

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개()발간등록번호()

11-1543000-002225-01

면역력 강화 황칠청국장 개발을 위한 황칠의 원료 표준화 연구 최종보고서

2018. 03. 30.

주관연구기관 / 조선대학교 산학협력단
협동연구기관 / 농업법인(주) 장흥식품

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 귀하

'면역력 강화 황칠청국장 개발을 위한 황칠의 원료 표준화 연구'(연구개발 기간 : 2016. 12. 5. ~ 2017. 12. 4.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2018. 3. .

주관연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 (대표자) 김재수(인)

협동연구기관명 : (주)농업회사법인 (대표자) 천정자



주관연구기관책임자: 이현화

협동연구기관책임자: 변한모

보고서 요약서

과제 고유 번호	116150-1	해당 단계 연구 기간	2016.12.05.- 2017.12.04	단계구분	1/1
연구사업명	중사업명	농생명산업기술개발사업			
	세부사업명	농식품 창업·벤처 지원 R&D 바우처 시범 사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	면역력 강화 황칠 청국장 개발을 위한 황칠의 원료 표준화 연구			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 4 명 외부: 2 명	해당단계 연구개발비	정부: 80,000천원 민간: 20,000천원 계: 100,000천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 4 명 외부: 2 명	총 연구개발비	정부: 80,000천원 민간: 20,000천원 계: 100,000천원	
연구기관명 및 소속 부서명	조선대학교 산학협력단		참여기업명 농업법인(주) 장흥식품		
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:		연구책임자:		

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

○ 황칠의 원료 표준화:

- 황칠 산지별(제주, 고흥, 제천), 부위별(잎, 줄기) 추출방법에 따른 수율, 지표물질의 함량변화, 기능성 변화 등의 조사를 통한 표준화 확립

보고서 면수
: 73

-
- LC/MS/MS를 이용하여 Hesperidin, Chlorogenic acid와 Salicylic acid정량 분석을 실시

 - 황칠추출물의 실험동물 수준에서 면역 증강효과 규명
 - 황칠추출물과 황칠 청국장추출물의 투여가 마우스의 체중 증가 및 혈중 면역세포 농도 증가, 면역단백질의 농도 증가 확인 총 5개군을 9주 후 장기무게 및 지라 조직 검사를 시행함
 - SRBC 항원을 통하여 양적혈구에 대한 항체생산 세포를 측정하였으며 9주 후의 백혈구 혈액학적 측정 및 혈중 면역 조제 및 면역글로불린검사를 통하여 추출물의 면역활성 효능을 검정

 - 황칠추출물 및 제품의 안전성 평가
 - 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 마우스의 골수세포를 이용한 소핵 실험을 실시함
 - 시험동물은 7주령 SD 랫드를 사용하여 단회 투여 독성검사를 실시함
 - 추출물을 13주간 반복투여하여 추출물의 무해 용량 및 장기에 미치는 영향을 확인함

 - 황칠 추출물 표준화 자료집을 (주)장흥식품에 제공함으로 이를 바탕으로 시제품 제작
-

요약문

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> - 황칠 원료 표준화 및 기능성, 유효물질 분석방법 설정과 이를 통한 황칠의 채취 부위별, 산지별 차이점을 분석하고 원료를 표준화 하고자 함. - 최적 기능성 함량을 포함한 개발물을 실험동물에게 투여함으로써 개발된 제품의 안전성 검증을 하고자 함. - 황칠을 소재화하여 고부가가치의 기능성식품을 개발함으로써 전통발효식품의 발전 모델을 제시하고, 국민보건 향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고하고자 함. 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 황칠 원료 표준화 및 기능성 성분 설정 및 표준화 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 황칠의 기능성 및 안전성과 관련된 문헌과 유사 면역 연구에 관련된 자료 수집 ▪ 황칠의 최적 추출 조건 확립 ▪ 기능성 원료의 제조 방법 표준화 확립 ▪ 최적 기능성 함량을 포함한 지표물질 분석법 확립 - 황칠추출물의 실험동물 수준에서 면역 증강효과 규명 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 실험동물의 체중 증가, 혈중 면역세포 농도증가, 면역단백질농도 증가 확인 - 황칠추출물의 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 소핵 실험, 단회투여 독성 실험, 13주 반복투여 독성 실험 ▪ 조직의 병리학적인 분석을 통한 안전성 평가 ▪ 결과에 대한 통계분석을 수행하고 결과 보고서 작성 - 황칠 원료 표준화 및 최적 제형을 확립하는 등 제품화 관련 기술을 마련함으로 후속 제품군의 개발 기술 확보 - 황칠 원료 기준 규격 설정 보고서 발간 - 시제품 제작 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 황칠과 콩은 다양한 발효 식품 뿐 아니라 전통식품의 주요 소재로써, 다양한 식품에 적용 가능 및 산업적 가치가 우수함. - 황칠의 기능성과 안정성을 과학적으로 검증함으로써 소비자들의 신뢰도를 높일 수 있음. - 황칠을 식품이 아닌 의약에 적용할 경우 의약품을 통하여 면역력을 높이거나 면역질환에 도움을 줄 수 있는 새로운 제품 개발이 가능함. - 황칠추출물을 이용한 제품이 출시되고 있지만 청국장 제품은 아직까지 판매되지 않고 있으므로 국내외 기능성 전통식품 시장 활성화가 기대 됨. 				
국문핵심어 (5개 이내)	황칠	청국장	면역	안전성	표준화
영문핵심어 (5개 이내)					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
1-1. 연구개발 목적	6
1-2. 연구개발의 필요성	6
1-3. 국내외 기술개발 현황	9
1-4. 연구개발 범위	13
2. 연구수행내용 및 성과	14
2-1. 황철 원료 표준화 및 기능성 성분 설정	14
2-2. 황철추출물과 황철청국장의 면역증강 효과	28
2-3. 황철추출물의 안전성 평가	37
2-4. 연구 성과	51
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	52
3-1. 연구개발 목표	52
3-2. 목표 달성 여부	53
3-3. 관련분야 기여도	54
4. 연구개발성과의 활용 계획 등	56
4-1. 연구성과의 활용	56
4-2. 사업화 추진 계획	57
붙임. 참고 문헌	65

<별첨> 주관연구기관의 자체평가 의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 황칠 원료 표준화 및 기능성 성분 설정

황칠의 최적 추출 조건을 확립하고 유효물질 분석방법 설정과 이를 통한 황칠의 원료를 표준화 하고자 함.

○ 황칠추출물의 실험동물 수준에서 면역 증강효과 규명

마우스를 통하여 황칠추출물의 양적혈구에 대한 항체 생산 세포 측정, 혈중 면역글로불린 검사, 백혈구 백분율 계산 및 비장 조직 검사 등을 통한 면역력 증강을 분석하고자 함.

○ 황칠추출물의 안전성 평가

황칠추출물과 황칠 청국장추출물을 실험동물에게 투여함으로써 개발된 제품의 안전성 증을 하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

1-2-1. 청국장

○ 청국장은 삶은 콩에 고초균을 번식시켜 만든 우리나라 전통 발효식품 중 하나이며, 단백질, 필수 아미노산, 필수 지방산의 함량이 높은 중요한 식품 원료이다(1). 청국장에 관한 연구로는 청국장의 제조 발효에 관한 연구가 주를 이루며, 청국장의 기능성에 관한 연구로는 항암활성(2, 3), 항산화(4), 고혈압 예방(5), 혈중콜레스테롤 저하(6), 혈전용해 및 골다공증 예방(7) 등 다양한 생리활성에 대한 보고가 있다. 이러한 기능성이 보고됨에 따라 건강 기능성식품으로써 관심이 증가하고 있다.

○ 청국장의 기능성 및 품질향상을 위해 홍삼 및 복분자(8), 미나리 분말(9), 땅콩 분말(10), 천일염(11), 다시마(12), 양파(13), 녹차와 쑥(14), 더덕(15) 등의 여러 가지 기능성 물질을 첨가한 청국장 제조에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 생약초(표고버섯, 더덕, 어성초) 추출물을 첨가한 청국장환(16)에 대한 연구 등이 이루어지고 있다.

○ 청국장의 건강기능성이 널리 알려짐에 따라 가루청국장, 청국장환, 말린 청국장 등 다양

한 형태의 제품이 상품화 되고 있다. 쑥, 뽕잎 등을 첨가한 기능성 청국장을 제조 판매하고 있으며, 홍삼이나 한약재를 첨가한 청국장의 특허 출원도 계속 증가되고 있는 추세이며 청국장 제품의 다양화와 고품질화를 위해서는 더욱 많은 연구가 요구되고 있는 실정이다.

1-2-2. 황칠

- 황칠나무는(*Dendropanax morbifera*) 두릅나무과 황칠나무 속에 속하는 난대성 상록 활엽수로 세계적으로도 귀한 난지성 수목으로 우리나라에는 1속 1종 밖에 없으며, 우리나라 온대남부와 난대지역인 제주도, 완도, 해남, 거제도 등 남, 서 해안과 일부 도서지역에서만 국소적으로 분포하고 있는 우리나라 특산수종이다(17).
- 만병통치나무라는 뜻의 학명을 가진 황칠나무는 일찍이 삼국시대부터 그 약효를 인정받아 중국으로 수출되었으며 두통, 전염병, 불치병 등 폭넓게 사용되어 왔다. 황칠의 주성분은 polyacetylenes계 화합물로서 식물의 외상에 의해 자극을 받으면 분비되는 항균성 물질인 것으로 보고되고 있다(18). 황칠나무에는 sesquiterpene에 속하는 β -selinene이 가장 많이 함유되어 있고, capnellane-8-one가 다음으로 많이 함유되어 있다고 알려져 있다(19).
- 황칠나무가 속하는 두릅나무과는 인삼, 두릅나무, 오가피 등의 많은 약용식물들을 포함하고 있어 황칠나무는 황칠 이외에 약용식물로서 가능성도 내포하고 있다.
- 황칠에 대한 기존의 연구로는 황칠나무 잎 추출물의 세포 항산화 활성과 미백 활성 특성(20), 황칠나무 추출물의 알콜성 간손상에 대한 보호효과(21), 황칠 정유성분의 항고지혈 활성(22), 황칠나무 잎의 면역활성증진기능(23, 24), 황칠나무의 항산화작용 및 항암효과(25, 26, 27), 항염증 효과(28, 29, 30) 등이 보고되어 있다. 또한 황칠나무 잎의 항당뇨, 항 동맥경화 효과(31), 항고혈압 활성(32), 황칠액의 진통, 진정, 항경련 효과(33) 등이 보고되었다. 선행 연구 결과에서와 같이 황칠나무 추출물은 다양한 생리활성을 가지고 있고, 생약으로써의 가치를 시사해 주어 면역학적 효과도 기대해 볼 수 있는 유용자원식물이다.

1-2-3. 기술적 측면

- 전통발효식품으로 널리 이용되고 있는 청국장의 기능성 증대 및 제조 공정의 표준화를 통해 기능성이 향상된 고부가 가치 제품을 대량 생산할 수 있는 토대를 마련할 수 있다.

- 현재 국내에서 전통식품의 기능성 연구가 활발히 진행되고 있는 바, 황칠의 생리활성 성분과 함량을 표준화하여 전통발효식품인 청국장에 새로운 기능성을 부여할 수 있다.
- 황칠의 기능성을 이용한 청국장 개발은 이를 이용한 다양한 응용 제품 개발 및 청국장 이외의 된장, 고추장, 젓갈, 김치, 간장 등 전통 발효식품에 대한 개발을 증대시킬 수 있다.

1-2-4. 경제, 산업적 측면

- 우리나라 사람들에게 옛날부터 애용되어온 청국장은 단백질 공급원으로 사용되어져 왔지만 다양한 전통 장류 제품 중 판매량이 가장 낮다.
- 2015년 장류 제품의 매출액을 살펴보면, 고추장과 간장이 각각 3,200억 원, 3,080억 원 된장이 1,450억 원으로 약 1조 350억 원의 시장을 형성하고 있으나 청국장의 매출액은 산정이 불가능 한 실정이다.
- 청국장의 단점을 개선하고, 새로운 기능성이 부각된 청국장의 개발로 소비자들의 구매 욕구 촉진을 통해 청국장의 시장성을 확대 할 수 있으며, 청국장 제조에 있어 순수 국산콩과 청정지역에서 재배된 황칠을 이용함으로써 국내 재배 농가의 소득 증대와 해외 수출이 가능하다.

1-2-5. 사회, 문화적 측면

- 최근 많은 연구자들에 의해 밝혀진 청국장의 유용성은 식품의 기능성을 추구하는 우리에게 기능성 식품, 첨단식품이라는 이미지로 부각되고 있다.
- 따라서 영양이 풍부하고 우수한 기능성 성분을 지닌 황칠 청국장의 개발은 청국장의 소비기반을 늘리고 지속적인 섭취를 가능하게 하여 국민 건강에 이바지 할 수 있으며 우리나라 전통음식의 계승 발전과 더불어 세계적으로 자긍심을 보이는 계기가 될 수 있다.

1-2-6. 연구 개발에 정부 투자 필요성

- 우리나라 전통발효식품을 계승 발전시키는 한편 청국장 산업을 활성화시키기 위해서는 청국장의 제조법 표준화, 품질 고급화, 대량생산을 위한 자동화 공정 확립 등 상품성을 높이기 위한 근본적인 연구가 필요하고 더불어 청국장 제품의 품질 차별화와 청국장 먹

기를 꺼려하는 사람들의 입맛을 공략할 수 있는 다양한 청국장 소재와 기능성 개발에 대한 노력에 대해 정부 지원이 함께 이루어진다면 소비증가는 물론 산업화가 가능할 것이다.

- 황칠의 기능성 연구와 타 추출물과의 혼용 제품들은 출시되고 있으나 기능성 작용을 위한 함량 연구나 기능성 검증 연구가 미비한 실정이며, 황칠과 청국장의 기능성 증대를 위한 제품개발에 있어 원료의 표준화와 제품의 효능검증이 필수적으로 요구되어지나 기업에서는 이러한 전문적인 연구가 시행되기 어려운 현실임으로 전문연구 기관과의 협업이 필요하다.
- 제품 원료의 표준화와 효능검증 개발 완료 후 첨가제가 사용되지 않은 차별화된 100% 순수 황칠 청국장을 개발하여 상품화하고 건조 분말 및 콩알 청국장의 상품화로 유통 변질 문제를 해결하고 간편 보관용 제품을 출시할 수 있다.

1-3. 국내외 기술개발 현황

1-3-1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 국내 기술현황

- 최근 의료기술이 발전하면서 평균 수명의 증가와 함께 만성 질환 유병률 또한 증가하고 있는 추세로 질병관리본부의 국민건강영양조사 2013년 발표에서 보면, 대표적인 질환에는 고혈압(63.3%), 백내장(35.8%), 비만(33.8%), 폐쇄성폐질환(29.9%), 골관절염(24.0%) 이 있고 만성질환의 증가는 곧 고령의 삶의 질 지수와도 연관이 깊다.
- 노인의 24%는 건강문제로 인한 삶의 질 지수가 2010~2012년에 0.973, 0.938, 0.846으로 감소하였다. 특히 노인의 만성질환은 1인당 2~3개 보유하는 것으로 나타났으며, 3개 만성 질환 보유자도 25.5%로 높게 나타나고 있다.
- 따라서 만성 염증성 질환의 예방을 위해서는 장기간에 걸쳐 복용 시 부작용이 없으면서 염증을 효과적으로 제어할 수 있는 식품 소재의 개발이 절실히 요구되어지고 있다.
- 식품의 경우 매일 섭취하는데 한계가 있으므로 기능성 식품 소재를 중심으로 통상의 간결한 섭취 형태로 만들어 섭취하는 것이 편리하며, 생리적 측면에서도 유용성을 기대할 수 있다.
- 청국장은 먹는 시기가 주로 가을부터 이른 봄까지로 계절적인 한계가 있고 찌개나 나물을

무칠 때 쓰는 조미료 등으로 쓰여져 사계절 상용되는 된장, 고추장, 간장, 혼합장과는 달리 이용면에서도 제약이 있는 식품이다.

- 현재 청국장이나 청국장환을 제조하는 소규모의 영세한 제조업체들이 난립되어 각자 재래식으로 제조하여 제조 기술 표준화에 대한 연구가 부족한 실정이다.
- 황칠나무는 우리나라 주로 남해안 일부 도서지방에서 주로 자생하고 있는 세계적으로도 귀한 난지성 수목으로 우리나라에 1속 1종밖에 없는 특산 수종이다.
- 황칠나무는 관상수와 약용으로 이용하기 위한 연구가 많이 수행되고 있으나 산지별, 계절별, 추출 부위별 등 약리성분과 복용량에 대한 표준화가 이루어지지 않고 있으며 제품도 주로 잎 추출 엑기스에 한정되어 다양한 제품 생산 기술이 요구되어지고 있다.

○ 국내 시장현황

- 면역기능개선에 관한 개별인증형 제품(2013년)은 총 개별인증형 제품 중 24.8%을 차지하며 가장 높은 제품 시장이고 그 밖에 혈행개선 (21.9%), 항산화 (20.6%)로 생산실적이 높게 나타났다. 2014년도 개별 기능성 인증 현황에서도 면역기능개선 관련 개별형 인증이 가파르게 증가하고 있는 추세이다.
- 생활 습관의 서구화 및 고령화 사회로 진행됨에 따라 만성질환과 관련된 제품의 비중은 더욱더 높아질 것으로 예상되고 2000년대 사회성, 공익성을 추구하는 LOHAS (Lifestyle of Health And Sustainability)시대가 도래하여 천연물 유래 기능성식품에 대한 요구가 높아지고 있다.
- 국내 장류 시장은 2012년 가정용과 업무용을 포함한 출하액 기준, 약 1조 350억 원 규모로 지속적 성장 추세이며 품목 중에서는 고추장이 30.9%(약 3,200억 원)로 출하액 규모가 가장 크고, 간장 29.8%(약 3,080억 원), 된장 14.0%(약 1,450억 원)순으로 나타나고 있다.
- 2016년을 기준으로 청국장 제조가 가능한 대한장유공업협동조합에 등록된 업체 현황은 25개 업체, 매출량은 2.9천 톤이고 대부분 가내 수공업 형태로 비회원사가 제조, 유통하고 있는 양이 더 많으며 직접 만들어 즐기는 가정도 많은 실정이다.
- 장류 시장은 연평균 3.8%의 성장을 기록하고 있으나 전체 식품군의 평균 성장률인 10.2% 보다는 낮은 수준을 보이고 있으며, 서구화된 식습관의 변화와 1인가구의 증가 등이 성장 둔화의 주요 원인으로 추정된다.
- 장류(가정용) 판매액은 2012년 기준 4,489억 원, 판매량은 93,971톤 규모로 판매액은 2010년부터 연평균 3.0% 수준으로 지속적으로 증가하는 반면, 판매량은 1.7% 수준으로 감소하고 있다.

- 장류의 프리미엄화로 인한 판매가격 상승이 판매액 증가의 주요 원인으로 보이며 이는 원료의 고급화, 용기 차별화, 제조공급 차별화 등을 통해 진행되고 있다. 2015년 기준 장류 시장은 간장 46.7%, 고추장 40.2%, 된장 13.1%로 조사되었다.
- 전체 시장 중 품목별 비중은 간장이 매년 1% 가량 감소하는 반면, 고추장은 매년 1%씩 증가하고 있으며 된장은 큰 변동을 보이지 않고 있고 국내 장류 시장은 대상, 샘표식품, CJ제일제당 3사가 주도하고 있다. 2016년 기준 대상이 29.3%의 가장 높은 점유율을 차지하고 있고 CJ제일제당이 28.0%, 샘표식품이 24.4% 순으로 나타내었다.
- 간장 시장 점유율은 샘표식품이 51.8%를 차지하고 있으며, 대상이 22.6%, 몽고식품이 10.9%의 점유율을 차지하고 있고 고추장은 CJ제일제당이 52.5%를 차지하고 있으며, 대상이 36.8%의 점유율을 나타내며, 된장은 CJ제일제당이 45.7%를 차지하고 있으며, 대상이 30.3%의 점유율을 나타내었다.
- 장류 메이저 3개 업체(CJ제일제당, 샘표식품, 대상)의 평균 점유율이 80% 이상을 차지하고 있어 전형적인 core-oligopoly 구조를 보이고 있는데 이러한 산업 구조는 후발업체 및 중소기업에게 매우 큰 진입 장벽이 되고 있다.

○ 국내 지식재산권현황

- 2016년 현재 청국장 관련 특허는 총 648건으로 청국장 제조방법(446건)은 전체의 68.8%, 제조 기구(제조기, 발효용기, 발효기, 숙성장치 등)에 관련된 특허(33건) 5.1%로 주로 청국장의 제조 방법으로 국한되어 있는 것으로 조사되었다.
- 청국장의 독특한 향을 싫어하는 사람들이 많기 때문에 그 우수성에도 불구하고 수요가 한정적인 것으로 추측되어 진다.

○ 기타현황

- 정부가 2016년까지 10년간 총 19조 1,557억 원(연 14.8% 증가)을 생명공학 사업 확대와 신규 사업에 투자해 2조 4,000억 원의 시장을 60조 규모의 시장으로 확대시켜 생명공학 분야 세계 7위의 기술 강국의 '바이오 경제'를 구현할 방침으로 많은 지원이 요구되어진 다.
- 지금까지 살펴본 것과 같이 건강기능식품 시장의 성장 가능성은 매우 높은 것으로 판단된다. 그러나 아직 많은 소비자들이 비싼 가격이나 효능에 대한 불확실로 인해 건강기능식품 복용을 주저하는 것으로 나타나고 있다. 따라서 건강기능식품의 효능에 대한 과학적 근거가 좀 더 뒷받침되고 유통 구조가 보다 투명한 방향으로 개선된다면 건강기능식품이 소비자들의 신뢰를 얻고 이를 통해 시장이 보다 안정적으로 성장할 수 있을 것으로 기대 된다.

1-3-2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 청국장은 약 천 삼백년 전부터 자연 발효시켜 상식해 온 우리나라 고유의 전통적인 대두 발효식품으로서 국외 기술현황은 조사하기 힘든 실정이다.
- 우리나라 청국장과 비슷한 일본의 낫토와 이를 활용한 기술 현황을 살펴보면 낫토를 비롯한 청국장 콩을 설탕과 함께 조리한 과자(아마낫토), 곰팡이로 발효시킨 청국장 콩을 소금에 버무려서 몇 달 동안 숙성시켜 술안주 등으로 이용한 시오까라낫토, 낫토피자를 비롯하여 샌드위치, 고로케, 케익, 샐러드, 오므라이스, 볶음밥, 스파게티, 카레라이스, 마끼 등 다양한 제품 등을 개발하고 있다.
- 최근에는 청국장을 이용한 유사치즈가 건강식품으로 각광받고 있어 유산발효식품을 혼합하여 제조한 식품으로 청국장 특유의 기능성과 이용 분야를 넓히고 있다.

○ 시장현황

- 장류의 세계 시장 규모는 정확한 통계가 없어 전체 규모를 명확하게 파악하기 어렵지만 한국, 일본, 중국 등 아시아 지역은 자체생산 및 소비 시장 규모 자료, 미국이나 러시아 등 서구 지역은 아시아 지역으로부터의 수입 장류 시장 규모 자료 등에 기초하여 추정하였다.
- 2012년 기준 세계 장류 시장 규모는 최소 150억 달러(15조 원)에 달할 것으로 추정되는데, 여기에 중국 인구 대비 장류 소비량과 장류 문화를 보유하고 있는 아시아 국가들의 시장이 포함되지 않은 것을 감안하면 세계 장류 시장은 200억 달러(20조 원) 이상까지도 내다볼 수 있을 것으로 예상된다.
- 일본의 경우 과거 아시아에서 가장 큰 시장규모를 보였으나 2012년을 기점으로 중국시장이 일본의 시장규모를 넘어선 것으로 조사되었으며, 중국시장의 이러한 성장세는 향후에도 지속될 것으로 예상되고 있다.
- 우리나라 장류 수출 규모는 2013년 기준 5,500만 달러로 세계 장류 시장 규모의 0.4%를 차지하고 있고, 주요 수출 시장으로는 미국이 2천만 달러로 가장 크고, 중국, 일본, 러시아 등이 뒤를 잇고 있다.
- 미국은 장류 전체뿐만 아니라, 간장, 된장, 고추장 모두 압도적인 1위를 차지하고 있어 우리나라 장류 수출의 주요 시장으로 부각되고 있다.

- 간장은 미국 다음으로 러시아가 가장 큰 수출 실적을 보이고 있는데, 3위인 중국의 2.1배의 규모로 분석되었다. 된장은 중국이 미국 다음으로 가장 큰 수출 실적을 보이고 있으며, 3위인 캐나다의 2.1배 수준이다. 고추장은 일본이 미국 다음으로 가장 큰 수출 실적을 보이는데, 3위인 중국의 1.7배 수준이나 캐나다와 호주도 수출 실적이 높아지고 있는 추세로 조사되었다.

○ 기타현황

- 최근 예방의학 차원에서 건강에 도움이 되는 천연 식품성분들을 공급하여 질병을 예방하고 최적의 건강을 유지하려는 노력이 증대되고 있다. 이는 현대사회의 생활습관에서 발생하는 질병을 개선하기 위한 차원에서 천연식품이 의약품을 대체 할 목적으로 사용되고 있기 때문이다.
- 국내 자생 약용식물을 활용하여 건강기능식품으로 상품화하면 저독성, 고효성, 저가의 천연 항산화 제품의 장점을 모두 지니고 있어 세계에 천연 면역강화 및 대사성 질환 시장으로 진출이 용이하고, 체계적·효율적 해외 시장개척이 이루어진다면 최소 1,000만 불 이상의 수출이 가능할 것으로 전망된다.

1-4. 연구개발 범위

- 농업회사법인 주식회사 장흥식품에서 개발하고자 하는 면역력 향상을 위한 기능성 황칠청 국장을 개발하고자 황칠 원료 표준화 및 실험동물을 활용한 황칠추출물의 안전성 평가를 실시한다.

○ 황칠 원료 표준화 및 기능성 성분 설정

- 황칠의 최적 추출 조건 확립
- 최적 기능성 함량을 포함한 지표물질 분석법 확립
- 기능성 원료의 제조 방법 표준화 확립

○ 황칠추출물의 실험동물 수준에서 면역 증강효과 규명

- 황칠추출물의 경구 투여를 통한 체중 및 장기 무게 변화
- 양적혈구에 대한 항체 생산 세포 측정
- 혈중 면역글로불린 검사
- 백혈구 백분율 계산 및 비장 조직 검사

○ 황칠추출물의 안전성 평가

- ICR mouse를 통한 동물 평가
- 소핵 실험, 단회 투여 독성 실험, 13주 반복 투여 독성 실험
- 조직의 병리학적인 분석을 통한 안전성

2. 연구수행내용 및 성과

2-1. 황칠 원료 표준화 및 기능성 성분 설정

2-1-1. 재료 및 방법

○ 추출물 제조

본 과제를 진행하기 위해 실시한 선행연구 결과에 따라 제주, 고흥, 제천 세곳의 산지별 황칠 줄기와 잎으로 구분하여 산지와 전남화순 소재의 ‘전남생약농업협동조합’으로부터 원물을 구매하였다. 황칠의 효과적이고 최적의 추출 조건을 확립하기 위하여 천연물 추출에 있어 가장 보편적인 용매인 물을 이용하였다.

천연물 내에는 많은 flavonoid 계열의 물질과 acid, phenol 화합물들이 다량 포함되어 있다. 이러한 물질을 효과적으로 추출하기 위해서는 유기 용매를 적정한 농도(40~80%)로 이용함이 효과적임으로 각각 70% 에탄올과 70% 메탄올을 제조하여 최종적인 추출용매로 활용하여 상온에서 24시간 방치 후 추출에 사용하였다.

산지별 황칠의 잎과 줄기 200 g에 8배량의 추출용매 800 mL를 가하여 추출하였으며 추출액을 Whatman NO.2 여과지로 여과하여 Vacuum evaporator(Heidolph VV2000, Germany)로 감압 진공 농축한 후 동결건조기(FD8508, Ilshin, Korea)로 건조하여 냉동 보관하며 사용하였다.

○ 항산화효소의 활성 측정

- 효소액 조제

여주의 부위별 생체시료와 동결 건조시킨 시료를 extraction buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.0; 1% Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화시키고 12,000 g에서 20분 동안 원심분리 한 다음 항산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 BSA을 표준물질로 사용하여 Bradford (1976) 방법(34)에 따라 측정하였다.

- Superoxide dismutase(SOD) 활성측정

SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich (1971)의 방법(35)에 따라 50 mM carbonic buffer, pH 10.2; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM Xanthine; 0.025 mM nitroblue tetrazolium에 추출액이 포함된 용액을 25°C에서 10분간 반응시킨 후 xanthine oxidase($3.3 \cdot 10^{-6}$ mM)를 첨가하고 550 nm에서 NBT의 광환원 정도를 측정하였다.

- Ascorbate peroxidase(APX) 활성측정

APX 활성은 Nacano and Asada (1981)의 방법(36)에 따라 50 mM potassium

phosphate, pH 7.0; 0.5 mM ascorbate; 0.1 mM H₂O₂; 0.1 mM EDTA에 추출액을 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 290 nm에서 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

-Catalase(CAT) 활성측정

Catalase활성은 Aebi (1984) 방법(37)에 따라 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 10 mM H₂O₂ 와 추출액을 가한 후 240 nm에서 2분간의 흡광도 변화를 관찰하였다. 이때 1분 동안에 1 uM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

○ LC-MS/MS에 의한 황칠추출물의 지표물질 선정 및 함량 측정

-지표물질 함량 측정을 위한 시험 용액 준비

본 실험에서는 제주, 고흥, 제천시 황칠의 줄기와 잎을 70% 메탄올과 70% 에탄올에 24시간 침지 시킨 후 추출하였다. 또한 121°C/15min, 100°C/3h, 60°C/24h 열수추출하여 추출하였다. 시료 내 지표물질 분석을 위해 건조 시료를 일정량 취하여 메탄올로 충분히 녹인 후 원침 시키고 상층을 50% Methanol로 일정 희석한 후 5~10 ul을 주입하여 분석하였다.

-시약 및 표준 물질

본 실험에서 사용한 목향, 신이, 전호의 지표 물질(Table 1)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며 추출과 분석에 사용되는 actonitrile, methanol은 HPLC 용(Fisher science)을 사용하였다. Formic acid(98%, Kanto chemical), acetone(Sigma) 등 실험에 사용된 모든 시약은 특급 및 그 이상의 수준을 사용하였다.

-분석방법

각각의 지표 물질을 정량분석하기 위해 LC/MS/MS(AB SCIEX 4000 Q-Trap 질량분석기, Shimadzu LC 20A System)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 용매 및 기기 조건은 Table 1과 같다.

2-1-2. 결과 및 고찰

○ 황칠추출물의 추출법 확립

천연추출물의 효과적인 추출을 위해서는 적절한 온도를 통해 적절한 시간동안 추출함으로써 추출물에 포함되어 있는 유용한 기능성 천연화합물을 보존하고 효과적으로 높은 추출 효율을 확보 할 수 있을 것이다. 이에 추출 효율을 높이기 위해 높은 온도 100°C와 121°C를 이용하였다. 그러나 높은 온도는 기능성 유효물질의 기능을 저하시키는 부작용도 보고되고 있으므로 저온 추출에 해당하는 60°C의 온도를 황칠 추출조건을 포함하였다.

Table 1. LC-MS/MS conditions for the confirmation of Marker compound.

Instrument	Parameter	Conditions
LC parameter	Column	Gemini C ₁₈ (5um,5.0mmX2.0mm) Gemini C ₁₈ (5um,4.0mmX2.0mm)guardcartridge
	Mobile phase	0.1% formic acid with deionized water (A) 0.1% formic acid with Acetonitrile (B) (A : B = 80 : 20 (V/V))
	Flow rate	0.2 ml/min
	Injection volumn	10 ul, 5ul
	mode	Negative mode / Positive mode
MS parameter	Spray voltage	-4500V / 5500 V
	Desolvation Temp.	500 °C
	Costunolide	231.166/185.1
MRM (Multiple Reaction Monitoring)	Dehydrocostus lactone	233.2/187.1
	Nodakenin	409.17/247
	Praeruptorin A	409.138/227.1
	Honokiol	265.071/223.9
	Magnolol	265.071/247

추출조건을 확립하기 위한 과정에서 추출온도는 매우 중요한 요인으로 작용한다. 온도에 의해서 천연물질의 구성과 분자구조가 변화할 수 있기 때문이다. 가령 인삼의 주요 기능성 물질인 phenolic acid의 경우 온도에 변화에 따라 compound의 형태나 함량 등의 변화를 일으킨다. 즉 천연추출물을 추출함에 있어서 온도 설정이 매우 중요하고 유용한 천연 성분의 기능성을 유지시키면서 추출하는 방법을 확립 하고자 하였다.

추출 시간은 최대한 짧은 시간에 원료로부터 최대 많은 추출물을 얻어야 하므로 추출 시간을 최소화하기 위해서는 원료의 크기도 중요한 요소로 작용한다. 원료의 표면적을 최대로 늘려주기 위해 원료를 세절하여야 한다. 본 연구에서는 줄기부분은 단단한 형태로 파쇄하는 것이 어려웠으나 1 cm²의 내외 크기로 세절하여 사용하였다. 잎 부분은 1 mm²이하로 세절하여 추출온도에 따라 15분, 3시간과 24시간으로 나누어 추출한 것을 비교 분석하여 최적의 추출 조건을 확립하고자 하였다. 최종적으로 제천, 고흥, 제주 산지별 황칠나무의 줄기와 잎, 6가지 시료에 추출조건 5가지를 준비하여 30가지 조건으로 연구하였다.

산지별 수율을 조사한 결과(Table 2) 고흥산 황칠잎을 60°C에서 24시간 열수추출한 조건에서 4.5 g으로 가장 높은 추출량과 9%의 높은 수율을 나타내었으며, 황칠잎 70% 메탄올 조건에서도 4.3 g의 높은 추출량을 나타내었다.

Table 2. Analysis of natural products freeze dry weight rates.

Sample name		leaf	stem	leaf	stem
	condition	Quantity(g)		yield (%)	
Je cheon	70% MeOH	1.5	1	3%	2%
	70% EtOH	1.5	1.5	3%	3%
	D.W 60°C 24hr	3.2	1.5	6%	3%
	D.W 100°C 3hr	1.8	1.5	4%	3%
	D.W 121°C 15min	1.2	0.3	2%	1%
Go heung	70% MeOH	4.3	0.2	9%	0%
	70% EtOH	3	0.7	6%	1%
	D.W 60°C 24hr	4.5	1.4	9%	3%
	D.W 100°C 3hr	1.3	1.4	3%	3%
	D.W 121°C 15min	1	1	2%	2%
Je ju	70% MeOH	1.6	1.4	3%	3%
	70% EtOH	2.4	1.2	5%	2%
	D.W 60°C 24hr	2	0.73	4%	1%
	D.W 100°C 3hr	2.1	1.5	4%	3%
	D.W 121°C 15min	1.1	1.2	2%	2%

○ 황칠추출물 조건에 따른 항산화 효소의 활성

식물은 고착생활을 하기 때문에 외부 스트레스에 대한 환경적응 능력이 다른 생물체 보다 높은 것으로 생각되며, 다른 생물체 보다 많은 종류의 항산화 물질을 생산한다. 세포는 세포의 구성성분을 보호하고 산화환원상태를 유지하기 위해 효소학적 및 비효소학적 방어시스템을 지니고 있다. 식물에서 비효소학적 방어시스템에는 천연 항산화제로 알려진 ascorbic acid, glutathione, α -tocopherol, carotenoids 등이 있고, 효소적 방어시스템에는 superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase 등과 같은 효소들이 있다. 황칠 추출 조건별 시료에 따른 SOD, APX 그리고 CAT의 항산화 효소 활성 능력을 측정하여 최적의 추출조건을 확립하는데 기초 자료로 활용하였다.

제주산 황칠 줄기 70% 에탄올 추출시료의 SOD 활성도가 0.08 U/g protein로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 특히 줄기는 잎에 비교하여 0.05 U/g protein 으로 높은 활성을 보여 항산화 효능이 높은 부위로 사료되었다. 열수추출의 온도 조건별로 살펴본 결과 산지별에 따라 큰 차이를 나타내지 않았지만 0.05~0.07 U/g protein의 활성을 나타내었다.

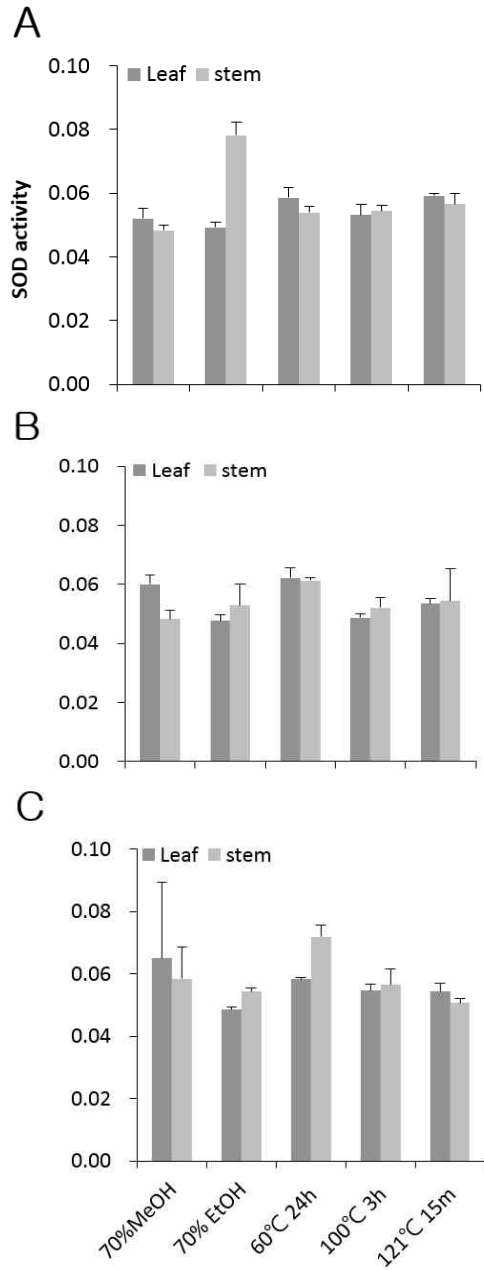


Figure 1. Activities of SOD in extract from *Dendropanax morbiferum*. (A)Jeju (B)Goheung (C)Jecheon.

식물체에서 APX는 세포질과 엽록체에서 작용하는 가장 중요한 제거제의 역할을 한다. 이들은 환원용 기질로 ascorbic acid를 이용하며, GPX (glutathione peroxidases)가 H₂O₂를 제거하고 지질의 과산화과정에서 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다(38). APX의 활성 측정결과 제천산 황칠잎 추출물이 용매별 추출시간별에 관계없이 높은 활성을 나타내었다. 제주 황칠 잎과 줄기는 121℃에서 15분 열수추출군에서 각각 2.42 U/g protein과 2.74 U/g protein로 동일 나무의 부위별로 가장 큰 활성차이를 나타내었다(Fig. 2).

CAT는 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 APX와 함께 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 제주와 고흥산 조건별 추출물이 제천산 황칠 나무의 조건에 비교하여 높은 활성을 나타내었으며 추출시료별 열수조건 내에서의 추출시간별로 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3).

본 실험결과에서도 관찰되었듯이 산지별과 부위별, 추출 조건에 따른 항산화성에 많은 차이를 나타냈으며, 시료별에 따른 다양한 항산화 검증 및 기능성 검증이 필요하리라 생각된다.

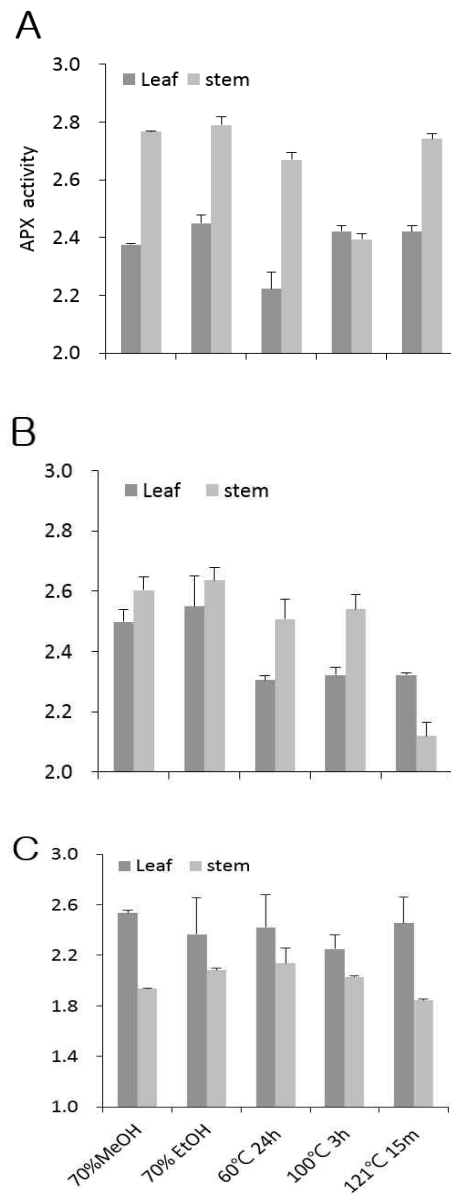


Figure 2. Activities of APX in extract from *Dendropanax morbifera*. (A)Jeju, (B)Goheung, (C)Jecheon.

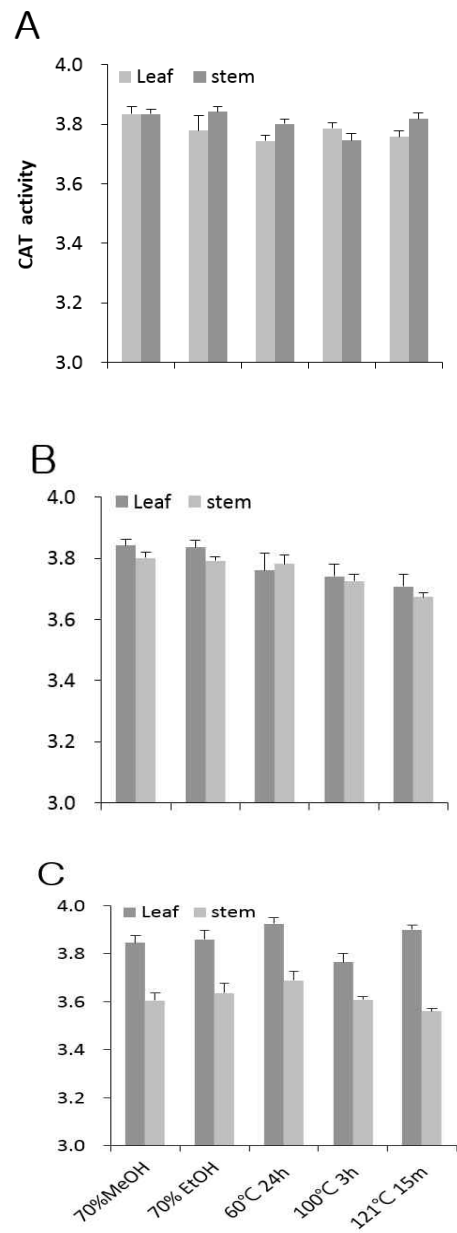


Figure 3. Activities of CAT in extract from *Dendropanax morbifera*. (A)Jeju, (B)Goheung, (C)Jecheon.

○ LC-MS/MS에 의한 황칠추출물의 지표물질 선정 및 함량 측정

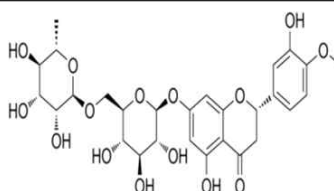
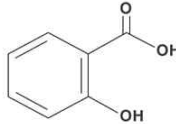
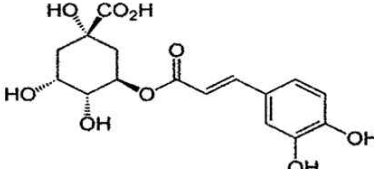
제주, 고흥, 제천 산지의 황칠의 줄기와 잎을 대상으로 70% 메탄올과 70% 에탄올에 24시간 침지시킨 후 추출하였다. 또한 121°C/15min, 100°C/3h, 60°C/24h 열수추출하였다. 총 30가지로 선별되어진 추출물을 가지고 Table 3에 나와 있는 Hesperidine, Salicylic acid와 Chlorogenic acid 의 3가지 지표물질을 선별하여 함량을 측정하였다.

Hesperidine은 항산화 효과와 항염증 효과를 보이며 모세혈관 보호 및 항암작용에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Chlorogenic acid는 폴리페놀의 일종으로 염증을 가라앉히고 위장을 튼튼하게 하며 통증을 없애고 산성체질을 개선해 성인병을 예방하는 효능이 있다고 알려져 있다.

- 황칠추출물의 Hesperidin 분석

30가지 조건의 황칠추출물을 SC-MS/MS를 통하여 1차(Table 4)와 2차(Table 5)를 통하여 정량분석을 시행한 결과, 제천 황칠추출물의 경우 70% 에탄올 추출물에서 3,840 ng/ml로 가장 많은 함량을 나타내었다. 제천산 황칠잎과 줄기를 비교하였을 때 잎에서 월등히 높은 함량을 나타내었다. 제천산 황칠줄기의 열수 121°C/15min 추출 조건에서는 0.559 ng/ml의 함량으로 가장 낮게 나타내었고 열수 100°C/3h의 조건(22.5 ng/ml) 비교하여 40배나 차이가 나는 결과를 보여준다. 이는 식물의 같은 재료라 하더라도 추출 방법에 따라 함량 차이가 많이 나는 것으로 확인되었다.

Table 3. List of Marker compound.

Marker compound	Constitutional formula	Function
Hesperidin C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅ = 610.1898		항산화 효과, 항염증 효과, 모세혈관 보호 및 항암작용, 콜레스테롤 감소
Salicylic acid C ₇ H ₆ O ₃ = 138.12		해열, 진통 작용
Chlorogenic acid C ₁₆ H ₁₈ O ₉ = 354.30		지방질에 대한 산화억제작용, 항암 기능

고흥산 황칠추출물과 제주산 황칠추출물의 경우 제천산 황칠추출물과는 반대로 줄기 부분에서 높은 Hesperidin의 함량을 확인할 수 있었다. 고흥산 황칠잎과 줄기 추출물은 모두 에탄올과 메탄올 추출물에서 높은 함량을 나타내었으며(Fig. 4) 열수추출물과 비교하여 최고 250배가 넘는 함량 차이를 나타내었다.

- 황칠추출물의 Chlorogenic acid 분석

제주, 고흥, 제천 산지별 Chlorogenic acid 함량을 분석한 결과 고흥산 황칠줄기 추출물이 70% 메탄올과 70% 에탄올 추출물에서 각각 25,700 ng/ml과 23,000 ng/ml로 높은 함량을 나타내었다. 다음으로 제주산 황칠줄기 추출물들이 18,500~6,070 ng/ml 으로 높은 함량을 나타내었는데 이는 제천산 황칠줄기 추출물과 비교하여 최고 18,000배의 함량 차이를 보여주었다(Fig. 5).

- 황칠추출물의 Salicylic acid 분석

30여 가지의 황칠추출물의 salicylic acid 함량을 비교분석한 결과 고흥산 황칠줄기 추출물들이 다른 군들에 비교하여 9.79~4.97 ng/ml로 높은 함량을 나타내었다(Fig. 6). 열수추출물 60℃에서 24시간 추출물에서 가장 높은 9.79 ng/ml함량으로 동일 조건의 제주의 0.759 ng/ml와 비교하여 9배에 가까운 함량 차이를 보여주었다.

- 각각의 Hesperidine, Salicylic acid와 Chlorogenic acid 의 3가지 지표물질의 함량을 정량 분석한 결과, 용매조건과 추출시간에 따라 많은 차이를 보이며 부위별 산지별에 따라서도 많은 함량 차이를 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 최종적으로 고흥산 줄기부위를 재료로 선택하여 60℃, 24시간 열수추출물을 최종적으로 선택하여 다음의 면역활성 효능 실험을 실시하였다.

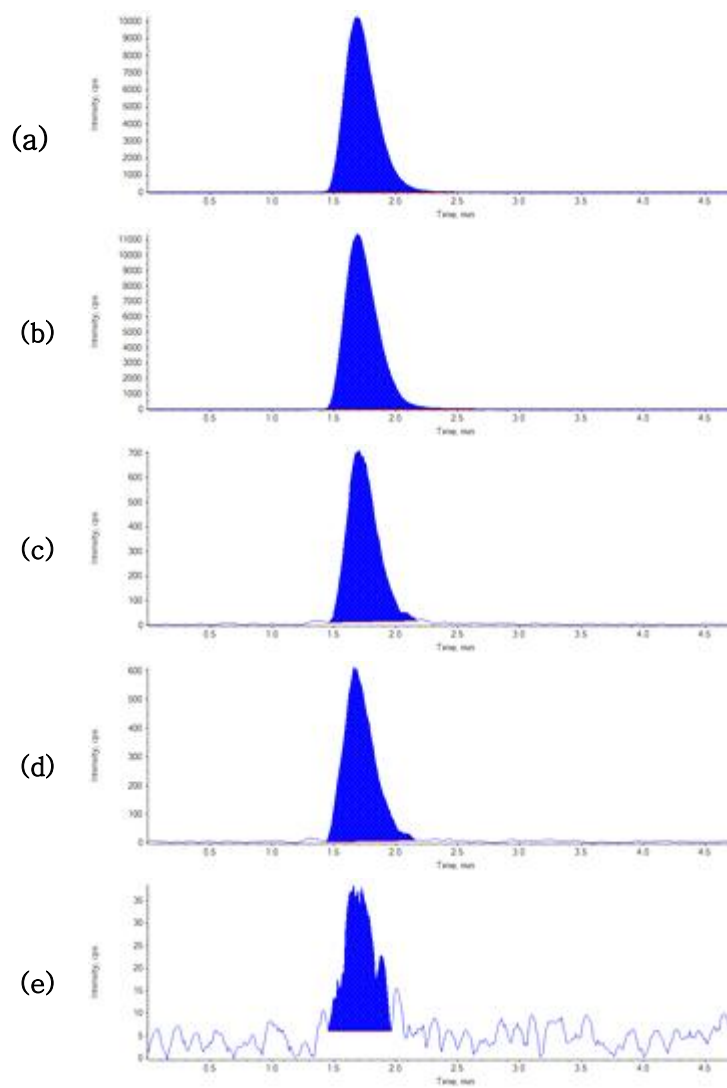


Figure 4. LC-MS/MS chromatograms of Hesperidine in various extract from *Dendropanax morbifera*.(stem). a, 70% EtOH/24hr; b, 70% MeOH/24hr; c, D.W 60°C/24hr; d, D.W 100°C/3hr; e, D.W 121°C/15min.

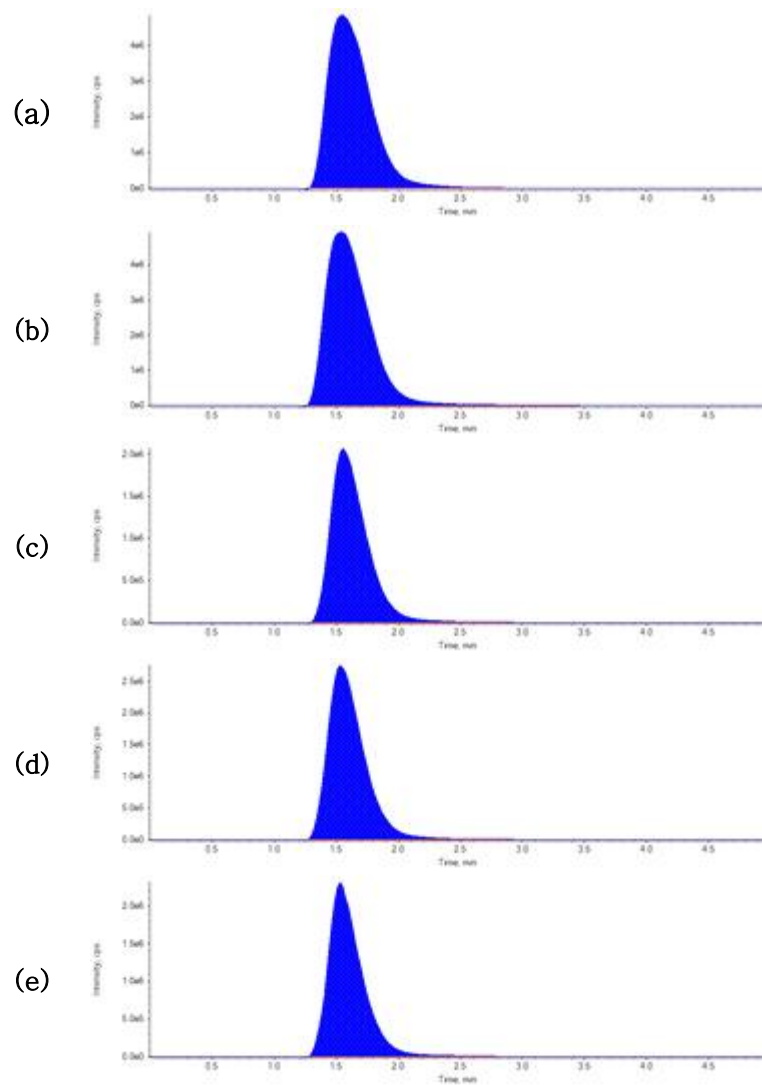


Figure 5. LC-MS/MS chromatograms of Chlorogenic acid in various extract from *Dendropanax morbifera* (stem). a, 70% EtOH/24hr; b, 70% MeOH/24hr; c, D.W 60°C/24hr; d, D.W 100°C/3hr; e, D.W 121°C/15min.

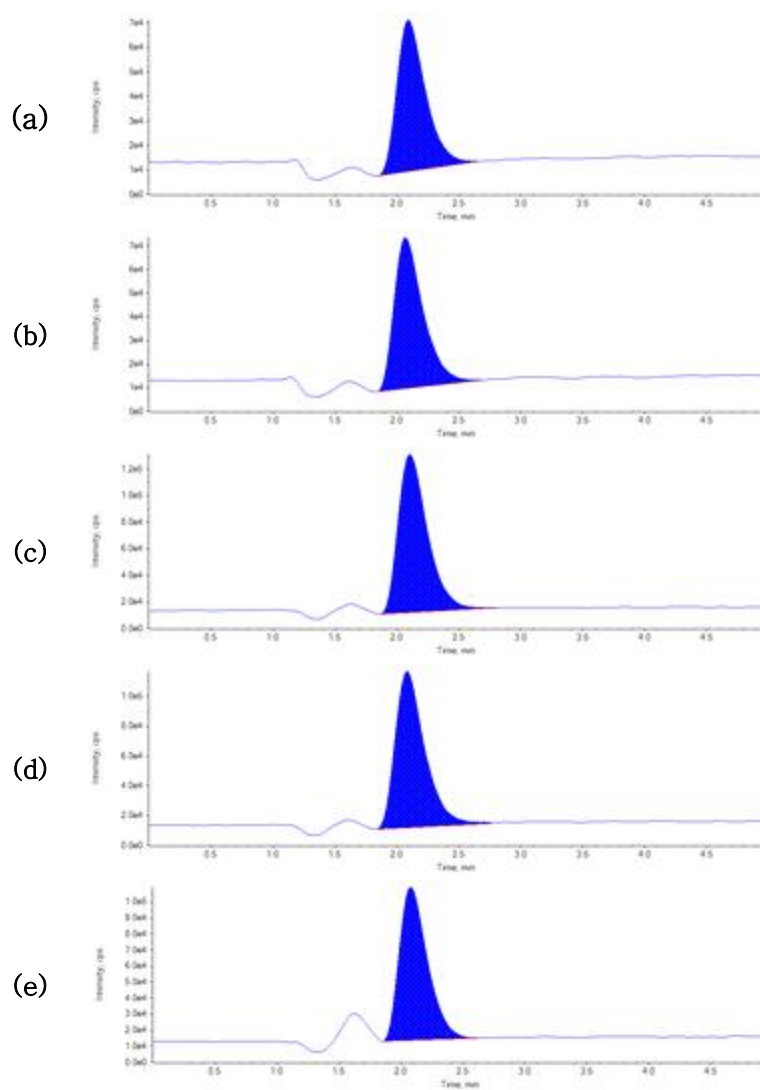


Figure 6. LC-MS/MS chromatograms of Salicylic acid in various extract from *Dendropanax morbifera* (stem). a, 70% EtOH/24hr; b, 70% MeOH/24hr; c, D.W 60°C/24hr; d, D.W 100°C/3hr; e, D.W 121°C/15min.

Table 4. Total indicator substance contents (first) of various extract from *Dendropanax morbifera*.

Sample name		1st calculated concentration (ng/ml)					
		leaf			stem		
	condition	Hesperidin	Chlorogenic acid	Salicylic acid	Hesperidin	Chlorogenic acid	Salicylic acid
Je cheon	70% MeOH	3840±4.62	3310±3.55	1.07±0.64	2.61±0.77	15.3±1.2	0.254±0.07
	70% EtOH	3610±5.29	3290±4.85	0.719±0.12	123±1.29	1010±3.54	0.573±0.19
	D.W 60°C	1250±2.29	1620±3.1	1.26±0.37	0.946±0.28	64±2.45	0.984±0.22
	D.W 100°C 3hr	1980±2.54	2350±3.37	3.41±0.15	22.5±1.72	4170±4.23	2.01±0.94
	D.W 121°C 15min	1810±2.2	2200±3.46	3.7±0.92	0.559±0.62	17.3±1.52	1.28±0.8
Jeju	70% MeOH	503±3.14	4580±5.16	0.955±0.03	18.4±1.72	25700±3.35	1.12±0.4
	70% EtOH	700±5.11	5860±6.29	1.36±0.07	34.6±3.49	23000±4.19	0.988±0.08
	D.W 60°C	28.8±1.28	1510±3.48	3.03±0.81	0.847±0.11	3440±6.48	0.759±0.03
	D.W 100°C 3hr	216±4.82	3080±5.72	4.01±1.25	0.954±0.15	11100±5.75	2.57±0.86
	D.W 121°C 15min	164±1.54	2220±3.87	5.12±1.4	1.15±0.46	12000±3.12	3.39±0.57
Go heung	70% MeOH	680±6.31	2970±4.56	3.75±0.54	297±3.17	17100±10.73	4.97±0.31
	70% EtOH	664±5.79	2660±4.01	2.72±0.29	351±1.23	18500±9.84	5.46±1.59
	D.W 60°C	0.37±0.04	213±3.46	5.94±1.42	0.807±0.08	6510±6.19	7.75±2.51
	D.W 100°C 3hr	121±2.62	1130±5.18	5.66±1.57	16.1±1.27	7910±4.55	8.5±1.2
	D.W 121°C 15min	140±2.20	1090±4.22	6.96±1.73	19.1±2.61	6070±5.92	9.79±1.37

Table 5. Total indicator substance contents (final) of various extract from *Dendropanax morbifera*.

Sample name		Final calculated concentration (ng/20mg)					
		leaf			stem		
	condition	Hesperidin	Chlorogenic acid	Salicylic acid	Hesperidin	Chlorogenic acid	Salicylic acid
Je cheon	70% MeOH	576000±69.3	496500±53.25	160.5±9.6	39.15±11.55	229.5±18	3.81±1.05
	70% EtOH	541500±79.35	493500±72.75	107.85±1.8	1845±19.35	15150±53.1	8.595±2.85
	D.W 60°C	187500±34.35	243000±46.5	189±5.55	14.19±4.2	960±36.75	14.76±3.3
	D.W 100°C 3hr	297000±38.1	352500±50.55	511.5±2.25	337.5±25.8	62550±63.45	30.15±14.1
	D.W 121°C 15min	271500±33	330000±51.9	555±13.8	8.385±9.3	259.5±22.8	19.2±12
Jeju	70% MeOH	75450±47.1	687000±77.4	143.25±4.5	276±25.8	385500±50.25	16.8±6
	70% EtOH	105000±76.65	879000±94.35	204±10.5	519±52.35	345000±62.85	14.82±1.2
	D.W 60°C	4320±19.2	226500±52.2	454.5±12.15	12.705±1.65	51600±97.2	11.385±0.45
	D.W 100°C 3hr	32400±72.3	462000±85.8	601.5±18.75	14.31±2.25	166500±86.25	38.55±12.9
	D.W 121°C 15min	24600±23.1	333000±58.05	768±21	17.25±6.9	180000±46.8	50.85±8.55
Go heung	70% MeOH	102000±94.65	445500±68.4	562.5±8.1	4455±47.55	256500±160.95	74.55±4.65
	70% EtOH	99600±86.85	399000±60.6	408±4.35	5265±18.45	277500±147.6	81.9±23.85
	D.W 60°C	55.5±6	31950±51.9	891±21.3	12.105±1.2	97650±92.85	116.25±37.65
	D.W 100°C 3hr	18150±39.3	169500±77.7	849±23.55	241.5±19.05	118650±68.25	127.5±18
	D.W 121°C 15min	21000±33	163500±63.3	1044±25.95	286.5±39.15	91050±88.8	146.85±20.55

2-2. 황칠추출물과 황칠청국장의 면역증강 효과

2-2-1. 재료 및 방법

○ 추출물 제조

본 실험에 사용된 황칠줄기는 전라남도 고흥산으로 전남화순 소재의 '전남생약농업조합'으로부터 구입하여 식물체 파쇄기(USC, Seoul, Korea)로 파쇄하여 실험에 사용하였다. 황칠 줄기 200 g에 8배량의 증류수 800 mL를 가하여 60°C의 Heating mantle(EAM9203-06, M-top, Seoul, Korea)상에서 24시간 추출하였다. 추출액을 Whatman NO.2 여과지로 여과하여 Vacuum evaporator(VV2000, Heidolph, Schwabach, Germany)로 감압 진공 농축한 후 동결건조기(FD8508, Ilshin, Busan, Korea)로 건조하여 총 11.8 g의 분말을 얻어 6%의 수득율을 얻었고 냉동 보관하며 사용하였다.

○ 실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 6주령의 체중 30 g의 ICR 수컷 생쥐를 다물사이언스로부터 구입하여 온도 22±2°C, 습도 55±5%, 12시간(light-dark cycle)의 환경이 조절되는 실험동물센터에서 식이와 음용수 제한 없이 공급하면서 일주일간 적응시켜 사용하였다. 이 동물실험은 조선대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: CIACUC2017-S0018)을 받아 동물윤리 준칙에 의해 진행하였다.

○ 실험군 설정 및 시료 투여

황칠추출물의 면역활성 증진 효과를 알아보기 위하여 대조군, 황칠추출물 투여군, 청국장 투여군, 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여군으로 나누어 각 군당 5마리씩 총 30마리를 사용하였다. 대조군은 증류수를 경구 투여하였고, 황칠추출물 투여군은 황칠추출물을 250, 500, 750 mg/kg 농도로 세분하여 각각 경구 투여하였다. 청국장 투여군은 (주)장흥식품에서 청국장분말을 구입하여 Lee 등(39)의 실험을 변용하여 400 mg/kg의 농도로 증류수에 희석하여 경구 투여하였고, 황칠추출물을 첨가한 청국장 투여군은 청국장 400 mg/kg과 황칠추출물 500 mg/kg을 증류수에 혼합하여 경구 투여하였다. 모든 시료는 증류수에 10 ml/kg의 투여용량으로 희석하여 9주간 경구 투여하였다.

○ 체중 및 장기무게 측정

모든 실험동물은 시료 투여 전, 투여 시작 후, 실험 종료 시까지 매주 1회 체중을 측정하였다. 실험 종료 24시간 전에 절식시키고 마취한 후 가슴샘, 심장, 허파, 간장, 지라, 콩팥(좌우), 고환(좌우)을 절취하여 무게를 측정하고 체중에 대한 상대 장기 중량을 측정하였다.

○ 백혈구 혈액학적 측정 및 혈중 면역글로불린(Immunoglobulin, Ig) 검사

흡입 마취한 마우스에서 심장천자(heart puncture)로 혈액을 채취하여 즉시 도말하고 wright' stain 염색하여 백혈구 백분율 계산(differential white cell count; DIF test)을 하였다. 채취한 혈액의 일부는 실온에 30분간 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 IgG을 측정하였다.

○ 양적혈구에 대한 항체생산세포 측정

항원 조제 및 면역: Heparin 처리된 면양적혈구(Sheep red blood cells; SRBC, Hanil Komed, Seongnam, Korea)를 동량의 Alserver's solution(pH 6.7) 을 가하여 4°C에 보관한 후 2주 이내에 용혈반형성 세포 수 측정을 위한 항원으로 사용하였다. 사용직전에 이 SRBC를 PBS 용액(pH 7.2)으로 3회 원심분리(400 g, 5min, 4°C)하여 세척한 후 SRBC 농도가 2×10^9 cells/mL 되도록 PBS용액으로 부유하여 부유액(8×10^8 cells/mL) 200 μ L를 모든 실험동물군의 복강 내 주사하여 면역시켰다.

항체 생산세포 측정(Plaque forming cell test: PFC test): 지라세포의 PFC test는 SRBC에 대한 Geetha 등의 방법을 이용하여 실시하였다(40). 각 용량의 시료를 8일간 연속으로 복강 내 투여한 마우스에 SRBC 항원주사 후 4일 후에 무균적으로 지라를 적출하였다. Zhang 등(41)의 방법에 따라 분리한 지라세포 부유액(1×10^7 spleens cell/mL)에 항원성 20% SRBC 2 ml를 top agar medium(RPMI 1640 medium과 0.6% agarose 혼합액) 시험관에 넣고 잘 혼합한다. 이 혼합액을 RPMI 1640 배지와 1.2% agarose로 미리 만들어 놓은 bottom agar plate에 고루 부어 응고시키고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 후 30배로 희석한 Guinea pig complement를 4 mL씩 넣어 plaque형성을 유도하여 PFC/10⁶ spleen cell 수를 계수하였다.

○ 백혈구 혈액학적 측정 및 혈중 면역글로불린(Immunoglobulin, Ig) 검사

흡입 마취한 마우스에서 심장천자(heart puncture)로 혈액을 채취하여 즉시 도말하고 wright' stain 염색하여 백혈구 백분율 계산(differential white cell count; DIF test)을 하였다. 채취한 혈액의 일부는 실온에 30분간 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 IgG을 측정하였다.

○ 지라 조직검사

지라의 여포변연부의 크기 및 배중심의 형성정도를 비교하기 위해 지라 조직을 10% neutral formalin 용액(pH 7.4)에 1주 이상 충분히 고정시킨 후 흐르는 물에 24시간 수세한 후, 저농도(70%)에서 고농도(100%) alcohol 단계를 거쳐 탈수하고 xylene으로 투명화한 후 파라핀 포매기(vacuum infiltration processor EC350, Leica, Wetzlar, Germany)에서 포매하였다. 파라핀 블록은 초박절편기(rm2245, Leica, Wetzlar, Germany)로 5~6 μ m 두께의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin stain으로 염색하여 관찰하였다.

○ 통계처리

통계적 분석은 IBM SPSS Statistics software (ver. 23, IBM Co., NY, USA)를 이용하여 실험결과를 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 각 실험군의 차이는 일원배치분산분석법(one way analysis of variance, ANOVA)으로 검증 한 후, 대조군과 실험군의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 유의성을 P<0.05 수준에서 검정하였다.

2-2-2. 재료 및 방법

○ 체중 및 장기무게 변화

황칠추출물과 황칠 청국장을 투여한 9주 동안의 마우스의 체중 증가량과 장기무게를 측정한 결과는 Fig. 7, Table 6에 나타내었다.

Table 6. Organ weight of male ICR mouse fed experimental diets after 9 weeks.

Visceral organ	Control	D(mg/kg)			GC(mg/kg)	DGC(mg/kg)
		250	500	750		
Weight (g)	45.28±5.24	41.74±2.05	43±3.33	45.1±4.28	42.52±3.95	44.02±5.65
Thymus	0.04±0.02	0.03±0.01	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.02
Heart	0.22±0.03	0.21±0.02	0.20±0.02	0.18±0.01	0.19±0.01	0.20±0.02
Lung	0.23±0.01	0.23±0.01	0.22±0.02	0.22±0.01	0.23±0.03	0.24±0.01
Liver	2.53±0.50 ^{1)c}	2.29±0.12 ^{bc}	2.12±0.20 ^{abc}	2.10±0.30 ^{ab}	1.74±0.20 ^a	2.12±0.32 ^{abc}
Spleen	0.18±0.05 ^{ab}	0.23±0.03 ^b	0.17±0.03 ^a	0.18±0.03 ^{ab}	0.16±0.03 ^a	0.22±0.02 ^b
Kidney(R)	0.42±0.05 ^b	0.40±0.04 ^b	0.34±0.03 ^a	0.32±0.03 ^a	0.34±0.02 ^a	0.33±0.04 ^a
Kidney(L)	0.40± 0.03 ^b	0.39±0.04 ^b	0.32±0.03 ^a	0.31±0.04 ^a	0.34±0.03 ^a	0.34±0.04 ^a
Testis(R)	0.13±0.01	0.13±0.02	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01
Testis(L)	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.12±0.02	0.11±0.01	0.12±0.02

Control, no treatment group; D, *Dendropanax moribifera* extract; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg/days; DGC, General cheonggukjang added with *Dendropanax moribifera* extract 500 mg/kg/day. The values are means±SD for each group (n=5).

¹⁾Different letters are statistical significantly as determined by Duncan's multiple test (p<0.05).

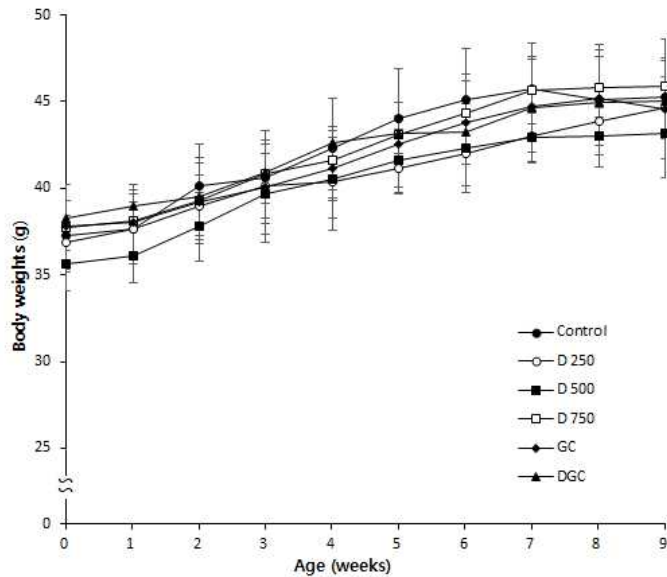


Figure 7. Changes in body weights of male ICR mouse during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks. ◻, control; ◊, *Dendropanax moribifera* extract(D) 250 mg/kg; ◼, D 500 mg/kg; ◻, D 750 mg/kg; ◈, General cheonggukjang extract 400 mg/kg (GC); ▲, GC added with D 500 mg/kg. Normal feeding was additionally used as controls. The values are means±SD for each group (n=5).

9주 동안의 체중 증가량은 대조군의 경우 8.04 ± 0.16 g이었으며 황칠추출물 250, 500 그리고 750 mg/kg을 투여군에서는 7.76 ± 0.28 , 7.56 ± 1.05 , 8.12 ± 0.28 mg/kg 증가되었다. 청국장 투여군에서는 6.72 ± 1.37 , 황칠추출물이 첨가된 청국장추출물 투여군은 6.76 ± 0.57 mg/kg로 증가되었다. 추출물 경구 투여 후 대조군과 투여군 모두 개시 체중에 비하여 체중이 증가하였으며, 황칠추출물이 첨가된 청국장추출물 투여군보다 황칠추출물 투여군의 체중 증가량이 다소 높게 나타났으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 7).

장기무게의 측정은 병리학적 측면에서 중요한 지표 자료가 될 수 있는 것으로 유의하여 살펴볼 필요가 있으며 간, 지라 및 가슴샘의 측정은 생체 내 면역 및 독성의 측정 지표로 인식

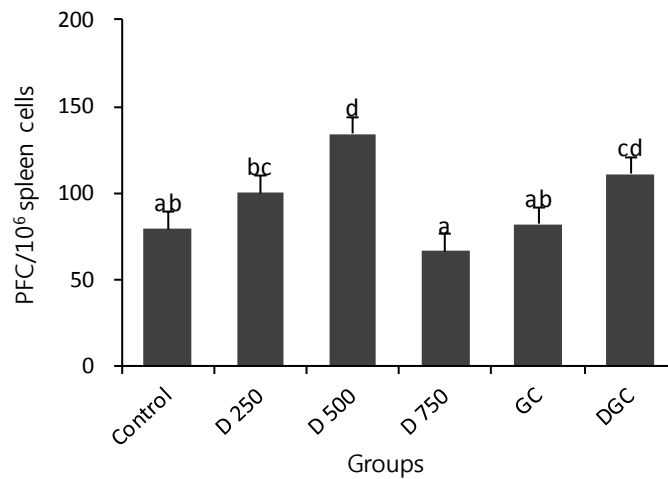


Fig. 8. Plaque-forming cell(PFC) assay by splenocytes isolated from immunized ICR mice. The mice were during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks and intraperitoneally injected with sheep red blood cells(SRBC). Four days after immunization, PFC per spleen cells was counted under a microscope. Control, no treatment group; D 250, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; D 500, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D 750, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg; DGC, General cheonggukjang added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg. The data are means±SD for each group (n=5). Value significantly different from the control (Duncan's multiple comparison test) at p<0.05.

되고 있다(42). 실험기간동안 황칠추출물이 첨가된 청국장추출물 투여군의 장기 무게를 살펴본 결과, 지라의 경우 황칠추출물 250, 500 그리고 750 mg/kg을 투여군에서는 0.23 ± 0.03 , 0.17 ± 0.03 , 0.18 ± 0.03 mg/kg으로 측정되었다(Table 6).

황칠추출물 750 mg/kg투여군에서 콩팥과 간의 무게에서 각각 0.31 ± 0.04 mg/kg, 2.10 ± 0.30 mg/kg으로 대조군과 비교하여 장기무게가 감소하게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 이러한 결과들을 통하여, 황칠과 청국장추출물들은 장기간 투여하더라도 뚜렷한 독성 증상이 나타나지 않은 시료임을 확인하였다.

○ SRBC에 대한 PFC test

황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물을 경구 투여한 마우스의 체액성 면역 활성화 여부를 측정하기 위해 PFC test를 실시하였다. 농도별 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물의 식이에 따른 PFC test를 측정한 결과, 지라세포(1×10^7 /cells)당 PFC(plaque forming cell)는 황칠추출물 250, 500 mg/kg 투여군에서 각각 100 ± 14.93 , 134 ± 16.46 으로 대조군 79 ± 12.10 에 비교하여 유의적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 8). 그러나 황칠추출물 750 mg/kg 투여군에서는 66 ± 11.68 으로 대조군보다 감소하였다. 청국장 투여군은 82 ± 14.73 으로 대조군과 비슷한 경향을 나타내었으며, 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여군은 111 ± 16.52 으로 황칠추출물 500 mg/kg을 투여한 경우보다 다소 감소하였다.

최근 천연물을 이용한 면역증진 작용을 규명하는 많은 연구가 시행되고 있다. 생강, 어성초, 대두 및 된장추출물 등을 투여한 마우스의 지라세포에서 높은 증식능을 확인하였으며 대식세포에서 분비되는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 사이토카인의 생성을 증가시키는 것으로 확인되었다(43). 황칠나무 잎의 에탄올 추출물을 인간의 B세포와 T세포에 투여하여 생육촉진을 실험한 결과 1.0 mg/ml 농도에서 세포 촉진활성을 관찰하였으며, IL-6와 TNF- α 의 발현도 모두 증가시키는 것으로 나타났다(44).

Table 7. Hematological data from white blood cell of male ICR mouse oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks.

Group	Control	D(mg/kg)			GC(mg/kg)	DGC(mg/kg)
		250	500	750		
Basophils	0.33±0.58	0.77±0.68	1±1	1±1	1.67±1.53	1.33±0.58
Eosinophils	4±2.65	2.33±2.08	3.33±1.53	4.67±1.15	3±2.65	2±1.73
Neutrophils	29.33±5.03	28.67±2.31	25.67±5.77	22.33±5.51	23±2	25±3.61
Lymphocytes	60.33±3.21 ^{1)a}	63±2 ^a	65.67±4.93 ^{ab}	73.33±5.51 ^c	70.67±2.52 ^{bc}	65.33±2.89 ^{ab}
Monocytes	6.33±2.31 ^b	2.67±1.53 ^a	1.33±2.31 ^a	2.67±1.53 ^a	4±1 ^{ab}	1.33±1.15 ^a

Control, no treatment group; D, *Dendropanax morbifera* extract; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg; DGC, General cheonggukjang 400 mg/kg added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg.

The values are means±SD for each group (n=5).

¹⁾Different letters are statistical significantly as determined by Duncan's multiple test (p<0.05).

본 연구 결과 황칠추출물 투여가 대조군에 비교하여 항체 생산 세포수가 증가하였으며 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여군의 경우 청국장 단독 투여 및 대조군에 비교하여 항체 생산 세포수가 증가하였다. 이는 황칠추출물을 투여한 마우스의 지라에서 항원으로 작용한 SRBC에 대하여 체액성 면역반응을 활성화시킨 것으로 추측되어진다. 이 같은 결과는 황칠추출물이 청국장의 기능성을 증대시킴으로 단일 및 다른 식품의 첨가제로의 활용 가능성이 있음을 시사해 준다.

○ 혈중 면역글로블린 검사

면역글로블린(Immunoglobulin, Ig)은 면역계의 주요 구성요소로 이 중 IgG는 혈액과 세포외액에 있는 주요 항체로 세균이나 진균과 같은 병원체에 대항하여 감염에 대한 방어에 관여한다(45, 46). 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물을 투여한 후 마우스의 혈청 내 IgG의 농도를 측정된 결과, 황칠추출물 500 mg/kg 투여군(1.48 ± 0.08 g/dL)이 대조군(1.58 ± 0.08 g/dL)보다는 다소 높은 함량을 나타내었다(Fig. 9).

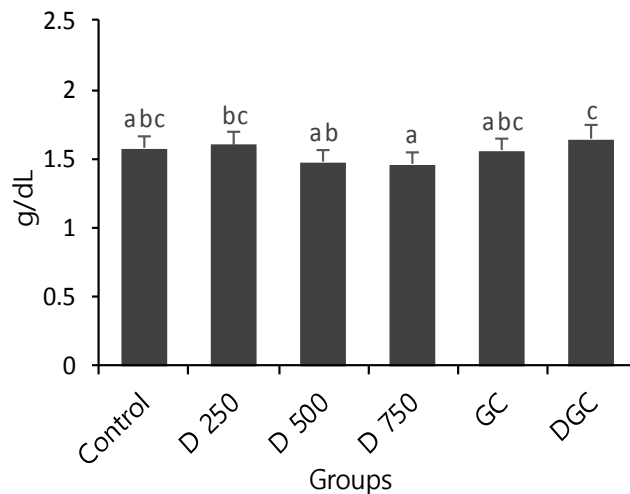


Figure 9. Comparison of immunoglobulin contents in male ICR mouse during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks. Control, no treatment group; D 250, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; D 500, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D 750, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg; DGC, GC added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg. The values are means \pm SD for each group (n=5). Different letters are statistical significantly as determined by Duncan's multiple test ($p < 0.05$).

청국장 투여군(1.56 ± 0.09 g/dL)과 비교하여 황칠추출물이 첨가된 청국장추출물 투여군은 1.64 ± 0.11 g/dL로 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 청국장 단독 투여군보다 황칠추출물이 첨가된 청국장추출물이 IgG의 활성을 증가시킴으로써 면역활성에 영향을 주는 것으로 확인하였다.

○ 백혈구 혈액학적 분석

백혈구는 다양한 항원에 대항하여 면역반응을 나타내고 손상된 조직을 복원하는데 작용하는 인체의 중요한 지표중 하나이다(47). 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여 한 후 백혈구의 변화를 측정한 결과는 Table 7에 나타내었다. 호중구(neutrophils)는 대조군과 비교하여 황칠추출물의 농도가 250, 500, 750 mg/kg으로 증가할수록 감소하였으며, 청국장과 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여군도 대조군과 비교하여 감소하였다. 림프구(lymphocytes)는 대조군($60.33 \pm 3.21\%$)에 비교하여 모든 투여군에서 모두 증가하였으며, 그 중 황칠추출물 500 mg/kg 투여군($65.67 \pm 4.93\%$)에서 높은 측정값을 나타내었다. 단핵구(monocytes)는 대조군과 비교하여 모든 추출물 투여군에서 감소하였으며, 그 중 황칠추출물 500 mg/kg 투여군과 황칠추출물을 첨가한 청국장 투여군에서 대조군에 비교하여 각각 4배 감소하였다. 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장 투여군의 호산구(eosinophils)와 호염기구(basophils)는 대조군에 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았다.

○ 지라 조직 검사

지라는 blood-borne pathogen에 대한 면역반응 조절기관으로 많은 림프조직이 모여 있으며 피막(capsule)과 지라속질(splenic pulp)로 구성되며, 속질은 다시 백색속질과 적색속질로 나누어진다(48). 대조군에서는 적색속질 사이에 하나 이상의 중심동맥을 중심으로 치밀하게 축적된 림프구가 보이며 뚜렷한 종자중심을 볼 수가 있다(Fig. 10A). 황칠추출물 700 mg/kg투여군은 대조군에 비하여 백색속질의 종자중심이 위축되고 적색속질은 림프구의 수가 감소됨이 관찰되었으며 이러한 조직의 모습은 고농도의 황칠추출물이 지라조직에 독성으로 작용한 것으로 추측되어진다(Fig. 10D). Lim 등(49)은 마우스에 가시오가피와 더덕추출물을 투여한 실험에서 추출물 투여량이 증가할수록 대조군에 비교하여 백색수질 세포의 증가가 관찰되었다. 이러한 지라조직의 변화는 추출물 투여로 인한 면역력 상승의 결과로 예측하였다. 본 실험결과에서도 황칠추출물 250, 500 mg/kg투여군과 청국장투여군, 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여군에서 백색속질의 종자중심이 증식됨을 관찰하였다(Fig. 10B, 10C, 10E). 특히 황칠추출물을 첨가한 청국장추출물 투여군의 백색속질의 증식이 강하게 관찰되었으며(Fig. 10F), 이러한 결과는 황칠추출물과 청국장 추출물이 면역작용 상승에 기인한 것으로 판단된다.

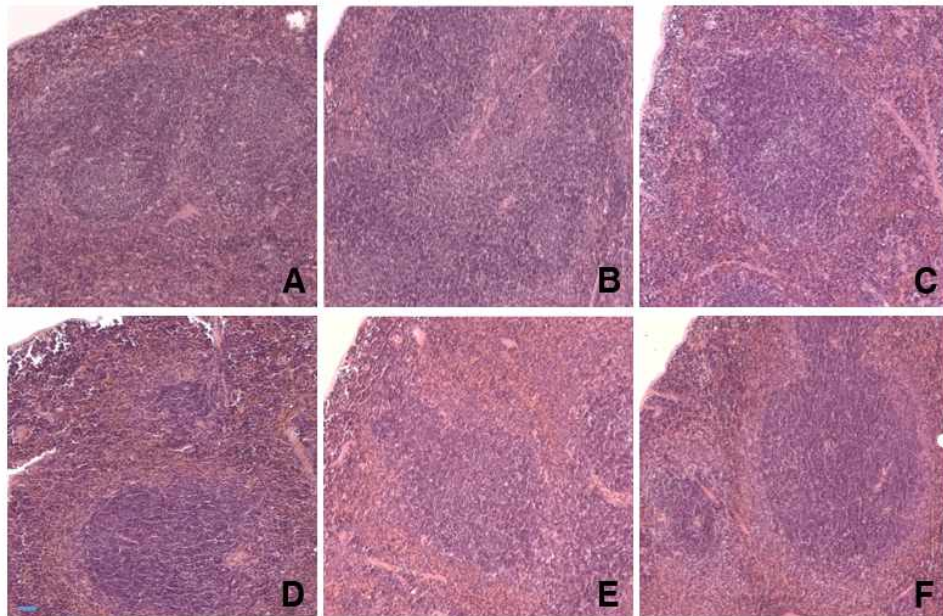


Figure 10. Light microscopic pictures of the spleen tissue male ICR mouse during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks. Histologic changes in spleen tissue were observed using H&E staining. A, Control; B, *Dendropanax morbifera* extract (D) 250 mg/kg; C, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; E, General chunggukjang 400 mg/kg (GC); F, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg + General chunggukjang 400 mg/kg (DGC). Scale bars=20 μ m.

2-3. 황칠추출물의 안전성 평가

2-3-1. 재료 및 방법

○ 소핵실험

황칠추출물의 유전 독성을 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스의 골수 세포를 이용한 소핵 관찰 실험을 하였다. 7주령 수컷 ICR 마우스를 7일간 순화시킨 후 시험물질을 멸균증류수에 용해하여 250, 500 및 750 mg/kg을 매일 1회 총 3일간 경구 투여 24시간 후 부검 후 골수 세포를 수거한다. 군 당 2,000개의 다염성 적혈구(Pormochromatic erythrocyte; PCE)를 관찰하고, 이 중 소핵 다염성 적혈구(PCE with one or more micronuclei; MNPCE)의 출현빈도를 측정한다. 동시에 정상체 적혈구(Normochromaticerythrocyte; NCE)와 다염성 적혈구를 더한 전 적혈구(PCE+NCE)에 대한 다염성 적혈구의 출현빈도를 구한 후, 소핵 다염성 적혈구의 출현빈도를 측정한다.

○ 단회 투여 독성 실험

실험동물은 7주령 ICR 마우스를 다물사이언스로부터 분양받아 6일간의 검역 및 순화과정을 거친 뒤, 체중 감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 각 군에 암수 각 5마리를 사용하여, 밤새 절식시킨 후 시료 처리하지 않은 대조군과 시험군을 1회 경구 투여한다. 투여 후 14일간 매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였으며, 투여 전, 투여 후 1, 4, 7 및 14일에 체중을 측정 후 14일 췌에 부검을 실시하고, 대사와 관련된 장기를 적출하여 병리조직학적 검사를 실시한다.

○ 13주 반복 투여 독성 실험

황칠추출물을 13주간 반복 투여 하여 황칠의 무해 용량 및 표적 장기에 미치는 영향을 확인한다. 실험동물은 각 군에 암수 각 5마리씩 Sprague-Dawley 계통의 SPF 랫드를 ㈜코아텍에서 분양받아 사용하며, 13주 동안 매일 일정량 추출물을 투여하며 매일 일반증상을 관찰하고, 체중은 입수 시, 군 분리 시, 투여 개시 시, 투여 후 주 1회, 절식 후 부검일에 각각 측정한다. 사료섭취량과 음수섭취량은 투여 개시일 및 투여 후 주 1회 측정, 투여 완료 후 일반 혈액학적 검사로 백혈구(white blood cell, WBC), 호중구(neutrophil, NE), 림프구(lymphocyte, LY), 단핵구(monocyte, MO), 호산구(eosinophil, EO) 및 호염구(basophil, BA)를 측정하고, 동시에 혈액생화학검사로 아스팔테이트 아미노 전이효소(aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 아미노 전이효소(alanine aminotransferase, ALT), 알칼라인 포스파타아제(alkalinephosphatase, ALP), 혈액요소성 질소(blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌(creatinine, CRE), 혈당(glucose, GLU), 총 콜레스테롤(total cholesterol, CHOL), 총 단백질(Total protein, TP) 등의 검사를 실시한다. 부검 후 장기를 통한 병리조직학적 검사를 실시한다.

2-3-2. 결과 및 고찰

○ 소핵실험

유전 독성 여부를 검사하는 연구 방법 중 소핵(micronucleus)시험은 시험물질을 마우스에 경구 투여하고, 24시간 후 골수를 채취하여 소핵 유발 유무를 관찰하는 *in vivo* 독성실험법의 하나이다. 소핵의 생성은 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종 분열한 후 탈핵 과정을 거쳐 미성숙 적혈구인 크기 10~15 μm 의 다염성적혈구가 되고, 이 다염성적혈구는 호산성적혈구, 망상적혈구를 거쳐 약 10시간 후 성숙 적혈구가 되어 혈관으로 가게 되는데, 핵이 있는 적혈구 상태에서 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성이 있으면 염색체가 깨져 더 이상 분화하지 못하고 파편으로 남아 다염성적혈구 내에 존재하게 된다. 이를 소핵이라 하고 소핵이 많이 관찰될수록 시험물질이 돌연변이를 유발하는 특성이 많다고 판단한다(50).

소핵시험은 특별한 육안적 이상소견은 보이지 않았으나 독성예비시험을 통하여 황칠 750 mg/kg을 최고용량으로 하고 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 3용량의 황칠군과 음성대조군을 설정하였다. 시험물질을 1일 1회 3일간 경구 투여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다.

결과의 판정은 PCE/(PCE+NCE) 비율 (Mean \pm SD)이 0.1 이상인 경우 실험이 타당한 것으로 하고, 소핵 유발빈도 (MNPCE/2000PCEs, Mean \pm S.D, %)가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

본 실험에서 설정한 용량범위에서 대조군과 비교하여 특이한 일반증상은 관찰되지 않았으며, PCE/(PCE+NCE) 비율이 0.1 이상이었으므로 실험이 적절한 조건하에서 실시되었음이 타당하다고 판단하였다. 개체 당 2,000개의 PCE에서 관찰된 소핵 유발빈도는 대조군, 황칠 250, 500, 750 mg/kg군에서 0.30 \pm 0.10, 0.28 \pm 0.18, 0.33 \pm 0.06, 0.32 \pm 0.15로 계수되어 (Table 8, Fig. 11) 시험물질에 의해 세포 독성 수치가 뚜렷하게 증가하거나 감소하는 경향이 없었으며, 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 8. Observations of micronucleus and PCE: RBC ratio.

Groups	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/PCE
Control	0.35 \pm 0.02	0.30 \pm 0.10
DM 250	0.34 \pm 0.06	0.28 \pm 0.18
DM 500	0.36 \pm 0.02	0.33 \pm 0.06
DM 750	0.55 \pm 0.04	0.32 \pm 0.15

PCE; Polychromatic erythrocyte, NCE; normochromatic erythrocyte, MNPCE; Micronucleated polychromatic erythrocyte.

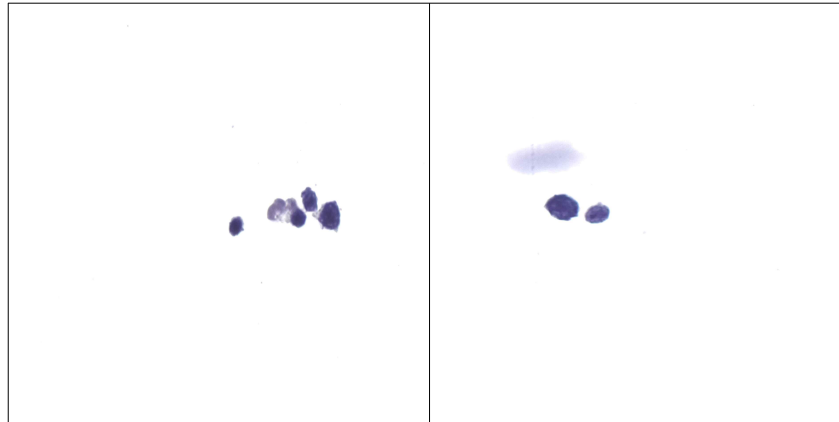


Figure 11. The presence of Polychromatic erythrocytes. Mouse bone marrow cells with Giemsa staining by optical microscopy. 1,000×.

○ 단회 투여 독성 실험

추출물의 단회 투여 독성 및 개량적인 치사량을 조사하기 위하여 ICR 계통 암·수 생쥐를 이용하여 단회 경구 투여를 하였다. 대조군과 3개의 시험군(250, 500, 750 mg/kg)에서 14일의 실험기간 동안 일반증상, 체중변화, 사망 유무, 사망동물 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다. 암·수 모든 실험군에서 특이한 일반증상 및 사망동물을 관찰되지 않았고, 경구 투여 후 14일까지의 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 9, 10).

Table 9. Body weight changes of orally one time administered with *Dendropanax morbifera* of male mice.

Groups	Days				
	0 day	1 day	3 day	7 day	13 day
Control	33.72±1.55	34.20±1.12	34.64±0.51	28.96±14.21	37.46±0.88
DM 250	33.58±1.91	34.98±1.41	35.82±1.83	36.98±2.85	38.62±3.74
DM 500	33.76±0.66	35.04±1.16	35.74±0.88	36.76±1.11	38.36±1.07
DM 750	33.80±0.64	35.34±1.28	35.46±1.29	36.52±1.12	38.36±1.14

Table 10. Body weight changes of orally one time administered with *Dendropanax morbifera* of female mice.

Groups	Days				
	0 day	1 day	3 day	7 day	13 day
Control	27.00±1.13	27.28±1.33	27.92±1.63	28.30±2.25	29.64±2.36
DM 250	26.88±1.16	26.54±1.15	26.60±0.75	27.66±0.68	29.24±1.71
DM 500	26.84±0.64	26.44±0.50	27.38±0.83	27.46±0.62	29.00±1.61
DM 750	26.80±0.74	27.00±1.08	27.84±1.32	28.88±1.21	29.38±1.17

Table 11. Effect of *Dendropanax morbifera* stem extracts on relative visceral weight of male mice.

Organs Groups	weight	Organs								
		Thymus	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney (R)	Kidney (L)	Testis (R)	Testis (L)
Control	33.66	0.04	0.16	0.19	1.52	0.12	0.31	0.31	0.11	0.11
	±1.15	±0.01	±0.01	±0.01	±0.12	±0.01	±0.03	±0.04	±0.02	±0.01
		0.13%	0.47%	0.58%	4.53%	0.35%	0.91%	0.91%	0.33%	0.32%
DM 250	35.30	0.05	0.17	0.21	1.46	0.12	0.30	0.30	0.11	0.12
	±3.64	±0.01	±0.01	±0.02	±0.18	±0.02	±0.03	±0.03	±0.02	±0.02
		0.14%	0.47%	0.59%	4.14%	0.33%	0.86%	0.85%	0.31%	0.33%
DM 500	35.38	0.03	0.17	0.22	1.64	0.14	0.35	0.36	0.13	0.11
	±0.93	±0.00	±0.00	±0.01	±0.10	±0.03	±0.02	±0.03	±0.02	±0.02
		0.09%	0.49%	0.61%	4.64%	0.39%	0.99%	1.01%	0.35%	0.31%
DM 750	34.88	0.06	0.16	0.22	1.49	0.12	0.31	0.29	0.11	0.11
	±1.21	±0.01	±0.01	±0.01	±0.05	±0.01	±0.02	±0.03	±0.02	±0.01
		0.16%	0.47%	0.63%	4.26%	0.35%	0.89%	0.84%	0.32%	0.31%

부검 결과 암·수 모든 군에서 황칠추출물로 인한 육안적 장기 변화는 관찰되지 않아 추출물이 영향을 미치지 않은 것으로 판단하였다. 장기중량에서 암·수 황칠추출물 투여군에서 추출물로 인한 영향으로 판단되는 농도 의존적 변화는 관찰되지 않았다(Table 11, 12).

혈액생화학적 검사에서 각 실험군의 혈청 분석을 실시한 결과, 수컷 황칠추출물 투여군은 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화는 나타나지 않아 간, 신장 독성은 없으며, Glucose 수치가 높아 당 함량이 많은 것으로 판단되었다. 암컷 황칠추출물 투여군에서 ALP는 농도 의존적으로 증가하고, BUN은 750 mg/kg에서 증가하는 결과가 나타나 간, 신장 독성이 있는 것으로 판단되었고, Glucose 수치는 감소하여 암컷과 수컷의 감수성이 다른 것으로 판단되었다(Table 13, 14).

Table 12. Effect of *Dendropanax morbifera* stem extracts on relative visceral weight of female mice.

Organs Groups	Weight	Thymus	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney (R)	Kidney (L)	Testis (R)	Testis (L)
Control	27.66 ±2.26	0.06 ±0.01	0.13 ±0.01	0.18 ±0.01	1.18 ±0.07	0.12 ±0.01	0.17 ±0.02	0.18 ±0.02	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00
		0.22%	0.46%	0.67%	4.25%	0.42%	0.60%	0.63%	0.05%	0.03%
DM 250	26.94 ±1.01	0.07 ±0.01	0.13 ±0.01	0.18 ±0.01	1.12 ±0.08	0.13 ±0.01	0.18 ±0.02	0.17 ±0.00	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00
		0.25%	0.49%	0.67%	4.15%	0.49%	0.65%	0.64%	0.04%	0.04%
DM 500	26.8 ±1.79	0.08 ±0.02	0.13 ±0.01	0.20 ±0.02	1.09 ±0.10	0.12 ±0.02	0.18 ±0.02	0.17 ±0.01	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00
		0.28%	0.47%	0.73%	4.08%	0.45%	0.67%	0.64%	0.04%	0.04%
DM 750	27.56 ±1.68	0.08 ±0.01	0.12 ±0.00	0.20 ±0.01	1.13 ±0.07	0.11 ±0.01	0.18 ±0.01	0.17 ±0.01	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00
		0.28%	0.43%	0.72%	4.10%	0.40%	0.64%	0.62%	0.04%	0.03%

Table 13. Serum biochemical values of male mice in orally one time administered *Dendropanax morbifera*.

	ALP (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TC (mg/dL)	Cre (mg/dL)	GLU (mg/dL)	TP (g/dL)	BUN (mg/dL)
Control	75.25 ±4.57	27.20 ±2.49	95.40 ±33.92	174.75 ±35.31	0.14 ±0.05	88.00 ±33.54	4.90 ±0.14	28.60 ±3.58
DM 250	83.60 ±15.92	25.80 ±5.36	69.00 ±9.67	147.00 ±36.72	0.06 ±0.03	108.20 ±30.10	4.38 ±0.16	24.00 ±3.00
DM 500	61.00 ±8.80	24.60 ±4.72	78.00 ±20.89	139.40 ±36.71	0.01 ±0.04	113.60 ±26.26	4.36 ±0.55	21.80 ±2.59
DM 750	82.20 ±11.30	24.80 ±2.39	86.40 ±24.74	161.00 ±13.82	0.05 ±0.02	106.40 ±36.95	4.58 ±0.22	23.20 ±2.77

병리조직학적 검사에 의한 암컷과 수컷의 간조직은 control군은 간소엽의 중앙에 위치한 중심정맥을 중심으로 간세포들이 굴모세혈관 양쪽으로 부챗살모양으로 뻗어있다. 중심정맥은 둥근모양을 형성하고 있다. 황칠 200, 500, 750 mg/kg군에서는 중심정맥이 둥글고 부챗살모양으로 간세포들이 배열되어 있으며, 굴모세혈관 주변으로 내피세포와 별큰포식세포가 관찰되었으나 대조군과 비교하여 차이는 보이지 않았다(Fig. 12A, Fig. 13A).

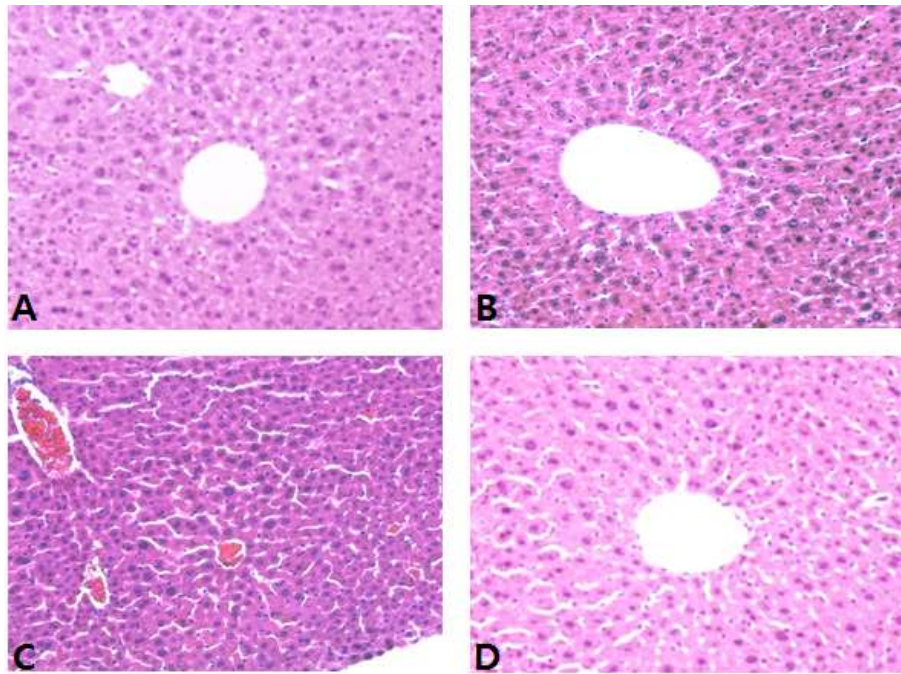
콩팥은 척추 양쪽 복막 뒤 장기로 대사 노폐물의 배출, 항상성 유지, 호르몬 분비기능을 가지고 있다. control군은 모세혈관으로 구성된 토리와 토리의 주변을 감싸고 있는 토리주머니는 일정한 간격으로 구분되며 먼쪽급습세관과 접하고 있는 치밀반점이 뚜렷하게 구분되어 관찰되었다. 토리쪽급습세관은 속공간으로 향한 미세용모들이 술가장자리를 형성하기 때문에 붉게 관찰되며 먼쪽급습세관은 미세용모가 관찰되지않아 가장자리가 깨끗하여 넓은 속공간을 확인할 수 있었다.

황칠 250, 500, 750 mg/kg군은 암컷과 수컷 모두 콩팥소체를 구성하는 토리와 토리주머니 모두 일정한 간격 유지를 하며 정상적으로 관찰되었다. 토리쪽급습세관은 술가장자리 때문에 붉고 좁은 속공간이 관찰되었으며 먼쪽급습세뇨관은 토리급습세뇨관에 비해 밝고 넓은 속공간이 관찰되었다(Fig. 12B, Fig. 13B). 이는 Cho 등의 실험(51)에서 전통음료를 먹이는 실험군에서 정상군과 유사한 특징을 나타나 본 실험과 일치하였다. 따라서 황칠추출물의 단회투여 시에는 간과 신장에 영향을 주지 않는 것으로 판단하였다.

Table 14. Serum biochemical values of female mice in orally one time administered *Dendropanax morbifera*.

	ALP (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TC (mg/dL)	Cre (mg/dL)	GLU (mg/dL)	TP (g/dL)	BUN (mg/dL)
Control	81.80 ±9.78	66.20 ±27.01	150.80 ±52.88	111.40 ±26.00	0.07 ±0.05	120.40 ±29.90	4.48 ±0.68	22.00 ±3.54
DM 250	83.00 ±9.82	27.60 ±2.79	102.00 ±12.94	88.80 ±12.99	0.11 ±0.04	110.20 ±21.51	4.30 ±0.31	24.20 ±4.21
DM 500	111.60 ±15.14	63.00 ±40.89	170.40 ±83.81	109.40 ±11.80	0.17 ±0.03	98.80 ±32.74	5.10 ±0.22	24.20 ±3.63
DM 750	115.80 ±20.97	41.60 ±10.74	133.20 ±21.68	111.00 ±15.31	0.19 ±0.06	78.80 ±22.57	5.10 ±0.10	28.20 ±4.60

(A)



(B)

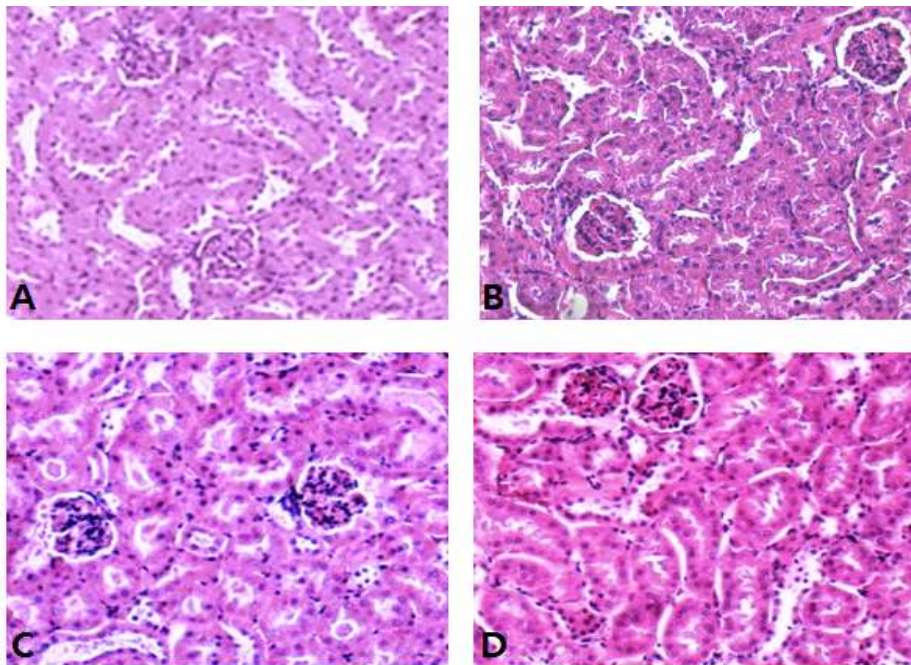
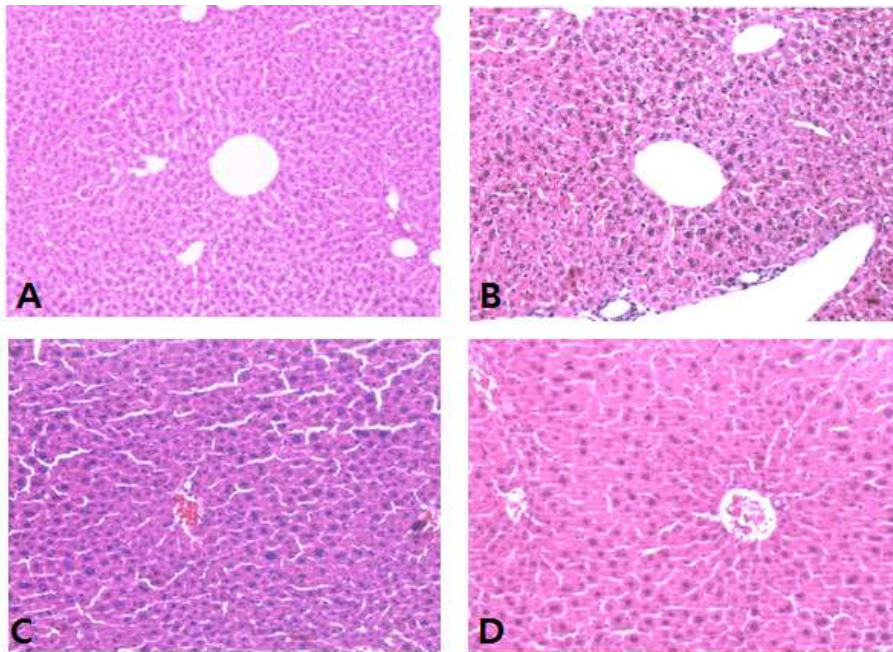


Figure 12. Light microscopic pictures($\times 200$) of hepatic cell(A) and renal cell(B) in male ICR mouse during orally one time administration treated with *Dendropanax morbifera*. Histologic changes in hepatic cell were observed using H&E staining.

A, Control; B, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; C, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg D, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg.

(A)



(B)

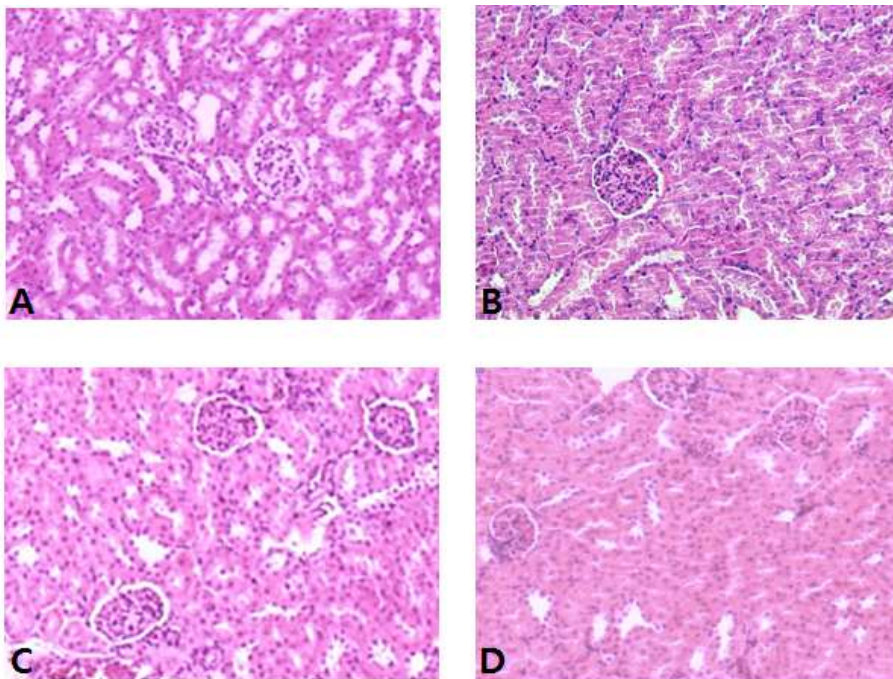


Figure 13. Light microscopic pictures($\times 200$) of hepatic cell(A) and renal cell(B) in female ICR mouse during orally one time administration treated with *Dendropanax morbifera*. Histologic changes in hepatic cell were observed using H&E staining.

A, Control; B, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; C, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg.

○ 13주 반복 투여 독성 실험

황칠추출물의 13주 반복 경구 투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 SD 계통 수컷 랫드를 이용하여 황칠추출물 용량을 750 mg/kg을 최고용량으로 하고 250, 500 mg/kg의 3용량의 황칠군과 음성대조군, 청국장 400 mg/kg, 청국장(400 mg/kg)-황칠(500 mg/kg) 동시투여 군으로 설정하였다.

Table 15. Effect of *Dendropanax morbiferus* stem extracts on relative visceral weight.

Groups Organs	Control	<i>Dendropanax morbiferus</i>			<i>Cheonggukjang</i>	Ch400+D
		250	500	750	400	M500
Thymus	0.42	0.32	0.34	0.32	0.35	0.27
	±0.16	±0.06	±0.08	±0.11	±0.07	±0.04
	0.10%	0.08%	0.09%	0.08%	0.09%	0.07%
Heart	1.40	1.35	1.39	1.38	1.3706	1.28
	±0.11	±0.19	±0.13	±0.17	±0.13	±0.05
	0.34%	0.34%	0.35%	0.34%	0.34%	0.34%
Lung	1.75	1.56	1.62	1.66	1.75	1.54
	±0.26	±0.10	±0.14	±0.15	±0.15	±0.03
	0.43%	0.39%	0.41%	0.41%	0.43%	0.41%
Liver	10.38	10.74	10.25	10.57	12.06	9.75
	±0.79	±0.77	±1.17	±1.00	±2.77	±0.43
	2.56%	2.69%	2.59%	2.64%	2.98%	2.57%
Spleen	0.71	0.73	0.77	0.76	0.82	0.69
	±0.05	±0.13	±0.10	±0.07	±0.11	±0.05
	0.17%	0.18%	0.20%	0.19%	0.20%	0.18%
Kidney(R)	1.25	1.27	1.31	1.28	1.37	1.25
	±0.09	±0.08	±0.14	±0.14	±0.17	±0.05
	0.31%	0.32%	0.33%	0.32%	0.34%	0.33%
Kidney(L)	1.26	1.25	1.33	1.30	1.38	1.23
	±0.08	±0.08	±0.21	±0.16	±0.14	±0.06
	0.31%	0.31%	0.34%	0.32%	0.34%	0.32%
Testis(R)	2.07	2.00	2.08	2.09	2.0946	2.03
	±0.08	±0.13	±0.09	±0.09	±0.08	±0.10
	0.51%	0.50%	0.53%	0.52%	0.52%	0.54%
Testis(L)	2.00	2.03	2.04	2.07	2.10	2.03
	±0.15	±0.08	±0.13	±0.10	±0.04	±0.11
	0.49%	0.51%	0.52%	0.51%	0.52%	0.54%

대조군과 5개의 실험군에서 13주의 실험기간 동안 행동 및 이상 징후, 체중변화, 사망 유무, 사망동물 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다. 암컷과 수컷 모든 실험군에서 대조군과 비교했을 때 특이한 행동, 이상 징후 또는 사망동물은 관찰되지 않았고, 투여군 모두에서 13주까지의 체중변화는 관찰되지 않았다.

부검 결과 모든 실험군에서 황칠추출물로 인한 육안적 장기 변화는 관찰되지 않아 추출물이 영향을 미치지 않은 것으로 판단하였다. 장기중량에서 황칠추출물 투여군에서 추출물로 인한 영향으로 판단되는 농도 의존적 변화는 관찰되지 않았다(Table 15). 혈액생화학적 검사에서 각 실험군의 혈청 분석을 실시한 결과, 황칠추출물 투여군은 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화는 나타나지 않았으며(Table 16), 혈액 내 추출물 농도에 따른 백혈구 종류별 계측치는 유의적 차이는 나타나지 않았다(Table 17).

Table 16. Serum biochemical values of female mice in orally 13 weeks administered *Dendropanax morbifera*.

	ALP	ALT	AST	Cholesterol	Creatinine	Glucose	Total Protein	BUN
Control	72.6 ±8.02	41.4 ±8.35	94.2 ±14.20	85.6 ±6.66	0.35 ±0.02	137.6 ±18.84	4.86 ±0.23	20.4 ±2.07
DM 250	72.4 ±14.98	49 ±18.75	94.6 ±26.65	75.4 ±9.34	0.36 ±0.07	185.4 ±72.58	4.82 ±0.15	21.2 ±1.10
DM 500	72.8 ±5.63	46.6 ±7.83	87.2 ±19.87	78.6 ±7.02	0.33 ±0.05	125.4 ±32.07	4.96 ±0.26	22.8 ±0.84
DM 750	67.6 ±11.67	42.6 ±3.21	83 ±3.94	73 ±10.84	0.33 ±0.06	146.2 ±39.63	4.76 ±0.13	22.4 ±4.56
Ch 400	69.2 ±10.62	60 ±20.71	87.6 ±23.81	82.4 ±12.46	0.41 ±0.13	133.4 ±18.88	5.06 ±0.09	21.2 ±1.64
Ch400 + DM500	74.2 ±15.42	40.8 ±6.65	76.4 ±13.92	72 ±17.92	0.27 ±0.05	136.2 ±26.14	4.66 ±0.54	21 ±2.12

Table 17. Hematological values of rats in the 13 weeks oral repeated toxicity study.

	WBC	Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil
Control	7.46±2.11	12.60±4.11	83.54±5.11	2.52±1.23	1.18±0.42	0.16±0.05
DM 250	5.43±1.23	10.96±1.93	83.50±2.54	3.88±2.21	1.62±0.83	0.04±0.09
DM 500	5.23±1.57	12.30±1.74	82.76±3.65	3.70±2.32	1.24±0.40	0.00±0.00
DM 750	5.03±1.40	9.64±2.96	86.36±2.66	2.78±1.24	1.10±0.57	0.12±0.13
Ch 400	6.61±1.65	8.04±1.29	79.98±6.65	10.18±6.28	1.68±0.67	0.12±0.08
Ch400+ DM500	5.13±0.67	11.92±5.28	82.30±4.82	3.88±1.92	1.82±0.83	0.08±0.11

13주간의 반복투여에 의한 간장의 조직학적 관찰 결과 Control 군은 중심정맥을 중심으로 하여 부챗살모양을 뿔어있는 간세포와 간세포 사이로 뿔은 굴모세혈관이 관찰되었다.

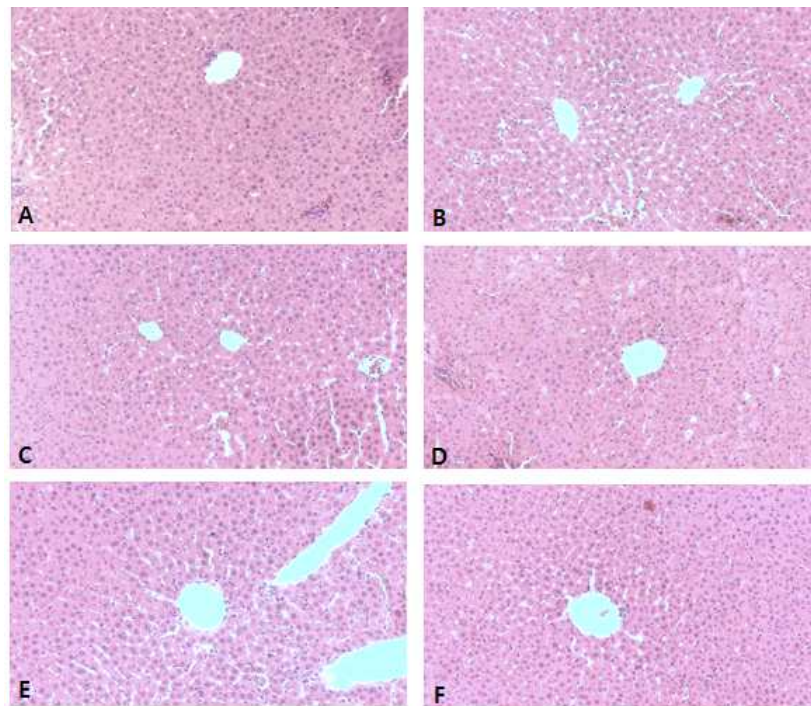
DM 250, 500, Ch 400, Ch 400+DM 500의 중심정맥은 둥근모양으로 정상적이 모습이 관찰되었다. 굴모세혈관 사이로 내피세포들과 별큰포식세포가 관찰되었다(Fig. 14A). DM 750군에서는 중심정맥은 둥근모양을 갖추고 있었으나 간세포의 팽창으로 불규칙하며 굴모세혈관 관찰이 힘들었다. 간소엽의 가장자리에는 간세포 괴사로 인하여 섬유화가 진행되어 간세포의 공변성 변성이 나타나 간손상을 확인할 수 있었다.

Lee 등(52)의 급성 납 투여한 흰쥐 실험에서 납 단독투여군의 간세포에서 세포들의 낮은 염색성과 세포들의 불규칙한 배열과 괴사가 관찰되어 본 연구의 황칠750군과 유사하여 간손상을 확인할 수 있었다. 식품첨가물로 황칠을 사용할 때는 섭취량과 섭취기간을 고려해야 할 것으로 판단되었다.

콩팥의 조직학적 관찰에서 Control 군은 콩팥소체를 형성하는 토리와 토리주머니는 일정한 간격으로 둥근모양을 유지하고 있으며 토리쪽굽슬세관은 속공간으로 뿔은 술가장자리로 인하여 붉고 좁은 속공간을 나타내고, 먼쪽굽슬세뇨관은 넓은 속공간을 관찰하였다. DM 250, 500, Ch 400, Ch 400+DM 500군은 콩팥소체와 세뇨관에서 정상적인 구조로 토리와

토리주머니가 일정한 간격과 둥근모양을 유지하였고 토리주머니 바깥막은 편평상피의 구조로 핵 부분만 튀어오른 정상적 구조가 관찰되었다. DM 750 군에서는 일부의 토리에서 응축되는 모습이 관찰되었고 토리쪽굽슬세뇨관에서 세포가 팽창되었다(Fig. 14B). Chung and Cheong(53)의 실험에서 4주 낚 단독군은 부분적인 토리변성과 토리쪽굽슬세뇨관의 속공간이 팽대되어 속공간 쪽으로 뺀 슬가장자리가 보이지 않아 본 연구의 황칠 750군과 유사하였다. 간장과 신장을 통한 황칠추출물의 독성 및 안전성을 관찰한 결과 안전성을 가진 최고 농도는 500 mg/kg으로 판단된다.

(A)



(B)

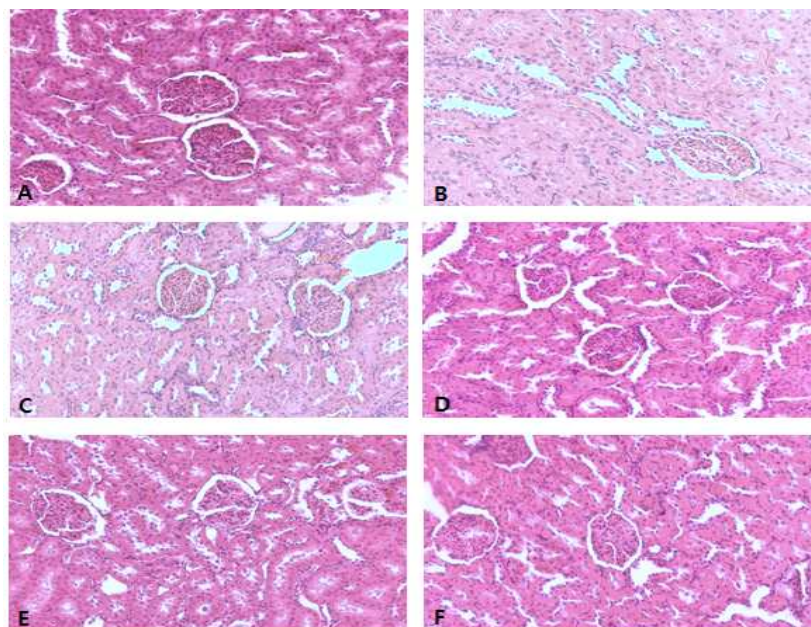


Figure 14. Light microscopic pictures($\times 200$) of hepatic cell(A) and renal cell(B) in male ICR mouse during oral administration treated with D, GC and DGC for 13 weeks. Histologic changes in spleen tissue were observed using H&E staining.

A, Control; B, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; C, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; E, General Chunggukjang 400 mg/kg; F, General Chunggukjang 400 mg/kg + *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg.

2-4. 연구 성과

2-4-1. “황칠추출물의 표준화 자료집” 제작

- 기타: 농업법인(주)장흥식품에 이전된 표준화 자료집 발간



2-4-2. 장흥 황칠청국장 시제품 제작



<본 개발 기술을 통해 얻어진 결과를 통하여 개발된 장흥 황칠 청국장 시제품 사진>

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

세부연구목표	가중치 (%)	평가 착안점
황칠추출물의 추출 조건 확립	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황칠나무 시료 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 산지별: 제주, 고흥, 제천 - 부위별: 줄기 잎 ○ 추출조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 용매별: 에탄올, 메탄올, 열수 - 온도별: 121℃, 100℃, 60℃ - 추출시간: 24h, 3h, 15min ○ 추출조건에 따른 항산화 검정 <ul style="list-style-type: none"> - SOD활성 - APX활성 - CAT활성
황칠추출물의 지표물질 확립	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ LC-MS/MS 분석법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - Hesperidin 정량 - Chlorogenic acid 정량 - Salicylic acid 정량
마우스를 통한 황칠추출물의 면역활성 효능 검정	30	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출물 투여 후 면역활성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 체중 및 장기무게 변화 - 혈중 면역글로블린 검사 - 백혈구 혈액학적 분석 - 지라 조직 검사
황칠추출물의 안전성 검증	30	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식약청 가이드라인에 따른 동물 실험 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 단독투여 및 13주 반복 투여 독성검사 - 소핵검사 - 혈액학적 분석 - 조직의 병리학적 검사

3-2. 목표 달성 여부

연구목표	연구개발 수행 내용	달성도(%)
황칠추출물의 추출 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 제주, 고흥, 제천의 3곳을 최종적으로 선발하여 잎과 줄기로 분리하여 70% 에탄올, 70% 메탄올, 1열수 3가지 조건 선택(121℃/15min, 100℃/3h, 60℃/24h)조건을 확립함. - 총 30가지의 추출조건을 대상으로 항산화 활성 실험을 시행함(SOD, APX, CAT) 	100
황칠추출물의 지표물질 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ LC/MS/MS(AB SCIEX 4000 Q-Trap 질량분석기, Shimadzu LC 20A System)를 이용하여 정량 분석을 실시함. - Hesperidin 정량, Chlorogenic acid 정량, Salicylic acid 정량 	100
마우스를 통한 황칠추출물의 면역활성 효능 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최종 선발된 고흥산 황칠줄기 200 g에 8배량의 증류수 800 mL를 가해 60℃의 Heating mantle(EAM9203-06, M-top, 한국)상에서 24시간 추출 후 시행함. - 황칠 추출물을 250 mg/kg, 500 mg/kg, 750 mg/kg 농도로 세분하여 각각 경구 투여. 청국장군은 청국장 400 mg/kg, 청국장 400 mg/kg과 황칠추출물 500 mg/kg을 혼합하여 총 5개군을 9주 후 장기무게 및 지라 조직 검사를 시행함. - SRBC 항원을 통하여 양적혈구에 대한 항체생산 세포를 측정하였으며 9주 후의 백혈구 혈액학적 측정 및 혈중 면역 조절 및 면역글로불린검사를 통하여 추출물의 면역활성 효능을 검정함. 	100
황칠추출물의 안전성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식약청 가이드라인에 따라 조선대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: CIACUC2017-S0018)을 받은 후 동물실험 수행함. - 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 마우스의 골수세포를 이용한 소핵 실험을 실시함. - 시험동물은 7주령 SD 랫드를 사용하여 단회투여 독성검사를 실시함. - 추출물을 13주간 반복투여 하여 추출물의 무해 용량 및 장기에 미치는 영향을 확인함. 	100

3-3. 관련분야 기여도

3-3-1. 기술적 측면

- 황칠로부터 건강기능성식품 원료(면역)기능성 성분을 추출하는 공정 기술 개발.
- 장흥식품의 다양한 제품개발에 활용가능.
- 질환 예방 및 치료용 활성 평가 model 확립 및 작용기전 규명을 통한 건강기능식품, 약용식품 (Pharmafood) 및 nutraceutical food 개발을 위한 산업기반기술 구축.
- 면역력 향상 식품 신소재 발굴로 성인병의 효율적인 예방, 관리 및 국민보건증진에 기여.

3-3-2. 경제적·산업적 측면

- 면역력 향상 기능성소재 개발로 인한 국내 건강기능성식품 소재 산업의 활성화.
- 국내 농산물의 고부가가치화를 통한 농가수익증대 및 수출을 통한 지역경제 활성화 및 선진국으로부터 역수출에 따른 시장지배방지 및 세계시장에 경쟁적 참여가능.
- 지속적인 국내 농산물의 수요에 따른 안정적인 농가의 소득 창출 및 고부가가치 신산업으로의 육성 가능.

3-3-3. 개발기술의 산업화 및 기대효과

- 현재 본 연구에서 건강기능식품 개발을 목표로 하여 개발하고자하는 물질은 국내 자생 및 농가 재배 중인 황칠과 콩의 추출 및 발효물질이므로 원료 수급이 용이하다는 장점이 있고 또한 전통적으로 사용하였다는 점에서 안전성이 검증된 물질로 볼 수 있음.
- 서구화 식습관에 따른 면역 및 만성질환 관련 기능성 시장 확보-서구화 식습관에 따른 청소년 및 성인 비만의 증가와 노령화에 따른 만성질환의 급속한 확대로 면역기능 향상 제품 등 새로운 식품의 영역으로 부각
- 면역기능 증진을 통한 건강한 생활을 위한 건강기능성식품 개발 촉진
- 안전하고 복합기능을 가지는 건강기능성 식품-본 연구에서 개발하고자하는 제품은 오래 전부터 식용 및 약용으로 사용되어왔다는 점에서 안전하고 또한 효능까지 검증되었다고 판단되고 또한 복합 기능을 가진 개별인정을 취득한 건강기능성 식품으로 그 수요가 높을 것으로 기대됨.

-산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	0	50	230	350	430	1,060
경제적 파급효과	0.5	10	20	30	50	70
부가가치 창출액	0.5	10	20	30	50	70
합 계	1	70	270	410	530	1,200

1) 직접 경제효과

본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

2) 경제적 파급효과

본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

3) 부가가치 창출액

본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

4. 연구개발성과의 활용 계획 등

4-1. 활용

4-1-1.

- 본 연구과제 수행을 통해 1건의 국내 특허를 출원할 예정으로 향후 황칠 청국장 개발에 관하여 특허를 등록시킴으로 참여기관인 농업법인(주)장흥식물에게 우선적으로 이전할 계획임.

4-1-2. 학술지 게재

- 본 과제로부터 얻어진 연구 내용들을 SCI급 및 국내학술논문지에 투고하여 출판함으로써 본 연구 성과를 국내외에 공유하고 홍보함.

4-1-3. 산업체 활용 및 실용화

- 과제의 성과물로 제작된 “장흥황칠 청국장”은 균일한 황칠의 포함과 안전성 검증 및 효능이 확인된 제품으로 산업화 할 수 있는 시설 및 준비를 완료하여 제품 시장에 진출할 수 있도록 한다. 또한 황칠을 첨가한 다양한 건강 음료 및 발효식품의 상품으로 응용 개발하여 상품화 한다.
- 황칠의 기능성 부분의 섭취량 함량과 표기는 식약처의 가이드라인에 따라 안전성이 확보된 황칠추출물의 전통 발효 식품 사용
-확대 품목군: 추출즙, 마른잎 차에서 장류나 발효식품 및 주류 등으로의 활용
- 황칠의 식품사용은 현장기술주요가 높은 기술로 생산단계의 1차 산업에 머물러 있던 황칠 산업이 발효 및 가공 식품 등 3차 산업으로의 활용
- 약재시장이거나 민간유통에 머물러 있던 황칠 재배 농가의 판매처를 확대하여 식품공장, 제약회사 등의 의약 소재로 활용
- 황칠의 활용을 다양화 하고 기능성이 첨부된 청국장을 개발함으로써 발효식품에 대한 수요층을 양성화 하여 국민들의 황칠과 청국장에 대한 이미지 제고
- 제품개발과 제조과정에 있어 제한적 식품원료인 황칠의 사용에 관한 제반 사항은 식약청과의 문의와 확인을 통하여 실시

4-1-4. 추가 기술 개발

- 황칠의 면역 기능성이 강화된 황칠청국장 개발을 시도하여 시제품을 제작하였으나 청국장의 특유 냄새와 쓴 맛으로 인하여 소비자의 기대에 미치지 못함으로 추후 발효과정을

개선하고 소비자들의 기호도 검사 및 마케팅 전략이 중요함.

- 실험결과 황칠의 농도별 면역활성을 실험한 결과 500 mg/kg 이상에서는 마우스에서 독성의 결과가 나타나바 정확한 복용과 활용에 대한 추가 실험이 진행된다면 이는 업체의 판매 증가와 농가 소득 증대로 이어질 것으로 판단된다.

4-2. 추진 계획

4-2-1.

		(2018년) 개발 종료 후 1년	(2019년) 개발 종료 후 2년	(2020년) 개발 종료 후 3년
내	시장점유율(%)	-	-	-
	판매량(단위: 거래처 수)	03	05	08
	판매단가(원)	10,000	10,000	12,000
	국내매출액(백만원)	200	280	350
해 외	시장점유율(%)	-	-	-
	판매량(단위: 거래처 수)	01	03	05
	판매단가(\$)	15	17	17
	해외매출액(\$)	15,000	20,000	25,000
당사 생산능력		4 ton	6 ton	8 ton

4-2-2. 투자계획

(: 백만원)

항목		(2018년) 개발 종료 후 1년	(2019년) 개발 종료 후 2년	(2020년) 개발 종료 후 3년
매출원가1)		100	150	200
판매관리비2)		50	70	100
자본적 지출	토지	-	-	-
	건물/구축물	-	-	-
	기계장치등	50	50	50
자본적지출 합계		50	50	50

○참여기업 -농업회사법인주식회사 장흥식품

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 전통 청국장, 분말 청국장, 건조 콩알 청국장 ○ 수요처 : 주부 및 일반 ○ 예상 단가 : 10,000원~12,000원 ○ 개발 투입인력 및 기간 <ul style="list-style-type: none"> - 개발 투입 인력 : ~70M/M - 개발 투입 기간 : ~15개월 (2017년~2018년)
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전통식품 제조 및 판매 전문 기업 ○ 자체 원료 생산 및 가공, 판매
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시제품 개발 완료 및 현장 적용 : 2017년 ○ 단가 절감 및 상품화 작업 완료 : 2018년 ○ 판매 개시 : 2018년

4-2-3. 전략

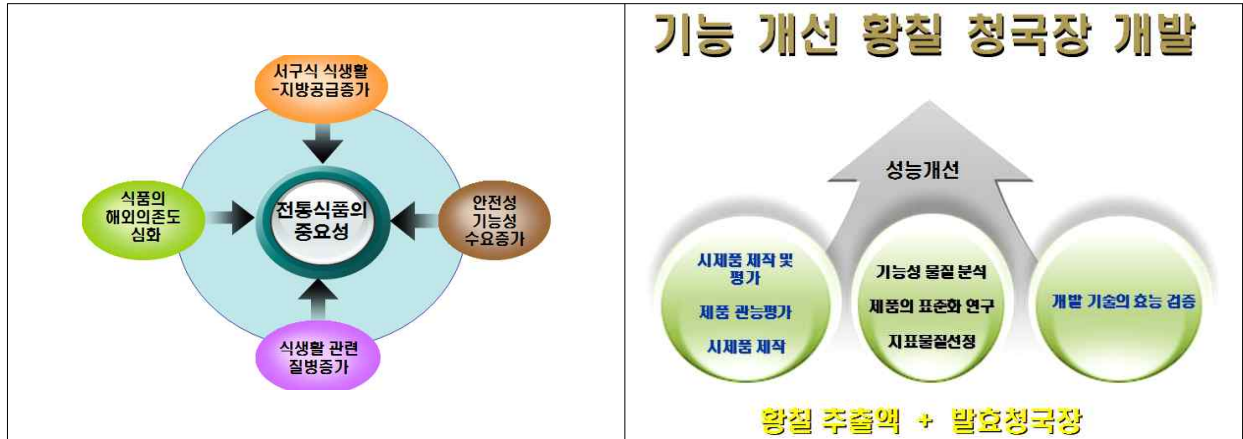
- 국내 유통 채널 다변화를 통한 유통 활성화 및 상품 차별화 (홈쇼핑 적극 활용)
- 국내 대형 마트, 백화점 행사와 박람회 등의 참가로 기업 이미지 제고
- 지적 재산권 강화를 통한 기업 경쟁력 강화 및 수익 극대화 추구



사업화 비즈니스 모델

-BM 수립 배경

:전통 식품 활성화로 인한 국민 건강 증진의 필요성



- BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- ① 우리 전통 발효식품인 청국장의 기능성 향상을 통한 변신으로 현대감각과 미각의 변신을 꾀하여 국민건강 식품수요 증가에 부응
- ② 청국장과 황칠을 결합한 기능성 식품개발로 황칠의 소비촉진을 이끌고 안정적 판로 모색 및 지역 경제 활성화
- ③ 장흥 지역에서 자생하는 생약재인 황칠을 청국장과 결합한 새로운 제품을 개발, 지역 특산물화 하여 안정적 일자리 제공

(2) 핵심경쟁요인

- ① 황칠 이용 제품들이 출시되고 있으나 건조형 청국장은 일반화 되어 있지 않음
- ② 일반 제품 들은 황칠추출액에 혼용하여 제품생산을 하고 있는 관행이나 이는 흡수부 이용 효율이 떨어져 기능성이 약한 현실임
- ③ 황칠의 기능성흡수와 청국장의 기능성흡수의 조화를 이루기 위해 타 첨가제를 사용하지 않은 차별화된 100%순수 융복합 황칠청국장을 개발 상품화를 시도
- ④ 건조분말 및 콩알 청국장 상품화로 생청국장의 유통변질 문제를 해결하고 보관이 용이한 제품으로 탈바꿈

-목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황

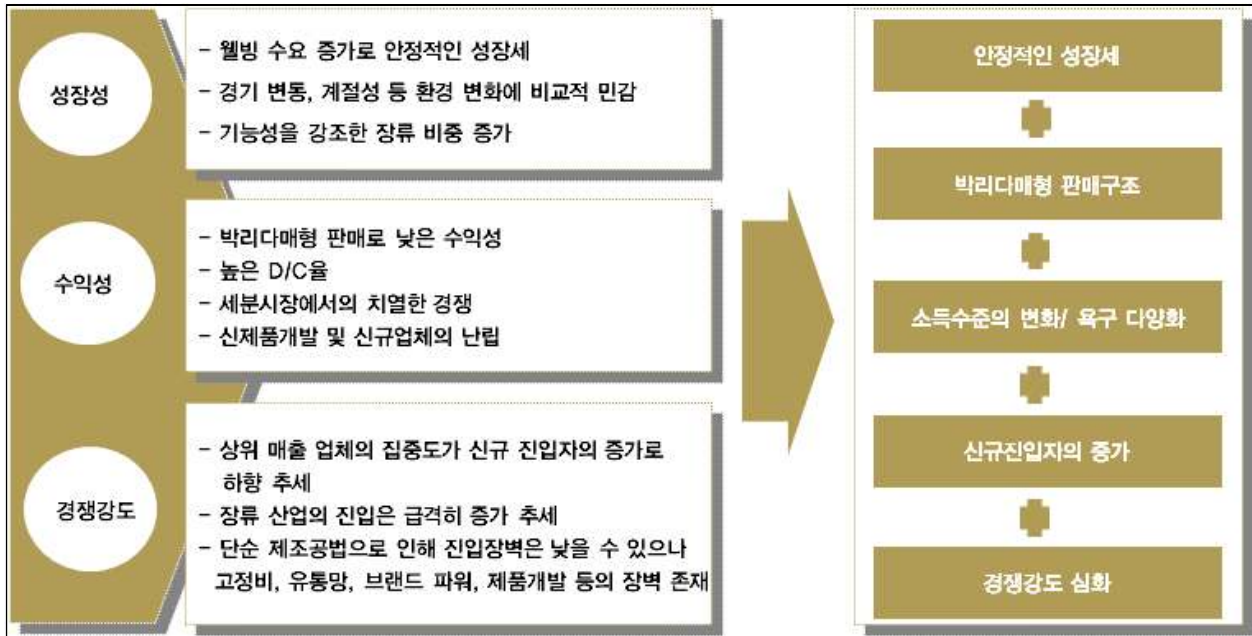
- 기순도 전통장

회사명	농업회사법인(주)고려전통식품
주소지	전라남도 담양군 창평면 유천길 154-15
브랜드	기순도 전통장
판매제품	
수상 및 인증 실적	

- 죽장연

회사명	죽 장 연 (주)
주소지	(본사) 경상북도 포항시 남구 언덕로 14 (공장) 경상북도 포항시 북구 죽장면 상사리 445-1
브랜드	죽 장 연
판매제품	
마케팅 방법	<p>↓ TV 홈쇼핑 판매</p>  <p>↓ PPL (케이볼 푸드TV)</p>  <p>↓ 전국 이마트 매장</p>  <p>← 대한민국 우수문화상품 선정</p>

(나) 경쟁 구조 및 시장 진입 장벽



-수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

지리적 변수	수도권	내륙지역	해외		
인구적 변수 (연령, 성별)	10대	20대	30대	40대	50대 이상
	여성				남성
심리적 변수 (라이프스타일)	건강	자연적	Biz	도시적	

지리적 변수	<ul style="list-style-type: none"> • 경제 시장이 크고 소득 수준이 높아 진입경로가 다양한 수도권 가장 큰 시장 • 내륙지역은 (광주/전남 등) 인접시장으로 지역 축제/박람회장/판촉 행사와 연계 • 진입 장벽이 높은 해외 수출 시장은 국내 시장 안정화 이후 시도
인구적 변수	<ul style="list-style-type: none"> • 기본 소비력 확보하고 건강 및 웰빙 테마로 기능성 식품을 선호하는 40대 이상 주력 소비층 형성 전망 • 장류 제품 주요 구매자인 동시에 이용자인 40대 이상 여성이 시장을 주도
심리적 변수	<ul style="list-style-type: none"> • 자연 친화적 라이프 스타일, 가족 건강 기능성 등 건강 관리에 신경 쓰는 웰빙족, 로하스족이 장류 소비시장 주도

BM의 수익창출 방안

- SOWT 분석 결과

내부 역량 / 외부 환경		강점(Strengths)	약점(Weaknesses)
		<ul style="list-style-type: none"> - 제품 품질의 고급화 - 친환경 국내산 원료 사용 - 사회적 기업으로서 다양한 사회공헌활동 - 직원들의 높은 회사에 대한 충성도 	<ul style="list-style-type: none"> - 자체 브랜드 파워 및 마케팅 역량 미흡 - 제품 유통을 위한 오프라인 판매점 부족 (지속적인 유통망 확충 필요) - 품질 관리 등 전문 인력 필요
기회(Opportunity)	<ul style="list-style-type: none"> - 가능성 장류 식품에 대한 선호도 증가 - 산학 협력 R&D 지원 확대 - 장류 식품의 다양한 효능과 중요성 언론 보도 - 온라인 유통 판매 시장 활성화 - 사회적 기업에 대한 정책적 지원 - 정부의 적극적인 6차 산업화 정책 	<ul style="list-style-type: none"> - 산학협력을 통한 신제품 개발 - 친환경 원료 사용을 부각한 홍보 추진 - 사회공헌활동 등 사회적 기업으로서 행하는 것들에 대한 적극적 홍보 - 정기적인 체험 행사 및 교육을 통한 차별화 마케팅 추진 (6차 산업화) 	<ul style="list-style-type: none"> - 온라인 고객 관리 체계 확립 - 에이전트를 통한 판로 확대 - 제품 생산 능력 강화 - 온/오프라인 동시 판매망 확보
위협(Threat)	<ul style="list-style-type: none"> - 가능성 장류 식품에 대한 소수업체의 허위 및 불량 제품 판매에 따른 언론의 부정적 보도에 타격 - 가공에 따른 인증 획득 및 규제 강화 - 소규모 업체의 Me Too 상품 개발 - 업계간의 경쟁 심화 	<ul style="list-style-type: none"> - 체험행사 및 교육을 통한 차별화 마케팅 추진 - 고급 브랜드 이미지의 적극적인 홍보를 통해 긍정적 언론 보도 추진 - 차별화 된 가능성 프리미엄 제품 출시 	<ul style="list-style-type: none"> - 신제품 개발 및 자체 판매점 홍보를 통한 제품 인지도 및 기업 이미지 제고 - HACCP 인증 획득을 통한 체계적인 위생관리체계확립과 기업 브랜드 가치 향상 - 전자 상거래 시스템 활용을 통한 매출 - 강화 및 원가절감 노력의 생활화

- 마케팅 전략



[마케팅 전략]

가격

- 국산원료, 전통적 생산 제품에 대해 소비자 80~90%가 수용 가능한 가격 수준
- 청국장 500g : 5,000원 ~ 7,000원
- 적정가격 초과시 제품 차별성 전달할 수 있는 가격이외 전략 필요

유통

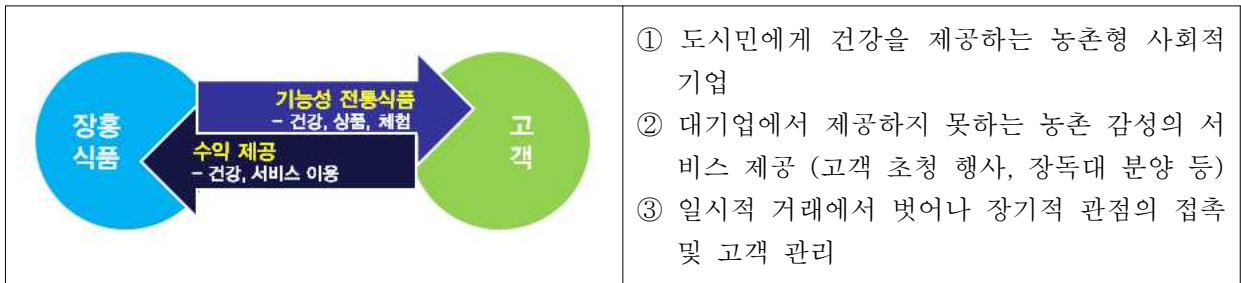
- 전통식품 판매처 농협매장, 백화점, 대형 유통업체, 친환경 유통업체 등 신뢰도 높고 고품질 선택 용이한 곳 선호
- 향후 친환경전문매장, 백화점 웰빙코너 등 건강식품 관련 고품질 식품매장 이용 증가 전망

제품개발

- 속성 평가, 연령·성별 섭취수준, 전략방향 등을 고려
- 명품화와 원료차별화 중점 추진, 차별성을 전달 할 수 있는 표시 인증제도 개선과 홍보·교육 확대 필요

[마케팅 방향]

- 수익 유형



- 수익 유형 분석

상 품	가 격	판매 수익	비 고
제품 판매 (고추장, 된장, 청국장, 간장)	고추장 1kg 40,000원	20,000원	- 제조원가 계상
	된장 30,000원	20,000원	
	청국장 500g 15,000원	8,000원	
	간장 380ml 8,000원	5,000원	
체험 상품 판매 (된장 학교, 장독대 분양)	-	-	-

- 경제적 효과

구 분	사업화 년도			
	2017년 (개발종료 해당년)	2018년 (개발종료 후 1년)	2019년 (개발종료 후 2년)	
사업화 제품	황칠 청국장			
투자계획(백만원)	15	15	20	
판매 계획 (백만원)	내 수	20	20	35
	수 출	5	10	15
	계	25	30	50
수입대체효과(백만원) (해당시)	-	-	-	
고용 창출(명)	3	3	3	

붙임.

참고문헌

1. Kim JS, Kim JG, Kim WJ. 2004. Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean J Food Sci Technol* 36: 294-298.
2. Kim JI, Kang MJ, Kwon TW. 2003. Antidiabetic effect of soybean and cheonggukjang. *Korea Soybean Digest* 20: 44-52.
3. Lee JH, Nam SH, Seo WT, Yun HD, Hong SY, Kim MK, Cho KM. 2012. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chemistry* 131: 1347-1354.
4. Hwang SH, Chung HS, Kim SD, Youn KS. 2004. Effect of *Glycyrrhizia uralensis* extract addition on the quality of cheonggukjang. *J East Asian Soc Dietary Life* 14: 571-575.
5. Heo S, Lee SK, Joo HK. 1998. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional cheonggukjang. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 41: 119-124.
6. Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. 2000. Production and separation of anti-hypertensive peptide during cheonggukjang fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 43: 247-252.
7. Sohn BH, Song YJ, Oh KH. 2008. Fibrinolytic activity and characterization of *Bacillus licheniformis* HK-12 isolated from cheonggukjang. *Korean J Biotech Bioeng* 23: 251-256.
8. Hong JY, Kim EJ, Shin SR, Kim TW, Lee IJ, Yoon KY. 2008. Physicochemical properties of cheonggukjang containing korean red ginseng and *Rubus coreanum*. *Korean J Food Preserv* 15: 872-877.
9. Lee SH, Kim JH. 2013. Fermentation and quality characteristics of cheonggukjang

- with addition of dropwort (*Oenanthe javanica* D.C.) powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1133-1138.
10. Kim MH, Kim SH, Cho HS, Park BH. 2016. Quality characteristics of cheonggukjang added with peanut (*Arachis hypogaea* L.) powder. *Korean J Food Preserv* 23: 488-494.
 11. Lee JJ, Kim AR, Chang HC, Lee MY. 2009. Antioxydative effects of chungkukjang preparation by adding solar salt. *Korean J Food Preserv* 16: 238-245.
 12. Jung YK, Lee YK, No HK, Kim SD. 2006. Effect of sea tangle on fermentation and quality characteristics of cheonggukjang. *Korean J Food Preserv* 13: 95-101.
 13. Lee MJ, Lee YG, Cho JI, Na KC, Hwang MS, Moon JH. 2014. Preparation of cheonggukjang added onion (*Allium cepa* L.) and its antioxidative activity. *Korean J Food Preserv* 21: 46-54.
 14. Lee KA, Jang JO, Yoon HK, Kim MS. 2007. Antithrombotic activities of cheongkookjang and cheongkookjang fermented with green tea or mugwort. *Kor J Microbiol* 43: 298-303.
 15. Hong SC, Kwon DJ. 2011. Changes in quality characteristics of cheonggukjang added with Deodeok. *Korean J Food Preserv* 18: 171-177.
 16. Park JS, Na HS. 2011. Properties of cheonggukjang tablet prepared with medicinal herb extracts. *Korean J Food Preserv* 18: 149-155.
 17. Chung JM, Kim SH, Kim SS. 1998. Population structure and emergence and growth dynamics of seedling and spatial distribution of *Dendropanax morbifera* LEV(Araliaceae). *Korean J Plant Res* 11: 345-352.
 18. Lim KP, Kim YS, Chung WY. 1997. Studies on the development of traditional korean Golden varnish (Hwangchil) (I)-anatomical characteristics and chemical composition of wood and exudates of Hwangchil-namu (*Dendropanax morbifera*). *J Korean Wood Sci Technol* 25: 24-28.
 19. Jung BS, Cho JS, Pyo BS, Hwang B. 1995. Studies on the distribution of

- Dendropanax morbifera* and component analysis of the Golden lacquer. *Korean J Biotechnol Bioeng* 10: 393-400.
20. Park SA, Park J, Park CI, Jie YJ, Hwang YC, Kim YH, Jeon SH, Lee HM, Ha JH, Kim KJ, Park SN. 2013. Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Korean J Microbiol Biotechnol* 41: 407-415.
21. Kim DG. 2012. Dendropanax tree extract for 12 weeks having drunk non-alcoholic fatty liver (NAFLD) effects of obesity college students. *Korea Entertainment Industry Association* 6: 142-146.
22. Chung IM, Kim MY, Park WH, Moon HI. 2009. Antiatherogenic activity of *Dendropanax morbifera* essential oil in rats. *Pharmaize* 64: 547-549.
23. Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. 2002. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 109-115.
24. Park BY, Min BS, Sei-Ryang Oh SR, Kim JH, Kim TJ, Kim DH, Bae KH, Lee HK. 2004. Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax morbifera*. *J Ethnopharmacology* 90: 403-408.
25. Moon CG. 2007. Antioxidant activity of *Dendropanax morbifera* Lev. Inje University, Gimhae, Korea.
26. Hyun TK, Kim MO, Lee H, Kim Y, Kim E, Kim JS. 2013. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveille. *Food Chem* 141: 1947-1955.
- .
27. Im KJ, Jang SB, Yoo DY. 2015. Anti-cancer effects of *Dendropanax Morbifera* extract in MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *J Korean Obstet Gynecol* 28: 26-39.
28. Yu HY. 2012. Anti-cancer and Anti-inflammatory activities of natural compounds isolated from Hyul-Tong-Ryung and *Dendropanax morbifera*. Dong-A University, Busan, Korea.

29. Shin JM. 2014. Efficacy test of *Dendropanax morbifera* on gastritis animal models. Wonkwang University, Jeonbuk, Korea.
30. Hyun TK, Ko YJ, Kim EH, Chung IM, Kim JS. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Industrial Crops and Products* 74: 263–270.
31. Moon HI. 2011. Antidiabetic effects dendropanaxide from leaves of *Dendropanax morbifera* leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* 30: 870–875.
32. Jo YB, Lee JH. 2016. A study on the effect of the *Dendropanax Mobifera* extract on Anti-Hypertensive. *J Korea Academia-Industrial cooperation Society* 17: 708–715.
33. Min JW. 2015. The Effect of *Textoria morbifera* extract on the central nervous system. Wonkwang University, Jeonbuk, Korea.
34. Bradford MM. 2015. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
35. Beauchamp C, Fridovich J. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276–287.
36. Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol* 22: 867–880.
37. Aebi HE. 1983. Catalase: in methodes of enzymatic analyses(Bergmeyer, H.U. ed.). *Verlag Chemie. Weinheim* 3: 273–282.
38. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365–369.
39. Lee KA, Jang JO, Yoon HK, Kim MS. 2007. Antithrombotic activities of Cheongkookjang and Cheongkookjang fermented with green tea or mugwort. *Korean J Microbiology* 43: 298–303.

40. Geetha BS, Latha PG, Mangalam SN, Remani P. 2017. In vivo approaches to investigate the immune response of plant-based anti tumour drug, *Elephantopus scaber* L. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics* 2: 1011.
41. Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q, Jin JO. 2014. Ascophyllan purified from *Ascophyllum nodosum* induces Th1 and Tc1 immune responses by promoting dendritic cell maturation. *Mar Drugs* 12: 4148-4164.
42. Lim JS. 2004. Effect of immune function on the fermentation of Kimchi intake to append *Acanthopanax cortex* extract in Balb/c mice. *Journal of Hyehwa Medicine* 12: 1-9.
43. Kim J, Ryu HS, Shin JH, Kim HS. 2005. *In vitro* and *Ex vivo* supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 167-175.
44. Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. 2002. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 109-115.
45. Park SH, Kim MJ, Kim GE, Park SY, Kim KBWR, Kim YJ, Cho YJ, Ahn DH. 2017. Immuno-enhancing effect of enzymatic extract of *Sargassum coreanum* using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46: 919-928.
46. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. 2010. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19985-19990.
47. Atala A, Irvine DJ, Moses M, Shaunak S. 2010. Wound healing versus regeneration: role of the tissue environment in regenerative medicine. *MRS Bull* 35: 597-606.
48. KABLSP. 2017. *Histology*. 6th ed. Korean medical publishing company, Seoul, Korea. p254-255.
49. Lim SD, Seong KS, Kim KS, Han DU. 2007. Effects of fermented milk with hot water extract from *Acanthopanax senticosus* and *Codonopsis lanceolata* on the

- immune status of mouse. *Korean J Food Sci Technol* 39: 323-329.
50. Hong SG, Chung SG, Hyun SH. 2008. The micronucleus test of the diglyceride preparation with conjugated linoleic acid by using mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 853-857.
51. Cho SY, Kim MJ, Lee MK, Park EM, Jang JY, Choi JM, Kim DJ. 2004. Effect of korean traditional tea materials on minerals content and histological changes in Pb-Administered rats. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 33: 311-317.
52. Lee HH, Chung MJ, Huh J, Song SY, Boo HO. 2009. Effects of *Momordica Charantia* L. water extracts on the rat liver and kidney with acute toxicated by lead. *J Micro* 39: 355-363.
53. Chung KA, Cheong MJ. 2016. Effects of *Viburnum erosum* ethanol extract on the liver, kidneys of lead administered mice. *J Kor Aca Indus coope Soc* 17: 207-214.

[별첨]

자체평가의견서

1.

				D-15	
			과제번호	116150-1	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	농림식품 융복합			과제구분	단위
사업명	농식품 창업·벤처 지원 R&D 바우처 시범사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	면역력 강화 황칠청국장 개발을 위한 황칠의 원료 표준화 연구			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	조선대학교산학협력단			연구책임자	이현화
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016. 12.05- 2017.12.04	80,000	20,000	100,000
	계	1년	80,000	20,000	100,000
참여기업	농업법인(주)장흥식품				
상대국				상대국연구기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018년 1월 15일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
조선대학교 생명과학과	부교수	이현화

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	확약합니다.
-----	--------

I. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

- 황칠의 원료 표준화: 황칠 산지별(제주, 고흥, 제천), 부위별(잎, 줄기)의 추출방법에 따른 수율, 지표 물질의 함량변화, 기능성 변화 등의 함량 조사를 통한 표준화를 완성하였으며, 동물실험을 통한 황칠 추출물과 황칠 청국장의 면역 증강효과 규명함.
- 이러한 결과를 바탕으로 시제품 개발과 안전성평가를 완료함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 황칠의 기능성과 안전성을 과학적으로 검증함으로써 소비자들의 신뢰도를 높여 면역력향상 기능성 신제품 개발이 가능

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 본 연구를 통하여 획득한 황칠의 원료 표준화 및 효능 검증 연구 개발 내용은 업체의 제품 개발에 소요되는 비용절감효과 뿐만 아니라, 상품화가 용이하여 다양한 형태의 기능성식품으로의 적용이 가능함.
- 지역의 원료 대량생산 / 대량수매 체제 확보 (콩, 황칠)
- 약용천연물 소재의 건강지향, 건강기능식품 및 음료 레시피 개발 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

- 본 과제는 참여기관인 (주)장흥식품업체의 애로사항을 기반으로 선정되어진 과제로 지속적인 업체와의 소통을 통해 성공적으로 연구과제를 완료하여 시제품이 생산됨

5. 공개발표 된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (보통)

- 표준화 자료집 발간
- 실험결과를 바탕으로 한“황칠추출물을 첨가한 청국장이 마우스의 면역기능에 미치는 효과” 논문을 한국식품영양과학회지에 투고

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
황칠추출물의 추출 조건 확립	20	100	열수추출조건 확립
황칠추출물의 지표물질 확립	20	100	Hesperidin, chlorogenic acid 선정
마우스를 통한 황칠추출물의 면역활성 효능 검증	30	100	식약청 가이드라인에 따른 동물실험 수행
황칠추출물의 안전성 확인	30	100	마우스를 통한 단기, 장기투여를 통한 추출물의 안전성 확인
합계	100점	100%	

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

- 농업회사법인 (주)장흥식품에서는 면역력 향상을 위한 기능성 황칠 청국장을 개발하고자 하여 황칠 추출물에 대한 원료 표준화와 안전성 평가를 실시함.
- 황칠추출물에 대한 면역활성 효능검증과 안전성평가를 성공적으로 수행을 바탕으로 시제품을 생산함으로써 업체의 고용창출과 생산성 증대에 기여함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 해당사항없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 황칠로부터 건강기능성식품 원료(면역)기능성 성분을 추출하는 공정 기술 개발 활용가능.
- 장흥식품의 다양한 제품개발에 활용가능.
- 안전성이 확보된 황칠추출물의 전통 발효식품 사용허용

IV. 보안성 검토

-

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.