

117022-  
2

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

## 창업벤처지원 R&D 바우처 사업 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-002590-01

뚝은감을 활용한 비만예방·항노화 고령친화형

기능성소재 및 고부가가치 패키지제품개발

최종보고서

2018

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

# 뚝은감을 활용한 비만예방·항노화 고령친화형 기능성소재 및 고부가가치 패키지제품 개발화 최종보고서

2018. 12. 31.

주관연구기관 / 태연  
협동연구기관 / 경북대학교 산학협력단

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

“뚝은감을 활용한 비만예방·항노화 고령친화형 기능성소재 및 고부가가치 패키지제품 개발화” (개발기간 : 2017. 04. 21 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 12. 31.

주관연구기관명 : 태연 (대표자) 노성수 (인)  
협동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 임기병 (인)

주관연구책임자 : 노성수  
협동연구책임자 : 이만휘

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	117022-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21-20 18.12.31	단 계 구 분	(1단계)/ (1단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발			
	사 업 명	창업벤처지원 R&D 바우처 사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	뽕은감을 활용한 비만예방·항노화 고령친화형 기능성소재 및 고부가가치 패키지제품 개발화			
연구책임자	노성수	해당단계 참여연구원 수	총: 10명 내부: 7명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 66,680천원 계: 266,680천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 10명 내부: 7명 외부: 3명	총 연구개발 비	정부: 200,000천원 민간: 66,680천원 계: 266,680천원
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 산학협력단			참여기업명	태연
국제공동연구					
위탁연구					

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당사항 없음
-------------------------	---------

### 9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

### <요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 연구의 목적: 뽕은감을 활용한 비만예방 (체지방 다이어트) 및 개선·항노화 고령친화형 고부가가치 기능성제품 생산을 산업화함으로써 감 생산 능가 및 국내경제 활성화에 중추적 핵심 역할을 하고자 함.</li> <li>▶ 연구 내용           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 뽕은감 기능성 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상주동시 뽕은감 원료 확보</li> <li>- 항산화, 항비만 및 항당뇨 실험으로 기초 기능성 평가</li> </ul> </li> <li>◆ 뽕은감 함유 고기능성 제품 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 체지방 조절 뽕은감 유래 기능성 물질 대량 생산 공정 개발</li> <li>- 시제품의 안정성 평가</li> <li>- 마케팅 전략 수립 및 시장조사</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 비만예방 및 개선 효과가 있는 뽕은감 소재 탐색           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 생체 모델계를 이용한 비만예방 및 개선의 뽕은감 소재 탐색 및 효능 확인</li> </ul> </li> <li>▶ 활성성분 분석 및 대량추출기술 개발           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 기능성 소재 최적 반응 조건, 분리 정제, 열처리 가공식품 등 제조공정 확립</li> <li>◆ 지표성분의 지표물질 설정 및 분석방법 확립, 분석표준법 확립</li> </ul> </li> <li>▶ 항비만-체지방 다이어트 제품개발 및 상용 상품화 개발           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 발굴소재를 이용한 가공 기능성 식품의 개발</li> <li>◆ 시제품 및 완제품의 소비자 기호도 조사, 관능평가, 국내외 시장 및 고객만족도 조사</li> </ul> </li> <li>▶ 학술대회 발표 3건, 논문게재 1건, 특허 출원1건/등록2건, 시제품 개발 4건 및 300만원 원료소재 매출발생</li> </ul>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 기술적 측면           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 우리 농산물 자원인 뽕은감으로부터 생산 및 특성규명 기술을 통하여 항비만 기능성 원료 대량 생산 기술력 확보 및 보급화 실현.</li> <li>◆ 뽕은감 유래 바이오신소재 발굴 기술은 우리 농산물 활용한 제품화 기술개발과 제조공정 확립으로 다양한 산업기술에 적용이 가능함.</li> </ul> </li> <li>▶ 경제적·산업적 측면           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 기존의 뽕은감을 이용한 식품과는 보다 과학적이고 체계적인 연구결과를 이용한 고부가가치 기능성소재 개발을 통하여 웰빙 산업의 활성화가 가능함.</li> <li>◆ 신소재를 활용한 기능성분포, 특성 및 효능검증 부분에 있어서는 국내·외적으로 기술이 부족한 실정이기 때문에, 이를 활용한 제품개발과 경쟁력 있는 연구개발 및 관련 산업의 활성화에 기여함.</li> </ul> </li> <li>▶ 사회적·문화적 측면           <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 국민 복지를 위한 비만 예방 및 피부미용 개선 기술개발로 농가 일자리 창출 강화</li> </ul> </li> </ul>

	에 기여함. • 항비만 및 피부미용 생리 활성 검색 및 응용기술의 국내외적 권리 확보 및 영농 단체, 산업계 등의 기술적 지원 및 기술이전 실시.				
국문핵심어 (5개 이내)	기능성 소재	뽕은감	췌장리파아제	항비만	체지방조절
영문핵심어 (5개 이내)	Functional materials	Persimmon	Pancreatic lipase	Antiobesity	Fat adjustment

# 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
1-1. 연구개발 목적	
1-2. 연구개발의 필요성	
1-3. 연구개발 범위	
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	4
2-1. 뚝은감의 서지학적 연구	
2-2. 뚝은감의 일반성분 함량 분석	
2-3. 시료 제조	
2-4. 품종별 뚝은감 <i>in vitro</i> 기능성 평가	
2-5. 뚝은감 추출물 분획	
2-6. 뚝은감 분획층 <i>in vitro</i> 체지방 기능성 평가	
2-7. 고지방식이 유도 비만 동물에 대한 뚝은감 추출물 항비만 기능성 평가	
2-8. 대량생산 공정 확립	
2-9. 화학성분 분석	
2-10. 활성성분의 분리 기술 개발	
2-11. 뚝은감 유래 체지방감소 물질의 <i>in vivo</i> 기능성 평가	
2-12. 뚝은감을 함유한 시제품 개발	
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	93
3-1. 목표	
3-2. 목표 달성여부	
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	95
붙임. 참고 문헌 .....	96

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

	코드번호	B-04-01
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 우리나라 농산물인 뽕은 감을 활용하여 비만으로 인한 성인병질환 예방과 삶의 질 향상을 위한 과학적인 기능성 메커니즘을 규명하고자 함.</li> <li>○ 뽕은 감 원료물질 함유 고부가가치 패키지 제품을 개발하여 최근 시대적 추이에 발맞추어서 비만예방 및 삶의질 향상의 니즈 필요성에 부합하고자 함.</li> <li>○ 최종적으로 비만예방 (체지방 다이어트) 및 개선의 고부가가치 기능성제품 생산을 산업화함으로써 감 생산 농가 및 국내경제 활성화에 중추적 핵심 역할을 하고자 함.</li> </ul>		

### 연구개발 대상 및 기술·제품의개요

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구개발 개요 : 뽕은감을 활용한 체지방 개선, 항노화 고령친화형 기능성소재 및 고부가가치 제품으로 개발함</li> <li>○ 핵심기술               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 영양성분분석 : 5대 영양성분 및 구성비를 공인기관에 의뢰하여 항비만에 대한 효능 예측.</li> <li>• 기능성 소재 성분분석 : 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정. 뽕은감 지표 성분 분리 및 분석.</li> <li>• 대량생산 공정 확립 ; 뽕은감 최적의 추출 공정을 연구. 뽕은감 유래 GMP 추출물 대량 생산 공정 연구.</li> <li>• 비만예방 및 개선효과 측정 ; <i>In vitro</i> pancreatic lipase 억제능 측정. 3T3-L1 지방세포를 통해 지질대사 관여 단백질 관련 유전자 발현도 측정. L6 근육세포의 당 대사 관련 단백질 발현도 측정. 45% 고지방식이 및 60% 고지방식으로 유도된 동물 모델을 이용하여 항비만 기능성 평가.</li> <li>• 기능성을 함유한 제품개발 ; 최종적으로 검증된 기능성과 관능 및 선호도 평가를 절충하여 최종 제품 개발</li> </ul> </li> </ul>	
--	--

## 1-2. 연구개발의 필요성

	코드번호	B-04-03
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현대사회는 업무환경의 변화로 인한 운동부족 및 식생활의 서구화로 인하여 비만, 당뇨 및 혈액 순환 장애 등과 같은 대사성 질환 (metabolic disease)의 발병률이 급속히 증가하고 있음.</li> </ul>		

- 비만은 이미 WHO에서 질환으로서 흡연에 이어 조기 사망의 두 번째 원인으로 인정하고, 당뇨 발병의 필연성을 규정하여 비만치료를 위한 권고를 제시하고 있음.
- 특히 비만은 대사질환의 대표적인 질환으로 사회적, 경제적 비용이 상당한 부분을 차지하는 중요한 질환이며, 국가 차원에서 관리 예방하려는 추세에 있음.
- 비만의 약물 치료를 위해 매년 항비만 제제들이 개발되고 있지만, 현재 사용 가능한 비만 치료 약물은 많지 않으며, 대부분 소화나 식욕을 억제 시키는 제제에 국한되어 있음.
- 대사성 질환 타겟 분자인 AMPK의 활성화와 체중증가 억제를 위한 지방흡수 저해 효능 소재인 뽕은감 탄닌 및 기능성 성분의 분자 메커니즘과 생리활성 기능이 과학적으로 입증된 우수한 효능의 새로운 식품소재 개발이 가능하며, 비만, 당뇨, 인슐린 저항성, 관절염 등 대사성 질환 치료 약품의 개발에도 응용될 수 있음.
- 뽕은감은 전 세계의 임야에서 널리 자생하기 때문에 저비용으로 손쉽게 원료를 확보할 수 있다는 장점과 비교적 많은 약리적 효능이 있어, 오늘날 부가가치와 응용가치가 매우 좋은 식품 소재가 될 수 있음.
- 국내 우리농산물 자원 중 뽕은맛을 일으키는 탄닌은 제거되어야 하는 무효성분으로 인식되어 탈삼을 통한 가공식품 연구에 치우쳐 있을 뿐만 아니라, 과학적으로 인정된 약리 효능을 위해 영세한 제조사에서 생산한 식품만이 제조 유통되고 있을 뿐, 이를 활용한 고부가가치 식품화 연구가 이루어지지 않고 있음.
- 뽕은감 추출물의 생화학적 효능 평가 및 생리활성 물질의 분리·정제 기술 확립을 통해 대량 생산 공정을 구축하며, 뽕은감 탄닌 및 추출물에서 성분 분리를 통한 소재 개발.
- 뽕은감 탄닌 및 비만예방(체지방 감소) 및 항노화(주름개선,미백 등) 기능성 생리활성 물질에 대한 *in vitro*, *in vivo* 약리효능 및 기작 규명하며, 뽕은감 탄닌 및 체지방 감소, 항노화의 기능성 지표 활성물질함량 분석 및 원료물질 표준화 연구를 수행.
- 뽕은감 탄닌 및 체지방 감소, 항노화의 기능성 지표 활성물질함량 분석 및 원료물질 표준화 연구를 수행하여, 뽕은감 탄닌(체지방 감소) 및 항노화(주름개선,미백 등) 기능성 물질 함유 제품의 기호성 및 효능검증 확보 및 인체적용시험을 통해 향후 식약처 기능성 원료 등록 신청을 하는데, 기초자료로 삼고자 함.

### 1-3. 연구개발 범위

	코드번호	B-05-02
<p>가. 1차년도</p> <p>① 개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관기관(태연) : 뽕은감 제품 개발화 및 산업화 연구</li> <li>- 참여기관 1 (경북대학교 산학협력단) : 뽕은감 <i>in vivo</i> &amp; <i>in vitro</i> 활성성분의 효능규명 및 작용기전</li> <li>- 참여기관2 (서원대학교 산학협력단) : 뽕은감 생리이화학적 활성평가 및 시제품안전성 평가</li> </ul> <p>② 개발 내용 및 범위</p>		



- 주관기관 (태연) :

- ◆ 원료 추출물의 대량 제조, 활성 분획물 제조
- ◆ 가공적성기술 표준화
- ◆ 제조공정 및 품질관리 표준화
- ◆ 소비자 기호도 조사
- ◆ 제품제형 연구, 부형제 및 포장
- ◆ 방식 등 선정
- ◆ 제품 디자인 연구
- ◆ 제품 산업화 활성화 및 유통망

- 참여기관 1 (경북대학교 산학협력단)

- ◆ 지방세포에 대한 독성 평가
- ◆ *In vitro* 효능 기능성 평가
- ◆ *In vivo* 효능 기능성 평가
- ◆ 결과물 지적재산, 특허, 논문 등 작성 및 등록게재
- ◆ 산학협력 기술이전

- 참여기관 2 (서원대학교 산학협력단)

- ◆ 활성성분의 지표물질 설정 및 분석방법 확립
- ◆ 생리이화적 영양분석 평가
- ◆ 시제품 안정성 평가
- ◆ 결과물 지적재산, 특허, 논문 등 작성 및 등록게재
- ◆ 산학협력 기술이전

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 뚱은감의 서지학적 연구

#### 가. 뚱은감 항비만 연구

- ▶ 탄닌성분이 많은 섬유질을 가진 감과실이 혈중 콜레스테롤 저하에 미치는 영향



▶ 뚝배기 식이가 콜레스테롤을 포함한 고지방식이 흰쥐에서 지질 대사에 미치는 효능 연구

**Nutrient Requirements and Interactions**

**Dietary Persimmon Improves Lipid Metabolism in Rats Fed Diets Containing Cholesterol<sup>1</sup>**

Shela Gorinstein,<sup>2</sup> Elzbieta Bartnikowska,\* Gustaw Kulasek,<sup>1</sup> Marina Zenser and Simon Trahtenberg\*\*

Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel; <sup>2</sup>Department of Diets, Faculty of Human Nutrition, Warsaw Agricultural University, Warsaw, 02-787 Poland; <sup>1</sup>Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University, Warsaw, 02-787 Poland; and <sup>\*\*</sup>Institute of Cardiology, Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel

**TABLE 1**

Composition of the diets

Ingredients	Control <sup>1</sup>	Chol <sup>1</sup>	Pers	Chol/Pers
g/kg diet				
Casein	180	180	180	180
Soybean oil	60	60	60	60
Wheat starch	660	660	620	610
Dry persimmon <sup>2</sup>	0	0	70	0
Cholesterol <sup>3</sup>	0	10	0	10
Vitamin mixture <sup>4</sup>	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>5</sup>	60	60	60	60
Total fiber	—	—	77.2	77.2
Soluble fiber	—	—	22.1	22.1
Insoluble fiber	—	—	55.1	55.1

<sup>1</sup> Control and cholesterol diets were fiber free.  
<sup>2</sup> Dry persimmon was prepared and supplied by the Department of Pharmaceutical Chemistry (see Materials and Methods).  
<sup>3</sup> Sigma Chemical (St. Louis, MO).  
<sup>4</sup> Vitamins (per kg of diet): thiamin, 20 mg; riboflavin, 15 mg; pyridoxin, 10 mg; nicotinamide, 100 mg; calcium pantothenate, 70 mg; folic acid, 5 mg; biotin, 0.3 mg; cyanocobalamin, 0.05 mg; retinyl palmitate, 1.5 mg; d- $\alpha$ -tocopheryl acetate, 125 mg; cholecalciferol, 0.15 mg; menadione, 1.5 mg; ascorbic acid, 50 mg; myo-inositol, 100 mg; omer wheat starch; 1.36 g.  
<sup>5</sup> Minerals (per kg of diet): CaHPO<sub>4</sub>, 15 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 g; KCl, 5 g; NaCl, 5 g; MgCl<sub>2</sub>, 2.5 g; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2.5 mg; MnSO<sub>4</sub>, 125 mg; CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 mg; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 100 mg; KIO<sub>3</sub>, 0.4 mg.

**TABLE 2**

Plasma lipids and total cholesterol concentration in liver of rats fed diets with and without 7% cholesterol (Chol) and with and without 7% persimmon (Pers)<sup>1,2</sup>

Diet	Plasma lipids						Liver
	TC	LDL-C	HDL-C	TG	TPH	HDL-PH	TC
							$\mu\text{mol/L}$
Control	2.85 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.08	0.69 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.15 <sup>c</sup>
Pers <sup>1</sup>	2.73 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.06	0.67 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.70 ± 0.14 <sup>c</sup>
Chol	4.88 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.27 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.58 ± 0.09	0.89 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.73 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>b</sup>	49.9 ± 0.31 <sup>b</sup>
Chol/Pers	3.88 ± 0.19 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.62 ± 0.08	0.72 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.06 <sup>b</sup>	32.8 ± 0.49 <sup>b</sup>
ANOVA (P-value)							
Pers	0.01	0.01	NS	0.01	0.01	0.01	0.01
Chol	<0.001	<0.001	NS	<0.001	0.01	<0.001	<0.001
Pers > Chol	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, n = 10.  
<sup>2</sup> Means without letters in common differ significantly (P < 0.05).  
<sup>3</sup> Abbreviations used: Chol, nonoxidized cholesterol; HDL-C, HDL cholesterol; HDL-PH, HDL phospholipids; LDL-C, LDL cholesterol; NS, not significant (P > 0.05); TG, total triglyceride; TPH, total phospholipids.

▶ 어린 뽕은감 과실이 C57BL/6-ApoE knockout Mice에 미치는 지질 저하 효능 연구

*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (10), 2651-2659, 2008

## Hypolipidemic Effect of Young Persimmon Fruit in C57BL/6.KOR-ApoE<sup>shl</sup> Mice

Kenji MATSUMOTO,<sup>1,†</sup> Shin-ichiro YOKOYAMA,<sup>1</sup> and Nobuki GATO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Applied Microbiology, Gifu Prefectural Research Institute for Bioengineering, 3481-2 Kamihachiya, Hachiya, Minokamo, Gifu 505-0004, Japan*

<sup>2</sup>*Nakano BC Co., Ltd., 758-45 Fujishiro, Kainan, Wakayama 642-0034, Japan*

Received May 7, 2008; Accepted June 19, 2008; Online Publication, October 7, 2008  
[doi:10.1271/bbb.80319]

**Table 1.** Nutritional Data for the YP and Experimental Diets Used in This Study

Constituents	YP	CE-2	CE-2 plus YP5%
Protein (%)	3.9	24.9	23.9
Fat (%)	0.6	4.6	4.4
NFE* (%)	34.6	51.4	50.6
Fiber (%)	51.4	3.7	6.1
Ash (%)	2.9	6.7	6.5
Moisture (%)	6.6	8.6	8.5
Energy (kcal/100g)	262.2	354.0	349.4

\*NFE, nitrogen-free extract (carbohydrates and others)

어린 뽕은 감의 성분 분석결과, 칼로리가 262.2 Kcal/100 g으로 나타났으며, 식이 섬유는 51.4 %로 성숙한 뽕은감에 비해 2.2배 이상 함량이 높음.

**Table 3.** Comparison of Various Physiological Parameters in the CR, SHL-C, and SHL-YP Groups

	CR	SHL-C	SHL-YP
Number	Five	Five	Five
Body weight (g)	32.4 ± 2.5	30.9 ± 1.8	30.4 ± 2.2
Body weight gain (g)	10.4 ± 1.5	8.2 ± 1.6	7.6 ± 1.8
Total energy intake (kcal)	865.5 ± 29.7	974.7 ± 72.2 <sup>b</sup>	955.2 ± 40.5 <sup>a</sup>
Liver weight (g)	1.22 ± 0.11	1.29 ± 0.15	1.10 ± 0.11
Liver weight/body weight	0.038 ± 0.001	0.042 ± 0.004	0.036 ± 0.004 <sup>d</sup>
Kidney weight (g)	0.40 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.48 ± 0.06
Kidney weight/body weight	0.012 ± 0.000	0.015 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.016 ± 0.001 <sup>c</sup>
EWAT weight (g)	0.96 ± 0.21	0.36 ± 0.15 <sup>e</sup>	0.30 ± 0.13 <sup>e</sup>
EWAT weight/body weight	0.029 ± 0.004	0.012 ± 0.005 <sup>e</sup>	0.010 ± 0.004 <sup>e</sup>
Liver cholesterol content (mg/g)	2.85 ± 0.13	4.98 ± 0.52 <sup>a</sup>	5.37 ± 0.58 <sup>a</sup>
Liver triglyceride content (mg/g)	61.95 ± 8.3	102.73 ± 19.78 <sup>b</sup>	132.47 ± 20.96 <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, <sup>c</sup>P < 0.001 vs. CR, <sup>d</sup>P < 0.05 vs. SHL-C

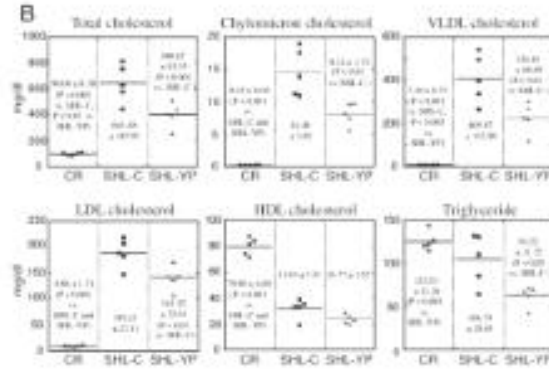


Fig. 5. Quantitative Analysis of Plasma Cholesterol and Triglyceride. Lipoprotein profiles of plasma cholesterol by HPLC analysis (A). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). Respective cholesterol and plasma triglyceride values (B). Means are shown as bars (n = 5). The value of mean  $\pm$  SD and statistic results (Tukey-Kramer test) are shown in each column.

혈중 킬로미크론 함량 분석 결과, 킬로미크론 중성지방은 식이 지방은 소장에서 흡수된 후 소장세포에서 지단백질인 킬로미크론을 형성하여 혈장으로 분비됨. 킬로미크론은 지방이 소장에서 흡수된 후 대사나 저장을 위해 신체의 다른 부분으로 운반되는 대사 경로에서 중요한 운반 기능을 담당. 따라서 킬로미크론 수준이 저하되면 섭취한 지방의 흡수가 감소되었다고 볼 수 있음. 림프액 또는 혈액에서 측정 가능한 것으로 고지방식이 대조군에 비해 어린 뽕은감 식이실험군에서 유의성 있는 감소량을 볼 수 있음. 이는 소화관내 지방 흡수 억제를 통해 혈중 킬로미크로 함량이 저하된 것으로 판단됨.

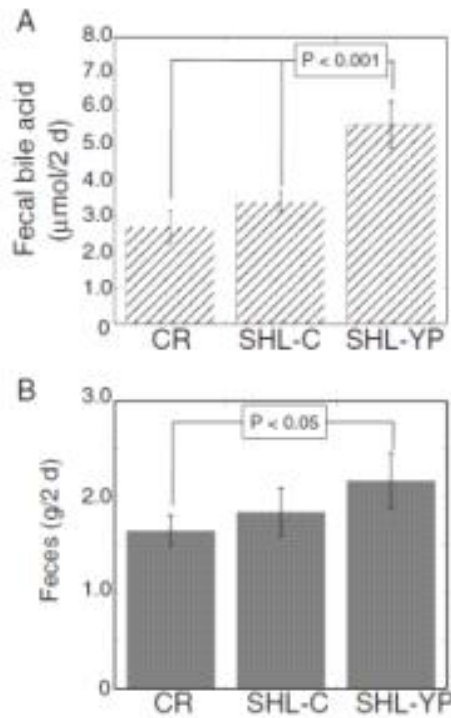


Fig. 5. The Effects of Young Persimmon Fruit on Fecal Bile Acid Excretion (A) and the Amount of Feces (B) at 9 Weeks after Treatment.

The results represent the mean  $\pm$  SD. Statistic data (Tukey-Kramer test) are shown in each graph.

뿔은감 과다 복용 시 변비 유발에 대한 부작용을 많은 사람들이 인식하고 있어, 과다 복용에 대한 거부감이 매우 큼. 그러나 위 연구결과에 의하면 어린 감을 9주간 식이로 먹인 생쥐의 경우 먹이지 않은 정상 생쥐에 비해 오히려 분변량이 증가됨. 또한 분변 내 담즙 산의 흡수를 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였음. 이는 담즙 산 재흡수 억제를 통해 간장에서 담즙 산 생산을 위해 콜레스테롤을 소비하는 것을 촉진하게 하여 혈청 내 지질 바이오마커의 개선효능으로 이어짐.

선행연구 결과로, 성숙한 감은 고지방식이로 유도된 비만 생쥐 모델에서 지질 대사를 향상시키지 않았음. 그러나 반대로 어린 감은 매우 많은 양의 탄닌성분 (어린 감: 14.7%, 성숙 감: 3.2% w/w)을 함유하고 있고, 식이 섬유가 효과가 없는 성숙감에 비해 많이 함유되어 있음. (어린 감: 44.9%, 성숙 감: 20.2% w/w). 이는 어린 감의 탄닌과 식이 섬유가 각각 고지혈증을 개선시키는데 시너지 효과 및 부가 효과가 있다고 판단됨.

▶ 감이 고지방 식이로 유발한 고지혈증 흰쥐에 대한 혈중 지질 개선 효능과 주스 및 넥타 제품 생산화 연구

### Hypolipidemic Effect of Persimmon in Rats Fed High Fat Diet and its Use in Juice and Nectar Preparation

Hanan, M.A. Al-Sayed, Ashoush, I.S. & Salwa, M. Abu-El-Fetoh  
Food Science Dept., Fac. of Agric., Ain Shams Univ., Cairo, Egypt

Table 2. Effect of experimental diets on body weight gain and relative weight of organs in rats fed on high fat diets.

Parameters	NC <sup>a</sup>	HF <sup>b</sup>	HF-Pers <sup>c</sup>
Initial weight (g)	120.90±1.78*	120.17±1.75*	120.90±1.87*
Average weight gain (g/day)	1.07±0.149*	0.81±0.143*	1.17±0.149*
Relative weight of organs (g/100 g BW)			
Liver	4.20±0.17*	5.77±0.15*	4.18±0.12*
Spleen	1.81±0.13*	1.04±0.11*	1.67±0.12*

<sup>a</sup> Normal control diet

<sup>b</sup> High fat diet

<sup>c</sup> High fat with whole dried persimmon diet

Means having different letters (superscript) in the same row are significantly different (P < 0.05).

Table 3. Effect of experimental diets on plasma lipid profiles in rats fed on high fat diets.

Parameters	NC <sup>a</sup>	HF <sup>b</sup>	HF-Pers <sup>c</sup>
Triglyceride (mmol/L)	1.07±0.07*	1.07±0.09*	1.10±0.07*
Total cholesterol (mmol/L)	2.02±0.19*	4.78±0.17*	1.35±0.11*
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.00±0.02*	1.23±0.04*	1.26±0.04*
LDL-cholesterol (mmol/L)	1.00±0.03*	3.55±0.04*	1.20±0.04*
Total cholesterol / HDL-cholesterol ratio	1.01±0.04*	3.22±0.17*	1.00±0.04*
Atherogenic index <sup>d</sup>	0.07±0.01*	2.26±0.02*	1.28±0.01*

<sup>a</sup> Normal control diet

<sup>b</sup> High fat diet

<sup>c</sup> High fat with whole dried persimmon diet

<sup>d</sup> Atherogenic index = (Total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol

Means having different letters (superscript) in the same row are significantly different (P < 0.05).

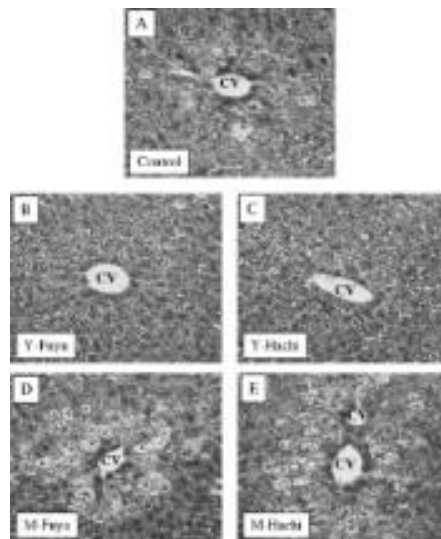
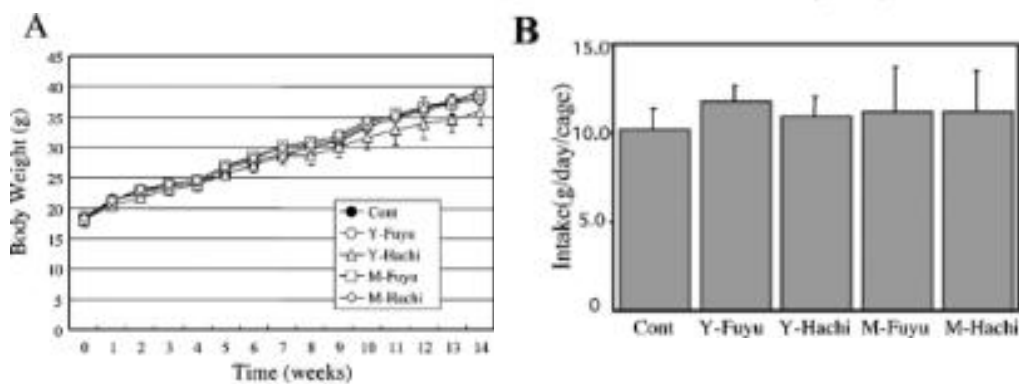
지질대사 바이오마커가 고지방식이 비만 유도 동물 군에 비해 뿔은감 식이를 한 실험군에서 유의성있는 약리적 효능을 보임

- ▶ 어린 뽕은감 열매가 고지방식이로 비만을 유발시킨 생쥐 모델에서 혈장 내 지질 증가를 억제 효능 연구 또한 성숙 뽕은감 열매 및 단감 열매 시료에 대한 효능 비교 연구

### Young Persimmon Fruits Prevent the Rise in Plasma Lipids in a Diet-Induced Murine Obesity Model

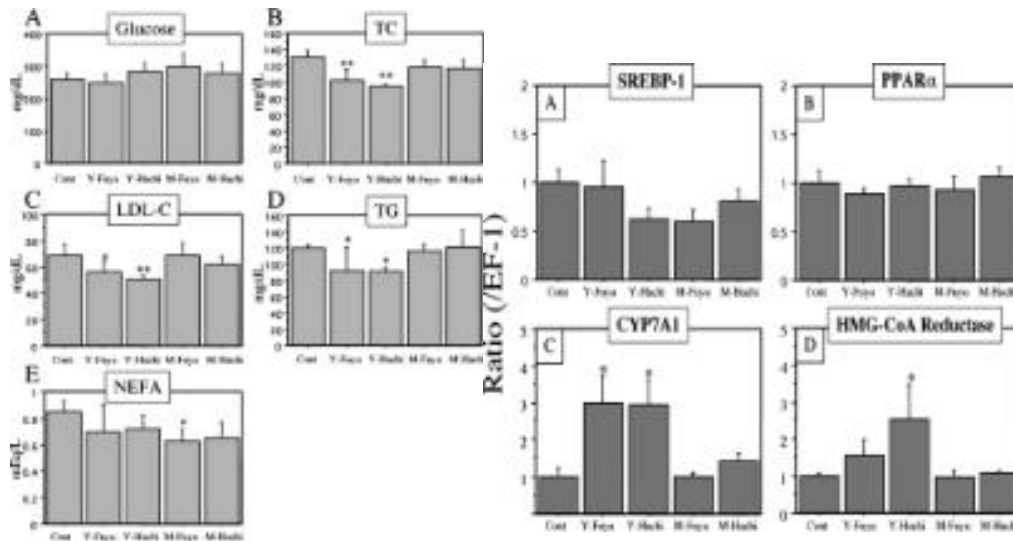
Kenji MATSUMOTO,<sup>a,\*</sup> Yutaka WATANABE,<sup>a</sup> Mami-aki OHTA,<sup>b</sup> and Shin-ichiro YOKUYAMA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Applied Microbiology, Gifu Prefectural Research Institute for Biotechnology, 1481-2 Kamibachiyu, Hachiya, Mino-cho, Gifu 505-0904, Japan; and <sup>b</sup>Takano-seiyu Co., Ltd., 1-9-11 Moriyama, Mino-cho, Gifu 505-0601, Japan. Received September 21, 2006; accepted October 5, 2006; published online October 6, 2006.



그림

Hematoxylin and Eosin Staining of Liver Tissues of Control (A), Y-Fuyu (B), Y-Hachiya (C), M-Fuyu (D), and M-Hachiya Mice (E) CV: central vein. Magnification, 200.



연구결과, 어린 뿔은감과 단감에서 TC, LDL, TG의 혈장 내 함량이 비만유도 생쥐 대조군의 혈장 내 수치보다 유의성 있게 감소되었으며, 간에서의 지질 대사 관련 mRNA 발현량 분석의 경향과도 유사한 것을 볼 수 있음.

▶ 뿔은 감에 대한 서지학적 연구

**REVIEW ARTICLE**

**Diospyros kaki (Ebenaceae): A Review**

Sunity Singh<sup>1</sup> and Himanshu Joshi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shoolim University of Biotechnology and Management, Solan, H.P.

<sup>2</sup>Nitte Gulabhi Shetty Memorial Institute of Pharmaceutical Sciences, Poneer, Mangalore India.

\*Corresponding Author E-mail: [visitdj@gmail.com](mailto:visitdj@gmail.com)



▶ 뽕은 감 수확 및 가공에 대한 연구



Post-harvest and processing of persimmon fruit

Testoni A.

in

Bellini E. (ed.), Giordani E. (ed.),  
First Mediterranean symposium on persimmon

Zaragoza: CIHEAM

Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 51

2002

pages 53-70

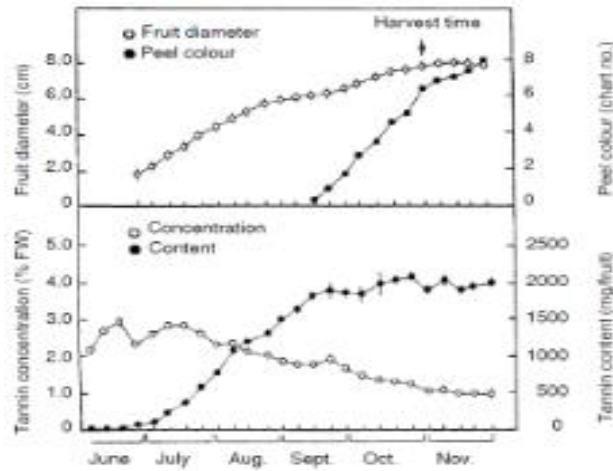


Fig. 1. Changes in fruit diameter, peel colour and soluble tannins of the flesh during fruit development in 'Hiratanenashi' (Taira, 1996).

총 페놀함량은 채취한 시기부터 점점 감소되는 경향이 있음. 이는 신선한 뽕은 감 일수록 함량이 높으며 약리적으로 더 효과가 있을 것으로 판단됨.

감탄닌의 농도는 6~7월 달에 무게단위별 가장 높으며, 총 함량은 성숙될수록 증가됨.

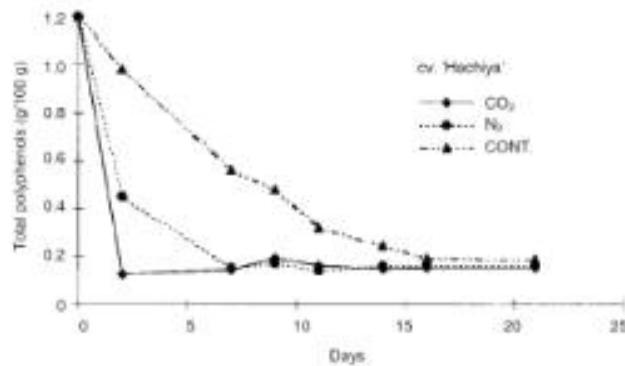


Fig. 5. Total polyphenol concentration in 'Hachiya' persimmon after treatment at 20°C for one day and during storage at 1°C (Zavtarik et al., 1999).

▶ 고분자 감탄닌이 고지방 식이 흰쥐에 있어서의 혈중 지질을 저하시키는 약리효능 연구



Short communication

High molecular weight persimmon tannin is a potent hypolipidemic in high-cholesterol diet fed rats

Bo Zou <sup>a</sup>, Chun-mei Li <sup>a,b,\*</sup>, Jin-yu Chen <sup>a</sup>, Xiao-qian Dong <sup>a</sup>, Ying Zhang <sup>a</sup>, Jing Du <sup>a</sup>

<sup>a</sup> College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430030, China  
<sup>b</sup> Key Laboratory of Environment Correlative Food Science, Huazhong Agricultural University, Ministry of Education, Wuhan, China

B. Zou et al. / Food Research International 48 (2012) 970–977

973

**Table 1**  
Serum, liver and fecal lipids of rats fed with basic diet or high-cholesterol diet, with or without HMWPT treatment.

	NC	HC	HC/LPT	HC/MPT	HC/HPT
<b>Serum</b>					
TG (mmol/L)	0.76 ± 0.04b	0.87 ± 0.06a	0.82 ± 0.15b	0.77 ± 0.07b	0.71 ± 0.07b
TC (mmol/L)	1.57 ± 0.07b	7.01 ± 0.55a	4.13 ± 1.15ab	5.14 ± 1.34ab	4.20 ± 0.60ab
HDL-C (mmol/L)	0.73 ± 0.04b	0.35 ± 0.03a	0.41 ± 0.02ab	0.38 ± 0.06a	0.45 ± 0.02ab
LDL-C (mmol/L)	0.37 ± 0.06b	2.72 ± 0.44a	0.65 ± 0.10ab	0.82 ± 0.23ab	0.64 ± 0.13ab
NEFA (mmol/L)	274.38 ± 36.62b	1131.52 ± 48.24a	1213.18 ± 92.78a	1155.52 ± 29.44a	883.16 ± 121.93ab
AI	1.16 ± 0.05b	19.80 ± 0.55a	8.56 ± 2.26ab	12.42 ± 1.77ab	8.48 ± 0.96ab
<b>Liver</b>					
TC (μmol/g)	13.15 ± 1.83b	48.80 ± 13.26a	56.41 ± 6.65a	54.73 ± 8.43ab	50.74 ± 10.32ab
TC (mmol/g)	21.8 ± 1.65b	289.87 ± 11.42a	272.37 ± 44.52a	270.11 ± 32.67a	234.12 ± 24.78ab
HDL-C (μmol/g)	9.25 ± 0.33b	3.96 ± 0.87a	6.41 ± 0.82a	7.58 ± 1.12ab	7.31 ± 0.54ab
LDL-C (μmol/g)	10.01 ± 1.53b	243.34 ± 9.94a	238.91 ± 35.64a	237.32 ± 26.06a	191.49 ± 22.76ab
<b>Feces</b>					
TG (μmol/g)	3.10 ± 0.42b	6.32 ± 0.53a	3.86 ± 0.65	6.57 ± 0.41a	6.01 ± 0.49a
TC (μmol/g)	0.64 ± 1.01b	18.71 ± 6.74a	25.54 ± 3.06ab	24.08 ± 3.88ab	28.75 ± 1.9a
Cholic acid (mg/g)	0.59 ± 0.08b	1.66 ± 0.03a	2.18 ± 0.11ab	2.28 ± 0.12ab	2.33 ± 0.08ab

TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; NEFA, non-esterified fatty acids; AI, atherogenic index; NC, normal control group; HC, high-cholesterol group; HC/LPT, high-cholesterol with low dose (25 mg/kg body weight) of persimmon tannin group; HC/MPT, high-cholesterol with moderate dose (50 mg/kg body weight) of persimmon tannin group; HC/HPT, high-cholesterol with high dose (100 mg/kg body weight) of persimmon tannin group. \* indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) versus NC group, <sup>a</sup> indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) versus HC group.

B. Zou et al. / Food Research International 48 (2012) 970–977

973

**Table 2**  
Serum and hepatic antioxidant capacity of rats fed with basic diet or high-cholesterol diet, with or without HMWPT treatment.

	NC	HC	HC/LPT	HC/MPT	HC/HPT
<b>Serum</b>					
T-AOC (U/ml)	7.06 ± 0.03b	5.93 ± 0.85a	6.19 ± 1.30b	6.72 ± 1.60b	6.76 ± 1.43b
GSH-Px (U/ml)	1576.34 ± 19.94b	1420.61 ± 90.86a	1303.02 ± 94.50a	2122.26 ± 63.96ab	2051.82 ± 93.78ab
T-SOD (U/ml)	163.13 ± 12.10	155.04 ± 9.38	199.39 ± 21.48ab	207.11 ± 8.35ab	208.00 ± 7.73ab
MDA (nmol/ml)	14.26 ± 1.67b	17.16 ± 2.48a	14.25 ± 2.11b	14.02 ± 2.14b	14.14 ± 1.40b
<b>Liver</b>					
T-AOC (U/mg prot)	0.99 ± 0.18	0.79 ± 0.30	1.41 ± 0.19ab	1.58 ± 0.39ab	2.01 ± 0.30ab
GSH-Px (U/mg prot)	660.84 ± 61.65b	542.89 ± 61.74a	493.27 ± 54.70a	481.91 ± 46.21a	603.52 ± 92.02
T-SOD (U/mg prot)	76.83 ± 8.72	81.96 ± 13.36	91.08 ± 11.36	78.26 ± 14.00	80.81 ± 9.64
CAT (U/mg prot)	686.37 ± 89.04	718.21 ± 51.76	672.98 ± 80.73	647.61 ± 59.80	720.53 ± 92.79
MDA (nmol/mg prot)	1.23 ± 0.24	1.06 ± 0.45	0.98 ± 0.33	0.95 ± 0.35	0.63 ± 0.11ab

T-AOC, total antioxidant capacity; GSH-Px, glutathione peroxidase; T-SOD, total superoxide dismutase; CAT, catalase; MDA, malondialdehyde; NC, normal control group; HC, high-cholesterol group; HC/LPT, high-cholesterol with low dose (25 mg/kg body weight) of persimmon tannin group; HC/MPT, high-cholesterol with moderate dose (50 mg/kg body weight) of persimmon tannin group; HC/HPT, high-cholesterol with high dose (100 mg/kg body weight) of persimmon tannin group. \* indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) versus NC group, <sup>a</sup> indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) versus HC group.

감탄닌의 강력한 항산화 효능을 알 수 있으며, 고농도 투여군 (100 mg/kg)에서 더욱 좋은 효과를 나타내고 있음. 이는 농도 의존적으로 혈중 지질을 저하시키고 산화스트레스에 의한 간 손상을 예방할 수 있다는 연구결과임.

## 나. 어린 뽕은 감 과실에 대한 대표적 선행연구

- ▶ 어린 뽕은감 유래 감탄닌이 *in vitro* 및 *in vivo*에서 담즙 산 결합능에 대한 연구

PHYTOTHERAPY RESEARCH  
*Phytother. Res.* 25: 624–628 (2011)  
 Published online 5 October 2010 in Wiley Online Library  
 (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.3306

### SHORT COMMUNICATION

## Bile Acid-binding Ability of Kaki-tannin from Young Fruits of Persimmon (*Diospyros kaki*) *In Vitro* and *In Vivo*

Kenji Matsumoto,<sup>1,2\*</sup> Akio Kadowaki,<sup>1</sup> Natsumi Ozaki,<sup>1</sup> Makiko Takenaka,<sup>4</sup> Hiroshi Ono,<sup>4</sup> Shin-ichiro Yokoyama<sup>2</sup> and Nobuki Gato<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Ishikawa Prefectural University, 1-308 Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan  
<sup>2</sup>Gifu Prefectural Research Institute for Biocircumventing, 3481-2 Kamihachiya, Hachiya, Mino-cho, Gifu 505-0004, Japan  
<sup>3</sup>Nakano BC Co., Ltd, 758-45 Fujishiro, Kainan, Wakayama 642-0034, Japan  
<sup>4</sup>National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

626

K. MATSUMOTO ET AL.

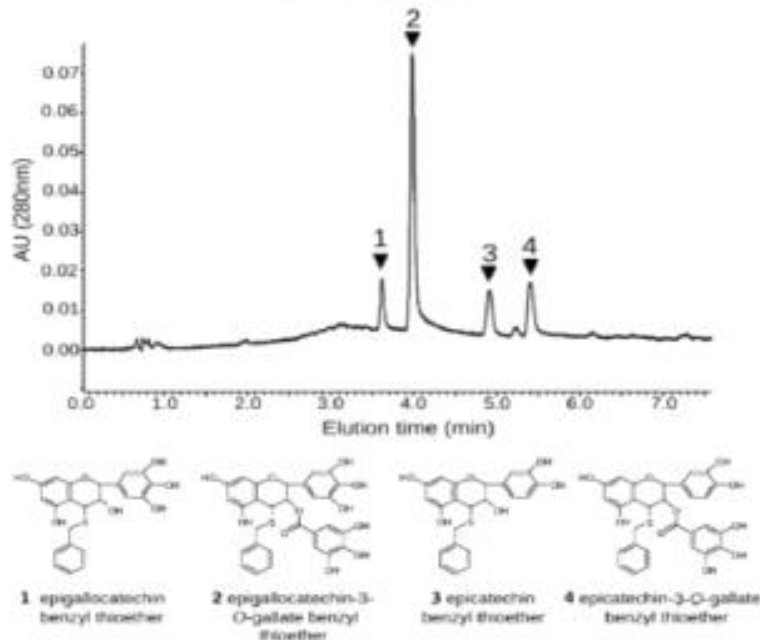


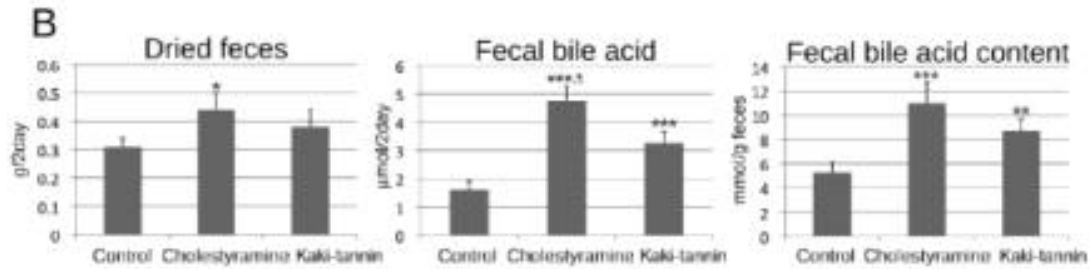
Figure 1. Ultra-performance liquid chromatography profile of kaki-tannin solution after thiolytic degradation. Chemical structures of compounds corresponding to peaks are shown.

어린 뽕은감에서 4종의 대표 탄닌성분을 분리함.

어린 감 유래 감탄닌은 소화관내 담즙 산 재흡수를 억제하기 때문에 분변 내 담즙 산 함량이 유의성 있게 감소되었음.

분변의 양이 대조군에 비해 증가된 것을 확인할 수 있으며, 이는 어린 감 식이가 변비를 유발시키지 않는다는 것을 의미함. 또한 분변 내 담즙 산 함량 분석 결과 어린 감 탄닌 투여군에서 대조군에 비해 유의성있는 함량 증가 효과를 나타냄. 이를 통해 간장에서 콜레스테롤을 이용하여 담즙 산을 만드는 과정

이 증가하게 되며 이는 결국 콜레스테롤 소비를 증가시키는 것임.



**Figure 2.** Bile acid-binding ability *in vitro* and *in vivo*. Affinity of sample (1% w/v) for each bile acid in 0.5–4.0 mM solutions (A). Positive control, cholestyramine; negative control, cellulose. Values are the mean of triplicates  $\pm$  SD. Analysis of feces from mice fed kaki-tannin or cholestyramine (1% w/w in diet) after 14 days treatment (B). Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs control group, †  $p < 0.01$  vs kaki-tannin group (Tukey-HSD test).

▶ 어린감의 담즙산 결합능과 혈중 지질 저하 효능 연구

PHYTOTHERAPY RESEARCH  
*Phytother. Res.* **24**: 205–210 (2010)  
Published online 7 July 2009 in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/ptr.2911

## Bile Acid-binding Activity of Young Persimmon (*Diospyros kaki*) Fruit and its Hypolipidemic Effect in Mice

Kenji Matsumoto,<sup>1</sup>\* Shin-ichiro Yokoyama<sup>1</sup> and Nobuki Gato<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Microbiology, Gifu Prefectural Research Institute for Bioengineering, 3481-2 Kamihachiya, Hachiya, Minokamo, Gifu 505-0004, Japan

<sup>2</sup>Nakano BC Co., Ltd, 758-45 Fujishiro, Kainan, Wakayama 642-0034, Japan

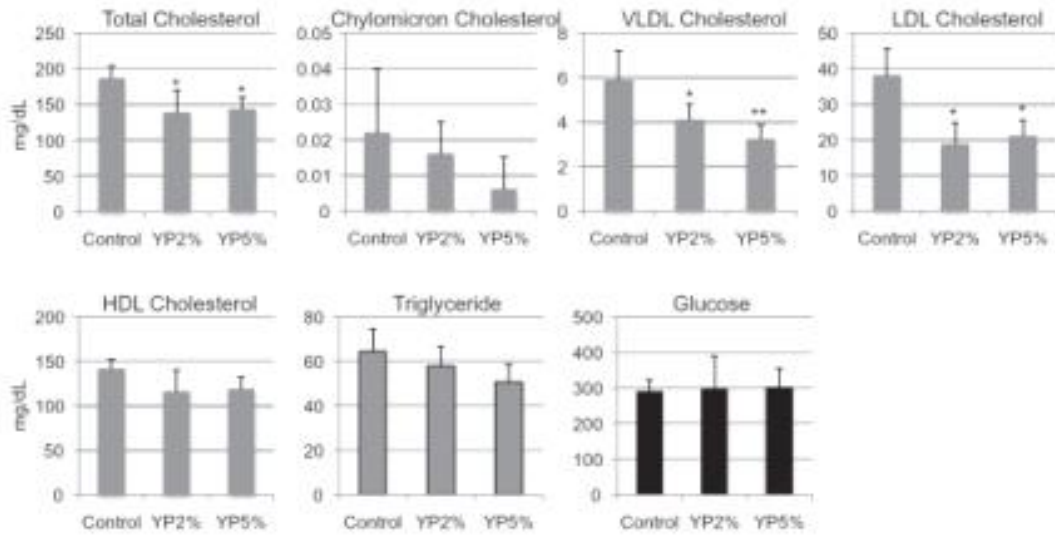


Figure 1. Quantitative analyses of plasma cholesterol, triglyceride and glucose. Values are mean  $\pm$  SD (n = 5). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs control group (Tukey-HSD test).

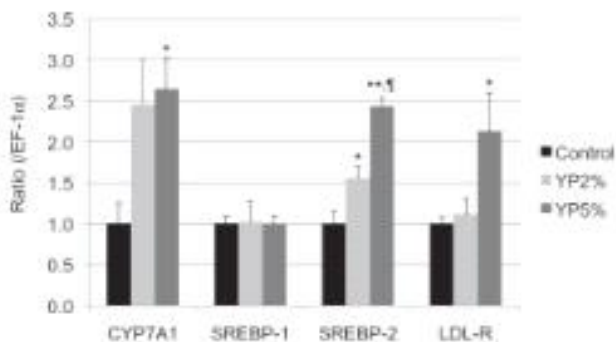
Table 1. Physiological parameters in control, YP2% and YP5% groups

	Control	YP2%	YP5%
Number	5	5	5
Total intake (kcal)	1138.83 $\pm$ 59.36	1099.46 $\pm$ 58.88	1026.77 $\pm$ 98.09
Initial body weight (g)	20.70 $\pm$ 1.20	20.28 $\pm$ 1.22	20.62 $\pm$ 1.16
Final body weight (g)	42.96 $\pm$ 2.41	39.34 $\pm$ 5.29	40.72 $\pm$ 6.42
Body weight gain (g)	22.26 $\pm$ 1.75	19.06 $\pm$ 4.16	20.10 $\pm$ 5.44
EWAT (g)	2.08 $\pm$ 0.24	1.74 $\pm$ 0.34	1.99 $\pm$ 0.57
Liver (g)	1.83 $\pm$ 0.28	1.43 $\pm$ 0.45	1.56 $\pm$ 0.43
Kidney (g)	0.40 $\pm$ 0.003	0.38 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.03
Liver cholesterol content (mg/g)	6.39 $\pm$ 0.89	5.02 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	4.84 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
Liver triglyceride content (mg/g)	233.42 $\pm$ 28.68	132.72 $\pm$ 37.99 <sup>b</sup>	145.1 $\pm$ 42.85 <sup>b</sup>
Feces (g/2 days)	0.55 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.12	0.70 $\pm$ 0.11
Fecal bile acid ( $\mu$ mol/2 days)	1.38 $\pm$ 0.29	3.95 $\pm$ 1.06 <sup>c</sup>	5.04 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>

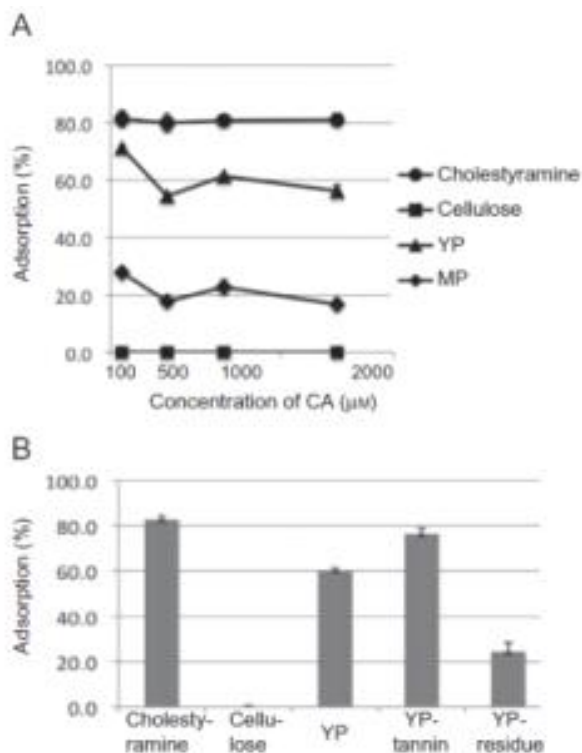
Values are mean  $\pm$  SD. <sup>a</sup>p < 0.05, <sup>b</sup>p < 0.01, <sup>c</sup>p < 0.001 vs control (Tukey-HSD test).

EWAT, epididymal white adipose tissue.

분변의 양이 대조군에 비해 증가된 것을 확인할 수 있으며, 이는 어린 감 식이가 변비를 유발시키지 않는다는 것을 의미함. 또한 분변 내 담즙산 함량 분석 결과 2%, 5% 어린 감 투여군에서 대조군에 비해 유의성있는 함량 증가 효과를 나타냄. 이를 통해 간장에서 콜레스테롤을 이용하여 담즙산을 만드는 과정이 증가하게 되며 이는 결국 콜레스테롤 소비를 증가시키는 것임.



**Figure 2.** Analysis of gene expression in liver tissue. Genes related to lipid metabolism were examined by SYBR Green-based real-time RT-PCR. Elongation factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) was used as a control to standardize the efficiency of each reaction. Values are mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). CYP7A1, cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase; SREBP, sterol regulatory element binding protein; LDL-R, low-density lipoprotein receptor. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control group, and †  $p < 0.01$  vs YP2% group (Tukey-HSD test).



**Figure 3.** Bile acid-binding ability in vitro. Affinity of sample (1% w/v) for cholic acid (CA) in 100, 500, 1000 and 2000  $\mu$ M CA solutions (A). Affinity of extracted YP-derived crude tannin (YP-tannin) and residue (YP-residue) for CA in 2000  $\mu$ M CA solutions (B). Positive control, cholestyramine; negative control, cellulose. Values are mean of duplicates  $\pm$  SD.

그림 A는 성숙감과 어린 감의 약리적 효능 비교 연구로, 성숙감에 비해 어린 감의 담즙산 결합능이 유의성 있게 증가되었으며, 그림 B는 어린 감, 어린 감탄닌, 어린 감 잔여물에 대한 약리 효능 비교 연구로, 어린 감 잔여물에서는 거의 약리적 담즙산 결합능을 볼 수 없었음.

▶ 감잎과 꼭지 및 유과에 함유된 성분 변화 연구

[*龐大農學報告* 第31号, p.1-9, 1981]

**カキ葉, ガク, 幼果に含まれるポリフェノールの経時的变化**

松尾友明・川添裕子\*・伊藤三郎

(*青果保藏学研究室*)

昭和55年8月9日 受理

**Seasonal Changes in the Polyphenol Content of Persimmon Leaves, Calyxes and Young Fruit**

Tomoaki MATSUO, Hiroko KAWAZOE and Saburo ITOO

(*Laboratory of Postharvest Physiology and Preservation of Fruits and Vegetables*)

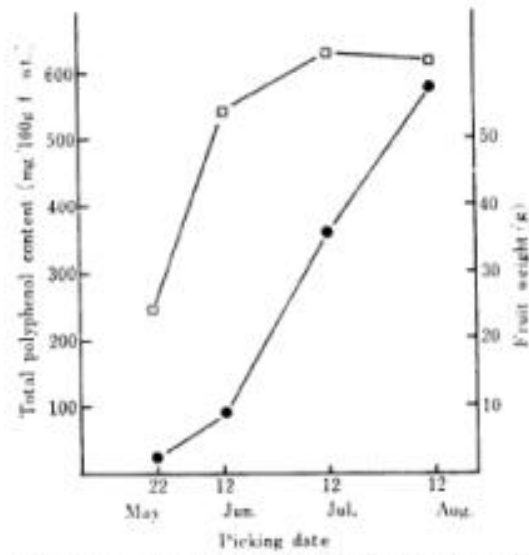


Fig. 7. Seasonal changes of total polyphenol content and average fruit weight of young persimmon fruit during development.

Persimmon fruit (cv. Hiratanenashi) was about 200 grams in weight at a maturation stage in late October (1978). Each spot shows the average of three determinations from the sample fruit. Total polyphenol content; —□—, average fruit weight; —●—.

6월부터 7월 12까지 총 페놀함량이 정점을 보이며, 8월 달에는 유의성 있는 함량 증가를 보이지 않음. 이는 생리적 낙과인 유시의 총 페놀함량이 높기 때문에 고부가가치 식품개발 가능성을 보여준다고 판단됨.

## 다. 떫은 감 화합성분의 약리효능 연구

### (1) EGCG 약리효능 연구

- ▶ EGCG의 췌장 리파아제 억제효능을 통한 고지방 식이 비만 유도 마우스의 체중 감소 효과에 대한 연구 (2012)



- ▶ EGCG가 고지방 식이 비만 유도 생쥐의 근육에서 지방 연소와 관련된 유전자 발현을 증가에 대한 연구 (2011)

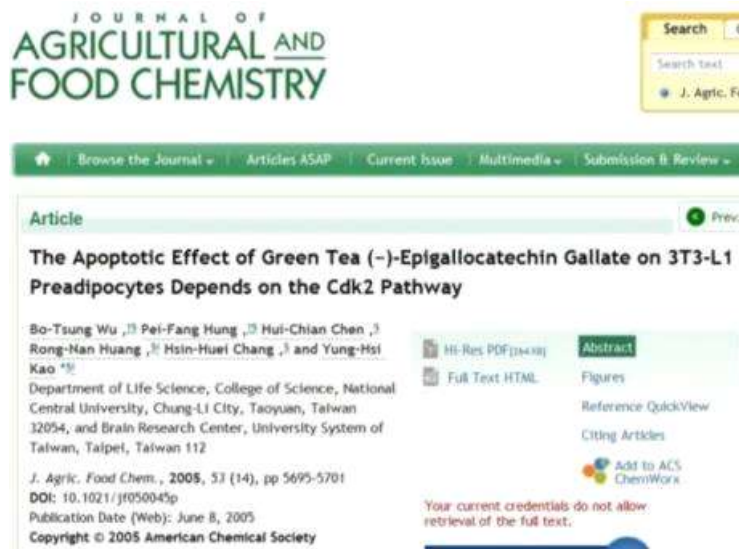


- ▶ 과체중/비만 남성지원자를 대상으로 한 EGCG와 postprandial 지방 산화에 대한 연구 (2011)

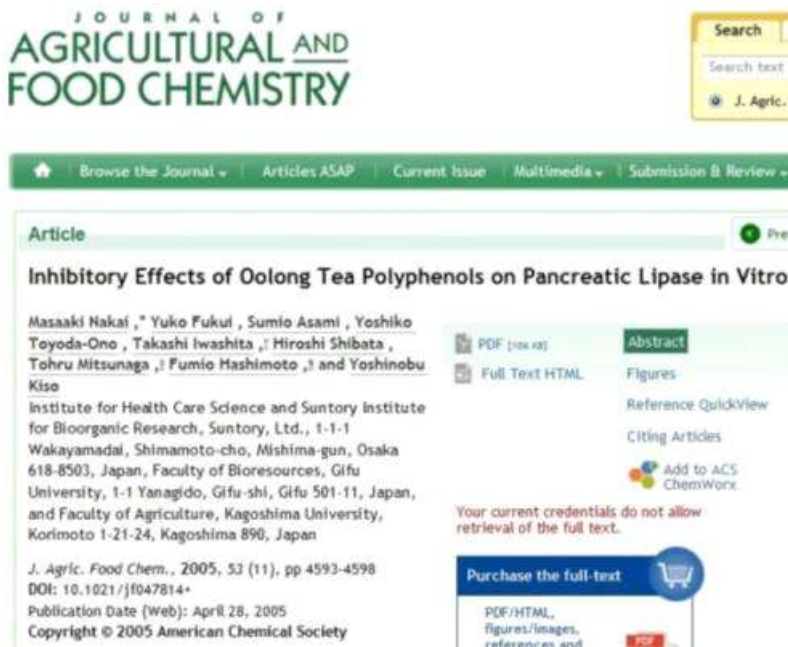




- ▶ 녹차 성분인 EGCG가 3T3-L1 전구지방세포에서 Cdk2 경로에 의존한 apoptotic 효능 연구 (2005)



- ▶ 우롱차 성분인 EGCG가 in vitro상에서 췌장 리파아제 억제 효능 연구 (2005)

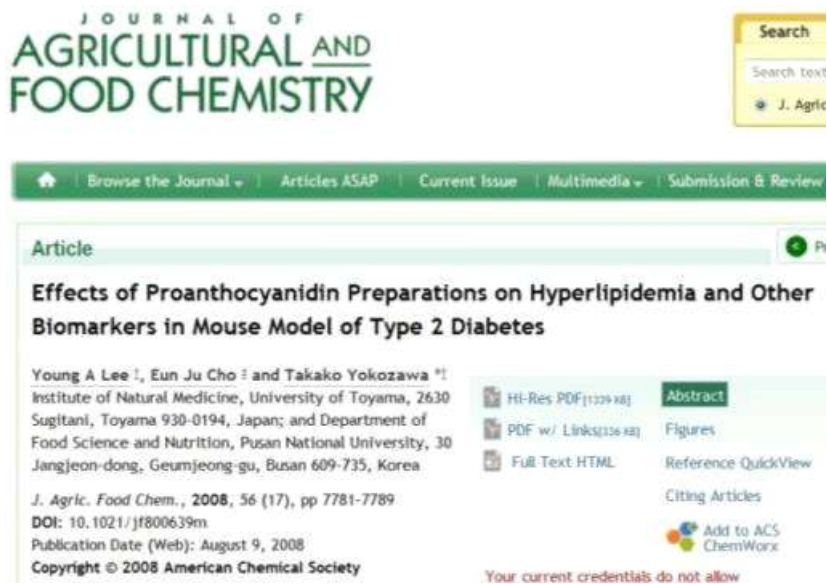


## (2) Proanthocyanidin

### ▶ 고분자 폴리머 Proanthocyanidin의 항비만 효능 연구 (2011)



### ▶ Proanthocyanidin이 2형 당뇨 생쥐 모델에서 혈중 지질 함량 저하 및 생체 바이오 마커에 미치는 효능 연구 (2008)



- ▶ 포도씨 유래 Proanthocyanidin이 고지방 식이 비만 유도 생쥐에서의 체지방 조절 효능 연구 (2008)

[Abs+Ref](#) [A+F&T+R](#) [Full Text](#) [XML](#) [PubReader](#) [PDF](#) [Links](#) [KoreaMed](#) [Journal Web](#) [f](#) [t](#) [e](#) [Export Citation](#)

---

Nutr Res Pract. 2008 Winter;2(4):227-233. English.  
 Published online 2008 December 31. <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2008.2.4.227>  
 ©2008 The Korean Nutrition Society and The Korean Society of Community Nutrition

### Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice

Su-Hui Park,<sup>1</sup> Tae-Sun Park,<sup>2</sup> and Youn-Soo Cha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Human Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Chonbuk National University, 664-14 1Ga Deokjin-dong, Deokjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea.  
<sup>2</sup>Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Chonbuk National University, 664-14 1Ga Deokjin-dong, Deokjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea.

<sup>\*</sup> Corresponding Author: Youn-Soo Cha, Tel. 82-63-270-3822, Fax. 82-63-270-3854, Email: [cha8@chonbuk.ac.kr](mailto:cha8@chonbuk.ac.kr)  
 Received October 10, 2008; Revised November 04, 2008; Accepted November 25, 2008.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

- ▶ 적포도 및 감와인 유래 폴리페놀이 혈중 지질 개선 및 동맥 기능 부전 개선 효능 비교 연구 (2011)

**Food & Function** Issue 9, 2011  
[More about this Journal](#)  
[Editorial Board](#)  
[Submit an Article](#)  
[Follow Journal](#)

**Paper** [Previous Article](#)

**Polyphenols prevent lipid abnormalities and arterial dysfunction in hamsters on a high-fat diet: a comparative study of red grape and white persimmon wines**

Jin-Hyang Suh , Anne Virsolvy , Aurélie Goux , Cécile Cassan , Sylvain Richard , Jean-Paul Cristol , Pierre-Louis Teissède and Jean-Max Rouanet

**Food Funct.**, 2011, **2**, 555-561  
**DOI:** 10.1039/C1FO10066A  
 Received 13 May 2011, Accepted 09 Aug 2011  
 First published on the web 30 Aug 2011

[PDF](#)  
[Rich HTML](#)  
[Download Citation](#)  
[BibTex](#)  
[Request Permissions](#)

## 2-2. 뽕은감의 일반성분 함량 분석

- 뽕은감의 일반성분 분석 결과 아래와 같음.



# 검 사 성 적 서

발 급 번 호		R181001-01	접 수 번 호	18090301-01
의 회 정 보	제 품 명	뽕은감	재 조 일 자 (또는 유통기한)	-
	업 체 명	태연	대표자성명	노성수
	소 재 지	대구시 수성구 신천동로 136, 503호 수성캠퍼스 한의학관(대구한의대)		
접수년월일		2018-09-03	검사완료일	2018-10-01
식 품 유 형		-	검사목적	참고
<b>시 험 항 목 및 결 과</b>				
시 험 항 목	기 준	결 과	1회제공량당 1일영양소기준치(%)	항목판정
열량(kcal/100g)	-	383	-	-
탄수화물(g/100g)	-	93.36	28.8	-
당류(g/100g)	-	6.63	6.6	-
단백질(g/100g)	-	2.22	4.0	-
지방(g/100g)	-	0.02	0.0	-
포화지방(g/100g)	-	0.03	0.2	-
트랜스지방(g/100g)	-	0.00	-	-
콜레스테롤(mg/100g)	-	불검출	-	-
나트륨(mg/100g)	-	146.79	7.3	-
세균수(CFU/1g)	-	0	-	-
대장균(CFU/1g)	-	0	-	-
대장균군(CFU/1g)	-	0	-	-
판정 : -	검사자 : 김자영, 이주남, 조아라			
비고 :	확인자 : 송아영			
※상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함				
<p>&lt;식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률&gt; 제11조 제2항 및 같은법 시행규칙 제12조 제4항에 따라 위와 같이 시험검사성적서를 발급합니다.</p> <p>2018년 10월 01일</p> <p>대전식품의약품안전청 식품위생검사기관 제80호 서원대학교 산학협력단 친환경 바이오 소재 및 식품 센터장</p>				
본 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰한 목적 이외 상업적인 광고 및 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.				

충북 청주시 서원구 무심서로 377-3 서원대학교 제2자연관 215호 Tel. (043)299-8156~7 Fax.(043)299-8158

## 2-3. 시료 제조

### 가. 뽕은감 추출

- 상주둥시를 절단 후 건조기에 건조시킴.
- 건조시킨 상주둥시를 갈아 분말화 시킨 후, 10배수 70% MeOH 3회 반복 추출함(그림 1).
- 추출한 용액을 감압농축하여 파우더를 얻음 (그림 2).

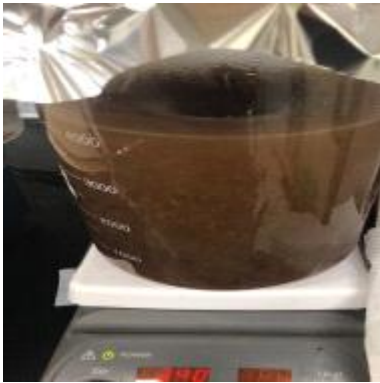


그림 1. 뽕은감 냉침 추출



그림 2. 뽕은감 추출물 농축

## 2-4. 품종별 뽕은감 *in vitro* 기능성 평가

### 가. 연구방법

#### (1) 추출

- 뽕은 감 (상주둥시, 청도반시, 갑주백목) 열수 추출물은 시료 각 100 g에 증류수 1000 mL를 가하여 열탕 추출기에서 100°C 조건에서 2시간 동안 추출하였고 30% EtOH 추출물은 시료 각 100 g에 30% EtOH 1000 mL를 가하여 열탕 추출기에서 90°C 에서 2시간 추출함.
- 70% EtOH 추출물은 시료 각 100 g에 70% EtOH 1000 mL를 가하여 열탕 추출기에서 80°C 에서 2시간 추출하였으며 얻은 액을 각각 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 파우더를 얻었으며 이를 냉동 (-80°C) 보관하면서 실험 직전에 증류수에 희석하여 사용함 (표 1).

표 1. 뽕은감 추출물 수율

Sample	Yield (%)
Sangju dungsi water extract	8.3
Sangju dungsi 30% EtOH extract	18.1
Sangju dungsi 70% EtOH extract	16.9
Chungdo bansi water extract	16.2

Chungdo bansi 30% EtOH extract	16.1
Chungdo bansi 70% EtOH extract	11.6
Kabju baekmok water extract	16
Kabju baekmok 30% EtOH extract	16.8
Kabju baekmok 70% EtOH extract	11.5

#### (2) 총 페놀 함량 측정

- 시료 20  $\mu$ L에 증류수 1.58 mL, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 300  $\mu$ L의 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 첨가.
- 20°C에서 2시간 후 UV spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정함.
- 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료의 총 페놀 함량을 산출함.

#### (3) 총 플라보노이드 함량 측정

- 890  $\mu$ L의 diethylene glycol과 시료추출물 100  $\mu$ L 및 1 N NaOH 10  $\mu$ L를 잘 혼합시켜 37°C의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정.
- 표준물질로는 naringin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료의 플라보노이드 함량을 산출함.

#### (4) Pancreatic lipase 저해 활성 실험 방법

- Enzyme buffer (10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 6.8)에 porcine pancreatic lipase 를 2.5 mg/mL 농도로 녹임.
- Tris buffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0)를 준비하여, lipase가 섞여 있는 enzyme buffer와 Tris buffer를 혼합함.
- 시료를 농도별 (500  $\mu$ g/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL)로 준비한 후, buffer 혼합물에 시료를 혼합하고, 37°C에서 15분간 배양함.
- 기질로 10 mM p-nitrophenyl butyrate (in DMF)를 첨가한 후 다시 37°C에서 30분간 배양하였고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료별 억제율 (%)을 나타냄.

### 나. 연구결과

#### (1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

- 총 페놀 및 플라보노이드 측정 결과, 상주동시 열수 추출물의 함량은  $46.91 \pm 0.27$  mg/g,  $6.97 \pm 0.78$  mg/g으로 각각 나타났으며 30% EtOH 추출물의 함량은  $52.37 \pm 0.78$  mg/g,  $7.97 \pm 0.13$  mg/g으로 나타났고 70% EtOH 추출물의 함량은  $43.75 \pm 0.46$  mg/g,  $7.98 \pm 0.26$  mg/g으로 나타남.
- 30% EtOH 추출물이 가장 높은 페놀 함량을 나타냈으며 플라보노이드함량은 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물이 유사하게 높은 함량을 나타남.

- 청도반시 열수 추출물의 함량은  $27.86 \pm 0.25$  mg/g,  $3.89 \pm 0.10$  mg/g으로 각각 나타났으며 30% EtOH 추출물의 함량은  $52.26 \pm 0.39$  mg/g,  $5.75 \pm 0.06$  mg/g으로 나타났으며 70% EtOH 추출물의 함량은  $48.46 \pm 0.58$  mg/g,  $6.26 \pm 0.04$  mg/g으로 나타남.
- 청도반시 또한 상주등시와 동일하게 30% EtOH 추출물이 가장 높은 페놀 함량을 나타냈으며 플라보노이드는 70% EtOH로 추출하였을 때 가장 높게 나타남.
- 갑주백목 열수 추출물의 함량은  $68.43 \pm 0.23$  mg/g,  $10.53 \pm 0.15$  mg/g으로 각각 나타났으며 30% EtOH 추출물의 함량은  $53.80 \pm 0.37$  mg/g,  $6.09 \pm 0.12$  mg/g으로 나타났으며 70% EtOH 추출물의 함량은  $31.39 \pm 0.51$  mg/g,  $3.27 \pm 0.14$  mg/g으로 나타남. 갑주백목의 페놀 함량, 플라보노이드 함량은 열수 추출물이 가장 높게 나타남 (표 2).

표 2. 뽕은감 품종별 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
Sangju dungsi water extract	$46.91 \pm 0.27$	$6.97 \pm 0.78$
Sangju dungsi 30% EtOH extract	$52.37 \pm 0.78$	$7.97 \pm 0.13$
Sangju dungsi 70% EtOH extract	$43.75 \pm 0.46$	$7.98 \pm 0.26$
Chungdo bansi water extract	$27.86 \pm 0.25$	$3.89 \pm 0.10$
Chungdo bansi 30% EtOH extract	$52.26 \pm 0.39$	$5.75 \pm 0.06$
Chungdo bansi 70% EtOH extract	$48.46 \pm 0.58$	$6.26 \pm 0.04$
Kabju baekmok water extract	$68.43 \pm 0.23$	$10.53 \pm 0.15$
Kabju baekmok 30% EtOH extract	$53.80 \pm 0.37$	$6.09 \pm 0.12$
Kabju baekmok 70% EtOH extract	$31.39 \pm 0.51$	$3.27 \pm 0.14$

## (2) Pancreatic lipase 저해 활성 결과

- 항산화 활성을 측정한 결과, 가장 높은 효과를 나타낸 상주등시를 pancreatic lipase 저해 활성을 평가하였으며 각각의 시료와 pancreatic lipase를 반응.
- 그 후 pancreatic lipase 억제율 공식에 의하여 억제율 (%)을 구함.
- 대조군으로는 orlistat를 이용하였으며 0.1  $\mu$ g/mL에서 pancreatic lipase 억제 효과는 77.12%을 나타냄.
- 총 3개의 상주등시 추출물 1000  $\mu$ g/mL에서 pancreatic lipase 억제 효과는 열수 추출물은 44.5%, 30% EtOH 추출물은 54.1%, 70% EtOH 추출물은 42.2%으로 나타났고 이는 지방 흡수 억제에 효과가 있음을 확인함 (그림 3).

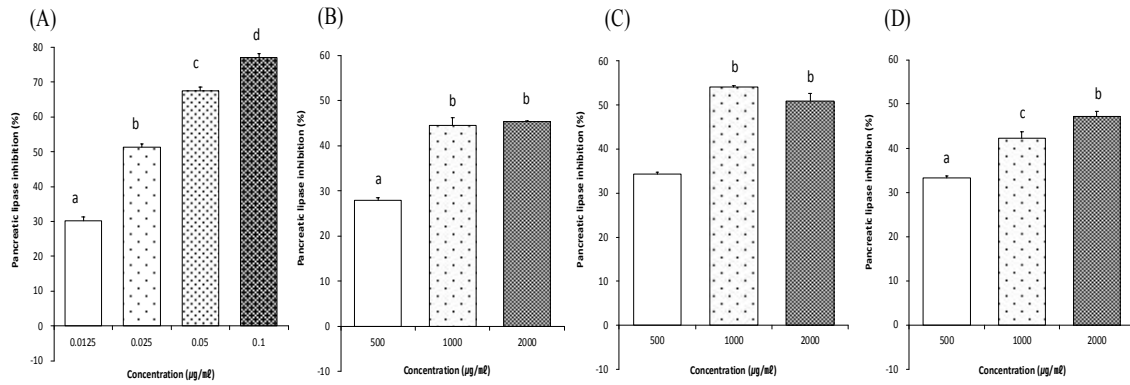


그림 3. 상주동시 췌장 라이페이스 억제능

## 2-5. 뽕은감 추출물 분획

### 가. 뽕은감 추출물 유기용매별 분획

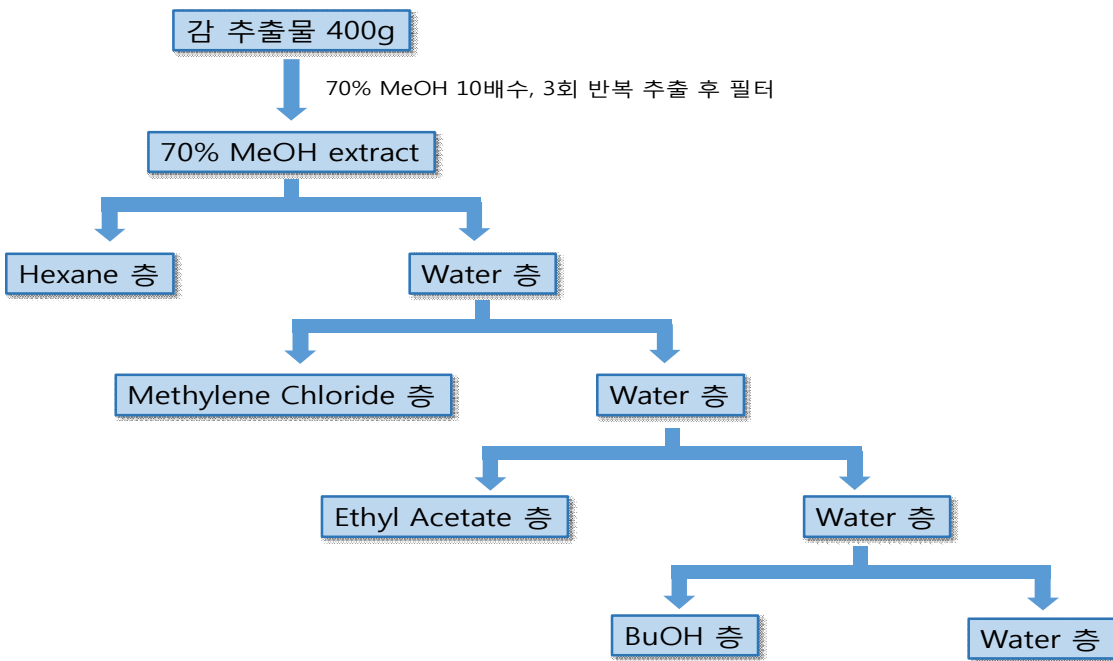


그림 4. 뽕은감 추출물 분획층 도식도

### 나. 뽕은감 Hexane층 분획

- 상주동시 추출물에 500~1000 mL 정도의 DW를 가하여 녹임.
- 상주동시 추출물을 녹인 DW에 Hexane을 가하여 분획깔대기를 이용해 가스를 빼주면서 잘 섞이게 흔들어줌.
- 층이 나뉘어지면 가라앉은 Water층을 받고 Hexane층을 따로 받아냄 (그림 5).
- 분획깔대기에 Water층을 다시 부어준 후, Hexane을 가하는 순서로 3반복하면서 추출함.



- 분리한 Hexane층은 감압농축기를 이용하여 농축하고 Water층은 다시 분획에 사용함 (그림 6).



그림 5. Hexane층 분획



그림 6. Hexane층 농축

#### 다. 뿔은감 Methylene Chloride층 분획

- Water층에 Methylene Chloride를 가하여 분획깔대기를 이용해 가스를 빼주면서 잘 섞이게 흔들어줌.
- 층이 나뉘어지면 가라앉은 Methylene Chloride층은 받아내고 다시 Methylene Chloride를 가하는 순서로 3반복 추출함 (그림 7).
- 분리한 Methylene Chloride층은 감압농축기를 이용하여 농축하고 Water층은 다시 분획에 사용함 (그림 8).



그림 7. Methylene Chloride층 분획



그림 8. Methylene Chloride층 농축

#### 라. 뿔은감 Ethyl Acetate층 분획

- Water층에 Ethyl Acetate를 가하여 분획깔대기를 이용해 가스를 빼주면서 잘 섞이게 흔들어 줌.
- 층이 나뉘어지면 가라앉은 Ethyl Acetate층은 받아내고 다시 Ethyl Acetate를 가하는 순서로 3반복 추출함 (그림 9).
- 분리한 Ethyl Acetate층은 감압농축기를 이용하여 농축하고 Water층은 다시 분획에 사용함

(그림 10).



그림 9. Ethyl Acetate층 분획

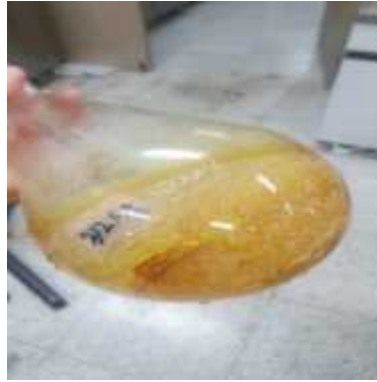


그림 10. Ethyl Acetate층 농축

#### 마. 뿔은감 BuOH층 분획

- BuOH층 분획을 시작하기 하루 전, BuOH 활성화를 위해 BuOH 1 L에 DW 1~2 L를 가하여 흔들어 섞어준 후 방치해둠.
- Water층에 활성화시킨 BuOH을 가하여 분획깔대기를 이용해 가스를 빼주면서 잘 섞이게 흔들어줌.
- 층이 나뉘어지면 가라앉은 Water층을 받아낸 후, BuOH층을 따로 받아냄.
- 분획깔대기에 Water층을 다시 부어, BuOH을 가하는 순서로 3반복하면서 추출함.
- 분리한 BuOH층과 DW층을 감압농축기로 농축함.



그림 11. BuOH 활성화



그림 12. BuOH층 분획



그림 13. Water층 농축



그림 14. BuOH층 농축

## 2-6. 뚝은감 분획층 *in vitro* 체지방 기능성 평가

### 가. 3T3-L1 지방세포 분화

#### (1) 실험방법

#### ▣ Scheme of extract treatment and 3T3-L1 differentiation

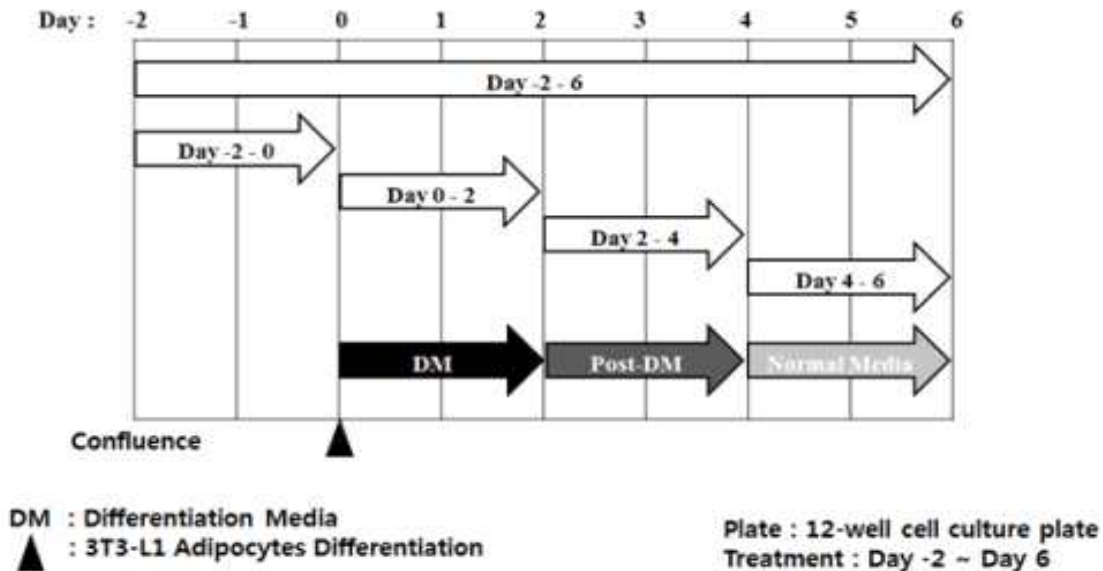


그림 15. 3T3-L1 세포의 분화와 추출물 처치 스케줄

- 3T3-L1 전지방세포가 confluent 상태가 되었을 때를 Day -2라 표기하였으며, 3T3-L1 전지방 세포가 confluent 상태가 된 2일 후 분화유도 배지 (Differentiation medium: DM)로 교체하고 Day 0라 함.
- 분화유도 배지는 10% FBS와 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지에 500  $\mu$ M의 IBMX, 5.2  $\mu$ M의 DEX, 그리고 167 nM의 insuLin을 포함하여 Day 0에서 Day 2까지 48시간 동안 사용함.
- Day 2에서 Day 4까지의 분화유도 후 배지 (Post-differentiaton medium; Post-DM)는 10% FBS와 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM에 167 nM의 insuLin만 포함하여 사용했고, 이후 10% FBS와 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM은 Day 4에서 Day 6까지 사용했으며, 3T3-L1 지방세포의 분화는 Day 6에 종료됨.
- 뚝은감 추출물은 분화 전기간 (Day -2~6), 분화이전 (Day -2~0), 분화초기 (Day 0~2), 분화중기 (Day 2~4), 그리고 분화후기 (Day 4~6)로 나누어 25, 50, 100, 200 ug/mL의 농도로 처리함 (그림 15).

## 나. 실험결과

### (1) 지방세포 분화억제능 평가

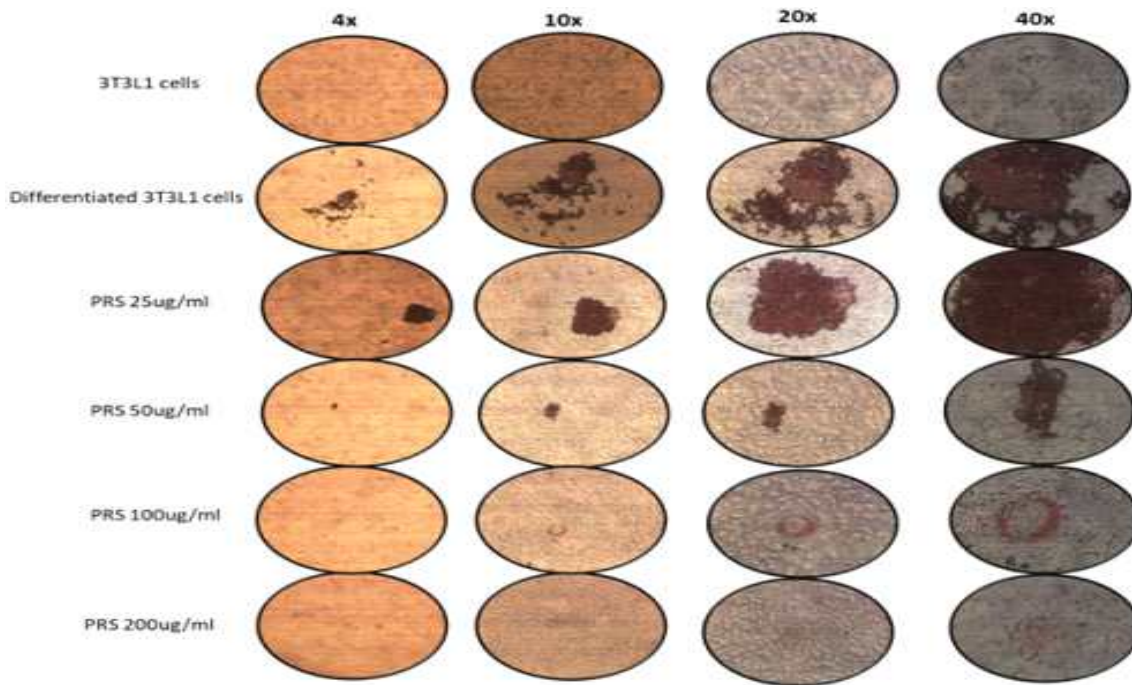


그림 16. 3T3-L1 세포의 현미경 관찰

### (2) 지방대사 조절 mRNA 유전자 발현 분석

#### (가) mRNA primer

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
PPAR- $\gamma$	Forward	CCCTGGCAAAGCATTGTAT
	Reverse	GGTGATTTGTCGTGTGCTTICC
SREBP-1c	Forward	CGGAAGCTGTCGGGGTAG
	Reverse	GTTGTTGATGAGCTGGAGCA
FAS	Forward	GGCCACCTCAGTCCTGTTAT
	Reverse	AGGGTCCAGCTAGAGGGTACA
Adiponectin	Forward	AGCCGCTTATATGTATCGCTCA
	Reverse	TGCCGTCATAATGATTCTGTTGG
Leptin	Forward	AAGAAGATCCCAGGGAGGAA
	Reverse	TGATGAGGGTTTTGGTGTCA
ACC	Forward	TGGAGAGCCCCACACACA
	Reverse	TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
IGF-1	Forward	TGGAATCCTGTGGTCCATGAAAC
	Reverse	GTCACAGTCAGCTGTATAGGG
Adipsin	Forward	CACCATCGACCACGACCTC
	Reverse	AGTGTGGCCTTCTCCGACAG
C/EBP	Forward	TGGACAAGAACAGCAACGAGTAC
	Reverse	CGGTCATTGTCACTGGTCAACT
AMPK $\alpha$ 1	Forward	GGGATCCATCAGCAACTATCG
	Reverse	GGGAGGGTCACGGATGAGG
AMPK $\alpha$ 2	Forward	CATTTGTGCAAGGCCCTAGT
	Reverse	GACTGTTGGTATCTGCCTGTTTCC
aP2	Forward	TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC
	Reverse	GAATTCACGCCAGTTTGA

(나) 비만관련 유전자 발현량 분석

- 지방형성관련 유전자의 억제로 비만을 억제함 (그림 17).

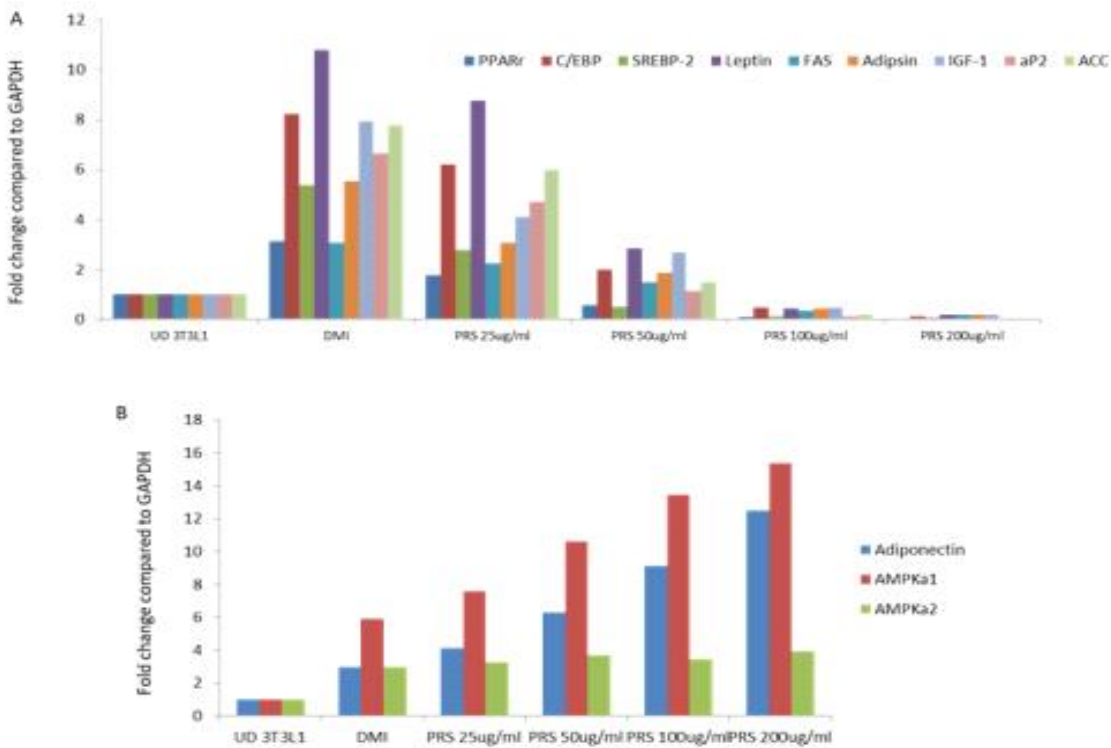


그림 17. 3T3-L1 세포의 비만 관련 mRNA 발현량 측정

다. 유기용매 분획층에 대한 췌장 라이페이스 억제능 평가

(1) 실험방법

- Enzyme buffer (10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 6.8)을 준비함.
- Porcine pancreatic lipase를 Enzyme buffer 1 mL에 녹임. 0.5 g/ 200 mL vortex ~ Filter (4°C)
- Tris buffer (100 mM Tris-HCL, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0)을 준비한 후 lipase가 들어있는 enzyme buffer 6 uL와 Tris buffer 169 uL (1+3)를 혼합함.
- 시험 약물을 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 준비. (샘플 10 mg/mL의 농도 = Final concentration 1000 ug 입)
- 시험약물 20 uL + buffer mixture 175 uL를 혼합한 후 37°C 15분 shaking incubation 함.
- incubation 후 5 uL의 substrate solution (20 mM p-NPB in DMF) 첨가 후 37°C 30분 shaking incubation 함.
- incubation 후 405 nm에서 reading 함.

(2) 실험결과

- Standard 물질인 orlistat와 뿔은감 분획층 4개의 췌장 lipase 억제율을 측정한 결과, 억제율 IC<sub>50</sub>

결과는 아래와 같음 (표 3).

표 3. 뱀은감 분획층 추출 lipase 억제 효과

Sample	IC <sub>50</sub>
Orlistate	234.46 ng/ml
Hexane	180.62 µg/mL
Methylene Chloride	225.43 µg/mL
Ethyl Acetate	428.32 µg/mL
BuOH	456.94 µg/mL
DW	665.74 µg/mL

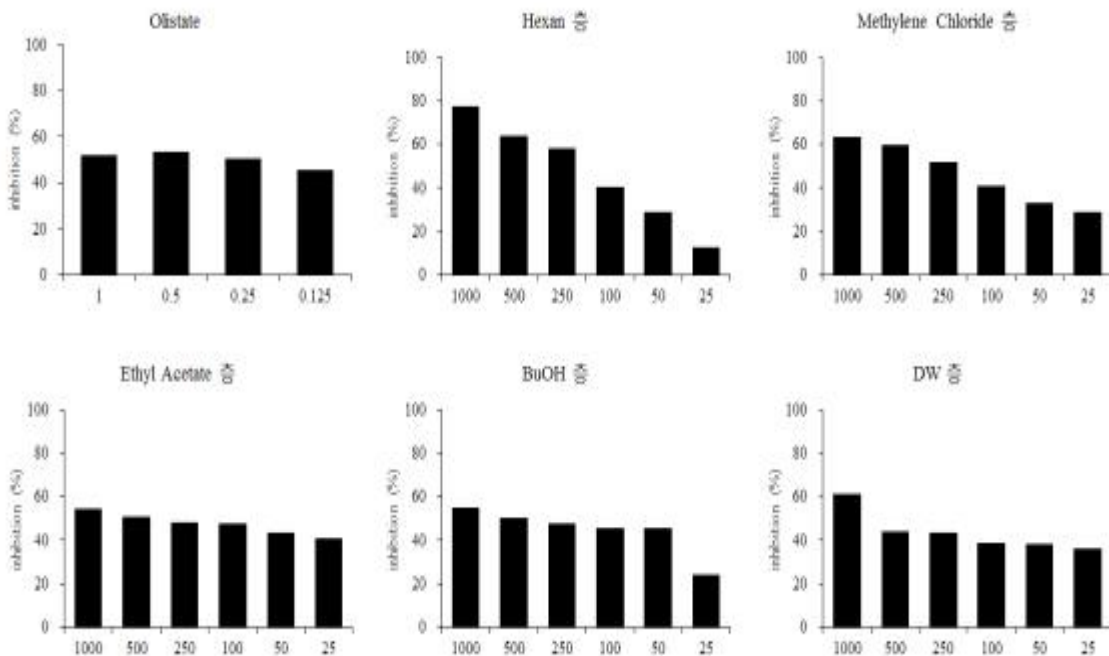


그림 18. 뱀은감 분획층별 pancreatic lipase 억제능 측정

## 2-7. 고지방식이 유도 비만 동물에 대한 뚝은감 추출물 항비만 기능성 평가

### 가. 연구방법

#### (1) 재료

- 본 실험에 사용한 뚝은감은 경상북도 상주감시험장에서 제공받아 사용함.
- 100 g의 뚝은감을 10배수의 물에 넣어 100℃에서 1시간 동안 끓임.
- 1시간 후에 10조각으로 자르고, 2시간 더 끓여 열수 추출물을 만듦.
- 뚝은감 추출물을 여과 후에 감압 농축기를 이용하여 농축 한 후 동결건조기로 분말을 만들었을 때 수율이 11.3%으로 나타남.

#### (2) 시약

- phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 및 dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich 회사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입함.
- TG, TC, HDL assay kit는 asanpharm (Seoul, Korea)의 제품을 사용함.
- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFDA), dihydrorhodamine123은 Molecular Probes로부터 구입했고, PPAR  $\alpha$ , SREBP-1, HMGCR, SCD-1, PPAR  $\gamma$ , RXR, C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ -actin, Histone 항체는 Santa Cruz Biotechnology 회사 (Santa Cruz, CA, U.S.A.)로부터 구입함.
- ACC, p-ACC, AMPK  $\alpha$ , p-AMPK  $\alpha$ 는 Cellsignaling TECHNOLOGY 회사로부터 구입함.
- Protease inhibitor mixture and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입함.
- 또한, ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용함.
- 이 외의 모든 시약은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하여 사용함.

#### (3) 실험동물

- 동물은 5주령 C57BL/6 생쥐를 샘타코에서 구입하여 7일간 적응 후 사용함.
- 대구한의대학교 동물사육실험실에서 12시간 간격으로 light cycle로 조절하고, 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%로 유지하여 사육했고, 실험 전 물과 사료는 충분한 양을 공급함.

#### (4) 동물실험

- 적응기간을 거친 후 체중에 근거하여 비만 대조군 (45% 고지방식이 섭취), 뚝은감 추출물 100 mg/kg 투여군 (Y100; 45% 고지방식이 섭취), 뚝은감 추출물 200 mg/kg 투여군 (Y200; 45% 고지방식이 섭취), 정상 쥐로 각 5마리씩 나눔.
- 정상쥐와 비만 대조군은 물을 먹여주고 투여군은 각 농도에 맞춰 매일 3주간 투여함.
- 매일 몸무게, 섭취량, 음수량을 측정함.

#### (5) 지방 조직의 무게 측정

- 실험 종료 후에 마우스를 12시간 동안 절식시킨 후, 에테르를 이용하여 마취시켜 관류후에 지방을 적출하여 생리식염수로 세척한 후 여과지로 수분을 제거하여 중량을 측정함.

(6) 혈액 지질 분석

- 투여 최종일에 심장천자법을 사용하여 혈액을 채취하여 얻은 혈액을 4000 rpm으로 원심분리하여 얻은 혈청을 사용해 Triglyceride, Total Cholesterol assay kit (asanpharm) 제품의 프로토콜에 따라 측정함.

(7) 지방 조직의 지질 함량 측정

- 지방조직에 있어서 Triglyceride, Total Cholesterol 함량을 측정하기 위해 각각의 조직을 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 분쇄한 후 chloroform과 methanol (2:1, v/v)로 만든 용매와 혼합한 후, 측정하며 측정값은 흡광도 기계를 사용하여 산출하여 계산함.

(8) 지방 조직의 Nuclear와 Post-Nuclear Fractions 제조

- 지방의 세포질단백질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, and 1.5 M sucrose, and then 0.1 M DTT and protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가함.
- 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질단백질을 포함하고 있는 상층액을 분리함.
- 핵단백질을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 uL의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex를 3번 함.
- 4°C 에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵단백질을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C 에서 각각 냉동 보관함.

(9) 지질대사 관련 단백질 발현을 Western blot 실험 방법으로 확인

- 지방에서 PPAR  $\alpha$ , SREBP-1, SREBP-2, ACC, p-ACC, SCD-1, PPAR  $\gamma$ , SREBP-2, HMGCR, pAMPK/AMPK, C/EBP  $\alpha$  단백질 발현을 측정하기 위하여 10  $\mu$ g의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동으로 분리한 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer시킴.
- 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.5% Tween 20 in PBS)에 담구어 1시간 처리한 후 PBS-T로 5분마다 5회 세척.
- 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 4°C 에서 overnight 시킨 다음 TBS-T로 10분마다 5회 세척.
- 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:5000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간30분 반응시킨 후, TBS-T로 10분마다 5회 세척.
- ECL 용액 GE Healthcare (Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량함.



(10) 지방의 조직학적 검사

- 지방조직에서 Oil Red O 분석하기 위해서 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)에 씻은 다음 Oil Red O 용액 (60% isopropanol and 40% water)에 30분간 염색을 하였고, Oil Red O 염색을 지우기 위해 증류수로 씻고 고정.
- 염색 슬라이스는 현미경과 Adobe Photoshop CS5 (Adobe)를 이용하여 분석함.

(11) 통계처리

- 통계 분석은 SPSS software program (SPSS 10.0)을 이용함.
- 모든 측정치는 평균±표준오차의평균으로 표시했고, 각 군간의 비교는 student t-test와 ANOVA를 이용한 통계적 분석을 시행하며 모든 통계값에서 0.05 미만인 경우 통계적 의의가 있는 것으로 결정함.

나. 연구결과

(1) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 체중과 지방 무게 및 섭식량, 음수량 변화

표 4. 체중, 지방 무게, 섭식량, 음수량에 있어서의 뿔은감 추출물의 효과

Group	Body weight			Adipose tissue weight	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g/3 weeks)			
<i>m/m</i>	25.0±0.1 <sup>c</sup>	25.3±0.2 <sup>c</sup>	0.3±0.3 <sup>c</sup>	1.06±0.1 <sup>c</sup>	3.0±0.1 <sup>c</sup>	5.8±0.4 <sup>c</sup>
Obese mice						
Veh	52.4±1.4 <sup>a</sup>	55.3±0.8 <sup>a</sup>	1.7±0.8 <sup>a</sup>	6.15±0.24 <sup>a</sup>	6.3±0.3 <sup>a</sup>	22.8±1.1 <sup>a</sup>
Y100	52.2±1.8 <sup>a</sup>	49.3±2.2 <sup>a</sup>	-2.9±1.3 <sup>b</sup>	5.20±0.07 <sup>b</sup>	6.6±0.4 <sup>a</sup>	32.4±1.6 <sup>a</sup>
Y200	52.1±1.5 <sup>a</sup>	49.2±1.3 <sup>b</sup>	-3.8±1.0 <sup>c</sup>	5.10±0.1 <sup>b</sup>	6.6±0.2 <sup>a</sup>	29.7±1.1 <sup>a</sup>

- 실험 기간 중 정상군에서는 체중의 변화가 없었지만 대조군에서는 체중이 증가하는 경향을 보임.
- 대조군과 비교하여 뿔은감 투여군에서 농도 의존적으로 유의한 체중이 감소를 확인함.
- 지방 무게 변화는 정상군과 비교하여 대조군에서는 유의하게 증가했고, 뿔은감 투여군 두 농도 모두 대조군에 비하여 유의한 감소를 보임.
- 그러나 섭식량 및 음수량은 대조군에 비하여 뿔은감 투여군에서 변화를 보이지 않음.

(2) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 혈중 및 지방조직에서의 생화학적 분석

표 5. 혈중 생화학적 분석에 있어서의 뿔은감 추출물의 효과

Item <sup>a</sup>	m/m <sup>a</sup>	Obese mice <sup>a</sup>		
		Veh <sup>a</sup>	Y100 <sup>a</sup>	Y200 <sup>a</sup>
Serum <sup>a</sup>				
Triglyceride <sup>a</sup> (mg/dl) <sup>a</sup>	222.2±2.3 <sup>c</sup>	311.9±3.4 <sup>a</sup>	290.0±8.0 <sup>b</sup>	272.3±11.0 <sup>b</sup>
Total cholesterol <sup>a</sup> (mg/dl) <sup>a</sup>	112.7±1.0 <sup>c</sup>	159.0±5.8 <sup>a</sup>	132.4±3.9 <sup>b</sup>	128.2±2.2 <sup>c</sup>
Adipose tissue <sup>a</sup>				
Triglyceride <sup>a</sup> (mg/mg protein) <sup>a</sup>	256.6±22.0 <sup>c</sup>	455.3±39.8 <sup>a</sup>	374.5±27.9 <sup>b</sup>	247.4±2.2 <sup>c</sup>
Total cholesterol <sup>a</sup> (mg/mg protein) <sup>a</sup>	3.5±0.1 <sup>b</sup>	6.8±0.8 <sup>a</sup>	4.4±0.3 <sup>a</sup>	3.9±0.9 <sup>a</sup>

- 혈중 생화학적 분석에서 triglyceride와 total cholesterol의 수치를 확인 한 결과, 대조군에서 tri glyceride는 정상군과 비교하여 유의하게 증가했고, 뿔은감 추출물을 투여한 군에서는 두 농도 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소.
- Total cholesterol의 수치 역시 대조군에서 정상군에 비하여 유의한 증가를 보였으며, 뿔은감 추출물이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고, 특히 Y200에서 크게 감소한 것으로 확인함.
- 지방조직에서의 triglyceride와 total cholesterol역시 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 증가하였고, triglyceride의 수치는 Y200에서만 유의한 감소를 보였고, total cholesterol의 수치는 두 농도 모두 유의한 감소를 보임.

(3) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 지방 조직에서의 지방 분화 관련 단백질 웨스턴 분석

- 지방 조직에서의 지방 분화 관련 단백질인 ppar  $\gamma$  와 C/EBP  $\alpha$  를 측정 한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 ppar  $\gamma$  와 C/EBP  $\alpha$  의 발현이 유의성 있게 증가함.
- 반면에 뿔은감 투여군에서 ppar  $\gamma$  의 발현은 Y200에서만 유의성 있게 감소하였고, C/EBP  $\alpha$  는 두 농도 모두 발현이 감소하는 경향만 보임.
- RXR의 발현은 정상군에 비하여 대조군에서 유의있는 증가를 보였고, 뿔은감 투여군에서는 정상군과 비슷한 수치까지 유의적인 감소를 보임.

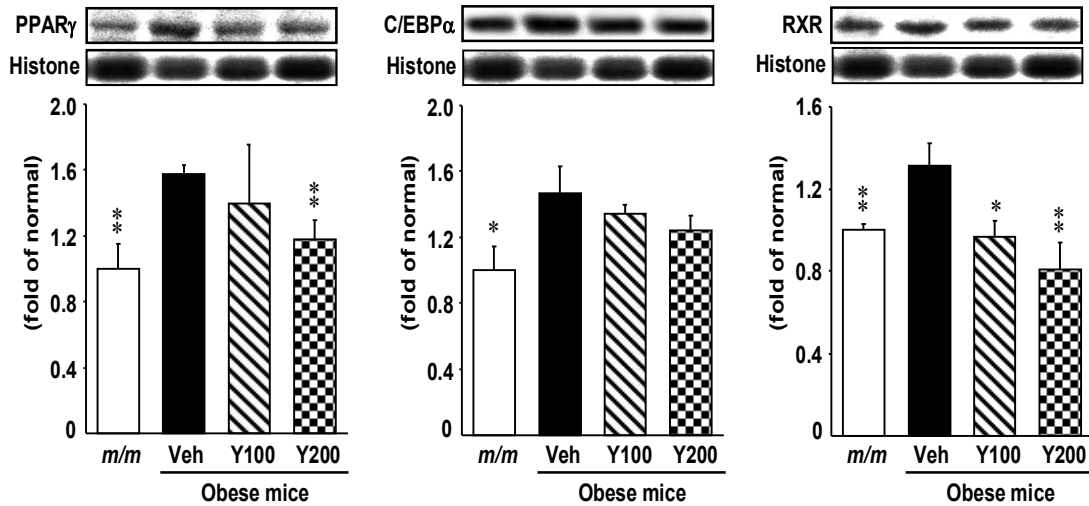


그림 19. 지방 조직에서의 지방 분화 관련 단백질 ppar  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$  측정

(4) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 지방 조직에서의 생체 에너지 대사 관련 단백질 웨스턴 분석

- 지방 조직에서 생체 에너지 대사 관련 단백질 분석에서 AMPK  $\alpha$ 와 p-AMPK  $\alpha$ 의 발현은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소함.
- AMPK  $\alpha$ 의 발현은 뿔은감 추출물 투여군에서 유의한 증가하였고, p-AMPK  $\alpha$ 의 발현은 뿔은감 추출물 200 mg/kg의 농도에서만 유의한 증가를 보임.

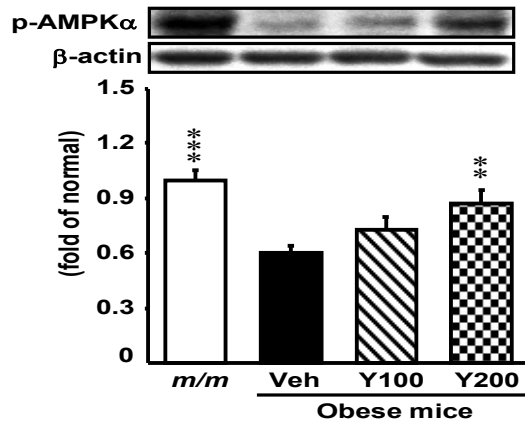


그림 20. 지방 조직에서 생체 에너지 대사 관련 단백질 p-AMPK  $\alpha$  분석

(5) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 지방 조직 중성지방합성 및 산화 관련 단백질 웨스턴 분석

- 지방 조직에서 산화와 관련된 단백질인 PPAR $\alpha$ 의 발현은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 감소했고, 뿔은감 추출물 투여군에서 두 농도 모두 유의적인 증가를 확인 할 수 있었음.
- 또한 지방 조직의 중성지방 합성 관련 단백질 분석에서 SREBP-1은 정상군에 비해 대조군은 유의하게 상승했고 Y100에서 감소하는 경향만 보였으나 Y200에서는 유의한 감소를 확인할 수 있음.
- p-ACC는 정상군에 비해 대조군은 유의성 있게 감소하였으며 Y200에서 정상군에 근접하게 유의적인 증가를 보임.
- SCD-1은 정상군에 비해 대조군에서 2.5배 유의하게 증가했고 Y100에서는 감소하는 경향만 보였고, Y200에서 유의하게 감소함 (그림 21).

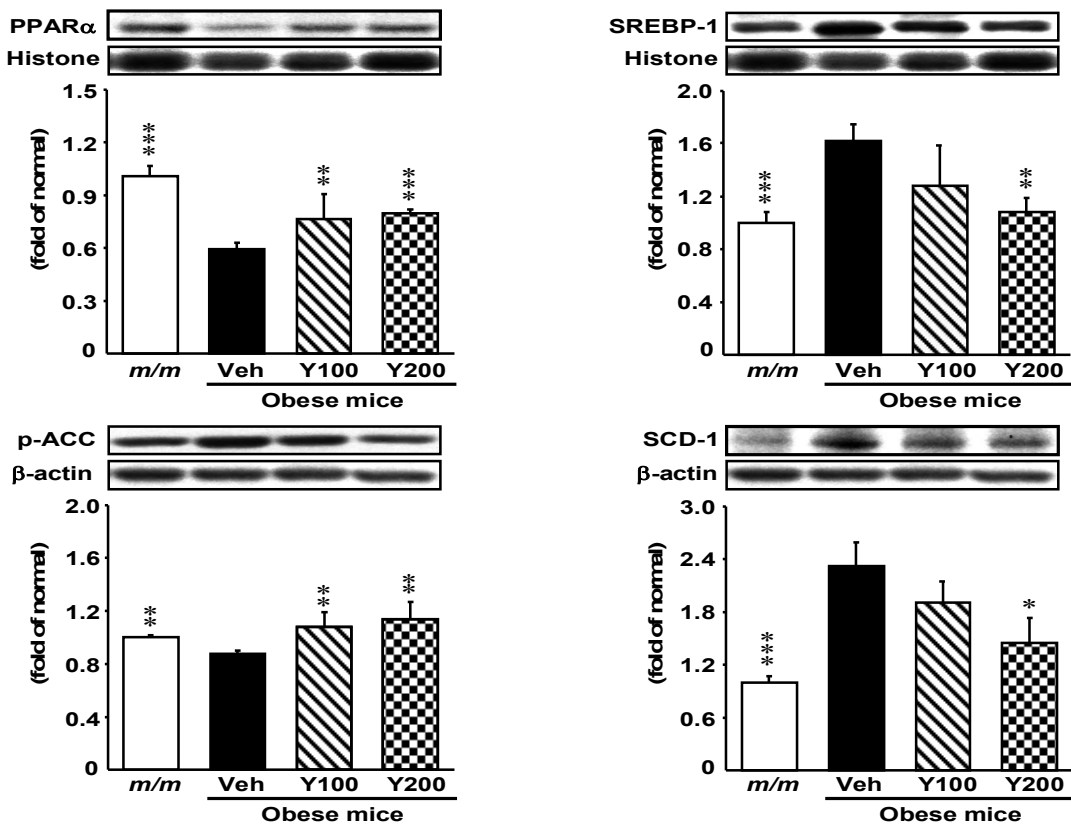


그림 21. 지방 조직의 PPAR $\alpha$ , SREBP-1, p-ACC, SCD-1 단백질 발현 분석

(6) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 지방 조직 콜레스테롤합성 및 배출 관련 단백질 웨스턴 분석

- 지방 조직의 콜레스테롤 합성 관련 단백질 분석에서 SREBP-2는 정상군에 비해 대조군은 유의한 상승을 보였고, 뿔은감 추출물 투여군에서 모두에서 감소하는 경향을 보임.
- HMGCR의 발현은 정상군에 비해 대조군은 유의하게 증가하였고 뿔은감 추출물 투여군은 두 농도 모두 감소하는 경향만 보임.
- 콜레스테롤의 배출에 관련된 단백질인 ABCA1은 정상군에 비해 대조군에서 3배 정도의 감소를 보였으나, 뿔은감 추출물 투여군에서는 두 농도 모두 유의한 증가를 확인 할 수 있음 (그림 22).

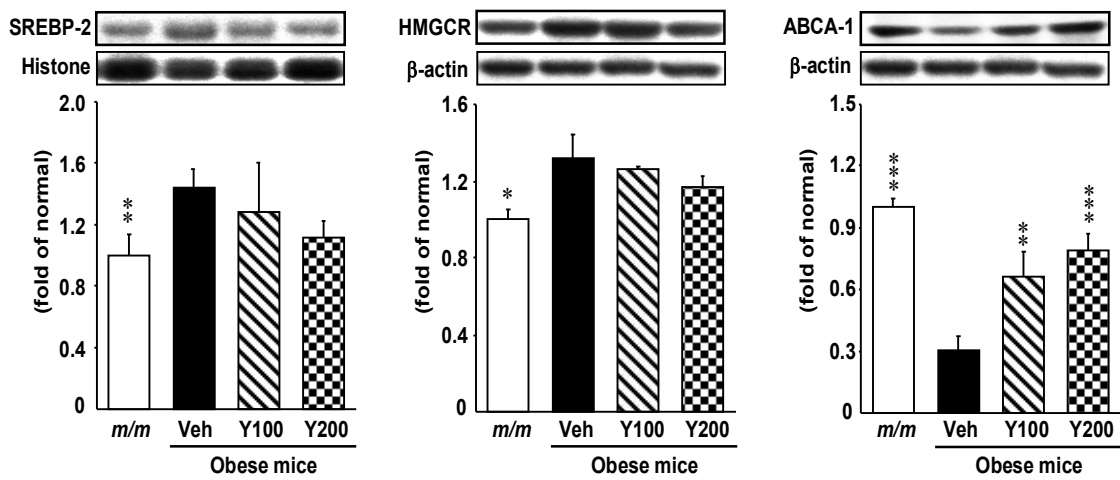


그림 22. 지방 조직의 SREBP-2, HMGCR, ABCA1 단백질 발현 분석

(7) 비만 생쥐에게 뿔은감 추출물 투여 후 지방 조직의 조직학적 형태 변화

- 지방 조직의 조직학적 형태 변화를 확인한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 adipocyte 크기가 크게 증가했고, 뿔은감 추출물 투여군에서는 농도에 의존적으로 adipocyte 크기가 감소함 (그림 23).
- 실험에 사용한 비만 생쥐는 렙틴 호르몬의 수용체 이상으로 증가된 식이량을 보이며 그 결과 비만이 유도 됨.

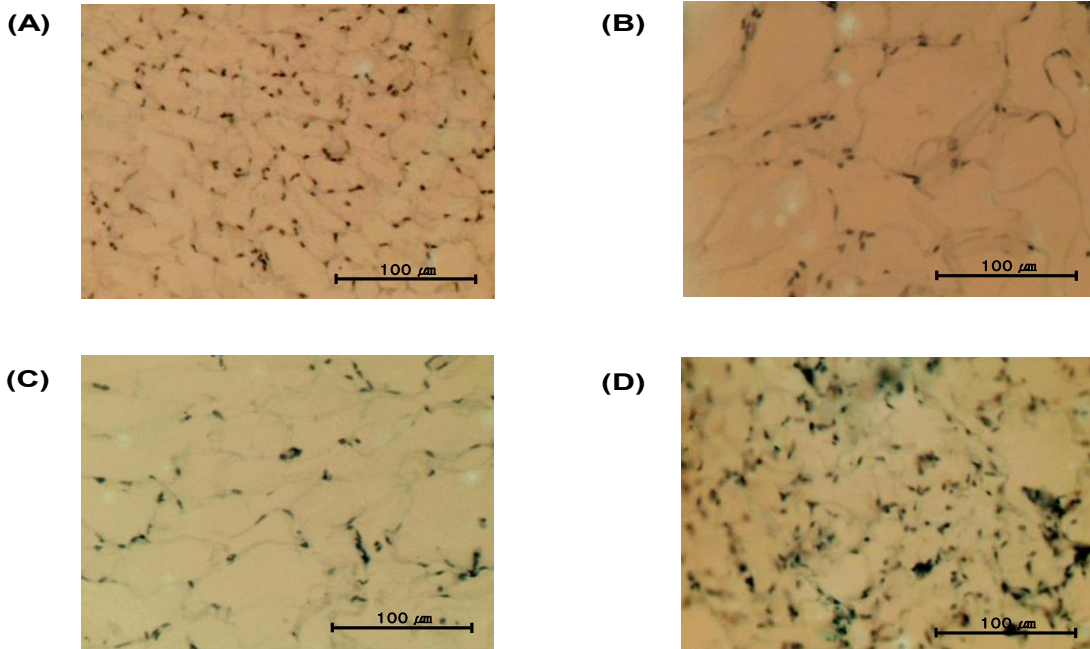


그림 23. 지방조직의 조직학적 관찰

## 2-8. 대량생산 공정 확립

### 가. 뽕은감 열수 추출을 통한 대량 생산 공정 연구

#### (1) 뽕은감 시료 준비

- 뽕은감은 상주동시 품종으로 상주감시험장에서 기원을 확인함.
- 동정된 뽕은감 열수 추출공정 연구를 위해, 아래 표와 같이 진행함.
- 뽕은감 300 kg을 무게를 달고, 5톤 용량 추출기에 넣고 물은 10배수를 넣어 132℃ 8시간이상 추출.
- 추출액은 여과한 후 50℃에서 50 cmhg에서 농축함.
- 농축은 40 브릭스이상으로 수행되었고, 바로 -30℃에서 급속 동결함.
- 동결된 시료는 동결건조를 하였으며, 분쇄 후 지대포장 함.



그림 24. 상주동시 뽕은감 원료

표 6. 뽕은감 시료 물질 공정과정

<p>작업공정도</p> <p>추 출 : 132℃ 8시간이상 추출</p> <p>여 과 : 100 mesh 추출액 여과</p> <p>감압농축 : 50cmhg, 50℃ 농축</p> <p>농 축 : 40brix이상 농축</p> <p>급속동결 : -30℃ 이하에서 급속동결</p> <p>동결건조 : 50℃, 1.0torr 동결건조</p> <p>지대포장</p>	<p>뽕은감 300 kg (생물)</p> <p>↓</p> <p>33.3 킬로그램 분말 생</p> <p>산</p> <p>수율 11.1%</p>
---	--



그림 25. 뽕은감 열수 추출물 시료

● 열수 추출의 목적

- 건강기능식품 원료로 사용될 수 있음.
- 추출방법은 크게 2가지로, 열수추출과 주정추출이 있음.
- 본 연구는 사전 *in vitro* 실험에서 에탄올농도가 높을수록 췌장리파이제 활성이 억제되는 것을 확인하였는데, 에탄올 추출물의 식이섬유 함유량은 열수 추출물보다 함유량이 적어 탄닌에 의한 변비 유발에 대한 우려가 있다고 판단하였음.
- 또한 이를 대량생산 공정으로 적용하기 위해서는 생산단가 부분과 제조공정을 검토해야 함.
- 이에 주정추출시 증가되는 생산단가의 증가와 GMP 제조시설에서의 주정 추출 OEM 식품회사의 부재 (방폭시설 설비)로 인해, 열수추출법을 결정하게 되었음.
- 이를 통해, 원료물질의 생산단가가 낮추어졌으며 이는 궁극적으로 경쟁력있는 제품이 될 수 있다고 판단됨.

## 나. 뽕은감 유래 GMP 추출물 대량 생산 공정 연구

### (1) 재료구입 및 생산공정

- 뽕은감의 구입은 상주시 중동면 소재 대산농원 (대표 김세경)을 통해 구매하였으며, 부재료인 진피는 경북 영천 (생산자: 방석백)에서 구입함.
- 식품유형은 기타가공품으로, 뽕은감 44.6%, 진피 44.6% 및 덱스트린 10.8%를 함유하고 있음.
- 제조 방법은 뽕은감과 진피를 계량하여 투입하고, 추출 : 정제수를 투입한 후 2 시간 동안 추출.
- 추출조에 효소분해를 시행하는데, 효소를 투입한 후 15시간 동안 효소분해함.
- 다음 단계로, 90℃에서 30분간 효소를 실활시킴.





그림 26. 뽕은감복합 추출물 제조 공정도

#### 효소 처리 공정의 필요성

뽕은감은 당 성분과 고분자 식이섬유가 대량으로 함유되어 있어 열수추출 시 점도가 매우 높으므로, 이를 여과하기 위해서는 고압식 필터가 필수적임.

그러나, 고압식 필터를 수행하더라도 여과가 어렵고, 잦은 필터 교환이 필요함. 이를 해결하기 위해 식이섬유 분해를 위해 효소 처리 후, 불활성시키는 공정이 꼭 필요함.

이는 효소 처리하지 않고 대량 추출한 예비 공정 연구 결과로 도출된 결론임.

- 추출액은 규조토를 이용하여 여과한 후 0 bx까지 농축.
- 농축액에 농축액에 덱스트린을 투입한 후 혼합하고, 95℃에서 30분간 가온 살균함.
- 살균처리된 덱스트린 혼합농축액을 동결건조한 후, 분쇄기로 분쇄하여 분말화하여, 최종 추출물 분말은 일정단위로 포장하여 제품화함.
- 본 제품의 성상은 고유의 색택과 향미를 가지는 암갈색의 분말로, 식품공전에서 정한 식품류 제조 시 적당량 사용하고, 포장방법 및 포장단위는 1 kg, 5 kg, 10 kg, 20 kg 등 폴리에틸렌 포장지에 밀봉 후 외포장함.
- 유통 기간은 제조일로부터 12개월까지(자가설정) : 직사 광선을 피하고 실온 보관함.



그림 27. 뚝은감복합 GMP 원료물질 포장백



그림 28. 뚝은감복합 GMP 원료물질



그림 29. 뚝은감 복합추출물



그림 30. 뚝은감복합 추출물 파우더 (좌)와 뚝은감 열수추출물 파우더 (우)

## 2-9. 화학성분 분석

### 가. 총 폴리페놀, 총플라보노이드 및 카테킨 함량 분석

#### (1) 총 폴리페놀 함량 실험 방법

- 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis<sup>1)</sup>법에 의해 측정.
- 시료 20  $\mu$ L에 증류수 1.58 mL, 폴린-시오칼토페놀 시약 (Folin-Ciocalteu' phenol reagent) 100  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 300  $\mu$ L의 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 첨가.
- 20°C에서 2시간 후 UV 분광광도계 (spectrophotometer) (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 표준물질 갈산 (gallic acid) (Sigma Aldrich)를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 시료추출물의 총페놀 함량을 산출.

#### (2) 총 플라보노이드 함량 실험 방법

- 시료를 1 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹이고, 시료 50  $\mu$ L와 445  $\mu$ L의 diethylene glycol, 1N NaOH 5  $\mu$ L를 가하여 잘 혼합<sup>2)</sup>.
- 37°C의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정함.
- 표준 곡선은 naringin을 이용하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구함.

(3) 카테킨 함량 실험 방법

- 카테킨 함량을 분석하기 위해 Nishitani and Yuko 2004<sup>3)</sup>법에 의해 측정함.
- HPLC 분석을 위해 Dikma Diamonsil (C18) (250×4.6 mm) 컬럼을 사용했고 40℃에서 작동시킴.
- 분리한 물질을 이동상으로 H2O:MeOH:Phosphoric acid = 80::20:0.1의 조건과 flow rate 0.3 mL/min으로 254 nm에서 분석한 결과 화합물은 (-)-catechin의 retention time과 일치함을 확인되었음.

(4) 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 카테킨 함량 분석

- 뽕은감의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 아래와 같음 (표 7).

표 7. 뽕은감 총 폴리 페놀, 플라보노이드 및 카테킨 함량

No.	뽕은감	Contents
1	Total polyphenol	19.22 ± 0.50 mg/g
2	Total flavonoid	18.93 ± 0.12 mg/g
3	(-)-catechin	5.70 ± 0.10 mg/100g

## 2-10. 활성성분의 분리 기술 개발

### 가. 실험 재료

(1) 본 실험에서 사용한 감 (*Diospyros kaki*)은 상주감시험장 및 대산농원에서 구입하여 사용하였고, 표 8에 나타난 내용과 같음.

표 8. Tested Korean herbal medicine

Sources	Scientific name	Part used	Collected aria
감	<i>Diospyros kaki</i>	Fruits	SangJu, 2016. 10. 12

### 나. 시료 제조

- 감에 대해 3 L의 증류수를 첨가하여 100℃에서 3시간 동안 열수 추출을 3회 반복하여, What man No. 1 여과지로 여과하며, 각 추출물은 감압농축기 (rotary vacuum evaporator)로 40℃

이하에서 농축하여 얻어진 시료에 대해 성분분석을 실시.

- 또한 극성별 물질을 분리를 용이하게 하기 위하여 극성별 유기용매인 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH을 활용하여 극성별 분획인 n-Hexane층, EtOAc층, n-BuOH층 및 H<sub>2</sub>O층을 각각 얻음.
- 각 분획별 농축 결과물에 대하여 지표물질 선정을 목표로 한 시료를 대량으로 확보하였으며, 각 추출물은 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용함.

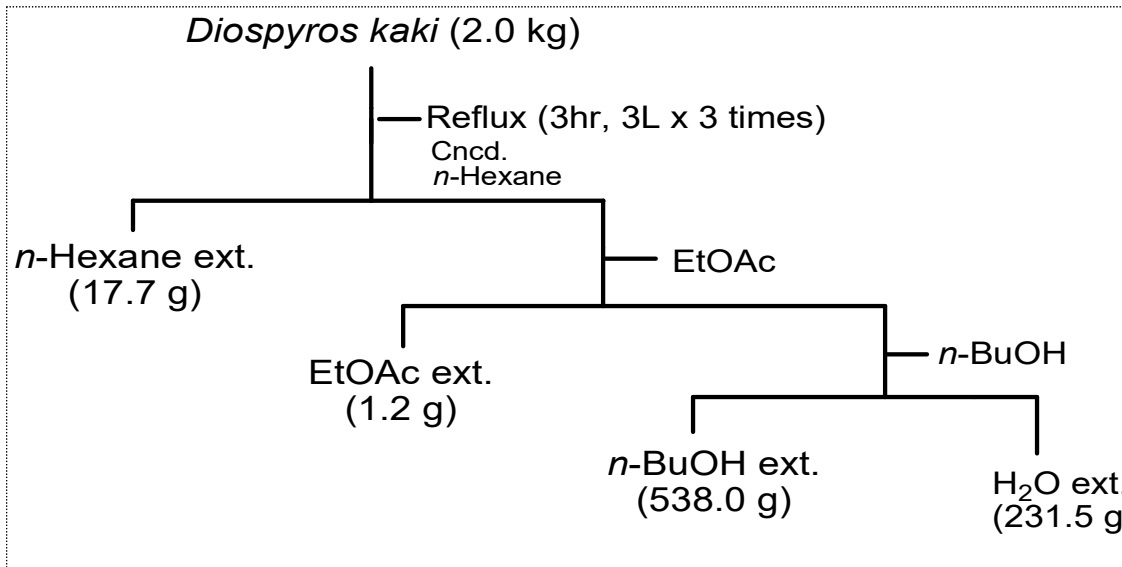
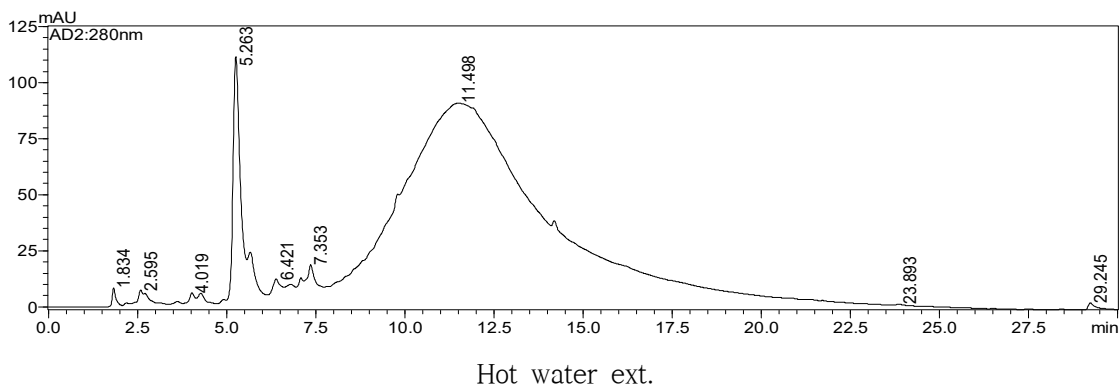
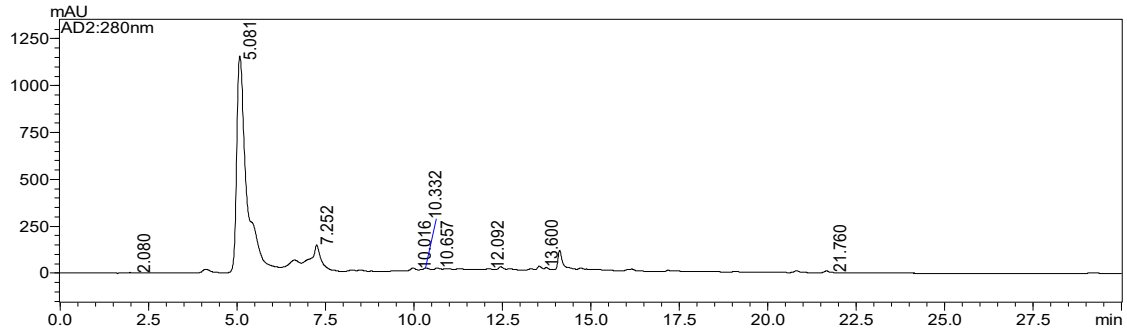


그림 31. Isolation procedure of Diospyros kaki fruits

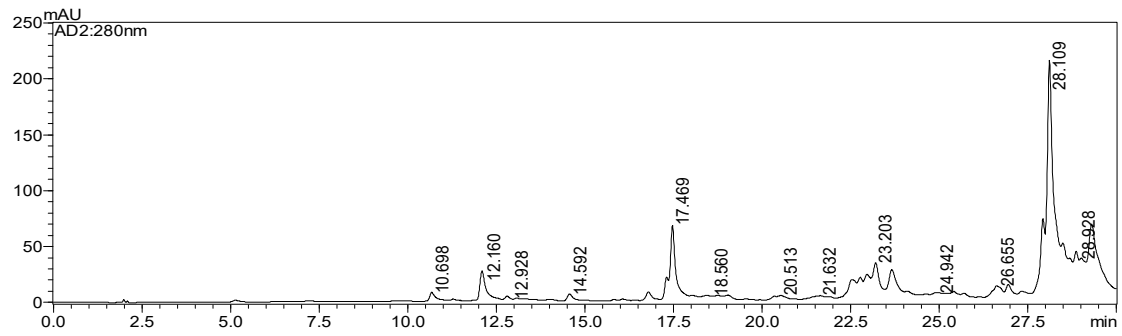
#### 다. 유기용매 분획 및 분석

- 감 열수추출물의 각 분획인 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 추출물 및 유기용매 가용부에 대해 지표물질선정을 위해 분석을 수행하였음.
- 감의 주요성분으로는 catechin 등의 물질이 보고되어 있으며, 이들 물질의 항산화, 항당뇨 등의 보고가 있음.
- 이들 분획에서 지표물질로 활용한 화합물의 분리 및 동정을 위하여 준비한 감 추출물 및 유기용매 분획에 대해서 시료 1.0 mg/mL의 농도로 조제하여 distilled MeOH로 녹인 다음, 2.0 mL를 injection함.
- Reversed-phase HPLC의 분석 조건은 아래에서 나타낸 것과 같음.

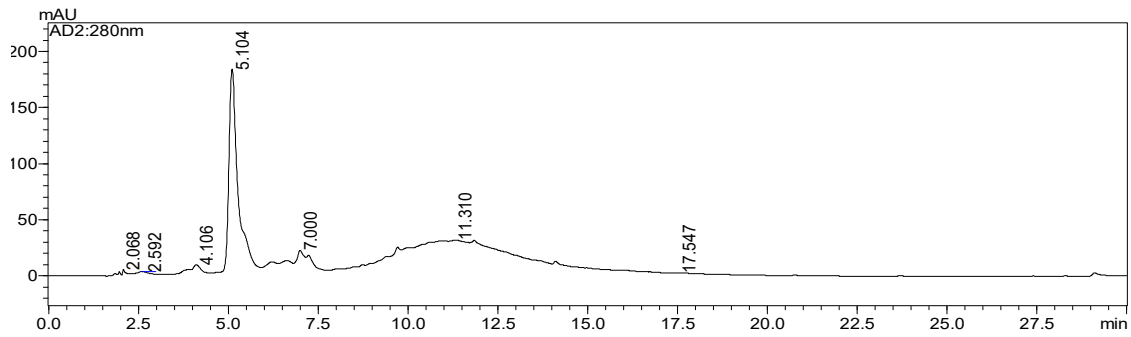




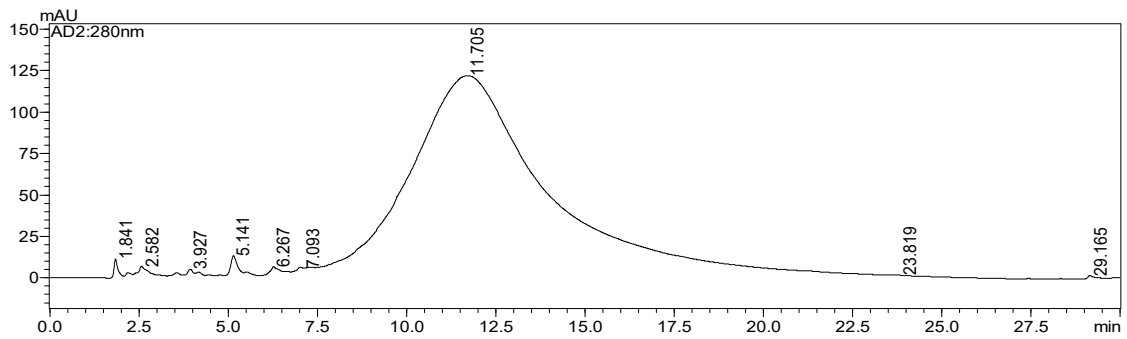
EtOAc ext.



n-Hexane ext.



n-BuOH ext.



H2O ext.

그림 32. HPLC chromatograms of D. kaki fruits extracts and organic solvent layers.

라. n-BuOH층의 성분에 대한 물질의 분리 및 동정

(1) Gallic acid

- 감열수추출물 및 각 유기용매 분획에 대해서 분석을 실시한 결과 5.1min 및 11.7min 대의 화합물이 감 열수추출물의 주요성분임을 확인.
- 또한 H<sub>2</sub>O층에서 감탄닌 polymer의 피크가 11.7min에 확인되었고 n-BuOH층에서 5.1min대의 화합물이 검출됨.
- 감탄닌 polymer의 경우 감의 생합성 조건에 따라 catechin의 결합 방식과 결합수가 틀려지므로 본 시료의 지표물질로 부적절함으로 n-BuOH층에서 5.1min대의 화합물의 구조결정을 통한 지표물질 후보로 선정하기 위하여 물질 분리를 수행함.
- n-BuOH층에 대해서 Diaion HP-20 및 ODS gel을 활용한 물질 분리를 수행하여 화합물의 구조를 결정함.
- 본 화합물의 분리 과정에서 reversed-phase HPLC를 활용하여 물질용출 패턴을 모니터링함 (그림 32).

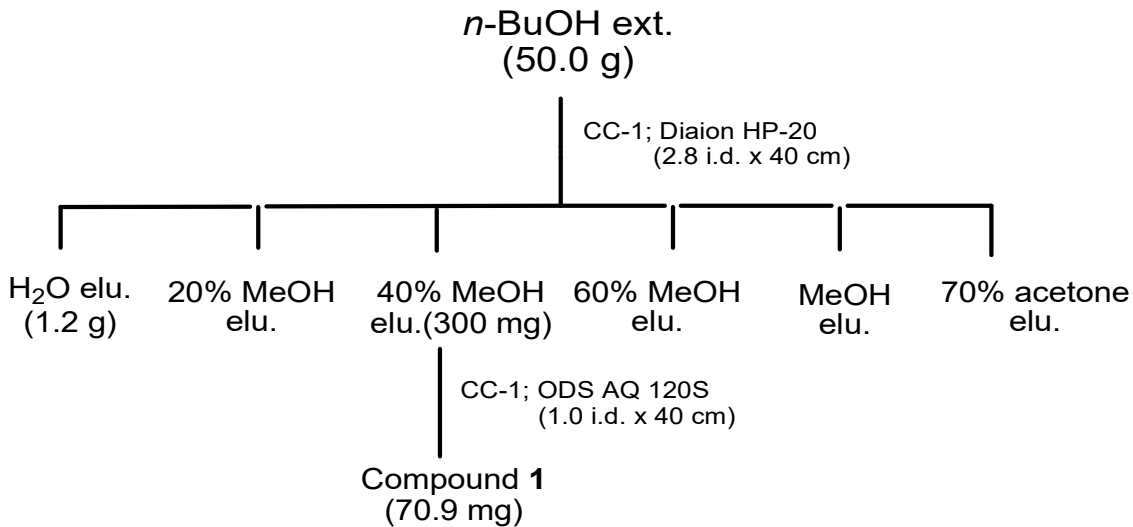
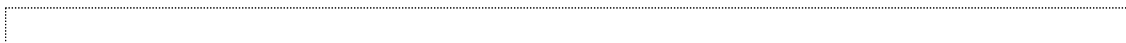


그림 33. Isolation procedure of n-BuOH ext. from Diospyros kaki fruits

분리한 물질을 이동상으로 H<sub>2</sub>O:MeCN = 99:1의 조건과 flow rate 1.0 mL/min로서 254 nm에서 분석한 결과 화합물 1은 gallic acid의 retention time과 일치함을 확인 (그림 34).



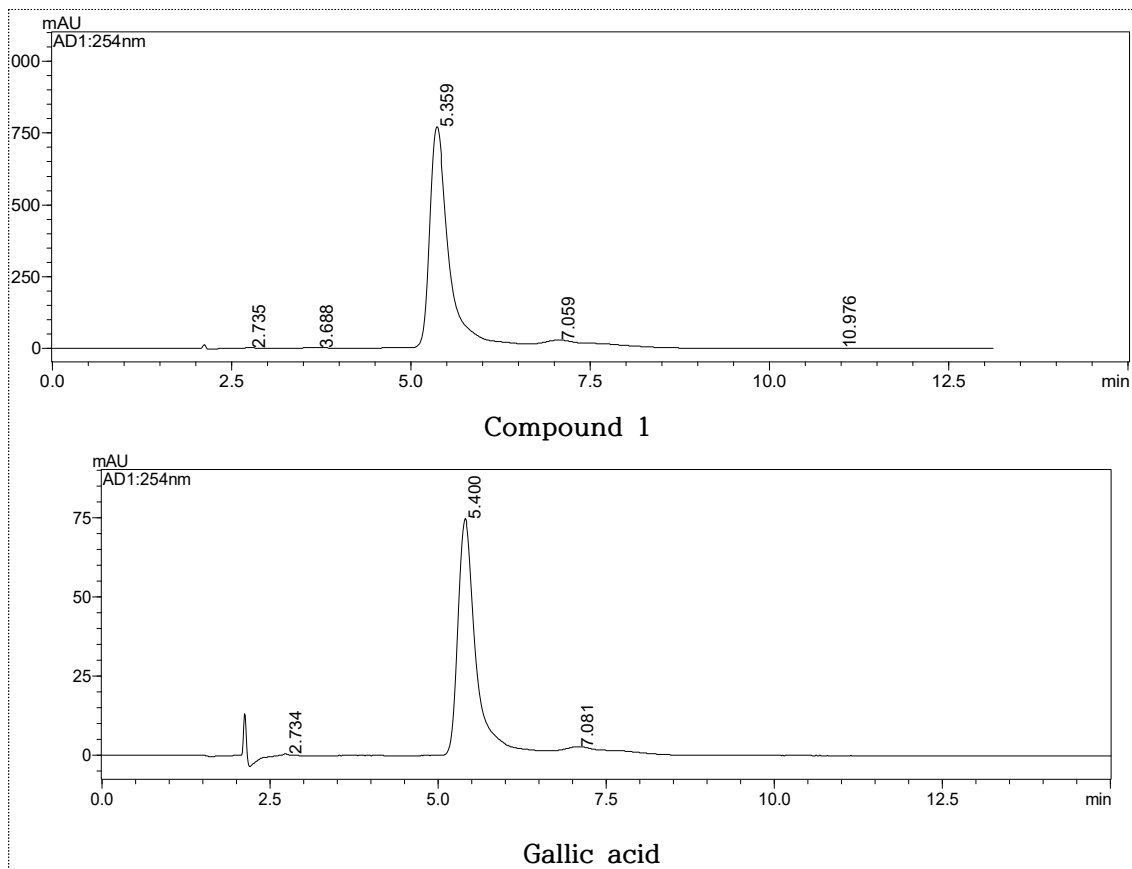


그림 34. Comparative HPLC analysis of isolated compound 1 and gallic acid.

### 마. 분리한 화합물의 구조 결정

- 각종 column chromatography를 통한 지표물질로 활용가능한 화합물의 분리를 실시하였고, 분리한 화합물에 대해서는 HPLC를 이용하여 순도를 검증하고, 순수한 물질에 대해서는  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -의 1D-NMR과 COSY, NOESY (or ROESY), HMBC, HMQC와 같은 2D-NMR을 측정하여 화합물 1의 구조를 gallic acid로 동정.
- 본화합물의 경우 향후 단일물질의 활성 검증 및 품질관리에 필요한 지표물질로서 활용가능하다고 사료됨.

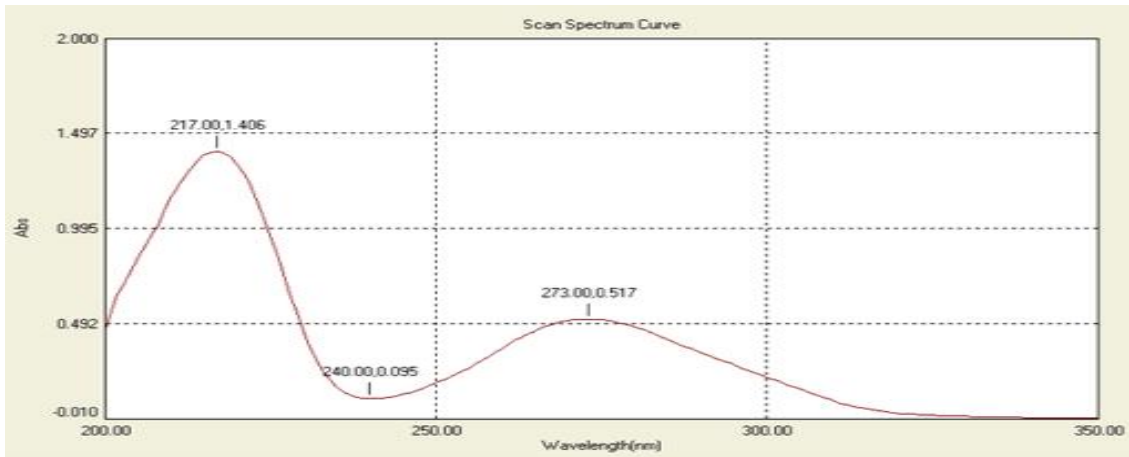


그림 35. UV spectrum of compound 1

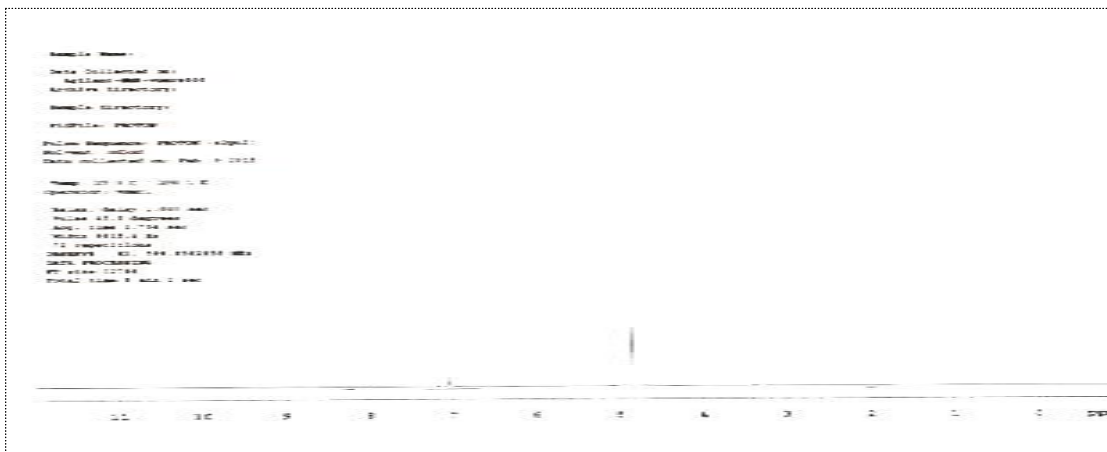


그림 36.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (600MHz)



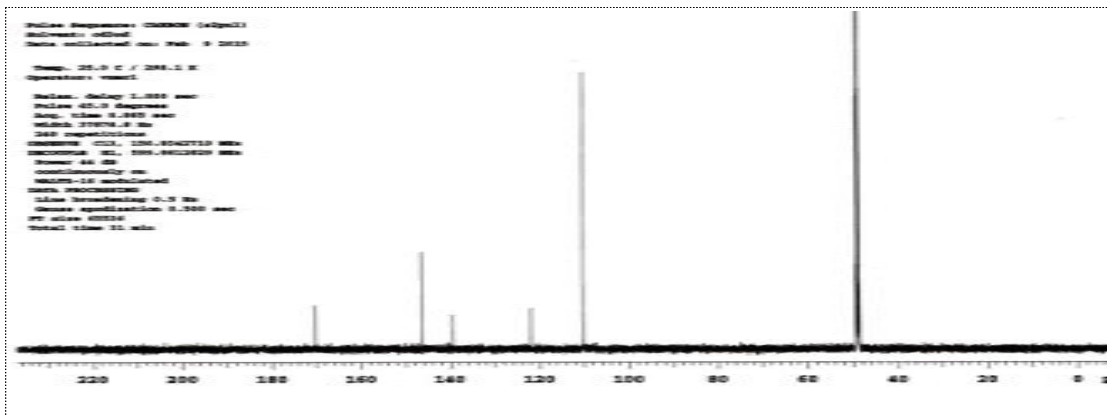


그림 37.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (600MHz)

- Compound 1 (gallic acid) : amorphous white powder;  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ H 7.01(2 H, s, H-2,6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ C 176.1( $\text{COO}^-$ ), 140.1(C-3,5), 139.1 (C-4), 121.1 (C-1), 110.0 (C-2,6). These data were in agreement with the reported literature values (Li Y, Shibahara A, Matsuo Y, Tanaka T, Kouno I. 2010. Reaction of the black tea pigment the aflavin during enzymatic oxidation of tea catechins. *J Nat Prod.* 73: 33-39).

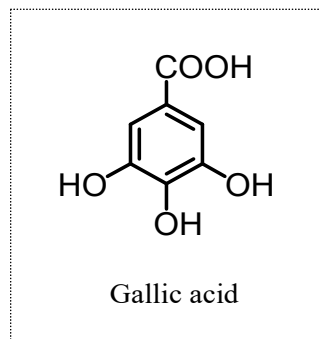


그림 38. Structures of isolated compound 1 (gallic acid)

## 2-11. 뚝은감 유래 체지방감소 물질의 *in vivo* 기능성 평가

### 가. 45% HFD 고지방식이 유도 비만 동물에 대한 뚝은감·진피 복합추출물 (PCM) 항비만 기능성 평가

#### (1) 실험방법

- 6주령 수컷 ICR 마우스 (20-25 g)를 ORIENT (경기도, 한국)에서 구입함.
- 1주일 실험실 환경에서 적응기간을 거친 후 체중에 근거하여 정상군, 비만 대조군 (45% 고지방식이 섭취), 양성 대조군 (orlistat 60 mg/kg 농도 투여군), PCM50 투여군 (45% 고지방식이 섭취 및 PCM 50 mg/kg 농도 투여군), PCM100 투여군 (45% 고지방식이 섭취 및 PCM 100 mg/kg 농도 투여군), PCM200 투여군 (45% 고지방식이 섭취 및 PCM 200 mg/kg 농도 투여군)로 각 5마리씩 나눔.
- 정상쥐와 비만 대조군은 물을 먹여주고 투여군은 각 농도에 맞춰 매일 8주간 경구 투여함.
- 매일 몸무게, 섭취량, 음수량을 측정하며 8주 동안 투여 한 후에 각 마우스를 12시간 동안 금식한 후 혈청, 간을 채취하여 분석할 때 까지 -80°C에 보관.

#### (2) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 체중변화량 및 지방조직 무게 측정

표 9. PCM 투여에 대한 무게 변화 및 지방 무게

Group	Body weight			Visceral fat weight (g)
	Initial (g)	Final (g)	Change (g/6weeks)	
Normal	36.06 ± 0.96	47.92 ± 1.46**	11.86 ± 1.00*	24.1 ± 1.0***
HFD-fed mice				
Con	37.67 ± 0.51	55.15 ± 1.78	17.48 ± 1.95	57.5 ± 1.5
O	36.71 ± 0.96	44.92 ± 1.62**	8.21 ± 1.82**	42.5 ± 2.8*
PCM50	37.18 ± 0.44	48.06 ± 0.17**	10.88 ± 0.52*	50.6 ± 3.2
PCM200	36.93 ± 0.38	45.98 ± 0.94**	9.05 ± 0.90**	50.3 ± 2.3*

#### (3) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 혈청 및 간 조직 분석

- 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS를 혈액 및 간 조직 내에서 PCM은 농도 의존적으로 유의하게 감소시킴.
  - 혈청 내 TG, TC 및 LDL는 PCM 100 투여군에서만 유의성 있게 감소시켰고 또한 VLDL 수치는 PCM 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시킴.
- 간 조직 내 TBARS는 PCM 농도 의존적으로 모두 유의성 있는 감소를 나타냈고 TG,TC는 PCM 100 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냄 (표 10).

표 10. PCM 투여에 대한 생화학적 분석

Parameters	Normal	HFD-fed mice			
		Veh	O60	PCM50	PCM100
<b>Serum</b>					
ROS (flu/min/mL)	5094 ± 219 <sup>***</sup>	6631 ± 941	5425 ± 294 <sup>**</sup>	5543 ± 180 <sup>***</sup>	5274 ± 547 <sup>*</sup>
TG (mg/dL)	187.3 ± 6.6 <sup>**</sup>	220.7 ± 5.7	198.9 ± 1.6 <sup>**</sup>	195.0 ± 2.3 <sup>**</sup>	189.5 ± 1.0 <sup>***</sup>
TC (mg/dL)	130.9 ± 1.4 <sup>***</sup>	196.6 ± 4.0	161.9 ± 4.6 <sup>***</sup>	184.5 ± 4.7	160.3 ± 12.2 <sup>*</sup>
HDL (mg/dL)	82.4 ± 0.5 <sup>***</sup>	96.1 ± 0.7	97.3 ± 7.1 <sup>**</sup>	103.8 ± 0.6 <sup>***</sup>	98.2 ± 2.7
LDL (mg/dL)	15.9 ± 1.1 <sup>***</sup>	45.1 ± 1.7	33.2 ± 2.1 <sup>**</sup>	39.3 ± 2.7	39.8 ± 0.9 <sup>*</sup>
VLDL (mg/dL)	39.6 ± 1.2 <sup>*</sup>	44.1 ± 1.1	39.8 ± 0.3 <sup>**</sup>	39.2 ± 0.6 <sup>**</sup>	37.9 ± 0.2 <sup>***</sup>
<b>Liver</b>					
ROS (flu/min/mg protein)	3123 ± 127 <sup>*</sup>	3870 ± 218	2507 ± 93 <sup>***</sup>	2948 ± 63 <sup>***</sup>	2630 ± 187 <sup>**</sup>
TBARS (nmol/mg protein)	0.12 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.0 <sup>***</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>**</sup>
TG (mg/mg protein)	2.87 ± 0.09	3.33 ± 0.3	2.12 ± 0.06 <sup>*</sup>	2.94 ± 0.12	2.23 ± 0.05 <sup>*</sup>
TC (mg/mg protein)	2.42 ± 0.08	2.81 ± 0.25	1.76 ± 0.04 <sup>**</sup>	2.48 ± 0.1	2.07 ± 0.16 <sup>*</sup>

(4) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 간 조직 oil red O 염색

- 간 조직을 oil red O 염색을 시켜 현미경 200배율로 관찰한 결과 대조군 (b)는 증가지방세포의 크기가 증가됨을 관찰했고 PCM은 농도 의존적으로 대조군에 비해 지방세포의 감소를 나타냄 (그림 39).

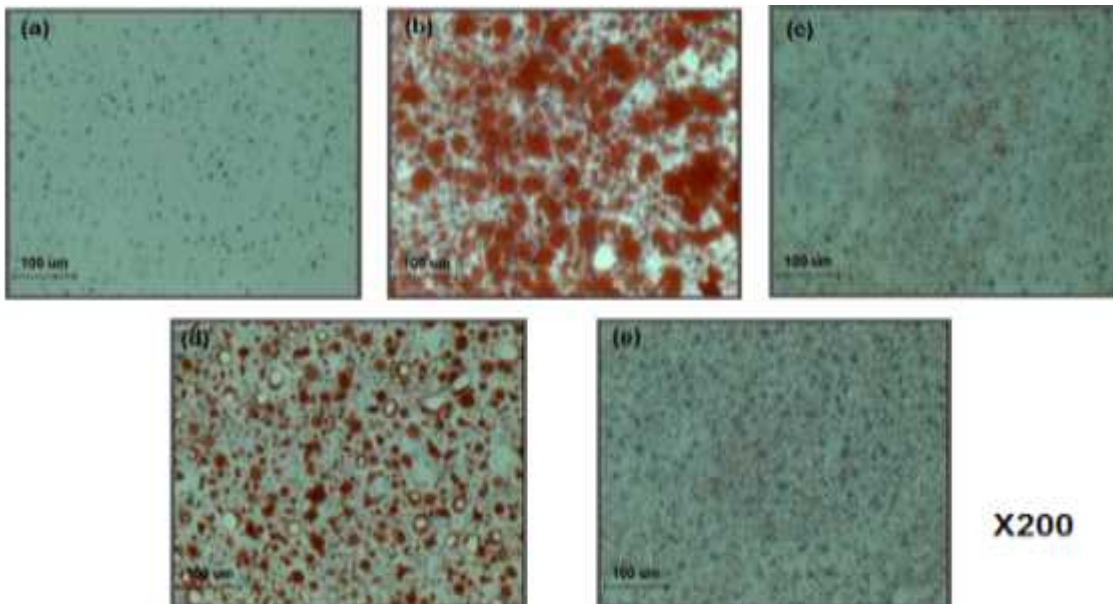


그림 39. 간 조직 oil red O 염색

(5) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 지방 조직 H&E 염색

- 지방 조직을 H&E 염색을 시켜 현미경 200배율로 관찰한 결과 대조군은 정상군에 비해 지방 세포의 크기가 증가됐고 PCM 투여군은 농도 의존적으로 지방세포의 크기가 감소하는 경향을 관찰함 (그림 40).

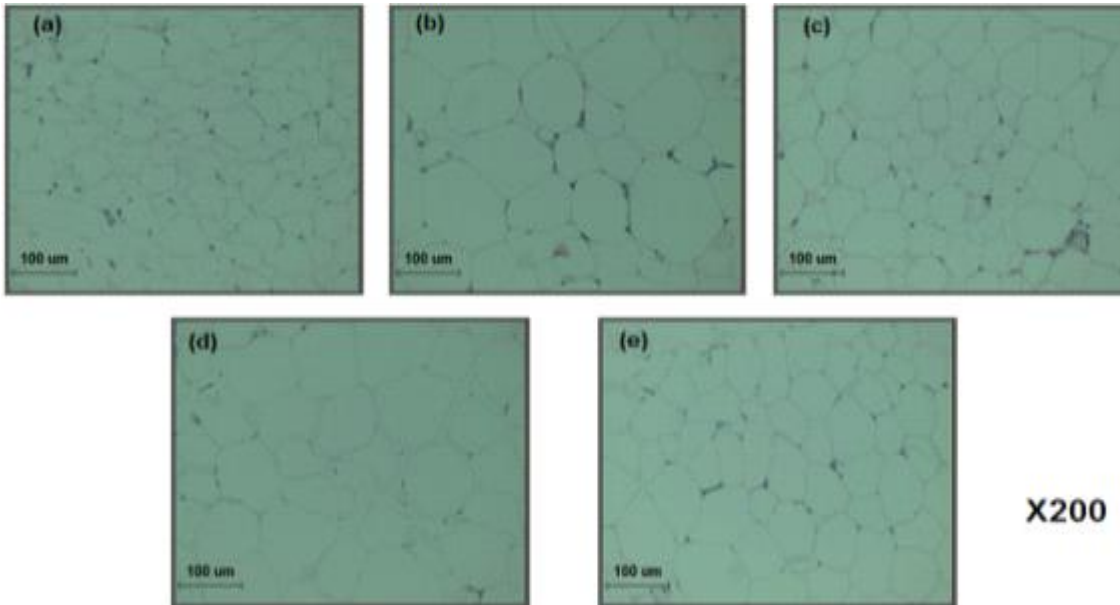


그림 40. 지방 조직 H&E 염색

(6) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 간 조직 AMPKα 인산화 측정

- 웨스턴 블롯을 통해 지질대사에서 매우 중요한 인자로 알려진 인산화 된 AMPKα를 측정한 결과, 대조군에 비해 PCM 100 투여군은 유의성 있게 증가하였고 PCM 50 투여군은 유의성은 나타나지 않았으나 증가된 경향을 나타냄 (그림 41).

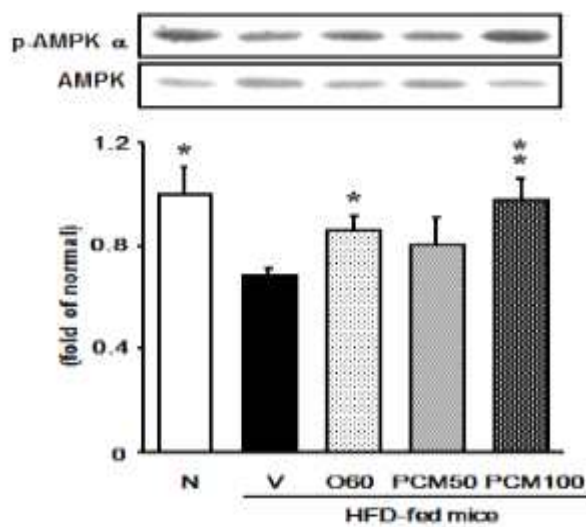


그림 41. 간 조직 p-AMPKα 발현량 측정

(7) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 간 조직 내 지질대사 산화 인자 측정

- 웨스턴 블롯을 통해 지질 산화와 관련된 인자인 PPAR $\alpha$ , CPT-1 및 UCP-2의 단백질 발현량을 측정된 결과, PPAR $\alpha$ 는 대조군에 비해 모든 약물 투여군에서 유의성은 없으나 증가된 경향을 나타냈고 CPT-1과 UCP-2는 양성대조군인 O60 투여군과 PCM100 투여군에서 모두 유의성 있게 증가함 (그림 42).

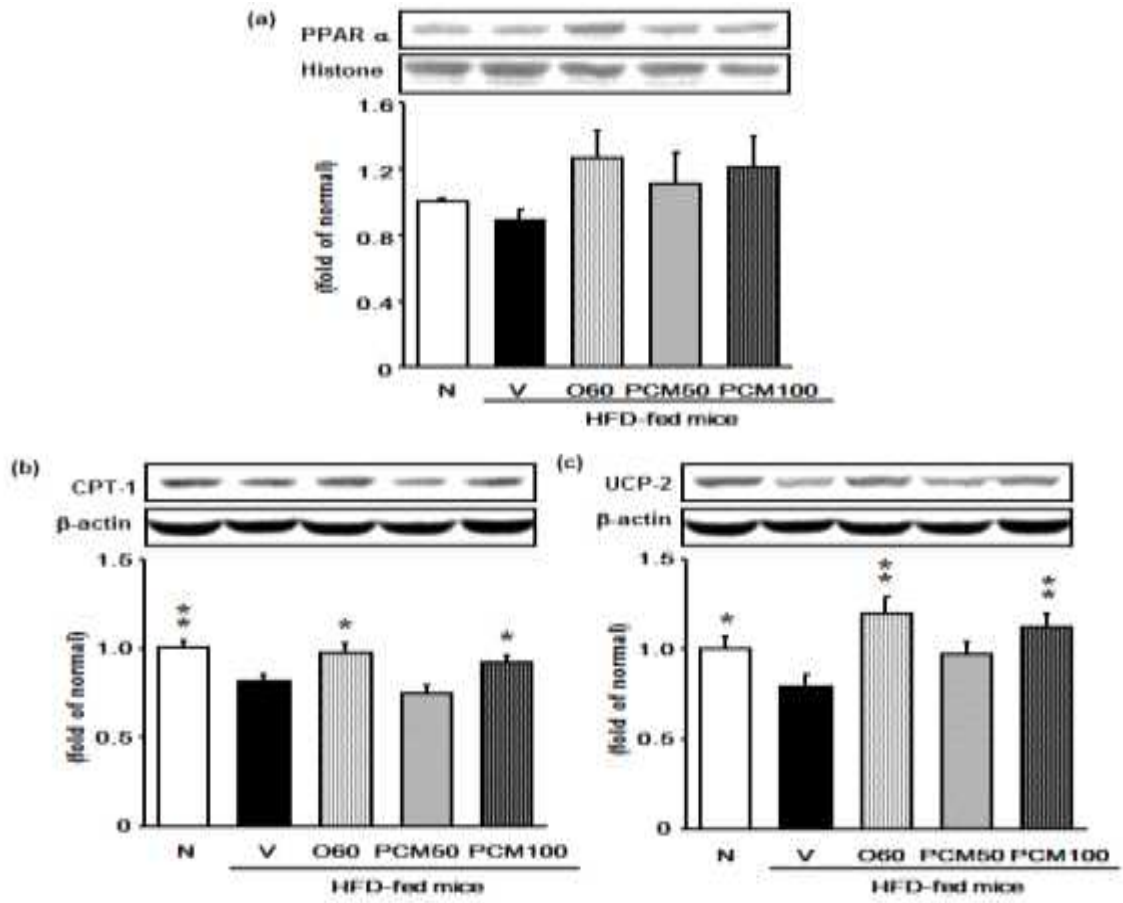


그림 42. 웨스턴 블롯 통한 지질 대사 관련 단백질 발현

(8) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 간 조직 내 지방생성 관련 인자 측정

- 웨스턴 블롯을 통해 지질대사에서 지방생성에 관련 인자인 SREBP-1과 SREBP-2의 단백질 발현량을 측정한 결과 모든 약물 투여군에서 대조군 보다 유의성있는 증가를 나타냈고 PCM 투여군은 농도 의존적으로 유의적인 증가를 나타냄 (그림 43).

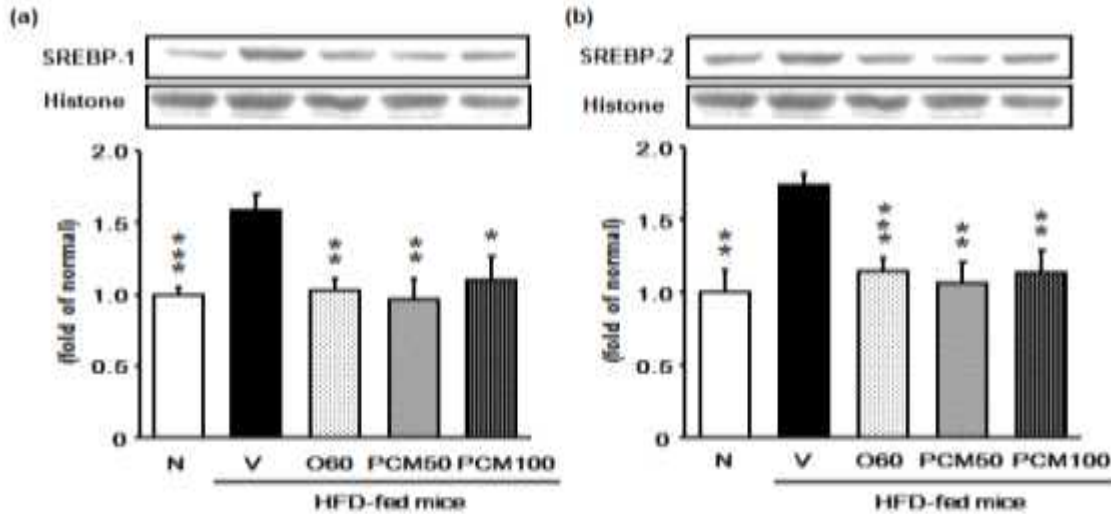


그림 43. 웨스턴 블롯 통한 SREBP-1, SREBP-2 단백질 발현

(9) 45% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 간 조직 내 지질대사 관련 인자 측정

- 웨스턴 블롯을 통해 지질대사에서 관련된 인자인 ACC, FAS, SCD-1 및 HMGCR의 단백질 발현량을 측정한 결과, HMGCR은 PCM 투여군이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소했고, ACC, FAS 및 SCD-1은 PCM 100투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냄 (그림 44).

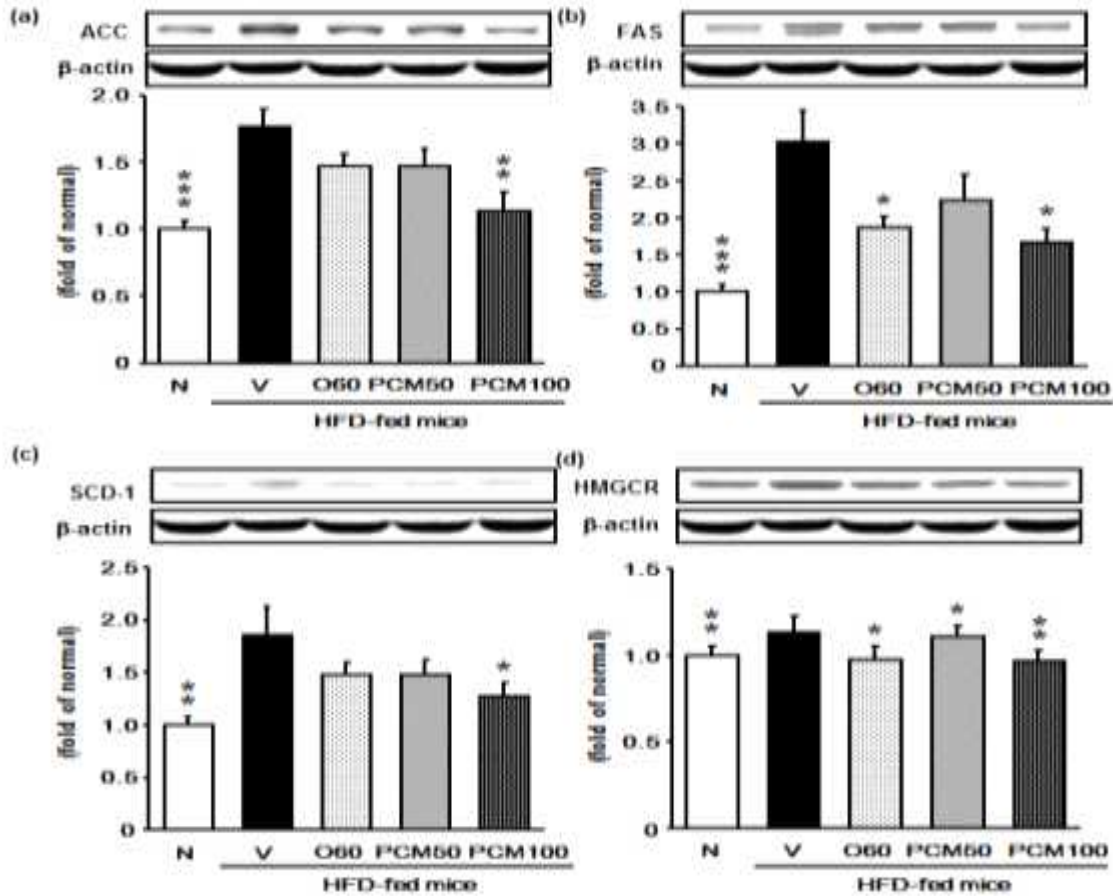


그림 44. 웨스턴 블롯 통한 지질대사 및 당합성 관련 단백질 발현

(10) 45% 고지방식으로 유도된 비만쥐에서 PCM의 약리학적 기전

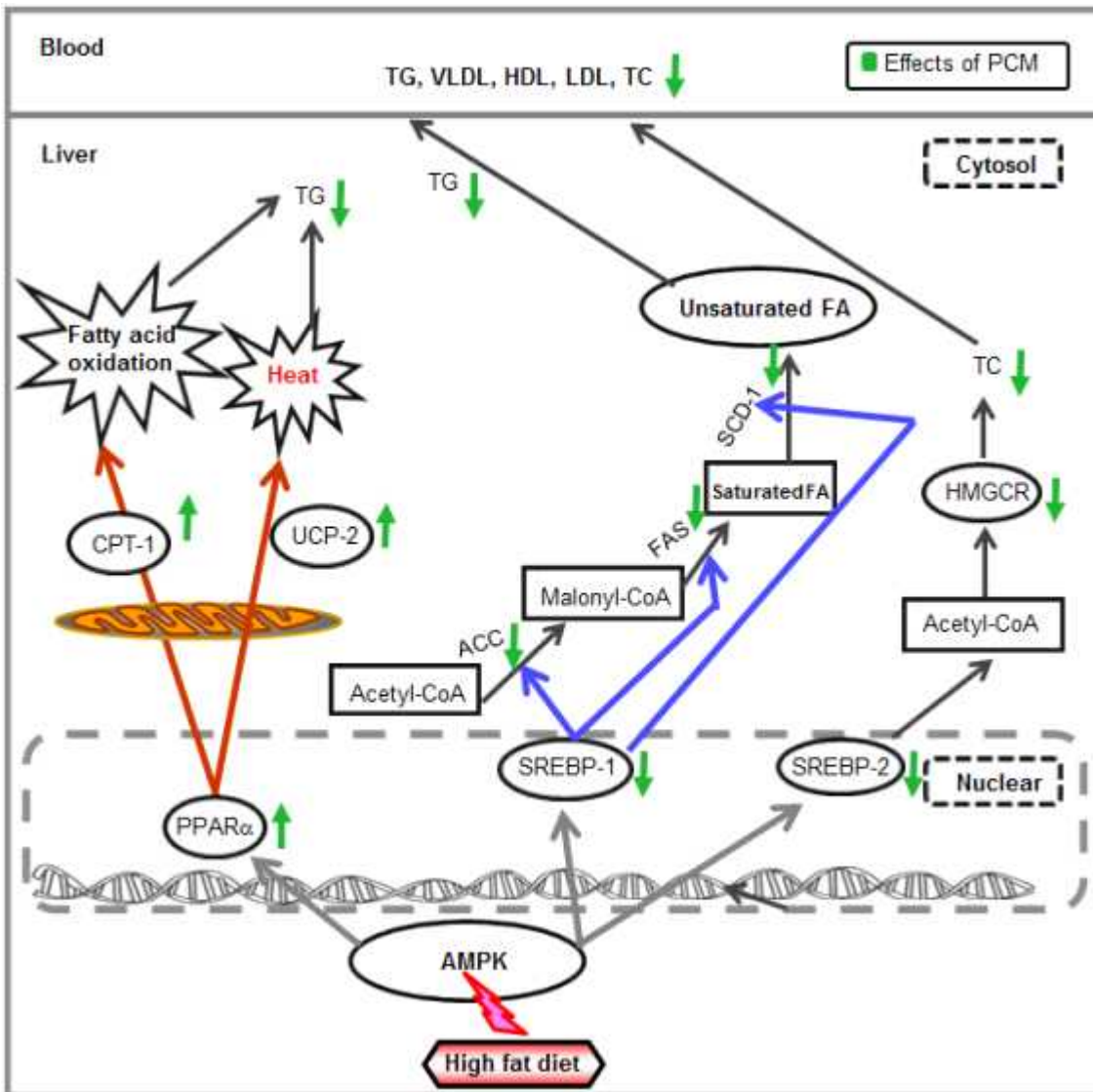


그림 45. 45% 고지방식으로 유도된 비만쥐에서 PCM의 약리학적 기전



## 나. 60% HFD 고지방식이 유도 비만 동물에 대한 뿔은감·진피 복합추출물 (PCM) 항비만 기능성 평가

### (1) 실험방법

- 5주령 수컷 ICR 마우스 (20-25 g)를 ORIENT (경기도, 한국)에서 구입하였함.
- 1주일 실험실 환경에서 적응기간을 거친 후 체중에 근거하여 정상군, 비만 대조군 (45% 고지방식이 섭취), 양성 대조군 (orlistat 60 mg/kg 농도 투여군), PCM50 투여군 (45% 고지방식이 섭취 및 PCM 50 mg/kg 농도 투여군), PCM100 투여군 (45% 고지방식이 섭취 및 PCM 100 mg/kg 농도 투여군), PCM200 투여군 (45% 고지방식이 섭취 및 PCM 200 mg/kg 농도 투여군)로 각 5마리씩 나눔.
- 정상쥐와 비만 대조군은 물을 먹여주고 투여군은 각 농도에 맞춰 매일 8주간 경구 투여함.
- 매일 몸무게, 섭취량, 음수량을 측정하며 8주 동안 투여 한 후에 각 마우스를 12시간 동안 금식한 후 혈청, 간을 채취하여 분석할 때 까지 -80°C에 보관.

### (2) 60% 고지방식이 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 체중변화량, 간 무게 및 지방 조직 무게

- 실험 기간 중 정상군에서는 체중의 변화가 없었지만 대조군은 체중이 유의성 있게 증가함.
- 대조군과 비교하여 PCM 투여군에서는 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 경향을 나타냄.
- 간 무게 변화는 정상군에 비해 대조군은 유의한 감소를 나타냈고 PCM 투여군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소된 경향을 나타냄.
- 지방 무게 변화는 정상군에 비해 대조군은 유의성 있게 증가했고 약물 투여군은 유의성은 없으나 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타냄 (표 11).

표 11. 체중변화량, 간 및 지방 조직 무게에 있어서의 PCM의 효과

Group	Body weight			Liver weight (g/body weight)	Adipose tissue weight (g/body weight)
	Initial (g)	Final (g)	Change (g/6weeks)		
Nor	35.76 ± 0.87	47.00 ± 1.66**	10.60 ± 0.88**	63.33 ± 2.94*	36.39 ± 2.44
HFD-fed mice					
Con	37.54 ± 0.41	55.15 ± 1.78	17.48 ± 1.95	48.08 ± 4.96	60.38 ± 1.51
O	37.02 ± 0.87	44.10 ± 1.60***	7.08 ± 1.91**	33.46 ± 0.47**	49.06 ± 5.36
PCM50	36.61 ± 0.68	46.41 ± 1.78**	9.80 ± 1.26**	36.35 ± 2.29	60.25 ± 2.04
PCM100	37.28 ± 0.63	49.37 ± 1.87*	10.05 ± 1.45**	36.00 ± 1.80***	57.25 ± 2.58
PCM200	37.39 ± 0.60	45.53 ± 0.99***	8.14 ± 1.29**	34.98 ± 1.26*	56.09 ± 3.24

(3) 60% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 혈중 및 지방조직에서의 생화학적 분석

- 혈청 내 생화학적 분석에서 triglyceride (TG)와 total cholesterol (TC)의 수치를 확인 한 결과, 대조군에 비해 PCM 200 투여군은 TG의 수치가 유의성 있게 감소함.
- 혈청 내 TC는 대조군에 비해 약물 처치군인 PCM 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냄 (그림 46).
- 간 조직 내 TG는 정상군에 비해 대조군은 유의성 있게 증가하였으나 PCM 200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈고 PCM 50, 100 투여군은 각각 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냄.
- 간 조직 내 TC를 측정 한 결과 정상군에 비해 대조군은 유의성 있게 증가하였으나 PCM 200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈고 PCM 50, 100 투여군은 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냄 (그림 47).

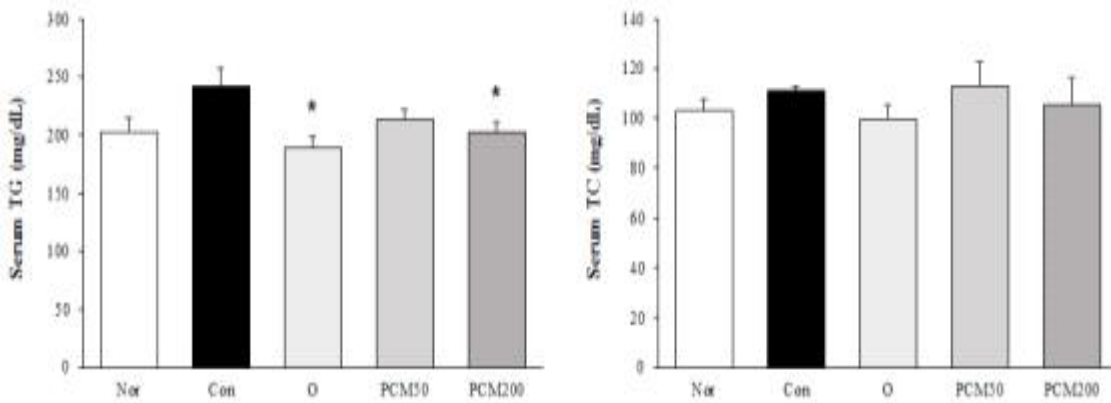


그림 46. 혈청 내 TG, TC 측정

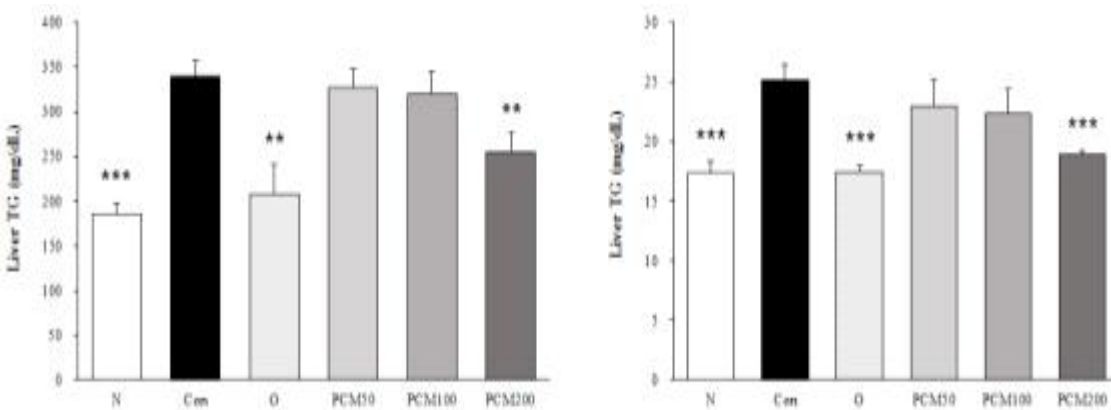


그림 47. 간 조직 내 TG, TC 측정

(4) 60% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 지질대사 관련 단백질 웨스턴 분석

- 생체 에너지 대사에서 매우 중요한 역할을 하는 활성화된 AMPK의 발현량을 측정한 결과, 정상군에 비해 대조군은 유의하게 감소했고 PCM 투여군은 100, 200 농도 투여군은 대조군에 비해 각각 유의하게 증가했고 PCM 50 투여군은 증가된 경향을 나타냄 (그림 48).

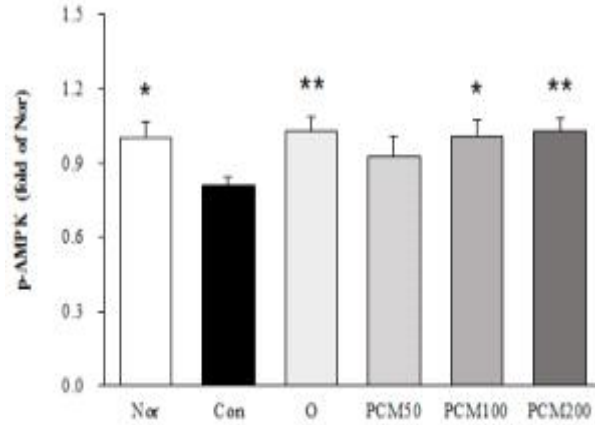


그림 48. AMPK 단백질 발현량 측정

(5) 60% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 지방합성 관련 단백질 웨스턴 분석

- 지방합성에 관련된 SREBP-1과 SREBP-2의 단백질 발현량을 측정한 결과, SREBP-1의 발현은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가했고 PCM 투여군 100, 200 농도 투여군은 대조군에 비해 유의하게 감소했고 PCM 50 투여군 감소하는 경향만 나타냄.
- 콜레스테롤 합성 관련 인자인 SREBP-2 발현은 대조군은 정상군에 비해 유의하게 증가했고 PCM 투여군은 모든 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소함 (그림 49).

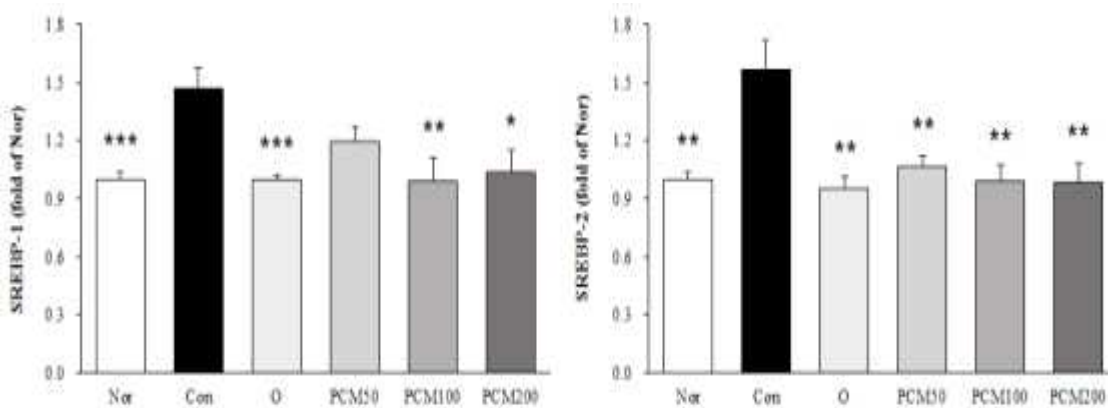


그림 49. 지방합성 관련 단백질 발현량 측정

(6) 60% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 중성 지방합성 관련 단백질 웨스턴 분석

- 웨스턴 블롯을 통해 지방 산화와 관련된 단백질인 p-ACC와 SCD-1의 발현량을 측정된 결과, p-ACC의 발현은 대조군에 비해 PCM 투여군 50, 100, 200 농도 모두 유의한 증가를 나타냄.
- SCD-1의 발현은 대조군에 비해 PCM 투여군은 모두 유의성은 없으나 감소하는 경향을 나타냄.
- 콜레스테롤 합성 관련 인자인 HMGCR의 발현은 정상군에 비해 대조군은 유의하게 증가되었고 PCM 투여군은 모두 대조군에 비해 유의하게 감소됨 (그림 50).

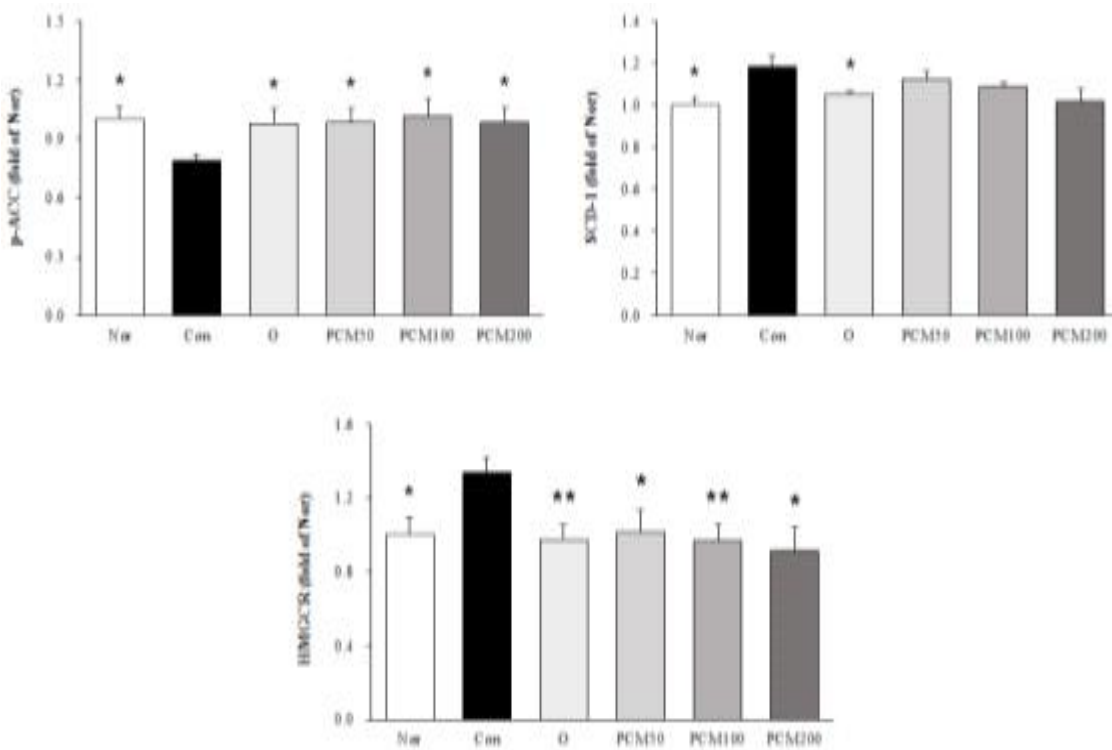


그림 50. 중성지방 및 콜레스테롤 합성 관련 단백질 발현량 측정

- (7) 60% HFD 비만 생쥐에서 PCM 투여 후 중성지방합성 및 산화 관련 단백질 웨스턴 분석
- 지방 산화와 관련된 단백질인 PPAR  $\alpha$  의 발현은 대조군에 비해 PCM 투여군은 유의성은 없으나 증가하는 경향을 나타냄.
  - CPT-1의 단백질 발현은 정상군에 비해 대조군은 유의하게 감소했으나 대조군에 비해 PCM 투여군은 모두 유의성은 없으나 증가된 경향을 나타냄.
  - UCP-2의 단백질 발현은 정상군에 비해 대조군은 유의하게 감소했고 대조군에 비해 양성 대조군인 orlistat 투여군은 유의한 증가를 보였으나, PCM 투여군은 유의성은 없으나 증가하는 경향을 나타냄 (그림 51).

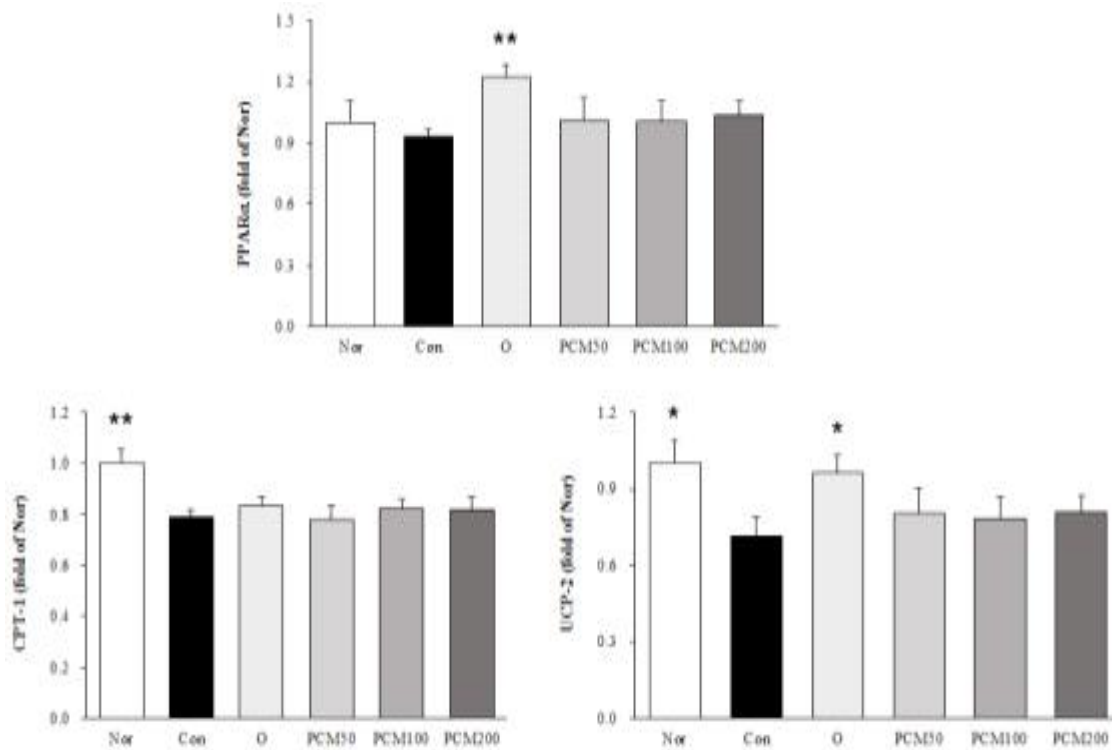


그림 51. 지방산화 관련 단백질 발현량 측정

## 2-12. 뽕은감을 함유한 시제품 개발

### 가. 뽕은감 함유 체지방감소 기능성 시제품 개발

#### (1) 과립제 및 환제 시제품 개발

##### - 샘플제작

- ① 뽕은감 유래 물질 50% + 콩가루 50%
- ② 뽕은감 유래 물질 60% + 콩가루 40%
- ③ 뽕은감 유래 물질 70% + 콩가루 30%
- ④ 뽕은감 유래 물질 75% + 콩가루 25%
- ⑤ 뽕은감 유래 물질 80% + 콩가루 20%

- 위 샘플은 우선, 뽕은감 유래 물질과 동량의 물과 같이 섞어 반죽한 다음, 콩가루를 같이 섞어 혼합하였음.
- 샘플 ①, ②, ③은 반죽이 너무 질퍽하여 과립제 제조 물성에 부적당하였고, ④ 샘플이 가장 적당한 물성이 나타났으며, ⑤ 샘플은 반대로 딱딱한 물성을 나타냄.
- 반죽된 ④ 샘플을 과립기에 넣고 과립으로 제조하였고 건조하였음.
- 또한 제환기를 이용하여 ④ 샘플을 직경 3 mm 내외 소환으로 제조하여 건조하였음.



그림 52. 뽕은감 유래 물질 과립제  
시료 사진



그림 53. 과립 불량

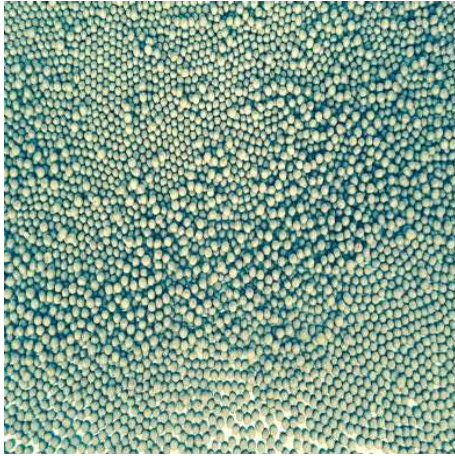


그림 54. 뿔은감 유래 물질 환제 시료 사진



그림 55. 불량과립 (좌)과 적합과립 (우)



그림 56. 뿔은감 유래 물질 함유 환제 사진



그림 57. 환 (좌측)과 과립 (우측) 건조기 사진

나. 뽕은감 복합추출물의 인체적용시험 (향후 연구진행 예정)

(1) 연구명

- 뽕은감과 진피 복합추출물의 체지방조절 예비인체적용시험 (Effect of astringent persimmon and citrus peel composite extract on body fat control in human subjects : pilot study)

(2) 실시기관

- 대구한의대학교 부속 대구한방병원

(3) 시험용 식품

- 시험 식품은 뽕은감과 진피 추출물 함유 식품, 대조식품은 부형제 함유 식품으로 제품의 성상, 성분 및 함량은 표 11과 같다.

표 12. 시험용 식품의 외관 및 원료 함량

항목	시험용 식품 A : 시험군			시험용 식품 B : 대조군		
식품	뽕은감과 진피 추출물 함유 식품			placebo 식품		
원료 및 함량	원료명	배합비 (%)	함량 (mg)	원료명	배합비	함량
	뽕은감복합추출물	62.5	250	-	-	-
	결정셀룰로오스	33.5	134	결정셀룰로오스	95.45	381.8
	히드록시프로필 메칠셀룰로오스	3	12	히드록시프로필 메칠셀룰로오스	2.45	9.8
	이산화규소	1	4	이산화규소	1	4
	-	-	-	감귤향	1.5	6
	-	-	-	카라멜색소	0.1	0.4
	<b>합계</b>	<b>100</b>	<b>400</b>	<b>합계</b>	<b>100</b>	<b>400</b>
외관	 <p>진한 녹색의 0호 하드캡슐, PTP 포장</p>					



(4) 섭취방법

- 1일 2회, 매일 아침과 저녁에 충분한 물과 함께 섭취하도록 하였으며, 복용기간은 6주로 하였다.

(5) 시험디자인

(가) 시험디자인 : 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교, 단일기관 인체적용시험

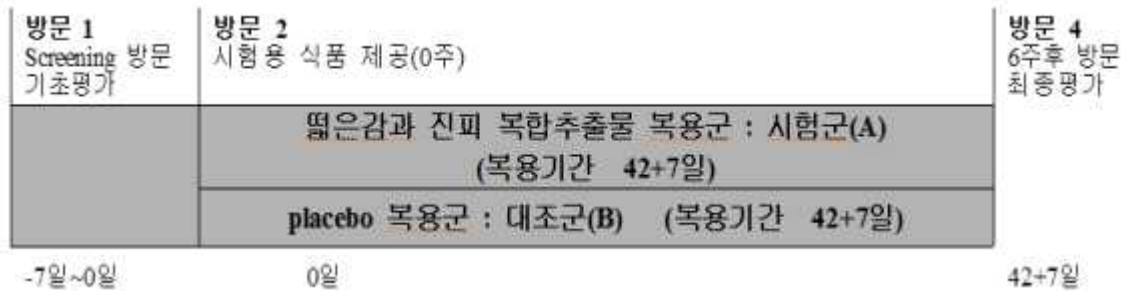


그림 58. 뽕은감과 진피 복합추출물의 체지방조절 인체적용시험 디자인

(나) 시험대상자 : 적극적인 치료가 필요한 질환이 없는 건강한 성인으로 선정기준을 만족하고, 제외기준에 해당이 없는 자를 선정하였다.

(나-1) 선정기준

- 만 20~65세의 성인
- BMI 25~30kg/m<sup>2</sup>의 과체중 범위에 속하는 자
- 치료가 필요한 특이질환이 없는 자
- 본 임상시험 참여에 서면으로 동의한 자

(나-2) 제외기준

- ALT 및 AST가 정상 상한의 3배를 초과하는 자
- (제외기준 해당항목 정상범위 ALT : 8~40 IU/L, AST : 5~43 IU/L, T3 : 78.1~182.3 ng/dL, Free T4 : 8.9~17.9 µg/dl, TSH : 0.15~5.00 µIU/mL)
- 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
- 조절되지 않는 급성 당뇨 및 고혈압이 있는 자
- 동의서 작성일로부터 2개월 내에 복부 CT를 촬영한 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, 알레르

- 기성 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 체지방조절에 영향을 줄 수 있는 의약품, 한약을 섭취한 자
- 체지방조절 기능을 인정받은 건강기능식품을 복용하고 있는 자
- 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

(다) 유효성 평가기준 : 컴퓨터 단층촬영에 의한 체지방 면적, 체중, BMI, WHR

(라) 통계분석방법

- 시험군간 사전 동질성 검정은 Independent t-test, Chi-square test 및 Fisher's exact test을 사용하였다.
- 유효성평가변수에 대한 효과검정은 각 시험군에서 사전-사후의 변화량에 대하여 정규성을 만족하는 경우에는 Independent t-test, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 Wilcoxon rank sum test로 검정하였다.

(마) 관찰일정 : 시험기간 동안 대상자는 3회 시험 실시기관을 방문하였으며, 각 방문 검사 내용은 표 12와 같음.

(바-1) 식품 섭취량 및 활동량 조사

- 식품 섭취로 획득한 열량을 조사하기 위하여, 시험용 식품 복용 전의 열량은 시험용 식품을 제공하는 두번째 방문일 이전 일주일 중 3일간의 식사일기를 작성하도록 하였고, 시험용 식품 복용 중에는 일주일 중 주말 1일을 포함한 3일간의 식사일기를 매주 작성하도록 하였다. 식이로 섭취한 열량은 Can Pro Ver. 5.0(한국영양학회)의 24시간 회상법을 사용하여 구함.
- 신체활동으로 소모한 열량은 시험용 식품 제공일로부터 이전 일주일 동안의 신체적 활동의 종류와 활동시간을 조사하고, 식품 복용 중에는 매일 신체활동의 종류와 시간을 일지에 기록하도록 함. 신체활동으로 소모한 열량은 식품의약품안전처에서 제공하는 Food and Nutrition Data System을 사용하여 구하였으며, 1일간 소모한 열량의 평균을 계산함.

(바-2) 컴퓨터 단층촬영

- 컴퓨터 단층촬영은 CT (SOMATOM Definition AS+, SIEMENS AG, Germany)를 이용하여 L1과 L4 부위를 횡단하여 촬영하였으며, Hounsfield unit -150~-50에 속하는 부위를 측정하여 총 복부지방 면적을 구하였다. 복부와 배부의 복막을 경계로 안쪽의 내장지방(viseral fat area) 면적과 바깥쪽의 피하지방 (subcutaneous fat area) 면적을 구함. 또한 대퇴 중간부위(mid portion of upper border of patella and greater trochanter)를 횡단하여 Hounsfield number -49 ~ +100에 속하는 부위의 대퇴근육 (thigh muscle area) 면적과, -150 ~ -50에 속하는 부위

의 대퇴지방 면적(thigh fat area)을 구함.

표 13. 대상자 방문 일정 및 검사 내용

방문일 확인/평가항목	방문 1	방문 2	방문 3
	Screening 기초평가	제품제공	시험종료 최종평가
	-7일~0일	0일	42일+7일
대상자 동의서	○		
인구학적 조사	○		
병력/약물투여력 조사	○		
활력징후검사	○	○	○
체성분분석	○		○
임상실험실 검사	○		○
갑상선호르몬 검사	○		
뇨검사	○		○
임신반응검사	○		
선정/제외기준 검토	○		
시험용 식품 제공		○	
식이·운동·음주 조사		○	○
컴퓨터 단층촬영(CT)		○	○
이상반응 모니터링	○	○	○
병용약물 체크	○	○	○
순응도 조사			○
※ 대상자가 동의서에 서명한 후에 본 인체시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.			

## 다. 뽕은감 함유 음료 시제품 개발

### (1) 주요 제품

(가) 오감도: 고급형 감음료 (100 mL, 단가 3,000원/개)

- 동양화로 그린 감이미지에 영문브랜드를 사용하여 동서양의 조화로움으로 현대인의 입맛에 맞는 감음료로서 고급형 제품 개발.



그림 59. 뽕은감 고급형 감음료

(나) 감양스토리: 보급형 감음료 (180 mL, 단가 1,000원/개)

- 감양에 화살표를 넣어 감량의 뜻을 담고 있으며 손글씨를 이용하여 소녀의 풋풋함을 주었으며, 감을 들고 있는 여성과 디자인 양끝 부분을 오목하게 하여 날씬한 느낌을 준 보급형 제품 개발.



그림 60. 뽕은감 보급형 감음료

(다) 팍캡: 팍캡형 감음료

- 휴대하기 용이한 타입을 이용하였으며, 기존의 형태가 아닌 새로운 형태의 감음료 팍캡

형 제품 개발.



그림 61. 뽕은감 팝캡형 감음료

표 14. 뽕은감 음료 장단점

제품의 특징점	원천기술 확보 및 참고
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 뽕은맛이 나지 않는다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 뽕은맛 저감 원천기술 확보</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 갈색으로 변색되지 않는다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 갈변방지 원천기술 확보</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 지방이 소장에서 흡수되는 것을 억제한다</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 약리효능 기술 확보</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 특허를 이용한 제품 마케팅이 가능하다</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 상표등록 완료 및 특허출원</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 변비를 유발하지 않는다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 동물실험 및 성분 분석 완료</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 어디서나 쉽게 구매할 수 있다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 의약품이 아닌 식품으로 판매</li> </ul>

**라. 뚝은감복합추출물 워터젤리 (제품명:뚝은감복합추출물젤로)**

(1) 뚝은감복합추출물 농축액을 이용하여, 요즘 트렌드에 적합한 워터 젤리 치어팩을 개발함. 워터젤리는 여성들에게 매우 인기가 높은 상품이며, 특히, 다이어트 식품으로의 각광을 받고 있으며, 이에 뚝은감복합추출물 농축액을 적용한 워터젤리를 개발하여, 다양한 소비층에 진입하고자 함. 이번 워터젤리는 통상의 곤약베이스가 아닌, 젤란과 칼라만시의 베이스로 개발하였으며, 전체적으로 가벼운 타입으로 개발함.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- 본 실험에 사용한 주재료는 뚝은감복합추출물농축액 (고형분12%이상), 올리고당 (백설탕), 폴리덱스트로스 (삼양사), D-말티톨 (보락), 구연산 (보락), 천연사과향 (삼진향료), 젤란검 (MSC), 에리스리톨 (보락), 카라기난 (MSC), 칼라만시 (MSC), 염화칼슘 (보락), 비타민C (D SM), 잔탄검 (MSC)를 통해 구매하여 사용함. 제조방법은 그림 64과 같은 방법으로 제조하였으며, 기본 배합비는 표 16에 나타냄.

(나) 최적배합비 확립

- 반응표면설계: 요인은 가장 중요 성분인 뚝은감복합추출물농축액, 칼라만시, 비타민C의 3가지요인으로 중심합성계획을 설계하였으며, 설정반복수는 1회이상, 기본 런 20회를 기준으로, 실험을 설계함. 또한 동일배합비일 때 시간과 순서가 변한 후, 유사점수가 나오는지도 확인함으로 데이터의 신뢰도도 검증함.

중심 합성 설계		
요인:	3	설정 반복 수: 1
기본 런:	20	전체 런 수: 20
기저값 블록:	1	전체 블록 수: 1
2-수준 요인 설계: 완전 요인 설계		
인방체 점:	8	
인방체의 중심점:	6	
축 점:	6	
축의 중심점:	0	
알파: 1.68179		

- 총 20회의 실험을 진행하였으며, 기초 실험을 통해 뚝은감복합추출물농축액은 1.66%~3.34%, 비타민C는 0.2%~1.0%, 칼라만시는 0.23%~1.07%의 구간을 설정함. 이를 통해 생성된 각 블록별 배합비는 아래의 표 17과 같음. 이를 토대로 20회에 걸쳐 관능검사를 실시하였으며, 관능검사의 항목은 맛, 색, 풍미, 종합적기호도의 4가지 항목으로 실시하였으며, 값은 1점이 아주나쁨, 3점이 나쁨, 5점이 보통, 7점이 약간 좋음, 10점이 아주좋음으로 10점도값으로 표현함.
- 반응의 최적화 도구는 최대값을 목표로 하였으며, 하한의 값은 3, 상한의 값은 7이며, 가중치는 맛이 2, 향과 풍미가 1, 종합적기호도가 3이며, 중요도는 맛이 2, 향과 풍미가 1, 종합적기호도가 3으로 설정하고, 최적화 도구의 값은 그림 65에 나타냄.
- 통계: 통계는 MINI TAB 프로그램을 사용하여 처리함.
- 관능검사: 관능검사는 관능검사에 관심도가 높은 (주)아크 및 대구한의대학교 식품공학과

학생 22명을 대상으로 실시하였으며, 그 값은 평균의 값으로 나타냄.

- 각 관능검사는 시료의 온도를 동일한 온도에서 실시하였으며, 시료와 시료 사이에 음용수를 두어 입을 행군 후 진행하도록 하였으며, 오차범위를 줄이기 위해 중간 중간 무작위로 동일 배합비의 시료를 두어, 그 값의 차이가 있는지를 확인함. 시료는 연속된 숫자나 문자를 사용하지 않고, 연속되지 않는 불특정의 숫자와 기호를 넣어 표시하였고 관능검사의 값은 표 18에 나타냄.

#### (다) 제품의 품질변화 실험

- 당도측정: 당도는 hand refractometer N-1E (ATAGO Co., Japan)를 사용하여 측정함. 단, 샘플링한 시료는 20°C로 유지된 상태에서 측정함.
- pH측정: pH는 pH meter (Metrohm Co., Swiss)를 사용하여 25°C의 조건에서 측정함.
- 갈색도측정: 갈색도는 UV-VIS spectrophotometer (UV-200S, Shimadzu Co.)를 사용하여 460nm에서 흡광도를 측정함.
- 총균수측정: 시료의 총균수 측정을 위해 따로 샘플링한 것을 무균적으로 채취함. 시료를 단계별로 희석하고 poring법으로 plate count agar (Merck, Germany) 배지를 이용하여, 35±1°C에서 48시간 배양한 후 Colony를 계측함. 단 총균수 측정은 20°C와 30°C 저장시료에 한해서만 실시하였으며, 시료는 각 온도당 3개씩 3회 반복 측정함.
- 관능평가: 관능평가는 본 실험에 흥미가 있고 차이식별 능력이 있는 20명을 대상으로 하여 실시하였으며, 표준시료를 대조구로 하여 다른 온도에서 보관한 시료와 비교하여 1~10점의 관능점수를 부여했고, 제품의 가치가 상실되는 지점을 6.0점으로 함.

#### (라) 제품의 유통기한 설정

- 유통기한설정: 유통기한설정은 식약처의 [유통기한설정 프로그램]을 활용함.
- 품질지표 규명 및 유통기한 예측: 시료의 저장온도 및 기간에 따른 품질특성 값을 관능검사의 전반적인 기호도와 회귀분석을 실시하여 상관관계가 높은 인자를 시료의 품질지표로 삼았고, 저장기간 (t)에 따른 품질특성 (A)의 변화량으로서 이 결과를 Kinetic plot으로 변형시키면 품질손상의 반응속도 상수 (K)를 얻음.

$$-\frac{dA}{dt} = KA^n$$

A : 측정성분의 품질변화량  
t : 저장기간  
K : 반응속도상수  
n : 반응차수  
dA/dt : 시간 변화에 따른 성분 A의 변화

- 또한 아래의 Arrhenius 방정식을 이용함.

$$K = Ae^{-E_a/RT} \text{ (자연로그값(Ln값)으로 전환)} \rightarrow \ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$$

- A : 아레니우스 상수
- E<sub>a</sub> : 활성화에너지(cal/mol)
- R : 기체상수(1.986 cal/mol)
- T : 절대온도(=℃+273)
- K : 반응속도상수

- 이를 통해 b Value의 반응속도 (K)를 산출하여, 온도에 따른 활성화에너지 (E<sub>a</sub>)를 산출하였으며, 이 후 실험하지 않은 구간의 반응속도를 산출함.
- 유통기한 산출 근거로서 1년간의 온도별 일수를 계산하여 실온 유통시 온도별 유통일수를 유통기한 산출근거로 사용하였고, 이를 통해 유통기한을 설정함.

- 평균기온 10℃이하 : 1월, 2월, 3월, 11월, 12월(5개월:152일)
- 평균기온 16~18℃ : 4월 13℃, 5월과 10월(2개월:61일)
- 평균기온 21℃ : 6월과 9월(2개월:61일)
- 평균기온 25~26℃ : 7월과 8월은 (2개월:61일)

▶ 실온 유통시 1년간 온도별 유통일수는 10℃(152일), 15℃(30일), 20℃(61일), 25℃(61일), 30℃(61일), 이를 유통기간 산출의 근거로 사용



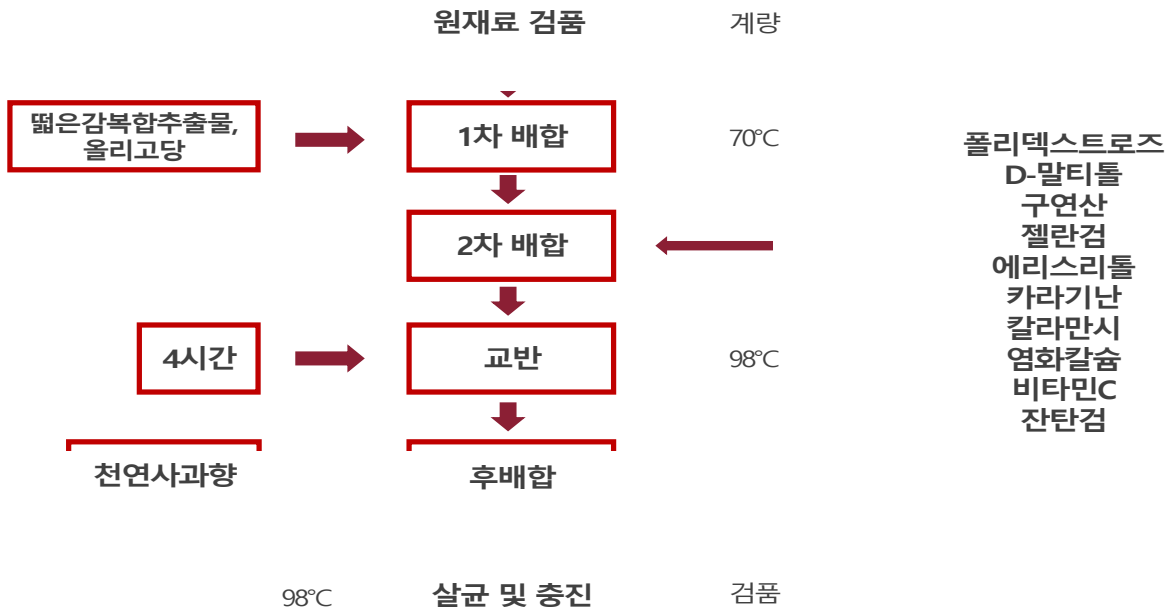


그림 62. 제조공정

표 15. 뽕은감복합추출물젤로 기본배합비

재료명	합량 (%)
뽕은감복합추출물농축액	1.66 - 3.34
올리고당	4.63
폴리덱스트로즈	3.24
D-말티톨	0.76
구연산	0.29
천연사과향	0.67
비타민C	0.2 - 1.0
에리스리톨	0.59
카라기난	0.72
칼라만시	0.23 - 1.07
염화칼슘	0.15
젤란검	0.28
잔탄검	0.16
정제수	86.42
합계	100

표 16. 뽕은감복합추출물젤로의 중심합성계획에 의한 배합비

RunOrder	뽕은감복합EX	비타민C	칼라만시
1	2.5	0.5	0.65
2	2.5	0	0.65
3	2.5	1.0	0.65
4	2.5	0.5	0.65
5	2	0.2	0.4
6	3	0.8	0.9
7	2.5	0.5	1.0
8	1.6	0.5	0.65
9	2.5	0.5	0.65
10	3	0.2	0.9
11	2.5	0.5	0.65
12	3	0.8	0.4
13	2.5	0.5	0.65
14	2.5	0.5	0.65
15	3.3	0.5	0.65
16	3	0.2	0.4
17	2.5	0.5	0.2
18	2	0.8	0.4
19	2	0.8	0.9
20	2	0.2	0.9

반응 최적화 도구 - 설정

반응	목적	하한	목표값	상한	가중치	중요도
C9 맛	최대화	8	10		2	2
C10 풍미	최대화	8	10		1	1
C11 식감	최대화	8	10		3	3
C12 종합적기	최대화	8	10		3	3

각 목표를 위한 비람직성 함수 - 가중치가 함수의 형상에 영향을 주는 방식

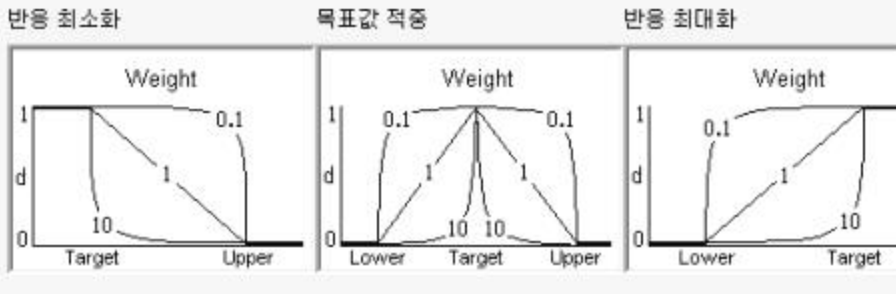


그림 63. 반응최적화 도구

표 17. 뽕은감복합추출물젤로의 관능검사 결과

RunOrder	뽕은감복합 추출물ex	비타민 C	칼라만시	맛	풍미	식감	종합적기호도
1	2.50	0.50	0.65	8.8	8.8	9.2	9.2
2	3.34	0.50	0.65	7.5	7.6	8.8	8.1
3	3.00	0.20	0.90	7.5	7.5	8.1	7.7
4	2.00	0.20	0.40	7.9	7.8	7.8	7.8
5	2.50	0.50	0.23	8.7	8.5	7.8	8.5
6	2.50	0.00	0.65	8.6	8.5	7	8.4
7	3.00	0.80	0.90	7.5	7.6	7.5	7.6
8	3.00	0.80	0.40	7.5	7.4	7.5	7.7
9	2.00	0.80	0.90	7.8	7.6	7.4	7.5
10	2.50	0.50	0.65	8.8	8.6	9.3	9.1
11	2.50	0.50	0.65	8.6	8.5	9.2	9.1
12	2.50	0.50	0.65	8.7	8.6	9.3	9.2
13	3.00	0.20	0.40	7.5	7.4	7.1	7.4
14	2.00	0.20	0.90	7.9	7.3	7.5	7.7
15	2.50	0.50	0.65	8.8	8.6	9.1	9.2
16	2.50	0.50	0.65	8.6	8.5	9.1	9.1
17	2.50	0.50	1.07	8.7	8.5	8.4	8.5
18	1.66	0.50	0.65	8.1	8	8.6	8.2
19	2.50	1.00	0.65	8.6	8.4	7.4	8.5
20	2.00	0.80	0.40	7.8	8.1	7.8	7.4

(3) 결과

(가) 회귀분석 결과

- 각 항목별 회귀분석의 결과 값은 그림 66에 나타냄.

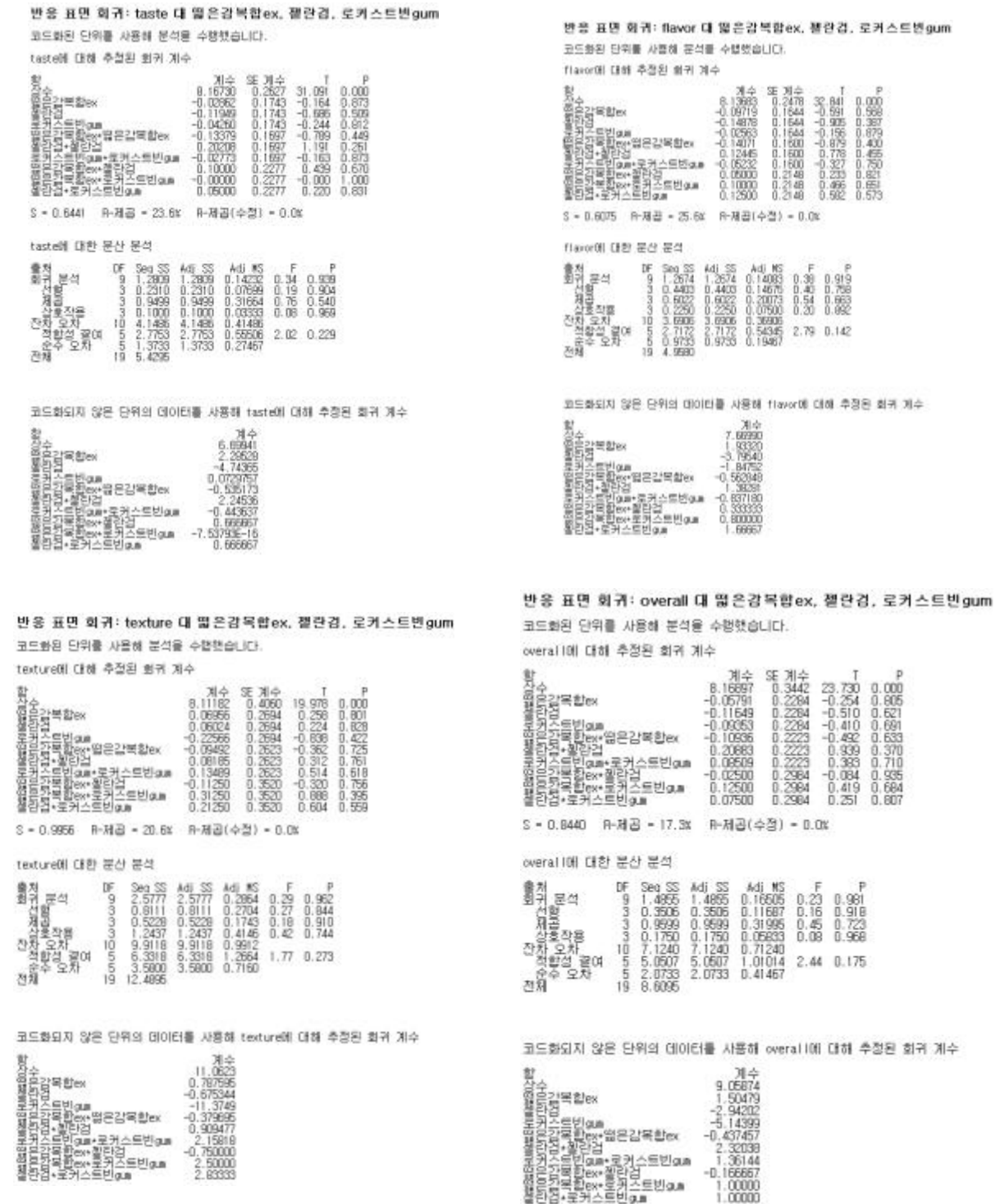


그림 64. 각 항목별 회귀분석의 결과

- 각 항목별 등고선 플롯과 표면플롯

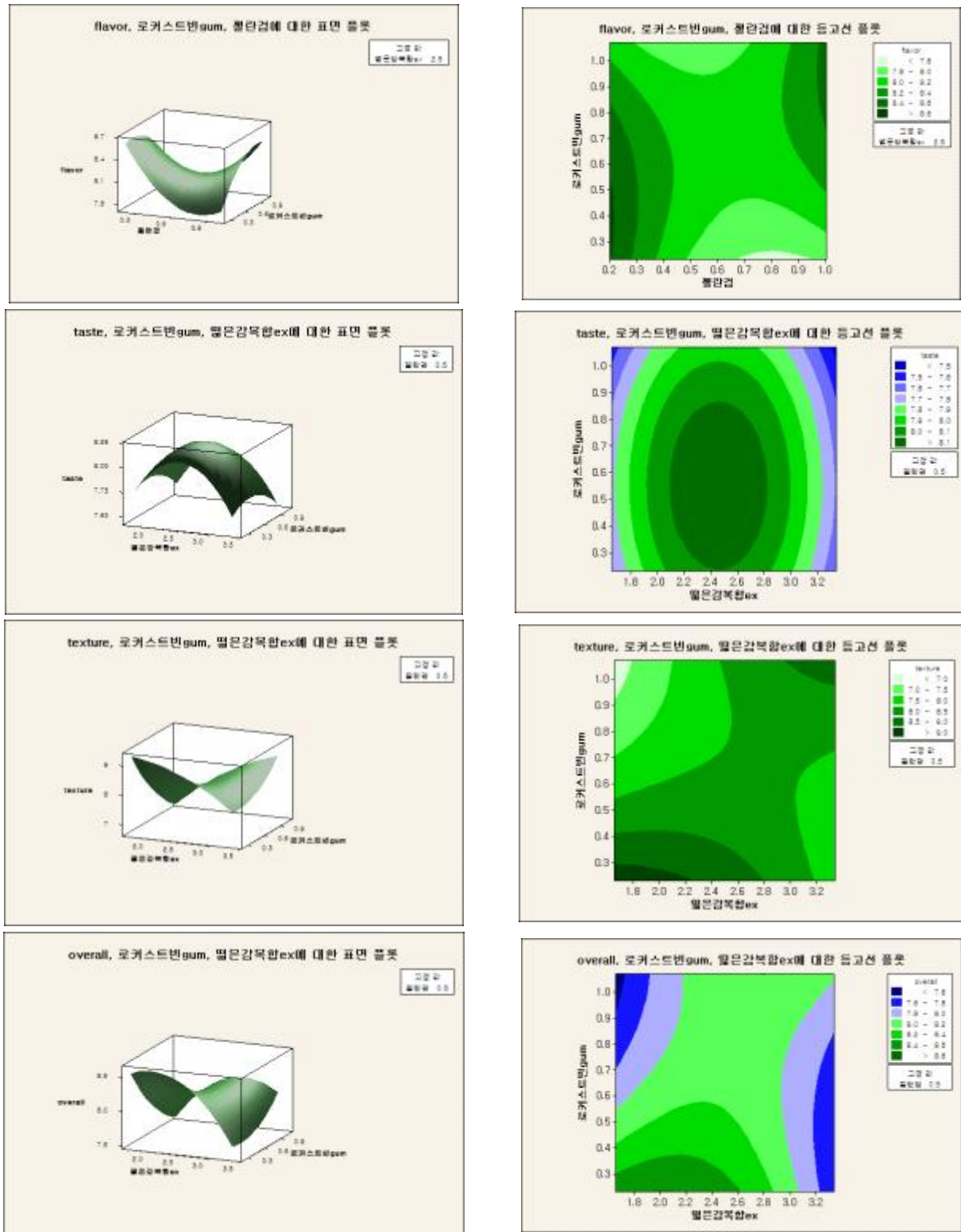
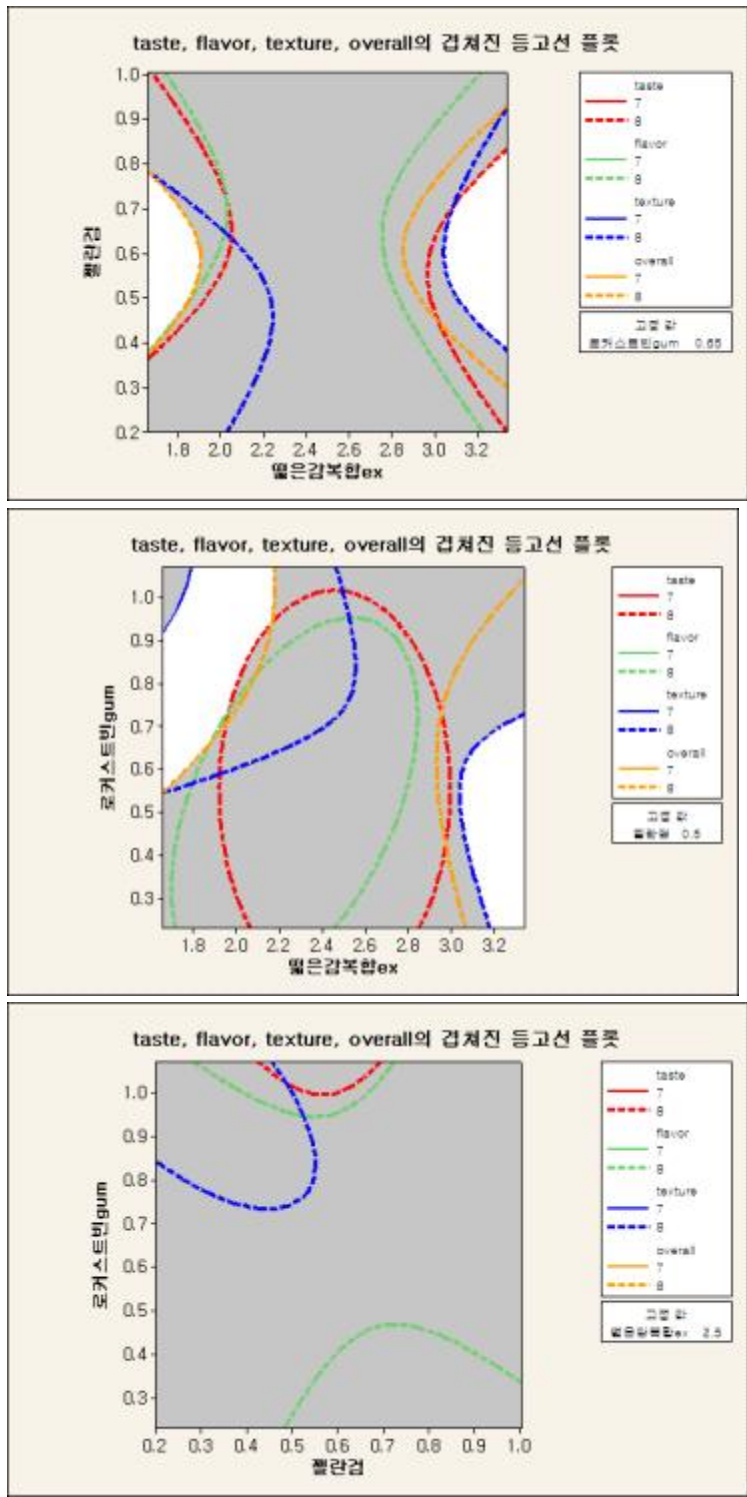


그림 65. 각 항목별 등고선플롯과 표면플롯의 결과

- 각 항목별 겹쳐진 등고선 플롯



고정값 칼라만시 0.55%

고정값 비타민 C 0.5%

고정값  
뽕은감복합추출물EX  
2.5%

그림 66. 각 항목별 겹쳐진 등고선 플롯의 결과

- 최종 최적배합비의 값

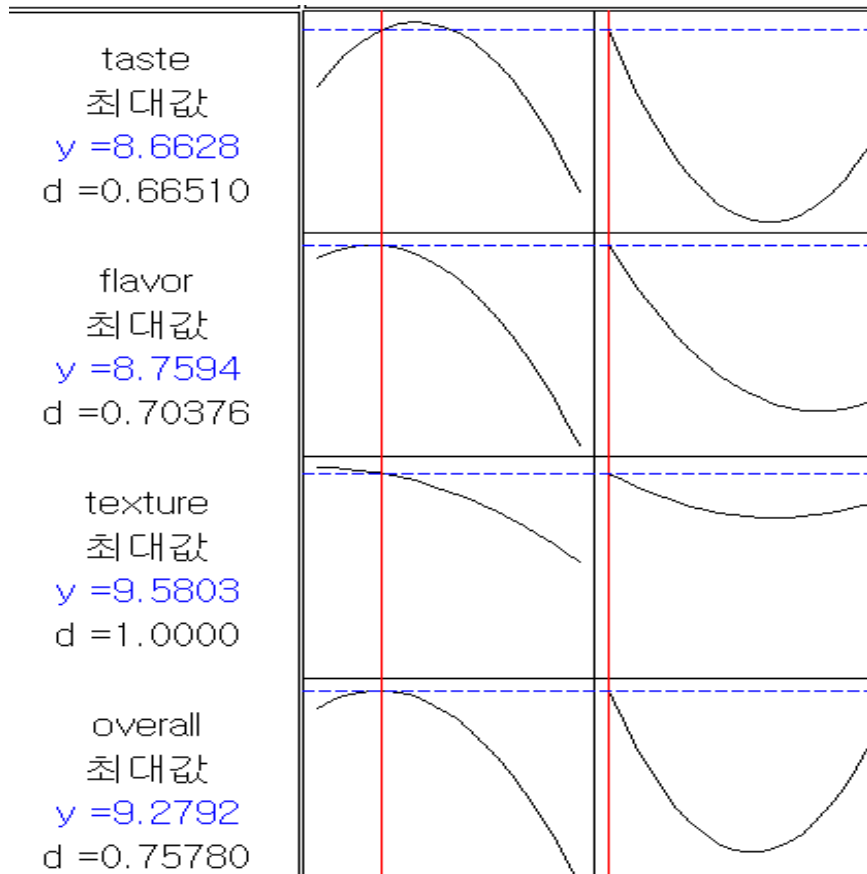


그림 67. 반응표면분석을 통한 최적배합비



(4) 최종배합비

(가) 최종 최적배합비

표 18. 뽕은감 제품 최종 최적 배합비

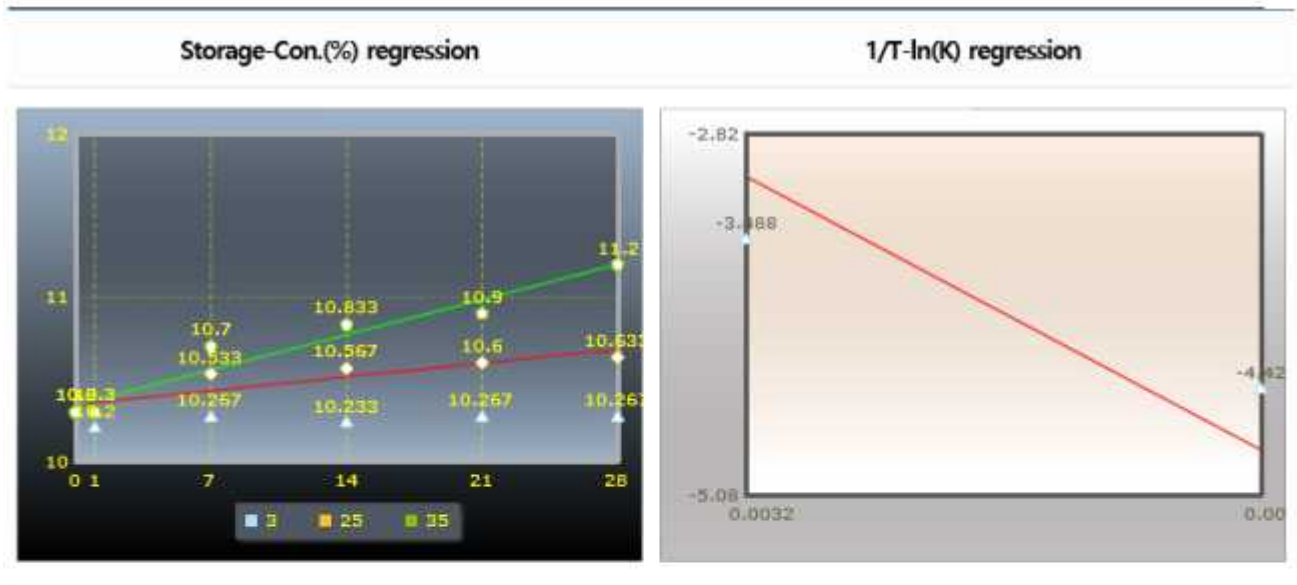
재료명	함량 (%)
뽕은감복합추출물농축액	2.07
올리고당	4.63
폴리덱스트로즈	3.23
D-말티톨	0.76
구연산	0.29
천연사과향	0.67
비타민C	0.2
에리스리톨	0.59
카라기난	0.72
칼라만시	0.23
염화칼슘	0.15
젤란검	0.28
잔탄검	0.16
정제수	86.07
합계	100

(5) 제품의 품질변화

(가) 당도측정

- 당도측정의 결과는 그림 70에 나타냄. 당도는 3주차가 지나면서 35℃ 이상 샘플군에서 조금씩 상승하는 것을 알 수 있음.

0차반응식 결과입니다.



Storage-Con.(%) regression

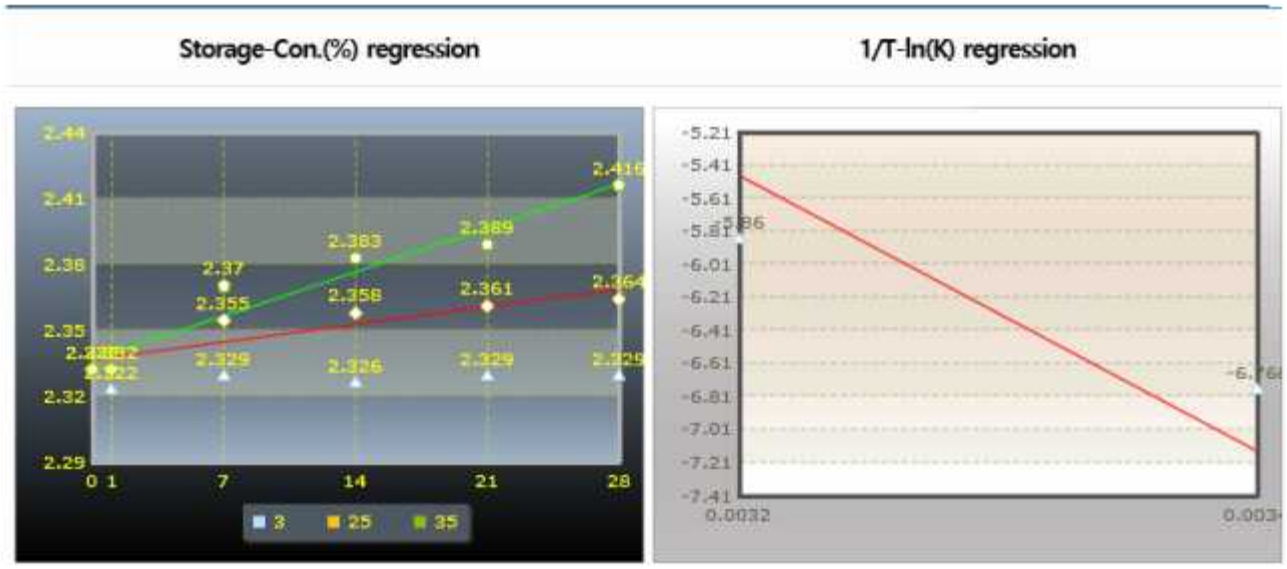
No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	0.0120	10.3465	0.8108
2	35	0.0306	10.3440	0.9381

1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
-8554.08	24.28	1.0000	-16996.96

그림 68. 저장기간별 음료의 당도변화표 (0차식)

1차 반응식 결과입니다.



Storage-Con. (%) regression

No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	0.0011	2.3366	0.8086
2	35	0.0029	2.3366	0.9348

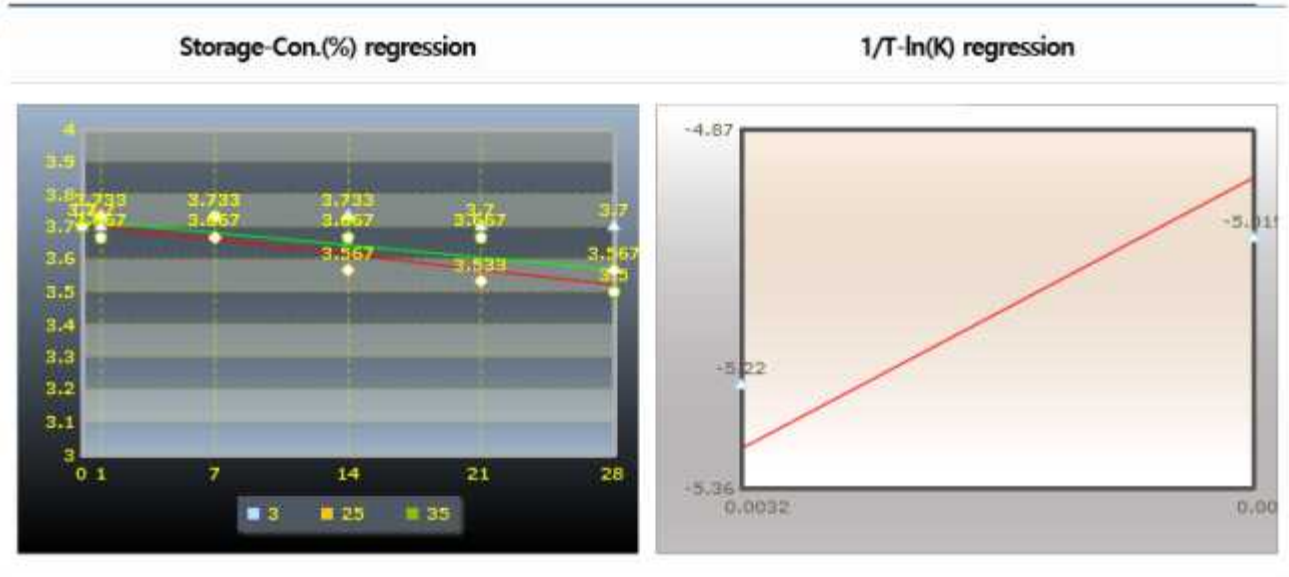
1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
-8336.59	2121	1.0000	-16564.80

그림 69. 저장기간별 음료의 당도변화표 (1차식)

- pH측정: pH측정의 결과는 그림 72에 나타내었고, pH는 저장기간이나 보존환경에 따른 큰 차이는 보이지 않음.

0차반응식 결과입니다.



Storage-Con.(%) regression

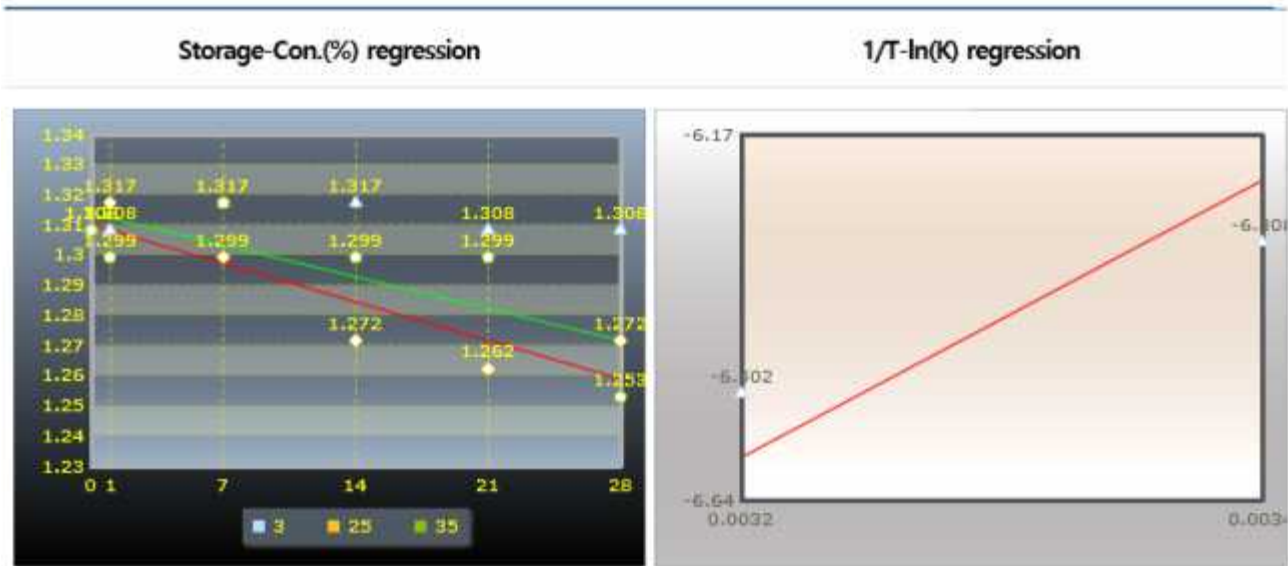
No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	-0.0066	3.7060	0.9055
2	35	-0.0054	3.7195	0.5659

1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
1848.63	-11.22	1.0000	3673.22

그림 70. 저장기간별 음료의 pH변화표 (0차식)

1차반응식 결과입니다.



Storage-Con.(%) regression

No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	-0.0018	1.3100	0.8053
2	35	-0.0015	1.3138	0.5660

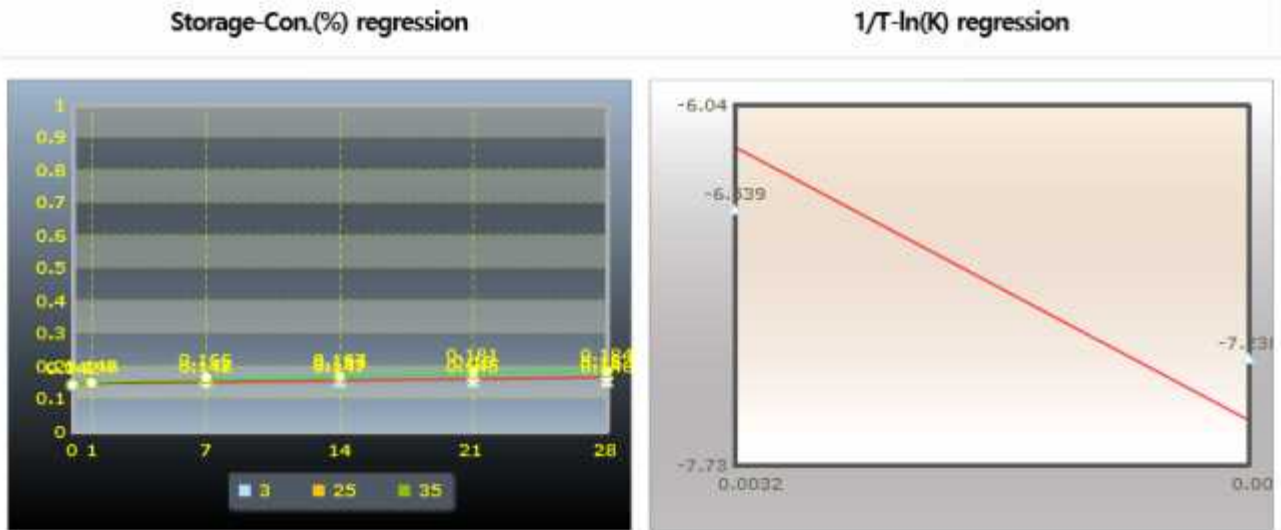
1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
1780.11	-12.28	1.0000	3537.09

그림 71. 저장기간별 음료의 pH변화표 (1차식)

- 갈색도측정: 저장 기간별 음료의 갈색도 변화는 그림 74에 나타냄. 갈색도는 시간의 경과에 따라 조금씩 색상이 진해지는 것을 알 수 있었으며, 60℃의 경우 7주차부터 가파르게 상승하여 색상이 짙어지는 것을 확인함.

0차반응식 결과입니다.



Storage-Con.(%) regression

No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	0.0007	0.1447	0.9108
2	35	0.0014	0.1476	0.9155

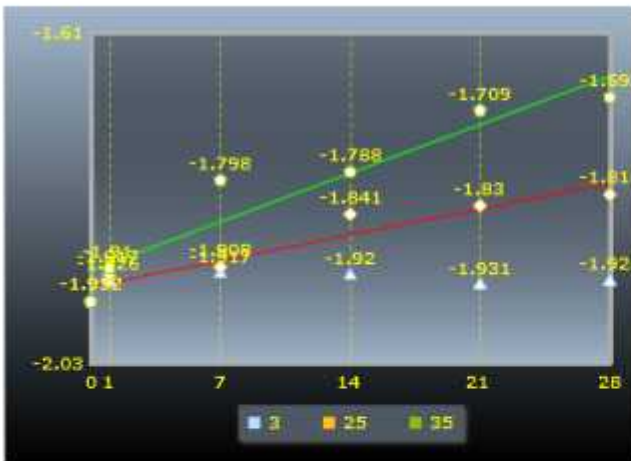
1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
-6412.44	14.28	1.0000	-12741.52

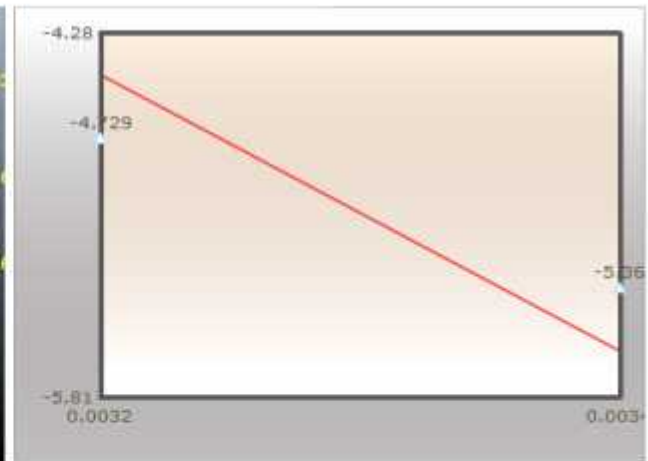
그림 72. 저장기간별 음료의 갈색도의 변화표 (0차반응식)

1차 반응식 결과입니다.

Storage-Con.(%) regression



1/T-ln(K) regression



Storage-Con.(%) regression

No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	0.0047	-1.9331	0.9049
2	35	0.0088	-1.9129	0.8999

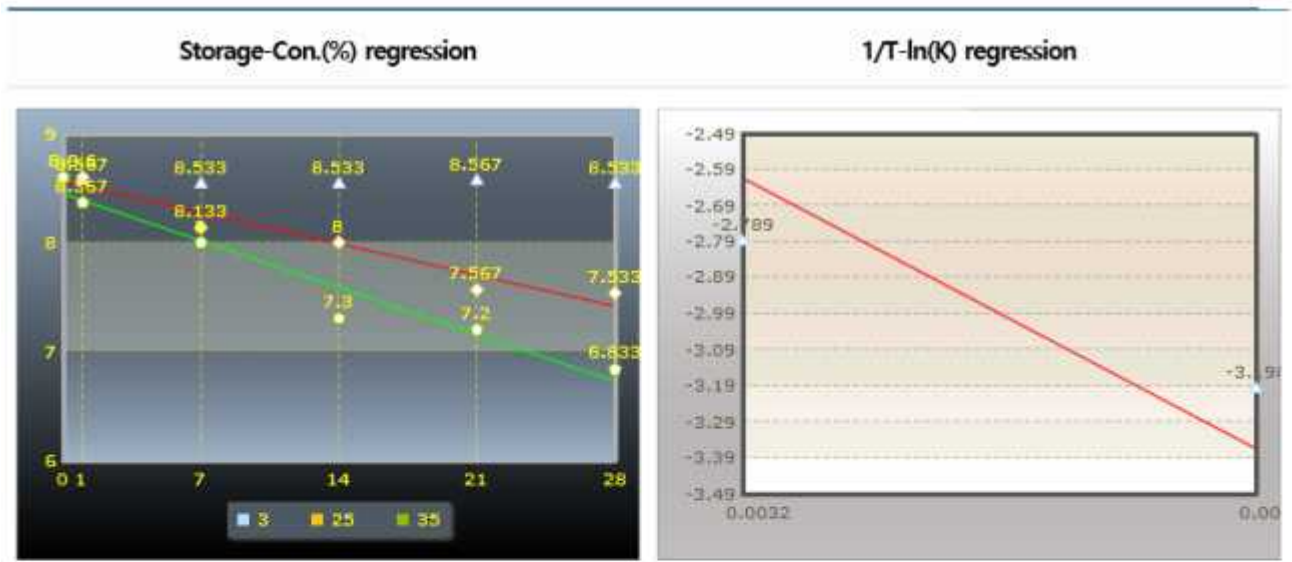
1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
-5798.33	14.10	1.0000	-11521.27

그림 73. 저장기간별 음료의 갈색도의 변화표 (1차반응식)

- 관능평가: 관능평가의 결과는 아래 그림 76에 나타냄. 관능검사의 경우 보존온도에 상관 없이 시간이 경과할수록 그 값이 상당히 큰 폭으로 하락하는 것을 알 수 있었고 이는 음료의 특성상 고형분 함량이 높고 풍미의 전달이 부족한 것을 그대로 반영하는 점이라고 볼 수 있음. 특히 35℃ 이상의 고온에서는 상대적으로 청량감이 감소하여 급격히 관능점수가 하락하는 것을 알 수 있음. 또한 상품 자체의 상품가치로서 소멸성을 가지는 값은 관능의 최종 종합적기호도가 6점 이하인 것으로 알 수 있음.

0차반응식 결과입니다.



Storage-Con.(%) regression

No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	-0.0408	8.5555	0.9460
2	35	-0.0615	8.4442	0.9523

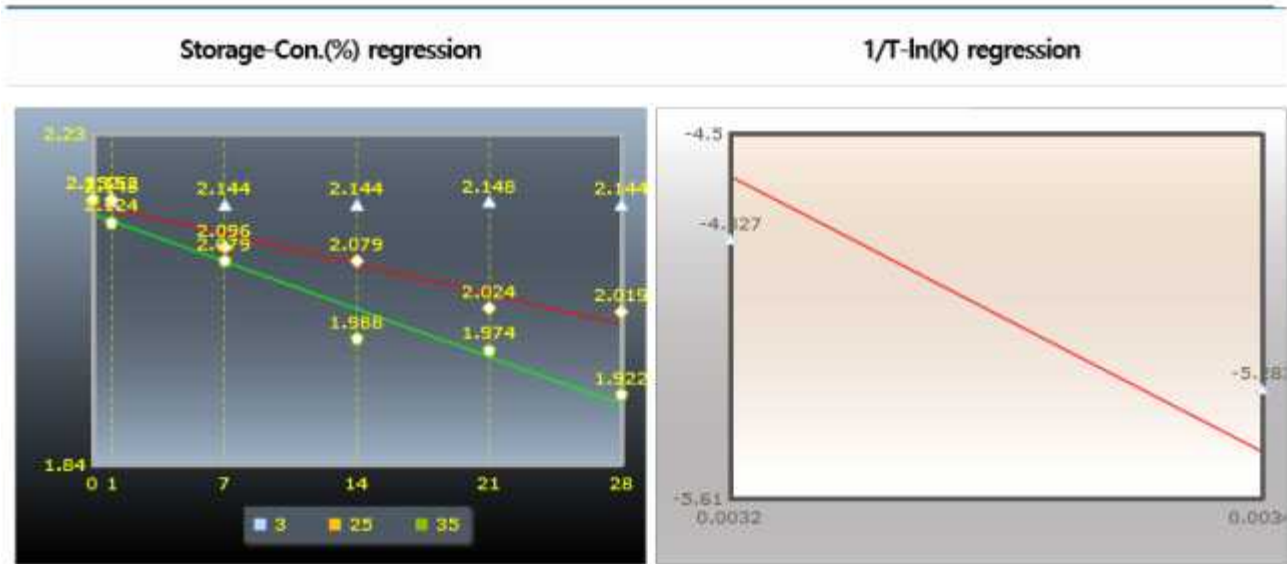
1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
-3755.11	9.40	1.0000	-7461.40

그림 74. 저장기간별 음료의 관능평가 변화표 (0차반응식)



1차 반응식 결과입니다.



Storage-Con.(%) regression

No.	온도	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
1	25	-0.0051	2.1471	0.9498
2	35	-0.0080	2.1347	0.9600

1/T-ln(K) regression

Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>	Ea
-4190.67	8.78	1.0000	-8326.86

그림 75. 저장기간별 음료의 관능평가 변화표 (1차반응식)

- 총균수측정: 저장기간별 총균수 측정결과는 표 20에 나타냄. 총균수는 25℃와 35℃의 두 군데서 확인 실험을 하였으며, 두 군데 모두 미생물이 검출되지는 않음. 이는 살균의 방법이 적절하며 장기간 유통시에도 안정적인 상품을 제공할 수 있는 지표가 됨을 알 수 있음.

표 19. 뽕은감복합추출물젤로의 미생물검사결과

	1주	2주	3주	4주
4℃	N.D	N.D	N.D	N.D
20℃	N.D	N.D	N.D	N.D
30℃	N.D	N.D	N.D	N.D

- 유통기한설정을 위한 품질지표 확인: 유통기한설정을 위한 최종 품질지표는 관능검사로 결정되었으며, 이를 통해 15.35개월의 유통기한을 확인할 수 있음.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

		코드번호	B-05-01
구분	내용		
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 본 연구의 최종목표는 연구기술 핵심원료인 뚝은감은 동아시아 원산으로 저비용으로 손쉽게 원료를 확보할 수 있다는 장점과 비교적 많은 약리적 효능이 있어, 오늘날 부가가치와 응용가치가 매우 좋은 식품 소재가 될 수 있음.</li> <li>• 우리나라 농산물인 뚝은감을 활용하여 비만으로 인한 성인병 대사성질환예방의 과학적인 메커니즘을 규명함으로써 기능성을 증가시킨 항비만 체지방 조절 고부가가치 패키지 제품을 개발하여 최근 시대적 추이에 맞춘 웰빙 및 삶의 질 향상의 니즈 필요성에 부합하고자 함.</li> <li>• 뚝은감을 활용하여 비만예방 특히, 체지방 조절에 효과가 있는 기능성 고부가가치식품 소재를 발굴하기 위해 비만에 미치는 대사성질환 생리활성소재 효능을 체계적 과학적으로 밝히고, 다양한 품질평가, 생리이화학적 특성평가, 효능 평가를 통하여, 이를 함유한 비만예방(체지방 다이어트) 및 고부가가치 기능성제품 생산을 산업화 하므로써 감 생산 농가 및 국내경제 활성화에 중추적 핵심역할을 하고자 함.</li> </ul>		
세부목표	<p>본 기술은 비만예방 또는 개선용 고부가가치 국내산 농산물 소재 발굴을 위하여 선행 연구결과 국내산 농산물인 뚝은감을 활용하여 항비만(체지방 조절) 효과가 있는 친환경 기능성 신소재를 발굴하여 다양한 품질평가, 생리이화학적 특성평가, 효능검증 및 제품개발 등 연구개발 성과를 통하여 향후 기능성식품 인증을 획득하는데, 근거 자료로 삼고자 함.</p> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 10px 0;"> <p><b>우리 농산물 뚝은감 자원을 활용한 비만예방 및 개선의 기능성소재 및 고부가가치 패키지제품 개발화</b></p> </div> <pre> graph LR     A[핵심원료 소재의 지표성분 함량 극대화 제조공정 확립 및 표준화] --&gt; B[친환경 추출공법에 의한 추출제작법 확립화]     B --&gt; C[생리 이화학적 특성 및 효능 평가 창출]     C --&gt; D[고부가가치 항비만 패키지제품 개발 및 상용화]     </pre> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 비만예방 및 개선 효과가 있는 농산물 소재 탐색</li> <li>- 활성성분 분석 및 대량추출기술 개발</li> <li>- 제품화에 따른 가공처리 조건 및 안정성 검토</li> <li>- 항비만(체지방 조절) 기능성평가</li> <li>- 항비만(체지방 조절) 제품개발 및 상용 상품화 개발</li> </ul>		

### 3-2. 목표 달성여부

성과목표											연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	1건	백만원	백만원	1명	백만원	건	건	1건		1건		명	건	건	
가중치	20	10				10	10		20					20	10	0				
최종목표	2	1				1	20		2			1	2		2	2	1			
1차년도	6	6				0	0		1			0	0		1	1	0			
2차년도	1	0				1	5		2			0	1		2	1	0			
성과	7	6				1	5		3			0	1		3	2	0			
달성도	20	10				10	4		20						20	10				

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

매출액의 달성도 부족  
SCI 논문 출판 준비

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

- 우리 농산물인 뽕은 감을 이용하여 비만예방 특히, 체지방 조절에 효과가 있으면서 피부미용 효과를 가진 고부가가치 기능성 식품소재 개발 및 뽕은감 유래 비만예방 및 피부미용에 미치는 대사성질환 생리활성 효능을 체계적 과학적으로 밝히고, 유효성분 분석과 생리활성효능 증진 극대화의 연구자료 확보, 다양한 품질평가, 생리이화학적 특성 평가 및 임상실험 연구 성과 등을 얻을 수 있음.
- 웰빙 소재로 개발하여 국제적인 기호성이 인정된다면 국외로 수출하여 외화 획득도 가능할 것으로 기대됨.
- 웰빙 산업(항비만) 고부가가치 기능성 원료개발 산업의 발전에 기여함.
- 한중 FTA를 대비한 뽕은감 생산 농가의 경제적 이익 창출 가능성 높음.
- 항비만 생리 활성 검색 및 응용기술의 국내외적 권리 확보 및 영농단체, 산업계 등의 기술적 지원 및 기술이전 실시.
- 건강한 삶의 유지를 통한 건강한 사회의 실천에 중요한 파급효과가 있다고 생각됨.
- 최근 사회적 트렌드인 항비만 소재 개발을 위한 심층연구 결과를 바탕으로 연구투자를 수주할 수 있음.
- 우리 농산물인 뽕은감으로부터 항비만 효능을 분석하고, 기능성 활성성분 효능검토 방법을 표준화, 객관화하여 전통의학적 경험과 지식을 과학적으로 검증할 수 있는 기술개발 함으로써 향후 새로운 웰빙 고부가가치 기능성식품 및 화장품, 의약품 제조의 확립 및 실용화에 기여함.
- 활성물질의 표준제조공정을 확립하고 활성성분의 고함유 원료 생산이 가능하며 이를 활용한 다양한 제품화 및 국제적 경쟁력을 강화 할 수 있음.
- 뽕은감 탄닌 및 비만예방(체지방 조절) 기능성 성분을 함유한 웰빙 고부가가치 패키지제품 개발을 통하여 상용화 기술개발 필요성과 중요성에 대한 인식과 연구 의욕을 고취시킴.

## 붙임. 참고문헌

1. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. Journal of biological chemistry. 1912 ; 12(2) : 239-43.
2. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. Journal of the science of food and agriculture. 1994 ; 64(2) : 155-61.
3. Nishitani E, Yuko MS. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. J Food Compos Anal. 2004; 17 : 675-85.

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 ‘창업벤처지원 R&D 바우처 사업’ 사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 ‘창업벤처지원 R&D 바우처 사업’의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.