

(뒷면) (옆면)

(앞면)

11-1543
000-002
246-01

발간등록번호

11-1543000-002246-01

농산물 소재를 활용한
고부가가치 제품개발
지원을 위한 CRO 구축
최종보고서

2018

농림축산식품부

기술사업화지원사업 R&D Report

농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품개발 지원을 위한 CRO 구축 최종보고서

2018.04.27

주관연구기관 / 계명대학교 산학협력단
협동연구기관 / 경북대학교 산학협력단
(재)대구테크노파크

농림축산식품부

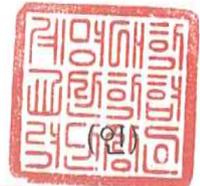
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 CRO구축”(개발기간 : 2014. 12. 19 ~ 2017 . 12. 18)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

남 재 열



협동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단

최 재 용 (인)



협동연구기관명 : (재)대구테크노파크

권 영 (인)



주관연구책임자 : 이 삼 빈

협동연구책임자 : 박 승 춘

협동연구책임자 : 도 은 주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314082-3	해당단계 연구기간	2014.12.19.~ 2017.12.18	단계구분	개발단계/ (총 단계)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	기술사업화지원사업			
연구과제명		농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 CRO구축 CRO for supporting the development of high value products using agriculture ingredients			
연구책임자	제1주관: 이삼빈 제1협동: 박승춘 제2협동: 도은주	해당단계 참여 연구원 수	총: 40명 내부: 40명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:440,000천원 민간:170,560천원 계:511,680천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 66명 내부: 66명 외부: 0명	총연구개발비	정부:1,320,000천원 민간:511,680천원 계:1,831,680천원
연구기관명 및 소속부서명	주관: 계명대학교 산학협력단 제1협동: 경북대학교 산학협력단 제2협동: (재)대구테크노파크	<참여기업명>			
		<ul style="list-style-type: none"> - 동우당제약(주) - 아람농장(주) - 계명바이오테크 - 구관모식초 - 상주호호쭈마스영농조합법인 - 한선당 - 더블어식품 - 청보내츄럴 - 알지아이오 - 농업회사법인(주)초록들 - (주)비케이바이오 - 금중쌀 - 경북친환경영농조합법인 - (주)오선디 - 농업회사법인 늘그린 - (주)리더스바이오텍 - 문경새재골민들레식품 - 새아침영농조합법인 			
요약 대구·경북 지역의 중소기업을 중심으로 제품개발과 효능입증을 체계적으로 지원하기 위해서 지역대학(계명대학교, 경북대학교)과 기존의 인증시험기관(대구테크노파크 한방산업지원센터)간 협력형 네트워크를 형성하여 참여기업의 맞춤형 CRO구축 및 서비스를 수행하였다. 농·식품을 중심으로 유용미생물을 통한 발효, 시제품개발 및 건강기능식품 도달을 위한 비임상·임상적 효능평가를 지원하였다					보고서 면수 258

〈 요약문 〉

	코드번호	D-01											
연구의 목적 및 내용	<p><input type="checkbox"/> 본 과제는 지역의 중소기업(농축산식품기업)에서 제품개발이 용이하도록 지역대학과 기존의 인증시험기관간 협력형 네트워크를 구축하여 소재탐색, 연구개발, 효능평가, 시제품제작 등 기업 맞춤형 연구기반의서비스를 원-스톱으로 지원하는 협력형 CRO시스템을 구축하여 발전시키고, 한편 특화된 전통 미생물자원 및 핵심발효기술을 활용한 고부가 기능성 식품소재개발 및 제품화 지원을 목표로 함</p> <p><input type="checkbox"/> 지역 농축산식품 중소기업에 최적화된 협력형 CRO 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 협력형 CRO 시스템의 구축 및 활용 - 제품개발지원을 위한 네트워크 및 One-stop 서비스 확립 - 기업맞춤형 개발단계별 패키지 서비스 확립 - 기존에 확립된 유효성 평가법 표준화 및 연구설계 지원 - 기업 애로기술, 연구개발 단계 진단, 기업별 지원방향 도출 및 지원계획 설계 - 연구기반 취약 영세기업의 기술수요에 대응한 연구개발 대행 서비스를 제공 <p><input type="checkbox"/> 농림축산식품소재 및 전통 미생물자원을 활용한 연구개발 대행 협력형 CRO 조직 육성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 발효기술을 통한 기능성강화 고부가가치 소재개발 지원 - 고부가 기능성 식품소재개발 및 제품화 지원 - 효능평가(<i>in vitro</i>), 소재 특성 평가, 품질평가 지원 핵심기술 및 시스템 확립 <ul style="list-style-type: none"> : 시험관, 세포계를 활용한 항목별(체지방조절, 면역기능, 간기능개선) 효능평가법 확립 및 SOP 구축 - 효능검증(<i>in vivo</i>) 지원 시스템 확립 및 SOP 구축 <ul style="list-style-type: none"> : 동물실험(체지방조절, 면역기능, 간기능개선)을 통한 효능 평가 - 인체적용시험(체지방조절, 면역기능, 간기능개선, 인지능개선) 지원 시스템 확립 - 구축된 연구개발 지원 시스템의 확립 및 패키지 프로그램 개발 <p><input type="checkbox"/> 민간위탁연구대행조직 자립화 방안 도출</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수요조사 결과를 기반으로 한 연구개발 대행시스템 확대 운영 - 산학공동연구 및 용역과제 활성화를 통한 기업지원, 수익모델 도출 - 민간위탁연구대행조직 운영 활성화를 통한 수익창출(기술이전, 상품화 로열티 확보) 												
연구개발 성과	<p><input type="checkbox"/> 정성지표</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">구분</th> <th style="width: 15%;">기관명</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">내용</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2" style="text-align: center;">주관 기관</td> <td style="text-align: center;">계명 대학교</td> <td style="text-align: center;">R&D 추진</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도: 발효율금의 젓산발효 최적화 외 9건 - 2차년도: 헛개나무 열매 추출물 혼합발효 최적화 외 6건 - 3차년도: 동충하초 배양액의 젓산발효 조건 확립 외 7건 </td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">지표물질</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> - curcumin, carotenoid, GABA, γ-PGA 등 HPLC 분석 </td> </tr> </tbody> </table>		구분	기관명	내용		주관 기관	계명 대학교	R&D 추진	<ul style="list-style-type: none"> - 1차년도: 발효율금의 젓산발효 최적화 외 9건 - 2차년도: 헛개나무 열매 추출물 혼합발효 최적화 외 6건 - 3차년도: 동충하초 배양액의 젓산발효 조건 확립 외 7건 		지표물질	<ul style="list-style-type: none"> - curcumin, carotenoid, GABA, γ-PGA 등 HPLC 분석
구분	기관명	내용											
주관 기관	계명 대학교	R&D 추진	<ul style="list-style-type: none"> - 1차년도: 발효율금의 젓산발효 최적화 외 9건 - 2차년도: 헛개나무 열매 추출물 혼합발효 최적화 외 6건 - 3차년도: 동충하초 배양액의 젓산발효 조건 확립 외 7건 										
		지표물질	<ul style="list-style-type: none"> - curcumin, carotenoid, GABA, γ-PGA 등 HPLC 분석 										

		분석	- 스피루리나 향기성분 GC-MS분석
		효능평가 (<i>In vitro</i>)	- 1차년도: 체지방 개선(늪은호박 발효물), 면역증진(민들레 발효물, 미강 발효물), 간기능보호(민들레발효물) 효능평가 - 2차년도: 체지방 개선(한방 청국장), 면역증진(발효 아로니아, 동충하초 발효물, 황칠 발효물) - 3차년도: 면역증진(늪은호박 발효물), 간기능 개선(발효스피루리나, 동충하초 발효물, 발효아로니아)
제1 협동	경북 대학교	효능평가 (<i>In vivo</i>)	- 1차년도: 체지방 조절(늪은호박 발효물), 간기능개선(토복령 발효물) - 2차년도: 면역활성(황칠나무 추출 발효액), 간손상 억제(헛개나무 추출 발효액) - 3차년도: 면역활성(발효아로니아, 한방청국장, 동충하초 발효액)
제2 협동	한방산 업지원 센터	임상평가	- 1차년도: 기억력 개선(발효울금), 면역 개선(현미흑초) - 2차년도: 인지기능 개선(발효울금), 숙취개선(토복령 발효물) - 3차년도: 인지기능 개선(발효울금), 체지방개선(호박 발효물), 면역개선(황칠 발효물)

□ 정량지표

목표		목표치 (달성율)	내용
사 업 화 지 표	지식 재산권	특허 출원 11건/ 등록 2건 (115%)	- ‘헛개나무 열매 추출 발효물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물 및 이의 제조방법’ 외 특허출원 14건 (특허출원 12건, 상표출원 2건) - ‘고초균 발효를 통한 간기능개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법’ 외 특허등록 4건 (특허등록 3건, 상표 1건)
	기술실시	기술실시 6건 (100%)	- ‘한방소재를 첨가한 고품질생청국장 제조방법’ 외 기술이전 6건 (통상실시권 5건, 노하우 이전 1건) - 총 기술이전료 37,850,000원
	사업화	제품화 3건 매출액 3건 (100%) 시제품화 15건 고용창출 3건 (200%)	- 제품화 3건, 매출액 699백만원 • 청보내츄럴 생나또,동결건조청국장 매출액690백만원 • 상주호호즙마스 Allygo99아로니아 3.5백만원 • 동우당제약(주) 간애력 5.5백만원 - 시제품화 15건 • 음료류 동안아로니아/황칠/좋은속/술이헛개/망개차 • 음료베이스 내뭉에단비/삼색호박/발효아로니아청 • 소스 산감미소스/산야초드레싱/야채무침소스 • 기타가공 청국장스낵/청국장건과류/호박과자/발효울금환 - 참여연구원 취업 및 참여업체 연계취업으로 고용창출 6건
기술인증	기술인증 1건	- 건강기능식품 개별인정형 기술인증 기초자료 확보 - 발효울금에 고시형 원료(밀크시슬)을 첨가하여 ‘간애력’ 상품화	
연구 기 반 지 표	학술성과	SCI 9건 비SCI 11건 (105%) 학술발표37건 (218%)	- SCI 논문 13건, 비SCI 논문 8건 <u>(비SCI 논문 목표 11건중 8건 달성으로 100% 달성하지 못하였지만 SCI 논문 대리달성으로 총 논문건수 달성)</u> - 학술발표 한국식품과학회 외 5개의 학회 참석으로 학술발표 총 81건 달성
	교육지도	90건 (158%)	- 기술지도 및 교육 목표 90건 중 143건 달성

인력양성	39건(53%)	- 박사 3명, 석사 7명, 학사 11명 참여연구원 졸업 및 연계취업
정책활용	6건(100%)	- 총 6회 협의체구성 실시
홍보전시	12건(150%)	- TMR센터 E-news letter 참여업체 홍보 16건 - 유망기술발표회 참여 등 인터넷 뉴스 2건
기타	0건	- <i>Bacillus methylotrophicus</i> 포함 미생물기탁 총 3건 - 국제학술대회우수포스터(3건),제품개발경진대회(3건): 6건 수상 - 업무제휴협약(MOU) 체결 10건 - 기업부설연구소, 지역혁신센터사업 등 연구개발 사업에 활용

□ 기 구축된 유용 균주 및 인프라 활용으로 발효산업 활성화

- 전통발효식품으로부터 분리된 고초균, 젖산균 등을 산업적 균주로 활용 확대
- 유용발효 균주의 활용을 통한 식품·바이오 관련 소재개발 및 기업지원 확대
- 발효제품의 기능성 및 효능평가로 기업의 제품 고도화를 통한 사업 활성화 지원

□ 유용성과 기능성이 확보된 웰빙 식품·바이오 소재산업 활성화

- 미강(흑미강) 등의 부산물을 활용한 고부가소재화 및 기업 수익창출
- 발효 및 생물전환에 따른 고부가 신소재 개발로 건강식품 소재산업 활성화 유도
- 핵심 발효기술을 활용한 기업의 차별화 제품개발 및 경쟁력 강화
- 바이오헬스 신소재 산업분야 소재개발을 위한 전통발효 핵심기술 및 제품화 지원

□ 협력형 민간위탁연구대행조직 자립화

- 연구개발 대행 서비스 이용 기업의 성장 및 연구개발 재투자 선순환 도모
- 밀착 기업지원 및 성공적인 연구개발 추진을 통한 자립화 시스템 확립
- 고부가 식품개발 기업의 CRO 인프라 활용 확대
- 다양한 소재의 *in vivo* 효능평가 지원을 위한 시스템 및 동물실험시설 운영 극대화
- 식품·바이오제품의 품질 및 기능성 연구를 통한 사업화 연계지원

□ 식품·바이오제품의 효능평가, 표준화 및 상품화 지원의 활용으로 기업 매출증대

- 제품의 효능 평가에 의한 제품의 신뢰도 증가 및 고부가 상품화
- 기업 경쟁력 강화 및 맞춤형 밀착 산학지원으로 고용창출 유도
- 자체 연구개발 인력 및 조직을 보유하지 않은 중, 소규모 업체의 제품의 표준화, 규격화, 상품화 지원에 따른 매출상승
- 국가공인 식품·축산물 검사기관의 연계활용을 통한 기업의 상품화 기간 단축

□ 식품·바이오 및 헬스소재의 글로벌 제품화

- 전통 발효제품의 품질 및 기능성의 체계적 연구를 통한 과학적 자료 확보에 따른 글로벌 바이오헬스 소재로 세계시장 진입
- 제품의 기호성, 유형의 다양화 및 효능 차별화를 통한 글로벌 건강제품 개발
- 한류 열풍에 따른 동남아, 일본, 미국 시장으로 수출확대

중심어 (5개 이내)	민간위탁연구대 행조직	전통미생물	발효식품	고부가식품	웰빙식품바이오 소재
----------------	----------------	-------	------	-------	---------------

< SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p><input type="checkbox"/> This project is to establish a cooperative network between local universities and Certification Testing Institutes to facilitate the product development in local SMEs including agricultural and livestock food companies, and to support the research on natural materials, R&D, efficacy and prototype. We will build and develop a cooperative CRO system that provides one-stop service based on the company-customized research. Our goal is to support the development and commercialization of high value-added functional food materials utilizing specialized traditional microbial resources and core fermentation technology.</p> <p><input type="checkbox"/> Establishment of cooperative CRO optimized for local agricultural and livestock food companies</p> <ul style="list-style-type: none"> - Construction and utilization of cooperative CRO system - Establish network and one-stop service for product development support - Standardization of existing established validation method and support for research design - Solving difficult technology of company, R&D stage diagnosis, direction of support for each company and design of support plan - Provide R&D agency services in response to the technology needs of small, vulnerable enterprises based on research <p><input type="checkbox"/> Fostering cooperative CRO organization for R&D service utilizing agricultural and livestock food as well as traditional microbial resources</p> <ul style="list-style-type: none"> - Functional enhancement through fermentation technology and supporting the development of high value added materials - Development and commercialization of high value-added functional food materials - Establishment of core technology and system for supporting in vitro efficacy evaluation, material characterization, and quality evaluation <li style="padding-left: 40px;">: Establishment of SOP system for supporting efficacy analysis. by using items such as test tube, cell line (control of body fat, immune function, liver function) - Establishment of support system for in vivo efficacy and construction of SOP: Evaluation of efficacy through animal experiments (body fat control, immune function, liver function improvement) - Establishment of support system for human body test (body fat control, immune function, liver function improvement, cognitive function improvement) - Establishment of established R&D support system and development of supporting package program <p><input type="checkbox"/> Deriving a plan for self-reliance of private commissioned research agency</p> <ul style="list-style-type: none"> - Expanded operation of R&D agency system based on demand survey of company - Operation of revenue model through enterprise support as well as joint research and service project 	

- Revenue creation through revitalization of private contract research agency (technology transfer and commercialization royalties)

Results	<input type="checkbox"/> Qualitative index			
	Division	Content		
	Host Organization	R&D	<ul style="list-style-type: none"> - First year: Optimization of GABA production by lactic acid fermentation of turmeric and other 9 cases - Second year: Production of functional beverage by mixed fermentation of <i>Hovenia dulcis</i> extract and other 6 cases - Third year: Establishment of lactic acid fermentation of <i>Cordyceps sinensis</i> and other 7 cases 	
		Analysis Marker compound	<ul style="list-style-type: none"> - HPLC analysis of curcumin, carotenoid, GABA, γ-PGA - GC-MS analysis of spirulina aroma compound 	
		Evaluation of efficacy (<i>In vitro</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - First year: Dietary supplement (fermented pumpkin), immune enhancement (fermented <i>Taraxacum coreanum</i>, fermented rice bran), Improvement of hepatic function (fermented <i>Taraxacum coreanum</i>) - Second year: Controlling body fat (herb natto), immune enhancement (fermented aronia, <i>Cordyceps sinensis</i>, <i>Dendropanax morbiiferus</i>) - Third year: Immune enhancement (fermented pumpkin), improvement of hepatic function (fermented spirulina, <i>Cordyceps sinensis</i>, aronia) 	
	First Cooperative Organization	Evaluation of efficacy (<i>In vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - First year: Controlling body fat (fermented pumpkin), improvement of hepatic function (fermented <i>Smilax china</i>) - Second year: Immune enhancement (fermented <i>Dendropanax morbiiferus</i>), improvement of hepatic function (fermented <i>Hovenia dulcis</i>) - Third year: Immune enhancement(fermented aronia, herb natto, fermented <i>Cordyceps sinensis</i>) 	
Second Cooperative Organization	Clinical evaluation	<ul style="list-style-type: none"> - First year: Improved memory function(Fermented turmeric), Immune enhancement (black vinegar) - Second year: Improved memory function(fermented turmeric), improvement of hangover (fermented <i>Hovenia dulcis</i>) - Third year: Improvement of cognitive function (fermented turmeric), Body fat control (fermented pumkin), Immune enhancement (fermented <i>Dendropanax morbiiferus</i>) 		

<input type="checkbox"/> Quantitative index			
Goal		Target Value (Achievement rate)	Content
C o m · I n	Intellectual Property Rights	Patent application 11건/ registration 2건 (115%)	<ul style="list-style-type: none"> - 'Composition for improving hepatic function, containing fermented extract of <i>Hovenia dulcis</i> as an active ingredient, and its production method' and other 14 patent applications (12 patent applications, 2 trademark applications) - 'Method of manufacturing fermented jujube with improved liver function or immune function through <i>B. subtilis</i> fermentation' and other 4 patent registration

	d e x			(1 trademark, 3 patent registration)	
		Technical Implementation	Technical implementation 6건 (100%)	- 'Production method of high-quality raw yeast supplemented with herbal ingredients' and other 6 technology transfer (5 patent license trade, 1 know-how transfer) - Technology transfer : total fee (37,850,000 won)	
		Commercialization	Commercialization 3건 Sale products 3건 (100%) Job creation 3건 (200%)	- Commercialization • raw natto (supplying new natto strains) ₩ 690,000,000 • Allygo99 Aronia (Arrioni drink) ₩ 3,500,000 • Power of liver (fermented turmeric) ₩ 5,500,000 - Achievement of 3 commercial products / 15 prototypes - Job creation by participating researchers and related companies (6 persons)	
		Technical Certification	Technical certification 1건	- Obtain the basic data for the authentication of health functional foods. - Development of noticed functional food with fermented turmeric and milk thistle (Liver Force)	
	R & D I n d e x	Academic Achievement	SCI 9건 non-SCI 11건 (105%) Presentation 37건 (218%)	- Publication of 13 SCI papers, 8 non-SCI papers - Academic post presentation (total 81) on National Symposium held in Korean	
		Education Support	90건 (158%)	- Achieved 143 cases out of 90 technical guidance and training goals	
		Student Training	39건 (53%)	- 3 doctoral students, 7 masters, 11 bachelor's graduates (total 21 students)	
		Policy Use	6건 (100%)	- Implementation of a total 6 association	
		Publicity Exhibition	12건 (150%)	- Promotion of participant (16 cases) through TMR Center E-newsletter - Participation in promising technology presentation and Internet news	
		Others	0건	- Microbial deposit (3) with <i>B. methylotrophicus</i> - Awards of excellent poster (3), and Product Development Competition (3) - Signed MOU with ten business partners (10 cases) - Application in R&D projects such as company-affiliated research institute and regional innovation center project	
	Expected Contribution	<input type="checkbox"/> Activation of fermentation industry by utilizing isolated novel strains and infrastructure - Expansion of utilization as industrial strains of <i>B. subtilis</i> and lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods - Development of food and biotechnology related materials and expansion of enterprise support through utilization of novel fermentation strains - Functional and efficacy evaluation of fermented product to support business activation by upgrading product quality <input type="checkbox"/> Activation of well-being food and biomaterial industry with usefulness and functionality - Profit creation with high-value-added materials using byproducts such as rice (black			

rice)

- Development of high-value-added new materials following fermentation and bioconversion
- Enhanced company competitiveness and development of new products utilizing core fermentation technology
- Supporting traditional fermentation core technology and commercialization for development of new material in bio-health industry

Self-reliance of collaboration-type CRO agency

- Strength of commercialization and R&D through expansion of CRO service
- Establishment of a self-supporting system through support of close enterprise and successful research and development
- Expanded utilization of CRO infrastructure for high-value food companies
- Maximizing system and animal testing facilities to support evaluation of in vivo efficacy of various materials
- Support for commercialization through research on quality and functionality of food and bio products

Increase sales of company by utilizing efficiency evaluation, standardization and commercialization of food · bio products

- Increasing reliability of products by evaluating the efficacy of products and commercialize high value-added products
- Increasing employ of company by strengthening competitiveness and customized close co-operation with industry
- Increased sales by supporting standardization, and commercialization of products in small companies without research system
- Shortening the period of commercialization of the new product through co-operation with national authorized food and livestock inspection agencies

Globalization of food, bio and health products

- Entering the global market as a global bio-health material by securing scientific data through systematic research on the quality and functionality of traditional fermented products
- Development of global health products by differentiating palatability, diversity of type and efficacy of products
- Expansion of export to Southeast Asia, Japan, and US market due to Korean wave open

Key words	Contract research organization	traditional microorganism	fermented foods	high-value foods	wellbeing food-biomaterial
-----------	--------------------------------	---------------------------	-----------------	------------------	----------------------------

〈Contents〉

1. Necessity of research development	1
2. Domestic and oversea technology development status	16
3. Result of research activity	22
가. Evaluating efficacy of cognitive function improvement using fermented tumeric and product development	22
나. Evaluation of efficacy and development of prototype for improvement of body fat of old pumpkin fermented	53
다. Evaluation of immune enhancement efficacy and production of prototype using fermented mushroom	83
라. Clinical evaluation of immunity enhancement of brown rice vinegar and commercialization of fermented product	98
마. Development and commercialization of immune enhancement efficacy evaluation of fermented aronia product	121
바. Evaluation of efficacy and product development of hangover by mixed fermentation of 7 kinds of medicinal herbs extract	139
사. Development of sauces using fermented apple pomace and ear mushroom rich in dietary fiber	164
아. Product development and efficacy evaluation of fermented Chungkookjang added herbal ingredients	172
자. Development of materials using spirulina and evaluation of liver function protection efficacy	186
차. Development of source prototype using fruits and vegetables fermented extract	194
카. Assessment and clinical evaluation of immunity enhancement effect by fermentation of <i>Dendropanax morbiferus</i> extract	196
타. Other research achievements	228
4. Accomplishment of research goal and contribution of relative filed	247
5. Application plan of research achievement	248
6. Oversea technology information collected during research process	250
7. Security rating of research achievement	251
8. Research facility and equipments enrolled in Comprehensive Information System of National Science Technology	251
9. Fulfillment of safety measures in laboratory activity during the research activities	251
10. Representative research achievement	253
11. Additional note	254
12. References	254

<Appendix> Self-evaluated sheet

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	16
3. 연구수행 내용 및 결과	22
가. 발효울금을 이용한 인지능개선 효능평가 및 제품 개발	22
나. 늪은호박 발효물의 체지방개선 효능평가 및 시제품 개발	53
다. 버섯 발효물을 이용한 면역증진 효능평가 및 시제품 제작	83
라. 현미흑초의 면역증진 임상평가 및 헛개발효물의 상품화 제작	98
마. 아로니아 젖산발효물의 면역증진 효능평가 및 상품화 개발	121
바. 토복령(망개뿌리)의 7종 한약재 추출물의 혼합발효를 통한 숙취해소 효능평가 및 제품개발	139
사. 식이섬유가 풍부한 사과박 및 목이버섯 발효물을 이용한 소스개발	164
아. 한방소재가 첨가된 발효청국장외의 제품개발 및 효능평가	172
자. 스피루리나를 이용한 소재개발 및 간기능보호 효능평가	186
차. 과일·채소 발효엑기스를 이용한 소스 시제품 개발	194
카. 발효황칠을 이용한 면역증진 효능평가 및 임상평가	196
타. 기타 연구성과	228
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	247
5. 연구결과의 활용계획 등	248
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	250
7. 연구개발성과의 보안등급	251
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	251
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	251
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	253
11. 기타사항	254
12. 참고문헌	254

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

가. 연구개발 목적

○ **최종목표:** 농축산식품기업의 90% 이상을 차지하는 중소기업에서 제품개발이 용이하도록 지역대학과 기존의 인증시험기관간 협력형 네트워크를 구축하여 소재탐색, 연구개발, 효능평가, 시제품제작 등 기업 맞춤형 연구기반의 토털 서비스를 원-스톱으로 지원하는 협력형 CRO시스템을 구축하여 발전시키고, 한편 특화된 **전통 미생물자원 및 핵심발효기술을 활용한 고부가 기능성 식품소재개발 및 제품화 지원**을 목표로 함

☞ 국내 농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 연구기반의 협력형 연구대행기관 구축으로 농림축산식품의 선진화와 국제 경쟁력 확보에 기여하는 것이 최종 목표임

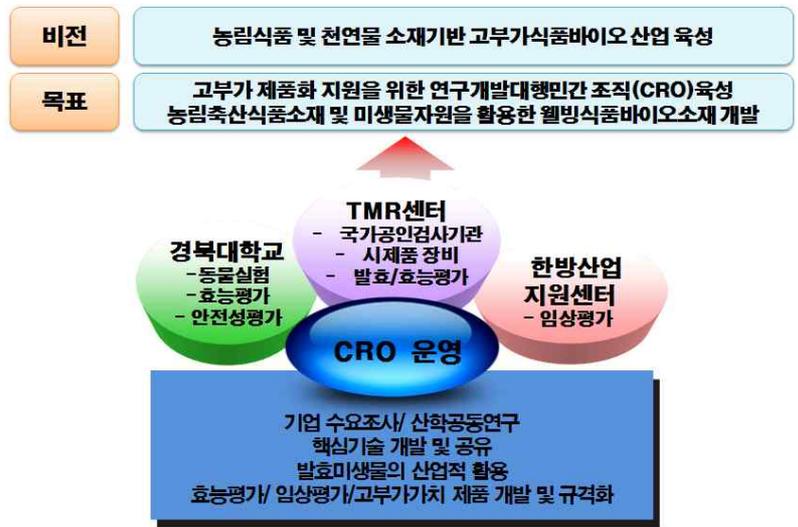


그림. 협력형 CRO 구축의 비전과 목표

나. 연구개발의 필요성

I. 지역기반의 농축산 식품관련 중소기업을 지원하기 위하여
기업중심 협력형 CRO 시스템의 구축이 필요함

(1) 협력형 CRO 시스템의 구축

○ 친환경/건강/경쟁력 있는 농축산식품에 대한 요구도 증가

- 국내 생물산업은 고부가가치를 창출할 수 있는 21세기형 미래 첨단산업으로, 생물농업, 생물환경 등 관련 응용분야의 급성장이 예상되고 항암제, 유전자치료제, 치매치료제 등이 차세대 유망품목으로 지정되었고 바이오식품, 생물농약 등으로 응용분야가 확대되는 추세

- 국내 전체 사업체의 수는 347만개이고 이 중에서 종업원 수 5인 이상 20명 미만인 소규모-사업체(소기업) 수는 아래와 같이 335만개로서, 전체의 96.4%를 차지하고 있음
- 90년대 중반 수십 개였던 바이오관련 기업 수가 현재는 1,000여개, 매출이 증가한 기업의 수도 전체의 64%에 이르는 등 양적 성장을 나타내고 있으며, 2005년 국내 생물 산업 생산 규모는 2조 7,714억 원으로 2004년의 2조 4,199억 원 대비 14.5% 증가됨

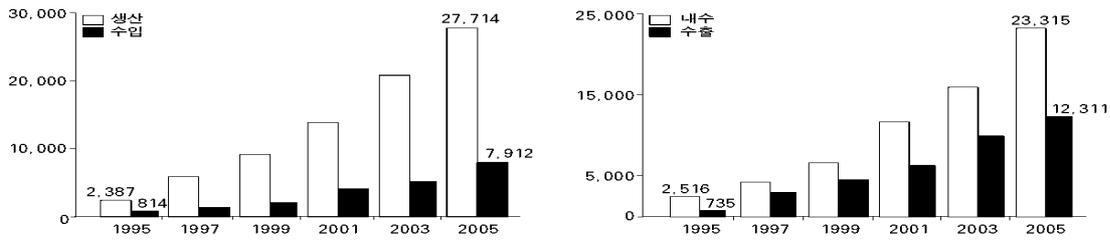


그림. 국내 생물산업활동 성장 추이

자료 : 한국생물산업협회 2006년

- 인구의 고령화, 웰빙 의식의 확산, 건강에 대한 관심고조, 식이요법에 대한 인식이 증대됨에 따라 건강식 및 기능성 식품/화장품 시장이 앞으로도 빠르게 성장할 것으로 전망됨



그림. 건강기능식품 분류별 매출액 현황

○ 중소기업을 지원하는 연구기반의 CRO 시스템의 필요성

- 이에 발맞추어 지역 내 생물 관련 기업체 수 역시 빠르게 증가하고 있으나 지역식품업계의 94.2%가 매출액 10억 미만의 소기업으로 매출액은 전체 식품제조가공업체 매출액의 34.3%를 차지하고 있는 수준임

표. 대구지역 식품제조가공업체 매출액 현황

(단위: 천원)

구분	업체수		매출액	
		비율%		비율 %
계	931	100	752,794,003	100
1억 원 미만	655	70.4	187,007,048	24.9
1-5억 원	177	19	39,601,300	5.3
5-10억 원	45	4.8	30,975,164	4.1
10-20억 원	19	2	29,254,088	3.5
20-50억 원	21	2.3	75,353,428	10.1
50-100억 원	9	1	63,056,762	8.4
100억 원 이상	5	0.5	327,546,213	43.7

출처: 식약청 식품이력추적관리시스템(www.kfda.go.kr), 2012

표. 산업집적지의 생산성 및 성장성

집적지명	시도	군	주요업종	사업체수(개)	종사자수(명)
식음료가공	대구광역시	달서구	식음료가공	918	3,428
의료	대구광역시	북구	의료기기	185	1,817
(한)의학	대구광역시	중구	의약품 약제품	23	33
전통식품	대구광역시	북구	전통가공 및 발효식품	150	265
R&D	대구광역시	달서구	농업 및 생명공학연구	6	124
		북구	의약 및 약학 연구	6	160

출처 : 대구광역시, [사업체기초통계조사보고서], 2006

-지역 내 이들 관련 중소기업 및 벤처기업의 산학협업체의 수요조사시 (2006, 기술지원사업), 생물 소재를 이용한 신상품개발, 신기술 및 시장정보제공, 시설 및 장비활용, 특허출원등록지원, 시제품개발, 제품안정성, 규격화 및 기능성·효능평가와 이를 통한 고부가가치 제품을 개발하고자하는 요구가 강함

☞ 식품신소재는 기존의 식음료산업, 건강기능식품산업, 바이오식품산업과 생물약산업(천연물 의약품산업 등), 생물화학산업(천연물화장품산업 등)분야의 기능성 소재로 사용되면서 창조경제 융합형 산업을 창출하게 될 것으로 전망

표. 5차년도 기술지원사업 희망분야

(단위 : n, %)

구분		전체	사업분야			
			건강기능식품	화장품·제약	일반식품	기타
기술개발지원	신상품개발지원	64 (55.7)	21 (70.0)	15 (57.7)	21 (56.8)	7 (31.8)
	시제품개발지원	47 (40.9)	16 (53.3)	10 (38.5)	14 (37.8)	7 (31.8)
	제품고급화기술지원	40 (34.8)	12 (40.0)	8 (30.8)	17 (45.9)	3 (13.6)
	디자인개발지원	50 (43.5)	16 (53.3)	12 (46.2)	18 (48.6)	4 (18.2)
분석 및 제작지원	시설 및 장비활용지원	54 (47.0)	17 (56.7)	13 (50.0)	15 (40.5)	9 (40.9)
	고가시험분석지원	57 (49.6)	13 (43.3)	13 (50.0)	20 (54.1)	11 (50.0)
	시제품제작지원	41 (35.7)	17 (56.7)	8 (30.8)	13 (35.1)	3 (13.6)
	현장기술 자문/지도	28 (24.3)	12 (40.0)	3 (11.5)	11 (29.7)	2 (9.1)
특허인증 지원	특허출원등록지원	54 (47.0)	17 (56.7)	9 (34.6)	20 (54.1)	8 (36.4)
	규격획득/인증지원	32 (27.8)	10 (33.3)	5 (19.2)	12 (32.4)	5 (22.7)
	제품안전성/기능성/효능평가	47 (40.9)	15 (50.0)	11 (42.3)	14 (37.8)	7 (31.8)
정보관리지원	신기술/시장정보제공	54 (47.0)	20 (66.7)	10 (38.5)	17 (45.9)	7 (31.8)
	생산혁신 및 관리지도	27 (23.5)	9 (30.0)	4 (15.4)	11 (29.7)	3 (13.6)
	기술관리지도	24 (20.9)	10 (33.3)	3 (11.5)	9 (24.3)	2 (9.1)
기술이전지원	기술이전지원	22 (19.1)	11 (36.7)	3 (11.5)	8 (21.6)	
	기술마케팅지원	44 (38.3)	17 (56.7)	6 (23.1)	15 (40.5)	6 (27.3)
계		115 (100.0)	30 (100.0)	26 (100.0)	37 (100.0)	22 (100.0)

자료출처 : 지역기술개발사업, 2006

- 지역 생물산업의 안정적인 발전과 성장을 위해서는 혁신역량이 있는 중소기업 및 벤처기업과의 협력 하에 지원센터, 대학 등의 산학연 협력체계 구축이 절실히 요구됨
- 대구광역시는 지난 6년간 지역 내 전통생물소재 즉 동·식물자원, 전통미생물, 전통발효식품 등을 이용한 다양한 기능성 제품의 개발 및 제조, 나아가 생물의약, 생물화학, 생물환경 등의 고부가가치 제품 개발을 위하여 생물산업 인프라를 구축하였음
- 지역 내 식품·생물산업체에 대한 위해요소중점관리기준(HACCP) 지도 및 위해요소분석 등을 통한 식품 규격화/생물소재의 안전성평가 및 규격화에 대한 분석과 평가를 위한 공인된 분석기관/건강기능식품 및 바이오 제품의 기능성·안전성·효능의 검증과 규격화 등은 공인된 인증기관 등에 대한 인프라 풍부함
- 생물소재의 고부가가치를 위한 개발 소재, 제품의 규격화와 기능성·안전성평가 및 상품화를 위한 인증지원센터의 구축이 대부분으로 연구지원 부분에는 소규모에 그침

표. 대구지역 바이오관련 인프라 구축 현황

사업명	지정부처	설치기관
첨단감각기능회복장치 연구센터	보건복지부	경북대학교 병원
생물건강·농업생명 융합형 인재양성 사업단	교육인적자원부	경북대학교
골격계질환유전체 연구센터	보건복지부	경북대학교병원
대구바이오산업지원센터	산업통상부	성서벤처공장내
전통미생물자원개발 및 산업화연구센터	산업통상부	계명대학교
한방산업지원센터	산업통상부	대구한의대부속한방병원
한방생명자원연구센터	산업통상부	대구한의대
첨단진료예측의료기술 클러스터 사업단	산업통상부	경북대학교
생체분자공학실용화연구센터	산업통상부	경북대학교의과대학
의료텔레메딕스산업육성사업단	산업통상부	계명대학교
만성질환예방 및 치료화학제 연구센터	과학기술부	계명대학교
지능형진료지원 및 정보공유 시스템 개발센터	보건복지부	경북대학교의과대학
BICT융합 애견산업 기반조성	산업통상부	경북대학교
지역임상센터	보건복지부	경북대학교병원
퓨전테크노벨트 연구개발사업단	과학기술부	계명대학교
생체정보기술개발사업단	산업통상부	계명대학교동산의료원
첨단산업지원센터	산업통상부	계명대학교

- 식품산업의 연구개발 집약도는 2007년 0.7%이후 완만하게 상승하여 2009년에는 0.99%에 이르렀으나 다른 보건의료산업인 의약품산업(5.77%), 의료기기산업(6.9%)과는 큰 차이를 보임
- 식품산업의 연구개발에 대한 정부의 지원도 다른 의료산업과 달리 소규모로써 식품산업의 연구개발비는 대부분 기업에 의해서만 추진되고 있음 2009년 식품산업의 연구개발비는 자체부담을 통한 재원조달이 전체의 94.3%로써 의약품산업(88.8%), 의료기기산업(76.5%) 보다 높게 나타나고 있음
- 지역식품업계의 74%가 매출액 10억 미만의 소기업으로 그 규모가 영세하여 연구소 보유, 연구개발전담부서, 연구개발인력에 대한 투자가 어려우므로 지역기반 생물/의약 관련 중소기업의 동반 성장을 위해서 연구지원이 필수적임



그림. 식품산업 연구개발 추이

출처: 한국보건산업진흥원, 2011, 2010 보건산업백서

○ **협력형 CRO 시스템의 필요성**

- 대학의 연구수준은 이미 세계 수준이며 이를 중심으로 대구·경북 지역에 산재되어 있는 풍부한 생물소재의 활용과 연구 결과의 산업화 지원 시, 선진국의 바이오 제품과 차별화된 제품 생산으로 지역특화 생물산업 발전이 촉진될 것으로 사료됨
- 대학 및 각 전문기관의 연계를 통해 기업요구에 맞춤형 제품을 연구개발 할 수 있는 환경이 조성되며 또한 연구영역의 확장으로 제품개발 능력은 무한대로 커짐

표. 생물산업 관련 대학부설 연구소 현황

대 학	연 구 소 명
경 북 대	유전공학연구소, 환경과학연구소, 농업과학기술연구소, 국제농업연구소, 농산물품질안전성평가연구소, 사과연구소, 잠사과학연구소
영 남 대	생명공학연구소, 약품개발연구소, 자원문제연구소, 장류연구소
계 명 대	자연과학연구소, 생활과학연구소, 산업기술연구소, 전통미생물자원개발 및 산업화센터
대구한의대	생명자원개발연구소, 환경시스템개발연구소, 기초과학연구소, 효능검증원, 제한동의학술원
대구가톨릭대	한국환경위생연구소, 식품과학연구소, 기초과학연구소, 응용과학연구소
대 구 대	과학기술연구소, 기초과학연구소
포항공대	생물공학연구소, 생명공학연구센터, 첨단유체공학연구센터, 축매기술연구센터, 생리분자과학연구센터, 기능성분자집합체연구센터, 공정산업의지능자동화연구센터

II. 국내 농림축산식품소재 및 전통미생물자원을 활용한 연구기반의 협력형 CRO 시스템의 구축이 필요함

(2) **농림축산식품소재 연구개발 CRO 구축의 필요성과 의미**

○ **생활 및 경제환경 급변에 대한 대비**

- 인간의 수명연장 및 고령화, 현대인의 바쁜 생활로 인한 불균형적인 식사, 각종 공해로 인한 환경오염 증가, 스트레스 증가 등으로 건강의 중요성은 더욱 부각되면서 식품, 천연물, 한방 소재기반 바이오헬스 산업관련 기능성 소재 및 관련 제품시장이 지속적으로 성장할 것으로 전망됨
- 100세 시대의 성인병 예방 및 건강증진을 위한 건강식품뿐만 아니라 **기능성 소재가 포함되거나 효능이 입증된 건강기능 식품에 대한** 소비자들의 요구도가 커지고 있음
- 한-미, 한-유럽, 한-중 FTA에 의한 농축산물 수입개방에 의해 국내 축산업 기반 붕괴의 우려가 높아지고 있으므로 새로운 축산산업을 대비하고 농축산물의 고부가가치화에 대한 지원 필요

○ 전통자원 및 발효를 통한 소재 기반 웰빙식품바이오소재 산업 관련 특화 기술 발굴

- 미생물에 의한 발효 및 발효산업은 과학기술의 발전에 따라 자연발효의 방식에서 관리·통제하는 방식으로 발전하여 원하는 최종 제품이 무엇인지에 따라 미생물을 선택하거나 발효조건을 관리하여 목적하는 **기능성 강화된 제품을 생산할 수 있음**
- 발효식품의 기능성이 주목받기 시작하면서 여러 형태의 복합 발효기술을 활용한 복합 기능성물질을 함유한 발효제품의 개발이 가능하며, **이로부터 기능성 물질을 추출하여 신소재로 개발하는 연구도 활발해 짐**
- 발효소재 및 웰빙식품바이오소재를 활용한 전통 식품산업에서 점차 고부가가치 상품인 건강기능성 제품 산업으로 변화하고 있으며, 미래 성장 동력인 BINT 융복합 산업으로 확산되어 신산업 발전의 원동력으로서 육성사업이 필요함
- 세부 기술분야로는 **바이오헬스산업과 관련된 소재개발, 효능평가(전임상, 임상), 제품화, 시제품 검증 및 표준화단계 등 BT (Biotechnology) 및 HT (health technology) 기술을 업체와 공유**
- 대구경북 지역의 경우는 한방 소재로 활용가치가 높은 농산물 및 풍부한 약용작물을 보유하고 있어, 이를 원료로 **발효기술을 접목 시키면 소재개발 및 고부가가치 한방 기능소재를 기반으로 신지역 특화산업으로 발전 가능성 있음**
- 이를 통하여 시장주도형 제품개발을 통한 **기업 경쟁력 제고**로 기업주도형 산업발전 유도로 **농림축산식품분야 경쟁력 강화**

○ 농림축산식품소재 연구개발 CRO 구축에 대한 필요성 대두

- 국내에는 농림축산식품소재 관련 기업들이 전문기관 기능성식품 인허가대행 전문기관을 찾아서 연구결과를 획득하여 식품의약품안전처에 제출하는 형태로 진행되어 제품의 보안성, 연구결과 해석의 문제점, 전문가의 경제적 이해의 부족 등으로 많은 문제점을 내포함
- 새로운 소재의 발굴 및 기능성 식품이 사업화가 되기까지는 기능성 바이오소재 발굴 → 기능성 입증 및 독성평가, 인허가 획득 → 기능성 소재기반 시제품개발 → 시제품 신뢰성 확보 → 양산 → 제품화(디자인개발 등) → 마케팅/유통·판매 등의 value chain 단계로 진행되는데 기존 소재기반 기능성 소재, 기능성 인증 식품산업 관련 기술개발은 기초 및 응용단계 위주로 수행되어 상용화 성공률이 다소 미흡함
- 현재 영세한 중·소 식품관련 기업은 시간 및 비용부담 등의 이용 장벽이 높은 실정임. 기능성식품의 개발을 추진하기보다, 기능성 식품 효능과의 별개로 부가가치는 높은 일반 식품에 기능성 소재 첨가한 제품이 각광받고 있음

- 식품분야, 식품소재분야, 웰빙식품바이오소재 등도 미생물 발효 등을 통한 고부가가치화를 위해서는 연구개발, 효능평가 및 임상평가 등의 요구가 절실하나, 연구조직을 보유하고 있는 업체는 거의 없으므로 이를 위한 지역거점 CRO가 요구됨
 - 농림축산식품분야 중소기업은 고용인원이 적고, 자체 연구개발 인력 및 조직을 보유하지 않은 영세 기업의 수가 많아 제품개발 및 기술경쟁력 확보가 어려운 관계로 민간위탁연구지원조직(CRO)을 통한 체계적인 기업지원이 절실하게 필요함
 - 실험실에서 효능평가 및 동물에의 적용도 중요한 부분이 있지만, 실제 인체의 적용 시 변화에 대한 실험은 기존의 R&D 개발 사업으로는 한계성이 있어, 제품개발을 포함하여 *in vitro*, *in vivo* 및 인체적용시험 등 참여업체의 요구도에 맞는 위탁 연구를 진행함으로써 그 업체의 제품 경쟁력에서 변화와 혁신을 유도하는 것이 효율적임
 - 기존의 CRO기관은 환자를 대상으로 의약품 및 의료기기 품목허가를 목적으로 한 임상위탁연구를 수행하는 기관이 대부분이고, 제약 및 건강기능식품 산업에 특화된 R&D 아웃소싱 업무를 주로 수행하거나, 질환동물 모델을 이용한 농업바이오 분야의 CRO를 구축하고 있어 비용부담이 높음. 따라서 농축수산식품분야 업체들이 고부가식품 개발을 목적으로 하는 연구를 기존 CRO 기관에 위탁하여 수행하는 것은 현실적으로 불가능함
 - 웰빙식품 · 바이오소재 식품산업은 관련한 건강의 ‘예방’ 및 ‘사후관리’ 분야 특화되어, 이의 임상평가를 통한 효능입증으로 차별화된 고부가 제품개발 필요하므로, 지역 천연물, 농림식품 소재를 기반으로 하고, 발효를 통하여 제품을 개발하는 업체들이 가장 요구도가 큰 부분은 그 제품의 효능에 대한 과학적인 평가 및 기 판매되어 온 전통발효식품에 대해 사람이 섭취했을 때의 객관적 효능입증 등에 대한 요구도와 필요성이 증대되어 있음
- 해외시장 진출 성공을 위한 과제
- 우리 고유의 전통식품 및 발효식품 등은 맛과 영양이 뛰어날 뿐만 아니라 생리활성기능, 면역증강, 항암, 항바이러스, 노화방지, 혈전용해 등의 기능성이 탁월한 것으로 밝혀지고 있지만, 일반적인 발효제품은 국내시장이 포화상태이므로, 그 효능 등을 입증하여 전통 발효식품을 국제식품으로 상품화 되어야 할 것이고, 그 업체가 특별한 노하우로 만들어지는 전통발효식품의 개별적 효능의 입증이 요구되고 있음
 - 바이오헬스 신소재 개발 및 해외 시장 진출을 위하여 전통 발효식품의 기능성 소재화, 규격화, 안전성 입증 관련 연구는 선택이 아닌 필수 사항이 되고 있으나 고유의 발효기술을 확보하고 있는 기업의 대부분은 중, 소기업으로 연구기반이 열악한 실정임. 이에 기업 맞춤형 연구지원이 필요하며, 사업화 연계지원 연구의 시스템 활용으로 급격한 시너지 효과 창출이 가능함

☞ 세계로 무대가 확장되고 생체조절기능(3차 기능)이 강조된 전통발효식품 및 식품 신소재 관련 산업은 고급화를 목적으로 새로운 고품질성 제품으로 국내외적으로 시장을 형성하고, 경쟁 확보하기 위해 신제품 개발, 효능평가 및 인허가, 산업화의 촉진 선진화를 위해 연구기반의 농림축산식품소재 및 전통미생물자원을 활용한 연구개발 협력형 수탁연구대행기관(협력형 CRO)의 구축이 시급한 현시점이 가장 적기라고 사료됨

○ 농림축산식품소재 연구개발 협력형 CRO 구축

- 현재 고부가식품개발을 위한 전문연구기관이 없으며, 현재 대부분의 CRO는 의약품 및 바이오, 기능성식품의 대행 기관으로 치우쳐져 있으므로, 이러한 요구도를 포괄할 수 있는 농림축산식품소재 연구개발 CRO 구축이 필요함

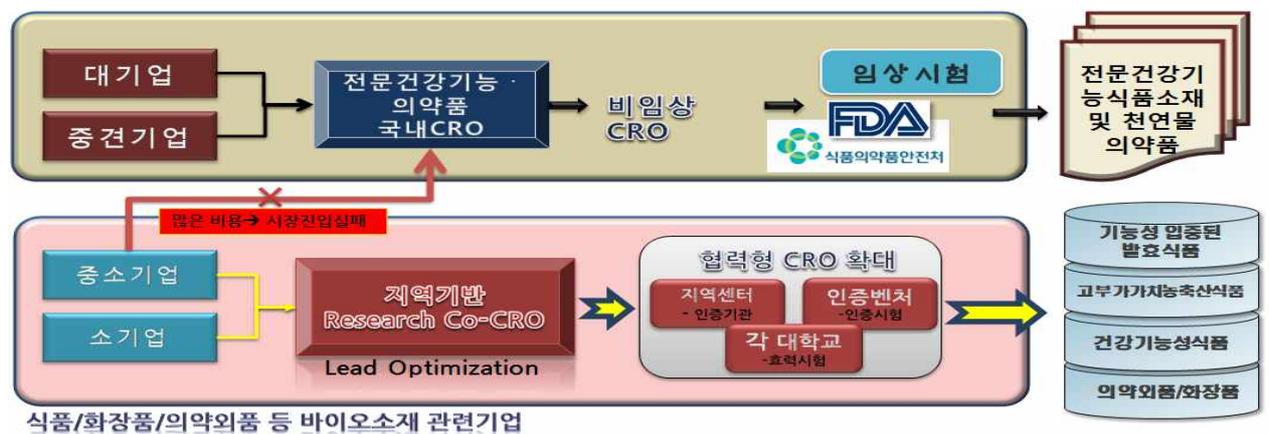


그림. 농림축산식품소재 연구기반 협력형 CRO의 필요성

표. 기존 CRO 기관 및 농림축산식품소재 연구개발 협력형 CRO 차이점

	기존 CRO	농림축산식품소재 연구개발 지원 CRO
목적	의약품 및 의료기기 품목허가 지원을 위한 영리 목적 CRO	영세 농림축산식품기업의 기술개발 및 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 목적으로 운영
수행업무	의약품 등 임상시험, 식약처 품목허가 대행 업무 위탁 중심	기능성 소재 발굴, 기술 개발, 제품 개발, 소재 및 제품 효능평가(<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>), 임상 효능평가) 등의 full-cycle 지원
사례	<ul style="list-style-type: none"> ■ 질환모델 이용 농업바이오CRO ■ 임상 CRO(드림싸아이에스, LSK글로벌파마 서비스, 씨엔알이서치, G.D.F.I) ■ 비임상 CRO(바이오톡스텍, 캠온, 안전성평가 연구소, 한국화학융합시험연구소) 	기존 확보된 사례 없음
비용	경비 부담이 큼	저비용, 기업 맞춤형 지원
대상	대기업, 중소기업 등 R&D 역량이 확보된 기업	지역의 농산물을 기반으로 하는 R&D 역량이 부족한 기업

- 연구용역의 요구도가 높은 전통발효 식품바이오분야 및 민간위탁연구기관에 대한 SWOT 분석을 하였을 때 다음과 같은 내용으로 요약됨

농림축산식품소재 제품화지원 CRO 구축의 SWOT 분석

강점(Strength)	약점(Weakness)
<ul style="list-style-type: none"> . 전통미생물자원 및 핵심 발효기술 확보 . 연구개발 및 시설 인프라 구축 . CRO 기반 구축 및 운영 자립화 가능 	<ul style="list-style-type: none"> . 지역 중소기업의 기술 경쟁력 및 자생력 부족 . 지역 식품관련 산업화 지원 및 육성책 부족 . 전통 발효식품산업의 세계화 전략 및 투자 미비
기회(Opportunity)	위협(Threat)
<ul style="list-style-type: none"> . 전통발효식품의 건강식품으로 인식 . 지역 중소기업 CRO기반 활용 수요 충분 . 발효관련 제품의 국내외 시장 확대 	<ul style="list-style-type: none"> . 식품바이오 관련 기업의 수도권으로 이전 . 젊은 고급인력의 유출과 핵심기술 부재 . 지역 경기의 침체 및 국내 시장 한계

- 생물자원 및 발효기술을 활용한 고부가 기능성 소재개발 협력 CRO 지원범위를 도출해보면 아래 그림과 같이 생물자원, 기능성 소재에 발효공정에 대한 지원, 소재의 저장 및 품질안정, 유효성/위해성 전임상 평가 및 임상평가, 소재의 기능성 탐색, 소재의 표준화, 대량생산 및 제품화 등의 요구도가 높게 나타나서 이를 만족하기 위한 **농림축산식품소재 연구개발 협력형 CRO (Cooperative CRO)**를 구축함



그림. 생물자원 및 발효기술을 활용한 고부가 기능성 소재개발 CRO 연구개발 지원범위

(3) 지역 농축산식품 중소기업 /국내 바이오헬스 소재산업 환경에 최적화된 협력형 CRO 모델 및 지원 분야 도출

- 계명대학교 TMR센터를 주관으로 추진하는 협력형 CRO기반 구축사업은 지역의 기업지원사업을 13년 동안 수행해오면서 전통미생물자원의 확보와 산업적 응용에 관한 많은 기술적 노하우 축적으로 활용이 가능함
- 경북대학교 수의과대학은 동물실험에 대한 독성평가 및 효능검증 시스템이 확립되어있고, (재)한방산업지원센터에는 임상시험평가 시스템이 확립되어 있으므로 이들을 협력기관으로 협력형 CRO기관을 구축하여 참여업체의 수요도를 만족시킬 수 있음
- 지역 전통식품 또는 식품바이오업체들은 대부분 중소기업체로서 제품의 고부가가치화를 위한 효능 및 임상평가에 대한 요구도가 높으나 재정적 투자의 어려움을 고려하여 최소한의 용역 경비로 추진함
- CRO기반 구축의 강점으로 자립화 달성: 주관기관인 TMR센터가 구축한 시설, 전문 인력 등의 인프라를 연계 활용함으로써 최소한의 용역과제 및 산학 공동연구를 수행하면서 지속적인 CRO운영이 가능함
- 본 과제에서 제안하는 **협력형 CRO 시스템**과 **정부정책 및 지역현장의 요구도와의 부합성**은 농림축산식품부 2011년 주요 정책과제와 대구지역 식품산업 육성방안(대구경북연구원, 2012) 모두를 충족하는 모델임을 확인할 수 있음

식품산업진흥 기본계획의 방향



자료 : 농림수산식품부, 2011, 식품산업진흥 기본계획

대구지역 식품산업 SWOT 분석

SWOT 분석을 통한 전략방향 도출	O(기회)	T(위협)
	<ul style="list-style-type: none"> - 식품산업 육성, 의료관광 등 정책적 추진의지가 강함. - 건강, 웰빙에 대한 관심 증가 - 1*2인 가구 증가 및 고령화 등 사회구조 변화 	<ul style="list-style-type: none"> - 식품산업 분야의 경우 타 지역과의 경쟁 치열 - 식품 안전성에 대한 관심 증가
S(강점)	SO전략	ST전략
<ul style="list-style-type: none"> - 대학, 연구소 등 식품관련 R&D 역량 보유 - 힐링푸드 산업 추진 - 한방분야와 연계 가능 	<ul style="list-style-type: none"> - 건강, 웰빙에 대한 관심이 증가하고 있으므로 건강기능식품 등 수요자에 적합한 제품 개발 - 의료와 식품을 접목한 힐링푸드 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오한방 관련 기관 간 산학연관의 유기적 협력 구축
W(약점)	WO전략	WT전략
<ul style="list-style-type: none"> - 기업세 규모 억제 및 지자체 지원 미흡 - 1차산업 규모 일약 및 연계 부족 - 식품산업 유통기관의 역할 중첩 	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오한방 유통기관이 연계하여 의료관광 콘텐츠 개발 - 대구경북이 협력적으로 연계할 수 있는 사업아이디어 도출 	<ul style="list-style-type: none"> - 1차산업 규모로 한차별화된 제품 개발

자료 : 대구경북연구원, 2012, 대구지역 식품산업육성방안

지역기반의 농축산식품 관련 중소기업을 위한 현장 중심 협력형 CRO 시스템의 구축은 농림축산식품부의 식품산업진흥 기본 정책과제에 부합하며 대구지역 식품산업 ST/WT 전략과도 일치함

☞ 본 센터는 지역기반 농축산식품 중소기업/국내 바이오헬스소재산업에 최적화된 CRO모델로서 연구기반의 협력형 민간위탁연구대행조직(협력형 CRO) 시스템을 제시함

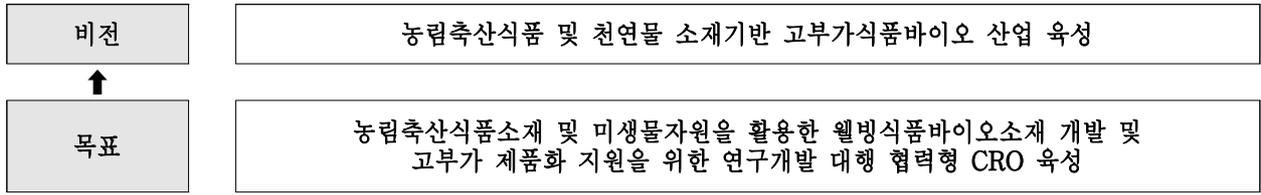


특징 1. 본 사업에서 구축하고자 하는 협력형 CRO 시스템은 제품개발을 위한 소재 탐색 및 연구 설계, 연구(실험·분석)개발, 효능 분석 등 기업 맞춤형 CRO 서비스를 원-스톱으로 제공하기 위한 시스템으로 특히, 발효식품, 고부가 식품, 신소재제품을 개발하고자 하는 영세 기업에서 제품개발이 용이하도록 연구 지원하는 것이 특징임

특징 2. 협력형 CRO라 함은 제품개발에 필요한 대학연구기관/유효성평가기관/인증기관 등이 역량 결집형 네트워크를 형성하고 대학이 협력 구심체 역할을 하는 시스템으로 기업맞춤형 전문 CRO 시스템 제공가능

특징 3. 협력형 CRO 시스템은 농축산물 관련 중소기업에 연구지원에 의한 제품개발의 촉진 ->농축산분야에서 문제가 되는 품질/위생/효능안정성 등 주요 3 요인 통제개선-> 생명자원의 고부가가치화-> 최종적으로 우수한 농축산 식품의 생산 및 개발/ 전통발효식품 및 고부가제품 수출/ CRO 신서비스 산업창출을 목적으로 함

다. 연구개발 범위



연구개발 계획 경로설정에 따른 중장기 발전전략

- (단기: 3년 연구과제 수행)
 - 참여업체 지원을 통한 민간위탁연구대행조직 성공적 모델 구축
 - 효능평가 지원 시스템(*in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험지원) 및 품질 관리를 통한 사업화 연계 시스템 구축
 - 기술 혁신형 및 효능평가 기업지원으로 고용창출 및 기업 경쟁력 강화 유도
- (중장기 : 과제 종료 후 자립화 방안)
 - 과제수행으로 구축된 민간위탁연구대행 CRO 조직을 활용하여 수익모델 창출
 - 미생물 발효에 의한 바이오 신소재 개발 기술을 접목한 헬스케어(헬스푸드, 셀프케어) 산업으로 구조고도화를 이룰 수 있는 전통산업에서 웰빙 식품 바이오 소재산업으로 구조 전환할 수 있도록 지원확대

구분	CRO 기반육성	효능평가	소재 개발 및 제품 고도화
추진방향	민간위탁연구대행조직 성공적 모델 구축	소재기반 웰빙식품바이오 산업기반 조성	제품개발 및 기업지원서비스의 전문성 강화
핵심 전략	R&D	○소재기반 중심의 연구개발 기반기술의 사업화를 위한 효능평가 기법보유	○바이오헬스 산업분야 창출을 위한 신소재 및 발효산업 제품화 지원
	역량제고	○식품 특성별 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 및 임상효능 지원 적용평가	○미생물 균주를 활용한 발효를 통한 소재의 유효성 증가, 글로벌 신소재개발
	기업특성별 지원수단 강화	○기술사업화 확대를 통한 사업화 모델 확립 ○산업화 기술 확보를 위한 입체적 지원시스템 운영	○기 구축된 공인검사기관을 통한 제품의 품질인증, 안전성 평가 ○기업규모에 따른 패키지 프로그램 효율성 극대화를 통한 전략적 지원
	연계협력	○클러스터 연계활성화 ○ 농식품부 정책부서와 정책자문회의 추진	○마케팅지원, 시장확대, 시장주도형 경쟁력 강화 ○기 구축된 지역의 인프라 연계활용

라. 과제별(세부·협동) 연구개발 목표

(1) 과제별 연구개발의 목표

제 1 세부 [계명대학교 TMR센터]

- 지역 농축산 산업환경에 최적화된 협력형 CRO 구축
 - Co-CRO 시스템의 보완 및 확장·최적화 확립
 - 제품개발지원을 위한 네트워크 확립
 - 제품개발지원을 위한 One-stop 서비스 확립
 - 기업맞춤형 개발단계별 패키지 서비스 확립
 - *In vitro* 유효성 평가법 확립

- 국내 발효식품 및 고부가식품개발 산업환경에 최적화된 협력형 CRO 구축
 - 전통발효식품으로부터 분리된 고초균, 젖산균 등을 산업적 균주로 활용확대
 - 연구기반의 협력형 CRO를 구축하고 연구계획 및 마케팅 지원
 - 발효제품의 기능성 및 효능 평가로 기업의 사업 활성화 지원
 - 바이오헬스 신소재 산업분야 창출을 위한 전통발효 핵심기술 및 제품화 지원을 통한 사업화 촉진
 - 기능성 강화 신소재개발을 위한 발효 핵심기술 개발

- 지역기반/연구기반/현장기반 기업지원 핵심기술 개발
 - 식품바이오제품의 효능확인, 표준화 및 상품화 지원 시스템 활용
 - *In vitro* 효능평가 위탁연구대행을 위한 핵심기술 개발 및 응용 확대
 - 인프라를 활용한 식품위생컨설팅, 식품안전성확인
 - 국가공인 검사기관의 연계활용을 통한 기업의 상품화 기간 단축
 - 국가공인검사기관을 활용한 제품의 분석, 품질인증, 규격화, 유통기간설정 제공

제 1 협동 [경북대학교 수의학과]

- 동물효능평가실험 위탁연구대행 서비스를 위한 기업 맞춤형 CRO 시스템 확립
 - 참여기관 간 연계협력 체계 구축
 - 전임상 위탁 연구대행을 위한 기업 간 피드백 시스템의 확립 및 최적화
- In vivo* 효능평가 위탁연구대행을 위한 Lead Optimization 시스템 확립
 - 효능 평가를 위한 약리/독성학적 optimization, LOP/T 시스템 운영
- 고부가 웰빙식품바이오소재 개발을 위한 위탁기업 맞춤형 유효성 평가(*in vivo*) 실시
 - 위탁기업 시제품의 유효성 평가
- 위탁기업의 기술지원 및 기능성식품 등록을 위한 지원
 - 통계학적 분석 및 해석 패키지 프로그램 제공
 - 기능성 식품 등록을 위한 데이터 베이스 수집 및 라이브러리화

제 2 협동 [(재)대구테크노파크 한방산업지원센터]

- 농림축산식품 소재 및 제품 임상(인체적용) 위탁연구대행을 위한 핵심기술 개발
- 임상평가 위탁수행을 위한 컨설팅 시스템 확보
- 임상평가 위탁수행을 위한 참여기관 간 연계협력체계 구축
- 임상평가 위탁연구 대행조직 운영 활성화

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 기술동향

가-1. 특허현황

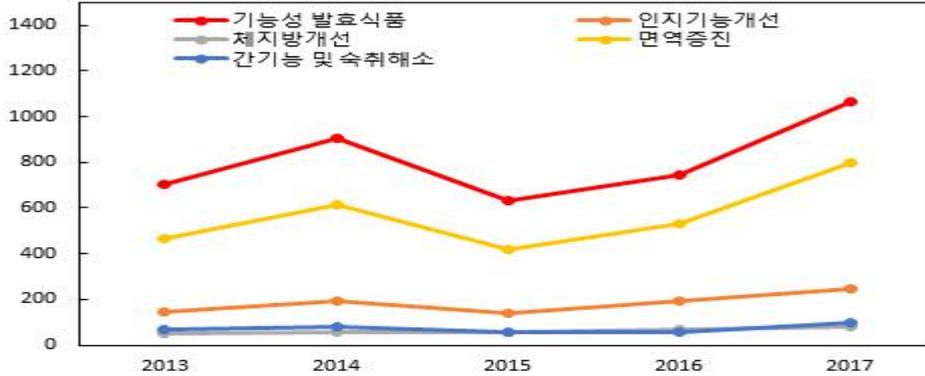


그림. 최근 5년간 각 기능성에 따른 발효식품의 등록현황

- 특허 정보넷 키프리스에서 기능성 발효식품, 인지능 개선 발효식품, 항비만(체지방 개선) 발효식품, 면역증진 발효식품, 간 기능·숙취해소 발효식품을 검색하여 최근 5년간 등록건수를 비교한 결과 모든 기능성 식품에서 2017년 특허등록건수가 눈에 띄게 증가하는 것을 확인할 수 있음
- 건강기능식품의 수요와 개발이 증가함에 따라 관련된 특허출원 및 등록이 증가함
- 발효를 통한 기능성 식품 개발에 관련성 있는 특허를 각 3건씩 표시

(1) 미생물발효를 통한 기능성 식품개발

번호	내용	특허권자	비고
1016907380000	발효 율피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항당뇨 조성물	고려대학교 산학협력단	등록
1016901970000	유리 아미노산 함량이 증가된 꽃송이버섯 발효 추출물의 제조방법	배영재 외2명	등록
1016359820000	바실러스 아밀로리퀴페시언스(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)에 의한 콩 발효물을 유효성분으로 포함하는 간 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물	한국식품연구원	등록

(2) 인지능개선

번호	내용	특허권자	비고
1018156600000	황칠나무 잎 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨에 의해 저하된 인지기능 또는 기억능력 개선용 조성물	경상대학교 산학협력단	등록
1018156600000	황칠나무 잎 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨에 의해 저하된 인지기능 또는 기억능력 개선용 조성물	경상대학교 산학협력단	등록
1018110480000	지노스테마 론기페스 VK1 추출물 또는 이로부터 분리한 론기페노사이드 A 화합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 조성물	서울대학교산학협력단 한국생명공학연구원	등록

(3) 체지방개선

번호	내용	특허권자	비고
1017811860000	유산균(<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HK-9) 발효 길경추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 개선 및 치료용 조성물	한림대학교산학협력단 주식회사세바바이오텍	등록
1016790450000	개체의 지방 함량을 감소시키는 미생물 및 그의 용도	(주)메디톡스	등록
1016181160000	발효 우영 추출물 또는 우영으로부터 분리된 화합물을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	경희대학교 산학협력단	등록

(4) 면역증진

번호	내용	특허권자	비고
1018149410000	맨드라미 꽃 물 추출물의 유산균 발효액을 함유하는 항산화 기능성 식품 조성물 및 그 제조방법	주식회사 웰파인 강원대학교산학협력단	등록
1018141660000	미강생물전환물을 함유하는 면역증강용, 당뇨개선용, 고지혈증 개선용 또는 간 보호용 조성물	(주)에스티알바이오텍	등록
1018117010000	면역기능 향상을 위한 밀기울의 가공방법	사조동아원 주식회사	등록

(5) 간 기능 개선 및 숙취해소음료

번호	내용	특허권자	비고
1018172820000	간 기능 개선 및 항산화 활성이 증진된 새싹보리 혼합 음료의 제조방법	(주)참선진녹즙 이재현 외 1명	등록
1017846880000	간 기능 개선 및 숙취해소를 촉진하는 약용버섯 고체발효 조성물 제조방법	(주)팜바이오스	등록
1017530850000	간 기능 개선용 한방발효제품 및 그 제조방법	주영철	등록

가-2. 원료개발현황

- 2004년부터 13년 동안 계속적으로 원료인증건수가 발생되고 있으며, 2016년 신규 원료인정건수는 6건으로 나타남
- 기능성에 따른 원료 인정 현황으로 체지방감소(27건), 혈당조절(22건), 관절/뼈 건강(21), 장건강(20), 피부건강(19) 순으로 총 32개의 기능성으로 총 263개(2016년 기준, 동일원료 2개 이상 기능성이 인정된 경우 합산) 원료 인정

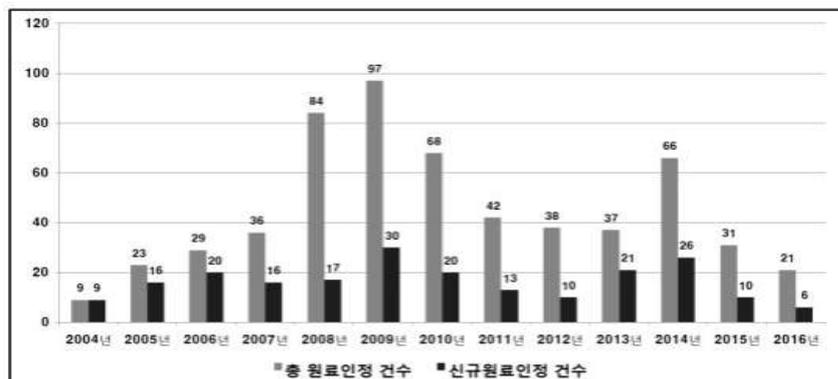


그림. 연도별 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황

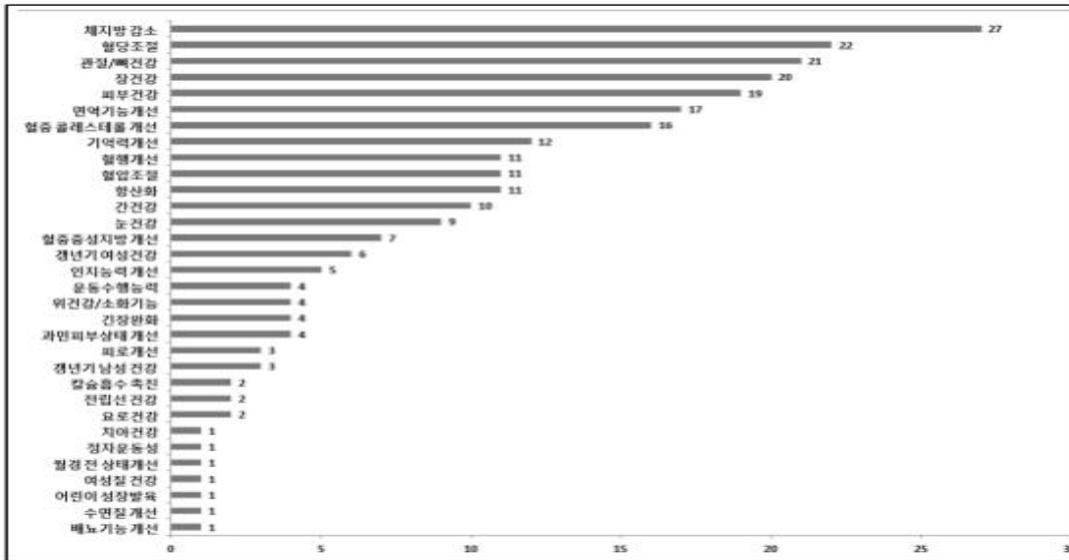


그림. 13년간('04-'16) 기능성별 원료 인정 현황

나. 시장동향

나-1. 국내 CRO산업 동향

○ 국내 자생 CRO 회사들의 설립 및 급성장을 이루고 있음

- 1999년까지만 해도 국내 임상시험 수는 31개 정도로 시장 규모가 매우 작았으나 2000년도 외국계를 포함해 6개 CRO가 잇달아 설립되어 한국위탁연구계약협회(KCROA)를 중심으로 활동하고 있음
- 임상·비임상시험 관련 규정의 강화로 인해 CRO시장(2001년도)은 임상부분을 제외하고 약 30~50억 원대의 시장으로 급속하게 성장

표. 국내 CRO 회사

국내 CRO	C&R research, DreamCIS, LSK, Solomon, ADM, Cynex, GDFI, Mecox 등
외자 CRO	CMIC, Quintiles, Parexel, COVANCE, PPD, ICON, PharmNet, Nocotech, Choice P, Omnicare, PRA, RPS, Seoul CRO
생동 CRO	바이오코아, 바이오인프라, SPL, 사과나무임상연구소, 바이오썬텍 등 20여 곳

나-2. 국외 CRO산업 동향

○ 미국과 유럽의 CRO산업 동향

- 1970년대 제약 산업의 신약개발이 가속화되면서 임상시험을 전문가 집단(CRO)에 의뢰
- 비임상시험 분야에서도 신약 후보물질의 합성이나 유전자 조직 신약개발 등의 연구를 CRO에 아웃소싱 함
- 현재 CRO의 대행 업무는 임상시험 이외에도 R&D 전 분야로 확대됨
- 미국의 CRO 시장 규모는 2010년 200억 달러에 해당함

○ 아시아 CRO산업 동향

- 세계 신약개발의 R&D아웃소싱 시장의 규모가 커지면서 다국적 제약기업들의 R&D센터들이 중국에 설립되고 있음. 다국적 CRO를 비롯하여 합작형 CRO에 이르기까지 중국 내에 10여개의 다국적 CRO 기업들이 포진하고 있음
- 중국의 '신약비 임상 안전성평가연구'는 반드시 GLP인증을 거쳐야 하므로 CRO에 대한 수요가 증가
- 일본의 CMIC은 CRO의 형태에서 발전을 계속하여 CMO(의약품 생산 대행), CSO(의약품 영업 대행)의 산업까지 규모를 확장

나-3. 국내 건강기능식품 시장동향

- 식품의약품안전처가 발행한 '2016년 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석'에 의하면 2016년 국내 건강기능식품 업체 수는 487개소이며, 업체당 평균 매출액이 43억 7천만 원으로 최근 5년간 지속적으로 증가
- 건강기능식품의 수입액은 매년 증가하였으며, 2016년 5억 675만 달러로 전년도 대비 소폭 감소하였으며, 수입중량은 1만 775톤으로 전년대비 13.3% 증가됨
- 2016년 총 매출액은 2조 1,260억 원으로 전년대비 16.6% 증가하였고, 총 매출은 4만 3,123톤으로 24.7% 증가

표. 국내 건강기능식품 시장규모

구분	업체 수(개소)		업체당 평균 매출액(억원)		수입액(억원)	
		전년대비 성장률(%)		전년대비 성장률(%)		전년대비 성장률(%)
2012	435	2.6	32.3	0.4	3,532	△5.3
2013	449	3.2	32.4	0.3	3,854	9.1
2014	460	2.4	33.0	1.9	4,412	14.5
2015	487	5.9	37.4	13.3	5,965	35.2
2016	487	-	43.7	16.8	5,880	△1.4
연평균 성장률(%)	2.9	-	7.7	-	13.6	

(출처:2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2017.08)

- 고시형 품목 중 홍삼제품이 9,900억 원의 매출, 고시형 비율 중 52.4%로 1위를 차지하였으며, 프로바이오틱스, 비타민 및 무기질 밀크시슬 순으로 나타남.
- 개별 인정형 품목은 당귀혼합추출물이 532.8억 원, 22.6%로 1위를 차지하였으며, 헛개나 무과병추출분말, 초록입홍합추출오일복합물 순으로 나타남
- 기능성별 매출현황에서 면역기능제품이 1조 984억 원으로 가장 높은 비중을 차지하였으며, 이어 혈행 개선, 항산화, 기억력개선, 피로개선 순서로 나타남. 대표 5가지 기능성별 제품들이 총 매출액의 80% 이상의 비중을 차지함

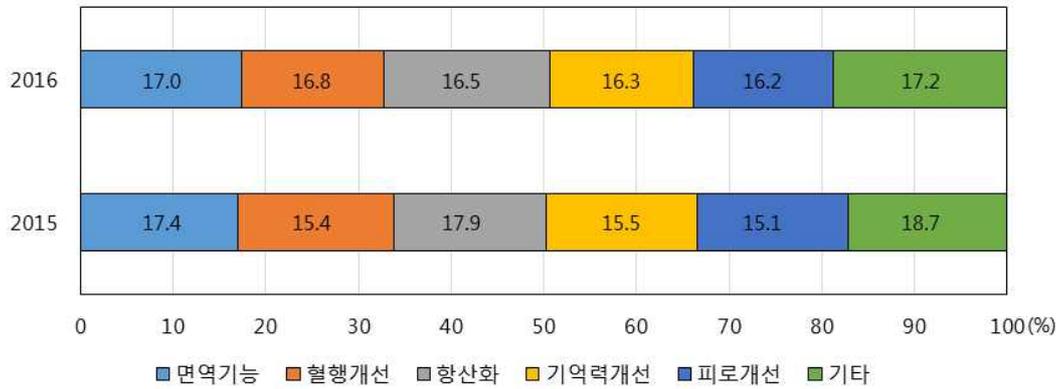


그림. 건강기능식품 기능성별 매출현황

(출처:2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2017.08)

- 건강기능식품의 매출은 매년 증가하고 있으나, 인정 형태별 추이에서 개별 인정형 제품은 성장률이 감소하고 있음. 이는 일부 기능성원료가 고시형으로 전환된 것에 기인한 것으로 보임

표. 국내 건강기능식품 산업규모

(매출액, 단위:억원)

구분	2012	2013	2014	2015	2016
전체	14,091	14,820	16,310	18,230	21,260
전년대비 성장률(%)	3.0	5.2	10.1	11.8	16.6
고시형	12,284	12,496	13,134	15,035	18,903
전년대비 성장률(%)	0.3	1.7	5.1	14.5	25.7
개별인정형	1,807	2,324	3,176	3,195	2,357
전년대비 성장률(%)	26.4	28.6	36.7	0.6	△26.2

(출처: 2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2017.08)

나-4. 국외 건강기능식품 시장동향

- 국가별 건강기능식품 시장규모(추정)를 살펴보면, 2015년에 미국이 404억 달러(약 45조원)로 1위를 차지하고 있으며, 다음으로 서유럽이 168억 달러, 중국 163억 달러의 순으로 나타남. 2020년에도 미국이 568억 달러로 가장 큰 규모를 보유할 것으로 예상되며, 2위는 중국이 267억 달러로 서유럽(190억 달러)을 뛰어 넘을 것으로 예측
- 연평균성장률을 살펴보면 남미와 중국이 각각 11.7%, 10.4%로 성장이 가장 높은 것을 알 수 있으며, 아시아 시장도 큰 폭으로 성장하고 있음

표. 국가별 건강기능식품 시장규모(추정치)

(단위: 억달러)

국가	2015e	2020e	점유율(%) (2015기준)	연평균 성장률(%)
미국	404	568	34.3	7.1
서유럽	168	190	14.2	2.5
중국	163	267	13.8	10.4
아시아 (중국, 일본 제외)	118	187	10.0	9.5
일본	109	122	9.2	2.3
남미	89	155	7.5	11.7
그 외	127	188	10.8	88.2
계	1,179	1,677	100.0	7.3

(출처: 2014 Nutrition Business Journal(New Hope Network))

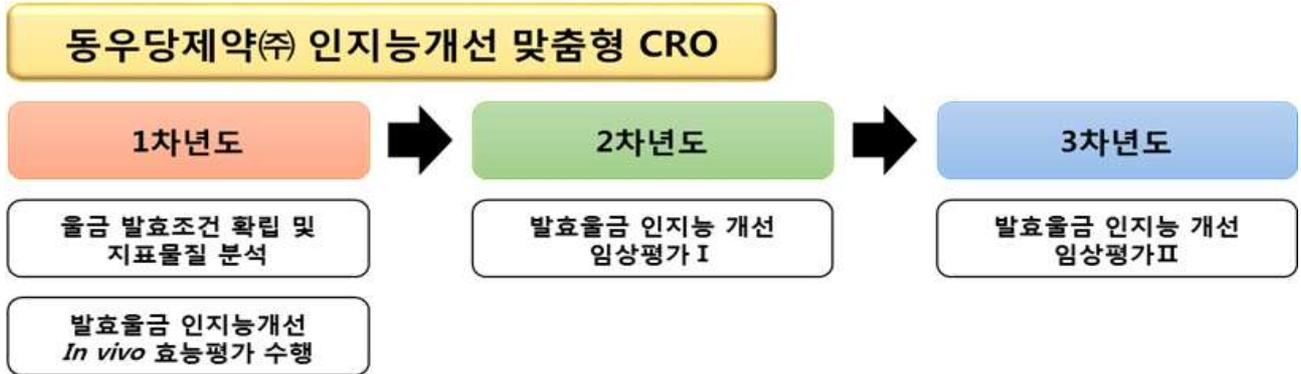
- 세계 건강기능식품 시장에서 가장 큰 비중을 차지하는 품목은 비타민으로 2016년 소비자 시장 133억 22백만 달러로 원재료시장, 도매시장, 소비자 시장에서 30% 이상의 비중을 차지함
- 2020년까지의 건강기능식품 규모를 예측해보면 Sports nutrition 제품과 Specialty supplements 제품이 8~10%의 높은 성장이 예측되며 비타민 제품과 미네랄 제품은 5%의 저조한 성장률이 예측됨
- 건강기능식품의 해외시장의 글로벌 트렌드로 소비자의 다양한 기호와 요구에 따라 맛과 형태(음료, 검, 젤리 등)의 제품이 출시되고 있으며, 합성원료보다 자연친화적인 원료(허브, 향신료)의 사용이 증가됨. 불특정 다수를 대상으로 하는 제품보다 나이, 성별, 섭취시간, 몸 상태 등에 따른 개별 맞춤형 제품군들의 인기가 상승되고 있음

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

가. 발효울금을 이용한 인공지능개선 효능평가 및 제품개발

가-1. 발효울금을 이용한 인공지능개선 효능평가 추진 일정



가-2. 발효울금의 GABA 생산 최적화 및 지표물질 분석

(1)재료 및 방법

- 동우당제약(주)의 울금 제품개발을 위해 울금배지를 이용하여 GABA 생산 최적화를 하였다. 울금 배지로 울금 10%, glucose 1%, CaCO₃ 0.25%, yeast extract 1%, MSG 1%를 증류수 3.5 L(대량발효)를 첨가하여 121℃에서 15분 멸균하였다. Seed starter는 울금배지 조건과 동일하게 하여 MRS broth에서 30℃에서 1일간 배양한 *L. plantarum* K154를 1% 접종하여 30℃에서 1일간 배양하여 본 발효에 접종하였다. 대량발효는 5 L 발효조를 사용하고, 소량발효는 500 mL 비커를 사용하여 발효량에 따른 GABA 전환율을 비교하였다(Figure 가-1).

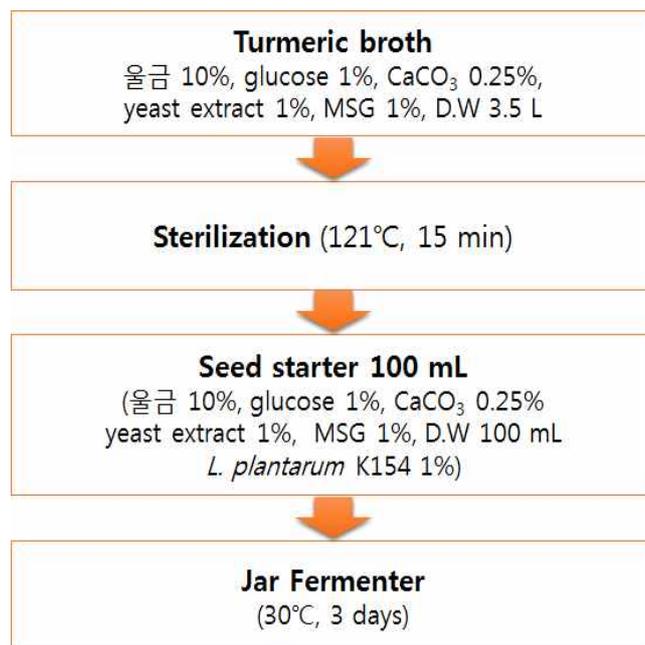


Figure 가-1. Fermentation process of turmeric using *Lactobacillus*

(2) 결과 및 고찰

- 울금의 젖산발효를 통한 GABA 생산최적화 배지조건에서 산업화를 위해 울금배지의 양을 달리하여 대량발효와 소량발효를 비교하였다. 그 결과 발효 전 pH는 5.80에서 발효 1일째 4.51, 4.58으로 pH가 감소하다가 2일째부터 증가하여 대량발효는 발효 3일째 4.83, 소량발효는 4.90으로 나타났다. 산도는 발효 전 0.34%에서 발효 1일째 대량발효 0.89%, 소량발효 0.80%로 가장 높았으며, 이후 산도가 감소하여 발효 3일째 대량발효 0.62%, 소량발효 0.67%로 나타났다(Figure 가-2). 생균수는 두 가지균 모두 발효 2일째까지 1.0×10^9 CFU/mL이상이었으며, 발효 3일째 균수가 감소하여 대량발효 1.7×10^8 CFU/mL, 소량발효 2.05×10^8 CFU/mL로 나타났다(Table 가-1).

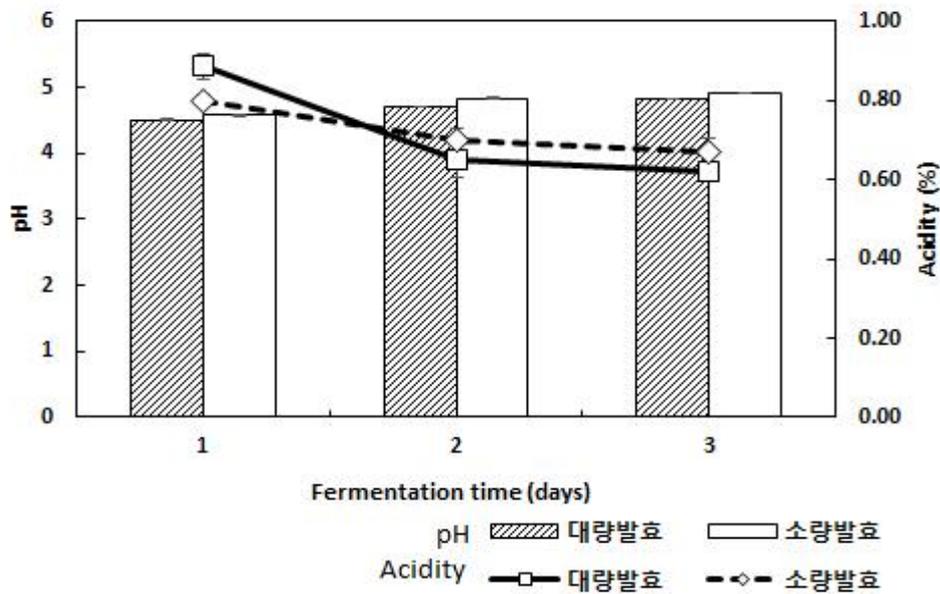


Figure 가-2. Changes in pH and acidity of fermented turmeric for 3 days

Table 가-1. Change in viable cell count of fermented turmeric for 3 days

(CFU/mL)

Fermentation type	Fermentation time (day)		
	1	2	3
Large scale	1.75×10^9	1.00×10^9	1.70×10^8
Small scale	1.05×10^9	1.55×10^9	2.05×10^8

- 울금의 발효양에 의한 GABA 생산능을 비교하기 위해 TLC를 이용하여 분석한 결과 Figure 가-3과 같다. 초기 첨가된 MSG에서 대량발효는 발효 2일째부터 MSG spot이 점차 감소하여 발효 3일째 대부분의 MSG가 소비되어 GABA로 전환되었으며, 소량발효는 발효 2일째 대부분의 MSG가 소비되어 GABA로 모두 전환되었다. 울금 젖산발효의 중화제로 사용된 CaCO_3 는 pH와 산도의 안정화에 의해 젖산균의 생균수를 유지할 뿐만 아니라 GABA의 생산을 증진시키는 것으로 판단된다.

- 발효울금의 산업화를 위해 5 L 발효조에서 대량발효를 시행한 결과 발효 3일을 최적조건으로 하였으며, 생산된 발효울금은 동결건조 후 지표물질 분석을 시행하였다.

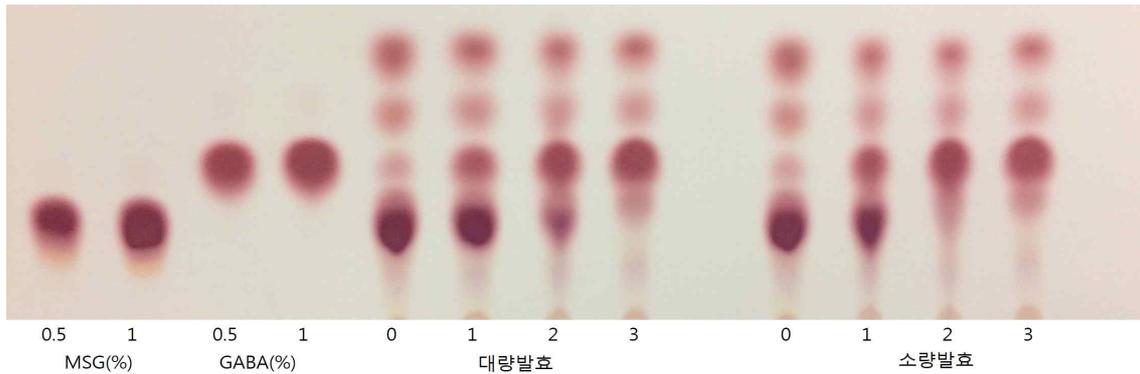


Figure 가-3. Comparison of GABA production during lactic fermentation

- 발효 전, 후의 발효울금을 3일간 동결 건조하여 얻은 울금가루의 수율은 10.83%, 10.49%로 나타났다. 울금의 curcumin 함량을 측정하기 위해 식품의약품안전처 생약연구과의 curcumin 분석방법을 변형하여 울금가루 1 g에 메탄올 10 mL을 넣어 30분 동안 초음파 추출을 한 다음 여과하여 총 3회 반복추출 하였다. 울금가루의 curcumin 함량은 발효 전 15.72 mg/g에서 발효 후 8.66 mg/g으로 절반가량이 감소되었다. 김 등의 강황 색소를 이용한 안정성 평가의 연구에서 curcumin 성분은 염기성이나 수용성 용매, 산소 또는 빛에 불안정한 것으로 알려져 있다. 또 다른 연구와 비교한 결과 울금 발효공정을 거치면서 빛과 열에 노출이 되어 발효 울금의 curcumin 함량이 감소되는 것으로 판단된다.
- 발효 전 glutamic acid는 5.30%에서 발효 후 0.04%로 감소되었으며 GABA는 발효 후 4.32%로 MSG가 대부분 GABA로 전환되는 것을 확인 하였다. glutamic acid와 GABA이외의 아미노산 함량은 Table 가-3에서와 같이 발효 전, 후 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 가-2. Free amino acid and curcumin content in fermented turmeric

Fermentation time (days)	Yield(%)	Curcumin content (mg/g)	Glutamic acid content (%)	GABA content (%)
0	10.83	15.72	5.30	0.05
3	10.49	8.66	0.04	4.32

Table 가-3. Comparison of free amino acid content after fermentation

AA	Before Fermentation	After fermentation
Cys	0.00	0.00
ASP	1.30	1.33
GLU	52.99	3.44
ASN	1.04	0.91
SER	1.06	0.00
GLN	0.16	0.32
GLY	0.58	0.50
HIS	0.18	0.31
ARG	0.90	1.16
THR	1.00	0.99
ALA	2.59	2.27
GABA	4.51	48.68
PRO	0.89	1.16
TYR	1.43	1.20
VAL	1.84	1.87
MET	0.46	0.32
Cys2	0.00	0.00
ILE	1.74	1.65
LEU	2.87	2.62
PHE	1.87	1.59
TRP	1.55	1.79
LYS	2.47	2.80
TOTAL	81.42	74.91

가-3. 발효율금 인지능개선 유효성 평가

(1) 체중변화

- 각 실험군에 울금 및 발효율금 추출물을 4주간 투여한 후, scopolamine으로 치매를 유도한 쥐의 체중 변화를 관찰한 결과를 Figure 가-4에 나타내었다. 실험기간 동안 정상군, 치매 유도군 및 부처손 메탄올 추출물의 평균체중은 꾸준히 증가하는 경향을 보여 치매 유도 약물 및 울금, 발효 울금 투여로 인하여 체중에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다 (Table 가-4).

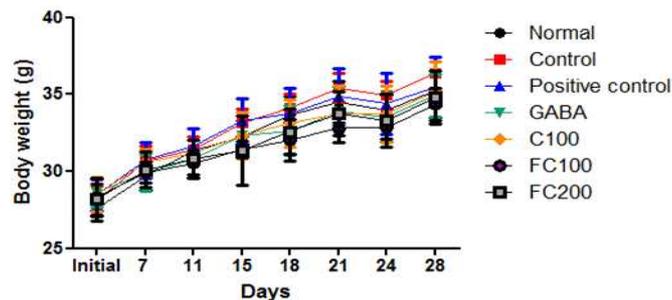


Figure 가-4. Change in weight gain

1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 가-4. Comparison of weight change by feeding diet with fermented turmeric

Group	Body weight (g)							
	Initial	7days	11days	15days	18days	21days	24days	28days
Normal	27.6±0.84 ^a	29.67±0.90 ^a	31.37±0.84 ^{ab}	32.25±1.04 ^{ab}	33.65±1.20 ^{ab}	34.49±1.35 ^{ab}	33.94±1.01 ^{abc}	35.24±1.04 ^{ab}
Control	28.08±0.97 ^a	30.64±1.03 ^a	31.42±0.79 ^{ab}	33.16±0.92 ^a	34.10±0.90 ^a	35.42±0.93 ^a	34.97±0.90 ^a	36.34±1.10 ^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	28.49±1.02 ^a	30.70±1.17 ^a	31.66±1.12 ^a	33.28±1.48 ^a	33.72±1.68 ^{ab}	34.84±1.87 ^{ab}	34.38±2.01 ^{ab}	35.43±1.97 ^{ab}
GABA (10 mg/kg)	28.64±0.97 ^a	29.90±1.20 ^a	30.84±1.19 ^{ab}	32.31±1.51 ^{ab}	32.64±1.63 ^{ab}	33.90±1.59 ^{abc}	33.55±1.58 ^{abc}	34.92±1.39 ^{ab}
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	28.52±1.12 ^a	30.57±0.83 ^a	31.21±0.83 ^{ab}	32.34±1.48 ^{ab}	33.13±1.56 ^{abc}	33.73±1.82 ^{abc}	33.72±1.86 ^{abc}	35.16±1.97 ^{ab}
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	28.32±1.23 ^a	29.91±0.68 ^a	30.55±0.79 ^b	31.44±0.53 ^b	32.02±1.38 ^a	32.81±0.91 ^c	32.84±0.72 ^c	34.36±1.03 ^b
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200 mg/kg	28.17±1.02 ^a	30.09±1.16 ^a	30.79±1.26 ^{ab}	31.35±2.24 ^b	32.58±1.46 ^{ab}	33.76±1.44 ^{abc}	33.29±1.72 ^{bc}	34.78±1.71 ^b

1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(2) 장기무게

- 식이투여 4주째 모든 동물을 CO₂가스 마취 하에서 개복한 후에 복부 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 뇌 조직을 적출하여 무게를 측정 한 결과를 Table 가-5에 나타내었다.

Table 가-5. Change in brain weight by feeding diet with fermented tumeric

Group	brain weight (g)
Normal	0.49±0.09 ^a
Control	0.44±0.11 ^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	0.48±0.10 ^a
GABA (10 mg/kg)	0.43±0.07 ^a
<i>Curcuma longa L.</i> (100 mg/kg)	0.43±0.08 ^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> (100 mg/kg)	0.44±0.10 ^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> (200 mg/kg)	0.43±0.07 ^a

1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(3) 행동실험

(가) 수중미로실험

- Scopolamine으로 기억손상을 유발한 흰쥐에 울금 및 발효울금 추출물을 투여하였을 때 효과를 확인하기 위해 해마 의존적 공간학습 능력을 평가하는 Morris water maze test를 시행하였고, 이를 Table 가-6,7에 나타내었다. 하루 1번씩 5일간 인지훈련을 실시 한 후, scopolamine 5 mg/kg을 투여하여 본 실험을 실시하였다.
- 인지 훈련실험 시 모든 군에서 5일째 유사한 11.95±6.32-39.40±18.68 sec범위 내 들어오는 것을 Table 가-6를 통해 확인할 수 있었다.
- 그러나 scopolamine 투여 후 본 실험에서는 Table 가-7과 같이, control군의 경우 수중미로 상의 platform의 위치를 찾아가는 탈출시간이 53.24-64.95 sec로 행동실험 본 실험 기간(4일) 동안 탈출시간이 감소하지 않아 scopolamine 으로 기억 손상을 일으킨 많은 치매 모델 실험 결과와 유사한 결과를 보여주었으며, 장기기억(long-term memory) 손상이 제대로 유도된 것을 확인할 수 있었다(Table 가-7).
- 한편 positive control로 Tacrcin을 섭취한 군과 GABA 투여군의 경우 scopolamine에 의한 기억손상이 4주간 시료 섭취로 각각, 9.03-30.95 sec, 14.60-17.22 sec로 control군에 비해 회복한 것을 확인할 수 있었다.
- 특히, 발효울금 200 mg/kg 투여군에서는 7.08-23.13 sec로 정상군인 10.51-17.41 sec 와 유사한 수준으로 회복된 것을 확인할 수 있었으며, 발효 울금 100 mg/kg 투여군에서도 15.68-21.51 sec로, 울금 100 mg/kg 투여군에서도 12.22-27.46 sec로 탈출시간이 줄어들 것을 확인할 수 있었다.

Table 가-6. Effect of fermented turmeric extracts on the Morris water maze test in white rat caused memory damage with Scopolamine

Group	Morris water maze test (Training)				
	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day
Normal	26.21±17.63 ^{ab}	30.29±16.17 ^a	15.69±5.18 ^a	30.44±26.82 ^{ab}	30.03±19.20 ^a
Control	24.82±16.95 ^{ab}	27.87±18.77 ^a	35.29±28.27 ^a	20.85±4.42 ^{ab}	23.09±16.02 ^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	21.90±14.17 ^{ab}	14.90±6.85 ^a	31.96±25.35 ^a	11.95±6.32 ^b	22.52±10.94 ^a
GABA(10 mg/kg)	39.40±18.68 ^a	23.44±12.71 ^a	22.83±14.47 ^a	32.12±19.93 ^a	33.29±20.63 ^a
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	26.20±13.97 ^{ab}	21.70±16.15 ^a	29.75±10.93 ^a	21.82±7.50 ^{ab}	33.29±20.63 ^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	12.40±7.40 ^b	19.82±16.74 ^a	14.85±6.38 ^a	21.70±11.71 ^{ab}	20.08±12.95 ^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200mg/kg	27.81±12.50 ^{ab}	22.98±13.78 ^a	24.73±18.06 ^a	22.31±10.60 ^{ab}	13.26±8.43 ^a

¹⁾ Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

²⁾ Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 가-7. Effect of fermented turmeric extracts on white rats with memory damage with Scopolamine

Group	Morris water maze test			
	1 day	2 day	3 day	4 day
Normal	10.51±3.34 ^b	16.91±10.82 ^b	12.25±6.31 ^b	17.41±5.91 ^b
Control	53.24±57.87 ^a	64.95±22.58 ^a	63.14±49.75 ^a	61.80±36.34 ^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	9.03±5.78 ^b	16.83±15.73 ^b	30.95±20.45 ^b	15.86±11.66 ^b
GABA (10 mg/kg)	14.60±10.16 ^b	15.80±8.16 ^b	16.33±11.18 ^b	17.22±7.21 ^b
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	12.22±3.13 ^b	21.86±25.29 ^b	27.46±20.80 ^b	22.72±14.61 ^b
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	21.51±6.25 ^{ab}	17.69±11.79 ^b	20.47±15.57 ^b	15.68±8.57 ^b
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200 mg/kg	23.13±4.88 ^{ab}	11.36±9.44 ^b	7.08±4.17 ^b	10.58±5.77 ^b

1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

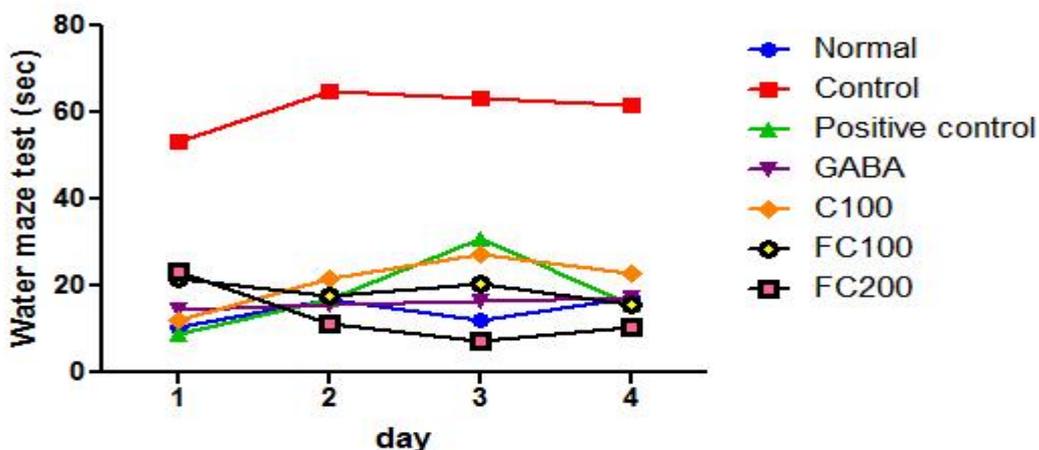


Figure 가-5. Effect of fermented turmeric extracts on white rats with memory damage by scopolamine

(나) 수동회피 실험

- Scopolamine (5 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치(shuttle box, Ugo, Italy)를 이용하여 확인하였다.
- 수동회피시험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 해마에서 조건화된 기억과 변연계와 연관 있는 기억에 관한 영향을 측정하기 위해 주로 사용된다. 수중미로시험이 공간기억력 및 장기기억력 정도를 측정하는 시험에 반하여 수동회피시험은 단기 기억력

의 정도를 측정하는 시험으로 알려져 있다.

- Table 가-8과 같이 학습시험에서는 10.73±7.87 sec에서 26.54±26.17 sec로 3 mM의 전기 쇼크를 주는 검은 방에 머물렀다.
- 그러나 scopolamine 투여 후, 기억력이 손상여부를 확인한 결과 Table 가-9와 같이 3 mM의 전기 쇼크에도 불구하고, 검은 방에 머무는 시간이 학습시험(training trial)과 비교하여 길어진 것으로 확인되었다. 이는 학습시험 시 전기 충격을 기억하지 못한 것으로 판단된다.
- 이에 비해 발효 울금 200 mg/kg 처리군 및 GABA 투여군에서 정상군 수준으로 유의한 결과를 얻어, 단기 기억력에도 긍정적인 역할을 하는 것으로 나타났다.

Table 가-8. Effect of administration of turmeric and fermented turmeric extracts on white rats with memory damage with Scopolamine (Passive avoidance experiment)

Group	Passive avoidance test (Training)				
	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day
Normal	16.92±17.52 ^a	13.68±13.14 ^a	13.27±11.35 ^a	16.12±8.01 ^a	11.61±7.16 ^a
Control	27.62±24.87 ^a	53.40±31.13 ^b	17.31±7.43 ^a	16.37±7.95 ^a	13.03±4.77 ^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	10.59±8.58 ^a	13.18±6.50 ^a	12.22±15.40 ^a	13.57±12.59 ^a	11.71±12.04 ^a
GABA (10 mg/kg)	19.05±16.75 ^a	24.36±21.38 ^a	18.96±17.21 ^a	14.43±10.84 ^a	17.11±14.59 ^a
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	23.49±16.44 ^a	21.88±10.74 ^a	10.92±8.37 ^a	11.76±6.57 ^a	10.73±7.87 ^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	20.91±18.26 ^a	26.54±26.17 ^a	22.26±14.20 ^a	14.83±9.02 ^a	18.30±13.15 ^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200 mg/kg	18.06±11.34 ^a	13.77±11.68 ^a	10.05±2.36 ^a	15.17±10.62 ^a	13.02±12.76 ^a

¹⁾ Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

²⁾ Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 가-9. Effect of administration of turmeric and fermented turmeric extracts on white rats with memory damage with Scopolamine (Passive avoidance experiment)

Group	Passive avoidance test			
	1 day	2 day	3 day	4 day
Normal	5.15±3.10 ^b	13.67±8.78 ^b	7.65±3.55 ^b	7.99±2.56 ^b
Control	34.10±32.05 ^a	60.60±40.55 ^a	87.13±47.28 ^a	82.56±67.97 ^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	9.06±6.60 ^b	8.01±6.70 ^b	11.94±7.35 ^b	7.05±10.65 ^b
GABA (10 mg/kg)	5.97±3.33 ^b	5.96±4.44 ^b	9.39±11.38 ^b	13.73±4.43 ^b
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	7.76±3.90 ^b	11.26±8.39 ^b	7.34±2.84 ^b	14.35±10.12 ^b
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	12.41±12.22 ^b	13.34±8.29 ^b	18.40±7.63 ^b	22.40±10.92 ^b
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200 mg/kg	8.16±5.77 ^b	14.68±9.09 ^b	7.67±2.31 ^b	10.00±4.70 ^b

¹⁾ Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

²⁾ Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

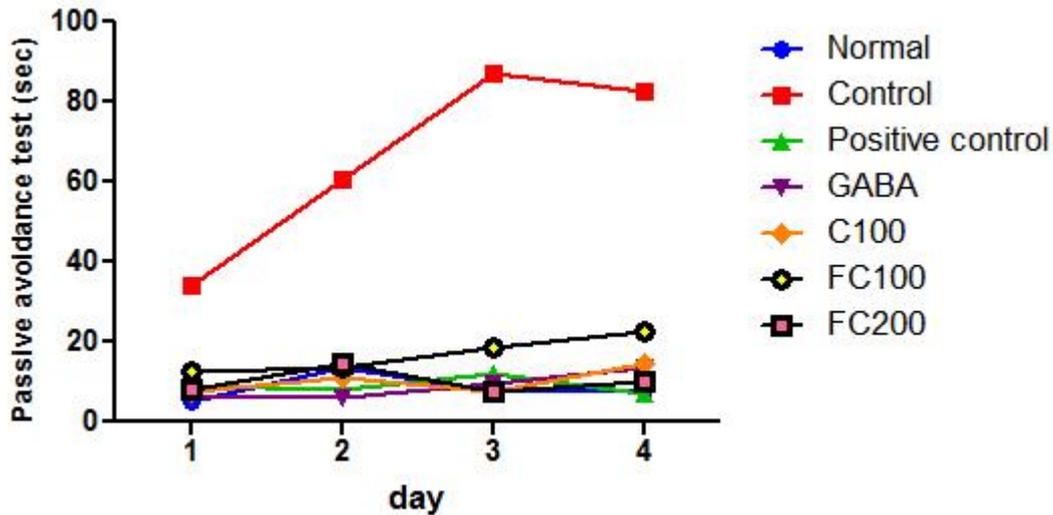


Figure 가-6. Effect of administration of turmeric and fermented turmeric extracts on white rats with memory damage with Scopolamine (Passive avoidance experiment)

(4) GABA 함량

- 뇌 조직 중 GABA 함량을 분석한 결과를 Table 가-10에 나타내었다. GABA는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산으로서 사람에게 있어서는 신경계, 혈액에 함유되어 있으나, 대부분은 뇌의 골수에 존재하여 신경전달 물질인 acetylcholine을 증가시키고 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용뿐 아니라 혈압 저하 작용, 이뇨작용, 항산화 작용, 성장 호르몬의 분비 조절에도 관여하며, 통증 완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Figure 가-7 및 Table 가-10은 GABA를 serum 및 brain에서 측정된 결과이다.
- Scopolamine 투여에 의해 serum 및 brain조직에서 감소된 GABA함량이 울금 및 발효울금의 시료물질 4주 섭취로 인하여 GABA 농도가 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- Serum에서의 GABA농도는 정상군에서는 159.563 ± 7.39 unit으로 control군의 74.863 ± 6.83 unit보다 약 2배가량 높은 농도를 나타내었다. 이에 반하여, positive control 및 GABA투여군의 GABA농도는 각각 97.27 ± 13.94 unit, 98.36 ± 9.27 unit으로 scopolamine을 투여한 control군에 비하여 약 1.5배 높은 농도였다.
- 한편 울금 및 발효울금 시료 투여군에서 GABA농도가 positive control 투여군과 더 높거나 유사한 농도로 나타났다.
- Brain조직에서는 정상군에서의 GABA농도는 216.39 ± 20.79 unit이었으나, 치매 유도군인 control군에서 165.30 ± 48.75 unit으로 serum에서와 같이 GABA농도가 줄어들음을 확인하였다. 한편 발효 울금 100, 200 mg/kg 섭취 결과, 용량 의존적으로 GABA함량이 늘어남을 확인할 수 있었으며, GABA 10 mg/kg 섭취군과 유사한 농도를 나타내었다.

Table 가-10. Comparison of GABA content in brain tissue and blood of white rat injected with turmeric and fermentation turmeric Extract

	Brain	Serum
Normal	216.39±20.78 ^a	159.563±7.39 ^a
Control	165.30±48.75 ^a	74.863±6.83 ^c
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	206.15±45.68 ^a	97.27±13.94 ^b
GABA (10 mg/kg)	184.84±38.91 ^a	98.36±9.27 ^b
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	179.51±53.60 ^a	109.02±1.16 ^b
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	169.51±42.60 ^a	88.53±17.27 ^{bc}
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200 mg/kg	183.20±53.71 ^a	92.90±9.03 ^{bc}

1) Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

2) Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

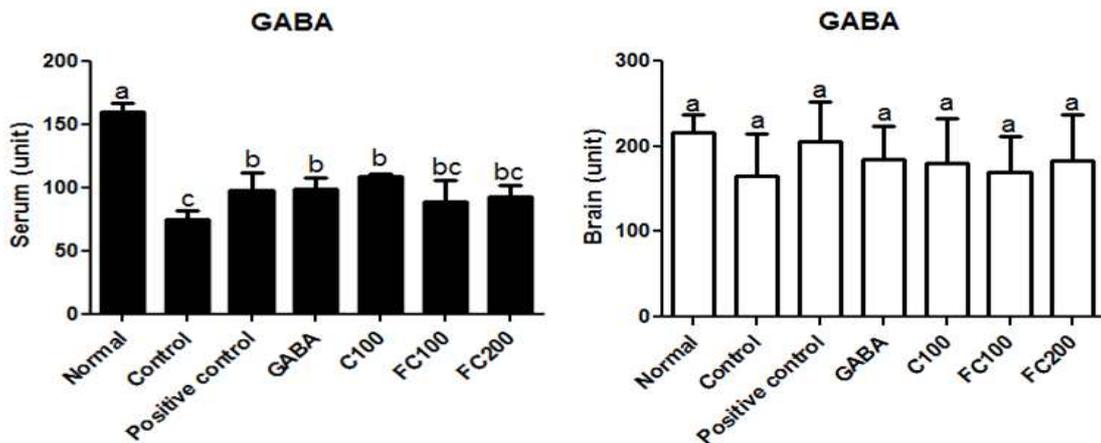


Figure 가-7. Comparison of GABA amount in brain tissue and blood of white rat injected with turmeric and fermentation turmeric extract

*Group: Normal, Control, Positive control, GABA, C100 (*Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC100 (Fermented *Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC200 (fermented *Curcuma longa L.* 200 mg/kg)

(5) Acetylcholine 활성 확인

- 아세틸콜린은 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로서 중추신경계의 콜린성 시스템과 관계가 깊다. 아세틸콜린은 acetyl CoA와 choline acetyltransferase (ChAT)의 효소 작용으로 합성되며, 아세틸콜린에스테라제의 작용으로 acetate와 choline으로 분해된다. 콜린성 신경계의 붕괴는 초기 알츠하이머 질환의 주요 원인으로 알려져 있다. Scopolamine은 항 콜린성 제제로 시냅스에서 acetylcholine의 활성을 감소시키는 약물로 기억손상을 일으켜 노인성 중추신경 장애와 관련된 연구에 많이 활용되는 약물로 알려져 있다. 아세틸콜린 생성계에 미치는 울금 및 발효 울금의 효

과는 Table 가-11에 제시하였다.

- 아세틸콜린의 함량의 경우, control군에서 $1.39 \pm 0.18 \mu\text{mol/mg brain tissue}$ 로 normal군의 $1.84 \pm 0.02 \mu\text{mol/mg brain tissue}$ 와 비교하여 약 25 % 감소하였다. 이는 scopolamine 투여에 의해 기억손상을 일으키며, 뇌 조직의 아세틸콜린의 함량을 감소시킨다는 Fan Y et al.¹⁰와 같은 결론을 얻었다. 한편 발효 울금 100 mg/kg, 200 mg/kg을 처리한 군에서 아세틸콜린 함량이 각각 $1.86 \pm 0.40 \mu\text{mol/mg brain tissue}$, $2.00 \pm 0.06 \mu\text{mol/mg brain tissue}$ 으로 나타났다.
- 아세틸콜린에스테라제 활성은 scopolamine을 처리한 control군에서는 $18.60 \pm 5.92 \text{ unit/mg protein}$ 으로 그 활성이 낮아졌으나, 시료 처리로 인하여 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 발효 울금 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군에서는 정상군보다 유의하거나, 더 높은 활성을 확인할 수 있었다.
- 이는 울금 및 발효 울금 투여로 인하여, 아세틸콜린의 함량 및 아세틸콜린에스테라제 효소 활성이 scopolamine을 처리한 control군과 비교해 볼 때, 농도 및 활성이 높아짐을 확인할 수 있었다. 특히, 발효 울금은 용량 의존적으로 acetylcholine 농도에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.
- 아세틸콜린에스테라제 저해 활성(Acetylcholinesterase inhibition)의 경우, 정상군에서는 약 72.95%로 저해 활성을 확인할 수 있었으나, scopolamine에 의해 61.23%로 아세틸콜린에스테라제 저해가 감소함을 확인할 수 있었다.
- 한편 시료투여군 모두 저해활성을 나타냈으며, 특히 발효 울금 100, 200 mg/kg을 처리한 군에서 아세틸콜린 함량이 68.12%, 64.12%로 저해 활성을 나타냈다.
- 즉, 노인성 치매에서 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제 활성이 감소한다는 보고를 고려했을 때, 발효 울금의 급여로 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제 활성이 농도 의존적으로 영향을 미침에 따라, 노인성 치매의 예방에 도움이 될 것으로 예상된다.

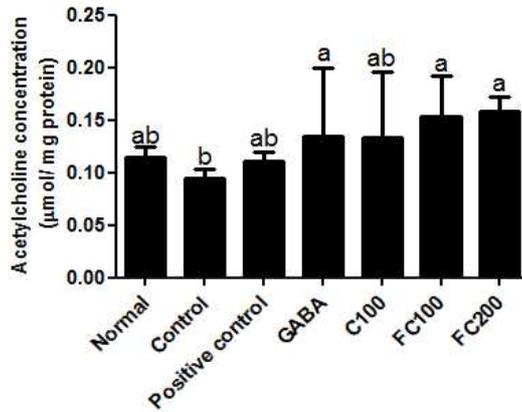
Table 가-11. Comparison of acetylcholine content, acetylcholinesterase activity and inhibition in white rats injected with turmeric and ferment turmeric extract

	Acetylcholine concentration ($\mu\text{mol/mg brain tissue}$)	Acetylcholinesterase activity (IC_{50}) (unit/mg protein)	Acetylcholinesterase inhibition (%)
Normal	1.84 ± 0.02^{ab}	22.16 ± 3.74^a	72.95 ± 5.21^a
Control	1.39 ± 0.18^b	18.60 ± 5.92^a	61.23 ± 2.03^a
Positive control (Tacrcin 0.01 mg/kg)	1.66 ± 0.03^{ab}	20.05 ± 5.93^a	64.19 ± 24.45^a
GABA (10 mg/kg)	2.05 ± 0.69^a	19.65 ± 5.26^a	70.79 ± 3.79^a
<i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	1.46 ± 0.47^{ab}	20.60 ± 3.71^a	61.23 ± 11.45^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 100 mg/kg	1.83 ± 0.40^a	22.80 ± 3.76^a	68.12 ± 0.53^a
Fermented <i>Curcuma longa L.</i> 200 mg/kg	2.00 ± 0.06^a	28.23 ± 4.97^a	64.12 ± 18.78^a

¹⁾ Values are expressed mean \pm S.D. for groups of ten experiments.

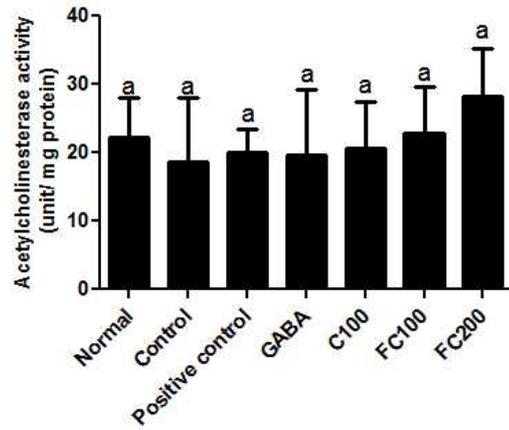
²⁾ Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

A.



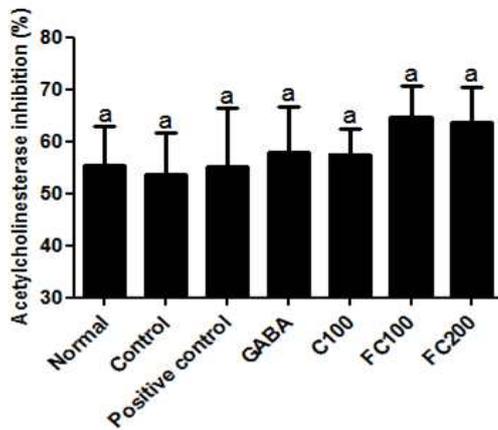
Acetylcholine concentration

B.



Acetylcholinesterase activity

C.



Acetylcholinesterase inhibition

Figure 가-8. Comparison of acetylcholine content, acetylcholinesterase activity and inhibition in white rats injected with turmeric and ferment turmeric extract

*Group: Normal, Control, Positive control, GABA, C100 (*Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC100 (Fermented *Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC200 (fermented *Curcuma longa L.* 200 mg/kg)

(6) 뇌 조직에서 BDNF, p-CREB (ser133)의 단백질 발현: 면역화학염색, Western blot

- BDNF는 brain-derived neurotrophic factor로써 신경 세포의 생존과 분화에 관여하며, 신경회로의 형성과 기억, 학습의 기반인 신경 시냅스의 조절에 관련된 중요한 인자이다. 분비 이상이나 부전, 우울증, 정신 분열증 등 신경질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. CREB은 cAMP response element-binding transcription factor로서, 기억을 담당하고 있는 단백질이다. 또한 BDNF를 조절하고 주로 장기간의 기억, 공간 기억에 관여하는 인자로 알려져 있다.
- 본 실험은 울금 및 발효울금 시료를 4주 투여하였을 때, 뇌 조직의 BDNF와 p-CREB (ser133) 단백질 발현에 미치는 영향을 면역화학 염색과 Western blot을 통해 확인하였다(Figure 가-9,10,11,12).
- BDNF 단백질 발현을 살펴본 결과(Figure 가-9), scopolamine의 투여로 인하여 control군에서 BDNF 발현이 Normal군에 비하여 약 10배 감소하였으나, 울금 및 발효 울금 100, 200 mg/kg을

- 4주간 처리함으로 인하여 control군보다 각각 BDNF 단백질 농도는 약 5배-8배 증가하였다. 특히 발효 울금 200 mg/kg 투여군의 경우, positive control 투여군과 유의한 결과를 나타내었다. Western blot 결과는 면역염색(IHC)염색 결과와도 유사한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- 해마조직에서 BDNF발현이 Normal군에서 가장 발현이 많이 된 것을 확인할 수 있었으며, scopolamine 투여로 해마 조직에서 BDNF 단백질이 감소하였으나, positive control 및 발효울금 투여로 인하여 BDNF 단백질이 증가함을 확인할 수 있었다.
 - p-CREB (ser133) 의 경우(Figure 가-10), scopolamine의 투여로 control군의 p-CREB 발현농도는 normal군의 발현농도와 비교하였을 때 약 3배 감소하였다. 반면, 발효 울금 100, 200 mg/kg 를 처리한 군에서는 scopolamine투여한 Control군에 비하여 농도 의존적으로 p-CREB (ser133) 단백질 발현양이 증가함을 확인할 수 있었다.
 - 이는 BDNF 결과와 같이 발효 울금 200 mg/kg 투여군의 경우, positive control (Tacrin 2 mg/kg) 투여군과 유의한 값을 나타내었다. Western blot 결과는 면역염색(IHC)염색 결과와도 유사한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 가-11). Scopolamine을 투여한 control군에서는 해마 부분에 p-CREB 발현이 적은 것을 확인하였으며, 울금 및 발효울금 투여로 인하여 p-CREB 단백질이 증가함을 확인할 수 있었다.

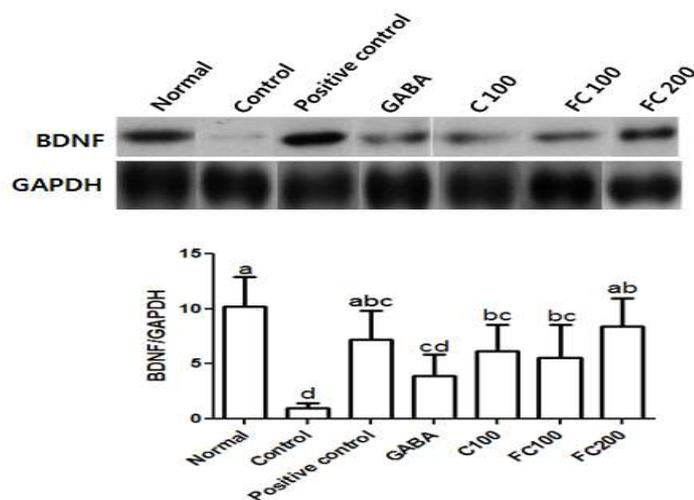


Figure 가-9. Western blot analysis of BDNF in the brain

*Group: Normal, Control, Positive control, GABA, C100 (*Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC100 (Fermented *Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC200 (fermented *Curcuma longa L.* 200 mg/kg)

¹⁾ Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

²⁾ Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

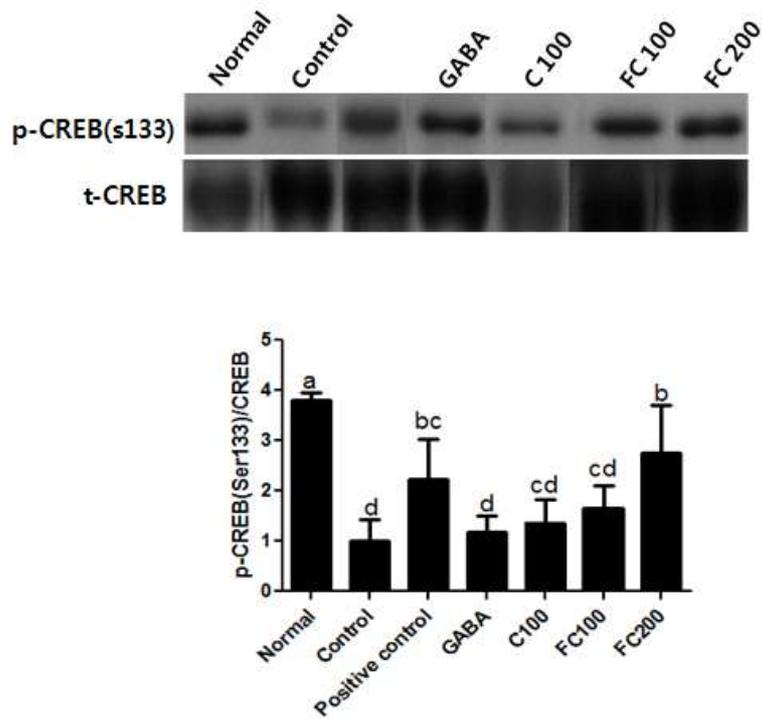


Figure 7-10. Western blot analysis of p-CREB (Ser133) in the brain.

*Group: Normal, Control, Positive control, GABA, C100 (*Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC100 (Fermented *Curcuma longa L.* 100 mg/kg), FC200 (fermented *Curcuma longa L.* 200 mg/kg)

¹⁾ Values are expressed mean±S.D. for groups of ten experiments.

²⁾ Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



Figure 7-11. Immunohistochemistry staining of BDNF expression in the brain (x100)

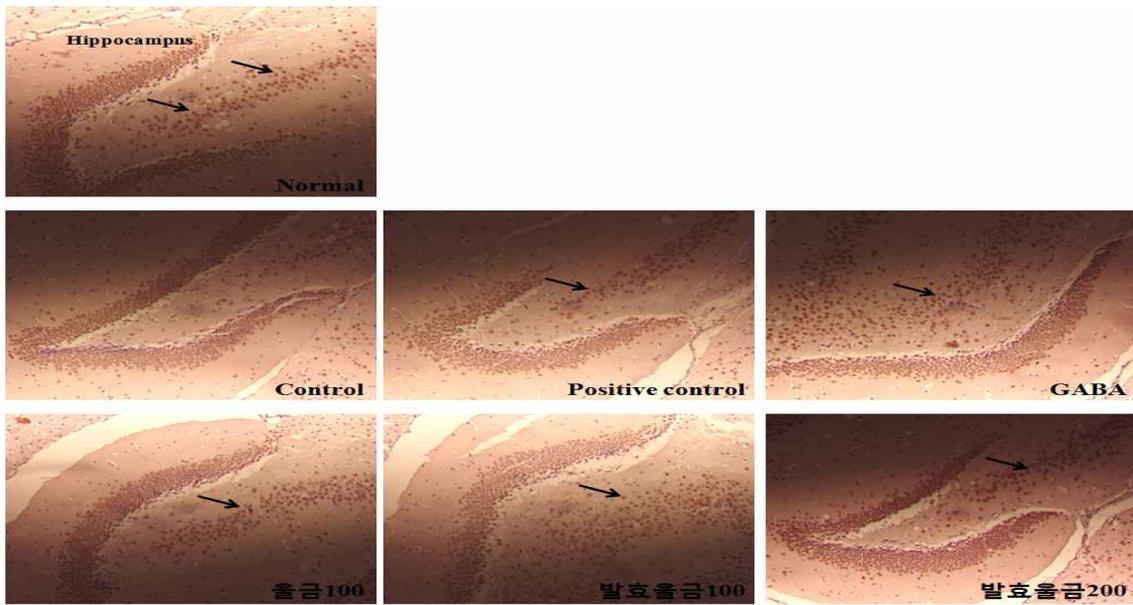


Figure 가-12. Immunohistochemistry staining of p-CREB (ser133) expression in the brain. (x100)

가-4. 발효을금 인지기능개선 임상시험

(1) 기억력 개선 임상 효능평가 기술 확보

(가) 임상시험용 제품 개발 및 관리

- 발효을금을 활용한 기억력개선 건강기능식품 원료 개발을 위하여 원료의 규격에 관하여 원재료에 관한 정보와 유해물질 규격설정에 관한 정보를 제공하였다.
- 원료의 규격은 원료명, 원산지, 성상, 지표성분 및 함량에 관한 정보를 확보하도록 전달하였으며, 유해물질 규격은 4대 중금속(납, 총 비소, 카드뮴, 총 수은), 미생물(대장균군, 세균수), 곰팡이독소(아플라톡신, 파툴린, 오크라톡신, 기타 곰팡이독소), 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)의 4종으로 하였으며, 규정의 개정시에는 업데이트된 정보를 지속적으로 전달하도록 하였다.
- 또한 시험용 식품 개발은 주관기관에서 추진한 *in vivo* 효능평가에서 사용한 시료와의 일관성을 고려하여 동결건조를 거쳐 시험용 식품 원료를 생산하도록 공정을 검토하고 있다.

(나) 동우당 제약 기억력개선 임상시험 자문을 위한 외부 전문가 활용

- 기억력개선 임상시험의 유효성평가방법에 대한 외부 자문을 위하여 임상시험실시기관인 영남대학교 의료원에 재직 중인 임상심리전문가를 위촉하여 기억력개선 임상시험 개요에 대한 외부 검토와 유효성평가방법에 대한 외부 자문을 진행하였다.
- 기 설계된 임상시험 개요에 대한 자문 결과 기억력 개선 유효성평가를 위한 검사도구로서 서울신경심리검사 2판(Seoul Neuropsychological Screening Battery 2nd Edition, SNSB-II) 과 한국형 컴퓨터 신경행동검사(Korean Computerized Neuro-Behavior Test System, KCNT)을 사용하도록 유효성평가방법을 수정하였다.

시험번호	KMHSC-FD-00
연구명	발효율금 활용 식품의 숙취해소 인체적용시험
시험목적	발효율금 활용 식품이 숙취해소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시한다.
시험기관 및 책임자	시험기관 : 대구한인대학교 부속 대구한방병원 시험책임자 : 이경
시험의뢰자	대우중공업
시험대상자	대중병원, 무직위배정, 병명불명, 단말기관 임상시험 스스로 기억력 저하를 느끼고 기억능력 검사를 받기를 희망하는 성인인
대상자수(예시)	시험대상자와 시험용 제품 특성에 따라 정해진 시험대상자를 따르며, 시험군당 대상자 수는 통계적 유의성을 확보할 수 있을 정도로 예상되는 최소 인원으로도 정한다 1. 1군(발효율금) 대상자수 : 29% 발효율금 고아 : 26명 (시험군당 13명) 2. 2군(대조) 대상자수 : 29% 발효율금 고아 : 26명 (시험군당 13명) 3. 3군(대조) 대상자수 : 42% 발효율금 고아 : 26명 (시험군당 13명)
선정기준	다음의 선정기준에 적합한 자 1. 1년 이내 기억력이 떨어진 자 2. 안전성 또는 안정성 평가 없이 내과적인 질환 결과, 병력 중상 또는 소견이 없는 자 3. 연구에 참여, 내용 중에 방해 중독의 위험을 없고 자발적으로 동의서에 서명할 자 4. 제외기준에 포함되지 않는 자
제외기준	1. 1세 이하의 집단기준에 속하는 자 2. 기억력상의 장애 외에 정신장애가 함께 있는 자 3. 알코올이나 약물로 인한 장애가 있는 자 4. 뇌졸중이 과거에 있어 있는 자 5. 심각한 의료로 인한 장애가 있는 자 6. 자해충동과 관련된 약물을 복용하고 있는 자 7. 시험 참여 4주 이내에 임신에 발할 수 있는 권장가능식품을 복용한 자 8. 과거에 정신질환을 앓았던 자 9. 기타 위 사항들의 시험책임자의 판단으로 임상수행이 곤란하다고 판단되는 자
시험관련 제품	시험제품 : *** 발효 식품 (대형 비알) 대조제품 : placebo (대조용, 병명 미명)
복용방법, 기간	복용량, 복용방법 : 미명, 복용기간 : 4주
시험방법	본 임상시험은 이중맹검, 무작위배정, 대조제를 비교, 단말기관 임상시험으로 디자인되었던 실험이며, 방문 1의 임상평가와 선정기준 및 제외기준에 이르지 못한 피험자에 한하여 방문 2의 임상평가 및 대조제를 복용한다. 방문 2는 방문 후 8주 시험인 방문 3에 시험기판을 방문하여 실시한다. 이상발생조사와 임상평가조사 및 기억력검사 등을 받는다.
방문회수	3회 방문 1 : 스크리닝/배출 복용 전 검사 방문 2 : 무작위배정, 배출 (7일(0주)) 방문 3 : 배출 복용 전(8주)
유효성 평가방법 및 평가방법	유효성 평가방법 : MMSE-K score, 연측제언어해 수행 성적 평가방법 : 시험군과 대조군에 방문 1과 방문 3에 유효성 평가변수를 비교하며, 유효수준 5% 이하의 변화를 유효한 것으로 한다.

Figure 가-13. Synopsis-memory improvement study

(다) 인체적용시험 개요 설계

- 발효율금을 활용한 기억력개선 기능성원료 후보 소재의 효능을 평가하기 위한 예비인체적용시험을 설계하였다. 치매의 진단기준에 속하지 않는 만 45세 이상의 성인을 대상으로 발효율금 분말을 포함하는 시험식품 또는 부형제를 포함하는 대조식품을 복용하게 하고 복용 후 8주시점에서 기억력검사와 안전성 평가를 위한 임상학적 검사를 실시한다.
- 기억력은 언어적 기억력과 시각적 기억력으로 나누어 평가한다. 언어적 기억력은 K-MMSE의 기억등록과 회상, 노인용 서울언어학습검사(Seoul Verbal Learning Test, Elderly's version)의 회상과 재인으로 평가하고 시각적 기억력은 RCFT (Rey Complex Figure Test: 모사(Copy), 시계 그리기 검사(Clock Drawing Test))의 회상과 재인으로 평가한다.

시험번호	KMHSC-FD-00
연구명	발효율금 활용 식품의 숙취해소 인체적용시험
시험목적	발효율금 활용 식품이 숙취해소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시한다.
시험기관 및 책임자	시험기관 : 대구한인대학교 부속 대구한방병원 시험책임자 : 이경
시험의뢰자	대우중공업
시험대상자	대중병원, 무직위배정, 병명불명, 단말기관 임상시험 스스로 기억력 저하를 느끼고 기억능력 검사를 받기를 희망하는 성인인
대상자수(예시)	시험대상자와 시험용 제품 특성에 따라 정해진 시험대상자를 따르며, 시험군당 대상자 수는 통계적 유의성을 확보할 수 있을 정도로 예상되는 최소 인원으로도 정한다 1. 1군(발효율금) 대상자수 : 29% 발효율금 고아 : 26명 (시험군당 13명) 2. 2군(대조) 대상자수 : 29% 발효율금 고아 : 26명 (시험군당 13명) 3. 3군(대조) 대상자수 : 42% 발효율금 고아 : 26명 (시험군당 13명)
선정기준	다음의 선정기준에 적합한 자 1. 1년 이내 기억력이 떨어진 자 2. 안전성 또는 안정성 평가 없이 내과적인 질환 결과, 병력 중상 또는 소견이 없는 자 3. 연구에 참여, 내용 중에 방해 중독의 위험을 없고 자발적으로 동의서에 서명할 자 4. 제외기준에 포함되지 않는 자
제외기준	1. 1세 이하의 집단기준에 속하는 자 2. 기억력상의 장애 외에 정신장애가 함께 있는 자 3. 알코올이나 약물로 인한 장애가 있는 자 4. 뇌졸중이 과거에 있어 있는 자 5. 심각한 의료로 인한 장애가 있는 자 6. 자해충동과 관련된 약물을 복용하고 있는 자 7. 시험 참여 4주 이내에 임신에 발할 수 있는 권장가능식품을 복용한 자 8. 과거에 정신질환을 앓았던 자 9. 기타 위 사항들의 시험책임자의 판단으로 임상수행이 곤란하다고 판단되는 자
시험관련 제품	시험제품 : *** 발효 식품 (대형 비알) 대조제품 : placebo (대조용, 병명 미명)
복용방법, 기간	복용량, 복용방법 : 미명, 복용기간 : 4주
시험방법	본 임상시험은 이중맹검, 무작위배정, 대조제를 비교, 단말기관 임상시험으로 디자인되었던 실험이며, 방문 1의 임상평가와 선정기준 및 제외기준에 이르지 못한 피험자에 한하여 방문 2의 임상평가 및 대조제를 복용한다. 방문 2는 방문 후 8주 시험인 방문 3에 시험기판을 방문하여 실시한다. 이상발생조사와 임상평가조사 및 기억력검사 등을 받는다.
방문회수	3회 방문 1 : 스크리닝/배출 복용 전 검사 방문 2 : 무작위배정, 배출 (7일(0주)) 방문 3 : 배출 복용 전(8주)
유효성 평가방법 및 평가방법	유효성 평가방법 : MMSE-K score, 연측제언어해 수행 성적 평가방법 : 시험군과 대조군에 방문 1과 방문 3에 유효성 평가변수를 비교하며, 유효수준 5% 이하의 변화를 유효한 것으로 한다.

Figure 가-14. Synopsis-memory improvement study

(라) 인체적용시험을 통한 기억력개선 효능평가 기술 확보

- ① 인체적용시험의 명칭: 발효율금의 인지기능 개선 예비인체적용시험
- ② 인체적용시험 실시기관: 대구한의대학교부속 대구한방병원
- ③ 인체적용시험 수행기간: 2016년 2월 19일 ~ 2016년 8월 17일
- ④ 시험용 식품: 시험식품은 발효율금 분말 함유 식품, 대조식품은 부형제 함유식품으로 제품의 성상, 성분 및 함량은 다음과 같다.

Table 가-12. Formulation of test and control food for study

항목	시험용 식품 A: 시험군			시험용 식품 B: 대조군		
식품	발효율금 분말 함유 식품			placebo 식품		
원료 및 함량	원료명	배합비 (%)	함량 (mg/정)	원료명	배합비 (%)	함량 (mg/정)
	발효율금 분말	50	250.00	-	-	-
	이산화규소	1.5	0.75	말토덱스트린	1.5	0.75
	스테아린산마그네슘	1.0	0.50	스테아린산마그네슘	1.0	0.50
	결정셀룰로스	47.5	237.50	결정셀룰로스	97.5	487.50
	합계	100.00	500.00	합계	100.00	500.00
외관	 <p style="text-align: center;">경질캡셀</p> <p style="text-align: center;">A : 발효율금 분말 캡셀 B : 부형제 캡셀</p>					

⑤ 시험용 식품의 섭취방법: 1일 2회, 1회 2정씩을 매일 아침과 저녁 공복에 충분한 물과 함께 섭취하도록 하였으며, 복용기간은 8주로 하였다.



Figure 가-15. Design for clinical study for memory improvement

⑥ 시험디자인

㉠ 시험디자인: 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교 인체적용시험

㉡ 시험대상자: 적극적인 치료가 필요한 질환이 없는 건강한 성인

㉢ 선정기준

- 만 45세 이상 70세 이하의 성인
- K-WAIS-IV 단축형 검사 성적이 85점 이상인 자

㉣ 제외기준

- GOT 및 GPT가 정상 상한의 2배를 초과하는 자
- 임신 또는 수유중인 여성
- 시험기간 동안 의학적으로 증명된 방법(예: 콘돔, 루프, 페미돔 등)을 사용하는 피임에 동의하지 않는 가임기 여성

- 공복 혈장 포도당 농도가 126 mg/dL 이상인 자
 - 고혈압(수축기 혈압 160 mmHg 이거나 확장기 혈압 100 mmHg 이상)이 있는 자
 - 거식증, 우울증, 조울증, 정신과 질환 등으로 지속적인 치료가 필요한 자
 - 면역관련 질환, 중증의 간 또는 신부전, 악성종양, 폐질환, 교원질증, 다발성 경화증, 알레르기성 피부질환 및 기타 자가면역질환 등의 전신질환이 이행되고 있는 자
 - 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
 - 시험식품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 또는 위장관계 수술(단순맹장수술 또는 탈장수술 제외)의 과거력이 있는 자
 - 기억력 또는 인지기능 개선 기능성을 인정받은 건강기능식품을 복용하고 있는 자¹⁾
 - 시험참가 3개월 이내에 다른 인체적용시험 또는 임상시험에 참여하여 시험용 제품을 복용한 자(화장품 인체적용시험 제외)
 - 위의 사항들 외에 연구자의 판단으로 시험의 수행이 곤란하다고 판단되는 자
- Ⓜ 시험용 식품: 발효율금 분말 함유 식품 및 부형제 함유 식품
- Ⓜ 유효성 평가기준: 컴퓨터 신경인지기능검사(CNT²⁾) 성적
- Ⓜ 통계분석방법
- 사전 동질성 검정: Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test
 - 효과검정: 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정함
- Ⓜ 관찰일정: 시험기간 동안 대상자는 4회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문별 검사내용은 다음과 같다.

Table 가-13. Brief study schedule at every visiting

방문일 확인/평가항목	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4
	Screening 기초평가, -14~0일	제품제공 0일	간기능검사 28일+7일	시험종료 최종평가 56일+7일
대상자 동의서	○			
인구학적 조사	○			
병력/약물투여력 조사	○			
활력징후검사	○	○		○
체성분검사	○			○
임상실험실 검사	○		○	○
노검사	○			○
선정/제외기준 검토	○			
신경인지기능검사		○		○
시험용 식품 제공		○		
이상반응 모니터링		○	○	○
병용약물 체크		○	○	○
순응도 조사				○

※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 인체시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

1) 인지기능 개선 기능성을 인정받은 건강기능식품 기능성 원료: 은행잎 추출물, 포스파티딜세린, 홍삼, 녹차추출물/테아닌복합물, 당귀등추출복합물, 인삼가시오갈피등혼합추출물, 원지추출분말, 은행잎추출물, 테아닌등복합추출물, 피브로인효소가수분해물, 홍삼당귀등추출복합물, 참당귀뿌리추출물, 포스파티딜세린, 도라지추출물(DRJ-AD), L.Helveticus 발효물

2) CNT: Computerized Neuro-Cognitive Function Test System, Maxmedica, Korea

⑦ 지능검사

- 본 시험에서는 적극적인 치료가 필요한 질환이 없고 일정 수준 이상의 지적 능력이 유지되고 있는 성인을 대상으로 실시하였다.
- 대상자의 지적 능력을 평가하기 위한 검사도구로는 한국판 웨슬러 성인용 지능검사 4판 (Korean Wechsler Adult Intelligence Scale-4th edition, K-WAIS-IV) 단축형을 사용하였다.
- 본 연구에서는 언어이해지수, 지각추론지수, 작업기억지수, 처리속도지수에 속하는 핵심 소검사인 상식, 행렬추론, 산수, 기호쓰기로 구성된 K-WAIS-IV 단축형 검사 결과로부터 전체 지능지수(Full Scale IQ, FSIQ)를 구하였다.

⑧ 컴퓨터 신경인지기능 검사

- CNT40은 전산화된 신경인지기능 검사 시스템 패키지로, 측정의 정확성, 검사방법의 표준화, 자료처리의 용이성 등 컴퓨터가 가지는 고유한 장점을 살리면서 검사자와 검사환경에 따른 영향을 배제하기 위해 개발되었다(김태훈, 전만중과 사공준, 2013). 주관에 의해 영향을 많이 받는 면접식 검사보다 신뢰도와 타당도가 높아(사공준, 정종학, 전만중과 신말숙, 2000; 정종학, 김창윤, 사공준, 전만중과 박홍진, 1998), 보건복지부에서 신의료기술로 결정되어 현재 널리 사용되고 있다(보건복지부, 2003).
- 본 연구에서는 CNT40에 포함된 17종의 소검사 중 기억력 검사와 주의력검사에 속하는 다음 5종의 소검사를 실시하였다.

Table 가-14. Memory test

검사	설명	
Digit Span Test	청각 주의폭 검사	언어적 기억력검사
Verbal Learning Test	언어 기억 및 학습 검사	언어적 기억력 검사
Visual Span Test	시각 주의폭 검사	시공간적 기억력검사

Table 가-15. Attention test

검사	설명	
Visual CPT	시각 지속주의력 검사	지속적 주의력검사
Word-Color Test	선택주의력 검사 (Stroop 검사)	선택적 주의력검사

⑨ 인체적용시험 결과

㉠ 인체적용시험 현황

- 자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 47명을 스크리닝하여 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 26명을 대상으로 선정하였다. 대상자 26명은 시험군 13명, 대조군 13명으로 배정되었다.
- 무작위 배정된 26명 중 중도 탈락한 대상자는 5명이었으며, 시험군 10명, 대조군 11명이 계획서에 따라 시험을 종료하였다.

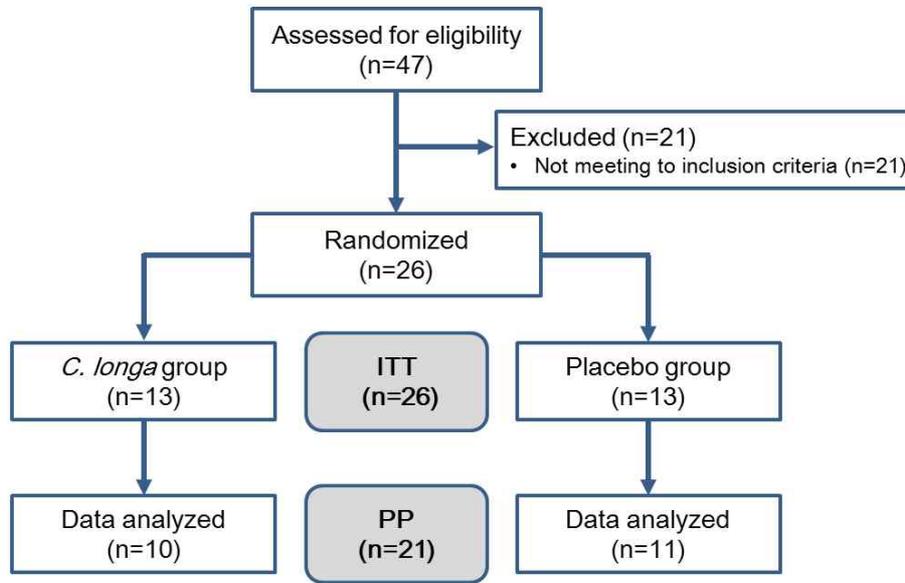


Figure 가-16. Schematic diagram for study summary

㉔ 동질성검정 결과

- 대상자의 인구학적 정보인 대상자의 인구학적 정보에 대하여 시험용 식품 섭취 전 측정치의 시험군간 동질성 검정을 실시하였으며, 조사한 항목에 대하여 3년 이내의 병력 이외의 모든 항목에서 시험군 간 유의한 차이가 확인되지 않았다(Table 가-16,17,18).

Table 가-16. Homogeneity analysis for gender

Variable		남		여		χ^2	p
		빈도	%	빈도	%		
성별 (방문1)	시험군	5	19.2	8	30.8	.185	.378
	대조군	2	7.7	11	42.3		

p: Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 가-17. Homogeneity analysis for demographic information: life style

Variable		0: 아니오		1: 예		χ^2	p
		빈도	%	빈도	%		
흡연 (방문1)	시험군	12	46.2	1	3.8	.539	1.000
	대조군	11	42.3	2	7.7		
규칙적 운동 (방문1)	시험군	2	7.7	11	42.3	.619	1.000
	대조군	3	11.5	10	38.5		
병력 (방문1)	시험군	8	30.8	5	19.2	.013	.039
	대조군	13	50.0	0	0		
약물 투여력 (방문1)	시험군	11	42.3	2	7.7	.619	1.000
	대조군	10	38.5	3	11.5		
비용 약물 (방문1)	시험군	10	38.5	3	11.5	.619	1.000
	대조군	12	46.2	1	3.8		

p: Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 가-18. Homogeneity analysis for demographic information: age, height, body weight, drinking and obesity

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
연령 (방문1)	시험군	53.62	7.467	-1.115	.276	.264
	대조군	56.77	6.942			
신장 (방문1)	시험군	163.44	7.186	1.198	.243	.264
	대조군	159.85	8.081			
체중 (방문1)	시험군	61.962	9.5883	.433	.669	.448
	대조군	60.746	3.2041			
일주일 음주량 (방문1)	시험군	12.800	20.5360	.236	.815	.545
	대조군	10.762	23.3980			
BMI (방문1)	대조군	24.148	3.6986	.198	.845	.801
	시험군	23.908	2.3542			
WHR (방문1)	대조군	.8938	.04788	-.046	.964	.960
	시험군	.8946	.03620			
VFA (방문1)	대조군	106.68	28.673	1.157	.259	.347
	시험군	95.62	18.437			

w: Mann-Whitney U 검정에 의한 점근 유의수준

㉔ 지능검사 결과의 시험군간 동질성 검정

- 대상자 선정기준인 지능검사 결과값인 FSIQ의 시험군과 대조군 비교 결과, 두 군간 차이는 확인되지 않았다.

Table 가-19. Homogeneity analysis for intelligence tests results

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
FSIQ (방문1)	시험군	106.31	8.920	.991	.332	.204
	대조군	102.92	8.490			

㉕ 컴퓨터 신경인지기능 검사 결과의 분석

- 컴퓨터 신경인지기능 검사는 시험용 식품 복용 전과 식품 복용 8주 후에 실시하였다. 각 항목에 대하여 시험용 식품 복용 전 시험군과 대조군의 동질성을 비교한 결과 Digit span test의 역방향 시험을 제외한 모든 항목에서 시험군과 대조군 간 차이는 없었다.
- Digit span test의 역방향 시험 성적은 시험군은 50.308±14.0913, 대조군은 39.308±9.1596으로 시험군이 대조군보다 통계적으로 유의하게 높은 것으로 나타났다(Table 가-20).
- 시험용 식품 복용 전과 복용 8주 후의 인지기능 검사 결과의 변화량에 대한 시험군간 비교 결과는 모든 항목에서 시험군과 대조군 간 차이가 없었다.

Table 가-20. Homogeneity analysis of Computerized Neurocognitive Function Test result: baseline

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
Digit Span Test-정방향	시험군	43.308	12.3179	.402	.691	.448
	대조군	41.385	12.0799			
Digit Span Test-역방향	시험군	50.308	14.0913	2.360	.027	.039
	대조군	39.308	9.1596			
Verbal Learning Test-지연검사	시험군	49.385	13.0929	1.297	.207	.264
	대조군	42.231	14.9619			
Verbal Learning Test-A1:A5합	시험군	41.923	7.2049	.296	.770	.920
	대조군	40.923	9.8443			
Visual Span Test-정방향	시험군	40.615	10.1779	.160	.874	.880
	대조군	40.000	9.3808			
Visual Span Test-역방향	시험군	41.769	5.7901	-.061	.952	.801
	대조군	41.923	6.9338			
Visual CPT-정반응수	시험군	71.000	13.5831	.178	.860	.614
	대조군	70.077	12.8741			
Word-Color Test	시험군	35.385	11.9271	2.172	.103	.125
	대조군	28.000	2.8284			

w: Mann-Whitney U 검정에 의한 접근 유의수준

Table 가-21. Changes of Computerized Neurocognitive Function Test result

Variable	시험군		대조군		t value	Pr > t	Pr > w
	평균	표준편차	평균	표준편차			
Digit Span Test-정방향 (방문1-방문3)	-.769	16.7539	-2.538	10.5878	.322	.750	.545
Digit Span Test-역방향 (방문1-방문3)	1.538	11.6018	-3.615	8.9400	1.269	.217	.204
Verbal Learning Test-지연검사 (방문1-방문3)	-3.615	6.8500	-8.846	14.9491	1.147	.263	.418
Verbal Learning Test-A1:A5합 (방문1-방문3)	-8.692	5.8078	-7.308	6.5496	-.570	.574	.687
Visual Span Test-정방향 (방문1-방문3)	-.769	4.2847	-2.154	7.2209	.595	.558	.336
Visual Span Test-역방향 (방문1-방문3)	-.077	3.7741	.231	6.0574	-.155	.878	.960
Visual CPT-정반응수 (방문1-방문3)	-2.077	12.6587	-6.385	13.3263	.845	.406	.186
Word-Color Test (방문1-방문3)	-4.077	7.2968	-4.231	7.0256	.055	.957	.448

w: Mann-Whitney U 검정에 의한 접근 유의수준

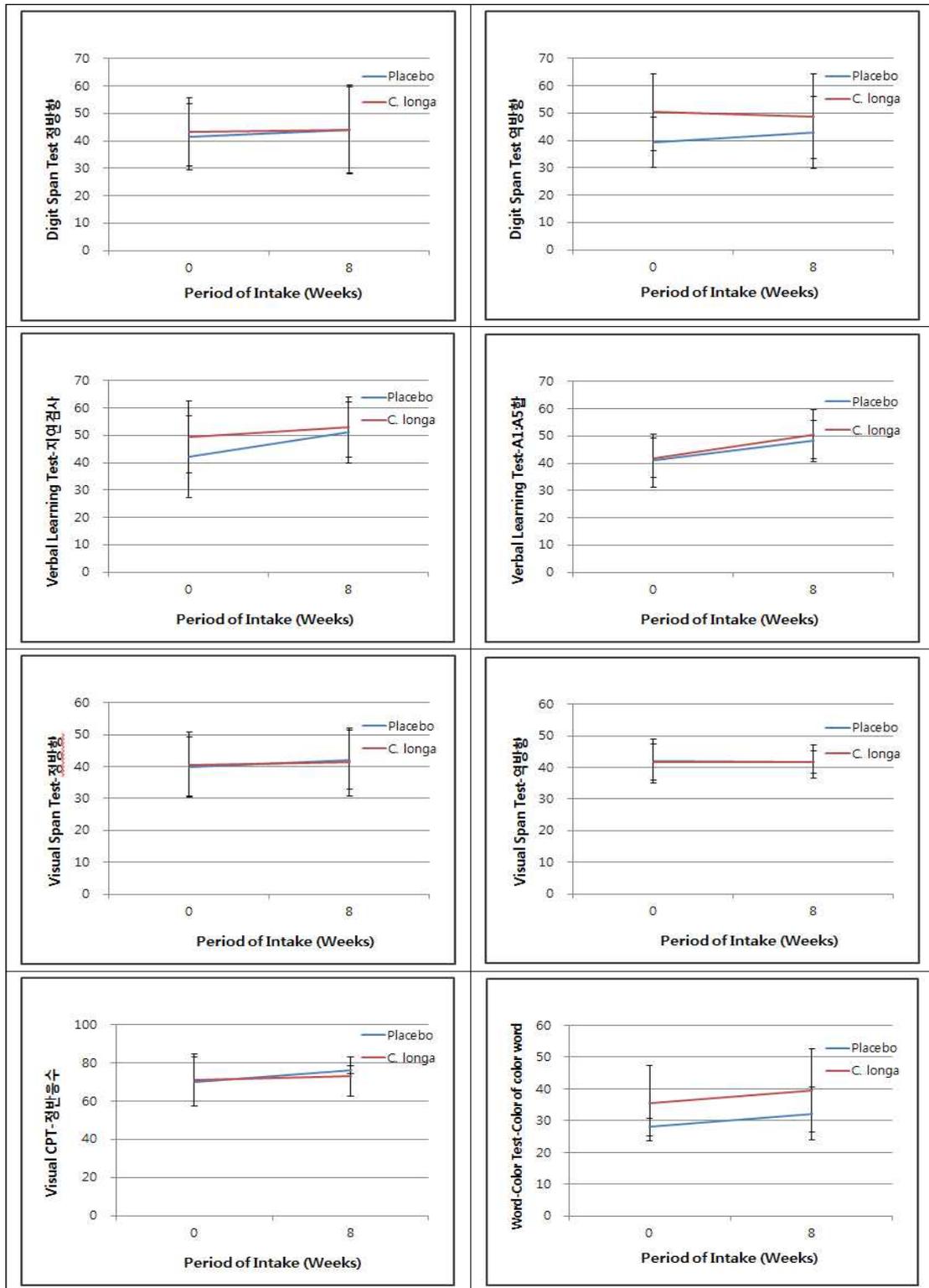


Figure 가-17. Changes of Computerized Neurocognitive Function Test result

(2) 인지기능 개선 임상 효능평가 기술 확보

(가) 인체적용시험 개요 설계

- 발효율금 분말을 활용한 기능성원료 후보 소재의 기억력 및 인지기능에 대한 효능을 평가하기 위하여 기억력 저하를 호소하는 만 50~84세의 성인을 대상으로 발효율금 분말을 포

함하는 시험식품 또는 부형제를 포함하는 대조식품을 복용하게 하고 복용 후 8주시점에서 기억력검사와 안전성 평가를 위한 임상학적 검사를 실시하였다.

- 기억력과 인지기능을 평가하기 위하여 언어 기억 및 학습검사, 시각 지속주의력 검사, 선택 주의력 검사와 전반적 인지기능 정도를 평가하기 위한 K-DRS2검사를 실시하였다.

(나) 인체적용시험을 통한 인지기능 개선 효능평가 기술 확보

- ① 인체적용시험의 명칭: 기억력 저하를 호소하는 성인에 대한 발효율금 분말의 기억력 및 인지기능에 미치는 효과: 무작위배정, 이중눈가림, 대조식품 비교 인체적용시험
- ② 인체적용시험 실시기관: 대구한의대학교부속 대구한방병원
- ③ 인체적용시험 수행기간: 2017년 4월 11일 ~ 2017년 6월 29일
- ④ 시험용 식품: 시험식품은 발효율금 분말 함유 식품, 대조식품은 부형제 함유식품으로 제품의 성상, 성분 및 함량은 다음과 같다.

Table 가-22. Formulation of test and control food for clinical study

항목	시험용 식품 A: 시험군			시험용 식품 B: 대조군		
식품	발효율금 분말 함유 식품			placebo 식품		
원료 및 함량	원료명	배합비 (%)	함량 (mg)	원료명	배합비 (%)	함량 (mg)
	발효율금 분말	50	250.00	-	-	-
	이산화규소	1.5	0.75	말토덱스트린	1.5	0.75
	스테아린산마그네슘	1.0	0.50	스테아린산마그네슘	1.0	0.50
	결정셀룰로스	47.5	237.50	결정셀룰로스	97.5	487.50
합계	100.00	500.00	합계	100.00	500.00	
외관	정제 (제품 외관은 변경될 수 있음)					
포장단위	260정/pk			260정/pk		
저장방법	직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관					
유효기간	제조일로부터 2년					

- ⑤ 시험용 식품의 섭취방법: 1일 2회, 1회 2정씩을 매일 아침과 저녁 공복에 충분한 물과 함께 섭취하도록 하였으며, 복용기간은 8주로 하였다.

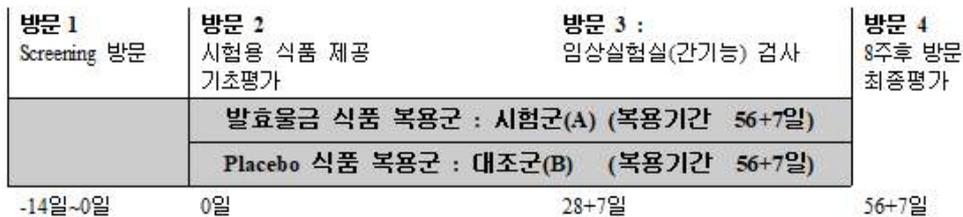


Figure 가-18 Study design

⑥ 시험디자인

㉠ 시험디자인: 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교 인체적용시험

㉡ 시험대상자: 스스로 기억력이 저하되었다고 느끼며, 기억력 검사를 받기를 희망하는 자

㉢ 선정기준

- 만 50~84세의 성인

- Verbal learning test 의 표준점수가 평균-1SD 이하인 자(즉각 회상점수 또는 지연점수 또는 재인점수)

㉣ 제외기준

- ALT 또는 AST가 정상 상한의 3배를 초과하면서 AST/ALT가 1 미만인 자

- ALT 또는 AST가 정상 상한의 3배를 초과하면서 AST/ALT가 2 이상인 자

- 정신지체나 치매로 진단받은 경력이 있는 자

- 망상, 환각, 조증 등 인지기능에 영향을 줄 가능성이 있는 신경과 또는 정신과 증상이 있는 자

- 알코올 또는 다른 물질의 남용 또는 의존이 있거나 과거력이 있는 경우

- 간경변증, 만성 신부전, 뇌졸중의 과거력이 있는 자

- 즉각적인 치료를 요하는 신체장애가 있는 자

- 치매증상과 관련한 약물을 복용하고 있는 자

- 약물로 조절되지 않는 고혈압 또는 당뇨가 있는 자

- 기억력 또는 인지기능 개선 기능성을 인정받은 건강기능식품을 복용하고 있는 자³⁾

- 시험참가 3개월 이내에 다른 인체적용시험 또는 임상시험에 참여하여 시험용 제품을 복용한 자(화장품 인체적용시험 제외)

- 위의 사항들 외에 연구자의 판단으로 시험의 수행이 곤란하다고 판단되는 자

㉤ 시험용 식품: 발효율금 분말 함유 식품 및 부형제 함유 식품

㉥ 유효성 평가기준: 컴퓨터 신경인지기능검사(CNT⁴⁾) 및 K-DRS 검사 성적

㉦ 통계분석방법

- 사전 동질성 검정: Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test

- 효과검정: 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정함

㉧ 관찰일정: 시험기간 동안 대상자는 4회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문별 검사내용은 다음과 같다.

3) 인지기능 개선 기능성을 인정받은 건강기능식품 기능성 원료: 은행잎 추출물, 포스파티딜세린, 홍삼, 녹차추출물/테아닌복합물, 당귀등추출복합물, 인삼가시오갈피등혼합추출물, 원지추출분말, 은행잎추출물, 테아닌등복합추출물, 피브로인효소가수분해물, 홍삼당귀등추출복합물, 참당귀뿌리추출물, 포스파티딜세린, 도라지추출물(DRJ-AD), L.Helveticus 발효물

4) CNT: Computerized Neuro-Cognitive Function Test System, Maxmedica, Korea

Table 가-23. Brief study schedule at every visiting

방문일 확인/평가항목	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4
	Screening	기초평가 제품제공	간기능검사	시험종료 최종평가
	-14~0일	0일	28일+7일	56일+7일
대상자 동의서	○			
인구학적 조사	○			
병력/약물투여력 조사	○			
활력징후검사	○	○	○	○
체성분검사	○			○
음주, 식이 및 운동 조사	○		○	○
임상실험실 검사	○		○	○
뇨검사	○			○
선정/제외기준 검토	○			
인지기능검사		○		○
시험용 식품 제공		○		
이상반응 모니터링		○	○	○
병용약물 체크		○	○	○
순응도 조사				○

※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 인체시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

⑦ 컴퓨터 신경인지기능 검사

- CNT40은 전산화된 신경인지기능 검사 시스템 패키지로, 측정의 정확성, 검사방법의 표준화, 자료처리의 용이성 등 컴퓨터가 가지는 고유한 장점을 살리면서 검사자와 검사환경에 따른 영향을 배제하기 위해 개발되었다(김태훈, 전만중과 사공준, 2013). 주관에 의해 영향을 많이 받는 면접식 검사보다 신뢰도와 타당도가 높아(사공준, 정종학, 전만중과 신말숙, 2000; 정종학, 김창윤, 사공준, 전만중과 박홍진, 1998), 보건복지부에서 신의료기술로 결정되어 현재 널리 사용되고 있다(보건복지부, 2003).
- 본 연구에서는 CNT40에 포함된 17종 항목 중 다음 3종의 검사를 실시하였다.

Table 가-24. The computerized neurocognitive function test

검사	설명	
Verbal Learning Test	언어 기억 및 학습 검사	언어적 기억력 검사
Visual CPT	시각 지속주의력 검사	지속적 주의력검사
Word-Color Test	선택주의력 검사 (Stroop 검사)	선택적 주의력검사

⑧ K-DRS 검사

- K-DRS (Korean Dementia Rating Scale, 한국판 치매평가 검사)는 전반적인 인지기능 정도를 평가하는 검사도구로 장·노년의 인지기능 평가, 치매진단 및 경과 측정 등을 위하여 개발되고 표준화작업이 완료된 검사도구로 환자들의 전반적인 인지 능력을 쉽고 객관적으로 측정하기 위해 고안된 것으로 주의 8개, 관리기능 11개, 구성 6개, 개념화 6개, 기억 5개 과제로 이루어져 있다. 총점은 144점으로, 만 50~59세, 60~69세, 70~79세, 80~89세의 4개 연령군의 노인군을 대상으로 문맹, 0~5세, 6~11세, 12년 이상의 교육연한군으로 나누어 측정한다.

○ 본 연구에서는 K-DRS는 국내 실정에 맞추어 재표준화된 K-DRS2를 사용하였다.

Table 가-25. K-DRS testing sheet

척도	측정내용	문항수	총점
주의	정보를 수동적으로 접수하고 이를 처리하는 용량 및 간섭 없이 주의를 집중시킬 수 있는 능력	8	144
관리기능	의도된 행동을 효과적으로 실행하는 능력	11	
구성	시공간적인 능력의 하나로 시지각 기능과 운동반응 요구	6	
개념화	구체적 사상이나 사건을 추상적으로 처리하는 사고 과정	6	
기억	접수된 정보를 저장, 유지하여 후에 회상, 재연하는 능력	5	

(다) 인체적용시험 결과

① 인체적용시험 현황

- 자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 67명을 스크리닝하여 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 50명을 대상자로 선정하여, 시험군 25명, 대조군 25명으로 배정되었다.
- 무작위 배정된 50명 중 시험군 4명, 대조군 3명의 총 7명이 중도 탈락하였으며, 시험계획서를 준수하여 시험을 종료한 대상자는 시험군 21명, 대조군 22명으로 총 43명이었다.

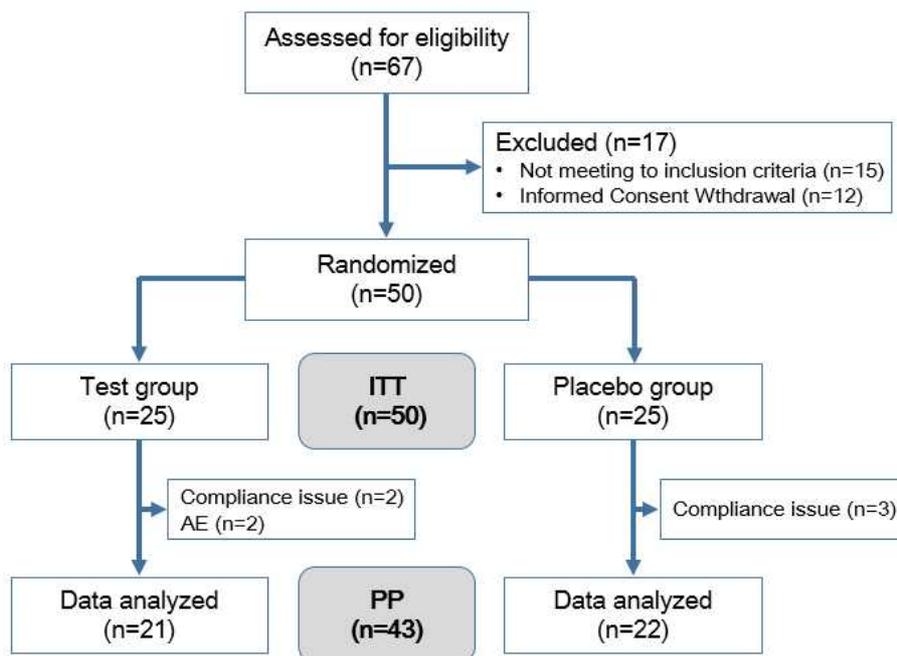


Figure 가-19. Schematic representation for study summary

② 동질성검정 결과

- 대상자의 인구학적 정보 중 범주형 변수인 성별, 음주, 규칙적 운동, 흡연 여부에 대하여 시

험용 식품 섭취 전 측정치의 시험군간 동질성 검정을 실시하였다.

- 성별과 음주 여부에 대한 검정 결과는 유의수준 5%에서 유의한 차이가 있어 동질하다고 볼 수 없었다. 즉, 성별에 대하여 시험군은 남자가 많고, 대조군은 여자가 많은 것으로 조사 되었으며, 음주여부에 대해서는 시험군은 음주를 하는 사람이 많고, 대조군은 음주를 하지 않는 사람이 많았다.
- 규칙적 운동과 흡연 여부에 대한 검정 결과 시험군과 대조군은 동질한 것으로 조사되었다.
- 또한 연속형 변수인 연령, 신장, 체중, 비만도, 음주에 대한 시험용 식품 섭취 전 시험군간 동질성 검정 결과 신장과 체중은 시험군간 유의한 차이가 있어 동질하다고 볼 수 없었다. 즉 신장은 시험군이 컸으며, 체중은 시험군이 높았다.
- 이 외의 모든 항목에서 시험군과 대조군은 동질하였다.

Table 가-26. Homogeneity analysis for demographic information

		구분	대조군	시험군	χ^2	p
성별	남자	빈도	6	13	0.0414	-
		행백분율	31.58	68.42		
	여자	빈도	19	12		
		행백분율	61.29	38.71		
음주여부	아니오	빈도	20	12	0.0184	-
		행백분율	62.5	37.5		
	예	빈도	10	26		
		행백분율	27.78	72.22		
운동여부	아니오	빈도	2	4	0.3841	0.6671
		행백분율	33.33	66.67		
	예	빈도	23	21		
		행백분율	52.27	47.73		
흡연여부	아니오	빈도	24	19	0.1292	0.18
		행백분율	55.81	44.19		
	예	빈도	1	4		
		행백분율	20	80		

χ^2 : Chi-square test에 의한 유의수준

p: Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 가-27. Homogeneity analysis for demographic information: age, height, body weight, drinking and obesity

구분	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
연령	대조군	63.040	6.711	0.99	0.325	0.3456
	시험군	61.240	6.071			
신장	대조군	158.800	7.663	-2.48*	0.0168	0.0116
	시험군	164.100	7.291			
체중	대조군	60.116	10.594	-2.58*	0.013	0.0031
	시험군	66.684	7.069			
BMI	대조군	23.796	3.261	-1.22	0.2301	0.4376
	시험군	24.788	2.453			
체지방율	대조군	31.368	7.902	0.32	0.7527	0.7710
	시험군	30.700	6.976			
음주일수	대조군	1.69	1.109	0.948	0.357	0.4417
	시험군	1.20	0.447			
음주량	대조군	65.91	66.861	-0.433	0.671	0.7674
	시험군	49.73	82.123			

③ 컴퓨터 신경인지기능 검사 결과의 분석

- 컴퓨터 신경인지기능 검사는 시험용 식품 복용 전과 식품 복용 8주 후에 실시하였다. 각 항목에 대하여 시험용 식품 복용 전 시험군과 대조군의 동질성을 비교한 결과 Verbal Learning Test의재인검사 성적이 시험군이 더 높았으며, 다른 항목에서의 검사성적은 시험군과 대조군이 동질한 것으로 분석되었다.
- 시험용 식품 복용 전과 복용 8주 후의 컴퓨터 신경인지기능 검사 결과의 변화량에 대한 시험군간 비교 결과 모든 항목에서 시험군과 대조군 간 차이가 없었다.

Table 가-28. Homogeneity analysis of Computerized Neurocognitive Function Test result: baseline

구분	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
Verbal Learning Test						
지연검사	대조군	32.60	6.481	1.510	.140	0.5023
	시험군	36.76	12.156			
A1~A5합	대조군	30.84	4.497	.653	.517	0.4248
	시험군	31.72	5.013			
재인검사	대조군	10.16	3.275	2.425*	.019	0.0170
	시험군	12.12	2.369			
Visual CPT						
정반응수	대조군	63.92	19.923	.915	.365	0.3113
	시험군	68.60	16.044			
누락 오류수	대조군	63.92	19.923	.915	.365	0.3113
	시험군	68.60	16.044			
오경보 오류수	대조군	51.16	20.001	-.554	.582	0.6008
	시험군	48.12	18.756			
정반응시간 표준편차	대조군	42.40	9.390	1.413	.164	0.1736
	시험군	46.16	9.424			
Word Color Test						
Word(black)	대조군	41.04	10.514	.611	.544	0.5381
	시험군	42.80	9.849			
Color only	대조군	33.76	7.688	1.330	.190	0.1210
	시험군	36.48	6.746			
Color word	대조군	33.16	9.402	1.140	.260	0.0904
	시험군	36.00	8.175			
Word of color word	대조군	36.92	9.785	1.001	.322	0.2487
	시험군	39.68	9.716			
Color of color word	대조군	31.36	7.879	1.904	.063	0.1775
	시험군	27.36	6.946			

Table 가-29. Changes of computerized neurocognitive function test result

구분	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
Verbal Learning Test						
지연검사	대조군	-7.560	8.540	-0.59	0.5568	0.6813
	시험군	-5.840	11.760			
A1~A5합	대조군	-8.600	9.336	-1.14	0.2604	0.3819
	시험군	-6.040	6.255			
재인검사	대조군	-1.560	3.852	-1.01	0.3172	0.2723
	시험군	-0.680	1.994			
Visual CPT						
정반응수	대조군	-0.880	17.619	-0.23	0.8207	0.4937
	시험군	0.160	14.493			
누락오류수	대조군	-0.280	17.082	-0.1	0.9222	0.4937
	시험군	0.160	14.493			
오정보오류수	대조군	-4.920	15.286	-0.2	0.8454	0.7277
	시험군	-4.120	13.520			
정반응시간 표준편차	대조군	-1.600	5.986	-1.51	0.1369	0.0809
	시험군	1.000	6.164			
Word Color Test						
Word(black)	대조군	-0.520	8.828	0.35	0.7315	0.9224
	시험군	-1.360	8.376			
Color only	대조군	-2.440	10.890	-0.86	0.3974	0.7664
	시험군	-0.360	5.361			
Color word	대조군	-3.840	13.536	-0.04	0.9678	0.9375
	시험군	-3.720	5.842			
Word of color word	대조군	-0.640	10.111	0.42	0.6781	0.2710
	시험군	-1.720	8.060			
Color of color word	대조군	-2.840	7.983	-0.31	0.7581	0.9533
	시험군	-2.160	7.532			

④ K-DRS 검사 결과의 분석

○ K-DRS 검사는 시험용 식품 복용 전과 식품 복용 8주 후에 실시하였으며, 각 항목에 대한 동질성 검정 결과, 개념화 점수에서 시험군이 더 높았으며, 다른 항목에서의 검사성적은 시험군과 대조군이 동질한 것으로 분석되었다.

Table 가-30. Homogeneity analysis of K-DRS test result: baseline

구분	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
주의	대조군	35.44	1.850	1.334	.188	0.0955
	시험군	36.08	1.525			
관리기능	대조군	32.12	4.065	.199	.843	0.3255
	시험군	32.40	5.723			
구성	대조군	6.00	.000	-1.000	.327	0.3371
	시험군	5.92	.400			
개념화	대조군	33.92	3.662	2.701*	.011	0.0099
	시험군	36.08	1.605			
기억	대조군	21.44	3.874	.547	.587	0.8669
	시험군	21.96	2.761			
총점	대조군	132.56	8.564	1.446	.155	0.0909
	시험군	128.92	9.224			

○ 시험용 식품 복용 전과 복용 8주 후의 K-DRS 검사 결과의 변화량에 대한 시험군간 비교 결과 모든 항목에서 시험군과 대조군 간 차이가 없었다.

Table 가-31. Changes of K-DRS test result

구분	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
주의	대조군	-0.160	1.313	0.00	1.0000	0.9752
	시험군	-0.160	1.405			
관리기능	대조군	-1.880	3.180	-0.35	0.7271	0.4439
	시험군	-1.480	4.727			
구성	대조군	0.000	0.000	1.00	0.3273	0.3371
	시험군	-0.080	0.400			
개념화	대조군	-0.600	2.102	-0.07	0.9415	0.7729
	시험군	-0.560	1.710			
기억	대조군	-0.800	3.731	-0.65	0.5174	0.8360
	시험군	-0.240	2.107			
총점	대조군	-3.440	6.131	-0.58	0.5665	0.4478
	시험군	-2.400	6.602			

나. 늙은호박 발효물의 체지방개선 효능평가 및 시제품개발(아람농장(주))

나-1. 늙은호박 발효물을 이용한 체지방개선 효능평가 추진 일정



나-2. 늙은호박의 혼합발효를 통한 발효조건 최적화 및 지표물질 분석

(1) 늙은호박의 혼합발효 최적조건

(가) 재료 및 방법

2배 희석한 늙은 호박을 습식분쇄 후 glucose 3%, MSG 1.5%를 첨가하여 1 L 삼각 플라스크에 500 mL을 제조하여 121°C에서 15분간 멸균하였다. 그 다음 고초균 10배 농축스타터를 1% 접종하여 42°C에서 2일간, 160 rpm으로 발효를 진행하였으며 그 후 *L. plantarum* EJ2014를 1% 접종하여 30°C에서 3일간 정지 배양하여 혼합 발효를 수행하였다(Figure 나-1).

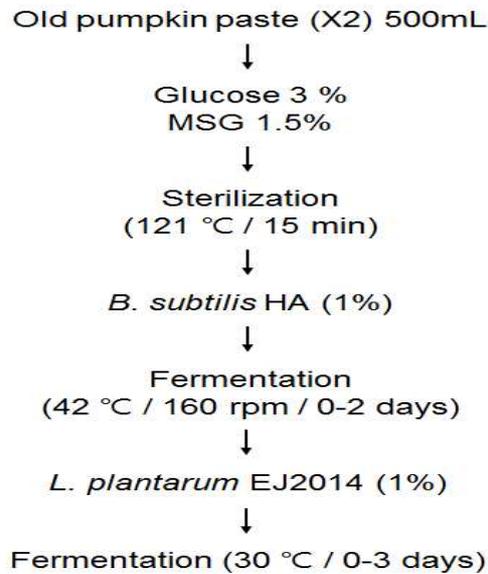


Figure 나-1. Process for mixed fermentation of old pumpkin

(나) 결과 및 고찰

- pH, 산도 측정 결과 발효 전 pH가 5.78로 나타났고 고초균 발효에 의해 1차 발효 1일째 pH가 5.10으로 감소하다가 2일째 6.31로 다시 증가하는 경향을 보였다. 이 후 2차 젖산발효가 진행되면서 3일째 pH가 4.12으로 감소하였다.
- 산도의 경우 발효 전 0.12%에서 1차 발효 1일째 0.32%로 증가하였다가 2일째 0.16%로 증가하는 경향을 보였으며, 그 다음 2차 젖산발효가 진행되면서 3일째 1.18%까지 계속 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 나-2).

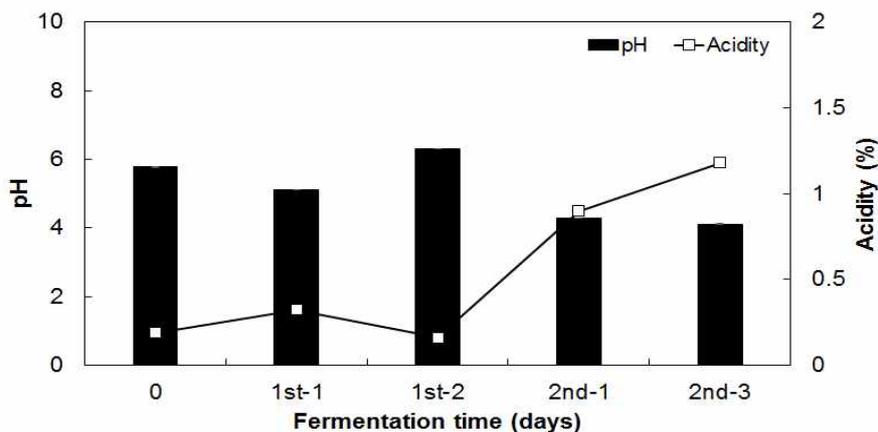


Figure 나-2. Changes in pH and acidity of old pumpkin fermented

- 생균수 측정결과는 Figure 나-3과 같다. 1차 발효에 의한 고초균의 생육은 초기 첨가된 스타터 1.00×10^7 CFU/mL에서 4.6×10^8 CFU/mL까지 증가하였으며, 2차 발효 1일째 2.2×10^7 CFU/mL로 감소한 뒤 3일째까지 2.3×10^7 CFU/mL로 유지되는 것을 알 수 있었다. 젖산균의 경우 초기 첨가된 스타터 1.50×10^7 CFU/mL에서 발효 1일째 9.0×10^8 CFU/mL로 증가한 후 3일째 2.8×10^8 CFU/mL로 유지되는 경향을 확인할 수 있었다.

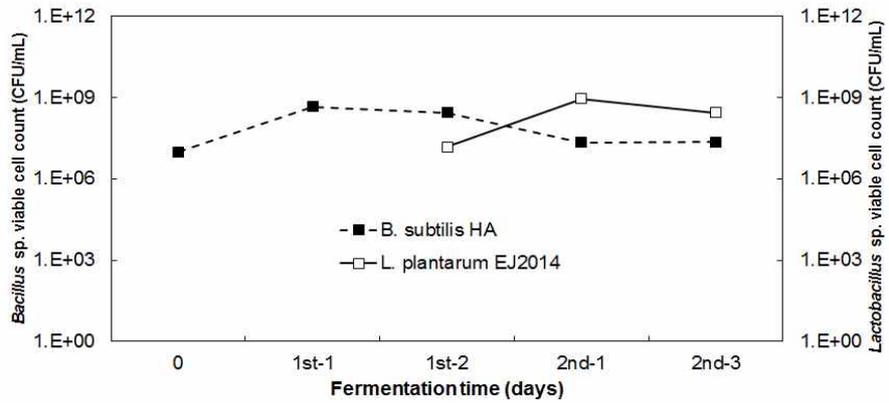


Figure 나-3. Changes in the number of viable cells of old pumpkin fermented

- 점질물 함량은 1차 고초균 발효 1일째 0.23%로 나타났으며, 2일째 0.40%로 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 2차 젖산균 발효 1일째부터 점질물이 뭉쳐지지 않는 것을 볼 수 있었다 (Figure 나-4).

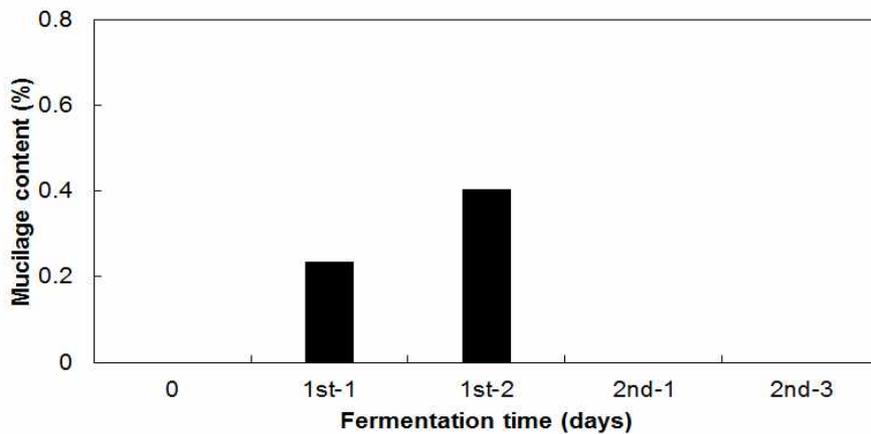


Figure 나-4. Measurement of mucilage content in fermented old pumpkin.

- 점조도는 발효 전 1.82 Pa·sⁿ으로 높은 값을 보였으며 1차 발효 1일째 1.25 Pa·sⁿ으로 감소하는 것을 볼 수 있었으나 2일째 1.38 Pa·sⁿ로 다시 증가한 후 2차 발효 3일째 0.51 Pa·sⁿ로 급격하게 감소하는 경향을 보였다(Figure 나-5).

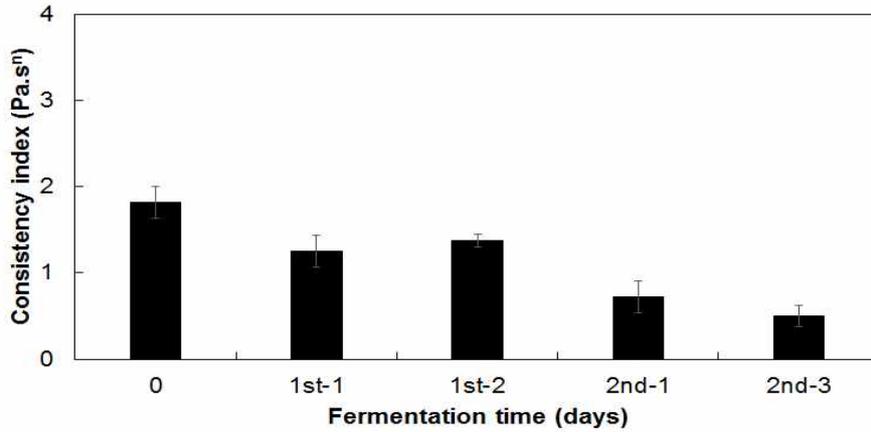


Figure 나-5. Measurement of consistency of old pumpkin fermented

- GABA 함량은 2차 발효 1일째 MSG가 GABA로 전환되었으며 3일째에 MSG가 일부 소진되고 약 0.8% GABA로 전환되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 나-6).

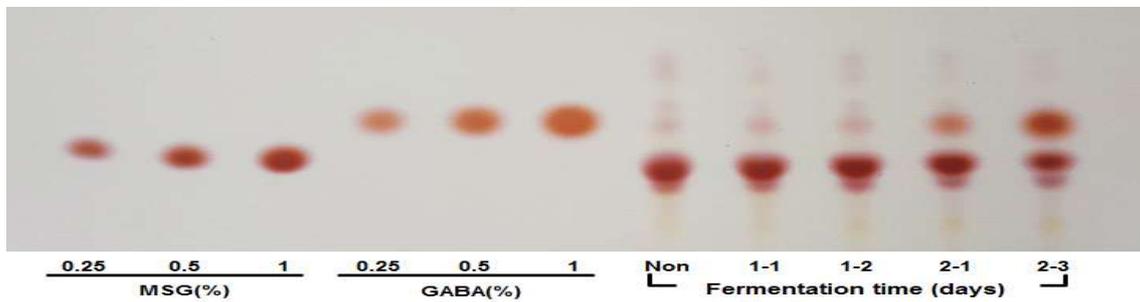


Figure 나-6. Measurement of GABA content in old pumpkin fermented

(2) 늙은 호박 발효물의 지표물질 분석

- 늙은 호박을 발효 시간에 따라 고형분 함량을 측정 해 본 결과 발효 전 9.21%에서 1차 고초균 발효와 2차 젖산균 발효가 진행됨에 따라 각각 11.41%, 11.54%로 증가하는 경향을 보였다. 수용성 고형분 변화를 측정 해 본 결과 발효 전 수용성 고형분 함량은 9.3 °Brix로 나타났으며 1차 고초균 발효와 2차 젖산균 발효가 진행됨에 따라 각각 11.03 °Brix, 10.33 °Brix로 발효 전에 비해 증가하는 경향을 보였다(Table 나-1).

Table 나-1. Changes in total solid contents and water soluble content of fermented old pumpkin

Fermentation time (days)	0	1 st 1 day	2 nd 3 day
Total solid content (%)	9.21±0.00	11.41±0.01	11.54±0.00
Soluble solid (°Brix)	9.30±0.52	11.03±0.06	10.33±0.12

- 늙은 호박의 발효 시간에 따른 색도 변화는 Table 나-2와 같다. 발효 전 명도(L)값은 29.10, 적색도(a)와 황색도(b)값은 각각 0.27, 10.52로 나타났다. 1차 고초균 발효 2일째에 명도(L)값

은 24.54로 발효시간이 지남에 따라 낮아졌으나 적색도(a)는 1.38로 증가하였고, 황색도(b)값은 11.07로 크게 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 2차 젖산 발효 3일째에 명도(L)값은 25.54로 약간 증가하였으며, 적색도(a)는 1.15로 감소하였고 황색도(b)값은 여전히 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이는 발효 시간이 지날수록 당에 의한 비효소적 갈변화가 진행되고 균에 의한 높은 호박의 펙틴이 가수분해 됨에 따라 명도 값이 변화한 것으로 생각된다.

Table 나-2. Change of chromaticity during fermentation of old pumpkin

Fermentation time (days)	Chromaticity		
	L ¹⁾	a ²⁾	b ³⁾
0	29.10±2.40	0.27±0.11	10.52±0.59
1 st 2 day	24.54±0.41	1.38±0.38	11.07±0.57
2 nd 3 day	25.54±0.50	1.15±0.12	10.77±0.17

¹⁾ L: lightness, ²⁾a: redness, ³⁾b: yellowness

- 발효 시간에 따른 늙은 호박 발효물의 환원당 측정은 해 본 결과 발효 전 환원당은 6853.70 mg%에서 1차 발효 1일째 5994.44 mg%로 감소하였다. 그 후 계속 감소하여 2차 발효 3일째 935.20 mg%로 나타났다(Figure 나-7). 늙은 호박 발효물에 존재하는 환원당이 균의 생육을 위해 고초균과 젖산균 발효 동안에 소비됨으로서 발효 시간에 따라 계속 감소하는 것으로 생각되었다.

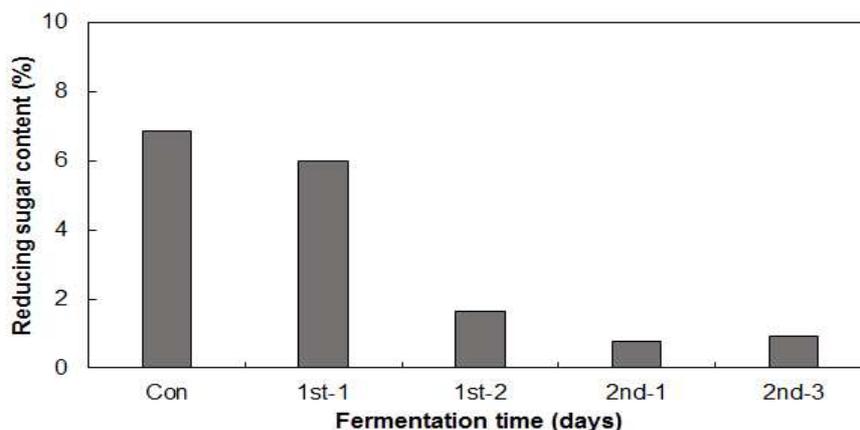


Figure 나-7. Determination of reducing sugar content during mixed fermentation of old pumpkin

- 2배 희석한 늙은 호박의 발효 전 총 카로티노이드 함량 측정 결과 44.26 µg/g으로 나타났으며 2차 젖산균 발효 3일째는 37.00 µg/g로 감소하는 경향을 보였다. β-carotene 함량 측정 결과 발효 전 27.30 µg/g으로 나타났으며 발효 후 4.68 µg/g로 나타났다(Table 나-3).

Table 나-3. Total carotenoid content and β -carotene content of old pumpkin fermented

Fermentation	Total carotenoids content ($\mu\text{g/g}$)	β -carotene content ($\mu\text{g/g}$)
Before	44.26	27.30
After	37.00	4.68

- 늙은호박 고초균 발효물로 얻어진 점질물의 총 아미노산 분석 결과 Table 나-5와 같다. 점질물의 총 아미노산 함량은 167.94 $\mu\text{g/mg}$ 으로 나타났으며 이중 glutamine과 glutamic acid의 함량은 149.51 $\mu\text{g/mg}$ 으로 점질물의 전체 아미노산중 약 89% 차지하였다.

Table 나-4. Total amino acid analysis in mucilage content

AA	($\mu\text{g/mg}$)
CYA*	0.00
ASX**	1.94
GLX**	149.51
SER	0.87
GLY	0.86
HIS	0.25
ARG	0.65
THR	0.43
ALA	1.57
PRO	0.69
TYR	0.36
VAL	1.33
MET	0.23
ILE	0.79
LEU	1.19
PHE	1.06
TRP	2.57
LYS	3.65
TOTAL	167.94

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

**ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

- 2배 희석한 늙은 호박의 발효 전 총 폴리페놀 함량 측정 결과 0.06 mg/mL 로 나타났으며 2차 젖산균 발효 3일째는 5.36 mg/mL 로 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 총 플라보노이드 함량 측정 결과 발효 전 0.21 mg/mL 로 나타났으며 발효 후 0.32 mg/mL 로 발효 후 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 증가하는 것으로 보아 발효 후 항산화능이 있는 것으로 보여 진다(Table 나-5).

Table 나-5. Comparison of total polyphenol and total flavonoid after mixed fermentation

Fermentation	Polyphenol content (mg/mL)	Flavonoid content (mg/mL)
Before	0.06	0.21
After	5.36	0.32

나-3. 늙은호박 발효 추출물의 지방세포 분화억제 효과(*In vitro*)

(1) 발효 호박이 3T3-L1 지방전구세포의 lipid droplet 생성에 미치는 영향

- 발효 전·후의 호박이 3T3-L1 전구지방세포의 지방구 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 전지방세포를 6 well에 3×10^5 cells /well로 분주하여 confluent 상태에서 48시간 경과 후 분화유도 배지(MDI)와 발효 전·후의 호박을 각각 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하면서 adipocyte로의 분화를 유도 하였다. 이 후 48시간 주기로 3번 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 insulin이 첨가된 배지로 교체하면서 시료를 처리하여 Oil-red-O로 지방구를 염색하고 200 배율의 현미경으로 지방구를 관찰하였다(Figure 나-8).
- 그 결과, 호박을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우, 세포질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었으나, 발효 호박 처리에 의해 지방구 형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 특히 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 35, 45%의 지방구 형성을 억제시켰다.
- 발효에 따른 미생물에 대한 영향을 배제시키기 위해 호박을 2차 발효시킨 후, 85°C, 30 분간의 열처리와 121°C, 15 분 열처리를 수행한 후 이들 시료의 지방세포 분화억제 효과를 확인하였다(Figure 나-9). 대조구에 비해 각각의 열처리 조건에서의 1000배 희석액의 경우, 지방세포 분화억제를 보이지 않았으나, 100배 희석액에서 85°C, 30 분간의 열처리와 121°C, 15 분 열처리 조건에서 각각 17%와 26%의 지방세포 분화억제 효과를 보였다.
- Lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의해 둘러싸인 중성지방으로 precursor fibroblast에서 부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR γ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 발효 호박의 지방세포 분화억제 효과가 이들 전사인자 및 하위 유전자에 의해 조절되는 것인지에 대한 연구가 추가되어야 한다.

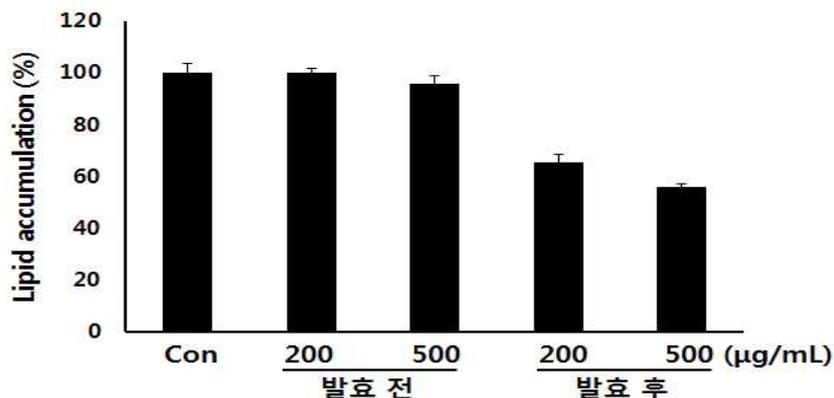
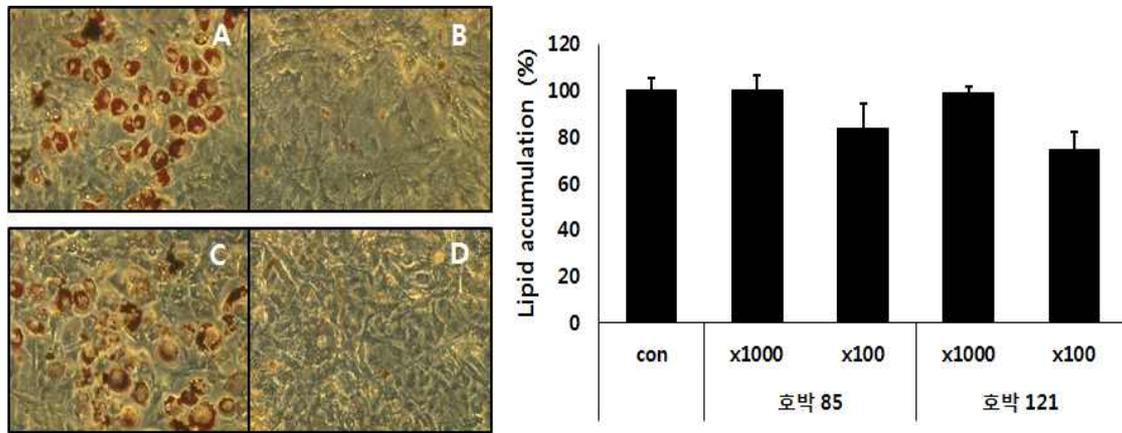


Figure 나-8. Effect of lipid droplet production on the lipid progenitor cells with or without fermented old pumpkin



A,C: 분화 대조구
 B: 호박 85°C, 30분 열처리
 D: 호박 121°C, 15분 열처리

Figure 나-9. Effects of the heat treatment of old pumpkin fermented by *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on lipid droplet generation of lipid precursor cells

나-4. 늙은호박 발효물을 이용한 체지방개선 *In vivo* 효능평가

나-4-1. 시험물질의 급성 경구독성 시험

(1) 서론

- 본 시험은 발효 호박에 대하여 SD 암컷 랫드에 대한 급성경구독성시험의 급성독성분류법 (Acute Toxic Class Method: ATC법, OECD TG 423조)으로 나타나는 독성의 양상 및 강도를 알고자 하였다.

(2) 시험물질

- 계명대학교에서 동결건조한 발효호박을 제공받아 시험에 이용하였다.

(3) 시험계 및 사육환경

- 계통 및 종: NTac: Sprague-Dawley Rat, SPF
- 공급원: 주식회사 오리엔트
- 동물의 성, 수 및 주령(입수시): 암컷 6마리 (5주령, 156.8±5 g)
- 동물의 성, 수 및 주령(투여시): 1단계: 암컷 3마리 (5주령, 157±1.0 g)
2단계: 암컷 3마리 (5주령, 156.7±7.6 g)
- 시험계 선택 이유: 본 시험에 사용한 SD 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험에 많이 사용하고 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부하므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.
- 잔여동물처리: 군 분리 후 잔여동물은 시험계에서 제외된 후 실험 종료 후에 안락사하였다.
- 본 시험의 사육환경은 온도 22±3°C, 상대습도 50±20%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150~300 Lux의 환경조건으로 설정된 경북대학교 수의과대학 약리생리학동물실험실에서 실험동물을 사육하였다.

(4) 시험방법

- 동물 입수시 체중을 측정하였으며, 사육실 내에서 7일간 검역 및 순화를 거쳐 체중 감소 등의 이상이 없는 동물만 시험에 사용하였다.
- 입수된 시험동물은 순화기간 종료 후 투여 전날 체중을 측정한 후 평균체중이 균일하게($\pm 20\%$ 이내) 분포하도록 군 분리하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다. 사육 상자에는 시험번호, 시험항목, 성, 시험물질, 투여용량, 시험기간, 동물번호, 시험책임자 및 담당자를 기재한 개체식별 카드를 부착하였다
- 시험물질을 한계용량인 2,000 mg/kg bw 용량으로 위내 강제 경구투여 한 후 14 일간 시험물질에 대한 치사율, 체중변화, 임상증상, 관찰기간 종료 후에 부검을 실시하였다.



Fermented old pumpkin extract



Oral administration

Figure 나-10. Preparation of acute oral administration

(5) 시험의 실시

- 시험군의 구성은 다음과 같다.

Table 나-6. Determination of test group with appropriate diet composition

시험단계	투여용량 (mg/kg bw)	성	동물번호 (두수)	사망례
1단계 투여군	2,000	암컷	1-3 (3)	없음
2단계 투여군	2,000	암컷	1-3 (3)	없음

○ 투여량 설정

- 본 시험에서는 한계시험용량인 2,000 mg/kg bw를 초기 투여 용량으로 설정하였으며 다음 단계의 투여는 최장 48시간 동안 사망여부를 관찰한 후 실시하였다.

○ 투여

- 투여경로 및 선택이유: 시험의뢰자 요구로 경구투여, 사료첨가제로 사용 예정이므로 경구투여를 선택하였다.
- 투여방법: 투여 전날 12-16 시간 절식(음수는 제외)시킨 후에 조제된 시험물질을 경구 투여용 존대를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다. 투여 후 4 시간 후부터 시험동물에게 사료를 공급하였다.

- 시험의 실시는 급성경구독성시험의 급성독성분류법(Acute Toxic Class Method: ATC 법, OECD TG 423조)에 따라 수행하였다(농촌진흥청 고시 제2013-21호 2013.6.28.) 별 포 12 인축 독성 시험기준과 방법“의 급성독성분류법, 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(II), 2008. 11, 식품의약품안전청)
- 초기 시험의 투여용량은 1단계 2000 mg/kg bw로 설정하였으며, 암컷 3마리에 시험물질을 투여하였다.
- 투여 후 48시간 동안 사망 또는 빈사 유무를 관찰한 결과 3마리 모두 생존하여 다른 암컷 3마리에 2000 mg/kg bw를 다시 투여하였다.
- 2단계 2000 mg/kg bw 용량에서 3마리 모두 48시간 동안 생존하여 그 다음 용량단계의 투여는 실시하지 않았다.

별첨 2d 시각 용량이 2000 mg/kg bw인 경우의 시험 절차

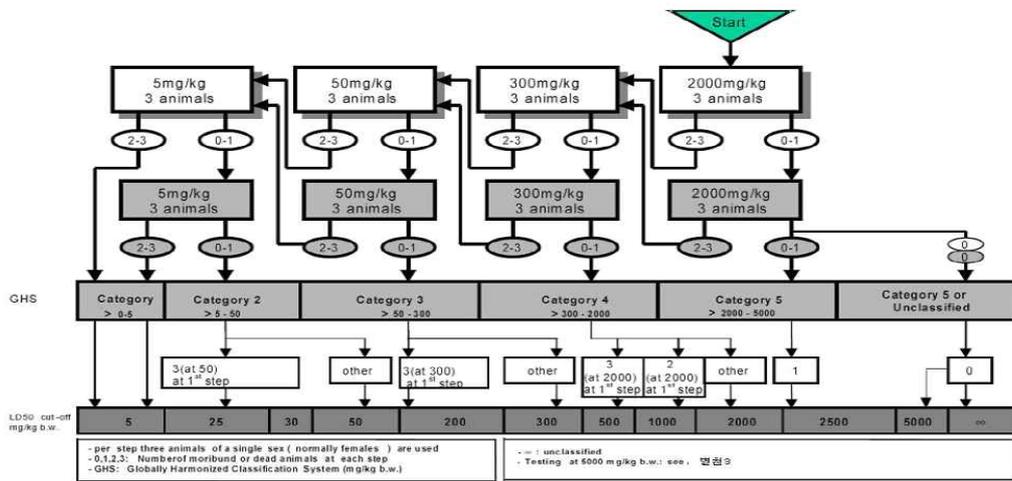


Figure 나-7. Flow chart of the classification for acute oral toxicity test

(6) 관찰항목

- 모든 동물에 대하여 투여 후 30분부터 4시간까지는 집중적으로 관찰하였고, 1회/1일 14일까지 일반증상을 관찰하였다. 관찰 시 사망여부 및 임상증상을 개체별로 기록하였다.
- 모든 동물에 대하여 투여직전(투여 당일), 투여 개시 후 3, 6, 9, 10일과 14일에 측정하였다.
- 시험 중 사망동물은 발견 즉시 부검하여 육안적으로 장기를 검사하였고 시험종료 시 모든 생존동물에 대하여 CO₂가스 흡입법으로 안락사하여 방혈한 후 육안적으로 장기를 검사하였다.

(7) 반수 치사량

- 반수치사량은 독성등급법의 본시험 단계 흐름도를 참조하여 산출하였다.

(8) 통계처리

- 체중 데이터는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 체중에 대한 통계학적인 분석은 실시하지 않았다.

(9) 결과

- 시험물질을 위내에 1회 강제 경구투여 시 나타나는 독성양상 및 독성강도를 알고자 SD 암컷 랫드에 Acute Toxic Class method로 시험을 수행하였다.
- SD 랫드에 시험물질을 2,000 mg/kg bw로 1단계 및 2단계로 단회 경구 투여한 후 14일간 사망 및 빈사동물 발생여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 관찰기간 종료 후 부검하여 개체별로 이상여부를 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.
- 시험물질을 2,000 mg/kg bw로 암컷 랫드 3마리에 투여(1단계)하였으며, 모든 동물에서 사망동물이 관찰되지 않아 다시 2,000 mg/kg bw를 암컷 랫드 3마리에 투여(2단계)하였으나 투여군 모두에서 사망동물이 관찰되지 않았다(Table 나-8).
- 시험기간 동안 2,000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 모두에서 투여 후부터 관찰기간 종료일까지 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다(Table 나-9)
- 투여 후에 시험물질과 관련된 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 나-10).

Table 나-8. Mortality in rats after single oral administration of extract

Groups	Days after dosing															Final Mortality
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1
Extract T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Extract TH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Extract THF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 나-9. Individual clinical signs induced by the treatment of test substance

Dose group (mg/kg bw)		Sex	Animal number	30 min	1 hour	2 hour	3 hour	4 hour	Day 1	Day 2-14
1	T	Female	1	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			2	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			3	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	TF		4	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			5	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			6	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	THF		7	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			8	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			9	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
2	T	Female	10	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			11	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			12	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	TF		13	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			14	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			15	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	THF		16	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			17	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
			18	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS

Table 나-10. Changes of bodyweight after oral administration

Groups	Days after treatments							
	0	1	3	5	7	10	12	14
Control	321.0 ± 0.0	341.0 ±0.0	371.0 ±0.0	384.0 ±0.0	391.0 ±0.0	412.0 ±0.0	432.0 ±0.0	435.0 ±0.0
Extract T	319.4 ± 24.3	337.8 ±27.4	358.2 ±28.9	367.6 ±30.6	379.8 ±32.7	381.4 ±33.6	400.4 ±33.1	411.2 ±36.4
Extract TH	345.2 ± 18.9	364.4 ±21.6	388.0 ±6.9	387.2 ±28.3	383.4 ±37.1	385.8 ±38.5	415.0 ±39.4	426.4 ±41.5
Extract THF	353.0 ± 25.9	366.4 ±11.3	380.0 ±15.1	389.4 ±16.7	386.6 ±13.2	397.0 ±10.4	421.8 ±11.9	429.8 ±12.8

○ 관찰기간 종료 후 2,000 mg/kg bw 투여군의 생존한 동물에 대하여 육안적 검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 이상소견이 관찰되지 않았다.



Figure 나-11. Photographs (left-control group, right-test group) of visual observation after autopsy

○ 각 시험물질의 개략적인 반수치사량(LD₅₀)은 2000~5000 mg/kg bw으로 확인되었다.

(9) 결론

- 시험물질을 1회 강제 경구투여시 발현되는 독성 강도를 알기 위하여 투여용량 2000 mg/kg(1단계, 2단계)로 시험을 수행하였다.
- 시험물질을 단회 경구투여 시 2000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 6마리 모두 생존하였다.
- 시험물질 2000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 모두에서 시험 종료일 까지 특이한 임상 증상이 관찰되지 않았다.
- 시험물질 투여 후 시험물질과 관련된 체중변화는 관찰되지 않았다.
- 실험 종료 후 모든 개체에 대하여 육안적 병리검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.
- 결론적으로 시험물질의 반수치사량의 범위는 2000~5000 mg/kg bw 이었으며, GHS

Category 5 (LD₅₀ cut-off 값: 2000 mg/kg bw)로서 안전한 물질로 확인되었다.

나-4-2. 시험물질의 효능 시험

- 계명대학교에서 동결건조 한 발효호박을 제공받아 시험에 이용하였다. 시험에 이용한 고지방식이(4% high fat diet) 및 일반 식이는 Dyets Inc에서 구입하였다. 펠렛을 가루형태로 분쇄하여 발효호박 동결 건조분 및 양성대조군 가르시니아 캄보지아 농축액을 각각의 용량(0.1, 0.3, 0.5%의 발효호박과 0.3%의 가르시니아 캄보지아 농축액)에 맞게 맞춰 low scale > middle scale > high scale로 혼합한 후 다시 펠렛으로 만들어 이를 시험에 이용하였다.
- 본 동물실험은 식약처 기능성식품고시(Acute Toxic Class Method: ATC법, OECD TG 423조, 농촌진흥청 고시 제2013-21호 2013.6.28., 별포 12 인축 독성 시험기준과 방법“의 급성독성분류법, 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(II), 단회경구독성 시험법, 2008. 11, 식품의약품안전청)에 따라 실시하였다. 발효호박 시료가 불충분하여 랫트를 대상으로 계획하였던 동물실험을 마우스로 변경하여 실시하였다.

(1) 시험방법

(가) 실험동물 윤리규정

-승인번호: KNU 2015-0024-1: 호박추출물의 체지방 감소시험과 토복령추출물의 지방간 예방효과 시험

(나) 시험계

- 계 통 및 종: C57/B6 종의 수컷 마우스 60마리
- 공 급 원: 중앙실험동물
- 동물의 성, 수 및 주령: 수컷 60마리(5주령)
- 본 동물실험은 식약처 기능성식품고시에 따라 실시하였다. 발효호박 시료가 불충분하여 랫트를 대상으로 계획하였던 동물실험을 마우스로 변경하여 실시하였다.
- 동물사육실은 온도 20°C-24°C, 습도 50%-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(다) 시험군의 구성

- 5주령의 C57/B6 종의 수컷 마우스 60마리를 구입하여 체중이 20 g이 되었을 때 10마리씩 6그룹으로 나누어 본 실험에 사용하였다.

(라) 투여량 설정 및 투여 방법

- 시료의 투여량은 125, 250, 500 mg/kg body weight로 결정하였다. 시험 전 마우스를 16시간 동안 공복을 유지시킨 후, 시험날부터 시료가 혼합된 사료를 8주간 급여하였다.



High-fat diet and regular diet



Groups of C57/B6 mouse

Figure 4-12. Preparation of feed and animals

Table 4-11. Composition of the high-fat (HF) and low-fat (LF) diets¹

Component	Low fat diet (g/kg of diet)	High fat diet (g/kg of diet)
Casein, high nitrogen	140	164
Cornstarch	455.7	303.1
Dyetrose	155	115
Sucrose	100	89.9
Cellulose	50.0	58.6
Butter oil	30.0	190.0
Soybean oil	10.0	10.0
Mineral mix ²	35.0	41.0
Vitamin mix ³	10.0	11.7
l-Cystine	1.8	2.1
Choline bitartrate	2.5	2.9
Mineral mix ⁴	10.0	11.7

¹ All dietary components were prepared by Dyets Inc., Bethlehem, PA.

² Mineral mix [AIN-93G-MX (30)]

³ Vitamin mix [AIN-93-VX, (30)]

⁴ Mineral mix [AIN-93M-MX (30)]

Table 4-12. Composition of experimental diet

Mice Groups	Diet for Mice Groups
Control	Normal Diet (ND)
Negative Control	High Fat Diet (HFD)
Positive Control	HFD + 0.3% Hydroxycitric Acid (HCA)
Test group 1	HFD + 0.1% Pumpkin Extract (PKE)
Test group 2	HFD + 0.3% PKE
Test group 3	HFD + 0.3% PKE

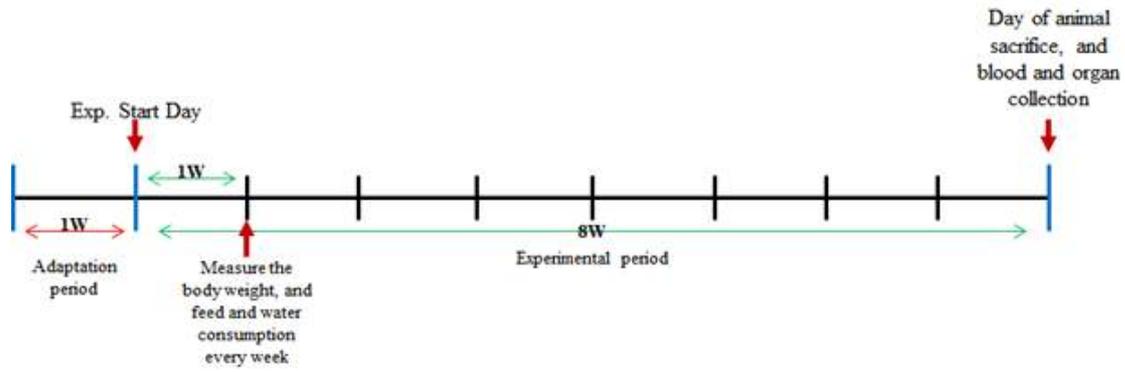


Figure 나-13. Schedule for evaluation of efficacy of fermented old pumpkin

(마) 시험의 실시

- 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 ‘체지방 감소에 도움’ 편, <체지방 감소 기능성 확인을 위한 바이오마커>를 참고하여 진행하였다.

(바) 체중 및 장기 무게의 변화

- 시험 기간 동안 사료 섭취량 및 체중을 특정한 후 기록하였다.
- 실험 종료 후 모든 실험동물을 안락사 하여 심장채혈 하였다. 채취한 혈액을 4℃에서 5분간 5,000 rpm으로 원심 분리, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.
- 안락사 후 신장, 간, 비장을 분리하여 각각의 무게를 측정 하였다. 그 후, 간 조직의 절반을 조직 병리학적 분석을 위해 포르말데히드로 고정시켜 보존하고, 나머지 절반을 RNA추출을 위해 -80 ℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) 시험 결과

(가) 마우스의 식이량 및 체중 변화

- 발효호박이 고지방 식이를 섭취한 실험동물의 체중증가량 및 식이섭취량을 Table 나-13, 나-14에 나타내었다. 실험식이 섭취 7주 후 음성대조군인 고지방 식이군의 체중은 정상군에 비하여 51% 증가하였다. 반면, 발효호박 투여군은 고지방 식이대조군에 비해 낮은 체중증가량을 보였다. 7주간의 식이 및 음수 섭취량은 군 간에 차이가 없었다.

Table 나-13. Water consumption weight (Mean±SD) after 42 days.

Treatment Groups	Weight of Water (Mean±SD) in (g)
ND	25.60±2.52
HFD	20.48±2.22
HFD+0.3%HCA	22.15±2.95
HFD+0.1%PKE	23.03±6.24
HFD+0.3%PKE	22.60±1.99
HFD+0.5%PKE	18.93±1.96

Table 4-14. Feed consumption weight (Mean±SD) after 42 days.

Treatment Groups	Weight of Feed (Mean±SD) in (g)
ND	21.02±2.20
HFD	19.62±2.23
HFD+0.3%HCA	18.28±2.13
HFD+0.1%PKE	18.18±1.62
HFD+0.3%PKE	18.32±1.99
HFD+0.5%PKE	18.70±1.60

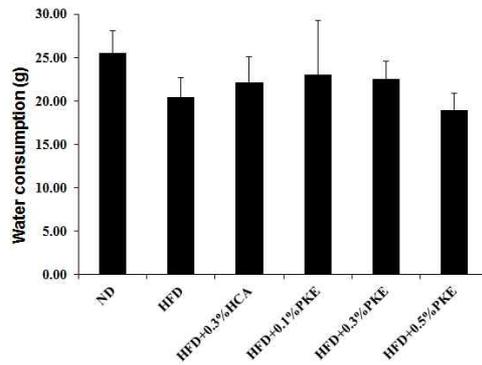


Figure 4-14. Water consumption weight (Mean±SD) after 42 days

Table 4-15. Body weight gain (Mean±SD) after 42 days.

Days of Treatment	Body Weight (Mean±SD) in (g)					
	ND	HFD	HFD+0.3%HCA	HFD+0.1%PKE	HFD+0.3%PKE	HFD+0.5%PKE
0	22.0±0.94	22.2±0.92	21.9±0.88	21.6±0.97	22.5±0.71	22.1±0.32
7	23.2±0.92	24.6±1.26	23.6±1.26	23.3±0.95	23.9±1.66	24.4±1.17
14	24.8±0.92	27.5±2.12	26.4±1.26	25.4±1.26	26.3±2.16	26.6±1.65
21	25.8±1.14	29.3±2.06	27.9±1.37	26.8±1.14	27.2±2.30	28.6±1.84
28	26.5±1.27	30.7±2.83	29.6±1.84	28.2±1.23	28.9±2.60	30.0±2.05
35	28.0±1.15	33.3±2.95	31.2±1.48	29.0±1.63	29.7±2.26	32.3±1.95
42	30.2±1.10	35.7±3.20	30.2±2.66	31.7±1.25	32.1±3.14	34.9±2.23

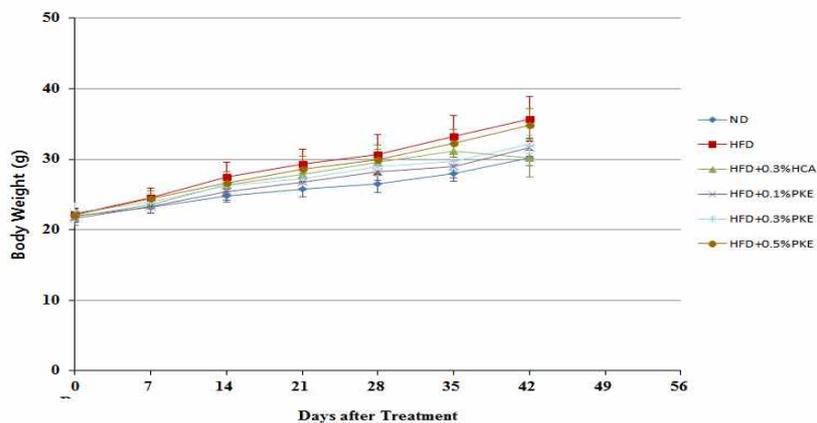
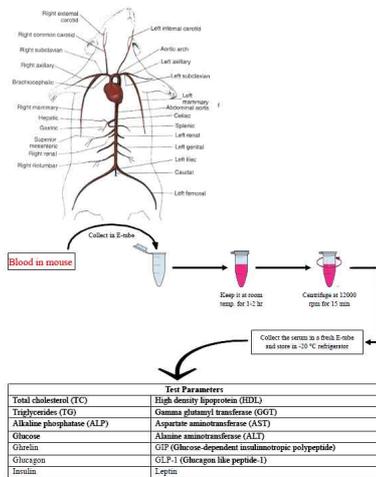


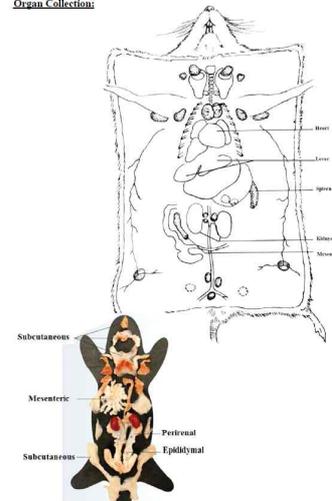
Figure 4-15. Comparison of body weight (Mean±SD) after 42 days

Blood Collection:



혈액 채취 부위

Organ Collection:



장기 및 지방조직 채취 부위

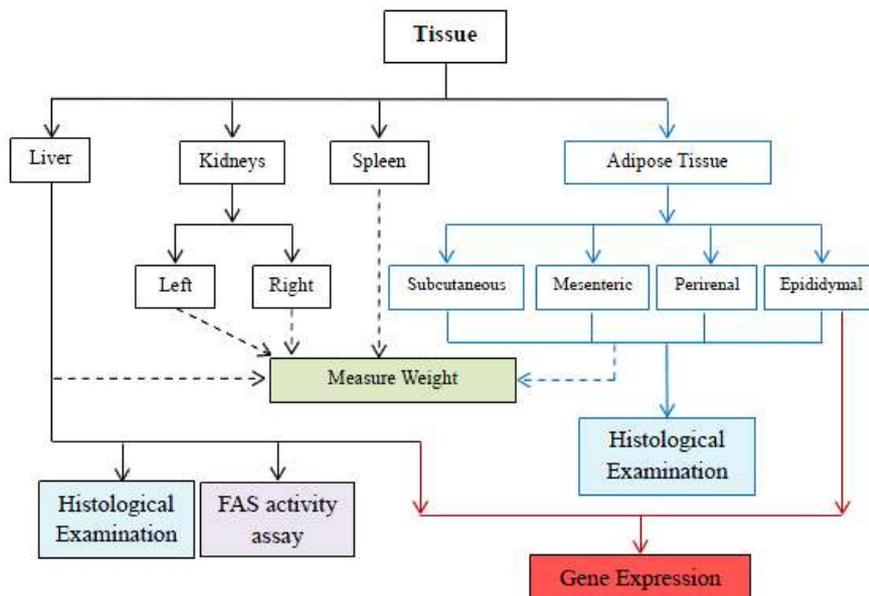


Figure 4-16. Flow chart for assay experiment

(나) 혈청 지질 농도 측정

- Total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, Triglyceride, free fatty acid 농도는 assay kit (Sigma)를 이용하여 정량하였다.
- 마우스 혈액 내 여러 지질 농도를 측정한 결과, 고지방식이군에 비해 호박발효음료 및 가르시니아 캄보지아 투여군 모두에서 total cholesterol, LDL-cholesterol, Triglyceride, free fatty acid의 농도가 유의적으로 감소하였다.
- 특히, 혈장 내 triglyceride은 고지방식이에 의해 가장 큰 영향을 받는데, 호박발효음료 고용량 투여군의 혈중 triglyceride의 농도가 유의적으로 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 반면 HDL-cholesterol농도는 모든 그룹에서 동일한 수준으로 확인되었다.
- 따라서 호박발효음료는 체내 triglyceride의 축적 및 혈중 cholesterol을 억제하는데 탁월한 것으로 확인되었다.

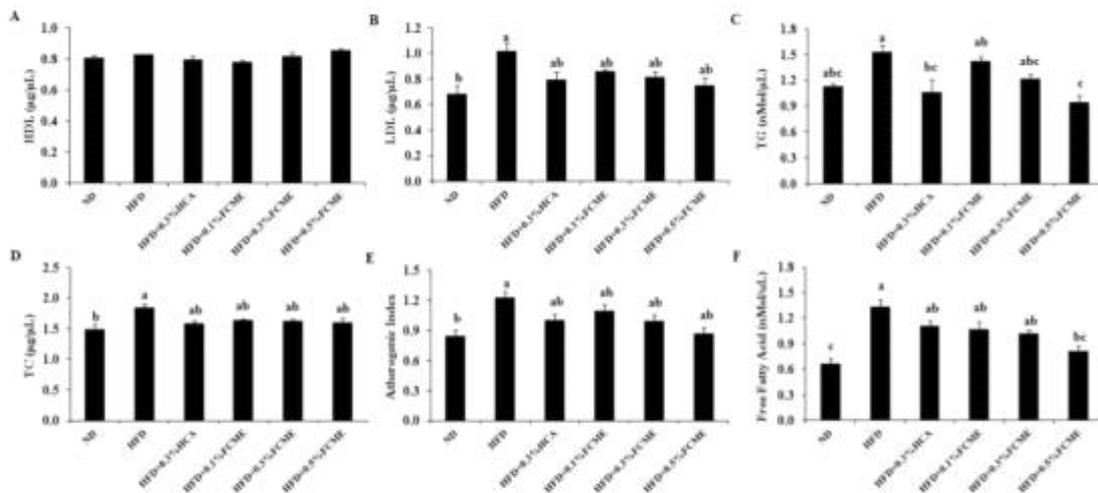


Figure 4-17. Changes of serum lipids in mice fed with normal diet; and high-fat diet with or without 0.1%, 0.3% and 0.5% of fermented Cucurbita moschata extract (FCME) for 8 wk. (A) HDL, (B) LDL, (C) TG, (D) TC, (E) AI and (F) FFA. Different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA.

(다) 혈중 leptin, ghrelin, insulin 및 GIP 농도

- 혈액 내 leptin, ghrelin, insulin 및 GIP 농도는 mouse quantitative ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용한 효소면역측정법으로 정량하였다.
- 혈장 렙틴 농도는 Figure 4-15와 같이 고지방식이군에서 정상군에 비해 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 반면 0.3% 호박발효음료(FCME) 투여군에서 혈중 leptin의 양이 유의하게 감소된 것으로 관찰되었다. Leptin은 에너지를 과잉섭취하였을 때, 식욕억제를 위해 생성이 증가되며 혈중 leptin의 양은 체중 및 체지방과 상관관계가 높다고 알려져 있으므로 비만의 지표로써 활용가능하다고 보고되고 있다. 이를 바탕으로 호박발효음료는 체중 증가

및 지방 축적억제를 통해 혈중 leptin의 농도를 감소시키는 것으로 생각할 수 있었다.

- 이와 유사하게 고지방식이군에서 혈중 인슐린 농도는 증가되었고 호박발효음료(FCME) 투여는 이를 유의적으로 감소시켜 인슐린 저항성을 개선시킴을 보여주었다. 반면 위장관에서 분비되는 gut hormone인 Ghrelin와 GIP도 에너지 균형에 관여한다는 것이 밝혀지고 있다. 호박발효음료(FCME)은 GIP를 유의적으로 억제하는 반면 Ghrelin에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

(라) 혈중 ALT 및 AST의 농도

- 간 기능을 확인하기 위해서 혈액에서 ALT와 AST를 측정하였다(Figure 나-19). ALT와 AST 간 효소는 간세포 막에 존재하는 효소로 간세포가 손상이 되면 혈액 속으로 분비되어 혈액내에서 검출될 수 있다.
- 고지방식이군에서 ALT와 AST 모두 정상군에 비해 유의적으로 증가하였고 이는 호박발효음료(FCME) 투여군과 양성대조군에서 각각의 수치가 유의적으로 감소하였으며 정상군과 유사한 수준이었다. 이는 호박발효음료(FCME)가 간세포 손상을 억제하는 것을 간접적으로 나타내는 결과로 생각할 수 있었다.

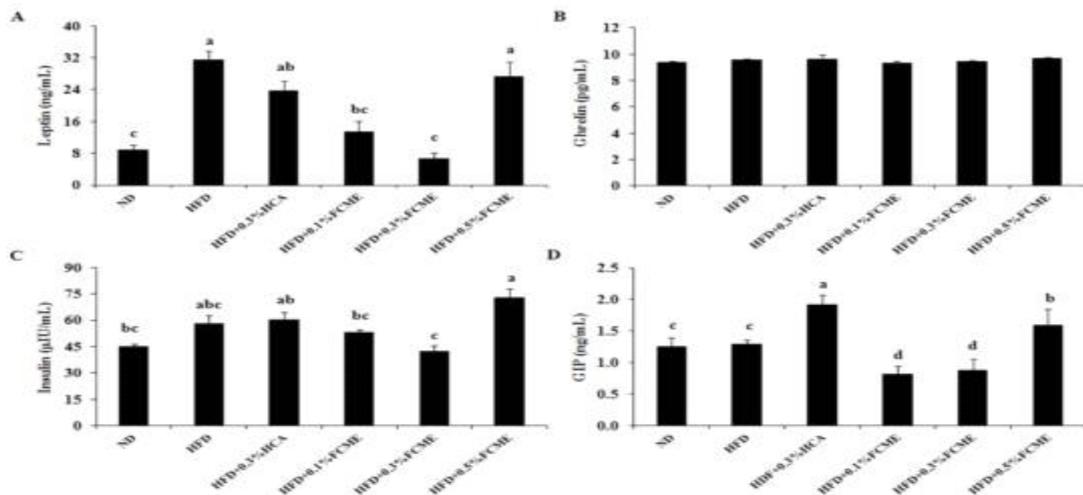


Figure 나-18. Effect of fermented *Cucurbita moschata* extract (FCME) on endocrine peptides of mice serum after 8 week feeding of ND, and 0.1%, 0.3% and 0.5% of FCME-added HFD. (A) leptin, (B) ghrelin, (C) insulin, and (D) GIP. Different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA.

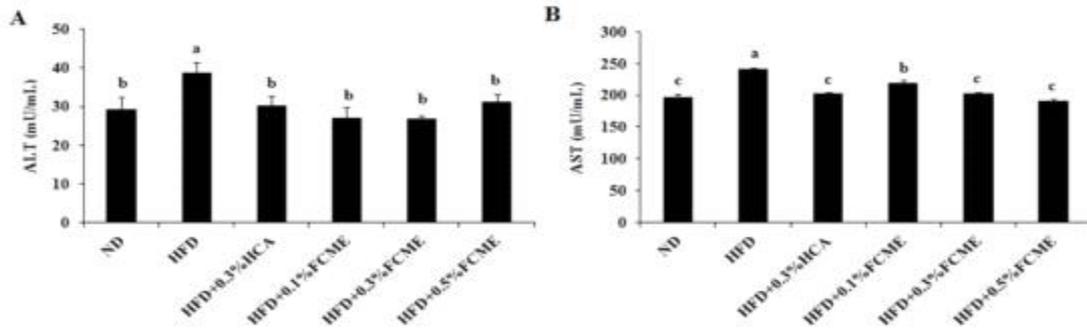


Figure 19. Effect of fermented *Cucurbita moschata* extract (FCME) on liver function enzyme. (A) ALT and (B) AST of mice serum fed with ND and 0.1%, 0.3% and 0.5% of FCME-added HFD for 8 wk. Different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA.

(마) 간조직의 병리학적 평가

- 마우스에서 고지방식이와 시험물질 혼합식을 8주간 급여한 후 고지방식에 의해 생성된 지방 세포의 변화를 확인하고자 간과 지방조직(고환주위, 장간막, 신장주위, 피하지방조직)을 분리하였다. 조직병리학적 관찰을 위해 10% 포르말린에 고정하였고 고정 후 동결, 절편, H&E 염색 및 사진 촬영은 서울대학교 의과대학 병리학교실에 의뢰하여 진행하였다.
- 간조직의 병리학적 관찰 결과, 고지방식이군에서 현저한 lipid droplet과 ballooning이 확인되었고 반면 호박발효 음료 투여군(FCME)에서 이러한 병변이 투여농도 의존적으로 뚜렷하게 감소하여 정상군과 동일한 수준으로 관찰되었다. 따라서, 호박발효음료(FCME)는 고지방식에 의한 지방간을 억제할 수 있는 것으로 사료된다.

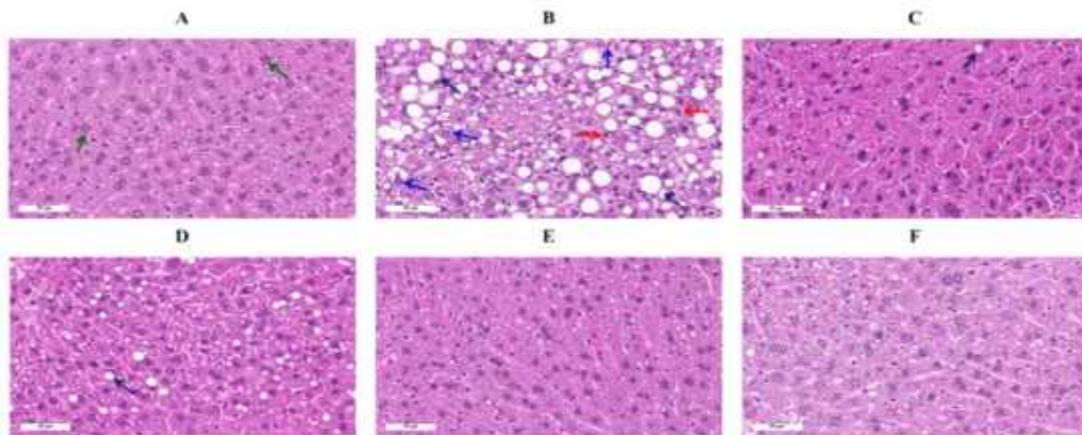


Figure 20. Haematoxylin and eosin staining of hepatic tissue (40 \times magnification). Mice fed normal diet. (A); high fat diet (B); high fat diet with 0.3% HCA (C); high fat diet with 0.1% FCME (D); high fat diet with 0.3% FCME (E) and high fat diet with 0.5% FCME (F). Well-structured hepatocytes are indicated by green arrows in A. Blue arrows in B indicate hepatocyte lipid inclusion (steatosis) and ballooning. Red arrows in B indicate lobular activity. Black arrows in B, C and D indicate fat droplets.

(바) 지방조직의 병리학적 평가

- 지방세포의 크기를 관찰한 결과 고지방식이 투여군에서 지방세포의 크기가 정상군투여군에 비해 확연하게 커진 것을 확인하였다. 호박발효음료 투여군(0.1, 0.3 and 0.5%) 및 가르시니아캄보지아추출물 투여군(0.5%)에서 지방세포의 크기는 고지방식이 투여군에 비해 투여농

도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었다. 특히 0.3% 호박발효음료 투여군에서 지방세포 크기의 감소가 두드러졌고 이는 정상군과 유사하게 관찰되었다.

- 따라서 마우스에서 고지방식이와 호박발효음료의 혼합식은 고지방식이에 의해 유도되는 지방세포의 세포크기 증가를 억제하는 효과가 있으며 특히 0.3% 용량이 이에 대한 효과가 우수한 것으로 확인하였다.

(사) 지방대사 유전자의 발현 조절

- 간은 탄수화물로부터 지방산 합성과 지질의 흡수, 저장, 배출 등에 중추 역할을 담당하며 혈중의 지질함량과 지방산의 산화를 조절한다. 따라서 고지방식이와 호박발효음료 혼합투여가 간 조직 내에서 지질대사 관련 효소에 미치는 영향을 확인하기 위해 관련 효소의 유전자 발현량을 qRT-PCR을 통해 측정하였다.
- 지방세포의 분화를 조절하는 전사인자로 SREBPs, PPARs, C/EBPs 등이 있다. 지방세포 분화 초기에 insulin 등에 의해 C/EBP-β의 발현이 유도되지 시작하고 활성화되어 분화 후기에 지방세포의 전사 인자인 C/EBP-α와 PPAR-γ의 발현이 유도된다. C/EBP-α는 PPAR-γ와 지방형성에서 상호작용한다.
- 실험결과를 살펴보면 adipogenesis의 주요 조절인자인 관련유전자의 발현이 증가된 고지방식이군에 비해 호박 발효음료(FCME) 투여군에서 여러 수준으로 유의적인 감소가 나타났다 (Table 나-16). 이는 호박발효음료(FCME)는 지방대사와 관련된 유전자를 억제하여 체내 지방축적을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

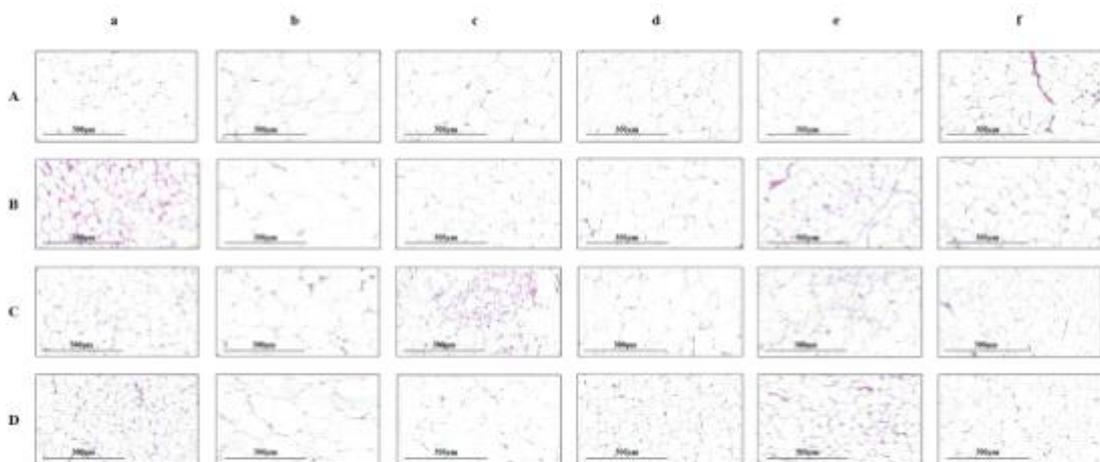


Figure 나-21. Haematoxylin and eosin staining of adipose tissues (10× magnification). (A) Epididymal, (B) Mesenteric, (C) Perirenal and (D) Subcutaneous adipose tissue. In vertical order, mice fed with (a) Normal diet, (b) High fat diet, (c) High fat diet plus 0.03% HCA, (d) High fat diet plus 0.1% FCME, (e) High fat diet plus 0.3% FCME, and (f) High fat diet plus 0.5% FCME

Table 나-16. Relative expression of adipogenic and lipogenic genes of mice liver tissue after 8 weeks treatment with fermented extract

Gene	ND	HFD	HFD+0.3%HCA	HFD+0.1%FCME	HFD+0.3%FCME	HFD+0.5%FCME
PPAR- γ	1.00 \pm 0.00 ^{bc}	1.62 \pm 0.14 ^a	1.21 \pm 0.09 ^{abc}	0.83 \pm 0.07 ^c	0.76 \pm 0.05 ^c	1.38 \pm 0.09 ^{ab}
SREBP-1C	1.00 \pm 0.00 ^b	1.77 \pm 0.02 ^a	1.18 \pm 0.03 ^b	1.08 \pm 0.10 ^b	1.07 \pm 0.09 ^b	1.04 \pm 0.13 ^b
CEBP- α	1.00 \pm 0.00 ^b	1.58 \pm 0.04 ^a	1.03 \pm 0.11 ^b	1.40 \pm 0.14 ^{ab}	1.32 \pm 0.08 ^{ab}	1.37 \pm 0.15 ^{ab}
CEBP- β	1.00 \pm 0.00 ^c	1.76 \pm 0.06 ^a	1.39 \pm 0.05 ^b	1.03 \pm 0.13 ^c	1.29 \pm 0.06 ^{bc}	1.30 \pm 0.03 ^{bc}
CEBP- γ	1.00 \pm 0.00 ^a	1.27 \pm 0.04 ^a	1.22 \pm 0.03 ^a	0.61 \pm 0.05 ^b	1.00 \pm 0.10 ^a	0.99 \pm 0.05 ^a
ACC1	1.00 \pm 0.00	1.06 \pm 0.06	0.88 \pm 0.02	0.93 \pm 0.01	1.09 \pm 0.03	1.01 \pm 0.04
FAS	1.00 \pm 0.00	1.18 \pm 0.06	1.22 \pm 0.08	1.34 \pm 0.12	1.47 \pm 0.09	1.32 \pm 0.19
GLUT4	1.00 \pm 0.00 ^c	0.39 \pm 0.01 ^d	1.07 \pm 0.03 ^{bc}	1.46 \pm 0.08 ^{ab}	0.94 \pm 0.04 ^c	1.53 \pm 0.09 ^a
LPL	1.00 \pm 0.00	1.10 \pm 0.08	0.94 \pm 0.09	0.92 \pm 0.02	0.84 \pm 0.06	0.87 \pm 0.08

ND: Normal diet; HFD: High-fat diet; HCA: ;FCME: Fermented extract. PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; C/EBP- α , CCAAT /enhancer binding protein- α ; C/EBP- β , CCAAT /enhancer binding protein- β ; C/EBP- γ , CCAAT /enhancer binding protein- γ ; FAS, fatty acid synthase; LPL, lipoprotein lipase; GLUT4, glucose transporter 4; SREBP-1C, sterol regulatory element-binding protein-1C; ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1.

(아) 호박발효음료의 성분 분석

○ 호박발효음료(FCME)의 성분은 GC/MS 및 LC/MS/MS 분석을 통해 확인하였으며 각 성분의 생리활성은 Table 나-17에 나타내었다. 호박발효음료(FCME)는 surfactin이 주요성분으로 분석되었으며 이는 여러 보고에서 antihyperlipidemic activity 있음이 알려져 있다. 따라서, 호박을 이용한 발효를 통해 발효균주의 surfactin 생산량이 증가된 것으로 생각된다.

Table 나-17. List of compounds identified from fermented old pumpkin extract by LC-MS/MS and GC-MS analysis

LC-MS/MS					
RT (min)	Name of Compound	m/z ([M+H] ⁺)	Δ ppm	Pharmacological Properties	References
24.74	Surfactin C13	1022.6766	1.142	Antiviral, antimycoplasma, antibacterial, antihypercholesterolemia, inflammation suppressor	[67]
25.17	Surfactin C14	1036.36925	1.271	Antiviral, antimycoplasma, antibacterial, antihypercholesterolemia, inflammation suppressor	[67]

GC-MS					
RT (min)	Name of Compound	Area (%)	Pharmacological Properties	References	
4.26	Cinnamyl cinnamate	6.53	-	-	
7.07	Ammonia	5.66	-	-	
23.64	Acetic Acid	3.68	-	-	
24.01	Pyrazin Tetramethyl	1.13	Cardioprotective, Antihypertensive, vasodilator, anti-inflammatory, anticoagulant, free radical-scavenging.	[74]	
25.97	2,3-Butanediol	45.86	Psychoactive	[74]	
39.66	2,3-Butanediol, Formamide	26.90	Effective against asthma	[75]	
40.40	Methyl Propyle Ether	1.58	-	-	

(3) 결론

- 따라서 surfactin을 주요성분으로 하는 호박발효음료는 고지방식이과 혼합식이를 하는 경우, 고지방식이에 의해 유도되는 비만관련 메커니즘을 억제하여 체내 지방축적을 억제할 수 있는 것으로 확인하였다

나-5. 늙은 호박 발효물의 체지방조절 임상 효능평가 기술 확보

(1) 인체적용시험 개요 설계

- 늙은 호박 발효물의 체지방 조절에 대한 효능을 평가하기 위하여 과체중 범위에 속하는 성인을 대상으로 늙은호박발효물 포함 시험식품 또는 부형제 포함 대조식품을 8주간 복용하게 하고 복용 전과 복용 8주 후에 CT 촬영에 의한 부위별 체지방율을 비교하였다.

(2) 인체적용시험을 통한 체지방 조절 효능평가 기술 확보

(가) 인체적용시험의 명칭: 늙은 호박 발효물의 체지방조절 예비인체적용시험

(나) 인체적용시험 실시기관: 대구한의대학교부속 대구한방병원

(다) 인체적용시험 수행기간: 2017년 6월 7일~2017년 7월 23일

(라) 시험용 식품: 시험식품은 호박 발효물 함유 식품, 대조식품은 부형제 함유식품으로 제품의 성상, 성분 및 함량은 다음과 같다.

(마) 시험용 식품의 섭취방법: 1일 1회, 1회 당 100 mL 1포를 8주간 섭취하도록 하였다.

Table 나-18. Fomulation of test and control food for study

항목	시험용 제품 A: 시험군			시험용 제품 B: 대조군		
제품	호박 발효물 함유 제품			호박 추출물 함유 제품		
원료 및 함량	원료명	배합비 (%)	함량 (g)	원료명	배합비 (%)	함량 (g)
	호박 발효물	39	17.85	호박 추출물	91.52	17.85
	유기농설탕	6.43		유기농설탕	6.43	
	유기농사과농축액	2		유기농사과농축액	2	
	구연산	0.03		구연산	0.03	
	비타민C	0.02		비타민C	0.02	
	정제수	52.52		정제수	-	
	합계	100	17.85	합계	100	17.85
외관						
포장단위	파우치 포장					
저장방법	냉장보관					
유효기간	제조일로부터 1년					



Figure 나-22. Study design

(바) 시험 디자인

- ① 시험디자인: 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교 인체적용시험
- ② 시험대상자: 적극적인 치료가 필요한 질환이 없는 성인
- ③ 선정기준
 - 만 20~65세의 성인
 - BMI 25~30 kg/m²의 과체중 범위에 속하는 자
- ④ 제외기준
 - ALT 및 AST가 정상 상한의 3배를 초과하는 자
 - 갑상선 호르몬 수치가 정상범위를 벗어난 경우
 - 임신 또는 수유중인 여성
 - 시험기간 동안 의학적으로 증명된 방법(예: 콘돔, 루프, 페미돔 등)을 사용하는 피임에 동의하지 않는 가임기 여성
 - 공복 혈당 농도가 126 mg/dL 이상인 자
 - 고혈압(수축기 혈압 160 mmHg 이거나 확장기 혈압 100 mmHg 이상)이 있는 자
 - 고혈압 약 복용자 중 ACE 차단제 또는 ARB 복용자
 - 동의서 작성일로부터 2개월 내에 복부 CT를 촬영한 자
 - 효과판정에 영향을 줄 수 있는 약제(고지혈증 치료제, 스테로이드제, 호르몬제, 면역억제제, 항생제, 이뇨제, 식욕억제제, 식욕촉진제등)을 지속적으로 사용하고 있는 자
 - 거식증, 우울증, 조울증, 정신과 질환 등으로 지속적인 치료가 필요한 자
 - 면역관련 질환, 중증의 간 또는 신부전, 악성종양, 폐질환, 교원질증, 다발성 경화증, 알레르기성 피부질환 및 기타 자가면역질환 등의 전신질환이 이행되고 있는 자
 - 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
 - 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 또는 위장관계 수술(단순맹장수술 또는 탈장수술 제외)의 과거력이 있는 자
 - 시험참가 1개월 이내에 체지방조절에 영향을 줄 수 있는 의약품, 한약을 섭취한 자
 - 체지방조절 기능성을 인정받은 건강기능식품을 복용하고 있는 자⁵⁾
- ⑤ 시험용 식품: 호박 발효물 함유 식품 및 부형제 함유식품
- ⑥ 유효성 평가기준: 컴퓨터 단층촬영(CT)에 의한 체지방 면적, 체중, BMI, WHR

5) 체지방감소 기능성을 인정받은 건강기능식품 기능성 원료 : 가르시니아카모보리아추출물, 녹차추출물, 그린마떼추출물, 대두배아추출물등복합물, 레몬밤추출물혼합분말, 중쇄지방산함유유지, 콜레우스스포스콜리추출물, 히비스커스등복합추출물, 갯잎추출물, L-카르니틴타르트레이트, 식물성유지디글리세라이드, 키토올리고당, 돌외잎주정추출분말, 마테얼수추출물, 미역등복합추출물(잔티젠),락토펜(우유정제단백질), 키토산, 서목테(쥐눈이콩)펩타이드, 핑거루트추출분말

⑦ 통계분석방법

- 사전 동질성 검정: Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test
- 효과검정: 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정함

⑧ 관찰일정: 시험기간 동안 대상자는 4회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문별 검사내용은 다음과 같다.

Table 나-19. Brief study schedule at every visit

확인/평가항목	방문일	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4
		Screening 기초평가	제품제공	제품제공 중간점검	시험종료 최종평가
		-7일~0일	0일	28일+7일	56일+7일
대상자 동의서		○			
인구학적 조사		○			
병력/약물투여력 조사		○		○	○
활력징후검사		○	○	○	○
체성분검사		○		○	○
임상실험실 검사		○			○
갑상선호르몬 검사		○			
뇨검사		○			○
임신반응검사		○			
선정/제외기준 검토		○			
시험용 제품 제공			○	○	
시험용 제품 회수				○	○
식이·운동·음주 조사			○	○	○
CT 촬영			○		○
이상반응 모니터링		○	○	○	○
병용약물 체크		○	○	○	○
순응도 조사				○	○

※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 인체시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

⑨ CT 검사

- 컴퓨터 단층촬영(CT)는 lumbar spine 중 1번과 4번에 해당하는 척추의 가운데를 횡단하여 이 부위에서 Hounsfield number -150~-50에 속하는 부위를 측정하여 총 복부지방 면적을 구한다. 복부와 배부의 복막을 경계로 안쪽을 내장지방 면적(viseral fat area), 바깥쪽을 피하지방 면적(subcutaneous fat area) 및 내장지방 면적과 피하지방 면적의 비율을 구한다. 대퇴 중간부위(mid portion of upper border of patella and greater trochanter)를 횡단하여 Hounsfield number -49~+100에 속하는 면적을 대퇴근육 면적(thigh muscle area)로 하고, -150~-50에 속하는 부위를 측정하여 대퇴지방 면적(thigh fat area)을 구한다. 또한 L1과 L4의 내장지방 면적 및 피하지방 면적은 각각 대퇴근육 면적 및 대퇴지방 면적과의 비율을 구한다.

(3) 인체적용시험 결과

(가) 인체적용시험 현황

- 자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 33명을 스크리닝하여 선정기준에 적합하

고 제외기준에 해당되지 않는 30명을 대상자로 선정하였다. ITT군은 선정된 30명 중 시험군 15명, 대조군 15명으로 구성되었다.

- 무작위 배정된 30명 중 동의철회 1명, 연락두절 5명, 시험계획서 미준수로 1명이 중도탈락하여 결과분석에서 제외되어 시험군 12명, 대조군 12명, 총 24명이 시험계획서를 준수하고 시험을 종료하였다.

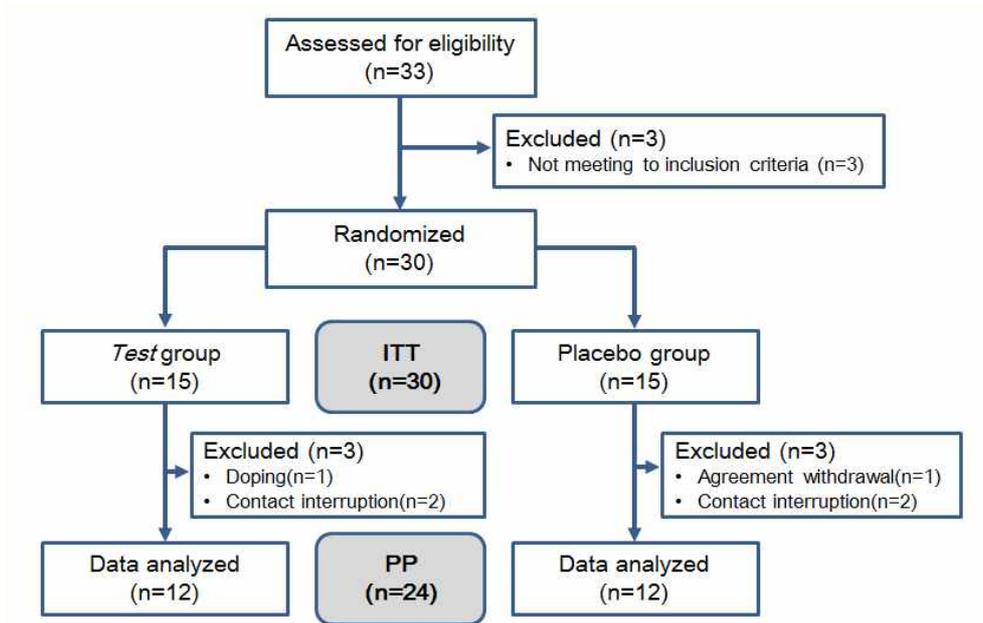


Figure 나-23. Schematic representaion of study summary

(나) 동질성검정 결과

- 대상자의 성별, 연령, 체중, 비만도, 음주량, 운동여부에 대하여 시험용 식품 섭취 전 동질성 검정(Table 나-20,21)을 하였으며, 조사한 모든 항목에서 시험군과 대조군 간 유의한 차이가 확인되지 않았다.

Table 나-20. Homogeneity analysis for demografic information: gender and exercise

Variable		구분	대조군	시험군	χ^2	p
성별	남자	빈도	4	5	0.159	0.690
		행백분율	26.67	33.33		
	여자	빈도	11	10		
		행백분율	73.33	66.67		
운동여부	아니오	빈도	1	5	3.33	0.068
		행백분율	6.67	33.33		
	예	빈도	14	10		
		행백분율	93.33	66.67		

χ^2 : Chi-square test에 의한 유의수준

p: Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 나-21. Homogeneity analysis for demographic information: age, body weight, obesity and alcohol intake

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
연령	시험군	37.400	10.301	0.44	0.662	0.693
	대조군	39.133	11.154			
체중	시험군	77.342	8.078	-1.8	0.085	0.112
	대조군	71.275	8.399			
비만도	시험군	36.458	5.907	-0.25	0.802	0.729
	대조군	35.800	6.771			
음주량 (방문1)	시험군	37.067	5.025	-0.64	0.528	0.756
	대조군	26.200	9.036			

‡ 정규성을 만족함, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

(다) 순응도 및 사후 동질성 검정

○ 대상자의 시험용 식품 섭취의 순응도와 시험기간 동안 체지방의 변화에 영향을 미칠 수 있는 음주량, 운동에 의한 열량 소모량, 식이에 의한 열량 섭취량에 대한 기초통계량과 시험군 간 동질성 검정(Table 나-22,23)을 실시하였으며, 순응도와 음주량 항목에서는 시험군과 대조군간의 유의한 차이가 확인되지 않았다.

(라) 사전-사후 동질성 검정

○ 알코올 섭취량, 식이에 의한 열량 섭취량 및 운동에 의한 열량 소모량은 유효성 평가에 중대한 영향을 미칠 수 있으므로, 각 시험군 내에서 식품 섭취 전-후의 동질성 검정을 실시한 결과, 시험군은 음주량에서 사전-사후에 유의한 변화가 있었으며, 대조군은 음주량과 운동 소모 열량에서 유의한 변화가 있었다.

Table 나-22. Homogeneity analysis for compliance, alcohol intake, dietary calorie intake and consumption by exercise

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
순응도	시험군	96.824	2.607	-1.05	0.308	0.483
	대조군	94.924	5.668			
음주량	시험군	22.133	46.775	0.22	0.824	0.810
	대조군	25.983	47.075			
운동 소모열량	시험군	1372.20	1170.70	0.59	0.5616	0.751
	대조군	1105.00	1024.30			
식이 섭취열량	시험군	1266.10	239.30	-0.23	0.8239	0.524
	대조군	1289.50	269.00			

‡ 정규성을 만족함, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

Table 나-23. Changes of alcohol intake, dietary calorie intake and consumption by exercise

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
시험군	음주량	95.480	52.518	4.07*	0.0153	0.0010
	운동소모 열량	-709.10	1181.00	-1.99	0.0745	0.123
	식이섭취 열량	93.750	313.500	1.04	0.3224	0.4697
대조군	음주량	36.650	30.148	3.44*	0.0109	0.0078
	운동소모 열량	-947.30	1173.10	-2.91*	0.013	0.0005
	식이섭취 열량	91.946	366.300	0.87	0.4031	0.6221

(마) CT 검사 결과의 분석

- 유효성평가 변수인 컴퓨터 단층 촬영에 의한 체지방 면적을 시험용 식품 섭취 전에 측정하여 집단간(시험군과 대조군) 동질성 검정을 실시한 결과(Table 나-23), 시험용 식품 섭취 전 측정항목 중 Lumbar (L1) vertebra Visceral fat, Lumbar (L4) vertebra Total fat, Lumbar (L4) vertebra Visceral fat, Lumbar (L4) vertebra Vis. fat/ Thigh muscle, Lumbar (L4) vertebra Vis. fat/ Thigh fat 관찰항목은 유의수준 5%에서 동질하지 않은 것으로 확인되었으며, 그 외 모든 항목은 시험군과 대조군에서 유의한 차이가 확인되지 않았다.
- 시험용 식품 섭취 전과 후의 체지방 면적 변화(방문2-방문4)에 대한 집단간 비교 결과, 유의수준 5%에서 유의한 차이를 보이고 있는 관찰항목은 Lumbar (L1) vertebra Visceral fat, Lumbar (L1) vertebra Vis. fat /Sub. fat, Lumbar (L1) vertebra Vis. fat/ Thigh muscle, Lumbar (L4) vertebra Visceral fat, Lumbar (L4) vertebra Vis. fat/ Thigh muscle으로 조사되었다. 하지만 Lumbar (L1) vertebra Visceral fat, Lumbar (L4) vertebra Visceral fat, Lumbar (L4) vertebra Vis. fat/ Thigh muscle 관찰항목은 집단 간의 동질성이 만족하지 않아 유의하다고 볼 수 없었으므로 실제 유의수준 5%에서 Lumbar (L1) vertebra Vis. fat /Sub. fat, Lumbar (L1) vertebra Vis. fat/ Thigh muscle 두 항목만 유의수준 5%에서 차이가 확인되었다.

(바) 체중 및 비만도 검사 결과의 분석

- 유효성평가 변수인 체중, BMI, WHR 측정 결과로 인한 집단간(시험군과 대조군) 동질성 검정을 분석한 결과, 시험용 식품 섭취 전 3가지 측정항목에서 WHR항목만이 시험군과 대조군에서 유의한 차이가 확인되지 않았으며(Table 나-25), 시험용 식품 섭취 전과 후의 체중, BMI, WHR의 변화(방문1-방문4)에 대한 집단(시험군과 대조군)간 비교 결과, 모든 측정항목에서 유의한 차이는 확인되지 않았다(Table 나-26).

Table 나-24. Homogeneity analysis of CT results between test Groups: baseline

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w	
L1	total fat	대조군	303.90	102.60	-0.67	0.509‡	0.616
		시험군	327.60				
	visceral fat	대조군	87.993	36.398	-2.08*	0.047‡	0.047
		시험군	120.000	46.184			
	subcutaneous fat	대조군	215.900	81.240	0.27	0.789‡	0.844
		시험군	207.800	78.918			
	visceral fat/ subcutaneous fat	대조군	0.435	0.172	-1.80	0.090	0.132
		시험군	0.669	0.454			
	visceral fat/ thigh muscle	대조군	0.353	0.183	-0.81	0.427‡	0.214
		시험군	0.402	0.137			
	visceral fat/ thigh fat	대조군	0.442	0.197	-1.82	0.089	0.156
		시험군	0.801	0.715			
L4	total fat	대조군	274.800	87.431	-2.18*	0.038‡	0.028
		시험군	350.700				
	visceral fat	대조군	85.719	39.530	-3.4**	0.002‡	0.002
		시험군	135.000	38.560			
	subcutaneous fat	대조군	189.600	84.067	-0.76	0.452‡	0.266
		시험군	215.700	100.200			
	visceral fat/ subcutaneous fat	대조군	0.542	0.329	-1.58	0.131	0.230
		시험군	0.854	0.668			
	visceral fat/ thigh muscle	대조군	0.334	0.160	-2.23*	0.034‡	0.025
		시험군	0.462	0.147			
	visceral fat/ thigh fat	대조군	0.452	0.257	-2.38*	0.024	0.034
		시험군	0.830	0.554			
thigh	fat	대조군	209.600	54.602	0.17	0.863‡	0.948
		시험군	205.300				
	muscle	대조군	263.200	49.695	-1.81	0.082	0.077
		시험군	299.300	58.008			

‡ 정규성을 만족함, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

Table 나-25. Changes of CT measurement values

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w	
L1	total fat	시험군	42.474	52.769	0.38	0.709	0.844
		대조군	52.365	83.683			
	visceral fat	시험군	-9.459	26.278	2.09*	0.046	0.052
		대조군	13.160	31.536			
	subcutaneous fat	시험군	51.860	62.101	-0.56	0.580	0.370
		대조군	38.963	61.787			
	visceral fat / subcutaneous fat	시험군	-0.401	0.584	2.14*	0.048‡	0.052
		대조군	-0.050	0.192			
	visceral fat / thigh muscle	시험군	-0.033	0.083	2.15*	0.041	0.042
		대조군	0.059	0.138			
	visceral fat / thigh fat	시험군	-0.077	0.244	1.76	0.090	0.092
		대조군	0.055	0.151			
L4	total fat	시험군	19.028	67.493	-1.13	0.270	0.212
		대조군	-7.469	59.253			
	visceral fat	시험군	13.504	19.130	-2.14*	0.042	0.034
		대조군	-6.329	29.372			
	subcutaneous fat	시험군	-42.586	72.735	0.38	0.709‡	0.810
		대조군	-33.599	54.928			
	visceral fat / subcutaneous fat	시험군	0.308	0.461	-1.79	0.092	0.110
		대조군	0.075	0.165			
	visceral fat / thigh muscle	시험군	0.052	0.073	-2.12*	0.044	0.024
		대조군	-0.031	0.128			
	visceral fat / thigh fat	시험군	0.031	0.117	-1.28	0.212‡	0.084
		대조군	-0.030	0.138			
thigh	fat	시험군	7.079	15.936	-0.27	0.788‡	0.776
		대조군	5.301	18.978			
	muscle	시험군	-2.041	8.623	0.91	0.368‡	0.444
		대조군	0.614	6.970			

‡ 정규성을 만족함, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

Table 나-26. Homogeneity analysis of obesity: baseline

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
체중	대조군	71.713	7.599	-2.05	0.05‡	0.1455
	시험군	77.507	7.861			
BMI	대조군	26.907	1.544	-2.45*	0.021	0.5263
	시험군	28.153	1.226			
WHR	대조군	0.917	0.038	0.12	0.907‡	0.0696
	시험군	0.915	0.054			

‡ 정규성을 만족함, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

Table 나-27. Changes of obesity

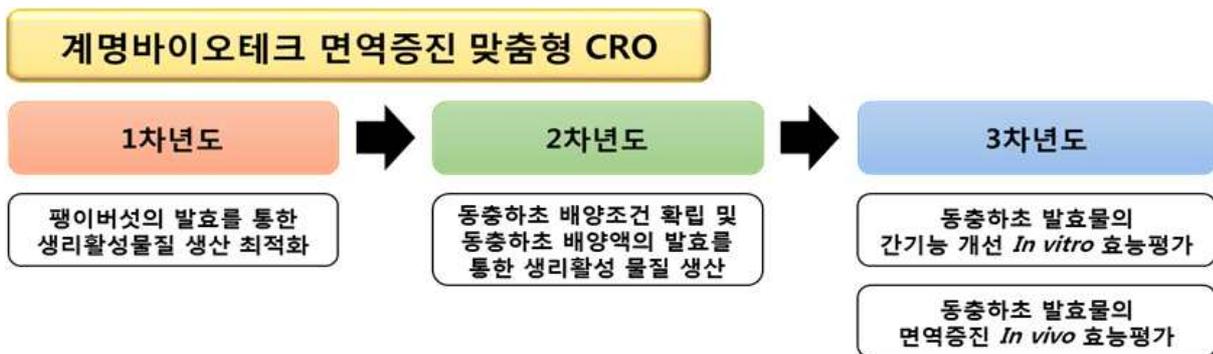
Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
체중	대조군	0.007	1.965	-0.35	0.7322	0.349
	시험군	0.220	1.362			
BMI	대조군	0.013	0.718	-0.21	0.8385	0.546
	시험군	0.060	0.507			
WHR	대조군	-35.709	6.167	-0.26	0.8002	0.934
	시험군	-35.091	7.052			

‡ 정규성을 만족함, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

다. 버섯 발효물을 이용한 면역증진 효능평가 및 시제품제작

(계명바이오테크)

다-1. 버섯 발효물을 이용한 면역증진 효능평가 및 시제품 제작 일정



다-2. 팽이버섯을 이용한 GABA 생산 최적화 및 시제품 제작

(1) 팽이버섯 분말의 젖산발효를 통한 GABA 생산 최적화

(가) 재료 및 방법

- 증류수 200 mL에 팽이버섯 분말을 20 g 넣은 후 yeast extract 1 g, glucose 2 g, MSG 4 g를 첨가하여 121°C에서 15분간 열처리 하였다. 그리고 각각의 시료에 *L. plantarum* EJ2014 starter를 1% 접종하고 30°C 인큐베이터에서 3일간 배양한 후 각각의 시료를 50°C, 65°C, 80°C에서 건조하여 분석하였다(Figure 다-1).

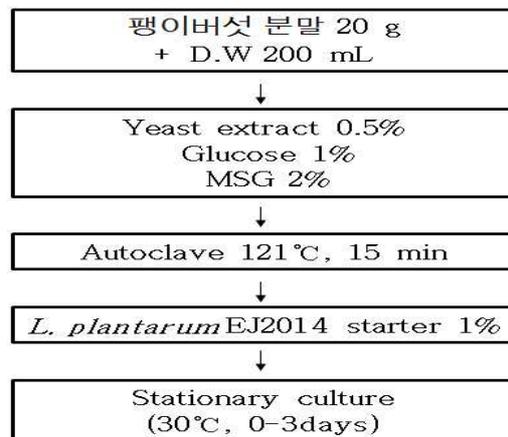


Figure 다-1. Process for lactic acid fermentation of winter mushroom powder

(나) 결과 및 고찰

- pH는 발효 1일에 pH 4.46으로 떨어졌고 발효 3일에 pH 4.41로 비슷하지만 좀 더 떨어진 것을 확인 할 수 있었다. 산도는 발효 1일에 1%로 증가하고 발효 3일에도 유지되는 경향을 보였다. 생균수 측정 결과 발효 1일에는 생균수가 3.0×10^9 CFU/mL으로 제일 높았고, 발효 3일에도 2.8×10^9 CFU/mL으로 생균수가 유지되는 경향을 보였다(Table 다-1).

Table 다-1. Effect of lactic acid fermentation on pH, acidity and viable cell count of winter mushroom

	Fermentation time (days)		
	0	1	3
pH	6.28	4.5	4.4
Acidity(%)	0.27	0.972	1.18
생균수(CFU/mL)	2.4×10^7	1.8×10^9	1.7×10^9

- GABA 함량 변화를 비교하기 위해 TLC를 이용하여 정성분석 한 결과 Figure 다-2와 같다. 발효 1일부터 발효 3일까지 GABA가 점차적으로 생성되기 시작하였고, 발효 3일에 MSG가 대부분 전환되었다(Figure 다-2).

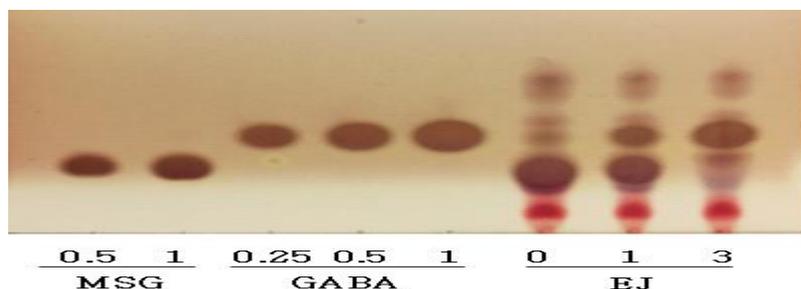


Figure 다-2. Comparison of GABA content during lactic acid fermentation of winter mushroom powder

(2) 팽이버섯 발효물을 이용한 양갱제조

(가) 재료 및 방법

- 물과 팽이버섯 분말 10% 발효물을 더한 부피가 200 mL이 되게 하여 발효물의 부피가 0, 10, 20, 30%가 되도록 한다. 여기에 한천 7 g, 설탕 80 g, 소금 1 g, 팔랑금 200 g을 넣고 섞 으면서 35분 가열한 후 굳힌다(Figure 다-3).

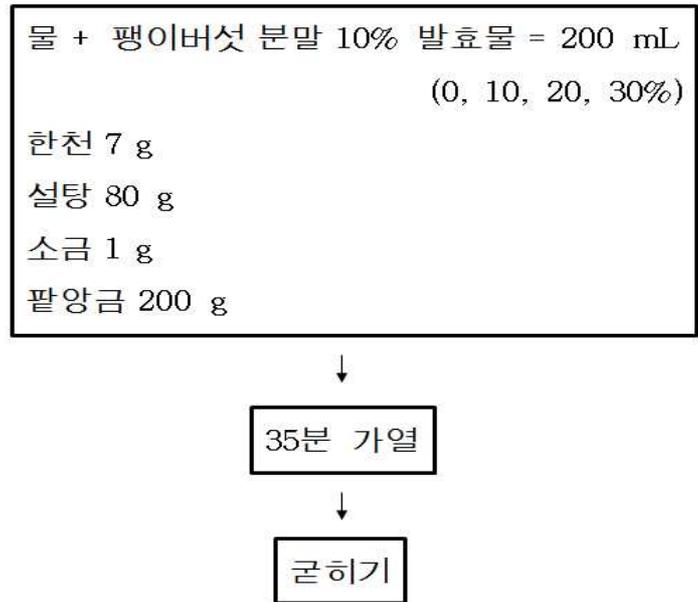


Figure 다-3. Manufacture of sweet jelly with red beans and fermented winter mushroom powder

(나) 결과 및 고찰

- 팽이버섯 분말 발효물이 각각 0, 10, 20, 30% 들어간 양갱을 만들었다. 종이컵을 틀로 사용 하였고 각각의 결과물은 육안상으로 보이는 차이는 없었다(Figure 다-4).



Figure 다-4. Sweet jelly (prototype) prepared with red beans and fermented winter mushroom powder

- 각 조건의 양갱을 가로 세로 1 cm씩 잘라 지퍼백에 넣어 일주일간 실온에 두고 저장성평가를 위하여 관찰해 보았다. 그 결과 발효물 30%의 양갱에서는 일주일보관 후에도 곰팡이가 자라지 않은 반면 다른 양갱에서는 모두 곰팡이가 생성되는 것을 확인하였다(Figure 다-5).

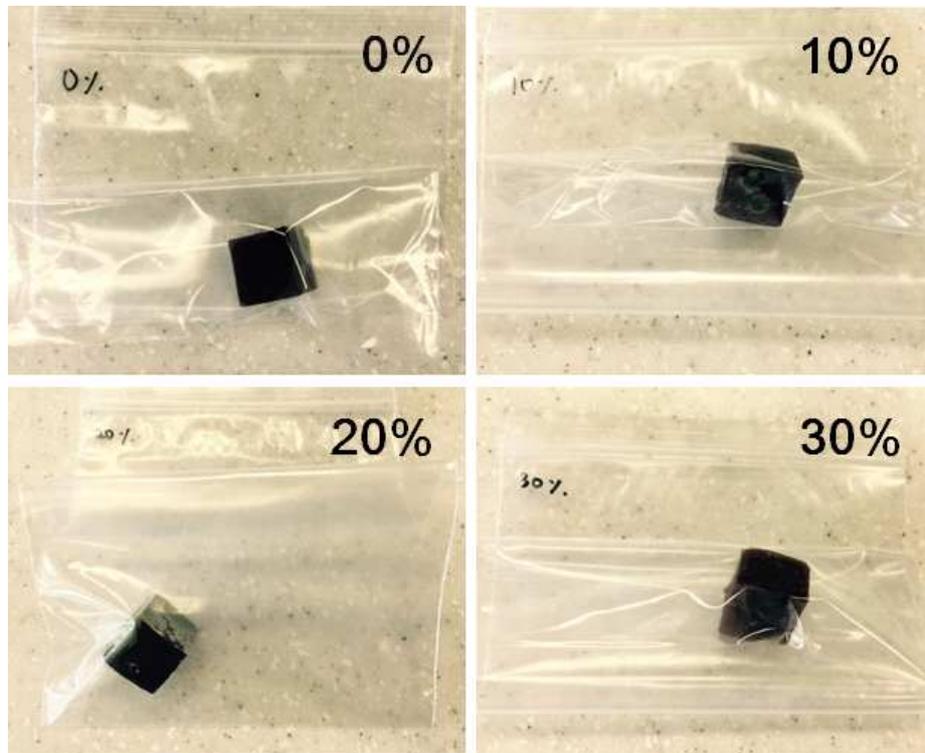


Figure 다-5. Assessment of storage stability of sweet jelly with red beans and fermented winter mushroom powder

- 팡이버섯 발효물의 첨가농도에 따른 양갱의 물성평가를 texture analysis로 측정하였다. 팡이버섯 발효물 10% 첨가한 양갱에서 경도 3247.47 dyne/cm², 점착성 1430.61%로 가장 높게 나타났다. 탄성은 0.68-0.70 g, 응집성은 0.39-0.44%으로 발효물 첨가농도에 따른 큰 차이는 없었다(Table 다-2).

Table 다-2. Property of sweet jelly with red beans and different amount of fermented winter mushroom powder

Rheology factor	Fermented winter mushroom content (%)			
	0	10	20	30
Hardness (dyne/cm ²)	2713.00	3247.47	2479.62	2625.01
Adhesiveness (g)	-120.51	-131.12	-126.60	-138.93
Springiness (g)	0.68	0.70	0.67	0.70
Cohesiveness (%)	0.44	0.44	0.40	0.39
Gumminess (%)	1170.50	1430.61	989.57	1033.11
Chewiness*	797.87	1005.77	664.07	723.25

*Chewiness=springiness×gumminess.

다-3. 동충하초 배양물의 젓산발효 조건 최적화

(1) 재료 및 방법

- 동충하초(*Cordyceps militaris*, CM)를 PDA (potato dextrose agar) 고체배지에 접종 후 24℃, 10일간 1차 종배양 하였다(plate배양). 상기된 균사체를 멸균된 punch를 이용하여 14.5

mm 직경으로 절개한 다음 100 mL의 PD (potato dextrose broth)배지에 접종하여 24°C, 160 rpm으로 교반하며 10일간 배양하여 액체 스타터를 배양하였다.

- 산업용 생산 배지의 베이스가 될 감자분말을 이용하여 potato flour 2.4%, malt extract 1%, peptone 0.5%, sucrose 4%를 첨가하여 POMPS배지를 제조하였고, 동충하초 액체 스타터를 5% 접종하여 25°C, 160 rpm 5일간 진탕 배양하였다.
- 동충하초를 이용하여 GABA 및 probiotics의 생산을 증대하기 위하여 POMPS배지를 이용하여 5일간 배양한 동충하초 배양액에 MSG 5%, glucose 3% 첨가한 후 *L. plantarum* EJ2014 starter를 1% 접종하여 30°C, 7일간 젖산발효를 하였다(Figure 다-6).

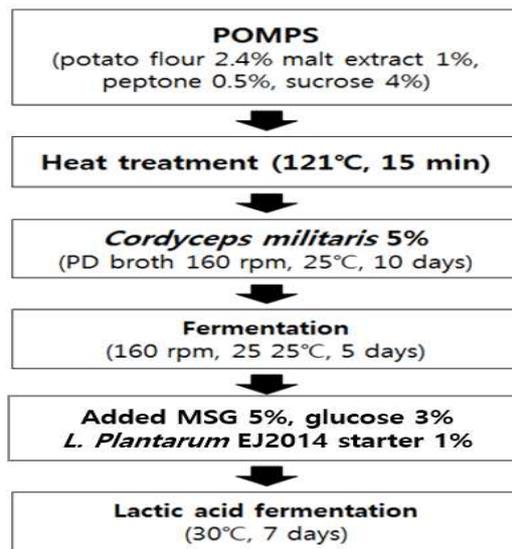


Figure 다-6. Optimization of lactic acid fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS culture

(2) 결과 및 고찰

- 젖산발효 전 POMPS 배지에서의 동충하초 배양결과 고형분 2.5%, 다당류 1.52%로 나타났다. 젖산발효 후, 고형분은 2.8%, 다당류는 0.5%로 젖산발효 후 다당류 함량이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. pH는 젖산발효 전 6.88, 산도 0.03%에서 발효 후 pH 5.18, 산도 0.9%로 산생성이 증가하는 경향을 보였다(Table 다-3).

Table 다-3. Physical-chemical properties after lactic fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS

Lactic fermentation	Polysaccharide (%)	Solid content (%)	pH	Acidity (%)
Before	1.52	2.5	6.88	0.3
After	0.5	2.8	5.18	1.09

발효 전: 동충하초 액체배양(POMPS배지) 10일

발효 후: 동충하초 액체배양액 + MSG 5%+glucose 3% 배지 7일

- pH를 분석해본 결과, 발효 전 pH 6.88에서 발효 3일째까지 감소 후 pH 5.18대로 유지되는 것을 알 수 있었다. 산도를 분석해본 결과, 발효 전 산도 0.3% 에서 발효 7일째 1.09%까지 산도가 올라간 것을 알 수 있었다(Figure 다-7).

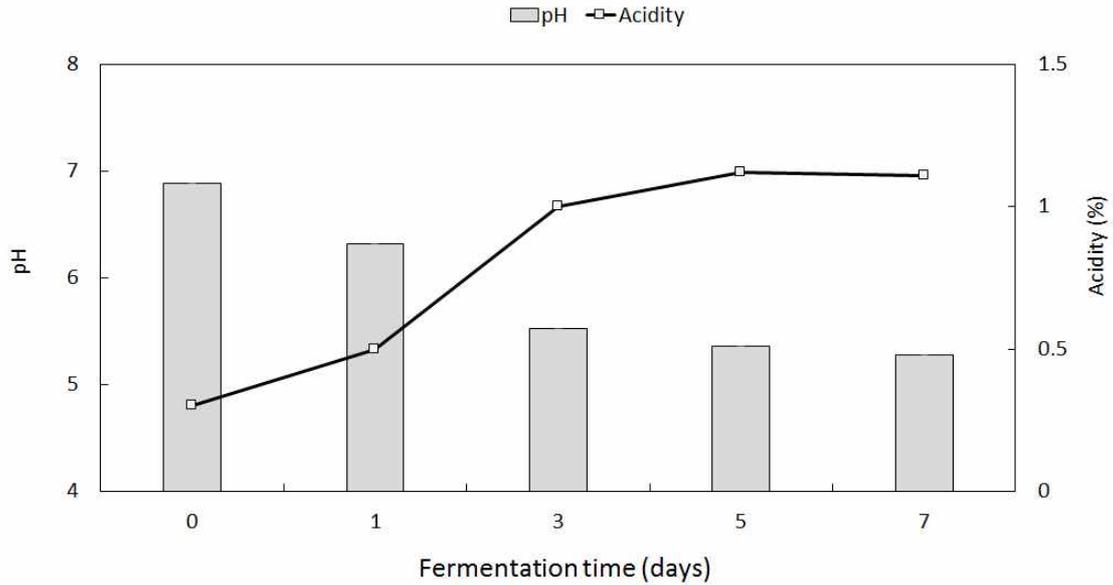


Figure 다-7. Change in pH and acidity during lactic fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS

- 발효 전 생균수는 10^8 CFU/mL로 나타났고 발효 3일째 10^9 CFU/mL으로 급격히 증가하는 것으로 나타났고 발효 7일째까지 높은 균수가 유지되는 것을 알 수 있었다(Figure 다-8).

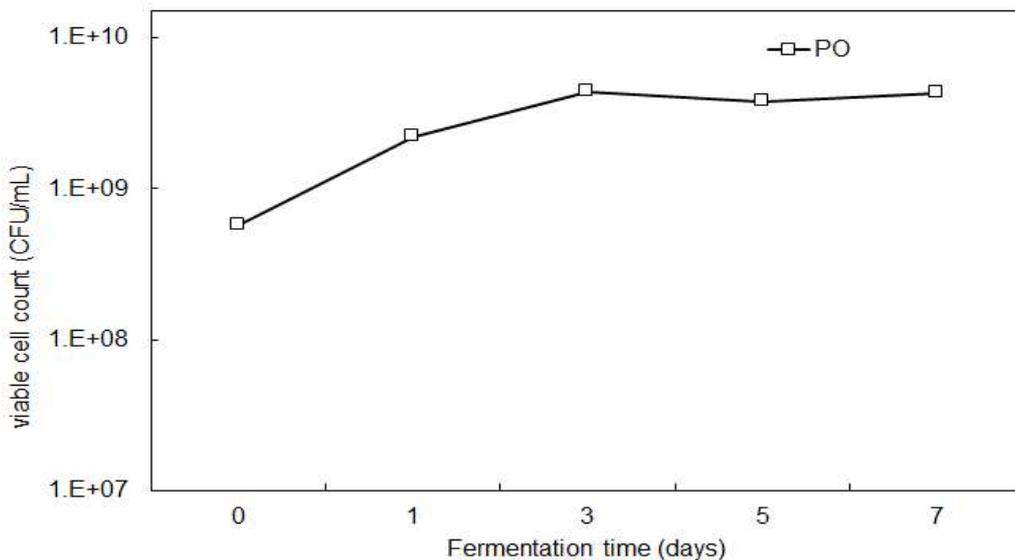


Figure 다-8. Optimization of lactic acid fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS

- TLC를 이용하여 POMPS 동충하초 배양액의 젖산발효 시간에 따른 GABA 생산 및 MSG 소진을 확인하였다. MSG 5%, glucose 3% 첨가한 동충하초 젖산발효물에서 발효 2일째부터 GABA spot을 확인 할 수 있었고 젖산발효 7일째 첨가한 MSG가 GABA로 전환되는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 다-9).

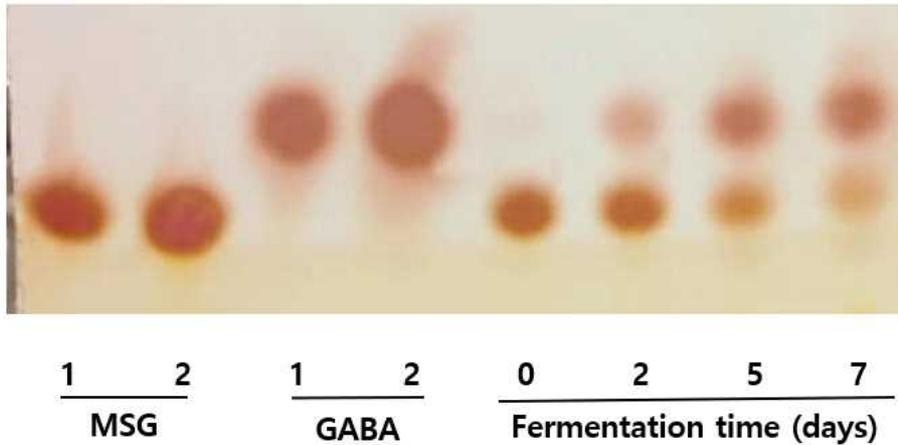


Figure 다-9. GABA content after lactic fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS

다-4. 동충하초 배양물의 *In vitro* 효능평가

(1) 동충하초 배양액 다당류를 이용한 NO 생성능 확인

- 세포배양을 활용하여 동충하초 POMPS 배양액의 다당류의 활성 효과를 측정하기 위해 동충하초 배양액을 원심분리 하여 상등액에서 isopropanol을 이용하여 다당류를 침전시켰다. 침전된 다당류를 회수하여 동결건조하여 이를 이용하여 세포독성능을 확인하였다. 세포독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 동충하초 다당류를 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하다. 그 결과, 100-2000 ug/mL 농도에서 모두 100% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 5000 ug/mL에서 약 80% 정도의 생존율을 보였다(Figure 다-10).

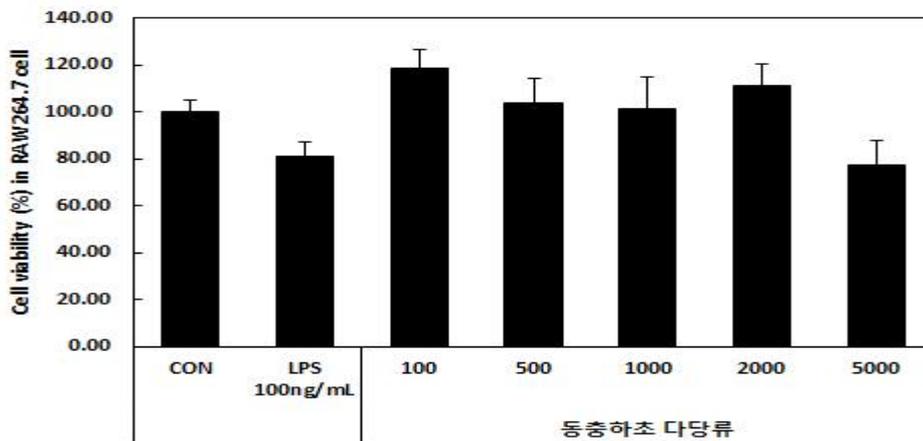


Figure 다-10. Cell viability of RAW 264.7 cells with *Cordyceps militaris* polysaccharide

- 동충하초 다당류의 농도에 따라 NO생성이 증진되는지를 확인하기 위해 positive control로 LPS 100 ng/mL과 동충하초 다당류를 농도별로 비교분석하였다. NO는 동충하초 다당류의 농도 의존적으로 증가하였으며, 5000 ug/mL농도에서 21 uM의 NO가 생성되어 LPS대비 57.75% 생성능을 보였다(Figure 다-11).

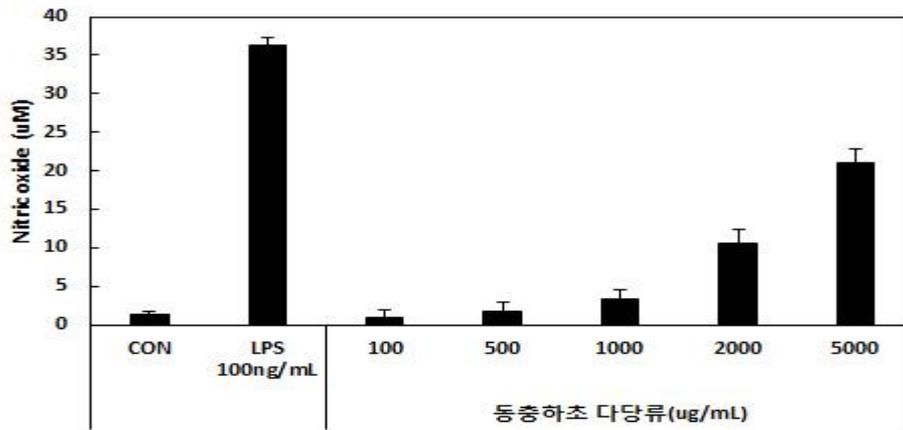


Figure 다-11. Comparison of NO production ability in RAW264.7 cells with *Cordyceps militaris* polysaccharides

(2) 동충하초 젖산발효물을 이용한 NO 생성능 확인

- 세포배양을 활용하여 동충하초 젖산발효물의 세포독성을 확인하였다. 세포독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 동충하초 젖산발효물을 농도별로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하다. 50-1000배 희석한 농도에서 100% 이상의 생존율을 보였으나 10배 희석액에서 7.06%로 세포 생존을 억제하였다(Figure 다-12). 이는 젖산발효로 생성된 산성분이 pH를 낮추어 세포가 생존하기 어려운 환경을 조성한 것으로 판단된다.

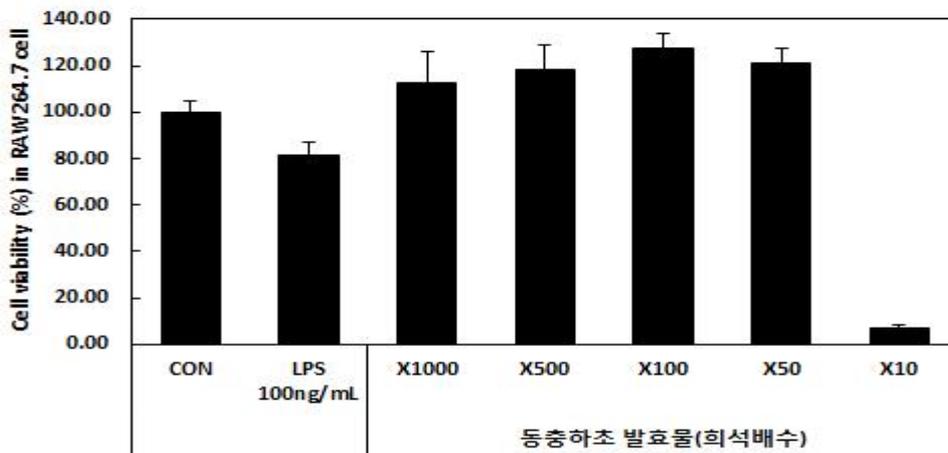


Figure 다-12. Comparison of NO production ability of RAW 264.7 cell after lactic fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS

- 동충하초 젖산발효물의 농도에 따라 NO생성이 증진되는지를 확인하기 위해 positive control로 LPS 100 ng/mL과 동충하초 젖산발효물을 농도별로 비교분석하였다. 대부분의 농도에서 NO가 생성되지 않았으며 50배 희석액에서 3.08 uM생성되어 positive control과 비교하였을 때 NO 생성능이 매우 낮은 것으로 확인 되었다(Figure 다-13).

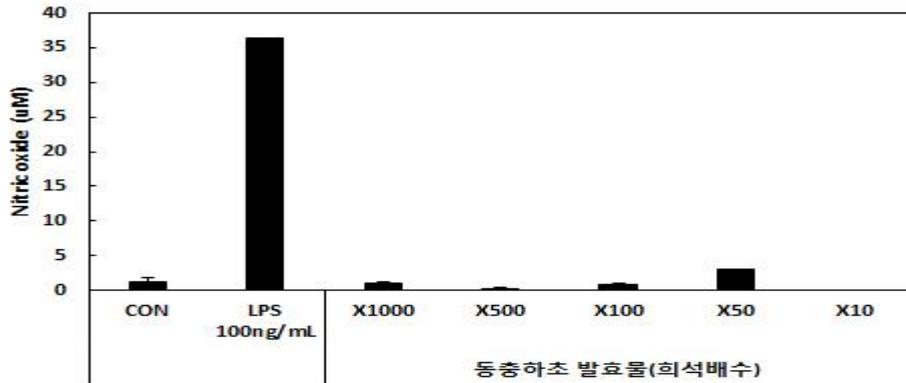


Figure 다-13. Comparison of NO production ability of RAW 264.7 cell after lactic fermentation with *Cordyceps militaris* cultivated in POMPS

(2) 동충하초 젖산발효물을 이용한 간세포 보호효과 확인

- 동충하초 젖산발효물을 이용하여 AML12 세포(마우스 유래 간세포)를 이용하여 간세포 보호 효과를 확인하였다. H₂O₂는 활성 산소종의 하나로서 세포내에서 대사과정 중에 발생하며 세포내 지질, 단백질, 핵산 등을 변형시켜 세포 독성을 나타낼 뿐만 아니라 매우 동석이 강한 hydroxyl radical의 source이기도 하다. 배양한 AML12 세포에 H₂O₂를 처리하기 24시간 전에 발효물을 200, 400, 600 µg/mL의 농도로 처리하고 배지를 제거한 후 7 mM H₂O₂를 새롭게 1시간 동안 처리하고 세포 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 동충하초 발효물은 H₂O₂ 처리에 의한 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과가 나타나지 않았으며 이는 발효 전·후에서 모두 같은 결과를 나타내었다(Figure 다-14).

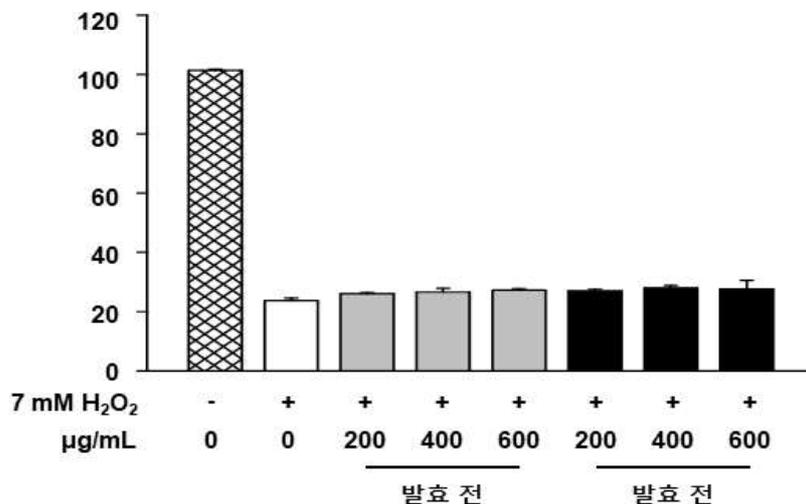


Figure 다-14. Effect of fermented *Cordyceps militaris* on the prevention of oxidative stress by hepatocyte protection

다-5. 동충하초 젖산발효물을 이용한 면역증진 *In vivo* 효능평가

(1) 서론

- 약용 식물은 인체에 유익한 비타민, 무기물, 알칼로이드, 사포닌 및 폴리페놀 화합물 등을 풍부하게 포함한다고 알려져 있어(Agbarya et al., 2014; Muszyńska et al., 2015), 최근 다양한 식물 추출물을 이용한 건강기능식품에 대한 관심이 커지고 있다.
- 동충하초는 겨울에 곤충의 몸 속에서 기생하다가 여름에 풀처럼 자라난다고 하여 지어진 이름으로 전통적으로 한국, 중국, 일본 등의 동양권에서 사용되어 왔다. 전 세계적으로 약 100속 750여종이며 자실체를 형성하는 *Cordyceps*속은 약 300 여종이 있는 것으로 보고되어 있으며 이중 국내에는 80여종이 알려져 있다(Koh, 2002; Kobayashi and Shimizu, 1983).
- 이중 국내에 자생하는 대표적인 동충하초는 이며 항산화 작용(Kim et al., 2001), 항균, 면역증강 및 항암 등의 생리적 활성이 있는 것으로 보고되어 있다(Lee et al., 2014; Ying et al., 1987).
- 동충하초는 다른 종에 비해 탄수화물이나 당의 비율은 낮지만 비타민 A와 미네랄 등을 풍부하게 함유하고 있어 건강기능성 식품으로의 인지도가 높다(Oh et al., 2003).
- 동충하초 추출물은 지질성분 농도 및 동맥경화의 지수를 저하시키고 간 기능 효소 활성이 낮아지는 것이 관찰되어 혈당 조절 기능과 혈청 지질성분, 간 기능 개선에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Kim HS et al., 2013).
- 동충하초 물 추출물은 세포독성에 의한 유전자 변이, 불안정성과 피부암 유발 등에 대한 인체 독성이 없는 천연물질로 흡수율 및 세포투과성이 높고 tyrosinase의 억제효과가 있어 미백효능이 있는 기능성 화장품 원료로의 기능도 갖추고 있다고 보고된 바 있다(Chien et al., 2008; Nam BH et al., 2010).
- 동충하초는 항산화 및 항염증 효과를 가지며, 숙주의 면역 활성화에 기여할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서 본 실험에서는 마우스에 발효 및 비발효된 동충하초 추출물을 투여, 면역기능활성의 효과를 확인하고자 하였다.

(2) 시험물질

- 시험물질은 계명대학교에서 액상으로 공급받아 사용하였다.

(3) 시험계 및 사육환경

(가) 실험동물 윤리규정

- 승인번호 KNU 2017-0046-1: 아로니아와 동충하초 추출발효액의 면역증진 효능평가와 어린이용 청국장의 체지방 억제능에 관한 효능 평가

(나) 시험계

- 계 통 및 종: 실험용 흰쥐 (BALB/c)
- 공 급 원: 주식회사 오리엔트
- 동물의 성, 수 및 주령: 암컷 60마리 (5주령)
- 본 시험에 사용한 BALB/c 마우스는 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부함으로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.
- 동물사육실은 온도 20℃-24℃, 습도 50%-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(4) 시험방법

- 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 ‘면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편, <면역기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오 마커>를 참고하여 진행하였다.

(가) 시험군의 구성

- 마우스를 임의로 12마리씩 분류(BG는 6마리), 총 8개의 그룹으로 나누었다(Table 다-4).

Table 다-4. Setting the dosage according to the group

Groups	Description
NC	Normal control group: received only water
PC	Positive control group: received known immunostimulator (Levamisol, 10 mg/kg)
D1	Treatment group: received 125 mg/Kg of fermented Cordyceps extract
D2	Treatment group: received 250 mg/Kg of fermented Cordyceps extract
G1	Treatment group: received 125 mg/Kg of red ginseng extract
G2	Treatment group: received 250 mg/Kg of red ginseng extract
NF	Treatment group: received 250 mg/Kg of non-fermented Cordyceps extract
BG	No Treatment group

(나) 투여량 설정 및 투여 경로

- 실험 시 정상 대조군(Normal control)을 제외한 모든 실험동물에 추출물을 20일 동안 200 μL (125 mg/kg, 250 mg/kg 동충하초 및 홍삼 추출물, 250 mg/kg 비발효 동충하초 추출물)을 1일 1회 경구 투여하였다.

(다) 체중 및 장기 무게 측정

- 체중을 3일 1회 측정하여 투여량을 조절하였으며, 21 일 후, 각 그룹의 잔여 마우스를 희생시킨 후 심장 채혈하여 Heparin Blood collection tube에 보관, 5분간 10,000 rpm으로 원심을 통해 혈장을 분리하여 -70℃에 보관하였다. 이후 ELISA 분석법을 통해 항체가를 확인하는 실험을 진행하였다. 또한 각 개체에서 간, 신장, 비장을 무게 측정 후 실험을 위해 -70℃에 보관하였다.

(라) 백혈구 분석

- URIT-3000 Vet Plus 혈액 분석기를 사용하여 혈액을 분석하였다. 헤파린을 처리한 튜브를 사용하여 전혈을 채취하여 분석하였다. 각 군당 2마리의 혈액을 2회 반복 분석하여 평균 결과를 사용하였다.

(마) 사이토카인 및 면역 글로불린 측정

- 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 <면역 기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오마커>를 참고하여 진행하였다.
- Microparticle cocktail 50 μ L이 첨가된 plate에 샘플, 대조군 및 standard를 교반기에서 실온에서 2시간(사이토카인), 30분(면역 글로불린) 동안 배양하고, 이후 50 uL의 표준 또는 샘플을 각 well에 추가로 첨가하였다.
- 4회 세척 후, 희석한 Biotin Antibody Cocktail 50 uL 각 well에 첨가하고 실온에서 1.5 시간 동안 교반기 상에서 배양하였다. 희석된 Streptavidin-PE (50 uL)를 각 well에 첨가, 세척 후 실온에서 30분 또는 15분 동안 반응을 진행하였다.
- 마지막으로, 각 well에 washing buffer를 100 uL를 첨가하여 microparticle을 재현탁하고 2분간 상온에서 반응시킨다. 이후 Luminex MAGPIX 분석기(Luminex, Austin, TX, USA)를 사용하여 값을 측정하였다. 각 샘플은 특정 비드에 부착된 해당 항체와 독립적으로 반응하였으며, 샘플의 농도는 표준 곡선이 five parameters logistic curve-fit (Master Plex QT 2010(MiraiBio, Hitachi, CA, USA))를 사용하여 나타내었다.

(바) 통계분석

- 모든 결과값은 SAS 7.1을 사용하여 Dunnett 's test와 Duncan's multiple range test에 따라 편도 및 양방향 분석법을 기반으로 통계 처리하였고, 결과는 평균 \pm 표준오차로 표현하였다. P <0.05는 통계적으로 유의성을 가짐을 나타낸다.

(5) 시험 결과

(가) 마우스의 식이 및 음수량

각 추출물 투여군 간의 식이량 및 음수량은 용량 의존적 관계는 유지되지 않았다(Figure 다-15). 동충하초 추출물 투여군의 사료 섭취량은 46.43-53.13 g, 홍삼 추출물 투여군의 경우 약 52 g이었다. 유사하게, 물 섭취량은 동충하초와 홍삼 추출물 투여군에서 각각 52.87-54.91 g과 52.02-56.71 g였다. 반면 BG 에서 다른 그룹과 식이량 및 음수량이 각각 약 12 g, 25 g 이 높게 나타났는데 이는 실험기간 동안 경구투여에 대한 스트레스가 없어 다른 그룹에 비해 사료 및 물의 섭취가 용이해 높게 나타난 것으로 사료된다.

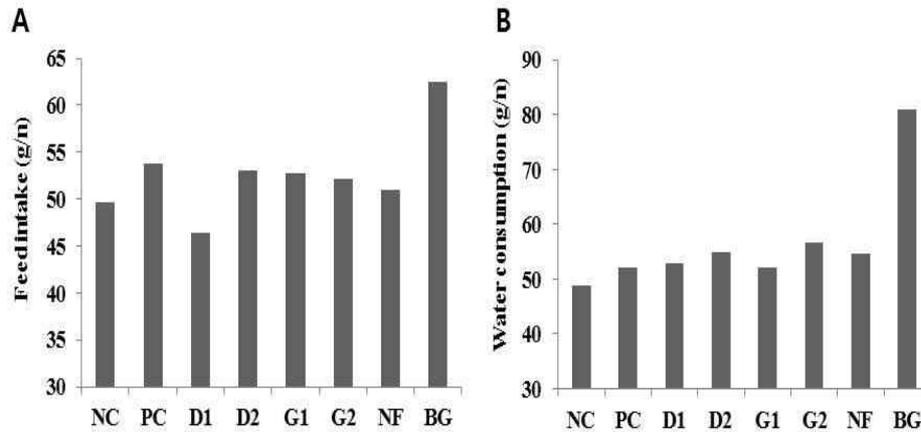


Figure 15. Comparison of the feed (A) and water (B) consumption

(나) 체중 및 장기 무게의 변화

- 투여 전과 20 일간 각 추출물을 투여한 후 마우스의 증체량은 BG를 제외한 나머지 그룹 간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Figure 16). 동충하초 발효 추출물과 홍삼 추출물 투여군에서 모두 250 mg/Kg 농도로 투여한 마우스가 125 mg/Kg 농도로 투여한 마우스보다 약 30~40 g 증체량이 높았으나 유의한 차이는 보이지 않았다. BG는 식이량과 음수량에서 다른 그룹과 나타난 차이만큼 증체량에도 영향을 미친 것으로 사료된다.

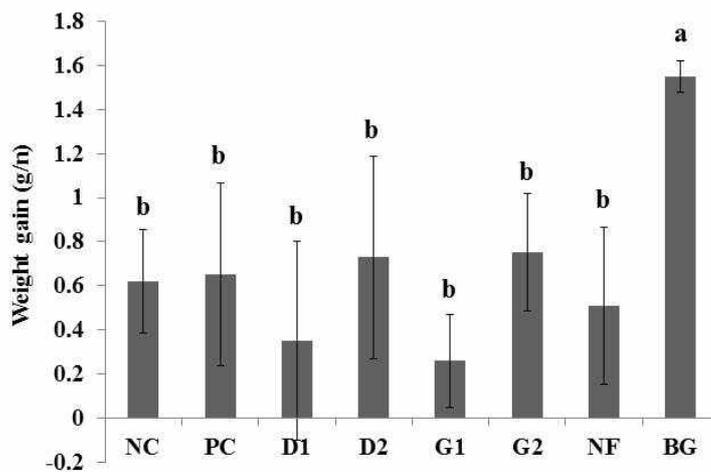


Figure 16. Comparison of body weight gain of each groups

- 실험 종료 후 장기(비장, 간, 흉선 및 신장)를 분리, 각각 무게를 측정하였다. 장기 무게는 투여물질과 용량 의존적인 관계가 없으며 그룹간에 유의한 차이도 없었다(Table 5).

Table 다-5. Weight of internal organs

Group	Liver	Spleen	L. Kidney	R. Kidney
NC	0.748±0.099a	0.075±0.014a	0.106±0.009a	0.105±0.012a
PC	0.760±0.073a	0.082±0.010a	0.115±0.017a	0.118±0.015a
D1	0.767±0.059a	0.076±0.015a	0.107±0.008a	0.109±0.015a
D2	0.756±0.095a	0.078±0.008a	0.112±0.015a	0.111±0.014a
G1	0.780±0.069a	0.083±0.012a	0.113±0.010a	0.113±0.012a
G2	0.765±0.136a	0.087±0.014a	0.110±0.009a	0.116±0.012a
NF	0.762±0.065a	0.077±0.012a	0.111±0.012a	0.108±0.007a
BG	0.828±0.137a	0.083±0.013a	0.113±0.005a	0.110±0.008a

(차) 사이토카인 및 면역 글로블린 측정

- 그룹별 마우스에서 cytokine (GM-CSF, IL-1 alpha, IL-4, IL-6, TNF-alpha) 확인 결과, GM-CSF에서는 NC와 비교했을 때 동충하초와 홍삼 추출물 투여군은 약 75% 낮은 농도로 나타났고 투여군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.
- IL-1 alpha는 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, IL-4에서는 G1을 제외한 나머지 추출물 투여군에서 비슷한 농도로 나타났으며 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(약 47-60 pg/mL).
- IL-6은 발효 동충하초 추출물 투여군은 농도 의존적으로 감소하였으며 D1에 비해 나머지 투여군은 2.3-9.13 pg/mL 정도로 유의적인 차이를 나타냈다.
- TNF-alpha는 모든 군에서 2-2.9 pg/mL로 나타났으나 대조군과 비교하였을 때 동충하초 추출물 투여군의 농도가 유의적으로 감소하였다(Figure 나-17).

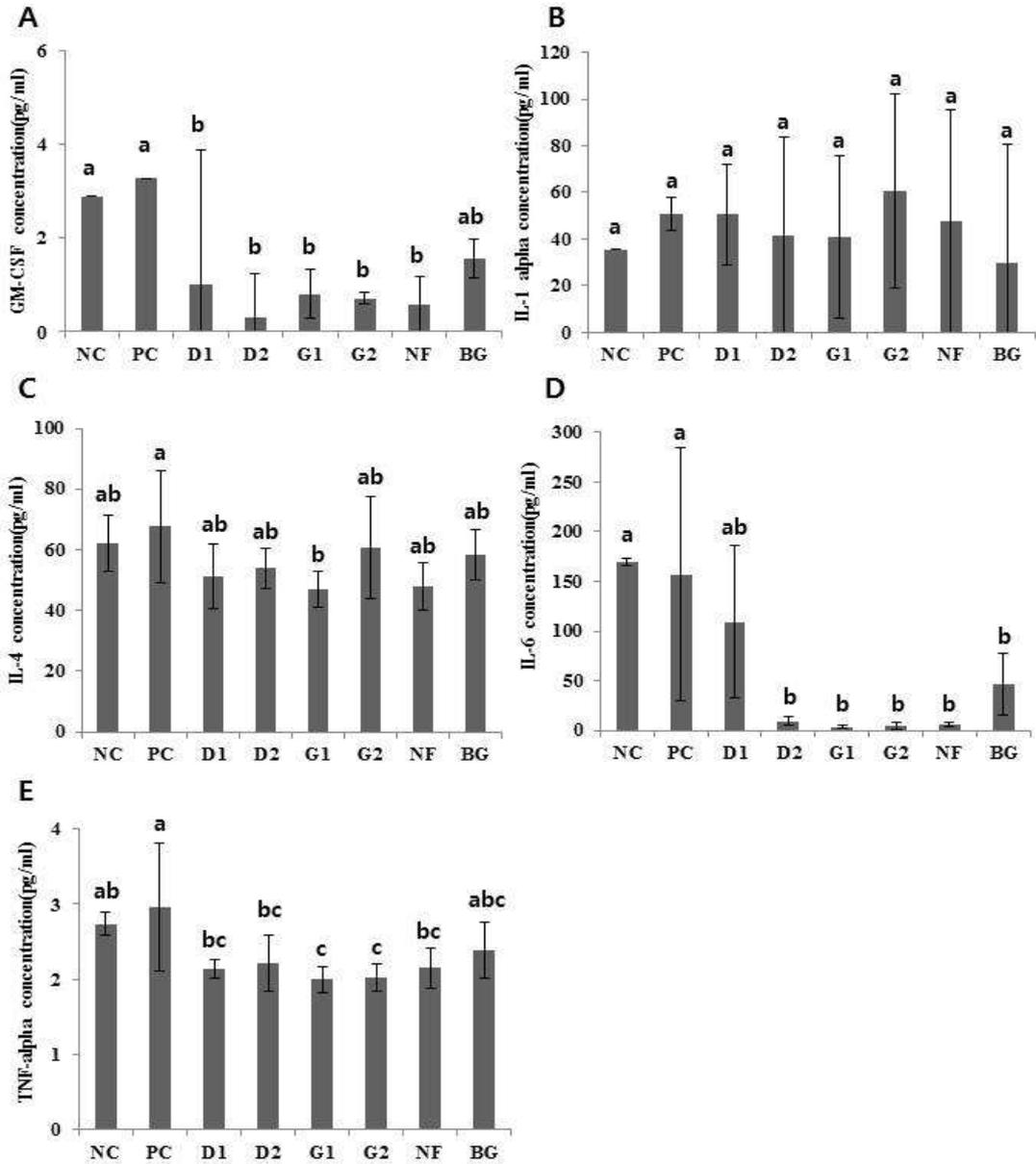


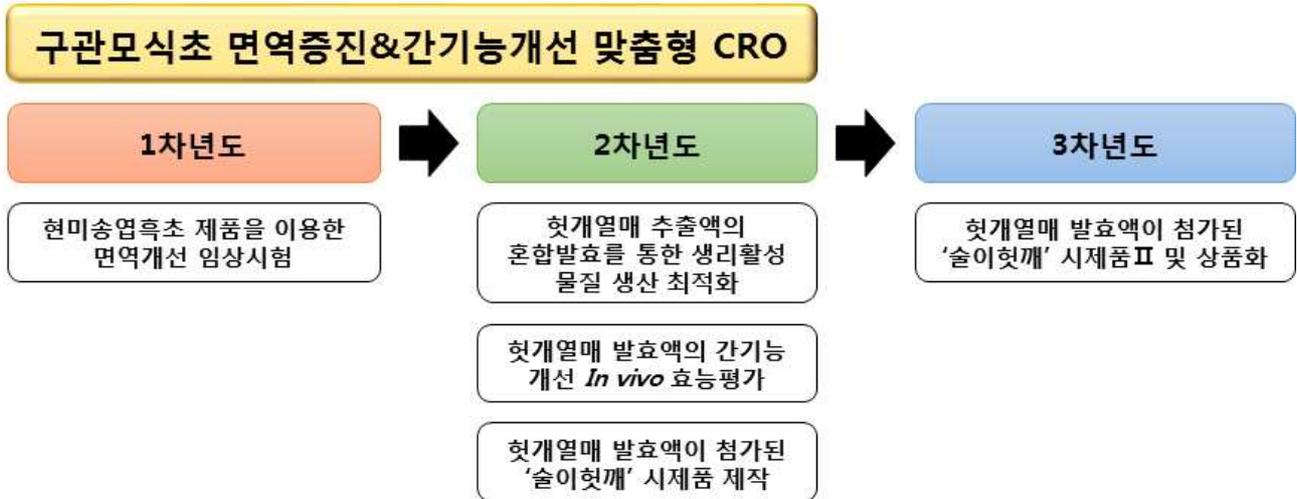
Figure 4-17. Cytokine detection in each mouse group. A, GM-CSF; B, IL-1 alpha; C, IL-4; D, IL-6 and E, TNF-alpha

(5) 결론

- 각 추출물을 투여한 마우스에서 식이량, 음수량 증체량에서 유의적인 차이를 보이지 않아 동충하초 추출물이 마우스의 식이에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.
- 발효 동충하초 추출물의 투여군에서 CM-CSF의 농도는 감소하였지만 IL-4, IL-6 및 TNF-alpha의 발현이 유의적으로 감소하였으므로, 발효 아로니아 추출물은 항염증 활성을 가짐을 확인하였다. 상기 결과로부터, 발효 동충하초 추출물은 BALB/c 마우스에서 면역 자극 효과를 갖는다고 할 수 있다.

라. 현미흑초의 면역증진 임상평가 및 헛개발효물의 상품화 제작

라-1. 구관모식초 맞춤형 CRO 추진 일정



라-2. 구관모식초 현미흑초의 면역증진 임상평가지험

(1) 기업에 대한 임상시험 수행 기술 및 정보 제공

(가) 임상시험용 제품 개발 및 관리

○ 구관모식초 면역개선 인체적용시험 대조제품 개발

- 시험제품인 구관모 현미송엽흑초의 면역개선 효능을 비교하기 위한 음성대조제품을 개발하기 위하여 현재 시판중인 식초제품을 사용하였다. 대조제품은 시험제품과 외관상 구별이 되지 않을 정도로 유사하여야 하므로 식품첨가물인 카라멜색소 Ⅲ을 첨가하여 시험제품과 동일한 색도로 조정하였다. 또한 시판중인 식초제품 특유의 향을 가리기 위하여 대조제품에 흑대추 발효액을 첨가하여 개봉하였을 때 시험제품과 대조제품의 향을 유사하게 인지되도록 조정하였다.



시험군, A		대조군, B	
구관모 현미송엽흑초		타사 식초(시판중)	
정제수	35%	타사 식초	94.7%
현미	30%	카라멜색소	0.5%
밀	15%	흑대추발효액	4.8%
송엽	10%	-	-
생강	4%	-	-
배	3%	-	-
도라지	3%	-	-
합계	100%	합계	100%

Figure 라-1. Formulation of test and control food for study

(나) 임상시험용 제품의 표시 및 기재에 대한 정보

○ 구관모식초 면역개선 시험용 제품의 표시 및 기재

- 구관모식초의 면역개선 인체적용시험은 시험용 제품이 구관모 현미송업흑초와 타사 식초제품과 구별이 되지 않도록 외관을 조정하고, 대상자에게 제공되는 제품이 어떤 제품인지 알 수 없도록 하는 눈가림(맹검)을 대상자와 연구자 양측에 대하여 적용하는 이중맹검 설계로 디자인되었다.
- 인체적용시험 설계에 따라 제품에 부착하는 라벨에서도 시험군별 차이가 노출되지 않도록 주성분, 일반명, 제조연월일, 제조사의 상호 및 제조번호는 기입하지 않도록 하였다. 시험용 제품에 대한 눈가림은 대상자와 연구자 모두에게 적용되므로 제품의 무작위배정은 통계분석자문을 담당하는 전문가가 시행하였고, 무작위배정 내용에 따른 시험제품 라벨 제작 및 부착과 대상자별 맹검봉투 제작은 시험의뢰사인 구관모식초(주)에서 담당하였다.

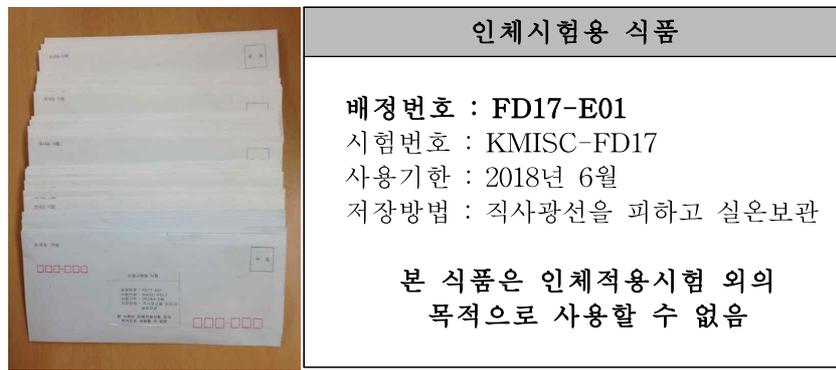


Figure 라-2. Signature registration form

(2) 임상시험 수행 및 지원을 위한 외부 전문가 활용

(가) 구관모식초 면역개선 임상시험 수행을 위한 외부 전문가 활용

- 면역개선 임상시험의 수행, 결과분석 및 자문을 위하여 대구한의대학교 부속 대구한방병원 소속의 한방전문의 및 양방 전문의가 임상시험 수행에 참여하도록 외부전문가를 포함한 연구진을 구성하였으며, 임상시험의 원활한 수행을 위하여 담당자별 업무분장을 완료하였다.

시험등록 및 업무분장확인표										
시험식품	구관모 현미송업흑초			JRB 접수번호			DHMC-C-15007			
상시기관	대구한의대학교 부속 대구한방병원			시험책임자			김재수 (서명)			
시험제목	구관모 현미송업흑초의 면역개선에 대한 연구 : 배비인체적용시험									
항목	시험책임자	시험담당자	시험담당자	시험담당자	시험담당자	시험담당자	시험담당자	시험담당자	시험담당자	시험담당자
성명	김재수	최성훈	도진수	이선강	이서영	이희연	이영희	박두성	김찬연	
시험 1										
시험 2										
시험 3										
1차 선별	○									
대상자 참여 설명 / 동의 취득	○			○		○		○		○
선정/제외기준 검토	○	○			○			○		○
연구목적 조사	○			○		○		○		○
법적/기술적/윤리/생물자율 조사	○			○		○		○		○
합격자율 / 위장본문서				○		○		○		○
사전 / 사후 설문조사				○		○		○		○
임상실험실습사 / 임상결과 검토	○	○						○		○
시험 종료일 확인										
시험용 제품 제공 / 환수				○		○		○		○
DR 기록, 작성	○			○		○		○		○
DR 검토확인	○			○		○		○		○
자율복합				○		○		○		○
시험자 및결판리				○		○		○		○
시험용 식품 관리										○
무작위배정/검정봉투 관리										○
Monitoring 및 Inspection	○			○		○		○		○
Query Correction	○			○		○		○		○
연구기간	From	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	To	20	20	20	20	20	20	20	20	20
연구책임자 확인	서명									
	인정일									

Figure 라-3. Study design

(3) 면역개선 임상 효능평가 수행

(가) 인체적용시험계획서 개발 완료

- 구관모 현미송엽흑초의 면역개선 효능을 평가하기 위하여 적극적인 치료가 필요한 질환이 없는 성인을 대상으로 6주간 시험식품인 구관모 현미송엽흑초 또는 대조식품인 시판중의 타사 식초를 복용하게 하고, 식품 복용 전후의 혈액검사 결과 및 감기 또는 인플루엔자성 증상을 관찰하여 구관모 현미송엽흑초의 면역개선능을 평가하기 위한 인체적용시험 프로토콜을 개발하였다.



Figure 라-4. Human body test plan for evaluating immunity improvement with black vinegar (brwon rice and pine needle)

(나) 구관모식초(주) 면역개선 인체적용시험 계획서의 IRB 승인

- 인체적용시험 실시에 앞서 임상연구의 필요성, 과학성 및 윤리성에 관한 심의를 신청하였으며, 대구한의대학교부속 대구한방병원 임상시험심사위원회(IRB)로부터 임상시험 실시를 승인받았다.
- 인체적용시험은 식품의약품안전처 임상시험 실시기관으로 등록된 대구한의대학교 부속 대구한방병원에서 실시하며, 임상시험 수행 경력이 풍부한 한방 전문의가 책임연구자로 참여하고, 혈액검사 결과를 통한 임상의학적 검토를 위하여 양방의사가 시험담당자로서 참여하여 시험을 수행하도록 하였다. 대상자의 보호를 위하여 대상자에 대한 모든 의학적 처치 등은 의사의 결정에 따라 진행하도록 하였다.
- 대구한의대학교 부속 대구한방병원 임상시험심사위원회(IRB)는 본 인체적용시험에서 대상자의 시험 참여가 타당한지를 검토, 평가하고 대상의 권리, 안전, 복지를 보호하기 위하여 절차가 확보되어 있는지 여부를 심사하였다.
- 인체적용시험 참여에 대한 동의를 얻기 위한 동의서 서식(ICF, Informed Consent Form)은 임상시험에 관한 모든 정보(시험의 목적, 대상자에게 예상되는 위험이나 불편, 대상자가 피해를 입었을 경우 주어질 보상이나 치료방법, 대상자가 시험에 참여함으로써 받게 될 금전적 보상이 있는 경우 예상금액 등)를 대상자에게 충분히 알리고, 자의에 의해 시험에 참여한다는 의사를 명확히 나타낼 수 있도록 하였다.

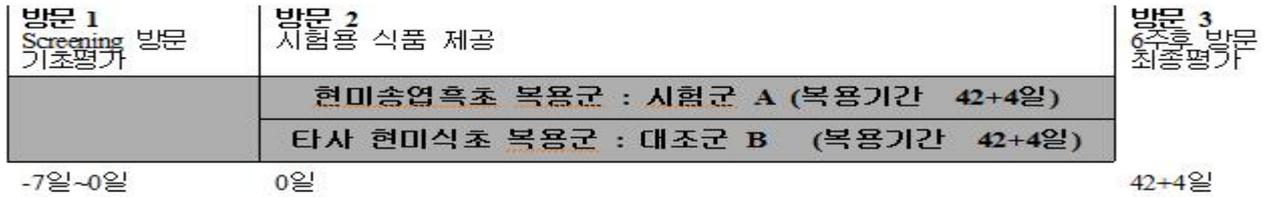


Figure 라-7. Study design

⑥ 시험디자인

㉠ 시험디자인: 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교 인체적용시험

㉡ 시험대상자: 적극적인 치료가 필요한 질환이 없는 건강한 성인

㉢ 선정기준

- 만 20세 이상 80세 이하의 성인
- 백혈구 수치가 $4\sim 8\times 10^3/\mu l$ 에 속하는 자

㉣ 제외기준

- BMI 18 미만 또는 35 초과인 자
- ALT 및 AST가 정상 상한의 3배를 초과하는 자
- 임신 또는 수유중인 여성
- 시험기간 동안 의학적으로 증명된 방법(예: 콘돔, 루프, 페미돔 등)을 사용하는 피임에 동의하지 않는 가임기 여성
- 조절되지 않는 급성 당뇨 및 고혈압이 있는 자
- 효과판정에 영향을 줄 수 있는 약제(혈당강하제, 고지혈증 치료제, 스테로이드제, 호르몬제, 면역억제제, 항생제등)을 지속적으로 사용하고 있는 자
- 거식증, 우울증, 조울증, 정신과 질환 등으로 지속적인 치료가 필요한 자
- 면역관련 질환, 중증의 간 또는 신부전, 악성종양, 폐질환, 교원질증, 다발성 경화증, 알레르기성 피부질환 및 기타 자가면역질환 등의 전신질환이 이행되고 있는 자
- 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- 시험식품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 또는 위장관계 수술(단순맹장수술 또는 탈장수술 제외)의 과거력이 있는 자
- 시험참가 1개월 이내에 면역력에 영향을 줄 수 있는 의약품, 한약을 섭취한 자
- 면역개선 가능성을 인정받은 건강기능식품을 복용하고 있는 자⁶⁾
- 시험참가 3개월 이내에 다른 인체적용시험 또는 임상시험에 참여하여 시험용 제품을 복용한 자(화장품 인체적용시험 제외)
- 위의 사항들 외에 연구자의 판단으로 시험의 수행이 곤란하다고 판단되는 자

㉤ 유효성 평가기준: 시험기간 동안의 감기증상 지속 일수 및 총 증상점수

㉥ 기타 관찰항목: WBC count, Differential count, 혈중 사이토카인 농도(TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12)

㉦ 통계분석방법

- 사전 동질성 검정: Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test

6) 면역개선 가능성을 인정받은 건강기능식품 기능성 원료 : 게르마늄효모, 금사상황버섯, 당귀혼합추출물, 스피루리나, 클로렐라, 표고버섯균사체, L-글루타민, 폴리감마글루탐산, 동충하초추출물, 합성PLAG, 효모베타글루칸

- 효과검정: 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정함
- ㉠ 관찰일정: 시험기간 동안 대상자는 3회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문별 검사내용은 다음과 같다.

Table 라-1. Brief study schedule at every visiting

확인/평가항목	방문일	방문 1	방문 2	방문 3
		Screening 기초평가	제품제공	시험종료 최종평가
		-7일~0일	0일	42일+4일
대상자 동의서		○		
인구학적 조사		○		
병력/약물투여력 조사		○		
활력징후검사		○	○	○
임신반응검사		○		
선정/제외기준 검토		○		
감기증상 설문조사		○		○
체성분검사		○		○
임상실험실 검사		○		○
노검사		○		○
사이토카인 분석		○		○
시험용 식품 제공			○	
이상반응 모니터링		○	○	○
병용약물 체크		○	○	○
순응도 조사				○

※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 인체시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

⑦ 감기증상 설문조사

- 감기증상은 발열, 오한, 콧물, 코막힘, 기침, 재채기, 인후통, 두통과 위장관계 증상(메스꺼움, 구토, 설사, 복통)의 9개 증상에 대하여 조사하였다.
- 시험용 식품 복용 전의 설문조사는 대상자가 통상적으로 감기에 걸리는 경우의 증상 지속일수와 증상정도를 조사하였고, 시험용 식품 복용 후의 설문조사는 시험기간 동안 매일 건강상태에 관한 일지를 작성하도록 하고, 일지에 기록된 감기 증상의 지속일수와 증상정도를 확인하였다.

⑧ 인체적용시험 현황

- 자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 30명을 스크리닝하여 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 26명을 대상자로 선정하였다. 대상자 26명은 시험군 13명, 대조군 13명으로 배정되었다.
- 무작위 배정된 26명 중 중도 탈락한 대상자는 4명이었으며, 시험군 11명, 대조군 11명이 계획서를 준수하고 시험을 종료하였다.

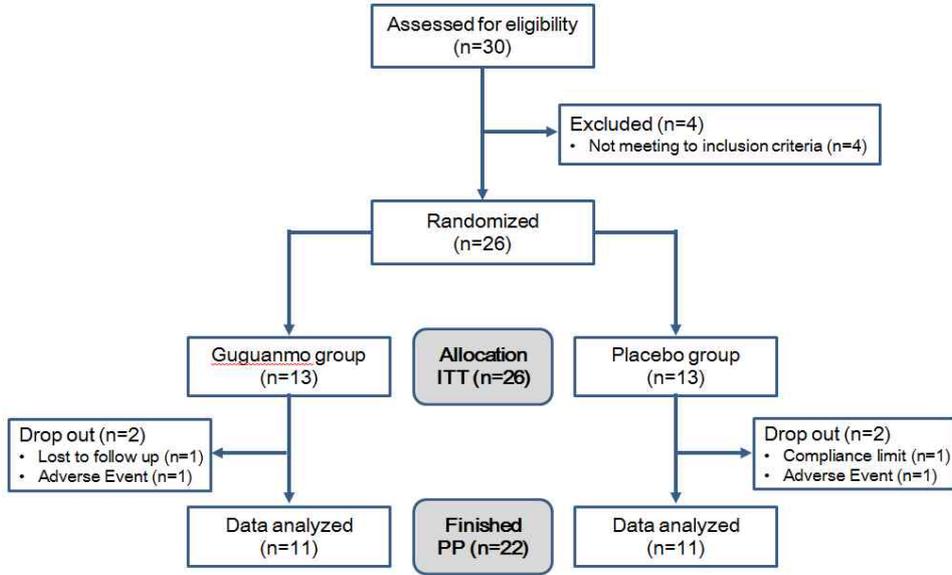


Figure 라-8. Schematic representaion of study summary

⑨ 동질성검정 결과

- 대상자의 인구학적 정보인 대상자의 나이, 성별, 신장, 체중, 음주일수, 음주량, 비만도에 대해서는 식품 섭취전의 측정치에 대하여, 시험기간 동안의 생활습관의 변화에 따라 시험결과에 영향을 줄 수 있는 항목인 체중, 비만도, 음주, 운동에 대해서는 식품 섭취 전과 섭취 후의 측정치에 대하여 시험군간 동질성 검정을 실시하였다.
- 대상자의 성별, 흡연, 병력, 치료력, 약물투여력, 병용약물 여부, 체중, 음주일수, 음주량에 대한 사전 동질성 검정(Table 라-2,3,4,5,6)을 하였으며, 조사한 대부분의 항목에 대하여 시험군간 유의한 차이가 확인되지 않았다.
- 체중, 음주일수, 음주량에 대한 각 군내 사전, 사후 동질성 검정 결과, 통계적으로 유의한 차이가 있어 사전-사후 변화량에 대한 시험군간 차이를 검정하였다. 그 결과 음주일수, 음주량에 대해서는 정규성을 만족하지 않아 비모수검정 결과에 따라, 체중은 정규성 검정 결과에 따라 분석하였으며, 조사한 항목 모두 두 군간 유의한 차이가 확인되지 않았다.

Table 라-2. Homogeneity analysis for gender

Variable		남		여		χ^2	p
		빈도	%	빈도	%		
성별 (방문1)	시험군	7	53.85	6	46.15	.4314	.6951
	대조군	5	38.46	8	61.54		

p : Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 라-3. Homogeneity analysis for demographic information: life style

Variable		0 : 아니오		1: 예		χ^2	p
		빈도	%	빈도	%		
흡연 (방문1)	시험군	9	69.23	4	30.77	.0297	.0957
	대조군	13	100.00	0	0		
음주여부 (방문1)	시험군	8	61.54	5	38.46	.2393	.4338
	대조군	5	38.46	8	61.54		

p : Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 라-4. Homogeneity analysis for demographic information: age, height, body weight, drinking and obesity

Variable		평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
연령 (방문1)	시험군	37.38	14.222	.296	.770	.920
	대조군	35.92	10.751			
신장 (방문1)	시험군	168.92	9.050	1.518	.142	.139
	대조군	163.62	8.780			
체중 (방문1)	시험군	68.300	12.9201	1.489	.150	.139
	대조군	61.438	10.4472			
음주일수 (방문1)	시험군	.85	.987	-.212	.834	.762
	대조군	.92	.862			
음주량 (방문1)	시험군	39.950	54.1993	-.248	.806	.920
	대조군	45.113	51.7642			
BMI (방문1)	시험군	23.815	3.0884	.901	.377	.650
	대조군	22.831	2.4500			
체지방율 (방문1)	시험군	23.815	3.0884	-.761	.454	.511
	대조군	22.831	2.4500			
WHR (방문1)	시험군	23.815	3.0884	.686	.499	.880
	대조군	22.831	2.4500			
VFA (방문1)	시험군	23.815	3.0884	.741	.466	.960
	대조군	22.831	2.4500			

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 점근 유의수준

Table 라-5. Homogeneity analysis for demographic information: life style

Variable		0 : 아니오		1: 예		χ^2	p
		빈도	%	빈도	%		
운동	시험군 (방문1)	6	66.67	3	33.33	.5686	1.000
	시험군 (방문3)	6	75.00	2	25.00		
	대조군 (방문1)	5	52.50	3	37.50	0.0242	0.0754
	대조군 (방문3)	5	100.00	0	00.00		

p : Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 라-6. Homogeneity analysis for demographic information: age, height, body weight, drinking and obesity

Variable	변수	N	평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
시험군	체중	13	-0.76	1.171	-2.35	.0370	.0366
	비만도	13	-0.23	0.384	-2.17	.0510	.0518
	음주일수	13	-2.54	2.696	-3.39	.0053	.0039
	음주량	13	-208	331.9	-2.26	.0435	.0039
대조군	체중	13	-0.58	0.916	-2.27	.0423	.0574
	비만도	13	-0.23	0.366	-2.27	.0422	.0596
	음주일수	13	-4.08	3.040	-4.83	.0004	.0005
	음주량	13	-197	216.3	-3.28	.0066	.0005

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 점근 유의수준

Table 라-7. Homogeneity analysis in body weight and alcohol drinking (number of drinking days, drinking amount) between test groups

Variable	시험군		대조군		t value	Pr > t	Pr > w
	평균	표준편차	평균	표준편차			
체중 (방문1-방문3)	-0.76	1.171	-0.58	0.916	-0.448	0.658	0.778
음주일수 (방문1-방문3)	-2.54	2.696	-4.08	3.040	1.365	0.185	0.161
음주량 (방문1-방문3)	-208	331.9	-197	216.3	-0.101	0.920	0.589

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 점근 유의수준

⑩ 감기증상 지속일수 및 증상정도 분석 결과

- 시험군과 대조군이 제품 복용기간 동안 감기에 걸렸는지 여부에 대한 분석 결과, 두 군간 유의한 차이는 없었다(Table 라-8). 시험용 식품 복용 전과 후의 두 집단(시험군, 대조군)간 측정 시점별 감기증상의 지속 일수는 시험군이 식품 복용 전 4.5±1.5일, 식품 복용 후 0.9±1.5일로 조사되었고, 대조군은 식품 복용 전 6.8±7.5일, 식품 복용 후 4.9±8.4일로 조사되었다. 또한 감기증상의 증상점수는 시험군이 식품 복용 전 5.7±2.8, 식품 복용 후 1.4±3.0로 조사되었고, 대조군은 식품 복용 전 5.8±2.7, 식품 복용 후 2.0±2.5로 조사되었다.
- 식품 섭취 전후에 따른 감기증상 지속 일수는 시험군이 3.6일로 줄어들고, 대조군은 1.9일로 줄어드는 것으로 나타났으나, 시험군 간의 통계적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다(Table 라-9).
- 그러나 측정 시점별 감기증상의 지속 일수, 증상정도 점수에 대해 각 집단내에서의 식품 복용 전과 후를 분석한 결과, 시험군에서는 감기증상의 지속 일수(p=0.001)와 증상정도(p=0.001)의 감소가 통계적으로 유의하였고, 대조군에서는 감기 증상정도(p=0.0002)의 감소에 대해 통계적으로 유의한 것으로 확인되었다(Table 라-10).

Table 라-8. Basic statistics and crossover analysis on the symptoms of cold during the test period

Variable (N=13)		0 : 아니오		1: 예		χ^2	p
		빈도	%	빈도	%		
감기증상 여부	시험군	9	69.23	4	30.77	0.4201	0.6882
	대조군	7	53.85	6	46.15		

p : Fisher의 정확검정에 의한 유의수준(양측)

Table 라-9. Comparing the average change of the group in duration of cold symptom and cold symptom score

Variable	시험군		대조군		t value	Pr > t	Pr > w
	평균	표준편차	평균	표준편차			
지속일수 (방문1-방문3)	3.5385	2.2217	1.8462	4.3560	1.25	0.2282	0.4068
지속일수 (방문3/방문1)	0.2431	0.4421	0.7138	0.9979	-1.56	0.1388	0.2788
증상점수 (방문1-방문3)	5.0000	3.1885	4.5385	3.0718	0.38	0.7103	0.4239
증상점수 (방문3/방문1)	0.2046	0.4607	0.2931	0.3674	-0.54	0.5933	0.3641

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 접근 유의수준

Table 라-10. Comparing the average change in the number of days of cold symptom duration and symptom severity score

Variable (방문1-방문3)	시험군					대조군				
	평균	표준 편차	t 값	Pr> t	Pr> S	평균	표준 편차	t 값	Pr> t	Pr> w
지속일수	3.538	2.222	5.74	<0.0001	0.0010	1.846	4.356	1.53	0.1524	0.1846
증상점수	5.000	3.189	5.65	0.0001	0.0010	4.538	3.072	5.33	0.0002	0.0002

Variable (방문3/방문1)	시험군					대조군				
	평균	표준 편차	t 값	Pr> t	Pr> S	평균	표준 편차	t 값	Pr> t	Pr> w
지속일수	0.243	0.442	1.98	0.0708	0.1250	0.714	0.998	2.58	0.0241	0.0313
증상점수	0.205	0.461	1.60	0.1353	0.1250	0.293	0.367	2.88	0.0139	0.0313

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 접근 유의수준

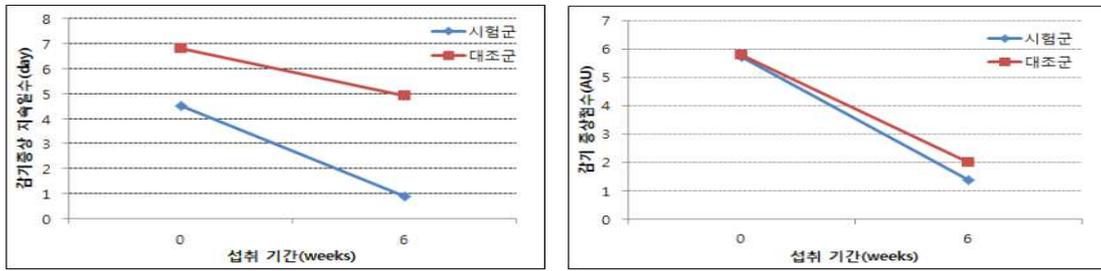


Figure 라-9. Continued days in the cold symptoms and changes in the symptom score after intaking test food

라-3. 헛개추출물의 혼합발효를 통한 γ -PGA, GABA 생산 최적화

(1) 재료 및 방법

- 헛개열매 추출물을 두 배 희석, MSG 5%를 첨가 후 121°C, 15분간 Autoclave에서 고압증기 멸균 방냉 후 멸균된 glucose 3%를 첨가하고 *B. subtilis* HA 5%를 접종하여 42°C, 160 rpm에서 3일 동안 진탕배양 한다. 고초균발효가 종료되고 glucose 1.5%, skim milk 5%와 *L. plantarum* EJ2014 1%를 접종하여 30°C, 7일 동안 정치배양 한다(Figure 라-10).

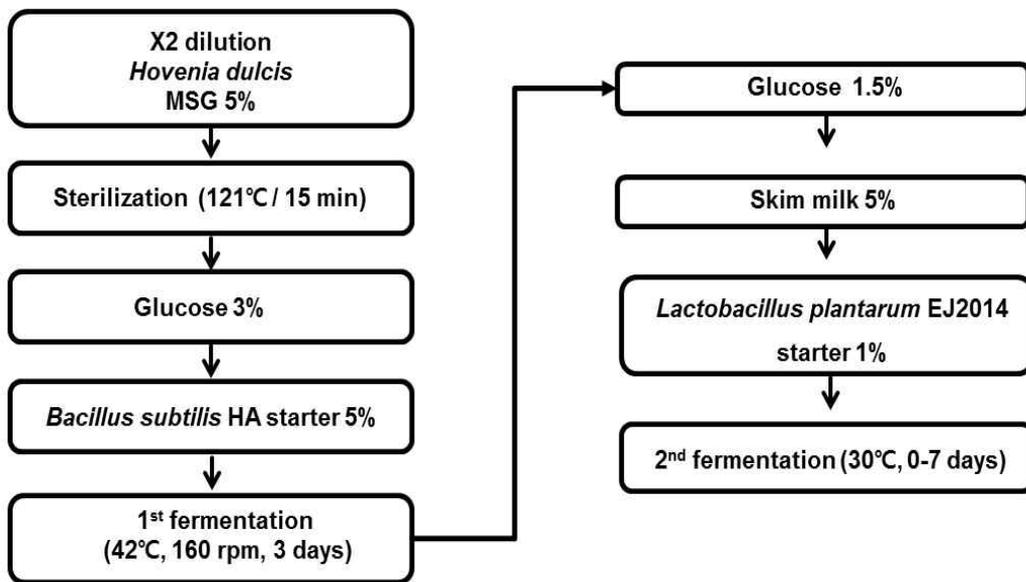


Figure 라-10. Process for co-fermentation of *Hovenia dulcis*

(2) 결과 및 고찰

- 헛개열매 진액의 이화학적 분석 결과는 Table 라-11,12와 같다. 고형분 함량이 2.11%로 나타났으며, 폴리페놀 함량 0.86 mg/mL, 플라보노이드함량 7.21 mg/mL로 나타났다. 헛개열매 진액에 있는 무기질은 K이 8.975 mg/100 g으로 가장 높으며, P, Ca, Mg 순으로 무기질을 함유하는 것으로 나타났다.

Table 라-11. Physicochemical analysis of *Hovenia dulcis*

Physicochemical analysis	Values
pH	5.85
Acidity (%)	0.16
Water content (%)	97.88
Solid content (%)	2.11
Reducing sugar (%)	0.85
Polyphenol (mg/mL)	0.86
Flavonoid (mg/mL)	7.21

Table 라-12. Mineral content of *Hovenia dulcis*

Test items	Contents (mg%)
Na	1.795
Ca	4.852
K	8.975
Mg	3.737
P	5.042
Fe	0.142
Mn	0.062

- 점질물과 GABA생성을 최적화하기 위해 MSG 5%를 고정하고, 1차 고초균 발효에서 glucose 0, 3, 5% 각각 첨가하고 *B. subtilis* HA 균을 5% 접종 후 고초균 발효를 3일 동안 진행해보았다. glucose 농도에 따른 고초균 발효에서 pH는 glucose 0%에서 발효 3일까지 가장 높게 나타났으며, glucose농도가 높아짐에 따라 pH 증가폭이 감소되는 경향을 보였다 (Figure 라-12).

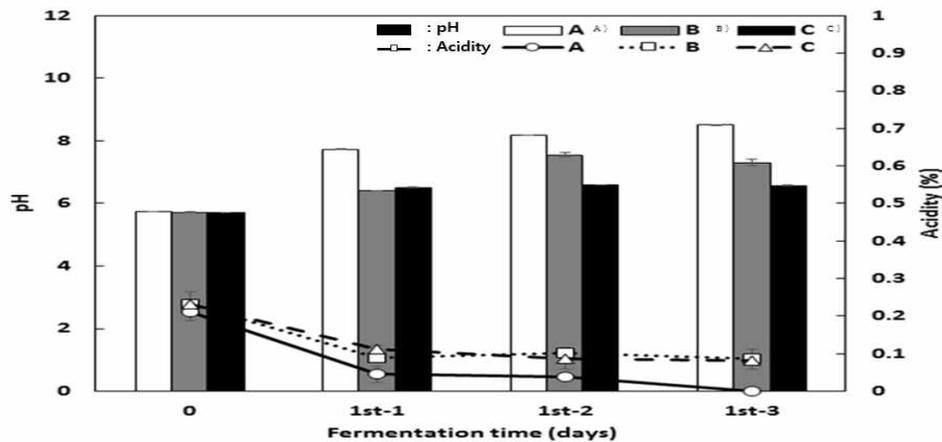


Figure 라-12. pH and acidity in fermented *Hovenia dulcis* with different glucose content by *B. subtilis* HA

A: glucose 0%, B: glucose 3%, C: glucose 5%

- 점조도와 점질물 함량을 비교하였을 때, glucose 0%는 발효 3일 동안 점질물과 점조도가 없었으며, glucose 3%조건에서 발효 2일에 점질물 3.27%, 점조도 3.9 Pa·sⁿ로 가장 높게 나타났다. 점질물과 점조도 함량을 비교한 결과 glucose 3%, 발효 2일을 고초균발효 최적조건으로 하였다(Figure 라-13).

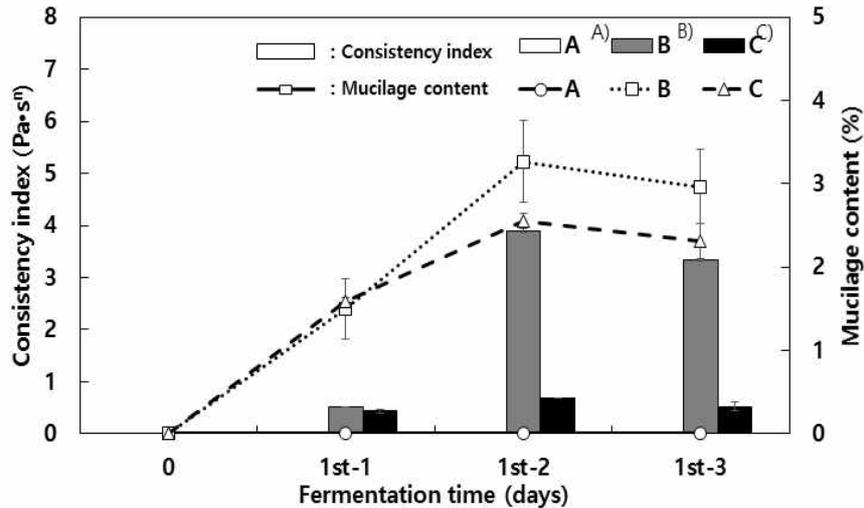


Figure 라-13. Consistency and mucilage content in fermented *Hovenia dulcis* with different glucose content by *B. subtilis* HA

A: glucose 0%, B: glucose 3%, C: glucose 5%

- 최적조건인 glucose 3%, MSG 5% 첨가한 헛개열매 진액을 3일 동안 고초균 발효시간별 점탄성 측정을 해보았다. Figure 라-14에서와 같이 발효 날짜에 따라 탄성(G')보다 점성(G'')이 높은 것으로 나타났으며 점성과 탄성모두 발효 2일째 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 점질물에 포함되어 있는 γ -PGA의 분자량이 점질물 용액의 점탄성에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

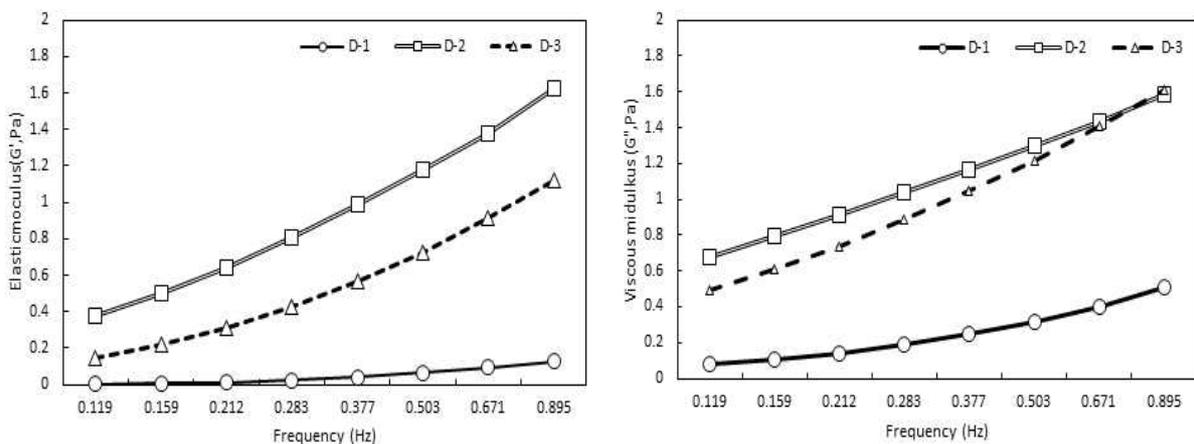


Figure 라-14. Elastic and viscous modulus of fermented *Hovenia dulcis* by *B. subtilis* HA

D: 1st fermentation time (days)

- 헛개열매 진액을 2배 희석하고, MSG 5%, glucose 3% 첨가한 헛개배지에서 고초균발효 2일을 최적조건으로 하여, 젖산균의 생육을 증식하기 위해서 glucose 1.5%를 추가로 첨가하고,

skim milk를 0-5% 농도별로 첨가하여 비교분석하였다. 젖산균의 경우 skim milk를 첨가한 조건에서 모두 균수가 높게 나타났으며, 고초균 skim milk 1%조건에서 고초균 생육이 가장 낮아졌으며, skim milk 0%에서 고초균수가 가장 높게 나타났다.

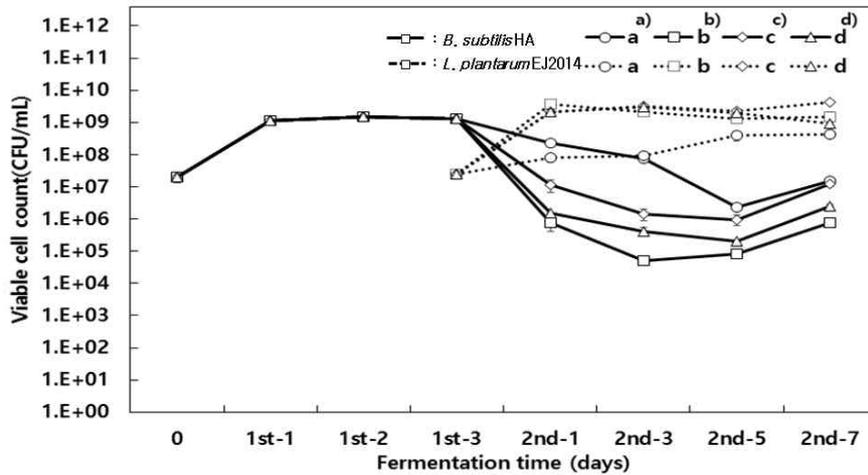


Figure 라-15. Viable cell count for fermented *Hovenia dulcis* with different skim milk content by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014
a: skim milk 0%, b: skim milk 1%, c: skim milk 3%, d: skim milk 5%

- 2차 젖산균 시간에 따른 tyrosine 함량의 변화를 Figure 라-16에서 확인 하였다. 고초균 발효동안 증가된 tyrosine은 젖산균 발효 0일째 첨가된 skim milk의 양에 따라 함량이 증가하는 것을 확인하였으며, 2차 젖산균 발효가 진행됨에 따라 계속적으로 tyrosine의 함량이 증가하는 경향을 보였다. 이는 고초균의 생육으로 첨가된 skim milk도 단백질이 분해되는 것으로 판단되었다.

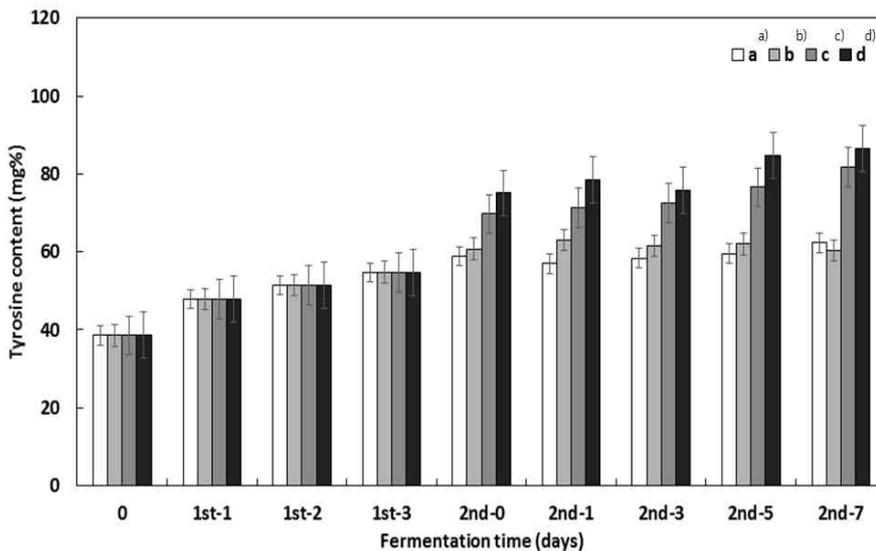


Figure 라-16. Tyrosine content of fermented *Hovenia dulcis* with different skim milk content by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014
a: skim milk 0%, b: skim milk 1%, c: skim milk 3%, d: skim milk 5%

- 첨가된 skim milk의 함량에 따라 생성되는 GABA의 양을 TLC plate를 이용하여 확인하였다. skim milk 1%조건에서 발효 5일에 MSG가 잔존하는 spot을 보이며, skim milk 3%, 5%에서는 모두 GABA로 전환되는 것을 확인 할 수 있었다.

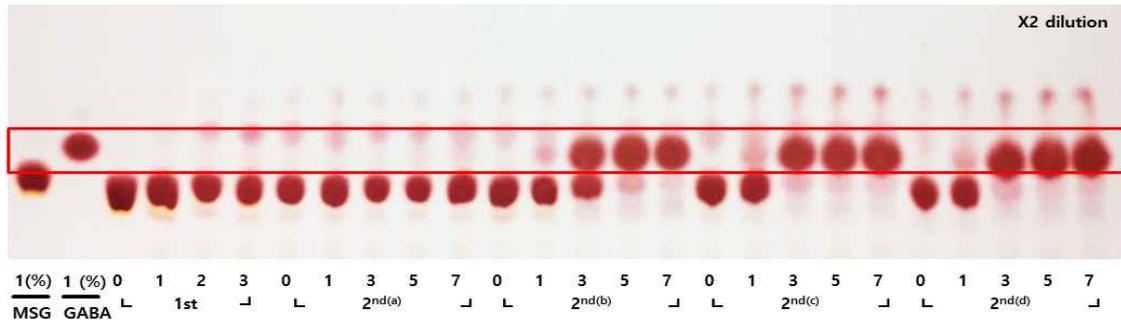


Figure 라-17. Analysis of GABA production in fermented *Hovenia dulcis* with different skim milk content

a: skim milk 0%, b: skim milk 1%, c: skim milk 3%, d: skim milk 5%

라-4. 헛개발효물의 간기능 보호 *In vivo* 효능평가

(1)서론

- 과도한 알코올 섭취는 지방증, 간경화 및 알코올성 간염을 포함한 간 손상의 주요 원인으로 알려져 있다. 때문에 간에서 지질 대사는 알코올성 간 손상과 관련하여 연구되어 왔다.
- 흡수 된 알코올은 간에서 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), proliferator activated receptor- α (PPAR α), carnitine palmitoyltransferase (CPT-1), sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c와 같은 다양한 효소에 의한 화학적 변형을 통해 분해된다. 특히, SREBP-1c는 지방산 및 트리글리세라이드 합성에 관여하는 유전자를 활성화시켜 지질 대사를 조절하는 전사 인자로서, 간에서 지방증의 발병 기전에 관여한다고 보고되어있다. 이들 효소는 알코올로부터 인산화되거나 불활성화되며, 효소 활성의 변화는 간세포, 조직, 구조 및 기능에 결정적으로 영향을 미친다.
- 또한, 알코올은 간에서만뿐만 아니라 장내 미생물의 불균형을 유발한다고 보고된 바 있다. 연구 결과, 알코올 급여 마우스와 래트에서 probiotic 박테리아를 제외한 장내세균의 과증식 (overgrowth)이 관찰되었으며, 반면 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 및 *Lactococcus*를 포함한 프로 바이오틱 박테리아의 비율이 감소했다. 과증식된 장내세균은 섭취한 알코올로부터 대사 작용을 통해 lipopolysaccharide (LPS), 아세트알데히드와 같은 대사산물을 방출하며, 이것은 장내 세포의 손상을 유발한다. 손상된 장벽을 통해 박테리아 대사산물은 혈관을 통해 장에서 간으로 이동하며, 섭취한 알코올과 함께 간 손상을 심화시킨다. 따라서 장내 미생물총의 안정화는 간 보호 효과를 향상시킬 것으로 기대된다.
- 전통적으로 약용식물은 약을 대신하여 간 기능을 개선시키는 용도로 사용되어 왔으며, 특히 아시아 지역의 전통 허브인 헛개(*Hovenia dulcis*)는 간장 보호 효과와 알코올 해독 효과가

있는 것으로 알려져 왔다. 특히 헛개는 페놀계 물질, 알칼로이드 및 플라보노이드를 함유하고 있다. 이 세 가지 물질은 항염증, 항산화 및 면역개선 효과가 있는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 혈중 알코올 농도를 감소시키고, 알코올 분해대사에 관련된 효소의 활성을 증가시킨다고 보고된 바 있다.

- 본 연구는 *Lactobacillus*와 *Bacillus* 같은 이미 효과가 알려진 probiotic 박테리아를 사용하여 발효된 헛개 추출물을 통해 장내 미생물의 안정화를 유도하여 기존에 일반적으로 사용되는 헛개 추출액보다 알코올로 섭취로 인한 간 손상 예방을 위한 효과적인 방법을 제안하고자 한다.

(2) 시험물질

- 본 실험에 사용된 시료는 헛개(*Hovenia dulcis*)추출발효물로, *Bacillus subtilis* HA (KCCM 10775P) 및 *Lactobacillus plantarum* EJ2014 (KCCM 11545P) 균주를 이용하여 추출물을 발효시켜 γ -PGA (γ -폴리글루타민산) 및 GABA (γ -아미노부티르산)가 풍부한 새로운 기능성 식품 성분이다.

(3) 시험계 및 사육환경

(가) 실험동물 윤리규정

- 승인번호 KNU 2016-0090: 황칠나무 추출 발효액의 면역 증진 효능평가와 흑초 발효액의 간기능 개선 효능 평가

(나) 시험계

- 계 통 및 종: C57BL / 6N CrSlc 마우스
- 공 급 원: 중앙실험동물
- 동물의 성, 수 및 주령: 수컷 60마리(5주령)
- 본 시험에 사용한 BALB/c 마우스는 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부하므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.

(다) 사육환경

- 동물사육실은 온도 20°C-24°C, 습도 50%-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(4) 시험방법

- 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 '간 건강에 도움을 줄 수 있음' 편, <간건강 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커>를 참고하여 진행하였다.

(가) 시험군의 구성

- 마우스를 임의로 12마리씩 분류, 총 7개의 그룹으로 나누었다(Table 라-13).

Table 라-13. Informations of extract in each groups

Group	Dose of EtOH (%)	Info. of extract	No. of Animals
Normal Control (NRC)	0	-	8
Negative Control (NC)	3	-	8
A	3	0.1% fermented <i>Hovenia dulcis</i>	8
B	3	0.3% fermented <i>Hovenia dulcis</i>	8
Positive Control (NC)	3	0.3% <i>Hovenia dulcis</i>	8

(나) 투여량 설정 및 투여 방법

○ 마우스를 그룹 당 8마리씩 한 개의 사육상자에 배치하였으며, 알코올 급여 실험에 일반적으로 사용되는 액상 타입의 Lieber DeCarli Diet 사료를 급여하였다. 정상 대조군에는 Lieber DeCarli Control Diet를 급여하였으며, Lieber DeCarli Ethanol Diet (3% EtOH)을 음성 대조군에, 양성대조군에는 발효하지 않은 0.3% 헛개 추출물을 함유한 Lieber DeCarli Ethanol Diet (3% EtOH)를 급여 하였다. 그룹 A와 B는 각각 0.1%, 0.3% 헛개 발효물을 첨가한 Lieber DeCarli Ethanol Diet (3% EtOH)를 4 주간 급여하였다(Figure 라-18).



Figure 라-18. Apparatus for measuring the feed consumption

(다) 시험의 실시

○ 이후 사료 섭취량을 1일 1회 확인하고, 실험동물의 체중을 3일 1회 측정 하여 기록하였다 (Figure 라-19).



Figure 라-19. Time schedule of the animal experiment

(라) 체중 및 장기 무게의 변화

○ 실험 시작 종료 후 모든 실험동물을 안락사 하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액

을 4°C에서 5분간 5,000 rpm으로 원심 분리, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

- 안락사 후 신장, 간, 비장을 분리하여 각각의 무게를 측정 하였다. 그 후, 간 조직의 절반을 조직 병리학적 분석을 위해 포르말데히드로 고정시켜 보존하고, 나머지 절반을 RNA 추출을 위해 -80°C 냉동고에 보관하였다.

(마) 생화학적 분석

- 간 손상 지표로 사용되는 Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 효소 활성 측정을 통해 간 손상을 확인 하였다. 이 효소의 활성 증가는 간 손상을 의미한다.
- 또한 혈중 지질 분석을 위해 저밀도 지단백질(LDL), 고밀도 지단백질(HDL), 중성 지방(TG) 및 유리 지방산을 ELISA법을 통하여 농도를 확인하였다. 실험에 사용된 ELISA 키트는 AST, ALT, LDL, HDL, Free fatty acid의 경우 Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO 63103, USA)제품을 사용하였고, 트리글리세라이드 측정은 abcam (Cambridge CB40F4, United Kingdom)제품을 사용하였다.

(바) 병리학적 분석

- 분리한 마우스의 간 조직을 10% 포르말린으로 고정하고, 에탄올(50-100%)을 이용하여 탈수 과정을 거친 후, xylene으로 세척, 파라핀에 고정하여 조직을 관찰하였다. 4~5 um 두께의 절편을 준비하고 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색으로 염색 한 후 현미경(DIXI3000, Leica, Wetzlar, Germany)의 100-400배 배율로 조직 병리학적 변화를 관찰하였다.
- 본 실험에서 결과를 간결하게 표시하기 위하여, 간에서 조직의 괴사, 염증 및 지방 변성의 정도와 같은 주요 병리학적 변화를 병변의 정도에 따라 0, 1, 2, 3, 4로 점수를 설정하여 채점하였다(0: 이상없음, 1: 미세한 변화, 2: 경증, 3: 중등도, 4: 중증). 도출된 결과는 병리학적 변화의 중요성에 따라 점수는 다음과 같은 가중치를 사용하여 곱하였다(지방 변성; 0.5, 염증 세포 여과; 1, 풍선 변성; 1.5, 괴사; 2). 이 가중 점수는 합계되어 결과표에 평균값±표준오차로 표시하였다.

(사) 유전자 발현 분석

- 마우스 간에서 지질 및 알코올 대사에 관여하는 효소의 유전자 발현 변화를 확인하기 위하여, 먼저 분리된 간 조직에서 RNA를 추출하였다. 50 mg 간 조직을 1 mL TRIZOL 용액을 첨가하여 파쇄한 후 추출은 TRIZOL 시약에 표기된 프로토콜에 따라 진행하였다.
- 추출된 RNA는 DEPC 처리된 증류수를 사용하여 2배로 희석하고, U-2800 분광 광도계 (Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하여 260 및 280 nm에서의 흡광도를 측정, RNA 농도(ug/mL)를 확인하였다. 이후 100 ng/mL의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이때 SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA 92008)를 사용하여 제공된 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다.

○ Real-Time PCR을 통한 유전자 발현 분석을 위하여, 목적한 알코올 및 지질 대사 관련 유전자의 프라이머(10 pmol) 각 1 uL, DEPC 처리된 증류수 9.5 uL 및 SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA) 12.5 uL을 PCR 튜브에 분주하고, 합성한 cDNA를 각 1 uL씩 첨가하여 Real-Time PCR을 진행하였다. Real-Time PCR은 CFX96 Touch™ Real-Time PCR 검출 시스템(Bio-Rad Laboratories Inc., Irvine, CA 92618, USA)을 사용하여 진행하였으며 실험 조건은 프라이머에 따라 다르다(Table 라-14).

Table 라-14. Primer informations for Real-Time PCR

Name	Forward	Reverse	Tm	Reference
PPAR- α	CGAAGACAAAGAGGCAGAGG	TGATGTCACAGAACGGCTTC	58	Murase, Takatoshi, et al
CPT-1	ACTCCTGGAAGAAGAAGTTCA	AGTATCITTGACAGCTGGGAC	58	Lee, Woo Je, et al
ACC	ACGAGCACACACAGTCCATG	GATGACCTCTGGATGTTCTTG	59	Murase, Takatoshi, et al
SREBP-1c	GTAGCGTCTGCACGCCCTA	CTTGGTTGTTGATGAGCTGGAG	57	Gomori A, et al
SCD-1	CCTACGACAAGAACAATCAATC	TTCTCTTAATCCTGGCTAAGAC	59	Murase, Takatoshi, et al
FAS	GGCTCAGCATGGTCGCTT	CTCCCGCCAGCTGTCATT	57	Gomori A, et al
Adh1	GTTGGAGAAGGGGTGACTTG	AGATCGCTTCGGCTACAAAA	58	Tan, Terrence CH, et al
Aldh2	GCCTCAGGTGGATGAAACTC	CGGTGGCTGGATAAGTAG	58	Tan, Terrence CH, et al
CAT	CGCCACATGAATGGATAATGA	GGTTTTTGATGCCCTGGTCA	58	Li, You-Gui, et al
GPX1	TTTCCCGTGCAATCAGTTCG	GGTGAGCCTTCTCACCATT	59	-
SOD1	GGGTCCACGTCCATCAGTA	ATTGCCAGGTCTCCAACAT	59	-
CYP2E1	CGCATGGAAGTGTTCCTGC	CAATGTAAACAGGGCTGAGGTC	59	Nixon, Belinda J., et al
PGC-1 α	AGCCGTGACCACTGACAACGAG	GCTGCATGTTCTGAGTGCTAAG	58	Lee, Woo Je, et al
β -actin	TGACAGGATGCAGAAGGAGAT	CTCCGCTTGCTGATCCACAT	58	-

(아) 통계분석

○ 실험을 통해 얻어진 데이터를 SAS SOFTWARE, Version 9.4를 사용하여 통계분석 하였다. ANOVA 및 Duncan's multiple range tests를 통해 3 회 반복 분석 후 결과를 평균값±표준 오차로 표현하였다. 이 과정을 통해 p<0.05의 결과값은 통계적으로 유의성이 있다고 간주한다.

(5) 시험 결과

(가) 마우스의 식이 및 체중, 장기무게 변화

○ 알코올 및 헛개추출물 발효액 급여가 생체에 미치는 영향을 확인하고자 실험동물의 체중, 장기무게 및 식이량 변화를 측정하였다(Table 라-15).

○ 정상대조군은 4 주에 걸쳐 체중이 21.1±0.8 g에서 29.2±2.0 g(증체량 8.1 g)으로 다른 그룹과 비교하여 높은 증체량을 보였으며, 음성대조군은 20.3±1.9 g에서 25.9±0.7 g(증체량 5.6 g)으로 다른 군보다 체중 증가가 적었다(p <0.001).

○ 헛개추출물 발효액을 급여한 그룹에서 실험 종료 시점의 체중 및 증체량은 음성대조군 보다 높았다(그룹 A는 26.3±0.6 g, 그룹B는 26.5±1.0 g). 반면에 체중에 대한 간 증량은 음성대조군에서 3.3%로 가장 높게 확인되었다.

Table 라-15. Mean of body weight, feed intake and liver index from mice

	Normal control	Negative control	A	B	Positive control
Initial body weight (g)	21.5±0.0	21.6±0.4	20.4±0.1	20.7±0.2	21.4±0.3
Final body weight (g)	29.5±0.6 ^{a*}	25.6±0.2 ^{c*}	26.4±0.2 ^{bc*}	27.0±0.3 ^{b*}	27.4±0.2 ^{b*}
Weight gain (g)	8.0 ^{a**}	4.0 ^{c**}	5.9 ^{bc**}	6.3 ^{ab**}	6.0 ^{b**}
Liver weight/Body weight	3.1%	3.3%	3.2%	3.1%	3.1%
Feed intake/each (g)	12.6	12.1	12.4	12.8	12.8

*Data have significantly different by Duncan's multiple range tests ($p < 0.001$), **Data have significantly different by Duncan's multiple range tests ($p < 0.01$)

(나) 병리학적 분석

- 알코올 유발 간 손상에 대한 헛개 추출발효물의 간손상 예방 효과를 평가하기 위하여 간 조직에서 조직 병리학적 변화를 확인하였다. 마우스 간에서의 병리학적 간 병변의 정도 및 증상의 중증도에 따라 평가하여 채점하였다(Figure 라-20. a,b).
- 음성대조군의 분석 결과는 1.67 ± 0.58 로, 염증 세포 침윤이 발견되었지만 간세포의 풍선 변성(ballooning degeneration) 및 괴사는 발견되지 않았다.
- 대조적으로, 헛개 추출물 급여군인 양성대조군과 헛개 추출발효물을 급여한 그룹 A, B의 간 조직 관찰 결과 알코올에 의한 대부분의 간 병변을 감소 시켰고, 특히 간 지방증과 염증 세포의 여과(filtration of inflammatory)가 각각 1.83 ± 0.44 , 1.17 ± 0.33 및 1.17 ± 0.67 로 확인되었다. 특히, 알코올로 인해 유발된 간 병변에 대한 결과는 그룹 A, B 군에서 음성대조군에 비하여 약 53% 유의하게 감소했음을 확인하였다.
- 헛개 추출발효물을 급여한 그룹 A와 B 군 사이의 점수는 유사하였고, 0.3% 농도로 급여한 그룹 B에서 대부분의 마우스는 가벼운 간 지방 변화(점수 0.5 점)를 보였으나 음성대조군과 달리 약간의 지방 변화와 부분적인 염증 세포(점수 2.5)를 보이는 개체는 확인되지 않았다. 헛개추출물을 급여한 양성대조군에서는 약간의 간 지방 변화와 염증 세포 침윤(0.5-1.5)이 확인되었다. 이러한 관찰 결과는 헛개 추출발효물의 급여가 알코올에 의한 마우스의 간 지방증을 예방할 수 있음을 시사한다.

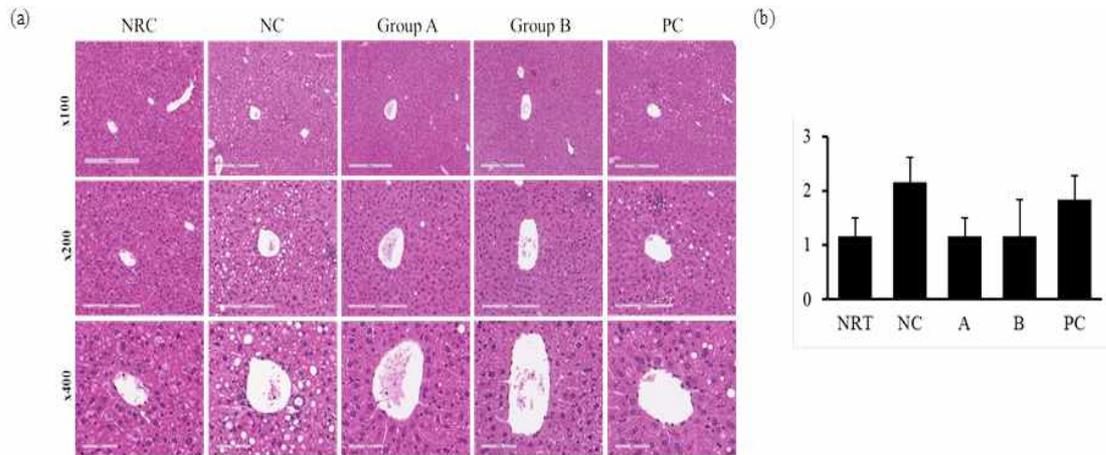


Figure 라-20. Results of histopathological analysis in mice. (a) effect of the fermented *Hovenia dulcis* on the histological changes in liver, (b) liver pathology score.

(다) Real-Time PCR을 통한 간 대사 관련 유전자의 정량적 분석

- 헛개 추출물 발효물이 간에서 알코올 탈수소 효소 활성(alcohol dehydrogenation), 항산화 효소 활성(antioxidant enzyme activity), 지방산 산화(fatty acid oxidation) 및 지방 생성(lipogenesis)과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 Real-Time PCR로 정량 분석하였다.
- Alcohol dehydrogenation에 관여하는 효소 ADH1, ADH2 및 CAT의 유전자 발현은 음성 대조군과 비교하여 헛개추출물 발효액을 급여한 그룹에서 증가하였다(Figure 라-21. a-c). 반면, CYP2E1과 lipogenesis 관련 효소의 유전자 발현은 헛개 추출물 발효액을 급여한 그룹에서 유의하게 억제되었다(Figure 라-21. d, j-m).
- 또한 antioxidant enzyme activity (SOD, GPx) 및 fatty acid oxidation (PPAR, PGC, CPT) 관련 효소의 유전자 발현은 음성대조군과 비교하여 발현량이 증가하였음을 확인 하였다(Figure 라-21. e-i).

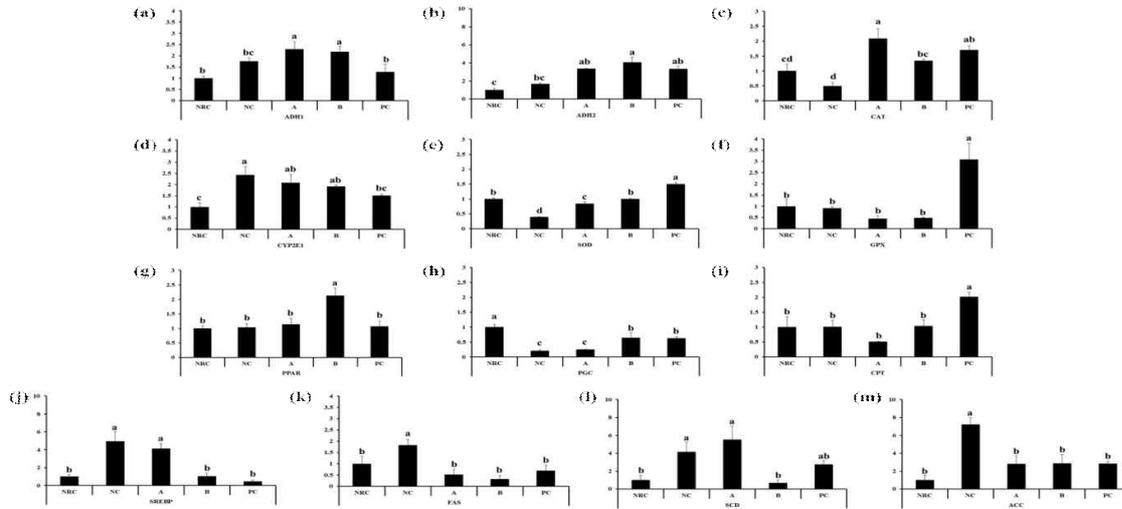


Figure 라-21. Analysis of gene expressions related alcohol metabolisms

(a) gene expression levels of alcohol dehydrogenase (ADH) 1; $p < 0.05$, (b) gene expression levels of ADH2; $p < 0.05$, (c) gene expression levels of catalase (CAT); $p < 0.01$, (d) gene expression levels of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1); $p < 0.05$, (e) gene expression levels of superoxide dismutase (SOD); $p < 0.001$, (f) gene expression levels of glutathione peroxidase (GPx); $p < 0.01$, (g) gene expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR); $p < 0.01$, (h) gene expression levels of PPAR γ coactivator (PGC); $p < 0.001$, (i) gene expression levels of carnitine palmitoyl-transferase (CPT); $p < 0.05$, (j) gene expression levels of sterol regulatory element-binding protein (SERBP); $p < 0.01$, (k) gene expression levels of fatty acid synthase (FAS); $p < 0.05$, (l) gene expression levels of stearoyl-CoA desaturase (SCD); $p < 0.05$, (m) gene expression levels of acetyl-CoA carboxylase (ACC); $p < 0.01$

(6) 결론

- 본 실험에서 알코올성 간 손상에 대한 헛개 추출발효물의 간기능개선 효과를 마우스를 이용하여 확인하였다.
- 실험 결과 그룹 간의 체중과 간 조직의 중량에서 차이를 확인하였으며, 알코올만을 급여한 마우스(음성대조군)는 체중이 다른 실험군에 비하여 유의적으로 낮게 확인되었고($p < 0.01$), 정상대조군과 비교하여 간 중량이 증가하였음을 확인하였다. 반면에 헛개 추출발효물을 급여한 그룹의 경우 알코올 투여로 인한 체중 감소 개선 효과가 있었고, 0.1% 헛개 추출발효물을 급여한 그룹 A에 비해 그룹 B(0.3 %급여)에서 평균 체중이 더 높았으며($p < 0.001$), 본 실험을 통해 도출된 결과는 헛개 추출발효물 급여가 알코올로 인한 체중 감소의 개선에 효과가 있음을 시사한다.
- 간에서 알코올 및 지질 대사 관련 효소의 유전자 발현 분석 결과, 알코올 섭취 마우스에서 alcohol dehydrogenation (ADH1, ADH2 및 CAT), antioxidant enzyme activity (SCD, GPx) 및 fatty acid oxidation (PPAR, PGC 및 CPT)과 관련된 효소의 유전자 발현은 억제되고, lipogenesis와 관련된 효소 SREBP, FAS, SCD 및 ACC의 발현은 음성대조군에서 증가함을 확인하였다. 이는 보고된 일반적인 경향과 일치하며, 따라서 본 연구 결과 헛개 추출발효물이 알코올 섭취로 인한 간 손상 예방에 효과가 있음을 시사한다.

- 특히, 헛개 추출발효물은 alcohol dehydrogenation와 관련한 효소의 유전자 발현을 촉진시키고, 간에서 lipogenesis를 억제하는 것에 효과적인 것으로 확인되었다. 또한 간에서 지방생성의 억제는 혈중 지질 농도에 영향을 미치는데, Lipogenesis를 통해 생성된 저밀도 지단백질(VLDL)은 트리글리세라이드(TG)와 결합하여 혈액에서 HDL 농도를 감소시키고 지방증을 유발한다고 알려져 있다.
- Figure 라-21에서 볼 수 있듯이, 헛개 추출발효물 급여군에서 lipogenesis 억제 효과가 확인됨에 따라 혈청 지질 농도 또한 연계하여 감소한 것으로 생각된다.
- 같은 맥락에서, 간세포의 병리학적 분석 결과를 설명할 수 있다. 지방증은 지방 생성 유전자의 발현 증가와 지방산 산화에 필요한 유전자의 발현 감소로 인해 발생하는데[Sana Bassiril and Richard C. Austin, 2008], 지방증은 알코올 섭취로 인한 간 손상 초기에 관찰되는 조직 병리학적 증상으로 일반적으로 간에서 중앙 정맥 및 문맥 주위에서 관찰된다. Figure 라-20에서, 헛개 추출발효물을 급여한 그룹의 마우스는 음성대조군과 비교하여 가벼운 간 지방 변성이 확인되었다.
- 결론적으로, 헛개 추출발효물은 알코올로 인한 체중 감소뿐만 아니라 혈중 지질 농도를 감소시키고, alcohol dehydrogenation 관련 효소의 유전자 발현 증진 및 lipogenesis를 억제함으로써 간에서 지방증 생성을 예방한다.
- 본 연구를 통하여 프로바이오틱 박테리아를 이용하여 발효한 헛개 추출물은 간기능 개선효과를 가진 기능성 소재로서 이용 가치를 가짐을 확인하였다.

라-5. 헛개발효물이 첨가된 숙취해소음료 시제품 개발

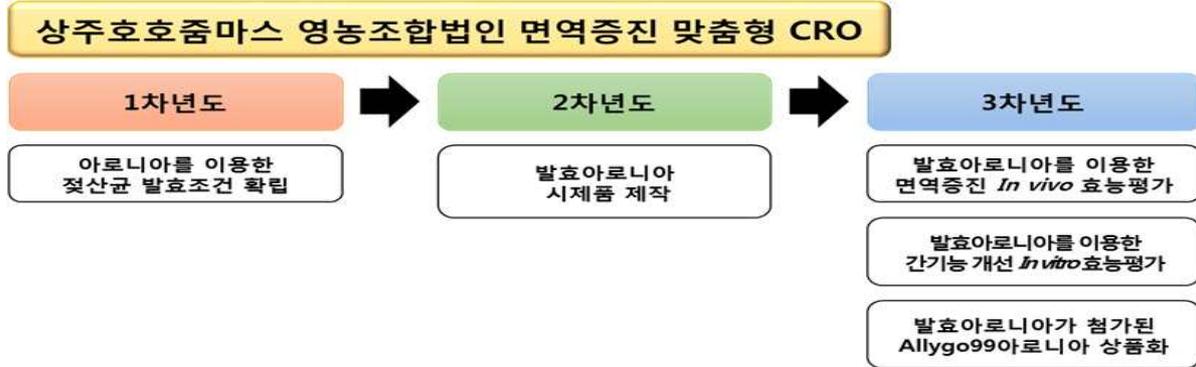


Figure 라-22. Production of prototype (hangover beverage) using fermented *Hovenia dulcis*

마. 아로니아 젖산발효물의 면역증진 효능평가 및 상품화 개발

(상주호호즙마스 영농조합법인)

마-1. 아로니아 젖산발효물을 이용한 면역증진 효능평가 및 상품화 추진일정



마-2. 아로니아 추출물의 젖산발효 조건 최적화 및 이화학적 분석

(1) 아로니아 추출물의 이화학적 분석

- *L. plantarum* EJ 2014의 젖산발효로 사용된 아로니아 배지의 pH, 산도를 포함한 이화학적 분석 및 무기질을 포함한 영양성분은 Table 마-1,2와 같다. 아로니아 배지의 무기질 성분 중 칼륨 함량이 $9,872.01 \pm 0.25$ mg/L 로 가장 높게 나타났다. 칼슘 $1,442.05 \pm 0.36$ mg/L, 마그네슘 962.14 ± 0.24 mg/L, 나트륨 159.36 ± 0.35 mg/L, 철 23.01 ± 0.12 mg/L, 인은 16.26 ± 0.35 mg/L, 망간은 15.12 ± 0.44 mg/L로 나타났다. 이와 같은 결과는 아로니아의 영양성분 분석을 한 연구결과 중 무기질 분석을 한 결과와 비슷한 경향을 확인하였다. 아로니아 착즙액의 수분 함량은 $93.33 \pm 0.04\%$ 를 나타내었다. 이후 아로니아 착즙액의 pH는 3.82 ± 0.01 , 산도는 $0.84 \pm 0.02\%$, 당도는 7.2 ± 0.1 °Brix 로 나타났다. 아로니아 원물에 대하여 환원당과 폴리페놀은 각각 $3.52 \pm 0.06\%$, 204.21 ± 2.35 µg/mL을 나타내었다. 플라보노이드 값은 30.12 ± 2.25 µg/ML으로 나타났다. 색도계를 이용하여 색도를 측정 한 결과 L: 15.12 ± 0.04 , a: 6.01 ± 0.03 , b: 2.12 ± 0.08 로 값이 나왔다.

Table 마-1. Basic physicochemical analysis of aronia extract

Moisture content	93.33%
pH	3.82
Acidity	0.84%
Soluble solid content	7.2 °Brix
Reducing sugar	3.52%
Polyphenol	204.21 µg/mL
Flavonoid	30.12 µg/mL
Chromaticity	L value: 15.12 a value: 6.01 b value: 2.12
Anthocyanin	0.0792 mg/100 mL

Table 마-2. Mineral analysis of aronia extract

Types	Content (mg/L)
K	9,872.01
Na	159.36
P	16.26
Mg	962.14
Ca	1,442.05
Fe	23.01
Mn	15.12

(2) 아로니아 젖산발효물의 이화학적 분석

- 아로니아 착즙액에 10% yeast extract 7 mL (0.7%), 30% MSG 7 mL (2%)를 첨가하여 9일간 30°C 정치배양 한 후 pH 및 산도를 측정된 결과는 Figure 마-1과 같다. pH와 총산은 발효진행 상황을 짐작할 수 있는 중요한 지표 중 하나로 이용된다. *L. plantarum* EJ 2014를 접종 전 발효 0일차 pH는 4.41로 나타났으며, 발효 1일차 *L. plantarum* EJ2014가 만들어내는 젖산으로 인해 pH는 3.86로 감소하였다. 발효 5일차 까지 pH는 감소하였으며, 발효 7일차 pH는 3.84로 pH 5일차 보다 소폭 상승하는 것을 확인 할 수 있었다. 마지막 9일차 발효물의 pH는 4.01을 나타내었다. 발효 3일차부터 pH가 증가한 이유는 MSG가 GABA로 전환되는 것을 의미한다. 비슷한 연구 결과로 김치에서 분리된 젖산균을 이용해 발효 중에 MSG 첨가 없는 배지에서 pH가 크게 감소하는 반면에 5% MSG를 첨가한 경우에 pH가 상승한다는 연구보고와 유사한 결과를 나타내었다. 아로니아 착즙액의 발효 0일차 산도는 0.74%로 나타났다. 이후 발효 1일차 젖산균이 만들어내는 산으로 인해 산도는 0.84%로 증가하였으며 발효 3일차는 1.08%로 나타났다. 발효 3일차 이후 발효 시간이 지남에 따라 산도는 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 발효 9일차 최종 발효물의 산도는 0.86%로 나타내었다.

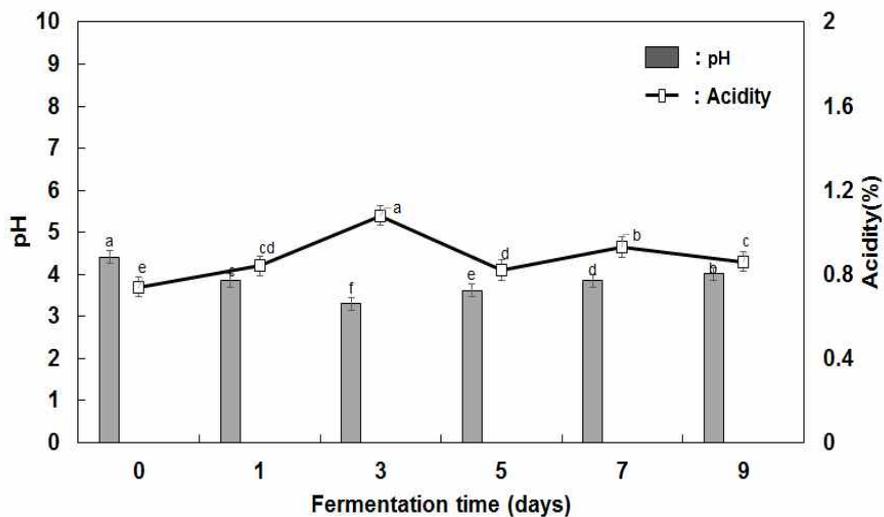


Figure 마-1. Changes in pH and acidity of the aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014. Each value is a mean±SD (n≥3); Different letters mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05)

- 수용성 고형분 결과는 Figure 마-2와 같다. 발효 0일차 수용성 고형분은 8.2 °brix를 나타내

었다. 발효 1일차 *L. plantarum* EJ2014 가 당을 이용하면서 생육이 시작함에 따라 수용성 고형분은 8 °Brix로 감소하였다. 이후 발효가 진행함에 따라 수용성 고형분 함량은 소폭 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

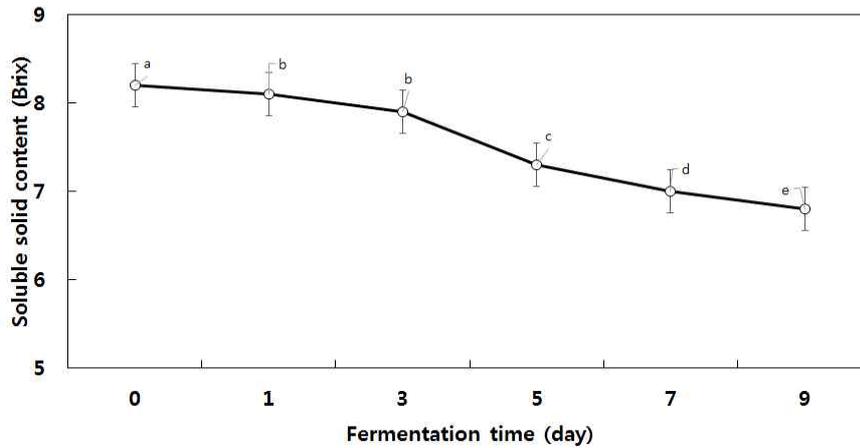


Figure 마-2. Change in soluble solid content of the aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014
Each value is a mean±SD (n≥3); Different letters mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05)

- 또한 젖산균의 생육의 중요한 급원인 환원당을 DNS 방법으로 측정 하였다. 표준곡선은 glucose를 이용하였으며 일차방정식 $y=0.4718x-0.3769$ 식으로 환원당 값을 계산하였다. 환원당 결과는 Figure 마-3과 같다. 아로니아 젖산발효 0일차 환원당 값은 4.1%로 나타났다. 발효 1일차 환원당 값은 1.74로 크게 감소하는 것을 확인하였다. 이후 발효가 진행함에 따라 환원당 값은 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 발효 7일차 환원당 값은 1.02%를 나타내었고 젖산발효 9일차 환원당 값은 0.86%로 나타났다.

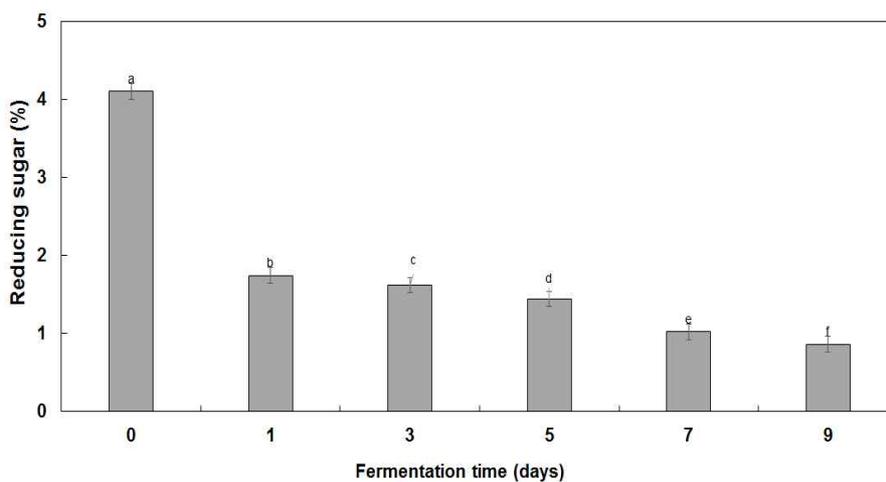


Figure 마-3. Change in reducing sugar of the aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014
Each value is a mean±SD (n≥3); Different letters mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05).

- 아로니아 착즙액 원액에 대하여 DPPH radical 소거능을 확인한 결과는 Table 마-3과 같다.

DPPH radical 소거 활성 법을 이용한 아로니아 착즙액 발효물의 항산화능을 측정한 결과는 발효하기 전 희석배수 10, 50, 100에서 각각 81.32%, 58.25%, 35.14%의 저해능을 보이는 것을 확인 할 수 있었으며 2.18 mg/mL IC₅₀ 값을 나타내었다. 아로니아 착즙액의 9일간 30°C 정치 배양후 radical 소거능은 희석배수 10, 50, 100에서 각각 75.32%, 53.21%, 39.21%로 나타났으며 IC₅₀ 값은 1.09 mg/mL로 IC₅₀ 값이 4.62 µg/mL인 항산화제 BHA보다는 소거활성이 낮았지만 아로니아 착즙액을 발효한 시료가 더 적은 농도에서 50%의 항산화 활성이 보이는 것으로 보아 발효 후에 어느 정도의 전자공여능이 향상되는 것으로 확인 되었다.

Table 마-3. Changes in DPPH of the aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014

Fermentation day	IC ₅₀
BHA (standard)	4.62±0.18 µg/mL
0 day	2.18±0.48 mg/mL
9 day	1.09±0.28*** mg/mL

Values represent the mean±SD (n=3). Significant differences were observed before and after fermentation using Student's *t*-test at *** *p*<0.001

- 아로니아 착즙액의 발효 0일차 폴리페놀 값은 213.79 µg/mL 이었다. 이후 *L. plantarum* EJ2014를 9일간 젖산발효를 진행함에 따라 폴리페놀 값은 완만하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 발효 3일차 아로니아 착즙 원액의 폴리페놀 값은 262.12 µg/mL이었고 발효 7일차 폴리페놀 값은 291.24 µg/mL를 나타내었다. 발효 마지막 날인 발효 9일차 312.54 µg/mL로 나타남에 따라 아로니아 효모발효를 하면서 항산화능이 증가하였다는 연구결과와 녹차 추출물의 젖산발효를 통한 γ-aminobutyric acid (GABA) 생산 및 생리활성평가에서도 젖산발효를 함에 따라 폴리페놀 값이 증가한다는 연구결과와 유사하였다.

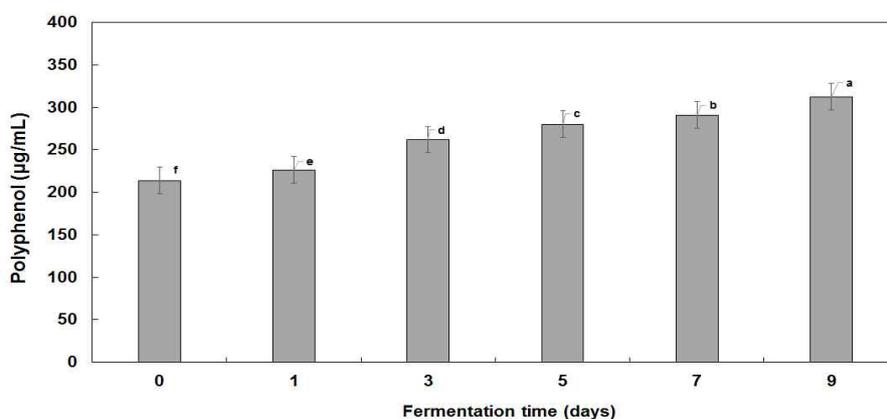


Figure 마-4. Changes in polyphenol of aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014
Each value is a mean±SD (n≥3); Different letters mean significant difference by Duncan's multiple range test (*p*<0.05)

- 플라보노이드는 gallic acid로 표준곡선을 그렸다. 아로니아 착즙 원액의 발효 0일차 플라보노이드 값은 34.23 µg/mL으로 측정되었다. 이후 폴리페놀과 유사하게 발효가 진행됨에 따라

플라보노이드 값도 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 발효 3일차 시료의 플라보노이드 값은 36.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 발효 7일차 플라보노이드 값은 37.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었고 발효 마지막 날 38.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었다.

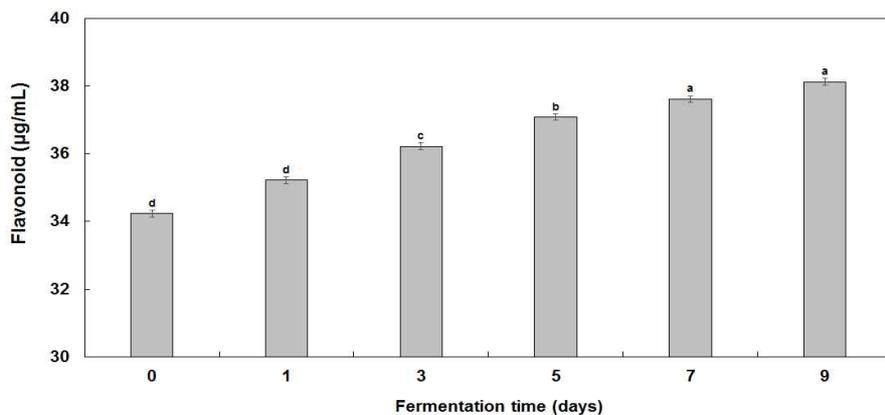


Figure 5. Changes in flavonoid of aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014
Each value is a mean \pm SD ($n\geq 3$); Different letters mean significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

Table 5. Changes in anthocyanin content of the aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014

	Fermentation time (days)					
	0	1	3	5	7	9
Anthocyanin (mg/ 100 mL)	0.0802 ^f	0.0814 ^e	0.0866 ^d	0.0882 ^c	0.0902 ^b	0.0912 ^a

Each value is a mean \pm SD ($n\geq 3$); Different letters in the same fermentation time mean significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

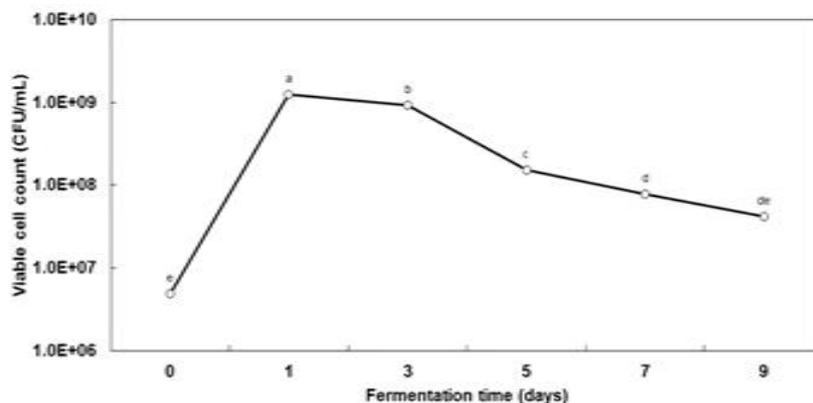


Figure 6. Viable cell count for aronia extract of *L. plantarum* EJ2014

Each value is a mean \pm SD ($n\geq 3$); Different letters in the same fermentation time mean significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

- 아로니아 착즙액 원액에 젖산균의 생육과 GABA 생산을 높이기 위해 10% yeast extract 7 mL, 30% MSG 7 mL을 첨가하여 9일간 젖산발효한 배양액을 TLC를 이용하여 GABA 생성능을 분석하였으며 이에 대한 TLC 결과는 Figure 마-7과 같다. 아로니아 착즙액을 9일 동안 젖산발효를 하였는데 발효 5일까지 MSG성분이 잔존하면서 GABA성분을 전환되지 않는 것으로 나타났다. 반면에 젖산발효 7일차부터 발효기간이 지속될수록 TLC상에서 MSG spot의 크기가 감소하면서, GABA spot의 크기가 증가하는 것을 확인하였다. 이후 발효 9일차까지 GABA spot의 농도가 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 발효 9일차에는 MSG가 대부분 전환 되면서 GABA 함량이 1% 이상 크게 증가하는 경향을 보였다.
- 아로니아 원액에 yeast extract, MSG를 첨가한 후 젖산발효 5일 동안 수행하여 얻어진 발효물의 GABA 함량을 HPLC로 정량 분석하였다. 결과는 Table 마-6과 같다. 정량분석한 결과 발효 전 기질인 glutamic acid는 대부분 이용되면서 초기 함량 13,251 µg/mL에서 발효 후 2,014 µg/mL로 수치가 감소하는 것을 확인하였고 10,412 µg/mL의 GABA가 전환되는 것으로 나타났다. 거의 소량만이 잔존하고 2.26%의 GABA로 전환되는 것으로 나타났다. 최근 까지 아로니아 원액을 배지로 하여 젖산발효에 의한 GABA 생산에 관한 연구보고는 없는 것으로 사료되며, 일부가 GABA로 전환됨을 확인함으로써 본 실험은 유용 젖산균을 이용하여 높은 농도의 전구물질 MSG를 효과적으로 전환시킴으로서 고농도 GABA생산은 매우 유용한 연구결과라고 판단되었다.

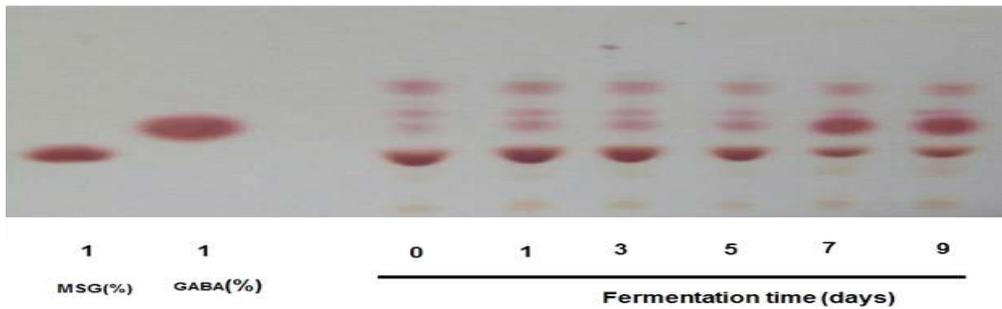


Figure 마-7. Changes in GABA production of fermented aronia extract by *L. plantarum* EJ2014

Table 마-6. Changes in anthocyanin of the aronia extract fermented by *L. plantarum* EJ2014

Fermentation (day)	Glutamic acid (µg/mL)	GABA (µg/mL)
0	13,251±9.44	N.D*
9	2014±5.51	10,412±7.42

*N.D: Not detected

마-3. 아로니아 발효물을 이용한 간기능개선 *In vitro* 효능평가

- 아로니아 젖산발효물을 이용하여 AML12 세포(마우스 유래 간세포)를 이용하여 간세포 보호 효과를 확인하였다. H₂O₂는 활성 산소종의 하나로서 세포내에서 대사과정 중에 발생하며 세포내 지질, 단백질, 핵산 등을 변형시켜 세포 독성을 나타낼 뿐만 아니라 매우 동적이 강한 hydroxyl radical의 source이기도 하다. 배양한 AML12 세포에 H₂O₂를 처리하기 24시간

전에 발효물을 200, 400, 600 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 배지를 제거한 후 7 mM H_2O_2 를 새롭게 1시간 동안 처리하고 세포 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 아로니아 발효물은 H_2O_2 처리에 의한 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과가 나타나지 않았으며 이는 발효 전·후에서 모두 같은 결과를 나타내었다.

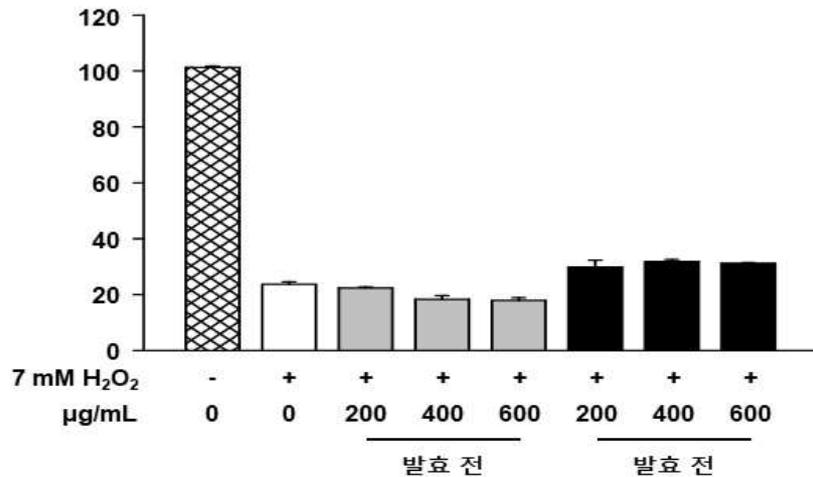


Figure 마-8. Effect of the fermented aronia extract on the protection of oxidative stress in hepatocyte

마-4. 아로니아 발효물의 면역증진 *In vivo* 효능평가

(1)서론

- 약용 식물은 인체에 유익한 비타민, 무기물, 알칼로이드, 사포닌 및 폴리페놀 화합물 등을 풍부하게 포함한다고 알려져 있어(Agbarya et al., 2014; Muszyńska et al., 2015), 최근 다양한 식물 추출물을 이용한 건강기능식품에 대한 관심이 커지고 있다.
- 크랜베리, 블루베리, 딸기 및 아로니아 딸기와 같은 여러 종류의 열매들 중에서 아로니아는 가장 많은 양의 항산화 물질을 함유한 것으로 보고된 바 있다(Broncel et al. 2007, Naruszewicz et al. 2007, Olas et al. 2008, Skupien et al. 2008, Valcheva-Kuzmanova et al. 2007). 특히 아로니아는 대표적인 항산화 물질로 알려진 폴리페놀을 풍부하게 함유하고 있는데, 이는 건강한 사람들과 당뇨병 및 심혈관 질환을 가진 환자 모두에게 긍정적인 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Borowska and Brzóska, 2016).
- 아로니아에서 발견되는 항산화 물질은 유리 라디칼로 인한 손상으로부터 세포를 보호하고 항산화 효소의 활성을 증가시키는 효과를 가진다고 알려져 있다(Francik et al., 2014; Mikulic-Petkovsek et al., 2012).
- 아로니아 추출물은 유방암 환자의 혈액 세포에서 산화 스트레스를 감소시키는 것으로 여겨지며(Kedzińska et al., 2009), 또한 IL-6, IL-8 및 TNF- α 와 같은 전-염증성 사이토카인의 방출을 억제하여 소염 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(Appel et al., 2015).

○ 또한, 아로니아는 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균 활성뿐만 아니라 요로 감염의 원인이 되는 박테리아에 대한 항균 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Bräunlich et al., 2013b; Handeland et al., 2014, Liepina et al., 2013).

○ 아로니아는 항산화 및 항염증 효과를 가지며, 숙주의 면역 활성화에 기여할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서 본 실험에서는 마우스에 발효 및 비발효된 아로니아 추출물을 투여, 면역 기능 활성화의 효과를 확인하고자 하였다.

(2) 시험물질

○ 계명대학교로부터 아로니아 및 아로니아추출 발효물을 액상으로 전달 받아 실험에 사용하였다.

(3) 시험계 및 사육환경

(가) 실험동물 윤리규정

- 승인번호 KNU 2017-0046-1: 아로니아와 동충하초 추출발효액의 면역증진 효능평가와 어린이용 청국장 발효액의 체지방 억제능에 관한 효능 평가

(나) 시험계

○ 계통 및 종: 실험용 흰쥐 (BALB/c)

○ 공급원: 주식회사 오리엔트

○ 동물의 성, 수 및 주령: 암컷 60마리 (5주령)

○ 본 시험에 사용한 BALB/c 마우스는 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부하므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.

○ 실험동물의 사육환경은 온도 20°C-24°C, 습도 50%-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(4) 시험방법

○ 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 '면역 기능 개선에 도움을 줄 수 있음' 편, <면역기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오 마커>를 참고하여 진행하였다.

(가) 시험군의 구성

○ 마우스를 임의로 12마리씩 분류, 총 7 개의 그룹으로 나누었다

Table 마-7. Description of treatment groups

Groups	Description
Group I	Normal control group: received only water
Group II	Negative control group: Received only water and treated with SRBC
Group III	Positive control group: received known immunostimulator (Levamisol, 10 mg/kg)
Group IV	Treatment group: received 125 mg/Kg of fermented aronia extract
Group V	Treatment group: received 250mg/Kg of fermented aronia extract
Group VI	Treatment group: received 500 mg/Kg of fermented aronia extract
Group VII	Treatment group: received 250 mg/Kg of non-fermented aronia extract

(나) 투여량 설정 및 투여 방법

- 실험 진행 시 정상 대조군(Normal control)을 제외한 모든 실험동물에 아로니아추출물을 14 일 동안 200 μ L (125 mg/kg, 250 mg/kg 및 500 mg/kg의 아로니아 추출물, 250 mg/kg 비발효 아로니아 추출물)을 1일 1회 경구 투여하였다.

(다) 시험의 실시

- 각 그룹 당 실험동물을 6마리씩 투여 후 14일째에 희생시키고 나머지 마우스는 15일째에 밀리리터 당 5.0×10^8 /mL sheep red blood cells (SRBCs)를 복강 내에 주사하여 면역을 유도한 후, 추출물을 추가로 일주일 동안 경구투여 하였다.

(라) 체중 및 장기 무게의 변화

- 실험동물의 체중을 3일 1회 측정하여 투여량을 조절하였으며, 마우스를 희생시킨 후 심장 채혈하여 Heparin Blood collection tube에 보관, 5분간 10,000 rpm으로 혈장을 원심 분리하여 -70°C 에 보관하였다. 이후 ELISA 분석법을 통해 항체를 확인하는 실험을 진행하였다.
- 또한 각 개체에서 간, 신장, 비장 및 흉선을 무게 측정 후 실험을 위해 -70°C 에 보관하였다.

(마) 호중구의 분리 및 계수

- 채취한 혈액에서 호중구를 Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 분리하였다. 동일한 부피의 Histopaque를 첨가하고 실온에서 30 분간 400xg에서 원심분리 하였다.
- 이후 상등액을 제거한 후 PBS를 첨가하여 표면을 세척, 250xg에서 10분간 3회 원심 분리 하였다. 최종적으로, 10% FBS를 함유한 DMEM을 첨가하여 펠렛을 부유 시킨 후 Trypan-Blue 염색법을 사용하여 세포를 계수 하였다.

(바) 호중구의 식세포 활성 측정

- 호중구의 식세포 활성은 Cytoselect™ 96-well phagocytosis assay (*E. coli*)(Cell Biolabs, INC. CA, USA)를 사용하여 수행 하였다.

- 96 well plate에 세포를 10^6 cell/mL 농도로 100 uL 씩 분주한 후 10 uL의 *E. coli* 현탁액을 플레이트에 첨가한다. 이 혼합물을 5% CO₂의 존재 하에 37°C에서 6시간 동안 배양 하였다. 원심 분리 후 배지를 제거하고 세포를 200 uL의 1X PBS로 세척하였다. 이후 세포를 실온에서 100 uL의 고정액을 첨가하여 5분간 배양하였다. 고정 용액을 제거하고 세포를 1X PBS로 2회 세척하고 100 uL의 1X blocking solution을 첨가하고 실온에서 30분 동안 교반기에서 배양하였다.
- 마지막으로 100 uL의 기질을 첨가하여 반응을 시작하고 20분간 배양한 후 100 uL의 stop solution을 첨가하고 Versamax ELISA reader (Molecular devices, USA)를 사용하여 450 nm의 흡광도에서 값을 측정하였다.

(사) 호중구의 이동상 분석

- Cytoselect™ 24 well 세포 이동 분석키트(3 um, fluorometric format)(Cell Biolabs, INC. CA, USA)을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 호중구 이동을 분석하였다. 호중구를 상기 언급 된 바와 같이 분리하고 혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배지에 세포를 5×10^6 cell/mL을 300 uL을 첨가한다. 그리고 10% FBS를 함유하는 배지 500 uL를 migration plate의 하단에 첨가 하였다.
- 세포를 8시간 배양한 후 세포 상등액 200 uL을 깨끗한 well로 옮기고 37°C에서 30 분간 배양하였다. 세포는 멤브레인의 하부로부터 완전히 제거되고, 추가적으로 세포로부터 400 uL의 배양액을 분리하였다.
- 마지막으로, 180 uL의 샘플을 96-well plate로 옮기고 4X Lysis Buffer/CyQuant® GR 염료 60 uL를 첨가한 후 실온에서 20 분간 배양하였다. 혼합물을 200 uL씩 96 well plate 옮긴 후 fluorescence plate reader로 플레이트를 480 nm/520 nm에서 형광값을 측정하였다.

(아) MAC I 발현 및 T-림프구 표현형에 대한 유동세포 계측 분석

- PBS, 10% FCS 및 1% sodium azide를 이용하여 비장세포 (5×10^6 cell/100 uL) 및 MAC-1 발현 호중구(5×10^6 cell/100 uL)의 T-림프구를 분리하여 FACS tube에 보관하였다.
- 접합 항체(10 ug/mL)를 첨가하고 세포를 30분간 암반응한 후 교반하여 항온배양기에서 배양 하였다. 세포를 Flow Cytometry Staining Buffer로 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거한 다음, 300xg에서 5분간 원심 분리하였다. 이후 세포를 세척하고 유세포 분석을 위한 완충 용액 200 uL로 재현탁 하였다.
- 마지막으로 BD FACSAria™III (BD Biosciences, CA, US)에서 FACSDiva 버전 6.1.3 소프트웨어를 사용하여 다중 색상 FACS를 사용하여 데이터를 분석하였다. 다른 T-림프구 하위 집단(CD4, CD8, CD11b 및 CD18) 사이에서 그룹간 비교 분석 하였으며, 결과는 백분율로 나타내었다.

(자) 백혈구 분석

- URIT-3000 Vet Plus 혈액 분석기를 사용하여 혈액을 분석하였다. 헤파린을 처리한 튜브를 사용하여 전혈을 채취하여 분석하였다. 각 군당 2마리의 혈액을 2회 반복 분석하여 평균 결과를 사용하였다.

(차) 비장세포의 분리

- 앞서 설명한 방법으로 비장세포를 처리하였다(Ahmad et al., 2015). 실험동물을 희생시킨 후, 비장 및 기타 기관을 모든 실험군에서 무균적으로 분리하여 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco Life Technologies, NY)를 포함한 멸균 튜브에 넣고 ice상에서 보관하였다.
- 분리한 비장을 3 mL 주사기 상에 70 um 미세 나일론 셀 스트레이너(BD Biosciences, CA)를 부착하여 압축 하였다. 압축된 세포를 스트레이너를 사용하여 과량의 HBSS로 세척하였다. 이후 세포 현탁액을 1,600 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고, 적혈구 용해 완충액(Sigma, UK) 1 mL로 재현탁한 후 37°C에서 1분간 배양하여 적혈구를 용해시키고 HBSS를 첨가하였다.
- 다음으로, 세포를 4°C에서 1,600 rpm으로 5분간 원심 분리 후 세포를 원심 분리하고 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 그 후, 상층액을 제거하고, 10%(v/v) FBS, 100 unit/mL의 페니실린 및 100 ug/mL의 스트렙토마이신을 첨가한 RPMI-1640배지(10% FBS, 1% P/S, Sigma-Aldrich, MO)를 이용하여 세포를 현탁하였다. 세포수는 the trypan blue dye exclusion method을 사용하여 hemocytometer로 측정하였다.

(카) 비장세포에서 림프구 분석

- 대조군과 처리군의 비장세포(4×10^6 cells/mL)를 RPMI-1640배지(10% FBS, 1% P/S)의 96 well plate에 200 uL/well 농도로 분주한 후, 각 그룹의 세포를 mitogen이 없는 상태에서 concanavalin A (5 ug/mL) 또는 LPS (10 ug/mL)의 존재 하에 37°C에서 72 시간 동안 배양하였다. 결과는 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 시약 분석을 사용하여 분석하였다. 증식 지수는 샘플의 OD값을 기준 OD값으로 나누어 계산하였다.

(타) 사이토카인 및 면역 글로불린 측정

- Microparticle cocktail 50 uL이 첨가된 plate에 샘플, 대조군 및 standard를 교반기에서 실온에서 2시간(사이토카인), 30분(면역 글로불린) 동안 배양하고, 이후 50 uL의 표준 또는 샘플을 각 well에 추가로 첨가하였다.
- 4회 세척 후, 희석한 Biotin Antibody Cocktail 50 uL 각 well에 첨가하고 실온에서 1.5시간 동안 교반기 상에서 배양하였다. 희석된 Streptavidin-PE (50 uL)를 각 well에 첨가, 세척 후 실온에서 30분 또는 15분 동안 반응을 진행하였다.

- 마지막으로, 각 well에 washing buffer를 100 uL를 첨가하여 microparticle을 재현탁하고 2분간 상온에서 반응시킨다. 이후 Luminex MAGPIX 분석기(Luminex, Austin, TX, USA)를 사용하여 값을 측정하였다. 각 샘플은 특정 비드에 부착된 해당 항체와 독립적으로 반응하였으며, 샘플의 농도는 표준 곡선이 five parameters logistic curve-fit (Master Plex QT 2010 (MiraiBio, Hitachi, CA, USA))를 사용하여 나타내었다.

(과) 통계분석

- 모든 결과값은 GraphPad Prism 7 software를 사용하여 Dunnett 's test와 Tukey 's test에 따라 편도 및 양방향 분석법을 기반으로 통계처리하였고, 결과는 평균±표준오차로 표현하였다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의성을 가짐을 나타낸다.

(5) 시험 결과

(가) 마우스의 식이 및 음수량

- 아로니아 투여군의 식이량 및 음수량은 대조군과 유의한 차이가 없었다. 또한 용량 의존적 관계는 유지되지 않았다(Figure 마-9). SRBC 투여군의 사료 섭취량은 92.84-132.06 g, SRBC를 투여 하지 않은 군의 경우 353-372 g이었다. 유사하게, 물 섭취량은 각각 SRBC 처리 군과 비 처리 군에서 126.47-129.25 mL와 381-421.12 mL였다.

(나) 체중 및 장기 무게의 변화

- SRBC를 투여하기 전 마우스 체중은 투여량 의존적인 관계를 나타내었다. 체중 증가량은 아로니아 투여군에서 2.6-2.95 g/each로 확인되었으나 그룹간 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Figure 마-10, A). 반대로 SRBC 투여 후 마우스의 체중은 감소하여 3주간 아로니아를 투여한 결과 0.66-1.09 g으로 증가하였다(Figure 마-10, B). 그러나, SRBC를 항원으로 투여 한 그룹에서는 투여량 의존적인 관계가 유지되지 않았다.
- 실험 종료 후 장기(비장, 간, 흉선 및 신장)를 분리, 각각 무게를 측정하였다. 장기 무게는 투여물질과 용량 의존적인 관계가 없으며 그룹간에 유의한 차이가 있었다(Table 마-8,9).

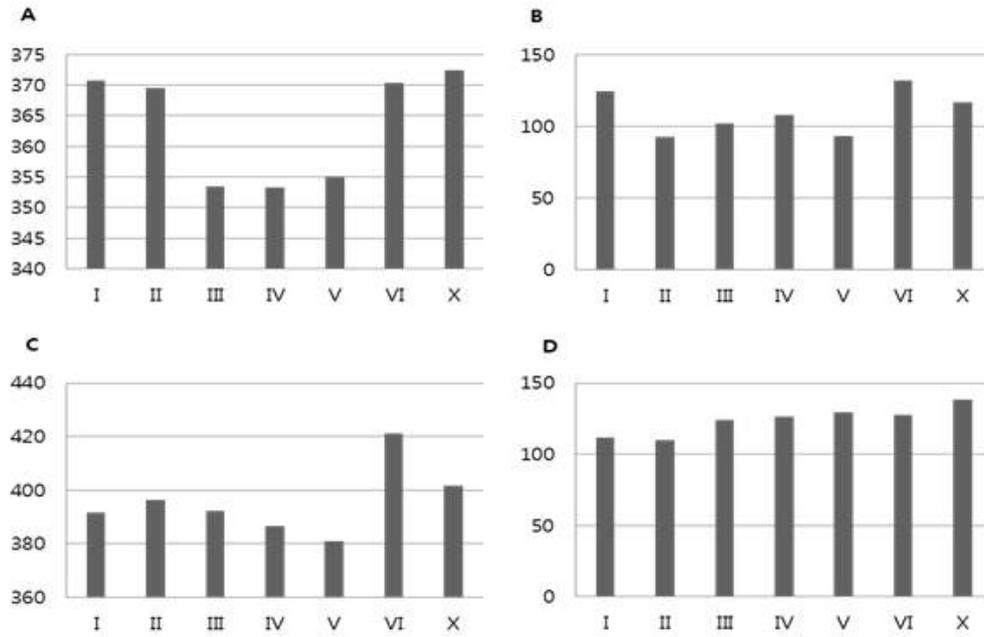


Figure 9. Feed and water consumption before and after treatment with SRBC. A mean of six mice in one group is presented. A, Feed consumption before SRBC treatment; B, Feed consumption after SRBC treatment; C, Water consumption before SRBC treatment and D, Water consumption after SRBC treatment. The result shows total feed and water consumption for two weeks for mice not received SRBC and one week for mice which received SRBC

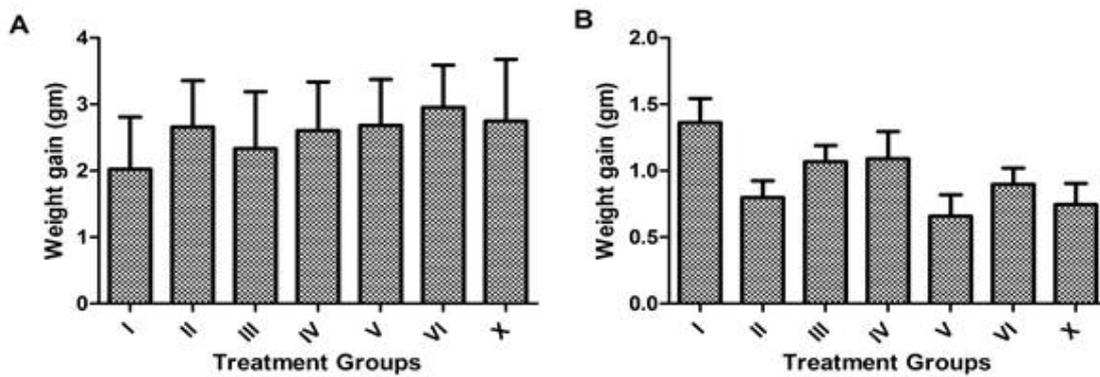


Figure 10. Body weight gain of mice before (A) and after (B) antigen (SRBC) administration. The mean and SEM for six mice is indicated in the Figure

Table 마-8. Weight of internal organs before treatment with SRBC

Group	Spleen	Liver	L. Kidney	R. Kidney	Thymus
I	0.05±0.01	0.7±0.013	0.09±0.007	0.09±0.013	0.05±0.006
II	0.06±0.006	0.62±0.023	0.1±0.009	0.1±0.01	0.06±0.003
III	0.07±0.003	0.68±0.063	0.09±0.007	0.1±0.003	0.04±0.003
IV	0.06±0.003	0.69±0.022	0.09±0.006	0.12±0.003	0.04±0.006
V	0.06±0.006	0.65±0.03	0.1±0.006	0.1±0.007	0.05±0.006
VI	0.05±0.003	0.72±0.03	0.09±0.006	0.1±0.003	0.04±0.003
X	0.06±0.003	0.6±0.023	0.09±0.003	0.09±0.003	0.04±0

Table 마-9. Weight of internal organs after treatment with SRBC

Group	Spleen	Liver	L. Kidney	R. Kidney	Thymus
I	0.07±0.012	0.77±0.029	0.1±0.003	0.11±0.003	0.04±0.006
II	0.08±0	0.77±0.029	0.1±0.003	0.11±0.003	0.03±0.007
III	0.08±0.007	0.81±0.026	0.1±0.003	0.10±0.007	0.05±0.003
IV	0.07±0.009	0.73±0.023	0.1±0.003	0.09±0.003	0.04±0
V	0.08±0.015	0.77±0.026	0.12±0.003	0.12±0.007	0.05±0.007
VI	0.06±0.003	0.71±0.039	0.11±0.013	0.1±0.015	0.05±0.012
X	0.1±0.009	0.8±0.017	0.12±0.007	0.12±0.003	0.04±0.006

(다) 호중구의 식세포 활성 측정

- 호중구의 식세포 활성은 SRBC를 투여하기 전 마우스로부터 채혈하여 *E.coli* 기질을 갖는 Cytoselect TM 96 well plate assay kit를 사용하여 확인하였다. 그 결과 아로니아를 투여한 그룹에서 호중구의 식세포 활성이 용량 의존적으로 증가함을 확인하였으며, 본 시험은 2회 반복 시험하였다(Figure 마-11).
- 125, 250 및 500 mg/kg의 투여량으로 발효한 아로니아를 투여한 그룹에서 호중구의 식세포 활성은 발효되지 않은 아로니아를 투여한 그룹의 호중구와 비교하여 각각 82.7%, 157.645% 및 244.95% 증가하였다.

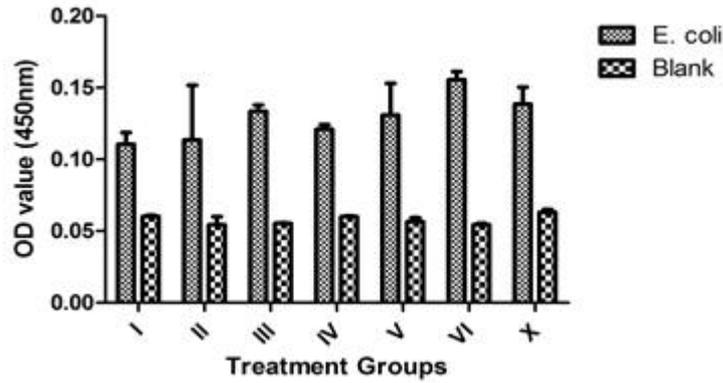


Figure 11. Neutrophil phagocytic activity of fermented and non-fermented aronia berry extract

(라) 호중구의 이동상 분석

○ Cytoselect™ 24 well 세포 이동 분석법을 사용하여 호중구의 이동상을 측정하였다. 아로니아를 투여한 그룹에서는 용량 의존 관계가 확인되었다. 이동 활성은 125, 250 및 500 mg/kg의 용량으로 발효 아로니아를 투여한 그룹에서는 각각 16.8%, 37.85% 및 65.51% 증가하였다. 반면 발효되지 않은 아로니아를 투여한 그룹(250 mg/kg)에서는 의 이동은 52.14% 증가하였다(Figure 12).

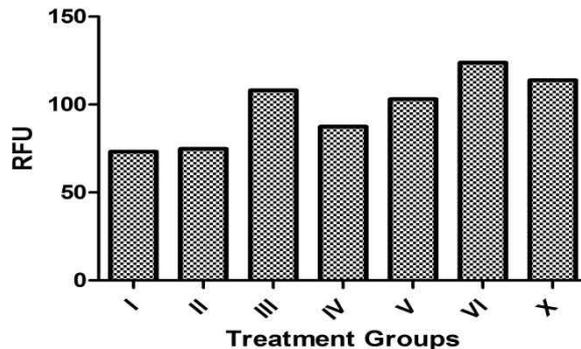


Figure 12. Neutrophil migration assay of fermented and non-fermented aronia berry extract

(마) MAC I 발현 및 T-림프구 표현형에 대한 유동세포 계측 분석

○ T-helper cell (CD-4)과 T-cytotoxic cell (CD-8)의 발현은 저용량 투여군에서 더 높았다. 모든 경우에서 CD-4의 발현은 양성 및 음성 대조군보다 추출물을 급여한 군에서 더 높게 측정되었으며, 125, 250 및 500 mg/kg 용량의 발효 아로니아 추출물은 CD-4 및 CD-8 세포에 대해 각각 30.2%, 25.4% 및 28.5%, 19.5%, 그리고 15.7%, 15.4%의 발현율을 보였다. 비발효 추출물의 발현은 각각 CD-4와 CD-8의 경우 23.2%와 13.4%였다(Figure 13).

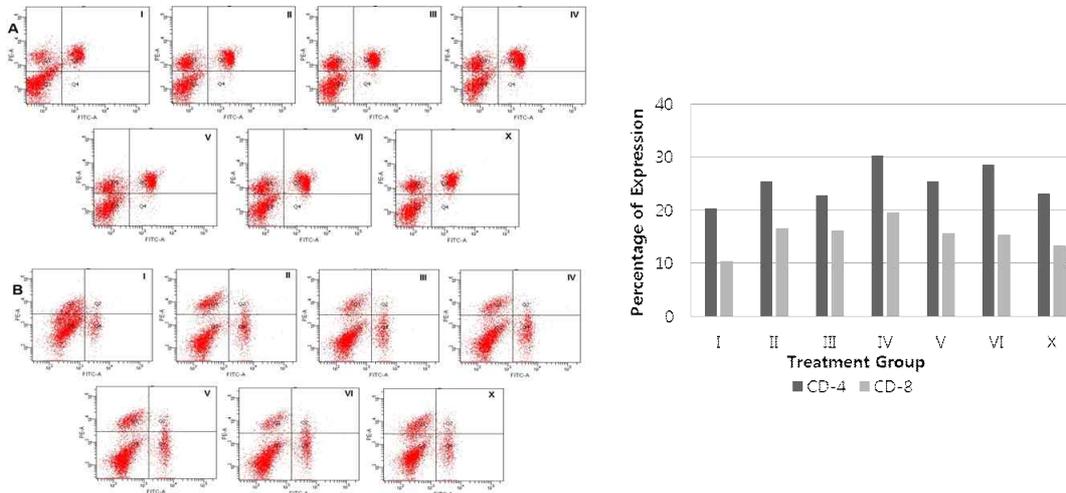


Figure 13. FACS analysis of CD-4 (A) and CD-8 (B) expression of mouse spleen cell after treatment with fermented and non-fermented aronia berry

(바) 비장세포에서 림프구 분석

- 마우스의 비장 세포수는 대조군보다 투여군에서 유의하게 높았다. 125, 250, 500 mg/kg의 발효 아로니아와 250 mg/kg 용량의 비발효 아로니아를 급여한 그룹의 경우 대조군과 비교하였을 때 비장세포 수가 각각 0.5, 1.6, 4.7 및 5.2배 증가한 것으로 확인되었다(Figure 14).

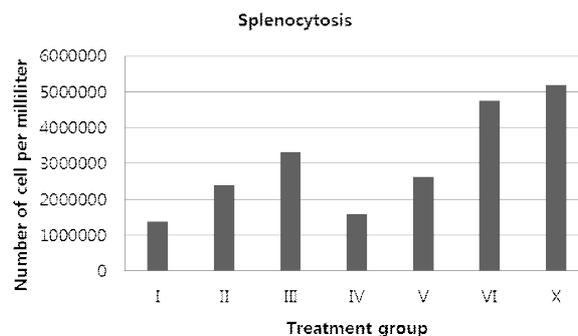


Figure 14. Splenic cell count after treatment with aronia berry extract in mice. Mice received SRBC after treatment for 15 days with aronia berry extracts and spleen cell were collected on day 21

- Con A (5 ug/mL)와 LPS (10 ug/mL)를 사용하여 아로니아가 마우스 비장의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 추출물은 비장 세포의 증식을 용량 의존적으로 증가시키는 것으로 확인되었다. Con A 활성화는 비장 증식을 53.85%, 75.23% 및 83.67% 증가시켰으며 LPS는 125, 250 및 500 mg/kg의 농도에서 발효된 아로니아를 투여한 마우스의 비장 세포 증식을 각각 36.77%, 43.68% 및 39.97% 증가시켰다. 반면 비발효 아로니아 추출물을 급여한 마우스에서 비장의 증식은 Con A와 LPS 활성화에 대해 각각 78.25%와 84.05%였다(Figure 15).

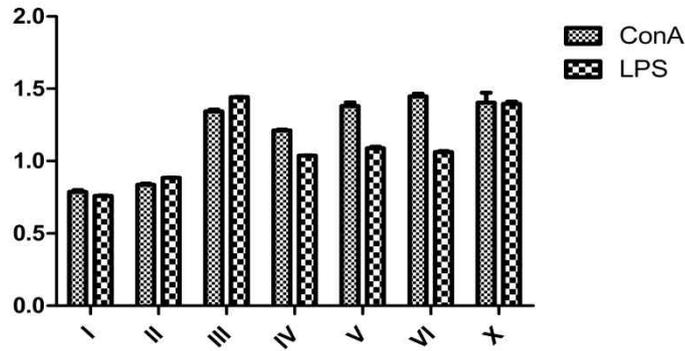


Figure 마-15. Proliferation of spleen cells treated by aronia berry extract with CON-A and LPS

(아) 사이토카인 및 면역 글로블린 측정

- 125, 250 및 500 mg/kg 농도의 발효 아로니아 추출물을 투여한 마우스의 경우 IFN- γ 가 각각 46.1%, 68.57% 및 81.86% 증가하였으며 비발효 아로니아 추출물을 투여한 마우스의 경우 44.29% 증가하였다. 또한, IL-2 수치는 125, 250 및 500 mg/kg 농도의 발효 아로니아 추출물 급여군에서 각각 188.18, 240.33% 및 437.9% 증가하였으며, 이는 용량 의존적으로 증가함을 확인하였다. 발효 추출물을 처리한 그룹에서 IL-4의 수준은 또한 복용량에 따라 증가하는 것으로 나타났다.
- 발효 아로니아 추출액을 각각 125, 250 및 500 mg/kg 및 261.98 pg/mol의 농도로 투여한 군에서 166.21, 252.27 및 365.61 pg/mol의 평균값을 확인하였다. 반면, 추출물은 IL-6 및 TNF- α 의 방출을 감소시키는 것으로 나타났다. IL-6 확인 결과 125, 250, 500 mg/kg 농도의 발효 아로니아와 250 mg/kg의 비발효 아로니아 추출물을 투여한 마우스에서 각각 12.08%, 22.86%, 44.41% 및 28.34%로 IL-6가 감소함을 확인하였다. 반면, TNF- α 는 각각 16.01%, 38.49%, 57.59% 및 45.28%로 용량 의존적으로 감소함을 확인하였다(Figure 마-16).

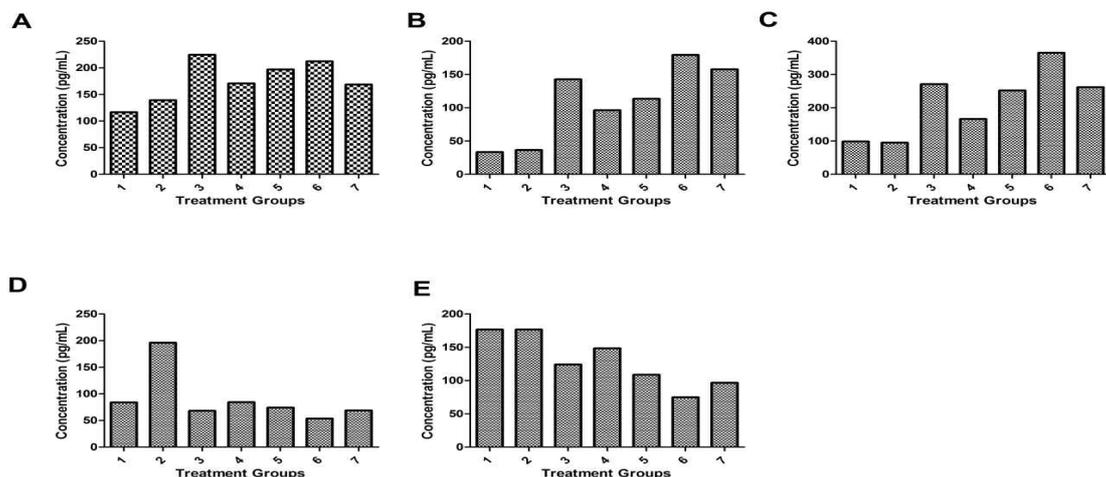


Figure 마-16. Cytokine profile of mice plasma treated fermented and non-fermented aronia berry.

(6) 결론

- 발효 아로니아 추출물은 마우스에서 호중구의 이동과 식균작용을 증가시키는 것으로 나타났다. 추출물은 마우스 비장세포의 수 및 증식을 증가시켰다. T-세포에서 아로니아의 효과를 확인하기 위하여 Con A 처리를 통한 실험 결과, 아로니아를 투여한 군에서 세포의 증식이 두드러짐을 확인하였다. B-세포 또한 증식이 확인되었으나, 그 관계는 용량 의존적이지 않았다.
- 발효 아로니아 추출물의 저용량 투여군에서 CD-4 및 CD-8 세포의 발현을 유의적으로 증가하였음을 확인하였고, 발효 및 아로니아 추출물 모두에서 IL-4, IL-2 및 IFN- γ 의 발현이 증가함을 확인하였다. 그러나, IL-6 및 TNF- α 의 수준은 감소하였으므로, 발효 아로니아 추출물은 항염증 활성을 가짐을 확인하였다.
- 상기 결과로부터, 발효 아로니아 추출물은 BALB/c 마우스에서 면역 자극 효과를 갖는다고 할 수 있다.

마-5. 아로니아 발효물이 첨가된 시제품 및 상품화 개발

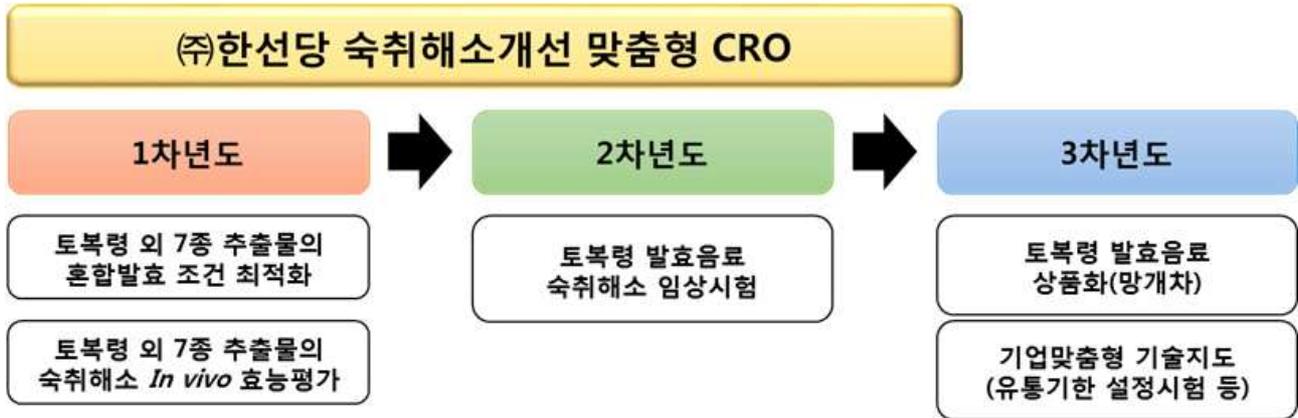


Figure 마-17. Commercialized Aronia product (Allygo99Aronia) with fermented aronia

바. 토복령(망개뿌리)의 7종 한약재 추출물의 혼합발효를 통한 숙취해소 효능평가 및 제품개발

((주)한선당)

바-1. 토복령 외 7종 한약재 혼합발효물의 숙취해소 효능평가 및 상품화 추진일정



바-2. 토복령 외 7종 한약재 추출물의 혼합발효 조건 최적화

(1) 토복령 외 7종 한약재 혼합추출물의 혼합발효

- (주)한선당에서 제공받은 토복령 외 7종의 한약재가 첨가된 추출물의 γ -PGA 생산을 비교한 후 2차 발효를 진행시켜 GABA함량을 측정하였다. 토복령 외 7종 한약재 추출물을 121℃에서 15분 멸균 후 각 추출물과 MSG 3%, glucose 3%를 혼합하여 NB broth에서 24시간 배양 후 10배 농축한 *B. subtilis* HA starter를 5% 접종하여 42℃, 160 rpm으로 3일간 발효 후 1차 토복령 외 7종 한약재 혼합추출물 발효물에 젖산균의 생육을 증진시키기 위해 skim milk 1%와 glucose 2%를 첨가하여 *L. plantarum* EJ2014 균주를 1% 접종하여 2차 젖산균 발효를 통해 GABA 생산 최적화 실험을 하였다(Table 바-1).

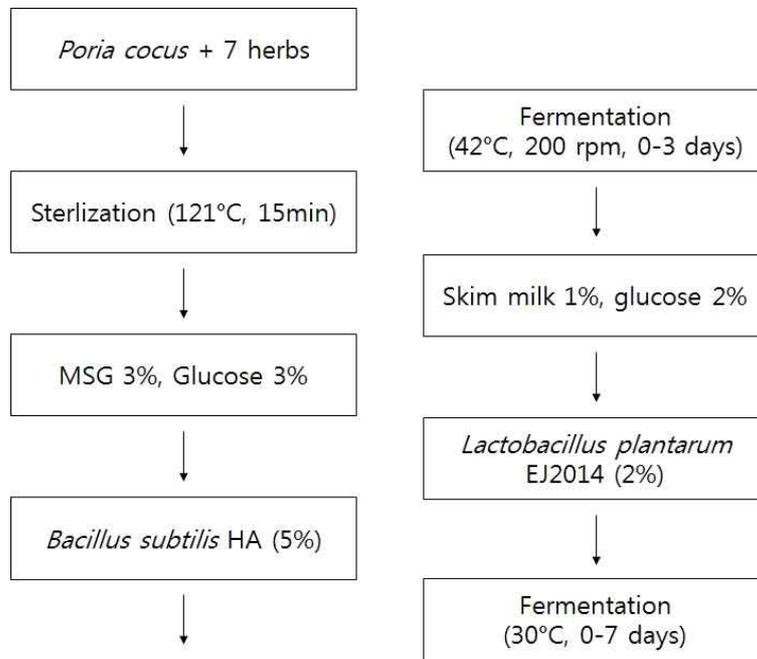


Figure 바-1. Process for co-fermentation of *Smilax china* with 7 herbs extract

(가) 1차 고초균 발효

- 토복령 외 7종 한약재 혼합추출물의 pH와 산도의 결과는 발효 날짜에 따라 pH는 점차 증가, 산도는 감소하는 경향을 보였으며, 발효 2일째 pH 7.80으로 가장 높게 증가하는 것을 확인하였다. 산도는 0.12%, 0.07%에서 발효 3일째 0.09%로 유지되는 경향을 보였다(Figure 바-2).

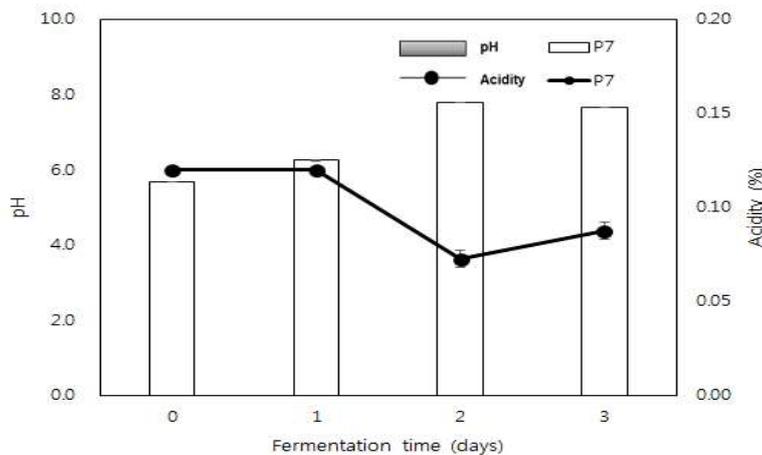


Figure 바-2. Changes in pH and acidity of *Smilax china* with 7 herbs extract fermented by *B. subtilis* HA

- 생균수 변화는 발효 1일 째에 생균수가 가장 높은 것을 확인 할 수 있었으며, 발효 2일째 발효물에서 6.65×10^8 CFU/mL로 가장 높게 나타났다. 발효 3일째 균수가 감소하는 경향을 보였다(Table 바-1).

Table 바-1. Viable cell count for fermented *Smilax china* with 7 herbs extract by *B. subtilis* HA (CFU/mL)

Fermentation time (days)			
0	1	2	3
2.00×10^6	3.65×10^8	6.65×10^8	2.50×10^8

- 점조도 및 점질물 함량은 발효물의 점조도가 2일째 0.262 Pa·sⁿ로 점조도가 가장 높아지는 것을 볼 수 있었다. 3일째부터 점조도가 점차 낮아지는 경향을 보였다. 점질물은 2일째 1.92%로 가장 높게 나온 것을 확인 할 수 있었으며, 점조도와 유사한 결과로 발효 3일째 다시 감소하였다(Figure 바-3).

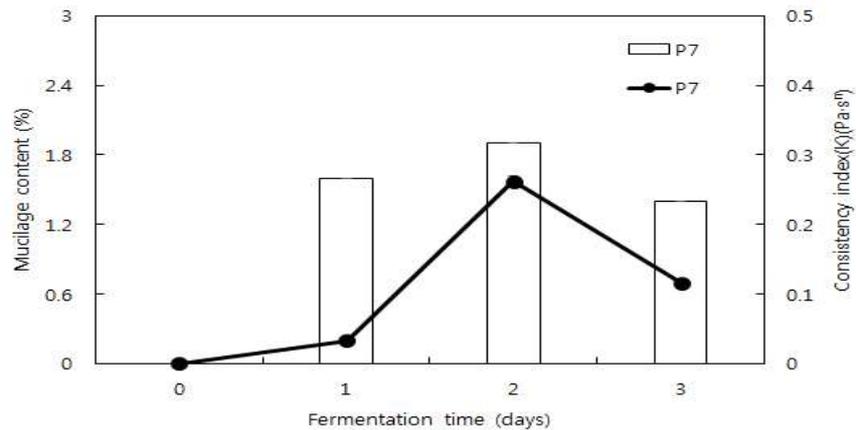


Figure 바-3. Changes in consistency index and mucilage content for fermented *Smilax china* with 7 herbs extract by *B. subtilis* HA

(나) 2차 젖산균 발효 결과

- 토복령 외 7종 한약재 혼합추출물을 *B. subtilis* HA를 이용하여 1차 고초균 발효를 하고, 이에 skim milk 1%와 glucose 2%를 첨가하여 *L. plantarum* EJ2014 균에 따른 2차 젖산발효를 진행하였다. 젖산발효 시간에 따른 pH와 산도 변화는 Figure 바-4와 같다. 발효 7일까지 계속해서 pH는 감소하여 1차 발효 시 pH 7.65에서 pH 4.04까지 감소하였으며, 산도는 1일째부터 증가하기 시작하여 5일째 1.69%로 가장 증가하였다.

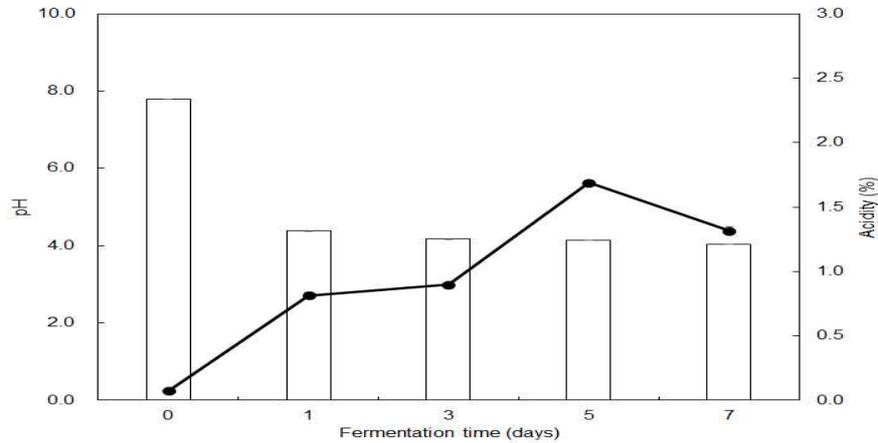


Figure 4. Changes in pH and acidity of *Smilax china* with 7 herbs extract fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

- 2차 발효 젖산균 생균수 변화는 Table 2와 같다. *L. plantarum* EJ2014는 발효 3일째에 2.10×10^9 CFU/mL로 가장 높았으며, 발효 7일째 7.78×10^8 CFU/mL로 균수가 감소하는 경향을 보였다. 고초균 생균수 변화는 3일까지 균수가 조금씩 감소하였으며, 발효 5일째부터 젖산균의 생육에 의해 pH 감소와 산도의 증가 등에 의해 고초균의 생육이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

Table 2. Viable cell count in fermented *Smilax china* with 7 herbs extract and different MSG content by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(CFU/mL)

	Fermentation time (days)				
	0	1	3	5	7
<i>L. plantarum</i> EJ2014	3.60×10^7	1.00×10^9	2.10×10^9	1.65×10^9	7.78×10^8
<i>B. subtilis</i> HA	1.90×10^9	4.50×10^8	4.50×10^8	N.D*	N.D

*N.D: Not detected

- 젖산발효 시간에 따른 점조도는 Figure 5와 같다. 발효 초기 $0.262 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 에서 젖산발효 1일째 급격하게 감소되었으며, 발효 7일째 $0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 점조도가 떨어지는 경향을 보이며 산도가 증가함에 따라 점조도가 낮아지는 것으로 젖산균의 생육이 활발함을 알 수 있다.

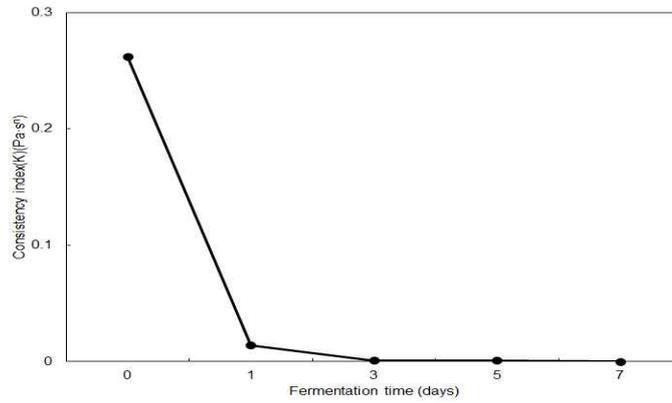


Figure 바-5. Change in consistency index during the 2nd fermentation of *Smilax china* with 7 herbs extract by *L. plantarum* EJ2014

- *L. plantarum* EJ2014균에 따른 2차 젖산발효 시간에 따른 TLC 결과 Figure 바-6과 같다. 발효 7일째 GABA 생성량이 약 0.5% 이상으로 가장 높은 것을 알 수 있었다. 3일째부터 GABA 생성량과 MSG 소진율이 증가하는 것으로 나타났다(Figure 바-6).

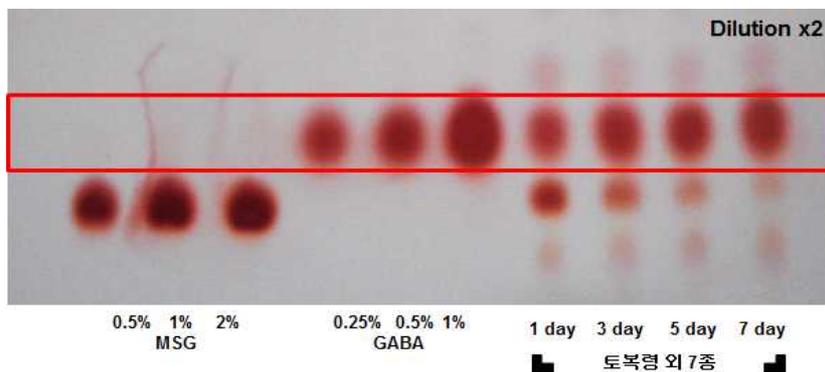


Figure 바-6. TLC analysis of GABA in the *Smilax china* with 7 herbs extract co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(2) 토복령 발효 및 희석배수별 중금속 흡착능 검사

- 토복령 외 7종 한약재 혼합추출액의 중금속 흡착능 실험을 하였다. 중금속 인공오염액은 Cd(카드뮴), Pb(납)을 각각 1 g/100 mL의 용액으로 제조하여 사용하였다. 토복령 외 7종 한약재 발효 전, 후를 각각 10, 50배 희석하여 흡착능을 확인하였다. 각 희석한 시료 10 mL에 중금속 용액 1 mL씩 혼합하여 실온에서 30 rpm, 5시간 반응하였다. 반응액을 0.45 μm필터로 여과한 후 여액에 존재하는 중금속 함량을 ICP분석기기를 이용하여 분석한 후 시료에 의해서 흡착된 중금속함량을 평가하였다(Figure 바-7).

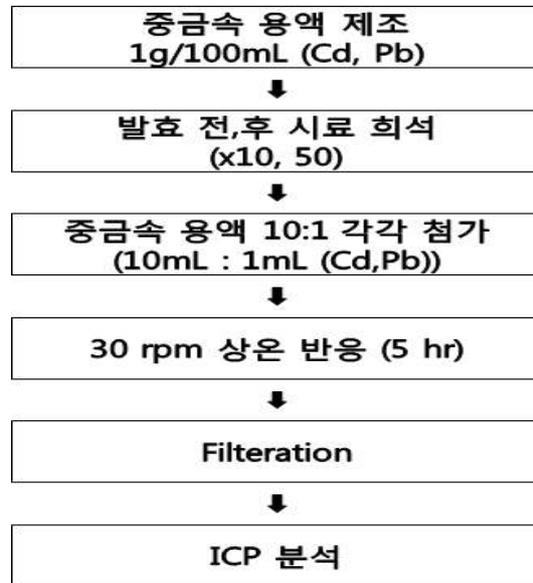


Figure 바-7. Procedure for evaluating heavy metal absorption ability in *Smilax china* ewith 7 herbs extract

- 토복령 외 한약재 7종 혼합추출물의 50배 희석액을 발효 전, 후에 중금속 흡착능을 비교한 결과 Table 바-3과 같다. 발효 전 토복령 추출물의 중금속 흡착 후 Cd, Pb의 함량은 각각 282.68, 432.86 mg/L로 나타났으며, 흡착능은 각각 2.02%, 8.25%로 나타났다. 발효 후 토복령 추출물의 중금속 흡착 후 Cd, Pb의 함량은 각각 275.72 mg/L, 344.91 mg/L로 나타났으며, 흡착능은 각각 4.43%, 26.89%로 나타났다. 발효 전에 비해 발효 후 중금속의 흡착능이 증가하는 것을 확인하였다.

Table 바-3. Comparison of heavy metal absorption ability in *Smilax china* with 7 herbs extract co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(Dilution ×50)

	Control ¹⁾	발효 전 (mg/L)	발효 후 (mg/L)	중금속 흡착능(%)	
				발효 전	발효 후
Cd	288.5	282.68	275.72	2.02	4.43
Pb	471.8	432.86	344.91	8.25	26.89
전체 중금속	760.3	715.54	620.63	5.89	18.37

¹⁾Control: 흡착 전

- 중금속 흡착 전 시료의 초기 중금속 함량은 Cd, Pb 각 288.5 mg/L, 471.8 mg/L, 에서 발효 전 토복령의 흡착 후 남은 중금속의 함량은 Table 바-4와 같이 Cd 277.93 mg/L, Pb 344.47 mg/L로 나타났다. 10배 희석된 발효 전 토복령의 중금속 흡착능은 Cd, Pb 각각 3.66% 26.99%로 나타났으며, 토복령 발효물의 흡착 후 남은 중금속의 함량은 Cd 199.81 mg/L, Pb 48.97 mg/L로 나타났다. 토복령 발효물의 중금속 흡착능은 전체 67.28%로 나타났으며, Pb의 흡착능이 89.62% 으로 가장 높게 나타났다. 토복령 외 한약재 7종 한약재 혼합추출물은 발

효 전에 비해 발효 후 Cd과 Pb에서 모두 흡착능이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 발효 후 생성되는 생리활성물질로 인해 Pb 흡착능은 50%이상 증가하는 것을 확인하였다.

Table 바-4. Comparison of heavy metal absorption ability in *Smilax china* with 7 herbs extract co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

(Dilution ×10)

	Control ¹⁾	발효 전 (mg/L)	발효 후 (mg/L)	중금속 흡착능 (%)	
				발효 전	발효 후
Cd	288.5	277.93	199.81	3.66	30.74
Pb	471.8	344.47	48.97	26.99	89.62
전체 중금속	760.3	622.40	248.78	18.13	67.28

¹⁾Control: 흡착 전

바-3. 토복령 외 7종 한약재 발효물의 숙취해소 *In vivo* 효능평가

바-3-1. 토복령의 급성 경구 독성 시험

(1) 서론

○ 본 시험은 황칠나무 추출물과 마찬가지로, 토복령에 대하여 SD 암컷 랫드에 대한 급성경구 독성시험의 급성독성분류법(Acute Toxic Class Method: ATC법, OECD TG 423조)으로 나타나는 독성의 양상 및 강도를 알고자 하였다.

(2) 시험물질

○ 계명대학교에서 토복령을 제공받아 시험에 이용하였다. 토복령은 다음과 같이 3종류로 토복령 망개뿌리 원액, 토복령 외 7종 한약재 원액 및 토복령 외 7종(2차 발효) 형태로 제공받았다.



토복령 망개뿌리 원액

토복령 외 7종 한약재 원액

토복령 외 7종(2차 발효)

Figure 바-8. Preparation of extract for lead optimization of toxicology

(3) 시험계 및 사육환경

○ 계 통 및 종: NTac Sprague-Dawley Rat, SPF

○ 공 급 원: 주식회사 오리엔트

○ 동물의 성, 수 및 주령(입수시): 암컷 6마리 5주령, 156.8±5 g)

○ 동물의 성, 수 및 주령(투여시): 1단계: 암컷 3마리(5주령, 157±1.0 g),

2단계: 암컷 3마리(5주령, 156.7±7.6 g)

- 시험계 선택 이유: 본 시험에 사용한 SD 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험에 많이 사용하고 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부하므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.
- 잔여동물처리: 군 분리 후 잔여동물은 시험계에서 제외한 후 실험 종료 후에 안락사하였다.
- 본 시험의 사육환경은 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 20\%$, 환기횟수 10~15 회/시간, 조명주기 12 시간, 조도 150~300 Lux의 환경조건으로 설정된 경북대학교 수의과대학 약리생리학동물실험실에서 실험동물을 사육하였다.

(4) 시험방법

- 시험의 실시는 급성경구독성시험의 급성독성분류법(Acute Toxic Class Method: ATC 법, OECD TG 423조)에 따라 수행하였다 (농촌진흥청 고시 제2013-21호 2013.6.28. 별포 12 인축 독성 시험기준과 방법“의 급성독성분류법, 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(II), 단회경구독성시험법, 2008. 11, 식품의약품안전청).
- 전반적인 시험 방법은 앞서 언급한 호박발효물의 경구 독성 시험과 같다.
- 동물 입수시 체중을 측정하였으며, 사육실 내에서 7일간 검역 및 순화를 거쳐 체중 감소 등의 이상이 없는 동물만 시험에 사용하였다.
- 입수된 시험동물은 순화기간 종료 후 투여 전날 체중을 측정한 후 평균체중이 균일하게($\pm 20\%$ 이내) 분포하도록 군 분리하였다.
- 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다. 사육 상자에는 시험번호, 시험항목, 성, 시험물질, 투여용량, 시험기간, 동물번호, 시험책임자 및 담당자를 기재한 개체식별 카드를 부착하였다
- 시험물질을 한계용량인 2,000 mg/kg bw 용량으로 위내 강제 경구투여 한 후 14 일간 시험물질에 대한 치사율, 체중변화, 임상증상, 관찰기간 종료 후에 부검을 실시하였다.
- 체중 데이터는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 체중에 대한 통계학적인 분석은 실시하지 않았다.

(5) 결과

- 시험물질을 위내에 1회 강제 경구투여 시 나타나는 독성양상 및 독성강도를 알고자 SD 암컷 랫드에 Acute Toxic Class method로 시험을 수행하였다.
- SD 랫드에 시험물질을 2,000 mg/kg bw로 1단계 및 2단계로 단회 경구 투여한 후 14일간 사망 및 빈사동물 발생여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 관찰기간 종료 후 부검하여 개체별로 이상여부를 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.
- 시험물질을 2,000 mg/kg bw로 암컷 랫드 3마리에 투여(1단계)하였으며, 모든 동물에서 사망동물이 관찰되지 않아 다시 2,000 mg/kg bw를 암컷 랫드 3마리에 투여(2단계)하였으나 투여군 모두에서 사망동물이 관찰되지 않았다.
- 시험기간 동안 2000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 모두에서 투여 후부터 관찰기간 종료일까지 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다.
- 각 시험물질의 개략적인 반수치사량(LD₅₀)은 2000~5000 mg/kg bw으로 확인되었다.

(6) 결론

- 토복령을 1회 강제 경구 투여시 발현되는 독성 강도를 알기 위하여 투여용량 2000 mg/kg(1단계, 2단계)로 시험을 수행하였다.
- 시험물질을 단회 경구투여 시 2000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 6마리 모두 생존하였다.
- 시험물질 2000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 모두에서 시험 종료일 까지 특이한 임상 증상이 관찰되지 않았다.
- 시험물질 투여 후 시험물질과 관련된 체중변화는 관찰되지 않았다.
- 실험 종료 후 모든 개체에 대하여 육안적 병리검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.
- 결론적으로 시험물질의 반수치사량의 범위는 2000~5000 mg/kg bw 이었으며, GHS Category 5 (LD₅₀ cut-off 값: 2000 mg/kg bw)로서 안전한 물질로 확인되었다.

바-3-2. 랫트에서 알코올 숙취 및 간손상에 대한 토복령 추출발효액(FSC-7H)의 효능평가

(1) 서론

- 간기능 개선이란 담즙분비 기능, 합성능, 배설능, 대사능 등의 주요 간기능을 개선하거나 염증이나 알코올, 약물 등 외부 원인에 의한 간의 손상정도를 개선하는 것을 의미한다. 지표로는 간 실질세포손상(ALT, AST), 담도계 손상(γ -GT, ALP), 담즙분비기능손상(bilirubin, urobilinogen), 합성기능손상(prothrombin time, choline esterase, albumin, total protein) 등이 있다.
- CCl₄ 유발성 급성 간장해 모델에서 간기능 개선 평가시험법; 랫드에 CCl₄를 투여하여 급성 간장해를 유발시킨 모델에서 기능성식품 또는 추출물의 간기능 개선 효과 측정한다.
- ANIT (α -naphthylisothiocyanate)가 유발한 담즙울체 동물모델에서 간기능 개선 평가시험법; 랫드에 ANIT를 투여하여 담즙울체를 유발시킨 동물모델에서 기능성식품 또는 추출물의 간기능 개선작용 효과를 평가한다.
- Ethionine이 유발한 지방간 동물모델에서의 간기능 개선 평가시험법; 랫드에 ethionine을 투여하여 지방간을 유발시킨 동물모델에서 기능성식품 또는 추출물의 간기능 개선작용 개선 작용 효과를 평가한다.
- CCl₄가 유발한 만성간장해 동물모델에서 간기능 개선 평가시험법; 랫드에 CCl₄를 반복투여하여 만성간장해를 유발시킨 동물모델에서 기능성식품 또는 추출물의 간기능 개선작용 효과를 평가한다.
- 분리간세포를 이용한 간기능 개선작용 평가시험법; 랫드의 분리간세포를 이용하여 기능성식품 또는 추출물의 간기능 개선작용 효과를 평가한다.
- 건강기능식품의 숙취해소 효능평가법; 실험동물에 알코올을 급여한 후 기능성 식품 또는 추

출물이 혈중 알코올과 대사체의 농도, 알코올대사효소, 간기능 지표, 해독지표 및 간조직 형태에 미치는 영향을 평가한다.

- 건강기능식품의 지질 및 콜레스테롤 조절 효능평가법; 고지혈증(hyperlipidemia)이란 중성지방이나 콜레스테롤과 같은 혈청 지질이 비정상적으로 증가된 상태를 말하며, 동맥경화와 고혈압, 심혈관계질환 등의 원인이 되며. 고지혈증은 대체로 고콜레스테롤혈증(isolated hypercholesterolemia), 고중성지방혈증(isolated hypertriglyceridemia) 및 고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증 복합형의 3가지 유형으로 분류된다.
- 고콜레스테롤혈증은 총 콜레스테롤 및 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL)-콜레스테롤의 상승, 고밀도 지단백(high density lipoprotein, HDL)-콜레스테롤의 저하, 총콜레스테롤 대 HDL-콜레스테롤 또는 LDL-콜레스테롤 대 HDL-콜레스테롤비가 상승되어 있는 경우를 의미한다.
- 고중성지방혈증은 중성지방이 비정상적으로 증가되어 있으며, 초저밀도 지단백(very low density lipoprotein, VLDL)이 상승되고, 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤이 약간 상승되어 있는 상태이다.
- 고중성지방혈증과 고콜레스테롤혈증 복합형이란 유전적 요인에 의해 VLDL 및 중저밀도 지단백(intermediate density lipoprotein, IDL) 농도는 상승하나 LDL-콜레스테롤 농도는 비교적 정상을 유지하는 경우이다.
- 고콜레스테롤 식이가 유발한 고지혈증 동물모델에서 혈중 지질강하 평가시험법; 랫드에 고콜레스테롤 식이를 섭취시켜 유발시킨 고콜레스테롤혈증 모델에서 기능성 식품 또는 추출물의 혈중 지질강하 효과를 측정한다.
- 트리톤이 유발한 고지혈증 동물모델에서의 혈중 지질 강하 평가시험법; 랫드에 트리톤을 정맥투여 하여 유발시킨 고지혈증모델에서 기능성 식품 또는 추출물의 혈중지질강하 효과를 측정한다.
- Poloxamer-407이 유발한 고지혈증 동물모델에서의 혈중 지질강하 평가시험법; Poloxamer-407을 이용하여 고지혈증을 유발한 실험동물에서 기능성 식품 또는 추출물의 혈중 지질강하효력 및 콜레스테롤 관련 효소활성을 측정한다.
- 고콜레스테롤 식이가 유발한 고콜레스테롤혈증 동물모델에서 콜레스테롤 강하 평가시험법; 랫드 등의 실험동물에 고콜레스테롤 식이를 급여하여 유발시킨 고콜레스테롤혈증 모델에서 기능성 식품 또는 추출물의 콜레스테롤 강하 효력을 평가한다.
- 건강기능식품의 면역활성 측정 평가법; 면역반응에 반응을 나타내는 물질을 효과적으로 선별하는 다양한 방법이 존재하지만 많이 사용되는 방법은 다음과 같다.

○ 마우스 면역세포 활성 측정; 비장세포 증식능을 측정한다.

○ 마우스 면역세포와 항체 생성능의 측정; 마우스 비장세포 중의 IgM 항체 생성 세포수 측정, 마우스 복강 대식세포의 분리 및 배양, T-lymphocytes proliferation 조사 및 실험동물에서 passive cutaneous anaphylaxis 반응 저해효과 측정한다.

(2) 시험물질

○ 계명대학교에서 발효 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H, 2차발효)를 제공받아 동결건조한 후 시험에 이용하였다.

(3) 시험계 및 사육환경

(가) 실험동물 윤리규정

-승인번호: KNU 2015-0024-1: 호박추출물의 체지방 감소시험과 토복령추출물의 지방간 예방효과 시험

(나) 시험계

- 계 통 및 종: 실험용 흰쥐(Sprague-Dawley)
- 공 급 원: 주식회사 오리엔트
- 동물의 성, 수 및 주령: 수컷 70마리(5주령)
- 본 시험에 사용한 Sprague-Dawley는 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부함으로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.
- 동물사육실은 온도 20°C-24°C, 습도 50%-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(4) 시험방법

○ 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 ‘간 건강에 도움을 줄 수 있음’ 편, <간건강 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커>를 참고하여 진행하였다.

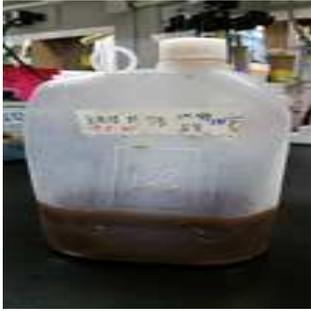
(가) 시험군의 구성

○ 5주령의 Sprague-Dawley 종의 수컷 흰쥐 70마리를 구입하여 체중이 200 g이 되었을 때 8마리씩 6그룹으로 나누어 본 실험에 사용하였다.

(나) 투여량 설정 및 투여 방법

○ 시험에 이용한 정상 액체식이(Lieber De Carli Control Diet) 및 에탄올 식이(Lieber DeCarli Ethanol Diet)는 Dyets Inc에서 구입하였다. Lieber De Carli Control Diet 및 Ethanol Diet은 1 mL에 1 kcal 섭취가 가능하도록 설정된 시료이다. 양성대조군으로 식약처에 간기능 개선에 가능성이 있는 것으로 고시된 헛개나무 열매 농축액을 사용하였다. 에탄올의 냄새에 의해 기호성이 떨어지는 것을 감안하여 얼음을 50 g씩 혼합하였고 식이와 시료는 투여 당일에 제조하여 매일 오전 11시에 급여하였다.

- 시료의 투여량은 125, 250, 500 mg/kg bw로 결정하였고 시료를 동결건조한 후 무게를 재어 사용하였다. 시험전 랫트를 16시간 동안 공복을 유지시킨 후, 시험 날부터 에탄올 단독(6%) 및 에탄올과 시료가 혼합된 사료(Lieber DeCarli Ethanol Diet)를 4주간 급여하였다.
- 에탄올에 의해 기호성 저하를 고려하여, 0, 1 일째는 3%, 2, 3일째는 4.5%, 4일째부터 6% 알코올 식이를 급여하였다.



토복령 한약재 혼합발효음료 (FSC-7H)
Figure 바-9. Extract and groups of rats

Animal groups

Animal experiment 토복령

- Animals: S/D rat (180-200g)
- Groups: 6그룹 (8 rats/group)=48 마리
 - Con: normal feeding
 - NC: 6.7% 알콜 식이
 - PC: 6.7% 알콜 식이+헛개열매 추출물
 - TC-1: alcohol 6.7% 알콜 식이+ 저용량 투여군 (125mg/mL)
 - TC-2: alcohol 6.7% 알콜 식이+ 중용량 투여군 (250mg/mL)
 - TC-3: alcohol 6.7% 알콜 식이+ 고용량 투여군 (500mg/mL)

3. 실험일정: 본시험일정 4주 (적응기간 별도 1주)

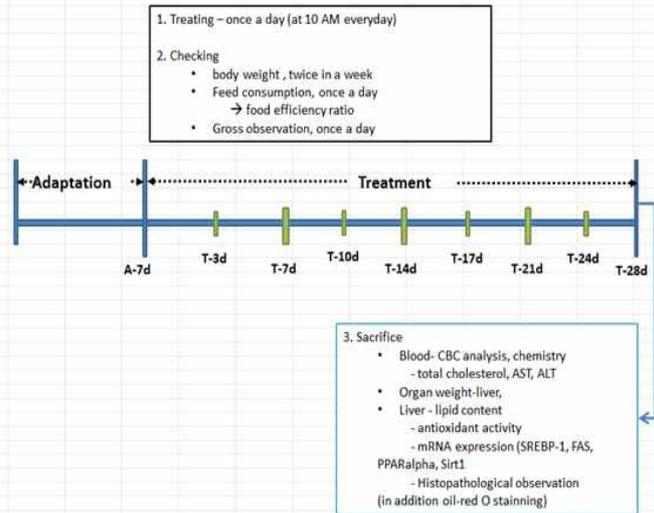


Figure 바-10. Flow-chart for the experiment procedures

(다) 시험의 실시

- 업체의 요구에 따라 후보 시제품, 토복령 망개뿌리 원액, 토복령 외 7종 한약재 원액 및 토복령 외 7종 한약재(2차 발효)의 알코올숙취 개선 효과에 대한 LOT를 실시하였다.

(라) 식이량 및 체중 측정

- 열량의 36%를 에탄올로 급여하는 액체식이와 SMF 시료(125, 250, 500 mg/kg bw)를 혼합한 식이를 4주간 급여한 랫트의 체중 및 식이섭취량을 측정하였다.

(마) 혈중 에탄올 및 아세트알데히드 농도

- 랫트에 각각의 시료(250 mg/kg bw)를 투여하고 30분후 3 g/kg bw의 알코올을 투여한 후 1, 3, 5시간에서 혈액을 채취하여 혈중 내 알코올 함량을 평가하였다.

(바) 간기능 개선 효과 확인

- 혈청 중 ALT 및 AST 활성을 확인하여 간기능 개선 효과를 확인하였다.

(5) 시험 결과

(가) 체중 측정 결과

- 열량의 36%를 에탄올로 급여하는 액체식이와 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 시료 (125, 250, 500 mg/kg bw)를 혼합한 식이를 4주간 급여한 랫트의 체중 및 식이섭취량을 측정한 결과, 알코올식이를 한 그룹이 정상식이를 한 그룹보다 체중이 감소된 것을 확인하였다.
- 간기능성 식품인 헛개나무 열매농축액 투여군인 양성대조군에서는 체중이 감소된 것이 확인되었다. 그러나 식이 효율의 그룹간 차이는 나타나지 않았다.
- 이는 알코올 섭취 시 체중 및 식이가 감소되고 열 발생에 의해 에너지 소모가 증가되기 때문에 체중 감소 현상이 나타는 것이라 사료되었다. 장기무게 측정 시, 실험군 간의 변화가 관찰되지 않았다(Figure 바-11).

Table 바-5. Effect of FSC-7H on feed intake and water intake

Group	NOR	NT	NC	PC	T1	T2	T3
Food intake (g/day)	374.11 ±59.35	370.63 ±57.68	300.71 ±91.05	303.48 ±93.47	325.70 ±98.91	311.2 ±96.63	314.07 ±104.02
Body weight gain (g/day)	283.51 ±52.60	264.43 ±39.09	257.43 ±40.09	243.43 ±36.05	250.98 ±35.29	248.39 ±39.57	253.60 ±32.11
Food efficiency ratio (%)	0.76	0.71	0.86	0.80	0.77	0.80	0.81

Table 바-6. The internal organ weights of males by oral administration

	(g)						
	NOR	NM	NC	PC	T1	T2	T3
River	10.87±1.62	12.69±1.97	10.89±1.60	10.72±1.25	11.33±1.27	12.17±1.02	10.87±1.62
Kidney-R	1.27±0.14	1.33±0.19	1.24±0.09	1.14±0.15	1.24±0.12	1.19±0.08	1.27±0.14
Kidney-L	1.18±0.11	1.25±0.17	1.20±0.10	1.11±0.14	1.20±0.13	1.22±0.16	1.18±0.11
Spleen	0.59±0.09	0.68±0.12	0.52±0.12	0.53±0.07	0.55±0.07	0.61±0.09	0.59±0.09

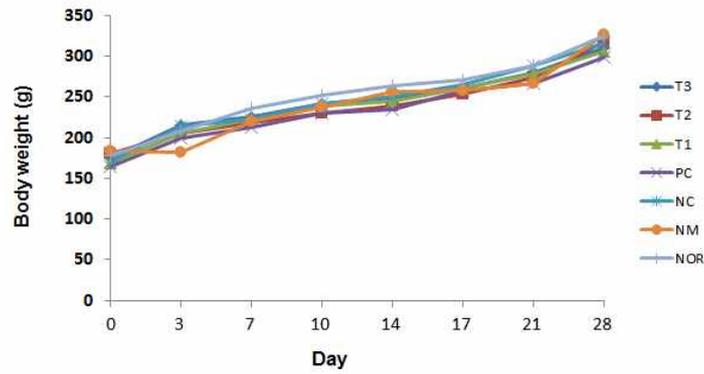


Figure 바-11. Effect of co-fermented *Smilax china* with 7 herbs extract (FSC-7H) on body weight gain

(나) 혈중 알코올 농도 및 아세트알데히드 농도의 변화

- 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H)가 혈장 중의 에탄올과 아세트알데히드 함량에 미치는 영향은 Figure 바-12에 나타내었다. 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 250과 500 mg/mL군의 1시간째 혈장 중 에탄올 농도는 음성대조군에 비하여 각각 20-23% 낮았으며 양성대조군인 컨디션(현재 시판중인 알코올숙취 개선음료) 보다 낮은 수준이었다.
- 한편, 혈장 중의 아세트알데히드 농도는 음성대조군에 비하여 토복령 한약재 혼합발효음료 (FSC-7H) 125와 500 mg/mL 처리군에서는 감소하였고 이는 양성대조군인 컨디션과 유사한 수준이었다.

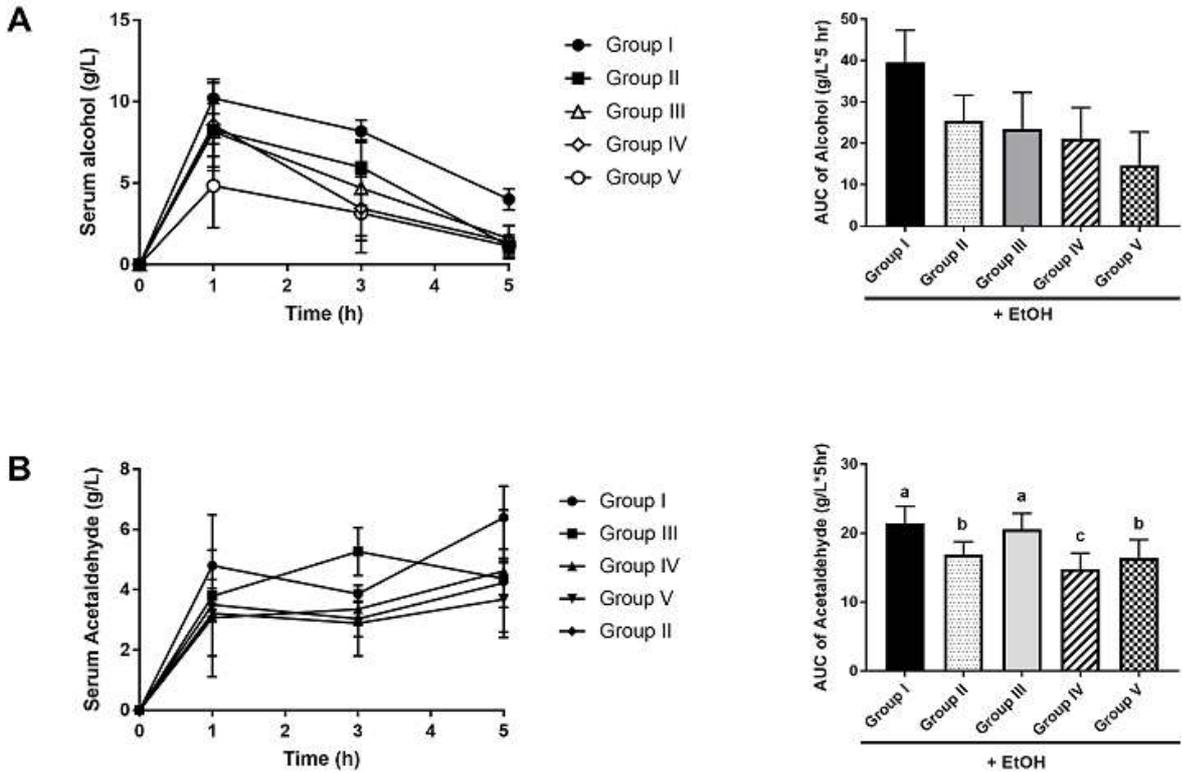


Figure 12. Effects of FSC-7H on blood alcohol concentrations and on area under the curve after administration of alcohol (A) and blood acetaldehyde concentrations and on area under the curve after administration of acetaldehyde in rats. Data are mean and standard error mean (Mean±SE) values (n=6).

○ 본 실험에서 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H)의 알코올숙취에 대한 효능을 확인 결과, 알코올섭취 후 알코올 및 그 대사산물인 아세트알데하이드의 생성 감소 및 제거 촉진을 하는 것으로 관찰되었으며 이때 적정 용량(500 mg/kg bw)이 필요한 것으로 확인되었다.

(다) 간 내 ADH 및 ALDH 활성 분석

○ 알코올의 대사는 간에서 이루어지며 ADH-1 (alcohol dehydrogenase-1)에 의해 아세트알데하이드로 전환되고 아세트알데하이드는 ALDH-2 (acetaldehyde dehydrogenase-2)에 의해 아세트산으로 대사되어 간에서 배출된다.

○ 특히, 아세트알데하이드의 경우, 간세포에 독성을 나타내며 알코올 숙취의 주원인으로 보고되고 있다. 따라서, 간에서의 아세트알데하이드 축적을 감소를 확인하는 것이 알코올 숙취에 대한 시험물질의 효능을 평가하는데 주요 인자가 될 것으로 사료된다.

○ 랫트에 발효 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H, 125, 250, 500 mg/kg bw) 나 물(동량), 컨디션(2.5 mL/kg bw)을 각각의 농도로 경구투여하고 30분 후 3 g/kg bw의 알코올 투여하였다. 5시간 후에 랫트를 희생한 다음 간을 적출하여 RNA를 추출하였다.

Table 바-7. Primers information in the study

Gene	Primer sequence	Product size
ADH-1	F: TGCTCCGTGCTGGAAAGAGTATCC R: TAAGGTTGTGATGTGGCTGGCG	117
ALDH-2	F: GACCTGGACAAGGCCAATTA R: TCTTCTGRGGCACTTTGACG	193
Cu/Zn-SOD	F: GGTGGTCCACGAGAAACAAG R: CAATCACACCACAAGCCAAG	98
Catalase	F: ATACGAAGGTGTTGAATGAGGAGG R: TCAGGTGGTTGGCAATGTTCTC	63
18s RNA	F: AAACGGCTACCACATCCAAG R: CCTCCAATGGATCCTCGTTA	112

- 에탄올 투여시 정상대조군보다 ADH-1 및 ALDH-2의 mRNA 발현이 29% 및 85%의 수준으로 감소되었다. 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 250과 500 mg/kg bw 투여시 효소의 발현이 투여농도 의존적으로 나타났으며 정상대조군보다 4 및 10배(ADH-1)와 2 및 3배(ALDH-2) 증가하였다(Figure 바-13).
- 특히 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 500 mg/kg bw 투여군에서 알코올 대사효소는 현재 시판중인 알코올숙취 음료인 컨디션 보다 2배(ADH-1) 와 동일한(ALDH-2) 수준으로 각각 확인되었다. 이는 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 투여 후 ADH-1 및 ALDH-2의 발현이 동시에 증가하였고 이것이 알코올의 대사를 빠르게 진행시켜 간에서 아세트알데히드를 신속하게 제거하는데 중요한 작용을 한 것으로 생각된다.

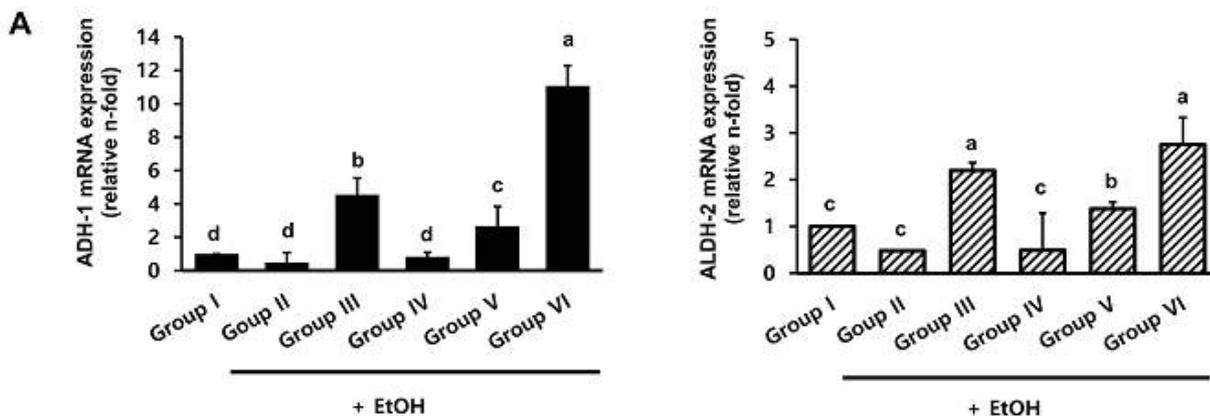


Figure 바-13. mRNA expression of ADH-1 and ALDH-2 from liver in rats administrated with 3 g/kg bw of ethanol.

(라) 간 내 항산화 효소의 활성화

- 알코올의 대사과정에서 발생하는 ROS (Reactive oxygen species) 역시 간에 독성을 나타내므로 ROS에 대한 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H)의 효과를 확인하고자 간에서 다음과 같은 단계에서 작용하는 효소(SOD, catalase)의 발현을 확인하였다.

- 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 투여 시 Cu/Zn-SOD의 mRNA 발현이 정상대조군에 비해 약 10배 이상 크게 증가하였고 이는 컨디션과 유사한 수준으로 확인되었다(Figure 바-14). 그러나 Catalase의 경우, 정상군 및 알코올단독투여군에서 mRNA 발현에서 차이가 나타나지 않았다.

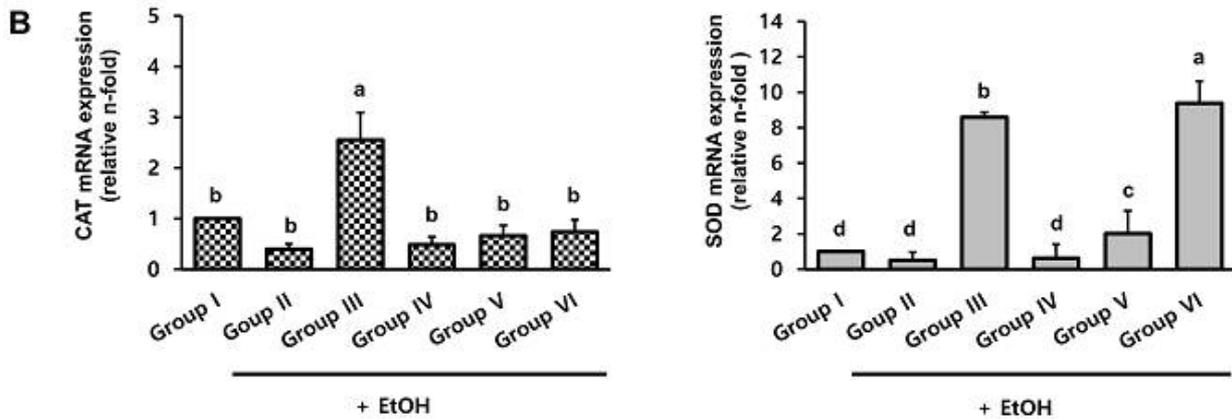


Figure 바-14. mRNA expression of CAT (catalase) and Cu/Zn-SOD from liver in rats administrated with 3 g/kg bw of ethanol.

Group (I): ethanol only (negative control); Group (II): condition[®]+ethanol (positive control); Group (III): 125 mg/kg bw FSC-7H+ethanol; Group (IV): 250 mg/kg bw FSC-7+ethanol; Group (V): 500 mg/kg bw FSC-7H+ethanol orally.

(마) 간의 조직병리학적 소견

- 본 연구에서 4주간 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 섭취에 의한 알코올성 간손상의 억제정도를 확인하기 위해 랫트의 간 조직의 H&E 염색을 하여 병리학적 소견을 확인하였다.
- 랫트의 간을 적출하여 10% formalin에 고정하였다. 고정 후 동결, 절편, H&E 염색 및 사진 촬영은 서울대학교 의과대학 병리학교실에 의뢰하여 진행하였다. 조직병리학적 소견은 3명의 수의사가 간 조직을 100x, 200x, 400x로 관찰한 후 fatty change, inflammatory cells infiltration, balloon degeneration, necrosis 등에 대하여 심각한 정도에 따라 0-4 (0, normal; 1, minimal; 2, mild; 3, moderate; 4, severe)의 점수를 부여하였고 이를 수치화하였다.
- 에탄올 단독 투여군에서는 지방과립이 간 실질에 심등도로 침윤된 것이 관찰되었고 염증세포의 침윤도 심등도로 관찰되었다. 반면 balloon degeneration 및 necrosis는 나타나지 않았다. 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 투여군 및 헛개나무 열매 추출물 투여군에서는 이가 다양한 수준으로 감소된 것이 관찰되었다(Figure 바-15A).
- 이를 점수화한 결과, 병리학적 수치는 에탄올 단독 투여군이 3.33점으로 나타났고 토복령

한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 투여군의 수치는 투여 농도 의존적으로 2.7, 1.8, 0.3로 평가되었다 (Figure 바-15B). 특히, 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 고용량 투여군(500 mg/kg bw, Group VI)에서 에탄올에 의한 fatty change, inflammatory cells infiltration, ballon degeneration 및 necrosis 등 병리적 병변은 거의 관찰되지 않았다. 이는 고시형 기능성 식품인 헛개나무 열매 추출물 125 mg/kg bw 투여군(Group III) 보다 더 낮은 수준이었으며 정상군(Group I)과 동일한 수준이었다. 또한 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H) 중용량 투여군(250 mg/kg bw, Group V)의 병변은 헛개나무 열매 추출물 투여군과 유사한 수준이었다.

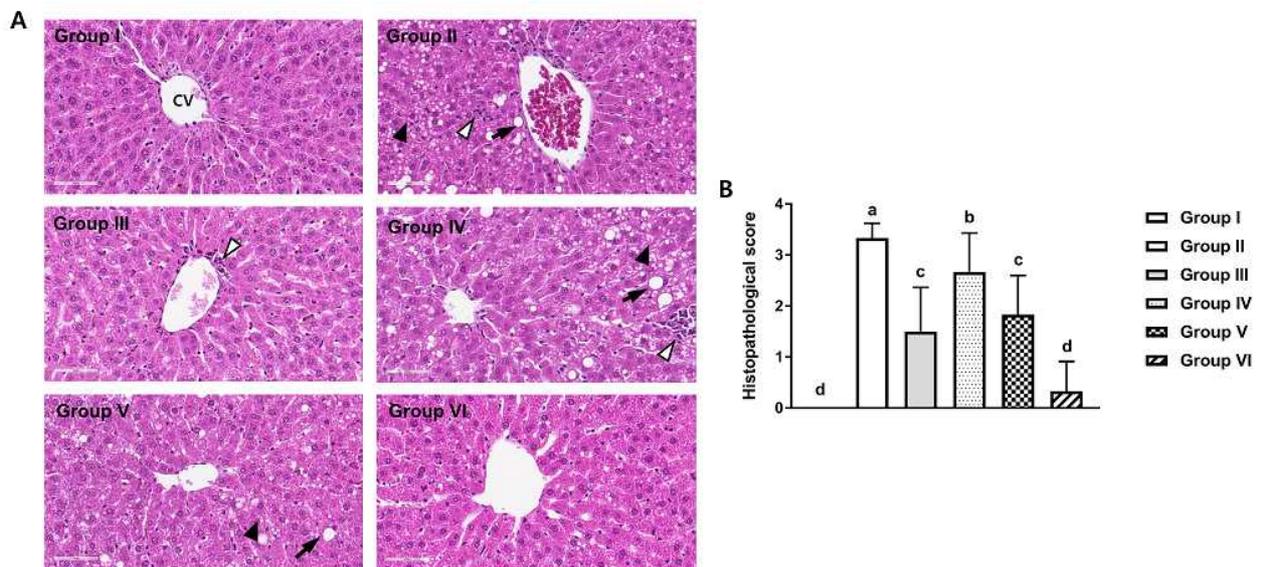


Figure 바-15. Histopathological examination of liver sections (200x) from rates treated with ethanol.

(A) Histopathological findings of liver section (B) The degree of hepatic pathologic lesion in the liver. Group (I): ethanol only (negative control); Group (II): HDF + ethanol (positive control); Group (III): 125 mg/kg bw FSC-7H+ ethanol; Group (IV): 250 mg/kg bw FSC-7H + ethanol; Group (V): 500 mg/kg bw FSC-7H + ethanol orally. Tissues were fixed in formalin and stained with H&E. Black Arrowhead, microvesicular fat droplet; thin arrow, macrovesicular fat droplet; white arrowhead, inflammatory cell infiltration; CV, central vein.

(6) 결론

- 토복령 한약재 혼합발효음료(FSC-7H)는 알코올섭취에 의한 혈중 알코올 농도 및 숙취와 관련된 아세트알데히드의 농도를 낮추며 간의 항산화 효소인 SOD를 유도하여 알코올에 의한 숙취를 약화시키는데 도움을 주는 것으로 확인되었다. 또한 알코올의 만성섭취에서 FSC-7H는 간에서 항산화 관련 유전자의 발현을 유도하고 지방간 및 간염증을 억제하여 알코올 유도성 간손상을 예방하는 것으로 확인되었다. 특히 FSC-7H 250 mg/kg bw와 500 mg/kg bw 용량이 이에 대한 효과가 우수한 것으로 확인하였다.

마-4. 토복령 외 7종 한약재 발효물(음료)의 숙취해소 임상시험

(1) 인체적용시험 개요 설계

- 한선당에서 개발한 토복령을 이용한 한방음료의 숙취개선에 대한 인체적용시험을 통한 효

능평가를 위한 인체적용시험 프로토콜을 개발하였다.

- 시험대상자는 신체 건강한 성인 남성으로, 음주 전에 시험제품을 1회 섭취하도록 하고, 음주 전과 음주 후 일정 시간별로 호기중 알코올 농도와 혈액중 아세트알데히드 농도를 측정하고 음주 후 숙취증상에 대한 설문평가를 실시하여 시험제품의 숙취개선 효능을 평가하도록 하였다.

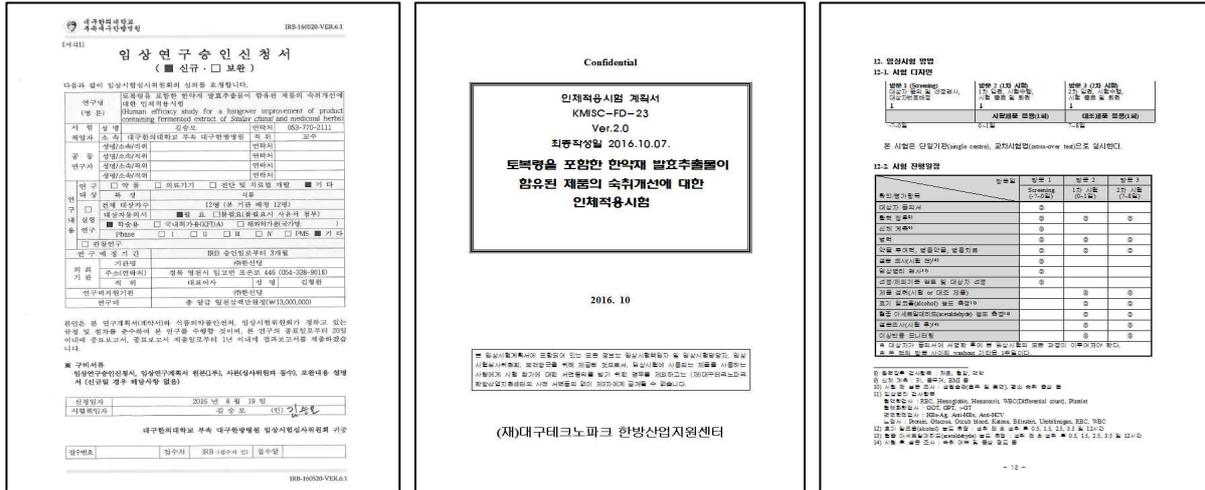


Figure 바-16. Plan for human volunteer test for improving the hangover with FSC-7H beverage

(2) 인체적용시험을 통한 숙취개선 효능평가 기술 확보

- (가) 인체적용시험의 명칭: 토복령과 한약재 7가지 발효추출물이 함유된 제품의 숙취개선에 대한 인체적용시험
- (나) 인체적용시험 실시기관: 대구한의대학교부속 대구한방병원
- (다) 인체적용시험 수행기간: 2016년 10월 21일~2017년 1월 20일
- (라) 시험용 식품: 시험식품은 토복령 발효 음료, 대조식품은 생수로, 제품의 성분 및 함량은 다음과 같다.
- (마) 시험용 식품의 섭취방법: 제공되는 시험제품(112.5 mL) 또는 대조제품(112.5 mL)을 알코올 섭취 30분 전에 대상자들에게 나누어 주고 음용하게 하였다.

Table 바-8. Composition and content of test food

항목	시험제품		대조제품
제품명	토복령 발효 음료		생수(제주 삼다수)
원료 및 함량	토복령 발효물	18%	-
	대추 5% 추출물	40%	
	헛개나무 원액	15%	
	꿀	7%	
	올리고당	5%	
	잔탄검(2.5% 용액)	15%	

방문 1 (Screening) 대상자 동의 및 선정검사, 대상자번호배정 ↓	방문 2 (1차 시험) 1차 입원, 시험수행, 시험 종료 및 퇴원 ↓	방문 3 (2차 시험) 2차 입원, 시험수행, 시험 종료 및 퇴원 ↓
	시험제품 음용(1회)	대조제품 음용(1회)
-7~0일	0~1일	7~8일

Figure 바-17. Design for human volunteer test for improving hangover

(바) 시험 디자인

- ① 시험디자인: 단일기관, 교차설계 인체적용시험
- ② 시험대상자: 건강한 성인 남성
- ③ 선정기준
 - 만 20세 이상 40세 이하의 건강한 성인 남성
 - 선천성 또는 만성질환이 없고, 내과적인 병적 증상 또는 소견이 없는 자
- ④ 제외기준
 - 시험개시 1개월 이내 바르비탈류 등의 약물대사효소 유도 및 억제약물을 복용한 자
 - 시험개시 7일 이내에 시험에 지장을 줄 우려가 있는 과도한 음주를 한 자
 - 현재 위염 및 위궤양 치료제를 복용하고 있거나, 최근 6개월 이내에 치료를 받은 경험이 있는 자
 - 과거에 췌장염, 통풍, 위장관 수술 등의 과거력이 있는 자
 - B형, C형 간염환자 또는 보균자
 - 기타 알코올대사에 영향을 미칠 것으로 판단되는 약물을 복용하고 있는 자
 - 아스피린 등 잠복출혈의 위험이 있는 약물을 복용하고 있는 자
 - 음주 후 심장질환 증상이나 부작용을 심하게 경험한 자
 - 과거에 정신질환 병력이 있었거나 현재 가지고 있는 자
 - 기타 위 사항들 외 시험책임자의 판단으로 임상수행이 곤란하다고 판단되는 자
- ⑤ 시험용 식품: 토복령 발효 음료 및 생수
- ⑥ 유효성 평가기준: 혈중 아세트알데히드 농도 및 호기성 알코올 농도
- ⑦ 통계분석방법
 - 사전 동질성 검정: Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test
 - 효과검정: 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정함
- ⑧ 관찰일정: 시험기간 동안 대상자는 3회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문별 검사내용은 다음과 같다.

Table 마-9. Test schedule and inspection lists

확인/평가항목	방문일	방문 1	방문 2	방문 3
		Screening (-7~0일)	1차 시험 (0~1일)	2차 시험 (7~8일)
대상자 동의서		⊙		
활력 징후		⊙	⊙	⊙
신체 계측		⊙		
병력		⊙	⊙	⊙
약물 투여력, 병용약물, 병용치료		⊙	⊙	⊙
설문 조사(시험 전)		⊙		
임상병리 검사		⊙		
선정/제외기준 검토 및 대상자 선정		⊙		
제품 섭취(시험/대조 제품)			⊙	⊙
호기 알코올(alcohol) 농도 측정			⊙	⊙
혈중 아세트알데히드(Acetaldehyde) 농도 측정			⊙	⊙
설문조사(시험 후)			⊙	⊙
이상반응 모니터링			⊙	⊙

※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 임상시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

※ 두 번의 방문 사이의 washout 기간은 1주일이다.

⑨ 혈중 아세트알데히드 농도 분석

- 혈중 아세트알데히드 농도 분석을 위하여 각 시간별 대상자의 혈액을 BD Vacutainer Serum Tube에 채혈하여 혈청을 분리하고, 혈청 단백질을 제거한 후 즉시 분석에 사용하였다. 아세트알데히드 농도 분석은 Acetaldehyde assay kit (Megazyme K-ACHYD, Co. Wicklow, Ireland)를 사용하였고, 제조사가 제공한 분석방법에 따라 측정하였다.
- 증류수 또는 시료와 Buffer, NAD⁺ solution을 혼합하고 2분 후에 340 nm에서 흡광도를 측정하고, Al-DH를 첨가하고 3분간 반응시킨 후 2분 간격으로 340 nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- 아세트알데히드 농도는 Kit에 제시된 방법에 따라 계산하였으며, mg/L로 산출하였다.

⑩ 호기중 알코올 농도 분석

- 호기성 알코올 농도는 음주측정기(SD-400, 라이온사, 영국)에 장착한 불대를 사용하여 호흡 시료를 채취하여 측정하였다.
- SD-400은 electrochemical fuel cell sensor 타입의 음주측정기로, 호흡 속의 알코올 분자가 백금 전극에서 산화에 의하여 발생하는 전류의 양을 측정하여 혈중 알코올 농도를 측정한다. 전기화학식 센서는 알코올에 대한 선택성이 높아 아세톤, 케톤, 하이드로카본, 향수, 페인트, 메탄 등 알코올이 아닌 다른 물질에 전혀 영향을 받지 않으며, 0.100% 알코올 농도에서 편차율 ±0.005% 이하로 정확성이 높다. 본 연구에 사용한 음주측정기의 혈중 알코올 농도 측정범위는 0.001%~0.575%(BAC⁷⁾ 기준)이다.

(3) 인체적용시험 결과

(가) 대상자의 인구학적 정보

7) BAC : Blood Alcohol Concentration

○ 본 시험은 대구경북 지역에 거주하는 최저 연령 22세부터 최고 연령 28세의 남성들을 대상으로 수행되었으며, 대상자의 평균 나이는 24.5±1.61세로써 시험에 참여한 대상자는 선정기준과 제외기준을 모두 만족하였다(Table 바-10).

Table 바-10. Information of clinical volunteer

N(명)	대상자 연령(Age)			
	Average	Std Dev.	Low value	High value
13	24.5	1.61	22	28

(나) 1차 유효성 평가변수(아세트알데히드) 분석 결과

○ 알코올 섭취 전과 섭취 후 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 12시간 후에 각 대상자들의 혈액을 채취하여 아세트알데히드 농도에 대한 분석 결과(Table 바-11), 시간에 대한 검정통계량을 살펴보면, F-값은 14.56, P-값은 <.0001로 유의수준 5%에서 매우 유의하게 분석되어 시간에 따라 아세트알데히드 농도에 차이가 남을 알 수 있었다(Table 바-12). 또한 시간과 처리군과의 교호작용의 효과에 대한 결과에서도 F-값이 42.19, p-값이 <.0001로 유의수준 5%에서 시간과 처리군에 대해 유의한 차이가 있는 것으로 분석되었다(Table 바-13).

Table 바-11. Descriptive statistics for acetaldehyde concentration measured in blood

Time	Control		Experiment	
	Average	Std Dev.	Average	Std Dev.
0 hr	-0.20137	0.41700	-0.00686	0.40602
0.5 hr	3.00249	2.33533	1.88927	1.87834
1.5 hr	0.82220	0.55279	2.55146	0.43356
2.5 hr	-0.06972	2.66623	0.26216	0.50580
3.5 hr	0.32570	0.08711	0.11336	0.20678
12 hr	-0.01736	0.55860	-0.27052	0.52809

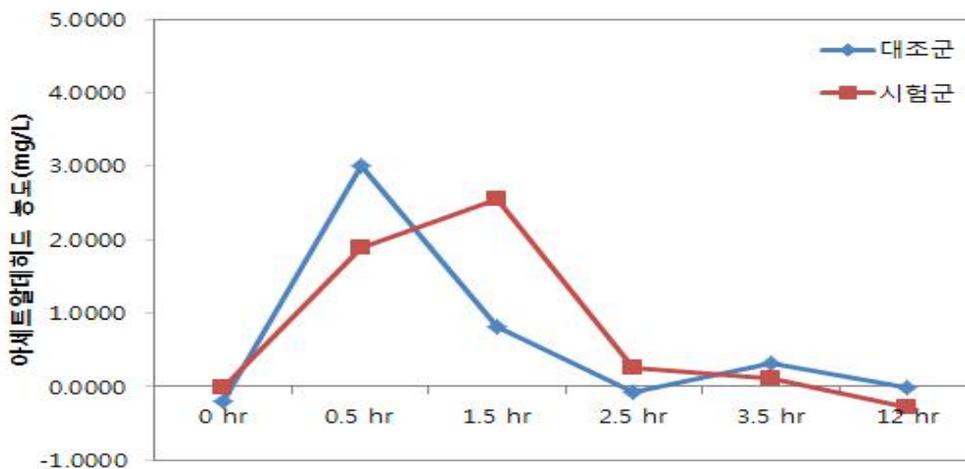


Figure 바-18. Descriptive statistics for acetaldehyde concentration

Table 바-12. Significance of acetaldehyde concentration between time and treatment groups

Variable	통계	검정통계량	F Value	Pr > F
시간	Wilks' Lambda	0.03135813	123.56**	<.0001
시간*처리군	Wilks' Lambda	0.08659289	42.19**	<.0001

○ 두 처리집단간의 아세트알데히드 농도에 대한 유의성을 검증한 결과, 시험군과 대조군은 유의수준 5%에서 유의한 차이가 없는 것으로 분석되었다(Table 바-13).

Table 바-13. Significance of acetaldehyde concentration among treatment groups

Variable	DF	Type III SS	Mean Square	F-value	Pr > F
처리군	1	0.4964322	0.496432	0.53	0.4719
오차	24	22.299503	0.929146		

○ 유의수준 5%에서 유의한 차이를 보이고 있는 것은 1.5 hr과 3.5 hr로 조사되었으며, t-test 와 비모수 통계 Wilcoxon Score 검증 결과는 동일하였다(Table 바-14).

Table 바-14. T-test and Wilcoxon score verification of acetaldehyde concentration among treatment groups

Variable		평균	표준편차	t-값 (p-value)	Wilcoxon Scores	Z값 (p-value)
0 hr	대조군	-0.2014	0.4170	-1.20‡ (0.240)	11.76923	-1.1282 (0.2592)
	처리군	-0.0069	0.4060		15.2307	
0.5 hr	대조군	3.0025	2.3353	1.34 (0.1930)	16.0769	1.6923 (0.0906)
	처리군	1.8893	1.8783		10.9230	
1.5 hr	대조군	0.8222	0.5528	-8.87** (<.0001)	7.0769	-4.2564** (<.0001)
	처리군	2.5515	0.4336		19.9230	
2.5 hr	대조군	-0.0697	2.6662	-0.44‡ (0.6666)	12.6923	-0.5128 (0.6081)
	처리군	0.2622	0.5058		14.3076	
3.5 hr	대조군	0.3257	0.0871	3.41** (0.0035)	17.50	2.6424** (0.0082)
	처리군	0.1134	0.2068		9.50	
12 hr	대조군	-0.0174	0.5586	1.19 (0.2467)	15.0769	1.0256 (0.3149)
	처리군	-0.2705	0.5281		11.9230	

‡ 정규성 검증결과, 정규성을 만족함

(다) 2차 유효성 평가변수(호기중 알코올) 분석 결과

○ 알코올 섭취 후 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 12시간 후에 음주측정기(SD-400, 영국)를 이용하여 각 대상자의 호기중 알코올 농도 측정에 대한 분석 결과, 시간에 대한 검정통계량에서 F-값은 183.06, p-값은 <0.0001로 유의수준 5%에서 매우 유의하게 분석되었다(Table 바-15). 따라서 시간에 따른 호기성 알코올 농도에서는 차이가 난다는 것을 알 수 있었다. 그러나 처리 집단간의 교호작용의 효과에 대한 분석 결과에서는 p-값이 0.2486로 유의수준 5%에서 처리 집단간의 유의한 차이가 없는 것으로 분석되었다.

Table 바-15. Descriptive statistics for breath alcohol concentration

시간	대조군		시험군	
	평균	표준편차	평균	표준편차
0 hr	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.5 hr	0.0686	0.0162	0.0658	0.0201
1.5 hr	0.0699	0.0155	0.0639	0.0182
2.5 hr	0.0581	0.0133	0.0609	0.0077
3.5 hr	0.0456	0.0130	0.0512	0.0091
12 hr	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

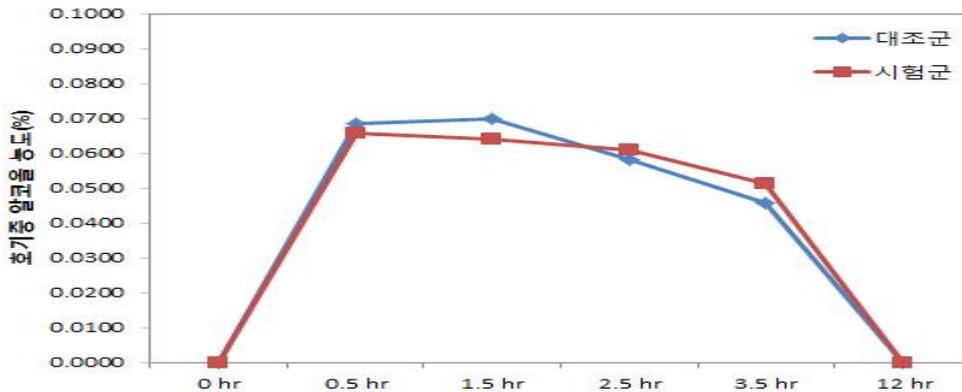


Figure 바-19. Descriptive statistics for alcohol concentration in breath

Table 바-16. Significance of breath alcohol concentration between time and treatment groups

구분	통계	검정통계량	F Value	Pr > F
시간	Wilks' Lambda	0.02787981	183.06**	<.0001
시간*처리군	Wilks' Lambda	0.78196528	1.46	0.2486

○ 처리집단간의 호기성 알코올 농도에 대한 유의성을 검증한 결과에서는 유의수준 5%에서 유의한 차이가 없는 것으로 분석되었다(Table 바-17).

Table 바-17. Significance of breath alcohol concentration among treatment groups

구분	DF	Type III SS	Mean Square	F-value	p-value
처리군	1	1.9E-07	1.9E-07	0	0.984
오차	24	0.011242	0.000468		

○ 처리집단간의 호기성 알코올(Alcohol)의 t 검증 및 Wilcoxon Score 검증 결과 모두 유의한 차이가 없었다(Table 바-18).

Table 마-18. T-test and Wilcoxon score verification of breath alcohol concentration among treatment groups

Variable		평균	표준편차	t-값 (p-value)	Wilcoxon Scores	Z값 (p-value)
0.5hr	대조군	0.0686	0.0162	0.40 (0.6948)‡	15.07692	1.0269 (0.3045)
	처리군	0.0658	0.0201		11.92307	
1.5hr	대조군	0.0699	0.0155	0.91 (0.3735)‡	15.0	0.9755 (0.3293)
	처리군	0.0639	0.0182		12.0	
2.5hr	대조군	0.0581	0.0133	-0.67 (0.5098)	13.23076	-0.1543 (0.8774)
	처리군	0.0609	0.0077		13.76923	
3.5hr	대조군	0.0456	0.0130	-1.27 (0.2154)	11.80769	-1.1054 (0.2690)
	처리군	0.0512	0.0091		15.19230	

‡ 정규성 검증결과, 정규성을 만족함

마-5. 토복령 외 7종 한약재 발효물을 첨가한 상품화 제작



마-16. Hangover drink (Mang-gae cha) containing co-fermented *Smilax china* with 7 herbs extract (FSC-7H)

사. 식이섬유가 풍부한 사과박 및 목이버섯 발효물을 이용한 소스개발 (더불어식품)

사-1. 사과박을 이용한 젖산균 및 효모 발효

(1) 재료 및 방법

- 더불어 식품의 소스 개발을 위해 사과박 발효물을 제조하였다. 사과박 발효를 위해 사과박 추출액에 2배 식초를 첨가하여 0.5% 식초함유 사과박 혼합액을 제조하였다. 사과박 발효물은 Table 사-1과 같이 사과박 식초혼합액을 2.5배 희석하여 100℃에서 20분간 살균 후 효모 또는 효모/젖산균 복합균주를 다르게 혼합하여 진탕배양과 정치배양법으로 나누어 실험하였다(Figure 사-1).

Table 사-1. Mixed fermentation condition of apple pomace mixture by lactic acid bacteria

Sample	배양방법	희석 배수	사과박 식초 혼합액(mL)	천연당 (mL)	Y.E* (%)	증류수 (mL)	효모	젖산균
A	진탕 배양	2.5	40	5	1	55	Y**	-
B								<i>L. plantarum</i> EJ2014
C	정치 배양							-
D								<i>L. plantarum</i> EJ2014

*Y.E: Yeast extract, **Y:효모

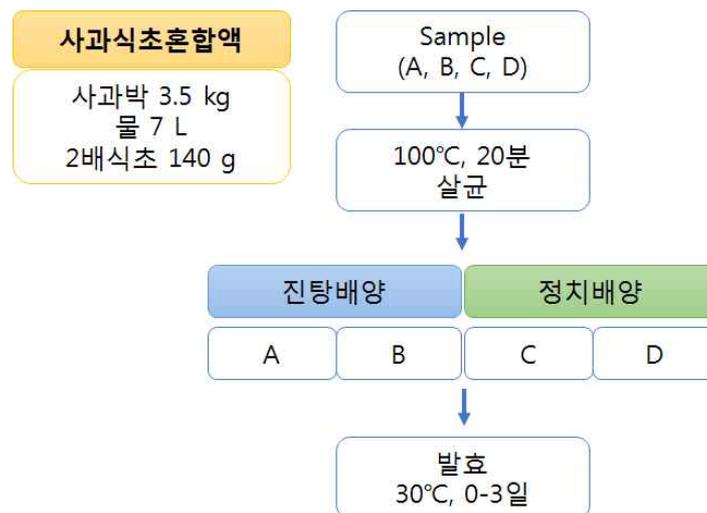


Figure 사-1. Procedure for lactic fermentation of apple pomace mixture

(2) 결과 및 고찰

- 사과박의 정치배양과 진탕배양에서의 pH와 산도의 변화는 Figure 사-2와 같다. 각각의 시료들은 발효가 진행될수록 pH는 감소하는 경향을 보이고 산도는 올라가는 경향을 보인다. 진

탕배양과 정치배양의 pH 변화는 진탕배양이 발효 1일째 pH가 급격하게 감소하지만 발효 2일째부터는 큰 차이를 보이지 않았다. 효모와 젖산균을 함께 접종한 B와 D군에서 A와 C군보다 pH가 조금 더 낮은 것을 알 수 있었다. 산도는 발효 3일째 A군에서 0.52%로 가장 높게 나타났다.

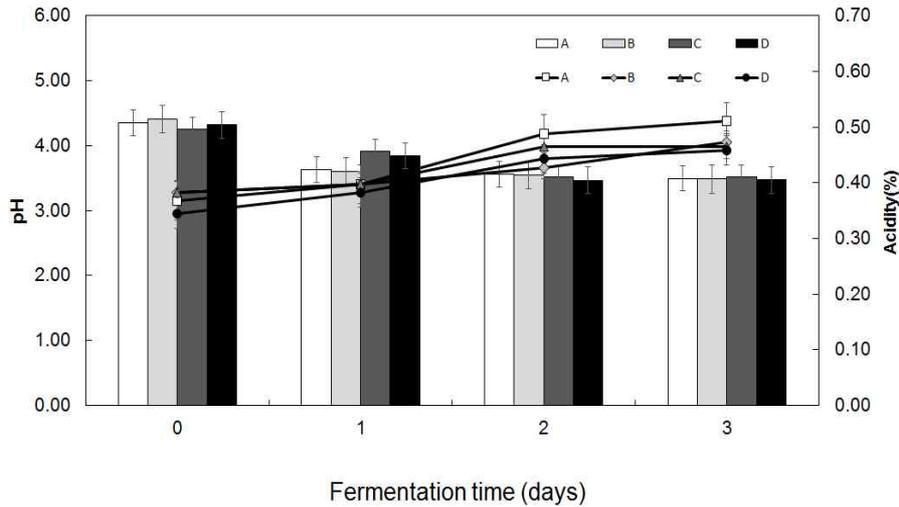


Figure 사-2. Changes in pH and acidity of the apple pomace mixture fermented by *S. cerevisiae* and *L. plantarum* EJ2014

- 젖산균이 접종된 시료 B와 D에 대해 젖산균의 변화는 Figure 사-3과 같다. 젖산균 초기 starter 생균수 2.22×10^7 CFU/mL을 접종하여 정치배양한 시료의 경우 발효 2일째에 1.11×10^9 CFU/mL 까지 가장 높게 증가하였으며, 발효 마지막 날에는 1.02×10^8 CFU/mL로 감소하는 경향을 보였다. 진탕 배양의 경우 발효 1일차에 6.95×10^9 CFU/mL까지 올라가는 경향을 보였고 이후 감소하는 경향을 보이면서 발효 마지막 날에는 4.03×10^8 CFU/mL으로 감소되는 것을 알 수 있었다.

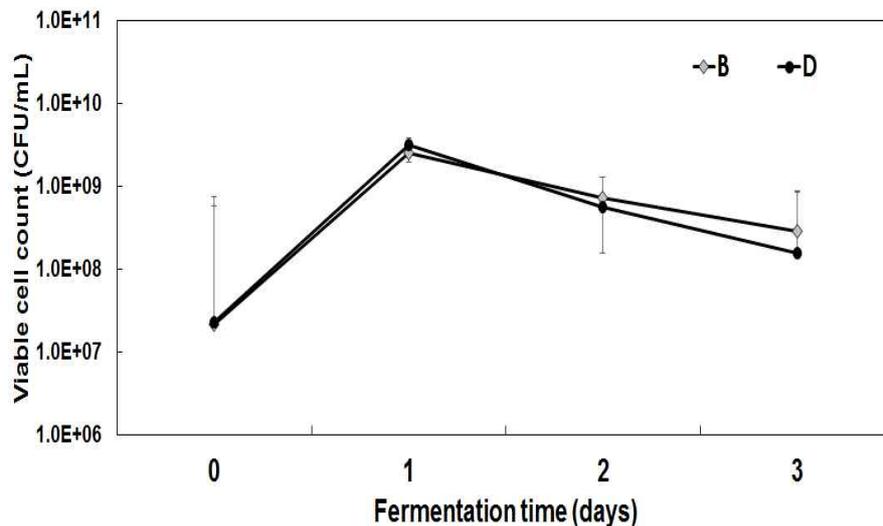


Figure 사-3. Viable cell count of the fermented apple pomace mixture by *L. plantarum* EJ2014

- 사과박 희석조건과 효모조건에 따른 진탕 배양과 정치배양의 차이에서 효모생균수의 변화는 Figure 사-4과 같이 초기 starter의 생균수 1.22×10^5 CFU/mL를 접종하였다. 발효 1일째 정치배양의 시료는 2.68×10^7 CFU/mL, 1.11×10^7 CFU/mL이었다 반면 진탕배양의 경우 3.02×10^8 CFU/mL, 1.02×10^8 CFU/mL으로 발효 1일차 진탕배양에서 효모가 많이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 발효 2일차가 되면서 진탕배양 시료에서의 균수는 줄어들어 발효 3일에 1.04×10^8 CFU/mL, 6.81×10^8 CFU/mL으로 감소하는 경향을 보였다. 반면 정치배양의 같은 경우 발효 2일째에 효모가 많이 증가하는 경향을 보인다.

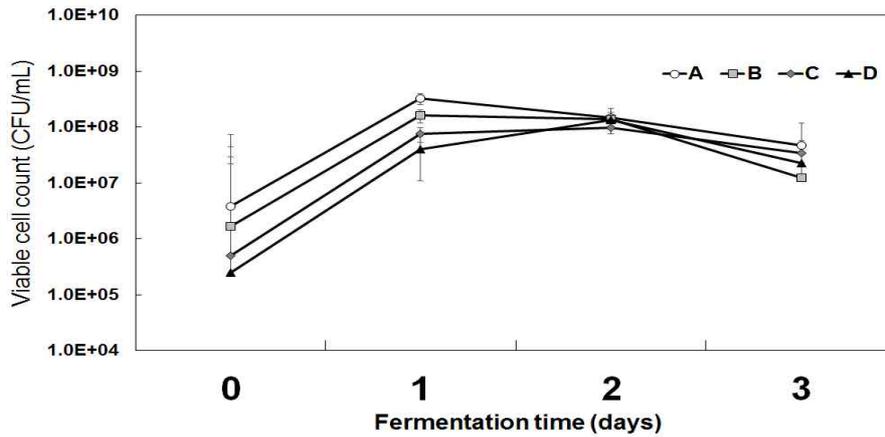


Figure 사-4. Viable cell count of the fermented apple pomace mixture by *S. cerevisiae*

- 사과박 희석조건과 효모조건에 따른 진탕 배양과 정치배양의 차이에서 효모생균수의 변화는 Figure 사-5와 같다. 진탕배양의 시료는 발효 초기 수용성 고형분 9.2 °Brix, 9.0 °Brix 이었지만 발효 1일째에 2.4 °Brix, 1.8 °Brix로 급격히 떨어지는 경향을 보였다. 이후 계속 줄어들어 발효 마지막 날 진탕배양의 수용성 고형분은 0.9 °Brix, 1.1 °Brix를 나타내게 되었다. 반면 정치배양의 시료는 발효 0일째 8.0 °Brix, 7.2 °Brix를 나타내었다. 발효 1일째 진탕배양과는 다르게 수용성 고형분은 소폭 감소하는 경향을 보였고 발효 2일째 1.3 °Brix, 1.5 °Brix로 급격히 떨어지는 경향이 있다. 이와 같은 경향으로 볼 때 진탕배양은 효모가 발효 1일 안으로 활발하게 배양이 되고, 정치배양 같은 경우 2일 안으로 배양되는 것을 확인 할 수 있었다.

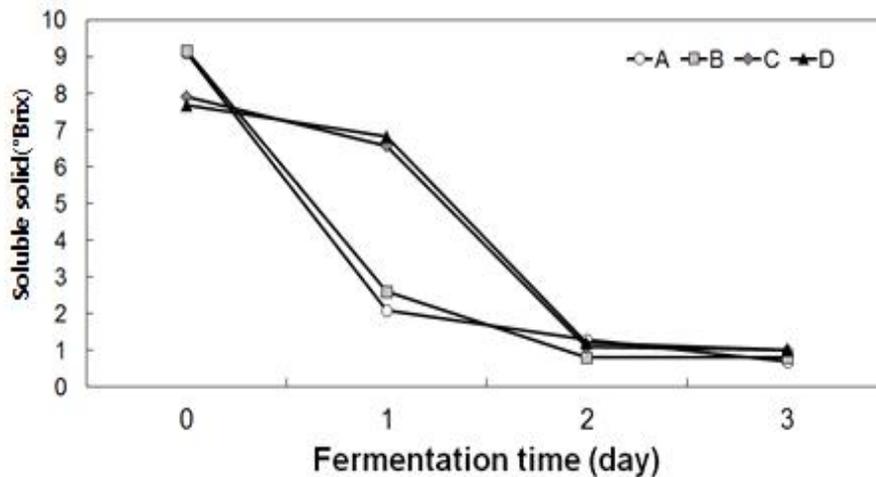


Figure 사-5. Changes in soluble solid contents (°Brix) of the apple pomace mixture fermented by *S. cerevisiae*

(3) 사과박 효모발효물을 이용한 기능성 모닝빵 제조

(가) 재료 및 방법

- 기능성 모닝빵의 제조를 위한 원료 조성물은 강력분 300 g에 사과박 효모 발효물 50 g, 100 g, 150 g을 각각 첨가한 후 설탕, 소금, 달걀을 첨가하여 제조하였다. 이때 강력분 밀가루를 기준으로 첨가된 사과박 발효물의 함량은 각각 50%, 25%, 12.5%를 나타내었다.

Table 사-2. Ingredients for making bread with apple pomace mixture fermented

Ingredient	content (g)
wheat flour(강력분)	300
fermented apple pomace	150
sugar	35
salt	2
egg	1 ea
dried yeast	2 g

① 반죽 제조(단계별 공정)

㉠ 버터를 제외한 모든 재료를 mixing ball에 넣고 믹싱한다.

㉡ 클린 업 단계에서 버터를 첨가한다.

㉢ 1차 발효하기: 발효실 25-35°C로 상대습도 75-80%의 조건에서 2-3시간 발효한다.

㉣ 분할하기: 반죽을 45 g씩 분할하고 표피가 매끄럽게 동그란 모양으로 둥글리기를 한다.

㉤ 팬닝하기: 한 팬에 8-10개 정도 팬닝하고 일정한 간격을 유지한다.

㉥ 2차 발효하기: 둥글리기 한 반죽을 발효실에서 35-40°C로 상대습도 90% 30분-1시간 2차 발효한다.

㉦ 굽기: 전체 오븐 윗불 180°C, 아랫불 160°C에서 15-20분간 굽기 한다(테크오븐기준).

(적절한 시기에 팬의 위치를 바꿔준다.)



Figure 사-6. Method for making morning bread with apple pomace mixture fermented by *L. plantarum* EJ2014 and *S. cerevisiae*

(나) 결과 및 고찰

- 일반적 모닝빵은 물 또는 우유를 130 g 첨가하고 이스트 4 g 첨가하는 반면에 기능성 모닝빵은 우유를 넣지 않고 이스트 분말의 함량을 절반으로 줄여 사과박 효모 발효물을 밀가루 대비 50%수준으로 첨가함으로써 반죽의 숙성 시에 탄산가스 생성에 따른 반죽의 팽창제로서 효모로서 역할과 식이섬유가 강화된 기능성 모닝빵 제품을 제조할 수 있었다. 특히, 사과박 효모 발효물의 첨가는 기능성 모닝빵의 색상과 맛이 우수한 특징을 나타내었다.



Figure 사-7. Cross section of morning bread with apple pomace mixture fermented by *L. plantarum* EJ2014 and *S. cerevisiae*

왼쪽: 기능성 빵 제품 / 오른쪽: 기존 모닝빵(위), 오른쪽(아래)

- 사과박 부산물을 균질화 및 여과공정을 통해서 껍질, 씨 등의 이물질을 제거시킴으로서 사과 식이섬유가 풍부한 식품소재로 개발이 가능하였다. 이를 원료로 효모의 발효를 통해 제빵의 숙성 시에 팽창시키는 역할을 하게 함으로서 기존의 상업적 효모분말의 첨가량을 감소시키며, 동시에 색상과 기호성의 증진 및 식이섬유 강화를 통해서 기능성 모닝빵 제품의 품질을 향상시키는 것이 가능하였다.

(바) 사과박 발효물을 이용한 치킨양념소스 시제품 개발

- 참여기업 더블어식품에서 판매되고 있는 치킨 양념소스와 데리야끼 소스에 사용되는 사과퓨레를 대신하여 계명대학교에서 개발한 사과박과 식초 혼합물을 첨가하여 산감미소스와 데리야끼소스를 개발하였다. 사과박을 과쇄, 여과 및 희석하여 보관성과 감미를 위해 식초를 첨가하였으며, 이를 이용하여 더블어식품에서 판매되고 있는 소스류에 첨가하여 시제품개발을 하였다.



Figure 사-8. Development of acid flavor prototype

사-2. 목이버섯 젖산발효를 통한 GABA 생산 최적화

(1) 재료 및 방법

- *L. plantarum* EJ2014를 접종하여 하루 배양한 목이 페이스트를 starter로 사용하였다. 목이버섯 20 g을 물에 충분히 불린 다음 세척한 후, 증류수 100 mL을 첨가하여 증류수의 부피를 기준으로 MSG를 각각 10, 15%, yeast extract를 각각 1, 3, 5%, glucose 3% 첨가하였다. 그 다음 믹서기로 파쇄하여 100°C에서 30분간 중탕, 살균하였다. 그 후 목이 페이스트에서 배양한 starter를 증류수 대비 1% 접종하여 30°C에서 9일간 정치배양 하였다(Figure 사-9).

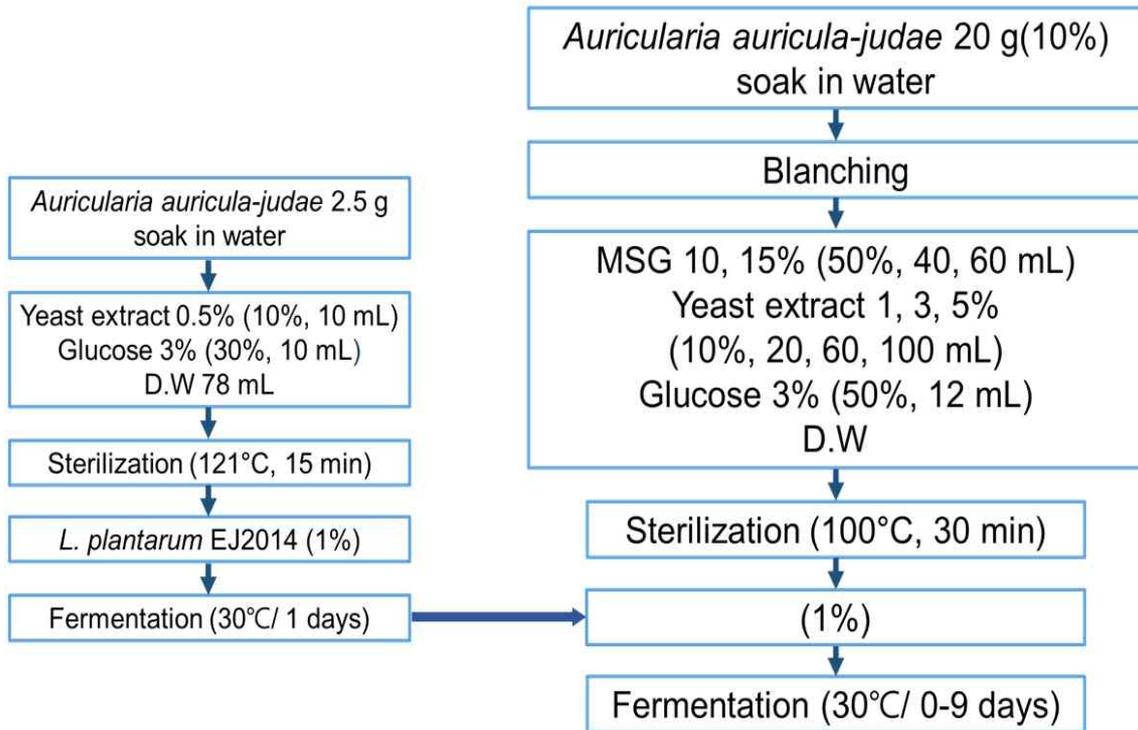


Figure 사-9. A flow diagram for lactic fermentation of *Auricularia auricula-judae*
 A : MSG 10%+yeast extract 1%, B : MSG 10%+yeast extract 3%, C : MSG 10%+yeast extract 5%
 D : MSG 15%+yeast extract 3%, E : MSG 15%+yeast extract 5%

(2) 결과 및 고찰

- 발효 전 pH 5.9-6.0에서 발효 1일차에 4.4-4.7로 감소, 이후 지속적으로 증가하여 발효 9일차에 pH가 약 7.0으로 나타났다. 산도는 발효 전 0.2-0.6%에서 A조건이 발효 3일차에 1.0%까지 증가하였던 반면, A조건을 제외한 나머지 조건들은 발효 1일차에 1.4-1.5%로 증가하였다가 이후 감소하는 것을 확인하였다(Figure 사-10).

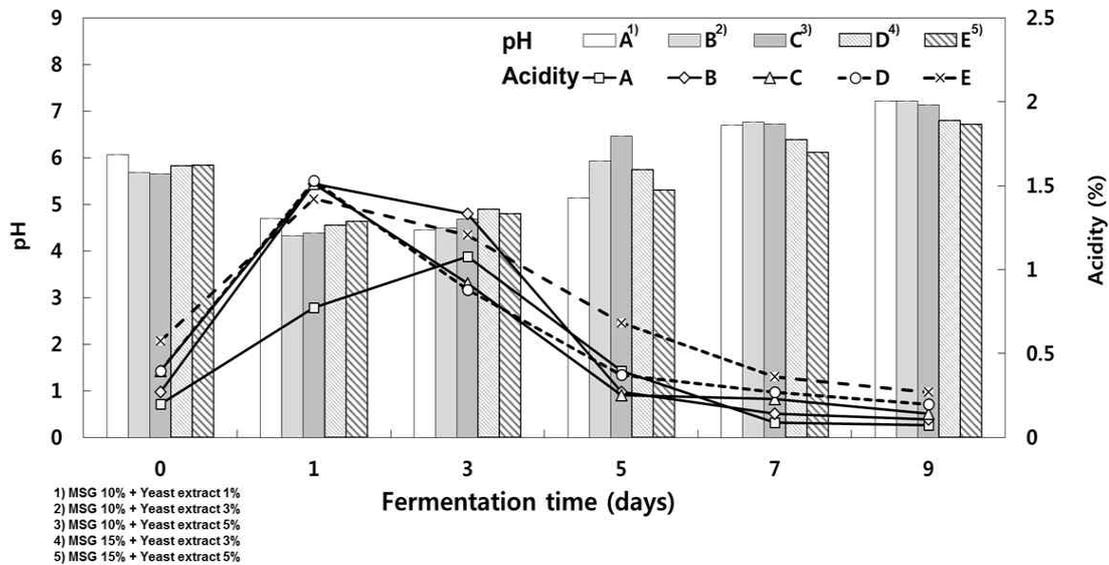


Figure 4-10. Changes in pH and acidity of the *Auricularia auricula-judae* fermented by *L. plantarum* EJ2014

- 초기 starter 10^7 CFU/mL에서 발효 1일차에 10^8 CFU/mL로 증가한 A조건을 제외한 나머지 조건은 발효 1일차에 10^9 CFU/mL 이상으로 증가하다가 이후 감소하여 발효 마지막 날에는 10^8 CFU/mL을 나타내었다(Figure 4-11).

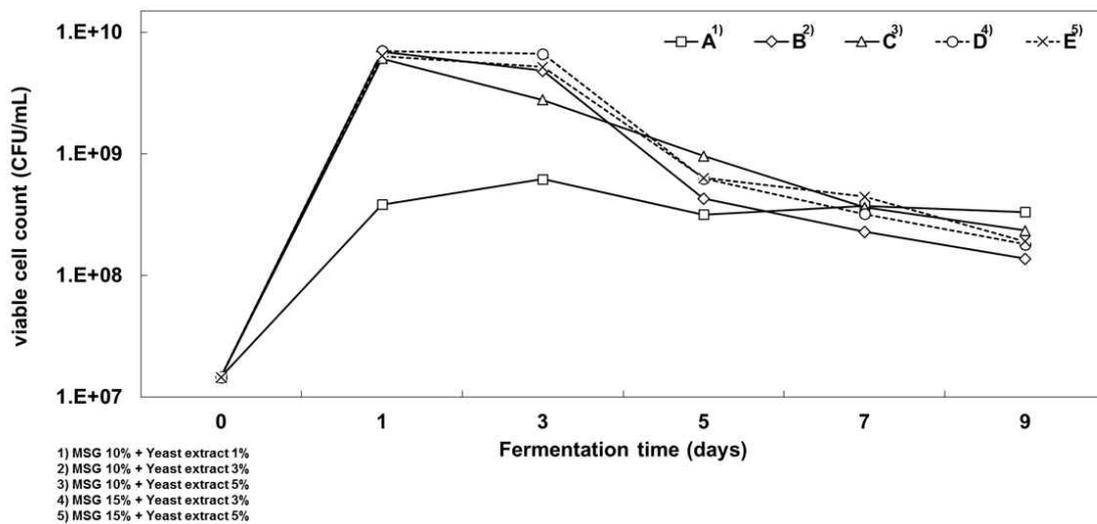


Figure 4-11. Viable cell count of the *Auricularia auricula-judae* fermented by *L. plantarum* EJ2014

- GABA의 함량 변화를 비교하기 위해 TLC를 이용하여 정성분석 한 결과, MSG 10%와 MSG 15% 첨가조건에 MSG가 완전히 소진된 조건은 없었다. 다만 yeast extract가 많이 들어간 조건일수록 MSG 소진량이 조금 더 많았음을 확인하였다(Figure 4-12). Yeast extract가 많이 들어갈수록 MSG가 더 소진되고, 그에 따른 이취가 나는 것은 아님을 확인하였다. 다만 발효가 완료된 발효물에서 색이 갈색 빛을 나타내는 변화는 있었다.

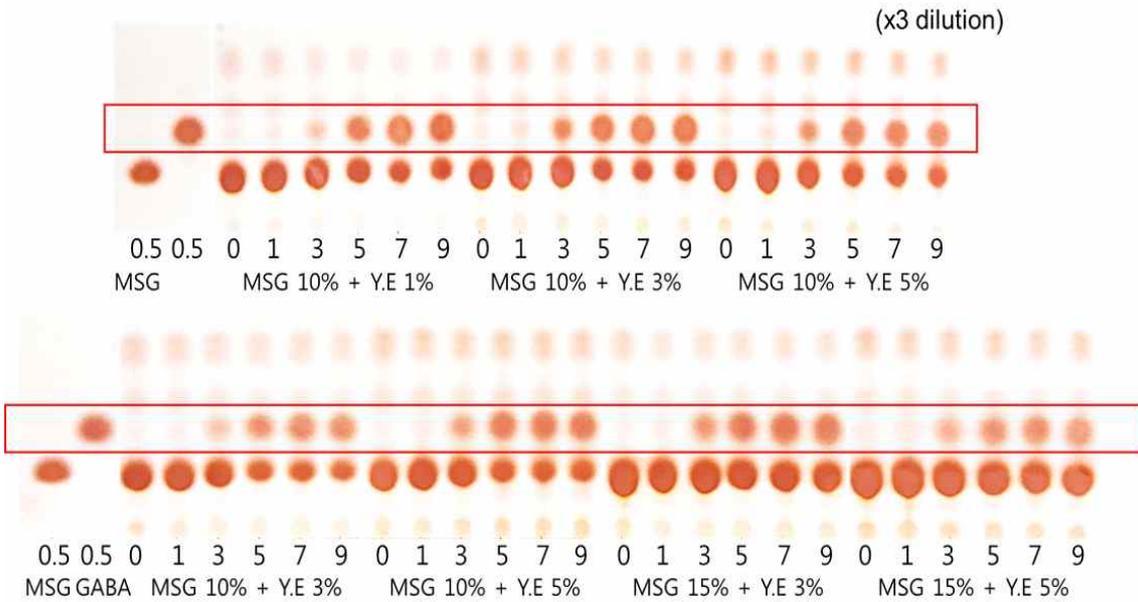


Figure 사-12. TLC analysis of GABA in the *Auricularia auricula-judae* fermented by *L. plantarum* EJ2014.

아. 한방소재가 첨가된 발효청국장의 제품개발 및 효능평가

(정보내츄럴)

아-1. 한방소재 청국장을 이용한 체지방 개선 및 면역증진 추진 일정



아-2. 한방소재를 이용한 TVP 발효 최적화

(1) 재료 및 방법

- 정보내츄럴의 새로운 청국장을 개발하기 위해 4가지 한약재를 이용하여 청국장 발효를 하였다. TVP 30 g에 물, 5% 두충껍질 추출물, 5% 황기 추출물, 황칠나무 추출물(4배희석), 헛개나무 추출물(2배 희석) 45 mL을 각각의 비커에 첨가하여 NB배지에서 24시간 배양한 *Bacillus subtilis* HA 균주를 고형분 대비 1% 첨가하여 42°C, 12시간 배양하였다(Figure 아-1).

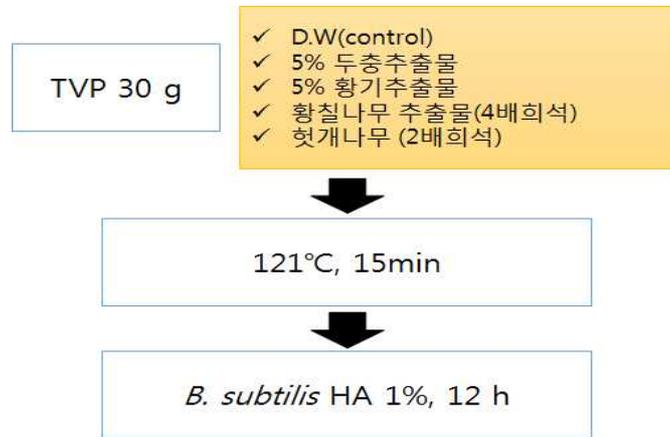


Figure 아-1. Procedure for alkaline fermentation of TVP with herbal materials

(2) 결과 및 고찰

- 한방소재를 활용한 TVP 청국장 발효의 pH와 산도 결과 pH는 6.74-6.77로 대부분 비슷한 수치를 보였으나, 산도는 control에서 1.48%로 나타났으며 황칠나무 추출물이 0.76%로 가장 낮게 나타났다(Figure 아-2). 생균수는 9.0×10^9 CFU/mL 이상으로 황칠나무 추출물에서 1.42×10^{10} CFU/mL로 가장 높은 균수를 나타내었다(Table 아-1). 점질물 함량은 control과 두충, 황기에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 헛개에서 가장 낮은 것을 확인 할 수 있었다(Figure 아-3).

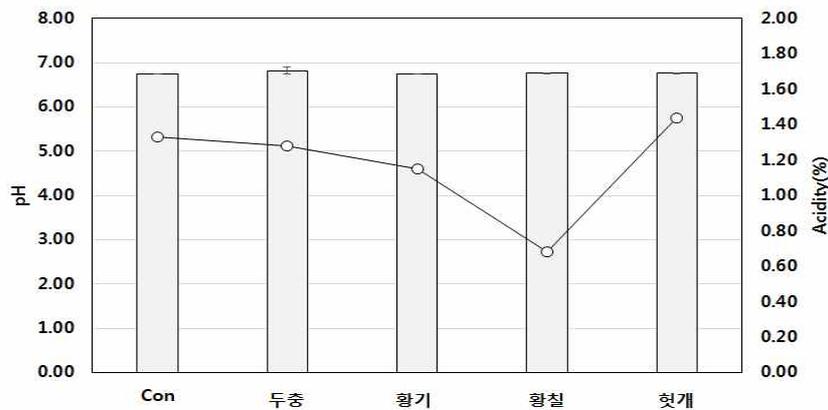


Figure 아-2. Changes in pH and acidity of TVP fermented with herbal materials

Table 아-1. Viable cell counts of TVP fermented with various herb extract

Sample	Viable cell count (CFU/mL)
Control	1.0×10^{10}
<i>Eucommia ulmoides</i>	1.07×10^{10}
<i>Astragalus propinquus</i>	9.05×10^9
<i>Dendropanax mobifera</i>	1.42×10^{10}
<i>Hovenia dulcis</i>	1.09×10^{10}

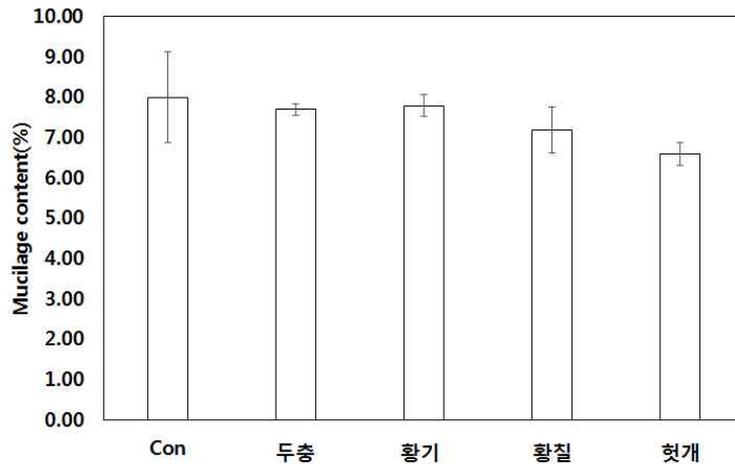
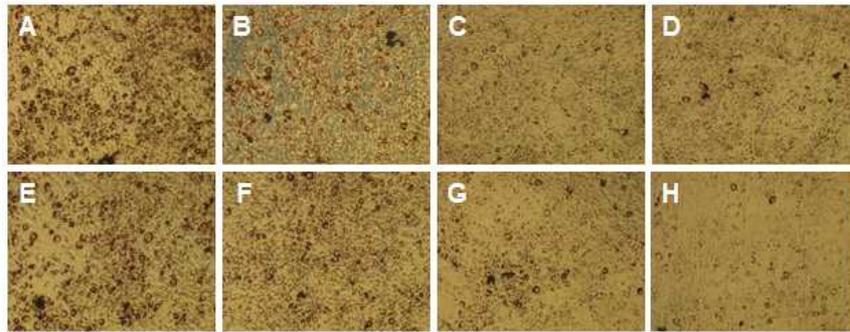
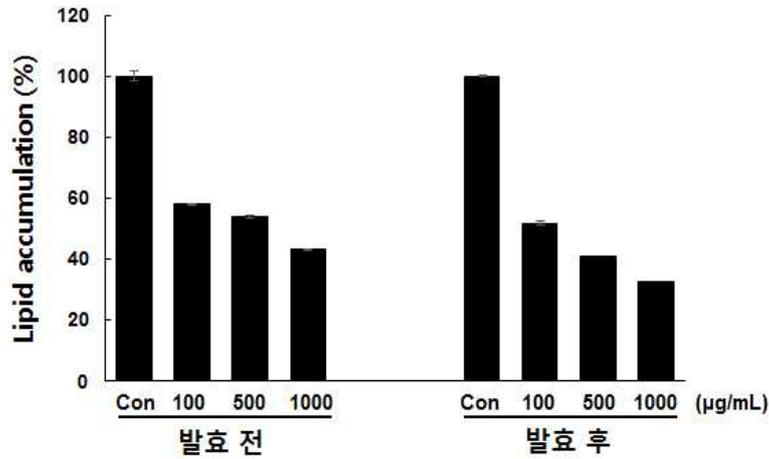


Figure 아-3. Mucilage content of TVP fermented with various herb extract

아-3. 한방 발효TVP가 지방전구세포 lipid droplet 생성에 미치는 영향

- 발효 전·후의 청국장이 3T3-L1 전구지방세포의 지방구 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 전지방세포를 6 well에 3×10^5 cells/well로 분주하여 confluent 상태에서 48시간 경과 후 분화유도 배지(MDI)와 발효 전·후의 청국장 시료를 각각 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하면서 adipocyte로의 분화를 유도 하였다. 이 후 48시간 주기로 3번 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 insulin이 첨가된 배지로 교체하면서 시료를 처리하여 Oil-red-O로 지방구를 염색하고 200 배율의 현미경으로 지방구를 관찰하였다(Figure 아-4).
- 시료를 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우, 세포질 내 lipid droplet이 활발하게 형성되었으나, 청국장에 의해 지방구 형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 특히 발효 전 청국장 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 42, 46, 56% 정도 지방구의 형성을 억제시켰다.
- 발효에 따른 미생물에 대한 영향을 배제시키기 위해 청국장을 발효시킨 후, 85°C, 30 분간의 열처리를 수행한 후 이 시료의 지방세포 분화억제 효과를 확인하였다(Figure 아-4). 대조구에 비해 발효 청국장을 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 각각 48, 59, 67%의 지방세포 분화억제 효과를 보였다. 청국장은 발효와 관계없이 지방세포의 분화를 억제시키는 효과를 가지기도 하지만, 발효를 통해 지방세포의 분화가 더욱 감소됨을 관찰하였다. 청국장의 발효를 통해 생성된 점질물(γ -PGA), peptide 등의 생리활성물질에 의해 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 비교시 지방세포 분화 억제능이 발효 전 56%에서 발효 후 67%로 약 10%이상 증가하는 것으로 판단된다.
- Lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의해 둘러싸인 중성지방으로 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, PPAR γ 와 같은 중요한 adipogenic transcription factor들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 청국장 추출물의 지방세포 분화억제 효과가 이들 전사인자 및 하위 유전자에 의해 조절되는 것인지에 대한 연구가 추가되어야 한다.



A,E: 분화 대조구
 B,C,D: 발효전 100,500,1000 µg/mL
 F,G,H: 발효후 100,500,1000 µg/mL

Figure 4-4. Effect of fermented TVP extract on the formation of Lipid droplet in Preadipocytes

아-4. 한방 발효 TVP를 이용한 면역증진 *In vivo* 효능평가

(1) 서론

- 콩은 여러 기능성 화합물의 존재로 인해 영양가가 높은 식품으로 알려져 왔다. 또한 펩타이드(lunasin)와 이소플라본(genistein) 등을 함유하여 항당뇨병, 항암, 항 고혈압 및 항산화 작용을 나타낸다고 보고된 바 있다(He et al., 2013; Kwon et al., 2010; Messina et al., 1994).
- 전통적 콩을 발효한 청국장은 암, 당뇨병에 대한 효과 및 강력한 항염증제(IL-6 및 TNF- α 저해제)로써 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 실험용 흰쥐의 장내에서 CD4+ 및 CD8+ 세포의 수준을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다(Lee et al., 2011).
- Lee 등(2017)은 최근에 전통적 방식으로 6개월 간 발효시킨 된장과 청국장의 생체 내 활성을 조사하였다. 두 가지 발효식품 모두 실험용 흰쥐의 전반적인 면역 상태를 향상시키는 것으로 나타났다. 그러나 전통적인 방식은 생산 시간이 상대적으로 길다는 단점이 있다.
- 따라서 본 연구에서는 청국장 *Bacillus subtilis* HA를 첨가한 조직대두 단백질을 12시간 동안 발효시켜 얻은 생청국장을 이용하여 마우스의 면역 활성화에 미치는 영향을 평가하였다.

(2) 시험물질

- 조직대두단백질(Texture vegetable protein, TVP) 30 g에 홍삼(Red ginseng\순홍삼엑골드, 효림농산영농조합법인)과 두충(*Eucommia ulmoides* Oliver) 5% 추출물(1:1) 혼합액을 45 mL 첨가하여 NB 배지에서 24시간 배양한 *Bacillus subtilis* HA 균주를 고형분 대비 1% 첨가하여 42°C, 12시간 배양하였다.

(3) 시험계 및 사육환경

(가) 실험동물 윤리규정

-승인번호 KNU 2017-0046-1: 아로니아와 동충하초 추출발효액의 면역증진 효능평가와 어린이용 청국장 단백질 억제능에 관한 효능 평가

(나) 시험계

- 계 통 및 종: 실험용 흰쥐 (BALB/c)
- 공 급 원: 주식회사 오리엔트
- 동물의 성, 수 및 주령: 암컷 60마리 (5주령)
- 본 시험에 사용한 BALB/c 마우스는 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부함으로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.

(다) 사육환경

- 동물사육실은 온도 20°C-24°C, 습도 50%-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(4) 시험방법

- 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 ‘면역 기능 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편, <면역기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오 마커> 를 참고하여 진행하였다.

(가) 시험군의 구성

- 마우스를 임의로 12마리씩 분류, 총 7 개의 그룹으로 나누었다(Table 아-2).

Table 아-2. Group arrangement and experimental design for mice feeding

Groups	Treatment groups	Description
Group I	Normal control	Received only diet and water
Group II	Vehicle control	Received water and treated with SRBC
Group III	Positive control	Received Levamisole 10 mg/kg
Group IV	Low dosage treatment	Received 125 mg/kg of soybean extracts
Group V	Intermediate dosage treatment	Received 250 mg/kg of soybean extracts
Group VI	High dosage treatment	Received 500 mg/kg of soybean extracts

(나) 투여량 설정 및 투여 방법

- 시험시 정산대조군을 제외한 각 시험군의 마우스에 200 mg/kg, 250 mg/kg 또는 500 mg/kg의 생청국장 분말을 14일 동안 매일 경구 투여 하였다.

(다) 실험 전반 일정 및 샘플링 방법

- 먼저 투여 14일차에 각 그룹당 6마리의 실험동물을 희생하여 심장채혈을 통해 혈액을 채취 하였다. 처리 군 및 기관을 희생시킨 후 각 마우스로부터 수집 하였다. 나머지 6마리 실험 동물은 15 일째에 밀리리터 당 5.0×10^8 양의 적혈구(SRBCs)를 복강 주사하여 면역을 유도, 일주일 동안 추출물을 투여 하였다. 체중은 복용량 조정을 위해 3일 1회 측정하였다.
- 시험 시작 후 21일 시점에 각 그룹의 잔여 마우스를 희생시킨 후 심장 채혈하여 Heparin Blood collection tube에 보관, 5 분간 10,000 rpm으로 원심을 통해 혈장을 분리하여 -70°C 에 보관하였다. 이후 ELISA 분석법을 통해 항체가를 확인하는 실험을 진행하였다. 또한 각 개체에서 간, 신장, 비장 및 흉선을 무게 측정 후 실험을 위해 -70°C 에 보관하였다(Figure 아-5).

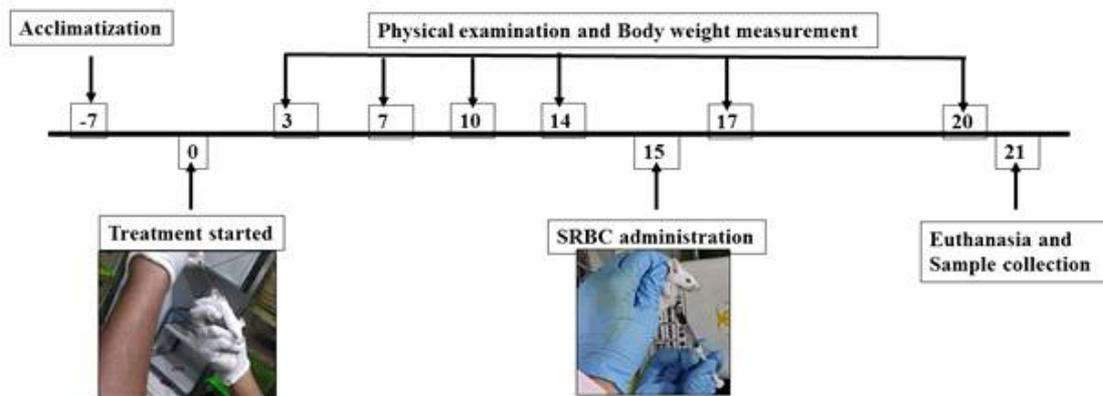


Figure 아-5. Flow chart for the experimental procedure

(라) 호중구의 분리 및 계수

- 채취한 혈액 샘플에서 호중구를 Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 분리 하였다. 혈액과 동량의 Histopaque를 첨가하고 실온에서 30 분간 400xg에서 원심분리 하였다. 이후 상등액을 제거하고, PBS를 첨가하여 표면을 세척 후 250xg에서 10 분간 3 회 원 심 분리 하였다. 최종적으로, 10% FBS를 함유한 DMEM을 첨가하여 펠렛을 부유 시킨 후 Trypan-Blue 염색법을 사용하여 세포를 계수 하여 실험에 사용하였다.

(마) 호중구의 식세포 활성 측정

- 호중구의 식세포 활성은 발효 아로니아 추출물과 같은 방법으로 진행 하였으며, Cytoselect™ 96-well phagocytosis assay (*E. coli*) (Cell Biolabs, INC. CA, USA)를 사용하여 수행 하였다.
- 96 well plate에 세포를 10^6 cell/mL 농도로 100 μL 씩 분주한 후 10 ul의 *E. coli* 현탁액을 플레이트에 첨가한다. 이 혼합물을 5% CO_2 의 존재 하에 37°C 에서 6 시간 동안 배양 하였

다. 원심 분리 후 배지를 제거하고 세포를 200 uL의 1X PBS로 세척하였다. 이후 세포를 실온에서 100 uL의 고정액을 첨가하여 5 분간 배양하였다. 고정 용액을 제거하고 세포를 1X PBS로 2 회 세척하고 100 uL의 1X blocking solution을 첨가하고 실온에서 30 분 동안 교반기에서 배양하였다.

- 마지막으로 100 uL의 기질을 첨가하여 반응을 시작하고 20 분간 배양한 후 100 uL의 stop solution을 첨가하고 Versamax ELISA reader (Molecular devices, USA)를 사용하여 450 nm의 흡광도에서 값을 측정하였다.

(바) 호중구의 이동상 분석

- 발효 아로니아 추출물과 같은 방법으로 진행 하였으며, Cytoselect™ 24-well 세포 이동 분석키트(3 μm, fluorometric format) (Cell Biolabs, INC. CA, USA)을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 호중구 이동을 분석하였다. 호중구를 상기 언급 된 바와 같이 분리하고 혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배지에 세포를 5×10^6 cell/mL을 300 uL을 첨가한다. 그리고 10% FBS를 함유하는 배지 500 uL를 migration plate의 하단에 첨가 하였다.
- 세포를 8시간 배양한 후 세포 상등액 200 uL을 깨끗한 well로 옮기고 37°C에서 30분간 배양하였다. 세포는 멤브레인의 하부로부터 완전히 제거되고, 추가적으로 세포로부터 400 uL의 배양액을 분리하였다.
- 마지막으로, 180 μL의 샘플을 96-well plate로 옮기고 4X Lysis Buffer/CyQuant®GR 염료 60 μL를 첨가한 후 실온에서 20 분간 배양하였다. 혼합물을 200 uL씩 96-well plate 옮긴 후 fluorescence plate reader로 플레이트를 480 nm/520 nm에서 형광값을 측정하였다.

(사) MAC I 발현 및 T-림프구 표현형에 대한 유동세포 계측 분석

- PBS, 10% FCS 및 1% sodium azide를 이용하여 비장세포(5×10^6 cell/100 uL) 및 MAC-1 발현 호중구(5×10^6 cell/100 uL)의 T-림프구를 분리하여 FACS tube에 보관하였다.
- 접합 항체(10 ug/mL)를 첨가하고 세포를 30 분간 암반응한 후 교반하여 항온배양기에서 배양 하였다. 세포를 Flow Cytometry Staining Buffer로 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거한 다음, 300xg에서 5분간 원심 분리하였다. 이후 세포를 세척하고 유세포 분석을 위한 완충 용액 200 uL로 재현탁 하였다.
- 마지막으로 BD FACSAria™III (BD Biosciences, CA, US)에서 FACSDiva 버전 6.1.3 소프트웨어를 사용하여 다중 색상 FACS를 사용하여 데이터를 분석하였다. 다른 T-림프구 하위 집단(CD4, CD8, CD11b 및 CD18) 사이에서 그룹간 비교 분석 하였으며, 결과는 백분율로 나타내었다.

(아) 비장세포의 분리

- 실험 전반 과정은 상기 설명한 발효 아로니아 추출물과 같은 방법으로 진행 하였다. 실험동물을 희생시킨 후, 비장 및 기타 기관을 모든 실험군에서 무균적으로 분리하여 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco Life Technologies, NY)를 포함한 멸균 튜브에 넣고 ice상에서 보관하였다.
- 분리한 비장을 3 mL 주사기 상에 70 um 미세 나일론셀 스트레이너(BD Biosciences, CA)

를 부착하여 압축 하였다. 압축된 세포를 스트레이너를 사용하여 과량의 HBSS로 세척하였다. 이후 세포 현탁액을 1,600 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고, 적혈구 용해 완충액(Sigma, UK) 1 mL로 재현탁한 후 37°C에서 1 분간 배양하여 적혈구를 용해시키고 HBSS를 첨가하였다.

- 다음으로, 세포를 4°C에서 1,600 rpm으로 5 분간 원심 분리 후 세포를 원심 분리하고 PBS를 이용하여 3 회 세척하였다. 그 후, 상층액을 제거하고, 10%(v/v) FBS, 100 unit/mL의 페니실린 및 100 ug/mL의 스트렙토마이신을 첨가한 RPMI-1640 배지(10% FBS, 1% P/S, Sigma-Aldrich, MO)를 이용하여 세포를 현탁하였다. 세포수는 the trypan blue dye exclusion method을 사용하여 hemocytometer로 측정하였다.

(자) 비장세포에서 림프구 분석

- 대조군과 처리군의 비장세포(4×10^6 cells/mL)를 RPMI-1640 배지(10% FBS, 1% P/S)의 96-well plate에 200 uL/well 농도로 분주한 후, 각 그룹의 세포를 mitogen이 없는 상태에서 concanavalin A (5 ug/mL) 또는 LPS (10 ug/mL)의 존재 하에 37°C에서 72 시간 동안 배양하였다. 결과는 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 시약 분석을 사용하여 분석하였다. 증식 지수는 샘플의 OD값을 기준 OD값으로 나누어 계산하였다.

(차) 사이토카인 및 면역 글로블린 측정

- Microparticle cocktail 50 uL이 첨가된 plate에 샘플, 대조군 및 standard를 교반기에서 실온에서 2시간(사이토카인), 30분(면역 글로블린) 동안 배양하고, 이후 50 uL의 표준 또는 샘플을 각 well에 추가로 첨가하였다.
- 4 회 세척 후, 희석한 Biotin Antibody Cocktail 50 uL 각 well에 첨가하고 실온에서 1.5시간 동안 교반기에서 배양하였다. 희석된 Streptavidin-PE (50 uL)를 각 well에 첨가, 세척 후 실온에서 30분 또는 15분 동안 반응을 진행하였다.
- 마지막으로, 각 well에 washing buffer를 100 uL를 첨가하여 microparticle을 재현탁하고 2 분간 상온에서 반응시킨다. 이후 Luminex MAGPIX 분석기(Luminex, Austin, TX, USA)를 사용하여 값을 측정하였다. 각 샘플은 특정 비드에 부착된 해당 항체와 독립적으로 반응하였으며, 샘플의 농도는 표준 곡선이 five parameters logistic curve-fit (Master Plex QT 2010 (MiraiBio, Hitachi, CA, USA))를 사용하여 나타내었다.

(카) 통계분석

- 모든 결과 값은 GraphPad Prism 7 software를 사용하여 Dunnett's test와 Tukey's test에 따라 편도 및 양방향 분석법을 기반으로 통계 처리하였고, 결과는 평균±표준오차로 표현하였다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의성을 가짐을 나타낸다.

(5) 시험 결과

(가) 마우스의 식이 및 음수량

- 본 실험에서는 21일간 생청국장을 실험용 흰쥐에 투여하였으며, 항원 처리 전과 투여 후 3 일마다 사료 및 물의 양을 측정 하였다. 각 시험군에서 식이량 및 음수량은 항원 투여 전과

투여 후 처리 그룹에서 상대적으로 더 높았다(Figure 아-6). 그러나 250 mg/kg의 생청국장을 투여한 시험군을 제외하고는 식이량, 음수량은 청국장 투여군과 비투여군간의 유의적인 차이는 없었다(Figure 아-6,아-7).

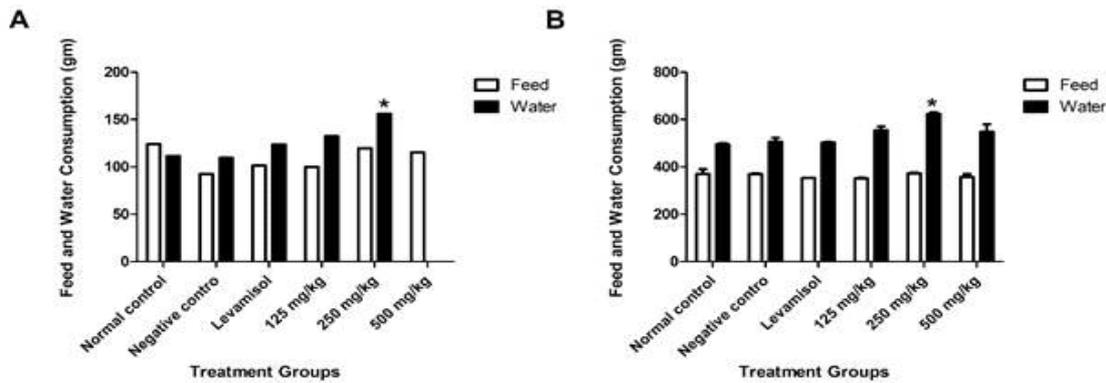


Figure 아-6. Average feed and water intake of mice in each treatment groups after (A) and before (B) antigen administration

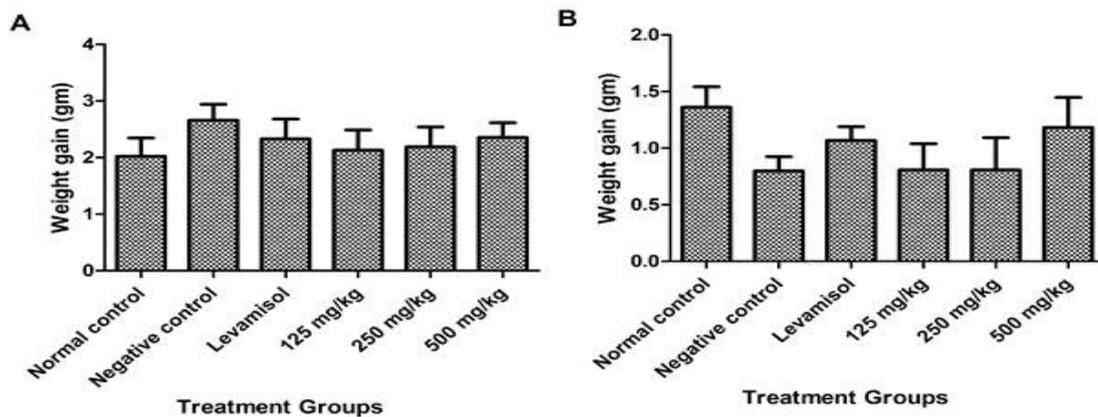


Figure 아-7. Average weight gain of mice in each treatment group before (A) and after (B) antigen administration

(나) 체중 및 장기 무게의 변화

○ 또한 각 마우스의 비장, 간, 흉선 및 두 신장을 무균적으로 채집하여 무게를 측정하였다 (Table 아-3,4, Figure 아-8). 250 mg/kg 생청국장을 투여군에서 비장의 중량이 다른 그룹과 비교하여 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 특히 항원 처리 전 생청국장을 투여한 마우스에서 비장의 무게가 각각 73.3%와 33.4% 증가함을 확인하였다. 항원 투여 후 비장 중량은 250 mg/kg을 투여군에서 38% 증가한 반면, 양성 대조군은 19% 증가하였다.

Table 아-3. Average weight of the organs collected from treated and non-treated mice before antigen administration

Group	Spleen	Liver	L. Kidney	R. Kidney	Thymus
I	0.05±0.01	0.703±0.013	0.087±0.007	0.087±0.013	0.05±0.006
II	0.06±0.006	0.62±0.023	0.097±0.009	0.1±0.01	0.057±0.003
III	0.067±0.003	0.677±0.063	0.087±0.007	0.103±0.003	0.037±0.003
IV	0.053±0.009	0.65±0.046	0.093±0.003	0.087±0.009	0.04±0.006
V	0.087±0.009	0.687±0.017	0.127±0.015	0.123±0.012	0.063±0.023
VI	0.06±0.006	0.64±0.006	0.097±0.003	0.1±0.006	0.05±0.006

Table 아-4. Average weight of the organs collected from treated and non-treated mice after antigen administration

Group	Spleen	Liver	L. Kidney	R. Kidney	Thymus
I	0.07±0.012	0.773±0.029	0.103±0.003	0.107±0.003	0.04±0.006
II	0.08±0	0.773±0.029	0.103±0.003	0.107±0.003	0.033±0.007
III	0.083±0.007	0.813±0.026	0.103±0.003	0.103±0.007	0.047±0.003
IV	0.083±0.003	0.757±0.023	0.113±0.003	0.11±0	0.04±0.006
V	0.097±0.007	0.853±0.078	0.113±0.009	0.123±0.009	0.047±0.003
VI	0.083±0.015	0.793±0.037	0.133±0.021	0.137±0.019	0.07±0.01

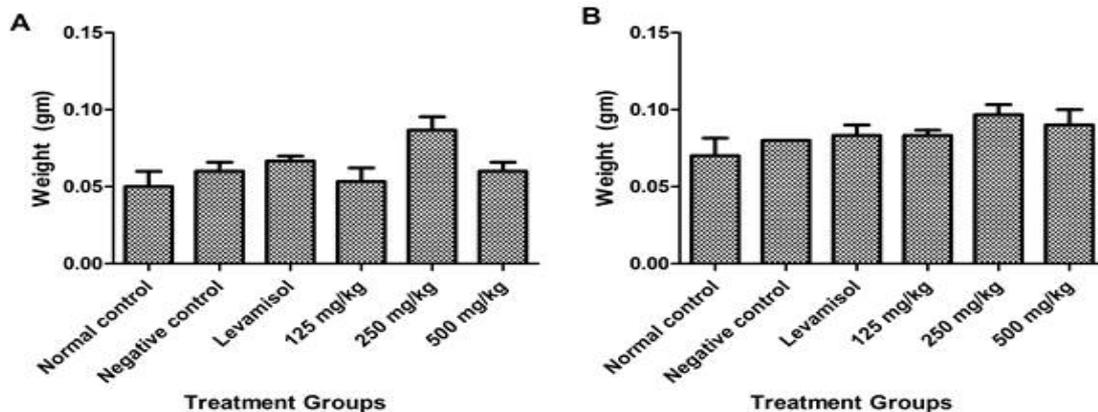


Figure 아-8. Weight of spleen taken from each mouse groups before (A) and after (B) treatment with antigen

(다) 호중구의 식세포 활성 및 이동상 분석

○ 호중구의 이동상 분석은 생청국장을 500 및 250 mg/kg의 투여한 시험군에서 대조군 보다 각각 25.67%, 4.14% 이동상이 증가함을 확인하였다(Figure 아-9A). 또한, 500, 250 및 125 mg/kg의 생청국장을 급여한 시험군에서 식균 활성은 대조군과 비교하여 각각 123.4%, 49.86% 및 29.77 % 증가함을 본 실험을 통해 확인하였다(Figure 아-9B).

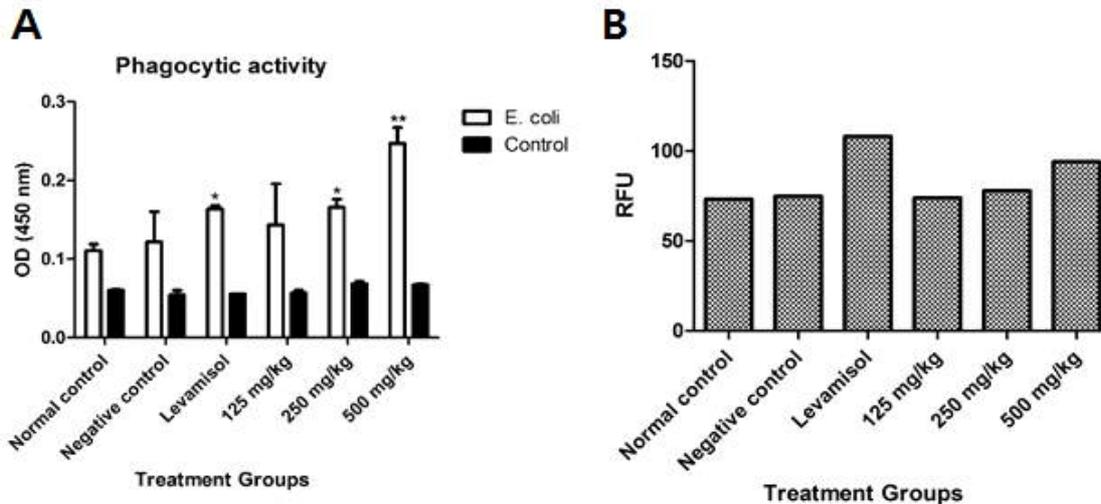


Figure 아-9. A) Total splenocyte count of different treatment groups. A significant increase in splenocyte counts was observed in mice those that received 250 and 500 mg/kg of soybean extract. B) In vitro activation of splenocytes by Con A and LPS after 72 h of incubation. A significant increase in activation of splenocyte derived from mice group treated with 250 and 500 mg/kg of soybean Con-A and LPS (*P value < 0.05; ***P<0.001).

(라) MAC I 발현 및 T-림프구 표현형에 대한 유동세포 계측 분석

○ Flow cytometry T-cell 림프구 확인 결과, 생청국장 급여군은 대조군보다 CD-4 및 CD-8a T-cell의 발현도가 높았다. 생청국장을 500 mg/kg을 급여한 군에서 CD-4 및 CD-8a는 대조군과 비교하여 각각 21.4와 57.14%의 증가율을 보였다 (Figure 아-9A). 또한 125와 250 mg/kg 급여군에서 각각 2.2와 5.5%와 40.95와 40% 증가함을 확인하였으며, CD-11b/CD-18의 발현의 경우 대조군과 비교하여 500 mg/kg을 급여한 군에서 18% 증가하였다 (Figure 아-9B).

(마) 비장세포에서 림프구 분석

○ 비장 세포는 Trypan Blue로 염색하여 계수 하였다. 마우스의 총 비장 세포 수는 투여군에서 용량 의존적으로 증가하였다. 500, 250 및 125 mg/kg의 생청국장 투여군과 정상 대조군과 비교 분석한 결과, 각각 159%, 51.62% 및 1.8% 비장 세포의 수가 증가한 것으로 확인되었다(P<0.001)(Figure 아-10A).

○ T cell 및 B cell 림프구 증식 분석 결과, Con-A 및 LPS 처리군 모두에서 생청국장 및 양성 대조군에서 결과값은 유의하게 더 높았으며 용량 의존적 관계가 확인되었다. Con-A 및 LPS 처리에 의한 비장 세포 증식은 125, 250 및 500 mg/kg의 생청국장급여군에서 Con-A 활성화에 의해 28.88, 63.03 및 75.82%, LPS 활성화를 통해 34.29, 57.37 및 62.78% 증가함을 확인하였다(Figure 아-10B).

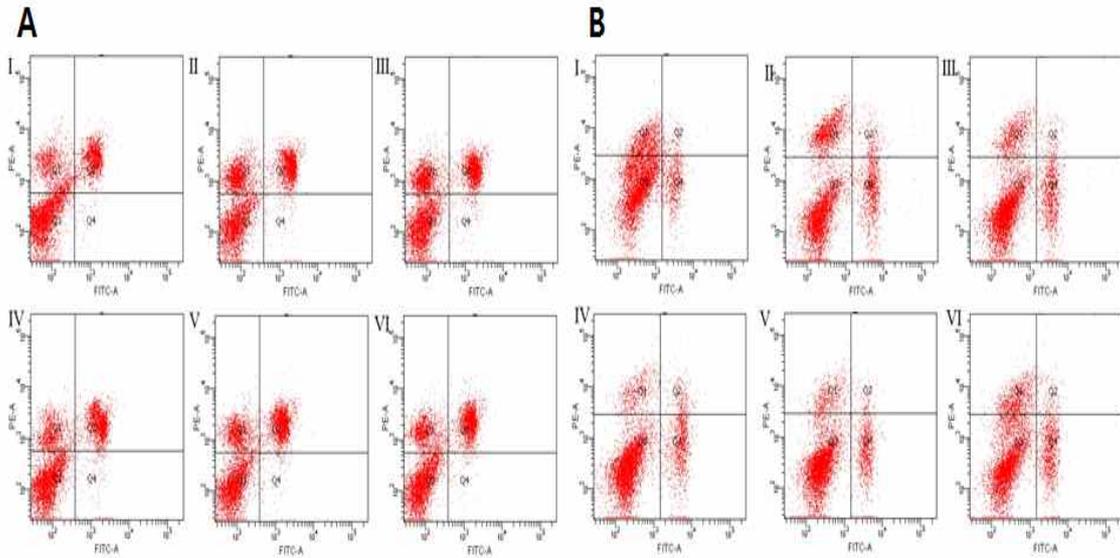


Figure 9. FITC-conjugated CD8a (A) and PE-conjugated CD3 (B) T cell population comparison among different treatment groups

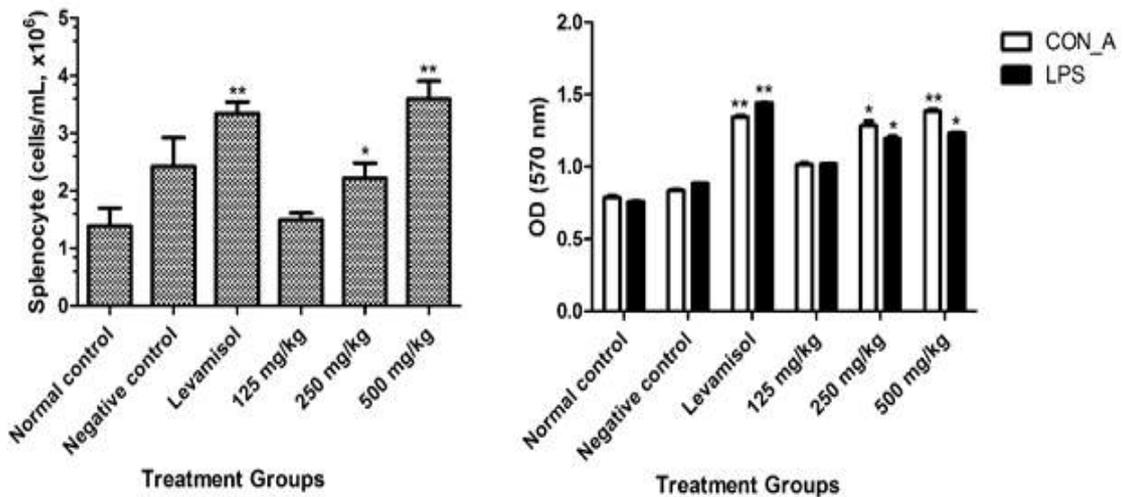


Figure 10. Neutrophil phagocytic activity and migration assay. A significant increase in phagocytic activity (A) of neutrophils was maintained in mice treated with 250 and 500 mg/kg of soybean extract (*P value<0.05; **P<0.001). The soybean extract increased the migration of neutrophils in a dose-dependent manner (B).

(바) 사이토카인 및 면역 글로블린 측정

- 생청국장이 Th1- 및 Th2- 의존성 사이토카인 방출에 미치는 영향을 측정하기 위하여 ELISA를 수행하였다. IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 는 생청국장을 투여한 시험군에서 용량 의존적으로 증가함을 확인하였다(Figure 아-11).
- 125, 250 및 500 mg/kg 생청국장 투여군에서 IFN- γ 의 수준은 대조군과 비교하여 각각 31.2, 58.1 및 82.7% 증가하였다. 또한, IL-2, IL-4 및 IL-6은 투여군에서 대조군 보다 2 배 이상 증가하였고, 통계적으로 유의함을 확인하였다. 유사하게, TNF- α 수치는 125, 250 및

500 mg/kg의 생청국장 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 63.8, 127.4 및 192.9%의 증가함을 확인 하였다.

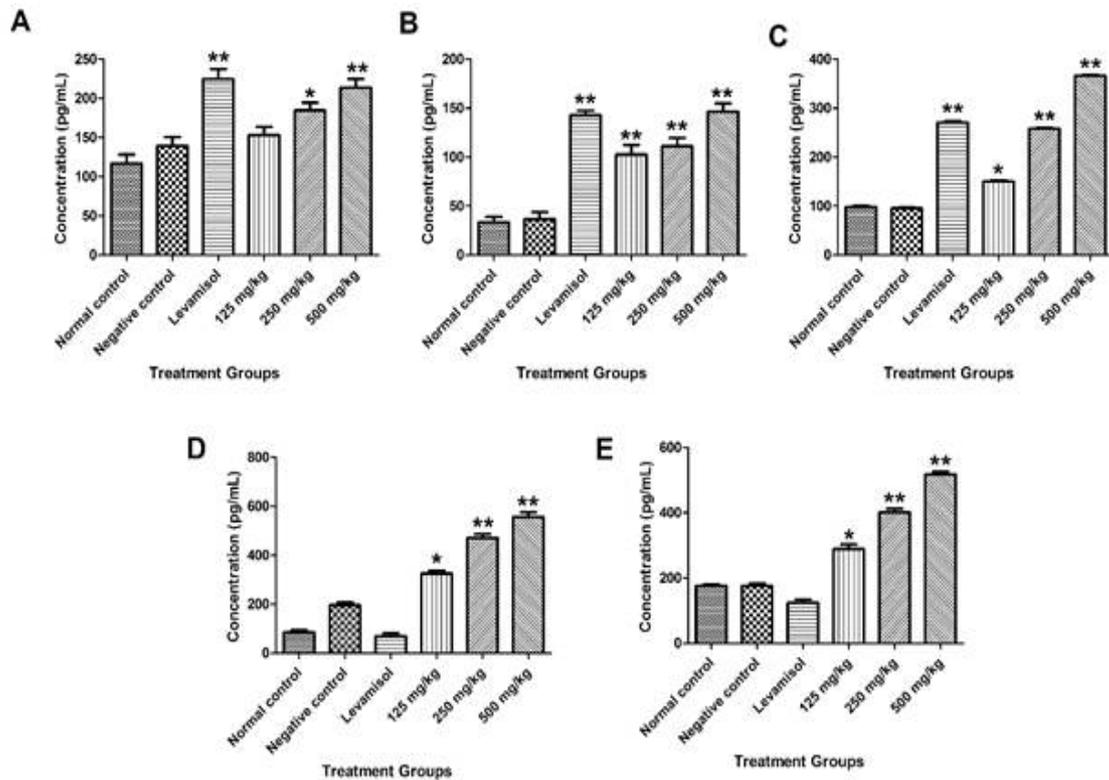


Figure 아-11. Cytokine concentration in different treatment groups of mice. A) IFN- γ , (B) IL-2 (C) IL-4, (D) IL-6 and (E) TNF- α . Mice treated with beans extract has shown a significant level of increase in expression of pro-inflammatory cytokines when compared with the normal and negative control group except in the level of IFN- γ for mice treated with 125 mg/kg of beans extract (*P value<0.05; **P<0.001).

(6) 결론

- 천연물의 면역 자극 활성은 면역과 관련된 질병을 예방하는데 있어서 효과가 보고되고 있으며, 이는 자가 면역 질환과 같은 질병에 사용되는 화학물질의 대체제로서 각광 받고 있다 (Shukla, et al., 2014; Patwardhan and Gautam, 2005). 따라서 본 연구에서는 실험용 흰쥐에서 생청국장을 이용한 면역 기능 활성화에 관한 효과를 확인하고자 하였다.
- 본 연구에서는 생청국장의 투여가 흰쥐에서 비장세포의 증식 및 T-, B-림프구의 증식을 증가시키는 것을 확인하였다. 생청국장을 급여한 시험군에서 B- 및 T-세포의 증식은 선천성 면역계에 대한 면역 자극 효과를 가짐을 시사한다. 흥미롭게도, T-cell의 증식이 높을수록 생청국장의 효과가 더 뚜렷함을 CD18 표현형이 증가함을 통하여 확인하였다.
- 호중구는 미생물의 침입에 있어서 가장 효과적인 1차 방어선으로, 본 연구에서는 생청국장을 급여한 시험군에서 호중구의 식균 활성화 및 이동이 증가함을 확인 하였다. 이는 생청국장의 투여가 흰쥐에서 선천성 면역계의 활성을 증가시키는 것을 의미한다.
- 또한 마우스에서 IFN- γ 의 증가 수준은 용량 의존적으로 증가 하였으며, 이는 생청국장의 투여가 Th1 세포 활성화를 유도함을 나타낸다. Th1와 관련한 면역은 암세포 성장 및 세포내 전염병을 예방하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험 결과는 생청국장의 항균 활성뿐

만 아니라, 항암 활성을 시사하고, 이는 이전에 보고된 논문의 내용과 일치한다.

- 본 연구를 통하여 생청국장을 투여한 시험군의 비장에서 T-및 B-림프구 세포의 수와 증식을 증가 시킨다는 것을 확인하였다. 특히, 증식은 Con-A 활성화에 의해 더욱 두드러지며 T-세포에 큰 영향을 미친다. 또한 호중구의 식균 작용과 이동을 증가시킴을 확인 하였고, CD-8 T-세포의 발현은 용량 의존적이었다. 반면, CD-4 세포의 발현은 고농도 그룹에서 증가하였다.
- 또한, 생청국장의 투여가 IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 의 발현을 증가시켜 전-염증성 사이토카인을 활성화시킨다는 것을 확인하였다.
- 따라서 본 연구를 통하여 생청국장은 BALB/c 마우스의 선천성 면역계에 면역 자극 효과를 가지며 비특이적인 면역을 강화시킬 수 있음을 확인하였으며, 대사와 관련된 부분은 추가적인 연구가 필요하다.

아-5. 청국장 시제품 및 상품화 개발

(1) 어린이용 청국장 시제품 개발

- 어린이용 청국장제품을 만들기 위해 시판되는 초콜렛볼 과자를 이용하여 두충TVP 발효물 및 볶은 밀기울 가루를 이용하여 시제품 생산하였다(Figure 아-12). 초콜렛볼 과자를 200 g 에 두충TVP 발효물 50 g, 볶은밀기울 15 g을 넣고 혼합하였다. 청국장 점질물로 코팅된 시료는 60°C에서 3시간 열풍 건조시킨 후 제품화 하였다.

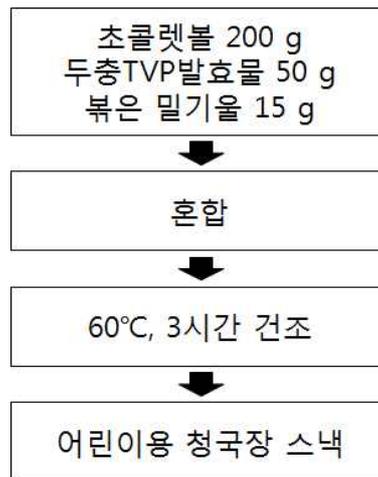


Figure 아-12. Procedure for manufacturing cheonggukjang snacks for children.

- 시판되는 초콜렛볼을 이용하여 제조한 어린이용 청국장은 볶은밀기울의 식이섬유와 청국장의 점질물이 코팅되어 있어 콩이나 청국장 등의 섭취를 꺼려하는 어린이들을 타겟으로 제조된 ‘청국장초콜렛’이다. TVP 발효에서 두충을 첨가함으로써 청국장의 고유의 풍미를 억제시켰으며, 기존 스낵제품에 청국장을 코팅시키는 방법은 이용하여 초콜렛볼 이외에도 다양한 어린이용간식에 코팅이 가능할 것으로 판단된다. 이를 통해서 청국장의 건강소재를 어린이 간식에 첨가하여 기호성이 우수한 건강 스낵제품의 제품화가 가능하다고 사료된다.

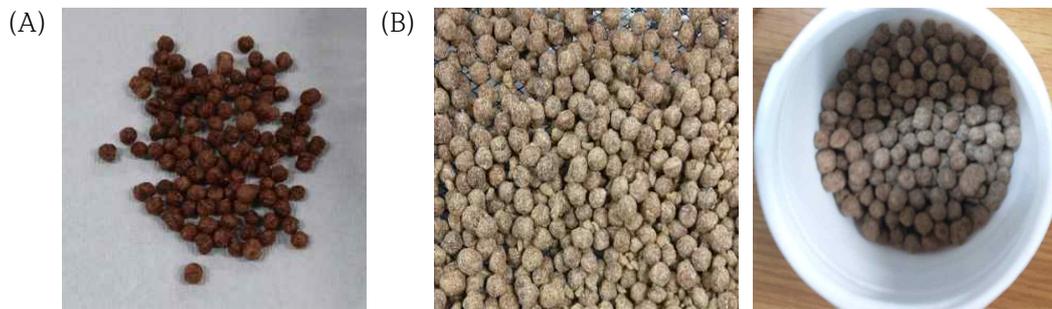


Figure 아-12. Cheonggukjang snack prototype for children
 (A) commercial chocoball product (B) chocoball for children with fermented TVP

(2) 동결청국장과 견과류, 건과일이 첨가된 청국장 시제품 제조



Figure 아-13. Manufacture of chongkukjang prototype for children with frozen chongkukjang, nuts ratio and fruit dry

자. 스피루리나를 이용한 소재개발 및 간기능보호 효능평가

(알지바이오)

자-1. 스피루리나 효모발효 및 자가소화 최적화

(1) 재료 및 방법

- 스피루리나 분말 5 g을 50 mL에 녹여 100°C에 30분간 증탕하여 열처리 하였다. 10% yeast extract 용액 10 mL (1%), 20% glucose 용액 25 mL을 첨가하여 총 부피 100 mL에 *Kazachania servazzii* KM2017 starter 1%를 접종하여 2일간 효모발효 후 5°C에서 5일간 자가소화를 진행하였다(Figure 자-1, Table 자-1)

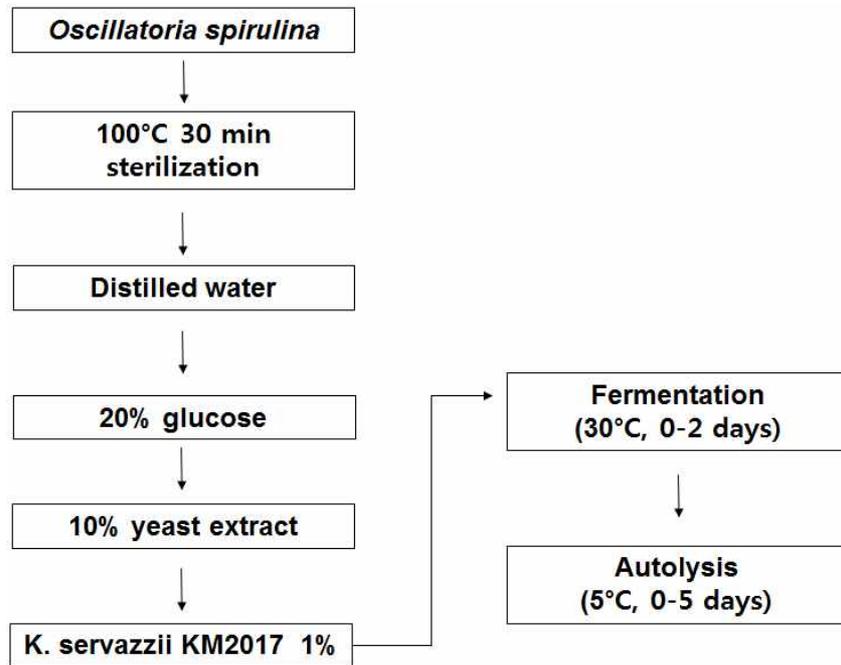


Figure 자-1. Procedure for yeast fermentation and autolysis of spirulina paste

Table 자-1. Medium composition for yeast fermentation and autolysis of spirulina paste

<i>Oscillatoria spirulina</i>	20 g
Distilled Water	50 mL
20% glucose	25 mL
10% yeast extract	10 mL
<i>Kazachania servazzii</i> KM2017	1 mL

(2) 결과 및 고찰

- 스피루리나 효모발효 및 자가소화 최적조건 실험에 대한 pH 및 산도의 결과는 Figure 자-2와 같다. 효모발효 0일차 pH는 6.92로 약중성을 나타내었다. 효모발효 1일차 효모가 생산하는 산으로 인해 pH는 감소하여 6.23으로 나타나 발효 2일차까지 pH는 감소하는 경향을 보였다. 효모발효가 끝난 후 5°C 자가소화 조건에서는 자가소화 5일까지 5.14로 자가소화동안은 pH의 변화가 크지 않았다. 산도의 경우 효모발효 0일차 0.26%를 나타내었고 효모발효를 진행함에 따라 산도는 소폭 증가하는 경향을 보였다. 자가소화 1일차 산도는 0.52%를 나타내었고 이후 유지되거나 감소되었다.

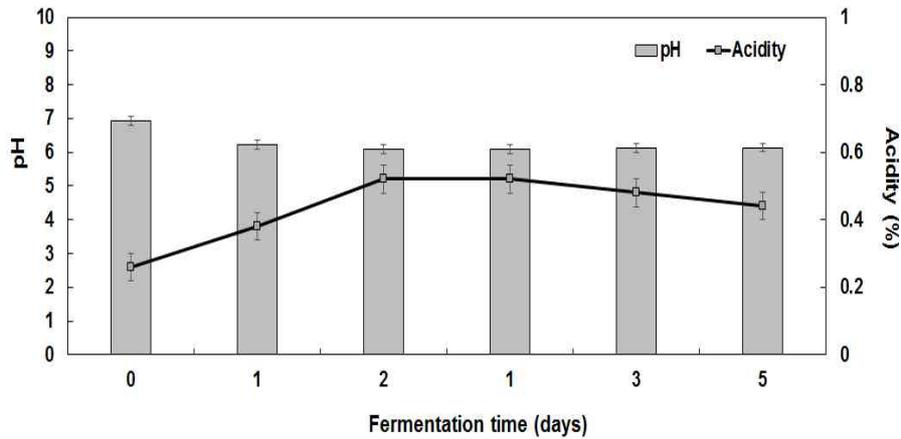


Figure 자-2. Changes in pH and acidity of the spirulina paste fermented by *K. servazzii* KM2017 for 7 days

- 스피루리나 효모발효 및 자가소화 최적조건 실험에 대한 수용성 고형분함량 분석 결과는 Figure 자-3과 같다. 효모발효 0일차 9.4 °Brix에서 효모가 당을 이용하면서 수용성 고형분은 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 효모발효 2일차 수용성 고형분은 2.6 °Brix로 나타났다. 이후 5°C 자가소화를 진행하였다. 자가소화를 진행하면서 수용성 고형분은 유지되거나 소폭 증가하는 경향을 보였다.

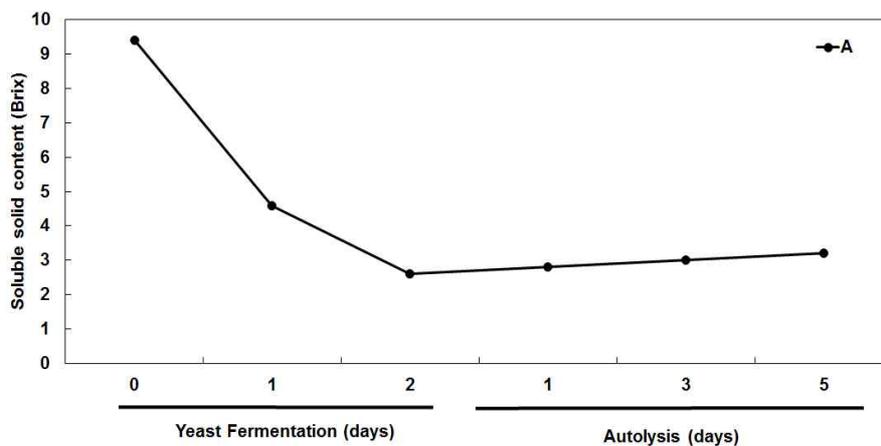


Figure 자-3. Changes in soluble solid contents (°Brix) of the spirulina paste fermented by *K. servazzii* KM2017 for 7 days

- 효모발효 및 자가소화 기간 동안의 환원당, 단백질함량, 생균수 변화는 Table 자-2와 같다. 효모발효 0일 환원당은 4.97%에서 효모발효 2일까지 0.68%로 감소하였으며, 자가소화 중 소폭 증가하여 1.53%로 나타났다. 스피루리나의 단백질을 효모 발효 전 242.98 ug/mL에서 발효 2일차 423.98 ug/mL로 급격히 증가하였다. 이는 효모발효 2일차 스피루리나가 절단 또는 효모가 터지면서 단백질이 용출되는 것으로 추측하였다. 자가소화동안은 계속적으로 소폭 증가하여 자가소화 5일차 464.09 ug/mL로 나타났다. 효모 생균수는 초기 1.58×10^6

CFU/mL의 starter를 접종 후 발효 1일에 2.35×10^8 CFU/mL로 가장 높게 나타났으며 이후 조금씩 감소하여 자가소화 5일에 3.12×10^7 CFU/mL로 10^7 CFU/mL 이상의 호모 균수를 유지하는 것을 확인하였다.

Table 자-2. Changes in reducing sugar, protein and viable cell count of the spirulina paste fermented by *K. servazzii* KM2017 for 7 days

	Yeast fermentation (days)			Autolysis (days)		
	0	1	2	1	3	5
Reducing sugar (%)	4.97	1.72	0.68	0.88	1.39	1.53
Protein (ug/mL)	242.98	250.76	423.98	453.65	459.43	464.09
Viable cell count (CFU/mL)	1.58×10^6	2.35×10^8	6.25×10^7	5.02×10^7	4.75×10^7	3.12×10^7

- 스피루리나의 호모발효 및 자가소화 기간 동안의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 자-3과 같다. 폴리페놀 함량은 초기 213.79 ug/mL에서 자가소화 5일까지 계속적으로 증가하여 420.55 ug/mL으로 나타났으며, 이와 유사하게 플라보노이드 함량은 23.26 ug/mL에서 자가소화 5일째 34.01 ug/mL으로 증가하는 것을 확인하였다.
- DPPH를 분석한 결과 Table 자-4와 같이 항산화능이 우수한 BHA를 standard로 스피루리나와 비교분석하였다. IC₅₀의 농도로 스피루리나 발효 전 2.48 mg/mL로 나타났으며, 호모발효 2일 후 1.21 mg/mL, 자가소화 5일 후 0.88 mg/mL로 발효 및 자가소화를 거치면서 스피루리나의 항산화능이 더 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 자-3. Changes in polyphenol and flavonoid of the spirulina paste fermented by *K. servazzii* KM2017 for 7 days

($\mu\text{g/mL}$)

	호모발효(일)			자가소화(일)		
	0	1	2	1	3	5
Polyphenol content	213.79	226.25	350.84	360.91	400.73	420.55
Flavonoid content	23.26	24.55	28.41	30.49	32.94	34.01

Table 자-4. Changes in DPPH radical scavenging ability of the spirulina paste fermented by *K. servazzii* KM2017 for 7 days

Treatment	IC ₅₀ value
BHA	$4.62 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$
Control	$2.48 \pm 0.41 \text{ mg/mL}$
Yeast fermentation (2 days)	$1.21 \pm 0.23 \text{ mg/mL}$
Ausolysis (5 days)	$0.88 \pm 0.11 \text{ mg/mL}$

- 피코시아닌 측정은 발효물 10 g에 증류수 100 mL 넣어 약 1분간 blend시켜 10시간 교반 후 13,200 rpm으로 원심 분리하여 상등 액을 취하여 spectrophotometer를 이용하여 562 nm, 620nm, 652 nm에서 측정하여 계산식을 이용하여 측정하였다.

$$C\text{-phycoyanin: } [A_{620} - 0.474(A_{652})]/5.34$$

$$\text{Allophycoyanin : } [A_{652} - 0.208(A_{620})]/5.09$$

$$\text{Phycoerythrin : } [A_{562} - (2.41(C\text{-PC})) - 0.849(\text{APC})]/9.62$$

- 스피루리나 효모발효 및 자가소화 최적조건 실험에 대한 피코시아닌 계열 결과는 Table 자-5와 같다. C-phycoyanin으로 불리는 색소단백질은 효모발효 0일차 0.072 mg/g으로 측정이 되었다. 이후 효모발효 1일차 0.094 mg/g으로 증가하는 것을 확인하였으며 자가소화 동안 증가하여 자가소화 5일차 0.133 mg/g으로 측정되었다. 색소단백질 중 allophycoyanin의 경우도 효모발효 0일차 0.052 mg/g으로 측정이 되었으나 자가소화 5일 후에는 0.116 mg/g으로 측정이 됨에 따라 스피루리나의 용출이 이루어진다고 판단하였다. Phycoerythrin 역시 자가소화를 함에 따라 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 자-5. Changes in C-phycoyanin, allophycoyanin and phycoerythrin of spirulina paste fermented by *K. servazzii* KM2017 for 7 days

(단위: mg/g)	효모발효(일)			자가소화(일)		
	0	1	2	1	3	5
C-phycoyanin	0.072	0.094	0.107	0.121	0.124	0.133
Allophycoyanin	0.052	0.076	0.088	0.097	0.102	0.116
Phycoerythrin	0.142	0.154	0.166	0.169	0.174	0.190

- 스피루리나에는 엽록소(클로로필a), 베타카로틴, 피코시아닌의 3가지 색소를 갖고 있으며 활성산소에 대한 항산화작용 및 면역기능이 뛰어나다고 밝혀져 있어 분광광도계를 이용하여 클로로필a를 측정하였다. 실험 방법은 발효물 15 mL을 여과지로 여과 시킨 후 90% 아세톤 용액을 15 mL 첨가 후 교반기로 강하게 교반한 후 24시간 4°C 이하의 냉암소에 보관하였다. 이후 원심 분리관을 이용하여 10분간 10,000 rpm에서 원심분리 후 상등액의 일부를 취하여 750 nm, 665 nm, 645 nm, 630 nm, 480 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

$$E_{665} = OD_{665} - OD_{750}$$

$$E_{645} = OD_{645} - OD_{750}$$

$$E_{630} = OD_{630} - OD_{750}$$

$$\text{Chlorophyll a} = 11.6E_{665} - 1.31E_{645} - 0.14E_{630}$$

- 스피루리나 효모발효 및 자가소화 최적조건 실험에 대한 클로로필a에 대한 결과는 Table 자-6과 같다. 효모발효 0일차 2.29 µg/L으로 나타났으며 효모발효 1일차 2.38 µg/L으로 소폭 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이후 효모발효 2일차 2.46 µg/L으로 나타났다. 5°C 자가

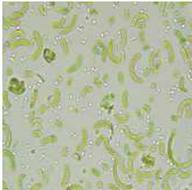
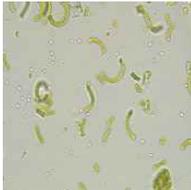
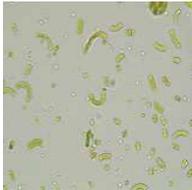
소화 과정에서 클로로필a는 완만하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 자가소화 3일차 2.81 µg/L을 나타내었고 자가소화 5일차 2.94 µg/L을 나타내었다.

Table 자-6. Change in chlorophyll content in spirulina paste after yeast fermentation and autolysis

(단위: mg/g)	Yeast fermentation (days)			Autolysis (days)		
	0	1	2	1	3	5
Chlorophyll a	2.29	2.38	2.46	2.62	2.81	2.94

- 스피루리나 효모 발효조건 확립 및 자가소화 실험 발효에서 현미경 사진은 Table 자-7과 같다. 자가소화를 진행하면서 자가소화로 인해 시간에 따라 스피루리나가 부분적으로 절단되는 것을 확인 할 수 있었으며, 이화학적으로 분석하였을 때 생리합성 물질이 발견된다는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 자-6. Morphological change of spirulina during yeast fermentation and autolysis

효모발효(일)			자가소화(일)		
0	1	2	1	3	5
					

- 스피루리나 효모발효(2일) 및 자가소화(5일)의 최적조건에서 발효 전, 후 향기성분을 GC-MS로 분석하였다. 발효 전엔 스피루리나 고유의 이취를 내는 휘발물질이 많은 반면 2일 효모발효 후 5일간 자가소화를 하였을 땐 ethanol, acetic acid, silanediol 등이 증가하고 불쾌 취를 내는 ammonia, cyclohexanone, pentadecane, heptadecane 등이 줄어드는 것으로 나타났다(Table 자-7).

Table 자-7. GC-MS analysis of spirulina paste before and after fermentation

Component	Before yeast fermentation	Yeast fermentation (2 days)/ Autolysis(5 days)
Ethanol	-	0.41
Ammonia	19.58	17.13
Cyclohexanone	0.13	0.10
Acetic acid	-	17.10
Pentadecane	2.90	1.28
Benzaldehyde	0.51	0.12
Hexadecane	2.17	0.99
Heptadecane	55.76	33.03
Naphthalene	0.07	0.13
Silanediol	-	0.10
Ethyl 9-hexadecenoate	-	0.15
1-Propanol-2-methyl	-	0.31

자-2. 스피루리나 발효물의 간기능 보호 *In vitro* 효능평가

(1) H₂O₂에 대한 간세포 보호 효과

- H₂O₂는 활성 산소종의 하나로서 세포내에서 대사과정 중에 발생하며 세포내 지질, 단백질, 핵산 등을 변형시켜 세포 독성을 나타낼 뿐만 아니라 매우 동석이 강한 hydroxyl radical의 source이기도 하다. 배양한 AML12 세포에 H₂O₂를 처리하기 24시간 전에 발효물을 200, 400, 600 µg/mL의 농도로 처리하고 배지를 제거한 후 7 mM H₂O₂를 새롭게 1시간 동안 처리하고 세포 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. H₂O₂를 1시간 처리한 결과, AML12 세포의 생존율은 약 30% 정도로 낮아졌으며, 발효 전 후의 스피루리나 모두 간세포 보호효과를 나타내는 것으로 확인 되었다. 특히 발효 후 스피루리나 농도 600 µg/mL에서 발효 전보다 유의적으로 높은 세포 생존율을 나타내었다(Figure 자-4).

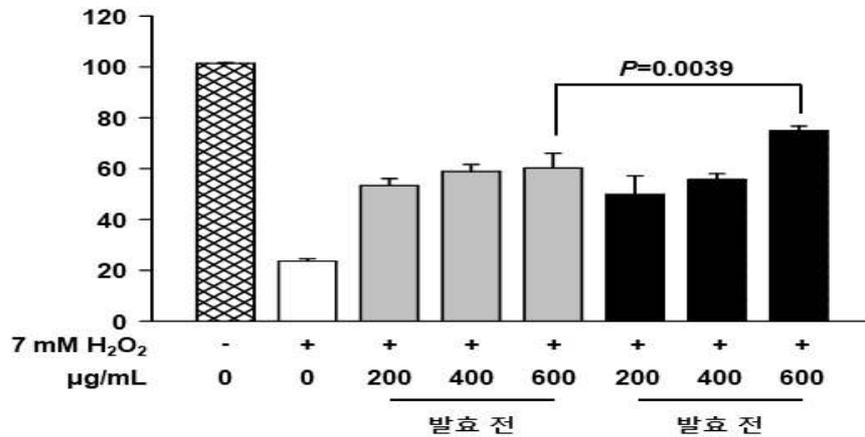


Figure 자-4. Effect of spirulina paste fermented on the protection in oxidative stress of hepatocytes

(2) 항산화 유전자 발현에 미치는 영향

- ROS 생성 억제에 관여하는 기전을 확인하기 위해 우선 대표적인 세포내 항산화 시스템을 구성하는 유전자들의 발현에 미치는 발효 전·후 스피루리나의 영향을 조사하였다. 이를 위해 정량 실시간 PCR분석법을 이용하였으며, 분석 대상이 된 유전자는 항산화 물질인 HO-1, GSH의 합성에 관여하는 GSS, GCLC, GCLM과 세포내 ROS 대사에 관여하는 대표적인 항산화 효소로 알려진 SOD1, SOD2, GPx2, CAT 그리고 GR로 총 9종의 유전자이다. 분석 결과, 발효 전 스피루리나에 비교하여 발효 후 모든 유전자의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며 특히 항산화 단백질로 알려지 HO-1의 경우 약 3배 정도 그 발현양이 증가되는 것으로 확인 되었다. 또한 GSH 합성 효소인 GCLC, GCLM이 증가하는 것으로 보아 GSH의 함량도 증가 되었을 것이라 사료된다. 이는 향후 추가적인 실험을 통해서 GSH의 함량과 대표적인 항산화 효소들의 활성을 확인해 볼 예정이다(Figure 자-5).

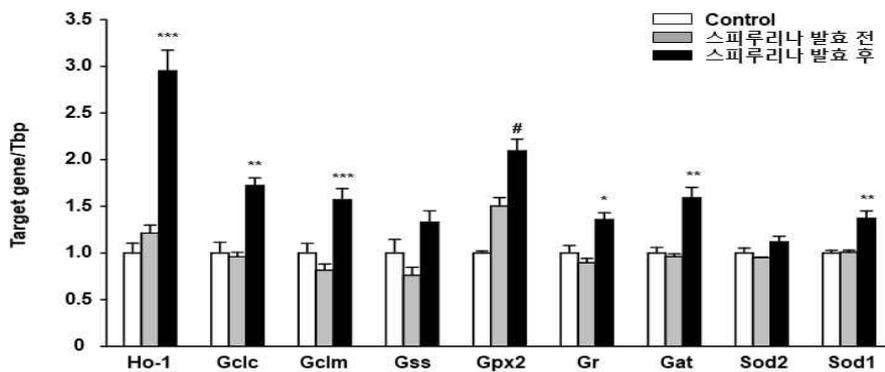


Figure 자-5. Effect of spirulina paste fermented on the expression of genes involved in oxidation in cells

차. 과일·채소 발효엑기스를 이용한 소스 시제품 개발

(농업회사법인(주)초록들)

차-1. 드레싱 소스 시제품 개발

- 농업회사법인(주)초록들에서 매실, 고추, 양파 등의 과일과 채소를 설탕 절임액을 베이스로 하여 샐러드 드레싱 소스를 개발하였다. 매실, 고추 및 양파의 설탕 절임액을 혼합하여 소스류 제품을 개발하면서, 양조간장(청정원), 식초(삼화식초)와 올리브유(올리타리아 엑스트라 버진)를 농도별로 첨가하여 최종 시제품을 제조하였다. 매실 10%, 고추 15% 및 양파 25%, 목이버섯 젖산 발효물(고형분 5%, w/w)을 20%수준으로 첨가한 후 사과식초 7%와 올리브유 3%수준으로 첨가하였다. 소스 제품의 조성비는 Table 차-1과 같다.

Table 차-1. Ingredient composition of dressing sauce prototype

단위: g

매실 추출액	고추 추출액	양파 추출액	목이버섯 발효물	사과식초 (13%)	사과 분쇄액	양조 간장	올리브 오일	볶음 참깨	합계
10	15	25	20	7	3	15	3	1.5	99.5



Figure 차-1. Sanyacho dressing (prototype)

- 산야초 드레싱 소스를 5점 척도법으로 관능평가 하였다. 전반적인 기호도는 3.33으로 보통 이상의 점수를 보였다. 통깨를 첨가한 부분에서 깨가 씹혀서 고소한 맛이 있지만 시각적인 부분이나 고소한 맛을 좀 더 증진하기 위해서 볶은 참깨를 첨가하는 것이 좋다는 의견이 있었으며, 단맛을 조금 더 증가하는 것도 기호성 증진에 좋을 것으로 판단된다.

Table 차-2. Sensory evaluation of Sanyacho dressing

짠맛	단맛	신맛	풍미	시각적 기호도	전반적인 기호도
3.22±0.97	2.89±0.60	3.11±1.05	3.67±0.71	3.11±0.60	3.33±0.87

1.매우 나쁨 2. 나쁨 3.보통 4.좋음 5.매우 좋음

차-2. 나물 무침용 시제품 개발

- 농업회사법인(주)초록들에서 만든 마늘, 청양고추 설탕 절임액과 10% 황기 추출액 등을 혼합하여 나물무침용 간장베이스 소스를 시제품화 하였다. 사과식초, 물엿 각 12%, 국간장, 프락토올리고당 각 24%, 사과육수, 마늘당절임, 사과즙 각 6%, 10% 황기추출물, 고춧가루 각 2.5%, 청양고추 당절임, 다진마늘, 볶은 참깨 각 1%씩 첨가하여 즉석 나물무침용 소스를 개발하였다.

Table 차-3. Composition ratio of herb sauce (prototype)

첨가물	첨가량(g)
13%사과식초	100
국간장	200
사과육수	50
물엿	100
프락토올리고당	200
마늘당절임	50
청양고추 당절임	10
10%황기 추출물	20
고춧가루	20
사과즙	50
다진 마늘	10
볶은깨	10
총량	820



Figure 차-2. Sauce with Hwanggi herb extract

카. 발효황칠을 이용한 면역증진 효능평가 및 임상평가

카-1. 발효황칠을 이용한 면역증진 효능평가 및 임상평가 추진 일정



카-2. 황칠 추출물을 이용한 발효조건 최적화

(1) 재료 및 방법

- 황칠나무 추출액을 제한배지(Table 카-1)를 이용하여 γ -PGA 및 GABA를 최적화 하였다. 황칠나무 시료를 121°C, 15분 멸균하고, 황칠나무 열수추출물과 제한배지를 1:1로 혼합한 배지를 이용하여, NB broth에서 24시간 배양한 *B. subtilis* HA 10배 농축 starter 5%를 접종하고 42°C, 160 rpm으로 3일간 고초균 발효를 진행하면서 비교하였다. 총 2일간 발효를 진행한 고초균 발효물에 skim milk 1%, glucose 2%, MSG 2, 5%를 혼합하고 농도별로 첨가 한 후 MRS broth에서 24시간 배양한 *L. plantarum* EJ2014 1%를 접종하여 30°C에서 5일간 발효를 진행하면서 비교하였다(Figure 카-1).

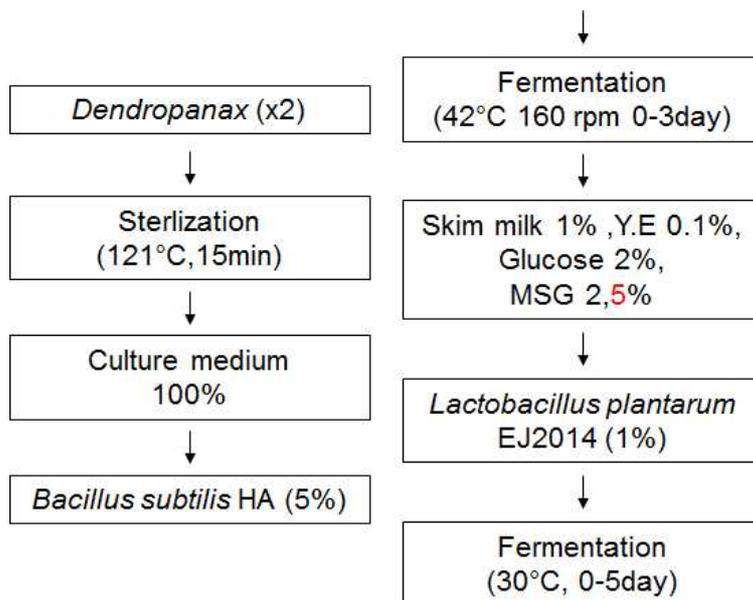


Figure 카-1. Preparation of fermented product using *Dendropanax moribiferus*

Table 카-1. Nutrient composition for culture media

Component	Concentration (%)
Sodium L-glutamate (MSG)	3
Glucose	3
Ammonium sulfate	0.5
KH ₂ PO ₄	0.1
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
CaCl ₂	0.04

(2) 결과 및 고찰

(가) 황칠나무 추출물의 1차 고초균 발효물의 이화학적 분석

- 황칠나무 추출물배지의 1차 고초균 발효에 따른 pH와 산도의 결과는 Figure 카-2와 같다. 발효 2일째 pH 7.49로 가장 높았으며 발효 3일째 pH 6.60으로 점차 감소하는 경향을 보였다. 산도는 pH가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다.

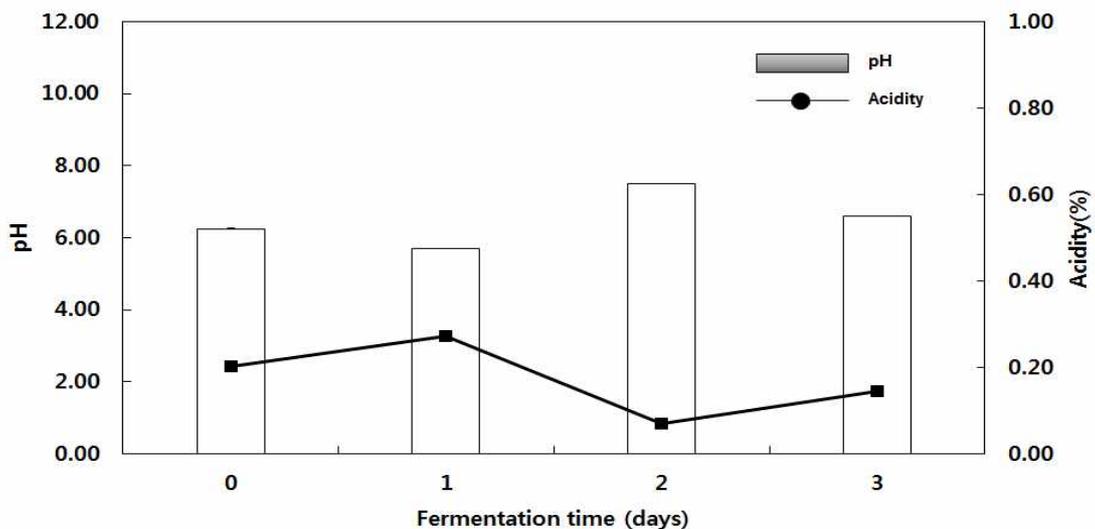


Figure 카-2. Changes in pH and acidity of the *Dendropanax morbiferus* fermented by *B. subtilis* HA

- 황칠나무 추출물에 제한배지를 첨가에 따른 생균수의 변화는 Table 카-2 에서와 같이 초기 starter의 생균수 1.50×10^6 CFU/mL를 접종하여 발효 1일째에 2.50×10^8 CFU/mL로 증가하는 경향을 보였으며 2일째 7.05×10^8 CFU/mL으로 균 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 발효물은 발효 3일째 까지 균활성이 유지되는 것을 볼 수 있었다.

Table 카-2. Viable cell count of *Dendropanax morbiferus* fermented by *B. subtilis* HA (CFU/mL)

Fermentation time (days)			
0	1	2	3
1.50×10^6	2.50×10^8	7.05×10^8	6.00×10^8

- 황칠나무 추출물에 제한배지를 첨가에 따른 점조도 및 점질물 함량 변화에서 발효 1일째 4.50 Pa·sⁿ으로 0일째에 비해 크게 증가하는 경향을 보였으며 2일째 5.39 Pa·sⁿ로 2일째 점조도가 가장 높아지는 것을 볼 수 있었다. 점질물은 2일째 1.58%로 가장 높게 나타났으며, 발효 1일 이후 점질물 함량은 거의 유사한 경향을 보였다(Figure 카-3).

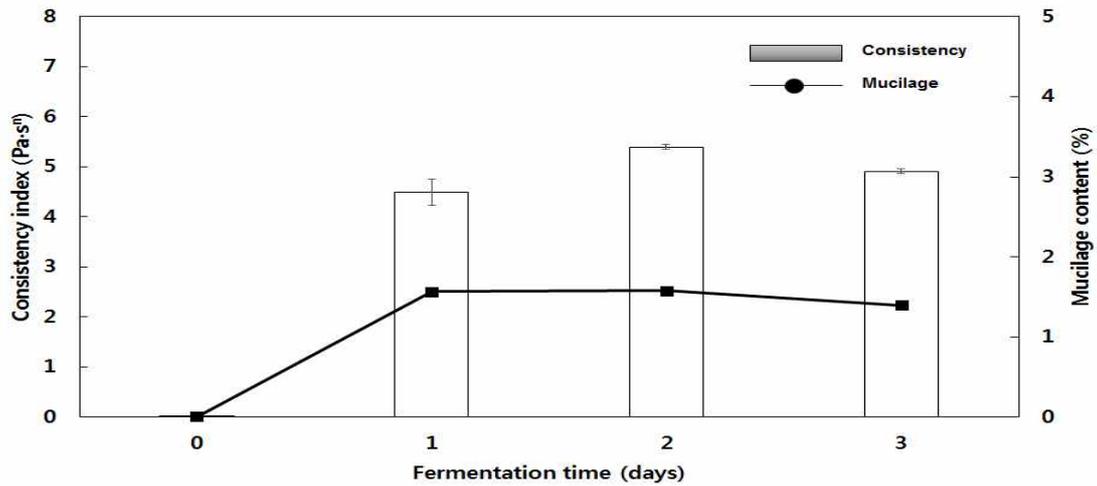


Figure 카-3. Changes in consistency index and mucilage content of the *Dendropanax morbiferus* fermented by *B. subtilis* HA

(가) 황칠나무 추출물의 2차 젖산균 발효물의 이화학적 분석

- 황칠나무 추출물의 1차 발효물에 MSG 2, 5%를 각각 첨가한 조건에 따른 pH와 산도의 결과는 Figure 카-4와 같다. 발효 날짜에 따른 pH는 점차 감소하는 경향을 보였다. MSG 2%에서는 발효 1일째 pH 4.45로 가장 낮아졌다가 이후 조금씩 증가하였다. MSG 5%에서는 발효 3일까지 계속 감소하여 pH 4.81로 감소하였다가 5일째 조금 증가하는 경향을 보인다. 산도의 경우 pH의 결과와 유사하게 MSG 2%에서 발효 1일째 약 1.2%까지 증가하였다가 이후 감소하였으며, MSG 5%에서는 발효 5일까지 계속 증가하지만 0.6%의 낮은 산도를 보였다.

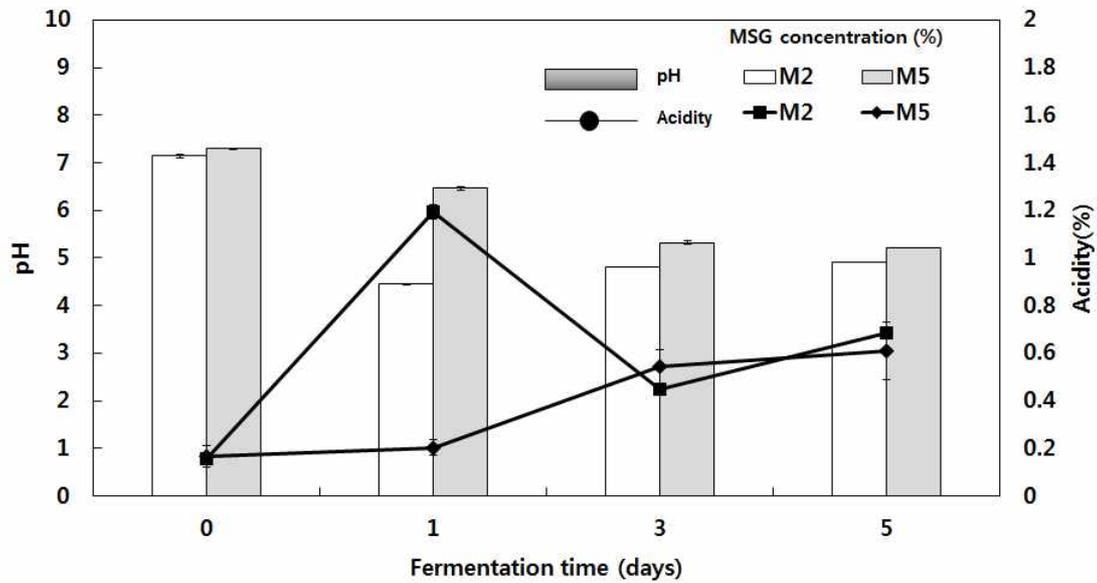


Figure 카-4. Changes in pH and acidity content of the *Dendropanax morbiferus* fermented by *L. plantarum* EJ2014 with MSG

- 황칠나무 추출물의 1차 발효물에 MSG 2, 5%를 각각 첨가한 조건에 따른 생균수의 변화는 Table 카-3, 카-4와 같다. *L. plantarum* EJ2014는 초기 starter의 생균수 1.50×10^7 CFU/mL를 접종하여 각각의 MSG 2, 5% 발효물은 발효 1일째에 각각 2.45×10^9 , 2.15×10^9 CFU/mL로 균수가 증가하며 3-5일째 까지 균활성이 유지되는 것을 알 수 있었다. *B. subtilis* HA의 변화는 MSG 2%가 5%에 비해 활성이 더 감소되는 경향을 보였으며 발효 3일째부터 유지되는 것을 볼 수 있었다.

Table 카-3. Viable cell count of *Dendropanax morbiferus* fermented by *L. plantarum* EJ2014 with MSG

(CFU/mL)

MSG content (%)	Fermentation time (days)			
	0	1	3	5
2	1.50×10^7	2.45×10^9	2.50×10^9	4.50×10^8
5	1.50×10^7	2.15×10^9	2.60×10^9	1.15×10^9

Table 카-4. Viable cell count of *Dendropanax morbiferus* fermented by *B. subtilis* HA with MSG

(CFU/mL)

MSG content (%)	Fermentation time (days)			
	0	1	3	5
2	7.05×10^8	1.00×10^8	3.00×10^6	1.50×10^6
5	7.05×10^8	1.00×10^8	2.00×10^7	2.20×10^7

- 황칠나무 추출물의 1차 발효물에 MSG 2, 5%를 각각 첨가한 조건에 따른 환원당 함량의 결과는 Figure 카-5와 같다. 황칠나무 추출물의 발효 시간에 따라 환원당 함량을 비교하였다. 영양성분이 첨가되지 않은 황칠나무 추출액 자체를 control로 하였으며, 1차 발효 0일째 glucose를 첨가하여 4%의 환원당에서 발효 1일째부터 감소하여 3일째까지 0.5%정도를 보였다. 2차발효는 배양하기 위해 glucose를 추가적으로 더 첨가함으로써 2차발효 0일째 약 3.5%까지 증가하였다가 MSG 2%는 1일째부터 점차적으로 감소하였으며, MSG 5%는 발효 1일째는 환원당 소모량이 작았다가 3일 이후부터는 MSG 2%보다 더 많이 소모된 것을 확인 하였다.

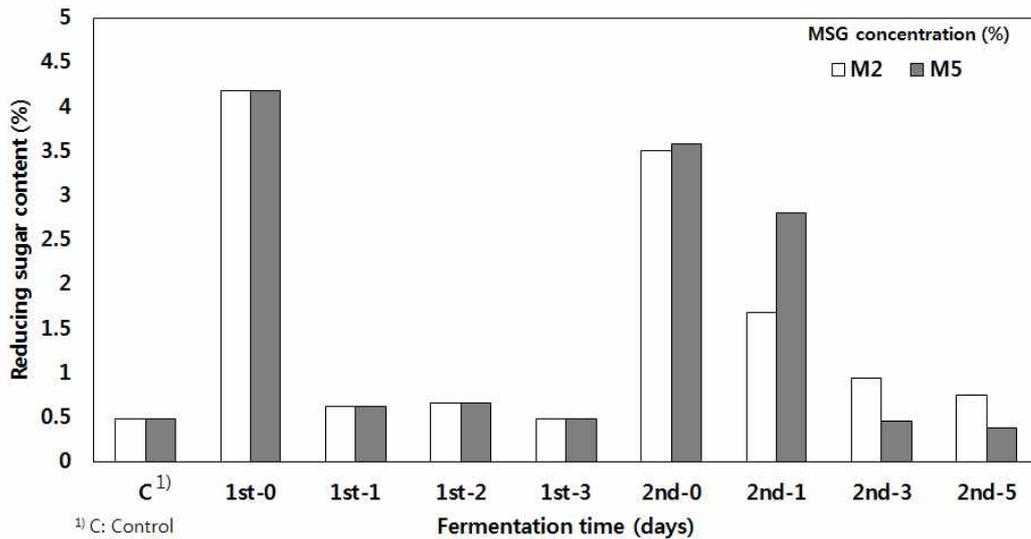


Figure 카-5. Changes in pH and acidity content of the *Dendropanax morbiiferus* fermented by *B.subtilis* HA and *L.plantarum* EJ2014 with MSG

¹⁾C : control

- 황칠나무 추출물의 1차 발효물에 MSG 2, 5%를 각각 첨가한 조건에 따른 TLC를 이용하여 MSG 전환률 및 GABA 함량 측정을 하였다. 1차 발효물에서 MSG 소진을 모두 하지 못했으나 2차 발효물에서 MSG 2% 발효물의 MSG 소진률이 가장 높은 것을 확인 할 수 있었으며 MSG 5%의 GABA 전환률은 전환이 모두 되지 않는 것을 알 수 있었다(Figure 카-6).

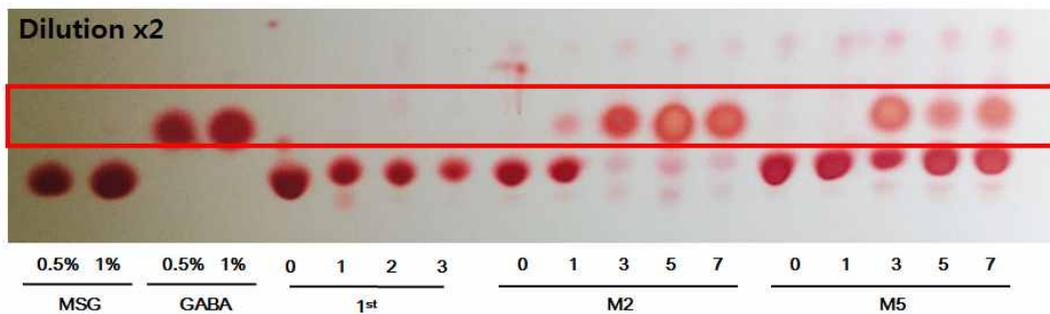


Figure 카-6. Changes in GABA production of *Dendropanax morbiiferus* fermented by *L. plantarum* EJ2014 with glucose

카-3. 황칠나무 발효액 면역증진 효능평가

(1) RAW264.7 cell을 이용한 황칠나무 발효액의 면역증진 효능평가

(가) 재료 및 방법

① RAW264.7 대식 세포 배양

- 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양을 받았으며 세포배양을 위해 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2, 3회 계대배양을 실시하였다.

② 세포독성 시험

- 세포독성 시험은 MTT assay를 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 수행하였다. MTT 시약은 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 formazan으로 변하여 세포의 성장을 멈추게 하며, 세포가 죽을수록 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 배양된 대식세포주를 1×10⁵ cells/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 예비 배양 한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 세포에 PBS에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액 10 mL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 반응시킨다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고, 각 well에 100 mL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan crystal을 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader (SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{시료 처리군의 흡광도}) / (\text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

③ Nitric oxide (NO) 생성량 측정

- NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System의 방법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁵ Cells/mL의 농도로 96 well plate에 분주 후 37°C, 5% CO₂ incubator를 이용하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하여 배양 상등액 100 μL를 새로운 96 well palte에 취하고 여기에 동량의 Griess 시약(1% Sulfanilamide, 0.1% naphthylethyldiamine in 2.5% phosphoric acid)을 첨가하여 10분간 반응 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 흡광도로 측정하였다. Nitrite의 농도(μM)는 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

(나) 결과 및 고찰

① 세포독성 측정

- 세포배양을 활용하여 황칠나무 발효액의 활성 효과를 측정하기 위해 시료 자체의 세포독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 황칠혼합발효액을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고 농도는 발효 원액을 10-500배 희석하여 사용하였다. 그 결과, 시험한 농도범위에서 20-500배 희석 범위 내에서 유의한 세포 독성은 나타나지 않았으나 10배 희석액에서는 70% 이하의 세포 생존율을 보여 20-500배 희석액을 이용하여 NO 생성능을 비교하였다(Figure 카-7).

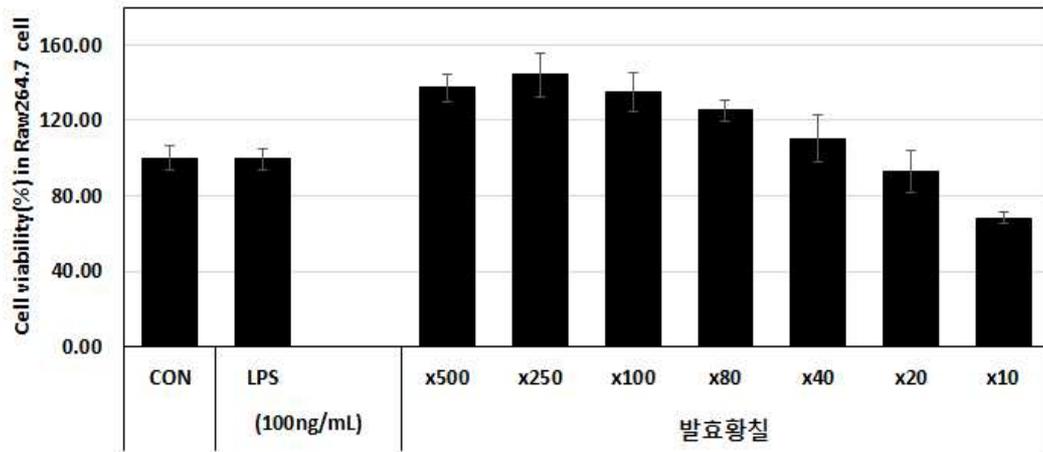


Figure 카-7. Comparison of cytotoxicity in macrophages of fermented *Dendropanax morbiferus*

② NO 생성능 확인

- 황칠 혼합발효액의 농도에 따라 NO생성이 증진되는지 확인하기 위해 positive control로 LPS 100 ng/mL과 황칠 혼합발효액을 농도별로 희석하여 비교분석 하였다. 황칠 혼합발효물은 500배 희석에서 40배 희석까지 발효물의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성능이 높아져 LPS 100 ng/mL과 유사하게 NO를 생성하는 것을 확인하였으며 20배 희석액부터는 NO 활성이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 카-8).

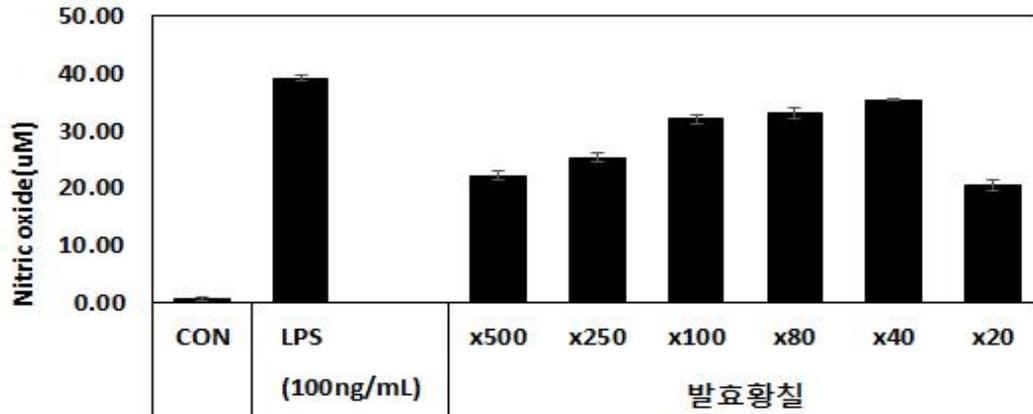


Figure 카-8. NO production ability in macrophages of mixed fermented *Dendropanax morbiferus*

(2) RBL-2H3 세포에서 추출물의 β -hexosaminidase 방출 억제 효과

(가) 재료 및 방법

① β -hexosaminidase 방출 확인

- RBL-2H3 세포에서 추출물의 β -hexosaminidase 방출 억제 효과를 확인하였다. 먼저, RBL-2H3 세포를 24 well 플레이트에 웰 당 1×10^5 세포로 분주하고 항-DNP IgE (450 ng/mL)로 37°C에서 하룻밤 동안 자극하였다. 그 후 세포를 Siraganian 버퍼(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 세척하고 인큐베이트 버퍼(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM

glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2) 160 μL을 첨가하여 37°C에서 20분 동안 인큐베이트한 후, 추출물 20 μL를 10분 동안 세포에 처리하고 항원(DNP-BSA, 10 μg/mL) 20 μL를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 세포가 과립을 형성하도록 자극하였다. 그 후, 얼음 수조에 10분 동안 담가 반응을 중단하였다. 상층액 50 μL를 96-well plate로 옮기고 기질(1 mM p-nitrophenyl-Nacetyl-β-D-glucosaminide)이 녹아있는 0.1 M 시트르산염(citrate) 버퍼(pH 4.5) 50 μL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그 후 정지액(0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.0) 100 μL를 첨가하여 반응을 중단시키고 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 세포독성 측정

- RBL-2H3 세포에 대한 황칠 추출물의 독성은 MTT assay 방법으로 측정하였다. 먼저 RBL-2H3 세포(4×10⁴ cells/well)에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 하룻밤 배양한 후 여러 농도(10-250 희석배수)의 황칠 추출물을 세포에 처리하였다. 24시간 후 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 20 μL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 200 μL의 DMSO로 well에 생성된 formazan 결정을 완전히 용해시켜 microplate를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

(나) 결과 및 고찰

① β-Hexosaminidase 방출에 대한 황칠 추출물의 억제 효과

- 비만세포가 함유하고 있는 과립에는 히스타민 및 tryptase 등 다양한 알레르기 증상을 유발하는 매개체들이 함유되어 있어 항원에 의한 이러한 매개체들의 분비를 확인하는 것은 매우 중요하다. β-Hexosaminidase는 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 히스타민과 함께 필수적으로 분비되므로 비만세포 탈과립의 표지인자로 널리 사용되고 있다. 따라서 RBL-2H3 세포에서 분비되는 β-hexosaminidase의 활성을 측정하였으며, 황칠 추출물에 의한 β-hexosaminidase 방출 억제 효과를 검색하였다. 250, 100, 80, 40, 20, 10배 희석된 황칠 추출물이 처리된 세포에서 유리되는 β-hexosaminidase의 활성은 대조군에 비해 각각 50, 41, 38, 16, -11, -12 %를 나타내어, 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 카-9).

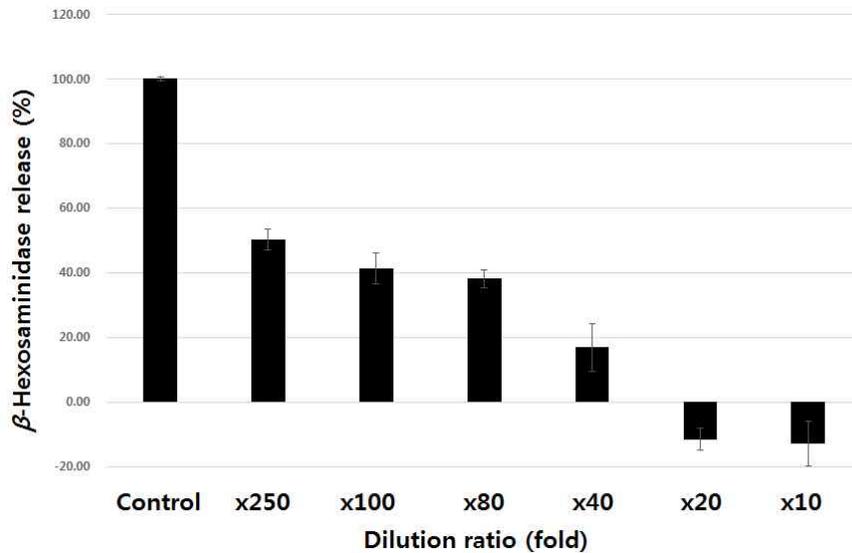


Figure 카-9. Inhibitory effects of *dendropanax mobifera* extract on β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA

② 황칠 추출물의 세포독성

- RBL-2H3 세포에 대한 황칠 추출물의 독성 정도를 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였으며, 그 결과는 Figure 카-10에 나타내었다. 세포생존율은 대조군에 대한 실험군의 세포 생존율을 백분율로 나타내었다. 황칠 추출물은 실험에 사용된 20-250배 희석에서 24시간 동안 어떠한 세포독성도 나타내지 않았고 10배 희석 황칠 추출물에서는 강한 독성활성이 나타났다.

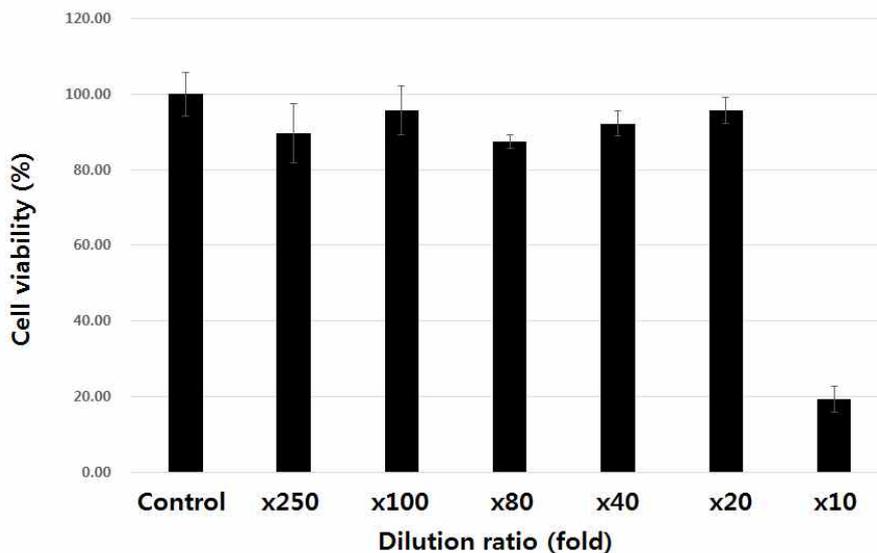


Figure 카-10. Cytotoxic effects of *dendropanax mobifera* extract on RBL-2H3 cells

카-4. 황칠발효액을 이용한 면역증진 및 염증억제 *In vivo* 효능평가

(1) 황칠나무 추출발효액의 급성경구독성평가

(가) 서론

- 본 시험은 황칠나무추출 발효물(FDME) 대하여 SD 암컷 랫드에 대한 급성경구독성시험의 급성독성분류법(Acute Toxic Class Method: ATC법, OECD TG 423조)으로 나타나는 독성의 양상 및 강도를 알고자 하였다.

(나) 시험물질

- 계명대학교에서 전달 받은 분말을 별도의 조제 없이 그대로 사용하였다. 시험당일 시험물질의 중량을 칭량하여 2000 mg/20 mL로 조제를 한 후에 투여용량에 맞게 사용하였다. 시험 종료 후 잔여 시험물질은 폐기하였다.

(다) 시험계 및 사육환경

- 계 통 및 종: NTac:Sprague-Dawley Rat, SPF
- 공 급 원: 주식회사 오리엔트
- 동물의 성, 수 및 주령(입수시): 암컷 6마리 (5주령, 150.5±15.4 g)
- 동물의 성, 수 및 주령(투여시): 1단계: 암컷 3마리(5주령, 139.3±3.2 g)
2단계: 암컷 3마리(5주령, 161.7±14.4 g)
- 시험계 선택 이유: 본 시험에 사용한 SD 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험에 많이 사용되고 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부하므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.
- 잔여동물처리: 군 분리 후 잔여동물은 시험계에서 제외한 후 실험 종료 후에 안락사하였다.
- 본 시험의 사육환경은 온도 22±3℃, 상대습도 50±20%, 환기횟수 10~15 회/시간, 조명주기 12 시간, 조도 150~300 Lux의 환경조건으로 설정된 경북대학교 수의과대학 약리생리학동물실험실에서 실험동물을 사육하였다.
- 경북대학교 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: KNU-2014-134).

(라) 시험방법

- 동물 입수시 체중을 측정하였으며, 사육실 내에서 7일간 검역 및 순화를 거쳐 체중 감소 등의 이상이 없는 동물만 시험에 사용하였다.
- 입수된 시험동물은 순화기간 종료 후 투여 전날 체중을 측정한 후 평균체중이 균일하게(±20% 이내) 분포하도록 군 분리하였다.
- 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였다. 사육 상자에는 시험번호, 시험항목, 성, 시험물질, 투여용량, 시험기간, 동물번호, 시험책임자 및 담당자를 기재한 개체식별 카드를 부착하였다
- 시험물질을 한계용량인 2,000 mg/kg bw 용량으로 위내 강제 경구투여한 후 14 일간 시험물질에 대한 치사율, 체중변화, 임상증상, 관찰기간 종료 후에 부검을 실시하였다.

(마) 시험의 실시

- 시험군의 구성은 다음과 같다.

Table 카-6. Experimental design for evaluation of a single toxicity

시험단계	투여용량 (mg/kg bw)	성	동물번호 (두수)	사망례
1단계 투여군	2,000	암컷	1-3 (3)	없음
2단계 투여군	2,000	암컷	1-3 (3)	없음

○ 투여량 설정

- 본 시험에서는 한계시험용량인 2,000 mg/kg bw를 초기 투여 용량으로 설정하였으며 다음 단계의 투여는 최장 48시간 동안 사망여부를 관찰한 후 실시하였다.

○ 투여

- 투여경로 및 선택이유: 시험의뢰자 요구로 경구투여, 사료첨가제로 사용 예정이므로 경구투여를 선택하였다.
- 투여방법: 투여 전날 12-16시간 절식(음수는 제외)시킨 후에 조제된 시험물질을 경구 투여용 존데를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다. 투여 후 4시간 후부터 시험동물에게 사료를 공급하였다.

○ 시험의 실시는 급성경구독성시험의 급성독성분류법(Acute Toxic Class Method: ATC 법, OECD TG 423조)에 따라 수행하였다 (농촌진흥청 고시 제2013-21호 2013.6.28.) 별포 12 인축 독성 시험기준과 방법“의 급성독성분류법, 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(II), 단회경구독성시험법, 2008. 11, 식품의약품안전청)

- 초기 시험의 투여용량은 1단계 2000 mg/kg bw로 설정하였으며, 암컷 3마리에 시험물질을 투여하였다. 투여 후 48시간 동안 사망 또는 빈사 유무를 관찰한 결과 3마리 모두 생존하여 다른 암컷 3마리에 2000 mg/kg bw를 다시 투여하였다.
- 2단계 2000 mg/kg bw 용량에서 3마리 모두 48시간 동안 생존하여 그 다음 용량단계의 투여는 실시하지 않았다.

(바) 관찰항목

- 모든 동물에 대하여 투여 후 30분부터 4시간까지는 집중적으로 관찰하였고, 1회/1일 14일까지 일반증상을 관찰하였다. 관찰 시 사망여부 및 임상증상을 개체별로 기록하였다.
- 모든 동물에 대하여 투여직전(투여 당일), 투여 개시 후 3, 6, 9, 10일과 14일에 측정하였다.
- 시험 중 사망동물은 발견 즉시 부검하여 육안적으로 장기를 검사하였고 시험종료 시 모든 생존동물에 대하여 CO₂가스 흡입법으로 안락사하여 방혈한 후 육안적으로 장기를 검사하였다.

(사) 반수 치사량

- 반수치사량은 독성등급법의 본시험 단계 흐름도를 참조하여 산출하였다.

(아) 통계처리

- 체중 데이터는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 체중에 대한 통계학적인 분석은 실시하지 않았다.

(자) 결과

- 시험물질을 위내에 1회 강제 경구투여 시 나타나는 독성양상 및 독성강도를 알고자 SD 암컷 랫드에 Acute Toxic Class method로 시험을 수행하였다.
- SD 랫드에 시험물질을 2,000 mg/kg bw로 1단계 및 2단계로 단회 경구 투여한 후 14일간 사망 및 빈사동물 발생여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 관찰기간 종료 후 부검하여 개체별로 이상여부를 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.
- 시험물질을 2,000 mg/kg bw로 암컷 랫드 3마리에 투여(1단계)하였으며, 모든 동물에서 사망동물이 관찰되지 않아 다시 2,000 mg/kg bw를 암컷 랫드 3마리에 투여(2단계)하였으나 투여군 모두에서 사망동물이 관찰되지 않았다(Table 카-11).

Table 카-12. Mortality after the administration of FDME

Dose group (mg/kg bw)	Sex	No. of Animals	Number of death on day										Mortality (%) (dead/total)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8~14			
1 st step 황칠나무 -2000	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0/3)
2 nd step 황칠나무 -2000	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0/3)

- 시험기간 동안 2000 mg/kg bw 1단계 및 2단계 투여군 모두에서 투여 후부터 관찰기간 종료일까지 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다(Table 카-13).

Table 카-13. Individual clinical signs induced by the administration of FDME

Dose group (mg/kg bw)	Animal Number	Day 0 (after dosing)					Day 1	Day 2~14
		30 min	1 hour	2 hour	3 hour	4 hour		
1 st step 황칠나무 추출물 -2000	1	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	2	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	3	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
2 nd step 황칠나무 추출물 -2000	1	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	2	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	3	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS

NCS: No clinical signs.

- 투여 후에 시험물질과 관련된 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 카-14).

Table 카-14. Body weight changes in female rats treated with FDME

Dose group (mg/kg bw)		Animal Number	Body weights (g)					Weight gain ^{b)}
			Day0 ^{a)}	Day 3	Day 6	Day 9	Day 14	
1 st step	황칠나무 추출물	1	138	150	157	169	177	39
		2	137	156	163	181	198	61
		3	143	156	164	184	193	50
		Mean	139.3	154	161.3	178	189.3	50
		SD	3.2	3.5	3.8	7.9	11	11
		n	3	3	3	3	3	3
2 nd step	황칠나무 추출물	1	145	161	177	202	208	63
		2	171	182	190	204	219	48
		3	169	182	205	221	223	54
		Mean	161.7	175	190.7	209	216.7	55
		SD	15.4	12.1	14	10.4	7.8	7.6
		n	3	3	3	3	3	3

a): Data after fasting for 16 hr.

b): Body weight gains were calculated for day 0-14.

(2) 마우스에서 황칠나무추출 발효액의 면역활성 효능평가

(가) 서론

- 최근 약용 식물이 사람 및 가축에서 다양한 미생물적 요소에 의한 질병 예방 및 개선에 있어서 중요한 역할을 하고 있으며, 약물과 달리 사용이 비교적 용이하기 때문에 그 수요가 증가하고 있다(Patwardhan and Gautam, 2005).
- 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Leveille)는 드릅나무과에 속하는 한국 고유종으로 전라남 북도, 경상남도 및 제주도 등 남부지방의 해안가와 섬에서 흔히 자라는 상록활엽교목이다. 이처럼 황칠나무를 이용한 추출물은 원료의 조달이 용이하여 경제적이고 국내 고유종을 이용한 추출물이란 점에서 그 가치가 높다고 생각된다(Hyun et al., 2013; Moon et al., 1999).
- 황칠나무를 이용한 추출물은 다방면으로 연구되고 있으며, 그 예로 색소침착 예방 등 피부 개선뿐만 아니라 혈행개선, 면역계, 신경계 강화에 도움을 주며, 항미생물 활성이 있어 병충해와 공해에 강하다는 연구결과 및 암세포의 증식억제 효과가 있다는 연구결과들이 보고되었다(Chung et al., 2009, Chung et al., 2011, Hyun et al., 2013, Moon, 2011 and Park et al., 2004 and Choi et al., 2015).
- 하지만 황칠나무 추출물을 이용하여 면역활성을 확인한 구체적인 동물 실험 결과는 아직 보고된 바 없어, 본 연구에서는 실험용 흰쥐(BALB/c)를 대상으로 면역활성에 관한 효과를 확인하고자 하였다.

(나) 시험물질

- 경구독성 시험과 마찬가지로 계명대학교에서 전달 받은 분말을 별도의 조제 없이 그대로 사용하였다.

(다) 시험계 및 사육환경

① 시험계

- 계 통 및 종: 실험용 흰쥐(BALB/c)
- 공 급 원: 주식회사 오리엔트
- 동물의 성, 수 및 주령: 암컷 60마리(5주령)

○ 본 시험에 사용한 BALB/c 마우스는 계통에 관한 시험 기초 자료가 풍부하므로 시험결과 해석 및 평가에 용이하여 선택하였다. 관련 규정에 의거하여 암컷을 사용하였다.

② 사육환경

○ 동물사육실은 온도 20°-24°C, 습도 50-65%로 12시간 간격으로 명암주기를 유지하였다.

(라) 시험방법

- KNU 2016-0090: 황칠나무 추출발효액의 면역증진 효능평가와 흑초발효액의 간기능 개선 효능 평가

○ 본 시험은 식품의약품 안전처에서 제시한 건강기능식품 기능성 평가 가이드상의 ‘면역 기능 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편, <면역기능 증진 기능성 확인을 위한 바이오 마커> 를 참고하여 진행하였다.

① 시험군의 구성

○ 마우스를 임의로 12마리씩 분류, 총 7개의 그룹으로 나누었다(Table 카-15).

Table 카-15. Treatment group arrangement for mice feeding

Treatment groups	Description
Normal control group (Group I)	Normal diet and water
Vehicle control group (Group II)	Treated with SRBC only
Positive control group (Group III)	Ginseng extract 200mg/Kg
Group IV	125 mg/Kg of the extract
Group V	250 mg/Kg of the extract
Group VI	500 mg/Kg of the extract

② 투여량 설정 및 투여 방법

○ 실험 시 정상 대조군(Normal control)을 제외한 모든 실험동물에 추출물을 200 uL씩 1일 1회 14일간 투여하였다.

③ 시험의 실시

○ 추출물 투여 후 15일째 마우스에 5.0×10⁸/ mL용량의 sheep red blood cells (SRBCs)를 복강 내 주사하여 면역 반응을 유도한 후, 7일간 추출물을 추가로 급여하였다.

④ 체중 및 장기 무게의 변화

○ 시험 기간 동안 실험동물의 식이량 및 음수량을 3일 1회, 체중과 임상증상을 주 1회 측정하여 기록하였으며, 21일 후 모든 생존동물에 대하여 안락사하여 심장채혈 및 장기를 추출하였다.

- 추출한 혈액은 Heparin Blood collection tube에 보관하였으며, 혈장 분리를 위해 E-tube로 옮긴 후 10,000 rpm, 5분간 원심분리 하여 -80℃ 냉장고에 보관한 후 실험에 이용하였다.
- ⑤ 비장세포의 분리
 - 안락사 직후 마우스에서 비장을 분리하여 무게를 측정하고 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)가 담긴 멸균 튜브에 보관하였다.
 - 세포 분리를 위해 분리한 비장을 70 µm fine nylon cell strainer (Becton Dickinson)를 이용하여 균질화 한 후 1,600 rpm, 5분간 원심분리하여 상등액 제거 및 펠렛을 1 mL pre-warmed Red Blood Cell Lysing Buffer solution (Sigma)에 부유시킨 후 적혈구 제거를 위해 37℃에서 1분간 배양하였다.
 - 이 후 1,600 rpm, 4℃, 5분간 원심분리하여 상등액 제거 및 PBS를 이용하여 세척하고 동일한 과정을 3회 반복하였다. 최종적으로 상등액을 제거하고 세포배지(RPMI-1640 (10% (v/v) FBS, 100 units/mL penicillin, 및 100 µg/mL streptomycin 포함; 10% FBS, 1% P/S))를 이용하여 펠렛을 재현탁 하였다.
 - 얻어진 비장 세포는 trypan blue로 염색하여 현미경을 통해 세포를 계수 하였다.



Figure 카-9. Flow-chart for the experiment procedures

- ⑥ 비장세포에서 림프구 분석
 - 96 well plate상에 각 well 당 200 uL의 RPMI-1640 (10% FBS, 1% P/S) 배지를 분주한 후 분리한 비장 세포를 4×10^6 cells/mL 농도로 분주한다. 이 후 유사분열물질인 mitogen 생성 방지를 위해 Concanavalin A (B-cell activator) 혹은 LPS (T-cell activator) 를 각각 처리하여 37℃에서 72시간 배양한다.

○ 모든 결과는 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 분석법으로 분석하였다.

⑦ MAC I 발현 및 T-림프구 표현형에 대한 유동세포 계측 분석

- T-림프구의 표현형 분석을 위하여 특정 세포 분석이 가능한 FACS (Fluorescence activated cell sorter)를 이용, 실험을 진행하였다.
- 분석을 위해 1×10^6 cells/100 uL 농도의 비장세포를 FACS (Fluorescence activated cell sorter) 전용 튜브에 분주한 후 IgG (1 ug IgG/ 10^6 cells)를 이용, 상온에서 15분 간 blocking 과정을 거쳤다. 여기에 10 uL/ 10^6 cells 용량의 접합항체(conjugating antibody)를 분주하고 혼합 후 상온에서 30분간 암배양하였다.
- 이 후 부착되지 않은 항체는 제거하고 Flow Cytometry Staining Buffer 를 이용하여 세포를 재현탁한 후 300xg, 5분간 원심분리 하고, 이 과정을 한 번 반복한다. 최종적으로 원심분리 후 상등액을 제거하고, 400 uL Flow Cytometry Staining Buffer를 이용하여 세포를 부유시켜 전처리 과정을 완료 후 FACS 기계를 통해 분석하였다.
- 실험결과는 FACSDiva version 6.1.3 software on BD FACSAria™ III (BD Biosciences, CA, US)를 통해 분석되었으며, 결과값은 발현율(%)로 표시하였다.

⑧ 사이토카인 및 면역 글로불린 측정

- 분석을 위해 96 well plate를 이용, 50 uL 대조군(Standards 및 controls)에 50 uL microparticle cocktail 을 분주 후 싸이토카인 분석의 경우 30분, 이뮤노글로불린 분석의 경우 2시간 상온에서 교반기로 배양하였다.
- 배양 후 4회 세척 하고 50 uL of Biotin Antibody Cocktail 각 well에 분 주 후 1시간 30분 동안 상온에서 교반기로 배양하였다. 이 후 50 uL Streptavidin-PE 용액을 분주하여 1시간 30분 동안 상온에서 교반배양하였다. 최종적으로 100 uL Washing Buffer를 이용하여 microparticles을 재현탁한 후 2분간 배양 후 Luminex (Luminex, Austin, TX, USA)를 이용하여 분석한다.
- 분석값은 각각의 샘플과 특정수의 비즈가 부착된 항체와의 결합을 분석을 통하여 도출된다. 각 샘플의 농도는 logistic curve-fit (MasterPlex QT 2010 (MiraiBio, Hitachi, CA, USA)을 기반으로 한 standard curve에 의거하여 도출된다.

⑨ 통계분석

- 결과값은 평균값±표준편차의 형태로 표기하였다. 본 연구에서 결과는 GraphPad Prism 7 software를 통하여 Dunnett's 혹은 Tukey's 분석법으로 분석되었다. 모든 결과값은 P-value 가 0.05 이하일 때 유효성을 가진다.

(바) 시험 결과

① 마우스의 식이 및 음수량

- 본 연구에서는 시험기간 동안 마우스에 자율급식을 하였으며, 3일 1회 식이 및 음수량을 측정하였다. 실험 결과 SRBC 투여 직후 모든 투여군에서 일시적으로 식이 및 음수량이 감소하는 경향을 보였으나 대조군과 시험군간의 유의적인 차이는 확인되지 않았다(Figure 카-8).

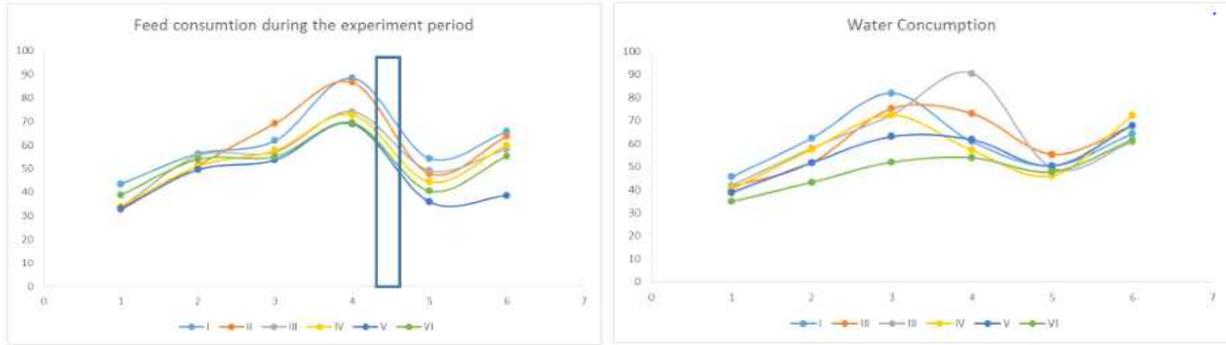


Figure 카-8. Feed intake of mice consisted of the six group at different time interval (left), Average water intake of mice in different time intervals (right)

② 체중 및 장기 무게의 변화

○ 시험 기간 중 체중 측정은 모든 개체에서 주 1회 실시 하였으며, 실험 종료 시 최종 증체량을 계산하였다(Figure 카-9). 그 결과, 황칠나무 추출물을 급여한 시험군에서 다른 군과 비교하여 체중 증가가 확인되었다.

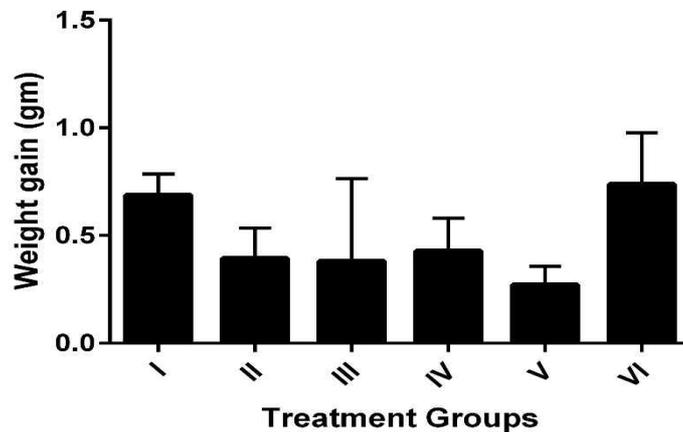


Figure 카-9. Change of body weight gain in each group (mean with SEM). Group I, negative control; Group II, vehicle control, Group III, positive control, Group IV, treatment with 125 mg/Kg, Group V, treatment with 250 mg/Kg and Group VI, treatment with 500 mg/Kg

○ 실험 종료 후 각 개체에서 비장, 간, 흉선 및 신장을 분리하여 체중 측정된 결과를 Table 카-16 및 Figure 카-9로 정리하였다. 실험 결과 양성대조군(positive control)과 황칠나무 추출발효물을 125 mg/kg, 500 mg/kg 급여한 시험군에서 비장의 무게가 증가한 것이 확인되었다.

Table 카-16. The average weight of tissue organs collected from treated and non-treated mice.

	Spleen (Mean±SEM)	Liver (Mean±SEM)	Thymus (Mean±SEM)	Left Kidney (Mean±SEM)	Right Kidney (Mean±SEM)
I	0.08 ± 0.002	0.854 ± 0.022	0.03 ± 0.0084	0.106 ± 0.006	0.110 ± 0.005
II	0.096 ± 0.008	0.824 ± 0.035	0.038 ± 0.0049	0.122 ± 0.007	0.116 ± 0.008
III	0.104 ± 0.007	0.894 ± 0.038	0.047 ± 0.0037	0.114 ± 0.007	0.12 ± 0.005
IV	0.102 ± 0.004	0.878 ± 0.024	0.059 ± 0.0086	0.112 ± 0.004	0.116 ± 0.004
V	0.094 ± 0.005	0.84 ± 0.028	0.049 ± 0.0031	0.114 ± 0.005	0.112 ± 0.002
VI	0.105 ± 0.005	0.863 ± 0.013	0.047 ± 0.0034	0.115 ± 0.006	0.128 ± 0.005

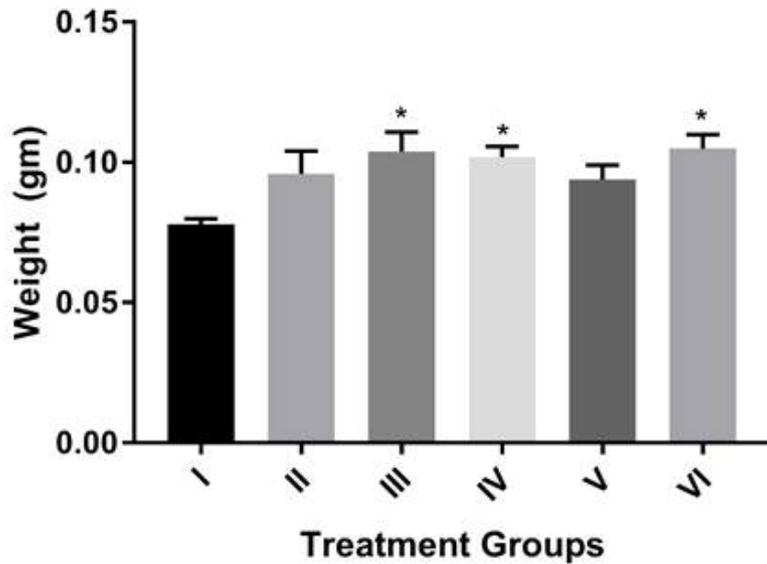


Figure 카-9. Comparison of organ weight collected from each groups. Group I, negative control; Group II, vehicle control, Group III, positive control, Group IV, treatment with 125 mg/Kg, Group V, treatment with 250 mg/Kg and Group VI, treatment with 500 mg/Kg.

③ 비장세포의 분리

○ 장기 무게 측정 후 비장세포를 분리, Trypan Blue로 염색 후 계수하였으며, 양성대조군과 125 mg/kg, 500 mg/kg 급여군에서 비장세포 수가 상대적으로 높은 비율로 계수되었다. 그러나 500 mg/kg 급여군에서 정상 대조군과 유의적인 차이는 확인되지 않았다(Figure 카-10).

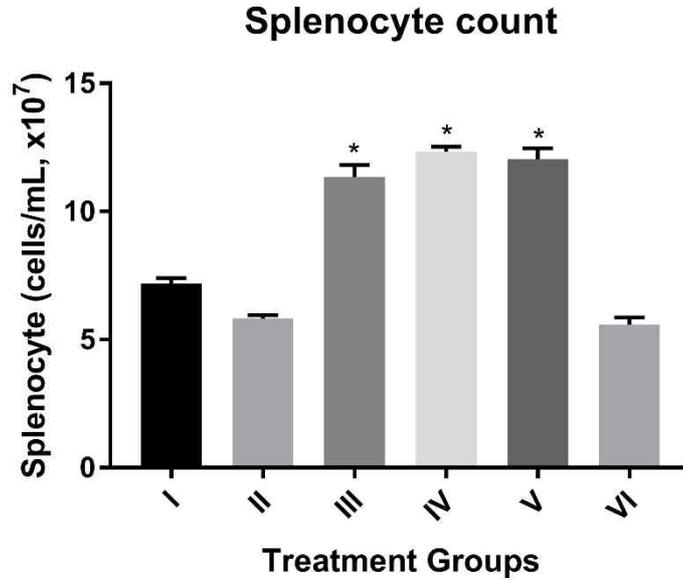


Figure 카-10. Change of splenocytes (CFU/mL). Group I, negative control; Group II, vehicle control, Group III, positive control, Group IV, treatment with 125 mg/Kg, Group V, treatment with 250 mg/Kg and Group VI, treatment with 500 mg/Kg.

④ 비장세포에서 림프구 분석

- Concanavalin A 혹은 LPS를 처리하여 배양한 비장세포 내 림프구 증식 분석 결과 *in vivo* 와 *ex vivo*의 실험 모두 Concanavalin A를 처리한 시료에서 LPS를 처리한 시료보다 림프구가 두 배 이상 증가한 것으로 확인되었다(Figure 카-11, 카-12). 이는 황칠나무 추출발효물이 B-림프구 보다는 T-림프구 증식에 효과적이란 것을 시사한다.
- 특히, 저용량(125 mg/kg)의 추출발효물을 투여한 경우가 고용량(500 mg/kg)을 투여한 개체보다 높은 림프구 증식 비율을 보였다.

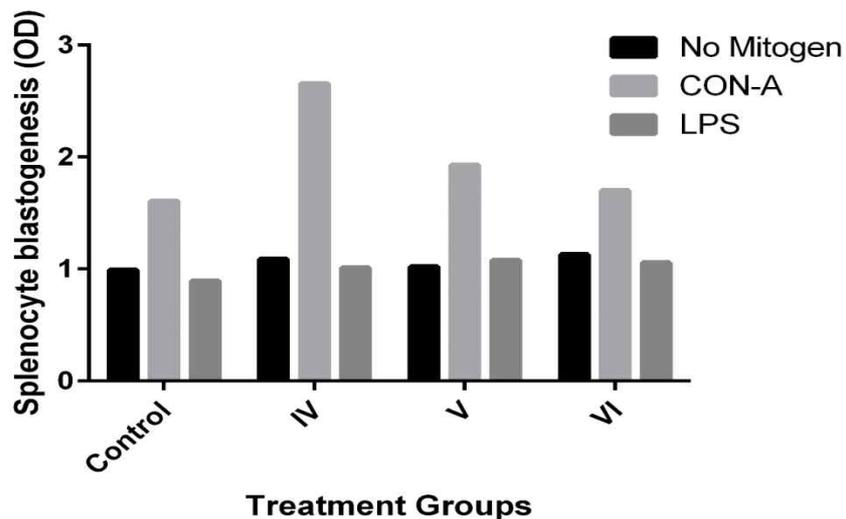


Figure 카-11. *Ex vivo* activation of splenocytes by Con A and LPS

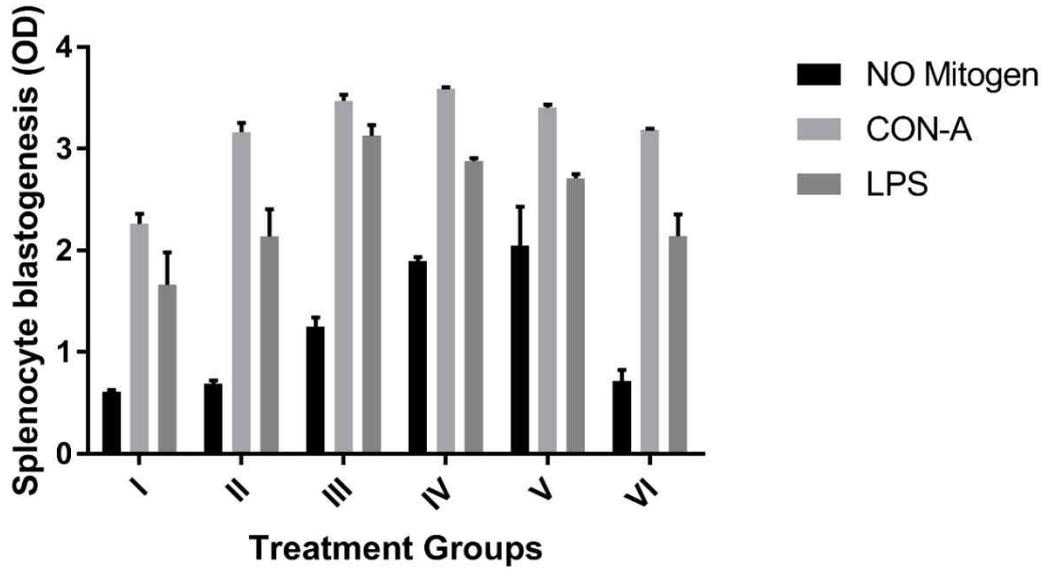


Figure 카-12. *In vivo* activation of splenocytes by Con A and LPS after 72 h of incubation. Group I, negative control; Group II, vehicle control, Group III, positive control, Group IV, treatment with 125 mg/Kg, Group V, treatment with 250 mg/Kg and Group VI, treatment with 500 mg/Kg

⑤ MAC I 발현 및 T-림프구 표현형에 대한 유동세포 계측 분석

○ FACS를 통한 T-림프구의 표현형 분석 결과, 황칠나무 추출물 급여군의 경우 CD8a 와 CD3 T-cell 발현이 모든 대조군 보다 높게 나타났다. 특히, 125 mg/kg 투여군의 경우 CD8a 와 CD3 T-cell 발현율이 다른 군보다 높게 확인되었다(Figure 카-13, 카-14).

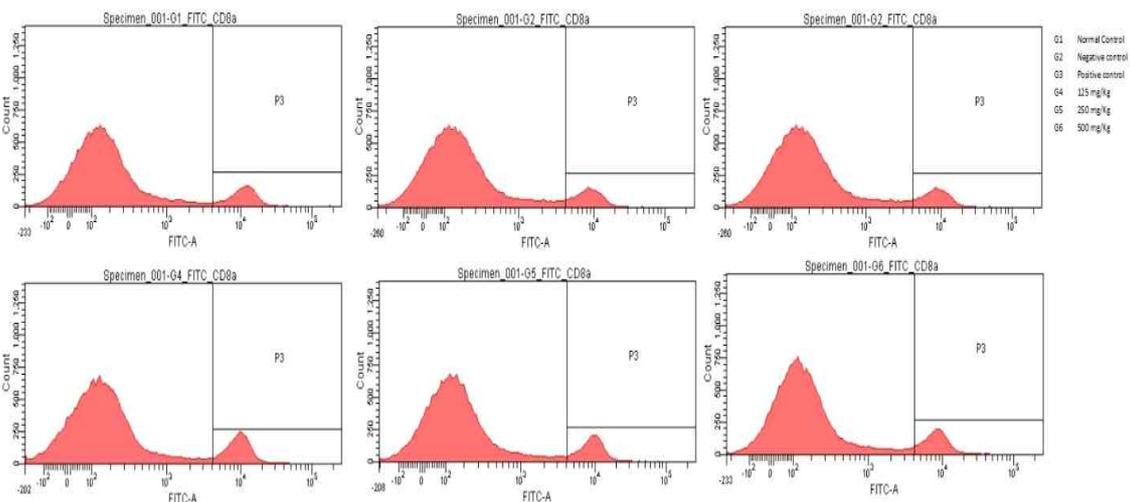


Figure 카-13. FITC conjugated CD8a T cell population comparison among different treatment groups.

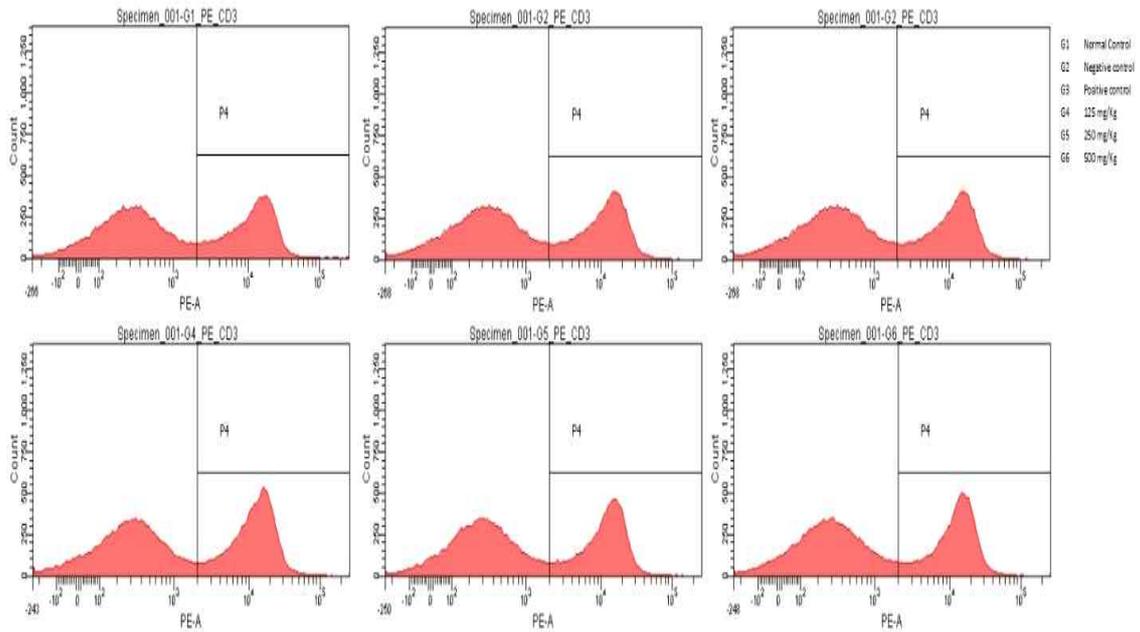


Figure 카-14. PE conjugated CD3 T cell population comparison among different treatment groups

⑥ 사이토카인 및 면역 글로불린 측정

○ Sandwich ELISA 방법을 통한 싸이토카인 및 이뮤노글로불린의 변화 측정 결과, 획득 면역(adaptive immune system)에 있어서 황칠나무 추출발효물은 효과를 가지는 것이 확인되었다. 실험결과 IgA, IgG (IgG1, IgG2A, IgG2B IgG3) 및 IgM과 같은 이뮤노글로불린 발현이 농도에 따라 억제되는 것을 확인하였다(Figure 카-15).

○ 이와 유사하게 황칠나무 추출물을 급여한 군에서 IL_{1α}, IL_{1β}, IL₄ 및 IL₉의 발현이 억제됨을 확인하였다(Figure 카-16). 이와 같은 결과는 추출물이 항염증성 효과를 가진다는 점을 시사한다.

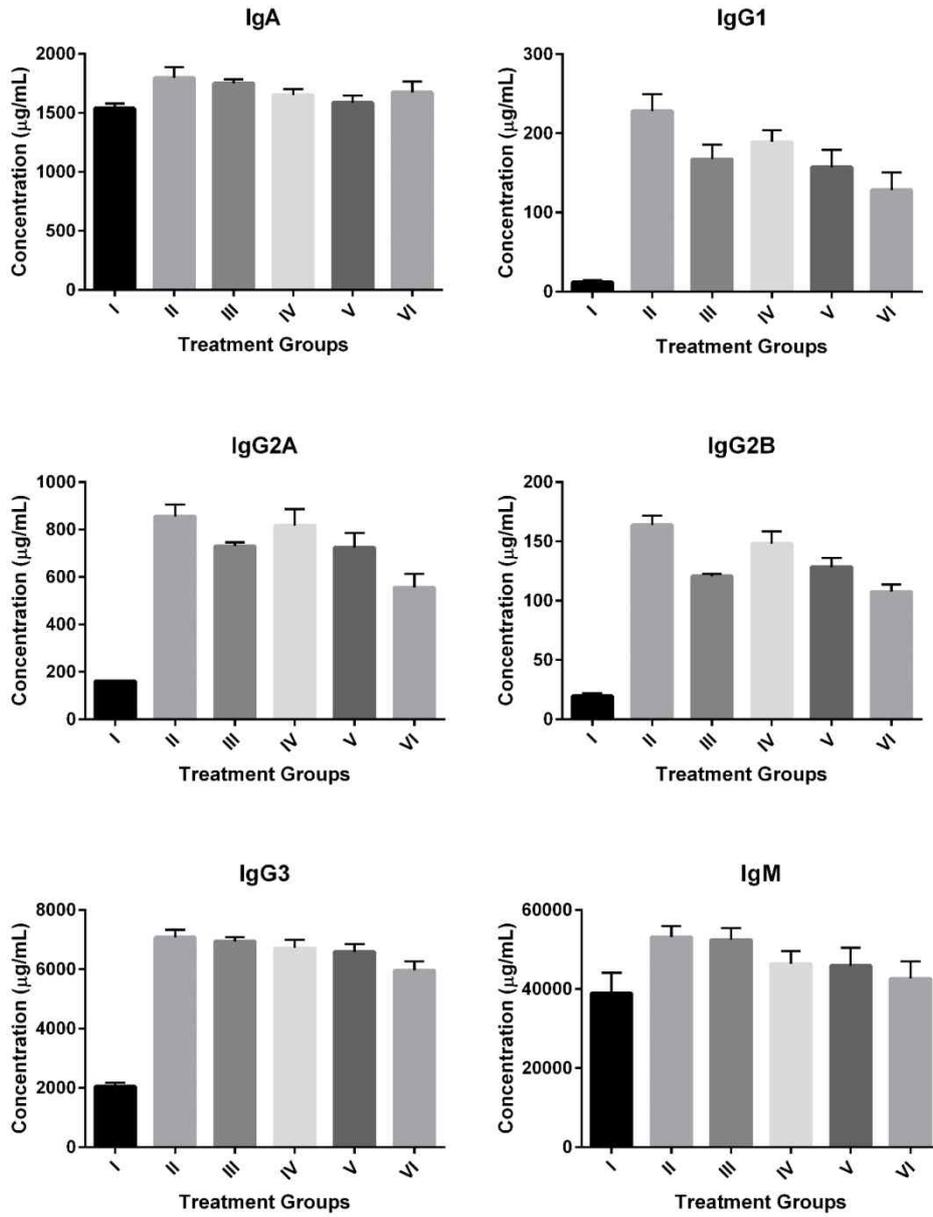


Figure 15. Comparison of Immunoglobulins level after treatment with *D. morbilfera*. Group I, negative control; Group II, vehicle control, Group III, positive control, Group IV, treatment with 125 mg/Kg, Group V, treatment with 250 mg/Kg and Group VI, treatment with 500 mg/Kg

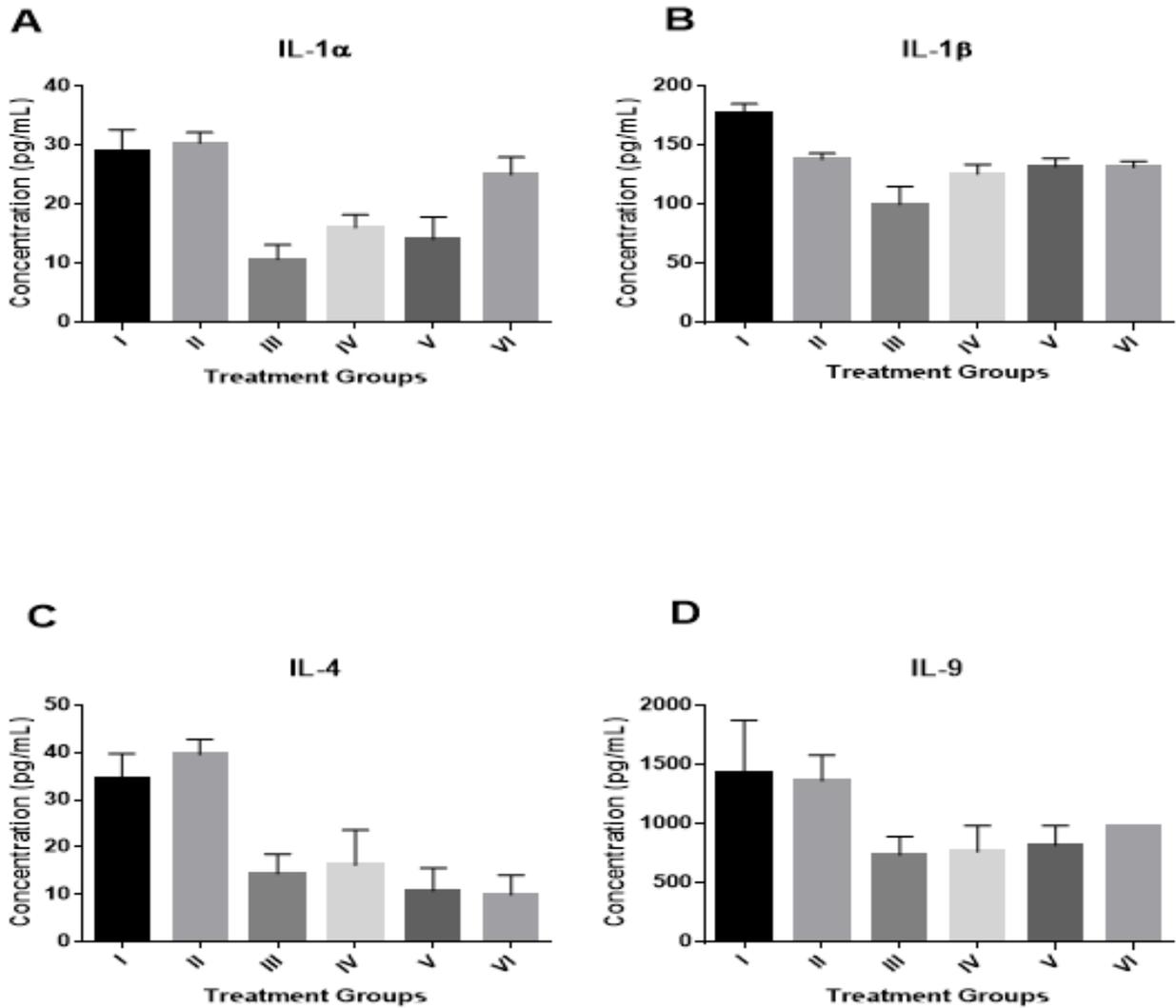


Figure 카-16. Cytokine concentration of different treatment groups in mice. Group I, negative control; Group II, vehicle control, Group III, positive control, Group IV, treatment with 125 mg/Kg, Group V, treatment with 250 mg/Kg and Group VI, treatment with 500 mg/Kg

(사) 결론

- 실험결과, 125 mg/kg 용량의 황칠나무 추출발효물을 급여한 군에서 비장세포 수가 가장 높게 관찰 되었으며, *in vivo*와 *ex vivo* 실험 모두에서 비장세포에 Concanavalin A 처리 시 단핵구의 증식이 관찰되었다. 이는 황칠나무 추출물이 비장내 T-cell의 증식에 중요한 역할을 한다는 점을 시사한다.
- 또한, 황칠나무 추출발효물 급여군에서 CD8a⁺ 과 CD3⁺ T-cell 발현율의 증가 및 of IgA, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3 and IgM과 같은 이뮤노글로불린의 억제, IL-1 α , IL-1 β , IL-4 와 IL-9의 발현 억제가 확인되었으며, 이는 항염증성 효과가 있음을 나타낸다.
- 따라서 본 연구를 통하여 황칠나무 추출발효물은 마우스에서 항염증성 효과를 가지며 비장에서 T-림프구 증식을 통한 면역 증진 효과를 가진다는 것을 확인하였다. 또한, 이뮤노글로불린의 발현 억제로 마우스의 면역체계와 관련된 항체 형성을 억제한다는 것을 확인하였다.

카-5. 황칠나무 추출액 발효물의 면역기능 개선에 대한 예비인체적용 시험

(1) 인체적용시험 개요 설계

○ 황칠나무 추출액 발효물의 면역 개선에 대한 효능을 평가하기 위하여 백혈구 수치가 $4\sim 7\times 10^3/\mu\text{l}$ 에 속하는 만 30~70세의 성인을 대상으로 황칠나무 추출액 발효물 함유 식품 또는 부형제 함유 대조식품을 4주간 섭취하게 하고 섭취 전과 섭취 후의 혈액검사와 감기증상에 대한 설문조사를 실시하여 감기증상의 지속일수와 증상정도, 백혈구수와 혈액 중 사이토카인 분석 및 NK세포를 이용한 세포독성활성도를 비교하였다.

(2) 인체적용시험을 통한 면역개선 효능평가 기술 확보

(가) 인체적용시험의 명칭: 황칠나무 추출액 발효물의 면역기능 개선에 대한 예비인체적용시험

(나) 인체적용시험 실시기관: 대구한의대학교부속 대구한방병원

(다) 인체적용시험 수행기간: 2017년 09월 07일~2017년 10월 26일

(라) 시험용 식품: 시험식품은 황칠나무 추출액 발효물 함유 식품, 대조식품은 부형제 함유 식품으로 제품의 성상, 성분 및 함량은 다음과 같다.

(마) 시험용 식품의 섭취방법: 1일 1회, 1회 당 100ml 1포를 4주간 섭취하도록 하였다.

Table 카-17. Appearance and raw material content of test food

항목	시험군			대조군		
	황칠나무 추출액 발효물 함유 식품			placebo 식품		
식품	원료명	배합비 (%)	함량 (g)	원료명	배합비 (%)	함량
	원료 및 함량	황칠나무 추출액 발효물	12.15	12.15	-	-
사과즙		40		사과즙	40	
자일리톨		5		자일리톨	5	
2배식초		3		2배식초	3	
사과향		0.2		사과향	0.2	
-		-		카라멜색소	0.1	
증류수		39.65		증류수	51.7	
합계		100.0	12.15	합계	100.0	
외관	<p style="text-align: center;"> <황칠음료(시험식품)> <부형제음료(대조식품)> 황칠 발효물 함유 황칠 발효물 비함유 </p>					
포장단위	100ml/포			100ml/포		
저장방법	직사광선을 피하고 냉장 보관					
유효기간	제조일로부터 1년					

방문 1 Screening 방문 기초평가	방문 2 무작위배정 시험용 식품 제공	방문 3 4주후 방문 최종평가
-14일~0일	0일	28+7일

황칠나무 추출액 발효물 섭취군 : 시험군
 (복용기간 28+7일)
placebo 섭취군 : 대조군
 (복용기간 28+7일)

Figure 카-17. Design for improved immune function in human body

(바) 시험 디자인

- ① 시험디자인: 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교 인체적용시험
- ② 시험대상자: 적극적인 치료가 필요한 질환이 없는 성인
- ③ 선정기준
 - 만 30세 이상 70세 이하의 성인
 - 백혈구 수치가 $4 \sim 7 \times 10^3/\mu\text{l}$ 에 속하는 자
- ④ 제외기준
 - BMI 18미만 또는 35초과인 자
 - ALT 및 AST가 정상 상한의 2배를 초과하는 자
 - 임신 또는 수유중인 여성
 - 시험기간 동안 의학적으로 증명된 방법(예: 콘돔, 루프, 페미돔 등)을 사용하는 피임에 동의하지 않는 가임기 여성
 - 공복혈장 포도당 농도가 126 mg/dL 이상일 때 및 고혈압(수축기 혈압 160 mmHg 이거나 확장기 혈압 100 mmHg이상)이 있는 자
 - 효과판정에 영향을 줄 수 있는 약제(고지혈증 치료제, 스테로이드제, 호르몬제, 면역억제제, 항생제등)을 지속적으로 사용하고 있는 자
 - 거식증, 우울증, 조울증, 정신과 질환 등으로 지속적인 치료가 필요한 자
 - 면역관련 질환, 중증의 간 또는 신부전, 악성종양, 폐질환, 교원질증, 다발성 경화증, 알레르기성 피부질환 및 기타 자가 면역질환 등의 전신질환이 이행되고 있는 자
 - 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
 - 시험식품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 또는 위장관계 수술(단순맹장수술 또는 탈장수술 제외)의 과거력이 있는 자
 - 시험참가 1개월 이내에 면역력에 영향을 줄 수 있는 의약품, 한약을 섭취한 자
 - 면역개선 기능성을 인정받은 건강기능식품을 복용하고 있는 자⁸⁾
 - 시험참가 3개월 이내에 다른 인체적용시험 또는 임상시험에 참여하여 시험용제품을 복용한 자(화장품 인체적용시험 제외)
 - 위의 사항들 외에 연구자의 판단으로 시험의 수행이 곤란하다고 판단되는 자
- ⑤ 시험용 식품: 황칠나무 추출액 발효물 함유 식품 및 부형제 함유식품

8) 면역개선 기능성을 인정받은 건강기능식품 기능성 원료 : 게르마늄효모, 금사상황버섯, 당귀혼합추출물, 스피루리나, 클로렐라, 표고버섯균사체, L-글루타민, 폴리감마글루탐산, 동충하초주정추출물, 합성PLAG, 효모베타글루칸

⑥ 유효성 평가변수

- 상기도 감염증상 정도: 감기 증상 지속 일수 및 총 증상정도 점수
- 면역세포의 수: WBC count, differential count, NK cell number
- 면역활성: serum 중의 IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ 함량 및 NK cell 세포독성 활성

⑦ 통계분석방법

- 사전 동질성 검정: Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test
- 효과검정: 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정함

⑧ 관찰일정: 시험기간 동안 대상자는 3회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문별 검사내용은 다음과 같다.

Table 차-18. Summary for test schedule and test inspections

방문일 확인/평가항목	방문 1	방문 2	방문 3
	Screening 기초평가	제품제공	시험종료 최종평가 (4주)
	-14일~0일	0일	28일+7일
대상자 동의서	○		
인구학적 조사	○		
병력/약물투여력 조사	○		
활력징후검사	○	○	○
사전/사후 설문조사	○		○
체성분검사	○		○
임상실험실 검사	○		○
노검사	○		○
사이토카인 분석		○	○
NK cell 분석		○	○
임신반응검사		○	
선정/제외기준 검토	○		
시험용 식품 제공		○	
이상반응 모니터링	○	○	○
병용약물 체크	○	○	○
순응도 조사			○

※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 인체시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

⑨ NK cell 수 분석

- 혈액 중 NK cell 수를 분석하기 위하여 방문 2와 방문 3에서 정맥혈을 헤파린 튜브에 채혈하고 PBMC (Peripheral blood mononuclear cell)을 분리한 후 NK cell 특이 표면단백질에 대한 형광항체로 염색하고 유세포 분석기(FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)로 cell 수를 계수한 후 PBMC 중 NK cell의 비율(%)을 분석하였다.

⑩ NK cell 세포독성 활성 분석

- NK cell에 대한 감수성이 높은 K562 cell (Target cell, T)과 PBMC (Effector cell, E)을 E:T 비율 20:1과 10:1의 비율로 조정하여 배양한 후 사멸한 세포를 PI로 염색한 후 유세포 분석기로 계수하여 사멸한 K562 cell의 비율(%)를 구한다. NK Cell의 세포독성 활성은 다음 식을 통해 구하였다.

$$Cytotoxicity = \frac{Dead\ target\ cell(\%) - Spontaneous\ death(\%)}{100 - Spontaneous\ death(\%)} \times 100$$

(3) 인체적용시험 결과

(가) 인체적용시험 현황

- 자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 48명을 스크리닝하여 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 30명을 대상자로 선정하였다. ITT군은 선정된 30명 중 시험군 15명, 대조군 15명으로 구성되었다.
- 본 연구에서는 중도탈락, 동의철회 및 시험계획서 미준수 등이 없었으며 선정된 대상자 전원이 시험계획서를 준수하고 시험을 종료하였다.

(나) 동질성검정 결과

- 대상자의 성별, 운동여부, 흡연여부, 연령, 체중, 신장, 비만도, 음주량에 대하여 시험용 식품 섭취 전 동질성 검정(Table 차-19,20,21)을 하였으며, 조사한 모든 항목에서 시험군과 대조군 간 유의한 차이가 확인되지 않았다.
- 시험기간 동안의 생활습관의 변화에 따라 시험결과에 영향을 줄 수 있는 항목인 비만도와 음주량에 대해서는 식품 섭취 전과 섭취 후의 변화량에 대하여 시험군간 동질성 검정을 실시하였으며, 체중, 비만도, BMI에서 사전과 사후의 변화가 있는 것으로 확인되었으므로 사전-사후 변화량에 대한 시험군간 차이를 검정하였다.
- 그 결과 3개 항목 모두 식품 섭취 전-후 변화량에서 시험군과 대조군 간 유의한 차이가 없었다.

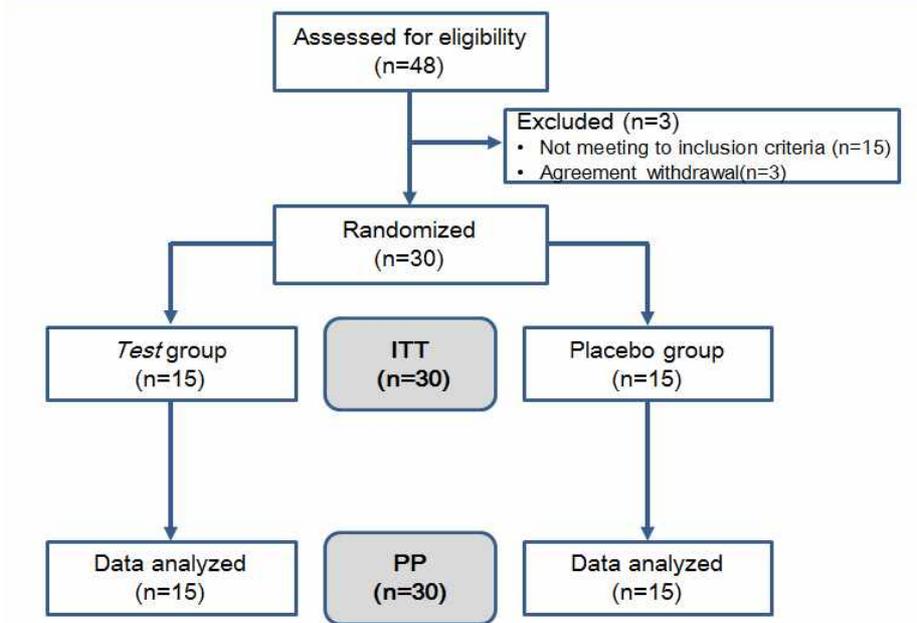


Figure 차-18. Procedure for selecting applicants in the human test

Table 차-19. Baseline statistics and homogeneity test for the subjects' gender

Variable	Group	남		여		Chi-square value	p-value
		Frequency	%	Frequency	%		
성별	시험군	2	13.33	13	86.67	0.24	0.624
	대조군	3	20.00	12	80.00		

Fisher's exact test p-value(1.000)

Table 차-20. Basic statistics and homogeneity test for the subjects' exercise

Variable	Group	예		아니오		Chi-square value	p-value
		Frequency	%	Frequency	%		
운동여부	시험군	11	73.33	4	26.67	0.159	0.6909
	대조군	10	66.67	5	33.33		

Fisher's exact test p-value(1.00)

Table 차-21. Basic statistics and homogeneity test in the subjects' smoking status

Variable	Group	예		아니오		Chi-square value	p-value
		Frequency	%	Frequency	%		
흡연여부	시험군	0	0.0	15	100	1.035	0.309
	대조군	1	6.67	14	93.33		

Fisher's exact test p-value(1.00)

Table 차-22. Baseline statistics and homogeneity test in age, weight, height, obesity, and alcohol intake of subjects

Variable	시험군		대조군		t-value	Pr > t	Pr > w
	Average	Std Dev.	Average	Std Dev.			
연령	45.133	9.326	46.933	10.423	0.5	0.662	0.565
체중	58.967	9.044	61.827	8.72	0.88	0.385	0.4305
신장	160.2	4.931	161.3	8.565	0.42	0.679	0.8844
BMI	22.98	3.429	23.833	3.396	0.68	0.499	0.395
체지방률	32.26	5.735	33.22	8.059	0.38	0.71	0.7874
WHR	0.851	0.069	0.881	0.061	1.26	0.217	0.2283
VFA	99.553	30.637	85.44	31.469	1.24	0.224	0.1711
음주량	75.908	69.79	88.625	50.438	-0.33	0.7512	0.5892

Table 차-23. Baseline statistics and homogeneity test in body weight, body fat percentage, and alcohol intake before and after dosing in experimental groups

Variable	변수	N	평균	표준편차	t value	Pr > t	Pr > w
시험군	체중	15	-0.587	0.859	-2.64*	0.0192	0.0320
	체지방률	15	1.493	1.573	3.68**	0.0025	0.0027
	BMI	15	-0.2400	0.3460	-2.69*	0.0177	0.0245
	음주량	15	5.3729	44.6219	0.32	0.7608	0.6875
대조군	체중	15	-0.740	0.664	-4.32**	0.0007	0.0013
	체지방률	15	0.667	1.431	1.80	0.0927	0.0855
	BMI	15	-0.2733	0.2738	-3.87**	0.0017	0.0023
	음주량	15	29.3340	73.4927	1.26	0.2386	0.5566

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 점근 유의수준

Table 차-24. Comparison of mean changes in weight and weight of drinking (drinking days, drinking)

Variable	시험군		대조군		t value	Pr> t	Pr> w
	평균	표준편차	평균	표준편차			
체중(방문1-방문3)	-0.587	0.8593	-0.740	0.6642	-0.547	0.589	0.744
체지방률(방문1-방문3)	1.4393	1.5732	0.667	1.4306	-1.506	0.143	0.098
BMI (방문1-방문3)	-0.240	0.3460	-0.273	0.2738	-0.293	0.772	0.838

w : Mann-Whitney U 검정에 의한 점근 유의수준

(다) 상기도 감염증상 정도 분석 결과

○ 시험제품의 유효성 평가를 위하여 제품 복용전 시점에서의 감기증상일 수와 감기증상정도

점수 관찰항목에 대해 시험군과 대조군에 대한 동질성 검정을 실시하였다. 그 결과, 감기 증상지속일 수는 유의수준 5%에서 동질하지 않았다. 즉, 시험군인 경우 증상지속일수가 5.333일로 대조군 3.6일보다 1.7일 정도 긴 것으로 나타났다. 감기증상정도는 유의수준 5%에서 시험군과 대조군은 동질한 것으로 나타났다.

- 시험제품 섭취 후 감기증상 지속일수와 감기증상정도 점수는 시험군간 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 방문 시점 간 평균 차이(사전-사후)의 유효성 검정 결과 시험군간 유의한 차이는 없었다.

Table 차-25. Baseline statistics and homogeneity test in the duration and symptom severity of cold symptoms of subjects

Variable	Variable	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
방문1	증상지속일 수	시험군	5.333	1.800	-2.36	0.025	0.013
		대조군	3.600	2.197			
	증상정도 점수	시험군	16.600	10.636	-1.27	0.215	0.074
		대조군	11.667	10.655			
방문3	증상지속일 수	시험군	2.000	2.391	-0.56	0.5777	0.398
		대조군	1.467	2.774			
	증상정도 점수	시험군	6.022	1.555	-0.24	0.814	0.517
		대조군	7.713	1.992			
사전-사후	증상지속일 수	시험군	3.333	2.320	-1.04	0.308	0.335
		대조군	2.133	3.833			
	증상정도 점수	시험군	12.067	7.851	-1.06	0.301	0.084
		대조군	7.733	13.797			

- 추가적으로 시험기간 동안 감기에 걸린 대상자에 한하여 감기 증상일수 및 감기 증상정도에 대한 방문 시점 간 평균 차이(사전-사후)에 대한 유효성 검정 결과 감기증상 지속일수는 시험군이 대조군보다 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않은 반면, 감기증상정도는 시험군이 대조군에 비해 유의하게 완화되는 것으로 나타났다.

Table 카-26. Comparison of the test group in the pre - and post - change of the subjects with cold symptoms

Variable	Group	평균	표준편차	t-value	Pr > t	Pr > w
증상지속일 수	시험군	1.714	1.800	-1.97	0.077	0.101
	대조군	-1.400	3.647			
증상정도 점수	시험군	11.429	10.952	-2.57	0.030	0.034
	대조군	-3.400	7.893			

(라) 면역세포의 수 분석 결과

- 시험용 식품의 유효성 평가를 위하여 혈액 검사의 식품 복용 전에 대한 동질성 검정을 한 결과 Eosino와 Monocyte를 제외한 모든 항목은 시험군과 대조군이 통계적으로 유의한 차

이가 없는 것으로 조사되었다.

- 시험용 식품 복용 전-후 변화에 대한 시험군간 비교 결과 Monocyte를 제외한 모든 항목에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. Monocyte의 수는 시험용 식품 복용 전-후 변화에서는 시험군간에 유의한 차이가 있었으나, 식품 복용 전 시점에서 시험군간 차이가 있었으므로 이러한 변화가 제품의 효과를 반영하는 것으로 판단하기는 어려웠다.

Table 카-27. Basic statistics and pre-homology test on the number of immune cells between test groups

	Variable	Group	Average	Std Dev.	t-value	Pr > t	Pr > w
방문1	WBC	대조군	5.260	0.718	1.38	0.178	0.146
		시험군	5.620	0.709			
	Neutro	대조군	52.313	5.179	1.04	0.3091	0.395
		시험군	54.460	6.132			
	Eosino	대조군	1.380	0.496	2.2*	0.036	0.038
		시험군	1.760	0.447			
	Baso	대조군	0.307	0.096	0	1	0.845
		시험군	0.307	0.110			
	Lympho	대조군	36.620	5.479	0.16	0.8721	0.407
		시험군	36.980	6.608			
	Mono	대조군	9.380	3.687	-2.68*	0.0123	0.011
		시험군	6.493	1.966			

Table 카-28. Comparison of change of immune cell counts between test groups

	Variable	Group	Average	Std Dev.	t-value	Pr > t	Pr > w
방문1-방문3	WBC	대조군	0.040	0.921	1.41	0.1704	0.418
		시험군	-0.633	1.6083			
	Neutro	대조군	-0.707	7.047	1.40	0.1727	0.4306
		시험군	-5.460	11.108			
	Eosino	대조군	-0.153	0.707	0.81	0.4247	0.1837
		시험군	-0.380	0.821			
	Baso	대조군	-0.027	0.212	0.56	0.5825	0.6017
		시험군	-0.073	0.246			
	Lympho	대조군	0.813	5.440	-0.62	0.5443	0.9669
		시험군	2.667	10.301			
	Mono	대조군	0.073	3.009	-3.3**	0.0026	0.0062
		시험군	3.113	1.913			

(마) 사이토카인 분석 결과

- IL-1 β , IL-10은 측정불가인 검체가 많아 분석이 불가능하였으므로 유효성평가에서 제외하였다. 시험용 식품의 유효성 평가를 위하여 식품 복용 전 사이토카인 농도에 대한 동질성 검정을 한 결과 시험군과 대조군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. serum 중 사이토카인 농도의 방문 시점 간 평균 차이에 대한 유의성(방문2-방문3)을 검증하기 위하여 T-test를 실시하였으며, 모든 항목에서 유의수준 5%에서 유의한 차이가 없었다.

Table 카-29. Baseline statistics and homogeneity test for pre-cytokine (serum)

Variable		Group	Average	Std Dev.	t-value	Pr > t	Pr > w
방문1	IL-6	대조군	1.466	0.604	1.15	0.261	0.288
		시험군	1.232	0.510			
	IL-8	대조군	18.239	9.404	1.46	0.157	0.171
		시험군	13.604	7.986			
	TNF-α	대조군	1.795	1.903	0.70	0.489	0.083
		시험군	1.235	2.437			
IFN-γ	대조군	0.009	0.034	-1.000	0.326	0.550	
	시험군	0.129	0.464				

Table 카-30. Validity of the test group in the subject's cytokine test

Variable		Group	Average	Std Dev.	t-value	Pr > t	Pr > w
방문1 - 방문3	IL-6	대조군	-23.508	61.036	-0.4	0.691	0.361
		시험군	-16.421	30.038			
	IL-8	대조군	-285.100	612.400	0.55	0.584	0.618
		시험군	-425.100	764.700			
TNF-α	대조군	-2.223	4.222	-0.32	0.749	0.934	
	시험군	-1.777	3.260				
IFN-γ	대조군	-3.017	2.978	-0.47	0.645	0.501	
	시험군	-2.523	2.815				

(바) NK 세포 수 및 세포독성 활성화도 검사 결과

○ NK cell의 수 및 세포독성 활성화도에 대한 식품 복용 전 시점에서의 시험군간 동질성 검정을 한 결과 시험군과 대조군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. NK 세포수 및 세포 독성 활성화도의 시험 군 간의 차이에 대한 유의성(방문2-방문3)을 검증하기 위하여 T-test를 실시하였으며, 모든 항목들은 유의수준 5%에서 시험군 간의 유의한 차이가 없었다.

Table 카-31. Baseline statistics and homogeneity test in pre-NK cells of subjects

Variable		Group	Average	Std Dev.	t-value	Pr > t	Pr > w
방문1	NK 세포 수	대조군	12.433	5.892	-1.00	0.3235	0.097
		시험군	14.540	5.586			
	Cytotoxicity (10:1)	대조군	6.440	4.692	-1.20	0.2412	0.168
		시험군	9.407	8.307			
	Cytotoxicity (20:1)	대조군	9.127	4.703	-0.76	0.4534	0.663
		시험군	10.887	7.633			

Table 카-32. Baseline statistics and validity test among test subjects for NK cells

Variable		Group	Average	Std Dev.	t-value	Pr > t	Pr > w
방문2- 방문3	NK 세포 수	대조군	1.293	3.048	0.75	0.461	0.165
		시험군	0.280	4.268			
	Cytotoxicity (10:1)	대조군	1.080	2.939	-1.88	0.071	0.213
		시험군	5.300	8.203			
	Cytotoxicity (20:1)	대조군	-2.480	7.530	-1.9	0.068	0.123
		시험군	2.567	7.011			

타. 기타연구성과

타-1. 사과음료 시제품 제작 ((주)오션디)

- (주)오션디에서 사과주스 신제품 개발을 위하여 제품 레시피 조절 시험을 하였다. Table 타-1 과 타-2과 관능평가 점수가 높은 4개의 시험군으로 표기하였다.

Table 타-1. Composition table for making apple beverage (prototype)

(단위: mL)

원료	Sample(사과음료)	
	C	F
사과주스	15	15
설탕용액(40%, w/w)	25	25
과당(40%, w/w))	0	0
포도당(20%, w/w)	10	10
구연산(10%, w/w)	1	1
사과산(10%, w/w)	8	7
펙틴(1%, w/w)	10	5
탄닌(홍차추출액)	5	1
솔비톨(10%, w/w)	10	10
사과향	0.01	0.01
스테비오사이드(5%, w/w)	0	0
음용수	16	26
열처리 공정	×	×
합계	100.01	100.01

Table 타-2. Composition table of apple beverage

(단위: mL)

원료	Sample(사과음료)	
	K	L
사과주스(ml)	10	10
설탕(40%, w/w)	0	25
과당(40%, w/w))	20	0
포도당(20%, w/w)	20	5
구연산(10%, w/w)	1	1
사과산(10%, w/w)	2	2
펙틴(1%, w/w)	5	5
탄닌(홍차추출액)	1	1
솔비톨(10%, w/w)	10	10
사과향	0.01	0.01
스테비오사이드(5%, w/w)	0	0
음용수	31	41
열처리 공정	O	O
합계	100.01	100.01

- 시제품의 pH, 산도 및 당도를 측정한 결과 Table 타-3와 같다. 시제품 C에서 pH와 산도, 당도가 시제품 F보다 모두 높았으나, 오차범위내의 큰 차이가 없는 것으로 보인다.

Table 타-3. Analysis of pH, acidity and sugar content according to the ratio of apple juice

	Sample(사과음료)	
	C	F
당도(°Brix)	17.5	17
pH	3.04±0.01	2.98±0.02
Acidity (%)	1.06±0.01	0.93±0.02

- 시제품의 pH, 산도 및 당도를 측정한 결과 Table 타-4와 같다. pH와 산도는 시제품에 따라 차이가 없었으며, 사과산의 함량을 줄임으로써 산도도 0.4%이하를 나타냈다. 과당과 포도당이 첨가된 시제품 K보다 설탕과 포도당이 첨가된 시제품 L에서 당도함량은 1 °Brix정도 더 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.
- 생산된 두 가지 시제품군을 이용하여 (주)오션디 직원들을 대상으로 관능평가 한 결과 두가지 시제품 모두 신맛이 강하게 느껴서 구연산과 사과산의 함량을 낮춰줄 것을 요청하였으며, 그중 시제품 L을 이용하여 관능평가 한 결과는 Table 타-5와 같다. 시제품 L의 종합적인 의견으로 사과향과 사과맛이 부족하며, 신맛이 강하고, 끝 맛이 깔끔하다는 의견을 보였다. 이를 참고하여, 다음 시제품에서는 사과주스와 사과향, 산성성분 등의 혼합비율을 달리하여 제작하고자 한다.

Table 타-4. Analysis of pH, acidity and sugar content in apple beverage

	Sample(사과음료)	
	K	L
당도(°Brix)	14.8	15.7
pH	3.24±0.01	3.08±0.02
Acidity (%)	0.36±0.01	0.31±0.01

Table 타-5. Sensory evaluation using prototype of apple beverage (sample L)

외관	풍미	신맛	단맛	칭량감	뽀은맛	전체적인 맛
6.7	7.8	6.1	7.7	7.3	6.1	7.9

- (주)오션디에서 제공받은 사과주스를 이용하여 사과음료생산을 최적화 하였다. 사과주스 원료에 설탕(40%, w/w), 과당(40%, w/w), 포도당(20%, w/w), 구연산(10% w/w), 사과산(10% w/w), 펙틴(1%, w/w), 탄닌(100°C, 5분, 홍차추출액), 솔비톨(10% w/w), 사과향을 첨가하여 사과 음료생산을 진행하였다(Table 타-6). 관능평가 결과 사과향이 부족하고, 싱거우며, 신맛이 강하다는 의견으로 사과향과 사과주스, 등의 비율을 달리하여 시제품 O, Q, P를 제작하였다. 관능평가 시 가장 부적절하다고 판단된 시제품 Q를 제외한 두 가지 품목을 비교분석하였다.

Table 타-6. Composition table of apple beverage

(단위: mL)

원료	O	P
사과주스(mL)	13	10
설탕(40%, w/w)	23	5
과당(40%, w/w))	-	15
포도당(20%, w/w)	5	20
구연산(10%, w/w)	0.5	0.5
사과산(10%, w/w)	2	2
펙틴(1%, w/w)	5	5
탄닌(홍차추출액)	1	1
솔비톨(10%, w/w)	10	0
사과향	0.04	0.025
스테비오사이드(5%, w/w)	-	-
음용수	40.5	41.5
열처리 공정	O	O
합계	100.05	100.025

- 시제품 O와 P의 당도는 15 °Brix로 차이가 없었으며, pH와 산도도 pH 2.9, 산도 0.3%로 큰 차이를 보이지 않았다. 시제품 P의 관능평가 결과 전체적인 맛의 조화가 좋았으며, 사과주스가 10% 첨가된 것 치고는 향이 좋다는 의견이 있었으나, 각각의 맛들이 너무 강하게 나타난다는 의견이 있었다. 전체적으로 향과 맛의 조화를 잘 이룬다는 평을 받은 시제품 O를 이용하여 7점법으로 관능평가 한 결과 외관과 풍미, 청량감, 전체적인 맛에서 6점 이상의 높은 점수를 받았으며, 이를 이용하여 사과주스 시제품을 개발하고자 한다.

타-7. Analysis of pH, acidity and sugar content in apple drinks

	Sample(사과음료)	
	O	P
당도(°Brix)	15	15.1
pH	2.90±0.01	2.86±0.01
Acidity (%)	0.30±0.01	0.28±0.01

타-8. Sensory evaluation using prototype of apple beverage (Sample O)

외관	풍미	신맛	단맛	청량감	뽀은맛	전체적인 맛
6.6	6.3	6.13	5.0	6.13	1.5	6.0

타-2. 구운 계란 껍질의 식품소재와 고부가 가치화를 위한 식초칼슘 제조 ((주)오션디)

(1) 재료 및 방법

(가) 계란 껍질 세척

- 건조된 계란 껍질을 250 g에 증류수 500-1000 mL을 넣은 후 핸드믹서를 이용하여 1분정도 분쇄시킨다. 상등액(단백질 등 수용성 물질)을 제거한 후 증류수를 첨가하여 분쇄 및 세척 작업을 5회 정도 수행하였다. 분쇄된 껍질은 90°C에서 건조시켜 소재로 사용하였다.



<원료 계란 껍질>



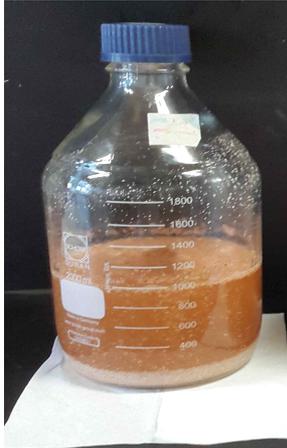
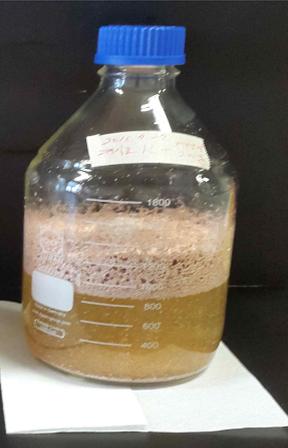
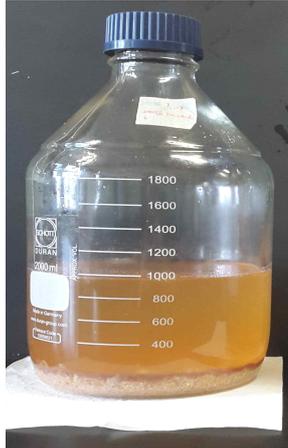
<세척후 건조된 계란 껍질>

Figure 타-1. Baked egg shells before and after pre-treatment

(나) 식초 칼슘 제조

- 사과식초(2배 식초, 삼화, 산도 13%) 1000 mL에 건조된 계란 껍질 200 g을 첨가하여 3일 동안 용해시키면서 pH, 산도 및 단백질함량을 측정하였다.

Table 타-9. Change of egg sell state according to washing and vinegar immersion time

0일 용해		3일 용해	
			
< 미세척 원료 >	< 세척된 원료 >	< 미세척 원료 >	< 세척된 원료 >

- 단순히 이물질만 제거하여 파쇄한 1차 공정을 거친 계란껍질과 이후 핸드 믹서를 이용한 파쇄를 거친 2차 공정, 2차 공정을 거친 후 압착 밀러로 한 번 더 공정을 거친 3차 공정 계란껍질을 다음과 같이 0일 용해에서 3일 용해까지 진행하여 보았다.

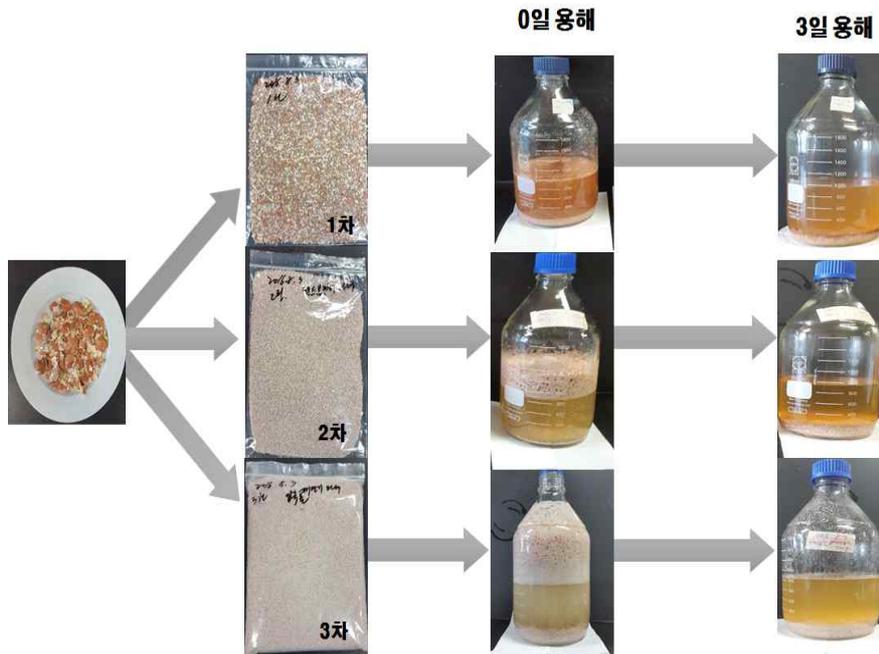


Figure 타-2. Solubilization of baked egg shell obtained by different treatment

(다) 결과 및 고찰

- 파쇄 공정을 3단계로 나누어 이물질만 제거하여 파쇄한 1차 파쇄, 이후 핸드믹서를 이용한 2차 파쇄, 2차 공정 후 압착밀러를 이용한 3차 파쇄물을 이용하여 식초에서 칼슘을 용해한 결과 Table 타-10과 같다. 2차 파쇄공정에서 발효 3일까지 pH가 4.75에서 4.88으로 증가 및 산도는 7.36%에서 6.58%로 감소한 결과를 보였으며, 3차 파쇄물의 3일 용해결과 pH 4.84, 산도 6.03%, 단백질 함량 4 mg/mL으로 외관적인 모습과 분석결과를 바탕으로 3차 파쇄 후 3일 용해하는 것이 가장 최적조건으로 판단된다.

Table 타-10. Total acidity and protein content of baked egg shell solubilized in vinegar

	2차 공정			3차 공정
	용해 시간 (days)			
	1	2	3	3
pH	4.75±0.01	4.82±0.01	4.88±0.01	4.84±0.01
Total acidity (%)	7.36±0.12	6.76±0.04	6.58±0.03	6.03±0.16
Protein content (mg/mL)	2.11±0.03	1.72±0.10	2.02±0.03	4.00±0.07

- 세척된 난각을 사과식초에 용해시켜 ICP 분석기기를 이용하여 분석한 결과 2.84% 수용성 칼슘, 36 mg% 마그네슘, 25 mg% 인을 포함한 무기질을 함유하고 있으며, 동시에 0.4%의 단

백질을 함유한 계란식초를 제조할 수 있었다. 일반적으로 계란껍질의 구성은 CaCO_3 99%, 조단백질 5.35%, 칼슘 34.5%, 건조물 99.2%, 인산 0.001%로 보고되어져 있으며, 이와 비교하였을 때 난각의 입자를 roller mill을 이용하여 미세화한 후 식초에 용해시키는 것이 계란식초 제조 시 유리할 것으로 판단된다.

- 달걀칼슘식초를 이용하여 유기농 설탕과 두충TVP 청국장, 망고추출액을 첨가하여 음료베이스 시제품을 제작하였다.



Figure 타-3. Vinegar fortified with egg shell calcium (prototype)

(성분 혼합물: TVP발효 추출물/칼슘강화 사과식초/유기농설탕/망고 추출액)

타-3. 콩고기 소재를 첨가한 죽 제조 최적화((주)늘그린)

- 찹쌀 현미 분말과 현미 분말을 기본으로 하여 다양한 분말을 첨가한 죽 조성물은 뜨거운 물로 간편하게 죽을 제조한 후 씹을 때 입안에서 씹히는 조직감(질감)이 없어서 이를 개선하기 위해서 콩고기 소재를 첨가하여 버섯죽 조성물을 제조 하였다. 콩을 원료로 한 식물성 콩고기는 베지푸드(주)에서 생산하는 건조 콩고기로서 많은 종류가 있지만 버섯죽 제조에 최적화하기 위해 쌀 불구이 단백질 250 g, 쌀 너비아니 단백질 250 g, 콩 단백질 슬라이스 250 g, 콩 단백질 청크 300 g 으로 총 4가지를 구입하였다.
- 구입한 건조 콩고기를 시식해 본 결과 Figure 타-4에서 Figure 타-5에 따라 콩 단백질 청크 제품이 맛과 형태 등 모든 면에서 버섯죽에 첨가하기에 가장 적합하다고 생각 되었다. 하지만 콩 단백질 청크 제품 시료의 크기가 너무 커서 버섯죽 제조에 최적화하기에는 어렵다고 판단이 되었다. 그래서 최적의 조직감을 나타내기 위해서 콩 단백질 청크 제품을 압착 방법에 의해 Figure 타-6과 같이 일정한 크기로 파쇄를 하여 버섯죽 조성물에 첨가하여 실험을 진행하였다.

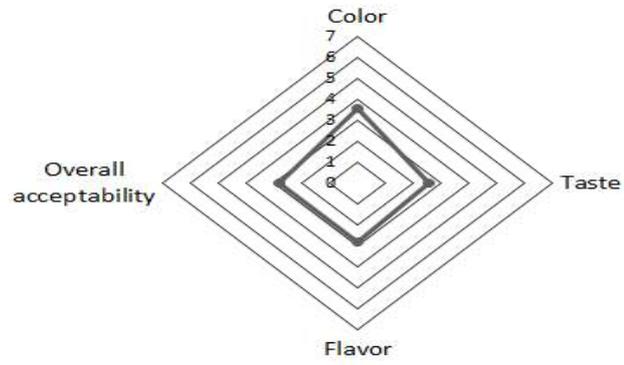


Figure 4-4. Sensory evaluation of rice cereal soup with vegetable protein meat

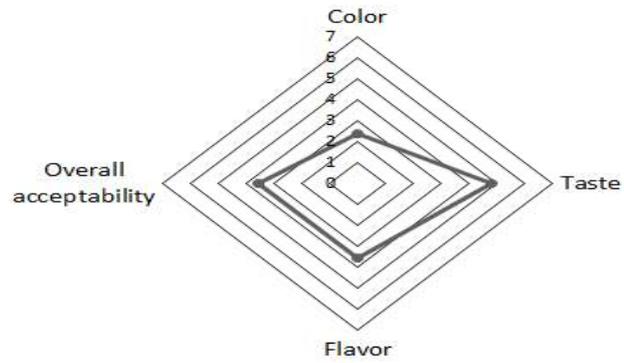


Figure 4-5. Sensory evaluation of rice cereal soup with nugget protein products

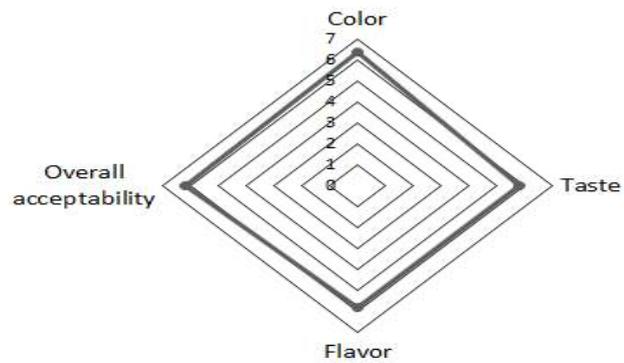


Figure 4-6. Sensory evaluation of bean protein slice products

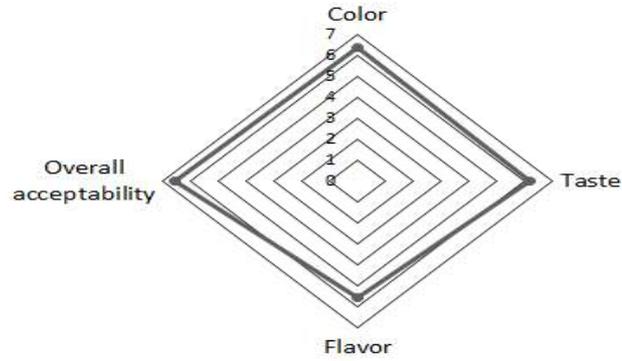


Figure 타-7. Sensory evaluation of soy protein chunk products



Figure 타-8. Shape after crushing of soybean protein chunk products

- Figure 타-9처럼 콩 단백 청크를 파쇄 하여 아래 Table 타-11로 각 성분들을 구성하여 버섯 죽을 제조하였다. 관능검사 결과 버섯의 향이 매우 잘 느껴졌고, 죽의 맛과 형태로 적합하다고 생각 되었다. 지금까지 죽 제조한 것 중 기호도가 좋고 관능평가 점수가 가장 높았다.

Table 타-11. Ingredients ratio for cereal soup with crushed soy protein chunk and mushroom

현미 찹쌀	현미	정제염	팽이버섯 분말	파쇄한 콩 단백질 청크	표고버섯 분말	검은 깨
55.00%	21.82%	0.18%	10.00%	10.00%	4.50%	0.50%

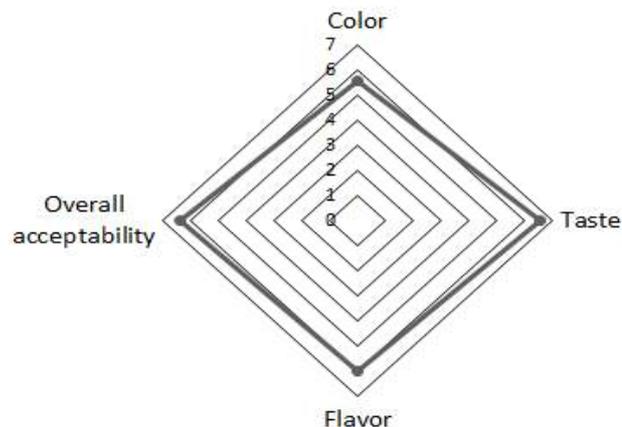


Figure 타-9. Sensory evaluation of cereal soup with mushroom and chopped soybean protein chunks

- 최종적인 레시피는 찹쌀현미 53%, 현미 21.82%, 정제염 0.18%, 팥이버섯 분말 10%, 표고버섯 분말 4.5%, 파쇄한 콩 단백질 청크 10%, 검정 깨 0.5% 를 혼합하여 제조한 죽 조성물이 가장 적절 하다고 판단된다. 최종 버섯 죽 조성물은 합성 감미료 및 향료 첨가 없이 현미, 팥이버섯, 표고버섯, 콩고기 등이 포함된 조성물로서 분말 형태 간편 죽제품의 식감과 맛을 개선한 간 죽 제품이다.



Figure 타-10. Cereal soup fortified with mushroom and soybean process products

타-4. 민들레 발효액을 이용한 발효물 제조 및 효능평가(문경새재골민들레식품)

(1) 민들레 발효액의 혼합발효를 이용한 GABA 생산 최적화

(가) 재료 및 방법

- 문경새재골 민들레 식품에서 제공 받은 민들레 당절임액을 10배 희석액을 멸균 후 MSG 3% 첨가, 10배 농축한 *B. subtilis* HA starter를 5% 접종하여 160 rpm, 42°C에서 2일간 1차 고초균 발효를 하였다. 1차 민들레발효물에 젖산균의 생육을 증진시키기 위해 skim milk 1%와 glucose 2%를 첨가하여 *L. plantarum* K154 균주를 1% 접종하여 2차 젖산균 발효를 통해 GABA 생산 최적화 실험을 하였다(Figure 타-11).

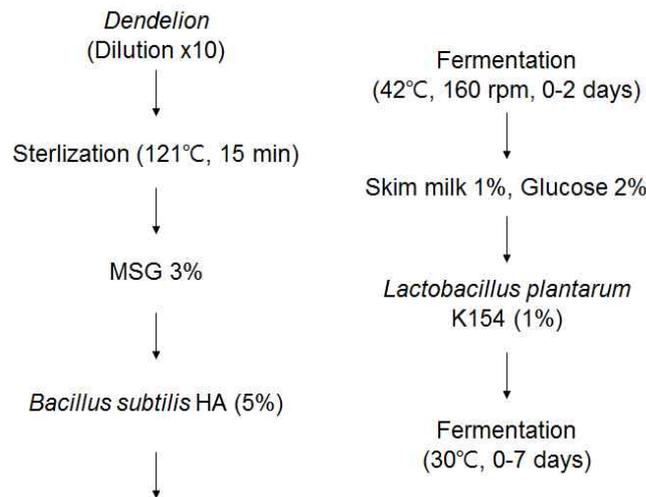


Figure 타-11. Procedure for GABA production using *Dandelion*

(나) 결과 및 고찰

① 민들레 발효액의 고초균 발효 시간에 따른 생리활성물질 생성

- 민들레 발효액을 10배 희석하여 MSG를 3% 첨가하고 1차 고초균 발효를 42°C에서 2일간 발효하였다. 발효민들레의 초기 pH와 산도는 각각 5.67, 0.12%이며, 발효 2일째에 pH 6.95로 증가하고, 산도 0.09%로 감소하였다(Figure 타-12). 발효민들레의 고초균 생균수는 발효 2일째 1.90×10^9 CFU/mL로 나타났다(Table 타-12).
- 발효민들레의 점질물 함량과 점조도의 변화는 Figure 타-13와 같다. 고초균 발효 시간이 지남에 따라 점질물 함량은 증가하여 발효 2일째 1.4%로 증가하였으며, 점조도는 발효 1일째 0.3 Pa·sⁿ에서 발효 2일째 2.11 Pa·sⁿ로 2일째 급격하게 증가하는 것을 확인 하였다.

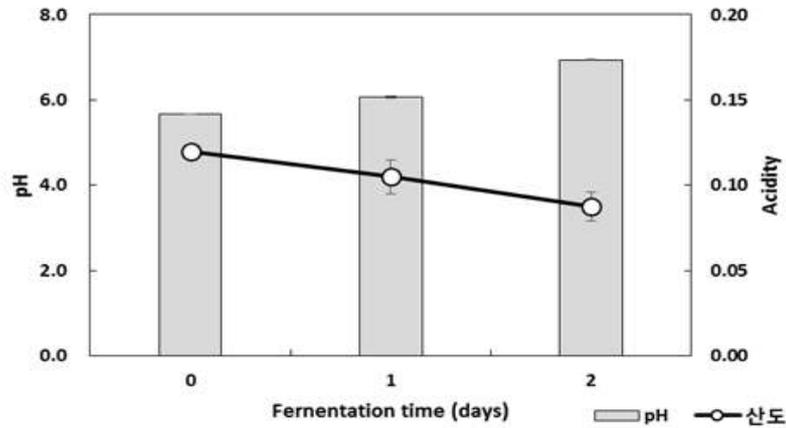


Figure 타-12. Changes in pH and acidity of the *Dandelion* fermented by *B. subtilis* HA

Table 타-12. Viable cell count of *Dandelion* fermented by *B. subtilis* HA

(CFU/mL)

1 st fermentation time (days)		
0	1	2
2.00×10^6	1.08×10^9	1.90×10^9

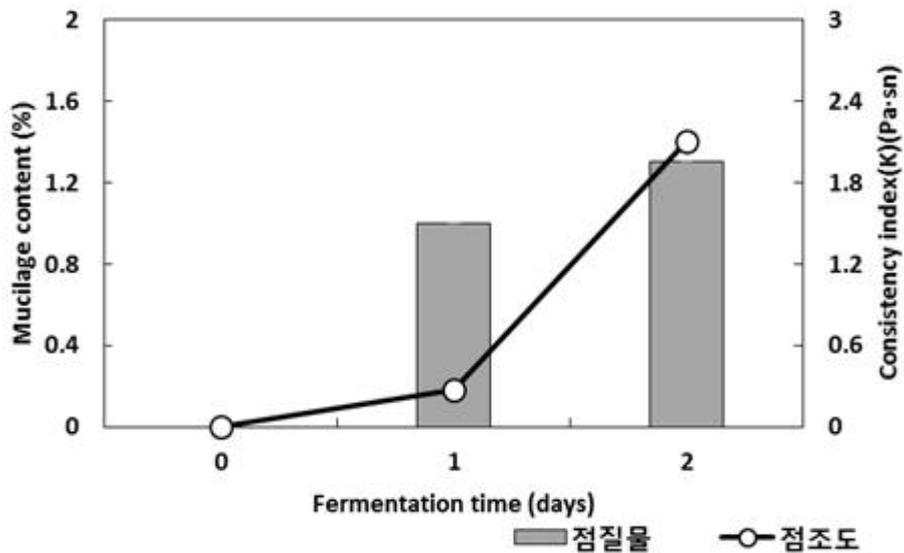


Figure 타-13. Changes in consistency index and mucilage content of *Dandelion* fermented by *B. subtilis* HA

② 민들레 발효액의 젖산균 혼합발효 시간에 따른 GABA 생산 최적화

- 민들레 발효액을 10배 희석하고 MSG 3%를 첨가하여 1차 고초균 발효 2일 후, skim milk 1%와 glucose 2% 첨가하여 *L. plantarum* K154를 이용하여 기능성 아미노산인 GABA 생산을 최적화 하였다. 민들레 1차 고초균 발효액의 pH와 산도는 각각 6.95%, 0.09%에서 젖산균 발효가 진행되면서 pH가 감소하여 발효 3일에는 pH 4.75, 7일에는 pH 4.61로 나타났다. 민들레 발효액의 산도는 발효 3일 0.71%로 가장 높았으며 이후 감소하여 발효 7일에 0.52%로

나타났다(Figure 타-14). 발효 3일 이후 GABA의 생산에 따라 pH가 4.6으로 유지되고 산도 또한 약 0.5%로 감소되는 경향을 확인하였다.

- 민들레 혼합발효액의 생균수 변화는 Table 타-13와 같다. 고초균은 초기 1.90×10^9 CFU/mL에서 젓산 발효가 진행되면서 감소하여 2차 발효 7일에 5.00×10^7 CFU/mL로 나타났으며, 젓산균은 발효 1일째 3.00×10^8 CFU/mL로 가장 높게 나타났다. 이후 발효 7일까지 2.50×10^8 CFU/mL로 유지되는 것을 확인하였다.
- 민들레 혼합발효액의 점조도 변화는 1차 고초균 발효 후 2.11에서 2차 젓산발효 1일째 0.06 Pa·sⁿ으로 크게 감소하였으며, 3일 이후 0.01 Pa·sⁿ로 점성을 거의 나타내지 않았다(Figure 타-15).
- 민들레 발효액의 혼합발효에 따른 glutamic acid 전환 및 GABA 생성능을 확인하기 위해서 TLC를 이용하여 비교하였다(Figure 타-16). Glutamic acid는 2차 발효 1일째 0.5% 이하로 잔존하였으며, 발효 1일부터 GABA가 0.25%이상 생성되었다. 잔존되어 있던 glutamic acid는 발효 3일째 모두 GABA로 전환되어 GABA 함량은 약 0.5%로 나타났으며, 3일 이후 GABA 함량은 차이가 없었다.

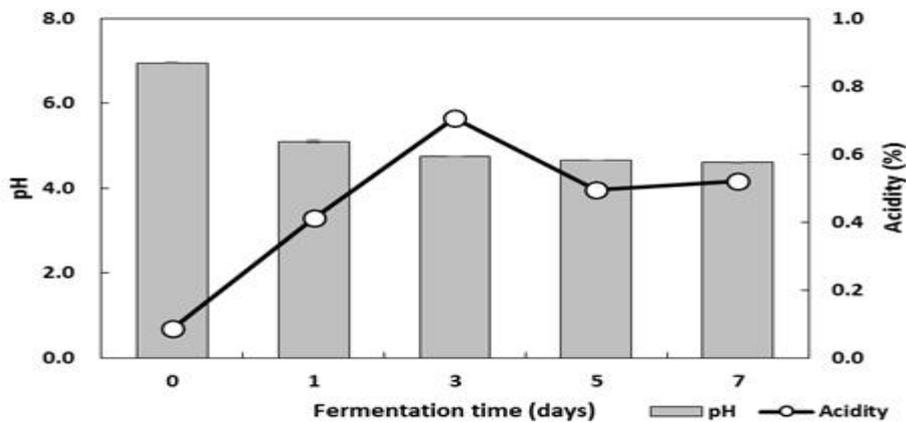


Figure 타-14. Changes in pH and acidity of the *Dandelion* co-fermented by *L. plantarum* EJ2014

Table 타-13. Viable cell count of *Dandelion* co-fermented by *L. plantarum* EJ2014 (CFU/mL)

	2 nd fermentation time (days)				
	0	1	3	5	7
<i>Bacillus</i> sp.	1.90×10^9	4.50×10^8	4.50×10^8	2.00×10^8	5.00×10^7
<i>Lactobacillus</i> sp.	3.60×10^7	3.00×10^8	4.50×10^8	2.50×10^8	2.50×10^8

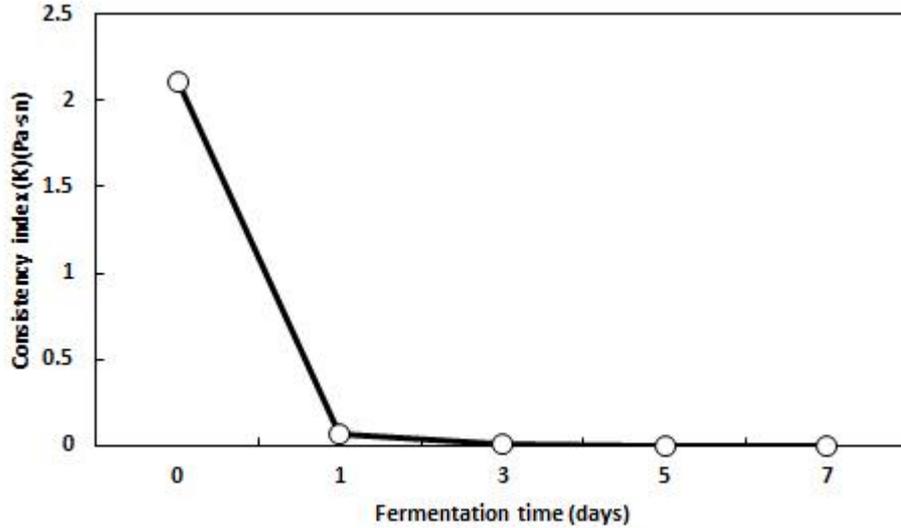


Figure 타-15. Changes in consistency index and mucilage content of *Dandelion* co-fermented by *L. plantarum* EJ2014

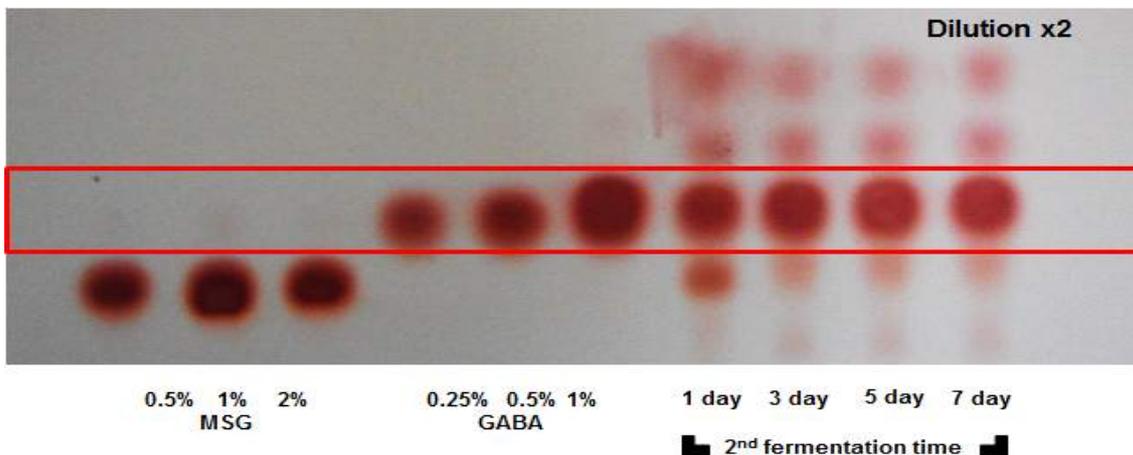


Figure 타-16. Glutamic acid conversion and GABA production by co-fermentation by lactic acid bacteria

(2) 민들레 발효액(발효 전, 후)의 간세포 산화적 손상에 대한 보호효과

(가) 민들레발효액(발효 전, 후)의 세포독성 시험

- 세포배양을 활용하여 민들레발효액의 활성 효과를 측정하기 위해 시료 자체의 세포 독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 민들레발효액(발효 전, 후)의 액을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고 농도는 10, 20, 40배 희석 범위로 하였다. 그 결과, 시험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않았다(Figure 타-17).

(나) t-BHP 유도 독성에 노출된 HepG2 세포에 대한 민들레발효액(발효 전, 후)의 독성 억제 효과

- HepG2 세포를 t-BHP로 처리한 경우 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 세포 생존율이 45.86%로 감소하였다. 민들레발효액(발효 전, 후)으로 세포를 전 처리하면 모든 시료에서 발

효 후 보호 효과가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 10배 희석액으로 비교한 경우 민들레발효액 발효 후 세포 생존율이 54.51%에서 86.02%로 유의적으로 증가하여 보호 활성이 높아지는 것을 알 수 있다(Figure 타-18).

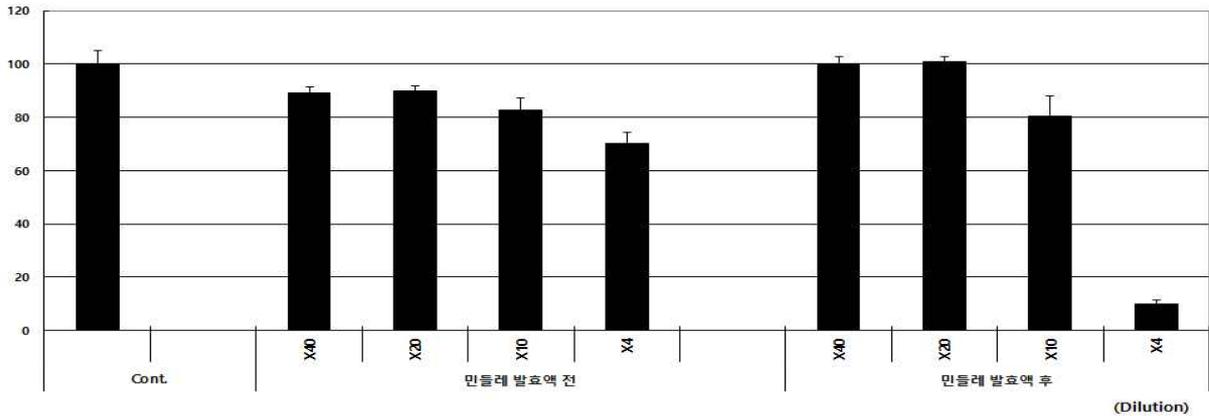


Figure 타-17. Cytotoxicity of the samples in HepG2 cells

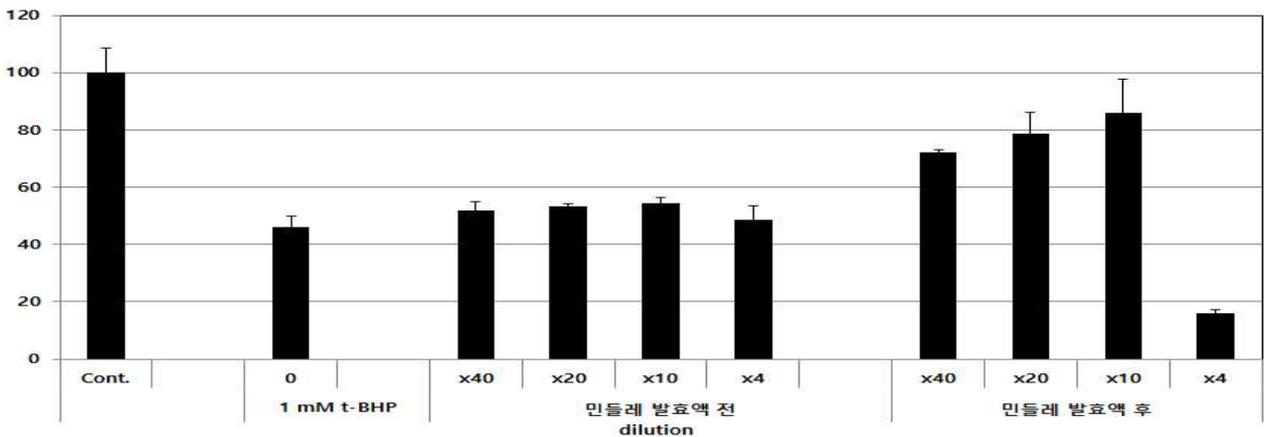


Figure 타-18. Protective effects of fermented *Dandelion* against t-BHP-induced oxidative damage in HepG2 cells

(3) 민들레 발효액(발효 전, 후)의 면역력 증진효과

(가) 민들레발효액(발효 전, 후)의 세포독성 시험

- 세포배양을 활용하여 민들레발효액의 활성 효과를 측정하기 위해 시료 자체의 세포 독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 민들레발효액(발효 전, 후)의 액을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고 농도는 20, 30, 40, 60, 80배 희석 범위로 하였다. 그 결과, 시험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않았다(Figure 타-19).

(나) 민들레발효액(발효 전, 후)의 NO생성능 비교

- 민들레 발효액의 농도에 따라 NO생성이 증진되는지 확인하기 위해 positive control로 LPS 100 ng/mL과 민들레액의 고초균발효로 생성되는 γ -PGA를 농도별로 하여 비교분석 하였다. 민들레 발효액은 발효 전, 후로 20, 30, 40, 60, 80배 희석하여 실험하였다. 민들레 발효 전에

서는 모든 농도구간에서 NO를 생성하지 않는 것을 확인하였으며, 민들레 발효 후에는 80 배 희석에서 20배 희석까지 발효물의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성능이 높아져 LPS 100 ng/mL과 유사하게 NO를 생성하는 것을 확인 하였다(Figure 타-20).

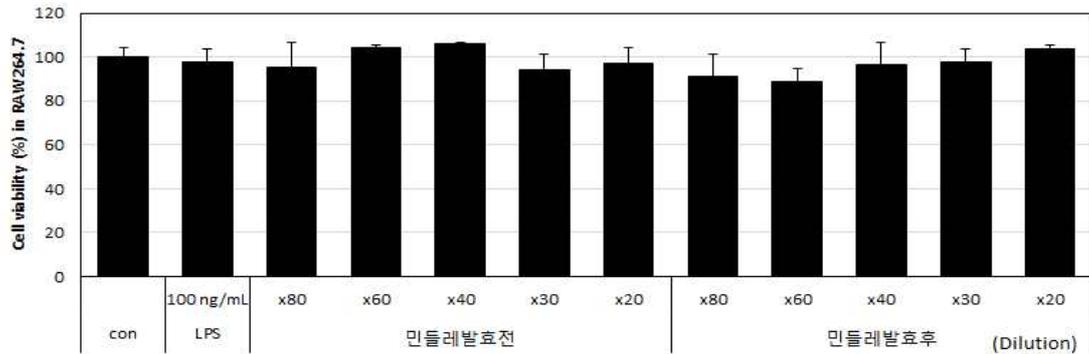


Figure 타-19. Cytotoxicity of the fermented *Dandelion* in RAW 264.7 cells

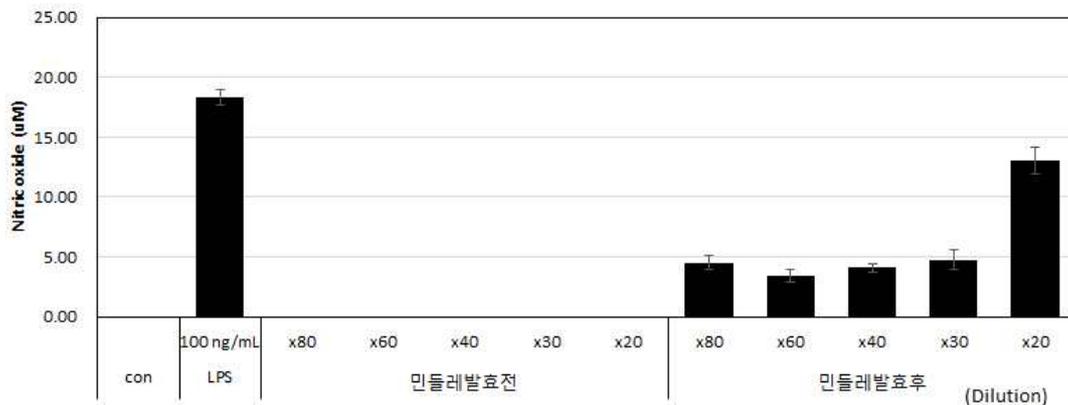


Figure 타-20. Nitric oxide production of fermented *Dandelion* in RAW 264.7 cells



Figure 타-21. Manufacture of beverage with fermented *Dandelion* (prototype)

타-5. 흑미강과 볶은 밀기울을 이용한 발효조건 확립 및 효능평가(금중쌀)

(1) 흑미강과 볶은 밀기울을 이용한 고초균 발효 제조 최적화

- 볶은밀기울에 MSG 첨가 농도를 달리하여 실험한 결과 MSG 5% 첨가에서 기능성 다당류 및 단백질 가수분해가 높은 것으로 보아 MSG 농도를 5%로 하고 볶은 밀기울에 금중쌀에서 제공받은 흑미강을 25, 50%첨가하였다(흑미강: 볶은밀기울, 25:75, 50:50). 흑미강과 볶은밀기울 혼합물에 수분을 150% 첨가하고, 전체 volume에 MSG 5% 첨가하였다. *B. subtilis* HA starter를 1% 접종 후, 42°C에서 3일간 정지 배양하여 흑미강과 볶은 밀기울 혼합 발효물을 분석하였다.

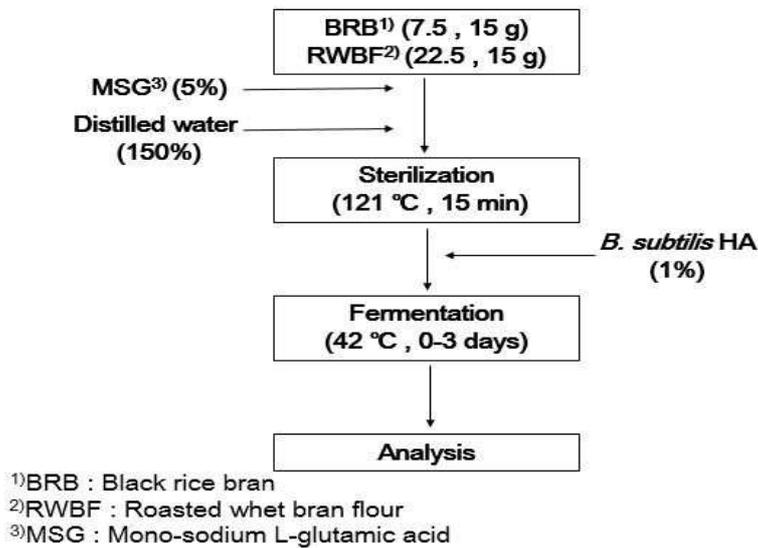


Figure 타-22. Preparation of fermented roasted brans by *Bacillus subtilis* HA

- 흑미강과 볶은 밀기울 혼합 발효물의 pH, 산도는 Figure 타-23과 같다. 혼합 발효물의 pH는 발효 초기 6.2에서 발효 3일째에 8.4, 8.32로 각각 나타났다. 산도는 발효 초기 0.8%에서 발효 2일 째 0%로 발효가 진행되면서 pH가 증가하고 산도가 감소하는 경향을 보였다.

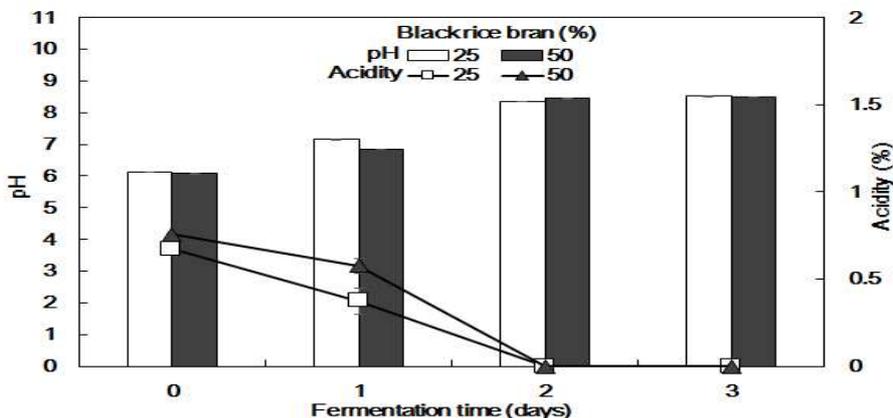


Figure 타-23. Changes in pH and acidity of the roasted and black rice fermented by *B. subtilis* HA

- 흑미강과 볶은 밀기울 혼합 발효물의 생균수는 Figure 타-24와 같다. 발효 초기 2.95×10^7 CFU/g에서 발효 2일째 흑미강 50% 첨가군에서 1.60×10^8 CFU/g으로 나타났다. 50% 첨가군에서 발효 3일 생균수가 5.05×10^7 CFU/g으로 감소하였으며, 흑미강 25%에서는 발효 1일 이후 조금씩 감소하여 발효 3일째 5.15×10^7 CFU/g으로 나타났다.

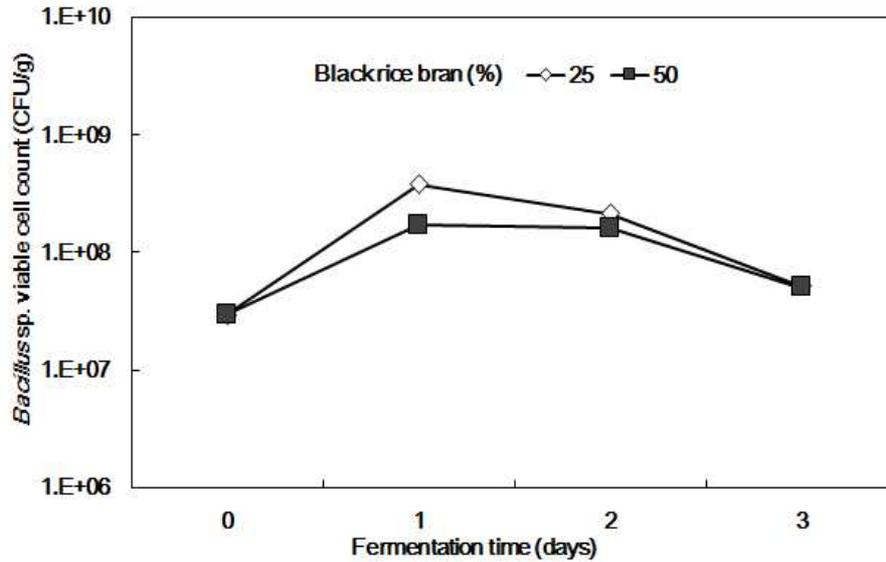


Figure 타-24. Viable cell count of the roasted and black rice fermented by *B. subtilis* HA

- 점질물 함량은 발효 1일째 가장 높게 나타났으며, 흑미강 25%에서 6.4%, 흑미강 50%에서 5.7%의 점질물이 생성되었다. 발효 2일째부터는 점질물 함량이 감소하는 경향을 보였다. 점조도는 점질물 함량의 경향과 반대로 발효 3일째까지 계속하여 증가하였으며, 흑미강 25% 첨가군에서 발효 3일째 $5.83 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 나타났다.

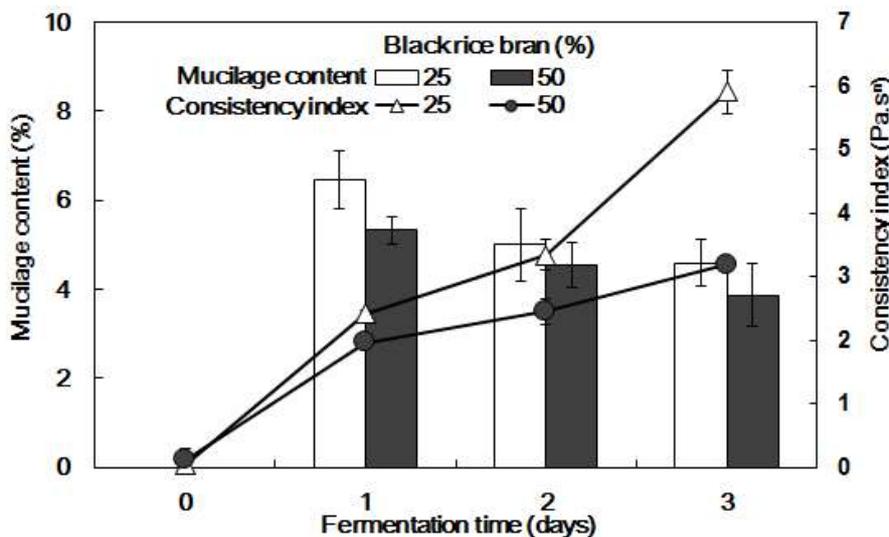


Figure 타-25. Changes in consistency index and mucilage content of the roasted and black rice fermented by *B. subtilis* HA

(2) 흑미강 발효물의 면역증진 효능평가

(가) 발효흑미강 추출방법

- 흑미강과 밀기울 혼합발효물 발효 전, 후로 나눠 혼합물 100 g을 500 mL의 증류수로 30분씩 2회 반복 추출하였으며, 이에 얻어진 1000 mL의 추출물을 40°C, 감압농축하여 100 mL로 농축하여 사용하였다. 발효흑미강 추출물의 수분함량은 Table 타-14과 같다. 발효 전, 후 수분함량과 고형분 함량의 차이가 없으며, 수분함량은 약 89-90%, 고형분 함량은 약 10% 내외로 나타났다.

Table 타-14. Moisture content and solid content of fermented black rice extract (Before and After Fermentation)

	수분함량(%)	고형분함량(%)
발효 전 추출물	89.71±2.34	10.37±2.33
발효 후 추출물	89.95±0.73	10.38±0.83

(나) 발효흑미강 추출물(발효 전, 후)의 세포독성 시험

- 세포배양을 활용하여 발효흑미강 추출물의 활성 효과를 측정하기 위해 시료 자체의 세포 독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 발효흑미강 추출물(발효 전, 후)의 액을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고 농도는 100, 500, 1000, 2000배 희석 범위로 하였다. 그 결과, 시험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않았다(Figure 타-26).

(다) 발효흑미강 추출물(발효 전, 후)의 NO생성능 비교

- 흑미강 추출물의 농도에 따라 NO생성이 증진되는지 확인하기 위해 positive control로 LPS 100 ng/mL과 흑미강추출물의 고초균 발효로 생성되는 γ -PGA를 농도별로 하여 비교분석하였다. 흑미강 추출물은 발효 전, 후로하여 100, 500, 1000, 2000배 희석하여 실험하였다. 흑미강 추출물 발효전에서는 100배 희석농도에서 2.12±0.61 μ M 생성되었으나, 흑미강 발효 후에는 2000배 희석에서 100배 희석까지 발효물의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성능이 높아져 100배 희석액에서는 22.39±0.24 μ M 생성하여 LPS보다 NO 생성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다(Figure 타-27).

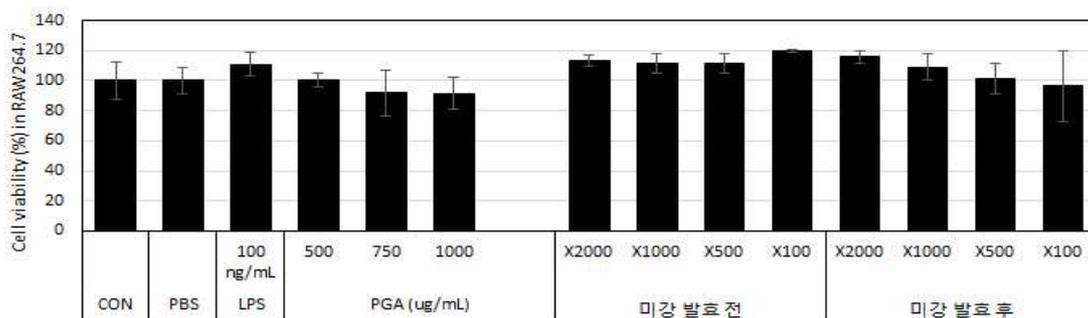


Figure 타-26. Cytotoxicity of the fermented black rice extract in RAW 264.7 cells

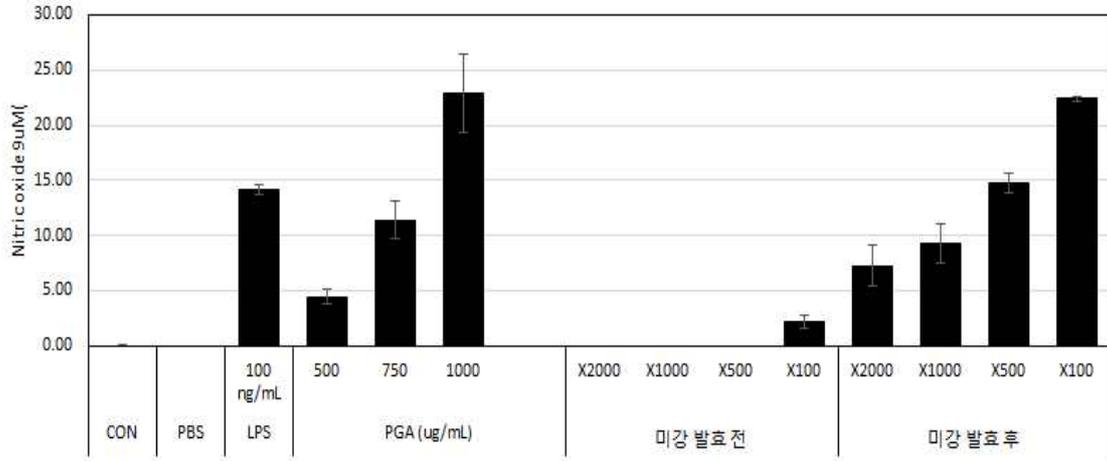


Figure 27. Nitric oxide production of the fermented black rice extract in RAW 264.7 cells

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
○ 목표달성도			
목표	달성도	내용	
사업화지표	지식재산권	100%	<ul style="list-style-type: none"> - ‘헛개나무 열매 추출 발효물을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 조성물 및 이의 제조방법’ 포함 특허 출원 총 14건(특허출원 12건, 상표출원 2건) - ‘고초균 발효를 통한 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추 발효액 제조방법’ 포함 특허등록 총 4건(특허등록 3건, 상표등록 1건)
	기술실시	100%	<ul style="list-style-type: none"> - ‘한방소재를 첨가한 고품질생청국장 제조방법’ 의 기술이전 6건 (통상실시권 5건, 노하우 이전 1건) - 총 기술이전료 37,850,000원
	사업화	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 제품화 3건, 매출액 699백만원 • 정보내츄럴 생나또,동결건조청국장 매출액690백만원 • 상주호호즙마스 Allygo99아로니아 3.5백만원 • 동우당제약(주) 간애력 5.5백만원 - 시제품화 15건 • 음료류 동안아로니아/황칠/좋은숙/술이헛개/망개차 • 음료베이스 내뎀에단비/삼색호박/발효아로니아청 • 소스 산감미소스/산야초드레싱/야채무침소스 • 기타가공 청국장스낵/청국장견과류/호박과자/발효울금환 - 참여연구원 취업 및 참여업체 연계취업으로 고용창출 6건
기술인증		60%	<ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 개별인정형 기술인증은을 위한 기초자료 확보 - 발효울금에 고시형 원료(밀크시슬)을 첨가하여 ‘간애력’ 상품화
연구기반지표	학술성과	100%	<ul style="list-style-type: none"> - SCI 논문 13건, 비SCI 논문 8건 (비SCI 논문 목표 11건중 8건 달성으로 100% 달성하지 못하였지만 SCI 논문 대리달성으로 총 논문건수 달성) - 학술발표 한국식품과학회 외 5개의 학회 참석으로 학술 발표 총 81건 달성
	교육지도	100%	- 기술지도 및 교육 목표 90건 중 143건 달성
	인력양성	70%	- 박사 3명, 석사 7명, 학사 11명 참여연구원 졸업 및 연계 취업
	정책활용	100%	- 총 6회 협의체구성 실시
	홍보전시	100%	<ul style="list-style-type: none"> - TMR센터 E-new letter 참여업체 홍보 16건 - 유망기술발표회 참여 등 인터넷 뉴스 2건
	기타	100%	<ul style="list-style-type: none"> - <i>B. methylotrophicus</i> 포함 미생물기탁 총 3건 - 국제학회 우수포스터(3건), 제품개발경진대회(3건) 등 수상 총 6건 - 업무제휴협약(MOU) 체결 10건 - 기업부설연구소사업, 지역혁신센터사업, 위탁연구 등 타 연구개발사업에 활용

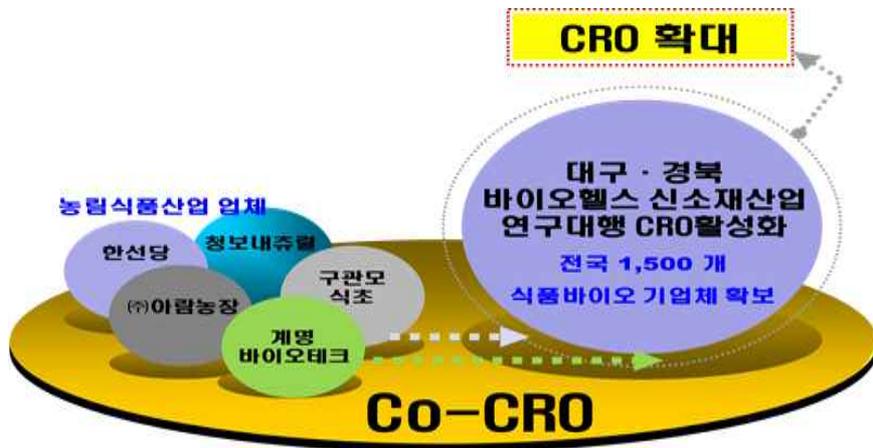
5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

○ 연구개발 결과물(발효소재, 효능평가 결과 등)의 기업체 활용계획

- 유용발효 균주 확보 및 활용을 통한 식품·바이오 관련 소재개발 및 기업지원 확대
- 연구진과 연구 장비의 적극적인 활용으로 바이오산업연구의 기반을 구축
- 지속적인 산학협력 공동연구를 통한 참여기업의 기술력 확보 및 경쟁력 증진
- 기능성 및 안전성이 확보된 발효소재를 기반으로 각 기업의 제품고도화
- 참여기업 외 대구·경북지역 식품·바이오관련 기업지원 확대



○ 기술이전 및 후속 연구

- 해당 연구에 대한 기술이전을 통한 기업의 기술력 확보
- 특허출원 14건(특허등록 4건) 중 성과활용 단계 기간동안 년 2건 기술이전 계획

종료 1차년도 (2018년)	종료 2차년도 (2019년)	종료 3차년도 (2020년)	종료 4차년도 (2021년)	종료 5차년도 (2022년)
2건	2건	2건	2건	2건

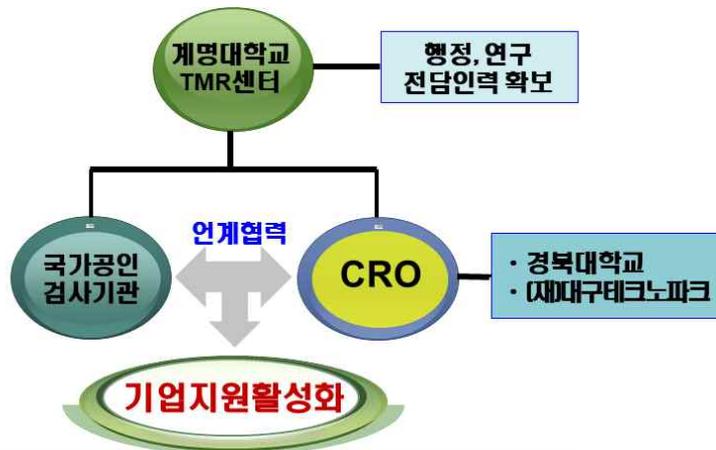
- 국가공인 식품·축산물 검사기관의 연계활용을 통한 기업의 상품화 기간 단축
- 상품화 증대를 통한 참여기업의 매출 증대

○ 상품화 추진

- 초기 개별인정형을 계획한 발효율금 소재를 활용하여 간건강에 도움을 주는 밀크시슬을 첨가하여 고시형 건강기능식품으로 판매중에 있음. 참여기업의 후속 연구과제를 통한 인지도개선 기능성 입증을 완료하여 지속적인 건강기능식품 추진 계획
- 개발된 총 15개의 시제품 중 2018년 상품화 추진 예정 숙취해소 음료 ‘망개차’, ‘술이헛개’
- 참여기업 구관모식초(주)와 (주)한선당의 기존 판매처인 백화점, 인터넷, 단체급식업체 외 숙취해소음료의 소비시장을 맞춤으로 마트, 편의점, 일반음식점 등의 다양한 판매처 확보
- 전임상 및 임상시험에서 면역증진(염증완화)의 효능을 가진 황칠나무 발효 추출액이 첨가된 제품을 유사기업에 기술이전 및 후속 과제 추진, 상품화 추진을 통해 건강기능식품 추진 계획

○ 협력형 민간위탁연구대행조직 자립화

- 연구개발 대행 서비스 이용 기업의 성장 및 연구개발 재투자 선순환 도모
- 민간위탁 연구대행조직의 기업지원 및 연구개발 성공적 추진을 통한 자립화 시스템 확립
- 고부가 식품 개발 기업의 CRO 활용 확산과 투자활성화 촉진
- 다양한 소재의 *in vivo* 효능평가 지원을 위한 시스템 및 동물실험시설 운영 극대화
- 식품·바이오제품의 품질 및 기능성 연구를 통한 사업화 연계 지원으로 기업의 매출증진에 기여하는 위탁연구대행기관(CRO)으로써의 성공적인 모델 제시
- 자체기술 및 주력제품 미보유 기업이 요구하는 지원분야에 대한 니치 서비스(Niche Service)를 통한 특화된 기업지원 수행



- ❖ 농산물·식품 소재의 고부가가치화 / 차별화 제품개발 지원
- ❖ 원료 기능성 강화 / 효능 / 임상평가 지원의 시스템 활용 확대

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
○ Ippolito JE, Piwnica-Worms D. "A fluorescence-coupled assay for gamma aminobutyric acid (GABA) reveals metabolic stress-induced modulation of GABA content in neuroendocrine cancer." PLoS ONE 9(2): e88667.	
○ Weon JB, Lee J et al. "Cognitive enhancing effect of the fermented Gumiganghwal-tang on scopolamine-induced memory impairment in mice." Nutritional Neuroscience (2016);19(3):125-30	
○ Zheng L, Oh ST et al. "The dietary effects of fermented chlorella vulgaris (CBT®) on production performance, liver lipids and intestinal microflora in laying hens." Asian-Australas J. Anim. Sci. 2012 Feb; 25(2): 261 - 266.	
○ Lee SW, Park HJ, Park SH, Kim N, Hong S. "Immunomodulatory effect of poly-γ-glutamic acid derived from Bacillus subtilis on natural killer dendritic cells." Biochem Biophys Res Commun. (2014)10;443(2):413-21.	
○ Aragón F, Carino S, Perdigón G, de Moreno de LeBlanc A. "The administration of milk fermented by the probiotic <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model." Immunobiology. (2014) 219(6):457-64.	
○ Allan V. Kalueff, Ph.D. and David J. Nutt, M.D, Role of gaga in anxiety and depression, Depression and Anxiety 24:495 - 517 (2007)	
○ Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B et al. An extract from berries of aronia melanocarpa modulates the generation of superoxide anion radicals in blood platelets from breast cancer patients. Planta Medica. 2009;75(13):1405-1409. doi:10.1055/s-0029-1185718.	
○ Muszyńska B, Łojewski M, Rojowski J, Opoka W, Sułkowska-Ziaja K. 2015. Natural products of relevance in the prevention and supportive treatment of depression. Psychiatr Pol 49:435 - 53.	
○ Naruszewicz, M., I. Laniewska, B. Millo and M. Dluzniewski. 2007. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). Atherosclerosis 194(2):79-84.	
○ Olas B., B. Wachowicz, A. Tomczak, J. Erler, A. Stochmal and W. Oleszek. 2008. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of <i>Aronia melanocarpa</i> , seeds of grape and bark of <i>Yucca schidigera</i> in vitro, Platelets 19(1):70-7.	
○ Skupien, K., D. Kostrzewa-Nowak, J. Oszmianski and J. Tarasiuk. 2008. In vitro antileukaemic activity of extracts from chokeberry (<i>Aronia melanocarpa</i> [Michx] Elliott) and mulberry (<i>Morus alba</i> L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. Phytotherapy Research 22(5):689-94.	

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
해 당 없 음	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10
해 당 없 음	

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

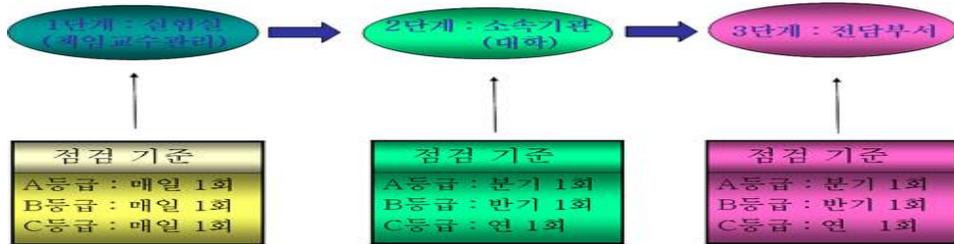
코드번호	D-11																	
<p>가. 계명대학교</p> <p>(1) 인력전문성 제고</p> <p>(가) 안전관리시스템 교육실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 2017. 03. 02 - 2017. 07. 31 계명대학교에서 온라인 교육 수행 ○ 2017. 09. 14 계명대학교에서 오프라인교육 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 연구실 안전관리 시스템 매뉴얼 - 연구실 안전업무 안내 ○ 2017. 11. 02 재난대응 안전한국훈련 계명대학교에서 오프라인교육 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 화재안전사고 대응 및 실험실 사고사례 - 실험실 사고 대응 복구 및 행동요령 - 실험실 안전점검 ○ 소방안전 훈련 실시 <ul style="list-style-type: none"> - 2017. 12. 01 성서소방서에서 실시함 <p>(나) 실험실 안전관리 점검(년 2회)</p> <p>(2) 점검사항</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">구 분</th> <th style="width: 20%;">점 검 분 야</th> <th style="width: 50%;">중점 점검 사항</th> <th style="width: 20%;">비 고</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4" style="text-align: center; vertical-align: middle;">자 체</td> <td style="text-align: center;">○ 담당자별 점검</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기자재 사용일지 ○ 유기·무기·산 폐수처리장 ○ 시약장 후드 작동 ○ MSDS배치 </td> <td style="text-align: center;">일일</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">○ 안전관리팀 합동</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고압가스 사용 및 관리상태 ○ 화학약품 사용 및 관리상태 </td> <td style="text-align: center;">년 2회</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">○ 야간 및 휴일</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ○ 시설운영상태 ○ 24시간 가동장비 운영상태 </td> <td style="text-align: center;">일일</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">○ 폐기물 점검</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ○ 유기·무기·산 폐수용액 폐기 </td> <td style="text-align: center;">월 1회</td> </tr> </tbody> </table>		구 분	점 검 분 야	중점 점검 사항	비 고	자 체	○ 담당자별 점검	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기자재 사용일지 ○ 유기·무기·산 폐수처리장 ○ 시약장 후드 작동 ○ MSDS배치 	일일	○ 안전관리팀 합동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고압가스 사용 및 관리상태 ○ 화학약품 사용 및 관리상태 	년 2회	○ 야간 및 휴일	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시설운영상태 ○ 24시간 가동장비 운영상태 	일일	○ 폐기물 점검	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유기·무기·산 폐수용액 폐기 	월 1회
구 분	점 검 분 야	중점 점검 사항	비 고															
자 체	○ 담당자별 점검	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기자재 사용일지 ○ 유기·무기·산 폐수처리장 ○ 시약장 후드 작동 ○ MSDS배치 	일일															
	○ 안전관리팀 합동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고압가스 사용 및 관리상태 ○ 화학약품 사용 및 관리상태 	년 2회															
	○ 야간 및 휴일	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시설운영상태 ○ 24시간 가동장비 운영상태 	일일															
	○ 폐기물 점검	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유기·무기·산 폐수용액 폐기 	월 1회															

		○ 의료폐기물 폐기	주 1회
		○ 화학약품 폐기병 폐기	년 1회

나. 경북대학교

(1) 연구실 안전 점검 체계 및 실시

(가) 실험실 안전 점검 체계



※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리

※ 관리위험등급의 지정

- B 등급: 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실

(나) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상: 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시: 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

(2) 교육 훈련

(가) 개요: 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

(나) 교육대상: 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

(다) 교육구분

- 정기교육: 방학기간 중 2회 출석 수업 실시
- 비정기 임시교육
 - 대상: 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담 직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)
 - 방법: 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상교육), 자료/유인물, 외부 온라인 상, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등
 - 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

(3) 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
재산종합보험 (종합패키지 보험)	재산종합위험담보: 2조 5천 6백억원 (신체배상책임보험 특별약관포함)	피보험자	설비안전팀
	대인대물일괄: 20억원-사고당	전체	“
	제3자 치료비 보상: 1천만원/인당, 8천만원/사고당	제3자 보상	“
	학생교내외치료비: 1천5백만원/인당, 8천만원/사고당	학생	“
학생단체 상해보험	상해사망, 후유장해: 2억원의사상자 상해위험: 1억원상해 후유정도에 따른 보상: 약관보상연구활동종사자보험 포함 (특별약관)	학부생, 대학원생	학생복지처
교직원 단체안심보험	사망, 후유장해, 질병사망 : 1억원/인 의료비지원 - 암치료비: 1천만원/인당 - 입원의료비지원: 3천만원/인당 - 상해의료실비: 2백만원/인당	교직원	인사팀

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사 여부	특기사항 (SCI여부/인용 횟수 등)
1	논문	Using In Vitro Dynamic Models To Evaluate Fluoroquinolone Activity against Emergence of Resistant <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	경북대학교	교신저자	Antimicrobial agents and chemotherapy	4.302	2017.08.01	중복사사	SCI
2	논문	Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lation-mediated quorum sensing regulatory pathways	경북대학교	교신저자	Scientific reports	4.259	2017.09.06.	중복사사	SCI
3	논문	Immunomodulation of <i>Lactobacillus pentosus</i> PL11 against <i>Edwardsiella ictaluri</i> infection in the head kidney cells of the Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	경북대학교	교신저자	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	3.025	2016.06.30.	중복사사	SCI
4	특허	헛개나무 열매 추출 발효물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물 및 이의 제조 방법	계명대학교 산학협력단 경북대학교 산학협력단	출원인	대한민국	-	2017.07.25	단독사사	10-2017-0094100
5	특허	헌방소재 혼합추출물 복합발효액 이의 제조방법 및 이를 포함하는 건강기능식품 조성물 또는 식품 첨가제	계명대학교 산학협력단 (주)한선당 (김형한)	출원인	대한민국	-	2017.01.19.	단독사사	10-2017-0008304

11. 기타사항

	코드번호	D-13
해 당 없 음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14		
<ul style="list-style-type: none"> ○ Agbarya A, Ruimi N, Epelbaum R, Ben-Arye E, Mahajna J. 2014. Natural products as potential cancer therapy enhancers: A preclinical update. SAGE Open Med 2: DOI:10.1177/2050312114546924. ○ Appel K, Meiser P, Millán E, Collado JA, Rose T, Gras CC, Carle R, Muñoz E. 2015. Chokeberry (<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF-κB and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. Fitoterapia 105:73 - 82. ○ Borowska S, Brzóska M. Chokeberries (<i>Aronia melanocarpa</i>) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2016. doi:10.1111/1541-4337.12221. ○ Borowska S, Brzóska M. Chokeberries (<i>Aronia melanocarpa</i>) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2016. doi:10.1111/1541-4337.12221. ○ Bräunlich M, Økstad OA, Slimestad R, Wangensteen H, Malterud KE, Barsett H. 2013b. Effects of <i>Aronia melanocarpa</i> constituents on biofilm formation of <i>Escherichia coli</i> and <i>Bacillus cereus</i>. Molecules 18:14989 - 99. ○ Broncel, M., M. Kozziolacinska, G. Andryskowski, P. Duchnowicz, M.Koter-Michalak, A. Owczarczyk and J. Chojnowska-Jeziarska. 2007. Effect of anthocyanins from <i>Aronia melanocarpa</i> on blood pressure, concentration of endothelin-1 and lipids in patients with metabolic syndrome. Pol Merkur Lekarski 23(134):116-9. ○ Francik R, Krośniak M, Sanocka I, Bartoń H, Hebda T, Francik S. 2014. <i>Aronia melanocarpa</i> treatment and antioxidant status in selected tissues in Wistar rats. BioMed Res Intern 2014:457085. ○ Handeland M, Grude N, Torp T, Slimestad R. 2014. Black chokeberry juice (<i>Aronia melanocarpa</i>) reduces incidences of urinary tract infection among nursing home residents in the long term - a pilot study. Nutr Res 34:518 - 25. ○ Liepina I, Nikolajeva V, Jakobsone I. 2013. Antimicrobial activity of extracts from fruits of <i>Aronia melanocarpa</i> and <i>Sorbus aucuparia</i>. Environ Exp Biol 11:195 - 9. ○ Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. Journal of Food Science. 2012;77(10):C1064-C1070. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x. 				

- Valcheva-Kuzmanova, S., K. Kuzmanov, S. Tancheva and A. Belcheva. 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29(2):101-5.
- Vita J. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(1):292S-297S.
- Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*. 2010;68(3):168-177. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x.
- He FJ, Chen JQ. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. *Food Sci Human Wellness*. 2013;2:146 - 161.
- Kwon DY, Daily JW, 3rd, Kim HY, Park S. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr Res*. 2010;30:1 - 13.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KDR, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*. 1994;21:113 - 131.
- Lee CH, Youn Y, Song GS, Kim YS. Immunostimulatory effects of traditional Doenjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011;40:1227 - 1234.
- Lee JH, Paek SH, Shin HW, et al. Effect of fermented soybean products intake on the overall immune safety and function in mice. *Journal of Veterinary Science*. 2017;18(1):25-32.
- Shukla S, Bajpai V, Kim M. Plants as potential sources of natural immunomodulators. *Rev Env Sci Biotechnol*. 2014;13:17 - 33.
- Patwardhan B, Gautam M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discov Today*. 2005;10:495 - 502.
- Ahmad W, Jantan I, Kumolosasi E, Bukhari SNA. Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. *Drug Des Devel Ther*. Dove Medical Press; 2015;9:2961 - 73.
- Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003;8:223 - 46.
- Bancos S, Bernard MP, Topham DJ, Phipps RP. Ibuprofen and other widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit antibody production in human cells. *Cell Immunol*. 2009;258:18 - 28.
- Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 α and IL-1 β Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J Immunol*. 2011;187:4835 LP-4843.
- Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, et al. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2003;65:2065 - 71.
- Albano, Emanuele. "Alcohol, oxidative stress and free radical damage." *Proceedings of the nutrition society* 65.03 (2006): 278-290.
- Bachmanov, Alexander A., et al. "Food intake, water intake, and drinking spout side

- preference of 28 mouse strains." *Behavior genetics* 32.6 (2002): 435-443.
- Basseri, Sana, and Richard C. Austin. "ER stress and lipogenesis: a slippery slope toward hepatic steatosis." *Developmental cell* 15.6 (2008): 795-796.
 - Busquet, M., et al. "Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation." *Journal of Dairy Science* 89.2 (2006): 761-771.
 - Caton, P. W., et al. "Metformin opposes impaired AMPK and SIRT1 function and deleterious changes in core clock protein expression in white adipose tissue of genetically obese db/db mice." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13.12 (2011): 1097-1104.
 - Cho, Byoung Ok, et al. "Hepatoprotective effect of *Diospyros lotus* leaf extract against acetaminophen-induced acute liver injury in mice." *Food Science and Biotechnology* 24.6 (2015): 2205-2212.
 - Cohen, Jessica I., et al. "Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice." *Gastroenterology* 139.2 (2010): 664-674.
 - Fouts, Derrick E., et al. "Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease." *Journal of hepatology* 56.6 (2012): 1283-1292.
 - Gao, Bin, and Ramon Bataller. "Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets." *Gastroenterology* 141.5 (2011): 1572-1585.
 - Hernandez, F., et al. "Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size." *Poultry science* 83.2 (2004): 169-174.
 - Hyun, Tae Kyung, et al. "*Hovenia dulcis* - an Asian traditional herb." *Planta medica* 76.10 (2010): 943-949.
 - Jeon, Sang-Min, Navdeep S. Chandel, and Nissim Hay. "AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress." *Nature* 485.7400 (2012): 661-665.
 - Kang, H., and S. Koppula. "Hepatoprotective effect of *Houttuynia cordata* thunb extract against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice." *Indian journal of pharmaceutical sciences* 76.4 (2014): 267.
 - Kim, Bonglee, et al. "*Hovenia dulcis* extract reduces lipid accumulation in oleic acid induced steatosis of Hep G2 cells via activation of AMPK and PPAR α /CPT 1 pathway and in acute hyperlipidemia mouse model." *Phytotherapy Research* 31.1 (2017): 132-139.
 - Kohjima, Motoyuki, et al. "SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease." *International Journal of Molecular Medicine* 21.4 (2008): 507-512.
 - Lee, M-S., C-T. Kim, and Yangha Kim. "Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice." *Annals of Nutrition and Metabolism* 54.2 (2009): 151-157.

- Li, You-Gui, et al. "Saponins from *Panax japonicus* protect against alcohol-induced hepatic injury in mice by up-regulating the expression of GPX3, SOD1 and SOD3." *Alcohol and alcoholism* 45.4 (2010): 320-331.
- Li, Yu, et al. "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." *Cell metabolism* 13.4 (2011): 376-388.
- Madrigal-Santillán, Eduardo, et al. "Review of natural products with hepatoprotective effects." *World J Gastroenterol* 20.40 (2014): 14787-14804.
- Mathews, Stephanie, et al. "Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 306.10 (2014): G819-G823.
- Mohd Ali, Norlaily, et al. "Antioxidant and hepatoprotective effect of aqueous extract of germinated and fermented mung bean on ethanol-mediated liver damage." *BioMed research international* 2013 (2012).
- Morales, Patricia, et al. "*Hovenia dulcis* Thunb. pseudofruits as functional foods: Phytochemicals and bioactive properties in different maturity stages." *Journal of Functional Foods* 29 (2017): 37-45.
- Murase, Takatoshi, et al. "Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 300.1 (2011): E122-E133.
- Nakamuta, Makoto, et al. "Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease." *International journal of molecular medicine* 16.4 (2005): 631-636.
- Nakamuta, Makoto, et al. "Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease." *International journal of molecular medicine* 16.4 (2005): 631-636.
- Nanji, Amin A., et al. "Dietary saturated fatty acids: a novel treatment for alcoholic liver disease." *Gastroenterology* 109.2 (1995): 547-554.
- Nixon, Belinda J., et al. "Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure." *PloS one* 9.5 (2014): e94904.
- Ooi, Lay-Gaik, and Min-Tze Liong. "Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings." *International journal of molecular sciences* 11.6 (2010): 2499-2522.
- Salama, Suzy M., et al. "Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma longa* on thioacetamide induced liver cirrhosis in rats." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13.1 (2013): 56.
- Schnabl, Bernd, and David A. Brenner. "Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases." *Gastroenterology* 146.6 (2014): 1513-1524.

- Tan, Terrence CH, et al. "Excess iron modulates endoplasmic reticulum stress-associated pathways in a mouse model of alcohol and high-fat diet-induced liver injury." *Laboratory Investigation* 93.12 (2013): 1295-1312.
- Tang, C. C., Huang, H. P., Lee, Y. J., Tang, Y. H., & Wang, C. J. (2013). Hepatoprotective effect of mulberry water extracts on ethanol-induced liver injury via anti-inflammation and inhibition of lipogenesis in C57BL/6J mice. *Food and chemical toxicology*, 62, 786-796.
- Valencia, Ana P., et al. "The presence of the ovary prevents hepatic mitochondrial oxidative stress in young and aged female mice through glutathione peroxidase 1." *Experimental gerontology* 73 (2016): 14-22.
- Yang, Seun-Ah, et al. "Hepatoprotective effects of fermented field water-dropwort (*Oenanthe javanica*) extract and its major constituents." *Food and Chemical Toxicology* 67 (2014): 154-160.
- Zhou, Yingqun, et al. "Protective effects of necrostatin-1 against concanavalin A-induced acute hepatic injury in mice." *Mediators of Inflammation* 2013 (2013).
- Chien SS, Tsai ML, Chen CC, Chang SJ and Tseng CH. 2008. Effects on Tyrosinase Activity by the Extracts of *Ganoderma lucidum* and Related Mushrooms. *Mycopathologia*. 166:117-120.
- Kim HS, Kim MA, Jang SH, Kang DS, Lee WK, Ryu JY and Lee CS, 2013. Effects of *Cordyceps militaris* on the improvement actions of blood glucose and atherosclerosis in diabetes. *J. Environ. Sci. Int.* 22(3):341-346.
- Kim MN, Oh SW, Lee DS and Ham SS. 2001. Antioxidative and antimutagenic effect of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Postharv. Sci. Technol.* 8, 109-117.
- Kobayashi Y and Shimizu D. 1983. Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikushapub, Co., Ltd. Osaka, 280-285.
- Koh J B. 2002. Effect of mycelium of *Cordyceps militaris* on growth, lipid metabolism and protein levels in male rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 685-690.
- Nam BH, Jo WS, Choi YJ, Lee JY, Kang EY, Jeong MH and Lee JD. 2010. Inhibitory effects of melanin secretion on B16 melanoma cell of *Cordyceps militaris* water extract. *Kor. J. Mycol.* 38(2):167-171.
- Lee HM, Lee YJ and Park TS. 2004. Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 59-65.
- Oh SW, Kim SH, Song HN and Han DS, 2003. Comparative chemical composition of four kinds of Tochukaso. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 35(1):15-22.
- Ying J, Mao Q, Zang Y and Wen H. 1987. Icons of medical fungi from China. Science Press. Beijing, China. 60-85.

주 의

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