

316025-05

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)
농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003561-01

활용한 융복합 스타 제품 개발
국내산 버섯(동충하초)산업화원천기술

국내산 버섯 (동충하초) 산업화
원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발

2021

2021. 6. 15.

농림식품기술기획평가관
농림축산식품부

주관연구기관 / 동아제약(주)
협동연구기관 / 가톨릭관동대학교
협동연구기관 / 주식회사바이오텍에스알에스
협동연구기관 / 주식회사 머쉬텍

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 버섯 (동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발”(개발기간 : 2016. 05. 19 ~ 2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 6. 8.

주관연구기관명 : 동아제약(주)

(대표자) 최 호 진



협동연구기관명 : (주)바이오텍에스알에스

(대표자) 윤 영 훈



협동연구기관명 : 가톨릭관동대학교 산학협력단

(대표자) 김 병 운



협동연구기관명 : (주)머쉬텍

(대표자) 손 명 자



주관연구책임자 : 권 용 삼

협동연구책임자 : 윤 영 훈

협동연구책임자 : 성 기 호

협동연구책임자 : 성 재 모

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316025-5	해 당 단 계 연 구 기 간	5	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	국내산 버섯(동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발			
	세부 과제명	세부1 동충하초를 활용한 수출전략형 면역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발 협동1 동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건 강기능 식품 개발 협동2 동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발 협동3 동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산시스템 개발			
연구책임자	권용삼	해당단계 참여연구원 수	총: 17 명 내부: 17 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발 비	정부: 335,000 천원 민간: 111,700 천원 계: 446,700 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 32 명 내부: 32 명 외부: 0 명	총 연구개발 비	정부: 1,580,000 천원 민간: 526,800 천원 계: 2,106,800 천원
연구기관명 및 소속부서명	동아제약 (학술임상연구팀) 가톨릭 관동대학교 (주)바이오텍에스알에스 (주)머쉬텍			참여기업명 동아제약(주), (주)바이오텍에스알 에스, (주)마쉬텍	
국제공동연구	상대국명: 해당없음			상대국 연구기관명: 해당없음	
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자: 해당없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반, 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음
-------------------------	---

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	14	7									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

1. 동충하초 여성갱년기 기능성 연구: 특허 출원완료
2. 동충하초 에스트로젠 수용체 작용기전 연구 : 작용기전 논문
투고 완료,
3. 여성갱년기 증상 개선 인체적용시험 : 6주 시점 유효성 확인
4. 노랑다발 동충하초 In vivo 여드름 개선 유효성 연구
5. 노랑다발 동충하초 여드름 피부 적합성 인체적용시험 완료(코
로나로 기능성 인체적용시험 기관 확보불가)
6. 일반 화장품 개발 : 여드름용 클렌징 화장품 3종 출시
7. 일반건강기능식품 개발 : 간건강 건강기능식품 (간박사)
8. 동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및
소재 발굴
9. 머쉬텍 스토리텔링 구축 연구 : 동충하초 마케팅 자료 확보를
통한 마케팅자료 지원 (동아제약 B2B 사업, 일본 동충하초 수
출(기리시마주조)
10. 동충하초 재배 최적화 연구 : 동충하초 지표성분 함량 극대
화 및 생산성 향상

보고서 면수

54 ~ 64p

65 ~ 76p

78 ~ 93p

108 ~ 110p

111 ~ 122p

125 ~ 126p

127 ~ 127p

128 ~ 166p

167 ~ 173p

174 ~ 191p

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ol style="list-style-type: none"> 건강기능성 인증을 바탕으로 한 제품 개발 및 출시 <ul style="list-style-type: none"> 동충하초 여성갱년기 건강기능식품 노랑다발 동충하초 여드름 기능성 화장품 일반건강기능식품 및 가공품 개발 원료 원산지 판별기술 개발 및 가공표준화 동충하초 소재개발을 다학제적으로 구축하여 국제화 추진 동충하초 원료 생산공정 표준화 및 최적화 (지표성분 함량 극대화) <ul style="list-style-type: none"> 동충하초 재배환경 및 조건 최적화를 통한 지표성분 함량 극대화로 산업적 경쟁력 강화, 생산성 강화 				
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ol style="list-style-type: none"> 건강기능성 인증을 바탕으로 한 제품 개발 및 출시 <ul style="list-style-type: none"> 면역력 강화 기능을 바탕으로 한 동충하초 추출물 B2B 제품화 : 자연모아 ‘면역원’출시, 추출물 원료 매출 1.84억원 여성갱년기 증상개선 기능성 관련 특허 출원 및 시제품 제작 여성갱년기 증상개선 관련 인체적용시험 완료(6주 시점 유효성 확인) 노랑다발 동충하초 여드름 개선 유효성 확인 및 화장품 인체적용 시험 완료(적합성 인체적용시험) 일반 건강기능식품 개발 : 간건강 건강기능식품(간박사) 화장품 개발 : 여드름용 클렌징 화장품 3종 출시 원료 원산지 판별기술 개발 및 가공 표준화 <ul style="list-style-type: none"> 생물주권 확립을 위한 유전체 기반 품종 판별 기술 개발 및 가공품 개발을 위한 원료 지표 성분 표준화 동충하초 소재개발을 다학제적으로 구축하여 국제화 추진 <ul style="list-style-type: none"> 동충하초 스토리텔링을 바탕으로 한 마케팅자료 구축을 통해 일본 동충하초 수출(일본 기리시마 주조 에 수출) 15억 달성 동충하초 스토리텔링을 바탕으로 한 마케팅자료 구축을 통한 동충하초 추출물 면역력 개선 원료 B2B사업을 통한 매출 1.84억 달성 동충하초 원료 생산공정 표준화 및 최적화 (지표성분 함량 극대화) <ul style="list-style-type: none"> 동충하초 재배환경 및 조건 최적화를 통한 지표성분 함량 극대화로 산업적 경쟁력 강화, 생산성 강화 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 연구성과 활용 계획 <ul style="list-style-type: none"> 여성갱년기 추가 임상 검토 여드름 개선 기능성 화장품 인체적용시험 추가 진행 노랑다발 동충하초 및 퐁퐁이 동충하초 추가 기능성 연구 및 의약품을 위한 효력 평가 진행 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	동충하초	여성갱년기	여드름	노랑다발 동충하초	
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<i>Cordyceps militaris</i>	postmenopausal	Acne	<i>Cordyceps bassiana</i>	

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<제목 차례>

1. 연구개발 과제의 개요	6
1-1. 연구개발 필요성	6
1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황	8
1-3. 연구개발의 중요성	24
1-4. 선행연구 내용 및 결과	37
2. 연구수행 내용 및 결과	43
2-1. 1세부 (동아제약(주))	43
2-2. 1협동 (주) 바이오텍에스알에스	95
2-3. 2협동 가톨릭관동대학교	128
2-4. 3협동 (주)머쉬텍	167
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	192
3-1. 목표	192
3-2. 평가 방법	192
3-3 연차별 성과 목표 및 달성도	192
3-4. 연구성과	196
3-5. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	198
4. 연구결과의 활용 계획 등	199
4-1 여성갱년기 인체적용시험 결과	199
4-2 여드름 개선 기능성 화장품	199
4-3 노랑다발 동충하초 및 풍뎅이 동충하초 소재 개발 연구	199

1. 연구개발 과제의 개요

1-1. 연구개발 필요성

버섯을 대표하는 품목으로 산업화를 촉진하여 버섯소비를 진작하고 국내 및 국제 기능성 인증에 의한 제품화와 브랜드 개발을 목적으로 버섯 대표품목을 동충하초로 선정

버섯유래 국내 개별인정형 기능성 원료는 3품목 6건으로 등록된 점은 버섯 기능성 연구개발이 미흡한 수준에 머물러 있음. 특히 국내에서 생산하는 품목의 자실체로 개별인증형 기능성인증을 받은 원료는 동충하초 주정 추출물과 금사상황버섯 단 2건에 불과함

《국내 버섯 기능성 원료 인증 현황 진단》

- 표고버섯균사체의 경우 일본의 아미노업 주식회사의 대표제품인 AHCC 즉 표고버섯에서 추출한 활성화 당류 화합물로 국내에서는 일본 수입 표고균사체 AHCC로 기능성 원료로 인증받음
- 2011년 동충하초 균사체의 발효 추출물로 지구력 증진 기능은 중국에서 수입된 박쥐나방동충하초 (*Ophiocordyceps sinensis*)에서 추출한 것으로 인증 받았으나 분리균인 *Paecilomyces hepiali* cs-4는 박쥐나방동충하초균이 아닐 것으로 추정됨
- 상황버섯 품목의 경우 금사상황버섯이라는 명칭으로 면역 능력 증진에 도움을 주는 인증을 받음
- 2013년도 7월에 밀리타리스 동충하초 주정추출물을 가지고 동아제약(주)에서 면역 증진에 도움을 주는 동충일기 제품을 출시하였고, 생리활성기능 2등급으로 기능성원료 인정받음

《연구개발 대상 품목 선정》

동충하초 : 버섯의 대표기능성인 면역기능개선 국내 개별인정형 기능성 인증을 받았으며 타 개별인정형 기능성 획득에 의한 다기능성 전략과 국내기능성 인증을 바탕으로 한 국제기능성 인증이 가능하고 국내산 농업생산자의 자실체를 사용할 수 있음. 특히 신규기능성 인증의 다기능성 획득과 제품화를 동시에 추진할 수 있음

《동충하초 활용 연구개발 대상 건강기능성 선정》

면역기능개선: 동충하초 면역기능개선 국내기능성 인증을 바탕으로 한 국제기능성 인증 필요 (미국 NDI 인증)
 피로개선: 동충하초의 기능성 다각화를 위해 피로개선 국내기능성 인증을 바탕으로 한 국제기능성 인증 (일본 보건용 식품 인증) 필요
 운동수행능력개선: 동충하초를 기반으로 한 운동수행능력개선용 국내기능성 인증. 차후 연관기능성인 피로회복과 면역기능개선 소재개발에 활용될 수 있게 함

동충하초 수출전략형 세계 명품 제품화를 위해서는 농업생산자와 후방산업 (가공품 및 식품 산업 등)의 유기적인 연계와 인문학적 스토리텔링, 브랜드 개발, 판별 및 과학적 효능 검증을 포괄하는 융복합 연구 필요

한국을 대표하는 국제적인 건강기능성 식품인 인삼은 중국 보건식품 국제기능성 인증을 지니고 국내에 체계화된 재배시스템이 구축되어 있으며 국내 품종을 보호할 수 있는 판별마커 개발이 타 품목보다 잘 이루어져 있음. 이에 인삼을 벤치마킹해 버섯 융복합 연구를 추진할 필요가 있음

국제적인 건강기능성 인증은 인삼과 백수오로 한정되어 있고 국내와 국제기능성 인증으로 시장이 확대되는 경우에 원자재 수급 방향과 판별 문제를 고려해서 병행해서 추진해야 할 필요가 있음을 최근의 백수오 사태에서 알 수 있음

특히, 백수오의 경우 1) 건강기능성 인증, 2) 농업의 후방 산업에 의한 제품화, 3) 판별과 과학적 효능 검정, 4) 생산단지구축의 및 명품화의 융복합 연구 4대 분야 중 수요확대에 의한 체계적인 생산단지 미구축과 판별로 인해 일어난 것으로 추정됨

2011년 식품의약품안전처 기준 버섯의 건강기능성 식품 전체 매출은 15억으로 인삼 및 홍삼의 가공품 국내 매출 약 7,000억원에 비해 현저하게 적음

이에 버섯 산업의 소비진작을 위해대표품목으로 동충하초를 선정하고 융복합 연구 추진 4대 분야를 병행해 추진할 필요가 있음

구분	핵심기술별 융복합 중점추진 방향			
	건강기능성 인증	농업의 후방산업에 의한 제품화후방 산업	판별과 과학적 효능 검정	생산단지 구축 및 명품화
동충하	- 국내 면역기	- 면역기능개선	- 동충하초	- 대량생산시스템

초 현황	능개선 인증	‘동충일기’ - 다양한 가공품이 만들어지고 있으나 판매 부진 - 브랜드와 스토리텔링 전략을 지닌 홍보 전략 필요	판별마커 구축 - 원재료 표준화 완료 - 면역기능 개선 임상효과 확인 - 국내산 동충하초 동물실험 연구 미비	구축 - 품종보호권 획득 - 중국, 일본, 한국에 재배특허 확보 - 소비 촉진을 위한 홍보 전략 필요
동충하초 융복합 추진방 향	- 국제 (미국) 건강기능성 인증 - 국내 피로개선 건강기능성 인증 - 국내 운동수행능력개선 건강기능성 인증 - 국제 (일본) 피로개선 건강기능성 인증	- 인문학과 스토리텔링을 접목한 홍보전략 마련 - 농업과 생산자가 연계된 체계적인 발전 계획 수립 - 브랜드 정립에 따른 체계적인 가공품 생산 필요	- 국내산 밀리타리스 동충하초 동물실험 효능 연구 - 국내산 밀리타리스 동충하초와 근연종 소재개발을 위한 효능 및 지표 성분 탐색	- 인문학과 스토리텔링에 의한 식품산업과 연계 필요 - 지자체와 협의를 통한 재배단지 구축 전략 필요 - 원가 절감을 위한 자동화 시스템 필요
동충하초 산업화 융복합 연구 목표	버섯을 대표하는 품목으로 동충하초의 산업화를 촉진하여 버섯소비를 진작하고 국내 및 국제 기능성 인증에 의한 제품화와 브랜드 개발에 의한 가공품 제품화로 동충하초 세계적 명품 육성			

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황



가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

버섯 재배 농가수와 재배 생산 면적은 지속적으로 감소한 반면 시설의 규모화와 자동화에 기인한 버섯 생산량은 지속적으로 증가하고 있음. 버섯의 총생산량은 2013년 기준으로 7700억원이고 농업생산액의 1.6%를 차지하고 있음. 인구고령화와 웰빙에 대한 관심 증대에 기인하여 웰빙식품으로 각인된 버섯의 소비량은 증가되고 있으나 2010년에 1인당 버섯 소비가 4.2kg에서 2013년 3.7kg으로 줄어들고 있음

시설의 규모화와 자동화에 대한 버섯 생산량증가에 비해 소비량 축소에 따른 생산과 소비의 불균형에 따른 소비진작이 필요. 이에 소비진작을 위해 다양한 가공제품이 개발되고 있으나 웰빙시대에 부응하는 식약처 건강기능성 인증 부재로 소비량 정체 또는 축소가 지속되고 있음

인삼 및 홍삼의 가공품 국내 매출은 약 7,000억원 버섯 건강기능성을 바탕으로 한 제품의 국내 매출은 약 15억으로, 버섯 시장의 활성화가 매우 절실한 상황임 (2011년 식품의약품안전처 기준)

인정현황	기능성원료	기능성		고시/개별인정형
		장건강	배변활동	고시형
		혈행 개선	혈행 개선에 도움	고시형
2008.02	표고버섯균사체 	면역 기능	면역력 증진에 도움	개별인정형
		간건강	간 건강에 도움	개별인정형
2008.06	표고버섯균사체추출물 	간건강	간 건강에 도움	개별인정형
2008.06	금사상황버섯 (국내) 	면역 기능	면역력 증진에 도움	개별인정형
2011.05	동충하초 발효 추출물 	운동수행능력	지구력 증진에 도움	개별인정형
2013.07	동충하초 주정 추출물 (국내) 	면역 기능	면역력 증진에 도움	개별인정형

<버섯류 건강기능식품 원료 현황 식품의약품안전처 제공>

식품의약품안전처에 고시된 버섯류 건강기능성 인증 품목은 총 8건으로 상황버섯 1건 표고버섯 균사체 및 균사체 추출물 3건, 동충하초 추출물 2건 등 총 6건이 개별인정을 받고 있음. 현재 기능성원료로 고시된 품목은 장건강 기능의 목이버섯 1건, 혈행 개선 기능의 영지버섯자실체추출물 1건 등 총 2건이 있고, 개별인정형으로 현재 상황과 동충하초 2개의 건강기능성만이 면역증강으로 인증되어 있기에 면역증강에 대한 추가적인 연구와 더불어 타 건강기능성 연구가 필요함

이에 소비 진작의 일환으로 생산되는 버섯 가공품은 건강기능성 부재로 인하여 판로 확보에 어려움을 가지고 있음

《국내 버섯 가공품의 현황 및 문제점》

- 2000년 이후 웰빙에 대한 관심 등으로 소비량이 증가하였다가 최근 감소, 대부분 생버섯 상태로 소비되고 가공식품 소비는 부진
- 기능성 제품 및 즉석요리 개발, 다양한 조리법 개발, 마케팅 활성화 등으로 소비가 확대 되었으나 2010년 이후 둔화되는 추세
- 다양한 가공제품이 개발되고 있으나, 실제 소비증가는 더딘 상황 (통조림, 건조분말, 장아찌, 스낵류, 음료 및 술재료 등 100여개 제품 개발)
- 통조림, 건조분말, 장아찌 등 다양한 가공품이 개발되고 있으나 홍보 및 마케팅 부족으로 소비 활성화에 애로 (절임식품이나 건조제품 등을 중심으로 수입되어 식자재로 공급 활용)
- 건조·조제양송이, 표고버섯 등 외식 식재료용 위주로 수입(국내 수요대비 14%수준) 되며, 한·중 FTA로 일부 수입 증가 전망 (수입 물량/금액: ('06) 22.3천톤/27.3백만\$ → ('10) 27.7/47.7 → ('13) 22.1/55.4)
- 단순 가공식품 개발에 치중 되어 건강·웰빙 수요 및 다양한 소비패턴 변화에 부응한 제품개발 미흡.
- 버섯류는 식품공전에 있는 버섯 종의 수가 실제로 활용되는 버섯의 수보다 적으므로 소비진작의 일환으로 식품공전에 버섯을 지속적으로 등록시킬 필요가 있음
- 버섯은 식약처 생약규격집 전체의 1.7%만을 차지하고 있음으로 상황버섯과 같은 약재도 등록되어 있지 않은 바 생약규격집에 지속적으로 버섯을 등록시킬 노력이 필요함
- 국내 약용버섯에 대한 우수성 및 안정성이 해외시장에 알려짐에 따라 중국산이 한국산으로 둔갑하여 유통되는 사례가 빈번하게 발생 이에 대한 홍보가 필요함

버섯의 재배기술은 전세계적으로 한국이 선진기술을 가지고 있으나 최근 중국의 선제적인 투자와 한국과 비교할 수 없는 생산량은 한국 버섯산업에 위협이 되고 있기에, 각 기능성에 있는 기존 제품군과의 차별화 및 경쟁력을 고려하여 약용버섯에 대한 기능성 실험을 통한 식약처 인증이 버섯산업 전체를 견인할 수 있음

피로개선 건강기능식품의 개별인정형 원료는 헛개나무 과병 추출분말과 발효생성 아미노산 복합물 3건이 있으며, 고시형 원료로는 홍삼, 매실, 홍경천 추출물 등이 알려져 있음 (아래 표 참조). 운동수행능력개선은 크레아틴, 마카젤라티화 분말, 동충하초 발효추출물, 헛개나무 과병 추출분말 4건이 있음

원료명	기능(지표) 성분	기능성	일일섭취량
홍경천 추출물	Rosavin	피로개선	홍경천추출물로서 200~600mg
헛개나무 과병 추출분말	Quercetin	피로개선, 운동수행 능력 향상	헛개나무과병추출분말로서 2,460mg
발효생성 아미노산 복합물	① L-Leucine ② L-Isoleucine ③ L-Valine	피로개선	발효생성 아미노산 복합물로서 4.7~5.0 g
크레아틴	Creatine monohydrate	운동수행 능력 향상 (운동능력 향상)	크레아틴으로 3g
마카젤라티화 분말	n - benzyl - heza decanamide	운동수행 능력 향상 (운동능력 향상)	마카 젤라틴화 분말로서 1.5g~3.0g
동충하초 발효추출물	아데노신	운동수행 능력 향상 (지구력 증진)	동충하초 발효추출물로서 2.1~3.0g

<출처: 2014 식품의약품안전처>

현재 운동능력 향상의 건강기능식품의 경우, 크레아틴의 경우 개별인정형 원료로 2등급을 인정받았으나 섭취 시 주의사항이 많아 안전성에 적신호 제품으로 인식되고 있으며, 마카와 동충하초발효 제품이 있으나 개별인정형 3등급으로 과학적 기능 입증 및 안전성이 확보되지 않아 제품으로 출시되지 않고 있기에 추가적인 과학적 기능 입증 및 제품개발이 필요함

기능성 연구의 상대적인 부족은 버섯이 건강에 좋다는 인식에도 불구하고 가공품개발 같은 후방산업에 파급되지 않고 생버섯 위주의 소비패턴을 보이는 큰 이유의 하나이며, 소비진작을 위한 스크리닝 위주의 기능성 발굴 체계가 필요하며 인삼과 같은 글로벌 명품화 전략에서는 국내 및 국제 건강기능성 인증은 필수불가결한 요소임

국가	국제 건강기능성 인증
미국	<ul style="list-style-type: none"> - NDI (New Dietary Ingredient) 는 미국 FDA(Food and Drug Administration) 에서 기능성 식품 원료에 해당하는 원료에 인증을 부여하는 제도. NDI 는 1994년 10월 15일 이전에 미국 내에서 식이보충제로 판매된 적이 없는 원료임 - GRAS (Generally Recognized As Safe): 한국의 건강기능식품 원료는 미국의 “일반적으로 안전한 것으로 인정되는 품목(Generally Recognized As Safe, GRAS)” 이 될 수 있음. 1957년 이전에 미국 내에서 사용된 적이 없는 물질을 식품의 원료로 사용하고자 할 경우에는 일반적으로 안전하다고 인정되는 Generally Recognized As Safe (GRAS) 에 등재되거나 GRAS 자가 확인 (self-affirmation) 방법을 통하여 전문가에게 해당물질의

	일반적 안전성을 확인
일본	<ul style="list-style-type: none"> - 보건용 식품 인증: 2015.04.01 기능성표시제도시행 일본의 소비자청에 신고만으로 식품에 건강효능 표기 가능해짐. 규제 완화를 통해 건강에 미치는 효과에 대한 과학적 근거를 보여주는 연구논문 등과 표기 내용을 소비자청에 신청하면 60일 후에 판매 할 수 있게 됨 - 이전에는 건강효능을 표기할 수 있는 식품을 특정보건용 식품 및 영양 기능식품으로 제한하여, 특정 보건용 식품 인증을 받으려면 2억엔 정도의 비용과 2~3년의 소요시간이 필요 - 사회적으로 연이은 대형 식품사고, 원전 방사능 유출사태에 관련하여 위생관련 HACCP, FSSC22000 등 관련 인증 취득에 대한 관심 증가
중국	<ul style="list-style-type: none"> - 중국에서는 건강기능식품을 ‘보건식품’이라 칭함. 2003. 5. 1부터 실시한 <보건식품검사와 기술규범검사> (중화인민공화국위생부)의 정의에 의하면 보건 식품은 기능에 따라 27가지로 분류
유럽	<ul style="list-style-type: none"> - 신소재 식품(novel food) 인증: Novel food EU 집행위 EU규정에 따라 과학적 정보 및 안전성 평가 자료를 제출하여 식품안전평가를 받아야함 - 모든 일반식품과 식이 보충제는 제출된 과학적 근거자료를 유럽식품안전청(EFSA)에서 검토하고 EC의 인정을 받아야만 건강표시를 할 수 있게 됨 - 새로운 원료나 성분을 사용하고자 하는 경우에는 신규식품 규칙 (Novel food Regulation)을 준수해야 하며, 식품첨가물인 경우에는 기존 식품첨가물 관련 규정을 준수해야 함
할랄	<ul style="list-style-type: none"> - 할랄인증은 이슬람의 종교적 율법인 샤리아 율법에 허용된 항목으로, 무슬림이 먹고 쓸 수 있는 제품 및 행동을 뜻하며, 할랄인증이란 이슬람의 종교적 율법인 샤리아 율법에 따라 제조, 가공되었다는 것을 보장하는 인증임

<각국의 건강기능성 식품의 인증>

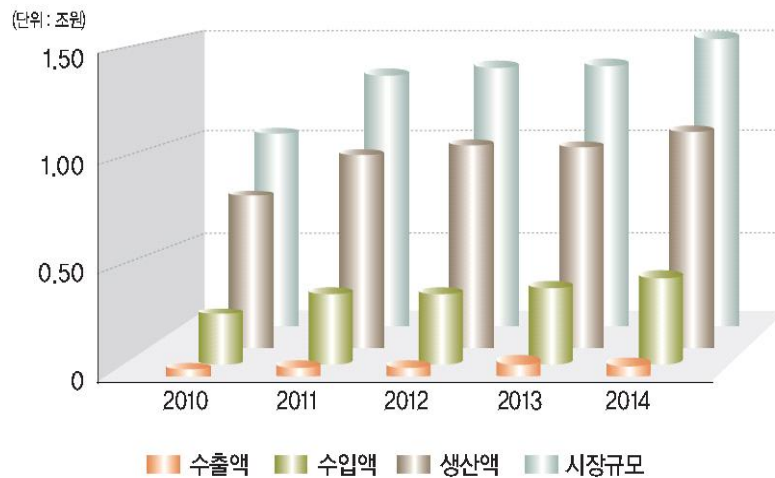
동서양을 아울러 버섯류의 복용이 항암제의 효능을 감소시키지 않으면서 독성을 유발하는 화학물질의 사용량을 감소시키는 것에 대하여 부작용 완화 효과에 대해서 언급하고 있고, 버섯의 면역증강, 항산화, 항암효과, 항바이러스, 항진균성, 간기능보호, 혈류개선 및 혈당조절 등의 효능들이 지속적으로 연구 발표되고 있음. 이러한 생리활성에 효능을 나타내는 좋은 다당류들은 버섯류에서 약 651여종이 보고되었으며, 이러한 물질들은 자실체나 균사체에서 지표물질들이 유래되고 있음

버섯의 대표 세계적 명품 육성을 위해 기 개발되어 있는 개별인정형 버섯 품목들 중 식품의약품안전처에 의해 버섯의 대표기능성인 면역 기능 개선 인증이 되어 있는 소재들인 상황버섯 품목과 동충하초 품목 중 동충하초를 선정하고 이에 대해 다기능성을 목적으로 피로개선과 운동능력개선에 대한 개별인정형 획득과 국제 기능성 인증과 국내 기능성 인증을 체계적으로 추진함으로써 세계적 명품이 육성될 수 있음

(2) 시장현황

국내 건강기능식품 시장은 국내외 경기 침체에도 불구하고, 건강에 대한 관심이 높아지

고 새로운 가능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되면서, ‘2015 식품의약품 통계연보’에 따르면 2014년 건강기능식품 생산액은 1.12조원으로 전년대비 7.69% 증가하였고, 수출액은 0.07조원으로 전년대비 12.5% 감소한 반면 수입액은 0.44조원으로 14.12% 증가하여 최근 5년 연평균성장률 10.47% 성장하여 1.49조원의 시장규모를 형성하였음



<식품의약품안전처, 2015년 식품의약품통계연보>

건강기능식품의 생산 경향을 살펴보면, 홍삼이 전체 시장의 39.6% (식품의약품안전처, 2013)로 가장 높은 비중을 차지하고 있으나, 그 규모는 2011년 이후 지속적으로 감소하고 있음, 최근에는 밀크씨슬추출 (간기능 개선), 프로바이오틱스 (유산균), 개별인정형 순으로 생산이 급증하고 있음

식품의약품안전처에서 2013.12월에 보고된 건강기능식품의 개별인정 생산제품 상위 10개 품목을 살펴보면, 한의약소재 및 약용작물기반의 추출물을 활용한 건강기능식품으로 구성되어 있음. 반면 버섯소재의 건강기능식품의 품목은 효능 면에서 우수한 건강기능식품의 소재로 충분히 가능성이 있음에도 불구하고, 연구개발 수준이 미흡하다고 볼 수 있음

2014년 조사된 국내 건강기능성 식품 소비 경향은 품목 선호도 면에서 홍삼과 비타민류가 압도적으로 높게 나타나고 있으며, 기능성으로는 면역력 증진에 대한 관심이 가장 높은 것을 확인. 이러한 선호도 기반으로 기능면에서 고령화 사회와 만성질환에 대한 예방차원으로서의 기능성 식품이 중요하며, 그 수요와 시장이 커지고 있음

<품목별 건강기능식품 생산실적 현황 (2013년)>

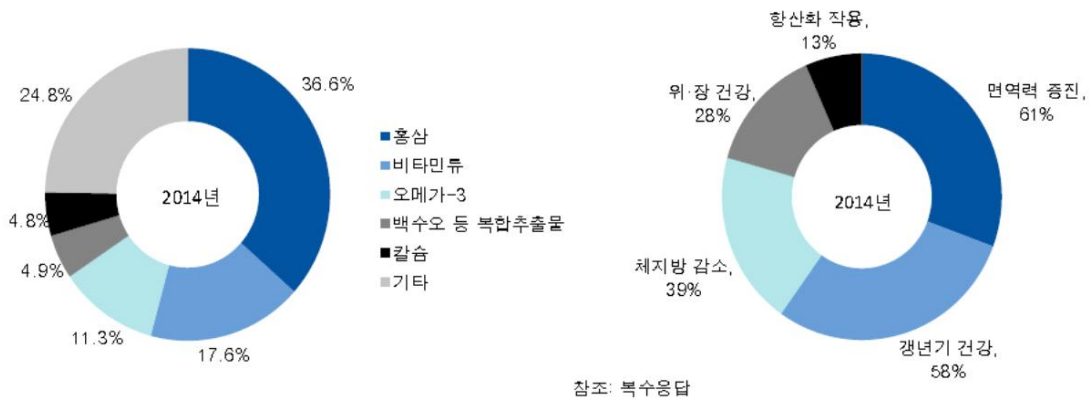
(단위: 십억원)	2009	2010	2011	2012	2013	2013 점유율 (%)	12~13년 증감률 (YoY %)
홍삼	499.5	587.1	719.1	648.4	589.6	39.6	(9.5)
개별인정형	79.9	112.9	143.5	180.7	232.4	15.7	28.6
비타민, 무기질	76.1	99.1	156.1	164.6	174.7	11.8	6.1
프로바이오틱스	25.4	31.7	40.5	51.8	80.4	5.5	55.2
알로에	64.8	58.4	69.2	68.7	62.8	4.2	(8.6)
누계 (5품목)	745.7	883.8	1,128.4	1,114.2	1,137.2	76.7	2.1
총 생산액 대비 누계 비중 (%)	78.0	83.0	82.0	79.0	77.0	-	-
가르시니아 캄보디아 추출물	-	20.8	20.7	44.0	54.1	3.7	23.0
오메가-3 지방산 함유유지	33.4	34.8	50.9	49.7	49.0	3.3	(1.4)
인삼	36.4	34.1	38.1	45.0	46.6	3.1	3.6
밀크씨슬 (카르두스 마리아누스) 추출물	-	-	-	-	30.8	2.1	128.1
감마-리놀렌산 함유 유지	10.8	9.3	22.4	15.2	18.6	1.2	22.4
누계 (10품목)	826.3	982.8	1,274.3	1,281.6	1,336.3	90.2	4.3
총 생산액 대비 누계 비중 (%)	86.0	92.0	92.0	90.0	90.0	-	-
기타	133.5	84.3	93.9	127.5	145.7	9.8	14.3
총계	959.8	1,067.1	1,368.2	1,408.1	1,482.0	100.0	5.2

자료: 식품의약품안전처, 한국건강기능식품협회, KB투자증권
 주: 상위 항목부터 2013년 생산액 순으로 정렬

<개별인정형 연도별 생산실적 현황 (2013)>

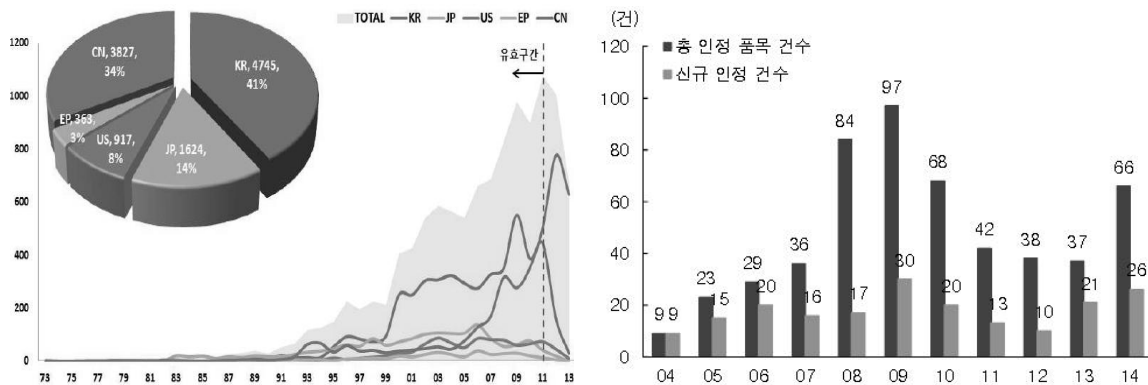
(단위: 십억원)	2011		2012		2013	
	품목	금액	품목	금액	품목	금액
1	헛개나무과병추출물	34.9	헛개나무과병추출물	50.2	백수오 등 복합추출물	70.4
2	당귀혼합추출물	14.0	당귀혼합추출물	24.5	헛개나무과병추출물	54.0
3	밀크씨슬추출물	13.8	그린마데추출물	15.1	당귀혼합추출물	31.4
4	히알우론산나트륨	7.1	밀크씨슬추출물	13.6	그린마데추출물	22.9
5	쓰팔메토열매추출물 등 복합물	4.6	복분자추출분말	10.4	들외임주정추출분말	6.4
-	누계 (5품목)	74.4	누계 (5품목)	113.8	누계 (5품목)	185.1
6	백수오 등 복합추출물	4.1	백수오 등 복합추출물	10.0	히알우론산나트륨	4.8
7	그린마데추출물	3.9	대두배아열수추출물 등 복합물	6.1	초록입홍합추출오일 복합물	3.6
8	복분자추출분말	3.2	히알우론산나트륨	5.1	대두배아열수추출물 등 복합물	2.7
9	초록입홍합추출오일 복합물	3.0	AP 클라겐 효소분해 펩타이드	3.0	사탕수수왁스알코올	2.3
10	알로에추출물분말	2.9	초록입홍합추출오일 복합물	2.8	알로에추출물	2.2
-	누계 (10품목)	91.5	누계 (10품목)	140.8	누계 (10품목)	200.7
11	기타품목	21.4	기타품목	40.9	기타품목	31.7
-	총계	143.5	총계	180.7	총계	232.4

자료: 식품의약품안전처, 한국건강기능식품협회, KB투자증권



<건강기능식품 소비자 구입 기준 분류 (좌) 및 소비자 선호 기능성 트렌드 (우)
자료: 한국건강기능식품협회, KDB대우증권 투자정보지원부>

식약처가 발간한 ‘건강기능식품의 기능성 원료 인정 현황’을 참조하면, 개별인정형 제품이 전체 건강기능식품 매출의 약 20%를 차지하고 있었으며, 2009년 이후 2014년까지의 성장률이 약 32%로 매우 높게 나타나고 있는 것이 특징으로, 연평균 약 20건의 신규 원료들이 인정을 취득할 정도로 신규 시장을 창출할 수 있다는 장점이 있음



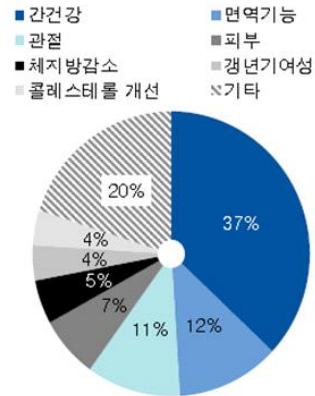
<건강기능식품 분류별 생산현황(좌) 및 연도별 기능성 원료 인정 현황(우)
(자료: 식약처, KDB대우증권 투자정보지원부)>

(3) 경쟁기관현황

- 식약처 통계연보에 따르면 2014년 기준 건강기능식품 사업을 영위 중인 사업자는 총 100,426곳에 이르며, 수입업자와 판매업자를 제외한 전문 제조업체수는 2014년 기준 460곳에 불과함

<생산실적 상위 10개 업체 및 개별인정형 세부품목별 생산 비중>

(단위: 십억원)		2013		2013년 점유율
순위	업체명	출하액		(%)
1	한국인삼공사	428.8		28.8
2	한국야구르트	78.6		5.3
3	서흥칼셀	58.3		3.9
4	노바렉스	50.9		3.4
5	코스맥스바이오	50.7		3.4
6	내츄럴엔도텍	47.3		3.2
7	아모레퍼시픽	46.9		3.1
8	콜마비엔에이치	42.5		2.9
9	마임	41.4		2.8
10	고려은단	36.5		2.4



자료: 식품의약품안전처, 한국건강기능식품협회, KB투자증권

- 최근 국내 건강기능식품 시장에서 자체적으로 개발한 독과점적 핵심원료를 바탕으로 강력한 브랜드 구축에 성공한 업체들이 폭발적인 성장세를 일어가고 있으며, 대표적인 회사로는 내츄럴엔도텍, 셀바이오텍, 콜마비엔에이치가 있음

업체명	콜마비엔에이치 (200130.KQ)	셀바이오텍 (049960.KQ)	내츄럴엔도텍 (168330.KQ)
핵심경쟁력	헤모힘당귀등혼합추출물 면역력 개선 기능으로 식 약처 개별인정 가격경쟁력 높은 화장품 의 글로벌 진출	이중코팅 유산균으로 제품 경쟁력 높음	백수오등 복합추출물 갱년기여성 건강 관련 식약 처 개별인정
타겟시장	항암치료한 환자대상으로 시작해 면역력 개선 기능 으로 일반인 대상 시장 확대중	장 건강 및 면역력 개선 기 능으로 일반인 대상	갱년기 증상 여성 및 여성 전반
국내시장	자체제품 독점판매	자체 프로바이오틱스 제품 판 매 및 OEM 공급 프로바이오틱스 시장 경쟁 치열	원료 독점판매 자체제품 판매 및 OEM 공 급
해외진출 여부	화장품 미국, 일본 등 해 외 진출 중 건강기능식품은 미정	덴마크에서 듀오락 자체 브 랜드 판매중 글로벌제약사 통해 핀란드, 암웨이 통해 아시아지역에 OEM 판매	백수오등복합추출물 원료 미국 수출중
'천연물신약 개발 여부	항암치료 보조제 개발 (MH30 헤모힘) 2015년 임상1상 실시	이중코팅 기술과 치료용 유 산균 등을 응용해 대장암 치료제 개발 중	EstroG 천연물 신약 개발 기대 고 흡수성 마이크로 칼슘 미국 임상중
매출비중	건강기능식품 43% 화장품 67%	건강기능식품 100%	건강기능식품 100%

(4) 시장진입 장벽

현재 식약처에서 인정하고 있는 건강기능식품 기능성 등급 4가지 중 ‘질병발생 위험감소 기능’은 단 3가지이며, 생리활성기능 3등급은 인체적용시험이 전혀 이루어지지 않아도 되는 등급이기에 표시등급에 대한 이해도가 부족한 소비자에게 신뢰도를 떨어뜨릴 수 있어, 건강기능식품에 대한 신뢰도를 떨어뜨릴 수 있음

현재 식약처에서 인정하고 있는 건강기능식품의 기능성 내용은 32가지 (2015년 기준)로 제한하고 있으나, 국외 시장 동향 및 국제 기능성 인증의 경우 매우 세분화된 기능성 내용을 제시하고 있음. 따라서 원료의 기능성의 내용을 구체화하여 정확한 정보를 제공하면서, 기 인정된 32개의 기능성 이외에 소비자들의 필요에 맞게 선택할 수 있도록 해야 할 필요가 있으며, 연령별, 성별, 직업별 등의 다양한 소비자층의 기호에 맞는 기능성의 영역과 내용을 설정하는 방향으로 나아가야 국외적으로 시장 확대할 수 있음

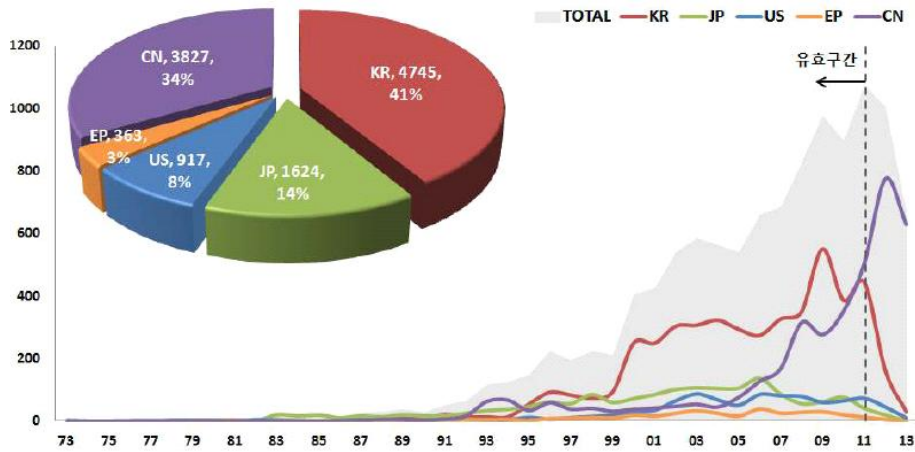
2014년 기준 건강기능식품 사업을 영위 중인 사업자는 총 101,426곳에 이르지만, 전문 제조업체수는 460곳에 불과해 건강기능식품 시장은 판매 사업자가 우위를 점한 시장으로 추정되며, 기능성 위주로 제품별 타겟 고객이 구분되어 있어 판매업자 중에서도 지배적 사업자는 아직 등장하지 못한 상태임

식품의약품안전처는 2014년 7월 28일 ‘건강기능식품에 관한 법률’ 및 관련 시행과 시행규칙 개정안을 입법하였으며, 본 내용에 영업신고 요건을 완화함으로써 소비자가 건강기능식품을 가까이에서 편하게 구매할 수 있도록 하여 건강기능 식품 산업의 활성화시켰지만, 아직까지도 다단계판매나 방문판매 등의 직접판매 비중이 높아 유통채널의 다각화할 필요성이 있음

특히, 국내 건강기능식품 연구개발업체는 대부분 영세하여 신뢰도 높은 과학적 근거 확보를 위해서는 건강기능식품개발에 대한 국가지원정책이 절실함

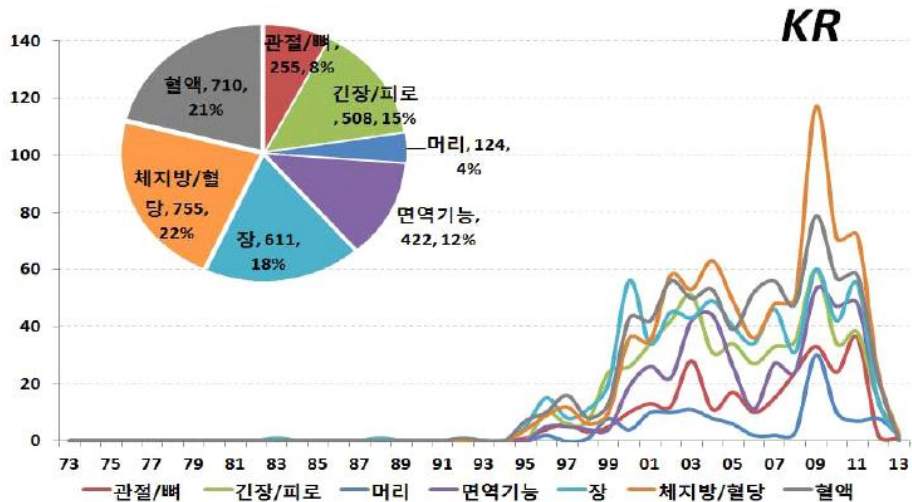
(4) 지식재산권 현황

특허출원 후 공개되는 기간을 고려할 때, 2011년까지 기능성식품에 대한 각국의 특허 점유율은 한국이 41% (4,75건), 중국 34% (3,827건), 일본 14% (1,624건), 미국 8% (917건), 유럽 3% (363건) 순으로 나타나 기능성 식품에 있어서 한국이 전 세계 기능성 식품을 주도하고 있음을 알 수 있음



<연도별 출원 동향 및 특허 점유율 (출처: 농림수산식품교육문화정보원)>

기능성 식품 관련 특허 출원 중 기능면에서 보았을 때 체지방/월당 22% (755건), 혈액 21% (710건), 장 18% (611건) 및 긴장/피로 15% (508건) 순으로 높은 점유율을 차지하고 있으며, 피로개선 기능성이 있는 헛개나무 과병 추출분말의 경우에도 운동능력향상과 관련된 용도특허(2004, 생명의 나무(주))가 있기는 하나 피로개선 관련 특허는 없기에, 피로개선 특허를 확보한 독점적 소재로써의 개발에 적절한 상황임



<건강기능식품의 기능 분야 점유율 (출처: 농림수산식품교육문화정보원)>

특허정보원 DB (www.kipris.or.kr) 검색에 의하면, 최근 5년간 ‘육체피로개선’으로 631건, ‘운동능력 향상, 건강기능식품’으로 909건의 특허가 검색되며, 본 연구와 연관성있는 유효 특허는 총 9건에 해당되지만 동충하초를 원료로한 피로개선이나 운동능력 향상에 관한 특허는 전무한 상태임

(5) 표준화현황

현재 버섯의 경우 품목당 품종판별마커가 체계적으로 적립된 품목이 전무하여 국내에서 품종에 대한 마커부족으로 분쟁이 발생하고 있고 국제적으로는 품종분쟁에 의해 년 45억의 로열티(2012년)를 지불하고 있을 것으로 추정함

최근(2013년)의 국내 한약재 수입량통계에서 버섯품목인 복령은 마황(1,213톤)에 이어 871톤으로 수입량 2위를 차지하고 있을 정도로 중국산 복령이 대량 수입되고 있음에도, 기존에 개발되었던 품종특이 마커는 현 시점에서 국내와 국외 품종을 구별할 수 있는 한계성을 가지고 있지 않아, 유전체 전체를 대상으로 한 주요 품목에 대해 품종 마커가 개발이 절실히 요구되고 있음

버섯품종에 대한 마커의 부재는 현재 송화버섯으로 유통되는 송이와 표고의 육종으로 현실적으로 육종이 불가능한 버섯의 시판 및 마케팅에서 볼 수 있듯이 시장교란으로 인한 소비자의 신뢰 하락과 품종에 대한 법적분쟁이 지속적으로 발생하고 있으며 추후 분쟁은 증가할 것으로 예상됨

식물과 버섯은 생물학적으로 전혀 다른 분류군에 속하고 있어 생물이 생산하는 유효물질이 다를 것으로 추정하나, 복령과 천마에서 보는 바와 같이 통상적으로 버섯임에도 불구하고 약용식물 통계에 잡혀 있을 정도로 식물에 비해 기존의 연구가 진행되지 않아 원재료 표준화에 필요한 chemical library 구축이 미흡하여 표준화 기술이 미흡함
특히 약용버섯은 식용버섯과 달리 환경제어가 되지 않고 버섯자체의 재배시기별 물질의 변동성이 커 식의약소재 개발에 필요한 원재료 표준화에 대한 체계적인 연구전략이 필요함

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

일본, 미국, 유럽 등에서의 식품산업 관련기술은 단순한 식량 확보 자원이 아닌 노화억제, 장수, 안전, 건강수명 연장 관련 식품을 발전 가능성이 높은 분야로 보고 이들 식품 개발을 위한 식품생명공학 기술 개발에 연구역량을 집중하고 있음

미국, 일본, 유럽 등의 건강기능식품의 규제 및 정의는 국가마다 다르게 적용하고 있으므로, 각국의 사회적 분위기, 문화에 따라 세계진출을 위한 건강기능식품의 다양성이 필요.

미국식품과학회 (IFT)에 따르면 미국 기능성식품의 키워드는 아동, 파이토케미컬즈 (phytochemicals), 50대 이상의 실버 세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐 제거, 자연친화 등에 역점을 두고, 건강기능식품 품목의 다양화, 라이프 스타일을 향상시킬 수 있는 기능성식품의 소비, 스포츠 시장과의 연계 및 어린이 건강시장 규모 확대, 인종, 성별 및 연령에 따른 기능성 식품의 차별화 방향을 지향하고, 체중조절 및 포만감지속/식욕저하, 자연식품의 개발 등에 중점을 두고 있음

일본 기능성식품의 키워드는 피부미용, 실버세대, 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 멘탈케어, 면역 등으로 고령화 현상이 심화로 인한 건강유지 제품에 관심을 두고 있음. 국내의 정서가 일본 건강기능 식품시장의 향후 방향성을 따르고 있어 추이를 살펴볼 필요가 있으며, 특히 건강기능식품의 유통이나 보급경로 면에 있어서 오프라인 매장보다는 인터넷이나 홈쇼핑, 통신판매 등의 소비가 증대되고 있음

유럽의 경우 비만 수준이 높아 일반적으로 비만 및 대체요법 등에 관심을 가지고 있으며, 인터넷을 활용한 건강기능성식품의 보급 정책과 프리미엄이 붙는 고품격 소재를 활용한 건강기능성식품 사업이 증대되고 있음. 건강기능 식품 규모가 가장 큰 나라는 독일로, 서유럽 전체의 27%의 소비자층을 확보하고 있음. 영국과 프랑스에서도 건강기능성식품의 관심과 매출이 꾸준히 증가 하고 있음

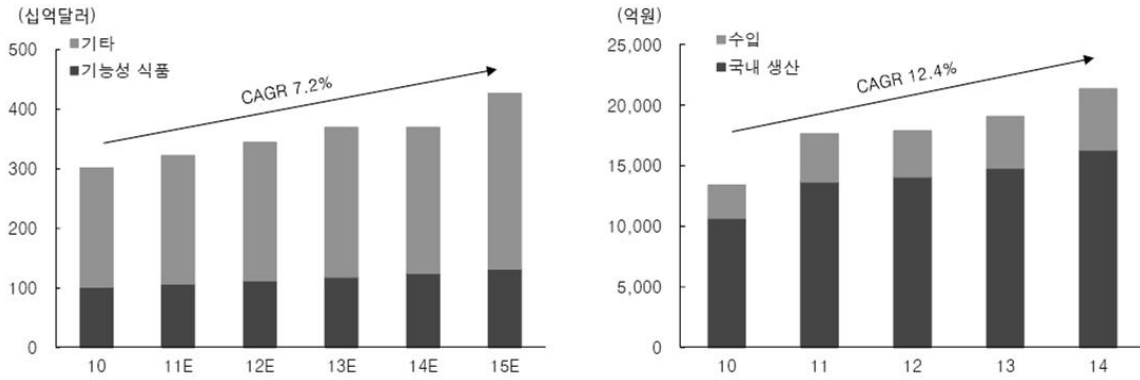
중국의 경우는 질병관리, 노인인구의 증대, 기능성 음료, 여성미용 관련, 당뇨병, 신장병, 수면 개선 및 소화계통 개선 등의 사회의 급성장에 따른 중약성분의 연구 개발과 함께 건강기능성식품에 관심이 증가함. 중국에서는 약주, 중약성분이 함유된 영양보충제와 다 이어트차, 인삼, 은행추출물 등을 이용한 연구개발을 진행하고 있음

피로개선과 관련되어 판매되고 있는 식이보충제의 원료는 종합비타민, 비타민B군 고함량 비타민 제품 등 한국의 고시형 원료에 해당하는 것이 많고, 그 외에 adrenal extract를 원료로 한 제품이 대부분임. 그 외 원료로는 과라나(Paullinia cupana) 추출물, 홍삼, 드린국화(Echinacea Purpurea)추출물, 스피롤리나 등이 있으나 그 비중이 적음

(2) 시장현황

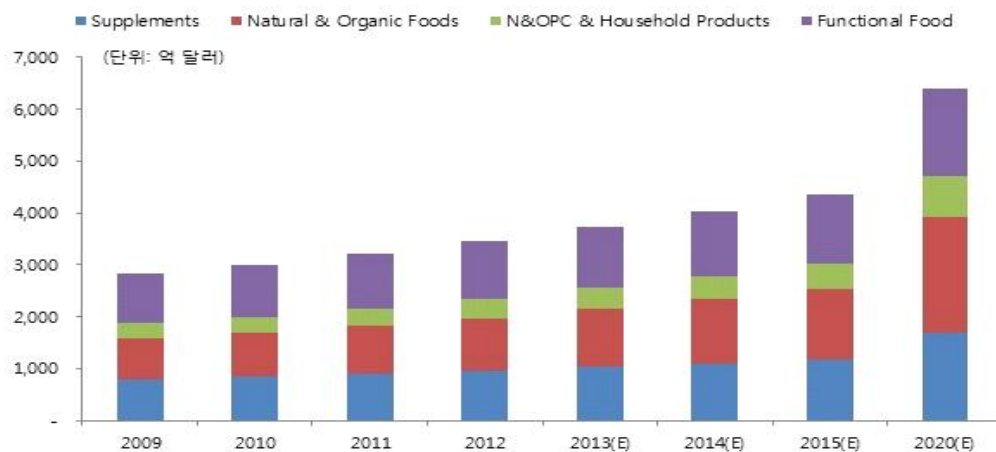
한국건강기능식품협회에 따르면 2012년 전세계 전체 건강식품 시장규모는 350조원으로 추산되며 2009년~2012년까지 연평균 +6% 성장률로 성장해 왔고, 향후 세계 건강식품 시장은 2013년~2020년 연평균 +7.9% 성장률로 성장세가 보다 강화되면서 2020년에는 6,394억 달러의 시장규모가 형성될 전망하고 있음

가속화되는 고령화, 웰빙트렌드 등의 이유로 기능성식품의 성장 잠재력은 높게 인식되어 지고 있으며, 한국건강기능식품협회의 보고에 따르면 전 세계적으로 건강식품 규모는 3,000억 달러를 2010년도에 달성하였고, 그 중에서 약30% 규모로 1천억 달러가 기능성식품으로 기록하였음. 국내의 건강기능식품 시장 규모는 국내생산액과 수입액을 포함하면 2조 1천억원에 달하며, 2010년 이후로 지속적으로 CAGR 12.4%로 성장해오고 있음



<세계 건강식품 시장 규모(좌) 및 국내 건강기능식품 시장 규모(우), 한국건강기능식품협회,KDB투자증권>

Nutrition Business Journal(2014)에 의하면 세계 건강식품 시장은 Supplements (비타민, 미네랄, 허브, 식사대용식품, 스포츠/영양강화식품, 스페셜티(글루코사민, DHEA, CoQ10, 아미노산, 프로바이오틱스, 콘드로이친 등), Natural&Organic Foods (자연 생산된 농수산물과 유기농 식품), N&OPC & Household Products (천연 및 유기농 헬스&뷰티 제품), Functional Food (특정성분을 강화하여 건강을 증진시키는 기능성을 함유한 식품) 등 4가지로 분류되며, 그 중 국내 건강기능식품과 가장 유사한 품목은 Supplements 이고, 4가지 품목 모두 매년 지속적인 성장을 하면서 세계 건강식품 시장 규모는 2012년부터 2020년까지 연평균 7.8%의 성장률을 보일 것으로 전망하고 있음



<세계 건강식품 품목별 시장규모 (출처: 한국건강기능식품협회, 2014)>

Supplements 시장은 2012년도 기준으로 전체 건강식품 시장에서 약 28%의 비중을 차지하고 있으며, 2020년까지 연평균 7.3%로 성장하여 2020년에 1,677억 달러 시장 규모에 이를 것으로 예상됨

미국, 유럽, 일본 등의 선진국에서는 항피로·항스트레스 제품이 대중화되어 활동적인 여성·노년층에 있어서도 “스태미너만들기”, “컨디션만들기” 등 용도에 맞는 다양한 맞춤형 제품이 개발됨으로서 새로운 시장이 형성되었음

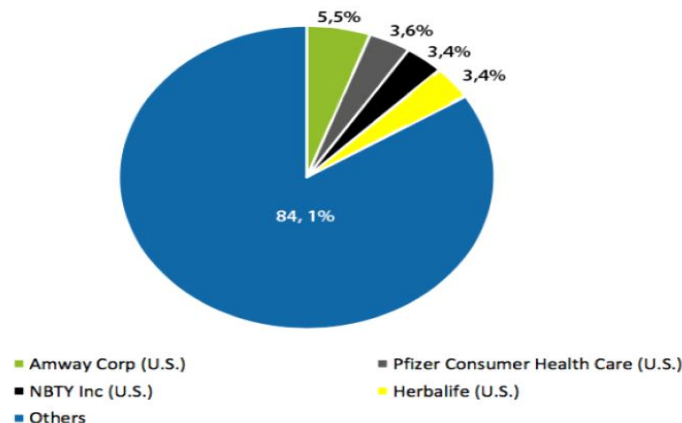
일본의 경우 2005년 항피로 시장이 2,000억엔 규모이며 매년 증가하고 있음. 국내에서는 연간 수천억 원의 피로회복 드링크제, 항피로 강장제 시장이 형성되었다고 하나 실제의 통계와 분석자료가 없고, 효능의 과학적 근거를 명시한 제품 거의 부재한 현황임

버섯을 재배하는 농가와 의약 및 식품제조 산업의 발전에 기회를 제공할 수 있는 건강기능성식품 제품화는 국내뿐만 아니라, 전 세계적으로도 건강기능성식품 및 개별인정형 제품의 시장이 급성장을 하고 있으며, 특히 면역력 증대, 다이어트, 항비만, 항당뇨, 항산화, 간기능 개선 등의 기능성 식품에 대한 수요가 증가 추세에 따라 약용버섯 소재류는 상기 대부분인 효능 평가가 되어있고, 전략적으로 건강기능성식품 개발 및 글로벌 시장에서 자리 잡을 가능성이 크다고 볼 수 있음.

(2) 경쟁기관 현황

2013년 비타민과 식이보충제 판매 회사의 시장 점유율에서 Amway Corp(U.S.)가 5.5%로 가장 크고 그 뒤를 이어 Pfizer Consumer Health (U.S.) 3.6%, NBTY(U.S.) 3.4%, Herbalife(U.S.) 3.4%. 기타 회사가 84.1%로 식이보충제 시장은 다양한 제조, 판매사가 참여

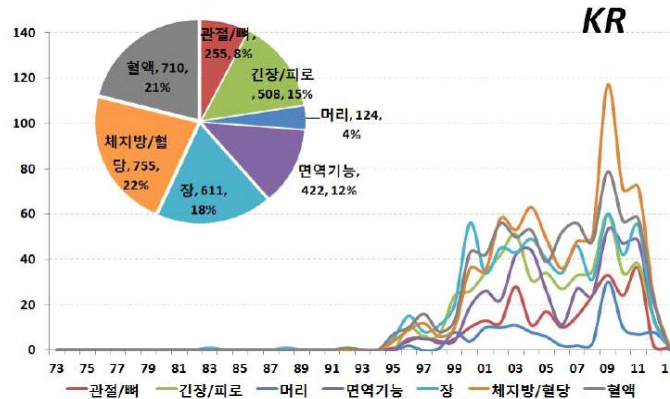
Top Vitamin and Supplement Companies' Market Share (%), 2013



Source: Euromonitor, Annual Reports

(3) 지식재산권현황

건강기능식품과 관련된 논문을 93년부터 2013년까지 분석한 결과, 2000년 이후 논문의 발생 건수가 급격히 증가하는 것으로 확인되었고, Food Science Technology 분야의 논문이 37%로 가장 많은 비유를 차지하는 것으로 보고되었음



<건강기능식품 관련 연도별 논문의 발행건수 및 연구분야 (출처: 농림수산식품교육문화정보원)>

국내외의 건강기능성식품의 연구 발전에 따라 원천기술에 따른 특허가 다양해지고 점점 늘어가는 추세임. 특히 자료에 의한 미국, 일본, 유럽 등에서의 건강기능식품 소재화 기술에 대한 해외 특허는 15,106건으로 보고 됨

각 국가의 연도별 유효특허 출원 동향은, 한국이 4,547건, 미국 1,917건, 일본 1,624건, 유럽 363건, 중국 3,827건이 확인되었으며, 한국과 중국은 2000년 이후 출원량이 증가하며 미국, 일본 유럽은 감소하는 추세임 (국내 지식재산권현황의 '연도별 출원 동향 및 특허 점유율 그래프 참조)

PubMed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov) 검색에 의하면, 최근 5년간 피로 (fatigue), 운동 (exercise), 동충하초 (Cordyceps militaris)에 대해 총 30건이 검색되며, 이들 중 본연구와 연관성이 높은 12건의 논문을 검색할 수 있었으나, 대부분 연구에 사용된 원료가 Cordyceps militaris가 아니었음. 단 1건의 논문의 경우에는 재료나 실험 방법에 많은 유사성이 있었지만, 중국에서 채집한 Cordyceps militaris를 쌀에서 인공재배하여 물추출 제조한 반면, 본 연구에서 사용되는 재료는 국내에서 균주가 분리되어 현미에서 배양된 시판중인 현미동충하초를 에탄올추출하여 얻은 재료를 사용하고 있어 차별성이 있음

《국내외 특허 검색에 의한 관련 지적재산권 현황 및 특허 회피 전략》

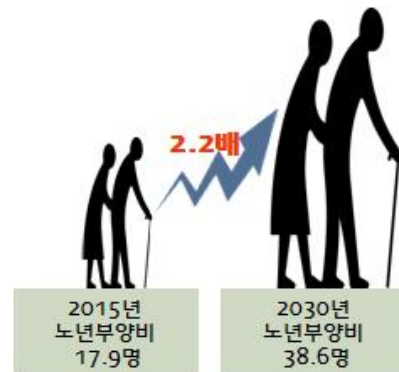
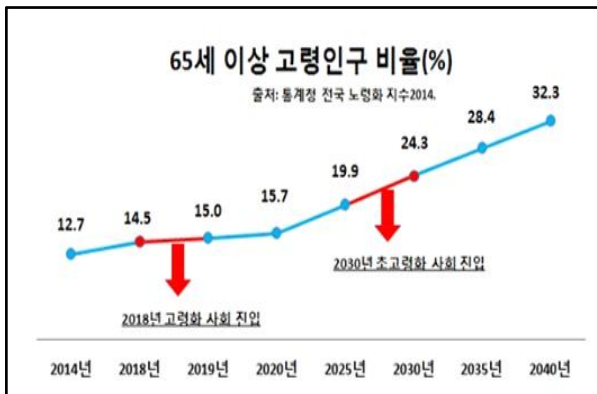
- 국내외 특허를 검색결과, 현재까지 동충하초 (*Cordyceps militaris*)를 이용한 피로 개선이나 운동능력향상에 도움을 주는 건강기능식품 개발은 전무한 상태이며, 면역증강 효과가 입증된 원료를 이용함으로써 독점적인 기능성 소재 개발에 유리한 상황임
- 피로개선과 관련하여 개별인정 받은 원료는 (주)생명의 나무의 헛개나무 과병 추출분말과 (주)CJ 제일제당의 발효생성 아미노산 복합물이 있음
- 현재의 헛개나무 추출액은 간건강과 피로개선의 다기능성으로 매출액 상위를 기록하고 있어 헛개나무 대비 특장점 확보가 중요할 것으로 판단됨
- 또한, 본 연구에서 사용되고 있는 동충하초는 국립종자원으로부터 품종보호 (제 3427호)를 받고 있는 균주를 이용하고 있으며, 균사체와 자실체를 배양하는 방법 모두 특허 (제0383558호, 제0266082호)로 보호받고 있음
- 피로개선 기능성이 있는 헛개나무 과병 추출분말의 특허로는 운동능력향상과 관련된 용도특허(2004, 생명의 나무(주))가 있기는 하나 피로개선 관련 특허는 없음. 따라서 피로개선 신규 특허를 확보할 필요가 있음
- 운동수행능력개선 기능성의 경우에는 동충하초를 활용한 특허는 존재하지 않고 효능이 보고되어 있음 Sone et. al., Evid Based Complement Alternat Med. (2015) 1-15. 그러나 본 연구의 소재의 특수성으로 인해 특허를 회피할 수 있을 것으로 판단됨

1-3. 연구개발의 중요성

가. 연구 배경

(1) 고령화 사회 노인층 인구 증가에 따른 건강기능성 식품 개발 필요

2015년 65세 이상 인구는 전체 인구의 13.1%로 2060년에는 40%대까지 늘어날 것으로 전망하고 있으며, 사회적으로 2018년도부터 고령화 사회에 진입한다고 이슈화 되고 있음



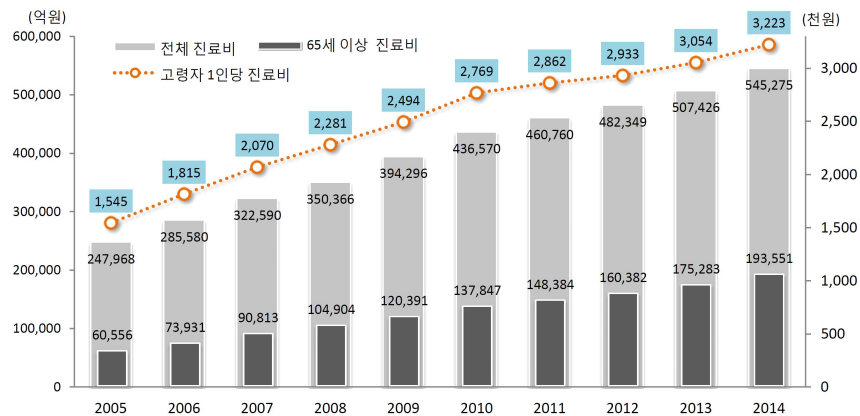
<대한민국 고령화 사회 진입 통계청 제공>

2014년 건강보험 상 65세 이상 고령자 진료비는 19조 3,551억원으로 전체 진료비 54조 5,275억원으로 35.5%를 차지하며, 고령자 1인당 진료비가 전년에 비해 5.5% 증가하였고 고령화의 영향으로 매년 증가하는 추세임. 특히 2014년 통계청의 발표에 의하면, 고령자들이 겪고 있는 어려운 점은 ‘건강문제(65.2%)’와 ‘경제적 어려움(53.0%)’이 가장 많으며 노인연령층의 증대로 사회적 문제로 심화될 것으로 사료됨 (2014년 건강보험 진료비 현황, 통계청)

고령화 사회에 노인연령층의 증대로 인한 뇌혈관 질환, 동맥경화증, 고혈압, 만성간질환, 당뇨 등의 만성퇴행성질환자가 급속도로 증가됨에 따라 의료비용의 감축 필요성과 건강한 삶의 보장을 위해 기능성 식품에 대한 기대와 수요가 증가하고 있음

국내 건강기능식품 시장은 국내외 경기 침체에도 불구하고, 건강에 대한 관심이 높아지고 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되면서 2008~2013년 연평균 +12.9%의 성장세를 이어가고 있으며, 고령화 사회의 진입으로 인해 건강에 관한 기능성 식품의 시장 규모가 확대될 것으로 전망함 (한국건강기능식품협회, 2015)

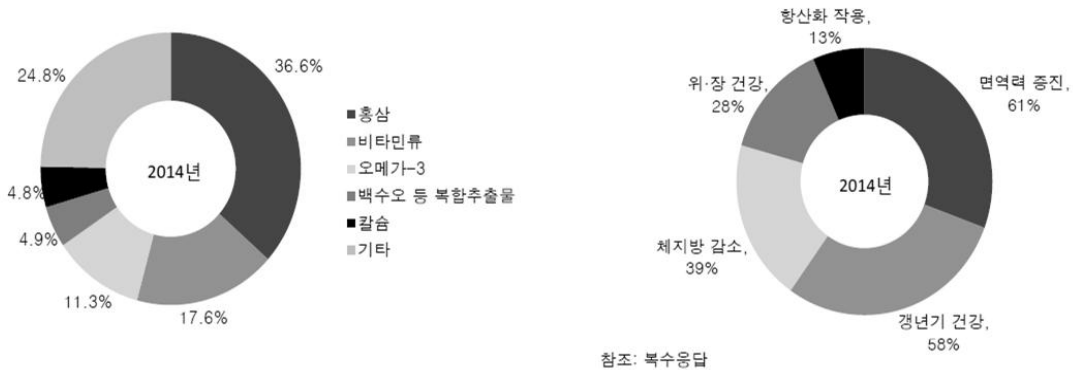
(2) 건강기능성 식품 국내 건강기능성 인증 동향 및 국제 건강기능성 인증 현황



식품의약품안전처에서 2105.6월에 보고된 2014년도 인정된 기능성 원료에 대한 정보를 살펴보면, 체지방감소, 혈당조절, 장건강, 관절 및 뼈건강, 면역기능, 피부건강, 혈중콜레스테롤 개선, 혈압조절, 항산화, 기억력 개선 상위 10순위로 10건 이상씩 기능성식품으로 인정되어 개별인정형 원료 등록이 증가하고 있음

2014년 조사된 국내 건강기능성 식품 소비 경향은 품목 선호도 면에서 홍삼과 비타민류가 압도적으로 높게 나타나고 있으며, 기능성으로는 면역력 증진에 대한 관심이 가장 높

은 것을 확인. 이러한 선호도 기반으로 기능면에서 고령화 사회와 만성질환에 대한 예방 차원으로서의 기능성 식품이 중요하며, 그 수요와 시장이 커지고 있음



<건강기능식품 소비자 구입 기준 분류 및 소비자 선호 기능성, 한국건강기능식품협회, KDB투자증권 >

《국내 기능성 원료 국제기능성 인증 현황 진단》

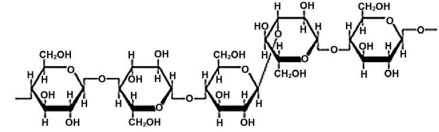
- KT&G가 만드는 정관장은 중국 보건식품 인증을 획득하고 수출. 기존 수입방식에서 현지법인방식으로 변화하여 유통망개척과 제품개발에 현지화 추진
- 기업인 내츄럴엔도텍이 개발한 전통식물 추출 소재인 에스트로지(백수오등 복합추출물)은 미국FDA로부터 기능성소재(NDI) 허가를 받음
- CJ 제일제당의 ‘타가토스’는 미국FDA GRAS 및 EU NOVEL FOOD 으로 등록되어 해외에서 기능성과 안전성을 인정받음
- 건강기능식품 전문업체인 월드웨이는 실크아미노산으로 세계 최초로 할랄인증을 받음. 또한, 네이처텍은 건강기능식품과 화장품 제품 7종이 글로벌 할랄인증기관인 IFANCA (Islamic Food and Nutrition Council of America) 로부터 인증획득. 이에 따라 이슬람 식품시장으로 본격적인 진출가능
- 특히, 인삼은 글로벌 시장에서 독점적인 지위를 가지는 국내 특유의 스토리텔링을 가지고 있으며, 쑥도 단오때 채취한다는 구전이 있는데 실제로 위계양역제, 항알레르기의 주성분인 eupatilin (동아제약/스티렌) 이 단오 채취시 가장 함량이 높아진다는 것을 과학적으로 입증하였음. 이와 같이 기능성제품의 개발 뿐만 아니라, 국내산 원료와 관련된 스토리텔링을 찾아내고 부각시키는 연구도 절실히 요구됨

국내 식약처 기능성 인증을 바탕으로 국제기능성 인증을 받은 경우는 정관장의 홍삼추출물, 내츄럴엔도텍의 백수오 복합추출물 등 5건 이내로 제한적임

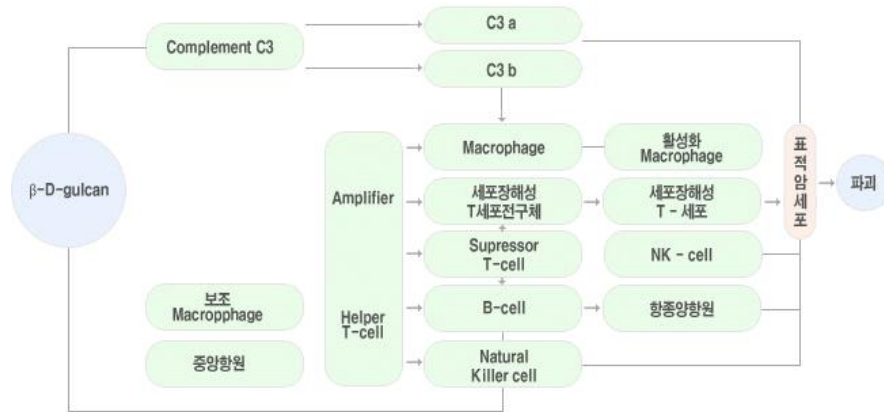
국제시장 진출을 통한 세계적 명품 육성을 위해서는 국제기능성 인증 획득이 시장 진출을 위해 필수불가결한 요소임

(3) 버섯의 대표 기능성 면역

버섯의 대표 기능성은 면역기능향상으로 대중에게 알려져 있으며 대부분의 식용 및 약용버섯들은 항종양물질과 면역조절물질을 함께 가지고 있는데 glucans과 glycans와 같은 베타글루칸으로 알려져 있으며, 미국 식품의약국안전청 (FDA)의 GRAS (General Recognized as Safe)로 승인을 얻어 식품 첨가물로 널리 사용중임



(1-3)-β-D-glucan 구조



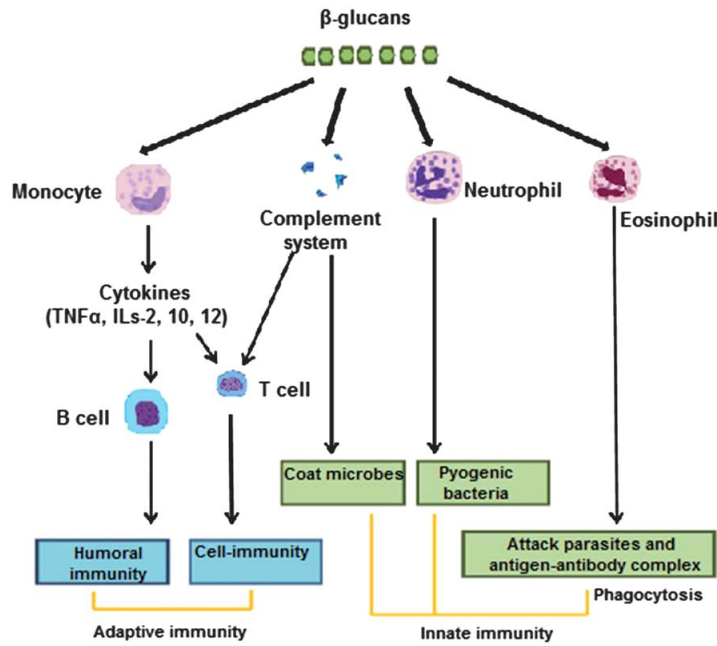
(β-Glucan 의 항암 및 면역조절 기능 모식도)

베타글루칸은 버섯에만 존재하는 것이 아니라, 효모, 곰팡이류, 박테리아뿐만 아니라 식물(곡류)에서도 발견됨. 식물(곡류)에서 추출한 베타글루칸은 가장 저렴하지만 주로 식이 섬유 기능으로 사용하고, 버섯이나 효모에서 추출한 베타글루칸이 의약품이나 건강기능성식품 개발에 많이 사용되고 있음

비특이적인, 면역증강 혹은 면역조절 기능이 있는 β-glucan은 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 것으로 보고됨 (Ren et al., Food & Function (2012) 3:1118-1130)

건강기능식품의 기능성원료 개별인정 받은 원료 중 영지버섯 자실체 추출물, 금사상황버섯 추출물, 표고버섯 균사체 추출물 등이 β-glucan을 지표성분으로 혈행 개선, 면역기능 개선, 간건강에 도움을 주는 것으로 식약청에 등록되어 있으며 버섯류에 대한 지표물질 다각화에 의한 효능연구가 필요함

특히, 지표물질의 다각화와 더불어 현재 시중에서 면역증강으로 가장 많이 유통되고 있는 표고버섯 glucan (상품명: AHCC)은 균사체 배양으로 glucan을 추출 가공하여 만든



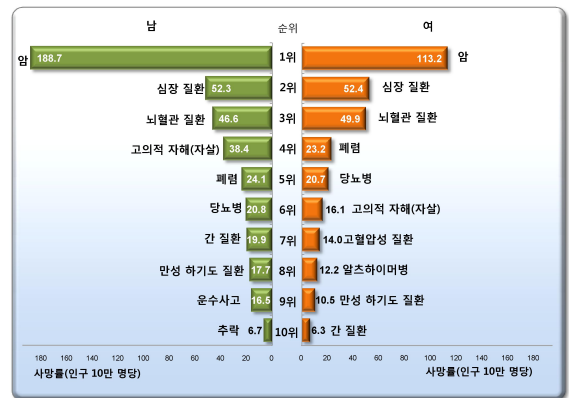
(Ren et al., Food & Function (2012) 3:1118-1130)

제품으로 농업생산자의 소득 창출에 기여하지 못하는 바 농업생산자 소득 창출을 위한 버섯 자실체를 대상으로 한 연구와 제품개발이 진행될 필요가 있음

(4) 버섯의 면역증강효과에 의한 암환자 부작용 완화

최근에는 고령화사회에서 초고령화사회로 변모하면서 암으로 인한 사망이 증가하고 있으며, 40대 이후 뿐만 아니라 전 연령층 (40대 이상 1위, 30대 2위, 10~20대 3위)에서도 주요 사망원인으로 지목되고 있음 (2014년 성별 사망원인 순위, 통계청)

악성 종양은 종양의 조직 침투 정도에 따라 치료 방법을 결정하고, 환자의 치료적 상태에 따라 수술, 항암화학요법, 방사선 치료를 병행함 (국가암정보센터, 2012). 그 중 항암화학요법은 환자의 생존율을 높이고, 암 재발의 위험을 낮추기 위해 사용되는 치료법으로써 종양의 상태에 따라 항암제를 체내에 투여하여 암세포의 성장과 전이를 억제하는 전신적인 치료 방법임 (국가암정보센터, 2014)



항암화학요법은 치료기간동안 오심, 구토, 설사, 식용부진과 같은 위장관계 부작용과 골수 기능의 저하로 인한 감염, 빈혈, 출혈 등의 문제를 가지며, 탈모 피부변화, 호흡계 이

<그림. 암치료의 부작용>



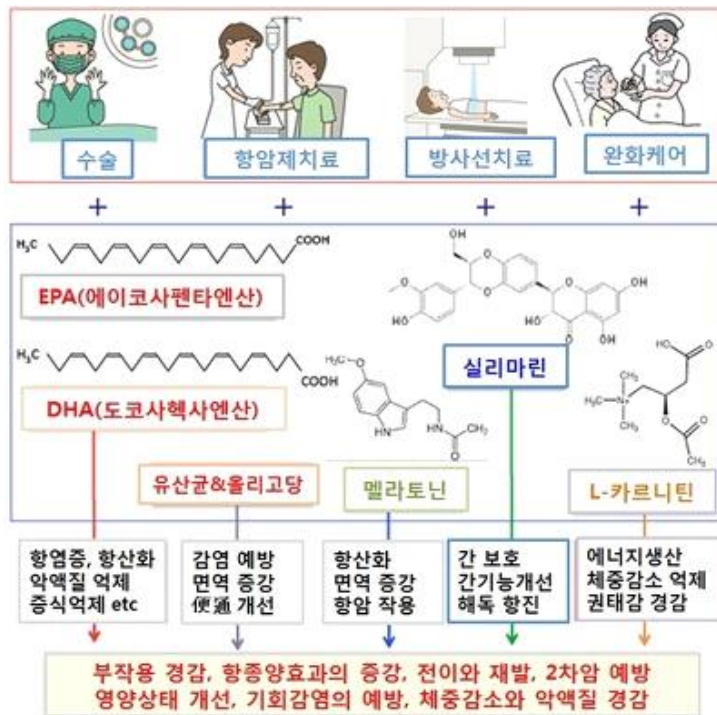
보건복지부 국립암센터 대한의사협회

상 등의 부작용도 일으킴 (Pereira et al, European Journal of Oncology Nursing (2012) 16:227-232)

현재 대장암 환자들에게 사용되고 있는 Oxaliplatin 항암제의 경우에는 환자의 감각 신경과 운동 신경에 영향을 미쳐 말초신경병증을 유발하며 (Land et al., Journal of clinical oncology (2007), 25: 2205-2211), 암환자 80% 이상은 항암화학요법을 통해 피로를 경감하는데 이는 통증 등의 신체적인 부작용뿐만 아니라 치료의 불확실성 등으로 인한 우울, 불안 두려움 등 정서적인 문제도 경험하는 것으로 보고되고 있고 (Ray et al., Comparative medicine (2008) 58: 234).

최근 항암화학요법의 부작용을 낮추고 치료의 효과를 높이기 위하여 운동과 관련된 다양한 연구들이 진행되고 있으며 운동을 통해 신체적, 심리적으로 긍정적인 영향을 미치는 것뿐만 아니라 더 나아가 생존율을 높일 수 있는 중요한 요인이라 보고됨 (Je et al., International Journal of Cancer (2013) 133:1905-1913; Schmidt et al., International Journal of Cancer (2015) 137: 471-480)

버섯은 면역증강기능을 가지고 암환자에게 나타날 수 있는 부작용완화를 목적으로 한 면역기능개선과 연관기능성인 피로개선과 운동수행능력개선 소재로 활용될 수 있음



<암 표준치료의 부작용 경감 및 항종양효과 증강효과가 임상시험에서 나타난 보충제 (일본 긴자클리닉)>

(5) 버섯 기능성 개별인정형 인증 현황 및 국내인증을 기반으로 국제인증 및 국제시장 진출
버섯 품목 선정

버섯유래 국내 개별인정형 기능성 원료는 3품목 (동충하초, 상황버섯, 영지버섯) 6건으로 등록된 점은 버섯 기능성 연구개발이 미흡한 수준에 머물러 있음. 특히 국내에서 생산하는 품목의 자실체로 개별인증형 기능성인증을 받은 원료는 동충하초 주정 추출물과 금사 상황버섯 단 2건에 불과함

《국내 버섯 기능성 원료 인증 현황 진단》

- 표고버섯균사체의 경우 일본의 아미노업 주식회사의 대표제품인 AHCC 즉 표고버섯에서 추출한 활성화 당류 화합물로 국내에서는 일본 수입 표고균사체 AHCC로 기능성 원료로 인증받음
- 2011년 동충하초 균사체의 발효 추출물로 지구력 증진 기능은 중국에서 수입된 박쥐나방동충하초 (*Ophiocordyceps sinensis*)에서 추출한 것으로 인증 받았으나 분리 균인 *Paecilomyces hepiali* cs-4는 박쥐나방동충하초균이 아닐 것으로 추정됨
- 상황버섯 품목의 경우 금사상황버섯이라는 명칭으로 면역 능력 증진에 도움을 주는 인증을 받음
- 2013년도 7월에 밀리타리스 동충하초 주정추출물을 가지고 동아제약(주)에서 면역 증진에 도움을 주는 동충일기 제품을 출시하였고, 생리활성기능 2등급으로 기능성 원료 인정받음

인정현황	기능성원료	기능성	고시/개별인정형	
목이버섯 식이섬유		장건강	배변활동	고시형
영지버섯자실체추출물		혈행 개선	혈행 개선에 도움	고시형
2008.02 표고버섯균사체		면역 기능	면역력 증진에 도움	개별인정형
		간건강	간 건강에 도움	개별인정형
2008.06 표고버섯균사체추출물		간건강	간 건강에 도움	개별인정형
2008.06 금사상황버섯 (국내)		면역 기능	면역력 증진에 도움	개별인정형
2011.05 동충하초 발효 추출물		운동수행능력	지구력 증진에 도움	개별인정형
2013.07 동충하초 주정 추출물 (국내)		면역 기능	면역력 증진에 도움	개별인정형

<버섯류 건강기능식품 원료 현황 식품의약품안전처 제공>

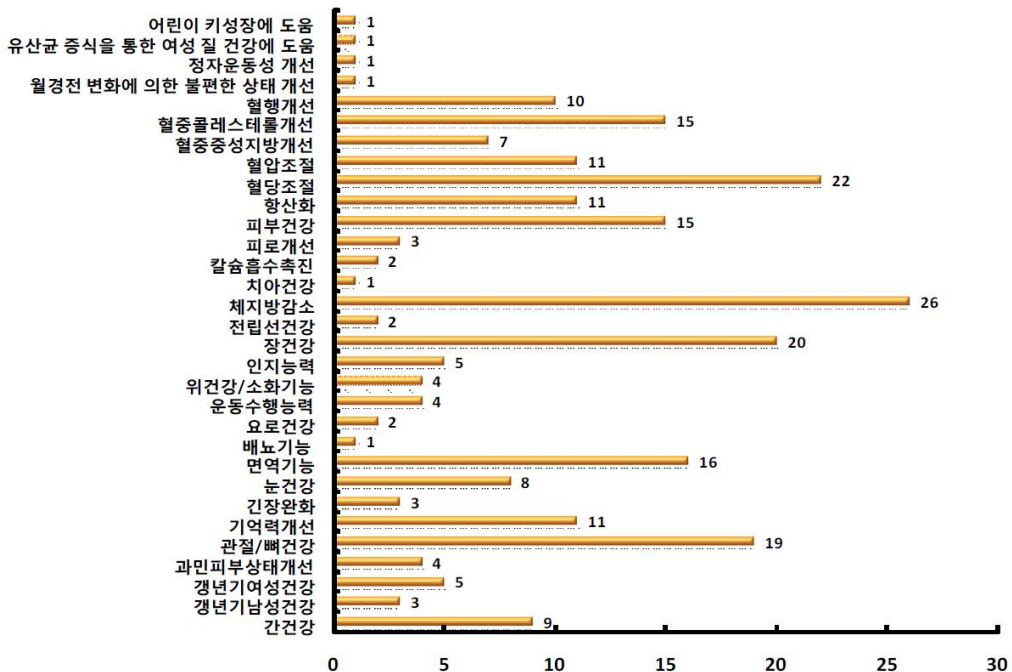
《연구개발 대상 품목 선정》

동충하초 : 버섯의 대표기능성인 면역기능개선 국내 개별인정형 기능성 인증을 받았으며 타 개별인정형 기능성 획득에 의한 다기능성 전략과 국내기능성 인증을 바탕으로 한 국제기능성 인증이 가능하고 국내산 농업생산자의 자실체를 사용할 수 있음. 특히 신규기능성 인증의 다기능성 획득과 제품화를 동시에 추진할 수 있음

나. 동충하초 국내 및 국제기능성 인증을 통한 세계적 명품 육성 및 약용버섯 복합추출물 신규 소재 발굴 필요

(1) 국내 기능성 원료 인증현황 파악 및 국내 및 국제 기능성 인증을 위한 타겟 기능성 선정

2014년도의 기능성별 원료 인정 현황에 따르면 고령화 사회에 진입하는 사회적 분위기에 맞추어 상위 5위의 기능성인증 원료는 1) 면역기능개선, 2) 혈당조절, 3) 체지방감소, 4) 관절/뼈건강 개선, 5) 장건강 으로 많은 기능성 원료가 인증되어 있음. 건강기능성 식품의 대표성을 지닌 건강기능성인 면역기능개선은 홍삼 및 당귀혼합추출물이 제품화와 시장점유에 있어 높은 수준을 유지하고 있음 (정관장: 약 7000억 매출 (홍삼), 헤모임: 약 1500억 매출 (당귀혼합추출물)).



<2014년도 기능성별 원료 인정 현황, 식품의약품안전처>

고령화 사회진입과 만성질환자 증가에 따라 면역기능개선 기능성식품 시장은 향후 지속적으로 증가될 것으로 예측되며, 동충하초의 면역기능개선 국내기능성인증에 따른 추가 기능성 발굴의 다기능성 전략이 필요함.

버섯이 건강인을 대상으로 한 면역기능증강과 암 환자의 부작용 완화를 위한 항암 보조 품목으로 사회적 인지도와 수요가 있는 바, 암 환자의 부작용 중의 하나인 피로를 개선시킬 수 있는 피로개선을 타겟으로 한 건강기능성 인증은 동충하초의 면역기능개선 기능성에 더하여 피로개선 기능성을 추가하는 다기능성 타겟 기능성이 될 수 있음. 특히, 다기능성 전략과 더불어 피로개선의 연관기능성인 운동수행능력개선에 대한 동충하초 기능성 소재개발, 기능성 인증, 제품화는 건강인을 대상으로 한 건강기능성 식품 개발과 암 부작용 완화 시장요구에 부응할 수 있음. 방사선 치료를 받는 전립선암 환자의 경우 평소 운동하는 사람은 치료 후 성 기능 장애의 정도가 낮다고 하는 결과가 있으며, 근력을 강화하는 저항 훈련 (Resistance training)은 암 치료를 받는 환자에게 급격하게 일어나는 체격의 변화 즉 근육과 골량의 감소를 방지하는 데 도움이 될 가능성이 있다고 보고됨 (CA Cancer J Cli 2006; 56:323-353). 또한, 운동 효과에 관해 많은 연구가 이루어지고 있는 가운데 암 치료가 끝난 생존자는 회복기에 정기적인 운동이 회복 촉진에 도움이 된다고 함. 상기 연구결과에 따라 면역기능이 약해진 암 환자의 경우, 운동능력이 감소되어 있으며, 신체적 스트레스로 인한 근육의 피로도 면에서도 정상인 사람에 비해 상당히 높은 수치를 가진 상태로 쉽게 체력 고갈이 될 가능성이 큼

기능성		기능성원료	인정 건수	기능(지표) 성분	고시/ 개별인정형
면역기능 개선	면역력 증진 에 도움	1. 당귀혼합추출물	1	Nodakenin, Paeoniflorin, Chlorogenic acid	개별인정형
		2. L-글루타민	2	L-글루타민	개별인정형
		3. 게르마늄효모	1	게르마늄	개별인정형
		4. 금사상항버섯	1	B-글루칸	개별인정형
		5. 표고버섯균사체	3	α-1,4 글루칸, α-글루칸	개별인정형
		6. 스피루리나	1	총 엽록소	개별인정형
		7. 클로렐라	1	총 엽록소	고시형
		8. 청국장균배양 정제물	1	폴리감마글루탐산칼륨	개별인정형
		9. 동충하초 주정추출물	1	코디세핀	개별인정형
		10. 효모베타글루칸	1	B-글루칸	개별인정형
	과민면역반응 완화에 도움	11. <i>Enterococcus faecalis</i> 가열 처리건조분말	2	<i>Enterococcus faecalis</i> FK-23 사균체, Cis-박세산, 박세산	개별인정형
		12. 구아바잎추출물등 복합물	1	Ellagic acid, EGCG, Gallic acid	개별인정형
		13. 다래추출물	2	Quinic acid, Citric acid	개별인정형
		14. 피카오프레토 분말 등 복합 물	1	Total Polyphenol, Vit C, Chlorogenic acid, Cinnamic acid	개별인정형
		15. 소엽추출물	1	Rosmarinic acid	개별인정형
		16. 합성 PLAG	1	1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetyl-rac-glycerol	개별인정형
피로 개선	피로 개선에 도움	1. 헛개나무과병 추출분말	1	Quercetin	개별인정형
		2. 홍경천추출물	16	Rosavin	고시형
		3. 발효생성 아미노산 복합물	2	L-Leucine, L-Isoleucine, L-Valine	개별인정형
운동수행 능력	운동능력 향 상에 도움	1. 크레아틴	3	Creatine monohydrate	개별인정형
		2. 헛개나무과병 추출분말	1	Quercetin	개별인정형
		3. 마카젤라틴화 분말	1	n-benzyl-hexa decanamide	개별인정형
	지구력 증진 에 도움	4. 동충하초 발효추출물	1	아데노신	개별인정형

< 동충하초 관련 기능성 개별인정 원료 현황 >

피로개선 의 경우 3개의 원료가 등록되어 있고, 기능성 인정번호는 18건으로 등록됨. 그러나 2016.1월부터 16건의 인정번호를 갖는 홍경천추출물 원료가 식품의약품안전처의 고시형 기능성 원료로 전환됨으로 피로개선 원료는 총 3건이고 운동수행능력의 기능성을 갖는 원료는 4건임

피로개선과 관련하여 개별인정 받은 원료는 (주)생명의 나무의 헛개나무 과병 추출분말과 (주)CJ 제일제당의 발효생성 아미노산 복합물이 있음. 피로개선 관련 시장은 아직 제대로 형성되어 있지 않은 것으로 판단됨

운동수행능력개선의 경우 개별인정 받은 원료는 (주)씨제이제일제당과 (주)선경트레이딩의 크레아틴과 (주)이스터비엔에프의 마카 젤라틴화 분말 그리고 (주)뉴스킨코리아의 동충하초 발효 추출물이 있음. (주)뉴스킨코리아의 동충하초 발효 추출물은 박쥐나방동충하초 (*Ophiocordyceps sinensis*)에서 분리된 균인 *Paecilomyces hepiali* cs-4는 판별에 의하면 박쥐나방동충하초가 아니고 한국식품공전에 등록되어 있는 밀리타리스 동충하초나 눈꽃동충하초 종도 아닌 다른 종일 것으로 추정됨. 운동수행능력개선 원료가 3건이 등록되어 있으나 면역기능개선과 연관된 다기능성을 확보할 수 있는 원료는 아닌 것으로 판단됨

《동충하초 활용 연구개발 대상 건강기능성 선정》

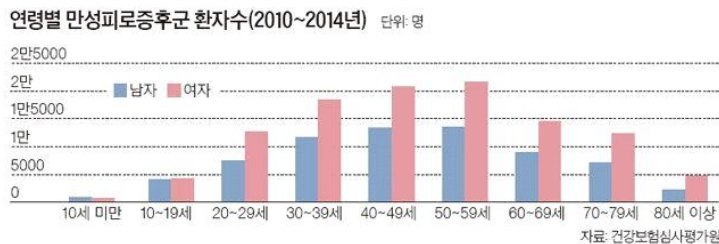
면역기능개선: 동충하초 면역기능개선 국내기능성 인증을 바탕으로 한 국제기능성 인증 필요 (미국 NDI 인증)

피로개선: 동충하초의 기능성 다각화를 위해 피로개선 국내기능성 인증을 바탕으로 한 국제기능성 인증 (일본 보건용 식품 인증) 필요

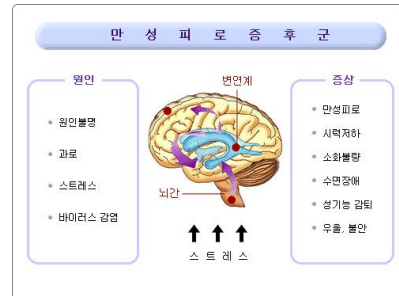
운동수행능력개선: 동충하초를 기반으로 한 운동수행능력개선용 국내기능성 인증. 차후 연관기능성인 피로회복과 면역기능개선 소재개발에 활용될 수 있게 함

(2) 피로개선과 운동수행능력개선

피로는 여러 가지 원인에 의해서 신체적 혹은 정신적으로 지치거나 약해진 상태를 말하며 원인과 관계없이 피로 증상이 6개월 이상 지속되거나 반복되는 경우를 만성피로라고 함. 흔히 피로를 느낄 때에는 기운이 없고, 쉽게 지치며, 기력이 없어지고, 다른 일에 무관심해지는 증상이 나타남



만성피로를 수반하는 원인질환에는 결핵, 암, 당뇨, 간질환, 빈혈 등의 신체질환에 의해 피로를 느낄 수 있지만 모든 만성피로의 90% 이상은 만성질환과는 관계없이 생기는, 심한 스트레스 등에 의한 정신적 피라 함



병, 있 관 로

만성피로를 느끼는 환자는 일관되고 확실한 원인보는 복잡한 요인에 의하여 지속된 피로가 있으면 통증, 인지장애, 근육통, 집중장애, 소화기증상, 관절 등을 동반하며, 약물치료보다는 인지행동치료나 단 적 운동치료 등이 중요시되고 있음 (주지현 등, e Korean Journal of Medicine, (2006) 70: 469-473)

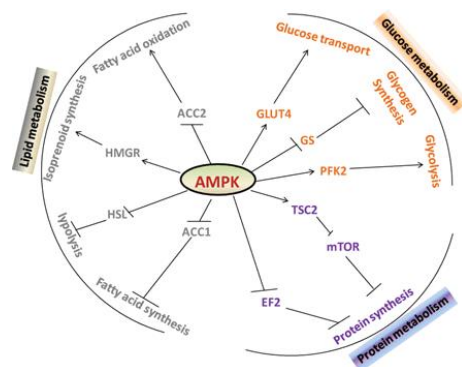


다 서 통 계 Th

운동수행능력은 신체의 저장된 에너지 전달력과 보 량, 회복능력 및 영양상태에 의해 좌우될 수 있음 (Berning, Int J Sport Nutr (1996) 6: 121-133). 운동수행능력이 떨어지게 되거나 불균형을 이루게 되면, 비정상적인 움직임이 나 보행을 초래하고, 운동량이 부족에 의해 체력저하 및 비만, 고지혈증, 고혈압 등의 문 제를 일으킬 수 있음.

노인에서의 운동능력의 감소는 흔하며 운동 후에도 회복이 느린 것을 흔히 볼 수 있음. 그러나, 노인에서의 규칙적이고 지속적인 운동은 기억력, 문제해결력 및 추론력을 증대시 키고, 자아존중감 또한 높아지는 것으로 보고되어 있음 (김영수, The Korean Journal of Physical Education (2001) 40:181-193)

운동량이 많고 운동시간이 길 경우 보다 많은 에 너지를 필요로 하는데, 근육에 저장되어 있는 글리 코겐과 지방을 효율적으로 써야 에너지의 부족 현 상이 나타나지 않으며 (Hickson et al., J Appl Physiol (1977) 43:829-833), 이러한 글루코스 (glucose)/지방(lipid)의 항상성(homeostasis)을 유 지시키는 데 있어 AMPK가 중요한 역할을 함 (Kim et al, Exp Mol Med (2016) 48: e224)



<Wang et al., Clinical Science

(2012) 122: 555-573>

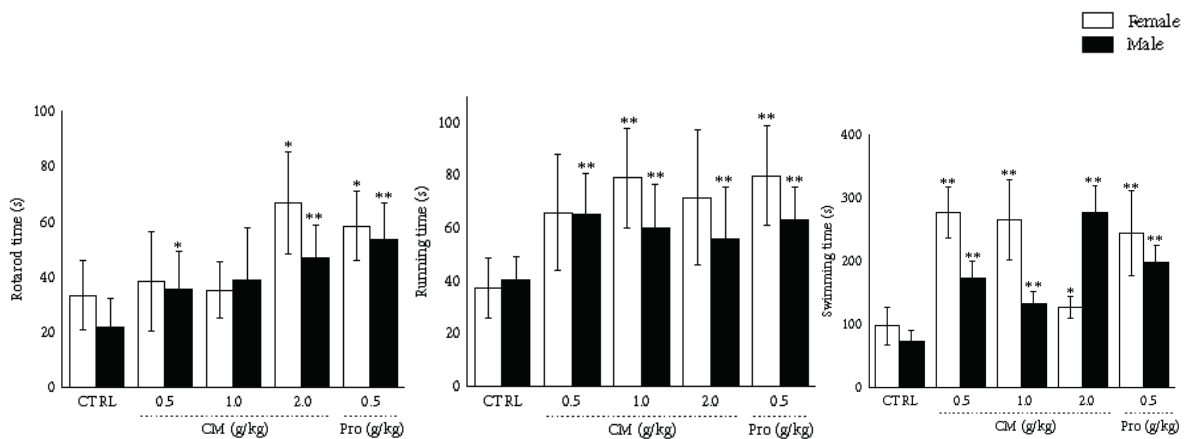
(3) 동충하초의 피로개선과 운동수행능력개선에 대한

효능 연구

현재 국내 면역기능개선 건강기능성을 인정받은 종은 400여종의 동충하초 종중에서 밀리타리스 동충하초(Cordyceps militaris)임 (향후 밀리타리스 동충하초를 동충하초로 칭함). 동충하초 지표물질인 코디세핀(Cordycepin, 3'-deoxyadenosine)은 세포 성장억제, 세포사멸 유도, 항염증 작용, 고지질혈증의 완화 등의 다양한 생물학적 효능이 보고됨 (Hardeep, 3 Biotech (2014) 4:1-12). 이러한 코디세핀의 다양한 생물학적 효능은 AMPK의 활성화와 연관이 있다는 연구 결과가 발표되고 있음

동충하초는 한국식품개발연구원에서 발표한 “운동 수행능력 향상을 위한 의약품 대체식품 개발” 보고서 (한대석 외 7인, 2004)에 의하면 지방의 이용을 증가시키고 글리코겐의 사용을 절약함으로써 운동수행능력이 향상됨을 보고하였음

중국에서는 (Sone et. al., Evid Based Complement Alternat Med. (2015) 1-15)이 동충하초 추출물을 이용하여 피로개선에 대한 효과를 확인하였고 이러한 작용에 AMPK와 mTOR의 활성화가 관여하는 것으로 발표하였으나, 국내산 동충하초 자실체를 이용한 연구는 미진함



<Sone et. al., Evid Based Complement Alternat Med. (2015) 1-15>

다. 동충하초 수출전략형 세계 명품 제품화를 위해서는 농업생산자와 후방산업 (가공품 및 식품산업 등)의 유기적인 연계와 인문학적 스토리텔링, 브랜드 개발, 판별 및 과학적 효능 검증을 포괄하는 융복합 연구 필요

한국을 대표하는 국제적인 건강기능성 식품인 인삼은 중국 보건식품 국제기능성 인증을 지니고 국내에 체계화된 재배시스템이 구축되어 있으며 국내 품종을 보호할 수 있는 판별마커 개발이 타 품목보다 잘 이루어져 있음. 이에 인삼을 벤치마킹해 버섯 융복합 연구를 추진할 필요가 있음.

국제적인 건강기능성 인증은 인삼과 백수오로 한정되어 있고 국내와 국제기능성 인증으로 시장이 확대되는 경우에 원자재 수급 방향과 판별 문제를 고려해서 병행해서 추진해야 할 필요가 있음을 최근의 백수오 사태에서 알 수 있음.

특히, 백수오의 경우 1) 건강기능성 인증, 2) 농업의 후방 산업에 의한 제품화, 3) 판별과 과학적 효능 검정, 4) 생산단지구축의 및 명품화의 융복합 연구 4대 분야 중 수요확대에 의한 체계적인 생산단지 미구축과 판별로 인해 일어난 것으로 추정됨.

2011년 식품의약품안전처 기준 버섯의 건강기능성 식품 전체 매출은 15억으로 인삼 및 홍삼의 가공품 국내 매출 약 7,000억원에 비해 현저하게 적음.

이에 버섯 산업의 소비진작을 위해 대표품목으로 동충하초를 선정하고 융복합 연구 추진 4대 분야를 병행해 추진할 필요가 있음

구분	핵심기술별 융복합 중점추진 방향			
	건강기능성 인증	농업의 후방산업에 의한 제품화후방 산업	판별과 과학적 효능 검정	생산단지 구축 및 명품화
동충하초 현황	- 국내 면역기능개선 인증	- 면역기능개선 ‘동충일기’ - 다양한 가공품이 만들어지고 있으나 판매 부진 - 브랜드와 스토리텔링 전략을 지닌 홍보전략 필요	- 동충하초 판별마커 구축 - 원재료 표준화 완료 - 면역기능개선 임상효과 확인 - 국내산 동충하초 동물실험 연구 미비	- 대량생산시스템 구축 - 품종 보호권 획득 - 중국, 일본, 한국에 재배 특허 확보 - 소비 촉진을 위한 홍보전략 필요
동충하초 융복합 추진방향	- 국제 (미국) 건강기능성 인증 - 국내 피로개선 건강기능성 인증 - 국내 운동수행능력 개선 건강기능성 인증 - 국제 (일본) 피로개선 건강기능성 인증	- 인문학과 스토리텔링을 접목한 홍보전략 마련 - 농업과 생산자가 연계된 체계적인 발전 계획 수립 - 브랜드 정립에 따른 체계적인 가공품 생산 필요	- 국내산 밀리타리스 동충하초 동물실험 효능 연구 - 국내산 밀리타리스 동충하초와 근연종 소재개발을 위한 효능 및 지표성분 탐색	- 인문학과 스토리텔링에 의한 식품산업과 연계 필요 - 지자체와 협의를 통한 재배단지 구축 전략 필요 - 원가 절감을 위한 자동화 시스템 필요
동충하초 산업화 융복합 연구 목표	버섯을 대표하는 품목으로 동충하초의 산업화를 촉진하여 버섯소비를 진작하고 국내 및 국제 기능성 인증에 의한 제품화와 브랜드 개발에 의한 가공품 제품화로 동충하초 세계적 명품 육성			

1-4. 선행연구 내용 및 결과


가. 선행연구 내용 및 결과

(1) 밀리타리스 동충하초를 활용한 면역기능 강화 건강기능성 인증 및 제품화

현재 동아제약(주)연구소에서 동충하초 활용 건강기능성 인증 기반 기술인 표준화 제조공정을 보유하고 있으며 동충하초 주정추출물 국내건강기능성 인증을 획득할 수 있는 기반이 되었음

동충하초의 면역증진 효과 규명을 동물실험과 임상실험을 통하여 건강기능식품 원료로 개별인정을 받음. 동물실험에서는 정상군, 면역억제군, 동충하초투여군을 설정하여 12일간의 경구투여를 진행. 임상실험에서는 건강한 성인 남성 78명, 위약섭취군과 시험군을 설정하여 4주간 음용을 진행.

제조공정	기준규격 (cordycepin)
(1) 동충하초	
(2) 파쇄	- 파쇄크기 : 2.5cm ² 이하
(3) 추출	- 추출조건 : 상온, 상압, 3일
(4) 여과	- 여과조건 : 가압 - 규조토 여과보조제 사용 - 여지 : 1µm
(5) 희석재침기	
(6) 농축	- 농축조건 : 60°C, 갈압
(7) 살균	- 살균조건 : 95°C, 2회 회당 40분간
(8) 건조, 포장	- 건조방법 : 분무건조 - 방습포장
(9) 동충하초추출물	0.32-0.48% 0.16-0.24%



분자식 C₁₁H₁₃N₃O₇

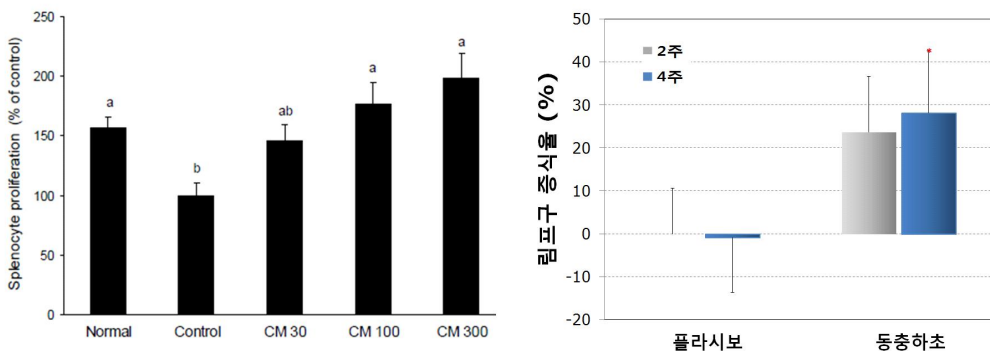
구조식 Nc1nc2nc(O)c3c2nc1O3

IUPAC name 9-(3-Deoxy-β-D-ribofuranosyl)adenine

분자량 251.24 g mol⁻¹

용해점 225.5 °C **함량 (0.32-0.48)**

<제조공정 표준화 및 동충하초추출물의 지표물질 함량 규격화, 동아제약(주)연구소>



<밀리타리스 동충하초의 면역기능 개선 동물실험 및 임상실험 결과, 동아제약>

국내에서 생산되는 국내 원료 버섯으로 금사상황버섯에 이어 2번째로 면역기능 증진 개별인정형 건강기능식품 인증을 받았음 (2014.9). 동일 원료는 피로개선 기능성 획득에 사용되어져 동충하초 다기능성을 획득할 수 있는 원료로 사용될 수 있음.



<건강기능식품 인증 및 제형 연구와 동충하초 제품화, 동아제약>

(2) 밀리타리스 동충하초의 표준화 재배 기술 개발

현재 머쉬텍에서 보유한 재배표준화 기술은 건강기능식품 원료로서 원활한 보급을 가능하게 하며, 현미를 활용한 동충하초 인공재배 및 대량 생산 제조공정 기술력을 보유하고 있음. 상기 원천기술력을 인정받아 한국과 중국, 일본에 효력 있는 재배 특허를 보유하고 있고 보유 품종은 국립종자원에 등록되어져 있음.



<현미기반의 인공재배법 과 대량생산라인 구축 및 한국,중국,일본 특허현황, 머쉬텍>

전 세계적으로 분포하는 동충하초는 약 400여종에 달하고 있으며, 이 중에서 (주)머쉬텍 고유 기술로 인공재배가 가능한 밀리타리스 동충하초 품종을 포함하여 3건에 대한 품종 보호권등록증을 보유하고 있어, 국가적인 차원에서 국립종자원에 의한 품종 보호 권리를 받고 있음. 상기의 기술력과 품종보호권 기반으로 건강기능식품 원료인 밀리타리스 동충하초 품종의 원활한 보급을 통하여 (주)동아제약의 동충하초 주정추출물시료 제조공정에 기여함



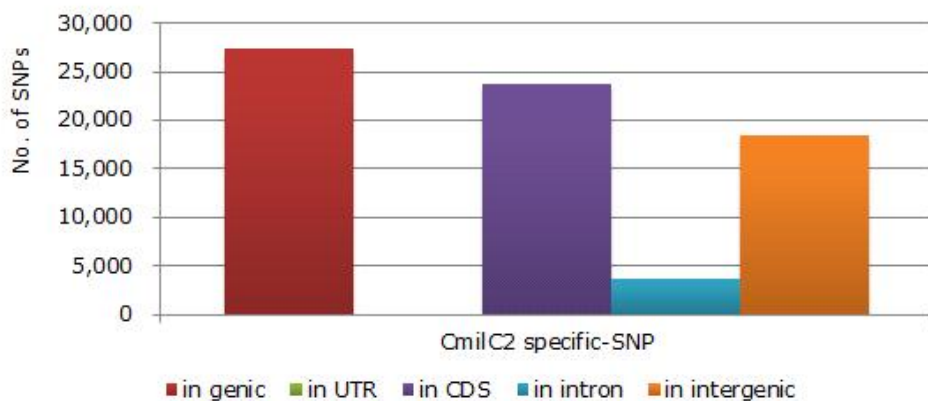
<건강기능식품 원료 밀리타리스 동충하초 등 3품종에 대한 품종 보호권 현황, 머쉬텍>

(3) 동충하초의 원산지 판별 기술 개발

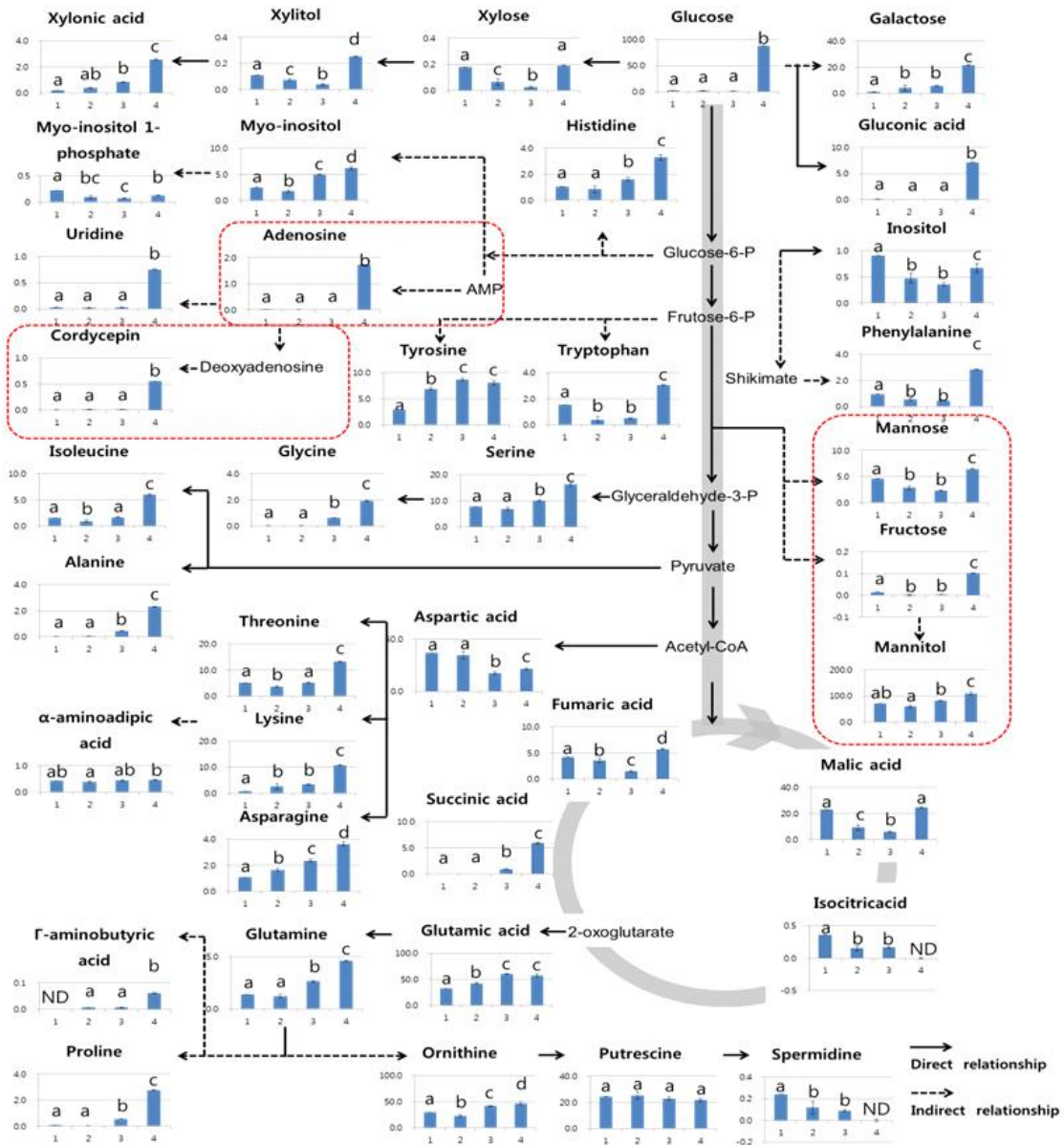
동충하초의 원산지 판별을 위한 유전체 분석 기술 도입. 국내생산 품종 보호를 위한 차세대시퀀싱 방법 (NGS)을 기반으로 원산지 판별기술 개발.

국내지역에 분포된 동충하초 균주 6개와 (주)머쉬텍이 보유하고 있는 재배 균주와의 비교를 통하여, 건강기능식품 원료에 사용되는 동충하초 품목의 품종 보호에 활용할 수 있는 판별 마커를 개발하였음.

	# of Total	in genic	in UTR	in CDS	in intron	in intergenic
CmilC2 특이적-SNP	45,835	27,332	0	23,736	3,596	18,503



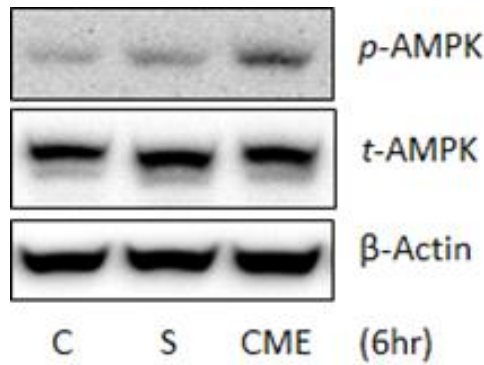
<건강기능식품 원료 균주와 국내 자생 동충하초 균주들 간의 SNP 비교, 머쉬텍>



<건강기능식품 원료 밀리타리스 동충하초 지표물질 GC 분석조건 확립, 가톨릭관동대>

(4) 피로개선과 운동수행능력개선 관련 인자인 AMPK에 대한 효능 확인 데이터

피로개선과 운동수행능력개선에 있어서는 AMPK의 활성화가 중요한 인자로 확인되고 있음. AMPK의 활성을 웨스턴블랏으로 측정하여, HepG2 human cancer cell에 대해 표적치료제(Sorafenib tosylate)와 밀리타리스 동충하초의 주정추출물 (CME) 10 μ g/ml을 처리하고 6시간 후에 AMPK의 활성이 증가 된 것으로 확인.



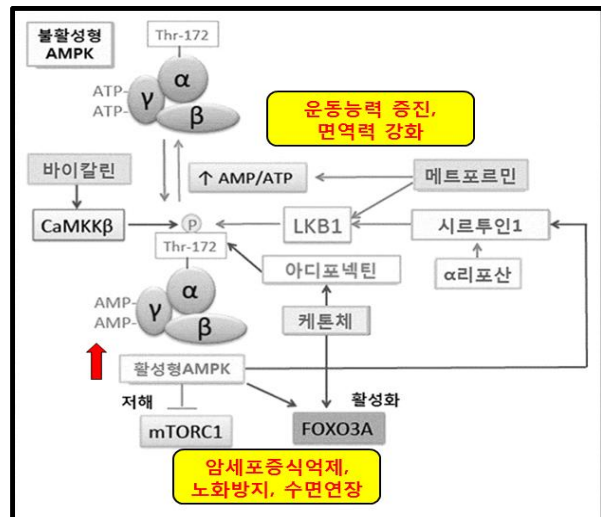
<AMPK 활성측정 결과, 가톨릭관동대>

(5) 선행연구 고찰

동충하초는 국내기능성 인증 및 글로벌 시장 개척을 위하여 기존 면역기능개선 인증 제품의 제형 다각화와 국제기능성인 미국 건강기능성 인증인 NDI인증 획득에 의해 국제적 지명도의 제품을 육성할 수 있음.

동충하초는 면역증강 건강기능성 인증과 더불어 건강인을 대상으로 한 피로개선에 활용될 수 있을 것으로 추정되고 이는 특히 암환자의 삶의 질 개선에 중요함.

운동능력이 증진되면 ATP 생산을 저하시켜 AMP/ATP를 상승시키는 것으로 AMPK를 활성화시키는 생리활성 기전경로가 존재하며, 면역기능개선을 통한 암세포 증식억제 등의 상승효과를 볼 수 있어, 다기능적 요소를 포함하는 피로개선과 운동능력개선에 대한 소재를 개발할 필요가 있음.



<AMPK 활성화와 운동능력 개선 및 면역력 증진, 후쿠다노리의 저서>

피로개선 기능성은 기 개발된 면역기능개선 소재를 사용하여 다기능성 전략을 추진하고 궁극적으로 국내 기능성 인증에 이은 일본 건강기능성 인증 획득을 목표로 추진하고 운동능력개선 소재를 활용하는 전략으로 추진.

동충하초 품목에 대한 인문학적 스토리텔링과 브랜드화에 의한 차별화 전략에 따른 다양

한 가공품 개발이 필요함.

위 사항을 고려하여 본 연구개발에서는 아래와 같이 네 팀으로 연구를 수행하고자 함.

《본 과제의 수행 과제 도출》

총괄과제 ->국내산 버섯(동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발

제1세부과제 (동아제약(주)연구소)

-> 동충하초를 활용한 수출전략형 면역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발

제1협동과제 ((주)바이오텍에스알에스)

-> 동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건강기능성 식품 개발

제2협동과제 (가톨릭관동대)

-> 동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발

제3협동과제 ((주)머쉬텍)

-> 동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산시스템 개발
(횡성군 농업기술센터와 지자체 연계 생산단지 육성에 협조하기로 함)

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 1세부 (동아제약(주))

가. 동충하초 신규 추출물 연구

머쉬텍에서 동충하초의 codycepin함량 최적화 연구가 진행됨에 따라서 codycepin함량이 최적화된 동충하초를 이용한 50%에탄올 추출물의 함량을 더 높여 기능성을 극대화하기 위해 추가적으로 농축을 진행하였다. 기존 동충하초 추출물(면역기능)의 지표성분 Codycepin의 함량은 0.16 ~ 0.24 %로 약 4배 상승하였다.

기준 규격	항목	기준	결과
	성상	이미 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 흑갈색의 분말	이미 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 흑갈색의 분말
	코디세핀	0.790 ~ 1.184	
	수분	40% 미만	
	회분	8% 미만	
유해물질	납	1ppm 미만	0.0119
	총비소	1ppm 미만	0.8903
	카드뮴	0.5 ppm 미만	0.036
	총수은	0.5 ppm 미만	0.0164
	대장균 군	음성	
	미생물	< 100 CFU	

<동충하초 농축액 규격>

제 D2018080033 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	동충하초연조엑스		제조사 (유동기한)	
의뢰인	업체명	동아제약(주)	성명	최효진
	주소	서울특별시 동대문구 천호대로 64 (용두동)		
제조번호	PM18001	접수년월일	2018-08-01	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018080033	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-08-10

시험·검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김천희

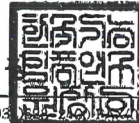
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
열량(Kcal/100g)	253.95Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	41.70%	한아름
조단백질(%)	21.27%	김정숙
조지방(%)	0.23%	이수경
수분(%)	31.19%	김명
회분(%)	5.61%	김명
나트륨(mg/100g)	70.68 mg/100g	김세미

※ 위 관경은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과만은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 8월 10일

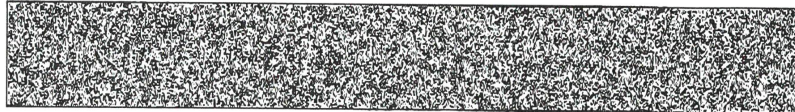
한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (02) 622-2200 팩스번호 (02) 622-1628-0400-1



KHSI



<동충하초 농축액 영양학적 분석결과>

제 D2018080035 호
문서화인

시험·검사성적서

제품명	동충하초연조엑스		제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	동아제약(주)	성명	최호진
	주소	서울특별시 동대문구 천호대로 64 (용두동)		
제조번호	PM18001	접수년월일	2018-08-01	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018080035	

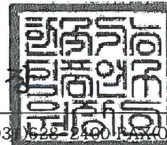
귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2018-08-14
 시험·검사 책임자 : 이정구
 검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0119mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0360mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.8903mg/kg	류미진
수은(mg/kg)	0.0164mg/kg	조웅

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 8월 14일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400-1



KHSI



<동충하초 농축액 중금속 분석결과>

나. 동충하초 추출물 피로개선 기능성 연구결과

(주)머쉬텍에서는 동충하초 내 codycepin함량을 고농도로 함유되도록 제배 조건을 최적화 한 바 있다. 이에 codycepin함량이 증가된 샘플을 이용하여 신규 추출물을 제조하였고 다음과 같이 기능성연구를 수행하였다.

(1). Forced swimming test (마우스 1차)

- 실험동물 : mouse, SKH1-Hairless, SPF 수컷 30마리, 5주령
- 실험군

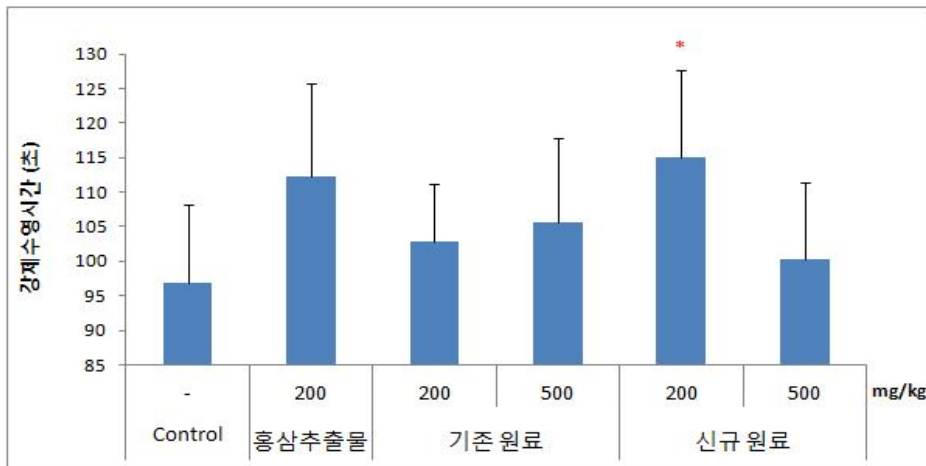
	실험군명	투여용량 (mg/kg)
1	Control	-
2	양성대조군	200, 홍삼분말
3	동충하초 추출물 (기존)	200
4		500
5	동충하초 추출물 (신규)	200
6		500

* 동충하초 추출물 (신규) : 지표성분 함량이 증가된 동충하초로 동일제조공정임.

- 평가지표 : 강제수영시간, 혈중 ALT, AST, Creatinine, LDH, Glucose, Lactate, SOD, IL-6, IL-1B

- 평가 결과

①. 강제수영시간



< 강제수영시간, *; p < 0.05 vs control >

강제수영시간 측정결과에서 대조군 대비 양성대조군의 수영시간은 약 15.9% 증가하였다. 특히 시험물질 투여군에서는 동충하초 신규 추출물 200mg/kg 투여군에서 대조군 대비 약 18.8% 증가한 수영시간을 나타내었다. 대조군 대비 동충하초 신규 추출물 200mg/kg 투여군에서 통계학적 유의성이 나타났다.

②. 혈액생화학 분석 (ALT, AST, Creatinine, LDH, Glucose, Lactate)

혈액생화학 분석에서 AST, ALT, Creatinine, LDH, Glucose 수치분석 결과 군간 통계학적으로 유의한 차이를 확인할 수 없었고, Lactate 분석결과 대조군 대비 양성대조군의 수치에서 통계적으로 유의한 차이를 확인하였다.

③. ELisa 분석

Elisa 분석 결과 양성대조군인 홍삼추출물은 SOD, IL-6등이 증가한 반면 동충하초 추출물 군은 감소하는 결과를 보였다. 항산화작용의 SOD는 피로상태에서 증가하는 것으로 알려져 있다. 동충하초 추출물 투여군은 오히려 감소하여 부정적인 결과를 나타내었다.

④. 결론

개발중인 신규 동충하초 추출물은 200 mg/kg에서 유의적인 수영시간 증가가 나타났다. 하지만 용량의존성이 보이지 않았고 SOD 농도가 오히려 감소하였다. 따라서 추가적인 기능성 평가연구를 통해 재현성 및 작용기전을 확인할 필요가 있다.

(2) forced swimming test Rat 모델

- 실험동물 : SD rat
- 실험군

	실험군명	투여용량 (mg/kg)
1	Control	-
2	양성대조군(홍삼추출물)	200
3	동충하초 추출물 (기존)	100
4		500
5		1000
6	동충하초 추출물 (신규)	100
7		500
8		1000

- 시험물질의 조제 및 분석

의뢰자측에서 제공한 시험 물질 정보를 토대로 해당 용매에 희석하여 조제하였다. 동충하초 추출물 원료 함량(26.6%)에 맞춰 동충하초 신규 추출물(원료 100%)의 함량도 26.6%로 맞춰 조제하였다. 양성대조물질인 정관장 홍삼분말(원료 100%)은 100%함량으로 조제하였다.

- 실험방법

①. 모델 유도

마지막 투여 후 1시간 쯤에 각 시험군별로 22±1 °C의 수온의 30cm 깊이의 물에 수영을 시켰다.

②. 실험동물 : SD rat, 수컷, 30마리, 6주령, 230 ~ 250g

③. 강제수영 수행시간 측정

피로도의 정도를 평가하기 위해 강제수영시험 (Forced swimming test)를 수행하였

다. 5~10일동안 A, B군은 매일 각각의 동충하초추출물을 투여하고, Control 군도 같은 용량으로 DDW를 투여한 후, 1시간뒤에 강제수영시험을 실시하였다. 수조의 크기 30X30X80cm, 물 높이 60cm, 물 온도 25±3°C의 수조 (swimming pool)에서, Leichtweis 등의 방법에 따라 체중의 10% 에 해당하는 추를 생쥐의 미근부(꼬리)에 매달아 탈진 때까지 강제로 수영하게 하였다. 탈진 (all out)의 판단은 실험동물이 물속에서 10초간 표면상으로 떠오르지 않는 상태로 판정하였다.

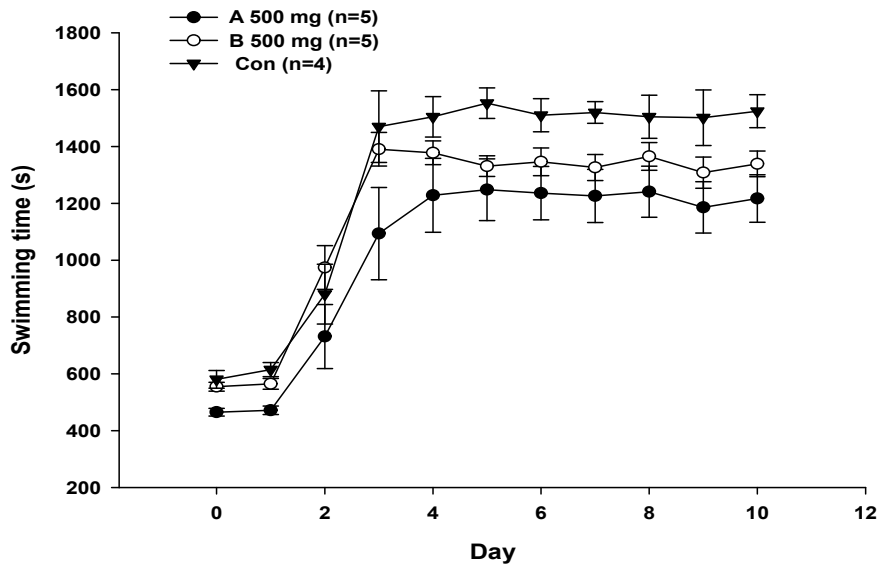
④. 통계처리

Sigma stat program을 사용하여 Mean±S.E로 나타내었다. 그룹간의 유의적인 통계치를 분석하기 위하여 p<0.05의 유의수준에서 T-test, Two-way ANOVA test를 실시한 후, Tukey test 를 이용하여 사후검정을 하였다.

- 평가 결과

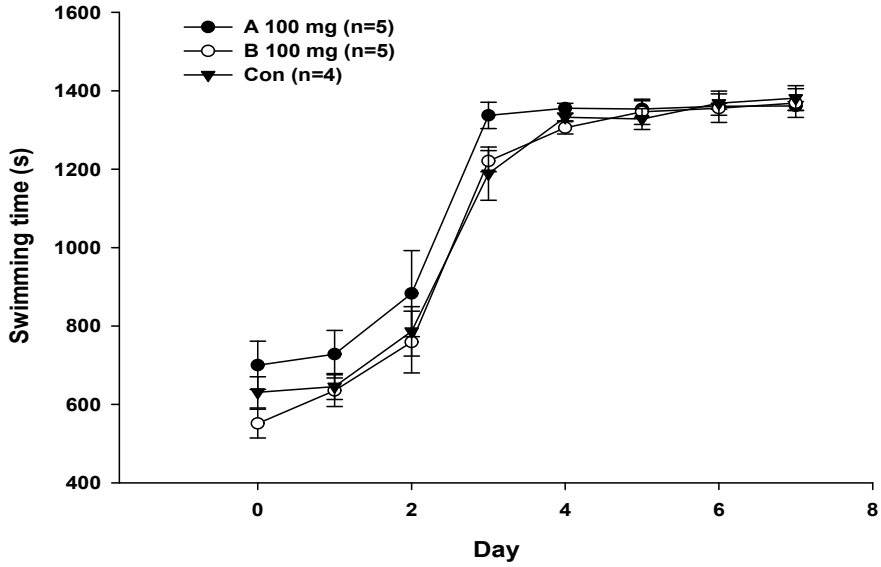
①. 동충하초추출물의 강제수영시간

500mg/kg 농도에서 강제수영능력을 측정할 결과는 다음과 같다. 투여 셋째 날 까지 Control군, A군, B군 모두 수영시간이 증가하는 경향을 보이고 이 후 증가한 수영시간이 유지되지만, 각 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

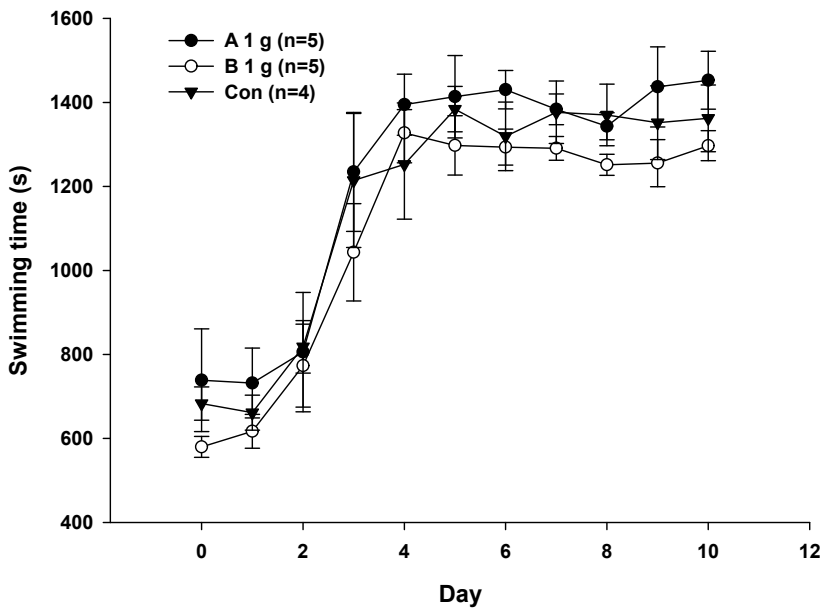


<강제 수영시간 (Rat model), 동충하초 추출물 500mg/kg)

1g/kg, 100mg/kg 용량에서 강제수영능력을 측정한 결과는 다음과 같다. 투여 셋째 날 까지 Control군, A군, B군 모두 수영시간이 증가하는 경향을 보이고 이 후 증가한 수영시간이 유지되지만, 각 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

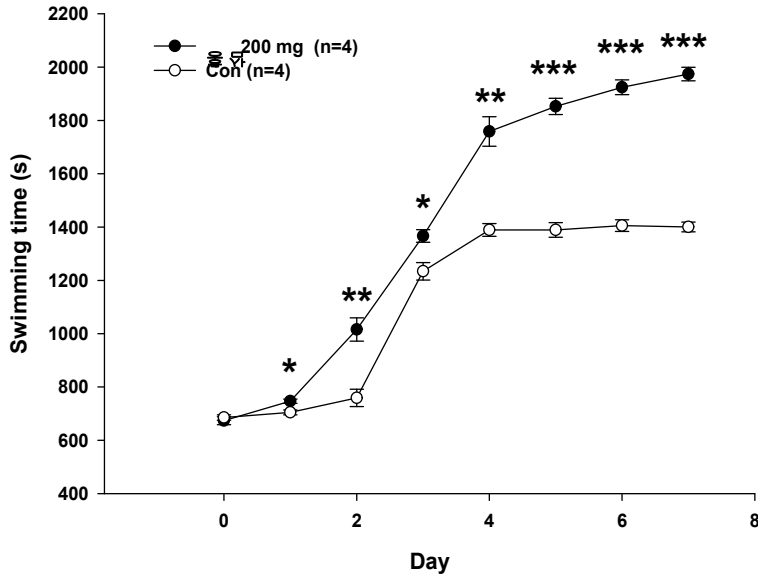


<강제 수영시간 (Rat model), 동충하초 추출물 100mg/kg)



<강제 수영시간 (Rat model), 동충하초 추출물 1g/kg)

홍삼 200mg/kg 용량에서 강제수영능력을 측정한 결과는 다음과 같다. 투여 첫째 날 부터 Control군에 비해 홍삼분말 투여군의 수영시간이 유의하게 증가하였다.



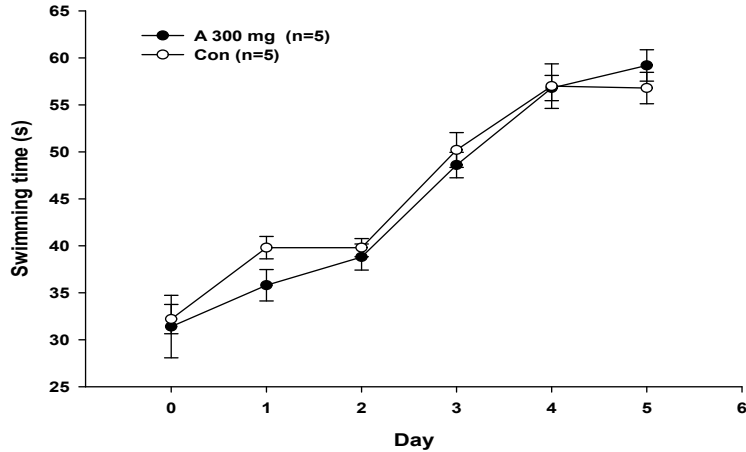
<강제 수영시간 (Rat model), 홍삼 추출물 200mg/kg, *;
 $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$ vs control)

- forced swimming test mouse 재현성 평가

- ①. 실험동물 : ICR mouse
- ②. 실험군

	실험군명	투여용량 (mg/kg)
1	Control	-
2	동충하초 추출물 (신규)	300

300mg/kg 용량에서 강제수영능력을 측정된 결과는 다음과 같다. 투여 셋째 날 까지 Control군, A군 모두 수영시간이 증가하는 경향을 보이지만, 각 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다.



<강제 수영시간 (mouse model), 동충하초 추출물 300mg/kg>

- 결론

동충하초추출물에 의한 항피로도 개선을 확인하기 위한 실험으로, Rat과 Mouse에 동충하초추출물(기존, 신규추출)을 투여한 후 강제수영시험을 실시하였다. Rat에서 100mg/kg, 500mg/kg, 1g/kg의 용량을 투여하고 강제수영시험을 실시한 결과 투여 셋째 날까지 수영시간이 모든 군에서 증가하는 경향을 보이나, 각 군간의 유의한 차이는 없었다. 본 실험의 오류를 확인 하고자 항피로도 개선효과가 있는 것으로 알려진 홍삼분말 300mg/kg 투여 후 강제수영시험을 실시한 결과, 수영시간이 투여 첫째 날부터 비 투여군에 비해 유의하게 증가하였다.

똑 같은 방법으로 Mouse에서 동충하초추출물 A, 300mg/kg의 용량으로 강제수영시험을 실시한 결과, 모든 군에서 수영시간이 증가하는 경향을 보이나, 각 군간의 유의한 차이는 없었다.

(3) 종합 결론

이상의 결과들로 동충하초 추출물의 피로개선에 대한 기능성은 100mg ~ 1g/kg 의 용량 범위에서는 유효한 효과를 얻기 어려운 것으로 결론을 도출 하였다.

다. 동충하초 개발 기능성 변경 검토

동충하초 추출물은 피로개선에 기능성을 보이지 않아 논문을 통한 기능성 탐색 수행하였고 관련된 유효성은 1. 항암효과, 2. 항산화 효과, 3.정자생성증가, 4. 골다공증 개선, 5..항방

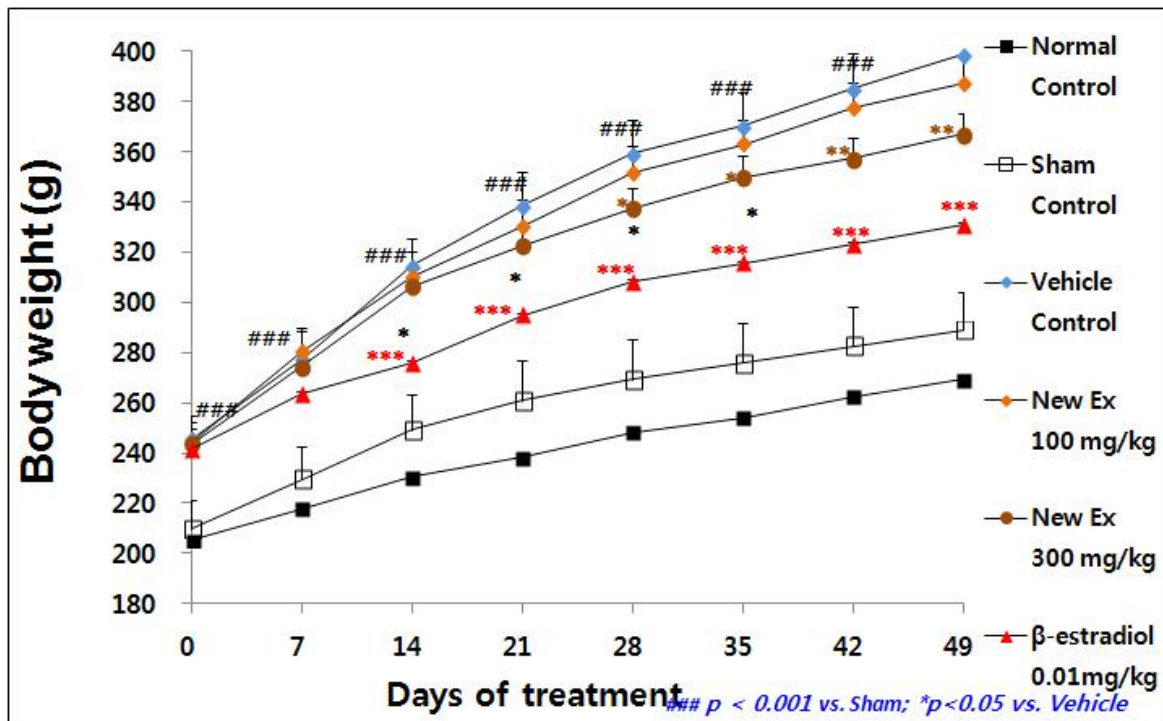
이러스 효과, 6.항곰팡이, 7.당뇨억제, 8.혈행개선, 9.항염 효과로 정리되었다.

앞서 피로개선 가능성이 없음을 확인 한 후 동충하초 추출물의 추가 가능성을 탐색하던 중 수컷랫드에 투여시 에스트로젠 농도가 상승하였다(Y. Chang et al., Am. J. Chin. Med., vol. 36, no. 5, pp. 849 - 859, 2008)는 사실을 확인하였고 여성호르몬에 대한 영향을 추가로 논문을 조사 하였다. 이 후 codydepin이 estrogen 결핍에 의해 유발된 골다공증을 개선시키는 효과가 있다는 논문(D. W. Zhang, et al., Biomed Res. Int., vol. 2015), 을 확인하였고 여성갱년기 기능성 연구를 시작하게 되었다.

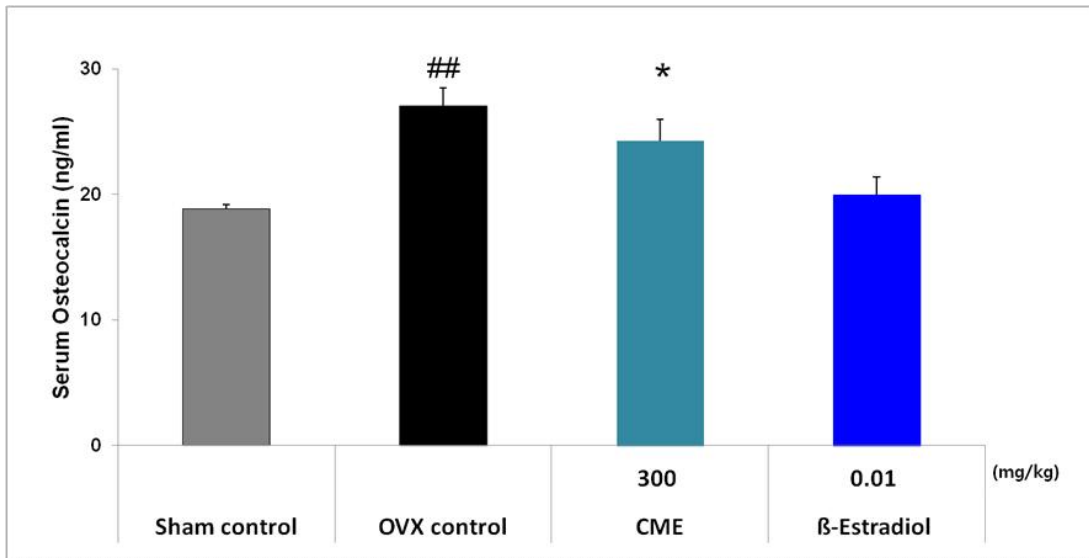
(1) 난소적출유발 여성 갱년기 유발모델에서 동충하초 농축액의 효과 (예비평가)

①. Rat OVX 모델에서 동충하초 추출물 기능성 평가

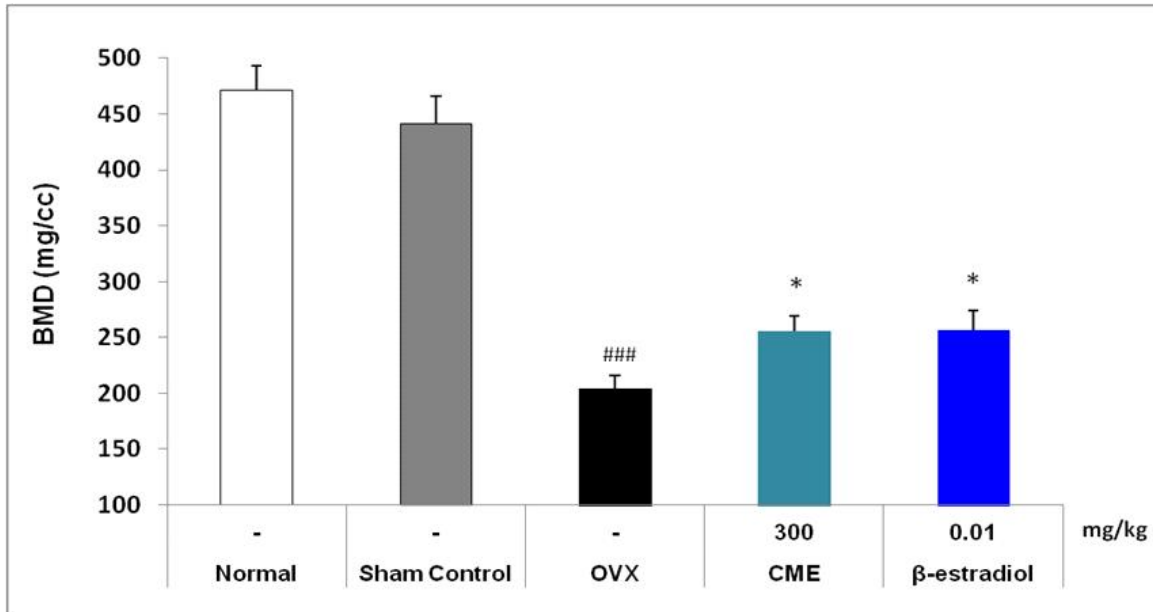
Rat 난소 절제(OVX) 모델 평가 결과 동충하초 추출물 투여군은 β -estradiol(양성 대조군)대비 약 50%의 체중증가 억제 효과가 있었다. 또한 골밀도, Osteocalcin, 모두 동충하초 추출물 투여군에서 증가함.



<난소적출 랫드에서 동충하초 추출물의 체중증가 억제효과>



<Osteocalcin>



Bone mineral density

라. 여성갱년기 기능성 연구

(1) 난소적출유발 여성 갱년기 유발 동물 모델에서 동충하초 농축액의 효과

폐경(menopause)이란 지속되어온 월경이 완전히 끝나는현상을 의미한다. 일반적으로 40 세이상의 여성에게 특별한 원인없이 1년동안 월경이 없으면 폐경을 의심할 수 있으며 이때, 폐경증상이 동반되기도 한다. 폐경기는 폐경 이후 남은생의 기간을 의미하며, 이 기간동안 여성의 난소에서는 여성호르몬이 거의 나오지 않는다. 갱년기(climacteric)란 폐경 전 후를 의미하는 폐경 주변기(perimenopause)보다 광범위한 기간인 폐경전 수년부터 폐경 후 약1년을 의미한다. 이 시기에 난소의 기능이 점진적으로 소실되며 일부여성은 폐경증상이 시작하기도한다. 폐경기 및 폐경주변기가 되면 호르몬의 변화로 인해 월경주기 의변화, 안면홍조, 배뇨장애 등 다양한 증상이 나타난다.이 시기의 여성은 호르몬 문제로 인해 지방이 축적 되기도 하는데 이는 비만을 야기한다.(질병관리본부)

비만은 체내에 지방이 필요이상으로 과도하게 쌓인 경우를 말한다. 이는 과체중과 구분 되는데, 과체중은 비만과는 달리 단순히 체중이 정상보다 많은 상태를 의미한다. 국민건강통계에 따르면 비만유병률은 1998년 26.0%에서 2011년 31.4%로 증가 추이를 보였다. 비만은 전세계적으로도 급속히 늘고 있으며 국내만 하더라도 매년 약40만명의 성인 비만 환자가 늘고 있다. 비만 환자의 증가로 인해 비만관련 질환으로 생각되는 당뇨병, 심혈관계질환 또한 급속히 늘어나고 ,사망률도 급증하고 있다.(질병관리본부)

동충하초(冬蟲夏草)는 버섯의 균사체가 동절기에는 곤충의 유충이나 성충의체내에 잠복해있다가 하절기에 버섯의 자실체가 자라나는 모양에서 연유된 버섯의 일종으로 충초산, 단백질,비타민B12등이 함유되어 있고, 예로부터 인삼, 녹용과 더불어 중국의 3대보약으로 알려져 약3,000년 전부터 이용되어 왔다. Cordyceps militaris는 cordycepin을다량함유하고있고 Cordyceps sinensis종과 함께 전통적으로 한방에서 널리 이용하는 대표적인 동충하초이며, 면역력증강, 노화억제, 피로회복 등 다양한 기능성이 보고되고 있다. 본 연구에서는 Cordyceps militaris가 갱년기 여성의 비만에 어떠한 효과를 가지는지에대해 알아보고자 하였다.

①. 실험군

A: DW를 B-D 군의경구투여부피와 동일하게경구투여

B: CME(Cordyceps militarisextract) 37.5 mg/kg/day 경구투여

C: CME(Cordyceps militarisextract) 75 mg/kg/day 경구투여

D: CME(Cordyceps militarisextract) 150 mg/kg/day 경구투여

E: Beta-estradiol (Sigma, E2257) 0.02 mg/kg/day복강내주사

F: 가장수술양성대조군(Sham)

②. 실험방법

난소를 절제한 7주령의 암컷 SD rat를 일주일간 순화 사육 후 B-D 실험군은 Rat

존대를 이용하여 각 실험 농도별로 희석한 동충하초를 최대부피가 3 ml이 넘지않는 부피로 매일 일정한 시간에 투여하였다. E군은 1ml syringe를이용해 투여 부피가 0.3 ml을 넘지않도록 매일 일정한 시간에 복강주사 하였다.

8주간의 실험이 끝나고 실험동물을 12시간 절식시킨 후 흡입마취로 심마취 하여 안락사 하였다. 피부 절개 후 복강을 통해 복대정맥을 찾아 10 ml 주사기에 18G needle을 꽂아 혈액응고를 보이기 전, 최대 채혈하였다. 채취한 혈액은 전혈검사를 위해 항응고제 K2EDTA가 든CBC bottle (SEWON MEDICAL)에 1ml 정도 담았고, 남은혈액은 모두 BD6 Vacutainer® Blood collection tube (BD367953, BD, NJ, USA)에 담아 아이스버킷에 보관하였다. 3,000 rpm에서 15분동안 원심분리 하였고, 혈청만 분리해서 -85℃에서 보관하였다.

③. 평가변수

1) 혈액검사

전혈검사(complete blood count)는 ADIVIA® 2120i (Hematology system, SIEMENS, Germany)를 사용하여 WBC (white blood cell, 백혈구), RBC (red blood cell, 적혈구), HGB (hemoglobin, 혈색소), HCT (hematocrit, 적혈구용적율), MCV (mean corpuscular volume, 적혈구평균용적), MCH (mean corpuscular hemoglobin, 평균적혈구혈색소량), MCHC (mean corpuscular hemoglobinconcentration,(평균적혈구혈색소농도), CHCM (cell hemoglobin concentration mean), CH (calculated hemoglobin), RDW (red cell distribution width, 적혈구입자분포폭), HDW (hemoglobin distribution width), PLT (platelet), MPV (mean platelet volume)를 측정하였다. 혈액생화학검사는 Accute TBA-40FR (Toshiba Medical Systems Co., Japan)를 이용하여 총8종 Cholesterol (mg/dL), Triglycerides (mg/dL), Calcium (mg/dL), HDL (mg/dL), LDL (mg/dL), Phosphorus (u/L), GOT (u/L), GPT (u/L)를 분석하였다.

2) 호르몬분석

Cobas e 411 (Roche Diagnostics)을이용하여Estradiol을분석하였다.

3) Dual energy X-ray(DXA)

체지방을측정하기위해INALYZER (MEDIKORS)를이용하였다.

4) 조직병리학적분석

난소주변의지방조직을포르말린에고정하여조직병리학적분석을하였다.

지방구크기분석은image J program을이용하여통계처리하였다.

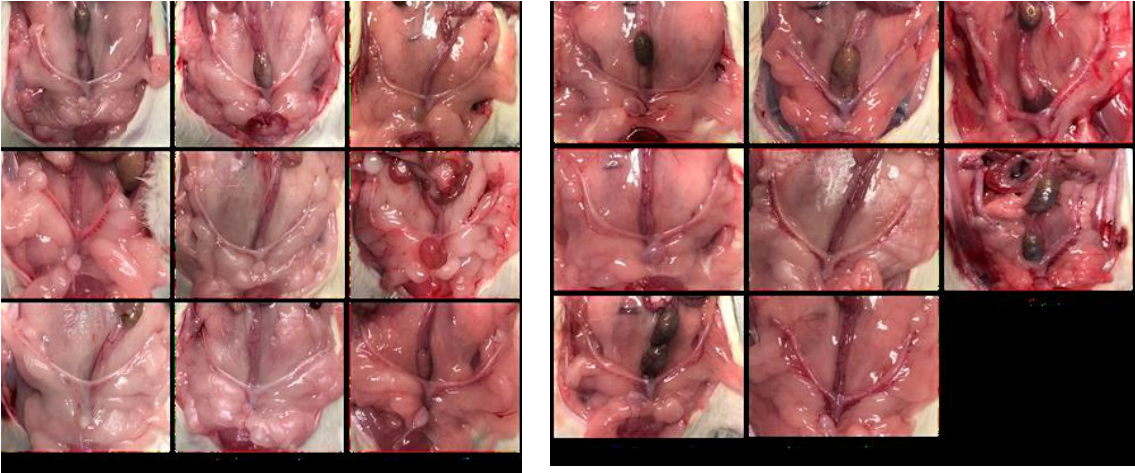
5) 통계학적분석

SPSS를이용한ANOVA test, LSD, Dunnette'sT3 (P<0.05)로분석하였다.

④. 평가 결과

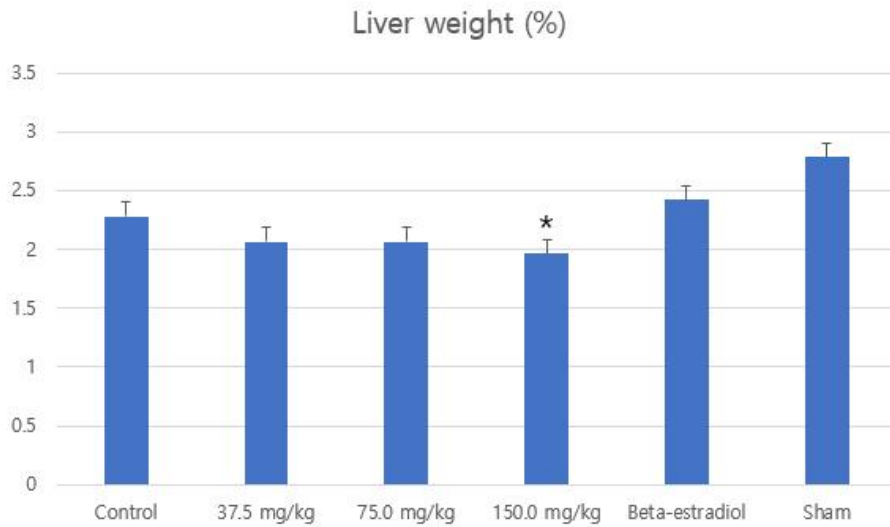
1) 장기관찰 및 무게 측정 결과

부검시 적출한 간장과 자궁의 무게를 측정하였다. 대조군과 비교했을 때 간장의 무게는 CME 투여군에서 감소하는 경향을 보였으나 유의적차이($p < 0.05$)는 CME 150mg/kg에서만 보였다. 자궁의 무게는 대조군과 비교하여 증가하기는 했으나 차이가 거의 미미하고 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이지 않았다.

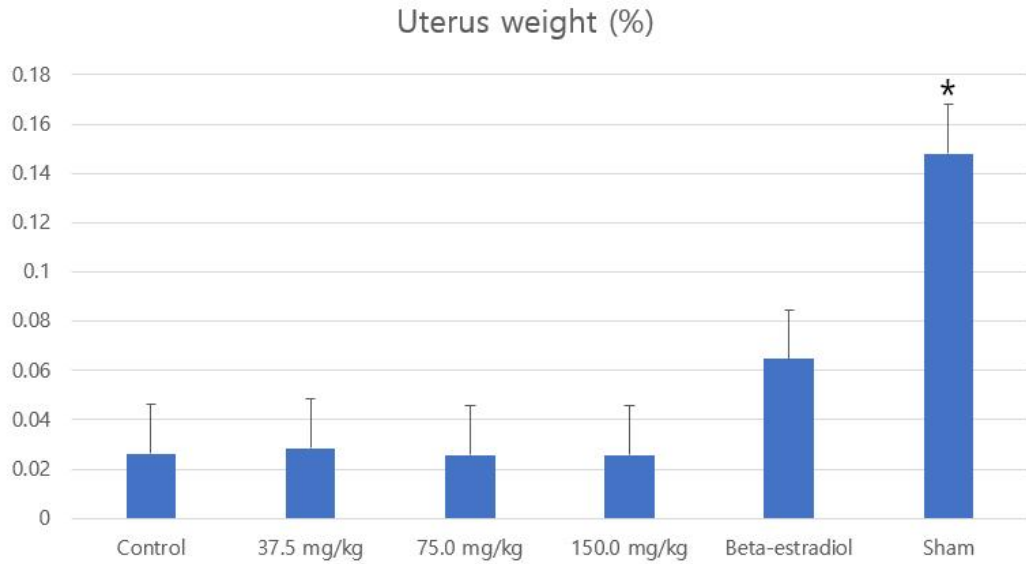


Control	CME 37.5	CME 75	CME 150	β -estradiol	Sham
---------	----------	--------	---------	--------------------	------

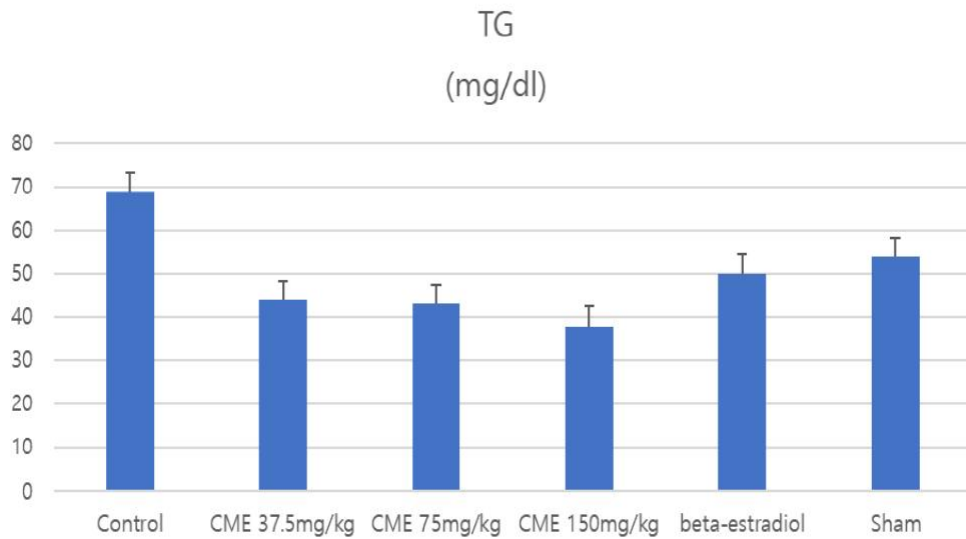
< 난소절출 부위, 단위 mg/kg >



< Liver weight >



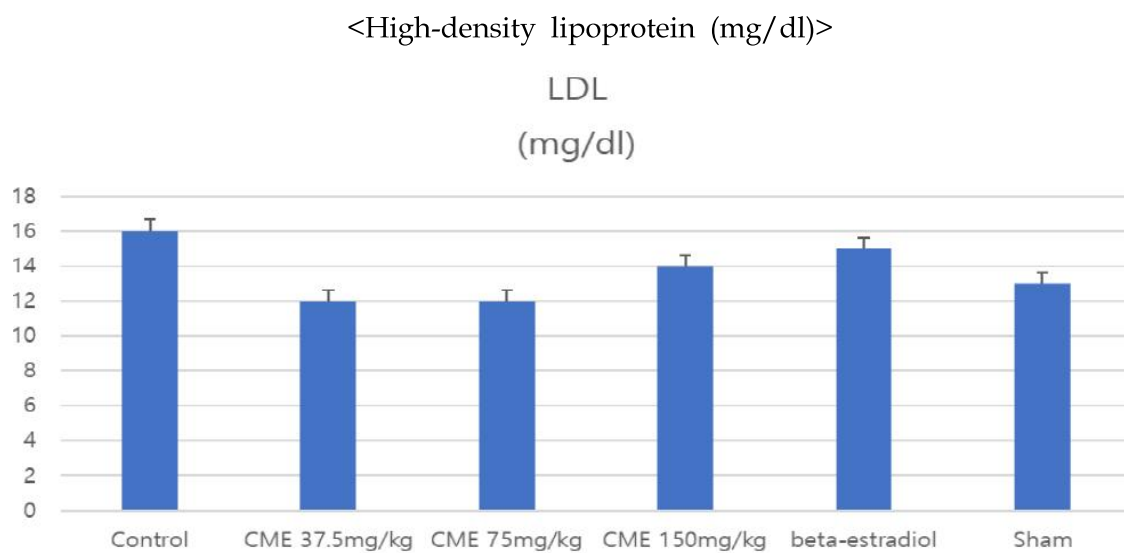
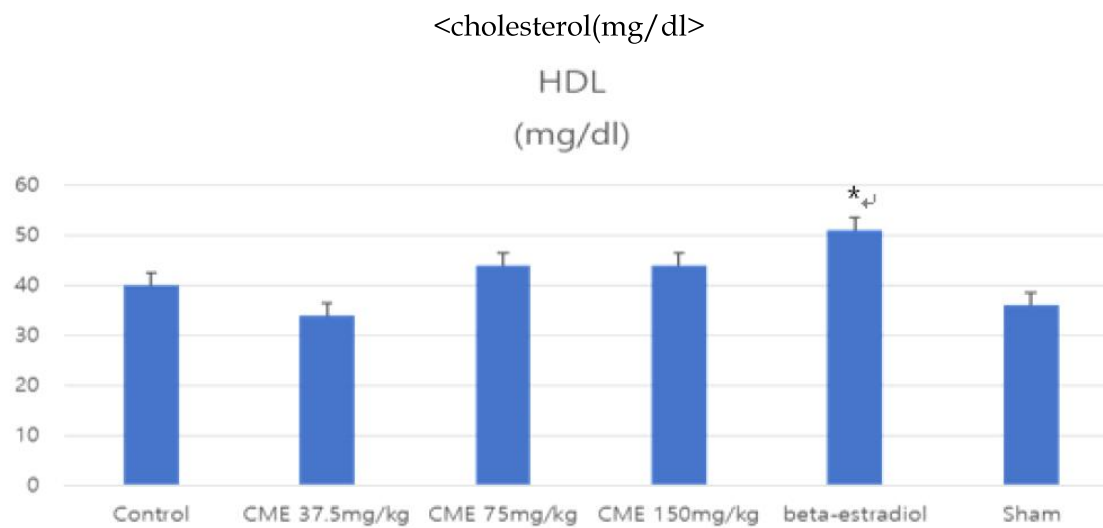
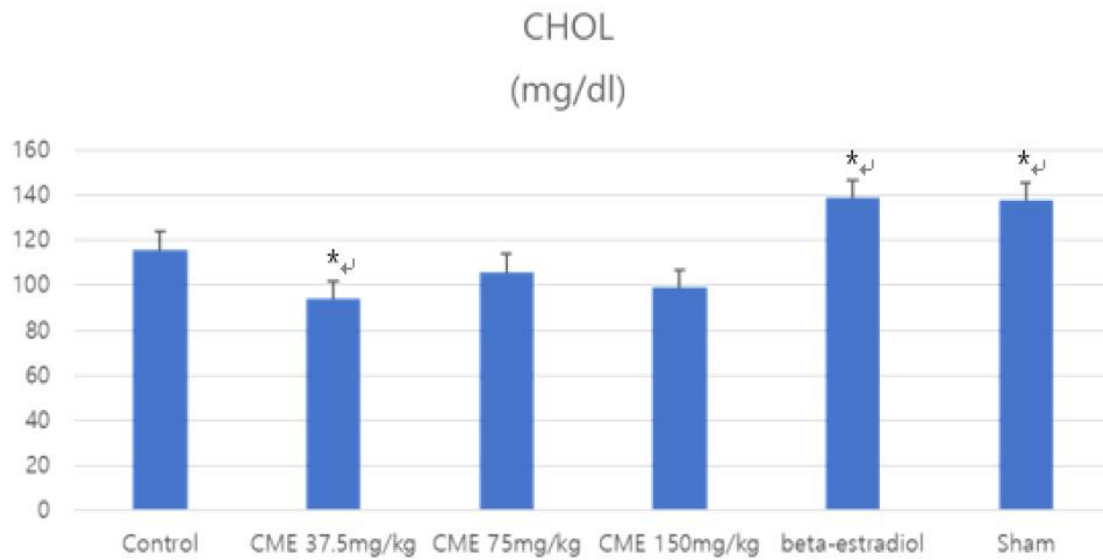
<자궁의 무게>



<Triglyceride>

2) 혈액검사 결과

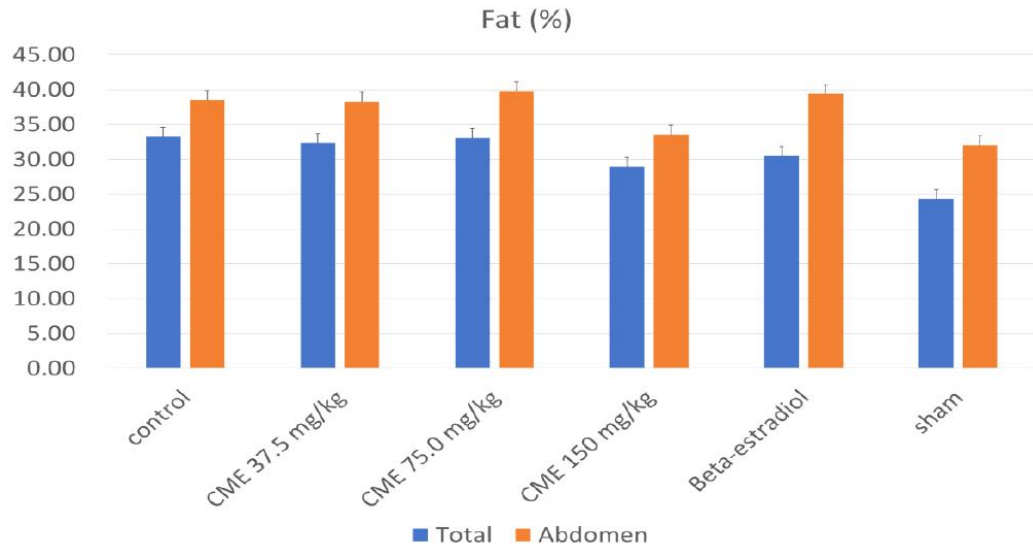
채혈한 혈액의 triglyceride, cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein을 측정했다. 각각 대조군과 비교했을 때 cholesterol농도가 37.5 mg/kg 에서만 유의적으로($p < 0.05$) 감소하였다.



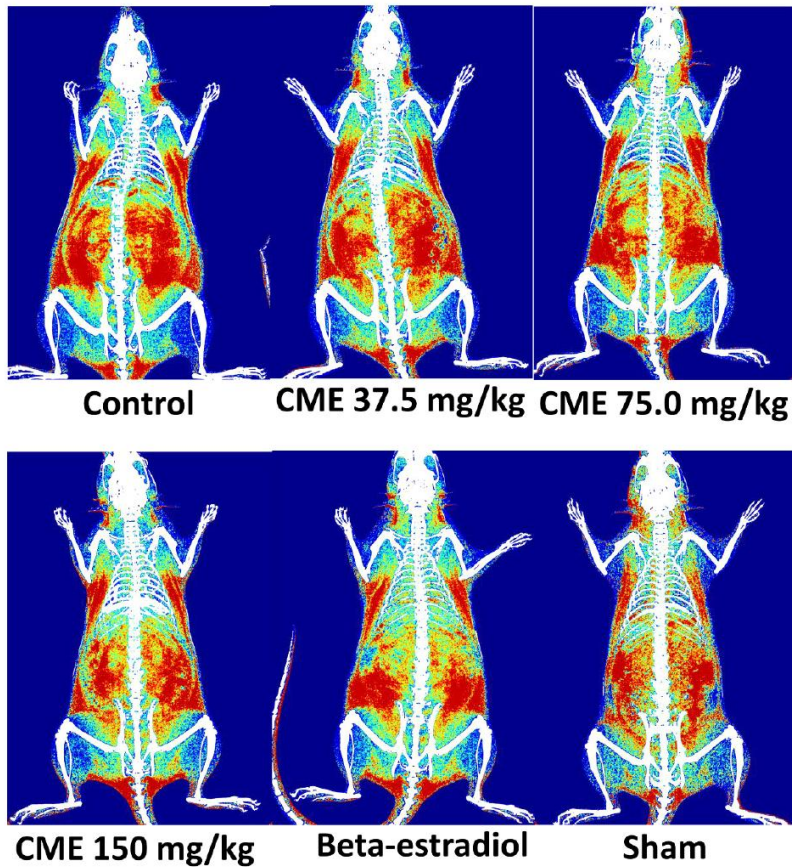
<Low-density lipoprotein(mg/dl)>

3) Dual energy X-ray

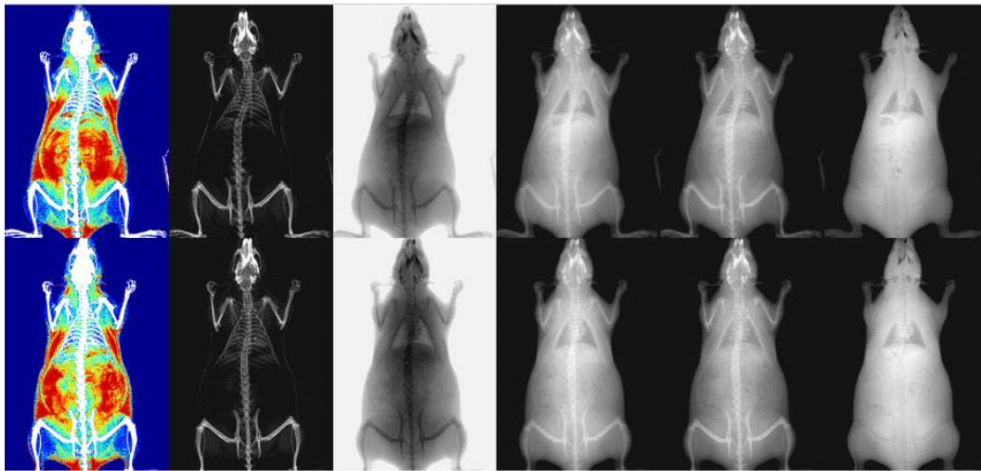
DXA로 측정 한 결과, Control에 비해 CME 150 mg/kg군에서 다소 적은 지방을 확인 하였으나 유의적인 차이($p < 0.05$)는 아니었다.



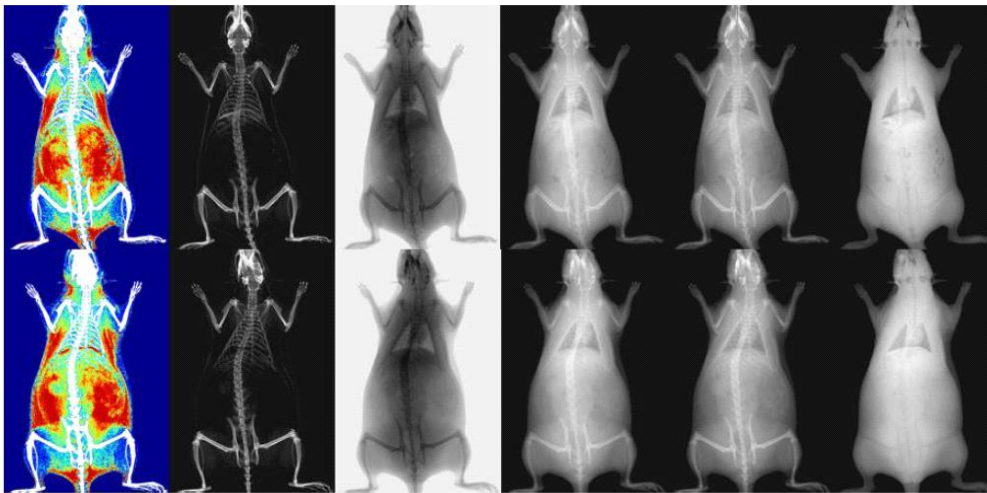
<Dual energy X-ray(Fat %)>



<DXA Fat composition>



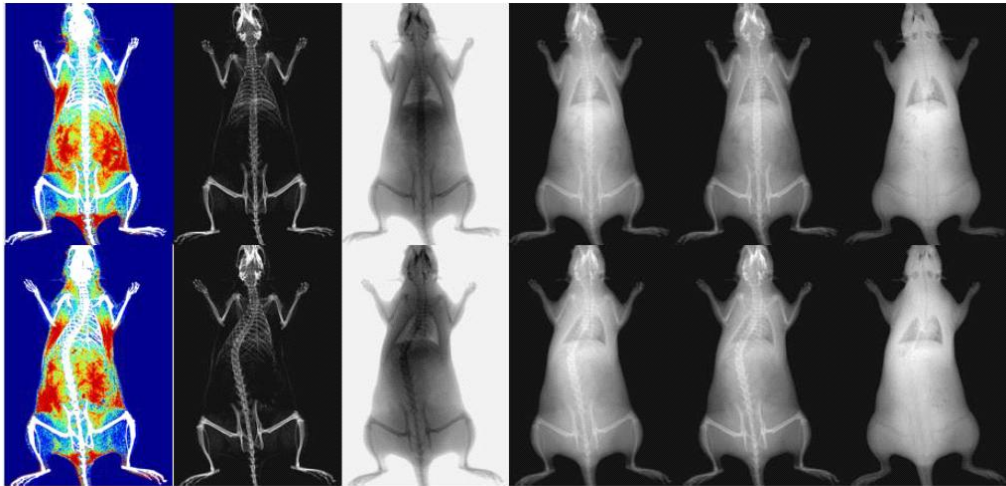
<DXA (Control)>



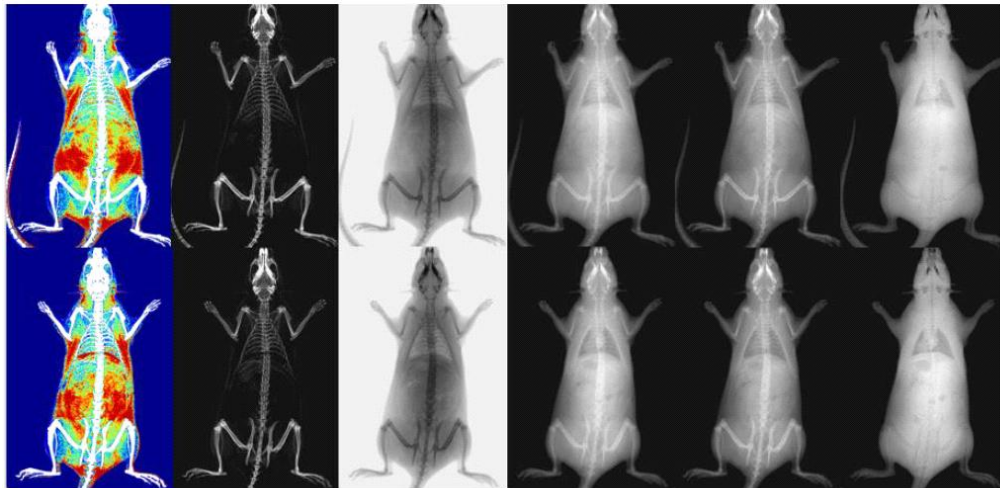
<DXA (CME 37.5mg/kg)>



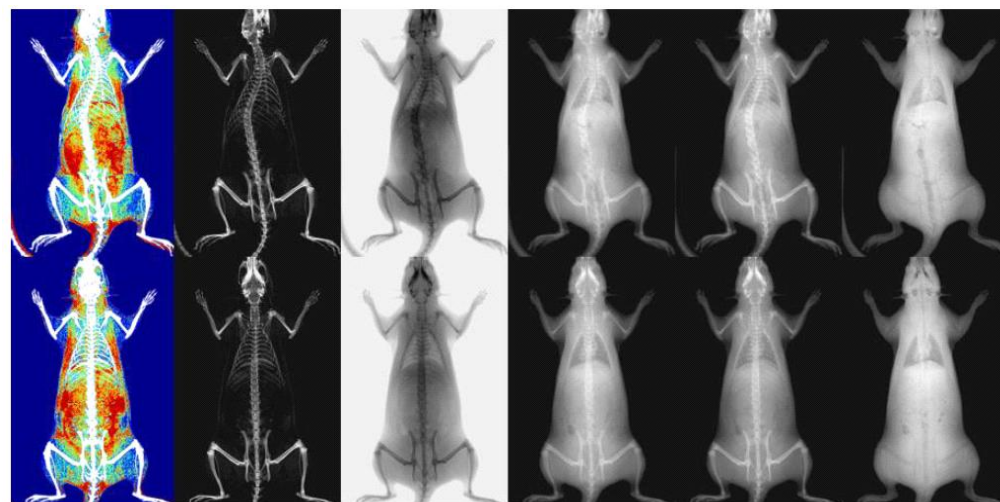
<DXA (CME 75mg/kg)>



<DXA (CME 150mg/kg)>



<DXA Beta-estradiol>

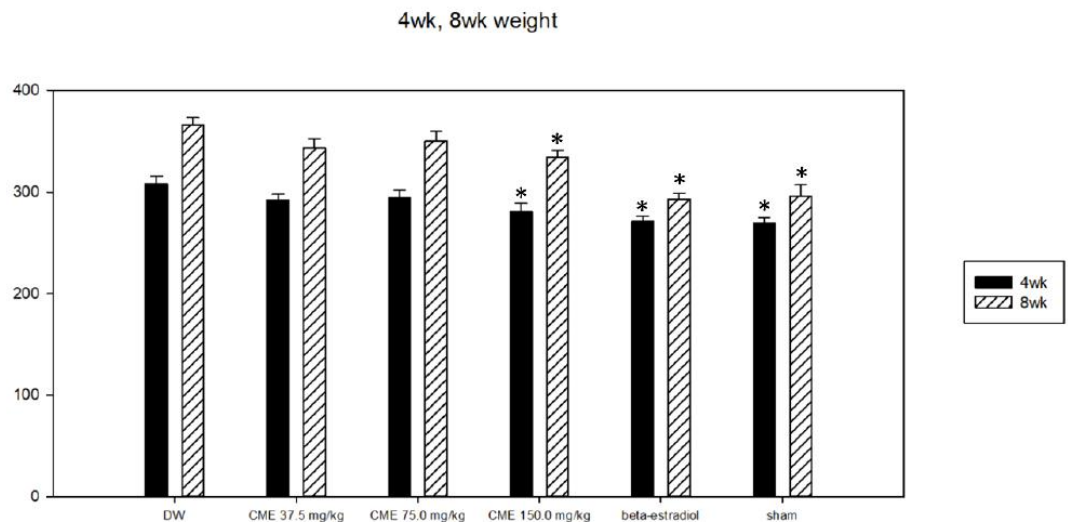


<DXA (Sham)>

왼쪽부터순서대로 fat composition, bone high reverse, high, low, tissue order를 DXA로 찍은 결과이다. 붉은색 부분은 지방이 많은 부위(>60%), 노란색 부분은 지방이 25%~60%인 부분, 연두색으로 나타나는 부위는 지방이 낮은(<25%)부위를 Control이 가장 빨간색이 많고 동충하초 투여군은 전체적으로 control에 비해서 붉은색 부분이 적게 나타났다. 뼈와 관련해서는 큰 차이가 나지 않았다.

4) 체중 측정 결과

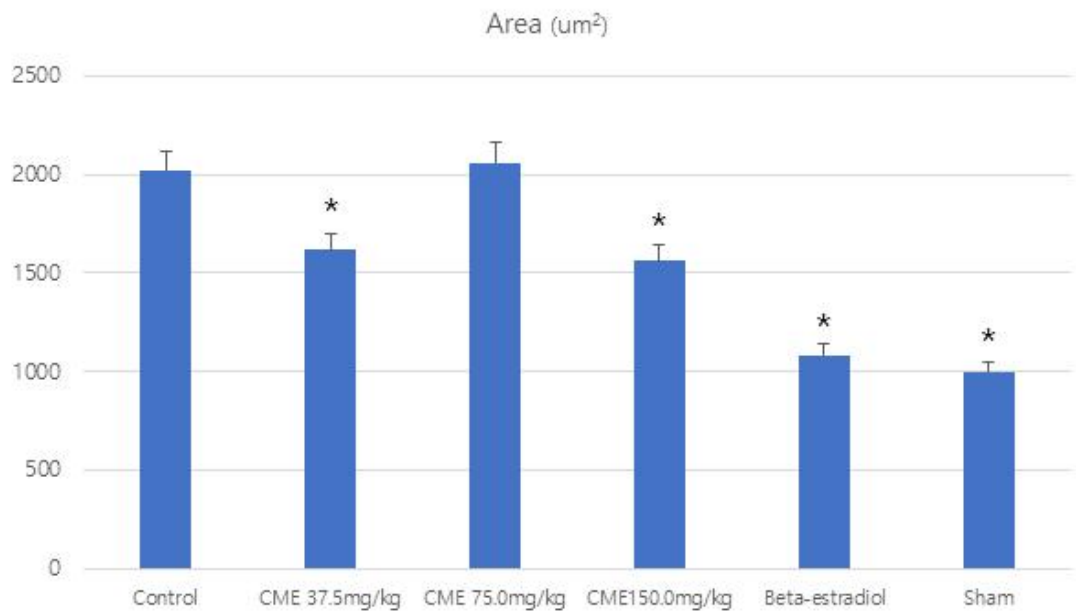
8주간의 실험 후, DW를 경구투여했던 대조군과 비교했을 때 CME를 경구투여한 3개의 실험군 중 CME 150 mg/kg는 4주차, 8주차에서 모두 유의적으로($p < 0.05$)개체의 체중이 감소하였으나 이보다 낮은농도인 CME 37.5 mg/kg와 CME 75 mg/kg는 대조군에 비해 개체의 체중은 감소 하였으나 유의하지는않았다.



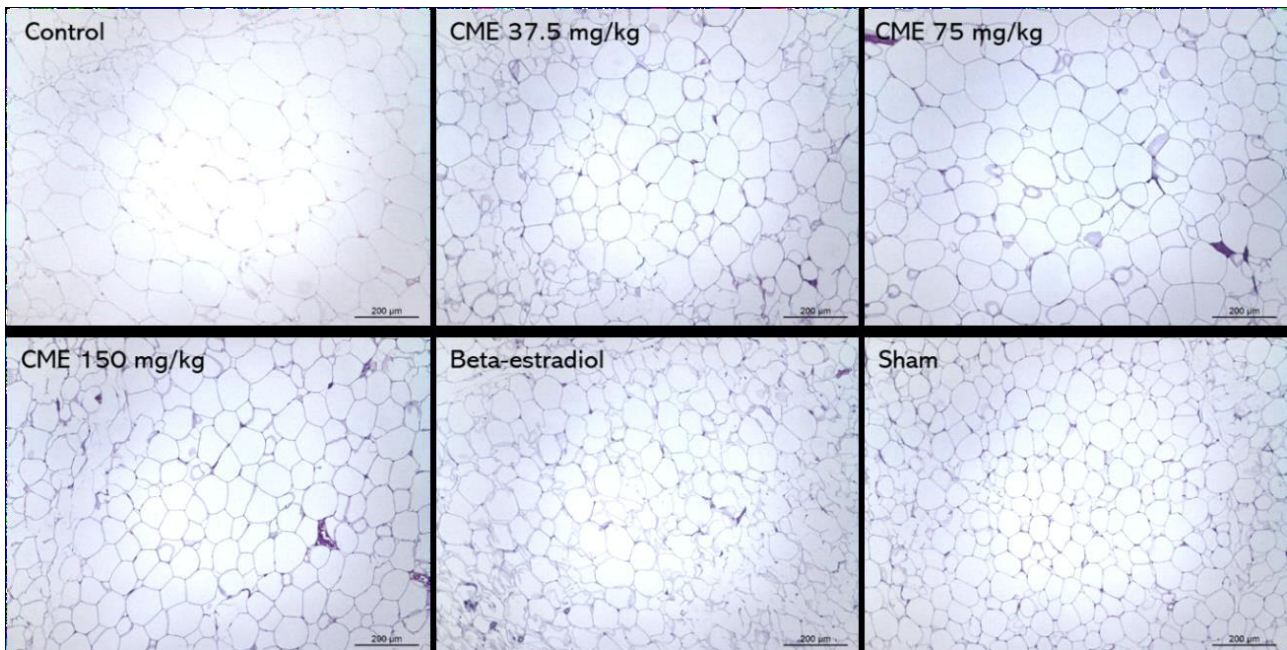
<4주, 8주 시점 체중변화*; $p < 0.05$ vs control>

5) White adipose tissue (WAT) histopathology

생식선 주변의 white adipose tissue (WAT)를 hematoxylin and eosin staining 하여 염색후 image J program을 이용해 지방구 크기를 확인한 결과 CME 75.0 mg/kg투여군을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의한 차이($p < 0.05$)를 보였다.



<White adipose tissue에 대한 동충하초 농축액의 영향>



<White adipose tissue 조직염색 사진>

6) Adipokine analysis

분리한 혈청을 이용해 fat key factor 인 adipokine 7 종 (IL 1B, Insulin, MCP 1, TNF a, IL 6, Leptin, PAI 1) 을 측정 한 결과이다 TNF a, PAI 1 은 대조군과 비교해 CME 를 투여한 실험군에서 감소하는 추세를 보였고 이를 제외한 모든 adipokine 이 증가하는 경향을 보였다 그러나 유의적인 차이 ($p < 0.05$) 를 보이는 결과는 없었다

⑤. 결론

4주차와 8 주차에 측정 한 개체 무게를 그룹별로 평균값을 내어 비교했을 때 두 번 모두 CME 150 mg/kg 에서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 다른 CME 투여 실험군에서도 대조군과 비교했을 때 감소하였으나 유의적이지는 않았다. 또한 4 주차와 8 주차의 사료 섭취량을 비교했을 때 4 주차에서는 37.5, 150 mg/kg 모두에서 유의적으로 감소하였고 8 주차에서는 150 mg/kg 에서만 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 동충하초 추출물을 고농도로 섭취하였을 때 무게 감소에 도움을 주는 것을 알 수 있다.

DXA 분석을 통해 전체 부피 기준 지방의 부피를 계산했을 때 대조군 대비 실험군에서 거의 차이를 보이지 않으며 유의적 차이 또한 없었다. WAT는 CME 37.5, 150 mg/kg에서 지방구의 크기가 유의적으로 감소하였다.

이러한 결과를 통해, *Cordyceps militaris*가 갱년기 여성의 비만에 대해 부분적으로 효과가 있었음을 알 수 있다.

(2) 동충하초 농축액의 여성갱년기 개선 관련 작용기전 연구

①. 시험개요

- 1) 목표 : 갱년기 증상에 대한 동충하초 추출물의 복합성분 다중표적(MCMT, multi-component multi-target) 기전 및 효능 평가
- 2) 연구개발의 내용

시험1: 동충하초의 복합성분 정보 확보 및 통합, in silico 예측을 위한 분자특징 정보 계산
시험2: 동충하초 포함 복합성분들의 생이용성 계산과 분자표적 예측
시험3: 동충하초 복합성분들의 표적 네트워크 구성 및 enrichment 분석
시험3: 동충하초 추출물의 세포독성(EZ-Cytox assay)
시험3: 에스트로겐 활성 측정(E-screen assay)
시험3: 갱년기 효능 작용기전 연구(Western blotting analysis)
시험3: 호르몬대체치료 부작용 개선 효능평가(Tali, Image-based cytometric assay)

②. 실험방법

1) MCF-7 세포의 에스트로겐 활성 평가

MCF-7 인체 유방암 세포 (에스트로겐 수용체 양성)를 10% fetalbovine serum(FBS, Gibco), penicillin G(100 µg/ml), streptomycin sulfate(100 µg/ml) 이 포함되어 있는 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하며, 37°C 온도와 5% CO₂ 가 공급되는 습윤한 조건으로 유지하였다. 실험에 사용되는 세포는 10% dextran-coated charcoal-stripped FBS가 포함되어 있는 Phenol red-free RPMI1640배지(Gibco)에서 배양하였다.

MCF-7 세포의 증식 평가(E-screen): 소토(Soto, 1995) 등에 의해 개발된 이 시험법은 시험물질이 ER의 신호전달을 활성화함으로써 ER-양성 유방선암 세포(MCF-7)가 과다증식을 하는 원리를 이용한다. 통상, 시험물질의 에스트로겐성과 MCF-7의 세포증식 정도가 비례하는 관계를 이용하며, ER 리간드로서 세포 증식효과를 확인하여 에스트로겐성을 확인한다. 동충하초 추출물에 의한 MCF-7 세포에서의 세포증식을 확인하기 위해 48 well plate에 1×10⁴ cells/well로 24시간 동안 배양하고 각각 동충하초 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였다. 또한 길항제(antagonist) 확인 시험을 위해 ER 길항제인 ICI 182,780를 처리하여 비교하였다. 양성대조군은 갱년기 증상 개선 의약품으로 시판 중인 퀸즈원정(Queens One Tab., 경진제약사)으로 설정하였다. 144시간 배양 후 Ez-Cytox (DoGEN) 시약을 넣고 1시간 배양 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 세포 증식 증가 효과는 3 회 반복 실험하여 평균 값을 취하였고, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 시료군의 흡광도의 비를 백분율로 표시하고 그래프로 비교 분석하였다.

Western blot: MCF-7 세포에서 동충하초 추출물의 에스트로겐 수용체(ER) 활성화에 대한 영향을 연구하기 위해 6 well plate에 3×10⁵ cells/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고, 24시간 후에 동충하초 추출물을

10 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다. 1시간 배양 후 1X RIPA buffer (Tech&innovation)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 BCA (Bicinchoninic acid, Sigma) 정량법을 이용하여 total 단백질을 정량한 후 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)을 이용하여 분리하였고, 분리된 단백질을 PVDF membrane (Immobilon-P membrane, Merck Millipore)에 이동시킨 후 항체를 반응시켰다. 실험에 사용된 1차 항체는 ER α (1:2000, cell signaling), phospho-ER α (ser118) (1:2000, cell signaling), GAPDH(1:5000, cell signaling)를 사용하였고, 2차 항체는 horseradish peroxidase가 부착된 anti-mouse 항체(1:3000, cell signaling) 및 anti-rabbit 항체(1:3000, cell signaling)를 사용하였다. 밴드는 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) 와 fusion solo (VILBER LOURMAT)를 이용하여 측정하였다.

2) 네트워크 약리학 플랫폼을 이용한 다중표적 예측모델 확립

동충하초 활성성분 탐색 : TCMSP Database(DB)를 이용하여 동충하초에 들어 있는 성분을 조사하고, 생체이용률(Oral Bioavailability, OB)과 약물유사도 (Drug-likeness, DL)를 이용하여 활성 성분으로 이용될 수 있는 성분을 탐색한다.

동충하초 활성성분-다중표적 작용 탐색 : TCMSP DB에서 제공하는 Drugbank DB를 이용하여 활성성분으로 사용 가능한 동충하초 성분들과 결합 가능한 표적과 갱년기 증상 관련 표적들과의 결합 가능성을 예측한다.

동충하초-질병 연관성 탐색 : TCMSP DB에서 제공하는 Therapeutic Target Database (TTD)를 이용하여 동충하초의 활성 성분이 작용할 수 있는 질병 및 갱년기 증상과 관련된 질병 위주로 탐색한다.

동충하초의 생물학적 경로 탐색 : 예측된 결합 다중표적과 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG), Gene set enrichment analysis-Enrichr 정보를 이용하여 동충하초가 작용할 수 있는 생물학적 경로와 갱년기 관련 생물학적 경로에 대한 통계적인 분석을 실시한다.

3) 지방암 증식 억제 활성(호르몬대체치료 부작용 개선) 평가

- 세포배양

MCF-7 인체 지방암 세포 (에스트로젠 수용체 양성)를 10% fetalbovine serum(FBS, Gibco-Brl, Grand Island, NY, USA), penicillin G(100 $\mu\text{g/ml}$ -1), streptomycin sulfate(100 $\mu\text{g/ml}$ -1)이 포함되어 있는 RPMI1640 배지에서 37°C 온도와 5% CO₂가 공급되는 습윤한 조건으로 배양하였다.

- MTT cell proliferation assay

이 assay는 세포 내에서 NADH 와 NADPH 에 의존하는 dehydrogenases 효소에 의해 tetrazolium salt 가 formazan 으로 변화되는 양을 분석하는 방법으로 96 well plates에 1×10⁴ cells/well로 100 μl 씩 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 다양한 농도의 C. sinensis., cordycepin 그리고 cisplatin(Positive control)를 처리

한 후 24시간 배양 하고 MTT 시약을 넣은 후 570nm에서 분석한다.

- MCF-7 세포의 형태학적 변화 관찰 및 Hoechst 33342 staining

C. sinensis와 cordycepin에 대한 MCF-7 세포주의 형태 학적인 변화를 관찰하기 위해 6 well plates에 4×10^5 cells/well로 2 ml씩 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 각각 C. sinensis. 100 μ g/ml, cordycepin 25 μ M, 50 μ M의 농도를 24시간 처리한 후, phase contrast microscope (Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 변화된 MCF-7 세포주의 형태학적 특징을 관찰하고 100 배로 사진 촬영하였다. 마찬가지로, C. sinensis. 100 μ g/ml, cordycepin 25 μ M, 50 μ M 처리 후 MCF-7 세포의 apoptotic body를 측정하기 위하여 세포를 Hoechst 33342 (Sigma, Mo, USA)로 염색한 뒤 fluorescent microscope (Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 변화된 MCF-7 세포의 형태학적 특징을 관찰하고 100 배로 사진 촬영하여 형광 이미지를 얻었다.

- Image-based cytometric assay

C. sinensis와 cordycepin의 Apoptosis 유도 효과를 확인하기 위해 6 well plate에 4×10^5 cells/well로 2 ml씩 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 각각 C. sinensis. 100 μ g/ml, cordycepin 25 μ M, 50 μ M의 농도로 24시간 처리하였다. Annexin-V binding buffer (Invitrogen)를 이용하여 세포를 잘 풀어 준 후, Alexa fluor-488이 결합된 Annexin V와 propidium iodide (PI) (Invitrogen)를 용하여 세포를 염색한 후 Tali-Image based Cytometer (Invitrogen)를 이용하여 측정 후 TaliPCApp (version 1.0) 세포 사멸 유형을 분석하였다.

- Western blot

C. sinensis와 cordycepin에 대한 MCF-7 세포주의 세포사멸 기전 연구를 위해 6 well plate에 4×10^5 cells/well로 2 ml씩 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 각각 C. sinensis. 100 μ g/ml, cordycepin 25 μ M, 50 μ M의 농도로 24시간 처리한 후, PBS를 넣고 cell scraper를 이용하여 세포를 배양 dish에서 떼어내고, 4 $^{\circ}$ C에서 13,200rpm으로 10분간 원심분리 하여 세포를 모았다. 320 mM sucrose, 200 mM HEPES, 1 mM EDTA로 구성된 lysis buffer (pH 7.2)에 protease inhibitor cocktail과 phosphatase inhibitor cocktail를 첨가한 후 모아진 세포에 넣고, 4 $^{\circ}$ C에서 초음파기를 이용하여 세포막을 파쇄함. BCA Protein Assay kit를 이용하여 총 단백질 양을 정량하고, 각 샘플들을 20 μ g씩 취하여 sample buffer와 섞은 후, 10 % SDSPAGE에 65 volt로 3시간 동안 실온에서 전기영동하여 단백질 분리하였다. Gel상에서 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride(PVDF) microporous membrane으로 25 mM Tris, 192 mM glycine, 10 % methanol이 포함된 blocking 용액을 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 15 volt로 이동시켰으며, 이동이 끝난 membrane은 TBS-T buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM NaCl, 0.1 % Tween@20)에 5 % non-fat dry milk or 5 % bovine serum albumin을 첨가하여, 항체와의 비특이적 결합을 억제하기 위해 shaker 위에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, blocking 용액에 항체를 이용하여 각각 실온에서 2시간 동안 shaker 위에서 반응시키고, TBS-T buffer로 5분씩

5회 세척한 후, 1차 항체와 반응하는 HRP-conjugated 2차 항체를 blocking 용액에 넣고 1차 항체와 동일한 조건으로 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T buffer로 5분씩 5회 세척 후, 암실에서 ECL system을 이용하여 필름에 감광시켜 각 단백질의 발현 양상을 관찰하였다.

4) 분자 모델링을 이용한 도킹(docking) 분석

Estrogen receptor (ER) 효능제로서의 결합 모드를 조사하기 위해, 동충하초에 함유되어 있는 화합물과 hER LBD 활성 부위의 도킹 분석을 Autodock 4.2 프로그램 (Molecular Graphic Laboratory)을 사용하여 수행하였다.

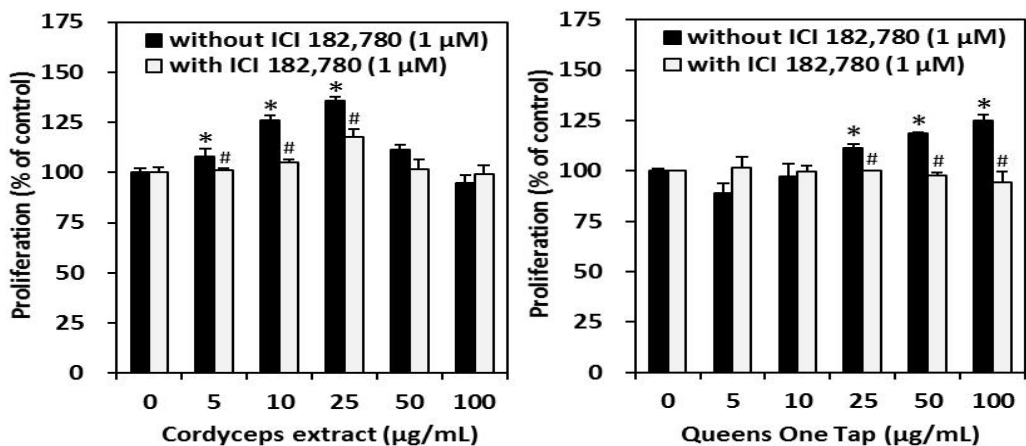
5) 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 평균과 표준편차를 구한 후 independent t-test를 이용하여 통계 분석하였다.

③. 연구결과

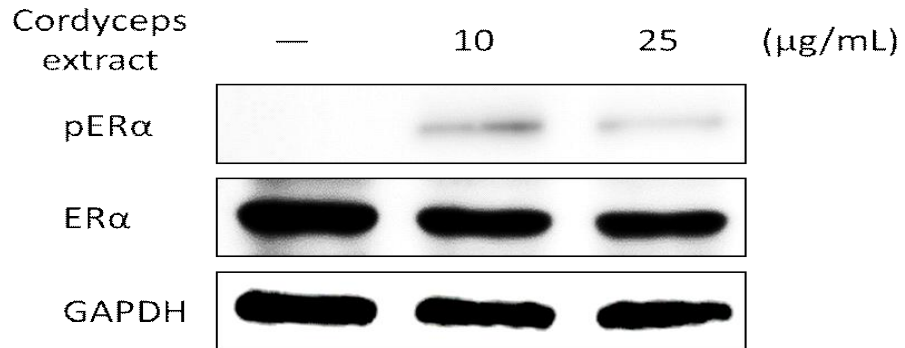
1) MCF-7 세포의 에스트로겐 활성 평가

에스트로겐(Estrogen) 활성 평가를 위한 MCF-7 세포에서 동충하초의 세포 증식 효과에 대한 실험 결과는 그림 2과 같다. 각각의 시료는 대조군의 세포 증식을 100%로 환산하여 이에 각 시료군의 성장비율로 나타내었다. 양성대조물질인 퀸즈원정은 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 각각 111.2, 118.5, 124.8%의 세포 증식 효과를 보였으며 에스트로겐 수용체의 길항제(antagonist)인 ICI 182,780를 동시 처리시 세포 증식이 억제되었다. 동충하초 추출물은 5, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 107.9, 126.1, 135.7%의 세포 증식률을 나타내어 유의적인 세포 증식 효과를 나타냈다. 한편, ICI 182,780를 동시 처리시 동충하초 추출물에 의한 세포 증식률이 5, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 농도에서 각각 7.0, 21.0, 17.8% 감소하였다. 이를 통해 동충하초 추출물은 5, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의적인 에스트로겐 활성을 나타냄을 확인하였다.



<Estrogenic effect of the cordyceps extract in MCF-7 cells. * $p < 0.001$ compared with non-treated cells. # $p < 0.001$ compared with ICI 182,780 non-treated cells.>

MCF-7 세포에서 동충하초 추출물 처리시 ER의 인산화를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 진행한 결과는 아래 그림과 같다. MCF-7 세포에 동충하초 추출물 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과 인산화된 ER α 단백질의 발현이 증가하였다.



<Effect of cordyceps extract (10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on phosphor-ER α , ER α and GAPDH protein expression in MCF-7 cells. >

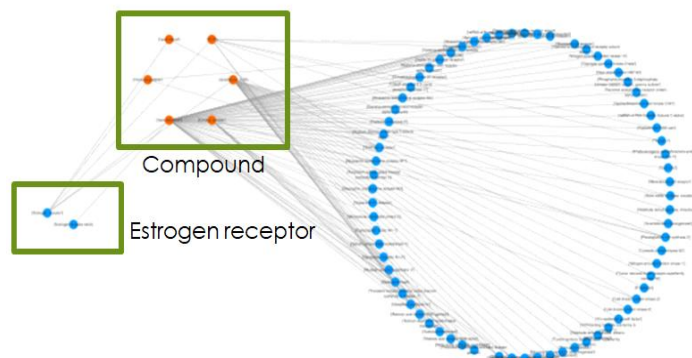
2) 네트워크 약리학 플랫폼을 이용한 다중표적 예측모델 확립

동충하초 활성성분 탐색 : TCMSP DB를 이용하여 동충하초의 성분을 조사 후 생체이용률(OB)이 30 이상, 약물유사도(DL)이 0.18 이상인 성분을 유효한 활성 성분으로 선정하였다.

유효 활성성분 이름	생체이용률 (OB)	약물유사도 (DL)
Cerevisterol	39.5211888256	0.76649
Cholesterol	37.8738975447	0.67677
Peroxyergosterol	44.391518379	0.82
Arachidonic acid	45.5732499096	0.20409
β -sitosterol	36.9139058327	0.75123
Linoleyl acetate	42.1007662274	0.19845

<동충하초의 유효 활성성분>

동충하초 활성성분-다중표적 작용 검색: 동충하초 성분들과 결합 가능한 표적을 예측하여 제시하였고, 특히estrogen receptor 표적(ER)과 연결되는 성분을 탐색하였다.



<동충하초와 결합 가능한 표적 후보 예측>

동충하초-질병 연관성 탐색: 동충하초의 활성 성분으로 예측한 다중표적과 연결된 질병을 탐색하고, ER과 연결되는 질병군을 탐색하여 갱년기 증상에서의 사용 가능성을 모색하였다.



<동충하초와 결합 가능한 질병 후보 예측>

ER과 연결된 질병 중에서 폐경 후 증후군(Postmenopausal symptoms)을 찾을 수 있었으며, 갱년기 증상으로 많이 나타나는 골다공증(Osteoporosis)과 호르몬 관련 증상도 찾을 수 있었다.

질병군	질병명
종양 및 암 관련 질병	ER beta-positive prostate tumors
	Breast cancer
	Endocrine independnet cancer
신경계 질병	Neurodegenerative diseases
	Brain injury
혈관계 질병	Vascular injury response
	Cardiovascular disease
	Coronary atherosclerosis
기타	Osteoporosis
	Postmenopausal symptoms

<ER과 연결된 질병>

동충하초의 생물학적 경로 탐색: 동충하초가 작용할 수 있는 생물학적 경로 분석 결과, Neuroactive ligand-receptor interaction, Pathways in cancer 등이 연결 점수(combined score)에서 상위권을 차지했으며, Estrogen signaling pathway, Progesterone-mediated oocyte maturation 등 여성 호르몬 관련 생물학적 경로도 찾을 수 있었다.

생물학적 경로	Adjusted P-value	결합 점수 (Combined Score)
Neuroactive ligand-receptor interaction	1.43E-18	87.72806
Pathways in cancer_Homo sapiens	7.64E-11	58.00039
Calcium signaling pathway	1.4E-10	51.17732
Cholinergic synapse_Homo sapiens	4.02E-10	50.35276
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	3.48E-09	44.00112
PI3K-Akt signaling pathway	7.6E-09	42.03419
Estrogen signaling pathway	3.48E-09	41.86323
Prostate cancer	2.49E-08	35.83561
Small cell lung cancer	2.12E-08	34.70482
Progesterone-mediated oocyte maturation	4.42E-08	32.84359

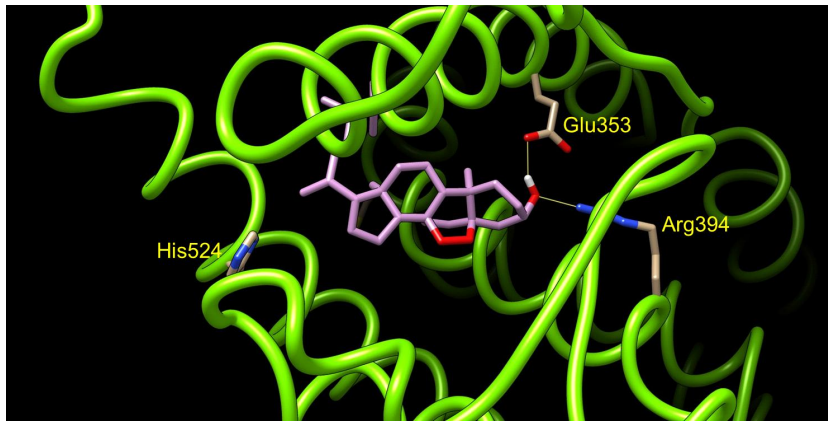
<동충하초의 생물학적 경로 중 결합 점수 상위 10개>

- 3) 네트워크 약리학적 분석법으로 도출된 유효성분의 에스트로젠 수용체 도킹 분석 ER- α 의 reference ligand가 결합된 crystal structure가 논문으로 보고되어 있다. 이 논문들을 참고하여 docking 실험을 진행하였으며, 값이 낮을수록 binding affinity가 좋은 결과임.

Ligand	ER- α binding affinity (Kcal/mol)	ER- β binding affinity (Kcal/mol)
Cerevisterol	-8.35	-11.17
Cholesterol	-8.91	-11.66
Peroxyergosterol	-9.17	-11.88
Arachidonic acid	-7.03	-6.75
Cordycepin	--5.64	-5.01
Estradiol	-10.23	-9.79

<동충하초 성분의 ER- α 도킹 결과>

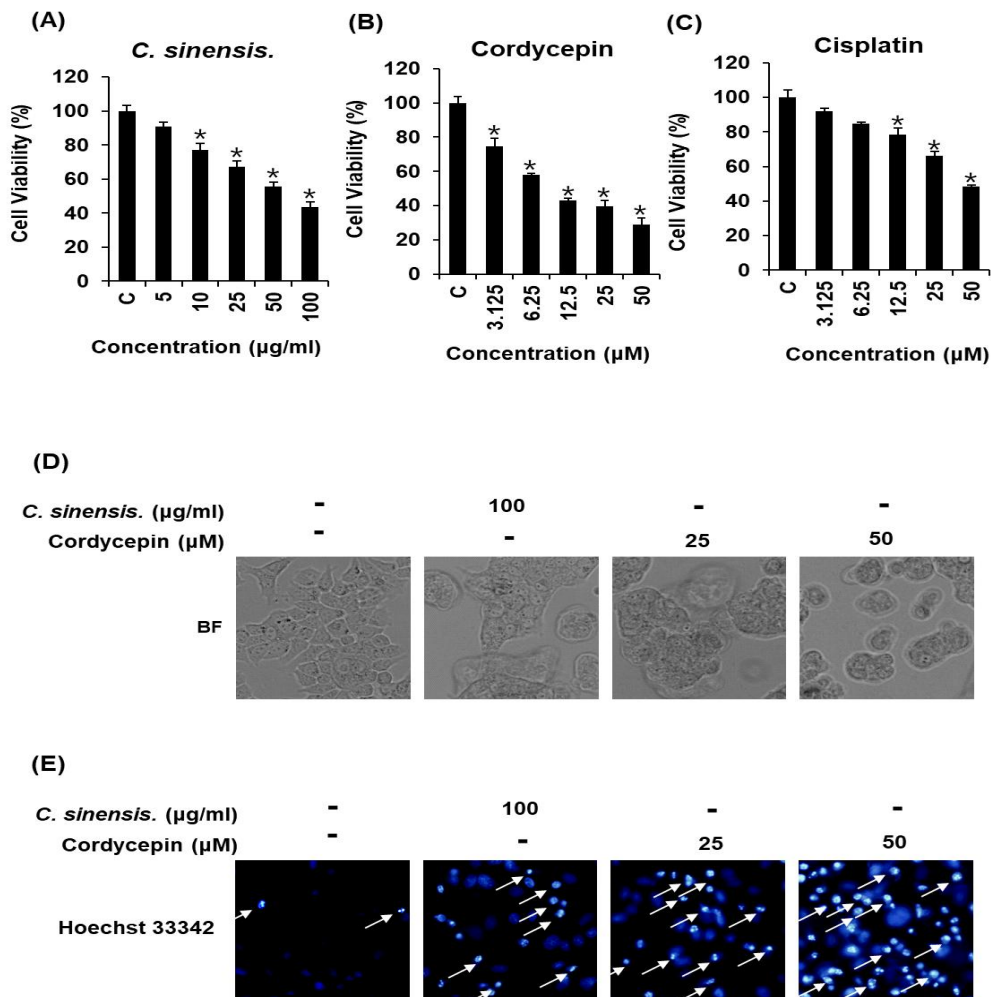
ER- α 와 가장 좋은 binding affinity를 보이는 물질은 estradiol 이며, ER- β 와 가장 좋은 binding affinity를 보이는 물질은 peroxyergosterol이었다.



<Proxysterone의 스테로이드 수용체 리간드 도킹 예시>

4) 유방암 증식 억제 활성(호르몬대체치료 부작용 개선) 평가

- *C. sinensis*와 cordycepin의 MCF-7 세포 사멸 효과



< *C. sinensis*와 cordycepin의 MCF-7 세포 사멸 효과>

(A) *C. sinensis*와 (B) cordycepin, (C) cisplatin(Positive control)의 세포 사멸 효과와 *C. sinensis* 100 µg/ml와 cordycepin 25µM, 50µM 처리 후 (D) 세포의 형태학적 변화 관찰 및 (E) Hoechst 33342 staining. *P>0.05.

0, 5, 10, 25, 50, 100 g/mL 농도의 *C. sinensis*와 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 M 농도의 cordycepin 그리고 동일한 농도의 cisplatin(Positive control)를 MCF-7 세포에 24 시간 동안 처리 후, MTT cell proliferation assay 분석 및 세포의 형태학적 변화 관찰 및 Hoechst 33342 staining을 실시하였다. 각 실험은 3번씩 수행하였으며 실험의 통계적 유의성을 확인하기 위해 Student's t-test를 사용하였고, 유의 확률 0.05 미만일 경우를 유의하다고 정의하였다.

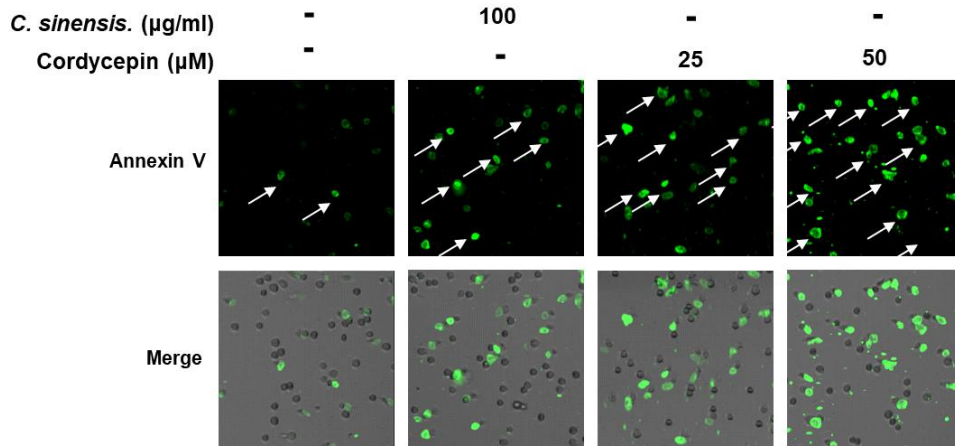
Cisplatin(Positive control)을 포함하여 *C. sinensis*와 cordycepin의 MCF-7 세포에 대한 사멸 효과를 그림. 7에 나타내었다. *C. sinensis*와 cordycepin의 농도가 높을수록 세포 증식 억제 효과가 컸으며 *C. sinensis*의 IC 50값(50% growth inhibition 값)은 73.48 µg/ml, cordycepin의 IC 50값은 9.58µM, cisplatin(Positive control)의 IC 50값은 48.50 µM 이었다 (그림. 7(A~C)). 이는 50% 이상의 세포 증식률 억제 효과는 *C. sinensis* 100 µg/ml과 cordycepin 12.5 µM 이상 농도에서 보여지는 것으로 해석된다. 이러한 경향은 세포 증식 밀도 및 형태 관찰 결과에서도 유사하게 나타났다.

C. sinensis. 100 µg/ml와 cordycepin 25µM, 50µM 처리 후 위상차 현미경을 이용한 세포의 형태학적 변화 관찰 및 Hoechst 33342 staining을 실시하였다. 대조군의 MCF-7 세포는 조밀하고, 정상적으로 성장하는데 반해 *C. sinensis*와 cordycepin이 처리된 세포는 세포의 수가 적을 뿐만 아니라 그 형태가 응축되어 있고, 불규칙적인 형태를 가지면서 세포 사멸이 나타난 것을 알 수 있었다 (그림. 7D)). 세포독성 효과를 좀 더 정확하게 알아보기 위해 Apoptosis의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하였다. 핵 내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광염색제인 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비해 *C. sinensis*. 100 µg/ml와 cordycepin 25µM, 50µM이 처리된 세포는 apoptotic body가 핵 주변에 나타나 세포 사멸에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며 cordycepin 처리 농도가 높아짐에 따라 apoptotic body의 형성 증가를 확인 할 수 있었다 (그림. 7E)).

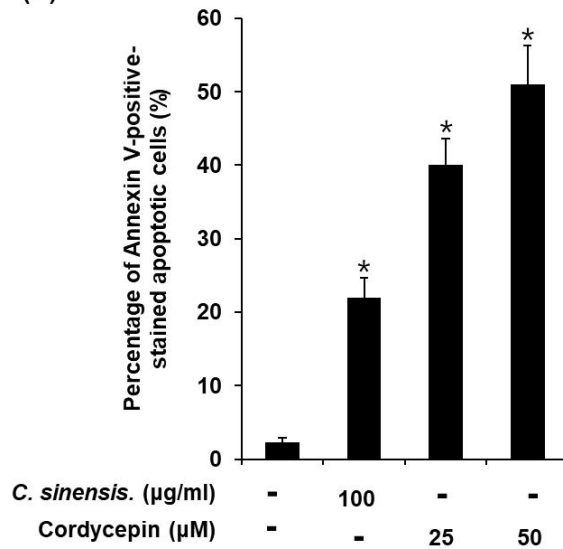
- *C. sinensis*와 cordycepin의 MCF-7 apoptosis 유도 효과

Apoptosis 유도 효과를 확인하기 위해, 세포를 Alexa Fluor488이 결합되어 있는 Annexin V와 propidium iodide (PI)로 세포를 염색하여, Image-based cytometric 분석을 수행하였다. Annexin V는 일종의 형광 probe로 apoptosis를 포함한 몇 가지 세포 사멸 과정의 세포 표면에 결합, 발견된다. Annexin V로 염색된 세포인 apoptotic 세포는 대조군에 비해 *C. sinensis*. 100 µg/ml와 cordycepin 25µM, 50µM 처리 군에서 현저하게 증가하였다 (그림. 8A)). 또한, 정량적인 분석 결과로부터, Apoptotic 세포가 대조군 2.33%에 비해 *C. sinensis*. 100 µg/ml처리 후 22%, cordycepin 25µM, 50µM 처리 후 40%, 51%로 증가하였다 (그림. 8B)). 이러한 결과는 *C. sinensis*와 cordycepin가 MCF-7세포에 일으키는 세포 사멸이 apoptosis임을 시사한다.

(A)



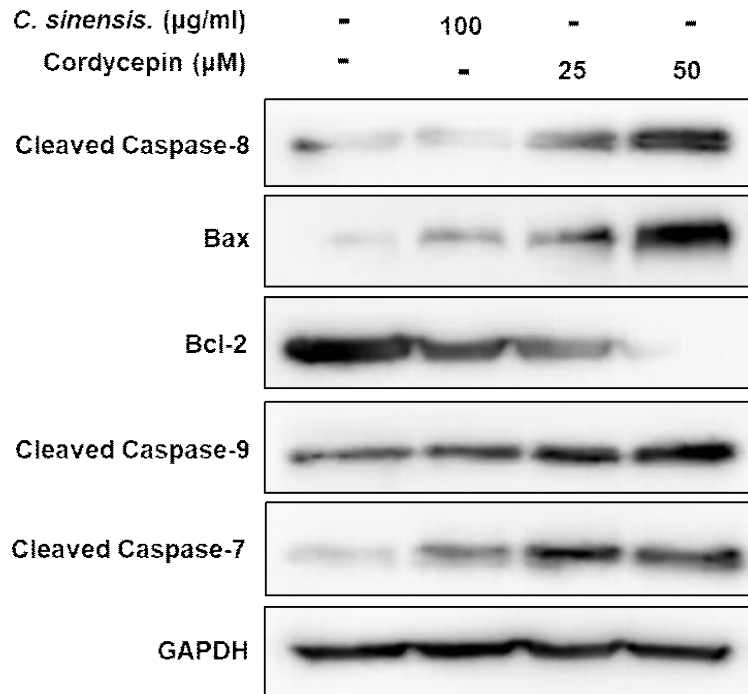
(B)



<C. sinensis.와 cordycepin의 MCF-7 apoptosis 유도 효과 (A) C. sinensis.와 cordycepin 처리 후 Annexin V로 염색된 apoptotic 세포 (B) 정량적인 분석 그래프. *P>0.05.>

- C. sinensis.와 cordycepin이 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에 C. sinensis. 100 µg/ml와 cordycepin 25µM, 50µM 처리 후 apoptosis 관련 단백질 발현을 살펴본 결과 C. sinensis. 100 µg/ml, cordycepin 25µM, 50µM 처리에 따라 Cleaved caspase -8, -9, -7, 그리고 Bax 발현이 증가하였고, Bcl-1 발현이 감소하였다.



<*C. sinensis.*와 cordycepin이 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향>

④. 결론

동충하초 추출물은 MCF-7 세포의 증식 효과를 보였으며, ER과 상호작용하는 길항제 ICI 182,780의 처리시 증식이 억제되었다. 동충하초 추출물은 에스트로겐 길항제에 의해 그 효과가 저해되었기 때문에 ER 리간드로서 에스트로겐 활성을 가진다고 판단된다.

에스트로겐은 ER을 활성화 시키는 데는 N말단의 AF-1에 위치하는 118번째 아미노산인 세린(serine: Ser118)의 인산화가 필요하다(Bunone G, 1996). MCF-7 세포에 동충하초 추출물을 처리시 Phospho-ER \-(Ser118)의 발현이 증가하는 결과를 통하여 동충하초 추출물이 ER을 활성화시킨다고 판단된다.

항암 세포 사멸 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 apoptosis는 크게 intrinsic pathway와 extrinsic pathway의 두 가지 경로를 통해 일어난다. Extrinsic pathway는 세포 표면에 위치하는 tumor necrosis factor alpha receptor(TNFR), Fas와 같은 death receptor와 밀접한 관련이 있으며, Intrinsic pathway는 mitochondrial apoptotic pathway로 미토콘드리아가 apoptosis의 중추적인 역할을 담당한다. Caspase는 단백질분해효소로 cystein protease에 속하며 apoptosis의 시작 및 진행에 중요한 역할을 수행한다. Effector caspase에 속하는 caspase-7는 extrinsic과 intrinsic 두 가지 경로를 통하여 활성화 될 수 있다. 대표적으로는 extrinsic pathway에 속하는 initiator caspase인 caspase-8이나 caspase-9에 의해서 활성화될 수 있고, intrinsic pathway에 속하는 cytochrome c에 의해서도 활성화될 수 있다. 본 연구의 결과를 살펴보면, *C. sinensis.* 100 µg/ml, cordycepin 25µM, 50µM 처리는 cleaved caspase-8, -9와 cleaved

caspase-7의 발현 모두 증가시켰다. 이러한 결과는 *C. sinensis*와 cordycepin가 일으키는 apoptosis가 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 활성화와 관계 있을 가능성이 높음을 시사한다. 또한, Intrinsic pathway는 Bcl-2 family에 속하는 pro-apoptotic 또는 antiapoptotic protein들에 의해 조절되며, Bcl-2은 anti-apoptotic protein에 속하고 Bax는 pro-apoptotic protein에 속한다. 따라서, apoptosis의 진행은 Bcl-2의 발현량과 반비례하고, Bax의 발현량과는 비례하기 때문에 Bax/Bcl-2 비율이 증가할수록 apoptosis는 활성화 된다. 본 연구의 결과에서 *C. sinensis*와 cordycepin의 처리는 Bax/Bcl-2 비율을 증가시키는 경향을 보였다. 이러한 결과는 Bax가 미토콘드리아로부터 cytochrome c와 pro-apoptotic factors들의 유리를 일으켜 intrinsic pathway를 통하여 apoptosis를 유도하는 증거로 해석될 수 있다. 이상의 결과로부터 *C. sinensis*와 cordycepin은 MCF-7 인체 유방암 세포 내에서 extrinsic pathway와 intrinsic pathway경로의 apoptosis를 유발하였으며, 그 결과 농도 의존적으로 세포 증식률이 감소하였고, Annexin V 양성인 세포를 증가시켰다. 이러한 결과는 *C. sinensis*와 cordycepin이 유방암 치료에 효과적인 항암 활성 소재로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

(3) 특허 출원

- ①. 특허명 : 동충하초 농축액을 유효성분으로 포함하는 여성 갱년기 증상 예방 또는 치료용 조성물
- ②. 출원번호 : 10-2019-0062648

마. 제형 연구

(1) 피로개선용 건강기능식품 겔 제형 검토

①. 제품화를 위한 겔의 제제시험(중점제 선정)

- 1) 중점제의 복합처방보다는 단일처방으로 설정
- 2) Scale up 진행시 점도 변화: 잔탄검처방으로 4시 열 안정성 확인

②. 섭취대상 및 기능성에 적합한 관능 선정

1) 관능시험

쌍화, 도라지, 대추, 생강등을 복합처방하여 관능평가 실시 : 20명이상 관능평가한 결과 대추, 생강 샘플이 선호도가 높게 평가됨.

③. 공정적용 가능성 및 지표성분 분석가능성 검토 및 본 설비 적용을 통한 시제품 생산

- 2) 공정조건(pH, 열)에 따른 부원료의 지표성분 간섭 : 공인기관 및 주관기관에 분석 후 영향이 없는 공정인 것을 확인함
- 3) 동충하초추출물 겔의 제품화를 위한 본 설비적용

(2) 피로개선용 건강기능식품 젤리 제형 개발

①. 제품화를 위한 젤리의 제제시험(중점제 선정)

- 1) 중점제의 복합처방보다는 단일처방으로 설정
- 2) Scale up 진행시 점도 변화: 열 안정성 확인 완료

②. 섭취대상 및 기능성에 적합한 관능 선정

- 1) 쌍화, 도라지, 대추, 생강등을 복합처방하여 관능평가 실시 : 20명이상 관능평가한 결과 대추, 생강을 샘플이 선호도가 높게 평가됨.

③. 공정적용 가능성 및 지표성분 분석가능성 검토 및 본 설비 적용을 통한 시제품생산

- 1) 공정조건(pH, 열)에 따른 부원료의 지표성분 간섭 : 영향이 없는 공정인 것을 확인함
- 2) 동충하초추출물 젤리의 제품화를 위한 본 설비적용

(3) 액상 제형

①. 중년여성의 취향에 적합한 액제 제형 개발

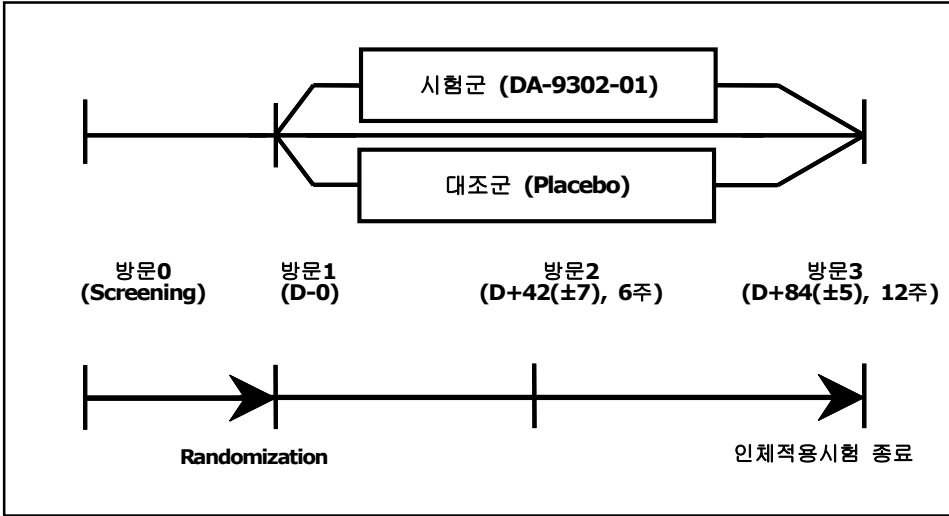
- 1) 50ml, 100ml 병 또는 파우치 제품 검토 : 50ml 파우치보다 양이 적어 복용 편의성이 높은 20ml 제형으로 처방
- 2) 섭취대상 및 기능성에 적합한 관능 선정 : 여성에게 어울리는 딸기향으로 착향 (원료의 맛과 어울림)
- 3) 공정적용 가능성 및 지표성분 분석가능성 검토 및 본 설비 적용을 통한 시제품 생산

바.인체적용시험

(1) 여성갱년기 유효성 평가 인체적용시험 계획

- ①. 임상시험 기관 : 전북대학교 병원
- ②. 임상시험 제목 : 갱년기 증상에 대한 동충하초 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
- ③. 임상시험 CRO 용역기관 : 네오뉴트라(주)
- ④. 인체적용시험 synopsis

인체적용시험 제목	갱년기 증상에 대한 동충하초농축액의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 계획서 번호	Protocol No.: DA-9302-01 Version No.: 3.2
인체적용시험 의뢰자	동아제약(주) 서울특별시 동대문구 천호대로 64
인체적용시험 책임자	채○완(전북대학교병원 의생명연구원 연구교수)
인체적용시험 실시기관	전북대학교병원(전라북도 전주시 덕진구 건지로 20)
인체적용시험 공동연구자	김○현(전북대학교 의과대학 산부인과학교실 교수) 최○정(전북대학교 의과대학 영상의학과학교실 교수) 박○현(전북대학교 의과대학 생화학교실 교수) 이○옥(전북대학교 의과대학 내과학교실 교수) 김○곤(전북대학교병원 의생명연구원 연구교수) 최○경(전북대학교병원 기능성식품임상시험센터 교수)
인체적용시험 기간	인체적용시험 시작일: 2019.03.06(첫 인체적용시험 대상자 시험 시작일) 인체적용시험 종료일: 2020.04.27(마지막 인체적용시험 대상자 시험 종료일)
인체적용시험 대상	갱년기 증상을 호소하는 폐경기 여성
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 갱년기 여성을 대상으로 동충하초농축액을 섭취했을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 갱년기 증상 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
시험 단계 및 디자인	단 계: 기타(건강기능식품) 디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품	<ul style="list-style-type: none"> ● 시험식품: DA-9302-01(동충하초농축액) ● 대조식품: Placebo

<p>인체적용시험용 식품 섭취 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 시험식품(DA-9302-01): 1일 1회, 1회 1포를 경구 섭취 (동충하초농축액으로서 500 mg/day(고형분으로서 약 375 mg/day)) • 대조식품(Placebo): 시험식품과 동일한 방법으로 섭취 																												
<p>인체적용시험용 식품 섭취 기간</p>	<p>12주</p>																												
<p>인체적용시험 방법</p>	 <p>인체적용시험 대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 하였다. 배정된 인체적용시험 대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취하였다.</p>																												
<p>인체적용시험 대상자 수</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 계획된 인체적용시험 대상자 수: <table border="1" data-bbox="393 1462 1293 1615"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합 계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수(PP Set)</td> <td>45</td> <td>45</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(25 %) 고려 레수</td> <td>60</td> <td>60</td> <td>120</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> • 결과분석에 포함된 인체적용시험 대상자 수: <table border="1" data-bbox="393 1693 1293 1937"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Safety Set</td> <td>60</td> <td>60</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>FA Set</td> <td>58</td> <td>58</td> <td>116</td> </tr> <tr> <td>PP Set</td> <td>51</td> <td>55</td> <td>106</td> </tr> </tbody> </table>		시험군	대조군	합 계	최종 평가 레수(PP Set)	45	45	90	Drop-out(25 %) 고려 레수	60	60	120		시험군	대조군	합계	Safety Set	60	60	120	FA Set	58	58	116	PP Set	51	55	106
	시험군	대조군	합 계																										
최종 평가 레수(PP Set)	45	45	90																										
Drop-out(25 %) 고려 레수	60	60	120																										
	시험군	대조군	합계																										
Safety Set	60	60	120																										
FA Set	58	58	116																										
PP Set	51	55	106																										

<p>선정기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 마지막 생리 후 1년 이상 경과한 만 40세-만 60세 여성 2) Kupperman Index 점수가 20 이상인 여성 3) 인체적용시험이 시작되기 전 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)를 작성한 여성
<p>제외기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 체질량 지수(BMI: Body Mass Index)가 30 kg/m² 초과인 자 2) 최근 3개월 이내에 여성호르몬 등의 호르몬제제를 사용한 자 3) 자궁내막증식증, 자궁암, 자궁내막암, 유방암 또는 유방질환 의증, 성호르몬 관련 암 등의 과거 또는 현재 병력이 있는 자 4) 최근 1년 이내 심한 편두통이 있거나, 혈전색전증, 뇌혈관질환, 심근경색, 불안정형 협심증을 진단받았거나 관상동맥 성형술을 시행한 과거력이 있는 자 5) 우울증, 불안장애 등의 심한 정신질환이 있거나, 현재 항우울제 등 정신신경계 약물을 복용중인 자 6) 폐경 1년 이후 부정형 자궁출혈이 있는 자 7) 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정기준) 8) 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우) 9) 조절되지 않는 갑상선 질환이 있는 자(시험자에 의해 본 인체적용시험에 참여가 가능하다고 판단되는 자는 참여 가능) 10) 약물이나 알코올 남용자 11) ALT 또는 AST가 시험기관 정상 상한치의 3배를 초과하는 자 12) Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배를 초과하는 자 13) FSH가 시험기관 정상범위 하한치 미만인 자 14) Mammography/PAP smear 상 임상적으로 유의한 이상(BI-RADS Category 3 이상, PAP smear의 경우 ASCUS까지는 이상이 없음)이 확인되는 자(단, BI-RADS Category 0인 경우 시험자 판단 하에 등록 가능) 15) 최근 3개월 이내에 Clonidine, 항응고제 또는 항혈전제(Warfarin, Clopidogrel 등)를 사용한 자 16) 최근 1개월 이내에 여성 갱년기 관련 의약품 또는 건강기능식품(또는 보충제)을 복용한 자 17) 비스포스포네이트(Bisphosphonate)제제 등 골다공증 치료제를 복용 또는 투여하고 있는 자 18) 본 인체적용시험 시작 2개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 자 19) 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 자

<p>유효성 평가 변수</p>	<p>1. 1차 유효성 평가 변수 1) KMI(Kupperman Index, 11가지 항목) 총점 2. 2차 유효성 평가 변수 1) Modified KMI의 12가지 개별 항목(KMI 11가지 항목, 질 건조 항목) 점수 2) 갱년기 정도 평가지수(MRS) 3) 혈중 ALP, OC</p>
<p>안전성 평가 변수</p>	<p>1) 이상반응 1) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사) 1) 활력징후(혈압, 맥박), 체중 1) E2, FSH 1) 자궁내막두께</p>
<p>통계 분석</p>	<p>통계분석은 SAS®(Version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석하였다.</p> <p>1. 유효성 평가 변수 1) 1차 유효성 평가 변수 1차 유효성 평가 변수인 KMI(Kupperman Index, 11가지 항목) 총점의 섭취 전후 변화의 정도는 정규성 가정 만족여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 실시하였고, 각 시점에서의 구간 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>2) 2차 유효성 평가 변수 2차 유효성 평가 변수인 Modified KMI 12가지 개별 항목 (KMI 11가지 항목, 질 건조 항목) 점수, 갱년기 정도 평가지수(MRS), 혈중 ALP, OC의 섭취 전후 변화의 정도는 정규성 가정 만족여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 실시하였고, 각 시점에서의 구간 변화의 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>2. 안전성 평가 변수 1) 이상반응 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(Treatment-Emergent Adverse Events, TEAEs)은 MedDRA에 따라 Coding 하였으며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가하였다.</p>

각 구간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.

2) 임상병리검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 정규성 가정 만족여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 실시하였고, 구간 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 뇨검사의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

3) 활력징후(혈압, 맥박), 체중

활력징후(혈압, 맥박), 체중 검사치의 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 정규성 가정 만족여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 실시하였고, 구간 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

4) E2, FSH

E2, FSH 검사치의 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 정규성 가정 만족여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 실시하였고, 구간 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

5) 자궁내막두께

자궁내막두께 측정치의 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 정규성 가정 만족여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 실시하였고, 구간 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

(2) 인체적용시험 결과

- ①. 인체적용시험 시작일 : 2019.03.06.(첫 인체적용시험 대상자 시험 시작일)
- ②. 인체적용시험 종료일 : 2020.04.27.(마지막 인체적용시험 대상자 시험 종료일)
- ③. 인체적용시험 결과보고서 작성일 : 2020.08.19.
- ④. 인체적용시험 결과보고서 요약

결과	<p>• 유효성 평가</p> <p>본 인체적용시험의 1차 유효성 평가는 KMI 총점 변화량으로서 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>KMI 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 11.39±7.47점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 9.36±8.39점 감소하여(p<0.0001) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p=0.0368^S). 섭취 12주 후 시험군은 13.12±7.72점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 12.96±8.38점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>KMI 총점 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서는 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>2차 유효성 평가는 섭취 Modified KMI 개별의 12가지 항목 점수, 갱년기 정도 평가지수(MRS), 혈중 ALP, OC 변화량으로서 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>Modified KMI 안면홍조 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 3.69±2.98점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 3.20±3.12점 감소하여(p<0.0001) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p=0.0266^S). 섭취 12주 후 시험군은 3.84±2.52점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 4.22±3.64점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>Modified KMI 안면홍조 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서는 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>Modified KMI 손발저림 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 1.25±1.70점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 0.84±1.95점 감소하여(p=0.0019) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p=0.0392^S). 섭취 12주 후 시험군은 1.37±1.52점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 1.42±1.87점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p> <p>Modified KMI 손발저림 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서는 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.</p>
----	--

Modified KMI 불면증 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.96 ± 1.85 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.89 ± 1.90 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 불면증 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 신경과민 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.45 ± 1.70 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.64 ± 1.97 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 신경과민 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 우울증 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.71 ± 0.81 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.44 ± 0.88 점 감소하여($p = 0.0003$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p = 0.0300^S$). 섭취 12주 후 시험군은 0.76 ± 0.91 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.64 ± 0.91 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 우울증 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서는 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 현기증 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.61 ± 1.04 점 감소하였고($p = 0.0002$), 대조군은 0.42 ± 0.79 점 감소하였으나($p = 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 현기증 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 피로 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.04 ± 0.98 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.85 ± 0.70 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 피로 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 근관절통 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.71 ± 0.90 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.64 ± 0.82 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 근관절통 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 두통 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.49 ± 0.90 점 감소하였고($p=0.0002$), 대조군은 0.35 ± 0.82 점 감소하였으나($p=0.0022$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 두통 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 가슴 두근거림 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.57 ± 0.81 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.49 ± 0.77 점 감소하였으나($p<0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 가슴 두근거림 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 개미환각 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.31 ± 0.65 점 감소하였고($p=0.0019$), 대조군은 0.42 ± 0.96 점 감소하였으나($p=0.0006$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 개미환각 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 질 건조, 분비물 감소 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.88 ± 0.82 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.85 ± 0.87 점 감소하였으나($p<0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Modified KMI 질 건조, 분비물 감소 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 9.18 ± 7.89 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 9.60 ± 7.20 점 감소하였으나($p<0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 총점 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 안면홍조 및 발한 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.90 ± 0.83 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.84 ± 1.00 점 감소하여($p<0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0368^{\text{§}}$). 섭취 12주 후 시험군은 0.86 ± 0.96 점

감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.22 ± 1.20 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 안면홍조 및 발한 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서는 섭취 12주 후 시험군은 0.83 ± 0.98 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.22 ± 1.17 점 감소하여($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나($p = 0.0304^{\&}$) 시험식품의 개선효과는 아니었다.

MRS 심장불편 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.69 ± 0.81 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.33 ± 1.04 점 감소하여($p = 0.0188$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p = 0.0033^{\&}$). 섭취 12주 후 시험군은 0.78 ± 0.99 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.80 ± 1.03 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 심장불편 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 6주 후 시험군은 0.57 ± 0.86 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.34 ± 1.04 점 감소하여($p = 0.0107$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p = 0.0124^{\&}$). 섭취 12주 후 시험군은 0.69 ± 1.05 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.79 ± 1.04 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 수면문제 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.06 ± 0.97 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.93 ± 1.03 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 수면문제 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 우울한 기분 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.96 ± 1.08 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.80 ± 1.16 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 우울한 기분 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 과민성 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.82 ± 1.13 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.85 ± 0.97 점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 과민성 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 불안감 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주

후 시험군은 0.75±1.11점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 0.65±0.93점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 불안감 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 신체 및 정신적 피로 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.96±1.08점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 1.02±0.93점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 신체 및 정신적 피로 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 성적인 문제 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.65±1.32점 감소하였고(p=0.0005), 대조군은 0.85±1.10점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 성적인 문제 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 배뇨 문제 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.67±0.99점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 0.64±1.02점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 배뇨 문제 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 질 건조 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 0.90±1.14점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 1.04±1.12점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 질 건조 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 관절 및 근육 불편 점수 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.76±1.21점 감소하였고(p<0.0001), 대조군은 0.80±1.01점 감소하였으나(p<0.0001) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

MRS 관절 및 근육 불편 점수 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

ALP 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.86±13.30 IU/L 증가하였고(p=0.0914), 대조군은 2.80±9.95 IU/L

증가하였으나(p=0.0415) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

ALP 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

OC 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.08±3.01 ng/mL 증가하였고(p=0.8459), 대조군은 0.42±2.85 ng/mL 증가하였으나(p=0.2757) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

OC 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

• 안전성 평가

안전성 평가는 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 한번이라도 섭취한 인체적용시험 대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였으며, 총 120명(시험군 60명, 대조군 60명)의 인체적용시험 대상자가 Safety Set에 포함되었다.

시험군에서는 총 6명(10.00 %)의 인체적용시험 대상자에게서 6건의 이상반응이 있었고, 대조군에서는 총 6명(10.00 %)의 인체적용시험 대상자에게서 6건의 이상반응이 있었으나 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=1.0000).

이 중 시험군 1명(1.67 %)에서 1건의 중대한 이상반응이 발생하였다. CB-R005 대상자는 2019년 3월 27일 본 인체적용시험에 등록되었으며, 2019년 4월 19일 아침 9시경 Cerebral infarction 증상 발견하여, 본원 응급실을 경유하여 신경과에 입원하여 검사 시행하였고, 입원 치료 완료 후 상태 호전되어 2019년 4월 24일 퇴원하였다. 시험자에 의해 중대한 이상반응과 인체적용시험용 식품의 인과관계는 ‘관련이 없다고 생각됨’으로 판단되었으며, 2019년 5월 2일 중도탈락 하였다.

본 인체적용시험 기간 동안에 발생한 이상반응의 증상정도 조사에서 시험군은 경도(mild) 3건, 중등도(Moderate) 2건, 중증(Severe) 1건이었으며, 대조군은 경도(mild) 2건, 중등도(Moderate) 4건이었다.

인체적용시험용 식품과의 관련성에서 시험군은 ‘관련 있을 가능성 있음’이 1건, ‘관련이 없다고 생각됨’이 4건, ‘명확히 관련이 없음’이 1건이었고, 대조군은 ‘관련이 없다고 생각됨’ 4건, ‘명확히 관련이 없음’ 2건으로 시험자에 의해 판단되었으며, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=1.0000).

인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 시험군에서 1건이 발생하였으며 위장관 장애였다. 해당 이상반응은 관련 조치 없이 완전치유 되었음을 확인하였다.

본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 임상병리검사는 스크리닝 방문과 방문3에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가되었다.

혈액학적검사의 모든 항목에서 섭취 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

혈액화학적검사 중 Ca 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.02 ± 0.36 mg/dL 증가하였고($p=0.6072$), 대조군은 0.12 ± 0.40 mg/dL 감소하여($p=0.0304$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0473$). Triglyceride 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.90 ± 68.12 mg/dL 감소하였고($p=0.7988$), 대조군은 21.81 ± 54.60 mg/dL 증가하여($p=0.0026$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0173$).

이는 정상범위 이내의 범위였으며, 이외 혈액화학적검사의 항목에서는 섭취 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

이외 혈액화학적검사의 항목에서는 섭취 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

뇨검사의 모든 항목에서 섭취 12주 후 시험군, 대조군 모두 정상이었으며 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

활력징후(혈압, 맥박), 체중의 분석 결과에서 섭취 6주, 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

FSH, E2, 자궁내막두께의 분석 결과에서 섭취 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

결론

폐경은 여성의 난소기능이 감소됨에 따라 자율신경계의 불균형을 가져와 안면홍조, 손발 저림, 관절통 등의 신체적 증상과 함께 짜증, 불면증, 정서적 변화 등의 다양한 건강문제를 야기하며, 중년여성의 80% 이상이 이러한 건강문제를 경험한다. 갱년기 증상을 호소하는 여성에서 호르몬 대체요법이 널리 사용되어 왔으나, 호르몬 요법에 에스트로겐 치료는 유방암의 위험을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용시에는 자궁암, 혈전질환, 당뇨병, 고혈압의 비율을 증가시킬 수 있다. 또한 갱년기 여성에서 폐경 이후의 건강하고 행복한 삶에 대한 욕구가 증가되었고, 중년기의 건강은 노년기 삶의 질에도 영향을 미치므로 갱년기 증상 개선을 위한 안전한 소재가 필요하다.

본 인체적용시험은 갱년기 여성을 대상으로 동충하초 농축액을 섭취하였을 때, 여성갱년기 증상의 개선정도를 평가하였다. 1차 유효성 평가변수인 KMI 총점은 6주 섭취 후 시험군에서 대조군 대비 통계적으로 유의하게 감소하였다.

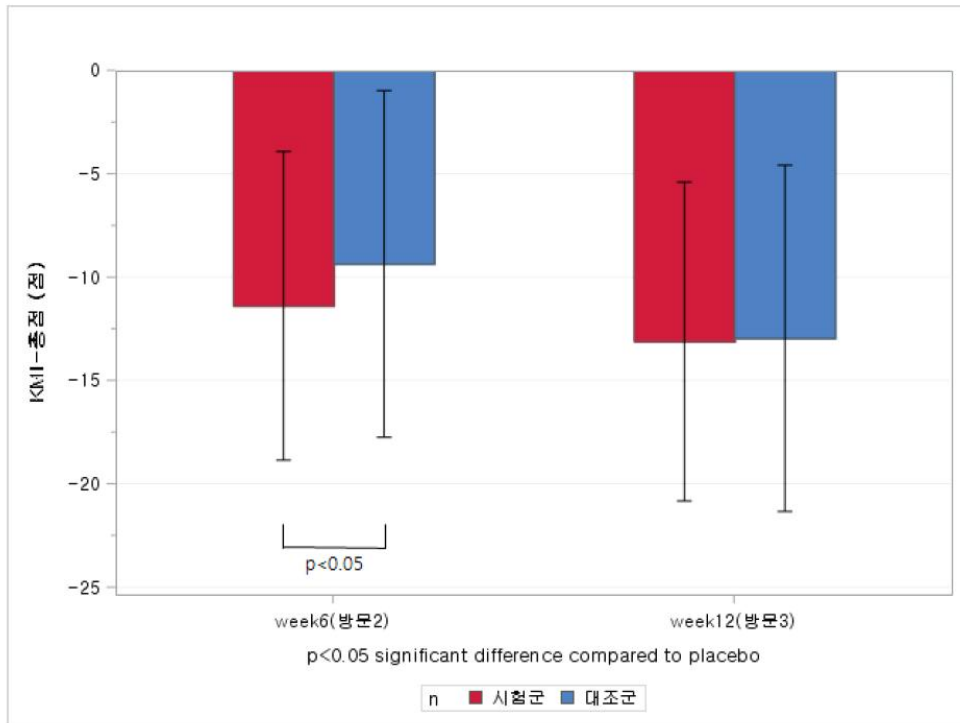
또한, 섭취 6주 후 시험군에서 2차 유효성 평가 변수인 Modified KMI의 안면홍조, 손발저림, 우울증 증상 점수와 갱년기 정도

	<p>평가지수 (MRS)의 안면홍조 및 발한, 심장불편 증상 점수가 대조군대비 통계적으로 유의하게 감소하였다.</p> <p>본 인체적용시험이 진행되는 동안 임상적으로 의미있는 이상반응이나 임상병리검사, 활력징후, 체중, E2, FSH, 자궁내막두께의 변화는 없었으며 동충하초농축액의 섭취는 인체에 안전한 것으로 판단된다.</p> <p>본 인체적용시험을 통해 12주 간의 동충하초농축액 섭취가 갱년기 증상 개선에 있어 대조식품 대비 유효함을 증명할 수는 없었으나 섭취 6주 후 KMI 총점이 동충하초농축액 섭취군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 개선됨이 확인되어, 추후 섭취기간 또는 섭취량 변경 등을 고려한 후속연구를 진행해 볼 수 있을것으로 판단된다.</p>
--	--

⑤. 주요 결과 및 논의

1) KMI 총점 변화 (PP set)

6주 시점까지 동충하초 농축액 섭취군의 총점이 더 많이 감소하였으나 6주~ 12주 사이에 플라세보 섭취군이 많이 감소하여 12주 시험에는 유의적인 차이가 나지 않았다. 플라세보 섭취군에서 많이 감소한 이유는 알 수 없으나 다른 문헌에서는 이러한 플라세보의 변화가 보이지 않아 원인을 파악할 필요가 있는 것으로 판단된다.

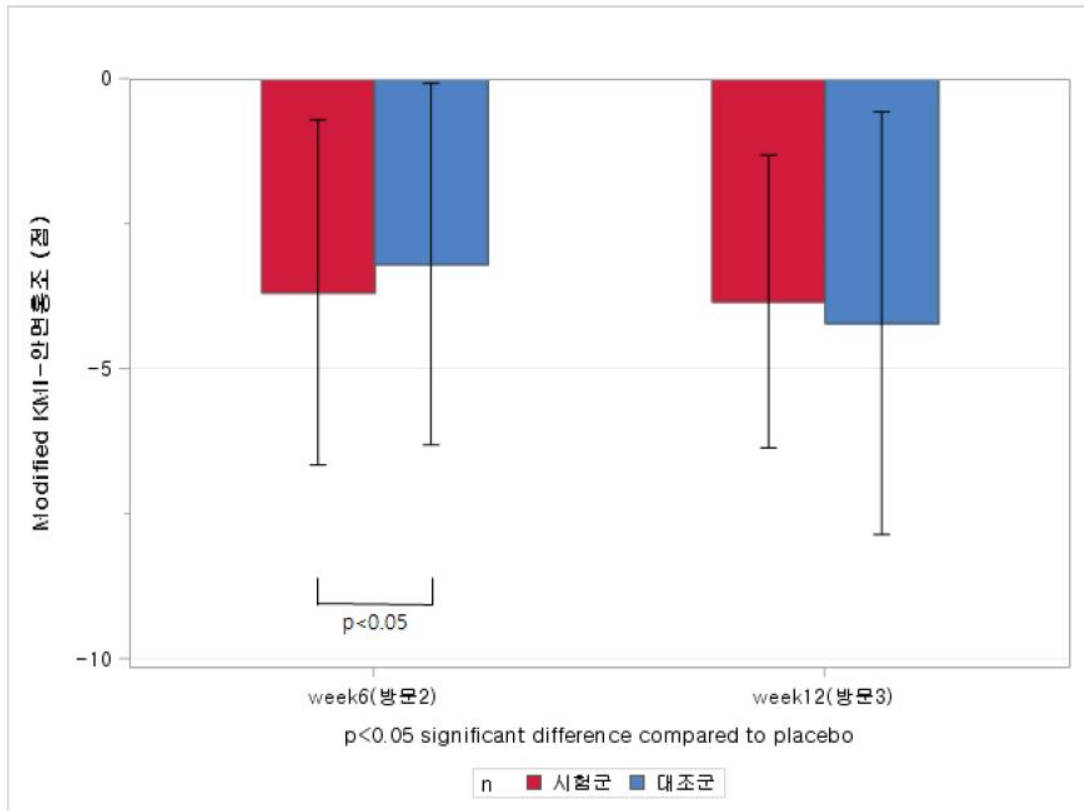


<KMI 총점변화>

2) Modified KMI 안면홍조 점수 변화 (PP set)

안면홍조 점수 변화 역시 6주시점에는 플라세보 보다 더 많은 점수 감소를 보였고 동

계적으로도 유의하였다. 하지만 6주 ~ 12주 사이에 플라세보군의 점수변화가 크게 나타나 12주 시점에 위약대비 통계적 유의성이 나타나지 않았다.



<modified KMI 안면홍조 점수>

마.사업화

(1) 동충하초 추출물 B2B 사업

면역기능 개선 동충하초 추출물의 원료 사업

자사 확보 판매망인 약국 영업만으로는 매출이 부진하여 매출증진 목적으로 면역력 개선의 동충하초 추출물 원료를 타 건강기능식품 제조 유통사에 공급하는 B2B 사업을 개시 하였다. 각종 원료 소개자료 및 마케팅에 도움이 되는 자료를 적극적으로 제공하여 원활한 마케팅을 할 수 있도록 지원하였다.

①. 실적

1) 웅진딜리에뜨와 원료 공급계약 체결

- 생산 제품 : 자연모아 ‘면역원’
- 머쉬텍 축적된 스토리텔링 관련 자료 활용



<면역원>

②. 매출 실적

년도	매출액(억원)	비고
2018	1.04	사업개시
2019	0.28	
2020	0.52	

물 품 거 래 계 약 서

매수인: ㈜웅진빌리에프

매도인: 동아제약㈜

상기의 "매수인"과 "매도인"은 당사자간의 "동송하초주정수출물" 등(이하 "제품")에 대한 거래에 있어 원활한 수행과 상호이익을 도모하기 위하여 신의와 성실의 원칙에 입각하여 다음과 같이 "제품" 거래를 위한 기본 계약(이하 "본 계약")을 체결한다.

제 1 조 목적

본 계약은 ["제품" 거래]와 관련하여 발생하는 "매수인"과 "매도인"의 권리·의무에 관한 기본적인 사항을 규정하는 것을 목적으로 한다.

제 2 조 기본 원칙

1. "매도인"이 제공하는 "제품"의 세부적인 사항(규격, 성분, 포장 등 세부사항 포함)은 본 계약 및 "매수인"이 "매도인"에 발행하는 발주서에 따르며, 발주서 및 기타 본 계약에 첨부된 사양서, 내역서 등은 본 계약의 일부로 간주한다.

2. "매수인"과 "매도인"은 본 계약에 기재된 것 외의 별도의 조건을 정하는 합의서 등(이하 "추가합의서")을 작성할 수 있다. 이 경우 추가합의서는 본 계약의 일부로 간주하되, 본 계약과 추가합의서의 내용이 상충되는 경우 추가합의서의 내용을 우선하여 적용한다.

3. "매도인"은 "매수인"의 구매부서에서 발행되는 문서화된 정식 발주서 및 계약서를 근거로 "제품"을 제작, 납품 및 서비스 제공을 하여야 하며, 만약 "매도인"이 구두전달 등 다른 방법으로 전달된 주문을 근거로 생산 또는 재고를 보유하거나 서비스를 준비한 경우, "매수인"은 이에 대해 어떠한 책임도 지지 않는다.

"매도인"은 "매수인"이 본 계약 상 "제품"과 동일 또는 동종의 제품에 대해서 매수인이 시장 경쟁력을 유지할 수 있도록 시장 질서 유지에 협력하도록 하며, 본 계약 이후 "매수인"이 최초 3년간 30억원 이상 발주하는 경우 "매도인"은 '네트워크 판매(양분판매 등에 관한 법률 상 판매)를 주업으로 하는 제 3 자에게 본 계약 상 "제품"과 동일 또는 동종의 제품을 "매수인"의 사전 서면 동의 하에서만 판매할 수 있다.

제 3 조 계약의 변경

<원료공급 계약서>

(2) 번역력 개선 ‘동충일기’ 제품 판매

년도	매출액(억원)
2016	
2017	2
2018	1.12
2019	0.75



<동충일기>

2-2. 1협동 (주) 바이오텍에스알에스

가. 동충하초 일반건강식품 및 가공품 제품화를 위한 추출공정개발 및 제형개발

(1) 제품 제형 연구

- ①. 유효성을 보이는 복용 용량에서의 제형연구 : 복용 횟수 및 복용 타블렛 수를 줄이기 위한 연구를 진행
- ②. 원료의 특성 및 복용 용량에 따라 제형은 달라 질 수 있음 : 타블렛 형태, 과립 및 액상 형태로 제형 연구 진행
- ③. 복용, 휴대의 편의성, 제품의 맛, 향 등의 관능 평가를 통한 기호성을 높이는 제형 연구
 - 1) 타블렛은 목 넘김의 부담이 없는 다이아몬드 형태로 개발
 - 2) 타블렛을 먹기 힘든 대상자를 위한 개발로 과립제와 액상 개발
 - 3) 여러 제형으로 여러 방향의 제품 개발 가능
- ④. 선택된 제형에 대한 품질 평가
- ⑤. 타블렛의 경우 성인 남성들이 복용하기에 적절하다는 평을 받음.
- ⑥. 과립제 및 액상의 경우 텁텁하거나 원료의 잔 감이 입에 남지 않으며, 부드러운 목 넘김으로 좋은 평을 받음.

1일 섭취 유효성분량 (mg)		1,920		
구분	무게 (mg)/정	유효함량 (mg)/정	1일 복용 정	
A 600	1,200	600	4	3.2
A 900		900	3	2.1
B 650	1,300	650	3	3.0
B 974		974	2	2.0
C 700	1,400	700	3	2.7
C 10 50		1,050	2	1.8
C-20 4(코스)			6	

<태블릿>



제형	분말	차(Tea)	과립	액상
제품				

(2) 일반건강식품 및 가공품 제품화를 위한 동충하초 원료의 대량공정 스케일 확립

①. 동충하초 원료의 대량 Scale-up 제조공정 최적화 연구

- 1) 지표성분 확인 및 유효성분 상대함량 증가방법 결정
- 2) 순도 및 수율 증가 방법 결정
- 3) 생산에서의 시간 단축 및 공정의 단순화를 위해 추출단계 및 추출시간 결정
- 4) 원료 생산을 위한 표준화된 품질보증(QA)과 품질관리(QC) 기준 확립



<동충하초 추출분말 (대량 생산공정)>

②. 동충하초 대량생산한 추출분말 중 지표성분인 cordycepin 함량 분석

- 1) 표준용액의 제조
 - 코디세핀 표준품 1 mg에 증류수 1 ml을 가한다.
 - Vortex 한 후 적절한 농도로 희석하여 표준용액으로 한다.
- 2) 시험용액의 제조
 - 시료 약 0.5 g을 준비한다. (다미 에프엔에프에서 제조한 동충하초 분말 사용)
 - 증류수 50 ml 첨가 후 10분동안 초음파 처리한다.
 - 여과(0.45 μm)하여 시험용액으로 한다.
- 3) 분석 조건

Mobile phase	A: DW, B: Acetonitrile	
Standard	Cordycepin (SIGMA, C3394, ≥98%)	
Flow rate	1 ml/min	
Injection volume	10 ul	
Run time	20 min	
Column	Agilent Zorbax Eclipse C18(4.6 x 150 mm, 5 μm)	
Column oven temp	30 °C	
UV wavelength	260 nm	
Gradient condition	Time (min)	B (%)
	0	10
	10	30
	10.5	100
	15	100
	15.1	10

4) 계산

$$\text{코디세핀 함량 (mg/g)} = [A \times (B/C) \times D] / 1,000$$

- A : 샘플 내 코디세핀 함량 (ug/ml)
- B : 검체를 녹인 용매의 양 (ml)
- C : 검체의 양 (g)
- D : 표준품의 순도
- 마. 함량 계산 결과
- 코디세핀 함량 (mg/g) = $[46.149 \times (50/0.5043) \times 0.98] / 1,000 = 5.46 \text{ mg/g}$

나. 동충하초 브랜드 설정에 따른 마케팅 전략 확립 및 이에 따른 대표시제품 개발 및 제품화

(1) 동충하초 브랜드 설정에 따른 숙취해소 음료 마케팅 개발 전략

①. 액상음료, 파우치 형태의 제품으로 숙취해소 음료 개발을 콘셉트로 한 시제품개발

1) 시제품 개발

동충하초를 이용하여 농축액상 음료, 캔디류 두 종류의 시제품을 개발 : 시제품 시안 완성



<시제품 시안>

- ②. 자판기, 편의점, 마트, 싸우나 등에 납품하기 위한 캔디류 형태로 시제품을 제작
- ③. 화순에서 열리는 블렌딩 국제차 문화제, 국화향연에 참석하여 홍보를 진행함으로써 마케팅 효과를 높임
- ④. 식품관련 특허 2건 출원 완료
 - 1) 상표출원“올베르”29류
 - 2) 상표출원“OLBERE”29류
- ⑤. 화순에서 열리는 블렌딩 국제차 문화제, 국화향연에 참석하여 홍보를 진행



<시제품 홍보>

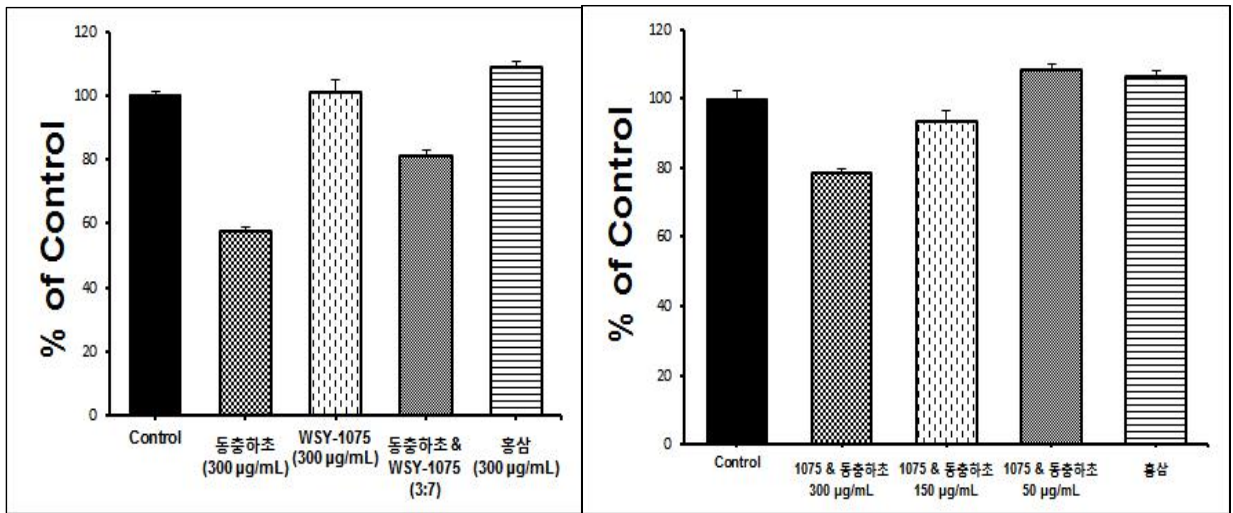
다. 운동능력 개선 개별인정형 원료 개발을 위한 기능성 연구

식품의약품안전처에서 발행한 기능성 효능 가이드라인을 따른 실험 진행

(1) 동충하초 추출물을 근육 세포주에 처리하여 세포증식에 미치는 영향 확인

1) MTT assay

세포독성을 실험해 본 결과, 동충하초 단독은 독성이 있으나 WSY-1075를 함께 처리한 군에서는 세포독성이 감소하는 것을 확인하였다. 동충하초와 WSY-1075를 함께 처리한 군의 농도를 다양하게 해서 관찰한 결과, 50 µg/mL의 경우 양성대조군인 홍삼보다도 더 세포증식을 늘리는 것을 관찰하였다.



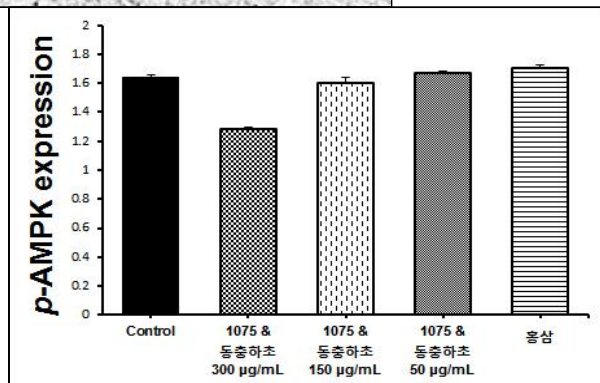
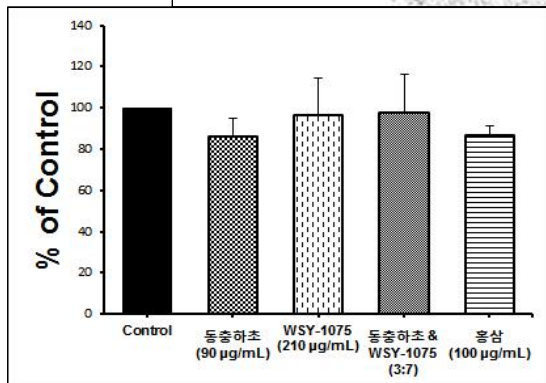
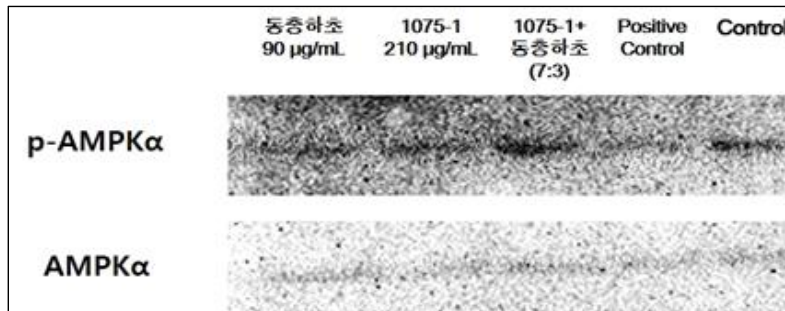
<MTT assay>

(2) 근육세포주에 동충하초 추출물 투여시 운동능력 향상에 미치는 영향

1) p-AMPK/AMPK 비율 비교

동충하초 단독투여, WSY-1075와 함께 처리한 군 모두에서 대조군과 비교해 차이가 없는 것을 관찰함 (양성대조군인 홍삼에서도 차이 없음)

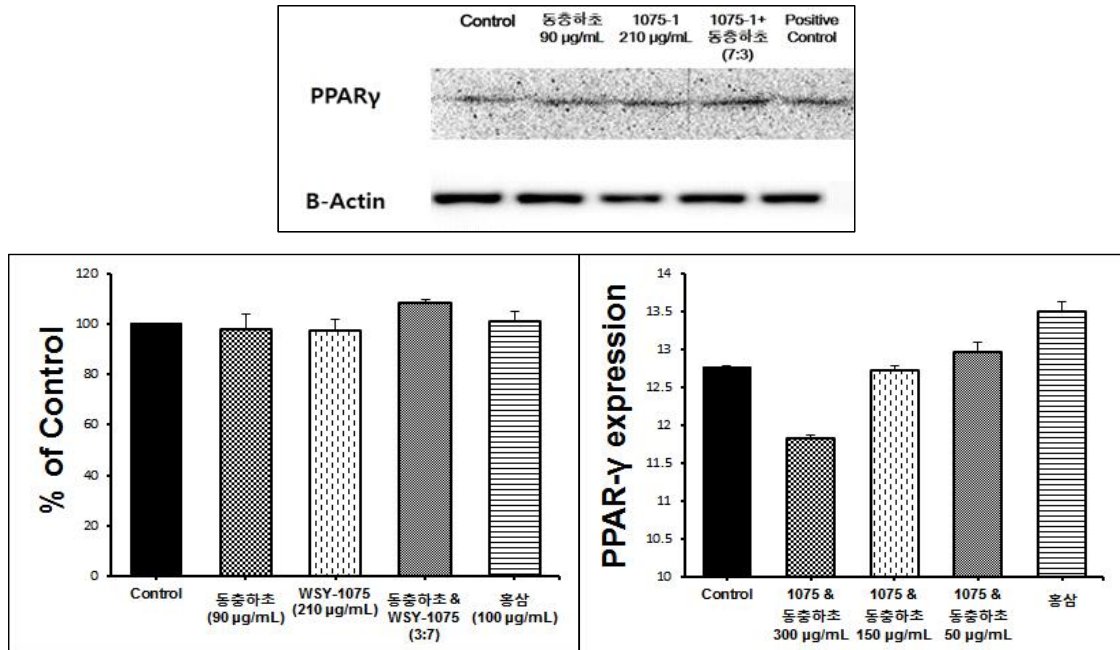
비율을 보면, 대조군인 홍삼보다도 동충하초, WSY-1075 복합물의 비율이 높았으나 유의적이지는 않았다.



<p-AMPK/AMPK ratio>

2) PPAR- γ 발현양

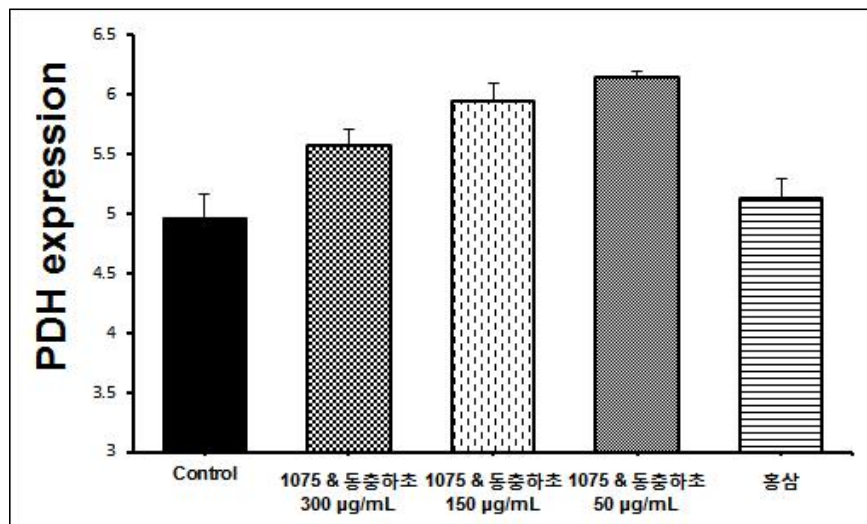
동충하초 단독투여에서는 차이가 없었으나, WSY-1075와 함께 처리한 군에서 대조군과 비교해 발현양이 증가하는 것을 관찰하였다. (양성대조군인 홍삼에서는 차이 없음) 따라서, 동충하초와 WSY-1075를 함께 처리한 군의 농도를 다양하게 해서 관찰한 결과, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 경우, 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 PPAR- γ 의 발현양이 증가하는 것을 관찰하였다.



<PPAR- γ expression>

3) PDH 발현양 비교

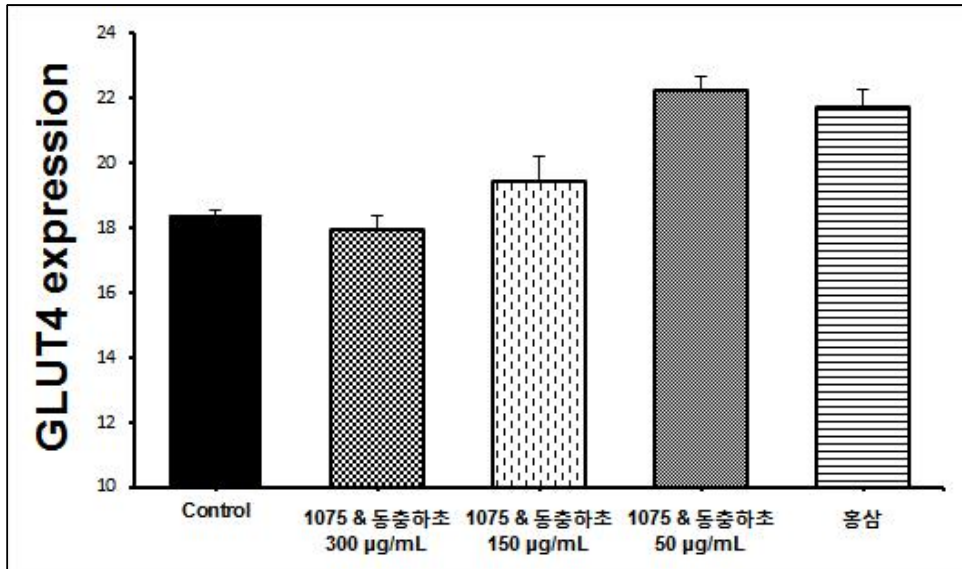
동충하초와 WSY-1075를 함께 다양한 농도로 처리한 결과, 50, 150, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 모두에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 PDH의 발현양이 증가하는 것을 관찰하였다. (양성대조군인 홍삼의 경우 음성대조군과 차이가 없음)



<PDH expression>

4) GLUT4 발현양 비교

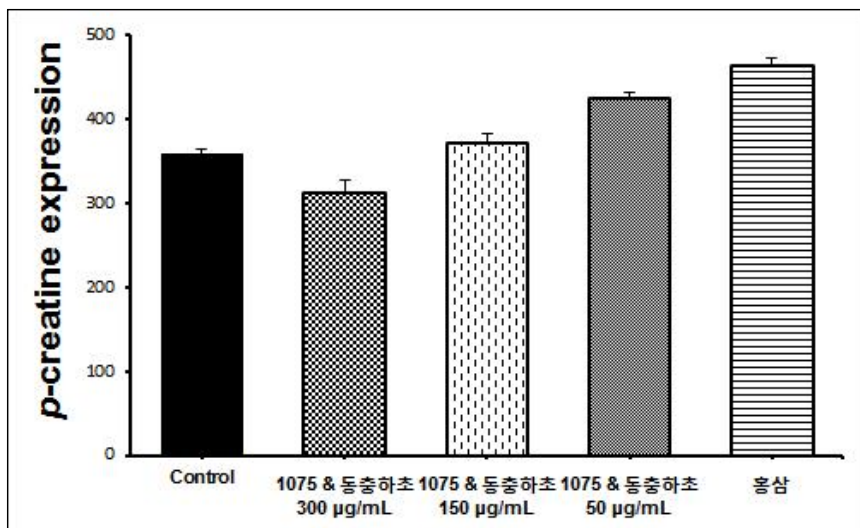
동충하초와 WSY-1075를 함께 처리한 균의 농도를 다양하게 해서 관찰한 결과, 50, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 GLUT4의 발현양이 증가하는 것을 관찰하였다. (특히, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 경우, 양성대조군인 홍삼보다도 효과가 좋은 것을 관찰함)



<GLUT4 expression>

5) p-creatine 발현양 비교

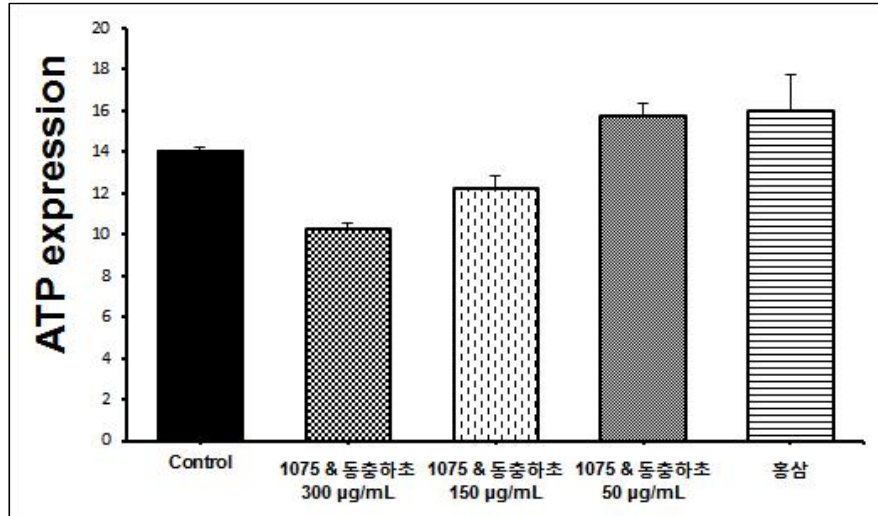
동충하초와 WSY-1075를 함께 처리한 균의 농도를 다양하게 해서 관찰한 결과, 50, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 p-creatine의 발현양이 증가하는 것을 관찰하였다.



<p-creatine expression>

6) ATP 발현양 비교

동충하초와 WSY-1075를 함께 처리한 군의 농도를 다양하게 해서 관찰한 결과, 50 μ g/mL에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 ATP의 발현양이 증가하는 것을 관찰함



<ATP expression>

(2) 운동수행능력 개선 In vivo 기능성 연구

- ①. 실험목적 : 본 시험은 시험물질을 수컷 ICR 마우스에 경구투여 후 운동성을 평가하기 목적으로 실시하였다.
- ②. 실험동물 : ICR 마우스, 수컷
- ③. 시험물질 : 동충하초 추출물
- ④. 실험군 : G1: 정상대조군, G2: 양성대조물질 투여군, G3: 시험물질 50 mg/kg 투여군, G4: 시험물질 150 mg/kg 투여군, G5: 시험물질 300 mg/kg 투여군
- ⑤. 실험 결과
 - 1) 체중 : 전체 실험 12주간 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
 - 2) Rotarod latency : 전 실험기간 중 모든 군간 유의한 차이는 관찰되지 않음
 - 3) Grip strength : 시험물질 투여개시 후 11 및 12 주째에 양성대조물질 투여군(G2) 및 모든 시험물질 투여군 (G3-G5)의 grip strength 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타남 ($p < 0.001$ 또는 $p < 0.01$)
 - 4) 혈액생화학적 검사
혈액생화학적 검사 결과, 모든 시험물질 투여군의 BUN 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났으며 ($p < 0.001$, $p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$), 시험물질 50 mg/kg 투여군 및 시험물질 300 mg/kg 투여군 (G5)의 BUN 수준은 양성대조물질 투여군 대비

유의하게 낮았고 ($p < 0.01$ 및 $p < 0.05$), 시험물질 150 mg/kg 투여군 (G4)의 creatinine 수
 준은 양성대조물질 투여군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타남 ($p < 0.05$)

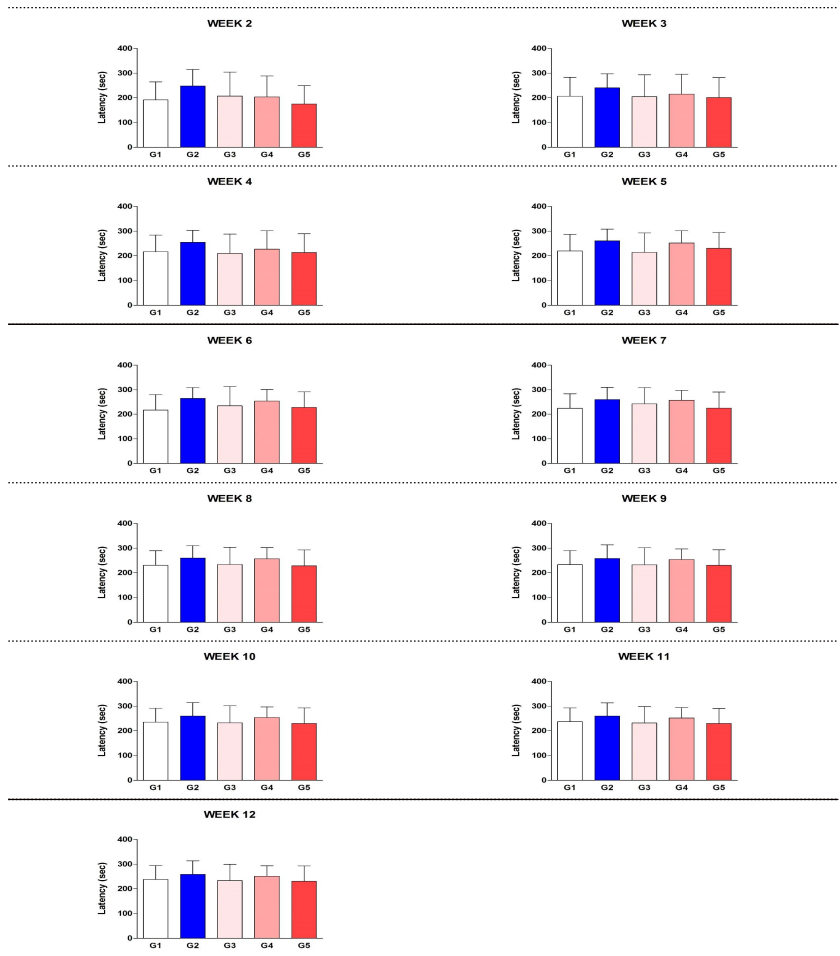
BODY WEIGHTS



<체중 변화>

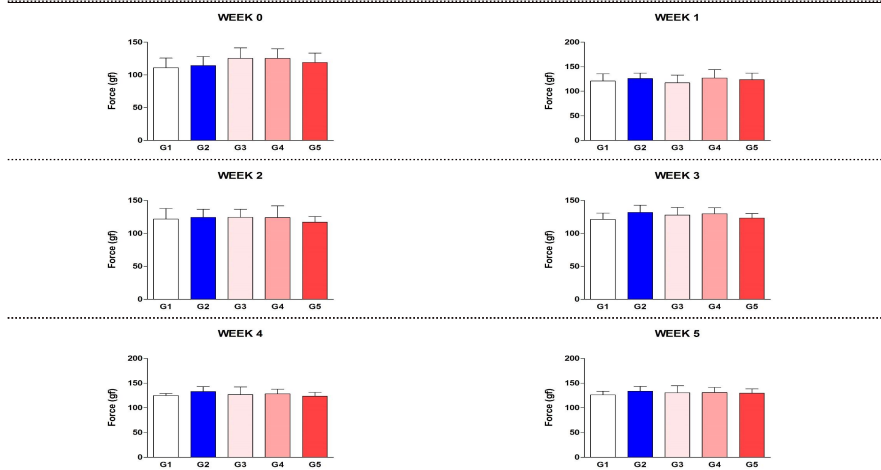
ROTAROD LATENCY

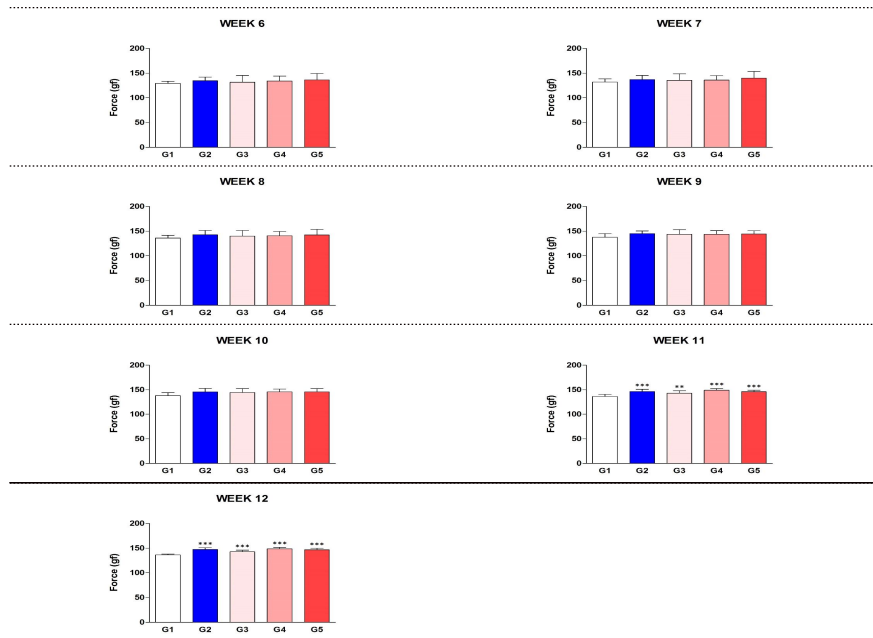




<Rotarod latency>

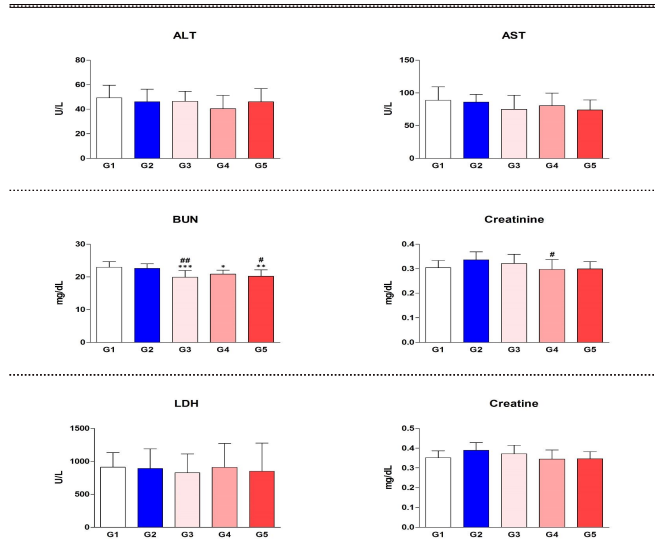
GRIP STRENGTH





<Grip strength>

SERUM BIOCHEMICAL EXAMINATION



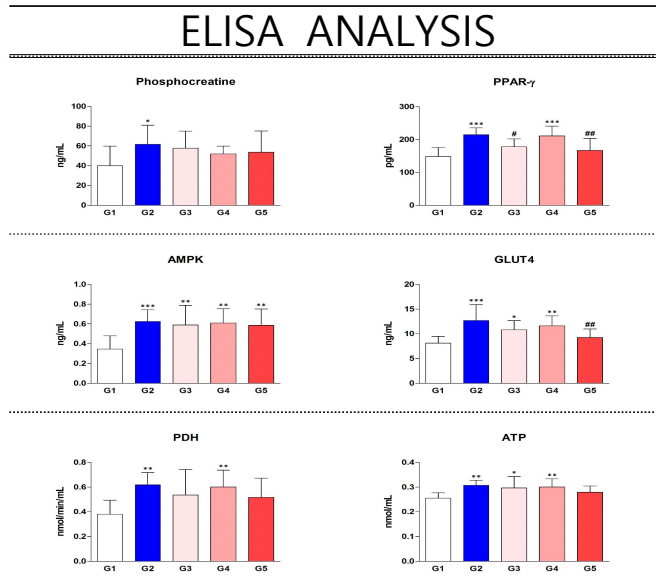
<Serum biochemical examination>

5) ELISA 검사

ELISA 분석 결과, 양성대조물질 투여군 (G2)의 phosphocreatine 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 ($p < 0.05$), 양성대조물질 투여군 및 시험물질 150 mg/kg 투여군의 PPAR- γ 및 PDH수준은 정상대조군 대비 유의하게 높았고 ($p < 0.001$ 또는 $p < 0.01$), 시험물질 50 mg/kg 투여군 및 시험물질 300 mg/kg 투여군의 PPAR- γ 수준은 양성대조물질 투여군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타남 ($p < 0.05$)

및 $p < 0.01$)

모든 시험물질 투여군의 AMPK 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다으며 ($p < 0.001$ 또는 $p < 0.01$), 양성대조물질 투여군, 시험물질 50 mg/kg 투여군 및 시험물질 150 mg/kg 투여군의 GLUT4 및 ATP 수준은 정상대조군 대비 유의하게 높았고, ($p < 0.001$, $p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 시험물질 300 mg/kg 투여군의 GLUT4 수준은 양성대조물질 투여군에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타남($p < 0.01$)



<ELISA analysis>

⑥. 결론

시험물질의 운동능력 평가를 위하여 매주 1 회 Rotarod latency 실험과 Grip strength와 같은 물리적인 능력을 평가하였다. 그 결과, rotarod latency 수준은 정상대조군과 시험물질 투여군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, grip strength 평가에서는 시험물질 투여개시 후 11 및 12 주차에 정상대조군에 비해 모든 시험물질 투여군에서 grip strength 수준이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다.

운동능력 평가 외에도 부검일에 채혈한 혈액을 이용하여 혈액 생화학적 분석을 실시. AST, ALT, BUN, creatinine, LDH, creatine의 농도를 측정된 결과, AST, ALT 및 LDH의 혈액 내의 농도는 모든 군간 유사한 수준을 보였으며, creatinine과 creatine의 혈중 함량 또한 정상대조군 대비 유의한 차이는 관찰되지 않음. BUN의 농도를 측정된 결과, 모든 시험물질 투여군의 BUN 수준은 정상대조군에 비하여 유의하게 낮음

이러한 혈액생화학분석기기를 이용하여 측정된 항목 이외에도 phosphocreatine, GLUT4,

PPAR- γ , ATP의 발현과 pyruvate dehydrogenase activity (PDH) 및 AMPK α 의 활성화를 ELISA을 통하여 확인하였다.

시험물질이 운동 수행능력에 미치는 영향을 평가하기 위하여 혈액내의 ATP 및 ATP 생성과 관련된 인자들을 선정한 근거는 phosphocreatine은 골격근에 저장되어 근수축시 ATP-phosphocreatine system을 통해 근섬유의 에너지원인 ATP를 생성하며, PDH는 피루브산을 acetyl CoA로 전환하는 효소로서 운동시 해당과정을 통해 형성된 피루브산을 호기 상태에서 크랩스 회로를 통해 ATP를 생성하는 역할을 하기 때문이다. 또한, GLUT4는 인슐린의 존적 포도당 수송체로서 주로 골격근과 지방조직에 분포하여 포도당을 세포 외부에서 세포 내부로 이동시키는 역할을 수행하며, AMPK는 운동에 의한 세포 내의 ATP 고갈시 AMP/ATP의 비율 증가에 따라 활성화되어 ATP의 소비를 중지시키는 동시에 생산하는 역할을 한다. PPAR- γ 는 지방대사 및 당대사를 조절하는 인자로, 골격근 내 대사과정 중 지방산 산화에 관여하는 단백질의 전사를 조절한다. 해당 인자들의 발현 및 활성을 ELISA를 이용하여 확인한 결과, 유의한 차이는 아니었으나 모든 시험물질 투여군의 phosphocreatine 수준은 정상대조군에 비하여 높은 수준을 보였으며, PPAR- γ 의 농도와 PDH 수준은 시험물질 150 mg/kg 투여군에서 정상대조군 대비 유의하게 증가함. 그리고 AMPK의 농도는 모든 시험물질 투여군(G3-G5)에서 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며, GLUT4와 ATP의 농도는 시험물질 50 mg/kg 투여군 및 시험물질 150 mg/kg 투여군에서 정상대조군 대비 유의하게 높았다.

이상의 결과를 통해 일부 가능성 있는 지표도 있었으나 동충하초는 상용범위의 용량에서는 운동수행능력에 대한 유효성이 미흡하였다.

라.협약 변경

(1) 연구 내용 변경 신청

운동수행능력 기능성 검토 결과 기능성이 미흡하여 연구 내용을 노랑다발동충하초를 이용한 아토피 피부염 개선 기능성 화장품 개발로 연구내용 변경을 신청하였다. 종합평가 의견을 받아 아토피 피부염개선 화장품 개발연구를 수행하였다.

(2) 연구기관 변경

(주)케미메디가 경영악화로 인한 연구수행불가로 4차년도부터 (주)바이오텍에스알에스로 연구기관을 변경하였다.

마. 노랑다발동충하초 제품화를 위한 기반 확보 및 화장품 제조공정 개발

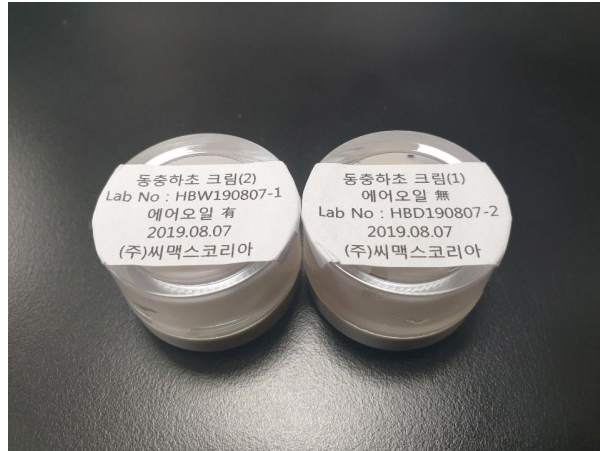
(1) 노랑다발 동충하초의 기준 및 규격설정

①. 노랑다발 동충하초 추출물 생산공정 확립

분쇄 > 여과 > 추출 > 농축 > 건조

②. 화장품 시제품화를 위한 OEM 생산업체 탐색 및 일반 동충하초 시제품 생산

-> 노랑다발 동충하초를 이용한 연구용 시제품 생산 -> 노랑다발 동충하초 크림
(주)씨맥스코리아에서 진행



<동충하초 크림 시제품>

바. 여드름 개선 기능성 유효성 연구

2019년에 아토피로 인한 건조함 개선 기능이 삭제되어 현재는 가려움증 개선에 도움을 주는 기능성 화장품으로 변경 진행 중이어서 연구내용을 여드름성 피부를 완화하는데 도움을 주는 기능성 화장품 개발로 연구 내용을 변경하였다. 항염증 효과는 이미 특허 출원되어 있고 화장품 원료로 노랑다발 동충하초 추출물이 등록(성분코드 16481)되어 있으므로 여드름 개선 기능성 화장품에도 가능성이 있다.

성분코드	16481	
성분명	코르디셉스 바시아나추출물	구명칭
영문명	Cordyceps Bassiana Extract	
기원 및 정의	이 원료는 Cordyceps bassiana에서 추출한 것이다.	
배합목적	피부컨디셔닝제(기타)	

<화장품 성분 기 등록>

(1) 여드름 기능성 유효성 평가

①. 실험목적 : 노랑다발동충하초 추출물 원료 유효성 평가

②. 실험방법

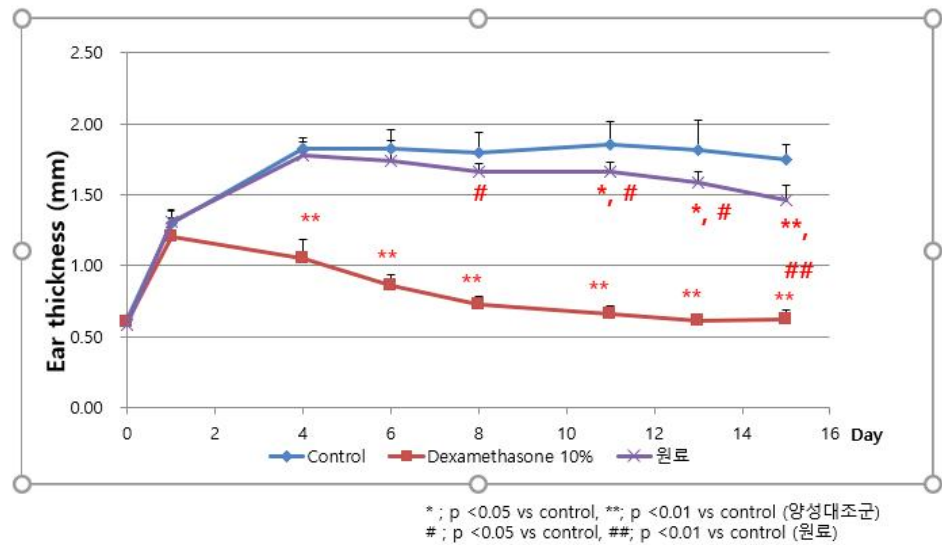
- 실험동물 : SD rat
- 실험군

실험군	remark
Control	DW
positive control	dexamethasone 10%
노랑다발 동충하초 원료	5% solution in 10% ethanol

- 여드름균: Propionibacterium acne (ATCC 6919, ATCC)
- 실험방법 : 여드름균을 2×10^7 /ul 농도로 saline에 희석 후 마리당 50ul씩 오른쪽 귀에 intradermal로 injection 하여 염증을 유발한다. 유발 후 1 일째 부터 양성 대조물질 (10% dexamethasone in 10% ethanol) 및 시험물질을 귀 전체에 끌고 루 도포한다.
- 귀 두께 평가 : 주 3회 귀 두께를 thickness guage (mitutoyo, japan)를 이용하여 여드름균이 주사된 부위를 가운데로 하여 측정한다.

③. 실험결과

양성대조군인 dexmethasone군은 투여한 다음부터 바로 두께가 감소하기 시작하였고 시험 원료는 서서히 감소하여 각각 dexamethasone 효과의 약 25% 정도의 염증 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.



<Ear Thickness (mm) 평가 결과>



<여드름 균 Ear dermal injection>

사. 여드름성 피부에 사용 적합성 화장품 인체적용시험 계획

여드름성 피부를 완화시키는 기능성 화장품 인체적용시험을 계획하였으나 코로나로 인해 임상시험기관을 찾을 수 없었고 차선책으로 여드름성 피부에 사용 적합성 인체적용시험은 다행히 여력이 되는 곳이 있어 진행하게 되었습니다.

(1) 시험자 및 의뢰자

의뢰자	(주)바이오 테크에스알에스 서울특별시 서초구 서래로 17, 4층 401호(반포동, 렉스빌딩)
의뢰항목	1) 여드름성 피부에 사용 적합성 2) 보습 효능 3) 피지량 개선 효능 4) 장벽기능 개선 효능
시험제품	[위셀바이오 퓨리파잉 클렌저]
시험번호	HM-P20-0123
시험기관	(주)휴먼 피부임상시험센터 서울특별시 금천구 가산디지털1로 24 10층, 1005호~1008호(가산동)
시험책임자	홍 ○ 규 / 피부과전문의
시험담당자	이 ○ 선 주임연구원
시험기간	2020년 12월 23일 ~ 2021년 01월 20일
국문 결과보고서 발행	2021년 02월 03일
영문 결과보고서 발행	2021년 02월 10일

(2) 목적 및 개요

여드름성 피부를 가진 한국인 남녀 20명 이상을 대상으로 시험제품을 배포하고 사용 전과 4주 사용 후에 피부과전문의 육안평가를 통해 시험제품의 여드름성 피부에 사용 적합성을 평가하고, 피부 수분량 및 피지량, 경피수분손실량을 기기측정하여 보습, 피지량 개선, 장벽기능 개선 효능을 평가한다.

(3) 일정과 절차

①. 일정

시험의뢰일	2020년 09월 28일
시험용역계약일	2020년 10월 30일까지
시험제품 제공일	2020년 12월 18일까지
시험대상자 모집과 준비 기간	2020년 12월 18일까지
시험기간	2020년 12월 23일 ~ 2021년 01월 20일
국문 결과보고서 발행	2021년 02월 03일
영문 결과보고서 발행	2021년 02월 10일

②. 절차

내용	사용 전	4주 사용 후
인체적용시험 동의서 작성	○	-
피부과전문의 육안평가	○	○
임상사진 촬영	○	○
피부 수분량 측정	○	○
피지량 측정	○	○
경피수분손실량 측정	○	○
이상반응 평가	-	○
순응도 평가	-	○

(4) 시험대상자

①. 모집 및 선정 방법

여드름성 피부를 가진 한국인 남녀를 대상으로 선정 및 제외기준을 만족하는 시험대상자를 선정한다.

②. 시험대상자 수

시험대상자 수는 화장품 표시광고 실증을 위한 시험방법 가이드라인민원인 안내서에 근거하여 20명 이상을 대상으로 한다.

③. 선정기준

- 만 14세~40세의 성인 남녀
- *만 19세 미만의 미성년자의 경우 보호자 서면 동의하에 참여하도록 한다.
- 여드름성 피부를 가진 자
- 시험의 목적, 내용 등에 관하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 시험참가동의서에 서명한 자
- 피부질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자
-

④. 제외기준

- 임신 중이거나 수유 중 또는 시험기간 내 임신을 계획하고 있는 자
- 정신과적 질환이나 감염성 피부질환이 있는 자
- 심한 소모성 만성질환이 있는 자
- 얼굴에 여드름 이외의 피부이상 또는 피부질환이 있는 자
- 시험시작 전 2주 이내에 여드름용 기능성화장품 등을 사용한 경험이 있는 자
- 시험시작 전 4주 이내에 여드름에 대해 경구 항생제, 도포제, 박피술, 스케일링 등의 치료를 받은 적이 있는 자
- 시험시작 전 3개월 이내에 경구 피임약을 복용한 적이 있는 자
- 시험시작 전 6개월 이내에 경구용 레티노이드를 사용했거나, 피지 분비에 장기간 영향을 줄 수 있는 미용시술을 받은 자
- 다른 임상시험 또는 인체적용시험에 참여하고 있는 자
- 기타 의사소통이 불가능하거나 지시를 따르기 힘든 자
- 민감성 또는 과민성 피부를 가진 자
- 당사의 임직원인 자
- 그 외 시험책임자의 판단으로 시험 수행이 곤란하다고 판단되는 자

(5) 시험제품

시험자는 의뢰자로부터 제공받은 표준품(시험제품)에 시험코드 및 일시를 기재한 라벨을 부착하여 당사의 자료 보관실에 보관하도록 한다.

종류	화장품 1종
명칭	[위셀바이오 퓨리파잉 클렌저]
분석	의뢰자는 시험제품에 관한 정보를 제공하여야 한다. 당사에서는 시험제품의 안정성, 물리적 특성을 확인하는 화학 분석은 수행하지 않는다.
보관방법	고온과 직사광선을 피하여 5~25C° 사이에서 보관하며 시험결과보고서를 발행한 날로부터 180일간 보관한다. 보관기간 만료 후 의뢰자로부터 별도의 요청이 없을 경우 폐기한다.
사용방법	시험대상자 스스로 자택에서 평소 화장습관에 따라 세안 후 하루 1회씩 사용한다.

<시험제품>

(6) 시험방법

①. 측정 및 평가

모든 측정 및 평가는 공기의 이동과 직사광선이 없으며 항온항습조건(22±2℃, 50±5%)이 유지되는 공간에서 시험대상자가 30분 이상 피부 안정을 취한 상태에서 실시하며, 시험제품 사용 전과 4주 사용 후에 평가를 실시한다.

②. 육안 평가

- 염증성 및 비염증성 병변 계수
피부과전문의가 시험대상자 얼굴을 관찰하여 비염증성 병변(Comedones, Microcysts)과 염증성 병변(Papules, Pustules, Nodules, Macrocyts)을 확인한 후 정확한 개수를 세어 기록하고 표시한다.

③. 여드름 중증도 등급 평가

피부과전문의가 Investigator's Global Assessment (IGA) 기준에 따라 여드름 중증도를 평가한다.

등급	특징
0	병변 없음
1	병변 거의 없음 (결절: 없음, 구진/농포: 1개 이하, 면포: 소수)
2	경증 (결절: 없음, 구진/농포: 5개 이하, 면포: 약간)
3	중증도 (결절: 1개 이하, 구진/농포: 6개 이상, 면포: 다수)
4	중증 (결절: 5개 이하, 구진/농포: 다수, 면포: 다수)

④. 기기 평가

- 임상사진 촬영
Mark-Vu (PSI Plus Co., Ltd., Republic of Korea)를 이용하여 시험제품 사용 전과 4주 사용 후에 얼굴 정면을 영상 촬영하여 제공한다.
- 피부 수분량 측정
Epsilon E100 (Biox Systems Ltd., England)을 이용하여 시험제품 사용 전과 4주 사용 후에 뺨 부위의 평균 유전율(ϵ)을 측정한다.
- 피지량 측정
Sebumeter® SM815 (Courage+Khazaka GmbH, Germany)를 이용하여 시험제품 사용 전과 4주 사용 후에 이마 부위의 피지량(Casual sebum level)을 측정한다.
- 경피수분손실량 측정
Vapometer (Delfin Technologies Ltd., Finland)를 이용하여 시험제품 사용 전과 4주 사용 후에 뺨 부위의 경피수분손실량(TEWL)을 측정한다.

(7) 이상반응 보고

시험기간 중 이상반응을 확인 또는 보고받은 경우 시험자는 48시간 이내 의뢰자에게 보고하며, 시험제품과의 관련성에 관해서는 시험책임자가 판단한다. 시험대상자가 자각하는 증상에 대한 내용은 당사 설문 양식에 따라 시험대상자가 작성한 내용을 취합하여 결과와 함께 보고한다.

(8) 결과 보고

시험이 종료되면 PDF 형태의 국문 보고서 파일을 이메일로 제공하며, 제공되는 보고서에는 시험의 종류 및 방법, 시험제품, 시험의뢰자 정보 및 시험대상자에 관한 사항, 측정 데이터, 결과, 결론 등을 포함한다.

(9) 문서 기록과 보관

시험과 관련된 모든 문서(시험계획서, 증례기록서, 설문지, 보고서 등)와 파일은 (주)휴먼 피부임상시험센터에서 3년간 보존한다. 보존기간이 만료되면 의뢰자의 서면

동의 후 기록을 폐기한다.

아. 화장품 인체적용시험 결과보고서

(1) 시험명: [위셀바이오 퓨리파잉 클렌저]의 4주 사용 후 여드름성 피부에 사용 적합성 (Non-comedogenicity) 및 보습, 피지량 개선, 장벽기능 개선 효능 평가 인체 적용시험

(2) 시험기관

시험기관	기관명	(주)휴먼 피부임상시험센터
	소재지	서울특별시 금천구 가산디지털 1로 24(대륭 13차), 1005~1008호
	시험기관장	정 ○ 정
	시험책임자	홍 ○ 규 / 피부과전문의
	시험담당자	이 ○ 선 주임연구원

(3) 의뢰자

의뢰자	기관명	(주)바이오텍에스알에스
	소재지	서울특별시 서초구 서래로 17, 4층 401호(반포동, 럭스빌딩)
	대표자	윤 ○ 훈
	담당자	윤 ○ 훈

(4) 결과요약

시험명	[위셀바이오 퓨리파잉 클렌저]의 4주 사용 후 여드름성 피부에 사용 적합성(Non-comedogenicity) 및 보습, 피지량 개선, 장벽기능 개선 효능 평가 인체적용시험
시험기관	(주)휴먼 피부임상시험센터
시험관리번호	HM-R20-0123
시험기간	2020년 12월 23일 ~ 2021년 01월 20일
보고서 제출일	2021년 02월 03일
시험 목적	본 시험은 화장품 1종의 여드름성 피부에 사용 적합성(Non-comedogenicity) 및 보습, 피지량 개선, 장벽기능 개선 효능을 평가하기 위함이다.
시험제품	시험제품 관리번호* 제품명 정상 *201124-E-1 위셀바이오 퓨리파잉 클렌저 백색의 크림상 **시험제품 수령 후 당사 규정에 따라 부여하는 관리번호
시험 방법	여드름성 병변을 가진 한국인 남녀 20 명 이상을 대상으로 4 주간 시험제품을 사용하게 하면서 여드름성 병변의 변화를 임상시험에 참여하지 않은 피부과전문의가 염증성 병변의 수를 세어 육안 평가 하고 피부 수분량 및 피지량, 경피수분손실량을 기기 측정하였다.
시험 결과	<ul style="list-style-type: none"> 염증성 및 비염증성 병변 계수 결과 - 임상시험에 참여하지 않은 피부과전문의가 염증성 병변의 수를

	<p>세어 시험제품 4주 사용 후 병변의 유발은 나타나지 않았으며, 면포(Comedones)와 구진(Papules)이 유의하게 감소하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 여드름 중증도 등급 평가 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 시험제품 4주 사용 후 여드름 중증도 등급 점수가 유의하게 감소 하였다. • 피부 수분량 측정 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 시험제품 4주 사용 후 피부 수분량(ϵ)이 유의하게 증가하였다. • 피부 피지량 측정 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 시험제품 4주 후 피부 피지량($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)이 유의하게 감소하였다. • 경피수분손실량 측정 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 시험제품 4주 사용 후 경피수분손실량($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$)이 유의하게 감소
결론	<p>(주)바이오텍에스알에스에서 의뢰한 [위셀바이오 퓨리파잉 클렌저]는 4주간 사용 시 여드름성 피부에서 면포 유발 가능성이 낮아 여드름성 피부에 사용 적합한 것으로 판정하였으며, 면포(Comedones)와 구진(Papules)이 감소되었다. 또한, 보습, 피지량 개선, 장벽기능 개선에 도움을 주는 것으로 판단된다.</p>

(5) 주요 시험결과

①. 염증성 및 비염증성 병변 육안 평가 결과

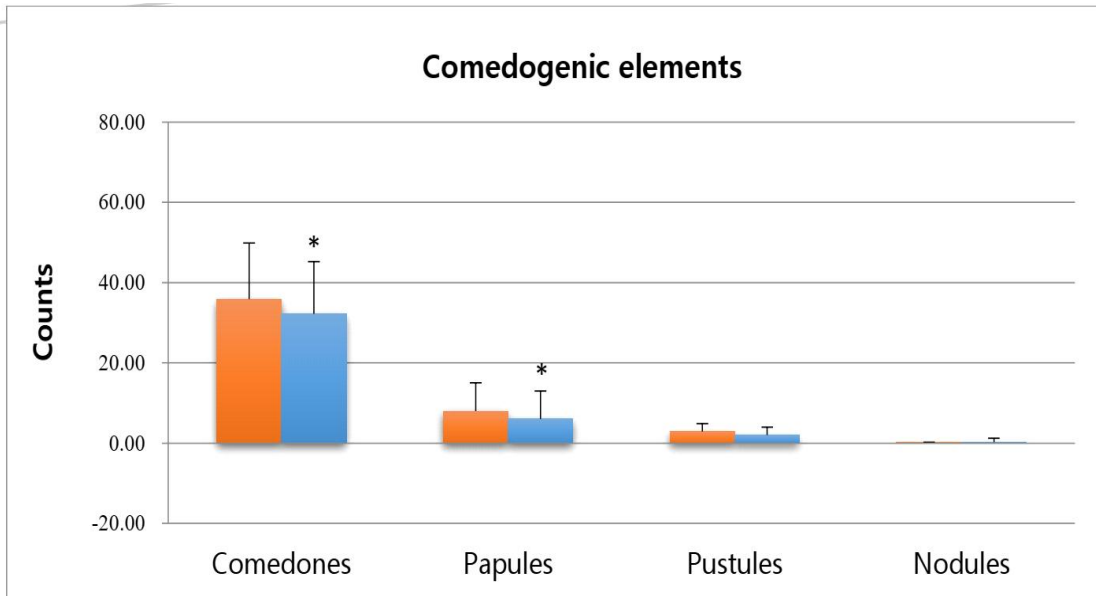
임상시험에 참여하지 않은 피부과전문의가 염증성 병변의 수를 세어 염증성 및 비염증성 병변 계수 결과 시험제품 4주 사용 후 병변의 유발은 나타나지 않았으며, 면포(Comedones)와 구진(Papules)이 유의하게 감소하였다

N=20 (No. 01~16, 18~21), (Mean±Standard deviation)		
항목	Comedones (ea.)	Papules (ea.)
시점		
시험제품 사용 전(D0)	36±14	8±7
4주 사용 후(D28)	32±13	6±7
유의확률	사용 전 대비 4주 사용 후	<0.001 [^]
변화율	사용 전 대비 4주 사용 후	10.04%
항목	Pustules (ea.)	Nodules (ea.)
시점		
시험제품 사용 전(D0)	3±2	0±0
4주 사용 후(D28)	2±2	0±1
유의확률	사용 전 대비 4주 사용 후	0.096 [^]
변화율	사용 전 대비 4주 사용 후	0.705 [^]
	N/A	N/A

N/A: 해당없음

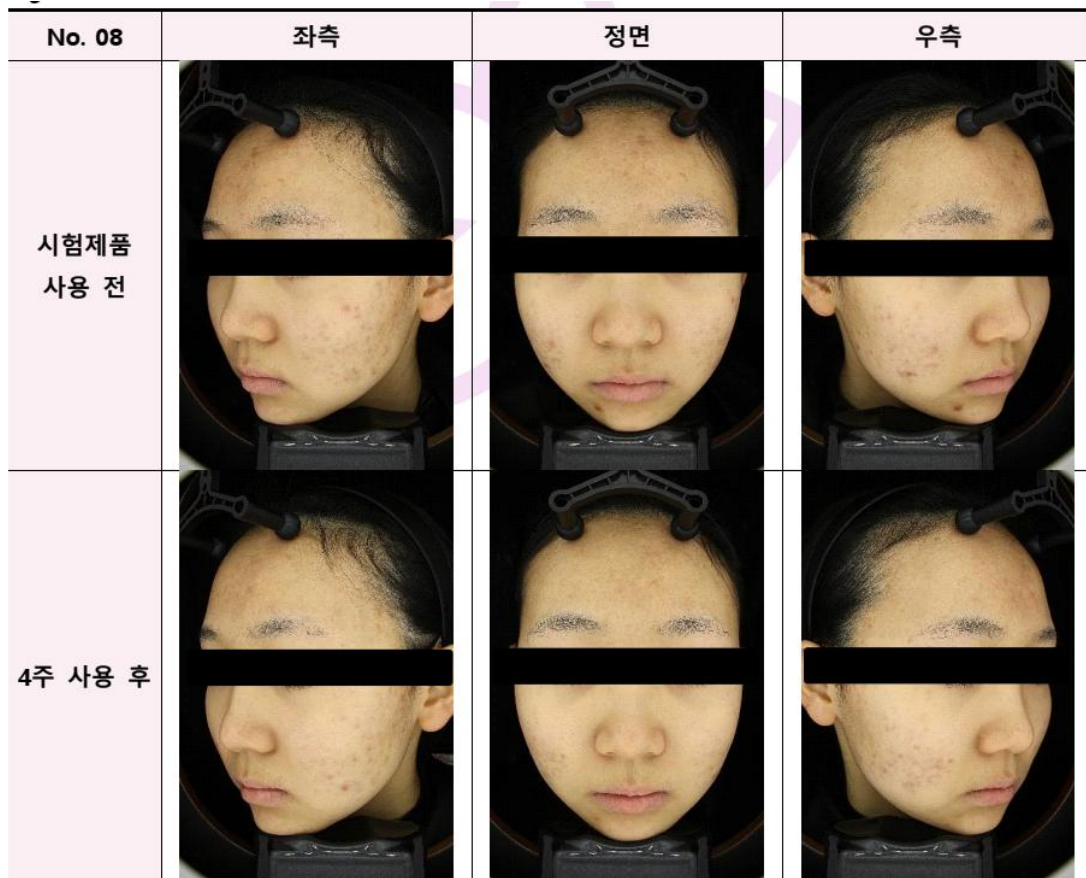
p-value: Significant probability, Paired t-test ($p < 0.05$, comparison to initial value (D0)), [^]Wilcoxon signed rank test.

<염증성 및 비염증성 병변 육안 평가>



**Significant difference ($p < 0.05$, comparison to initial value (D0)).*

<염증성 및 비염증성 병변 육안 평가_차트>



Mark-Vu 임상사진 촬영 이미지

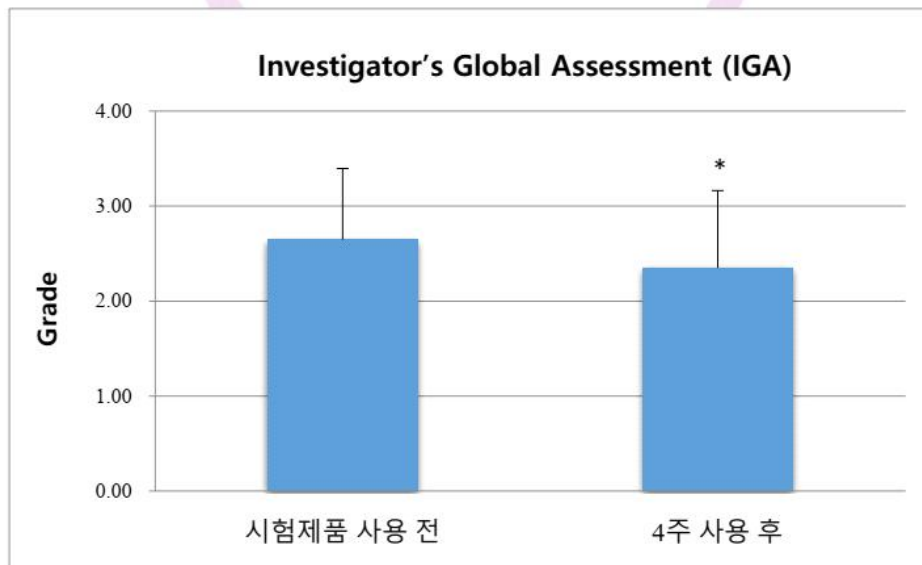
②. 여드름 중증도 등급 평가 결과

피부과전문의가 Investigator's Global Assessment (IGA) 기준에 따라 여드름 중증도를 평가한 결과 시험제품 4주 사용 후 여드름 중증도 등급 점수가 유의하게 감소하였다.

N=20 (No. 01~16, 18~21), (Mean±Standard deviation)		
시점	항목	여드름 중증도 등급(Grade)
	시험제품 사용 전(D0)	3±1
	4주 사용 후(D28)	2±1
유의확률	사용 전 대비 4주 사용 후	0.014
변화율	사용 전 대비 4주 사용 후	11.32%

p-value: Significant probability, Wilcoxon signed rank test (p<0.05, comparison to initial value (D0)).

<여드름 중증도 등급 평가 결과>



**Significant difference (p<0.05, comparison to initial value (D0)).*

<여드름 중증도 등급 평가 결과_차트>

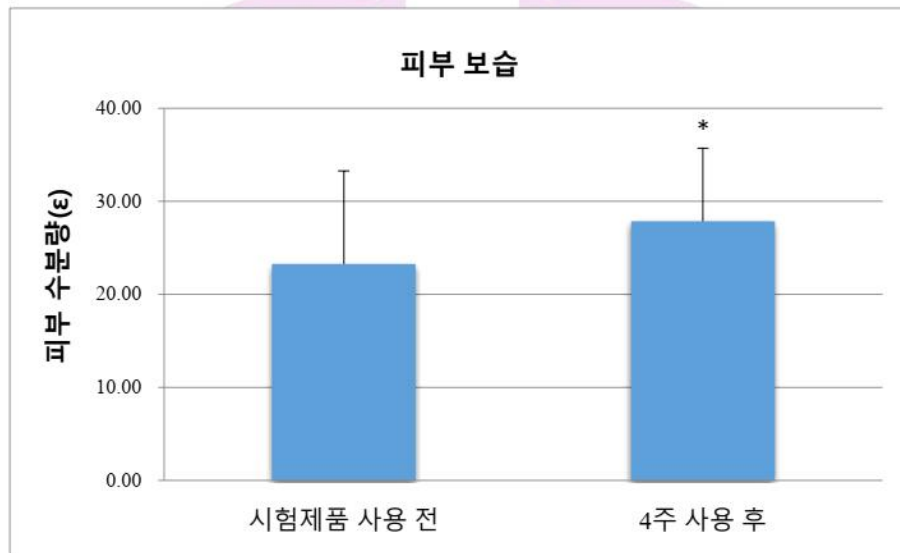
③. 보습 개선 측정 결과

시험제품 사용 전과 비교하여 시험제품 4주 사용 후 피부 수분량(ε)이 유의하게 증가하였다.

N=20 (No. 01~16, 18~21), (Mean±Standard deviation)		
시점	항목	피부 수분량(ε)
	시험제품 사용 전(D0)	23.25±10.01
	4주 사용 후(D28)	27.84±7.85
유의확률	사용 전 대비 4주 사용 후	0.001
변화율	사용 전 대비 4주 사용 후	19.74%

p-value: Significant probability, Wilcoxon signed rank test ($p < 0.05$, comparison to initial value (D0)).

<보습 개선 측정 결과>



*Significant difference ($p < 0.05$, comparison to initial value (D0)).

<보습 개선 측정 결과_차트>

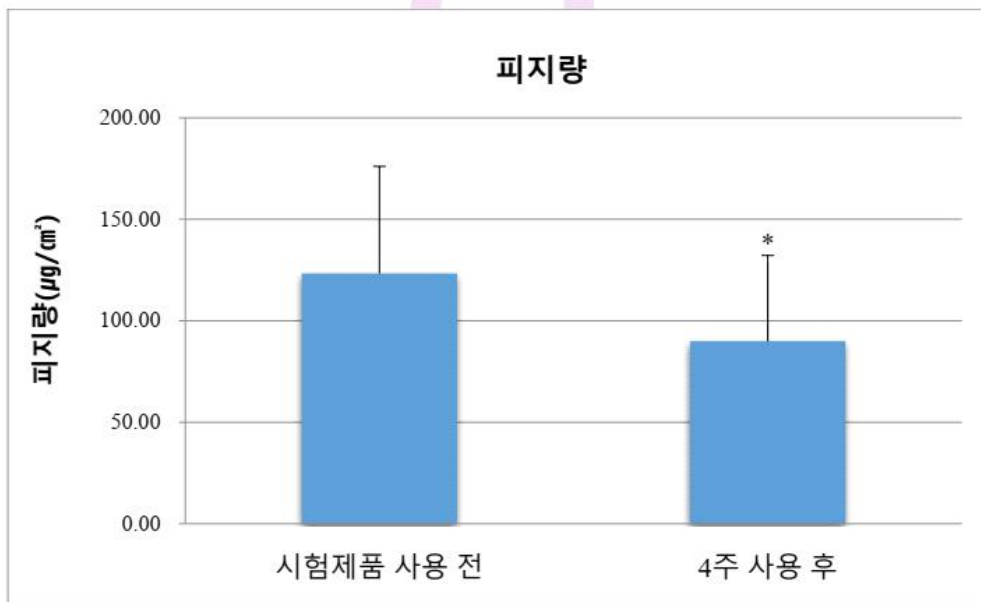
④. 피지량 개선 측정 결과

시험제품 사용 전과 비교하여 시험제품 4주 사용 후 피부 피지량($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)이 유의하게 감소하였다.

N=20 (No. 01~16, 18~21), (Mean±Standard deviation)		
시점	항목	피지량($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
	시험제품 사용 전(D0)	123±53
	4주 사용 후(D28)	90±42
유의확률	사용 전 대비 4주 사용 후	<0.001
변화율	사용 전 대비 4주 사용 후	27.05%

p-value: Significant probability; Paired t-test ($p < 0.05$, comparison to initial value (D0)).

<피지량 측정 결과>



*Significant difference ($p < 0.05$, comparison to initial value (D0)).

<피지량 측정 결과_차트>

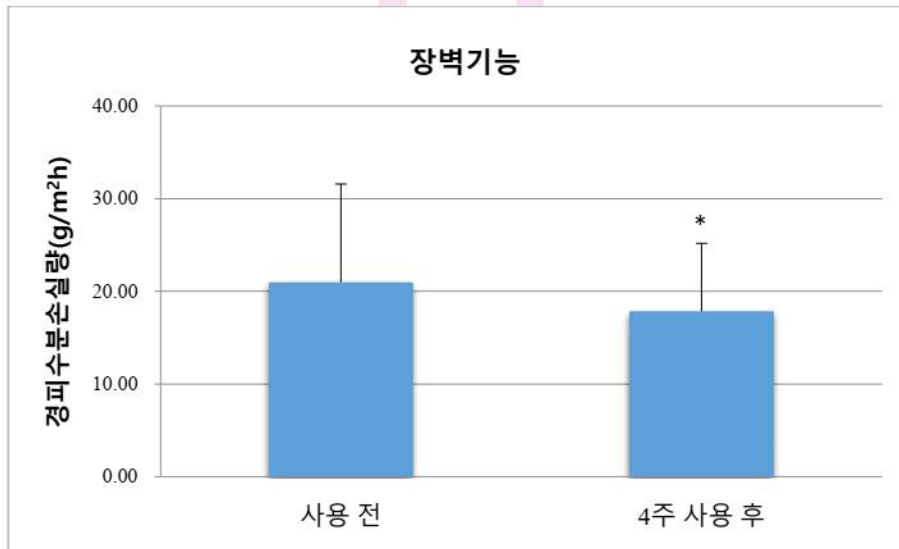
⑤. 장벽기능 개선 측정 결과

시험제품 사용 전과 비교하여 시험제품 4주 사용 후 경피수분손실량(g/m²h)이 유의하게 감소하였다.

N=20 (No. 01~16, 18~21), (Mean±Standard deviation)		
시점	항목	경피수분손실량(g/m ² h)
	시험제품 사용 전(D0)	21.0±10.6
	4주 사용 후(D28)	17.8±7.4
유의확률	사용 전 대비 4주 사용 후	<0.001
변화율	사용 전 대비 4주 사용 후	14.89%

p-value: Significant probability, Wilcoxon signed rank test (p<0.05, comparison to initial value (D0)).

<경피수분손실량(g/m²h) 측정 결과>



*Significant difference (p<0.05, comparison to initial value (D0)).

<경피수분손실량_차트>

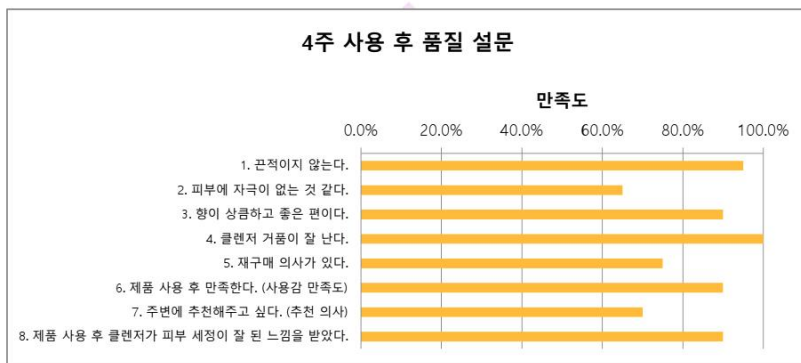
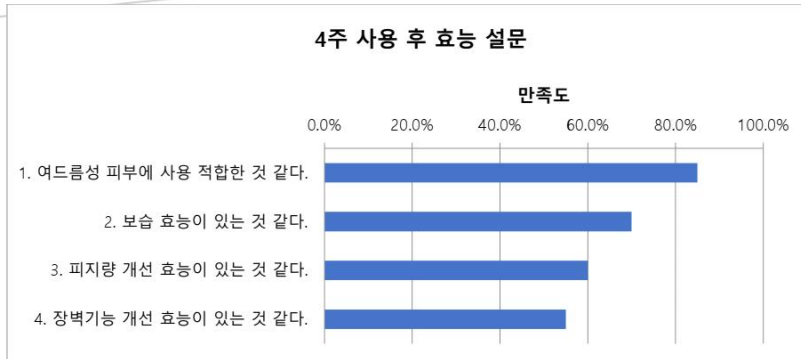
⑥. 시험제품 4주 사용 후 효능 및 품질에 대한 설문 평가 결과

시험대상자에게 4주 사용 후 효능 및 품질에 대한 설문을 실시하고 분석한 결과는 다음과 같다

시험제품의 효능에 대한 설문	4주 사용 후, 만족함(4+5)*
1. 여드름성 피부에 사용 적합한 것 같다.	85.00%
2. 보습 효능이 있는 것 같다.	70.00%
3. 피지량 개선 효능이 있는 것 같다.	60.00%
4. 장벽기능 개선 효능이 있는 것 같다.	55.00%
시험제품의 품질에 대한 설문	4주 사용 후, 만족함(4+5)*
1. 끈적이지 않는다.	95.00%
2. 피부에 자극이 없는 것 같다.	65.00%
3. 향이 상큼하고 좋은 편이다.	90.00%
4. 클렌저 거품이 잘 난다.	100.00%
5. 재구매 의사가 있다.	75.00%
6. 제품 사용 후 만족한다. (사용감 만족도)	90.00%
7. 주변에 추천해주고 싶다. (추천 의사)	70.00%
8. 제품 사용 후 클렌저가 피부 세정이 잘 된 느낌을 받았다.	90.00%

*답변 척도

- 1: 매우 동의하지 않음
- 2: 동의하지 않음
- 3: 보통
- 4: 동의함
- 5: 매우 동의함



<제품사용 후 효능 및 품질 설문 평가 결과>

자. 동충하초를 활용한 나노미분 또는 초음파 추출 제조공정의 면역증강용 약학적 조성물 기술 개발

(1) 개발 내용

- 특허명 : 코디세핀 및 인지질 유효성분으로 포함하는 간기능 및 뇌기능 개선용 조성물
- 등록번호: 10-2137515
- 특허등록일 : 20200.07.20

동충하초로 추출된 물질이며, 동충하초를 나노 미분한 파우더 또는 초음파 추출하여 수득된 것이며, 인지질 조성물은 수중 유형 에멀전 형태의 가수분해 조성물 또는 공유 결합적으로 접합된 형태의 조성물 등으로 면역 활성증강용 약학적 조성물을 제공하는 것이 핵심임.

장기간 사용에도 인체에 안전하고, 간 기능 개선 및 뇌 기능 개선 효과가 증진된 코디세핀을 포함하는 약제학적 조성물을 제공

장기간 사용에도 인체에 안전하고, 간 기능 개선 및 뇌 기능 개선 효과가 증진된 코디세핀을 포함하는 식품 조성물을 제공

장기간 사용에도 인체에 안전하고, 간 기능 개선 및 뇌 기능 개선 효과가 증진된 코디세핀을 포함하는 건강기능 식품을 제공

장기간 사용에도 인체에 안전하고, 간 기능 개선 및 뇌 기능 개선 효과가 증진되어 질병 감염에 대한 저항성을 높일 수 있는 첨가제를 제공

장기간 사용에도 인체에 안전하고, 간 기능 개선 및 뇌 기능 개선 효과가 증진된 코디세핀을 포함하는 조성물의 제조방법

따라서, 본 기술은 코디세핀과 인지질을 유효성분으로 포함하는 면역 활성증강용 약학적 조성물을 제공하여 생산하는 것에 목적이 있음.

차. 코디세핀-단백질 분해효소접합체 배양물을 유효성분으로 함유하는 면역활성 증강용 조성물

(1) 개발내용

- 특허명 : 코디세핀-단백질 분해 효소 접합체 배양물을 유효성분으로 함유하는 면역활성 증강용 조성물
- 등록번호: 10-2040470
- 특허등록일 : 2019.10.30

코디세핀 분말과 포스파티딜콜린 분말의 고분산 형태의 조성물로 제조 시에는 고압의 농축 타블로이드 형태로 제조가 가능하여 고용량 섭취에 유리하고 장기간 보관에 유리함.

기존에 알려진 접합 방식이 아닌, CDAP 접합 방법 또는 시아닐레이션 접합 방법 또는 고분자 합성방법을 사용하여 접합할 수 있으며, 본 기술개발은 코디세핀(Cordycepin)과 인지질을 유효성분으로 포함하는 간 기능 및 뇌 기능 개선용 식품 조성물을 제공함.

- 본 기술개발 제품은 코디세핀과 인지질을 유효성분으로 포함하는 간 기능 및 뇌 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- 본 기술개발의 식품 조성물로 제조되는 경우에는 유효성분으로서 코디세핀 및 인지질뿐 아니라, 식품제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하여, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함함.
- 본 개발 제품을 토대로 건강기능 식품으로 제조될 수 있는 식품은 제한되지 않으나, 건강기능성 식품 외에 다양한 식품군에 이에 대한 조성물로 제조되는 경우 적용이 가능함.

카. 동충하초를 활용한 일반 화장품 개발

(1) 일반 화장품

- BIOI : Body slim care 제품



<일반화장품 개발>

- 퓨리파잉클렌저 : 여드름용 폼클렌징 화장품 (제조번호 : J01)



<퓨리파잉 클렌저>

- 퓨리파잉세럼 : 세럼 피부화장품(제조번호 : K01)



<퓨리파잉세럼>

- 퓨리파잉 화장비누 3종 : 세안용(제조번호 MFD 20201121, MFD20201122, MFD 20201125)



<퓨리파잉 화장비누>

(2) 일반 건강기능식품 개발

- 제품명 : 간박사

제조번호 : 801510

출시일 : 2020.02.02



<간박사>

2-3. 2협동 가톨릭관동대학교

가. 동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 발굴

(1) 밀리타리스 동충하초 및 근연종 식의약 소재용 지표물질 발굴용 및 품종 마커 개발을 위한 유전체 분석

① 시험개요

1) 목표 : 근연종 풍뎅이 동충하초(*Cordyceps scarabaeicola*)의 유전체 분석을 통한 지표물질 후시딕산(Fusidic acid) 유전자 클러스터 검정 및 대량생산을 위한 물질 생산 조절 메커니즘 규명

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 근연종 풍뎅이 동충하초의 불완전세대 (*Beauveria sungii*) 균사체 배양조건 확립 및 지표물질 후시딕산(Fusidic acid) 유전체 분석

② 실험방법

1) 밀리타리스 동충하초의 근연종 유전체 분석

밀리타리스 동충하초의 근연종인 노랑다발동충하초, 풍뎅이 동충하초, 붉은자루동충하초 균주의 유전체 분석을 수행하고자 함

2) 유전체 분석 기반 근연종 동충하초의 지표물질 검출

유전체 데이터를 활용하여 근연종 특유의 이차대사물질 생합성 유전자 집단 검출 프로그램 antiSMASH3 를 활용한 지표물질 검출 및 분석

③ 실험결과

1) 노랑다발동충하초 유전체 분석 기반 이차대사물질 발굴

노랑다발동충하초의 경우, beauvericin, tenellin, fusidic acid 등 많이 알려진 이차대사물질이 확인되었으며, 그 중에서 beauvericin 물질 생산과 연관된 이차대사산물 유전자 집단에 대해 조절 메커니즘 검정을 함

노랑다발동충하초의 beauvericin 의 경우 생합성하는 데 가장 필요로 하는 전구물질 유전자 중 하나인 2-ketoisovalerate reductase (Kivr) 유전자의 기능을 확인하고자 생리학적 기능 유전자인 Calmodulin 유전자와의 binding site 와의 활성화와 다양한 스트레스 조건에서의 상호관계 파악함. Kivr 유전자의 효소 활성화는 빛과 삼투압 스트레스에 영향을 많이 받고 있으며, 그 작용 기전은 칼슘신호전달 매개 단백질 Calmodulin의 역할이 관계되어있음. Beauvericin 생합성에서 온도나, 삼투압, pH 등의 외부 환경적 자극은 Calmodulin 에 매개하여 저해되거나 증가 할수 있음을 밝힘.

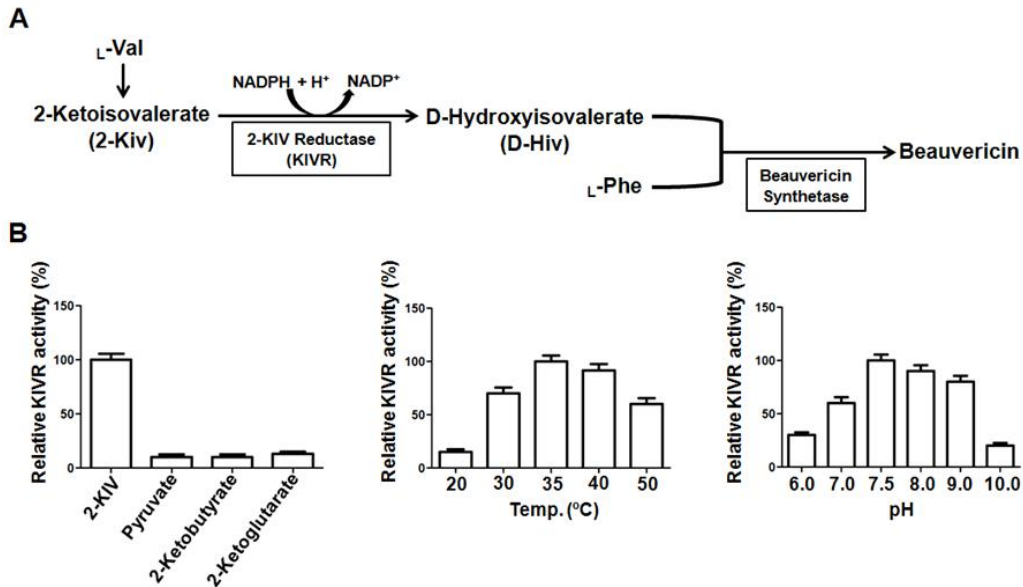


그림 1 BbKIVR과 2-ketoisovalerate (2-HIV)의 활성 정도

그림1에서 보여지는 노랑다발동충하초의 beauvericin 의 생합성유전자 집단에서 Kivr 유전자와 2-ketoisovalerage(2-HIV) 와 동시적으로 활성을 나타내며, beauvericin 생합성에 최적의 활성조건은 35°C, pH 7.5에 해당함

붉은자루동충하초의 경우 밀리타리스 동충하초와 가까운 근연종으로 이차대사산물 생합성 유전자 집단이 비슷한 숫자로 보유하고 있으며, 다른 근연종인 노랑다발동충하초, 풍뎅이동충하초 보다 적은 숫자로 존재하고 있음

2) 풍뎅이동충하초 유전체 분석 기반 이차대사물질 발굴

풍뎅이동충하초의 계통분류학적으로 노랑다발동충하초와 가루꽃동충하초(*Isaria farinosa*)와 가까운 근연종으로 대표적인 이차대사산물인 후시딕산(Fusidic acid)을 생산할 수 있는 생합성 유전자군 집단이 존재하고 있음을 확인. 특히 가루꽃동충하초의 유전자 집단 개수로는 NRPS 의 개수는 12, NRPS-like 11, Hybrid 의 경우 9 개를 포함하고 있음. 풍뎅이동충하초의 유전체 어셈블 리 결과가 정확하지 못하지만 비슷한 수치의 이차대사산물 생합성 집단을 가지고 있을 것으로 판단함

대표적인 후시딕산 생합성 유전자 집단을 확인한 결과, prostandienol cyclase 유전자를 비롯하여 2개의 p450 유전자가 주변부에 포함하여 후시딕산의 생합성 메커니즘에 핵심이 될 것으로 보고 있음

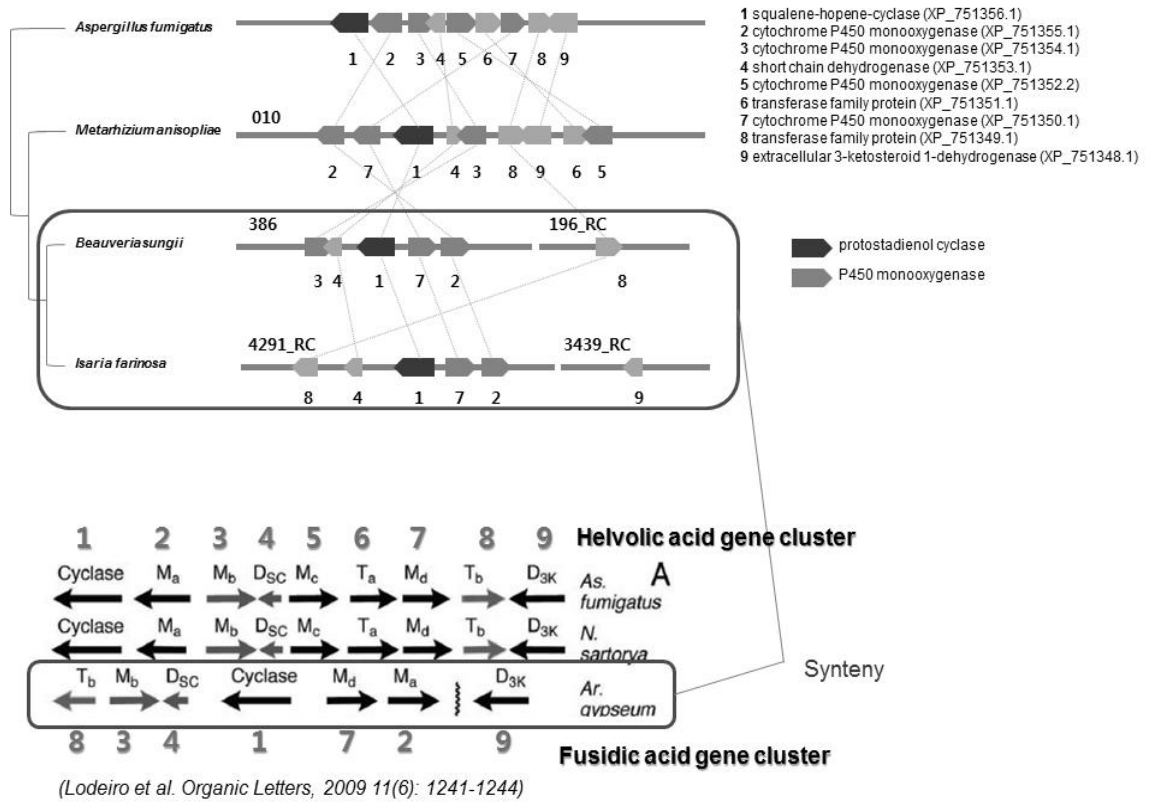


그림 2 풍뎅이동충하초와 가루꽃동충하초의 후시딕산 생합성 유전자 집단

또한, 동충하초 근연종을 비롯하여 후시딕산 생성하는 다른 곰팡이 *Aspergillus*, *Metarhizium* 과의 계통분류학적 분석도 수행하여 Oxydosqualene cyclase (OSC) 유전자가 후시딕산 생합성에 관여하는 것으로 확인함.

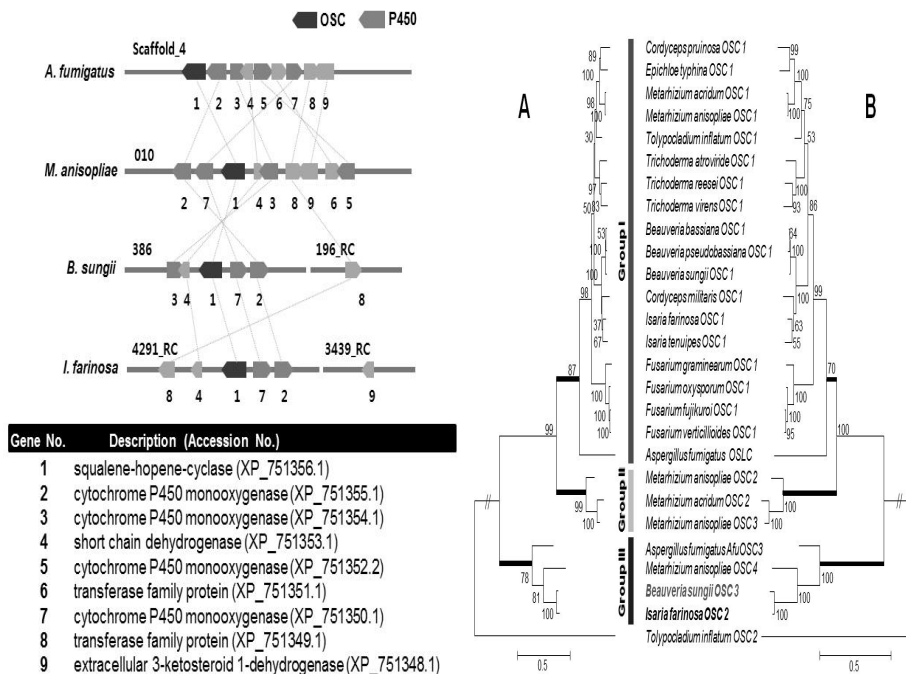


그림 3 풍뎅이동충하초와 근연종의 OSC 유전자 계통분류학적 분석

추후 후시딕산의 생합성 메커니즘을 규명하기 위한 다양한 배양조건 실험과 대사체 프로파일링 연구에 기반이 될 수 있는 유전자 정보 및 지표물질 후보군 이차대사산물 생합성 집단을 파악함

(2) 밀리타리스 동충하초 및 근연종 식의약 소재용 지표물질 발굴용 대사체 프로파일링

① 시험개요

1) 목표 : 근연종 풍뎅이 동충하초(*Cordyceps scarabaeicola*)의 지표물질 후시딕산(Fusidic acid) 대량생산을 위한 최적화 조건 분석 및 대사물질 프로파일링 분석

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 근연종 풍뎅이 동충하초의 불완전세대 (*Beauveria sungii*) 균사체 배양조건 확립 및 지표물질 후시딕산(Fusidic acid) 함량 분석

② 실험방법

1) 선행연구 유전체 분석 활용

밀리타리스 동충하초의 근연종인 풍뎅이 동충하초 균주의 선행연구를 통해 확보된 유전체 분석 데이터를 활용하여 이차대사물질 검출 프로그램 antiSMASH 프로그램을 활용한 지표물질 분석

2) 생리학적 기전을 활용한 균주배양

곰팡이 성장하는 생리 조건 중 빛을 계속 주어 키우는 명 조건과 빛을 주지 않는 암 조건, 곰팡이 내의 생리학적 기능 중에서 히스톤단백질로부터 아세틸 그룹을 제거하는 효소인 Histone deacetylases 의 저해제로 활용하는 Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)를 처리한 균주와 DNA 메틸화 이동 효소 (DNA methyltransferases) 저해제인 5'-azacytidine을 처리한 균주를 2주간 배양

3) 균주배양 조건 확립

대조군 균주와 스트레스 4가지 (명, 암, SAHA 처리, 5'-azacytidine 처리) 균사체를 모아 동결건조기(freezing drier)를 이용하여 3일간 동결건조 수행 및 균사체를 막자사발에 넣고, 미세한 분말 형태로 제조

4) NMR 분석기기 활용을 위한 시료 전처리 방법

배양조건별 분말 형태의 풍뎅이 동충하초 시료들에 대한 NMR (nuclear magnetic resonance) 600Hz 기기를 통하여 분석 수행 및 대사체 프로파일링 분석

5) 대사체 프로파일링 및 다변량 통계분석

지표물질인 후시딕산의 생산경로를 확인하기 위해 각각의 배양조건에 따라 일차 대사 과정에 관한 대사경로의 변화 파악 및 다변량 통계분석

6) Fusidic acid HPLC 검증

풍뎅이 동충하초의 지표물질인 후시딕산의 존재 여부 HPLC 검증

③ 실험결과

1) 선행연구 유전체 분석 기반 이차대사물질 발굴

밀리타리스 동충하초의 근연종인 풍뎅이 동충하초 균주의 선행연구를 통해 확보된 유전체 분석 데이터를 활용하여 이차대사물질 검출 프로그램 antiSMASH 프로그램을 활용한 결과, 풍뎅이 동충하초에서 후시딕산(Fusidic acid)을 생산할 수 있는 유전자군 집단(Gene cluster)이 존재하고 있음을 확인

2) 배양조건에 따른 NMR 대사체 프로파일링 연구

풍뎅이 동충하초 대조군 균주와 스트레스 4가지 (명, 암, SAHA 처리, 5'-azacytidine 처리) 조건에서 배양된 균사체에 대한 대사체 프로파일링 수행하기 위해 최초 4 반복 수의 샘플들을 준비하여 NMR 분석을 수행하였고, 일차적으로 물 peak을 제외한 총 244 NMR 물질 peak이 검출되었고, 다변량 통계분석 중에서 아래의 그림1을 살펴보면, PLS-DA 모델에서 6 components와 UV scaling 방법을 활용하여 배양 스트레스 조건별로 분리된 결과를 확인

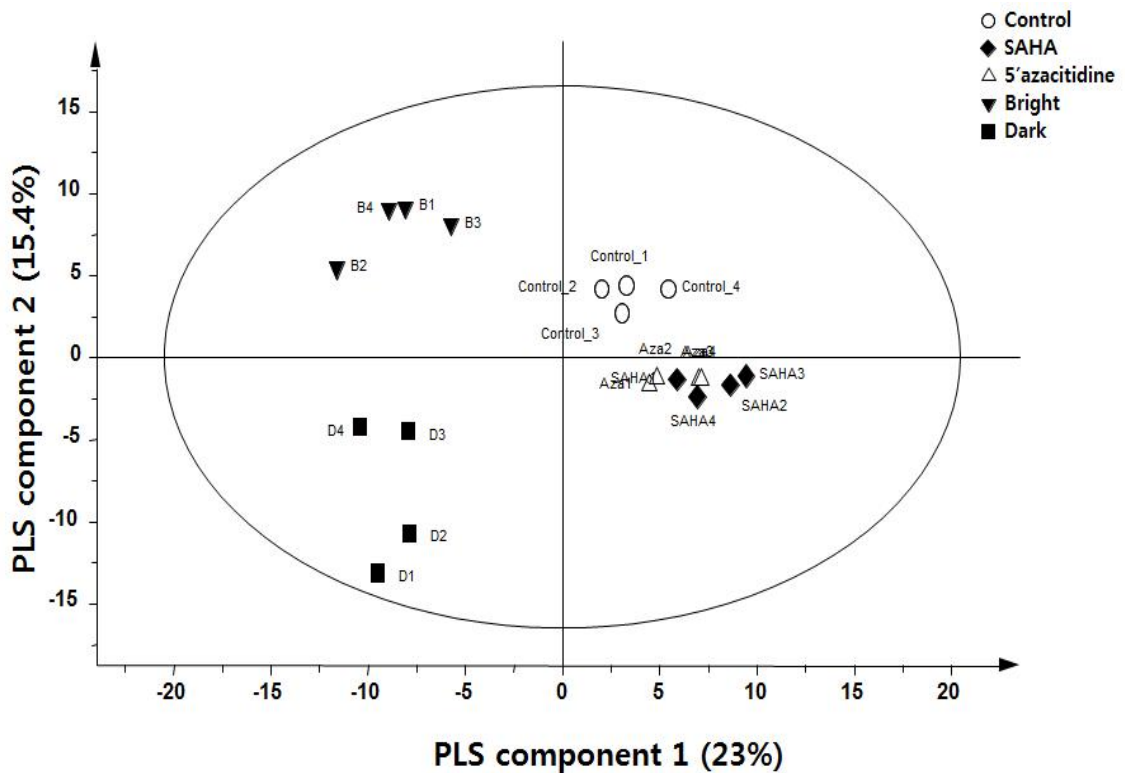


그림 1. 풍뎅이 동충하초의 물 peak을 제외한 244 물질들에 대한 PLS-DA 분석

표1에서 그룹별로 구분이 되도록 기여한 물질들을 검증할 수 있도록 기준이 되는 VIP(Variable Importance in Projection) scores 상에서 0.7 이상으로 선별하였고, 그 결과 그룹 분리에 기여하는 물질들은 46개로 검출되었음. 선별된 물질들을 살펴보면, 당알콜, 단당류, 이당류 계열에서는 7개, 핵산과 연관된 물질들은 6개, 유기산과 연관된 물질들은 8개, 아미노산은 22개, 기타 성분들의 물질들은 3개를 확인하였으며 상대적인 정량수치를 나타내었음.

표2를 살펴보면, 46개의 물질을 검증할 수 있도록 ^1H 주위에 존재하는 전자 (electron)에 의해 나타나는 현상인 화학 이동 값 (ppm)을 비롯하여 각각의 물질이 나타나는 피크간의 거리를 나타내는 peak의 커플링상수 (J value) 값임.

추후 선별된 46개의 물질만 선별하여 이상값 (outlier)를 제거한 3 반복 수의 샘플들로 다변량 통계분석을 수행하였다. 그림 2에서 그룹별 3 반복 수의 PLS-DA 분석을 수행하였고, PLS component 1 (50.3%) 과 component 2 (38.1%)로 인하여 5개의 그룹 간의 분리가 잘 이루어져 있으며, 특히 PLS component 1에 의해서 명반응 샘플들이 확실하게 대조군 그룹 및 다른 스트레스 군들과도 분리되는데, 차이가 나타나고 있음을 확인하였음. 반면에 암반응 스트레스 군에서도 대조군과 비슷한 위치로 그룹 간의 분리가 됨을 확인할 수가 있었지만, 다른 화학물질을 처리한 두 그룹 간에는 분리가 잘되어 있음을 확인할 수가 있었음. 후성유전과 연관된 화학물질 처리한 두 그룹 SAHA와 5'azacitidine 처리 군에서 분명하게 그룹 간의 분리가 잘 이루어지지 않은 점을 확인할 수가 있음.

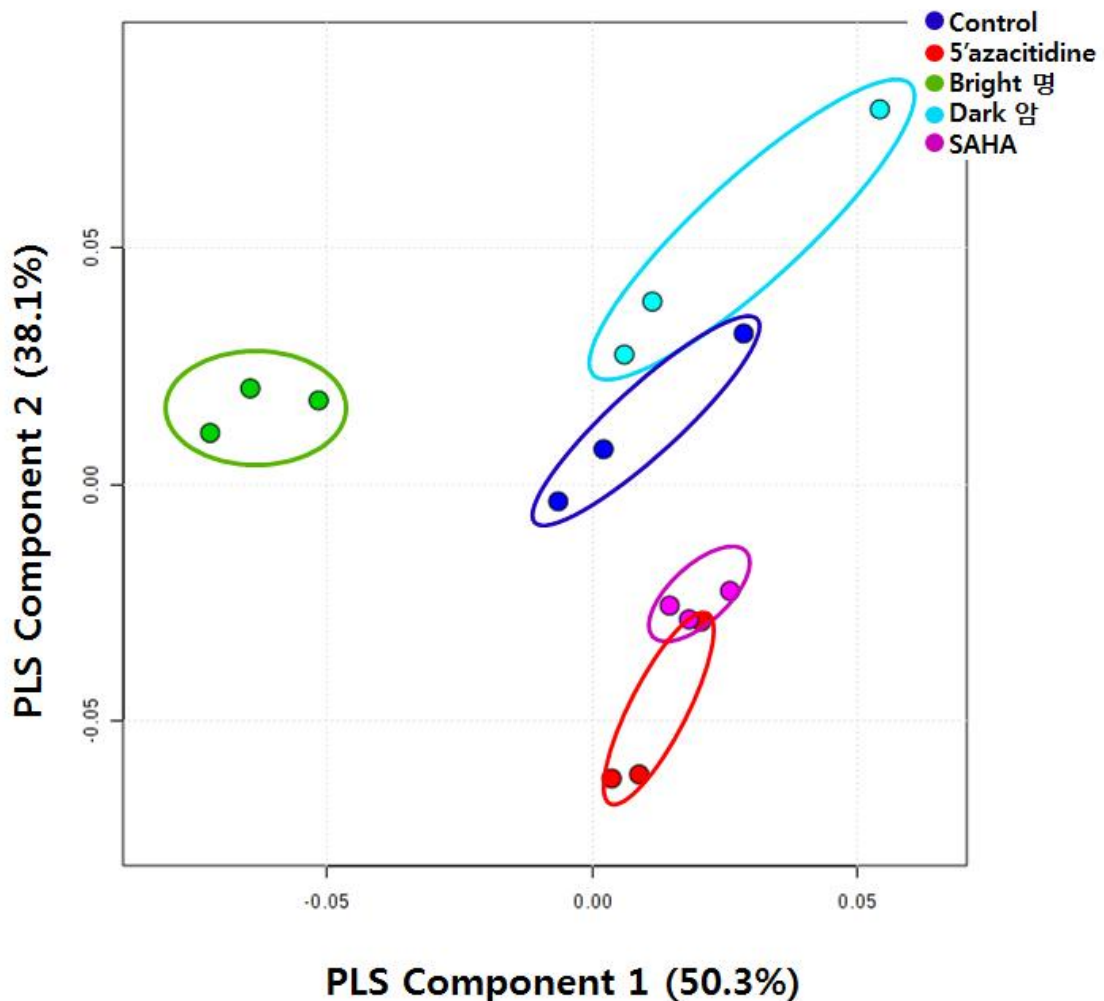


그림 2. 이상점(Outlier)를 제거한 46개 물질에 대한 PLS-DA 분석

그림 3에서 보이는 heatmap 분석을 통하여 상대적인 정량차이를 확인할 수가 있으며, 각각 샘플 그룹 간의 클러스터링이 잘 분리되어 있음. 특히 명반응에서의 상대적인 정량차이가 두드러지게 나타나고 있음을 확인할 수 있었음. 특히 항진균제로 활용할 수 있는 imidazol의 경우 명반응에서 가장 두드러지게 증가했다는 점을 확인함. 생리활성에 효능이 있는 adenosine을 비롯한 핵산 물질계열 uridine, inosine과 대다수의 아미노산 leucine, phenylalanine, thymidine, tryptophan, isoleucine, valine, tyrosine, alanine, cysteine들이 뚜렷하게 증가되어 있음을 확인할 수가 있었음. 또한 일부 당당류, 이당류도 증가되었음.

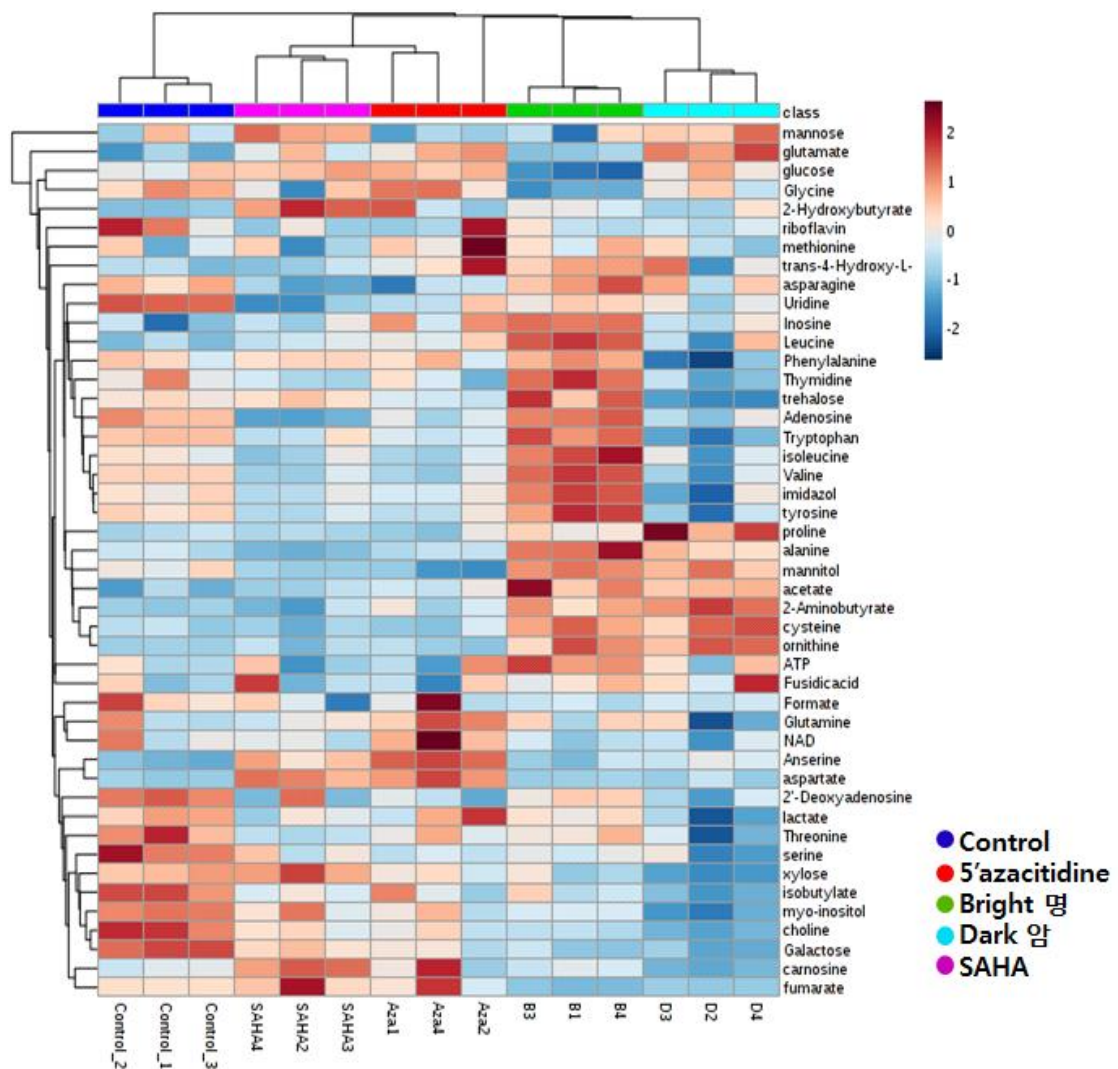


그림 3. 풍덩이 동충하초 유래의 46개의 대사물질에 대한 Heatmap

표1을 살펴보면, 46개의 풍덩이 동충하초 대사물질들의 상대적인 정량데이터를 확보하고, 일원 배치 분산분석 ANOVA 도 수행하였으며 사후 분석으로 Duncan 방법에 따라 그룹 간의 차이를 확인할 수가 있었으며, 위 통계의 수치를 뒷받침하기 위해

정규성 검정을 통하여 $P > 0.05$ 의 유의성을 나타내고 있음을 확인하였음.

각각의 그룹에서 대조군보다 높아진 대사물질들을 살펴보면 명반응에서는 위 heatmap 결과에서 나열해놓았으며, 암반응의 경우에는 일부의 아미노산 계열 glutamate, proline, alanine, cysteine, ornithine 에서 증가되었고, 일부의 당알콜인 mannose, mannitol이 증가하였음.

다음으로 후성유전을 조절하는 화학물질 첨가해서 배양한 균사체에서는 유기물질이 다소 증가하였으나 두드러지게 증가했다고 볼 수 없을 정도로 변화가 미미함. 특이한 점은 물질 처리한 군들은 anserine과 aspartate가 대조군 및 명암 반응과 비교해서 많이 증가했다는 것을 관찰할 수 있었음. anserine 물질의 경우 imidazole 형성에 기본 골격이 되는 물질로서 이것이 합성이 제대로 이루어지지 않은 것으로 imidazole 생산을 억제하거나 생합성 과정을 저해하는 것으로 사료됨. 따라서 위 두 개의 후성유전 조절하는 화학물질들은 항균제의 생산을 방해하기 때문에 상대적으로 대조군보다 imidazole이 줄어들었다고 볼 수 있음.

또한 5'-azacitidine 화학물질들이 glutamate 또는 aspartate carboxyl group의 methylation을 유발하기 때문에 covalent modification, 즉 공유수정 현상이 나타나는데 일반적으로 효소는 전달된 분자의 수용체 역할을 하는 아미노산 연결사슬(측쇄)로의 공여자로부터의 분자 또는 원자의 전달 때문에 조절될 수 있고, 효소를 조절하는 또 다른 방법은 단백질 분해 절단 (proteinolytic cleavage)에 의해 아미노산 서열 자체를 변화시킴. 위 현상이 나타나는 요인 중 하나으로써, aspartate의 양이 methylation 을 저해하는 5'-azacitidine 처리 군에서 가장 많이 증가했을 것으로 판단됨.

풍뎅이 동충하초의 지표물질인 후시딕산을 NMR을 이용하여 분석하였지만 존재하는 함량이 소량으로 존재하기 때문에, NMR 크로마토그램 상에서 검출이 되었으나, 절대적으로 정량하기엔 다소 미비하고 유의적으로 차이가 나지 않았기 때문에, NMR 분석기기보다는 HPLC 기기를 활용하여 추후 분석이 필요함. 본 연구에서 풍뎅이 동충하초 대사체 프로파일링이 변화된 결과를 확인하였음. 하지만 후성유전에 영향을 주는 물질들을 선행연구에서 알려진 농도인 각각 10 mM로 수행하였지만, 뚜렷한 변화가 나오지 않았기 때문에 추후에 높은 농도로 변화를 주어 수행해서 대사체의 변화를 분석해볼 필요가 있다고 판단됨. 그리고 물리적인 스트레스 조건을 늘려 저온 상태 10°C, 고온 상태 37°C, pH의 변화를 주는 H₂O₂를 성장 배지에 첨가하여, 지표물질인 후시딕산의 생성에 영향을 주는지 확인해볼 필요가 있음.

Metabolites	Control	SAHA	5'Azacitidine	Bright	Dark
Sugars and Alcohols					
Glucose	194.296±8.4832 ^b	218.002±4.6647 ^b	217.564±3.6908 ^b	116.741±6.2102 ^a	202.036±10.1084 ^b

Galactose	2.034±0.0513 ^c	1.305±0.0736 ^b	0.970±0.1364 ^b	0.583±0.0997 ^a	0.361±0.0868 ^a
Mannose	0.131±0.0377 ^{ab}	0.250±0.0149 ^b	0.059±0.0180 ^a	0.084±0.0550 ^a	0.225±0.0258 ^b
Mannitol	251.044±5.1825 ^b	218.452±1.2940 ^a	199.556±7.1863 ^a	290.170±2.3007 ^c	278.573±8.0012 ^c
Xylose	2.478±0.0902 ^c	2.839±0.2006 ^c	1.884±0.1472 ^b	1.480±0.2211 ^b	0.665±0.0556 ^a
Trehalose	3.558±0.1333 ^{bc}	3.857±0.1555 ^c	2.751±0.0839 ^b	5.304±0.5288 ^d	0.891±0.1199 ^a
Myo-inositol	5.535±0.0480 ^c	4.563±0.4556 ^{bc}	4.143±0.3893 ^b	3.738±0.0080 ^b	2.296±0.1831 ^a

Nucleic acid

ATP	0.048±0.0052 ^{ab}	0.043±0.0107 ^a	0.050±0.0127 ^{ab}	0.080±0.0043 ^b	0.054±0.0088 ^{ab}
Uridine	3.861±0.0233 ^c	2.428±0.1146 ^a	3.016±0.1633 ^b	3.262±0.0695 ^b	2.956±0.1266 ^b
2'-Deoxyadenosine	0.554±0.0091 ^b	0.400±0.0694 ^a	0.363±0.0282 ^a	0.458±0.0141 ^{ab}	0.348±0.0280 ^a
Adenosine	0.703±0.0205 ^c	0.425±0.0082 ^a	0.548±0.0242 ^b	0.774±0.0112 ^c	0.524±0.0321 ^b
Inosine	0.136±0.0238 ^a	0.177±0.0127 ^{ab}	0.239±0.0244 ^{bc}	0.282±0.0017 ^c	0.184±0.0117 ^{ab}
NAD ⁺	0.040±0.0051 ^{ab}	0.035±0.0017 ^a	0.052±0.0060 ^a	0.031±0.0018 ^a	0.030±0.0036 ^a

Organic acid

2-Aminobutyrate	0.630±0.0414 ^a	0.491±0.2345 ^a	1.099±0.2026 ^a	2.106±0.1928 ^b	2.689±0.1699 ^b
2-Hydroxybutyrate	3.136±0.1471 ^b	10.869±0.8135 ^a	6.411±2.0907 ^a	5.780±0.2275 ^a	4.774±0.9028 ^a
Acetate	3.665±1.2867 ^a	5.866±0.5835 ^a	8.508±0.7118 ^a	18.585±2.8150 ^b	14.204±0.3421 ^b
Isobutylate	2.863±0.1600 ^c	1.473±0.0964 ^{ab}	1.657±0.4508 ^b	1.463±0.2424 ^{ab}	0.547±0.0991 ^a
Imidazol	2.919±0.0863 ^b	2.427±0.1116 ^{ab}	2.605±0.0799 ^{ab}	3.893±0.1047 ^c	1.900±0.4156 ^a
Lactate	6.398±0.1872 ^b	5.053±0.3197 ^{ab}	6.369±0.7290 ^b	5.667±0.1210 ^b	3.630±0.5188 ^a
Formate	0.091±0.0108 ^a	0.059±0.0149 ^a	0.087±0.0210 ^a	0.060±0.0024 ^a	0.062±0.0013 ^a
Fumarate	2.424±0.0362 ^c	3.614±0.7581 ^c	2.889±0.8717 ^a	0.434±0.0648 ^a	0.661±0.0352 ^{ab}

Amino acid

Alanine	11.976±0.5064 ^b	8.357±0.2582 ^a	11.593±0.2721 ^b	23.809±1.5668 ^d	17.262±0.6366 ^c
Anserine	3.791±0.1425 ^a	6.848±0.3450 ^c	8.581±0.1531 ^d	4.426±0.3153 ^a	5.341±0.1662 ^b
Asparagine	5.747±0.1468 ^b	4.080±0.1780 ^a	4.266±0.3818 ^a	6.146±0.2564 ^b	5.402±0.3556 ^b
Aspartate	4.886±0.7400 ^a	41.125±3.0775 ^b	43.976±3.8601 ^b	5.601±0.6085 ^a	6.918±2.3642 ^a
Carnosine	0.382±0.0196 ^{ab}	0.768±0.0382 ^c	0.540±0.1855 ^{bc}	0.363±0.0176 ^{ab}	0.142±0.0125 ^a
Cysteine	9.894±0.9302 ^a	7.940±1.1024 ^a	9.242±1.4673 ^a	22.696±1.3396 ^b	23.191±2.5352 ^b
Glutamate	74.669±1.5908 ^a	84.059±2.2404 ^b	88.498±2.1869 ^{bc}	76.783±0.6372 ^a	93.668±1.5404 ^c
Glutamine	2.299±0.3530 ^{ab}	2.217±0.1029 ^b	3.094±0.2131 ^b	2.344±0.2342 ^{ab}	1.550±0.4836 ^a
Glycine	18.917±0.4361 ^{bc}	16.397±1.2372 ^{ab}	19.260±0.7484 ^c	14.343±0.2339 ^a	17.276±0.5362 ^{bc}
Isoleucine	17.302±0.4623 ^a	14.504±0.9999 ^a	14.552±0.6273 ^a	23.793±1.0006 ^b	14.555±1.5939 ^a
Leucine	34.399±1.9956 ^a	41.296±1.1801 ^a	47.036±2.1685 ^a	66.931±1.1277 ^b	39.814±7.3726 ^a
Methionine	1.744±0.2585 ^a	1.569±0.3067 ^a	2.549±0.4122 ^a	2.085±0.1674 ^a	1.716±0.2009 ^a
Ornithine	0.250±0.0226 ^a	0.388±0.2980 ^a	0.282±0.1901 ^a	3.279±0.5363 ^b	3.536±0.4325 ^b
Phenylalanine	16.322±0.6474 ^b	16.703±0.1312 ^b	16.409±0.7385 ^b	18.231±0.2797 ^b	10.892±1.0470 ^a
Proline	71.017±0.5227 ^a	70.598±0.2284 ^a	70.751±1.4865 ^a	75.487±0.6822 ^a	83.989±2.5464 ^b
Serine	39.768±2.5749 ^b	25.514±2.6703 ^a	21.253±0.7327 ^a	23.496±0.7314 ^a	15.518±4.4257 ^a
Threonine	20.677±0.8195 ^c	16.222±0.1262 ^{ab}	18.113±0.6930 ^{bc}	18.337±0.4856 ^{bc}	14.624±1.2439 ^a
Thymidine	0.086±0.0137 ^b	0.050±0.0042 ^{ab}	0.057±0.0131 ^{ab}	0.130±0.0064 ^c	0.038±0.0081 ^a
Trans-4-Hydroxy-L-proline	7.631±0.2322 ^a	7.562±0.2191 ^a	9.733±0.8754 ^a	9.787±0.2076 ^a	8.537±1.0264 ^a

Tryptophan	0.440±0.0035 ^c	0.326±0.0308 ^b	0.317±0.0075 ^b	0.541±0.0213 ^d	0.170±0.0286 ^a
Tyrosine	7.309±0.1402 ^b	5.741±0.2164 ^{ab}	6.054±0.3371 ^{ab}	9.437±0.4924 ^c	4.674±0.7614 ^a
Valine	28.053±0.1085 ^b	20.154±1.2778 ^a	20.509±1.5156 ^a	36.606±0.7738 ^c	18.532±2.5868 ^a
Others					
Choline	48.113±2.1153 ^d	32.749±1.5989 ^c	30.900±2.3580 ^{bc}	25.778±0.4312 ^b	19.116±0.6338 ^a
Riboflavin	0.423±0.0940 ^a	0.129±0.0478 ^a	0.268±0.1530 ^a	0.177±0.0378 ^a	0.159±0.0171 ^a

표 1. 풍뎡이 동충하초의 NMR 분석으로 확인된 46개의 대사물질 및 상대적인 함량 (Duncan a<b<c<d)

Metabolites	Chemical shift (ppm), J (Hz)
Sugars and Alcohols	
Glucose	3.22(dd, $J_1=9.220$, $J_2=8.06$), 3.38(t, $J=8.9$), 3.42(m), 3.46(m), 3.50(m), 3.90(m), 4.66(m), 5.22(d, $J=4.07$)
Galactose	5.26(d, $J=3.66$)
Mannose	4.99(d, $J=1.31$)
Mannitol	3.66(dd, $J_1=11.76$, $J_2=6.2$), 3.70(m), 3.78(m), 3.84(dd, $J_1=11.87$, $J_2=2.8$)
Xylose	4.58(d, $J=7.90$)
Trehalose	5.18(d, $J=3.80$)
Myo-inositol	4.06(t, $J=2.84$)
Nucleic acid	
ATP	6.14(d, $J=5.82$)
Uridine	5.86(d, $J=8.10$), 5.90(d, $J=8.10$), 7.86(d, $J=8.10$)
2'-Deoxyadenosine	6.46(t, $J=6.92$), 8.34(s)
Adenosine	6.06(d, $J=6.07$)
Inosine	6.1(d, $J=5.68$)
NAD	9.34(s)
Organic acid	
2-Aminobutyrate	1.86(m)
2-Hydroxybutyrate	0.90(t, $J=7.47$), 1.78(m)
Acetate	1.90(s)
Isobutylate	1.06(d, $J=7.02$)
Imidazol	7.34(s), 8.22(s)
Lactate	1.3(d, $J=6.91$)
Formate	8.46(s)
Fumarate	6.5(s)
Amino acid	
Alanine	1.46(d, $J=8.31$)
Anserine	2.74(m), 4.42(dd, $J_1=15.79$, $J_2=8.9$), 8.3(d, $J=0.72$)
Asparagine	2.86(m), 2.94(m)
Aspartate	2.66(dd, $J_1=17.45$, $J_2=8.85$), 2.7(dd, $J_1=17.45$, $J_2=3.72$)
Carnosine	7.98(s)
Cysteine	3.06(m)
Glutamate	2.02(m), 2.10(m)
Glutamine	2.46(m)
Glycine	3.54(s)
Isoleucine	0.98(d, $J=7.00$), 1.22(m), 1.42(m)
Leucine	0.94(t, $J=5.897$), 1.70(m)
Methionine	2.62(t, $J=7.587$)
Ornithine	1.82(m)
Phenylalanine	3.14(m), 7.30(d, $J=6.96$), 7.38(m), 7.42(m)
Proline	1.98(m), 2.06(m), 2.34(m), 3.34(m), 4.14(dd, $J_1=8.63$, $J_2=6.42$)
Serine	3.94(m)

Threonine	1.34(d, $J=6.585$), 3.58(d, $J=4.867$), 4.26(m)
Thymidine	6.30(t, $J=6.79$)
Trans-4-Hydroxy-L-proline	2.42(m), 4.34(d, $J=7.97$), 4.38(d, $J=7.97$)
Tryptophan	7.70(d, $J=7.993$)
Tyrosine	6.90(m), 7.18(m)
Valine	0.98(d, $J=7.01$), 1.02(d, $J=7.05$)
Others	
Choline	3.18(s)
Riboflavin	7.34(s)

표 2. 풍뎡이 동충하초 유래의 46개 대사물질에 대한 화학이동값(Chemical shift) 및 커플링상수

3) 풍뎡이 동충하초 지표물질 HPLC 검정

풍뎡이 동충하초 균주의 지표물질인 Fusidic acid를 검출하기 위해서 HPLC 기기를 활용하였으며, 그림 4 결과에서 Fusidic acid가 실험상에서 낮은 농도로 검출된 이유는 peak 상에서 유사 물질이 존재하였기 때문이고 기준물질에 대비하여 정량한 결과, 0.19 mg/ml 약 0.02% 정도 포함된 것으로 확인됨. 따라서 풍뎡이 동충하초에서 유전자들의 gene cluster에서 제시하는 Fusidic acid를 생성하는 것으로 판단되어 화장품 원료로서의 가치가 있을 것으로 판단함.

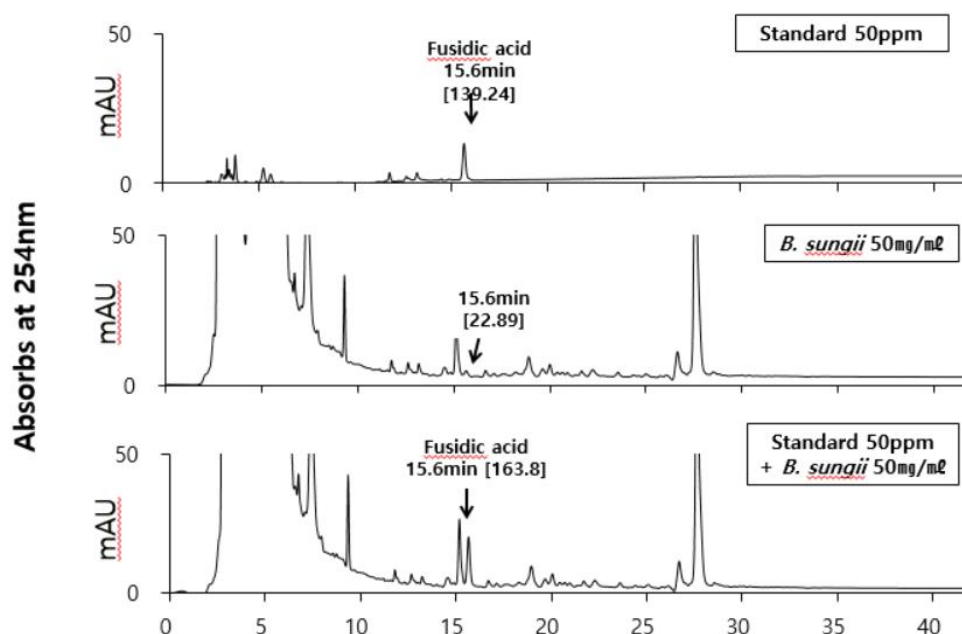


그림 4. 풍뎡이 동충하초 유래의 Fusidic acid 및 유사 물질 screening

(3) 밀리타리스 동충하초 근연종 노랑다발 동충하초의 식의약 소재 지표물질 발굴용 형질전환체 제작

① 시험개요

1) 목표 : 밀리타리스 동충하초의 근연종 노랑다발 동충하초 균주의 지표물질 발굴용 형

질 전환체 제작 및 지표물질 검정

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 근연종인 노랑다발 동충하초의 유전체 정보 기반의 이차대사산물 발굴과 형질전환체 제작 및 지표물질 후보에 대한 HPLC 검정

② 실험방법

1) 유전체 분석 활용

밀리타리스 동충하초의 근연종인 노랑다발 동충하초 균주의 PacBio 시퀀싱 기법을 이용한 유전체 데이터 생산 및 조립을 통해 확보된 유전체 정보에 곱팡이 유래의 이차대사산물 생합성 유전자 발굴함

2) 노랑다발동충하초 형질전환체 제조법 구축

노랑다발동충하초의 이차대사산물 생합성 관련 유전자를 선발하여 아그로박테리움 형질 전환 시스템을 이용한 형질전환체 제조. 형질전환체 선발을 위한 항생제 종류별 농도별 균주 저항성 시험 수행 및 원형질체 제작을 위해 노랑다발동충하초 균주를 1×10^8 수를 맞추어 CM broth 10ml에 첨가하여 25°C에서 150 rpm으로 24시간 배양 후 미라크로스를 이용하여 배양액과 포자를 걸러내고, glucanex와 driselase를 이용하여 2시간 반응하여 원형질체를 획득

3) 가루꽃 동충하초와 효모균의 이중유전자도입을 위한 플라스미드 벡터 제조

곶팡이 동충하초의 유전체데이터의 Assemble된 염기서열이 정확하지 않아 근연종인 가루꽃 동충하초의 OSC 유전자의 기능을 규명하고자 TOPO TA cloning 키트를 활용하여 pYES2.1 효모에 클로닝하여 OSC 유전자 플라스미드를 제조하여 후시딕산 생합성과 연관되는지 유전자의 기능 검정

③ 실험결과

1) 유전체 분석 기반 이차대사물질 발굴

밀리타리스 동충하초의 근연종인 노랑다발 동충하초 균주의 유전체 데이터 생산 및 조립(assembly) 후 이차대사산물 생합성 유전자 예측 프로그램 antiSMASH3를 이용하여 모티프 검색한 결과, NRPS 17, PKS 3, Hybrid 2, Terpene 5, Other 6, Total 33개의 이차대사산물 확인

2) 노랑다발 동충하초 형질전환체 HPLC 검정

노랑다발 동충하초의 이차대사산물 생합성 관련 유전자 중에서 NRPS와 연관된 것을 선발하여 아그로박테리움 형질전환 시스템을 이용하여 형질전환체 제조. 노랑다발 동충하초와 형질전환체를 각각 DMSO 용매에서 추출하여 HPLC 분석기기로 그림 1의 결과 screening 함.

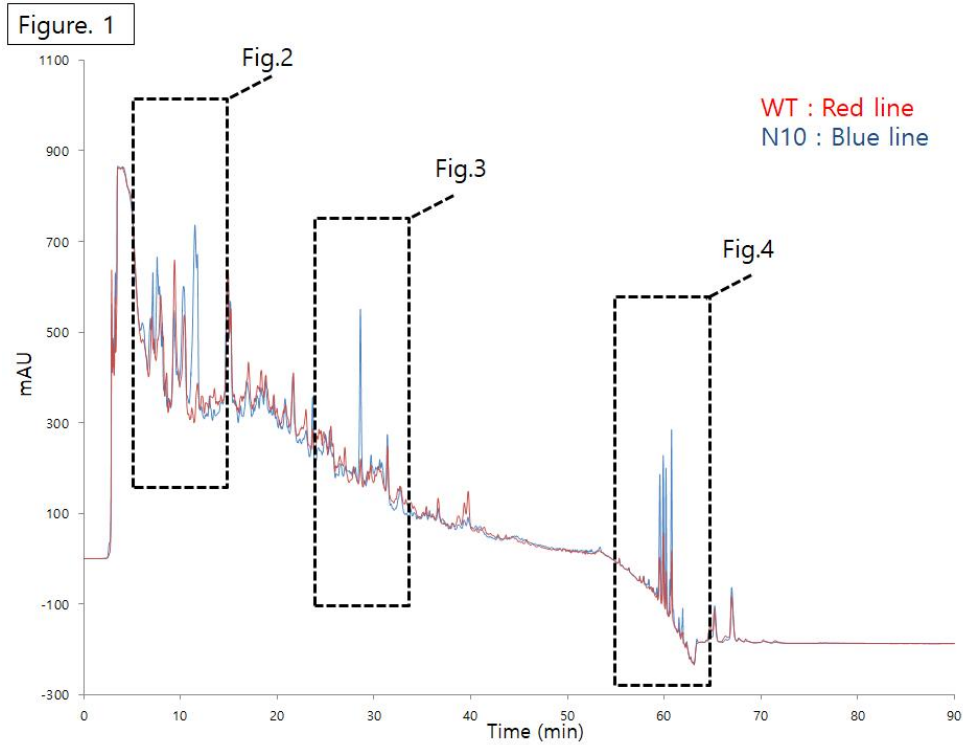


그림 1. 노랑다발 동충하초(WT), 형질전환체(N10) HPLC 스크리닝

그림 2-4 결과를 확인하면 노랑다발 동충하초와 형질전환체에서의 스펙트럼 차이가 있는 부분은 총 8 부분으로 측정값의 차이와 패턴이 달라져 있음을 확인함. 그림 2에서는 3가지의 물질 패턴 중에서 11.48 min에 물질 peak이 생긴 것이 확인됨. 그림 3에서는 RT 28.58 min 위치에서 형질전환체에서 증가된 Peak을 확인

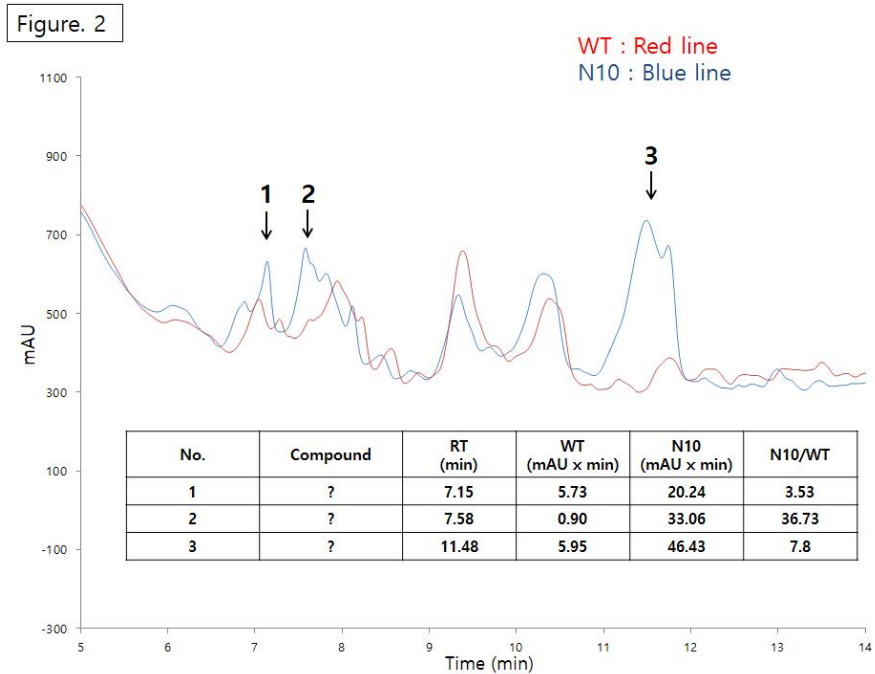


그림 2. 노랑다발 동충하초(WT), 형질전환체(N10) HPLC 스크리닝

Figure. 3

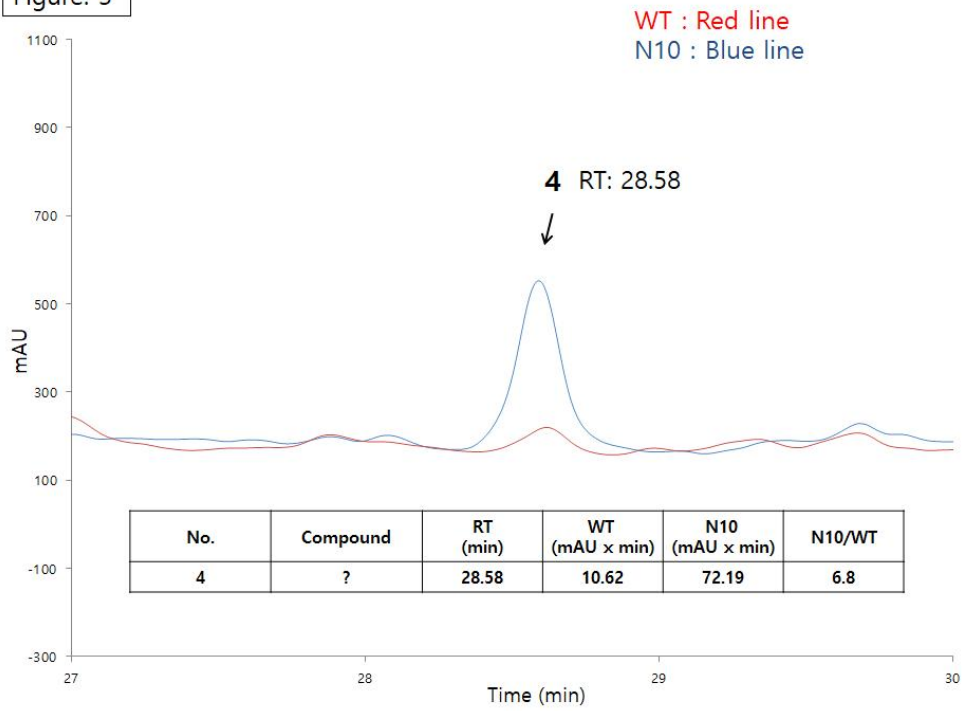


그림 3. 노랑다발 동충하초(WT), 형질전환체(N10) HPLC 스크리닝

그림 4 에서는 노랑다발 동충하초의 지표물질인 beauvericin을 비롯하여 주변의 물질 peak 4개에서 WT 보다 2-3배씩 증가된 peak을 확인함.

Figure. 4

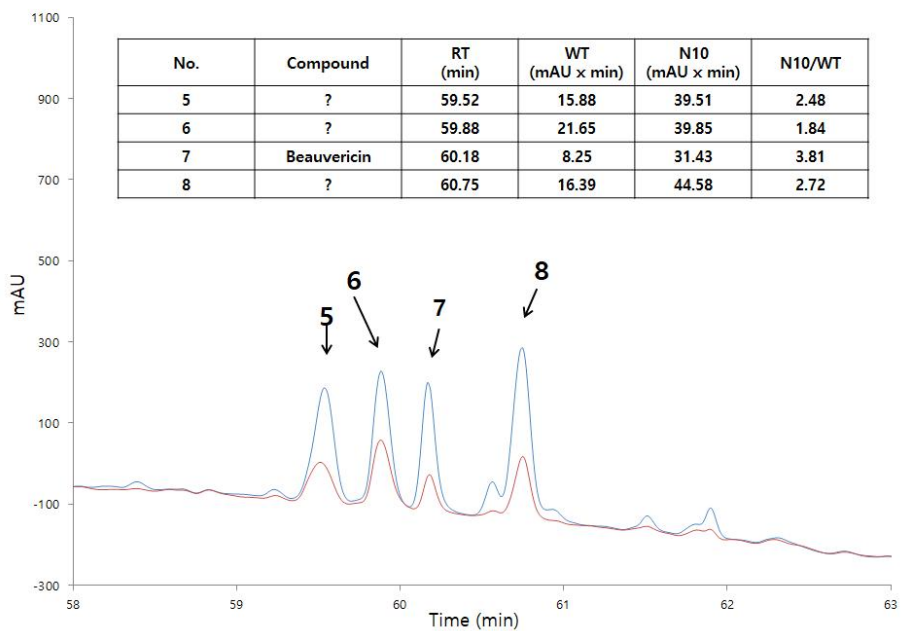


그림 4. 노랑다발 동충하초(WT), 형질전환체(N10) HPLC 스크리닝

형질전환체 균주에서 Beauvericin을 비롯하여 8개의 peak의 차이를 확인하였으며, 그중에서 3번째 나온 Peak의 경우 복합물질로 보임. 이를 제외하면 단일 peak의 함량 변화는 1.5-8배 정도의 차이가 있음. 용출용매를 통해 좀 더 스크리닝 수행할 필요가 있으나, 물질구조 동정 작업까지 진행하기에는 인력, 시간, 비용, 분석 장비 등이 필요할 것으로 보여 현 과제에서 진행하는 것은 어려울 것으로 보임.

3) 가루꽃동충하초 OSC 유전자 이중 플라스미드 제조 및 후시딕산 생성 기전 검정

기존에 알려진 후시딕산 생합성 과정에 가루꽃동충하초의 OSC 유전자 이중 플라스미드 벡터를 제조하여 각각의 생합성 대사경로에 생성되는 물질들이 나오고 이 유전자에 의해서 실제로 생합성에 관여하는지 규명함.

가루꽃 동충하초의 후시딕산 생합성 집단 내에 존재하는 p450 유전자에 의해 생성된 크로마토그래피 피크의 질량분석을 통해 각각의 생성되는 물질을 확인한 결과, 그림 5에서 보여지는 피크 중에서 3번 피크는 Protosta-17(20)Z,24-dien-3 β ,29-diol와 4번 피크는 Protosta-17(20)Z,24-dien-3 β -ol-29-oic acid로 예측 됨.

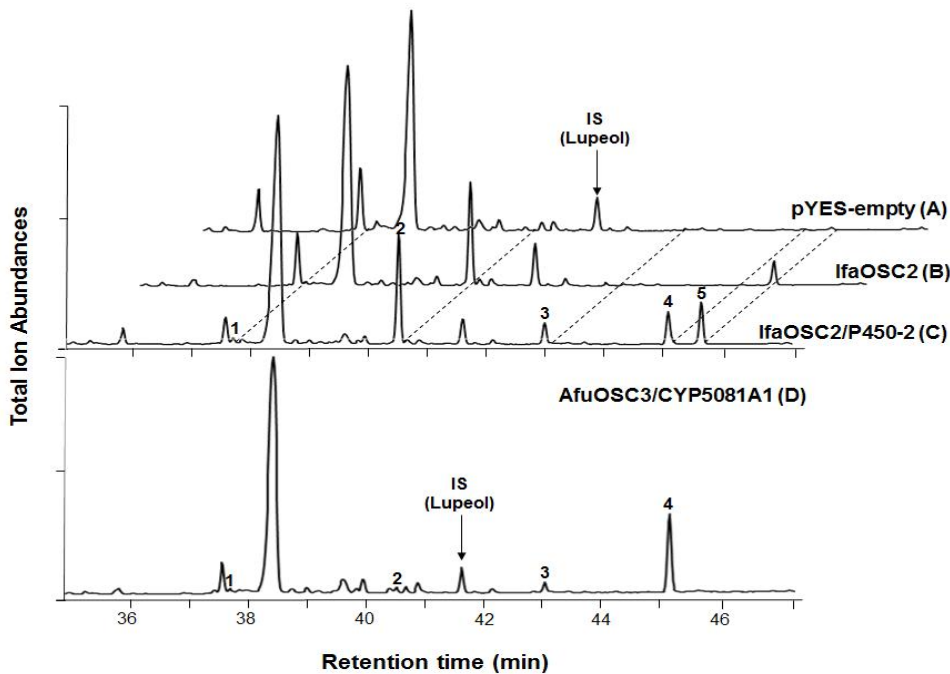


그림 5. 가루꽃동충하초 OSC 유전자와 P450 유전자의 이중 유전자 도입 후시딕산 생합성 경로 규명

(3) 밀리타리스 동충하초의 면역 증강 효능에 의한 암세포 성장억제 및 피로 개선 in vivo 효능 평가

① 시험개요

1) 목표 : 밀리타리스 동충하초의 면역 증강 효능에 의한 항암 및 항피로 in vivo 효능

평가

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 면역 증강 효능에 의한 암세포 성장억제 및 피로 개선 in vivo 효능 평가(식품의약품안전처 피로 개선 가이드북 참고)

② 실험방법

1) 실험동물 모델

특정 병원체 부재 6주령 (SPF) BALB/c Nude 마우스에 Huh-7 (1×10^5) 암세포를 이종이식한 xenograft 모델

2) 약물 투여 방법

암세포 이식 후, 종양 부피 평균 $75-100 \text{ mm}^3$ 이 되었을 때, 동충하초 분획추출물 50 mg/kg/day , 소라페닙 30 mg/kg/day 로 단독 또는 병용하여 19일간 경구 투여

3) 체중 변화 측정

입수 시, 군 분리 시, 암세포 이식 후 및 약물 투여 기간 중 2회/주 측정

4) 종양 부피 측정

버니어캘리퍼스를 이용하여 측정하고 계산식 $(\text{장축} \times \text{단축}^2) / 2 (\text{mm}^3)$ 을 사용하여 산출

5) 종양 무게 측정

방혈치사 시킨 동물의 종양을 적출하여 종양 무게 측정

6) 혈액 채혈

isoflurane으로 흡입마취 후, 후대정맥에서 1 mL 주사기를 이용하여 채혈하고, clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입 후 20분간 상온 방치 응고시킨 후에, 응고시킨 후 10분간 원심분리하여 혈청 확보 및 -80°C 보관

7) 혈액 실험

-80°C 냉동 보관된 혈청은 AU5800 Clinical chemistry analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 기기를 활용하여, 혈액 바이오마커인 lactate dehydrogenase (LDH), serum glucose (GLU), aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) 을 분석

③ 실험결과

1) 실험동물 체중 변화

간암세포주(Huh-7)을 BALB/C 누드마우스에 이종이식 후 암세포의 크기가 평균적으로 $75-100 \text{ mm}^3$ 이 되었을 때, 대조군($12.5\% \text{ Cremophor} + 12.5\% \text{ EtOH in water}$), 동충하초 분획추출물 50 mg/kg/day , 소라페닙 30 mg/kg/day 로 단독 또는 병용투여한 4개의 그룹에서 19일 동안 마우스를 개별적으로 관찰하고, 그룹별로 평균 체중을 확인. 체중 측정 결과, 동물들의 체중 변화가 급격하게 감소하거나 증가한 경향이 나타나지 않았으며, 약물에 의한 사망 및 부작용 현상도 보이지 않음 (그림 1).

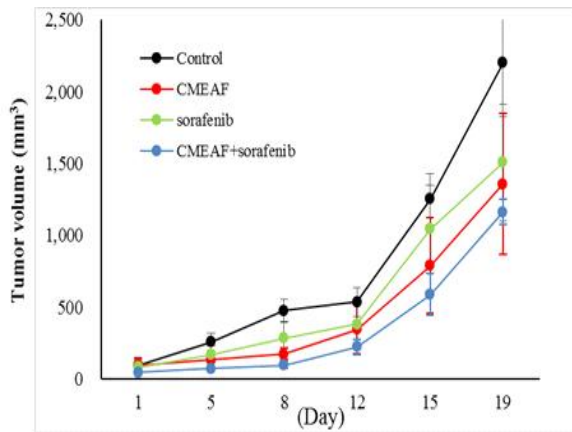


그림 1. 실험동물 그룹별 체중 변화

2) 실험동물 종양 부피 측정 결과

간암세포주(Huh-7)을 BALB/C 누드마우스에 이식한 xenograft 모델에서 대조군(일반 부형제 12.5% Cremophor + 12.5% EtOH in water) 그룹과 간암에서 상용화되고 있는 소라페닙(sorafenib) 투여 그룹, 동충하초 에틸아세테이트 분획추출물(CMEAF) 단독처리 그룹 및 CMEAF+sorafenib의 병용처리 그룹 총 4개 그룹으로 (N = 4) in vivo 효능 검정.

약물 투여 5일 동안, 대조군을 비롯하여 약물 처리 그룹에서 약물에 의한 항암 효과는 차이가 나지 않았으나, 약물 투여 12일 이후 각각의 약물을 투여한 그룹에서 대조군과 차이가 나기 시작함.

최종적으로 19일 동안 약물 투여 결과, 소라페닙 투여 그룹이 대조군 투여 그룹보다 39% 암조직의 부피가 감소하였고, 동충하초 분획추출물 그룹이 대조군 투여 그룹보다 52% 암조직의 부피가 감소하였으며, 병용처리 그룹에서 56%의 암조직의 부피가 감소한 것으로 나타남 (그림 2).

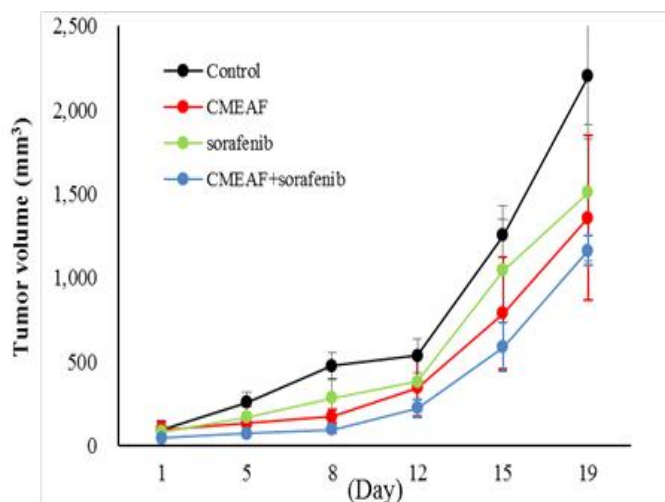


그림 2. Huh-7 암조직의 부피 변화

3) 실험동물 종양 무게 측정 결과

종양 무게는 19일 동안 약물 투여 및 관찰 후 실험동물 개체수 4 마리에 대한 부검을 수행하였으며, 암조직을 적출하여 무게를 측정한 결과 암조직의 크기 변화와 비슷한 경향으로 감소하였음.

종양 무게 측정 결과, 대조군에서의 암조직이 육안으로도 가장 크게 자랐으며, 소라페닙 단독처리 그룹에서 대조군보다 약 21.0% 암조직의 무게가 감소했으며, 동충하초 분획추출물 그룹에서 약 30.9% 암조직의 무게가 감소했으며, 병용처리 그룹에서 41.5% 암조직 무게가 감소하였음을 확인하였음 (그림 3).

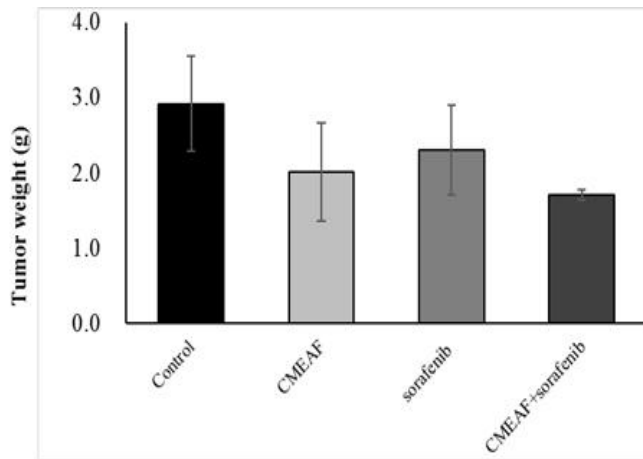


그림 3. 종양 무게 측정 결과

4) 실험동물 혈액 분석 기반 피로회복 마커(LDH) 측정 결과

젖산탈수소효소 (lactate dehydrogenase, LDH)는 무산소 상태에서 젖산 형성을 촉매하는 효소로, 근육 피로에 중요한 인자로 알려져 있음. 과격한 운동 및 암 관련 피로한 상태에서 과량의 피루브산이 생성되어 젖산 형성이 촉진되고, 또한 피루브산을 젖산으로 전환 시키는 과정을 촉매하는 LDH의 활성도 증가하여 피로 관련 생물학적 마커로 활용함.

LDH 혈액 분석 결과, 대조군보다 소라페닙 단독처리 그룹이 약 16.8% LDH 수치가 감소했으며, 동충하초 분획추출물 그룹에서 약 31.8%의 LDH 수치가 감소했으며, 병용처리 그룹에서 45.5% LDH의 수치가 감소하였음을 확인함 (그림 4).

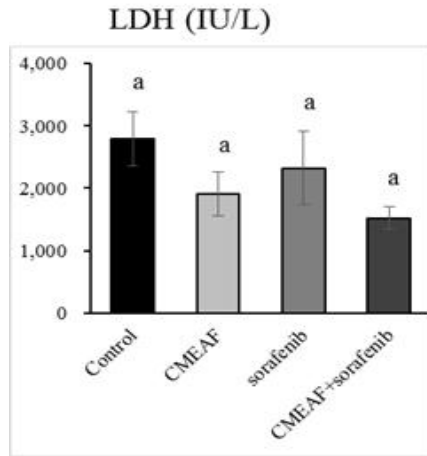


그림 4. 실험동물 혈액 피로회복 마커(LDH)의 측정

5) 실험동물 혈액 분석 기반 피로회복 마커(GLU) 측정 결과

혈당의 농도가 감소하면 피로감을 느끼게 되고, 지구력 운동 수행 능력을 저해하는 결과가 초래되기 때문에 운동 후반부나 암 관련 피로 상태에서 근육의 글리코겐 함량이 감소하면 혈중 글루코스가 근육으로 유입되는 양이 증가하는데, 이로 인해서 혈중 글루코스가 감소하게 됨.

약물 투여 실험 후, GLU 혈액 분석 결과, 대조군보다 동충하초 분획추출물 단독처리 그룹에서 약 6.2% GLU의 수치가 증가하였으며, 소라페닙 단독처리 그룹이 약 44.5% GLU 수치가 증가했으며, 병용처리 그룹에서 58.6% GLU의 수치가 증가하였음을 확인하였음 (그림 5).

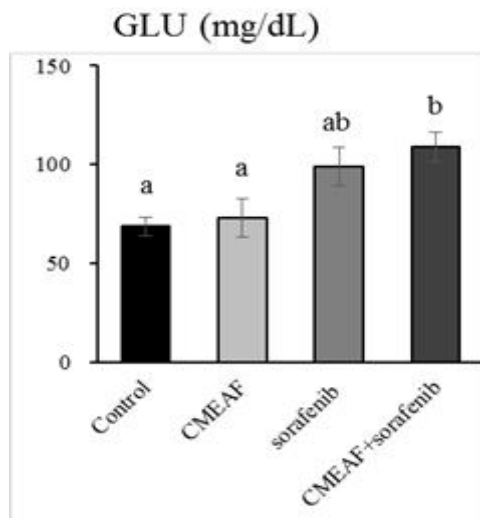


그림 5. 실험동물 혈액 피로회복 마커(GLU)

6) 실험동물 혈액 분석 기반 간기능 마커(ALT) 결과

ALT는 알라닌 아미노기 전달 효소로, 간기능이 아닌 간에 대한 정보를 알 수 있으

며, 그중에서 간손상의 표지자로서, AST보다 ALT가 간손상에 있어서 더 특이적인 표지자로 활용되고 있음. 따라서 간이 손상되어 간세포가 파괴되면 그 안에 존재하는 ALT가 빠져나와 혈액 속에 섞여 돌아다니기 때문에 수치가 높아지면 간이 손상되었다고 확인됨.

실험동물 부검 후에 확보한 혈액 ALT 수치의 결과는 통계적으로 유의한 차이가 나지 않으며, ALT의 수치가 변화가 거의 없는 것으로 보아, 실험에 투여한 약물들에 의한 간세포의 손상에 영향을 주지 않는 결과 확인하였음 (그림 6).

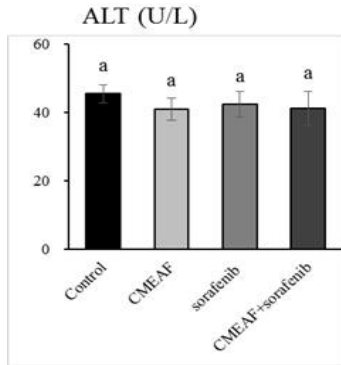


그림 6. 실험동물 혈액 간기능 마커(ALT)

7) 실험동물 혈액 분석 기반 간기능 마커(AST) 결과

AST 는 아스파르트산염 아미노기 전달 효소로 대표적인 간기능 검사 지표로, 간세포 내에 존재하는 효소로 주로 간세포가 손상되면 혈중으로 방출되어 수치가 증가하는 것으로 지나치게 높은 경우 간질환 가능성 여부를 확인할 수 있는 생물학적 마커임.

AST 혈액 분석 결과, 대조군보다 소라페닙 단독처리 그룹이 약 13.4% 감소했으며, 동충하초 분획추출물 그룹에서 약 26.7%, 병용처리 그룹에서 35.7% 감소하였음을 확인하였음 (그림 7).

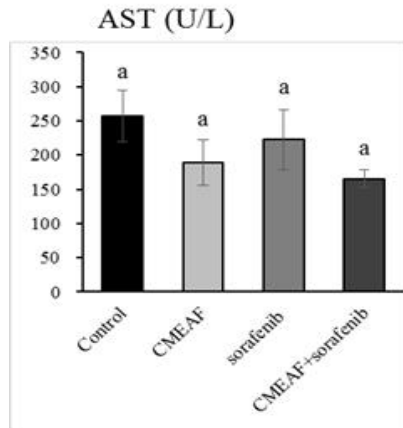


그림 7. 실험동물 혈액 간기능 마커(AST)

8) 실험동물 혈액 분석 기반 간기능 마커(ALP) 결과

ALP는 알칼라인 포스파타아제로 간의 담관 안을 싸고 있는 세포 내부의 효소로, 혈액 속의 ALP의 농도는 간기능 개선을 나타내는 지표로도 활용하고 있는 생물학적 바이오마커임.

ALP 혈액 분석 결과, 대조군보다 동충하초 분획추출물 단독처리 그룹에서 약 32.0% 수치가 증가하였으며, 소라페닙 단독처리 그룹이 약 22.7% 증가하였고, 병용처리 그룹에서 41.6% ALP의 수치가 증가하였음을 확인하였음 (그림 8).

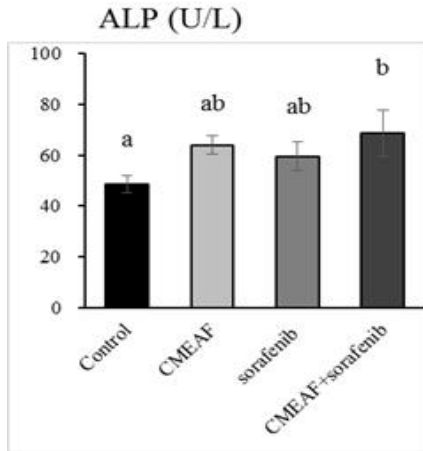


그림 8. 실험동물 혈액 간기능 마커(ALP)

결론적으로 동충하초 분획추출물은 간암세포의 성장을 억제하는 항암 효과를 가지고 있으며, 암과 연관된 피로도 개선할 수 있음을 혈액 지표로 확인하였음. 따라서 동충하초 분획추출물은 암환자들에 대한 피로 개선 및 항암보조제로서 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

(4) 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 지표물질 함량 분석

① 시험개요

1) 목표 : 밀리타리스 동충하초의 지표물질 코디세핀 함량 증진을 위한 분획 추출물 제조

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 다양한 용매를 활용한 분획추출물을 제조하여 지표물질 코디세핀의 함량을 비교하고자 함

② 실험방법

1) 밀리타리스 동충하초 분획추출물 HPLC 검정

밀리타리스 동충하초 분획추출물의 지표물질 코디세핀 함량을 측정하기 위해 KNAUER HPLC System 분석기에 phenomenex 사의 gemini C18 컬럼을 사용하였고, 이동상 조건은 초순수물과 acetonitrile 혼합액(95:5)을 사용하여 1.0 ml/min 속

도 전개하였음. 표준물질은 Sigma 사의 (C3394) cordycepin을 구매하여 사용하였음. 각각의 동충하초 분획추출물을 100 mg/ml의 농도가 되도록 DMSO 용매에 녹인 후, 1시간 동안 초음파분해(sonication)를 수행하여 코디세핀을 추출하였고, 0.45 μ m filter로 여과한 후, DMSO 용매로 희석한 뒤 HPLC 분석 수행함.

③ 실험결과

1) 밀리타리스 동충하초 분획추출물 HPLC 검정

HPLC 분석에 활용한 동충하초 분획추출물은 총 5개의 분획물로, 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 부탄올층, 물층에서 추출 확보한 분획추출물임. 표준물질인 코디세핀에 대한 표준 곡선을 그린 후, 함량을 계산함. 반복 수는 3 반복을 수행하여 각각의 분획추출물의 함량 측정 결과, 헥산층은 0.580 ± 0.0000 mg/g, 클로로포름층에서는 검출이 되지 않았으며, 에틸아세테이트층은 268.0 ± 5.38 mg/g, 부탄올층은 667.2 ± 45.28 mg/g, 물층에서는 2.278 ± 0.0365 mg/g으로 확인함.

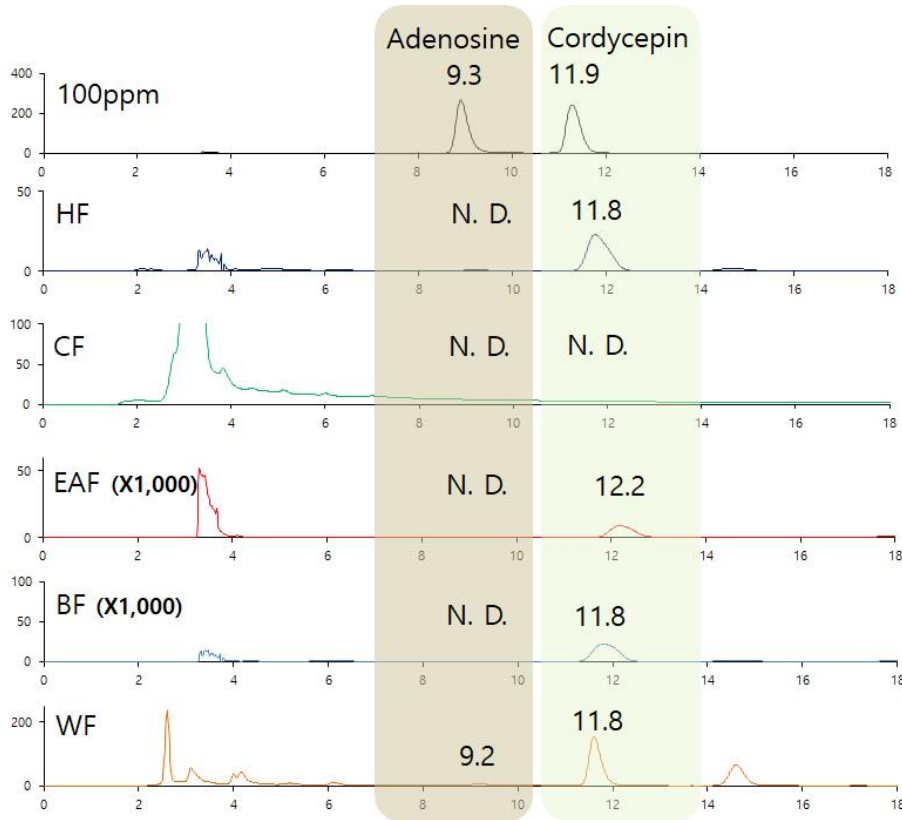


그림 1. 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 지표물질 HPLC 검정

(5) 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 항암 효과 동물실험 및 항피로 대사체 분석

① 시험개요

- 1) 목표 : 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 항암 및 항피로 효과에 대한 동물실험과 조직들에 대한 대사체 분석
- 2) 연구개발의 내용

항암 및 항피로 실험동물 모델을 통해 밀리타리스 동충하초의 분획추출물의 효능 평가와 실험동물 체내 조직의 대사체 프로파일링 분석을 하고자 함

② 실험방법

1) 항 피로 실험동물 모델

6주령 BALB/c Nude 마우스에 Huh-7 (1×10^5) 암세포를 이종 이식한 암세포 연관 피로 모델

2) 항 피로 실험 동물 모델 약물 투여 방법

암세포 이식 후, 종양 부피 평균 $75-100\text{mm}^3$ 이 되었을 때, 대조군(부형제 12.5% Cremophor + 12.5% EtOH in water), 동충하초 에틸아세테이트 분획추출물 50 mg/kg/day, 소라페닙 30 mg/kg/day로 단독 또는 병용하여 19일간 경구 투여

3) 실험동물 간 조직 NMR 대사체 분석

-80°C 초저온 냉동 보관된 간암 조직을 0.2 g 씩 정량하여 전처리 후, 상층액을 $580\ \mu\text{l}$ NMR tube에 담아, $^1\text{H-NMR}$ 분석을 수행함. NMR은 Bruker사의 AVANCE 600.13-MHz, High Resolution NMR Spectrometer (서울대학교 농생명과학대학 공동기기원, NICEM 나이셈)을 이용하여 분석하였음.

분석조건으로 pulse sequence는 CPMG 이고, 스캔 횟수는 64회, 수집시간은 2.73초, 분석 용매로는 D_2O 를 사용하였고, 작동주파수는 600.13 MHz, $^1\text{H-NMR}$, Water-suppress를 수행 후, shimming 작업을 하면서 보정작업을 거친 raw data를 얻음

4) 대사체 프로파일링 및 다변량 통계분석

대사체 프로파일링을 하기 위해 NMR Data processing을 Chenomx NMR suite 8.2(Chenomx, Alberta, Canada)와 MestReNova v.6.0.2를 이용하여 baseline 정리와 검출된 compounds를 assignment 하고 물질의 intensity 값을 얻음

다변량 통계분석을 비롯하여 유의성 검정 및 사후 분석은 web기반의 Metaboanalyst 3.0(www.metaboanalyst.ca/)를 활용하였고, 사후검정으로 IBM SPSS Statistics 22를 활용하여 One way ANOVA, t-test를 분석하여 $p < 0.05$ 기준으로 유의성 검정 수행함

③ 실험결과

1) 실험동물 간 조직 $^1\text{H-NMR}$ 프로파일링 분석 결과

19일간의 약물 및 부형제를 투여한 그룹들의 실험동물들을 부검 후, 확보한 간 조직을 대사체 분석에 앞서 간조직의 대사 과정이 진행되지 않게 하기 위해 -80°C 에 보관함.

간조직을 $^1\text{H-NMR}$ 분석하여 프로파일링 수행한 결과, 42개의 대사체 물질들을 확인하였고, 그 목록은 5개의 sugars (glycocholate, methanol, glucose, glycerol, guanidinoacetate), 6개의 nucleic acids (uracil, uridine, ATP, xanthosine, adenine,

AMP), 11개의 organic acids (3-hydroxybutyrate, lactate, acetate, pyruvate, succinate, citrate, citrulline, isocitrate, malonate, fumarate, formate), 15개의 amino acids (isoleucine, leucine, valine, alanine, arginine, glutamate, glutamine, aspartate, asparagine, tyrosine, taurine, betaine, glycine, phenylalanine, ornitine), and 5개의 other molecules (trimethylamine (TMA), creatinine, creatine, choline, niacinamide 등으로 검출되었음 (그림 1).

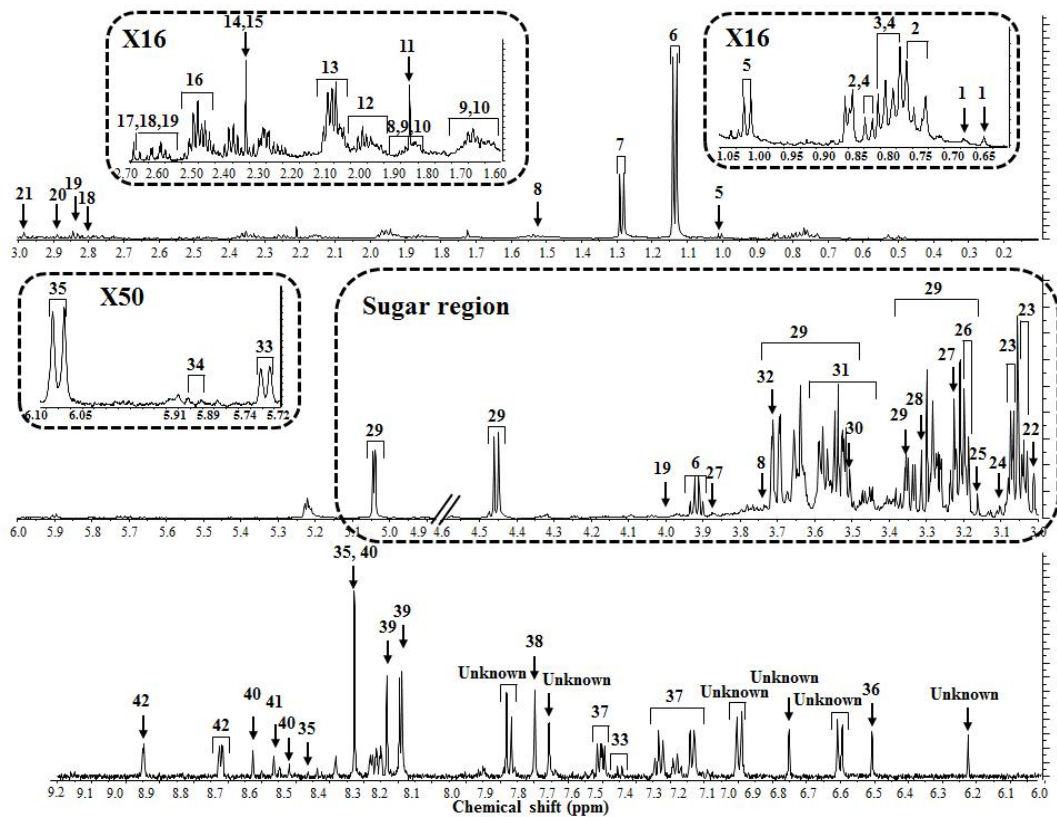


그림 1. 항암 및 항피로 실험동물 모델에서의 간조직 $^1\text{H-NMR}$ 분석

2) 항피로 실험동물 모델의 간 조직에 대한 다변량 통계분석

간 조직에서 검출된 대사체 42개를 활용하여 다변량 통계분석을 통해 피로회복에 연관된 바이오마커를 발굴하고자 함. 특히 데이터의 신뢰성을 높이기 위해 OPLS-DA 분석을 하였고, 실험동물 조직에서 검출된 42개에 의한 패턴 분리가 그룹 간의 차이가 나타나는 것을 확인함 (그림 2).

그림 3 에서 확인할 수 있는 결과는 피로회복 혈액 지표인 LDH 와 GLU를 활용하여 대사체들과의 correlation 분석을 통해 간에서의 피로회복에 따라 변화되는 대사체들을 확인하였고, LDH 변화에 연관된 대사체는 betaine 1개이고, GLU 변화에 연관된 대사체는 adenine, arginine, asparagine, aspartate, phenylalanine, isoleucine,

leucine, xanthosine, valine, isocitrate, creatine, ATP, TMA, lactate, pyruvate, fumarate, betaine 등 17개의 대사체가 연관되어 있음.

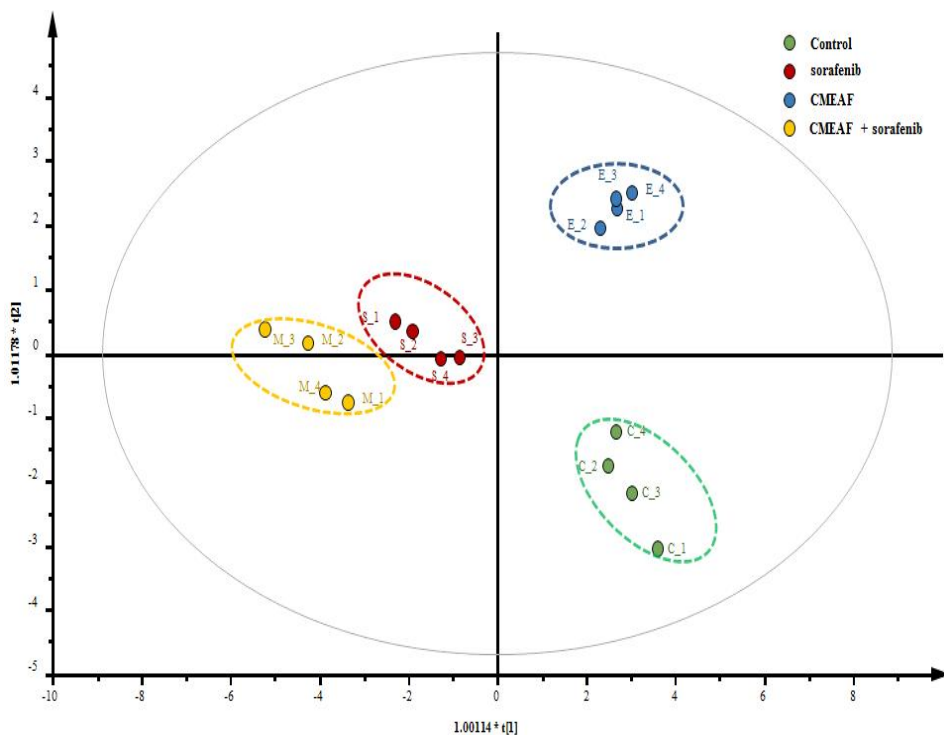


그림 2. 실험동물 모델 그룹 간의 간조직에 대한 OPLS-DA

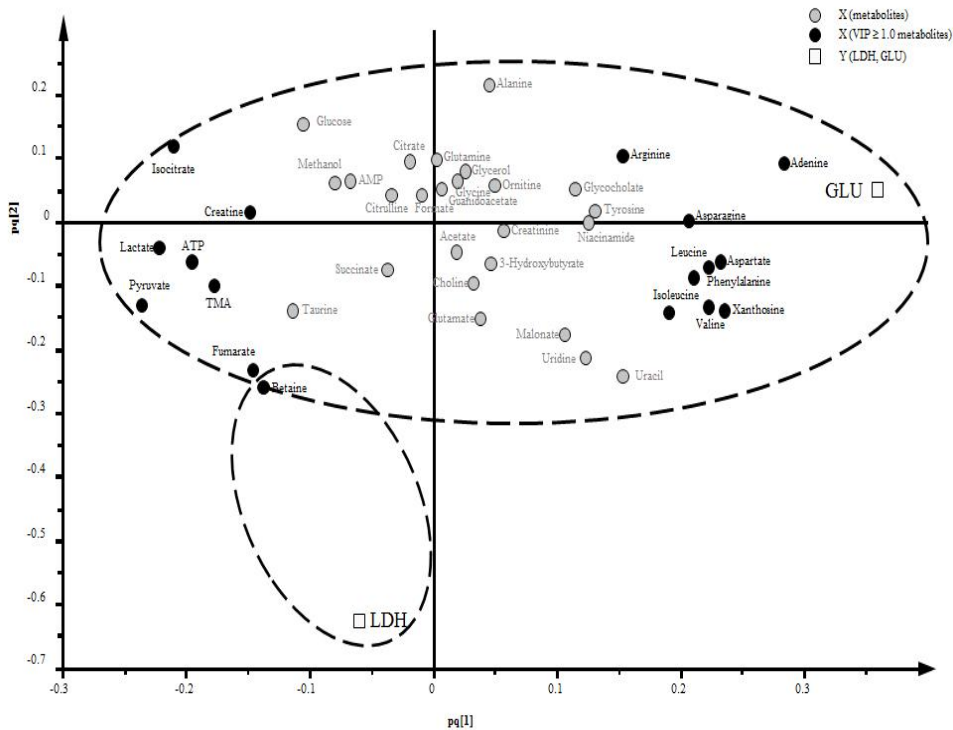


그림 3. 그룹 간의 간조직 대사체와 LDH GLU 마커와의 상관관계 Loading plot

3) 실험동물 간 조직에 대한 Enrichment 분석 결과

피로회복 혈액 지표인 LDH와 GLU가 검출된 대사체의 correlation 분석 결과에서 17개의 GLU 연관 대사체들을 확인하였고, 17개 선별된 대사체를 Enrichment 분석을 수행한 결과, P value 0.005 이상의 관련된 유의적으로 관련된 대사경로는 Glycine and Serine metabolism, Warburg Effect, Citric acid cycle, Ammonia Recycling, Arginin and proline metabolism, Aspartate metabolism, Urea cycle 임. 다수의 대사 경로 중에서 GLU와 연관된 대사체들의 변화는 Urea cycle 활성이 가장 유의적으로 연관된 것으로 확인되었음 (그림 4).

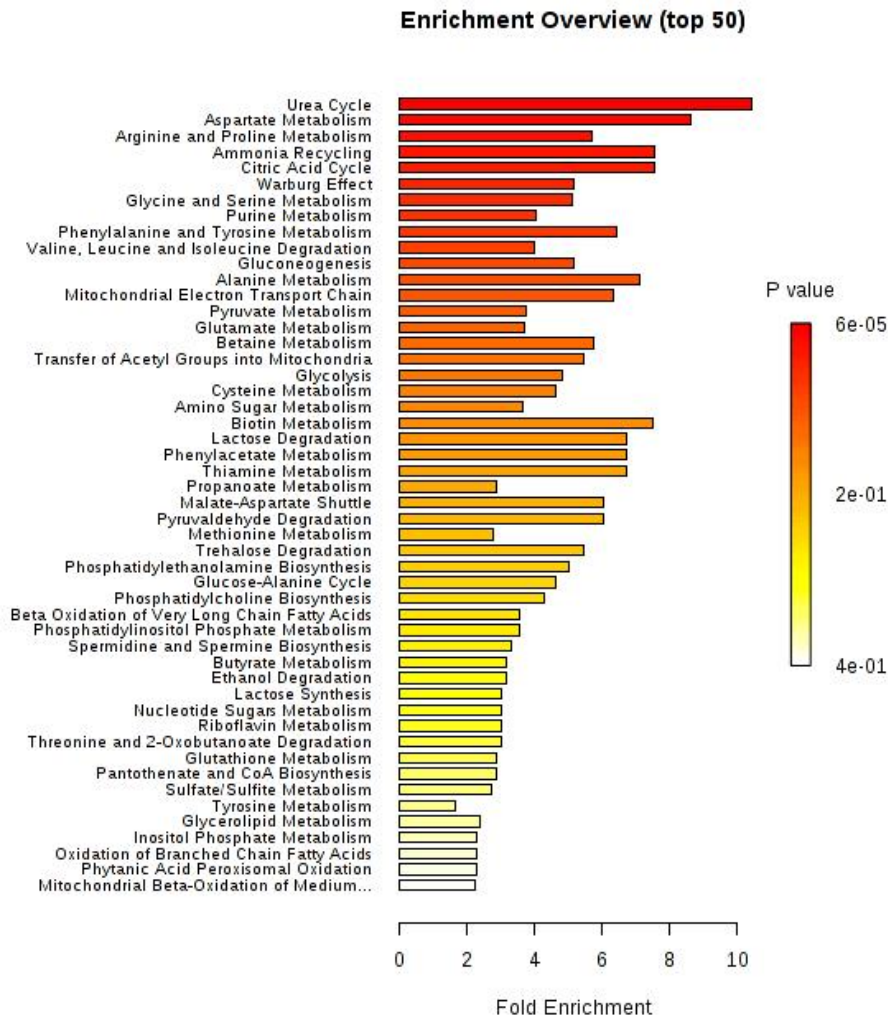


그림 4. 실험동물 모델에서의 GLU 연관 대사체(17)에 대한 Enrichment 분석

(7) 노랑다발 동충하초 추출물의 염증 억제 효능 및 작용기전 연구

① 시험개요

1) 목표 : 노랑다발 동충하초 추출물의 면역 활성 억제 효능 평가 및 기전 규명

2) 연구개발의 내용

운동수행능력에서 화장품소재로 연구목표 변경에 따라 노랑다발동충하초를 아토피 또는 여드름 화장품 소재로 활용하기 위해 다양한 추출용매를 사용하여 노랑다발 동충하초 추출물을 확보하고 LPS에 의해 활성이 유도된 대식세포의 면역 활성 억제 효능을 평가하고 면역 활성 억제 효능 기전을 규명하고자 함.

② 실험방법

1) 노랑다발 동충하초 추출 및 분획

인공 배양된 노랑다발 동충하초(*C. bassiana*) 자실체를 50℃에서 건조한 뒤 블렌더로 분쇄하고 미세분말을 80℃에서 8시간 동안 에탄올로 추출하고, 60℃에서 감압 농축함. 3차 증류수에 현탁하고 n-헥산, n-부탄올 및 에틸아세테이트와 각각 혼합한 뒤 감압 농축하여 분획추출물을 확보함.

2) MTT assay

사람의 비소세포성폐암 세포주 A549(5.0×10^3 cells/well)를 배지에 0-100 µg/ml의 농도의 노랑다발 동충하초의 추출물 또는 분획을 24 시간 배양 후, MTT 분말 3 mg과 PBS 1 ml를 혼합하여 제조한 MTT 용액 50 µl를 각 웰에 첨가하였음. 배양 후 MTT 용액이 포함된 배지를 이소프로판올로 교체하여 염료를 추출하였음. 30분 동안 배양한 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 A549 세포 증식 억제 효능을 확인하였음.

3) 대식세포 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7는 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였음. 대식세포의 면역 활성은 1 µg/ml의 LPS를 사용하였음.

4) NO 농도 측정

RAW 264.7 세포(4×10^6 cells/well)를 1 µg/ml의 LPS로 16시간 면역 활성화를 유도하였음. NO의 산화 생성물인 아질산염을 Griess 시약으로 확인하였음. 배지 100 µl를 제거하고 100 µl Griess 시약을 첨가한 뒤 550 nm에서 흡광도를 측정함.

5) 세포핵 추출

세포를 1.5 ml의 차가운 TBS (pH 7.9)로 모은 뒤 12,000 g에서 30초 동안 원심 분리함. 펠렛을 10 mM HEPES 버퍼로 풀어준 뒤 얼음에 15분 incubation하고 10초 동안 불텍싱하고 12,000 g에서 60초 동안 원심분리함. 상등액을 제거하고, 펠렛을 50-100 µl의 20mM HEPES 버퍼로 풀어준 뒤 4℃에서 15분 동안 흔들면서 배양하고 12,000 g에서 5분 동안 원심분리함. 상등액의 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트로 확인함.

6) Western blotting

노랑다발 동충하초 및 LPS 처리된 대식세포를 차가운 TBS로 두 번 세척하고 Lysis 버퍼를 사용하여 세포를 용해한 뒤, 4℃, 12,000 g에서 20분 동안 원심분리하

여 상등액을 분리함. 8-12% 폴리 아크릴 아미드 SDS 겔을 사용하여 단백질(30-50 μg)을 전기영동한 뒤 PVDF membrane으로 transfer 하였음. membrane을 0.1% Tween-20 및 5% 스킴밀크를 함유하는 TBS로 실온에서 2시간 동안 blocking 한 다음 항체와 함께 incubation 하였음. 화학 발광 방법을 사용하여 면역 복합체를 수행하고 X-ray 필름에 노출해 단백질 밴드를 확인함. 밴드 강도는 'Scion Image' 소프트웨어를 사용하였음.

7) RT-PCR analysis

Total RNA는 Trizol 시약을 사용하여 추출하였음. 1 μg 의 total RNA를 역전사효소와 oligo-DT primer를 사용하여 cDNA로 합성하였음. 합성된 cDNA는 Taq DNA 중합 효소 및 iNOS 및 COX-2 primer로 증폭하였음. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide 염색하여 밴드를 확인하였음.

8) 세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS는 공초점 레이저 주사 현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope)을 사용하여 측정하였음. 0.5% FBS 배지에서 배양한 대식세포를 DCFH-DA로 30분 동안 처리하고 PBS로 두 번 세척함. 대식세포를 LPS로 20분 동안 처리한 뒤 DCFH-DA (5M)를 배양액에 첨가하고 30분 동안 배양하였음. 대식세포를 PBS로 3 회 세척하고 세포 내 ROS를 측정하였음 (excitation: 488 nm, emission 525 nm)

③ 실험 결과

1) 노랑다발 동충하초 분획추출물의 LPS에 의한 대식세포 면역 활성화 억제

대식세포주에 노랑다발 동충하초 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 n-헥산 분획(HF), n-부탄올 분획(BF), 에틸아세테이트 분획(EAF) 및 물 분획(AF)으로 30분 동안 전처리한 뒤 LPS를 처리하였음. CBBF는 다른 용매 분획보다 LPS에 의한 NO 생성을 강력하게 억제함을 확인하였음 (그림 1).

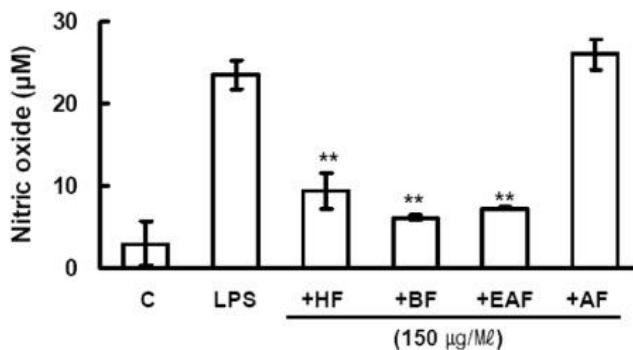


그림 1. LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 노랑다발 동충하초 분획추출물의 NO 생성 억제 효과

노랑다발 동충하초 에탄올 추출물(CBEE)이 LPS로 활성이 유도된 대식세포에서 NO,

iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 그림 2A에서 볼 수 있듯이 CBEE는 용량이 증가함에 따라 NO 생성을 억제하였고, iNOS (그림 2B, C) 및 COX-2 (그림 2B D) 단백질의 발현 또한 CBEE의 용량 증가에 따라 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였음.

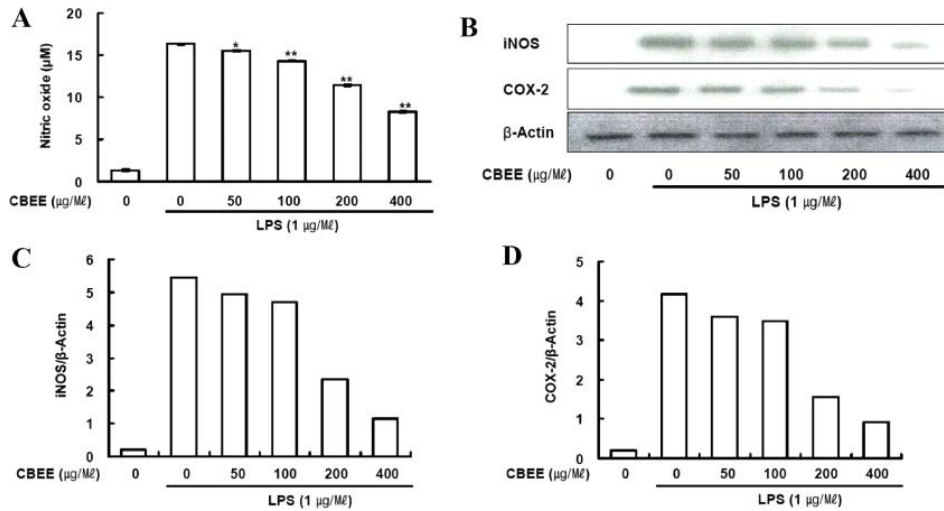


그림 2. 노랑다발 동충하초 에탄올 추출물의 LPS에 의한 대식세포 활성화 억제

2) 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 대식세포 활성화 억제

노랑다발 동충하초 부탄올 추출물(CBBF)의 NO 생성과 iNOS 단백질 및 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하였음. LPS에 의한 대식세포의 NO 생성(그림 3A)과 iNOS mRNA 및 단백질의 발현(그림 3B, C)은 CBBF의 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였음.

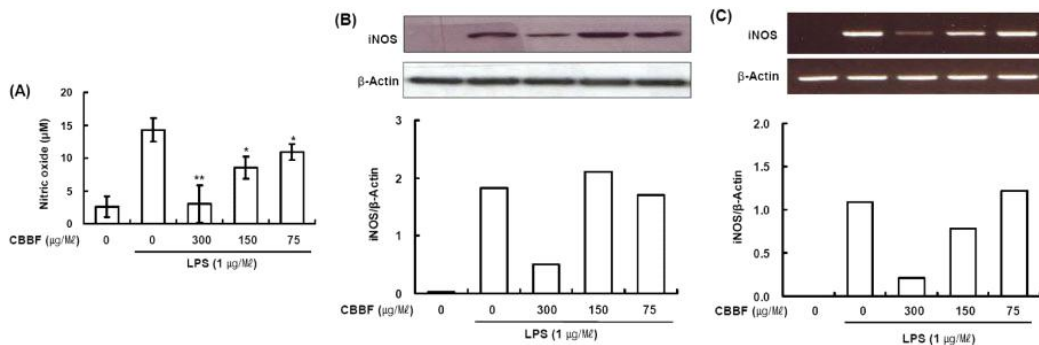


그림 3. 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 LPS에 의한 대식세포 활성화 억제

3) 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 LPS에 의한 IκB-α 인산화 억제 효능

NF-κB는 iNOS, COX-2를 포함하여 염증 반응에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하는 대표적인 전사 인자임. NF-κB/Rel 전사 인자는 IκB 단백질과 결합된 비활성 상태로 세포질에 존재함. NF-κB의 핵 전위는 IκB-α의 인산화, 유비퀴틴화 및 proteolytic 분해로 진행됨. 따라서 IκB-α의 인산화 억제는 NF-κB의 핵 전위 및

NF- κ B에 의해 발현되는 염증 관련 유전자의 발현 억제와 관련이 있음.

노랑다발 동충하초 부탄올 추출물은 용량 의존적으로 LPS에 의한 I κ B- α 인산화를 억제하였음 (그림 4).

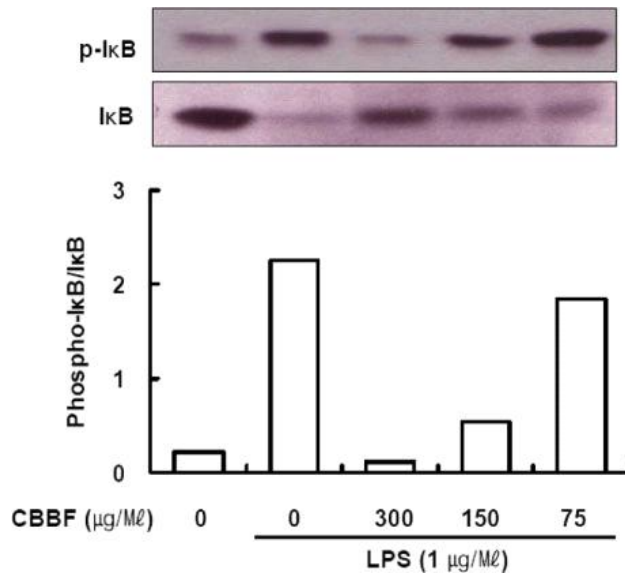


그림 4. 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 I κ B- α 의 인산화 억제

4) 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 Akt 및 MAPKs 신호 전달 억제 효능

iNOS의 발현은 대식세포에서 Akt 및 MAPK를 포함하는 경로에 의해 조절됨. Akt 신호 분자는 IKK 활성화를 통해 NF- κ B 활성화를 조절하는 것으로 알려져 있음. IKK의 활성화는 NF- κ B-inducing kinase, NK- κ B-activating kinase 및 Akt와 같은 다양한 upstream kinases를 통한 인산화에 의해 매개되며, 이는 전 염증 자극에 대한 반응으로 세포 신호에 관여함. CBBF는 LPS에 의한 Akt 인산화를 억제하였으며 (그림 5A), 대식세포에서 염증매개인자 중 하나인 MAPKs 관련 세포 내 신호전달 단백질인 ERK, JNK, p38의 인산화를 확인한 결과 CBBF에 의해 JNK 및 p38의 인산화가 억제됨을 확인하였음 (그림 5B, C).

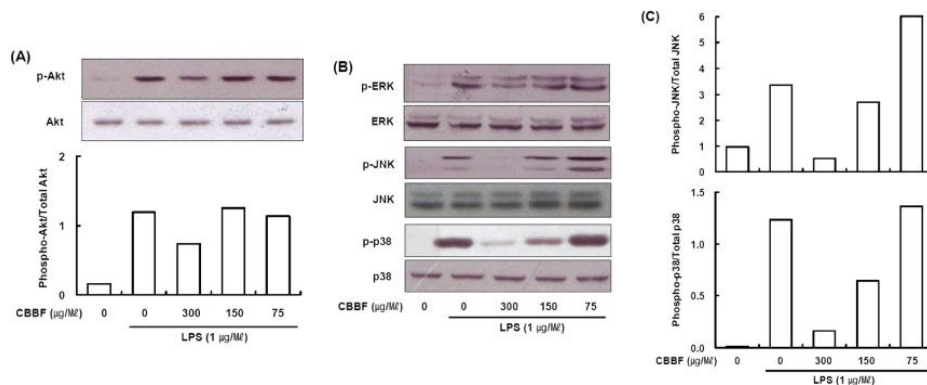


그림 5. 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 Akt, JNK 및 p38 인산화 억제

5) 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 ROS 억제 효능

대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증 반응은 ROS 생성을 시작으로 MAPK 및 NF- κ B의 활성화와 iNOS 단백질 발현 및 NO 생성 유도로 진행됨. LPS로 자극된 대식세포는 미토콘드리아의 막에 결합된 NADPH 산화 효소의 활성화를 통해 ROS를 생성하며, ROS는 NF- κ B 활성화에 중요한 역할을 함. 항산화제는 ROS의 제거 및 생성 억제를 통해 NF- κ B 활성화를 억제함으로써 염증성 유전자 발현 및 NO 생성을 억제함. 대식세포에서 LPS에 의한 ROS 생성이 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물에 의해 억제됨을 확인하였음.

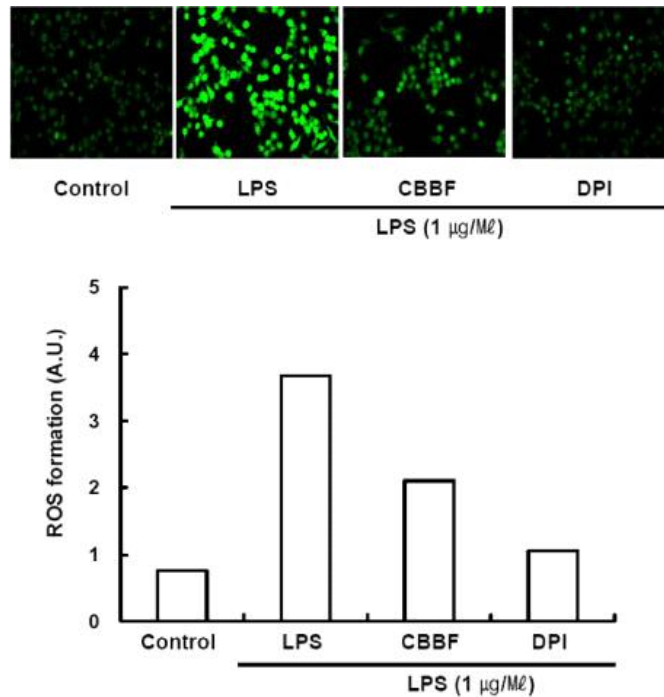


그림 6. 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물의 ROS 생성 억제

(8) 밀리타리스 동충하초 근연종 붉은자루 동충하초의 붉은 색소 분리 및 구조 동정

① 시험개요

1) 목표 : 밀리타리스 동충하초 근연종 붉은자루 동충하초의 지표물질 붉은 색소에 대한 분리 및 구조 동정

2) 연구개발의 내용

붉은자루 동충하초의 붉은 색소의 효능은 선행연구들을 통해 항산화, 항염증, 항암 효과를 보이는 등 생리활성 물질들이 포함되었기 때문에 붉은 색소의 분리와 구조 동정을 통한 지표물질을 발굴하고자 함.

② 실험방법

1) 붉은자루 동충하초 에탄올 추출물의 붉은 색소 분리

붉은자루 동충하초(*C. pruinosa*) 균주를 접종하고 20°C에서 50-60일간 75% 습도 및

지속적인 조명 조건에서 배양하여 자실체를 생산하였고, 수확 후에 50°C에서 열풍 건조함.

건조된 자실체를 Sunbeam 유리 블렌더(Milwaukee, WI)에서 분쇄하고, 붉은자루동충하초의 미세분말을 70°C에서 24시간 동안 에탄올로 추출함.

에탄올 추출물을 60°C의 회전식 증발기(erator)에서 농축을 시키고 동결건조 후 분말 형태로 확보함.

2) 붉은자루 동충하초의 붉은 색소 순수 정제 분리

붉은자루동충하초의 붉은 색소의 HPLC 1차 정제를 하기 위해 각 파장의 흡광값은 Blue = 264 nm, Red = 543 nm, Green = 430 nm, Black = 328 nm임. 컬럼은 Genomenex 사의 Gemini 제품을 사용했으며, 용매는 TFA buffer를 사용.

3) 붉은자루 동충하초 붉은색소의 구조 동정

일반적으로 분자식과 함께 NMR 스펙트럼으로부터 붉은자루동충하초의 붉은색소 물질의 구조를 알아내기 위한 과정으로 mass spectrometer로부터 얻어진 분자식으로부터 물질의 불포화 수(number of unsaturation)를 파악한 후, Proton, Carbon 1D-NMR을 수행하여 양성자수와 탄소수를 파악
특히 화학적 이동값(chemical shift)과 커플링 구조 패턴 등을 활용하여 구조의 요소들을 모아 2D-NMR에서 COSY, HMBC 기법을 활용하여 뒷받침하고 예상되는 물질들을 조합하여 물질구조 식을 파악함.

③ 실험결과

1) 붉은자루 동충하초의 붉은 색소 순수 1차 정제 분리

아래의 그림1에서 31분에 나오는 색소가 핑크색이며, 33분에 나오는 색소가 붉은색, 35분에 나오는 색소가 노랑색을 포함하고 있음. 따라서 이 세 개의 색소 중에서 33분에 나오는 붉은색 색소만을 모아 2차 정제를 수행 붉은자루동충하초의 HPLC를 활용한 붉은색소 2차 정제는 아래 그림 2과 같음.

2) 붉은자루 동충하초의 붉은 색소 순수 2차 정제 분리

붉은자루 동충하초의 HPLC를 활용한 붉은색소 2차 정제는 아래 그림 2과 같음. 각각의 파장의 흡광 값과 분리에 사용한 컬럼과 용매는 1차 정제와 동일하지만, Gradient 작업과 Running time에는 변동을 주어 물질 peak의 분리를 좀 더 용이하게 수행하도록 조절하였음. 33분에 단일 물질 peak을 띄고 있으므로, 다시 그 부분만을 모아 농축하고 순수한 붉은 색소를 다시 얻기 위해서 3차 정제 작업을 수행하였음.

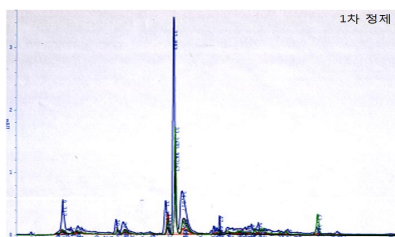


그림 1. 붉은자루동충하초에서 HPLC를 이용한 색소의 1차 정제

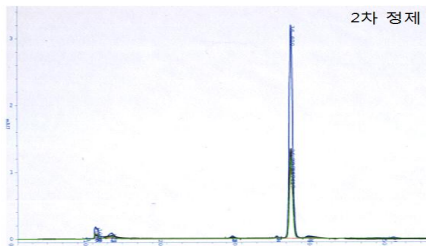


그림 2. 붉은자루동충하초에서 HPLC를 이용한 붉은색소의 2차 정제

3) 붉은자루 동충하초의 붉은 색소 순수 3차 정제 분리

붉은자루 동충하초의 붉은색소의 HPLC 3차 정제 과정은 아래의 그림 3과 같음. 각각의 파장의 흡광값은 Blue = 264 nm, Red = 543 nm, Green = 430 nm, Black = 328 nm 임.

컬럼의 경우 1,2차 정제와는 다른 Thermo 사의 50DS Hypersil 제품을 사용하였으며, 용매의 조성은 Phosphate buffer를 사용하였음.

3차 정제 과정에서 16분에 1번 peak, 19분에 2번 peak 두 가지로 분리가 되는 것을 확인할 수가 있었으며, 16분 peak을 모아 농축을 하였고, 추후 NMR 분석에 시료를 활용함.

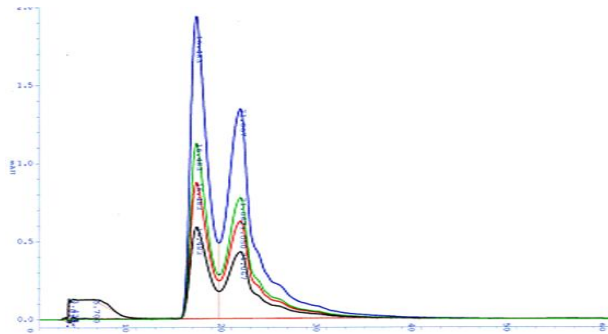


그림 3. 붉은자루동충하초에서 HPLC를 이용한 붉은색소의 3차 정제

4) 붉은자루 동충하초의 붉은 색소 BDH1 분리 및 구조 동정

붉은자루 동충하초의 붉은색소를 구성하는 BDH1의 구조를 핵자기 공명 분광법 (NMR spectroscopy)을 통해 규명하고자 하였음. NMR은 분석하려는 시료의 원자핵에 자기장이 가해지면 스핀 각운동량에 따라 에너지가 갈라지고, 이러한 에너지의 차이를 이용하여 화합물을 분석하는 방법임. $^1\text{H-NMR}$ 양성자 스펙트럼의 각 피크 아랫부분의 적분 값(면적)은 그 피크를 나타내는 수소의 개수에 비례하기 때문에 피크의 면적비로부터 각 유형의 수소 개수비를 확인할 수 있음. 또한 외부 자기장의 세기에 따라 핵의 공명 진동수도 달라지는데, 이는 화학적 이동 값(chemical shift)을 결정함. 외부 자기장 하에서 수소 핵의 원자가전자는 회전하여 외부 자기장과 반대 방향의 자기장을 형성하게 되는데, 이러한 효과를 반자기성 가리움이라고 함. 알

려진 물질 중에 가리움이 가장 큰 물질인 TMS (tetramethylsilane)를 기준으로 원자핵의 전자가 가리움이 덜할수록 화학적 이동이 커져 스펙트럼의 왼쪽에 나타나게 됨. $^1\text{H-NMR}$ 양성자 스펙트럼과 유사하게 $^{13}\text{C-NMR}$ 탄소 스펙트럼은 유기분자 내의 탄소원자를 식별할 수 있음. DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 기법은 탄소 원자에 결합 되어 있는 수소의 개수를 결정하는 데 사용되는 가장 중요한 방법으로 탄소 시그널의 위상은 펄스 순서에 프로그램으로 짜여진 지연(delay)의 지속 시간에 따라 달라짐. 45° DEPT 측정으로 수소가 결합 되어 있는 탄소만의 피크를 얻고, 약간의 다른 지연시간으로 90° DEPT 측정을 통해서 CH 그룹의 탄소 원자들에 대한 피크를 확인하고, 더 긴 지연시간으로 135° DEPT 스펙트럼을 확보함. DEPT NMR에서 표시되지 않은 탄소는 수소가 하나도 붙어있지 않은 탄소이며, 135° DEPT에서는 CH/CH₃는 up(+), CH₂는 down(-) 피크로 표시됨. 90° DEPT: CH만 up 피크로 표시되며, 45° DEPT: all protonated 탄소(수소가 붙어있는 모든 탄소)가 up 피크로 표시됨.

그림 4는 BDH1의 $^1\text{H-NMR}$ 양성자 스펙트럼 결과이고, 그림 5는 $^{13}\text{C-NMR}$ 탄소 스펙트럼 결과임. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 분석하여 양성자들의 상대적인 수를 확인하고 화학적 이동값과 커플링 패턴을 분석하여 각 양성자가 어떤 화학적 구조에 결합 되어 있는 양성자인지를 확인하였음. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼과 DEPT 스펙트럼을 분석하여 탄소의 수 및 몇 개의 수소와 결합 되어 있는 탄소인지를 확인하였음. 분석 결과와 기존의 문헌들을 바탕으로 최종적으로 동정 된 구조는 아래의 그림 6, 7 과 같음.

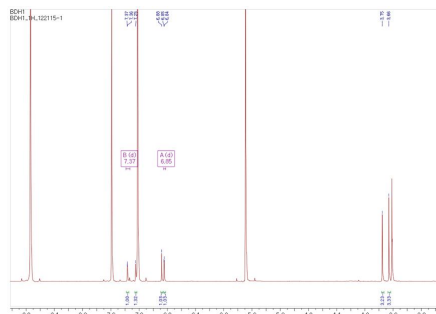


그림 4. 붉은자루 동충하초의 BDH1 붉은 색소의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼

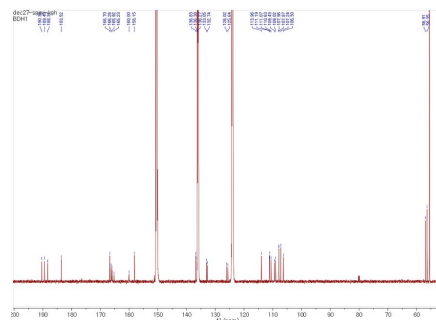
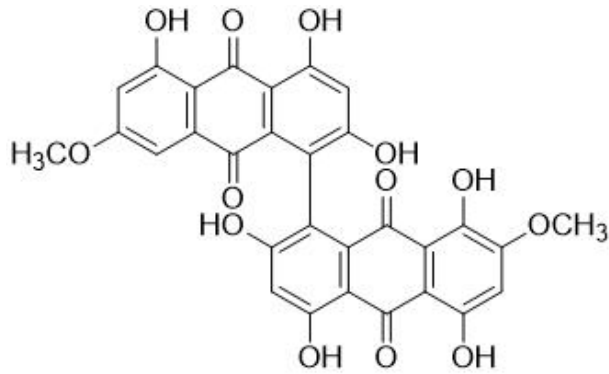


그림 5. 붉은자루 동충하초의 BDH1 붉은 색소의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼

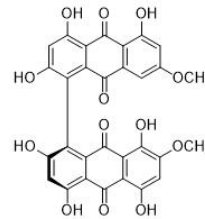
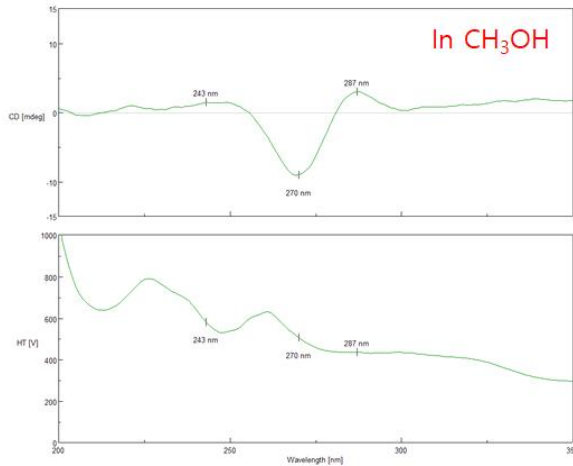


BDH1

Chemical Formula: C₃₀H₁₈O₁₃

Exact Mass: 586.0747

그림 6. 붉은자루 동충하초의 BDH1 붉은 색소의 구조



BDH1

Abs. Stereo was assigned for the first time

(M)-compound

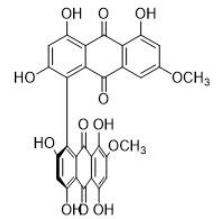


그림 7. 붉은자루 동충하초의 BDH1 absolute configuration 규명

(9) 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 항혈전 및 항혈소판 응집 억제 기전을 통한 혈행 개선 효능 평가

① 시험개요

1) 목표 : 동맥 혈전증 동물 모델에서 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 혈행 개선 효능을 평가하고 관련 기전을 규명하고자 함.

2) 연구개발의 내용

FeCl₃로 유도된 동맥 혈전증 동물 모델에서 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 항혈전, 항응고 및 항혈소판 활성 평가를 기반으로 혈행 개선 효능을 평가하고자 함.

② 실험방법

1) FeCl₃로 유도된 동맥 혈전증 동물 모델에서의 항혈전 활성 시험

밀리타리스 동충하초 분획추출물 마지막 경구 투여 45분 후에 Isoflurane로 흡입마취하고 목을 절개하여 경동맥을 노출시킨 뒤, 밀리타리스 동충하초의 분획추출물 투여 60분 후에 70% FeCl₃를 적신 2 mm²의 Whatman No.1 filter paper를 경동맥에 올려놓고 혈류측정기(Omegawave, Tokyo, Japan)를 이용하여 혈류를 측정하였음. 10분 후 Whatman filter paper를 제거하고 30분 동안(총 40분) 혈류량을 기록하였음. 처음 혈류량의 10%가 되었을 때를 경동맥 폐색이 일어난 것으로 판단함.

2) 동맥 혈전증 동물 모델 약물 투여 방법

밀리타리스 동충하초 분획추출물 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg 3개 투여군과 양성대조군으로 은행잎추출물 100 mg/kg을 사용하였음. 각 군당 8마리씩 구성하여 투여시 체중을 측정하고 10 ml/kg으로 환산하여, 매 1회, 21일간 경구투여함.

3) 혈액 채취 - PRP 및 PPP 분리

밀리타리스 동충하초 분획추출물 마지막 경구투여 1시간 후에 시험동물의 복대정맥에서 혈액 9 ml를 채취하고 항응고제 3.8% Sodium citrate 1 ml 처리함. 950 rpm에서 10분간 원심분리하여 platelet rich plasma (PRP)를 분리한 뒤, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 분리함. PRP는 혈구계수기 (MELET SCHLOESING Laboratories, Osny, France)를 이용하여 혈소판의 수를 계수하고 PPP로 3.8 x 10⁸ platelets/ml 로 희석하였음.

4) 혈소판 응집률 측정

혈소판 응집은 Chrono-Log aggregometer (Chrono-Log, Havertown, USA)를 사용하여 측정하였음. 정량된 혈소판을 cuvette에 넣고 37°C에서 10분간 incubation한 후 1,200 rpm으로 교반하면서 baseline이 안정화되면 혈소판 응집촉진물질인 adenosine diphosphate (ADP)와 Collagen을 넣고 반응하여 15분간 응집률을 측정함.

5) 혈액 응고 측정

혈액응고에 대한 효과를 평가하고자 prothrombin time (PT)과 plasma-activated partial thromboplastin time (aPTT)을 자동 혈액 응고 분석기 ACL100 (Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)로 측정하였음. PPP를 37°C에서 7분간 incubation 하여 50 µl PPP와 PT reagent (RecombiPlasTin 2G, Instrumentation Laboratory) 100 µl를 섞어 응고까지의 시간을 측정함. aPTT는 PPP와 시료를 섞어 37°C에서 7분간 incubation한 후 50 µl를 따서 aPTT reagent (SynthASil, Instrumentation Laboratory) 53 µl를 첨가한 후 CaCl₂ 50 µl를 넣어 응고까지의 시간을 측정하였음.

③ 실험 결과

1) 시험 기간 중 체중

시험 기간 중 용매대조군(CM 0)과 밀리타리스 동충하초의 분획추출물(CM 30, CM 100, CM 300) 및 은행잎추출물(Ginkgo 100)을 투여한 시험 동물의 체중은 차이를

보이지 않았음 (그림 1)

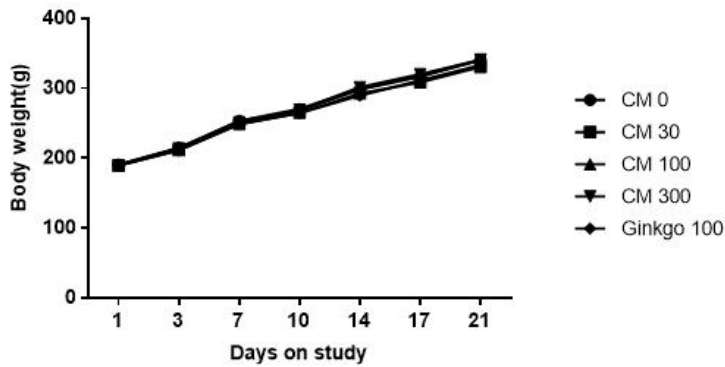


그림 1. FeCl₃ 유도 경동맥 혈전증 SD rat 동물 모델에서의 체중 변화 (n = 8)

2) 항혈전 활성 시험

밀리타리스 동충하초 분획추출물을 시험 동물에 21일간 경구 투여 후 경동맥에 70% FeCl₃를 10분간 처리하여 인위적으로 혈전을 유발하고 시험물질이 혈류의 흐름에 미치는 영향을 40분 동안 측정하였음. 혈관 폐색이 일어나는 기준은 FeCl₃를 처리하기 전 혈류량을 기준으로 10% 이하가 되는 시간을 기준으로 하였음. 용매대조군(0)의 혈관 폐색이 일어나는 시간은 17.0 ± 6.2 min이었고 밀리타리스 동충하초의 분획추출물 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg 투여군에서는 각각 32.2 ± 11.1 min, 34.8 ± 9.0 min, 37.7 ± 4.5 min으로 혈관 폐색 시간이 지연되었으며 통계적인 유의성을 보였음. 또한 양성대조군인 은행나무추출물은 39.6 ± 1.1 min으로 통계적 유의성을 보였음 (그림 2, 그림 3)

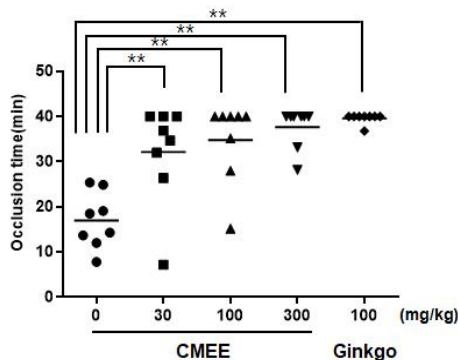


그림 2. FeCl₃ 유도 경동맥 혈전증 SD rat 동물 모델에서 밀리타리스 동충하초의 분획추출물의 항혈전 효능 (***p* < 0.01)

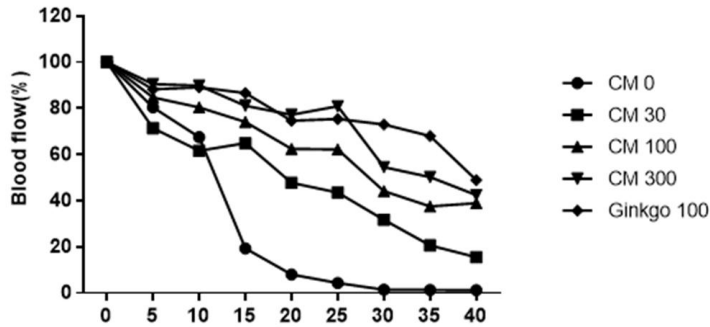


그림 3. FeCl₃ 유도 경동맥 혈전증 SD rat 동물 모델에서 혈전 유발 후 시간에 따른 경동맥 혈류량

3) 혈소판 응집 억제 시험

밀리타리스 동충하초 분획추출물을 시험 동물에 21일간 경구 투여 후 채취한 혈액에서 혈소판을 분리하여 agonist인 ADP와 collagen으로 반응하여 혈소판 응집률을 aggregometer로 측정하였음. 용매대조군의 ADP에 대한 응집률은 $53.4 \pm 1.8\%$ 이고 밀리타리스 동충하초 분획추출물 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg 투여군의 응집률은 $50.4 \pm 2.7\%$, $45.6 \pm 3.6\%$, $44.9 \pm 2.2\%$ 로 100 mg/kg 투여군과 300 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였음 (그림 4A).

용매대조군의 collagen에 대한 응집률은 $55.0 \pm 5.2\%$ 이고 밀리타리스 동충하초 분획추출물 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg 투여군의 응집률은 각각 $49.5 \pm 7.3\%$, $48.8 \pm 1.7\%$, $44.5 \pm 5.2\%$ 로 300 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였음. 양성대조군 은행잎추출물의 ADP와 Collagen에 대한 응집률은 각각 $47.5 \pm 2.0\%$, $46.9 \pm 7.7\%$ 로 통계적으로 유의성을 보였음 (그림 4B).

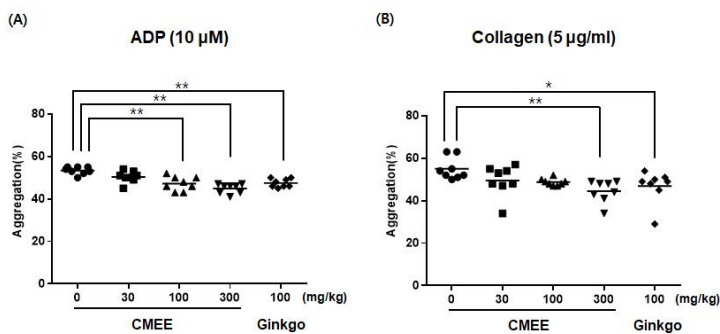


그림 4. 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 혈소판 응집 억제 효능

4) 혈액응고 억제 시험

밀리타리스 동충하초 분획추출물을 시험 동물에 21일간 경구 투여 후 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 prothrombin time (PT)과 activated partial thromboplastin time (aPTT)를 측정하여 밀리타리스 동충하초 분획추출물이 혈액 응고에 미치는

영향을 평가하였음. 용매대조군의 PT는 9.1 ± 0.5 sec이고 밀리타리스 동충하초 분획추출물 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg 투여군의 PT값은 각각 9.4 ± 0.6 sec, 9.4 ± 0.5 sec, 9.6 ± 0.7 sec로 통계적 유의성이 없었음. aPTT의 용매대조군의 값이 33.1 ± 3.1 sec 밀리타리스 동충하초 분획추출물 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg 투여군의 aPTT 값은 각각 33.2 ± 3.4 sec, 34.6 ± 2.1 sec, 35.6 ± 2.6 sec로 용매대조군 보다 높았으나 통계적 유의성은 보이지 않았음 (그림 5). 양성대조군 은행잎추출물의 PT와 aPTT의 값은 각각 9.4 ± 0.5 sec, 35.1 ± 1.9 sec로 용매대조군보다 높았으나 통계적 유의성은 없었음.

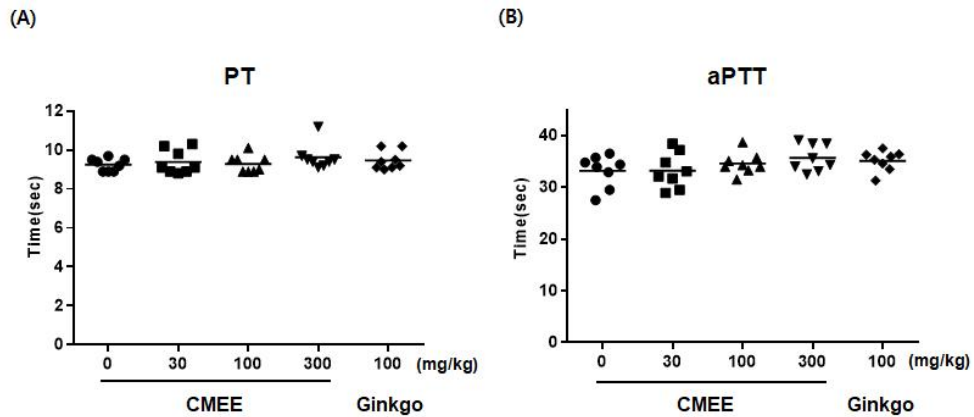


그림 5. 밀리타리스 동충하초 분획추출물의 혈액 응고 억제 효능

2-4. 3협동 ㈜머쉬텍

가. 동충하초의 브랜드 전략 확립 및 마케팅 이미지 구축을 위한 마케팅 조사 및 인문학적 스토리텔링

(1) 동충하초 관련 소비자 인식조사

① 조사개요

- 1) 목표 : 동충하초는 피부미용, 면역력 강화, 항암 효과 등 여러 순기능을 포함한 약용 버섯으로 동충하초의 브랜드 전략 확립을 위해서는 동충하초에 대한 인식 및 효능조사가 선행되어야 하기 때문에 국내 거주 국민들의 인식조사를 실시하고, 조사결과를 토대로 마케팅 방향성을 설정하려고 함

2) 연구개발의 내용

대한민국 국적의 성인 남녀 100명을 대상으로 하고 구조화된 설문지를 통해 온라인 설문조사를 실시함

② 조사방법

- 1) 동충하초에 대한 인식, 동충하초 관련 제품 구매경험, 동충하초 활용 제품 개발의 적합성 등을 조사함 (표 1과 같이 조사함)

* 조사 문항 설계

- (기본조사) 동충하초 인지, 동충하초 정보 획득방법 등 조사
- (효능조사) 동충하초 효능 조사
- (동충하초 관련 제품) 구매경험, 적합성, 구매의향 등 조사

* 응답자 특성

- 전체 100명(남:51명, 여:49명)
- 10대 1명, 20대 25명, 30대 26명, 40대 38명, 50대 5명, 60대 이상 5명

구분	조사 대상
대상	국내 성인 남녀
표본	100명
방안	구조화된 설문지를 통한 온라인 조사(붙임1. 설문지)

표 1. 조사 대상 및 방안

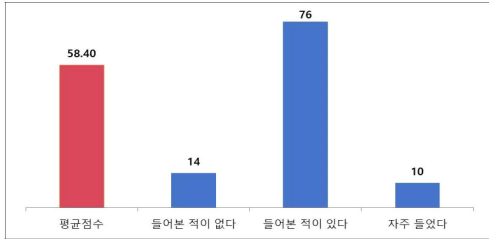
③ 조사결과

1) 동충하초 단어 접촉 경험

- * 전체 응답자 중 76%는 '동충하초'라는 단어를 들어본 경험이 있는 것으로 조사됨
- * 응답자 중 14%는 들어본 적이 없는 것으로 나타났으며, 10%는 자주 들었다고 응답함

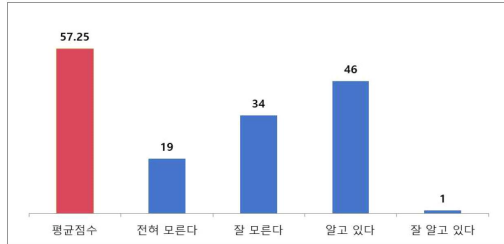
2) 동충하초 인지 여부

- * 전체 응답자 중 19%는 동충하초에 대해서 전혀 모르는 것으로 조사됨
- * '잘 알고 있다'고 응답한 인원은 1명 이었으며, '잘 모른다' 또는 '알고 있다'에 응답한 인원은 각각 34명, 46명 인 것으로 나타남



구분	들어본 적이 없다	들어본 적이 있다	자주 들었다	평균	
전체	14	76	10	58.40	
성별	남성	3	42	6	62.35
	여성	11	34	4	54.29
연령대	10대	0	1	0	60.00
	20대	5	17	3	56.80
	30대	4	21	1	55.38
	40대	1	32	5	64.21
	50대	1	3	1	60.00
	60대 이상	3	2	0	36.00

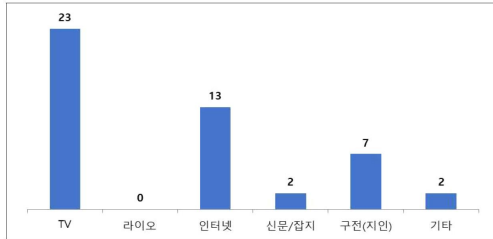
* 10~30대 연령대의 평균점수가 전체 평균보다 낮은 것으로 조사됨



구분	전혀 모른다	잘 모른다	알고 있다	잘 알고 있다	평균	
전체	19	34	46	1	57.25	
성별	남성	6	18	26	1	60.78
	여성	13	16	20	0	53.57
연령대	10대	0	1	0	0	50.00
	20대	6	10	9	0	53.00
	30대	6	9	11	0	54.81
	40대	4	13	20	1	61.84
	50대	1	0	4	0	65.00
	60대 이상	2	1	2	0	50.00

3) 동충하초 정보 습득 방법

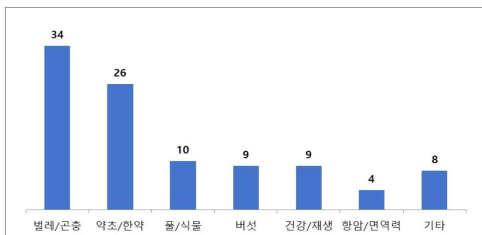
- * 동충하초에 대해서 '잘 알고 있다' 이상에 응답한 47명 중 23명이 TV를 통해서 동충하초 관련 정보를 습득한 것으로 조사됨
- * 인터넷이나 구전(지인)으로 정보를 습득한 인원은 각각 13명, 7명으로 조사됨
- * 40대에서는 TV, 20대에서는 인터넷을 통한 정보습득 비율이 가장 높은 것으로 나타남



구분	TV	라디오	인터넷	신문/잡지	구전(지인)	기타	
전체	23	0	13	2	7	2	
성별	남성	13	0	9	0	5	0
	여성	10	0	4	2	2	2
연령대	10대	0	0	0	0	0	0
	20대	3	0	5	0	0	1
	30대	4	0	3	1	2	1
	40대	11	0	5	1	4	0
	50대	3	0	0	0	1	0
	60대 이상	2	0	0	0	0	0

4) 동충하초 연상시 가장 먼저 생각나는 단어

- * 동충하초를 떠올릴 경우, 벌레나 곤충이 연상(34%)된다고 응답한 비율이 가장 높은 것으로 조사됨
- * '약초/약재'라고 응답한 비율은 26%, 풀/식물(10%), 버섯(9%), 장수/건강/재생(9%), 향암/정력/면역력강화(4%) 순인 것으로 나타남



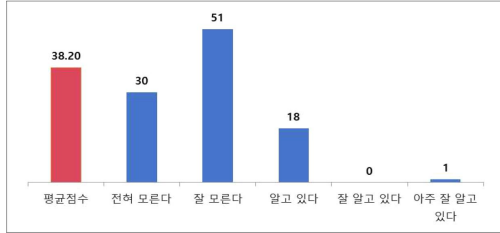
구분	벌레/곤충/애벌레	약초/약재/한약/보약	풀/식물	버섯	장수/건강/재생	향암/정력/면역력 강화	기타	
전체	34	26	10	9	9	4	8	
성별	남성	21	10	4	3	6	2	5
	여성	13	16	6	6	3	2	3
연령대	10대	1	0	0	0	0	0	0
	20대	7	7	6	1	1	0	3
	30대	10	6	3	3	2	0	2
	40대	12	10	1	5	5	2	3
	50대	1	2	0	0	1	1	0
	60대 이상	3	1	0	0	0	1	0

5) 동충하초 효능 인지

- * 동충하초의 효능에 대해서 '전혀 모른다' 또는 '잘 모른다'라고 응답한 비율이 81%

인 것으로 조사됨

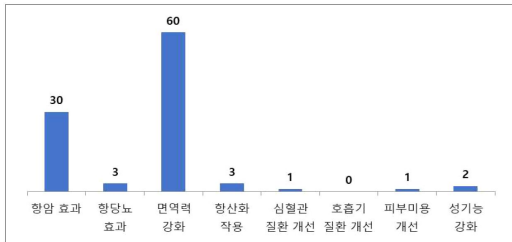
- * 10대(20점), 20대(34.4점), 30대(36.15점)의 인지 비율이 전체 평균(38.2점) 보다 낮은 것으로 나타남
- * 50대(48점)의 인지 비율이 전 연령대 중 가장 높은 것으로 나타남



구분	응답수	전혀 모른다	잘 모른다	알고 있다	잘 알고 있다	아주 잘 알고 있다	평균
전체	30	51	18	0	0	1	38.20
성별	남성	12	32	6	0	1	38.82
	여성	18	19	12	0	0	37.55
연령대	10대	1	0	0	0	0	20.00
	20대	9	14	2	0	0	34.40
	30대	10	11	5	0	0	36.15
	40대	7	24	6	0	1	41.05
	50대	1	1	3	0	0	48.00
	60대 이상	2	1	2	0	0	40.00

6) 동충하초 연상시 가장 먼저 떠오르는 효능

- * 응답자의 60%는 면역력 강화를 동충하초의 주된 효능으로 인식하고 있었음
- * 항암 효과가 주된 효능이라고 응답한 비율은 30% 였으며, 항당뇨 효과(3%), 항산화 작용(3%), 성기능 강화(2%) 순으로 조사됨
- * 심혈관 질환 및 피부미용 개선에 좋다고 응답한 비율은 각각 1%



구분	항암 효과	항당뇨 효과	면역력 강화	항산화 작용	심혈관 질환 개선	호흡기 질환 개선	피부미용 개선	성기능 강화
전체	30	3	60	3	1	0	1	2
성별	남성	11	2	34	1	1	0	0
	여성	19	1	26	2	0	1	0
연령대	10대	0	0	1	0	0	0	0
	20대	6	0	17	0	1	0	1
	30대	9	0	16	1	0	0	0
	40대	8	2	24	2	0	0	1
	50대	3	1	1	0	0	0	0
	60대 이상	4	0	1	0	0	0	0

7) 동충하초 관련 제품 구매 경험

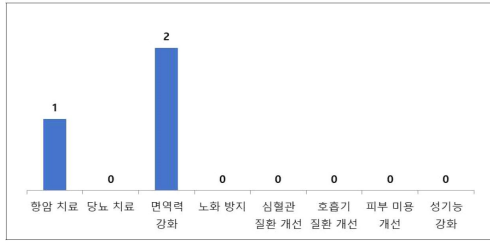
- * 전체 응답자 중 3% 만이 동충하초 관련 제품의 구매 경험이 있는 것으로 조사됨
- * 남성 중 2명, 여성 중 1명이 구매한 경험이 있다고 응답함
- * 40대 2명, 50대 1명이 동충하초 관련 제품 구매 경험이 있다고 응답



구분	있다	없다
전체	3	97
성별	남성	2
	여성	1
연령대	10대	0
	20대	0
	30대	0
	40대	2
	50대	1
	60대 이상	0

8) 동충하초 관련 제품 구매 목적

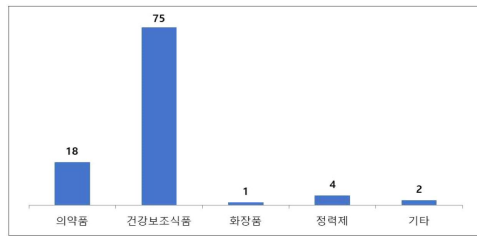
- * 구매 목적을 묻는 질문에 전체 응답자 중 66.6%인 2명이 면역력 강화를 위해서 구매했다고 응답함
- * 40대 중 2명은 면역력 강화를 위해, 50대 중 1명은 항암 치료를 위해서 동충하초 관련 제품을 구매한 것으로 조사됨



구분	항암 치료	당뇨 치료	면역력 강화	노화 방지	심혈관 질환 개선	호흡기 질환 개선	피부 미용 개선	성기능 강화
전체	응답수	1	0	2	0	0	0	0
성별	남성	1	0	1	0	0	0	0
	여성	0	0	1	0	0	0	0
연령대	10대	0	0	0	0	0	0	0
	20대	0	0	0	0	0	0	0
	30대	0	0	0	0	0	0	0
	40대	0	0	2	0	0	0	0
	50대	1	0	0	0	0	0	0
	60대 이상	0	0	0	0	0	0	0

9) 동충하초 관련 제품 적합도

- * 동충하초를 이용한 제품이 개발될 경우, 가장 적합한 항목을 묻는 질문에 응답자의 75%가 '건강보조식품'이라고 응답함
- * 남성과 여성 각각 9명씩 총 18명이 의약품을 꼽았으며, 남성 중 4명이 정력제라고 응답함
- * 30대 여성 중 1명이 화장품을 적합한 제품이라고 응답함



구분	의약품	건강보조식품	화장품	정력제	기타	
전체	응답수	18	75	1	4	2
성별	남성	9	37	0	4	1
	여성	9	38	1	0	1
연령대	10대	0	0	0	1	0
	20대	8	14	0	2	1
	30대	3	21	1	0	1
	40대	3	34	0	1	0
	50대	0	5	0	0	0
	60대 이상	4	1	0	0	0

10) 동충하초 관련 제품 구입 의사

- * 동충하초 관련 제품의 구입 의사를 묻는 질문에 전체 응답자중 62%가 '구입 의사가 없다'고 응답함
- * 남성 중 17명, 여성 중 21명이 '구입 의사가 있다'고 응답
- * 30~40대의 구매 가능성이 다른 연령대 보다 높은 것으로 조사됨



구분	있다	없다	
전체	응답수	38	62
성별	남성	17	34
	여성	21	28
연령대	10대	0	1
	20대	6	19
	30대	10	16
	40대	14	24
	50대	4	1
	60대 이상	4	1

11) 시사점

- * 동충하초 인지 수준 및 효능 인식이 낮은 수준이므로, 인식 개선을 위한 전략 수립 및 시행이 필요함.
- * 조사 대상 중, 동충하초에 대해 인지하고 있는 수준과 동충하초의 효능에 대해서 인식하고 있는 수준 모두 매우 낮았는데, 제품 판매 확대를 논하기 전에 인식수준 개선을 위한 조치가 선행되어야 함.
- * 인식수준이 낮으므로, 동충하초 관련 제품의 구매 가능성 역시 매우 낮은 결과가 나타남

- * 동충하초와 연관성이 가장 높은 항목은 면역력 강화이었고, 이것은 건강보조식품 구매와 연결될 가능성이 높으며, 마스크팩 판매를 위해서는 피부미용과의 연관성을 확대하기 위한 전략적 접근이 필요함.
- * 또한, 실제적인 구매로 연결될 가능성도 매우 낮은 것으로 나타났는데, 구매 유도 및 인식 개선을 위한 여러 이벤트 개최 등 구매자의 이목을 집중할 수 있는 전략 마련이 필요함.
- * 동충하초 마케팅 전략 수립 시, 동충하초에 대한 인식 개선을 위한 인문학적 스토리텔링 선행적인 조치와 단계별 전략 마련, 타겟 선정을 통한 집중적인 마케팅 시행이 필요함.
- * 동충하초의 효능과 마케팅 전략 수립의 매칭 포인트 선별 후, 집중적인 마케팅 시행이 필요함.

12) 동충하초의 인문학적 스토리텔링

- * 오늘날 생물체는 동물계, 식물계, 균계, 원생동물계, 세균계로 나누어지는데, 동충하초는 균계에 속하며, 겨울에는 곤충의 몸 안에 있다가 여름에는 풀처럼 나타난다는 데서 그 이름이 유래하였다. 동충하초균은 곤충의 호흡기, 소화기, 관절 등에 침투하여 곤충을 죽게 한 다음 그 기주(寄主)의 양분을 이용하여 자실체를 형성하는 버섯의 일종이다. 동물성인 기주와 식물성인 자실체로 이루어진 동충하초는 일반적으로 동양의 음양사상을 표상한다하여 인삼, 녹용과 함께 3대 불로장생의 한방 약재로 쓰이기도 하고, 자연 생태계 내에서 곤충 개체군의 밀도 조절과 관련된 특성 때문에 천연 생물 제충제로도 활용되는 등 예로부터 인류에게 유용한 것으로 알려져 있다.
- * 동충하초의 독특한 형태론적 특성에 주목, 이를 감각적 기호(기호학적 체계가 아닌, 징후, 징조를 의미하는 들뢰즈의 프루스트적 사유체계를 의미)로써 본질에 대한 순수사유의 근거로 삼았다. 이어 동충하초의 생태학적 특성과 진화론적 개념에 대한 이론적 접근을 시도함으로써 감성과 지성의 융합을 꾀하고자 하였다. 곤충이자 식물의 복합적 형상을 품고 있는 동충하초는 처음에는 다소 충격적인 인상으로 다가왔다. 이 신비한 생물체는 생과 사, 윤회사상과 자연의 순환법칙 등 많은 사유를 자극하였고, 특히 죽음과 재생이라는 존재론적 고민과 맞닥뜨리게 하였다. 하나의 생명체가 다른 생명체를 기주로 삼아 새 생명으로 재생하기 위해서는 필연적으로 파괴가 수반되고, 이는 모든 생명활동의 근본이치다. 나는 특히, 동충하초의 융합적인 형상이 지닌 모호한 경계로부터 삶과 죽음, 현실과 가상, 선과 악, 미와 추 등이 세상에 존재하는 모든 이분법적 개념들의 한계를 떠올렸다. 그리고 현재 전 세계에 불어 닥친 코로나 팬데믹과 제 4차 기술혁명으로 인한 우리가 당면한 삶과 존재방식에 대한 현실적 문제로 귀결되었다. 비대면 사회의 지속과 언택트 문화의 정착으로 우리는 그야말로 지금껏 한 번도 체험하지 못한 뉴노멀 시험하고 있다. 바이러스 감염병과 최첨단 디지털 기술이 동시다발적으로 우리의 삶을 공격적으로 침투하

며, 기존의 삶의 방식과 인식체계를 전면적으로 뒤바꾸고 있다. 파괴와 구축의 양면성, 그리고 삶의 패러독스가 그 어느 때보다 강력하게 작용하는 시대다. 앞으로 점점 더 가속화될 대변혁의 소용돌이 속에서 우리는 진정 무엇을, 어떻게 대비해야 할까. 급변하는 세상에서 변하지 않는 가치란 무엇일까. 우리가 과연 잃어버린 것은 무엇이며, 되찾아야 할 것은 무엇일까. 예술의 본질과 정신적 가치는 아직 유효한가. 이 리서치는 전대미문의 혼란스런 시대를 살아가는 우리가 당면한 본질에 대한 실존적 질문과 문제의식으로부터 출발하였으며, 그에 대한 인문학적 통찰과 동 시대적 매체의 접목을 통한 새로운 시각적 인문학적 스토리텔링에 그 의의가 있다.

* 동물성과 식물성의 속성을 동시에 지닌 동충하초는 곤충의 기주를 자양분 삼아 자실체를 형성하는 특이한 버섯이다. 동충하초균은 토양 어디서나 살 수 있는 균으로, 자낭포자(子囊孢子)나 분생포자(分生孢子)를 형성하여 곤충들의 활발한 활동 시기에, 살아 있는 곤충의 호흡기, 소화기, 관절 등 부드러운 부분을 통해 침입한다. 곤충에 부착한 발아한 포자는 발아관(發芽管)을 형성하며 곤충 체내로 완전히 침입하는데, 이때 병원성을 가진 포자 또는 균사와 같은 전염 기관을 신속하게 복제함으로써 기주인 곤충의 면역 체계를 파괴시킨다. 그리고 곤충체내의 영양분을 섭취하면서 균사를 뺀어 종국에는 곤충을 죽음에 이르게 한다. 균사는 곤충의 체내를 완전하게 메우며 딱딱한 균핵을 형성함으로써 곤충의 형태를 그대로 유지하게 된다. 그리고 이듬해 동충하초 자실체를 발생시키며 새로운 생명으로 나타난다.

* 이는 동충하초의 생활사에 대한 간략한 설명이다. 공기 중의 눈으로 보이지 않는 동충하초균이 곤충을 침투하여 그 기주에 정착하여 새로운 생명체로 변한다. 곤충은 죽지만 본래의 형상은 그대로 유지한 채 다른 생명체의 집이 되어준다. 이러한 동충하초의 진화론적 면모는 삶과 죽음, 파괴와 재생, 기생과 공생, 육신과 정신 등 이 세상에 존재하는 모든 이분법적 개념을 함축한다. 즉, 모든 생명의 이면에는 죽음이 공존한다. 문제는 어떤 시각으로 바라보느냐에 따라 해석의 차이가 발생한다. 곤충의 입장에서는 파괴와 죽음을 의미하지만 식물의 입장에서는 재생과 생명을 의미한다. 이는 동충하초를 두 개의 구분된 개체로 볼 것인가 하나의 실체로 볼 것인가라는 관점과 가치의 문제이기도 하다. 동물성의 기주와 식물성의 자실체를 지닌 복합적인 형상과 죽음과 재생의 진화론적 특성을 지닌 동충하초는 이러한 이중적 가치의 충돌과 공존에 대한 열린 사유의 장을 삶과 죽음, 현실과 제공하였다. 삶과 죽음, 현실과 가상, 육신과 영혼, 아날로그와 디지털, 감성과 지성 등, 포스트 코로나 시대를 살고 있는 우리가 현재 당면한 문제들과 직결된 일들이다.

13) 동충하초 스토리텔링을 통한 마케팅 지원 결과

* (주)웅진릴리에뜨 동충하초 제품 면역원 마케팅에 대한 스토리텔링 지원으로 인한 마케팅 지원



그림 1. (주)웅진릴리에뜨의 면역원 마케팅 자료

* (주)기리시마주조 동충하초 제품 금무도 마케팅에 대한 스토리텔링 지원으로 인한 마케팅 지원

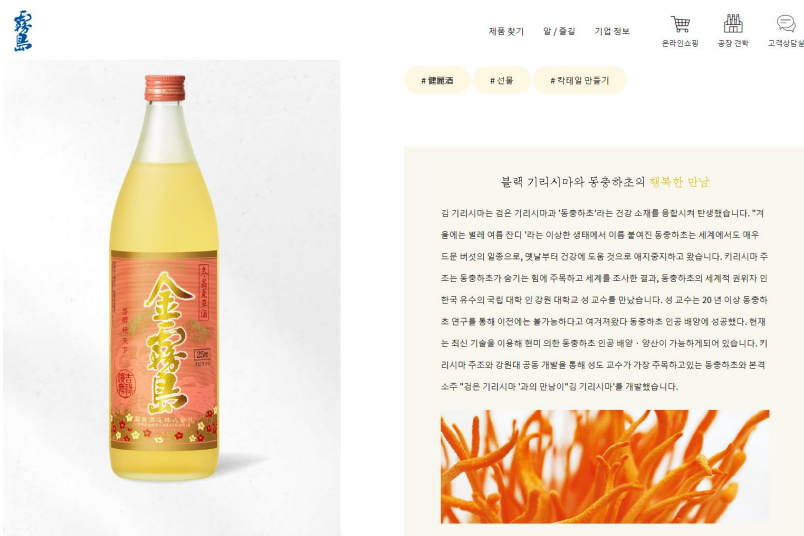


그림 2. (주)기리시마주조의 금무도 마케팅 자료

나. 동충하초의 대량생산을 위한 표준화 및 재배 최적화 및 자동화

(1) 밀리타리스 동충하초 개발 품종 설정

(주)머쉬텍이 보유하고 있는 성재모동충하초 품종은 국립종자원에 품종이 등록되어 있는 우수 동충하초 품종으로 밀리타리스 동충하초 식의약 소재 개발을 위해 성재모동충하초 품종을 선택해 지표물질을 기반으로 생산성을 제고하기 위한 실험을 진행하기로 함.

그림 3. 국립종자원에 등록된 성재모동충하초 품종보호권



(2) 밀리타리스 동충하초의 대량생산 최적화를 위한 추출물 조건 확립

① 시험개요

- 1) 목표 : 밀리타리스 동충하초 추출물의 제조 방법 최적화
- 2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 분획추출물 제조법 수행 및 다양한 추출법을 활용한 지표물질 함량 검정함.

② 실험방법

- 1) 밀리타리스 동충하초 건초와 배지 1.0 kg 기준으로 다양한 용매분획을 제조하기 위하여 1차로 에탄올로 추출한 후, 극성이 없는 헥산추출, 클로로포름 추출, 에틸아세테이트 추출, 부탄올 추출, 극성이 높은 물에 이르기까지 극성에 따른 용매 분획을 시도
- 2) 밀리타리스 동충하초 건초와 배지등의 주정추출법에 따라 에탄올의 농도별 25%, 50%, 75%, 95%, 물 100% 조성 용매에 추출물 제조 및 수율 확인
- 3) 밀리타리스 동충하초 건초와 배지등의 분말가루 2.0g씩 마이크로웨이브 추출기기의 밀폐형 용기에 넣고, 40ml씩 HPLC 기준 EtOH 와 Water 를 혼합하여 선택적인 비율(0%, 25%, 50%, 75%, 95% 등)을 제조하여 용매를 넣어준 후 잘 섞어줌 65℃ 상태의 마이크로웨이브 장비에서 20 분간 총 3회 반복 추출함.

Whatman 2호 paper 및 Glass filter paper 이용한 감압필터를 통하여 2차례 필터링 작업 후, 추출물 확보함.

감압농축기를 이용하여 추출용매를 증발시킨 후, 초저온냉동고에 24시간 보관 후, 동결건조 24-48시간 수행함.

- 4) 밀리타리스 동충하초 건초와 배지등의 건조 중량을 200g 무게를 재어 5 L 둥근 플라스크에 넣어 준 후, 용매 조성별로 에탄올을 4L 부어줌. 맨틀 장치를 활용하여 온도를

80°C 설정 한 후, 24시간 동안 1차 추출, 다시 반복하여 2차 추출 총 8L 추출물을 확보한 뒤 감압 필터 및 감압 농축기를 이용하여 동결 건조 과정을 거친 후 추출물을 확보함.

③ 실험결과

1) 밀리타리스 동충하초의 분획추출물 확보

아래의 그림1에서 밀리타리스 동충하초 분획추출물을 제조하기 위해 D-Ultrasonic cleaner (SDN-900H)를 이용하여 80°C에서 3시간동안, 100% 에탄올 12L로 5회 반복 추출 각 단계별 추출된 용매를 모두 모아서, 회전증발기로 감압농축하고 동결 건조하여 73.0g의 추출물을 획득함.

밀리타리스 동충하초의 에탄올 추출물 73.0g을 2L의 증류수에 녹인 후, 동량의 헥산 2L를 넣고 진탕한 후, 분획하여 헥산층 만을 분리해서 취하고 이를 2회 더 반복하여 헥산 분획물을 취득 남은 물층에 다시, 클로로포름 2L를 넣고 헥산 용액과 동일한 방법으로 분획을 수행하였고, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획을 하였고 최종적으로 물층 확보함.

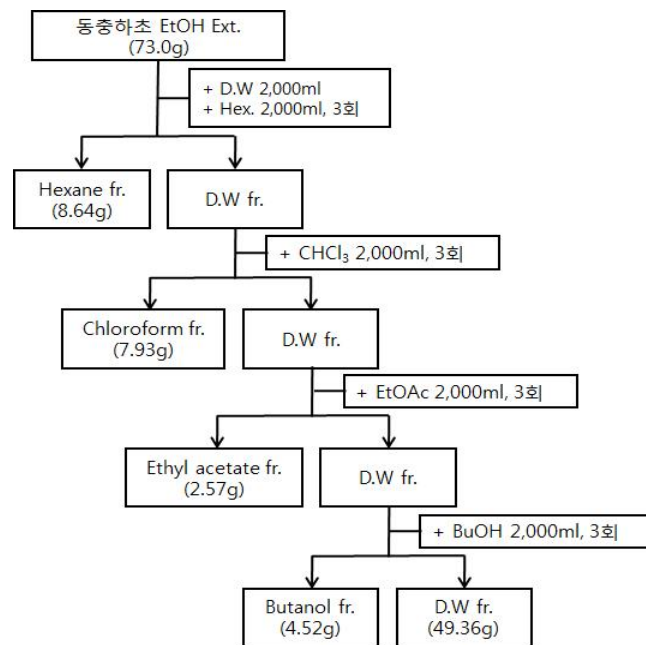


그림 4. 밀리타리스 동충하초 분획물 제조 및 확보

2) 밀리타리스 동충하초 마이크로웨이브 추출물 및 멘트 추출물 확보

표1에 정리한 추출물을 확보한 결과, 연구에 사용된 마이크로웨이브 기기의 추출물과 멘틀 기기로 확보한 추출물은 고농도의 에탄올을 활용할수록 수율이 낮은 점을 확인 할 수가 있었다. 특히 마이크로웨이브를 추출기기를 사용시 용매 조성별로 추

출물 확보에 차이가 (3.2~ 16.2%) 많이 나타남.

추후 용매 조성별 추출물의 생리활성 비교 및 지표물질 함량 분석을 수행하여 최적의 추출물 조성을 결정하여 대량공정을 가기 위한 기초 자료로서 활용할 필요가 있음.

	EtOH	Total (g)	Extracts (g)	Yield (%)
Microwave	95%	72.33	2.32	3.2
	75%	72.17	5.61	7.8
	50%	72.18	8.71	12.1
	25%	72.23	11.44	15.8
	0%	72.19	11.67	16.2
Mantle	100%	200	48.97	24.5
	0%	200	87.16	43.6

표 1. 밀리타리스 동충하초 추출방법별 추출물 확보

(3) 밀리타리스 동충하초의 대량생산 최적화를 위한 대량생산 및 지표물질 분석

① 시험개요

1) 목표 : 밀리타리스 동충하초 추출물의 지표성분인 cordycepn 함량을 활용해 동충하초 발달단계별 물질 분석을 통한 동충하초 대량생산 최적화 방법을 설정함.

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 분획추출물 제조법 수행 및 다양한 추출법을 활용한 지표물질의 함량을 측정하여 cordycepin 함량을 설정하고 발달단계별로 대량생산 시 cordycepin 함량이 높일 수 있는 재배조건을 구축함으로써 밀리타리스 동충하초 대량생산 최적화 방법을 도출하고자 함.

② 실험방법

1) 밀리타리스 동충하초의 6~10주 정도의 재배기간을 소재를 확보함. 확보 후, 밀리타리스 동충하초의 자실체, 배지, 자실체와 배지 혼합물 등 3부분으로 형태학적으로 구분하여 -75℃ 초저온냉장고에 보관하였음. 일정시간을 두고, 냉동된 한약소재들을 동결건조를 3일간 수행하여 얻은 건조시료를 마쇄하여 분말가루상태로 초저온냉장 보관하였음.

2) 밀리타리스 동충하초의 건조 분말가루를 2g씩 무게를 재고, 마이크로웨이브 추출기기의 밀폐형 용기에 넣고, 지표물질의 최적화 조건을 찾고자 HPLC 기준의 Water와 EtOH을 혼합하여 용매를 제조 (25%, 50%, 75%, 95%)하여 약 40ml 씩 튜브에 넣고, 선행연구에서 최적화되었던 온도 65℃ 와 수행시간 20 분 동안 같은 주파수는 2450 MHz 이고, 마이크로웨이브 에너지강도는 960W 추정추출 하였다. 상위의 방법으로 3

- 반복을 거쳐 소재별로 추출용매를 500ml 이상씩 확보하였음.
- 3) 열수추출의 경우, HPLC 급의 Water를 사용하여 밀리타리스 동충하초의 건조 분말가루 2g 당 40ml 기준으로 계상하여 65°C Dry oven을 이용하여 2~3일에 걸쳐 추출물 500 ml 이상을 확보하였고, Watman 2호 여과지를 활용해서 걸러낸 후, 농축하기 전까지 4°C에서 냉장 보관하였음.
 - 4) 밀리타리스 동충하초 각각의 추출물을 확보하고, Watman paper 2 호 여과지를 이용하여 추출된 분말가루를 걸러내었으며, 걸러진 추출용액을 회전식 감압농축기를 이용하여 농축을 수행하였음. 에탄올을 이용한 주정추출물인 경우 150mbar 정도의 감압과 추출물이 변하지 않는 수준의 온도인 40°C에서 농축을 수행하였고, 열수추출물인 경우 약 20~50mbar 정도의 감압과 40°C 온도 상태에서 농축을 수행하였음. 농축된 추출물들은 약 50~70ml 정도로 확보되었으며, -75°C 초저온냉장고에 보관하였음. 농축된 추출물을 동결건조기를 이용하여 2~3일간 동결건조를 수행 후, 추출물의 균질화를 위해 막자사발을 이용해서 마쇄 후 -20°C에서 냉동보관 하였음.
 - 5) 밀리타리스 동충하초의 주정추출물과 열수추출물을 이용하여 지표물질 코디세핀 등의 함량 측정과 표준화를 위해 HPLC와 NMR 분석기기를 이용하여 절대적인 정량과 상대적인 정량 및 정성분석을 수행하였음.
 - 6) 선행적으로 HPLC 분석기기를 이용하여 밀리타리스 동충하초의 퓨린계열 Nucleoside 구조를 주로 지표물질로 활용하고 있으며, 그 중에서 코디세핀과 아데노신을 지표로 정량분석 수행하였음. Sigma사(St Louis, MO)로부터 표준물질을 구입하였고, HPLC 분석 조건은 KNAUER HPLC System을 이용하였음. 컬럼은 Macherey-Nagel사의 Nucleoshell RP 18 컬럼을 사용하였음. 이동상은 초순수와 ACN(acetonitrile) 혼합액 (95:5)을 사용하였음. 밀리타리스 동충하초는 100mg/ml, 각각의 주정 추출물은 10mg/ml의 농도가 되도록 초순수를 이용해 제조한 후, 초음파처리기를 활용하여 1시간동안 40°C에서 sonication 추출한 후 PTFE 재질의 0.2 μ m filter로 여과하여 HPLC 분석하였음.
 - 7) 후속적으로 1차 H-NMR 분석기기를 이용하여, 상대적인 양으로 정성분석과 정량분석을 수행하여 밀리타리스 동충하초 추출물의 유효 생리활성물질의 후보군 탐색을 하였음. NMR에 대한 간단한 이론적 설명으로 소재가 가지고 있는 물질을 형성하는 원자의 핵이 전자와 같이 핵스핀을 갖고 있어, 강한 자기장에 의해서 스핀상태의 에너지가 달라져 스핀상태에서 전이(transition)가 일어나는 것을 핵자기공명현상이라고 하는데 이런 순간을 이용하여 스핀상태의 에너지 차이가 생기므로 각각의 물질들이 가지고 있는 수소들이 실질적으로 느끼는 자기장의 세기에 약간의 차이가 생기게 되고, 같은 수소가 같은 외부 자기장 아래에 있더라도 실질적인 자기장의 세기에 따라 차이가 생길 수도 있으며, 자기장의 세기가 높을수록 분리능이 확실해져 공명을 보이는 주파수에 따라서 물질마다 차이를 보이게 되므로 이러한 원리로 NMR 분석을 하고 있음.
 - 8) 1H-NMR 분석을 수행하기 위해서 건조된 추출물을 100mg 씩 3반복수로 나누어 담아

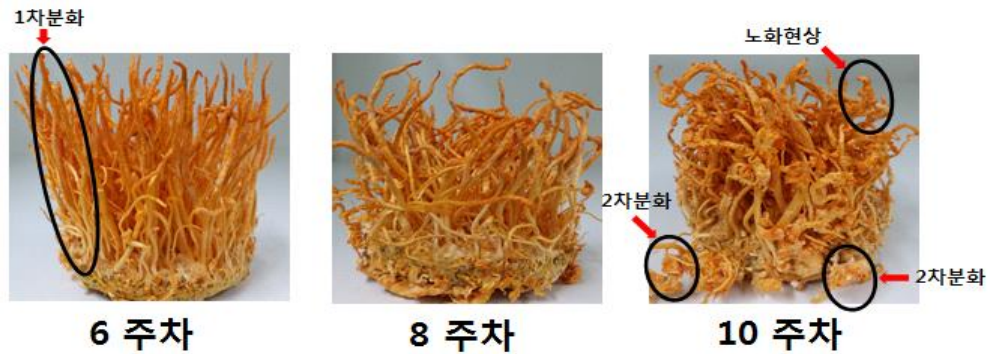
D₂O Buffer(90mM Postassium phosphate, pH 6.2, 0.2%TMS) 750 μ l 와 CD₃OD 750 μ l 을 넣어줌. 각각의 추출물 샘플들을 Vortex을 하여 균일하게 되도록 추출물을 녹여줌. 초음파추출(sonication)으로 1시간동안 상온에서 추출을 수행함. 추출 후에 12000 rpm 의 원심분리기를 15분간 수행하고 상층액을 PTFE 재질의 0.2 μ m filter로 여과한 다음, 각각 샘플마다 700 μ l 씩 NMR tube에 넣어줌.

- 9) ¹H-NMR 분석은 Bruker사의 AVANCE 600MHz, High Resolution NMR Spectrometer (서울대학교 농생명과학대학공동기기원, 나이셈)을 이용하여 분석 하였음. 분석조건으로 pulse sequence는 zgcprr 이고, 스캔 횟수는 128회, 수집시간은 1.7 초, 분석용매로는 D₂O를 사용하였고, 작동주파수는 600.13 MHz, 1H NMR, Water-suppress를 수행 후, shimming 작업을 하면서 보정작업을 거친 raw data를 기반으로 Chenomx NMR suite 8.1(Chenomx, Alberta, Canada)와 MestReNova v.6.0.2 를 이용하여 data processing을 하였다. NMR data 는 TMS를 기준으로 비교수행 하였고, 0.04ppm 간격으로 0.01~10.5ppm의 범위를 binning 작업을 수행하였음. binning 작업 후 chemical shift 된 peak의 위치를 가지고 물질의 assignment 및 intensity 값을 얻었음.
- 10) 통계분석은 상위 Binning 값을 이용하여 통계적 유의성 검정을 web기반의 Metaboanalyst 3.0를 활용하여 다변량 통계분석과 Heatmap, PCA, PLS-DA 분석을 하였음. 사후검정으로 IBM SPSS Statistics 22를 활용하여 One way ANOVA, t-test를 분석하여 $p < 0.05$ 기준으로 유의성 검정을 하였음.
- 11) 밀리타리스 동충하초의 지표물질 탐색 기법 및 유효성분 분석과정 흐름을 다음 그림에 도식적으로 요약하였음.

③ 실험결과

- 1) 밀리타리스 동충하초 같은 경우, 현재 인공재배를 통해서 대량으로 생산하고 있고, 국내외로 유통하고 있는 형태는 6~8주차 자실체가 곧게 뻗어 1차분화만 일어난 상태이고, 8주차로 가면서 자실체의 길이가 3~5cm 이상으로 성장하지만 2차분화가 일어나지 않은 상태로 수확하여 이용하는 상황임. 추가적으로 지표물질 최적화를 위해서 노화현상으로 자실체 끝부분이 두꺼워지고, 2차분화현상이 발생하기 시작한 노화단계 10주차의 자실체들을 수확함으로써, 밀리타리스 동충하초를 재배기간 및 형태학적인 구분기준을 명확하게 확립하음. 향후 밀리타리스 동충하초 소재를 이용하는 경우, 지표물질 함량의 최적화 및 표준화에 대한 안정성을 확보하였음.

그림 5. 밀리타리스 동충하초 재배기간 및 형태학적 구분



- 2) 밀리타리스 동충하초 유래의 지표물질인 코디세핀 함량에 대한 최적화 분석을 위하여 자실체발달단계별, 주정추출용매의 농도별, 밀리타리스 동충하초의 배지, 자실체, 자실체+배지 부분 등의 소지하고 있는 분석소재의 다양화를 통해 지표물질 함량 분석 범위를 넓히게 되었음. 다양한 시도로 소재의 표준화범위가 통용될 수 있도록 함량의 오차 범위를 줄이고 안정성을 확보하였음.

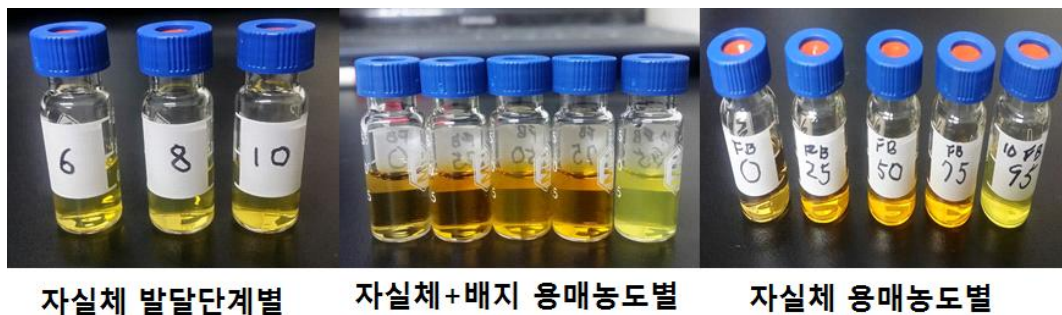


그림 5. 밀리타리스 동충하초 추출과정 다양화

- 3) 밀리타리스 동충하초 유래의 지표물질인 코디세핀의 특징은 구조상 극성용매에 함량이 높게 나오는 것으로 연구되어 왔음. 극성용매인 주정추출 특정상 메탄올이나 에탄올을 활용하는 것으로 되어 있지만, 특히 메탄올은 에탄올보다 극성이 더 높기 때문에 물과 쉽게 혼합되므로 감압농축을 하면서 제거되는 것이 어렵다고 판단되었고, 감압 농축시 메탄올용매 추출물은 잔류메탄올의 농도가 높아 지표물질의 함량의 변화가 유의수준이 되지 않아 표준화과정에 어려움이 나타났음. 또한 메탄올의 용매 비율을 70% 이상의 조건의 경우 어는점이 매우 낮아져, 초저온냉동고를 활용한 동결건조방법을 수행하는데 어려움이 많아 용매선정에 있어서 메탄올을 이용한 주정추출 용매는 활용하지 않기로 하였음.
- 4) 에탄올을 주정추출 용매로 활용할 경우 약 40℃의 온도에서 감압농축을 수행하면서 잔류에탄올이 없어지기 때문에, 주정추출 시 에탄올을 이용하였으며, 어느점 또한 25%, 50%, 75%, 95% 까지도 메탄올에 비해서 어는점이 높기 때문에 초저온냉장고에서도 시도할 수가 있었음. 함량분석 범위를 확장하여, 열수를 이용한 물 추출물은 감압농축과정 시간이 6시간 이상 소요 되어 에탄올을 활용한 주정추출물보다 4~5배 이상의 시간이 걸리게 되었음.

5) 밀리타리스 동충하초의 추출 용매는 에탄올을 선택하였고, 전처리 과정 중에 하나인 침출방법으로 열수추출법, 초음파추출법(Sonication), 마이크로웨이브추출법(MAE)등을 활용하여 효율적으로 추출물을 얻기 위한 최적화 연구를 수행하여 표를 작성하였음.

항목	열수추출	초음파 추출	마이크로웨이브추출
추출효율	낮음	높음	매우 높음
추출시료량	많음 >100g	보통 10~30g	적음 1~2g
변성	열에 의한 변성	거의 없음	없음
생성기간	2~3일	50min ~1hr	10~20 min
비용/에너지	고비용/고에너지 (65도 유지)	저비용/저에너지	저비용/고에너지 (높은에너지강도)

표 2. 밀리타리스 동충하초 침출방법 비교표

6) 위 표를 비교하였을 경우, 마이크로웨이브 추출법을 주요 추출방법으로 선택을 하였음. 특히 이 방법은 제한된 시료의 추출물 내의 함량 및 수율 등의 효율을 높이기 위하여 주로 사용하고 있으며, 추출 온도는 용매의 끓는점까지로 제한되어 있으나, 밀폐형 용기를 사용하는 마이크로웨이브 추출의 경우는 그 물질의 정상 끓는점보다 100 °C 이상 높게 가열할 수 있어서, 단시간에 효율적으로 추출 할 수가 있음. 밀리타리스 동충하초에서 원하는 지표성분인 코디세핀 추출에 효과적이기에 HPLC, NMR 분석을 목적인 경우, 분석 하고자 하는 시료의 양이 적은 경우에도 유용하게 사용할 수 있음. (총 추출 소요시간 1시간 30분 마이크로웨이브 추출법을 사용하지 않을 시, 순수 추출 48~72시간이 소요)

7) 밀리타리스 동충하초의 추출물을 확보한 뒤, 여과하는 방법에 따라 순수한 고형의 추출물을 얻을 수가 있음. 일반적으로 여과지를 이용하여 filter를 수행하고 나서, 감압농축을 수행하지만 본 연구에서는 여과과정에도 복합적인 방법을 활용하였음. 첫 번째 Watman 2호 filter paper를 활용하여 굵은 입자의 분석시료를 걸러냈음. 두 번째 진공을 걸어서 여과지 위의 액체를 빨아들여서 여과를 수행하였음. 본 과정을 할 경우, 여과지를 자주 갈아줘야 하는 단점이 있지만, 그 단점을 첫 번째 여과과정을 거친 후에는 여과지 한 장으로 충분히 추출물을 확보 할 수가 있음. 결과적으로 두 번의 여과과정을 수행하여 순수한 추출물을 얻을 수 있음.

8) 밀리타리스 동충하초의 지표물질 아데노신, 코디세핀의 함량 측정 및 시료별 함량 비교를 HPLC 분석을 수행하였음. 구입한 표준물질 아데노신과 코디세핀을 일정 농도로 희석하여 범위를 1~100ppm의 농도를 이용하여 각각의 농도와 분석 peak의 면적에 대한 표준곡선에서, 결정계수가 아데노신은 0.9987, 코디세핀은 0.9996 으로 측

정이 되어 각각 표준곡선이 직선성을 나타내었음. 이를 기반으로 밀리타리스 동충하초의 지표물질에 대한 HPLC 분석조건에 대해서 확립시켰음.

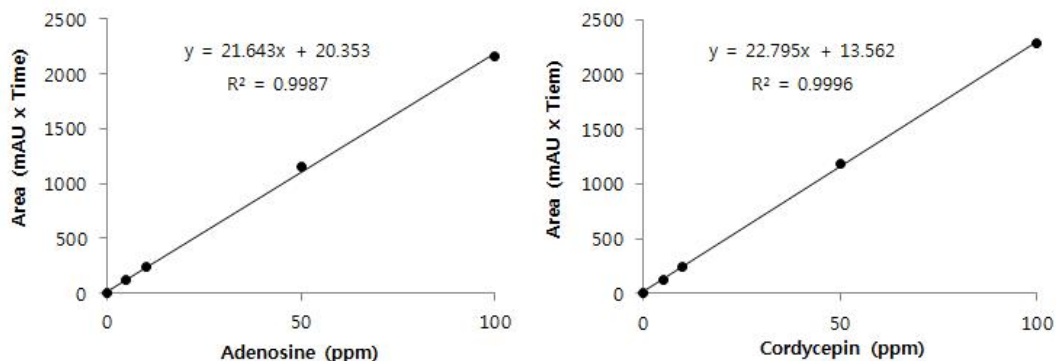


그림 6. 밀리타리스 동충하초 지표물질 아데노신과 코디세핀의 표준곡선

9) 밀리타리스 동충하초의 분석시료에서 아데노신 과 코디세핀 함량을 측정하기 위해서, 각각의 시료 및 시료와 표준물질을 혼합하여(Spiking) HPLC 분석을 하였음. 특히 분석시료에서 아데노신 과 코디세핀의 동일한 위치에서 검출되는 peak의 면적을 각각의 표준곡선의 수식값에 넣어 함량을 계산하였음. 밀리타리스 동충하초의 추출 과정을 거치지 않은 원 소재에 대한 지표물질 함량 확인과 추출물의 용매농도별 지표물질 함량, 배양시기별 추출물의 지표물질 함량 등을 측정하였음. 특히 최적화 용매농도를 찾고자 용매농도별의 추출물 함량비교를 우선 수행 했으며, 그 함량값은 아래의 표에 나타나 있음. 전반적으로 아데노신과 코디세핀의 합친 함량을 비교해보았을 때, 50% 에탄올 주정추출물에서의 지표물질이 많이 나오는 것을 확인 할 수가 있음. 50%와 75%에서는 표준편차 값의 차이에 의해서 비교 해보았을 때 75%보다 50% 에탄올 주정추출물이 유의성을 가지고 안정적인 함량을 보이는 것을 확인하였음.

에탄올 함량 (%)	Contents, mg/g (n=3)	
	Adenosine	cordycepin
0	1.98 ± 0.062	22.35 ± 0.807
25	0.24 ± 0.042	34.45 ± 3.171
50	0.24 ± 0.121	36.82 ± 0.070
75	0.21 ± 0.067	36.89 ± 2.558
95	0.07 ± 0.061	29.55 ± 1.833

표 3. 밀리타리스 동충하초 지표물질 용매농도별 추출물의 아데노신과 코디세핀 함량

10) 50%에탄올 주정추출방법으로 용매를 선별하였고, 재배시기별 추출하지 않은 원재료와 재배시기별 추출물의 지표물질 아데노신과 코디세핀의 함량 비교를 수행하였

음. 아래의 표는 결과 값을 보여주고 있음.

		Contents, mg/g (n=3)	
		Adenosine	Cordycepin
현미 동충하초	6주	0.53 ± 0.012	1.69 ± 0.009
	8주	0.44 ± 0.013	2.76 ± 0.011
	10주	0.41 ± 0.037	4.45 ± 0.036
50% 주정추출물	6주	0.07 ± 0.022	11.76 ± 0.278
	8주	1.13 ± 0.030	28.16 ± 1.076
	10주	0.27 ± 0.089	41.08 ± 0.490

표 4. 밀리타리스 동충하초 원재료 및 50%주정추출물의 아데노신 코디세핀 함량 비교표

11) 종합적으로 HPLC 정량분석 결과 밀리타리스 동충하초의 지표물질 아데노신과 코디세핀의 함량비교를 했을 때, 아데노신의 경우는 일부 생초에서 주정추출물보다 일정한 수준으로 높게 나오지만, 그 차이가 미비하다고 볼수 있으며 일반적으로 재배시기와 추출용매농도와 상관없이 아데노신 지표물질의 함량이 일정 수준을 유지하는 것을 확인하였음. 반면에 코디세핀의 함량은 재배시기가 길어질수록 기존 상품으로 출시하는 6주 재배시기에서 10주 노화단계기간 4주 동안 대략적으로 4배 가까이 증가하였고, 2주마다 2배씩 가량 증가되어 있음을 확인하였음. 또한, 50% 주정추출을 이용하여 재배시기별로 비교하였을 때, 10주차의 소재가 기존 재배상품의 6주 시료보다 9.2배 약 10배 가까이 코디세핀 함량이 높게 측정되었는데, 이 결과는 지표물질 코디세핀의 함량이 고농축된 추출물로 제조할 수 있는 가능성을 확인하였음. 결론적으로, 밀리타리스 동충하초 지표물질의 최적화 및 표준화 연구의 기반이 구축되었고, 이 추출물 소재로 2세부와 3세부 연구와의 연계성을 갖고 모든 연구에 사용되는 소재가 10주차 50% 주정추출물이 되도록 선정되었음. 아래의 그림은 HPLC 분석기기 상에서의 크로마토그램 결과 그림임.

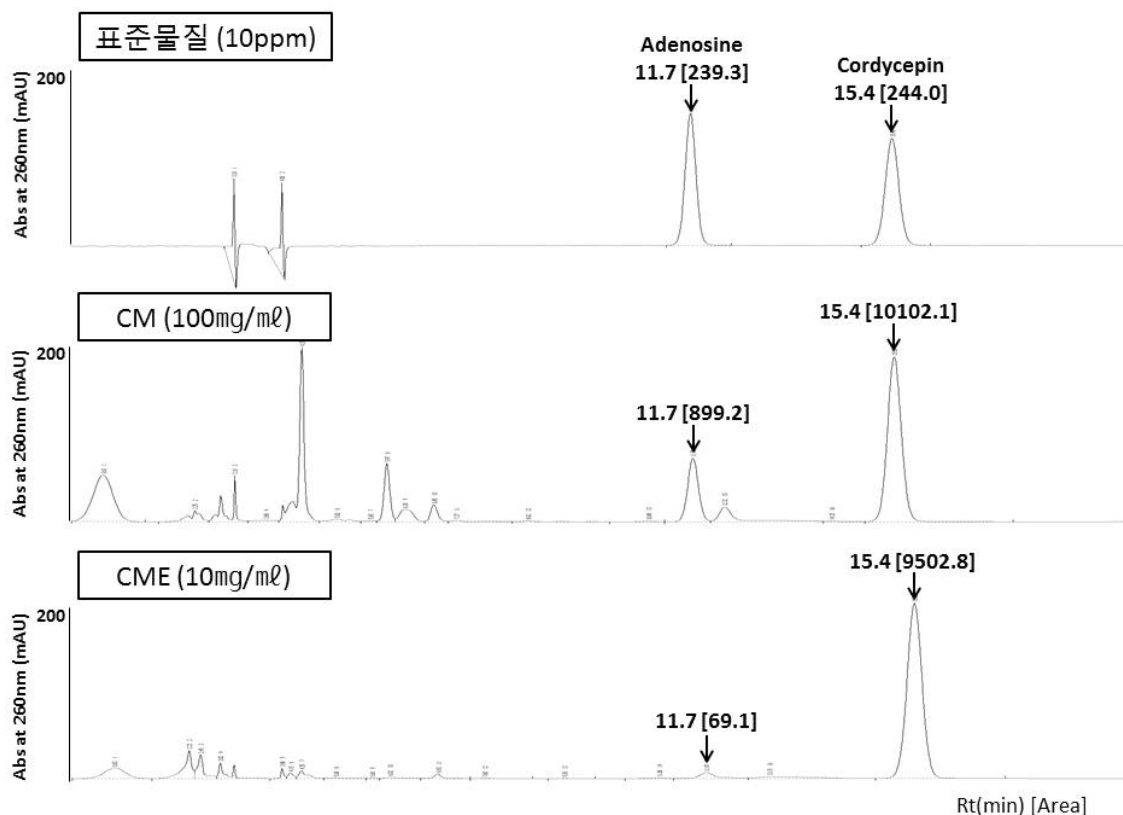


그림 7. 밀리타리스 동충하초 50% 주정추출물의 HPLC 분석 결과

12) 밀리타리스 동충하초 소재의 NMR 분석을 수행하여 지표물질 아데노신과 코디세핀 이외의 유용한 생리활성물질을 탐색하고자, 대사체 프로파일링 분석을 수행하였다. 밀리타리스 동충하초의 6, 8, 10주차의 50% 주정추출물을 각각 100mg 씩 이용하여 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 수행하여 얻은 NMR 스펙트럼은 아래와 같이 결과가 나왔음. 확인된 물질은 총 44개의 대사체가 검출되었으며, 그 화합물의 종류와 화합물 고유의 화학적 이동(chemical shift) 델타(δ)와 J -coupling 상수를 표로 나타내었음.

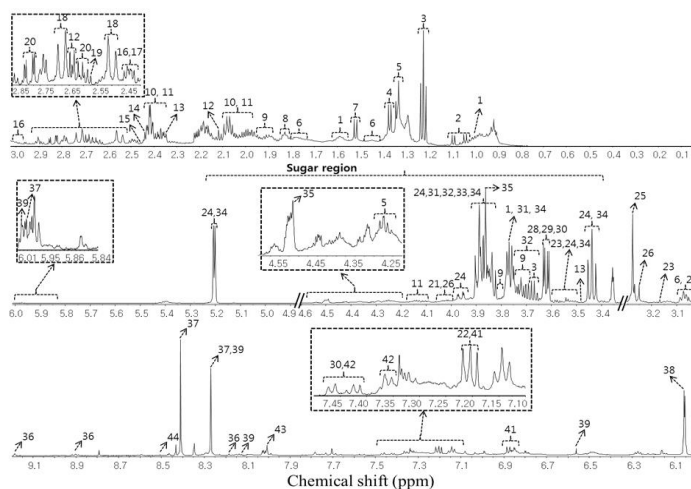


그림 8. 밀리타리스 동충하초 50% 주정추출물의 NMR 분석 결과

No	Metabolite compound	Chemical shift (ppm)
1	Leucine	0.96(t, $J=6.5$),1.69(m),3.76(m)
2	Valine	0.98(d, $J=6.87$),1.05(d, $J=6.0$)
3	Ethanol	1.18(t, $J=7.08$),3.62(q, $J=7.07$)
4	Lactate	1.3(d, $J=6.91$)
5	Threonine	1.34(d, $J=6.58$),4.22(m)
6	Lysine	1.42(m),1.74(m),3.00(t, $J=7.5$)
7	Alanine	1.46(d, $J=8.31$)
8	Putrescine	1.78(m)
9	Arginine	1.94(m),3.24(t, $J=6.93$),3.76(t, $J=6.11$)
10	Glutamate	2.02(m), 2.14(m), 2.38(m)
11	Proline	2.02(m),2.06(m),4.06(dd, $J_I=8.63$, $J_Z=6.42$)
12	Methionine	2.14(s),2.62(t, $J=7.58$)
13	Acetoacetate	2.3(s), 3.42(s)
14	Pyruvate	2.34(s)
15	Succinate	2.38(s)
16	2-Oxoglutarate	2.43(t, $J=6.95$),2.98(t, $J=6.84$)
17	Glutamine	2.46(m)
18	Citrate	2.5(d, $J=15.92$),2.7(d, $J=15.59$)
19	Methylamine	2.58(s)
20	Aspartate	2.66(dd, $J_I=17.45$, $J_Z=8.55$),2.78(dd, $J_I=3.8$, $J_Z=3.7$)
21	Asparagine	2.94(m), 3.98(m)
22	Tyrosine	3.02(dd, $J_I=4.76$, $J_Z=12.48$),7.18(d, $J=8.41$)
23	Malonate	3.1(s)
24	Glucose	3.18(t, $J=8.9$),3.38(m),3.46(m),3.82(m),5.2(d, $J=4.07$)
25	TMAO	3.22(s)
26	Choline	3.22(s), 4.02(m)
27	Betaine	3.26(s), 3.9(s)
28	Glycine	3.54(s)
29	Glycerol	3.54(m), 3.62(m)
30	Phenylacetate	3.54(s), 7.64(m), 7.38(m)
31	Xylitol	3.62(m), 3.72(m)
32	Xylose	3.66(m),3.94(m),5.18(d, $J=3.66$)
33	Mannitol	3.66(dd, $J_I=11.76$, $J_Z=6.2$),3.84(dd, $J_I=11.87$, $J_Z=2.8$)
34	Trehalose	3.85(m),5.18(d, $J=3.8$)
35	Guanidoacetate	3.78(s)
36	Trigonelline	4.46(s), 8.1(m), 8.86(m), 9.14(s)
37	Cordycepin	5.98(d, $J=2.73$),8.22(s),8.42(s)
38	Maleate	6.02(s)
39	Adenosine	6.06(d, $J=6.07$),8.11(s),8.28(s)

40	Fumarate	6.5(s)
41	4-Hydroxyphenylacetate	6.86(d, $J=8.6$),7.18(d, $J=8.65$)
42	Phenylalanine	7.32(m), 7.36(m), 7.42(m)
43	Xanthine	7.94(s)
44	Formate	8.44(s)

표 5. 밀리타리스 동충하초 50% 주정추출물의 검출된 화합물 결과표

13) 밀리타리스 동충하초 소재 NMR 분석을 수행하여 검출된 대사물질들의 binning 된 raw data 값을 기반으로 자실체 재배시기간의 비교와 물질들의 경향을 파악할 수 있는 Heatmap으로 결과를 나타내었음. 각각의 6, 8, 10주차 소재 3반복수 sample 들이 재배시기별로 클러스터링이 되었고, 상이의 결과에 따라 각 그룹간의 상대적인 양의 차이를 나타내어 대사물질들의 비교가 가능함. 검출된 44개의 대사산물 중에서 Alanine, 2-Oxoglutarate, trigonelline, glutamine, methylamine, glucose, adenosine, cordycepin, maleate, betaine, glycine, proline, xanthine, succinate, threonine, pyruvate, phenylalanine, xylitol, fumarate, mannitol, trehalose, ethanol, asparagine 등 23개가 10주차 소재에서 상대적으로 배당체나 일부아미노산, 뉴클레오타이드 산물 등이 많은 함량을 가지고 있음을 확인할 수가 있음. 8주차에서는 Methionine, valine, phenylacetate, glutamate, malonate, lactate, TMAO, choline 등 8개의 일부 아미노산계열 산물이 상대적으로 높게 나타났으며, 6주차 소재에서는 Arginine, citrate, acetoacetate, xylose, putrescine, tyrosine, lysine, glycerol, leucine, guanidoacetate, aspartate, hydroxyphenylacetate 등 12개의 대사산물이 상대적으로 높은 함량을 가지고 있음을 확인할 수가 있었고, Formate 같은 경우에는 상대적으로 비교하기가 어려운 결과가 나왔음.

14) 각각의 자실체의 재배기간별로 상대적으로 높게 나온 특징적인 산물을 찾아보았을 때, 6주차 소재인 경우, glycerol 같은 세포벽구성성분의 대사물질로 실질적으로 8주, 10주차의 소재보다 자실체의 두께가 두껍고, 단단한 형태로 1차분화상태가 유지된 상태라고 판단이 되기 때문에 상대적으로 함량이 높게 나타났을 것이라 판단이 됨. 또한, 특징적으로 acetoacetate, putrescine, guanidoacetate, hydroxyphenylacetate 와 같은 알코올 성질의 대사물질이 다소 상대적인 함량이 8주차, 10주차 소재보다 높게 나온 결과를 확인하였음. 다음으로 8주차에서는 Methionine 과 같은 필수 아미노산대사물질 위주로 상대적으로 6주, 10주차 소재보다 높게 나타나 있음을 확인하였음. 선별한 10주차 소재에서는 코디세핀과 아테노신 같이 이미 알려진 지표물질이 상대적으로 높게 존재한다고 나왔을 뿐만 아니라, 만니톨(Mannitol), 글루코스(Glucose), 트레할로우스(Trehalose) 같은 배당체는 일부 버섯들에서도 생리활성 효능 및 항암효과와 면역증강 연관 활용지표로 사용하고 있기 때문에 밀리타리스 동충하초에서 단당류, 다당류 대사물질들이 상대적으로 많이 함량 되어 있음을 확인하였음. 또한 해당과정과 TCA cycle 의 구성 요소들이 상대적으로 높게 포함하고 있음을 확인하였음.

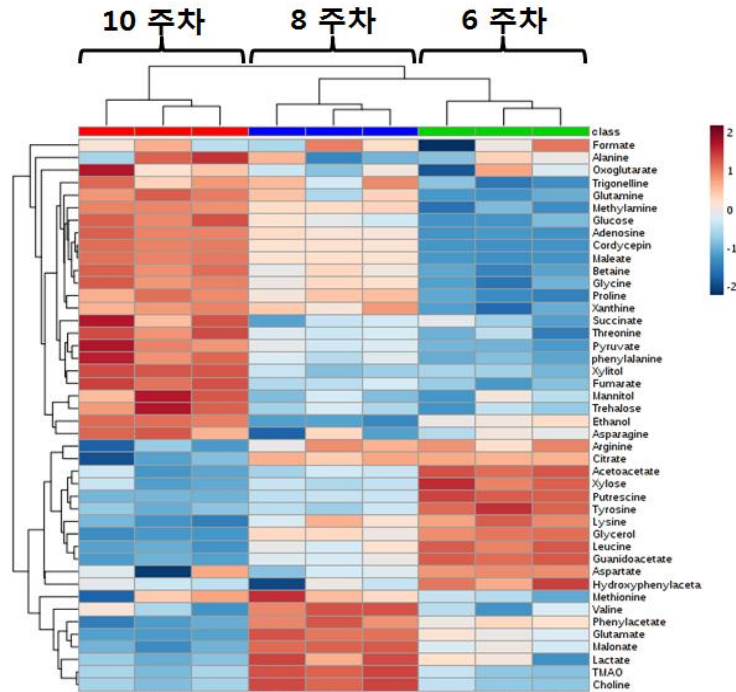


그림 9. 밀리타리스 동충하초 재배시기별 50% 주정추출물의 Heatmap 결과

15) 대사체 프로파일링 결과 binning 된 raw data를 활용하여, 밀리타리스 동충하초 소재들의 대사물질들이 자실체의 재배시기별의 그룹별로 구분 비교할 수 있는 다변량 통계분석을 수행하였음. 다변량 통계분석에서 클래스를 부여하여 구분하는 PLS-DA 분석을 통하여 그룹간의 대사물질 분리의 신뢰도를 파악하였음. 그 결과 아래와 같이 그림에 결과가 나타나 있음. 각각의 6, 8, 10주차 재배시기별로 PLS Component 1 (55.3%)에 의해 분리가 됨을 확인하였음. 10주차 소재를 기준으로 봤을 경우, 6주와 8주 소재와 거리가 기준0쪽으로 치우쳐 위치하고 있기 때문에 명확하게 분리 되고 있음을 확인 할 수가 있었음. 특히 PLS-DA는 Y variable들(그룹)간의 최대분산을 나타내는 함수식을 찾는 과정이기에, R2Y값을 주요 지표로 삼고 있음. R2Y 값은 0.998 로 일반적으로 R2Y 값이 1에 가까울수록 좋고, Q2Y 값은 0.968 로 일반적으로는 > 0.5 이상이 good, > 0.9 이상은 excellent 기준에 적용되기 때문에 결과적으로 밀리타리스 동충하초의 재배시기간의 대사물질들의 함량 차이에 대한 유의성을 갖고 있음을 판단 할 수 있음.

(3) 동충하초 대량생산 최적화 방법 설정

① 시험개요

- 1) 목표 : 밀리타리스 동충하초의 대량생산 방법에 대한 고찰
- 2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 대량생산 방법 및 기술 현황 파악

② 실험방법

- 1) 밀리타리스 동충하초 대량생산 방법 설정 고찰
- 2) 밀리타리스 동충하초 현미배지 원료개발 및 생리활성 물질 검정
- 3) 밀리타리스 동충하초 대량생산 최적화에 따른 시제품 제작 및 지표물질 함량 검정

③ 실험결과

1) 동충하초 대량생산 방법에 대한 고찰 결과

- * 현재 머쉬텍에서 보유한 재배표준화 기술은 건강기능식품 원료로써 원활할 보급을 가능하게 하며, 현미를 활용한 동충하초 인공재배 및 대량 생산 제조공정 기술을 보유하고 있음
- * 일반적으로 동충하초는 6~8주 동안 배양하여 자실체의 길이가 8~10cm로 성장했을 때, 현미배지를 포함한 생초로 판매하거나 열풍건조한 건배초, 자실체만을 취해 건조한 건초로만 판매되고 있음



그림 12. 동충하초의 대표상품. 왼쪽부터 생초, 건초, 비로

- * 발달단계별 지표물질 물질분석을 통해 10주차인 노화단계에서 codycepin의 함량이 증진되는 것을 보고하였기에 이 결과를 바탕으로 대량생산 시스템을 구축할 수 있었음
- ##### 2) 밀리타리스 동충하초 현미배지 원료개발 및 생리활성 물질 검정
- * 건조된 건배초의 경우 자실체와 현미배지의 비율이 1:5.9로 자실체만을 건초로 판매할 경우 많은 양의 현미배지는 폐기되기에, 이에 대한 활용방안을 모색할 필요성이 있음
 - * 특히, 자실체를 생산한 후 현미배지에도 많은 양의 균사체가 잔유하고 있기에 cordycepin 등의 생리활성 물질에 대한 성분검사가 필요함



그림 13. 자실체를 생산한 현미배지

- * 동충하초 현미배지를 이용한 원료개발 및 생리활성 물질 검토
- * 현미배지를 분말 형태로 가공, 시제품-1을 제조함



그림 14. 동충하초 현미배지 시제품-1

3) 동충하초 현미배지를 이용한 시제품-1에 대한 cordycepin 함량분석

현미배지를 초미분쇄한 시제품-1에서도 HPLC 분석 결과 (그림13) 생리활성물질인 cordycepin 함량이 1.76mg/g (0.18%) 존재하는 것으로 분석되었음. 제품개발에 이용되는 건초의 경우 0.2~0.3%의 cordycepin 함량을 보이는데 반해, 자실체만 사용하고 남은 현미배지는 0.18%의 cordycepin을 함유하고 있지만 대부분 폐기되는 현실임. 생리활성 물질을 함유하고 있지만, 폐기되고 있는 현미배지를 이용하면 추가적인 동충하초의 생산 없이도 기능성제품을 개발할 수 있는 원료를 확보할 수 있을 것으로 사료됨.

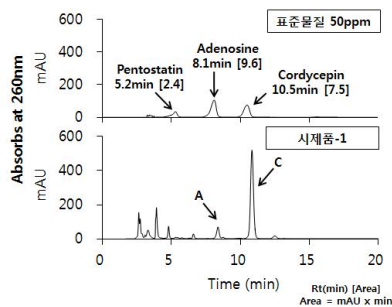


그림 15. 시제품-1의 HPLC 분석결과

(4) 동충하초 현미배지를 활용한 시제품 개발

① 시험개요

1) 목표 : 밀리타리스 동충하초의 현미배지를 이용한 다양한 제품 개발

2) 연구개발의 내용

밀리타리스 동충하초의 현미배지를 초미분한 시제품-1을 이용 다양한 시제품의 제작할 필요성이 있음.

② 실험방법

1) 시제품-1의 분말 제품 개발

2) 시제품-1의 캡슐알약 제품 개발

시제품-1을 200~500mg 공캡슐에 넣어 다양한 용량의 알약을 제조함.

3) 시제품-1을 활용한 현미배지 음료 제품 시제품-2 개발

시제품-1의 20배에 해당되는 물을 넣고 85℃에서 6 시간 동안 추출함. 추출액을 필터를 통해 걸러내고, 잔사에 다시 10배의 물을 넣고 85℃에서 2 시간 동안 추출함 다시 필터로 걸러내고, 10배의 주정으로 80℃에서 4 시간 추출한 다음 필터로 걸러냄. 모든 추출액을 모은 후, 50℃에서 감압농축하여 에탄올을 제거함 고속원심분리기로 상등액만을 분리한 후, 90kg이 되도록 정제수를 넣고 다시 90℃로 가열하여 살균하여 제조함 현미배지 음료에 대한 cordycepin 함량은 시제품-1과 동일한 방법으로 분석함.

③ 실험결과

1) 동충하초 현미배지를 이용한 다양한 제품 개발 결과

현재 머쉬텍에서 보유한 시제품-1을 이용한 분말제품, 분말제품을 먹기 쉽게 가공한 캡슐 알약, 동충하초 음료, 마스크팩 등 다양한 시제품을 제조하였음
시제품-1

시판되고 있는 '비로'와 형태로 직접 또는 물에 넣어 섭취할 수 있음



그림 16. 시제품-1

캡슐 알약은 분말 상태인 시제품-1을 직접 먹기 힘든 사람들도 섭취하기 쉽게 제조하였음



그림 17. 캡슐 알약

현미배지 음료 (시제품-2) 시제품-1을 이용하여, 기개발된 동충하초 음료와 동일한 방법으로 제조하였음. 시제품-2의 코디세핀 지표물질의 HPLC 함량 분석 결과, 현미배지를 이용한 음료인 시제품-2에도 217.02mg/L (0.022%)의 cordycepin이 있는 것으로 확인되었기에, 기능성 식품으로써 이용할 수 있을 것으로 사료됨

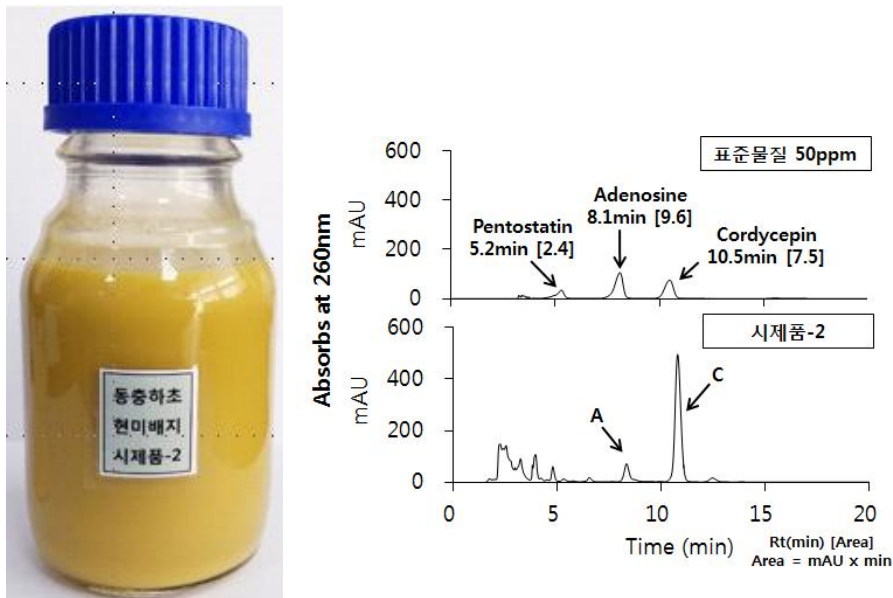


그림 18. 시제품-2 와 HPLC 지표물질 분석 결과

2) 동충하초 시제품에 대한 고찰 결과

동충하초를 이용한 기능성 제품은 대부분 자실체에 대한 기능성이 부각된 반면, 균사체에 대해서는 생리활성 효능평가 및 이용성이 전무한 상태임.

본 연구에서는 자실체를 재배하고 폐기되는 현미배지에서도 생리활성 물질인 cordycepin이 자실체와 유사한 함량으로 있는 것을 관찰하였고, 이러한 결과는 현미배지가 자실체와 유사한 생리활성 효과를 나타낼 것으로 기대되었음.

반면 균사체에서는 항암성분인 pentostatin이 검출되지 않아 자실체에 비해 항암 효과는 우수하지 않을 것으로 추정함.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

국내산 버섯 (동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 체계적 명품 육성면역기능개선, 피로개선, 운동수행능력에 대한 국제 또는 국내 기능성 인증 및 가공품 개발로 농업과 식품의 동반성장을 견인하고 동충하초 글로벌 명품을 육성

3-2. 평가 방법

본 과제 의 전략 성과는 스타 제품 개발에 따른 파급효과임. 이에 과제 진행에 있어 전체적인 사업화 지표와 연구기반지표의 정량적 성과보다는 전략 성과의 방향성으로 진행되고 있는 지가 중요할 것으로 판단됨

본 연구는 유기적인 협조체계가 과제 목표에 도달하기 위해 필수불가결한 요소임에 연계관계를 구축하는 융합적인 접근 방향으로 과제가 진행되는 지 여부가 중요함

특허에 있어서는 정량적인 특허보다 사회적 파급력을 지닐 수 있는 정성적으로 우수한 특허 출원과 등록이 가능하여야 함

3-3 연차별 성과 목표 및 달성도

구분 (년도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2016)	1세부 (동충하초를 활용한 수출전략형 면역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발)	동충하초 피로개선 기능성 자료 확보	100%	<ul style="list-style-type: none"> 신규 추출물 원료 표준화 피로개선 기능성 연구 결과 특정 용량 유효성 도출(재현성 평가 필요)
		동충하초 다기능성 전략에 따른 제형 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> 피로개선용 겔 제형 검토 적합한 관능 선정 시제품 생산
	1협동 (동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건강기능성 식품 개발)	일반건강기능식품 및 가공품 제품화를 위한 추출공정 개발 및 제형개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> 분말, 과립, 차, 액상, 타블렛 제형 개발 추출공정 개발
		일반건강식품 및 가공품 제품화를 위한 동충하초 원료의 대량공정 스케일 확립	100%	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산 스케일 생산공정 확립
2협동(동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발)	밀리타리스 동충하초 관별법을 활용한 국내 품종 판별 마커	100%	<ul style="list-style-type: none"> 밀리타리스 동충하초 품종 및 타 품종의 관별 마커 개발 (gDNA 기반 맵핑을 통해 SNP(유전자 	

				변이)를 검출함)
		밀리타리스 동충하초 및 근연종의 신규 소재 개발을 위한 지표물질 탐색 전략 확립	100%	<ul style="list-style-type: none"> 재배환경과 코디세핀 함량 상관관계 조사 data 확보
	3협동(동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산 시스템 개발)	동충하초 생산자 및 지자체가 포함된 협의체 구성 및 표준화 기준 및 개발 품종 설정	100%	<ul style="list-style-type: none"> 성재모 동충하초로 품종 선정 횡성군 지자체와 협의체를 구성
		동충하초의 브랜드 전략 확립 및 마케팅 이미지 구축을 위한 브랜드 설정	100%	<ul style="list-style-type: none"> 선정 품종을 설명하기 위한 브로셔 제작 및 브랜드 구체화 선정 품종의 홍보를 위한 브랜드 전략을 마련함
2차년도 (2017)	1세부 (동충하초를 활용한 수출전략형 번역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발)	피로개선 유효성 검증을 위한 인체적용시험	90%	<ul style="list-style-type: none"> Rat 모델 및 마우스 모델에서 피로개선 효과가 나타나지 않음 탐색 기능성 연구중 여성갱년기 기능성 가능성 확인 후 연구 내용 변경 신청
		피로개선용 건강기능식품 젤리 제형 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> 젤리 제형 개발 완료
	1협동 (동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건강기능성 식품 개발)	동충하초 브랜드 설정에 따른 마케팅 전략 확립 및 이에 따른 대표 시제품 개발 및 제품화	80%	<ul style="list-style-type: none"> 숙취해소 음료 컨셉 시제품 개발 자판기, 편의점, 마트, 싸우나 등에 적합한 캔디류 형태 시제품 개발
		운동수행능력개선 소재에 대한 유효성 획득을 위한 연구 및 인체적용시험 프로토콜 개발	90%	<ul style="list-style-type: none"> 운동수행능력 개선 In vitro 기능성 연구 수행
	2협동(동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발)	밀리타리스 동충하초 및 근연종 식의약 소재용 지표물질 발굴용 대사체 프로파일링	100%	<ul style="list-style-type: none"> 풍덩이동충하초의 불완전세대 균사체 배양조건 확립 지표물질인 후시딕산의 생산경로를 확인하기 위해 각각의 배양조건에 따라 일차대사과정에 관한 대사경로 변화 파악
		동충하초 식의약 소재 지표물질 발굴용 대사체 분석을 위한 형질전환체 제작	100%	<ul style="list-style-type: none"> 노랑다발동충하초 유전체 데이터 생산 및 조립 곰팡이 유래의 이차대사산물 생합성 유전자 발굴 (NRPS, PKS)
	3협동(동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산 시스템 개발)	동충하초 대량생산 최적화 방법 설정	100%	<ul style="list-style-type: none"> 밀리타리스 동충하초로부터 분획 추출한 용매별 분획물의 cordycepin 함량분석을 통해 추출용매에 따른 수율 및 지표성분 함량 data 확보. 추후 용매 조성별 추출물의 생리활성 및 지표성분 함량 최적화를 위한 기초자료

		동충하초 브랜드에 대한 다학제적 고찰을 통한 인문학적 스토리텔링 전략 확립	100%	로 활용 • 동충하초 관련 문헌서적, 관련제품 분석, 사업체 조사 및 국민인식 조사, 브랜드 방향 설정
3차년도 (2018)	1세부 (동충하초를 활용한 수출전략형 면역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발)	여성갱년기 인체적용시험 진행	100%	• 여성갱년기 In vivo 기능성 평가 완료 • 여성갱년기 인체적용시험 프로토콜 작성 • 여성갱년기 인체적용시험 진행 • Estrogen recept 활성화 작용기전 연구 완료
		동충하초 다기능성 전략에 따른 여성갱년기 제품화를 위한 제형 개발	100%	• 인체적용시험용 액상 시제품 생산(카라멜 향)
	1협동 (동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건강기능성 식품 개발)	운동수행능력개선 소재에 대한 유효성 획득을 위한 연구 및 인체적용시험 프로토콜 개발	90%	• ICR mouse 운동수행능력 기능성 평가 : 유효성 미흡 • 아토피 피부염 개선 기능성 화장품 개발 내용으로 연구내용 변경 및 연구기관 변경(바이오텍에스알에스로)
	2협동(동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발)	동충하초의 면역증강에 의한 암 억제효과 및 피로개선 효과 관련 동물효능평가	100%	• 동충하초 항암 동물 효능 평가 : 종양 이식 후 동충하초 섭취에 따른 크기 변화 관찰 • 종양 이식 모델에서 피로관련 동물 효능 평가 : 암과 관련한 피로모델에서 항피로 효과 확인
		동충하초 대사체 비교 프로파일링을 통한 지표물질 발굴 및 항피로 대사체 분석	100%	• 동충하초 분획추출물의 지표물질 함량 분석 • 동충하초 분획추출물 항암 동물 실험 모델에서의 항피로 관련대사체 분석
	3협동(동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산 시스템 개발)	동충하초 대량생산 최적화 방법 설정	100%	• 동충하초 대량생산 방법에 대한 고찰 • 동충하초 현미배지를 이용한 원료개발 및 생리활성 물질 검토
동충하초 배지를 활용한 시제품 개발 및 인문학적 스토리텔링 전략 확립		100%	• 동충하초 현미배지를 이용한 다양한 제품 개발 (분말, 캡슐, 현미 배지 음료) • 마스크 팩 : MDX 골드 마스크 팩	
4차년도 (2019)	1세부 (동충하초를 활용한 수출전략형 면역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발)	여성갱년기 인체적용시험을 수행 및 개별인정을 위한 개별인정자료를 작성 및 확보	100%	• 인체적용시험 수행 • 개별인정자료 작성 진행
	1협동 (동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건강기능성 식품 개발)	노랑다발동충하초 제품화를 위한 기반 확보 및 화장품 제조	100%	• 붉은자루동충하초의 붉은 색소 분리 및 구조동정 • 노랑다발동충하초의 피부 전달력

	능성 식품 개발)	공정 개발		향상을 위한 피부 투과 개선 연구
	2협동(동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발	밀리타리스 동충하초 근연종의 지표물질 발굴 및 밀리타리스 동충하초 소재개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 붉은자루동충하초의 붉은 색소 분리 및 구조동정 • 노랑다발동충하초와 풍뎅이동충하초에 들어있는 Fusidic acid 지표물질 검증 • 밀리타리스 동충하초 재배시의 배지를 활용한 기능성 소재 개발 • 노랑다발동충하초 추출물을 확보하고 LPS에 의해 활성이 유도된 대식세포의 면역 활성 억제 효능을 작용기전 규명연구
	3협동(동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산 시스템 개발)	동충하초 재배 공정 대	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 기존의 발달단계별 동충하초 재배 생산공정 개선과 육종시스템을 바탕으로 대량생산 시스템 구축 및 농산품 개발
5차년도 (2020)	1세부 (동충하초를 활용한 수출전략형 면역기능 및 피로개선 건강기능성 식품 개발)	인체적용시험 수행	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험 CSR 완료
		개별인정신청 자료작성	70%	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험자료의 작성
	1협동 (동충하초를 활용한 다목적 가공품 및 운동능력개선 건강기능성 식품 개발)	동충하초 활용 일반 화장품 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 퓨리파잉 화장품 3종 출시
		아토피로 인한 건조함 개선 유효성 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 식약처 아토피 기능성 삭제로 여드름 개선 기능성 평가
		기능성 화장품 기능성 인체적용시험	90%	<ul style="list-style-type: none"> • 코로나로 인한 임상시험기관 확보가 어려워 진행이 불가 • 여드름 피부 적합성 인체적용시험 완료 (우수결과 도출)
	2협동(동충하초(밀리타리스 동충하초)와 근연종의 지표물질 발굴 및 소재 개발	붉은자루동충하초 유래 분리 성분 항암 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 작용기전 연구 • 항암 효능 스크링
		밀리타리스 동충하초의 혈행개선에 대한 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 밀리타리스 동충하초의 혈행개선에 용 소재 개발
	3협동(동충하초 스토리텔링을 이용한 명품 브랜드 육성 및 생산 시스템 개발)	기존의 발달단계별 동충하초 재배 생산공정 개선과 육종시스템을 바탕으로 대량생산 시스템구축	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 육종시스템을 바탕으로 한 지속 가능한 대량생산 시스템 구축

3-4. 연구성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	SCI여부 (Impact factor)	게재일
1	Suppression of a methionine synthase by calmodulin under environmental stress in the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i>	Environmental Microbiology Reports	SCI (3.5)	2017.10.01
2	Current nomenclatural changes in <i>Cordyceps sensu lato</i> and its multidisciplinary impacts	Mycology	비SCI	2017.10.01
3	<i>Cordyceps</i> species parasitizing hymenopteran and hemipteran insects	Mycosphere	SCI (0.63)	2017.10.01
4	Identification of calmodulin binding proteins in the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i>	Folia Microbiologica	SCI (1.5)	2017.05.01
5	Beauvericin synthetase contains a calmodulin binding motif in the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i>	The Journal of general and applied microbiology	SCI (1.2)	2018.03.01
6	Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence process of <i>Cordyceps militaris</i> fruit bodies	Journal of Microbiology	SCI (2.319)	2019.01.01
7	Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution	Mycological progress	SCI (2.0)	2018.08.01
8	¹ H-NMR-Based Metabolic Profiling of <i>Cordyceps militaris</i> to Correlate the Development Process and Anti-Cancer Effect	Journal of microbiology and biotechnology	SCI (1.975)	2019.08.01
9	The Inhibitory Effect of Cordycepin on the Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells, and Its Mechanism: An Investigation Using Network Pharmacology-Based Analysis	Biomolecules	SCI (4.694)	2019.8.26
10	Coleopteran and Lepidopteran Hosts of the Entomopathogenic Genus <i>Cordyceps sensu lato</i>	Journal of Mycology	비SCI	2016.06.30
11	Synthesis and antitumor activity of (R)-bassianolide in MDA-MB 231 breast cancer cells through cell cycle arrest	Bioorganic Chemistry	SCI (2.252)	2016.09.20
12	Antithrombotic and Antiplatelet Effects of <i>Cordyceps militaris</i>	Mycobiology	SCI (1.416)	2020.06.01
13	Efficacy of ethyl acetate fraction of <i>Cordyceps militaris</i> for cancer-related fatigue in blood biochemical and H-Nuclear magnetic resonance metabolomic analyses	Integrative Cancer Therapies	SCI (2.379)	2020.03.01
14	Beneficial Effect of <i>Cordyceps militaris</i> on Exercise Performance via Promoting Cellular Energy Production	Mycobiology	SCI (1.416)	2020.06.01

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2017 한국미생물학회연합 국제학술대회	성기호	2017.11.02	일산Kintex	국내
2	Cordyceps Forum 2017	성기호	2017.08.07	선양	중국
3	Cordyceps Forum 2017	부산슈레스타	2017.08.07	선양	중국
4	2017 한국대사체학회 정기학술대회	오준상	2017.04.06	건국대학교	국내
5	The effect of Cordiceps militaris extract on osteoporosis induced by estrogen deficiency	Nam Joon Baek	2018.05.15	제네바	스위스
6	2019년 한국균학회 춘계 학술대회 (발표 2건)	오준상 등	2019.05.08	리솜오션캐슬 코즈머스홀	국내
7	Cordyforum 2016 중국	성재모	2016.08.12	핑후	중국

다. 특허

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원/등록				기여 율
			출원/ 등록	출원인	출원일	출원/등록 번호	
1	동충하초 농축액을 유효성분으로 포함하는 여성갱년기 증상 예방 또는 치료용 조성물	모든 지정국	출원	동아제약 주식회사	2019년 5월 28일	PI8207DON GST	1/1
2	밀리타리스 동충하초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항피로용 조성물	대한민국	출원	가톨릭관동대 학교	2018년 10월 30일	10-2018-01 31145	1/1
3	밀리타리스 동충하초 배지 추출물을 유효성분으로 함유하는 운동 능력 개선용 조성물	대한민국	출원	가톨릭관동대 학교	2019년 10월 29일	10-2019-01 35309	1/1
4	밀리타리스 동충하초 배지 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈행 개선용 조성물	대한민국	출원	가톨릭관동대 학교	2019년 10월 29일	10-2019-01 35314	1/1
5	코디세핀-단백질 분해 효소 집합체 배양물을 유효성분으로 함유하는 면역활성 증강용 조성물	대한민국	등록	주식회사 바이오텍에스 알에스	2019년 10월 30일	10-2040470	1/1
6	동충하초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 흑색종 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	출원	가톨릭관동대 학교	2018년 10월 31일	10-2018-01 31475	1/1
7	코디세핀 및 인지질을 유효성분으로 포함하는 간 기능 및 뇌기능 개선용 조성물	대한민국	등록	주식회사 바이오텍에스 알에스	2020년 6월 26일	10-2137515	1/1

3-5. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 가. 여성갱년기 기능성 인체적용시험 유효성 자료 미확보 : 인체적용시험 결과 12주에는 플라시보와 차이가 나지 않았지만 6주 시점에는 플라시보 대비 유의적으로 증상이 개선되어 향후 6주 인체적용시험을 검토할 필요가 있다고 판단됩니다. 또한 다른 여성갱년기 12주 임상 결과(Kim, Sun Young, et al, 2012)에서는 플라시보의 증상점수 변화가 크게 나타나지 않았는데 이번 임상 결과는 플라세보의 증상개선이 6주에서 12주 사이에 커졌다. 이에 대해 원인분석을 해 볼 필요가 있고 향후 추가 임상에 참고하여 진행할 예정입니다.
- 나. 여드름 개선 기능성 인체적용시험 미시행 : 코로나로 인한 임상기관 확보가 어려워 진행이 불가하였습니다. 추후 가능한 시점에 수행 예정이며 여드름 피부 적합성 인체적용시험은 여력이 되는 임상 기관이 있어 진행하였고 예상외로 우수한 결과를 도출하였습니다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1 여성갱년기 인체적용시험 결과

6주 인체적용시험 검토 : 6주시점에 분명한 증상개선 효과가 있었으므로 6주간 섭취 인체적용시험 검토 중이며 추후 개별인정 승인 획득시 해외 수출을 위한 미국 NDI 또는 일본 기능성 표시식품 등록을 진행 할 예정입니다.

4-2 여드름 개선 기능성 화장품

여드름 개선 기능성 임상 진행을 통해 기능성 화장품 개발 진행 및 해외 수출을 진행할 예정입니다.

4-3 노랑다발 동충하초 및 풍뎅이 동충하초 소재 개발 연구

추가 기능성 연구 및 의약품을 위한 효력 평가 진행

붙임. 참고문헌

- [1] Kim, Sun Young, et al. "Effects of red ginseng supplementation on menopausal symptoms and cardiovascular risk factors in postmenopausal women: a double-blind randomized controlled trial." *Menopause* 19.4 (2012): 461-466.)
- [2] Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., & Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO journal*, 15(9), 2174-2183.
- [3] Choi, Eunhyun, Junsang Oh, and Gi-Ho Sung. "Beneficial Effect of Cordyceps militaris on Exercise Performance via Promoting Cellular Energy Production." *Mycobiology* 48.6 (2020): 512-517.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내산 버섯 (동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발				
	(영문)Development of star product practiced with generic technology of mushroom industrialization				
주관연구기관	동아제약 주식회사		주 관 연 구	(소속) 동아제약 주식회사	
참 여 기 업	주식회사 바이오텍에스알에스 주식회사 머쉬텍		책 임 자	(성명) 권 용 삼	
총연구개발비 (천원)	계	2,106,800	총 연구 기간	2016. 5. ~ 2020. 12.(4년 8월)	
	정부출연 연구개발비	1,580,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	30
	기업부담금	526,800		내부인원	24
	연구기관부담금			외부인원	5

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 건강기능성 인증을 바탕으로 한 제품 개발 및 출시
 - 면역력 강화 기능성을 바탕으로 한 동충하초 추출물 B2B 제품화
 - 여성갱년기 증상개선 기능성 관련 특허 출원 및 시제품 제작
 - 여성갱년기 증상개선 관련 인체적용시험 완료(6주 시점 유효성 확인)
 - 노랑다발 동충하초 여드름 개선 유효성 확인 및 화장품 인체적용 시험 완료(적합성 시험)
 - 일반 건강기능식품 개발 : 간건강 건강기능식품(간박사)
 - 화장품 개발 : 여드름용 클렌징 화장품 3종 출시
2. 원료 원산지 판별기술 개발 및 가공 표준화
 - 생물주권 확립을 위한 유전체 기반 품종 판별 기술 개발 및 가공품 개발을 위한 원료 지표 성분 표준화
3. 동충하초 소재개발을 다학제적으로 구축하여 국제화 추진
 - 동충하초 스토리텔링을 바탕으로 한 일본 동충하초 수출(일본 기리시마 주조 에 수출)
4. 동충하초 원료 생산공정 표준화 및 최적화 (지표성분 함량 극대화)
 - 동충하초 재배환경 및 조건 최적화를 통한 지표성분 함량 극대화로 산업적 경쟁력 강화, 생산성 강화

○ 연구내용 및 결과

1. 동충하초 여성갱년기 기능성 연구 : 기능성 논문 투고 진행 중, 특허 출원완료
2. 동충하초 에스트로젠 수용체 작용기전 연구 : 작용기전 논문 투고 완료,
3. 여성갱년기 증상 개선 인체적용시험 : 6주 시점 유효성 확인
4. 노랑다발 동충하초 In vivo 여드름 개선 유효성 연구
5. 노랑다발 동충하초 여드름 기능성 화장품 임상 시험 진행 중(코로나로 지연)
6. 동충하초 재배 최적화 연구 : 동충하초 지표성분 함량 극대화 및 생산성 향상
7. 머쉬텍 스토리텔링 구축 연구 : 동충하초 마케팅 자료 확보를 통한 마케팅자료 지원 (동아제약 B2B 사업, 일본 동충하초 수출(기리시마주조))
8. 일반건강기능식품 개발 : 간건강 건강기능식품 (간박사)
9. 일반 화장품 개발 : 여드름용 클렌징 화장품 3종 출시

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 여성갱년기 추가 임상 검토
2. 여드름 개선 기능성 화장품 인체적용시험 추가 진행
3. 노랑다발 동충하초 및 팡팅이 동충하초 추가 기능성 연구 및 의약품을 위한 효력 평가 진행

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호		316025		
사업구분	일반				
연구분야	건강기능식품 및 화장품		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	국내산 버섯(동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발		과제유형	(개발)	
연구기관	동아제약(주)		연구책임자	권용삼	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016년 5월 ~ 2016년 12월	240,000	80,000	320,000
	2차연도	2017년 1월 ~ 2017년 12월	335,000	111,700	446,700
	3차연도	2018년 1월 ~ 2018년 12월	335,000	111,700	446,700
	4차연도	2019년 1월 ~ 2019년 12월	335,000	111,700	446,700
	5차연도	2020년 1월 ~ 2020년 12월	335,000	111,700	446,700
	계	2016년 5월 ~ 2020년 12월	1,580,000	526,800	2,106,800
참여기업	동아제약(주), (주)바이오텍에스알에스, (주)머쉬텍				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 12월 28일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
동아제약 (주)	차석연구원	권용삼

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 권용삼

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

확약	
----	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, √ 우수, 보통, 미흡, 불량)

동충하초 재배조건을 최적화하고 스토리텔링 자료 축적 등 서로간의 협력연구가 잘 되어 비록 아직 인정을 받지 못했으나 동충하초 관련 신규 기능성(여성갱년기, 여드름 개선 기능성)을 발굴했고 원료 B2B사업 및 일본 수출 등의 성과가 이루어졌다고 생각합니다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, √ 보통, 미흡, 불량)

파급효과는 동충하초 재배 시장이 아직 크지 않아 파급효과는 보통이라고 생각합니다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, √ 우수, 보통, 미흡, 불량)

신규연구개발 소재인 노랑다발 동충하초 및 풍뎡이동충하초와 관련하여 신규기능성, 의약품개발 등 활용가능성이 풍부하고 여성갱년기 인체적용시험 결과는 추가임상진행에 활용될 것이며 여드름 적합성 임상결과 상당히 우수한 결과를 도출하여 향후 기능성 화장품 인체적용시험을 진행하여 좋은 결과가 나올 것으로 예상됩니다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, √ 우수, 보통, 미흡, 불량)

매 연차별 달성목표를 이루고자 모두 노력하였으며 연구기간 중 협조가 잘 이루어졌습니다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, √ 우수, 보통, 미흡, 불량)

동충하초의 여성호르몬 작용기전 문헌은 impact factor 4.694로 높은 편에 속하고 논문을 많이 낸 가톨릭관동대도 전반적으로 우수한 저널에 발표하였습니다. 특허도 필요한 수준으로 출원하였습니다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
건강기능성 인증을 바탕으로 한 제품 개발 및 출시 (동아제약주식고회사, 주식회사 바이오텍에스알에스)	60	90	<ul style="list-style-type: none"> • 면역기능 바탕으로 B2B사업을 통한 자연모아 ‘면역원 제품 출시 • 화장품 3종 및 건강기능식품 출시 • 여성갱년기 개선 기능성 발굴 인체적용시험 6주 유효성 확인 • 여드름 개선 기능성 화장품 유효성 확인 화장품 임상 진행 중 •
동충하초 소재 개발 및 과학적 근거 확보 연구(가톨릭 관동대학교)	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • 동충하초 근연종인 품랭이동충하초와 노랑다발동충하초의 소재개발을 위한 대사체 확인 및 항염 효과 확인 • 동충하초 근연종인 붉은 동충하초 유래 물질 분석 및 구조 동정을 통한 신규 지표물질 확보 • 밀리타리스 동충하초 항암, 피로개선, 혈행개선에 대한 효능 확보
동충하초 소재 스토리텔링 강화 및 재배 최적화 연구(머쉬텍)	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • 동충하초 대량생산 최적화를 통한 동충하초 생산성 향상 • ㈜웅진릴리에뜨와 ㈜기리시마주조에 대한 마케팅 스토리텔링 지원
합계	100점	94	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

비록 인증까지 받지 못하였으나 여성갱년기 개선 신규 기능성과 여드름 개선 화장품 신규 기능성을 발굴하였고 계획하였던 동충하초 관련 원산지 관별기술 개발, 스토리텔링 기반 마케팅자료 축적이 원활히 진행되었고 일본 수출 달성의 성과를 이루었으며 서로간의 협업을 통해 우수한 사업화 성과(면역력 개선 B2B사업)를 달성하였다고 판단됩니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

정량성과 관련하여 사업화 성과는 종료 후 5년 시점에 달성할 목표를 이루었음
피로개선, 운동수행능력 개선의 유효성 확보 실패 후 포기하지 않고 다른 기능성을 찾았음.
코로나로 인한 여드름 개선 기능성 화장품 인체적용시험의 시험기관을 찾을 수 없었지만 지속적인 노력으로 여드름 피부 적합성 인체적용시험을 할수 있다는 기관을 찾아 목표성과를 이룰 수 있도록 노력하였습니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

여성갱년기 개선 건강기능식품 관련 6주 인체적용시험 검토 : 6주시점에 분명한 증상개선 효과가 있었으므로 6주간 섭취 인체적용시험 검토할 예정입니다.

여드름 개선 기능성 화장품은 추가로 기능성 화장품 인체적용시험을 진행할 예정입니다.

노랑다발 동충하초 및 풍뎅이 동충하초관련 발굴된 지표성분을 통해 추가 기능성 연구 및 의 약품을 위한 효력 연구에 활용할 예정입니다.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	(국문) 국내산 버섯 (동충하초) 산업화 원천기술을 활용한 융복합 스타 제품 개발			
주관연구기관	동아제약주식회사		주관연구책임자	권용삼
연구개발비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,580,000	526,800		2,106,800
연구개발기간	2016년 5월 19일 ~ 2020년 12월 31일			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타()) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:))			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 건강기능성 인증을 바탕으로 한 제품 개발 및 출시	<ul style="list-style-type: none"> • 면역기능 개선 B2B사업화로 ‘면역원’ 제품 출시 • 일반 화장품 3종 출시 • 여성갱년기 개선 유효성 확인, 작용기전 연구 완료, 인체적용시험 6주 유효성 확인 • 노랑다발 동충하초 여드름 개선 원료 유효성 확인 • 화장품 안전성 임상 진행 중/ 기능성 화장품 임상 코로나로 인한 지연
② 원료 원산지 판별기술 개발 및 가공 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 동충하초 근연종인 풍덩이동충하초와 노랑다발 동충하초의 소재개발을 위한 대사체 확인 및 항염 효과 확인 • 동충하초 근연종인 붉은 동충하초 유래 물질 분석 및 구조 동정을 통한 신규 지표물질 확보 • 밀리타리스 동충하초 항암, 피로개선, 혈행개선 에 대한 효능 확보
③ 동충하초 소재개발을 다학제적으로 구축하여 국제화 추진	<ul style="list-style-type: none"> • 동충하초 대량생산 최적화를 통한 동충하초 생산성 향상 • (주)웅진릴리에프와 (주)기리시마주조에 대한 마케팅 스토리텔링 지원

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고 용 창 출	투자 유치		SCI	비 SCI	논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
											건					백만 원	백만 원			백만 원
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	0.14 3	0.143																		
최종목표	6	3		5		10	200	40			10			5						
연구기간내 달성실적	5	2		5		10	2,151	1,550	1		14	2		8			12			
달성율(%)	83	67		100		100	1,076	3,875			140			160						

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①.	여성갱년기 개선용 건강기능식품용 조성물
②.	노랑다발 동충하초를 이용한 여드름 개선 기능성 화장품
③.	동충하초 원산지 판별 기술
④.	근연종 동충하초 지표성분 도출 및 표준화 기술
⑤.	동충하초 스토리텔링 마케팅 자료

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		✓				✓				✓
②의 기술		✓								
③의 기술	✓									
④의 기술	✓									
⑤의 기술	✓									

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	후속 인체적용시험 검토에 활용, 성공률 향상
②의 기술	여드름 개선 기능성 화장품 임상시험, 기능성 인증 및 마케팅 자료로 활용
③의 기술	동충하초 원생약 품질관리
④의 기술	신규 동충하초 기능성 탐색 및 의약품용도 신규 약효 평가
⑤의 기술	신규 제품 마케팅 자료로 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
											SCI	비SCI	논문평균IF						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	6	6	0	5	10	1,100	290				10		5						
연구기간 내 달성실적	5	2		5	10	215	1550	1			12	2	8					12	
연구종료 후 성과창출 계획	1	4				-	-												

주 의

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