00
(158) 페나리몰	1.00	(361) 테플루트린	0.05
(164) 펜발러레이트	3.00	(380) 피리달릴	5.00
(165) 펜뷰코나졸	3.00	(408) 스피네토람	3.00
(200) 헥사코나졸	1.00	(416) 클로란트라닐리프롤	7.00
(206) 클로르페나피르	3.00	(417) 플루벤디아마이드	20.00

- 「식품의 기준 및 규격」 제2. 5. 식품일반의 기준 및 규격 10) 농약의 잔류허용기준
 - 울릉미역취에 잔류한 농약에 대하여 「식품의 기준 및 규격」에 별도로 잔류허용기준이 정해지지 않았고 CODEX 기준도 없음
 - 따라서, [별표 4] 농산물의 농약 잔류허용기준의 그 농약 기준 중 당해농산물과 제 1. 3. 1) 식물성 원료의 분류에서 정한 대분류군(단, 견과종실류, 과실류 및 채소류에 한해서는 소분류를 우선 적용)에 속한 농산물의 최저기준을 우선 적용하고 [별표 4] 농산물의 농약 잔류허용기준의 그 농약 기준 중 최저기준을 적용함

○ 시험항목 : 엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT 등 245종

○ 시험방법

- 원 재 료 : 울릉미역취(건조물)
- 시험기관(공인지위) : (재)금산국제인삼약초연구소(농산물안전성시험기관)
- 분 석 법 : 농산물 등의 유해물질 분석법/II. 농산물 등의 유해물질 분석법/1. 잔류농약/1.1. GC 및 LC를 이용한 다성분 동시분석법(식품의약품안전처 고시 제 2013-138호)

○ 시험결과(울릉미역취 건조물 기준)

- 불검출 농약 : 엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT 등 244종
- 검출 농약 : 트리아디메폰(0.67 ± 0.02 mg/kg) 검출

○ 울릉미역취(생물) 중 트리아디메폰의 잔류량 : 0.08 ± 0.02 mg/kg

- 산출방법(근거 : 2014년 자주하는 질문(FAQ)집[식품] '건조 김')

$$\begin{aligned} \text{생물 중 잔류농약}(mg/kg) &= \frac{100 - \text{생물 중 수분함량}}{100 - \text{건조물 중 수분함량}} \times \text{건조물 중 잔류농약}(mg/kg) \\ &= \frac{100 - 89.3}{100 - 11.7} \times 0.67 \pm 0.02 \text{ mg/kg} \\ &= 0.081 \pm 0.02 \text{ mg/kg} \end{aligned}$$

○ 결과검토

- 「식품의 기준 및 규격」 [별표 4] 농산물의 농약 잔류허용기준(취나물)에 트리아디메폰의 잔류허용기준이 없으므로 「식품의 기준 및 규격」 [별표 4] 농산물의 농약 잔류허용기준(트리아디메폰)의 잔류허용기준 적용

농산물	허용기준 (mg/kg)	농산물	허용기준 (mg/kg)	농산물	허용기준 (mg/kg)
가지	0.2	사과	0.5	파	0.1
구기자	0.2	수박	0.2	파인애플	3.0
멜론	0.2	양파	0.1	포도	1.0
밀	0.1	오이	0.2	피망	0.5
배	0.5	완두콩	0.1	호박	0.2
보리	0.5	토마토	0.5	구기자(건조)	0.5

- 울릉미역취(생물) 중 트리아디메폰의 잔류량은 0.08 mg/kg으로 「식품의 기준 및 규격」의 잔류허용기준 최소량(0.1 mg/kg) 보다 적음. 따라서 「식품의 기준 및 규격」에 적합함.

다. 미역취농축액 GMP 제조공정 확립 및 제조신고

- 제품명 : 미역취농축액(60~70°Brix)
- 식품의 유형 : 농축액
- 원재료 또는 성분명 : 건조 미역취 복합체
- 제조방법
 - 원료구입 : 기준 및 규격에 적합한 건조 미역취를 구입한다.
 - 원료준비 : 건조 과정에서 출입될 수 있는 이물질을 제거한다.
 - 추출 : 미역취를 추출기에 투입한 후, 미역취 중량 대비 10배수의 10%발효주정을 가하여 70℃에서 7시간 이상 1~2회 추출한 후 여과하여 미역취추출액으로 한다.
 - 농축 : 미역취추출액을 농축기에 투입해 60~70°Brix 까지 농축하여 미역취농축액으로 한다.
 - 살균 : 미역취농축액을 95±5℃에서 30분 이상 살균한다.
 - 포장 : 미역취농축액을 일정량씩 충전 후 밀봉한다.
 - 출하 : 기준 및 규격에 따라 시험하여 적합여부를 확인한 후 포장하여 출하한다.
- 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취, 이물이 없어야 한다.
- 용도 및 용법
 - 제품 : 1~2g을 물 (200~300ml)로 희석하여 음용한다.
 - 원료 : 최종 제품 성분에 적합하게 배합한다.
- 포장단위 : 50g, 240g, 1kg, 20kg
- 포장재질 : 유리병 또는 폴리프로필렌
- 유통기한 : 제조일로부터 24개월까지
(직사광선을 받지 않는 서늘한 곳<실온>에서 보관 유통)
- 성 과
 - 식품(식품첨가물) 품목제조보고서 2건
 - 식품의 유형 : 액상차(미역취, 미역취농축액)

라. 울릉미역취농축액분말의 제조(GMP시설)

- 원재료(학명) : 울릉미역취(*Solidago virgaurea* subsp. *gigantea*)
 - 이용부위 : 순(잎)
 - 원 산 지 : 경상북도 울릉군 일대(재배)
- 제조공정표

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	지표(기능)성분 함량변화(mg/g)	수율 (kg)
원재료	울릉미역취	3.13	80
↓			
추출	10% 주정물혼합용매(1,000 kg) 70℃, 7시간, 2회	0.16	1,600
↓			
여과	연속식원심분리기		
↓			
농축	70℃, 20°Brix	3.58	70
↓			
건조	동결건조기		
↓			
분쇄	미분쇄기		
↓			
원료	울릉미역취농축액분말	14.51	17.25

○ 울릉미역취농축분말의 영양성분

시험항목 (기준량 : 100 g)	LOT 1		LOT 2		LOT 3	
	결과	%*	결과	%*	결과	%*
열량(kcal)	237.66	-	246.94	-	241.43	-
탄수화물(g)	59.28	17.96	61.60	18.67	60.22	18.25
당류(g)	6.77	-	6.46	-	7.17	-
단백질(g)	13.42	24.39	13.33	24.24	13.33	24.24
지방(g)	0.15	0.29	0.14	0.28	0.14	0.28
포화지방(g)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
트랜스지방(g)	0.00	-	0.00	-	0.00	-
콜레스테롤(g)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
나트륨(mg)	728.47	36.42	752.53	37.63	757.50	37.88

마. 울릉미역취농축분말의 대장균군

- 관련규정 : 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제14조 6항 가목
 - [별표 2] 유해물질규격설정항목(대장균군) : 음성
 - 대장균군 : Gram음성, 무아포성 간균으로서 유당을 분해하여 가스를 발생하는 모든 호기성 또는 통성 혐기성세균
- 시 료 : 울릉미역취농축액(LOT 1, LOT 2)
- 시험방법 : 「식품의 기준 및 규격」 제 9. 3.7.1 대장균군 정성시험
- 시험결과 : 음성(불검출)



울릉미역취농축액(LOT 1)



울릉미역취농축액(LOT 2)

바. 울릉미역취농축분말의 유해물질

- 시험항목 : 중금속(4종), 잔류농약(56종)
 - 중금속 : 납, 카드뮴, 총 비소, 총 수은
 - 잔류농약 : 엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT 등 56종
- 시험결과
 - 중금속

단위 : mg/kg

검사항목	LOT 1	LOT 2	LOT 3	비고
납	불검출	불검출	불검출	
카드뮴	0.26	0.26	0.26	
총 비소	0.00	0.00	0.00	
총 수은	불검출	불검출	불검출	

- 잔류농약

단위 : mg/kg

검사항목	LOT 1	LOT 2	LOT 3	비고
티아메톡삼	1.71	1.52	1.61	평균 1.6
트리아디메폰	2.39	0.26	1.94	평균 1.5

사. 기능(지표)성분 밸리데이션 및 대량추출 미역취분말 함량분석

○ 지표성분 : 클로로겐산(Chlorogenic acid)

일반명	Chlorogenic acid	구조식
성상	백색분말	
CAS No.	327-97-9	
분자식	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	
분자량	354.31	
녹는점	210℃	
순도	≥95%	
제조사	Sigma Co.	

○ 시험법 : 「독일공업협회」 커피 및 커피제품의 클로로겐산(DIN 10767)

- 분석장비 : HPLC
- 컬럼 : Fortis H2o(4.6 × 150mm, 5μm)
- 표준용액 : 표준물질 100 mg/L을 제조하여 표준원액으로 사용
- 시험용액 : 일정량의 검체를 부피플라스크(50 mL)에 넣고 메탄올·증류수혼합용액(1:1)으로 충분히 진탕하여 용해하고 이 용액 1 mL를 부피플라스크(100 mL)에 넣고 희석하여 시험용액으로 사용
- 기기분석 조건

항목	조건
이동상 용매	A 용매 : 아세토니트릴 B 용매 : 1% 인산 수용액
유속	1.0 mL/min
이동상	0 분 - 10% A, 20 분 - 20% A, 25 분 - 30% A, 35 분 - 40% A, 40 분 - 40% A, 41 분 - 25% A, 45 분 - 10% A, 50 분 - 10% A.
주입량	10 uL
컬럼온도	25℃
검출기	324 nm

○ 표준용액 농도에 따른 지표성분 면적값

단위 : mV-s

	1.00 mg/L	3.00 mg/L	5.00 mg/L	10.00 mg/L	12.50 mg/L
1회	28.46	85.16	140.25	289.46	357.67
2회	28.96	89.79	149.55	305.26	376.22
3회	28.89	92.96	152.82	312.88	377.38
평균 Mean±SD	28.77±0.27	89.30±3.92	147.54±6.52	302.53±11.94	370.42±11.06

○ 시험 날짜에 따른 지표성분 면적값

단위 : mV-s

	1.00 mg/L	3.00 mg/L	5.00 mg/L	10.00 mg/L	12.50 mg/L
2016. 1. 11	28.77	89.30	147.54	302.53	370.42
2016. 1. 13	29.67	85.73	144.19	289.33	356.61
2016. 1. 29	29.53	89.57	146.82	295.37	364.79
2016. 2. 3	23.56	79.11	137.40	290.65	360.50

○ Spiking Test

- USP Reference Standard(USP RS) : Chlorogenic acid(No. 1115545)
- 울릉미역취추출물에 일정량의 Reference Standard를 첨가해 시험용액으로 제조하여 사용
- 검량식 : $y = 28.598x + 0.9392$, $R^2 = 0.9999$

단위 : mV-s

	1.00 mg/L	3.00 mg/L	5.00 mg/L	10.00 mg/L	12.50 mg/L
면적	29.67	85.73	144.19	289.33	356.61

- 측정 횟수에 따른 지표성분 면적값

단위 : mV-s

	USP RS	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 1 + USP RS	LOT 2 + USP RS	LOT 3 + USP RS
1회	29.10	48.17	135.29	193.13	122.18	201.78	401.43
2회	29.07	47.21	136.60	190.33	121.74	201.75	395.69
3회	28.41	48.17	135.46	190.68	119.76	200.64	394.57
평균	28.86 ±0.39	47.85 ±0.55	135.78 ±0.71	191.38 ±1.52	121.22 ±1.29	201.77 ±0.65	397.23 ±3.68

- 측정 횟수에 따른 지표성분 함량

단위 : mg/L

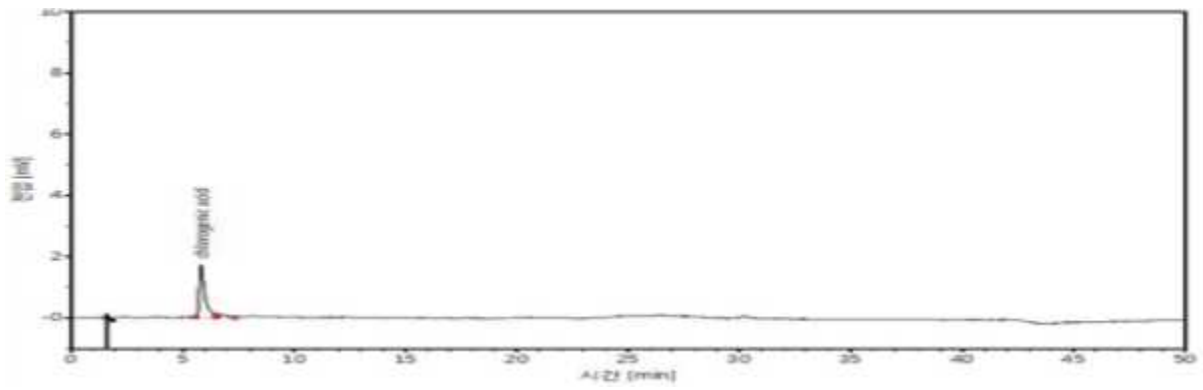
측정값	USP RS	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 1 + USP RS	LOT 2 + USP RS	LOT 3 + USP RS
1회	1.01	1.68	4.71	6.73	4.26	7.03	13.99
2회	1.01	1.65	4.76	6.63	4.24	7.03	13.79
3회	0.99	1.68	4.72	6.64	4.17	6.99	13.75
Mean±SD	1.00 ±0.01	1.67 ±0.02	4.73 ±0.03	6.67 ±0.06	4.22 ±0.05	7.03 ±0.02	13.84 ±0.13

- 결과값

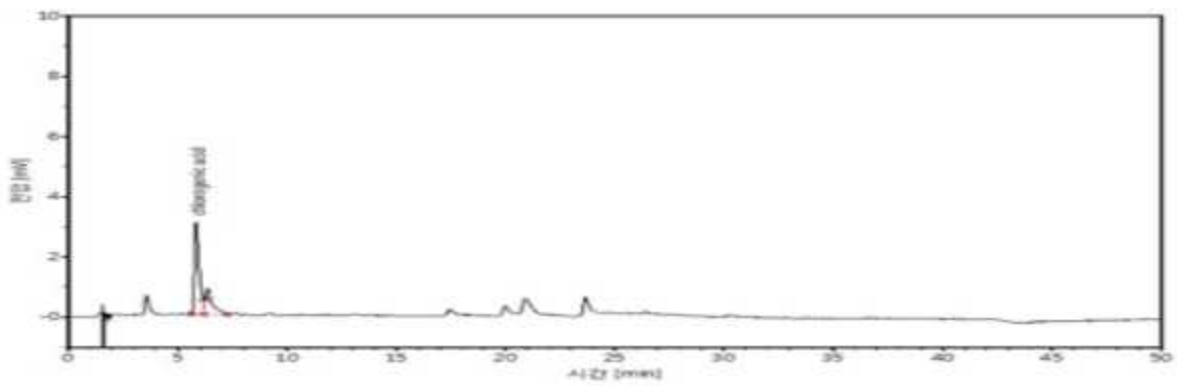
단위 : mg/g

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 1 + RS	LOT 2 + RS	LOT 3 + RS
결과값	15.87	14.98	12.67	19.96	63.60	42.42
계산값	-	-	-	20.87	64.98	46.00

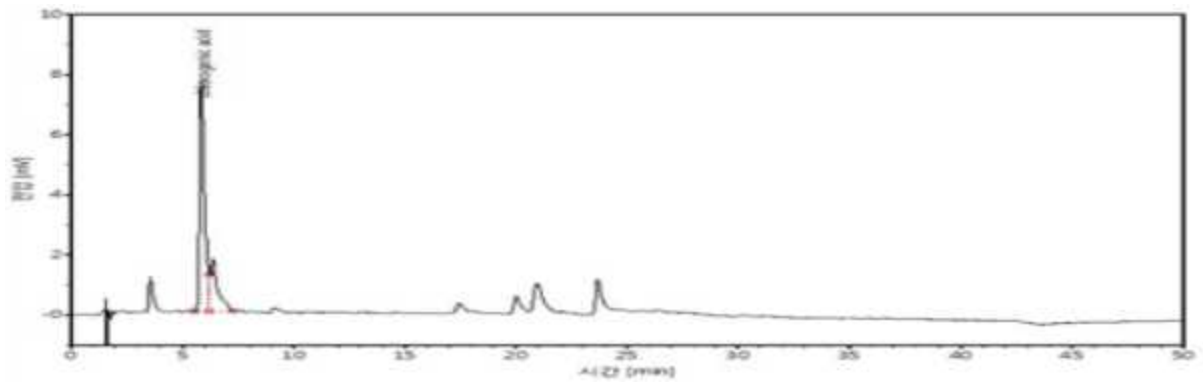
○ 주요 크로마토그램



Chlorogenic acid Reference Standard(1 mg)



울릉미역취농축액분말 LOT 1(100 mg)



LOT 1(200 mg) + USP RS(1 mg)

(2) 임상시험용 시험제품 개발 및 제조

가. 시험식품, 대조식품 제조 및 함량분석

○ 인체적용시험용 식품

- 시험식품 및 대조식품 제조 : (재)전남생물산업진흥원 위탁연구로 진행

	시험식품	대조식품
주 성분	미역취추출물	결정셀룰로오스, 옥수수전분
제 형	캡슐	
중 량	250 mg (미역취추출물 160 mg 함유)	250 mg (미역취추출물 미함유)
보관방법	상온보관 (유통기한 2년)	
섭취방법	1일 3회, 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취	

- 구성성분

(%)

	시험식품	대조식품
미역취추출물	64	0
결정셀룰로오스	17	47.2
옥수수전분	17	47.2
이산화규소	1	1
스테아린산마그네슘	1	1
카라멜색소	0	3.6

○ 시험식품의 기능(지표)성분 시험방법 밸리데이션

- 기능(지표)성분의 3반복에 따른 검량선 면적값

◦ Protocatechuic acid의 면적값

단위 : mV-s

농도	10	20	30	40	50	R ²	검량식
반복횟수							
1회	510.56	1022.73	1518.04	2028.47	2544.30	0.9999	y=50.732x+ 2.854
2회	505.81	1022.98	1529.86	1991.08	2471.43	0.9990	y=48.993x+ 34.43
3회	504.28	1018.58	1522.79	1987.26	2474.70	0.9993	y=49.095x+ 28.666
Mean±SD	506.88 ±3.27	1021.43 ±2.47	1523.56 ±5.95	2002.27 ±22.77	2496.81 ±41.16	0.9994 ±0.00	-

◦ Chlorogenic acid의 면적값

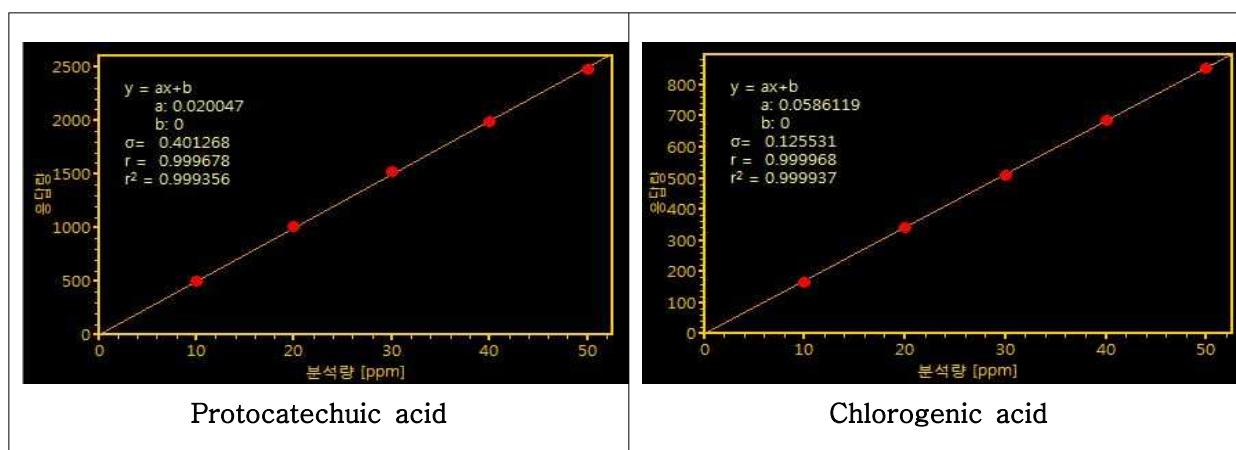
단위 : mV-s

농도	10	20	30	40	50	R ²	검량식
반복횟수							
1회	170.56	343.29	514.13	683.97	859.77	0.9999	y=17.191x-1.3909
2회	167.19	341.11	514.63	685.01	856.66	0.9999	y=17.228x-3.9291
3회	167.41	340.42	511.63	685.00	852.11	0.9999	y=17.14x-2.8805
Mean±SD	168.39 ±1.88	341.61 ±1.50	513.46 ±1.61	684.66± 0.59	856.18± 3.86	0.9999 ±0.00	-

- 기능(지표)성분의 검량선

Protocatechuic acid 검량식 : y=49.095x+ 28.666

Chlorogenic acid 검량식 : y=17.14x-2.8805



기능(지표)성분의 검량선(10.0 ~ 50.0 mg/L)

- Spiking test

◦ 3반복에 따른 면적값

단위 : mV-s

면적 값	Protocatechuic acid			Chlorogenic acid		
	RS	LOT 3	LOT 3 + RS	RS	LOT 3	LOT 3 + RS
1회	951.52	701.44	1640.47	340.87	465.67	809.33
2회	951.89	705.00	1628.86	342.04	463.75	814.15
3회	955.26	700.43	1629.19	341.96	464.73	813.03
Mean ±SD	952.89±2. 06	702.29±2. 40	1632.84±6. 61	341.62±0. 66	464.72±0. 96	812.17±2. 52

◦ 함량측정값

단위 : mg/L

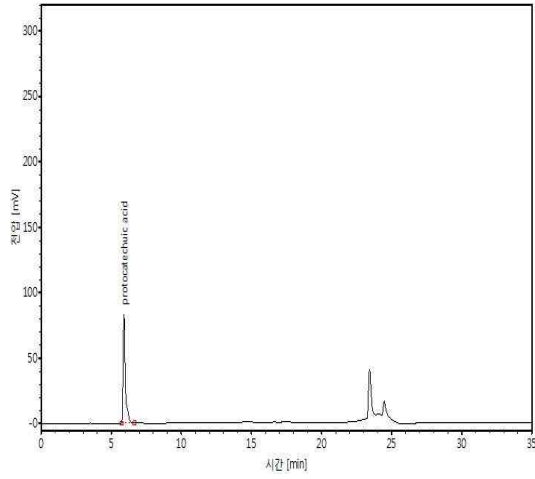
측정값	Protocatechuic acid			Chlorogenic acid		
	RS	LOT 3	LOT 3 + RS	RS	LOT 3	LOT 3 + RS
1회	19.08	14.06	32.89	19.98	27.29	47.44
2회	19.08	14.12	32.65	20.05	27.18	47.72
3회	19.15	14.04	32.66	20.04	27.24	47.65
Mean± SD	19.10±0.04	14.07±0.04	32.73±0.14	20.02±0.04	27.24±0.06	47.60±0.15

◦ 결과치 비교

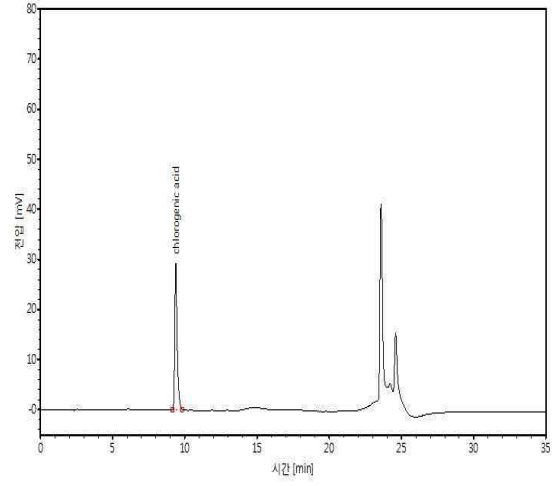
단위 : mg/g

측정값	Protocatechuic acid			Chlorogenic acid		
	RS	LOT 3	LOT 3 + RS	RS	LOT 3	LOT 3 + RS
결과값	1.94	1.33	3.18	9.5	12.94	22.61
계산값	-	-	3.27	-	-	22.44
회수율 (%)	-	-	97	-	-	100

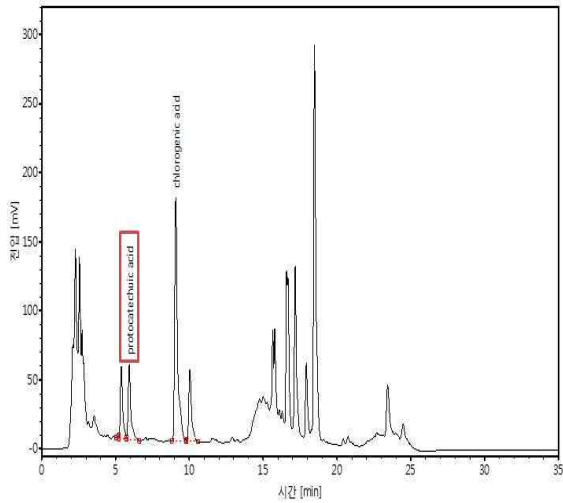
- 주요 크로마토그램



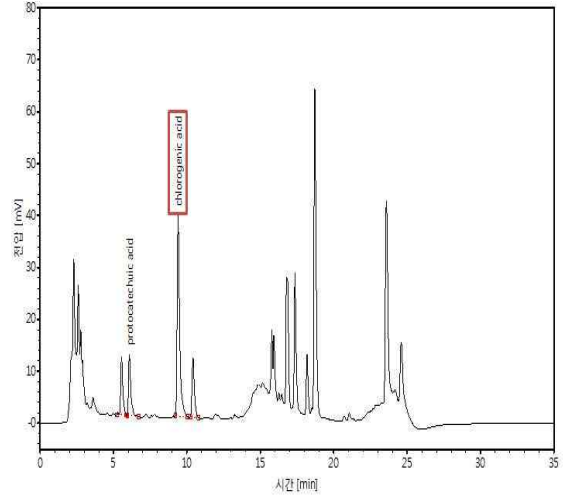
Protocatechuic acid(1 mg)



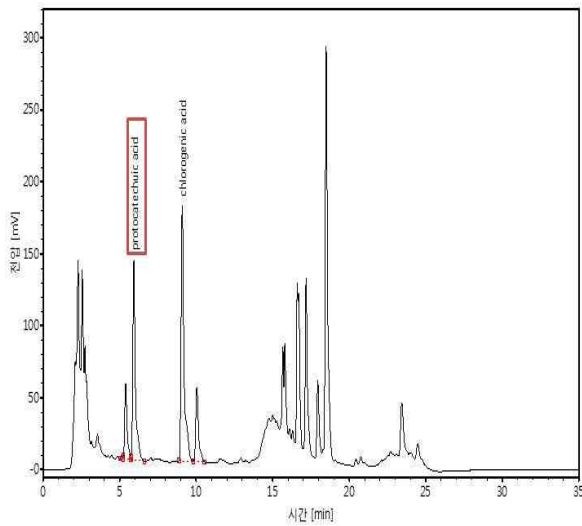
Chlorogenic acid(1 mg)



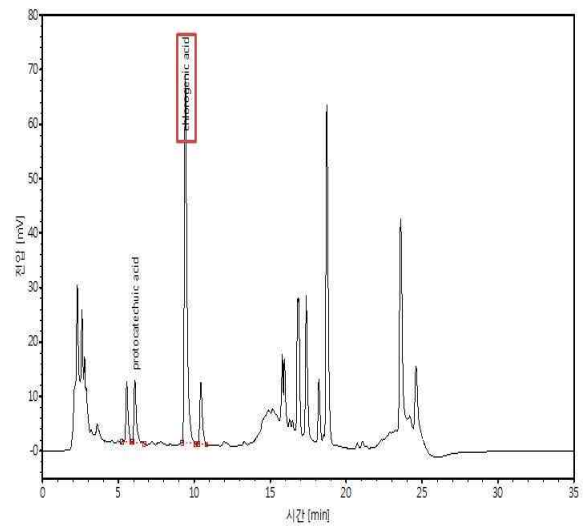
울릉미역취농축액 분말 LOT 3(500mg)



울릉미역취농축액 분말 LOT 3(100mg)



LOT 3(500 mg) + RS(1 mg)



LOT 3(100 mg) + RS(1 mg)

- 기능성원료 분석 결과

◦ 시험 추출물 중 3반복에 따른 지표성분 함량

단위 : mg/g

제조번호 반복횟수	Protocatechuic acid				Chlorogenic acid			
	LOT 1	LOT 2	LOT 3	시험식품	LOT 1	LOT 2	LOT 3	시험식품
1회	2.31	1.87	1.33	2.01	15.09	15.05	12.96	14.44
2회	2.30	1.87	1.34	2.00	15.31	14.97	12.91	14.45
3회	2.30	1.89	1.33	2.02	15.33	14.96	12.94	15.67
Mean±SD	2.30 ±0.01	1.88 ±0.01	1.33 ±0.00	2.01 ±0.01	15.24 ±0.13	14.99 ±0.05	12.94 ±0.03	14.85 ±0.71

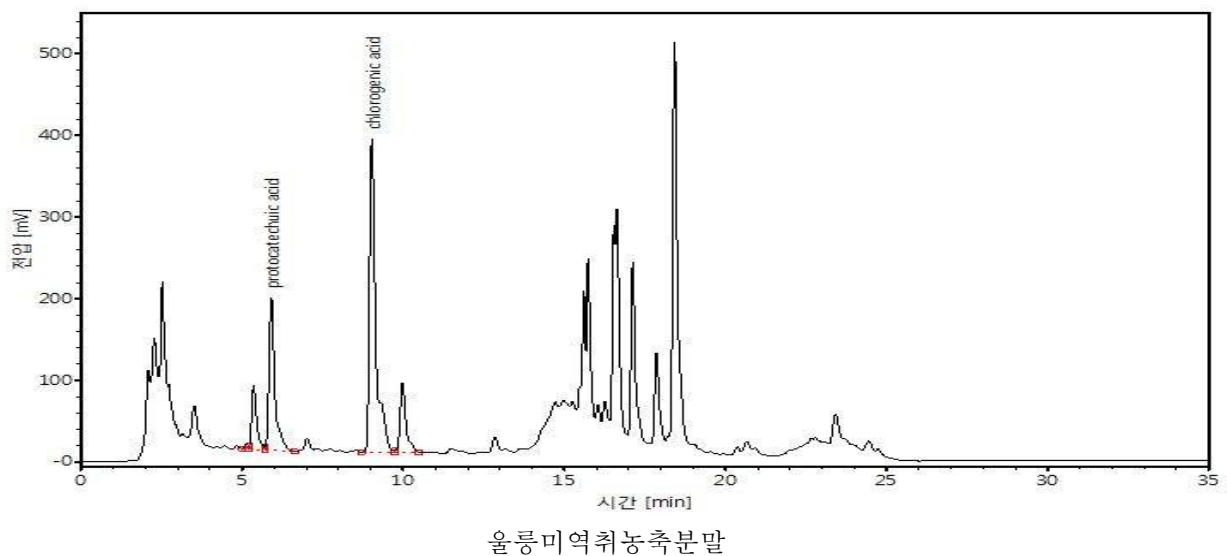
◦ 시험 추출물 중 지표성분 함량

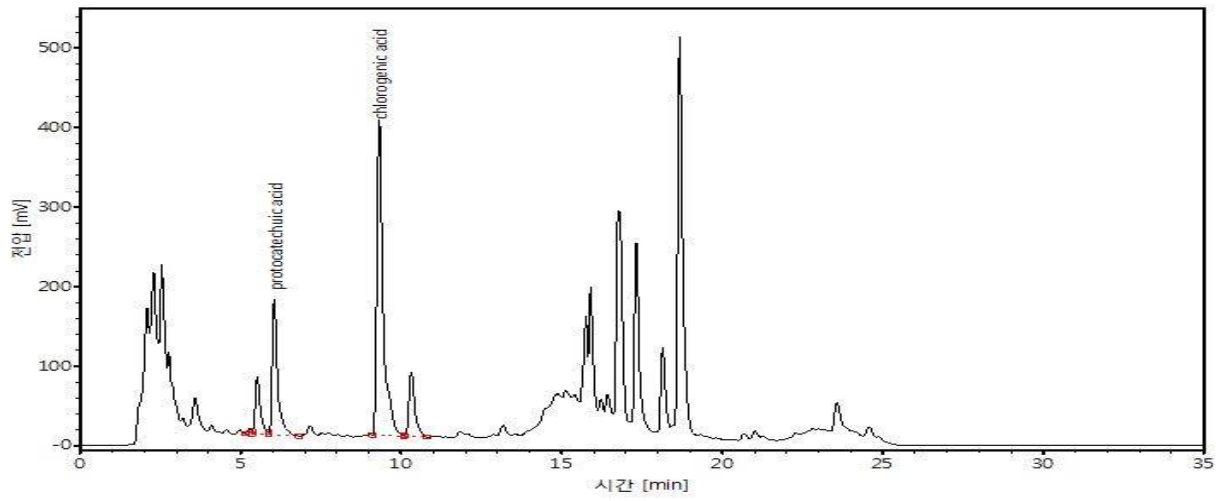
구 분	지표성분 함량(mg/g)	
	Protocatechuic acid	Chlorogenic acid
LOT 1	2.30 ±0.01	15.24 ±0.13
LOT 2	1.88 ±0.01	14.99 ±0.05
LOT 3	1.33 ±0.00	12.94 ±0.03
시험식품	2.01 ±0.01	14.85 ±0.71

* 울릉미역취농축분말 1 g 중 Protocatechuic acid는 1.84 mg, Chlorogenic acid는 14.39 mg임.

* 시험식품 1 g 중 Protocatechuic acid는 2.01 mg, Chlorogenic acid는 14.85 mg임.

◦ 주요 크로마토그램





시험식품

나. 상표개발 및 제품 용기, 제품 케이스 디자인 개발

- 상표명 및 제품명 : 예기채(禮己菜)
- 상표출원 및 등록 : 등록번호 제 40-1197304호



위의 표장은 「상표법」에 따라 상표등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Trademark Act, a trademark has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2016년 08월 19일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최 동 규

○ 용기 및 케이스 디자인



(3) IRB신청/승인 및 임상시험 진행

가. 인체적용시험 진행

○ 개요

- 과업명 : 비만인에게서 미역추출물의 섭취가 체지방 수준 및 관련 대사에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용시험
- 의뢰기관 : 성신비에스티(주)
- 수탁기관 : 바이오푸드씨알오
- 시험기관 : 한림대학교 춘천성심병원
- 연구기간 : IRB 승인일로부터 20개월
- 연구대상 : 비만인 성인 80명(시험식품 40명, 대조식품 40명)
- 시험식품 : 미역취추출물이 함유되어 있는 캡슐(미역취추출물 160 mg/캡슐)
- 평가항목 : 복부지방 면적(CT), 체성분 구성(DEXA), 체중, BMI, 허리둘레, 체지방, 혈당대사 등
- 안전성 평가 : 이상반응, 활력징후, 혈액검사 등
- 시험모식도
 - 인체적용시험에 자원하고 시험대상자 선정기준에 적합한지 확인(방문 1)
 - 시험대상자는 run-in period(1주) 후 등록된 순서에 따라 무작위로 시험식품군 또는 대조식품군으로 배정되고 식품을 섭취(12주)
 - 기능성평가 수행(방문 2, 3, 4)
 - 임상병리검사 수행(방문 2, 4)



○ 시험대상자

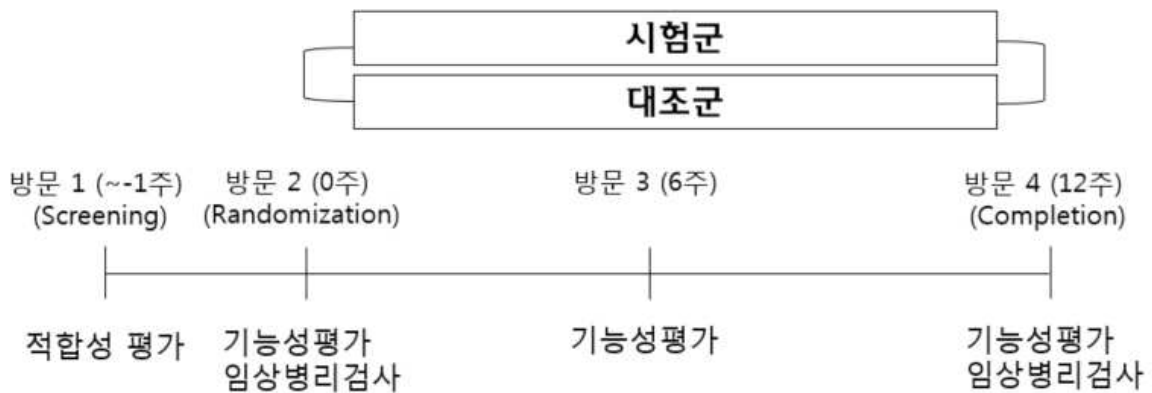
- 시험대상자의 수

	시험식품군	대조식품군	합 계
최종 시험 대상자	28	28	56
탈락율(30%) 고려 시험 대상자	40	40	80

- 선정조건
 - 만 20세 이상 65세 미만의 성인 남녀
 - 체질량 지수(BMI)가 25 kg/m² 이상 30 kg/m² 미만인 자
 - 허리둘레가 남성은 90 cm 이상, 여성은 85 cm 이상인 자
 - 중재기간 동안 식이/운동 지침을 준수할 수 있는 자
 - 상기의 조건을 모두 충족하고 본 시험에 참여하는 것에 동의하며 서면 동의서에 서명한 자
- 모집방법
 - 병원 및 인근지역에 홍보물을 배부하거나 시험대상자 모집 전문기관을 활용

○ 인체적용시험 방법

- 1일 섭취량 및 섭취방법
 - 시험식품 : 1일 3회, 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취(미역취추출물 960 mg/day)
 - 대조식품 : 1일 3회, 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취(미역취추출물 미함유)
- 섭취기간 : 12주(84일)
- 시험 모식도



- 시험 일정 및 항목

Period	Screening	Intervention		
		2	3	4
Visit	1			
Week	-1	01)	6	12
연구대상자 동의	√			
인구학적 특성(성별, 생년월일, 연령)	√			
활력징후(맥박, 혈압, 체온)	√	√	√	√
병력 조사	√			
약물/건강기능식품 섭취 조사	√	√	√	√
검사	√		√	√
적합성 평가	√			
무작위배정		√		
식습관 조사		√		
식이/운동 지침 교육	√	√	√	
식이/운동 모니터링		√	√	√
흡연력, 음주력 조사		√		
임상병리검사(혈액, 소변 검사)		√		√
평가		√	√	√
시험/대조식품 배부		√	√	
반납식품 회수 및 순응도 확인			√	√
이상반응 확인			√	√

○ 관찰항목, 임상검사 및 관찰검사

- 인구학적 특성 : 성별, 생년월일, 연령 등
- 활력징후 : 맥박, 혈압, 체온
- 병력 : 문진표를 활용해 과거 진료기록을 점검, 5년 이내의 외과적 수술력 등
- 약물, 건강기능식품 섭취 조사 : 6주 이내 섭취한 약물과 건강기능식품
- 식습관 : 시험대상자의 식습관을 조사
- 식이/운동 지침 교육
 - 미역취 또는 함유 식품의 섭취 제한
 - 나물류 과량섭취 금지
 - 평상 시 보다 열량을 250 kcal 적게 섭취
 - 운동으로 평상 시 보다 열량을 100 kcal 더 소모
 - 해조류 및 채소 환 등의 섭취 금지
 - 채소 및 과일 엑기스류 섭취 금지

- 음주력 및 흡연력 조사
- 임상병리검사
 - 혈액학적 검사 : CBC, Differential count 등
 - 혈액화학적 검사 : AST, ALT, BUN, creatinine, albumin, total protein 등
 - 소변검사 : RBC, WBC, glucose, color, pH 등
- 기능성 평가
 - 복부지방 면적(CT) : 총지방, 내장지방 및 피하지방 면적
 - 체성분 구성(DEXA) : 체지방량, 제지방량, 체지방률
 - 신체계측 : 체중, BMI, 엉덩이 둘레, 허리 둘레 등
- 이상반응 : 발열, 자·타각적 점검, 임상병리학적 점검 등

○ 통계분석

- 자료의 분포에 대한 정규성 검정을 수행하여 비정규 분포를 이루는 자료의 경우 정규 분포를 이루도록 log transformation, square root transformation 등의 방법으로 자료를 전환한 후 모수적 방법으로 분석하거나, 또는 비정규 분포 자료에 대하여 비모수적 방법으로 분석
- 연속형 변수는 다음과 같이 분석한다. 군간 비교는 Student's t-test, ANCOVA, Wilcoxon's rank sum test 등으로 분석하고 시간의 변화에 대한 군간 비교는 mixed model 등으로 분석
- 양측검정하여 P-value<0.05인 경우는 유의한 것으로 간주

○ 시험대상자 보상보험보상보험

- 계약자 : ㈜바이오푸드씨알오
- 피보험자 : 성신비에스티(주) 외 다기관
- 보험기간 : 2016. 5. 15 ~ 2018.1.15.
- 목적물명(시험약물) : 임상시험(미역취추출물)
- 임상단계 : 2상/기타상/생동성
- 담보지역 / 재판관할법원 : 대한민국 / 대한민국

○ 인체적용시험을 위한 한림대학교 춘천성심병원 IRB 심의

- 연구과제명 : 비만인인에게서 미역취추출물의 섭취가 체지방 수준 및 관련 대사에 미치는 영향을 평가하기 위한 인체적용시험
- 의뢰기관 / 대행기관 : 성신비에스티(주) / 바이오푸드씨알오
- 연구종류 : 유전자 연구 / 조직 및 혈액 연구 / 식품 / 학술연구
- 접수일자 : 2016년 4월 11일
- 지속심의 주기 : 12개월
- 심의결과 : 승인
 - 1차 심의 결과 : 조건부승인(2016. 4. 25)
 - * 연구에 사용되는 식품에 대한 설명자료 추가 보완

- * 연구에 사용되는 식품 섭취 시, 발생 가능한 부작용 자료 보완
- 2차 심의 결과 : 승인(2016. 5. 23)

나. 인체적용시험자 모집을 위한 광고

- 지역 신문을 이용한 모집자 광고(2017년 2월~7월)
 - 춘천벼룩시장(월 20회)
 - 춘천교차로(월 20회)
- 지역 대단지 아파트 게시물 광고
 - 춘천 두산 위브 아파트
 - 춘천 포스코더샵 아파트

다. 인체적용시험 진행현황 모니터링

- 2017년 10월 기준 모니터링 현황

Plan	Screening	Screening failure*	Run-in period	Randomization	Ongoing	Drop-out**	Completion
80	96	16	-	80	-	10	70

- 총 96명을 스크리닝하여 목표한 연구대상자 80명의 등록 완료.
- 등록 된 80명 중, 70명이 계획된 모든 방문을 완료.
- 10명이 중도 탈락(사유 : 동의철회 4명, 추적실패 1명, 이상반응 발생 2명(위장불편감 2명), 계획서 위반 2명(시험식품 섭취 지침 미준수 1건, 금지약품인 요산약 복용 1건), 연구자 판단 1명(빈혈수치 비정상 1건))
- 스크리닝에서 탈락한 16명 중 4명은 선정기준에 적합하지 않았고(혈압수준 부적합 1건, ALT 수준 초과 2건, 타 연구 참여 1건), 4명은 연구자 판단(당뇨 질환자 2명, 고령과 creatinine 수준 고려한 안전성 우려 1건, 연구지침 미준수 1건)으로 탈락됨.
- 7명은 무작위배정 전에 동의철회 하였으며 1명은 추적실패 하였음.

(4) 기능성 원료 신청 자료 준비

가. 기원

○ 원재료명(학명) : 울릉미역취(*Solidago virgaurea*)

- 원 산 지 : 대한민국 울릉도(울릉도 특산물)
- 사용부위 : 지상부(잎, 줄기)

○ 울릉미역취의 식물분류학적 위치

- 미역취속(*Solidago* L.)은 국화과(Asteraceae, Compositae) 참취족(Tribe *Astereae* Cass.)에 속하며, 황색 계통의 설상화를 갖는 특징 등으로 미역취아족(subtribe *Solidagininae* Hoffm.)에 포함됨.
- 동북아산 미역취 복합체(*S. virgaurea* complex)에는 미역취(*S. virgaurea* subsp. *asiatica*), 잔미역취(*S. virgaurea* var. *taquetii*), 나래미역취(*S. virgaurea* var. *coreana*), 산미역취(*S. virgaurea* subsp. *leiocarpa*), 울릉미역취(*S. virgaurea* subsp. *gigantea*) 등 5가지의 종하분류군이 보고되었음.
- 미역취는 유럽산 미역취(*S. virgaurea* L.)와 명확히 구분되는 독립된 종(*S. japonica* Kitam.)으로 인정되었고 울릉도를 제외한 한반도 전역과 일본에만 한정 분포함.
- 잔미역취와 나래미역취의 검색형질들은 미역취의 해당 형질 변이 폭 내에 포함되고 산 미역취는 국내에 자생하지 않음.
- 줄기(stem)는 양미역취가 울릉미역취보다 2.1배 길고, 1.8배 두꺼움.
- 잎(leaves)은 미국미역취가 울릉미역취의 잎보다 1.1배 길고, 넓이는 3.1배 얇음.
- 귀화미역취의 잎자루(petiole)가 없고, 울릉미역취 잎자루 크기가 제주산 미역취보다 5배로 제일 큼.
- 양미역취와 미국미역취는 피침형, 미역취와 제주산 미역취는 장타원형, 도피침형, 울릉미역취와 산미역취는 난형임.
- 중심화(Disc florets) 수는 울릉미역취가 미국미역취보다 1.6배 많이 있음.
- 중심화는 울릉미역취가 귀화미역취보다 1.2배 길고, 2배 넓음.
- 주변화(Ray florets) 수는 귀화미역취가 울릉미역취보다 1.4배 많이 있음.
- 참고문헌
 - 미역취 및 근연분류군(국화과)의 분류학적 재검토(Korean journal of plant taxonomy v.42 no.1, pp.40 - 49, 2012)
 - 한국산 미역취속의 분류학적 연구(최하나, 2008, 안동대학교, 국내석사)

○ 형태학적 비교자료

Taxa		Characters						
		<i>Solidago altissima</i> ¹	<i>S. serotina</i> ²	<i>S. virgaurea asiatica</i> ³	<i>S. virgaurea asiatica (in Jeju)</i> ⁴	<i>S. virgaurea subsp. gigantea</i> ⁵	<i>S. virgaurea var. leiocarpa</i> ⁶	
stem	length(cm)	103.1-186 (148.7)	79.5-142.1 (100.6)	40.9-102.3 (71.0)	5.8-19 (12.9)	26.4-77.9 (60.7)	36.1-62.5 (48.5)	
	thickness(mm)	4.3-6.4(5.1)	3.2-4.8(3.9)	1.4-3.6(2.1)	0.6-1.8(1.1)	1.71-4.15(2.9)	1.7-3.1(2.2)	
leaves	cauline leaves	length(cm)	6.8-11.2(9.2)	8.5-13.6(11.6)	2.4-10.9(6.7)	1.8-3.4(2.6)	8.2-1.9(10.4)	7-10.2(8.2)
		width(cm)	0.9-2(1.3)	1.4-2.4(1.8)	1.3-5.4(2.9)	0.4-1(0.7)	3.4-8.3(5.6)	3-5.2(3.7)
		L/W	4.6-10.6	5.7-7.9	1.4-3.3	1.9-8	1.4-2.6	1.7-2.6
		petiole(cm)	-	-	1.9-4(3)	0.5-2.6(1.5)	3.8-13(7.5)	0.9-7.2(2.6)
		shape	lanceolate	lanceolate	ovate-oblong to oblanceolate	ovate-oblong to oblanceolate	broadly ovate	broadly ovate
		margin	entire or sparsely serrate	distinctly serrate	minutely serrate	minutely serrate	serrate	acutely serrate
	base	caudate to attenuate or cuneate	caudate to attenuate or cuneate	broadly cordate or attenuate	broadly cordate or attenuate	bruncate or cordate	bruncate or cordate	
	bract	length(cm)	2.3-7.3(3.9)	3-7.7(4.7)	1.7-4.5(2.9)	1.1-2.5(1.9)	4.5-8.2(6.6)	5.5-8(6.6)
		width(cm)	0.3-0.7(0.5)	0.4-1.1(0.6)	0.3-0.9(0.6)	0.2-0.5(0.3)	1.5-2.4(2.0)	1.4-2(1.7)
		L/W	5.9-10.4	6.0-9.5	3.0-7.0	5.0-8.3	2.4-4.5	3.6-4.9
Involucre	series	3	3	3-4	3	3	3	
	length(mm)	3.5-4.3(3.9)	3.1-3.7(3.4)	4.1-7.1(5.6)	4.5-6(5.4)	4.7-6.2(5.6)	5.5-8(6.6)	
	width(mm)	1.7-2.7(2.3)	2.3-3.5(2.9)	3.1-5(4.2)	3.8-7.5(5.0)	4.2-6.1(4.8)	3.8-6.2(4.8)	
	L/W	1.5-2.2	0.9-1.6	1-1.7	0.8-1.3	0.9-1.4	1-1.7	
	bract	length of inner involucre (mm)	3.2-4.1(3.7)	2.9-3.5(3.1)	4.3-6(5.0)	4.5-6(5.1)	4.8-5.5(5.1)	5.6-7.9(6.5)
		width of inner involucre (mm)	0.2-0.6(0.4)	0.4-0.7(0.5)	0.6-1.3(1.0)	0.8-1.3(1.0)	0.7-1.3(1.0)	0.8-1.3(1.1)
		L/W	5.3-17	4.1-7.8	3.5-8.6	3.5-6.7	3.8-7.1	4.6-8.1
		length of outer involucre (mm)	0.9-1.6(1.1)	0.8-1.4(1.1)	1.4-2.1(1.8)	1.9-3.5(2.6)	1.6-2.5(2.1)	2.7-4.6(3.5)
		width of outer involucre (mm)	0.2-0.5(0.4)	0.3-0.5(0.4)	0.6-1.3(0.9)	0.6-1.5(1.0)	0.7-1.2(0.9)	0.9-1.4(1.1)

* 1 : 양미역취, 2 : 미국미역취, 3 : 미역취, 4 : 제주산 미역취, 5 : 울릉미역취, 6 : 산미역취

Characters			Taxa		<i>Solidago</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>
			<i>altissima</i>	<i>serotina</i>	<i>virgaurea</i> <i>asiatica</i>	<i>virgaurea</i> <i>(in Jeju)</i>	<i>virgaurea</i> <i>subsp.</i> <i>gigantea</i>	<i>virgaurea</i> <i>var.</i> <i>leiocarpa</i>		
		L/W	2.5-4.5	2-3.7	1.2-2.7	1.9-4.2	2-3.1	2.4-5		
		Ratio of inner/outer involucre	2.4-4.4(3.3)	2.4-3.6(2.9)	2.2-3.9(2.8)	1.4-2.6(2.0)	2.0-3.2(2.4)	1.5-2.2(1.9)		
Pappus(mm)			2.6-3.7(3.1)	3.1-3.6(3.4)	2.8-4.2(3.6)	3.2-4.3(3.9)	3.6-4.5(4.0)	3.2-4.3(3.8)		
Heads	Diameter(cm)		0.5-0.7(0.6)	0.7-0.9(0.8)	1.1-1.5(1.3)	1.0-1.5(1.3)	0.9-1.2(1.1)	1.4-1.7(1.6)		
	Ray florets	number	10-14	8-14	5-8	5-8	5-10	4-7		
		length(mm)	3.9-5(4.4)	4.7-5.8(5.3)	6.7-8.9(7.7)	6.2-8.9(7.7)	6.2-8(6.9)	7-8.7(7.8)		
		width(mm)	0.2-0.5(0.3)	0.7-1.1(0.9)	1.2-2.3(1.8)	1.2-2.2(1.9)	1.2-2.3(1.8)	0.9-1.8(1.3)		
		L/W	8-25	4.9-7	3.2-6.1	3.3-5.2	3-5.5	4.5-8.4		
	pistil	stigma	L	0.7-1(0.9)	0.8-1.2(1.0)	0.8-1.2(1.0)	0.6-1.2(0.9)	0.9-1.4(1.2)	0.7-1.3(1.0)	
			W	0.1(0.1)	(0.1)	0.1-0.2(0.2)	0.1(0.1)	0.1-0.2(0.1)	0.1-0.2(0.1)	
		style length	2.5-3(2.7)	1.9-3.5(2.7)	2.5-4.6(3.5)	0.5-3.5(2.8)	2.1-4.7(3.4)	2.8-4.4(3.7)		
	Disc florets	number	5-7	6-9	7-14	8-18	10-15	8-12		
		length(mm)	3.7-4.3(4.0)	3.7-4.2(4.0)	4.1-5.3(4.7)	4.1-5.1(4.7)	4.1-5.6(5.1)	4.1-5.2(4.9)		
		width(mm)	0.7-1(0.9)	0.7-1.1(0.9)	0.8-1.6(1.1)	0.8-1.5(1.0)	1.2-2.4(1.8)	0.8-1.4(1.1)		
		L/W	5.7-3.7	3.4-5.6	3.3-6.3	3.3-5.4	1.9-4.7	3.2-6.4		
		pistil (mm)	stigma	L	0.8-1(0.9)	0.7-1(0.9)	0.8-1.4(1.2)	0.8-1.5(1.2)	0.7-1.9(1.4)	0.9-1.5(1.2)
				W	0.1-0.3(0.2)	0.1-0.3(0.2)	0.2-0.3(0.2)	0.1-0.3(0.2)	0.2-0.6(0.3)	0.1-0.2(0.2)
			style length	3.1-4(3.6)	3.3-4(3.7)	3.2-5(4.0)	3.2-5(4.2)	3.7-6.4(4.3)	2.9-5.3(4.6)	
		stamen	anther	L	1.4-1.7(1.6)	1.1-1.8(1.6)	1.4-2.1(1.8)	1.4-2(1.8)	1.2-2.5(2.0)	1.8-2.2(2.0)
	W			0.2-0.3(0.3)	0.2-0.4(0.3)	0.2-0.4(0.3)	0.2-0.3(0.2)	0.1-0.5(0.3)	0.2-0.3(0.2)	
		filament length(m)	2.4-3.8(3.1)	2.2-3.2(2.8)	2.9-4(3.5)	2.9-4(3.5)	2.6-4(3.5)	3-4.1(3.6)		
inflorescence			9월~11월	7월~10월	7월~10월	7월~10월	8월~10월	7월~9월		
achene	length(mm)	0.7-1.1(0.9)	0.8-1.2(1.0)	1-3.2(1.8)	1-3.1(2.0)	1.6-3.7(2.2)	2-4.1(3.0)			
	width(mm)	0.2-0.4(0.3)	0.2-0.3(0.3)	0.4-0.9(0.5)	0.3-0.8(0.5)	0.4-1.1(0.6)	0.4-0.8(0.6)			
	L/W	2.3-3.5	2.7-6	2.5-5.5	2.8-7.3	2.3-9.3	3.3-7.3			

○ 울릉미역취 일반영양성분

(식품성분표 제7개정판, 농촌진흥청, 2006 / 울릉군농업기술센터)

- 일반영양성분

	단백질 (g/100g)	지질 (g/100g)	탄수화물 (g/100g)	섬유소 (g/100g)	회분 (g/100g)
생물	0.4	0.4	10.9	2.7	1.6
건조물	22.2	2.3	42.8	10.8	10.2

- 무기질

	칼슘 (mg/100g)	인 (mg/100g)	철 (mg/100g)	칼륨 (mg/100g)
생물	17	251	2.4	552
건조물	231	175	8.8	

- 비타민

	A		B1 (mg/100g)	B2 (mg/100g)	C (mg/100g)
	RE/100g	베타카로틴 (ug/100g)			
생물	447	2859	0.02	0.03	13
건조물	33	197	0.03	0.08	

* RE(Retinol Equivalent): 총 비타민A 값을 나타내는 단위. 1RE= 6μg 베타카로틴

○ 울릉미역취의 이용현황

- 식품공전, 식품첨가물공전, 건강기능식품공전 : 미등재
- 식품원료 DB(식품의약품안전처) : 가능(순)
 - 원재료명(이명 / 생약명) : 울릉미역취(큰미역취 / 일지황화(一枝黃花))
 - 학 명 : *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq.
 - 식용외 용도 : 약용
 - 최종수정일 : 2015년 11월 30일
- 학계에서는 울릉미역취를 미역취와 다른 종하분류군으로 연구하고 있으나 일반 대중은 울릉도에서 채취 또는 재배되는 미역취로 인식하고 섭취하고 있음.
- 생물(새순, 잎, 줄기)은 쌈, 샐러드, 무침, 데친 무침으로 섭취하고 건조물(새순, 잎, 줄기)은 나물, 국으로 섭취하고 있음(울릉군농업기술센터)

○ 울릉미역취의 재배 및 유통 현황

- 재배면적(2012년)은 66.1ha로 소득작물 전체 재배면적의 24%를 차지하고 있음.

	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
소계	269.3	361.0	335.2	333.2	312.9	325.3	278.5	270.1
더덕	87.2	154.9	114.0	94.7	90.0	92.0	83.0	52.2
미역취	78.9	54.3	64.9	72.0	66.7	72.3	58.7	66.1
부지깁이	62.5	75.5	74.7	80.0	72.4	75.0	64.1	72.1
삼나물	26.8	45.1	47.3	50.5	48.9	44.7	40.5	43.6
참고비	13.9	31.2	34.3	36.0	34.9	41.3	32.2	36.1

* 출처 : 울릉군농업기술센터, 단위 : ha

- 생산량(2012년)은 204.8M/T로 소득작물 전체 생산량의 29%를 차지하고 있음.

	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
소계	492.6	490.8	467.6	941.8	867.3	885.0	796.9	696.5
더덕	133.6	168.5	118.6	577.2	546.0	550.0	500.0	312.9
미역취	249.6	167.3	205.2	223.0	192.0	204.0	177.8	204.8
부지깁이	94.0	137.7	128.6	126.0	114.0	114.0	105.7	161.4
삼나물	11.0	10.6	7.3	7.0	7.5	7.0	5.8	11.0
참고비	4.4	6.7	7.9	8.6	6.1	10.5	7.6	6.4

- 생산액(2012년)은 1,827백만원으로 소득작물 전체 생산액의 16%를 차지하고 있음.

	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
소계	5,800	5,594	10,370	10,841	11,880	12,528	11,305
더덕	1,685	1,186	5,772	5,460	5,500	5,000	3,129
미역취	1,673	2,052	2,230	2,409	2,753	3,734	1,827
부지깁이	1,377	1,286	1,260	1,664	1,965	2,431	5,055
삼나물	529	438	420	621	560	508	484
참고비	536	632	688	687	1,102	855	810

○ 농산물품질관리법 제8조 및 동법시행규칙 제19조의 규정에 의거 임산물 지리적표시 품목으로 유통되고 있음(산림청 공고 제2006-65호).

- 등록번호(등록일자) : 제6호(2006. 12. 15)

- 등록품목 : 미역취

- 등록명칭 : 울릉도 미역취(Ulleungdo Miyeokchwi)

- 대상지역 : 행정구역상의 경상북도 울릉군 일원

- 등록자 : 울릉농업협동조합(경상북도 울릉군 울릉읍 도동리 214-2)



K P G I

지 리 적 표 시 등 록 증

1. 등록번호 : 제6호
2. 등록품목 : 미역취
3. 등록명칭
 - 한글 : 울릉도 미역취
 - 영문 : Ulleungdo Miyeokchwi
4. 대상지역 : 행정구역상 경상북도 울릉군 일원
5. 등 록 자 : 울릉농업협동조합
6. 주 소 : 경상북도 울릉군 울릉읍 도동리 214-2

농산물품질관리법 제8조 및 동법시행규칙 제19조의 규정에
의하여 위와 같이 지리적표시의 등록을 하였음을 증명합니다.

2006년 12월 15일

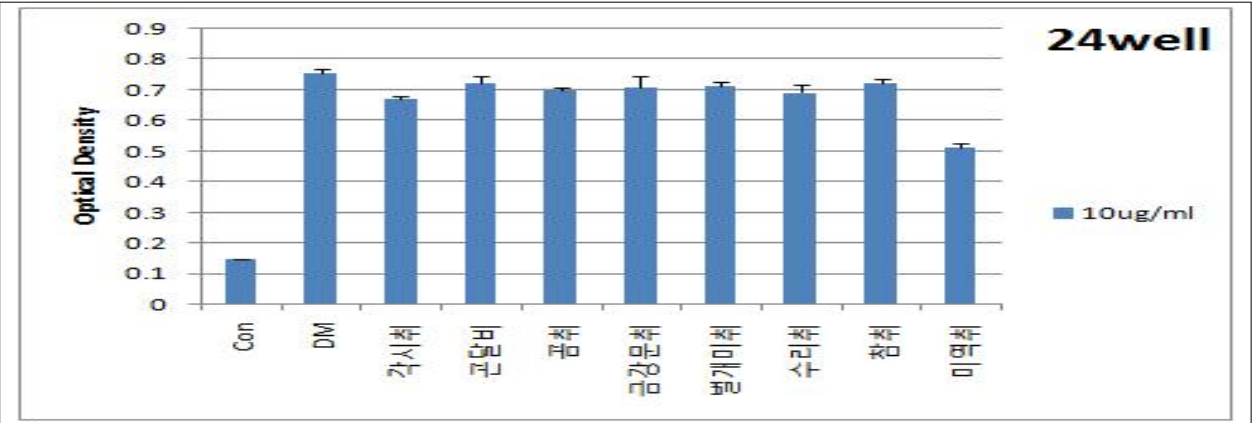
산 립 청 장 인

나. 개발경위

○ 3T3-L1 pre-adipocyte cell을 대상으로 천연추출물 300여종의 지방세포 분화 억제 효과를 비교 평가하여 울릉미역취의 효능을 확인하였음



- 각종 취나물류의 지방세포 분화 억제 효과를 비교 평가하였음.
- 미역취 추출물의 지방세포 분화 억제 활성이 제일 높았음.



다. 국내·외 인정·허가 현황

○ 국내 인정·허가 현황

- 원재료 ‘울릉미역취’는 식품의 원료로 사용 가능(식약처 식품기준과-671호, 2013.4.29.)
- 식품공전, 식품첨가물공전, 건강기능식품공전 : 울릉미역취는 등재되어 있지 않음
- 식약처 식품원료DB 결과
 - 원재료 : 미역취
 - 이 명 : 울릉미역취, 돼지나물, Asian goldenrod, Korean goldenrod
 - 학 명 : *Solidago virgaurea* subsp. *asiatica* Kitam. ex Hara / *Solidago japonica* Kitam./ *Solidago virgaurea* subsp. *gigantea* Kitam.
 - 식품원료 사용가능 여부 : 가능(순)
- 대한민국약전외한약(생약)규격집 : ‘골든로드50%에탄올엑스(5.5→1)’ 로 등재
 - *Solidago serotina* L.(미국미역취)의 50% 에탄올 추출물
 - 식품원재료DB 식품원료 사용가능 여부 : 공란(검토 필요)
- ‘네프리스에스정(수출용)’의 원료약품으로 사용하고 있음
 - 제품명 / 제조사 : 네프리스에스정(수출용) / 우리들제약(주)
 - 분류 / 품목기준코드 : 일반의약품 / 200402464
 - 분류번호 : [259] 기타의 비노생식기관 및 향문용약
 - 원료약품의 분량 : 1정 중 솔리다기니스엑스(5.5:1) 200mg
- *Solidago*속 식품원재료DB(식약처) 등재 현황

원료명	학명	가능여부
Canadian goldenrod	<i>Solidago canadensis scabra</i>	가능(있)
Coast goldenrod	<i>Solidago spathulata</i>	가능(있)
Giant goldenrod	<i>Solidago gigantea</i>	
Nevada goldenrod	<i>Solidago spectabilis</i>	가능(씨)
Prairie goldenrod	<i>Solidago missouriensis</i>	가능(있)
<i>Solidago fistulosa</i>	<i>Solidago fistulosa</i>	
<i>Solidago japonica</i>	<i>Solidago japonica</i>	가능(있)
<i>Solidago leavenworthii</i>	<i>Solidago leavenworthii</i>	
<i>Solidago nana</i>	<i>Solidago nana</i>	
<i>Solidago radiata</i>	<i>Solidago radiata</i>	가능(있)
<i>Solidago suaveolens</i>	<i>Solidago suaveolens</i>	가능(있)
Stiff goldenrod	<i>Solidago rigida</i>	
Sweet goldenrod	<i>Solidago odora</i>	가능(있)
Sweet goldenrod	<i>Solidago graminifolia</i>	가능(있)
Velvety goldenrod	<i>Solidago mollis</i>	
나래미역취	<i>Solidago virgaurea</i> L. var. <i>coreana</i> Nakai	가능(있)
미국미역취	<i>Solidago serotina</i> Ait	
미역취	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i> Kitam. ex Hara.	가능(순)
울릉미역취	<i>Solidago virga-aurea</i> var. <i>gigantea</i> Miq.	

○ 국외 인정·허가 현황

- European Medicines Agency(Science Medicines Health)
 - Inventory of herbal substances for assessment
 - * Herbal substances proposed to HMPC for assessment(EMA/HMPC/494079/2007)
 - * Herbal substances : *Solidaginis virgaureae herba*
 - * Ph. Eur. related monographs (Status June 2015) : 등재
 - Solidaginis virgaureae herba* 1893
 - Solidaginis herba* 1892
 - * European Scientific Cooperative on Phytotherapy(ESCAP) Monographs : 등재
 - Published monographs(2nd ed. including suppl. 2009; individual monographs published online by Jun 2015)
 - * German Commission E monographs (BfArM) :
 - monographs published successively until 1994(corrections until 2002)
 - * French Avis aux fabricants : 등재
 - list entries in Les Cahiers de l'Agence No 3, Les médicaments a base de plantes 1998
 - * Chinese monographs : 등재
 - monograph in Chinese Pharmacopoeia (PPRC, Vol. 1 Traditional Chinese Materia Medica, 2010)
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China(중국약전) : 등재(증빙자료 확보 필요)
- Homoeopathic Pharmacopoeia of the United States(미국동종요법약전) : 등재(증빙자료 확보 필요)
 - American Botanical Council(ABC), Herbal Medicine Expanded Commission E : 등재(증빙자료 확보 필요)
 - Complete German Commission E : 등재
 - * 약 품 명
 - *Solidaginis virgaureae herba*, European goldenrod herb (*Solidaginis virgaureae herba*, *Echtes Goldrutenkaut*)
 - *Solidaginis herba*, Goldenrod herb (*Solidaginis herba*, *Goldrutenkaut*)
 - * 구성성분(정의)
 - European goldenrod : 개화한 미역취(*S. virgaurea*)의 지상부
 - Goldenrod herb : 개화한 미국미역취(*S. serotina*, syn. *S. gigantea*) 또는 *S. canadensis*의 지상부
 - * 사용용도 : 염증성 요로 또는 신장 결석(ATC-Code: C03FA)
 - * 금기사항/부작용/약물상호작용 : 알려진 사례 없음
 - * 사 용 량 : 식물 건조물로서 1일 6 ~ 12g

- * Erscheinungsdatum Bundesanzeiger: 15.10.1987., Heftnummer: 193.
- 독일약전(Deutsches Arzneibuch) : 등재
 - “Einzelmonographien zu Pflanzlichen Drogen und Zubereitungen aus pflanzlichen Drogen”에 ‘Goldrutenkraut(Stand 8.1)’, ‘Goldrutenkraut, Echtes(Stand 8.0)’으로 등재되어있음
 - * Indikationsliste nach § 109 a AMG (Stand 23.12.2005)
 - * Indikationsliste der homöopathischen Stoffe/Stoffkombinationen nach § 109 a Absatz 3 AMG (Stand 23.07.2001)
 - * Derzeit gültige Monografien der Standardzulassung für Humanarzneimittel (BUNDESINSTITUT FÜR ARZNEIMITTEL UND MEDIZINPRODUKTE, BfArM)
 - * Liste der Monographien der E-Kommission (Phyto-Therapie), die im Bundesanzeiger veröffentlicht sind (BfArM)
 - 49005 Solidago / Goldrute (BAnz. Nr.193a vom 15.10.1987)
 - 49005 Solidago / Goldrute -Berichtigung- (BAnz. Nr. 50 vom 13.03.1990)
 - * 유럽약전 및 영국약전의 근거 기반으로 활용되었음
- 유럽약전(European Pharmacopoeia 8.6) : 등재
 - 약 품 명 : GOLDENROD, EUROPEAN(Solidaginis virgaureae herba)
 - 정 의 : 미역취(*S. virgaurea*)의 개화한 지상부
 - 성분함량 : Hyperoside(flavonoids)로서 0.5 ~ 1.5%
- 영국약전(British Pharmacopoeia) : 등재
 - “British Pharmacopoeia Volume I & II Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances”에 ‘European Goldenrod’로 등재되어 있음
 - 유럽약전에 근거하여 동일하게 등재되어 있음
- European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use(요약)
 - 제품명 : 최종 제품에 개별적으로 명시
 - 구성성분
 - * 전통적 사용(Article 16d(1) of Directive 2001/83/EC)
 - * 천연물 : *S. virgaurea* L., herba(European goldenrod)
 - * 제 제 : 분쇄물, 추출액, 팅크제, 농축건조물
 - 제 형 : 경구용 허브차, 액체 및 고형물
 - 처방지시 : 소변 불량에 대하여 소변량을 증가시킴
 - 사용대상 : 12세 이상의 남녀(청소년, 성인)
 - 복용량 및 복용방법
 - * 분 쇠 물 : 3 ~ 5g, 1일 2 ~ 4회 경구투여
 - * 추출액, 팅크제 : 0.5 ~ 2mL, 1일 3회 경구투여
 - * 농축건조물 : 350 ~ 450mg, 1일 3회 경구투여
 - 사용기간 : 약 2 ~ 4주
 - 주의사항

- * 국화과 식물에 대한 알러지 반응이 있는 사람
- * 심한 심장 또는 신장 질환자
- * 사용 경험이 없는 12세 미만 어린이
- 다른 약물과의 상호작용 : 보고된 사례 없음
- 이상반응 : 과민반응, 위장장애가 있을 수 있으나 빈도는 알려져 있지 않음
- 과다복용 : 보고된 사례 없음
- 약력학적 특성 : 불필요(Article 16c(1)(a)(iii) of Directive 2001/83/EC)
- 약동학적 특성 : 불필요(Article 16c(1)(a)(iii) of Directive 2001/83/EC)
- 전임상자료
 - * 불필요(Article 16c(1)(a)(iii) of Directive 2001/83/EC)
 - * 발암성, 생식독성 및 유전독성 시험은 수행하지 않았음
- 함유성분
 - * Flavonoids(1.5%) : quercetin, kaempferol, astragalín 등
 - * Triterpene saponins(2%) : oleanane type
 - * Phenolic acids : caffeic acid, chlorogenic acid (0.2-0.4%)

국가명	주요내용
오스트리아	- 조합제품에만 사용 가능(평균 2 ~ 3가지를 혼합) - Phytodolor® : 류마티스 관련 표시를 인증 받았음 - Heumann's Blasen- und Nierentee; Phytodolor; Urelium Neu
체코	- 허브제제 분쇄물로 시장 판매 허가를 받았음(1998년) ◦ 체코약전(2005) : 1회 2g, 1일 10 ~ 20g ◦ 체코어명 : nař zlatobýlu obecného ◦ 적응증 : 요로 및 신장 결석에 따른 염증의 보조적 치료에 사용 - Epilobin; Urcyston Planta
덴마크	- Solidaforce® (MAH Bioforce) : 2000년 이전에 시장 상품화 ◦ 1일 3 ~ 4회 30 ~ 40방울 사용 - Solidamin 10® : 요로를 자극해 이뇨를 약하게 증가시킴(ATC code : C03)
독일	- 13종 중 대부분의 제품이 1976년부터 시장에서 유통되고 있음 - 30%에탄올(6종), 60%에탄올(3종), 물(1종), 분쇄(1종), 50%에탄올(2종) 형태 - 코팅정제(3종), 정제(2종), 하드캡슐(4종), 액상(3종), 연질캡슐(1종) - Cystinol Long; Nieral; Polbax novo; Solidacur; Solidagoren mono; Solidagoren Uro; Stromic; Urol - Aqualibra; BioCyst; Cefasabal; Cystinol N; Dr S.scheffler Bergischer Krautertee Blasen- und Nierentee; Harntee 400 N; Harntee-Steiner; Heumann Blasen- und Nierentee Solubitat uro; Nephroselect M; Phytodolor; Prostamed; Solidagoren N.
폴란드	- 3종의 제품이 1995년부터 시장에 유통되고 있음

	<ul style="list-style-type: none"> - 경구용 액제(7종), 캡슐(2종), 페이스트(1종) 등 - Diuronis; Fitoven; Nefrobonisol; Nefrol; Nefrosept; Prostopol; Reumacor; Urofort
스페인	- 1980년 이전부터 시장에서 유통되고 있음
스웨덴	- 1978년 이전부터 시장에서 유통되고 있음

- 주요 제품 사진



- Health Canada

◦ Health Canada

* Ingredient Search(Search For : goldenrod; Role : All)

Ingredient	Proper Name(s)	Common Name(s)
Goldenrod flavour (Chemical Substance)	Goldenrod flavour Golden rod flavour	Goldenrod flavour Golden rod flavour
Herba Solidaginis (Defined Organism Substance) Pre-cleared Information: Traditional Chinese Medicine Ingredients	Solidago decurrens	Common Goldenrod Herb Herba Solidaginis Liu zhi huang Yi zhi huang hua
HPUS Solidago virgaurea (Homeopathic Substance)	Solidago virgaurea	Goldenrod Solidago alpestris Solidago virgaurea Verge d'or
Solidago canadensis (Organism)	Solidago canadensis	Canadian Goldenrod
Solidago odora (Organism)	Solidago odora	Anise-scent goldenrod Fragrant goldenrod
Solidago virgaurea (Organism)	Solidago virgaurea	European goldenrod Goldenrod Golden rod
Solidago virgaurea (goldenrod) extract (Defined Organism Substance)	Solidago virgaurea	Goldenrod extract Solidago virgaurea (goldenrod) extract Solidago virgaurea extract

◦ Herba Solidaginis(Defined Organism Substance)

◦ NHPID Name : Herba Solidaginis

◦ Reference : CP 2010(중국약전 2010)

◦ Category : Approved Herbal Substance Name

◦ Monograph(s) : Traditional Chinese Medicine Ingredients

Schedule 1 : Plant and plant material

◦ HPUS Solidago virgaurea(Homeopathic Substance)

◦ NHPID Name : HPUS_Solidago virgaurea

◦ Reference : HPUS(미국 동종요법약전)

◦ Category : Homeopathic Name

◦ Source Material(s) : Flowering tops

◦ Method of Preparation(s)

Name : HPUS Class C / HPUS Class N

Minimum Homeopathic Potency : MT

- Natural Medicines Comprehensive Database

◦ 일반명 : Aaron's Rod, Baguette d'Aaron, Canadian Goldenrod, Early Goldenrod, European Goldenrod, Gerbe d'Or, Herbe des Juifs, Solidage, Solidage du Canada, Vara de Oro, Verge d'Or, Woundwort

◦ 학 명 : *Solidago virgaurea* (European goldenrod); *Solidago canadensis* (Canadian goldenrod), synonym *Solidago longifolia*; *Solidago gigantea* (Early goldenrod), synonym *Solidago serotina*. Family: Asteraceae/Compositae

* 이 용

- 경구용 항 염증제, 경련 방지제, 이노제로 활용하고 통풍, 류머티즘, 관절염, 습진 및 기타 피부 질환에도 사용함
- 폐결핵, 당뇨, 간, 치질, 내부 출혈, 알레르기 성 비염, 천식의 확대 및 전립선 비대증의 급성 악화에 사용
- 요로, 비노기 결석, 신장 결석의 염증성 질환의 소변 흐름을 증가시키는 보조치료제로 활용

◦ *Solidago virgaurea*를 함유한 제품은 148 종의 제품이 있고 54종이 캐나다 인증을 받았음

* Ingredient Search(Search For : goldenrod; Role : All)

Ingredient	Proper Name(s)	Common Name(s)
Goldenrod flavour (Chemical Substance)	Goldenrod flavour Golden rod flavour	Goldenrod flavour Golden rod flavour
Herba Solidaginis (Defined Organism Substance) Pre-cleared Information: Traditional Chinese Medicine Ingredients	Solidago decurrens	Common Goldenrod Herb Herba Solidaginis Liu zhi huang Yi zhi huang hua
HPUS Solidago virgaurea (Homeopathic Substance)	Solidago virgaurea	Goldenrod Solidago alpestris Solidago virgaurea Verge d'or
Solidago canadensis (Organism)	Solidago canadensis	Canadian Goldenrod
Solidago odora (Organism)	Solidago odora	Anise-scent goldenrod Fragrant goldenrod
Solidago virgaurea (Organism)	Solidago virgaurea	European goldenrod Goldenrod Golden rod
Solidago virgaurea (goldenrod) extract	Solidago virgaurea	Goldenrod extract Solidago virgaurea

(Defined Organism
Substance)

(goldenrod) extract
Solidago virgaurea extract

- Herba Solidaginis(Defined Organism Substance)
 - * NHPID Name : Herba Solidaginis
 - * Reference : CP 2010(중국약전 2010)
 - * Category : Approved Herbal Substance Name
 - * Monograph(s) : Traditional Chinese Medicine Ingredients
 - * Schedule 1 : Plant and plant material
- HPUS Solidago virgaurea(Homeopathic Substance)
 - * NHPID Name : HPUS_Solidago virgaurea
 - * Reference : HPUS(미국 동중요법약전)
 - * Category : Homeopathic Name
- Source Material(s) : Flowering tops
 - * Method of Preparation(s)
Name : HPUS Class C / HPUS Class N
Minimum Homeopathic Potency : MT
- Natural Medicines Comprehensive Database
 - 일반명 : Aaron's Rod, Baguette d'Aaron, Canadian Goldenrod, Early Goldenrod, European Goldenrod, Gerbe d'Or, Herbe des Juifs, Solidage, Solidage du Canada, Vara de Oro, Verge d'Or, Woundwort
 - 학 명 : *Solidago virgaurea* (European goldenrod); *Solidago canadensis* (Canadian goldenrod), synonym *Solidago longifolia*; *Solidago gigantea* (Early goldenrod), synonym *Solidago serotina*. Family: Asteraceae/Compositae
 - 이 용
 - * 경구용 항 염증제, 경련 방지제, 이뇨제로 활용하고 통풍, 류머티즘, 관절염, 습진 및 기타 피부 질환에도 사용함
 - * 폐결핵, 당뇨, 간, 치질, 내부 출혈, 알레르기 성 비염, 천식의 확대 및 전립선 비대증의 급성 악화에 사용
 - * 요로, 비뇨기 결석, 신장 결석의 염증성 질환의 소변 흐름을 증가시키는 보조치료제로 활용
 - *Solidago virgaurea*를 함유한 제품은 148 종의 제품이 있고 54종이 캐나다 인증을 받았음

(5) 제품 홍보 및 마케팅 전략 수립

- 식품박람회 참여를 통한 미역취 제품 홍보



- 예기채 홍보 홈페이지 구축

- 원재료/개발경위/효능의 소개를 통한 소비자 인지도 향상 도모

- 예기채(禮己菜)의 브랜드 스토리 설명

- * 조선시대 임금들이 “예신(禮臣)*을 행 하셨듯이 “자신의 건강한 심신을 위해 자기에게 예로써 선사하는 채소나 약초”

- 울릉미역취 : 기원, 생태, 용도 등을 개요

- B2BC 사업화를 위한 수요자 대상의 홍보/마케팅 수단으로 활용

- 체지방 감소 관련 미역취추출물 소재 개발 홍보물 게재

- 자사 홈페이지와의 링크(연동)을 통한 사업화 홍보수단으로 활용

- 향후 중견기업 이상 규모 기업과의 연구개발 세미나를 통한 3자 간 공동 사업화 기초마련 및 유통 경로 확보

(6) 기타

가. 선행기술조사보고서 작성

- 미역취 관련 국내 특허 조사
- 조사일 : 2017년 6월 19일
- 작성기관 : 특허법인 세신
- 보고서 검토 의견
 - 총 50건 중 33건의 특허가 유효특허로 확인됨.
 - 유효특허의 대부분은 미역취가 산야초, 산나물, 야생초 등의 하나의 예시로 기재되어 있으며, 일반적인 효능에 대해서 기재되어 있을 뿐, 미역취 자체로 인하여 발생하는 특징적인 효능에 대해서는 기재되어 있지 않음.
 - 미역취 효능으로는
 1. 출원번호 제2004-0050306호에 골 대사 질환 예방 및 치료기능,
 2. 출원번호 제2011-0078458호에 육제품의 지방산화 억제(항산화제, 보존제) 기능,
 3. 출원번호 제1991-0700255호에 염증성 류마티스 통증과 염증 감소 기능,
 4. 출원번호 제2012-0141635호와 제2010-0129398호에 항산화, 항주름, 항염증, 미백, 주름억제 등의 효능(화장료 조성물)에 대하여 기재되어 있음.
 - 특허, 항비만(고지혈증 등)과 관련하여
 1. 출원번호 제2017-0065451호에 항비만 기능(식품 조성물),
 2. 출원번호 제 2015-0148988호에 혈중 콜레스테롤 감소 및 고지혈증 개선효과.
 3. 출원번호 제2015-0077595호에 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선 효과(식품조성물),
 4. 출원번호 제2015-0076181호에 항비만 기능 (식품조성물)의 특허가 공개 및 등록 되어있음.
 - 상기 검토한 바와 같이, 미역취는 산나물, 산야초 등으로는 잘 알려져 있지만, 미역취의 특징적인 효능이나 작용에 대해서는 연구가 미진하여 연구개발 가능성이 높음.
 - 최근 연구 및 출원이 활발하게 진행되고 있는 추세이므로, 관련된 기술에 대하여 특허 확보를 원하는 경우에는 신속한 연구 및 출원의 진행이 필요할 것으로 판단됨.

나. 울릉미역취추출물 사업화 제안

- 대상 : 한국콜마(콜마비엔에이치)
- 한국콜마 기업개요
 - 사업영역 : 화장품, 의약품, 건강기능식품 ODM 토털 컨설팅
 - 화장품 : 기초화장품, 색조화장품, 베이비화장품, 헤어제품 등
 - 의약품 : 전문 및 일반 의약품, 생동의약품, 의약외품 등
 - 건강기능식품 : 라피노스, 아스잔틴, 가르시니아캄보지아 등
 - 건강기능식품 생산현황(푸드팜사업부문)
비타민&미네랄 : 파원버프, 활기소, 츠어블비타 등

체중조절 : 에스라인카페, 악마다이어트, 리얼화이버 등

스포츠/영양 : 스피드게이너, 크레아틴

장건강 : 락토파원, 프로바이오틱스, 프로칸, 황금유산균 등

여성/남성 : 백세백수오, 에노포즈퀸, 백수오신비 등

- 사업화 동기요인

- 악마다이어트((주)팜스빌)을 생산해 공급하고 있음
- 악마다이어트에 사용하는 원료는 가르시니아캄보지아추출물(인도산)
- 가르시니아캄보지아추출물을 전량 수입(인도)하고 있어 그 대체소재를 탐색하고 있음
- 제형(발포제, 탄산수소나트륨)에 따른 나트륨함량(5,500mg)이 매우 높아 향후 소비자 불만 문제를 가지고 있음

○ 기능성원료 소개

- 원재료명 : 울릉미역취(*Solidago virgaurea* subsp. *gigantea*)
- 제조공정 : 원재료 → 추출 → 농축 → 건조 → 기능성원료
- 기능성분 : 클로로겐산(*Chlorogenic acid*)

○ 한국콜마 검토결과 및 요청사항

- 한국콜마는 사업영역을 건강기능식품까지 확장하고 있음
- 다양한 건강기능식품을 OEM, ODM 공급하고 있음
- 가르시니아캄보지아추출물을 사용하는 악마다이어트는 체지방 감소 관련 주력 품목으로 팜스빌(김약사네)에 공급하고 있음
- 가르시니아캄보지아추출물을 대체할 수 있는 안정적인 원료를 탐색하고 있음
- 울릉미역취추출물은 국내산 원료로 경제성이 확보되면 가르시니아캄보지아추출물의 대체원료로 사용 가능함
- 사업성 검토를 위한 울릉미역취추출물의 경제성 분석자료와 일반식품 제품화를 위한 상품화 제안서를 요청

3-3. 연구개발성과

1. 논문

- Screening of Korean Natural Products for Anti-Adipogenesis Properties and Isolation of Kaempferol-3-*O*-rutinoside as a Potent Anti-Adipogenetic Compound from *Solidago virgaurea*, 2016, *Molecules*, 21(2):226-237.
- Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* extract in high-fat diet-fed SD rat, 2016, *ANIMAL CELLS AND SYSTEMS*, 20(6):335-343.
- Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* var. *gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N), 2017, *FOOD & NUTRITION RESEARCH*, 61(1):1273479.
- Analytical Method for the Validation of Three Polyphenols as a Marker Compound for the Standardization of *Solidago virgaurea* subsp. *gigantea* Extracts and Antiadipogenesis of Harvesting Time and Location, 2017, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. Article ID 3047408, 9 pages.

2. 특허

- 출원번호 : 10-2015-0076181, 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법, 2015.05.29
- 상표출원번호 : 40-2015-0094878, 상표등록출원-예기채, 2015.12.22
- 출원번호 : 10-2016-0093055, 신규한 시나모일 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물, 2016.07.22
- 상표등록번호 : 40-1197304, 상표등록출원-예기채, 2016.08.19
- 출원번호 : 10-2017-0017494, 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조 방법, 2017.02.08
- 출원번호 : 10-2017-0065451, 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조 방법, 2017.05.26
- 등록번호 : 10-1754149, 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조 방법, 2017.06.29

3. 인력양성

- 본 연구과제에 참여를 통해 미역취의 추출 및 유효 성분 분리법과 항비만에 대한 기능성 평가 기술에 대한 전문 인력 6명 배출함.

4. 홍보

- (1) 2015 서울국제식품산업대전 원재료 홍보 및 관능평가 수행
 - 행사명 : 2015 서울국제식품산업대전
 - 개최기간 : 2015. 5. 12(화) ~ 15(금)

- 개최장소 : 킨텍스(KINTEX) 1 ~ 8홀
- 전시구성 : 신제품 발표회, 디자인 컨설팅, 맞춤형 수출 마케팅 컨설팅 등
- 활동사항 : 울릉미역취(원재료) 홍보 리플릿 배부, 미역취 시제품 관능평가 수행

(2) 2016 서울국제식품산업대전 원재료 및 시제품 홍보

- 행사명 : 2016 서울국제식품산업대전
- 개최기간 : 2016. 5. 10(화) ~ 13(금)
- 개최장소 : 킨텍스(KINTEX) 1 ~ 8홀
- 전시구성 : 서울국제식품기기전, 서울국제호텔&레스토랑기기전, 서울국제식품전 등
- 주요프로그램 : 제 4회 글로벌 유통기업 초청 입점상담회 등
- 활동사항 : 예기채(울릉미역취) 시제품 홍보, 울릉미역취(원재료) 홍보 리플릿 배부

(3) 2017 대구국제식품산업전 원재료 및 시제품 홍보

- 행사명 : 2017 대구국제식품산업전
- 개최기간 : 2017. 6. 8(목) ~ 11(일)
- 개최장소 : 엑스코(EXCO)
- 전시구성 : 가공·기능식품존, 포장기기존, B2C 판매·홍보존
- 주요프로그램 : 중소기업 1:1구매 및 수출상담회 등
- 활동사항 : 예기채(울릉미역취) 시제품 홍보

○ 국제식품산업대전에서 본 연구팀이 ‘미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법’ 기술의 내용을 홍보함으로써 많은 농가를 포함한 농업조합, 항비만 관련 건강기능식품제조 업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 울릉도 미역취 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있음.

5. 교육지도

○ 각 세부와 협동이 교육지도를 거쳐 1) 표준화(Validation) 및 기능성 소재의 산업화 연구, 2) 제품화를 위한 정보 구축, 3) 건강기능식품 가이드라인 잡기, 4) 천연물 분리 정제의 기본 가이드, 5) 건강기능식품 소재 (체지방 개선)의 임상연구, 6) 시제품 생산을 통한 홍보 및 경제성, 시장성 분석에 대한 내용을 기술 지도함.

6. 시제품

○ 본 연구를 진행하면서 울릉도 미역취 소재의 체지방 감소 효능에 대한 연구 결과를 토대로 성신비에스티(주)가 주체로 “예기채” 시제품을 제작함. 타블렛 제조함으로써 미역취 소재의 고부가가치소재로서의 활용성 다양화를 추구함.

7. 기술실시

○ 출원 특허 “미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법”에 관하여 기술을 제공하고 독점적 전용실시권의 기술이전을 체결함.

8. 타 연구에 활용 및 2단계 연구에 활용

- 지역전략작목산학협력 광역화사업에 참여하여 홍삼을 활용한 면역강화 다이어트용 가공 시제품 개발 연구에 활용됨.

9. 학술발표

- 2014년 한국식품영양과학회, Inhibitory effects of Butanol fraction of *Solidago virga* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells
- 2015년 한국질량분석학회, Extraction methods and chemical standardization of *Solidago virga aurea* by HPLC and HPLC/MS/MS
- 2015년 International Conference on Biological, Environment and Food Engineering (BEFE-2015), Anti-Adipogenic Effect of *Solidago virga-Aurea* var. *Gigantea* Extract In 3T3-L1 Adipocytes
- 2015 한국질량분석학회 여름정기학술대회 및 총회, Effect of Anti-adipogenesis of *Solidago Virga aurea* var. *Gigantea* on the 3T3-L1 Adipocyte Cells and Structure Analysis Using EI-MS
- 2015년 한국생약학회, Inhibitory effects of Butanol fraction of *Solidago virgaurea* var. *gigantea* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells
- 2016년 제11회 세계약물연구학회, Butanol Fraction of *Solidago virgaurea* L. subsp. *gigantea* (Nakai) Kitam suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells
- 2016년 한국식품과학회, Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* subsp. *Gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathway in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N)
- 2016년 대한비만학회, Anti-obesity effects of *Solidago virgaurea* subsp. *Gigantea* characterized by decreased adipogenesis and regulated lipid metabolism
- 2016년 한국식품영양과학회, 미역취 국내외 식의약품 관련 인허가 현황 조사
- 2016년 한국응용생명화학회, Antioxidant Activity of Herbal Plants used for Health Functional Food
- 2017년 제46차 대한비만학회 춘계학술대회, Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* var. *Gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N)
- 2017년 한국식품과학회, Effect of *Solidago virgaurea* extract on obesity in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N)

10. 기타

- 시제품 제작하기 전 미역취농축액과 미역취과우치음료의 품목제조보고서를 제출함.

11. 연구성과 추후계획

(1) 추가 제품 개발

- 건강기능식품 상용화 이전에 침출차, 음료 형태의 시제품 개발예정
- 건강기능식품 상용화 이전스틱제품(통상 10g기준) : 미역취 추출 농축액 형태 - 2017년 12월 목표
- 향후 건강기능식품 개발 일정:
 - 1) 2018년 3월 임상보고서 완성 확보(바이오푸드 CRO 임상결과보고서 제출)
 - 2) 2018년 6월 이내로 CRO 계약으로 미역취추출물의 체지방개선을 위한 건강기능식품 개별인정 원료로 인정받기 위한 자료(논문 및 보고서) 취합 및 신청서 제출
 - 3) 2018년 12월 미역취추출물을 원료 인정받은 이후 이 원료가 함유된 품목의 제품 품목 신고
 - 4) 2019년 3월 이내 미역취추출물의 체지방개선을 위한 건강기능식품 최종 제품이 개발/시판 계획

(2) 사업화 계획

- 체지방 감소 (울릉)미역취농축분말 사업성 검토

- 개요

- 원 재 료 : 울릉미역취(200ton/년 생산)
- 기능성원료 : 울릉미역취분말로서 연간 약 40ton 생산
- 기능성원료 단가 : 175,000원/kg, 제품(15g) 1개당 2,652원
- 제조공정 : 원재료 → 추출 → 농축 → 건조 → 울릉미역취분말
- 울릉미역취분말 제품 생산량 : 연간 약 264만개 생산 가능
 - * 중량 및 구성 : 17g(150mg × 112정), 1개월분
 - * 원재료명 및 함량 : 울릉미역취농축분말 89%
 - * 기능성분 및 함량 : Chlorogenic acid로서 1.6%
- 울릉미역취분말 제품 소비자가격 : 8,700원
- 가르시니아카보지아 수입 및 매출현황
 - * 수 입 액 : 6,060천달러(7,375,020천원)
 - * 매 출 액 : 22,107,048천원
 - * 약 74억원을 수입해 221억원을 매출(약 3배의 부가가치)
 - * 디펫 파워가르시니아(56g) 기준, 464만개 생산
- 울릉미역취분말 제품 매출액 : 약 153억원 예상
 - * 전체 매출량의 50% 매출 달성
 - * 산출근거 : 264만개 × 2/3 × 8,700원 = 15,312,000,000원

- 원 재 료

- 원 재 료 : 울릉미역취(임산물 지리적표시 품목)
- 원 산 지 : 경상북도 울릉군 일대
- 생산과정 : 재배 → 수확(2회/년) → 블렌칭 → 연화 및 건조
 - * 노동력이 원료 가격의 대부분을 차지하고 있음

- 생산량 : 건물로서 약 200ton/년
- 가격 : 20,000 ~ 25,000원/kg(소비자가)
- 제조공정 및 기능성원료 단가
 - 수득율 : 20%
 - 기능성원료 단가 : 175,000원/kg(제품(15g) 1개당 2,652원)
 - 연간생산량 : 40ton
 - * 예기채 울릉미역취(17g/개) = 디펫 과워가르시니아(56g/개)

제조 공정	투입 자원	투입 경비	연간생산량	비 고
원재료	울릉미역취 80kg	160만원	200ton	2만원/kg
		↓		
추출	10% 주정 1,600kg			
		↓		
농축	시설 및 인력			
		↓		
동결건조	외주가공	120만원		30만원/회
		↓		
기능성원료	농축분말 16kg		40ton	15.13g/개

- 연간 제품 생산량
 - 기능성원료 : 울릉미역취농축분말 40ton
 - * 17g 제품 2,643,754개 생산 가능
 - 제품사양
 - * 중량 및 구성 : 17g(150mg × 112정), 1개월분
 - * 원재료명 및 함량 : 울릉미역취농축분말 89%
 - * 기능성분 및 함량 : Chlorogenic acid로서 34%
 - * 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 2정(300mg)
 - * 1회분 당 기능성분 섭취량 : 4.27mg
 - * 1일 기능성분 섭취량 : 8.50mg
 - * 소비자가격 : 8,700원
- 가르시니아캄보지아 수입 및 매출 현황
 - 수입현황(2014년)
 - * 수입건수 / 수입량 : 133건 / 195ton(1.47ton/회)
 - * 수입액 : 6,060천달러(7,375,020천원)
 - * 1ton 당 수입가격 : 3,782만원(37,820원/kg)
 - 매출현황(2014년)
 - * 제조품목수 : 915건
 - * 매출액 : 22,107,048천원

- 국내매출 : 21,657,845천원(전체 매출액의98%)
- 수 출 액 : 426,594달러(약5억원)
- 약 74억원을 수입해 221억원을 매출(약 3배의 부가가치)
디펫 파워가르시니아(56g) 기준, 464만개 생산

- 제품 및 기능성원료 비교

제 품 명	예기채 울릉미역취	디펫 파워가르시니아
제 조 원	성신비에스티	(주)노바렉스
관 매 원	성신비에스티	CJ제일제당
중 량	17g(150mg × 112정)	56g(500mg × 112정)
사용기간	1개월	1개월
소비자가격	8,700원	43,500원
원재료명 및 함량	울릉미역취농축분말 89%	가르시니아캄보지아추출물 75%
기능성 등급	생리활성기능성 2등급	생리활성기능성 1등급
기능성분 및 함량	Chlorogenic acid로서 1.6%	총 Hydroxycitric acid로서 60%
용법 및 용량	1일 2회, 1회 2정(300mg)	1일 2회, 1회 2정(1,000mg)
1회 분당 기능성분량	4.27mg	450mg
1일 기능성분 섭취량	8.50mg	900mg

○ 판매 사업화 계획

구 분	사업화년도					
	2017년 (종료)	2018년 (종료 후 1년)	2019년 (종료 후 2년)	2020년 (종료 후 3년)	2021년 (종료 후 4년)	
사업화 품목	-	2	4	5	5	
투 자 계 획	인건비 억원/고용인원	-	2/5명	4/10명	6/15명	6/15명
	재료비 및 설비투자비	2	5	10	15	15
	경상운영비	1	3	5	5	5
	계(억원)	3	8	15	20	20
생 산 계 획	개별인정형 원료(ton)	-	2	20	40	60
	일반식품 원료(ton)	-	10	20	40	60
관 매 계 획	내수	-	15	50	70	150
	수출	-	5	10	30	50
	계	-	20	60	100	200

- 세부 판매계획

- 협력업체인 대기업(CJ, 롯데, 대상, 광동제약 등)의 높은 브랜드 이미지를 활용하여 OEM 방식의 판매를 통한 수입원료 “ 가르시니아 캄보지아추출물” 보다 활성이 탁월하고,

청정지역인 울릉도에서만 자생하는 국내산 원료임을 대중매체에 적극 홍보할 예정이다.

◦ 상기 대기업을 통한 원재료 미역취의 체지방 감소효과 및 제품인지를 높인 후 자사 브랜드 상표출원명 “예기채” 이름으로 홈쇼핑 및 ON-Line 마켓을 통한 적극적으로 판매할 예정이다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

4-1. 목표달성도				
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년 도 (2014)	제1세부: 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가	제조 공정 표준화 연구	100	추출용매/온도/비율/시간/대량 추출최적화(scale-up/ 농축, 건조 등)
		원재료의 표준화 연구	100	식물종 확정/재배지역/사용부위/채취시 기 확립
		기능성 원료의 표준화 연구	100	지표물질 선정, 지표성분을 대상으로 validation 자료 확보
		활성 추출 분획물로부터 유효성 분리정제	100	추출, 여과, 농축 및 Chromatography를 통한 유용 물질의 분리, 정제 조건 확립
	제2세부: 미역취추출물로부터 체지방감소 효능검증 및 기전 연구	미역취추출물의 3T3L-1 세포에서 분화를 억제하는 분자기전 연구	100	PPAR- γ 및 연관 전사인자 발현 분석
			100	AMPK 연관인자의 발현 및 인산화 분석
			100	3T3L-1 세포에서 lipid 축적의 분석
	제1협동: 체지방감소에 도움을 주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구	원재료 최적화 및 대량생산	100	대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화
			100	건기식 원료 GMP 생산
	2차년 도 (2015)	제1세부: 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가	원재료 표준화	100
제조공정의 표준화			100	주정 비율별, 추출 온도별, 시간별 추출물의 HPLC 패턴 분석 및 유효 활성 검색

	유효성분 구조규명	100	활성 추출 분획물로부터 유효성분 구조 규명 및 분석 방법 확립
	비만관련효소활성	100	활성 추출 분획물의 pancreatic lipase의 억제 활성 측정
			활성 추출 분획물의 malic enzyme의 억제 활성 측정
			활성 추출 분획물의 Glucose-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)의 억제 활성 측정
			활성 추출 분획물의 Fatty acid synthase (FAS)의 억제 활성 측정
제2세부: 미역취추출물로부터 체지방감소 효능검증 및 기전 연구	고지방 식이 SD rat에서 체지방 감소효능 검증	100	일반사료와 고지방식이를 사용하여 6개의 군(군당 10 마리), 각각 미역취추출물을 투여 후 체중 변화 분석
	지방조직의 분석	100	FAS, PPAR- γ , CREB, ACC의 단백질 발현 분석
	혈액 내 지방 및 콜레스테롤 인자들의 분석	100	혈청내의 Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (HDLC)을 ELISA kit에 의해 측정
	식으로 섭취한 미역취의 독성 확인	100	미역취가 실험동물에 독성을 가지는지 확인하기, 신장독성의 표지자인 BUN을 혈액에서 ELISA로 측정

		Lipogenesis와 Lipolysis 연관 전사인자 의 단백질 발현 분석	100	미역취추출물의 활성 분획물로부터 분리 된 성분(21개)의 3T3L-1 세포에서 분화를 억제하는 분자기전 연구-FAS, C/EBP α , PPAR- γ 단백질 발현 분석
제1협동: 체지방감소에 도움을 주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구		식품 원료 사용 가능 인정	100	식물 형태학적 비교분석
		원재료 안전성 근거 확보	100	유통현황 조사 국내외 인허가 조사, 국내외 사용현황 조사
		원재료 유해물질 안전성 검증	100	중금속 시험분석 잔류농약 시험분석,
		지표(기능)성분 설정	100	클로로겐산 밸리데이션
		기능성원료 시생산	100	울릉미역취추출물 생산
		시제품 생산	100	상표 및 디자인 개발 제품 패키지 개발/생산
		제품 사업화 제안	100	경제성 비교분석 가르시니아캄보지아와 비교
		임상연구심의(IRB)	100	인체적용시험계획수립
		원재료 및 시제품 홍보	100	2016 서울식품산업대전 홍보 리플릿
3차년 도 (2016)	제1세부: 미역취추출물로부터 유효성분 분리, 구조 규명 및 항비만 효능 평가	항비만 효능 검증 및 기전 연구(<i>in vivo</i>) 고지방식이 마우스를 사용한 체지방 감소 효능 검증	100	체중, 사료섭취량 변화 측정 지방 세포 크기와 조직 무게 측정 혈액 내 지방 및 콜레스테롤 인자들의 분석 부고환 지방 조직의 지방세포 비교

			간과 지방 조직의 유전자 발현량 분석
	안정성 연구	100	3Lot 생산결과로 기준규격 설정한 규격이내에 안정성 실험(상온 1년, 가속 1년) 실시
제2세부: 미역취추출물로부터 체지방감소 효능검증 및 기전 연구	ob/ob 마우스에서 지방 감소효능 검증	100	ob/ob 마우스에서 미역취 추출물과 Compound 7을 투여하였을 때, 지방의 무게를 제어 지방감소 효능 확인
	지방조직의 분석	100	ob/ob 마우스에서 미역취 추출물과 Compound 7에 의한 지방 분화 관련 단백질(FAS, PPAR- γ , CREB)의 감소 현상 확인
	지방세포 사이즈 분석	100	ob/ob 마우스의 부고환지방과 복부지방에서 미역취 추출물과 Compound7에 의해 지방세포의 크기가 감소하는 현상을 확인하기 위해 복부지방과 부고환지방을 염색하여 사이즈 감소 확인
	혈액 내 지방 및 콜레스테롤 인자들의 분석	100	ob/ob 마우스의 혈청 내에서 미역취 추출물과 Compound7에 의한 전반적인 Cholesterol 감소현상을 생화학분석을 통해 확인
	식이로 섭취한 미역취의 독성확인	100	미역취 추출물과 Compound7을 식이로 섭취하였을 때 실험동물에 독성을 가지는지 확인하기 위해 혈청을 사용하여 간독성 수치인 AST, ALT의 분석과 신장독성 수치인 BUN을 통해 독성수치 확인
제1협동: 체지방감소에 도움을	IRB 신청, 승인 및 임상시험 진행	100	IRB 신청 및 승인 완료

주는 식품소재개발(제품화) 및 산업화 연구	기능성원료 신청 및 자료 보완	100	건강 기능 식품 기능성 원료 신청을 위한 제출 자료 작성
	(시)제품 개발	100	인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제조
	제품의 홍보 및 마케팅 전략 수립	100	2017 대구식품산업전 참가

4-2. 관련분야 기여도

- (1) SCI 논문 “Screening of Korean Natural Products for Anti-Adipogenesis Properties and Isolation of Kaempferol-3-*O*-rutinoside as a Potent Anti-Adipogenetic Compound from *Solidago virgaurea*, 2016, *Molecules*, 21(2):226-237.”을 게재함으로써 300가지 식물 추출물의 항 지방 생성 활성을 조사하였고, 미역취 소재 선별하여 새로운 기능성 소재를 발굴.
- (2) SCI 논문 “Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* extract in high-fat diet-fed SD rat, 2016, *ANIMAL CELLS AND SYSTEMS*, 20(6):335-343.”을 게재함으로써 생체 내 동물 모델에서 미역취 추출물의 항비만 활성을 조사하였고, Sprague-Dawley (SD) 쥐에게 고지방식을 투여하고 미역취 추출물 투여한 결과 활성화 된 AMPK가 지방 조직에서 지방 생성 및 지질 생합성의 억제를 유도함으로써 (1)의 *in vitro*의 활성을 뒷받침해주는 결과를 도출.
- (3) SCI 논문 “Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* var. *gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N), 2017, *FOOD & NUTRITION RESEARCH*, 61(1):1273479.”을 게재함으로써 생체 내 동물 모델에서 미역취 추출물의 항비만 활성을 조사하였고, 마우스 (C57BL/6N)에게 고지방식을 투여하고 미역취 추출물 투여한 결과 지방 생성과 지방 형성하는 유전자를 억제.
- (4) SCI 논문 “Analytical Method for the Validation of Three Polyphenols as a Marker Compound for the Standardization of *Solidago virgaurea* subsp. *gigantea* Extracts and Antiadipogenesis of Harvesting Time and Location, 2017, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. Article ID 3047408, 9 pages.”을 게재함으로써 울릉도에서 4 월에 수집 된 미역취 추출물은 기능성 식품 성분(Protocatechuic acid (PC), chlorogenic acid (CA)으로 비만 예방에 사용.
- (5) 특허 10-2015-0076181 “미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조 방법” 출원을 통하여 항비만 효능을 함유하는 미역취 추출물 또는 분획물을 함유하는 식품 조성물로의 기능성 식품소재로 이에 따른 기술을 제공하고 독점적 전용실시권의 기술 이전 체결.
- (6) 특허 10-2016-0093055 “신규한 시나모일 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함

하는 약제학적 조성물” 출원을 통하여 미역취로부터 분리된 신규한 시나모일 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서의 활용 가능성.

(7) 특허 10-2017-0017494 “미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조 방법” 출원을 통하여 우수한 각 지역별 미역취 추출물 또는 각 시기별 미역취 추출물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법으로의 활용 가능성.

(8) 특허 10-1754149 “미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조 방법” 등록을 통하여 우수한 활성 부탄올 분획물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법으로의 활용 가능성.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>○ 본 과제에서 획득한 체지방 감소 효능을 가진 울릉도 미역취 소재 추출물 및 유효 성분을 이용하게 되면, 농업인의 농가 소득의 증가와 함께 지역 경제를 활성화시키고, 고부가가치 산업으로 육성 가능.</p> <p>○ 울릉도 미역취 소재의 체지방 감소에 대한 검증된 효능을 참여기업에 기술이전 하였으며, 참여기업은 새로운 건강기능식품의 원료의 상품화 홍보에 적극적으로 활용할 계획.</p> <p>○ 협력업체인 대기업(CJ, 롯데, 대상, 광동제약 등)의 높은 브랜드 이미지를 활용하여 OEM 방식의 판매를 통한 수입원료 “ 가르시니아 캄보지아추출물” 보다 활성이 탁월하고, 청정 지역인 울릉도에서만 자생하는 국내산 원료임을 대중매체에 적극 홍보할 예정임.</p> <p>○ 효능 극대화의 과학적인 효능과 임상연구 기반으로 특허 및 논문 등의 확보된 지식재산권을 이용하여 건강기능식품의 개별인정 절차를 거쳐 원료인정이 확보하고, 이후에 미역취추출물 원료가 함유된 품목의 제품 품목신고를 거쳐 최종 제품이 개발/ 시판 예정임.</p> <p>○ 상기 대기업을 통한 원재료 미역취의 체지방 감소효과 및 제품인지도를 높인 후 자사 브랜드 상표출원명 “예기채” 이름으로 홈쇼핑 및 ON-Line 마켓을 통한 적극적으로 판매할 예정임.</p>	

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ 미역취 추출물에서 분리 된 caffeoylquinic acid의 in vivo 항염증 활성에 대한 기술정보 입수 (Abdel Motaal A., Ezzat SM. Tadros MG. El-Askary HI. (2016) In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from <i>Solidago virgaurea</i> in rats. <i>Pharm Biol</i> 54(12):2864-2870.)</p> <p>caffeoylquinic acid 계열 4개의 분리 된 화합물(25 및 50 mg/kg)의 생체 내 항염증 활성을 rat에서 평가했다. 분리 된 화합물은 염증 매개체 TNF-α 및 IL-1β의 과도한 생성을 크게 억제했다.</p> <p>○ 미역취 추출물이 심장 독성에 미치는 생화학적 영향에 대한 기술정보 입수 (El-Tantawy WH. 2014) Biochemical effects of <i>Solidago virgaurea</i> extract on experimental cardiotoxicity. <i>J Physiol Biochem.</i> 70(1):33-42.)</p> <p>심혈관 질환 (Cardiovascular diseases:CVD)은 세계의 개발도상국뿐만 아니라 선진국의 주요 건강 문제이다. Isoproterenol에 의해 유발 된 심장 독성에 대한 <i>Solidago virgaurea</i> 추출물의 보호 효과를 조사했다. <i>S. virgaurea</i> 추출물이 isoproterenol-처리 된 쥐에서 MDA(cardiac tissue malondialdehyde) 수준을 감소시키고 항산화제 상태를 증가시킴으로써 보호 효과를 제시했다.</p> <p>- 따라서 최근 논문 검색 결과 <i>Solidago virgaurea</i>의 선행 효능 연구 및 분리에 대한 연구가 미비하므로 지속적인 연구 결과를 통해 보다 효과적인 미역취 소재의 체지방 개선 건강기능식품 소재 활용성을 기대해 볼 수 있다.</p>		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<p>○ 본 연구는 일반과제로 신청하였다. 현재 특허 출원하여 일부 권리 확보를 하였으나, 건강기능식품 개별인정을 위한 절차는 남아 있는 상태이므로 향후 1년간의 보안을 유지하는 것이 산업화를 위하여 필요할 것으로 사료됩니다.</p>		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 과제는 실험실 안전관리위원회 규정을 준수하여 시행하였고, 연구원들은 연구실 안전관리법에 의거하여 1년에 12시간 의무로 규정되어 있는 연구종사자 안전교육을 실시하여 연구실 안전관리법 준수를 의무화함. ○ 교육을 수료한 연구원들에 한하여 수료증 발급함. ○ 수료증을 발급받은 연구원한테서만 실험실 출입을 가능하게 함. ○ 다양한 인화성·발암성 물질을 사용하기 때문에 후드시설, 소화기, 고글, 실험복 등을 갖춘 안전한 실험환경을 조성한 후 연구를 수행함. ○ 연구 개발을 위해 다양한 종류의 유기 용매를 사용하고 있어 공정에서 발생하는 위험 요인을 파악하고 월 1회 전체 연구원들의 안전교육 실시함. 		

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	논문	Screening of Korean Natural Products for Anti-Adipogenesis Properties and Isolation of Kaempferol-3-O-rutinoside as a Potent Anti-Adipogenic Compound from <i>Solidago virgaurea</i>	한림대학교	교신	Molecules	2.465	2016.02.17	중복	SCI
2	논문	Anti-obesity effect of <i>Solidago virgaurea</i> extract in high-fat diet-fed SD rat	한림대학교	교신	ANIMAL CELLS AND SYSTEMS	0.481	2016.12.19	중복	SCI
3	논문	Anti-obesity effect of <i>Solidago virgaurea</i> var. <i>gigantea</i> extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N)	한림대학교	교신	FOOD & NUTRITION RESEARCH	3.226	2017.02.13	단독	SCI
4	논문	Analytical							

		Method for the Validation of Three Polyphenols as a Marker Compound for the Standardization of <i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>gigantea</i> Extracts and Antiadipogenesis of Harvesting Time and Location	한림대학교	교신	Journal of Analytical Methods in Chemistry	1.801	2017.07.12	중복	SCI
5	기타	미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법	한림대학교산학협력단	기술이전	기술실시대상기관명-성신비에스티(주)	특허	계약체결일: 2016.05.03	단독	전용실시권

11. 기타사항

코드번호

D-13

○ 향후 건강기능식품 개발일정:

- 1) 2018년 3월 임상보고서 완성 확보(바이오푸드 CRO 임상결과보고서 제출)
- 2) 임상시험 대행기관인 “바이오푸드씨알오” 업체와의 위임계약을 통해 식약처에 건강기능성식품 개별인정형 신청서 작성, 접수, 자문 및 검토를 진행 할 계획.
(2018년 6월 예정, 처리기간 : 120일 소요됨)
- 3) 2018년 12월 미역취추출물을 원료 인정받은 이후 이 원료가 함유된 품목의 제품 품목신고 계획.
- 4) 2019년 3월 이내 미역취추출물의 체지방개선을 위한 건강기능식품 최종 제품이 개발/시판 계획.

- 준비자료 목록

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
3. 제조방법 및 그에 관한 자료
4. 원료의 특성에 관한 자료
5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격과 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서
6. 유해물질에 대한 규격과 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서
7. 안전성에 관한 자료
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

12. 참고문헌

코드번호	D-14
○ 2016년 기초연구과제 총서, 지방분해효소(pancreatic lipase) 작용을 억제하는 차세대 다이어트 식품소재 개발	
○ 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016	
○ 건식투데이, 한국건강기능식품협회, 2016	
○ 연구성과실용화진흥원, 건강기능식품 시장 동향, 2016.10	
○ 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2015, 2. 식품의약품안전처	
○ 항비만 소재기술분야 국내·외 연구동향, 식품산업진흥본부, 2006	
○ 보건복지부, 2006 비만 심포지움	
○ 통계청, 2013 한국의 사회지표	
○ 질병관리본부, 「국민건강통계」, 2011	
○ Datamonitor, "Pipeline and Commercial Insight: Obesity"(2009.7)	
○ Nutrition business journal 2010	
○ 식약청 식품원재료 DB	
○ 2006년 산림청-울릉군미역취, 지리적표시, 등록공고	
○ 울릉군농업기술센터, 고흥군농업기술센터	
○ 미역취 및 근연분류군(국화과)의 분류학적 재검토. Korean journal of plant taxonomy 42(1): 40-49, 2012	
○ 한국산 미역취속의 분류학적 연구(최하나, 2008)	
○ 식품성분표 제7개정판, 농촌진흥청, 2006 / 울릉군농업기술센터	
○ 특허정보넷 키프리스 www.kipris.or.kr	
○ Buchholz T., Melzig M. F. (2015) Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. Planta Med 81:771-783.	
○ Abdel Motaal A., Ezzat SM. Tadros MG. El-Askary HI. (2016) In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from <i>Solidago virgaurea</i> in rats. Pharm Biol 54(12):2864-2870.	
○ El-Tantawy WH. 2014) Biochemical effects of <i>Solidago virgaurea</i> extract on experimental cardiotoxicity. J Physiol Biochem. 70(1):33-42.	

주 의

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