

발간등록번호

11-1543000-002166-01

전남특산 약용작물(결명자,
하수오)을 이용한 수출전략형
장개선 식품 개발 최종보고서

2018.02.01.

주관연구기관 / 해남자연농업영농조합법인
협동연구기관 / 한약진흥재단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “전남특산 약용작물(결명자, 하수오)을 이용한 수출전략형 장개선 식품 개발”(개발기간 : 2014. 12. 19~ 2017. 12. 18)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 02. 01.

주관연구기관명 : 해남자연농업영농조합법인 (대표자) 황 상 덕 (인)
협동연구기관명 : 한약진흥재단 (대표자) 이 응 세 (인)

주관연구책임자 : 용 주 현
협동연구책임자 : 안 병 관

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114150-3	해당 단계 연구 기간	2014.12.19~ 2017.12.18	단 계 구 분	개발/개발
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	전남특산 약용작물(결명자, 하수오)을 이용한 수출전략형 장개선 식품 개발			
연구책임자	용주현	해당단계 참여 연구원 수	총: 10 명 내부: 10 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:210,000천원 민간: 60,000천원 계:270,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 16 명 내부: 16 명 외부: 명	총연구개발비	정부:630,000천원 민간:180,000천원 계:810,000천원
연구기관명 및 소속부서명	해남자연농업영농조합법인 기업부설연구소			참여기업명: 한약진흥재단	
위탁연구				연구책임자: 안 병 관	
요약				보고서 면수	
<p>- 발효균주 표준화 기술 확립, 발효 원료의 지표설정 및 시험법, validation 기술 확립, 동물시험을 통한 효능 평가, 원료의 안전성 평가 및 시제품 안정성 확보, 대량생산기술 확립 등을 통해 전남특산 약용식물인 결명자와 유산균 발효 기술을 이용한 신소재 ‘결명자발효분말’을 개발하였으며 이를 포함한 완제품, 변할시간 분말형 4,000set와 변할시간 음료형 1,500set를 생산하였음</p> <p>- 2017년 결명자 계약재배를 통해 해남 및 강진 지역 6개 농가로부터 3,280kg을 수매하였으며 국외 수출계약 2건(중국, 러시아)과 국내 판매계약 1건을 진행하였음. 더불어 향후 2018년~2022년까지 5년간 5,227백만원의 매출을 기대하고 있음</p> <p>- 향후 결명자발효분말의 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 개별인정형 원료 등재를 위해 동 기관이 주관하는 ‘기술사업화지원사업’에 본 기술을 활용하고 있으며 개별인정 등재 후, 제품화를 통해 국민 건강 증진, 수입효과대체, 소득증가, 일자리 창출 등을 기대함</p>				534 page	

〈 국문요약문 〉

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> - 전남특산 약용식물(결명자, 하수오)과 유산균 발효 기술을 이용한 핵심원료가 함유된 수출전략형 장기능개선 건강식품 개발 - 발효균주 표준화 기술 정립, 발효 원료의 지표설정 및 validation 기술 확립, 동물 실험을 통한 발효원료의 효능 평가 방법 확립, 발효원료의 안전성 평가 및 시제품 안정성 확보, 대량생산기술 확립을 통한 제품 개발 및 출시 		
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 1차년도 (2014. 12. 19 ~ 2015. 12. 18) <ol style="list-style-type: none"> 1. 변비개선 2종 소재의 추출방법 설정 <ul style="list-style-type: none"> • 50% 에탄올, 80℃, 4시간 3회 추출 확립 2. 발효력이 우수한 유산균 선별 <ul style="list-style-type: none"> • 최종 5종의 유산균 선별 - ①다른 종 ②우수한 당 분해 효소활성 ③비교적 빠른 균 성장 ④호기적 배양 가능 ⑤식품으로 사용 가능한 균주 • K1(<i>Pediococcus pentosaceus</i>), K2(<i>Lactobacillus casei</i>), K3(<i>Lactobacillus plantarum</i>), MJ90(<i>Lactobacillus kefir</i>), MJ92(<i>Lactobacillus pentosus</i>) 3. 결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 선별된 5종 균주 적용, 배지는 시료만 첨가 및 기타영양성분 미첨가, 시료량은 수분함량 대비 3%(v/v), 균 접종량은 수분함량 대비 3%(v/v), 배양시간 72시간, 배양온도 37℃ 설정 4. 개발된 발효기술에 의한 발효물 제작 <ul style="list-style-type: none"> • 기존 K1, K2, K3 + C1(<i>Bacillus subtilis</i>), Y(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 추가하여 상기 발효기술로 결명자 주정추출물, 하수오 주정추출물 제작 5. 결명자, 하수오 발효물에 대한 장기능(배변기능)개선 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • SD rat를 통한 각 균주별 결명자, 하수오 주정추출물의 변 개수, 변 중량, 변 수분함량, 장 이동거리, 대장관내 점액질 분비효과를 바탕으로 발효균을 K2 균주로 설정 6. 결명자, 하수오 발효물의 지표(유효)성분 분리 <ul style="list-style-type: none"> • 결명자: Emodin을 포함한 12개 anthraquinone계 화합물 분리 및 구조 동정 • 하수오: 지표성분 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside 분리 및 구조 동정 7. 발효 전·후 성분 모니터링 및 지표물질 함량변화 <ul style="list-style-type: none"> • K1, K2, K3, C1, Y 균을 이용한 결명자 주정발효 전·후의 배당체 및 aglycon(비당체)의 변화 확인 • K2 균주 발효물의 배당체 증가 및 aglycon감소를 제외하고 모두 배당체 및 aglycon 함량이 일정하거나 함께 감소 - 2차년도 (2015. 12. 19 ~ 2016. 12. 18) <ol style="list-style-type: none"> 1. 유효성, 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 설정 <ul style="list-style-type: none"> • 결명자 대비 하수오의 ①낮은 변비개선 효과 ②10배 높은 단가 ③이엽우피소 과동에 따른 추가 분석 필요와 수급 어려움 문제로 하수오를 미첨가한 결명자 		

100% 사용 결정

- 주정추출물의 볶음분쇄물 대비 ①182~211배 높은 제작 비용 ②에탄올 화기 취급에 따른 화재 위험 및 취급 주의 ③에탄올 필수 회수에 따른 막대한 비용 증가와 같은 문제로 결명자 단순분쇄물 또는 볶음분쇄물로 대체

2. 결명자 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발

- 시료량 3%, 발효균주 K2, seed 접종량 3%, 사균, glucose 미첨가, 24시간배양

3. 장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립

- 10L jarfermentor와 300L 발효조에서의 최적 aeration은 2L/min

4. 장기능개선 발효물의 장기능(배변기능)개선 유효성 평가

- 결명자 Methylene Chloride 분획물의 변비개선 활성 우수 확인
- 결명자추출물보다 분쇄물의 장기능개선 효능이 우수 확인
- 볶음 분쇄 결명자와 분쇄 결명자의 장기능개선 효능 차이 거의 없음 확인
- 발효 시간별 장기능개선 효능은 24시간 발효균에서 효과 우수 확인

5. 장기능개선 발효물의 안전성 평가

- 자체 및 외부위탁하여 SD rat에 대한 단회투여독성평가 실시
- 자체 - 3,000mg/kg까지 사망사례 및 이상증상 미관찰
- 외부(한국화학융합시험연구원) - 2,000mg/kg까지 사망사례 및 이상증상 미관찰

6. 장기능개선 발효물의 품질관리지표설정 및 시험법 밸리데이션

- 분리한 12개 화합물 중 함유량이 가장 많으며 발효 전·후 성분변화가 가장 우수한 Aurantio-obtusin으로 지표성분 설정
- 식품의약품안전처의 가이드라인을 바탕으로 시험법 밸리데이션 진행

7. 장기능개선 발효물의 식품 제형 설정

- 섭취가 용이하며 식감이 우수한 과립제형과 공정이 간단하여 제작기간이 비교적 짧고 원가 절감이 우수한 분말제형, 총 2종 선정
- 난소화성말토덱스트린 55%, 결명자발효분말 9.67%, 차전자피분말 8.33%, 치커리추출물분말 8.33%, 볶은쌀분말 8.33%, 프락토올리고당 7%, 혼합유당 3.34%

8. 개발된 제형에 따른 시제품 생산

- 제형별 약 2,000포씩 생산 (3g/포)
- 결명자발효분말 및 시제품 2종에 대한 품목제조보고 진행
- 결명자발효분말 및 시제품 2종의 영양성분 분석(열량, 탄수화물, 조단백질, 나트륨, 당류, 포화지방산, 트랜스지방, 콜레스테롤) + 식이섬유 분석

9. 발효물의 지적재산권 출원

- 특허 출원 및 등록 - 결명자를 발효시켜 변비의 개선 또는 예방 활성을 증진시키는 락토바실러스 카제이 균주(10-2016-0135269), 등록(10-1808306)
- 특허 출원 - 결명자 유산균 발효물을 포함하는 변비예방 및 치료용 조성물 (10-2016-0121282)
- 균주 국제 특허/기탁 - K2 균주(KCCM11907P)

- 3차년도 (2016. 12. 19 ~ 2017. 12. 18)

1. 원재료의 품질검사

- 결명자 수분함량 2.2%, 성상, 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은) 적합, 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, 비에치시, 디디티, 엔도설판) 불검출, 이산화황, 총 아플라톡신 불검출 확인
2. 제조공정 표준화 확립
- ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 원료들과의 단가 경쟁력 상승을 위해 기존 액상발효에서 고체발효로 시료 및 발효공정 변화하여 원가 21.15% 절감
 - 고체발효 대량생산공정 확립을 통해 핵심공정별 지표성분 함량 변화 및 최종 수율 76.5% 확인
 - 시험법밸리데이션 재 수행을 통한 지표성분 시험법 설정
3. 결명자발효분말(고체발효)의 장기능(배변기능)개선 유효성평가(이종간 포함)
- 결명자발효분말(고체발효)의 효능(SD rat)
 - 기존 결명자발효분말(액상발효) 대비 변 개수 약 74.3%, 변 중량 약 89.9%, 변 수분함량 약 91.4%, 장 이동거리 약 94.4%
 - 결명자발효분말(고체발효)의 장 이동거리 효능 SD rat와 비교(ICR mouse)
 - 이종간 유사한 결과로 유효성 평가 신뢰성 확보
4. 시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구
- 결명자발효분말(고체발효)의 발효 시 생성가능한 보존료(소르빈산, 안식향산, 데히드로초산, 파라옥시안식향산, 프로피온산)와 볶음 시 생성 가능한 벤조피렌 불검출 확인
 - 봉쇄시험은 제형이 정제와 캡슐제에 해당하지 않아 미진행
 - α-아밀라아제와 프로테아제는 효소식품에 해당하지 않아 미진행
 - 유통기한설정시험은 식품의약품안전처 고시 제2014-206호 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준” III.1.다항에 적용되어 미진행
5. BI&CI, 디자인 개발
- BI&CI 통합 브랜드명 국문 ‘변할시간’, 중문 ‘舒畅时间’, 영문 ‘C-Time’
 - 제형별 포장지, 내·외박스 디자인, 캐릭터 디자인 개발
 - 국문 ‘변할시간’ 상표 지식재산권 출원
6. 시제품의 장기능(배변기능)개선 유효성 평가
- 변할시간 분말형 및 음료형의 높은 장기능개선 효능 확인 및 음료형의 더 높은 효능 확인
7. 완제품 생산
- 변할시간 스틱 분말형 4,000set(30포/set, 2.5g/포)
 - 변할시간 스파우트파우치 음료형 1,500set(30포/box, 100ml/포)
8. 완제품의 품질검사
- 변할시간 분말형 - 열량, 탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨, 프로바이오틱스, 성상, 대장균군, 이물, 수분 확인
 - 변할시간 음료형 - 열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 나트륨, 당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당), 난소화성말토덱스트린(식이섬유), 성상, 대장균군, 세균수 확인
9. 판매마케팅, 바이어 상담을 통한 수출계약 체결

	<ul style="list-style-type: none"> • 변할시간 브랜드 전용 홈페이지(http://c-time.co.kr)와 공식인스타그램(https://www.instagram.com/ctime_official) 운영 중 • NSmall, GSshop, 2017 대한민국식품대전, 한국종합격투기(TFC) 경기 중 변할시간 로고 노출, 기 구축된 지역 판매처 및 소비자 등을 통한 홍보 및 판매마케팅 진행 중 • 2017 국제식품박람회(홍콩, 러시아 모스크바, 중국 산시성) 참가를 통한 세계 바이어 및 소비자 대상 홍보 및 판매마케팅 진행 • 국내 하라헤드쿼터스와 변할시간 2중 판매 계약 1건 체결과 러시아 “VENDING RU LTD”와 변할시간 분말형, 중국 “산서태원시백세식품유한공사”와 결명자발효분말 및 변할시간 2중에 대한 수출계약 체결 <p>10. 중국 수입건강기능성식품 개별 인증 중국 현지 보건 대행 체결</p> <ul style="list-style-type: none"> • 중국 내 보건기능 변통(쾌변 기능식품) • 중국 내 검사와 번역공증, 대행을 위해 KTR-China(Shanghai)와 보건 대행 계약 체결 <p>11. 장기능개선 발효물 및 변비개선, 생리활성 규명 관련 논문 투고</p> <ul style="list-style-type: none"> • KCI급 1건 투고 및 1건 게재 - 한국약용작물학회 • 게재 논문 - Effect of Roasted Water Extract of Fermented <i>Cassia tora</i> L. by <i>Lactobacillus casei</i> on the Loperamide-Induced Constipation Model in Rats. • 투고 논문 - A Twenty-six Week Repeated Oral Dose Toxicity Study and A Four Recovery Study of <i>Cassia tora</i> L. in Juvenile Sprague-Dawley Rats.. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균 발효기술을 통해 배변효능이 증진된 신규 핵심소재 ‘결명자발효분말’ 및 이를 활용한 완제품 ‘변할시간 분말형’, ‘변할시간 음료형’의 개발 및 판매를 진행하고 있으며 2018년~2022년까지 5년간 5,227백만원의 매출을 기대하고 있음 - 2017년 결명자 계약재배를 통해 해남 및 강진 지역 6개 농가로부터 3,280kg을 수매하였으며 국외 수출계약 2건(중국, 러시아)과 국내 판매계약 1건을 진행하여 사업화 기대가 큼 - 결명자발효분말은 같은 기관이 주관하는 ‘기술사업화지원사업’의 지원을 받아 전임 상시험, GLP 건강기능식품 안전성시험, 인체적용 임상시험 등을 진행 및 계획하고 있으며(사업기간 2017.08.30.~2019.12.31.) 이를 통해 표준화, 안전성, 유효성 자료를 마련하여 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 기능성원료로 등재하고자 함 - 약용작물의 단일 균주 발효 기술과 관련된 연구개발이 더욱 활발히 이루어질 것으로 기대되며, 이로 인해 관련 종사자의 일자리 창출 및 관련 업체의 소득 증대가 이루어질 것으로 예상됨 - 결명자발효분말의 팽창성 및 자극성 복합 효능을 통한 배변원활 효과를 통해, 변비로 고통받고 있는 전 세계인의 삶의 질이 향상될 것으로 기대됨 - 끝으로 결명자의 수입대체효과가 기대되며 결명자발효분말의 수출을 통해 관련 농가의 소득증대 및 국가 이미지 향상 등이 기대됨 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>약용작물</p>	<p>유산균</p>	<p>발효원료 안전성</p>	<p>대량생산기술</p>	<p>원료표준화</p>

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> - Export strategic technological development of intestinal function improvement health food that contains Jeonnam specialty medical plants (<i>Cassia tora</i> L., <i>Pleuropterus multiflorus</i> TURCZ.) and core materials utilizing Lactobacillus fermentation technique. - Fermentation Lactobacillus strain standardization technique establishment, index establishment and validation technique solidification of fermentation raw materials, Establishment of the effect evaluation method of fermentation raw materials through animal experiments, Safety evaluation of fermentation raw materials and establishment of safety for the test products, product development and sales initiation through the establishment of mass production technique. 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> - The 1st year (2014. 12. 19 ~ 2015. 12. 18) 1. Establishment of extraction method for two materials for constipation improvement <ul style="list-style-type: none"> • 50% Ethanol, 80℃, 4hour 3time extraction establishment 2. Differentiation of Lactobacillus with superb fermentation effect <ul style="list-style-type: none"> • Selection of two final Lactobacillus - ① Different species ② Superb sugar resolvability enzyme activation ③ Relatively fast growth ④ Aerobic cultivation possible ⑤ Bacteria strain used for food • K1(<i>Pediococcus pentosaceus</i>), K2(<i>Lactobacillus casei</i>), K3(<i>Lactobacillus plantarum</i>), MJ90(<i>Lactobacillus kefir</i>), MJ92(<i>Lactobacillus pentosus</i>) 3. The optimum fermentation technique development for <i>Cassia tora</i> L., <i>Pleuropterus multiflorus</i> TURCZ. extractions and grinded substances <ul style="list-style-type: none"> • Application of the selected five kinds bacillus strain, The culture medium with only the specimen and no other nutritions, the amount of the specimen to be 3%(v/v) of water content, bacteria strain addition to be 3%(v/v) of water content, culture time 72hours, culture temperature to be established at 37℃. 4. Fermentation product manufacturing by the developed fermentation technique <ul style="list-style-type: none"> • The existing K1, K2, K3, Manufacture of <i>Cassia tora</i> L. alcoholic extraction product and <i>Pleuropterus multiflorus</i> TURCZ. alcoholic extraction product by addition of C1(<i>Bacillus subtilis</i>), Y(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) and the aforementioned fermentation technique 5. Effectiveness evaluation of intestine function (bowel movement function) improvement of <i>Cassia tora</i> L., <i>Pleuropterus multiflorus</i> TURCZ. fermentation products <ul style="list-style-type: none"> • To establish the fermentation strain as Lactobacillus K2 based on number of feces, weight of feces, wet weight of feces, intestinal transit ratio, mucous secretion capacity effect of <i>Cassia tora</i> L., <i>Pleuropterus</i> 		

multiflorus TURCZ. alcoholic extraction through SD rats.

6. Index (effective) composition separation of *Cassia tora* L., *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. fermentation substances
 - *Cassia tora* L.: separation and structure identification of 12 anthraquinone system compounds including Emodin
 - *Pleuropterus multiflorus* TURCZ.: separation and structure identification of index substance 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside
7. Composition monitoring and index substance content change before and after fermentation
 - Confirmation of glycoside and aglycon changes before and after *Cassia tora* L. alcoholic fermentation using K1, K2, K3, C1, and Y strain
 - All glycoside and aglycon contents remain the same or reduce except for the increase and the reduction of aglycon of fermentation substances by K2 strain

- **The 2nd year (2015. 12. 19 ~ 2016. 12. 18)**

1. Mixing ratio establishment of the two substances through usefulness and economic evaluations
 - Decision on use of 100% *Cassia tora* L. without any *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. additive was made based on the factors such as *Pleuropterus multiflorus* TURCZ.'s ① Low constipation improvement effect ② ten-times high cost ③ The necessity for additional analysis due to *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight crisis and difficulty in its smooth purchase, as compared to the *Cassia tora* L.
 - As compared to mixed grinded substance, the issues such as ① 182~211 times high manufacturing cost ② Risk of fire and extinguisher system handling issue of ethanol ③ Substantial expense increase related to the compulsory ethanol reclaim made *Cassia tora* L.'s simple grinded substance or roasted grinded substance as the replacement.
2. Optimal fermentation technique development for *Cassia tora* L. extraction substances, grinded substances
 - Specimen quantity 3%, fermentation strain K2, seed quantity 3%, S, glucose not added, 24 hour culture
3. Establishment of mass production technology for fermentation substance of intestine function improvement
 - The optimum aeration is 2L/min in 10L jar fermenter and 300L fermenter
4. The effectiveness evaluation on intestine function (bowel movement function) of intestine improvement fermentation substances
 - Confirmation made on excellent constipation improvement activation of *Cassia tora* L. Methylene Chloride fraction
 - Confirmation made on more excellent intestine function improvement of *Cassia tora* L. grinded substance as compared to extracted substance
 - Confirmation of almost no difference in intestine function improvement between roasted-grinded *Cassia tora* L. and grinded *Cassia tora* L.

- As for the fermentation time, it is confirmed that 24hour fermentation group is most excellent in intestine function improvement
5. The safety evaluation on intestine function improvement fermentation substances
 - Conducted single dose oral toxicity test to SD rat in our own test and also contracted-out outside test
 - Own test – No death or abnormal symptom found up to 3,000mg/kg
 - Outside test(Korea Testing & Research Institute, KTR) – No death or abnormal symptom found up to 2,000mg/kg
 6. Quality management index establishment and method validation of intestine function improvement fermentation substances
 - Index concentration established with the highest concentration amount and the most excellent aurantio-obtusin in terms of substance change before and after fermentation among the separated 12 compounds
 - Test method validation is in progress based on the Food and Medicine Safety Bureau guideline
 7. Food formation establishment for intestine function improvement fermentation substances
 - Two kinds selected: Granules type that is easy to take and with good taste and Powder type that is easy to manufacture with relatively short production time and the best cost-reduction feature
 - Indigestible maltodextrin 55%, cassia seed fermentation powder 9.67%, psyllium seed husks powder 8.33%, cichorium intybus extraction powder 8.33%, roasted rice powder 8.33%, fructooligosaccharide 7%, mixed lactose 3.34%
 8. Production of test product according to developed formulation shape
 - About 2,000 bags per formulation (3g/bag)
 - Product manufacturing report in progress on two products of cassia seed fermentation powder and test product
 - Nutrition composition analysis on two products of cassia seed fermentation powder and test product (calories, carbohydrate, crude protein, natrium, sugar, saturated fatty acid, trans fat, cholesterol) + dietary fiber analysis
 9. Intellectual property patent applications on fermentation products
 - A patent application and registration
 - *Lactobacillus casei* strain improving constipation or enhancing preventive activation by fermented *Cassia tora* L.(Application number 10-2016-0135269), (Registration number 10-1808306)
 - Constipation prevention and treatment compounds that include *Cassia tora* L. Lactobacillus fermentation substance (Application number 10-2016-0121282)
 - A strain international patents/deposition – K2 strain (KCCM11907P)

- The 3rd year

1. Raw material quality test

	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cassia tora</i> L. water content 2.2%, phase, heavy metal(lead, arsenic, cadmium, mercury) passed, residual agrochemical (endrin, dieldrin, aldrin, BHC, DDT, endosulfan) not found, sulfur dioxide and total aflatoxins not found - confirmation <p>2. Manufacturing process standardization establishment</p> <ul style="list-style-type: none"> • Production cost 21.15% reduced by switching from the existing liquid fermentation to solid fermentation in specimen and fermentation process so as to be competitive in the price with 'Excretion activity enhancement effect' solid form notification type raw materials • Confirmation of core process index substance concentration change and the final yield 76.5% through solid fermentation mass-production process establishment • Index composition test method establishment through test method validation repetition <p>3. Intestine function(bowel movement function) improvement effectiveness evaluation (including different kinds)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cassia seed fermentation powder (solid fermentation) effects(SD rat) <ul style="list-style-type: none"> - As compared to the existing cassia seed fermentation powder(liquid form fermentation), number of feces 74.3%, weight of feces 89.9%, wet weight of feces 91.4%, intestinal transit ratio about 94.4% • Comparison with SD rat, ICR mouse in Cassia seed fermentation powder (solid fermentation) intestinal transit ratio effects <ul style="list-style-type: none"> - Reliability secured in effectiveness evaluation through results on different species <p>4. Research for evaluation in test product's safety, shelf life establishment</p> <ul style="list-style-type: none"> • Confirmation of absence of preservatives (sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, parahydroxybenzoic acid, propionic acid) that may be produced during cassia seed fermentation powder(solid fermentation) fermentation process, and benzopyrene that may be produced during roasting • Crumbling test not performed because the dosage form is not applicable to tablet and capsule forms • α-amylase and protease tests not performed as it is not applicable to enzyme food • Shelf life test was not conducted because Food and Medicine Safety Bureau Publication 2014-206 "Food, Food additive and health function food shelf life criteria" is applicable <p>5. BI&CI, design development</p> <ul style="list-style-type: none"> • BI&CI consolidated brand name, Korean name '변할시간', Chinese name '舒畅时间', English name 'C-Time' • Each packing paper by formulation, inside & outside boxes design, character design development • Application of trademark intellectual property for Korean name '변할시간' <p>6. Evaluation of test product's intestine function (bowel movement function) improvement effectiveness</p>
--	--

	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmation of effectiveness of C-Time powder form and even higher effectiveness of C-Time liquid form in intestine function improvement <p>7. Final product production</p> <ul style="list-style-type: none"> • C-Time Stick powder form 4,000set(30bag/set, 2.5g/bag) • C-Time Spout pouch drink form 1,500set(30bag/box, 100mL/bag) <p>8. Final product quality test</p> <ul style="list-style-type: none"> • C-Time Powder form <ul style="list-style-type: none"> - Calories, carbohydrate, sugar, crude protein, crude fat, saturated fat, trans fat, cholesterol, natrium, probiotics, shape, coliform group, foreign substance, water content confirmation • C-Time Drink form <ul style="list-style-type: none"> - Calories, carbohydrate, crude protein, crude fat, natrium, saccharide (fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose), Indigestible maltodextrin (dietary fiber), shape, coliform group, bacterial count confirmation <p>9. Sales marketing, buyer consultation for exportation contracts</p> <ul style="list-style-type: none"> • C-Time Brand homepage (http://c-time.co.kr) and official instagram (https://www.instagram.com/ctime_official) in operation • NSmall, GSshop, 2017 Korea Food Grand Exhibit, '변할시간' logo exposure in Korean Top Fighting Championship (TFC), Promotion and sales marketing in progress through existing local sales networks and consumers • Promotion and sales marketing through international buyers and consumers at 2017 International Food Exhibition (Hongkong, Moscow of Russia, Shanxi of China) • Contract signed with domestic buyer on two-kinds products; one contract with "RU LTD" of Russia on powder form product, "Shanxi one hundred Food Limited" of China on cassia seed fermentation powder and two-kinds of C-Time product export contracts signed <p>10. As for China exportation, health food individual certification being contracted out to an agency in China</p> <ul style="list-style-type: none"> • Health function excretion enhancement (Easy excretion functional food) in china • Contract made with Chinese agency KTR-China(Shanghai) for test and translation <p>11. Intestine function improvement fermentation substances and constipation improvement, Biological activation analysis paper submitted</p> <ul style="list-style-type: none"> • KCI class 1 paper submitted and 1 paper published <ul style="list-style-type: none"> - The Korean Society of Medicinal Crop Science, KSMS • Published paper - Effect of Roasted Water Extract of Fermented <i>Cassia tora</i> L. by <i>Lactobacillus casei</i> on the Loperamide-Induced Constipation Model in Rats. • Submitted paper - A Twenty-six Week Repeated Oral Dose Toxicity Study and A Four Recovery Study of <i>Cassia tora</i> L. in Juvenile Sprague-Dawley Rats..
--	--

<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sales efforts in progress, expected sales 5,227,000,000 won over 5 years 2018 through 2022 expected on 'cassia seed fermentation powder' with improved bowel movement function based on new materials produced through Lactobacillus fermentation technique; products in 'C-Time powder form' and 'C-Time drink form'. - In 2017년, 5,752Kg <i>Cassia tora</i> L. were purchased from six farms of Haenam and Gangjin through contracts and two export contracts (China, Russia), and one domestic contract have been made, raising the expectation for the success into the future. - Cassia seed fermentation powder is being supported by 'Technology Commercialization Support Project' and is planned for tests such as pre-clinic test, GLP health function food safety test, clinic test on human body, etc., (Project period 2017.08.30~2019.12.31), and materials on standardization, safety, effectiveness will be prepared for helping people on 'excretion activity enhancement'. To be registered as 'Functional Material'. - Research and development related to medical crop's single strain fermentation technique is expected to become active further, and job creation and income boost for related businesses are expected. - It is expected that the life quality would improve for the people suffering from the constipation when they use cassia seed fermentation powder that has expansion and stimulus effects that eases the symptom through excretion enhancement effect. - Lastly, <i>Cassia tora</i> L. import replacement effect is expected, and through exportation of the cassia seed fermentation powder, the income of the farms and the national image would be boosted. 				
<p>Keywords</p>	<p>Medininal plant</p>	<p>Lactobacillus</p>	<p>Safety of fermented ingredient</p>	<p>Mass production</p>	<p>Standardization of functional ingredient</p>

< CONTENTS >

1. Outline of Research and Development Project	15
2. Domestic and overseas technology development status	64
3. Contents and Results of Research	105
3-1. Research and development strategy and method	105
3-2. Research and development proceeding system	106
3-3. Annual research and development schedule	108
3-4. Annual research and development objects and main contents	111
3-5. Annual research objectives and research method	115
3-6. Detailed research results	123
3-6-1. The 1st year	128
3-6-2. The 2nd year	251
3-6-3. The 3rd year	358
3-7. Research and development results	465
3-8. Technical achievements and economic achievements	481
4. Achievement of goal and contribution to related field	495
4-1. Objective achievement levels of objectives and contents	495
4-2. Objective evaluation criteria and objective achievement level per criterion	498
4-3. Contribution to the related field	501
5. Plan to use research results	507
5-1. The necessity of the additional research and utilization for other businesses	507
5-2. Other research application and usage fields	509
6. Overseas science and technology information collected during the research process	510
7. Security level of R&D achievement	524
8. Research facilities & equipments registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System	525
9. Implementation of safety measures in laboratories based on R&D tasks ·	526
10. Representative Research Results of R&D Project	530
11. Others	531
12. References	532

<Enclosure 1> Research and Development abstract

<Enclosure 2> Self evaluation written opinion

<Enclosure 3> Research results utilization plan

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	15
2. 국내외 기술개발 현황	64
3. 연구수행 내용 및 결과	105
3-1. 연구개발 추진전략 및 방법	105
3-2. 연구개발 추진체계	106
3-3. 연차별 연구개발 추진일정	108
3-4. 연차별 연구개발 목표 및 주요내용	111
3-5. 연차별 연구목표 및 연구수행방법	115
3-6. 세부연구수행 결과	123
3-6-1. 1차년도	128
3-6-2. 2차년도	251
3-6-3. 3차년도	358
3-7. 연구개발성과	465
3-8. 기술적 성과 및 경제적 성과	481
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	495
4-1. 목표 및 수행내용에 따른 목표달성도	495
4-2. 평가의 착안점 및 기준에 따른 목표달성도	498
4-3. 관련분야 기여도	501
5. 연구결과의 활용계획 등	507
5-1. 추가 연구의 필요성 및 타 사업에 활용	507
5-2. 기타 연구 응용 및 활용 분야	509
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	510
7. 연구개발성과의 보안등급	524
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	525
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	526
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	530
11. 기타사항	531
12. 참고문헌	532

<별첨1> 연구개발보고서 초록

<별첨2> 자체평가의견서

<별첨3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

※선정당시 「연구개발계획서」와 전년도 제출하였던 「연차실적계획서」상의 내용과 동일하게 작성

1-1. 연구개발 목적

- 장기능 개선 약용식물 유산균 발효를 이용한 장건강식품 개발을 위해 발효균주 표준화 기술 정립, 발효 원료의 지표성분 설정 및 validation 기술 확립, 동물실험을 통한 발효 원료의 측정 평가 방법 확립, 발효원료의 안전성 평가 및 시제품 안정성 확보, 대량생산기술 확립으로 수출전략형 제품 개발, 제품 출시를 목표로 함

1-2. 연구개발의 필요성

1) 건강지향형 식품개발의 필요성

- 우리나라를 비롯한 중국, 대만 등 동남아 주변국의 산업화로 인해 국민소득이 상승함에 따라 생활수준이 향상되었고, 의학기술의 발달로 고령화 인구가 폭발적으로 증가됨에 따라 건강에 대한 관심이 전 세계적으로 증가하고 있음
- 이에 따라 보다 더 행복하게 살기위한 ‘웰빙’ 이 트렌드가 되었고 그로인해 인간의 궁극적인 목표 중 하나인 노화를 지연시킬 수 있는 의약품 및 건강을 예방할 수 있는 기능성 식품에 대한 수요가 증가하고 있음
- 또한 고령화로 인해 발생하는 관절염 및 노인성 변비 등의 환자가 꾸준히 증가되고 있으며, 이에 따르는 건강기능식품 및 관련 식품에 대한 수요도 늘어나고 있는 추세임
- 최근에는 우리나라와 일본 등의 동양에서도 변비와, 염증성 장질환의 빈도가 급격하게 증가하고 있는데, 이는 식생활을 비롯하여 점차 서구화되어 가는 생활습관과도 관련이 있으며, 진단 기술의 발달도 이에 기여하리라 생각됨
- 장기능 개선 약용식물의 유산균 발효 기술 개발은 농림식품부 10대 농생명소재와 부합된 소재 기술임
- 농생명소재분야에서 우리나라는 선진국에 비해 5년 정도 뒤쳐져 있어 국가 전략적 산업 육성이 필요함

〈표〉 농림식품부 10대 농생명소재

구분	주요 내용	소재	관련산업	주요 소재기업
천연 항생제 대체재	무독성(저독성)의 천연 항생제 대체재 개발 - 미생물(생균제) 항생제 대체재 - 약용식물(허브) 추출물 항생제 대체재 - 농산물 가공 부산물을 이용한 항생제 대체재	동물건강소재	생물 농산업	카길에그푸리나, (주)CJ, (주)미아리산제약, (주)인트론바이오 테크놀로지
천연 5味 소재	천연 기능성 감미·조미료 소재 상용화 기술	식품소재,	식품 산업	(주)CJ, (주)대상,

구분	주요 내용	소재	관련산업	주요 소재기업
	개발 - 향당뇨비만충치 감미료 소재 생산 기술 확보 - 천연 고감미료(혼합 감미제) 확보	농산업소재		(주)삼양사, 카길에그푸리나, 코카콜라
기능성 아미노산	농축수산업 및 식품산업 부산자원을 원료로 한 유용 아미노산과 펩타이드 개발 - 신부가가치의 건강식품용, 화장품용, 사료용 등의 향균/향비만/향당뇨/향치매 기능의 펩타이드 개발	동물건강소재, 농산업소재, 생활소재, 식품소재	식품 산업, 화장품 산업, 의약품 산업	(주)CJ, 펩트론, (주)코스데이, (주)샘표, (주)바이오FD&C, (주)케어젠, (주)에이앤랩
기능성 효소	고기능 및 신기능 산업효소 개발 - 가축 사료용 효소 개발 - 식품첨가물 효소 개발 - 펄프, 세제, 섬유 제조를 위한 효소 개발	농산업소재, 생활소재, 동물건강소재	식품 산업, 의약품 산업, 바이오에너지 산업	화이자, DSM, Novozyme, Novo-Nordise, (주)CJ, (주)인섹트 바이오효소
천연 장기능 개선제	장 정착능력이 우수한 고 기능성 프로&프리바이오틱스 개발 - 고기능성 프로&프리 바이오티스 확보 - 전통 발효 식품 유래 프로프리 바이오티스 확보 - 인체 적합성이 높은 맞춤형 프로&프리 바이오티스 확보 - 유전체 기반 식이섭유 및 올리고당류 개발	식품소재	식품 산업, 의약품 산업	(주)오리온, (주)CJ제일제당, (주)한국야쿠르트, (주)셀바이오텍, (주)에이엠바이오

- 농생명소재 시장규모는 2020년도에는 2,500억달러 시장규모를 보일 것으로 예상함
- 장기능개선소재의 발굴 및 개발은 농생명소재 실용화사업으로 신성장동력 창출될 것으로 예상됨
- 전남도는 1차 산업구조의 비중이 타 시도에 비해 높ی 구성되어 있음
- 내년 쌀시장 전면 개방은 전라남도 농가에 치명적인 타격을 줄 수 있으며 이를 타개할 수 있는 전략이 필요함
- 따라서 이러한 위기를 극복할 수 있으며 고부가가치 산업을 창출할 수 있는 소재의 개발이 필요하다고 판단하였음

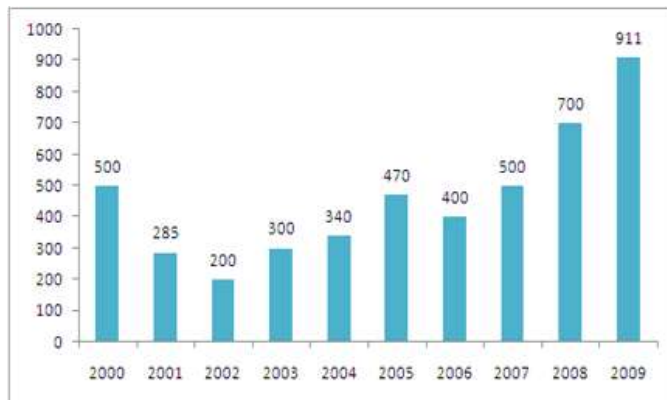
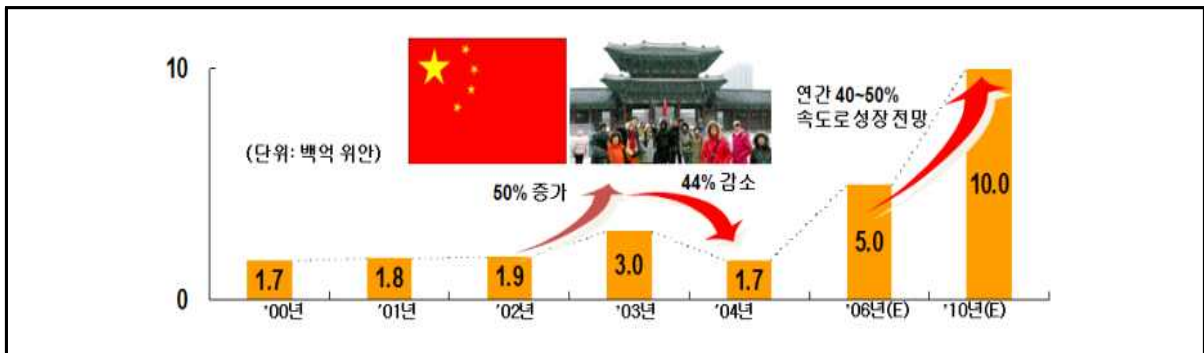


2) 대중국 수출전략형 기술개발 및 제품개발의 필요성

- Nutrition Business Journal(2012)의 자료에 따르면, 건강기능식품 시장은 2010년 약 3,014억불로 연평균 6.6%의 성장을 기록하고 있으며 연평균 성장율은 동유럽/러시아 (11.7%)가 가장 높았으며 그 다음 라틴아메리카(11.6%), 중국(11.4%)순으로 폭발적으로 성장하고 있음
- 중국내 판매되는 건강기능식품은 면역력 강화, 혈액 지질 조절, 장기능개선, 피로회복 등의 제품이 판매되고 있으며 이들 제품은 총 건강보조식품 판매 수익의 41.4%를 차지하고 있음



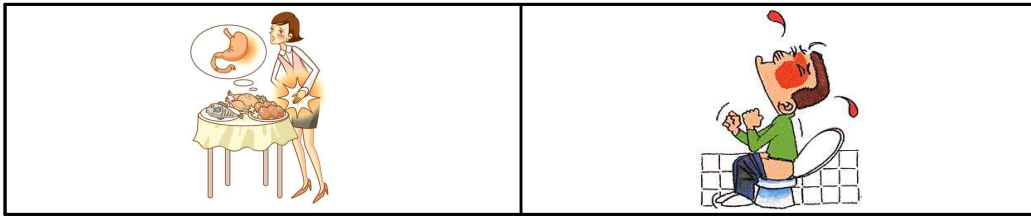
- 2010년 중국의 건강기능식품의 산업 규모 약 1,300억 위안으로 계속 증가되고 있으며 중국의 경제성장과 더불어 건강에 대한 관심 증가로 건강기능식품의 효능, 효과에 대한 기대 및 신뢰 증가되고 있음



[그림] 중국의 보건식품 매출액 추이(2009)

3) 장기능 개선 관련 기술개발의 필요성

- 최근 생활수준의 향상, 식문화의 활발한 교류 등으로 인해 우리의 식생활은 고단백, 고지방질, 저섬유질의 서구식 식생활로 바뀌고 있는 실정임. 질병관리본부의 2007년 건강영양조사에 대한 보고서에 따르면 한국인의 동물성 식품 섭취비율이 20% 수준에 달하게 되었으며 이는 1969년 3.0%에 불과하였던 것과 비교하여 매우 증가한 수치임을 알 수 있음
- 이와 연관 지어 식물성 식품의 섭취비율은 1969년 559g이었던 것과 비교하여 최근 282g으로 현저하게 감소하였으며 그 결과 채소, 곡류 등 식물성 식품에 함유되어 있는 식이섬유의 섭취가 감소하면서 대장 관련 질병의 발생이 증가하고 있음



- 이러한 식생활의 변화는 고지혈증, 비만, 변비 등의 생리적 변화를 유발시켜 다양한 만성퇴행성 질환으로 인한 대사 증후군의 발병 원인이 되며 또한 현대인들의 불규칙적이고 불균형된 식생활, 운동부족, 스트레스의 증가 등 복합적인 생활요인들로 인해 장기능의 저하와 만성 변비, 과민성 대장증후군, 장염 등 각종 대장 관련 질병을 증가시키는 것으로 알려짐
- 변비(constipation)는 예로부터 만병의 근원으로 일컬어지고 있으며 체내의 유해 물질을 몸 밖으로 배출하는 작용의 문제가 생겨 변의 독소가 장을 통해 혈액에 흡수되어 여드름, 기미, 피부노화 등을 촉진시킴
- 변비는 기질적인 장관 내 병소, 대사성 질환, 특정 약물의 복용 등 변비를 유발하는 원인으로 인해 이차적으로 발생하는 변비와 특정원인 없이 특발성으로 발생하는 변비로 분리되는데 대부분의 경우 대장운동의 저하 또는 직장항문의 운동 이상이 있다고 알려짐
- 만성변비는 삶의 질을 저하시키고 장내 이상 발효로 생긴 유해물질로 인해 두통, 식욕부진, 복부불쾌감, 알레르기의 원인이 되고 치질, 대장계실증 및 대장암 발생과 뇌졸중 위험 등 2차 질환의 원인이 있는 실정임
- 변비의 치료에서 가장 기본적으로 식이요법과 운동 등이 동반되지만 이런 방법이 용이하지 않은 환자의 경우 이차적으로 약물을 사용하는데 부피형성 완화제 및 삼투성 완화제의 경우 복부팽만, 설사 등이 동반될 수 있으며 자극성 하제의 경우 장기간 사용 시 대장 흑색소증, 전해질 이상 및 고알도스테론증 등의 합병증을 유발할 수 있다고 알려져 있음
- 현재 치료약물의 부작용 및 변비환자의 규모를 고려할 때 변비의 예방 및 치료에 효과가 있는 식품 또는 천연소재의 탐색 및 연구가 보다 활발해야 할 것으로 사료됨

- 이러한 변비를 개선시키고 장 기능을 원활히 하기 위해서는 변비를 유발시키는 원인을 감별한 후 생활 습관 지도와 식사요법으로 치료하는 것이 좋는데 규칙적이고 적절한 양의 식사를 하는 것이 가장 중요함
- 장의 연동 운동에 효과적인 식품으로는 섬유소가 많이 함유된 해조류, 펙틴, 유기산 등이 많이 함유된 과일, 우유에 함유된 유당과 요구르트 등을 들 수 있음
- 최근 발효유에 기능성 물질이 첨가된 여러 형태의 발효제품이 생산되고 있는데 발효 기질로는 다시마, 자색 고구마, 녹차, 인삼, 삼백초, 구기자, 오디, 클로렐라 등 다양한 천연재료가 이용되고 있으며, 이들을 이용한 장 기능 및 변비를 해결하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있음

4) 장기능 발효 제품개발의 이점

- 최근 안전성, 고급화, 편의성, 건강 등 소비자들의 다양한 가치 추구에 의해 제품의 생산과 가공에 있어 새로운 변화를 요구하고 있으며 소비 패턴이 단순했던 과거에 비해 다양성과 개개인의 취향을 고려해야하는 시대임
- 발효는 효모나 세균 따위의 미생물이 지니고 있는 효소작용으로 유기물이 분해되어 알콜류, 유기산류, 탄산가스 등이 발생하는 작용이며 최근 들어 다양한 천연 약용작물을 발효기술의 접목을 통해 새로운 기능과 효능을 부가하여 개발되는 추세임
- 특히, 유산균 관련 제품을 포함한 발효식품은 대표적인 웰빙식품으로 소비자의 관심이 높아지고 있으며 발효과정에서 생성되는 효소와 기능성 물질들은 식품분야뿐만 아니라 바이오에너지, 바이오플라스틱, 제약 및 화장품 등 관련 산업간의 융·복합을 이루면서 다양한 형태로 파급되고 있음
- 미국의 건강 전문 잡지 ‘헬스’가 선정한 세계 5대 건강식품으로는 스페인의 올리브유, 그리스의 요구르트, 일본의 낫토, 한국의 김치, 인도의 렌틸 콩이 있으며 이 중 요구르트, 낫토, 김치는 발효식품이 건강에 기여하는 중요성을 보여주는 단적인 예임
- 또한 발효식품은 민족의 역사와 생활양식, 그 지역의 기후 등을 모두 반영하고 있는 문화의 집합체이자 슬로우 푸드(Slow Food)의 대명사로 현대인들의 인식에 있어 매우 호의적이며 현재 고기능성 자연식품으로 소비의 트렌드가 이동하고 있음

5) 변비개선 치료제 시장동향

- 연간 3백50억원 대로 추정되는 변비치료제의 국내시장 규모는 작지만 수요가 꾸준하여 매년 5%씩의 안정적인 성장을 나타내고 있음. 특히 매일 약국을 찾아오는 변비 환자들이 10여명 이상되는 것으로 파악되고 있어 안정적인 수요가 확보되어 있는 시장이기도 함(출처: 약업신문, www.pharm21.com)
- 2008년 8월 독일계 리서치회사인 GfK가 국내 인구 1천5백63명을 대상으로 변비 유행률을 조사한 결과, 전체 인구의 25.1%로 나타났으며 20대가 28.2%, 60대가 25.7%로 조사됐음



[그림] 국내 변비환자 및 진료비 추이

- 건강보험심사평가원이 최근 5년간(2007~2011년)의 심사 결정자료를 이용해 변비에 대해 분석한 결과, 진료인원은 2007년 43만3000명에서 2011년 57만8000명으로 5년간 약 14만5000명이 증가(33.7%)했고 연평균 증가율은 7.6%로 나타남
- 총 진료비는 2007년 157억원에서 2011년 219억원으로 5년간 약 62억원이 증가(39.7%)했고 연평균 증가율은 8.8%로 나타남



[그림] 성별 진료인원 현황

- 변비의 성별 진료인원 현황을 비교해보면 남성이 2007년 17만3301명에서 2011년 24만1358명으로 약 6만8000명이 증가했으며 여성도 2007년 25만9719명에서 2011년 33만7507명으로 약 7만 8000명이 증가함
- 성별 비율은 매년 약 1.4~1.5배 수준으로 여성이 많았고 연평균 증가율은 남성이 약 1.9% 더 높은 것으로 나타남으로(남성 8.7%, 여성 6.8%) 성별에 관련없이 점차 급히 증가함을 알 수 있음
- 변비 유병률이 이처럼 높은 것은 환자들이 변비를 간단한 증상으로 여겨 방치하고

있기 때문인 것으로 전문가들은 판단하고 있음

- 국내 변비 치료제 시장은 한국베링거인겔하임의 돌코락스 에스(34%), 코오롱제약의 비코그린(18%), 부광약품의 아락실(15%) 등 빅3 제품이 시장을 리드하고 있으며 이 세 가지 제품이 전체 시장의 65% 이상을 점유하고 있음



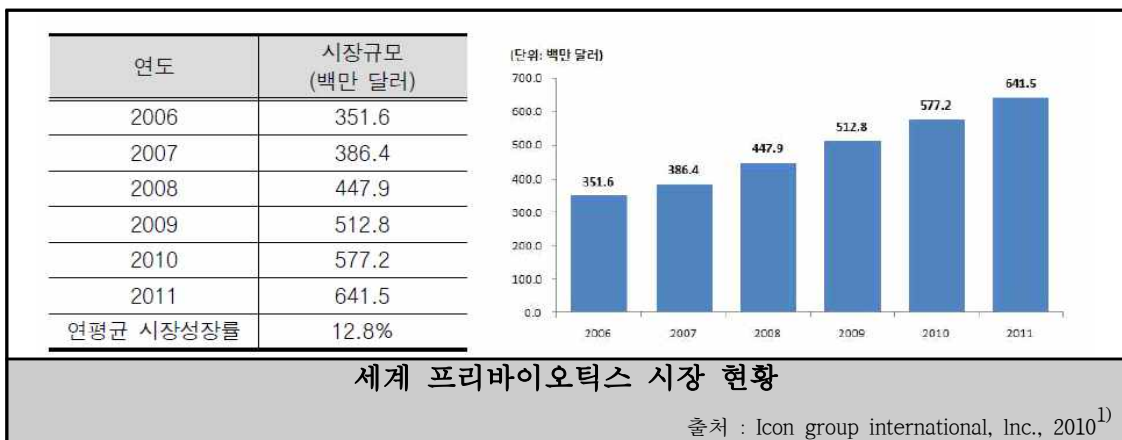
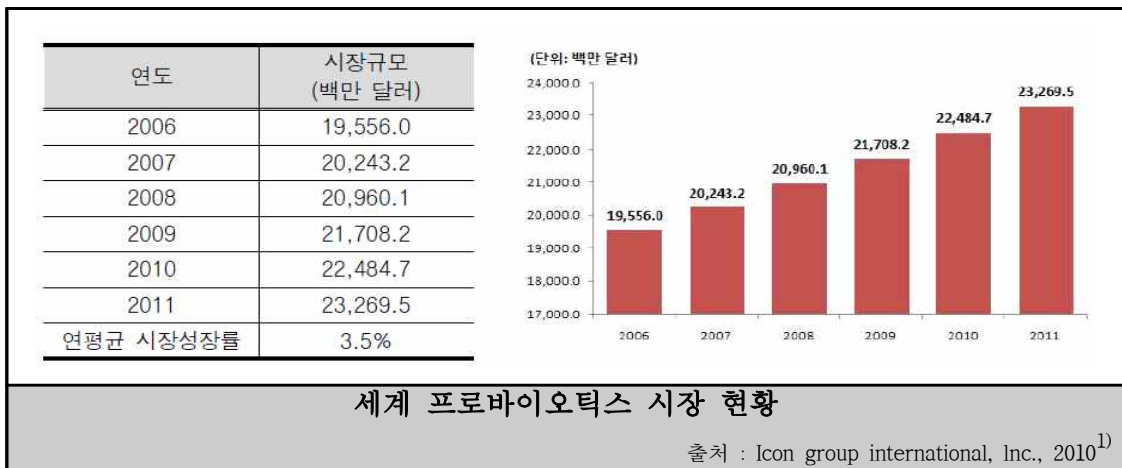
- 병의원에서는 마그밀(삼남제약) 처방이 대종을 이루고 있으며 노바티스 젤막이나 중외제약 듀파락 등은 종합병원 위주로 마케팅을 펼치고 있음
- 변비치료제 시장은 매출변화의 폭이 적어 정체돼있는 듯 보이지만 다른 일반의약품 매출이 담보상태인 반면 경기에 민감하지 않고 수요가 매년 5%씩 소폭으로 꾸준히 성장하고 있는 시장이기도 함
- 돌코락스 에스로 매출 1위를 달리고 한국베링거인겔하임은 돌코락스가 매출순위에서는 1위지만 브랜드 인지도는 1위가 아니라는 판단에 따라 광고 활동을 통해 브랜드 인지도를 높이는데 초점을 맞추고 있음
- 지난 2월부터 30-40대 주부들을 겨냥해 TV CF를 방영한바 있으며 최근에는 돌코락스 홈페이지를 오픈해 변비 및 돌코락스 제품에 대한 정보를 소비자들에게 제공하고 있다. 또한 경제적으로 어려운 노인들을 위해 서울시내 15개 노인 종합 복지관에서 전문의의 노인 변비에 대한 강좌 및 상담행사까지 진행하고 있음
- 의(약)사들 대상으로 돌코락스가 美FDA로부터 카테고리 I (안전성, 유효성 모두 인정)으로 지정됐다는 점을 강조하고 있음
- 코오롱제약은 비코그린이 소비자 인지도 분야에서 1위인만큼 이 장점을 극대화 시키면서 소비자 대상 마케팅을 펼치고 있음. 매년 대학교정을 찾아 비코그린 이벤트를 실시하고 있으며 잡지, 신문 등 매체를 다변화해 비코그린 홍보를 강화할 계획임
- 부광약품은 아락실이 국내 최초의 코팅 과립제로서 수용성 섬유소와 불용성 섬유소를 이상적으로 배합해 모든 급·만성 변비 환자에 효과적인 제품임을 강조하고 있음
- 신제품인 폴락스산으로 변비약 시장에 뛰어들었던 안국약품은 변비약 시장의 점진적인 증가가 기존 제품들을 복용한 환자들이 약물 내성으로 만성화해 다른 제품을 찾기 때문인 것으로 파악하고 있음
- 제품 발매 후 약국 관측에 힘을 기울여왔던 안국약품은 최근 병원쪽으로 프로모션

방향을 선회하고 로컬영업 조직을 최대한 활용해 마케팅을 펼치고 있음

- 안국약품은 프랑스 부포입센사에서 개발해 프랑스에서 판매실적 1위를 기록하고 있는 폴락스산이 효과빠른 변비약은 아니지만 장 점막을 자극하거나 장내 이상 발효를 일으키는 자극성 완하제 성분을 주로 사용한 기존 제품들과는 달리 안전하여 장기 복용이 필요한 변비환자들에게 적합한 새로운 제품임을 부각하고 있음
- 변비치료제 시장은 빅3 제품의 시장점유율이 높아 이들 제품들을 제외하곤 매출실적이 미미한게 사실임. 특히 새롭게 시장에 진출한 제품들이 구색 품목으로 전략하는 등 고전하고 있는 이유도 빅3 제품들의 시장 방어가 강력해 자리를 잡지 못하고 있는 것으로 분석되고 있음
- 한편 최근에는 변비약 시장이 일반의약품과 전문의약품의 경계가 모호해지면서 일반의약품을 병의원 대상으로 프로모션하는 현상도 나타나고 있어 주목되고 있음

6) 장건강 식품 시장동향

- 국내 발효제품시장은 2000년 8,400억원에서 2010년 8조4000억원으로 급격히 성장하는 추세이며 그 규모가 매우 다양하고 크다는 것을 알 수 있음
- 세계시장 또한 2000년 152억달러에서 2010년 730억달러로 급격한 성장세를 유지하고 있으며 점차 각광받는 시장이 되고 있음을 알 수 있음



- 장건강의 대명사인 프로바이오틱스는 연평균 3.5%대의 시장성장률을 보이고 있으며 장내의 유용균을 증식시키는 인자로 작용하는 올리고당과 식이섬유 같은 프리바이오틱스의 경우 연평균 12.8%대의 시장성장률을 보이고 있음
- 이와 같이 발효식품시장 성장세를 지속적으로 유지시키기 위해서는 다양한 기술적, 정책적 지원이 뒷받침되어야 할 것이며 다양한 지원책 가운데 정책자금이나 산업 육성을 위한 제도적 지원 및 발효제품개발을 위한 기술 개발이 요구됨
- 본 사업을 통한 제품개발은 시장에서 유통되는 국내·외 유사 제품과의 차별화 및 고부가가치의 제품화가 형성될 수 있으며 충분한 경쟁력을 확보 할 수 있음
- 향후 판로가 구축된 중국시장과 연계하여 안정적인 수출 진행을 할 수 있고 중국시장 내 소비자들에게 제품에 대한 신뢰도 및 한국발효식품에 대한 인식을 향상 시킬 수 있으며, 수출시장의 브랜드 및 상품의 가치를 상승시킬 수 있음

7) 선행 연구결과

□ 변비개선과 관련된 전남지역 주요 약용식물소재 문헌 검색

1) 결명자



기원: 콩과 결명차 또는 결명의 잘익은 씨

주요효능: 장기능개선, 혈압강하, 간보호, 혈중 지질저하효과

주요성분: Chrysophanol, Physcion, Obutusin, Cassiaside, Toralactone, Emodin, Carotin

생리활성: 항종양효과, 항균활성효과, 중추억제작용

재배면적(ha)		생산량(톤)	
전남	전국	전남	전국
15	662	185	2,955

- 결명자(Cassiae Semen)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 1년생 초본인 결명차 *Cassia tora* Linne 또는 결명 (決明) *Cassia obtusifolia* Linne의 잘 익은 씨로서 우리나라에서 기후가 온화한 남쪽지방의 산야에서 많이 재배되고 있으며 가을철에 과실이 성숙할 때 채취하여 건조함
- 북아메리카가 원산이나 오래전부터 중국에서 재배되어 왔던 식물로써 키 1.5m, 전체에 털이 없으며 잎은 호생이고 깃꼴겹잎이 있고 작은잎은 2-3쌍, 도란형임. 꽃은 잎 겨드랑이에 1-2송이가 피고 노란색, 꽃잎은 5장, 난형, 수술은 10개, 길이가 같지 않은 열매는

협과, 길이 15cm, 긴 기둥모양, 구부러지고 네모진 마름모꼴의 씨가 1줄로 늘어섬

- 개화기는 6-7월, 결실기는 9-10월임. 한방에서 결명자는 성질이 약간 차고 맛은 달고 쓰며 간열을 내리며 눈을 맑게 하며 간양상황(肝陽上亢)으로 인한 머리와 눈의 어지러움증을 치료하며 장을 윤희하게 하고 변을 통하게 하는 효능이 있다고 하였음
- 결명자의 생리활성 기능은 항균, 살충, 돌연변이 억제, 항알레르기, 치주질환 원인균 제거, 항산화, 간보호, 혈압강하, 혈중 지질저하효과, 혈당강하 등의 다양한 효능들이 있는 것으로 밝혀졌음
- 주요 약리 성분으로는 chrysophanol, emodin, aloe-emodin, torachryson, rubrofusarin-6-β-gentiobioside, nor-rubrofusarin, aurantio-obtusin, rubrofusarin, toralactone, rhein, physcion, obtusifolin, obtusin, chryso-obtusin 등의 anthraquinone 유도체가 분리되었다고 보고된 바 있으며 특히 결명자의 emodin 성분은 완만한 사하작용이 있다고 보고되었음
- 또한 chrysophanic acid-9-anthrone는 dermatophytes의 발육을 억제하고 살균작용이 있으며 결명자 엑기스를 공복시 위내에 투여할 경우 위액분비 항진작용이 있는 것으로 보고되었음
- 효능 실험으로는 혈소판 응집억제작용 성분에 관한 연구, 결명자 종실에서 추출한 알코올 추출물이 사염화탄소에 의하여 유발된 간 손상 방지효과가 우수하였다고 보고하였으며 저혈당 효과 및 아질산염 소거 인자의 특성 등이 보고되었음

2) 하수오



기원: 마디풀과(polygonaceae) 속하는 다년생 덩굴인 하수오(何首烏)의 괴경을 말린것

주요효능: 보익, 보혈, 해독, 운장통변

주요성분: Chrysophanol, Emodin, rhein, physcin 등의 anthraquinone 유도체

생리활성: 혈중 콜레스테롤 저하, 심장박동 완화, 항 변비 등

- 하수오는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본인 하수오(何首烏) *Polygonum multiflorum*의 괴경으로서 3~4년생 괴근을 가을과 겨울에 잎이 시들고 말랐을 때 캐어 큰 것은 두 개로 쪼개서 건조하여 사용함
- 하수오는 우리나라 중남부 지방에서 재배되고 중국의 하남, 광둥, 황서, 호북지역이

주산지이며 각지에서 재배됨

- 이 약물의 성미는 쓰고 약간 따뜻하며 살짝 찌면 단맛이 높아져서 보하고 간 신경에서 작용하여 신정(腎精)과 간혈(肝血)을 보익하며 능히 모발을 검게하고 아울러 정기를 수렴하는 효능이 있다고 알려져 있음
- 하수오의 생리활성 연구로는 혈청 콜레스테롤을 낮추고 심장박동을 느리게 하며 관상동맥 혈류량을 약간 증가시키는 등의 작용을 한다고 알려져 있고 면역증강작용 등도 보고된 바 있음
- 하수오의 화학성분으로는 주로 anthraquinone 유도체를 함유하고 있으며 그 주성분은 chrysophanol, emodin으로 알려져 있으며 rhein, physcin, chrysophanic acid anthrone 등으로 알려져 있음
- 농림축산식품부에서 발간한 특산작용생산실적(2013.06)에 2012년도 국내 생산량 통계 자료를 보면 결명자는 재배면적이 47ha이며 수확량이 89M/T임. 이중 90%가 전남 지방에서 재배, 수확되고 있음. 하수오는 수확 면적이 66ha이며 생산량이 222M/T임
- 결명자는 전남 장흥, 강진, 해남 지역에서 많이 재배되는 약용작물이며 하수오 또한 전남 순천 지역에서 재배되고 있는 실정임

□ 결명자 발효물의 변비개선활성 선행연구

1) 발효물의 제작

- 선행연구를 위해 전남 장흥산 결명자 10kg을 구입하여 분쇄한 다음 물 추출한 다음 3배 증류수를 가하여 100℃에서 3시간 동안 두 번 추출하였음. 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 감압농축기로 농축하였고 시료를 동결건조기(LYOPH-PRIDE 20R, ILSIN, Korea)를 이용하여 -70℃에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 실험에 이용하였음



- 동결건조물 300g중 50g 씩 취해 유산균이 살 수 있는 조건을 만든 후에 고압증기멸균

(121°C/15분)을 한 후 김치 등 발효식품에서 분리하고 동정한 다양한 유산균 (Lactobacillus sp.) 5종을 각각 접종하여 3일간 발효(37°C/150rpm/1air) 과정을 진행함

- 그 후 6000rpm 15min 4°C로 침전되어 있는 것을 제외한 상등액만을 취하였음. 변비 개선효과 물질탐색의 일환으로 결명자 물 추출물과 결명자 발효 처리된 발효추출물을 제조하였으며 변비개선 생리활성 검증 시료로 사용함
- 결명자 발효물의 생리활성 시험은 SD(Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 이용하였으며 결명자 발효물 및 변비치료제를 이용하였고 각 시료들을 1주일 동안 투여를 한 후에 정상군을 제외한 모든 군에서 4mg/kg의 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 피하투여하여 변비를 유발하고 6일째에 희생한 다음 변의 개수 및 변의 중량, 변의 수분함량, 장내 변의 개수 등을 측정하였음



실험동물 입고 및 순화

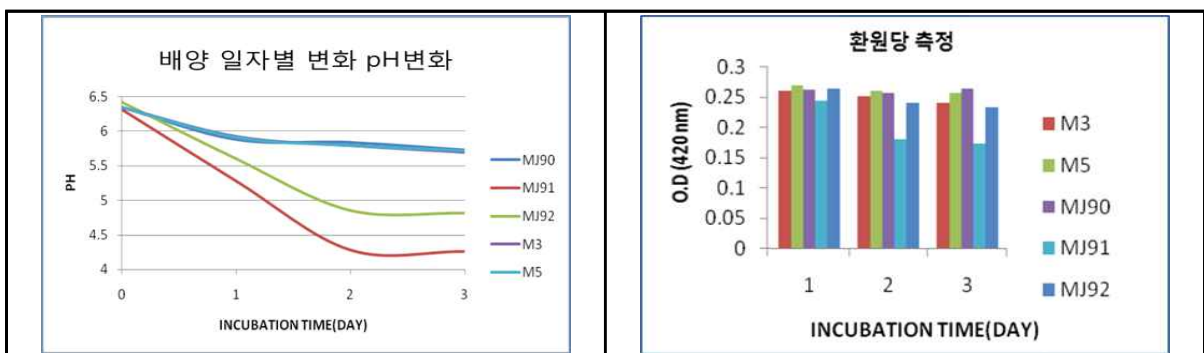
결명자 발효물 시료 경구투여

실험동물 부검 및 대장 조직 적출

생체시료의 혈액생화학 및 타겟 유전자 분석 등

2) 유산균 배양 특징

- 유산균(Lactobacillus sp.) 5종 (MJ90, MJ91, MJ92, M3, M5)을 접종하여 24시간 간격으로 pH변화와 환원당을 측정하여 발효력이 우수한 균주를 선별하였음. 결명자가 발효되면서 유기산이 생성되어 pH 변화를 보임을 확인하였으며 β-glucosidase의 작용을 확인하기 위하여 환원당 변화를 측정한 결과 pH변화와 유사한 결과를 보여주었음
- 발효력이 우수한 MJ91균주는 16s rRNA 동정결과 *Lactobacillus paracasei*로 동정하였으며 변비 개선 효과 실험에서도 MJ91균을 이용한 발효물에서 좋은 효과를 보여주었음. pH 변화와 환원당 측정으로 3일차에 발효가 완료됨을 확인할 수 있었음



3) 결명자 발효물의 변비개선 효과

(1) 변의 개수, 중량

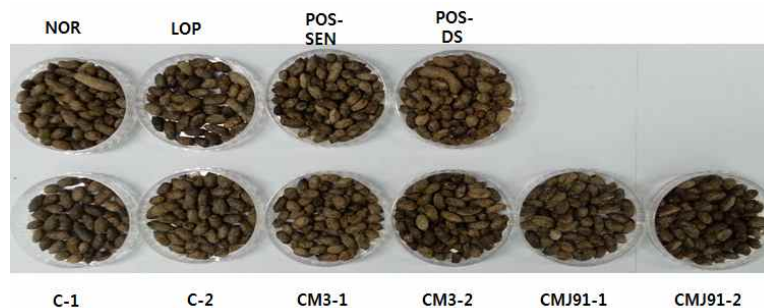
- Loperamide 투여 후 5일째 변의 개수는 정상대조군(NOR)이 35.0 ± 2.35 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군(LOP)이 24.4 ± 3.78 개로 감소하여 loperamide에 대한 변비유발이 확인되었고 양성대조군(PC)에서는 31.8 ± 2.59 로 loperamide에 의한 변비유발을 억제시키는 것을 확인할 수 있었음
- 저 농도 결명자군(SA-1)은 24.4 ± 3.58 개로 Lop군과 비교하였을 때 배변 개수의 차이는 없었음. 그러나 고농도의 결명자를 처리한 군(SA-2)에서는 배변 개수가 증가하는 경향을 보였고 결명자 발효추출물 군들(SC-1, SC-2)에서 변비유발군(LOP)보다 농도의 존적으로 변의 개수가 증가하는 경향을 보였음
- 변의 중량 또한 LOP군에서 정상대조군(NOR)보다 감소되는 것을 양성대조군(PC)에서 다시 변의 중량이 회복되는 것을 보였고 결명자 처리 군들(SA-1, SA-2)보다 결명자 발효추출물 군들(SC-1, SC-2)에서 더욱 더 중량이 회복되는 것을 확인함

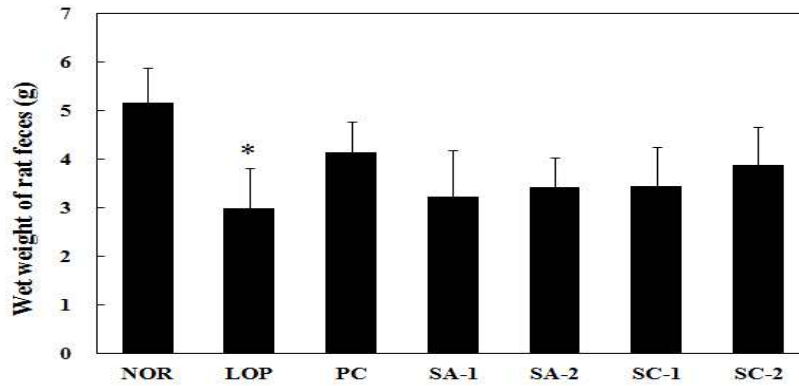
(2) 변의 수분함량

- 변의 수분함량은 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide단독투여 군이 감소하는 경향을 보였으며 양성대조군(PC)에서는 다시 회복되는 경향을 보였음. 결명자 물 추출물을 처리한 군(SA-1, SA-2)보다 결명자 발효추출물 군(SC-1, SC-2)에서 좀 더 높은 수분함량을 확인할 수 있었음

(3) 장내 변의 개수

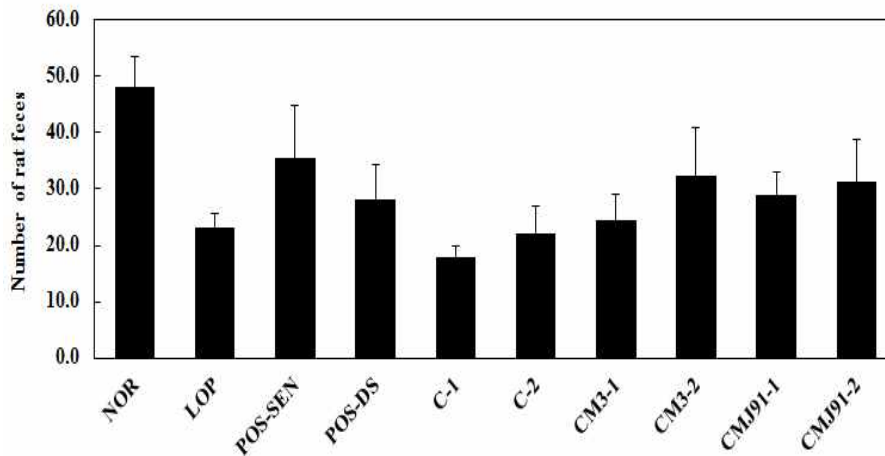
- 실험 6일째에 실험동물을 희생시켜 대장 안에 잔류하고 있는 변의 개수를 확인하였음. 정상대조군이 4.0 ± 0.71 개 인 것에 비하여 loperamide 단독 투여 군에서는 8.8 ± 0.84 개로 증가하여 loperamide에 의해 변비가 유발됨을 볼 수 있었음. 양성대조군은 6.8 ± 0.84 개로 장내 변의 개수가 감소되는 것을 확인 할 수 있었음
- 결명자 물 추출물 처리군(SA-1, SA-2)과 결명자 발효추출물 처리군(SC-1, SC-2)에서 농도별로 장의 변의 개수가 감소되는 것을 확인 할 수 있었고 결명자 물 추출물 처리군보다 결명자 발효추출물 처리군이 좀 더 장의 변의개수가 감소되어 있어 변비유발이 감소되는 경향을 확인 할 수 있었음





정상대조군(NOR) / 양성대조군(PC) / 결명자 물 추출물을 처리한 군(SA-1, SA-2) /
결명자 발효추출물 군(SC-1, SC-2)

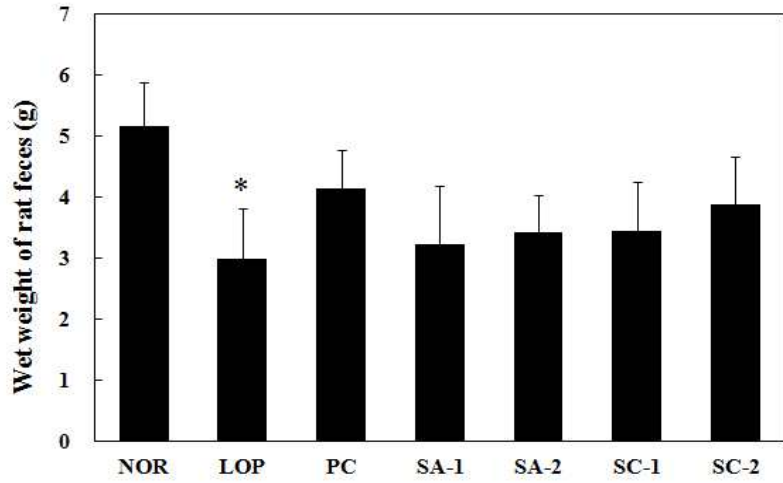
[그림] 결명자 물 추출물과 발효추출물 처리 후 변의 중량



정상대조군(NOR) / Loperamid 투여군(LOP) / 양성대조군(POS-SEN, POS-DS)
/ 결명자 30% 에탄올 추출물을 처리한 군(C-1, C-2) /
결명자 30% 에탄올 추출물 발효물 군(CM3, CMJ91)

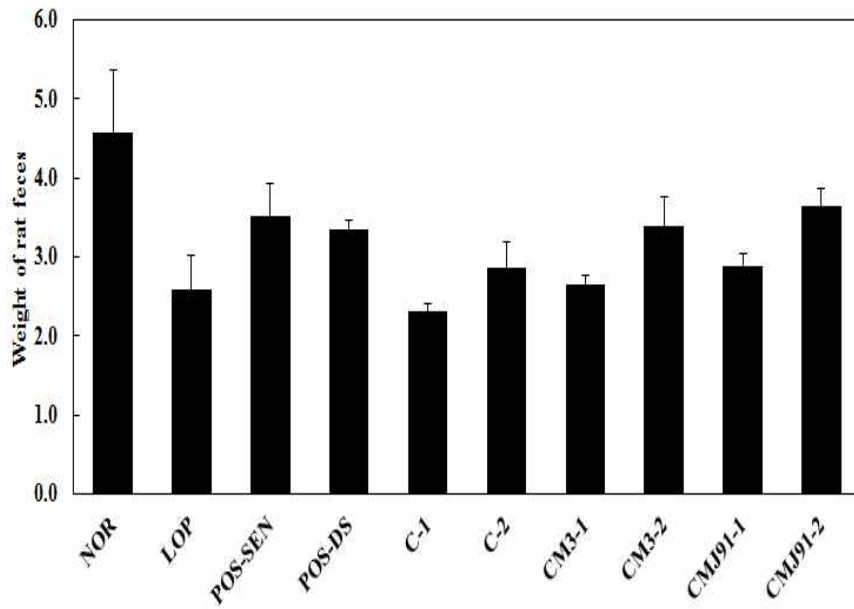
[그림] 결명자 30% 에탄올 추출물과 추출발효물 처리 후 변의 개수

- Loperamide는 지사제로 사용되는 약물이지만 장 운동을 억제하여 배변에 걸리는 시간을 연장시키므로(Schiller *et al.*, 1984)²⁾ 실험동물에서 변비유발을 위해 이용됨. 본 연구에서도 loperamide의 투여는 변의 개수 및 중량 감소, 장내 잔류 변 개수 등을 초래하였으며 이러한 변비의 증상들은 결명자 발효추출물에 의하여 완화되는 효과를 볼 수 있었음
- 또한 loperamide의 작용기전으로 장운동 억제와 더불어 장내 수분 흡수증가 또는 분비억제(Read, 1983; Theodoru *et al.*, 1991)^{3,4)}등의 가능성도 보고되었으며 본 실험에서도 loperamide에 의한 변의 수분함량 변화를 확인 할 수 있었고 결명자 발효추출물 투여가 변의 수분함량 증가에 효과가 있음을 확인하였음



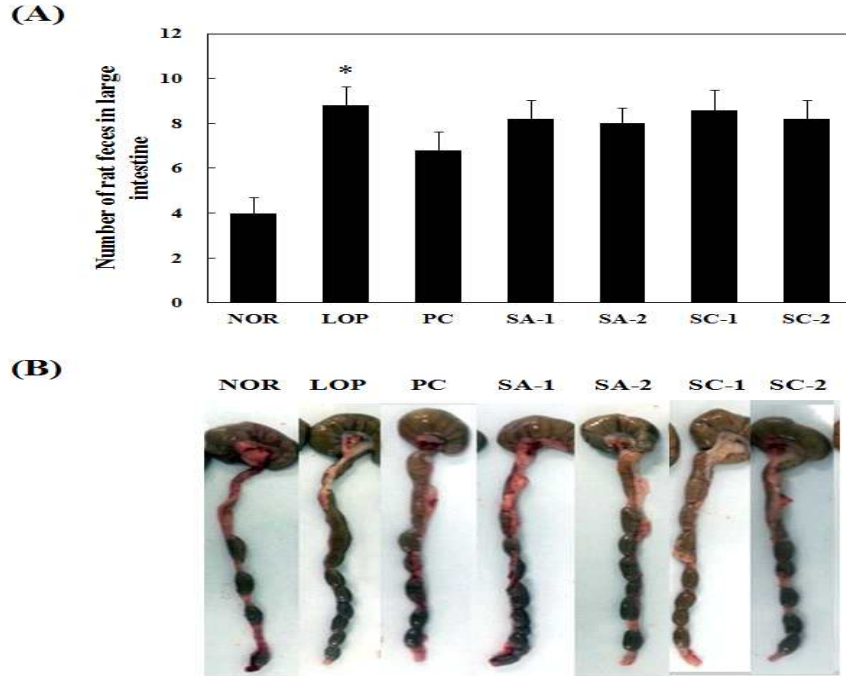
정상대조군(NOR) / 양성대조군(PC) / 결명자 물 추출물을 처리한 군(SA-1, SA-2) /
결명자 발효추출물 군(SC-1, SC-2)

[그림] 결명자 물 추출물과 발효추출물 처리 후 변의 중량



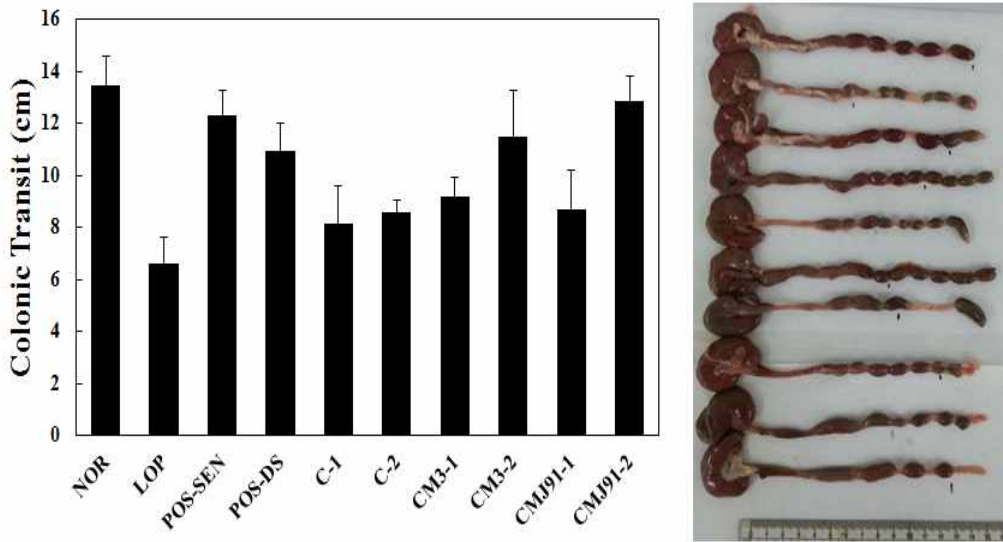
정상대조군(NOR) / Loperamid 투여군(LOP) / 양성대조군(POS-SEN, POS-DS)
/ 결명자 30% 에탄올 추출물을 처리한 군(C-1, C-2) /
결명자 30% 에탄올 추출물 발효물 군(CM3, CMJ91)

[그림] 결명자 30% 에탄올 추출물과 추출발효물 처리 후 변의 중량



정상대조군(NOR) / 양성대조군(PC) / 결명자 물 추출물을 처리한 군(SA-1, SA-2) /
결명자 발효추출물 군(SC-1, SC-2)

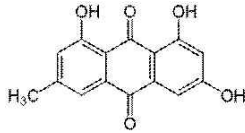
[그림] 결명자 물 추출물과 발효추출물 처리 후 rat의 대장 내 변의 개수와 Carmine의 이동 거리



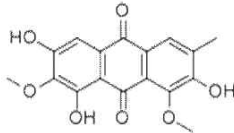
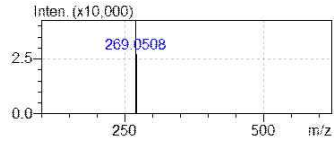
체크된 부분이 carmine 이동 부위

정상대조군(NOR) / Loperamid 투여군(LOP) / 양성대조군(POS-SEN, POS-DS)
/ 결명자 30% 에탄올 추출물을 처리한 군(C-1, C-2) /
결명자 30% 에탄올 추출물 발효물 군(CM3, CMJ91)

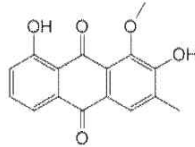
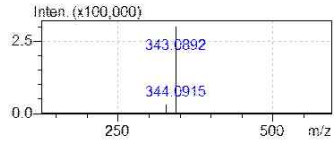
[그림] 결명자 30% 에탄올 추출물과 추출발효물 처리 후 rat의 대장 내 Carmine의 이동 거리



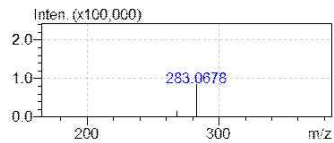
Emodin
Molecular weight : [M-H]⁻
=269.0508



Obtusin
Molecular weight : [M-H]⁻
=343.0892

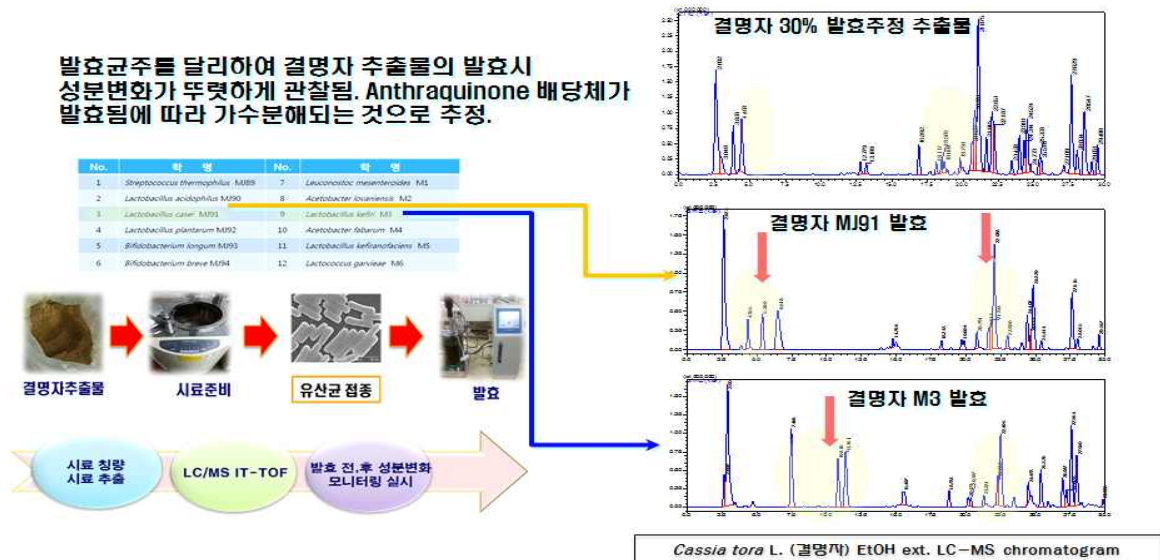


Obtusifolin
Molecular weight : [M-H]⁻
=283.0678



5) 결명자 발효 전·후 성분 스크리닝 실시

- 결명자 30% 주정추출물과 해남자연농업영농조합법인이 보유한 유산균인 MJ91, M3를 이용한 결명자 발효물에 대한 LC/MS분석을 실시하였음. 성분 스크리닝 결과, 발효 전·후의 성분변화가 있음을 확인하였으며 이는 유산균에 의해 배당체가 가수분해되어 발생하는 것으로 추정할 수 있었음. anthraquinone 배당체도 포함되어 있을 경우 성분변화로 인해 변비개선활성을 높일 수 있을 것으로 추정할 수 있으며 이러한 성분변화로 인해 발생한 물질을 분리하여 구조를 동정하고자 함



[그림] 결명자 30% 에탄올 추출물의 M3, MJ91 발효 후 성분변화 모니터링

1-3. 연구개발 범위

※선정당시 「연구개발계획서」와 전년도 제출하였던 「연차실적.계획서」상의 내용과 동일하게 작성

■ 1차년도 연구방법

1. 결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정

1) 결명자, 하수오 소재에 대한 문헌 검색

- 결명자 등 콩과 Cassia속 식물과 마디풀과 식물인 하수오의 사하작용과 관련된 성분인 anthraquinone 유도체와 관련한 논문, 특허 검색
- 생리활성 물질의 극대화를 위한 추출법 논문 검색
- 변비개선 활성 및 각종 생리활성 논문 검색

2) 선정된 소재에 대한 성분 스크리닝

- 결명자는 강진, 장흥, 해남, 순천 지역에서 재배되는 것을 전남생약협동조합 등의 지역 수집상을 통해 원료를 조달할 예정이며 하수오는 장흥지역에서 직접 재배되고 있는 농가를 방문하여 구입하고 전남동부생약협동조합 등에서 원료를 수급함
- 본 사업이 성공적으로 수행되면 한약진흥재단에서 종묘 및 종자를 보급하여 전남지역에 재배를 장려하도록 할 예정임
- 결명자 등 선정된 2종의 소재에 대해 에탄올 넣어 각각 추출함
- 추출물은 LC/MS/MS 성분스크리닝을 실시하고 기존 논문과의 비교를 통해 anthraquinone 유도체의 존재여부를 파악함

3) 결명자 하수오 원료의 최적 유효성분 추출용매 설정

- 물, 에탄올, 이산화탄소 등의 추출용매에 대한 선정추출물의 수율 및 유효성분의 함량이 극대화 되는 추출방법 연구
- 물, 에탄올 등의 용매 및 초임계 유체 추출법 등의 추출방법 연구
- 용매별 추출물의 LC/MS/MS를 이용한 anthraquinone 성분 비교평가
- LC/MS 성분 검출 패턴 비교를 통한 추출용매 선정

4) 선정된 소재에 대한 구입 및 분쇄

- 결명자, 하수오 등은 장흥 지역 또는 전남에서 재배되어 수집된 것을 구입하고 정확한 동정을 거침
- 결명자는 껍질이 단단하여 추출효율이 떨어지므로 분쇄기를 이용하여 결명자를 분쇄함

5) 추출 및 농축 동결건조

- 각 소재 10kg에 추출용매 30kg을 넣어 4시간 동안 추출하고 여과함
- 추출물은 20L 회전 감압농축하여 유기용매를 날려버린 다음 물층만 남게하고 10brix 이하가 되게 물을 넣어 동결건조기를 이용하여 건조시킴
- 이를 반복적으로 수행하여 발효물 제조용 동결건조엑스를 제작함



2. 발효력이 우수한 균주 선정

1) 발효력이 우수한 균주 분리 및 동정

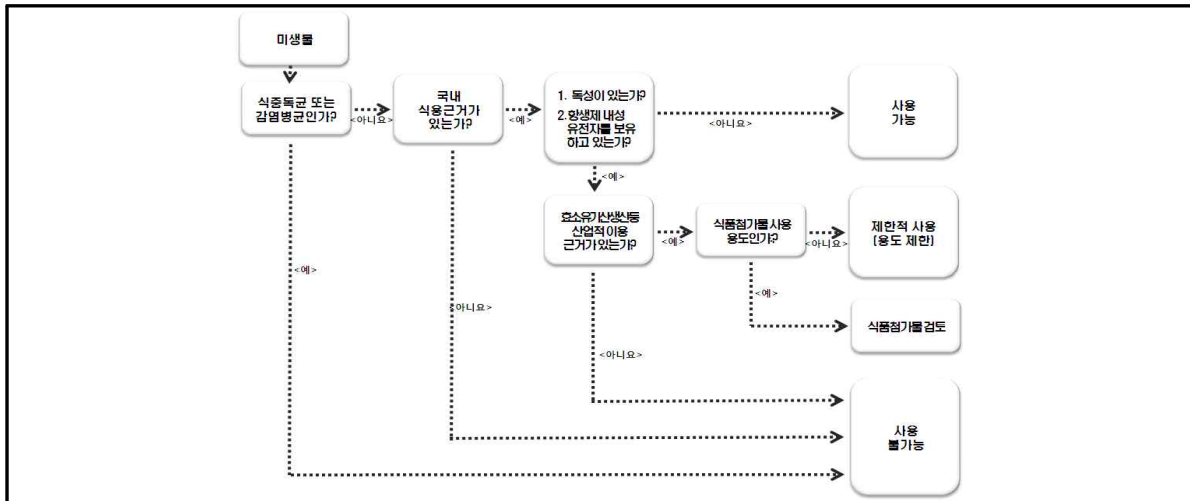
(1) 유산균 분리

- 발효식품, 토양 등의 시료를 유산균 전용 배지인 MRS 액체 배지에 37°C에서 150rpm으로 24시간 진탕 배양 후 1% CaCO₃이 함유된 MRS평탄 배지에 멸균수로 10배씩 3회 희석한 100 μL를 분주 후 도말
- 항온·항습 배양기에서 37°C, 48시간 동안 배양하여 투명한 생성이 우수한 단일 콜로니를 선별

(2) 유산균 분리 동정

- 16s rRNA 분석
- Fatty acid profile 분석 (MIDI 분석)
- 생물학적 동정 (API kit)
- Whole cell protein pattern 분석 (SDS-PAGE)

(3) 식약처 “식품원료 미생물 사용을 위한 의사 결정도” 를 참조 하여 식용가능 균주선별



2) 유산균 특성 분석

(1) β -glucosidase 활성 조사

- 유산균 배양용 배지인 MRS 액체배지에 셀룰로오스나 β -1,3 당쇄결합, β -1,4 당쇄결합을 지니고 있는 기질을 포함하여 배양
- 염기서열 분석과 생물학적 동정을 통해 확보된 유산균의 β -glucosidase의 특성을 조사하기 위해 시간당 생성되는 환원당의 양을 검량선과 비교하여 정량
- DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) 시약을 사용하여 분광광도계 550nm 파장에서 흡광도를 측정
- β -glucosidase의 분자량을 확인하기 위해 셀룰로오스나 β -1,3 당쇄결합, β -1,4 당쇄결합을 지니고 있는 기질을 포함하는 zymography 실시

(2) Protease 활성 조사

- 유산균주를 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하여 그 상등액을 조효소로 사용
- 0.1M 인산완충용액(pH 7.0)에 용해한 2%(w/v) azo-casein을 기질로 사용
- 기질용액 500 μ l에 조효소액 50 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응
- 12%(w/v) trichloroacetic acid 1ml을 가하여 반응 종료
- 4°C에서 30분간 침전시킨 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리
- 원심분리한 상등액 500 μ l에 0.5M NaOH 500 μ l가하고 440nm에서 흡광도 측정
- 효소 활성 1unit은 주어진 조건에서 분당 440nm에서의 흡광도를 0.001증가시키는 양으로 정의
- 단백질 분해 효소 분자량을 확인하기 위해 카제인 기질을 포함하는 zymography 실시

(3) 발효력이 우수한 균주 선정

- 유산균 20여종 중 발효력이 검증된 유산균 5종을 선발하고 발효력을 검증함

3. 결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발

1) 각 추출물 시료에 대한 유효성분 극대화 발효기술 개발

(1) 결명자, 하수오 등 시료 형태에 따른 배양 효과

- 물 추출물 시료
- 유기용매 추출물 시료
- 입자 크기별 시료
 - 조분쇄, 50mesh, 100mesh 입자 크기 사용

(2) 유산균 발효의 최적 배양 조건 탐색

- 유산균 접종 농도
- 배양 일자에 따른 유산균 개체수 측정
- 배양 일자에 따른 산도 측정
 - 결명자, 하수오 등의 각 시료에 유산균을 접종하여 37℃에서 배양
 - 24시간 간격으로 발효액을 샘플링
 - 샘플링한 발효액 9ml에 증류수 10ml을 가해 희석
 - 희석한 발효액에 0.1% phenolphthalein 용액 500 μ l를 첨가하고, 30초 동안 미홍색이 없어지지 않을 때까지 0.1N NaOH로 적정
 - NaOH 소비량을 % 적정 산도로 명시
 - 산도는 유산(0.1N NaOH 1ml=유산 0.009g)으로 표시하여 계산

(3) 배양 일자에 따른 pH 변화 측정

- pH meter 이용하여 24시간 간격으로 변화량 측정

(4) 배양 조건에 따른 생균수 측정

- 생균수 측정방법
 - 표면 평탄배양법(spread plate): 고체배지에 희석 시료를 분주 후 골고루 분산시켜 배양

- 주입 평탄배양법(pour plate): 페트리디쉬에 희석 시료를 분주 후 냉각된 배지를 골고루 시료가 퍼지도록 한 다음 응고시켜 배양

(5) 영양 조건 탐색

- 일반적인 배지 조성
 - MRS
 - Glucose (1%), Yeast extract (0.1%), CaCO₃ (0.01%)
- 탄소원과 질소원의 공급에 따른 배양효과
 - 탄소원의 종류로써는 글루코사민, 솔비톨, 만니톨, 전분, 라피노스(raffinose), 포도당, 갈락토스, xylose 등을 사용함
 - 질소원의 종류로써는 trypton, yeast extract, peptone, albumin, L-asparagine, NH₄Cl, NH₄NO₃, KNO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃을 사용함
- 무기이온 공급에 따른 배양효과
 - 무기이온의 종류로써는 K₂HPO₄, MnSO₄, MgSO₄, FeCl₃, CaCl₂ 등을 사용함

(6) 환경 조건에 따른 배양효과

- 고체배지와 액체배지에서 배양효과
- 액체배지에서 정치배양과 교반배양 효과
- 온도, 습도, Aeration 따른 영향



2) 배양 조건에 따른 발효 효과 검증

- Emodin 등 anthraquinone 유도체의 생리활성 물질의 변화를 HPLC 기기분석을 통한 모니터링

3) 최적 발효 조건에 따른 발효물 제작

- 본 사업은 유산균을 변비개선 또는 장개선 소재로 이용하는 것이 아니며, 변비개선활성이 있다고 알려진 약용식물(한약재) 추출물을 유산균 발효시켜 생리활성을 극대화할 수 있는 기술을 개발하는 것이 목적임
- 온도, 습도, 산소량, 생균수 등 각 발효조건에 맞는 조건에 따라 발효물을 제작함. 발효물은 3~5일 발효시킨 다음 유산균을 105℃에서 30분간 멸균 처리한 다음 연구용시료 및 제품개발용 시료로 사용할 예정임

4. 발효물의 유효성 평가 : 각 원료 건조엑스 발효물에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가

- 개발하고자 하는 제품은 probiotics 제품이 아니므로 유사제품인 센나엽 관련 의약품과의 비교연구를 수행할 예정임. 추가적인 선행연구를 통해 사하작용과 관계되는 anthraquinone이 많이 들어있는 의약품의 원료로 사용되는 센나엽과 결명자 발효물의 변비개선활성을 비교 연구하고자 함

1) 유효성 평가용 시료의 제조

- 개발된 발효조건에 따라 제작된 시료인 결명자 발효물, 하수오 발효물을 동결건조하여 분말로 제조한 후 농도별로 제조하여 동물시험용 시료로 사용함
- 유효성 평가는 각 발효물 별로 각각 평가한 다음 배합비 연구용 데이터로 활용하고자 함

2) 장기능 개선 유효성 평가 시험방법

- 실험동물은 SD(Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 다물사이언스(대전, 대한민국)에서 구입하여 사용하며 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육함
- 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 5마리씩을 배치하여 총 7군으로 실험군을 분류함
- 정상대조군(Con), loperamide 투여군(Lop), 양성대조군(PC), 저농도 결명자 물 추출물 투여군(100mg/kg), 고농도 결명자 물 추출물 투여군(200mg/kg), 저농도 결명자 발효추출물(100mg/kg), 고농도 결명자 발효추출물(200mg/kg)으로 나누고 양성대조군으로는 변비치료제의 생약 원료인 센나엽(Sennae Folium)을 이용함

- 각 시료들을 1주일 동안 투여를 한 후에 정상군을 제외한 모든 군에서 4mg/kg의 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 피하투여 하여 변비를 유발하고 6일째에 희생시키고 체중 및 사료섭취량, 음수량을 측정하고 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 및 변의 장내 이동거리를 측정함으로써 유효성을 평가함

3) 장기능 개선 유효성 평가

(1) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

- Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하고 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정함

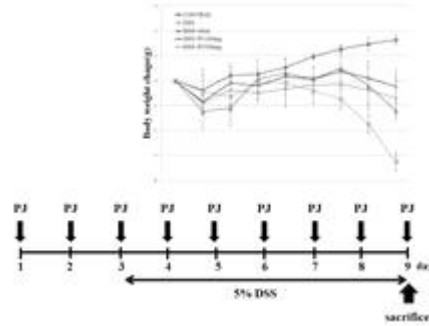
(2) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량, 장내 변의 이동거리 측정

- 각 실험동물의 변은 실험시작 후 4일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후에 5일째에 수거하며 개체 당 변의 개수와 변 중량(wet weight)을 측정
- 변의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변중량으로 나누어 계산
- 변의 장내 이동거리는 4일째에 Carmine(Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여 한 후, 3시간에 실험동물을 희생시키고 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정

(3) 통계처리

- 본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 ± 표준오차(mean ± S.E.)로 나타내며 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value 값이 0.05미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정함





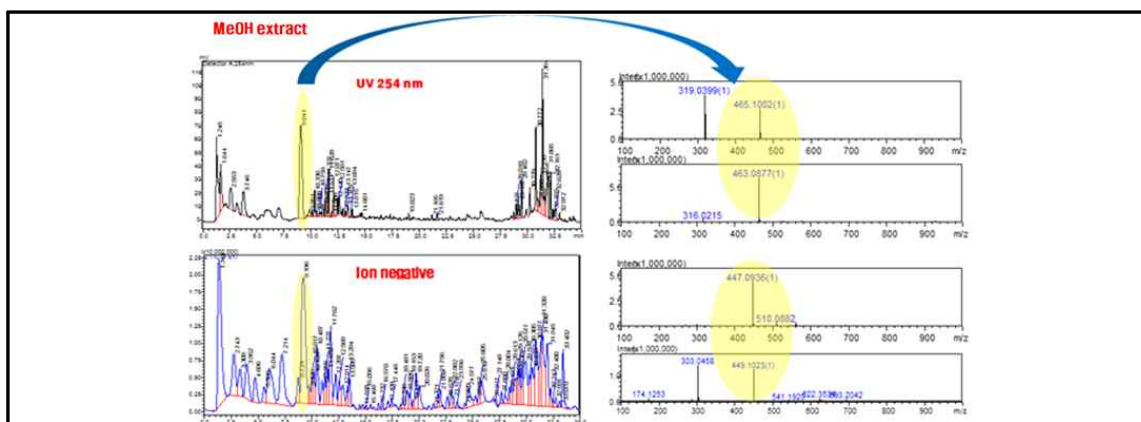
5. 결명자, 하수오 발효물의 유효성분 분리

1) 원료의 추출 및 분획

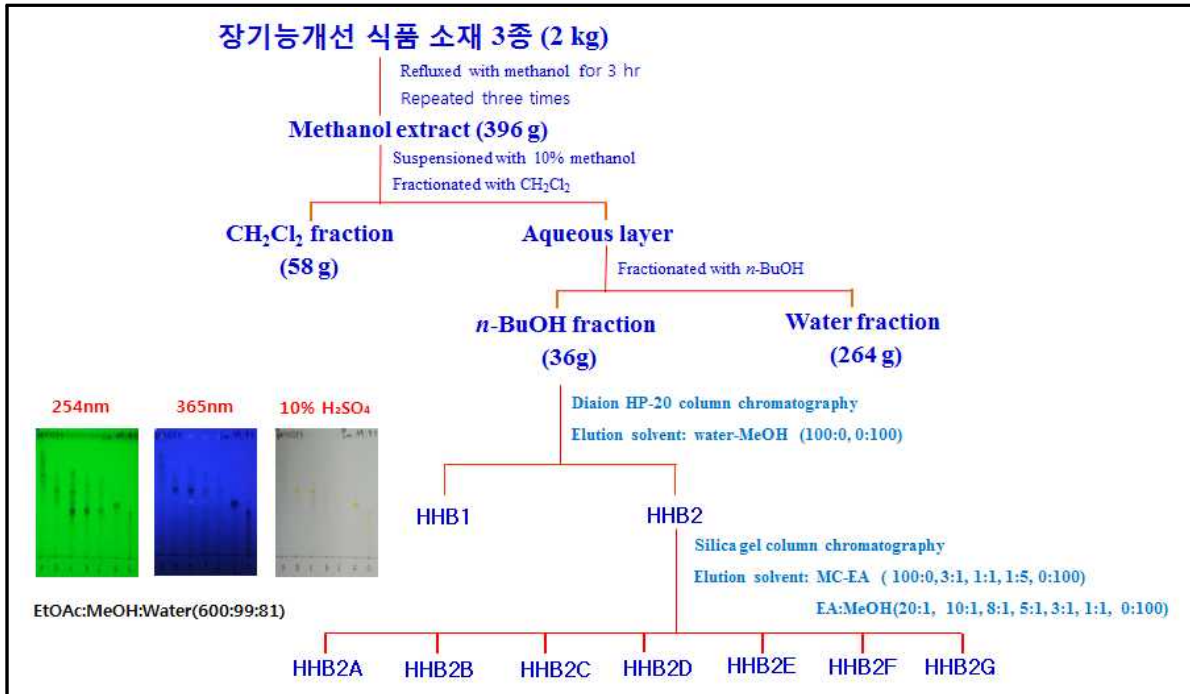
- 결명자, 하수오 원료 2kg을 취해 에탄올 5L로 3회 반복 환류 추출하고 대형 회전 농축기를 이용하여 농축함
- 에탄올 농축물은 HPLC/ELSD, LC/MS/MS를 사용하여 성분 스크리닝함
- 분리의 효율성을 위해 유기용매를 사용하여 분획을 거쳐서 사용함

2) Major 화합물이 함유된 분획물에 대한 성분분리

- 에탄올 추출물과의 비교를 거쳐 major 화합물이 함유된 분획물에 대해 실리카겔, ODS가 사용된 박층크로마토그래프를 이용하여 크로마토그래피 조건을 설정함
- HPLC, TLC 정보를 활용하여 역상실리카겔 또는 실리카겔을 사용한 열린 칼럼크로마토그래피를 실시하고 설정된 유기용매 조성비에 의해 순차적으로 극성을 변화시키며 유출시킨 후 TLC, HPLC 패턴에 따라 소분획함
- Major 화합물이 포함된 소분획에 대해 ODS, silica gel을 이용하여 재칼럼 크로마토그래피를 실시함
- 재칼럼 소분획물에 대해서는 sephadex 또는 preparative HPLC를 이용하여 분리 또는 정제함

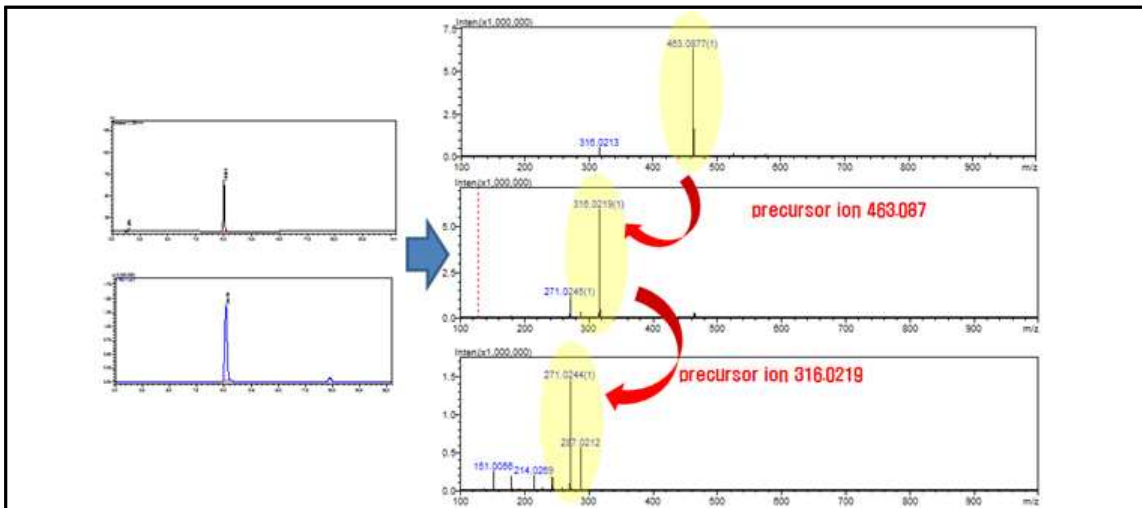


- 성분스크리닝

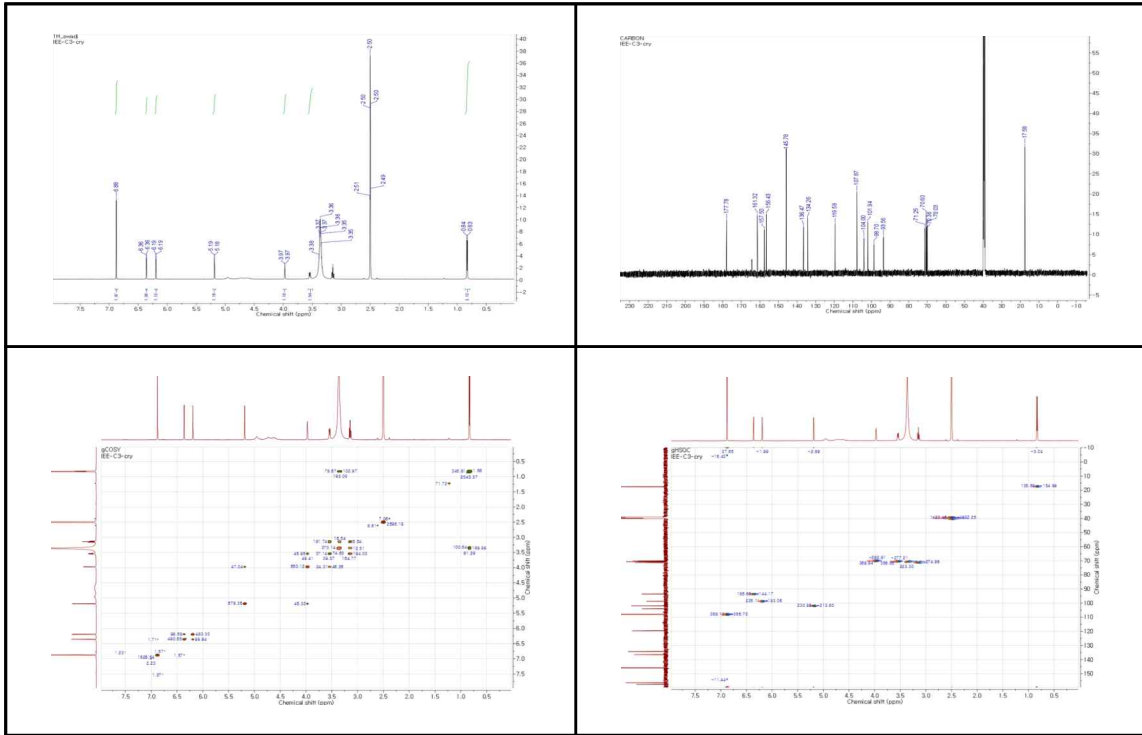


3) 분리된 화합물의 구조분석

- 분리된 화합물에 대해서는 LC/MS IT-TOF를 이용하여 분자량 및 분자식을 확인하고 1H, 13C-NMR, COSY, HMBC, HSQC을 측정하여 화합물들의 구조를 결정함
- 분리시킨 화합물에 대해서는 LC/MS/MS를 이용하여 순도를 평가하고 시험법 밸리데이션 및 품질관리 지표물질로 설정함



- 분리 물질의 LC/MS/MS

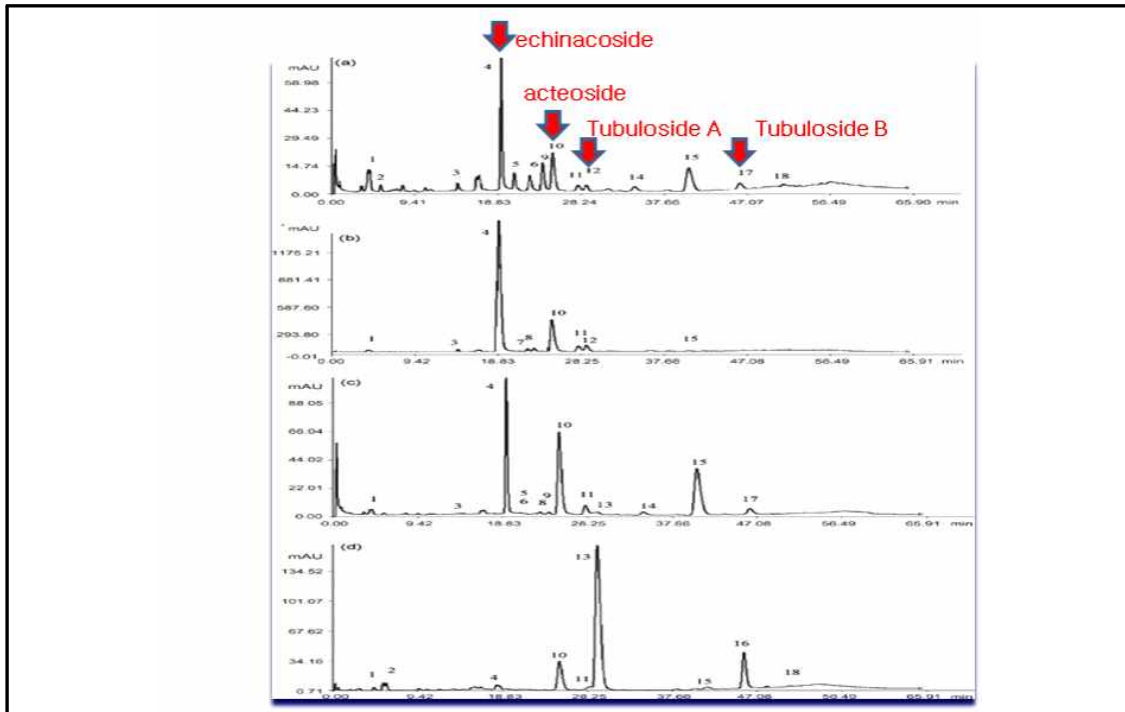


- NMR data 해석 및 구조결정

6. 발효 전·후 성분 모니터링 및 지표설정

1) 발효 전·후 성분 모니터링

- 결명자, 하수오 등 각 원료 추출물의 발효균주에 따라 제조된 발효물에 대한 성분변화 모니터링을 실시함
- 성분변화에 대한 모니터링은 LC/MS IT-TOF를 이용하여 확인하고 MS/MS data를 이용하여 발효 전·후의 성분변화를 바탕으로 하여 발효물에 대한 품질관리 방법에 대한 연구를 진행함
- anthraquinone 배당체와 유도체, 분리된 물질과의 구조 상관관계를 파악하여 생리활성 물질의 변화를 모니터링 함



- 발효 전·후 성분 모니터링 후 성분 변화의 예

■ 2차년도 연구방법

1. 유효성 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 설정

1) 각 발효물의 생리활성 및 경제성 평가를 통한 배합비 설정

- 결명자 발효물의 변비개선 유효농도에 따른 추출물의 단가 평가
- 최종 제품의 단가 등 경제성, 원료 수급성 등 평가
- 원료 수급 및 원료 단가, 기 제품과의 차별성 등을 바탕으로 2종 소재의 배합비를 연구함
- 중국내 수요자의 요구 등을 반영한 소재의 배합비율 연구
- 장기능개선 연구조성물 제작을 위한 최종 배합비 선정

2) 장기능개선 연구조성물 동결건조엑스 제작

- 장기능개선 연구조성물 원료 10kg에 추출용매 30kg을 넣어 4시간 동안 추출하고 여과함
- 추출물은 20L 회전 감압농축하여 유기용매를 날려버린 다음 물층만 남게 하고 10 brix이하가 되게 물을 넣어 동결건조기를 이용하여 건조시킴
- 이를 반복적으로 수행하여 발효물 제조용 동결건조엑스를 제작함

2. 결명자, 하수오 혼합추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발

1) 연구용 조성물에 대한 제조방법 표준화

- 연구용 조성물 제조방법에 대한 프로토콜을 제작하고 표준 제조 공정서를 제작함
- 제조단계별 소요시간 및 장비의 활용 시간 등에 대한 제조방법 연구

2) 발효조건에 따른 pH 변화 및 성분변화 모니터링

- 온도, 습도 및 추출물의 농도 등 발효조건별 결명자, 하수오 복합추출물, 분쇄물에 대한 pH 및 맛, 냄새 등의 물성변화 평가
- 각 조건별 발효물의 LC/MS/MS를 활용한 유효성분의 변화 모니터링 실시
- 최적 발효조건 설정 및 유효성분이 극대화 될 수 있는 농도 설정

3) 표준화 방법에 의한 연구용 조성물 제작

- 표준화 공정에 의한 연구용 조성물을 생산함
- 3회 반복 제조하고 각 Lot별 조성물은 장 기능 개선 효능평가용 시료로 사용함
- 표준화된 공정의 확인은 지표성분의 함량 평가를 통해 확인함

3. 장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립

1) 장기능개선 발효물의 대량 제조를 위한 최적 공정조건 탐색

- 결명자, 하수오 등의 발효를 극대화하기 위한 최적 배양 조건으로 다양한 탄소원 (sucrose, glucose, fructose, lactose, galactose, maltose, starch) 중 1종 이상 선택된 기질을 사용하여 시험함
- 최적 배양 조건으로 다양한 질소원 (NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, peptone, casein, yeast extract) 중 1종 이상 선택한 기질을 사용하여 최적 배양 조건을 시험함

2) 중, 대형 발효탱크에서 발효(생산) 조건 최적화(scale up)

- 중, 대형 발효탱크에서 결명자 최적발효조건 확립을 위해 진탕 배양기(rotary shaker)에서 flask 배양, 10L 발효기에서 결정된 배지조성을 우선적으로 사용하여 중, 대형 발효탱크에서 적용하며 배양시기별, inoculum size와 aeration을 조정하여 50L, 100L, 500L, 1000L 발효탱크에서 배양하면서 세포의 성장과 효소의 생산성에 미치는 영향을 조사함

3) 표준화된 발효공정으로 인한 발효물 제작

- 결명자, 하수오 등 선정된 소재를 구입 및 정선, 세척 분쇄함
- 표준화된 추출용매를 넣고 표준화된 공정에 따라 추출물을 제작함
- 최적 발효조건에 맞는 유산균을 배양하고 추출물을 넣어 최적화된 발효조건에 따라 발효시킴
- 발효공정에 따른 발효물 제작은 3Lot로 시험함

4) 표준화된 발효공정의 증명

- 장기능개선 발효물에 대해서는 시험법 밸리데이션 설정용 시료로 사용함

4. 장기능 개선 발효물의 식품 제형 설정

1) 결명자는 분쇄 후 또는 추출한 경우 추출물에서 특유의 향취가 있으므로 결명자 추출물의 제형설정이 중요함

2) 장기능개선 발효물의 변비 개선 활성을 높이기 위한 장용성 제제 등의 개발 또한 검토할 예정임

3) 결명자 발효물의 향, 미, 취를 고려하고 전분, 유당 등의 부형제를 첨가하여 환제 또는 분말등의 제형을 고려하여 설정함

4) 장기능 개선 및 변비개선의 기능성을 높이기 위해 동일 기능성 부형제를 첨가한 시제품을 개발함

- 식감을 높이기 위한 부형제 첨가비율을 설정함
- 생리활성 평가를 기반으로 한 주원료인 결명자 발효물의 배합비를 연구하고 이에 따른 부형제의 함량도 조절함

5) 캡슐이나 환 형태로 섭취하는데 부담을 느꼈던 성인이나, 건강식품을 섭취하기 힘든 유아, 어린이들에게도 접근이 용이한 제형 연구

- 기존 6개 제형
 - 정제(tablet) : 일정한 형상으로 압축된 것
 - 캡슐(capsule) : 캡슐기체에 충전 또는 피포한 것
 - 환(pill) : 구상(球狀)으로 만든 것
 - 과립(granule) : 입상(粒狀)으로 만든 것
 - 액상(lipid) : 유동성이 있는 액체상태의 것 또는 액체상태의 것을 그대로 농축한 것

- 분말(powder) : 입자의 크기가 과립제품보다 작은 것
- 확대 6개 제형
 - 편상(flake) : 얇고 편편한 조각상태의 것
 - 페이스트상(paste) : 점성이 강한 유동성의 반 고체상
 - 시럽(syrup) : 점성이 약한 유동성의 반 액상
 - 겔(gel) : 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 있는 고체상
 - 젤리(jelly) : 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 없는 고체상
 - 바(bar) : 막대형태의 것

5. 장기능개선 발효물의 유효성 평가: 장기능 개선 발효물(결명자, 하수오 복합추출물 발효물)의 랫트에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가

1) 유효성 평가 개요

- 장기능 개선 발효물(결명자, 하수오 복합추출물 발효물)을 이용한 개발 방향 제품은 probiotics 제품이 아니므로 유산균 제품과의 비교하지 않을 예정이며 유사한 기전에 의해 사용되는 의약품 원료인 센나엽과의 비교연구를 수행할 예정임

2) 실험동물 사육 및 실험식이

- 실험동물은 SD(Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 다물사이언스(대전, 대한민국)에서 구입하여 사용하며, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육함
- 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 5마리씩을 배치하여 총 7군으로 실험군을 분류함
- 정상대조군(Con), loperamide 투여군(Lop), 양성대조군(PC), 저농도 결명자 물 추출물 투여군(100mg/kg), 고농도 시제품 투여군(200mg/kg), 저농도 시제품(100mg/kg)으로 나누고, 양성대조군으로는 변비치료제의 생약 원료인 센나엽(Sennae Folium)을 이용함
- 각 시료들을 1주일 동안 투여를 한 후에 정상군을 제외한 모든 군에서 4mg/kg의 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 피하투여 하여 변비를 유발하고 6일째에 희생시키고 체중 및 사료섭취량, 음수량을 측정하고 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 및 변의 장내 이동거리를 측정함으로써 유효성을 평가함

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

- Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하고 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정함

4) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량, 변의 장내 이동거리 측정

- 각 실험동물의 변은 실험시작 후 4일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후에 5일째에 수거하며 개체 당 변의 개수와 변 중량을 측정
- 변의 수분함량은 변을 70℃ 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변 중량으로 나누어 계산
- 변의 장내 이동거리는 4일째에 Carmine(Sigma, St, Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여 한 후, 3시간에 실험동물을 희생시키고 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정

5) 통계처리

- 본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 \pm 표준오차(mean \pm S.E.)로 나타내며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정함

6. 장기능개선 발효물에 대한 안전성 평가: 단회투여독성평가

- 장기능개선 발효물의 원료인 결명자, 하수오 등은 식품원료로 사용가능한 시료임
- 하지만 유산균 발효로 인해 독성물질이 생성될 여지가 조금이라도 있으므로 마우스에 대하여 단회투여독성시험을 실시하여 안전성을 평가하고자 함
- 안전성 평가는 식품의약품안전처 「의약품 등의 독성시험 기준 (고시 제2015-82호, 2015. 11.11)의 「단회투여독성시험」에 준하여 실시함
- 단회투여 및 반복투여 독성평가는 독성평가 전문기관인 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소에 의뢰할 예정이며 상세한 내용은 다음과 같음

1) 단회투여독성 평가

(1) 조제물분석

- 시험목적: 본 시험은 시험물질인 장기능개선 발효물의 농도분석법 보증을 위한 validation 및 안정성을 확인하기 위해 실시

(2) 설치류에 대한 단회투여 독성시험

- 시험목적 : 암·수 Sprague-Dawley 랫트를 이용하여 시험물질인 장기능개선 발효물을 단회 경구 투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시

- 시험군의 구성 · 투여농도 및 용량

군	투여용량 (mg/kg)	동물수 (개체번호)	
		Male	Female
G1 대조군	vehicle (0)	5	5
G2 시험물질투여군1	2,000	5	5
소계		10	10

(3) 관찰 및 검사법: 일반증상 및 사망관찰/체중변화/부검/조직병리학적 검사

7. 장기능개선 발효물에 대한 품질관리 지표설정 및 시험법 밸리데이션

1) 대량 생산기술 및 표준화된 발효공정에 따라 제조된 시료에 대해 시험법 밸리데이션을 설정하고 조성물에 대한 품질관리 기준을 설정하여 중국내 장기능개선 기능성 제품의 기초자료로 활용하고자 함

2) 결명자, 하수오의 수확시기 및 재배지별 지표물질 분리 및 원료의 품질관리 기준 설정

- 결명자, 하수오의 anthraquinone 유도체 지표성분의 수확시기별, 재배지에 따른 함량 변화 모니터링 실시
- 결명자 발효물의 생리활성 극대화 및 품질관리를 위한 원료의 지표성분 함량 범위 설정
- 결명자, 하수오 원료의 품질경쟁력 확보(지표성분 높은 원료 선정) 및 최적 단가를 통한 가격경쟁력 향상

3) 발효물에 대한 품질관리 지표는 기존 논문 및 식품공전, 각 국의 공전 등을 참조하여 시험법을 개발하며 식품의약품안전처의 시험법 validation의 기준에 따라 분석법을 개발함

4) 시험법 밸리데이션 자료는 확인, 순도, 정확성, 완전성, 반복성, 특이성 등이며 식약청의 가이드라인에 따라 실험하여 최적의 시험용매 및 분석조건을 개발함

5) 시험법 밸리데이션 세부 연구내용

- 확인시험(Identification Test)이란 검체 중 분석대상물질을 확인하는 시험을 말하며 일반적으로 검체의 물리화학적 특성(스펙트럼, 크로마토그래프법에서 얻어지는 정보, 화학적 반응성 등)을 표준물질의 특성과 비교하는 방법을 이용함
- 순도시험(Purity Test)이란 검체 중 유연물질, 중금속, 잔류용매 등 불순물의 존재 정

도를 정확하게 측정하는 시험을 말하며 정량시험과 한도시험이 있음

- **함량 또는 효능시험(Assay: Content or Potency)**이란 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 양 또는 효능을 정확하게 측정하는 시험을 말함. 즉, 원료 또는 제제 중의 주요 성분(주성분, 유효성분, 생리활성성분)이나 특정 성분(예: 안정제 또는 보존제 등 첨가제)의 함량을 측정함. 용출시험 중의 정량 분석과정도 포함됨
- **특이성(Specificity)**이란 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말함
- 분석법의 특이성이 부족할 경우 다른 보조적인 분석법으로 보완될 수 있음 특이성은 정확성 및 정밀성실험으로 나누어짐
- **정확성(Accuracy)**이란 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말함
- **정밀성(Precision)**이란 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 말함. 정밀성은 세 가지 다른 조건에서 확인되는데 반복성(병행정밀성), 실험실내 정밀성 및 실험실간 정밀성이 있음
- **반복성(병행정밀성, Repeatability)**이란 동일한 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장치와 기구, 동일 제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 복수의 시료를 짧은 시간차로 반복 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말함. Intra-assay precision이라고도 함
- 실험실내 정밀성(Intermediate Precision)이란 동일 실험실내에서 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말함
- 실험실간 정밀성(Reproducibility)이란 일반적으로 표준화된 분석법을 사용한 공동연구에 적용되는데, 서로 다른 실험실에서 하나의 균일한 검체로부터 채취한 시료에 대하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말함
- **검출한계(Detection Limit)**란 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며, 반드시 정량가능할 필요는 없음
- **정량한계(Quantitation Limit)**란 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 말하며, 저 함량의 분석대상물질을 함유한 검체의 정량시험이나 특히 불순물, 분해생성물 결정에 사용되는 정량시험의 밸리데이션 파라미터임
- **직선성(Linearity)**이란 실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양 (또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말함
- **완건성(Robustness)**이란 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 영향을 받지 않는지에 대한 척도를 말함. 분석법이 통상 사용되는 동안

그 분석법을 얼마나 신뢰할 수 있는 지에 대한 지표임

8. 개발된 제형에 따른 시제품 생산

1) 표준화 된 결명자, 하수오 등 복합 발효물 제작

- 표준화된 시제품의 개발을 위해 결명자, 하수오 복합 발효물을 제작하고 시험법 벨리 데이션에 의해 설정된 시험법에 따라 시험하여 지표성분의 함량을 측정함
- 지표성분의 함량 비교를 통해 결명자 발효물의 표준화 지표로 설정함

2) 시제품의 영양성분 분석은 식약처 식품표기기준의 영양성분 표시기준에 따라 시험하며, 영양성분을 전문기관에 의뢰하여 수행함

- 영양성분 필수표시대상식품은 식품위생법 시행규칙 제4조의2제1항의 규정에 따르며 특수용도식품, 과자류 중 식빵, 케이크류, 빵, 도넛, 기타빵, 건과류, 캔디류, 초콜렛류 및 잼류, 면류, 레토르트식품, 음료류 외의 식품 중 영양성분 또는 영양강조 표시를 하고자 하는 식품임
- 영양성분 함량은 1회 제공량당, 100그램(g)당, 100밀리리터(ml)당 또는 1 포장 당 함유된 값으로 표시함. 이 경우 영양성분 함량 단위는 영양소 기준치의 영양소 단위와 동일하게 표시하여야 하고 1회 제공량과 총 제공량을 함께 표시하는 때에는 그 단위를 동일하게 표시하여야 함
 - 일반성분 분석 - 탄수화물, 조단백질, 지방(포화지방, 트랜스지방), 수분함량 등
 - 무기성분 분석 - 나트륨, 칼륨, 칼슘의 함량을 분석
 - 일반 아미노산 및 특수 아미노산 분석

3) 개발된 제형에 따른 시제품 개발

- 개발된 제형에 따라 시제품을 생산함
- 표준화된 공정으로 시제품 제작을 원칙으로 함

9. 장기능개선 발효물의 변비개선 조성물 특허출원

1) 유산균을 이용한 결명자 발효물 조성물 개발 특허 출원

- 유산균주를 이용한 장기능개선(변비개선활성)이 있는 결명자, 하수오를 이용한 복합 발효물에 한방원료 및 일반식품원료를 가미한 조성물 및 제조방법

■ 3차년도 연구방법

1. 원재료의 품질검사

1) 완제품 생산을 위한 원료의 품질검사

- 결명자 원료에 대한 품질검사는 식품의약품 안전처에서 고시하는 약전의 품질검사 항목에 의거하여 실시함
- 한약재 품질검사는 품질검사기관인 한약진흥재단에서 수행할 예정이며 원료의 품질검사 적합여부는 공인된 시험성적서로 판단할 예정임
- 식품의약품안전처에서 고시하는 결명자, 하수오 원료의 시험항목은 성상, 확인, 순도, 건조감량, 엑스함량 등의 정밀검사 항목 및 중금속, 잔류농약, 잔류이산화황 등의 유해물질 등이며 이러한 항목에 대해 정밀검사를 실시할 예정임

2. 제품의 제조공정 표준화 확립

1) 생산 시스템구축

- 대량 생산을 위한 현재 주력 수출품 청국장환은 주원료가 대두이며 해남지역에서 계약재배를 통한 원료 수급을 경험한바 있으며 대두의 경우 연평균 19M/T를 소비하고 있음
- 본 연구사업을 통한 신제품 개발시 수출역량과 새로운 소비시장 창출로 결명자에 대한 원료가 10M/T~15 M/T정도 필요 할 것으로 예상하며 현재 계약한 농가와의 계약재배를 통해 충분히 확보할 수 있을 것으로 사료되고 원료 수급 계약 체결을 통해 원료의 가격변동폭을 줄일 수 있을 것으로 판단됨
- 대량시스템 구축을 위한 대량 생산공정상의 발효조건을 설정하고 이에 따른 제품을 시험생산함으로써 공정을 표준화 확립함

2) 제조관리 및 품질관리 구축

- 제조관리 및 품질관리를 위한 전담부서(연구부서) 인력 충원 등을 통한 제품의 퀄리티 향상을 위한 체계를 구축함
- 품질관리 성적서 및 시제품의 자가품질규격평가 등은 식품위생검사기관인 식품산업연구원, 식품연구원 등에 의뢰하여 수행함
- 기타 품질관리에 필요한 기자재는 사업 종료 후 매출 향상에 따라 구입을 고려할 예정임

3. 고체발효 결명자발효분말의 유효성 평가: 랫트 및 마우스 모델에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가

1) 유효성 평가 개요

- 장기능 개선 시제품을 이용한 개발 방향 제품은 probiotics 제품이 아니므로 유산균 제품과는 비교하지 않을 예정이며 시중에 사용되고 있는 의약품인 돌코락스S나 동 기능 고시형 원료와 비교연구를 수행함
- 효능검증을 위한 다각적인 동물 모델을 이용하기 위해 변비실험모델로 이용하는 랫트와 마우스를 이용하여 장 거리이동개선효과가 있는지 확인할 예정임

2) 실험동물 사육 및 실험식이(랫트, 마우스)

- 실험동물은 SD(Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷 및 C57/BL6 mouse 6주령을 다물사이언스(대전, 대한민국)에서 구입하여 사용하며 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 12시간 명암 조건에서 사육함
- 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 5~7마리씩을 배치하여 총 7군으로 실험군을 분류함
- 정상대조군 (NOR), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 액체발효 결명자 투여군 (LF-300, 300mg/kg), 저농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-300, 300mg/kg), 중농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-600, 600mg/kg), 고농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-1,000, 1,000mg/kg)으로 군을 분리함
- 각 시료들을 1주일 동안 투여를 한 후에 정상군을 제외한 모든 군에서 4mg/kg의 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 피하투여 하여 변비를 유발, 6일째에 희생시키고 체중 및 사료섭취량, 음수량, 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 및 변의 장내 이동거리를 측정함으로써 유효성을 평가함 (랫트)
- 각 시료들을 1주일 동안 투여를 한 후에 정상군을 제외한 모든 군에서 4mg/kg의 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 피하투여 하여 변비를 유발, 6일째에 희생시키고 체중 및 사료섭취량, 음수량, 변의 장내 이동거리를 측정함으로써 유효성을 평가함 (마우스)

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정(랫트)

- Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하고 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정함

4) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 측정(랫트)

- 각 실험동물의 변은 실험시작 후 4일째에 케이지안의 변을 제거하고 bed를 갈아준 후에 5일째에 수거하며, 개체 당 변의 개수와 변 중량(wet weight)을 측정함
- 변의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변

증량과 건 중량의 차이를 변증량으로 나누어 계산함

5) 장내 변이동거리개선 효과측정(랫트, 마우스)

- 변의 장내 이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St, Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정함

6) 통계처리

- 실험에서 얻은 결과에 대해서 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내고 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA) 을 실시함. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시함

4. 시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구

- 결명자발효분말에 대한 보존료(소르빈산, 안식향산, 데히드로초산, 파라옥시안식향산), 보존료(프로피온산)에 대한 생성 여부 및 함량을 한국식품과학연구원을 통해 확인하고자 함
- 시제품의 안정성 평가는 식품위생검사기관인 전남식품산업연구원 또는 한국기능성식품연구원 등에 의뢰하여 수행할 예정임

1) 기준규격

항 목	기 준	항 목	기 준
수 분(%)	10 이하	조 단백질(%)	10 이상
α -아밀라아제	양 성	프로테아제	양 성
대 장 균	음 성	붕 해	적 합

2) 시험방법

- (1) 수분 : 식품공전 제10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.1 수분에 따라 진행
- (2) 조단백질 : 식품공전 제10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.3 질소화합물 1.1.3.1 총질소 및 조단백질에 따라 진행
- (3) α -아밀라아제

- 시약

- 1% 가용성전분용액 : 가용성전분(표준품) 1g을 물에 녹이고 호화하여 100ml로 함
- 맥바인 (McIlvaine) 완충액 (pH 6.0 또는 7.0) : 0.1N 인산일수소나트륨액 일정량에 0.1N 구연산액을 넣어 pH 6.0 및 7.0으로 각각 조제
- 0.1% 염화칼슘용액 : 염화칼슘 1g을 물에 녹여 1L로 함
- 요오드시액 : 요오드 0.2g과 요오드칼륨 2g을 물에 녹여 100ml로 하고 그 1ml에 1N 염산 1ml를 넣고 물로 100ml로 함

- 기구 및 장치

- 분광광도계 (Spectrophotometer)

- 시험용액의 조제

- 검체 5.0g을 정밀히 달아 물 또는 완충액에 녹여 100ml로 한 다음 여과하여 검액으로 함
- 20ml 시험관 2개를 준비하여 각각 시험용, 공시험용으로 함
- 시험관에 1% 가용성전분용액 5ml, 맥바인완충액 (pH 6.0 또는 7.0으로서) 13ml와 0.1% 염화칼슘용액 1ml를 넣고 37°C로 가온
- 검액 1ml를 넣은 후, 37°C에서 30분간 방치함
- 별도로 100°C에서 30분간 가열하여 활성을 잃은 검액 1ml를 위와 같이 조작하여 공시험으로 사용함
- 시험용과 공시험용 반응액 0.2ml에 요오드시액 10ml를 넣은 것을 시험용액으로 함

- 시험조작

- 물을 대조액으로 파장 660nm에서 측정함
- 시험용액의 흡광도는 공시험의 흡광도보다 0.030이상 작아야 함
- 발색의 정도가 지나쳐 측정이 곤란한 경우는 검액을 희석하여 시험하고 희석배수를 적용함

(4) 프로테아제

- 시약

- 0.6% 카제인용액 : 카제인 (표준품)을 건조하여 0.6g을 달아 0.1N 수산화나트륨액 20ml에 가열하여 녹임
- 0.1M 인산을 첨가하여 pH 조정 (pH 7.0)
- 0.4M 삼염화초산액 : 삼염화초산 65.4g을 물에 녹여 1L로 함
- 0.4M 탄산나트륨액 : 탄산나트륨 42.5g을 물에 녹여 1L로 함
- 포린시액 : 식품첨가물공전에 따라 만들어 원액으로 함

- 완충액 : 0.1M 인산염완충액(pH 6.0 또는 8.0) 또는 0.1M 초산염 완충액 (pH 6.0 또는 8.0)

- 기구 및 장치

- 분광광도계 (Spectrophotometer)

- 시험용액의 조제

- 검체 약 5.0g을 정밀히 달아 물 또는 완충액에 녹여 100ml로 한 다음 여과하여 검액으로 함
- 0.6% 카제인용액 1ml를 시험관에 넣고 37°C의 항온수욕 중에서 가온한 다음 여기에 검액 1ml를 정확히 넣고 잘 흔들어 섞음
- 37°C의 항온수조에 넣고 정확히 10분간 반응시킨 다음 여기에 0.4M 삼염화초산액 2ml를 넣음
- 37°C에서 25분간 방치한 다음 이것을 여과
- 여액 1ml를 시험관에 정확히 취하여 0.4M 탄산나트륨용액 5ml 및 포린시액 (원액을 3배 희석한 액) 1ml를 넣어 잘 흔들어 섞음
- 37°C에서 20분간 방치한 다음 발색된 액을 시험용액하며 이와는 별도로 검액 1ml를 정확히 취하여 시험관에 넣고 37°C에서 10분간 방치한 후 0.4M 삼염화초산액 2ml를 첨가하고 0.6% 카제인용액 1ml를 넣어 37°C에서 25분간 방치한 다음 이하 시험용액과 동일하게 조작하여 공시험용액으로 함

- 시험조작

- 물을 대조액으로 파장 660nm에서 흡광도를 측정
- 시험용액의 흡광도는 공시험의 흡광도보다 0.030이상 커야 함
- 발색의 정도가 지나쳐 측정이 곤란한 경우는 검액을 희석하여 시험하고 희석배수를 적용

(5) 대장균 : 식품공전 제10. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.8 대장균에 따라 진행

(6) 봉해시험 : 식품공전 제10. 일반시험법 9. 일반시험법 9.6 봉해시험에 따라 진행

(7) 유통기한 설정 시험

- 가혹시험

- 광선, 온도, 습도의 3조건을 검체 특성을 고려하여 설정함
- 품질관리상 중요한 항목과 분해산물 생성 유무를 확인 및 정량을 시행함

- 중요한 분해산물은 그에 대한 물리화학적 성질, 독성 및 약리시험자료 등을 제출함
- 장기보존시험
 - 시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용함
 - 3Batch 이상에 대하여 시험하는 것이 원칙임
 - 실온보관 의약품: 온도 $25.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, 상대습도 $60.0 \pm 5.0\%$ 또는 온도 $30.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, 상대습도 $60.0 \pm 5.0\%$ 조건에서 실시함
 - 냉장보관 의약품: 온도 $5.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$ 조건에서 실시함
 - 냉동보관 의약품: 온도 $-20.0 \pm 5.0^\circ\text{C}$ 조건에서 실시함
 - 시험기간은 신약은 최소 12개월, 자료제출 의약품은 최소 6개월 이상 진행함

5. 장기능개선 시제품의 유효성 평가: 장기능 개선 시제품의 랫트 모델에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가

1) 실험동물 사육 및 실험식이(랫트)

- 실험동물은 SD(Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 다물사이언스(대전, 대한민국)에서 구입하여 사용하며 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육함
- 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 5~7마리씩을 배치하여 총 7군으로 실험군을 분류함
- 정상대조군(Con), loperamide 투여군(Lop), 양성대조군(PC), 분말형 시제품 투여군(20mg/kg), 음료형 시제품(10ml/kg)으로 나누고 양성대조군으로는 의약품인 돌코락스S나 동 기능 고시형 원료와 비교연구를 수행함
- 각 시료들을 1주일 동안 투여를 한 후에 정상군을 제외한 모든 군에서 4mg/kg의 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 5일간 피하투여 하여 변비를 유발하고 6일째에 희생시키고 체중 및 사료섭취량, 음수량, 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량을 측정함으로써 유효성을 평가함

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정(랫트)

- Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하고 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정함

4) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량(랫트)

- 각 실험동물의 변은 실험시작 후 4일째에 케이지안의 변을 제거하고 bed를 갈아준 후에 5일째에 수거하며, 개체 당 변의 개수와 변 중량(wet weight)을 측정함

- 변의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변중량으로 나누어 계산함

5) 장거리이동개선 효과측정(랫트)

- 장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험 동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였음

6) 통계처리

- 실험에서 얻은 결과에 대해서 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내고 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA) 을 실시함. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시함

6. BI & CI, 디자인 개발

1) 대중국 수출형 상품개발을 BI & CI 개발

- 중국인의 소비트렌드 분석 및 수요요구와 친근한 브랜드명 개발
- 각 국의 관련 법규에 맞는 원료 함량 및 기준 및 표시기준 등을 준용

2) 인케이스, 아웃케이스 개발

- 장기능 개선 기존 제품을 벤치마킹한 보편적인 형태의 용기선정
- 독특한 형태의 포인트를 강조한 파우치, 박스 디자인 개발
- 중국인들이 선호하는 색깔 및 로고 등을 감안하여 인, 아웃케이스를 제작함

7. 완제품 생산

1) 원료 분쇄 및 볶음

- 결명자 시료 분쇄
- 150°C, 5분 볶음

2) 발효물 제작

- 대량 생산공정에 따른 장기능개선 발효물 제작
- 동결건조물 생산

3) 부형제 첨가 및 완제품 증진

- 부형제 첨가 및 완제품 증진(100kg/1Lot): 1Lot
- 과일 스틱 파우치 포장, 아웃박스 3g씩 30포/1개월 포장

4) 완제품 포장

- 판매용 완제품 포장: 1000 BOX(30포/box, 3g/포)

8. 완제품의 품질검사

1) 표준화된 발효물에 의해 만들어진 완제품에 대한 품질관리 지표는 결명자 발효물의 시험방법을 이용하여 설정함

2) 시제품의 시험법 밸리데이션 세부 연구내용

- 특이성(Specificity)이란 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말함
- 직선성(Linearity)이란 시험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양 (또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말함
- 완건성(Robustness)이란 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 영향을 받지 않는지에 대한 척도를 말함. 분석법이 통상 사용되는 동안 그 분석법을 얼마나 신뢰할 수 있는 지에 대한 지표임

3) 시제품의 지표물질 함량범위 설정

- 생리활성의 주원료인 결명자 발효물의 첨가 비율에 따른 지표물질의 함량 범위를 재 설정하고 3반복이상 하여 표준화 함

9. 판매 마케팅, 수출계약 체결

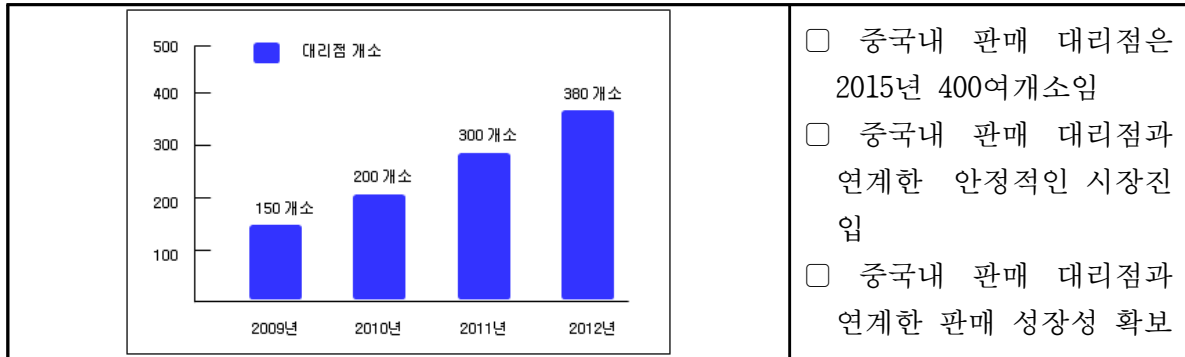
1) 중국내 수출계약체결

- 중국은 2009년 ‘식품안전법’을 제정하였으며 식품검사, 식품 수출입 등에 관한 법률책임 및 부칙이 명시되어있음. 중국내 식품안전 기준이 식품 또는 처음으로 수입되

는 식품 관련 제품의 신규 품종에 대해 안전 평가 자료를 제출하여야 함

2) 중국 등 국외시장 판매 마케팅

- 중국 소비자의 자가 건강관리, 고령화 등으로 건강지향형 식품에 대한 수요가 증가함
- 또한 중국 소비자들의 경제적 수준이 높아지면서 고급 건강보조식품에 대한 수요도 갈수록 늘어나는 등 신제품에 대한 기대도 계속 증가하고 있음
- 중국 보건식품시장은 2010년 1,300억 RMB(원화 22조원)으로 연평균 20.7%으로 지속적인 성장을 유지, 잠재적인 시장규모가 큼(출처 : 건강기능식품의 글로벌 전략)
- 현재 해남자연농업영농조합법인은 중국 내 구축된 유통체계(중국 바이어 회사명 : Qingdao Hanking Trading Co., Ltd.)와 연계한 수출시장의 안정적 시장진출 및 판매 성장성 확보함
- 국외 식품관련 박람회 참가를 통한 제품 판매 및 홍보예정임



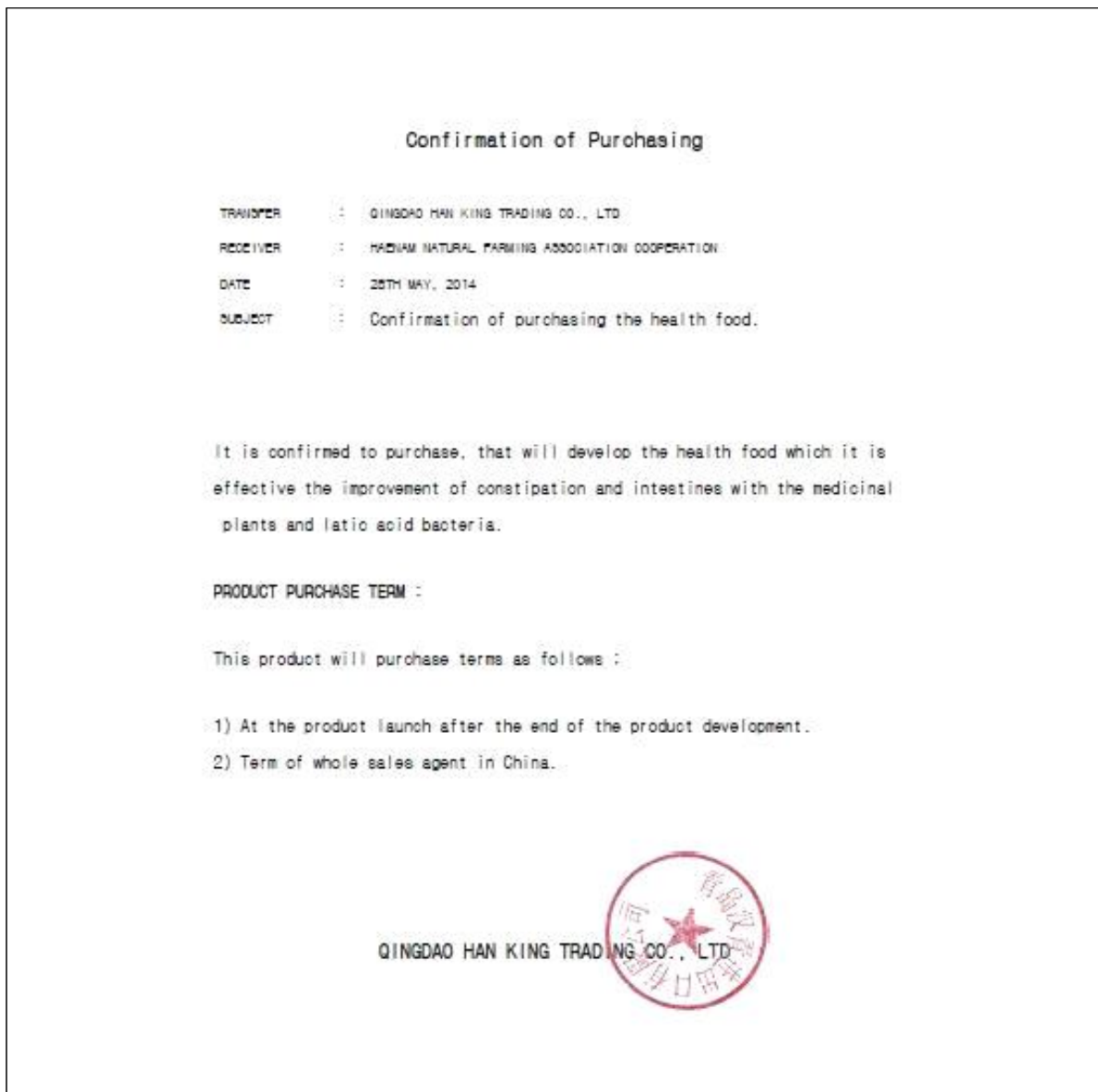
3) 신규수출시장 개척

- 신규수출시장 개척은 아시아권 선진국인 일본이나 신흥국가인 베트남, 싱가포르, 인도네시아 등을 목표로 하고 있으며 신흥국가들은 기능성식품 성장단계에 진입하였기에 향후 성장 가능성이 매우 높음



4) 내수시장 판매마케팅

- 온라인 마케팅 구축 : 온라인 광고(홈페이지, 홈쇼핑, 쇼핑몰 등) 활용
- 오프라인 마케팅 구축
 - 지역대리점이 구축되어 있으며 지속적인 판매 대리점 개설에 따른 개발제품의 판로 확보
 - 국내 식품관련 박람회 참가를 통한 제품 판매 및 홍보



※ 본 사업을 통해 개발될 변비개선 및 장건강식품 구매확약서
(바이어 회사명 : Qingdao Hanking Trading Co., Ltd.)

10. 중국 수입건강식품 인증 보전 대행 계약

- ※ 중국수입건강식품의 인증은 국내 제품판매 실적이 1년 이상인 품목에 한해 신청할 수 있으며 인증 기간 또한 4~5년 소요됨으로 사업종료 후 주관기관에서 좀 더 투자를 실시하여 중국내 건강기능식품 개별인증식품으로 인증을 얻을 예정임
- ※ 중국내 인증을 위해 중국 현지 보전대행기관과 계약할 예정임

1) 중국 수입건강식품 인증 분야

- 중국 건강보전식품은 국가식품약품감독관리부에서 승인을 받고 생산, 판매해야 하며 특정한 건강기능 효과나 비타민, 미네랄 보충의 목적이 있는 식품이어야 함
- 건강보전식품은 중국에서 크게 2부분으로 나뉘는데 하나는 기능성 건강보전식품(위장기능개선, 면역력 증강 등 27종 기능 중 하나)과 영양소 보충분야임
- 본 개발사업을 통하여 건강보전식품 27종의 기능 중 하나인 위장기능개선용으로 개별 인증 신청하고자 함

2) 외국 건강보전식품이 중국 진출을 위해서 필요한 인증 절차

- 보전식품 판매허가증서 : 외국 건강보전식품이 중국에 수입되기 전 반드시 국가위생부의 심사를 받아야 함
- 보전식품 대 중국 수출시 ‘국식건자 J*****’ 로 나가는 문서번호는 중국진출을 위해 제일 중요한 단계이며 제품번호 획득한 후 보전식품 허가증서에 근거해 수입절차 진행
- 보건부와 국가식약품감독부가 사용하는 건강보전식품허가 마크 획득
- 수입보전식품 신고 관리 규정
- 건강보전식품 등록신청 허가 자격 : 1년이상 판매실적 있어야함

3) 중국 건강보전식품 인증기관의 실험 방법 및 내용

- ① 안전성 독물학 시험은 검사기구인 SFDA가 반포한 보전식품 안전성 독물학 평가 절차와 검사방식에 따라 식용 안전성의 검정을 목적으로 신청자가 제공한 샘플에 대하여 진행하는 동물시험을 가리키고 필요 시 인체시험을 진행할 수 있음
- ② 기능성 시험은 검사기구인 SFDA가 배포 또는 기업이 제공한 보전식품 기능성 평가 절차와 검사방식에 따라 신청 샘플의 보전기능을 검정하기 위한 동물시험 또는 인체 시험을 지칭함
- ③ 효능성분 또는 지표성분(标志性成分)의 검사측정은 검사기구인 SFDA 및 관련 부서가 반포 또는 기업이 제공한 보전식품 효능성분 또는 지표성분(标志性成分)의 검사측정방식에 따라 신청자가 제공한 샘플의 효능성분 또는 지표성분(标志性成分)의 함량 및 그 품

질 보장기간 내의 함량 변화를 측정하는 검사를 지칭함

- ④ 위생학 시험은 검사기구인 국가 관련 부서가 반포 또는 기업이 제공한 검사방식에 따라 신청자가 제공한 샘플의 위생학 및 제품 품질과 관련된 지표(효능성분 또는 지표 성분(标志性感)을 제외)에 대하여 진행하는 검사를 지칭함
- ⑤ 안정성 시험은 검사기구인 국가 관련 부서가 반포 또는 기업이 제공한 검사방식에 따라 신청자가 보낸 샘플의 위생학 및 제품 품질과 관련된 지표(효능성분 또는 지표 성분(标志性感)을 제외)의 품질 보장기간 내의 변화에 대하여 진행하는 검사측정을 지칭함
- ⑥ 샘플검사는 신청자가 신고한 품질표준에 따라 SFDA가 제공한 샘플에 대해 전체 항목을 검사하는 것을 지칭함
- ⑦ 재검사는 신청자가 신고한 품질표준 중의 효능성분 또는 지표성분(标志性感)의 검사 측정방식에 대한 재검사를 지칭함

4) 건강보건식품 허가등록 신청과정

- 국가에서 지정한 검사기관에서 규정항목에 대한 검사를 진행 함
- 이 후 국가식약품관리국에 신청을 하고 식약국은 1차 심의를 거친 후 상품의 자료와 진행된 기술에 대해서 심사하고 견해를 제출함
- 신청기업은 전문가의 제출의견에 맞춰 국가에서 규정한 요구에 부합되도록 보충하고 수정해야 함
- 절차 수행 후 최종적으로 국가의 행정심사허가 등록
 - 건강보건식품 허가증서 신청/등기 소요시간 : 4~5년
 - 보건식품 허가증서의 유효기간은 5년이며, 유효기간 완료돼 연장을 원할 경우 신청인은 유효기간이 만료되기 3개월 전에 신청기관에 다시 신청 등록해야 함

5) 보건식품 수입 신청자료 항목

- 보건식품 수입신청표
- 보건식품의 배합방법, 생산방식 및 품질표준
- 독극물 안정성 평가 보고서
- 보건효과 평가보고서
- 보건식품의 효능성분 명단과 효능성분의 성질규정 및 정량검사 방법, 안정성 실험보고서
- 제품의 샘플 및 위생실험 보고서
- 상표 및 설명서
- 관련문헌자료

- 신분증 사본과 영업허가증 사본
- 등기신청의 수입보전식품의 통용명칭과 이미 허가받은 등기 약품 명칭과 이름이 다른 검사자료 제공
- 신청자가 타인이 취득한 특허를 침해하지 않았다는 증명서
- 상표등기 설명문서 제공
- 제품연구개발보고서(연구개발 발상, 기능 선별과정, 기대효과 등 포함)
- 제품 배합방법(원재료와 부재료)과 배합근거, 원재료와 보조재료의 출처 및 사용근거
- 기능성분, 표지성 성분, 함량과 검사방법
- 생산과정 도표 및 상세한 설명과 관련된 연구자료
- 제품 품질표준 및 기초설명
- 직접 접촉제품의 포장재료 종류, 명칭, 품질표준과 선택근거
- 검사기관에서 제출한 실험보고서와 상세자료
- 제품 상표, 설명서 원고
- 기타 제품평가에 도움이 될만한 자료
- 아직 개봉하지 않은 포장된 판매용 샘플

11. 장기능개선 발효물의 변비개선 및 생리활성 규명 논문 투고

1) 장기능개선 발효물의 유효성분 규명 논문 투고

- 특정 유산균에 의한 발효공정으로 인한 결명자의 유효물질 변화 논문 투고

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

2-1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 국내 기술현황

- 2018년 현재 국내 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’의 고시형 원료는 주로 팽창성 하제인 식이섬유가 12개, 삼투성 하제 1개, 자극성 하제 1개, 프로바이오틱스, 프락토올리고당 각 1개로 총 16개임

<표> ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 기능성 원료

No.	원료	기능(지표)성분	일일섭취량
1	알로에전잎	안트라퀴논계 화합물 (무수바바로인)	무수바바로인으로서 20~30 mg
2	구아검/구아검 가수분해물	식이섬유	구아검/구아검 가수분해물 식이섬유로서 9.9~27g
3	글루코만난 (곤약,곤약만난)	식이섬유	글루코만난 식이섬유로서 2.7~17g
4	난소화성 말토덱스트린	식이섬유	난소화성 말토덱스트린 식이섬유로서 2.5~30g; 액상 2.3~44g
5	대두 식이섬유	식이섬유	대두 식이섬유로서 20~60g
6	목이버섯 식이섬유	식이섬유	목이버섯 식이섬유로서 12g
7	밀 식이섬유	식이섬유	밀 식이섬유로서 36g
8	보리 식이섬유	식이섬유	보리 식이섬유로서 20~25g
9	아라비아검 (아카시아검)	식이섬유	아라비아검 식이섬유로서 20g
10	이눌린/치커리 추출물	식이섬유	이눌린/치커리 추출물 식이섬유로서 6.4~20g
11	차전자피식이섬유	식이섬유	차전자피식이섬유로서 3.9g 이상
12	폴리덱스트로스	식이섬유	폴리덱스트로스 식이섬유로서 4.5~12g
13	프락토올리고당	프락토올리고당	프락토올리고당으로서 3~8g
14	프로바이오틱스	생균 수	프로바이오틱스로서 10^8 ~ 10^{10} CFU
15	라피노스	라피노스	라피노스로서 3~5g
16	분말한천	식이섬유	분말한천으로서 2~5g (총 식이섬유로서 1.6~4g)

※ 출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016⁵⁾

- 2017년 개별인정된 원료는 총 5개로 모두 식이섬유와 올리고당 원료들이 이에 해당됨

〈표〉 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 개별인정 기능성 원료

No.	원료	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	이소말토 올리고당	제2005-10호	생리활성기 능 2등급	이소말토올리고당 (isomaltose, kojibiose, nigerose, isomaltotriose, panose, isomaltotetraose, isomaltopentaose)	이소말토 올리고당으로서 8~12g/일
		제2005-11호		이소말토올리고당 (isomaltose, isomaltotriose, panose, isomaltotetraose, isomaltopentaose)	
		제2006-2호			
2	대두올리고당	제2005-20호	생리활성기 능 2등급	stachyose, raffinose	Stachyose, raffinose의 합 2~3g/일
3	커피만노 올리고당분말	제2009-15호	생리활성기 능 2등급	만노올리고당	만노올리고당으로 서 1.0g/일
4	자일로올리고당	제2009-80호	생리활성기 능 2등급	자일로올리고당	자일로올리고당으 로서 0.7~7.5g/일
		제2009-81호			
5	무화과페이스트	제2014-29호	생리활성기 능 2등급	식이섬유	신청원료로서 300g/일

※ 출처: 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016⁵⁾

- 고시형 원료는 프로바이오틱스, 난소화성말토덱스트린, 차전자피식이섬유, 알로에전잎이 주원료로 많이 사용되고 있으며 이 중, 장기능 개선에 활용되는 프로바이오틱스나 알로에, 식이섬유와 같은 원료들은 국내 건강기능식품 매출 상위 품목 10위 안에 들어갈 정도로 많이 사용되는 원료임

〈표〉 건강기능식품 매출액 상위 20개 품목 현황 : 2015

(단위 : 천원)

순위	매출액	
	품목명	금액 (천원)
	총계	1,766,075,719
1순위	홍삼	694,290,522
2순위	개별인정제품	319,537,001
3순위	비타민 및 무기질	207,866,125
4순위	프로바이오틱스	157,871,787
5순위	밀크씨슬추출물	70,518,958
6순위	알로에	55,997,302
7순위	EPA 및 DHA 함유유지	48,465,063
8순위	인삼	30,687,289
9순위	가르시니아카모보지아추출물	27,692,953
10순위	식이섬유	26,048,055
11순위	루테인	20,353,597
12순위	클로렐라	16,527,733

13순위	스피루리나	14,482,768
14순위	감마리놀렌산함유유지	12,811,676
15순위	코엔자임Q10	12,574,727
16순위	녹차추출물	12,072,461
17순위	키토산/키토올리고당	10,494,321
18순위	프로폴리스추출물	9,904,747
19순위	N-아세틸글루코사민	9,257,495
20순위	쏘팔메토열매추출물	8,621,139

※ 출처 : 식품의약품안전처 건강기능식품정책과, 2016⁶⁾

- 이 중, 프로바이오틱스는 건강기능식품 매출 4위를 기록할 정도로 많이 사용되고 있는 원료임. 그러나 프로바이오틱스는 생균을 섭취해야하기 때문에 제품에서 프로바이오틱스의 생존을 위한 제형 및 부형원료 설정이 매우 중요함
- 프로바이오틱스의 제형은 주로 분말과 캡슐 형태로 한정되는데, 정제는 압축에 따른 균주의 손실, 과립은 물과의 혼합 및 건조에 따른 유산균 손실 등과 같은 문제점 때문임
- 이를 위해 냉장보관이 필수이지만 이 또한 균수가 처음에 비해 감소되며 냉장보관하지 않으면 유통기한이 18개월로 짧아지는 등의 문제점도 가지고 있음
- 이러한 생존율을 높이기 위해 필수적으로 프리바이오틱스가 함께 구성되어야 하며 이를 위한 프리바이오틱스는 주로 당류와 유지류가 사용되지만 당류의 끈적임을 해결하기 위해 소비자들이 비 선호하는 이산화규소나 스테아린산마그네슘과 같은 고결방지제가 함유되는 실정임
- 난소화성말토덱스트린은 폴리머 당으로 구성된 올리고당류이며 이는 끈적이는 특징 때문에 흐름성이 좋지 않아 제형 설정에 한계가 있음
- 차전자피식이섬유는 일일섭취량이 비교적 많으며 특유의 고무 향과 맛을 가지기 때문에 비선호하는 소비자층이 있음
- 알로에전잎은 일일섭취량이 무수바바로인으로 20~30mg이지만 추출·농축·정제하지 않은 국내 알로에전잎의 무수바바로인의 함량은 10mg/g 이하로 실제 일일섭취량을 위해서는 알로에전잎을 2~3g 섭취해야하기 때문에 캡슐로의 제형 설정이 어려우며(많은 섭취량 필요) 매우 쓴맛을 가지고 있어 혀에 닿아 맛을 느낄 수 밖에 없는 기타 제형(정제, 과립, 분말, 환 등)에 대해서는 소비자의 선호도가 매우 낮음
- 그러나 결명자발효분말은 한약재 특유의 향이 있어 거부감이 들지 않으며 끈적임이 없어 흐름성이 좋기 때문에 타 재료와 배합이 쉽고 다양한 제형으로 상품 개발이 용이하며 고결방지제를 사용하지 않아도 되는 큰 장점들이 있음. 더불어 발효를 통해 쓴맛이 거의 없어지는 특징이 있어 주원료로서의 가치가 매우 높음
- 현재 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 관련 고시형 및 개별인정형 원료들은 대부분 단순 천연물을 추출, 농축, 합성 또는 배양 균주를 농축한 것으로 프로바이오틱스를 제외하고 단일 하제 효능을 일으키는 원료가 대부분임

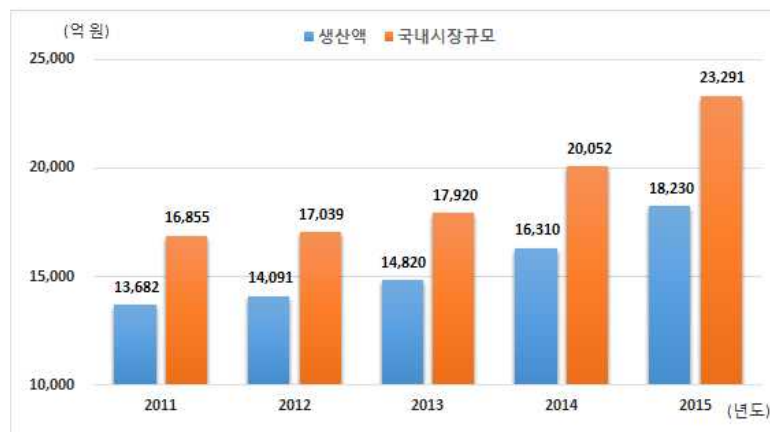
- 그러나 변비 환자의 원인 및 치료 방법이 다양하기 때문에 세계 판매 1위 변비치료 의약품인 둘코락스-에스와 같은 이중 복합적인 하제 효능을 가지는 제품이 필요함
- 결명자발효분말에는 50% 이상의 식이섬유와 12개의 안트라퀴논(anthraquinone)계 화합물이 포함되어있어 팽창성하제(식이섬유)와 자극성하제(안트라퀴논계 화합물)의 시너지 효과를 기대할 수 있음
- 더불어 현재 배변활동 원활 관련 고시 및 개별인정된 원료의 일일섭취량은 대부분 2.5g 이상인 반면에 본 기술을 이용하여 개발한 결명자발효분말의 예상 일일섭취량은 1.0g~5.0g으로 타 재료들과 비슷하거나 낮은 섭취량이 예상됨
- 위와 같은 결명자발효분말의 많은 장점들로 보다 더 많은 소비자층을 확보할 수 있으며 이는 궁극적으로 국내 및 세계인의 건강 증진에 도움이 되리라 판단됨

2) 시장현황

(1) 시장 규모 및 수출입 현황

(가) 국내 시장 규모

- 건강기능식품 시장규모는 약 21억달러(2조 3,291억원, 2015년)로 약 18억달러(2조 52억원, 2014년)에 비해 16.2%가 증가하였으며 2011년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있음
- 생산액은 약 16억달러(1조 8,230억원, 2015년)로 약 15억달러(1조 6,310억원, 2014년)에 비해 11.8% 증가하였음
 - 최근 5년간 건강기능식품 생산액의 평균 성장률은 7.4%로 국내 제조업 국내총생산(GDP) 성장률 2.3% 보다 3.2배 높은 수준임
 - 건강관리에 대한 관심 증가로 면역기능 개선 제품이나 비타민 등과 같은 영양 보충용 제품에 대한 수요가 증가한 것이 생산 증가의 주요 요인으로 분석됨



[그림] 국내 건강기능식품 생산실적 및 시장 규모(2011-2015년)

※ 국내시장규모=생산-수출+수입

※ 출처: 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016⁷⁾

- 건강에 대한 경각심 확대가 빠르게 나타나고 있어 건강 유지를 위하여 건강기능식품 소비 비율은 점진적으로 증가할 것으로 전망됨
 - * OECD 국가별로 본인의 건강상태가 양호하다고 생각하는 비율을 조사한 결과, 한국은 35.1%만 자신이 건강하다고 응답하여 평균이 69.2%임을 감안했을 때 매우 낮은 수치임
- 개별인정형 원료가 국내·외에서 인정받기 시작하면서 소비자의 신뢰도가 높아지고 있으며 일반식품 형태의 건강기능식품도 인정이 가능해지면서 다양한 형태 또는 제형의 제품 개발이 이루어질 것으로 예상됨
- 국내 건강기능식품 시장의 경우 2000년대 초·중반 건강기능식품은 기초 영양소 및 특정 성인병 위주의 기능 개선 선호현상이 나타난 반면 2000년대 후반으로 접어들면서 점차 질병 예방 및 건강관리 제품의 선호 현상이 나타남
- 시장규모는 약 21억달러(2조 3,291억원, 2015년)로 약 18억달러(2조 52억원, 2014년)에 비해 16.2%가 증가하였으며 2011년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있음

<표> 건강기능식품 국내 시장규모(2011 ~ 2015)

구분		2011	2012	2013	2014	2015
생산실적 (억원)		13,682	14,091	14,820	16,310	18,230
전년대비 성장률(%)		28.2	3.0	5.2	10.1	11.8
내수용 (억원)	전년대비 성장률(%)	28.5	2.9	4.1	11.2	10.8
	원화 기준 (억원)	556	584	754	670	904
수출용	전년대비 성장률(%)	20.9	5.0	29.1	-11.1	34.9
	달러 기준 (만달러)	5,021	5,189	6,888	6,361	7,989
	전년대비 성장률(%)	26.3	3.3	32.7	-7.7	25.6
수입 ¹⁾	원화 기준 (억원)	3,729	3,532	3,854	4,412	5,965
	전년대비 성장률(%)	43.8	-5.3	9.1	14.5	35.2
	달러 기준 (만달러)	33,654	31,372	35,192	41,900	52,719
	전년대비 성장률(%)	50.1	-6.8	12.2	19.1	25.8
국내시장규모 ²⁾ (억원)		16,855	17,039	17,920	20,052	23,291
전년대비 성장률(%)		31.6	1.1	5.2	11.9	16.2

출처 : 식품의약품안전처 건강기능식품정책과, 2016⁶⁾

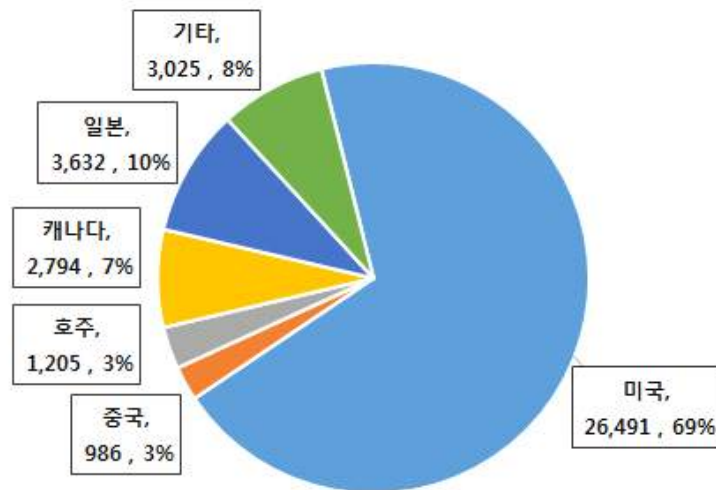
1) 건강기능식품 수입실적의 적합 제품만을 기준
 2) 국내시장규모 = 생산 - 수출 + 수입
 ※ 적용 환율: 1\$=1,108원('11), 1,126원('12), 1,095원('13), 1,053원('14), 1,131원('15)

(나) 수출입 현황 및 품목

- 무역적자 규모는 4.54억달러(5,062억원)로 전년도 3.36억달러(3,742억원)에 비해 35.3% 증가함(2015년 기준)
- 기능성 원료의 수출액은 0.81억달러(904억원)에 반해, 수입액은 5.35억달러(5,965억원)임
- 주요 수입 국가는 미국(2.65억달러, 2,954억원), 일본(0.36억달러, 405억원), 캐나다

(0.28억달러, 311억원) 순으로 미국이 전체 수입액의 69.5%를 차지하고 있음(2014년 기준)

- 수입 품목은 영양소 및 기능성원료 혼합(2.48억달러, 2,544억원) 제품이 가장 큰 비중을 차지함
- 다음으로 프로바이오틱스(0.50억달러, 557억원)와 개별인정형(0.26억달러, 284억원) 제품의 수입 비중이 높은 것으로 나타남
- 국내 판매율이 높은 품목(영양소 및 기능성 원료, 프로바이오틱스 등)들이 상당부분 수입으로 대체되고 있음
- 영양소 및 기능성원료 혼합 제품은 미국, 캐나다, 호주에서 주로 수입되고 있으며 프로바이오틱스는 미국, 일본에서 주로 수입되고 있음

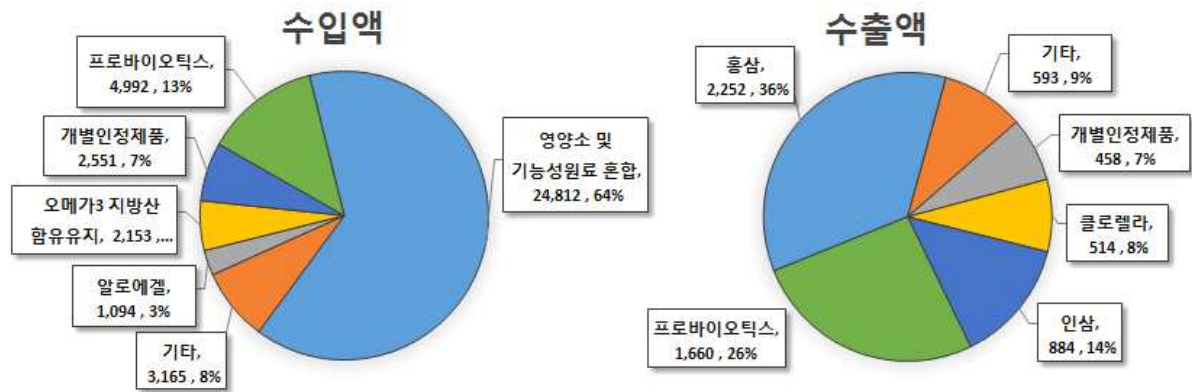


[그림] 건강기능식품 수입 상위 10개 국가(2014년)

※ 출처: 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2015⁸⁾

- 수출 품목은 홍삼(0.23억달러, 251억원), 프로바이오틱스(0.17억달러, 185억원), 인삼(0.09억달러, 99억원) 순으로 큰 비중을 차지하며 특히 홍삼 및 인삼은 전체 수출액의 49.3%를 차지하고 있음
 - 홍삼 및 인삼의 수출은 중국, 홍콩, 일본, 대만 등 아시아 4개국에 치중되어 있으며 이들 국가에 수출하는 금액은 홍삼 및 인삼의 수출액의 78.8%임
- 프로바이오틱스는 수입(0.50억달러, 11.9%)과 수출(0.17억달러, 26.1%) 모두 높은 비중을 차지하고 있는 품목이지만 국내에서 생산되는 프로바이오틱스는 김치 또는 장류에서 분리되어 있는 것으로 수입되는 프로바이오틱스와 차이가 있음
 - * 국내에서 생산되는 프로바이오틱스는 항신료와 프로폴리스에 강한 저항성을 보이며 수입 프로바이오틱스 대비 장내 생존율이 2배 이상 높은 것으로 보고됨

- 클로렐라/스피루리나는 수입(0.08억달러)과 수출(0.05억달러)이 유사한 규모를 차지하고 있음



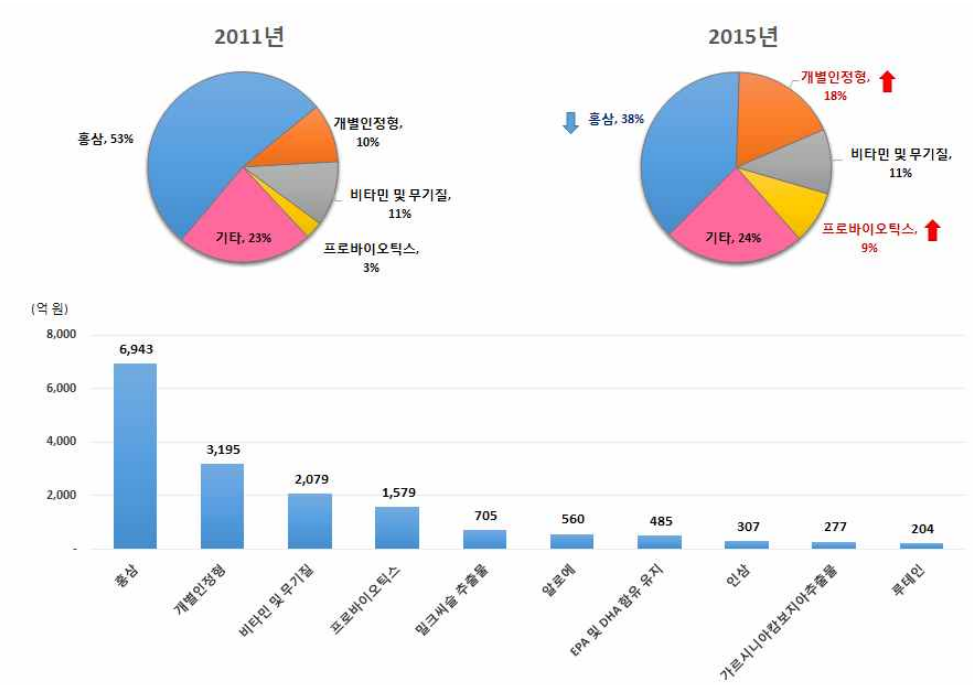
[그림] 건강기능식품 수입 및 수출 품목(2014년)

※ 출처: 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2015⁸⁾

(2) 제품 판매 및 소비 동향

- 품목별 판매 동향

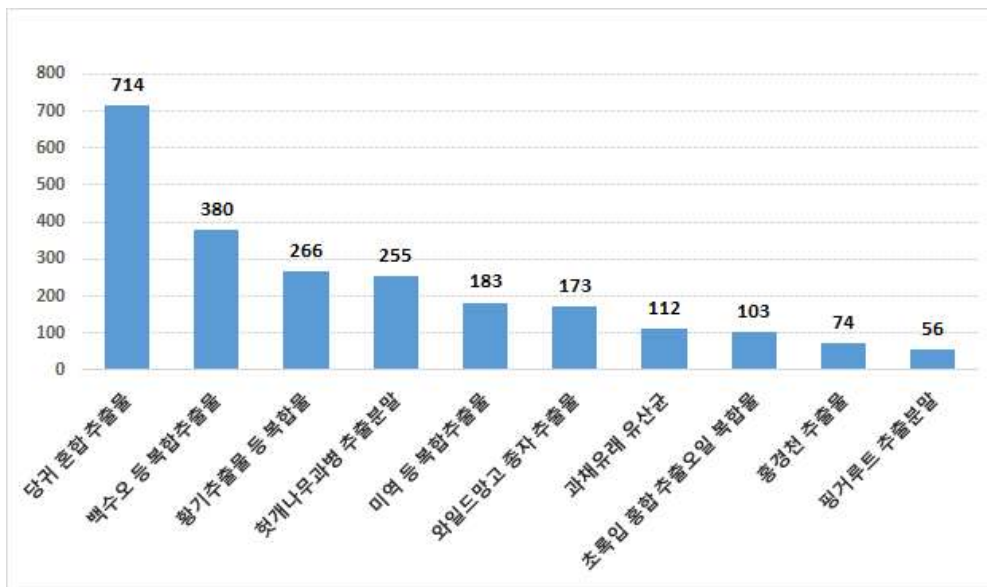
- 건강기능식품 생산액 1,000억원 이상 품목은 홍삼(6,943억원), 개별인정형(3,195억원), 비타민 및 무기질(2,079억원), 프로바이오틱스(1,579억원) 임(2015년 기준)
- 홍삼은 점진적으로 점유율이 감소하고 있는 반면 개별인정형 제품 및 프로바이오틱스의 점유율은 증가하고 있음
- 개별인정형 건강기능식품은 당귀혼합 추출물(면역기능)이 714억원으로 1위를 차지하였으며, 백수오 등 복합 추출물(갱년기 여성건강) 380억원, 황기추출물 등 복합물(키성장) 266억원 순임(2015년 기준)
 - 개별인정형 제품 상위 5개 제품의 비중은 56.3%(1,799억원)으로 2014년 상위 5개 제품이 70%를 차지하던 것에 비해 대폭 감소함
- 2015년 89종류의 개별인정형 제품이 판매되어 전년도에 비해 다양한 제품들이 생산·판매되었으며 이는 소비자들의 관심이 다양한 제품과 기능성으로 분산되고 있는 것으로 보임
 - 면역기능 개선 제품의 수요증가로 개별인정형 원료인 당귀혼합 추출물의 생산실적은 714억원으로 전년 대비 80% 증가함(2015년 기준)
 - 미역 등 복합 추출물(체지방 감소)은 190%(2014년 63억→2015년 183억), 과채유래 유산균(피부건강)은 96%(2014년 57억→2015년 112억) 생산실적이 증가함



[그림] 건강기능식품 품목별 생산실적(2015년) 및 점유율 비교

※ 출처: 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2016⁹⁾

- 일상에서 섭취하기 어려운 영양소 보충 등을 위한 비타민 및 무기질 제품에 대한 수요가 증가하여 생산액이 1,415억원(2014년)에서 2,079억원(2015년)으로 47% 증가함
- 면역력 수요 증가로 인하여 프로바이오틱스 생산액은 405억원(2011년)에서 1,579억원(2015년)으로 연평균 58% 증가함



[그림] 개별인정형 품목별 생산실적(2015년)

※ 출처: 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2016⁹⁾

(3) 기능성별 매출 현황

(가) 2015년 전체 현황

- 항산화 제품이 8,956억원으로 가장 높은 비중을 차지하였으며 이어서 면역기능, 기억력개선의 순서로 나타났음

<표> 기능성별 전체 매출 현황

기능성	총 매출액(억원, %)			
	2015년		2014년	
계	50,147.9	100	43,858.9	100
항산화	8,955.6	17.9	7,594.7	17.3
면역기능	8,717.2	17.4	7,930.4	18.1
기억력개선	7,751.0	15.5	6,811.9	15.5
혈행개선	7,716.4	15.4	6,588.2	15.0
피로개선	7,586.6	15.1	7,220.1	16.5
장건강	2,493.9	5.0	2,133.7	4.9
체지방감소	1,132.4	2.3	979.6	2.2
간건강	990.5	2.0	692.1	1.6
피부건강	967.9	1.9	868.4	2.0
콜레스테롤개선	765.5	1.5	719.4	1.6
관절/뼈건강	640.8	1.3	499.7	1.1
혈중중성지방개선	559.1	1.1	60.0	0.1
갱년기 여성건강	429.6	0.9	1,204.1	2.7
운동수행능력	318.5	0.6	2.0	0.0
어린이키성장	266.2	0.5	-	-
눈건강	243.1	0.5	16.9	0.0
혈압조절	181.0	0.4	86.5	0.2
혈당조절	126.2	0.3	93.3	0.2
과민피부상태개선	115.0	0.2	208.2	0.5
전립선건강	86.2	0.2	65.3	0.1
칼슘흡수도움	29.1	0.1	20.3	0.0
긴장완화	26.7	0.1	20.5	0.0
갱년기 남성건강	17.6	0.0	32.0	0.1
인지능력개선	16.8	0.0	5.0	0.0
위건강	7.0	0.0	3.7	0.0
요로건강	3.7	0.0	1.1	0.0
배뇨기능	1.8	0.0	-	-
정자운동성개선	1.2	0.0	-	-
치아건강	1.2	0.0	1.8	0.0
여성 질건강	0.3	0.0	-	-

※ 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

(나) 고시형 현황

- 고시형 매출 현황

- 항산화, 면역기능개선, 혈행개선, 피로개선, 기억력개선의 상위 5개 기능성 품목이 전체의 84.8%를 차지하고 있음

<표> 2015년 고시형 매출 현황

기능성	총 매출액(억원)	비율(%)
계	45,565.8	100
항산화	8,935.4	19.6
면역기능개선	7,881.2	17.3
혈행개선	7,619.0	16.7
피로개선	7,256.9	15.9
기억력개선	6,991.2	15.3
장건강	2,403.4	5.3
피부건강	866.6	1.9
간건강	705.2	1.5
콜레스테롤개선	689.0	1.5
혈중중성지방개선	559.1	1.2
체지방감소	531.7	1.2
관절/뼈건강	469.9	1.0
눈건강	211.8	0.5
혈압조절	125.7	0.3
혈당조절	106.6	0.2
전립선건강	86.2	0.2
운동수행능력	59.1	0.1
칼슘흡수도움	29.1	0.1
긴장완화	23.5	0.1
인지능력개선	15.2	0.0

* 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

- 배변활동 원활 고시형 매출 현황

- 배변활동 원활 고시형 제품의 대부분은 내수판매용으로 판매되는 것으로 나타남

<표> 2015년 배변활동 원활 고시형 매출 현황

기능성	매출액(억원)		
	총 매출액	내수용	수출용
계	817.5	762.1	55.3
알로에	560.0	530.3	29.6
차전자피식이섬유	136.0	110.8	25.2
난소화성말토덱스트린	74.4	73.9	0.5
폴리덱스트로	32.6	32.6	-
프락토올리고당	14.5	14.5	-

* 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

(다) 개별인정형 현황

- 개별인정형 매출 현황

- 면역기능개선, 기억력개선, 체지방감소, 갱년기 여성건강, 피로개선의 상위 5개 기능성 품목이 전체의 64.5%를 차지하고 있음

<표> 2015년 개별인정형 매출 현황

기능성	총 매출액(억원)	비율(%)
계	4,582.1	100
면역기능개선	836.0	18.2
기억력개선	759.9	16.6
체지방감소	600.7	13.1
갱년기 여성건강	429.6	9.4
피로개선	329.7	7.2
간건강	285.3	6.2
어린이키성장	266.2	5.8
운동수행능력	259.4	5.7
관절/뼈건강	170.9	3.7
과민피부상태개선	115.0	2.5
피부건강	101.4	2.2
혈행개선	97.3	2.1
장건강	90.4	2.0
콜레스테롤개선	76.5	1.7
혈압조절	55.2	1.2
눈건강	31.2	0.7
항산화	20.2	0.4
혈당조절	19.6	0.4
갱년기 남성건강	17.6	0.4
위건강	7.0	0.2
요로건강	3.7	0.1
긴장완화	3.2	0.1
배뇨기능	1.8	0.0
인지능력개선	1.6	0.0
정자운동성개선	1.2	0.0
치아건강	1.2	0.0
여성질건강	0.3	0.0

※ 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

- 배변활동 원활 개별인정형 매출 현황

- 배변활동 원활 개별인정형 제품의 대부분은 내수판매용으로 판매되는 것으로 나타남

<표> 2015년 배변활동 원활 개별인정형 매출 현황

기능성	매출액(억원)		
	총 매출액	내수용	수출용
계	4.4	4.4	
라피노스	0.2	0.2	-
분말한천	0.1	0.1	-
자일로올리고당 분말	4.1	4.1	-

* 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

(4) 국내 산업 현황

(가) 산업 규모

- 2015년 업체 수는 487개소이며 업체당 평균 매출액은 37억 4천만원으로 지속적으로 증가하고 있음
- 식품의약품안전처에 신고된 건강기능식품 제조업체 수는 487개소(2015년)로 460개소(2014년) 대비 5.9% 증가하였으며 우수 건강기능식품 제조기준(GMP) 지정업체 수는 208개소 (2014년)에서 216개소(2015년)로 늘어남
- 2015년 기준 건강기능식품 판매업체 94,691개소, 수입업체 3,596개소, 제조업체 487개소이며 건강기능식품의 안전성과 품질향상을 위해 GMP 의무화가 2020년까지 단계적으로 추진될 예정이고 이에 따른 GMP 지정 제조업소의 수는 증가할 전망이다

<표> 건강기능식품 관련업체 현황 - 업종별, 연도별 : 2005-2015

(단위 : 개소)

구 분	총계	건강기능식품제조업				건강기능식품판매업		
		소계	건강기능식품전문제조업	건강기능식품벤처제조업	건강기능식품수입업	소계	건강기능식품일반판매업	건강기능식품전문판매업
2005	44,307	310	298	12	1,635	42,362	41,614	748
2006	49,203	337	313	24	1,955	46,911	45,833	1,078
2007	50,255	345	319	26	2,201	47,709	46,649	1,060
2008	58,570	356	328	28	2,395	55,819	54,538	1,281
2009	63,601	385	349	36	2,528	60,688	59,370	1,318
2010	75,449	397	361	36	2,818	72,234	70,753	1,481
2011	83,377	424	386	38	2,772	80,181	78,591	1,590
2012	87,343	435	396	39	2,926	83,982	82,246	1,736
2013	96,199	449	407	42	3,139	92,611	90,687	1,924
2014	101,426	460	414	46	3,386	97,580	95,404	2,176
2015	98,774	487	434	53	3,596	94,691	92,217	2,474

출처 : 식품의약품안전처 건강기능식품정책과, 2016⁶⁾

- 15년 국내 제조업 GDP의 전년 대비 성장률은 2.3%인데 비해 건강기능식품 생산은 11.8% 증가하여 고속 성장 중으로 나타남 (2015년 국내 제조업 GDP 2.3% 성장, 한국은행 경제통계시스템, 2016.7)

〈표〉 국내 산업대비 건강기능식품 산업 비중 - 연도별 : 2004-2015

(단위 : 10억원, %)

구 분	국내총생산 (GDP)	제조업GDP	건강기능식품 등 매출액	GDP 대비 (%)	제조업 GDP 대비 (%)
2004	876,033	225,328	798	0.09	0.35
2005	919,797	234,697	686	0.07	0.29
2006	966,055	242,292	701	0.07	0.29
2007	1,043,258	265,627	724	0.07	0.27
2008	1,104,492	284,940	803	0.07	0.28
2009	1,151,708	300,037	960	0.08	0.32
2010	1,265,308	351,771	1,067	0.08	0.30
2011	1,332,681	379,521	1,368	0.10	0.36
2012	1,377,457	388,010	1,409	0.10	0.36
2013	1,429,445	403,657	1,482	0.10	0.37
2014	1,486,079	408,510	1,631	0.11	0.40
2015	1,558,592^(p)	418,042^(p)	1,823	0.12	0.44

출처 : 식품의약품안전처 건강기능식품정책과, 한국은행경제통계시스템 ¹¹⁾

주:p는 잠정치

(나) 제조업체 규모별 분포

- 연 매출액 10억 미만의 소규모 업체 비율이 계속해서 74% 내외를 차지하고 있는 것을 볼 때, 여전히 영세업체의 비중이 높은 것을 알 수 있음

〈표〉 건강기능식품 제조업체 규모별 분포

(단위: %)

구분	2014	2015
생산실적 없음	24.5	26.1
1억원 미만	19.9	20.9
1~5억	21.0	17.7
5~10억	8.4	9.4
10~20억	7.9	8.6
20~50억	9.3	7.2
50~100억	3.0	4.7
100~300억	3.0	2.5
300~500억	1.2	1.6
500~1,000억	1.4	1.0
1,000~2,000억	-	-
2,000~5,000억	0.2	0.2

3) 경쟁기관현황

(1) 배변활동 원할 고시형 상위 5개 업체

○ 배변활동 원활 고시형 상위 5개 업체 제품의 대부분은 내수판매용으로 판매되는 것으로 나타남

<표> 2015년 배변활동 원활 고시형 상위 5개 업체 매출 현황

품목유형	순위	업체명	매출액(억원)		
			총 매출액	내수용	수출용
난소화성 말토덱스트린	1	대상(주)	50.0	50.0	-
	2	(주)참다운녹즙	6.8	6.8	-
	3	클마비엔에이치(주)푸드팜사업부문	6.4	6.4	-
	4	(주)삼양사	2.1	1.7	0.5
	5	(주)네이처텍	1.7	1.7	-
알로에	1	(주)마임	278.2	278.2	-
	2	(주)네이처넥	104.6	104.6	-
	3	(주)뉴트리바이오텍	43.0	13.5	29.5
	4	코스맥스바이오(주)	34.1	34.1	-
	5	(주)김정문알로에	22.3	22.3	-
차전자피 식이섬유	1	엘라이프주식회사	48.3	48.3	-
	2	(주)뉴트리바이오텍	25.7	0.5	25.2
	3	한독화장품(주)	15.2	15.2	-
	4	(주)두루원	12.6	12.6	-
	5	(주)한국하비스알엔디	6.4	6.4	-
폴리덱스트로	1	극동에치팜(주)	23.2	23.2	-
	2	한국인삼농업법인(주)	3.5	3.5	-
	3	(주)로제트	3.5	3.5	-
	4	주식회사 노바렉스	1.8	1.8	-
	5	주식회사 한미양행	0.6	0.6	-
프락토올리고당	1	코스맥스바이오(주)	7.0	7.0	-
	2	(주)삼양제넥스	2.8	2.8	-
	3	(주)뉴트리바이오텍	2.3	2.3	-
	4	(주)양생당	0.9	0.9	-
	5	(주)힐링푸드	0.8	0.8	-

※ 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

(2) 배변활동 원활 개별인정형 상위 5개 업체

○ 배변활동 원활 개별인정형 상위 5개 업체 제품의 대부분은 내수판매용 위주로 판매되고 있는 것으로 나타남

<표> 배변활동 원활 개별인정형 상위 5개 업체 매출 현황

품목유형	순위	업체명	매출액(억원)		
			총 매출액	내수용	수출용
라피노스	1	(주)팜크로스	0.2	0.2	-
분말한천	1	(주)젠푸드	0.1	0.1	-
	2	주식회사 엠에스씨	0.0	0.0	-
자일로올리고당 분말	1	주식회사 노바렉스	2.1	2.1	-
	2	코스맥스바이오(주)	2.0	2.0	-

※ 출처: 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015¹⁰⁾

- 개별인정형 원료들은 고시형 원료들과 유사한 식이섬유와 올리고당이 해당되며 자일로올리고당을 제외하고 매출이 거의 없음

4) 변비 개선 기능성 식품소재 개발동향

- 변비 치료를 위해서는 식생활 개선 및 수분섭취 증대 등의 일반적인 치료와 함께 변비치료제를 사용하게 되는데, 변비치료제의 경우 이차적으로 사용되는 변비치료약물로서 하제는 그 효과가 일시적이고 종류에 따라서 여러 가지 부작용을 유발함
- 특히, 자극성 하제의 경우 장기 연용 시 그 효력이 점차 감소되고 더욱이 장기복용 시 장근신경총이 파괴되어 “하제형 대장“이 되어 대장기능을 상실할 수도 있음
- 하지만 장 건강에 도움을 주는 건강기능식품 섭취 시 부작용 없이 장기간 섭취가 가능하며 배변횟수, 배출시간이 촉진되고 변의 수분량 개선 및 장내 균총에서 유익균 증식, 유해균 억제를 통해 장운동 및 배변활동 개선에 도움을 주는 것으로 확인된 바 있음. 이에 따라 다양한 식품 소재 및 한약재를 이용한 변비 개선용 건강기능식품에 대한 수요가 증가하고 있으며 제품개발 또한 점차 증가하고 있는 추세임
- 변비를 해소하기 위한 기능성 식품소재 중 가장 일반적인 것이 식이섬유이고 이외에도 다시마, 야콘, 삼백초, 결명자차, 동규자차, 알로에, 해조류 등을 포함하는 다양한 식품이 판매되고 있으나 과학적으로 그 효과가 충분히 입증되었는지 여부가 의문시되고 있음
- 상기의 문제를 해결하기 위하여 다양한 방법들이 연구되어 오고 있으며 그 결과, 다양한 의약품 또는 식품 등이 개발되어 오고 있음. 예를 들어, 상기 변비 등의 문제를 해결하기 위해서 장기능의 활성을 최우선으로 볼 수 있는데, 이를 위한 많은 연구가 실시되었음
- 대한민국 등록특허공보 제149389호(1995.03.)에는 말린 굴껍질, 인삼, 오미자, 백반, 감초, 살구씨 및 구기자를 이용한 변비치료용 생약성분 조성물이 기재되어 있음
- 대한민국 등록특허공보 제0584153(2002.07.)에서는 카스카라 사그라다(Cascara sagrada), 당귀, 지각, 우슬로 이루어진 생약소재들에 의해, 기존의 변비약에서 문제점인 단속성

과 의존성을 해결하여 지속적인 효과를 발휘하는 뛰어난 변비 개선효과를 갖는 생약 소재에 의한 변비개선용 농축액에 관하여 기재되었음

- 대한민국 등록특허공보 제0506824호(2002.12.)에는 장기능 활성을 갖는 생약추출물로서 무(*Raphanus sativus* L.) 및 차(*Camellia sinensis*) 추출물을 필수적으로 포함하는 생약조성물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 장기능 개선 및 변비 질환의 예방 치료를 위한 약학조성물이 기재되어 있음
- 대한민국 등록특허공보 제1485505호(2013.05.)에는 대황 추출물 또는 대황 분말이 변비의 예방, 개선 또는 치료용 식품 또는 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있음이 제시되었으며 대한민국 등록특허공보 제1594650호(2013.12.)에서는 헛개나무(*Hoveniadelphica Thunb*) 추출물과 죽엽 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 변비 개선을 위한 기능성 식품 조성물이 기재되어 있음
- 대한민국 공개특허공보 제2017-0035731호(2015.09.)에서는 석곡속 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 변비 예방 또는 개선용 조성물에 관하여 기재하였으며 대한민국 공개특허공보 제2017-0044838호(2015.10.)에는 차전자피 분말, 다시마 분말, 알로에 분말, 산사열매, 백작약뿌리, 백출(삼주뿌리), 진피(귤껍질) 및 꿀이 유효성분으로 포함되는 식품원료로 분류되는 한약재를 이용한 변비 개선용 조성물이 기재되어 있음
- 이처럼 천연소재나 기능성 식품들을 이용한 변비치료제가 개발·시판되고 있음에도 불구하고 변비환자는 계속해서 증가하고 있어, 새로운 변비치료제에 대한 개발이 계속적으로 필요하다는 것을 여실히 입증해 주고 있음

5) 지식재산권현황

- 결명자를 함유함으로써 변비개선 효과를 가지는 차의 제조방법에 관한 종래의 기술로서는 국내 한국등록특허 제10-0344325호가 있음
- 또한, 한국공개특허 제1999-0084271호에서는 결명자 또는 결명자엽과 다른 생약재를 혼합하고 단순 분쇄 및 배전하여 제조한 티백차가 변비개선에 효과가 있음을 설명하고 있고 한국공개특허 제2003-0062493호는 결명자를 추출, 농축 후 분무건조하여 제조한 결명자 추출물 분말과 카스카라사그라다 추출분말 등을 혼합하여 제조한 혼합침출차가 기호성이 우수하고 변비증상 개선 효과가 있음을 설명하고 있음
- 그러나 상기 특허들은 결명자를 단순 분쇄하여 배전하거나 추출 및 농축하여 건조한 것이거나, 또는 이들과 다른 변비 개선 효과가 있는 생약제와 혼합하는 것에 불과하기 때문에 본 결명자발효분말 생산 기술은 매우 독창적임
- 추가로 본 결명자와 유산균의 발효기술과 직접적으로 경쟁관계에 놓여 있지는 않으나 향후 본 기술을 대체할 수 있는 대체재로서의 잠재력을 가진 대체기술들의 특허를 선정하여 분석하였음
- 본 결명자발효분말 기술에 대한 대체기술의 구체적인 정의로는 천연물을 발효시킴으로써 장 기능 원활 또는 변비 개선 효과를 갖는 조성물 및 그 제조방법으로서 본 기

술의 천연물 소재인 결명자와 유산균 발효 기술과는 상이한 기술에 속함

- 이에 따라 상기 대체기술의 정의에 맞게 발효 천연물을 활용한 변비 개선 효과를 갖는 기능성식품 분야의 공개·등록된 특허에서 선정하였으며 본 기술과의 특허성 비교 및 권리 비교 없이 대체기술을 소개하는 정도로 기술하였음

〈표〉 대상특허의 대체기술 리스트

연번	등록번호 (출원일)	출원인	발명의 명칭
1	10-0716123 (2005.11.21.)	영남대학교 산학협력단	마 또는 산약의 유산 발효액을 함유하는 변비 및 비만의 예방 및 개선용 식품 조성물
2	10-1377405 (2011.09.27.)	종근당건강 주식회사	장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 산약 발효물의 제조방법
3	10-1391441 (2011.10.11.)	주식회사 글루칸	쌀발효 추출물을 포함하는 장기능 또는 변비 개선용 조성물
4	10-1421677 (2012.09.24.)	종근당건강 주식회사	장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 치커리 화이버 발효물의 제조방법
5	10-1744478 (2015.08.27.)	주식회사 글루칸	보리 발효물을 유효성분으로 포함하는 변비 개선, 치료 또는 예방용 조성물

(1) 대체기술 특허의 발명의 목적 및 해결수단

① 한국등록특허 제10-0716123호

- 발명의 목적 :

- 상기 등록특허는 탁월한 정장 효과, 체중 증가 억제 효과 및 변비 예방 효과를 지닌 마 또는 산약의 유산발효액 또는 마 또는 산약의 유산발효 분말을 유효성분으로 함유한 변비 및 비만의 예방 및 개선에 유용한 식품을 제공하는 것을 목적으로 함

- 해결수단 :

- 상기 발명의 목적을 해결하기 위한 방법으로 마 또는 산약의 유산발효액 또는 마 또는 산약의 유산발효분말을 유효성분으로 함유하고 식품학적으로 첨가 가능한 식품보조첨가제를 포함하는 변비 및 비만의 예방 및 개선용 식품을 제공함

② 한국등록특허 제10-1377405호

- 발명의 목적 :

- 상기 등록특허는 유산균을 이용하여 산약을 발효시킴으로써, 산약 특유의 끈적한 성분인 뮤신에 의한 식감 저하 및 풍미를 개선하고, 기능성 물질의 함량을 증대시켜 장 기능 및 변비 개선에 효과를 나타내는 산약 발효물의 제조방법을 제공하는 목적과, 장 기능 및 변비 개선에 효과를 나타내는 산약 발효물을 지속적으로 섭취하여 장내 유익균의 수를 증가시키고 유해균의 증식을 억제하여 장 건강에 도움을 주고

자 함을 목적으로 함

- 해결수단 :

- 상기 발명의 목적을 해결하기 위한 방법으로 세척을 거쳐 표면 물기가 제거된 산약을 건조한 이후 분쇄기로 투입하여 분쇄하는 산약 분말화 1단계;
- 3종류의 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대배양하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 침전물을 동일 비율로 혼합하는 유산균 배양 및 혼합 2단계; 상기 산약 분말화 1단계에 의한 산약 분말에 증류수를 첨가하고 가열 살균한 후 살균 완료된 산약 현탁액에 상기 유산균 배양 및 혼합 단계에 의한 유산균을 첨가하는 산약 현탁액에 유산균 첨가 3단계; 상기 산약 현탁액에 유산균 첨가 단계가 완료된 산약 현탁액을 발효시키는 산약 현탁액 발효 4단계; 상기 산약 현탁액 발효 단계가 완료된 발효액을 동결건조한 후 분쇄하여 분말로 하는 발효액 분말화 5단계;로 이루어지는 것을 특징으로 함

③ 한국등록특허 제10-1391441호

- 발명의 목적 :

- 상기 등록특허는 쌀발효 추출물을 포함하는 변비 또는 장기능 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하며, 쌀발효 추출물을 포함하는 변비의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 함

- 해결수단 :

- 상기 발명의 목적을 해결하기 위해 필요한 쌀발효 추출물의 제조방법으로, 1) 쌀을 물과 혼합하여 불리고 가열 호화시키는 단계, 2) 상기 호화한 쌀에 누룩을 0.05 내지 10 중량%로 첨가하여 20 내지 40℃에서 10 내지 30시간 동안 당화시키는 단계, 3) 15 내지 40℃에서 1일 내지 10일 동안 배양시키는 단계, 및 4) 살균 및 농축 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 함

④ 한국등록특허 제10-1421677호

- 발명의 목적 :

- 상기 등록특허는 유산균을 이용하여 치커리 화이바를 발효시킴으로 기능성 물질의 함량을 증대시켜 장 기능 및 변비 개선에 효과를 나타내는 치커리 화이바 발효물의 제조방법을 제공하는 목적과 함께, 장 기능 및 변비 개선에 효과를 나타내는 치커리 화이바 발효물을 지속적으로 섭취하여 장내 균총 개선 및 배변활동을 원활하게 하는 등 장 건강에 도움을 주고자 함을 목적으로 함

- 해결수단 :

- 상기 발명의 목적을 해결하기 위해 필요한 유산균 발효를 이용한 치커리 화이바 발효물의 제조방법으로, 식이섬유로 이루어진 치커리 화이바 분말에 증류수를 5-6배 가수하여 현탁하는 1단계; 치커리 화이바 현탁액을 121℃에서 20분 멸균하여 30-4

0℃로 식히는 2단계; 1종류 이상의 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대 배양하고 원심분리한 후 상층 액을 제거한 침전물을 동일 비율로 혼합하는 유산균 배양 및 혼합하는 3단계; 상기 살균 완료된 치커리 화이버 현탁액에 상기 유산균 배양 및 혼합 단계에 의한 유산균을 첨가하는 치커리 화이버 현탁액에 유산균을 첨가하는 4단계; 상기 치커리 화이버 현탁액에 유산균 첨가 단계가 완료된 치커리 화이버 현탁액을 발효시키는 치커리 화이버 현탁액을 발효하는 5단계; 상기 치커리 화이버 현탁액 발효 단계가 완료된 발효액을 95-100℃에서 5-10분 동안 살균처리 하는 6단계;로 이루어지는 것을 특징으로 함

⑤ 한국등록특허 제10-174447호

- 발명의 목적 :

- 상기 등록특허는 보리 당화액을 효모 발효; 또는 효모 발효 후 유산균 발효;하여 얻은 보리 발효물을 유효성분으로 포함함으로써 우수한 장 연동운동 촉진효과를 나타내는 변비 개선 또는 예방용 건강기능식품, 변비 치료 또는 예방용 약학 조성 및 장 연동운동 촉진효과를 나타내는 보리 발효물을 제공하는 것을 목적으로 함

- 해결수단 :

- 상기 발명의 목적을 해결하기 위해 보리 발효물을 유효성분으로 하고, 상기 보리 발효물의 1,3-1,4 베타글루칸 및 1,3-1,6 베타글루칸의 중량비는 5:1 ~ 5.7:1이며, 상기 보리 발효물의 다당류 함량은 11~14 중량%인 것을 특징으로 하는 변비 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제시함

(2) 대체기술 특허의 요지 및 특징

- 본 평가 대상 기술에 대하여 검색된 상기 6개의 대체 가능 특허들의 요지 및 특징을 각각 표로 요약하여 정리하였음

<표> 대체특허 1의 요지 및 특징

발명의 명칭	마 또는 산약의 유산 발효액을 함유하는 변비 및 비만의 예방 및 개선용 식품 조성물		
등록번호	10-0716123	등록일자	2007.05.02.
공개번호	-	공개일자	-
출원번호	10-2005-0111088	출원일자	2005.11.21.
출원인	영남대학교 산학협력단	발명자	남두현, 김순동, 신경욱, 김종연, 임상규
기술 요지			
<p>마 (<i>Dioscorea batatas</i> DECNE.) 또는 이의 주피를 제거한 근경을 그대로 또는 쪼서 말린 산약의 분말에 유산균을 접종, 발효하여 수득한 유산 발효액 또는 이를 건조하여 수득 가능한 분말을 함유하는 변비 및 비만의 개선 및</p>			

예방을 위한 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 의한 마 또는 산약의 유산 발효액은 랫트에서 정상 효과, 체중 증가 억제 효과 및 변비 예방 효과가 탁월하여, 변비 및 비만의 개선 및 예방용 건강기능식품으로 이용할 수 있음

대상기술과 비교한 기술적 특징

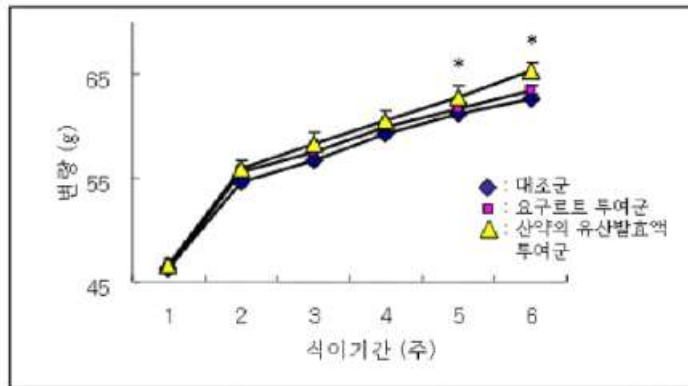
- 대상기술과 비교 시 대체기술은 마 또는 산약을 주성분으로 하여 유산발효액을 제조함
- 마 또는 산약의 유산발효에 이용되는 균주는 락토바실러스속 유산균, 스트렙토코커스속 유산균 및 비피도박테리움속 유산균으로부터 선택된 한 종류 이상의 유산균을 단독 또는 혼합하여 사용하며, 바람직하게는 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 비피도박테리움 비피더스(*Bifidobacterium bifidus*)의 혼합유산균을 포함함

대표 청구항

1 수세한 마 또는 이를 음건하여 분쇄한 산약을 물로 현탁하여 70 내지 120℃에서 30분 내지 5시간 동안 열수 처리하여 실온으로 냉각하는 제 1 단계; 상기 산약 물 추출액에 0.03 내지 0.075%의 락토바실러스속 유산균, 스트렙토코커스속 유산균, 비피도박테리움속 유산균 또는 이들의 혼합 유산균을 첨가하여, 30 내지 40℃에서 15시간 내지 24시간 발효하여 마 또는 산약의 유산발효액을 수득하는 제 2단계를 포함하는 공정으로 이루어진 마 또는 산약의 유산발효액의 제조방법.

8 수세한 마 또는 이를 음건하여 분쇄한 산약을 물로 현탁하여 70 내지 120℃에서 30분 내지 5시간 동안 열수 처리하여 실온으로 냉각하는 제 1 단계; 상기 산약 물 추출액에 0.03 내지 0.075%의 락토바실러스속 유산균, 스트렙토코커스속 유산균, 비피도박테리움속 유산균 또는 이들의 혼합 유산균을 첨가하여, 30 내지 40℃에서 15시간 내지 24시간 발효하여 마 또는 산약의 유산발효액을 수득하는 제 2단계; 상기 마 또는 산약의 유산발효액을 40 내지 70℃에서 열풍건조, 감압건조 또는 동결건조하여 마 또는 산약의 유산발효 분말을 수득하는 제 3단계의 공정으로 이루어진 마 또는 산약의 유산발효 분말의 제조방법.

대표 도면



[도면] 산약 유산발효액의 투여에 따른 랫트의 변량 변화를 대조군과 비교한 도

<표> 대체특허 2의 요지 및 특징

발명의 명칭	장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 산약 발효물의 제조방법		
등록번호	10-1377405	등록일자	2014.03.13.
공개번호	10-2013-0033709	공개일자	2013.04.04.
출원번호	10-2011-0097557	출원일자	2011.09.27.
출원인	중근당건강 주식회사	발명자	현미선, 신선, 허정무
기술 요지			
<p>장 기능 및 변비 개선에 효과적인 유산균을 이용한 산약 발효물의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세척을 거쳐 표면 물기가 제거된 산약을 건조한 이후 분쇄기로 투입하여 분쇄하는 산약 분말화 1단계; 3종류의 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대배양하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 침전물을 동일 비율로 혼합하는 유산균 배양 및 혼합 2단계; 상기 산약 분말화 1단계에 의한 산약 분말에 증류수를 첨가하고 가열 살균한 후 살균 완료된 산약 현탁액에 상기 유산균 배양 및 혼합 단계에 의한 유산균을 첨가하는 산약 현탁액에 유산균 첨가 3단계; 상기 산약 현탁액에 유산균 첨가 단계가 완료된 산약 현탁액을 발효시키는 산약 현탁액 발효 4단계; 상기 산약 현탁액 발효 단계가 완료된 발효액을 동결건조한 후 분쇄하여 분말로 하는 발효액 분말화 5단계;로 이루어지는 것으로서, 본 발명은 식용 가능한 유산균을 이용하여 산약(마)을 발효시킴으로써 산약 특유의 끈적한 성분인 뮤신에 의한 식감 저하 및 풍미를 개선하고, 기능성 물질의 함량을 증대시켜 장 기능 및 변비 개선에 효과를 나타내는 산약 발효물의 제조방법에 관한</p>			
대상기술과 비교한 기술적 특징			
<p>- 대상기술과 비교 시 대체기술은 산약(마) 분말에 3종의 유산균을 첨가시켜 발효를 함으로써 산약 발효물을 제조함</p>			

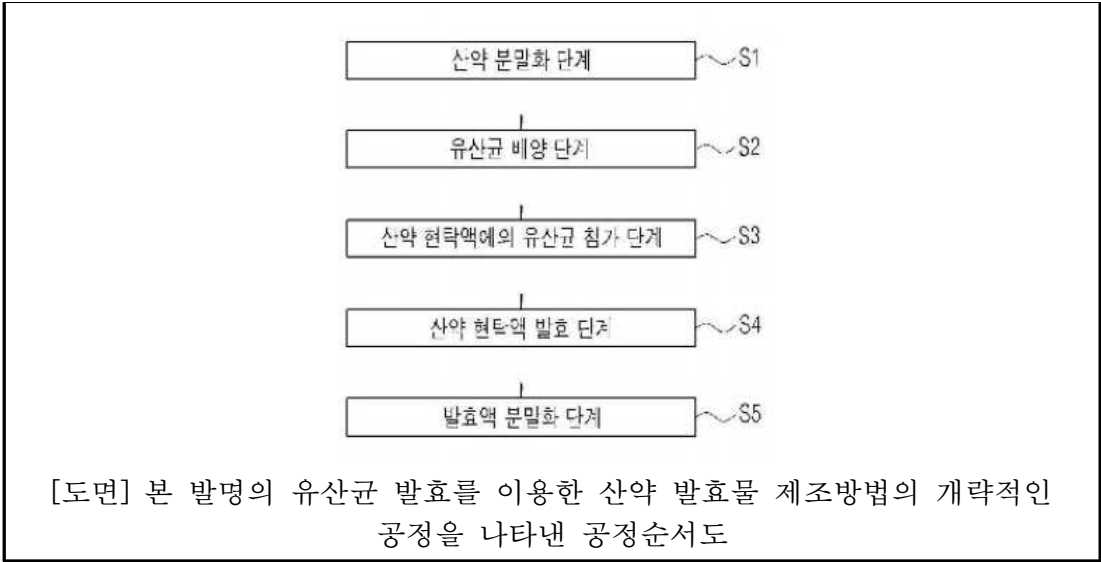
- 본 발명에 사용한 유산균은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)등 3종류의 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대배양하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 침전물을 동일 비율로 혼합

독립항

1

세척을 거쳐 표면 물기가 제거된 산약을 건조한 이후 분쇄기로 투입하여 분쇄하는 산약 분말화 단계(S1); 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)의 3종류 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대배양하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 유산균 침전물을 1:1:1 동일 비율로 혼합하는 유산균 배양 및 혼합 단계(S2); 상기 산약 분말화 단계(S1)에 의한 산약 분말에 증류수를 첨가하고 95-100℃에서 1-1.5시간 가열 살균한 후 살균 완료된 산약 현탁액에 상기 유산균 배양 및 혼합 단계(S2)에 유산균을 첨가하는 산약 현탁액에 유산균 첨가 단계(S3); 상기 산약 현탁액에 유산균 첨가 단계(S3)가 완료된 산약 현탁액을 37-45℃에서 24-96시간 동안 발효시키는 산약 현탁액 발효 단계(S4); 상기 산약 현탁액 발효 단계(S4)가 완료된 발효액을 동결건조 후 분쇄하여 분말로 제작하는 발효액 분말화 단계(S5);로 이루어지는 유산균을 이용한 산약 발효물의 제조방법에 있어서, 산약 발효물은, 상기 산약 현탁액에 유산균 첨가 단계(S3)의 증류수 첨가는 산약분말 1kg당 5-6l로 이루어지고, 가열 살균은 95-100℃에서 1-1.5시간 진행되며 유산균은 산약 현탁액 중량 대비 4-5% 첨가되며, 상기 산약 현탁액 발효 단계(S4)의 산약 현탁액발효는 유산균이 첨가된 산약 현탁액을 37℃에서 96시간 진탕 배양되며, 상기 진탕 배양 함으로 유산균의 활성화에 의한 산약 현탁액의 발효가 균일하게 이루어진 산약 현탁액 발효 단계(S4)가 완료된 발효액을 동결건조 후 분말 입자를 100-120mesh로 분쇄하여 제조한 것을 특징으로 하는 장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 산약 발효물의 제조방법.

대표 도면



<표> 대체특허 3의 요지 및 특징

발명의 명칭	쌀발효 추출물을 포함하는 장기능 또는 변비 개선용 조성물		
등록번호	10-1391441	등록일자	2014.04.25.
공개번호	10-2013-0039189	공개일자	2013.04.19.
출원번호	10-2011-0103692	출원일자	2011.10.11.
출원인	주식회사 글루칸	발명자	조형래, 문승배
기술 요지			
쌀발효 추출물을 포함하는 변비 또는 장기능 개선용 조성물에 관한 것으로 보다 구체적으로, 정상 동물모델 및 변비유발 실험모델에서 장기능 활성을 유도하고 장내의 점액 분비를 활성화하여 변비 개선에 우수한 효과를 보임으로써, 장기능 개선 및 변비의 개선에 효과적인 식품 조성물 및 약학 조성물에 관한			
대상기술과 비교한 기술적 특징			
- 대상기술과 비교 시 대체기술은 호화한 쌀에 누룩을 첨가하여 당화시킨 후 배양시켜 발효시킴 - 쌀의 당화과정에는 누룩곰팡이를 포함하는 조성물을 사용할 수 있으며, 통상적으로 백국균(<i>Aspergillus kawachii</i> , <i>Aspergillus shirousamii</i> 등), 황국균(<i>Aspergillus oryzae</i> 등), 흑국균(<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus usamii</i> 등) 및 리조푸스 속(<i>Rhizopus</i> sp.) 등의 누룩을 사용할 수 있음			
독립항			
1	1) 쌀을 물과 혼합하여 불리고 가열 호화시키는 단계, 2) 상기 호화한 쌀에 누룩을 0.05 내지 10 중량%로 첨가하여 20 내지		

	<p>40℃ 에서 10 내지 30시간 동안 당화시키는 단계, 3) 15 내지 40℃ 에서 1일 내지 10일 동안 배양시키는 단계, 및 4) 살균 및 농축 단계에 의하여 제조된 쌀발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 변비 또는 장기능 개선용 식품 조성물.</p>
6	<p>1) 쌀을 물과 혼합하여 불리고 가열 호화시키는 단계, 2) 상기 호화한 쌀에 누룩을 0.05 내지 10 중량%로 첨가하여 20 내지 40℃ 에서 10 내지 30시간 동안 당화시키는 단계, 3) 15 내지 40℃ 에서 1일 내지 10일 동안 배양시키는 단계, 및 4) 살균 및 농축 단계를 포함하는, 제1항의 변비 또는 장기능 개선용 식품 조성물을 제조하는 방법.</p>
7	<p>1) 쌀을 물과 혼합하여 불리고 가열 호화시키는 단계, 2) 상기 호화한 쌀에 누룩을 0.05 내지 10 중량%로 첨가하여 20 내지 40℃ 에서 10 내지 30시간 동안 당화시키는 단계, 3) 15 내지 40℃ 에서 1일 내지 10일 동안 배양시키는 단계, 및 4) 살균 및 농축 단계에 의하여 제조된 쌀발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 변비의 예방 또는 치료용 약학 조성물.</p>

대표 도면

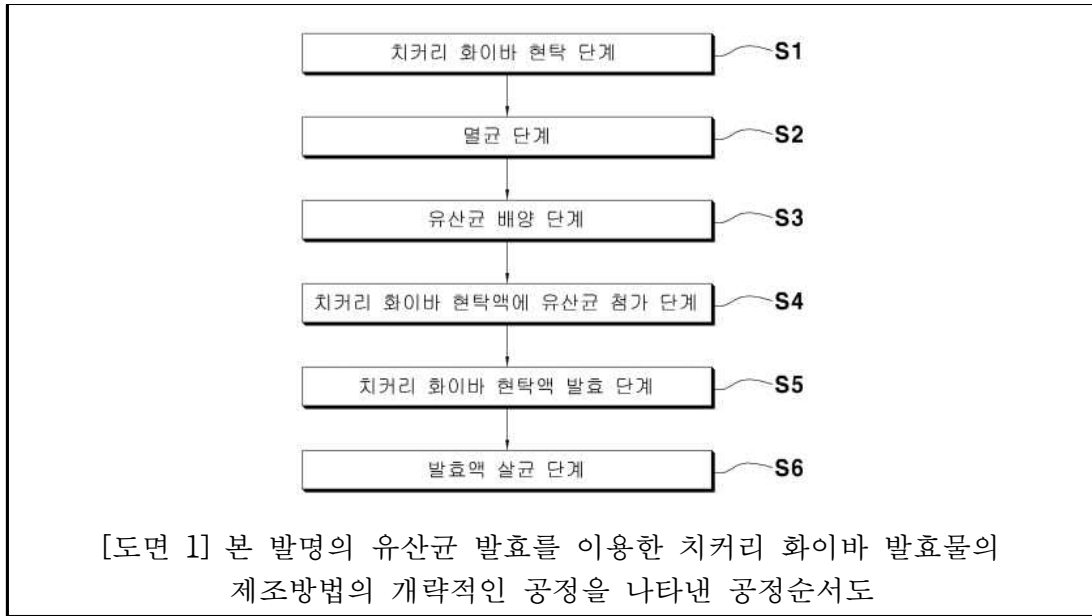
[도면 4]
로페라미드 유발 변비 랫트 모델에서 분변을 포함하는 결장의 조직학적 프로파일을 알시안 블루(alcianblue) 염색으로 나타낸 것

(A) 및 (B) : 매체 대조군
(C) 및 (D) : 로페라미드 대조군
(E) 및 (F) : 약물 대조군
(G) 및 (H) : FRe100군
(I) 및 (J) : FRe200군
(K) 및 (L) : FRe300군

<표> 대체특허 4의 요지 및 특징

발명의 명칭	장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 치커리 화이버 발효물의 제조방법		
등록번호	10-1421677	등록일자	2014.07.15.
공개번호	10-2014-0039525	공개일자	2014.04.02.
출원번호	10-2012-0105772	출원일자	2012.09.24.
출원인	중근당건강 주식회사	발명자	박성선, 허정무, 신선

기술 요지	
<p>장 기능 및 변비 개선에 효과적인 유산균을 이용한 치커리 화이버 발효물의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 식용이 가능한 유산균을 이용하여 치커리 화이버를 발효시킴으로써 장내 비피더스 유산균의 증식을 촉진시킬 뿐만 아니라 풍미를 향상시키고, 발효에 의해 치커리 화이버(이눌린)가 프락토올리고당으로 전환되는 것을 기대함으로써 장 기능 및 변비 개선에 효과를 나타내는 치커리 화이버 발효물의 제조방법에 관함</p>	
대상기술과 비교한 기술적 특징	
<ul style="list-style-type: none"> - 대상기술과 비교 시 대체기술은 치커리 화이버 분말 현탁액에 1종 이상의 유산균을 첨가시켜 발효를 함으로써 치커리 화이버 발효물을 제조하는 것임 - 락토바실러스 퍼멘텀(<i>Lactobacillus fermentum</i>), 락토바실러스 플란타럼(<i>Lactobacillus plantarum</i>), 비피도박테리움 터모필리움(<i>Bifidobacterium thermophilum</i>) 중에서 1종류 이상의 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대배양하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 침전물을 동일비율로 혼합한 유산균을 사용 	
독립항	
1	<p>1. 치커리 화이버 분말에 증류수를 5-6배 가수하여 현탁하는 단계(S1); 상기 치커리 화이버 현탁액을 121℃에서 20분 동안 멸균하여 30-40℃로 식히는 단계(S2); 락토바실러스 퍼멘텀(<i>Lactobacillus fermentum</i>), 락토바실러스 플란타럼(<i>Lactobacillus plantarum</i>), 비피도박테리움 터모필리움(<i>Bifidobacterium thermophilum</i>)의 유산균을 각각 엠알에스(MRS)배지에서 계대 배양하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 1종류 이상의 유산균 침전물을 동일 비율로 혼합하는 유산균 배양 및 혼합 단계(S3); 상기 유산균 배양 및 혼합한 유산균을 치커리 화이버 현탁액에 유산균을 첨가하되 유산균은 치커리 화이버 현탁액 중량 대비 4-5% 첨가하는 단계(S4); 상기 치커리 화이버 현탁액에 유산균 첨가 단계(S4)가 완료된 치커리 화이버 현탁액을 37-45℃에서 24-48시간 동안 발효시키는 치커리 화이버 현탁액 발효 단계(S5); 상기 치커리 화이버 현탁액 발효 단계(S5)가 완료된 발효액을 95-100℃에서 5-10분 동안 살균처리 하는 단계(S6);로 이루어지는 것을 특징으로 하는 장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 치커리 화이버 발효물의 제조방법</p>
대표 도면	



<표> 대체특허 5의 요지 및 특징

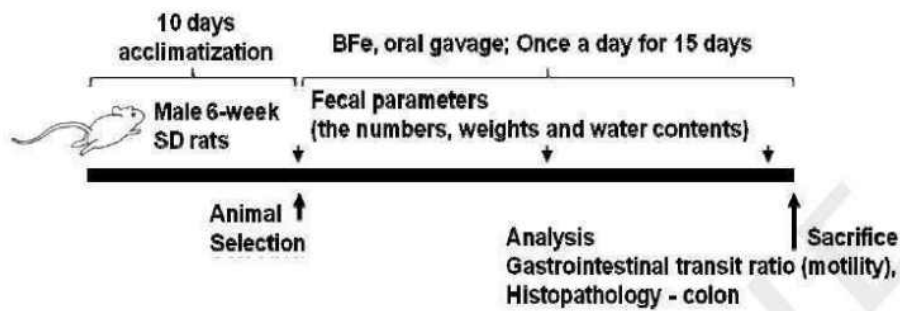
발명의 명칭	보리 발효물을 유효성분으로 포함하는 변비 개선, 치료 또는 예방용 조성물		
등록번호	10-1744478	등록일자	2017.06.01.
공개번호	10-2017-0025089	공개일자	2017.03.08.
출원번호	10-2015-0121018	출원일자	2015.08.27.
출원인	주식회사 글루칸	발명자	조형래, 문승배
기술 요지			
<p>보리 발효물을 유효성분으로 포함하는 변비 개선, 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 보리 당화액을 효모 발효; 또는 효모 발효 후 유산균 발효;하여 얻은 보리 발효물을 유효성분으로 포함함으로써 우수한 장 연동운동 촉진효과를 나타내는 변비 개선 또는 예방용 건강기능식품, 변비 치료 또는 예방용 약학 조성 및 장 연동운동 촉진효과를 나타내는 보리 발효물의 제조방법에 관한</p>			
대상기술과 비교한 기술적 특징			
<ul style="list-style-type: none"> - 대상기술과 비교 시 대체기술은 보리 발효물은 상기 보리 당화액을 효모 발효시킨 보리 효모 발효물이거나, 또는 상기 보리 당화액을 효모 발효시킨 후 유산균 발효시켜 얻은 보리 발효물임 - 보리 당화액을 효모 발효시키는 단계는, 상기 보리 당화액에 효모인 사카로마이세스속(<i>Saccharomyces</i> sp.), 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지에(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)를 접종하여 발효시키는 것일 수 있음 - 효모 발효 후 얻은 발효물을 유산균 발효시키는 단계는, 상기 발효물에 유 			

산균을 접종하여 발효시키는것일 수 있으며, 상기 유산균은 와이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*), 락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 브레비스(*Bifidobacterium brevis*), 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) 및 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*) 중에서 선택되는 1종임

독립항

1	보리 발효물을 유효성분으로 하고, 상기 보리 발효물의 1,3-1,4 베타글루칸 및 1,3-1,6 베타글루칸의 중량비는 5:1 ~ 5.7:1이며, 상기 보리 발효물의 다당류 함량은 11~14 중량%인 것을 특징으로 하는 변비 개선 또는 예방용 건강기능식품.
6	보리 발효물을 유효성분으로 하고, 상기 보리 발효물의 1,3-1,4 베타글루칸 및 1,3-1,6 베타글루칸의 중량비는 5:1 ~ 5.7:1이며, 상기 보리 발효물의 다당류 함량은 11~14 중량%인 것을 특징으로 하는 변비 치료 또는 예방용 약학 조성물.
11	보리 당화액에 효모균을 접종하여 발효시키는 효모 발효 단계; 및 상기 효모 발효 단계에서 얻은 발효물에 유산균을 접종하여 발효시키는 유산균 발효 단계;를 포함하는 보리 발효물의 제조방법으로서, 상기 보리 발효물의 1,3-1,4 베타글루칸 및 1,3-1,6 베타글루칸의 중량비는 5:1 ~ 5.7:1이며, 상기 보리 발효물의 다당류 함량은 11~14 중량%인 것을 특징으로 하는 변비 개선 활성을 갖는 보리 발효물의 제조방법.

대표 도면



[도면 1] 실험예3의 실험 대상 랫트에 각 실험군에서 규정된 실험물질을 투여한 후 각 실험군의 장 연동운동 촉진효과를 관찰하는 일련의 과정을 나타낸 모식도

2-2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황¹²⁾

(1) 미국

- 미국식품과학회(IFIT)에 따르면 미국 기능성식품 시장의 키워드는 아동, 파이토케미컬즈(phytochemicals), 50대 이상의 실버 세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐 제거, 자연친화 등이라고 보고하였음



[그림] 미국 기능성식품 시장의 키워드

- 가장 인기를 끌고 있는 품목은 프로바이오틱스, 비타민, 오메가 3제품을 들 수 있음
 - 프로바이오틱스는 미국식이보충제 시장의 23%를 차지하고 있을 정도로 비중이 큼. 특히 유럽에서 성공한 프로바이오틱스 제품이 미국에서도 유행하는 공식이 통하고 있음
 - 비타민은 종합비타민이 46억불, 단일제 형태의 비타민이 40억불 정도의 규모를 형성하고 있음. 단일 비타민 중에서는 비타민 B가 가장 각광받고 있으며 비타민C, 비타민 D가 뒤를 잇고 있음
 - 오메가-3제품 역시 해마다 가파른 성장세를 보이고 있음

(2) 일본

- 일본기능성식품 시장의 키워드는 피부미용, 실버세대, 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 멘탈케어, 면역 등으로 정리할 수 있음
 - 일본의 건강기능식품 시장은 미용과 관절이 강력한 키워드로 자리매김하면서 콜라겐, 히알루론산, 글루코사민 등의 인기가 특히 높음



[그림] 일본 기능성식품 시장의 키워드

- 일본 건강산업신문이 기능성식품 주문자 생산방식(OEM)기업을 대상으로 '11년 상반기 인기소재와 하반기 예상 인기소재를 조사한 결과, 콜라겐과 글루코사민이 6년 연속 상반기 인기소재 투톱 체제를 고수한 것으로 나타났음

(3) 중국

- 중국 기능식품 시장의 키워드는 급성장, 기능성 음료, 노인인구 증가, 질병케어 등이었음



[그림] 중국 기능성식품 시장의 키워드

- 기능성식품의 판매는 각종 비타민과 미네랄 성분 등 기본적인 영양성분을 포함한 제품들이 시장에 출시되면서 본격적으로 시작되었음
 - 소비자들은 비타민과 같은 미량원소 보충과 신체기능 활성화, 질병예방 등을 기대하며 보건식품을 구입하는 것으로 밝혀지고 있음
- 최근 기능성 식품의 종류는 더욱 다양해져 오메가-3지방산, 식물 추출물, 콩·단백질, 레시틴, 아미노산 등의 제품들이 소비자 시장에 등장했음

(4) 서유럽

- 유럽 역시 웰빙 트렌드의 꾸준한 확산에 따라 식료품 시장에 있어서도 기능성 식품소재 및 건강식품시장이 소비트렌드를 주도할 것으로 여겨짐. 서유럽 지역 기능식품 시장의 키워드는 비만, 인터넷, 대체요법, 고품격 등으로 정리할 수 있음



[그림] 유럽 기능성식품 시장의 키워드

- 영국은 비만인구가 증가하고 있는 가운데 영국인의 3분의 1수준이 과체중인 것으로 조사됐으며, 20%정도가 위험한 비만 수준임. 이로 인해 기능성식품 시장은 확대될 가능성이 높음
- 독일은 비타민과 무기질, 강장제 이외에 대체요법, 허브요법 제품들이 각광받고 있음. 최대한 몸에 무리를 주지 않고 질병에 걸리지 않는 몸상태를 유지하려는 것으로 기능성 식품시장의 가파른 성장을 예상하게 함

2) 세계 시장현황

(1) 세계 시장 규모 및 전망

(가) 세계 시장 규모

- 세계 건강기능식품 시장 규모는 1,179억달러(약 131조원, 2015년 기준) 규모로 추산되며 연평균 7.3% 성장하여 1,677억달러(약 187조원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨



[그림] 세계 건강기능식품 시장 규모 및 성장률(2009년-2020년)

※ 출처: NBJ's global supplement&nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014.¹³⁾

- 세계 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 곳은 미국으로 약 404억달러(약 45조원, 점유율 34.3%) 규모이며, 중국 약 163억달러(약 18조원, 점유율 13.8%), 일본 약 109억달러(약 12조원, 점유율 9.2%) 순임(2015년 단일 국가 기준)
- 한국은 21억달러 규모의 시장을 형성하고 있으며 세계 시장에서의 점유율은 1.78%를 차지하고 있음(2015년 기준)

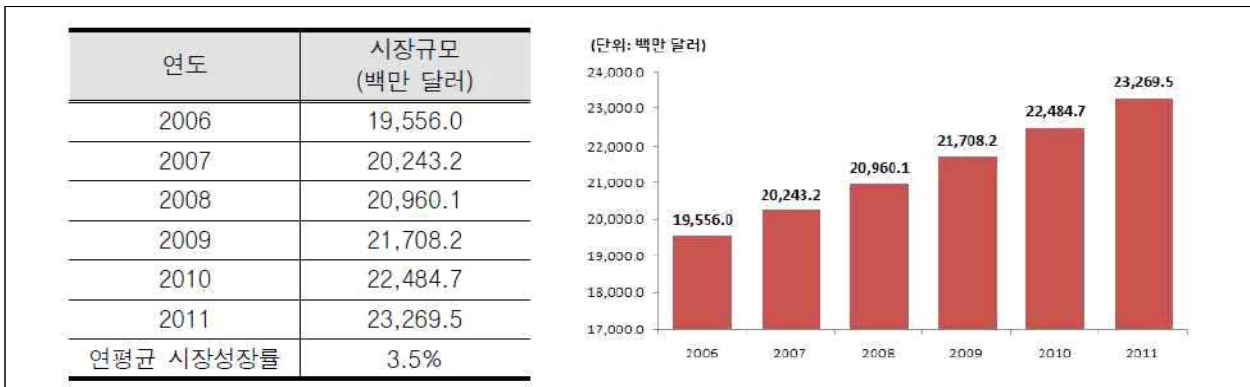
<표> 국가별 건강기능식품 시장 규모 및 전망

(단위: 억달러 또는 %)

구분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015년 기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
그 외	127	188	8.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

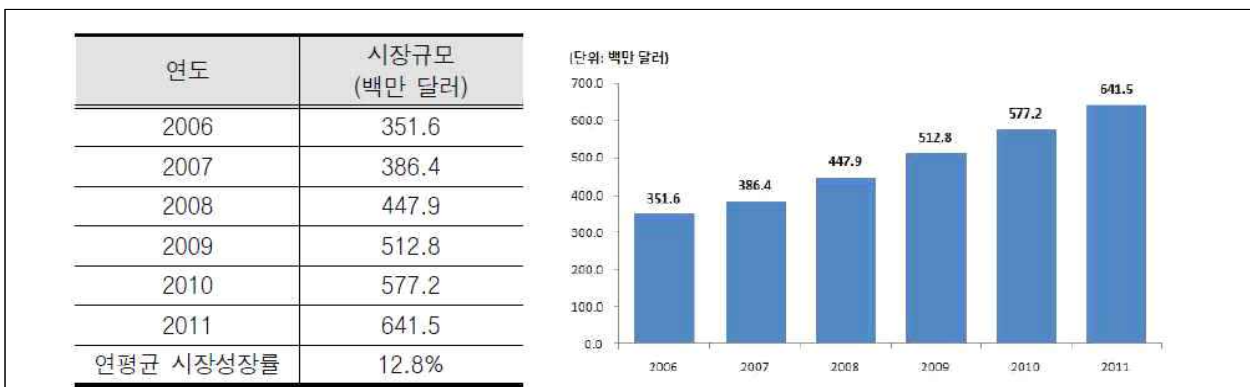
※ 출처: NBJ's global supplement&nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014.¹³⁾

- 장기능 개선 건강기능식품 세계시장의 경우 2000년 152억달러에서 2010년 730억달러로 급격한 성장세를 유지하고 있으며 점차 각광받는 시장이 되고 있음을 알 수 있음



출처 : Icon group international, Inc., 2010¹⁾

<그림> 세계 프로바이오틱스 시장 현황



출처 : Icon group international, Inc., 2010¹⁾

<그림> 세계 프리바이오틱스 시장 현황

- 장건강의 대명사인 프로바이오틱스는 연평균 3.5%대의 시장성장률을 보이고 있으며, 장내의 유용균을 증식시키는 인자로 작용하는 올리고당과 식이섬유 같은 프리바이오틱스의 경우 연평균 12.8%대의 시장성장률을 보이고 있음

(2) 주요 국가별 동향

(가) 미국 시장

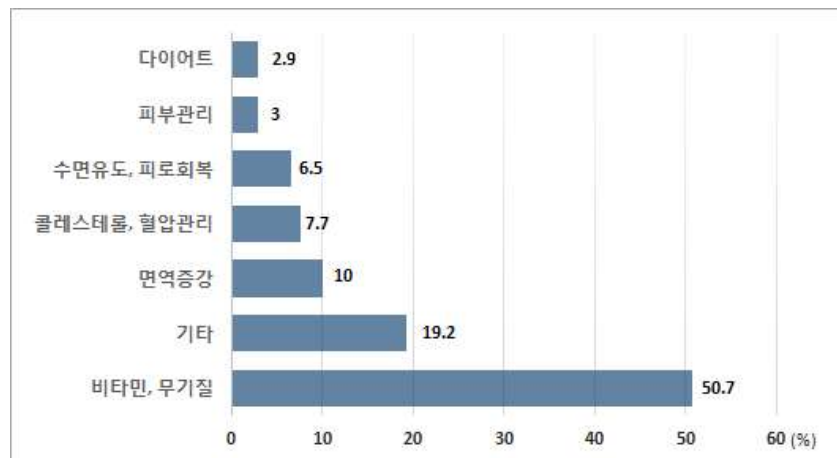
- **(시장 규모)** 미국 건강기능식품 시장은 약 404억달러(약 45조원, 2015년) 규모로 연평균 7.1% 성장하여 약 568억달러(약 63조원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨
 - 전체 건강기능식품 시장의 67.3%를 차지하고 있는 비타민 및 식품보충제는 272억달러(약 30조원, 2015년)의 규모를 형성함
- **(비타민 시장)** 비타민 시장은 104.9억달러(약 11조 7,907억달러)의 규모를 형성하고 있으며 멀티 비타민이 49.3%로 가장 큰 점유율을 차지하고 있음
 - 비타민 B 및 D가 비타민 분야에서 가장 높은 성장률(전년 대비 각각 7.7%, 6.8%)을 나타내며 20.7억달러(약 2조 2,022억원)와 8.8억달러(약 9,787억원) 규모를 형성함
- **(식품보충제 분야)** 식품 보충제 시장은 천연물/전통 식품 보충제가 가장 큰 시장을 형성하고 있으며 34.7억달러(약 3조 9,002억달러) 규모를 형성함
 - 소화기능이 저하되어 영양분 섭취에 어려움을 겪는 미국인들의 소화 기능 촉진을 위한 보조제로서 프로바이오틱스 제품은 17.2억달러 규모를 형성하였으며 식품보충제 분야에서 가장 높은 성장률을 기록함(연평균 14.2%).
- **(수출입 현황)** 소비자의 대부분이 자국 제품을 이용하고 있으나 인삼 및 홍삼 제품은 중국과 한국 등에서 수입하고 있음

(나) 중국 시장

- **(시장 규모)** 중국 건강기능식품 시장은 약 163억달러(약 18조원, 2015년)규모로 연평균 13.8% 성장하여 약 267억달러(약 30조원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨
 - 건강관리에 대한 인식 확산 및 인구 규모 등을 고려할 때 중국 시장은 더욱 성장할 것으로 예측됨
- 건강관리에 대한 관심 증가 이외에도 중국 시장의 성장 요인으로는 다음의 3가지가 있음
 - 2009년에 실시한 의료제도 개혁에서 국민 건강의 중점을 치료가 아닌 예방에 두고 있음
 - 사스, 조류인플루엔자 등의 전염병 발생으로 국민들이 면역력 강화를 목적으로 다수의 건강기능식품을 이용하게 됨
 - 건강기능식품은 중국 정부의 가격 간섭을 받지 않아 최근 가격상승 경향이 계속

되고 있음

- 중국의 건강기능식품 소비 계층으로는 중·노년층이 약 50%, 여성층이 약 35%를 차지하고 있으며 나머지 부분은 아동·청소년층으로 점차 소비자 평균 연령이 낮아지는 추세임
 - 건강기능식품시장에서 비타민 및 무기질이 점유율 50.7%로 1위를 차지함(2015년 3/4분기)
 - 영양소 보충제 중 최근 인기 품목은 칼슘제로 2014년 판매액은 약 24억달러(약 2조 7,000억원)로 2010년 대비 약 2배 성장함
 - * 1가구 2자녀 정책에 의해 어린이와 산모의 필수 영양소인 칼슘의 소비 증가에 영향을 받은 것으로 분석됨
- 보건식품 소비 품목은 주로 면역 조절, 항피로, 항노화, 혈중 지방 조절 등의 기능으로 집중되어 있으며 천연 보건식품의 끊임없는 요구로 천연 영양 보건식품 수요가 증가할 것으로 예측됨



[그림] 중국시장 건강기능식품 판매 점유율(2015년 3/4분기)

※ 출처: 1. CFDA 남방 의약경제연구소 데이터센터, 2. KOTRA 해외비즈니스포털 홈페이지¹⁴⁾

- **(수출입 동향 및 전망)** 2011년 중국 국가발전개발위원회에서 영양과 보건식품 제조업 육성방안 제시 이후 수입 제품 시장이 빠르게 성장함
 - **(수출 현황)** 수출액은 2.7억달러(약 3,000억원, 2014년)로 전년 대비 8.9% 증가하였으며 주 수출 품목은 어유, 레시틴, 로열젤리 등 건강기능식품 원료로 98개 국가와 지역으로 수출되고 있음
 - **(수입 현황)** 수입액은 11.8억달러(약 1조 3,000억원, 2014년)로 전년 대비 8.3% 증가함. 비타민류가 전체 수입 품목 중 26.1%로 1위를 차지하였으며 식물 추출물(23.6%), 아미노산류(20.8%), 연골소(4.11%) 순임
 - 2016년 7월 1일부터 중국 국가식품약품감독관리총국(CFDA)의 새로운 '보건식품 등기 및 접수등록 관리 방법'이 적용되어 수입 제품에 대한 인증 기간이 대폭 줄

어늘고 서류도 간소화될 것으로 전망됨

- 다만 10월 1일부터 강화된 식품안전법이 시행됨에 따라 건강기능식품의 생산 및 제조와 유통에 있어서 철저한 관리가 요구됨

(다) 일본 시장

- **(시장 규모)** 일본 건강기능식품 시장은 약 109억달러(약 12조원, 2015년) 규모로 연평균 2.3% 성장하여 약 122억달러(약 14조원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨
 - 급속히 고령화되는 사회, 라이프 스타일의 변화로 야기된 질병, 건강관리에 대한 관심 등이 꾸준하기 때문에 완만한 성장은 계속될 것으로 전망됨
 - 시력 보호 및 수면 보조 관련 제품이 2015년 주목을 받았음
 - **(시력보호 제품)** 중년 이후 원시 증상을 완화해 주는 눈 영양제를 기능성 표시 식품으로 출시되면서 시력보호 기능 시장은 전년 대비 7.6% 성장함
 - **(수면 보조 제품)** 일본 후생노동성의 설문조사에 따르면 성인의 70% 이상이 수면의 질에 문제가 있다고 답변하여 수면 보조 기능성 식품시장이 주목받고 있음
- **(수출입 동향)** 대부분의 완제품 형태의 건강기능식품은 「식품위생법」이나 「건강증진법」 하의 엄격한 규제를 피하기 위해 일본 국내에서 제조되고 있음
 - 제품에 함유된 첨가제, 보존제, 식용 색소 및 향료 등의 주요 성분에 대한 자세한 기술사항 및 증명서가 없이는 통관이 되지 않는 등 규제가 엄격함
 - 비타민 제품의 경우에는 완제품 또는 원재료 형태로 수입되고 있음. 완제품은 미국에서의 수입량이 제일 많고 원재료의 경우 중국에서의 수입이 가장 많은 것으로 나타남
- **(특정보건용 식품 시장)** 일본의 특정보건용식품 시장은 2014년에 3,693억엔(약 37억 달러)으로 추정되며, 전년대비 4.4%의 성장률을 나타내었음
 - 효과 효능별 시장규모를 살펴보면, ‘정장’ 효과가 제품이 1648억엔(44.6%)으로 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, ‘체지방 중성지방 감소’ (31.1%), ‘치아잇몸 건강’ (8.2%)의 순서로 나타남
 - 성장률을 살펴보면, ‘체지방 중성지방 감소’ 제품이 최근 몇 년간 급격하게 성장하고 있으며, 혈당조절 제품도 점차 증가하고 있음

〈표〉 일본 특정 보건용 식품 현황

(단위: 억엔)

Category	2009	2010	2011	2012	2013	2014
정장작용	1,760	1,727	1,703	1,775	1,766	1,648
체지방·중성지방감소	660	560	531	749	912	1,148
치아잇몸건강	387	348	310	295	297	302
혈당조절	178	164	144	131	162	212
콜레스테롤 감소	204	155	148	144	144	143
혈압조절	135	140	148	158	157	141
미네랄·뼈건강	164	125	100	98	99	99
Total	3,488	3,219	3,084	3,349	3,537	3,693

※ 출처: 일본 기능성표시 식품제도 및 시장 조사, 한국농수산식품유통공사, 2015¹⁵⁾

- 특정보건용식품은 식품 안전성에 대한 소비자의 인식 향상으로 정부의 심사기준이 높아지고 있어, 취득 비용과 기간이 대폭 증가함에 따라 대기업 중심으로 취득이 이루어지고 있음
- 또한, 제조업체가 청량음료 등을 중심으로 TV광고를 확대함에 따라 해당 상품 매출이 확대되면서 시장전체를 견인하는 추세에 있음
 - 정제 캡슐 형태의 제품보다는, 청량음료 및 조미료, 껌 등의 일반식품 형태 중심임

(3) 국가별 소비자 트렌드

(가) 미국

- 미국의 기능성식품 시장 트렌드는 건강기능식품 품목의 다양화, 라이프스타일을 향상시킬 수 있는 기능성식품의 소비, 스포츠 시장과의 연계 및 어린이 건강시장규모 확대, 성별, 연령 및 인종에 따른 기능성 식품의 차별화, 체중조절 제품, 포만감 지속/식욕저하 제품의 성장, 자연식품의 선호 등으로 정리할 수 있음
- 약 4%에 해당하는 미국 인구가 식이보충용제품을 왕성하게 섭취하는 것으로 나타났으며 전체 인구 중 32%는 자주섭취, 23%는 경우에 따라 섭취, 19%는 가끔 섭취, 그리고 26%는 섭취하지 않는 것으로 조사되었음

(나) 일본

- 초고령화 사회의 도래로 인해 건강에 대한 관심이 매우 높으며 이로 인해 일본의 건강기능식품에 대한 소비자 1인당 지출 비용은 전 세계에서 가장 높고 건강유지와 질병의 예방 차원에서 건강기능식품을 소비하고 있음

- 식품과 먹거리를 통한 영양 보충, 기능성 니즈 충족에 대한 관심이 높은 편이나 최근 식품안전에 대한 의의의식 강화와 경기침체로 인해 건강기능식품 시장이 일부 감소하였음
- 최근 건강한 라이프스타일 및 wellness관련 제품에 대한 관심이 급증하면서 체중조절, 신진대사, 스트레스 관리 및 미용제품 등의 기능성식품 시장의 성장이 예상되고 있음

(다) 중국

- 소득수준의 증가, 건강에 대한 관심 고조, 노령인구 증가에 따라 중국에서 보건의품의 성장이 점차 예상되고 있으며, 특히 여성, 어린이, 중년, 고령 인구를 중심으로 보건의품 소비가 이루어지고 있음
- 보건의품 전문연구조사('09)에 따르면, 건강식품을 사용하는 주 연령층에 대한 질문에 응답자의 63.5%가 노년층임
 - 보건의품을 소비하는 소비자들은 자국내에서 생산된 제품보다 외국에서 수입된 제품을 선호하는 것으로 나타났음

(라) 베트남

- 소비자의 소비패턴에서 주목되는 부분은 계속되는 경제성장으로 인해 국민들의 생활수준이 향상되고 있고, 이에 따라 소비자들은 건강에 관심이 높아지고 있으며 관련품목의 매출이 증가하였음
- 건강관련 제품에 대한 소비는 '09년 이후 급증했으며 소비자들의 건강에 대한 기준도 크게 향상 되고 있음
- 다만, 중산층의 소비자들은 품질에 대한 신뢰가 높은 수입제품을 선호하는 반면, 저소득 계층의 소비자들은 베트남 현지업체의 비교적 저렴한 건강기능식품을 선호하는 편이었음
- 국내 건강기능식품은 관련 기능에 대한 식품의약품안전처장의 인정을 획득해야만 원료 및 제품으로 사용이 가능한 특징이 있음
- 따라서 국외에서는 제품이 아닌 원료로만 국내에 판매되고 있는 실정임
- '배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음' 기능성 관련 고시형 원료들 중, 프로바이오틱스, 난소화성말토덱스트린, 알로에전잎, 차전자피, 치커리 등이 국외에서 수입되고 있음

3) 경쟁기관현황

(1) 미국 경쟁기관

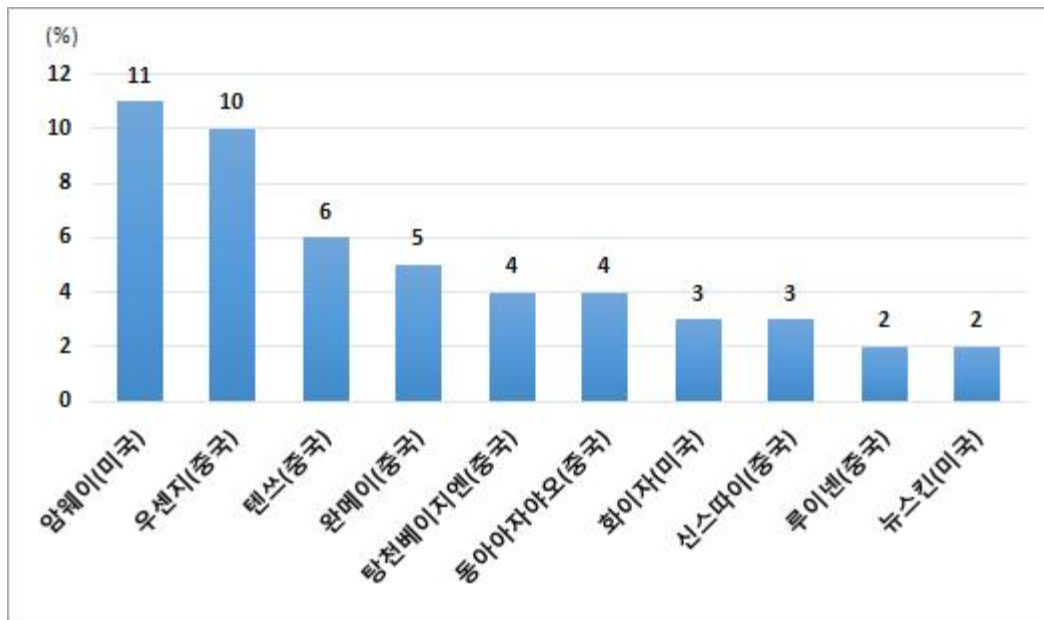
- (기업 동향) 대형 기업들이 시장을 선점하고 있으며 중소형 후발업체들이 틈새시장

을 공략하고 있음

- NBTY는 대규모의 유통망 확보를 통하여 주요 브랜드인 Nature's Bounty와 Sundown를 소매점에서 판매하고 있으며 다른 자사 브랜드들도 인터넷과 건강식품 전문점 운영을 통해 판매 중임
- General Nutrition Center(GNC)는 비타민과 식이보조제품, 운동 보조제, 체중 감량제를 주로 제조하며 미국 전역에서 5,300여개의 전문 상점을 운영하고 있음
- CVS Health는 미국 전역에 1,660개 이상의 매장을 가지고 있는 약국·클리닉 사업부 인수(2015년 6월)를 통해 오프라인 매장을 확대함
- 소규모 업체들은 다른 시장의 대형업체와 파트너십을 통해 시장 경쟁력을 기르고 있음
- Private Label 업체인 Perrigo Company는 Ferrara Candy Company와 공급 계약(2015년 1월)을 통해 다양한 비타민 제품 출시를 준비 중임
- **(한국 제품의 판매 동향)** 미국 내에서 한국 건강기능식품에 대한 인지도는 낮은 실정이나 아시아 지역 인삼 중 고려 인삼의 효능은 우수하다고 인정받고 있음
 - (주)KT&G, 대상(주), NH한삼인 등이 독립점포를 통해 영업하고 있으며 주로 한인 교포를 대상으로 판매하고 있음

(2) 중국 경쟁기관

- **(기업 동향)** 시장 점유율은 1~10위 기업이 전체 시장의 50%를 차지하고 있음
 - 점유율 10위 내 기업 중 외국 기업은 3개(암웨이, 화이자, 뉴스킨)로 초기 중국시장에 진출하여 직접 판매하는 형식으로 영업 활동을 진행하고 있음. 최근에는 미국, 호주, 영국의 건강기능식품 업체들이 중국 본토기업과 합작하는 방식으로 시장 진입 중임
 - 암웨이는 뉴트리라이트 시리즈의 판매로 11%의 점유율(판매율 1위)을 차지하고 있음
 - 우셴지(无限极)는 아동 건강 보건식품의 수요 증가와 함께 매출액이 매년 증가하고 있음
 - 탕천베이지엔(汤臣倍健)은 연간 매출의 3% 이상을 신제품과 특허 개발에 투자하고 있으며 By-Health(면역력 증진 기능) 제품이 대표적임
 - 화이자는 칼슘제 브랜드인 칼트레이트와 센트럼 시리즈의 판매량이 높으며 이들 제품의 확대 생산을 위하여 쑤저우 공장 건설에 착수함(2016년)



[그림] 중국 건강기능식품 기업 동향(2015년)

※ 출처: 중국 건강보조식품산업 현황 분석, 한국무역협회, 2016¹⁶⁾

- **(한국 제품의 판매 동향)** 중국의 한국 건강기능식품 수입 금액은 0.1억달러(112억원, 2011년)에서 0.4억달러(483억원, 2015년)로 연평균 44.3% 증가하고 있는 추세임
 - (주)KT&G, 일양약품(주), 일동제약(주), (주)폴무원, (주)개성인삼협동조합 등에서 제조한 건강기능식품이 수출 등록되어 있음(2016년 3월 말 기준)

(3) 일본 경쟁기관

- **(기업 동향)** 제품 판매가 방문판매에 한정되어 있었으나 규제 완화로 인하여 드럭 스토어, 통신판매 등 판매 방식이 다양해지고 있음
 - 소비자들의 가격 대비 가치를 따지는 성향이 강해지면서 유통업체의 자체 브랜드 제품의 성장세가 나타남
 - 일본 내 가장 많은 점포를 보유하고 있는 드럭 스토어인 마츠모토키요시가 자체 브랜드의 비타민 제품 및 식이보조 제품군을 출시하여 유통하고 있음
 - 드럭 스토어 연합인 HapYcom는 자체 브랜드의 비타민 및 식이보조제품을 출시하여 유통하고 있음
- **(한국 제품의 판매 동향)** 한국산 인삼 및 홍삼제품은 고급품으로서의 인식이 강하며 50대 이후의 중장년층이 주요 구매대상임
 - 그러나 제품 수준이 전통적 이미지에만 머물러 있고 신제품 개발이 미흡하여 아직은 선물용과 건강에 도움이 되는 정도로 인식되고 있음
 - 인삼제품의 유통은 대부분 한국산이 주를 이루지만 원료를 한국이나 중국에서 수

입하여 건강기능식품 제조회사가 자체적으로 제품을 생산하는 경향이 증가하고 있음

<표> 건강기능식품 주요 국가별 동향

구분	미국	중국	일본
시장 규모	· 404억달러(45조원) · 연평균 성장률 : 7.1%	· 163억달러(18조원) · 연평균 성장률 : 13.8%	· 109억달러(12조원) · 연평균 성장률 : 2.3%
주요 소비 분야	· 멀티 비타민 · 천연물/전통식품보충제	· 비타민 및 무기질	· 비타민 및 무기질
성장 분야	· 비타민 B, D · 프로바이오틱스	· 칼슘제	· 시력 보호 · 수면 보조
기업 동향	· 대형 기업이 시장 선점 · 대규모 유통망을 통해 판매	· 점유율 10위 기업 중 · 외국 기업 3개 포함 · 직소판매형식	· 드럭 스토어, 통신 판매 등 다양한 판매 · 자체 브랜드 제품의 성장

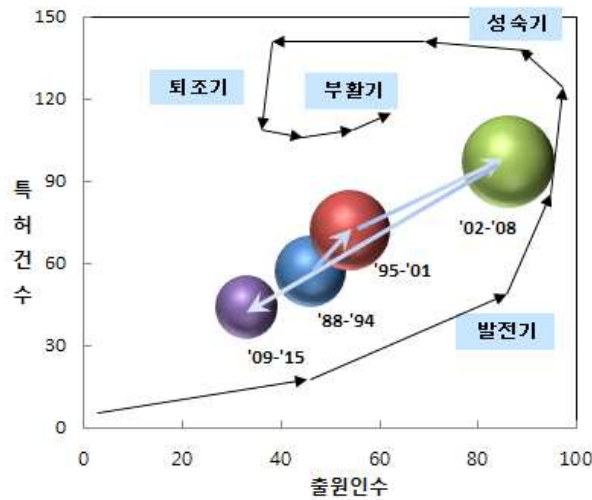
4) 국외 지식재산권현황

- “배변 치료 및 개선”의 연구개발과 관련한 해외 주요국가인 미국, 일본, 유럽에서 현재까지 출원된 특허출원 건수는 총 298건으로 나타남
- 전체 연도별 특허건수의 추이는 1979년 최초 출원이 시작된 이후 현재까지 활발하지는 않으나 지속적으로 출원이 이루어지는 추세임
- 특히 1990년대 후반부터 2000년대 중반까지 일본을 중심으로 현저히 증가하였으며 2005년 최고조를 이룬 후 최근까지 꾸준하고 지속적인 출원을 보이고 있음
- 국가별로는 일본이 226건(76%)으로 전체 출원의 과반수 이상을 차지하고 있어 관련 기술을 주도하는 것으로 파악되며, 다음으로 미국 41건(14%), 유럽 31건(10%)의 순으로 나타남



[그림] 배변 치료 및 개선 해외특허 동향

- 해외특허를 중심으로 특허건수와 출원인수 변화의 상관관계를 통해 기술의 위치를 살펴보는 포트폴리오 기본 모델에서, “배변 치료 및 개선” 기술은 발전기 단계를 거쳐 퇴조기 진입 단계에 있는 것으로 나타남
- “배변 치료 및 개선” 기술 분야의 전체 특허동향은 초기진입단계를 거친 후 2000년대 후반까지 기술혁신의 주체인 출원인수와 기술혁신의 결과인 특허건수가 동시에 증가하다가 2009년 이후 현재까지는 출원인 수와 특허출원건수가 모두 감소함에 따라 기업과 연구개발 활동이 모두 감소하고 있음을 알 수 있음



[그림] 포트폴리오로 본 배변 치료 및 개선 전체 기술의 위치

- “배변 치료 및 개선” 분야의 출원은 개인발명가 또는 개별기업 및 기관별로 1-2건의 출원이 대다수를 차지하고 있음. 따라서 특정 기업이나 연구기관 중심으로 연구가 이루어지고 있지 않는 것으로 나타남
- 상위 다출원인의 대다수가 일본국적 및 유럽국적 기업으로, 특허출원이 가장 활발한 연구주체로는 일본기업인 KAO CORP(8건)으로 자국인 일본 외에도 미국과 유럽을 주요 타겟 시장으로 하여 출원을 한 것으로 나타남
- 유럽 기업으로는 Compagnie Gervais Danone(7건)을 비롯하여 Nestec S.A.(6건) 및 N.V. Nutricia(6건)이 관련 기술분야에서 활발한 출원활동을 보이고 있으며, 이들 기업 역시 유럽을 외에도 미국과 일본을 주요 타겟 시장으로 하여 출원하였음
- 미국 기업인 The Procter & Gamble Company에서는 미국과 유럽을 주요 타겟 시장으로 하여 총 4건의 특허를 출원하였음
- 해남자연농업영농조합법인은 대한민국 특허등록 3건, 특허출원 2건, PCT출원 1건(출원일 2015.10.27)을 포함한 미국출원 1건(2016.12.12), 일본출원 1건(2016.12.14), 중국출원 1건(2014.11.26.)이 등록 및 출원 중에 있음

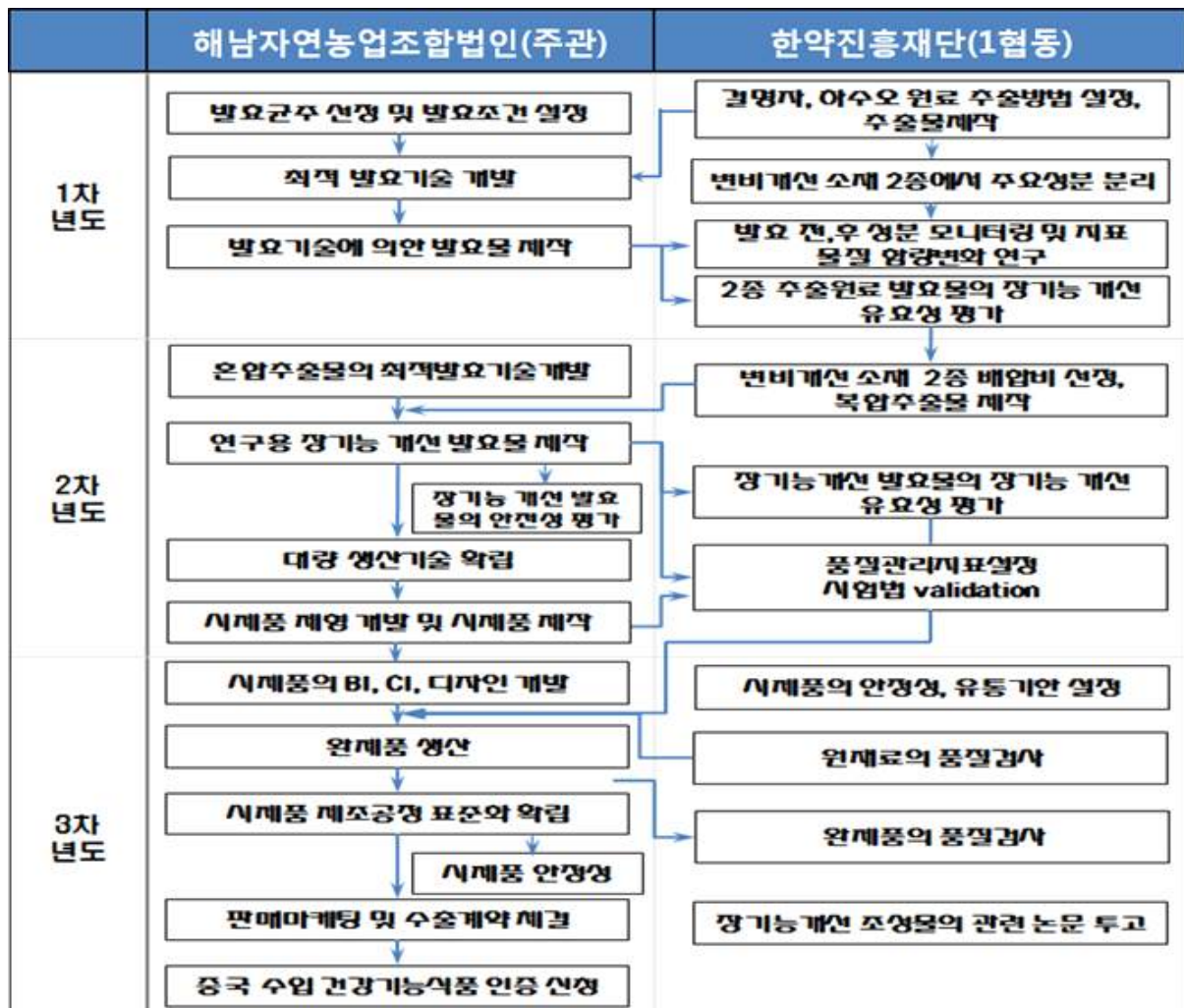
<표> 배변 치료 및 개선 해외 주요출원인 TOP 9 + 해남자연농업영농조합법인

순위	대표출원인	미국	유럽	일본	총합계
1	KAO CORP	1	1	6	8
2	Compagnie Gervais Danone	3	3	1	7
3	Nestec S.A.	4	1	1	6
4	N.V. Nutricia	1	5	-	6
5	The Procter & Gamble Company	2	2	-	4
6	TOYO SHINYAKU CO LTD	-	-	4	4
7	AJINOMOTO CO INC	-	1	3	4
8	TAIYO KAGAKU CO LTD	1	1	2	4
9	NIPPON KAYAKU CO LTD	-	-	4	4
-	해남자연농업영농조합법인	한국등록 3건, 한국출원 2건, PCT 출원 1건, 미국출원 1건, 일본출원 1건, 중국출원 1건			9

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1. 연구개발 추진전략 및 방법

- 1) 본 연구와 관련된 기술 정보는 KISTI 문헌정보 탐색을 이용하여 보고서, 문헌 및 특허 등의 정보를 수집하여 활용함
- 2) 본 연구의 실험재료가 되는 결명자의 변비 개선 효과에 대해 약리성 및 독성 평가를 통하여 식품 소재로서 활용을 연구함
- 3) 고부가가치 식품 개발을 위한 전문가 풀 활용
 - 식품 관련 전문가 Pool을 구성하고 한방 고서의 문헌 및 기초자료에 대한 자문을 구함
 - 제품개발을 위한 식품회사, 마케팅전문가, 특허전문가 등으로 된 자문단 구성하여 정기적인 컨설팅 및 제품화 연구를 진행함
- 4) 주관기관과 협동기관과의 유기적인 협력체계 유지
 - 제품개발을 위해 정기적으로 회의를 개최하며 세부과제별 업무 분장에 따라 유기적인 협조체계 구축하여 추진함

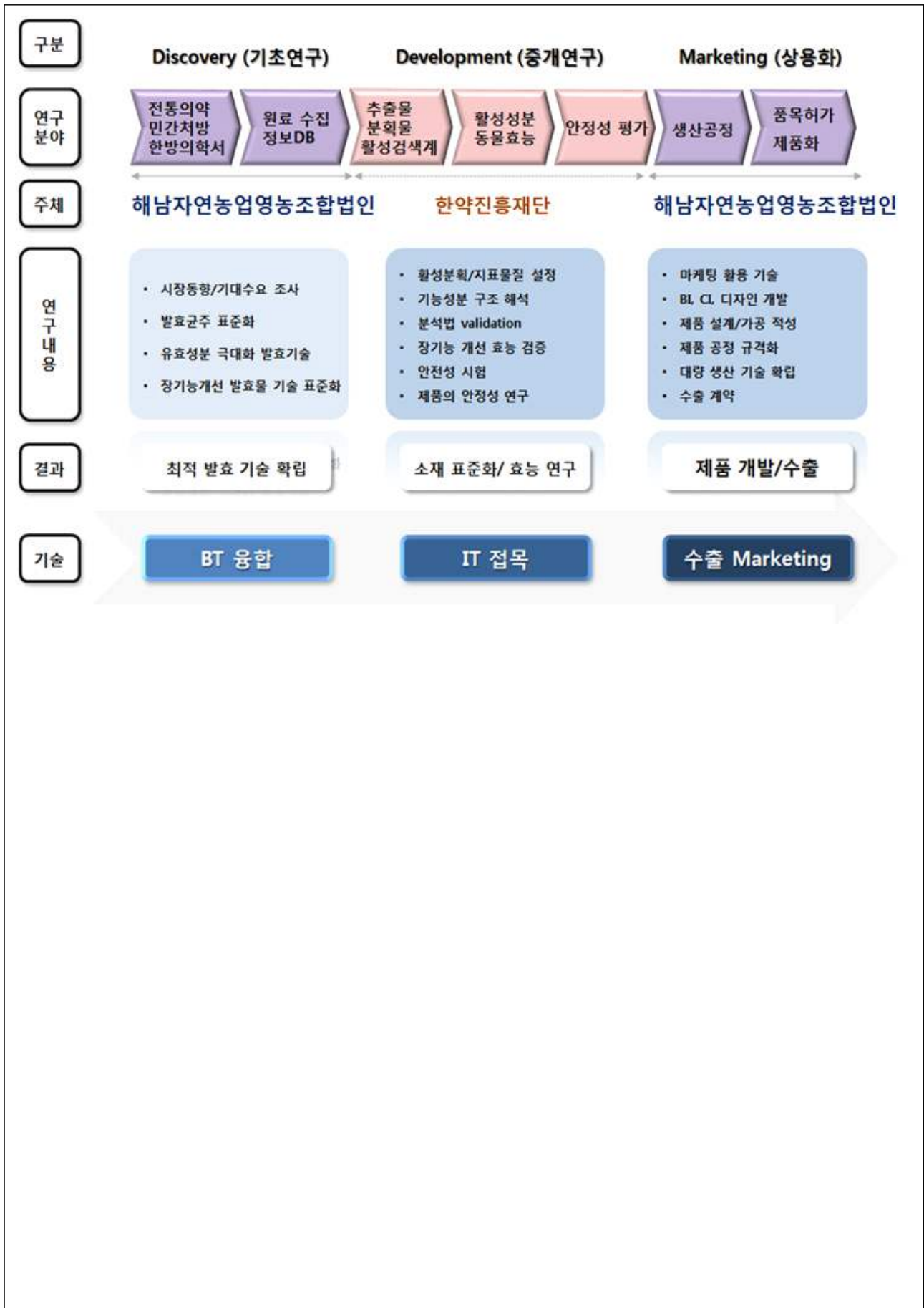


3-2. 연구개발 추진체계

해남자연농업영농조합법인
용 주 현
총괄과제명 전남특산 약용작물(결명자, 하수오)을 이용한 수출 전략형 장개선 식품 개발

해남자연농업영농조합법인
제1세부: (발효균주 표준화 및 제품개발)
용 주 현
<p><주요 연구개발 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> • 발효력이 우수한 균주 선별 • 결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발 • 단일 추출물에 의한 발효물 제작 • 결명자, 하수오 혼합추출물의 최적 발효기술 개발 • 장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립 • 장기능개선 발효물의 식품 제형 설정 • 개발된 제형에 따른 시제품 생산 • 시제품의 BI & CI, 디자인 개발 • 완제품 생산 • 제조공정 표준화 확립 • 수출계약 체결 및 마케팅 • 중국 수입건강식품 인증 대행 계약 • 지식재산권 출원

한약진흥재단
제1협동: (장개선 발효물의 표준화 및 유효성 평가)
안 병 관
<p><주요 연구개발 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> • 결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정 • 2종 소재 발효물에 대한 장기능개선 유효성 평가 • 2종 소재의 유효성분 분리 • 발효 전·후 성분변화 연구 • 2종 소재의 배합비 연구 • 장기능개선 발효물의 유효성 평가 • 장기능개선 발효물의 안전성 평가 • 장기능개선 발효물의 품질관리지표설정 및 시험법 밸리데이션 • 시제품의 품질관리 지표설정 및 함량범위 설정 • 시제품의 안정성 평가 • 원재료 및 완제품의 품질검사 • 지식재산권 출원



3-3. 연차별 연구개발 추진일정

1 차년도 (2014. 12. 19. ~ 2015. 12. 18.)														
일련 번호	연구내용	추진 일정												책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	발효력이 우수한 유산균 선별	■	■	■	■	■	■							용주현 (해남자연농업 영농조합법인)
2	결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
3	개발된 발효기술에 의한 발효물 제작										■	■	■	
4	결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정	■	■	■										안병관 (한약진흥재단)
5	결명자, 하수오 발효물에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가				■	■	■	■	■	■	■	■	■	
6	결명자, 하수오 발효물의 지표 및 유효성분 분리			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
7	발효 전·후 성분 모니터링 및 지표물질 함량변화											■	■	

2 차년도 (2015. 12. 19. ~ 2016. 12. 18.)														
일련 번호	연구내용	추진 일정												책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	유효성, 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 연구	■	■	■	■	■								용주현 (해남자연농업 영농조합법인)
2	결명자, 하수오 혼합추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발		■	■	■	■	■							
3	장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립					■	■	■	■	■	■	■	■	
4	장기능 개선 발효물의 식품 제형 설정							■	■	■	■			
5	개발된 제형에 따른 시제품 생산										■	■	■	
6	발효물의 지적재산권 출원										■	■	■	
7	장기능 개선 발효물의 랫트에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가							■	■	■	■	■	■	안병관 (한약진흥재단)
8	장기능개선 발효물의 안전성 평가(자체, 외부)							■	■	■	■	■	■	
9	장기능개선 발효물의 품질관리지표설정 및 시험법 밸리데이션	■	■	■	■	■	■	■						

3 차년도 (2016. 12. 19. ~ 2017. 12. 18.)															
일련 번호	연구내용	추진 일정												책임자 (소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	제조공정의 표준화 확립	■	■	■	■	■	■								용주현 (해남자연농업 영농조합법인)
2	시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구	■	■	■											
3	시제품의 BI & CI, 디자인 개발	■	■	■	■	■									
4	완제품 생산						■	■	■						
5	완제품의 품질검사						■	■	■	■					
6	판매마케팅 및 수출계약 체결									■	■	■	■		
7	중국 수입건강 기능성식품 개별 인증 중국 현지 보건 대행 체결										■	■	■	■	
8	원재료의 품질검사	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				안병관 (한약진흥재단)
9	발효형태별 장기능 유효성 평가(이중간 포함)	■	■	■	■										
10	시제품 장기능개선 유효성 평가				■	■	■	■							
11	장기능개선 조성물 관련 논문 투고									■	■	■	■	■	

3-4. 연차별 연구개발 목표 및 주요내용

1 차년도 (2014. 12. 19. ~ 2015. 12. 18.)		
과제구분 (담당기관)	목표	주요내용
제1세부 (해남자연 농업영농 조합법인)	발효력이 우수한 유산균 선별	- 20종 유산균 분리 및 동정(16s rRNA, API) - 균주의 특성 분석(API, β -glucosidase, LV-SEM) - 결명자, 하수오 각 추출물에서 발효력이 우수한 균주 선정 (20종 대상 5종 선정)
	결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	- 결명자, 하수오 각 추출물, 분쇄물의 농도별 시료 제작 - 발효조건(시료 농도, 수분함량, 배양시간 등) 설정 - 발효조건에 따른 유산균 발효효과 평가 - 조건별 최적의 발효조건 설정(시료형태, 영양조건, 배지)
	개발된 발효기술에 의한 발효물 제작	- 결명자, 하수오의 선정된 시료형태 및 농도, 균 접종량, 배 양시간 등 표준화된 발효공정에 따른 생리활성 및 유효성 평가용 시료 제작
제1협동 (한약진흥 재단)	결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정	- 결명자 등 2종 소재에 대한 문헌검색 - 결명자 등 2종 소재의 성분 스크리닝 - anthraquinone 최대 효율을 위한 추출용매 선정 및 추출방 법 연구(기존 논문 활용) - 선정된 원료의 표준화된 방법에 의해 시료 제작
	결명자, 하수오 발효물에 대한 장기능(배변기 능) 개선 유효성 평가	- 유효성 평가용 시료의 제조 - 각 시료의 rat를 이용한 변비개선(식이량, 음수량, 변중량, 변 의 수분함량, 대장내 점액 분비 등) 효능평가 실시 - 각 발효물에 대한 변비개선활성 종합평가 실시
	결명자, 하수오 발효물의 지표 및 유효성분 분리	- 결명자, 하수오 원료 추출, 농축, 분획 - 크로마토그래피 및 재칼럼크로마토그래피 성분분리 - NMR, LC/MS/MS 구조분석, anthraquinone 물질 분리
	발효 전·후 성분 모니터링 및 지표물질 함량변화	- 발효 전·후 성분 모니터링 실시 - 지표물질의 성분변화 연구 - 생리활성과 상관관계 연구

2 차년도 (2015. 12. 19. ~ 2016. 12. 18.)

과제구분 (담당기관)	목표	주요내용
제1세부 (해남자연 농업영농 조합법인)	유효성, 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자, 하수오 배합별 anthraquinone계 화합물 함량 비교 - 결명자, 하수오 경제성 및 수급성 비교 - 원료의 에탄올 추출효율 평가 및 경제성 분석 - 원료 수급을 위한 계약 농가 확보
	결명자 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 분쇄결명자, 볶은분쇄결명자 시료 준비 - 발효조건 설정(수분함량, 시료량, 발효균주, 접종량, 생균 및 사균, glucose 첨가, 배양시간) - 표준화 방법에 의한 프로토콜 및 표준제조공정서 제작
	장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 장기능개선 발효물의 대량 제조를 위한 최적 공정조건 탐색 - 10L, 300L scale up에 따른 aeration별 CFU/ml 확인 조건 설정
	장기능개선 발효물의 식품 제형 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 물성, 식품형태에 따른 제형 설정 - 최종 일반식품용 제형 2종 선정 - 특유의 맛과 향 제거를 위한 변비개선 기능성 당류 및 부형원료 설정 - 설정된 부형원료들로 혼합한 시료의 중국 소비자 관능평가
	개발된 제형에 따른 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> - 분말: 입고/검사 → 세척 → 건조 → 30mesh 분쇄 → 볶음 → 100mesh 분쇄 → 발효 → 동결건조 → 혼합 → 금속선별 → 스틱충진 → 포장 - 과립 30mesh 분쇄 → 볶음 → 100mesh 분쇄 → 발효 → 동결건조 → 혼합 → 반죽 → 과립성형 → 건조 → 선별 → 금속선별 → 스틱충진 → 포장 - 시제품의 영양성분 분석
	장기능개선 발효물의 지적재산권 출원	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자 유산균 발효물을 포함하는 변비 예방 및 치료용 조성물 - 결명자를 발효시켜 변비의 개선 또는 예방 활성을 증진시키는 락토바실러스 카제이 균주 - K2 균주 국제 특허/기탁
제1협동 (한약진흥 재단)	장기능개선 발효물의 랫트에 대한 장기능(배변기 능) 개선 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자, 하수오 및 하수오 발효균에 대한 변비개선 유효성 평가 - 결명자 50% 주정추출물 및 Methylene Chloride 분획물간의 변비개선 비교 평가 - 분쇄결명자, 볶은분쇄결명자에 대한 발효 전·후와 발효 후 생균과 사균, 2% glucose 첨가에 대한 변비개선 유효성 평가 - K2 균주의 발효 시간별 변비개선 유효성 평가
	장기 개선 발효물의 안전성 평가 (자체, 외부)	<ul style="list-style-type: none"> - 발효결명자를 단회 경구투여시 나타나는 독성 파악(rat) - 자체 3,000mg/kg, 외부 전문기관 의뢰 2,000mg/kg - 14일 단회 경구투여시 일반증상 관찰 및 체중 이상여부, 치사량 확인 및 독성이 없고 변비개선이 있는 최적 농도 설정

	장기능개선 발효물의 품질관리지표설정 및 시험법 밸리데이션	<ul style="list-style-type: none"> - K2 균주를 통한 발효 결명자의 anthraquinone 화합물의 탐색을 통한 성분변화 확인 - 발효 시간별 결명자 성분함량 측정 및 비교를 통한 발효지표 설정 - 식약처 기준 특이성, 안전성, 완건성, 직선성 등의 분석을 통한 시험법 밸리데이션
3 차년도 (2016. 12. 19. ~ 2017. 12. 18.)		
과제구분 (담당기관)	목표	주요내용
제1세부 (해남자연 농업영농 조합법인)	결명자발효분말의 제조공정 표준화 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 단가경쟁력 상승을 위한 발효형태 변화(액상발효 → 고체발효) - 생균수, 지표성분 함량 변화 확인을 통한 발효형태별 비교 - pilot 및 scale up을 통한 고체발효 결명자발효분말 생산 - 발효형태 변화에 따른 시험법 및 시험법밸리데이션 재설정 - 핵심공정별 지표성분 함량 변화 및 수율 확인
	시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 고체발효 결명자발효분말의 보존료 및 벤조피렌 함량 확인(전문기관 의뢰) - 봉해시험 생략(제형 미해당) - α-아밀라아제와 프로테아제 시험 생략(식품유형 미해당) - 유통기한 설정 시험 생략(‘식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준’ III. 1. 다항에 해당)
	BI & CI, 디자인 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 수출 및 내수형 통합 브랜드명 및 제품별 슬로건 개발 - 국문, 중문, 영문 - 건강기능식품 일일섭취량에 맞는 용기 개발 - 소비트렌드에 맞는 인, 아웃케이스, 캐릭터 개발 - 국문 브랜드명 지식재산권 출원
	완제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> - ‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’ 건강기능식품으로 유형 설정 - 제형 2종 설정 및 제형별 고시형 주원료, 부형원료, 혼합비 설정 - 스틱 분말형 완제품 4,000set(30포/set, 2.5g/포)와 스파우트파우치 음료형 1,500set(30포/box, 100ml/포), 2종 생산(GMP 인증기관)
	완제품의 품질검사	<ul style="list-style-type: none"> - 분말형 완제품의 품질검사(자가품질검사 및 전문기관 의뢰) - 음료형 완제품의 품질검사(자가품질검사 및 전문기관 의뢰)
	판매마케팅 및 수출계약 체결	<ul style="list-style-type: none"> - 온라인과 오프라인 홍보 및 마케팅, 판매 진행 - 국내, 국외(홍콩, 러시아 모스크바, 중국 산시성) 박람회 참가 - 바이어 상담 및 국내 판매계약 1건, 수출계약 2건 체결
	중국 수입건강 기능성식품 보건 대행 계약	<ul style="list-style-type: none"> - 중국 보건기능 중 변통(쾌변 기능식품) 인증을 위한 보건 대행 전문기관과 계약 체결

제1협동 (한약진흥 재단)	원재료의 품질검사	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자 원료의 성상, 수분함량, 주요성분 Emodin 존재여부 확인 - 중금속 4종, 잔류농약 6종, 이산화황, 총아플라톡신 함량 확인 (전문기관 의뢰)
	발효형태별 장기능개선 유효성 평가 (이종간 포함)	<ul style="list-style-type: none"> - 고체발효 및 액체발효 결명자발효분말의 장기능개선 유효성 평가 비교 - mice를 이용한 SD rat와 mice의 이종간 장 이동거리 유효성 비교
	시제품의 장기능개선 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품 분말형 및 음료형의 장기능개선 유효성 평가 비교
	장기능개선 조성물의 관련 논문 투고	<ul style="list-style-type: none"> - 핵심원료의 장기능개선 효능 논문 게재 - 결명자의 반복투여에 따른 안전성 논문 투고

3-5. 연차별 연구목표 및 연구수행방법

1 차년도 (2014. 12. 19. ~ 2015. 12. 18.)		
연구목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. 결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 예로부터 결명자나 하수오의 사하작용에 대한 효능은 문헌이나 연구자료에서 쉽게 찾아볼 수 있음 - 이러한 사하작용을 일으키는 물질로는 emodin, chrysophanol과 같은 anthraquinone 유도체라고 알려져 있으며 이들이 장관 내에서 자극성 사하작용을 유발함 - 따라서 논문을 통해 사하작용의 key 물질인 anthraquinone류의 표준화된 최적 추출방법을 설정하였음 	<ul style="list-style-type: none"> - 문헌을 참고하여 anthraquinone 최대 효율을 위한 추출용매 선정 및 추출방법 연구 - 선정된 원료의 표준화된 방법에 의해 추출물 제작
2. 발효력이 우수한 유산균 선별	<ul style="list-style-type: none"> - 식품으로 사용하기 위한 신규 유산균 분리 및 동정 진행함 - anthraquinone류의 사하작용은 배당체보다 emodin과 같은 비당체에서 상대적으로 효과가 있다고 알려져 있음 - 따라서 anthraquinone 배당체에서 당이 분해되면서 anthraquinone 비당체로 전환되기 위한 분리 균주별 당 분해 활성 우수 균주를 선별함 	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 분리 유산균 20종의 16s rRNA sequencing과 API assay kit를 이용한 분리 및 동정 - 결명자의 각 추출물에서 관능평가 및 배양에 따른 결명자 및 하수오 분해능이 우수한 균주 확인 - β-glucosidase 및 API 50 CHL 결과 ①종이 다르고 ②당 분해 효소활성이 우수하며 ③균 성장이 비교적 빠르고 ④호기적 배양이 가능하며 ⑤식품으로 사용이 가능한 최적 균주 선별(20종 대상 5종 선정) - 선별된 균주들의 표면형상관찰을 위한 LV-SEM 사진 촬영
3. 결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자, 하수오의 최적 발효조건을 찾기 위한 시료별 발효기술 개발함 · 최적 pH, 온도, 시료농도, 수분함량, 배양시간, 균 접종량 등 · 시료형태별, 영양조건별, 배지별 비교 	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자, 하수오 각 추출물, 분쇄물의 농도별 시료 제작(통, 조분쇄, 주정추출물) - 최적 발효조건(시료농도, 수분함량, 배양시간, 균 접종량) 설정 - 발효조건에 따른 유산균 발효효과 평가 - 추출물별 최적의 발효조건 설정(시료형태별, 영양조건별, 배지별 anthraquinone 비당체 총 함량 측정)
4. 개발된 발효기술에 의한 발효물 제작	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자와 하수오의 주정추출물에서 anthraquinone 비당체의 총 함량이 높게 나오기 때문에 시료는 주정추출물만을 이용함 - 균주는 3종 유산균(K1, K2, K3)과 장내 유익균으로 청국장 발효에 쓰이는 	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자, 하수오의 선정된 최적 시료농도, 온도, 시간, 배지 등 최적화된 발효공정에 따른 생리활성 시료 제작 - 생리활성 분석 및 동물 유효성 평가 시료로 한약진흥재단에 인계

	<i>Bacillus subtilis</i> (C1), 막걸리 및 빵 발효 등에 쓰이는 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Y)를 포함한 5종 균주로 72시간 발효한 발효물을 각각 제작함	
5. 결명자, 하수오 발효물에 대한 장기능(배변 기능) 개선 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 5종 균주의 72시간 발효물에 대한 유효성 평가를 위해 Rat를 이용한 변비 개선(식이량, 음수량, 변중량, 변의 수분함량, 장 이동거리, 대장관내 점액질의 분비효과) 효능평가를 실시함 	<ul style="list-style-type: none"> - 실험동물은 SD rat 4주령 수컷 이용 - 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암조건에서 사육 - 구입 후 1주일 동안 순화, 군당 5마리씩 배치 - 정상대조군, loperamide투여군, 양성대조군, 시료투여군(저농도 100mg/kg, 중농도 200mg/kg, 고농도 300mg/kg) - 정상대조군 제외하고 loperamide 4일간 12시간씩 피하투여하여 변비 유발 - 시료는 loperamide 투여 30분 후 투여 - 각 발효물에 대한 변비개선활성 종합평가 실시
6. 결명자, 하수오 발효물의 지표 및 유효성분 분리	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자 추출물의 LC/MS 성분 스크리닝 후 anthraquinone류로 추정되는 지표 및 유효성분의 chromatography를 이용한 분리실험 실시함 - 하수오 추출물의 LC/MS 성분 스크리닝 후 지표성분의 유무 확인 및 chromatography를 이용한 분리실험 실시함 	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자, 하수오 원료 추출, 농축, 분획 - 크로마토그래피 및 재칼럼크로마토그래피를 이용한 anthraquinone 유도체 12종의 결명자 유효성분 및 1종의 하수오 지표성분 분리 - NMR, LC/MS/MS 구조분석, anthraquinone 물질 분리
7. 발효 전·후 성분 모니터링 및 지표물질 함량변화	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자의 발효 전·후에 대한 성분 변화를 확인하기 위하여 5개의 균주(K1, K2, K3, C1, Y)를 이용한 발효 전·후 시료를 통해 결명자에서 분리된 성분을 이용하여 배당체 및 aglycon의 함량 변화를 확인함 - 발효에 의해 배당체에 붙은 당이 영양분으로 사용되어 aglycon으로 전환되었을 것으로 예상함 	<ul style="list-style-type: none"> - K1, K3, C1, Y 균주들의 경우는 배당체가 감소하는 만큼 aglycon이 증가 할 것으로 예상하였으나, 그 함량이 일정하거나 함께 감소하는 현상을 보임 - 반대로 K2 발효물의 경우, 변화량이 크지는 않지만, 배당체의 함량이 줄어드는 만큼 aglycon의 함량이 증가하는 현상을 확인하였음 - 하수오도 마찬가지로 발효시 분리된 성분이 감소됨을 확인함
2 차년도 (2015. 12. 19. ~ 2016. 12. 18.)		
연구목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. 유효성, 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자와 하수오의 배합비별 변비개선 효능이 있다고 알려진 지표물질의 함량 분석을 통한 최적 배합비 설정함 - 결명자 및 하수오 변비개선 효과 동물 유효성 평가함 	<ul style="list-style-type: none"> - 서로 다른 지표성분을 가지는 결명자와 하수오의 배합비 비교를 통한 유효성분의 함량에 따른 하수오의 배합여부 판단 - 결명자 및 하수오 변비개선 효과를 랫트에서 실험한 결과 결명자에 비해 하수오

	<ul style="list-style-type: none"> - 2중 소재의 실제구입가 및 인터넷판매가 비교를 통한 경제성 평가함 - 추가 경제성 및 공급성 평가 비교함 - 50%EtOH 추출물은 생결명자에 비해 변비개선 효능 물질인 anthraquinone계 화합물의 함유량은 많지만 에탄올 사용에 따른 화기취급매뉴얼 준수와 화재위험성, 에탄올 회수비용, 에탄올 구입 비용 등 추가 위험성 및 제약이 따르며 높은 원가 상승이 필수적임 - 따라서 분쇄한 50%EtOH 추출물과 분쇄한 결명자의 발효 전·후 성분변화와 유효성 평가를 통해 에탄올추출의 사용 여부를 결정하고 원료를 대체하기로 함 	<ul style="list-style-type: none"> 의 변비개선 유효성이 낮음을 확인함 - 하수오의 결명자 대비 10배 높은 실제구입가와 인터넷판매가 - 이엽우피소 파동에 따른 하수오의 추가 분석 필요 및 소비자 선호도 하락 - 재배농가 급감에 따른 공급 어려움 - 위와 같은 하수오의 문제들로 결명자 100% 최종 결정 - 결명자 50% 주정추출물의 단순분쇄물, 볶음분쇄물 대비 182~211배 높은 제작 비용 - 에탄올 사용에 따른 추가 화재 위험 및 화기 취급 주의, 에탄올 필수 회수에 필요한 막대한 비용 추가과 같은 주정추출물의 문제점으로 인해 분쇄물이나 볶음분쇄물로 원료를 대체하기로 결정
<p>2. 결명자추출물, 분쇄물의 최적발효기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 볶지 않은 결명자의 독성에 대한 논문이 확인된 바, 볶는 과정의 필요성이 제시되었고, 볶기 전과 후의 변비개선 활성물질의 분석 및 동물실험 유효성 평가를 통해 추가 볶는 과정 삽입 여부를 결정함 - 변경된 시료에 대한 최적 시료농도, 발효균주, seed 접종량, 배양시간, glucose 첨가여부, 멸균 여부에 대한 발효여부를 CFU/ml과 유효성 평가를 통해 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자분쇄물과 결명자볶은분쇄물의 발효 전·후 색상, pH, CFU/ml 비교, 확인 - 선정된 시료에 대한 최적 발효조건(시료농도, 발효균주, 균 접종량, 배양시간, 탄소원 glucose첨가여부, 발효 후 멸균여부)을 설정함 - 변화된 시료에 대한 배양시간, glucose첨가, 미첨가, 멸균을 통한 생균과 사균에 대한 변비개선 유효성 평가를 진행함
<p>3. 장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 1L 플라스크배양, 10L, 300L scale up에 따른 최적 aeration을 확인함. 발효 전·후 CFU/ml와 생리활성 변화를 통해 대량생산기술 확립함 - 표준화된 발효공정에 따른 발효물 제작함 	<ul style="list-style-type: none"> - 통성혐기적 최적 배양을 위한 aeration 농도를 설정하기 위해 aeration 조건별 발효 후의 CFU/ml을 측정하여 최적 aeration 조건 확립함 - 10L 발효조에서 aeration별 발효 전·후 CFU/ml 확인(3Lot) - 300L 발효조에서 설정된 aeration의 발효 전·후 CFU/ml과 10L 대비 상대활성 비교(3Lot) - 표준화를 위해 시험법 밸리데이션 설정용 시료로 사용
<p>4. 장기능 개선 발효물의 식품 제형 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 6개 제형(정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말) 확대 6개 제형(편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바) 중 선택함 - 변비개선 활성물질인 anthraquinone계 화합물과 섬유소는 물에 잘 녹지 않는 	<ul style="list-style-type: none"> - 선정된 제형 중, 직접 생산이 가능한 제형과 식감이 우수한 제형을 선정 - 약간의 쓴 맛을 감소시켜주기 위해 당류 첨가 - 대부분 부형원료들은 무향으로 고소한 향

	<p>특징이 있기 때문에 역상 제형은 제외함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 변비개선과 같은 건강과 관련된 식품, 건기식으로 많이 사용되며 소비자들이 선호하는 제형 선정함 - 결명자 특유의 쓴맛과 향은 볶는 과정과 발효과정만으로도 많이 감소되고 발효 후엔 조금 달콤한 맛과 향이 남 - 부형원료들 중, 변비개선 효능을 높이기 위해 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 개별인정 원료들 탐색 및 관능평가를 통해 부형원료를 선정함 	<p>이 날 수 있는 부형원료를 첨가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 개별인정 원료들을 탐색하고 부작용이 없으며 인지도가 높은 원료들만 선정 - 선정된 원료들을 혼합하고 중국 소비자 대상 5점척도제 무작위선정 관능평가를 통해 최종 확정 - 차후 건강기능식품 개별인증 후엔 섭취가 용이하며 부형원료 혼합이 적은 캡슐이나 정제 제형 탐색
<p>5. 장기능 개선 발효물의 랫트에 대한 장기능(배변 기능) 개선 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 발효물에 대한 유효성 평가를 위해 Rat를 이용한 변비개선(식이량, 음수량, 변중량, 변의 수분함량, 장이동 거리, 대장관내 점액질의 분비효과) 효능평가를 실시함 - 다양한 조건들을 통해 장기능 개선을 증진시킬 수 있는 최적의 발효물 선정함 	<ul style="list-style-type: none"> - 실험동물은 SD rat 5주령 수컷 이용 - 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암 조건에서 사육 - 구입 후 1주일 동안 순화, 군당 5마리씩 배치 - 정상대조군, loperamide투여군, 양성대조군, 시료투여군(저농도 100mg/kg, 중농도 200mg/kg, 고농도 300mg/kg) - 정상대조군 제외하고 loperamide 4일간 12시간씩 피하투여하여 변비 유발 - 시료는 loperamide 투여 30분 후 투여 - 각 발효물에 대한 변비개선활성 종합평가 실시
<p>6. 장기능개선 발효물의 안전성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 장기능개선 발효물의 원료인 결명자는 식품원료로 사용가능한 시료임 - 유산균 발효로 인한 독성물질 생성 가능성이 있어 단회투여독성시험을 실시하여 안정성 평가함 - 독성평가 전문기관인 한국화학융합시험연구소에서 의뢰(2,000mg/kg까지) 및 자체(3,000mg/kg까지) 실시함 - 독성이 일어나는 농도 및 발효물 효능이 나타나는 농도사이를 구해 최종 제품 농도를 설정함 	<ul style="list-style-type: none"> - 장기능개선 발효물의 농도분석법 보증을 위한 validation 및 안정성을 확인 - 암·수 Spargue-Dawley랫트를 이용 단회 경구 투여시 나타나는 독성반응 관찰하고, 개략의 치사량을 구함 - 체중, 사료섭취량, 혈액생화학적검사 실시 - 각 장기의 장기중량 측정하여 육안소견이 있을시 조직병리학적 검사를 통해 발효물의 안전성 종합평가 실시
<p>7. 장기능개선 발효물의 품질관리지표 설정 및 시험법 밸리데이션</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 장기능개선 효능시험을 위해 준비한 결명자의 발효물 중 가장 높은 효능을 보인 균주를 선발하여 발효 전, 후의 유효성분의 함량변화 측정함 - 변화한 성분의 탐색 및 발효 시간에 따른 함량변화 비교함 - 결명자 발효물을 이용해 제작한 시제 	<ul style="list-style-type: none"> - K2 유산균을 이용해 발효시킨 결명자의 LC /MS를 이용한 함량변화 탐색 - 함량의 변화를 보이는 성분을 이용한 결명자 발효물의 발효 시간별 함량 측정 및 발효 지표 설정 - 결명자 발효물로 제작된 시제품의 식품의약품안전처 기준에 따라 LC를 이용한 완

	<p>품의 유효성분을 이용한 시험법 밸리데이션 설정함</p>	<p>건성, 특이성, 정확성, 정밀성등의 실험을 통한 시험법 밸리데이션 및 품질관리 지표설정</p>
<p>8. 개발된 제형에 따른 시제품 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 원가 절감을 위해 최종 제형에 맞는 과정을 단순화하고 표준화된 공정으로 시제품을 제작함 - 시험법 밸리데이션에 의해 설정된 시험법에 따라 시험하고 지표성분의 함량을 측정함 - 영양성분 분석을 통해 1포(3g)당 함유된 영양성분을 표시함 	<ul style="list-style-type: none"> - 분말: 입고/검사 → 세척 → 건조 → 30mesh 분쇄 → 볶음 → 100mesh 분쇄 → 발효(K2균주, 24시간) → 동결건조 → 부형제혼합 → 금속선별 → 스틱충진(3g) → 포장 - 과립: 입고/검사 → 세척 → 건조 → 30mesh 분쇄 → 볶음 → 100mesh 분쇄 → 발효(K2균주, 24시간) → 동결건조 → 혼합 → 과립성형 → 건조 → 이물선별 → 금속선별 → 스틱충진(3g) → 포장 - 영양성분 분석(발효분말, 스틱분말 시제품)
<p>9. 발효물의 지적재산권 출원</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 발효물의 지적재산권 출원 진행함 - 핵심 균주의 국제 특허/기탁 1건 	<ul style="list-style-type: none"> - 결명자 유산균 발효물을 포함하는 변비 예방 및 치료용 조성물(10-2016-0121282) - 결명자를 발효시켜 변비의 개선 또는 예방 활성을 증진시키는 락토바실러스 카제이 균주(등록 10-1808306) - K2 균주 국제 특허/기탁(KCCM11907P)

3 차년도 (2016. 12. 19. ~ 2017. 12. 18.)

연구목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>1. 원재료 결명자의 품질검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 대한민국 약전을 참고하여 결명자의 성상을 비교함 - 주 원재료 결명자의 기원감별을 위해 LC/MS를 이용한 정성분석으로 결명자의 주요 성분인 Emodin의 유무를 확인함 - 결명자의 한약재 품질검사를 위해 중금속 4종, 잔류농약 6종, 이산화황, 총아플라톡신 함량을 한국식품과학 연구원에 의뢰하여 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> - 다기능 줌 현미경을 사용하여 대한민국 약전에 표기된 결명자의 길이와 너비 비교 - LC-ESI-IT-TOF MS를 사용하여 Emodin의 유무를 확인 - 중금속 4종(납, 비소, 카드뮴, 수은)과 잔류농약 6종(엔드린, 디엘드린, 알드린, 비에치시, 디디티, 엔도설판), 이산화황, 총아플라톡신(B1, B2, G1, G2의 합) 함량 확인
<p>2. 제조공정의 표준화 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 배변활동원활 관련 고시형 원료들과의 가격경쟁력 상승을 위해 발효형태를 기존 액상발효에서 고체발효로 변경함 - 발효지표인 K2 생균수와 지표성분 함량 변화를 확인하여 scale up함 - 발효형태 변화에 따라 시험법과 시험법밸리데이션을 재 수행 및 설정함 - 3Lot 대량생산을 통한 핵심공정별 지 	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 액상발효의 발효+건조 공정 단가와 고체발효 발효+건조 공정 단가의 비교 - ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 주요 원료들인 프로바이오틱스, 난소화성말토덱스트린, 차전자피식이섬유, 알로에아보레센스분말, 이눌린식이섬유, 결명자발효분말(액상발효), 결명자발효분말(고체발효)의 단가 경쟁력 비교 - 고체발효 결명자발효분말의 pilot(18kg/

	<p>표성분 함량 변화 및 수율 확인하여 제조공정을 확립함</p>	<p>회) 및 scale up(320kg/회) 각 3Lot 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고체발효의 핵심공정별 지표성분 함량 및 수율 변화 확인(3Lot) - 결명자발효분말(고체발효)의 품목제조보고 변경 - 밸리데이션 재수행 및 시험법 설정
<p>3. 고체발효한 결명자발효분말의 장기능 유효성 평가(이종간 포함)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 고체발효 결명자발효분말과 액상발효 결명자발효분말의 비교를 위해Rat를 이용한 변비개선(식이량, 음수량, 변 개수, 변 중량, 변의 수분함량, 장 이동 거리, 대장관내 점액질의 분비 효과) 효능평가를 실시함 - Mice를 이용한 장 이동거리 효능평가를 통해 rat와 mice의 이종간 유효성 평가를 진행함 	<ul style="list-style-type: none"> - 실험동물은 발효형태별 비교는 SD rat 4주령 수컷, 이종간 비교는 ICR mouse 4주령 수컷 이용 - 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암 조건에서 사육 - 구입 후 1주일 동안 순화, 각 군당 4마리 - 정상대조군, loperamide투여군, 양성대조군, 액체발효 결명자 투여군(300mg/kg), 고체발효 결명자 투여군(저농도 300mg/kg, 중농도 600mg/kg, 고농도1,000mg/kg) - 정상대조군 제외하고 loperamide 4일간 12시간씩 피하투여하여 변비 유발 - 시료는 loperamide 투여 30분 후 투여 - 고체발효 및 액체발효에 대한 변비개선 활성 종합평가 실시 - 이종간 장 이동거리 비교를 통한 rat 유효성 평가 실시
<p>4. 시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 발효 시 생성가능한 보존료 5종과 볶음 시 생성가능한 벤조피렌의 함량을 한국식품과학연구원을 통해 확인함 - 시제품의 봉해시험(정제 및 캡슐 제형 해당), α-아밀라아제 및 프로테아제(효소식품 해당) 진행여부 확인함 - 시제품의 유통기한 설정 평가 진행여부 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> - 보존료 5종(소르빈산, 안식향산, 데히드로초산, 파라옥시안식향산, 프로피온산)과 벤조피렌 함량 확인 - 봉해시험은 분말형과 액상형으로 제형이 설정되어 미진행 - α-아밀라아제 및 프로테아제도 건강기능식품 유형으로 설정되어 미진행 - 식품의약품안전처 고시 제2014-206호 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준” III. 1. 다항에 적용되어 특성이 유사한 기존 유통제품의 유통기한을 참고하여 최종 설정
<p>5. 시제품의 BI & CI, 디자인 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 글로벌 소비시장의 트렌드, 내·외부환경 조사 분석, 경쟁환경 분석 등을 통해 개발방향 수립함 - BI&CI는 네이버, 아프리카TV, 코카콜라처럼 통합된 브랜드명으로 진행함 - 중국 바이어 및 최근 트렌드 등을 바탕으로 브랜드명(국문, 중문, 영문)과 각 디자인을 개발함 	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 트렌드와 소비자의 소비 경향 파악 위해 내부환경 및 외부환경 조사 - 제품의 특성에 어울리는 브랜드명, 디자인 개발 (국문, 영문, 중문) - 현대인들의 수요에 맞는 제품용기 개발 및 패키지 디자인, 캐릭터 디자인 완성 - 국문 브랜드명 지식재산권 출원 - 기능성표시 광고 심의를 통한 문구 적용

	<ul style="list-style-type: none"> - 용기 개발 및 패키지 디자인, 캐릭터 디자인 개발함 	
<p>6. 시제품 장기능개선 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품 변할시간 분말형과 액상형의 rat를 이용한 변비개선(식이량, 음수량, 변 개수, 변 중량, 변의 수분함량, 장 이동 거리, 대장관내 점액질의 분비효과) 효능평가를 실시함 - 투여량은 설정된 일일섭취량 분말형 2.5g, 음료형 100ml에 맞추어 중간 안전계수 약 1/10을 삽입하여 최종 분말형 250mg/kg, 음료형 10mg/kg를 투여함 	<ul style="list-style-type: none"> - 실험동물은 발효형태별 비교는 SD rat 4주령 수컷 이용 - 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암 조건에서 사육 - 구입 후 1주일 동안 순화, 각 군당 4마리 - 정상대조군, loperamide투여군, 양성대조군, 변할시간 분말형 (250mg/kg), 변할시간 액상형 (10mg/kg) - 정상대조군 제외하고 loperamide 4일간 12시간씩 피하투여하여 변비 유발 - 시료는 loperamide 투여 30분 후 투여 - 시제품별 변비개선활성 종합평가 실시
<p>7. 완제품 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 12개 건강기능식품 제형 중 2개의 제형을 선택함 - 주원료는 ‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 원료를 참고하여 선택함 - 주원료 및 제형을 바탕으로 핵심원료 결명자발효분말과 부형원료를 설정하고 자체 평가를 통해 최종 혼합비를 설정함 - 건강기능식품 생산을 위해 국내 GMP인증 중, 위탁생산 기관을 선택함 - 분말형은 스틱포장으로 4,000set, 음료형은 스파우트파우치로 1,500set 위탁 생산함 	<ul style="list-style-type: none"> - 주원료는 ①일일섭취량당 단가가 저렴하며 ②섭취량이 비교적 적고 ③제형 설정이 용이한 원료로 최종 선택 - 부형원료는 결명자발효분말을 포함하고 ①가격이 저렴하며 ②부작용이 거의 없고 ③소비자들이 비선호하지 않는 원료들로 추가 선정 - 혼합비는 ①제형별 ‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’ 주원료의 함량 ②제형별 결명자발효분말의 혼합비 설정 ③맛과 향의 밸런스 조절 ④가급적 적은 당류 첨가를 바탕으로 설정 - 국내 GMP인증기관 225개(2016.12.31.일 기준) 중, 결명자발효분말을 혼합하여 충전 및 생산이 가능한 업체를 1차 선별하고 시제품 생산 테스트를 통해 제형별 위탁생산 기관을 최종 선택 - 분말형 4,000set(30포/set, 2.5g/포)와 음료형 1,500set(30포/set, 100ml/포) 생산
<p>8. 완제품의 품질검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 변할시간 분말형은 열량 및 9대 영양성분과 주원료 함량, 성상, 대장균 수, 이물, 수분 함량을 위탁제조업체에서 자가품질 및 한국바이오분석연구원을 통해 확인함 - 변할시간 분말형은 열량 및 5대 영양성분 주원료 함량, 성상, 대장균 수, 세균수를 한국기능식품연구원을 통해 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> - 변할시간 분말형 : 열량, 탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨, 프로바이오틱스 수, 성상, 대장균, 이물, 수분 확인 - 변할시간 음료형 : 열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 나트륨, 당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당), 난소화성말토덱스트린(식이섬유), 성상, 대장균, 세균수 확인

<p>9. 판매마케팅 및 수출계약 체결</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 판매를 위한 영업신고 및 등록함 - 국내 온라인 및 오프라인 홍보 및 마케팅을 진행 중임 - 국내 온라인 및 오프라인 판매를 진행 중임 - 국제 식품박람회 (홍콩, 러시아 모스크바, 중국 산시성) 참가를 통해 홍보 및 마케팅을 진행하고 수출계약 체결함 	<ul style="list-style-type: none"> - 변할시간 브랜드 전용 홈페이지(http://c-time.co.kr)와 공식인스타그램(https://www.instagram.com/ctime_official) 운영을 통해 온라인 홍보 및 마케팅 진행 중 - 2017 대한민국식품대전, 한국종합격투기(TFC)경기 중 변할시간 로고 노출, 해남 자연농업영농조합법인 지역 판매처를 통해 오프라인 홍보 및 마케팅 진행 중 - 국내 변할시간 전용 홈페이지 및 NSmall, GSshop을 통해 온라인 판매 진행 중 - 자사 기 구축된 지역 판매처 및 소비자들을 통한 오프라인 판매 진행 중 - 국내 ‘하리헤드쿼터스’와 판매계약 체결 - 2017 국제 식품박람회(홍콩, 러시아 모스크바, 중국 산시성) 참가를 통해 러시아 “VENDING RU LTD” 중국 “산서태원 시백세식품유한공사”와 수출계약 체결
<p>10. 중국 수입건강 기능성식품 개별 인증 보건 대행 계약 체결</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 장기능개선과 같은 기능성 식품은 건강기능식품으로 분류되어 식품의약품안전처의 인증을 받아야 되는 것과 같이 중국은 보건식품 CFDA에 등록되어야 함 - 장기능개선 항목과 유사한 중국 내 보건기능은 변통(쾌변 기능식품)임 	<ul style="list-style-type: none"> - 중국 내 검사와 번역공증, 대행을 위해 KTR-China(Shanghai)와 계약 체결
<p>11. 장기능개선 발효물 및 시제품의 변비개선 및 생리활성 규명 논문 투고</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 논문 투고함 	<ul style="list-style-type: none"> - 한국약용작물학회에 논문 투고(KCI급)

3-6. 세부연구수행 결과

□ 1차년도 세부연구수행 결과 요약

○ 추출방법 설정

결명자, 하수오 원료의 추출방법을 설정하기 위하여 문헌조사 결과 100% 에탄올 보다는 70%와 50% 에탄올 추출물이, 가열추출 보다는 상온추출이, 통결명자 보다는 2~4절, 10~40mesh정도로 처리한 결명자가 추출 수율에서 효율이 더 높은 것으로 확인되어 50% 에탄올을 이용하여 추출하였다.

○ 우수 균주 선발

발효력이 우수한 균주를 선발하기 위하여 종이 다르고, 당 분해 효소활성이 우수하며, 균 성장이 비교적 빠르고, 호기적 배양이 가능하며, 식품으로 사용이 가능한 최적 균주를 선발하기 위한 실험을 토대로 MJ203(*Pediococcus pentosaceus*), MJ213(*Lactobacillus casei*), MJ222(*Lactobacillus plantarum*), MJ90(*Lactobacillus kefir*), MJ92(*Lactobacillus pentosus*)를 최종적으로 선별하였고 이들을 각각 K1, K2, K3, MJ90, MJ92로 다시 명명하였다.

○ 발효기술 개발

선별된 균주의 최적 발효기술을 개발하기 위하여 시료농도, 수분함량, 균 접종량을 확인하고 시료형태별, 영양 조건별, 배지별 발효효과를 비교하여 최적 발효기술을 설정하였다.

○ 장 개선 기능성 검증

동물실험을 토대로 발효 전·후 결명자, 하수오의 장기능개선 효능을 평가한 결과, 발효전 결명자에서 농도의존적으로 장기능개선 효능이 나타났고, 선발된 5가지 균주로 발효한 후에는 그 기능성이 더욱 증가된 것으로 나타났다. 그중에서도 K2 균주로 발효한 시료에서 변의 개수, 수분함량, 장 이동거리 등이 가장 우수하였고, 하수오 시료 또한 K2 균주로 실험을 수행한 결과, 농도의존적으로 장기능 개선 효능이 나타났다.

○ 유효성분 분리

유효성분을 분리하여 시험법 밸리데이션 및 품질관리 지표물질로 설정하고 발효 전·후 성분 모니터링에 이용하고자 결명자에서 12개의 anthraquinone 유도체와 그 배당체 화합물을 분리·구조 동정하였으며 하수오에서는 1개의 지표물질을 분리하였다.

○ 발효 전·후 성분 모니터링

결명자의 발효 전·후에 대한 성분 변화를 확인하기 위하여 5개의 균주(K1, K2, K3, C1, Y)를 이용한 발효물을 통해 분리된 성분을 이용하여 배당체의 함량 변화를 확인하

였다. 하지만 K1, K3, C1, Y 균주들의 경우는 배당체가 감소하는 만큼 aglycon이 증가할 것으로 예상하였으나, 그 함량이 일정하거나 함께 감소하는 현상을 보였다. 반대로 K2 발효물의 경우, 배당체와 aglycon의 변화량이 크지는 않지만, 배당체의 함량이 줄어드는 만큼 aglycon의 함량이 증가하는 현상을 확인하였다. 하수오도 마찬가지로 발효시 분리된 성분이 감소됨을 확인하였다.

□ 2차년도 세부연구수행 결과 요약

○ 결명자와 하수오 2종 소재의 최적 배합비 설정

결명자와 하수오의 anthraquinone계 화합물 함량 비교와 g당 단가 비교를 통한 경제성 비교를 종합하여 결명자 대비 하수오의 1)낮은 변비개선 효능, 2)10배 높은 단가, 3)이엽우피소 파동에 따른 추가 분석 필요와 수급 어려움과 같은 문제들로 인해 하수오를 미첨가한 결명자 100% 사용을 결정하였다. 또한, 주정추출물의 볶음분쇄물 대비 1)182~211배 높은 제작 비용과 2)에탄올 화기취급사용에 따른 화재 위험 및 취급 주의, 3)에탄올 필수 회수에 따른 막대한 비용 추가와 같은 문제들로 인해 주정추출물 사용이 아닌 결명자 단순분쇄물이나 볶음분쇄물로 대체하였다.

○ 결명자 분쇄물의 최적 발효기술 개발

최적 발효기술 개발을 통한 결명자분쇄물의 최적 발효조건은 시료량 3%, 발효균주 *Lactobacillus casei* K2, seed 접종량 3%, 사균, glucose 미첨가, 24시간배양이다.

○ 발효물의 대량생산기술 확립

10L Jar fermentor와 300L 발효조에서의 scale up에 따른 최적 aeration은 2L/min이다.

○ 발효물의 식품 제형 및 부형원료 설정

일반식품에서 사용할 수 있는 제형 중, 섭취가 용이하며 식감이 우수한 과립제형과 공정이 간단하여 제작기간이 비교적 짧고 원가 절감이 우수한 분말제형, 총 2종을 선정하였다. 부형원료는 관능평가를 통해 난소화성말토덱스트린 55%, 차전자피분말 8.33%, 치커리추출물분말 8.33%, 볶음쌀분말 8.33%, 프락토올리고당 7%, 혼합유당 3.34%를 첨가하였다.

○ 발효물의 장기능개선 유효성 평가

결명자 50%에탄올 추출물과 Methylene Chloride분획물을 비교 평가하여 실험한 결과 분획물에서 변비개선활성을 증가시키는 것을 확인하였고, 이후 결명자 추출물보다는 분쇄한 것이 더욱 더 변비개선활성을 증진시켰다. 이 후에 결명자는 일반적으로 볶아서 차로 음용하기 때문에 볶음 분쇄 결명자와 분쇄 결명자 간의 변비개선실험을 수행하였으나 큰 차이가 없어 비교적 널리 쓰이며 안정도가 높은 볶음 분쇄 결명자로 추후

실험하였다. 1차년도에 효과가 있었던 K2 균주로 발효시간에 따라 처리를 한 결과 24 시간 발효균에서 효과가 우수하였다.

○ 발효물에 대한 안전성 평가: 단회투여독성평가 - 자체진행 및 위탁진행

자체진행 결과, 투여 후 14일 동안 암수 1,500 및 3,000mg/kg 시험물질 투여군에서 사망사례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

외부위탁 진행 결과, 투여 후 14일 동안 암수 500, 1,000, 2,000mg/kg 시험물질 투여군에서 사망사례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

이상으로 발효결명자를 랫트에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 각 3,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

○ 품질관리 지표설정 및 시험법 밸리데이션

발효결명자를 이용해 제조된 시제품을 통해 식약처의 시험방법 가이드라인을 토대로 HPLC와 LC/MS를 이용해 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계 등의 실험을 진행하였으며, 발효결명자의 지표성분에 대한 최적의 분석조건을 개발하였다.

○ 시제품 생산

과립과 분말 2종의 제형을 3g 스틱포장으로 하여 시제품을 약 2,000포씩 생산하였다. 그리고 기술개발 핵심원료인 결명자발효분말과 시제품 2종, 총 3종에 대한 품목제조보고를 진행하였으며 핵심원료 결명자발효분말과 스틱 시제품에 대한 10대 영양성분 분석(열량, 탄수화물, 조단백질, 식이섬유, 나트륨, 당류, 포화지방산, 트랜스지방, 콜레스테롤)을 진행하였다.

□ 3차년도 세부연구수행 결과 요약

○ 원재료 결명자의 품질검사

결명자의 수분함량은 2.2%이며 중금속 납, 비소, 수은에 대한 분석결과는 불검출, 카드뮴은 0.05mg/kg(=0.05 μ g/g)로 일일섭취량 3.0 μ g 이하임을 확인하였다. 더불어 잔류농약 엔드린, 디엘드린, 알드린, 비에치시, 디디티, 엔도설판 모두 불검출이며 기타 이산화황, 총아플라톡신(B1, B2, G1, G2의 합)도 불검출임을 확인하였다.

○ 결명자발효분말의 제조공정 표준화 확립

단가 경쟁력 상승을 위해 기존 액상발효에서 고체발효로 원료 발효형태를 변화하여 원가를 기존대비 21.15%로 절감하였다. 발효형태 변화에 따른 시험법 및 시험법밸리데

이선을 재설정 하였으며 핵심공정별 지표성분 함량 변화 및 수율 확인을 통해 제조공정을 확립하였다.

○ 고체발효한 결명자발효분말의 장기능개선 유효성 및 이중간 장 이동거리 유효성 평가 비교

SD rat에서 고체발효한 결명자발효분말의 효능이 기존 액체발효대비 변 개수 약 74.3%, 변 중량 약 89.9%, 변 수분함량 약 91.4%, 장 이동거리 약 94.4% 효과를 나타냄을 확인하였다. SD rat와 mice 이중간 장 이동거리 효능은 거의 동일한 것으로 확인되어 유효성 평가 신뢰성을 확보하였다.

○ 시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구

고체발효한 결명자발효분말에 대한 보존료(소르빈산, 안식향산, 데히드로초산, 파라옥시안식향산, 프로피온산)와 **벤조피렌은 모두 불검출**임을 확인하였다. 시제품의 봉해시험은 제품이 정제와 캡슐제에 해당하지 않기 때문에, α -아밀라아제와 프로테아제는 효소식품에 해당되지 않기 때문에 진행하지 않았다. 시제품의 유통기한설정시험은 식품의약품안전처 고시 제2014-206호 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준” III. 1. 다항에 적용되어 생략하였다.

○ BI&CI, 디자인 개발

BI와 CI를 통합한 브랜드명과 슬로건을 국문, 영문, 중문으로 개발하였다. 국문은 ‘변할시간’으로 슬로건은 분말형 ‘하루에 한 번 UP!’, 음료형 ‘산뜻하게 하루에 한 번’으로 제형별 다르게 설정하였다. 영문은 Change Time의 약자인 ‘C-Time’, 중문은 시원한 시간, 활가분한 시간 등으로 직역이 가능한 ‘舒畅时间’으로 최종 선택하였다. 디자인의 색상은 전체적으로 산뜻한 파란색과 흰색을 바탕으로 하고 음료형은 사과향에 어울리는 색상으로 선택하였다. 글씨체는 왼쪽으로 기울어지는 디자인으로 선택하고 날씬한 여성이 삽입된 이미지로 변비개선 이미지를 부각시켰다. 추가 결명자에 어울리는 캐릭터를 개발하였고 ‘변할시간’을 상표 지식재산권 출원하였다. 추가로 건강기능식품 기능성표시·광고 심의를 통한 삽입 문구를 최종 확정하여 디자인 개발을 완료하였다.

○ 시제품의 장기능개선 유효성 평가

시제품 2종(분말형, 음료형)의 높은 장기능개선 효능을 확인하였으며 특징적으로 음료형이 분말형에 비해 4가지 항목 모두에서 보다 우수함을 확인하였다.

○ 완제품 생산

장기능개선 제품의 특성상 일반식품은 홍보 및 마케팅의 한계(과장광고)가 있기 때문

에 건강기능식품으로 유형을 변경(배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음)하여 진행하였다. 제형은 기존 분말 및 과립 제형에서 과립 제형을 제외하고 분말, 음료 제형으로 변경하였다. 각 제형별 특성에 맞추어 주원료를 고시형원료로 설정(음료형-난소화성말토덱스트린, 분말형-프로바이오틱스)하고 핵심원료 결명자발효분말과 부형원료들을 첨가하여 스틱 분말형 완제품 4,000set(30포/set, 2.5g/포)와 스파우트파우치 음료형 1,500set(30포/box, 100ml/포), 2종을 위탁생산하였다.

○ 완제품의 품질검사

분말형 100g에 대한 9대 영양성분은 열량 409.65Kcal, 탄수화물 73.12%, 당류 21.81g/100g, 조단백질 13.79%, 조지방 6.89%, 포화지방 2.18g/100g, 트랜스지방 0g/100g, 콜레스테롤 5.38mg/100g, 나트륨 22.54mg/100g(2.5g/포 환산 시, 열량 10Kcal, 탄수화물 2g, 당류 1g, 단백질 0g, 지방 0g, 포화지방 0mg, 트랜스지방 0mg, 콜레스테롤 0mg, 나트륨 1mg)이며 주원료 프로바이오틱스는 260억CFU/2.5g, 이물은 불검출, 대장균군은 음성, 수분은 4.78%로 모두 적합임을 확인하였다. 음료형 100ml에 대한 영양성분은 열량 30Kcal, 당류 3g, 단백질 0g, 지방 0g, 나트륨 4mg이며 주원료 난소화성말토덱스트린(식이섬유)은 표시량의 112%, 대장균군은 음성, 세균수는 0CFU/ml로 모두 적합임을 확인하였다.

○ 판매 마케팅, 수출계약 체결

국내 판매를 위해 온라인으로는 변할시간 브랜드 전용 홈페이지 <http://c-time.co.kr>를 제작하여 운영 중이며 추가 변할시간 공식인스타그램을 통한 홍보 및 마케팅, 한국종합격투기(TFC) 경기 중 변할시간 로고를 경기장 바닥과 라운드걸에게 노출하는 방법 등으로 온라인 판매 마케팅을 진행하고 있다. 오프라인으로는 2017 대한민국식품대전 참가를 통한 홍보 및 마케팅, 기 구축된 본사 지역 판매처를 통한 판매 마케팅을 진행하고 있으며 추후 약국과 방문판매를 기획하고 있다. 판매는 변할시간 전용 홈페이지와 NSmall, GSshop과 같은 대형 쇼핑몰을 통한 온라인 판매와 기 구축된 지역 판매처와 소비자들을 통한 오프라인 판매가 진행되고 있다.

국외 판매를 위해 국제식품박람회 3회(2017 홍콩식품박람회, 2017 러시아 모스크바 국제 식품박람회, 2017 중국 산시성 특색농산품교역 박람회) 참석하여 결명자발효분말과 변할시간 분말형, 분말시간 음료형에 대한 제품 홍보 및 마케팅을 진행하였다. 이를 통해 러시아 VENDING RU LTD와 변할시간 분말형 제품에 대한 수출계약을 체결하였고 중국 산서태원시백세식품유한공사와는 주원료 결명자발효분말과 변할시간 분말형, 변할시간 음료형에 대한 수출계약을 체결하였다.

○ 중국 수입건강식품 인증 보건 대행 계약

핵심원료 결명자발효분말의 중국 보건기능 중 변통(쾌변 기능식품)을 인증받기 위한 중국 CFDA 인증 보건 대행 계약을 KTR-China(shanghai)와 진행하였다.

- 1차년도 (2014.12.19.~2015.12.18.)

I-1. 결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정

1-1. 문헌검색 및 성분 스크리닝

결명자의 장기능 개선 효과에 대한 효율적인 성분 추출방법을 위해 문헌검색을 진행하였다. 먼저 농림부 보고서(하태열 외 8명, 결명자의 유효성분을 활용한 고부가가치 가공제품화 기술개발, 최종연구보고서, 농림부, 2002)에 따르면 100% 에탄올 보다는 70%, 와 50% 에탄올 추출물이, 가열추출 보다는 상온추출이, 그리고 통결명자 보다는 2~4절, 10~40mesh정도로 처리한 결명자가 추출 수율에서 효율이 더 높은 것으로 보고되었다. 또한 기존에 발표된 논문(Hong KH, Choi WH, Ahn J, Jung CH and Ha TY., Physicochemical Properties of Ethanol Extracts and Dietary Fiber from *Cassia tora* L. Seed., Korean J. Food & Nutr, 25: 612-619, 2012)¹⁷⁾에서도 역시 100% 에탄올< 70% 에탄올< 50% 에탄올의 순으로 수율이 확인되었으며, 분쇄도에 따라서도 통결명자< 2~4절 절단 결명자< 40mesh분쇄 결명자의 순으로 수율의 차이가 나타났으며 역시 상온에서의 추출이 가열보다 수율이 더 높은 것을 확인하였다.

Table 2-4. The contents of soluble solid in *Cassia tora* extract

추출조건	고형분량(%)	추출조건	고형분량(%)
24시간 상온 추출		2시간 가열 추출	
100% EtOH 통결명자	0.008	100% EtOH 통결명자	0.100
100% EtOH 2-4절	3.952	100% EtOH 2-4절	6.900
100% EtOH 10mesh	4.608	-	-
100% EtOH 40mesh	4.364	100% EtOH 40mesh	7.512
70% EtOH 통결명자	0.172	70% EtOH 통결명자	3.696
70% EtOH 2-4절	9.280	70% EtOH 2-4절	8.280
70% EtOH 10mesh	8.464	-	-
70% EtOH 40mesh	11.28	70% EtOH 40mesh	10.68
50% EtOH 통결명자	1.488	50% EtOH 통결명자	7.608
50% EtOH 2-4절	8.272	50% EtOH 2-4절	7.956
50% EtOH 10mesh	9.040	-	-
50% EtOH 40mesh	12.54	50% EtOH 40mesh	7.728

Table 2. Comparison of the content of soluble solid of *Cassia tora* seed extract

Conditions	Soluble solid(%)		
	Room temp. (24 hr)	Heating (2 hr)	
100% EtOH	Whole	0.0	0.1
	Cut	4.0	6.9
	Grind	4.4	7.5
70% EtOH	Whole	0.2	3.7
	Cut	9.3	8.3
	Grind	11.3	10.7
50% EtOH	Whole	1.5	7.6
	Cut	8.3	8.0
	Grind	12.5	7.7

Fig. I-1. Content datas of *Cassia tora* L. extract from recorded in the previous literature.

1-2. 추출용매 선정 및 추출방법 연구

문헌상으로는 상온에서의 냉침이 열을 이용한 온침보다 수율이 높은 것으로 나타나 있지만, 가열추출의 경우 2시간의 짧은 시간 동안 추출을 하였고, 상온추출의 경우 24시간동안 추출을 하여 시간에 따른 영향이 크기 때문에 짧은 시간동안 효율적인 수율을 얻기 위해 3시간씩 3번 이상 추출을 진행 하는 것이 높은 수율을 얻을 수 있다고 판단하였다.

I. 재료 및 방법

제공받은 결명자 50kg을 50% 에탄올을 이용해 추출기에 넣은 뒤 80℃에서 4시간씩 3번 추출하였다. 용액상태의 추출물은 다시 감압농축기를 이용해 에탄올을 제거한 뒤

동결건조기를 이용해 수분을 제거하여 고체상태의 추출물 4kg을 얻었다.

II. 결과 및 고찰

기존의 문헌을 바탕으로 결명자를 추출 및 농축하였으며, 7.7%의 수율을 확인하였다. 이렇게 얻은 추출물을 LC/MS를 통해 스크리닝 하였으며, 다양한 2차대사산물이 함유되어있음을 확인하였다.

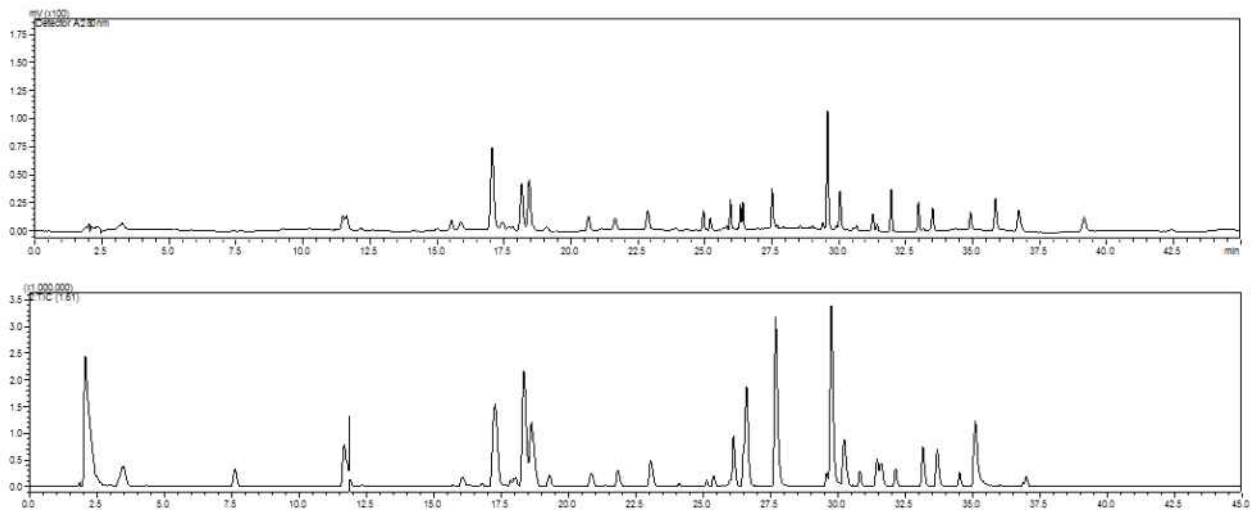


Fig. 1-2. LC and MS chromatogram from extraction of *Cassia tora* L. Seeds

I-2. 발효력이 우수한 유산균 선별

I. 재료 및 방법

1) 20종 유산균 분리 및 동정

유산균을 분리하기 위하여 판매하거나 집에서 직접 담근 김치류(배추김치, 열무김치, 깍두기, 갓김치 등)와 장류(된장, 고추장, 간장 등)를 전라남도 해남, 목포, 곡성, 장흥에서 수집하였다. 수집한 시료를 1% CaCO₃이 함유된 MRS평판 배지 상에 도말하여 투명한 생성능이 있는 유산균만 선별하여 분리하였다. 분리된 유산균은 Lactobacilli MRS 배지(이하 MRS 배지, 55g/L, Enzymatic digest of animal tissue 10g, Beef extract 10g, Yeast extract 5g, Dextrose 20g, Sodium acetate 5g, Polysorbate80 1g, Disodium phosphate 2g, Ammonium citrate 2g, Magnesium sulfate 0.1g, Manganese sulfate 0.05g, Acumedia)에서 37°C, 24~48시간동안 혐기적조건으로 배양하였고 agar는 정치배양, broth는 150rpm 진탕배양 하였다.

(1) 16s rRNA sequencing

27F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), 1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT) primer를 이용하여 양방향으로 미생물 동정하였다. 16s rRNA 유전자의 염기 서열은 Big Dye™

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA) 분석 키트와 ABI PRISM 3730xl DNA Analyzer (50cm capillary) 분석기기를 사용하여 (주)솔젠타 (Daejeon, Korea)에서 실시하였다. 제공된 염기서열을 이용하여 NCBI에서 블라스트 검색을 실시하였으며, MEGA 6.0 프로그램을 사용하여 Neighbor joining 방법으로 계통도를 조사하였다.

(2) API 50 CHL

API 50 CHL 분석을 통한 Lactobacillus의 동정 및 분리된 유산균의 49가지 탄수화물에 대한 발효 여부를 확인하였다. API kit는 biomérieux(France)사의 50CH+50CHL medium 을 사용하였고 API 50CHL medium 조성은 다음 Table 1-1.과 같다.

Table 1-1. Component of API 50 CHL medium.

Polypeptone (bovine/porcine origin)	10g
Yeast extract	5g
Tween 80	1ml
Dipotassium phosphate	2g
Sodium acetate	5g
Diammonium citrate	2g
Magnesium sulphate	0.20g
Manganese sulphate	0.05g
Bromocresol purple	0.17g
Demineralized water to make pH : 6.7-7.1	1000ml

균주는 유산균 전용배지인 MRS agar 배지에서 37°C, 24시간 동안 혐기적 배양하였다. 다음으로 배양된 유산균을 DENSIMAT나 spectrophotometer를 이용하여 탁도 2McFarland로 맞추고, 이를 API 50CHL medium에 부유하여 각각의 스트립 튜브에 각각 분주하였다. 다음으로 mineral oil을 첨가하여 37°C, 48시간 동안 혐기적 배양하고 결과를 Fig. 1-3과 같이 24시간, 48시간 나눠서 색상 변화로 양성, 음성 판독하였다.

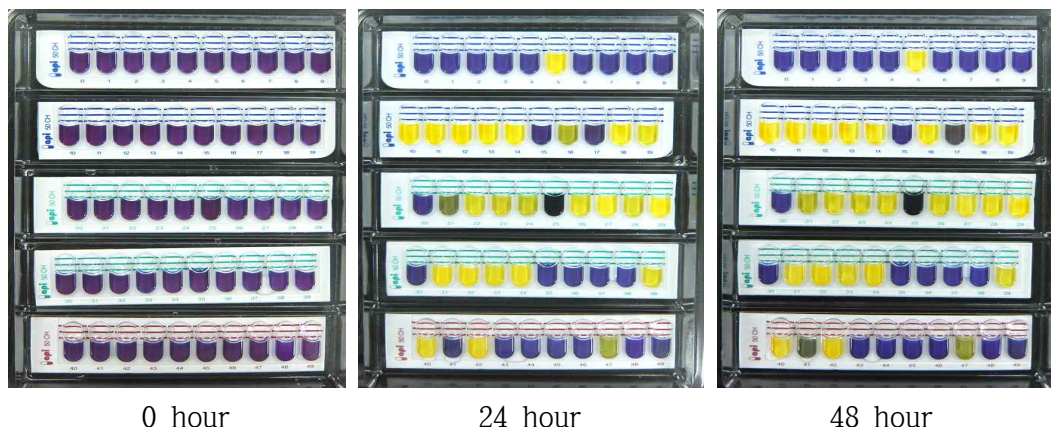


Fig. 1-3. Changes of the API assay activity at 24hr and 48hr.

사용된 49가지 탄수화물의 성분표는 Table I -2.와 같다.

Table I -2. Ingredient list of strip.

0 CONTROL	25 Esculin
1 Glycerol	26 Salicin
2 Erythritol	27 Cellobiose
3 D-Arabinose	28 Maltose
4 L-Arabinose	29 Lactose
5 Ribose D-Ribose	30 Melibiose
6 D-Xylose	31 Sucrose
7 L-Xylose	32 Trehalose
8 Adonitol	33 Inulin
9 Methyl-BD-Xylopyranoside	34 Melezitose
10 D-Galactose	35 Raffinose
11 D-Glucose	36 Starch
12 D-Fructose	37 Glycogen
13 D-Mannose	38 Xylitol
14 L-Sorbose	39 Gentiobiose
15 Rhamnose	40 D-Turanose
16 Dulcitol	41 D-Lyzose
17 Inositol	42 D-Tagatose
18 Manitol	43 D-Fucose
19 Sorbitol	44 L-Fucose
20 α -methyl-D-Mannoside	45 D-Arabitol
21 α -Methyl-D-Glucoside	46 L-Arabitol
22 N-Acethyl-Glucosamine	47 Gluconate
23 Amygdalin	48 2-keto-Gluconate
24 Arbutin	49 5-keto-Gluconate

2) 20종 유산균 특성 분석

(1) β -glucosidase activity assay

발효 최적 균주 선별을 위한 20종의 균주 특성 분석을 위해 β -glucosidase activity assay kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 순수 분리된 미생물의 β -glucosidase 활성을 비교하였다. 균주는 MRS broth에서 37°C, 150rpm, 24시간 동안 혐기배양 하였고, 이를 96well plate 에 distilled water와 calibrator, sample, master reaction mix를 이용하여 다음과 같이 혼합하였다.

- 20uL D.W + 200uL water (A_{405})_{water}
- 20uL D.W + 200uL calibrator (A_{405})_{calibrator}
- 20uL sample + 200uL master reaction mix

Reagent	Volume
Assay Buffer	200uL
β -NPG Substrate	8uL

<Master reaction mix>

혼합된 96well plate를 405nm에서 흡광도를 측정하고 $(A_{405})_{initial}$, 37°C에서 20분간 incubation 한 후에 다시 405nm에서 흡광도를 측정하였다. $(A_{405})_{final}$
 β -glucosidase activity(units/L) 계산식은 다음과 같다.

$$= \frac{(A_{405})_{final} - (A_{405})_{initial}}{(A_{405})_{calibrator} - (A_{405})_{water}} \times 250 \text{ units/L}$$

(2) 저진공주사전자현미경(LV-SEM)

선별된 K1, K2, K3, MJ90 균주들의 표면 형상관찰을 위해 전남대학교 공동실험실습관에서 LV-SEM 사진을 촬영하였다.

전처리 과정은 전고정→washing→후고정→washing→탈수→건조로 진행되었다. 먼저 MRS broth에서 37°C, 24시간 혐기적 진탕배양한 배양액을 centrifuge로 원심분리하여 cell만 따로 수집하고, 수집된 cell에 glutaraldehyde와 paraformaldehyde를 2%(w/v)씩 mix하여 전고정한 후, 0.05M cacodylate buffer로 washing, 1% OsO₄로 후고정, 다시 0.05M cacodylate buffer로 washing하였다. 이 후, 50% EtOH→70% EtOH→90% EtOH→95% EtOH로 washing하고 다시 absolute ethanol로 2회 탈수하였다. 마지막으로 membrane filter로 여과 후 air 건조하였고, SEM 촬영은 JSM-IT300을 이용하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 20종 유산균의 분리 및 동정

(1) 16s rRNA 미생물 동정 결과

```
>MJ201 - Lactococcus lactis BIHB 331
AGAGTTTGTATCGTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGCGC
TGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAAT
CTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAAAACTTTAAA
CACAAGTTTTAAGTTTGAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGGTTGTATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGTCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACT
ACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCGGCCGCGTAATACGTAGGTCCCAGCGGTT
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTTATTAAGTCTGGTGAAAAGGCA
GTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTC
TCTGGCCTGTAACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGT
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAG
CTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCAAGTAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATACTCGTGCTATTCCCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAG
GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGC
```

AACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTTAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATT
CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
TCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGT
TGGGAGTACCCGAAGTAGGTTGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCCTAAGGTAAGACCGATG
ACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTACCCGT

>MJ203 - *Pediococcus pentosaceus* strain DSM 20336

AAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCG
TGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTTAACCT
CGCGGTCTCGGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGG
CATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACACCGGGCAGTCTCACTAGAGT
GCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACC
TCTAATCTCTTAGACTGTCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTCTTTCGCGTAGCTTCGA
ATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTTGTAGTTTCAACCTTG
CGGTCGTA TCCCAGGCGGATTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCC
TCCAACACTTAGTAATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCT
ACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTT
CTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCA
AGTCTCCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAA
AGACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCACTGGGTAAACAG
TACTCTTACCCACGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCACTC
ACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTACGTAT
CACTGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAGAAGT
GATAGCAGAGCCATCTTTTAAAAGAAAACCATGCGGTTTTCTCTGTTATACGGTATTAGCA
TCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCTACTTCTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCC
CCACTCACTTCGTGTTAAAATCTCAATCAGTACAAGTACGTCATAATCAATTAACGGAAGT

>MJ212 - *Leuconostoc mesenteroides* strain PT670

GTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAA
ACTTAGTGTGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGC
GGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGA
GAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAG
GGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTT
CGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTG
ACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGT
CCCGAGCGTTATCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTTATTAAGTCTGAT

GTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTAACTTGAGTGCAGTAG
AGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGG
CGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGC
CTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTC
TTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTTCAGATGGGCACTCTAG
CGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAG
CTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTT

>MJ213 - *Lactobacillus casei* ATCC 334 strain 334

CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAG
ATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGCTGAAAGATGGCGTAAGCTA
TCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG
AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG
CGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGG
GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAA
GCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAG
GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAG
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGA
GAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATT
TAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTG
CGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAAC
TCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCG

>MJ221 - *Pediococcus pentosaceus* strain ATCC 25745 strain ATCC 25745

AGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACC
TGGAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATG
GCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTC

ACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGG
AGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAC
GTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAT
TGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTG
AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGA
TGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATC
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCT
GACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAG
TTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGT
ACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGACT
GTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCA
AAGCCGGTGGGGTAACCTT

>MJ222 - *Lactobacillus plantarum* WCFS1 strain WCFS1

TTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAAC
ACCTGGAAACAGATGCTAATAACGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGA
TGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGC
TCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAG
AACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTG
CATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACG
CTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAA
CGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
TTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATAC
TATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATC
AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
GTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGA

TTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTgTAACACCC
AAAGTCGGtgGGGTAACCTT

>MJ231 - *Lactobacillus sakei* subsp. sakei 23K strain 23K

CCTCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG
GAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGA
GTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTC
GCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
TTTGACGTTCGTCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTA
AATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTC
TAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCGTAC
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACC
TAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATGCT
TTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATAT
ATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCA
GTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTG
CGTTCGCTTTACGCCAATAAATCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACTACCTGATCAGTTACTATCA
GATACATTTCTTCCAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCG
TTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT
GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTTCGGCTATGCATCACGGTCT
TGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAACTAATGCACCGCGGGTCCATCCTAAAGTGATAGCCG
AAACCATCTTTCAACCTACACCATGCGGTGTTAGGTTTTATGCGGTATTAGCATCTGTTT
CCAAATGTTATCCCCACTTTAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCA
CTCAAATGTTTATCAATCAGGAGCAAGCTCCTTCAATCTAAACGAGAGTGCGTTCGACT

>MJ232 - *Lactobacillus paracasei* strain NBRC 15889

AAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACT
GAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCATCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCT
CCGGTTTGTACCGGCAGTCTTACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA
CCACCTGTCATTTTGCCCCGAAGGGGAAACCTGATCTCTCAGGTGATCAAAGATGTCAA
GACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGC
GTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCATTCATCGTTTACGGCATG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAG
ACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACA

TGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCCTCGGTTA
AGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATC
CGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC
TGGTTGGATACCGTCACGCCGGCAACAGTTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACAACAGAG
TTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCCTCCATG
TGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGCTCAGTCCCAATGTGGC
CGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAG
CTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCATG
CGTTTCTTGGATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGC
AGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTCCATGT

>MJ241 - *Enterococcus faecalis* strain ATCC 19433

CGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGA
TTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGAT
TTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAG
GTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCCGGCAGTC
TCGCTAGAGTGCCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA
CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCC
CGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCG
CGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAG
TTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAG
GGCGGAAACCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCC
ACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTT
CTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCA
GACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTA
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGG
GACGTTACGTTACTAACGTCCCTTGTCTTCTTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACC
TTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCTACTGC
TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC
GGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCC
ATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGC
GGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACT
CACCCGTCCGCCACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGC

>MJ90 - *Lactobacillus kefir* strain KG-17

CCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCAGAGTAACTGTTG
ACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAG
GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGATCGGAAACCAGGAGACTTGAGT

GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG
ATGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGGCT
TCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACT
CTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGT
CAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
TTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTAC
ACACCGCCCGTCACACCA

>MJ91 - *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. kefirgranum strain DSM 10550

CCCGTGAGTGAaaaAGGTTTTTCGGACCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTgtcCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGAagaATAAGTCTGATGTGAAAGCCctcGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTT
TCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG
GAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCAT
GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGT
TGGGAGGCTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGA
GCGGAACCAGCAGAATCACTTCGGTGAGGACGCTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGT
AACACGTGGGGAACCTGCCCTTAAGTCTGGGATACCACTTGGAACAGGTGCTAATACCGG
ATAAGAAAGCAGTTCGCATGAACAGCTTTTAAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTAAAGGATG
GACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTACCAAGGCAGTGATGCATAGCCG
AGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
GTTTTTCGGACCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTA ACTGGCCTTTA
TTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAA
GAGGAGAGTAGAACTCCATGTGTAGCGG

>MJ92 - *Lactobacillus pentosus* strain 124-2

CTAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGT
ACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT
CATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACT
CTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACCAGAG

TGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAAC
GTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCG
AATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTT
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACC
CTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGC
TACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGT
TCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTC
AAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAA
AAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACA
GTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCAC
TCACGCGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGT
ATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAA
GTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTA
GCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCACCAGT
TCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACAATCAATACCAGAGT

>MJ93 - *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149

AAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACT
GAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCT
CCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC
CACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAG
ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCG
TTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAG
ACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACA
TGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTG
AGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATC
CGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC
TGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGA
GTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATT
GTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGG
CCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTA
GCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCAT
GCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGC
AGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGC

ACCAATCAATACCAGAGTTTCGT

>MJ94 - *Lactococcus garvieae* strain FAM395

ACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGACAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCA
TAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATTTGAAAGAAGCAATTGCTTCACTACTTGATGAT
CCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGGACTACCAAGGCGATGATACATAGCCGA
CCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTTAAGTAGAGTGGAAAATTACTT
AAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTCCCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTCCTTAAGT
CTGATGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCA
GGAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCG
GAGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGCTGTAGGGAGCTATA
AGTTCTCTGTAGCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCC
TTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTA
GTGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTG
CGTAATCTCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCGTACACCACGGAAGTTGGGAGTACCCAAAGTAGGTTGCCTAACCGCAAGGAGGGC
GCTTCCTAAGGTA

>MJ95 - *Lactobacillus plantarum* strain CIP 103151

GTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC
CCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAG
GCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGA
GTTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATG
ATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACAGAGTGCCCA
ACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAA
TCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAA
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCG
TACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAAC
ACTTAGCATTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCAT
ACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCA
TATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTC
CCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGC

CTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT
GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTC
TCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCG
GCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
TTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTACGTATCATTG
CCATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAG
CCGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTG
TTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCAC
TCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGT

>MJ96 - *Lactobacillus sakei* strain NBRC 15893

CCTCACC GGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG
GAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGA
GTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTC
GCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
TTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTA
AATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTC
TAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTAC
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACC
TAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATGCT
TTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATAT
ATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCA
GTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTG
CGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACTACCTGATCAGTTACTATCA
GATACATTCTTCTCCAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCG
TTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT
GGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTATGCATCACGGTCT
TGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAATAATGCACCGCGGGTCCATCCTAAAGTGATAGCCG
AAACCATCTTTCAACCTACACCATGCGGTGTTAGGTTTTATGCGGTATTAGCATCTGTTT
CCAAATGTTATCCCCACTTTAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCA
CTCAAATGTTTATCAATCAGGAGCAAGCTCCTTCAATCTAAACGAGAGTGCGTTCGACT

>MJ97 - *Lactobacillus brevis* ATCC 367 strain ATCC 367

GCTGACTCCCGAAGGTTATCTCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGC
GGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT
CCAACCTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGCTTTAAGAGATTA
GCTTAGCCTCACGACTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGT
CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTC
ACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGA

AGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGGCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT
AGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAACCTTGCGGTCGTA TCTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGC
GGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCAC
TGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCT
GCACTCAAGTCTCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGA
CTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTT
GAACAGTTACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTC
TTCACTCACGCGCATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGC
TACGTATCATCGTCTTGGTGGGCCTTACCTCACCAACTAACTAATACGCCGCGGGATCATC
CAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTCAAACAAAATCCATGCGGATTTTGTGTTATACGG
TATTAGCACCTGTTTCAAAGTGTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTCCCACGTGTTACTCA
CCAGTTCGCCACTCGCTTCATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGG

>MJ98 - *Lactobacillus paraplantarum* strain DSM 10667

CCCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG
GAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGA
GTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTC
GCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
TTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTT
AATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTC
TTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCAGCCGTTAC
TCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACT
TAGCATTATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATACT
TTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATAT
ATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCA
GTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCT
GCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGC
TGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTC
AGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGC
GTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTT
TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCC
ATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCC
GAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTT
TCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTGCCACTC
ACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACT

>MJ211 - *Lactobacillus paracasei* strain ATCC 25302

CCTAAAGGGTTACGCCACCGGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
TCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACCTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGA
CCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG
GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTACTAGA
GTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTTTGCCCCGAAGGGGA
AACCTGATCTCTCAGGTGATCAAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCT
TGCGGTGCTACTCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAAC
CCTCCAACACCTAGCATTTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCG
TACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGT
TCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTC
AAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCCTCGGTTAAGCCGAGGGCTTTCACATCAGACTTAAA
AAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGGCAACAG
TACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTC
ACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCCT
AGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCCGGCTACGTAT
CATCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGC
GATAGCTTACCCATCTTTCAGCCAAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTATGCGGTATTAGC
ATCTGTTTCCAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCACTCGTTCCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCAATCATCAACGAGAACTC

>MJ202 - *Lactococcus garvieae* strain CNM149_12

ACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGACAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCA
TAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATTTGAAAGAAGCAATTGCTTCACTACTTGATGAT
CCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGGACTACCAAGGCGATGATACATAGCCGA
CCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG
TTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTTAAGTAGAGTGGAAAATTACTT
AAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTCCCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT
CTGATGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCA
GGAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCG
GAGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGCTGTAGGGAGCTATA
AGTTCTCTGTAGCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCC
TTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG

TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTA
 GTGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTG
 CGCTAATCTCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTC
 GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
 CCGCCCGTACACCACGGAAGTTGGGAGTACCCAAAGTAGGTTGCCTAACCGCAAGGAGGGC
 GCTTCCTAAGGTA

(2) API 50CHL

미생물 동정결과는 16s rRNA sequencing 동정결과와 동일하였고 (Table 1-3.), API 분석 결과, 분리된 20종 유산균 모두에서 galactose(GAL, 10), glucose(GLU, 11), fructose(FRU, 12), mannose(MNE, 13)에 대한 분해 활성이 우수하였다. 또한, MJ201, 202, 212, 221, 231, 241, 94, 97 균주들은 maltose(MAL, 28), lactose(LAC, 29), sucrose(SAC, 31)에 대한 활성이 없거나 다른 균주들에 비해 50% 이상 약하거나 활성이 없음을 확인하였다(Table 1-4.).

Table 1-3. Identification and Food availability.

Name	Strain	Food availability*
MJ201	<i>Lactococcus lactis</i> BIBH 331	impossible
MJ202	<i>Lactococcus garvieae</i> strain CNM149_12	impossible
MJ203	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336	possible
MJ211	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain ATCC 25302	possible
MJ212	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain PT670	possible
MJ213	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 strain ATCC 334	possible
MJ221	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745 strain 25745	possible
MJ222	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 strain WCFS1	possible
MJ231	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. sakei 23K strain 23K	possible
MJ232	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain NBRC 15889	possible
MJ241	<i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC 19433	limited
MJ90	<i>Lactobacillus kefir</i> strain KG-17	possible
MJ91	<i>Lactobacillus kefir</i> subsp. kefirgranum strain DSM 10550	possible
MJ92	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain 124-2	possible
MJ93	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain JCM 1149	possible
MJ94	<i>Lactococcus garvieae</i> strain FAM395	impossible
MJ95	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CIP 103151	possible
MJ96	<i>Lactobacillus sakei</i> strain NBRC 15893	possible
MJ97	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367 strain ATCC 367	possible
MJ98	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> strain DSM 10667	possible

* Confirmed of Food availability - 식품안전정보포털 식품안전나라 (www.foodsafetykorea.go.kr)¹⁸⁾

Table I -4. 49 Carbohydrate enzyme activity of lactic acid bacteria in API 50CHL medium

Strain	Hour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		CTRL	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX
MJ201	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	△	-	-	-	-
MJ202	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ203	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ211	24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MJ212	24	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
MJ213	24	-	△	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	△	-	+	△	+	-	-	-	-
MJ221	24	-	-	-	-	+	+	△	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	△	-	-	-
MJ222	24	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MJ231	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ232	24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MJ241	24	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MJ90	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ91	24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	△	-	-	-	+	-	-	-	-
MJ92	24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	△	-	-	-	+	-	-	-	-
MJ93	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	△	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ94	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ95	24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	-	-	△	+	+	△	△	-	-
MJ96	24	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	48	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
MJ97	24	-	-	-	-	△	+	+	-	-	-
	48	-	-	-	-	△	+	+	-	-	-
MJ98	24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	48	-	△	-	-	-	+	-	-	-	-

Strain	Hour	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
		GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR
MJ201	24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	△	-
MJ202	24	+	+	+	+	-	△	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	△	-	-	-	-
MJ203	24	+	+	+	+	-	△	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	△	-	-	-	-
MJ211	24	+	+	+	+	+	-	△	-	+	+
	48	+	+	+	+	+	-	+	△	+	+
MJ212	24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MJ213	24	+	+	+	+	+	-	△	-	+	+
	48	+	+	+	+	+	-	+	△	+	+
MJ221	24	+	+	+	+	-	△	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	△	-	-	-	-
MJ222	24	+	+	+	+	-	△	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	-	△	-	-	+	+
MJ231	24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MJ232	24	+	+	+	+	+	-	+	△	+	+
	48	+	+	+	+	+	-	+	△	+	+
MJ241	24	+	+	+	+	-	△	-	△	+	+
	48	+	+	+	+	-	△	-	△	+	+
MJ90	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MJ91	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MJ92	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MJ93	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MJ94	24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MJ95	24	+	+	+	+	-	△	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	△	△	△	△	+	+
MJ96	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
MJ97	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
MJ98	24	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	48	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

Strain	Hour	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
		MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC
MJ201	24	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
	48	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
MJ202	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	△
	48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	△
MJ203	24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	△
	48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ211	24	-	△	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ212	24	-	△	+	+	+	+	+	+	+	△
	48	-	△	+	+	+	+	+	+	+	△
MJ213	24	-	△	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ221	24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	△
	48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	△
MJ222	24	△	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ231	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	△
MJ232	24	-	△	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ241	24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	△
	48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	△
MJ90	24	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
	48	-	△	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ91	24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ92	24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ93	24	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ94	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	△
MJ95	24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ96	24	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	48	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MJ97	24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	48	△	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MJ98	24	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Strain	Hour	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
		MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN
MJ201	24	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MJ202	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MJ203	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MJ211	24	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	48	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MJ212	24	+	+	+	-	-	△	-	-	-	+
	48	+	+	+	-	-	△	-	-	-	+
MJ213	24	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	48	-	+	+	+	+	-	-	-	-	△
MJ221	24	+	+	+	-	-	△	-	-	-	+
	48	+	+	+	-	-	△	-	-	-	+
MJ222	24	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
MJ231	24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	-	-	-	-	-	-	△
MJ232	24	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	48	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MJ241	24	-	△	+	-	+	-	△	-	-	+
	48	-	+	+	-	+	-	△	-	-	+
MJ90	24	+	+	+	-	+	+	-	-	-	△
	48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
MJ91	24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
MJ92	24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
MJ93	24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	+	+	+	-	+	+	-	-	-	△
MJ94	24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MJ95	24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MJ96	24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MJ97	24	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
MJ98	24	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
	48	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Strain	Hour	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
		TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
MJ201	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MJ202	24	-	-	+	-	-	-	-	△	△	-
	48	-	-	+	-	-	-	-	△	△	-
MJ203	24	-	-	+	-	-	-	-	△	△	-
	48	-	-	+	-	-	-	-	△	△	-
MJ211	24	+	-	+	-	-	-	-	△	-	-
	48	+	-	+	-	-	-	-	△	-	-
MJ212	24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	-	-	-	-	-	-	△	-	-
MJ213	24	+	-	+	-	-	-	-	△	-	-
	48	+	△	+	-	-	-	-	△	-	-
MJ221	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MJ222	24	+	-	-	-	-	-	-	△	-	-
	48	+	-	-	-	-	-	-	△	-	-
MJ231	24	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MJ232	24	+	-	+	-	-	-	-	△	-	-
	48	+	-	+	-	-	-	-	△	-	-
MJ241	24	-	-	+	-	-	-	-	△	-	-
	48	-	-	+	-	-	-	-	+	△	-
MJ90	24	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	48	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
MJ91	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-
MJ92	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-
MJ93	24	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	48	+	-	-	-	-	-	-	△	-	-
MJ94	24	-	-	-	-	-	-	-	△	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MJ95	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MJ96	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MJ97	24	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	48	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
MJ98	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	-	+	-	-	△	-	-	-	-

(3) Phylogenetic tree

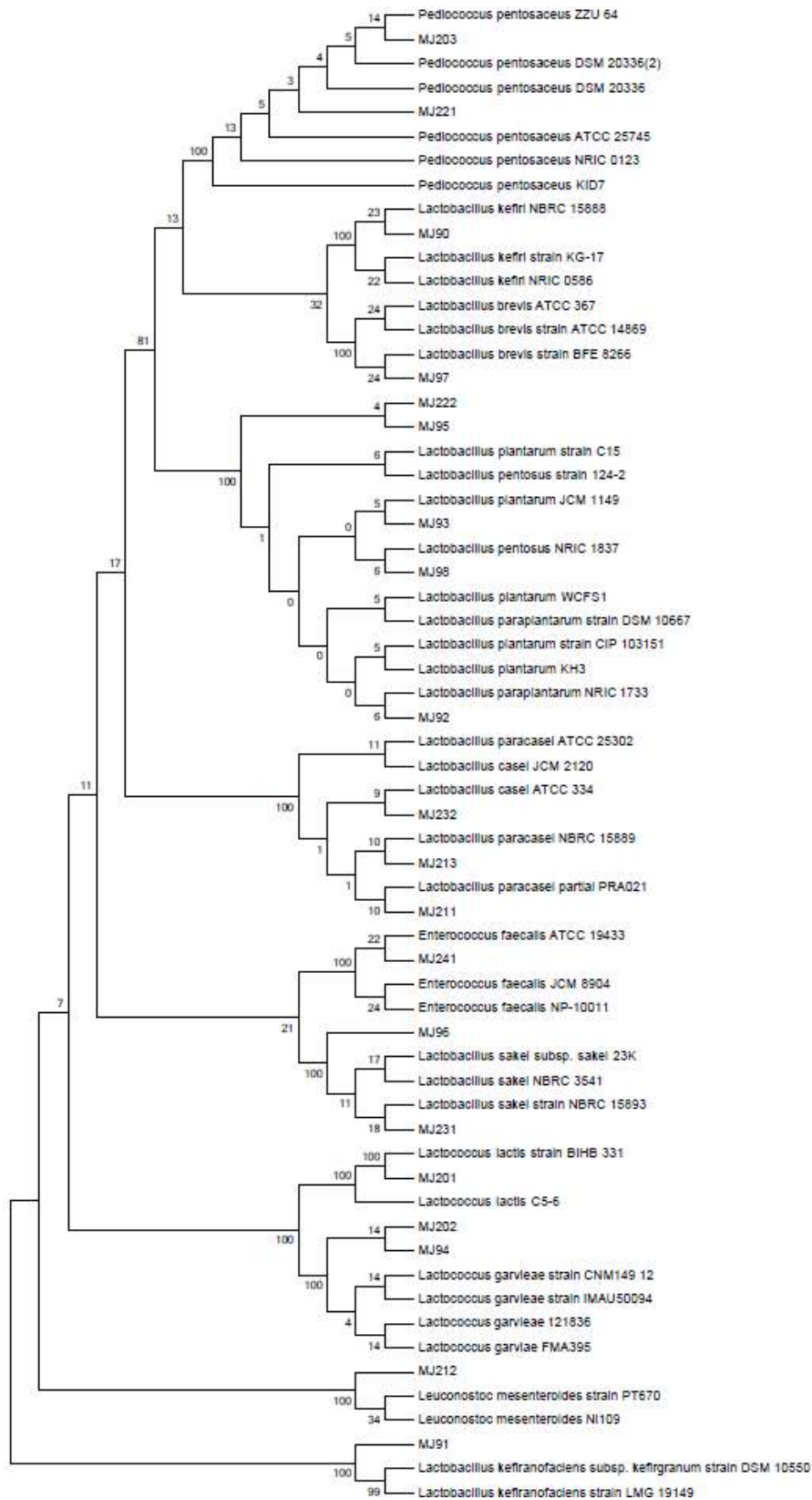


Fig. I-4. Phylogenetic tree of 16s rRNA from the isolated strain. The tree was constructed using the CLUSTAL X and the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are provided at branching points when >50%.

2) 특성 분석

(1) β -glucosidase activity

MRS broth에서 24시간 동안 배양된 20종 유산균의 β -glucosidase 활성비교 결과, MJ213 균주의 효소 활성이 가장 높았으며 다음으로 MJ222, MJ203, MJ90, MJ92 균주들의 활성이 높았다. 효소 활성이 가장 높은 MJ213 균주의 β -glucosidase 활성은 MJ92 균주에 비해 약 1.5배 높았다(Fig. 1-5).

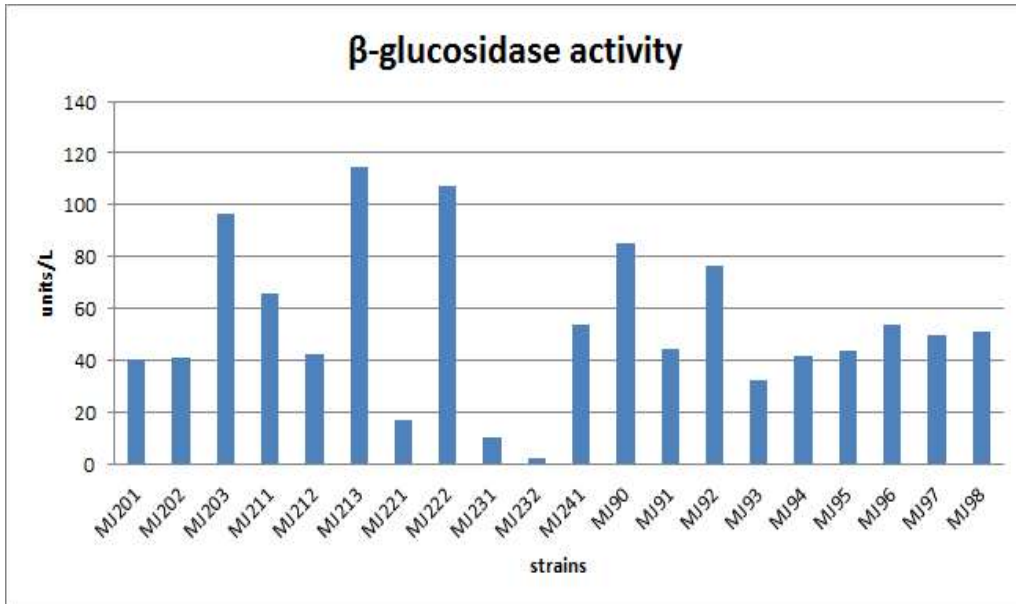


Fig. 1-5. Comparison of β -glucosidase activity.

(2) 유산균 5종 선별

분리된 20종 유산균의 동정 및 β -glucosidase 활성 등을 비교·분석한 결과,

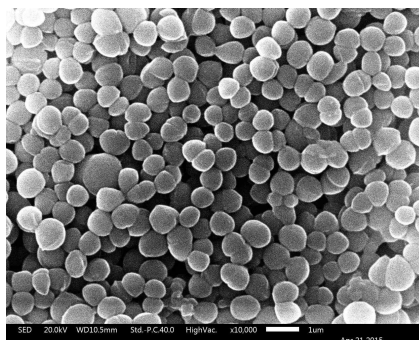
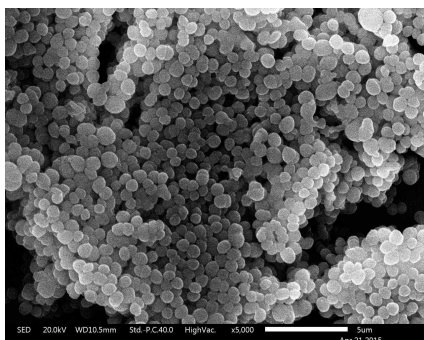
1. 종이 다르며
2. 효소활성이 우수하고
3. 균 성장이 비교적 빠르며
4. 호기적 배양이 가능하고
5. 식품으로 사용이 가능한

5가지 균주 MJ203(*Pediococcus pentosaceus*), MJ213(*Lactobacillus casei*), MJ222(*Lactobacillus plantarum*), MJ90(*Lactobacillus kefir*), MJ92(*Lactobacillus pentosus*)를 최종적으로 선별하였고, 이들을 각각 K1, K2, K3, MJ90, MJ92로 다시 명명하였다.

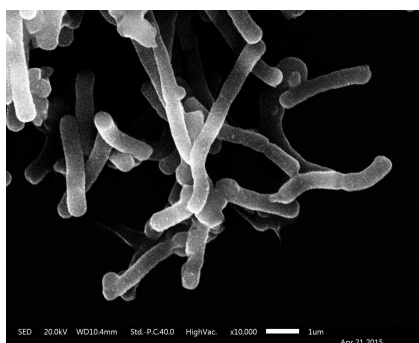
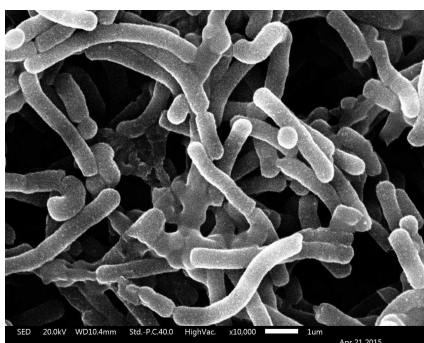
(3) 저진공주사전자현미경(LV-SEM)

LV-SEM 확인 결과, *Pediococcus*는 구균, *Lactobacillus*는 간균이고 각 균주별로 표면형상의 특징이 있어 차별성을 확인할 수 있었다(Fig. 1-6).

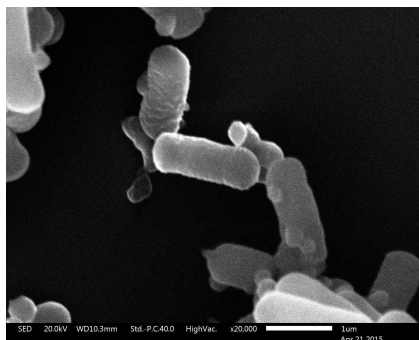
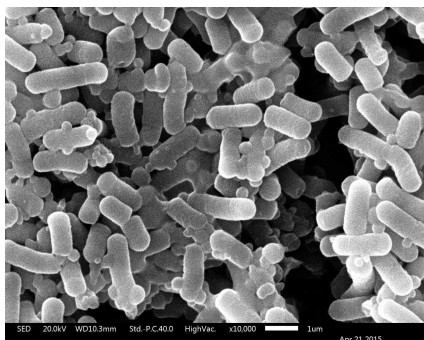
K1-*Pediococcus pentosaceus*



K2 - *Lactobacillus casei*



K3 - *Lactobacillus plantarum*



MJ90 - *Lactobacillus kefir*

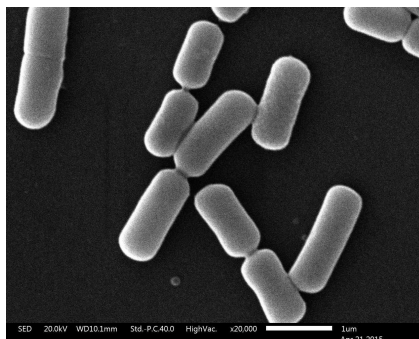
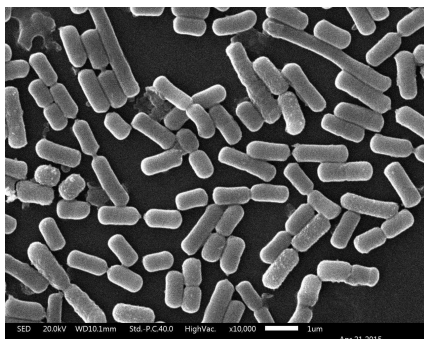


Fig. I -6. LV-SEM picture of the K1, K2, K3 and MJ90 strains.

I-3. 결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발

I. 재료 및 방법

1) 결명자

(1) 결명자 추출물, 분쇄물의 농도별 시료 제작

① 통결명자(고체시료)

통결명자 고체시료는 전남 해남에서 구매한 건조된 결명자 씨앗을 그대로 사용하였다. 시료는 3차 증류수 대비 1, 3, 5, 10, 20, 30%를 저울로 칭량하여 3차 증류수와 혼합하였고 이 후, 고압멸균기를 이용해 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

② 조분쇄(고체시료)

조분쇄 고체시료는 구매한 결명자 씨앗을 방앗간에서 분쇄한 후, 30mesh로 일정하게 걸러 사용하였다. 시료는 3차 증류수 대비 1, 3, 5, 10, 20, 30%를 저울로 칭량하여 3차 증류수와 혼합하였고 이 후, 고압멸균기를 이용해 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

③ 조분쇄(액체시료)

조분쇄 액체시료는 30mesh로 일정하게 걸러진 조분쇄를 3차 증류수 대비 1, 3, 5, 10, 20, 30%를 저울로 칭량하여 3차 증류수와 혼합하였고 이 후, 고압멸균기를 이용해 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

④ 주정추출물(액체시료)

주정추출물 액체시료는 한방산업진흥원에서 결명자 시료 대비 3배 볼륨의 50% EtOH를 이용해 70°C에서 3회 추출하였으며, 이를 감압농축한 후 다시 동결건조를 하여 제공한 것을 주정추출물로 액체시료로 이용하였다. 시료는 3차 증류수 대비 1, 3, 5, 10, 20, 30%를 저울로 칭량하여 3차 증류수와 혼합하였고 이 후, 고압멸균기를 이용해 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

(2) 발효조건 설정 - 시료농도, 수분함량, 배양시간, 균 접종량

시료의 농도는 수분함량 100% 대비 1, 3, 5, 10, 20, 30%로 설정하였고, 고체시료의 수분함량은 다시 40, 50, 60, 70, 80%로 설정하여 0일~4일간 균 성장을 확인하였다. 균 접종량은 MRS broth에서 37°C, 24시간동안 150rpm으로 혐기적 진탕배양한 균주를 seed로 하고 1, 2, 3, 4, 5% 접종하여 확인하였다.

(3) 발효조건에 따른 유산균 발효효과 평가

위의 설정된 발효조건에 따른 유산균 발효효과를 비교·확인하였다. 사용된 균주는 최종선별된 K1, K2, K3, MJ90, MJ92 균주를 이용하였고 발효 과정은 다음의 Fig. 1-7과 같다.



Fig. 1-7. Fermentation process.

(4) 조건별 최적의 발효조건 설정 - 시료형태별, 영양조건별, 배지별

(4)-1 시료 형태별 발효효과

① 생결명자(고체시료)

수분함량 50% 대비 생결명자 3%를 혼합하여 121°C에서 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후, 37°C, 150rpm에서 24시간 동안 혐기적 진탕배양한 seed를 3% 접종하여 37°C incubator에서 통성혐기적 조건으로 4일간 정치배양하였다.

② 조분쇄(고체시료)

30mesh로 일정하게 거른 조분쇄를 수분함량 50% 대비 3% 혼합하여 121°C에서 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후, 37°C, 150rpm에서 24시간 동안 혐기적 진탕배양한 seed를 3% 접종하여 37°C incubator에서 통성혐기적 조건으로 4일간 정치배양하였다.

③ 조분쇄(액체시료)

30mesh로 일정하게 거른 조분쇄를 3차 증류수 대비 3% 혼합하여 121°C에서 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후, 37°C, 150rpm에서 24시간 동안 혐기적 진탕배양한 seed를 3% 접종하여 37°C incubator에서 통성혐기적 조건으로 4일간 정치배양하였다.

④ 주정추출물(액체시료)

50%EtOH로 70°C에서 3회 추출한 주정추출물 시료를 3차 증류수 대비 3% 혼합하여 121°C에서 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후, 37°C, 150rpm에서 24시간 동안 혐기

적 진탕배양한 seed를 3% 접종하여 37°C incubator에서 통성 혐기적 조건으로 4일간 정지배양하였다.

(4)-2 영양 조건별 발효효과

① 탄소원

탄소원은 API assay 결과, 선별된 5종의 유산균 모두가 분해활성을 나타낸 7가지 탄소원 Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, Lactose, Maltose, Sucrose를 이용하여 결명자 발효 최적 탄소원을 선정하고자 실험을 진행하였다. 균주는 1차로 MRS agar 배지에 혐기적배양을 하고, 이를 동일 액체 배지에 배양을 하여 seed를 준비하였다. 배지는 결명자 3%, 탄소원 2%, 질소원 1%, 기타 미량원소 0.5~0.005% 첨가하고 멸균한 후, 여기에 seed 2%를 첨가하여 37°C, 150rpm으로 혐기적 진탕배양 하였고, 최종적으로 72시간 배양 후의 anthraquinone 비당체의 총 함량을 비교·분석하였다.

② 질소원

질소원은 결정된 탄소원을 2%로 고정하고 서로 다른 질소원 Tryptone, Yeast extract, Peptone, L-asparagine, Albumin, NH₄Cl, NH₄NO₃ 각 1%와 기타 미량원소 0.5~0.005%를 첨가하여 37°C, 150rpm으로 혐기적 진탕배양 하였고, 최종적으로 72시간 배양 후의 anthraquinone 비당체의 총 함량을 비교·분석하였다.

③ 무기염류원

무기염류는 결정된 탄소원 2%와 결정된 질소원 1%를 고정하고 무기염류 K₂HPO₄, MnSO₄, MgSO₄, FeCl₃, CaCl₂를 각 0.1%씩 첨가하여 37°C, 150rpm으로 혐기적 진탕배양 하였고, 최종적으로 72시간 배양 후의 anthraquinone 비당체의 총 함량을 비교·분석하였다.

(4)-3 배지별 발효효과

통결명자, 조분쇄, 주정추출물 3% 이외 영양분을 첨가하지 않은 각 시료 3종(None-통, None-조, None-주) 배지와 주정추출물 3%에 선정된 탄소원, 선정된 질소원, 미량원소를 첨가하여 만든 선택(selection) 배지, 주정추출물 3%+MRS 배지, 주정추출물 3%+1/4 MRS 배지, 주정추출물 3%+M9 minimal 배지까지, 총 7종류 배지로 배지별 발효효과를 확인하였다. 실험은 각 배지에 37°C에서 24시간 동안 혐기적 배양된 K3 균주를 seed로 하여 3% 첨가하고, 37°C에서 150rpm으로 3일간 혐기적 진탕배양한 후, anthraquinone 비당체 총 함량으로 비교·분석하였다.

① 선택 배지

주정추출물 3%, 선정된 탄소원 2%, 선정된 질소원 1%, 무기염류(Na₂HPO₄ 0.6%, K₂HPO₄ 0.25%, NaCl 0.05%, NH₄Cl 0.09%)로 구성된 선택배지를 고압멸균하여 충분히

식힌 후, 24시간 배양된 K3 균주 seed 3%를 접종하여 37°C에서 3일간 혐기적 진탕배양하고 다른 배지와 anthraquinone 비당체 총 함량을 비교·분석하였다.

② MRS 배지

Lactobacilli MRS medium에 주정추출물 3%를 넣고 고압멸균하여 충분히 식힌 후, 24시간 배양된 K3 균주 seed 3%를 접종하여 37°C에서 3일간 혐기적 진탕배양하고 다른 배지와 anthraquinone 비당체 총 함량을 비교·분석하였다.

③ 1/4 MRS 배지

Lactobacilli MRS medium가 1/4만 들어간 배지에 주정추출물 3%를 넣고 고압멸균하여 충분히 식힌 후, 24시간 배양된 K3 균주 seed 3%를 접종하여 37°C에서 3일간 혐기적 진탕배양하고 다른 배지와 anthraquinone 비당체 총 함량을 비교·분석하였다.

④ M9 최소배지

멸균된 M9 minimal medium salts 11.28g/L(Na_2HPO_4 0.6%, K_2HPO_4 0.25%, NaCl 0.05%, NH_4Cl 0.09%, Difco)에 필터링한 20% glucose solution 20ml, 1.0M MgSO_4 2ml, 1.0M CaCl_2 0.1ml을 넣고 24시간 배양된 K3 균주 seed 3%를 접종하여 37°C에서 3일간 혐기적 진탕배양하고 다른 배지와 anthraquinone 비당체 총 함량을 비교·분석하였다.

2) 하수오

최종 제품의 key 물질은 결명자 발효물이며, 여기에 부 원료를 일정량 혼합하여 발효한 산물을 이용해 제품화 할 계획이다. 따라서 하수오에 대한 시료별, 조건별, 영양별, 배지별 등의 개별 최적 발효조건을 재설정하지 않고 결명자의 최적 조건과 동일한 조건으로 5가지 균을 배양하여 pH와 CFU/ml(Colony Forming Unit)를 측정함으로써 균의 사멸과 하수오 발효여부를 확인하였다.

(1) 하수오 주정추출물 시료 제작

결명자와 같은 방법으로 50% EtOH을 이용해 70°C에서 3회 추출하였으며, 이를 감압농축한 후 다시 동결건조를 하여 주정추출물을 제조하였다. 이를 3차 증류수에 농도별로 녹이고 균 접종 전, 멸균하여 사용하였다.

(2) 발효조건 설정 - 시료상태, 시료농도, 균주 종류, 균 접종량 등

발효조건 설정은 결명자 최적조건을 참고하여 설정하였다. 시료는 결명자와 동일하게 3차 증류수에 하수오 50%주정추출물 3%를 혼합한 시료로 고정하고, 균 접종량은 MRS broth에서 24시간 혐기적 진탕배양된 균주를 Seed로 하여 3% 접종하였다. 또한, 균주는 결명자와 동일한 K1, K2, K3, MJ90, MJ92 균주를 이용하였다.

(3) 발효조건에 따른 하수오 발효효과 평가

위의 설정된 발효조건으로 5균주의 하수오 발효효과를 확인하기 위해 72시간 동안 24시간마다 샘플링하여 일자별 pH와 CFU/ml를 확인하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 결명자

(1) 발효 조건 설정

① 시료농도

농도별 CFU/ml를 측정한 결과, 수분함량 대비 고체시료는 5%, 액체시료는 4% 이상에서 24시간만에 균이 사멸됨을 확인할 수 있었다(총균수는 3회 반복의 평균값). 따라서 시료의 농도를 3%로 고정하였다.

② 수분함량

고체시료의 수분함량은 40~60%까지는 크게 차이가 없었으나 70%와 80%는 균이 거의 성장하지 못하였다. 따라서 수분함량을 50%로 고정하였다.

③ 균 접종량

균 접종량에 따른 CFU(Colony Forming Unit) 변화결과, 3% 이상부터는 24시간만에 총균수가 10^9 CFU/ml에 도달할 정도로 균 성장이 우수하였다. 따라서 균 접종량을 3%로 고정하였다.

(2) 시료 형태별 발효효과

① 생결명자(고체시료)

K1, K2, K3, MJ90, MJ92 균주들의 3% 생결명자 관능평가 결과, 대체적으로 맛은 쓴맛과 신맛, 짠맛이 복합적으로 나타났으며, 향은 시큼하면서 점차 조금 새콤한 향으로 바뀌었다. 이 중, K3 균주는 시간이 지남에 따라 맛은 쓰고 짠맛에서 약간의 단맛, 향은 시큼한 향에서 새콤하면서 단향으로 변하였기 때문에 관능평가 결과는 K3 균주가 다른 균주에 비해 조금 더 우수하다고 판단되었다. 시간에 따른 pH 변화는 시간이 지남에 따라 대부분 유의적으로 감소하나 1일 이후, K1 균주와 MJ90 균주의 pH 변화는 거의 없었다. 한편, 1일차 K3, MJ90, MJ92 균주들의 pH는 K1과 K2 균주에 비해 약 2배 더 감소하였다(Fig. 1-8).

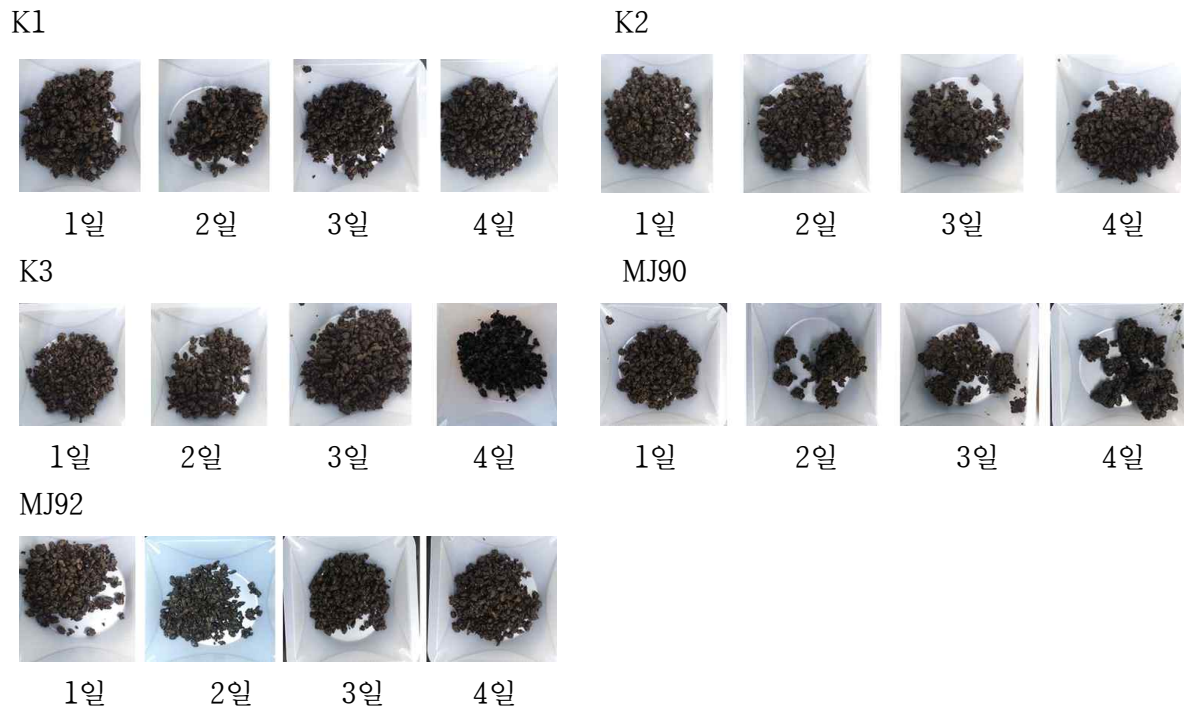


Fig. I-8. Form change according to fermented time of the solid *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

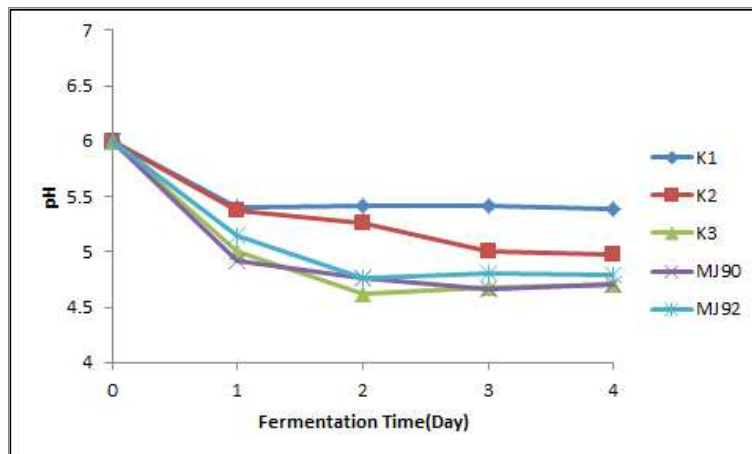


Fig. I-9. pH change according to fermented time of the solid *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

② 조분쇄(고체시료)

K2 균주는 시간이 지남에 따라 다른 균주들과는 다르게 시료를 많이 분해하였으며, 이는 K2 균주의 조분쇄 시료 분해능이 우수하다는 것을 증명한다. pH에서는 발효 1일 차에 K1, K2, K3 균주가 MJ90 균주에 비해 약 1.5배, MJ92 균주에 비해 약 2배 더 감소됨을 확인하였고, 2일 이후부터는 모든 균주의 pH가 그대로 유지되거나 조금 감소되었다(Fig. I-10).

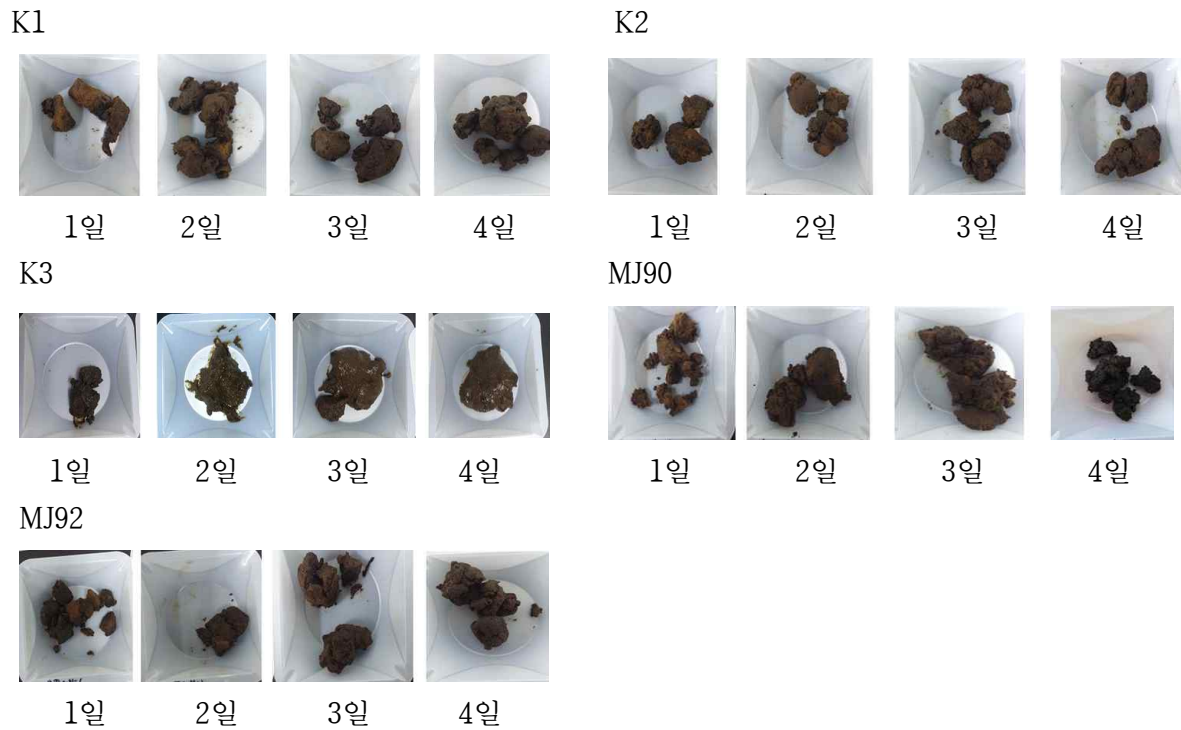


Fig. I -10. Form change according to fermented time of the solid cut *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

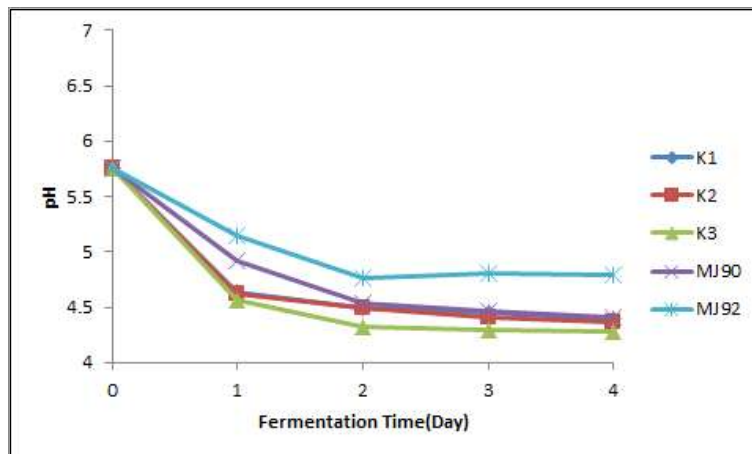


Fig. I -11. pH change according to fermented time of the solid cut *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

③ 조분쇄(액체시료)

유산균 5종 모두의 색상이 96시간 동안 Fig. I -10과 같이 점차 탁해지면서 연한 갈색으로 변하는 것을 확인하였다(Fig. I -12). pH는 시간이 지남에 따라 유의적으로 감소하였지만 K1 균주는 1일 이후에 거의 감소하지 않았고, K3 균주는 2일까지 감소하였다가 이후부터 점차 증가하였다(Fig. I -13).

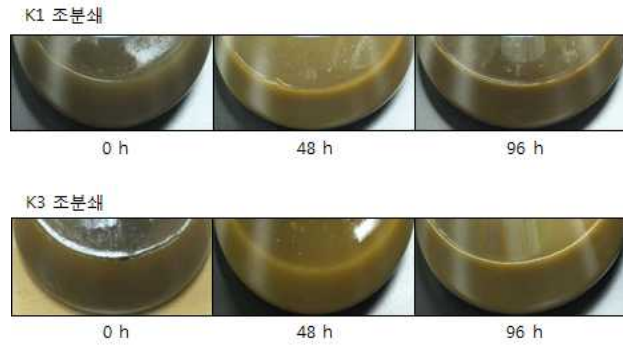


Fig. I-12. Color change according to fermented time of the liquid cut *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

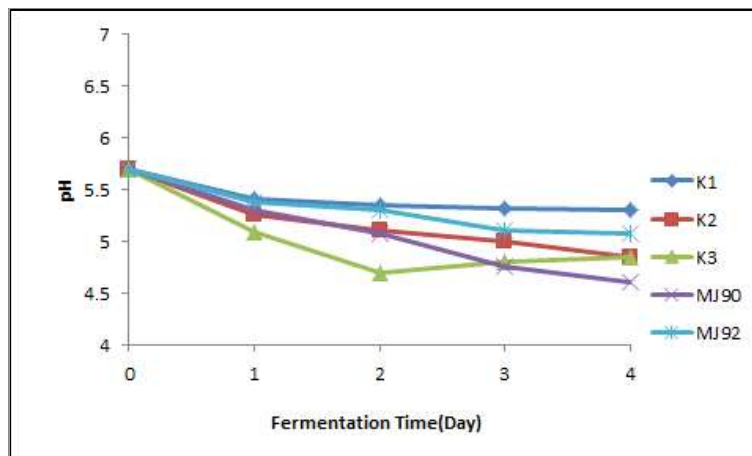


Fig. I-13. pH change according to fermented time of the liquid cut *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

④ 주정추출물(액체시료)

시간이 지남에 따라 색상은 크게 변화가 없었으나 pH는 다른 시료들과 비교하여 약 20~50% 더 감소함을 확인할 수 있었다. 이 중, K2와 K3 균주는 pH가 약 4.2까지 떨어졌으며 MJ90 균주에 비해 약 2배, MJ92 균주에 비해 약 1.5배 더 감소됨을 확인할 수 있었다.



Fig. I-14. Color change according to fermented time of the EtOH ex. *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

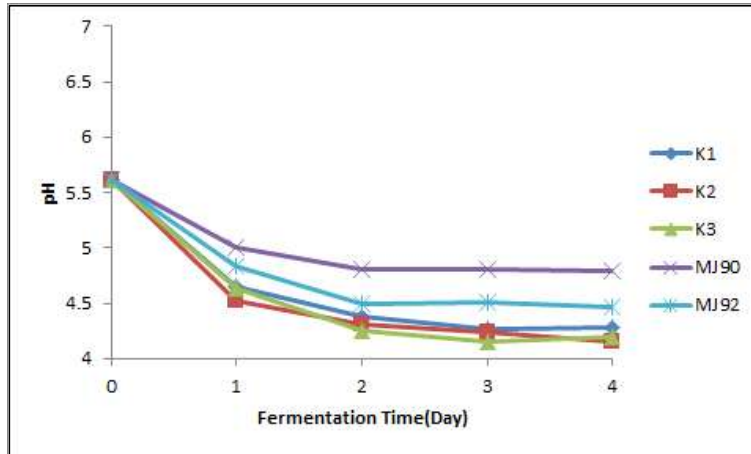


Fig. I-15. pH change according to fermented time of the EtOH ex. *Cassia tora* L. by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

(3) 영양 조건별 발효효과

전체적으로 K3 균주의 pH 감소가 가장 크며 시간이 지남에 따라 다른 균주에 비해 맛과 향이 식품에 사용하기 적합한 달콤하고 새콤한 맛과 향으로 변했다. 더불어 조분 채 고체시료에 대한 K3 균주의 분해능이 우수한 점 등을 참고하여 K3 균주를 이용해 영양 조건에 따른 최적 배지를 선별하였다.

① 탄소원 - Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, Lactose, Maltose, Sucrose

발효 3일 후, 탄소원들의 anthraquinone 비당체 총 함량 분석 비교 결과, lactose의 비당체 총 함량이 가장 높았으나, 단가 대비 glucose의 anthraquinone 비당체 총 함량이 가장 우수하였기에 glucose를 최적 탄소원으로 선정하였다.

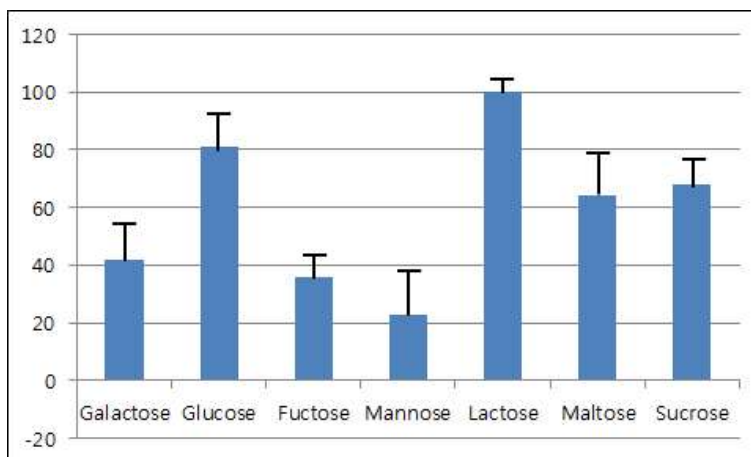


Fig. I-16. To compare of total amount of anthraquinone aglycon by fermented carbon sources.

② 질소원 - Tryptone, Yeast extract, Peptone, L-asparagine, Albumin, NH₄Cl, NH₄NO₃

발효 3일 후, 질소원들의 anthraquinone 비당체 총 함량 분석 비교 결과, yeast

extract의 비당체 총 함량이 가장 높았기에 yeast extract를 최적 질소원으로 선정하였다.

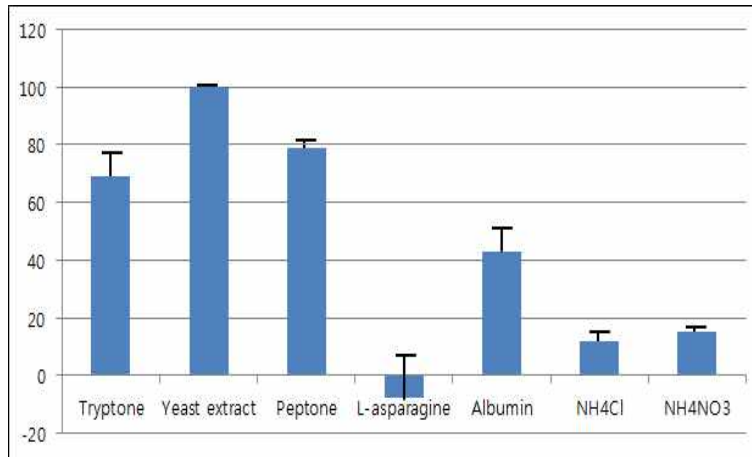


Fig. I-17. To compare of total amount of anthraquinone aglycon in the fermented nitrogen sources.

③ 무기염류원 - K_2HPO_4 , $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeCl_3$, $CaCl_2$

무기염류원에 대한 차이는 거의 없었기에 universal하게 사용되는 최소배지인 M9 minimal 배지에서 사용하는 무기염류원 Na_2HPO_4 0.6%, K_2HPO_4 0.25%, $NaCl$ 0.05%, NH_4Cl 0.09%를 사용하였다.

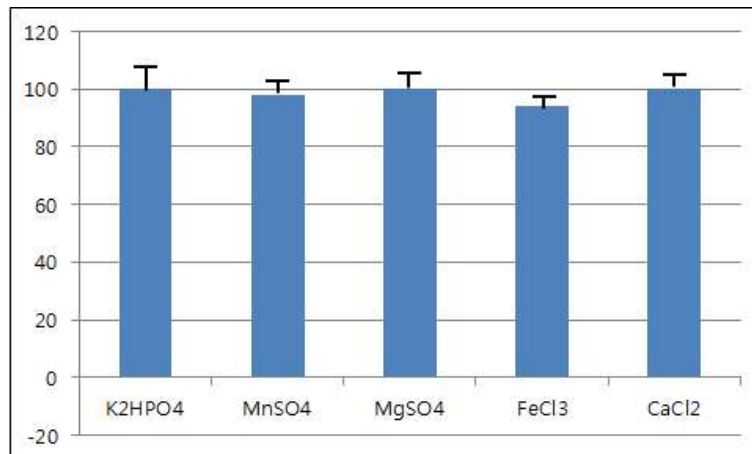


Fig. I-18. To compare of total amount of anthraquinone aglycon in the fermented mineral sources.

(4) 배지별 발효효과

발효 3일 후, 배지별 anthraquinone 비당체 총 함량 분석 비교 결과, MRS 배지에서 함량이 가장 높게 나왔으나 주정만 넣은 배지와 큰 차이가 없는 것을 확인하였다.

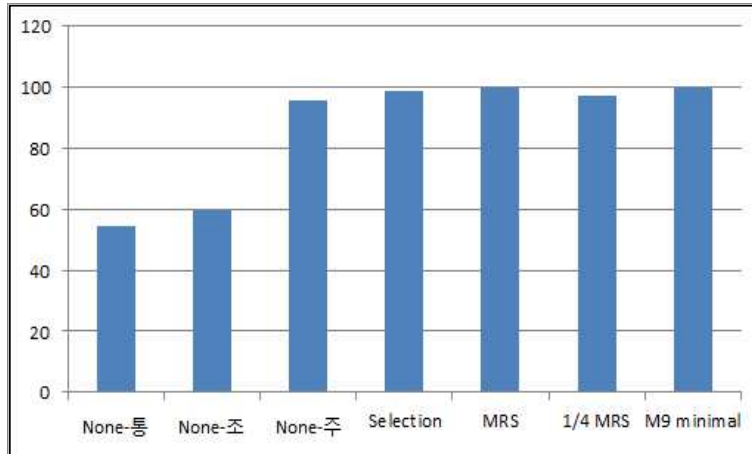


Fig. I-19. To compare of total amount of anthraquinone aglycon in the fermented media.

2) 하수오

최적 발효 조건에 따른 하수오 주정추출물 발효 결과, 색상은 결명자 주정추출물과는 다르게 시간이 지남에 따라 점점 연하게 변하는 것을 확인할 수 있었다. pH는 24시간 까지 감소하는 유의한 결과를 나타내었지만, 48시간 이후부터는 거의 변화가 없었다. 총균수 측정은 24시간까지 K2와 K3 균주는 그대로 유지되었으나 나머지 균주들은 10^7 CFU/ml에서 10^6 CFU/ml까지 50% 이상 감소되었고, 24시간 이후부터는 모든 균주의 총균수가 꾸준히 감소하였다. 따라서 하수오 주정추출물 시료도 결명자 주정추출물 시료와 마찬가지로 다른 영양분 없이 하수오 영양분만을 이용하여 균이 성장하였기에 발효가 되었다고 판단하였다.

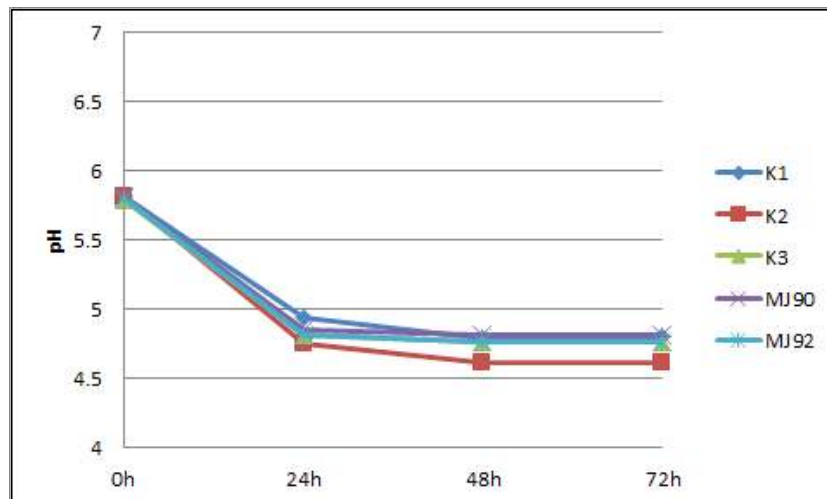


Fig. I-20. pH change according to fermented time of the EtOH ex. *Pleuropterus multiflorus* TURCZ by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

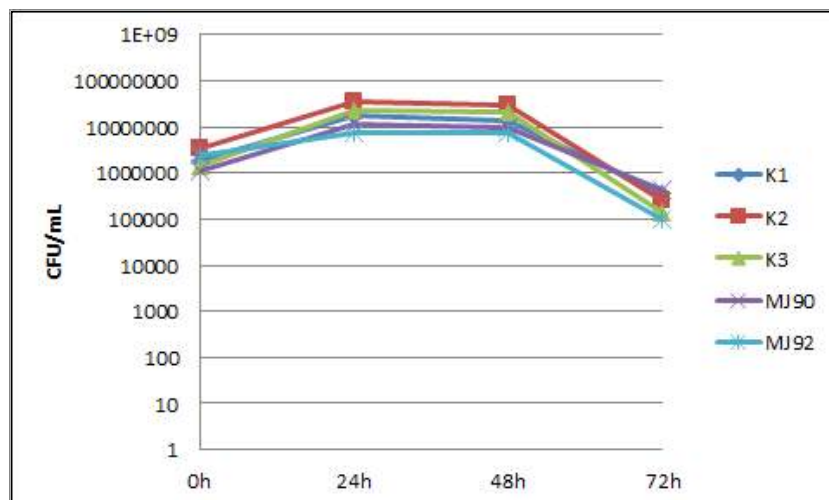


Fig. I-21. CFU change according to fermented time of the EtOH ex. *Pleuropterus multiflorus* TURCZ by the K1, K2, K3, MJ90 and MJ92 strains.

I-4. 개발된 발효기술에 의한 발효물 제작

I. 재료 및 방법

결명자 및 하수오 발효물에 대한 장기능(배변) 유효성 평가를 위해 발효물을 제작하였다. 균주는 배지별 비교 결과, anthraquinone 비당체 함량이 상대적으로 높은 K1, K2, K3 균주를 선택하였고, 3종 균주를 포함하여 장내 유익균인 2종 균주를 추가로 포함한 총 5종 균주로 실험을 진행하였다. 추가된 장내 유익균 2종은 청국장 발효에 쓰이는 *Bacillus subtilis*(C1)와 막걸리 및 빵 발효에 쓰이는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*(Y)이다. K1, K2, K3 3종 유산균들은 3차 증류수에 동결건조된 결명자나 하수오 50%주정추출물만 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균하였고, 충분히 식힌 다음 MRS 배지에서 24시간 동안 배양된 seed를 3% 접종하였다. 이를 37°C, 150rpm에서 3일간 진탕배양하였고, 배양 후 같은 방법으로 고압멸균하여 동결건조 하였다. C1 균주도 동일한 방법으로 3차 증류수에 50%주정추출물을 첨가하여 고압멸균하였고, 식힌 다음 LB broth(Luria Bertani, Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, Sodium chloride 1%, Difco) 배지에서 24시간 동안 배양된 seed를 3% 접종하여 동일한 방법으로 진탕배양하고 멸균 후 동결건조하였다. Y 균주도 위와 동일한 방법으로 진행하였고 배양은 YM broth(Yeast Mold, Yeast extract 0.3%, Malt extract 0.3%, Peptone 0.5%, Dextrose 1%, Difco) 배지를 사용하였다. 결명자 발효 여부 확인은 균 성장에 따른 pH와 CFU/ml로 확인하였다.

II. 결과 및 고찰

(1) 결명자

50%주정추출물 3%만 함유된 결명자에서의 C1 pH는 24시간까지 증가하다 거의 유지되고 Y와 K1, K2, K3 균주는 유의적으로 감소함을 확인하였다. K3 균주를 제외한 나머지 균주들의 총균수는 24시간까지 증가하다 48시간 이후부터 점차 감소하였다. K3 균주는 24시간까지 감소하다 72시간까지 꾸준히 증가하였다.

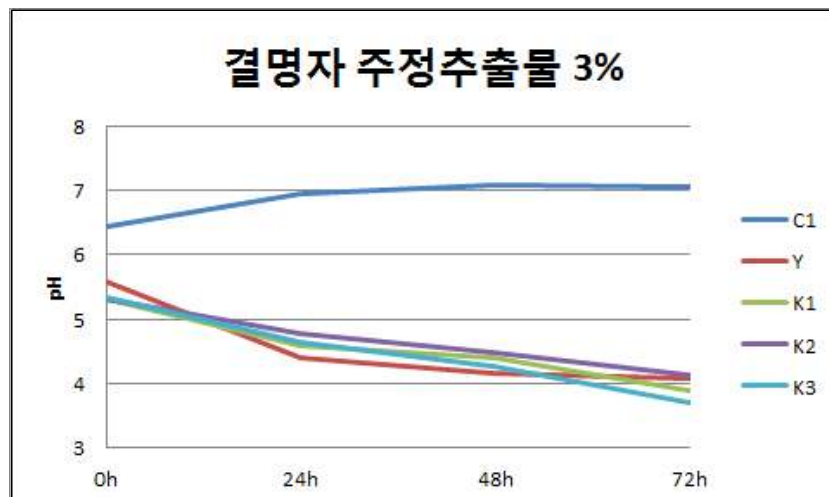


Fig. I -22. pH change according to fermented time of the EtOH ex. *Cassia tora* L. by the C1, Y, K1, K2 and K3 strains

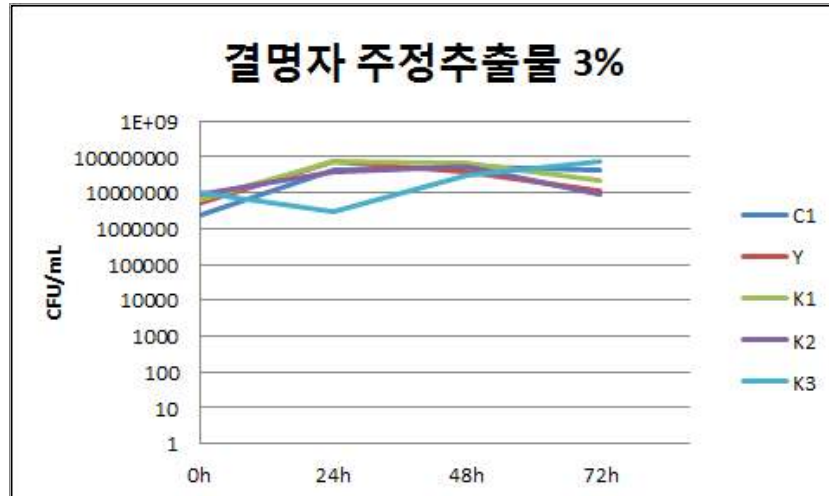


Fig. I -23. CFU change according to fermented time of the EtOH ex. *Cassia tora* L. by the C1, Y, K1, K2 and K3 strains.

(2) 하수오

50%주정추출물 3%가 함유된 하수오에서의 pH는, 24시간까지 C1 균주는 증가하고 Y와 K1, K2, K3 균주는 감소하지만, 24시간 이후는 크게 변화가 없음을 확인하였다. 총균수는 유산균 시료는 결명자 시료와 마찬가지로 24시간까지 모든 균주가 증가하고 48시간까지 거의 유지되다가 48시간 이후엔 감소되나, 감소량이 결명자 시료보다 더 크다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, C1 균주는 증가폭이 크지 않고 72시간까지 거의 그대로 유지됨을 확인할 수 있었으며, Y 균주는 24시간까지 증가되지 않고 그대로 유지되다가 24시간 이후부터 꾸준히 감소됨을 확인할 수 있었다.

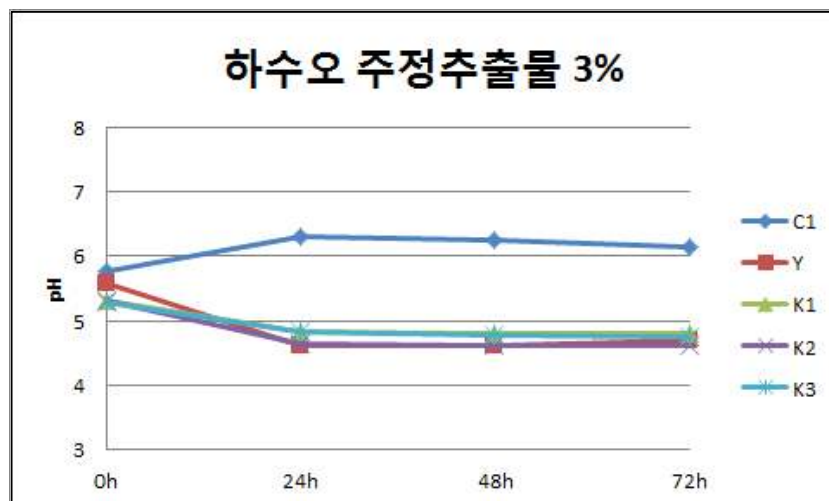


Fig. I -24. pH change according to fermented time of the EtOH ex. *Pleuropterus multiflorus* TURCZ by the C1, Y, K1, K2 and K3 strains.

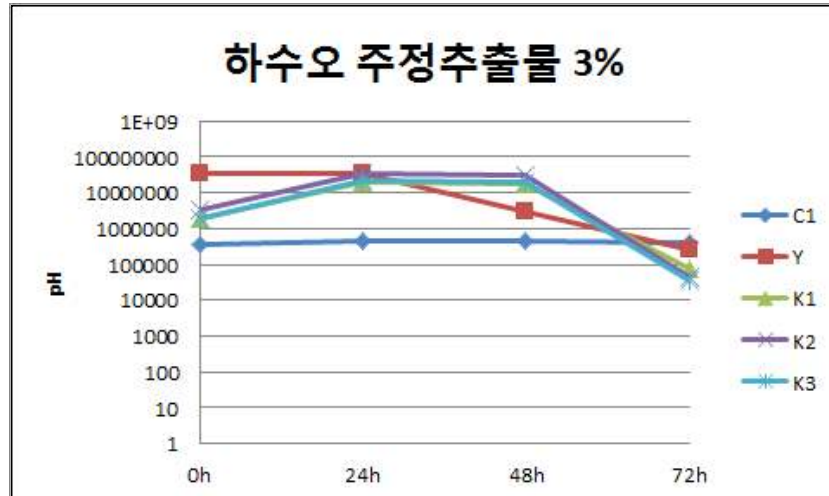


Fig. I -25. CFU change according to fermented time of the EtOH ex. *Pleuropterus multiflorus* TURCZ by the C1, Y, K1, K2 and K3 strains.

I -5. 결명자, 하수오 발효물에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가

I. 재료 및 방법

1) 시료

시료추출물은 해남자연농업영농조합법인에서 인수받아 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 시료를 동결건조기(LYOPH-PRIDE 20R, ILSIN, Korea)를 이용하여 -70℃에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 실험에 이용하였다.

2) 실험동물 사육 및 실험식이

실험동물은 SD(Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화된 다음, 각 군당 5마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군(Con), loperamide 투여군(Lop), 양성대조군(POS), 저농도 결명자 투여군(Auto-100, 100mg/kg), 중농도 결명자 투여군(Auto-200, 200mg/kg), 고농도 결명자 투여군(Auto-300, 300mg/kg), *Bacillus subtilis* 발효 결명자 투여군(C1-100, 100mg/kg), 중농도 발효 결명자 투여군(C1-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군(C1-300, 300mg/kg), *Saccharomyces cerevisiae* 저농도 발효 결명자 투여군(Y1-100, 100mg/kg), 중농도 발효 결명자 투여군(Y1-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군(Y1-300, 300mg/kg), *Lactobacillus paracasei* 저농도 발효 결명자 투여군(K1-100, 100mg/kg), 중농도 발효 결명자 투여군(K1-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군(K1-300, 300mg/kg), *Lactobacillus casei* 저농도 발효 결명자 투여군(K2-100, 100mg/kg), 중농도 발효 결명자 투여군(K2-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군(K2-300, 300mg/kg), *Lactobacillus plantarum* 저농도 발효 결명자 투여군(K3-100, 100mg/kg), 중농도 발효 결명자 투여군(K3-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군(K3-300, 300mg/kg), 저농도 하수오 투여군(HS-100, 100mg/kg), 중농도 하수오 투여군(HS-200, 200mg/kg), 고농도 하수오 투여군(HS-300, 300mg/kg), *Lactobacillus casei* 저농도 발효 하수오 투여군(HK2-100, 100mg/kg), 중농도 발효 하수오 투여군(HK2-200, 200mg/kg), 고농도 발효 하수오 투여군(HK2-300, 300mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg 용량의 loperamide(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 양성대조군은 시판되는 변비 치료제인 돌코락스 에스를 이용하였다. 시료는 loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여를 하였다.

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정하였다

4) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 측정

각 실험동물의 변은 실험시작 후 3일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후에 3일째에 수거하였으며, 개체 당 변의 개수와 변 중량(wet weight)을 측정하였다. 변

의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변중량으로 나누어 계산하였다.

5) 장이동거리 측정

장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine(Sigma, St, Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험 동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였다.

6) 대장관내 점액질의 분비효과 측정

대장은 맹장 이후 부분부터 직장까지 부위의 양쪽을 결찰하여 적출하였다. 적출한 대장관을 10% formaldehyde으로 고정하여 조직처리 과정을 거치고 파라핀으로 embedding 하여 5 μ m 두께로 절편을 제작하였다. Alcian blue (pH 2.5)로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

7) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS(18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

II. 결과 및 고찰

가. 결명자 추출물 C1

1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 loperamide로 변비를 유발시킨 군(LOP)이 정상 대조군(NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table I -5).(Kim *et al.*, 2011; Shimotoyodome *et al.*, 2000)^{19,20)}

Table I -5. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with fermented *Cassia tora* L. extract in loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	140.9±4.04 ^{NS}	19.3±1 ^{NS}	44.6±5.73 ^a
LOP	137.2 ± 7.5	18.1 ± 1.74	40±3.67 ^{ab}
Auto-100	135.1 ± 5.53	17.1 ± 2.35	38.8±1.64 ^b
Auto-200	140.2 ± 6.97	17.7 ± 1.37	40±2.55 ^{ab}
Auto-300	138.8 ± 8.36	18.4 ± 1.14	41.4±3.05 ^{ab}
C1-100	145.3 ± 8.88	17 ± 1.96	39.4±1.52 ^b
C1-200	136.9 ± 9.33	16.8 ± 1.46	39.4±3.85 ^b
C1-300	139.2 ± 3.98	18.1 ± 2.64	36.6±3.29 ^b

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS} non significant

2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군(NOR)이 54.8 ± 4.87인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군(LOP)이 40.0 ± 5.78개로 감소하여 loperamide에 대한 변비유발이 확인되었다. 양성대조군인 (POS)군에서는 47.78 ± 5.37개로 LOP군 보다 유의적으로 증가하였다. 발효를 하지 않은 결명자를 처리한 군(Auto-100, Auto-200, Auto-300) 변의 개수는 모두 loperamide에 비해 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 한편 C1처리군은 LOP군보다는 변의 개수가 증가하는 양상을 보였고 결명자만 처리한 군보다 확연히 변의개수가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. I -26). 변의 중량역시 변의 개수와 같은 경향을 보였으나, Auto-300 그룹보다 C1-100 그룹이 변의 중량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. I -27). Loperamide와 morphine을 포함한 여러 화학물질들은 변비유발동물모델을 만들 때 넓게 사용된다 (Kakino *et al.*, 2010)²¹⁾. 그 중, loperamide는 변의 배출 시간 연장을 촉진시키고 장의 수분분비를 억제시키게 되어 결과적으로 변의 개수 및 중량이 감소하게 된다 (Sohji *et al.*, 1978)²²⁾

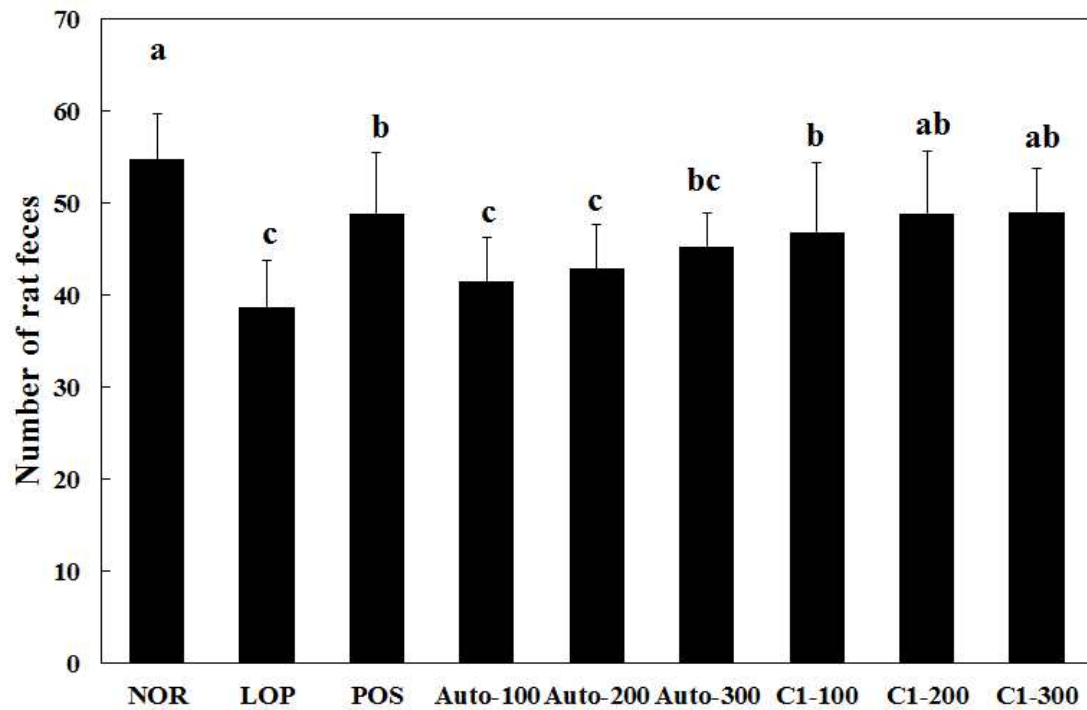


Fig. I -26. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on number of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

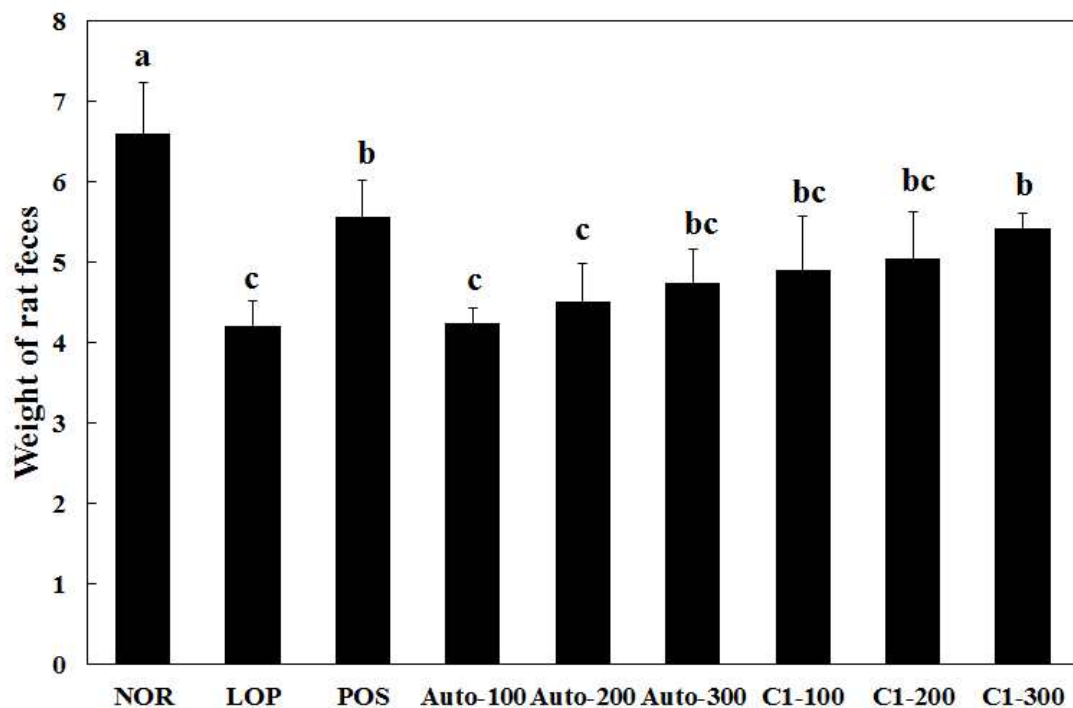


Fig. I -27. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였다. 이를 양성대조군에서 유의적으로 증가시켰으며 Auto-200, Auto-300군에서는 약간이나마 증가시켰다. 이는 결명자가 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 결명자를 발효시킨 C1 투여군에서는 각각 C-100 군은 LOP 그룹과 별 차이가 없었지만 C1-200, C1-300군에서 농도의존적으로 수분함량이 증가되는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 1-28). 변비에 의해 일어난 감소된 변의 무게와 변의 수분함량에 관한 상관연구에 대한 연구가 보고되었으며 (Aichbichler *et al.*, 1998)²³⁾, loperamide에 의해 장내 수분 분비가 억제된다는 가능성도 보고되었다 (Hughes *et al.*, 1984)²⁴⁾

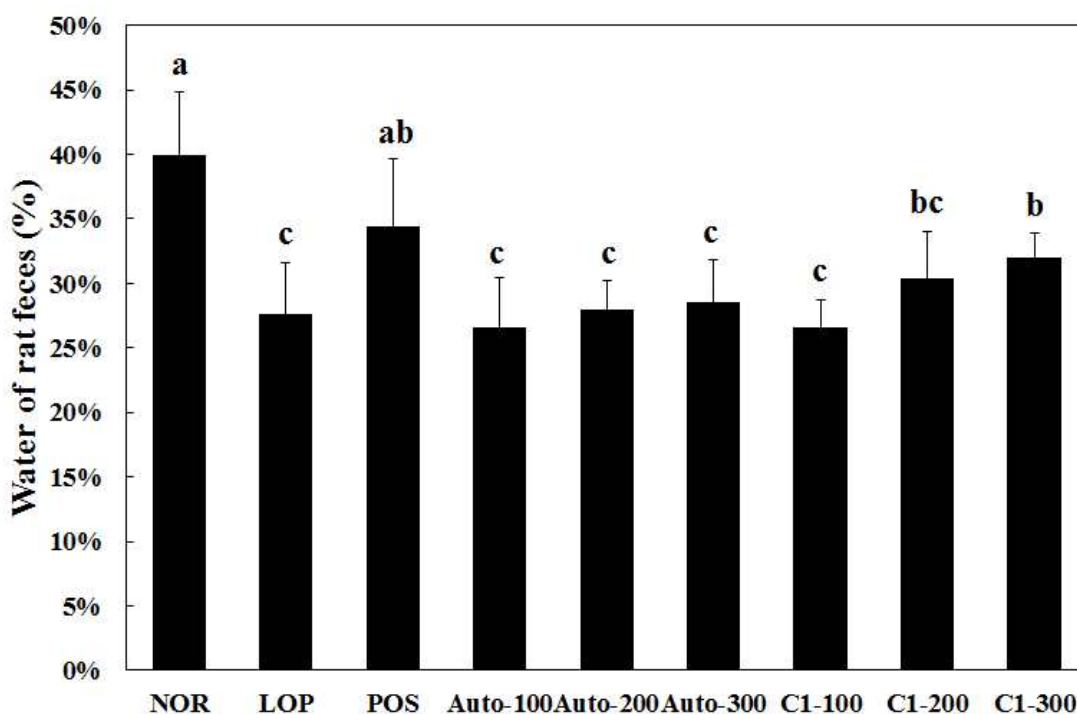


Fig. 1-28. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on wet weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 장내 이동거리

실험 4일째에 천연염색시약을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군이 전체 장의 45%로 이동한 것에 비하여 loperamide 단독 투여 군에서는 30%로 감소하여 loperamide에 의해 장의 이동거리가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. POS군에서는 이를 유의적으로 증가시켰으며, Auto 투여군에서도 농도의존적으로 장의 이동거리가 loperamide군에 비해 모두 증가되었다. C1-100군에서는 loperamide군과 비교하면 차이가 없었지만 C1-200, C1-300군에서는 장의 이동거리가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Auto군과 비교해서 장의 이동거리 개선효과가 있었다(Fig. 1-29). Loperamide는 장근육세포에 존재하는 오피오이드 수용체 (opioid receptor)에 결합 한 뒤 칼슘 신호전달을 차단하고, 그 결과 흥분성 신경전달을 억제하여 장의 운동성을 감소시킨다고 알려져 있다 (Holzer, 2009).²⁵⁾

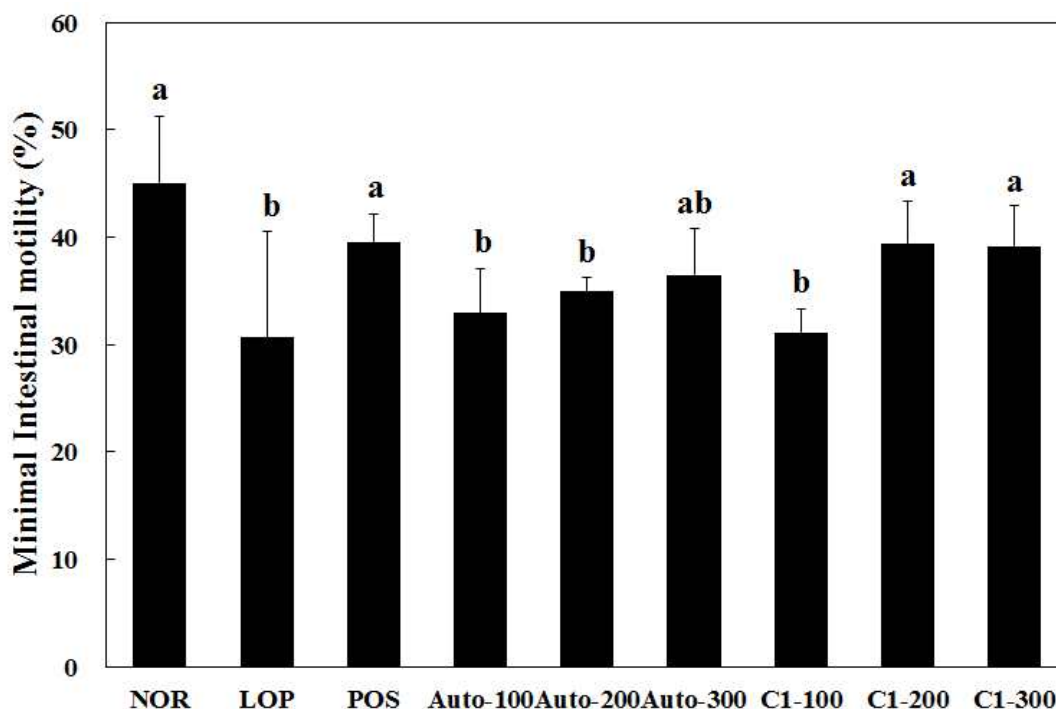


Fig. 1-29. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on intestinal transit ratio in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비환자의 장점막에서 점액분비의 기능이 감소한다고 보고되어져 있으며, loperamide 투여시 대장운동 저하와 동시에 대장관 내 점액분비가 감소하여 그 결과로서 대장 내용물의 이동에 저해를 준다고 알려져 있다.(Cepinskas *et al.*, 1993)²⁶⁾ 실험에 사용된 흰 쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만들어 alcian blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군에 비하여 loperamide 투여군에서 crypt cell 내의 염색되는 점액이 감소하는 반면에 물질투여군에서 진하게 염색되는 crypt cell 이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 loperamide 투여군에서 대장관내 내용물로 분비되는 점액양이 감소하였으나 양성대조군(POS) 군에서 이를 증가시켰다. 반면, 발효하지 않은 결명자(Auto)군에서는 LOP군보다는 점액분비량이 증가하는 것이 나타났다. C1 처리군은 LOP군보다는 점액질 분비가 농도에 의해 증가되는 것을 관찰할 수 있었지만 발효되지 않은 결명자(Auto)군과는 큰 차이는 없는 것을 확인하였다.

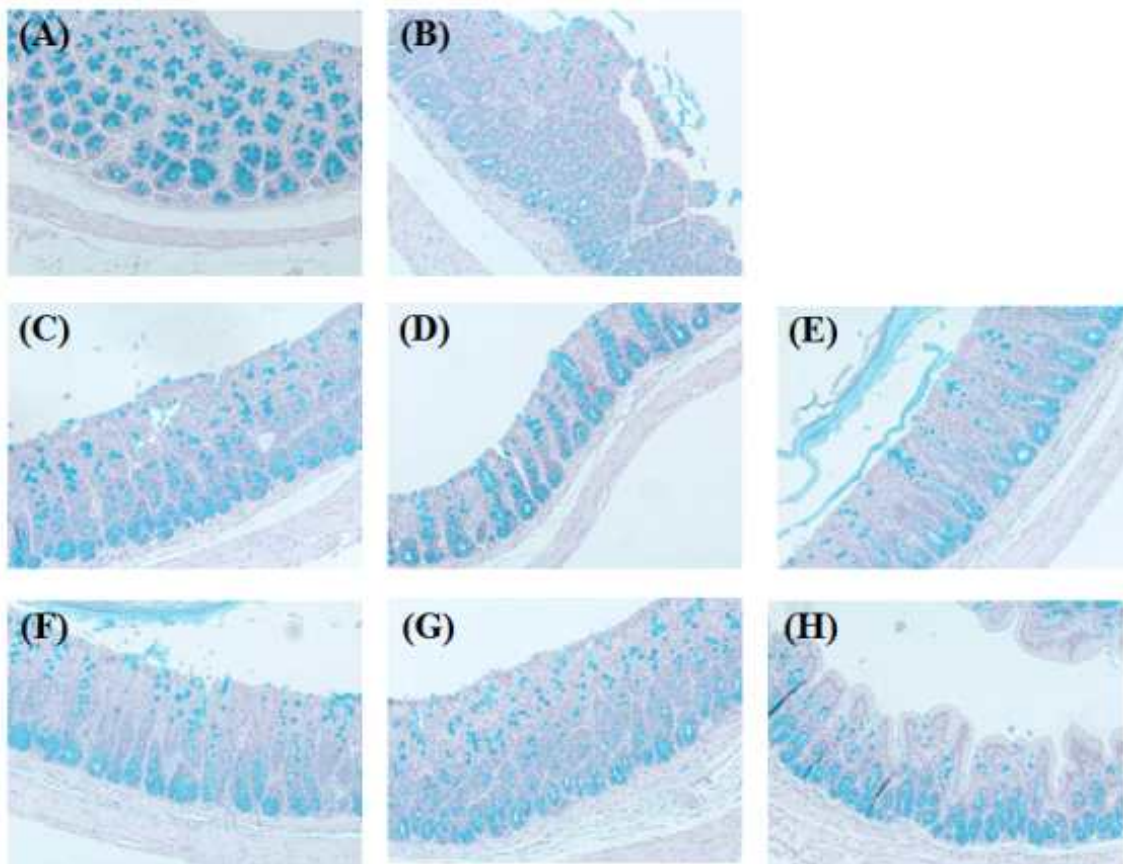


Fig. 1-30. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on mucous secretion capacity in loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) Auto-100 group, (D) Auto-200 group, (E) Auto-300 group, (F) C1-100 group, (G) C1-200 group, (H) C1-300 group.

나. 결명자 추출물 Y1

1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 loperamide로 변비를 유발시킨 군(LOP)이 정상 대조군(NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table I -6).

Table I -6. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with fermented *Cassia tora* L. extract in loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	140.9±4.04 ^{NS}	19.3±1 ^{NS}	44.6±5.73 ^a
LOP	137.2 ± 7.5	18.1 ± 1.74	40±3.67 ^{bc}
Auto-100	135.1 ± 5.53	17.1 ± 2.35	38.8±1.64 ^{bc}
Auto-200	140.2 ± 6.97	17.7 ± 1.37	40±2.55 ^{bc}
Auto-300	138.8 ± 8.36	18.4 ± 1.14	41.4±3.05 ^{ab}
Y1-100	139.5 ± 3.54	16.9 ± 2.01	36±1.87 ^c
Y1-200	142.5 ± 2.14	16.9 ± 1.05	38±2.12 ^{bc}
Y1-300	142 ± 5.56	18.6 ± 1.39	37.6±3.44 ^{bc}

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS} non significant

2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군(NOR)이 54.8 ± 4.87 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군(LOP)이 40.0 ± 5.78 개로 감소하여 loperamide에 대한 변 비유발이 확인되었다. 양성대조군인 (POS)군에서는 47.78 ± 5.37 개로 LOP군 보다 유의적으로 증가하였다. 발효를 하지 않은 결명자를 처리한 군(Auto-100, Auto-200, Auto-300) 변의 개수는 모두 loperamide에 비해 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 한편 Y1처리군은 LOP군과 비슷한 양상을 보였다(Fig. I -31). 변의 중량은 농도별로 증가하는 경향을 확인할 수 있었으나 Auto군과는 큰 차이가 없는 것을 확인하였다(Fig. I -32).

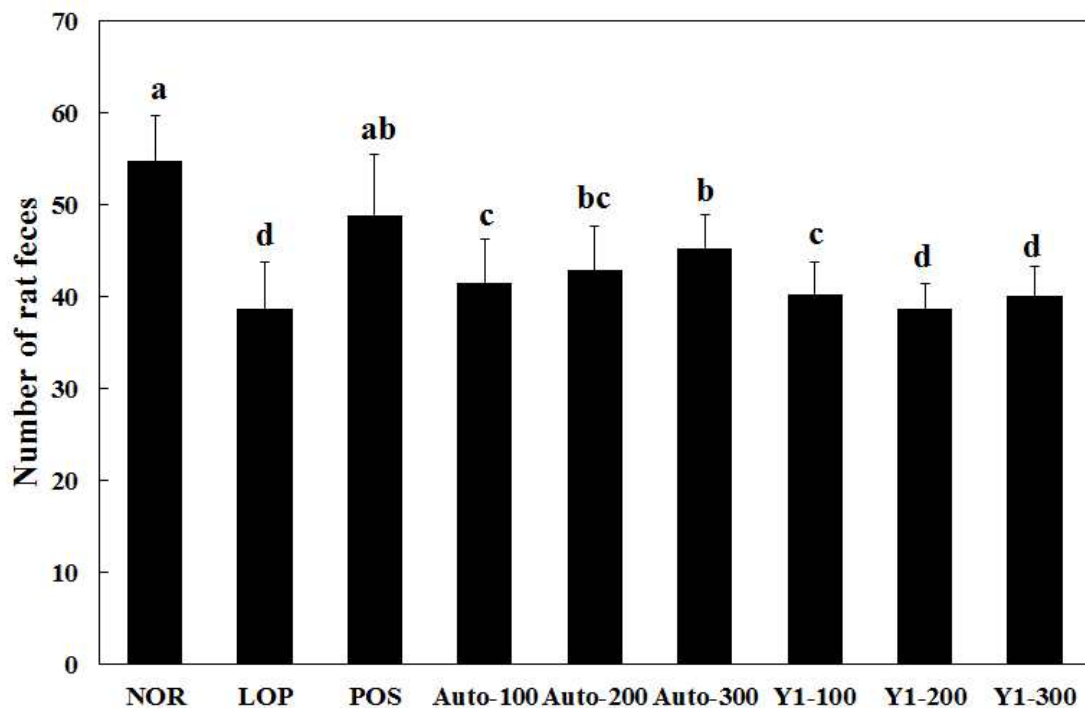


Fig. I -31. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on number of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

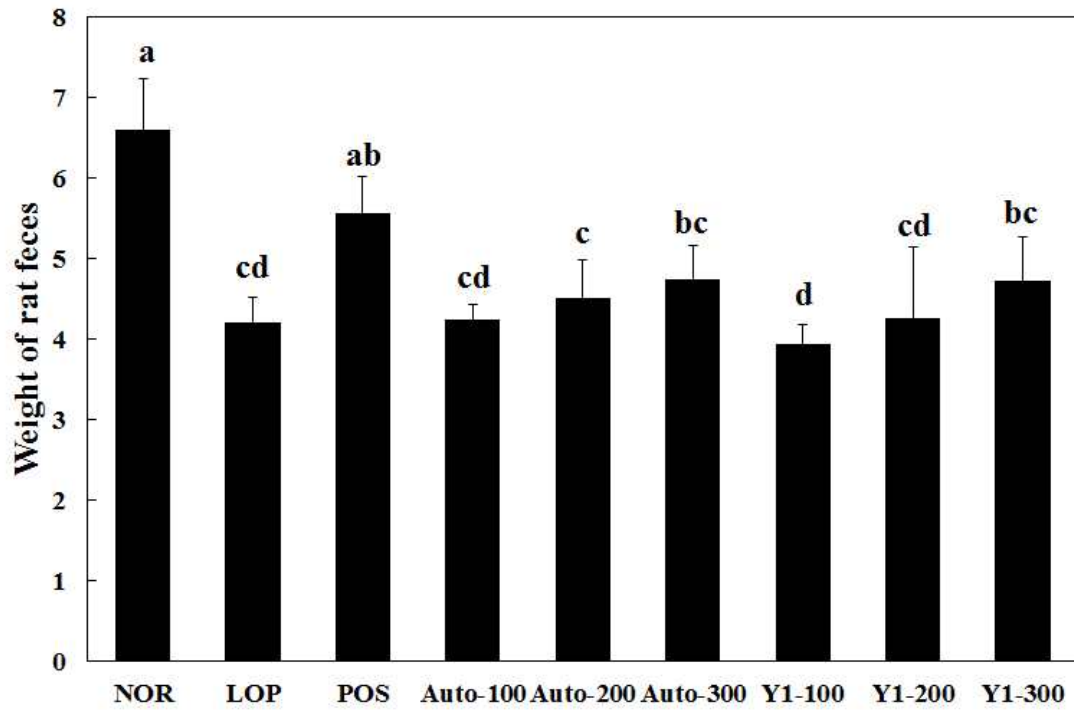


Fig. I -32. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 양성대조군에서 유의적으로 증가하였다. 또한 Auto-200, Auto-300군에서 수분함량이 약간 증가하였다. 이는 결명자가 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 결명자를 발효시킨 Y1 투여군에서는 각각 LOP 군보다 더 높은 수분함량을 보였고 농도별로도 차이가 있었다(Fig. 1-33).

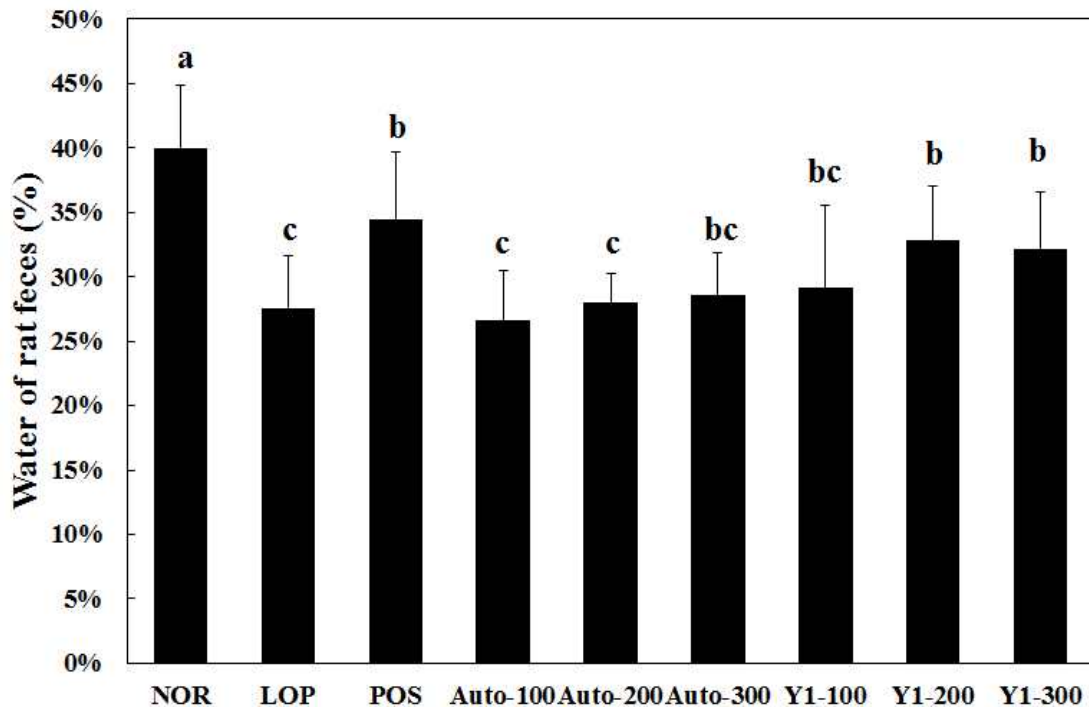


Fig. 1-33. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on wet weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 장내 이동거리

실험 4일째에 천연염색시약을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군이 전체 장의 45%로 이동한 것에 비하여 loperamide 단독 투여 군에서는 30%로 감소하여 loperamide에 의해 장의 이동거리가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. POS군에서는 이를 유의적으로 증가시켰으며, Auto 투여군에서도 농도의존적으로 장의 이동거리가 loperamide군에 비해 모두 증가되었다. Y1-100군에서는 loperamide군과 비교하면 차이가 있었지만 Auto군과 비교해서 장의 이동거리 개선에는 부족하였다(Fig. 1-34).

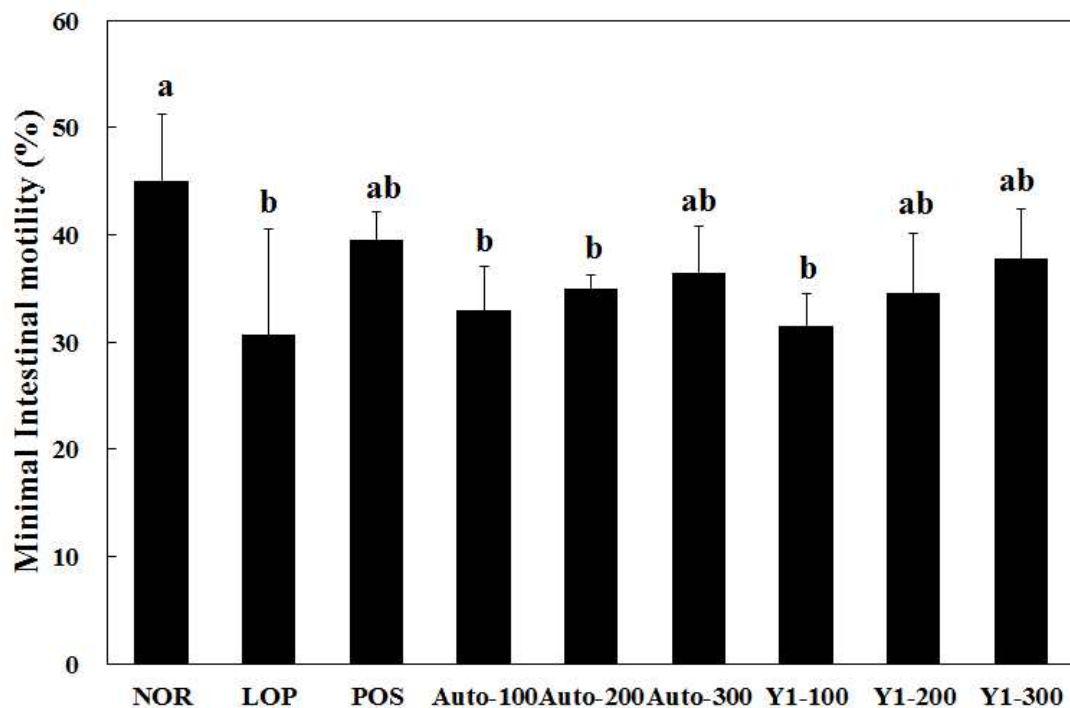


Fig. 1-34. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on intestinal transit ratio in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비환자의 장점막에서 점액분비의 기능이 감소한다고 보고되어져 있으며, loperamide 투여시 대장운동 저하와 동시에 대장관 내 점액분비가 감소하여 그 결과로서 대장 내용물의 이동에 저해를 준다고 알려져 있다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만들어 alcian blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군에 비하여 loperamide 투여군에서 crypt cell 내의 염색되는 점액이 감소하는 반면에 물질투여군에서 진하게 염색되는 crypt cell 이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 loperamide 투여군에서 대장관내 내용물로 분비되는 점액양이 감소하였으나 양성대조군(POS) 군에서 이를 증가시켰다. 반면, 발효하지 않은 결명자(Auto)군에서는 LOP군보다는 점액분비량이 증가하는 것이 나타났다. 그러나 Y1 처리군은 LOP군보다는 점액질 분비가 농도에 의해 조금이나마 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나 발효되지 않은 결명자(Auto)군에 비해서는 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

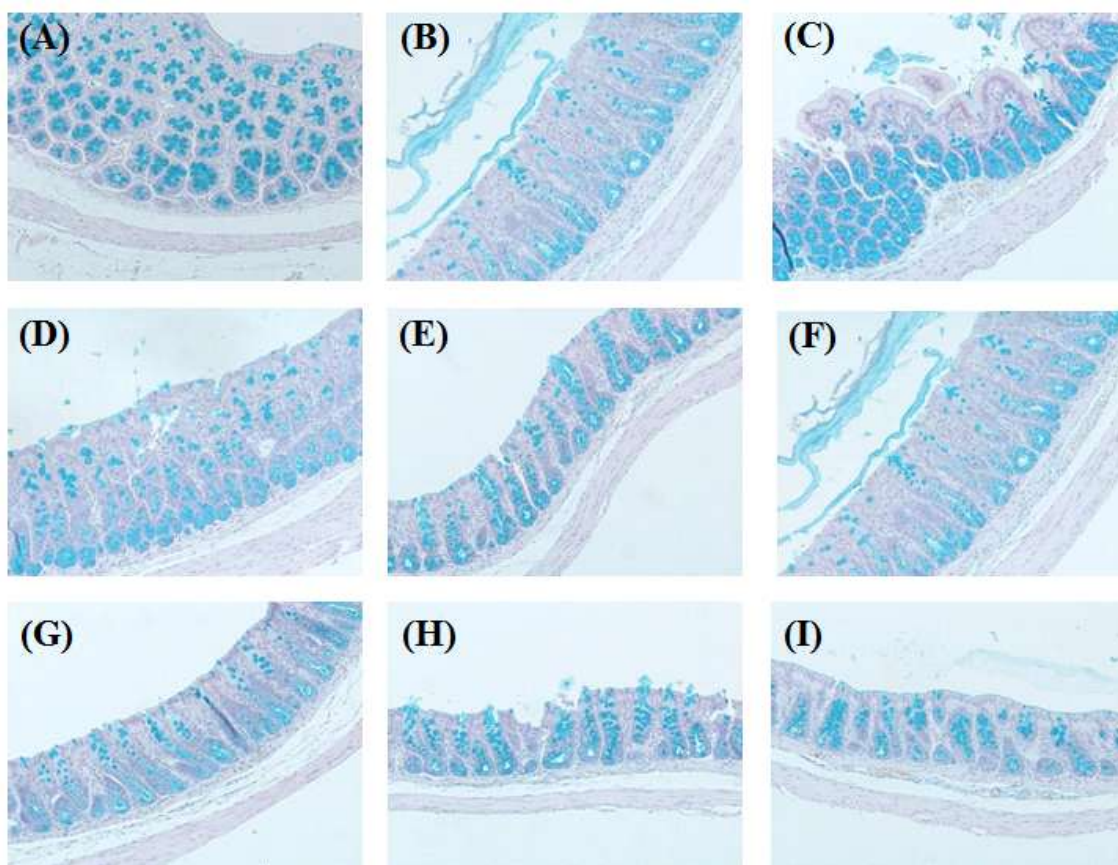


Fig. 1-35. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on mucous secretion capacity in loperamide-induced constipation rats. A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) POS; Positive control group, (D) Auto-100 group, (E) Auto-200 group, (F) Auto-300 group, (G) Y1-100 group, (H) Y1-200 group, (I) Y1-300 group.

다. 결명자 추출물 K1

1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 loperamide로 변비를 유발시킨 군(LOP)이 정상 대조군(NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1-7).

Table 1-7. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with fermented *Cassia tora* L. extract in loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	140.9±4.04 ^{abc}	19.3±1 ^{NS}	44.6±5.73 ^a
LOP	137.2±7.5 ^{bc}	18.1 ± 1.74	40±3.67 ^{ab}
POS	138.9±8.14 ^{bc}	17.5 ± 1.21	36.8±1.25 ^b
Auto-100	135.1±5.53 ^c	17.1 ± 2.35	38.8±1.64 ^b
Auto-200	140.2±6.97 ^{abc}	17.7 ± 1.37	40±2.55 ^{ab}
Auto-300	138.8±8.36 ^{bc}	18.4 ± 1.14	41.4±3.05 ^{ab}
K1-100	145.5±3.02 ^{ab}	18.7 ± 1.66	41±4.18 ^{ab}
K1-200	148.2±4.43 ^a	16.8 ± 1.26	38±4.36 ^b
K1-300	137.1±2.1 ^{bc}	16.8 ± 0.82	40±2.24 ^{ab}

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS} non significant

2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군(NOR)이 54.8 ± 4.87 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군(LOP)이 40.0 ± 5.78 개로 감소하여 loperamide에 대한 변 비유발이 확인되었다. 양성대조군인 (POS)군에서는 47.78 ± 5.37 개로 LOP군 보다 유의적으로 증가하였다. 발효를 하지 않은 결명자를 처리한 군(Auto-100, Auto-200, Auto-300) 변의 개수는 모두 loperamide에 비해 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 한편 K1처리군은 Auto군과 비슷한 양상을 보였다(Fig. I -36). 변의 중량은 K1처리군이 농도별로 증가하는 경향을 확인할 수 있었지만 마찬가지로 Auto군과 비슷한 양상을 보였다(Fig. I -37).

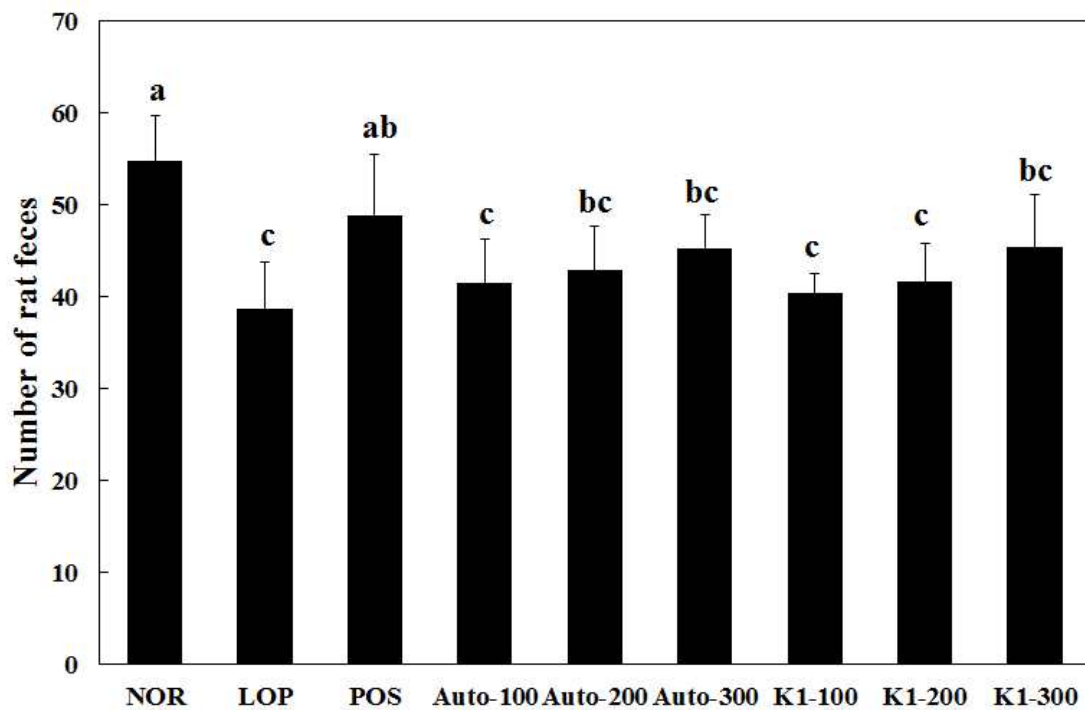


Fig. I -36. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on number of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

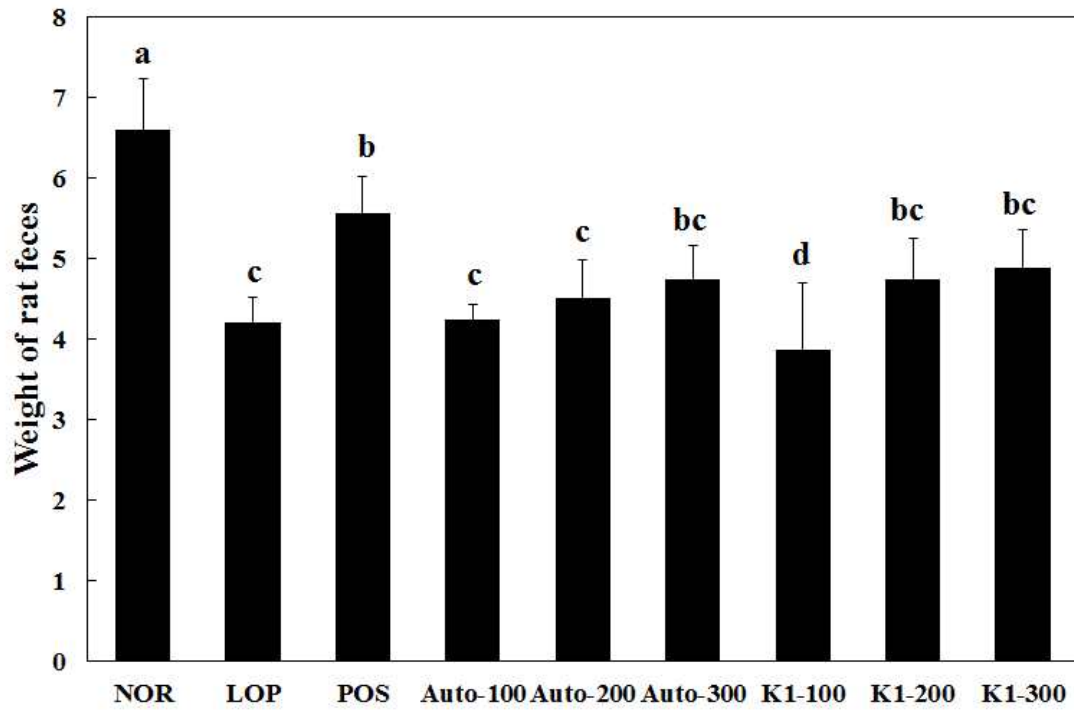


Fig. I -37. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 양성대조군에서(POS) 유의적으로 증가시켰다. 또한, Auto-200, Auto-300군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 결명자가 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 결명자를 발효시킨 K1 투여군에서는 LOP 군과 비교하여 차이가 없었고, 고농도 Auto 군보다는 비교적 낮은 수분함량을 확인할 수 있었다(Fig. I -38).

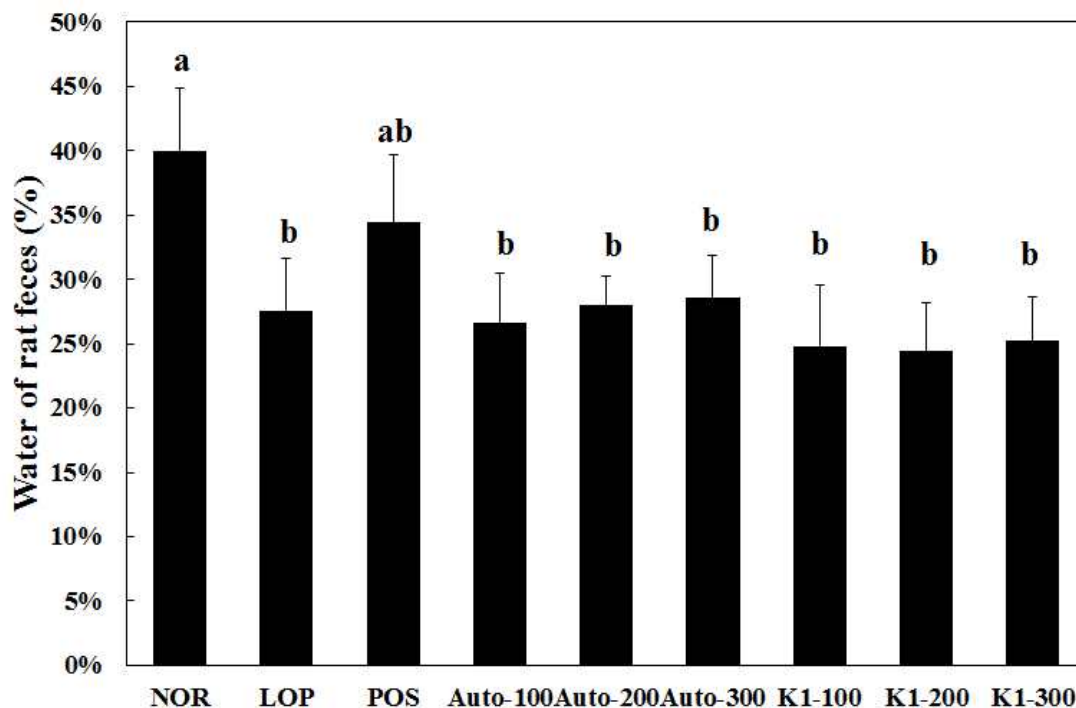


Fig. I -38. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on wet weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 장내 이동거리

실험 4일째에 천연염색시약을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군이 전체 장의 45%로 이동한 것에 비하여 loperamide 단독 투여 군에서는 30%로 감소하여 loperamide에 의해 장의 이동거리가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. POS군에서는 이를 유의적으로 증가시켰으며, Auto 투여군에서도 농도의존적으로 장의 이동거리가 loperamide군에 비해 모두 증가되었다. K1 군에서는 장의 이동거리가 증가되는 것을 확인할 수 있었고 고농도에서는 Auto군과 비교하여 장의 이동거리가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. I -39).

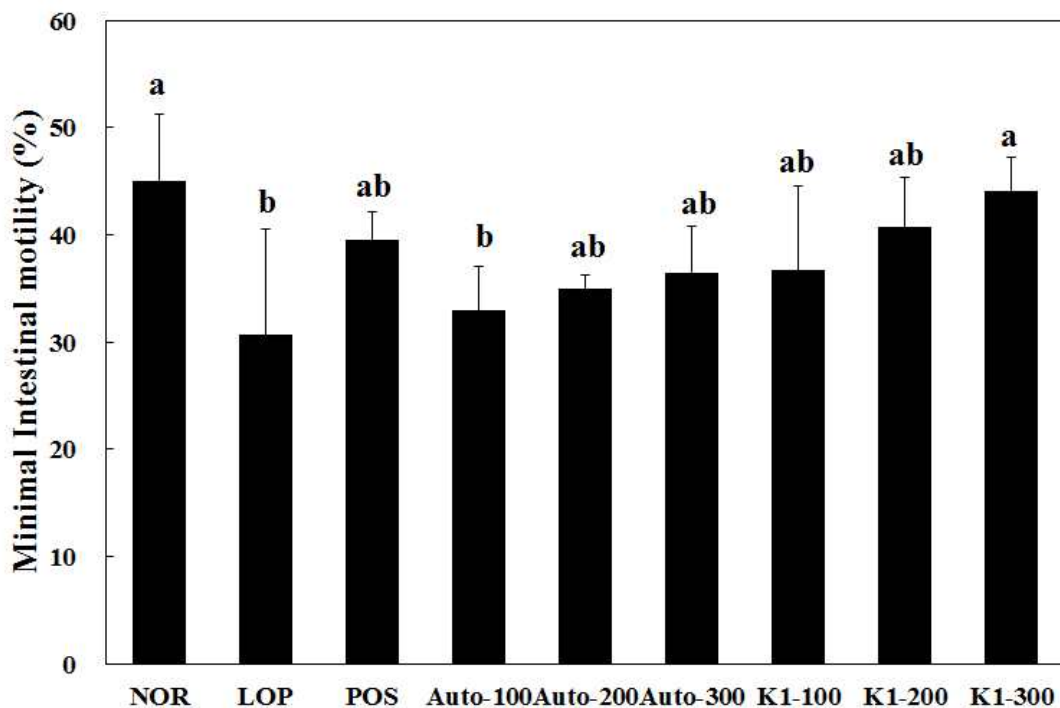


Fig. I -39. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on intestinal transit ratio in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비환자의 장점막에서 점액분비의 기능이 감소한다고 보고되어져 있으며, loperamide 투여시 대장운동 저하와 동시에 대장관 내 점액분비가 감소하여 그 결과로서 대장 내용물의 이동에 저해를 준다고 알려져 있다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만들어 alcian blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군에 비하여 loperamide 투여군에서 crypt cell 내의 염색되는 점액이 감소하는 반면에 물질투여군에서 진하게 염색되는 crypt cell 이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 loperamide 투여군에서 대장관내 내용물로 분비되는 점액양이 감소하였으나 양성대조군(POS) 군에서 이를 증가시켰다. 반면, 발효하지 않은 결명자(Auto)군에서는 LOP군보다는 점액분비량이 증가하는 것이 나타났다. K1 처리군은 LOP군보다는 점액질 분비가 농도에 의해 조금이나마 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나 발효되지 않은 결명자(Auto)군에 비해서는 큰차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

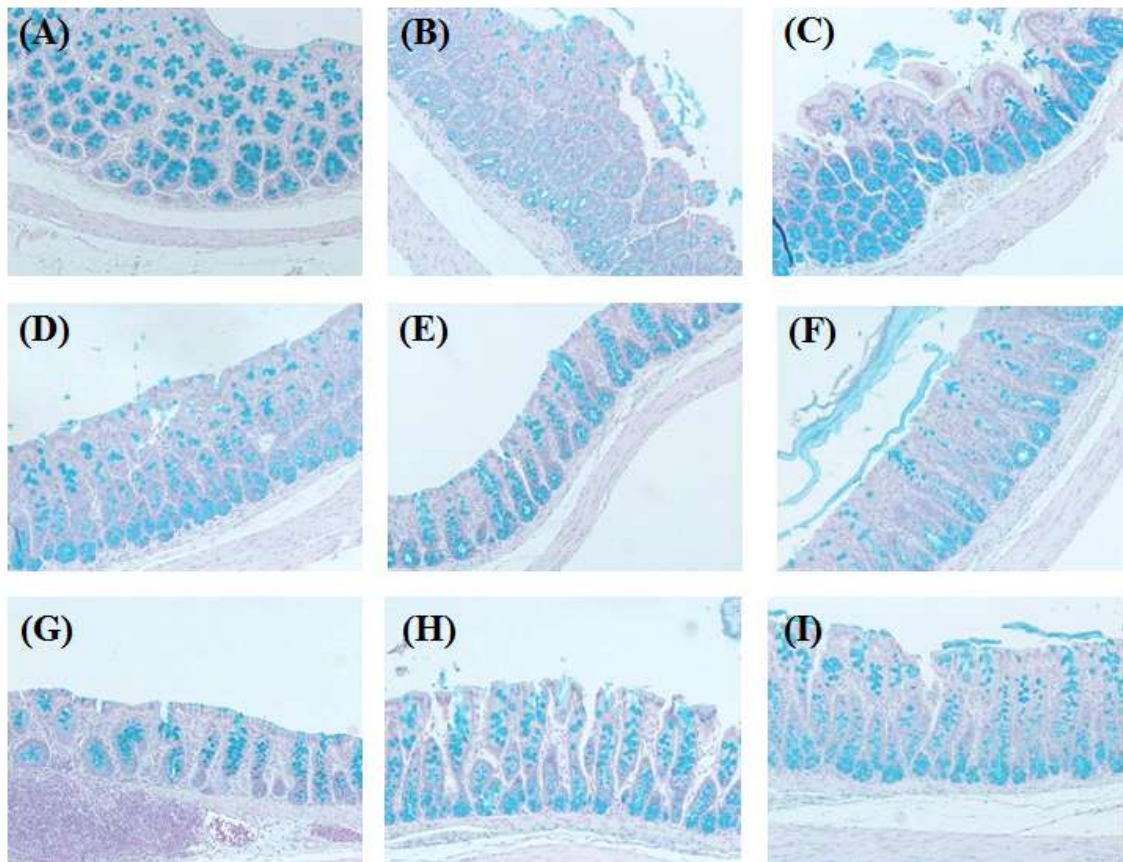


Fig. 1-40. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on mucous secretion capacity in loperamide-induced constipation rats. A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) POS; Positive control group, (D) Auto-100 group, (E) Auto-200 group, (F) Auto-300 group, (G) K1-100 group, (H) K1-200 group, (I) K1-300 group.

라. 결명자 추출물 K2

1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 loperamide로 변비를 유발시킨 군(LOP)이 정상 대조군(NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다(Table I -8). Loperamide 투여에 의하여 보여지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 음수량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table I -8).

Table I -8. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with fermented *Cassia tora* L. extract in loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	140.9±4.04 ^{bc}	19.3±1 ^a	44.6±5.73 ^{NS}
LOP	135.1±5.53 ^{bc}	18.1±1.74 ^{ab}	40 ± 3.67
POS	138.9±8.14 ^{bc}	17.5 ± 1.21	36.8 ± 1.25
Auto-100	132.3±5.29 ^c	17.1±2.35 ^{ab}	38.8 ± 1.64
Auto-200	140.2±6.97 ^{bc}	17.7±1.37 ^{ab}	40 ± 2.55
Auto-300	138.8±8.36 ^{bc}	18.4±1.14 ^{ab}	41.4 ± 3.05
K2-100	145.3±6.42 ^{ab}	16.7±1.78 ^b	41.6 ± 5.55
K2-200	135.7±2.18 ^{bc}	17.9±2.16 ^{ab}	41.4 ± 4.39
K2-300	150.8±5.25 ^a	18±0.62 ^{ab}	45.4 ± 7.96

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS} non significant

2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군(NOR)이 54.8 ± 4.87 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군(LOP)이 40.0 ± 5.78 개로 감소하여 loperamide에 대한 변 비유발이 확인되었다. 양성대조군인 (POS)군에서는 47.78 ± 5.37 개로 LOP군 보다 유의적으로 증가하였다. 발효를 하지 않은 결명자를 처리한 군(Auto-100, Auto-200, Auto-300) 변의 개수는 모두 loperamide에 비해 증가하는 경향을 보였으며 농도의존적으로 유의성 있게 증가하는 경향을 보였다. K2처리군은 LOP군과 비교하여 변의 개수가 농도별로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, Auto군과 비교해도 더 높은 변의 개수가 관찰되었고 양성대조군보다 더 높은 변의 개수를 확인할 수 있었다(Fig. 1-41). 변의 중량은 K2처리군이 농도별로 증가하는 경향을 확인할 수 있었고, 저농도(K2-100)군에서는 LOP 군과 차이가 없었으나 중농도(K2-200), 고농도(K2-300)군에서는 변의 중량이 증가하였다. 그리고 발효처리하지 않은 결명자(Auto) 군에 비해서도 효과적이었다(Fig. 1-42).

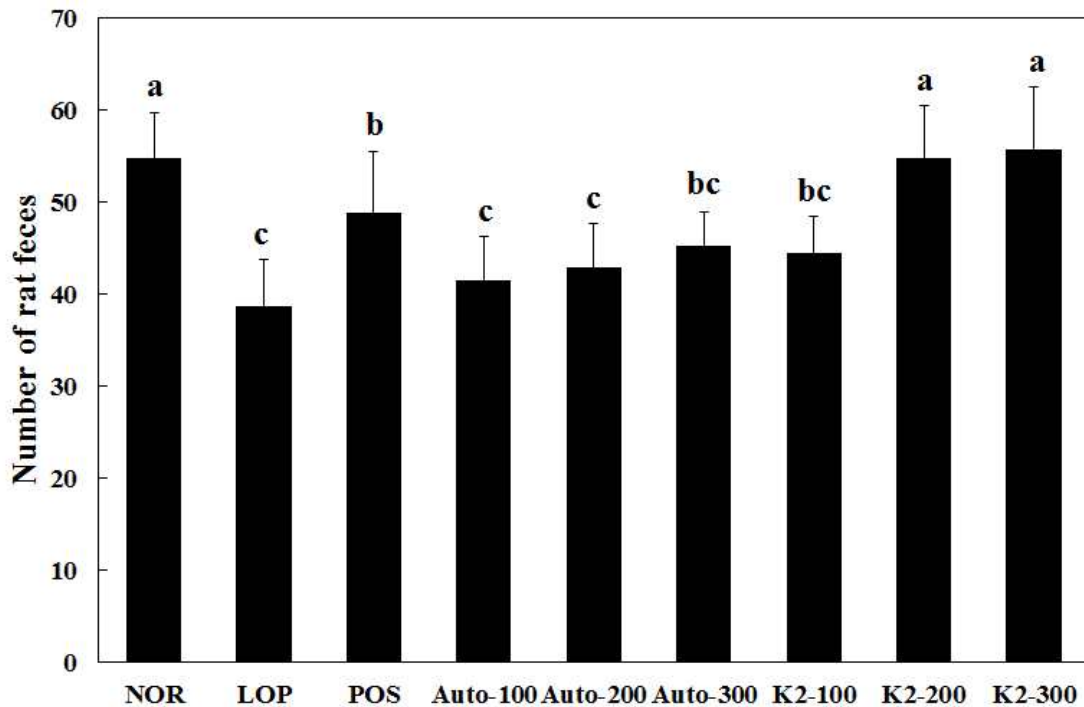


Fig. 1-41. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on number of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

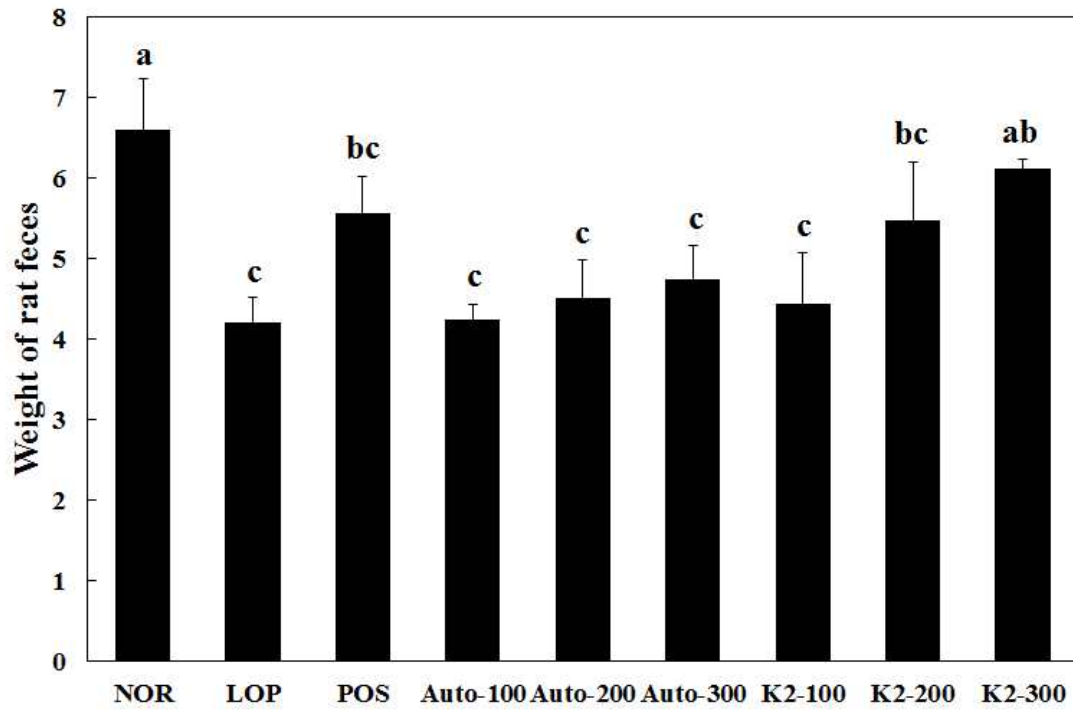


Fig. I -42. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 양성대조군(POS)에서 유의적으로 증가시켰다. 또한, Auto-200, Auto-300군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 결명자가 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 결명자를 발효시킨 K2 투여군에서는 각각 LOP 군보다 더 높은 수분함량을 보였고 농도별로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, Auto 군보다 더 높은 수분함량을 확인할 수 있었다(Fig. 1-43).

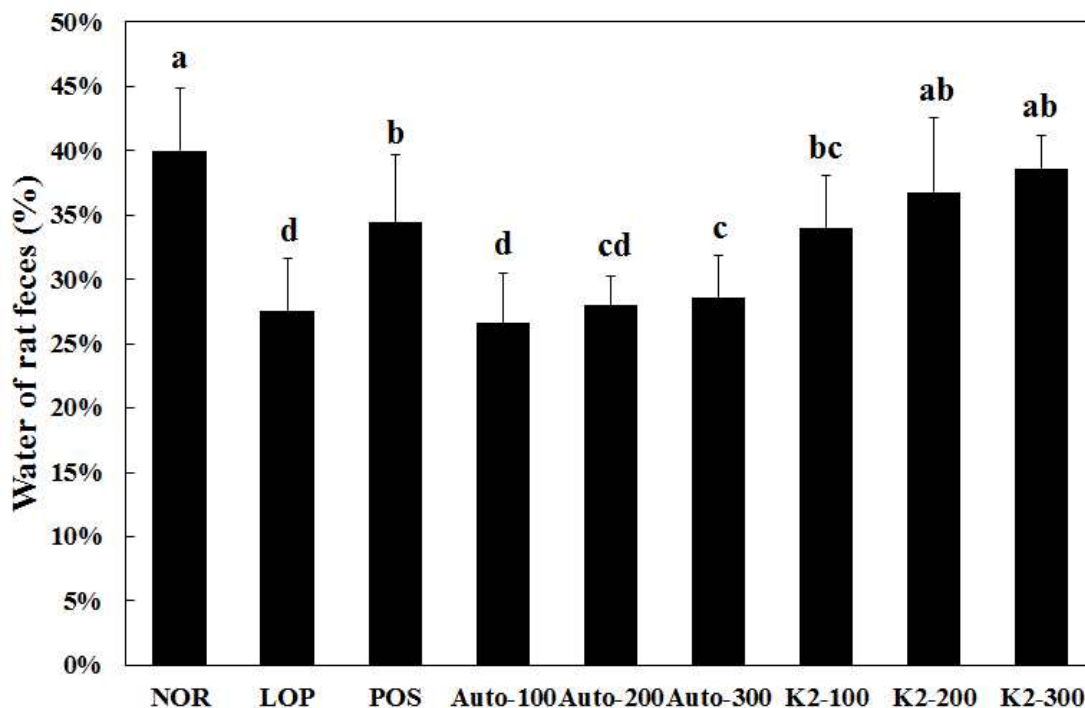


Fig. 1-43. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on wet weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 장내 이동거리

실험 4일째에 천연염색시약을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군이 전체 장의 45%로 이동한 것에 비하여 loperamide 단독 투여 군에서는 30%로 감소하여 loperamide에 의해 장의 이동거리가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. POS군에서는 이를 유의적으로 증가시켰으며, Auto 투여군에서도 농도의존적으로 장의 이동거리가 loperamide군에 비해 모두 증가되었다. K2 군에서는 장의 이동거리가 증가되는 것을 확인할 수 있었고 Auto군과 비교하여 장의 이동거리가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. I -44).

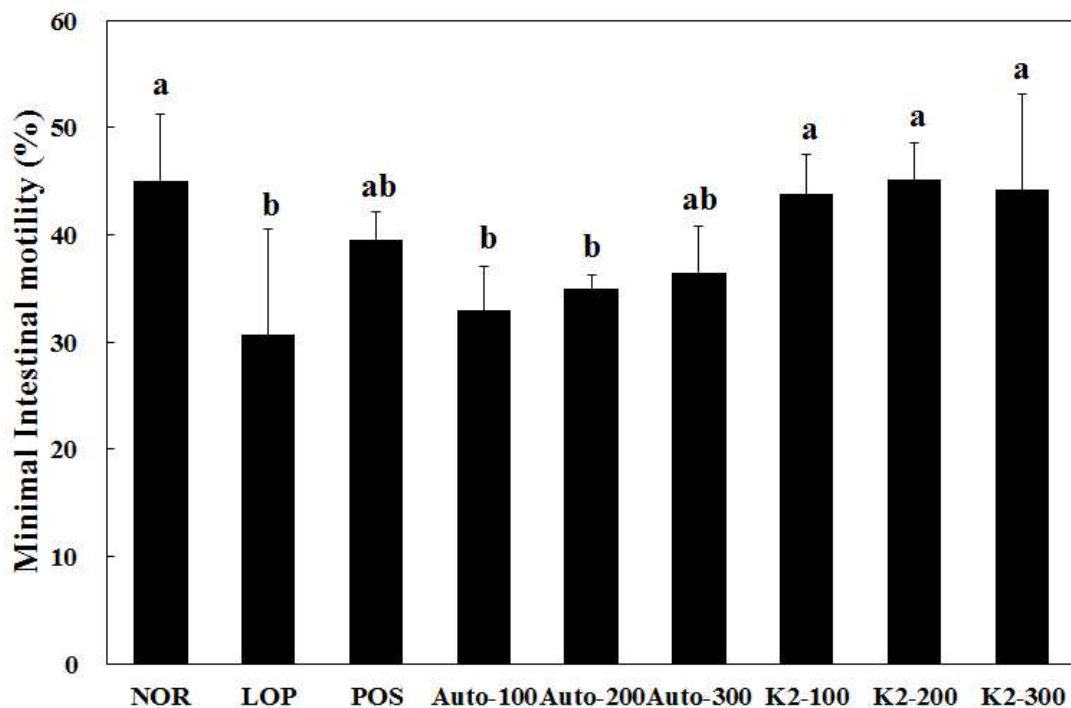


Fig. I -44. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on intestinal transit ratio in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비환자의 장점막에서 점액분비의 기능이 감소한다고 보고되어져 있으며, loperamide 투여시 대장운동 저하와 동시에 대장관 내 점액분비가 감소하여 그 결과로서 대장 내용물의 이동에 저해를 준다고 알려져 있다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만들어 alcian blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군에 비하여 loperamide 투여군에서 crypt cell 내의 염색되는 점액이 감소하는 반면에 물질투여군에서 진하게 염색되는 crypt cell 이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 loperamide 투여군에서 대장관내 내용물로 분비되는 점액양이 감소하였으나 양성대조군(POS) 군에서 이를 증가시켰다. 반면, 발효하지 않은 결명자(Auto)군에서는 LOP군보다는 점액분비량이 증가하는 것이 나타났다. K2 처리군은 LOP군보다는 점액질 분비가 농도에 의해 증가되는 것을 관찰할 수 있었고 K2-200, K2-300 군은 정상대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타나 K2가 점액질 분비향상에 도움이 되는 것을 확인할 수 있었다.

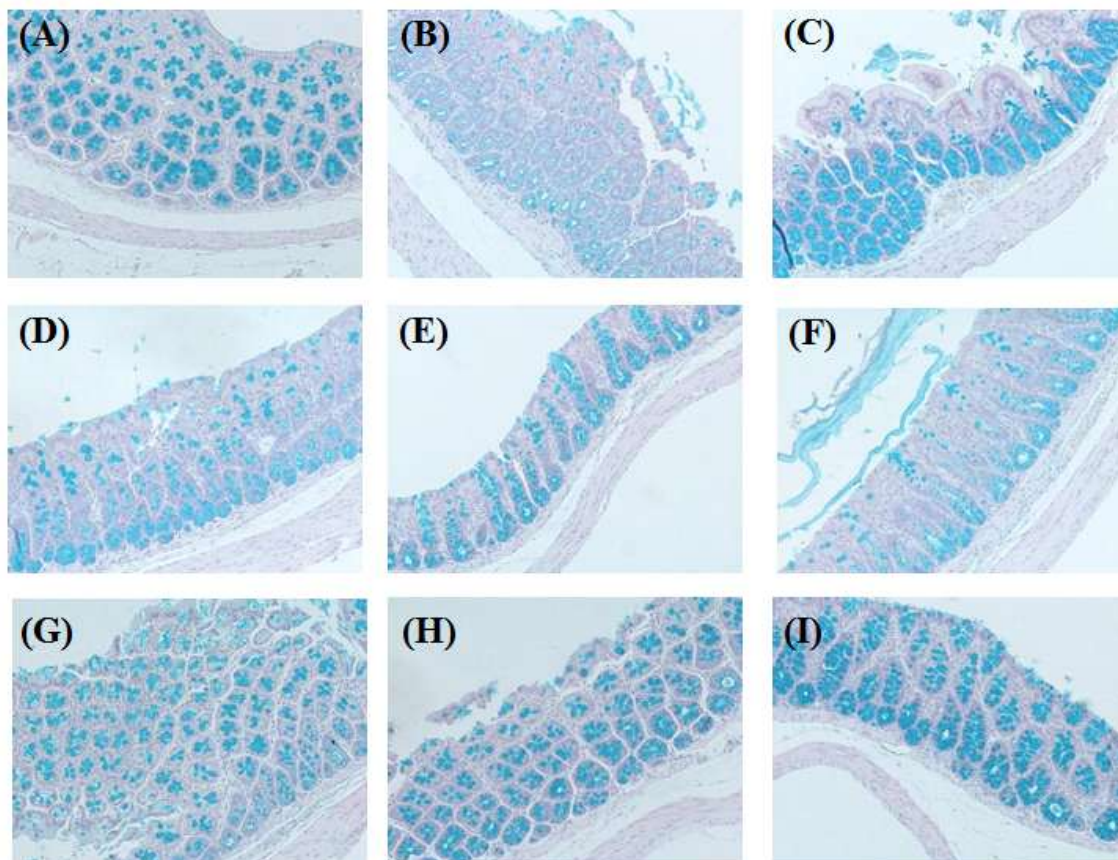


Fig. 1-45. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on mucous secretion capacity in loperamide-induced constipation rats. A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) POS; Positive control group, (D) Auto-100 group, (E) Auto-200 group, (F) Auto-300 group, (G) K2-100 group, (H) K2-200 group, (I) K2-300 group.

마. 결명자 추출물 K3

1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 loperamide로 변비를 유발시킨 군(LOP)이 정상 대조군(NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table I -9).

Table I -9. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with fermented *Cassia tora* L. extract in loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	140.9±4.04 ^{ab}	19.3±1 ^{NS}	44.6±5.73 ^a
LOP	135.1±5.53 ^b	18.1 ± 1.74	40±3.67 ^{ab}
POS	138.9±8.14 ^{ab}	17.5 ± 1.21	36.8±1.25 ^b
Auto-100	132.3±5.29 ^b	17.1 ± 2.35	38.8±1.64 ^b
Auto-200	140.2±6.97 ^{ab}	17.7 ± 1.37	40±2.55 ^{ab}
Auto-300	138.8±8.36 ^{ab}	18.4 ± 1.14	41.4±3.05 ^{ab}
K3-100	144.3±4.16 ^{ab}	18 ± 1.43	41.6±1.14 ^{ab}
K3-200	142.7±4.64 ^{ab}	19 ± 1.49	38±5.7 ^b
K3-300	147.4±4.76 ^a	18.6 ± 1.34	37.4±3.85 ^b

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS} non significant

2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군(NOR)이 54.8 ± 4.87 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군(LOP)이 40.0 ± 5.78 개로 감소하여 loperamide에 대한 변 비유발이 확인되었다. 양성대조군인 (POS)군에서는 47.78 ± 5.37 개로 LOP군 보다 유의적으로 증가하였다. 발효를 되지 않은 결명자를 처리한 군(Auto-100, Auto-200, Auto-300) 변의 개수는 모두 loperamide에 비해 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 한편 K3처리군은 농도별로 증가하는 하였지만 LOP군보다 오히려 감소된 변의 개수를 확인할 수 있었다(Fig. I -46). 변의 중량은 K3처리군이 농도별로 증가하는 경향을 확인할 수 있었지만, K3-100 군은 오히려 LOP 군보다 감소되는 것을 확인하였고, 발효처리하지 않은 결명자 군에 비해서도 감소하였다(Fig. I -47).

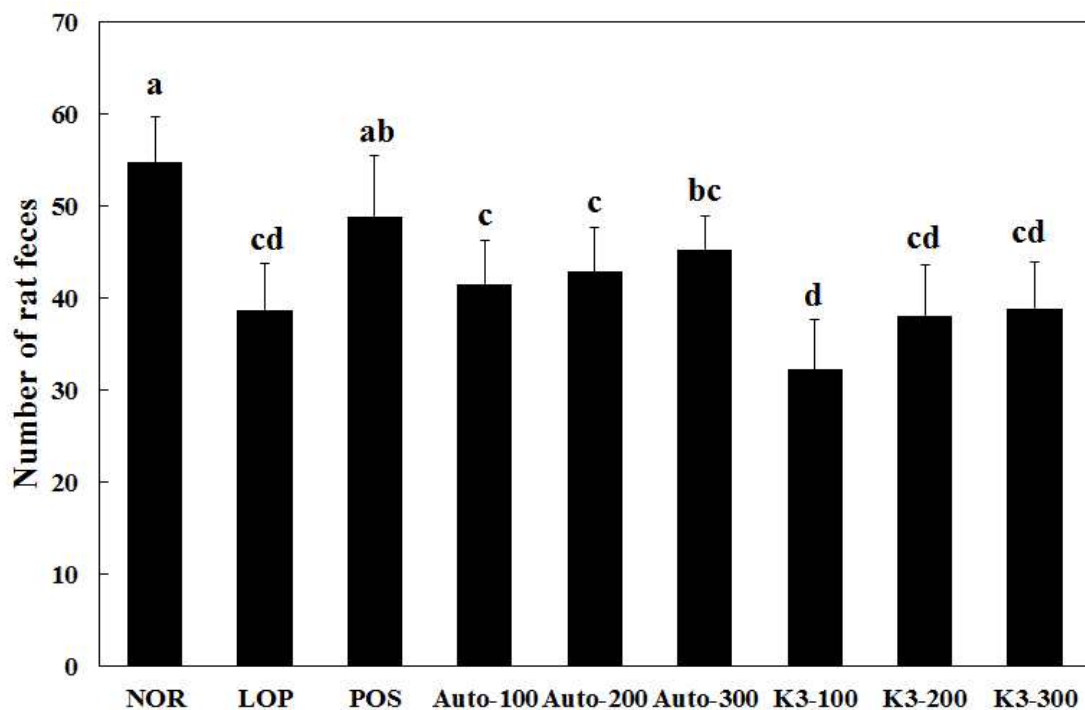


Fig. I -46. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on number of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

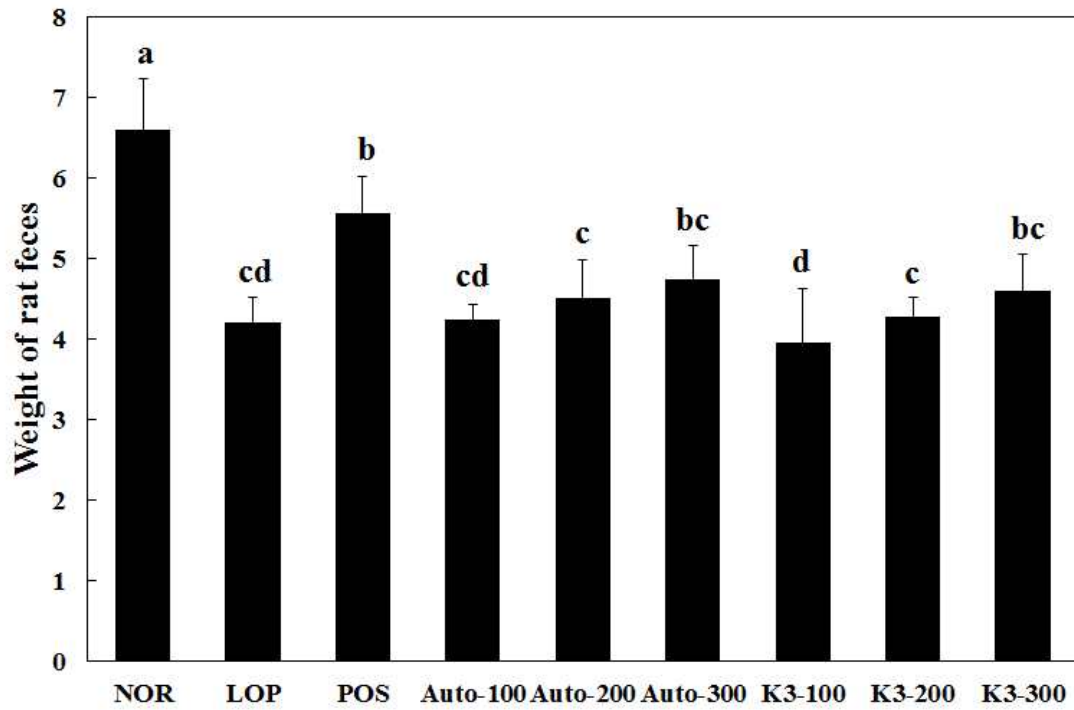


Fig. I -47. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군(NOR)에 비하여 loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며 이를 양성대조군(POS)에서 증가시켰으나, 모든 결명자 투여군에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다(Fig. I -48).

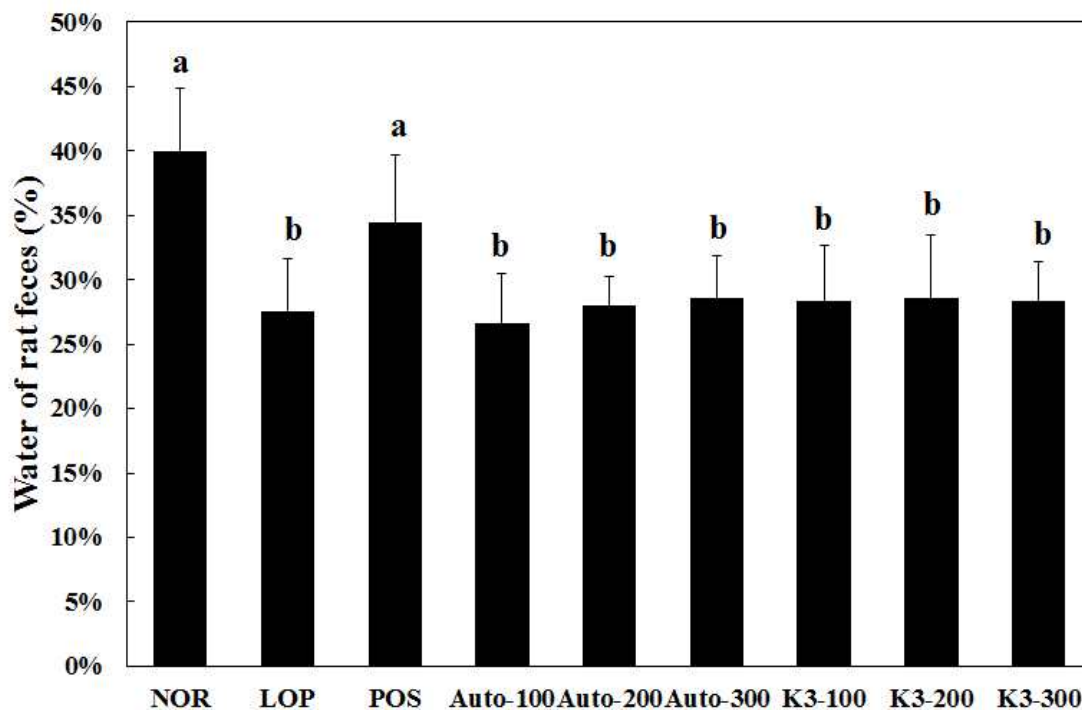


Fig. I -48. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on wet weights of fecal pellets in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 장내 이동거리

실험 4일째에 천연염색시약을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군이 전체 장의 45%로 이동한 것에 비하여 loperamide 단독 투여 군에서는 30%로 감소하여 loperamide에 의해 장의 이동거리가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. POS군에서는 이를 유의적으로 증가시켰으며, Auto 투여군에서도 농도의존적으로 장의 이동거리가 loperamide군에 비해 모두 증가되었다. K3 군에서는 장의 이동거리가 증가되는 것을 확인할 수 있었지만 Auto군과 비교하여 장 이동거리 활성이 크지 않다는 것을 알 수 있었다(Fig. I -49).

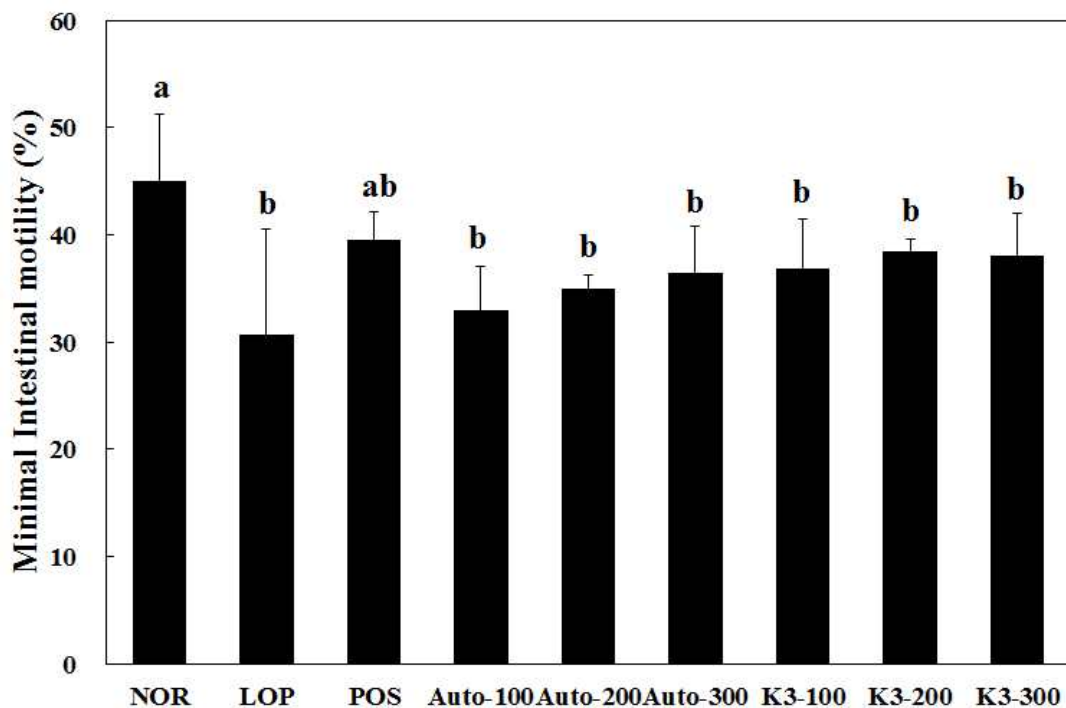


Fig. I -49. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on intestinal transit ratio in loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비환자의 장점막에서 점액분비의 기능이 감소한다고 보고되어져 있으며, loperamide 투여시 대장운동 저하와 동시에 대장관 내 점액분비가 감소하여 그 결과로서 대장 내용물의 이동에 저해를 준다고 알려져 있다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만들어 alcian blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군에 비하여 loperamide 투여군에서 crypt cell 내의 염색되는 점액이 감소하는 반면에 물질투여군에서 진하게 염색되는 crypt cell 이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 loperamide 투여군에서 대장관내 내용물로 분비되는 점액양이 감소하였으나 양성대조군(POS) 군에서 이를 증가시켰다. 반면, 발효하지 않은 결명자(Auto)군에서는 LOP군보다는 점액분비량이 증가하는 것이 나타났다. K3 처리군은 LOP군보다는 점액질 분비가 농도에 의해 조금이나마 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나 발효되지 않은 결명자(Auto)군에 비해 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

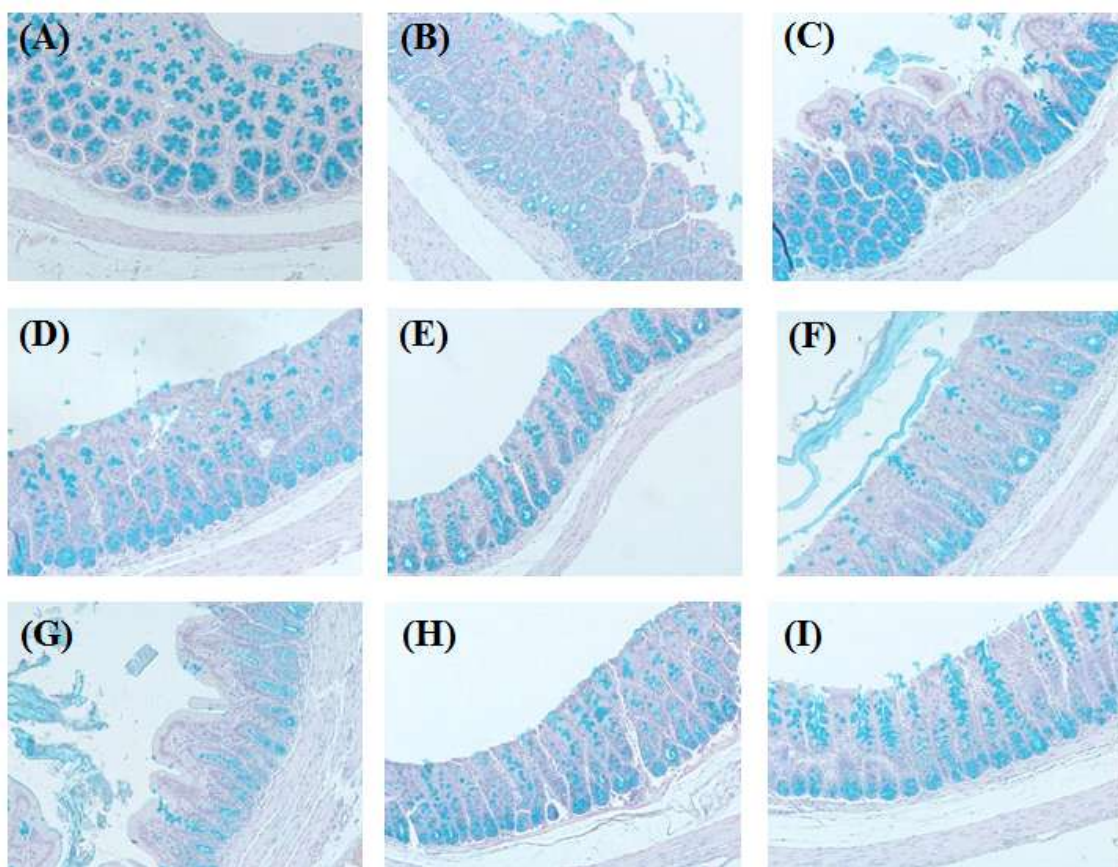


Fig. 1-50. Effects of the fermented *Cassia tora* L. on mucous secretion capacity in loperamide-induced constipation rats. A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) POS; Positive control group, (D) Auto-100 group, (E) Auto-200 group, (F) Auto-300 group, (G) K3-100 group, (H) K3-200 group, (I) K3-300 group.

I-6. 결명자, 하수오 발효물의 지표 및 유효성분 분리

6-1. 결명자의 유효성분 분리

I. 재료 및 방법

1) 결명자 추출물의 LC/MS 스크리닝

결명자에 함유되어있는 성분을 분리하기위해 LC/MS를 이용한 성분 스크리닝을 진행하였다. 그 결과 결명자에는 anthraquinone과 그 배당체등의 화합물이 들어있음을 확인 하였으며, 그 화합물들에 대한 분리실험을 진행하였다.

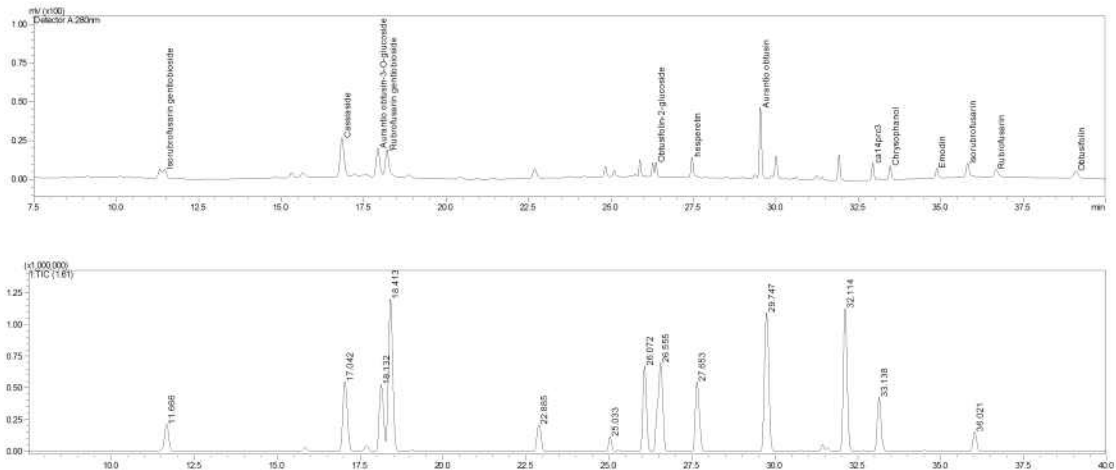


Fig. 1-51. LC and MS chromatogram of *Cassia tora* L. Seed.

2) 결명자 추출 및 성분 분리

결명자 5kg을 50% 주정을 이용해 추출하였으며, 그 추출물을 다시 50℃ 이하에서 감압 농축하여 건조 추출물 358g을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 ODS gel (50um, 1.2Kg YMC)을 이용한 Open column chromatography를 진행하였다. 실험은 고정상인 OSD gel을 Glass Column (16cm x 60cm)에 충전하여 Water-ACN (100: 0 → 40: 60)을 이동상으로 하여 전개하였으며, 그 결과 19개의 소분획물로 나누었다 (MJ90-1~19).

이렇게 나누어진 각각의 분획물에 대해서는 LC/MS IT-TOF (shimadzu, japan)를 이용하여 성분 스크리닝 하였으며 메탄올 추출물의 chromatogram과 비교하여 각각의 소분획물에서의 main compound를 확인하였고 소분획물간의 분리조건을 LC/MS 및 TLC를 이용하여 선정하고 분리를 진행하였다.

- 소분획물 MJ90-5와 MJ90-6을 합하여 OSD gel(20um, 250g YMC)을 이용한 open column chromatography를 진행하였다. Glass column(5cm x 70cm)에 충전된 ODS gel에 Water-ACN (100:0 → 40:60)을 이동상으로 전개하였으며 11개의 소분획물을 얻었다 (MJ90-89-1~11). 그리고 이중 MJ90-56-5의 재결정화를 통해 Compound 1을 순수하게 분리하였다. 또한 MJ90-56-11을 Preparation HPLC를 이용해 Compound 2를 순수히 분리하였다.

- 소분획물 MJ90-9와 MJ90-10을 합하여 역시 OSD gel(20um, 250g YMC)을 이용한

open column chromatography를 진행하였다. ODS gel은 Glass column(5 cm x 70 cm)에 충전하였으며, 이동상은 Water,ACN을 100:0에서 40:60의 비율로 하여 전개하였다. 그 결과 10개의 소분획물을 얻었으며, 이중 MJ90-910-8과 MJ90-910-9를 합해 Preparation HPLC를 진행하였으며, Compound 3를 순수히 분리하였다.

- 소분획물 MJ90-11을 TLC와 LC/MS를 이용해 스크리닝 하였고, TLC결과를 토대로 silica gel을 이용한 순상 open column chromatography를 진행하였다. Silica gel(70-230mesh, Merck, Germany)을 충전 후 이동상으로 EtOAc : MeOH : DW = 6 : 1 : 0.2의 비율로 혼합된 용매를 이용해 전개하였고, 총 15개의 소분획물을 얻었으며 이중 MJ90-11-2를 Prep. HPLC를 이용해 Compound 4를 순수하게 분리하였다.

- 소분획물 MJ90-13을 TLC와 LC/MS를 이용해 스크리닝 하였고, TLC결과를 토대로 silica gel(70-230mesh, Merck, Germany)을 이용한 순상 opencolumn chromatography를 진행하였다. Silica gel이 충전된 glass column에 이동상인 EtOAc : MeOH : DW = 6 : 1 : 0.2의 혼합용매를 이용해 전개하였으며, 그 결과 6개의 소분획물을 얻었다. 그리고 이중 MJ90-13-1을 Prep. HPLC를 이용해 Compound 5를 순수히 분리하였다.

- 소분획물 MJ90-16과 17을 합하여 Silica gel(70-230mesh, Merck, Germany)을 이용한 순상 open column chromatography(n-Hexane : EtOAc = 2:1 → 1:1)를 진행 하여 3개의 소분획물을 얻었으며, MJ90-1617-1의 재결정화를 통해 Compound 6를 순수히 분리하였다.

MeOH extraction of *Cassia tora* L. seeds. (385g)

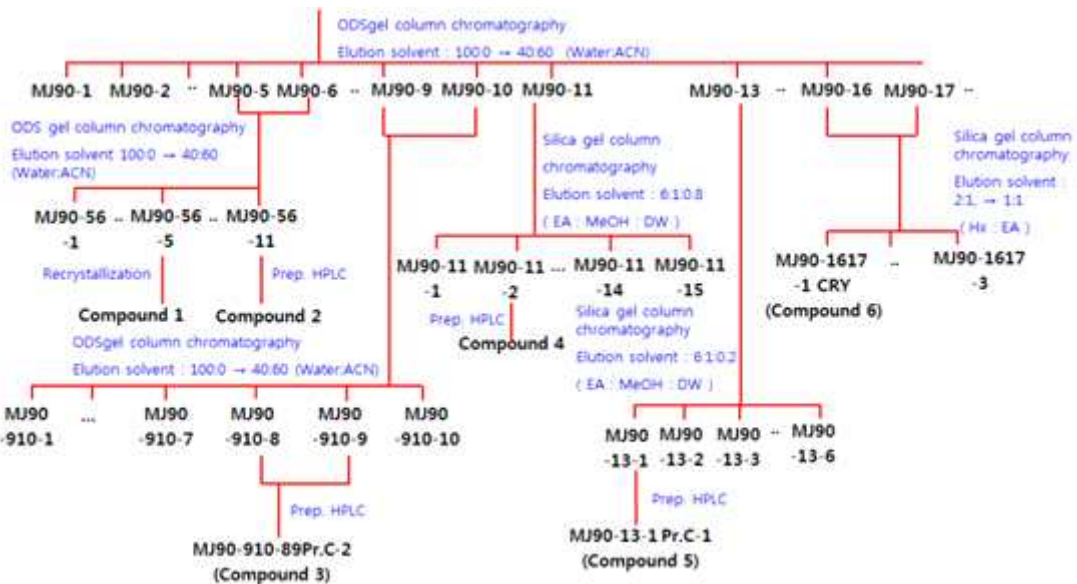


Fig. I -52. Isolation of compound 1 to 6 from *Cassia tora* L. seed.

- 소분획물 MJ90-18과 19를 합하여 TLC를 찍어 분리조건 설정 후 Silica gel (70-230mesh, Merck, Germany)을 이용한 순상 open column chromatography(EtOAc : MeOH : Water = 6 : 1 : 0.8)를 진행 하여 13개의 소분획물을 얻었으며, 이중

MJ90-1819-1을 Prep. HPLC를 이용해 Compound 7을 순수히 분리하였다. 그리고 MJ90-1819-5를 Prep. HPLC를 이용해 Compound 8과 Compound 9을 순수히 분리하였다.

- MJ90-20을 TLC와 LC/MS를 통해 포함된 화합물을 스크리닝 한 후 Silica gel(70-230 mesh, Merck, Germany)을 이용한 순상 open column chromatography를 진행 하였으며, 이중 MJ90-20-14를 Prep. HPLC를 이용해 Compound 10, 11, 12를 순수히 분리하였다.

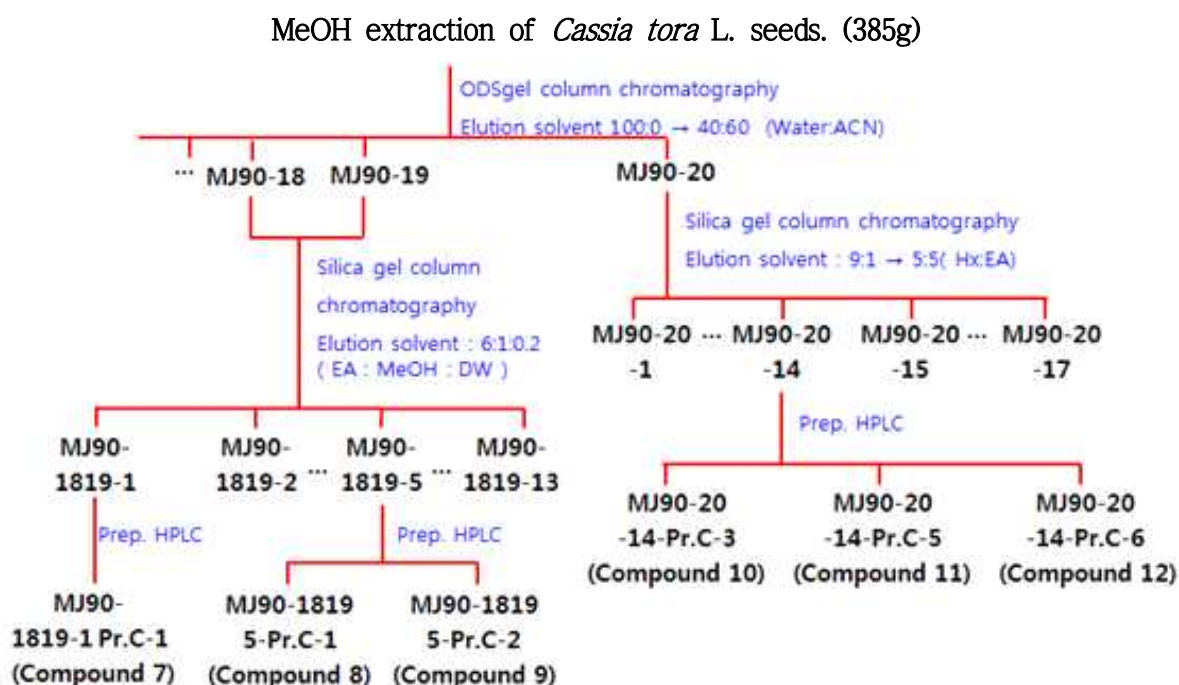


Fig. 1 -53. Isolation of compound 7 to 12 from *Cassia tora* L. seed.

II. 결과 및 고찰

1) Compound 1 (MJ90-56-5)의 구조동정

결명자로부터 분리한 Compound 1 (MJ90-56-5)의 ESI-IT-TOF-MS분석을 통해 597.1814 [M+H]⁺와 641.1651 [M+HCOO]⁻의 분자량을 갖는 것을 확인 하였으며, MS spectrum을 formular predictor (Shimadzu, Japan)에 적용하여 C₂₇H₃₂O₁₅의 분자식을 가지는 화합물임을 확인할 수 있었으며 기존의 문헌을 조사해본 결과 rubrofusarin 배당체와 유사물질임을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 data를 바탕으로 핵자기공명을 통한 구조동정을 진행하였다.

¹H-NMR data에서는 먼저 δ 6.93 (s, 1H), 6.91 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 0.8 Hz, 1H)의 이중결합 영역에서 proton peak를 확인 하였으며, benzen ring에 존재함을 확인하였다. 또한, δ 6.91, 6.80에서 나타나는 각각의 J value 값을 이용해 meta coupling의 위치에 존재하는 서로 연관된 proton임을 확인 하였으며, δ 6.93이 singlet이 나타난 것을 통해 주변에 작용기가 있는 proton임을 확인 하였다. δ 3.88 과 2.53에서 수소이온을 3개씩 갖는 methoxyl기와 methyl기의 두 작용기를 확

인 하였으며, methyl기의 경우 역시 J value값을 통해 δ 6.49의 proton과 근접한 위치에 존재하는 것을 확인 하였다. 또한 δ 5.14 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H)에서 당의 1번 proton을 나타내는 anomeric proton을 확인 하였으며, 각각의 J value를 통해 β -form을 가지는 두 개의 당이 존재하는 것을 추정하였다.

^{13}C -NMR spectrum에서는 δ 182.33에서 carbonyl기가 존재하는 것을 확인하였으며, 168.40에서 99.50까지 13개의 이중결합 영역의 peak를 확인하고, 55.50, 19.86 ppm에서 methoxyl기와 methyl기를 각각 확인하여 이를 ^1H -NMR에서 얻은 정보를 바탕으로 benzen 과 chroman ring이 존재하는 isorubrofusarin의 기본골격을 가지는 화합물임을 추정하였다. 또한 103.57, 100.24 ppm에서 각각의 anomeric carbon을 확인 하였으며, 76.94, 76.78, 76.66, 75.40, 73.65, 73.53, 70.07, 69.50, 68.70, 61.04 ppm에서 6탄당 두 개의 peak를 모두 확인하였다. 이렇게 MS와 NMR data를 통해 얻은 정보를 기존의 문헌 (Choi *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1997)과 비교한 결과, compound 1을 isorubrofusarin gentiobioside로 구조동정 하였다.^{27,28,29,30}

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 12.94 (s, 1H, 5-OH), 6.93 (s, 1H, H-6), 6.91 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-7), 6.80 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-9), 6.49 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-3), 5.14 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.19 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1''), 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.53 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 182.33 (C-4), 168.40 (C-2), 161.14 (C-8), 156.05 (C-10), 155.61 (C-5), 155.16 (C-11), 140.27 (C-13), 109.64 (C-3), 108.09 (C-12), 104.93 (C-6), 104.17 (C-14), 103.57 (C-1''), 100.24 (C-1'), 100.03 (C-9), 99.50 (C-7), 76.94 (C-3'), 76.78 (C-3''), 76.66 (C-5''), 75.40 (C-5'), 73.65 (C-2'), 73.53 (C-2''), 70.07 (C-4'), 69.50 (C-4''), 68.70 (C-6''), 61.04 (C-6'), 55.50 ($-\text{OCH}_3$), 19.86 ($-\text{CH}_3$).

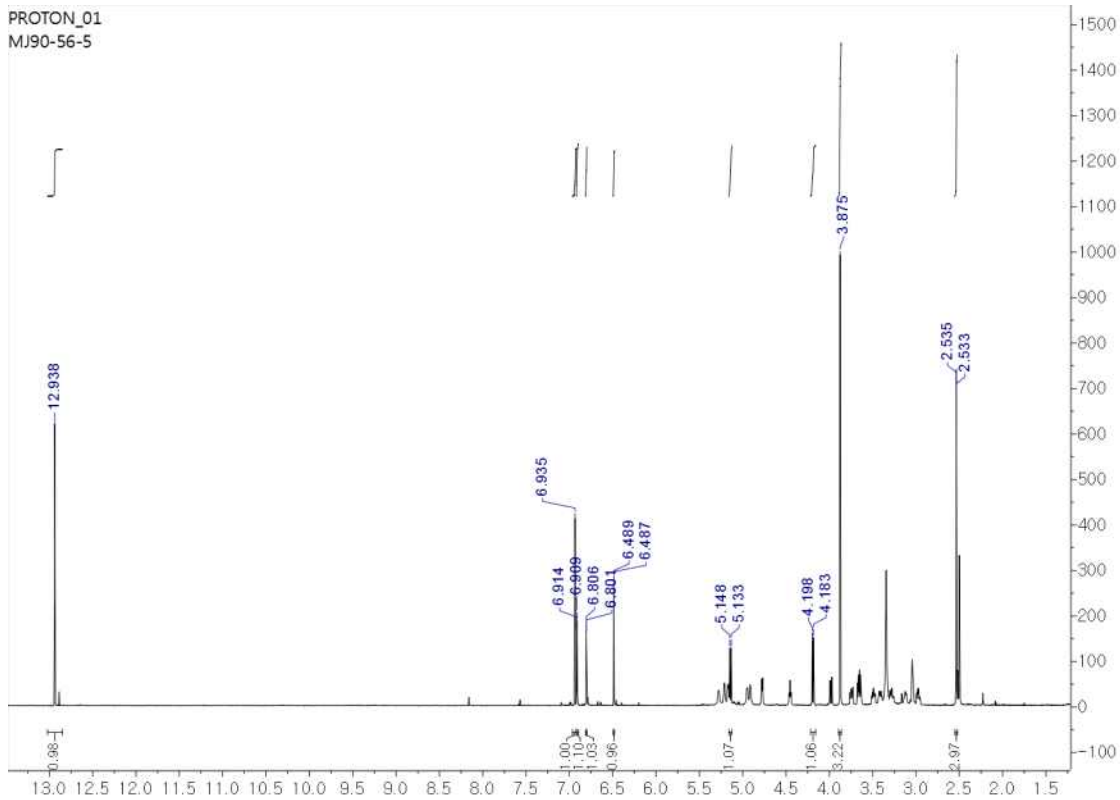


Fig. I -54. ^1H -NMR spectrum of compound 1 (isorubrofusarin gentiobioside).

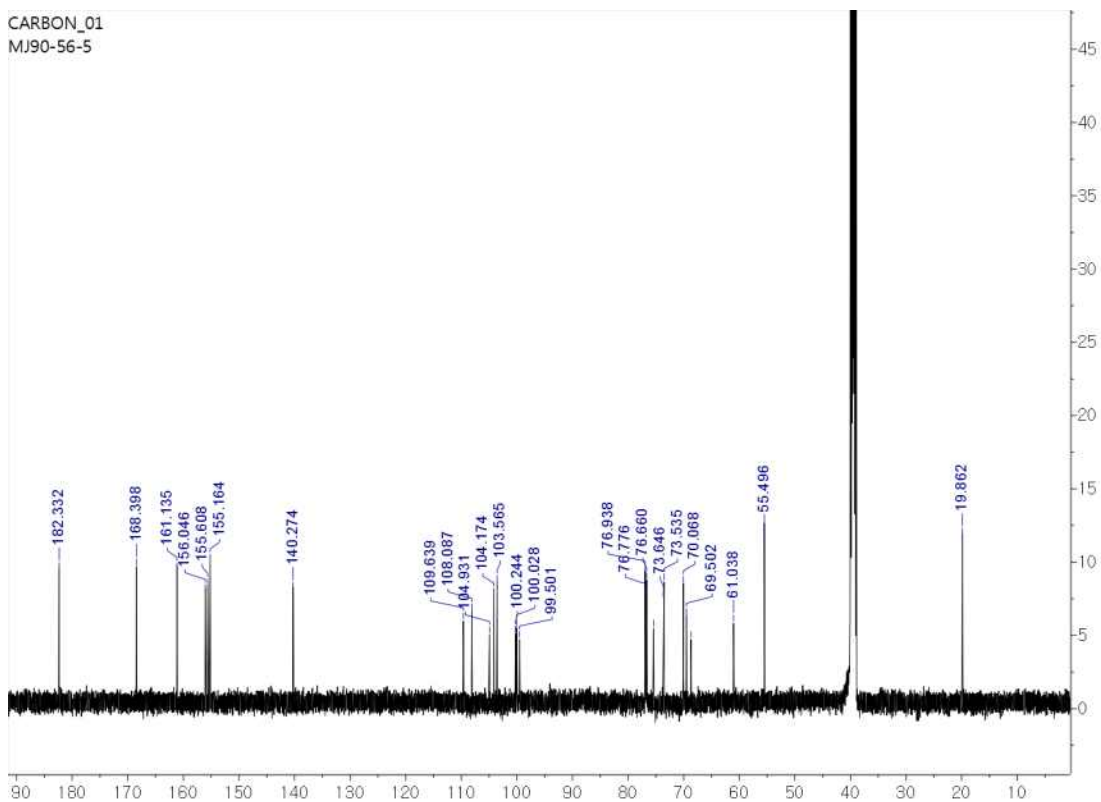


Fig. I -55. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (isorubrofusarin gentiobioside).

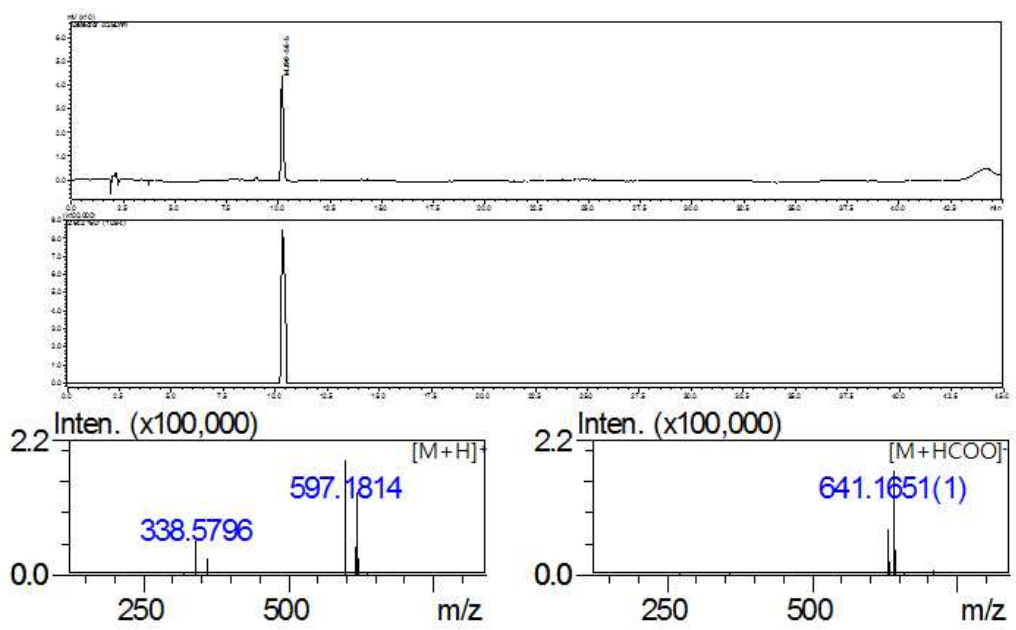


Fig. I -56. Mass spectrum(ESI) of compound 1.

Table I -10. ¹H- and ¹³C-NMR data of Compound 1 in DMSO-*d*₆

Position	δ_{H}	δ_{C}
2	-	168.40
3	6.49 (d, <i>J</i> = 0.8 Hz, 1H)	109.64
4	-	182.33
5	-	155.61
6	6.93 (s, 1H)	104.93
7	6.91 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H)	99.50
8	-	161.14
9	6.80 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H)	100.03
10	-	156.05
11	-	155.16
12	-	108.09
13	-	140.27
14	-	104.17
1'	5.14 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H)	100.24
2'	-	73.65
3'	-	76.94
4'	-	70.07
5'	-	75.40
6'	-	61.04
1''	4.19 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H)	103.57
2''	-	73.53
3''	-	76.78
4''	-	69.50
5''	-	76.66
6''	-	68.70
8-OCH ₃	3.88 (s, 3H)	55.50
2-CH ₃	2.53 (d, <i>J</i> = 0.9 Hz, 3H)	19.86
5-OH	12.94 (s, 1H)	-

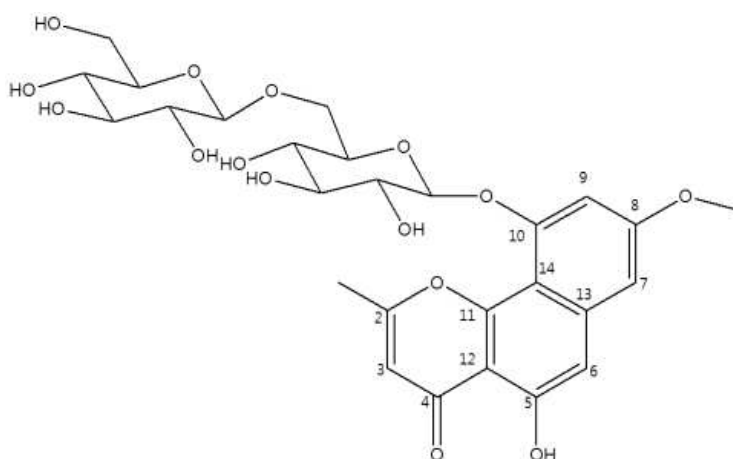


Fig. I -57. Structure of isorubrofusarin gentiobioside.

2) Compound 2 (MJ90-56-11 Pr. C-1)의 구조동정

Compound 2 (MJ90-56-11 Pr. C-1)의 ESI-IT-TOF-MS분석을 통해 493.1253 [M+H]⁺와 491.1122 [M-H]⁻의 분자량을 갖는 것을 확인 하였으며, 확인된 MS spectrum을 formular predictor (Shimadzu, Japan)에 적용하여 C₂₃H₂₄O₁₂의 분자식을 가지는 화합물임을 확인할 수 있었으며 기존의 문헌을 조사해본 결과 anthraquinone계열의 화합물인 aurantio obtusin 배당체와 유사물질임을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 data를 바탕으로 핵자기공명을 통한 구조동정을 진행하였다.

¹H-NMR data에서는 먼저 δ 7.79 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H)의 이중결합 영역에서 proton peak를 확인 하였으며, anthraquinone의 benzen ring에 존재하는 수소이온임을 확인하였다. 또한, 5.16 (d, J = 7.4 Hz, 1H)에서 확인된 doublet peak를 통해 β -form의 당이 존재하는 것을 확인하였다. 그리고 δ 3.87 (s, 3H), 3.80 (s, 3H) 에서 methoxyl기를 확인 하였으며, 2.28 (d, J = 0.8 Hz, 3H)를 통해 methyl기를 가지는 화합물임을 확인하였다.

¹³C-NMR spectrum에서는 δ 188.10과 180.44에서 두 개의 carbonyl기의 존재를 확인 하였으며, 156.69, 156.36, 155.98, 147.78, 141.87, 132.89, 128.71, 126.43, 125.01, 124.08, 113.50, 106.65 ppm의 benzen ring의 영역의 peak와 100.74, 77.80, 76.93, 73.68, 69.79, 60.98 ppm의 glucose의 peak를 확인하여 anthraquinone계열의 배당체 화합물임을 확인하였고, 61.61, 60.84, 17.06 ppm에서 두 개의 methoxyl기와 하나의 methyl기를 가지는 aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside임을 추정하였다. 이렇게 MS와 NMR data를 통해 얻은 정보를 기존의 문헌(Lee *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004)^{31,32,33}과 비교한 결과, compound 1을 aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside로 구조동정 하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 7.79 (d, J = 0.8 Hz, 1H, H-4), 7.42 (s, 1H, H-5), 5.16 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-1'), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 3.80 (s, 3H, -OCH₃), 2.28 (d, J = 0.8 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 188.10 (C-9), 180.44 (C-10), 156.69 (C-8), 156.36 (C-2), 155.98 (C-6), 147.78 (C-1), 141.87 (C-7), 132.89 (C-3), 128.71 (C-11), 126.43 (C-4), 125.01 (C-14), 124.08 (C-13), 113.50 (C-12), 106.65 (C-5), 100.74 (C-1'), 77.80 (C-5'), 76.93 (C-3'), 73.68 (C-2'), 69.79 (C-4'), 61.61 (-OCH₃), 60.98 (C-6'), 60.84 (-OCH₃), 17.06 (-CH₃).

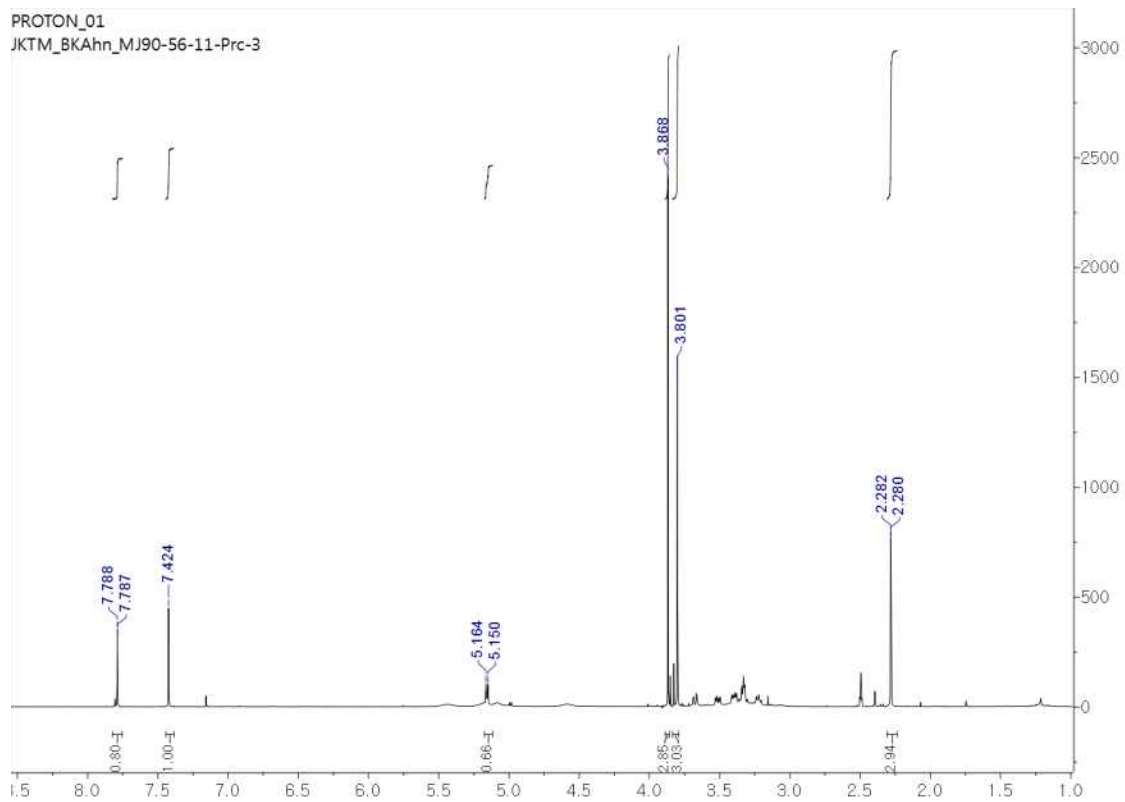


Fig. I -58. ^1H -NMR spectrum of compound 2 (aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside).

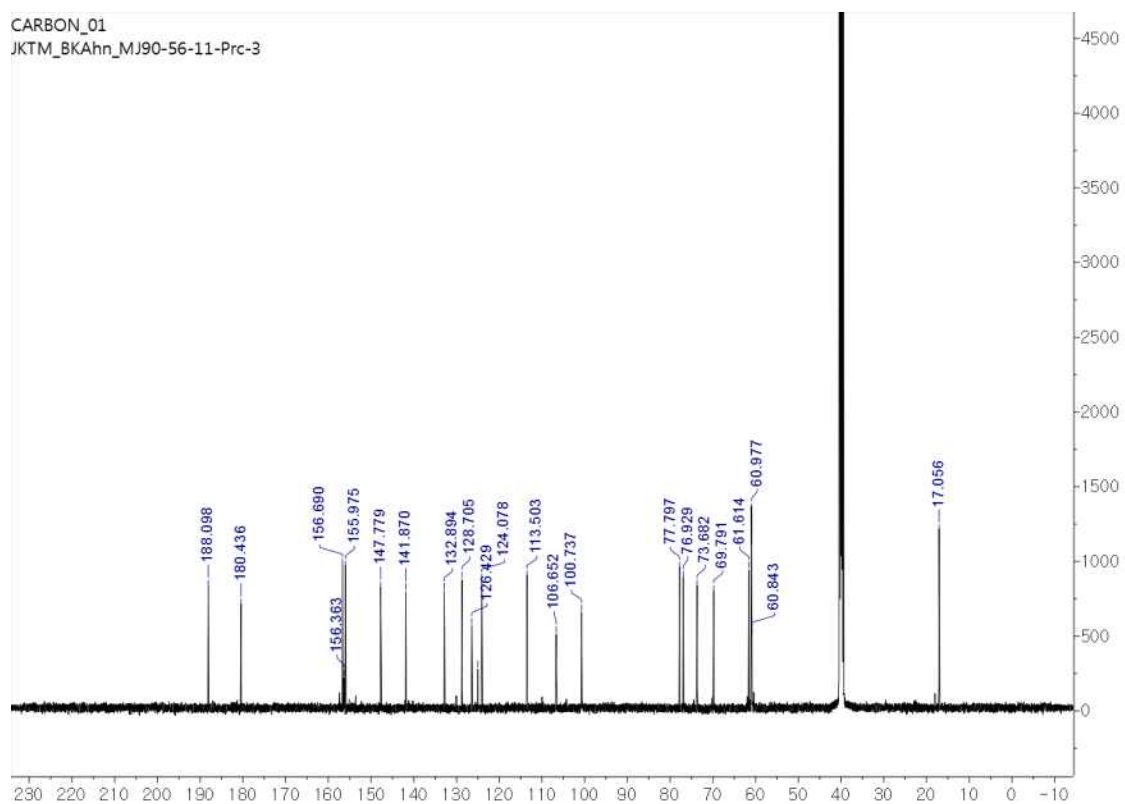


Fig. I -59. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside).

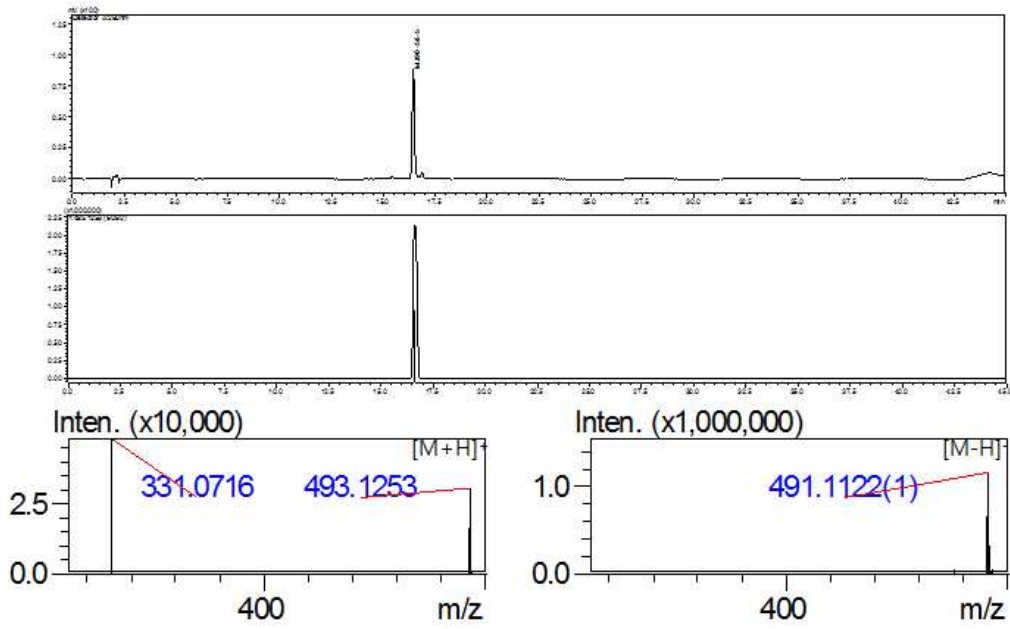


Fig. I -60. Mass spectrum(ESI) of compound 2.

Table I -11. ^1H - and ^{13}C -NMR data of Compound 2 in DMSO-d₆

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	147.78
2	-	156.36
3	-	132.89
4	7.79 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H)	126.43
5	7.42 (s, 1H)	106.65
6	-	155.98
7	-	141.87
8	-	156.69
9	-	188.10
10	-	180.44
11	-	128.71
12	-	113.50
13	-	124.08
14	-	125.01
1'	5.16 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H)	100.74
2'	-	73.68
3'	-	76.93
4'	-	69.79
5'	-	77.80
6'	-	60.98
7-OCH ₃	3.87 (s, 3H)	61.61
1-OCH ₃	3.80 (s, 3H)	60.84
3-CH ₃	2.28 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H)	17.06

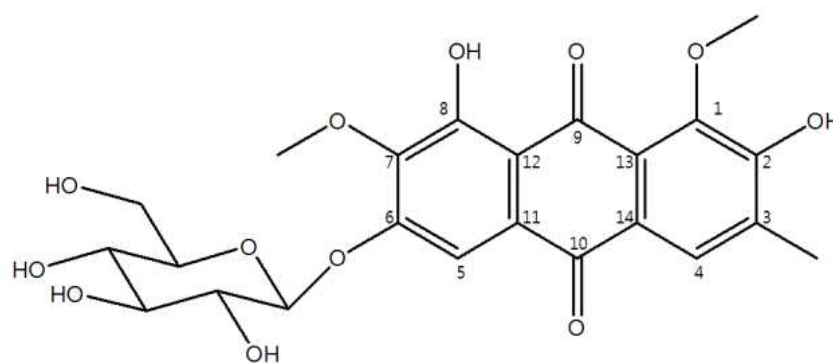


Fig. I -61. Structure of aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside.

3) Compound 3 (MJ90-910-89 Pr. C-2)의 구조동정

Compound 3의 LC/MS 분석 결과, 597.2789 [M+H]⁺, 595.2566 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며 formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과, C₂₇H₃₂O₁₅의 분자식을 얻었다. 또한 MS¹에서 324.16 dalton 차이를 보이는 273.1142 [M+H]⁺, 271.1014 [M-H]⁻의 분자량으로부터 aglycon인 rubrofusarin의 분자식인 C₁₅H₁₂O₅를 확인하였으며, glucose 또는 galactose 등의 6탄당이 결합되어 있는 배당체임을 확인하였다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 6.94 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H)에서 서로 meta coupling에 의해 연관된 protons peak를 확인 하였으며, δ 7.19 (s, 1H)와 6.20 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H)에서 나타난 peak들을 통해 aglycon aromatic ring에 위치한 protons을 확인하였다. 또한 δ 5.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H)에서 두 개의 anomeric proton을 확인하였으며, 각각의 *J* value 값을 통해 β-form으로 형성된 두 개의 당이 연결 되어있음을 추정하였고, δ 3.88 (s, 3H)과 2.39 (s, 3H)에서 나타난 peak들을 통해 methoxyl 및 methyl group을 확인하였다.

또한, ¹³C-NMR spectrum에서 δ 183.7과 168.6 의 peak를 통해 carbonyl과 ether group을 알 수 있었으며, benzene 영역의 peak들의 개수를 통해 세 개의 연결된 고리형의 aglycon을 추정하였으며, δ 103.5과 100.7을 포함한 두 개의 glucosyl group의 peak들을 확인하였다. 또한 δ 55.47, 20.18 에서 각각 methoxyl 및 methyl group의 carbon을 추가적으로 확인할 수 있었고, 이를 기존 문헌과 비교하여 rubrofusarin 6-O-β-D-gentiobioside로 구조 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 7.19 (s, 1H, H-10), 6.94 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-9), 6.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-7), 6.20 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-3), 5.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-1''), 4.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.99 - 2.97 (m, Glc-H), 2.39 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 183.7 (C-4), 168.7 (C-2), 161.9 (C-5), 161.0 (C-8), 157.6 (C-6), 152.4 (C-10a), 140.3 (C-9a), 107.6 (C-5a), 106.7 (C-3), 103.6 (C-10), 103.5 (C-1'), 101.0 (C-4a), 100.8 (C-7), 100.7 (C-1''), 99.7 (C-9), 76.8 (C-3'), 76.6 (C-5''), 76.3 (C-3''), 75.4 (C-5'), 73.5 (C-2'), 73.4 (C-2''), 70.0 (C-4'), 69.5 (C-4''), 68.6 (C-6'), 61.0 (C-6''), 55.4 (OCH₃), 20.1 (CH₃).

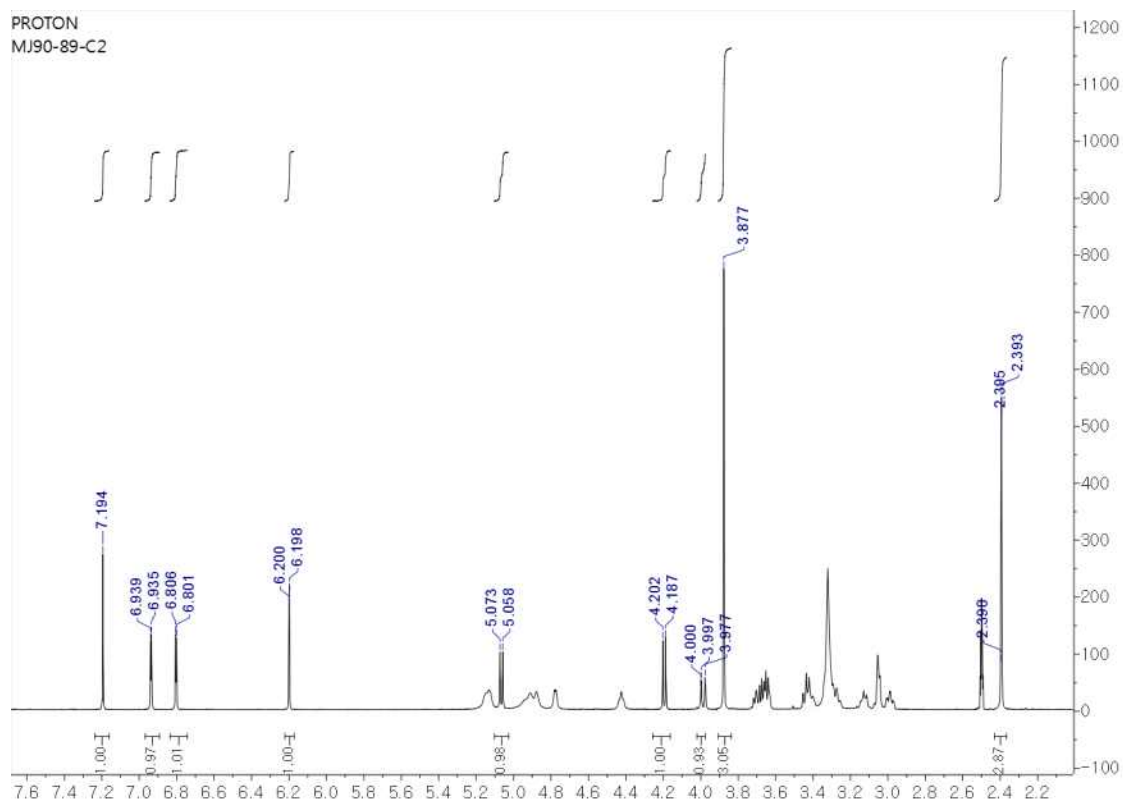


Fig. I -62. ¹H-NMR spectrum of compound 3 (rubrofusarin 6-O-β-D-gentiobioside).

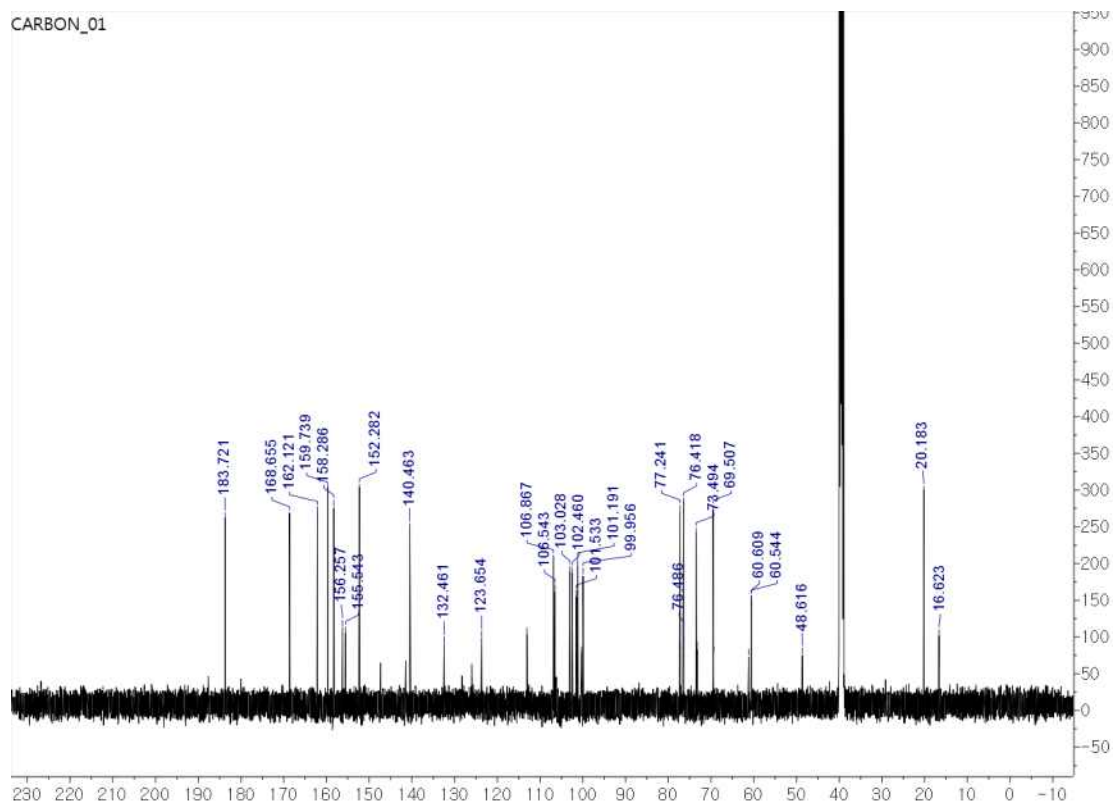


Fig. I -63. ¹³C-NMR spectrum of compound 3 (rubrofusarin 6-O-β-D-gentiobioside).

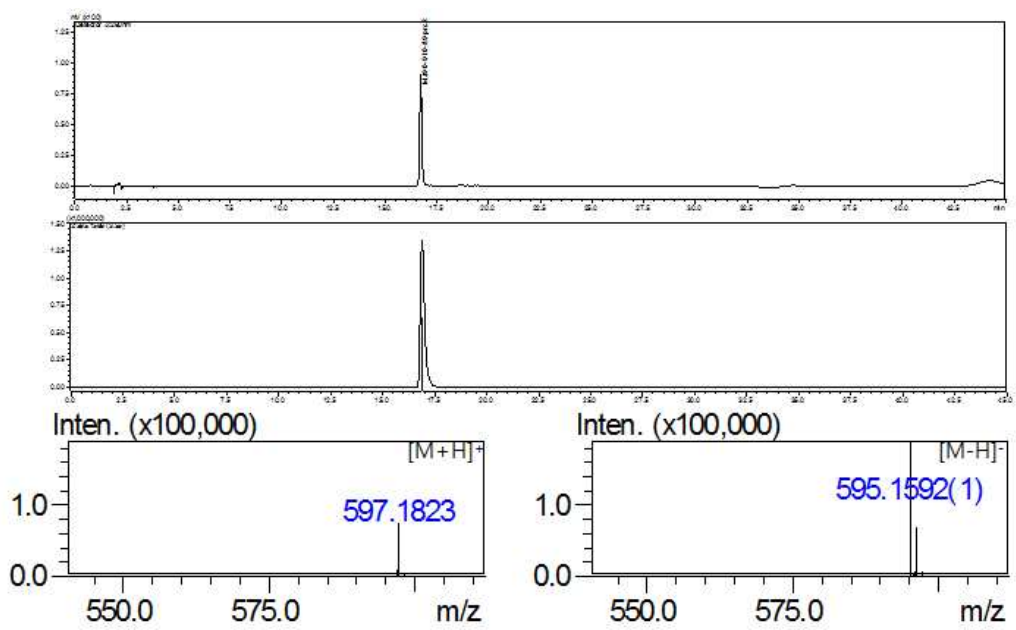


Fig. I -64. Mass spectrum(ESI) of compound 3.

Table I -12. ^1H - and ^{13}C -NMR data of Compound 3 in $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{H}	δ_{C}
2	-	168.7
3	6.20 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H)	106.7
4	-	183.7
4a	-	101.0
5	-	161.9
5a	-	107.6
6	-	157.6
7	6.80 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H)	100.8
8	-	161.0
9	6.94 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H)	99.7
9a	-	140.3
10	7.19 (s, 1H)	103.6
10a	-	152.4
1'	4.19 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H)	103.5
2'	-	73.5
3'	-	76.8
4'	-	70.0
5'	-	75.4
6'	-	68.66
1''	5.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H)	100.7
2''	-	73.4
3''	-	76.3
4''	-	69.5
5''	-	76.6
6''	-	61.0
OCH_3	3.88 (s, 3H)	55.4
CH_3	2.39 (s, 3H)	20.1

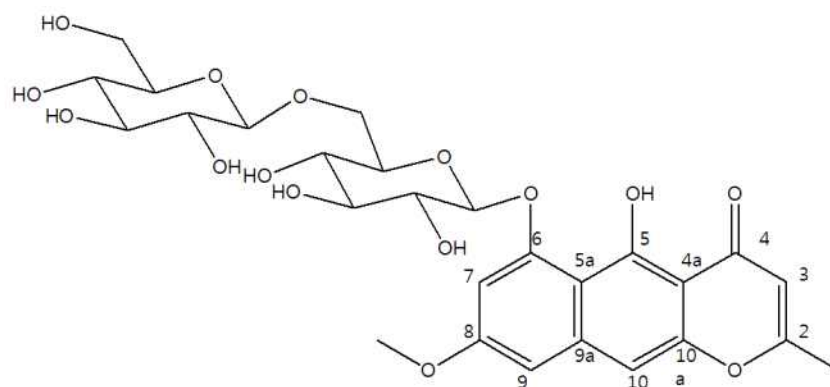


Fig. I -65. Structure of aurantio rubrofusarin 6-O- β -D-gentiobioside.

4) Compound 4 (MJ90-11-2 Pr. C-1)의 구조동정

Compound 4의 LC/MS 분석 결과 421.1755 [M+H]⁺, 419.1616 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₂₀H₂₀O₁₀의 분자식을 얻었다. 또한 MS¹에서 162.02 dalton 차이를 보이는 259.0946 [M+H]⁺, 257.0832 [M-H]⁻의 분자량으로부터 aglycon인 nor-rubrofusarin의 분자식인 C₁₄H₁₀O₅을 확인하였으며, glucose 또는 galactose 등의 6탄당이 결합되어 있는 배당체임을 확인하였다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.07 (s, 1H), 6.72 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 0.9 Hz, 1H)에 나타난 peak들을 통해 각각의 aglycon aromatic ring에 위치한 proton을 확인하였으며, δ 4.97 (d, J = 7.7 Hz, 1H)에서 anomeric proton을 확인 하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 나타난 δ 183.7 과 168.6의 peak를 통해 carbonyl과 ether group을 알 수 있었으며, δ 101.1, 77.2, 76.4, 73.4, 69.5, 60.5에서 glucosyl group의 peak를 확인하였다. 또한 CH₃의 carbon인 δ 20.1을 확인 하였으며, 이를 기존 문헌과 비교하여 Cassiaside (nor-rubrofusarin glucoside)로 구조 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 14.94 (s, 1H, OH-5), 10.36 (s, 1H, OH-8), 7.07 (s, 1H, H-10), 6.72 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-9), 6.68 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 6.17 (d, J = 0.9 Hz, 1H, H-3), 4.97 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-1'), 3.77 - 3.12 (m, Glc-H) 2.37 (d, J = 0.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 183.7 (C-4), 168.6 (C-2), 162.1 (C-5), 159.7 (C-8), 158.2 (C-6), 152.2 (C-10a), 140.4 (C-9a), 106.8 (C-5a), 106.5 (C-3), 103.0 (C-4a), 102.4 (C-9), 101.5 (C-7), 101.1 (C-1'), 99.9 (C-10), 77.2 (C-5'), 76.4 (C-3'), 73.4 (C-2'), 69.5 (C-4'), 60.5 (C-6'), 20.1 (CH₃).

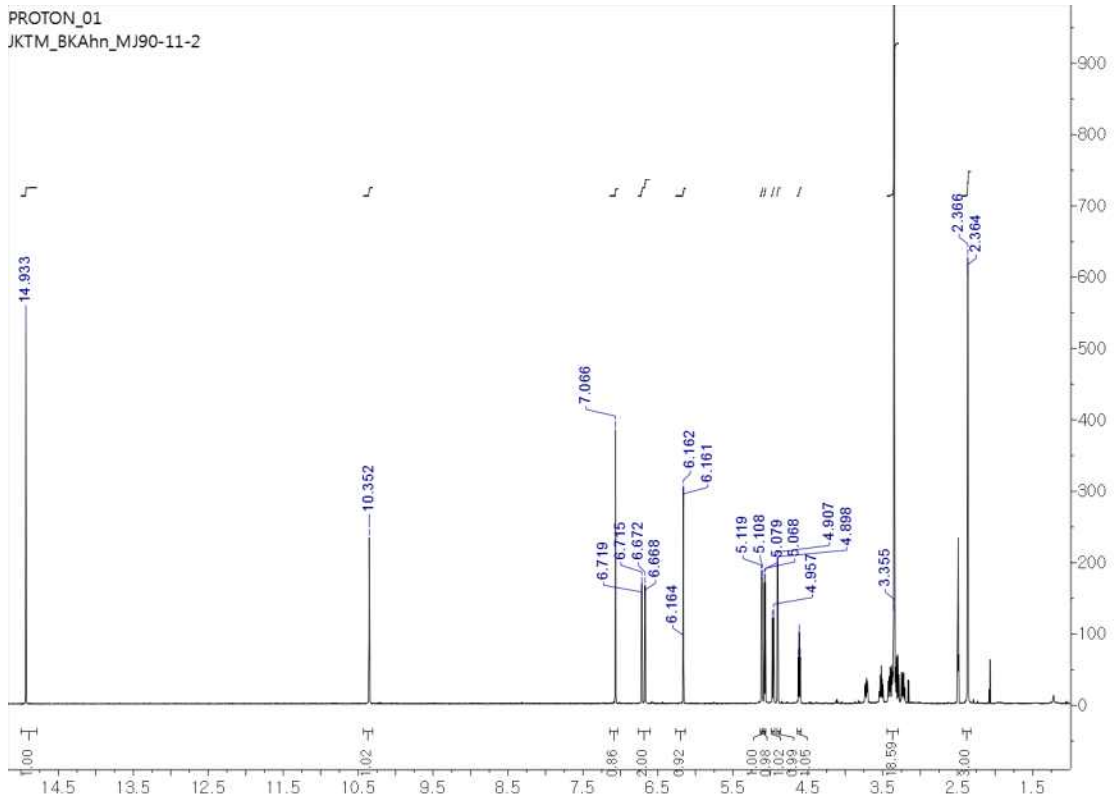


Fig. I -66. ^1H -NMR spectrum of compound 4 (nor-rubrofusarin 6-O- β -D- gentiobioside).

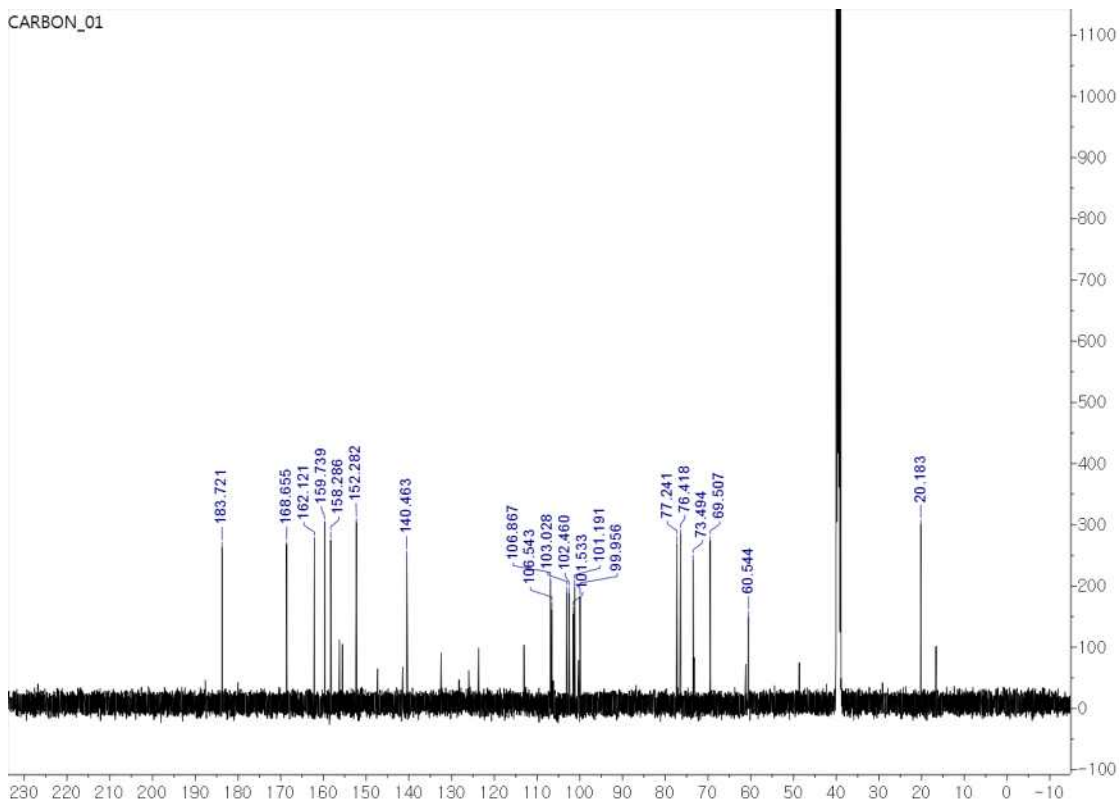


Fig. I -67. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (nor-rubrofusarin 6-O- β -D- gentiobioside).

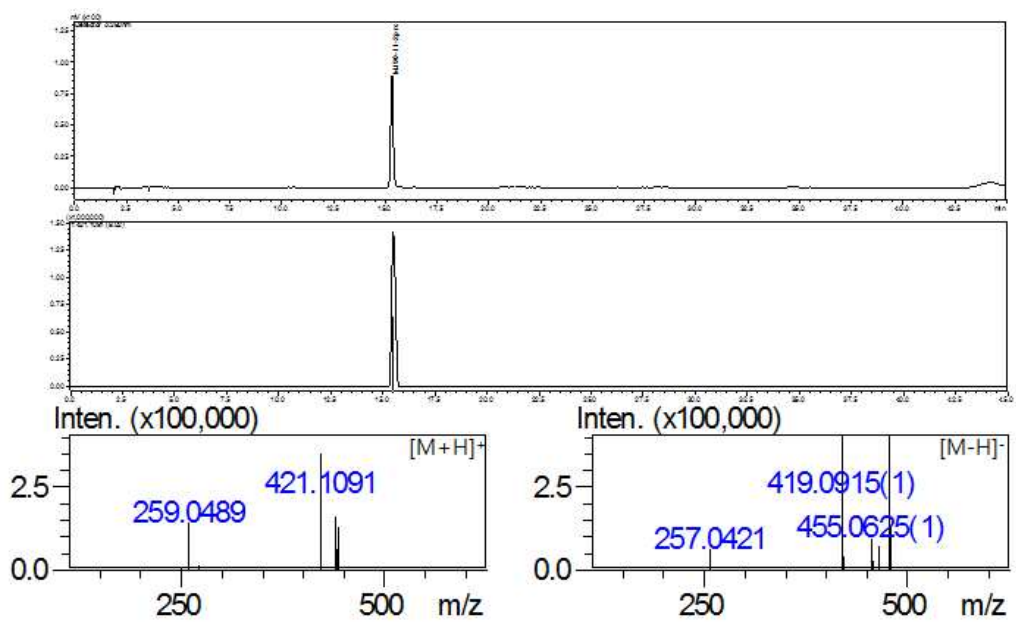


Fig. I -68. Mass spectrum(ESI) of compound 4.

Table I -13. ¹H- and ¹³C-NMR data of Compound 4 in DMSO

Position	δ_{H}	δ_{C}
2	-	168.6
3	6.17 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H)	106.5
4	-	183.7
4a	-	103.0
5	14.94 (s, 1H, -OH)	162.1
5a	-	106.8
6	-	158.2
7	6.68 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H)	101.5
8	10.36 (s, 1H, -OH)	159.7
9	6.72 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H)	102.4
9a	-	140.4
10	7.07 (s, 1H)	99.9
10a	-	152.2
1'	4.97 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H)	101.1
2'	-	73.4
3'	-	76.4
4'	-	69.5
5'	-	77.2
6'	-	60.5
CH ₃	2.37 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H)	20.1

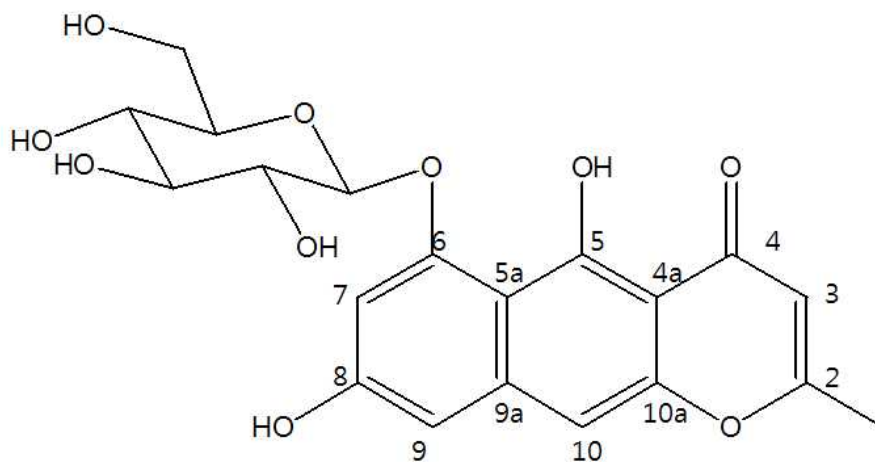


Fig. I -69. Structure of Cassiaside (nor-rubrofusarin glucoside).

5) Compound 5 (MJ90-13-1 Pr. C-1)의 구조동정

Compound 5의 LC/MS 분석 결과 469.1035 [M+Na]⁺, 491.1106 [M+HCOO]⁻의 분자량을 확인 하였으며 formulat predictor (Shimadzu, Japan)을 이용한 결과 C₂₂H₂₂O₁₀의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 두개의 aromatic proton peak δ 7.76 (s, 1H)와 7.16 (s, 1H)을 확인하였으며, 두개의 methoxy proton signal δ 3.83 (s, 3H)와 3.80 (s, 3H)와 methyl proton δ 2.28 (s, 3H)을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 두 개의 ketone peak δ 187.6과 180.8를 통해 anthraquinone type을 예상할 수 있었고, 12개의 benzen ring carbon을 추가로 확인하였다. 그 외에 두 개의 methoxy carbon δ 61.6과 60.4, 한 개의 methyl carbon δ 16.9를 확인 할 수 있었다. 이를 기존 문헌과 비교하여 obtusifolin 2-O-β-D-glucoside로 구조 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

7.88 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, H-4), 7.75 (dd, *J* = 8.3, 7.5 Hz, 1H, H-6), 7.65 (dd, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, H-5), 7.35 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, H-7), 5.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 2.43 (d, *J* = 0.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 187.99 (C-9), 181.40 (C-10), 161.40 (C-8), 154.73 (C-2), 153.23 (C-1), 141.51 (C-7), 136.46 (C-6), 132.54 (C-3), 129.70 (C-11), 125.22 (C-4), 124.61 (C-14), 124.12 (C-13), 118.38 (C-5), 116.90 (C-12), 103.84 (C-1'), 77.38 (C-3'), 76.41 (C-5'), 74.02 (C-2'), 69.80 (C-4'), 61.47 (C-6'), 60.86 (-OCH₃), 17.65 (-CH₃).

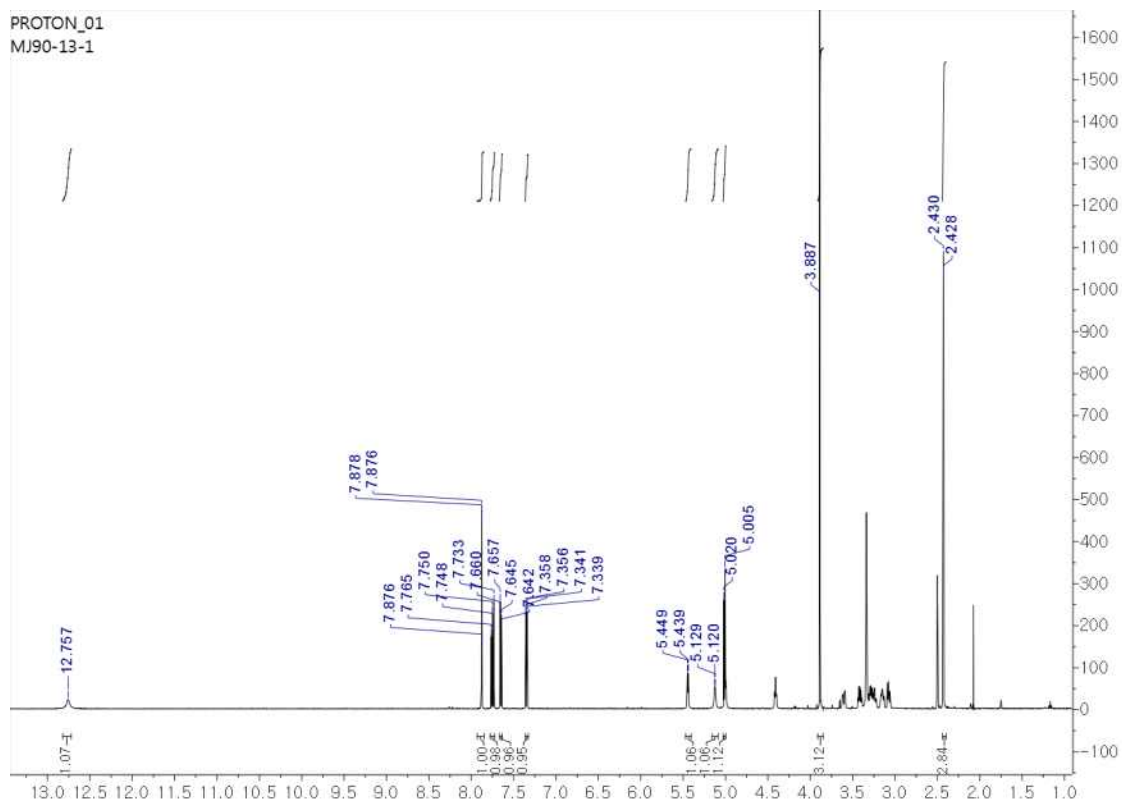


Fig. I -70. ¹H-NMR spectrum of compound 5 (obtusifolin 2-O-β-D-glucoside).

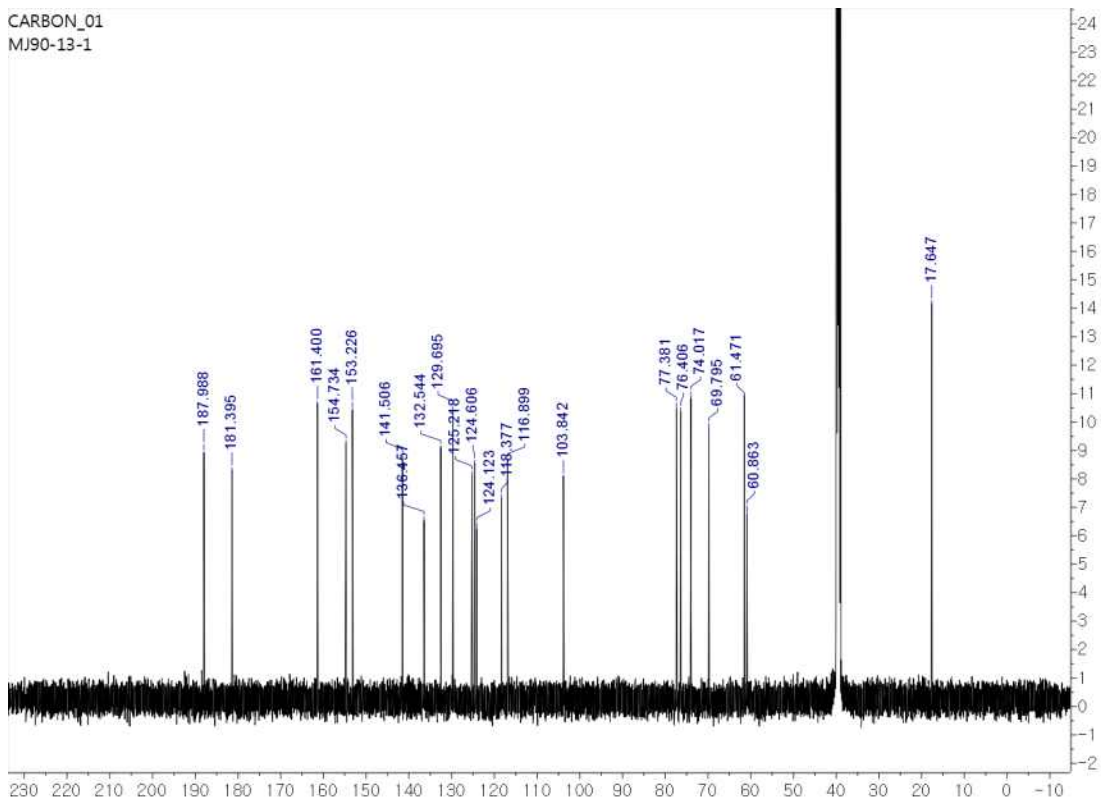


Fig. I -71. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 (obtusifolin 2-O- β -D-glucoside).

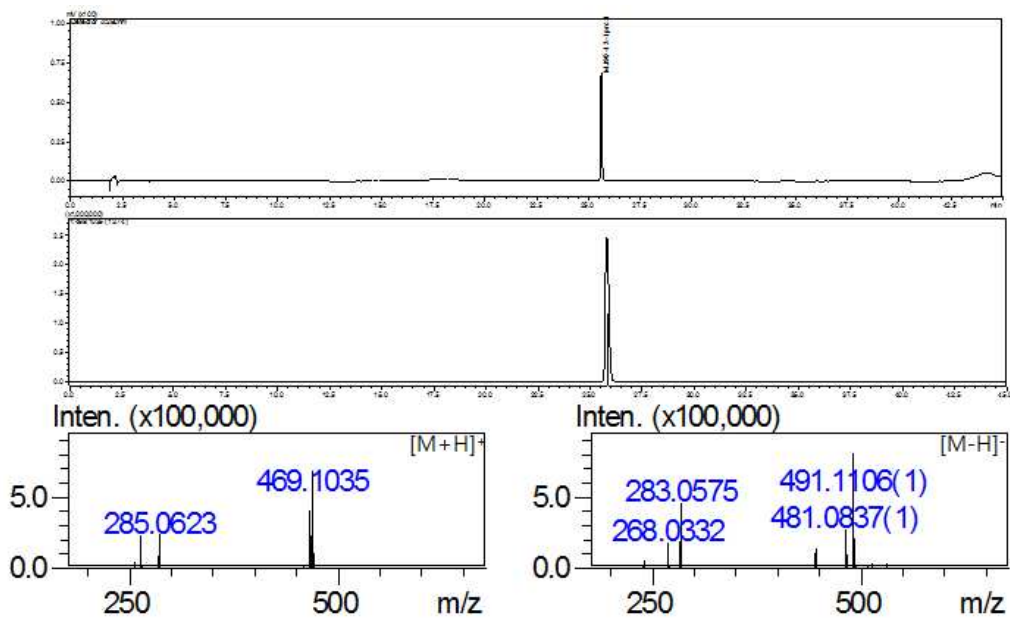


Fig. I -72. Mass spectrum(ESI) of compound 5.

Table I -14. ^1H - and ^{13}C -NMR data of Compound 5 in DMSO

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	153.23
2	-	154.73
3	-	132.54
4	7.88 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H)	125.22
5	7.65 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H)	118.38
6	7.75 (dd, $J = 8.3, 7.5$ Hz, 1H)	136.46
7	7.35 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H)	141.51
8	-	161.40
9	-	187.99
10	-	181.40
11	-	129.70
12	-	116.90
13	-	124.12
14	-	124.61
1'	5.01 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H)	103.84
2'	-	74.02
3'	-	77.38
4'	-	69.80
5'	-	76.41
6'	-	61.47
OCH ₃	3.89 (s, 3H)	60.86
CH ₃	2.43 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H)	17.65

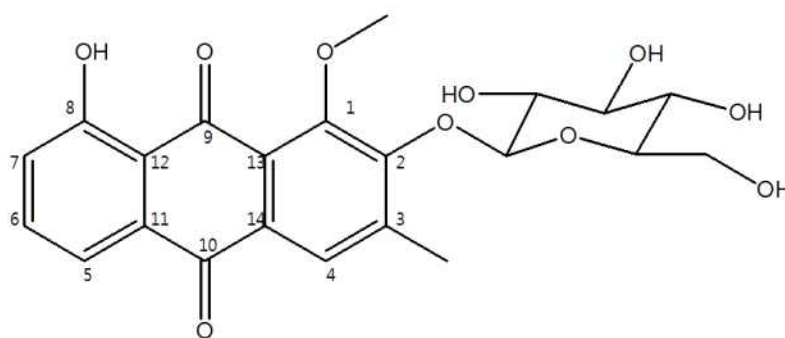


Fig. I -73. Structure of obtusifolin 2-O- β -D-glucoside.

6) Compound 6 (MJ90-1617-1)의 구조동정

Compound 6의 LC/MS 분석 결과 331.0743 [M+H]⁺, 329.0673 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며 formulat predictor (Shimadzu, Japan)을 이용한 결과 C₁₇H₃₁O₇의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 두개의 aromatic proton peak δ 7.76 (s, 1H)와 7.16 (s, 1H)을 확인하였으며, 두개의 methoxy proton signal δ 3.83 (s, 3H)와 3.80 (s, 3H)와 methyl proton δ 2.28 (s, 3H)을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 두 개의 ketone peak δ 187.6과 180.8를 통해 anthraquinone type을 예상할 수 있었고, 12개의 benzen ring carbon을 추가로 확인하였다. 그 외에 두 개의 methoxy carbon δ 61.6과 60.4, 한 개의 methyl carbon δ 16.9를 확인 할 수 있었다. 이를 기존 문헌과 비교하여 Aurantio-obtusin으로 구조 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

13.25 (s, 1H, 8-OH), 7.76 (s, 1H, H-4), 7.16 (s, 1H, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)

187.6 (C-9), 180.8 (C-10), 157.4 (C-8), 157.1 (C-6), 155.9 (C-2), 147.6 (C-1), 139.8 (C-7), 132.4 (C-3), 128.9 (C-11), 126.3 (C-4), 125.3 (C-14), 124.1 (C-13), 111.5 (C-12), 108.1 (C-5), 61.6 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 16.9 (CH₃).

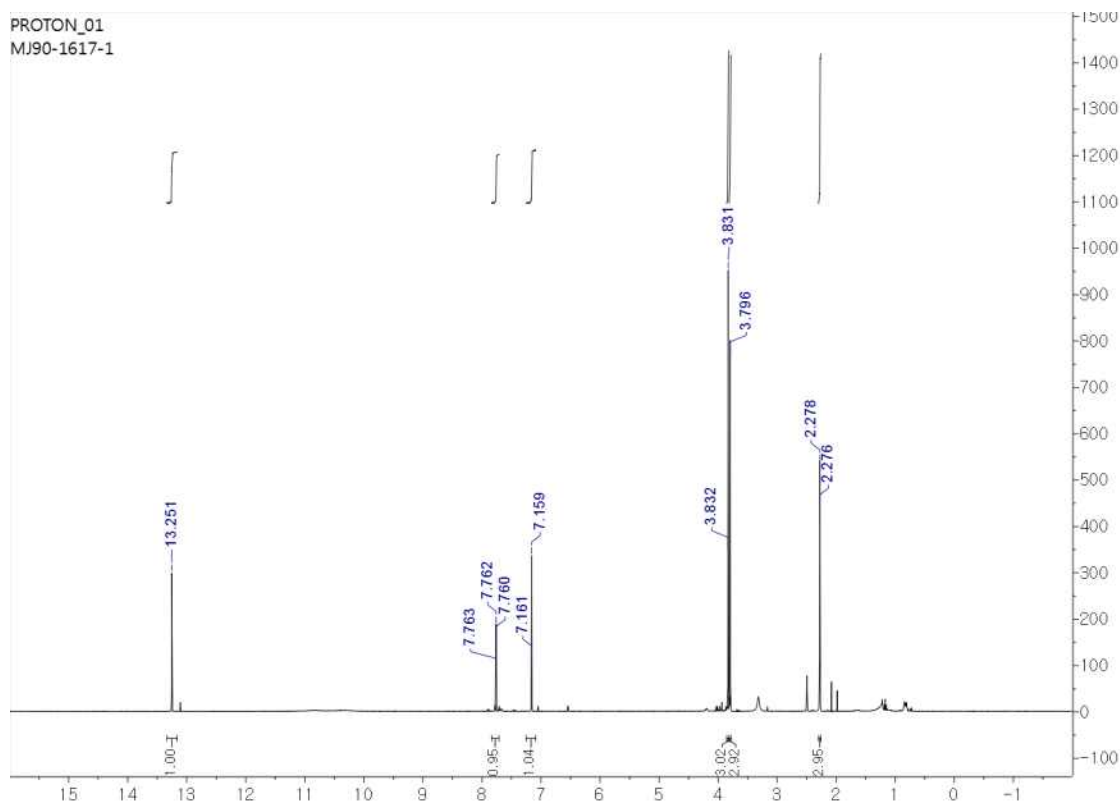


Fig. I -74. ¹H-NMR spectrum of compound 6 (Aurantio-obtusin).

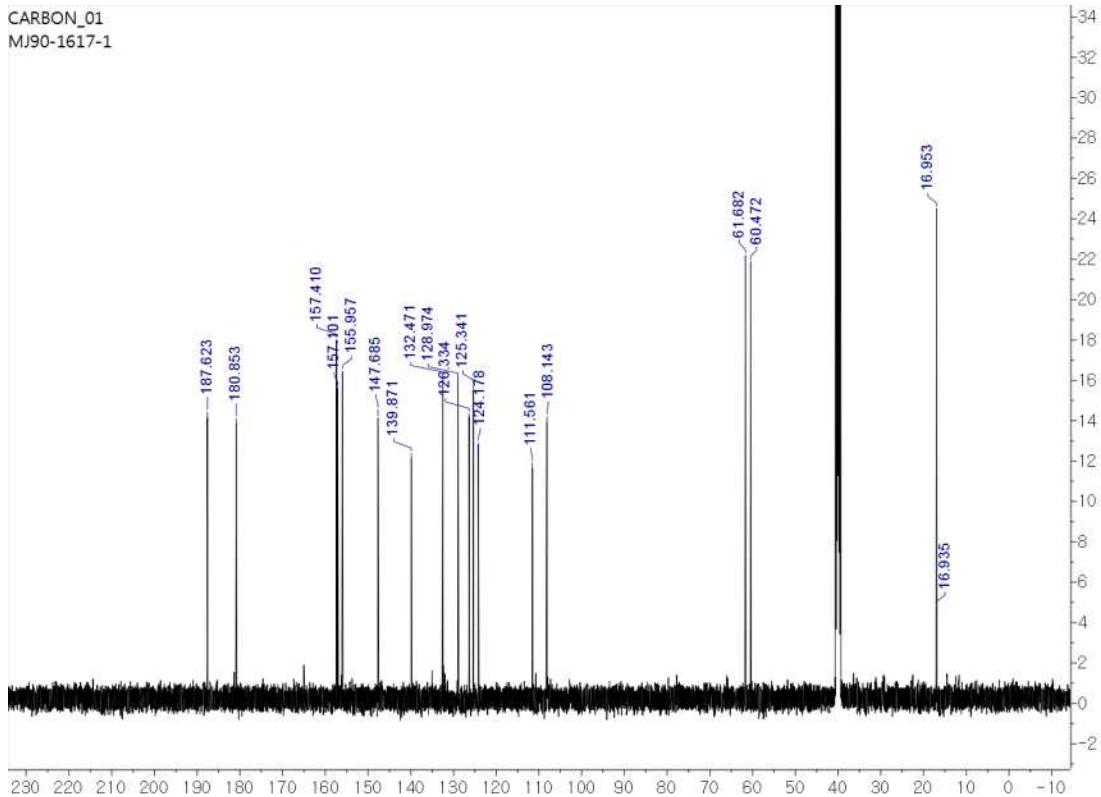


Fig. I -75. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 (Aurantio-obtusin).

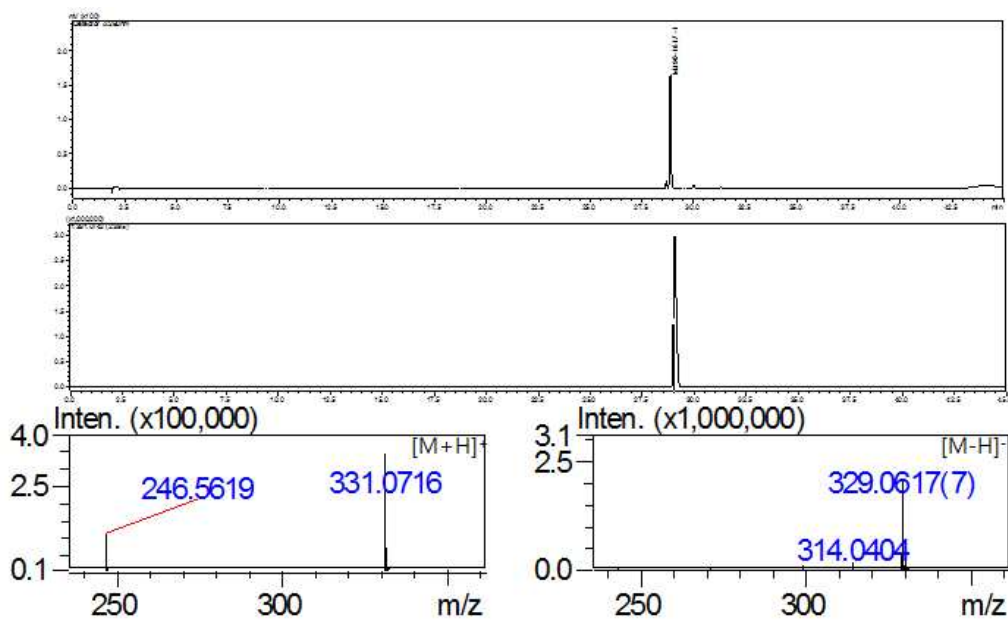


Fig. I -76. Mass spectrum(ESI) of compound 6.

Table I -15. ¹H- and ¹³C-NMR data of Compound 6 in DMSO

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	147.6
2	-	155.9
3	-	132.4
4	7.76 (s, 1H)	126.3
5	7.16 (s, 1H)	108.1
6	-	157.1
7	-	139.8
8	13.25 (s, 1H, OH)	157.4
9	-	187.6
10	-	180.8
11	-	128.9
12	-	111.5
13	-	124.1
14	-	125.3
OCH ₃	3.83 (s, 3H)	61.68
OCH ₃	3.80 (s, 3H)	60.47
CH ₃	2.28 (s, 3H)	16.95

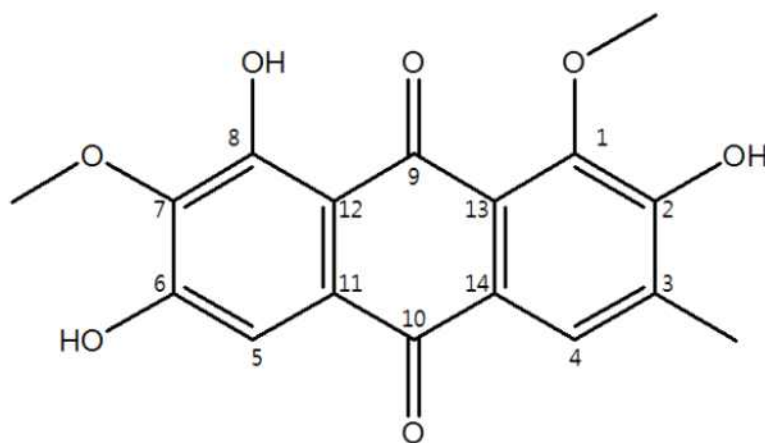


Fig. I -77. Structure of Aurantio-obtusin.

7) Compound 7 (MJ90-1819-1 Pr.C-1)의 구조동정

Compound 7의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 5개의 aromatic proton δ 7.83 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.69 (dd, 8.3, 7.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.30 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H)을 확인하였고, 한 개의 methyl proton δ 2.48 (s, 3H)을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 두 개의 ketone peak δ 192.5과 181.9를 알 수 있었으며, 12개의 aromatic carbon을 추가로 확인하였다. 그 외에 한 개의 methyl carbon δ 22.2를 확인할 수 있었다. 이를 기존 문헌과 비교하여 chrysophanol로 구조동정하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ 12.13 (s, 1H), 7.83 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.69 (dd, 8.3, 7.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.30 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 2.48 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ 192.5 (C-9), 181.9 (C-10), 162.7 (C-1), 162.4 (C-8), 149.3 (C-3), 136.9 (C-6), 133.6 (C-11), 133.2 (C-14), 124.5 (C-7), 124.3 (C-2), 121.3 (C-4), 119.9 (C-5), 115.8 (C-12), 113.7 (C-13), 22.2 (CH_3).

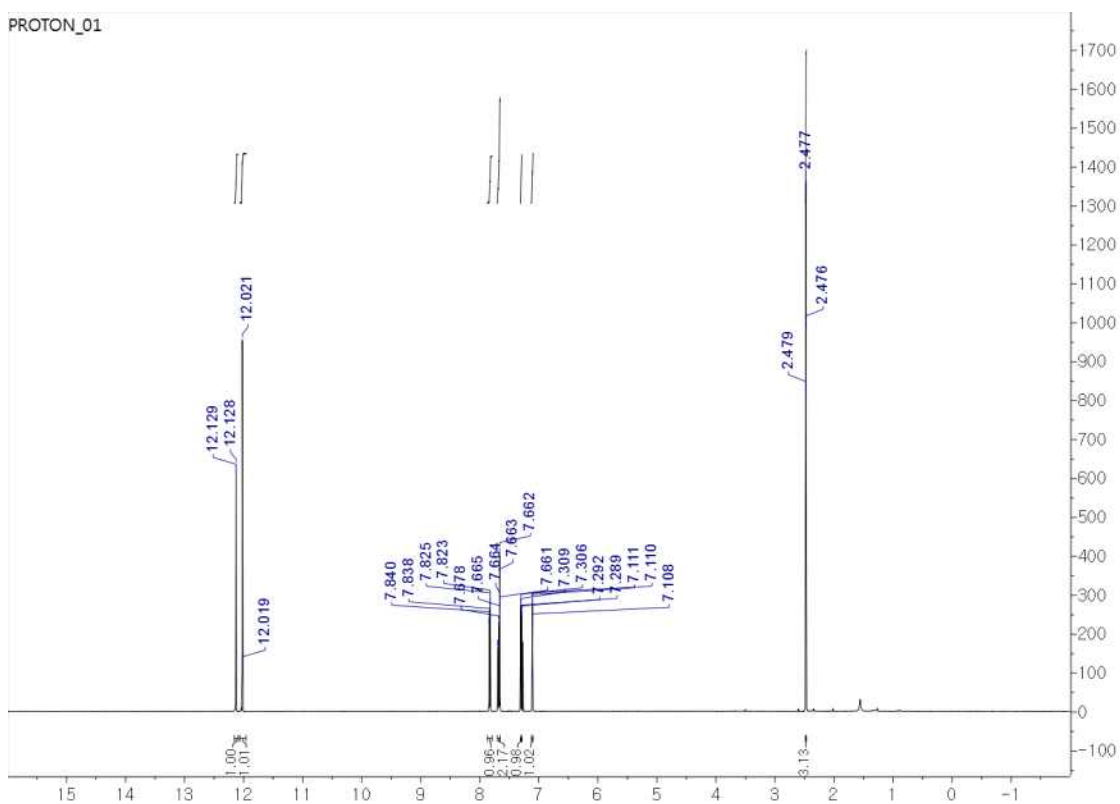


Fig. I -78. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 7 (chrysophanol).

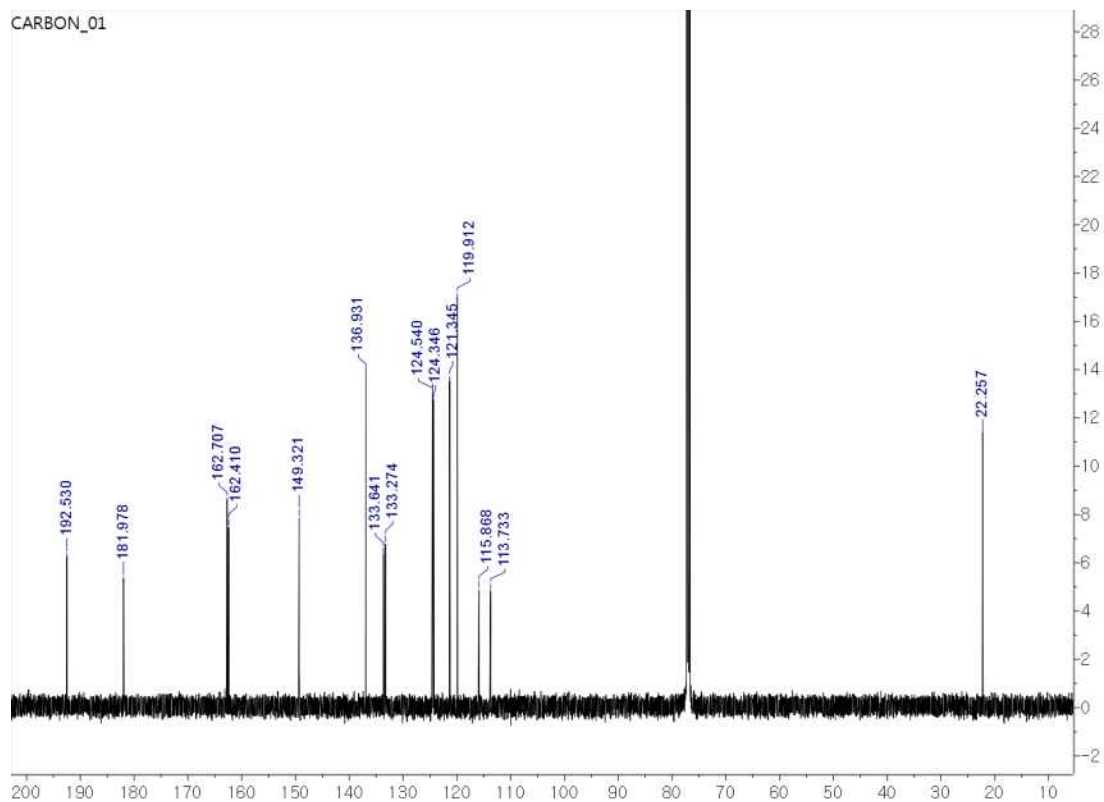


Fig. I -79. ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 (chrysophanol).

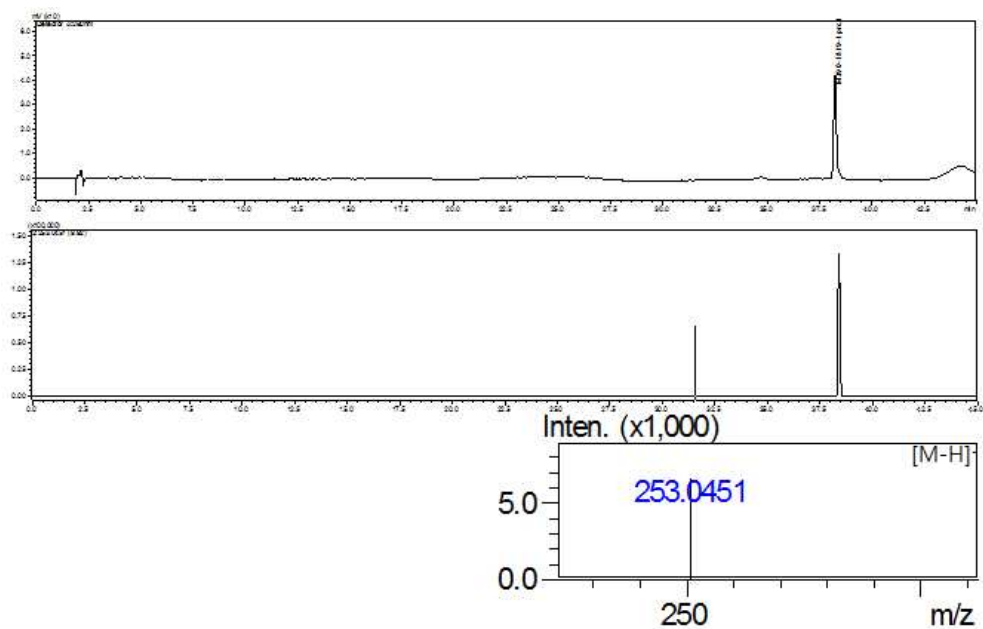


Fig. I -80. Mass spectrum(ESI) of compound 7.

Table I -16. ^1H - and ^{13}C -NMR data of Compound 7 in DMSO

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	162.7
2	7.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H)	124.3
3	-	149.3
4	7.67 (s, 1H)	121.3
5	7.83 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H)	119.9
6	7.69 (dd, 8.3, 7.6 Hz, 1H)	136.9
7	7.30 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H)	124.5
8	12.13 (s, 1H)	162.4
9	-	192.5
10	-	181.9
11	-	133.6
12	-	115.8
13	-	113.7
14	-	133.2
CH_3	2.48 (s, 3H)	22.2

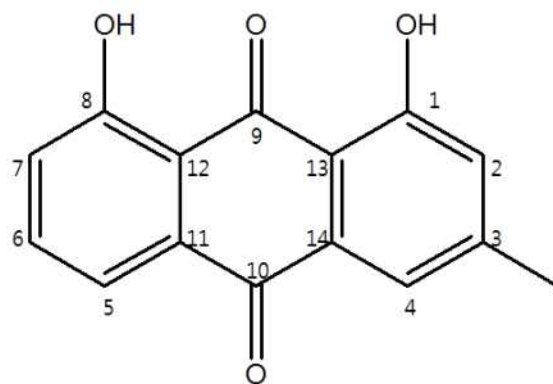


Fig. I -81. Structure of chrysophanol.

8) Compound 8 (MJ90-1819-5 Pr.C-1)의 구조동정

Compound 8의 LC/MS 분석 결과 285.0709 [M+H]⁺, 283.0593 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₁₆H₁₄O₅의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 4개의 aromatic proton δ 7.81 (t, J = 0.8 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 1H)을 확인하였고, 추가적으로 methoxy와 methyl proton δ 3.82 (s, 3H), 2.29 (s, 3H)을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 마찬가지로 두 개의 ketone signal δ 188.8과 181.3을 확인하였고, 그 외 12개 aromatic carbon을 확인할 수 있었다. 또한 methoxy와 methyl carbon δ 61.6과 17.0도 확인하였다. 이를 기존 문헌(Vivek B *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2011; Hatano *et al.*, 1999)^{34,35,36,37}과 비교한 결과 obtusifolin으로 구조 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 12.79 (s, 1H, 8-OH), 7.81 (t, J = 0.8 Hz, 1H, H-4), 7.72 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H, H-6), 7.62 (dd, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H, H-5), 7.31 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 1H, H-7), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 188.8 (C-9), 181.3 (C-10), 161.8 (C-8), 156.3 (C-2), 147.7 (C-1), 136.8 (C-6), 133.2 (C-11), 133.2 (C-3), 126.3 (C-4), 125.2 (C-7), 124.1 (C-14), 124.0 (C-13), 118.6 (C-5), 117.1 (C-12), 61.6 (OCH₃), 17.0 (CH₃).

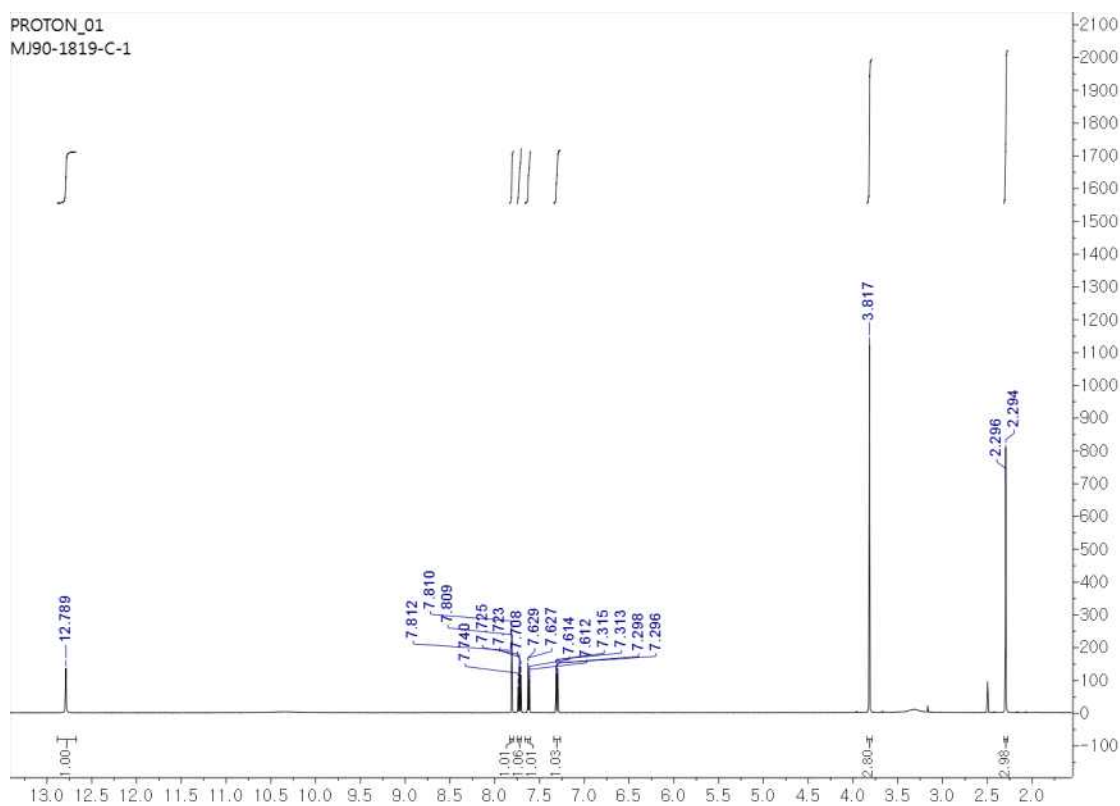


Fig. I -82. ¹H-NMR spectrum of compound 8 (obtusifolin).

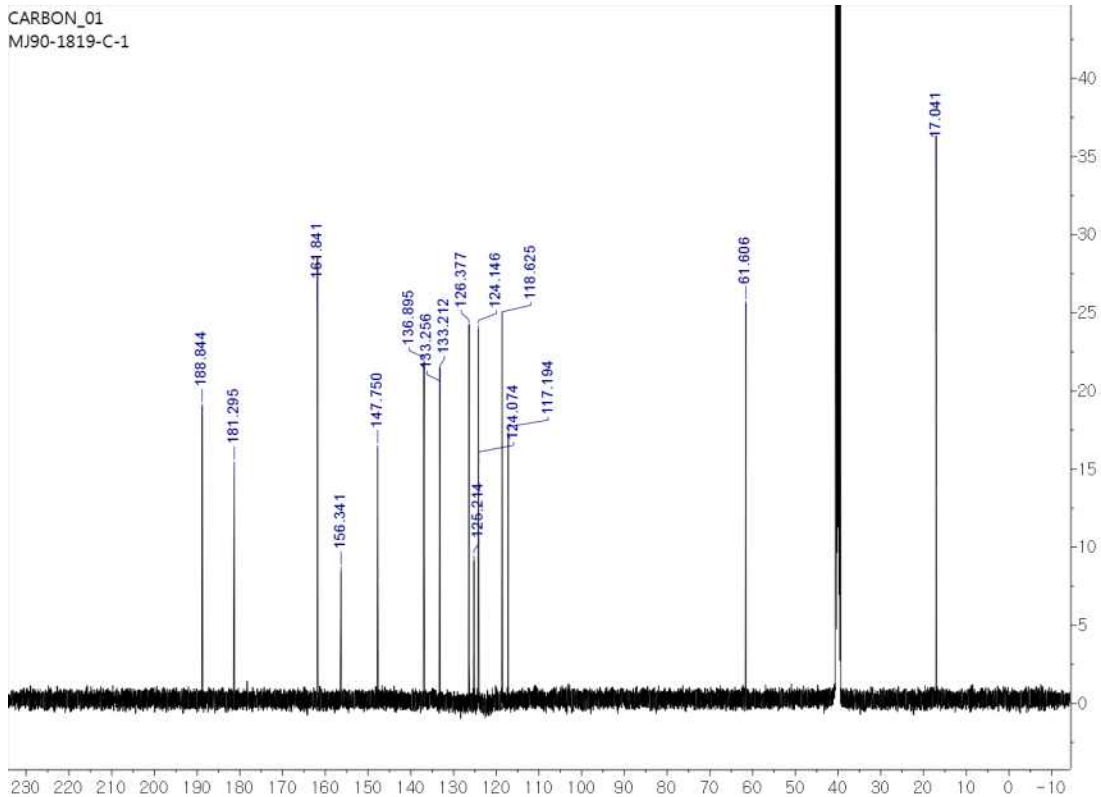


Fig. I -83. ^{13}C -NMR spectrum of compound 8 (obtusifolin).

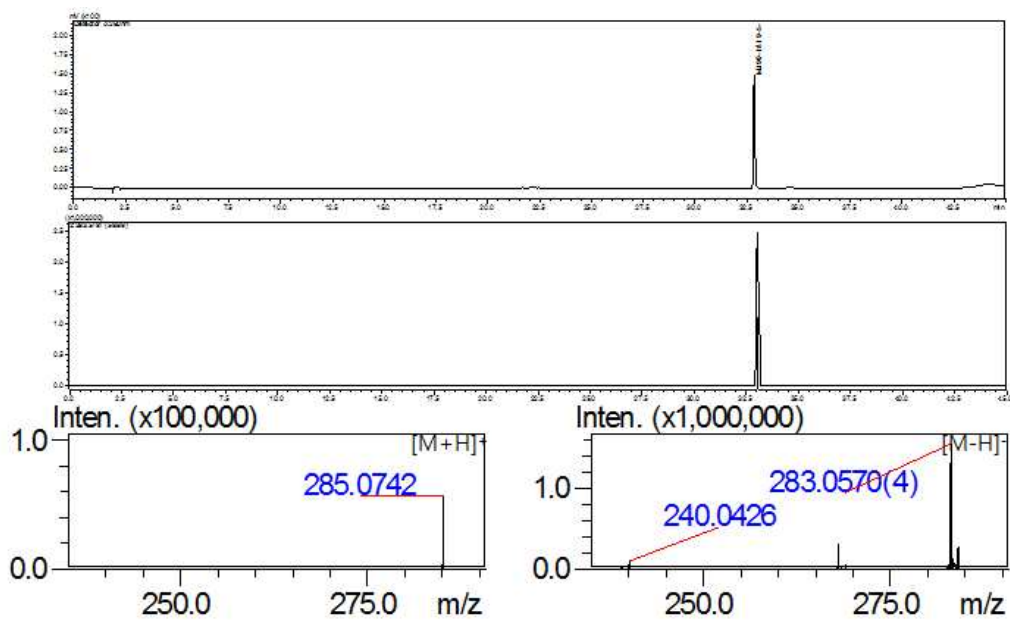


Fig. I -84. Mass spectrum(ESI) of compound 8.

Table I -17. ¹H- and ¹³C-NMR data of Compound 8 in DMSO

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	147.7
2	-	156.3
3	-	133.2
4	7.81 (t, $J = 0.8$ Hz, 1H)	126.3
5	7.62 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H)	118.6
6	7.72 (dd, $J = 8.3, 7.5$ Hz, 1H)	136.8
7	7.31 (dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 1H)	125.2
8	12.79 (s, 1H, OH)	161.8
9	-	188.8
10	-	181.3
11	-	133.2
12	-	117.1
13	-	124.0
14	-	124.1
OCH ₃	3.82 (s, 3H)	61.6
CH ₃	2.29 (s, 3H)	17.0

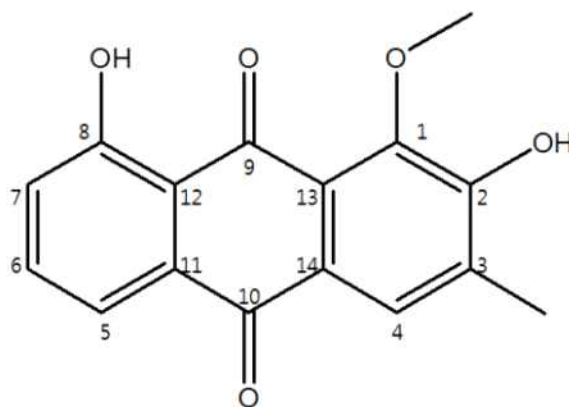


Fig. I -85. Structure of obtusifolin.

9) Compound 9 (MJ90-1819-5 Pr.C-2)의 구조동정

Compound 9의 LC/MS 분석 결과 271.1059 [M+H]⁺, 269.0585 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₁₅H₁₀O₅의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 meta-coupled aromatic proton δ 7.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H)와 6.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H)을 확인하였고, 2개의 aromatic proton δ 7.46 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H)를 확인하였다. 추가적으로 methyl proton δ 2.40 (s, 3H)을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 전형적인 anthraquinone의 ketone signal δ 189.7과 181.9를 확인하였고, 그 외 12개의 benzene ring carbon 또한 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 기존 문헌과 비교하여 emodin으로 결정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)
δ 7.46 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)
δ 189.7 (C-9), 181.9 (C-10), 166.7 (C-6), 164.9 (C-8), 161.8 (C-1), 148.5 (C-3), 135.4 (C-11), 133.2 (C-14), 124.5 (C-2), 120.8 (C-4), 113.8 (C-13), 109.6 (C-5, 12), 108.3 (C-7), 21.9 (CH₃).

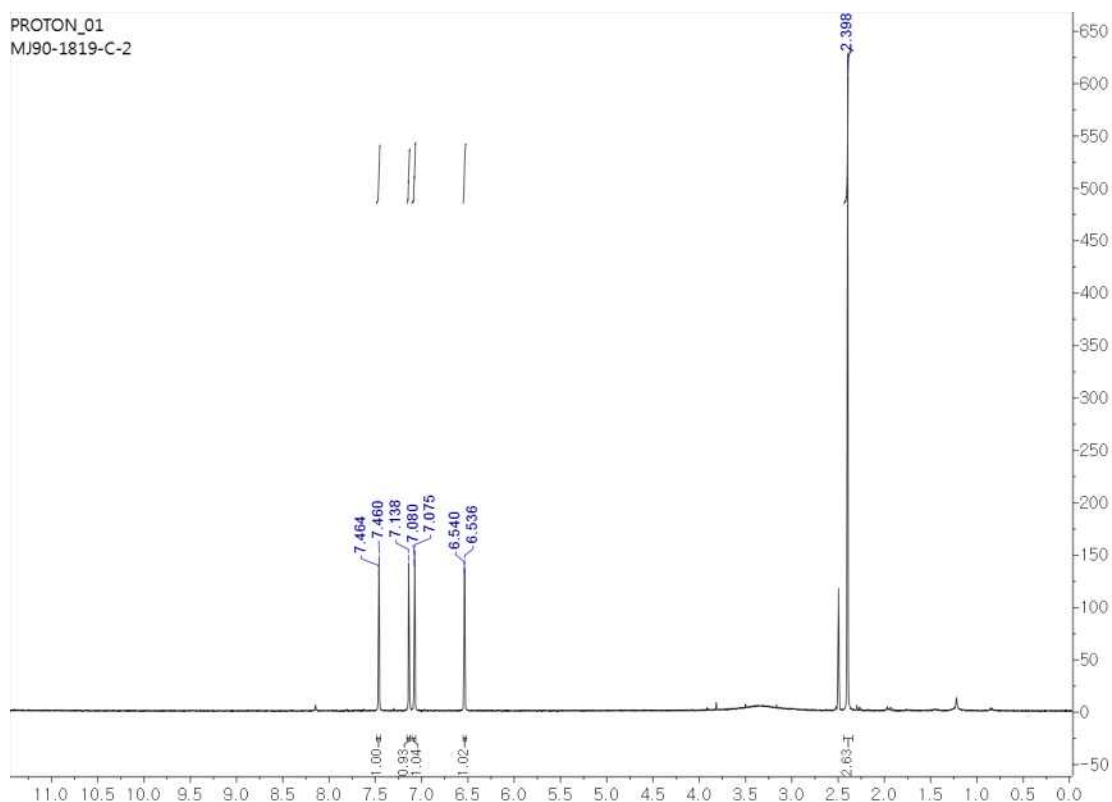


Fig. I -86. ¹H-NMR spectrum of compound 9 (emodin).

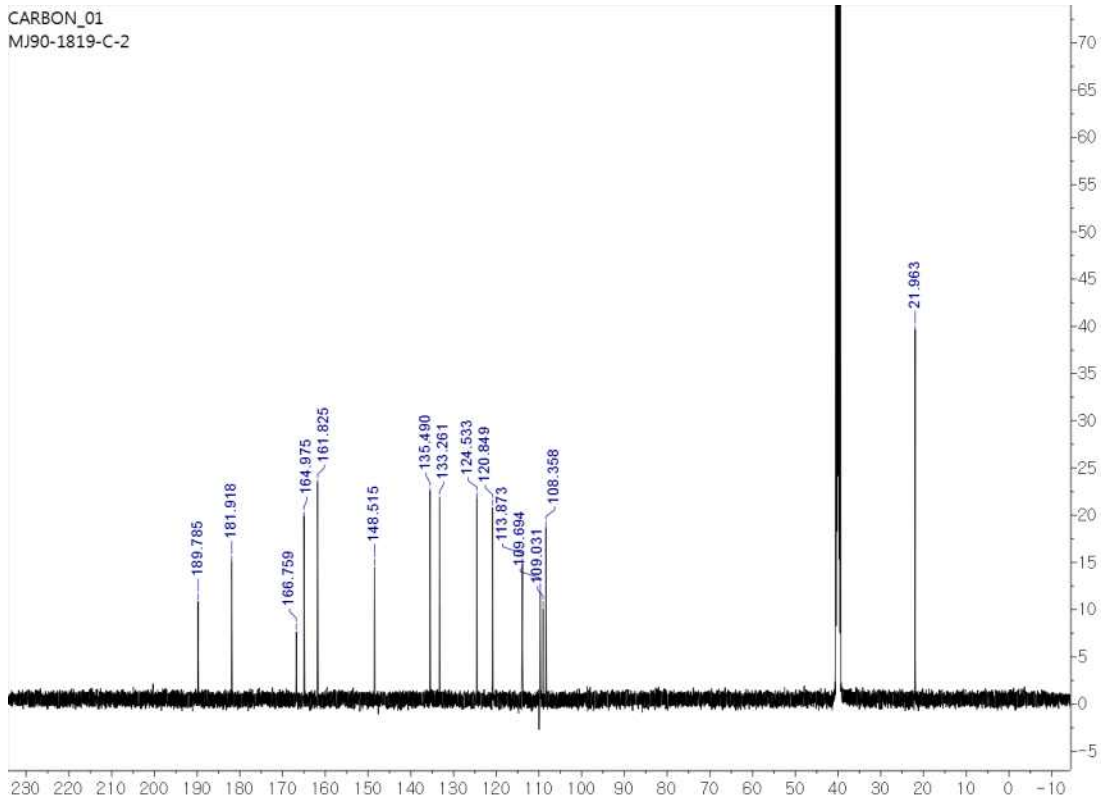


Fig. I -87. ^{13}C -NMR spectrum of compound 9 (emodin).

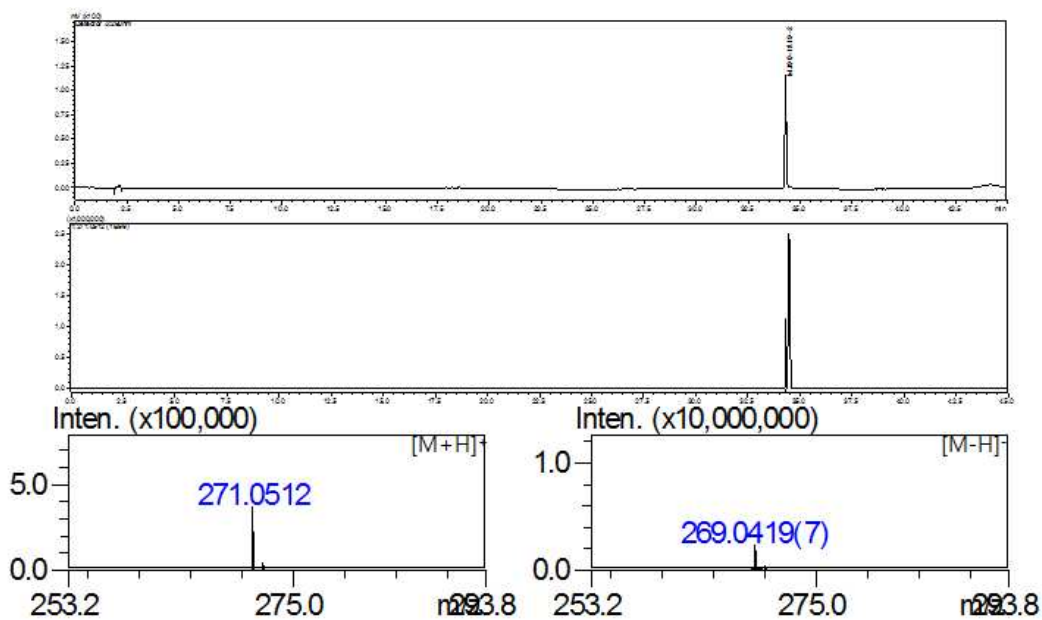


Fig. I -88. Mass spectrum(ESI) of compound 9.

Table I -18. ¹H- and ¹³C-NMR data of Compound 9 in DMSO

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	161.8
2	7.14 (s, 1H)	124.5
3	-	148.5
4	7.46 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H)	120.8
5	7.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H)	109.6
6	-	166.7
7	6.54 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H)	108.3
8	-	164.9
9	-	189.7
10	-	181.9
11	-	135.4
12	-	109.6
13	-	113.8
14	-	133.2
CH ₃	2.40 (s, 3H)	21.9

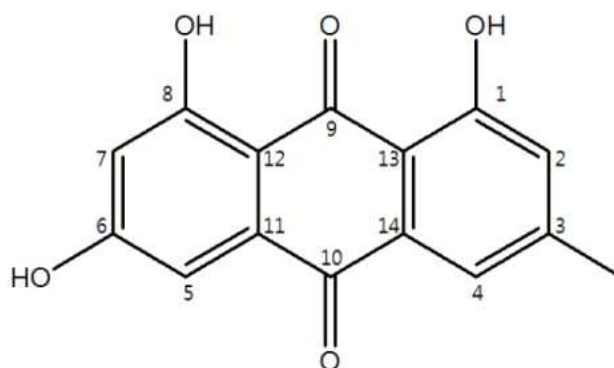


Fig. I -89. Structure of emodin.

10) Compound 10 (MJ90-20-14 Pr.C-3)의 구조동정

Compound 10의 LC/MS 분석 결과 345.0852 [M+H]⁺, 343.0775 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₁₈H₁₆O₇의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.77, 7.28의 결합 peak를 확인하였고, δ 3.97 (s, 3H), 3.81 (6H)에서 3개의 methoxyl proton을 확인하였고, 추가적으로 methyl proton δ 2.28 (s, 3H)을 확인하였다. 이를 바탕으로 기존 문헌과 비교하여 Compound 10을 obtusin으로 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 7.77 (s, 1H, H-4), 7.28 (s, 1H, H-5), 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 3.81 (d, *J* = 10.1 Hz, 6H, -OCH₃x2), 2.28 (s, 3H, -CH₃).

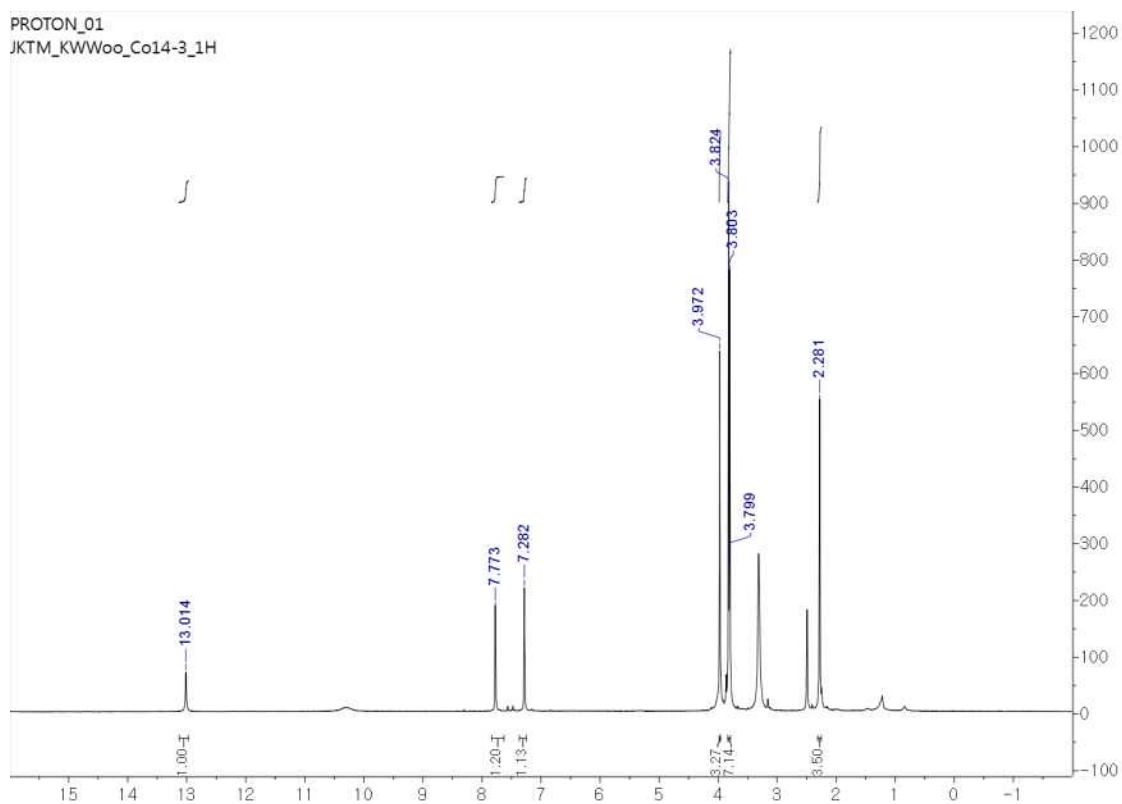


Fig. I -90. ¹H-NMR spectrum of compound 10.

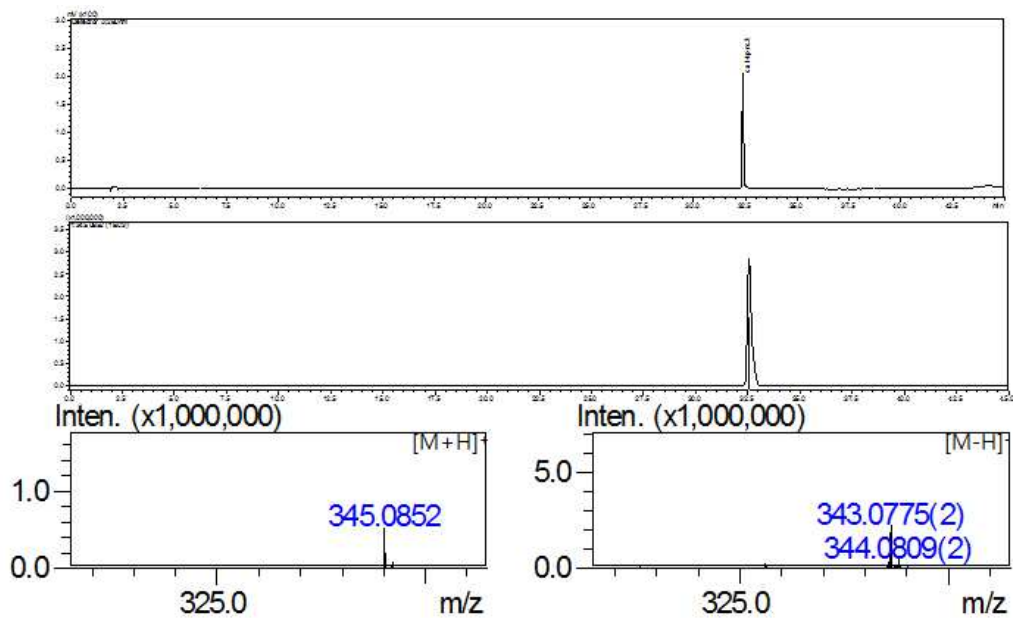


Fig. I -91. Mass spectrum(ESI) of compound 10.

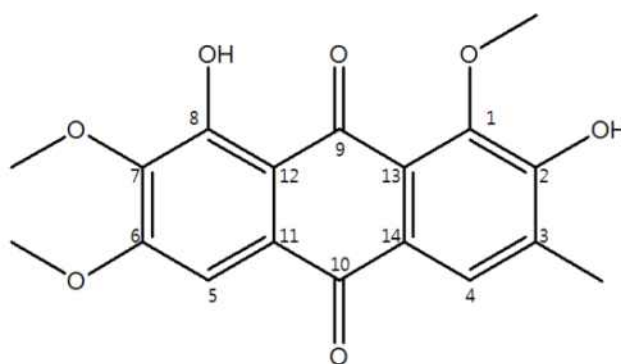


Fig. I -92. Structure of obtusin.

11) Compound 11 (MJ90-20-14 Pr. C-5)

Compound 11의 LC/MS 분석 결과 273.0664 [M+H]⁺, 271.0584 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₁₅H₁₂O₅의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.14 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 6.23(s, 1H)의 peak에서 benzen ring안의 proton peak를 확인하였고, δ 3.84 (s, 3H)에서 methoxyl proton을 확인하였고, 추가적으로 methyl proton δ 2.40 (s, 3H)을 확인하였다. 이를 바탕으로 기존 문헌과 비교하여 Compound 11을 rubrofusarin으로 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)
δ 7.14 (s, 1H, H-10), 6.80 (s, 1H, H-9), 6.38 (s, 1H, H-7), 6.23 (s, 1H, H-3), 3.84 (s, 3H), 2.40 (s, 3H).

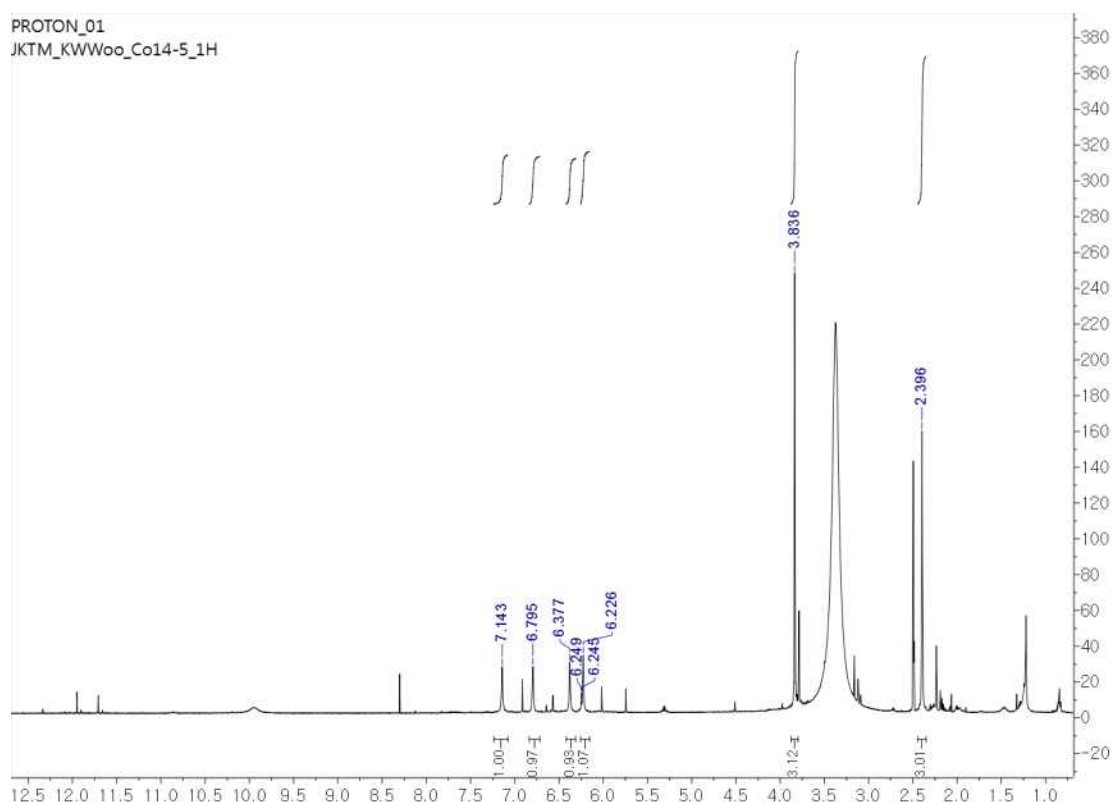


Fig. I -93. ¹H-NMR spectrum of compound 11.

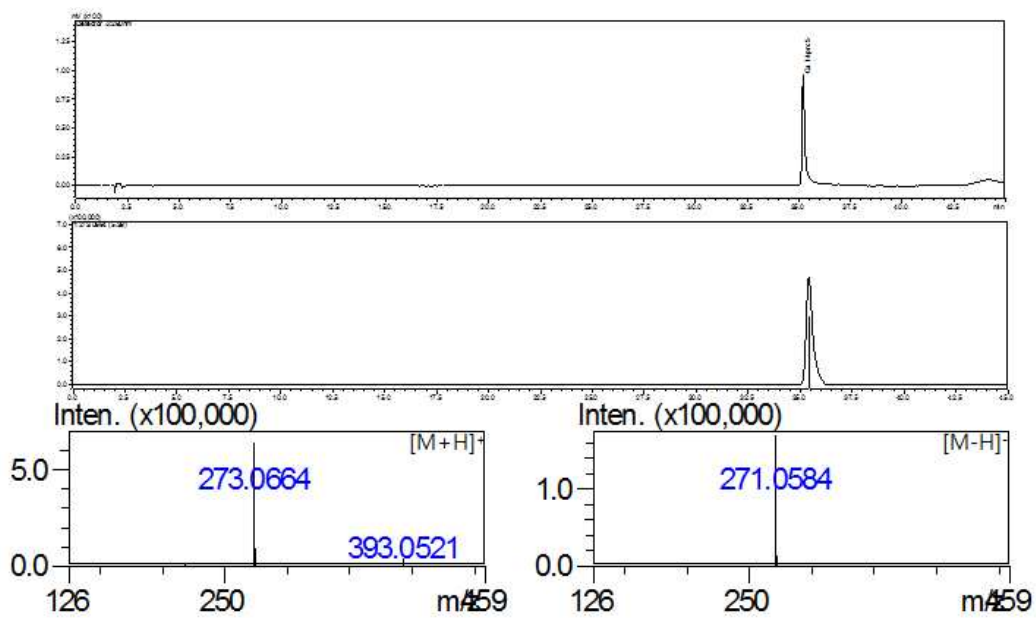


Fig. I -94. Mass spectrum(ESI) of compound 11.

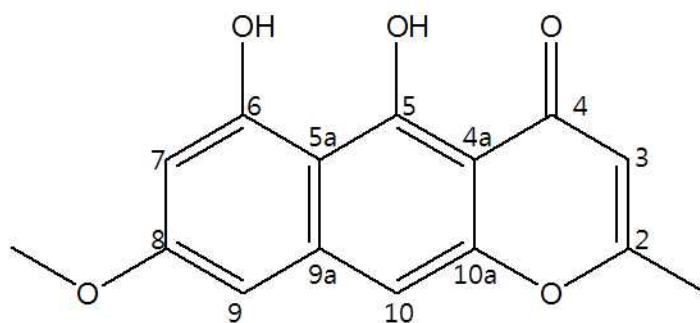


Fig. I -95. Structure of rubrofusarin.

12) Compound 12 (MJ90-20-14 Pr. C-6)의 구조동정

Compound 12의 LC/MS 분석 결과 273.0764 [M+H]⁺, 271.0582 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₁₅H₁₂O₅의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 6.81 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.24 (s, 1H)의 peak에서 benzen ring안의 proton peak를 확인하였고, δ 3.80 (s, 3H)에서 methoxyl proton을 확인하였고, 추가적으로 methyl proton δ 2.16 (s, 3H)을 확인하였다. 이를 바탕으로 기존 문헌과 비교하여 Compound 12을 isorubrofusarin으로 동정하였다.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 6.81 (s, 1H, H-6), 6.57 (s, 1H, H-7), 6.33 (s, 1H, H-9), 6.24 (s, 1H, H-3), 3.80 (s, 3H, -OCH₃), 2.16 (s, 3H, -CH₃)

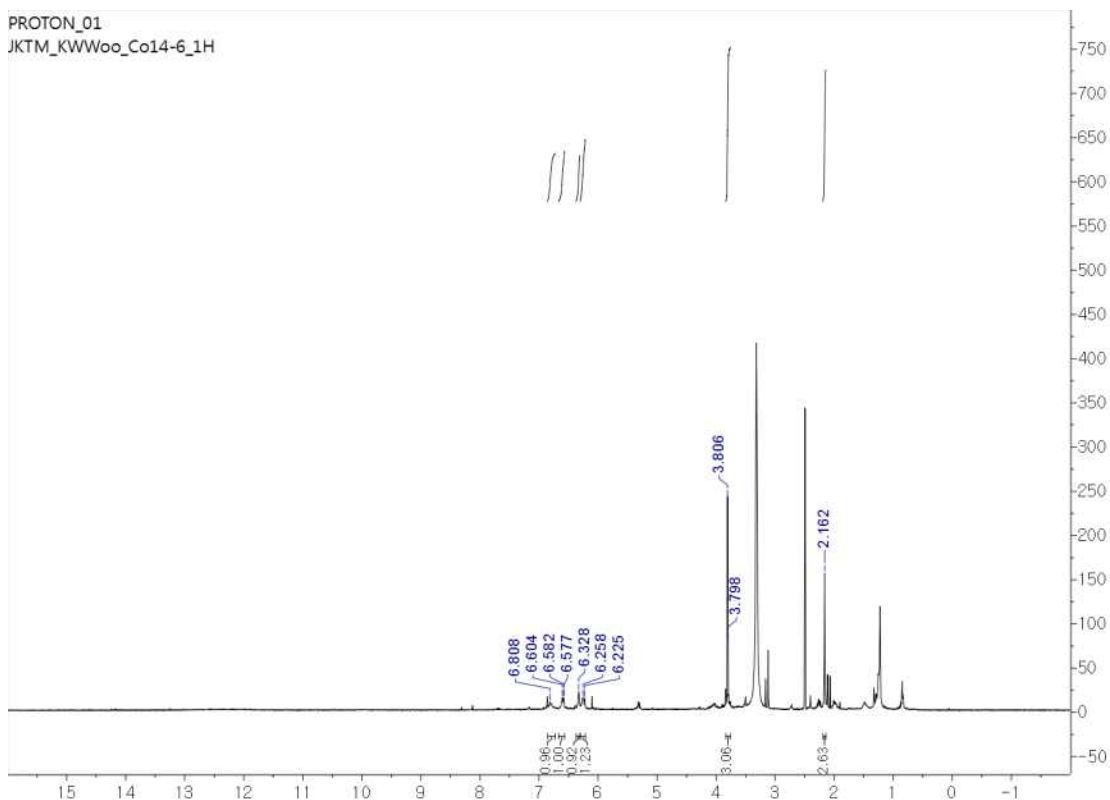


Fig. 1 -96. ¹H-NMR spectrum of compound 12.

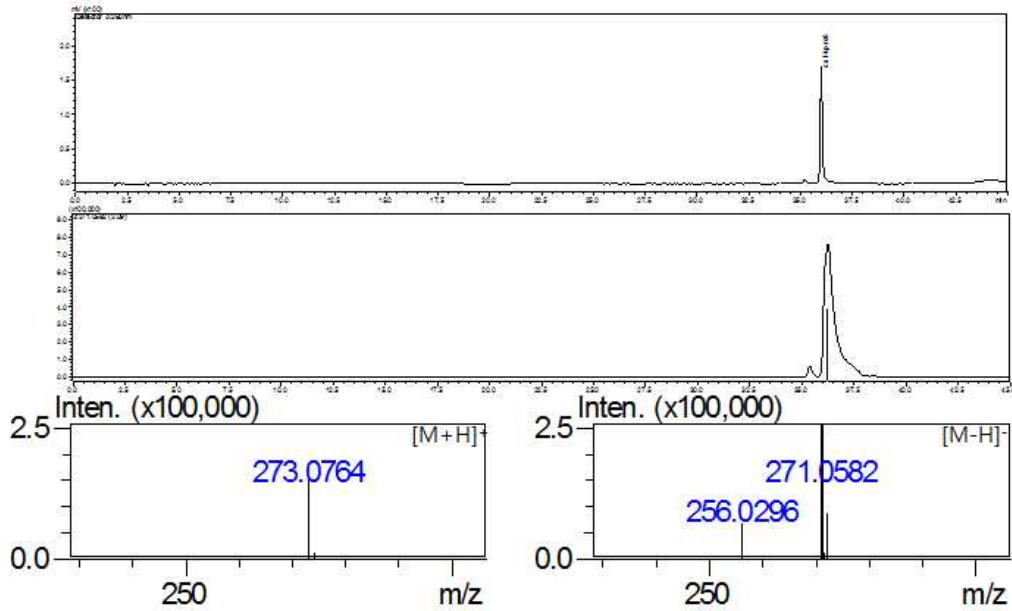


Fig. I -97. Mass spectrum(ESI) of compound 12.

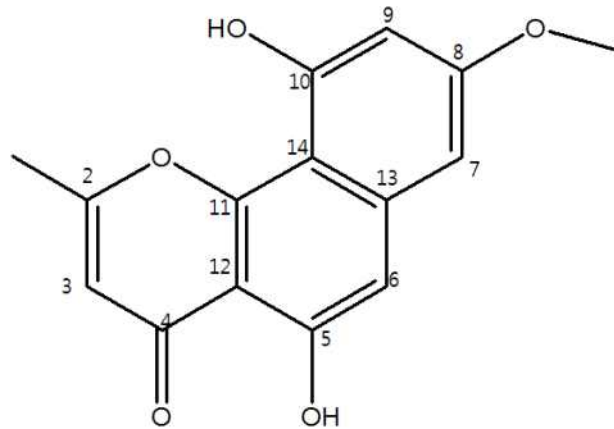


Fig. I -98. Structure of isorubrofusarin.

결명자 추출물을 open column chromatography와 Preparation HPLC를 이용해 분리 및 정제 하여 12개의 성분을 분리하였으며, 각각의 성분은 LC-IT-TOF-MS와 1D-NMR을 이용해 구조동정 하였다. 그 결과 분리한 12개의 성분이 각각 isorubrofusarin gentiobioside, aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside, rubrofusarin 6-O- β -D-gentiobioside, Cassiaside, obtusifolin 2-O- β -D-glucoside, Aurantio-obtusin, chrysophanol, obtusifolin, emodin, obtusin, rubrofusarin, isorubrofusarin임을 확인하였고, 이 성분들을 이용한 성분 함량 분석실험을 진행하였다.

6-2. 하수오의 지표성분 분리

I. 재료 및 방법

1) 하수오의 성분 스크리닝

하수오의 지표성분을 분리하기 위해 LC/MS를 이용한 스크리닝을 진행하였으며, 분리 조건을 설정한 후에 open column chromatography를 진행하였다.

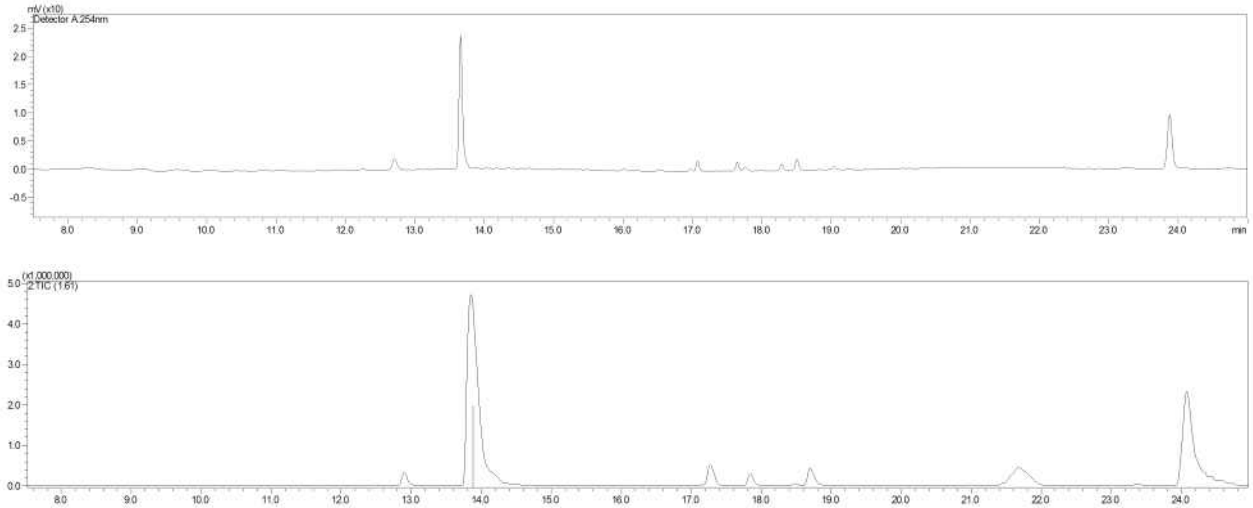


Fig. I -99. LC and MS chromatogram of *Cassia tora* L. Seed.

2) 하수오 추출 및 성분분리

하수오 건조물 3kg을 MeOH를 이용해 추출하고 이를 감압농축기를 이용해 농축하여 하수오 MeOH 추출물 360g을 얻었다. 이 추출물을 다시 ODS gel (50um, 1.2Kg YMC)을 이용한 open column chromatography (16cm x 60cm, Glass Column, Water-ACN = 100:0 → 40: 60)를 이용한 성분분리를 진행 하여 6개의 소분획물로 나누었다. 각각의 소분획물의 스크리닝을 통해 PMW2에 지표성분이 포함되어있음을 확인 하였으며, 이 소분획물을 Prep. HPLC를 이용해 compound 1(360mg)을 분리 및 정제하였다.

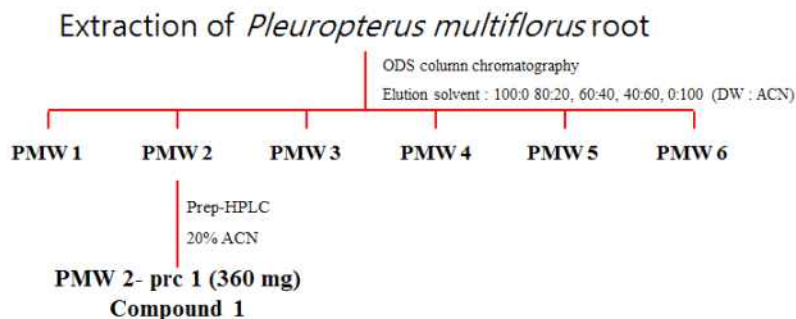


Fig. I -100. Isolation of compound 1 from *Pleuropterus multiflorus* TURCZ root.

II. 결과 및 고찰

1) Compound 1 (PMW2-prc 1)의 구조동정

Compound 1의 LC/MS 분석 결과 407.1021 [M+H]⁺, 405.0924 [M-H]⁻의 분자량을 확인하였으며, formular predictor (Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 C₂₀H₂₂O₉의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR에서 δ 7.70 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H) 영역에서 두 개의 연관된 이중결합 peak가 나타났으며, *J* Value값을 통해 두 proton이 trans form으로 연결된 탄소에 연결된 수소이온임을 확인하였다. 또한 δ 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H)과 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H)의 두 peak와, δ 6.64 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H)의 두 peak를 통해 각각 A2B2 type과 meta coupling으로 연관된 두개의 benzen ring이 존재하는 것을 확인 하였고 이 둘이 δ 7.70, 6.94의 이중결합에 의해 연결이 되어있음을 추정하였다. 또한 δ 4.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H)에서 나타난 anomeric peak를 통해 β -form의 당이 연결되어있음을 확인하였다. ¹³C-NMR에서는 δ 156.85, 154.46, 150.56, 136.50, 132.30, 129.45, 128.73, 127.83, 120.26, 115.08, 102.22, 101.39의 이중결합 영역에서 14개의 peak를 확인하였으며 역시 두 개의 benzen ring과 두 개의 이중결합이 존재함을 확인 하였다. 또한, 106.75, 76.77, 76.49, 74.06, 69.36, 60.66의 peak에서 glucose의 존재를 확인하였다. 이렇게 얻은 MS 및 NMR data를 기존 문헌과 비교하여 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside임을 확인 및 동정 하였다.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄)

δ 7.70 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, H-8), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2', 6'), 6.94 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, H-7), 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3', 5'), 6.64 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-6), 6.27 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-4), 4.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'').

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄)

δ 156.85 (C-4'), 154.46 (C-5), 150.56 (C-3), 136.50 (C-2), 132.30 (C-1'), 129.45 (C-8), 128.73 (C-1), 127.83 (C-2', 6'), 120.26 (C-7), 115.08 (C-3', 5'), 106.75 (C-1''), 102.22 (C-4), 101.39 (C-6), 76.77 (C-5''), 76.49 (C-3''), 74.06 (C-2''), 69.36 (C-4''), 60.66 (C-6'').

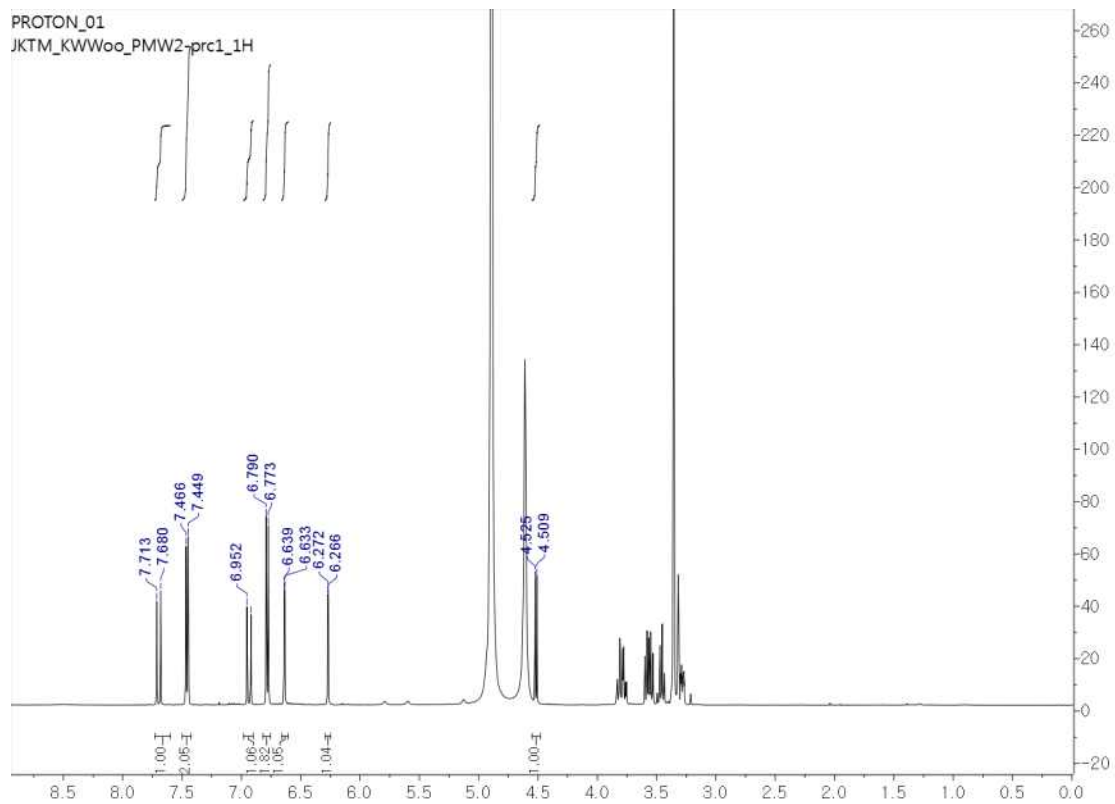


Fig. I -101. ^1H -NMR spectrum of compound 1.

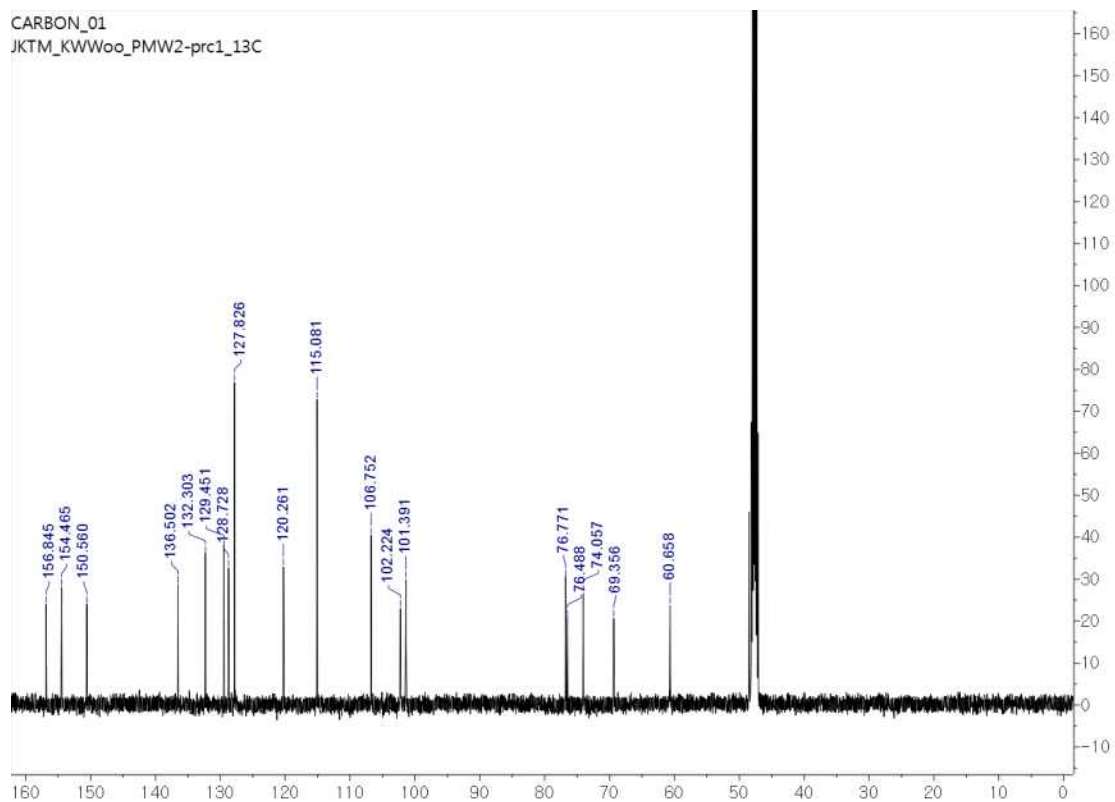


Fig. I -102. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1.

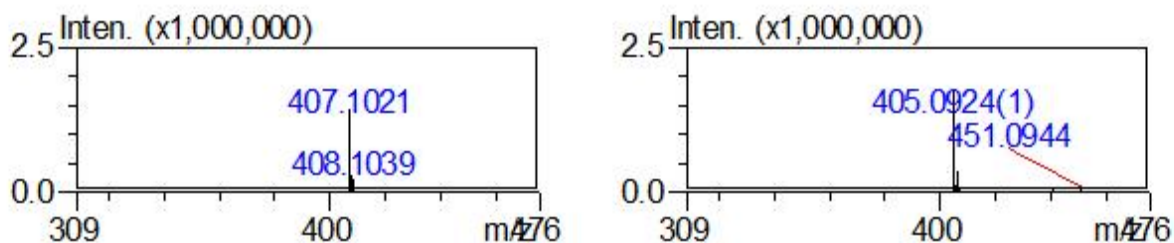


Fig. I -103. Mass spectrum(ESD) of compound 1.

Table I -19. ^1H - and ^{13}C -NMR data of Compound 1 in Methanol- d_4 .

Position	δ_{H}	δ_{C}
1	-	128.73
2	-	136.50
3	-	150.56
4	6.27 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H)	102.22
5	-	154.46
6	6.64 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H)	101.39
7	6.94 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H)	120.26
8	7.70 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H)	129.45
1'	-	132.30
2', 6'	7.46 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H)	127.83
3', 5'	6.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H)	115.08
4'	-	156.85
1''	4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H)	106.75
2''	-	74.06
3''	-	76.49
4''	-	69.36
5''	-	76.77
6''	-	60.66

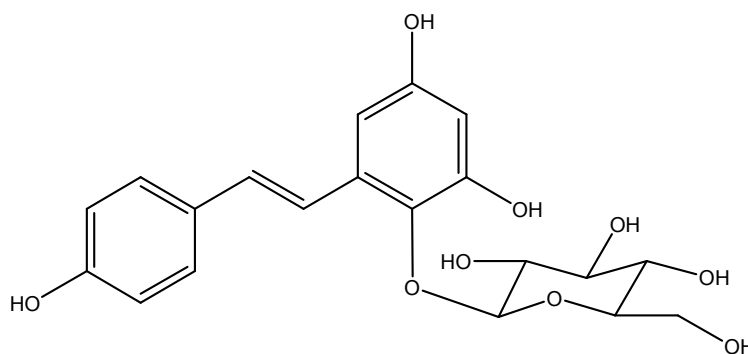


Fig. I -104. Structure of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside.

I-7. 발효 전·후 성분 모니터링 및 지표물질 함량변화

7-1. 결명자로부터 분리한 화합물의 함량분석

I. 재료 및 방법

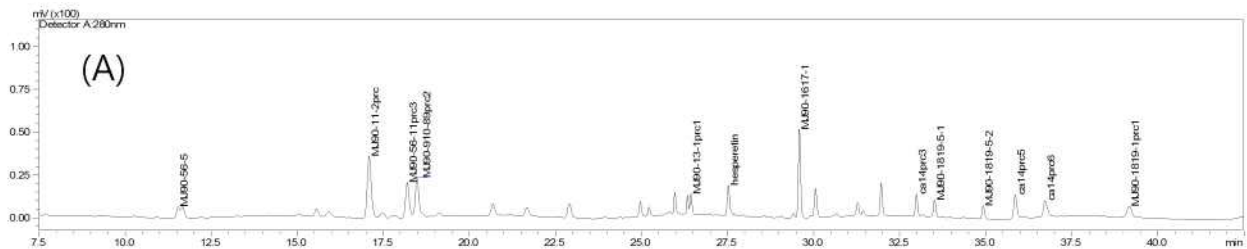
1) LC/MS 분석 조건 설정

결명자의 발효 전, 후에 대한 성분의 변화를 확인하기 위해 먼저 결명자 4kg을 50% EtOH를 이용해 70°C에서 3회 추출하였으며, 이를 감압농축한 후 다시 동결건조를 하여 주정추출물을 제조하였다. 그리고 이를 균주별로 발효한 후 LC/MS를 이용한 함량분석을 진행하였다. 분석장비는 shimadzu UFLC-MS system을 사용하였으며, Waters ACQUITY UPLC (®)BEH C18(2.1 x 150mm, 1.7um) column을 사용하였다. 또한 UV detector는 280nm파장으로 설정하여 사용하였으며, 시료를 용해시킨 용액을 필터하여 각각 1ul씩 주입하였고, 이동상으로는 Solvent A (Water in 0.1% formic acid), Solvent B (Acetonitrile)을 사용하여 0.21ml/min의 유속으로 흘러주었으며, 시간에 대한 이동상의 농도변화는 다음과 같다.

Time (min)	Solvent B(%)
0	15
20	25
25	40
32	60
40	60
41	15
50	15

2) 시료의 준비

결명자 추출물 및 그 발효물의 시료를 각각 100mg을 정밀하게 칭량하여 25ml 용량플라스크에 넣어 MeOH를 이용해 추출하였으며, 12개의 분리한 화합물을 동시에 분석하여 성분 각각의 회귀곡선을 통한 방정식을 이용해 각각의 화합물에 대한 성분함량을 측정하였으며, 각각의 성분 및 추출물을 분석한 chromatogram은 다음과 같다.



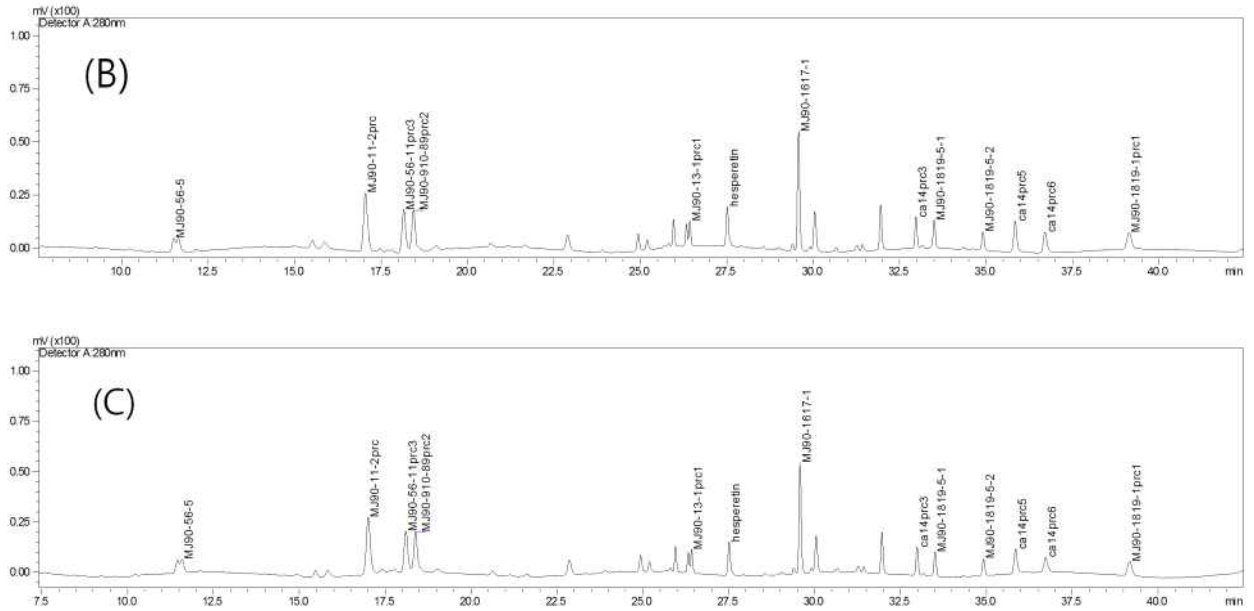


Fig. 1-105. LC chromatogram of *Cassia tora* L. Seed(A), And fermentation extraction by K2 (48 h(B) and 72 h(C)).

II. 결과 및 고찰

1). 배당체와 그 aglycon의 함량변화 비교

결명자 추출물과 발효물에 대한 함량을 각각 compound의 회귀방정식을 통해 계산하였고, 그 중 배당체와 aglycon이 서로 연관된 화합물 4종 (Isorubrofusarin gentiobioside - Isorubrofusarin, aurantio obtusin-6-O-glucoside - Aurantio obtusin, Rubrofusarin gentiobioside - Rubrofusarin, obtusifolin-2-glucoside - obtusifolin)에 대해 그 변화를 확인하였다. 그 결과, 전체적으로 5종 균주(K1, K2, K3, C1, Y)를 이용한 발효물에서 배당체의 함량 변화를 확인하였다. 하지만 K2 균주를 제외한 K1, K3, C1, Y 균주의 경우는 배당체가 감소하는 만큼 aglycon이 증가 할 것으로 예상하였으나, 그 함량이 일정하거나 함께 감소하는 현상을 보였다. 반대로 K2 발효물의 경우는 배당체와 aglycon의 변화량이 크게 나타나지는 않지만, 배당체의 함량이 줄어드는 만큼 aglycon의 함량이 증가하는 현상을 확인하였다. 따라서 K2 균주의 경우, 결명자에 함유되어 있는 배당체 성분을 이용하여 aglycon의 함량 증가에 관여하는 것을 확인하였으며, 시간이 지남에 따라서도 지속적인 변화가 있을 것으로 예상된다.

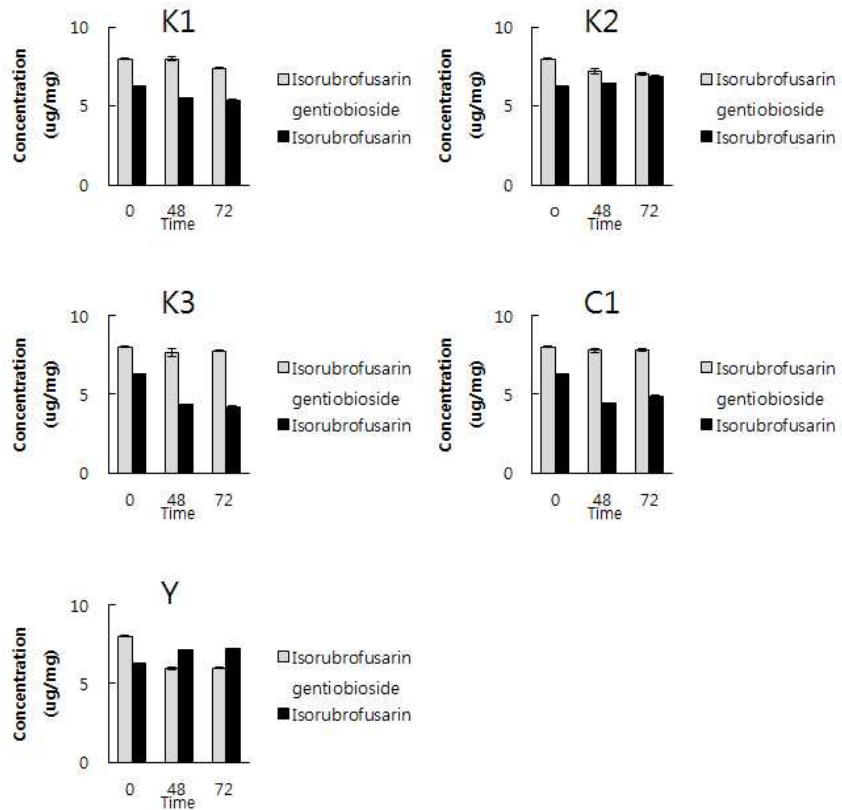


Fig. I -106. The Concentrations graph of Isorubrofusarin gentiobioside and Isorubrofusarin.

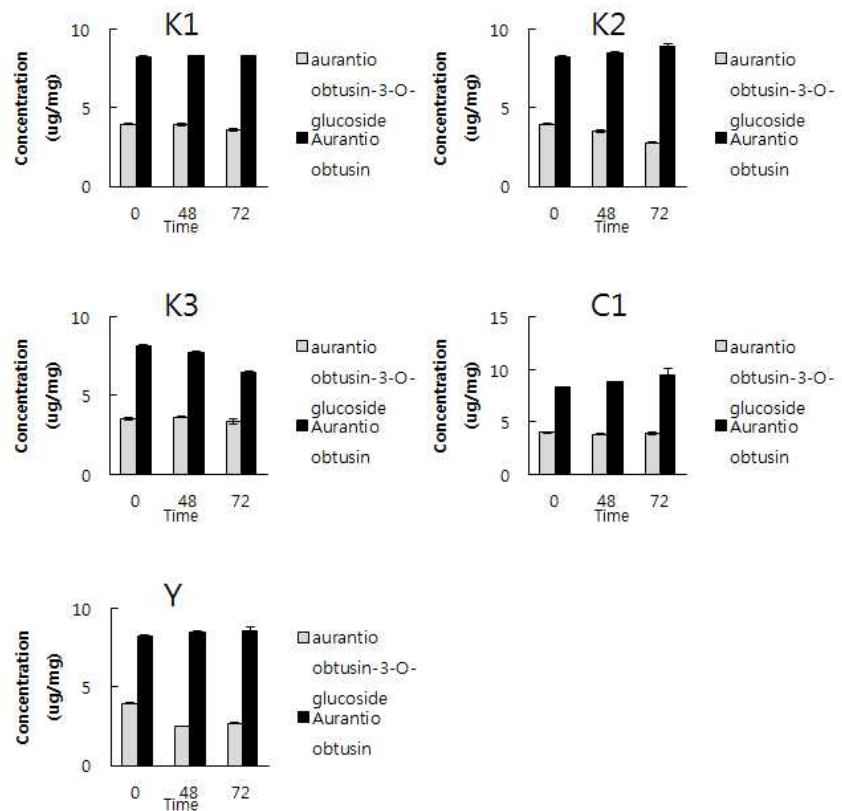


Fig. I -107. The Concentrations graph of aurantio obtusin-6-O-glucoside and Aurantio obtusin.

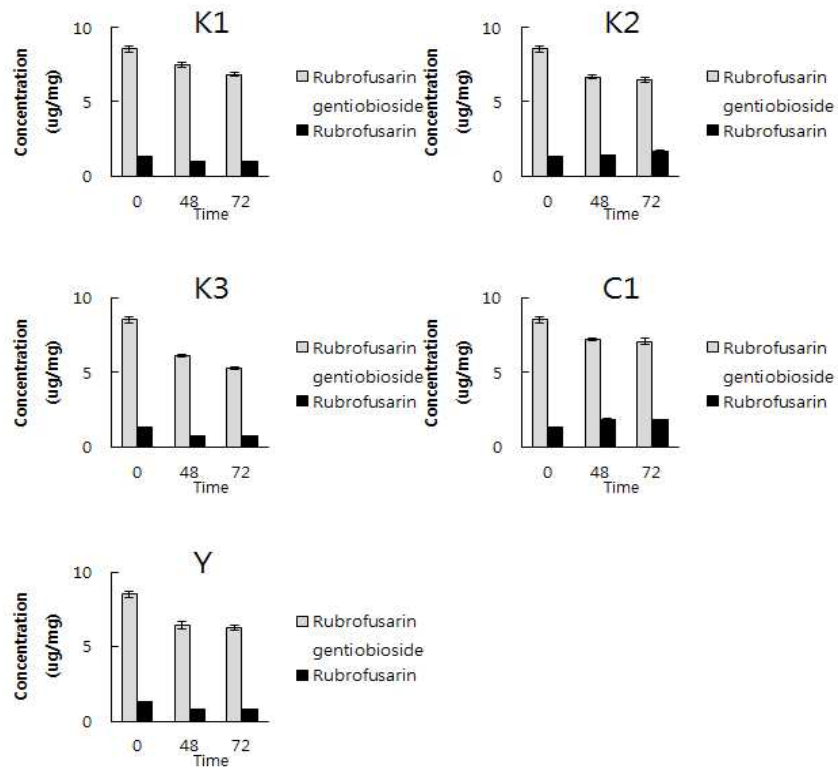


Fig. I -108. The Concentrations graph of Rubrofusarin gentiobioside and Rubrofusarin.

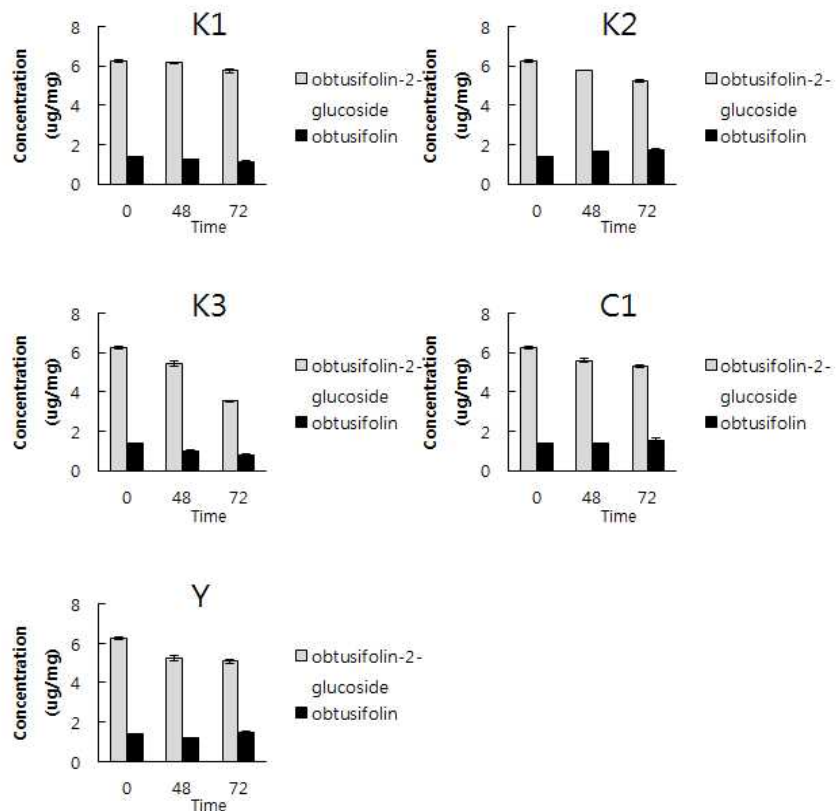


Fig. I -109. The Concentrations graph of obtusifolin-2-glucoside and obtusifolin.

그 외의 결명자에서 분리한 모든 화합물에 대한 함량 data는 다음과 같다. 배당체와 aglycon이 서로 연관된 화합물 외에도 cassiaside의 경우 모든 균주에서 감소하는 것을 확인하였으며, K2 균주의 발효물에서는 분리한 비당체 화합물이 모두 조금씩 증가하는 것을 확인하였다.

Table I -20. Concentrations of glycoside compounds from *Cassia tora* L. Seed (ug/mg).

	Isorubrofusarin gentiobioside	Cassiaside	Aurantio obtusin-3-O- glucoside	Rubrofusarin gentiobioside	Obtusifolin-2- glucoside
auto 0h	7.99 ± 0.05	26.72 ± 0.15	3.94 ± 0.05	8.54 ± 0.21	6.24 ± 0.05
RSD	0.66	0.55	1.28	2.49	0.81
K1 48h	8.00 ± 0.15	20.49 ± 0.02	3.92 ± 0.06	7.45 ± 0.19	6.17 ± 0.04
RSD	1.89	0.10	1.58	2.50	0.61
K1 72h	7.42 ± 0.07	19.52 ± 0.23	3.60 ± 0.06	6.83 ± 0.10	5.76 ± 0.10
RSD	0.90	1.17	1.66	1.39	1.69
K2 48h	7.24 ± 0.10	18.99 ± 0.17	3.50 ± 0.06	6.66 ± 0.12	5.76 ± 0.02
RSD	1.40	0.88	1.85	1.75	0.33
K2 72h	7.06 ± 0.09	21.04 ± 0.36	2.77 ± 0.15	6.47 ± 0.17	5.23 ± 0.06
RSD	1.26	1.70	5.33	2.69	1.18
C1 48h	7.78 ± 0.15	17.69 ± 0.01	3.77 ± 0.03	6.43 ± 0.25	5.58 ± 0.10
RSD	1.89	0.08	0.88	3.92	1.71
C1 72h	7.82 ± 0.01	17.11 ± 0.11	3.85 ± 0.20	6.30 ± 0.18	5.28 ± 0.07
RSD	0.10	0.65	5.14	2.90	1.30
K3 48h	7.66 ± 0.24	19.66 ± 0.37	3.61 ± 0.14	6.13 ± 0.35	5.46 ± 0.14
RSD	3.07	1.89	3.81	5.71	2.63
K3 72h	7.76 ± 0.06	16.04 ± 0.12	3.34 ± 0.02	5.28 ± 0.08	3.54 ± 0.03
RSD	0.73	0.78	0.68	1.57	0.78
Y 48h	5.96 ± 0.09	23.74 ± 0.30	2.48 ± 0.03	7.18 ± 0.09	5.25 ± 0.12
RSD	1.52	1.28	1.10	1.29	2.38
Y 72h	5.96 ± 0.05	24.72 ± 0.37	2.65 ± 0.03	7.09 ± 0.17	5.07 ± 0.10
RSD	0.77	1.48	1.26	2.46	1.94

Table I -21. Concentrations of aglycon compounds from *Cassia tora* L. Seed (ug/mg).

	Aurantio obtusin	Obtusin	Obtusifolin	Emodin	Iso- rubrofusarin	Rubrofusarin	Chrysophanol
auto 0h	8.27 ± 0.04	1.11 ± 0.01	1.40 ± 0.01	2.32 ± 0.03	6.26 ± 0.06	1.29 ± 0.04	6.90 ± 0.27
RSD	0.50	1.22	0.85	1.36	0.95	2.79	3.87
K1 48h	8.29 ± 0.04	1.27 ± 0.01	1.79 ± 0.01	2.62 ± 0.04	5.54 ± 0.02	0.99 ± 0.02	8.54 ± 0.18
RSD	0.51	0.65	0.75	1.40	0.43	2.37	2.13
K1 72h	8.27 ± 0.07	1.15 ± 0.01	1.64 ± 0.00	2.37 ± 0.01	5.39 ± 0.04	0.97 ± 0.01	7.63 ± 0.13
RSD	0.86	0.86	0.14	0.22	0.69	0.67	1.66
K2 48h	8.47 ± 0.09	1.15 ± 0.00	1.66 ± 0.01	2.44 ± 0.04	6.43 ± 0.03	1.38 ± 0.04	8.28 ± 0.39
RSD	1.04	0.21	0.63	1.50	0.42	2.72	4.72
K2 72h	8.94 ± 0.11	1.24 ± 0.02	1.74 ± 0.02	2.64 ± 0.03	6.91 ± 0.05	1.68 ± 0.03	8.56 ± 0.52
RSD	1.20	1.68	1.01	1.23	0.72	1.51	6.08
C1 48h	8.74 ± 0.07	1.37 ± 0.02	1.81 ± 0.00	2.66 ± 0.03	4.43 ± 0.02	0.81 ± 0.01	8.23 ± 0.48

RSD	0.79	1.24	0.12	0.97	0.44	0.74	5.81
Cl 72h	9.47 ± 0.63	1.55 ± 0.09	2.13 ± 0.14	3.03 ± 0.26	4.87 ± 0.07	0.81 ± 0.01	9.29 ± 0.45
RSD	6.61	5.74	6.68	8.55	1.53	1.45	4.86
K3 48h	7.75 ± 0.09	1.01 ± 0.01	1.35 ± 0.02	1.83 ± 0.04	4.31 ± 0.05	0.74 ± 0.03	5.65 ± 0.13
RSD	1.11	1.40	1.39	2.17	1.07	3.96	2.38
K3 72h	6.49 ± 0.04	0.80 ± 0.01	1.35 ± 0.02	1.46 ± 0.04	4.20 ± 0.05	0.71 ± 0.02	4.23 ± 0.10
RSD	0.57	1.59	1.50	2.59	1.13	2.15	2.35
Y 48h	8.53 ± 0.03	1.17 ± 0.01	1.46 ± 0.02	2.51 ± 0.04	7.13 ± 0.03	1.85 ± 0.03	7.53 ± 0.28
RSD	0.34	0.78	1.22	1.77	0.43	1.59	3.77
Y 72h	8.55 ± 0.06	1.45 ± 0.04	1.64 ± 0.01	2.93 ± 0.05	7.21 ± 0.04	1.82 ± 0.03	8.18 ± 0.06
RSD	0.7	2.61	0.62	1.68	0.53	1.51	0.79

7-2. 하수오로부터 분리한 화합물의 함량분석

I. 재료 및 방법

1) 시료의 준비

하수오에서 분리한 화합물의 발효 전, 후의 함량변화를 확인하기 위해 HPLC(shimadzu, Japan)를 이용한 분석을 진행하였다. 먼저, 하수오 7kg을 50%에탄올을 이용해 추출하였으며, 이를 감압농축 및 동결건조를 하여 1019g의 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 추출물을 균주를 이용해 발효하였으며, K2 발효물에 대한 발효 전, 후의 함량을 분석하였다.

2) HPLC 분석 조건 설정

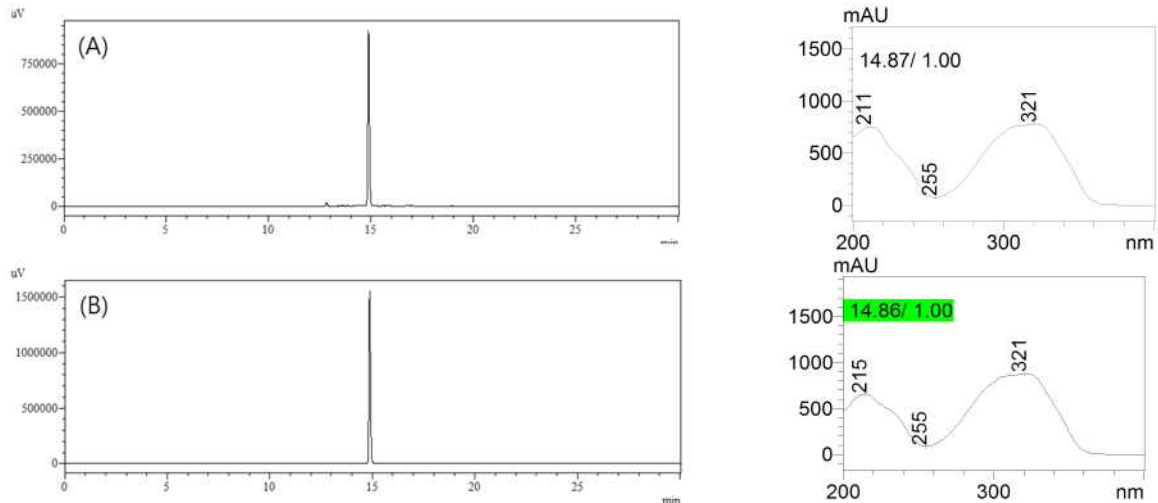
하수오 추출물과 발효물을 동결건조하여 수분을 제거하고, 각각 200mg씩 칭량하여 50ml 용량플라스크에서 메탄올을 이용해 추출하였다. 추출용액을 필터하여 바이알에 담고, 5ul씩 주입하여 HPLC(shimadzu, Japan) 분석을 진행하였다. 이동상으로는 Water (0.1% formic acid, solvent A)와 Acetonitrile (solvent B)를 사용하였으며, 컬럼은 Phenomenex Luna 5mu C18 (250 x 4.60 mm) 컬럼으로 하여 1.0ml/min의 유속으로 0에서 22분동안 solvent B를 0에서 60%로 흘려주었으며, UV는 320nm의 파장으로 측정하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 하수오 추출물의 compound 1 함량계산

하수오 추출물에 함유되어있는 compound 1의 함량계산은 STD의 회귀곡선을 통해 계산하였다. 하수오 추출물과 STD의 파장은 다음과 같다.

Fig. I -110. LC chromatograms of extract(A) and compound 1(B) and respective UV spectrum data from *Pleuropterus multiflorus* TURCZ.



추출물의 지표성분 peak와 분리한 화합물의 peak가 동일한 머무름 시간에 측정 되었 으며, UV 스펙트럼 역시 일치하는 것을 확인하였다. STD 회귀곡선은 510ug/ml의 농도 에서 시작하여 31.875ug/ml의 농도까지 2배수로 희석하여 만들었으며, R2= 0.9999의 직 선성을 확인하였다. 여기서 계산된 회귀방정식을 이용해 추출물의 발효 전, 후의 함량 을 각각 계산하여 그 변화량을 확인하였다.

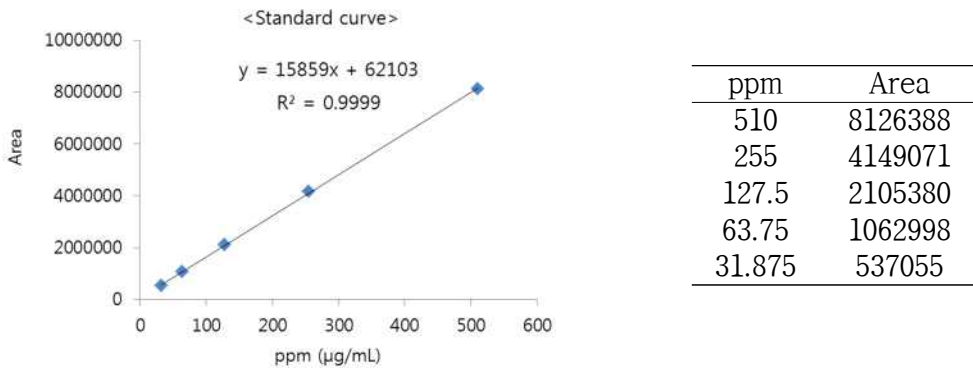


Fig. I -111. The calibration curve and peak area by the concentration of compound 1.

STD 결명자 추출물의 발효 전, 후의 검체를 위의 회귀방정식에 대입하여 함량계산을 한 결과 는 다음과 같다.

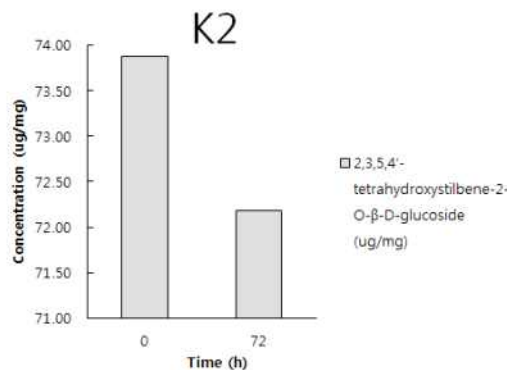


Fig. I -112. The concentrations graph (ug/mg) of 2,3,5,4 '-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside by K2.

Table I -22. Concentrations of compound 1 in *Pleuropterus multiflorus* TURCZ.

Sample	Concentration (ug/mg)	RSD
발효 전	73.87 ± 0.28	0.38
발효 후	72.18 ± 0.15	0.21

분석결과 compound 1이 발효 전과 비교하여 발효 후, 73.87ug에서 72.18ug으로 감소하였음을 확인하였으며, K2 균주가 결명자뿐만 아니라 하수오의 배당체 화합물에 대해서도 관여를 하는 것을 확인 하였다.

- 2차년도 (2015.12.19.~2016.12.18.)

II-1. 결명자, 하수오 2종 소재의 배합비 설정

1-1. 결명자와 하수오의 유효성분 함량 비교·분석을 위한 시료 제작

결명자와 하수오를 각각 100:0, 90:10, 80:20, 70:30 (w/w) 비율로 혼합하여 anthraquinone계 화합물의 지표성분 함량을 비교·분석하기 위한 시료를 제작하였다.

1-2. 결명자와 하수오 발효물에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가

Loperamide로 유도된 변비 모델에 대해 하수오 추출물 (HS-100, HS-200, HS-300), *Lactobacillus casei* 발효 하수오 추출물 (HK2-100, HK2-200, HK2-300), 결명자 추출물 (A-100, A-200, A-300)의 효능 차이를 조사하였다.

1-3. 결명자와 하수오의 경제성 및 수급성 평가

결명자와 하수오의 100g 당 구입단가를 실제구입처와 인터넷 www.naver.com에서 확인·비교하였으며 원료 수급에 대한 편의성을 비교·확인하였다.

1-4. 원료의 추출효율 평가 및 경제성 분석

50% 에탄올 사용에 따른 결명자추출물과 분쇄물, 볶음분쇄물에 대한 단가산정을 통해 추출물과 분쇄물에 대한 경제성을 비교·분석하였다.

1-5. 원료 수급을 위한 계약 농가 확보

전남지역 농가와의 계약재배를 통해 원료 수급의 문제점을 해결하고자 하였다.

I. 재료 및 방법

1) 결명자와 하수오 배합을 통한 분석 시료제작

(1) 시료준비

결명자와 하수오의 배합비에 따른 anthraquinone계열 지표성분인 MJ901617-1 (Aurantio-obtusin)의 함량비교를 위해 결명자와 하수오를 각각 100:0, 90:10, 80:20, 70:30의 비율로 혼합하였으며, 각각의 시료를 80mg씩 정밀하게 칭량하고 25ml volumetric flask에 methanol로 정용하였으며, 이를 다시 초음파 추출기를 이용해 추출하여 이를 검체로 하였다.

(2) 표준용액 조제

함량분석에 사용된 성분은 결명자에서 직접 분리한 MJ901617-1를 사용하였으며, MJ901617-1 5mg을 정밀하게 칭량하여 100ml volumetric flask에 methanol로 정용하여 용해시켜 표준용액 1 (50ug/ml)로 하였다. 또한 표준용액 1을 methanol을 희석하여 농도별 표준용액을 조제하여 함량분석에 사용하였다.

(3) 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 HPLC는 Prominence 20AD system (Shimadzu, Japan) 이며, 20AD (binary) pump를 통해 이동상의 분석조건을 설정하였다. 검출기는 diode array detector (DAD)를 이용해 200-400nm까지의 전파장 UV spectrum을 확인하고 이중 흡수 극대파장 288nm를 최종 선정하여 정량분석에 사용하였다. 시료의 주입은 SIL-20A autosampler를 이용해 10ul씩 주입하였으며, 이동상으로는 0.1% formic acid (A), acetonitrile (B)를 사용하였다. 함량측정을 위한 HPLC의 분석조건은 다음과 같다.

Table II-1. HPLC analysis condition.

- Flow rate: 1.0ml/min - Oven temp: 40°C
- Injection volume: 10 μ L
- Column: Luna C-18 5 μ m(4.6mm x 250 mm, Phenomenex, USA)
- Detector: DAD (extraction wavelength: 288nm)
- Mobile phase:

Time	Mobile phase	
	A% (0.1% formic acid)	B% (Acetonitrile)
0	75	25
15	40	60
35	60	40
43	60	40
44	75	25
50	75	25

2) 장기능개선 유효성 평가용 시료 제작

(1) 결명자 분쇄물

3회 흐르는 물에 깨끗이 세척한 후, 60°C에서 12시간 건조시킨 결명자를 30mesh로 고르게 분쇄하여 결명자 분쇄물을 제작하였다.

(2) 하수오 분쇄물

3회 흐르는 물에 깨끗이 세척한 후, 60°C에서 12시간 건조시킨 하수오를 30mesh로 고르게 분쇄하여 하수오 분쇄물을 제작하였다.

(3) 하수오 주정추출물 *Lactobacillus casei* K2발효

30mesh로 분쇄한 하수오에 추출용매 EtOH을 3배 볼륨 첨가하여 4시간 동안 3회 반복 추출하고 여과하였다. 그리고 추출물은 20L 회전감압농축하여 유기용매를 날리고

물층만 남게하여 10brix이하가 되게 물을 넣고 동결건조하여 하수오 주정추출물 동결건조분말을 제작하였다. 이를 결명자 주정추출물 발효방법과 동일하게, 3차 증류수에 하수오주정추출물 3%(v/v)를 혼합하고 121℃, 15분간 고압멸균하였다. 그리고 충분히 식힌 후, 변비개선 효능이 가장 우수했던 *Lactobacillus casei* K2 균주를 Lactobacilli MRS 배지(이하 MRS 배지, 55g/L, Enzymatic digest of animal tissue 10g, Beef extract 10 g, Yeast extract 5g, Dextrose 20g, Sodium acetate 5g, Polysorbate80 1g, Disodium phosphate 2g, Ammonium citrate 2g, Magnesium sulfate 0.1g, Manganese sulfate 0.05g, Acumedia)에서 37℃, 24시간, 150rpm, 통성혐기적조건으로 진탕배양한 seed를 3% 접종하고 37℃, 72시간, 150rpm, 통성혐기적조건으로 진탕배양하였다.

3) 결명자와 하수오 발효물에 대한 장기능개선 유효성 평가

(1) 실험동물 사육 및 실험식이

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (NOR), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 저농도 하수오 투여군 (HS-100, 100mg/kg), 중농도 하수오 투여군 (HS-200, 200mg/kg), 고농도 하수오 투여군 (HS-300, 300mg/kg), 저농도 *Lactobacillus casei* 발효 하수오 투여군 (HK2-100, 100mg/kg), 중농도 *Lactobacillus casei* 발효 하수오 투여군 (HK2-200, 200mg/kg), 고농도 *Lactobacillus casei* 발효 하수오 투여군 (HK2-300, 300mg/kg), 저농도 결명자 투여군 (A-100, 100mg/kg), 중농도 결명자 투여군 (A-200, 200mg/kg), 고농도 결명자 투여군 (A-300, 300mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여를 하였다.

(2) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정하였다

(3) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 측정

각 실험동물의 변은 실험시작 후 3일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후, 실험 3일째에 수거하였으며, 개체 당 변의 개수와 변 중량 (wet weight)을 측정하였다. 변의 수분함량은 변을 70℃ 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변중량으로 나누어 계산하였다.

(4) 장이동거리 측정

장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g

suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험 동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였다.

(5) 대장관내 점액질의 분비효과 측정

대장은 맹장 이후 부분부터 직장까지 부위의 양쪽을 결찰하여 적출하였다. 적출한 대장관을 10% formaldehyde으로 고정하여 조직처리 과정을 거치고 파라핀으로 embedding 하여 5 μ m 두께로 절편을 제작하였다. Alcian blue (pH 2.5)로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 유효성분 함량 비교

결명자와 하수오혼합물 100:0 90:10, 80:20, 70:30 의 MJ901617-1에 대한 함량을 비교한 결과, 1.89, 1.43, 1.12, 0.85%로 지표성분의 점차적인 감소를 확인하였다. 이전의 결과에서 알 수 있듯이 결명자와 하수오의 동일한 성분이 존재하지 않으며, 결명자에서 장기능개선 효능을 보이는 anthraquinone계열의 화합물(MJ901617-1)은 하수오와 혼합되는 만큼 감소하는 것으로 확인되었다.

Table II-2. Contents of MJ901617-1 from *Cassia tora* L. and *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. Mixture.

시료명 결명자:하수오	검체량 (mg)	농도 (ug/ml)	함량 (mg/g)	함량 (%)
10:0	80.13	1.51	0.19	1.89
9:1	80.04	1.15	0.14	1.43
8:2	80.02	0.89	0.11	1.12
7:3	80.08	0.68	0.09	0.85

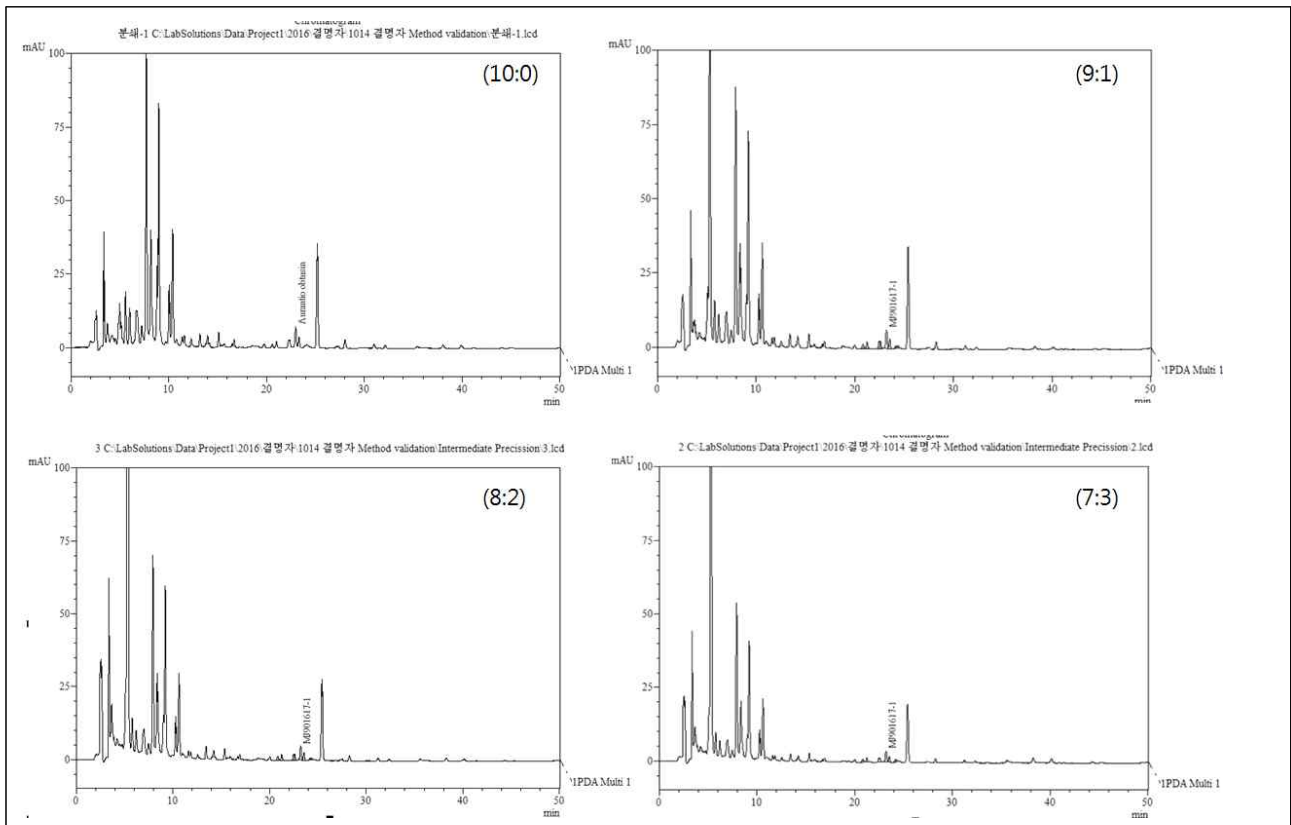


Fig. II-1. LC chromatogram of extract from *Cassia tora* L. and *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. Mixture.

2) 하수오 주정추출물의 pH 및 CFU/ml 변화

하수오 50%주정추출물 3%가 함유된 시료를 K2 균주로 발효시킨 시료의 pH와 CFU/ml 은 Table I -2와 같이 pH는 24시간까지 감소되다 거의 일정하게 유지되고 CFU는 24시간까지 증가되다 48시간까지 정체하고 72시간에 사멸하기 시작하였다.

Table II-3. pH and CFU/ml change according to fermented time of the ethanol extract *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. by the *Lactobacillus casei* K2 strains.

하수오주정	0h	24h	48h	72h
pH	5.72±0.04	4.71±0.03	4.62±0.02	4.66±0.04
CFU/ml	1.24±0.18 x10 ⁶	4.84±0.21 x10 ⁷	4.92±0.17 x10 ⁷	6.11±0.12 x10 ⁵

3) 결명자와 하수오 발효물에 대한 장기능개선 유효성 평가

(1) 하수오 실험군 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide로 변비를 유발시킨 군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)보다 감소하였다. 최근연구에 따르면, Loperamide 투여에 따라 나타나는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중

증가량 및 사료섭취량은 실험군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table II -4).

Table II-4. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with fermented and non-fermented *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. extract in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	187.9 ± 13.73 ^{NS}	16.3 ± 1.12 ^b	21.0 ± 1.37 ^b
LOP	186.3 ± 12.02	13.6 ± 1.10 ^a	14.5 ± 2.09 ^a
P/C	186.7 ± 12.02	14.8 ± 1.65 ^a	15.5 ± 2.09 ^a
A-100	189.9 ± 14.00	14.0 ± 2.21 ^a	15.5 ± 1.76 ^a
A-200	190.6 ± 14.40	14.2 ± 1.34 ^a	15.0 ± 2.09 ^a
A-300	189.4 ± 12.25	14.8 ± 3.29 ^a	15.5 ± 2.67 ^a
HS-100	186.4 ± 13.31	14.9 ± 0.94 ^a	15.5 ± 2.09 ^a
HS-200	186.6 ± 13.50	14.1 ± 2.25 ^a	15.0 ± 1.76 ^a
HS-300	187.4 ± 11.74	15.2 ± 1.15 ^a	14.5 ± 1.00 ^a
HK2-100	188.4 ± 13.73	14.9 ± 0.97 ^a	14.5 ± 2.09 ^a
HK2-200	188.8 ± 13.77	14.1 ± 2.62 ^a	15.0 ± 1.76 ^a
HK2-300	189.1 ± 13.91	14.6 ± 1.35 ^a	15.0 ± 1.76 ^a

Data represents the mean ± S.D. Different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS non significant

(2) 하수오 실험군 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 54 ± 3 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 39.4 ± 1.67 개로 감소하여 Loperamide에 대한 변비 유발이 확인되었다. 하수오 처리군 (HS-100, HS-200, HS-300)의 변 개수, 변 중량 모두 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 차이가 크지 않았으며, *Lactobacillus casei* 발효 하수오 처리군 (HK2-200, HK2-300)은 Loperamide 단독 투여군 (LOP)에 비해 변 개수 및 중량이 증가하는 경향을 나타냈지만 유의적인 차이는 크지 않았다(Fig. II-2 & 3).

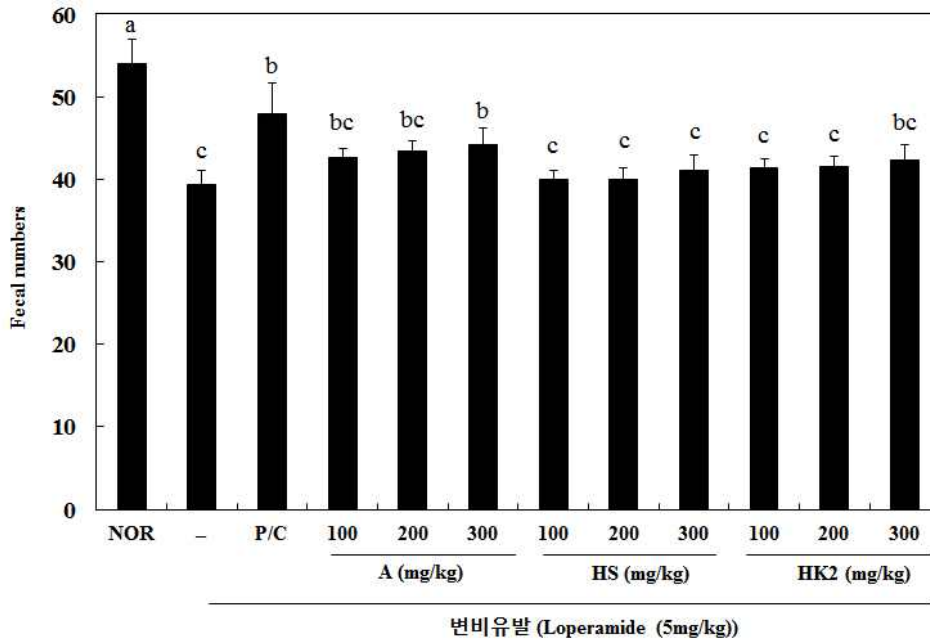


Fig. II-2. Effects of the fermented and non-fermented *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. extract on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

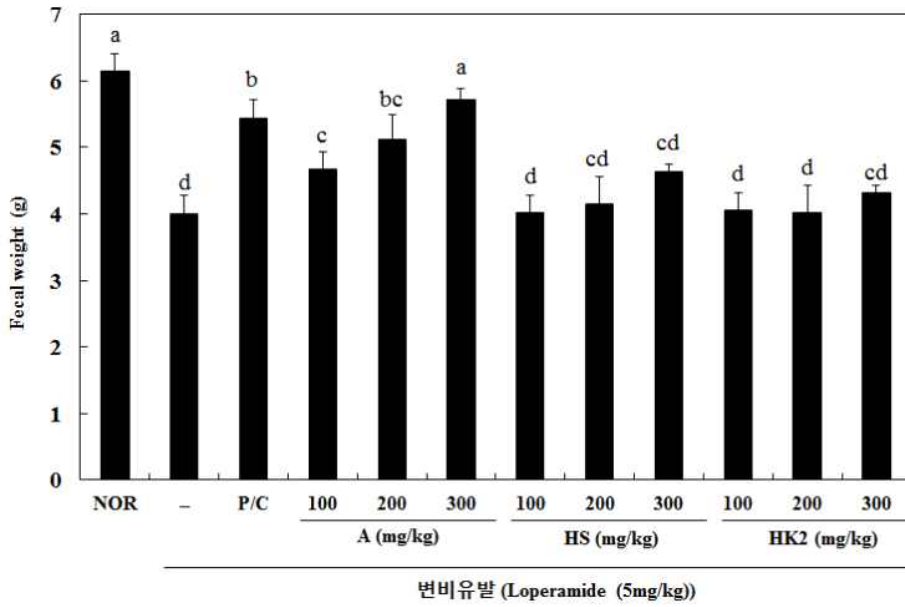


Fig. II -3. Effects of the fermented and non-fermented *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 하수오 실험군 변의 수분함량

변비 유발 후, 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)의 변의 수분함량이 유의적으로 감소하였으며, 하수오 처리군 (HS-100, HS-200, HS-300)과 *Lactobacillus casei* 발효 하수오 처리군 (HK2-100, HK2-200, HK2-300)은 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 농도 의존적으로 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. II-4).

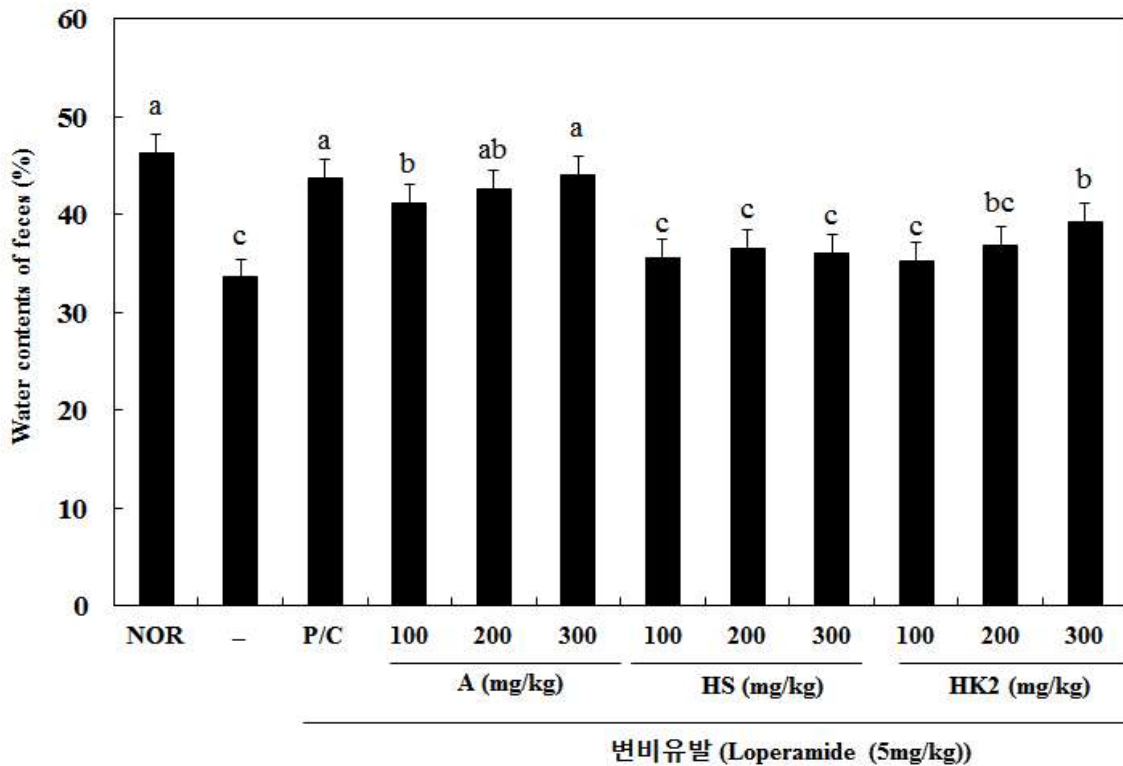


Fig. II-4. Effects of the fermented and non-fermented fermented *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. extract on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 하수오 실험군 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시 약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 하수오 처리군 (HS-100, HS-200, HS-300)과 *Lactobacillus casei* 발효 하수오 처리군 (HK2-100, HK2-200, HK2-300)은 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 Carmine의 장내 이동거리를 증가시켰다(Fig. II-5).

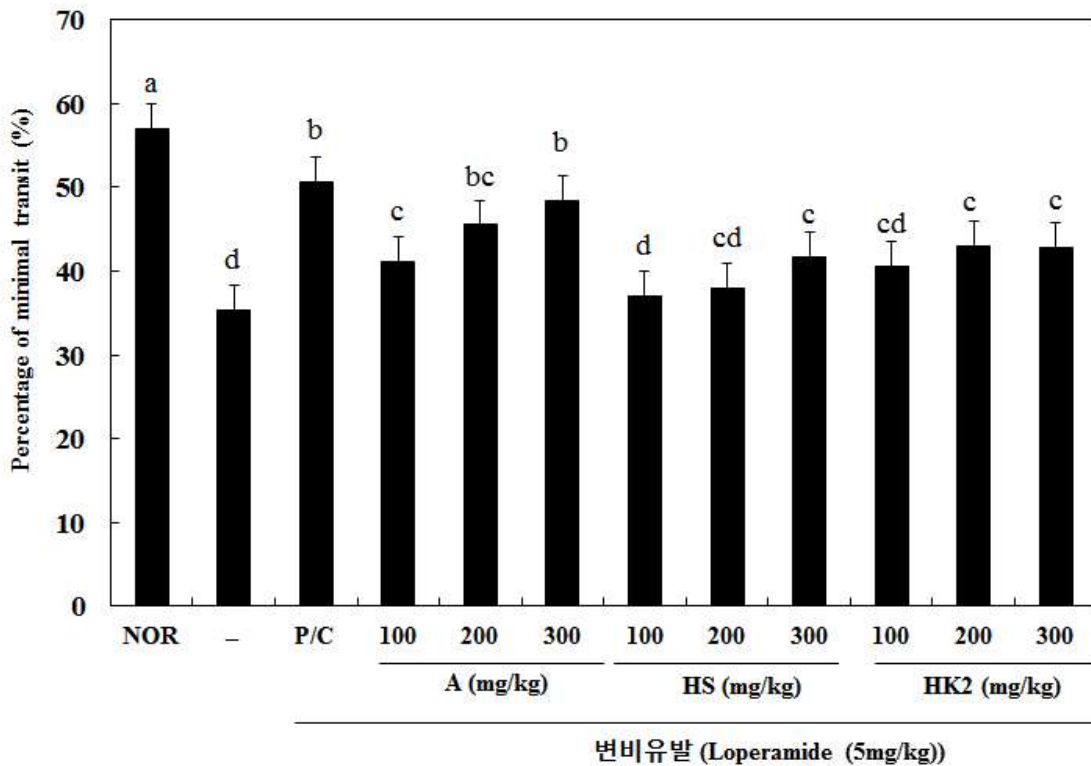


Fig. II-5. Effects of the fermented and non-fermented *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군(NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군 (LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 반면에 발효 하수오 처리군 (HK2-300)은 Loperamide에 의해 감소된 goblet cell의 점액분비정도와 intestinal crypt의 형태를 회복시킨 것으로 나타났다(Fig. II-6).

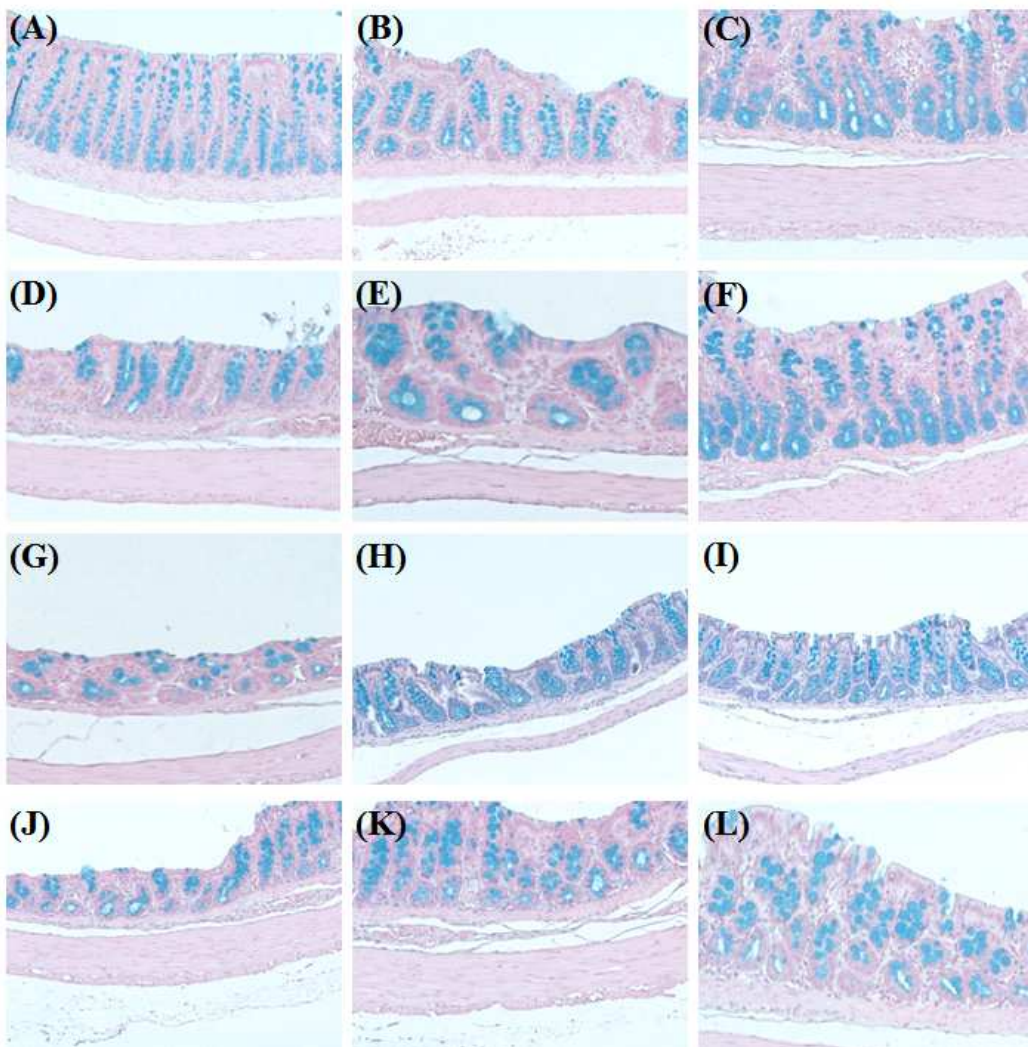


Fig. II-6. Effects of the *Pleuropterus multiflorus* TURCZ. extract on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) A-100 group, (E) A-200 group, (F) A-300 group, (G) HS-100 group, (H) HS-200 group, (I) HS-300 group, (J)HK2-100 group, (K)HK2-200 group, (L) HK-300 group.

4) 경제성 및 수급성 평가

결명자는 특별히 관리를 안 해도 한번 심어 놓으면 잘 자라는 작물로 약 5개월 재배 하며 일반적으로 5월 ~ 6월경에 파종하여 10월~11월에 수확한다. 따라서 수확시기인 10월~11월의 일반적인 소비자가는 100g당 1,000원 가량이며 수확시기 외엔 100g당 2,000원 가량으로 비성수기가 성수기에 비해 약 2배 비싸다.

하수오는 흔히 우리나라 각지의 산야에 야생하고 내한성, 내충성, 내건성 등이 강해 전국 어디서나 재배가 가능하다. 일반적으로 3월~4월 파종하여 다음해 3월~4월에 수확하기 때문에 약 1년 이상 관리가 필요하다. 더불어 하수오는 3년근, 6년근처럼 오래 재배할수록 약효가 우수하다고 알려져 있어 오래 재배하기 때문에 관리에도 비용이 많이 소요된다. 하수오의 수확시기인 3월~4월의 일반적인 소비자가는 100g당 10,000원 가량이며 수확시기 외엔 100g당 20,000원 가량으로 결명자와 동일하게 수확시기별로 약 2배 차이가 나며 결명자에 비해서는 약 10배 비싸다.

성수기의 결명자 실제 구입가는 100g당 1,000원이었으며 온라인에서는 100g당 1,167원 가격으로 형성되어 있다. 이에 비해 성수기의 하수오 실제 구입가는 100g당 10,000원이며 온라인 판매가는 100g당 10,667원으로 하수오가 결명자에 비해 약 9.14~10배 비싸다. 더불어 하수오는 이엽우피소와 형태가 비슷하기 때문에 구분이 어려우며 실제 백수오로 둔갑한 수입산 이엽우피소 파동에 의해 하수오에 대한 소비자들의 선호도와 신뢰도는 현재까지도 매우 낮은 상태다. 이를 해결하기 위해서는 추가 분석을 통해 하수오가 이엽우피소가 아니라는 사실을 증명하여야 하며, 이는 원가 상승의 큰 원인이 된다. 추가로 위의 파동에 따른 하수오 재배농가의 감소로 인해 수급이 쉽지 않은 문제점도 존재한다. 따라서 위와 같은 3가지 원인인 ①결명자 대비 하수오의 낮은 유효성분 함량 및 장기능개선 효능 ②하수오의 약 10배 높은 단가 ③추가 분석에 따른 원가 상승 및 수급 어려움의 이유들로 인해 하수오를 혼합하지 않고 순수 결명자 100% 사용으로 최종 결정하였다.

5) 추출효율 평가 및 경제성 분석

Table II -5와 같이 50kg 결명자를 50%에탄올 추출하고 농축, 동결건조한 건조물의 무게는 4kg으로 수율은 8%이다. 그리고 결명자 50kg을 기준으로 추출물을 제작하기 위한 에탄올 구입비와 장비사용료의 합계는 2,250,000원이고 분쇄물과 볶음분쇄물의 장비사용료 합계는 각각 120,000원과 140,000원으로 에탄올추출물의 비용이 단순분쇄물에 비해 약 16배~18배나 비싸다. 추가로 결명자 50kg을 주정추출물로 만들기 위한 기간은 약 5일이지만 분쇄물은 1일만에 시료를 제작할 수 있는 큰 차이점이 있다. 더불어 결명자 50kg에 대한 추출물의 수율은 8%로 분쇄물의 수율인 91%나 볶음분쇄물의 90% 수율과 비교하여 약 11배 수율의 차이도 발생한다. 이를 비용에 적용하면 추출물은 분쇄물에 비해 약 182~211배 많은 비용이 필요하다. 이는 5배의 제작기간 차이를 제외하더라도 매우 높은 비용 차이가 발생함을 확인할 수 있다. 추가로 에탄올은 화기취급 위험물로 이를 사용하기 위해서는 취급에 주의해야하며 화재의 위험성도 있고 필수 회수에 따른 막대한 비용도 추가 되는 큰 문제점이 있다. 따라서 주정추출물이 아닌 결

명자 ①분쇄물이나 ②볶음분쇄물로 시료를 선정하였다.

Table II -5. Comparison of recovery ratio and production cost about the ethanol extract, cut and roast cut.

시료	주정추출물		분쇄물			
	① 주정추출물		② 분쇄물		③ 볶음분쇄물	
50kg 시료제작과정	3회 추출		30mesh 분쇄		30mesh 분쇄	
	농축				150℃, 5분 볶음	
	3일 동결건조		100mesh 분쇄		100mesh 분쇄	
비용(원)	EtOH구입비 450L	1,250,000	30mesh분쇄비 (2시간)	50,000	30mesh분쇄비 (2시간)	50,000
	추출비 (1일)	100,000			볶음비 (30분)	20,000
	농축비 (1일)	300,000	100mesh분쇄비 (4시간)	70,000	100mesh분쇄 비 (4시간)	70,000
	동결건조비 (3일)	600,000				
합계(원)	2,250,000		120,000		140,000	
회수 무게	4kg		45.5kg		45kg	
회수율	8%		91%		90%	

6) 결명자 수급을 위한 계약 농가 확보 - 2건

전남 해남군 소재지 농가 2곳과 결명자 재배 및 매매 계약서를 체결하였다.

결명자 재배 및 매매 계약서

결명자의 재배인(매도인) 박권근 (이하 "갑"이라 한다)와 매수인 해남자연 농업영농조합법인 (이하 "을"이라 한다)은 다음과 같이 합의하여 계약을 체결한다.

제1조(총칙)

갑은 결명자를 재배하여 을에게 매도하고 을은 이를 매수한다.

제2조(품목, 품종 및 재배 소재지)

- ① 품목 : 결명자
- ② 품종 : 일반

제3조(규격 및 단가)

- ① 규격 : 2017년산 결명자 상품
- ② 단가 : 200,000원/40Kg

제4조(대금지급)

을은 갑에게, 결명자 인수·인도시 결명자 매매금액 총액을 지급한다.

제5조(인수·인도)

인수 및 인도 시기는 2017년 10월부터 11월까지로 지정 한다.

제6조(권리 의무의 존속)

갑과 을은 계약서상의 권리와 의무를 상호 협의 없이 제3자에게 양도할 수 없다

본 계약을 증명하기 위하여 계약서 2부를 작성하여 계약당사자가 이의 없음을 확인 하고 날인한다.

2016년 10월 15일

(갑) 주 소
이 름
생 년 월 일

개인정보

(을) 주 소 : 전남 해남군 옥천면 농공단지길 37
 사업자번호 : 415-81-15612
 회 사 명 : 해남자연농업영농조합법인
 대 표 자 : 황 상 덕



결명자 재배 및 매매 계약서

결명자의 재배인(매도인) 유영애 (이하 "갑"이라 한다)와 매수인 해남자연농업영농조합법인 (이하 "을"이라 한다)은 다음과 같이 합의하여 계약을 체결한다.

제1조(총칙)

갑은 결명자를 재배하여 을에게 매도하고 을은 이를 매수한다.

제2조(품목, 품종 및 재배 소재지)

- ① 품목 : 결명자
- ② 품종 : 일반

제3조(규격 및 단가)

- ① 규격 : 2017년산 결명자 상품
- ② 단가 : 200,000원/40Kg

제4조(대금지급)

을은 갑에게, 결명자 인수·인도시 결명자 매매금액 총액을 지급한다.

제5조(인수·인도)

인수 및 인도 시기는 2017년 10월부터 11월까지로 지정 한다.

제6조(권리 의무의 존속)

갑과 을은 계약서상의 권리와 의무를 상호 협의 없이 제3자에게 양도할 수 없다

본 계약을 증명하기 위하여 계약서 2부를 작성하여 계약당사자가 이의 없음을 확인하고 날인한다.

2016년 10월 15일

(갑) 주 소
이 름
생 년 월 일

개인정보

(을) 주 소 : 전남 해남군 옥천면 농공단지길 37
사업자번호 : 415-81-15612
회 사 명 : 해남자연농업영농조합법인
대 표 자 : 황 상 역



II-2. 결명자 분쇄물의 최적 발효기술 개발

I. 재료 및 방법

1) 2중 결명자 시료 준비

(1) 분쇄(액체시료) - 100mesh

결명자 열매를 방앗간에서 1차 분쇄한 후, 30mesh로 일정하게 걸러 사용하였다. 다음으로 분쇄기(30~140mesh, 성장기계)를 이용하여 100mesh로 2차 분쇄하였다.

(2) 볶음분쇄(액체시료) - 100mesh

30mesh로 일정하게 거른 조분쇄를 150℃에서 5분간 볶았다. 다음으로 분쇄기(30~140mesh, 성장기계)를 이용하여 100mesh로 2차 분쇄하였다.

2) 발효조건 설정 - 수분함량 및 시료량, 발효균주 및 접종량, 생균 및 사균, glucose 첨가여부, 배양시간

(1) 수분함량 및 시료량, 발효균주 및 접종량

1차년도 결과를 참고하였으며 seed는 MRS 배지에서 37℃, 24시간동안 통성혐기적조건으로 150rpm 진탕배양 하였다.

(2) 균주 생존여부

3차 증류수 대비 3% 혼합된 분쇄결명자와 볶음분쇄결명자 시료를 121℃, 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후에 같은 조건으로 진탕배양한 K2균주를 3% 접종하여 48시간 배양하였다. 그리고 0시간, 24시간, 48시간마다 무균작업대에서 5ml씩 sampling하여 pH와 CFU/ml를 측정하였다. 48시간 배양이 완료된 배양액은 121℃, 15분간 고압멸균하여 사균한 시료와 고압멸균하지 않은 생균 시료 2종으로 제작하였다. 배양시간 48시간의 이유는 전년도 발효조건 설정 실험에서 24시간까지 균이 성장하고 48시간까지 정체하다 72시간에 사멸하기 시작했기 때문이며 배양시간이 늘어날수록 대형발효조 비용은 크게 늘어나기 때문에 원가절감을 위해 배양시간을 48시간으로 단축시켰다.

(3) 2% glucose 첨가

3차 증류수 대비 3% 혼합된 분쇄결명자와 볶음분쇄결명자 시료를 121℃, 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후에 미리 준비한 멸균된 glucose를 2% (v/v) 첨가하였다. 여기에 37℃, 24시간동안 통성혐기적조건으로 150rpm 진탕배양한 K2균주를 3% 접종하여 48시간 배양하였다. 그리고 0시간, 24시간, 48시간마다 무균작업대에서 5ml씩 sampling하여 pH와 CFU/ml를 측정하였다.

(4) 72시간 배양시간

앞선 (2)의 균주 생존여부에서 언급한 바와 같은 이유로 최적 배양시간을 유효성과 독성 등을 판단하여 시료를 선정한 후 진행하였다. 3차 증류수 대비 3% 시료를 121℃,

15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후에 37°C, 24시간동안 통성 혐기적 조건으로 150rpm 진탕배양한 K2균주를 3% 접종하여 72시간 배양하였다. 그리고 0시간, 24시간, 48시간, 72시간마다 무균작업대에서 5ml씩 sampling하여 pH와 CFU/ml를 측정하였고 120시간까지 추가 배양하여 이를 지표 및 유효성분 분석용 시료로 사용하였다.

3) 발효물의 발효 전·후 유효성분 함량비교

(1) 시험용액의 조제

본 실험은 결명자의 발효를 통해 변화되는 성분을 확인하고자 하였으며, 주관기관에서 제공받은 결명자시료를 검체로 사용하였다. 시료는 K2균주를 이용한 결명자이며, 0시간, 24시간, 48시간, 72시간씩 발효하였다. 각각의 시료는 약 200mg씩 정밀하게 칭량하였으며, 용량플라스크를 이용해 methanol 25ml상에서 60분간 초음파 추출하였다. 이후 추출한 용액을 상온에서 냉각 및 필터하여 함량분석을 진행하였다.

(2) 표준액 조제

결명자로부터 분리한 성분인 MJ905611-3(Aurantio obtusin 6-O-β-D-glucoside)과 MJ901617-1(Aurantio obtusin)을 정밀저울을 이용해 각각 2.00mg, 2.09mg을 정밀하게 칭량하였으며, volumetric flask 에 넣어 methanol 10ml 정용하여 각 용액을 합한 후 2배 희석하여 표준액 1을 제작하였다. (50ug/ml, 52.25ug/ml)

표준액 1을 4배 희석하여 표준액 2를 제작하였다. (12.25ug/ml, 13.06ug/ml)

표준액 2를 4배 희석하여 표준액 3을 제작하였다. (3.06ug/ml, 3.27ug/ml)

표준액 3을 4배 희석하여 표준액 4를 제작하였다. (0.19ug/ml, 0.20ug/ml)

(3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 기기는 Shimadzu analytical UFLC system (Kyoto, Japan) 으로 20AD XR binary pump를 통해 이동상을 조정하였으며, SIL-20A XR autosampler를 통해 1 μl 씩 검체를 주입하였다. 또한, 검출기는 DAD(diode array detector)를 사용하여 흡수 극대파장을 이용하여 280nm에서 측정하였다. 이동상으로는 0.1% Formic acid의 3차 증류수(A)와 acetonitrile(B)를 사용하였으며, BEH C18 1.7 μm (2.1 x 150mm) column을 고정상으로 하여 분석조건을 설정하였다. 결명자의 함량비교를 위한 분석조건은 다음과 같다.

Table II-6. HPLC analysis conditions.

- Flow rate: 0.21ml/min - Oven temp: 40°C
- Injection volume: 1 μL
- Column: BEH C18 1.7 μm (2.1 x 150mm)
- Detector: DAD(extraction wavelength: 280nm)
- Mobile phase:

Time	Mobile phase	
	A% (0.1% Formic acid in water)	B% (ACN)
0	85	15
20	75	25
32	40	60
40	40	60
41	85	15
50	85	15

4) 표준화 방법에 의한 연구용 조성물 제작

(1) 분석 및 유효성 평가를 위한 6종 시료 제작

위의 48시간동안 발효시킨 후 고압멸균한 분쇄결명자(분쇄A, autoclave)와 볶음분쇄결명자(볶음분쇄A) 2종, 48시간 발효시킨 후 고압멸균하지 않은 분쇄결명자(분쇄)와 볶음분쇄결명자(볶음분쇄) 2종, 2% glucose를 첨가하여 48시간 발효시킨 후 고압멸균한 분쇄결명자(분쇄AG, autoclave glucose)와 볶음분쇄결명자(볶음분쇄AG) 2종까지 총 6종의 시료를 제작하였으며 이는 Table II-7 같다. 추가로 이의 시료들은 Rat를 이용한 변비 개선 유효성 평가 시료로 사용되었다.

Table II-7. Fermentation condition of 6 samples.

시료명	볶음 여부	결명자 농도	접종 농도	2% glucose	배지	배양 시간	배양 온도	배양 속도	발효 후 멸균 여부
1. 분쇄A (사균)	부	3%	3%	미첨가	MRS	48 시간	37°C	150 rpm	멸균(사균)
2. 볶음분쇄A (사균)	볶음								멸균(사균)
3. 분쇄 (생균)	부								부(생균)
4. 볶음분쇄 (생균)	볶음								부(생균)
5. 분쇄AG (사균)	부			첨가					멸균(사균)
6. 볶음분쇄AG (사균)	볶음								멸균(사균)

(2) 프로토콜과 표준제조공정서 작성

분석 및 유효성평가 결과를 바탕으로 볶음분쇄결명자 발효분말(볶음결명자발효분말)에 대한 프로토콜과 자체 표준제조공정서를 제작하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 수분함량 및 시료량

전년도에 수행하였던 조분쇄(액체시료)의 경우, 30mesh로 일정하게 걸러진 조분쇄를 3차 증류수 대비 1, 3, 5, 10, 20, 30% 저울로 칭량하여 3차 증류수와 혼합하였고 이후, 고압멸균기를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하였다. 그 결과, 5%이상의 시료들에서는 결명자의 높은 수분흡수율에 따른 수분감소로 진탕배양이 불가능하였다. 또한, 결명자의 농도가 높을수록 균이 잘 성장하지 못함도 확인되었었다. 따라서 기존 결과를 바탕으로 분쇄한 결명자의 시료량은 3차 증류수대비 3% (v/v)로 설정하였다.

2) 발효균주 및 접종량

발효균주는 유효성 평가 실험에서 가장 좋은 결과를 얻었던 K2 균주로 선정하였다.

접종량은 전년도에 수행하였던 발효조건 설정-균접종량 1, 2, 3, 4, 5%에서 3% 이상부터 24시간 만에 생균수가 10⁹CFU/ml에 도달할 정도로 균 성장이 우수하였다. 따라서 시간 효율성을 고려하여 균 접종량을 3% (v/v)로 설정하였다.

3) 6종 시료에 대한 색상변화 및 pH, CFU/ml

Table II-7 의 6종 시료에 대한 색상은 Fig. II-7, 과 같이 시간이 지남에 따라 변화되어 발효가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 그리고 pH는 볶음 과정을 진행한 시료들을 제외하고 모두 시간이 지남에 따라 감소하였다. 그러나 볶은 시료는 모두 pH가 변하지 않은 특징이 있었다. 더불어 2% glucose를 첨가한 6.볶음분쇄AG 시료는 시간이 지남에 따라 pH가 꾸준히 감소함을 확인할 수 있었으며 glucose를 넣지 않은 시료에 비해 약 3.5배 더 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. II-8). 6종 시료의 CFU/ml는 24시간 까지 꾸준히 증가하다가 이후 정체를 이루었으며 볶지 않은 시료가 볶음시료에 비해 24시간까지는 비슷하지만 48시간에서 약 2배 높은 CFU/ml 값을 나타냈다. 또한, glucose를 첨가한 2종의 시료는 넣지 않은 시료에 비해 약 2~4배 높은 CFU/ml 값을 나타냈다(Fig. II-9).



Fig. II-7. Color change according to fermented time of 6 samples by the K2 strains.

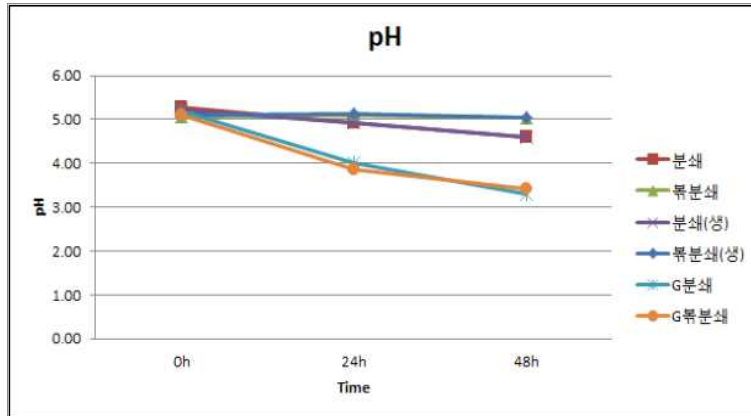


Fig. II-8. pH change according to fermented time of 6 samples by the K2 strains.

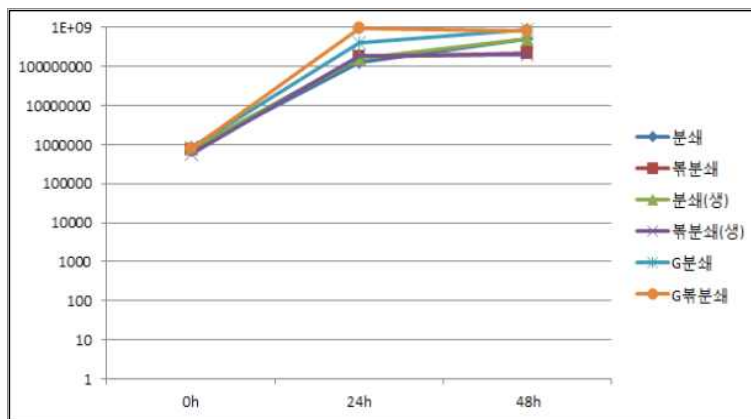


Fig. II-9 CFU/ml change according to fermented time of 6 samples by the K2 strains.

4) 배양시간

유효성과 독성에 따라 선정된 볶음분쇄결명자 시료의 최적 배양시간 확인을 위해 72 시간동안 배양하여 pH변화, CFU/ml를 측정하였다. 그 결과, pH는 72시간동안 변화가 없었으며 CFU/ml는 24시간까지 꾸준히 증가하다가 48시간동안 정체하고 72시간에 조금 감소하였다. 추가로 각 시료들의 유효성 평가 결과를 통해 최적 배양시간을 설정하였다. 더불어 볶음시료는 pH 변화가 없는 특이점이 계속해서 확인되었기에 원가절감 및 편의성을 위해 이후 실험에서 pH 측정을 제외하였다.

Table II-8. pH and CFU/ml change according to fermented time of the roast cut *Cassia tora* L. by the K2 strains.

볶음분쇄	0h	24h	48h	72h
pH	4.67±0.02	4.77±0.03	4.73±0.01	4.76±0.02
CFU/ml	4.53±0.25 x10 ⁵	2.34±0.29 x10 ⁸	2.48±0.13 x10 ⁸	1.89±0.17 x10 ⁸

5) 표준 MJ905611-3과 MJ901617-1의 LC Chromatogram

2종류의 표준품을 HPLC로 분석한 결과, MJ905611-3과 MJ901617-1의 순으로 용출되었다. 2종의 화합물의 peak가 겹치지 않고 약 35분 이내에 완전하게 분리가 완료됨으로써 분석법에 대한 시스템 적합성과 특이성이 입증되었다.

표준품을 4 point로 하여 회귀분석 한 결과 R2 값이 0.999 이상의 값을 가짐으로서 분석법에 대한 직선성이 확보되었다.

Table II-9. HPLC Retention time of Standards.

Name	Retention Time (min)
MJ905611-3	19.90
MJ901617-1	30.26

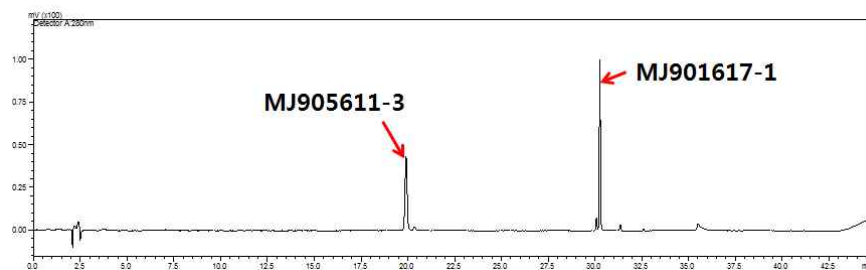


Fig. II-10. Chromatogram of MJ905611-3 and MJ901617-1.

Table II-10. HPLC analyses of Aurantio obtusin.

Standard	농도 (μ g/ml)	Area	Standard	농도 (μ g/ml)	Area
MJ905611-3	50	313589	MJ901617-1	52.25	421162
	12.25	81961		13.063	106326
	3.062	21508		3.266	27409
	0.766	5116		0.204	6789

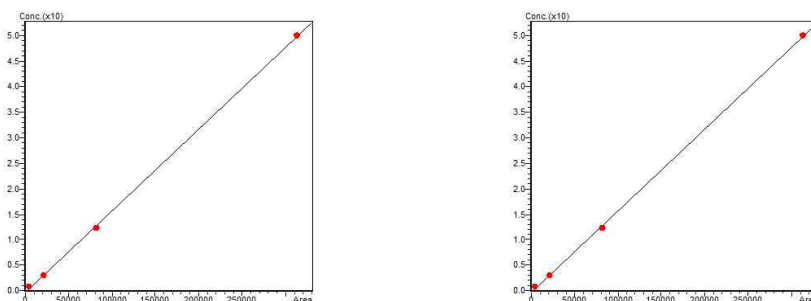


Fig. II-11. Calibration curve of MJ905611-3 and MJ901617-1.

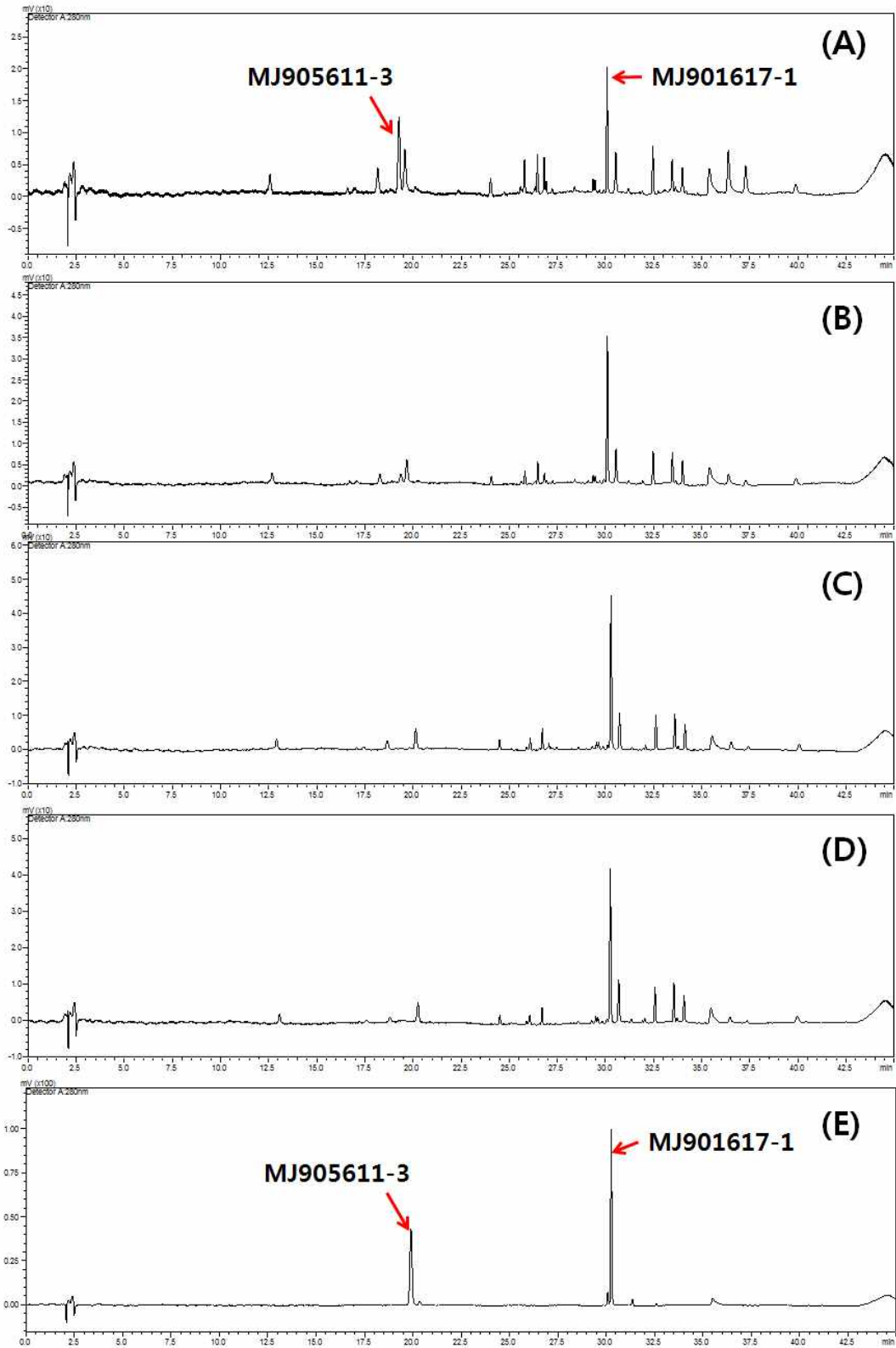


Fig. II-12. Chromatogram of sample. (A, K2-0 hr; B, K2-24 hr-1; C, K2-48 hr-1; D, K2-120 hr; E, Standard mixture)

Table II-11 Contents of MJ905611-3, MJ901617-1 in Sample (mg/g).

시료명		MJ905611-3		MJ901617-1
K2, 0 h	1	1.387	1	1.265
	2	1.468	2	1.252
	3	1.472	3	1.252
	평균	1.442	평균	1.256
K2, 24 h	1	0.137	1	2.271
	2	0.135	2	2.325
	3	0.138	3	2.269
	평균	0.136	평균	2.288
K2, 48 h	1	-	1	3.056
	2	-	2	2.735
	3	-	3	2.877
	평균	-	평균	2.889
K2, 120 h	1	-	1	2.949
	2	-	2	2.846
	3	-	3	2.702
	평균	-	평균	2.832

6) 발효결명자의 발효 전·후 성분변화

결명자의 발효 전·후 시료의 함량분석을 통해 K2 균주가 결명자에 함유되어있는 MJ905611-3과 MJ901617-1에 영향을 주는 것을 확인하였다. 결명자의 발효전 시료인 K2 0 h에서 MJ905611-3과 MJ901617-1의 함량이 각각 평균 1.442, 1.256mg/g으로 측정되었으며, 24시간 발효시료에서는 0.136, 2.288mg/g, 48시간 후에는 MJ905611-3은 검출되지 않았고, MJ901617-1만 2.889mg/g의 함량이 측정되었다. 또한, MJ905611-3의 함량이 평균 1.442mg/g에서 0mg/g만큼 감소하였으며, MJ901617-1의 경우 평균 1.256mg/g에서 2.832mg/g까지의 함량증가를 보여주었다. 따라서, K2 유산균이 배당체 화합물인 MJ905611-3의 기본골격과 당의 결합부위를 분해하여 aglycon 형태의 화합물인 MJ901617-1의 함량을 증가시키는 것을 확인하였으며, 이를 토대로 결명자의 장기능 개선 유효성분인 MJ901617-1을 품질관리를 위한 지표성분으로 사용하였다.

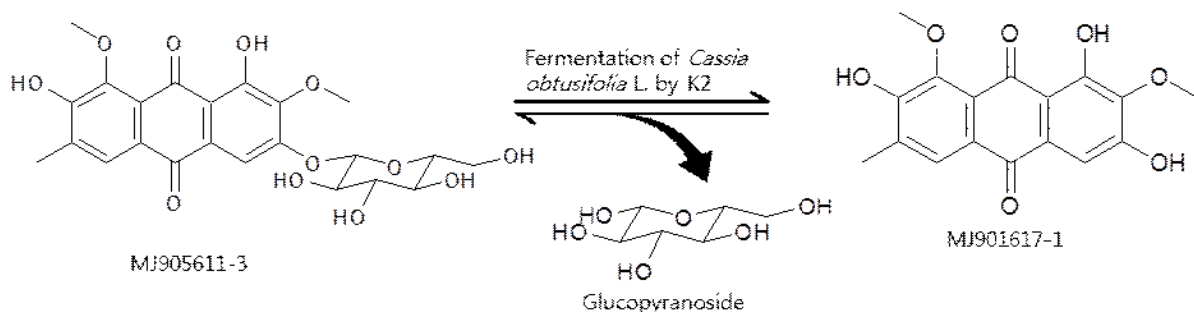


Fig. II-13. fermentation process of *Cassia tora* L. by K2.

7) 제조방법에 대한 프로토콜 - 볶음결명자유산균발효분말

볶음결명자유산균발효분말 제작 프로토콜

준비물 : 결명자, 삼각플라스크, 3차증류수, stopper, pipet, tip, MRS medium, 백금이, spreader, petridish, 70%에탄올

사용장비 : 분쇄기, 가열기, 고압멸균기, 배양기, 진탕배양기, pH미터기, 동결건조기, 무균작업대

실험순서

1. 실험 24시간 전 seed 배양
 - 1) Stock된 균주를 해동하여 MRS agar plate에 streaking하여 37°C, 24시간 incubation
 - 2) 121°C, 15분 고압멸균된 MRS broth를 준비
 - 3) 1)을 2)에 접종하고 37°C, 24시간 동안 150rpm 진탕배양
2. 발효
 - 4) 150°C, 5분간 볶고 100mesh로 분쇄된 결명자를 준비
 - 5) 삼각플라스크에 5)를 증류수 대비 3% 담음
 - 6) 121°C, 15분 고압멸균
 - 7) 충분히 식힌 후, 3)을 3% 접종
 - 8) 37°C, 24시간, 150rpm 진탕배양
 - 9) 121°C, 15분 고압멸균
 - 10) 3일 동결건조

※pH와 CFU/mL을 측정시, seed는 3)을 sampling하고, 발효물은 9)를 sampling.

pH 미터기 사용방법

- 3.0, 7.0, 10.0을 calibration한 후 측정

CFU/mL 측정방법

3차 증류수 대비 0.85% NaCl을 첨가하고 고압멸균 - Saline

- 1) saline과 sample을 측정 농도까지 희석
- 2) 30~300CFU/mL이 측정될 희석농도를 설정하여 3 plate에 100uL 반복 도말
- 3) incubation

CFU/mL 계산법

예) 3개의 10⁻⁶에서 colony가 각각 50, 52, 51 측정
 $(50+52+51)/3 \cdot 10(100uL) \cdot 10^6$

해남자연농업영농조합법인

8) 제조방법에 대한 표준 제조공정서 - 볶음결명자유산균발효분말

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		페 이 지	1 / 9

구 분	부 서 명	성 명	서 명	년 월 일
승 인	대표이사	개인정보		2016.10.5
검 토	부설연구소			2016.10.5
검 토	생산관리팀장			2016.10.5
작 성	부설연구소			2016년 10월 5일

해남자연농업 영농조합법인

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		페 이 지	3 / 9

목 차

순번	항목	페이지
1	적용범위	4
2	목적	4
3	용어의 정의	4
4	제품설명서	5
5	제조 공정도	7

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		페 이 지	5 / 9

4. 제품설명서

4.1 제품 설명서 작성

제품설명서에는 제품명, 제품유형 및 성상, 성분 배합비율 및 제조방법, 제조단위, 완제품의 규격, 보관·유통 상의 주의사항, 제품용도, 포장방법 및 재질, 표시사항, 기타 필요한 사항이 포함되어야 한다.

제품설명서의 각 사항에는 기본적으로 위생적인 요소만을 고려하여야 하나 품질적인 사항을 포함시켜야 하는 경우에는 위생적인 요소와 구분하여 기재한다. 제품설명서는 식품별로 작성함을 원칙으로 한다. 그러나 각 식품의 특성이 같거나 비슷하여 식품유형별로 작성하여도 무방하다고 판단되는 경우 식품을 묶거나 식품유형별로 작성한다.

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문서번호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개정번호	Rev. 0
		페이지	6 / 9

제 품 설 명 서			
1. 제품명	결명자 발효 분말		
2. 식품 유형 및 성상	-식품유형: 기타가공품 -성상: 결명자 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없음		
3. 품목제조보고연월일			
4. 성분배합비율	발효 결명자 100%		
6. 제조(포장)단위	100g, 200g, 500g, 1kg, 5kg		
7. 완제품의 규격	구분	법적규격	사내규격
	성상	고유의 색택을 가지고 이미 이취가 없어야 한다	고유의 색택을 가지고 이미 이취가 없어야 한다
	이물	적합하여야 한다.	적합하여야 한다.
	물리적 항목	-	금속성 이물 불검출 Fe:1.0 ϕ 이상, SUS 2.0 ϕ 이상
	생물학적 항목	대장균군: 음성	대장균군: 음성
	화학적 항목	타르색소: 검출되어서는 안 된다. 보존료: 검출되어서는 안 된다	타르색소: 검출되어서는 안 된다. 보존료: 검출되어서는 안 된다
8. 보관, 유통 상의 주의사항	직사광선을 피하고 상온에 보관		
9. 제품용도	- 제품용도: 식품 보조용		
10. 포장방법 및 재질	- 포장방법: 충전 후 실링 - 포장재질: 폴리에틸렌(PE)		
11. 표시사항	<ul style="list-style-type: none"> - 제품명: 결명자 발효분말 - 식품의 유형: 기타가공품 - 내용량: 100g, 200g, 500g, 100g, 200g, 500g, 1kg, 5kg - 원재료명 및 함량: 발효 결명자 100% - 포장재질: 폴리에틸렌(PE) - 보관방법: 직사광선을 피하고 상온에 보관 - 제조원: 해남자연농업영농조합법인 		

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		페 이 지	7 / 9

5. 제조 공정도

원·부원료의 입고에서부터 최종제품의 출고까지의 모든 단계를 파악하여 공정흐름 도면을 작성하여 제품이 어떤 환경 하에서 어떤 경로를 통해 만들어지는 과정의 자료를

5.1 제조공정도

5.1.1 제조공정도 작성방법

- 1) 원·부원료 및 포장재의 종류를 파악한다.
- 2) 원·부원료 및 포장재의 입고부터 출고까지의 전 공정을 조사하여 작업장에서 제조되는 방식과 동일하게 순서별로 세부적으로 작성한다.
- 3) 각 공정에 맞는 공정명을 표시하고 공정의 흐름을 알기 쉽도록 작성한다.
- 4) 해당공정을 아래의 양식에 맞게 작성한다.

5.2 각 공정별 주요 가공조건의 개요를 기재한다. 이때 구체적인 제조공정별 가공방법에 대하여 일목요연하게 표로 정리한다.

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		페 이 지	4 / 9

1. 적용범위

본 표준서는 해남자연농업영농조합법인(이하 “당사”라 한다)에서 개발한 결명자 유산균 발효물 제조공정에 대한 기준 및 관리활동에 관한 사항에 적용한다.

2. 목적

본 표준서는 당사에서 개발한 결명자 유산균 발효물에 대하여 제조공정에 대한 구체적인 관리 기준을 정함으로써 표준화된 제조를 위한 목적이 있다.

3. 용어의 정의

3.1 결명자(Cassia seed)

결명자는 콩과(Leguminosae)에 속하는 1년생 초본인 결명차(*Cassia tora* linne)의 잘 익은 씨로서, 전남(해남, 강진, 장흥) 지역 내에서 재배되는 결명자를 말한다.

3.2 유산균(Lactic acid bacteria)

당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 락트산을 생성하는 세균의 총칭으로, 본 제조공정에서는 결명자 발효에 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei* K2) 와 락토바실러스 케피리(*Lactobacillus kefir* MJ90) 유산균을 선택 사용한다.

3.2.1 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei* K2) : 결명자 발효용으로 사용되며, 성상은 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 미황색 분말 이다.

3.2.2 락토바실러스 케피리(*Lactobacillus kefir* MJ90) : 결명자 발효용으로 사용되며, 성상은 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 미황색 분말 이다.

3.3 발효(Fermentation)

유산균이 결명자에 함유된 당을 분해하는 과정을 말한다.

3.4 배양(Culture)

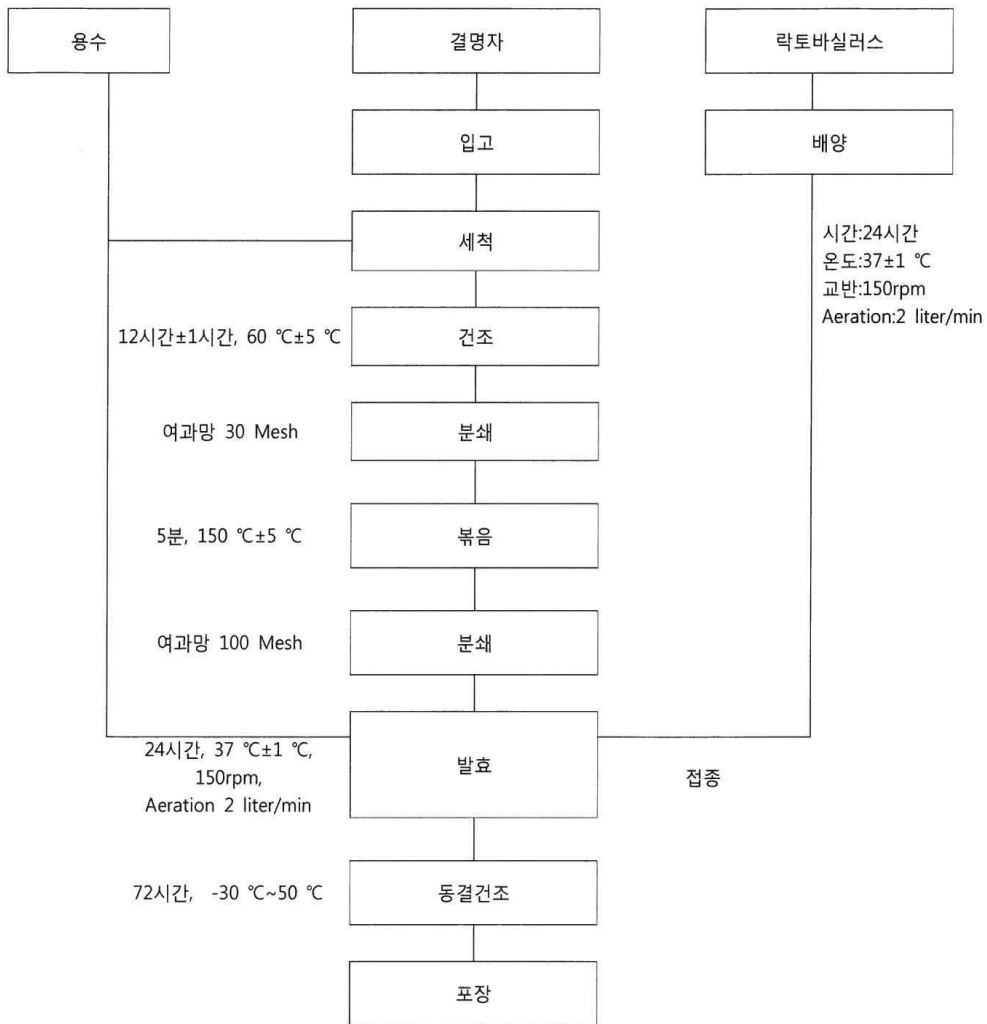
유산균을 배양기에서 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 말한다.

3.5 결명자 발효물(Fermented substance of cassia seed)

결명자가 유산균에 의해 발효된 산물을 말한다.

해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		페 이 지	8 / 9

(1) 결명자 발효물 제조 공정도



해남자연농업 영농조합법인	제조공정 표준서	문 서 번 호	HN-HA-10
		제·개정일자	2016.10.05
		개 정 번 호	Rev. 0
		폐 이 지	9 / 9

(2) 공정별 제조방법

순서	제조공정	사용기계기구	가공방법 및 조건	담당자	비 고
1	결명자 입고/검사	원료창고/육안	원료 입고 시 육안검사(선별)를 실시하고 보관창고에 보관한다.	물류관리담당	
2	세척	세척기	결명자에 묻은 흙을 씻어내고, 이물질을 제거한다. (세척시간 3회/3분~5분)	생산관리담당	
3	건조	건조기	세척된 결명자를 12시간±1시간, 60 ℃± 5 ℃로 건조한다.	생산관리담당	
4	분쇄	분쇄기	건조된 원료를 분쇄기(30Mesh)로 분쇄한다.	생산관리담당	
5	볶음	볶음기	5분, 150 ℃ ± 2 ℃로. 볶는다.	생산관리담당	
6	분쇄	분쇄기	볶은 원료를 분쇄기(100Mesh)로 분쇄한다.	생산관리담당	
7	배양	배양기	배양기에서 24시간, 37 ℃±1 ℃, 교반은 150rpm, Aeration 2liter/min으로 배양한다.	연구관리담당	
8	발효	발효기	발효기에 분쇄된 결명자 3%, 락토바실러스 배양액 3%, 용수 94% 비율로, 24시간, 37 ℃±1 ℃, 150rpm, Aeration 2liter/min으로 발효한다.	연구관리담당	
9	동결건조	동결건조기	동결건조기를 이용하여 발효물을 42시간, -35 ℃~50 ℃로 건조한다. (-30 ℃/6hr, -20 ℃/4hr, -10 ℃/4hr, 0 ℃/3hr, 10 ℃/3hr, 20 ℃/2hr, 30 ℃/2hr, 40 ℃/2hr, 50 ℃/46hr)	생산관리담당	
10	포장	포장기	포장기를 이용하여 설정된 중량에 적합하게 포장한다.	생산관리담당	

II-3. 장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립

1) 10L Jar fermentor

설정된 조건(3% 시료, 3% seed 접종, 37°C, 24시간, 150rpm 진탕배양)을 바탕으로 10L Jar fermentor를 이용하여 scale up에 따른 변화를 확인하였다. 발효여부는 CFU/ml을 통해 확인하였고 최적 통성혐기적조건을 위해 분당 산소투여량을 변경하여 최적 aeration을 측정하였다. 그리고 선정된 aeration으로 발효시킨 시료의 성분변화를 확인하였다.

2) 300L 발효조

설정된 조건을 바탕으로 300L 발효조를 이용하여 CFU/ml과 성분변화를 확인하고 이의 발효물은 표준화를 위한 시험법 벨리데이션 설정용 시료와 시제품 제작 시료로 사용하였다.

I. 재료 및 방법

1) 10L Jar fermentor

10L Jar fermentor에 60% 용량인 6L를 배양하였다. 3차 증류수 대비 3%(180g) 혼합된 볶음결명자 시료를 Jar fermentor에 넣어 121°C, 15분간 고압멸균하고 충분히 식힌 후 37°C, 24시간동안 통성혐기적조건으로 150rpm 진탕배양한 K2균주를 화염멸균 조건에서 3% (180ml) 접종하였다. 그리고 Jar fermentor의 통성혐기적 배양을 위한 aeration 조건을 위해 0L/min, 1L/min, 2L/min, 3L/min, 4L/min으로 aeration을 설정하여 24시간 배양하였다. 배양 24시간 후, 무균작업대에서 일정량 sampling하여 CFU/ml을 측정하였고 121°C 15분간 고압멸균하여 균주를 사멸하였다. 측정은 각 0~4L/min ÷ 0L/min 공식을 이용하였다.

2) 300L 발효조

300L 발효조에 60% 용량인 180L를 배양하였다. 3차 증류수 대비 3%(5.4kg) 볶음결명자를 넣고 121°C, 15분간 고압멸균 하였다. 균주 접종을 위해 37°C 까지 충분히 식힌 후, MRS 배지에서 37°C, 24시간, 150rpm, 통성혐기적조건으로 배양한 K2균주를 화염멸균(무균) 조건에서 3%(5.4L) 접종하였다. 그리고 37°C, 24시간동안 2L/min aeration 조건으로 배양하였다. 24시간 발효 후, 일정량 sampling하여 오염여부 확인 및 CFU/ml을 측정하였고, 121°C 15분간 고압멸균하여 균주를 사멸하고 회수하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 10L Jar fermentor aeration별 CFU/ml

모든 aeration 조건에서 24시간 동안 발효시킨 후의 색상변화는 Fig. II-14 과 같이 모두 점차 연한 갈색으로 변함을 확인할 수 있었다. 이에 따른 CFU/ml 측정값과 CFU/ml값을 0L/min에 대한 상대활성으로 나타낸 값은 Table II-12 과 같다. 2L/min의

aeration 조건에서 균 성장이 가장 이루어짐을 확인할 수 있었다. 따라서 aeration을 2L/min으로 설정하였다.

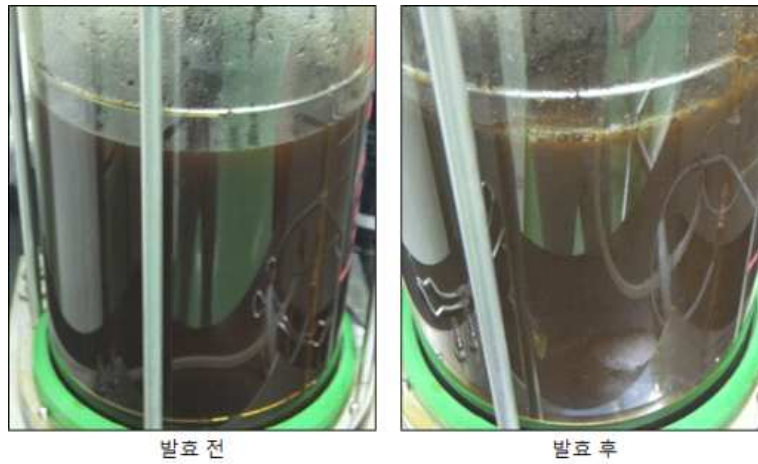


Fig. II-14. Color change according to fermented time of the roast cut *Cassia tora* L. by the K2 strains in the 10 L Jar fermentor.

Table II-12. CFU/ml change according to fermented aeration condition and relative activity.

10L 24h	0L/min	1L/min	2L/min	3L/min	4L/min
CFU/ml	$1.46 \pm 0.16 \times 10^8$	$2.22 \pm 0.19 \times 10^8$	$2.82 \pm 0.14 \times 10^8$	$2.51 \pm 0.22 \times 10^8$	$1.72 \pm 0.20 \times 10^8$
상대활성	1.00	1.308	1.553	1.427	1.106

2) 300L 발효조 CFU/ml

24시간 배양 후의 CFU/ml 측정값은 각각 2.65×10^8 , 2.66×10^8 , 2.67×10^8 으로 평균 $2.66 \pm 0.01 \times 10^8$ 이었다. 이는 Jar fermentor에 비해 94.3%로 발효가 이루어졌음을 확인할 수 있었으며 오염은 되지 않았다.

II-4. 장기능개선 발효물의 식품 제형 설정

I. 재료 및 방법

1) 제형 설정

정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말과 같은 기존 6개 제형과 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바와 같은 확대 6개 제형, 총 12개 제형에 대한 최적 제형을 설정하였다.

2) 부형원료 설정

시중에 유통되고 있는 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 원료, 개별인정형 원료들과 과립, 환 제형의 건강기능식품 전성분에서 부형원료들을 참고하여 자주 사용되는 부형원료들을 탐색하였다. 이를 참고하여 ①배변활동 원활의 효능을 극대화시킬 수 있고 ②부작용이 거의 없으면서 ③소비자들이 거부하지 않는 원료들을 탐색하여 최적 부형원료를 선정하였다.

3) 혼합비 설정

다음과 같은 4가지 중요사항을 바탕으로 부형원료들을 탐색, 혼합하였다.

중요사항 ① ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 기능성 원료의 우선 순위 및 높은 함량

중요사항 ② 주원료 결명자발효분말의 전성분 상 높은 순서

중요사항 ③ 가급적 적은 당류 함량 - 전성분 상 낮은 순서

중요사항 ④ 배합 후 과립성형이 가능한 보슬보슬한 상태

이 중, 결명자의 하루 섭취량은 인간 투여용량 설정 방법을 토대로 산정하였다. 먼저 농도는 동물실험 변비개선 효능 유효성 평가에서 rat에게 효능이 높게 나타났던 300mg/kg으로 설정하였으며 Human Equivalent Dose (HED) 상수와 Safety factor (외삽변수나 예측지 못한 독성등을 미연에 방지하고자 하는 factor) 값을 산정하여 최종 투여 용량을 설정하였다.

4) 관능평가용 시료 제작 및 중국 현지 소비자 관능평가

부형원료들의 혼합을 통한 관능평가용 분말 시료(3g/EA)를 제작하고 자체 평가를 통해 혼합비를 선정하였다.

선정된 혼합비로 만든 시료로 중국 현지 소비자를 통한 관능평가를 진행하여 최종 혼합비를 확정하였다. 이를 위한 관능평가 실시방법은 다음과 같다.

(1) 관능평가 준비

- 온도, 습도 및 조명이 동일한 공간에서 실시

- 유리나 사기 등과 같이 맛, 냄새를 흡수하지 않는 동일한 용기 및 식도구를 사용
- 시료의 양 동일
- 동반식품은 사용하지 않았으며 물만 제공

(2) 패널의 선별

- 패널의 선별에는 삼점검사법, 무경험패널, 유경험패널이 있다.
- 본 관능검사에서는 번비로 고생하는 일반소비자 중에 후보를 무작위로 선별하는 무경험패널을 이용하였다.
- 단, 연령별 평가자료를 얻기 위해 20대 이하, 30대, 40대, 50대, 60대 이상의 연령에서 각 10명씩 총 50명을 대상으로 행하였다.

(3) 관능평가 방법

- 정확한 검사를 위해 2시간의 공복상태를 유지하도록 하였다.
- 관능평가의 실시 전 입안을 물로 헹군 후 수행하도록 하였다.
- 5점 척도법을 이용하여 항목의 평가가 우수할수록 높은 점수를 주도록 하였다 (아주 좋다: 5점 ~ 아주 싫다: 1점).
- 평가 결과는 각 연령별로 나누어 평가결과의 평균 점수로 나타내었으며, Table 및 Figure 로 도식화 하였다.

(4) 관능평가 설문조사표

관능평가 설문조사

성별: 남 여

날짜: 년 월 일

연령: 20대 이하 , 30대 , 40대 , 50대 , 60대 이상

'결명자 발효' 시제품에 대해 시식 후, 다음 다섯 가지 항목에 대하여 평가해주세요. (√)

평가항목		척도	
1.	가장 맛이 좋은 시제품은 무엇인가요?	아주 좋다(5).	
		좋다(4).	
		보통이다(3).	
		싫다(2).	
		아주 싫다(1).	
2.	가장 향이 좋은 시제품은 무엇인가요?	아주 좋다(5).	
		좋다(4).	
		보통이다(3).	
		싫다(2).	
		아주 싫다(1).	
3.	가장 조직감이 좋은 시제품은 무엇인가요?	아주 좋다(5).	
		좋다(4).	
		보통이다(3).	
		싫다(2).	
		아주 싫다(1).	
4.	시제품의 변비개선효과는 어떠한가요?	아주 좋다(5).	
		좋다(4).	
		보통이다(3).	
		싫다(2).	
		아주 싫다(1).	
5.	시제품의 전체적인 기호도는 어떠한가요?	아주 좋다(5).	
		좋다(4).	
		보통이다(3).	
		싫다(2).	
		아주 싫다(1).	
6.	제품이 출시되면 구매의향이 있나요?	있다.	
		없다.	
7.	기타 의견 및 소감을 서술해 주세요.		

(5) 중국 현지 시제품 관능평가 설문조사 요청 공문



TRANSFER: QINGDAO HAN KING TRADING CO.,LTD

RECEIVER: HAENAM NATURAL FARMING ASSOCIATION CORPORATION

DATE: 06TH OCT, 2016

SUBJECT: Result of sensory evaluation for cassia fermentation powder

We performed a test for your cassia fermentation powder to our consumers.
As a result, It was very pleased with the taste and fragrance and effect of constipation.

All things cosidered, the results came out satisfied for cassia fermentation powder and
we hope to make a shape of product with granule and pill.

Thank you for your new product.

QINGDAO HAN KING TRADING CO.,LTD



(6) 시제품 관능평가 설문조사표 - 중문

性能评价调查问卷

性别: 男 女

日期: 年 月 日

年龄: 20岁以下 , 30岁 , 40岁 , 50岁 , 60岁以上

试服“决明子发酵”产品后, 请评价以下5项. (√)

评价项目		尺度	
1.	新产品的味道怎么样?	非常好(5).	
		好(4).	
		一般(3).	
		差(2).	
		非常差(1).	
2.	新产品的香味怎么样?	非常好(5).	
		好(4).	
		一般(3).	
		差(2).	
		非常差(1).	
3.	新产品的口感怎么样?	非常好(5).	
		好(4).	
		一般(3).	
		差(2).	
		非常差(1).	
4.	新产品的便秘改善效果怎么样?	非常好(5).	
		好(4).	
		一般(3).	
		差(2).	
		非常差(1).	
5.	新产品的整体喜好度怎么样?	非常好(5).	
		好(4).	
		一般(3).	
		差(2).	
		非常差(1).	
6.	新产品上市后有没有购买意向?	有	
		没有	
7.	如有其他意见和感想请记录		

II. 결과 및 고찰

1) 제형 설정

정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말과 같은 기존 6개 제형과 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바와 같은 확대 6개 제형 중, 정제와 캡슐은 건강기능식품용으로 사용되는 제형으로 일반식품인 본 제품의 특성으로 인해 제외하였다. 그리고 액상은 물에 녹지 않는 섬유소의 특성상 제외하였다. 더불어 확대 6개 제형은 비교적 낮은 연령대를 위한 식감과 맛을 위한 제형으로 본 과제의 결과물인 변비개선 및 치료용 제품과는 차별화되기 때문에 제외하였다. 따라서 환과 과립, 분말 제형 중 소비자가 섭취하기 용이한 과립과 제작과정이 간편해 빠르게 제작할 수 있으며 원가 절감이 용이한 분말 제형으로

설정하였다. 이들의 섭취량은 3g 스틱포장으로 휴대는 간편하고 섭취는 용이한 포장과 무게로 선정하였다.

2) 부형원료 설정

(1) 배변활동원활에 도움을 주는 기능성 원료

‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’의 고시형과 개별인정형 원료들 중 결정셀룰로오스, 난소화성말토덱스트린(원재료 옥수수전분), 치커리/이눌린추출물분말, 차전자피분말, 유산균혼합분말, 녹차추출물분말, 알로에전잎(알로에아보레센스분말)과 같은 분말형과 글루코만난, 자일로올리고당, 대두올리고당, 구아검가수분해물, 갈락토올리고당, 라피노스, 락추로스파우더, 이소말토올리고당과 같은 당류, 맛과 향 증진을 위한 볶음이나 증진류 중 ①비교적 가격이 저렴하며 ②부작용이 거의 없고 ③소비자가 비선호하지 않은 원료들을 탐색하였다.

Table II-13. List of functional ingredients for health functional foods about the gut health.

번호	원료명	인정번호	인정등급 (생리활성기능)	기능(지표) 성분	일일 섭취량	섭취 시 주의사항
1. 장내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움						
1	갈락토올리고당	제2011-29호	3등급	갈락토올리고당	갈락토올리고당으로서 2.1~8.4g	-
2	구아검가수분해물	제2009-10호	2등급	식이섬유	구아검가수분해물로서 7~21g	-
3	대두올리고당	제2005-20호	2등급	stachyose, raffinose	Stachyose+ raffinose합으로서 2~3g	과량으로 섭취 시에는 설사를 유발할 수 있으므로 주의
4	라피노스	제2006-15호 제2010-19호	2등급	라피노스 (Raffinose)	라피노스로서 3~5g	제안된 섭취량보다 많은 양을 섭취할 때에는 설사를 유발할 수 있으므로 주의
5	락추로스파우더	제2009-40호	2등급	락추로스 (Lactulose)	락추로스파우더로서 650~3000mg	과량 섭취 시 위장관계 계통의 이상반응 및 전해질 이상 등이 나타날 수 있으므로 주의
6	밀전분유래 난소화성말토덱스트린	제2011-6호	2등급	식이섬유	밀전분유래난소화성말토덱스트린으로서 8~20g	과량 섭취 시 설사, 복부팽만 등을 유발할 수 있으므로 주의

7	이소말토 올리고당	제2005-10호 제2005-11호 제2006-2호	2등급	이소말토올리고당	이소말토올리고당으로서 8~12g	과량으로 섭취 시에는 설사를 유발할 수 있으므로 주의
8	자일로 올리고당	제2009-80호 제2009-81호	2등급	자일로올리고당	자일로올리고당으로서 0.7~7.5g	과량으로 섭취 시에는 설사를 유발할 수 있으므로 주의
9	커피만노 올리고당분말	제2009-15호	2등급	만노올리고당의 합	만노올리고당으로서 1.0g	①어린이, 임산부, 수유기 여성은 섭취에 주의 ②과량 섭취 시 복부팽만감을 느낄 수 있으므로 주의
10	프락토 올리고당	제2008-75호	2등급	프락토올리고당(GF2)+ 니스토즈(GF3)+프락토 퓨라노실니스토즈(GF4)	프락토올리고당으로서 3~8g	-
11	프로바이오틱스	제2009-28호	2등급	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	프로바이오틱스로서 $10^8\sim 3 \times 10^{12}$ CFU	-

2. 면역력을 조절하여 장 건강에 도움

1	프로바이오틱스	제2009-28호	2등급	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	프로바이오틱스로서 $10^8\sim 3 \times 10^{12}$ CFU	-
---	---------	-----------	-----	--	---	---

3. 배변활동 원활에 도움

1	대두올리고당	제2005-20호	2등급	stachyose, raffinose	Stachyose+ raffinose합으로 서 2~3g	과량으로 섭취 시에는 설사를 유발할 수 있으 므로 주의
2	라피노스	제2006-15호 제2010-19호	2등급	라피노스 (Raffinose)	라피노스로서 3~5g	제안된 섭취량보 다 많은 양을 섭 취할 때에는 설 사를 유발할 수 있으므로 주의
3	목이버섯	제2005-2호	2등급	식이섬유	① 목이버섯으로 서 4g/회 ② 식 이 섬유 1.8g/회 이상	① 충분한 물과 함께 섭취 ② 권장된 섭취 량 이상으로 과 량 섭취해도 기 능을 더 증가시 키지는 않음
4	분말한천	제2007-8호	2등급	총 식이섬유	분말한천으로서 2~5g	① 어린이나 임 산부, 수유부는 섭취를 주의 ② 충분한 물과 함께 섭취 ③ 과다 섭취 시 미약한 설사, 구 토, 배변량 증 가, 배변빈도 증 가, 복부팽만, 두통 등의 부작용 을 일으킬 수 있으므로 주의
5	이소말토 올리고당	제2005-10호 제2005-11호 제2006-2호	2등급	이소말토올리고당	이소말토올리고 당으로서 8~12g	과량으로 섭취 시에는 설사를 유발할 수 있으 므로 주의
6	자일로 올리고당	제2009-80호 제2009-81호	2등급	자일로올리고당	자일로올리고당 으로서 0.7~7.5g	과량으로 섭취 시에는 설사를 유발할 수 있으 므로 주의
7	커피만노 올리고당분말	제2009-15호	2등급	만노올리고당의 합	만노올리고당으 로서 1.0g	① 어린이, 임신부, 수유기 여성은 섭 취에 주의 ② 과량 섭취 시 복부팽만감을 느 낄 수 있으므로 주의

8	프락토올리고당	제2008-75호	2등급	프락토올리고당(GF2)+ 니스토즈(GF3)+프락토 퓨라노실니스토즈(GF4)	프락토올리고당 으로서 3~8g	-
9	프로바이오틱스	제2009-28호	2등급	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	프로바이오틱스 로서 10 ⁸ -3x10 ¹² CFU	-

※기타 기능성 원료 특징 및 주의사항

- **결정셀룰로오스** - 알약과 캡슐의 형태로 사용되는 첨가제, 고결방지제, 안정제, 유화제, 식이섬유제로 각질제거제로도 사용되어 일부 소비자 비선호
- **자일로올리고당** - 과량으로 섭취 시 설사를 유발할 수도 있음
- **치커리추출물분말** - 배변활동 원활, 콜레스테롤 개선, 식후혈당상승억제 기능성 원료
- **차전자피분말** - 배변활동 원활, 콜레스테롤 개선 기능성 원료
- **녹차추출물분말** - 체지방 감소에 도움을 줄 수 있지만 쥐의 간세포 실험에서 세포독성 위험 발견됨
- **다시마분말** - 갑상선 기능 이상, 다시마의 요오드는 결핵 조직을 녹여 결핵균을 흡여지게 만들기 때문에 결핵환자는 피해야 함
- **이산화규소(실리카)** - 식품 건조제, 정제용 흡착제로 소비자 비선호
- **스테아린산마그네슘, 산화마그네슘분말, 비타민혼합제제** - 비교적 고가이며 소비자마다 마그네슘제와 비타민제를 별도로 추가 복용하는 사람이 많기 때문에 과다복용이 되지 않게 제외함. 이 중, 스테아린산마그네슘은 알약 형태 만들 때 입자들이 눌러 붙는 것을 방지하기 위한 윤활제로 사용되며 독성을 유발시킨다는 보고가 있어 소비자들이 비선호
- **유산균혼합분말** - 고가이며 완제품 QC 중, 유산균 증식에 따른 혼란 초래 가능

배합의 편의성을 위하여 부형원료 종류는 최소화하고자 하였으나 주원료인 묽음결명자유산균발효분말의 전성분 상에서의 높은 위치 대비 낮은 함량(9.67%, 290mg/3g)으로 인해 부형원료를 6~8종 첨가하고자 하였다. 그리고 주원료를 제외한 부형원료는 변비

개선 효능을 더욱 증가시키기 위한 효능 증진용 원료 3~4종과 맛을 위한 당류 1~2종에 맛과 향 증진을 위한 원료 1종을 추가로 선정하고자 하였다.

효능 증진용 원료 3~4종 중, 배변활동원활, 식후혈당상승억제, 혈중 중성지방 개선 기능성 원료인 난소화성말토덱스트린과 최근 각광받고 있는 식이섬유가 풍부한 치커리추출물분말, 차전자피분말을 효능 증진용 원료로 선정하였다.

당류는 부작용이 없으며 ‘장내유익균 증식 및 유해균 억제에 도움’ 과 ‘배변활동원활에 도움’ 2중 기능성 원료인 프락토올리고당과 위 점막을 보호하며 칼슘 흡수를 증가시키고 장내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움을 주는 혼합유당의 첨가로 맛과 기능성 모두 해결하였다.

(2) 맛과 향 증진을 위한 볶음이나 증진류 원료

- 볶음쌀분말 - 미숫가루와 같은 향과 맛을 나타내며 비교적 저렴한 특징이 있음
- 볶음미강분말 - 볶음쌀분말에 비해 비교적 저렴하나 향과 맛이 약함
- 딸기향에센스 - 특정향에 대한 소비자 호불호 큼
- 기타향에센스 - 소비자 비선호
- 기타감미료 - 소비자 비선호

위와 같이 쉽게 접하면서 거부감이 없는 미숫가루같은 고소한 향과 맛이 나고, 비교적 저렴한 볶음쌀분말로 선택하였다.

(3) 최종 선정된 원료

- 볶음결명자유산균발효분말
- 난소화성말토덱스트린
- 차전자피분말
- 치커리추출물분말
- 볶음쌀분말
- 프락토올리고당
- 혼합유당

3) 혼합비 설정

설정된 부형원료 중, 볶음결명자유산균발효분말의 하루섭취량은 291.84mg으로, 이는 다음과 같은 공식을 이용하여 산정되었다.

- Human Equivalent Dose (HED) 상수 = 체표면적에 다른 동물 간의 변환 상수
Human : Rat : Mouse = 37 : 6 : 1
Human 동일 투여 용량 : $300/37 \times 6 = 48.64\text{mg/kg}$
- Safety factor은 보통 10으로 설정함
따라서 $48.64\text{mg/kg} \div 10 = 4.864\text{mg/kg}$
- 섭취하는 사람의 무게를 60 kg으로 설정 : $4.864\text{mg/kg} \times 60\text{kg} = 291.84 \text{ mg/day}$

위의 결명자의 농도를 고정시킨 상태에서 다른 6개의 부형원료를 다음 4가지 중요사항을 참고하여 혼합하고 자체 평가를 실시하여 선별하였으며 중국 소비자 상대 관능평가를 통해 최종 확정하였다.

- 중요사항 ① ‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’ 기능성 원료의 우선 순위 및 높은 함량
- 중요사항 ② 주원료 결명자발효분말의 전성분 상 높은 순서
- 중요사항 ③ 가급적 적은 당류 함량 - 전성분 상 낮은 순서
- 중요사항 ④ 배합 후 과립성형이 가능한 보슬보슬한 상태

중요사항 ①을 위해 볶음결명자유산균발효분말과 난소화성말토덱스트린, 차전자피분말, 치커리추출물분말을 전성분 상에서 상위에 놓고 중요사항 ③을 위해 프락토올리고당과 혼합유당을 하위에 배치하였다. 이 중, 중요사항 ②를 위해 결명자와 같이 천연생약성분 유래 원료인 차전자피분말과 치커리추출물분말은 결명자보다 하위에 배치하고 볶음쌀분말을 이들과 당 사이에 배치하였다. 프락토올리고당과 혼합유당은 프락토올리고당의 낮은 단가로 인해 프락토올리고당의 함량을 더 높게 설정하였다. 이를 통한 전성분 순서와 함량은 Table II-14와 같다.

Table II-14. Full ingredient and mixture ratio of the prototype.

번호	원료명	3g당 함량 (g)	전체 대비 함량 (%)	kg당 단가(원)	비고
1	난소화성말토덱스트린	1.65	55.00	11,500	화이바줄, 대상
2	볶음결명자유산균발효분말	0.29	9.67	-	-
3	차전자피분말	0.25	8.33	11,500	인도산, 대한제당
4	치커리추출물분말	0.25	8.33	11,000	벨기에, WHANEE
5	볶음쌀분말	0.25	8.33	3,750	맑은들(주)
6	프락토올리고당	0.21	7.00	2,500	액상, 삼양
7	혼합유당	0.1	3.34	5,600	유당95, 성풍양행

4) 관능평가

혼합분말 시제품에 대한 5점 척도 관능평가 결과는 Table II-15과 같다. 평가 지표인 맛, 향, 조직감, 변비개선효과 중에서 맛은 약간 쓴맛이 느껴진다는 사람이 있었지만 평균 3.9점으로 대체적으로 좋은 평가를 받았고, 향은 평균 4.52로 좋다와 매우 좋다는 중간으로 매우 좋은 평가를 받았다. 또한, 조직감은 평균 4.22로 좋음 이상의 평가를 받았으며 가장 중요한 변비개선 효과는 3.96으로 좋다와 근접한 평가를 받았다. 더불어 전체적인 기호도는 평균 4.12로 좋음 이상의 평가를 받았다. 추가로 본 제품 개발 시 구매의향이 있느냐는 질문에는 총 50명 중, 39명이 구매의향이 있다고 답했다. 본 결과로 보아, 전 연령층에서 고르게 높은 점수를 얻었기에 본 시료의 배합비와 원료로 최종 선정하였으며 높은 관능평가 결과에 따라 완제품에 대한 기대감을 높일 수 있었다.

Table II-15. Sensory evaluation of ‘The sample of roasted *Cassia tora* L. seeds fermented by Lactobacillus’ by different ages.

평가항목 연령	맛	향	조직감	변비효과	전체적 기호도	구매의향
20대 이하	3.5	4.3	3.8	3.3	3.7	7명 있다
30대	3.8	4.5	4.4	4.2	4.2	8명 있다
40대	3.9	4.4	4.2	4.0	4.4	9명 있다
50대	4.1	4.6	4.3	3.8	4.0	7명 있다
60대 이상	4.2	4.8	4.4	4.0	4.3	8명 있다
평균	3.9	4.52	4.22	3.96	4.12	39/50

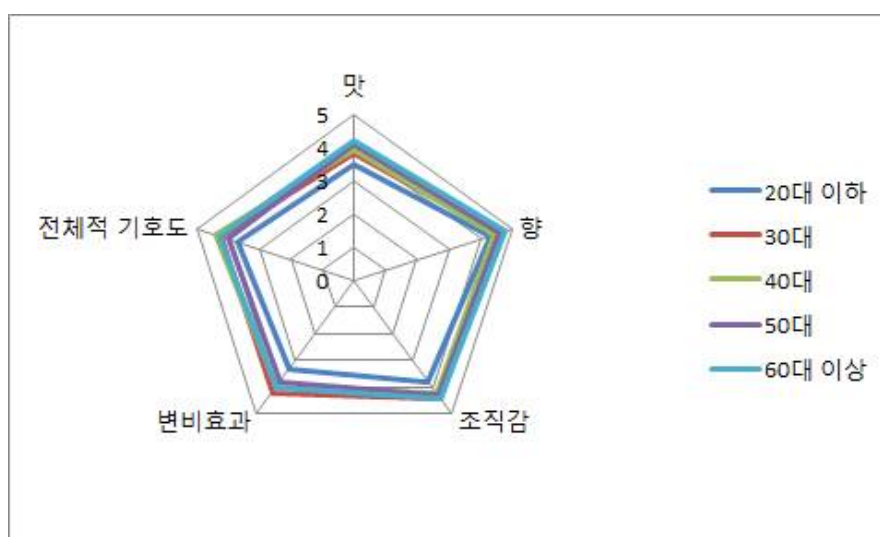


Fig. II-15. Average preference of ‘The sample of roasted *Cassia tora* L. seeds fermented by Lactobacillus’ by different ages.

II - 5. 장기능개선 발효물의 유효성 평가

I. 재료 및 방법

1) 시료

시료추출물은 해남자연농업영농조합법인에서 인수받아 이를 실온에서 방냉하고 여과한 다음 시료를 동결건조기 (LYOPH-PRIDE 20R, ILSIN, Korea)를 이용하여 -70℃에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 실험에 이용하였다.

2) 실험동물 사육 및 실험식이

(1) 1차 실험

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (NOR), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 저농도 결명자 투여군 (A-100, 100mg/kg), 중농도 결명자 투여군 (A-200, 200mg/kg), 고농도 결명자 투여군 (A-300, 300mg/kg), 저농도 결명자 Methylene Chloride 분획물 투여군 (MC-100, 100mg/kg), 중농도 결명자 Methylene Chloride 분획물 투여군 (MC-200, 200mg/kg), 고농도 결명자 Methylene Chloride 분획물 투여군 (MC-300, 300mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여를 하였다.

(2) 2차 실험

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (CON), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 저농도 결명자 투여군 (A-100, 100mg/kg), 중농도 결명자 투여군 (A-200, 200mg/kg), 고농도 결명자 투여군 (A-300, 300mg/kg), 저농도 분쇄 결명자 투여군 (SG-100, 100mg/kg), 중농도 분쇄 결명자 (SG-200mg/kg), 고농도 분쇄 결명자 (SG-300, 300mg/kg)로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여를 하였다.

(3) 3차 실험

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (Con), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 저농도 분

쇠 결명자 투여군 (분쇄 결명 100, 100mg/kg), 중농도 분쇄 결명자 투여군 (분쇄 결명 200, 200mg/kg), 고농도 분쇄 결명자 투여군 (분쇄 결명 300, 300mg/kg), 저농도 볶은 분쇄 결명자 투여군 (볶은 분쇄 결명 100, 100mg/kg), 중농도 볶은 분쇄 결명자 투여군 (볶은 분쇄 결명 200mg/kg), 고농도 볶은 분쇄 결명자 투여군 (볶은 분쇄 결명 300, 300mg/kg), 저농도 멸균 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 A 100, 100mg/kg), 중농도 멸균 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 A 200, 200mg/kg), 고농도 멸균 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 A 300, 300mg/kg), 저농도 멸균 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 A, 100mg/kg), 중농도 멸균 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 A 200, 200mg/kg), 고농도 멸균 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 A 300, 300mg/kg), 저농도 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 100, 100mg/kg), 중농도 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 200, 200mg/kg), 고농도 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 300, 300mg/kg), 저농도 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 100, 100mg/kg), 중농도 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 200, 200mg/kg), 고농도 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 300, 300mg/kg), 저농도 멸균 분쇄 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 AG 100, 100mg/kg), 중농도 멸균 분쇄 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 AG 200, 200mg/kg), 고농도 멸균 분쇄 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (분쇄 AG 300, 300mg/kg), 저농도 멸균 볶음 분쇄 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 AG 100, 100mg/kg), 중농도 멸균 볶음 분쇄 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 AG 200, 200mg/kg), 고농도 멸균 볶음 분쇄 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 투여군 (볶은 분쇄 AG 300, 300mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간 씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여를 하였다.

(4) 4차 실험

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (Con), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 저농도 멸균 3% 볶은 결명자 투여군 (C-100, 100mg/kg), 중농도 멸균 3% 볶은 결명자 투여군 (C-200, 200mg/kg), 고농도 멸균 3% 볶은 결명자 투여군 (C- 300, 300mg/kg), 저농도 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 투여군 (24G-100, 100mg/kg), 중농도 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 투여군 (24G-200mg/kg), 고농도 2% Glucose 첨가 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 투여군 (24G-300, 300mg/kg), 저농도 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 투여군 (24-100, 100mg/kg), 중

농도 발효 결명자 투여군 (24-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군 (24-300, 300mg/kg), 저농도 *Lactobacillus casei* 48h 발효 결명자 투여군 (48-100, 100mg/kg), 중농도 발효 결명자 투여군 (48-200, 200mg/kg), 고농도 발효 결명자 투여군 (48-300, 300mg/kg), 저농도 *Lactobacillus casei* 72h 발효 결명자 투여군 (72-100, 100mg/kg), 중농도 *Lactobacillus casei* 72h 발효 결명자 투여군 (72-200, 200mg/kg), 고농도 *Lactobacillus casei* 72h 발효 결명자 투여군 (72-300, 300mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여를 하였다.

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정하였다

4) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 측정

각 실험동물의 변은 실험시작 후 3일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후, 실험 3일째에 수거하였으며, 개체 당 변의 개수와 변 중량 (wet weight)을 측정하였다. 변의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변중량으로 나누어 계산하였다.

5) 장이동거리 측정

장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였다.

6) 대장관내 점액질의 분비효과 측정

대장은 맹장 이후 부분부터 직장까지 부위의 양쪽을 결찰하여 적출하였다. 적출한 대장관을 10% formaldehyde으로 고정하여 조직처리 과정을 거치고 파라핀으로 embedding 하여 5 μ m 두께로 절편을 제작하였다. Alcian blue (pH 2.5)로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

II. 결과

1) 1차 실험

(1) 결명자 실험군 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide 단독 투여군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)에 비해 감소하였다. 앞서 기술한대로, Loperamide 투여에 따라 나타나는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 결과가 나타났으며, 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료 섭취량 그리고 음수량은 실험군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table II-16). 이는 기존 변비개선관련 연구들과 마찬가지로 loperamide에 의해 감소되는 사료섭취량 및 몸무게의 유의적인 차이가 없다고 보고된 것과 일치하였다.

Table II-16. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	187.9 ± 13.73 ^{NS}	16.3 ± 1.12 ^b	21.0 ± 1.37 ^b
LOP	186.3 ± 12.02	13.6 ± 1.10 ^a	14.5 ± 2.09 ^a
P/C	185.5 ± 13.13	14.8 ± 1.29 ^a	14.5 ± 2.09 ^a
A-100	189.9 ± 14.00	14.0 ± 2.21 ^a	15.5 ± 1.76 ^a
A-200	190.6 ± 14.40	14.2 ± 1.34 ^a	15.0 ± 2.09 ^a
A-300	189.4 ± 12.25	14.8 ± 3.29 ^a	15.5 ± 2.67 ^a
MC-100	190.7 ± 13.84	13.4 ± 1.44 ^a	15.0 ± 1.76 ^a
MC-200	189.9 ± 12.31	13.9 ± 2.27 ^a	15.0 ± 2.09 ^a
MC-300	190.3 ± 12.45	15.1 ± 0.49 ^a	15.5 ± 2.67 ^a

Data represents the mean ± S.D. Different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS non significant

(2) 결명자 실험군 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 54 ± 3인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 39.4 ± 1.67개로 감소하여 Loperamide에 대한 변비 유발이 확인되었다. 결명자 처리군 (A-100, A-200, A-300)과 결명자 Methylene Chloride 분획물 처리군 (MC-100, MC-200, MC-300)의 변의 개수는 모두 Loperamide에 비해 농도 의존적으로 증가하는 유의적인 차이를 보였다(Fig. II-16). 뿐만 아니라, Loperamide 투여에 의해 감소된 변의 무게도 결명자 처리군 (A-100, A-200, A-300)과 결명자 Methylene Chloride 분획물 처리군 (MC-100, MC-200, MC-300)에서 증가되는 결과가 나타났다(Fig. II-17).

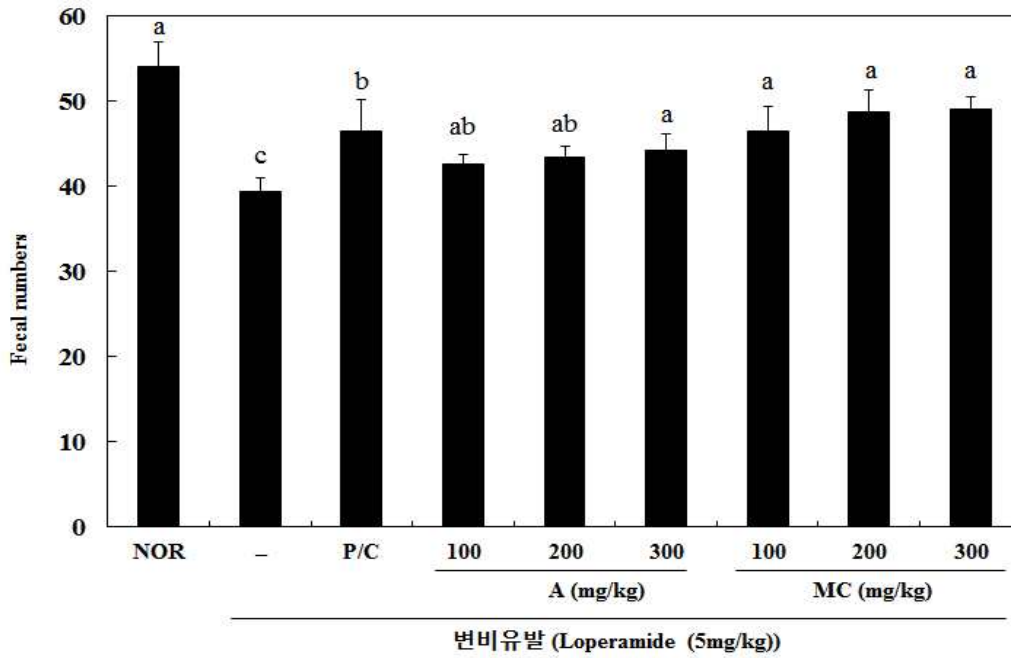


Fig. II-16. Effects of the *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

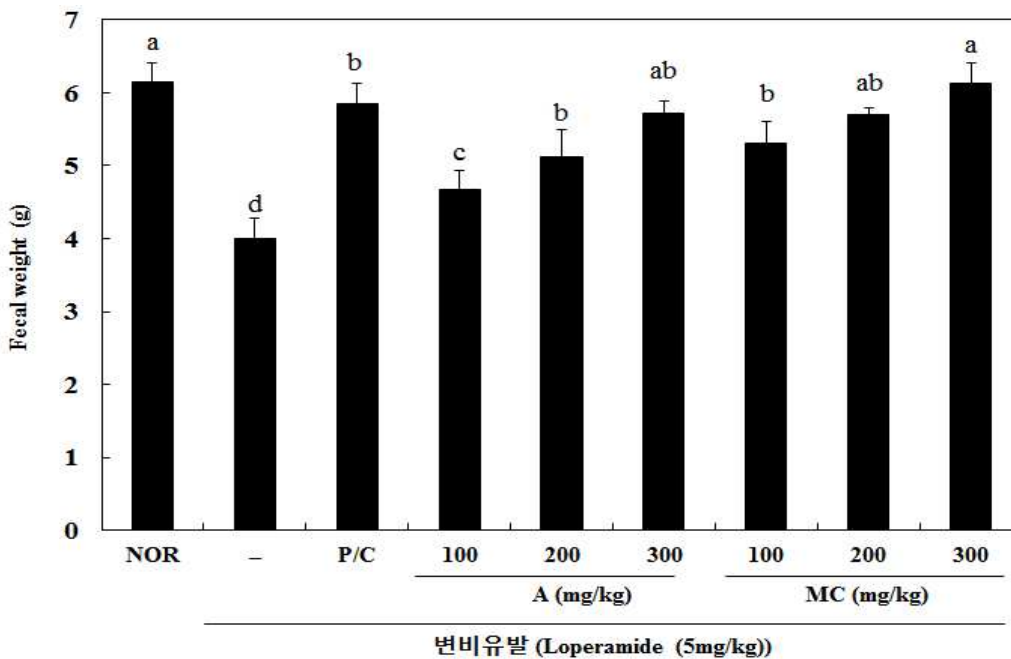


Fig. II-17. Effects of the *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 결명자 실험군 변의 수분함량

변비 유발 후, 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)의 변의 수분함량이 유의적으로 감소하였으며, 결명자 처리군 (A-100, A-200, A-300)과 결명자 Methylene Chloride 분획물 처리군 (MC-100, MC-200, MC-300)은 Loperamide 단독투여군 (LOP)에 비해 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. II -18).

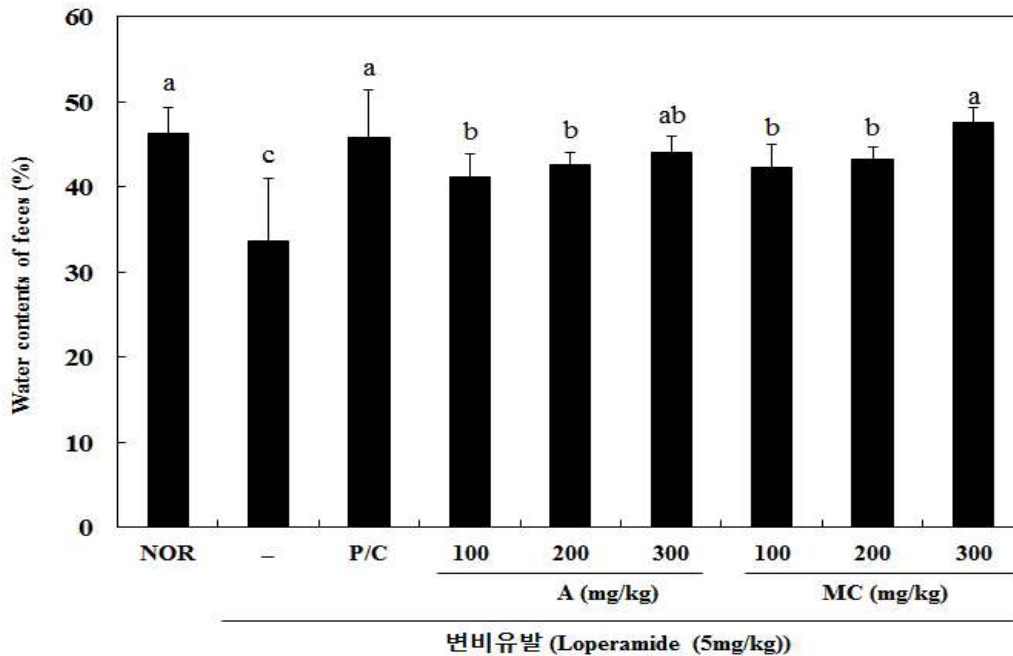


Fig. II-18. Effects of the *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 결명자 실험군 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 결명자 처리군 (A-100, A-200, A-300)과 결명자 Methylene Chloride 분획물 (MC-100, MC-200, MC-300)은 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 농도 의존적으로 Carmine의 장내 이동거리를 증가시켰다(Fig. II-19).

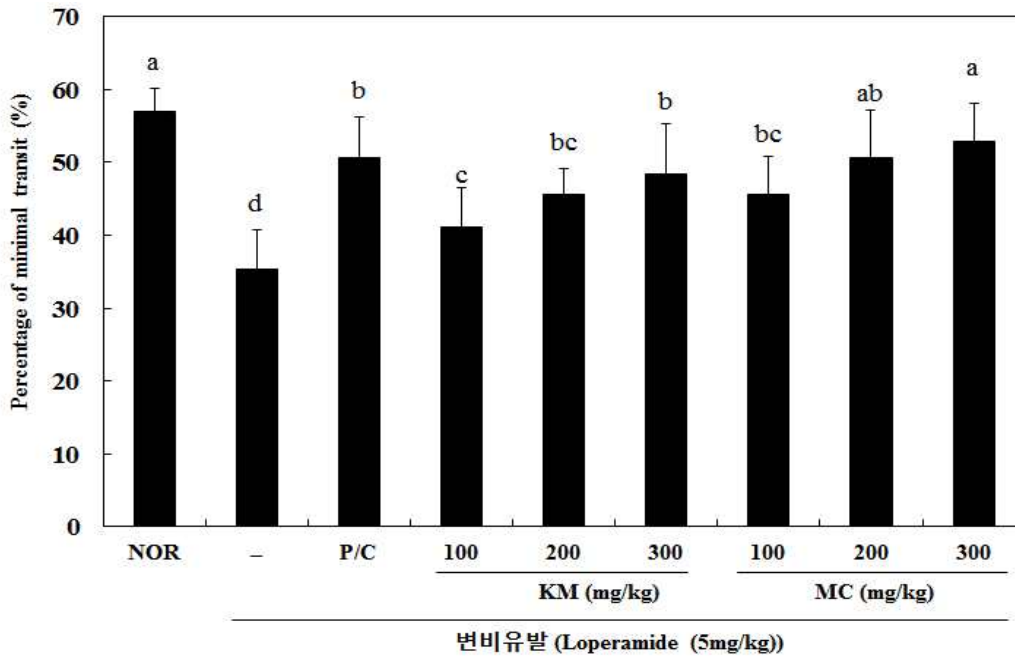


Fig. II-19. Effects of the *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군(NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군 (LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 반면에 고농도 결명자 추출물 처리군 (A-300)과 Methylene Chloride 분획물 처리군 (MC-300)은 Loperamide에 의해 감소된 goblet cell의 점액분비 정도를 회복시켰을 뿐만 아니라 intestinal crypt의 형태가 회복되었다(Fig. II -20).

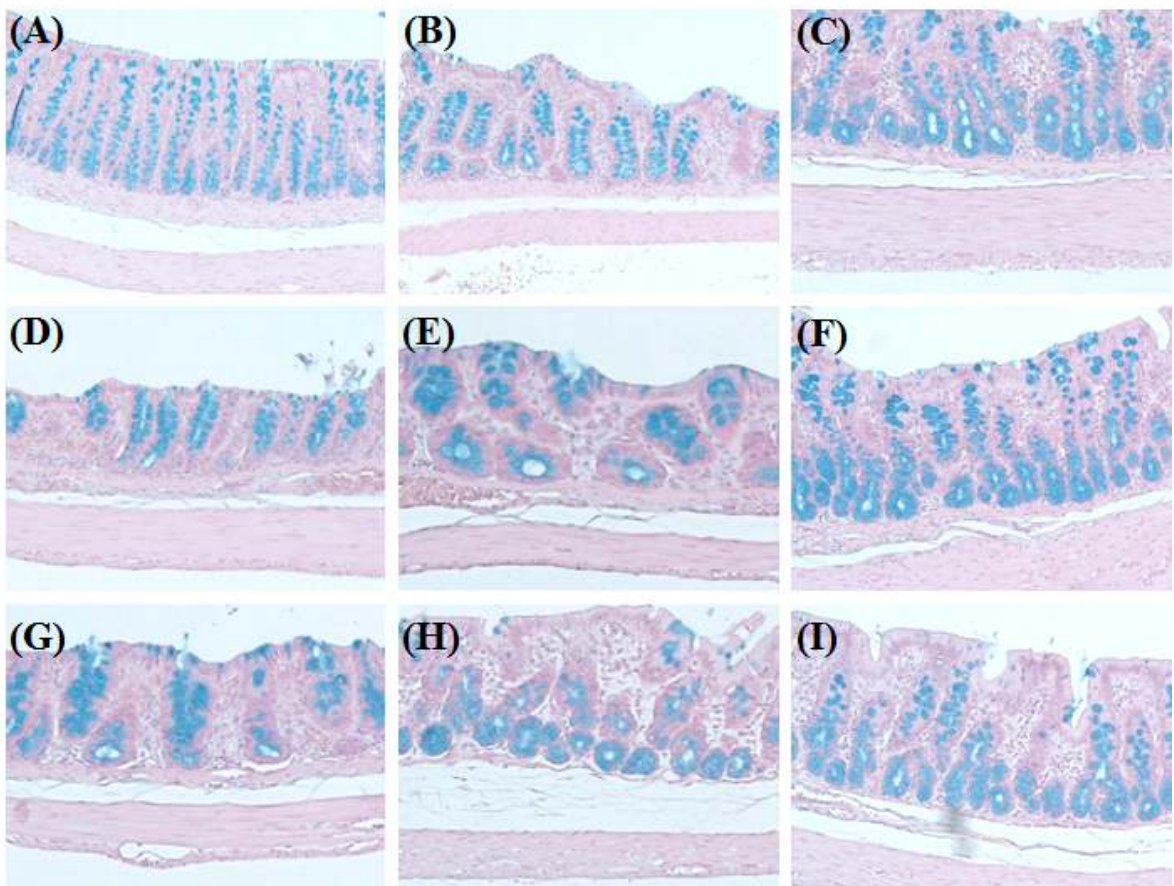


Fig. II-20. Effects of the *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) A-100 group, (E) A-200 group, (F) A-300 group, (G) MC-100 group, (H) MC-200 group, (I) MC-300 group.

2) 2차 실험

(1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide로 변비를 유발시킨 군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table II-17).

Table II-17. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with *Cassia tora* L. extract in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	308.8±23.17 ^{NS}	13.1±0.84 ^a	39.5±1.68 ^a
LOP	300.8 ± 10.75	12.7±0.57 ^b	29.1±1.3 ^c
P/C	306.6 ± 11.05	14.1±0.72 ^{ab}	32.8±1.74 ^b
A-100	288.8 ± 15.65	12±0.13 ^b	27.1±1.33 ^c
A-200	290.2 ± 18.72	13.1±0.26 ^b	30.7±1.19 ^{bc}
A-300	295.8 ± 26.51	14.7±0.21 ^a	36.5±1.09 ^{ab}
SG-100	284.4 ± 10.23	13.4±0.32 ^{ab}	26±1.16 ^d
SG-200	292.2 ± 22.42	13.3±0.14 ^{ab}	31.4±1.3 ^{bc}
SG-300	298.6 ± 9.31	14.2±0.19 ^{ab}	33.6±1.63 ^b

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. NS non significant

(2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 45 ± 2.91인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 22.4 ± 2.70개로 감소하여 Loperamide에 대한 변비유발이 확인되었다. 결명자 처리군 (A-100, A-200, A-300), 분쇄 결명자 처리군 (SG-100, SG-200, SG-300)의 변 개수는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 유의적으로 증가했지만, 분쇄 결명자 처리군 (SG-300)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. 5-6). 마찬가지로, 변 무게 또한 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 결명자 처리군 (A-100, A-200, A-300), 분쇄 결명자 처리군 (SG-100, SG-200, SG-300)이 유의적으로 증가했으며, 분쇄 결명자 처리군 (SG-300)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. II-21).

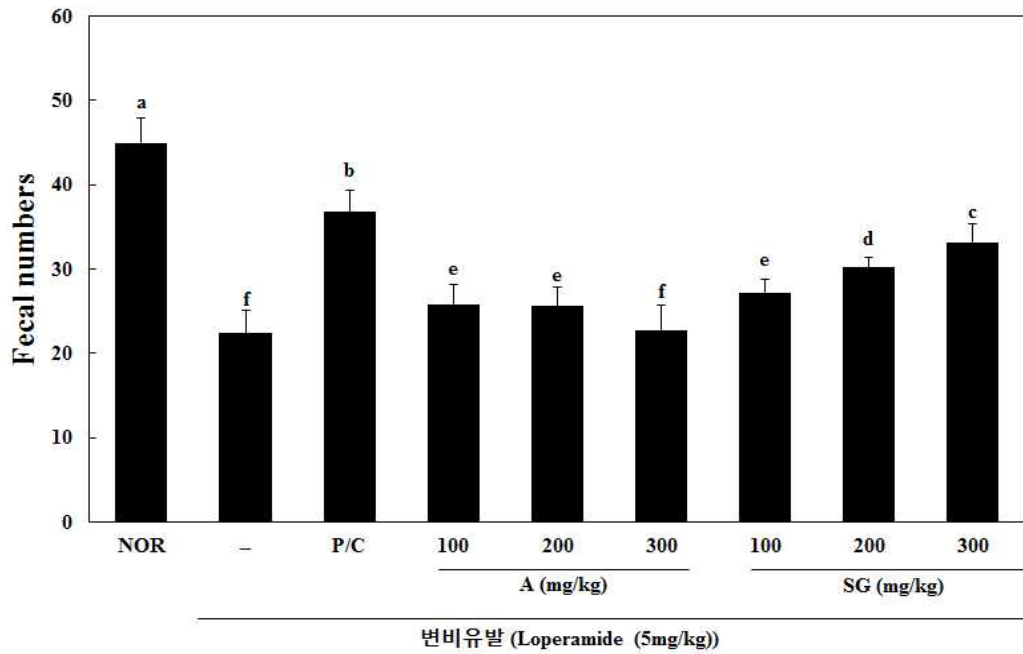


Fig. II-21. Effects of the *Cassia tora* L. extract on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

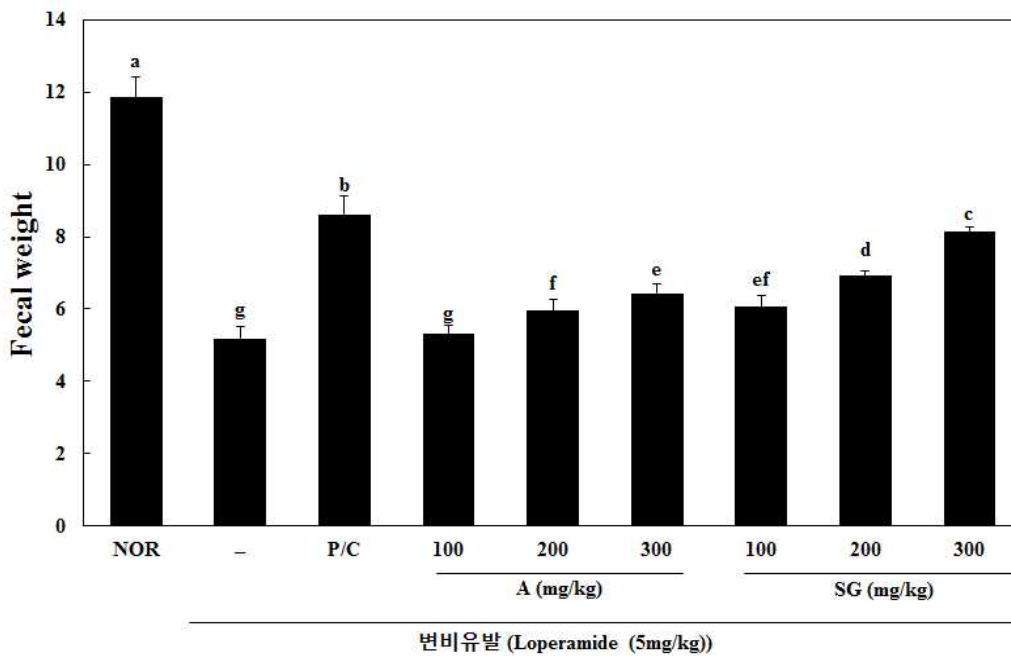


Fig. II-22. Effects of the *Cassia tora* L. extract on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean ± S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군 (NOR)에 비하여 Loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 결명자 처리군 (A-200, A-300), 분쇄 결명자 처리군 (SG-300)은 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비교해 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. II-23).

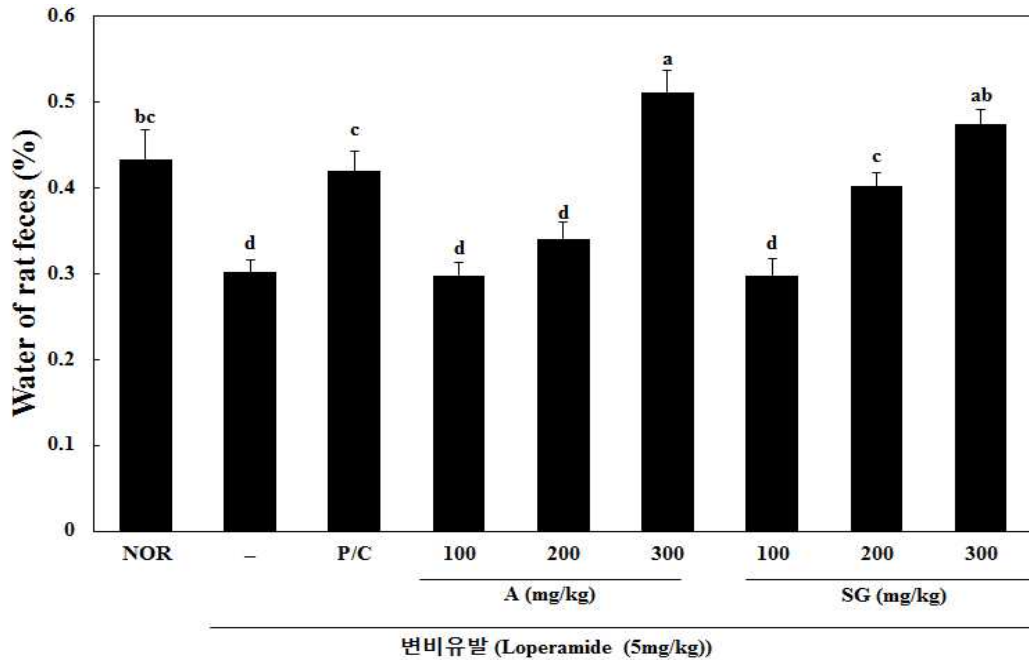


Fig. II-23. Effects of the *Cassia tora* L. extract on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 분쇄 결명자 처리군 (SG-300)이 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 장내 이동거리가 증가되는 경향이 나타났지만, 유의적인 차이 ($p=0.065$)는 나타나지 않았다(Fig. II -24).

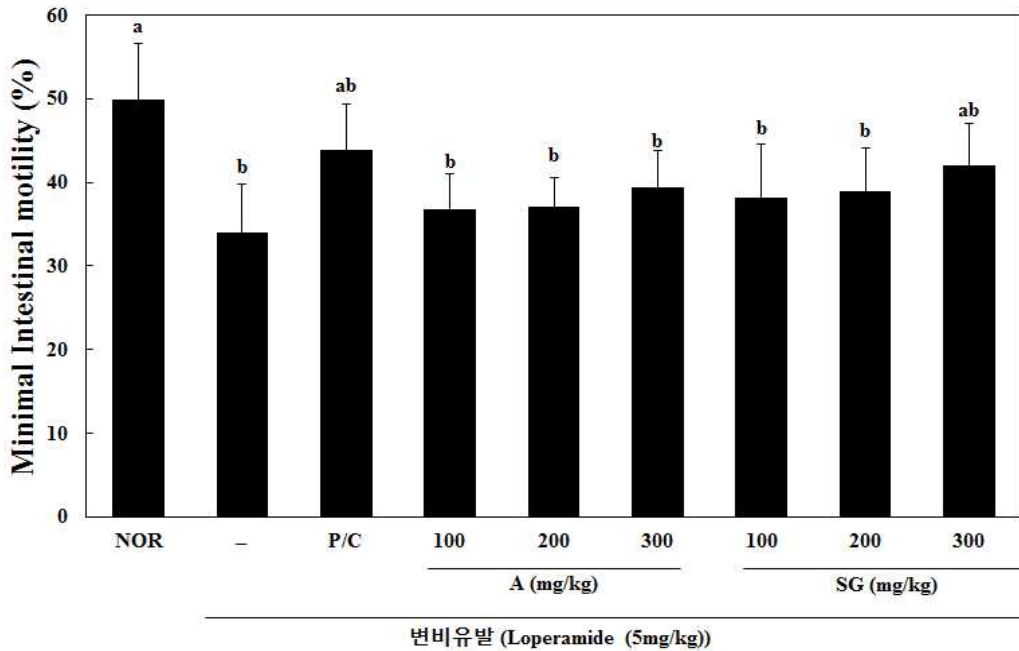


Fig. II-24 Effects of the fermented *Cassia tora* L. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

(5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군(NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군(LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 반면에 고농도 분쇄 결명자 처리군(SG-300)은 Loperamide에 의해 감소된 goblet cell의 점액분비정도를 회복시켰을 뿐만 아니라 intestinal crypt의 형태가 정상에 가깝게 회복되었다(Fig. II -25).

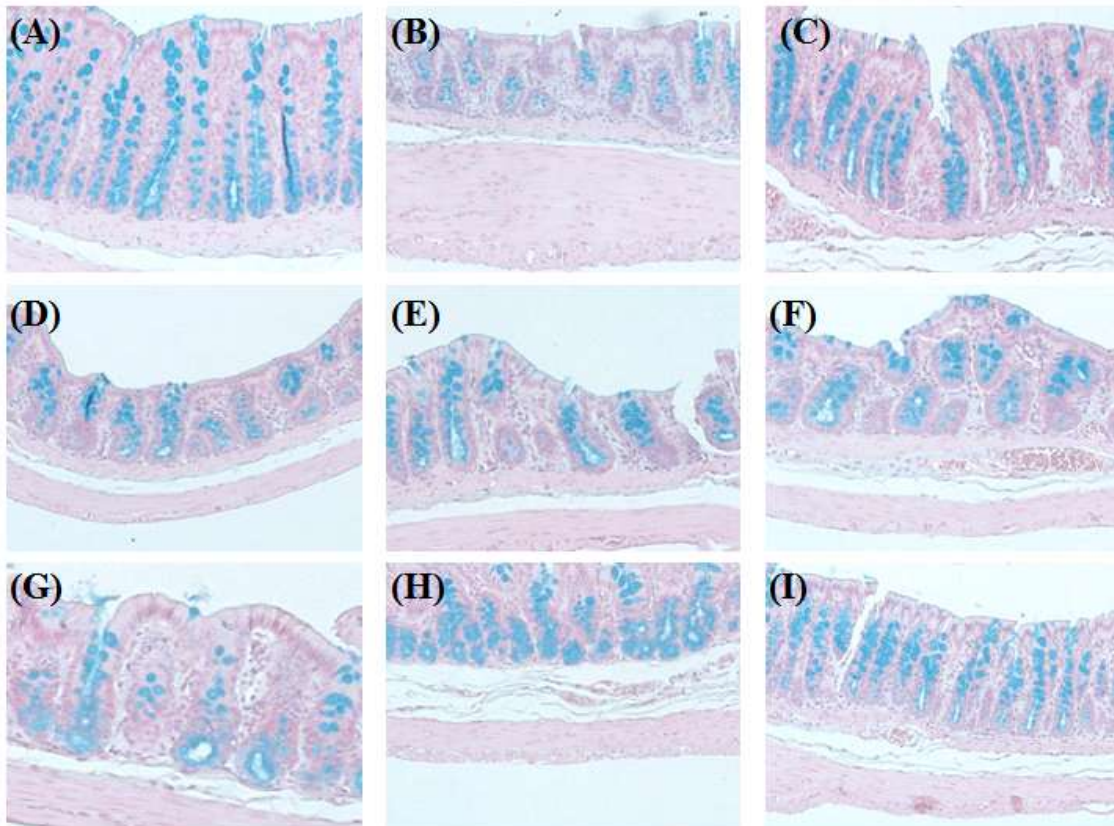


Fig. II-25. Effects of the *Cassia tora* L. extract on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) A-100 group, (E) A-200 group, (F) A-300 group, (G) SG-100 group, (H) SG-200 group, (I) SG-300 group

3) 3차 실험

(1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide로 변비를 유발시킨 군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여 지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table II -18).

Table II -18. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with *Cassia tora* L. extract in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	192.3 ± 10.43 ^{NS}	23.4 ± 2.86 ^k	46.22 ± 1.45 ^{ab}
LOP	192.0 ± 14.23	26.6 ± 1.04 ^{gh}	33.45 ± 0.78 ^k
P/C	189.5 ± 18.17	30.4 ± 1.76 ^{bc}	37.20 ± 1.15 ^{hi}
분쇄 결명-100	187.5 ± 13.22	23.7 ± 2.61 ^{jk}	43.71 ± 1.95 ^{bc}
분쇄 결명-200	195.0 ± 14.40	24.9 ± 1.60 ^j	42.54 ± 0.57 ^{de}
분쇄 결명-300	194.3 ± 4.38	27.8 ± 2.38 ^{ef}	45.04 ± 2.09 ^{ab}
볶은 분쇄 결명-100	195.8 ± 8.93	24.5 ± 2.85 ^{jk}	46.21 ± 1.82 ^{ab}
볶은 분쇄 결명-200	198.3 ± 2.28	30.5 ± 1.72 ^{ab}	43.41 ± 1.74 ^{bc}
볶은 분쇄 결명-300	193.5 ± 3.50	29.5 ± 1.37 ^{bc}	37.32 ± 2.19 ^{hi}
분쇄 A-100	203.5 ± 3.04	28.9 ± 2.85 ^{cd}	40.55 ± 2.44 ^{ef}
분쇄 A-200	183.5 ± 3.64	29.6 ± 1.80 ^{bc}	35.89 ± 2.45 ^j
분쇄 A-300	189.3 ± 13.55	29.3 ± 1.70 ^{cd}	40.13 ± 0.80 ^{fg}
볶은 분쇄 A-100	197.0 ± 5.24	26.7 ± 1.31 ^{gh}	40.00 ± 2.44 ^{fg}
볶은 분쇄 A-200	189.5 ± 15.24	24.4 ± 1.63 ^{jk}	42.60 ± 1.05 ^{de}
볶은 분쇄 A-300	190.3 ± 2.49	24.7 ± 1.29 ^{jk}	46.28 ± 1.45 ^{ab}
분쇄-100	183.5 ± 5.72	25.3 ± 1.49 ^j	46.47 ± 1.19 ^a
분쇄-200	187.8 ± 3.63	27.4 ± 1.38 ^{fg}	45.00 ± 1.89 ^{ab}
분쇄-300	183.0 ± 8.46	25.4 ± 0.59 ^j	39.99 ± 2.65 ^{fg}
볶은 분쇄-100	195.3 ± 7.66	26.9 ± 2.41 ^{fg}	33.21 ± 2.13 ^k
볶은 분쇄-200	193.5 ± 3.50	27.0 ± 1.21 ^{fg}	41.82 ± 1.20 ^{de}
볶은 분쇄-300	203.5 ± 3.04	23.5 ± 1.75 ^k	43.12 ± 2.11 ^{de}
분쇄 AG-100	183.5 ± 3.64	26.2 ± 0.73 ^{hi}	43.14 ± 1.66 ^{de}
분쇄 AG-200	189.3 ± 13.55	24.5 ± 2.04 ^{jk}	43.75 ± 0.99 ^{bc}
분쇄 AG-300	189.0 ± 5.61	29.4 ± 2.16 ^{bc}	35.06 ± 2.85 ^j
볶은 분쇄 GA-100	182.5 ± 16.59	31.5 ± 1.71 ^a	32.26 ± 2.59 ^k
볶은 분쇄 GA-200	196.3 ± 5.54	28.3 ± 1.58 ^{de}	37.74 ± 1.26 ^{gh}
볶은 분쇄 GA-300	194.0 ± 17.29	31.3 ± 1.32 ^{ab}	43.25 ± 3.56 ^{cd}

*Data represents the mean ± S.D. Different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS non significant

(2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 43.5 ± 2.29 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 28.7 ± 1.78 개로 감소하여 Loperamide에 대한 변비유발이 확인되었다. 모든 처리군의 변 개수는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 농도 의존적으로 증가했지만, 멸균 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 처리군 (분쇄 A-300)과 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 처리군 (볶음 분쇄A-300)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. II-26). 마찬가지로, 변 무게 또한 모든 처리군이 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 유의적으로 증가했으며, 멸균 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 처리군 (분쇄 A-300)과 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 처리군 (볶음 분쇄A-300)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. II-27).

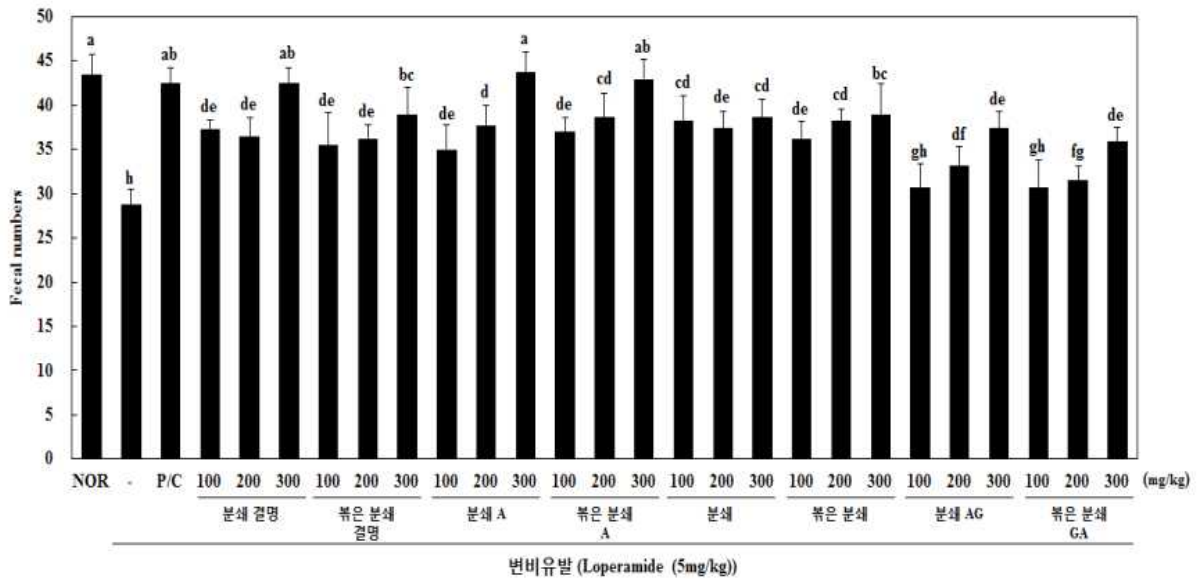


Fig. II-26. Effects of the *Cassia tora* L. extract on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

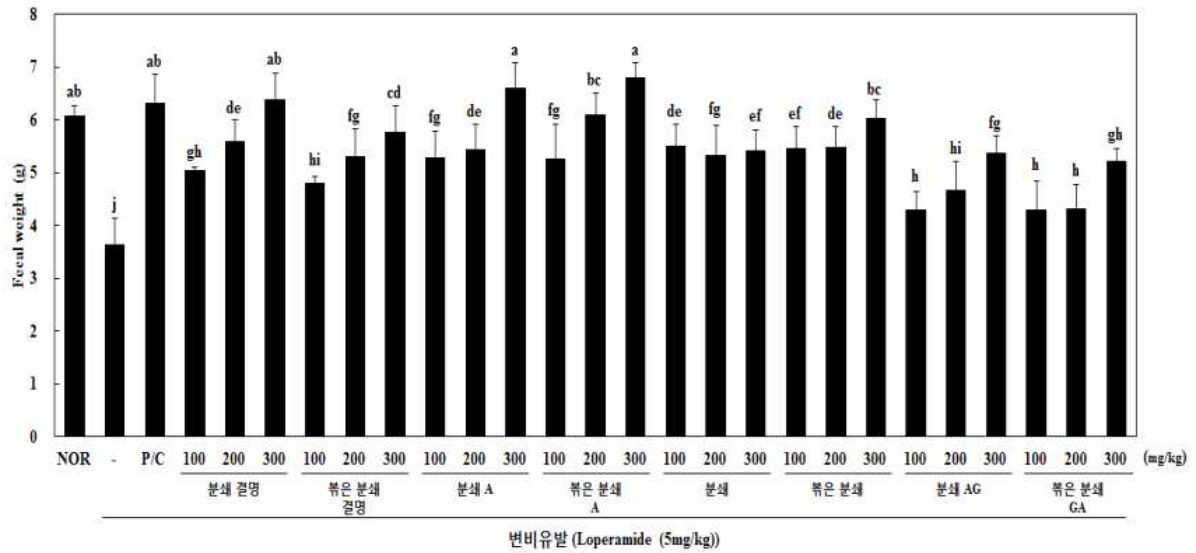


Fig. II-27. Effects of the *Cassia tora* L. extract on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군 (NOR)에 비하여 Loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, Loperamide 단독투여 군 (LOP) 비교했을 때 모든 처리군이 농도 의존적으로 변의 수분함량을 증가시켰지만 그 중 볏음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결정자 처리군 (볶음 분쇄A-300)이 변의 수분함량을 가장 많이 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. II-28).

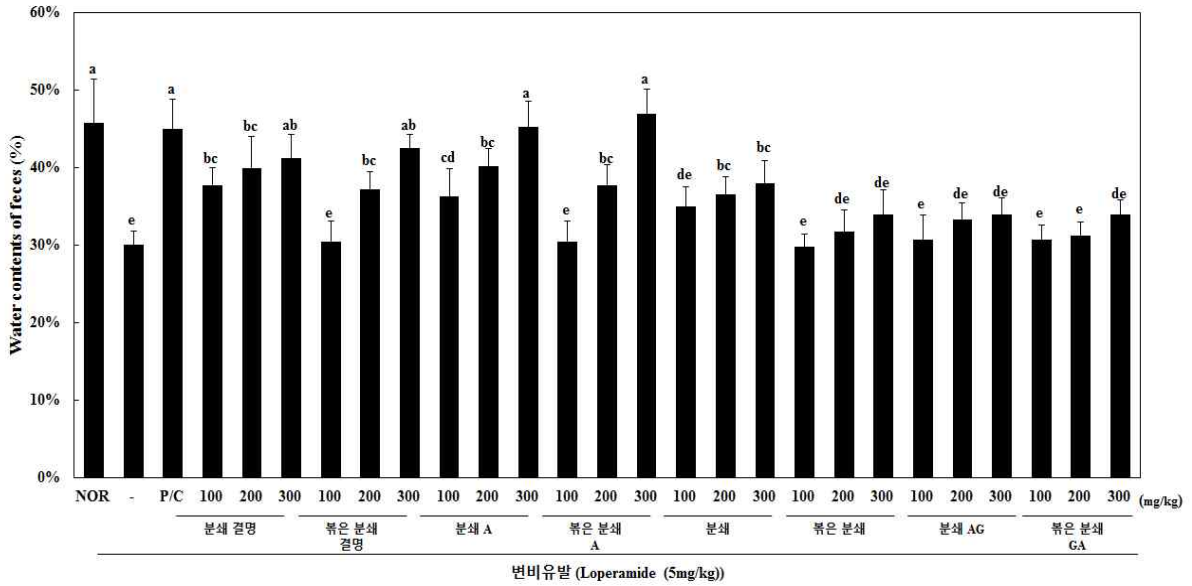


Fig. II-28. Effects of the *Cassia tora* L. extract on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시 약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 모든 처리군이 농도 의존적으로 Carmine의 장내 이동거리를 증가시켰지만, 그 중 볏음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 처리군 (볶음 분쇄A-300)이 가장 효과가 좋은 것으로 확인되었다(Fig. II-29).

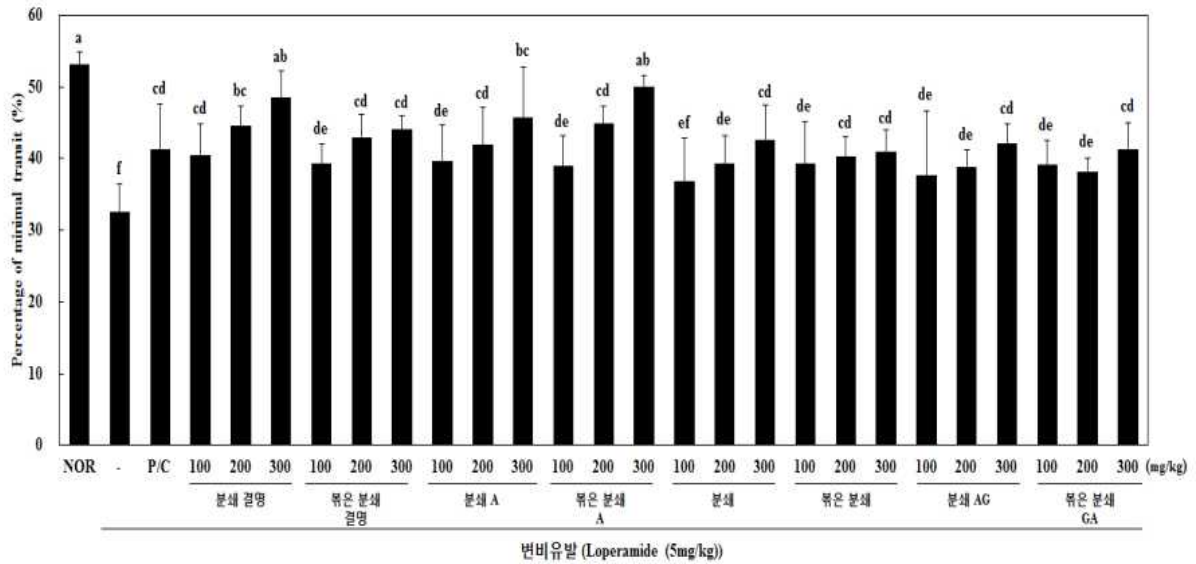
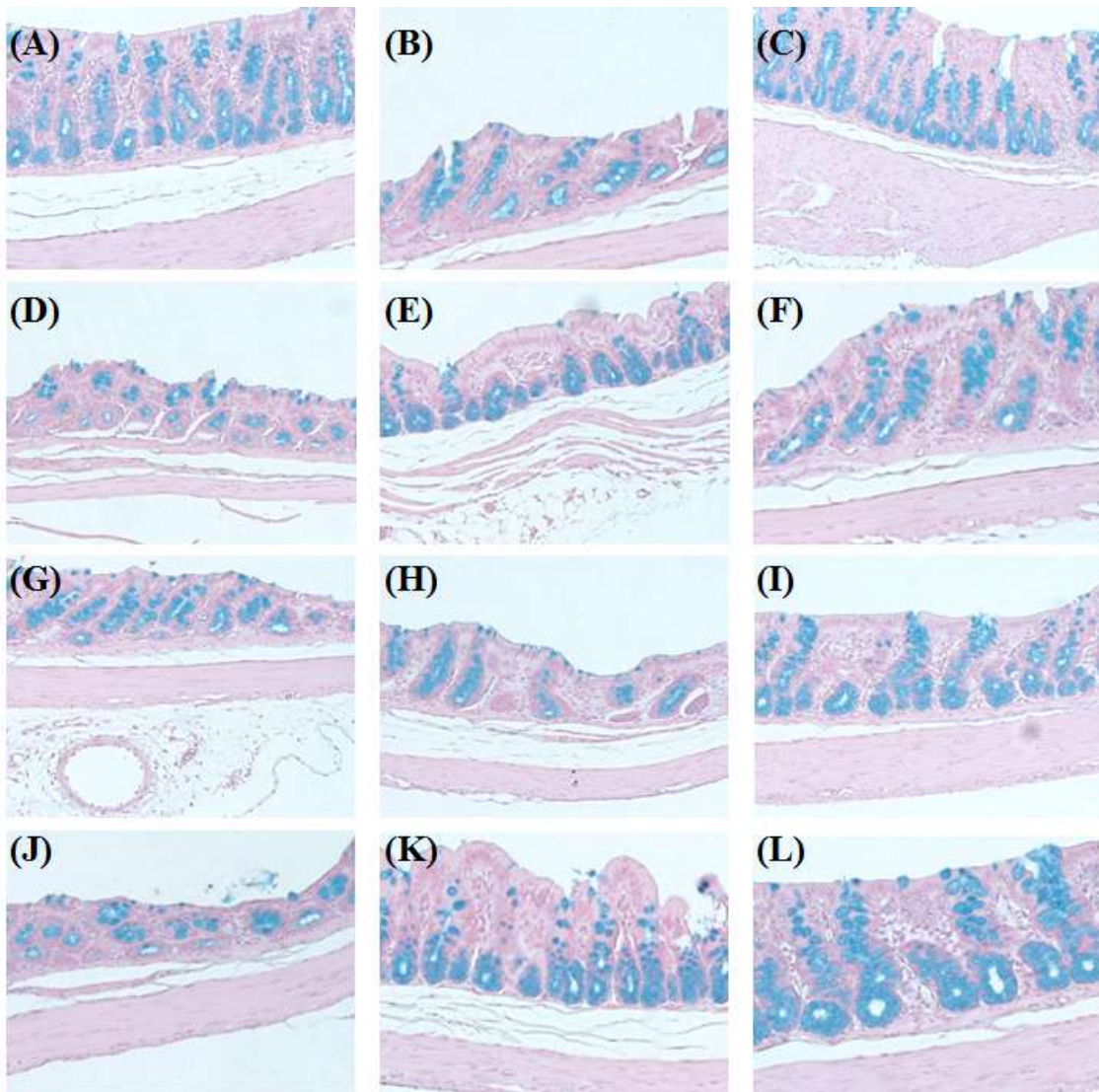


Fig. II-29. Effects of the *Cassia tora* L. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군(NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군(LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 추출물의 고농도 실험군 모두 Loperamide 투여군(LOP)에 비해 점막 내 점액질의 양과 intestinal crypt의 형태가 회복되었으며, 그 중 볶음 분쇄 *Lactobacillus casei* 발효 결명자 처리군(볶음 분쇄A-300)이 가장 좋은 효과를 나타내었다(Fig. II-30).



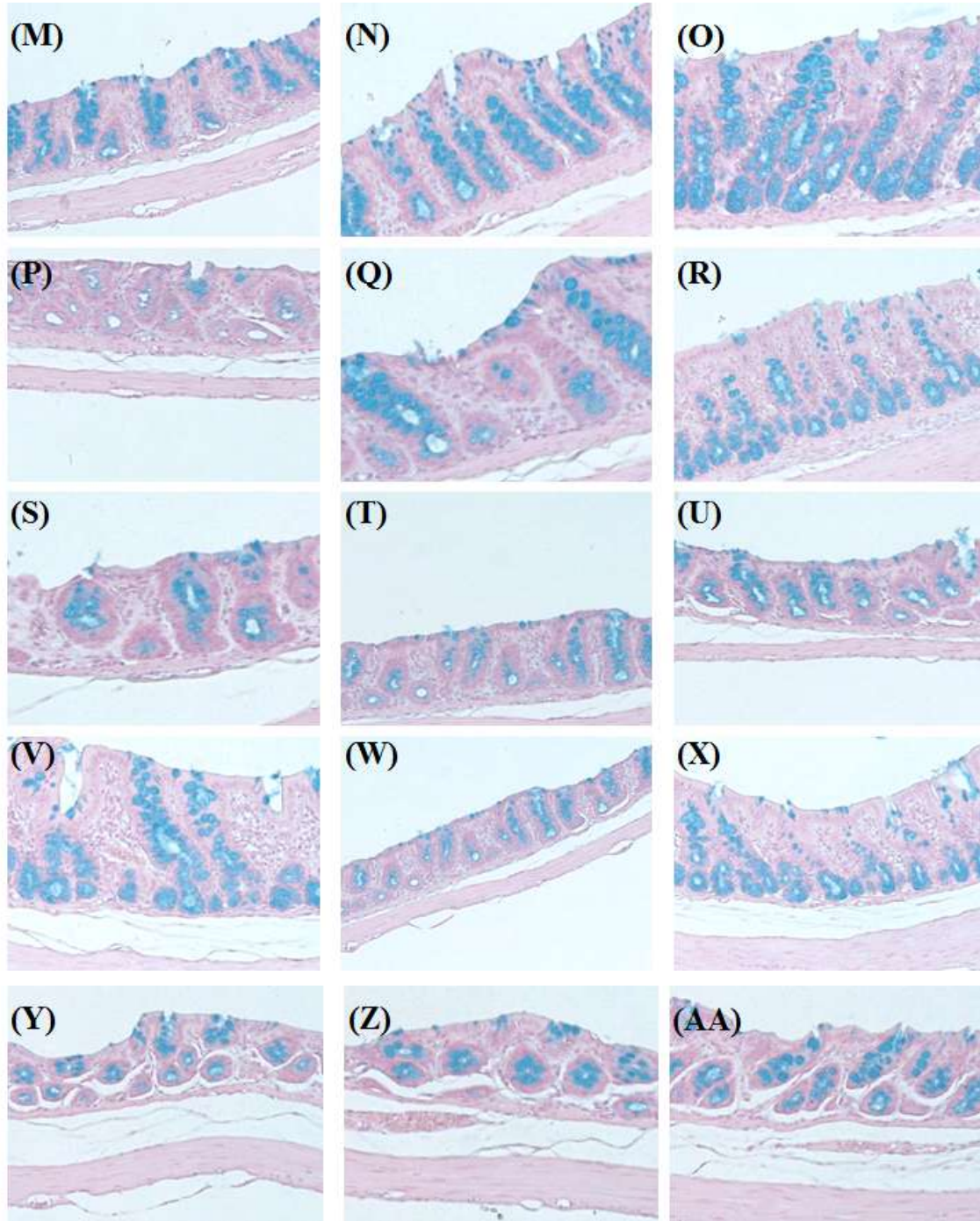


Fig. II-30. Effects of the *Cassia tora* L. extract on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) 분쇄 결명-100 group, (E) 분쇄 결명-200 group, (F) 분쇄 결명-300 group, (G) 볶은 분쇄 결명-100 group, (H) 볶은 분쇄 결명-200 group, (I) 볶은 분쇄 결명-300 group, (J) 분쇄 A-100 group, (K) 분쇄 A-200 group, (L) 분쇄 A-300 group, (M) 볶은 분쇄 A-100 group, (N) 볶은 분쇄 A-200 group, (O) 볶은 분쇄 A-300 group, (P) 분쇄-100 group, (Q) 분쇄-200 group, (R) 분쇄-300 group, (S) 볶은 분쇄-100 group, (T) 볶은 분쇄-200 group, (U) 볶은 분쇄-300 group, (V) 분쇄 AG-100 group, (W) 분쇄 AG-200 group, (X) 분쇄 AG-300 group, (Y) 볶은 분쇄 GA-100 group, (Z) 볶은 분쇄 GA-200 group, (AA) 볶은 분쇄 GA-300 group.

4) 4차 실험

(1) 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide로 변비를 유발시킨 군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여 지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table II -19).

Table II -19. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with *Cassia tora* L. extract in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	192.3 ± 10.43 ^{NS}	19.7 ± 1.53 ^c	46.5 ± 1.33 ^{ab}
LOP	183 ± 10.12	20.5 ± 2.27 ^{abc}	42.6 ± 2.01 ^{ef}
P/C	200 ± 9.51	22.4 ± 1.53 ^a	44.2 ± 2.58 ^{cd}
C-100	192.3 ± 7.85	21.6 ± 0.68 ^{abc}	43.4 ± 1.74 ^{cde}
C-200	197.3 ± 11.86	20.8 ± 1.17 ^{abc}	43.1 ± 2.11 ^{def}
C-300	194.3 ± 4.38	19.9 ± 1.25 ^{bc}	43.7 ± 0.99 ^{cde}
24G-100	193.8 ± 11.14	20.3 ± 1.32 ^{abc}	43.6 ± 3.23 ^{cde}
24G-200	184 ± 13.55	22.4 ± 0.9 ^a	43.4 ± 0.81 ^{cde}
24G-300	201.3 ± 5.12	22.3 ± 1.31 ^a	40.8 ± 2.16 ^{fg}
24-100	190.3 ± 1.3	22.1 ± 1.09 ^{ab}	46.1 ± 1.88 ^{ab}
24-200	187.5 ± 14.08	21.6 ± 0.86 ^{abc}	48.7 ± 2.56 ^a
24-300	189.8 ± 6.76	21.5 ± 1.15 ^{abc}	40.4 ± 1.52 ^g
48-100	192.5 ± 12.7	21.9 ± 1.51 ^{abc}	41.1 ± 1.28 ^{ef}
48-200	182.5 ± 4.72	22.3 ± 0.92 ^a	44.1 ± 1.69 ^{cd}
48-300	200 ± 5.43	21.9 ± 1.28 ^{abc}	45.4 ± 1.76 ^{bc}
72-100	191 ± 6.96	20.2 ± 1.51 ^{abc}	46.2 ± 1.92 ^{ab}
72-200	188.5 ± 3.91	20.5 ± 1.38 ^{abc}	43.1 ± 1.01 ^{def}
72-300	184 ± 10.12	20.6 ± 1.12 ^{abc}	42 ± 2.25 ^{ef}

*Data represents the mean ± S.D. Different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS non significant

(2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 55.5 ± 2.08 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 42.2 ± 2.21 개로 감소하여 Loperamide에 대한 변비유발이 확인되었다. 고농도 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 처리군 (24-300)의 변 개수는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교했을 때 가장 많이 증가했지만, 발효 시간 (48-100, 48-200, 48-300, 72-100, 72-200, 72-300)이 늘어날수록 그 효과가 감소했다(Fig. II-31). 마찬가지로, 변 무게 또한 고농도 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 처리군 (24-300)의 변 개수는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교했을 때 가장 많이 증가했지만, 발효 시간 (48-100, 48-200, 48-300, 72-100, 72-200, 72-300)이 늘어나더라도 그 효과가 오히려 감소하는 경향이 나타났다(Fig. II-32).

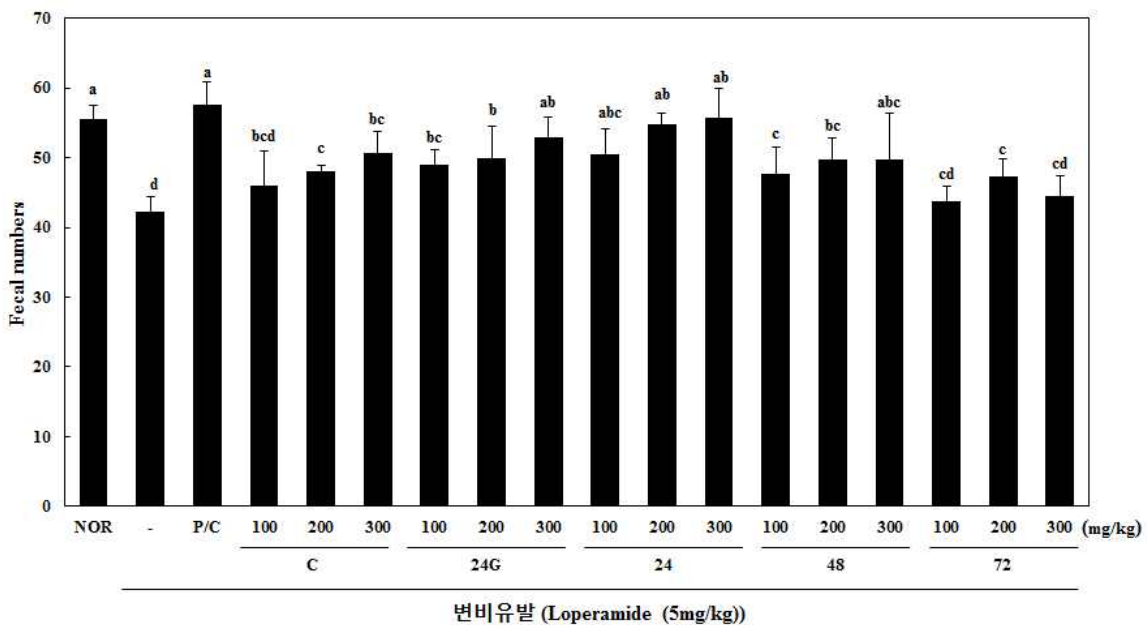


Fig. II-31. Effects of the *Cassia tora* L. extract on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

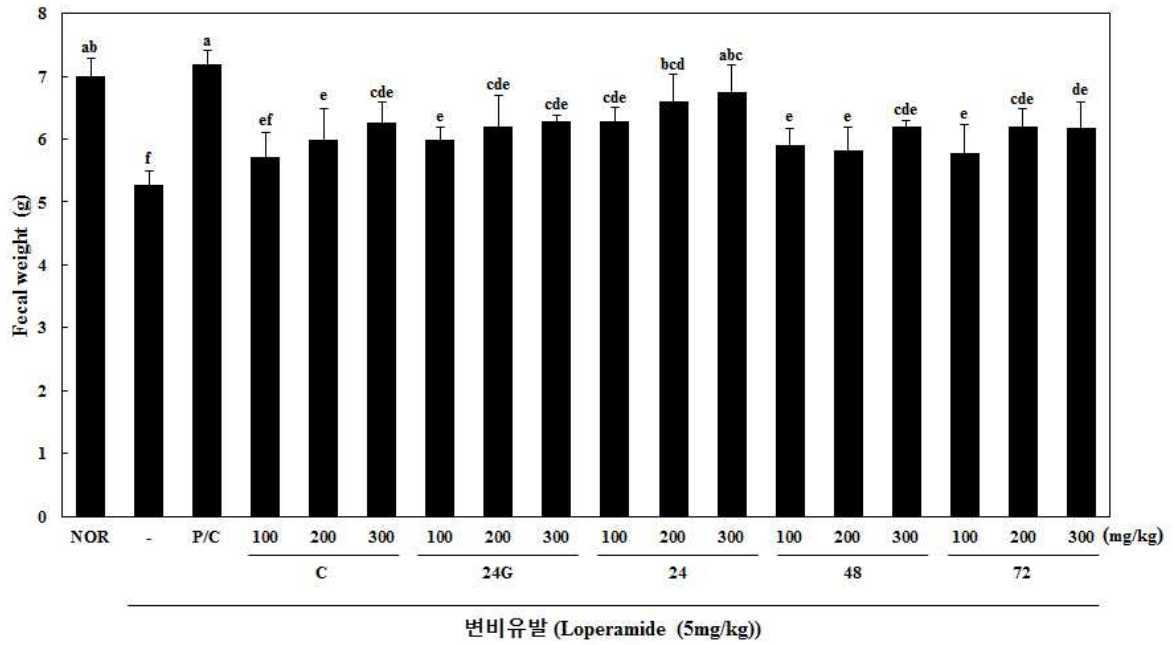


Fig. II-32. Effects of the *Cassia tora* L. extract on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군 (NOR)에 비하여 Loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 고농도 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 처리군 (24-300)의 변 수분 함량은 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교했을 때 가장 많이 증가했지만, 발효 시간 (48-100, 48-200, 48-300, 72-100, 72-200, 72-300)이 늘어나더라도 그 효과가 오히려 감소하는 경향이 나타났다(Fig. II-33).

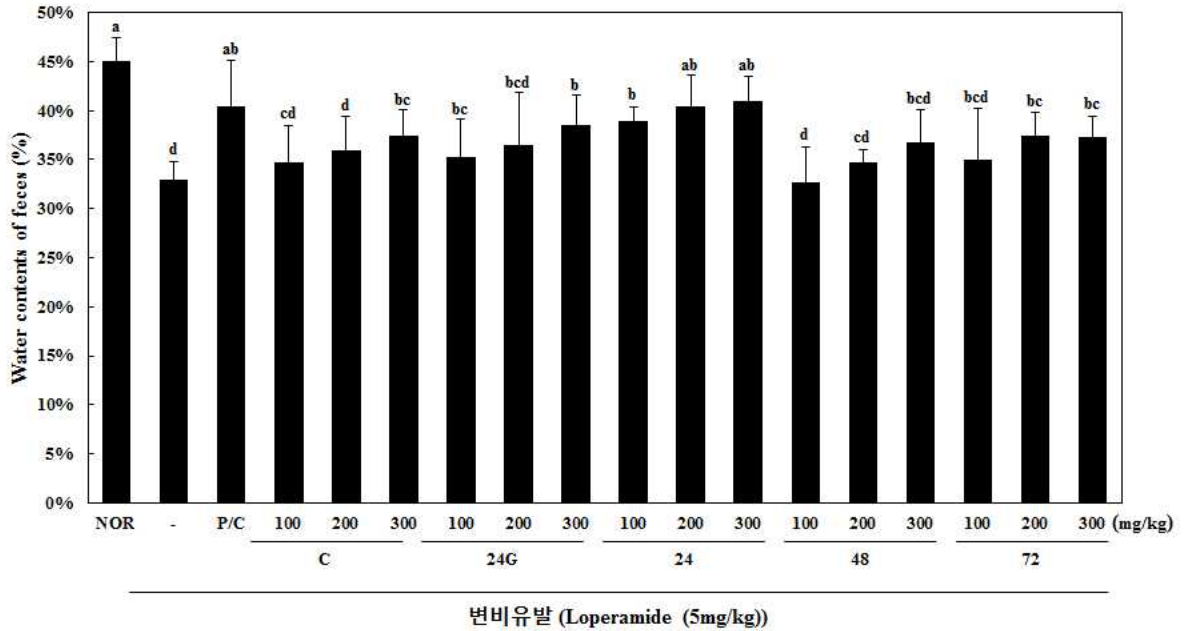


Fig. II-33. Effects of the *Cassia tora* L. extract on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 고농도 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결정자 처리군 (24-300)의 Carmine의 장내 이동거리는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교했을 때 가장 많이 증가했지만, 발효 시간 (48-100, 48-200, 48-300, 72-100, 72-200, 72-300)이 늘어나더라도 그 효과가 오히려 감소하는 경향이 나타났다(Fig. II -34).

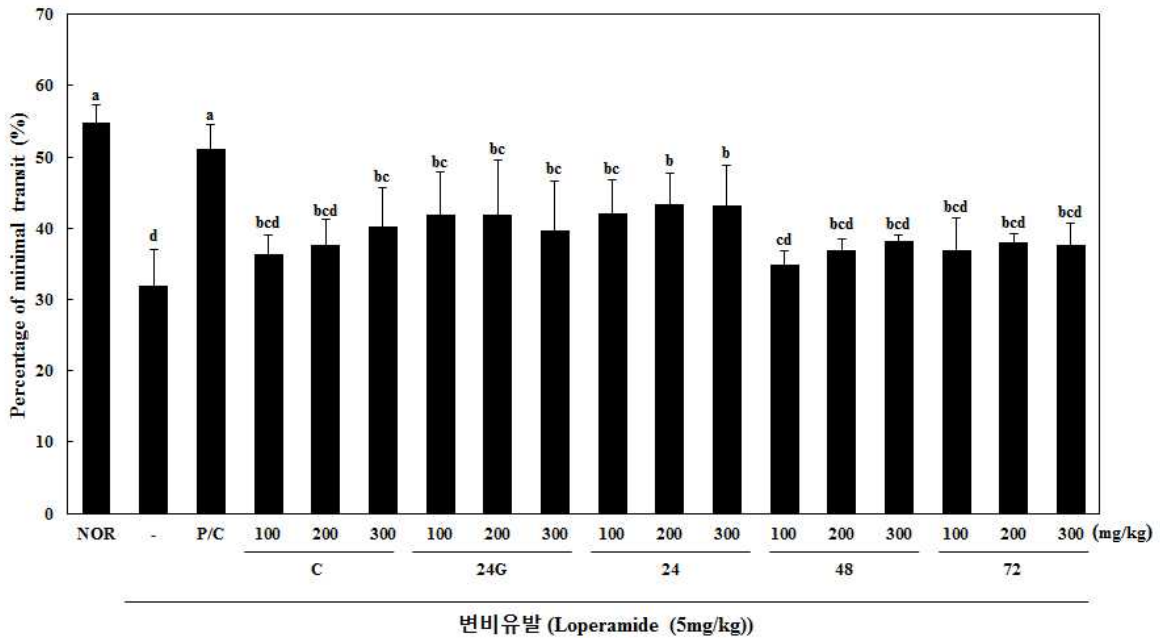
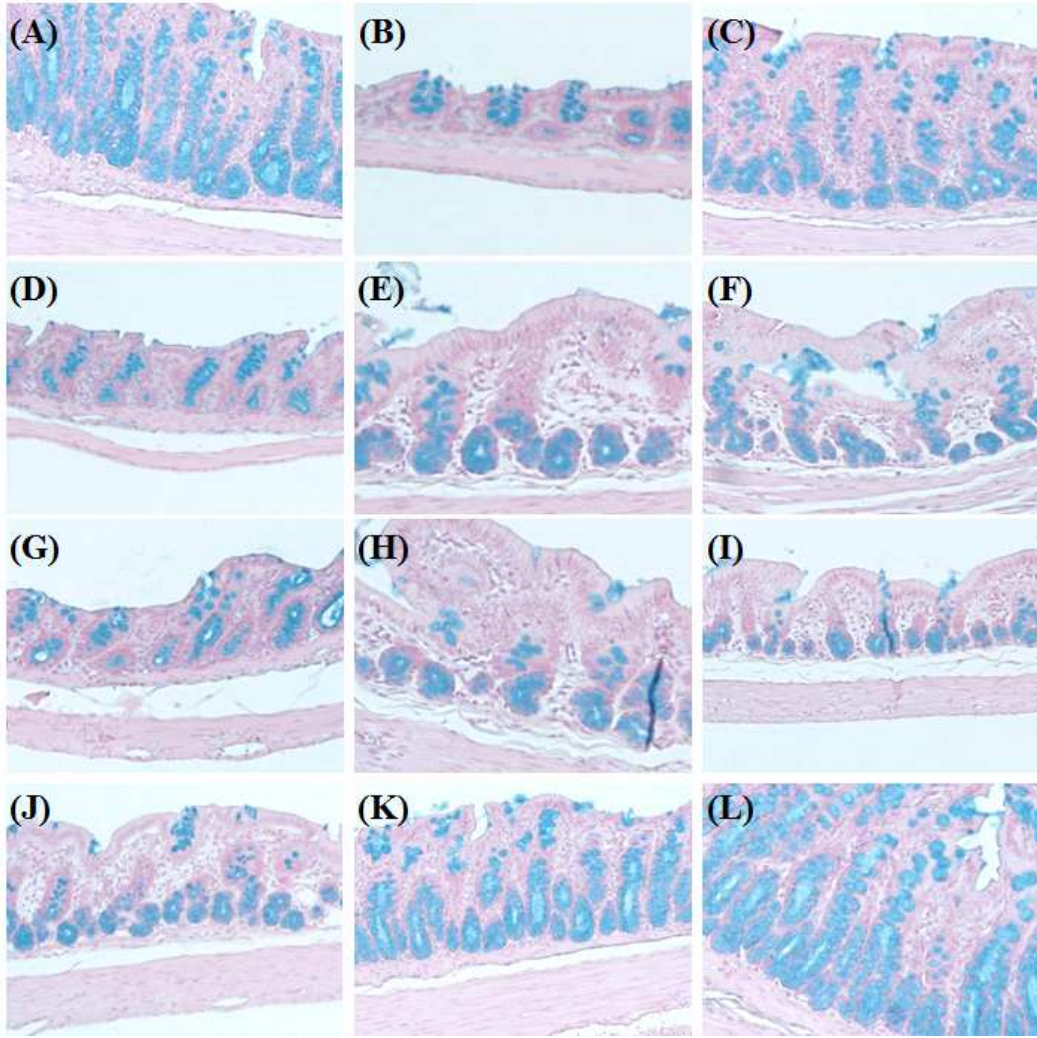


Fig. II-34. Effects of the fermented *Cassia tora* L. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군(NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군 (LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 반면에 고농도 *Lactobacillus casei* 24h 발효 결명자 처리군 (24-300)은 Loperamide에 의해 감소된 goblet cell의 점액분비정도를 회복시켰을 뿐만 아니라 intestinal crypt의 형태가 정상에 가깝게 회복되었다(Fig. II -35).



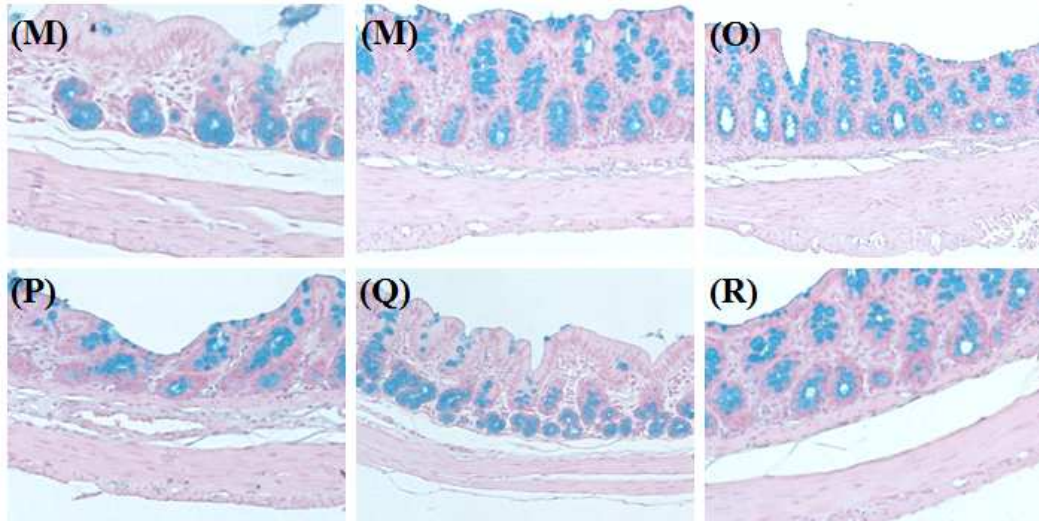


Fig. II-35. Effects of the *Cassia tora* L. extract on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) C-100 group, (E) C-200 group, (F) C-300 group, (G) 24G-100 group, (H) 24G-200 group, (I) 24G-300 group, (J) 24-100 group, (K) 24-200 group, (L) 24-300 group, (M) 48-100 group, (N) 48-200 group, (O) 48-300 group, (P) 72-100 group, (Q) 72-200 group, (R) 72-300 group.

II-6. 발효물에 대한 안전성 평가: 단회투여독성평가

6-1. 단회투여독성평가 - 자체수행

I. 재료 및 방법

1) 시험물질 조제

본 실험에 사용된 결명자(*Cassia tora* L.)는 2015년 전라남도 해남에서 생산된 것을 구입하여 3차원 회전 뒤틀림방식과 간접 열풍방식을 이용한 볶음기(Gene Café CBR-101A, Genesis Co., Ltd., Gunpo, Korea)로 150℃ 온도에서 5분간 볶음처리를 하였다. 볶음 처리된 결명자를 수세, 건조한 후 40mesh로 분쇄한 시료 5kg를 24시간 발효한 후 멸균 증류수 50L를 가하고 95℃에서 4시간씩 2회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYELA, N-1100 series, Tokyo, Japan)에서 농축하여 에탄올을 기화시켜 농축액을 얻었다. 농축이 완료된 추출물은 동결건조기(Lyoph-pride 20R, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 건조하여 시료를 얻었다.

2) 실험동물 및 사육환경

본 시험에서는 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)로부터 입수한 6주령 암수 특정병원체 부재(specific-pathogen free) Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것을 선발하여 시험에 제공하였다. 동물실의 사육환경은 온도 22±3℃, 상대습도 50±15%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(07:00 점등~19:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L×180H mm)에 수용하였으며, 실험식이와(TEKLAD CERTIFIED GLOBAL 18% PROTEIN RODENT DIET 2918C, Harlan TEKLAD, U.S.A.)와 식수를 자유급여하였다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 미국 National Research Council(1996)의 “실험동물의 관리와 사용에 관한 지침”에 따라 유지하였으며, 동물실험은 한약진흥재단 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 승인(승인번호: 2016-1-01) 하에 수행되었다.

3) 시험물질 투여

본 시험에 사용한 발효결명자는 투여 직전에 투여용량에 맞게 증류수 (주)대한약품공업)에 현탁하여 조제하였다. 부형제 대조군은 증류수만을 사용하였다. 투여는 주요 노출경로 중의 하나인 경구로 하였다. 모든 동물을 투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내를 비게 한 후 금속제 경구투여용 зонд(sonde)와 1회용 주사기를 이용하여 강제 경구투여를 하였고, 3~4시간이 경과한 후에 다시 사료를 급여하였다. 투여액량은 투여당일에 측정된 체중을 기준으로 kg당 30ml로 계산하였다.

4) 일반증상 관찰 및 체중측정

투여당일에는 투여 후 6시간까지 매 시간마다 동물의 일반증상과 중독증상 및 사망유

무에 대해서 관찰하였고, 투여 익일부터 부검 시까지는 매일 1회 이상 투여 일반증상을 관찰하였다. 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 1, 3, 7 및 14일째에 체중을 측정하였다.

5) 부검

투여 후 15일째에 모든 동물에 대하여 약 18시간 이상 절식시킨 후, CO₂로 마취시킨 후 방혈치사 시킨 후 부검하여 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다.

6) 통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계 프로그램인 PASW statistics 18(IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 각 실험결과들로부터 ANOVA(analysis of variance)를 적용하였으며, 유의성이 인정되었을 경우, Duncan's multiple test(P<0.05)를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

II. 결과

1) 사망유무 및 일반증상

대조군 및 모든 시험물질투여군에서 사망동물은 발생하지 않았다. 시험물질 투여군에서 투여 1일째 시험물질 혼입변(compound-colored stool)이 관찰되었으나, 그 외 기간에는 어떠한 이상증상은 관찰되지 않았다(Table II -20).

Table II -20. Clinical signs and mortality.

Sex : Male																			
Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Duration on study (day)															Mortality (dead/total)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15
G1 0	5	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G2 1,500	5	Abnormal findings	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
		C		5															
G3 3,000	5	Abnormal findings	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
		C		5															
Sex : Female																			
Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Duration on study (day)															Mortality (dead/total)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15
G1 0	5	Abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
G2 1,500	5	Abnormal findings	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
		C		5															
G3 3,000	5	Abnormal findings	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
		C		5															

*Data represents the mean±S.D. C; compound-colored stool.

2) 체중변화

관찰기간 동안, 암수 1,500 및 3,000mg/kg 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다(Fig. II-36).

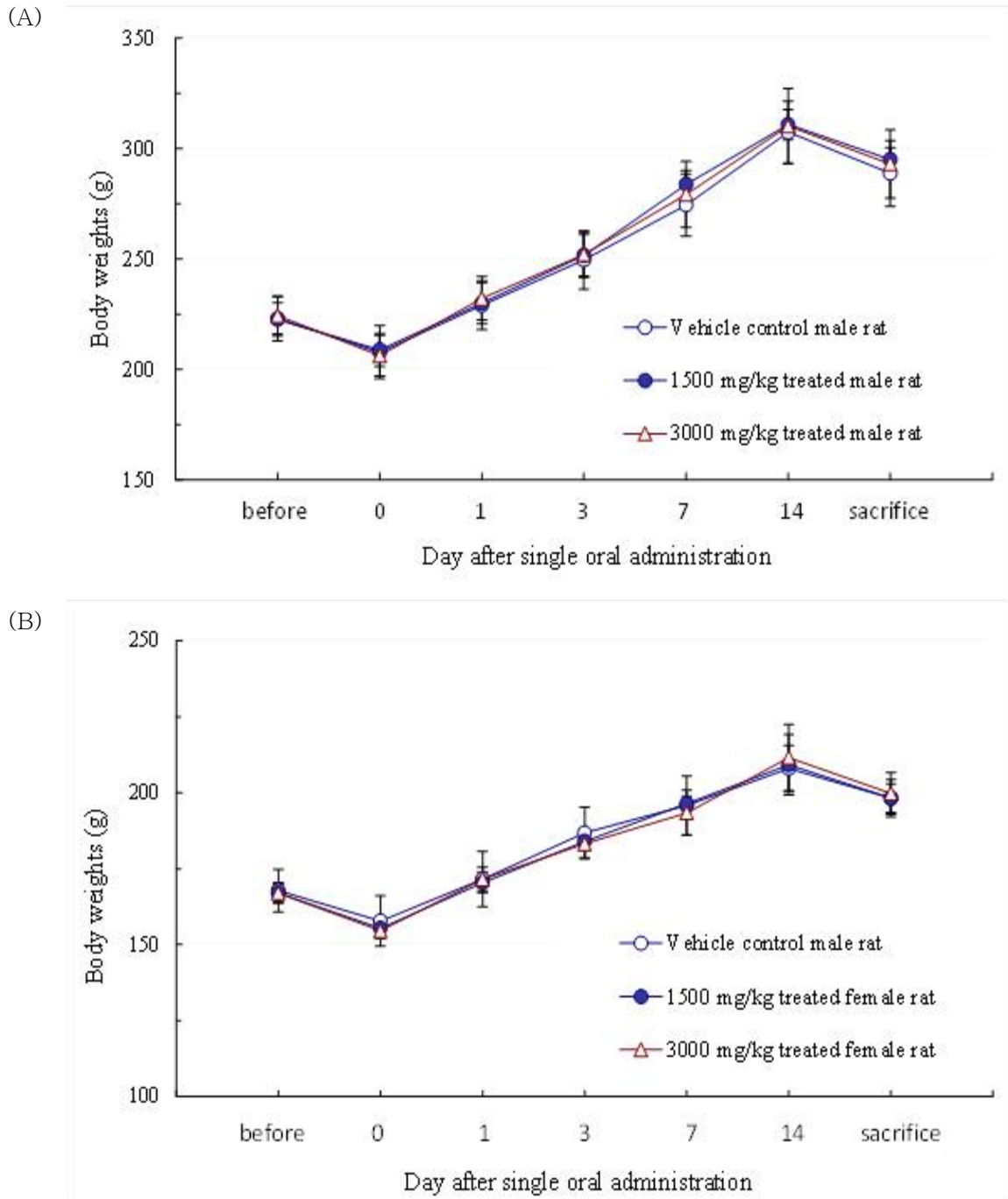


Fig. II-36. Body weights of (A) male and (B) female SD rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 육안적 부검소견

부검시, 암수 1,500 및 3,000mg/kg 시험물질투여군 전체에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다(Table II-21).

Table II-21. Necropsy findings*

Organ / Findings	Sex			Female			
	Group	G1	G2	G3	G1	G2	G3
	Dose (mg/kg)	0	1,500	3,000	0	1,500	3,000
	No. of examined	5	5	5	5	5	5
	Remarkable findings	0	0	0	0	0	0
No abnormal organs							

*Data represents the mean ± S.D.

6-2. 단회투여독성평가 - 외부용역 의뢰

- 전라남도 화순군에 소재한 ‘(재)한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소’에 단회투여독성평가를 의뢰하였다.

I. 재료 및 방법

1) 시험물질 조제

본 실험에 사용된 결명자(*Cassia tora* L.)는 2015년 전라남도 해남에서 생산된 것을 구입하여 3차원 회전 뒤틀림방식과 간접 열풍방식을 이용한 볶음기(Gene Café CBR-101A, Genesis Co., Ltd., Gunpo, Korea)로 150°C 온도에서 5분간 볶음처리를 하였다. 볶음 처리된 결명자를 수세, 건조한 후 40mesh로 분쇄한 시료 5kg를 24시간 발효한 후 멸균 증류수 50L를 가하고 95°C에서 4시간씩 2회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYELA, N-1100 series, Tokyo, Japan)에서 농축하여 에탄올을 기화시켜 농축액을 얻었다. 농축이 완료된 추출물은 동결건조기(Lyoph-pride 20R, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 건조하여 시료를 얻었다.

2) 실험동물 및 사육환경

본 시험에서는 (주) 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)로부터 입수한 5주령 암수 특정병원체 부재(specific-pathogen free) Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 동물을 도입 후 7일 동안 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 동물실의 사육환경은 온도 20.2 ~ 22.7°C, 상대습도 50.6 ~ 58.1%, 환기횟수 10~20회/시간,

조명시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 stainless 사육상자(310W×500D×200H mm)에 수용하였으며, 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 [Labdiet, USA]를, 음수는 R/O수를 자유섭취 시켰다. 본 시험은 동물보호법[시행 2015-01-20][법률 제13023호(2015-01-20, 일부개정)] 및 실험동물에 관한 법률[시행 2016-05-04][법률 제14023호(2016-02-03, 일부개정)]에 근거한 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 동물윤리위원회에 의해 승인(IAC2016-1610)하에 수행되었다.

3) 시험물질 투여

본 시험에 사용한 발효결명자는 멸균증류수(주사용수, (주)대한약품공업)에 투여농도 50mg/ml, 100mg/ml 농도로 조제하여 사용하였다. 시험물질 투여량은 식품의약품안전처 고시 중 “의약품등의 독성시험기준”에 근거하여 고용량 투여군을 2000mg/kg B.W.로 설정하고 공비를 2로 하여 1000 및 500mg/kg B.W.의 농도를 고용량 투여군과 저용량 투여군으로 각각 설정하였다. 대조군으로는 부형제인 멸균증류수(주사용수)를 투여하는 대조군을 두었다. 시험물질의 투여를 위해 약 18시간 절식 시킨 실험동물에 시험물질 조제물을 경구 투여용 sonde를 장착한 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

4) 일반증상 관찰 및 체중측정

모든 동물에 대하여 1일 1회 관찰하였으며, 투여 후 14일간 관찰하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 3 및 4 시간에 관찰하였다. 체중은 도입 시, 군분리 시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7일 및 14일째에 측정하였다.

5) 부검

투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 방혈치사 하여 육안으로 장기를 검사하였다.

6) 통계분석

본 시험에서는 체중 데이터에 대해 SPSS(Ver 19.0) 통계 프로그램을 이용하여 통계처리를 하였다. 먼저, Levenve's test를 통해 동질성 검정을 수행하였고, 이후, one way ANOVA(분산분석) 검사를 수행하였다.

II. 결과

1) 사망유무 및 일반증상

실험기간 중, 시험물질 투여에 의한 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않았다(Table II -22).

Table II-22. Clinical signs and mortality.

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animal	Clinical signs	Mortality			
					Group	Dose (mg/kg B.W.)		
G1	0	Male	5	Normal	G1	0	0% (0 / 5) ^a	0% (0 / 5)
		Female	5	Normal				
G2	500	Male	5	Normal	G2	500	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
		Female	5	Normal				
G3	1000	Male	5	Normal	G3	1000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
		Female	5	Normal				
G4	2000	Male	5	Normal	G4	2000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
		Female	5	Normal				

B.W. : Body weight

^a : No. of dead animals / No. of tested animals, B.W. : Body weight

2) 체중변화

체중측정 결과, 시험물질 투여군과 부형제 대조군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다(Table II-23).

Table II-23. Body weights of SD rats. Data represent the mean±S.D.

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration			Unit : g					
			0	7	14						
			Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N
G1	0	Male	Mean	174.3	277.5	340.4					
			S.D.	4.5	9.8	10.5					
			N	5	5	5					
		Female	Mean	129.1	185.5	213.5					
			S.D.	2.8	8.7	12.8					
			N	5	5	5					
G2	500	Male	Mean	178.0	281.8	341.2					
			S.D.	7.1	7.9	14.0					
			N	5	5	5					
		Female	Mean	130.0	189.5	215.5					
			S.D.	5.2	16.3	16.9					
			N	5	5	5					
G3	1000	Male	Mean	175.6	273.2	329.5					
			S.D.	3.4	9.2	10.3					
			N	5	5	5					
		Female	Mean	129.4	190.3	214.7					
			S.D.	4.7	10.6	12.4					
			N	5	5	5					
G4	2000	Male	Mean	174.0	272.4	331.1					
			S.D.	4.2	11.4	14.3					
			N	5	5	5					
		Female	Mean	127.6	186.7	209.5					
			S.D.	4.6	9.2	6.9					
			N	5	5	5					

N : Number of animals, S.D. : Standard deviation, B.W. : Body weight

3) 육안적 부검소견

부검소견 결과, 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다(Table II-24).

Table II-24. Necropsy findings*

Findings	Group (mg/kg B.W.)							
	G1 (0)		G2 (500)		G3 (1000)		G4 (2000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5
External findings	No gross findings		No gross findings		No gross findings		No gross findings	
Internal findings	No gross findings		No gross findings		No gross findings		No gross findings	

B.W. : Body weight

II-7. 장기능개선 발효물에 대한 품질관리 지표설정 및 시험법 밸리데이션

I. 재료 및 방법

1) 시료 및 기기

(1) 결명자 발효물을 이용한 시료 준비

K2 균주를 이용한 결명자 발효물 29g과 부형제 271g 의 비율로 15ml의 물과 함께 혼합한 후 과립성형기를 이용해 과립을 제조하였다. 이렇게 제조된 과립을 건조기를 이용해 50℃에서 수분을 제거한 뒤 이를 시료로 하였다. 이렇게 준비된 시료는 400mg을 정밀히 칭량하여 methanol을 이용해 50ml volumetric flask에서 정용 및 추출한 뒤 이를 syringe filter를 이용해 필터하였으며, 이를 검체로 하였다.

(2) 표준용액 조제

K2 균주를 통해 발효시킨 결명자에서 함량의 증가를 보이는 MJ901617-1 (Auratio-obtusin)을 표준화합물로 하였다. MJ901617-1을 미세저울을 이용해 5mg을 정밀히 칭량하였으며, 이를 다시 100ml volumetric flask에서 methanol을 이용해 정용 및 용해한 뒤 이를 표준용액 (50ug/ml)으로 하였다. 이렇게 조제한 표준용액은 다시 methanol을 이용해 25, 10, 5, 3, 1ug/ml의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

(3) 시약 및 기기

시험법 밸리데이션에서 사용한 HPLC는 Prominence 20AD system (Shimadzu, Japan)이며, 20AD (binary) pump를 통해 이동상의 분석조건을 설정하였으며, 검출기는 diode array detector (DAD)를 이용해 200-400nm까지의 전파장 UV spectrum을 확인하고 이중 흡수 극대파장 288nm를 최종 선정하여 정량분석에 사용하였다. 시료의 주입은 SIL-20A autosampler를 이용해 10ul씩 주입하였으며, 이동상으로는 0.1% formic acid (A), acetonitrile (B)를 사용하였다. HPLC를 이용한 분석조건 설정은 지표성분의 분리도와 시료의 크로마토그램 등을 고려하여 결정하였으며, MJ901617-1의 UV 극대파장을 고려하여 detector의 파장을 결정하였다. 구체적인 분석조건은 다음과 같다.

Table II-25. HPLC analysis condition.

- Flow rate: 1.0ml/min
- Oven temp: 40℃
- Injection volume: 10 μL
- Column: Luna C-18 5 μm (4.6mm x 250mm, Phenomenex, USA)
- Detector: DAD (extraction wavelength: 288nm)
- Mobile phase:

Time	Mobile phase	
	A% (0.1% formic acid)	B% (Acetonitrile)
0	75	25
15	40	60
35	60	40
43	60	40
44	75	25
50	75	25

2) 특이성

MJ901617-1을 데시게이터에서 수분을 제거한 다음 정밀저울을 이용해 5mg을 칭량하여 100ml volumetric flask에 담았고, methanol을 이용해 정용하였다. 이를 HPLC를 이용해 Blank와 표준용액, 검체의 chromatogram을 확인하였으며, 이를 이용해 분리도를 측정하였다. 또한, 표준용액의 순도시험은 LC/MS를 사용하였으며, 각 물질의 TIC peak 및 불순물 peak와의 면적차이를 이용하여 순도를 결정하였다. 시험에 사용한 LC/MS의 분석조건은 다음과 같다.

Table II-26. LC/MS/MS analysis condition.

* UFLC condition

- Flow rate: 0.25ml/min - Oven temp: 40°C
- Injection volume: 1.0 μ L
- Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μ m (2.1mm x 100mm, Waters, USA)
- Detector: UVD (269nm), MSD (MCP)
- Mobile phase:

Time	Mobile phase	
	A% (0.1% formic acid)	B% (Acetonitrile)
0	100	0
15	88	12
20	40	60
23	40	60
25	100	0
30	100	0

* Mass analyzer condition

- Ion source: ESI, - Interface temp.: 200°C
- CDL temp.: 200°C, - Analyzer: IT-TOF -Detector: MCP

3) 직선성(Linearity)

지표성분 분석법의 검량선은 정량한계의 직선성 자료를 기반으로 작성하였다. 표준용액은 정량한계 시험에 사용된 표준액을 사용하였으며, 농도는 50, 25, 10, 5, 3, 1 μ g/ml로 하였다.

4) 정확성(Accuracy)

조제한 표준용액의 범위에서 최저, 중간, 최고 농도의 검액을 3반복 이상으로 제조 및 측정하여, 면적값의 상대표준편차가 5% 이내의 값을 가짐으로써 정확성을 분석하였다.

5) 정밀성(Precision)

(1) 반복성(repeatability)

MJ901617-1에 대한 직선성이 확인된 농도 범위에 맞는 표준액을 3농도에 대하여 3회씩 반복 실험함으로써 기준에 적합한지 평가하였다. 또한 시료 농도범위의 검출농도의 표준액을 6회 반복 측정하였다.

(2) 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

실내 정밀성을 확인하기 위해 서로 다른 시험자의 표준용액 범위 내의 최저, 중간, 최고 농도의 표준용액을 서로 다른 시험자가 동일한 농도의 표준용액을 조제하여 3농도에 대하여 6회씩 반복실험을 진행하였다.

6) 검출한계(Detection limit)

직선성 시험결과를 통해 측정된 값에 따라 $\sigma = 3259.41$ 과 $S = 54263.33$ 임을 확인하였으며, 이를 정해진 식에 대입한 결과 검출한계(DL)는 $0.198\mu\text{g/ml}$ 임을 확인하였다.

7) 정량한계(Quantitation Limit)

적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 확인하는 방법으로 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법을 통해 계산하였다.

8) 발효결명자를 이용한 제품의 MJ901617-1 함량분석

(1) 시료 및 표준용액 조제

이전 실험을 통해 확인된 시험방법을 통해 발효결명자를 이용해 조제한 검체에 대한 함량분석을 진행하였다. 부형제를 혼합하여 제작된 결명자 분말 400mg을 정밀히 칭량하여 50ml volumetric flask를 이용해 methanol을 이용해 정용 및 추출하였으며, 추출한 용액을 필터하여 검체로 하였다. 또한 MJ901617-1 5mg을 정밀히 칭량하여 100ml volumetric flask를 이용해 정용하여 용해하고, 이를 다시 희석하여 표준용액으로 하였다.

(2) 시약 및 기기

HPLC는 Prominence 20AD system (Shimadzu, Japan)이며, 20AD (binary) pump를 통해 이동상의 분석조건을 설정하였으며, 검출기는 diode array detector (DAD)를 이용해 MJ901617-1의 흡수 극대과장인 288nm에서 측정하였다. 또한 검체는 SIL-20A autosampler를 이용해 10ul씩 주입하였으며, 이동상으로는 증류수(A, 0.1% formic acid), acetonitrile (B)을 사용하였다. 구체적인 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

Table II-27. HPLC analysis condition.

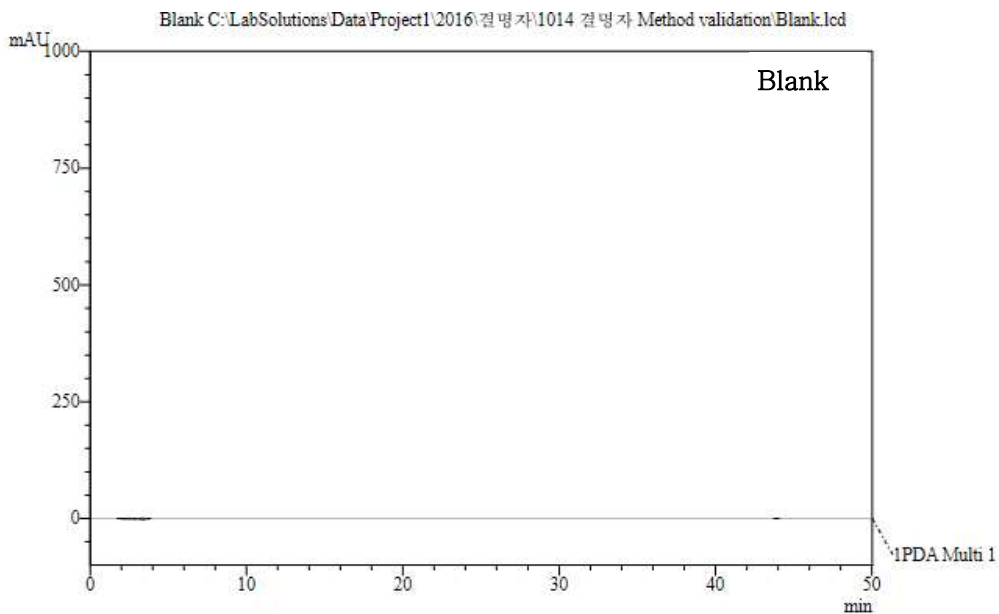
- Flow rate: 1.0ml/min - Oven temp: 40°C
- Injection volume: 10 μL
- Column: Luna C-18 5 μm (4.6mm x 250mm, Phenomenex, USA)
- Detector: DAD (extraction wavelength: 288nm)
- Mobile phase:

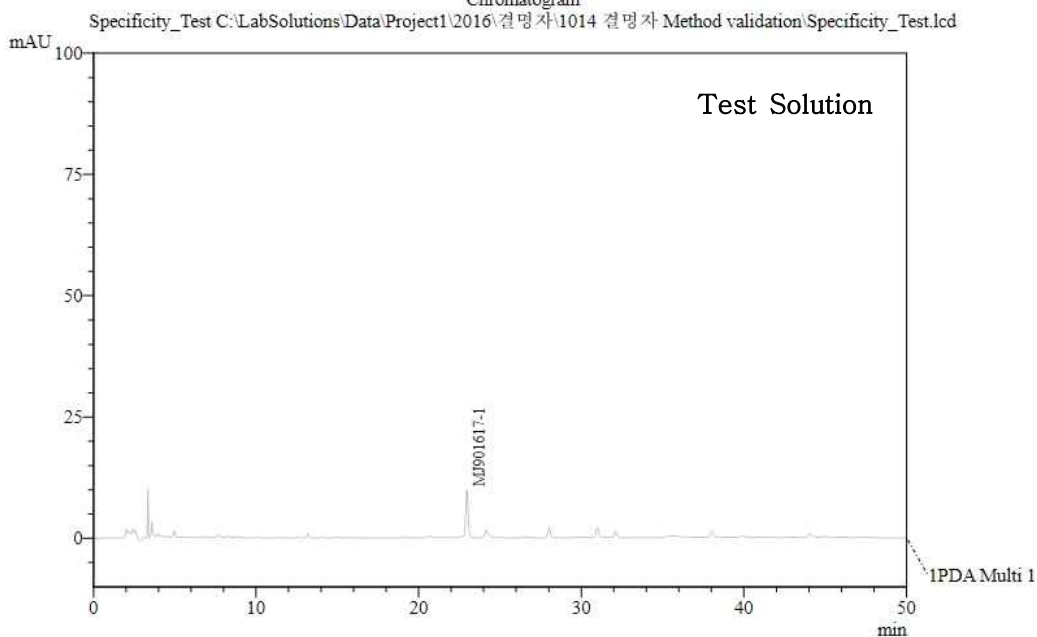
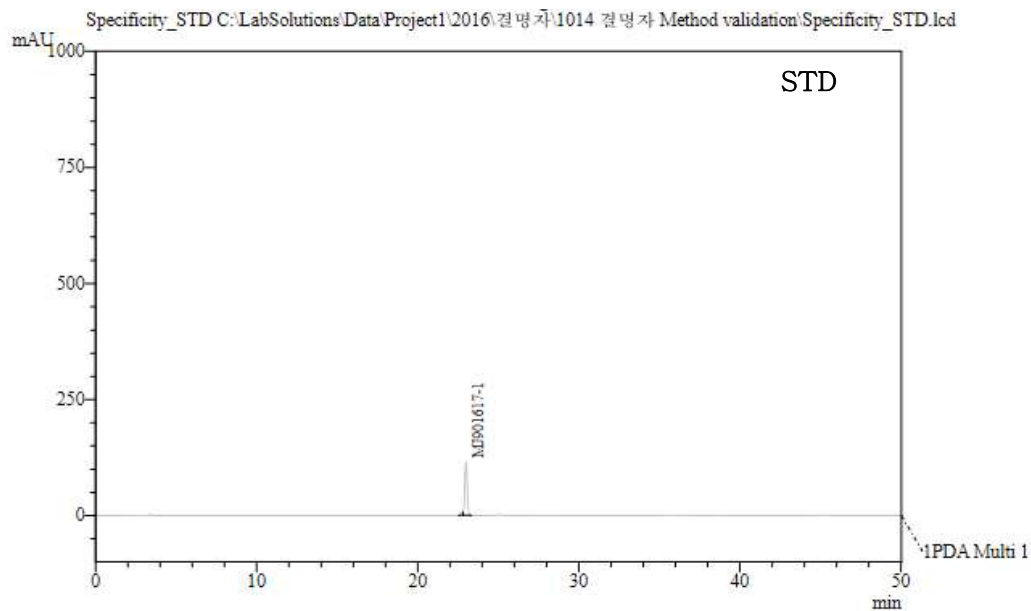
Time	Mobile phase	
	A% (0.1% formic acid)	B% (Acetonitrile)
0	75	25
15	40	60
35	60	40
43	60	40
44	75	25
50	75	25

II. 결과

1) 특이성

검체에서 MJ901617-1의 resolution(USP 기준)이 8.67인 것을 확인하였으며, 이는 식품 의약품안전처 밸리데이션 가이드라인에서 제시하고 있는 0.8 이상을 만족하는 것을 확인하였다. 지표성분인 MJ901617-1에 대한 순도는 실험결과 97%에 가까운 순도를 보여 주었다. 따라서 분리도 및 순도결과를 통해 특이성을 입증하였다.





1 PDA Multi 1 / 288nm 4nm

PeakTable

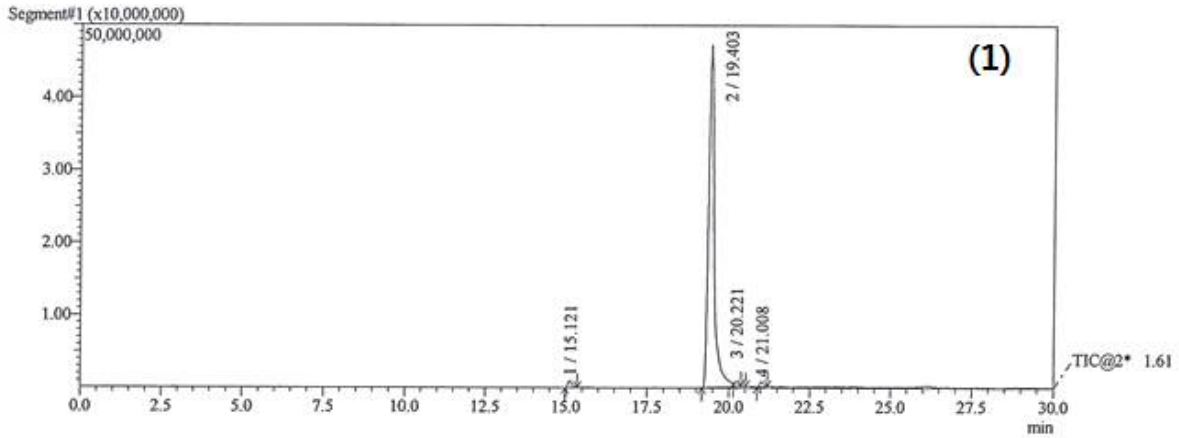
Name	Ret. Time	Area	Height	Area %	Resolution
	20.701	3292	414	2.673	0.000
MJ901617-1	22.960	98347	9592	79.861	8.675
	24.133	21508	1509	17.466	3.798
		123147	11514	100.000	

Fig. II -37. Chromatogram of Test solution for specificity.

Table II -28. Purity result of MJ901617-1.

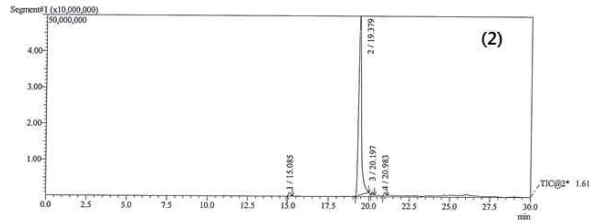
Compound Name	Purity(%)					Mean(%)
	1	2	3	4	5	
MJ901617-1	97.32	97.11	96.02	96.69	96.74	96.78

<Chromatogram>



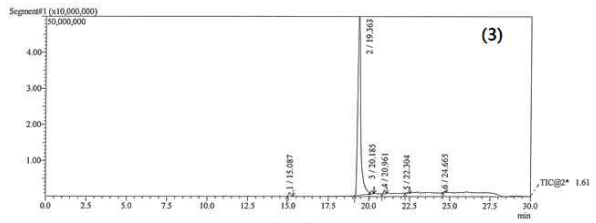
Peak#	Ret. Time	Peak Start	Peak End	Area	Area%	Name	Event#
1	15.121	14.973	15.360	5332588	1.42		1-2
2	19.403	19.173	20.527	365897161	97.32		1-2
3	20.221	20.133	20.380	1357823	0.36		1-2
4	21.008	20.873	21.187	3368105	0.90		1-2
Total				375955677	100.00		

<Chromatogram>



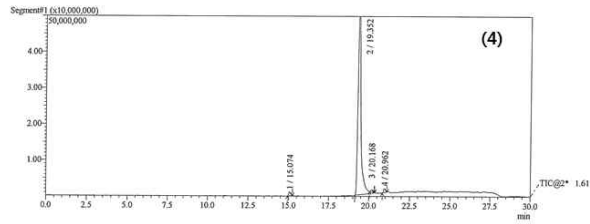
Peak#	Ret. Time	Peak Start	Peak End	Area	Area%	Name	Event#
1	15.085	14.953	15.273	5173828	1.35		1-2
2	19.379	19.193	19.667	372207383	97.11		1-2
3	20.197	20.115	20.347	2033054	0.53		1-2
4	20.983	20.853	21.120	3882704	1.01		1-2
Total				383399969	100.00		

<Chromatogram>



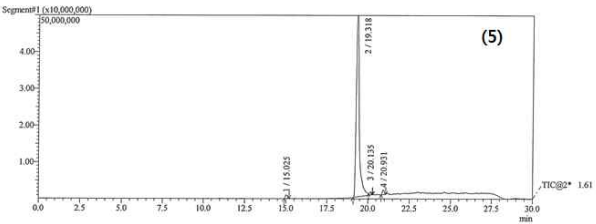
Peak#	Ret. Time	Peak Start	Peak End	Area	Area%	Name	Event#
1	15.087	14.940	15.327	5805270	1.38		1-2
2	19.383	19.133	20.333	404248222	96.02		1-2
3	20.185	20.047	20.315	5016077	0.86		1-2
4	20.961	20.807	21.113	4868993	1.16		1-2
5	22.304	22.277	22.527	1209767	0.30		1-2
6	24.665	24.567	24.927	1193605	0.30		1-2
Total				421000434	100.00		

<Chromatogram>



Peak#	Ret. Time	Peak Start	Peak End	Area	Area%	Name	Event#
1	15.074	14.900	15.260	5629112	1.30		1-2
2	19.332	19.140	20.360	41864050	96.69		1-2
3	20.168	20.040	20.313	3250273	0.75		1-2
4	20.962	20.877	21.113	4437034	1.26		1-2
Total				433189769	100.00		

<Chromatogram>



Peak#	Ret. Time	Peak Start	Peak End	Area	Area%	Name	Event#
1	15.025	14.893	15.207	5285855	1.21		1-2
2	19.318	19.100	20.500	422031570	96.74		1-2
3	20.135	20.003	20.373	2331613	0.53		1-2
4	20.931	20.793	21.087	6642362	1.52		1-2
Total				436263280	100.00		

Fig. II -38. MS chromatogram(TIC 2) and purity result (area%) of MJ901617-1 (n=5).

2) 직선성(Linearity)

MJ901617-1의 극대파장에 대한 chromatogram은 다음과 같다. 표준용액의 농도별 범위에서 0.9999 이상의 검량선 상관계수 (R2)로 양호한 직선성을 나타내었다.

Table II-29. Linearity result of MJ901617-1.

Level	Conc.	1 time	2 time	3 time	Mean Area	SD	%RSD
1	50	2673900	2744507	2758844	2725750.3	45472.3	1.7
2	25	1356389	1348478	1376471	1360446.0	14430.7	1.1
3	10	531065	542950	555399	543138.0	12168.1	2.2
4	5	270529	273683	280921	275044.3	5328.1	1.9
5	3	161691	166720	170229	166213.3	4291.5	2.6
6	1	54488	55052	55070	54870.0	330.9	0.6

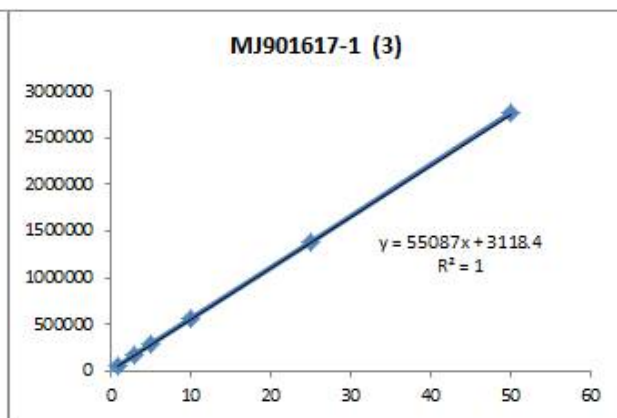
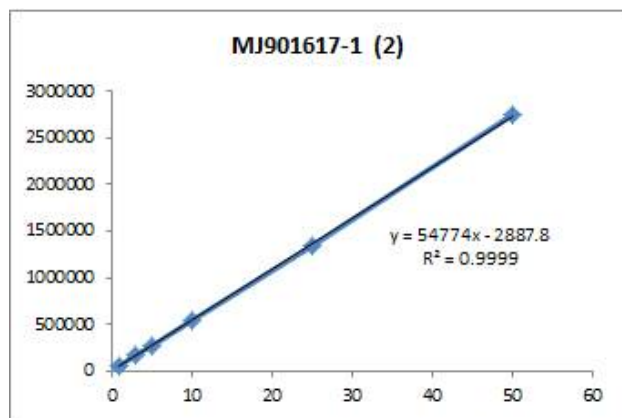
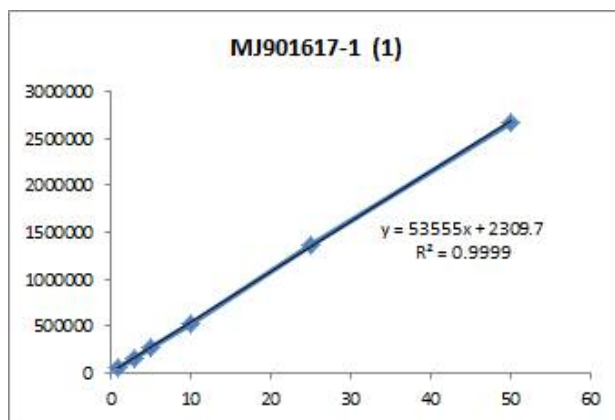


Fig. II-39. Calibration curve of MJ901617-1 solution.

3) 정확성(Accuracy)

시험에 사용한 1, 25, 50 ug/ml 농도의 표준용액의 3회 이상 반복실험 결과 표준편차 5%이내의 정확성을 보여주었다.

Table II -30. Accuracy result.

STD	이론값 (ug/ml)	이론값 보정농도 (ug/ml)	STD Peak Area	참값 (ug/ml)	회수율 (%)	Difference (%)
1	1.00	1.00	56730	1.03	102.99	0.00
			56085	1.02	101.80	0.02
			57970	1.05	105.27	0.02
			평균값	1.03	103.35	0.01
			표준편차	0.02	1.77	0.01
2	25.00	25.00	1337116	24.63	98.50	0.26
			1327325	24.45	97.78	0.08
			1303991	24.02	96.06	0.35
			평균값	24.36	97.45	0.23
			표준편차	0.31	1.25	0.13
3	50.00	50.00	2722339	50.15	100.31	0.45
			2773435	51.10	102.19	0.49
			2744231	50.56	101.11	0.04
			평균값	50.60	101.20	0.33
			표준편차	0.47	0.94	0.25

4) 정밀성(Precision)

직선성이 확인된 농도 범위 내에서의 반복성을 실험한 결과 3농도에 대한 6회 반복 상대표준편차가 1.0% 내외로 양호한 결과를 나타냈다. 또한 실험실내 정밀성 확인 결과, 총 평균에 대한 상대표준편차역시 1.0% 내외로 우수한 결과를 보여주었다.

Table II -31. Repeatability result.

Conc. (ug/ml)	Area						Mean	SD	%RSD
	1 time	2 time	3 time	4 time	5 time	6 time			
50	2767280	2780074	2778817	2784898	2762288	2850200	2787260	31977.33	1.15
25	1274514	1264695	1272906	1262183	1286370	1281736	1273734	9382.15	0.74
1	55594	55308	56164	56956	57075	57081	56363	789.70	1.40

Table II-32. Intermediate precision result of standard solution.

농도 (ug/ml)	Area		농도 (ug/ml)	Area		농도 (ug/ml)	Area	
	실험자 1	실험자 2		실험자 1	실험자 2		실험자 1	실험자 2
1	55594	56229	25	1274514	1257295	50	2767280	2803237
	55308	55917		1264695	1261853		2780074	2832693
	56164	56430		1272906	1268580		2778817	2813007
	56956	55675		1262183	1287888		2784898	2843341
	57075	55376		1286370	1285950		2762288	2846111
	57081	54903		1281736	1305692		2850200	2804547
평균	56363	55755	평균	1273734	1277876.33	평균	2787259.50	2823823
표준편차	789.70	562.58	편차	9382.15	18471.00	편차	31977.33	19332.45
RSD	1.40	1.01	RSD	0.74	1.45	RSD	1.15	0.68
총평균	56059.00		총평균	1275805.17		총평균	2805541.08	
표준편차	726.74		표준편차	14134.06		표준편차	31611.36	
RSD	1.30		RSD	1.11		RSD	1.13	

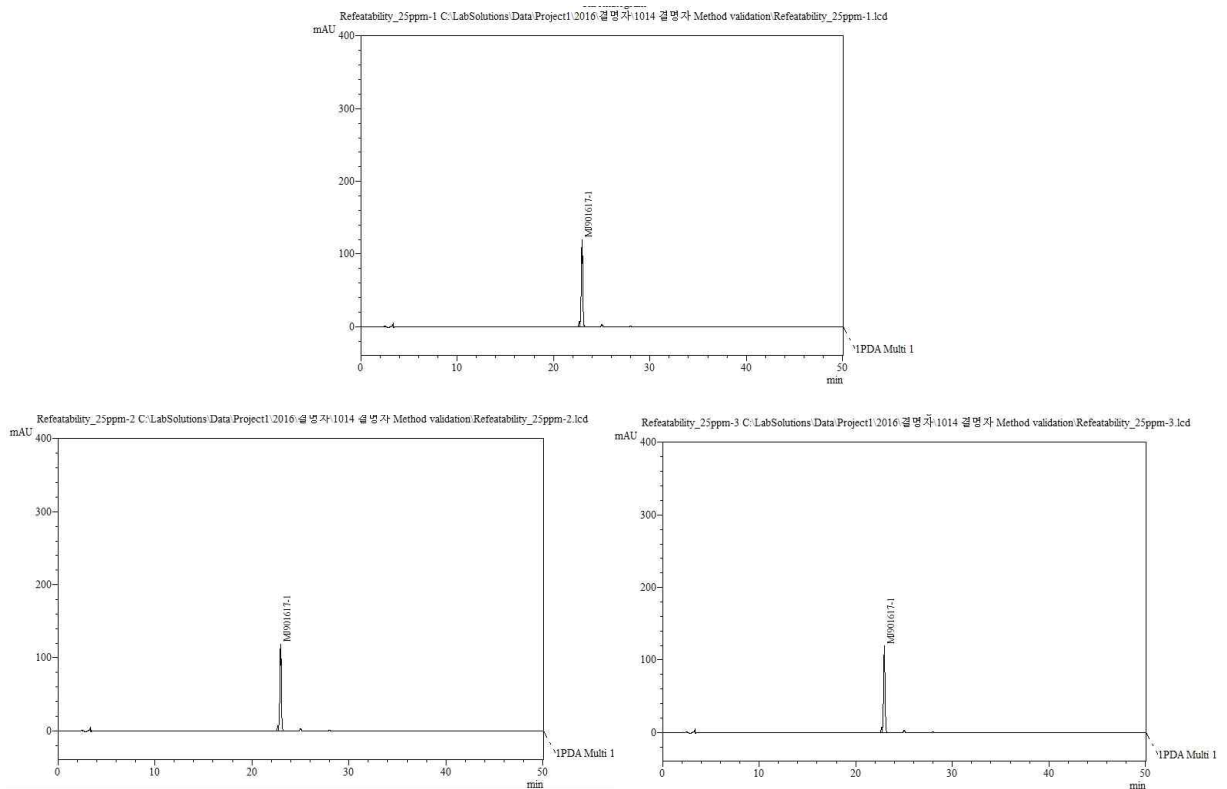


Fig. II-40. LC chromatogram of 25ppm STD solution for repeatability.

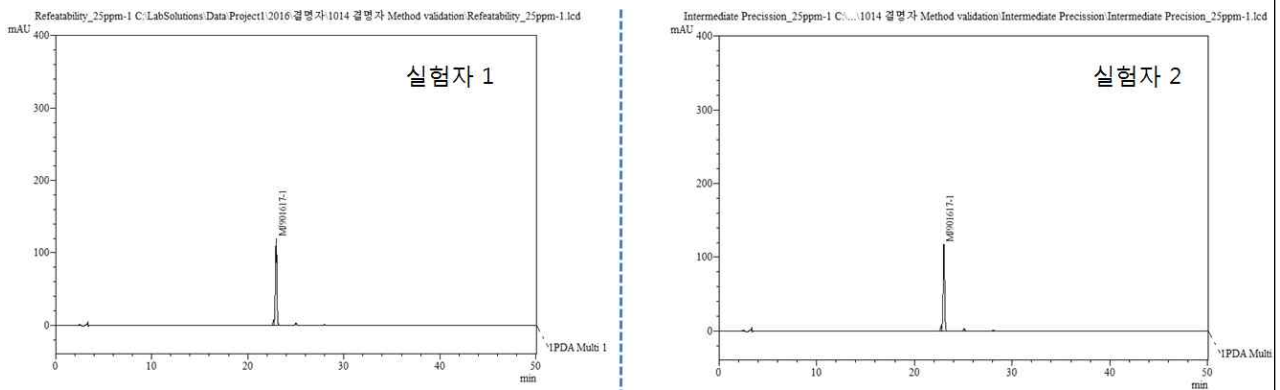


Fig. II -41. LC chromatogram of the different users for Intermediate precision.

5) 검출한계(Detection limit)

직선성 시험결과를 통해 측정된 값에 따라 $\sigma = 3259.41$ 과 $S = 54263.33$ 임을 확인하였으며, 이를 정해진 식에 대입한 결과 검출한계(DL)는 0.198ug/ml임을 확인하였다.

6) 정량한계(Quantitation Limit)

정량한계(QL)역시 $QL = 10 * \sigma / S$ 의 식에 대입하여 계산하였으며, $\sigma = 3259.41$ 과 $S = 54263.33$ 를 대입한 결과 정량한계(QL)은 0.601ug/ml임을 확인하였다.

Table II -33. Standard deviation of y-intercept and slope average data for calculating of Detection and Quantitation Limit.

	Slope	Intercept	Coefficients of Determination (R^2)
1 time	53555	2309.7	0.9999
2 time	54584	-2887.8	0.9999
3 time	54651	3118.4	1
Mean	54263.33	846.7667	0.9999
SD	614.35	3259.41	0.0001

7) 발효결명자를 이용한 제품의 MJ901617-1 함량분석

발효결명자 혼합분말을 위의 실험결과(특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계)를 토대로 HPLC를 이용한 함량분석을 진행하였으며, 분석결과 상대표준편차 1.24%로 MJ901617-1의 함량이 평균 2.27% 함유되어있음을 확인하였다. 따라서, 발효결명자의 장기능 개선 효능시험 농도를 기준으로 제조한 발효결명자 혼합물에는 평균 2.27%의 MJ901617-1이 함유되어있어야 한다.

Table II-34. Concentration of MJ901617-1 from fermentation *Cassia tora* L. mixture.

시료명	검체량 (mg)	area	농도 (ug/ml)	함량 (mg/g)	함량 (%)	평균 (%)	표준 편차	상대 표준 편차
발효결명자 혼합 분말	1	400.9	100594	1.84	0.23	2.29		
	2	400.2	98010	1.79	0.22	2.24	2.27	0.03
	3	400.5	99574	1.82	0.23	2.27		1.24

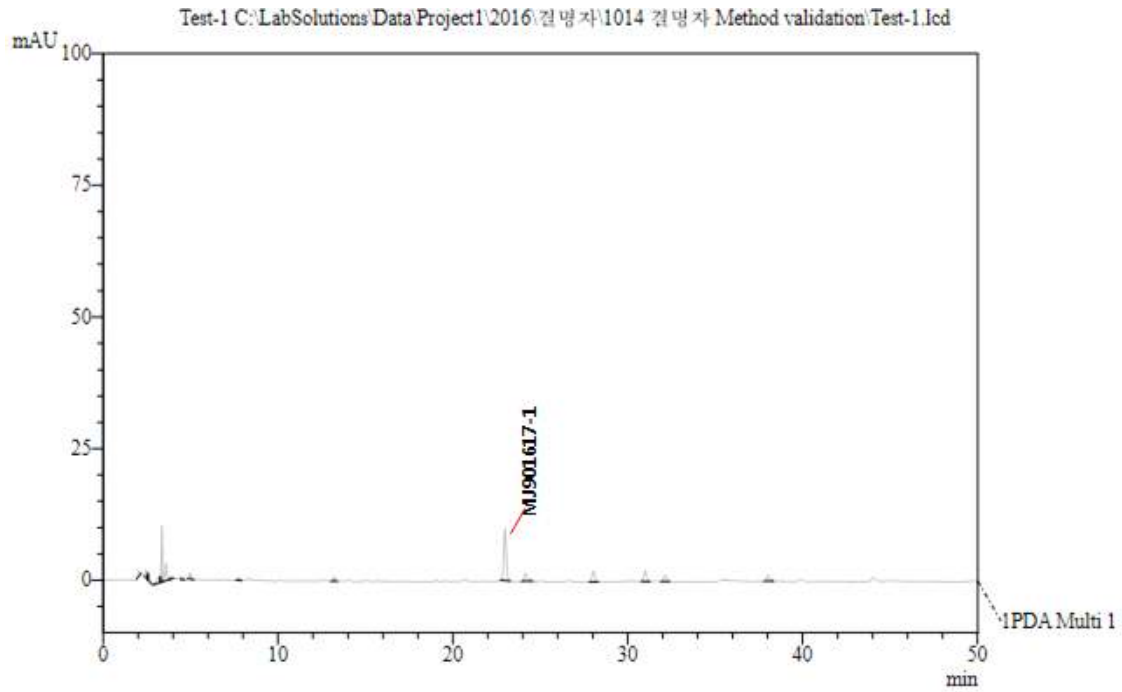


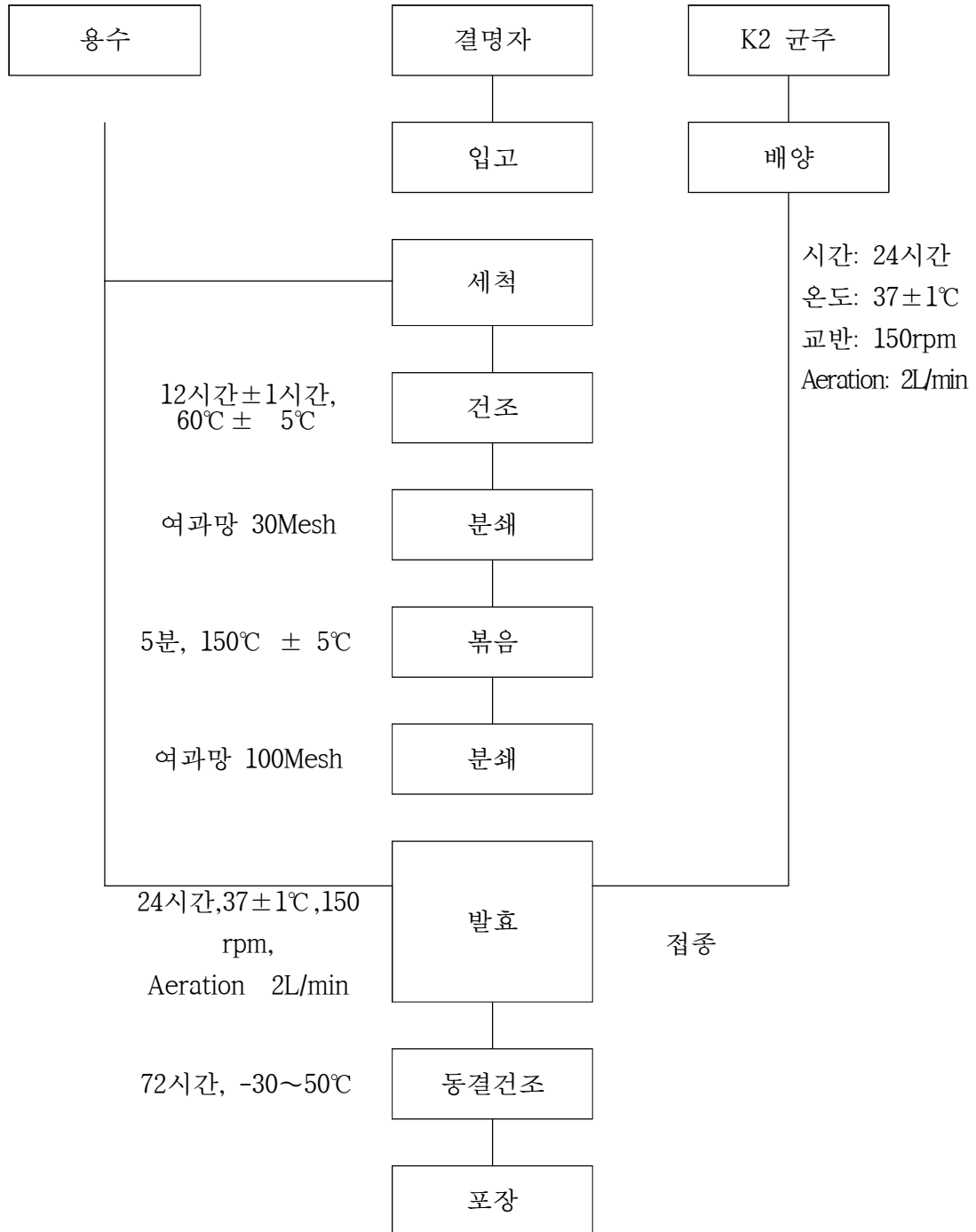
Fig. II-42. LC chromatogram of *Cassia tora* L. mixture.

II-8. 개발된 제형에 따른 시제품 생산

I. 재료 및 방법

1) 볶음결명자유산균발효분말(결명자발효분말) 제작 과정

볶음결명자유산균발효분말(결명자발효분말)을 도식화한 제작과정은 아래와 같다.



(1) 입고 및 세척

흐르는 물에 3회 세척하여 이물질을 제거한다.

(2) 건조

세척된 결명자를 열풍건조기를 이용하여 12시간±1시간, 60℃ ± 5℃ 로 건조한다.

(3) 분쇄

건조된 원료를 분쇄기(30mesh)를 이용하여 분쇄한다.

(4) 볶음

분쇄된 결명자를 볶음기에서 150℃ ±5℃, 5분간 볶는다.

(5) 2차 분쇄

볶은 원료를 건식분쇄기(30~140mesh, 성장기계)에서 100mesh 분쇄망을 이용하여 분쇄한다.

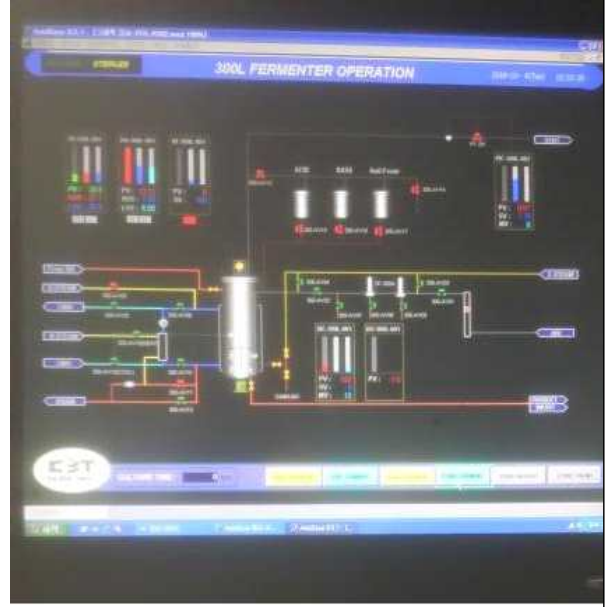


(6) 발효

2차 분쇄된 볶음결명자를 3차 증류수 대비 3% 증류수와 혼합하여 121℃, 15분 고압멸균한다. 충분히 식히고 미리 MRS 배지에서 37℃, 150rpm으로 24시간 동안 *Lactobacillus casei* K2 균주로 진탕배양한 seed를 3% 접종한다. 그리고 37℃, 150rpm, 2L/min aeration 조건으로 24시간 동안 발효한다. 완료되면 다시 121℃, 15분 고압멸균하여 균을 사멸한다.



300L 발효조



300L 발효조 operator

(7) 동결건조

동결건조기(PVTFD100R, 일신바이오)를 이용하여 발효물을 아래와 같이 72시간 건조 하였다.

온도(℃)	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	50
시간(min)	360	240	240	180	180	120	120	120	999



동결건조기 100L







발효 후 동결건조물

2) 시제품 제작

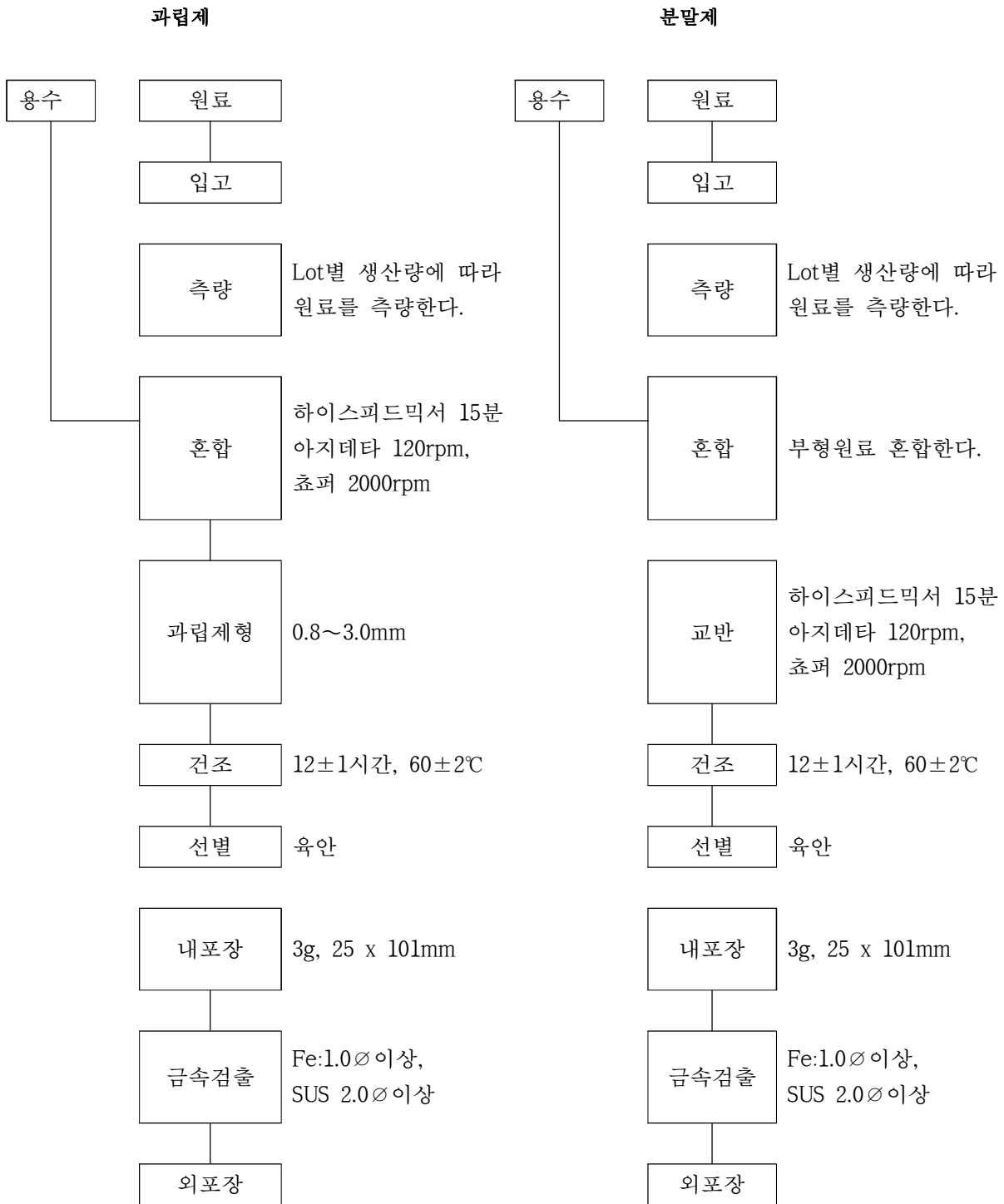
(1) 원료 혼합 - High speed mixer

하이스피드믹서(KM450, KeumSung)를 이용하여 프락토올리고당을 제외하고 동결건조한 볶음결명자유산균발효분말과 난소화성말토덱스트린(화이바줄, 대상, 국내산), 치커리추출물분말(WHANEE, 벨기에), 차전자피분말(대한제당, 인도산), 볶음쌀분말(맑은들(주), 국내산), 혼합유당(유당95, 성풍양행)을 아지데타120rpm, 초퍼 2000rpm 속도로 15분간 교반하였다.

	
하이스피드믹서	배합원료 회수
	
볶음결명자유산균발효분말	부형원료 6종 혼합 후의 분말

(2) 과립 및 분말 성형

과립제형과 분말제형의 시제품을 생산하는 과정은 아래와 같다.



(3)-1 과립 성형 및 건조

부형원료가 혼합된 분말은 역회전과립기를 이용하여 과립화(0.8~3.0cm) 한다. 이 때, 반죽을 위해 혼합하는 물에 프락토올리고당을 첨가한다. 과립형성 후, 60℃에서 12시간 열풍건조한다.



(3)-2 분말 제형 건조

분말 제형은 하이스피드믹서 교반 시 프락토올리고당을 첨가한다. 교반 후 60℃에서 12시간 열풍건조한다.

(4) 과립 및 분말 선별

과립과 분말은 육안으로 이물질을 확인하고 제거한다.

(5) 3g 스틱 내포장

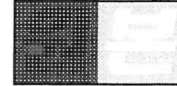
건조된 과립과 분말은 STICK PACKAGING M/C(진성파마텍)을 이용하여 3g 씩 스틱 포장한다.



3) 품목제조보고

(1) 볶음결명자유산균발효분말(결명자발효분말)

발급번호 : 1200-BHS2-9YMO-0AVF-RB1Z



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 황상덕	개인정보		
	주소 전라남도 해남군 농공단지길 37			
영업소	명칭(상호) 명정식품			
	소재지 전라남도 해남군 농공단지길 37			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업등록번호	20010523220
	제품명	결명자발효분말		
	유통기한	제조일부터 2년		
	품질유지기한	제조일부터 2년		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	폴리에틸렌(PE) 밀봉포장, 100g, 200g, 500g, 1kg, 5kg		
	성상	결명자 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없음		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [○]해당 없음		
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2016년 10월 25일

보고인 황상덕

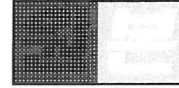
전라남도 해남군수 귀하

품목보고번호	20010523220-65				
처리부서	문화관광과	처리자성명	주형천	처리일자	2016년 10월 28일



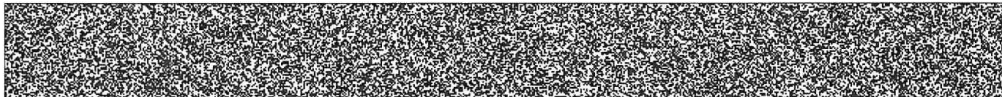
본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 120Q-8HS2-9YMO-ØAVF-R81Z



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	볶은결명자 [락토바실러스발효]	100%

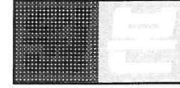
용도용법	식품보조용 1일 1회 1회 3g씩 섭취
보관방법 및 포장재질	실온 폴리에틸렌(PE)



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

(2) 분말 시제품(땅의보감분말 시제품)

발급번호 : 1200-CHZ2-JYE0-3ARF-PG40



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)			개인정보
	황상덕			
	주소			
	전라남도 해남군 농공단지길 37			
영업소	명칭(상호)			
	명정식품			
	소재지 전라남도 해남군 농공단지길 37			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업등록번호	20010523220
	제품명	땅의보감분말 시제품		
	유통기한	제조로부터 2년		
	품질유지기한	제조로부터 2년		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	충진 후 실링, 3g		
	성상	연노랑 색택을 가지고 이미 이취가 없어야 한다.		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [○]해당 없음		
기타				

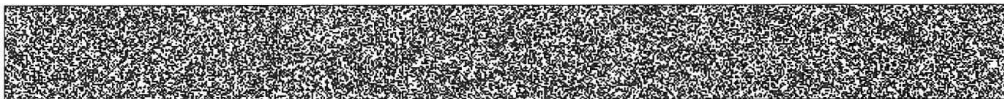
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2016년 10월 25일

보고인 황상덕

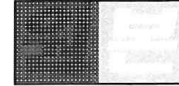
전라남도 해남군수 귀하

품목보고번호	20010523220-64				
처리부서	문화관광과	처리자성명	주형천	처리일자	2016년 10월 28일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1200-CH22-JYE0-3ARF-PG4Q



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	난소화성말토덱스트린(고시형)	55.01%
2	볶은결명자 [락토바실러스 발효]	9.67%
3	쌀분말 [볶음쌀분말]	8.33%
4	치커리추출분말 [벨기에산]	8.33%
5	차전자피식이섬유(고시형) [인도산]	8.33%
6	액상프락토올리고당(고형분기준 55%)(기능성원료 인정 제 2008-75호)	7%
7	유당혼합분말	3.33%

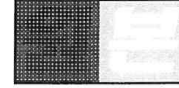
용도용법	식품보조용 1일 1회, 1회 3g(1포)씩 섭취
보관방법 및 포장재질	직사광선을 피하고 실온에 보관 폴리에틸렌(PE)



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

(3) 과립 시제품(땅의보감과립 시제품)

발급번호 : 12RQ-TH52-XYF0-FAXF-50AX



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	개인정보		
	황상덕			
	주소			
	전라남도 해남군 농공단지길 37			
영업소	명칭(상호)			
	명정식품			
	소재지	전라남도 해남군 농공단지길 37		
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업등록번호	20010523220
	제품명	땅의보감과립 시제품		
	유통기한	제조일부터 2년		
	품질유지기한	제조일부터 2년		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	PE 밀봉 포장, 3g		
	성상	연노랑 색택을 가지고 이미 이취가 없음		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [O]해당 없음		
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2016년 10월 25일

보고인 황상덕

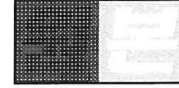
전라남도 해남군수 귀하

품목보고번호	20010523220-66		
처리부서	문화관광과	처리자성명	주형천
		처리일자	2016년 10월 28일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 12RQ-TH52-XYFO-FAXF-50AX



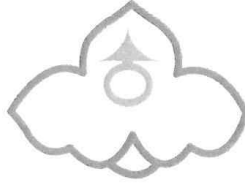
원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	난소화성말토덱스트린(고시형)	55.01%
2	볶은결명자 [락토바실러스 발효]	9.67%
3	쌀분말 [볶음쌀분말]	8.33%
4	치커리추출분말 [벨기에산]	8.33%
5	차전자피식이섬유(고시형) [인도산]	8.33%
6	액상프락토올리고당(고형분기준 55%)(기능성원료 인정 제 2008-75호)	7%
7	유당혼합분말	3.33%

용도용법	식품보조용, 1일 1회, 1회 3g씩(1포) 섭취
보관방법 및 포장재질	직사광선을 피하고 실온 보관 폴리에틸렌(PE)



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

(4) 영업등록증



제 47 호



영 업 등 록 증

법 인 명 : 해남자연농업영농조합 법 인 번 호 : 201436-0002852
 대 표 자 : 황상덕 주민등록번호 : 500207-*****
 영업소명칭 : 명정식품
 소 재 지 : 전라남도 해남군 옥천면 농공단지길 37

영업장면적 : 116.82㎡
 영업의종류 : 식품제조·가공업 (영업의형태:식품제조가공업)
 식품의종류 : 식품별기준및규격외의일반가공식품, 과자류 (개정), 다류 (개정), 음
 료류 (개정), 정류 (개정), 기타식품류 (개정), 규격외일반가공식품 (개
 정)
 조 건 : 법 제44조 및 동법시행규칙 제57조에 규정된 준수사항을 이행하
 고 기타 신고권자의 지시사항을 이행해야함.

식품위생법 제37조제5항, 같은 법 시행령 제26조의2
 및 같은 법 시행규칙 제43조의2제2항에 따라 위와 같이
 등록하였음을 증명합니다.

2001년 12월 05일




해 남 군



4) 영양성분 분석

본 기술개발의 핵심 원료인 볶음결명자유산균발효분말(결명자발효분말)과 분말 시제품, 총 2종에 대한 (1)열량, (2)탄수화물, (3)조단백질, (4)조지방, (5)나트륨, (6)당류, (7)포화지방산, (8)트랜스지방, (9)콜레스테롤, (10)식이섬유 영양성분 함량을 분석 의뢰하였다. 분말제만 분석 의뢰한 이유는 분말제와 과립제의 혼합비가 동일하기 때문이며 추후 완제품 개발이 완료되면 완제품에 대한 영양성분 분석을 추가 진행할 계획이다. 이의 분석은 한국식품과학연구원에 의뢰하였다.

(1) 볶음결명자유산균발효분말(액상발효)

<div style="text-align: center;">   </div> <div style="text-align: center;"> 시 험 성 적 서 </div>					
일련	제 20324 호				
검 체 명	볶음결명자유산균발효분말				
회 사 명	해남자연농업농조합법인	대 표 자	최상덕		
주 소	전라남도 해남군 옥천면 농공단지길 37 (병성식품, 해남자연농업농조합법인)				
시험항목	열량 외 8종목		의뢰목적	참고용	
제조번호		제조일자	유통기한	접수일자	2016. 10. 27
귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.					
의뢰.....결핵의 분말량 열량(kcal).....273.7(100g당) 탄수화물(%).....89.1 조단백질(%).....19.8(실수계수 0.25) 조지방(%).....4.9 나트륨(mg/100g).....291.68 당류(g/100g).....1.9 포화지방산(g/100g).....1.3 트랜스지방(g/100g).....0.01 콜레스테롤(mg/100g).....2.01 식이섬유(%).....56.11 끝					
2016년 11월 03일					
한국식품과학연구원 					
이 성적은 제출된 견본에 한하며, 의뢰목적 이외의 성분, 신장 등 상임종 및 지가품질검사용으로 사용할 수 없음.					

(2) 결명자발효시제품 분말(땅의보감분말 시제품)



일반 제 20325 호 <h2 style="text-align: center;">시 험 성 적 서</h2>							
검 체 번	결명자발효시제품 분말						
회 사 명	해남자연농업인능조합법인	대 표 자	홍성덕				
주 소	전라남도 해남군 목천면 농공단지길 37 (방송식품, 해남자연농업인능조합법인)						
시험항목	일반 외 9항목			의뢰목적	검고음		
제조번호		제조일자		유통기한		검수일자	2016.10.27
귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.							
외관.....연갈색의 분말임 열량(kcal).....300.2(100g당) 탄수화물(%).....88.1 조단백질(%).....2.3(질소계수 8.25) 조지방(%).....0.4 나트륨(mg/100g).....47.15 당류(g/100g).....5.5 포화지방산(g/100g).....0.1 트랜스지방(g/100g).....0.00 콜레스테롤(mg/100g).....불검출 식이섬유(%).....32.5 검							
2016년 11월 09일 <h3 style="text-align: center;">한 국 식 품 과 학 연 구 원 장</h3>							
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 다른 선전 등 상권경 및 자기품질검사용으로 사용할 수 없음							



- 3차년도 (2016.12.19.~2017.12.18.)

Ⅲ-1. 원재료 결명자의 품질검사

I. 재료 및 방법

1) 성상 및 한약재 품질검사

국내산 결명자를 구입하여 사용하였다. 성상확인을 위해 대한민국 약전에 고시된 결명자의 특징을 현미경을 사용하여 비교·확인하였다. 사용한 현미경은 다기능 줌 현미경 (Nikon AZ100)을 사용하였으며, 0.5배 확대경을 사용하였다. 한약재 품질검사는 한국식품과학연구원에 검사 의뢰하여 확인하였다.

2) 결명자의 주요성분 Emodin 유무 확인

결명자의 기원감별을 위한 확인시험을 실시하였다. 결명자의 주요 성분인 Emodin의 유무 확인을 위해 LC/MS를 이용한 정성분석을 진행하였다.

표준용액은 Emodin 2mg을 정밀히 칭량해 10ml MeOH에 용해시켜 사용하였으며, 검액으로는 결명자 300mg을 10ml 용량플라스크를 이용해 MeOH상에 추출하여 사용하였다.

시험에 사용한 장비는 LC-ESI-IT-TOF MS (shimadzu prominence UFLC-IT-TOF MS system, Shimadzu, Japan)이며, 고정상은 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 150mm, 1.7um)를 사용하였다. 유속은 0.21ml/min으로 하였으며, 이동상으로는 Solvent A (Water in 0.1% formic acid), Solvent B (Acetonitrile)를 사용하였으며, 이동상의 조건은 다음과 같다.

Time (min)	Solvent B(%)
0	5
20	60
24	60
25	5

이동상을 통과한 성분에 대하여 Nebulizing gas의 유속은 1.5L/min, CDL 및 Heat Block의 온도를 200°C로 하여 이온화 된 성분의 이동한 거리에 따른 시간(Time Of Flight)을 이용해 분자량을 측정하였다. Collision gas energy는 50%이며, mass 분석 범위는 m/z 100 에서 1000, Ion accumulation time은 150msec로 설정하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 성상

대한민국 약전	관측결과
이 약은 씨로 짧은 원기둥모양이며 비교적 작고. 길이 3 ~ 5mm, 너비 2 ~ 3mm이다. 바깥쪽의 능선은 양쪽에 각각 폭이 넓고 연한 황갈색의 띠가 한 줄씩 있다.	현미경을 이용한 관측한 종자는 갈색이며, 황갈색의 띠가 한줄씩 있다. 무작위로 선별한 종자 10립의 평균 길이는 4.8mm이며, 너비는 3.1mm 이다.

Table III-1. Length and breadth of *Cassia tora* L. seeds.

NO.	시료명	길이(um)	너비(um)
1	결명자1	5009.92	3436.10
2	결명자2	5083.29	3428.22
3	결명자3	4232.01	3288.94
4	결명자4	4738.62	2600.87
5	결명자5	4162.40	2736.21
6	결명자6	4615.32	3400.82
7	결명자7	4234.41	2709.30
8	결명자8	5095.31	3494.35
9	결명자9	5220.52	2800.01
10	결명자10	5372.95	3071.91
	평균	4776.475	3096.673



Fig. III-1. Microscopic photograph of *Cassia tora* L. Seeds.

2) 한약재 품질검사

한국식품과학연구원의 분석결과, 카드뮴을 제외하고 모두 불검출임을 확인하였다. 카드뮴의 일일섭취량은 $3.0\mu\text{g}$ 으로 결명자는 $0.05\text{mg/kg}(=0.05\mu\text{g/g})$ 이기 때문에 하루 60g의 대용량을 섭취해야 일일섭취량과 같음을 확인하였으며 실제 완제품 사용량은 0.5 ~ 1g, 향후 예상섭취량은 1~5g이기 때문에 안전성에 문제가 없음을 최종 확인하였다.



일반 제 11941 호

시험 성적서

검체명	결명자 원료		
회사명	한약진흥재단	대표자	신흥묵
주소	전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288		
시험항목	납 외 11항목	의뢰목적	제출용
제조번호	제조일자	유통기한	접수일자 2017.07.28

귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

외관	갈색의 고형물임
납(mg/kg)	불검출
비소(mg/kg)	불검출
카드뮴(mg/kg)	0.05
수은(mg/kg)	불검출
이산화황(g/kg)	불검출
총아플라톡신(B1,B2,G1및G2의 합)(µg/kg)	불검출
비에치시(mg/kg)	불검출
디디티(mg/kg)	불검출
알드린(mg/kg)	불검출
디엘드린(mg/kg)	불검출
엔드린(mg/kg)	불검출
엔도설판(mg/kg)	불검출

2017년 08월 11일

한국식품과학연구원



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

3) 결명자의 주요성분 Emodin 유무 확인

LC/MS를 이용한 분석결과는 다음과 같다.

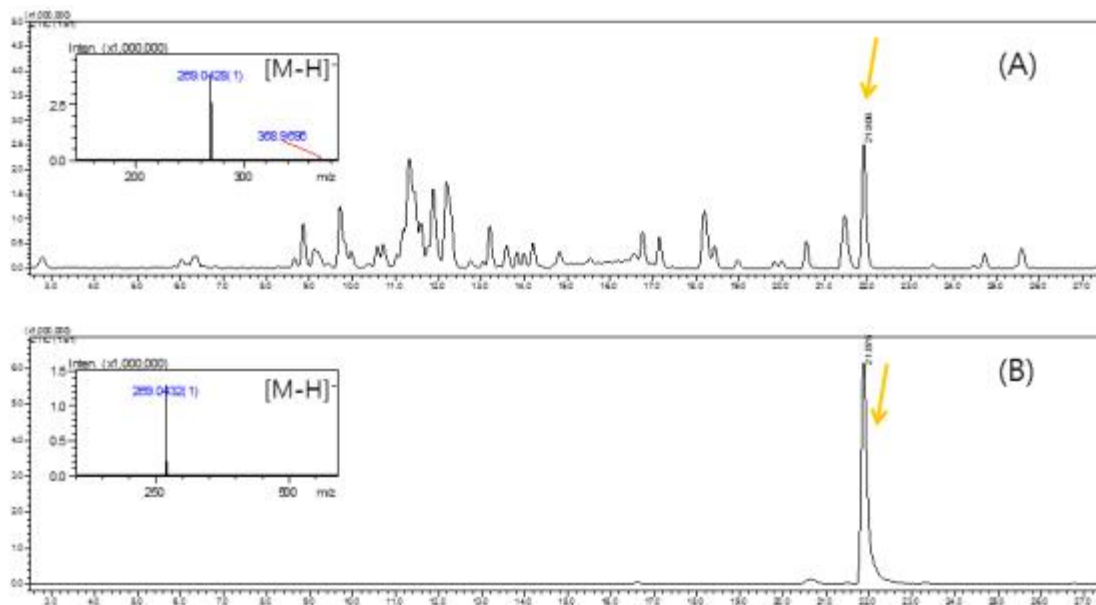


Fig. III-2. Chromatogram of *Cassia tora* L. (A: Extraction, B: Emodin, TIC data)

추출물과 표준품의 TIC(Total Ion Chromatogram)를 비교한 결과 21.90의 머무름 시간에서 동일한 peak를 확인하였으며, 두 data에서 모두 m/z 269.04 [M-H]-의 동일한 분자량을 확인하였기 때문에 대한민국 약전에 등재된 결명자의 지표성분 확인에 따른 기준에 적합함을 최종 확인하였다.

III-2. 결명자발효분말의 제조공정 표준화 확립

2-1. 생산 원가 비교를 통한 발효형태 변화

기존 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 원료들과의 단가 경쟁력 확보를 위해 발효 방법을 기존 증류수 대비 조분쇄 결명자 3% 함유(w/w)한 액상발효에서 증탕 후 발효하는 고체발효로 발효 방법 및 세부공정을 변화하였다.

2-2. 고체발효 결명자발효분말 대량생산

변화된 고체발효 공정으로 대량생산을 진행하고 CFU/ml 함량 변화를 확인하여 발효 유무를 확인하였다.

2-3. 핵심공정별 지표성분 함량 변화 및 수율 확인

대량생산공정 중 지표성분 변화가 예상되는 4가지 핵심공정에 대한 3Lot 지표성분 함량 변화와 수율을 확인하여 대량생산공정 표준화를 확립하였다.

2-4. 시험법 설정 및 시험법밸리데이션 재설정

대량생산한 결명자발효분말을 이용하여 시험법밸리데이션을 재진행하고 지표성분 시험법을 최종 설정하였다.

2-5. 고체발효 결명자발효분말의 품목제조보고

생산공정이 변화됨에 따라 결명자발효분말의 기존 품목제조보고에서 제조방법 설명서를 수정하여 품목제조보고를 변경하였다.

1) 발효 공정별 생산 원가 비교 - 조분쇄 액상발효와 고체발효

본 사업의 핵심원료인 결명자발효분말은 장기능개선 관련 기능을 가지는 원료이기 때문에 원활한 판매를 위해서는 주로 사용되는 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 원료들과 가격경쟁력 측면에서 경쟁이 되어야 한다. 하지만 액상발효한 결명자발효분말은 생산공정에서 고체발효한 결명자발효분말과는 달리 발효를 위한 대형발효조 사용과 건조를 위한 농축기 또는 동결건조기를 사용해야하며 액상발효는 증류수 대비 결명자가 3%만 혼합되기 때문에 생산 원가가 고체발효에 비해 약 5배 이상 높은 수준이다(Table III-2). 비록 액상발효는 외부위탁으로 진행하고 고체발효는 본사에서 진행하는 차이가 있지만 ①5ton 대형발효조와 1.5ton 및 1ton 감압농축기 사용에 따른 높은 장비 사용단가 ②1회 생산소요일 2배 이상 차이만으로도 액상발효의 비용이 높고 효율이 낮음을 확인할 수 있다. 실제 공정별 액상발효(농축)와 고체발효를 통한 결명자발효분말 가격은 고체발효가 액체발효의 21.15% 수준이다(Table III-3). 따라서 기존 액상발효 공정이 아닌 고체발효 공정으로 변경하여 진행하였다.

Table III-2. Fermentation per process *Cassia tora* L. fermentation powder 180kg production cost comparison.

(단위 : 원)

발효방법	결명자발효분말(액상발효) 180kg 생산 발효+건조 장비사용료		결명자발효분말(고체발효) 180kg 생산 발효+건조 장비사용료	
발효과정	A. 5,000L 발효조 (3,000L/5,000L) (결명자 90kg/회)	834,000/일 x 4 = 3,336,000	E. 발효실 (본사, 320kg/회)	480,000 x 1 = 480,000
건조과정 (농축)	B. 1차 농축기 6회 (1,000L/1,500L)	286,000 x 6 = 1,716,000	F. 열풍건조실 (본사, 350kg/회)	350,000 x 2 = 700,000
	C. 2차 농축기 2회 (600L/1,000L)	460,000 x 2 = 920,000		
합계 (A+B+C)		5,972,000		
건조과정 (동결)	D. 동결건조기 12회 (500L, 1.5일/회)	400,000/일 x 18 = 7,200,000		
합계 (A+D)		10,536,000	합계 (E+F)	1,180,000
kg당 원가	액상발효+농축기	33,178	kg당 원가	6,556
	액상발효+동결건조기	58,534		
생산 소요일 (발효+건 조)	액상발효+농축기	4+2 = 6일	생산 소요일 발효+건조	1+2일 = 3일
	액상발효+동결건조기	4+18 = 22일		

Table III-3. Comparison of the price of *Cassia tora* L. seed fermentation powder according to changes in fermentation process.

항목	내용	결명자발효분말 액상발효 (발효+농축 외부)		결명자발효분말 고체발효 (자사)	
		가격(180kg)	가격(kg)	항목	가격(kg)
0. 원물가	결명자 1회 90kg	900,000	5,000	0. 원물가	5,000
1. 세척가	본사 세척기	90,000	500	1. 세척가	500
2. 건조가	본사 열풍건조기	90,000	500	2. 건조가	500
3. 분쇄가	본사 분쇄기	216,000	1,200	대외비	5,800
4. 볶음가	본사 볶음기	180,000	1,000		
5. 발효가	Seed(90L/150L), 2회 279,400원/회	558,800	3,104		
	5ton(3,000L/5,000L) 결명자 90kg/회, 2회 1,668,000원/회	3,336,000	18,534		
	MRS 배지, 55g/L, 2회, 92,000원/500g (90Lx55g/500*92,000)	1,821,600	10,120		
6. 농축가	1차 1,000L/1,500L 3x2회, 858,000/3반복	1,716,000	9,534		
	2차 600L/1,000L 2회, 460,000/회	920,000	5,111		
7. 분쇄가	본사 분쇄기	216,000	1,200		
합계		10,044,400	55,803	합계	11,800

2) 발효 공정별 결명자발효분말과 고시형 원료의 도매가 비교

주로 사용되는 고시형 원료 프로바이오틱스, 난소화성말토덱스트린, 차전자피식이섬유, 알로에아보레센스분말, 이눌린식이섬유의 도매가와 결명자발효분말-액상발효, 결명자발효분말-고체발효의 원가를 비교한 결과, 고체발효한 결명자발효분말의 가격 경쟁력이 액상발효한 결명자발효분말에 비해 우수하고 기타 고시형 원료들과도 경쟁력이 있음을 확인하였다(Table III-4).

Table III-4. *Cassia tora* L. fermentation powder of fermentation per process and notification and individual acknowledgment ingredient a wholesale price comparison.

원료명	국내 판매처 및 수입처	판매가 (원/kg)	일일섭취량	일일섭취량당 도매가 비교
프로바이오틱스	국내판매처: 쉐바이오텍, 메디오젠 수입처: 한독 등	650,000 (2,000억마리) 메디오젠기준	1억~100억/g마리 30억투입시, 1~2억생존	9.8원(1억)~975원(100억) 30억투입기준(섭취1억)
난소화성말토덱스트린	수입판매처: 대상 수입: 한국마쓰다니	11,550	2.5~30g 식이섬유85%, 3g투입	34.7원(3.0g)
차전자피식이섬유	수입판매처: 바렌츠코리아 수입: 대한제당	15,500	3.9g 이상	60.5원(3.9g)
알로에아보레센스분말	녹십초, 김정문알로에, 미래바이오텍 등	국내산 건조잎 32,000 수입산 28,000	무수바바로인 20~30mg 국내산 8.5mg/g 남아프리카산 30mg/g	국내산 76.8원(2.4g) 수입산 28.0원(1.0g)
이눌린식이섬유	브렌탁코리아	11,000	6.4g 이상	70.4원(6.4g)
결명자발효분말(액상발효)	해남자연농업 영농조합법인	55,800	1~5g (예상섭취량)	55.8원(1g)~551원(5g) *원가
결명자발효분말(고체발효)	해남자연농업 영농조합법인	11,800	1~5g (예상섭취량)	11.8원(1g)~59.0원(5g) *원가

3) 고체발효 결명자발효분말 대량생산

I. 재료 및 방법

(1) 생산 세부공정

세부공정은 Table III-5 과 같이 고체발효공정으로 변경하여 진행하였다(세부공정 대외비).

Table III-5. Liquid fermentation and solid fermentation of production process comparison.

결명자발효분말 생산 공정 - 액체발효	결명자발효분말 생산 공정 - 고체발효
1. 원재료 입고	1. 원재료 입고
2. 세척	2. 세척
3. 건조	3. 1차 건조
4. 볶음	변화된 4~10. 공정 (대외비)
5. 분쇄	
6. 멸균	
7. 접종	
8. 발효	
9. 멸균	
10. 농축 또는 동결건조	
11. 분쇄	11. 분쇄
12. QC	12. QC
13. 포장	13. 포장

(2) 발효균주 및 배지

K2 균주를 Seed 배양하여 접종하고 배지는 Lactobacilli MRS 배지(Acumedica)에서 37°C, 24~48시간동안 agar는 정치배양, broth는 150rpm 진탕배양 하였다.

(3) Pilot 생산 - 향온항습기(18kg/회)

구매한 국내산 결명자를 고체발효 생산공정 1.입고 ~ 11.분쇄까지 16kg씩 3Lot 생산하고 발효 후 시료에 대한 K2 발효균주의 생균수와 발효 전·후 시료에 대한 지표성분 함량 변화를 비교·확인하였다. 발효는 1회 18kg 생산 가능한 향온항습기(한백과학)에서 37°C ±1, 24시간, 90±5% RH 조건으로 진행하였다.

(4) 대량생산 - 발효실(320kg/회)

구매한 국내산 결명자를 고체발효 생산공정 1.입고 ~ 11.분쇄까지 150kg씩 3Lot 생산하고 발효 후 시료에 대한 K2 발효균주의 생균수와 4가지 핵심공정 시료에 대한 지표

성분 함량 변화를 비교·확인하였다. 발효는 발효실에서 $37^{\circ}\text{C} \pm 2$, 24시간, $90 \pm 9\%$ RH 조건으로 진행하였다.

(5) 생균수 측정

발효 전·후 시료를 각각 채취하여 적정 배수로 희석하고 평판도말법을 활용하여 K2 균주의 생균수를 측정하였다. 배지는 Lactobacilli MRS 배지(Acumedica)에서 37°C , 24~48 시간동안 정치배양한 후, 집락수를 계산하였다.

II. 결과 및 고찰

(1) 결명자 입고

구입한 결명자의 성상(갈색의 고형물)을 확인하였다(Fig. III-3).



Fig. III-3. Warehousing of *Cassia tora* L. seeds.

(2) K2 균주 seed 배양

결명자에 접종할 K2 균주를 Lactobacilli MRS 배지에서 37°C , 24시간, 150rpm으로 진탕배양하고, 이를 seed로 사용하였다.



Fig. III-4. Shaking cultured K2 strain for 24hr in MRS broth.

(3) 향온항습기 Pilot 발효

(가) 향온항습기 발효

K2 균주를 접종한 결명자를 향온항습기에서 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, 24시간, $90\pm 5\%$ RH 조건으로 16kg 3Lot 발효하였다.



Fig. III-5. *Cassia tora* L. seeds during the fermentation in temperature humidity controller machine.

(나) 향온항습기 발효 후 발효결명자



Fig. III-6. *Cassia tora* L. seeds after the fermentation in temperature humidity controller machine.

(4) 발효실 대량발효

(가) 대량발효

K2 균주를 접종한 결명자를 발효실에서 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, 24시간, $90\pm 9\%RH$ 조건으로 3Lot 발효하였다.



Fig. III-7. Fermenting *Cassia tora* L. seeds in fermentation room.

(나) 대량발효 후 발효결명자



Fig. III-8. Fermented *Cassia tora* L. seeds (mass volume).

(5) 결명자발효분말

3회 대량생산을 반복(3Lot)하여 총 344kg의 결명자발효분말을 생산하였으며, 수율은 약 76.5%로 향온항습기 공정 수율과 유사하였다.



Fig. III-9. *Cassia tora* L. fermentation powder.

(6) 생균수 변화

향온항습기와 발효실에서 발효한 시료의 발효 후 3Lot 생균수를 비교한 결과, 향온항습기 발효는 평균 $1.04 \pm 0.04 \times 10^9$ CFU/ml이었으며 발효실 발효는 평균 $1.18 \pm 0.09 \times 10^9$ CFU/ml로 발효실 발효와 향온항습기 발효의 생균수 차이는 크지 않음을 확인하였다.

Table III-6. According to pilot and scale up fermentation CFU/ml comparison.

CFU/ml - 향온항습기 pilot 발효		CFU/ml - 발효실 대량발효	
Lot	발효 후	Lot	발효 후
1Lot	$1.00 \pm 0.02 \times 10^9$	1Lot	$1.38 \pm 0.06 \times 10^9$
2Lot	$9.37 \pm 0.05 \times 10^8$	2Lot	$9.27 \pm 0.09 \times 10^8$
3Lot	$1.17 \pm 0.05 \times 10^9$	3Lot	$1.24 \pm 0.12 \times 10^9$
평균	$1.04 \pm 0.04 \times 10^9$	평균	$1.18 \pm 0.09 \times 10^9$

(7) 핵심공정별 지표성분 함량 및 수율 변화

변경된 고체발효공정으로 변경하여 진행하였다. 지표성분 함량설정은 추후 20Lot 생산하여 범위를 설정할 계획이다.

Table III-7. Index component content and yield change of solid fermentation per key process.

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3) 기능/지표성분 함량변화 (3Lot)	(4) 수율(%)
1. 원재료 입고	대외비	0.2~0.4mg/g	100
2. 세척		-	-
3. 1차 건조		-	89.6
대외비	대외비	0.2~0.4mg/g	84.6
		-	-
		0.2~0.4mg/g	-
		-	-
		-	-
		-	-
		1.0~1.4mg/g	80.5
11. 분쇄	대외비	-	76.5
12. QC		-	-
13. 포장		-	-

4) 지표성분 시험법 설정 및 밸리데이션

가) 시험법 밸리데이션

I. 재료 및 방법

(1) 시료준비 및 지표성분

고체발효한 결명자발효분말을 사용하였으며 이의 표준품은 결명자로부터 자체 분리한 Aurantio-Obtusin(A.O)을 사용하였다.

(2) 검액 및 표준액 제조

분말 시료는 약 400mg을 정밀하게 달아 삼각플라스크에 넣고 70% MeOH를 45ml 넣어 90분간 환류 추출을 한 후, 이를 50ml 용량플라스크에 깔때기와 filter paper를 이용해 filter하여 정용 후 검액 50ml를 제조하였다. 이 검액을 0.2µm syringe filter를 이용하여 필터한 뒤 HPLC를 이용하여 실험을 진행하였다.

지표물질은 정밀저울을 이용하여 2.03mg을 정밀하게 달아 MeOH에 녹이고 10ml volumetric flask에 넣어 정용하여 표준액 1을 제작하였다. (203µg/ml) 표준액 1을 단계 별로 희석하여 12.6875, 6.34375, 3.17188, 1.58594, 0.79297µg/ml을 제조하였다.

(3) 시약 및 기기

지표물질의 순도시험에 사용된 장비는 LC/MS (UFLC-IT-TOF-MS, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 시험방법 밸리데이션에 사용된 HPLC는 LC 20AD (Shimadzu, Japan)를 사용하였으며 diode array detector (DAD)를 이용하여 UV spectrum을 확인하고, 이 중 흡수 극대파장인 286nm에서 진행하였다. 시험에 사용된 용량플라스크는 특급을 사용하였으며 solvent로 쓰인 acetonitrile, 증류수, formic acid, Methanol 등의 시약 또한 특급을 사용하였다.

시험방법 밸리데이션의 분석 조건은 검액과 표준액의 분리도, 크로마토그램 등을 고려하여 설정하였으며 구체적인 조건은 다음과 같다.

Table III-8. HPLC analysis conditions.

- Flow rate: 1ml/min - Oven temp: 35°C
- Injection volume: 10 μ L
- Column: Luna 5u C18(2) 100A (250 x 4.60mm)
- Detector: DAD (extraction wavelength: 286nm)
- Mobile phase:

Time	Mobile phase	
	A% (0.1% Formic acid in water)	B% (Acetonitrile)
0	70	30
45	50	50
46	10	90
52	10	90
53	70	30
60	70	30

II. 결과 및 고찰

(1) 특이성(Specificity)

검액과 표준액을 제조하여 이를 HPLC를 이용하여 Blank, 표준액, 검액의 chromatogram을 확인하였으며 분리도를 측정하였다.

표준액의 순도시험은 LC/MS를 사용하였으며, 표준물질의 TIC peak와 불순물 peak의 면적차이를 이용하여 순도를 결정하였으며, 시험에 사용한 LC/MS 분석조건은 다음과 같다.

Table III-9. LC/MS/MS analysis conditions.

* UFLC condition

- Flow rate: 1ml/min - Oven temp: 40°C
- Injection volume: 1.0 μ L
- Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 150 mm, Waters, USA)
- Detector: UVD (286nm), MSD (MCP)
- Mobile phase:

Time	Mobile phase	
	A% (0.02% Formic acid in water)	B% (Acetonitrile)
0	95	5
30	40	60
35	40	60
36	90	5
40	100	0

* Mass analyzer condition

- Ion source: ESI, - Interface temp: 200°C
- CDL temp: 200°C - Analyzer: IF-TOF - Detector: MCP

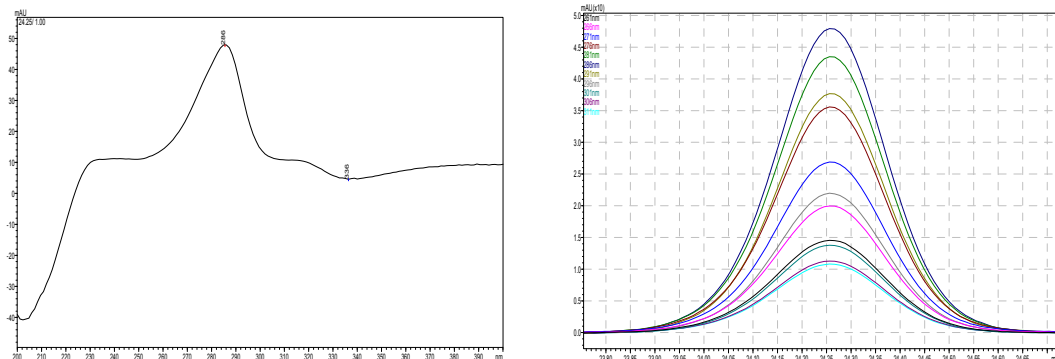
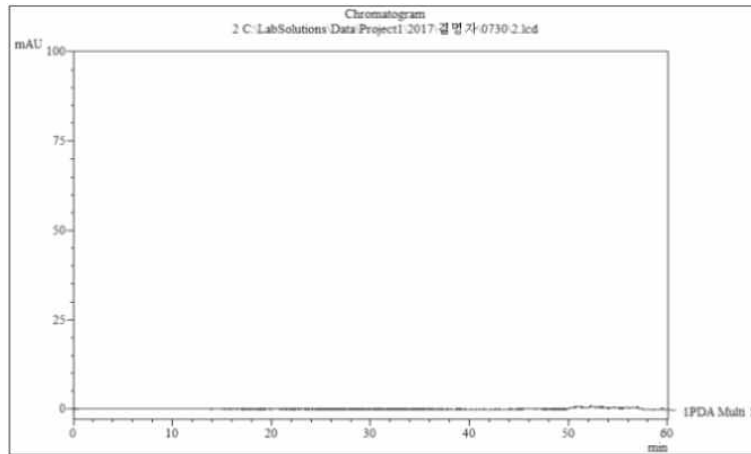
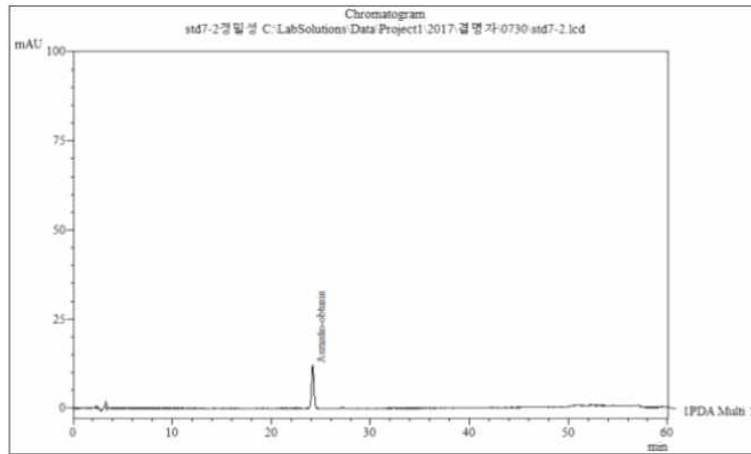


Fig. III-10. UV spectrum of compound and extract.

- Blank



- STD



- Extract

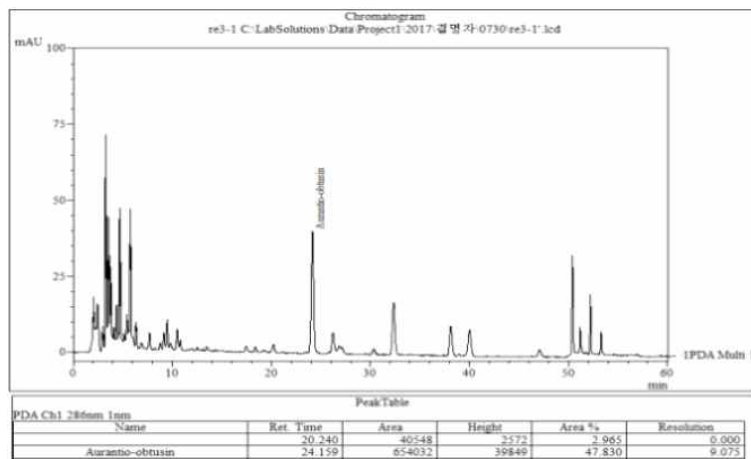


Fig. III-11. Chromatogram of Extract for specificity.

Table III-10. Purity result of Aurantio-Obtusin.

Compound	Purity(%)						Mean(%)
	1	2	3	4	5	6	
Aurantio-Obtusin	86.78	86.35	86.73	86.33	85.08	85.41	86.11

지표물질인 Aurantio-Obtusin의 순도시험을 진행한 결과 86% 이상을 보였으며, 검역에서 Aurantio-Obtusin의 resolution이 9.075임을 확인하였으며 기준 0.8 이상을 만족하는 결과를 얻을 수 있었다.

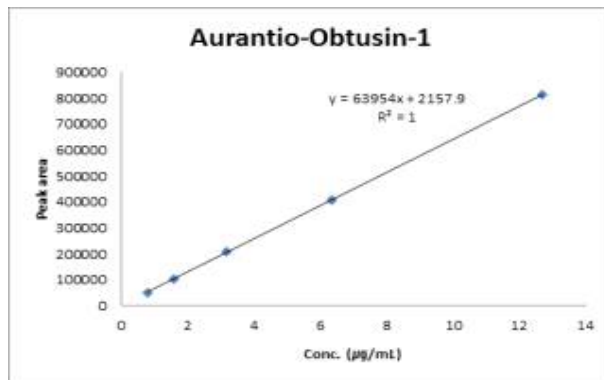
(2) 직선성(Linearity)

지표물질의 직선성을 확인하는 방법으로 표준액을 제조하여 이를 농도별 회석을 통해 검량선을 얻어 상관계수 R2의 값을 확인하여 직선성을 증명할 수 있다.

표준액은 12.6875, 6.34375, 3.17188, 1.58594, 0.79297µg/ml 의 농도를 이용하여 검량선을 작성하여 직선성을 분석하였다.

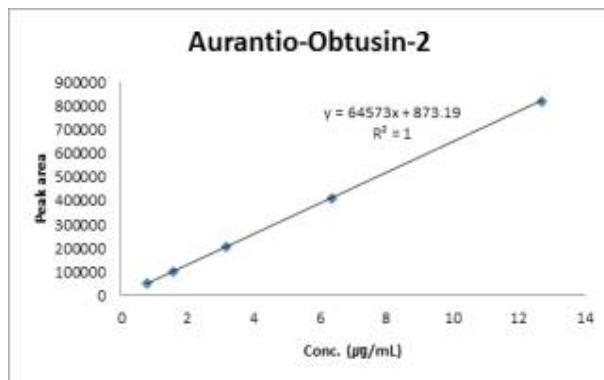
① 검량선 1

Level	Conc.	Area
1	0.79297	52402
2	1.58594	102504
3	3.17188	207232
4	6.34375	407306
5	12.6875	813461



② 검량선 2

Level	Conc.	Area
1	0.79297	51887
2	1.58594	102446
3	3.17188	206236
4	6.34375	411515
5	12.6875	819624



③ 검량선 3

Level	Conc.	Area
1	0.79297	50503
2	1.58594	103407
3	3.17188	205574
4	6.34375	415145
5	12.6875	823742

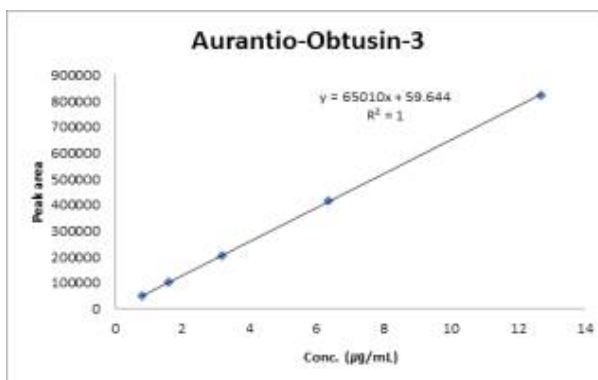


Table III-11. Linearity result of Aurantio-Obtusin.

Level	Conc.	Area			Mean	SD	%RSD
		1 time	2 time	3 time			
1	0.79297	52407	51887	50503	51599.0	984.1	1.9
2	1.58594	102504	102446	103407	102785.7	538.9	0.5
3	3.17188	207232	206236	202576	205348.0	2451.7	1.2
4	6.34375	407306	411515	415145	411322.0	3923.1	1.0
5	12.6875	813461	819624	822549	818544.7	4639.1	0.6

3회 측정하여 직선성을 평가한 결과 모든 검량선의 상관계수 R2 값이 0.9999 이상으로 우수한 결과를 나타내었다.

(3) 정확성(Accuracy)

시험에 사용한 표준액 농도 중 최저, 중간, 최고 농도인 0.79297, 3.17188, 12.6875µg/ml을 3회 이상 반복 제조 및 측정하여 피크의 면적값의 표준편차 값을 확인하였다.

Table III-12. Accuracy result of Aurantio-Obtusin.

Level	이론값(ug/ml)	Peak Area	참값	회수율 (%)	Difference(%)
1	0.79297	52407	0.78570	99.08	0.22
		51887	0.79004	99.63	0.77
		50503	0.77604	97.86	0.99
평균값		51599	0.78393	98.86	0.66
표준편차			0.01	0.90	0.40
3	3.17188	207232	3.20663	101.10	0.75
		206236	3.18032	100.27	0.08
		202576	3.16133	99.67	0.68
평균값		205348	3.18276	100.34	0.50
표준편차			0.02	0.72	0.37
5	12.6875	813461	12.68563	99.99	0.06
		819624	12.67937	99.94	0.01
		822549	12.66993	99.86	0.07
평균값		818544.7	12.67831	99.93	0.04
표준편차			0.01	0.06	0.03
		회수율 (%)	Difference (%)		
전체 평균값		99.71	0.40		
전체 표준편차		0.88	0.39		
표본의 크기		9	9		
95% 신뢰구간	99.03	100.39	0.10	0.70	

직선성이 확인된 표준액 최저, 중간, 최고 농도인 0.79297, 3.17188, 12.6875 μ g/ml을 3회 이상 반복 시험하여 회수율을 측정된 결과 표준편차가 $\pm 5.0\%$ 이내로 정확성을 보였다.

(4) 정밀성(Precision)

(가) 반복성(Repeatability)

직선성이 확인된 표준액 농도 범위 내에서 0.79297, 3.17188, 12.6875 μ g/ml 3농도에 대하여 6회 반복 측정하여 상대표준편차를 확인하였다.

Table III-13. Repeatability result of Aurantio-Obtusin.

Level	Conc.	Area						Mean	SD	%R SD
		1 time	2 time	3 time	4 time	5 time	6 time			
1	0.79297	51367	51287	51434	51334	51385	51414	51370.17	53.76	0.10
3	3.17188	206729	208910	208533	209286	207878	207459	208132.5	957.46	0.46
5	12.6875	817201	814643	819232	818121	819144	816706	817507.83	1730.32	0.21

직선성이 확인된 표준액 농도 범위 내에서 0.79297, 3.17188, 12.6875 μ g/ml 3농도에 대하여 6회 반복 측정하여 반복성을 확인한 결과 상대표준편차가 1% 내외로 우수한 결과를 나타내었다.

(나) 실험실 내 정밀성(Intermediate Precision)

서로 다른 실험자가 표준용액 범위 내의 최저, 중간, 최고 농도의 동일한 농도의 표준액을 제조하여 3농도에 대하여 6회 반복실험을 통하여 실내 정밀성을 확인하였다.

Table III-14. Intermediate precision result of Aurantio-Obtusin.

Conc.	Peak Area		Conc.	Peak Area		Conc.	Peak Area	
	실험자1	실험자2		실험자1	실험자2		실험자1	실험자2
0.79297	51367	52282	3.17188	206729	211843	12.6875	817201	828316
	51287	52614		208910	212683		814643	829196
	51434	52490		208533	212733		819232	829391
	51334	52931		209286	211567		818121	825456
	51385	52188		207878	212320		819144	826586
	51414	52555		207459	210193		816706	828668
Mean	51370.17	52510	Mean	208132.5	211889.8	Mean	817507.8	827935.5
SD	53.76	263.12	SD	957.46	949.82	SD	1730.32	1572.12
%RSD	0.10	0.50	%RSD	0.46	0.45	%RSD	0.21	0.19
Total Mean	51940.08		Total Mean	210011.17		Total Mean	822721.67	
SD	622.19		SD	2162.64		SD	5669.19	
%RSD	1.20		%RSD	1.03		%RSD	0.69	

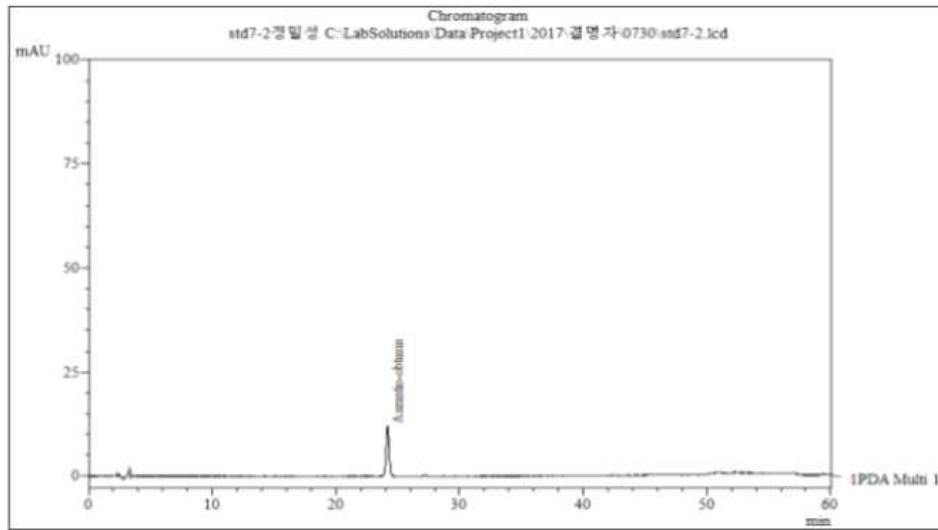


Fig. III-12. Chromatogram STD of the different experimenter 1.

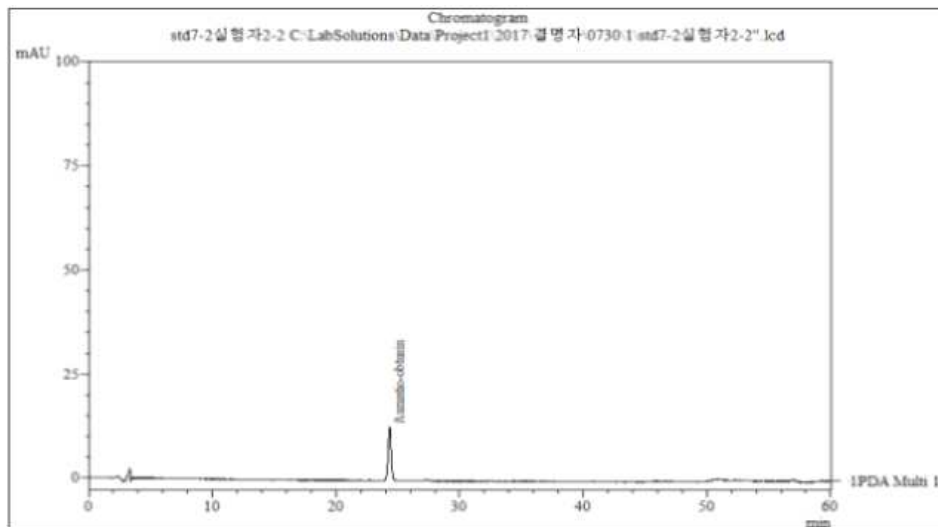


Fig. III-13. Chromatogram STD of the different experimenter 2.

실험실 내 정밀성을 확인한 결과 서로 다른 실험자의 총 상대표준편차가 1% 내외로 우수한 결과를 나타내었다.

(5) 검출한계와 정량한계

(가) 검출한계 (Detection Limit)

직선성에서 확인된 값에 따라 검량선 y절편의 표준편차(σ)와 기울기(S)에 근거하는 방법으로 정해진 식 검출한계(DL) = $3 * \sigma / S$ 에 대입한 결과 0.054 μ g/ml 임을 확인하였다.

(나) 정량한계(Quantitation Limit)

정량한계 역시 정해진 식 정량한계(QL) = $10 * \sigma / S$ 에 대입한 결과 0.164 μ g/ml 임을 확인하였다.

Table III-15. Standard deviation of y-intercept and slope average data for calculating of Detection and Quantitation Limit.

	1 time	2 time	3 time	Mean	SD
기울기(S)	63954	64573	65010	64512.33	530.61
y절편	2157.9	873.19	59.64	1030.24	1057.91
상관계수(R ²)	1	1	1	1.00	0.00

(6) 완건성(Robustness)

(가) 시험용액의 안정성(Stability)

제조한 표준액에 대한 안정성을 평가하기 위하여 제조된 표준액 0.79297, 3.17188, 12.6875 μ g/ml 농도를 상온, 냉장상태로 보관하여 2일 간격으로 확인하였다.

Table III-16. Stability result of solution.

- 상온 (25 $^{\circ}$ C)

Level	Conc.	Date	Peak Area			Mean	SD	%RSD
			1 time	2 time	3 time			
1	0.79297	1 day	52407	51887	50503	51599	984.13	1.91
		3 day	51367	51434	51385	51395.33	34.67	0.07
		5 day	51610	51591	51998	51733	229.69	0.44
전체 평균						51575.78		
전체 표준편차						526.59		
전체 상대표준편차						1.02		
Level	Conc.	Date	Peak Area			Mean	SD	%RSD
			1 time	2 time	3 time			
3	3.17188	1 day	207232	206236	202576	205348	2451.73	1.19
		3 day	206729	208533	207878	207713.33	913.20	0.44
		5 day	205510	209117	209512	208046.33	2205.39	1.06
전체 평균						207035.89		
전체 표준편차						2133.19		
전체 상대표준편차						1.03		

Level	Conc.	Date	Peak Area			Mean	SD	%RSD
			1 time	2 time	3 time			
5	12.6875	1 day	813461	819624	822549	818544.67	4639.14	0.57
		3 day	817201	819232	819144	818525.67	1148.04	0.14
		5 day	815333	818955	819265	817851	2186.15	0.27
전체 평균						818307.11		
전체 표준편차						2649.87		
전체 상대표준편차						0.32		

- 냉장 (4℃)

Level	Conc.	Date	Peak Area			Mean	SD	%RSD
			1 time	2 time	3 time			
1	0.79297	1 day	52407	51887	50503	51599	984.13	1.91
		3 day	51641	51842	51595	51692.67	131.36	0.25
		5 day	51458	51467	51242	51389	127.39	0.25
전체 평균						51560.22		
전체 표준편차						518.30		
전체 상대표준편차						1.01		

Level	Conc.	Date	Peak Area			Mean	SD	%RSD
			1 time	2 time	3 time			
3	3.17188	1 day	207232	206236	202576	205348	2451.73	1.19
		3 day	207613	208603	207727	207981	541.68	0.26
		5 day	208164	209152	207419	208245	869.33	0.42
전체 평균						207191.33		
전체 표준편차						1920.78		
전체 상대표준편차						0.93		

Level	Conc.	Date	Peak Area			Mean	SD	%RSD
			1 time	2 time	3 time			
5	12.6875	1 day	813461	819624	822549	818544.67	4639.14	0.57
		3 day	819155	819371	819666	819397.33	256.52	0.03
		5 day	819379	819699	817477	818852	1201.2	0.15
전체 평균						818931.22		
전체 표준편차						2428.47		
전체 상대표준편차						0.30		

표준액에 대한 안정성 평가하기 위해 상온, 냉장상태로 보관하며 2일 간격으로 시험한 결과 상대표준편차가 1% 내외로 안정한 상태를 확인할 수 있었다.

(나) 추출시간 및 추출방법

추출시간과 추출방법에 따른 지표물질의 함량을 비교하기 위하여 분말 시료 약 400mg을 정밀하게 달아 삼각플라스크에 넣고 추출효율이 우수했던 70% MeOH 45ml를 넣어 30분, 60분, 90분 120분간 환류 추출, 초음파 추출 한 후, 이를 50ml 용량플라스크에 filter paper를 이용하여 filter하여 정용하여 50ml를 제조하였다. 이를 검액으로 하였다.

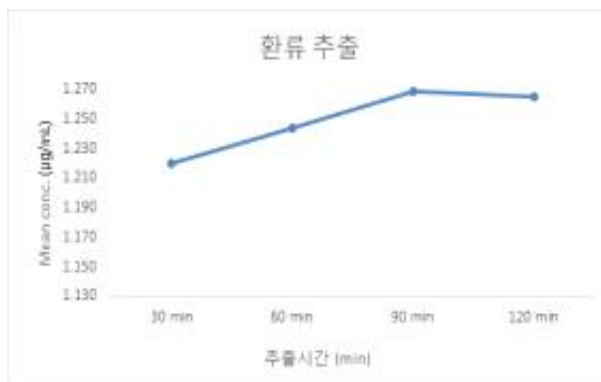
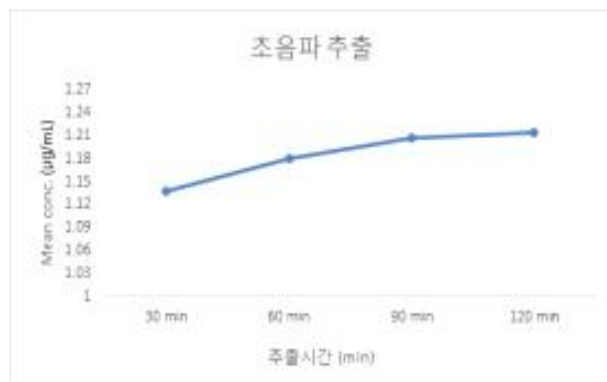
Table III-17. Concentration of Aurantio-Obtusin from extraction time and extraction method(sonication extraction method, reflux extraction method).

- 환류 추출

추출시간	함유량(ug/mg)			Mean	SD	%RSD
	sample 1	sample 2	sample 3			
30min	1.219	1.219	1.221	1.220	0.001	0.109
60min	1.242	1.246	1.245	1.244	0.002	0.194
90min	1.266	1.270	1.272	1.269	0.003	0.237
120min	1.264	1.265	1.267	1.265	0.001	0.117

- 초음파 추출

추출시간	함유량(ug/mg)			Mean	SD	%RSD
	sample 1	sample 2	sample 3			
30min	1.138	1.139	1.138	1.138	0.001	0.067
60min	1.178	1.180	1.182	1.180	0.002	0.201
90min	1.209	1.209	1.205	1.208	0.003	0.217
120min	1.212	1.216	1.215	1.214	0.002	0.152



추출시간에 따른 추출방법에 대한 지표물질의 함량을 비교한 결과 90분간 환류추출을 한 검액에서 우수한 결과를 나타내었다.

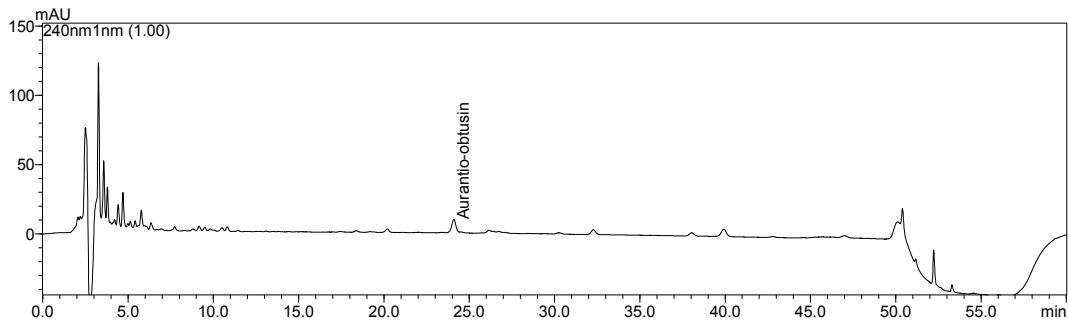
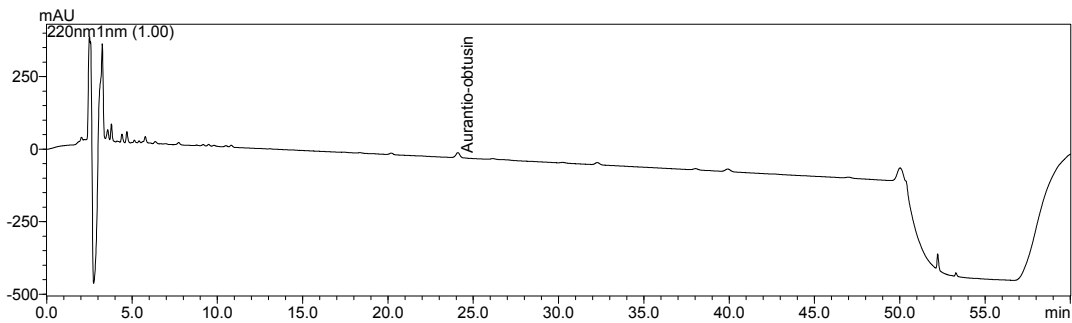
(다) Flow rate, 온도, 파장

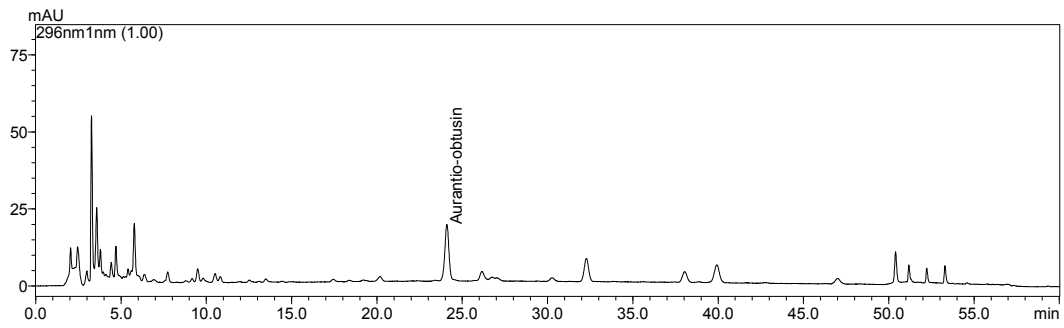
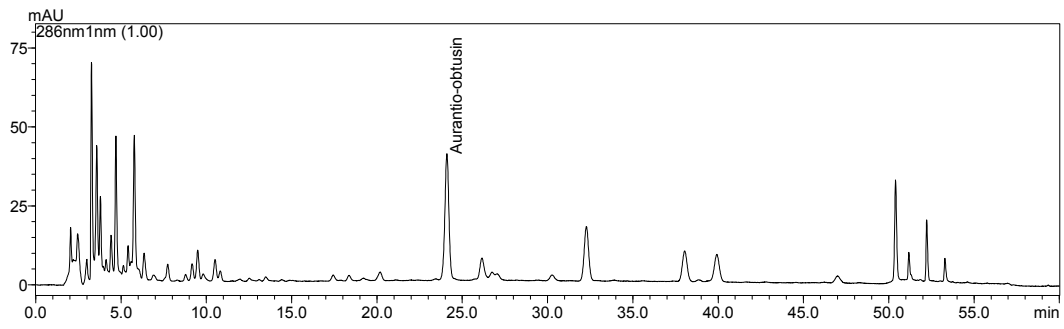
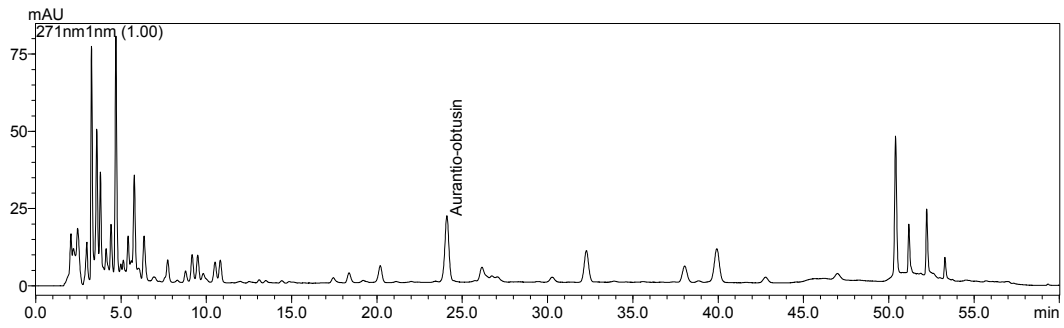
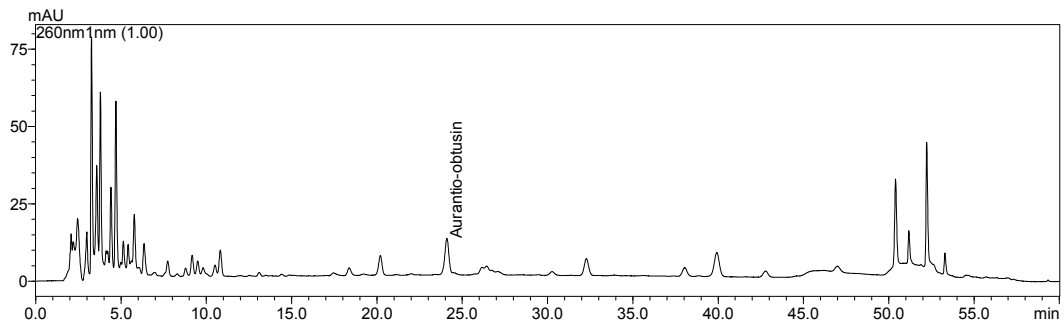
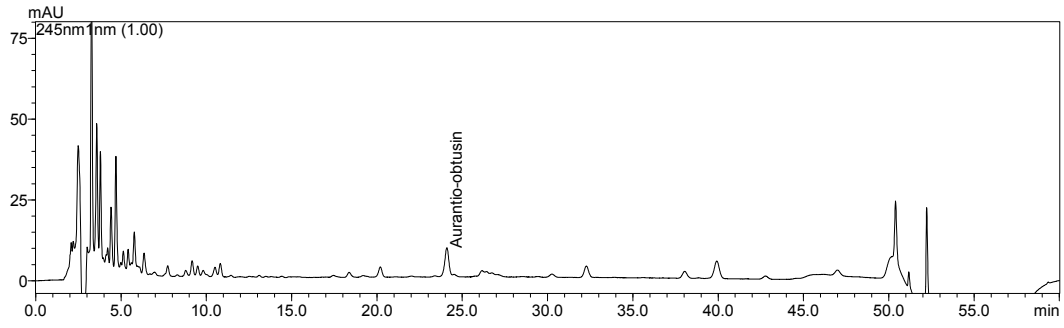
다음은 Flow rate, 분석온도를 변경하였을 때 분리도에 대한 영향을 비교한 것이다. 적당한 분석 조건은 Flow rate 1.0ml/min, 온도 35℃로 이와 같은 조건에서 분석을 실시하였다.

Table III-18. Resolution result of Analytical variable.

분석변수	분석조건	분리도
Flow rate	0.8ml/min	8.438
	1.0ml/min	7.977
	1.2ml/min	7.488
온도	30℃	8.114
	35℃	8.576
	40℃	8.067

결명자 분말 시료 추출물을 220, 240, 245, 260, 271, 286, 296, 311nm 파장별로 비교한 결과 지표물질인 Aurantio-Obtusin의 peak가 높게 인식된 286nm에서 분석을 실시하였다.





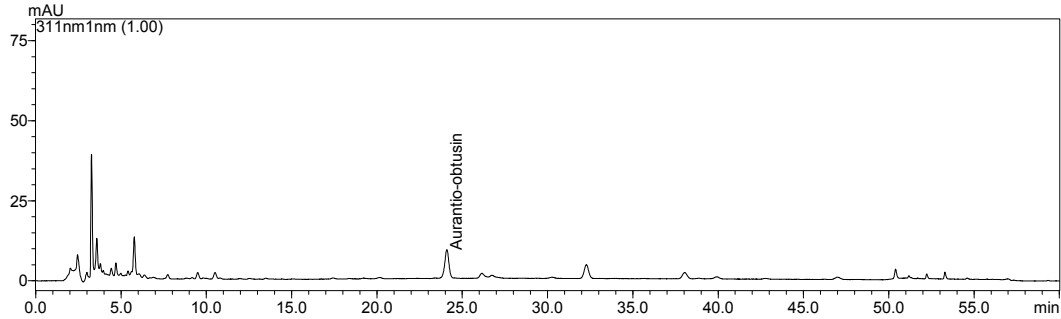


Fig. III-14. Chromatogram Extracted from UV spectrum.

나) 지표성분 시험법

(1) 표준용액

지표물질 Aurantio-Obtusin 2mg을 정밀하게 달아 70% MeOH에 녹이고 10ml volumetric flask에 넣어 정용하여 표준액으로 한다. 이 표준액에 일정량의 70% MeOH로 희석하여 표준용액으로 한다.

(2) 시험법

분말 시료는 약 400mg을 정밀하게 달아 삼각플라스크에 넣고 70% MeOH 45ml를 넣어 90분간 환류 추출을 한 후, 이를 50ml 용량플라스크에 filter paper를 이용하여 filter 후 정용하여 50ml를 제조하고, syringe filter를 이용해 필터한 뒤 검액으로 사용한다. 검액과 표준용액의 10 μL를 다음 조건으로 액체 크로마토그래프법에 따라 시험하여 표준품의 피크 면적에 대한 회귀곡선을 이용해 함량을 측정한다.

(3) 조작조건

- * 검출기: 자외부흡광광도계(측정파장 286nm)
- * 칼럼: 안지름 4.6mm 길이 약 25cm 스테인레스강관에 액체크로마토그래프용 옥타데실 실리카겔을 충전한다.
- * 칼럼온도: 35℃
- * 유량: 1.0ml/min
- * 이동상: A- 0.1% formic acid, B- acetonitrile

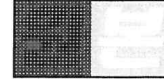
Time	Mobile phase	
	A% (0.1% Formic acid in water)	B% (Acetonitrile)
0	70	30
45	50	50
46	10	90
52	10	90
53	70	30
60	100	0

5) 고체발효 결명자발효분말의 품목제조보고(변경)

기 신고한 결명자발효분말의 품목제조보고에서 제조방법을 고체발효 방법으로 변경하여 품목제조보고하였다.

- 기존 결명자발효분말(액상발효)의 품목제조보고필증

발급번호 : 1200-BHS2-9YMO-0AVF-R81Z



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	개인정보		
	황상덕			
	주소			
	전라남도 해남군 농공단지길 37			
영업소	명칭(상호)			
	명정식품			
	소재지			
	전라남도 해남군 농공단지길 37			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업등록번호	20010523220
	제품명	결명자발효분말		
	유통기한	제조일부터 2년		
	품질유지기한	제조일부터 2년		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	폴리에틸렌(PE) 밀봉포장, 100g, 200g, 500g, 1kg, 5kg		
	성상	결명자 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없음		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [O]해당 없음		
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2016년 10월 25일
보고인 황상덕

전라남도 해남군수 귀하

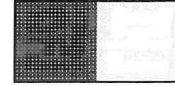
품목보고번호	20010523220-65				
처리부서	문화관광과	처리자성명	주형천	처리일자	2016년 10월 28일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

- 변경된 결명자발효분말(고체발효)의 품목제조보고필증

발급번호 : 124Q-ZH02-RY80-7A2F-55ER



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

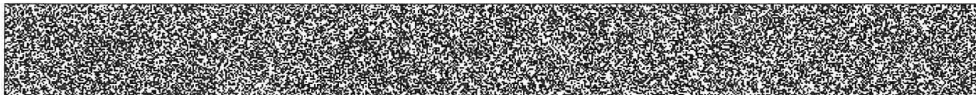
보고인	성명(법인명) 황상덕	개인정보		
	주소 전라남도 해남군 농공단지길 37			
영업소	명칭(상호) 명정식품			
	소재지 전라남도 해남군 농공단지길 37			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업등록번호	20010523220
	제품명	결명자발효분말		
	유통기한	제조일부터 2년		
	품질유지기한	제조일부터 2년		
	원재료 또는 성분명 및 배합 비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	폴리에틸렌(PE) 밀봉포장, 100g, 200g, 250g, 300g, 500g, 600g, 1kg, 5kg, 10kg, 20kg, 40kg		
	성상	결명자 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없음		
고열량·저영양 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input checked="" type="checkbox"/> 해당 없음	할랄인증 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오	
기타	"없음."			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2017년 07월 11일
보고인 황상덕

전라남도 해남군수 귀하

품목보고번호	20010523220-65				
처리부서	문화관광과	처리자성명	주형천	처리일자	2017년 07월 11일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

III-3. 고체발효한 결명자발효분말의 장기능개선 유효성 및 이종간 장 이동거리 유효성 평가 비교

3-1. 고체발효한 결명자발효분말의 장기능개선 유효성 평가

I. 재료 및 방법

1) 시료

시료는 해남자연농업영농조합법인에서 인수받아 냉동보관하면서 실험에 이용하였다.

2) 실험동물 사육 및 실험식이

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (NOR), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 액체발효 결명자 투여군 (LF-300, 300mg/kg), 저농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-300, 300mg/kg), 중농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-600, 600mg/kg), 고농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-1,000, 1,000mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide 2,000 (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간 씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여하였다.

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정하였다

4) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 측정

각 실험동물의 변은 실험시작 후 3일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후, 실험 3일째에 수거하였으며, 개체 당 변의 개수와 변 중량 (wet weight)을 측정하였다. 변의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변 중량으로 나누어 계산하였다.

5) 장이동거리 측정

장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였다.

6) 대장관내 점액질의 분비효과 측정

대장은 맹장 이후 부분부터 직장까지 부위의 양쪽을 결찰하여 적출하였다. 적출한 대장관을 10% formaldehyde으로 고정하여 조직처리 과정을 거치고 파라핀으로 embedding 하여 5 μ m 두께로 절편을 제작하였다. Alcian blue (pH 2.5)로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 고체발효 결명자발효분말과 액체발효 결명자발효분말의 장기능개선 유효성 평가와 비교

(1) 결명자 실험군 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide로 변비를 유발시킨 군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여 지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table III-19).

Table III-19. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	311.2 \pm 13.3 ^{NS}	44.5 \pm 2.2 ^{ab}	37.7 \pm 0.9 ^a
LOP	299.6 \pm 8.0	38.3 \pm 1.2 ^d	28.7 \pm 0.4 ^{cd}
P/C	303.0 \pm 10.7	45.9 \pm 0.4 ^a	34.3 \pm 0.9 ^b
LF-300	308.2 \pm 13.7	44.0 \pm 2.5 ^{abc}	31.1 \pm 1.3 ^c
SF-300	327.6 \pm 9.2	41.9 \pm 2.2 ^{cd}	30.8 \pm 1.2 ^c
SF-600	304.2 \pm 18.2	40.4 \pm 1.1 ^{cd}	27.8 \pm 1.7 ^d
SF-1000	324.8 \pm 21.7	43.7 \pm 1.9 ^{abc}	37.7 \pm 1.0 ^a

Data represents the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS}non significant

(2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 45 ± 2.91 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 22.4 ± 2.70 개로 감소하여 Loperamide에 대한 변비유발이 확인되었다. 액체발효 결명자 처리군 (LF-300), 고체발효 결명자 처리군 (SF-300, SF-600, SF-1,000)의 변 개수는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 유의적으로 증가했으며, 특히 고농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-1000)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. III-15). 마찬가지로, 변 무게 또한 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 액체발효 결명자 처리군 (LF-300), 고체발효 결명자 처리군 (SF-300, SF-600, SF-1,000)이 유의적으로 증가했으며, 고농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-1000)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다. 변의 개수는 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300) 평균 13.48개, 액체발효 결명자 처리군 (LF-300) 평균 18.15개로 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300)이 액체발효 결명자 처리군 (LF-300)에 비해 약 74.3% 효과를 나타내었고 변 중량은 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300) 평균 8.03g, 액체발효 결명자 처리군 (LF-300) 평균 8.93g으로 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300)이 액체발효 결명자 처리군 (LF-300)에 비해 약 89.9% 효과를 나타냄을 확인하였다 (Fig. III-16).

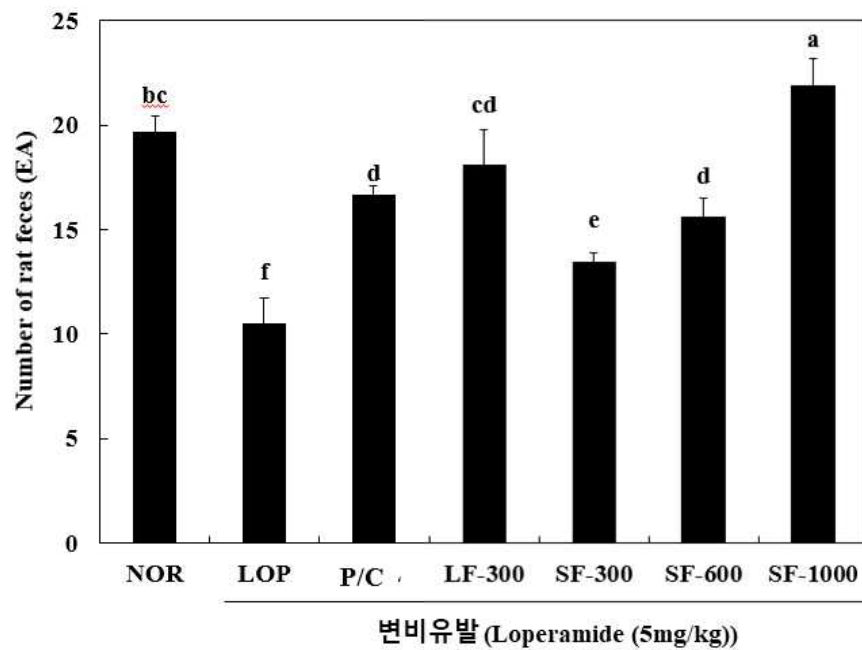


Fig. III-15. Effects of the *Cassia tora* L. extract on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

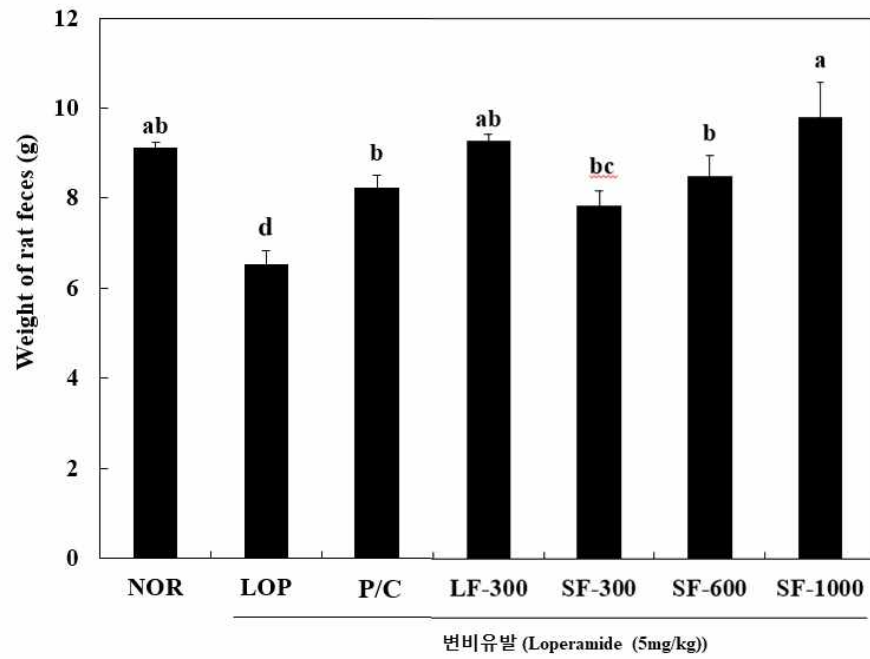


Fig. III-16. Effects of the *Cassia tora* L. extract on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군 (NOR)에 비하여 Loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 액체발효 결명자 처리군 (LF-300), 고체발효 결명자 처리군 (SF-300, SF-600, SF-1,000)은 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비교해 변의 수분함량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 변의 수분함량은 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300) 평균 42.43%, 액체발효 결명자 처리군 (LF-300) 평균 46.43%로 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300)이 액체발효 결명자 처리군 (LF-300)에 비해 약 91.4% 효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. III-17).

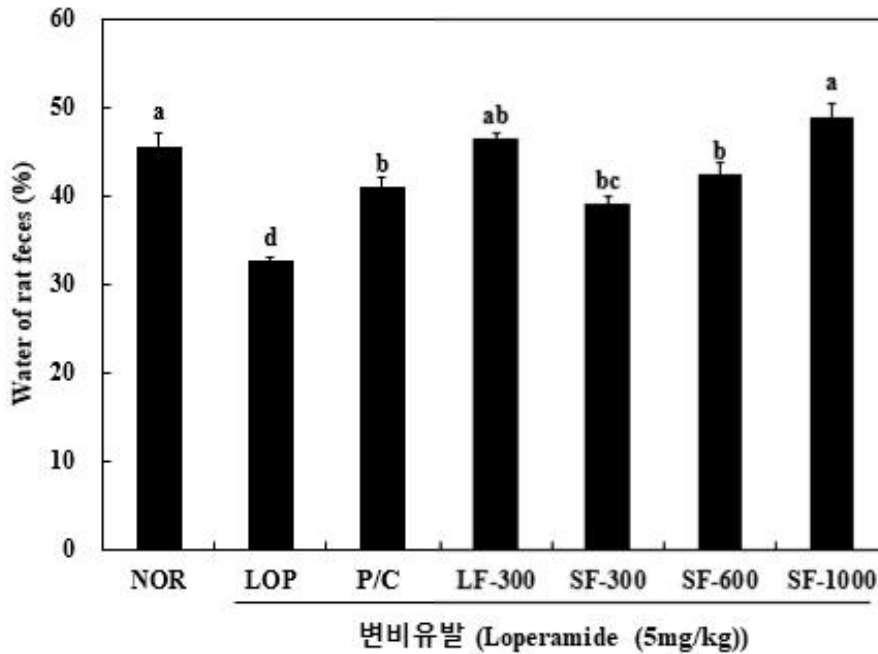


Fig. III-17. Effects of the *Cassia tora* L. extract on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 분결명자 처리군 (K-300), 액체발효 결명자 처리군 (LF-300), 고체발효 결명자 처리군 (SF-600)이 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 장내 이동거리가 증가되는 경향이 나타났으며, 고농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-1000)에서는 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 유의적으로 증가하였다. 장내 이동거리는 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300) 평균 32.59%, 액체발효 결명자 처리군 (LF-300) 평균 34.53%로 저농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-300)이 액체발효 결명자 처리군 (LF-300)에 비해 약 94.4% 효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. III-18).

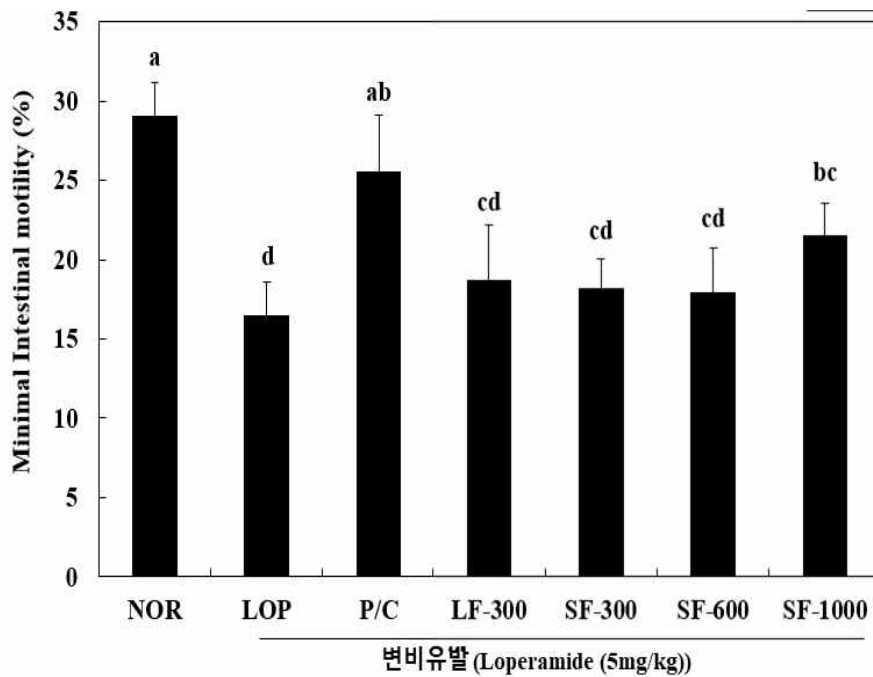


Fig. III-18. Effects of the fermented *Cassia tora* L. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m 두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군 (NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군 (LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 반면에 고농도 분쇄 결명자 처리군 (SF-300)은 Loperamide에 의해 감소된 goblet cell의 점액분비정도를 회복시켰을 뿐만 아니라 intestinal crypt의 형태가 정상에 가깝게 회복되었다(Fig. III-19).

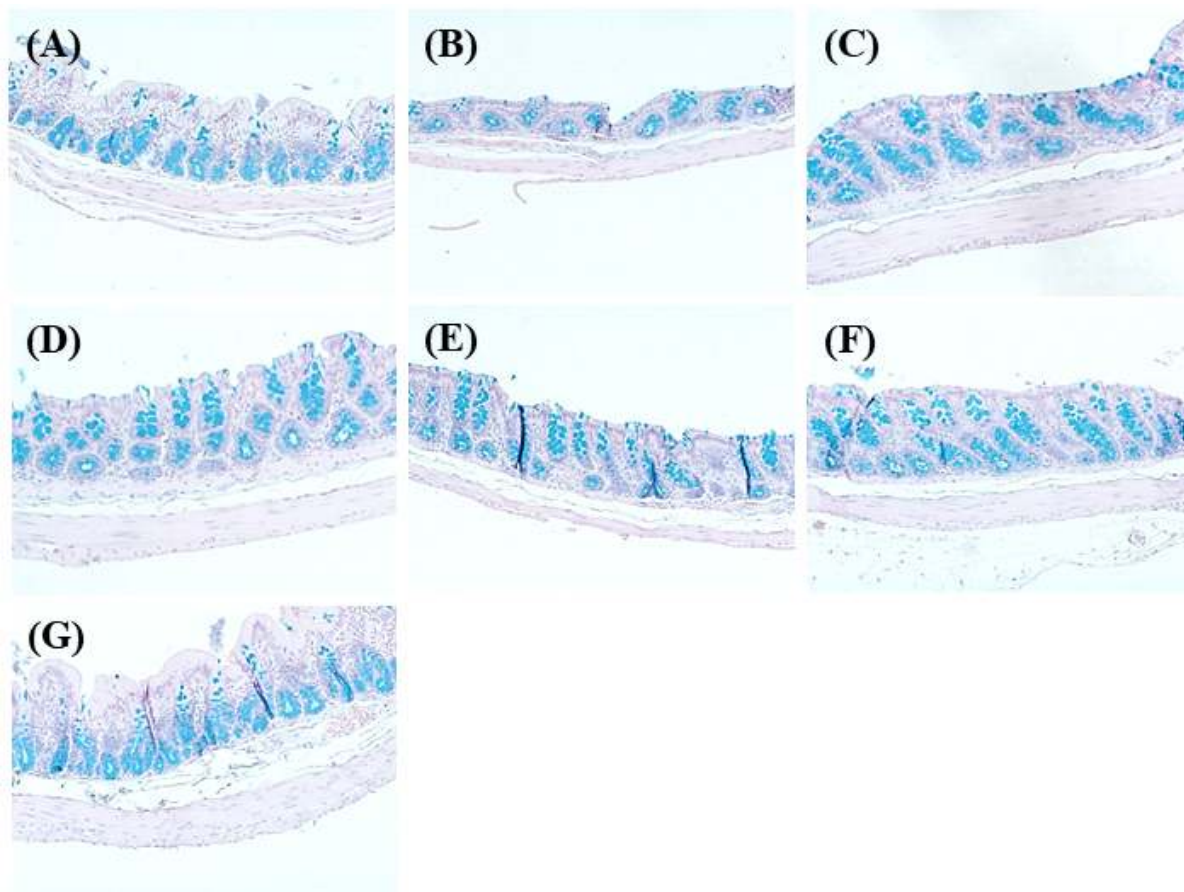


Fig. III-19. Effects of the *Cassia tora* L. extract on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) LF-300 group, (E) SF-300 group, (F) SF-600 group, (G) SF-1000 group.

3-2. 이종간 장 이동거리 개선효과 유효성 평가

I. 재료 및 방법

1) 시료

시료는 해남자연농업영농조합법인에서 인수받아 냉동보관하면서 실험에 이용하였다.

2) 실험동물 사육 및 실험식이

이종간 비교를 위한 실험동물 ICR (Imprinting Control Region) mouse rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 5마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (NOR), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 액체발효 결명자 투여군 (LF-300, 300mg/kg), 저농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-300, 300mg/kg), 중농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-600, 600mg/kg), 고농도 고체발효 결명자 투여군 (SF-1,000, 1,000mg/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 경구투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여 하였다.

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정하였다

4) 장이동거리 측정

장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였다.

5) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 결명자 실험군의 체중 및 장 이동거리

결명자 시료의 유효성평가를 SD rat가 아닌 다른 종에서 확인하기 위해 ICR mice를 이용하여 각 시료의 장 이동거리를 확인하였다. 군사이의 체중의 유의적인 차이는 나

타나지 않았다(Fig. III-20).

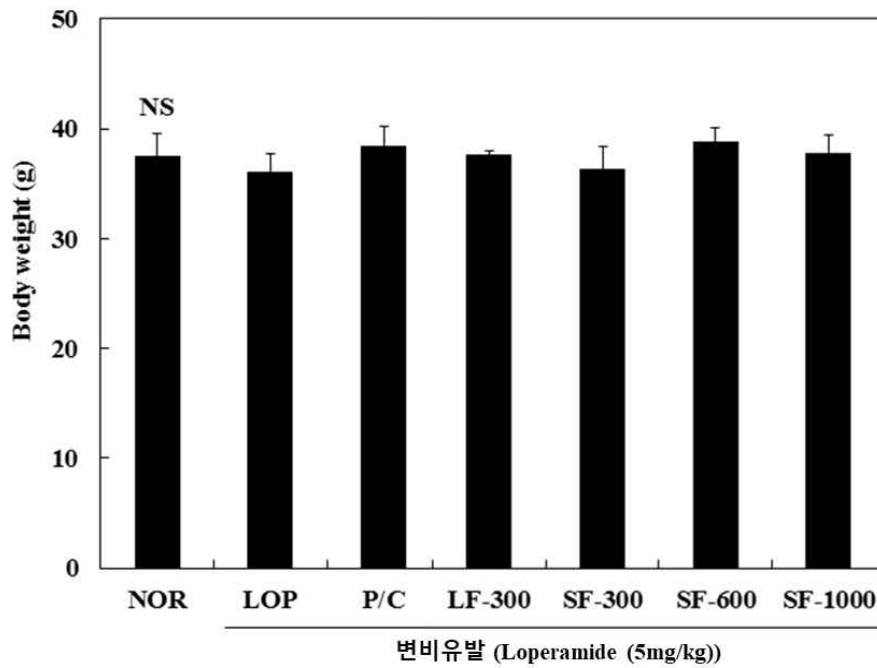


Fig. III-20. Effects of the *Cassia tora* L. extract on body weight in Loperamide-induced constipation rats. (A) NOR; Normal group, (B) LOP; Loperamide group, (C) P/S group, (D) K-300 group, (E) LF-300 group, (F) SF-300 group, (G) SF-600 group, (H) SF-1000 group.

2) 장내 이동거리

Carmine을 투여한 후 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장안에 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 유의적인 차이는 아니지만 액체발효 결명자 처리군 (LF-300), 고체발효 결명자 처리군 (SF-300, 600)이 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 장내 이동거리가 조금 증가되는 경향이 나타났으며, 고농도 고체발효 결명자 처리군 (SF-1000)에서는 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 장내 Carmine의 이동거리가 유의적으로 증가하였다(Fig. III-21).

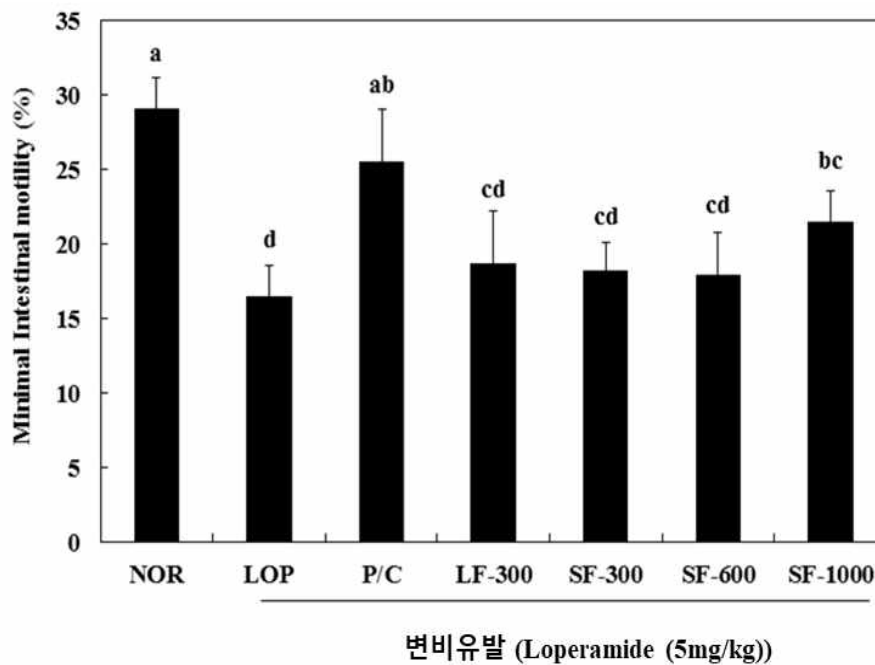


Fig. III-21. Effects of the fermented *Cassia tora* L. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Ⅲ-4. 시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가

4-1. 안정성 평가

고체발효한 결명자발효분말을 시료로 하여 발효 시 생성가능한 보존료(소르빈산, 안식향산, 데히드로초산, 파라옥시안식향산, 프로피온산)와 볶음 시 생성가능한 벤조피렌의 함량을 한국식품과학연구원을 통해 확인하였다. 기타 시제품의 봉해시험은 제형이 정제와 캡슐제에 해당하지 않기 때문에, α -아밀라아제와 프로테아제는 효소식품에 해당되지 않기 때문에 진행하지 않았다.

4-2. 유통기한 설정 평가

결명자발효분말(고체발효)의 유통기한 설정은 수분 10% 이하의 건조제품으로 미생물 생육이 억제될 수 있고 습기를 차단할 수 있는 PE-밀봉 포장 되어 있어 지질의 산패로 인한 품질변화를 최소화한 제품인 점과 본 제품과 제품특성이 유사한 기존 유통제품의 유통기한이 24개월인 점을 감안하여 유통기한 설정 실험을 식품의약품안전처 고시 제2014-206호 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준” III. 1. 다항에 적용되어 생략하고 유통기한을 24개월로 설정하였다.

완제품의 유통기한 설정은 각 분말형과 음료형 제품과 특성이 유사한 기존 유통제품의 유통기한을 참고하여 18개월로 설정하였다.



일반 제 8175 호

시험 성적서

검 체 명	결명자발효분말					
회 사 명	해남자연농업영농조합법인			대 표 자	황상덕	
주 소	전라남도 해남군 옥천면 농공단지길 37 (명정식품, 해남자연농업영농조합법인)					
시험항목	소르빈산 외 5항목			의뢰목적	제출용	
제조번호		제조일자		유통기한	접수일자	2017.06.05

귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

외관.....진녹색의 분말임
 소르빈산(g/kg).....불검출
 안식향산(g/kg).....불검출
 데히드로초산(g/kg).....불검출
 파라옥시안식향산(g/kg).....불검출
 프로피온산(g/kg).....불검출
 벤조피렌(μ g/kg).....불검출 끝.

2017년 06월 14일

한국식품과학연구원 

이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

III-5. BI&CI, 디자인 개발

5-1. 조사분석 및 진단과 개발전략 수립

삶의 질 향상으로 인한 건강에 대한 관심이 증가하여 소비자의 신체적 건강과 심리적 만족까지 충족하는 가치소비가 트렌드이며, 이에 맞춰 기술력과 제품의 특성이 잘 드러나고 차별화를 할 수 있는 디자인 개발 전략을 수립하였다. 브랜드 차별성을 위한 결명자의 가치를 재미있고 개성 있게 표현할 모티브 개발, 소비자들이 직관적으로 제품을 연상할 수 있도록 재치 있는 디자인 개발을 중점으로 하였다. 이로 인해 결명자 제품의 핵심이미지를 소비자들에게 연상시킴으로써 마케팅 효율을 증가시키는 개발 전략을 수립하였다.

1) 글로벌 소비시장의 트렌드

글로벌 소비시장의 메가 트렌드 "내 몸을 위한 가치소비"



생활패러다임의 변화와 웰빙의 엔도르핀 디쉬- 소비시장의 핵심 키워드는
소비자의 신체적 건강과 심리적 만족까지 충족하는 가치소비, Premium Variation

Fig. III-22. Mega trend of global consumption market.

2) 내·외부환경 조사 분석



해남자연농업영농조합법인 의 기술력과 제품력이 잘드러나고
건강기능 제품시장에서 차별화를 할 수 있는 패키지디자인 개발 필요

Fig. III -23. The inside and outside environmental analysis.

3) 경쟁환경 분석



전반적으로 제품 연상 이미지와 제품 효능의 부드러운 이미지를 알릴 수 있는
스카이블루, 그린옐로우, 베이지 컬러가 주를 이루고 있음

Fig. III -24. Competitive environment color analysis.

4) 종합분석을 통한 포지셔닝 맵



Fig. III -25. Positioning map.

5) 최종 개발방향 수립



이미지 연상이 용이한 네이밍, 브랜드 개발과 스토리를 포함한 패키지개발로 차별성 획득
슬로건 결합으로 지역 중소기업의 브랜드 핵심 속성 전달

Fig. III -26. Development direction establishment.

5-2. 네이밍 및 디자인 개발

1) 브랜드 네이밍

BI와 CI는 네이버, 아프리카TV, 코카콜라처럼 별도로 구분하지 않고 하나의 브랜드를 사용하는 것처럼 해남자연농업영농조합법인도 하나의 브랜드명으로 진행하기로 하였으며 추후 제품군이 다양해지면 CI 개발을 별도로 진행하기로 하였다. 네이밍은 5글자를 넘어가지 않는 범위내로 설정하고 지향가치를 강조한 브랜드명 및 슬로건 8개와 결명자와 유산균의 직접적인 속성을 강조한 브랜드명 및 슬로건 5개, 총 13개를 1차 개발하였다. 추가로 배변 기능성에 직접적인 브랜드명 2개와 발효 기능적인 브랜드명 3개, 스토리설명 브랜드명 4개, 의미압축 브랜드명 5개, 감성스토리 브랜드명 4개, 총 18개 브랜드명을 슬로건과 함께 2차 개발하였다. 1, 2차 합계 31개의 브랜드명과 슬로건에 대한 의견들을 종합하여 장건강의 직접적 표현과 동시에 울드하지 않은 독창적인 브랜드명과 슬로건 16개를 추가 개발하였다. 1, 2, 3차 합계 47개 브랜드명 중, 발음의 용이성 및 제품과의 연관성, 소비자의 접근 용이성을 고려한 브랜드명 34개를 선별하여 변비에 관심이 많은 일반 소비자 100인과 자체 선호도 조사를 통해 6개로 세분화하였다.

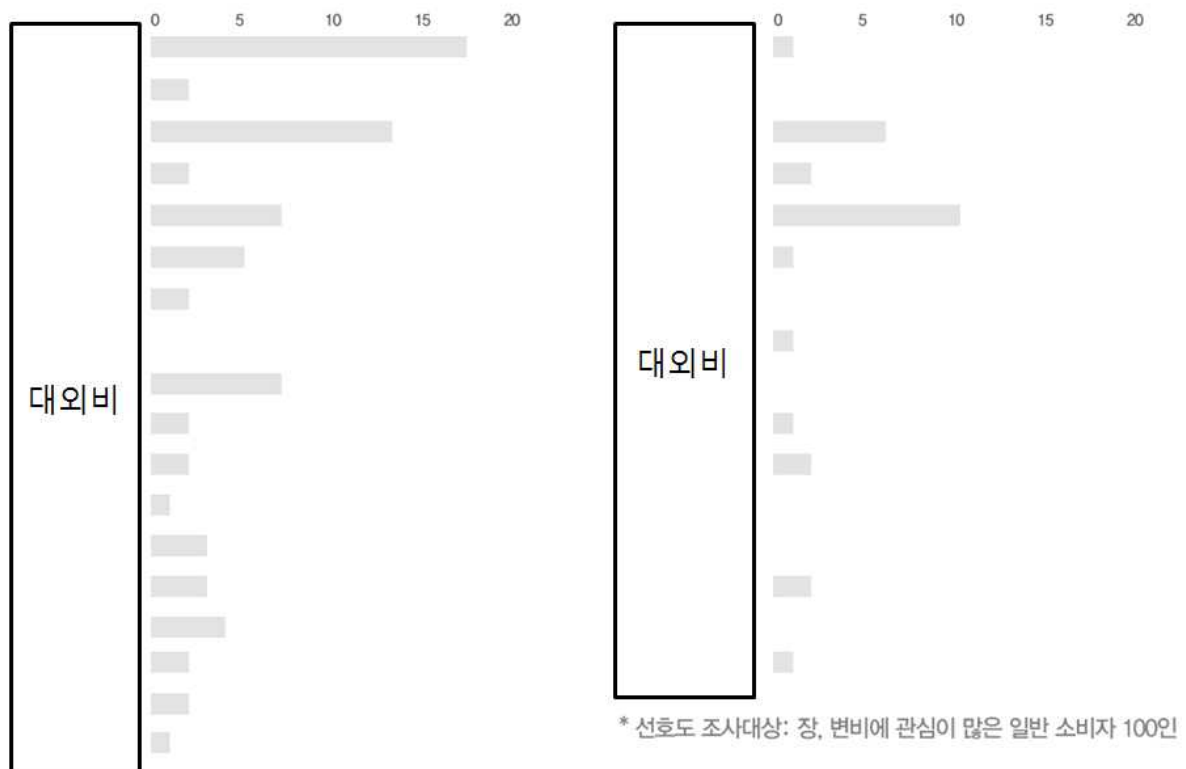


Fig. III-27. Thirty-four brand naming preference survey result.

이후 추가 미팅을 통해 6개 중, 2개의 브랜드명을 선별하고 4개의 브랜드명을 추가 개발하여 권리화를 위한 상표검토의견을 특허법인에 위탁하여 확인하였다. 이를 바탕으로 3개의 브랜드 후보군을 최종 선별하고 브랜드 디자인을 개발하였다. 추가 수출을

위한 영문 브랜드명 4개와 중문 브랜드명 2개를 선별하여 디자인을 개발하였다. 이 중국문은 최종 ‘변할시간’으로 선택되었다. 더불어 영문은 Change Time의 약자인 ‘C-Time’, 중문은 시원한 시간, 휴가분한 시간 등으로 직역이 가능한 ‘舒畅时间’으로 최종 선택하였다. 더불어 슬로건도 추가 10건 개발하여 소비자들이 제품을 연상하는 데 도움이 되도록 하는 분말형 ‘하루에 한 번 UP!’, 음료형 ‘산뜻하게 하루에 한번’으로 슬로건을 제형별로 다르게 적용하였다.

2) 브랜드 디자인

선택된 브랜드명과 슬로건을 바탕으로 디자인 8개를 개발하였으며 이 중 Fig. III-28.과 같이 최종 선택하였다. 글씨 색상은 전체적으로 산뜻한 파란색과 검은색을 기본으로 하고 음료형은 사과향에 어울리는 색상으로 선택하였다. 글씨체는 왼쪽으로 기울어지는 디자인으로 선택하고 날씬한 여성이 삽입된 이미지로 변비개선 이미지를 부각시켰다.



Fig. III-28. Brand and slogan design(Korean, English, Chinese).

3) 용기 형태 및 디자인 개발과 캐릭터 디자인 개발

현대인들의 수요에 맞는 제품용기 디자인을 개발하기 위해 제품특성, 일일섭취량, 유통되는 제품 특성 등을 바탕으로 분말형은 스틱 포장형태로, 음료형은 스파우트파우치 형태로 선별된 브랜드 네이밍과 디자인에 어울리는 용기 및 인, 아웃케이스 패키지 디자인을 1차 8개, 2차 27개 개발하였으며, 자체 기호도 조사 후 최종 디자인을 선별하였다. 추가로 핵심원료 결명자발효분말에 맞는 캐릭터를 추가 개발하여 디자인에 적용하였다.



국문 (변할시간)



영문 (C-Time)



중문 (舒畅时间)



결명자 캐릭터

Fig. III-29. Package design & *Cassia tora* L. seeds character.

5-3. 지식재산권

개발한 상표의 권리 확보를 위해 대한민국특허청에 특허를 출원하였다.


변할시간

상세정보		통합행정정보	
서지정보 인명정보 도형분류번호(마크) 출원처리 상표출원/지정상품			
(511) 상품분류	29분류(11판) 30분류(11판)	다운로드 크게보기	
(220) 출원번호(일자)	4020170031488(2017.03.10)	<div style="border: 1px solid black; padding: 20px; text-align: center;"> <h1>변할시간</h1> </div> <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 10px;"> UPL 복사 f t QR </div>	
(731) 출원인	해남자연농업영농조합법인		
(111) 등록번호(일자)			
(260) 출원공고번호(일자)			
(112) 등록공고번호(일자)			
(641) 원출원번호(일자)			
(300) 우선권주장번호(일자)			
관련출원번호			
법적상태	출원		
심사진행상태(일자)			
소급구분(일자)	(2017.03.10)		
심판사항			
구분	국내상표, 한글상표, 일반상표		
기술이전 희망			
이의신청 일자			
이의신청 상태			
이의신청 대상			

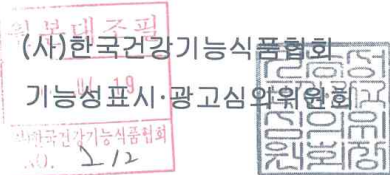
5-4. 기능성표시·광고 심의

1) 변할시간 분말형

기능성표시·광고 심의결과 통보서


회 사 명	해남자연농업영농조합법인	대 표 자	황상덕
제 품 명	변할시간 분말형	심 의 번 호	21716507
표시·광고매체	인쇄물/인터넷 표시, 인쇄물, 인터넷, 신문, 잡지	심의필여부	
심의결과	수 정 적 합		
시정사항	<p>0 유산균 증식 및 유해균 억제에 도움 -> '유산균 증식 및 유해균 억제에 도움을 줄 수 있음'으로 수정</p> <p>0 배변활동 원활에 도움 -> '배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음'으로 수정</p> <p>0 유산균 증식 및 유해균 억제 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음 -> '유산균 증식 및 유해균 억제 · 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음'으로 수정</p> <p>[참고사항]</p> <p>0 인터넷 전자상거래 등 통신판매의 수단으로 판매하는 경우 '전자상거래 등에서의 상품 등의 정보제공에 관한 고시'에 의거하여 건강기능식품에 관한 법률에 따른 표시사항 및 소비자 상담 전화번호를 함께 광고할 것</p> <p>0 건강기능식품 관한 법률 제17조에 따른 표시기준은 심의하지 않음</p> <p>0 무첨가의 표시는 건강기능식품 표시기준 제6조 11항 하목에 적합한 경우 사용가능</p> <p>0 유산균 수 -> 해당 수치의 내용이 사실이 아닐 경우 「건강기능식품에 관한 법률」 제18조에 따라 허위·표시 광고임</p>		
시정사유	<p>0 건강기능식품법 시행규칙 제 21조 등</p> <p>* 기능성표시·광고심의기준별 세부지침/세부기준</p> <p>-모호한 표현으로 소비자를 오인, 혼동시킬 우려가 있는 내용</p> <p>-제품의 기능과 관련없는 내용</p>		
<p>※ 근거법령 : 건강기능식품에관한법률 제 16조에서 규정한 건강기능식품표시및광고심의기준</p> <p>※ 유의사항 1) 심의결과가 '수정적합'인 경우 심의필 날인없이 임의로 광고할 수 없음. 시정사항을 수정통보하지 않은 광고물을 광고하는 경우, 허위·과대광고로 처벌받을 수 있음.</p> <p>2) 본 결과통보서는 제출된 자료에 근거하여 심의하였으므로 임의로 해석하여 표시·광고할 수 없음</p> <p>3) 부적합시 삭제 또는 수정되어야 할 대표적인 문안만을 지적</p> <p>4) [표시광고의공정화에관한법률]에 의거, 환불/교환 가능여부 및 환불/교환 기준을 명시</p> <p>5) 심의필 마크 사용시 광고심의 홈페이지(http://www.adhfood.or.kr) 알림마당 공지사항 10번 참조</p>			

2017. 07. 04.




2) 변할시간 음료형

기능성표시·광고 심의결과 통보서

회 사 명	해남자연농업영농조합법인	대 표 자	황상덕
제 품 명	변할시간 음료형	심 의 번 호	21716421
표시·광고매체	인쇄물/인터넷 표시, 인쇄물, 인터넷	심의필여부	
심의결과	수 정 적 합		
시정사항	<p>0 배변활동 원활에 도움 -> '배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음' 으로 수정 0 본 제품은 특허원료 ~ 함유된 제품입니다 -> 삭제 0 본 제품은 공동연구개발 ~ 함유된 제품입니다 -> 삭제 0 체질에 따라 과량 섭취 시 설사를 유발 할 수 있습니다 -> 삭제</p> <p>[참고사항] 0 인터넷 전자상거래 등 통신판매의 수단으로 판매하는 경우 '전자상거래 등에서의 상품 등의 정보제공에 관한 고시'에 의거하여 건강기능식품에 관한 법률에 따른 표시사항 및 소비자 상담 전화번호를 함께 광고할 것 0 건강기능식품 관한 법률 제17조에 따른 표시기준은 심의하지 않음</p>		
시정사유	<p>0 건강기능식품법 시행규칙 제 21조 등 * 기능성표시·광고심의기준별 세부지침/세부기준 -모호한 표현으로 소비자를 오인, 혼동시킬 우려가 있는 내용 -제품의 기능과 관련없는 내용 -부원료의 기능을 강조한 내용</p>		
<p>※ 근거법령 : 건강기능식품에관한법률 제 16조에서 규정한 건강기능식품표시및광고심의기준 ※ 유의사항 1) 심의결과가 '수정적합'인 경우 심의필 날인없이 임의로 광고할 수 없음. 시정사항을 수정통보하지 않은 광고물을 광고하는 경우, 허위·과대광고로 처벌받을 수 있음. 2) 본 결과통보서는 제출된 자료에 근거하여 심의하였으므로 임의로 해석하여 표시·광고할 수 없음 3) 부적합시 삭제 또는 수정되어야 할 대표적인 문안만을 지적 4) [표시광고의공정화에관한법률]에 의거, 환불/교환 가능여부 및 환불/교환 기준을 명시 5) 심의필 마크 사용시 광고심의 홈페이지(http://www.adhfood.or.kr) 알림마당 공지사항 10번 참조</p>			

2017. 06. 27.


 (사)한국건강기능식품협회
 원본대주필
 기능성표시·광고심의위원회
 2017. 07. 05
 (사)한국건강기능식품협회
 NO. 313

III-6. 시제품의 장기능개선 유효성 평가

I. 재료 및 방법

1) 실험동물 사육 및 실험식이

실험동물은 SD (Sprague Dawley) rat, 4주령 수컷을 Orient bio (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 실험군을 분류하였다. 정상대조군 (NOR), Loperamide 투여군 (LOP), 양성대조군 (P/C), 변할시간 분말형 (TP, 250mg/kg), 변할시간 액상형 (TL, 10ml/kg)으로 군을 분리하였다. 정상대조군을 제외한 모든 군에서 5mg/kg의 용량의 Loperamide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 4일간 12시간씩 피하투여 하여 변비를 유발하였고, 시료는 Loperamide 투여 30분 후에 각 시료들을 투여하였다.

2) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

Loperamide투여 시작일과 마지막 일에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 실험기간 중에 매일 측정하였다

3) 변의 개수, 변 중량, 변의 수분함량 측정

각 실험동물의 변은 실험시작 후 3일째에 케이지안에 변을 제거하고 bed를 갈아준 후, 실험 3일째에 수거하였으며, 개체 당 변의 개수와 변 중량 (wet weight)을 측정하였다. 변의 수분함량은 변을 70°C 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 건 중량을 측정하고 변 중량과 건 중량의 차이를 변 중량으로 나누어 계산하였다.

4) 장이동거리 측정

장이동거리를 측정하기 위해서 4일째에 Carmine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1ml (3g suspended in 50ml of 0.5% carboxymethylcellulose)을 경구투여를 한 후 3시간에 실험동물을 희생시킨 후 장을 적출하여 장내 색소의 이동거리를 측정하였다.

5) 대장관내 점액질의 분비효과 측정

대장은 맹장 이후 부분부터 직장까지 부위의 양쪽을 결찰하여 적출하였다. 적출한 대장관을 10% formaldehyde으로 고정하여 조직처리 과정을 거치고 파라핀으로 embedding 하여 $5 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 제작하였다. Alcian blue (pH 2.5)로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One

way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우, p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

II. 결과 및 고찰

(1) 결명자 실험군 사료 섭취량, 음수량 및 체중 증가량

실험기간 동안의 사료 섭취량과 음수량은 Loperamide로 변비를 유발시킨 군 (LOP)이 정상 대조군 (NOR)보다 사료섭취량과 음수량이 감소하는 경향을 보였다. Loperamide 투여에 의하여 보여 지는 사료섭취량 및 음수량 감소는 최종 체중증가에 영향을 미치는 정도가 아닌 것으로 보고되었으며, 본 연구에서도 같은 현상을 보였다. 실험기간동안 실험동물의 체중 증가량 및 사료섭취량은 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table III-20).

Table III-20. Changes in final body weight, food intake and water intake of rat with *Cassia tora* L. extract and methylene chloride fraction in Loperamide-induced constipation.

Groups	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
NOR	202.0 ± 21.1 ^{NS}	20.6 ± 1.29 ^{ab}	46.7 ± 1.20 ^{ab}
LOP	200.8 ± 7.4	19.5 ± 0.94 ^b	37.3 ± 1.65 ^c
P/C	201.4 ± 7.7	20.9 ± 0.35 ^{ab}	45.4 ± 1.06 ^{ab}
TP	205.2 ± 11.0	20.5 ± 0.49 ^{ab}	42.4 ± 1.77 ^b
TL	201.6 ± 9.1	22.4 ± 1.16 ^a	47.6 ± 1.89 ^a

Data represents the mean±S.D. Different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. ^{NS}non significant

(2) 변의 개수, 중량

Loperamide 투여 후 3일째 변의 개수는 정상대조군 (NOR)이 45 ± 2.91 인 것에 비하여 Loperamide 단독 투여 군 (LOP)이 7.9 ± 0.7 개로 감소하여 Loperamide에 대한 변 비유발이 확인되었다. 변할시간 분말형 처리군 (TP), 변할시간 액상형 처리군 (TL)의 변 개수는 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 유의적으로 증가했으며, 특히 변할시간 액상형 처리군 (TL)의 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. III-30). 마찬가지로, 변 무게 또한 Loperamide 단독 투여군 (LOP)과 비교해 변할시간 분말형 처리군 (TP), 변할시간 액상형 처리군 (TL)이 유의적으로 증가했으며, 변할시간 액상형 처리군이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Fig. III-31).

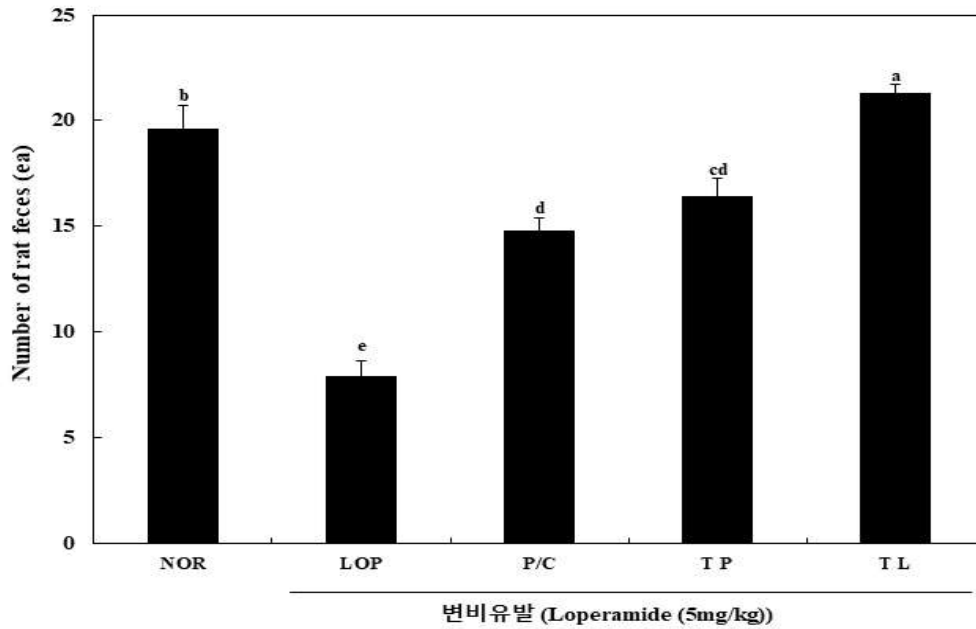


Fig. III-30. Effects of the *Cassia tora* L. extract on number of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

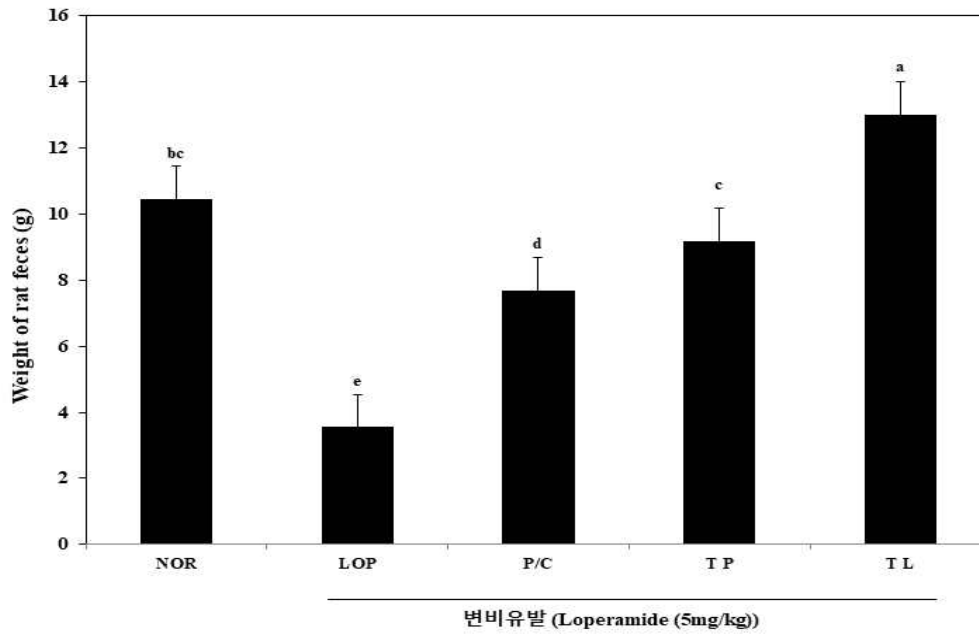


Fig. III-31. Effects of the *Cassia tora* L. extract on weight of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 변의 수분함량

변비 유발 후 변의 수분함량은 정상대조군 (NOR)에 비하여 Loperamide 단독투여 군 (LOP)이 유의적으로 감소하였으며, 변할시간 분말형 처리군 (TP), 변할시간 액상형 처리군 (TL)은 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비교해 변의 수분함량을 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. III-32).

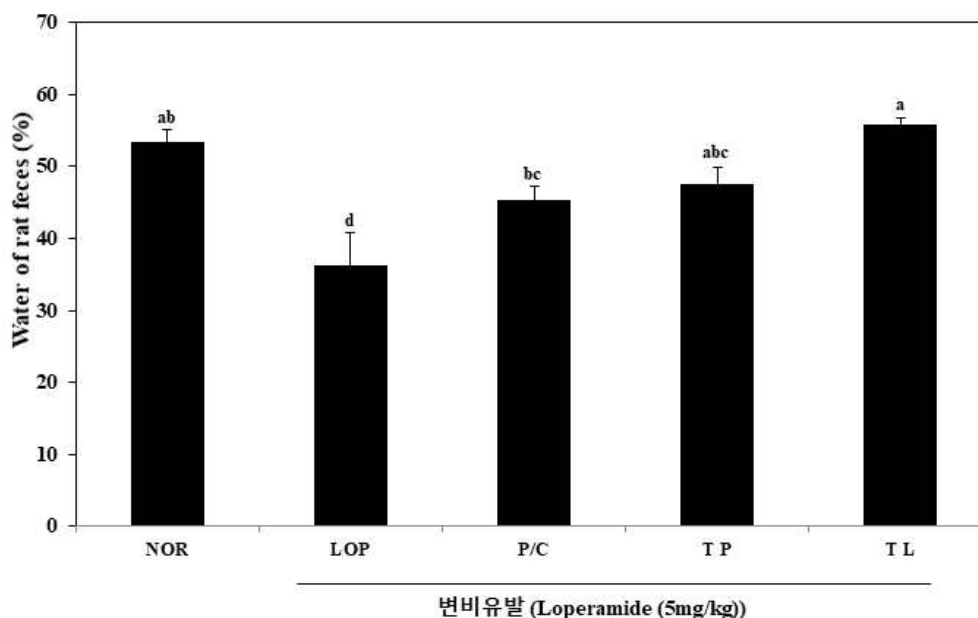


Fig. III-32. Effects of the *Cassia tora* L. extract on wet weights of fecal pellets in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 장내 이동거리

실험 4일째에, Carmine을 투여하고 3시간 후에 실험동물을 희생시켜 장내 염색시약의 이동거리를 확인하였다. 정상대조군 (NOR)에 비해 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에서 Carmine의 장내 이동거리가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 변할시간 액상형 처리군 (TL)이 Loperamide 단독투여 군 (LOP)에 비해 장내 이동거리가 유의적으로 증가되었으며, 그중 변할시간 액상형 처리군 (TL)이 가장 효과가 높은 것으로 나타났다(Fig. III-33).

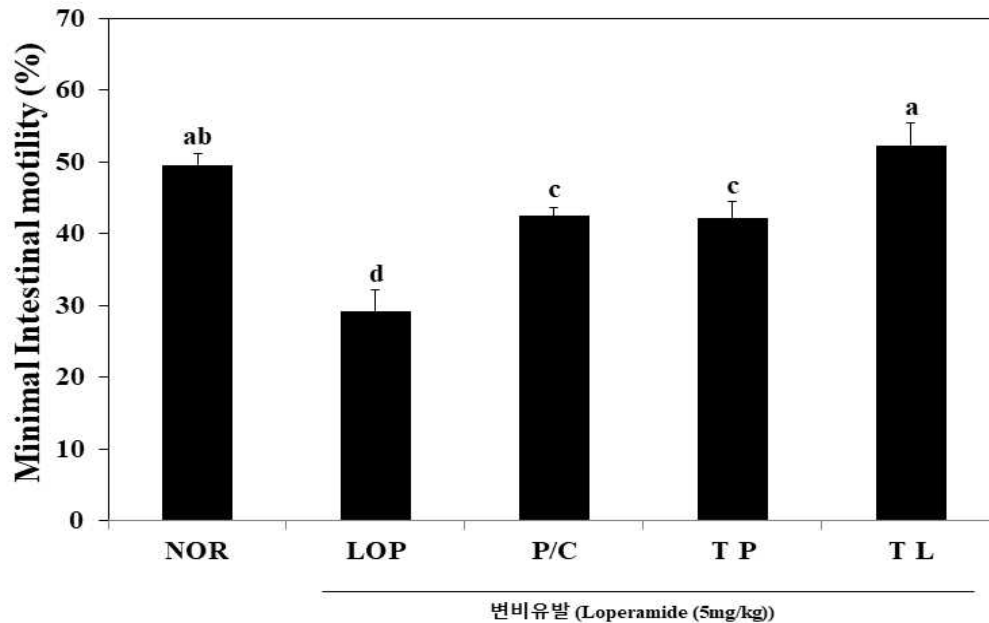


Fig. III-33. Effects of the fermented *Cassia tora* L. extract on intestinal transit ratio in Loperamide-induced constipation rats. Data represent the mean \pm S.D. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(5) 대장관내 점액질 분비효과 측정

변비의 특징으로, 변비환자는 대장운동의 감소, 결장 내 분립의 점막표면두께 감소, 점막두께 감소와 점액세포의 수가 감소됨에 따라 장의 이동성이 감소된다. 실험에 사용된 흰쥐의 대장 조직을 5 μ m두께의 파라핀 절편으로 만든 후, alcian blue 염색을 통해 광학현미경으로 관찰한 결과 정상대조군 (NOR)과 비교했을 때 Loperamide 투여군 (LOP)은 점막 내 점액을 함유하고 있는 goblet cell의 수가 감소하고 intestinal crypt의 형태가 일정하지 않았다. 반면에 변할시간 분말형 처리군 (TP)와 변할시간 액상형 처리군 (TL)은 Loperamide에 의해 감소된 goblet cell의 점액분비정도를 회복시켰을 뿐만 아니라 intestinal crypt의 형태가 정상에 가깝게 회복되었다(Fig. III-34).

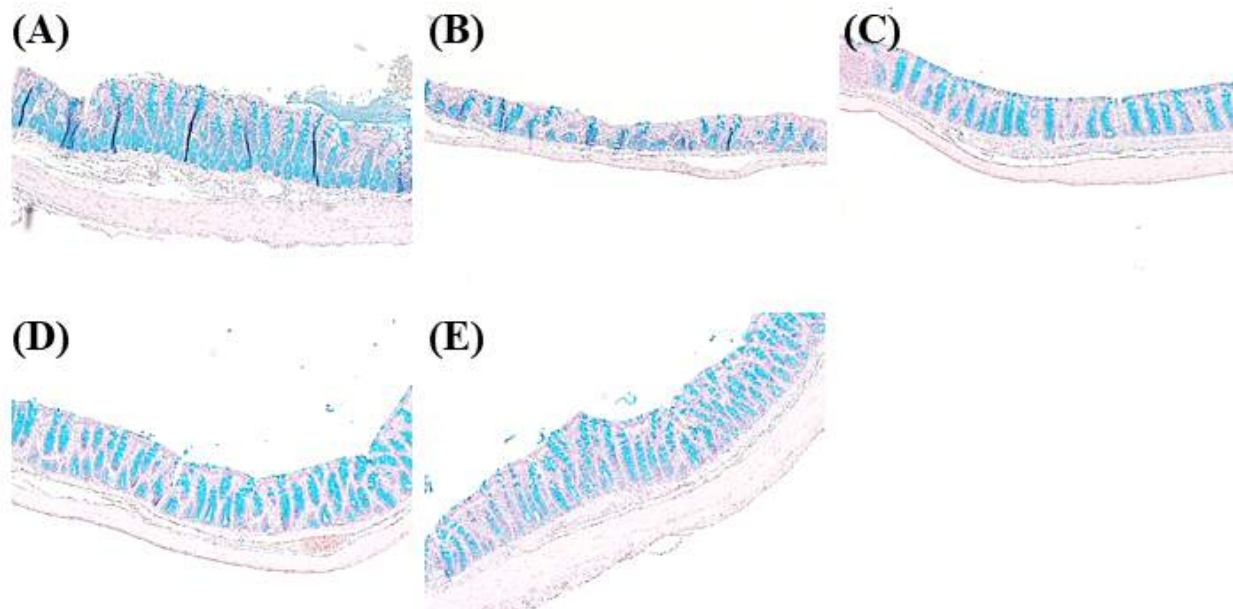


Fig. III-34. Effects of the *Cassia tora* L. extract on the mucous secretion capacity and intestinal crypt structure in Loperamide-induced constipation rats. (A) Normal group, (B) Loperamide group, (C) P/C group, (D) TP group (E) TL group.

III-7. 완제품 생산

I. 재료 및 방법

1) 주원료 및 제형 설정

설정된 제형과 시중에 유통되고 있는 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시형 및 개별인정형 원료, 건강기능식품에 사용되는 주원료를 참고하여 ①일일섭취량당 단가가 저렴하며 ②섭취량이 비교적 적고 ③제형 설정이 용이한 원료로 최종 선정하였다.

제형은 설정된 주원료를 참고하여 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말과 같은 기존 6개 제형과 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바와 같은 확대 6개 제형, 총 12개 건강기능식품 제형 중에서 선택하였다.

2) 부형원료 설정

주원료와 결명자발효분말 혼합을 참고하여 ①가격이 저렴하며 ②부작용이 거의 없고 ③소비자들이 비선호하지 않는 원료들로 최종 선정하였다.

3) 혼합비 설정

다음과 같은 4가지 중요사항을 바탕으로 주원료와 부형원료들을 탐색, 혼합하였다.

중요사항 ① 제형별 ‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’ 주원료의 함량

중요사항 ② 제형별 결명자발효분말의 높은 혼합비 설정

중요사항 ③ 맛과 향의 밸런스 조절

중요사항 ④ 가급적 적은 당류 첨가

4) 관능평가용 시료 제작 및 평가

부형원료들의 혼합비율에 따른 관능평가용 시료를 제작하고 자체평가를 통해 혼합비를 선정하였다.

5) 완제품 생산

완제품 생산을 위해 국내 GMP (Good Manufacturing Practice) 인증을 획득한 업체 225개(2016. 12. 31.일 식약처 고시 기준) 중에서 결명자발효분말을 혼합하여 충전 및 생산이 가능한 업체를 우선 선별하고 자체 설정한 혼합비로 시제품 생산을 의뢰하였다. 이 중 시제품의 제형과 맛, 향 등이 우수하고 단가가 가장 저렴한 곳으로 최종 선정하여 완제품을 주문 위탁생산하였다.

II. 결과 및 고찰

1) 주원료 및 제형 설정

원활한 홍보 및 마케팅을 위해 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 기능성관련 고시형 주원료와 결명자발효분말을 혼합하여 건강기능식품으로 개발하였다. 12개 제형

중, 건강기능식품으로 많이 사용되는 기존 6개 제형 정제, 캡슐, 과립, 환, 액상, 분말을 검토하였으며 확대 6개 제형은 비교적 낮은 연령대를 위한 식감과 맛을 위한 제형이기 때문에 제외하였다. 더불어 정제와 캡슐은 최소발주량이 높고 단가가 높으며 결명자발효분말(0.5g 이상)과 주원료(1g 이상) 혼합 시, 일일섭취 복용량이 많기 때문에 제외하였다.

남은 4개 제형 중, 음료형은 물이 혼합되어 섭취하기 용이하고 맛과 향을 가미하여 음료처럼 섭취할 수 있는 장점으로 전 연령대의 소비자를 만족시킬 수 있는 점과 중국 바이어의 요청으로 인해 선택하였으며 보다 다양한 소비자를 만족시키기 위해 환, 과립, 분말 중, 1개의 제형을 추가 선택하였다.

1개의 제형을 추가 선택하기 위해 앞서 확인한 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 기능성관련 고시형 원료 중, 자주 사용되는 프로바이오틱스, 난소화성말토덱스트린, 차전자피식이섬유, 알로에아보레센스분말 중에서 ①일일섭취량이 비교적 낮고 ②일일섭취량당 단가가 저렴하며 ③환, 과립, 분말 제형 설정이 용이한 프로바이오틱스를 최종 선택하였다. 제형은 프로바이오틱스의 특성상 물이 혼합되는 환과 과립을 제외한 분말 제형으로 최종 선택하였다.

더불어 프로바이오틱스는 기능성 인증을 받은 고시형 19가지 중에 종이 다르며 비교적 많이 사용되는 12가지 프로바이오틱스 *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*을 선택하였으며 프로바이오틱스의 기능성을 증진시키기 위하여 200억 마리 투입, 일일섭취량 10억 보장으로 제작하였다.

Table III-21 Notification type probiotics 19 kinds.

고시형 프로바이오틱스 종류 (19종)	
Lactobacillus	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.gasseri</i> , <i>L.delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>L.helveticus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.reuteri</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.salivarius</i>
Lactococcus	<i>Lc.lactis</i>
Enterococcus	<i>E.faecium</i> , <i>E.faecalis</i>
Streptococcus	<i>S.thermophilus</i>
Bifidobacterium	<i>B.bifidum</i> , <i>B.breve</i> , <i>B.longum</i> , <i>B.animalis ssp. lactis</i>

음료형의 주원료는 ①일일섭취량이 비교적 낮고 ②일일섭취량당 단가가 비교적 저렴하며 ③물에 녹는 특징을 가져 음료 제형 설정에 적합한 난소화성말토덱스트린을 최종 선택하였다.

Table III-22. Competitiveness comparison as per main functionality ingredient.

원료	일일섭취량	단가 및 필요량	음료	환	과립	분말
프로바이오틱스	1억 마리 이상 (20~2,000억/g)	9.8원(1억)~975원(100억) (10mg~g) 30억 투입 시, 1~2억 보장	생균으로 물 혼합하는 제형 사용 불가			가능
난소화성말토덱스트린	2.5g 이상	34.7원 (3g, 순도 85%)	가능 (물에 녹음)	사용 가능하지만 당으로 매우 끈적이기 때문에 고결방지제 및 부형원료 함량이 많이 필요하여 일일섭취량이 다소 많음		
차전자피식이섬유	3.9g 이상	60.5원 (3.9g)	물과 혼합 시 흡수하여 팽창하는 특징으로 부형원료 함량이 많이 필요하기 때문에 일일섭취량이 많음			가능하지만 섭취량 많음
알로에아보레센스분말	무수바바로인 20~30mg	수입산 28원 (1g, 30mg/g)	구매가 어려우며 매우 쓴맛 때문에 캡슐제에 적합하지만 결명자혼합 시 1회 투여량이 많음			

2) 부형원료 설정

추가 기능성 고시 및 개별인정형 원료들과 맛과 향 증진을 위한 부형원료 중 ①비교적 가격이 저렴하며 ②부작용이 거의 없고 ③소비자가 비선호하지 않은 원료들을 탐색하였다.

이 중, 가격 경쟁력을 위하여 부형원료 혼합을 최소화하고자 하였으며 추가 결명자발효분말의 맛과 향을 증진시키기 위한 부형원료를 첨가하였다.

가) 변할시간 분말형

기존의 과립 및 분말 시제품 제형을 바탕으로 제작하였다.

(1) 맛과 향 증진을 위한 원료

향을 증진시키기 위하여 볶은현미가루를 첨가하고 맛과 청량감을 증진시키기 위하여 결정과당, 에리스리톨, 자일리톨, 비타민C를 첨가하였다.

(2) 최종 선정된 원료

- 프로바이오틱스 (주원료)
- 결명자발효분말 (핵심원료)

- 볶은현미가루
- 결정과당
- 에리스리톨
- 자일리톨
- 비타민C

나) 변할시간 음료형

주원료인 난소화성말토덱스트린과 결명자발효분말을 제외한 부형원료는 변비개선 효능을 더욱 증가시키기 위한 효능 증진용 원료 2종과 맛을 위한 당류 2종에 맛과 향 증진을 위한 원료 6종을 추가로 선정하였다.

당류는 부작용이 없으며 ‘장내유익균 증식 및 유해균 억제에 도움’ 과 ‘배변활동원활에 도움’ 2종 기능성 원료인 **프락토올리고당**을 첨가하여 기능성을 증진시키고자 하였다.

(1) 기타 맛과 향 증진을 위한 원료

- **당류** - 소비자들은 낮은 첨가량 선호
- **기타감미료** - 적은 양으로 높은 단맛을 나타낼 수 있으나 종류에 따라 소비자 비선호
- **당알콜** - 특유의 청량감을 띠며, 다량 섭취 설사를 유발할 수도 있음
- **과일농축과즙** - 과일농축액에 저감미료가 첨가되어 달콤한 과일맛과 향을 냄
- **착향료** - 특정향에 대한 소비자 호불호 큼
- **산도조절제** - 주로 제품의 산도를 조절하는 데 쓰이며, 신맛을 뱀

위와 같은 특징을 지닌 부형원료 중 소비자들이 쉽게 접하면서 거부감이 없는 원료를 부형원료로 선택하였다.

(2) 최종 선정된 원료

- **난소화성말토덱스트린 (주원료)**
- **결명자발효분말 (핵심원료)**
- 치커리추출물분말
- 프락토올리고당
- 결정과당
- 에리스리톨
- 아세살팜칼륨
- 구연산삼나트륨
- 무수구연산
- 비타민 C
- 사과농축과즙
- 천연사과향

3) 최적 혼합비 설정

다음의 4가지 사항을 참고하여 혼합비를 설정하고 평가를 통하여 혼합비 설정을 완료하였다.

중요사항 ① ‘배변활동원활에 도움을 줄 수 있음’ 기능성 원료의 우선순위 및 높은 함량

중요사항 ② 결명자발효분말의 기능성 원료 상 높은 순서

중요사항 ③ 섭취가 용이하도록 맛과 향의 밸런스 조절

중요사항 ④ 가급적 적은 당류 함량

가) 변할시간 분말형

중요사항 ①을 위해 프로바이오틱스를 상위에 놓고 중요사항 ②를 위해 결명자발효분말을 2순위로 설정하였다. 중요사항 ③을 위해 볶은현미가루, 결정과당, 에리스리톨, 자일리톨, 비타민C 첨가하여 맛과 향을 조절하였다. 중요사항 ④를 위해 결정과당, 에리스리톨, 자일리톨의 함량을 최소화하였다.

위의 중요사항을 바탕으로 17가지의 혼합비율을 개발하였으며, 이중 5가지 혼합비율에 대한 시료를 자체 제작하여 맛에 대한 평가 후 최종 혼합비율을 선택하였다. 이를 통한 최종 혼합비에 대한 전성분 순서와 함량은 Table III-23 와 같다.

Table III-23. Full ingredient and mixture ratio of *Cassia tora* L. fermentation powder beverage(C-time powder).

원료명	전체 대비 함량 (%)			
	혼합비 1	...	혼합비 17	최종
12종 프로바이오틱스	대외비			
결명자발효분말				
볶은현미가루				
결정과당				
에리스리톨				
자일리톨				
비타민C				
합계				

나) 변할시간 음료형

중요사항 ①을 위해 난소화성말토덱스트린을 상위에 놓고 중요사항 ③을 위해 결정과당, 에리스리톨, 아세설팜칼륨, 구연산삼나트륨, 무수구연산, 비타민C, 사과농축과즙, 천연사과향을 첨가하여 맛과 향을 조절하였다. 이 중, 중요사항 ②를 위해 배변활동원활기능성을 가진 치커리추출물분말 및 프락토올리고당은 결명자발효분말보다 하위에 배치하였다. 중요사항 ④를 위해 액상과당, 설탕, 포도당 대신 결정과당 및 아세설팜칼륨을 첨가하여 제품에 포함된 당류를 최소화하였다.

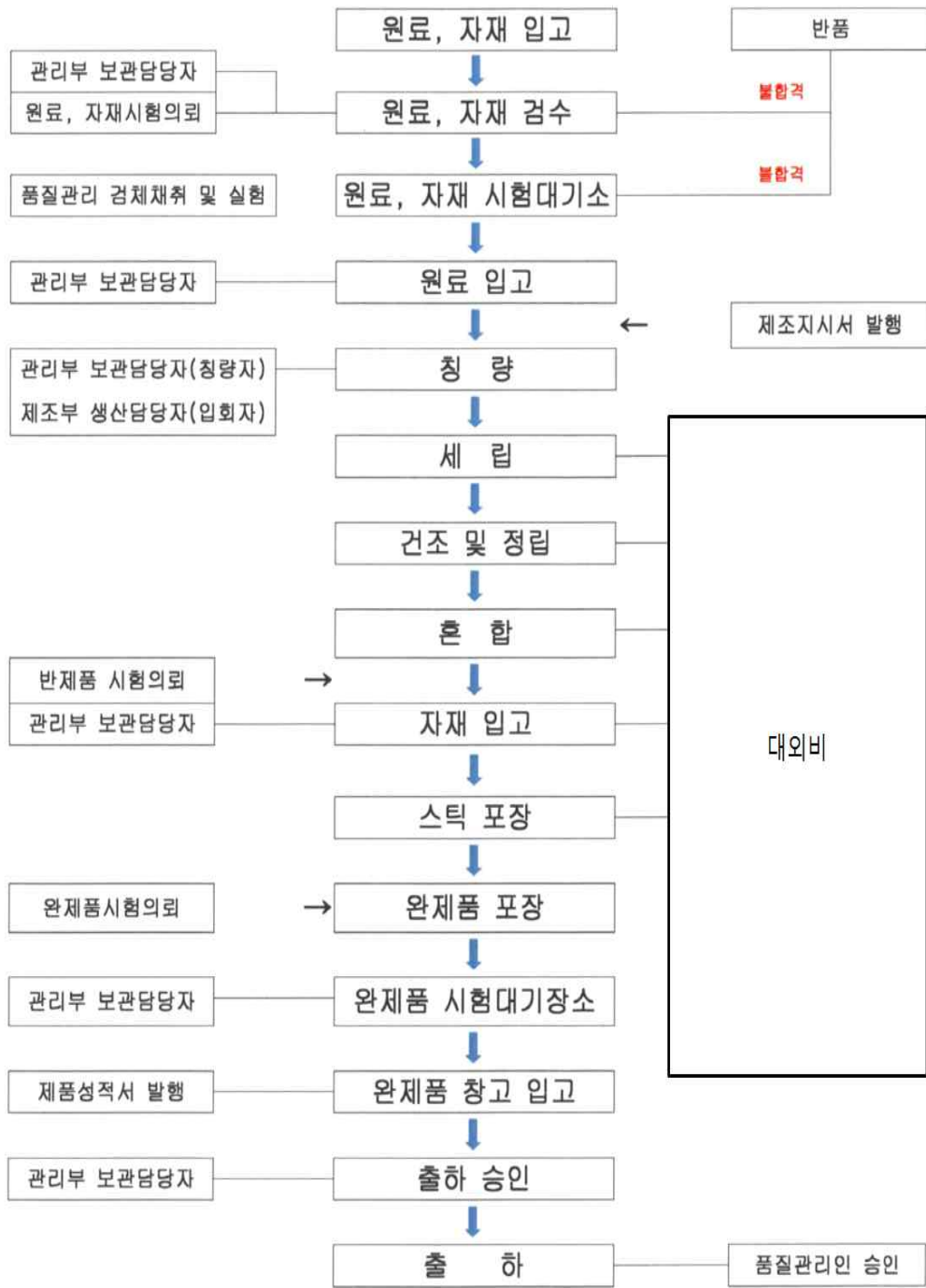
위의 중요사항을 바탕으로 30가지의 혼합비율을 개발하였으며, 이중 5가지 혼합비율에 대한 시료를 자체 제작하여 맛에 대한 평가 후 최종 혼합비율을 선택하였다. 이를 통한 최종 혼합비에 대한 전성분 순서와 함량은 Table III-24 와 같다.

Table III-24 . Full ingredient and mixture ratio of *Cassia tora* L. fermentation powder beverage(C-time drink).

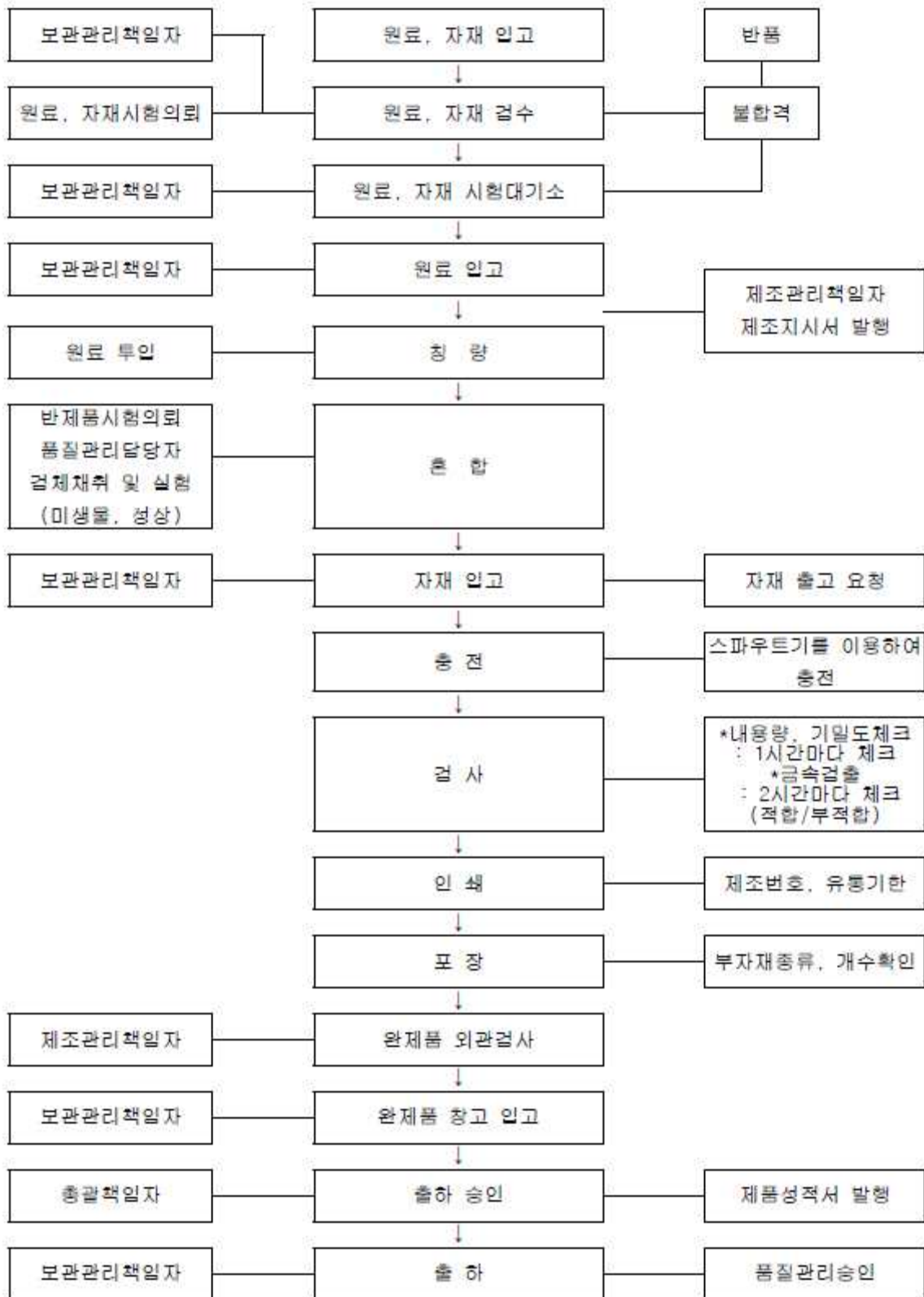
원료명	전체 대비 함량 (%)			
	혼합비 1	...	혼합비 30	최종
난소화성말토텍스트린	대외비			
결명자발효분말				
치커리추출물분말				
프락토올리고당				
결정과당				
에리스리톨				
아세살팜칼륨				
구연산삼나트륨				
무수구연산				
비타민C				
사과농축과즙				
천연사과향				
합계				

4) 제조공정도

가) 변할시간 분말형



나) 변환시간 음료형



5) 완제품

최소발주량을 바탕으로 변할시간 분말형 4,000set (2.5g/포, 30포/set, 20set/외박스), 변할시간 음료형 1,500set (100ml/포, 30포/set, 4set/외박스)을 생산하였다.

가. 변할시간 분말형



Fig. III-35. Complete product and warehousing of the C-time powder.

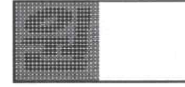
나. 변할시간 음료형



Fig. III-36. Complete product and warehousing of the C-time drink.

6) 품목제조신고증
가) 변할시간 분말형

발급번호 : 12D1-ZIWP-NCMW-QTVU-C6RC



제 2004001704673 호

건강기능식품 품목제조신고증

- 영업허가(번호) : 제 20040017046 호
- 업 소 명 : (주)정은헬스케어
- 소 재 지 : 경기도 광주시 오포읍 오포로859번길 52-7
- 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업
- 제 품 명 : 변할시간 분말형 (유형: 프로바이오틱스)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)
「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

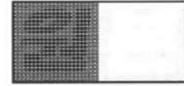
2017년 07월 21일

경인지방식품의약품안전청장



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 12D1-Z1WP-NCMW-QTVU-C6RC

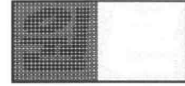


제품명	변화시간 분말형
섭취방법	1일 1회, 1회 1포씩 음용수 또는 물과 함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	질환보유자 또는 약물 복용 중이신 분은 섭취 전에 의사, 약사 등 전문가와 상의하십시오. 알레르기 등 특이체질이신 분은 제품 성분을 확인 후 섭취하시기 바랍니다. 제품 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하십시오.
포장방법	밀봉포장(스틱포장)
포장단위	2.5gx6포(15g), 2.5gx12포(30g), 2.5gx30포(75g), 2.5gx60포(150g), 2.5gx90포(225g)
포장재질	폴리에틸렌(PE)
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 갈회색의 분말
기능성내용	①유산균 증식 및 유해균 억제에 도움을 줄 수 있음 ②배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음
제조방법	대외비

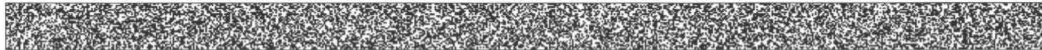


본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 1201-Z1WP-NCMW-QTVU-C6RC



제품의 형태	분말
기준과 규격	1) 성 상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 갈회색의 분말 2) 프로바이오틱스 수 : 표시량 (1,000,000,000/2.5g) 이상 3) 대장균군 : 음성
보존 및 유통기준	직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관하시고 습기를 피하여 주십시오.
유통기간	제조일로부터 18개월
기타	



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

나) 변환시간 음료형

발급번호 : Ø 1UZ-50EK-XQ2E-9J87-EPOY



제 201600039667 호

건강기능식품 품목제조신고증

- 영업허가(번호) : 제 20160003966 호
- 업 소 명 : 드림바이오(주)
- 소 재 지 : 강원도 고성군 송지호로 15-22 해양심층수산업특화단지
- 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업
- 제 품 명 : 변환시간음료형 (유형: 난소화성말토덱스트린)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)

「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

2017년 07월 04일

서울지방식품의약품안전청장



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 01UJ-50EK-X02E-9J87-EPOY

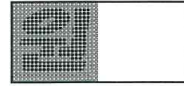


제품명	변할시간용요형
섭취방법	1일 1회, 1회 1포(100ml)를 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	반드시 충분한 물과 함께 섭취할 것(역상제외)
포장방법	종이박스포장
포장단위	100ml*1, 100ml*10, 100ml*20, 100ml*30, 100ml*60, 100ml*90, 100ml*120
포장재질	폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP)
성상	어미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 역상
기능성내용	①·배변활동 전환에 도움을 줄 수 있음
제조방법	대외비



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : Ø 1UZ-50EK-XQ2E-9J87-EPOY



변경 및 처분사항				
변경일자	변경항목	변경전	변경후	작성자 직급·성명 (서명 또는 인)
		변경사유		



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

III-8. 완제품의 품질검사

8-1. 변할시간 분말형

변할시간 분말형의 열량, 탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨과 같은 영양정보를 한국바이오분석연구원을 통해 확인하였으며 주원료인 프로바이오틱스수를 한국기능식품연구원을 통해 시험·검사 하여 적합임을 확인하였다. 추가 성장, 대장균 균, 이물, 수분을 위탁제조업체에서 자가품질검사하여 모두 적합임을 확인하였다.



문서확인번호 : PPPU-O3YK-RHVA-0ZAR

시험·검사성적서

발행번호		R20170714-0002		접수번호		170101606-002	
검사완료일		2017-07-14		접수연월일		2017-07-03	
제품명		변할시간					
(품목)제조번호		품목제조신고번호					
유형·재질·품목명		기타기준규격외					
제조(수입)일		유통(품질유지)기한					
의뢰자	성명	이병운		업체명	(주)정은헬스케어		
	소재지	(12790)경기도 광주시 오포읍 오포로859번길 52-7 전화번호: 031 - 767 - 4521 팩스번호: 031 - 767 - 4520 전자우편:					
제조원	업체명					제조국	
	소재지						
시험·검사목적		식품 기타(영양성분검사)					
시험·검사 항목 및 결과							
시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고			
열량(kcal)	기준없음	409.65	상기시험확인 합				
탄수화물(%)	기준없음	73.12	상기시험확인 합				
당류(g/100g)	기준없음	21.81	상기시험확인 합				
조단백질(%)	기준없음	13.79	상기시험확인 합				
조지방(%)	기준없음	6.89	상기시험확인 합				
포화지방(g/100g)	기준없음	2.18	상기시험확인 합				
트랜스지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기시험확인 합				
콜레스테롤(mg/100g)	기준없음	5.38	상기시험확인 합				
나트륨(mg/100g)	기준없음	22.54	상기시험확인 합				



* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드를 스캐너를 이용하여(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.



종합판정 : 상기실험확인함

시험검사원 : 강동완, 신은정, 최보라, 최서영

시험검사책임자 : 노은지, 노철휘

비고 :

- ※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- ※ 검사결과를 광고하거나 용기·포장 등에 표시할 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사성적서를 발급합니다.

2017년07월14일

(주)한국바이오분석연구원



13216 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 519 3층 305호 (상대원동, 중일아인스프라츠)

T:032-602-8898

F:031-604-9001



※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다. <http://lims.mfds.go.kr> Page 2 of 2



문서확인번호 : M7B3-BS3D-ZA1A-GDPF

시험 · 검사성적서

발행번호	R20170817-0019		접수번호	170120513-001	
검사완료일	2017-08-17		접수연월일	2017-08-11	
제품명	변할시간 분말형				
(품목)제조번호	170727.01		품목제조신고번호	2004001704673	
유형 · 재질 · 품목명	프로바이오틱스				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한	2019-01-26	
의뢰자	성명	이병운		업체명	(주)정은헬스케어
	소재지	(464890)경기 광주시 오포읍 오포로859번길 52-7 전화번호: 031 - 767 - 4521 팩스번호: 031 - 767 - 4520 전자우편: aquablue1231@nate.com			
제조원	업체명	(주)정은헬스케어		제조국	
	소재지	경기도 광주시 오포읍 오포로859번길 52-7			
시험 · 검사목적	식품 자가품질위탁검사				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
프로바이오틱스수	표시량 이상	26,000,000,000 CFU/2.5g	적합	1,000,000,000 CFU/2.5g	

종합판정 : 적합

시험검사원 : 고민채

시험검사책임자 : 김천희, 이현영

- ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- ※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다.

2017년08월17일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원



13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 B동 102호(삼평동,코리아바이오파크)

T:031-628-2400

F:031-628-0400~1



※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.

<http://lims.mfds.go.kr> Page 1 of 1

자가 제1701호

자가 품질 검사

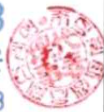
검 체 명	변할시간 분말형				
시험항목	성상, 이물, 수분, 프로바이오틱스 수, 대장균 군				
제조일자	17. 07. 27	제조번호 (LOT NO.)	170727.01	시험일자	17.07.31
항 목	규 격		결 과	적합여부	비고
성 상	어두운 갈회색의 분말로서 이미, 이취가 없어야한다.		적 합	적합	자사
대장균 군	음 성		음 성	적합	자사
이 물	불검출		불검출	적합	자사
수 분	10%이하		4.78%	적합	자사
프로바이오틱스 수	표시량(1,000,000,000/2.5g) 이상		26,000,000,000/2.5g	적합	의뢰
판 정			적 합		

126-86-57148

(주)정은헬스케어 이 병 운

경기도 광주시 오포읍 추자리 67-3

도 소 매 건강보조식품
제 조 업 일 반 식 품



2017년 08월 18일

정 은 헬 스 케 어



문서확인번호 : 1X5K-JN5H-DRAM-XUTN

시험 · 검사성적서

발행번호	R20170810-0084		접수번호	170119611-001	
검사완료일	2017-08-10		접수연월일	2017-08-01	
제품명	변화시간음료형				
(품목)제조번호			품목제조신고번호	201600039667	
유형 · 재질 · 품목명	난소화성말토덱스트린				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한	2019-01-24	
의뢰자	성명	문국봉	업체명	드림바이오(주)	
	소재지	(24747)강원도 고성군 죽왕면 송지호로 15-22 전화번호: 033 - 638 - 3841 팩스번호: 033 - 638 - 3844 전자우편: kami1111@naver.com			
제조원	업체명	드림바이오(주)		제조국	
	소재지	강원도 고성군 송지호로 15-22 해양심층수산업특화단지			
시험 · 검사목적	식품 자가품질위탁검사				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
성상	고유의 색택과 향미를 가지며 이미,이취가 없어야 한다.	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 액상	적합		
식이섭유(%)	표시량의 80% 이상	112%(2.8g/100ml)	적합	2.5g/100ml	
대장균군	음성	음성	적합		
세균수(1ml당)	100이하	0	적합		

종합판정 : **적합**

시험검사원 : 민경하, 박상진, 조미주

시험검사책임자 : 김천희, 이현영, 장정순

비고 :

- ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- ※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다.

2017년08월10일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원



13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 B동 102호(삼평동,코리아바이오파크)

T:031-628-2400 F:031-628-0400~1



※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다. <http://lims.mfds.go.kr> Page 1 of 1

Ⅲ-9. 판매 마케팅, 수출계약 체결

9-1. 판매 마케팅

1) 영업신고증

건강기능식품의 원활한 영업을 위해 건강기능식품 영업을 신고·획득하였다.



제 2017- 0523064 호



건강기능식품 영업신고증

업 소 명 : 해남자연농업영농조합법인

소 재 지 : 전라남도 해남군 옥천면 농공단지길 37

대 표 자 : 황상덕

생 년 월 일 : 1950년02월07일

법 인 명 : 해남자연농업영농조합법인 법 인 번 호 : 201436- 0002852

영업의종류 : 건강기능식품판매업 (세부종류 : 건강기능식품유통전문판매업)

조 건 : 법 제44조 및 동법시행규칙 제57조에 규정된 준수사항을 이행하고 기타 신고권자의 지시사항을 이행해야함.

건강기능식품에관한법을 제6조와 같은 법 시행규칙 제 5조에 따라 영업을 신고를 수리합니다.

2017년 06월 13일

해 남 군



2) 국내 온라인 홍보 및 마케팅

온라인으로는 변할시간 브랜드 전용 홈페이지 <http://c-time.co.kr>를 제작하여 운영 중이며 추가 변할시간 공식인스타그램을 통한 홍보 및 마케팅을 진행하고 있다.

(1) 변할시간 홈페이지 (<http://c-time.co.kr>)



(2) 변할시간 공식인스타그램 (https://www.instagram.com/ctime_official/)



3) 국내 오프라인 홍보 및 마케팅

2017 대한민국식품대전 참가를 통한 홍보 및 마케팅, 한국종합격투기(TFC) 경기 중 변할시간 로고를 경기장 바닥과 라운드걸에게 노출하는 홍보 및 마케팅, 기 구축된 본사 지역 판매처를 통한 홍보 및 마케팅을 진행하고 있다.

(1) 2017 대한민국식품대전



(2) 한국종합격투기(TFC) 변할시간 브랜드 노출



4) 국내 판매 마케팅

국내 판매 마케팅은 변할시간 전용 홈페이지와 NSmall, GSshop과 같은 대형 쇼핑몰을 통한 온라인 판매와 기 구축된 지역 판매처와 소비자들을 통한 오프라인 판매가 진행되고 있으며 추후 약국과 방문판매를 기획하고 있다.

(1) NSmall (http://www.nsmall.com)

The screenshot shows the NSmall website interface. At the top, there are navigation tabs for various categories like '트렌드샵', '영품 해외직구', '마담샵', 'THE BABY', 'THE KITCHEN', '프리미엄 장보기', '기획전/이벤트', and '삼성/NH농협 5%청구할인'. The main header features the 'NS 홈쇼핑' logo and a search bar. Below the header, there are three main category buttons: 'FASHION & BEAUTY', 'HOME & LIFESTYLE', and 'FOOD & HEALTH'. The breadcrumb trail indicates the product is in 'HOME > FOOD & HEALTH > 건강식품 > 유산균/효소/알로에 > 유산균(프로바이오틱)'. The product title is '[변할시간] 변할시간 분말형+음료형 1개월 혼합'. The product image shows boxes and packets of the supplement. The price is listed as 90,000원. A '구매혜택' box indicates a 5% discount for members. The product details include '신용카드할인가 85,500원 (삼성카드 1원 이상 결제시 5% 할인, 최대 200,000원 할인)', '신규가입혜택', '배송비' (free), '배송정보', '원산지/원재료', '제조사/제조국', '모델번호', and '상품번호'. There are buttons for '바로주문' and '장바구니'. The right sidebar shows '최근 본 상품' and other related products like '한복선&김하진탕 공일가전' and '봉팔형님'.

The banner features the text '건강한 설' (Healthy Christmas) and lists three offers: '카드할인 5~7%' (Card discount 5~7%), '최대적립 5만원' (Maximum accumulation 50,000 won), and '매일매일 1DAY특가' (Daily 1 DAY special price). The banner is decorated with colorful pine trees and ornaments.

(2) GSshop (http://www.gsshop.com)

GS SHOP

마이쇼핑
 장바구니

☰

[TV쇼핑](#)
[백화점](#)
[브랜드 X GS](#)
[지금BEST](#)
[오늘오픈](#)
[이벤트](#)

[로그인](#)
[회원가입](#)
[고객센터](#)

[바로접속 ON](#)

[홈](#)
[식품](#)
[건강·다이어트 식품](#)
[유산균](#)
[스틱/분말](#)

ON-AIR
00:41:40
구매하기
TV편성표

장바구니

심

B
찜한 브랜드
최근분상품
상품이 없습니다.
TOP

하루에 한번 변할시간

이미지 확대

13일 이후 뒤 종료

새해에는 하루에 한번 변할시간

원산지 : 구매정보 참조

★★★★★ 첫 상품평 쓰기

GS가 24,000원 ~ ?

	카드결제할인	KB국민 7% (5만원 이상 결제시) ?
	적립금	5% ?
	무이자	KB국민, 신한 최대 6개월 ?
	배송비	무료배송

상품을 선택하세요.
▼

심

장바구니

바로구매

위대한 실! 최대 6만원 적립금 >

f
t

다른 고객님이 함께 보신 상품

[중군당건강]전인화의 락토픽 생유산균 6통 (총 300포)
69,000원
79,000원

[여에스터유산균] 울트라 플로라 프로바이오틱스 BLUE 6병
197,000원
227,000원

[GS 1등 유산균] 덴마크 유산균 이마기 3+3병 총 12개월분
197,000원
198,000원

듀오락 데일리키즈 유산균 2통 (60일분)
62,700원
66,000원

새해에는 하루에 한번 변할 시간

옵션

상품을 선택하세요.

총 금액 ?

0원

바로구매



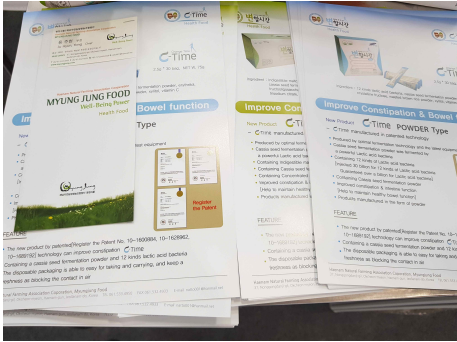
장바구니

🔍 상품 자세히 보기

5) 수출을 위한 국외 홍보 및 판매 마케팅


(1) 2017 홍콩 식품박람회 참가

박람회에 참석한 세계 바이어와 현지인에게 결명자발효분말과 변할시간 제품을 홍보 및 판매 마케팅 하였다.

	
<p>홍콩식품박람회 참석 부스</p>	<p>결명자발효분말 및 완제품 2종 전시</p>
	<p style="text-align: center; font-size: 24px;">개인정보</p>
<p>완제품에 대한 홍보 자료</p>	<p>바이어에 대한 홍보 및 설명</p>
<p style="text-align: center; font-size: 24px;">개인정보</p>	<p style="text-align: center; font-size: 24px;">개인정보</p>
<p style="text-align: center;">DASANTEX CO.,LTD</p>	<p style="text-align: center;">GLOBELINKS(THAILAND) CO.,LTD</p>
<p style="text-align: center; font-size: 24px;">개인정보</p>	<p style="text-align: center; font-size: 24px;">개인정보</p>
<p style="text-align: center;">NISOON INTERNATIONAL TRADING CO.,LTD</p>	<p style="text-align: center;">CENTURY STAGE ASSOCIATION</p>

(2) 러시아 모스크바 국제식품박람회 2017 참가 및 시장조사

박람회에 참석한 세계 바이어와 현지인에게 결명자발효분말과 변할시간 제품을 홍보 및 판매 마케팅 하였다.

	<p>개인정보</p>
<p>러시아 모스크바 국제 식품박람회 부스</p>	<p>바이어 및 현지인에 대한 홍보 및 설명</p>
<p>개인정보</p>	<p>개인정보</p>
<p>LLC WINNER, MAXIM GORYUNOV</p>	<p>DEPO</p>
<p>개인정보</p>	<p>개인정보</p>
<p>OGNIKOBO, LIDIA</p>	<p>BUSINESSOPTIM LTD</p>
<p>개인정보</p>	<p>개인정보</p>
<p>ALPHA ROBBON</p>	<p>ALLA, MEHNEVCKI</p>
<p>개인정보</p>	<p>개인정보</p>
<p>VLADAN, VITA</p>	<p>INTER TRADE LLC</p>

개인정보	개인정보
DOCTOR NEAR	UPKAIT CORP
개인정보	개인정보
VENDING RU LTD	YEVGANIA KYBANKOVA

추가 러시아 현지의 약국 및 건강기능식품 판매점 방문을 통한 시장조사로 향후 수출을 위한 초석을 마련하였다.

(가) 약국

	
모스크바 약국의 변비 관련 건강기능식품	모스크바 약국의 변비 관련 건강기능식품
	
모스크바 약국의 변비 관련 건강기능식품	모스크바 약국의 변비 관련 건강기능식품
	
모스크바 약국의 변비 관련 의약품	모스크바 약국의 변비 관련 의약품

개인정보	개인정보
모스크바 약국의 외부	모스크바 약국의 내부
개인정보	개인정보
모스크바 약국의 외부	모스크바 약국의 내부

(나) 건강기능식품 판매점

	
러시아산 건강기능식품 판매점	러시아산 건강기능식품 판매점
	개인정보
러시아산 건강기능식품 판매점	러시아산 건강기능식품 판매점
개인정보	
인도산 건강기능식품 판매점	인도산 건강기능식품 판매점

개인정보
인도산 건강기능식품 판매점



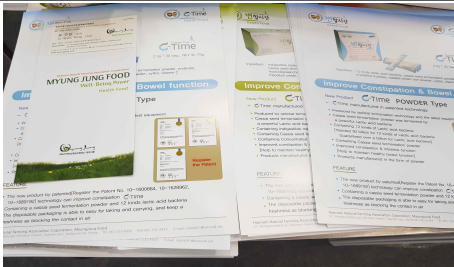
인도산 건강기능식품 판매점

(3) 2017 중국 산시성 특색농산품교역박람회 참가

박람회에 참석한 세계 바이어와 현지인에게 결명자발효분말과 변할시간 제품을 홍보 및 판매 마케팅 하였다.

개인정보

중국 산시성 박람회 참석 부스



완제품에 대한 홍보 자료

개인정보

바이어 및 현지인에 대한 홍보 및 설명

개인정보

바이어에 대한 홍보 및 설명

개인정보

가한건강식품과학유한공사

개인정보

백세통원식품영양문의유한공사 방문


9-2. 국내 판매계약 1건 및 수출계약 2건 체결


1) 판매계약 - 하라헤드쿼터스

변할시간 2종에 대한 국내 판매계약을 체결하였다.

판매 계약서

계약서번호 : HN2017120501

본 사 해남자연농업 영농조합법인 

판매원 하 라 헤 드 쿼 터 스 

판매 계약서

계약서번호 : HN2017120501

A 본 사 : 해남자연농업 영농조합법인
대표자 : 황 상 덕

B 판매원 : 하라헤드쿼터스
대표자 : 고 태 현

본 계약에 있어 해남자연농업영농조합법인, 명정식품을 "A"라 하며, 하라헤드쿼터스를 "B"라 한다. "A", "B" 는 본 계약서 조항/규정에 대하여 성실히 수행할 것을 약속하며, 상호 신뢰와 믿음으로 공동이익 도모를 목적으로 본 계약을 체결한다.

제 1조 목적

"A"는 "B"에게 제품을 공급하고, "B"는 이를 판매하기 위함이다.

본 계약은 A가 제조, 판매하는 제품을 B가 위탁받아 국내에 판매하는데 목적이 있으며 그에 수반되는 "A"와 "B" 간의 권리 및 의무사항을 규정함을 목적으로 한다.

제 2조 제품

"A" 가 "B"에게 제공하는 제품은 변할시간분말형 과 변할시간음료형 제품이며, "을"은 계약제품에 한하여 온라인 영업행위(판매, 홍보)를 할 수 있다.

대외비

한
KHO

대외비

2017 년 12 월 13 일

A 상 호 해남자연농업영농조합법인

사업자번호 415-81-15612

주 소 전남 해남군 옥천면
농공단지길 37

대 표 자 황 상 덕



B 상 호 하라레드퀘터스

사업자번호 206-31-40531

주 소 서울특별시 광진구 자양로 325

대 표 자 고 태 현



2) 수출계약 - VENDING RU LTD(러시아)

모스크바 국제식품박람회를 통해 변할시간 분말형 제품에 대한 수출계약을 체결하였다.

SALES AGREEMENT

Application No : HN20170914

"Party A" HAENAM NATURAL FARMING ASSOCIATION CORPORATION

"Party B" VENDING RU LTD

In this agreement, the HAENAM NATURAL FARMING ASSOCIATION CORPORATION is called "Party A", and VENDING RU LTD is referred to as "Party B". This agreement is based on the principle of mutual trust and benefit which is based on the mutual interests of both parties. The "Party A" and "Party B" in the agreement shall be responsible for the compliance and execution of the terms and conditions of this agreement.

Article 1 Objective

The objective of Party A is to supply the products mentioned in article 3 to Party B, then Party B sell the products provided by Party A.

Article 2 Designated marketing area

2.1 The Party B marketing area within Russia territory

Article 3 Product

3.1 Product Name : MUCIN

- Shape : Pill
- Packaging unit : 1Box(3g * 90 bag)
- Duration : 8 week, (8 week mean is from payment 50% for order to finished manufacture)
- Mode of foreign trade : FOB BUSAN, KOREA
- Certifications that Party A need to provide to Party B
 - 1) Certificate of origin
 - 2) Certificate of analysis (COA)
 - 3) Sanitary certificate
 - 4) Invoice
 - 5) Packing list

3.2 Product Name : NATTO KINAJE CP

- Shape : Pill
- Packaging unit : 1Box(3g * 90 bag)
- Duration : 8 week, (8 week mean is from payment 50% for order to finished manufacture)
- Mode of foreign trade : FOB BUSAN, KOREA
- Certifications that Party A need to provide to Party B
 - 1) Certificate of origin
 - 2) Certificate of analysis (COA)
 - 3) Sanitary certificate
 - 4) Invoice
 - 5) Packing list

3.3 Product Name : CHANGE TIME (C-TIME) POWDER

- Shape : Powder
- Packaging unit : 1Box(2.5g * 30 bag)
- Duration : 8 week, (8 week mean is from payment 50% for order to finished manufacture)
- Mode of foreign trade : FOB BUSAN, KOREA
- Certifications that Party A need to provide to Party B
 - 1) Certificate of origin
 - 2) Certificate of analysis (COA)
 - 3) Sanitary certificate
 - 4) Invoice
 - 5) Packing list



대외비

한
KHO

14th / SEP. / 2017

Party A

Trade name : HAENAM NATURAL FARMING ASSOCIATION CORPORATION

개인정보

Legal representative : JUHYUNG, YONG

Signature :



Party B

Trade name : VENDING RU LTD

개인정보

Legal representative : JURY BOCHAROV

Signature :



3) 수출계약 - 산서태원시백세식품유한공사(중국)

산시성 특색농산품교역 박람회를 통해 결명자발효분말, 변할시간 분말형, 변할시간 음료형에 대한 수출계약을 체결하였다.

销售合同

合同编号：HN20171201

"甲方" 海南自然农业营农组合法人

"乙方" 山西·太原市百岁食品有限公司

销售合同

合同编号：HN20171201

"甲方"：海南自然农业营农组合法人

"乙方"：山西·太原市百岁食品有限公司

韩国海南自然农业营农组合法人（以下称为甲方）和中国的山西·太原市百岁食品有限公司（以下称为乙方），甲方和乙方遵守本合同条款和规定，以互惠互利、相互信赖为基础，签定本合同。

第一条 [目的]

1.1 甲方向乙方提供第三条的产品，乙方销售该产品。

第二条 [指定销售区域]

2.1 乙方有权在全中国营业行为（销售、推广）产品。

第三条 [产品]

3.1 产品名称：决明子发酵粉 (POWDER OF PERMENTED CASSIA SEED)

- 产品类型：粉 (POWDER)
- 包装单位：1 Carton (10kg * 1 bag)

3.2 产品名称：CHANGE TIME (C-TIME) 粉 (POWDER TYPE)

- 产品类型：粉 (POWDER)
- 包装单位：1 Box (2.5g * 30 bag)

3.3 产品名称：CHANGE TIME (C-TIME) 液状

- 产品类型：液状 (LIQUID)
- 包装单位：1 Box (100ml * 30 bag)

대외비

한
KHO

대외비

第十三条【解决纠纷】

13.1 因本合同或有因本合同出现的所有纠纷，经大韩商社仲裁院的仲裁解决。

另外出现有因本合同的诉讼，将甲方地址的法院为管辖法院。

为证明上述内容，甲方和乙方签署、盖章及申请公证，之后各持一份。

(附件：营业执照)

2017年 12月 07日

"甲方"	公司名称	:	海南自然农业营农组合法人
	公司地址	:	韩国 全南 海南郡 玉泉面 农工园区 37
	营业执照号码	:	415-81-15612
	公司代表	:	黄相德
"乙方"	公司名称	:	山西·太原市百岁食品有限公司
	公司地址	:	山西省太原市万柏林区玉河中街22号
	营业执照号码	:	91140109554106384
	公司代表	:	石剑英



III-10. 중국 수입건강식품 인증 보전 대행 계약

국내 장기능개선과 같은 기능성 식품은 건강기능식품으로 분류되어 식품의약품안전처의 인증을 받아야 되는 것과 같이 중국은 보건식품 CFDA에 등록되어야 한다. 국내 장기능개선 항목과 유사한 중국 내 보건기능은 변통(쾌변 기능식품)이며 중국 내 검사와 번역공증, 대행을 위해 KTR-China(Shanghai)와 계약을 체결하였다.

KTR 韩研检测技术服务(上海)有限公司
KOREA TESTING & RESEARCH INSTITUTE

NO KTR-171212-01

중국 보건식품 CFDA 등록 계약서

해남자연농업영농조합법인 (이하 "갑"이라 한다), 및 KTR-China (Shanghai) (이하 "을"이라 한다)은 다음과 같이 중국 보건식품 CFDA 등록에 대한 계약을 체결한다.

제1조 (목적)

본 계약은 "갑", "을" 사이에 중국의 보건식품 CFDA 등록과 관련한 업무의 원활한 수행을 위하여 필요한 계약 당사자의 권리 및 의무 등 제반 사항을 정하는 것을 그 목적으로 한다.

제2조 (당사자의 지위)

"갑"은 "을"에게 제3조에서 규정하는 소정의 관련 업무를 위탁하고, "을"은 "갑"으로부터 수탁 받은 업무를 수행한다.

제3조 (용역 범위)

"갑"이 "을"에게 위탁하는 구체적인 용역 업무는 아래와 같다.

- 1) 중국 보건식품 등록 적합성 사전 검토 필수자료 요청
- 2) 배합, 생 산공정, 품질 표준, 개발 근거 등의 적합성 사전 검토
- 3) 시험 신청, 시험 필수 서류 및 샘플 제출
 - 등록에 요구되는 시험 의뢰 대행
 - 시험 필수 자료 요청, 정리, 작성, 제출 및 샘플 요청, 제출
 - 위생학, 안정성, 기능성분시험
 - 안전독리시험
 - 기능 검증시험
- 4) CFDA 등록 신청, 등록 필수 서류 및 샘플 제출
 - 시험 필수 자료 요청, 정리, 작성, 제출 및 샘플 요청, 제출
 - 재시험
 - 기술 심사, 서류 보충, 기술 재심사
 - 행정 심사
- 5) CFDA 보건식품 비준증서 취득

제4조 (해당 제품)

제3조의 해당 제품은 "갑"이 중국 보건식품 CFDA 비준증서 등록을 원하는 제품으로서 그 내용은 "별첨1"과 같다.

제5조 (보수 및 지급)

1항: "갑"은 "을"의 제3조 용역 제공의 대가로 대행비 (RMB:500,000)을 "을"에게 지급하며 그 상세

내역은 별첨2 견적서 와 같다. 대행비는 상호 협의하여 분할 지급한다.

2항: 시험비는 실비로 지불하고 시험진행전에 시험비(실비정산: RMB 약 600,000)를 을에게 지급하고 그 상세 내역은 중국 시험 기관 견적 내용과 같다.

3항: 본 계약의 번역공증 비용은 실제 등록 진행시 페이지로 별도 정산한다.

4항: 본 계약 제3조의 용역 내용 이외에 추가로 이루어지는 업무가 있는 경우의 용역 비용 및 그 지급시기 등에 대한 자세한 사항은 "갑", "을"이 별도의 서면 합의를 통해 결정한다.

5항: 송금계좌는 다음과 같다.

구분	내용
계좌정보	개인정보

제6조 (계약기간)

본 계약의 계약기간은 본 계약체결일로부터 해당제품의 CFDA증 취득 일까지로 한다.

제7조 (상호협조)

"을"은 제3조 소정의 용역 제공과 관련된 CFDA 등록 결과 "갑"에게 보고하여야 하며, "갑"은 "을"이 해당제품의 CFDA 등록을 위한 제3조의 용역을 제공하기 위하여 "갑"에게 요청하는 정보나 자료 및 샘플을 적극적으로 제공하는 등 계약당사자는 신의성실로써 협조한다.

제8조 (정보제공)

1항: "갑"은 제4조의 제품을 등록하기 위하여 "을"에게 정확한 제품정보를 제공하여야 한다.

2항: "갑"이 "을"에게 제공한 정보의 하자 및 지연으로 인한 손해는 "갑"이 부담한다.

3항: "을"이 제3조의 용역을 달성하기 위해 "갑"은 "갑"의 수입자가 "을"에게 협조할 수 있도록 최

선을 다하여야 한다.

4항: 중국 CFDA 등록에 관해 추가 자료가 필요한 경우, "을"은 "갑"에게 관련 자료를 요구할 수 있다.

제9조 (용역의 성과물)

"을"은 CFDA 등록 결과 (등록증) 및 기타 증빙서류를 CFDA 등록 결과 수령 후 10일 이내에 "갑"에게 각각 제공한다.

제10조 (비밀유지의무)

본건 관련 모든 자료 및 정보는 "갑"이 "을"에게 의뢰한 해당 제품의 중국 CFDA 등록 목적으로만 사용되어야 하고, "갑"과 "을"은 그에 따른 비밀을 유지하여야 한다. 계약 수행을 위해 계약당사자가 상대방으로부터 제공받은 자료나 정보를 제3자에게 제공해야 할 경우 반드시 상대방 당사자의 사전 서면동의를 얻어야 함은 물론 당해 제3자와의 별도의 비밀유지계약을 체결하여야 한다.

제11조 (권리/의무의 양도금지)

"갑" 과 "을"은 나머지 계약당사자의 사전 서면동의 없이 본 계약상의 지위, 본 계약상의 권리 및 의무의 전부 또는 일부를 제3자에게 양도, 위임, 하도급 또는 담보로 제공할 수 없다.

제12조 (등록대리인 선임)

해당제품의 중국 CFDA 등록을 위한 등록대리인은 "을"(KTR-China(Shanghai))으로 한다.

제13조 (조항 효력의 개별성)

1항: 본 계약의 조항에 대하여 "갑"과 "을"사이해 해석을 달리하여 이행상 차질이 발생할지라도 본 계약 자체 및 잔여 조항의 유효성 및 기능은 영향을 받지 아니한다. 다만, "갑", "을"이 별도로 합의한 경우에는 그러하지 아니하다.

2항: 본 계약의 각 조항에 붙여진 표제는 열람 또는 조회시의 편익을 위한 것일 뿐, 그 어느 조항의 표제도 계약내용에 영향을 미치지 아니한다.

제14조 (완전합의)

본 계약은 "갑"과 "을"간에 완전합의를 표시하는 것으로서 계약과 관련하여 본 계약 체결 일까지 "갑"과 "을"간에 주고받은 서면이나 구두의 모든 사항은 본 계약으로 대체된다.

제15조 (계약의 변경)

"갑"과 "을"은 본 계약의 내용을 변경할 수 있다. 다만 서면으로 하지 않으면 그 효력이 없다.

제16조 (계약의 해지)

1항: "갑"이나 "을"이 본 계약을 위반하고 상대방이 그 위반의 시정을 최고하였으나, 최고 후 30일 이내에 그 위반이 시정되지 않는 경우 상대방에 대한 서면통지로서 본 계약을 해지할 수 있다.

2항: 다음 각 호1의 경우 상대방은 제1항에도 불구하고 본 계약을 즉시 해지할 수 있다.

- 가) "갑", "을"이 부도, 해산, 워크아웃, 회생절차, 파산 등의 신청으로 본 계약을 정상 적으로 이행할 수 없게 된 경우
- 나) "갑", "을"이 가압류, 압류, 가처분, 경매 등의 강제집행을 당하여 본 계약을 정상 적으로 이행할 수 없게 된 경우
- 다) "갑", "을"이 제9조 또는 제10조의 의무를 위반한 경우
- 라) 법률, 법원의 판결, 정부의 명령 등으로 인해 본 계약의 정상적인 이행이 불가능한 경우

3항: "을"의 귀책사유로 본 계약이 해지되는 것이 아닌 한 "을"은 "갑"으로부터 지급받은 대가를 반환하지 않는다.

4항: "을"의 귀책사유로 본 계약이 해지되는 경우에는 "을"은 "갑"과 상호 협의하여 진행 단계에 의거 실비정산한다.

제17조 (불가항력)

본 계약을 이행함에 있어 천재지변 또는 불가항력으로 발생하거나 기타 일방의 고의, 과실 또는 태만에 의하지 아니한 원인으로 업무를 더 이상 진행하는 것이 불가능 할 경우에는 이를 서면으로 상대방에게 통보해야 한다. 서면으로서 상대방에게 알린 경우에만 이 계약서 내용의 의무 및 책임을 지지 아니하며, 불가항력의 상황으로 인해 상대방 측에 발생한 손실 또는 손해에 대하여 책임을 지지 아니한다.

제18조 (사정변경)

1항: 중국 보건식품 CFDA 등록 관련 규정이 변경됨으로 인한 추가비용에 대하여 "을"은 "갑"에게 이를 서면 통보하여야 한다.

2항: 만일 "갑"의 영업양도로 인하여 "갑"측의 영업주체가 변경된 경우, 그 양수인은 본 계약을 승계한 것으로 보며, 이 경우 "갑"은 양수인과 연대하여 채무를 부담한다.

제19조 (손해 배상)

1항: "갑"이 "을"에게 제공한 정보로 인하여 손해가 발생한 경우에는 "을"은 그 손해에 대하여 배상할 책임이 없다.

2항: 해당제품에 대한 "갑"의 중국수출 범위는 해당 제품의 등록범위 내에서 이루어져야 하며, "갑"의 고의 또는 과실로 등록범위를 이탈하여 해당제품이 중국으로 출하되고 이로 인하여 "을"에게 손해가 발생한 경우 "갑"은 "을"에게 이를 배상하여야 한다.

제20조 (준거법 및 분쟁해결)

1항: 본 계약은 중화인민공화국 법률을 준거법으로 한다.

2항: 본 계약과 관련하여 혹은 "갑", "을"의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 "갑", "을"은 이를 원만히 해결토록 노력하여야 하며, 이로 인하여 발생하는 일체의 분쟁에 대하여 해결이 불가능할 경우 중화인민공화국법원으로 하여 이를 해결한다.

제21조 (계약의 효력)

"갑", "을"이 기명날인 또는 서명한 날부터 본 계약의 효력은 발생한다.

제22조 (해석)

본 계약에 명기되지 아니하거나 본 계약상 이의가 있는 사항에 대하여는 계약의 목적 달성 및 신의 성실에 적합하게 "갑", "을"의 합의에 의하여 결정하며, 합의가 이루어지지 아니할 경우에는 관련 법령 및 일반상관례에 의하여 한다.

본 계약의 체결을 증명하기 위하여 본 계약서 2통을 작성하여 "갑", "을"이 각 기명날인 또는 서명한 후 각 1통씩 보유하기로 한다.

2017년 12월 12 일

"갑" : 해남자연농업영농조합법인
대표이사 황 상 덕 (인 또는 Sign)
한국 전남 해남군 옥천면 동공단지길 37

"을" : KTR-China (Shanghai)
법인대표 김 지 영 (인 또는 Sign)
중국 상해시 갑북구 감창3로 76호



중국 보건식품 CFDA 등록 계약서 (부속1)

대외비

“갑” : 해남자연농업영농조합법인
대표이사 황 상 덕 (인 또는 Sign)
한국 전남 해남군 옥천면 농공단지길 37

“을” : KTR-China (Shanghai)
법인대표 김 지 영 (인 또는 Sign)
중국 상해시 갑북구 강장3로 76호



3-7. 연구개발성과

1) 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인 력 양 성	정책 활용· 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI						
최종 목표	4	3			2			3				3	4		0	6			
1 차 년 도	목 표	1						1					1		0	1			
	실 적	1						2					1		1	6			
2 차 년 도	목 표	2						1				1	1			1			
	실 적	3						1				1	1			5			
3 차 년 도	목 표		0			1		1				1	1			1	0		
	실 적		1			1		1				1	1			5	1		
소 계	목 표	3	0			1		3				2	3		0	3	0		
	실 적	4	1			1		4				2	3		1	16	1		
종료 1차년도		1	1			1							1			1			
종료 2차년도			1									1				1			
종료 3차년도			1													1			
소 계		1	3			1						1	1			3			

2) 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], **신품종**, **프로그램개발** 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지식재산권	발명특허	대한민국	해남자연 농업영농 조합법인	2015. 07.22	10-2015- 0103955				
지식재산권	발명특허	대한민국	해남자연 농업영농 조합법인	2016. 09.22	10-2016- 0121282				
지식재산권	발명특허	대한민국	해남자연 농업영농 조합법인	2016. 10.18	10-2016- 0135269	해남자연 농업영농 조합법인	2017. 12.06	10-1808 306	

3) 논문게재 및 학술회의 발표

(1) 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Effect of Roasted Water Extract of Fermented <i>Cassia tora</i> L. by <i>Lactobacillus casei</i> on the Loperamide-Induced Constipation Model in Rats	The Korean Journal of Medicinal Crop Science	노종현	24(6)	대한민국	한국약용작물학회	비SCI
2	A Twenty-six Week Repeated Oral Dose Toxicity Study and A Four Recovery Study of <i>Cassia tora</i> L. in Juvenile Sprague-Dawley Rats	The Korean Journal of Medicinal Crop Science	정호경	투고	대한민국	한국약용작물학회	비SCI

Loperamide로 유도된 변비모델에서 *Lactobacillus casei*에 의해 발효된 볶은 결명자 물 추출물의 효과

노종현* · 정호경* · 이두진* · 장지훈* · 심미옥* · 정자균* · 이기훈* · 안병관* · 조정희* · 장민철** · 용주현** · 조현우**
*한약진흥재단, **해남자연농업농조합법인

Effect of Roasted Water Extract of Fermented *Cassia tora* L. by *Lactobacillus casei* on the Loperamide-Induced Constipation Model in Rats.

Jong Hyun Nho*, Ho Kyung Jung*, Mu Jin Lee*, Ji Hun Jang*, Mi Ok Sim*, Ja Kyun Jung*, Ki Ho Lee*, Byeong Kwan An*, Jung Hee Cho*, Min Cheol Jang**, Ju Hyun Yong**, and Hyun Woo Cho**

*National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 38540, Korea.
**Heasam Natural Farming Association Corporation, Heasam 59021, Korea.

ABSTRACT

Background: Constipation is one of the most common functional gastrointestinal disorder. The present study examined the ability of water extract of fermented (FRC) and non-fermented (NFR) roasted *Cassia tora* to improve intestinal function and reduce constipation in a rat constipation model.

Methods and Results: Different concentration of FRC and NFR were orally administered loperamide (5 mg/kg; LOP) reduced the number, weight, and water content of feces, as well as intestinal transit motility. However, 24 h-(24-hour fermented roasted-*Cassia tora*) 300 mg/kg FRC administration increased the number, weight, and water content of feces, compared to that seen in the LOP group, and also improve intestinal transit motility and the thickness of distal colon and mucous fluid.

Conclusions: The results of the present study indicated that LOP-induced constipation was improved by treatment with FRC. Therefore FRC could be used to develop functional foods or natural medicine for constipation. However, further study is needed to clarify how fermentation improves the medicinal properties of roasted *C. tora*.

Key Words: *Cassia tora* L., Cassia semen, Constipation, Laxative, Loperamide

서 언

변비는 인구집단 유병률이 14% 이상으로 보고된 흔한 질환이다. 환자마다 변비에 대해 표현하는 내용이 다양하지만, 하나의 증상군이기 때문에 객관적으로 정의하기가 쉽지 않다 (Jun et al., 2006). 변비가 환자의 생활을 위협하는 중증 질환은 아니지만, 치료 약발에도 불구하고 개선되지 않았다고 응답한 환자의 비율이 50%에 이를 정도로 개선이 어려운 질환이다. 변비환자 90% 이상은 질환 없이 발생하는 만성 특발성

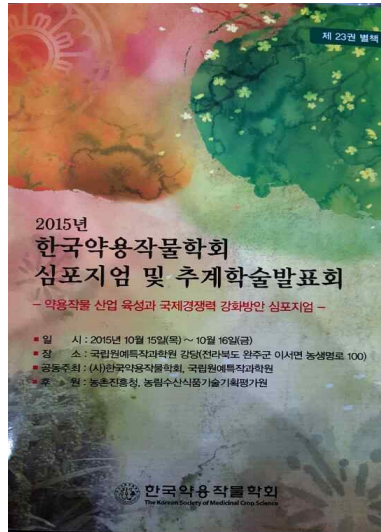
변비이며, 장내 내 병소, 대사성 질환, 특정 약물의 복용 등의 원인으로 변비가 유발되기도 한다 (Choi, 2005). 이러한 변비의 치료에 있어 가장 중요한 점은 식이요법이다. 식이섬유는 장내 효소에 의해 소화되지 않으며, 대장에서 물을 흡수해 변을 연하게 하고 변의 부피를 늘려 배설에 도움을 준다. 때문에 충분한 식이섬유의 섭취는 변비의 예방 및 치료에 적절하다 (Jung, 2011). 하지만 갑작스럽게 수송성 식이섬유를 많이 섭취하면 일부 환자들은 복부 팽만을 느낄 수 있고, 환자마다 식이섬유에 대한 반응이 다르기 때문에 섭취 시 주의가 요구

*Corresponding author: (Phone) +82-41-869-2873 / (E-mail) #j0123@nra.com
Received 2016 October 26 / 1st Revised 2016 November 21 / 2nd Revised 2016 December 8 / 3rd Revised 2016 December 19 / Accepted 2016 December 21
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.- 본 연구과제의 수행결과로 발표된 것만 기재합니다.)

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015 한국약용작물학회 심포지움 및 추계학술발표회	정호경 등 9명	2015. 10. 15	국립원예특작과학원 강당	대한민국
2	2016 Spring International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea	장지훈 외 8명	2016. 04. 18	광주 김대중컨벤션센터	대한민국
3	2017 KALAS International Symposium	장지훈 외 8명	2017. 08. 23	서울연세대학교 신촌캠퍼스 백양누리	대한민국



IP03-044
 LC/MS Analysis and Laxative Effect of fermented *Cassia tora* L. seeds
 Jollanamdo Development Institute of Traditional Korean Medicine, Jangheung-gun 56338, Korea
 Ho Kyung Jung, Ji Han Jung, Ki ho Lee, Mi Jin Lee, Mi Ok Sim, Byoung Kwan An, Hyun Woo Cho, Jung Hye Cho and Wan Seok Jung.

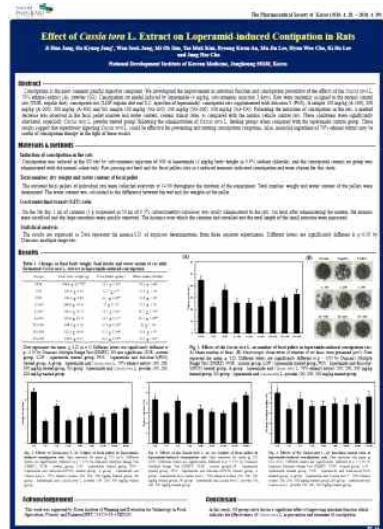
Objectives
 The present study was designed to investigate LC/MS analysis and the improvement constipation preventive effects of the fermented *Cassia tora* L. seeds.

Materials and Methods
Isolation and LC/MS analysis
 Seed of *C. obtusifolia* L. (20 kg) was extracted with 20% ethanol (60 L) aqueous. The extract was subjected to chromatography on an RP-C18 silica gel (1 kg) column, and eluted successively with 10% to 80% ACN to afford the corresponding fractions (1-11). These compounds were redissolved in MeOH, and was filtered through a 0.22 μm membrane prior to use, and the solution was injected into the system for LC/MS analysis.
Induction of constipation in the rats
 Constipation was induced in the SD rats by subcutaneous injection of 300 μl loperamide (4 mg/kg body weight in 0.9% sodium chloride).
 Total number, dry weight and water content of fecal pellet
 The excreted fecal pellets of individual rats were collected everyday throughout the duration of the experiment. The water content was calculated as the difference between the wet and dry weights of the pellet.

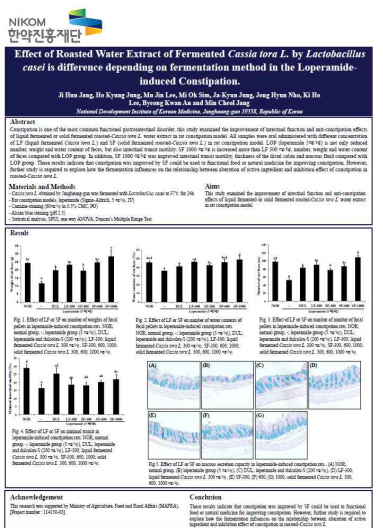
Results
 As a result of LC/MS analysis, We identified to Emodin, chrysoferanol, emodin, obtusin, rufosulfuricin, rufosulfuricin-2-O-glucoside, rufosulfuricin-3-O-glucoside, rufosulfuricin-6-O-glucoside, rufosulfuricin-7-O-glucoside, rufosulfuricin-8-O-glucoside, rufosulfuricin-9-O-glucoside, rufosulfuricin-10-O-glucoside, rufosulfuricin-11-O-glucoside, rufosulfuricin-12-O-glucoside, rufosulfuricin-13-O-glucoside, rufosulfuricin-14-O-glucoside, rufosulfuricin-15-O-glucoside, rufosulfuricin-16-O-glucoside, rufosulfuricin-17-O-glucoside, rufosulfuricin-18-O-glucoside, rufosulfuricin-19-O-glucoside, rufosulfuricin-20-O-glucoside, rufosulfuricin-21-O-glucoside, rufosulfuricin-22-O-glucoside, rufosulfuricin-23-O-glucoside, rufosulfuricin-24-O-glucoside, rufosulfuricin-25-O-glucoside, rufosulfuricin-26-O-glucoside, rufosulfuricin-27-O-glucoside, rufosulfuricin-28-O-glucoside, rufosulfuricin-29-O-glucoside, rufosulfuricin-30-O-glucoside, rufosulfuricin-31-O-glucoside, rufosulfuricin-32-O-glucoside, rufosulfuricin-33-O-glucoside, rufosulfuricin-34-O-glucoside, rufosulfuricin-35-O-glucoside, rufosulfuricin-36-O-glucoside, rufosulfuricin-37-O-glucoside, rufosulfuricin-38-O-glucoside, rufosulfuricin-39-O-glucoside, rufosulfuricin-40-O-glucoside, rufosulfuricin-41-O-glucoside, rufosulfuricin-42-O-glucoside, rufosulfuricin-43-O-glucoside, rufosulfuricin-44-O-glucoside, rufosulfuricin-45-O-glucoside, rufosulfuricin-46-O-glucoside, rufosulfuricin-47-O-glucoside, rufosulfuricin-48-O-glucoside, rufosulfuricin-49-O-glucoside, rufosulfuricin-50-O-glucoside, rufosulfuricin-51-O-glucoside, rufosulfuricin-52-O-glucoside, rufosulfuricin-53-O-glucoside, rufosulfuricin-54-O-glucoside, rufosulfuricin-55-O-glucoside, rufosulfuricin-56-O-glucoside, rufosulfuricin-57-O-glucoside, rufosulfuricin-58-O-glucoside, rufosulfuricin-59-O-glucoside, rufosulfuricin-60-O-glucoside, rufosulfuricin-61-O-glucoside, rufosulfuricin-62-O-glucoside, rufosulfuricin-63-O-glucoside, rufosulfuricin-64-O-glucoside, rufosulfuricin-65-O-glucoside, rufosulfuricin-66-O-glucoside, rufosulfuricin-67-O-glucoside, rufosulfuricin-68-O-glucoside, rufosulfuricin-69-O-glucoside, rufosulfuricin-70-O-glucoside, rufosulfuricin-71-O-glucoside, rufosulfuricin-72-O-glucoside, rufosulfuricin-73-O-glucoside, rufosulfuricin-74-O-glucoside, rufosulfuricin-75-O-glucoside, rufosulfuricin-76-O-glucoside, rufosulfuricin-77-O-glucoside, rufosulfuricin-78-O-glucoside, rufosulfuricin-79-O-glucoside, rufosulfuricin-80-O-glucoside, rufosulfuricin-81-O-glucoside, rufosulfuricin-82-O-glucoside, rufosulfuricin-83-O-glucoside, rufosulfuricin-84-O-glucoside, rufosulfuricin-85-O-glucoside, rufosulfuricin-86-O-glucoside, rufosulfuricin-87-O-glucoside, rufosulfuricin-88-O-glucoside, rufosulfuricin-89-O-glucoside, rufosulfuricin-90-O-glucoside, rufosulfuricin-91-O-glucoside, rufosulfuricin-92-O-glucoside, rufosulfuricin-93-O-glucoside, rufosulfuricin-94-O-glucoside, rufosulfuricin-95-O-glucoside, rufosulfuricin-96-O-glucoside, rufosulfuricin-97-O-glucoside, rufosulfuricin-98-O-glucoside, rufosulfuricin-99-O-glucoside, rufosulfuricin-100-O-glucoside.

주최자 연락처: 정호영 E-mail: JCTM@saver.com Tel: 061-860-2813

번호 1. 2015 한국약용작물학회 심포지엄 및 추계학술발표회



번호 2. 2016 Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea



번호 3. 2017 KALAS International Symposium

4) 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

5) 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도

6) 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율
1	변할시간 분말형, 변할시간 음료형	건강기능식품 '배변활동 원화에 도움을 줄 수 있음	해남자연농업 영농조합법인	사업화	0	0	0	100

7) 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

8) 인력활용/양성 및 고용창출

(1) 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학사→석사 졸업	2015		1			1					1	

(2) 고용창출

고용창출 성과													
번호	분류	기준년도	고용창출 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사 채용	2015		2			2					2	
2	석사 채용	2016		1			1					1	
3	석사 채용	2017		1				1				1	

9) 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

10) 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	신문	해남우리신문	회사의 영업활동 및 기술개발 홍보	2015. 06. 29
2	신문	전남중앙신문	기술개발 홍보	2015. 10. 20

미생물발효 산업...중국에만 200개 대리점

김유성 기자 | 5340234@hanmail.net



▲ 옥천 농공단지 내 명정식품 미생물 연구실, 다수의 석박사들이 연구개발 다양한 미생물 특허제품을 국내외로 수출하고 있다.

옥천농공단지 내 명정식품 화장품까지, 미생물 연구매진

21세기 식품산업의 중심에 서있는 미생물 발효, 해남에 미생물발효 전문기업이 있다. 옥천면 농공단지 내에 위치한 명정식품은 1개의 특허특종과 6개의 특허출원 중에 있으며 건강보조 식품에서 화장품까지 미생물을 이용한 기능성 제품을 개발하고 수출하는 기업으로 성장했다. 현재 5명의 석 박사 연구진과 선진기술을 바탕으로 한 자동화 생산라인 시설까지 두루 갖춘 기업이다.

해남자연농업영농조합법인 명정식품은 2003년 허초청국장완 생산 판매를 시작했다. 이후 2007년 미생물을 이용한 천연 발효 식품을 개발하면서 국내는 물론 중국내에서도 200여개 이상의 대리점을 개설했다.

번호 1. 해남우리신문

'무인근 최훈' 전남한방경진대회 종합우승

경희대 교수 최훈은 2015년 10월 24일 열린 '전남한방경진대회'에서 종합우승을 차지했다. 최 교수는 '무인근'을 주제로 한 연구를 통해 한방의 효능을 입증했으며, 이는 한방계에서 큰 성과로 평가된다.

2015 국제농업박람회 막 올라

전남농업박람회에서는 '2015 국제농업박람회'가 막을 내렸다. 이번 박람회는 국내외 농업인들에게 많은 기회를 제공했으며, 전남의 농업 발전에 크게 기여했다.

전남한방산업진흥원 발효결명자 변비개선 효과 규명

전남한방산업진흥원은 발효결명자의 변비개선 효과를 규명하는 연구를 완료했다. 연구 결과, 발효결명자는 변비 증상을 효과적으로 개선하는 것으로 나타났다.

전남한방산업진흥원 발효결명자 변비개선 효과 규명

전남한방산업진흥원(원장 조정희)과 해남자연농업영농조합법인이 변비개선효과가 탁월한 결명자 발효물을 개발하는데 성공했다. 결명자는 전남 해남의 지역에서 재배되는 주요 약용 작물로서 한약에서는 눈을 뜨게 하고 변비를 개선시키는데 효험이 있다고 알려진 식물이자, 해남자연농업영농조합법인은 동립축산식품부의 지원을 받아 전남한방산업진흥원과 함께 결명자의 발효를 통해 변비개선능력이 우수한 조성물 개발 및 제품 개발 공동연구를 추진하고 있으며, 전남한방산업진흥원에서 진행된 장기능개선 동물효력평가에서 청국장 유래 유산균 발효결명자 추출물은 장기능이 개선되는 연구결과를 얻어 관련 학술지에 투고하는 한편 관련 특허도 출원할 예정이라고 밝혔다. 변비는 일상에서 관찰되는 가장 흔한 증상 중 하나로 전 인구의 5~20%에서 호소할 만큼 흔히 겪는 질환 중 하나로 간단한 시술이나 변비약을 섭취함으로써 통증이 없이 배변을 볼 수 있게 하는 것이 일반적인 치료방법이지만 많은 변비환자들은 이 방법이



만족스럽지 못하여 다른 치료법들에 관심이 높아지고 있는 추세이며 이와 관련된 장개선 건강기능식품의 수요도 점점 늘어나고 있다. 해남자연농업영농조합법인 연구진 연구희실장은 이번 연구를 통해 "결명자 발효물을 이용해 장개선 건강기능식품을 개발할 예정이며, 수출 주력품목으로 육성할 예정"이라고 당찬 포부를 밝혔다. 결명자는 전라남도에서 전국 생산량의 40% 이상 생산되는 대표적인 약용자원으로써 이번 연구결과를 통해 결명자가 건강기능식품의 원료로 사용될 경우 전남 지역 농가 수익창출에 도움이 될 것으로 기대된다.

김정성 기자 jr-joongang.co.kr

번호 2. 전남중앙신문

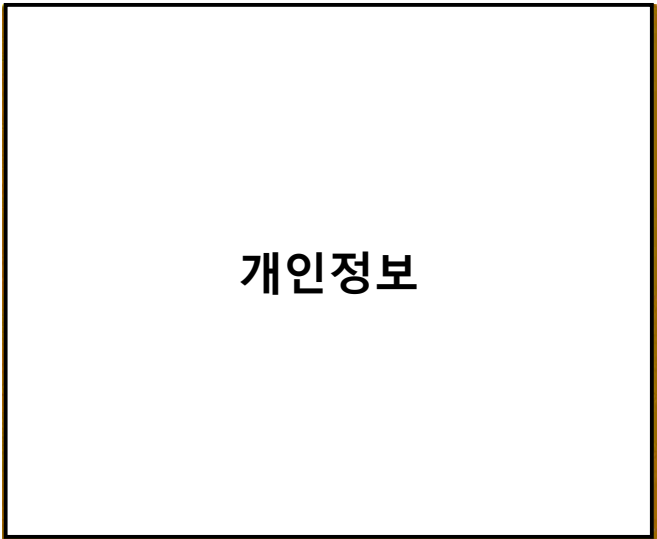
(2) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	제품설명회	상호협력 심포지엄	발효식품 및 기술	청도시, 중국	2015
2	제품설명회	한단시 제품설명회	발효식품 및 기술	한단시, 중국	2015
3	제품설명회	중국 소비자 초청 행사	발효식품 및 기술	제주도, 부산	2015
4	제품설명회	연구개발 및 제품설명회	발효식품 및 기술	청도시, 중국	2015
5	제품설명회	중국 심양시 제품설명회	발효식품 및 기술	심양시, 중국	2016
6	제품설명회	중국 상하이 제품설명회	발효식품 및 기술	상하이, 중국	2016
7	기타	2016 KITA 중화권 해외바이어 초청 수출상담회	발효식품 및 기술	광주	2016
8	제품설명회	중국 창수시, 한단시 제품설명회	발효식품 및 기술	창수시, 한단시, 중국	2016
9	박람회	HKTDC food expo 2017	발효식품 및 변할시간	홍콩, 중국	2017
10	박람회	World Food Moscow 2017	발효식품 및 변할시간	모스크바, 러시아	2017
11	박람회	The Fifth China (Shanxi) Trade Fair Application	발효식품 및 변할시간	산시성, 중국	2017
12	전시회	2017 대한민국식품대전	변할시간	서울	2017
13	기타	TFC 코리아 격투기 대회	변할시간 로고	인천	2017

번호 1. QINGDAO HAN KING TRADING (중국 총판) 상호협력 심포지엄 개최

- 장소: 청도시, 중국
- 일자: 2015. 03. 10 ~ 2015. 03. 11

당사는 중국 총판매대리점인 QINGDAO HANKING 사와 공동으로 중국 청도에서 상호 협력 심포지엄을 개최하여, 본 과제 책임자인 용주현 부장, QINGDAO HANKING사 대표 외 25개 중국 지역 판매 대리점장 및 관계자를 대상으로 제품 설명회(향후 출시예정 제품(결명자) 포함) 및 기술개발 사항(본과제인 결명자를 이용한 장기능개선 건강식품개발)에 대한 홍보를 진행하였다.



번호 2. 중국 한단시 제품 설명회 개최

- 장소: 한단시, 중국
- 일자: 2015. 05. 31

당사는 중국 한단시 대리점에서 개최한 제품 설명회에 본 과제 책임자인 용주현 부장, 목포대학교 생물학과 이오형 교수 등이 참여하여, 한단시 소비자 400여명을 대상으로 제품 설명회 및 기술개발 사항(본과제인 결명자를 이용한 장기능개선 건강식품개발), 한국 발효문화에 대한 홍보를 진행하였다.

개인정보

번호 3. 중국 소비자 초청 행사

- 장소: 제주, 부산, 대한민국
- 일자: 2015. 10. 14 ~ 2015. 10. 18

당사는 중국 총판 HANKING TRADING 사의 중국내 제품 판매촉진 및 홍보, 마케팅을 위하여, 2015년 10월 14일부터 2015년 10월 18까지 5일간 여객선을 이용, 중국 소비자 300여명을 초청하는 행사를 진행하였으며, 일정은 상해에서 출발하여 국내 2개 지역 제주와 부산을 경유하면서 한국의 문화 체험 및 제품, 기술개발 사항(본과제인 결명자를 이용한 장기능개선 건강식품개발)에 대한 홍보를 진행하였다.

개인정보

번호 4. 연구개발 및 제품 설명회

- 장소: 청도시, 중국
- 일자: 2015. 11. 16 ~ 2015. 11. 19

당사는 중국 HANKING TRADING사와 공동으로 본 과제(결명자를 이용한 장기능개선 건강식품 개발)에 대한 1차년도 연구개발 현황 및 개발될 제품에 대한 설명회를 HANKING TRADING사 대표와 관계자를 포함한 약 20명을 대상으로 진행하였고 설명회 및 면담으로 과제 관련 중국 시장 상황과 소비자 니즈 등을 확인하였다. 더불어 중국 내 대형마트 점유율 1위인 따룬파(RT 마트)를 방문하여 소비자의 주 선호 사항 및 본 과제 관련 제품 현황 등을 파악하였다.

개인정보

번호 5. 중국 심양시 제품설명회

- 장소: 심양시, 중국
- 일자: 2016. 05. 27 ~ 2016. 05. 30

당사는 중국 심양시 대리상에서 개최한 제품 설명회에 참여하여 심양시 소비자 1,350여명을 대상으로 제품 설명회 및 기술개발 사항(본과제인 결명자를 이용한 장기능개선 건강식품개발), 한국 발효문화에 대한 홍보를 진행하였다.

개인정보

번호 6. 중국 상하이 제품설명회

- 장소: 상하이, 중국
- 일자: 2016. 07. 15 ~ 2016. 07. 17

당사는 중국 상하이 대리상에서 개최한 제품 설명회에 참여하여 상하이 소비자 850여 명을 대상으로 제품 설명회 및 기술개발 사항(본과제인 결명자를 이용한 장기능개선 건강식품개발), 한국 발효문화에 대한 홍보를 진행하였다.

개인정보

번호 7. 2016 KITA 중화권 해외바이어 초청 수출상담회

- 장소: 광주광역시, 대한민국
- 일자: 2016. 08. 18 ~ 2016. 08. 18

당사는 광주전남 무역협회에서 개최한 2016 KITA 중화권 해외바이어 초청 수출상담회에 참여하여 베트남 바이어 (HUYNH TAN PHONG, NGUYET HOA COMPANY LIMITED) 와 인도 바이어(SAMEER GUPTE, TANVI INTERNATIONAL)에게 본 과제(결명자를 이용한 장기능개선 건강식품개발)의 연구 결과에 대한 홍보팜플렛 및 시제품을 제공하고 수출상담을 진행하였으며, 지속적인 업무교류를 통하여 수출이 이루어질 수 있도록 진행할 계획이다.

개인정보

번호 8. 중국 창수시 제품설명회

- 장소: 창수시, 한단시, 중국
- 일자: 2016. 10. 31 ~ 2016. 11. 04

당사는 중국 창수시 대리상과 한단시 대리상이 개최하는 제품 설명회에 (2016. 11. 01 창수시 제품설명회, 2016. 11. 03 한단시) 참석하여 본 과제(결명자를 이용한 장기능개선 건강식품 개발)의 시제품, 홍보물 제공 및 기술개발 사항에 대해 홍보를 진행하였다.

개인정보

번호 9. HKTDC food expo 2017

- 장소: 홍콩, 중국
- 일자: 2017. 08. 17 ~ 2017. 08. 19

본 과제를 통해 개발된 결명자발효분말과 이를 이용한 제품 “변할시간”의 해외 홍보 및 판매를 위한 2017 홍콩식품박람회 참석과 이를 통한 세계 바이어들과 홍콩 현지인에 대한 원료와 제품, 기술의 우수성 홍보 및 마케팅, 판매를 진행하였다.

개인정보

번호 10. World Food Moscow 2017

- 장소: 모스크바, 러시아
- 일자: 2017. 09. 11 ~ 2017. 09. 14

본 과제를 통해 개발된 결명자발효분말과 이를 이용한 제품 “변할시간”의 해외 홍보 및 판매를 위한 모스크바 국제 식품박람회 2017 참석과 이를 통한 세계 바이어들과 러시아 현지인에 대한 원료와 제품, 기술의 우수성 홍보 및 마케팅, 판매를 진행하였다.

개인정보

번호 11. The Fifth China (Shanxi) Trade Fair Application

- 장소: 산시성, 중국
- 일자: 2017. 09. 17 ~ 2017. 09. 20

본 과제를 통해 개발된 결명자발효분말과 이를 이용한 제품 “변할시간”의 해외 홍보 및 판매를 위한 2017 중국 산시성 특색농산품교역 박람회 참석과 이를 통한 세계 바이어들과 중국 현지인에 대한 원료와 제품, 기술의 우수성 홍보 및 마케팅, 판매를 진행하였다.

개인정보

번호 12. 2017 대한민국식품대전

- 장소: 서울, 대한민국
- 일자: 2017. 11. 29 ~ 2017. 12. 02

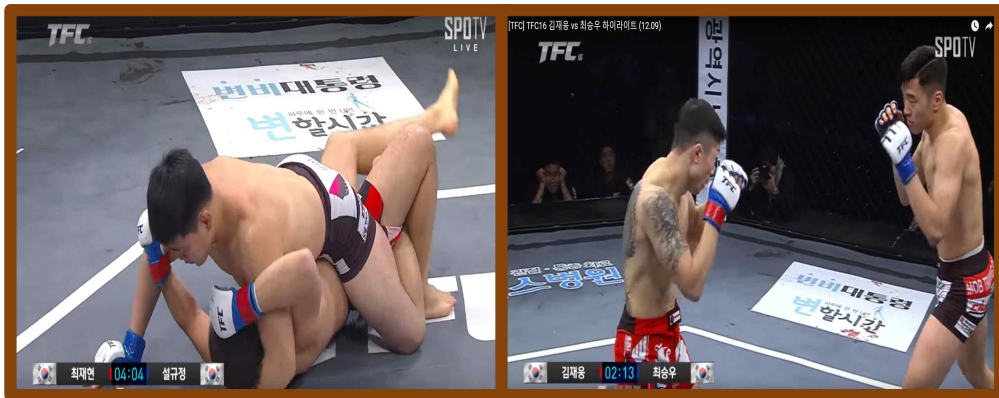
본 과제를 통해 개발된 결명자발효분말과 이를 이용한 제품 “변할시간”의 국내 홍보 및 판매를 위한 2017 대한민국식품대전 참석과 이를 통한 국내 소비자에 대한 원료와 제품, 기술의 우수성 홍보 및 마케팅, 판매를 진행하였다.



번호 13. TFC 코리아 격투기 대회

- 장소: 인천, 대한민국
- 일자: 2017. 12. 09 ~ 2017. 12. 09

완제품 변할시간의 로고를 한국종합격투기(TFC) 생방송 중 경기장 바닥과 옆면에 노출하여 오프라인 홍보 하였다.



(3) 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역
1	2016.10.21 ~ 11.01	홍보동영상 제작 - 국문, 중문, 영문	국내 및 국외 바이어와 소비자를 대상으로 제품과 기술 홍보
2	2016.10.16	홍보팸플렛 제작 - 국문, 영문	국내 및 국외 바이어와 소비자를 대상으로 제품과 기술 홍보
3	2017.08.14	국제식품박람회 홍보 동영상 제작 - 영문	국내 및 국외 바이어와 소비자를 대상으로 회사와 제품, 기술 홍보

번호 1. 홍보동영상 제작 - 국문, 중문, 영문

본 과제의 연구 결과에 대한 홍보동영상(국문, 중문, 영문)을 제작하였다. 제작된 홍보동영상은 바이어 및 소비자에게 제공하여 본 과제 연구결과에 대한 홍보를 진행하고 있으며 신규 수출국가 개척에도 적극적으로 활용하고 있다.



번호 2. 홍보팜플렛 제작 - 국문, 영문

본 과제의 연구 결과에 대한 홍보팜플렛(국문, 영문)을 제작하여 국내 및 국외 홍보와 신규 수출국가개척에 적극적으로 활용하고 있다.



번호 3. 국제식품박람회 홍보동영상 - 영문

본 과제의 연구 결과에 대한 홍보팜플렛(국문, 영문)도 제작하여 국내 및 국외 홍보와 신규 수출국가개척에 적극적으로 활용하고 있다.



11) 기타

(1) 국제화 협력성과

국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공

(2) 타 연구개발사업에의 활용

타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	기술사업화지원사업	결명자발효분말의 배변활동원할 기능성원료인정 및 건강기능식품 개발	용주현	농림축산식품부 (농림식품기술기획 평가원)	2017년

(3) 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관

3-8. 기술적 성과 및 경제적 성과

가. 기술적 성과

1) 변비 치료제 개발 동향

- 변비를 해결하기 위하여 시판되는 변비약(Laxatives)은 거의 대부분 이완성 변비를 위한 약임. 그 작용 기전에 따라 나누어 보면 다음의 연변완화제, 팽변완화제, 식염류 완화제, 자극성 완화제의 4가지로 나눌 수 있음³⁸⁾
- 연변완화제(Lubricant Laxatives)는 위장관에 잘 흡수되지 않으며 굳은 변을 연화시켜 배변이 쉽게 일어나게 하는 약물임. 주로 Mineral oil이나 Docusate(dioctyl sodium sulfosuccinate)이다. 부작용으로는 지용성 비타민의 흡수 장애를 일으킬 수 있음
- 팽변 완화제(Bulk-forming Laxatives)는 대장 내에서 수분 및 이온과 결합하여 대변을 부드럽게 하면서 부피를 증대시켜 배변을 촉진하는 약물임.식이성 섬유소로 현미, 씨앗 껍질, 해초, 밀기울(Bran), 차전자피(Psyllium), 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리카보필(Polycabophil) 등이 있음
- 식염류 완화제(Saline Laxatives, Osmotic Laxatives)는 주로 염으로, 장에서 삼투압 활성물질로 작용하여 장벽으로부터 수분흡수를 방지하여 변의 수분 함량을 유지시킴으로 배변을 쉽게 하는 약물임. 마그네슘 설페이트(Magnesium sulfate), 마그네슘 시트레이트(Magnesium citrate), 마그네슘 하이드록사이드(Magnesium hydroxide), 소듐 설페이트(Sodium sulfate), 소듐 포스페이트(Sodium phosphate), 디사카라이드 락툴로스(Disaccharide lactulose), 글리세린 소르비탈(Glycerin, Sorbital), 락툴로스(Lactulose), 듀파락(Duphalac) 등이 있음
- 자극성 완화제(Stimulant Laxatives)는 장내에서 수분 및 전해질의 흡수를 억제하고 장운동을 증강시켜 배변을 촉진시키는 약물임. 디페닐메탄(Diphenylmethane) 유도체로 페놀프탈레인(Phenolphthalein)과 비사코디일(Bisacodyl)이 있고, 안트라퀴논(Anthraquinone) 계열의 센나(Senna), 단트론(Danthron), 카사카라 사그라다(Casacara sagrada)와 알로에(Aloe) 등이 있으며 그 밖에 파마자유(Castor oil), 포도필룸(Podophyllum)과 담즙산 등도 이 자극성 완화제로 분류되고 있음
- 현재 변비약으로 시판되고 있는 돌코락스(한국베링거인겔하임(주))에는 자극성 완화제인 비사코디일(Bisacodyl(5mg/정))과 연변 완화제인 Docusate natrium(16.75mg/정)이 함유되어 있음. 기장다시마농축효소(부산동부수협)에는 팽변 완화제인 해초(다시마, 미역)와 보리, 자극성 완화제인 카사카라 사그라다(Casacara sagrada)가 함유되어 있음. 아락실(부광약품)에는 팽변 완화제인 차전자피(Psyllium husk)와 자극성 완화제인 센나(Senna)가 함유되어 있음
- 이러한 약물요법은 일시적으로 변비 증상을 완화해 주기는 하지만, 변비 치료제 중 부피형성 완화제 및 삼투성 완화제의 경우 복부팽만, 설사 등이 동반될 수 있으며 자극성 하제의 경우 장기간 사용 시 다양한 합병증을 유발하는 등의 부작용이 발생함
- 이에 해당업계에서는 장기간 복용하여도 부작용이 거의 없고, 약물요법에 의해 유발

된 변비를 개선하며, 나아가 인체에 필요한 영양소가 다량 함유되어 있는 천연소재나 기능성 식품들을 변비 치료제로 사용하려는 노력들이 꾸준히 시도되고 있음

- 최근에는 변비를 예방하기 위해 다양한 종류의 천연 식품이나 천연 생약제를 이용한 변비 개선 식품에 대한 연구가 진행되고 있음. 그러나 아직까지 식품으로 활용할 수 있는 변비 치료제는 그 필요성에 비해 많지 않기 때문에 변비 예방이나 치료용 식품에 대한 개발이 요구되고 있는 실정임

2) 독창성

- 국내 장기능 개선 중 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’으로 인정된 고시형 원료는 16개, 개별인정형 원료는 9개로 총 25개이며 주로 식이섬유나 올리고당이 주를 이루고 있음. 즉, 25개 고시형 및 개별인정형 원료 중 20개가 특정 천연물을 단순 가공한 올리고당 또는 식이섬유임
- 더불어 현재 배변활동 원활 관련 고시형 및 개별인정형 원료들은 대부분 단순 천연물을 추출, 농축, 합성 또는 배양 균주를 농축한 것으로 프로바이오틱스를 제외하고 팽창성 또는 삼투성 또는 자극성 중의 하나인 단일 하제 효능을 일으키는 원료가 대부분임
- 그러나, 변비 환자의 원인 및 치료 방법이 다양하기 때문에 세계 판매 1위 변비치료 의약품인 둘코락스-에스와 같은 이중 복합적인 하제 효능을 가지는 제품이 요구되는 실정임
- 결명자발효분말은 기존 배변활동원활 관련 원료들의 단순 추출 또는 농축과는 다르게 약용작물 결명자를 유산균으로 발효시킨 제품으로 결명자발효분말에 많이 함유된 anthraquinone계 화합물은 장벽을 자극하여 배변활동에 도움을 준다고 알려져 있으며 당이 붙은 배당체에 비해 당이 없는 비당체의 배변활동 원활 효능이 더 우수하다고 알려져 있음
- 본 기술은 배당체의 당을 유산균 발효를 통해 비당체로 전환시킴으로서 장내 정상 세균군총을 가지지 못한 변비 환자들에게 도움을 줄 수 있는 특징이 있기 때문에 기존 제품들과는 차별화됨
- 더불어 유산균 발효기술로 개발된 결명자발효분말은 안트라퀴논계 화합물에 의한 자극성 하제 효능과 식이섬유에 의한 팽창성 하제 효능을 합한 이중 복합 효능을 나타내고, 비교적 낮은 안트라퀴논계 화합물 함량(발효조건에 따라 0.7~5.0mg/g)에 따른 자극성 하제의 부작용 우려를 해소하는 것을 특징으로 하여 종래 단순 추출, 농축 등으로 가공한 기존의 기 인증된 배변관련 고시형 및 개별인정된 기능성 원료들과는 매우 차별화됨으로서 독창성이 있는 기술임
- 국내 배변활동 원활 기능성 관련 자주 사용되는 원료는 프로바이오틱스, 난소화성말토덱스트린, 차전자피식이섬유, 알로에전잎, 이눌린식이섬유로 모두 고시형 원료가 해당됨
- 이눌린식이섬유는 섭취량이 6.4 g으로 많고 비용이 높아 주원료로 거의 사용되지 않고

있음

- 프로바이오틱스는 생균을 이용하는 특징으로 인해 제형설정에 한계가 있으며, 실온보관 시 유통기한이 다소 짧아짐(18개월)
- 난소화성말토덱스트린은 폴리머 당으로 구성된식이섬유로 매우 끈적이기 때문에 제형설정이 어려움
- 차전자피식이섬유는 특유의 고무향과 맛으로 비선호 층이 많고 일일섭취량과 단가가 비교적 높음
- 알로에전잎은 매우 쓴맛을 가지고 있어 비선호하는 소비자 층이 있음
- 이에 반해, 결명자발효분말은 자극성 및 팽창성 복합 이중 하제 효능을 가지며 흐름성이 비교적 좋아 다양한 제형 설정이 가능함

<표> 배변활동 원활 고시형 원료와 결명자발효분말의 일일섭취량당 단가 비교

원료명	국내 판매처 및 수입처	판매가(원/kg)	일일섭취량	일일섭취량당 단가
프로바이오틱스	국내판매처: 쉐바이오텍, 메디오젠 수입처: 한독 등	650,000 (2,000억마리) 메디오젠기준	1억~100억/g마리 <u>30억투입시, 1~2억생존</u>	9.8원(1억)~975원(100억) 30억투입기준(섭취1억)
난소화성말토덱스트린	수입판매처: 대상 수입: 한국마쓰다니	11,550	2.5~30g 식이섬유85%, 3g투입	34.7원(3.0g)
차전자피식이섬유	수입판매처: 바렌츠코리아 수입: 대한제당	15,500	3.9g 이상	60.5원(3.9g)
알로에아보레센스분말	녹십초, 김정문알로에, 미래바이오텍 등	국내산건조잎 32,000 남아공 28,000	무수바바로인 20~30mg 국내산 8.5mg/g 남아프리카산 30mg/g	국내산76.8원(2.4g) 수입산28원(1.0g)
이눌린식이섬유	브랜탁코리아	11,000	6.4g 이상	70.4원(6.4g)
결명자발효분말	해남자연농업 영농조합법인	11,800	1~5g(예상섭취량)	11.8원(1g)~59.0원(3g)

〈표〉 배변활동 원할 고시형 원료와 결명자발효분말의 수입액과 제형, 특징 비교

원료명	2016년 수입액	주원료 원산지	주요가능 제형	특징
프로바이오틱스	\$44,047,000	국내 수입 (미국 등)	분말, 캡슐	<ul style="list-style-type: none"> 유통기한까지 유지를 위한 생균수 투입 일일섭취량의 20~30배 필요 생균으로 제형설정 한계 생균을 위한 프리바이오틱스 함유 필수 당류와 유지류 프리바이오틱스에 의한 고결방지제 함유 냉장보관 유통기한 2년, 실온보관 유통기한 18개월
난소화성 말토덱스트린	\$216,000	수입 (유럽)	정제, 분말, 음료	<ul style="list-style-type: none"> 팽창성 하제 단일 효능 폴리머당으로 매우 끈적임, 제형설정 어려움 수입산
차전자피식이섬유	\$1,659,000	수입 (인도산)	과립, 분말	<ul style="list-style-type: none"> 팽창성 하제 단일 효능 일일섭취량이 다소 많아 제형설정 한계 특유의 고무향과 맛으로 비선호층이 많음
알로에전잎	\$409,000	국내 수입 (남아프리카)	정제, 분말, 과립	<ul style="list-style-type: none"> 자극성 하제 단일 효능 전잎 그대로 사용해 매우 쓴맛 국내산 2.4g, 수입산 1g 필요
이눌린식이섬유	\$1,030,000	수입 (벨기에산)	분말	<ul style="list-style-type: none"> 팽창성 하제 단일 효능 일일섭취량이 매우 많아 섭취 불편, 제형설정 한계
결명자 발효분말	자체공급	국내산	캡슐, 정제, 분말, 과립, 음료	<ul style="list-style-type: none"> 팽창성 하제(불용성식이섬유 50% 이상), 자극성하제(12종 anthraquinone계 화합물)의 이중 복합 효능 흐름성이 좋아 제형설정 편함, 쓴맛이 거의 없음 국내 결명자 사용으로 인한 관련 농가 소득 증가

3) 기술 경쟁력

- 천연물을 발효시켜 얻은 발효물은 발효에 의한 생물전환(biotransformation) 또는 프로바이오틱(probiotic) 효과에 의해 천연물의 생리활성이 증가되는 것으로 알려짐에 따라, 발효물이 새로운 기능성 식품 원료 또는 천연물 신약 등의 재료로 각광받고 있음. 특히, 식용 가능한 무해한 미생물로 발효한 발효 천연물은 발효하지 않은 원료 천연물에 비해 더 우수한 약리 효과를 내는 것으로 알려져 있음
- 결명자(*Senna tora* L.)는 콩과에 속하는 한해살이 초본으로 초결명(*Cassia obtusifolia* L.)과 결명자(전명-*Senna tora* L., 이명-*Cassia tora* L.)의 두 품종이 알려져 있음. 초결

명자는 중앙아메리카 원산으로 일본 등지에서 결명자는 열대 아시아산으로 중국, 우리나라 등지에서 재배되며 결명자는 예로부터 간의 열기를 제거하고 대장의 연동운동을 활발히 하여 눈이 충혈되어 붓고 아플 때, 시력감퇴 및 야맹증과 같은 안질환뿐만 아니라 변비 치료에 있어서도 그 효과가 뛰어난 것으로 알려져 왔음

- 이러한 결명자를 함유함으로써 변비개선 효과를 가지는 차의 제조방법에 관한 종래의 기술로서는 국내 한국등록특허 제10-0344325호가 있음. 또한, 한국공개특허 제1999-0084271호에서는 결명자 또는 결명자엽과 다른 생약재를 혼합하고 단순 분쇄 및 배전하여 제조한 티백차가 변비개선에 효과가 있음을 설명하고 있고, 한국공개특허 제2003-0062493호는 결명자를 먼저 추출, 농축 후 분무건조하여 제조한 결명자 추출물 분말과 카스카라사그라다 추출분말 등을 혼합하여 제조한 혼합침출차가 기호성이 우수하고 변비증상 개선 효과가 있음을 설명하고 있음
- 그러나, 상기 특허들은 결명자를 단순 분쇄하여 배전하거나, 추출 및 농축하여 건조한 것이거나, 또는 이들과 다른 변비 개선 효과가 있는 생약재와 혼합하는 것에 불과함
- 본 평가대상기술인 결정자발효분말은 전통적으로 오랫동안 사용되어 그 안전성을 검증받은 생약인 결명자를 유산균으로 발효시켜 얻은 결정자 발효물이 결정자 추출물에 비하여 변의 개수, 변의 수분 함량 또는 변의 중량을 증가시켜 변비를 개선하거나 치료하는 효과가 현저히 증진됨이 입증되었음
- 고시형 및 개별인정형 배변원활 기능성 원료들은 단순 추출 또는 농축 등의 방법으로 가공한 것으로 팽창성 또는 삼투성 또는 자극성 중 1가지 효능만 발휘하지만 유산균 발효기술로 개발된 결정자발효분말은 발효를 통해 비당체 안트라퀴논계 화합물 함량이 증가되어 배변활동 효능이 증가됨과 더불어 발효 후에도 50% 이상의 높은 불용성 식이섬유 함량을 가져 팽창성과 자극성 복합 효능을 가짐. 따라서 기존 원료들과 비교하여 보다 더 다양한 소비자층에 활용할 수 있는 특징이 있음
- 더불어 결정자발효분말은 단순 천연 원료를 가공한 기타 단일 성분 제품들과는 다르게 결정자 자체를 발효시킨 것으로 섭취량에 따라 결정자 자체의 주요 효능들인 간기능 개선, 눈 개선 등의 다른 기능성 효능도 함께 발휘될 수 있을 것으로 예상됨
- 고시형 원료들 중 주 원료로 자주 활용되는 분말 및 액상 제품의 난소화성말토덱스트린(최저 2.5g), 과립 또는 분말 제품의 차전자피(최저 3.9g)와 비교하여 결정자발효분말은 1~5g 예상으로 비교적 낮은 섭취량을 가짐. 또한, 발효 기술을 접목함에도 불구하고 판매 단가는 많이 사용되는 고시형 원료인 차전자피식이섬유와 비슷하며 일일섭취량은 차전자피식이섬유(3.9g 이상)에 비해 낮을 것으로 판단됨
- 따라서 유산균을 이용한 결정자 발효기술과 이의 결과물인 결정자발효분말의 제품화 가치는 매우 높고 타 원료들과 비교하여 경쟁력이 우위에 있다고 판단됨

4) 기술 수준

- 본 기술의 핵심소재인 결명자발효분말은 발효기술력을 바탕으로 2014년부터 현재까지 결명자를 소재로 한 유산균 발효, 물질 분석, 동물 실험 등의 연구개발을 통하여 변비개선에 우수한 효과가 있음을 확인하였고, 결명자발효분말의 생산 공정 표준화를 거의 확립한 상태임
- 침출차가 아닌 결명자를 유산균으로 발효시킨 장기능 개선 소재는 국내 최초이며 결명자발효분말은 발효 후 고압멸균 공정을 통해 유산균이 멸균된 상태로 프로바이오틱스 유산균과 결명자발효분말의 복합 효능이 아닌 순수 결명자발효분말의 하제 효능임. 이에 따라 결명자발효분말을 생산하기 위한 발효공정 및 원가절감을 위한 공정기술 등의 종합적인 공정기술은 쉽게 모방되기 어려울 것으로 판단됨
- 국내 발효 식품에서 식품으로 활용 가능한 미생물 100여 종을 분리하고 이 중 발효 후 장기능 개선 효능이 우수한 신균주 락토바실러스 케피리 MJ90과 락토바실러스 카제이 K2 균주를 확보하였으며, 이를 한국미생물보존센터(KCCM)에 국제 균주 특허 기탁한 상태임(기탁번호: KCCM11575P, KCCM11907P). 상기 확보한 유산균들은 발효과정에서 기존의 유산균들과는 다르게 식이섬유를 분해하지 않으면서 안트라퀴논계 화합물 배당체의 당을 분해하는 특징을 갖는 균주로 매우 특이성을 가지기 때문에 모방이 어려울 것으로 예상됨
- 결명자의 장개선 유효물질을 순수분리하기 위해 LC/MS IT-TOF, HPLC, NMR 등의 장비와 ESI-IT-TOF-MS 분석법 등을 활용하여 자극성 하제인 안트라퀴논계 배당체 화합물 5종과 비당체 화합물 7종, 총 12종의 화합물들을 순수 분리하였음 (Isorubrofusarin gentiobioside, Aurantio obtusin 6-O- β -D-glucoside, Rubrofusarin, 6-O- β -D-gentiobioside, Cassiaside, Obtusifolin 2-O- β -D-glucoside, Aurantio-obtusin, Chrysophanol, Obtusifolin, Emodin, Obtusin, Rubrofusarin, Isorubrofusarin)
- 또한, K2 균주 발효 기술을 통해 지표물질인 aurantio-obtusin의 발효 후 함량이 발효 전에 비해 약 3배 이상 증가함을 확인하였으며, 지표물질인 aurantio-obtusin을 분석하기 위한 시험법 밸리데이션을 기 개발 완료하였음 (특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계)
- 더불어 건조된 결명자발효분말의 불용성 식이섬유 함량은 약 50% 이상으로 기타 식용 가능한 식품들의 식이섬유 함량과 비교하여 매우 높음을 확인하였음
- 결명자발효분말의 SD랫트에 대한 변 개수, 변 무게, 변 수분함량, 장내 이동거리를 확인한 결과, 발효 방법에 따라 발효 후의 100mg 결명자발효분말은 발효 전의 300mg 결명자분말과 유사한 효능을 나타내었으며 이는 대장관 내 점액질 분비효과 측정을 통해서도 발효 후 결명자의 우수한 배변 개선 효능을 확인할 수 있었음

나. 경제적 기대성과

- 현재 개발제품 3건(결명자발효분말, 변할시간분말형, 변할시간음료형)에 대한 국내 판매를 진행하고 있음
- 국외 수출계약 2건(중국, 러시아), 국내 판매계약 1건을 진행함

〈표〉 국내외 계약 체결 진행사항

사업화 진행사항					
구분	항목	건수	국가	계약처	계약제품
국외	수출계약	2건	중국	산서태원시백세식품유한공사	결명자발효분말 변할시간분말형 변할시간음료형
			러시아	VENDING RU LTD	변할시간분말형
국내	판매계약	1건	한국	하라헤드쿼터스	변할시간분말형 변할시간음료형

- 향후 5년간(2018년~2022년) 결명자발효분말 및 변할시간 제품으로 국내 2,693백만원, 수출 2,534백만원 매출 성과를 계획 및 기대하고 있음

〈표〉 향후 5년간 매출계획

(단위: 백만원)

항목	1차년도 (2018년)	2차년도 (2019년)	3차년도 (2020년)	4차년도 (2021년)	5차년도 (2022년)	합계
국내	133	327	600	724	906	2,693
수출	92	222	518	740	962	2,534
합계	226	549	1,118	1,464	1,425	5,227

- 향후 5년간(2018년~2022년) 매출계획을 위한 개발제품별 생산 및 판매계획은 결명자발효분말 생산량 5,512kg 및 매출 108.6백만원, 변할시간분말형 생산량 121,720박스 및 매출 1,713백만원, 변할시간음료형 121,720박스 및 매출 3,512백만원을 계획 및 기대하고 있음

〈표〉 개발제품 생산 및 판매계획

개발제품		1차년도 (2018년)	2차년도 (2019년)	3차년도 (2020년)	4차년도 (2021년)	5차년도 (2022년)	합계
결명자발	생산량(KG)	230	562	1,156	1,584	1,980	5,512
효분말	금액(백만원)	4.6	11	23	31	39	108.6
변할시간	생산량(박스)	5,120	12,500	25,700	34,400	44,000	121,720
분말형	금액(백만원)	74	180	367	480	612	1,713
변할시간	생산량(박스)	5,120	12,500	25,700	34,400	44,000	121,720
음료형	금액(백만원)	152	369	751	984	1,256	3,512

- 본 사업의 사업화 관련하여, 결명자 계약재배를 체결하고 2017년에 해남, 강진 지역의 6개 농가로 부터 3,280kg을 수매 하였으며 향후 지속적으로 계약재배 면적 및 농가를 확대해 나갈 계획임

〈표〉 2017년 결명자 계약재배 농가 및 수매량(kg)

계약재배 지역	계약 농가	구분	2017년 수매량(kg)
전남 해남	박*자	농업인(경영체등록자)	540
전남 해남	윤*애	농업인(경영체등록자)	320
전남 해남	용*술	농업인(경영체등록자)	950
전남 강진	최*호	농업인(경영체등록자)	390
전남 강진	김*홍	농업인(경영체등록자)	493
전남 강진	김*민	농업인(경영체등록자)	607
합계			3,280

다. 향후 경제적 기대성과

- 결명자발효분말의 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 개별인정형 원료 인정 후, 기대되는 경제적 성과는 다음과 같음

1) 가격 경쟁 우월성

- 현재 결명자발효분말의 원료와 완제품의 원가가 산정된 상태이며, 이에 따른 부형제 포함 완제품의 소비자가는 표와 같음

<표> 결명자발효분말을 활용한 제품 형태 및 예상 판매가격

(단위: 원)

제품 종류	형태	포장형태		순중량	소비자가
원료	분말	벌크	1KG	1kg	20,000
완제품	분말	스틱	5g*30포/BOX	150g	30,000
완제품	액상	파우치팩, 유리병	100ml*30팩/BOX	3,000ml	90,000

- 이와 같이 제품 종류별로 해당 제품들의 용량, 용기 및 포장 형태·디자인 등 가격에 영향을 미치는 요소들에 대해서 구체적인 계획이 수립되었으며 이에 따른 예상 판매가격이 설정되었음. 이에 경쟁업체들의 대표적인 제품들의 가격을 참고하여 가격경쟁력을 살펴보았음(2017.08.31일 기준)
- 경쟁업체의 제품들은 모두 식품의약품안전처로부터 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 고시된 원료들을 주성분으로 하였으며, 해당 품목별 매출액 1위 업체(2015년 기준)의 현재 시판 중인 제품으로 선정하였음
- 난소화성말토덱스트린을 원료로 하는 대상웰라이프의 ‘장쾌한 아침 플러스(분말 225g, 15일분)’의 경우 49,000원으로 판매하고 있으며, g단가로는 217원/g으로 형성되어 있음(출처: 대상통합쇼핑몰 정원샵 <http://www.jungoneshop.com/>)
- 차전자피식이섬유를 원료로 하는 엘라이프 주식회사의 ‘장박사 플러스 식이섬유(환 900g, 30일분)’의 경우 시중 판매가격이 220,000원~250,000원으로 형성되어있으며, g 단가로는 244~278원/g임을 확인할 수 있음
- 알로에아보레센스 분말(무수바바로인)을 원료로 하는 마임건강식품의 ‘알로에 로에 정(정제 215g, 60일분)’의 경우 판매가격은 75,000원으로 확인되었으며, g단가로는 349원/g으로 형성되어 있음(출처: 마임건강식품 홈페이지(<https://www.maim.com>))
- 본 평가대상기술인 결명자발효분말을 원료로 하는 제품의 경우, 판매가격은 성상에 따라 분말 30,000원(150g, 30일분), 액상 90,000원(3000ml, 30일분)으로 책정되었으며, 이를 g단가로 환산하면 각각 분말 200원/g, 액상 30원/ml임

〈표〉 예상 경쟁사 및 유사제품 비교

품목	식품의약품안전처 고시 일일섭취량	업체 및 상품명	주성분	성상	일일섭취량	소비자가(원)
난소화성 말토덱스트린	난소화성 말토덱스트린 식이섬유로서 2.5~30g, 액상 2.3~44g	대상 웰라이프 장쾌한아침플러스 	난소화성 말토덱스트린 분말 (식이섬유 85%이상)	분말	1일 3회, 1회 1포	5g×45포 (225g) 49,000(15일)
차전자피 식이섬유	차전자피 식이섬유로서 3.9 g 이상	엘라이프(주) 장박사 플러스 식이섬유 	이눌린/치커리추 출물, 차전자피분말	환	1일 3회, 1회 1포	10g×90포 (900g) 250,000(30일)
알로에 아보레센스분말 (무수바바로인)	무수 바바로인으로서 20~30mg *재평가 대상	마임건강식품 알로에 로에정 	알로에전잎 (알로에 아보레센스) 99.8%	정제	1일 3회, 1회 3정	0.42g×513정 (215g) 75,000(60일)
결명자 발효 분말	결명자발효분말 로서 1g~5g (예상섭취량)	해남자연농업 영농조합법인 분말형	결명자발효분말	분말	1일 1회 1회 1포	5g×30포 (150g) 30,000(30일)
		해남자연농업 영농조합법인 음료형		액상	1일 1회 1회 1포	100ml×30포 (3,000ml) 90,000원(30일)

- 이와 같이 평가대상 기술을 활용한 예상 제품들의 가격을 경쟁업체들의 유사 제품과 g당 단가로 비교해보면 개발될 제품들은 가격 경쟁력이 확보된 상태라고 판단됨
- 더불어 알로에전잎은 무수바바로인화합물을 통한 자극성하제이며, 난소화성말토덱스트린과 차전자피는 식이섬유를 통한 팽창성하제로, 각각 단일 효능을 나타내는 원료 들임. 반면에 결명자발효분말은 안트라퀴논계 화합물들을 이용한 자극성하제와 식이 섬유 50% 이상 함유를 이용한 팽창성하제 효능이 복합적으로 작용하기 때문에 보다 다양한 원인을 가진 변비 환자에 적용할 수 있음
- 또한 제형 설정에서 난소화성말토덱스트린은 매우 끈적이고 차전자피식이섬유는 특유의 고무향, 알로에전잎은 매우 쓴맛과 같은 특징을 보유한 반면에 결명자발효분말은 끈적임이 거의 없어 분말, 과립, 환 등 다양한 형태의 제형 개발이 용이하고 발효를 통해 결명자 특유의 향과 쓴맛이 매우 감소된 원료이기 때문에 섭취 시 거부감도 거의 없는 특징이 있음
- 그리고 결명자발효분말은 추출 및 화학적 가공이 아닌 단순 유산균 발효를 이용하였기 때문에 결명자 자체의 기타 기능성 성분들이 대부분 함유되어 있으며, 이는 ‘본초강목’ 과 같은 고서에서 언급된 결명자의 기타 효능인 눈을 맑게하고, 항알레르기, 항산화, 간보호, 혈압강하, 혈중지질저하, 혈당강하 등 효능과의 복합 작용도 기대할 수 있는 특징이 있음
- 위와 같은 다양한 이유들로 인해 결명자발효분말의 제품경쟁력은 매우 높다고 판단

되며 출시 후 과급효과도 매우 클 것으로 예상됨

2) 향후 예상 매출 및 유통방안

- 본 사업과 관련된 2015년 기준 건강기능식품 기능성원료의 국내시장규모는 50,149억이며, 이 중 장건강(배변활동원활에 도움을 줄 수 있음) 개별인정형 기능성 원료의 국내시장규모는 90.4억원 규모임⁵⁾
- 본 사업을 통한 결명자발효분말의 장건강(배변활동원활에 도움을 줄 수 있음)의 시장 점유율은 2024년기준 13.284%를 계획하고 있음

<표> 향후 결명자발효분말 원료 매출액 및 시장점유율

산업화 년도 항 목	제품화 (2019년)	2020년	2021년	2022년	2023년	2024년	계
원료 매출액(억원)	1.175	4.25	8.5	18	36	72	67.925
건강기능식품기능성 원료시장점유율(%)	0.003	0.012	0.024	0.05	0.1	0.201	0.189
배변활동 원활 관련 개별인정형원료 시장점유율(%)	0.217	0.784	1.568	3.321	6.642	13.284	12.532

- 국내 및 해외 생산 계획과 투자 계획은 아래 표와 같음

<표> 향후 사업화 생산계획

구분		(2019년) 3차년도	(2020년) 종료 후 1년	(2021년) 종료 후 2년	(2022년) 종료 후 3년	(2023년) 종료 후 4년
국 내	배변활동원활 건강기능 식품 시장점유율(%)	0.217%	0.784%	1.568%	3.321%	6.642%
	판매량(단위: kg, box)	원료* 1,000kg 스틱* 3,000box 음료 3,000box	원료 5,000kg 스틱 10,000box 음료 10,000box	원료 10,000kg 스틱 20,000box 음료 20,000box	원료 25,000kg 스틱 40,000box 음료 40,000box	원료 50,000kg 스틱 80,000box 음료 80,000box
	판매단가(원)-도매가	원료 20,000 스틱 10,000 액상 22,500	원료 20,000 스틱 10,000 액상 22,500	원료 20,000 스틱 10,000 액상 22,500	원료 20,000 스틱 10,000 액상 22,500	원료 20,000 스틱 10,000 액상 22,500
	국내매출액(백만원)	117.5	425	850	1,800	3,600
	건강기능식품 시장점유율(%)	-	-	-	-	0.00057%
해 외	판매량(단위: kg, box)	-	-	-	-	원료 5,000kg 스틱 20,000box 음료 20,000box
	판매단가(\$) (1\$=1,000원 계상)	-	-	-	-	원료 20 스틱 10 액상 22.5
	해외매출액(천\$)	-	-	-	-	750
	당사 생산능력	원료 30,000kg	원료 35,000kg	원료 40,000kg	원료 80,000kg	원료 90,000kg

*원료 = 결명자발효분말

*스틱 = 분말 스틱 또는 과립 스틱

〈표〉 향후 사업화 투자계획

(단위 : 백만원)

항목		(2019년) 3차년도	(2020년) 종료 후 1년	(2021년) 종료 후 2년	(2022년) 종료 후 3년	(2023년) 종료 후 4년
매출원가		84	305	611	1,293	3,125
판매관리비		26	94	189	399	965
자본적 지출	토지	0	0	0	0	0
	건물/건축물	99	0	0	594	0
	기계장치등	80	0	0	520	20
자본적지출 합계		179	0	0	1,114	20

○ 후속 사업화 전략은 아래와 같음

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 결명자발효분말 원료, 스틱분말 또는 과립 1건, 음료 1건 ○ 수요처 : 국내직영판매장, 홈쇼핑, 온라인채널, 방문판매, 통신판매 등 ○ 예상 공급가 : 원료 20,000원/kg, 스틱 10,000원/box, 음료 22,500원/box ○ 개발 투입인력 및 기간 : 2017년~2019년 6명, 2020년 7명, 2022년 9명, 2024년 11명(※주문량에 따라 폭발적 증가 가능)
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 결명자 재배농가 계약재배를 통한 수급 ○ 결명자발효분말 자체생산 (생산량 약 200kg/1회) ○ 스틱 및 음료 생산은 일부위탁 또는 전부위탁 계획
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 결명자발효분말 건강기능식품 기능성원료 등록 : 2019년 ○ 제형 개발 및 완제품 생산 : 2019년 ○ 판매 개시 : 2019년 ○ 국내판매(직영판매장, 홈쇼핑, 온라인쇼핑몰 등) 및 해외수출(중국, 일본, 러시아, 미국 등)을 계획함

○ 본 사업 관련한 유통방안으로 온라인채널(대형오픈마켓, 소셜커머스, 백화점몰 등), 매장판매(건강기능식품판매전문매장, 백화점, 약국 등), 방문판매, 홈쇼핑, 통신판매(광고, 신문, 잡지), 해외박람회 등을 통한 해외수출을 진행할 계획임

〈표〉 판매유통방안 및 추진계획

판매유통방안	
구분	추진계획
온라인채널	- 국내 온라인 채널 입점을 통한 판매유통채널 확보 - 대형오픈마켓, 소셜커머스, 백화점몰 등
직영판매점	- 국내 직영판매점을 통한 판매유통채널 확보 - 건강기능식품전문매장, 백화점, 약국
방문판매	- 국내 방문판매 전문업체를 통한 판매유통채널 확보
홈쇼핑	- 국내 메이저 TV홈쇼핑 판매를 통한 판매유통채널 확보 - NS, GS, CJ, 홈앤홈 등
통신판매	- 광고, 신문, 잡지를 통한 판매유통채널 확보
블로거	- 영향력 있는 유저들을 활용한 국내 판매유통채널 연계 - 파워블로거, 건강기능식품 블로거
서포터즈 운영	- 도시권을 중심으로 서포터즈 운영을 통한 국내 판매유통 채널 연계
박람회	- 해외 건강기능식품 박람회 참가를 통한 해외수출 연계

- 국내건강기능식품의 유통채널 및 매출액은 다단계, 방문판매가 21,281억원, 60.8%이며, 매장판매(전문매장, 백화점, 할인매장, 약국, 병원 등)가 8,602억원, 24.6%이며, 홈쇼핑 및 케이블방송 판매가 2,258억, 6.45% 순으로 나타남

(단위:억원, %)

구분		2012년	2013년	증가율
		매출액(점유율)	매출액(점유율)	
매장판매	전문매장	3,717(10.7)	3,530(10.1)	-4.9
	백화점	2,558(7.3)	2,210(6.3)	-13.6
	할인매장	2,027(5.8)	2,095(6.0)	3.4
	약국	310(0.9)	541(1.5)	74.5
	병원	40(0.1)	64(0.2)	60.0
	기타	208(0.6)	162(0.5)	-22.1
	소계	8,856(25.4)	8,602(24.6)	-2.9
직접판매	다단계 판매	12,258(35.2)	12,796(36.6)	4.4
	방문 판매	9,396(27.0)	8,485(24.3)	-9.7
	소계	21,654(62.1)	21,281(60.8)	-1.7
전화권유판매		120(0.3)	195(0.6)	62.5
홈쇼핑 또는 케이블		1,690(4.8)	2,258(6.5)	33.6
인터넷		734(2.1)	1,061(3.0)	44.6
기타		1,793(5.1)	1,581(4.5)	-11.8
계		34,847(100.0)	34,978(100.0)	0.4

출처 : 건강기능식품시장현황 및 소비자실태조사, 한국건강기능식품협회, 2014³⁹⁾

- 제품 생산 이후 국내판매(직영판매장, 홈쇼핑(NS), 온라인쇼핑몰 등) 및 해외수출(중국, 일본, 러시아, 미국 등)을 계획하고 있으며, 국내 대기업 및 중견기업을 대상으로 본 평가기술의 핵심소재인 결명자발효분말의 원료 납품 및 판매를 진행할 계획이며,

이와 관련하여 국내기업인 풀무원건강생활주식회사(건강기능식품 국내 생산 15위, 생산액 299억원)와 결명자발효분말 원료 납품관련 제품설명회를 진행하였으며, 현재 구매의향서를 통보받은 상태임

구매 의향서

수신 : 해남자연농업영농조합법인
발신 : 풀무원건강생활(주) FD사업본부장

제품	결명자발효물
구매 조건	귀사에서 제안한 결명자발효물에 대하여, 건강기능식품 개별인증 (기능성: 배변활동 개선에 도움을 줌) 획득이 필요함.

위와 같이 귀사 제품(결명자발효물)에 대한 구매의향서를 제출합니다.

2017년 03월 17일

상 호 : 풀무원건강생활 주식회사
주 소 : 서울특별시 강남구 광평로 280
(수서동, 로즈데일빌딩) 2층
부 서 : **개인정보**
본부장 :

[그림] 구매의향서-풀무원건강생활(주)

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표 및 수행내용에 따른 목표달성도			
구분 (연도)	성과목표	연구개발 수행내용	
1차 년도	결명자, 하수오 원료의 추출방법 설정	- 결명자 등 2종 소재에 대한 문헌검색 및 성분 스크리닝, anthraquinone 최대 효율을 위한 추출용매 선정 및 추출 방법 연구(기존 논문 활용), 선정된 원료의 표준화된 방법에 의해 시료 제작을 통해 성과목표 100% 달성함	
	발효력이 우수한 유산균 선별	- 20종 유산균 분리 및 동정(16s rRNA, API), 균주의 특성 분석(API, β -glucosidase, LV-SEM), 결명자, 하수오 각 추출물에서 발효력이 우수한 균주 선정(20종 대상 5종 선정)을 통해 성과목표 100% 달성함	
	결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	- 결명자, 하수오 각 추출물, 분쇄물의 농도별 시료 제작, 발효조건, (시료 농도, 수분함량, 배양시간 등) 설정, 발효조건에 따른 유산균 발효효과 평가, 조건별 최적의 발효조건 설정(시료형태, 영양조건, 배지)을 통해 성과목표 100% 달성함	
	개발된 발효기술에 의한 발효물 제작	- 결명자, 하수오의 선정된 시료형태 및 농도, 균 접종량, 배양시간 등 표준화된 발효공정에 따른 생리활성 및 유효성 평가용 시료 제작을 통해 성과목표 100% 달성함	
	결명자, 하수오 발효물에 대한 장기능(배변기능) 개선 유효성 평가	- 유효성 평가용 시료의 제조, 각 시료의 rat를 이용한 변비 개선(식이량, 음수량, 변중량, 변의 수분함량, 대장내 점액 분비 등) 효능평가 실시, 각 발효물에 대한 변비개선활성 종합평가 실시를 통해 성과목표 100% 달성함	
	결명자, 하수오 발효물의 지표 및 유효성분 분리	- 결명자, 하수오 원료 추출, 농축, 분획, 크로마토그래피 및 재칼럼크로마토그래피 성분분리, NMR, LC/MS/MS 구조 분석, anthraquinone 물질 분리를 통해 성과목표 100% 달성함	
	발효 전·후 성분 모니터링 및 지표물질 함량변화	- 발효 전·후 성분 모니터링 실시, 지표물질의 성분변화 연구, 생리활성과 상관관계 연구를 통해 성과목표 100% 달성함	

2차 년도	유효성, 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 설정	- 결명자, 하수오 배합별 anthraquinone계 화합물 함량 비교, 결명자, 하수오 경제성 및 수급성 비교, 원료의 에탄올 추출효율 평가 및 경제성 분석, 원료 수급을 위한 계약 농가 확보를 통해 성과목표 100% 달성함
	결명자, 하수오 혼합추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	- 분쇄결명자, 볶은분쇄결명자 시료 준비, 발효조건 설정(수분함량, 시료량, 발효균주, 접종량, 생균 및 사균, glucose 첨가, 배양시간), 표준화 방법에 의한 프로토콜 및 표준제조공정서 제작을 통해 성과목표 100% 달성함
	장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립	- 10L, 300L scale up에 따른 aeration별 CFU/ml 확인 조건 설정을 통해 성과목표 100% 달성함
	장기능개선 발효물의 식품 제형 설정	- 물성, 식품형태에 따른 제형 설정, 최종 일반식품용 제형 2종 선정, 특유의 맛과 향 제거를 위한 변비개선 기능성 당류 및 부형원료 설정, 설정된 부형원료들로 혼합한 시료의 중국 소비자 관능평가를 통해 성과목표 100% 달성함
	장기능개선 발효물의 랫트에 대한 장기능(배변기능)개선 유효성 평가	- 결명자, 하수오 및 하수오 발효(K2)균에 대한 변비개선 유효성 평가, 결명자 50% 주정추출물 및 Methylene Chloride 분획물간의 변비개선 비교 평가, 분쇄결명자, 볶은분쇄결명자에 대한 발효 전·후와 발효 후 생균과 사균, 2% glucose 첨가에 대한 변비개선 유효성 평가, K2 균주의 발효 시간별 변비개선 유효성 평가를 통해 성과목표 100% 달성함
	장기능개선 발효물의 안전성 평가	- 발효결명자를 단회 경구투여시 나타나는 독성 파악, 14일 단회 경구투여시 일반증상 관찰 및 체중 이상여부 확인, 14일 단회 경구투여시 치사량 확인, 결명자 독성이 없고 변비 개선이 있는 최적 농도 설정을 통해 성과목표 100% 달성함
	장기능개선 발효물의 품질관리지표설정 및 시험법 밸리데이션	- K2 균주를 통한 발효 결명자의 anthraquinone 화합물의 탐색을 통한 성분변화 확인, 발효 시간별 결명자 성분함량 측정 및 비교를 통한 발효지표 설정, 식약처 기준 특이성, 안전성, 완건성, 직선성등의 분석을 통한 시험법 밸리데이션을 통해 성과목표 100% 달성함
	개발된 제형에 따른 시제품 생산	- 분말: 입고/검사 → 세척 → 건조 → 30mesh 분쇄 → 볶음 → 100mesh 분쇄 → 발효 → 동결건조 → 혼합 → 금속선별 → 스틱충진 → 포장 - 과립: 30mesh 분쇄 → 볶음 → 100mesh 분쇄 → 발효 → 동결건조 → 혼합 → 반죽 → 과립성형 → 건조 → 선별 → 금속선별 → 스틱충진 → 포장 - 시제품의 영양성분 분석을 통해 성과목표 100% 달성함
	발효물의 지적재산권 출원	- 결명자 유산균 발효물을 포함하는 변비 예방 및 치료용 조성물 (10-2016-0121282) - 결명자를 발효시켜 변비의 개선 또는 예방 활성을 증진시키는 락토바실러스 카제이 균주 (10-2016-0135269) - K2 균주 국제 특허/기탁 - 한국종균협회(기탁번호 KCCM11907P)을 통해 성과목표 100% 달성함

3차 년도	원재료의 품질검사	- 결명자 성상, 기원감별, 한약재 품질검사(전문기관 의뢰, 중금속 4종, 잔류농약 6종, 이산화황, 총아플라톡신)를 통해 성과목표 100% 달성함
	제조공정의 표준화 확립	- 고시형 원료들과의 단가 비교를 통해 발효형태를 고체발효로 변경하고 pilot 및 scale up 3Lot 생산하여 생균수 및 지표성분 변화를 확인하고 핵심공정별 지표성분 함량 변화 및 수율 확인하여 제조공정을 확립함 - 고체발효한 결명자발효분말의 밸리데이션을 재수행하고 지표성분 시험법을 설정하여 성과목표 100% 달성함
	고체발효한 결명자발효분말의 장기능 유효성 평가 (이중간 포함)	- Rat를 활용한 고체발효 결명자발효분말과 액상발효 결명자발효분말의 장기능개선 유효성 평가 비교와 mice를 활용한 장 이동거리 비교를 통해 성과목표 100% 달성함
	시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가 연구	- 결명자발효분말의 보존료(소르빈산, 안식향산, 데히드로초산, 파라옥시안식향산, 프로피온산) 및 벤조피렌의 생성여부 확인과 봉해시험 진행필요 제형에 미해당, α-아밀라아제 및 프로테아제 진행필요 식품유형에 미해당, 건강기능식품의 유통기한 설정기준 진행필요 항목에 미해당되어 성과목표 100% 달성함
	시제품의 BI & CI, 디자인 개발	- BI & CI 통합 브랜드명 개발(국문, 중문, 영문)과 설정된 제형(분말형, 음료형)에 적합한 용기 개발, 패키지 디자인 개발, 캐릭터 디자인 개발, 브랜드명 지식재산권 출원(국문)으로 성과목표 100% 달성함
	시제품 장기능개선 유효성 평가	- 시제품 변할시간 분말형과 변할시간 음료형의 장기능개선 유효성 평가를 진행하여 성과목표 100% 달성함
	완제품 생산	- GMP인증 기관을 통한 외부 위탁생산으로 변할시간 분말형 4,000set, 음료형 1,500set를 생산하여 성과목표 100% 달성함
	완제품의 품질검사	- 완제품 원료에 대한 품질검사, 완제품의 자가품질검사, 유효성분 함량 평가(전문기관 의뢰)를 통해 성과목표 100% 달성함
	판매마케팅 및 수출계약 체결	- 국내 온·오프라인 홍보 및 마케팅과 국내 기 구축된 지역 판매처와 소비자를 통한 판매마케팅, 국외(홍콩, 러시아 모스크바, 중국 산시성) 박람회 참가를 통한 완제품 홍보, 바이어 상담 및 수출계약 체결을 통해 성과목표 100% 달성함
	중국 수입건강기능성식품 개별 인증 보건 대행 계약 체결	- 중국 내 보건기능 변통(쾌변 기능식품) 신청을 위한 중국 내 검사와 번역공증, 대행을 담당할 KTR-China(Shanghai)와 보건 대행 계약 체결하여 성과목표 100% 달성함
	장기능개선 조성물의 관련 논문 투고	- 결명자의 반복투여에 따른 안전성 및 결명자발효분말의 장기능개선 효능에 대한 논문 투고하여 성과목표 100% 달성함

4-2. 평가의 착안점 및 기준에 따른 목표달성도

연도구분	평가항목	단위	비중 (%)	평가의 착안점 및 기준	평가방법	결과 및 달성도
1차년도	발효력이 우수한 균주선정	종	10	- 유산균 20종 중 발효력 검증 유산균 5종선정	특허출원 1건	20종 중 5종 선정 균주 특허출원 1건 (100% 달성)
	결명자, 하수오 원료의 추출용매 설정	건	10	- 용매별 추출물의 anthraquinone 성분 비교 평가(LC/MS/MS 성분분석) 및 추출용매 설정: 2건	연구보고서 1건	각 추출용매 설정 (100% 달성)
	결명자, 하수오 추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	%	30	- 하수오 발효물의 PH, 성분변화 15% 이상(LC/MS 분석 성분변화 확인) - 결명자 발효물의 PH, 성분변화 15% 이상(LC/MS 분석 성분변화 확인)	조성물 특허출원 1건	K2균주 72h 발효 결명자 발효물의 pH 및 성분변화 15% 이상 하수오 72h 발효 하수오 발효물의 pH 변화 15% 이상, 성분변화 2.3% 변화 조성물 특허출원 2건 (하수오 성분변화 15% 이상 미달성)
	2종 소재에서 지표성분 분리	종	20	- 결명자 발효물의 칼럼크로마토그래피를 이용한 성분분리: 2종 - 하수오 발효물의 칼럼크로마토그래피를 이용한 성분분리: 2종 - 분리성분의 구조동정 및 지표물질 설정 2건	연구결과 의 논문 투고 1건	결명자 12종, 하수오 1종 성분분리 및 각 지표물질 설정 (하수오 1종 미달성)
	발효물의 유효성 평가	식	30	- 결명자, 하수오 각 발효물의 랫트를 이용한 배변기능 개선 유효성 평가 및 유효성 농도 설정(양성대조군 센나엽과 비교): 1식 (평가 20건, 농도설정 2건)	연구결과 의 논문 투고 1건	평가 진행 및 논문 투고 1건 (100% 달성)
	합계		100			하수오 성분변화 15% 이상 미달성, 하수오 1종 성분분리 미달성 외 100% 달성

연도구분	평가항목	단위	비중 (%)	평가의 착안점 및 기준	평가방법	결과 및 달성도
2차년도	유효성 경제성 평가를 통한 2종 소재의 배합비 설정	건	10	- 원 재료의 가격 및 생산량, 유효성, 원가분석을 통한 2종 소재의 배합비 설정: 1건	원가분석 및 유효성 분석	원가분석 및 유효성 분석을 통한 배합비 1건 설정 (100% 달성)
	2종 혼합추출물, 분쇄물의 최적 발효기술 개발	%	15	- 2종 혼합소재 발효물의 PH, 성분변화 15% 이상 (LC/MS 분석 성분변화 확인)	연구 보고서 1건	결명자 단독소재, pH 및 지표성분 변화 15% 이상 (100% 달성)
	장기능개선 발효물의 대량생산기술 확립	%	15	- 대량생산 공정상 혼합발효물의 PH, 성분변화 (LC/MS 분석 성분변화 확인) - 대량생산공정상의 발효기술 표준화(3 Lot, LC/MS 성분 분석 편차로 확인)	연구 보고서 1건	진행 및 대량생산기술 확립 (100% 달성)
	장기능 개선 발효물의 식품제형설정	건	10	- 장기능 개선 식품 유형 설정 및 부형제 첨가, 식품제형 설정: 1건	관능평가 1건	일반식품, 부형제 첨가, 제형 2건 설정, 관능평가 진행 (100% 달성)
	장기능개선 발효물의 유효성, 안전성 평가	건	25	- 장기능개선 발효물의 랫트를 이용한 배변기능 개선 유효성 평가: 4건 - 유효성 농도 설정: 1건 (양성대조군 센나엽과 비교) - 장기능개선 발효물의 랫트를 이용한 단회투여독성 평가: 1건	연구보고서 1건 독성평가보고서 1건	※센나엽 식품사용 금지 배변기능개선 유효성 평가 4건 진행, 유효성 농도 1~3g 설정, 단회투여독성평가보고서 1건 (100% 달성)
	장기능개선 발효물의 품질관리지표설정 및 시험법 밸리데이션	건	15	- 장기능개선 발효물의 지표성분 분석법 validation 설정: 1건 - 발효물의 품질관리를 위한 지표성분 함량 범위 설정: 1건	밸리데이션 연구보고서 1건	지표설정 분석법 및 밸리데이션 설정 1건, 지표성분 함량 범위 설정 1건 (100% 달성)
	장기능 개선 발효물 시제품 개발	건	10	- 장기능 개선 발효물의 시제품 생산	품목제조보고 1건	결명자발효분말 1건, 시제품 분말형, 과립형 2건, 총 3건 품목제조보고 (100% 달성)
	합계			100		

연도구분	평가항목	단위	비중 (%)	평가의 착안점 및 기준	평가방법	결과 및 달성도
3 차 년 도	시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가	건	15	시제품의 안정성, 유통기한 설정 평가(식품위생기관)	품질평가 보고서	제형 및 식품유형 미해당, 건강기능식품 유통기한 설정 진행필요 항목 미해당되어 진행 불필요 (100% 달성)
	원재료의 품질검사	건	15	식품, 한약재 품질검사기준에 따른 원재료의 품질 평가: 2건	적합 시험 성적서	품질 평가 자체 1건, 시험성적서 1건 모두 적합 (100% 달성)
	시제품의 BI&CI, 디자인 개발, 완제품생산	Lot	40	BI&CI 개발: 1건 용기, 포장지 디자인 개발 제형별 시제품 충전: (400kg/1Lot): 1Lot 완제품생산: 1000EA(300g/EA)	완제품 생산량	국문, 중문, 영문 BI&CI 개발, 용기, 포장지, 캐릭터 디자인 개발 각 1건 시제품 결명자발효분말 450kg 이상 생산, 완제품 분말형 4,000set, 음료형 1,500set 생산 (100% 달성)
	완제품의 품질검사	회	10	완제품의 지포성분 분석 및 유효성 분석	완제품 시험성적서	각 제형별 완제품 시험성적서 1건 (100% 달성)
	판매마케팅 및 수출계약 체결	회	10	박람회 참가 및 시제품 홍보: 2회 바이어 상담 및 수출계약 체결: 1회	수출계약서	식품박람회 3회 참석, 수출계약 체결 2회 (100% 달성)
	중국수입건 강식품 인증대행 계약	회	10	통변기능 개선 인증 중국 현지 보건대행 계약	계약서 1부	보건대행 계약 완료 (100% 달성)
	합계			100		

4-3. 관련분야 기여도

1) 기술적 측면

(1) 기술의 독창성

- 국내 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’ 으로 인정된 고시형 원료는 16개, 개별인정형 원료는 5개로 총 21개이며 식이섬유나 올리고당이 주를 이루고 있음. 즉, 21개 고시형 및 개별인정형 원료 중 16개가 특정 천연물을 단순 가공한 식이섬유임
- 더불어 현재 배변활동 원활 관련 고시형 및 개별인정형 원료들은 대부분 단순 천연물을 추출, 농축, 합성 또는 배양 균주를 농축한 것으로 프로바이오틱스를 제외하고 팽창성 또는 삼투성 또는 자극성 중의 하나인 단일 하제 효능을 일으키는 원료가 대부분임
- 그러나, 변비 환자의 원인 및 치료 방법이 다양하기 때문에 세계 판매 1위 변비치료의약품인 돌코락스-에스와 같은 이중 복합적인 하제 효능을 가지는 제품이 요구되는 실정임
- 본 기술은 유산균 발효기술로 개발된 결명자발효분말로서 안트라퀴논계 화합물에 의한 자극성 하제 효능과 식이섬유에 의한 팽창성 하제 효능을 합한 이중 복합 효능을 나타냄
- 발효 후에도 50% 이상의 매우 높은 불용성 식이섬유 함량과 비교적 낮은 안트라퀴논계 화합물 함량(섭취량에 따라 0.7~5mg/g)을 가져 자극성 하제의 부작용 우려를 해소하는 것을 특징으로 함
- 따라서 단순 추출, 농축 등으로 가공한 기존의 기 인증된 배변관련 고시형 및 개별인정된 기능성 원료들과는 매우 차별화됨으로서 독창성이 있는 기술임

〈표〉 식품 중의 식이섬유 함량

식품명		가식부 100g 당 식이섬유 함량 (g)
곡류	백미 / 찰쌀	0.6
	현미쌀	3.3
	혼합잡곡	6.9
	국수	2.6
	식빵	3.5
	통밀식빵	8.6
	감자	1.4
	고구마	3.8
채소류	배추김치	3.0
	상추	1.8
	깎잎	7.9
	무추	2.9
	브로콜리	2.9
	양배추	2.2
	양상추	1.1
	취나물	5.8
	풋고추	4.7
	팽이버섯	2.9
	김 (마른 것)	33.6
	마역 (마른 것)	43.4
	두류	검정콩
강낭콩		27.5
붉은팥		17.6
과일류	단감	2.5
	얇기	1.8
견과류	복숭아(백도)	2.1
	아몬드	10.4
	호두	7.5

※ 출처 : 임상영양관리지침서, 대한영양사협회, 2008⁴⁰⁾

(2) 기술 경쟁력

- 천연물을 발효시켜 얻은 발효물은 발효에 의한 생물전환(biotransformation) 또는 프로바이오틱(probiotic) 효과에 의해 천연물의 생리활성이 증가되는 것으로 알려짐에 따라, 발효물이 새로운 기능성 식품 원료 또는 천연물 신약 등의 재료로 각광받고 있음
- 특히, 식용 가능한 무해한 미생물로 발효한 발효 천연물은 발효하지 않은 원료 천연물에 비해 더 우수한 약리 효과를 내는 것으로 알려져 있음
- 본 핵심원료 결정자발효분말은 전통적으로 오랫동안 사용되어 그 안전성을 검증받은 생약인 결명자를 유산균으로 발효시켜 얻은 결명자 발효물이 결명자 추출물에 비하여 변의 개수, 변의 수분 함량 또는 변의 중량을 증가시켜 변비를 개선하거나 치료하는 효과가 증진됨이 입증되었음
- 결명자발효분말은 발효를 통해 비당체 안트라퀴논계 화합물 함량이 증가되어 배변 활동 효능이 증가됨과 더불어 발효 후에도 50% 이상의 높은 불용성 식이섬유 함량을 가져 팽창성과 자극성 복합 효능을 가짐
- 또한, 고시형 원료들 중 주원료로 자주 활용되는 분말 및 액상 제품의 난소화성말 토덱스트린(최저 2.5g), 과립 또는 분말 제품의 차전자피(최저 3.9g)와 비교하여 결명자발효분말은 1g~5g 예상으로 비교적 낮은 섭취량을 가짐

(3) 기술 수준

- 본 기술의 핵심소재인 결명자발효분말은 발효기술력을 바탕으로 2014년부터 현재까지 결명자를 소재로 한 유산균 발효, 물질 분석, 동물 실험 등의 연구개발을 통하여 변비개선에 우수한 효과가 있음을 확인하였고, 결명자발효분말의 생산 공정 표준화를 거의 확립한 상태임
- 침출차가 아닌 결명자를 유산균으로 발효시킨 장기능 개선 소재는 국내 최초이며 결명자발효분말은 발효 후 고압멸균 공정을 통해 유산균이 멸균된 상태로 프로바이오틱스 유산균과 결명자발효분말의 복합 효능이 아닌 순수 결명자발효분말의 하제 효능임. 이에 따라 결명자발효분말을 생산하기 위한 발효공정 및 원가절감을 위한 공정기술 등의 종합적인 공정기술은 쉽게 모방되기 어려울 것으로 판단됨
- 국내 발효 식품에서 식품으로 활용 가능한 미생물 100여 종을 분리하고 이 중 발효 후 장기능 개선 효능이 우수한 신균주 락토바실러스 케피리 MJ90과 락토바실러스 카제이 K2 균주를 확보하였으며, 이를 한국미생물보존센터(KCCM)에 국제 균주 특허 기탁한 상태임(기탁번호: KCCM11575P, KCCM11907P). 상기 확보한 유산균들은 발효과정에서 기존의 유산균들과는 다르게 식이섬유를 분해하지 않으면서 안트라퀴논계 화합물 배당체의 당을 분해하는 특징을 갖는 균주로 매우 특이성을 가지기 때문에 모방이 어려울 것으로 예상됨
- 결명자의 장개선 유효물질을 순수분리하기 위해 LC/MS IT-TOF, HPLC, NMR 등의

장비와 ESI-IT-TOF-MS 분석법 등을 활용하여 자극성 하제인 안트라퀴논계 배당체 화합물 5종과 비당체 화합물 7종, 총 12종의 화합물들을 순수 분리하였음 (Isorubrofusarin gentiobioside, Aurantio obtusin 6-O-β-D-glucoside, Rubrofusarin, 6-O-β-D-gentiobioside, Cassiaside, Obtusifolin 2-O-β-D-glucoside, Aurantio-obtusin, Chrysophanol, Obtusifolin, Emodin, Obtusin, Rubrofusarin, Isorubrofusarin)

- 또한, K2 균주 발효 기술을 통해 지표물질인 aurantio-obtusin의 발효 후 함량이 발효 전에 비해 약 3배 이상 증가함을 확인하였으며, 지표물질인 aurantio-obtusin을 분석하기 위한 시험법 밸리데이션을 기 개발 완료하였음 (특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계)
- 더불어 건조된 결명자발효분말의 불용성 식이섬유 함량은 약 50% 이상으로 기타 식용 가능한 식품들의 식이섬유 함량과 비교하여 매우 높음을 확인하였음
- 결명자발효분말의 SD랫트에 대한 변 개수, 변 무게, 변 수분함량, 장내 이동거리를 확인한 결과, 매우 우수한 배변개선 효능을 나타내었으며 이는 대장관 내 점액질 분비효과 측정을 통해서도 확인할 수 있었음

2) 경제산업적 측면

(1) 원료 수급효과 측면

- 약용작물 중 결명자의 국내생산 현황은 2015년 기준 농가수 184호, 재배면적 33ha, 생산량 55톤 이며, 기 5년간 생산현황과 비교하면 2011년 생산량은 78톤, 2013년 43톤으로 30% 이내의 증감이 됨
- 국내 결명자 생산량 중 69% 가 전라남도(장흥군, 강진군 등) 지역에서 생산되며, 본 사업의 주관기관 지역과 근접하여, 주원재료인 결명자의 수급이 원활함
- 결명자의 농가 출하가격은 지난 5년간(2012년 ~ 2016년) 4,000원 ~ 5,000원/kg 으로 일정한 가격을 형성하고 있으며, 안정적인 결명자 수급을 위하여 계약재배 및 자체 재배를 진행할 계획임

〈표〉 국내 지역별 결명자 생산실적 - 2015년

시도(1)	품명(1)	품명(2)	2015				
			농가수 (호)	재배면적 (ha)	수확면적 (ha)	단수 (kg/10a)	생산량 (M/T)
충청북도	약용작물	결명자	11	1.6	1.28	337.82	4.33
충청남도	약용작물	결명자	1	0.15	0.15	333.33	0.5
전라남도	약용작물	결명자	100	23.54	23.48	162.17	38.08
경상북도	약용작물	결명자	6	2.3	2.3	84.17	1.94
경상남도	약용작물	결명자	66	5.83	5.83	171.27	9.98
계	약용작물	결명자	184	33	33	1,089	55

※ 출처: 농림축산식품부, 특용작물생산실적, 2016⁴¹⁾

(2) 수입대체 효과 측면

- 2013년도 결명자 수입량은 900톤 이며, 국내생산량은 43톤으로 국내 생산량은 수입량 대비 4.7% 수준으로 수입에 의존도가 높음. 본 사업을 통한 결명자의 수입대체효과 및 결명자 시장점유율은 2023년 기준 9.11%, 8.69%를 계획하고 있음

<표> 결명자 수급에 따른 예상 수입 대체효과와 예상 시장 점유율

항 목 \ 산업화 년도	1차년도 (2019년)	2차년도 (2020년)	3차년도 (2021년)	4차년도 (2022년)	5차년도 (2023년)	계
결명자 수급(톤)	1.6	7	14.4	35	82	140
수입 대체효과(%)	0.17	0.77	1.6	3.89	9.11	15.54
결명자 시장 점유율(%)	0.17	0.74	1.52	3.71	8.69	14.83

※ 출처: 농림축산부, 특용작물 생산실적, 2013년도 주요한약재 수출입현황, <http://blog.naver.com/conif/90166514615>⁴²⁾

- 식품의약품안전처의 2016 식품의약품통계연보, “<표> 건강기능식품 수입 현황”에 따르면 차전자피 \$1,659,000, 이눌린 \$1,030,000, 프락토올리고당 \$319,000, 프로바이오틱스 \$44,047,000, 알로에전잎 \$409,000, 난소화성말토덱스트린 \$216,000 등과 같이 주요 원료들이 수입되고 있는 실정임

<표> 건강기능식품 수입 현황

(단위: 건, 톤, 천달러)

구 분	총 계		
	건수	중량	금액
2010	6,555	6,918	225,667
2011	8,017	8,495	329,041
2012	7,423	8,603	315,033
2013	7,945	9,378	352,745
2014	8,520	8,755	418,565
2015	10,113	9,555	440,636
영양소 ⁱ 및 기능성원료혼합 ⁱⁱ	4,867	4,755	243,445
가르시니아카보지아추출물	139	269	7,058
감마리놀렌산함유유지	162	150	4,904
개별인정형건강기능식품	469	558	38,152
공액리놀레산	66	63	3,385
구아검/구아검가수분해물 제품	3	3	69
구아바잎 추출물	10	3	110
귀리식이섬유	53	113	8,688
글루코사민	173	76	2,788
난소화성말토덱스트린	6	46	216
녹차추출물	68	25	1,255
달맞이꽃종자 추출물	10	5	272
대두이소플라본	11	1	211

디메틸설펜(Methyl sulfonylmethane,MSM)	113	121	1,310
레시틴	27	14	365
루테인	145	25	3,862
매실추출물	-	-	-
뮤코다당.단백	13	2	285
밀식이섬유(원료성)	9	39	61
밀크씨슬(카르두스 마리아누스) 추출물	122	59	5,032
보리식이섬유(원료성)	3	1	24
스쿠알렌	5	1	50
스피루리나/클로렐라	429	262	8,576
식물스테롤/식물스테롤에스테르	5	0	13
쏘팔메토열매추출물	28	20	3,309
아라비아검(아카시아검)	14	202	722
알로에겔	113	187	10,202
알로에전잎	37	30	409
알콕시글리세롤함유상어간유	9	2	67
엽록소함유식물	21	6	192
영지버섯자실체추출물	10	1	609
오메가-3지방산함유유지	948	1,142	27,602
은행잎 추출물	38	9	1,736
옥타코사놀함유유지	110	13	1,614
이눌린	37	49	1,030
인삼/홍삼	45	56	2,188
차전자피	57	253	1,659
치커리추출물(원료성)	14	212	537
코엔자임Q10	140	14	4,104
키토산/키토올리고당	86	66	2,259
테아닌	19	2	85
포스파티딜세린 (원료성)	1	1	383
폴리덱스트로스	31	426	747
프락토올리고당	9	6	319
프로바이오틱스	1,005	181	44,047
프로폴리스추출물	404	82	5,858
헤마토코쿠스추출물	18	1	734
홍국	6	2	58
N-아세틸글루코사민	5	0	34

출처 : 식품의약품안전처 수입식품정책과 ⁴³⁾

i) 영양소 : 비타민, 필수지방산 중 1개 또는 2개 이상의 영양소 혼합 제조한 것을 말함

ii) 기능성원료혼합 : 건강기능식품 제조에 사용되는 기능성을 가진 물질(영양소~홍국)을 1개 또는 2개 이상 혼합 제조한 것을 말함

- 그러나 결명자발효분말은 본사의 독자적인 기술로 개발된 원료로 향후 개별인정되면 위의 원료들에 대한 수입 대체효과와 수출을 통한 수출효과 및 국가 이미지에 향상에 기여함
- 식품의약품안전처의 2016 식품의약품통계연보, <표> 건강기능식품 수입 현황에 따르면 차전자피 \$1,659,000, 이눌린 \$1,030,000, 프락토올리고당 \$319,000, 프로바이오틱스 \$44,047,000, 알로에전잎 \$409,000, 난소화성말토덱스트린 \$216,000 등과 같이

주요 원료들이 수입되고 있는 실정임

- 하지만 결명자발효분말은 독자적인 기술로 개발된 원료임. 따라서 개별인정되면 위의 원료들에 대한 수입 대체효과와 수출을 통한 수출효과 및 국가 이미지 향상에 기여함

(4) 산업적 측면

- 미생물 발효기술을 이용한 효소 산업, 미생물 제재, 건강 보조제, 스킨케어 등 다양한 분야에서 미생물이 사용되고 있으며, 이에 응용/확장 가능함
- 본 기술을 국내 약용작물의 발효에 적용하여 고부가가치를 창출할 수 있으며, 이를 이용한 다양한 제품 생산이 가능함
- 실제 화장품 중 락토바실러스배양물을 원료로 활용한 화장품들이 출시되었으며 이와 같은 발효기술로 식품 및 건강보조제, 뷰티 아이템 등 건강과 미용에 관련된 상품의 재료 및 첨가제로 사용될 수 있음
- 식품에 첨가되는 방부제, 산화방지제, 계면활성제 등 화학물질을 대체할 수 있는 천연 물질 개발에 과학적 바탕이 되는 기술로서 사용할 수 있으며, 이를 이용하여 산업 및 환경 분야의 천연물 시장에 진입할 수 있음
- 결명자는 본초강목(本草綱目)에서 향균, 살충, 항알레르기, 치주질환 완화, 항산화, 간보호, 혈압강하, 혈중지질저하, 혈당강하 등에 효능이 있다고 알려져 왔기 때문에 관련 분야로 활용 가능함
- 일본 건강기능식품 시장의 경우 시력과 관련된 시장이 성장하고 있으며, 본 기술을 확장하여 결명자의 눈에 좋은 효능을 증진시켜 새로운 상품으로 일본 시장에 진입할 수 있음

3) 사회문화적 측면

- 한의약 소재의 활용으로 재배 농가 소득 증대 및 일자리 창출
- 관련 기능성 식품 산업의 활성화
- 과학적 분석을 통한 제품 품질 향상 및 소비자 신뢰 증대
- 국내산 원료 사용기반 확충 및 식품산업 연계발전 강화
- 제품 판매를 통한 소득 증대와 일자리 창출
- 변비 개선을 통한 국가 건강 이바지 및 수출을 통한 국가 이미지 상승과 세계인의 건강 증진

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

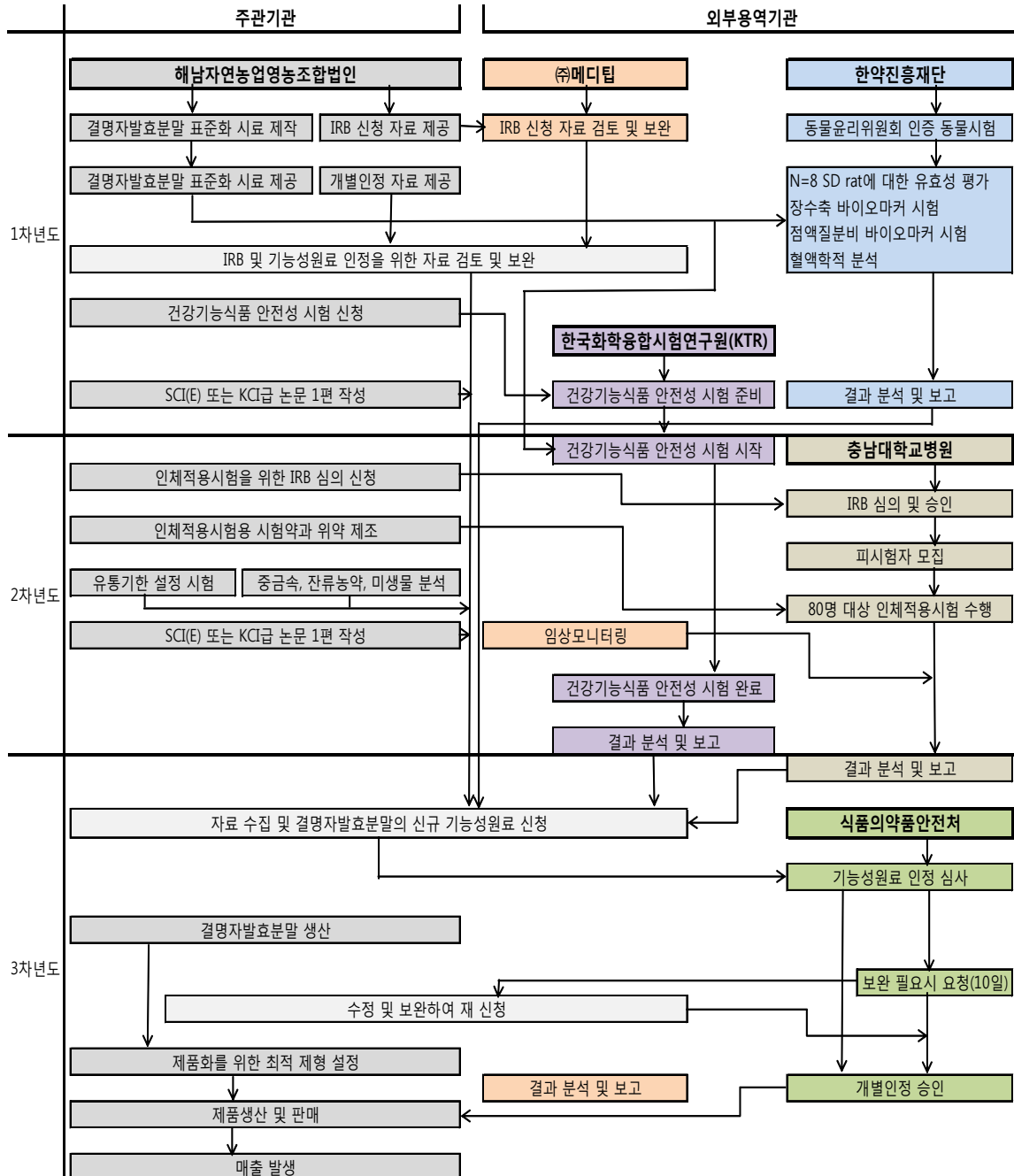
D-07

5-1. 추가 연구의 필요성 및 타 사업에 활용

- 현재 일반식품은 규정상 건강기능식품이나 의약품으로 오인할 수 있는 ‘배변활동과 관련된 기능’에 대한 홍보 및 마케팅을 전혀 할 수가 없음. 그러나 본 기술의 핵심원료인 결명자발효분말은 배변활동원활 기능에 대해 우수한 효과를 나타내는 원료이기 때문에 이의 홍보가 필수적으로 필요한 실정임
- 따라서 고부가가치 원료인 결명자발효분말의 건강기능식품 개별인정 획득이 필수이며 현재, 표준화는 거의 완성 단계이기 때문에 추가 전임상(기능성) 연구와 독성시험(안전성), 인체적용임상시험(기능성과 안전성)이 추가 진행되어야 함
- 기존의 SD랫트를 통한(N=5) 변 수, 변 무게, 변 수분함량, 장 이동거리, 점액질 분비효과에 대한 유효성 평가를 넘어 동물실험윤리위원회의 인증을 통한 N=8 이상에 대한 추가 동물시험이 필요함
- 기존 점액질 분비효과에 대한 점액축진 바이오마커와 함께 장수축과 관련된 바이오마커들인 무스카린 수용체 M2, M3 유전자 발현 양상, PKC와 PI3K 단백질들의 발현 양상의 확인과 추가 장 점막층과 근육두께에 대한 수치 변화 연구도 필요함
- 추가 안전성 간접자료의 지표물질 중 간지표인 AST, ALT, ALP, GGT와 신장지표인 BUN, Cre의 수치 변화 확인 연구도 필요함
- 본 연구의 핵심재료 결명자발효분말의 원재료인 결명자는 예로부터 현재까지 꾸준히 섭취되어온 약용작물이며 고서(동의보감-1613년, 세의득효방-1345년, 의학정전-1515년, 의종금감-1742년, 신농본초경, 강서초약, 태평성혜방, 운남사모중초약선) 등에 나온 결명자의 일일섭취량은 1.125~24g 으로 평균의 95% 극한치 약 10g에 비해 본 결명자발효분말의 예상섭취량은 1~5g 으로 적은 일일섭취량임
- 더불어 식약처 고시 안전성 평가에 대한 자체 의사결정도의 결과, ‘나’ 또는 ‘다’ 항목으로 독성시험평가 자료의 제출 여부 판단이 향후 필요하지만, 실제 소비자들에게 안전한지에 대한 확실한 평가를 위해 GLP인증기관을 통한 건강기능식품 안전성 평가시험을 진행하고자 함
- 건강기능식품 안전성 평가시험 항목(GLP)
 - 1) 급성경구독성시험-랫트, 2) 단회경구투여 용량증가 독성시험-비글견, 3) 90일 반복 경구투여 독성시험+4주 회복시험-랫트, 4) 소핵시험-마우스, 5) 복귀돌연변이시험-5군주, 6) 염색체이상시험-CHL세포, 7) 4주반복용량설정(DRF)시험-랫트(Non-GLP)
- 마지막으로 인체적용 임상시험(80명 대상 무작위배정, 이중눈가림 플라세보-대조)을 통해 대장통과시간 등 유효성 및 안전성을 확보할 수 있음
- 현재 타 사업 활용을 통해 농림축산식품부의 기술사업화지원사업을 수행하고 있으며 진행 내용을 아래와 같음 (과제명: 결명자발효분말의 배변활동원활 기능성원료 인정 및

건강기능식품 개발, 과제번호: 817034-3, 총연구기간 2017. 08. 30 ~ 2019. 12. 31)

- 기술사업화지원사업을 통해 결명자발효분말의 배변활동원활 관련 건강기능식품 개별인정을 획득하여 2019년 제품의 자체 생산 또는 외주가공으로 완제품을 출시할 계획임
- 향후 예상되는 제품 종류와 예상 판매가격은 결명자발효분말 원료 자체의 판매 (20,000 원/kg)와 이를 주원료로 포함한 완제품 분말, 액상, 캡슐, 정제, 과립 중 분말과 액상이 예상됨(실제 일일섭취량에 따라 최적 제형 설정 예정)
- 기술사업화지원사업의 세부 추진방법과 세부내용은 아래와 같음



[그림] 결명자발효분말의 개별인정 획득 추진전략

5-2. 기타 연구 응용 및 활용분야

- 미생물 발효기술을 이용한 효소 산업, 미생물 제제, 건강 보조제, 스킨케어 등 다양한 분야에서 미생물이 사용되고 있으며, 이에 응용/확장 가능함
- 본 기술을 국내 약용작물의 발효에 적용하여 고부가가치를 창출할 수 있으며, 이를 이용한 다양한 제품 생산이 가능함
- 실제 화장품 중 락토바실러스배양물을 원료로 활용한 화장품들이 출시되었으며 이와 같은 발효기술로 식품 및 건강보조제, 뷰티 아이템 등 건강과 미용에 관련된 상품의 재료 및 첨가제로 사용될 수 있음
- 식품에 첨가되는 방부제, 산화방지제, 계면활성제 등 화학물질을 대체할 수 있는 천연물질 개발에 과학적 바탕이 되는 기술로서 사용할 수 있으며, 이를 이용하여 산업 및 환경 분야의 천연물 시장에 진입할 수 있음
- 결명자는 본초강목(本草綱目)에서 향균, 살충, 항알레르기, 치주질환 완화, 항산화, 간보호, 혈압강하, 혈중지질저하, 혈당강하 등에 효능이 있다고 알려져 왔기 때문에 관련 분야로 활용 가능함
- 일본 건강기능식품 시장의 경우 시력과 관련된 시장이 성장하고 있으며, 본 기술을 확장하여 결명자의 눈에 좋은 효능을 증진시켜 새로운 상품으로 일본 시장에 진입할 수 있음

〈표〉 주요 국가별 동향

구분	미국	중국	일본
시장 규모	<ul style="list-style-type: none"> • 404억달러(45조 원) • 연평균 성장률 : 7.1% 	<ul style="list-style-type: none"> • 163억달러(18조 원) • 연평균 성장률 : 13.8% 	<ul style="list-style-type: none"> • 109억달러(12조 원) • 연평균 성장률 : 2.3%
주요 소비 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 멀티 비타민 • 천연물/전통 식품보충제 	<ul style="list-style-type: none"> • 비타민 및 무기질 	<ul style="list-style-type: none"> • 비타민 및 무기질
성장 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 비타민 B, D • 프로바이오틱스 	<ul style="list-style-type: none"> • 칼슘제 	<ul style="list-style-type: none"> • 시력 보호 • 수면 보조
기업 동향	<ul style="list-style-type: none"> • 대형 기업이 시장 점점 • 대규모 유통망을 통해 판매 	<ul style="list-style-type: none"> • 점유율 10위 기업 중 외국 기업 3개 포함 • 직소판매형식 	<ul style="list-style-type: none"> • 드럭 스토어, 통신 판매 등 다양한 판매, • 자체 브랜드 제품의 성장

출처 : S&T Market report, vol.41, 연구성과실용화진흥원, 2016⁴⁴⁾

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

6-1. 일본

- 일본의 특허를 살펴보면, 소재의 특성상 기업·연구기관 중심이 아닌 개인 발명가(출원인) 중심으로 출원이 이루어진 것으로 파악됨
- 최다 출원인으로는 KAO CORP에서 총 6건의 출원으로 가장 많았으며, 다음으로 TOYO SHINYAKU CO LTD 및 NIPPON KAYAKU CO LTD에서 각각 4건씩의 출원을 하였음. 그 외, AJINOMOTO CO INC 및 FANCL CORP에서 각각 3건씩의 출원이 이루어진 것으로 나타남

KAO CORP

카오 주식회사는 도쿄 도 주오 구 니혼바시카야바 정에 본사를 둔 일본의 화학 기업임. 가정용이나 업무용 세제, 화장품, 식품을 제조·판매하고, 세제, 화장품에서는 일본 내 최고를 자랑하며, 화장품 매출에서는 2위를 기록하였음. 같은 화장품 제조 업체의 가네보 화장품을 100% 자회사로 소유하고 있음. 원료로부터의 일관 생산 및 물류·판매 시스템에 강점이 있고, 일본 국내외에 많은 공장과 매장을 가지고 있음

KAO CORP 특허 요약 (1)

특허번호	출원일	출원인	대표도면																		
JP 2000-060483	1998.08.27	KAO CORP	<table border="1"> <tr><td>4型カラギーナン</td><td>1g</td></tr> <tr><td>有胞子乳酸菌</td><td>10⁸個</td></tr> <tr><td>ビタミンC</td><td>0.3g</td></tr> <tr><td>糖類(砂糖、果糖ぶどう糖液糖)</td><td>10g</td></tr> <tr><td>香料</td><td>0.025g</td></tr> <tr><td>蒸留水</td><td>バランス</td></tr> <tr><td colspan="2" style="text-align: right;">100.0ml</td></tr> </table>	4型カラギーナン	1g	有胞子乳酸菌	10 ⁸ 個	ビタミンC	0.3g	糖類(砂糖、果糖ぶどう糖液糖)	10g	香料	0.025g	蒸留水	バランス	100.0ml					
4型カラギーナン	1g																				
有胞子乳酸菌	10 ⁸ 個																				
ビタミンC	0.3g																				
糖類(砂糖、果糖ぶどう糖液糖)	10g																				
香料	0.025g																				
蒸留水	バランス																				
100.0ml																					
제목	장내 환경 개선 경구 조성물																				
<p>【과제】 장내 환경을 정상화하고 배변 횟수, 분편 함유율 및 배변감 등을 개선하는 장내 환경 개선 경구 조성물</p> <p>【해결 수단】 산성 다당류 및 유포자 유산균을 함유하는 장내 환경 개선 경구 조성물</p>																					
특허번호	출원일	출원인	대표도면																		
JP 2000-060487	1998.08.27	KAO CORP	<table border="1"> <tr><td>小麦粉(強力粉)</td><td>50g</td></tr> <tr><td>小麦粉(薄力粉)</td><td>47.5g</td></tr> <tr><td>砂糖</td><td>15g</td></tr> <tr><td>卵</td><td>25g</td></tr> <tr><td>食塩</td><td>0.5g</td></tr> <tr><td>ショートニング</td><td>40g</td></tr> <tr><td>カラギーナン</td><td>2g</td></tr> <tr><td>エリスリトール</td><td>20g</td></tr> <tr><td>計</td><td>200g</td></tr> </table>	小麦粉(強力粉)	50g	小麦粉(薄力粉)	47.5g	砂糖	15g	卵	25g	食塩	0.5g	ショートニング	40g	カラギーナン	2g	エリスリトール	20g	計	200g
小麦粉(強力粉)	50g																				
小麦粉(薄力粉)	47.5g																				
砂糖	15g																				
卵	25g																				
食塩	0.5g																				
ショートニング	40g																				
カラギーナン	2g																				
エリスリトール	20g																				
計	200g																				
제목	변비 개선제																				
<p>【과제】 소량의 섭취로 충분한 변비 개선 효과를 가지는 변비 개선제의 제공</p> <p>【해결 수단】 수용성 식이섬유 및 당 알코올을 유효성분으로 하는 변비 개선제</p>																					

KAO CORP 특허 요약 (2)

특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																				
JP 2000-060510	1998.08.27	KAO CORP	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="6">아스코르빈酸濃度(g/100ml)</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>0</th> <th>0.01</th> <th>0.1</th> <th>1</th> <th>10</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="6">カキトニンとの糖類と濃度 (g/100ml)</td> <td rowspan="3">+型¹⁾</td> <td>0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>0.01</td> <td>10.10</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td>0.1</td> <td>60.60</td> <td>30.30</td> <td>16.10</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">-型²⁾</td> <td>1</td> <td>130.130</td> <td>100.100</td> <td>30.30</td> <td>15.15</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td>0.01</td> <td>10.10</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td>0.1</td> <td>50.50</td> <td>20.20</td> <td>16.16</td> <td>5.5</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">+型³⁾</td> <td>1</td> <td>100.100</td> <td>80.75</td> <td>30.20</td> <td>15.15</td> <td>5.5</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>120.120</td> <td>100.100</td> <td>30.30</td> <td>15.15</td> <td>5.5</td> </tr> </tbody> </table>			아스코르빈酸濃度(g/100ml)								0	0.01	0.1	1	10		カキトニンとの糖類と濃度 (g/100ml)	+型 ¹⁾	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.01	10.10	5.5	5.5	5.5	5.5	0.1	60.60	30.30	16.10	5.5	5.5	-型 ²⁾	1	130.130	100.100	30.30	15.15	5.5	0.01	10.10	5.5	5.5	5.5	5.5	0.1	50.50	20.20	16.16	5.5	5.5	+型 ³⁾	1	100.100	80.75	30.20	15.15	5.5	1	120.120	100.100	30.30	15.15	5.5
		아스코르빈酸濃度(g/100ml)																																																																					
		0		0.01	0.1	1	10																																																																
カキトニンとの糖類と濃度 (g/100ml)	+型 ¹⁾	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																																																																
		0.01	10.10	5.5	5.5	5.5	5.5																																																																
		0.1	60.60	30.30	16.10	5.5	5.5																																																																
	-型 ²⁾	1	130.130	100.100	30.30	15.15	5.5																																																																
		0.01	10.10	5.5	5.5	5.5	5.5																																																																
		0.1	50.50	20.20	16.16	5.5	5.5																																																																
+型 ³⁾	1	100.100	80.75	30.20	15.15	5.5																																																																	
	1	120.120	100.100	30.30	15.15	5.5																																																																	
제목	액상 음료																																																																						
<p>【과제】 카라기난 및 아스코르브산의 가지는 생리 작용을 상실시키지 않고 용이하게 섭취할 수 있는 음료 및 아스코르브산 수용액의 갈변을 억제하는 방법의 제공</p> <p>【해결 수단】 카라기난을 0.1~5w/v% 및 아스코르브산을 카라기난에 대해서 0.1 중량배 이상 배합한 액상 음료 ; 및 아스코르브산 수용액에 카라기난을 첨가하는 것을 특징으로 하는 아스코르브산 수용액의 갈변 억제법</p>																																																																							
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																				
JP 2002-154977	2001.09.05	KAO CORP	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="2">収縮期血圧(mmHg)</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>投与前</th> <th>投与4週間後</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>対照区</td> <td></td> <td>152.1±4.4</td> <td>201.0±3.9</td> </tr> <tr> <td>試験区 1</td> <td></td> <td>153.4±2.9</td> <td>185.1±4.5*</td> </tr> <tr> <td>試験区 2</td> <td></td> <td>154.0±4.3</td> <td>173.5±4.3**</td> </tr> <tr> <td>試験区 3</td> <td></td> <td>155.1±3.9</td> <td>170.6±4.2**</td> </tr> <tr> <td>試験区 4</td> <td></td> <td>153.7±4.8</td> <td>169.7±5.0**</td> </tr> <tr> <td>試験区 5</td> <td></td> <td>155.7±3.2</td> <td>172.9±4.6**</td> </tr> <tr> <td>試験区 6</td> <td></td> <td>152.9±3.0</td> <td>168.1±4.7**</td> </tr> </tbody> </table>			収縮期血圧(mmHg)				投与前	投与4週間後	対照区		152.1±4.4	201.0±3.9	試験区 1		153.4±2.9	185.1±4.5*	試験区 2		154.0±4.3	173.5±4.3**	試験区 3		155.1±3.9	170.6±4.2**	試験区 4		153.7±4.8	169.7±5.0**	試験区 5		155.7±3.2	172.9±4.6**	試験区 6		152.9±3.0	168.1±4.7**																																
		収縮期血圧(mmHg)																																																																					
		投与前		投与4週間後																																																																			
対照区		152.1±4.4	201.0±3.9																																																																				
試験区 1		153.4±2.9	185.1±4.5*																																																																				
試験区 2		154.0±4.3	173.5±4.3**																																																																				
試験区 3		155.1±3.9	170.6±4.2**																																																																				
試験区 4		153.7±4.8	169.7±5.0**																																																																				
試験区 5		155.7±3.2	172.9±4.6**																																																																				
試験区 6		152.9±3.0	168.1±4.7**																																																																				
제목	음식용 조성물																																																																						
<p>【해결 수단】 (a) 카페산, 클로로겐산, 페룰라산, 이들의 에스테르 및 이들의 약학적으로 허용되는 염의 군에서 선택되는 화합물, (b) 식이섬유를 함유하는 음식용 조성물</p>																																																																							
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																				
JP 4463494	2003.04.15	KAO CORP	<p>飼料組成 (重量%)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>試験飼料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>試験澱粉</td> <td>5%</td> </tr> <tr> <td>α化馬鈴薯澱粉</td> <td>56%</td> </tr> <tr> <td>脂質</td> <td>60%</td> </tr> <tr> <td>カゼイン</td> <td>25%</td> </tr> <tr> <td>ミネラル混合物</td> <td>6%</td> </tr> <tr> <td>ビタミン混合物</td> <td>2%</td> </tr> </tbody> </table>		試験飼料	試験澱粉	5%	α化馬鈴薯澱粉	56%	脂質	60%	カゼイン	25%	ミネラル混合物	6%	ビタミン混合物	2%																																																						
	試験飼料																																																																						
試験澱粉	5%																																																																						
α化馬鈴薯澱粉	56%																																																																						
脂質	60%																																																																						
カゼイン	25%																																																																						
ミネラル混合物	6%																																																																						
ビタミン混合物	2%																																																																						
제목	변비 개선제																																																																						
<p>【과제】 변비나 장내 환경 등을 개선하는 효과를 발휘하고 안전성이 높으며 적용 범위가 넓고 식감을 훼손하는 것이 적은 식품, 의약품 등의 소재를 제공함</p> <p>【해결 수단】 하이드록시프로필화된 전분을 유효성분으로 하는 변비 개선제, 장내 환경 개선제, 장관 점액 산생 촉진제 및 장내 짧은 사슬 지방산 산생 촉진제</p>																																																																							
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																				
JP 2010-047606	2009.11.25	KAO CORP	<p>飼料組成 (重量%)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>試験飼料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>試験澱粉</td> <td>5%</td> </tr> <tr> <td>α化馬鈴薯澱粉</td> <td>56%</td> </tr> <tr> <td>脂質</td> <td>60%</td> </tr> <tr> <td>カゼイン</td> <td>25%</td> </tr> <tr> <td>ミネラル混合物</td> <td>6%</td> </tr> <tr> <td>ビタミン混合物</td> <td>2%</td> </tr> </tbody> </table>		試験飼料	試験澱粉	5%	α化馬鈴薯澱粉	56%	脂質	60%	カゼイン	25%	ミネラル混合物	6%	ビタミン混合物	2%																																																						
	試験飼料																																																																						
試験澱粉	5%																																																																						
α化馬鈴薯澱粉	56%																																																																						
脂質	60%																																																																						
カゼイン	25%																																																																						
ミネラル混合物	6%																																																																						
ビタミン混合物	2%																																																																						
제목	변비 개선제																																																																						
<p>【과제】 변비나 장내 환경 등을 개선하는 효과를 발휘하고 안전성이 높으며 적용 범위가 넓고 식감을 훼손하는 것이 적은 식품, 의약품 등의 소재 제공</p> <p>【해결 수단】 하이드록시프로필화된 전분을 유효성분으로 하는 변비 개선제, 장내 환경 개선제, 장관 점액 산생 촉진제 및 장내 짧은 사슬 지방산 산생 촉진제</p>																																																																							

NIPPON KAYAKU CO LTD

Nippon Kayaku (일본 화학약품 주식회사, 일본 제약 회사)는 1916년에 Nippon Kayaku Seizo Co., Ltd.의 이름으로 일본에서 최초의 산업용 폭약 제조업체로 설립된 일본 회사.

주요 사업 분야 : 기능성 화학 물질, 의약품, 안전 시스템 및 농약

NIPPON KAYAKU CO LTD 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																	
JP 2978332	1992.05.11	NIPPON KAYAKU CO LTD	<table border="1"> <thead> <tr> <th>質</th> <th>投与前</th> <th>投与1週間</th> <th>投与2週間</th> <th>投与後</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>アンモニア (mg/g)</td> <td>261.3</td> <td>125.4</td> <td>106.2</td> <td>232.1</td> </tr> <tr> <td>硫化物 (μg/g)</td> <td>4.9</td> <td>3.6</td> <td>3.6</td> <td>3.9</td> </tr> <tr> <td>フェノール (μ)</td> <td>31.8</td> <td>12.9</td> <td>15.5</td> <td>21.7</td> </tr> <tr> <td>エチルフェノール (μ)</td> <td>9.6</td> <td>1.6</td> <td>2.5</td> <td>5.6</td> </tr> <tr> <td>パラクレゾール (μ)</td> <td>61.9</td> <td>19.6</td> <td>24.8</td> <td>51.6</td> </tr> <tr> <td>インドール (μ)</td> <td>54.3</td> <td>16.2</td> <td>22.3</td> <td>38.1</td> </tr> <tr> <td>スカトール (μ)</td> <td>20.5</td> <td>9.1</td> <td>7.5</td> <td>19.2</td> </tr> <tr> <td>糞便重量 (g)</td> <td>95.5</td> <td>111.2</td> <td>116.3</td> <td>97.1</td> </tr> <tr> <td>糞便のpH</td> <td>6.4</td> <td>6.2</td> <td>6.3</td> <td>6.5</td> </tr> <tr> <td>糞便水分 (%)</td> <td>74.9</td> <td>76.7</td> <td>76.4</td> <td>74.6</td> </tr> </tbody> </table>	質	投与前	投与1週間	投与2週間	投与後	アンモニア (mg/g)	261.3	125.4	106.2	232.1	硫化物 (μg/g)	4.9	3.6	3.6	3.9	フェノール (μ)	31.8	12.9	15.5	21.7	エチルフェノール (μ)	9.6	1.6	2.5	5.6	パラクレゾール (μ)	61.9	19.6	24.8	51.6	インドール (μ)	54.3	16.2	22.3	38.1	スカトール (μ)	20.5	9.1	7.5	19.2	糞便重量 (g)	95.5	111.2	116.3	97.1	糞便のpH	6.4	6.2	6.3	6.5	糞便水分 (%)	74.9	76.7	76.4	74.6										
質	投与前	投与1週間		投与2週間	投与後																																																															
アンモニア (mg/g)	261.3	125.4	106.2	232.1																																																																
硫化物 (μg/g)	4.9	3.6	3.6	3.9																																																																
フェノール (μ)	31.8	12.9	15.5	21.7																																																																
エチルフェノール (μ)	9.6	1.6	2.5	5.6																																																																
パラクレゾール (μ)	61.9	19.6	24.8	51.6																																																																
インドール (μ)	54.3	16.2	22.3	38.1																																																																
スカトール (μ)	20.5	9.1	7.5	19.2																																																																
糞便重量 (g)	95.5	111.2	116.3	97.1																																																																
糞便のpH	6.4	6.2	6.3	6.5																																																																
糞便水分 (%)	74.9	76.7	76.4	74.6																																																																
제목	장내 대사 개선 식품 및 장내 대사 개선제																																																																			
<p>키토산을 유효성분으로 하는 장내 대사 개선제 및 키토산 함유 장내 대사 개선 식품으로 정상 작용을 가지며, 변비 개선제, 위장의 이상 발효 방지제, 간기능에 대한 부하 경감제, 대장암, 궤양성 대장염 예방제 및 분변 냄새 경감제로서의 용도 등이 기대됨</p>																																																																				
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																	
JP 3332784	1997.02.14	NIPPON KAYAKU CO LTD	<table border="1"> <thead> <tr> <th>処方</th> <th>1号</th> <th>MC</th> <th>AG</th> <th>緑合</th> <th>乾燥</th> <th>SE</th> <th>卵殼粉末</th> <th>混合</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>97g</td> <td>2g</td> <td>—</td> <td>3分</td> <td>50℃</td> <td>1g</td> <td>—</td> <td>1分</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>97g</td> <td>2g</td> <td>—</td> <td>3分</td> <td>50℃</td> <td>—</td> <td>1g</td> <td>1分</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>97g</td> <td>—</td> <td>2g</td> <td>3分</td> <td>50℃</td> <td>1g</td> <td>—</td> <td>1分</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>97g</td> <td>—</td> <td>2g</td> <td>3分</td> <td>50℃</td> <td>—</td> <td>1g</td> <td>1分</td> </tr> </tbody> </table>	処方	1号	MC	AG	緑合	乾燥	SE	卵殼粉末	混合	1	97g	2g	—	3分	50℃	1g	—	1分	2	97g	2g	—	3分	50℃	—	1g	1分	3	97g	—	2g	3分	50℃	1g	—	1分	4	97g	—	2g	3分	50℃	—	1g	1分																				
処方	1号	MC		AG	緑合	乾燥	SE	卵殼粉末	混合																																																											
1	97g	2g	—	3分	50℃	1g	—	1分																																																												
2	97g	2g	—	3分	50℃	—	1g	1分																																																												
3	97g	—	2g	3分	50℃	1g	—	1分																																																												
4	97g	—	2g	3分	50℃	—	1g	1分																																																												
제목	활택제, 정제 및 그 제조법																																																																			
<p>식이섬유가 고함량인 정제 제조를 가능하게 하는 활택제로서 식이섬유에 카라기난, 검질, 펙틴, 한천, 메틸 셀룰로오스 등 증점제를 이용하여 연합 조립, 정립한 후, 활택제로서 달걀껍질 분말을 더해 타정함으로써, 식이섬유 고함량의 정제를 얻을 수 있음</p>																																																																				
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																	
JP 2001-252046	2000.03.09	NIPPON KAYAKU CO LTD	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">各錠剤中のキトサン、アロエニン及びアロインの含有量</th> </tr> <tr> <th>キトサン含有量 (mg/錠)</th> <th>アロエニン含有量 (mg/錠)</th> <th>アロイン含有量 (mg/錠)</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>キダチアロエ錠</td> <td>0.0</td> <td>2.3</td> <td>1.6</td> </tr> <tr> <td>キトサン錠</td> <td>75.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>キトサンとキダチアロエ錠</td> <td>75.0</td> <td>2.3</td> <td>1.6</td> </tr> </tbody> </table>	各錠剤中のキトサン、アロエニン及びアロインの含有量				キトサン含有量 (mg/錠)	アロエニン含有量 (mg/錠)	アロイン含有量 (mg/錠)		キダチアロエ錠	0.0	2.3	1.6	キトサン錠	75.0	0.0	0.0	キトサンとキダチアロエ錠	75.0	2.3	1.6																																													
各錠剤中のキトサン、アロエニン及びアロインの含有量																																																																				
キトサン含有量 (mg/錠)	アロエニン含有量 (mg/錠)	アロイン含有量 (mg/錠)																																																																		
キダチアロエ錠	0.0	2.3	1.6																																																																	
キトサン錠	75.0	0.0	0.0																																																																	
キトサンとキダチアロエ錠	75.0	2.3	1.6																																																																	
제목	정상 또는 변비 개선용 식품																																																																			
<p>알로에와 키토산을 동시에 섭취하고 알로에의 사졸작용으로 변비를 해소하고 키토산이 작용해 변 중의 수분을 조절해 아미노기로 대변 중의 유해 물질을 흡착할 수 있는 정상 또는 변비 개선용 식품을 제공</p>																																																																				
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																	
JP 4830130	2005.05.13	NIPPON KAYAKU CO LTD	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">1粒あたりの配合割合</th> </tr> <tr> <th></th> <th>コントロール</th> <th>処方1</th> <th>処方2</th> <th>処方3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>キトサン</td> <td>70mg</td> <td>70mg</td> <td>70mg</td> <td>70mg</td> </tr> <tr> <td>ケンメイシエキス(2% 品)</td> <td>—</td> <td>30mg</td> <td>—</td> <td>30mg</td> </tr> <tr> <td>麻の実粉</td> <td>—</td> <td>—</td> <td>100mg</td> <td>100mg</td> </tr> <tr> <td>小麦胚芽油</td> <td>60mg</td> <td>100mg</td> <td>90mg</td> <td>60mg</td> </tr> <tr> <td>ビタミンB2</td> <td>5mg</td> <td>5mg</td> <td>5mg</td> <td>5mg</td> </tr> <tr> <td>ビタミンB6</td> <td>4mg</td> <td>4mg</td> <td>4mg</td> <td>4mg</td> </tr> <tr> <td>ビタミンE (d75品)</td> <td>6mg</td> <td>6mg</td> <td>6mg</td> <td>6mg</td> </tr> <tr> <td>ミツロウ</td> <td>20mg</td> <td>20mg</td> <td>20mg</td> <td>20mg</td> </tr> <tr> <td>グリセリン脂肪酸エステル</td> <td>5mg</td> <td>5mg</td> <td>5mg</td> <td>5mg</td> </tr> <tr> <td>ゼラチン(カプセル外 皮)</td> <td>111mg</td> <td>111mg</td> <td>111mg</td> <td>111mg</td> </tr> <tr> <td>グリセリン(カプセル外 皮)</td> <td>39mg</td> <td>39mg</td> <td>39mg</td> <td>39mg</td> </tr> </tbody> </table>	1粒あたりの配合割合						コントロール	処方1	処方2	処方3	キトサン	70mg	70mg	70mg	70mg	ケンメイシエキス(2% 品)	—	30mg	—	30mg	麻の実粉	—	—	100mg	100mg	小麦胚芽油	60mg	100mg	90mg	60mg	ビタミンB2	5mg	5mg	5mg	5mg	ビタミンB6	4mg	4mg	4mg	4mg	ビタミンE (d75品)	6mg	6mg	6mg	6mg	ミツロウ	20mg	20mg	20mg	20mg	グリセリン脂肪酸エステル	5mg	5mg	5mg	5mg	ゼラチン(カプセル外 皮)	111mg	111mg	111mg	111mg	グリセリン(カプセル外 皮)	39mg	39mg	39mg	39mg
1粒あたりの配合割合																																																																				
	コントロール	処方1	処方2	処方3																																																																
キトサン	70mg	70mg	70mg	70mg																																																																
ケンメイシエキス(2% 品)	—	30mg	—	30mg																																																																
麻の実粉	—	—	100mg	100mg																																																																
小麦胚芽油	60mg	100mg	90mg	60mg																																																																
ビタミンB2	5mg	5mg	5mg	5mg																																																																
ビタミンB6	4mg	4mg	4mg	4mg																																																																
ビタミンE (d75品)	6mg	6mg	6mg	6mg																																																																
ミツロウ	20mg	20mg	20mg	20mg																																																																
グリセリン脂肪酸エステル	5mg	5mg	5mg	5mg																																																																
ゼラチン(カプセル外 皮)	111mg	111mg	111mg	111mg																																																																
グリセリン(カプセル外 皮)	39mg	39mg	39mg	39mg																																																																
제목	키토산 배합 조성물 및 식품																																																																			
<p>키토산과 함께 (a) 삼씨 기름 및 (b) 케츠메이시 또는 그 추출물 중 일종 혹은 양자를 함유하는 조성물로 함으로써 키토산 섭취에 의한 변비의 부작용을 방지할 수 있는 동시에, 배합약제에 의한 설사 등의 부작용도 발생하지 않고 카토산을 안전하게 지속적으로 섭취할 수 있도록 함</p>																																																																				

Toyo Shinyaku Co Ltd

Toyo Shinyaku Co Ltd는 1997년에 설립되었으며, 회사의 사업 영역에는 가공 식품 제조 및 다양한 식품 특산품 제조 등이 있음

Toyo Shinyaku Co Ltd 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면
JP 2002-051731	2000.08.11	Toyo Shinyaku Co Ltd	
제목 보리 새잎 유래의 소재를 함유한 변비 개선 식품 보리 새잎 유래의 소재와 변비 개선 작용을 가지는 성분을 함유하는 소재로서 유산균, 비피더스균, 식이섬유, 올리고당류 또는 알로에 중 1종 또는 2종 이상을 배합하여 변비 개선 작용을 가지는 식품으로 함			
JP 2002-204669	2001.01.11	Toyo Shinyaku Co Ltd	
제목 양배추 가공물을 함유한 변비 개선 식품 케일 가공물과 변비 개선 작용을 가지는 성분을 함유하는 소재로서 유산균, 비피더스균, 식이섬유, 올리고당류 및 알로에로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 1종을 배합하고 변비 개선 작용을 가지는 식품으로 함			
JP 2003-174856	2001.01.11	Toyo Shinyaku Co Ltd	
제목 양배추 가공물과 알로에를 함유하는 식품 케일 가공물과 알로에를 함유하는 식품을 제공함. 알로에는 알로에 아르보레스첸스 또는 알로에 베라인 것이 바람직하고 케일 가공물은 γ -아미노글루타민산부화 처리되어 있는 것이 바람직함			
JP 2017-039658	2015.08.19	Toyo Shinyaku Co Ltd	
제목 정장제 보리류의 잎 및/또는 줄기의 분말을 함유하는 정장제로서, 상기 분말은 평균 입자 지름이 $25\mu\text{m}$ 이하인 분말인 상기 정장제에 의해 해결됨. 본 발명의 정장제에 의하면 변비, 설사, 배변 장애 등의 장기능 부전, 장관 면역 부전, 장내의 유해 미생물 대사 산물이나 유해 효소 발생, 생활 습관병, 알레르기 등의 장조직의 비정상적으로 관련된 다양한 질병 및 이상의 개선, 완화, 치료 및 예방하는 것을 기대할 수 있음			

AJINOMOTO CO INC

아지노모도 주식회사(Ajinomoto Co., Inc.)는 일본의 식품 기업임
 사업내용으로는 일본의 식품 회사로 널리 알려져 있지만, 화장품 브랜드 “Jino“의 제
 조 판매 등 아미노산 생산 기술을 활용 한 화학 사업, 의약 사업도 실시하고 있음

AJINOMOTO CO INC 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면
JP 4752233	2004.10.01	AJINOMOTO CO INC	
제목	면역부활제		
<p>버섯 유래 성분 및 β-글루칸에서 선택되는 성분, 예를 들 면 버섯 유래 성분, 특히 표고버섯 등 버섯의 추출물을 초 미립자화하고 바람직하게는 물 추출물을 분산화제 처리함 으로써 점막으로부터의 흡수성을 향상시켜 면역부활 작용 및/또는 면역 조절작용을 발휘할 수 있음. 이 초미립자화체 (또는 이를 함유하는 조성물)는 면역부활제 및/또는 면역 조절제로서 사용 가능하다. 또한 면역부활제 또는 면역 조 절제에의 사용 ; 혹은 상기 초미립자 화체의 상기 항종양제, 항감염증제, 항바이러스제, 항자기면역질환제, 항당뇨병제, 항알레르기제, 항소화기 질환제(과민성장증후군(IBS), 염증성 장질환(IBD), 변비, 설사 등에 대한 치료제 등) 등에서의 사 용도 제공함</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
JP 2007-022982	2005.07.20	AJINOMOTO CO INC	
제목	변통 개선제 및 변통 개선 식품		
<p>【과제】 소량의 섭취에서도 충분한 배변 촉진 등의 변통 개선 효과를 나타내는, 안전성이 높다 또한 미네랄 흡수 억 제의 폐해가 없는 우수한 변통 개선제 및 이 변통 개선제 를 첨가한 변통 개선 효과를 가지는 식음료품을 제공하는 것</p> <p>【해결 수단】 γ-PGA를 유효성분으로 하는 변통 개선제 및 변통 개선 식품</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
JP 5051335	2005.12.13	AJINOMOTO CO INC	
제목	장내 환경 개선 작용을 가지는 조성물		
<p>L-카르니틴, 올리고당 및 식이섬유를 함유해서 이루어지는 것을 특징으로 하는 보조 영양 조성물이며 또한 코 엔자임 Q10 혹은 비피더스균을 함유하는 조성물이며 혈액 투석 환 자, 변비증 환자 혹은 다이어트용으로 사용되며 에너지 대 사 개선제, 장내 환경 개선제로서의 조성물</p>			

FANCL CORP

FANCL은 우편 주문을 통해 Mutenka 화장품을 만들었으며 고품질 보충제, 케일 주스, 발아 현미와 같은 식품 보조제를 포함한 신제품 라인업을 개발하였음

FANCL CORP 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																																							
JP 2003-335691	2002.05.20		<table border="1"> <thead> <tr> <th>被験物質</th> <th>阻害率(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ケール抽出物 (500 μg/ml)</td> <td>107</td> </tr> <tr> <td>ブラジル産プロポリス抽出物 (100 μg/ml)</td> <td>89</td> </tr> </tbody> </table>	被験物質	阻害率(%)	ケール抽出物 (500 μg/ml)	107	ブラジル産プロポリス抽出物 (100 μg/ml)	89																																																																																	
被験物質	阻害率(%)																																																																																									
ケール抽出物 (500 μg/ml)	107																																																																																									
ブラジル産プロポリス抽出物 (100 μg/ml)	89																																																																																									
제목	멜라토닌 관여 질환 치료제																																																																																									
<p>케일, 프로폴리스 또는 이들의 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 장장애, 돌발성 변비, 과민장증후군에 관련된 소화 운동성 장애의 예방 또는 치료제</p>																																																																																										
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																																							
JP 4236441	2002.10.17		<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="5">变化あり</th> <th rowspan="2">变化なし</th> </tr> <tr> <th>下痢</th> <th>軟便</th> <th>正常便</th> <th>固形便</th> <th>便秘</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DFA用3g摂取群</td> <td>0</td> <td>7</td> <td>39</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>メリビオース3g摂取群</td> <td>0</td> <td>8</td> <td>40</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>プラセボ3g摂取群</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>4.7</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">悪化</th> <th colspan="2">やや悪化</th> <th colspan="2">変化なし</th> <th colspan="2">やや改善</th> <th colspan="2">大幅に改善</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>0</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DFA用3g摂取群</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>7</td> <td>2</td> <td>7</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>メリビオース3g摂取群</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>8</td> <td>2</td> <td>8</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>プラセボ3g摂取群</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>4</td> <td>5</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		变化あり					变化なし	下痢	軟便	正常便	固形便	便秘	DFA用3g摂取群	0	7	39	3	0	0	メリビオース3g摂取群	0	8	40	2	0	0	プラセボ3g摂取群	0	0	0	3	0	4.7		悪化		やや悪化		変化なし		やや改善		大幅に改善		0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	DFA用3g摂取群	0	0	0	0	2	7	2	7	2	3	メリビオース3g摂取群	0	0	0	0	2	8	2	8	2	2	プラセボ3g摂取群	1	2	4	5	2	0	2	0	0	0
	变化あり					变化なし																																																																																				
	下痢	軟便	正常便	固形便	便秘																																																																																					
DFA用3g摂取群	0	7	39	3	0	0																																																																																				
メリビオース3g摂取群	0	8	40	2	0	0																																																																																				
プラセボ3g摂取群	0	0	0	3	0	4.7																																																																																				
	悪化		やや悪化		変化なし		やや改善		大幅に改善																																																																																	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1																																																																																
DFA用3g摂取群	0	0	0	0	2	7	2	7	2	3																																																																																
メリビオース3g摂取群	0	0	0	0	2	8	2	8	2	2																																																																																
プラセボ3g摂取群	1	2	4	5	2	0	2	0	0	0																																																																																
제목	변통 개선제																																																																																									
<p>DFA(다이플렉토스 안 하이드라이드) 또는 멜리바이오스를 함유하는 것을 특징으로 하는 변통 개선 조성물로서 이들의 2 당류를 직접 음용, 또는 함유시킨 식품을 섭취함으로써 사람에게 있어서 배변을 개선하는 효과가 있음</p> <p>이들 2 당류는 음용했을 경우, 장내 세균, 특히 비피더스균에 의해 일부자화되거나, 대부분이 자화되지 않고, 혈중으로 이행해 간으로 분해 대사되는 특징을 가짐</p>																																																																																										
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																																							
JP 2015-178481	2014.03.20																																																																																									
제목	소화관 기능 조절제																																																																																									
<p>ε-비니페린을 유효성분으로 하는 소화관내의 이온채널을 자극하는 제 및 수분 이행 자극제가 제공됨</p> <p>본 발명의 소화관내 이온채널을 자극하는 제 및 수분 이행 자극제는 변비 개선제로서 유용하다. 또한 본 발명의 소화관내 이온채널을 자극하는 제 및 수분 이행 자극제는 변비성 과민성 대장증의 개선, 치료에 유용함</p>																																																																																										

6-2. 미국

- 미국에서는 프로바이오틱스 위주의 특허가 대다수를 이루고 있으며, 대표적인 기업으로는 Nestec S.A.에서 4건의 출원을 비롯하여 Compagnie Gervais Danone에서 2건의 출원이 이루어짐
- 또한, 대표적인 발명자로는 Helicobacter pylori bacteria에 대한 치료법 개발로 유명한 Thomas Julius Borody가 관련 기술의 출원을 2건 한 것으로 나타남

Nestec S.A.

Nestec S.A.는 스위스의 Vevey에 위치하며, Nestlé S.A의 자회사로 운영되고 있음
Nestlé S.A.와 그 자회사에 상업 연구 및 컨설팅 서비스를 제공하며, 또한 과학 연구 및 기술 개발 서비스를 제공함

Nestec S.A. 특허 요약 (1)

특허번호	출원일	출원인	대표도면
US 7794746	2003.11.25		
제목	Prebiotic compositions		
<p>염증성 장 질환 및 관련된 장애, 예컨대 설사 및 변비를 조절하기 위한 올리고당을 포함하는 영양 조성물에 관한</p> <p>a) 조성물 100ml 당 약 15g-20g의 프락토 올리고당 (FOS) 및 갈 락토 올리고당(GOS) 블렌드; (b) 상기 oligofructose 및 oligogalactose 각각은 약 2-7의 중합도를 갖는 사슬로 구성되고; (c) FOS 및 GOS의 중량비가 약 0.5-20이고; (d) FOS 및 GOS는 <i>Lactobacilli</i>의 성장을 상승적으로 촉진 할 수 있어, 결합된 프리 바이오틱 특성이 개별 프리바이오틱 특성의 합보다 큼</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
US 8815312	2007.05.24		
제목	Methods of use and nutritional compositions of Touchi Extract		
<p>1이상의 α-glucosidase 억제제와 1이상의 플라바놀을 포함하는 조성물로서, 상기 α-glucosidase 억제제가 오티 추출물이고 상기 플라바놀은 에피카테킨 화합물 및 카테킨 화합물 중 적어도 하나이고, <i>E. coli</i> Nissle 1917, <i>Lactobacillus johnsonii</i>, <i>Bifidobacterium breve</i>, <i>Saccharomyces boulardii</i> 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 프로바이오틱을 추가로 포함하는 조성물</p>			

probe	sequence	target genus	temperature
266-268	5'-CGAATGAGGAGACTT-3'	Bacteroides spp.	45° C.
212-214	5'-CATGCGCTTACACC-3'	Bifidobacterium spp.	50° C.
226-228	5'-CGGACCTGATGAGAGC-3'	Clostridium sporosides/Bacterium rectale group	50° C.
234-236	5'-AAGAGAGAGGAGAGCCGCA-3'	Clostridium histolyticum group	50° C.
24-25	5'-CACGAGAGAGAGAGAGAG-3'	<i>B. coli</i>	50° C.
246-248	5'-GGATATGACGTCCTTTTCCT-3'	<i>Lactobacillus/Bacteroides</i> spp.	45° C.
249-251	5'-TACGATTCATCTCT-3'	Desulfohalobium spp.	45° C.

없음

Compagnie Gervais Danone

Compagnie Gervais Danone S.A.는 2006년에 설립되었으며 프랑스 파리에 본사를 두고 있음. Compagnie Gervais Danone S.A.는 Danone의 자회사로 운영됨. Danone 은 파리에 본사를 둔 프랑스 다국적 식품 제품 회사로서 신선한 유제품, Waters, Early Life Nutrition and Medical Nutrition 등 네 가지 비즈니스 라인을 가지고 있음

Compagnie Gervais Danone 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면
US 9198940	2011.05.27		없음
제목	Probiotic strains for use in improving the enteric nervous system		
<p>장내 신경계의 변형에 사용하기 위한, 특히 변비 및/또는 과민성 장 질환과 같은 장 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 락트산 세균의 용도에 관함</p> <p>본 발명은 발효유 식품 조성물에 관한 것으로서, 2010년 5월 19일에 콜렉션 Nationale De Cultures De Micro-Organismes(CNCM)로 수탁번호 I-4321로 기탁된 DN-156-0032, 2010년 5월 19일 CNCM에 수탁번호 I-4318로 기탁된 DN-121-0304, 2010년 5월 19일에 수탁번호 I-4317하에 CNCM에 기탁된 DN-116-047 및 DN-154-0067은 2010년 5월 19일에 수탁번호 I-4320하에 CNCM에 기탁되었음</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
US 9402872	2011.05.30		없음
제목	Probiotic strains for use in improving transepithelial resistance		
<p>상피 내성을 개선시키고, 특히 변비 및/또는 과민성 장 질환을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 락트산 세균의 용도에 관함</p> <p>적어도 하나의 단리 된 유산균 균주를 포함하는 발효 유 제품으로서, 상기 유방암 세포주의 장 상피 세포의 트랜스 상피 전기 저항(TEER)을 증가시킬 수있는 활성 성분으로서, 락토 바실러스 람 노스(Lactobacillus rhamnosus) DN_116_0044는 수탁번호 I-4316하에 2010년 5월 19일에 국립 미생물 수탁 연구소(Nationale de Cultures de Micro-Bifidobacterium bifidum DN_154_0062는 수탁 번호 I-4319로 등록되어 있으며, 2010년 5월 19일에 Nationale de Cultures de Micro-organismes에 수탁됨</p>			

Thomas Julius Borody

위장병 학자인 Borody는 Helicobacter pylori 박테리아에 대한 세 가지 치료법 개발에 대한 연구로 가장 유명함

1987년경에 발명된 삼중 치료 는 비스무트, 메트로니다졸 및 테트라 사이클린의 조합임. 1990년대와 2000년대 초 크론 병과 같은 위장병 치료에 중요한 것으로 입증 된 여러 약물 조합을 발견함. 또한 건강한 사람의 분변 물질을 사용하여 유익한 박테리아로 장을 재분배하는 소변 막 대장염 및 궤양 성 대장염에 대한 혁신적인 치료에 상당한 기여를 하였으며 이것은 Clostridium difficile 대장염 치료에 특히 유익한 것으로 입증되었음

Thomas Julius Borody 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면
US 9050358	2014.05.05	Thomas Julius Borody	없음
제목	Compositions and methods for probiotic recolonization therapies		
<p>포유류의 위장관에서 과민성 대장 증후군 (IBS), 설사, 교대 변비 /설사, 헛배림, 또는 변비와 관련된 만성 위장관 감염의 치료 방법으로서, (a) (1) 다수의 생존 가능한 비 병원성 Clostridia 포자; 그리고 (2) 다수의 생존 가능한 비-병원성 Collinsella, 상기 생존 가능한 비 병원성 Clostridia는 <i>Clostridium bifermentans</i>, <i>Clostridium butyricum</i>, <i>Clostridium difficile</i>, <i>Clostridium ramosum</i>, <i>Clostridium innocuum</i> 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 인 방법; 과 (b) (a)의 약제학적 조성물의 유효량을 포유류에게 투여하는 단계를 포함</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
US 9320763	2015.07.07	Thomas Julius Borody	없음
제목	Probiotic recolonisation therapy		
<p>만성 지속성 설사, 설사, 헛배림, 변비 및 교대 변비 / 설사로 이루어진 군으로부터 선택되는 자폐증 및 위장 증상을 갖는 피험자에서 자폐증을 치료하는 방법. 상기 방법은 생존 가능한 비 병원성 클로스트리디움 속 (<i>Clostridium</i> sp.)을 포함하는 상기 자폐증의 증상을 치료하는데 유효한 양의 약학 조성물을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함함; 생존 가능한 비병원성 <i>Bacteroides</i> sp .; 및 생존 가능한 비병원성 대장균.</p>			

6-3. 유럽

- 유럽에서는 다국적 식품 회사인 Danone 및 그 계열사인 N.V. Nutricia에서 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 계열의 특허를 다수 출원한 것으로 나타남
- 개인 발명가로는 David Danon 교수가 식이성 불용성 및 난소화성 파이버를 포함하는 식이보충제 및 약제를 이용한 변비치료에 관하여 출원하였음

David Danon

David Danon 교수 (1921년~2015년)는 의사, 과학자, 노화 의 생물학 연구의 선두 주자였으며, 기존의 치료법에 반응하지 않는 압력 궤양과 다른 심각한 상처의 치유를 한 독특한 치료법의 발명가였음

전자현미경 검사를 위한 이스라엘 협회의 창립자이자 초대 회장, Weizmann Institute of Science의 Gerontology Center 책임자, 이스라엘 보건부의 수석과학자 등을 역임함

David Danon 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면
EP 0179295	1985.09.25	Danon, David	없음
제목	Medicament and dietary supplement containing insoluble and indigestible fiber, method of making it, and method of use		
<p>만성 변비의 예방 및 치료에 유용한 조성물을 섬유 보충제로서 제조하는 방법으로서, (a) 버섯 살, 오렌지 펄프 (c) 상기 물질을 생리학적으로 허용되는 탈수제로 추출하여 탈수시키고 상기 탈수제를 제거하는 단계; (d) 상기 물질을 동결 건조시키는 단계; (d) 상기 물질을 균질 한 슬러리로 분쇄하는 단계; 및 (e) 상기 동결 건조 된 물질을 미립자 형태로 분쇄하는 단계를 포함하는 방법</p>			

Compagnie Gervais Danone

Danone 은 파리에 본사를 둔 프랑스 다국적 식품 제품 회사로서 신선한 유제품, Waters, Early Life Nutrition and Medical Nutrition 등 네 가지 비즈니스 라인을 가지고 있음

Compagnie Gervais Danone 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면
EP 2857027	2011.05.27	Compagnie Gervais Danone	
제목	PROBIOTIC STRAINS FOR USE IN IMPROVING THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM		
<p>바람직하게는 락토 바실러스 및 비피더스 균으로 이루어진 균으로부터 선택된 박테리아의 적어도 하나의 균주를 포함하는 조성물로서, A) 장내 신경계의 혈관 활성 장내 펩티드(VIP) 수준의 증가, 또는 B) 장내 신경계의 Choline 아세틸 트랜스퍼라제 면역 반응 뉴런(ChAT) 수준의 증가, 또는 C) 장 기관의 ChAT 수준을 감소시키는 것</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
EP 2575837	2011.05.27	Compagnie Gervais Danone	
제목	PROBIOTIC STRAINS FOR USE IN IMPROVING THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM		
<p>다음로 구성되는 그룹으로부터 선택된 박테리아의 스트레인: - dn_156_0032 (2010년 5월 19일 출원된 CNCM I-4321) - dn_121_0304 (2010년 5월 19일 출원된 CNCM I-4318), - dn_116_047 (2010년 5월 19일 출원된 CNCM I-4317) 그리고 - dn_154_0067 (2010년 5월 19일 출원된 CNCM I-4320)</p>			
특허번호	출원일	출원인	대표도면
EP 2575834	2011.05.30	Compagnie Gervais Danone	
제목	PROBIOTIC STRAINS FOR USE IN IMPROVING TRANSEPITHELIAL RESISTANCE		
<p>장 상피 세포의 위 상피 전기 저항(TEER) 증가에 사용하기 위한 락토 바실러스 및 비피더스 균으로 이루어진 균으로부터 선택된 박테리아의 적어도 하나의 균주를 포함하는 조성물로서, 상기 균주는 DN_116_0044 (CNCM 1-4316) 2010년 5월 19일) 및 DN_154_0062 (CNCM I-4319, 2010년 5월 19일 제출)</p>			

Group	DN Number species (CNCM number)	Estimated difference* vs control	VIP		ChAT		
			p value	Empiric mean	Estimated difference* vs control	p value	Empiric mean
1	DN_154_0067 (CNCM I-4320) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	-0.0097	0.9	0.0700	0.2708	0.08	0.1796
1	DN_116_047 (CNCM I-4317) Lactobacillus rhamnosus Lactobacillus rhamnosus	-0.0369	0.7	0.0307	0.3191	0.10	0.2658
1	DN_116_019 (CNCM I-4319) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	-0.1329	0.08	-0.2221	0.2847	0.02	0.2796
2	DN_171_018 (CNCM I-4394) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	0.2345	0.01	0.2001	-0.2815	0.05	-0.0825
2	DN_156_0032 (CNCM I-4321) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	0.2248	0.01	0.2020	-0.5450	0.00	-0.5723
2	DN_116_047 (CNCM I-4317) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	0.2715	0.02	0.3652	-0.3632	0.01	-0.1281
2	DN_121_0304 (CNCM I-4318) Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum	0.6076	0.00	0.6813	-0.6200	0.00	-0.3918

* Values are given as a difference compared to the control, where no bacterial strains were added.

Strain	TEER 14/TEER 10 (%)	TEER 14/TEER 10 (%)		TEER 14/TEER 10 (%)	
		Significance	Empiric mean	Significance	Empiric mean
TEER control			96.20		96.76
DN_171_018 (CNCM I-4394) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	B. bifidum	***	71.27	***	91.03
DN_156_0032 (CNCM I-4321) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	B. bifidum	***	70.70	***	95.87
DN_121_0304 (CNCM I-4318) Lactobacillus plantarum Lactobacillus plantarum	L. plantarum	***	65.84	***	64.37
DN_154_0067 (CNCM I-4320) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	B. bifidum	***	84.44	***	80.38

*** p value < 0.05

Strain	TEER 14/TEER 10 in damaging conditions (LPS)	TEER 14/TEER 10 in damaging conditions (LPS)		TEER 14/TEER 10 in damaging conditions (LPS)	
		Significance	Empiric mean	Significance	Empiric mean
TEER control			96.20		96.76
DN_116_0044 (CNCM 1-4316) Lactobacillus rhamnosus Lactobacillus rhamnosus	L. rhamnosus	**	90.25	**	95.38
NCC2709 (donated in US 718310) B. longum Bifidobacterium bifidum	B. longum	Non significant	96.25	Non significant	93.8
DN_156_0032 (CNCM I-4321) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	B. bifidum	***	90.59	*	92.62
DN_154_0062 (CNCM I-4319) Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium bifidum	B. bifidum	***	85.04	***	75.40

*** p value < 0.01; ** p value < 0.05; * value < 0.1

N.V. Nutricia

Nutricia 는 유아식 과 임상 영양 을 전문으로 하는 Danone 그룹의 일원임
 제품은 유아용 조제 부터 특정 요구가 있는 아기 및 모유 수유모를 위한 특수 영양
 에 이르기까지 다양함. 또한 특수 임상 영양, 다이어트 제품 및 질병 별 영양을 생산
 하고 판매함

N.V. Nutricia 특허 요약

특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																						
EP 2266414	2000.12.13	N.V. Nutricia	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>g per 100g powder</th> <th>g per 100 ml*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Protein equivalents</td> <td>11.6</td> <td>1.7</td> </tr> <tr> <td>Whey-protein hydrolysate**</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Carbohydrates</td> <td>55.4</td> <td>8.3</td> </tr> <tr> <td>Saccharides (lactose)</td> <td></td> <td>4.0 (2.9)</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from maltodextrins</td> <td></td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from potato starch</td> <td></td> <td>1.8</td> </tr> <tr> <td>Fat</td> <td>21.1</td> <td>3.3 (= 42 wt.%)</td> </tr> <tr> <td>Saturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Beta palmitate</td> <td></td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>Mono-unsaturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Poly-unsaturated</td> <td></td> <td>0.54</td> </tr> <tr> <td>Fibre / non-digestible oligosaccharides</td> <td>5.0</td> <td>0.78</td> </tr> <tr> <td>TOS</td> <td></td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>FOS</td> <td></td> <td>0.08</td> </tr> <tr> <td>Further components:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Minerals, trace elements and vitamins</td> <td></td> <td>in amounts as recommended by the EEC regulation 321.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Notes: * obtained by dissolving 15.0 g powder in 100 ml water. **: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.</p>	Component	g per 100g powder	g per 100 ml*	Protein equivalents	11.6	1.7	Whey-protein hydrolysate**			Carbohydrates	55.4	8.3	Saccharides (lactose)		4.0 (2.9)	Polysaccharides from maltodextrins		1.5	Polysaccharides from potato starch		1.8	Fat	21.1	3.3 (= 42 wt.%)	Saturated		1.4	Beta palmitate		0.23	Mono-unsaturated		1.4	Poly-unsaturated		0.54	Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78	TOS		0.7	FOS		0.08	Further components:			Minerals, trace elements and vitamins		in amounts as recommended by the EEC regulation 321.			
Component	g per 100g powder	g per 100 ml*																																																							
Protein equivalents	11.6	1.7																																																							
Whey-protein hydrolysate**																																																									
Carbohydrates	55.4	8.3																																																							
Saccharides (lactose)		4.0 (2.9)																																																							
Polysaccharides from maltodextrins		1.5																																																							
Polysaccharides from potato starch		1.8																																																							
Fat	21.1	3.3 (= 42 wt.%)																																																							
Saturated		1.4																																																							
Beta palmitate		0.23																																																							
Mono-unsaturated		1.4																																																							
Poly-unsaturated		0.54																																																							
Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78																																																							
TOS		0.7																																																							
FOS		0.08																																																							
Further components:																																																									
Minerals, trace elements and vitamins		in amounts as recommended by the EEC regulation 321.																																																							
제목	Improved infant formula, proteinhydrolysate for use in same and method for making said hydrolysates																																																								
<p>변비, 복부 불편 및 위장 문제를 감소시키는 개선 된 유아용 조제유가 제공되며, 단백질 가수 분해물로 구성되는 단백질 성분; 팔미트 산으로 구성되는 지질 성분, 갈락토 올리고 사카라이드로 구성되는 프리바이오틱 성분을 포함</p>																																																									
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																						
EP 2208424	2000.12.13	N.V. Nutricia	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>g per 100 g powder</th> <th>g per 100 ml**</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Protein equivalents</td> <td>12.4</td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Whey-protein hydrolysate**</td> <td></td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Carbohydrates</td> <td>54.8</td> <td>8.6</td> </tr> <tr> <td>Saccharides (lactose)</td> <td></td> <td>4.0 (2.7)</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from maltodextrins</td> <td></td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from potato starch</td> <td></td> <td>2.3</td> </tr> <tr> <td>Organic acids</td> <td></td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>Fat</td> <td>21.1</td> <td>3.3 (= 41 wt.%)</td> </tr> <tr> <td>Saturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Beta palmitate (Loders Croklean)</td> <td></td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>Mono-unsaturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Poly-unsaturated</td> <td></td> <td>0.54</td> </tr> <tr> <td>Fibre / non-digestible oligosaccharides</td> <td>5.0</td> <td>0.78</td> </tr> <tr> <td>TOS</td> <td></td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>FOS</td> <td></td> <td>0.08</td> </tr> <tr> <td>Further components:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Minerals, trace elements and vitamins</td> <td></td> <td>in amounts as recommended by the EEC regulation 321.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Notes: * obtained by dissolving 15.0 g powder in 100 ml water. **: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.</p>	Component	g per 100 g powder	g per 100 ml**	Protein equivalents	12.4	1.9	Whey-protein hydrolysate**		1.9	Carbohydrates	54.8	8.6	Saccharides (lactose)		4.0 (2.7)	Polysaccharides from maltodextrins		2.0	Polysaccharides from potato starch		2.3	Organic acids		0.1	Fat	21.1	3.3 (= 41 wt.%)	Saturated		1.4	Beta palmitate (Loders Croklean)		0.23	Mono-unsaturated		1.4	Poly-unsaturated		0.54	Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78	TOS		0.7	FOS		0.08	Further components:			Minerals, trace elements and vitamins		in amounts as recommended by the EEC regulation 321.
Component	g per 100 g powder	g per 100 ml**																																																							
Protein equivalents	12.4	1.9																																																							
Whey-protein hydrolysate**		1.9																																																							
Carbohydrates	54.8	8.6																																																							
Saccharides (lactose)		4.0 (2.7)																																																							
Polysaccharides from maltodextrins		2.0																																																							
Polysaccharides from potato starch		2.3																																																							
Organic acids		0.1																																																							
Fat	21.1	3.3 (= 41 wt.%)																																																							
Saturated		1.4																																																							
Beta palmitate (Loders Croklean)		0.23																																																							
Mono-unsaturated		1.4																																																							
Poly-unsaturated		0.54																																																							
Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78																																																							
TOS		0.7																																																							
FOS		0.08																																																							
Further components:																																																									
Minerals, trace elements and vitamins		in amounts as recommended by the EEC regulation 321.																																																							
제목	Infant formula																																																								
<p>변비, 복부 불편 및 위장 문제를 감소시키는 개선 된 유아용 조제유가 제공되며, 단백질 가수 분해물로 구성되는 단백질 성분; α - 리놀렌산, 올레산, 아라키돈 산 및 도코사헥사엔산으로 구성되는 지질 성분; 갈락토 올리고당으로 구성되는 프리바이오틱 성분을 포함.</p>																																																									
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																						
EP 1535520	2000.12.13	N.V. Nutricia	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>g per 100 g powder</th> <th>g per 100 ml**</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Protein equivalents</td> <td>12.4</td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Whey-protein hydrolysate**</td> <td></td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Carbohydrates</td> <td>54.8</td> <td>8.6</td> </tr> <tr> <td>Saccharides (lactose)</td> <td></td> <td>4.0 (2.7)</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from maltodextrins</td> <td></td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from potato starch</td> <td></td> <td>2.3</td> </tr> <tr> <td>Organic acids</td> <td></td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>Fat</td> <td>21.1</td> <td>3.3 (= 41 wt.%)</td> </tr> <tr> <td>Saturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Beta palmitate (Loders Croklean)</td> <td></td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>Mono-unsaturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Poly-unsaturated</td> <td></td> <td>0.54</td> </tr> <tr> <td>Fibre / non-digestible oligosaccharides</td> <td>5.0</td> <td>0.78</td> </tr> <tr> <td>TOS</td> <td></td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>FOS</td> <td></td> <td>0.08</td> </tr> <tr> <td>Further components:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Minerals, trace elements and vitamins</td> <td></td> <td>in amounts as recommended by the EEC regulation 321.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Notes: * obtained by dissolving 15.0 g powder in 100 ml water. **: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.</p>	Component	g per 100 g powder	g per 100 ml**	Protein equivalents	12.4	1.9	Whey-protein hydrolysate**		1.9	Carbohydrates	54.8	8.6	Saccharides (lactose)		4.0 (2.7)	Polysaccharides from maltodextrins		2.0	Polysaccharides from potato starch		2.3	Organic acids		0.1	Fat	21.1	3.3 (= 41 wt.%)	Saturated		1.4	Beta palmitate (Loders Croklean)		0.23	Mono-unsaturated		1.4	Poly-unsaturated		0.54	Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78	TOS		0.7	FOS		0.08	Further components:			Minerals, trace elements and vitamins		in amounts as recommended by the EEC regulation 321.
Component	g per 100 g powder	g per 100 ml**																																																							
Protein equivalents	12.4	1.9																																																							
Whey-protein hydrolysate**		1.9																																																							
Carbohydrates	54.8	8.6																																																							
Saccharides (lactose)		4.0 (2.7)																																																							
Polysaccharides from maltodextrins		2.0																																																							
Polysaccharides from potato starch		2.3																																																							
Organic acids		0.1																																																							
Fat	21.1	3.3 (= 41 wt.%)																																																							
Saturated		1.4																																																							
Beta palmitate (Loders Croklean)		0.23																																																							
Mono-unsaturated		1.4																																																							
Poly-unsaturated		0.54																																																							
Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78																																																							
TOS		0.7																																																							
FOS		0.08																																																							
Further components:																																																									
Minerals, trace elements and vitamins		in amounts as recommended by the EEC regulation 321.																																																							
제목	Infant formula containing prebiotic additive																																																								
<p>변비, 복부 불편 및 위장 문제를 감소시키는 개선 된 유아용 조제유가 제공되며, 이는 (a) 적어도 하나의 단백질 성분, (b) 적어도 하나의 지질 성분; (c) 하나 이상의 프리바이오틱 성분, 여기서 상기 프리바이오틱 성분은 갈락토 올리고 사카라이드, 및 (d) 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함</p>																																																									

N.V. Nutricia 특허 요약 (2)

특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																														
EP 1557096	2000.02.13	N.V. Nutricia	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>g per 100 g powder</th> <th>g per 100 ml*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Protein equivalents</td> <td>12.4</td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Whey-protein hydrolysate**</td> <td></td> <td>1.9</td> </tr> <tr> <td>Carbohydrates</td> <td>54.8</td> <td>8.8</td> </tr> <tr> <td>Saccharides (lactose)</td> <td></td> <td>4.0 (2.7)</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from maltodextrine</td> <td></td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from potato starch</td> <td></td> <td>2.3</td> </tr> <tr> <td>Organic acids</td> <td></td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>Fat</td> <td>21.1</td> <td>3.3 (= 41 wt.%)</td> </tr> <tr> <td>Saturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Beta palmitate (Loders Crokiaan)</td> <td></td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>Mono-unsaturated</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Poly-unsaturated</td> <td></td> <td>0.54</td> </tr> <tr> <td>Fibre / non-digestible oligosaccharides</td> <td>5.0</td> <td>0.78</td> </tr> <tr> <td>TOS</td> <td></td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>FOS</td> <td></td> <td>0.08</td> </tr> <tr> <td>Further components:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Minerals, trace elements and vitamins</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="3">in amounts as recommended by the EEC regulation 321.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Notes: *: obtained by dissolving 15.6 g powder in 100 ml water.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">**: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.</td> </tr> </tbody> </table>	Component	g per 100 g powder	g per 100 ml*	Protein equivalents	12.4	1.9	Whey-protein hydrolysate**		1.9	Carbohydrates	54.8	8.8	Saccharides (lactose)		4.0 (2.7)	Polysaccharides from maltodextrine		2.0	Polysaccharides from potato starch		2.3	Organic acids		0.1	Fat	21.1	3.3 (= 41 wt.%)	Saturated		1.4	Beta palmitate (Loders Crokiaan)		0.23	Mono-unsaturated		1.4	Poly-unsaturated		0.54	Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78	TOS		0.7	FOS		0.08	Further components:			Minerals, trace elements and vitamins			in amounts as recommended by the EEC regulation 321.			Notes: *: obtained by dissolving 15.6 g powder in 100 ml water.			**: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.																	
Component	g per 100 g powder	g per 100 ml*																																																																															
Protein equivalents	12.4	1.9																																																																															
Whey-protein hydrolysate**		1.9																																																																															
Carbohydrates	54.8	8.8																																																																															
Saccharides (lactose)		4.0 (2.7)																																																																															
Polysaccharides from maltodextrine		2.0																																																																															
Polysaccharides from potato starch		2.3																																																																															
Organic acids		0.1																																																																															
Fat	21.1	3.3 (= 41 wt.%)																																																																															
Saturated		1.4																																																																															
Beta palmitate (Loders Crokiaan)		0.23																																																																															
Mono-unsaturated		1.4																																																																															
Poly-unsaturated		0.54																																																																															
Fibre / non-digestible oligosaccharides	5.0	0.78																																																																															
TOS		0.7																																																																															
FOS		0.08																																																																															
Further components:																																																																																	
Minerals, trace elements and vitamins																																																																																	
in amounts as recommended by the EEC regulation 321.																																																																																	
Notes: *: obtained by dissolving 15.6 g powder in 100 ml water.																																																																																	
**: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.																																																																																	
제목	Infant formula with improved fat composition																																																																																
<p>유아용 조제유로서,</p> <p>a. 적어도 하나의 단백질 성분;</p> <p>b. 적어도 하나의 지질 성분;</p> <p>c. 적어도 하나의 프리바이오틱 성분; 상기 프리바이오틱 성분은 하나 이상의 trans-galacto-oligosaccharides 및 하나 이상의 fructo-oligosaccharides류의 혼합물을 포함하고; 및</p> <p>d. 고도 불포화 유지의 고급 지방산류 linoleic acid, α-linolenic acid, oleic acid, arachidonic acid 및 docosahexaenoic acid가 포함됨</p>																																																																																	
특허번호	출원일	출원인	대표도면																																																																														
EP 1237419	2000.02.13	N.V. Nutricia	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>g per 100 g powder</th> <th>g per 100 ml*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Protein equivalents</td> <td>10.5</td> <td>1.54</td> </tr> <tr> <td>Hydrolysed whey**</td> <td></td> <td>1.46</td> </tr> <tr> <td>From L-tryptophan</td> <td></td> <td>0.01</td> </tr> <tr> <td>From L-methionine</td> <td></td> <td>0.01</td> </tr> <tr> <td>From hydrolysed baker's yeast**</td> <td></td> <td>0.06</td> </tr> <tr> <td>Carbohydrates</td> <td>55.4</td> <td>8.3</td> </tr> <tr> <td>Saccharides (lactose)</td> <td></td> <td>3.5</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from maltodextrine</td> <td></td> <td>3.3</td> </tr> <tr> <td>Polysaccharides from potato starch</td> <td></td> <td>1.4</td> </tr> <tr> <td>Fat</td> <td>19.2</td> <td>3.0 (= 40 wt.%)</td> </tr> <tr> <td>Saturated</td> <td></td> <td>1.2</td> </tr> <tr> <td>Beta palmitate</td> <td></td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>Mono-unsaturated</td> <td></td> <td>1.3</td> </tr> <tr> <td>Poly-unsaturated</td> <td></td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Fibre / non-digestible oligosaccharides</td> <td>3.2</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>TOS</td> <td></td> <td>0.37</td> </tr> <tr> <td>FOS</td> <td></td> <td>0.03</td> </tr> <tr> <td>Lacto-N-tetraose</td> <td></td> <td>0.10</td> </tr> <tr> <td>Further components:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Folic acid (μg)</td> <td></td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Vitamin K (μg)</td> <td></td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Minerals, trace elements and vitamins:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="3">in amounts as recommended by the EEC regulation 321.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Notes: *: obtained by dissolving 11.0 g powder in 100 ml water.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">**: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.</td> </tr> </tbody> </table>	Component	g per 100 g powder	g per 100 ml*	Protein equivalents	10.5	1.54	Hydrolysed whey**		1.46	From L-tryptophan		0.01	From L-methionine		0.01	From hydrolysed baker's yeast**		0.06	Carbohydrates	55.4	8.3	Saccharides (lactose)		3.5	Polysaccharides from maltodextrine		3.3	Polysaccharides from potato starch		1.4	Fat	19.2	3.0 (= 40 wt.%)	Saturated		1.2	Beta palmitate		0.23	Mono-unsaturated		1.3	Poly-unsaturated		0.5	Fibre / non-digestible oligosaccharides	3.2	0.5	TOS		0.37	FOS		0.03	Lacto-N-tetraose		0.10	Further components:			Folic acid (μ g)		20	Vitamin K (μ g)		10	Minerals, trace elements and vitamins:			in amounts as recommended by the EEC regulation 321.			Notes: *: obtained by dissolving 11.0 g powder in 100 ml water.			**: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.		
Component	g per 100 g powder	g per 100 ml*																																																																															
Protein equivalents	10.5	1.54																																																																															
Hydrolysed whey**		1.46																																																																															
From L-tryptophan		0.01																																																																															
From L-methionine		0.01																																																																															
From hydrolysed baker's yeast**		0.06																																																																															
Carbohydrates	55.4	8.3																																																																															
Saccharides (lactose)		3.5																																																																															
Polysaccharides from maltodextrine		3.3																																																																															
Polysaccharides from potato starch		1.4																																																																															
Fat	19.2	3.0 (= 40 wt.%)																																																																															
Saturated		1.2																																																																															
Beta palmitate		0.23																																																																															
Mono-unsaturated		1.3																																																																															
Poly-unsaturated		0.5																																																																															
Fibre / non-digestible oligosaccharides	3.2	0.5																																																																															
TOS		0.37																																																																															
FOS		0.03																																																																															
Lacto-N-tetraose		0.10																																																																															
Further components:																																																																																	
Folic acid (μ g)		20																																																																															
Vitamin K (μ g)		10																																																																															
Minerals, trace elements and vitamins:																																																																																	
in amounts as recommended by the EEC regulation 321.																																																																																	
Notes: *: obtained by dissolving 11.0 g powder in 100 ml water.																																																																																	
**: preferred protein hydrolysate A as described under II. above.																																																																																	
제목	INFANT FORMULA WITH IMPROVED PROTEIN CONTENT																																																																																
<p>변비, 복부 불편 및 위장 문제를 감소시키는 개선된 유아용 조제유로서 0.75g/100g 단백질 미만의 인 함량을 갖는 하나 이상의 단백질 성분 및 유아에 의해 쉽게 소화될 수 있는 하나 이상의 지질 성분을 포함함. 바람직하게는, 이는 적어도 하나의 프리바이오틱 성분 및 적어도 하나의 점도-개선 성분을 추가로 포함함</p> <p>상기 화학식의 단백질 분획은 바람직하게는 단백질 출발물질, 특히 하나 이상의 엔도- 및 적어도 하나의 엑소 프로테아제의 조합으로 유장 단백질을 가수 분해하여 제조된 가수 분해물임</p>																																																																																	

7. 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안등급 분류	보안	일반	
		√	
결정 사유	“ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음”		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 - 해당사항 없음

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

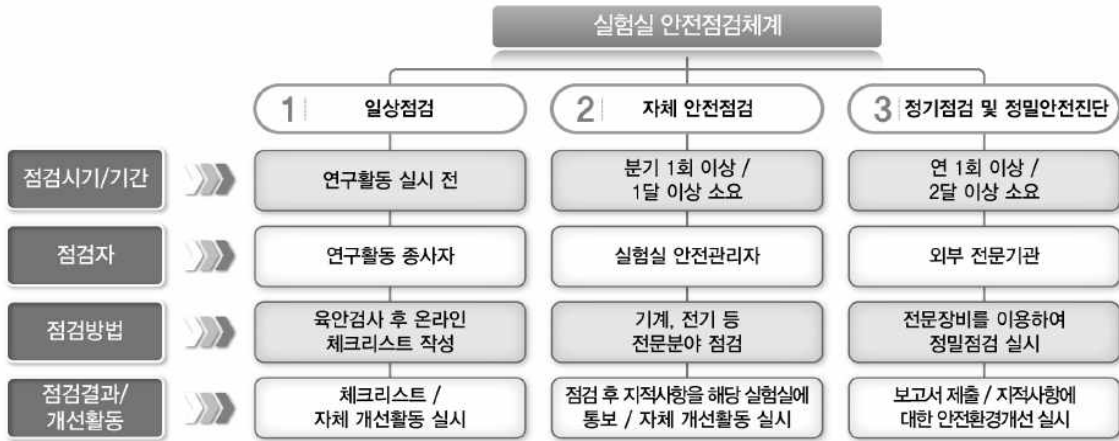
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호 D-11

1. 세부기관 - 해남자연농업영농조합법인

가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

- 연구실 안전 점검 체계



나. 연구실 안전점검

1) 연구실 일상 점검

- 연구활동 시작 전 연구실 책임자가 육안으로 장비 및 시설을 매일 점검

2) 연구실 정기 점검

- 내용 : 과학기술분야 실험실의 일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전 등의 전문분야 점검

- 실시 : 매월 각 연구실을 주기적으로 점검

3) 연구실 정밀안전진단

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

- 실시 : 정기점검(1회/년) 및 정밀안전진단(1회/2년) : 외부 전문기관에 의뢰하여 실시 후 중대결함이 발견될 경우, 보고

※ 관리위험등급의 지정

- A 등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 연구실

- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 연구실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 연구실

다. 교육 훈련

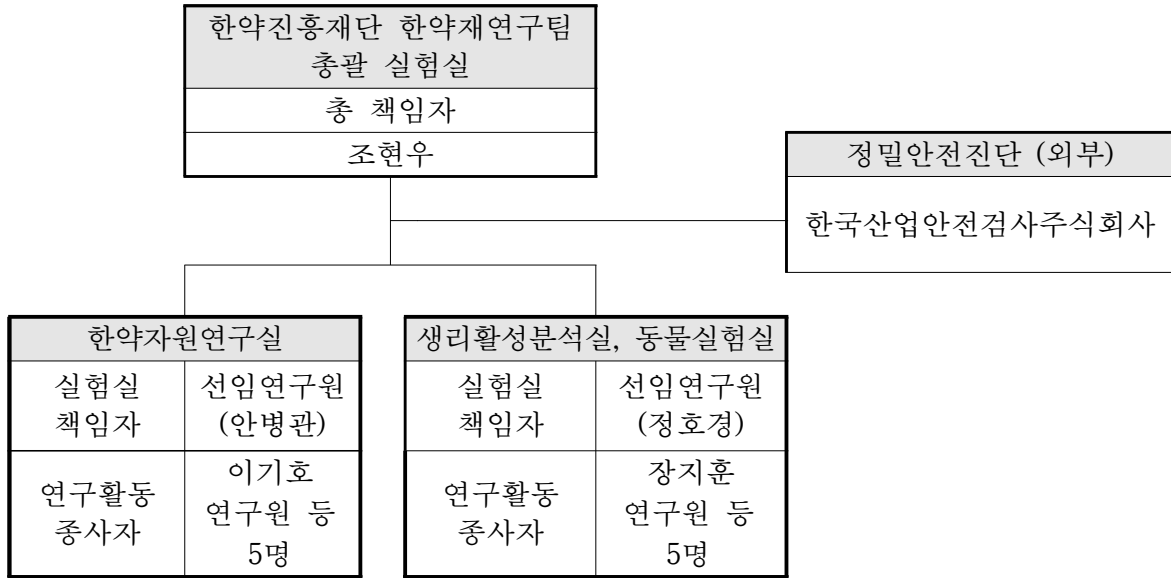
- 1) 개요 : 연구실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 의거하여 연구실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 연구원 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강
- 2) 교육대상 : 소속연구원, 전문직원 등
- 3) 교육실시
 - 1학기 : 법정 교육시간인 6시간을 온라인 및 집합교육으로 실시
 - 2학기 : 법정 교육시간인 6시간을 온라인 교육으로 실시

라. 건강 검진

- 1) 개요 : 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사자의 건강을 보호함
- 2) 대상 : 산업안전보건법 시행령 제29조에 따른 유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자를 취급하는 연구활동 종사자에 대하여 일반건강검진과 특수건강검진을 실시
- 3) 건강검진 실시 : 매년 1회 건강검진 대상자를 선정하여 일반 건강검진 및 특수건강검진 실시

2. 제 1협동기관 - 한약진흥재단

가. 안전관리조직체계 및 직무수립



나. 실험실 안전점검시기

1) 실험실 일상 점검

- 연구활동 시작 전 연구활동종사자가 육안으로 장비 및 시설을 매일 점검

2) 실험실 정기 점검

- 내용 : 과학기술분야 실험실의 일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전 등의 전문분야 점검
- 실시 : 매월 각 실험실을 주기적으로 점검

3) 실험실 정밀안전진단

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

- 실시 : 2년 1회 이상 외부 전문기관에 의뢰하여 실시 후 조치 보고

- 시행 : 2017. 12. 22

- 점검항목 : 화학, 기계, 안전

- 점검결과 : 1등급(안정성 유지) 1 연구실, 2등급(안전성 영향무) 3개 연구실

※ 관리위험등급의 지정

- A 등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실

- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

다. 교육 훈련

1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 연구원 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

2) 교육대상 : 소속연구원, 전문직원 등

3) 교육실시

- 1학기 : 법정 교육시간인 6시간을 온라인 및 집합교육으로 실시
- 2학기 : 법정 교육시간인 6시간을 온라인 교육으로 실시

정기안전보건교육	과정명	과목	대 상	일시
온라인교육	근로자 정기안전보건교(연구직종1)	8과목	연구활동 종사자	17. 03. 21.
	근로자 정기안전보건교(연구직종2)	8과목	연구활동 종사자	17. 05. 31.
	근로자 정기안전보건교(연구직종3)	8과목	연구활동 종사자	17. 08. 31.
	근로자 정기안전보건교(연구직종4)	8과목	연구활동 종사자	17. 12. 31.

라. 건강 검진

1) 개요 : 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사자의 건강을 보호함

2) 대상 : 산업안전보건법 시행령 제29조에 따른 유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자를 취급하는 연구활동 종사자에 대하여 일반건강검진과 특수건강검진을 실시

3) 건강검진 실시 : 매년 1회 전직원 흡수 짝수년생으로 일반 건강검진 및 종합건강검진 실시

마. 보험 가입 현황

보 험 명	보상 내용	대 상	주관부서
연구실 안전공제 보험	사망 : 1억원	연구활동 종사자	시설팀
	부상 : 최대 1,000만원	연구활동 종사자	“
	후유장애 : 최대 1억원	연구활동 종사자	“
	연구활동 중 발생한 사고에 대한 보상	연구활동 종사자	“

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재 지/ 특허등록 국가	Impact Factor	코드번호		특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
							논문게재일 /특허등록일	D-12 (단독사사 또는 중복사사)	
1	특허	결명자를 발효시켜 변비의 개선 또는 예방 활성을 증진시키는 락토바실러스 카제이 균주	해남자 연농업 영농조 합법인	-	대한민국	-	2017.12.06. (10-1600884)	단독사사	등록
2	특허	결명자 유산균 발효물을 포함하는 변비 예방 및 치료용 조성물	해남자 연농업 영농조 합법인	-	대한민국	-	2016.09.22. (10-2016-01 21282)	단독사사	출원
3	특허	결명자 발효물을 유효성분으로 하는 변비 개선, 치료 또는 예방용 조성물	해남자 연농업 영농조 합법인	-	대한민국	-	2015.07.22. (10-2015-01 03955)	단독사사	출원
4	논문	Effect of Roasted Water Extract of Fermented <i>Cassia tora</i> L. by <i>Lactobacillus casei</i> on the Loperamide-Induced Constipation Model in Rats	한약진 홍재단	제1저 자, 교신저 자	The Korean Journal of Medicinal Crop Science	KCI	yyyy.mm.dd	단독사사	비SCI
5	논문	A Twenty-six Week repeated oral dose toxicity study and A four recovery study of <i>Cassia tora</i> L. in Juvenile Sprague-dawley rats	한약진 홍재단	제1저 자, 교신저 자	The Korean Journal of Medicinal Crop Science	KCI	2017.11.08	단독사사	투고

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none"> 1) Icon group international, Inc., 2010 2) LA WRENCE R. SCHILLER, CAROL A. SANTA ANA, STEPHEN G, MORAWSKI, and JOHN S, FORDTRAN. (1984). Mechanism of the Antidiarrheal Effect of Loperamide, GASTROENTEROLOGY 86;1475-80 3) Read. N.W. (1983). Speculations on the role of motility in the pathogenesis and treatment of diarrhea. J. Gastroenterol. 84:45-63. 4) Theodoru. V., J. Fioramonti, T. Hachet and L. Bueno. (1991). Absortive and motor components of the antidiarrheal action of loperamide: an in vivo study in pigs. Gut: an International J. of Gastroenterology and Hepatology 11: 1355-1 5) 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016 6) 식품의약품안전처 건강기능식품정책과, 2016 7) 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016 8) 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2015 9) 식품의약품 통계연보, 식품의약품안전처, 2016 10) 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2015 11) 식품의약품안전처 건강기능식품정책과, 한국은행경제통계시스템 12) 농림축산식품부, 기술사업화지원사업, “유산균 발효기술을 활용한 결명자발효분말의 고부가가치 장개선 건강기능식품 개발을 위한 기술가치평가”, 2017 13) NBJ’ s global supplement&nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014 14) 1. CFDA 남방 의약경제연구소 데이터센터, 2. KOTRA 해외비즈니스포털 홈페이지 15) 일본 기능성표시 식품제도 및 시장 조사, 한국농수산물유통공사, 2015 16) 중국 건강보조식품산업 현황 분석, 한국무역협회, 2016 17) Hong KH, Choi WH, Ahn J, Jung CH and Ha TY. (2012). Physicochemical Properties of Ethanol Extracts and Dietary Fiber from <i>Cassia tora</i> L. Seed., Korean J. Food & Nutr, 25: 612-619, 18) 식품안전정보포털 식품안전나라 (www.foodsafetykorea.go.kr) 19) Kim DG, Jin YG, Jin JY, Kim SC, Kim SC, Han CH and Lee YJ. (2011). Effects of the <i>Actindia chinensis</i> on loperamide-induced constipation in rat. Korean Journal of Plant Resources. 24:61-68. 20) Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I and Sakata T. (2000). Decreased colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. Comparative Biochemistry and Physiology. 126:203-211. 21) Kakino M, Tazawa S, Maruyama H, Tsuruma K, Araki Y, Shimazawa M and Hara H. (2010). Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 10:68. 22) Sohji Y, Kawashima K and Shimizu M. (1978). Pharmacological studies of loperamide, an anti-diarrheal agent. II. Effects on peristalsis of the small intestine and colon in 	

- guinea pigs. *Folia Pharmacologica Japonica*. 74:155-163.
- 23) Aichbichler BW, Wenzel HH, Santa Ana CA, Porter JL, Schiller LR and Fordtran JS. (1998). A comparison of stool characteristic from normal and constipated people. *Digestive Diseases and Sciences*. 43:2353-2362.
 - 24) Hughes S, Higgs NB and Turnberg LA. (1984). Loperamide has antisecretory activity in the human jejunum in vivo. *Gut*. 25:931-935.
 - 25) Holzer P. (2009). Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regulatory Peptides*. 155:11-17.
 - 26) Cepinkas G, Specian RD and Kvietys PR. (1993). Adaptive cytoprotection in the small intestine: role of mucus. *American Journal of Physiology*. 264:921-927.
 - 27) Choi JS, Jung JH, Lee HJ, Lee JH and Kang SS. (1995). A Naphthalene Glycoside From *Cassia tora* *Phytochemistry* 40:997-999
 - 28) Choi IS, Lee HL and Kang SS. (1994). Alaternin, Cassiaside and Rubrofusarin gentiobioside, Radical Scavenging Principles from the Seeds of *Cassia tora* on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) Radical. *Arch Pharm Res* 17:462-466.
 - 29) Lee GA, Jang DS, Lee YM, Kim LJ, and Kim JS. (2006). Naphthopyrone Glucosides from the Seeds of *Cassia tora* with Inhibitory Activity on Advanced Glycation End Products (AGEs) Formation. *Arch Pharm Res*. 29(7):587-90.
 - 30) Lee HJ, Jung JH, Kang SS, and Choi JS. (1997). A rubrofusarin gentiobioside isomer from roasted *Cassia tora*. *Arch Pharm Res* 20:513-515
 - 31) Lee HJ, Choi JS and Kang SS. (1998). Alaternin glucoside isomer from *Cassia tora*. *Phytochemistry* 49:1403-1404
 - 32) Jang DS, Lee GY, Kim YS, Lee YM, Kim CS, Yoo JL, and Kim JS. (2007). Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase. *Biol. Pharm. Bull.* 30(11): 2207-2210.
 - 33) Kim YM, Lee CH, Kim HG, and Lee HS. (2004). Anthraquinones Isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) Seed Show an Antifungal Property against Phytopathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6096-6100
 - 34) Vivek B, Masih J, Eusebius LCT, Pravin KS, and Singh J. (2013) A new Phytochemical constituent from the *Cassia tora*. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.* 3(1):31-34.
 - 35) Wong SM, Wong MM, Seligmann O and Wagner H. (1989) Anthraquinone Glycosides from The Seeds of *Cassia tora*. *Phytochemistry*, 28(1): 211-214
 - 36) Park YB and Kim SB. (2011) Isolation and Identification of Antitumor Promoters from the Seeds of *Cassia tora* *J. Microbiol. Biotechnol.* , 21(10): 1043-1048.
 - 37) Hatano T, Uebayashi H, Ito H, Shiota S, Tsuchiya T, and Yoshida T. (1999). Phenolic constituents of *Cassia* seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem. Pharm. Bull.* 47(8): 1121-1127
 - 38) 홍사석, 이우주의 약리학 강의, 의학 문화사, p677-678, 1993

- 39) 건강기능식품시장현황 및 소비자실태조사, 한국건강기능식품협회, 2014
- 40) 임상영양관리지침서, 대한영양사협회, 2008
- 41) 농림축산식품부, 특용작물생산실적, 2016
- 42) 농림축산부, 특용작물 생산실적, 2013년도 주요한약재 수출입현황,
(<http://blog.naver.com/conif/90166514615>)
- 43) 식품의약품안전처 수입식품정책과
- 44) S&T Market report, vol.41, 연구성과실용화진흥원, 2016

주 의

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