

과제 번호;  
116152-1

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

발간등록번호 : 11-1543000-002214-01

(견고닥31p)

# 고소에 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품개발 최종보고서

고소에  
혼합물을  
이용한  
신장기능  
개선능  
평가 및  
제품개발  
최종보고  
서

(견고닥  
14p)

2017

(견고닥13p)

농  
림  
축  
산<sup>2017</sup>  
식  
품  
평  
가  
부  
원

(견고닥  
17p)

2017. 12. 04.

(견고닥15p)

주관연구기관 / 을지대학교 산학협력단  
협동연구기관 /

(견고닥 15.5p)

농 립 축 산 식 품 부  
농림식품기술평가원

(견고닥 20p)

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부귀하

‘고소애 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품개발’(연구개발 기간 : 2016.12.05 ~ 2017.12.04) 과제의 최종보고서 10부를 제출합니다.

2017. 12. 04.

주관연구기관명 : 을지대학교 산학협력단	(대표자) 신문삼	(인)
협동연구기관명 :	(대표자)	(인)
참 여 기 관 명 : 을지생명과학	(대표자) 이민호	(인)

주관연구기관책임자: 신재호

협동연구기관책임자:

참여기관책임자: 이민호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	116152-1	해당 단계 연구 기간	2016.12.05.~ 2017.12.04	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농식품창업·벤처지원R&D바우처시범사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	고소애 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품 개발			
연구책임자	신재호	해당단계 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 8명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 70,000천원 민간: 24,000천원 계: 94,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 8명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 70,000천원 민간: 24,000천원 계: 94,000천원
	연구기관명 및 소속 부서명		을지대학교 산학협력단		참여기업명 을지생명과학
	국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:		연구책임자:		

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		2	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 고소애 혼합물의 신장기능 개선 효과 확인
- 고소애 및 고소애 혼합물의 특허출원
- 고소애의 건강기능식품 상품화 기대

보고서 면수

요약	보고서 면수
----	--------

## 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>농림수산물식품부는 갈색거저리 애벌레(밀웜)의 식용을 추진시키기 위해 '고소한 애벌레'라는 뜻의 '고소애'로 부를 것을 제안하였으며 단백질과 불포화지방산 함량이 높아 심혈관 질환 예방에 탁월한 효과가 있다. 신장질환은 전 세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 국내에도 대략 45만 명의 신부전증 환자가 있으며 초기 신부전증 환자까지 고려한다면 발병자는 더 많을 것으로 예측된다. 갈색거저리의 효능성 평가를 위해 본 연구에서는 신장손상을 일으키는 것으로 알려진 반코마이신을 투여하여 급성신장독성이 유발된 동물모델을 이용하여 갈색거저리 단독 혹은 해마혼합물의 신장개선능을 평가하였다.</p>				
연구개발성과	<p>동물실험을 통해 고소애 혼합물의 신장기능 개선 효과를 확인하였다. 본 시험의 결과를 이용해 특허를 2건 출원하였으며, 향후 논문을 제출하여 연구성과를 공유하고 고소애를 건강기능식품으로 상품화 하고자 한다. 또한 고소애의 연구를 통해 전문적인 석사 및 박사과정의 인력 및 연구원을 양성하였다. 고소애의 연구를 향후 개별인정 기능성식품으로 등록하기 위한 자료로 활용할 예정이다.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>고소애를 건강기능식품으로 제조하는 과정을 거쳐 시각적인 거부감을 줄여주어 연령층과 성별에 상관없이 모두가 섭취 가능하도록 하고, 식용곤충이 어린이와 노인, 환자 등 특별한 영양이 요구되는 사람들의 건강 증진에 기여할 것으로 기대되며, 유엔식량농업기구(FAO)에서 미래에는 식량생산이 인구증가를 따라잡지 못할 것이라는 예측을 하였는데, 고소애는 단백질 함량이 소고기의 10배 이상이고 풍부한 영양성분을 가지고 있어 미래식량의 대체제로서 기대가 된다. 또한 고소애는 사육기간은 짧은데 반해 대량사육이 가능하며, 유전자 변이 등의 인공변이가 아닌 친환경적이며, 사육 시 물의 소비가 적고, 사육을 위한 면적과 사료비용이 적으며, 사료에 사용되는 곡물소비량이 적어 인간이 가진 즐거움인 미식을 유지할 수 있는 식품으로 기대된다.</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	식용곤충	고소애	신장	기능성 식품	동물실험
영문핵심어 (5개 이내)	edible insects	mealworm	kidney	functional foods	animal test

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

본문 작성 양식

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행내용 및 성과 .....	7
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	19
4. 연구개발성과의 활용 계획 등 .....	20
붙임. 참고 문헌 .....	23

<별첨> 주관연구기관의 자체 평가 의견서

## 1. 연구개발과제의 개요

### □ 연구개발의 필요성

- 갈색거저리(mealworm beetle)는 거저리과에 속하는 곤충의 일종이다. 곡물거저리와 비슷하지만 애벌레 때 더 크다. 갈색거저리의 애벌레는 흔히 밀웜(영어: mealworm)이라 부르고 주로 애완동물의 먹이와 식용 곤충으로 많이 사용된다.

그림 2 갈색거저리 유충



- 농림수산식품부는 갈색거저리 애벌레(밀웜)의 식용을 추진시키기 위해 '고소한 애벌레'라는 뜻의 '고소애'로 부를 것을 제안하였으며 소고기 100g에는 단백질 21g이 들어 있는데 반해 '고소애'에는 50g이 함유돼 있어 육류를 대체하는 미래식량으로 각광받고 있다. 단백질과 불포화지방산 함량이 높아 심혈관 질환 예방에 탁월한 효과가 있다. 병원식으로도 공급되고 있다.
- 신장질환은 전세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 국내에도 대략 45만 명의 신부전증 환자가 있으며 초기 신부전증 환자까지 고려한다면 발병자는 더 많을 것으로 예측된다. 신부전증의 치료에 있어서 비록 장기적 투석과 신장이식 등 치료수단이 존재하지만 만성 신부전증의 초기, 중기의 치료문제를 해결하지 못하며, 게다가 치료비용이 높아서 나라와 환자가정에 심한 경제부담을 가져다준다.
- 식이 곤충이 시험관 내에서 소화 및 흡수 된 펩타이드의 항산화 및 항염증 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 식용 곤충 가수 분해물의 항산화능은 자유 라디칼 소거 활성, 이온 킬레이트 활성 및 환원력으로 통해 확인 하였고, 소염 활성은 리폭시게나제 (lipoxygenase) 및 시클로옥시게나제-2 (cyclooxygenase-2) 억제 활성으로 나타났다(Zielińska 등)

- 작은 유럽 농어(*Dicentrarchus labrax*)에 6 주동안 유충이 혼합된 사료를 급여한 결과 유의한 항염증 반응 (ceruloplasmin, myeloperoxidase and nitric oxide)을 나타냈으며, 그람 음성 박테리아에 대한 혈청 용해 작용은 식이 요법으로 유의한 영향을 받지 않았으며, 일반적으로 물고기의 항 기생충 활성화와 관련되어있는 리소자임 항균 활성화와 혈청 트립신 저해는 유의하게 증가되었다(Henry 등)
- 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 사용하여 산화 스트레스 및 생물의 수명에 대한 저항성에 대한 *Tenebrio molitor* 추출물의 영향을 조사한 결과 산화 스트레스와 자외선 조사에 대한 저항성에 유의적인 효과를 나타냈고, *C. elegans*의 평균 수명과 최대 수명을 연장시켰다. 또한, *T. molitor*를 투여한 군에서 생성된 자손의 수가 유의적으로 증가하였고, *hsp-16.2*, *sop-3*의 발현이 upregulation되었다 (Won 등)
- 수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에서 동결건조된 *Tenebrio molitor* 유충의 잠재적 과민성을 포함한 아만성 독성을 평가한 결과 사망률, 임상징후, 체중 및 장기무게, 음식 섭취량, 안과, 혈액 및 혈청 화학 검사, 육안검사, 조직검사, 알레르기 반응을 포함한 독성평가에서 특이한 발견이 없었으며, NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)이 수컷, 암컷 모두 3000 mg/kg/day를 초과하는 결과를 나타내었다(Han 등)
- 수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에서 28일 동안 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day로 *Tenebrio molitor* 유충의 동결 건조 분말의 유전 독성과 반복 투여 독성을 평가한 결과 돌연변이 유발성 또는 유전적으로 발생하지 않았고 랫드에 경구투여 후 투여와 관련된 변화가 나타나지 않았다 (Han 등)
- 수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에서 동결 건조 된 *T. molitor* larvae (fdTML)의 잠재적 과민성을 포함한 아만성 독성을 평가하기 위하여 *Tenebrio molitor* (*T. molitor*) 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day의 용량으로 90일간 경구투여하여 사망률, 임상 징후, 체중 및 장기 무게, 음식 섭취량, 안과, 소변 검사, 혈액학, 혈청 화학 검사, 육안 소견, 조직 병리 검사 및 알레르기 반응을 포함한 독성 평가함. 임상 증상, 소변 검사, 혈액학 및 혈청 화학 검사, 육안 검사, 조직 병리 검사 또는 알레르기 반응에서 fdTML 관련 발견은 없음. 결론적으로, 본 연구의 실험 조건 하에서 fdTML에 대한 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)이 쥐의 남녀 모두 3000 mg / kg / day를 초과하는 것으로 결정
- *T. molitor* 유충의 동결 건조 분말의 유전 독성과 반복 투여 독성을 평가하기 위하여 사망률, 임상 징후, 신체 및 기관 무게, 음식 섭취량, 안과학, 소변 검사, 혈액학, 혈청 화학 검사, 전체 결과 및 조직 병리 검사를 실시. *T. molitor* 유충의 냉동 파우더 분말은 시험관내 및 생체 내 유전 독성 시험의 결과에 근거한 돌연변이 유발성 또는 유전적으로 발생하지 않았으며, 28 일 경구 투여 후 쥐의 어떠한 매개 변수에서도 치료와 관련된 변화나 발견이 관찰되지 않음. 결론적으로, *T. molitor* 유충의 동결 건조 분말은 우리의 실험 조건 하에서 SD 독성 쥐의 남녀 모두에서 유전 독성이 없으며 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)이 3000 mg / kg / day로 측정

- 시험관내 및 생체 내에서 *T. molitor* 유충의 항 지방 형성 및 항 비만 효과를 조사하기 위하여 고지 방식을 먹은 비만 랫드에 *T. molitor* (TME)를 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과, 고지 방식을 먹인 쥐에서 분말이 간 지방증뿐만 아니라 아스파 테이트 및 알라닌 트랜스 아미나 제 효소 수치를 효과적으로 감소 시킨다는 것을 발견. *T. molitor* 유충 추출물이 식품 보충제로 투여 될 때 항 비만 효과가 있고 비만 치료제로서의 가능성이 있음을 시사
- *Tenebrio molitor* 유충이 함유된 육계용 사료에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수컷육계 병아리 (Ross 708)에 Tm meal (분말)을 50, 100, 150g의 용량으로 53 일간 투여하고, growth performance, gut morphology, 조직학적검사를 실시한 결과, 수컷 육계에 닭고기 섭취를 증가 시키면 체중과 사료 섭취량은 증가하지만 사료 효율과 장 형태에는 부정적인 영향을 미치므로 낮은 용량이 더 적합 할 수 있음을 시사함. 또한 TM 식사 이용과 관련하여 haematochemical parameters, carcass traits, histological findings에는 영향을 미치지 않았음.
- *T. molitor* 유충으로부터 factor Xa (FXa) 및 혈소판 응집에 대한 저해 활성을 가지는 생리 활성 화합물을 동정하여, 동맥 및 폐동맥 혈전증 동물모델을 이용하여 실험을 실시한 결과, *T. molitor* 유충으로부터 보고되지 않은 생리활성화합물인자 Xa (FXa) 및 혈소판 응집에 대한 저해활성물질들을 동정하고, 응고 시간, 혈소판 응집, FXa 활성 및 혈전 형성을 모니터링함으로써 항 FXa 및 항 혈소판 응집 특성에 대해 평가를 실시. Tm유충으로부터 분리된 화합물은 FXa의 촉매활성을 억제하였고 아데노신2인산염과 U46619로 인한 혈소판 응집을 억제시키고, 산화질소생산을 개선시킴. 동맥 및 폐동맥 혈전증의 동물모델에서 항혈전 효과를 나타내었으며, 마우스에서 항응고제 효과를 나타냄.
- weaning pig의 성장능, 영양소 소화율 및 혈액학적 측면에 대해 건조된 mealworm 유충의 영향을 조사하기 위해 120 마리 weaning pig ( $28 \pm 3$  일 및  $8.04 \pm 0.08$ kg)에 분말 mealworm을 weaning pig 사료에 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 %의 농도로 혼합하여 투여하여, 체중, ADG, ADFI, 사료 섭취량, dry matter, crude protein의 nitrogen retention, digestibility, BUN, 인슐린 유사성장인자, IgA, IgG 농도를 측정 한 결과, 건조된 mealworm의 섭취 수준이 증가함에 따라 체중, average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI) 향상됨. 전체 실험기간동안 사료섭취비율 증가하는 경향을 보이며, mealworm 섭취수준이 증가할수록 dry matter와 crude protein의 nitrogen retention과 digestibility증가함. 혈액학적 측면에서 건조된 mealworm 섭취가 증가함에 따라 BUN 감소와 인슐린유사성장인자의 증가가 관찰되었으나, IgA 및 IgG 농도에서는 유의한 차이없음. weaning pig 식단에서 건조된 mealworm을 6%까지 보충하면 면역반응에 해로운 영향을 미치지 않으면서 성장능과 영양소소화율이 향상됨.

□ 연구개발 범위

- ‘건강기능식품’이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공 포



함)한 식품을 말한다. 건강기능식품의 기능성은 ①영양소 기능 ②생리활성 기능 ③질병발생 위험감소 기능의 3가지가 있으며, 기능성을 가진 원료나 성분은 식약처장이 고시(고시형 건강기능식품)하거나 별도로 인정(개별인정형 건강기능식품)한 원료 또는 성분으로 나눌 수 있다.

- 연구자(사업자)가 건강기능식품소재를 발굴하고 원료의 기준규격설정과 안전성 및 효능연구 결과를 토대로 식약처로부터 허가 받는 개별인정형 건강기능식품 소재개발사업은 식품산업에서 신약개발과 같이 매우 높은 부가가치를 창출할 수 있는 분야이지만 많은 비용과 노력이 필요하기도 하다.
- 건강기능식품 기능성 원료로 식약처에 인정받기 위해서는 신소재 탐색, 생산, 가공, 분석에 대한 전문기술이 요구되고 과학적 근거를 토대로 기능성 식품 소재의 기능성에 대한 충분한 자료 확보가 필요하며, 생리활성 기능성 평가결과를 주요학술지에 발표함으로써 인정받을 수 있다.

#### □ 국내외 기술 수준 및 현황

##### ○ 국내 기술 수준 및 현황

- 국내의 건강기능식품은 국민의 삶의 향상 및 식품의 기능성을 과학적인 테두리 안에서 확립하기 위하여 2004년 「건강기능식품에 관한 법률」 시행에 따라 정착한 제도이며, 「건강기능식품에 관한 법률」에 따라 건강기능식품이라 인체에 유용한 기능성을 가진 원료 또는 성분을사용하요 제조·가공한 식품으로 정의 되어 있으며, 기능성의 정의도 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것으로 정의 되어 있다.
- 건강기능식품의 제도 시행 이후 ‘13년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총생산액은 1조 4,820억 원이었으며, 12년도(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가한 것으로 나타났다. 또한 ‘14년 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사’ 자료에 따르면 건강기능식품 섭취를 통해 해결하려는 건강 문제로는 피로 회복이 31.8%로 가장 많았다. 이어 면역력증진(26.6%), 전반적 건강증진(14.7%)순이었으며, 지속적으로 건강기능식품에 대한 소비자의 관심을 증대하고 있다.
- 건강기능식품은 고시형과 개별인정형 2가지 유형으로 구분되는데 고시형 건강기능식품은 ‘건강기능식품공전’에 수록된 기능성 원료로 건강기능식품제조업 및 수입업을 가진 가 ‘건강기능식품공전’의 기준규격에 적합하면 제조할 수 있는 건강기능식품과 ‘건강기능식품공전’에 등재되어 있지 않은 원료를 제조·수입 판매하고자 할 때 식약처에 기능성, 안전성, 기준 및 규격을 인정받은 수 제조·수입할 수 있는 개별인정형 건강기능식품으로 구분된다.
- 건강기능식품의 현재의 기능성은 간건강, 눈건강, 혈행개선 등 총 321개 기능성에 대해

여 인정되어 있으며, 세부적으로는 영양소 28종, 기능성 원료 56종으로(2014.02월 기준) 구분되어 있다. 그 중 가장 많이 인정된 원료는 체지방 감소가 79건, 관절/뼈 건강이 50건, 간건강이 38건 등의 순으로 되어 있다.

- 건강기능식품은 의약품과는 달리 건강기능식품의 효능에 대한 체계적이고 과학적인 방법에 근거한 평가 및 검증에 관한 연구가 부족하여 국내 건강기능식품 시장성장 및 발전에 장애가 되고 있다. 따라서 건강기능식품 기능성 평가에 필요한 효능과 안전성 중심의 연구가 지속적으로 필요하며, 관련 내용을 과학적으로 평가할 수 있는 체계적화된 연구가 필요하다.

○ 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 우리나라의 건강기능식품과 유사한 제도를 운영하고 있는 나라는 미국, 일본, 유럽, 중국, 캐나다, 호주 등이 있으며, 이 중 가장 유사한 제도는 일본의 '특정보건용식품' 등이다.
- 미국의 경우에는 Nutritional Labeling and Education Act (NLEA), Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA) 등 관련 규정에 따라 식이보충용제품 형태의 건강기능식품을 판매하고 있으며, Food and Drug Administration Modernization Act(FDAMA)법에 따라 새로운 건강강조표시(health claim)에 대한 허가 및 관리 등을 하고 있다.
- 일본은 우리나라의 제도와 가장 유사하게 고시형인 영양기능식품과 개별인정형인 특정보건용 식품으로 구분되어 운영하고 있다. 건강증진법 관련 보건기능식품제도(영양기능식품, 특정보건용식품) 등 관련 규정이 있다.
- 유럽은 Nutrition and health claims (Regulation (EC) No 1924/2006), General food law(Regulation (EC) No 178/2002), Food supplement directive (Directive (EC) 2002/46) 등 관련 규정에 따라 질병발생위험감소기능표시, 어린이의 성장·건강 표시 기타 건강정보표시 등의 건강강조표시(health claim)를 운영하고 있다.
- 캐나다는 Natural Health Products Regulation, Food and Drug Regulation, NutritionLabelling Regulation 등에 따라 NHP(Natural Health Products)로 운영되고 있으며, 질병, 건강상태 등에 대한 기능성을 언급할 수 없고, 특정한 건강강조표시는 정해진 규격을 충족하면 국내의 고시형 원료 같이 사용할 수 있다. 다만 NHP는 비타민과 무기질, 프로바이오틱스, 아미노산과 필수지방산 등의 원료 대한 허용을 하고 있다.
- 호주는 식품의약품규정 (Australia New Zealand Food Standards) 및 Therapeutics Goods Act에 따라 국내와 달리 건강기능식품의 개념을 보조의약품(Complementary medicine) 개념으로 인정하고 있으며, 일반적인 수준의 건강강조표시는 비타민, 무기질, 기타 (식이섬유, 지방산, 단백질 등) 등에 대하여 영양소기능표시와 기타기능표시에 해

당할 수 있으며, 높은 수준의 건강강조표시는 질병발생위험 감소표시에 해당하며 총 11개의 항목에 대해 허가되어 있다. 보조의약품(Complementary medicine) 개념에 따라 의약품으로 관리된다.

- 중국 ‘보건식품 등록관리법’에 따라 영양소 보충용 제품과 기타 다른 기능성 식품으로 구분되며 현재 27개의 기능성을 인정하고 있다.

□ 연구개발 목적

- 전통적으로 사용해 온 천연물은 새로운 작용, 골격구조를 갖는 화합물과 독성 및 부작용이 적은 물질이 발견될 가능성이 매우 높기 때문에 천연물, 특히 생약으로부터 신약을 창출하려는 시도가 공통된 연구추세이다.
- 갈색 거저리의 애벌레(mealworm, 고소애)의 건강기능식품으로서의 활용 및 사업성을 알아보기 위하여, 고소애를 이용하여 효능을 연구하고자 본 시험을 수행하였다.

## 2. 연구수행내용 및 성과

□ 재료 및 방법

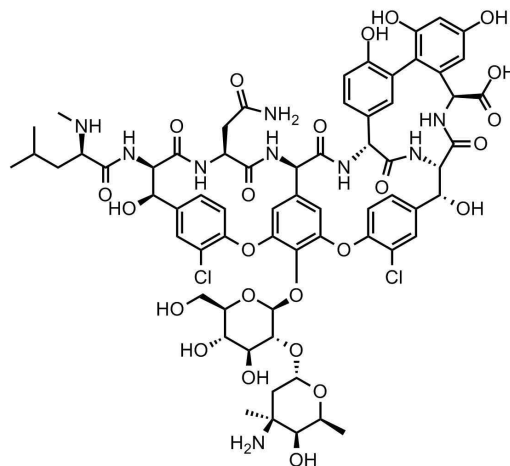
○ 물질 및 시약

- Vancomycin HCl (1 g, CJ healthcare., Korea)은 멸균된 생리식염수에 녹여 400 mg/kg으로 5 ml/kg으로 복강 내 주사 할 양으로 만들었다.

그림 3 반코마이신 주사제



그림 4 Vancomycin의 구조



- 고소에 주정 추출물을 추출한 방법은 건조되어 분쇄기로 분쇄한 고소에 분말 500 g에 70 % 발효 에탄올을 10배수 넣고, 상온에서 24시간 침지 하여 추출하였다. 추출 후에 체로 한번 거른 후, 추출물을 여과지(whatman No.1)를 이용하여 여과처리 하였다. 감압농축(rotary evaporator N-1200, Eyela, Japan)을 하여 에탄올을 제거하고 최종 부피 1 L가 되도록 한 후 시료로 사용하였다. 이 때 최종 농도는 0.5 g/ml이다.
- 고소에 및 해마 주정 혼합물을 추출한 방법은 건조되어 분쇄기로 분쇄한 고소에 분말 500 g과 해마 분말 500 g에 70 % 발효 에탄올을 10배수 넣고, 상온에서 24시간 침지 하여 추출하였다. 추출 후에 체로 한번 거른 후, 추출물을 여과지(whatman No.1)를 이용하여 여과

처리 하였다. 감압농축(rotary evaporator N-1200, Eyela, Japan)을 하여 에탄올을 제거하고 최종 부피가 1 L가 되도록 한 후 시료로 사용하였다. 이 때 최종 농도는 0.5 g/ml이다.

- 본시험에서는 고소애와 해마혼합물의 경우, 배합비율을 1:1로 하였다. 예비시험에서 고소애와 해마를 1:2로 혼합한 군도 같이 실험을 하였으나, 해마의 비율을 높여도 배합비율인 1:1인 군과 유의한 차이를 보이지 않아, 고소애와 해마혼합물을 1:1로 배합한 군을 최종적으로 본시험에 이용하였다.

그림 5 고소애 주정추출물 및 해마/고소애 혼합추출물



- TBARS assay kit(Sta-330, Cell Biolabs, Inc.), Total Glutathione assay kit (Sta-312, Cell Biolabs, Inc.)를 사용하였다. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)을 하기위해 In situ cell death detection kit (POD, cat# 684 817 910, Roche)를 사용하였고, primary antibody로 Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ;ab66579, Abcam), N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGLU; ab214671, Abcam)를 사용하였고, ABC-HRP kit (peroxidase, Rabbit IgG; PK6101, Vector Laboratories)를 사용하였다.

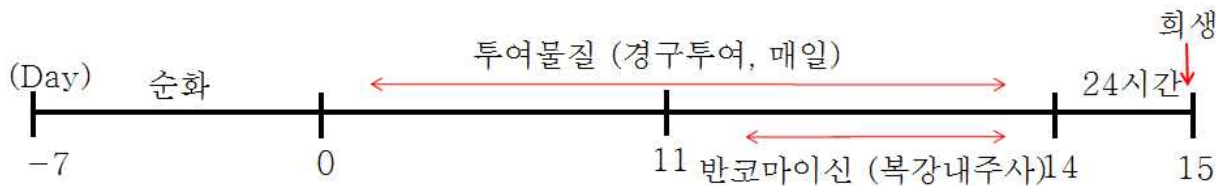
#### ○ 동물 모델 및 실험디자인

- 36마리 male Sprague Dawley rat (5주령, 약180-200 g)를 1주일 동안 순화 한 후 랜덤으로 다음과 같이 군을 나누어 투여하였다. 대조군(n=8); 2주일 동안 증류수를 경구투여 하고, 마지막 3일 동안 saline을 복강 내 주사하였다. Vancomycin 투여군(n=9); 2주일 동안 증류수를 경구투여 하고, 마지막 3일 동안 400 mg/kg의 vancomycin을 5 ml/kg으로 하루에 한번 복강 내 주사하였다. 고소애 주정추출물+vancomycin 투여군(n=9), 고소애 주정 및 해마 주정 혼합물+vancomycin투여군(n=9); 2주일 동안 고소애 주정 추출물과 고소애 및 해마 주정 혼합물을 10 ml/kg으로 경구투여하고, 마지막 3일 동안 vancomycin을 투여물질 투여 1시간 후 복강 내 주사하였다.

- 사육환경은 12 h light/dark cycle,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  온도,  $50 \pm 10\%$  습도를 유지시켰다. 모든 동물에 commercial food (Purina Inc., Gyeonggi-Do, Korea)와 물을 자유롭게 공급하였다.

그림 5 실험디자인

대조군	증류수 경구투여 + 멸균생리식염수 복강내주사
반코마이신으로 신독성 유발군	증류수 경구투여 + 반코마이신 400 mg/kg 복강내주사
	고소애주정추출물 10 ml/kg 경구투여 + 반코마이신 400 mg/kg 복강내주사
	고소애+해마 주정추출물 10 ml/kg 경구투여 + 반코마이신 400 mg/kg 복강내주사



- 일반적 치료목적의 약물의 효능 시험과 달리, 본시험은 향후 건강기능성 식품원료로 인정을 받기 위한 기본자료로 활용하기 위해, 정상동물군에게 먼저 시료를 2주간 위내로 투여하였다. 이후, 시료투여군과 동일한 기간동안 동일방법으로 증류수를 투여한 군 모두 신장손상을 유발하여 시료 투여에 따른 효능을 비교하였다.
- 실험 프로토콜은 을지대학교의 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)에서 승인받았다(EUIACUC 17-01). 모든 동물은 일주일에 두 번 체중 측정을 하였고, 마지막 투여 24시간 후 희생되었고 희생 전 12시간 동안 물을 제외하고 모든 음식을 절식하였다. 혈액은 배대동맥에서 수집하여 3000 rpm, 15분 동안 원심분리하여 serum을 분리하여 분석을 위해  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.
- 신장은 양쪽 모두 피막을 벗긴 후 장기 무게를 측정하였다. 왼쪽신장과 간의 좌엽은 조직학적 검사를 위해 10 % formalin고정을 하였고, 오른쪽 신장은 3등분 하여 전자현미경 검사를 위한 조직을 채취한 후 MDA, Total glutathione assay를 위해  $-80^\circ\text{C}$ 에 얼렸다.

○ ALT, AST, BUN, Cr의 측정

- 간기능검사를 위해 serum을 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), 신기능검사를 위해 serum을 이용하여 Blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr)을 녹십자에서 자동화기기를 사용하여 측정하였다.

○ 조직병리학적 검사

- 10 % 포르말린으로 고정된 왼쪽신장을 알코올 탈수, 자일렌 투명, 파라핀 침투과정을 거쳐 파라핀 포매하여 3 um로 section하였고, 후에 일반염색, 특수염색, 면역염색을 진행하였다.

- Hematoxylin and eosin염색 H&E 자동화 염색기기를 사용하여 자일렌으로 파라핀을 녹인 후, 알코올 함수, hematoxylin 핵 염색, 1N HCl 탈수, 0.15 % 암모니아수 청색화, eosin 세포질 염색, 알코올 탈수, 자일렌 투명과정을 거쳤다. Renal injury를 평가하기 위해 scoring1을 modify하여 진행하였다. Renal injury는 신장피질의 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, interstitial inflammation, interstitial edema, cast를 다음과 같이 측정하여 평균화하였다. 0=none, 1=foci, 2=moderate, 3=severe

- 신장 피질의 기저막을 보기 위한 PAS염색은 xylene을 이용한 탈파라핀, 알코올을 이용한 함수를 거쳐 0.5 % periodic acid로 산화시킨 후, schiff 시약으로 발색시켰고, 핵 염색으로 는 Harris hematoxylin을 하였다.

#### ○ TUNEL assay

- 신장피질에 있는 proximal tubule cell의 apoptosis를 보기 위해 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)을 진행하였다. 파라핀 섹션 한 신장을 탈파라핀 과정을 거친 후, 항원성 부활을 위해 0.1 % trypsin in 1x PBS (pH 7.4)로 37°C, 10분 동안 incubation하였다. 내인성효소억제를 위해 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol로 실온에서 30분 동안 incubation한 후 enzyme solution과 label solution을 혼합하여 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 incubation하였고, convert POD를 넣고 37°C에서 30분 동안 incubation하였다. 시각화하기 위해 기질로 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride을 사용하였고 대조염색으로 Harris hematoxylin을 사용하였다.

- TUNEL positive cell counting을 하여 scoring을 진행하였다. 랜덤으로 400배로 5개 시야를 관찰하여 TUNEL positive cell을 counting하여 전체 핵의 개수를 백분율 하여 나타내었다.

#### ○ TNF- $\alpha$ , NAG면역염색

- 신장피질의 염증을 관찰하기 위해 Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) 면역염색을 진행하였다. 항원성 부활을 위해 0.1 % trypsin으로 37°C, 30분 동안 incubation하였고, 내인성효소활성억제를 위해 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol로 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 비특이적 반응 차단을 위해 3 % bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS (pH 7.4)로 실온에서 1시간 동안 incubation하였고, 1차항체로 TNF- $\alpha$ (1:200 in 3 % bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS (pH 7.4; ab66579, abcam)를 사용하여 4°C, overnight을 진행하였고, 2차항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG로 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 visualization하였다. 대조염색으로 Harris hematoxylin을 사용하였다.

- 신장의 proximal tubule의 손상을 관찰하기 위해 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) 면역염색을 진행하였다. 항원성 부활을 위해 microwave를 사용하여 low power에서 10분 동안 1x citrate buffer (pH 6.4)와 함께 boiling한 후 microwave안에서 30분 동안 cooling

을 하였고, 내인성효소활성억제를 위해 0.5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol로 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 비특이적 반응 차단을 위해 3 % bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS (pH 7.4)로 실온에서 20분 동안 incubation하였고, 1차항체로 NAGLU (1:2000 in 3% bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS(pH 7.4); ab217671, abcam)를 사용하여 4°C, 30분 동안 incubation하였고, 2차항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG를 사용하여 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 visualization하였다. 대조염색으로 Harris hematoxylin을 사용하였다.

#### ○ MDA, Total GSH측정

- Lipid peroxidation을 측정하기 위해 MDA kit (sta-330, Cell Biolabs, INC.)를 사용하여 진행하였다. 조직의 MDA를 측정하기 위해 100 mg/ml in 1x PBS (pH 7.4)로 조직을 homogenization하여 4°C, 10,000 g, 5분 동안 centrifuge하여 600 ul supernant에 6 ul 100x BHT를 첨가하였다. 추후 분석을 위해 -80°C에 보관하였다. MDA standard와sample에 100 ul SDS lysis solution을 첨가하였고, thoroughly mix한 후 room temperature에서 5분 동안 incubation 한 후 standard와 sample에 250 ul Thiobarbituric acid(TBA) reagent를 첨가한 후 95°C, 60분 동안 air dry oven에서 incubation하였다. Ice 위에서 실온으로 5분간 cooling한 후 3000 rpm, 15분 동안 sample을 centrifuge하였다. Hemoglobin과 hemoglobin의 derivatives의 interference를 막기 위해 300 ul의 상층액을 다른 Eppendorf tube에 넣고 300 ul n-butanol을 첨가한 후 vigorously vortex를 1분 동안 한 후 10,000 g, 5분 동안 centrifuge하였다. 96 well plate에 standard와 sample의 상층액을 200 ul씩 넣고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- Antioxidant enzymes을 측정하기 위해 Total glutathione(GSH)을 측정하였다. Total GSH를 측정하기 위해 GSH kit (sta-312, Cell Biolabs,INC.)를 사용하였고, 조직의 Total GSH를 측정하기 위해 50 mg 조직에 500 ul 5 % MPA를 넣고 homogenization한 후 4°C, 12,000 rpm, 15분 동안 centrifuge하여 상층액을 측정에 사용하였다. 96 well plate에 25 ul 1x glutathione reductase solution을 넣고 25 ul 1x NADPH solution을 첨가하였다. 각각의 well에 100 ul glutathione standard와 sample을 넣고 thoroughly mix하였다. 50 ul 1x chromogen을 첨가한 후 짧게 mix하고 즉시 405 nm에서 흡광도를 1분 간격으로 10분 동안 측정하였다. 조직 MDA는 1 mg/ml Bovine serum albumin을 standard로 사용하여 Bradford assay로 단백질 정량을 하여 계산하였다.

#### ○ 통계학적 분석

- 모든 데이터는 mean ± SE로 나타내었다. 통계학적 분석을 위해 SPSS 프로그램(Version 10.0; SPSS Inc., USA)을 사용하여 ANOVA를 수행한 후 사후분석으로 LSD를 수행하였다. p값은 0.05미만으로 통계학적 유의성을 나타내었다.

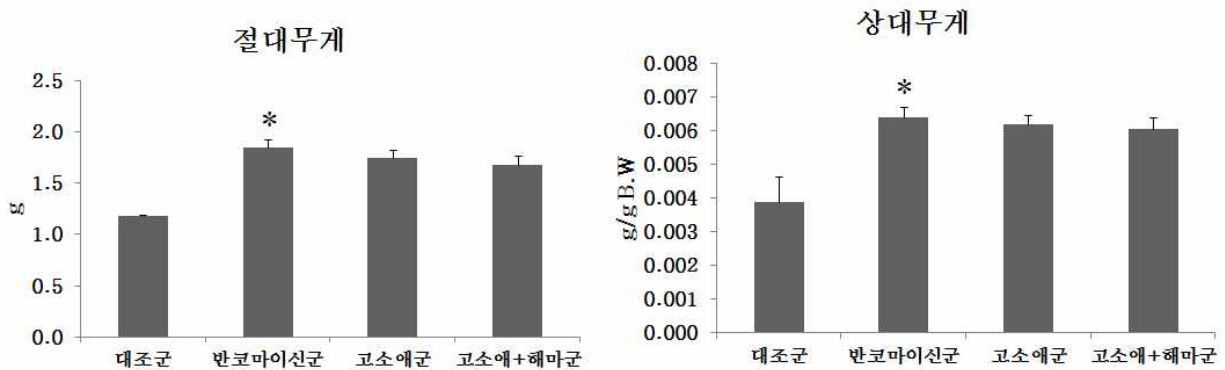
#### □ 연구결과



○ 신장무게 변화(그림 6)

- 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 절대무게와 상대무게가 유의적으로 증가하였고, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 감소하는 경향을 보였다.

그림 6 절대무게와 상대무게

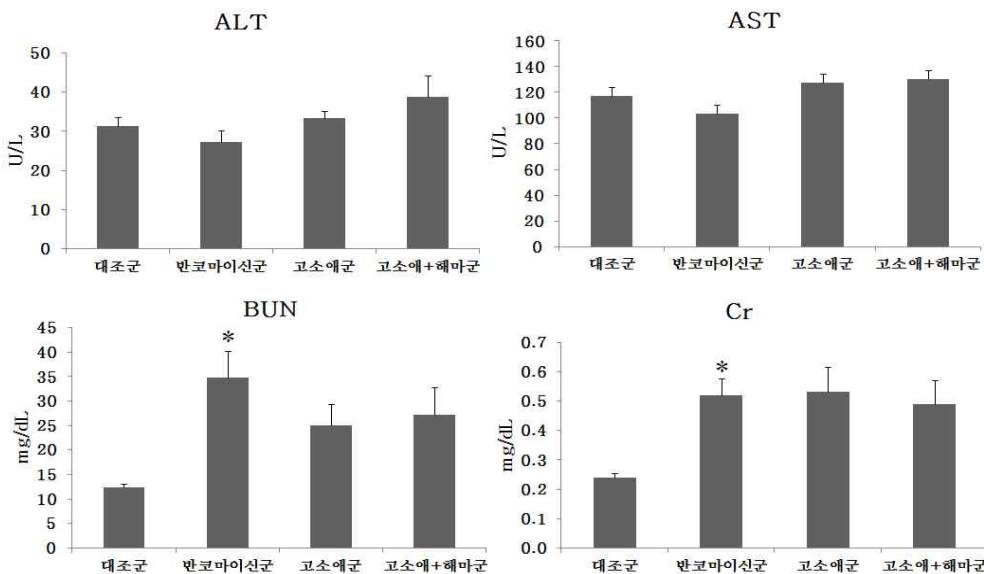


Values are mean ± SEM of 8 to 10 rats per group. \*p<0.05 compared to control.

○ 혈청 중 효소의 변화(그림 7)

- 간기능을 나타내는 지표인 ALT와 AST 결과 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 감소하는 경향을 보였고, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 증가하는 경향을 보였다.
- 신기능을 나타내는 지표인 BUN과 Cr 결과 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 유의적으로 증가하여 반코마이신으로 인한 신독성으로 신기능 저하가 나타난 것을 볼 수 있다. BUN 결과, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 감소하는 경향을 보인다. 반면 Cr 결과 고소애+해마군만 반코마이신군과 비교했을 때 감소하는 경향을 보였다.

그림 7 Serum으로 측정된 ALT, AST, BUN 및 Cr 결과

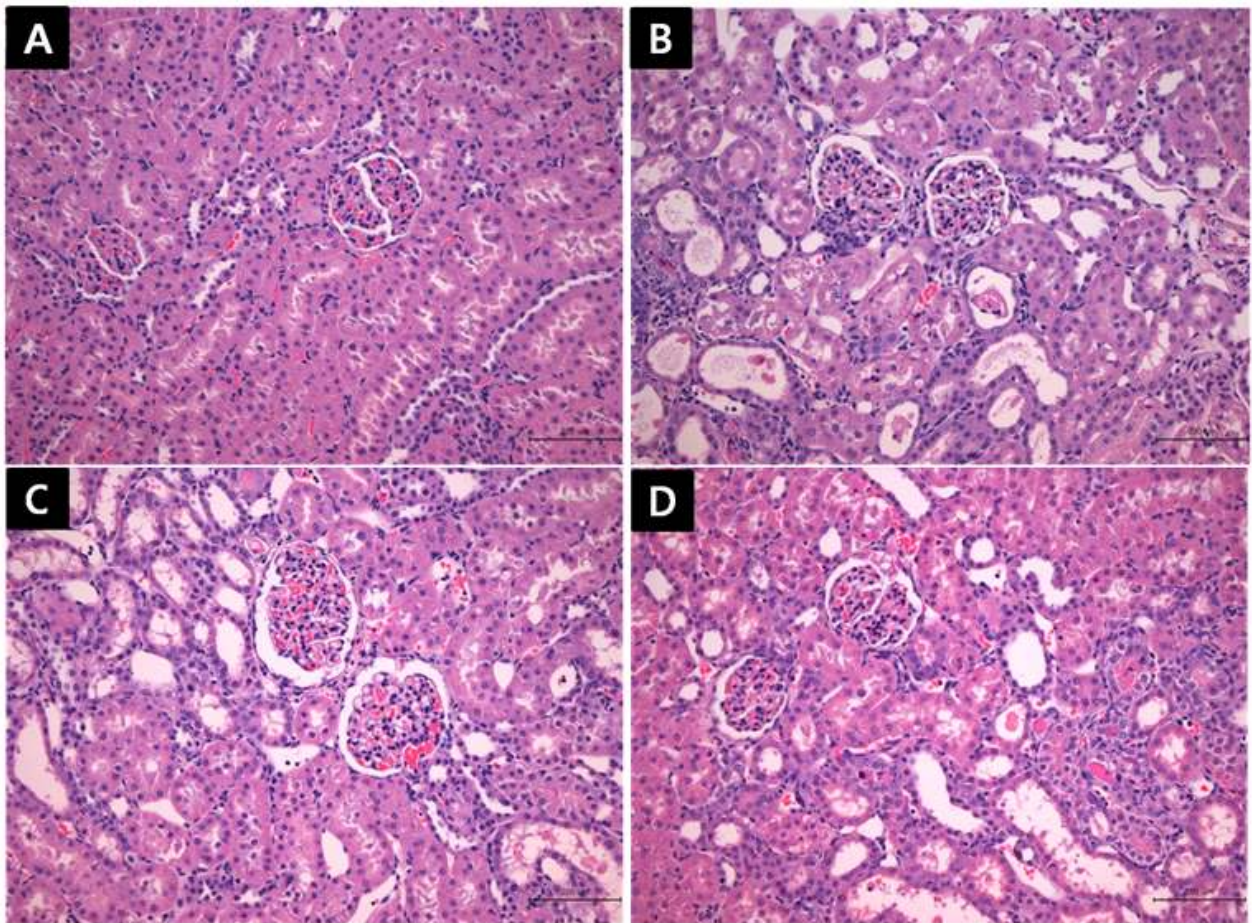


Values are mean  $\pm$ SEM of 8 to 10 rats per group. \* $p < 0.05$  compared to control.

○ 조직학적 변화(그림 8)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. H&E 염색을 하여 조직학적 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 정상 of 사구체, 근위 및 원위세뇨관 형태를 보이나, 신장피질에서 vancomycin group에서는 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, interstitial inflammation, interstitial edema, tubule안에 cast가 보인다. 반면 투여군에서는 vancomycin group에서 보다 완화된 것을 볼 수 있다. (H&E, scale bar: 200  $\mu$ m)

그림 8 신장의 H&E염색 결과



○ scoring

- H&E 한 후 scoring 하여 정량화 하여 나타낸 결과 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, interstitial inflammation, interstitial edema, tubule안에 cast가 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 유의적으로 증가하였으나, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애군에서 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, cast는 감소하는 경향을 보였고, interstitial inflammation, interstitial edema는 유의적으로

감소하였다. 고소애+해마군은 반코마이신군과 비교했을 때 tubular dilation을 제외한 나머지가 감소하는 경향을 보였다

Table 1. 조직병리학적 scoring한 결과

	tubular dilation	tubular cell desquamation	tubular vacuolation	interstitial inflammation	interstitial edema	cast
대조군	0.1±0.06	0.6±0.08	0.2±0.09	0.9±0.08	0.3±0.09	0.1±0.06
반코마이신군	1.7±0.17*	1.8±0.12*	1.5±0.08*	1.8±0.20*	1.7±0.15*	1.4±0.10*
고소애군	1.5±0.15	1.65±0.17	1.35±0.11	1.35±0.13#	1.2±0.17#	1.35±0.11
고소애+해마군	1.8±0.22	1.7±0.08	1.3±0.24	1.4±0.10	1.3±0.24	1.4±0.18

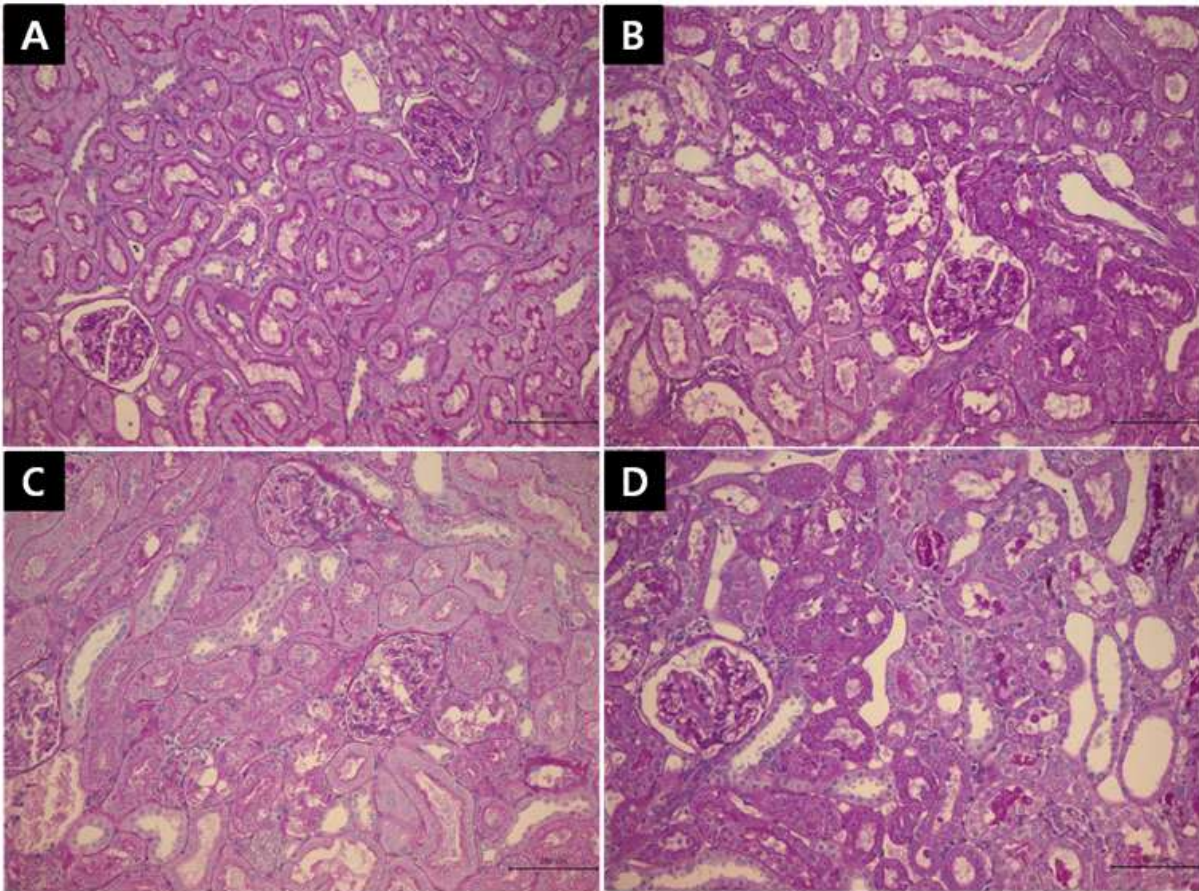
Values are mean ±SEM of 8 to 10 rats per group. \*p<0.05 compared to control group, #p<0.05 compared to vancomycin group.

○ 조직학적 변화(그림 9)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이다. PAS염색을 하여 조직학적 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 기저막과 proximal tubule의 brush border에 진한 PAS 양성을 보인다. 반면 반코마이신군에서는 약해진 기저막의 PAS 양성반응과 proximal tubule의 brush border의 소실로 인해 줄어든 PAS 양성반응을 보인다. 투여군에서는 반코마이신군보다 brush border 소실이 덜 일어난 것으로 보인다. (PAS, scale bar: 200 μm)



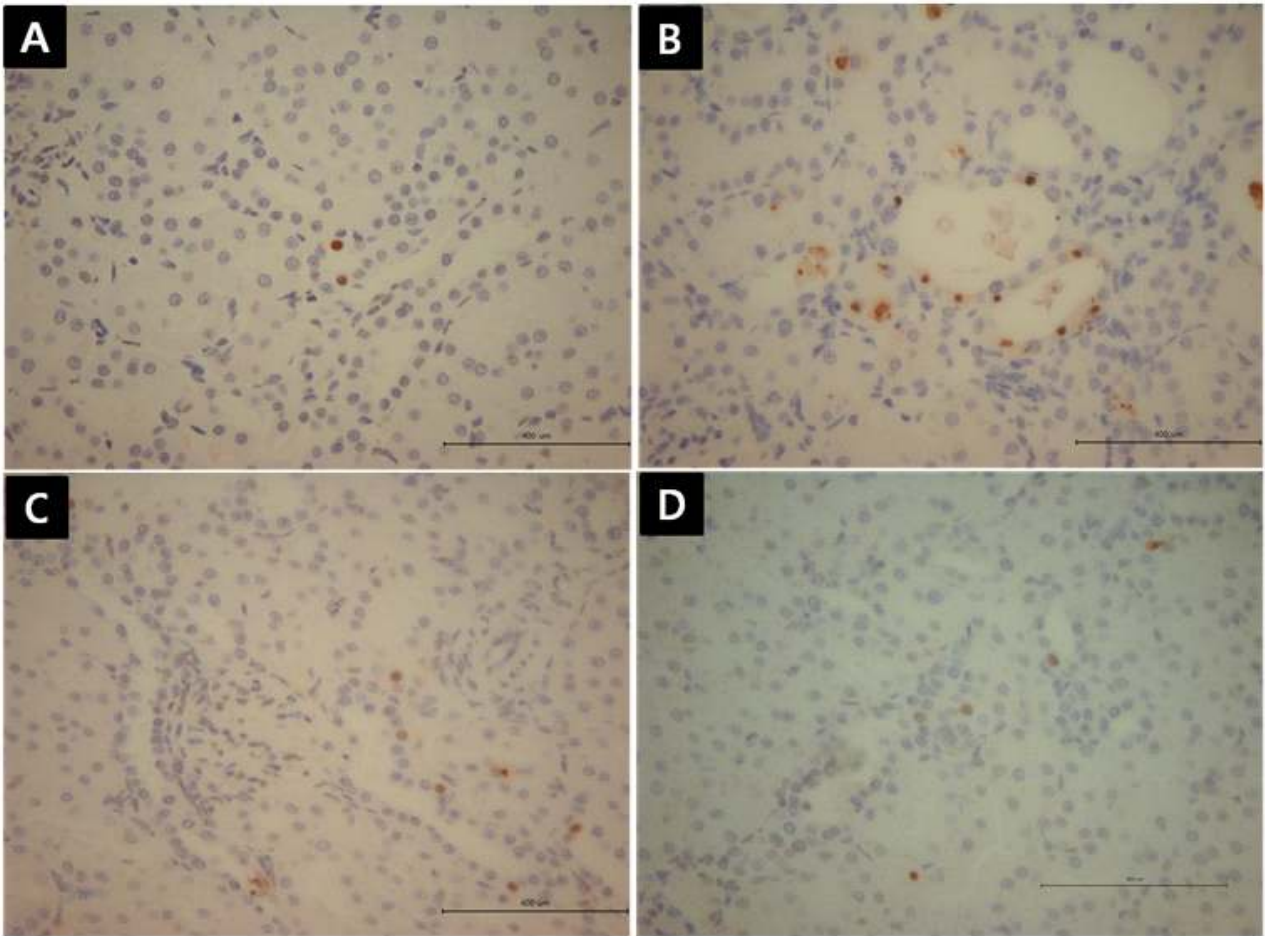
그림 9 신장의 PAS염색 결과



○ 신장의 TUNEL assay 결과(그림 10)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. TUNEL positive cell은 주로 원위세뇨관 핵에 보였고, 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 증가한 것으로 보였고, 반코마이신군과 비교했을 때 투여군에서 감소한 것을 보인다. (TUNEL, scale bar: 400  $\mu$ m)

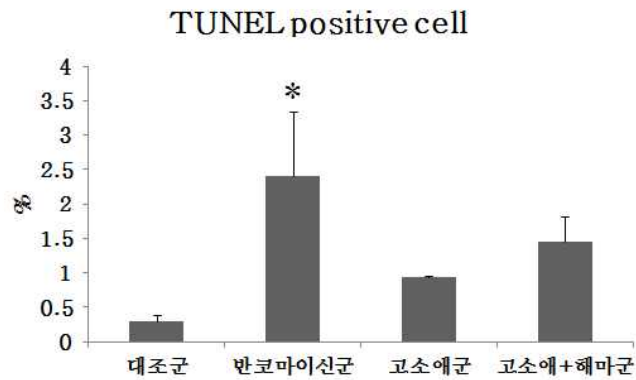
그림 10 신장의 TUNEL assay 결과



○ TUNEL positive cell counting 결과(그림 11)

- 대조군과 비교했을 때 반코마이신 군에서 유의적으로 TUNEL positive cell이 증가하였고, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 감소하는 경향을 보였다.

그림 11 TUNEL positive cell counting 결과



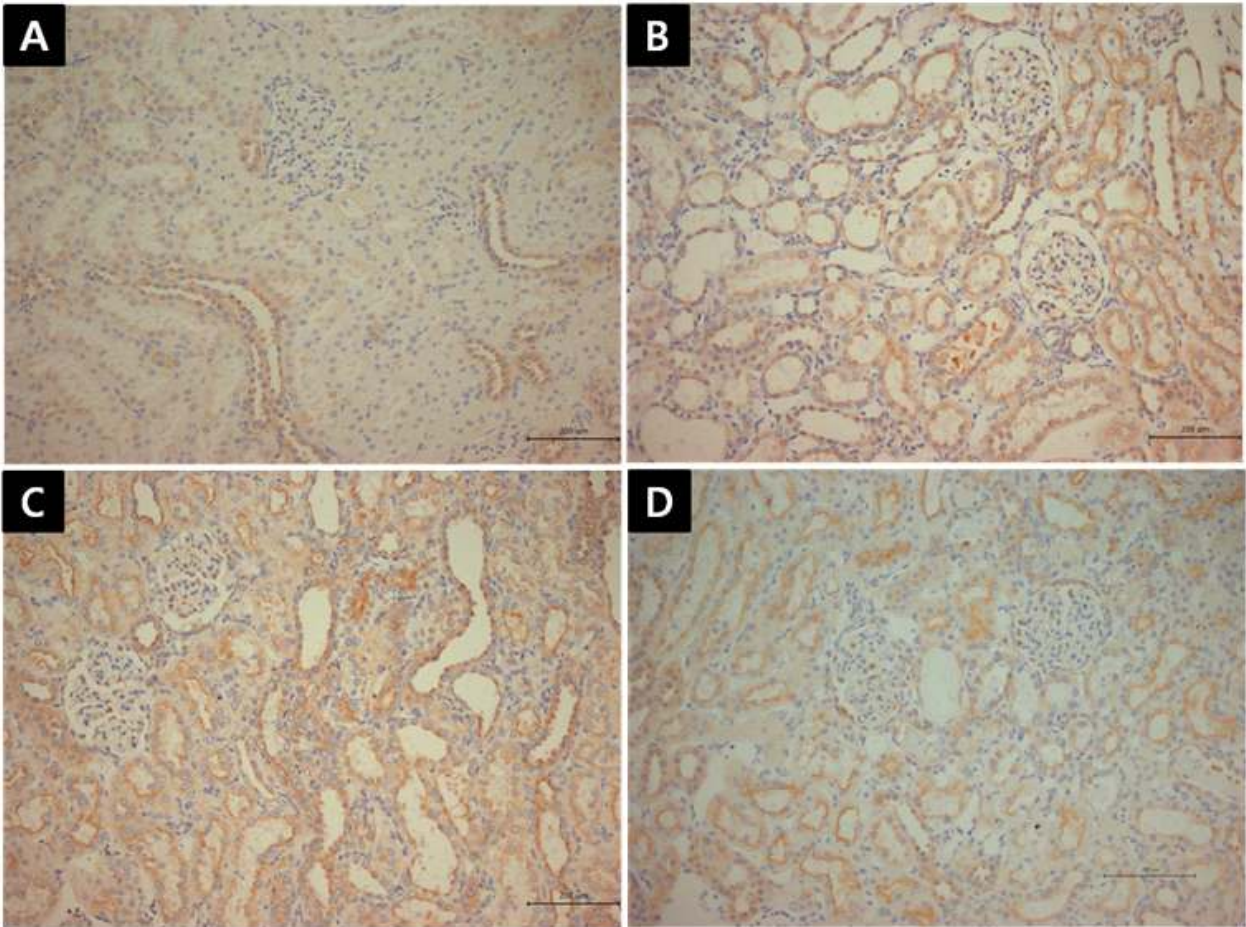
Values are mean  $\pm$  SEM of 3 rats per group. \* $p < 0.05$  compared to control.

○ 신장 세뇨관 내 TNF- $\alpha$ 의 발현 결과(그림 12)



- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. 대조군보다 반코마이신군에서 근위 세뇨관 내 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가되었고, 반면 투여군에서 반코마이신군보다 발현이 감소된 것을 보인다. 또한 고소애군 보다 고소애+해마군에서 발현이 더 감소된 경향을 보인다. (TNF- $\alpha$ , scale bar: 200  $\mu$ m)

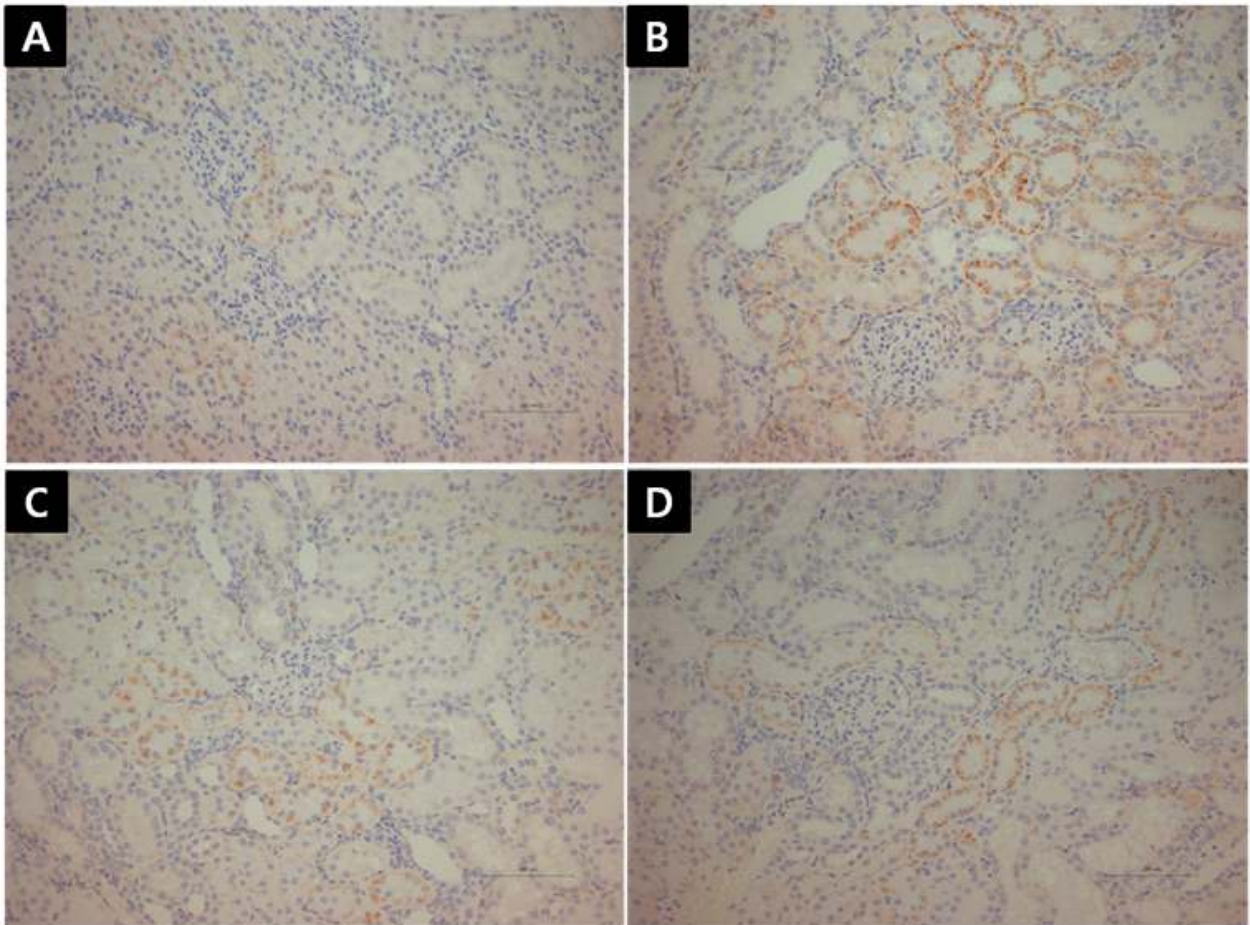
그림 12 신장에서 TNF- $\alpha$ 의 발현 결과



○ 신장 세뇨관 내 NAG의 발현 결과(그림 13)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. 대조군보다 반코마이신군에서 특히 근위 세뇨관 세포질 내 NAG의 발현이 증가되었고, 반면 투여군에서 반코마이신군보다 발현이 감소된 것을 보인다. (NAG, scale bar: 200  $\mu$ m)

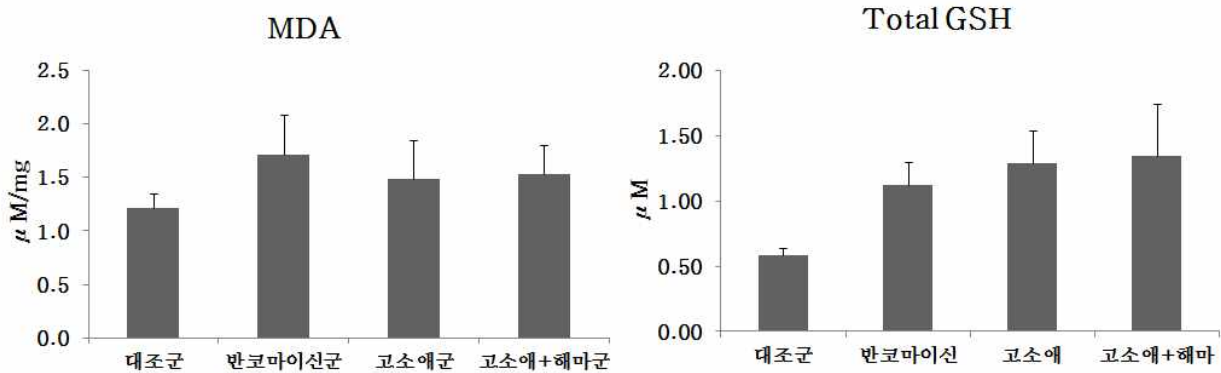
그림 13 신장에서 NAG의 발현 결과



○ 신장조직에서 MDA, Total GSH 결과(그림 14)

- MDA의 경우 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 증가하는 경향을 보여 vancomycin으로 인한 lipid peroxidation의 증가가 나타난 것을 보인다. 반면 반코마이신군과 비교했을 때 투여군에서 MDA가 감소하는 경향을 보인다. Total glutathione의 경우 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

그림 14 신장조직에서 MDA, Total GSH 결과



## □ 연구결론

- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 신장에 미치는 영향
  - 반코마이신군에 비해, 고소애와 고소애+해마군에서 절대 무게 및 상대무게가 감소하였고, 신기능과 관련된 BUN과 Cr이 고소애와 고소애+해마이 반코마이신군에 비해 유의적으로 감소하여, 고소애와 고소애+해마의 투여가 신장에 보호효과가 있는 것으로 사료되었다.
  
- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 신장의 조직학적 변화에 미치는 영향
  - 고소애와 고소애+해마군이 반코마이신 투여군에 비해, 세뇨관의 변화, 염증, 요원주가 감소되었고, 조직병리학적 점수를 비교한 결과, 유의적으로 좋아진 결과를 보였다. 이러한 변화는 신장무게의 변화와 관련이 있는 것으로 생각되었다.
  
  - 특히, 반코마이신 군에서 보인 기저막의 약한 PAS 양성반응은 proximal tubule의 brush border의 손상과 관련이 있는 것으로 보이며, 고소애와 고소애+해마군의 기저막과 proximal tubule의 brush border에 진한 PAS 양성은 신장에 보호효과를 보이는 것을 나타내며, 이러한 현상이 신장에서의 병변감소와 관련이 있는 것으로 생각되었다.
  
- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 apoptosis에 미치는 영향
  - TUNEL assay 결과, 고소애와 고소애+해마군이 반코마이신군에 비해, TUNEL positive cell이 유의적으로 감소하여, 조직학적으로 관찰된 신장세포의 손상은 광범위한 apoptosis와 관련이 있는 것으로 생각되며, 약물 투여군에서 고소애 및 고소애/해마는 항 apoptosis 기능이 있는 것으로 생각된다.
  
- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 염증인자에 미치는 영향
  - 고소애 및 고소애+해마가 염증에 미치는 영향을 알아보기 위해, 신장조직에서 면역조직학적으로 TNF- $\alpha$ 의 발현을 조사한 결과, 투여군에서 반코마이신군보다 발현이 감소되었으며, 특히 세뇨관에서의 발현이 감소되었으며, 이는 세뇨관의 손상이 약물투여군에서 감소된 것과 일치한다. 특히, 고소애군보다 고소애+해마군에서 발현이 더 감소된 경향을 보여 고소애 및 해마혼합물 투여군의 경우가 항염증효과가 더 있는 것으로 생각된다.
  
- 신장 세뇨관의 손상 관련 지표에 미치는 영향
  - NAG는 신장세뇨관의 손상과 관련있는 마커로 세뇨관내 NAG의 발현이 투여군이 반코마이신군에 비해서 근위 세뇨관 세포질 내 NAG의 발현이 감소되어, 신장손상이 고소애 및 고소애/해마 투여군에서 감소되어, 약물에 의한 보호효과가 있는 것으로 생각되며, 이런 변화는 조직학적 소견 및 육안적 소견과 일치하였다.
  
- 신장조직의 항산화성 검색
  - MDA는 세포막의 지질화와 관련있는 인자로, 반코마이신군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나, 투여군에서 MDA가 감소하는 경향을 보여 vancomycin에 의한 lipid peroxidation이 억제되어 있음을 알 수 있었다. 그런, total glutathione의 경우 각 군간의 유



의적인 차이를 보이지 않았는데, 이는 반코마이신의 경우, 다른 항생제에서 보이는 항생제에 의한 영향으로 생각되었다.

- 따라서, 고소애 및 고소애/해마 혼합물을 건강한 동물에 전처리한 경우, 반코마이신에 의해 유도되는 신장손상을 예방할 수 있는 것으로 생각되며, 해마혼합물의 경우, 항염증효과가 고소애 단독투여군에 비해 더 있는 것으로 생각된다. 향후 건강기능성 식품원료 개발을 위해 고소애 및 해마 주성분에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

- 고소애에 대한 유효성을 조사한 첫 번째 실험으로 본 실험을 통하여 국내 생산되는 고소애의 건강기능식품으로서의 활용가능성 확인

#### 3-2. 목표 달성여부

- 고부가가치 식·의약 및 신소재로 활용하기 위한 식용곤충 활용 연구를 위한 고소애 함유 제품을 2종 생산 및 동물실험들을 통해 고소애가 갖고 있는 효능 입증

최종성과목표	평가방법	개발내용 및 범위	가중치	달성도(%)
고소애 함유 제품 생산	제품개발건수	고소애 분말, 추출물 및 해마혼합물 개발	30	100
고소애 효능 입증	동물실험 및 효능확인	신장독성 동물 모델 확립 효능 확인을 위한 동물실험 실시 항산화효능 기전 검증	70	100

#### 4. 연구개발성과의 활용 계획 등

○ 제품의 상용화에 따른 건강기능식품의 효과

- 신장질환은 전세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며, 발병자는 더 많을 것으로 예측됨, 신장질환은 치료비용이 높아서 심한 경제부담을 가져다줌, 고소애의 신장기능 개선 효과를 통해 이와 같은 신장질환의 발병을 낮출 수 있고 이에 따라 고소애와 같은 건강기능식품의 사용량이 증가됨
- 음식을 씹거나 삼키기 어려운 경우, 질환 및 수술 등 여러가지 원인으로 식욕이 떨어져 영양 불량이 예상되는 사람들에게 영양 보충을 할 수 있음
- 고소애의 식품화로 인하여 식용곤충 농가와 관련 산업체의 소득 증대에 기여할 수 있음
- 고소애는 단백질과 무기질 등 함량이 높고, 새우와 같은 고소한 맛을 내 전체적으로 음식에 영양과 고소함을 더할 수 있음, 추후 고소애의 성분 및 효능을 연구함으로써 고소애를 건강기능식품으로 제조하는 것 뿐만 아니라, 고소애를 다른 식품에 접목시켜 다양한 용도로 쓰이는 식품을 개발 할 수 있고, 식용곤충이 어린이, 노인, 환자 등 특별한 영양요구량을 가진 사람들의 건강을 증진시킬 수 있음

#### <기대성과>

- 고소애를 건강기능식품으로 제조하는 과정을 거쳐 시각적인 거부감을 줄여주어 연령층과 성별에 상관없이 모두가 섭취 가능함
- 식용곤충이 어린이와 노인, 환자 등 특별한 영양이 요구되는 사람들의 건강 증진에 기여할 것으로 기대됨
- 유엔식량농업기구(FAO)에서 미래에는 식량생산이 인구증가를 따라잡지 못할 것이라는 예측을 하였는데, 고소애는 단백질 함량이 소고기의 10배 이상이고 풍부한 영양성분을 가지고 있어 미래식량의 대체제로서 기대가 됨
- 고소애는 사육기간은 짧은데 반해 대량사육이 가능하며, 유전자 변이 등의 인공변이가 아닌 친환경적이며, 사육 시 물의 소비가 적고, 사육을 위한 면적과 사료비용이 적으며, 사료에 사용되는 곡물소비량이 적어 인간이 가진 즐거움인 미식을 유지할 수 있는 식품으로 기대됨

#### <파급효과>

- 개발 대상 기술·제품의 파급효과

[기술적 측면]

- 인체에 부작용이 따를 수 있는 물질이 아닌 자연물질로 만들었기 때문에 부작용이 적음
- 고소애의 효능에 대한 연구를 통해서 고소애를 이용한 환자식·어린이 간식 등을 개발

[경제적·산업적 측면]

- 축산물을 대체하여 효과적인 단백질 공급원으로 이용함으로써, 전 세계 10억 기아 인구와 영양가가 높은 곤충을 상용화 할 수 있는 장점이 있음
- 축산물의 소비를 축소시켜 축산물로 인한 환경오염을 방지할 수 있음
- 고소애와 같은 건강기능식품을 섭취함으로써 신장질환 등을 미리 예방할 수 있어 인체의 건강증진에 도움이 됨

[사회적 측면]

- 2016년도에 고소애가 일반 식품원료로 인정받음에 따라 곤충식품 시장이 활성화 될 전망
- 고소애 사육 농가의 소득을 올리는 데에도 도움이 될 것으로 기대됨

(별첨) 참고문헌

- Kim SG, Jo YH, Seong JH, Park KB, Noh MY, Cho JH, Ko HJ, Kim CE, Tindwa H, Patnaik BB, Bang IS, Lee YS, Han YS. TmSR-C, scavenger receptor class C, plays a pivotal role in antifungal and antibacterial immunity in the coleopteran insect *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017 Oct;89:31-42. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.08.007. Epub 2017 Sep 1.
- Lee W, Kim MA, Park I, Hwang JS, Na M, Bae JS. Novel direct factor Xa inhibitory compounds from *Tenebrio molitor* with anti-platelet aggregation activity. *Food Chem Toxicol*. 2017 Nov;109(Pt 1):19-27. doi: 10.1016/j.fct.2017.08.026. Epub 2017 Aug 24.
- Seo M, Kim J, Moon SS, Hwang JS, Kim MA. Intraventricular administration of *Tenebrio molitor* larvae extract regulates food intake and body weight in mice with high-fat diet-induced obesity. *Nutr Res*. 2017 Aug;44:18-26. doi: 10.1016/j.nutres.2017.05.011. Epub 2017 May 18.
- Jo YH, Kim YJ, Park KB, Seong JH, Kim SG, Park S, Noh MY, Lee YS, Han YS. TmCactin plays an important role in Gram-negative and -positive bacterial infection by regulating expression of 7 AMP genes in *Tenebrio molitor*. *Sci Rep*. 2017 Apr 18;7:46459. doi: 10.1038/srep46459.
- Seo M, Goo TW, Chung MY, Baek M, Hwang JS, Kim MA, Yun EY. *Tenebrio molitor* Larvae Inhibit Adipogenesis through AMPK and MAPKs Signaling in 3T3-L1 Adipocytes and Obesity in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 28;18(3). pii: E518. doi: 10.3390/ijms18030518.
- Seo GW, Jo YH, Seong JH, Park KB, Patnaik BB, Tindwa H, Kim SA, Lee YS, Kim YJ, Han YS. The Silencing of a 14-3-3 $\epsilon$  Homolog in *Tenebrio molitor* Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. *Genes (Basel)*. 2016 Aug 20;7(8). pii: E53. doi: 10.3390/genes7080053.
- Islam MM, Yang CJ. Efficacy of mealworm and super mealworm larvae probiotics as an alternative to antibiotics challenged orally with *Salmonella* and *E. coli* infection in broiler chicks. *Poult Sci*. 2017 Jan 1;96(1):27-34. Epub 2016 Aug 12.
- Jin XH, Heo PS, Hong JS, Kim NJ, Kim YY. Supplementation of Dried Mealworm (*Tenebrio molitor* larva) on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Blood Profiles in Weaning Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016 Jul;29(7):979-86. doi:

10.5713/ajas.15.0535. Epub 2016 Jun 6.

Han SR, Lee BS, Jung KJ, Yu HJ, Yun EY, Hwang JS, Moon KS. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016 Jun;77:206-12. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.03.006. Epub 2016 Mar 16.

Lee JH, Jo YH, Patnaik BB, Park KB, Tindwa H, Seo GW, Chandrasekar R, Lee YS, Han YS. Cloning, expression analysis, and RNA interference study of a HORMA domain containing autophagy-related gene 13 (ATG13) from the coleopteran beetle, *Tenebrio molitor*. *Front Physiol*. 2015 Jun 17;6:180. doi: 10.3389/fphys.2015.00180. eCollection 2015.

Tindwa H, Jo YH, Patnaik BB, Lee YS, Kang SS, Han YS. Molecular cloning and characterization of autophagy-related gene TmATG8 in *Listeria*-invaded hemocytes of *Tenebrio molitor*. *Dev Comp Immunol*. 2015 Jul;51(1):88-98. doi: 10.1016/j.dci.2015.02.017. Epub 2015 Feb 26.

Lee SJ, Yu JS, Parker BL, Skinner M, Je YH, Kim JS. Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm-pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2015 Jan;42(1):151-6. doi: 10.1007/s10295-014-1551-z. Epub 2014 Nov 28.

Tindwa H, Jo YH, Patnaik BB, Noh MY, Kim DH, Kim I, Han YS, Lee YS, Lee BL, Kim NJ. Depletion of autophagy-related genes ATG3 and ATG5 in *Tenebrio molitor* leads to decreased survivability against an intracellular pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2015 Jan;88(1):85-99. doi: 10.1002/arch.21212. Epub 2014 Nov 17.

Park SJ, Kim SK, So YI, Park HY, Li XH, Yeom DH, Lee MN, Lee BL, Lee JH. Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. *Mol Microbiol*. 2014 Dec;94(6):1298-314. doi: 10.1111/mmi.12830. Epub 2014 Nov 4.

Han SR, Yun EY, Kim JY, Hwang JS, Jeong EJ, Moon KS. Evaluation of Genotoxicity and 28-day Oral Dose Toxicity on Freeze-dried Powder of *Tenebrio molitor* Larvae (Yellow Mealworm). *Toxicol Res*. 2014 Jun;30(2):121-30. doi: 10.5487/TR.2014.30.2.121. Erratum in: *Toxicol Res*. 2016 Apr;32(2):175.

Ullah I, Jang EK, Kim MS, Shin JH, Park GS, Khan AR, Hong SJ, Jung BK, Choi J, Park Y, Kwak Y, Shin JH. Identification and characterization of the insecticidal toxin "makes caterpillars floppy" in *Photorhabdus temperata* M1021 using a cosmid library. *Toxins (Basel)*. 2014 Jul 10;6(7):2024-40. doi: 10.3390/toxins6072024.

Jung J, Heo A, Park YW, Kim YJ, Koh H, Park W. Gut microbiota of *Tenebrio molitor* and their response to environmental change. *J Microbiol Biotechnol.* 2014 Jul;24(7):888-97.

Ha C, Kim SK, Lee MN, Lee JH. Quorum sensing-dependent metalloprotease VvpE is important in the virulence of *Vibrio vulnificus* to invertebrates. *Microb Pathog.* 2014 Jun-Jul;71-72:8-14. doi: 10.1016/j.micpath.2014.04.001. Epub 2014 Apr 21.

## 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

210mm×297mm[백상지(80g/㎡) 또는 중질지(80g/㎡)]



<첨부3>

최종보고서 관련제출 문서(첨부 제출 양식)

과제정보		문서 제출 내역									
		우편 발송						PDF파일 탑재			
과제명	연구 책임자	최종 보고서 1부	연구 개발 보고서 초록 1부	자체 평가 의견서 1부	연구 결과 활용 계획서 1부	평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서 1부	최종보고서 배포결과보고 1부	최종 보고서	연구 개발 보고서 초록	자체 평가 의견서	연구 결과 활용 계획서
고소애 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품 개발	신재호	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

#### <첨부4>

### 최종보고서 배포결과

대상기관	제출 내역
농림축산식품부 자료실	•최종보고서 책자 1부 •전자파일(PDF) 1점(메일) parkea@korea.kr , 044-201-1260
국가기록원	•최종보고서 책자 3부 •전자파일(PDF) 1점(CD) 031-750-2036
국립중앙도서관	•최종보고서 책자 2부 •전자파일(PDF) 1점(메일) data@nanet.go.kr , 02-788-4257
국회도서관	•최종보고서 책자 1부 •전자파일(PDF) 1점(메일) parkea@korea.kr , 044-201-1260
기타 기관(연구책임자 제량)	• 최종보고서 00부

\* 증빙자료(등기 영수증 사본) 별도첨부

\* 정확한 배포 내역은 발간등록번호와 함께 연구책임자 이메일로 안내

## <참고> 농식품 R&D 사업 기술료 감면 및 지식재산권 관련 규정

### □ 농림수산물식품과학기술육성법 시행령 (대통령령)

**제14조(기술료의 감면)** ① 농림축산식품부장관 또는 해양수산부장관은 법 제7조제1항 단서에 따라 다음 각 호와 같이 기술료를 감면한다. <개정 2013.3.23>

1. 「농어업·농어촌 및 식품산업 기본법」 제3조제4호에 따른 생산자단체: 100퍼센트
  2. 「농어업경영체 육성 및 지원에 관한 법률」 제2조제7호에 따른 농어업경영체: 100퍼센트
  3. 「중소기업기본법」 제2조에 따른 중소기업: 70퍼센트(해당 연구과제에 참여한 기업의 경우 80퍼센트)
  4. 「대·중소기업 상생협력 촉진에 관한 법률」 제2조제2호에 따른 대기업: 30퍼센트(해당 연구과제에 참여한 기업만 해당한다)
- ② 농림축산식품부장관 또는 해양수산부장관은 기술료의 최초 납부시점으로부터 1년 이내에 기술료 전부를 일시납부하는 경우에는 기술료의 30퍼센트를 추가 감면할 수 있다. <개정 2013.3.23>

### □ 농림축산식품 연구개발사업 운영규정 (농림축산식품부 훈령)

**제34조(연구개발결과의 활용촉진)** ① 연구개발결과물 소유기관의 장 또는 전문기관의 장은 연구개발결과가 널리 활용될 수 있도록 출원 중인 지식재산권을 포함한 연구개발결과물을 대상으로 기술실시계약을 체결하는 등 연구개발결과를 활용하는 데에 필요한 조치를 하여야 한다. 이 경우 계약체결 대상자로는 국내에 있는 자로서 기술 실시 능력이 있는 자를 우선적으로 고려하여야 한다.

② 연구개발결과물 소유기관의 장은 제1항에 따른 특허출원 중인 연구개발결과물을 특허등록 후 기술사용기간 내에 실시기간 연장을 전문기관의 장에게 요청하는 경우 전문기관의 장은 지식재산권 존속기간까지 연장할 수 있다.

③ 참여기업이 있는 경우 연구개발결과물에 대해서는 참여기업이 실시하는 것을 원칙으로 하며, 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 경우에는 참여기업 외의 자가 실시할 수 있다.

1. 연구개발결과물을 일반에 공개하여 활용할 목적으로 수행하는 연구개발과제의 경우
2. 참여기업 외의 자가 실시를 원하는 경우로서 해당 연구개발결과물을 공동 소유한 참여기업이 동의한 경우
3. 다음 각 목의 어느 하나에 해당하는 경우로서 참여기업이 정당한 사유가 있음을 소명하지 못한 경우
  - 가. 연구개발과제의 종료 후 1년 이내에 참여기업이 실시계약을 체결하지 아니한 경우
  - 나. 참여기업이 약정한 기술료를 1년 이상 납부하지 아니한 경우
  - 다. 참여기업이 기술실시계약을 체결한 후 연구개발결과를 활용하는 사업을 정당한 사유 없이 1년 이내에 시작하지 아니하거나 그 사업을 1년 이상 쉬는 경우
  - 라. 참여기업이 기술료 감면 승인을 받은 후 특별한 사유 없이 1년 이내에 기술실시계약을 체결하지 않은 경우
4. 그 밖에 장관이 참여기업 외의 자가 실시할 필요가 있다고 인정하는 경우

**제35조(기술료의 징수)** ③ 장관이 연구개발결과물 소유기관의 장으로부터 기술료를 징수하는 경우는 다음 각 호의 경우에 한하며 정액기술료의 형태로 징수함을 원칙으로 한다. 다만, 장관이 별도로 정하는 경우 정부출연금의 범위에서 경상기술료의 형태로 징수할 수 있다.

1. 영리법인이 제1항에 따라 징수하는 경우
2. 연구개발결과물 소유기관의 장이 영리법인으로서 연구개발결과물을 직접 실시하는 경우

④ 정액기술료는 원칙적으로 다음 각 호의 금액에 따른다.

1. 중소기업: 정부출연금의 10퍼센트
2. 중견기업(「산업발전법」 제10조의2제1항에 따른 기업을 말한다): 정부출연금의 30퍼센트
3. 대기업(「독점규제 및 공정거래에 관한 법률」 제14조제1항에 따른 상호출자제한기업집단에 속하는 기업을 말한다): 정부출연금의 40퍼센트

표지

(옆면)

(앞면)

116152-1

보안 과제( ), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개( )발간등록번호( )  
농식품창업·벤처지원 R&D바우처시험사업 최종보고서

R&D / 116152 - 1

# 고소에 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품개발 최종보고서

2017. 12. 04.

주관연구기관 / 을지대학교 산학협력단  
협동연구기관 /

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술평가원

고소에 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품개발 최종보고서

2017

농림축산식품부

농림식품기술평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부귀하

‘고소애 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품개발’(연구개발 기간 : 2016.12.05 ~ 2017.12.04) 과제의 최종보고서 10부를 제출합니다.

2017. 12. 04.

주관연구기관명 : 을지대학교 산학협력단	(대표자) 신문삼	(인)
협동연구기관명 :	(대표자)	(인)
참 여 기 관 명 : 을지생명과학	(대표자) 이민호	(인)

주관연구기관책임자: 신재호

협동연구기관책임자:

참여기관책임자: 이민호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	116152-1	해당 단계 연구 기간	2016.12.05.~ 2017.12.04	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농식품창업·벤처지원R&D바우처시범사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	고소애 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품 개발			
연구책임자	신재호	해당단계 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 8명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 70,000천원 민간: 24,000천원 계: 94,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 8명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 70,000천원 민간: 24,000천원 계: 94,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	을지대학교 산학협력단			참여기업명	을지생명과학
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		2	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 고소애 혼합물의 신장기능 개선 효과 확인
- 고소애 및 고소애 혼합물의 특허출원
- 고소애의 건강기능식품 상품화 기대

보고서 면수

요약	보고서 면수
----	--------

## 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>농림수산식품부는 갈색거저리 애벌레(밀웜)의 식용을 추진시키기 위해 '고소한 애벌레'라는 뜻의 '고소애'로 부를 것을 제안하였으며 단백질과 불포화지방산 함량이 높아 심혈관 질환 예방에 탁월한 효과가 있다. 신장질환은 전 세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 국내에도 대략 45만 명의 신부전증 환자가 있으며 초기 신부전증 환자까지 고려한다면 발병자는 더 많을 것으로 예측된다. 갈색거저리의 효능성 평가를 위해 본 연구에서는 신장손상을 일으키는 것으로 알려진 반코마이신을 투여하여 급성신장독성이 유발된 동물모델을 이용하여 갈색거저리 단독 혹은 해마혼합물의 신장개선능을 평가하였다.</p>				
연구개발성과	<p>동물실험을 통해 고소애 혼합물의 신장기능 개선 효과를 확인하였다. 본 시험의 결과를 이용해 특허를 2건 출원하였으며, 향후 논문을 제출하여 연구성과를 공유하고 고소애를 건강기능식품으로 상품화 하고자 한다. 또한 고소애의 연구를 통해 전문적인 석사 및 박사과정의 인력 및 연구원을 양성하였다. 고소애의 연구를 향후 개별인정 기능성식품으로 등록하기 위한 자료로 활용할 예정이다.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>고소애를 건강기능식품으로 제조하는 과정을 거쳐 시각적인 거부감을 줄여주어 연령층과 성별에 상관없이 모두가 섭취 가능하도록 하고, 식용곤충이 어린이와 노인, 환자 등 특별한 영양이 요구되는 사람들의 건강 증진에 기여할 것으로 기대되며, 유엔식량농업기구(FAO)에서 미래에는 식량생산이 인구증가를 따라잡지 못할 것이라는 예측을 하였는데, 고소애는 단백질 함량이 소고기의 10배 이상이고 풍부한 영양성분을 가지고 있어 미래식량의 대체제로서 기대가 된다. 또한 고소애는 사육기간은 짧은데 반해 대량사육이 가능하며, 유전자 변이 등의 인공변이가 아닌 친환경적이며, 사육 시 물의 소비가 적고, 사육을 위한 면적과 사료비용이 적으며, 사료에 사용되는 곡물소비량이 적어 인간이 가진 즐거움인 미식을 유지할 수 있는 식품으로 기대된다.</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	식용곤충	고소애	신장	기능성 식품	동물실험
영문핵심어 (5개 이내)	edible insects	mealworm	kidney	functional foods	animal test

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

본문 작성 양식

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행내용 및 성과 .....	7
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	19
4. 연구개발성과의 활용 계획 등 .....	20
붙임. 참고 문헌 .....	23

<별첨> 주관연구기관의 자체 평가 의견서



## 1. 연구개발과제의 개요

### □ 연구개발의 필요성

- 갈색거저리(mealworm beetle)는 거저리과에 속하는 곤충의 일종이다. 곡물거저리와 비슷하지만 애벌레 때 더 크다. 갈색거저리의 애벌레는 흔히 밀웜(영어: mealworm)이라 부르고 주로 애완동물의 먹이와 식용 곤충으로 많이 사용된다.

그림 2 갈색거저리 유충



- 농림수산식품부는 갈색거저리 애벌레(밀웜)의 식용을 추진시키기 위해 '고소한 애벌레'라는 뜻의 '고소애'로 부를 것을 제안하였으며 소고기 100g에는 단백질 21g이 들어 있는데 반해 '고소애'에는 50g이 함유돼 있어 육류를 대체하는 미래식량으로 각광받고 있다. 단백질과 불포화지방산 함량이 높아 심혈관 질환 예방에 탁월한 효과가 있다. 병원식으로도 공급되고 있다.
- 신장질환은 전세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 국내에도 대략 45만 명의 신부전증 환자가 있으며 초기 신부전증 환자까지 고려한다면 발병자는 더 많을 것으로 예측된다. 신부전증의 치료에 있어서 비록 장기적 투석과 신장이식 등 치료수단이 존재하지만 만성 신부전증의 초기, 중기의 치료문제를 해결하지 못하며, 게다가 치료비용이 높아서 나라와 환자가정에 심한 경제부담을 가져다준다.
- 식이 곤충이 시험관 내에서 소화 및 흡수 된 펩타이드의 항산화 및 항염증 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 식용 곤충 가수 분해물의 항산화능은 자유 라디칼 소거 활성, 이온 킬레이트 활성 및 환원력으로 통해 확인 하였고, 소염 활성은 리폭시게나제 (lipoxygenase) 및 시클로옥시게나제-2 (cyclooxygenase-2) 억제 활성으로 나타났다(Zielińska 등)

- 작은 유럽 농어(*Dicentrarchus labrax*)에 6 주동안 유충이 혼합된 사료를 급여한 결과 유의한 항염증 반응 (ceruloplasmin, myeloperoxidase and nitric oxide)을 나타냈으며, 그람 음성 박테리아에 대한 혈청 용해 작용은 식이 요법으로 유의한 영향을 받지 않았으며, 일반적으로 물고기의 항 기생충 활성화와 관련되어있는 리소자임 항균 활성화와 혈청 트립신 저해는 유의하게 증가되었다(Henry 등)
- 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 사용하여 산화 스트레스 및 생물의 수명에 대한 저항성에 대한 *Tenebrio molitor* 추출물의 영향을 조사한 결과 산화 스트레스와 자외선 조사에 대한 저항성에 유의적인 효과를 나타냈고, *C. elegans*의 평균 수명과 최대 수명을 연장시켰다. 또한, *T. molitor*를 투여한 군에서 생성된 자손의 수가 유의적으로 증가하였고, hsp-16.2, sop-3의 발현이 upregulation되었다 (Won 등)
- 수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에서 동결건조된 *Tenebrio molitor* 유충의 잠재적 과민성을 포함한 아만성 독성을 평가한 결과 사망률, 임상징후, 체중 및 장기무게, 음식 섭취량, 안과, 혈액 및 혈청 화학 검사, 육안검사, 조직검사, 알레르기 반응을 포함한 독성평가에서 특이한 발견이 없었으며, NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)이 수컷, 암컷 모두 3000 mg/kg/day를 초과하는 결과를 나타내었다(Han 등)
- 수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에서 28일 동안 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day로 *Tenebrio molitor* 유충의 동결 건조 분말의 유전 독성과 반복 투여 독성을 평가한 결과 돌연변이 유발성 또는 유전적으로 발생하지 않았고 랫드에 경구투여 후 투여와 관련된 변화가 나타나지 않았다 (Han 등)
- 수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에서 동결 건조 된 *T. molitor* larvae (fdTML)의 잠재적 과민성을 포함한 아만성 독성을 평가하기 위하여 *Tenebrio molitor* (*T. molitor*) 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day의 용량으로 90일간 경구투여하여 사망률, 임상 징후, 체중 및 장기 무게, 음식 섭취량, 안과, 소변 검사, 혈액학, 혈청 화학 검사, 육안 소견, 조직 병리 검사 및 알레르기 반응을 포함한 독성 평가함. 임상 증상, 소변 검사, 혈액학 및 혈청 화학 검사, 육안 검사, 조직 병리 검사 또는 알레르기 반응에서 fdTML 관련 발견은 없음. 결론적으로, 본 연구의 실험 조건 하에서 fdTML에 대한 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)이 쥐의 남녀 모두 3000 mg / kg / day를 초과하는 것으로 결정
- *T. molitor* 유충의 동결 건조 분말의 유전 독성과 반복 투여 독성을 평가하기 위하여 사망률, 임상 징후, 신체 및 기관 무게, 음식 섭취량, 안과학, 소변 검사, 혈액학, 혈청 화학 검사, 전체 결과 및 조직 병리 검사를 실시. *T. molitor* 유충의 냉동 파우더 분말은 시험관내 및 생체 내 유전 독성 시험의 결과에 근거한 돌연변이 유발성 또는 유전적으로 발생하지 않았으며, 28 일 경구 투여 후 쥐의 어떠한 매개 변수에서도 치료와 관련된 변화나 발견이 관찰되지 않음. 결론적으로, *T. molitor* 유충의 동결 건조 분말은 우리의 실험 조건 하에서 SD 독성 쥐의 남녀 모두에서 유전 독성이 없으며 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)이 3000 mg / kg / day로 측정

- 시험관내 및 생체 내에서 *T. molitor* 유충의 항 지방 형성 및 항 비만 효과를 조사하기 위하여 고지 방식을 먹은 비만 랫드에 *T. molitor* (TME)를 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day의 용량으로 경구투여한 결과, 고지 방식을 먹인 쥐에서 분말이 간 지방증뿐만 아니라 아스파 테이트 및 알라닌 트랜스 아미나 제 효소 수치를 효과적으로 감소 시킨다는 것을 발견. *T. molitor* 유충 추출물이 식품 보충제로 투여 될 때 항 비만 효과가 있고 비만 치료제로서의 가능성이 있음을 시사
- *Tenebrio molitor* 유충이 함유된 육계용 사료에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수컷육계 병아리 (Ross 708)에 Tm meal (분말)을 50, 100, 150g의 용량으로 53 일간 투여하고, growth performance, gut morphology, 조직학적검사를 실시한 결과, 수컷 육계에 닭고기 섭취를 증가 시키면 체중과 사료 섭취량은 증가하지만 사료 효율과 장 형태에는 부정적인 영향을 미치므로 낮은 용량이 더 적합 할 수 있음을 시사함. 또한 TM 식사 이용과 관련하여 haematochemical parameters, carcass traits, histological findings에는 영향을 미치지 않았음.
- *T. molitor* 유충으로부터 factor Xa (FXa) 및 혈소판 응집에 대한 저해 활성을 가지는 생리 활성 화합물을 동정하여, 동맥 및 폐동맥 혈전증 동물모델을 이용하여 실험을 실시한 결과, *T. molitor* 유충으로부터 보고되지 않은 생리활성화합물인자 Xa (FXa) 및 혈소판 응집에 대한 저해활성물질들을 동정하고, 응고 시간, 혈소판 응집, FXa 활성 및 혈전 형성을 모니터링함으로써 항 FXa 및 항 혈소판 응집 특성에 대해 평가를 실시. Tm유충으로부터 분리된 화합물은 FXa의 촉매활성을 억제하였고 아데노신2인산염과 U46619로 인한 혈소판 응집을 억제시키고, 산화질소생산을 개선시킴. 동맥 및 폐동맥 혈전증의 동물모델에서 항혈전 효과를 나타내었으며, 마우스에서 항응고제 효과를 나타냄.
- weaning pig의 성장능, 영양소 소화율 및 혈액학적 측면에 대해 건조된 mealworm 유충의 영향을 조사하기 위해 120 마리 weaning pig ( $28 \pm 3$  일 및  $8.04 \pm 0.08$ kg)에 분말 mealworm을 weaning pig 사료에 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 %의 농도로 혼합하여 투여하여, 체중, ADG, ADFI, 사료 섭취량, dry matter, crude protein의 nitrogen retention, digestibility, BUN, 인슐린 유사성장인자, IgA, IgG 농도를 측정 한 결과, 건조된 mealworm의 섭취 수준이 증가함에 따라 체중, average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI) 향상됨. 전체 실험기간동안 사료섭취비율 증가하는 경향을 보이며, mealworm 섭취수준이 증가할수록 dry matter와 crude protein의 nitrogen retention과 digestibility증가함. 혈액학적 측면에서 건조된 mealworm 섭취가 증가함에 따라 BUN 감소와 인슐린유사성장인자의 증가가 관찰되었으나, IgA 및 IgG 농도에서는 유의한 차이없음. weaning pig 식단에서 건조된 mealworm을 6%까지 보충하면 면역반응에 해로운 영향을 미치지 않으면서 성장능과 영양소소화율이 향상됨.

□ 연구개발 범위

- ‘건강기능식품’이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공 포

함)한 식품을 말한다. 건강기능식품의 기능성은 ①영양소 기능 ②생리활성 기능 ③질병발생 위험감소 기능의 3가지가 있으며, 기능성을 가진 원료나 성분은 식약처장이 고시(고시형 건강기능식품)하거나 별도로 인정(개별인정형 건강기능식품)한 원료 또는 성분으로 나눌 수 있다.

- 연구자(사업자)가 건강기능식품소재를 발굴하고 원료의 기준규격설정과 안전성 및 효능연구 결과를 토대로 식약처로부터 허가 받는 개별인정형 건강기능식품 소재개발사업은 식품산업에서 신약개발과 같이 매우 높은 부가가치를 창출할 수 있는 분야이지만 많은 비용과 노력이 필요하기도 하다.
- 건강기능식품 기능성 원료로 식약처에 인정받기 위해서는 신소재 탐색, 생산, 가공, 분석에 대한 전문기술이 요구되고 과학적 근거를 토대로 기능성 식품 소재의 기능성에 대한 충분한 자료 확보가 필요하며, 생리활성 기능성 평가결과를 주요학술지에 발표함으로써 인정받을 수 있다.

#### □ 국내외 기술 수준 및 현황

##### ○ 국내 기술 수준 및 현황

- 국내의 건강기능식품은 국민의 삶의 향상 및 식품의 기능성을 과학적인 테두리 안에서 확립하기 위하여 2004년 「건강기능식품에 관한 법률」 시행에 따라 정착한 제도이며, 「건강기능식품에 관한 법률」에 따라 건강기능식품이라 인체에 유용한 기능성을 가진 원료 또는 성분을사용하요 제조·가공한 식품으로 정의 되어 있으며, 기능성의 정의도 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것으로 정의 되어 있다.
- 건강기능식품의 제도 시행 이후 ‘13년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총생산액은 1조 4,820억 원이었으며, 12년도(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가한 것으로 나타났다. 또한 ‘14년 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사’ 자료에 따르면 건강기능식품 섭취를 통해 해결하려는 건강 문제로는 피로 회복이 31.8%로 가장 많았다. 이어 면역력증진(26.6%), 전반적 건강증진(14.7%)순이었으며, 지속적으로 건강기능식품에 대한 소비자의 관심을 증대하고 있다.
- 건강기능식품은 고시형과 개별인정형 2가지 유형으로 구분되는데 고시형 건강기능식품은 ‘건강기능식품공전’에 수록된 기능성 원료로 건강기능식품제조업 및 수입업을 가진 가 ‘건강기능식품공전’의 기준규격에 적합하면 제조할 수 있는 건강기능식품과 ‘건강기능식품공전’에 등재되어 있지 않은 원료를 제조·수입 판매하고자 할 때 식약처에 기능성, 안전성, 기준 및 규격을 인정받은 수 제조·수입할 수 있는 개별인정형 건강기능식품으로 구분된다.
- 건강기능식품의 현재의 기능성은 간건강, 눈건강, 혈행개선 등 총 321개 기능성에 대해

여 인정되어 있으며, 세부적으로는 영양소 28종, 기능성 원료 56종으로(2014.02월 기준) 구분되어 있다. 그 중 가장 많이 인정된 원료는 체지방 감소가 79건, 관절/뼈 건강이 50건, 간건강이 38건 등의 순으로 되어 있다.

- 건강기능식품은 의약품과는 달리 건강기능식품의 효능에 대한 체계적이고 과학적인 방법에 근거한 평가 및 검증에 관한 연구가 부족하여 국내 건강기능식품 시장성장 및 발전에 장애가 되고 있다. 따라서 건강기능식품 기능성 평가에 필요한 효능과 안전성 중심의 연구가 지속적으로 필요하며, 관련 내용을 과학적으로 평가할 수 있는 체계적화된 연구가 필요하다.

○ 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 우리나라의 건강기능식품과 유사한 제도를 운영하고 있는 나라는 미국, 일본, 유럽, 중국, 캐나다, 호주 등이 있으며, 이 중 가장 유사한 제도는 일본의 '특정보건용식품' 등이다.
- 미국의 경우에는 Nutritional Labeling and Education Act (NLEA), Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA) 등 관련 규정에 따라 식이보충용제품 형태의 건강기능식품을 판매하고 있으며, Food and Drug Administration Modernization Act(FDAMA)법에 따라 새로운 건강강조표시(health claim)에 대한 허가 및 관리 등을 하고 있다.
- 일본은 우리나라의 제도와 가장 유사하게 고시형인 영양기능식품과 개별인정형인 특정보건용 식품으로 구분되어 운영하고 있다. 건강증진법 관련 보건기능식품제도(영양기능식품, 특정보건용식품) 등 관련 규정이 있다.
- 유럽은 Nutrition and health claims (Regulation (EC) No 1924/2006), General food law(Regulation (EC) No 178/2002), Food supplement directive (Directive (EC) 2002/46) 등 관련 규정에 따라 질병발생위험감소기능표시, 어린이의 성장·건강 표시 기타 건강정보표시 등의 건강강조표시(health claim)를 운영하고 있다.
- 캐나다는 Natural Health Products Regulation, Food and Drug Regulation, NutritionLabelling Regulation 등에 따라 NHP(Natural Health Products)로 운영되고 있으며, 질병, 건강상태 등에 대한 기능성을 언급할 수 없고, 특정한 건강강조표시는 정해진 규격을 충족하면 국내의 고시형 원료 같이 사용할 수 있다. 다만 NHP는 비타민과 무기질, 프로바이오틱스, 아미노산과 필수지방산 등의 원료 대한 허용을 하고 있다.
- 호주는 식품의약품규정 (Australia New Zealand Food Standards) 및 Therapeutics Goods Act에 따라 국내와 달리 건강기능식품의 개념을 보조의약품(Complementary medicine) 개념으로 인정하고 있으며, 일반적인 수준의 건강강조표시는 비타민, 무기질, 기타 (식이섬유, 지방산, 단백질 등) 등에 대하여 영양소기능표시와 기타기능표시에 해

당할 수 있으며, 높은 수준의 건강강조표시는 질병발생위험 감소표시에 해당하며 총 11개의 항목에 대해 허가되어 있다. 보조의약품(Complementary medicine) 개념에 따라 의약품으로 관리된다.

- 중국 ‘보건식품 등록관리법’에 따라 영양소 보충용 제품과 기타 다른 기능성 식품으로 구분되며 현재 27개의 기능성을 인정하고 있다.

#### □ 연구개발 목적

- 전통적으로 사용해 온 천연물은 새로운 작용, 골격구조를 갖는 화합물과 독성 및 부작용이 적은 물질이 발견될 가능성이 매우 높기 때문에 천연물, 특히 생약으로부터 신약을 창출하려는 시도가 공통된 연구추세이다.
- 갈색 거저리의 애벌레(mealworm, 고소애)의 건강기능식품으로서의 활용 및 사업성을 알아보기 위하여, 고소애를 이용하여 효능을 연구하고자 본 시험을 수행하였다.

## 2. 연구수행내용 및 성과

### □ 재료 및 방법

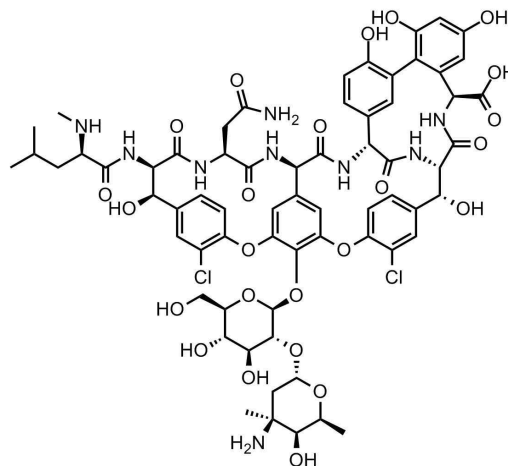
### ○ 물질 및 시약

- Vancomycin HCl (1 g, CJ healthcare., Korea)은 멸균된 생리식염수에 녹여 400 mg/kg으로 5 ml/kg으로 복강 내 주사 할 양으로 만들었다.

그림 3 반코마이신 주사제



그림 4 Vancomycin의 구조



- 고소에 주정 추출물을 추출한 방법은 건조되어 분쇄기로 분쇄한 고소에 분말 500 g에 70% 발효 에탄올을 10배수 넣고, 상온에서 24시간 침지 하여 추출하였다. 추출 후에 체로 한번 거른 후, 추출물을 여과지(whatman No.1)를 이용하여 여과처리 하였다. 감압농축(rotary evaporator N-1200, Eyela, Japan)을 하여 에탄올을 제거하고 최종 부피 1 L가 되도록 한 후 시료로 사용하였다. 이 때 최종 농도는 0.5 g/ml이다.
- 고소에 및 해마 주정 혼합물을 추출한 방법은 건조되어 분쇄기로 분쇄한 고소에 분말 500 g과 해마 분말 500 g에 70% 발효 에탄올을 10배수 넣고, 상온에서 24시간 침지 하여 추출하였다. 추출 후에 체로 한번 거른 후, 추출물을 여과지(whatman No.1)를 이용하여 여과

처리 하였다. 감압농축(rotary evaporator N-1200, Eyela, Japan)을 하여 에탄올을 제거하고 최종 부피가 1 L가 되도록 한 후 시료로 사용하였다. 이 때 최종 농도는 0.5 g/ml이다.

- 본시험에서는 고소애와 해마혼합물의 경우, 배합비율을 1:1로 하였다. 예비시험에서 고소애와 해마를 1:2로 혼합한 군도 같이 실험을 하였으나, 해마의 비율을 높여도 배합비율인 1:1인 군과 유의한 차이를 보이지 않아, 고소애와 해마혼합물을 1:1로 배합한 군을 최종적으로 본시험에 이용하였다.

그림 5 고소애 주정추출물 및 해마/고소애 혼합추출물



- TBARS assay kit(Sta-330, Cell Biolabs, Inc.), Total Glutathione assay kit (Sta-312, Cell Biolabs, Inc.)를 사용하였다. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)을 하기위해 In situ cell death detection kit (POD, cat# 684 817 910, Roche)를 사용하였고, primary antibody로 Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ;ab66579, Abcam), N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGLU; ab214671, Abcam)를 사용하였고, ABC-HRP kit (peroxidase, Rabbit IgG; PK6101, Vector Laboratories)를 사용하였다.

#### ○ 동물 모델 및 실험디자인

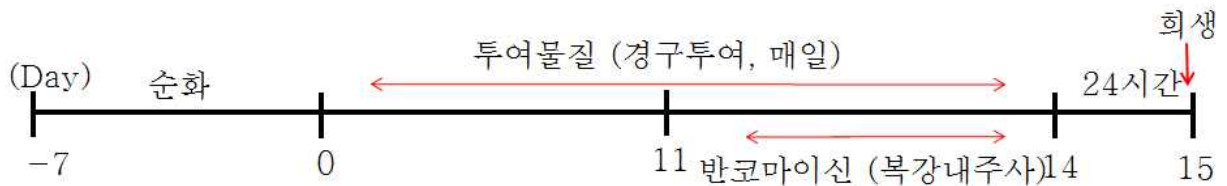
- 36마리 male Sprague Dawley rat (5주령, 약180-200 g)를 1주일 동안 순화 한 후 랜덤으로 다음과 같이 군을 나누어 투여하였다. 대조군(n=8); 2주일 동안 증류수를 경구투여 하고, 마지막 3일 동안 saline을 복강 내 주사하였다. Vancomycin 투여군(n=9); 2주일 동안 증류수를 경구투여 하고, 마지막 3일 동안 400 mg/kg의 vancomycin을 5 ml/kg으로 하루에 한번 복강 내 주사하였다. 고소애 주정추출물+vancomycin 투여군(n=9), 고소애 주정 및 해마 주정 혼합물+vancomycin투여군(n=9); 2주일 동안 고소애 주정 추출물과 고소애 및 해마 주정 혼합물을 10 ml/kg으로 경구투여하고, 마지막 3일 동안 vancomycin을 투여물질 투여 1시간 후 복강 내 주사하였다.



- 사육환경은 12 h light/dark cycle,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  온도,  $50 \pm 10\%$  습도를 유지시켰다. 모든 동물에 commercial food (Purina Inc., Gyeonggi-Do, Korea)와 물을 자유롭게 공급하였다.

그림 5 실험디자인

대조군	증류수 경구투여 + 멸균생리식염수 복강내주사
반코마이신으로 신독성 유발군	증류수 경구투여 + 반코마이신 400 mg/kg 복강내주사
	고소애주정추출물 10 ml/kg 경구투여 + 반코마이신 400 mg/kg 복강내주사
	고소애+해마 주정추출물 10 ml/kg 경구투여 + 반코마이신 400 mg/kg 복강내주사



- 일반적 치료목적의 약물의 효능 시험과 달리, 본시험은 향후 건강기능성 식품원료로 인정을 받기 위한 기본자료로 활용하기 위해, 정상동물군에게 먼저 시료를 2주간 위내로 투여하였다. 이후, 시료투여군과 동일한 기간동안 동일방법으로 증류수를 투여한 군 모두 신장손상을 유발하여 시료 투여에 따른 효능을 비교하였다.
- 실험 프로토콜은 을지대학교의 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)에서 승인받았다(EUIACUC 17-01). 모든 동물은 일주일에 두 번 체중 측정을 하였고, 마지막 투여 24시간 후 희생되었고 희생 전 12시간 동안 물을 제외하고 모든 음식을 절식하였다. 혈액은 배대동맥에서 수집하여 3000 rpm, 15분 동안 원심분리하여 serum을 분리하여 분석을 위해  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.
- 신장은 양쪽 모두 피막을 벗긴 후 장기 무게를 측정하였다. 왼쪽신장과 간의 좌엽은 조직학적 검사를 위해 10 % formalin고정을 하였고, 오른쪽 신장은 3등분 하여 전자현미경 검사를 위한 조직을 채취한 후 MDA, Total glutathione assay를 위해  $-80^\circ\text{C}$ 에 얼렸다.

○ ALT, AST, BUN, Cr의 측정

- 간기능검사를 위해 serum을 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), 신기능검사를 위해 serum을 이용하여 Blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr)을 녹십자에서 자동화기기를 사용하여 측정하였다.

○ 조직병리학적 검사

- 10 % 포르말린으로 고정된 왼쪽신장을 알코올 탈수, 자일렌 투명, 파라핀 침투과정을 거쳐 파라핀 포매하여 3 um로 section하였고, 후에 일반염색, 특수염색, 면역염색을 진행하였다.

- Hematoxylin and eosin염색 H&E 자동화 염색기기를 사용하여 자일렌으로 파라핀을 녹인 후, 알코올 함수, hematoxylin 핵 염색, 1N HCl 탈수, 0.15 % 암모니아수 청색화, eosin 세포질 염색, 알코올 탈수, 자일렌 투명과정을 거쳤다. Renal injury를 평가하기 위해 scoring1을 modify하여 진행하였다. Renal injury는 신장피질의 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, interstitial inflammation, interstitial edema, cast를 다음과 같이 측정하여 평균화하였다. 0=none, 1=foci, 2=moderate, 3=severe

- 신장 피질의 기저막을 보기 위한 PAS염색은 xylene을 이용한 탈파라핀, 알코올을 이용한 함수를 거쳐 0.5 % periodic acid로 산화시킨 후, schiff 시약으로 발색시켰고, 핵 염색으로 는 Harris hematoxylin을 하였다.

#### ○ TUNEL assay

- 신장피질에 있는 proximal tubule cell의 apoptosis를 보기 위해 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)을 진행하였다. 파라핀 섹션 한 신장을 탈파라핀 과정을 거친 후, 항원성 부활을 위해 0.1 % trypsin in 1x PBS (pH 7.4)로 37°C, 10분 동안 incubation하였다. 내인성효소억제를 위해 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol로 실온에서 30분 동안 incubation한 후 enzyme solution과 label solution을 혼합하여 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 incubation하였고, convert POD를 넣고 37°C에서 30분 동안 incubation하였다. 시각화하기 위해 기질로 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride을 사용하였고 대조염색으로 Harris hematoxylin을 사용하였다.

- TUNEL positive cell counting을 하여 scoring을 진행하였다. 랜덤으로 400배로 5개 시야를 관찰하여 TUNEL positive cell을 counting하여 전체 핵의 개수를 백분율 하여 나타내었다.

#### ○ TNF- $\alpha$ , NAG면역염색

- 신장피질의 염증을 관찰하기 위해 Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) 면역염색을 진행하였다. 항원성 부활을 위해 0.1 % trypsin으로 37°C, 30분 동안 incubation하였고, 내인성효소활성억제를 위해 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol로 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 비특이적 반응 차단을 위해 3 % bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS (pH 7.4)로 실온에서 1시간 동안 incubation하였고, 1차항체로 TNF- $\alpha$ (1:200 in 3 % bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS (pH 7.4; ab66579, abcam)를 사용하여 4°C, overnight을 진행하였고, 2차항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG로 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 visualization하였다. 대조염색으로 Harris hematoxylin을 사용하였다.

- 신장의 proximal tubule의 손상을 관찰하기 위해 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) 면역염색을 진행하였다. 항원성 부활을 위해 microwave를 사용하여 low power에서 10분 동안 1x citrate buffer (pH 6.4)와 함께 boiling한 후 microwave안에서 30분 동안 cooling

을 하였고, 내인성효소활성억제를 위해 0.5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol로 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 비특이적 반응 차단을 위해 3 % bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS (pH 7.4)로 실온에서 20분 동안 incubation하였고, 1차항체로 NAGLU (1:2000 in 3% bovine serum albumin in 1.5 % normal goat serum in 1x PBS(pH 7.4); ab217671, abcam)를 사용하여 4°C, 30분 동안 incubation하였고, 2차항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG를 사용하여 실온에서 30분 동안 incubation하였고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 visualization하였다. 대조염색으로 Harris hematoxylin을 사용하였다.

#### ○ MDA, Total GSH측정

- Lipid peroxidation을 측정하기 위해 MDA kit (sta-330, Cell Biolabs, INC.)를 사용하여 진행하였다. 조직의 MDA를 측정하기 위해 100 mg/ml in 1x PBS (pH 7.4)로 조직을 homogenization하여 4°C, 10,000 g, 5분 동안 centrifuge하여 600 ul supernant에 6 ul 100x BHT를 첨가하였다. 추후 분석을 위해 -80°C에 보관하였다. MDA standard와sample에 100 ul SDS lysis solution을 첨가하였고, thoroughly mix한 후 room temperature에서 5분 동안 incubation 한 후 standard와 sample에 250 ul Thiobarbituric acid(TBA) reagent를 첨가한 후 95°C, 60분 동안 air dry oven에서 incubation하였다. Ice 위에서 실온으로 5분간 cooling한 후 3000 rpm, 15분 동안 sample을 centrifuge하였다. Hemoglobin과 hemoglobin의 derivatives의 interference를 막기 위해 300 ul의 상층액을 다른 Eppendorf tube에 넣고 300 ul n-butanol을 첨가한 후 vigorously vortex를 1분 동안 한 후 10,000 g, 5분 동안 centrifuge하였다. 96 well plate에 standard와 sample의 상층액을 200 ul씩 넣고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- Antioxidant enzymes을 측정하기 위해 Total glutathione(GSH)을 측정하였다. Total GSH를 측정하기 위해 GSH kit (sta-312, Cell Biolabs,INC.)를 사용하였고, 조직의 Total GSH를 측정하기 위해 50 mg 조직에 500 ul 5 % MPA를 넣고 homogenization한 후 4°C, 12,000 rpm, 15분 동안 centrifuge하여 상층액을 측정에 사용하였다. 96 well plate에 25 ul 1x glutathione reductase solution을 넣고 25 ul 1x NADPH solution을 첨가하였다. 각각의 well에 100 ul glutathione standard와 sample을 넣고 thoroughly mix하였다. 50 ul 1x chromogen을 첨가한 후 짧게 mix하고 즉시 405 nm에서 흡광도를 1분 간격으로 10분 동안 측정하였다. 조직 MDA는 1 mg/ml Bovine serum albumin을 standard로 사용하여 Bradford assay로 단백질 정량을 하여 계산하였다.

#### ○ 통계학적 분석

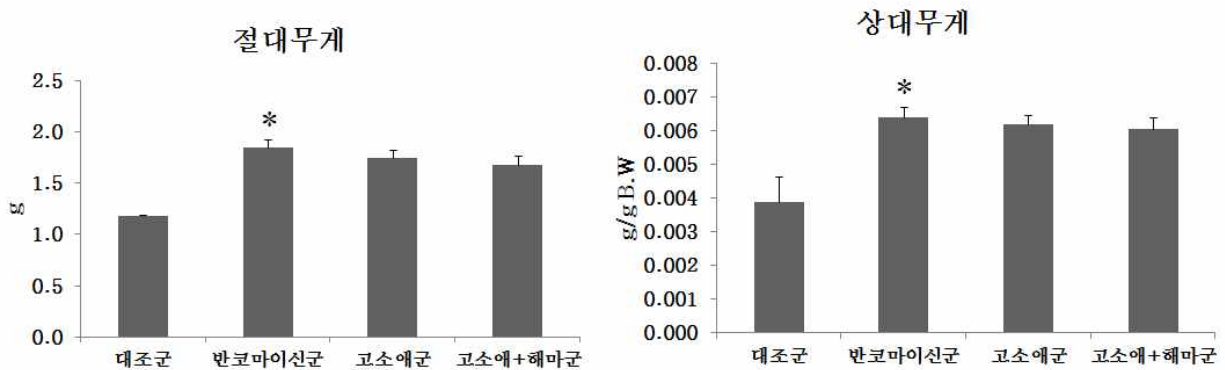
- 모든 데이터는 mean ± SE로 나타내었다. 통계학적 분석을 위해 SPSS 프로그램(Version 10.0; SPSS Inc., USA)을 사용하여 ANOVA를 수행한 후 사후분석으로 LSD를 수행하였다. p값은 0.05미만으로 통계학적 유의성을 나타내었다.

#### □ 연구결과

○ 신장무게 변화(그림 6)

- 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 절대무게와 상대무게가 유의적으로 증가하였고, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 감소하는 경향을 보였다.

그림 6 절대무게와 상대무게

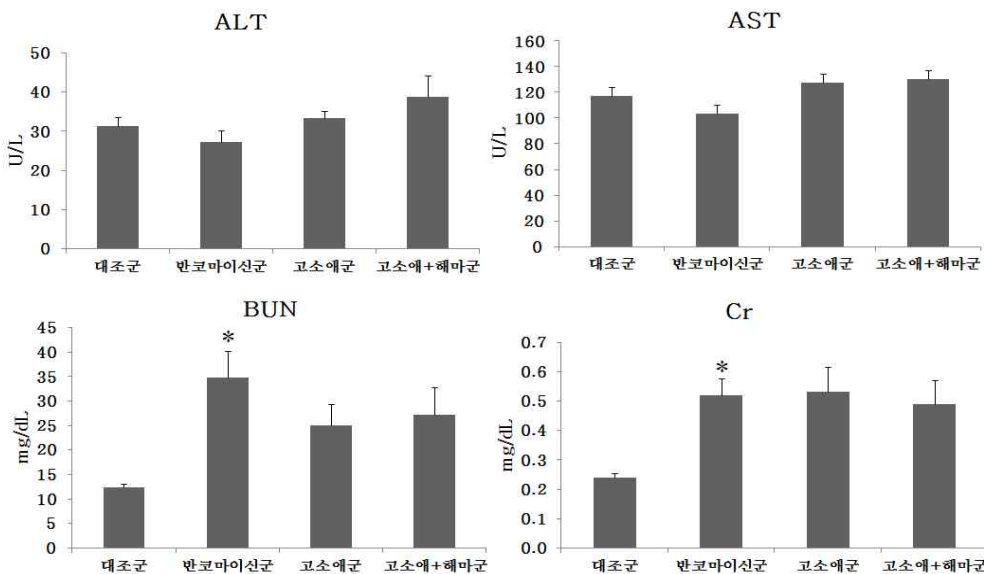


Values are mean  $\pm$  SEM of 8 to 10 rats per group. \* $p < 0.05$  compared to control.

○ 혈청 중 효소의 변화(그림 7)

- 간기능을 나타내는 지표인 ALT와 AST 결과 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 감소하는 경향을 보였고, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 증가하는 경향을 보였다.
- 신기능을 나타내는 지표인 BUN과 Cr 결과 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 유의적으로 증가하여 반코마이신으로 인한 신독성으로 신기능 저하가 나타난 것을 볼 수 있다. BUN 결과, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 감소하는 경향을 보인다. 반면 Cr 결과 고소애+해마군만 반코마이신군과 비교했을 때 감소하는 경향을 보였다.

그림 7 Serum으로 측정된 ALT, AST, BUN 및 Cr 결과



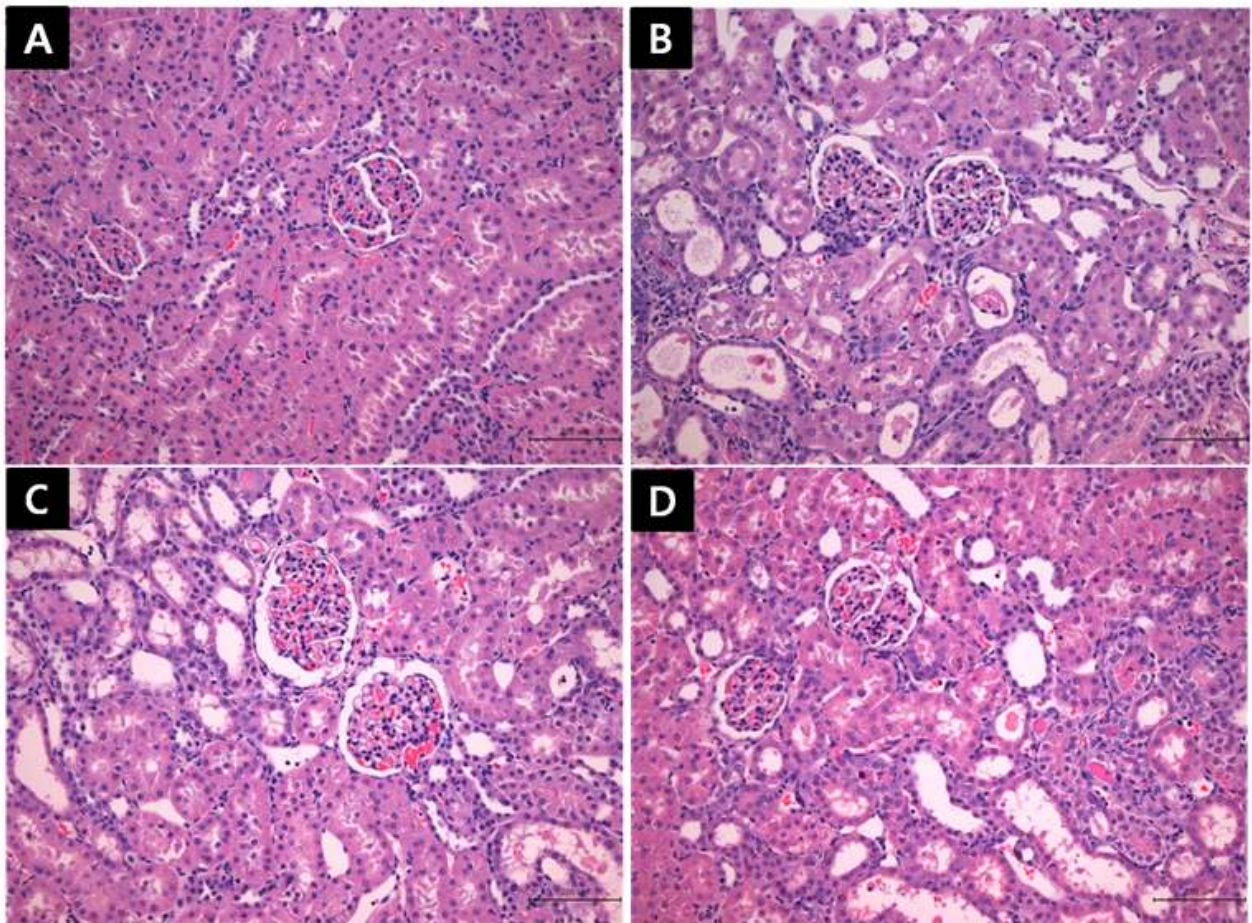


Values are mean  $\pm$ SEM of 8 to 10 rats per group. \* $p < 0.05$  compared to control.

○ 조직학적 변화(그림 8)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. H&E 염색을 하여 조직학적 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 정상 of 사구체, 근위 및 원위세뇨관 형태를 보이나, 신장피질에서 vancomycin group에서는 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, interstitial inflammation, interstitial edema, tubule안에 cast가 보인다. 반면 투여군에서는 vancomycin group에서 보다 완화된 것을 볼 수 있다. (H&E, scale bar: 200  $\mu$ m)

그림 8 신장의 H&E염색 결과



○ scoring

- H&E 한 후 scoring 하여 정량화 하여 나타낸 결과 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, interstitial inflammation, interstitial edema, tubule안에 cast가 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 유의적으로 증가하였으나, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애군에서 tubular dilation, tubular cell desquamation, tubular vacuolation, cast는 감소하는 경향을 보였고, interstitial inflammation, interstitial edema는 유의적으로

감소하였다. 고소애+해마군은 반코마이신군과 비교했을 때 tubular dilation을 제외한 나머지가 감소하는 경향을 보였다

Table 1. 조직병리학적 scoring한 결과

	tubular dilation	tubular cell desquamation	tubular vacuolation	interstitial inflammation	interstitial edema	cast
대조군	0.1±0.06	0.6±0.08	0.2±0.09	0.9±0.08	0.3±0.09	0.1±0.06
반코마이신군	1.7±0.17*	1.8±0.12*	1.5±0.08*	1.8±0.20*	1.7±0.15*	1.4±0.10*
고소애군	1.5±0.15	1.65±0.17	1.35±0.11	1.35±0.13#	1.2±0.17#	1.35±0.11
고소애+해마군	1.8±0.22	1.7±0.08	1.3±0.24	1.4±0.10	1.3±0.24	1.4±0.18

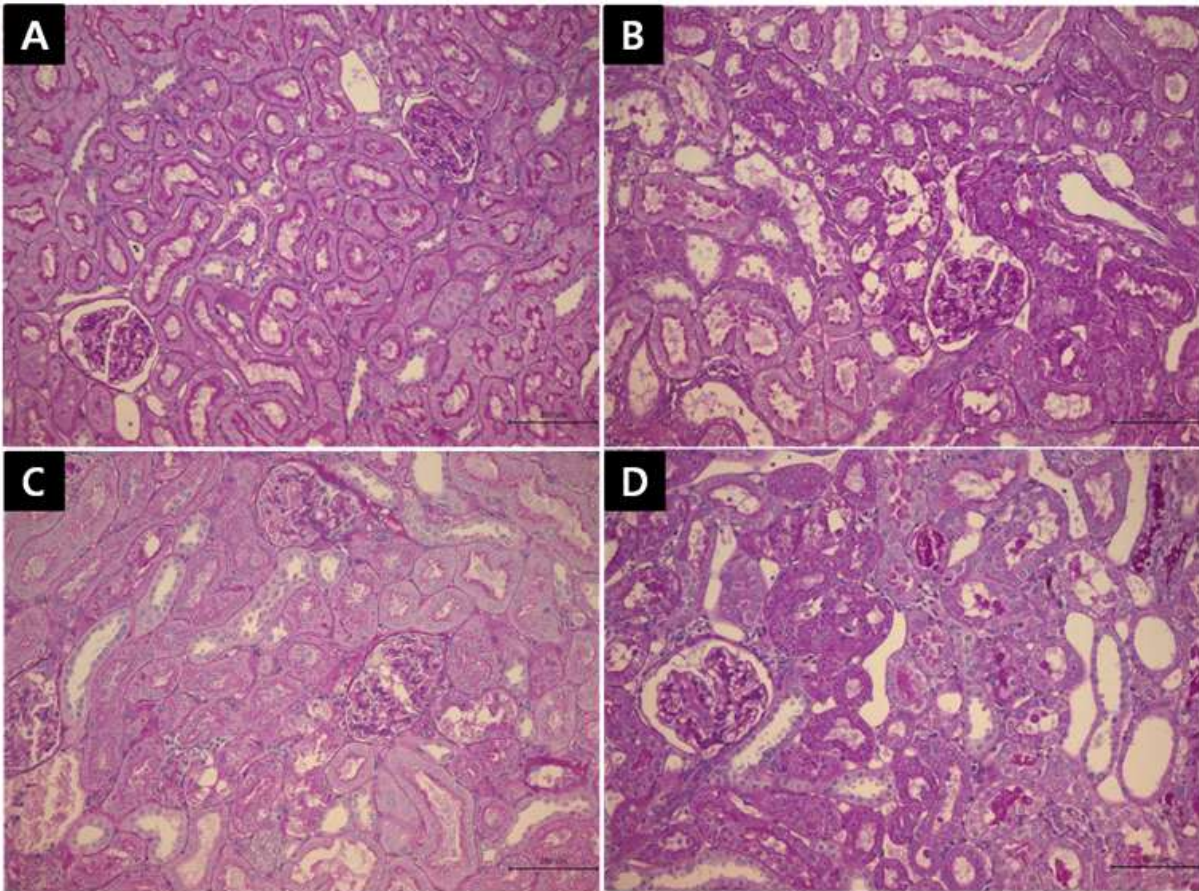
Values are mean ±SEM of 8 to 10 rats per group. \*p<0.05 compared to control group, #p<0.05 compared to vancomycin group.

○ 조직학적 변화(그림 9)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. PAS염색을 하여 조직학적 변화를 관찰한 결과 대조군에서는 기저막과 proximal tubule의 brush border에 진한 PAS 양성을 보인다. 반면 반코마이신군에서는 약해진 기저막의 PAS 양성반응과 proximal tubule의 brush border의 소실로 인해 줄어든 PAS 양성반응을 보인다. 투여군에서는 반코마이신 군 보다 brush border 소실이 덜 일어난 것으로 보인다. (PAS, scale bar: 200 μm)



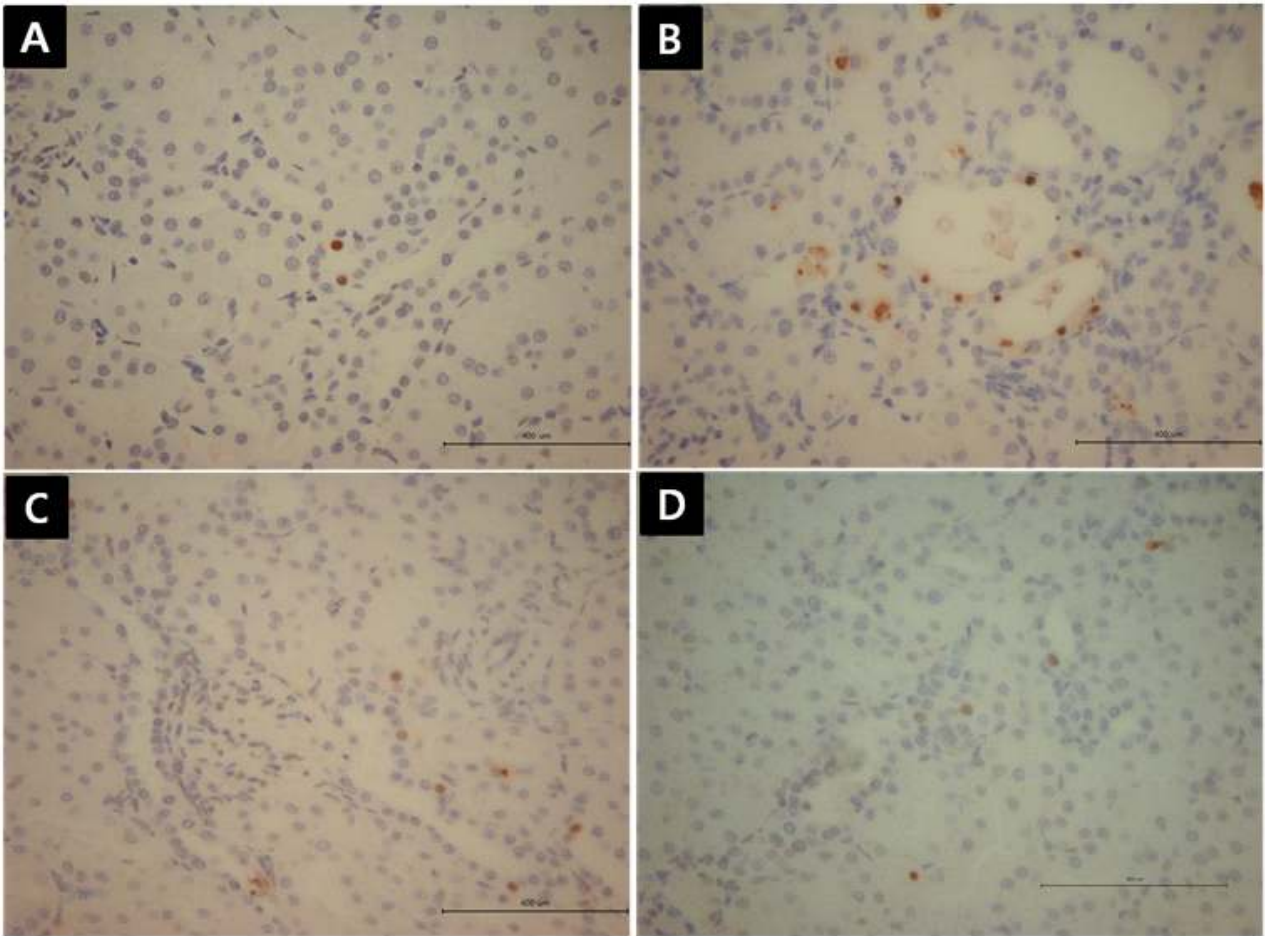
그림 9 신장의 PAS염색 결과



○ 신장의 TUNEL assay 결과(그림 10)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. TUNEL positive cell은 주로 원위세뇨관 핵에 보였고, 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 증가한 것으로 보였고, 반코마이신군과 비교했을 때 투여군에서 감소한 것을 보인다. (TUNEL, scale bar: 400  $\mu$ m)

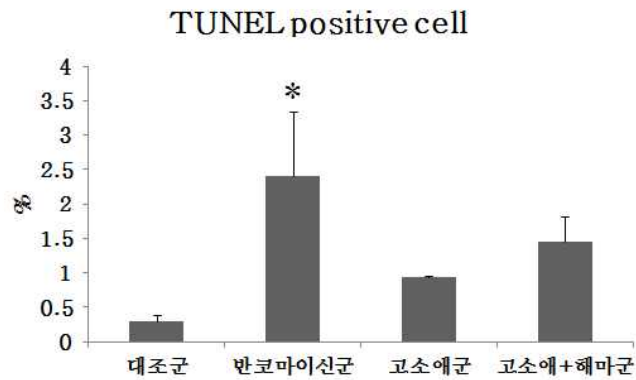
그림 10 신장의 TUNEL assay 결과



○ TUNEL positive cell counting 결과(그림 11)

- 대조군과 비교했을 때 반코마이신 군에서 유의적으로 TUNEL positive cell이 증가하였고, 반코마이신군과 비교했을 때 고소애와 고소애+해마군에서 감소하는 경향을 보였다.

그림 11 TUNEL positive cell counting 결과



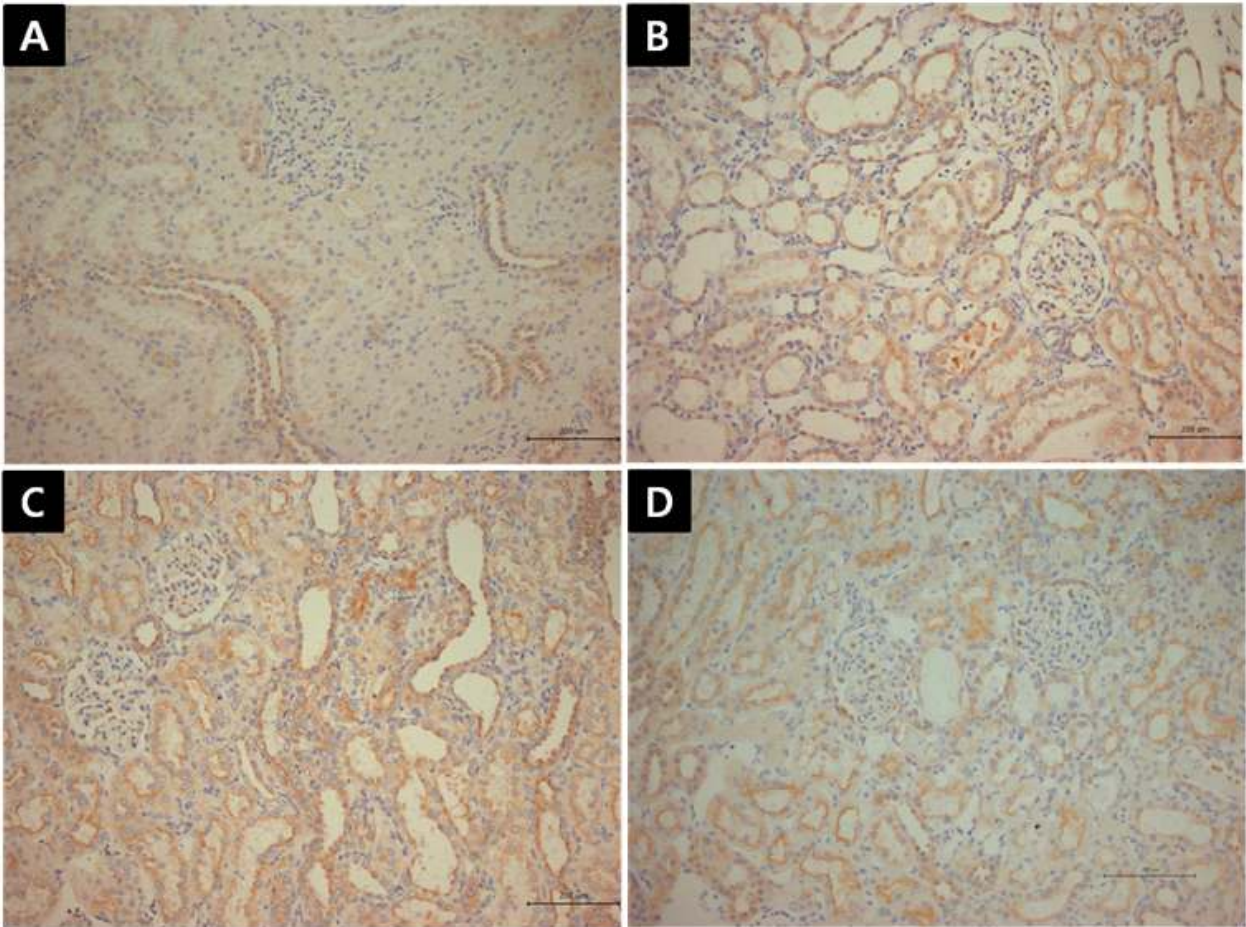
Values are mean ± SEM of 3 rats per group. \* $p < 0.05$  compared to control.

○ 신장 세뇨관 내 TNF- $\alpha$ 의 발현 결과(그림 12)



- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. 대조군보다 반코마이신군에서 근위 세뇨관 내 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가되었고, 반면 투여군에서 반코마이신군보다 발현이 감소된 것을 보인다. 또한 고소애군 보다 고소애+해마군에서 발현이 더 감소된 경향을 보인다. (TNF- $\alpha$ , scale bar: 200  $\mu$ m)

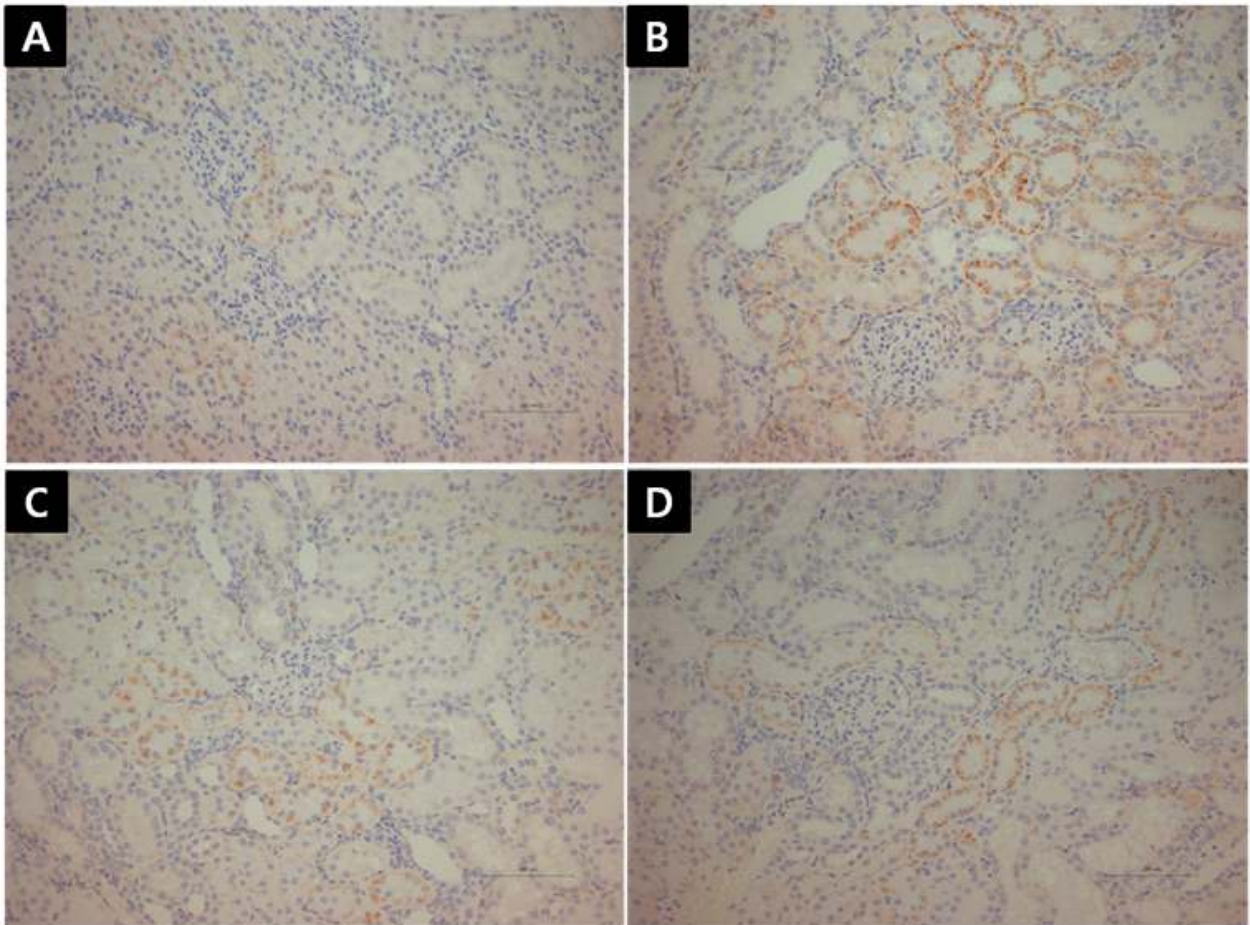
그림 12 신장에서 TNF- $\alpha$ 의 발현 결과



○ 신장 세뇨관 내 NAG의 발현 결과(그림 13)

- A는 대조군, B는 반코마이신군, C는 고소애주정추출물군, D는 고소애+해마주정추출물군이 다. 대조군보다 반코마이신군에서 특히 근위 세뇨관 세포질 내 NAG의 발현이 증가되었고, 반면 투여군에서 반코마이신군보다 발현이 감소된 것을 보인다. (NAG, scale bar: 200  $\mu$ m)

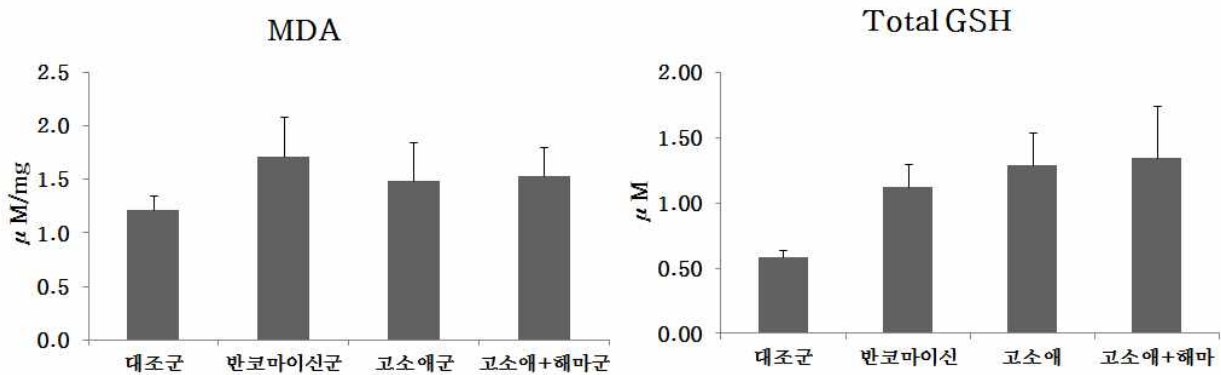
그림 13 신장에서 NAG의 발현 결과



○ 신장조직에서 MDA, Total GSH 결과(그림 14)

- MDA의 경우 대조군과 비교했을 때 반코마이신군에서 증가하는 경향을 보여 vancomycin으로 인한 lipid peroxidation의 증가가 나타난 것을 보인다. 반면 반코마이신군과 비교했을 때 투여군에서 MDA가 감소하는 경향을 보인다. Total glutathione의 경우 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

그림 14 신장조직에서 MDA, Total GSH 결과



## □ 연구결론

- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 신장에 미치는 영향
  - 반코마이신군에 비해, 고소애와 고소애+해마군에서 절대 무게 및 상대무게가 감소하였고, 신기능과 관련된 BUN과 Cr이 고소애와 고소애+해마이 반코마이신군에 비해 유의적으로 감소하여, 고소애와 고소애+해마의 투여가 신장에 보호효과가 있는 것으로 사료되었다.
  
- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 신장의 조직학적 변화에 미치는 영향
  - 고소애와 고소애+해마군이 반코마이신 투여군에 비해, 세뇨관의 변화, 염증, 요원주가 감소되었고, 조직병리학적 점수를 비교한 결과, 유의적으로 좋아진 결과를 보였다. 이러한 변화는 신장무게의 변화와 관련이 있는 것으로 생각되었다.
  
  - 특히, 반코마이신 군에서 보인 기저막의 약한 PAS 양성반응은 proximal tubule의 brush border의 손상과 관련이 있는 것으로 보이며, 고소애와 고소애+해마군의 기저막과 proximal tubule의 brush border에 진한 PAS 양성은 신장에 보호효과를 보이는 것을 나타내며, 이러한 현상이 신장에서의 병변감소와 관련이 있는 것으로 생각되었다.
  
- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 apoptosis에 미치는 영향
  - TUNEL assay 결과, 고소애와 고소애+해마군이 반코마이신군에 비해, TUNEL positive cell이 유의적으로 감소하여, 조직학적으로 관찰된 신장세포의 손상은 광범위한 apoptosis와 관련이 있는 것으로 생각되며, 약물 투여군에서 고소애 및 고소애/해마는 항 apoptosis 기능이 있는 것으로 생각된다.
  
- 고소애 및 고소애/해마 혼합물이 염증인자에 미치는 영향
  - 고소애 및 고소애+해마가 염증에 미치는 영향을 알아보기 위해, 신장조직에서 면역조직화학적으로 TNF- $\alpha$ 의 발현을 조사한 결과, 투여군에서 반코마이신군보다 발현이 감소되었으며, 특히 세뇨관에서의 발현이 감소되었으며, 이는 세뇨관의 손상이 약물투여군에서 감소된 것과 일치한다. 특히, 고소애군보다 고소애+해마군에서 발현이 더 감소된 경향을 보여 고소애 및 해마혼합물 투여군의 경우가 항염증효과가 더 있는 것으로 생각된다.
  
- 신장 세뇨관의 손상 관련 지표에 미치는 영향
  - NAG는 신장세뇨관의 손상과 관련있는 마커로 세뇨관내 NAG의 발현이 투여군이 반코마이신군에 비해서 근위 세뇨관 세포질 내 NAG의 발현이 감소되어, 신장손상이 고소애 및 고소애/해마 투여군에서 감소되어, 약물에 의한 보호효과가 있는 것으로 생각되며, 이런 변화는 조직학적 소견 및 육안적 소견과 일치하였다.
  
- 신장조직의 항산화성 검색
  - MDA는 세포막의 지질화와 관련있는 인자로, 반코마이신군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나, 투여군에서 MDA가 감소하는 경향을 보여 vancomycin에 의한 lipid peroxidation이 억제되어 있음을 알 수 있었다. 그런, total glutathione의 경우 각 군간의 유

의적인 차이를 보이지 않았는데, 이는 반코마이신의 경우, 다른 항생제에서 보이는 항생제에 의한 영향으로 생각되었다.

- 따라서, 고소애 및 고소애/해마 혼합물을 건강한 동물에 전처리한 경우, 반코마이신에 의해 유도되는 신장손상을 예방할 수 있는 것으로 생각되며, 해마혼합물의 경우, 항염증효과가 고소애 단독투여군에 비해 더 있는 것으로 생각된다. 향후 건강기능성 식품원료 개발을 위해 고소애 및 해마 주성분에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

- 고소애에 대한 유효성을 조사한 첫 번째 실험으로 본 실험을 통하여 국내 생산되는 고소애의 건강기능식품으로서의 활용가능성 확인

#### 3-2. 목표 달성여부

- 고부가가치 식·의약 및 신소재로 활용하기 위한 식용곤충 활용 연구를 위한 고소애 함유 제품을 2종 생산 및 동물실험들을 통해 고소애가 갖고 있는 효능 입증

최종성과목표	평가방법	개발내용 및 범위	가중치	달성도(%)
고소애 함유 제품 생산	제품개발건수	고소애 분말, 추출물 및 해마혼합물 개발	30	100
고소애 효능 입증	동물실험 및 효능확인	신장독성 동물 모델 확립 효능 확인을 위한 동물실험 실시 항산화효능 기전 검증	70	100

#### 4. 연구개발성과의 활용 계획 등

○ 제품의 상용화에 따른 건강기능식품의 효과

- 신장질환은 전세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며, 발병자는 더 많을 것으로 예측됨, 신장질환은 치료비용이 높아서 심한 경제부담을 가져다줌, 고소애의 신장기능 개선 효과를 통해 이와 같은 신장질환의 발병을 낮출 수 있고 이에 따라 고소애와 같은 건강기능식품의 사용량이 증가됨
- 음식을 씹거나 삼키기 어려운 경우, 질환 및 수술 등 여러가지 원인으로 식욕이 떨어져 영양 불량이 예상되는 사람들에게 영양 보충을 할 수 있음
- 고소애의 식품화로 인하여 식용곤충 농가와 관련 산업체의 소득 증대에 기여할 수 있음
- 고소애는 단백질과 무기질 등 함량이 높고, 새우와 같은 고소한 맛을 내 전체적으로 음식에 영양과 고소함을 더할 수 있음, 추후 고소애의 성분 및 효능을 연구함으로써 고소애를 건강기능식품으로 제조하는 것 뿐만 아니라, 고소애를 다른 식품에 접목시켜 다양한 용도로 쓰이는 식품을 개발 할 수 있고, 식용곤충이 어린이, 노인, 환자 등 특별한 영양요구량을 가진 사람들의 건강을 증진시킬 수 있음

#### <기대성과>

- 고소애를 건강기능식품으로 제조하는 과정을 거쳐 시각적인 거부감을 줄여주어 연령층과 성별에 상관없이 모두가 섭취 가능함
- 식용곤충이 어린이와 노인, 환자 등 특별한 영양이 요구되는 사람들의 건강 증진에 기여할 것으로 기대됨
- 유엔식량농업기구(FAO)에서 미래에는 식량생산이 인구증가를 따라잡지 못할 것이라는 예측을 하였는데, 고소애는 단백질 함량이 소고기의 10배 이상이고 풍부한 영양성분을 가지고 있어 미래식량의 대체제로서 기대가 됨
- 고소애는 사육기간은 짧은데 반해 대량사육이 가능하며, 유전자 변이 등의 인공변이가 아닌 친환경적이며, 사육 시 물의 소비가 적고, 사육을 위한 면적과 사료비용이 적으며, 사료에 사용되는 곡물소비량이 적어 인간이 가진 즐거움인 미식을 유지할 수 있는 식품으로 기대됨

#### <파급효과>

- 개발 대상 기술·제품의 파급효과

[기술적 측면]

- 인체에 부작용이 따를 수 있는 물질이 아닌 자연물질로 만들었기 때문에 부작용이 적음
- 고소애의 효능에 대한 연구를 통해서 고소애를 이용한 환자식·어린이 간식 등을 개발

[경제적·산업적 측면]

- 축산물을 대체하여 효과적인 단백질 공급원으로 이용함으로써, 전 세계 10억 기아 인구와 영양가가 높은 곤충을 상용화 할 수 있는 장점이 있음
- 축산물의 소비를 축소시켜 축산물로 인한 환경오염을 방지할 수 있음
- 고소애와 같은 건강기능식품을 섭취함으로써 신장질환 등을 미리 예방할 수 있어 인체의 건강증진에 도움이 됨

[사회적 측면]

- 2016년도에 고소애가 일반 식품원료로 인정받음에 따라 곤충식품 시장이 활성화 될 전망
- 고소애 사육 농가의 소득을 올리는 데에도 도움이 될 것으로 기대됨



(별첨) 참고문헌

- Kim SG, Jo YH, Seong JH, Park KB, Noh MY, Cho JH, Ko HJ, Kim CE, Tindwa H, Patnaik BB, Bang IS, Lee YS, Han YS. TmSR-C, scavenger receptor class C, plays a pivotal role in antifungal and antibacterial immunity in the coleopteran insect *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017 Oct;89:31-42. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.08.007. Epub 2017 Sep 1.
- Lee W, Kim MA, Park I, Hwang JS, Na M, Bae JS. Novel direct factor Xa inhibitory compounds from *Tenebrio molitor* with anti-platelet aggregation activity. *Food Chem Toxicol*. 2017 Nov;109(Pt 1):19-27. doi: 10.1016/j.fct.2017.08.026. Epub 2017 Aug 24.
- Seo M, Kim J, Moon SS, Hwang JS, Kim MA. Intraventricular administration of *Tenebrio molitor* larvae extract regulates food intake and body weight in mice with high-fat diet-induced obesity. *Nutr Res*. 2017 Aug;44:18-26. doi: 10.1016/j.nutres.2017.05.011. Epub 2017 May 18.
- Jo YH, Kim YJ, Park KB, Seong JH, Kim SG, Park S, Noh MY, Lee YS, Han YS. TmCactin plays an important role in Gram-negative and -positive bacterial infection by regulating expression of 7 AMP genes in *Tenebrio molitor*. *Sci Rep*. 2017 Apr 18;7:46459. doi: 10.1038/srep46459.
- Seo M, Goo TW, Chung MY, Baek M, Hwang JS, Kim MA, Yun EY. *Tenebrio molitor* Larvae Inhibit Adipogenesis through AMPK and MAPKs Signaling in 3T3-L1 Adipocytes and Obesity in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 28;18(3). pii: E518. doi: 10.3390/ijms18030518.
- Seo GW, Jo YH, Seong JH, Park KB, Patnaik BB, Tindwa H, Kim SA, Lee YS, Kim YJ, Han YS. The Silencing of a 14-3-3 $\epsilon$  Homolog in *Tenebrio molitor* Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. *Genes (Basel)*. 2016 Aug 20;7(8). pii: E53. doi: 10.3390/genes7080053.
- Islam MM, Yang CJ. Efficacy of mealworm and super mealworm larvae probiotics as an alternative to antibiotics challenged orally with *Salmonella* and *E. coli* infection in broiler chicks. *Poult Sci*. 2017 Jan 1;96(1):27-34. Epub 2016 Aug 12.
- Jin XH, Heo PS, Hong JS, Kim NJ, Kim YY. Supplementation of Dried Mealworm (*Tenebrio molitor* larva) on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Blood Profiles in Weaning Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016 Jul;29(7):979-86. doi:



10.5713/ajas.15.0535. Epub 2016 Jun 6.

Han SR, Lee BS, Jung KJ, Yu HJ, Yun EY, Hwang JS, Moon KS. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016 Jun;77:206-12. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.03.006. Epub 2016 Mar 16.

Lee JH, Jo YH, Patnaik BB, Park KB, Tindwa H, Seo GW, Chandrasekar R, Lee YS, Han YS. Cloning, expression analysis, and RNA interference study of a HORMA domain containing autophagy-related gene 13 (ATG13) from the coleopteran beetle, *Tenebrio molitor*. *Front Physiol*. 2015 Jun 17;6:180. doi: 10.3389/fphys.2015.00180. eCollection 2015.

Tindwa H, Jo YH, Patnaik BB, Lee YS, Kang SS, Han YS. Molecular cloning and characterization of autophagy-related gene TmATG8 in *Listeria*-invaded hemocytes of *Tenebrio molitor*. *Dev Comp Immunol*. 2015 Jul;51(1):88-98. doi: 10.1016/j.dci.2015.02.017. Epub 2015 Feb 26.

Lee SJ, Yu JS, Parker BL, Skinner M, Je YH, Kim JS. Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm-pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2015 Jan;42(1):151-6. doi: 10.1007/s10295-014-1551-z. Epub 2014 Nov 28.

Tindwa H, Jo YH, Patnaik BB, Noh MY, Kim DH, Kim I, Han YS, Lee YS, Lee BL, Kim NJ. Depletion of autophagy-related genes ATG3 and ATG5 in *Tenebrio molitor* leads to decreased survivability against an intracellular pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2015 Jan;88(1):85-99. doi: 10.1002/arch.21212. Epub 2014 Nov 17.

Park SJ, Kim SK, So YI, Park HY, Li XH, Yeom DH, Lee MN, Lee BL, Lee JH. Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. *Mol Microbiol*. 2014 Dec;94(6):1298-314. doi: 10.1111/mmi.12830. Epub 2014 Nov 4.

Han SR, Yun EY, Kim JY, Hwang JS, Jeong EJ, Moon KS. Evaluation of Genotoxicity and 28-day Oral Dose Toxicity on Freeze-dried Powder of *Tenebrio molitor* Larvae (Yellow Mealworm). *Toxicol Res*. 2014 Jun;30(2):121-30. doi: 10.5487/TR.2014.30.2.121. Erratum in: *Toxicol Res*. 2016 Apr;32(2):175.

Ullah I, Jang EK, Kim MS, Shin JH, Park GS, Khan AR, Hong SJ, Jung BK, Choi J, Park Y, Kwak Y, Shin JH. Identification and characterization of the insecticidal toxin "makes caterpillars floppy" in *Photorhabdus temperata* M1021 using a cosmid library. *Toxins (Basel)*. 2014 Jul 10;6(7):2024-40. doi: 10.3390/toxins6072024.

Jung J, Heo A, Park YW, Kim YJ, Koh H, Park W. Gut microbiota of *Tenebrio molitor* and their response to environmental change. *J Microbiol Biotechnol.* 2014 Jul;24(7):888-97.

Ha C, Kim SK, Lee MN, Lee JH. Quorum sensing-dependent metalloprotease VvpE is important in the virulence of *Vibrio vulnificus* to invertebrates. *Microb Pathog.* 2014 Jun-Jul;71-72:8-14. doi: 10.1016/j.micpath.2014.04.001. Epub 2014 Apr 21.

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

210mm×297mm[백상지(80g/㎡) 또는 중질지(80g/㎡)]

<첨부3>

최종보고서 관련제출 문서(첨부 제출 양식)

과제정보		문서 제출 내역									
		우편 발송						PDF파일 탑재			
과제명	연구 책임자	최종 보고서 1부	연구 개발 보고서 초록 1부	자체 평가 의견서 1부	연구 결과 활용 계획서 1부	평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서 1부	최종보고서 배포결과보고 1부	최종 보고서	연구 개발 보고서 초록	자체 평가 의견서	연구 결과 활용 계획서
고소애 혼합물을 이용한 신장기능 개선능 평가 및 제품 개발	신재호	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

#### <첨부4>

### 최종보고서 배포결과

대상기관	제출 내역
농림축산식품부 자료실	•최종보고서 책자 1부 •전자파일(PDF) 1점(메일) parkea@korea.kr , 044-201-1260
국가기록원	•최종보고서 책자 3부 •전자파일(PDF) 1점(CD) 031-750-2036
국립중앙도서관	•최종보고서 책자 2부 •전자파일(PDF) 1점(메일) data@nanet.go.kr , 02-788-4257
국회도서관	•최종보고서 책자 1부 •전자파일(PDF) 1점(메일) parkea@korea.kr , 044-201-1260
기타 기관(연구책임자 제량)	• 최종보고서 00부

\* 증빙자료(등기 영수증 사본) 별도첨부

\* 정확한 배포 내역은 발간등록번호와 함께 연구책임자 이메일로 안내

## <참고> 농식품 R&D 사업 기술료 감면 및 지식재산권 관련 규정

### □ 농림수산물식품과학기술육성법 시행령 (대통령령)

**제14조(기술료의 감면)** ① 농림축산식품부장관 또는 해양수산부장관은 법 제7조제1항 단서에 따라 다음 각 호와 같이 기술료를 감면한다. <개정 2013.3.23>

1. 「농어업·농어촌 및 식품산업 기본법」 제3조제4호에 따른 생산자단체: 100퍼센트
  2. 「농어업경영체 육성 및 지원에 관한 법률」 제2조제7호에 따른 농어업경영체: 100퍼센트
  3. 「중소기업기본법」 제2조에 따른 중소기업: 70퍼센트(해당 연구과제에 참여한 기업의 경우 80퍼센트)
  4. 「대·중소기업 상생협력 촉진에 관한 법률」 제2조제2호에 따른 대기업: 30퍼센트(해당 연구과제에 참여한 기업만 해당한다)
- ② 농림축산식품부장관 또는 해양수산부장관은 기술료의 최초 납부시점으로부터 1년 이내에 기술료 전부를 일시납부하는 경우에는 기술료의 30퍼센트를 추가 감면할 수 있다. <개정 2013.3.23>

### □ 농림축산식품 연구개발사업 운영규정 (농림축산식품부 훈령)

**제34조(연구개발결과의 활용촉진)** ① 연구개발결과물 소유기관의 장 또는 전문기관의 장은 연구개발결과가 널리 활용될 수 있도록 출원 중인 지식재산권을 포함한 연구개발결과물을 대상으로 기술실시계약을 체결하는 등 연구개발결과를 활용하는 데에 필요한 조치를 하여야 한다. 이 경우 계약체결 대상자로는 국내에 있는 자로서 기술 실시 능력이 있는 자를 우선적으로 고려하여야 한다.

② 연구개발결과물 소유기관의 장은 제1항에 따른 특허출원 중인 연구개발결과물을 특허등록 후 기술사용기간 내에 실시기간 연장을 전문기관의 장에게 요청하는 경우 전문기관의 장은 지식재산권 존속기간까지 연장할 수 있다.

③ 참여기업이 있는 경우 연구개발결과물에 대해서는 참여기업이 실시하는 것을 원칙으로 하며, 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 경우에는 참여기업 외의 자가 실시할 수 있다.

1. 연구개발결과물을 일반에 공개하여 활용할 목적으로 수행하는 연구개발과제의 경우
2. 참여기업 외의 자가 실시를 원하는 경우로서 해당 연구개발결과물을 공동 소유한 참여기업이 동의한 경우
3. 다음 각 목의 어느 하나에 해당하는 경우로서 참여기업이 정당한 사유가 있음을 소명하지 못한 경우
  - 가. 연구개발과제의 종료 후 1년 이내에 참여기업이 실시계약을 체결하지 아니한 경우
  - 나. 참여기업이 약정한 기술료를 1년 이상 납부하지 아니한 경우
  - 다. 참여기업이 기술실시계약을 체결한 후 연구개발결과를 활용하는 사업을 정당한 사유 없이 1년 이내에 시작하지 아니하거나 그 사업을 1년 이상 쉬는 경우
  - 라. 참여기업이 기술료 감면 승인을 받은 후 특별한 사유 없이 1년 이내에 기술실시계약을 체결하지 않은 경우
4. 그 밖에 장관이 참여기업 외의 자가 실시할 필요가 있다고 인정하는 경우

**제35조(기술료의 징수)** ③ 장관이 연구개발결과물 소유기관의 장으로부터 기술료를 징수하는 경우는 다음 각 호의 경우에 한하며 정액기술료의 형태로 징수함을 원칙으로 한다. 다만, 장관이 별도로 정하는 경우 정부출연금의 범위에서 경상기술료의 형태로 징수할 수 있다.

1. 영리법인이 제1항에 따라 징수하는 경우
2. 연구개발결과물 소유기관의 장이 영리법인으로서 연구개발결과물을 직접 실시하는 경우

④ 정액기술료는 원칙적으로 다음 각 호의 금액에 따른다.

1. 중소기업: 정부출연금의 10퍼센트
2. 중견기업(「산업발전법」 제10조의2제1항에 따른 기업을 말한다): 정부출연금의 30퍼센트
3. 대기업(「독점규제 및 공정거래에 관한 법률」 제14조제1항에 따른 상호출자제한기업집단에 속하는 기업을 말한다): 정부출연금의 40퍼센트