

발간등록번호

11-1543000-002484-01

**신규 기능성 쌀 품종을
이용한 갱년기 이후 여성
건강 개선용 건강기능식품
소재 개발 및 제품화
최종보고서**

2018. 12.

주관연구기관 / (주) 이룸
협동연구기관 / 한국방송통신대학교
경북대학교
한남대학교

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신규 기능성 쌀 품종을 이용한 갱년기 이후 여성 건강 개선용 건강기능 식품소재 개발 및 제품화”(개발기간 : 2015.10. ~ 2018.10.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.12.10.

주관연구기관명 : (주)이룸 (대표자) 황성주, 유양원 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 홍 성 길
협동연구책임자 : 류 수 노
강 미 영
권 영 인

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	115018-3	해 당 단 계 연 구 기 간		단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	신규 기능성 쌀 품종을 이용한 갱년기 이후 여성 건강 개선 용 건강기능식품소재 개발 및 제품화			
연구책임자	홍 성 길	해당단계 참여연구원 수	총: 63 명 내부: 63 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:630,000천원 민간:210,000천원 계:840,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 63 명 내부: 63 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:630,000천원 민간:210,000천원 계:840,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)이름			참여기업명 (주)이름	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

--	--

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>- 본 연구는 폐경기 이후 여성 건강 개선 가능성이 강화 된 신규 품종 쌀 (슈퍼홍미)의 산업화 및 고부가가치화를 목적으로 하여 연구를 수행하였음 - 본 목적을 달성하기 위하여 신제품 쌀인 슈퍼홍미 품종으로부터 기능성 식품 소재로의 생산을 위한 생산 공정의 표준화, 품질관리를 위한 지표성분의 설정 및 표준화 및 품질규격을 수립하고, 슈퍼홍미 추출분말의 in vitro, 전임상 및 인체적용시험을 통한 폐경기 이후 여성의 건강개선 효과를 검증함으로써 개별인정형 건강기능식품 소재로의 등록을 위한 자료를 구축하였으며, 이와 동시에 신제품종의 안정적 공급을 위한 재배적지 선정 및 재배기술 최적화, 품종의 판별을 위한 유전자 마커등의 연구를 수행하였음</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>- 본 연구개발을 통하여 신규 쌀 품종인 슈퍼홍미 품종으로부터 신규 기능성 성분인 taxifolin을 분리 동정하였고, 이를 지표성분으로 하여 기준시험법을 제정한 후 유효성(validation)을 수행하였고, 기능성 식품원료인 슈퍼홍미 추출분말의 제조공정 표준화를 통해 식품 소재 생산 공정을 완성하여 신규 식품 소재 공급이 가능하게 하였음 - 슈퍼홍미 추출분말의 기능성 검증을 위해서 폐경기 모델을 사용한 전임상 모델 및 인체적용시험을 시행하였으며, 그 결과 슈퍼홍미 추출분말의 투여가 폐경기 이후 여성 건강을 개선하는 가능성을 보유하고 있음을 확인하였음 - 또한, 슈퍼홍미의 산업화를 대비하여 신제품 쌀의 안정적 공급을 위한 재배적지의 선정, 재배방법의 최적화 및 품종 판별을 위한 분자 마커를 개발하여 차후 산업화를 위한 공급 기반을 구축하였음 - 상기의 연구결과를 통하여 식품의약품안전처의 개별인정형 원료로서의 등록 구비요건을 갖추어 차후 국내 개발 신제품 쌀을 이용한 개별인정형 원료로서의 개발을 최종 목적으로 추가 연구 과정을 진행하고 있음</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>- 본 연구개발의 성과를 이용하여 2019년 슈퍼홍미 추출분말로서 식품의약품안전처의 개별인정형 원료 등록 과정을 진행할 예정으로, 개별인정형 원료 등록 후 건강기능식품 소재 및 완제품으로서의 판매를 통해 활용하고자 하고 있음 - 또한, 슈퍼홍미의 원물을 이용한 생식 제품 및 음료 제품의 기반 원료로서의 활용을 계획하고 있으며, 이를 통해 국내 신제품 쌀의 산업화를 통해 안정적인 정착을 유도하여 농민과 식품산업계의 공생 발전이 가능함</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	건강기능식품	개별인정형	슈퍼홍미	갱년기	대사성질환
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Functional Food	SuperHongmi	Metabolic syndrome	Food Ingredient	Rice

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	13
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	131
4. 연구결과의 활용 계획 등	136

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 국내 농산물 자원을 활용한 비만 예방 및 개선을 위한 식품 소재 및 식품의 개발은 아직까지 미진한 편이기 때문에 가능성이 검증된 농산물자원을 활용한 제품 개발을 통하여 농업자원의 판로 확보와 더불어 국내 기능성식품 시장의 니즈를 충족시킬 수 있음
- 특히, 우리나라의 식량자급율은 약 26% 수준으로 해외의존도가 매우 높으며 최근 유럽 등 농업 비교 우위국가들과의 FTA 협정으로 인한 농업 시장 강압력은 국내 농업 산업에 대한 심각한 위협으로 다가오고 있음
- 국내 농산물의 총수입액은 농촌경제연구소의 통계 수치에 따르면 2003년도 84억달러에서 2005년 98억달러, 2007년에 149억달러로 급증한 반면에, 농축산물의 수출액은 2003년도 18억달러에서 2005년 21억달러, 2007년에 28억달러로 큰 변화를 보이지 않고 있으며, 수입농산물의 급증은 국내 농산물의 입지 축소를 나타내고 있는 것으로 보임
- 특히, 우리나라의 주식인 벼의 재배량을 살펴보면 재배면적이 2005년도 967,000ha에서 2009년도 816,000ha로 감소하였고, 주야채중 하나인 당근의 재배면적 역시 약 3,200ha에서 2009년 약 2,700ha로, 오이 재배면적은 2005년 약 5,700ha에서 5,100ha로 감소하는 등 전반적인 농업 재배면적의 축소 경향을 보이고 있음

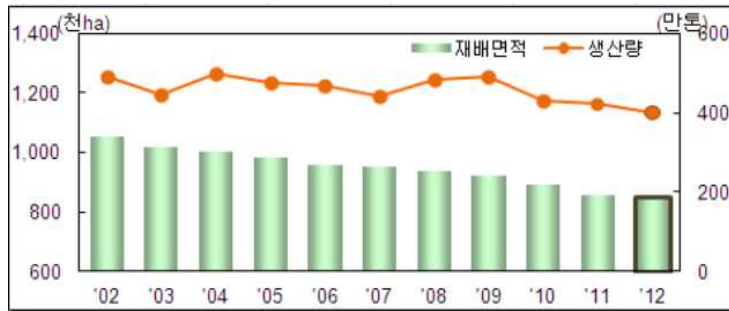


그림 1. 국내 농가 재배면적 및 농산물 생산량 추이



그림 2. 국내 농업 인구 및 농가수 변화 추이

표 1. 국내 벼 재배면적 및 생산량 추이

연도	재배면적	생산량
2005	967	4,735
2006	945	4,659
2007	942	4,389
2008	928	4,825
2009	918	4,899
2014	816	4,241

(농촌경제연구원 통계자료)

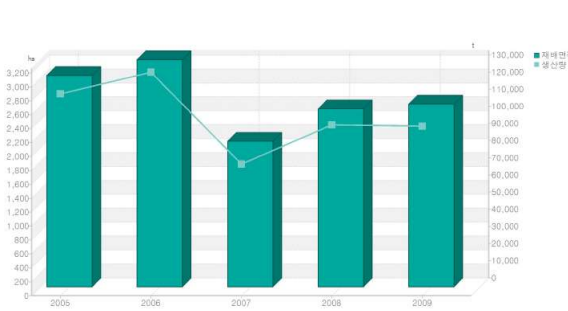


그림 3. 당근 생산 면적 및 생산량 변화

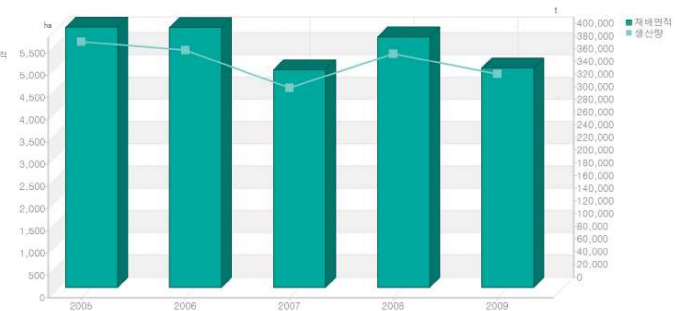


그림 4. 오이 재배면적 및 생산량 변화

- 이러한 재배면적의 감소는 국내 양곡의 소비추세에서도 더 확실하게 나타나는데 주곡인 쌀의 경우 1인당 소비량이 2005년 80.4kg에서 2014년 69kg으로 감소하였고, 콩은 9.3kg에서 8.0kg으로 감소하고 있음. 그러나 수입이 주를 이루고 있는 밀의 경우는 2005년 33.2kg에서 2009년 33.4kg으로 큰 변화를 나타내고 있지 않아 국내 농업에서 수입의 비중이 상대적으로 크게 작용하고 있는 것으로 판단할 수 있음
- 이러한 국내 농업 산업의 위축을 타파하기 위하여 국내 농산물의 부가가치화가 필요하나 농산물을 직간접적으로 이용하고 있는 음식료품의 부가가치 창출 부분에서도 2004년 11조 5400억원에서 2009년 12조 3400억원으로 5년간 약 7% 성장하는데 그쳐 음식료품의 고부가가치화가 빠르게 진행되지 않음을 알 수 있으며, 음식료품의 고부가가치화의 한계는 농업 산업의 활력을 증진시켜 농업 생산성을 증대시키는데 장애요인으로 작용하고 있다고 판단됨

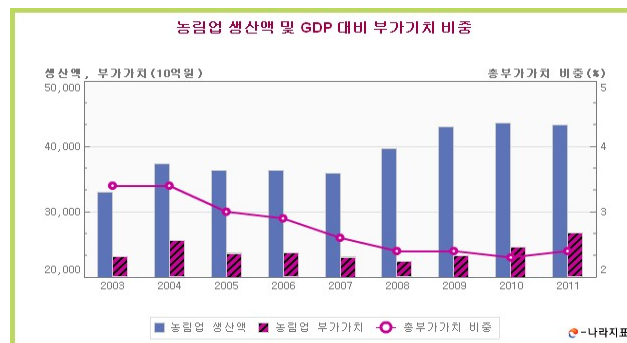


그림 5. 농림업의 GDP 대비 부가가치 비중 변화 추이

- 이러한 재배면적, 1인당 소비량의 감소에도 불구하고 쌀은 우리나라의 가장 중요한 식량 자원으로서 위치를 차지하고 있고, 식량자원의 무기화를 대비하여 전략적으로 육성할 수 있는 다양한 방법들이 지원되고 있음
- 이러한 지원책에는 생산단가를 낮추기 위하여 비교적 젊은 생산자를 대상으로 한 기업농 정책, 영세한 가족농, 노령 농가 등 한계농들은 친환경 고품질의 농산물을 생산하도록 하여 고부가가치화를 실행하거나 농업의 다원적 기능을 유지하고자 하고 있으며, 이외에도 시장 가격을 지지하기 위한 몇가지 정책이 시행되고 있으나 아직까지 그 효과의 유효성에 대해서는 확인되지 않고 있어 지속적으로 새로운 대책들이 강구되어야 하는 상황임
- 이러한 정책들의 결과로 매년 전체적인 쌀 시장의 규모 축소에도 불구하고 친환경 농법을 이용한 고품질의 쌀에 대한 시장은 빠른 성장세를 보이고 있어 친환경 쌀의 재배 면적이 계속해서 증가하고 있으며, 이는 친환경, 안정성을 추구하는 사회적 분위기와 소득 증대로 인한 고품질의 쌀 수요가 높 다라는 것을 반증하고 있는 결과로 판단됨

표 2. 친환경 쌀 재배 면적 및 시장 규모의 변화 추이

구분	2000	2001	2002	2010
오리농법	13,017	17,094	34,942	48,196
우렁이농법	1,840	4,555	19,113	30,804
쌀겨농법	0	493	7,581	11,887
키토산농법	0	7,298	26,684	32,988
기타	7,627	17,945	56,717	70,063
합계	22,484	47,385	145,037	193,938
총재배면적 (ha)/총면적대비(%)	2,171/0.19	4,782/0.48	14,935/1.52	19,875/2.01
농가수/총농가수대비(%)	3,613/0.28	7,933/0.61	18,935/1.58	24,432/2.05

- 이와 같이 농산물 시장의 축소, 소비자의 기호변화, 기술의 발달 등으로 소비자의 니즈를 만족시켜 새로운 수요를 창출할 수 있는 소득작물로서 전통의 육종법을 활용한 신품종 쌀의 개발 및 이를 활용한 고부가가치 식품 개발은 국내의 농업 기반을 강화함과 동시에 식품 산업의 발전을 동시에 만족시킬 수 있는 기술로서 개발이 절실한 상황임

1-2. 연구개발의 필요성

국내산 농산물의 경쟁력 강화를 위한 기능성 강화 품종개량 - 슈퍼홍미

- 쌀은 고온 다습한 아시아 지역에서 전세계 생산량(57백만톤/년)의 약 91%가 생산되고 있으며 전세계 열량공급의 약 20% 정도를 담당하고 있으며, 국제적으로 유통되는 쌀은 전체 생산량의 약 5% 수준으로 최대 생산국가이며 소비국가인 중국과 인도의 국내상황에 따라 전체수급이 크게 영향을 받는 매우 불안정한 구조를 하고 있음
- 그럼에도 우리나라의 식량자급율은 24% 수준으로 해외의존도가 매우 높으며, 최근 유럽 등 농업비교 우위국가들과의 FTA 협정으로 인한 농업시장 개방압력은 식량주권에 심각한 위협으로 작용하고 있는 것이 현실이며, 이것은 해외 국가에 의한 식량 자원의 무기화에 의한 위협의 증가와 더불어 국내 농산업의 근간에 심각한 위협 요소로 작용하게 됨
- 또한 도시와 농촌간의 소득격차가 심화되고, 사회 전반적인 농업 경시풍조 등으로 농산업이 크게 위축되었으며, 특히 주곡인 쌀의 경쟁력이 크게 후퇴하면서 국가적인 보호에도 그 한계에 직면하고 있어 식량안보를 위한 최소한의 쌀생산 능력을 유지하는 것 자체가 당면 과제가 되고 있으나 순수 생산성 측면에서 해외의 쌀 재배 능력과의 차이가 있어 이를 극복할 수 있는 연구개발이 필요함
- 다행히 국민소득의 향상과 참살이 등의 영향으로 먹거리에 대한 국민적 인식이 바뀌면서 우리 농산물에 대한 관심이 점차 증진되는 추세에 있어, 이를 계기로 제2의 농업부흥의 기회로 삼을 수 있는 시기로서 매우 중요한 시기라 판단됨
- 우리도 이미 국내 농산물의 경쟁력을 높이기 위하여 고품질 고기능 고부가가치 명품 농산물을 개발하기 위한 연구개발이 활발히 이루어지고 있으며, 이를 위하여 농업생산 기술의 개량과 더불어 작물의 품종 개량에 대한 연구가 진행되고 있음
- 품종 개량은 기후 변화 및 병충해에 강한 품종 개발, 생산성이 우수한 품종 개발의 연구와 같은 농업 환경 개선 및 경제성 개선 품종 개량 연구와 더불어 작물의 기능성을 강화할 수 있는 품종 개량 연구가 진행되고 있는데, 식이섬유 함량을 증대시킨 고아미, GABA의 함량을 증대시킨 GABA쌀등이 대표적이라 할 수 있으나 이러한 기능성 강화 쌀들은 재배지역의 한계 등으로 아직까지 대량의 상용화에 대해서는 미진한 편이라 할 수 있음
- 본 연구개발에서 활용하고자 하는 기능성 강화 품종 개량 벼인 슈퍼홍미는 기존의 일반현미, 흑미(흑진주)를 비롯하여 기능성 품종인 큰눈자미들과 대비할 때 중요한 식물성 생리활성 성분인 폴리페놀 성분이 비약적으로 증대된 것을 특징하고 있음

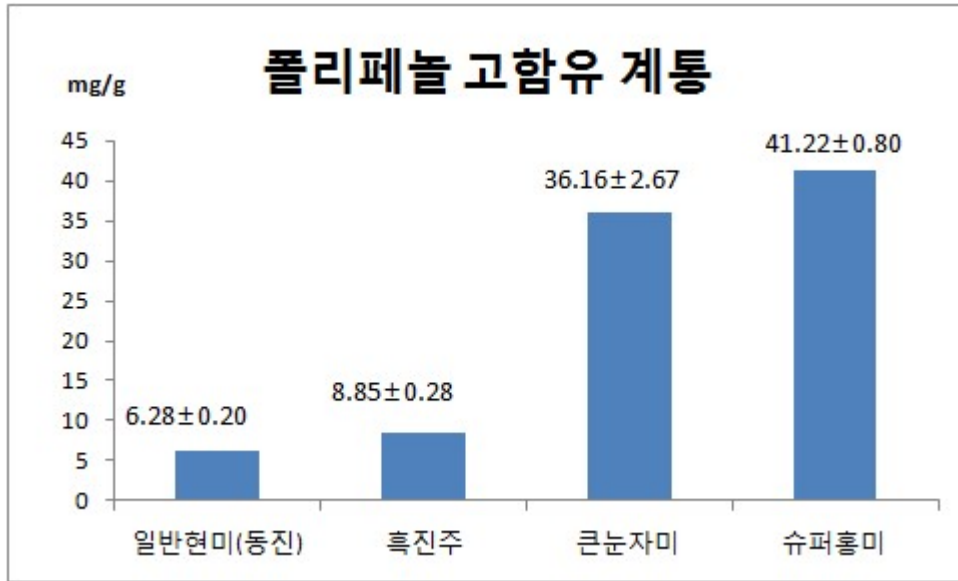


그림 6. 슈퍼홍미의 폴리페놀 함량의 비교 분석

- 슈퍼홍미 품종은 폴리페놀을 고함유하고 있는 신품종의 종자로서 [슈퍼홍미] 명칭으로 2015년 3월자로 국립종자원에 품종보호 출원을 완료한 상태임(출원번호 : 2015-339)

민원인을 가족같이, 민원을 내일같이

봉지된 내용에 의문이 있으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.

담당자: 김민지 전화: (054) 912-0113 FAX: (054) 912-0210

인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr

7 4 0 - 2 2 0

경상북도 김천시 혁신8로 119

품종보호출원번호 통지서

출원일자: 2015. 3.31	품종보호 출원번호: 출원 2015 - 339
	품종명칭 출원번호: 명칭

작 품 명: 벼

품종 명칭: 슈퍼홍미

출 원 인: 한국방송통신대학교산학협력단

주 소: 서울 종로구 동숭동169

2015년03월31일

국립종자원



- 또한, 국내 농산물 및 농산물 가공 식품의 해외 수출을 위해 경쟁력을 확보할 필요가 있으나 일부 식품군에서는 해외에서 활발한 영업 활동이 수행되고 있음에도 불구하고 국내 농산물을 주원료로 사용하면서 해외에서 성공적으로 진입한 제품은 아직까지 두드러지지 않고 있는 형편임
- 따라서, 국내 농산물의 고부가가치화 및 국제적 경쟁력 확보를 위한 국내 농산물을 사용한 식품 개발은 농업 산업의 활력을 위해 절대적으로 필요한 사항이며, 특히 국민소득의 지속적인 향상과 웰빙 문화의 영향으로 식품을 통한 건강을 지향하고자 하는 목적이 뚜렷해지고 있으며 국산 먹거리에 대한 국민적 인식이 확산되어 국산 농산물을 이용한 고부가가치 식품이 개발의 시장 진입 가능성은 매우 높다고 판단됨

쌀을 주원료로 한 소재 개발 현황

- 쌀은 주식이외에 현미유, 기능성 식품 소재가 될 수 있는 기능성 다당체, 식이섬유를 비롯하여, 쌀 단백질 및 화장품의 원료(세라마이드, 피틴산), 친환경 사료로 쓰일 수 있는 활용 잠재력이 큰 고부가가치 곡물자원이며, 관련시장(식품용단백질, 현미유, 쌀식이섬유)은 전 세계적으로 2조 6000억원 대를 형성하고 있음.
- 특히, 미강은 벼 도정시 발생하는 부산물로, 소화가 잘 안되어 식품소재로서의 활용도가 낮았으며, 거의 대부분이 미강유 제조에 이용되고 나머지는 동물의 사료로 이용되거나 폐기 되었으나, 미강에는 기능성 다당체 및 생리활성물질이 풍부하고, 항산화, 면역증진, 정장작용 등 다양한 생리활성 효능이 알려지면서, 이를 활용한 기능성 소재화에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 현재 식품의약품안전청에 개별인정형 기능성 원료로 인정된 원료 중 쌀 유래의 원료로는 CJ의 쌀겨추출물, 씨제이테아닌등 복합추출물(테아닌과 쌀미강 발효추출물의 혼합물)과 (주)에프엔피의 홍국쌀이 있으며, 개별인정형 기능성 원료로 현재 인정되지 않았으나, 신청된 사례로는 (주)대덕약품의 탈지배아발아(GABA)건조분말과 (주)미스바통상의 쌀추출물 세라마이드가 있음. 특히, 홍국쌀과 탈지배아발아건조분말을 제외한 다른 원료들은 쌀겨(미강) 유래 원료임.

표 3. 쌀 유래 개별인정형 기능성 원료 인정현황

인정번호	원료명	업체명	기능성 내용
제2004-3호	씨제이테아닌등 복합추출물	CJ(주)	기억력 개선에 도움을 줄 수도 있으나, 아직은 과학적 근거가 부족함.
제2009-19호	홍국쌀	(주)에프엔피	콜레스테롤 개선
제2009-66호	쌀겨추출물	CJ제일제당(주)	피부보습에 도움을 줄 수 있음.

표 4. 쌀 유래 개별인정형 기능성 원료 신청현황

원료명	업체명	신청 기능성 내용
탈지쌀, 배아발아(GABA), 건조분말	(주)대덕약업	정신적 피로도 개선/스트레스완화/갱년기 수면문제, 우울증 개선
쌀 추출물 세라마이드	(주)미스바통상	피부보습에 도움을 줄 수 있음.

- 미강을 이용한 식품개발 사례로는 상기의 개별인정형 기능성 원료 이외에 CJ의 쌀 단백질(CJ Riber 80®)과 쌀 식이섬유(CJ Riber 50®)가 상품화 되었음. 특히, 쌀 단백질의 경우는 알레르기 유발확률이 낮고, 밀 글루텐이 원인인 celiac disease를 가진 환자들에게 필요한 gluten free 식품에 적용 가능하다고 함.
- 쌀은 주식이외에 현미유, 기능성 식품 소재가 될 수 있는 기능성 다당체, 식이섬유를 비롯하여 쌀 단백질 및 화장품의 원료(세라마이드, 피틴산), 친환경 사료로 쓰일 수 있는 활용 잠재력이 큰 고부가가치 곡물자원이며, 관련시장(식품용단백질, 현미유, 쌀식이섬유)은 전세계적으로 2조 6000억원대를 형성함. 특히, 미강은 벼 도정시 발생하는 부산물로, 소화가 잘 안되어 식품소재로서의 활용도가 낮았으며, 거의 대부분이 미강유 제조에 이용되고 나머지는 동물의 사료로 이용되거나 폐기되었으나, 미강 내에는 기능성 다당체 및 생리활성물질이 풍부하고, 항산화, 면역증진, 정장작용 등의 다양한 생리활성이 알려지면서, 이를 활용한 기능성 식품소재화에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 기능성 강화를 위한 품종 개량과 실제 대량 생산을 위한 재배 준비가 진행되었던 슈퍼지미 및 큰눈 자미의 건강 기능성 소재로의 활용을 위한 기반 연구인 항 비만, 항 당뇨, 항지혈증 중재기작은 본 과제팀에 의해서 수행되었음.
- 그러므로 유사한 소재인 슈퍼홍미의 건강 기능성 소재로의 활용을 위한 기반 연구는 성공적으로 수행할 수 있을 것임. 동시에 갱년기 이후의 대사조절 관련 기본적인 연구 및 골대사 개선 효능의 연구도 성공적으로 수행하여, 슈퍼홍미 추출물을 식약처의 개별인정형 건강기능성 식품 소재화를 위한 제반 연구의 수행이 가능함

여성 갱년기 및 관련 개발 현황

- 최근 우리나라는 급속한 경제성장과 생활수준 향상으로 평균연령이 비약적으로 증대하고 있으며, 이에 따라 과거 장수에 대한 단순한 희망보다는 삶의 질의 향상에 대해서 높은 관심을 가지게 되었음
- 특히, 우리나라 여성의 평균연령은 2000년 78.6세에서 2012년 84세로 급속도로 증가하고 있으며, 이는 여성들의 삶이 평균적으로 폐경이후 20~30년간을 지내게 되어 폐경 이후 여성들의 변화된 삶을 살게 됨
- 폐경이란 여성에서 난소의 기능 저하로 정상적인 월경 현상이 중지되는 현상 또는 시전으로 정의되고 있는데, 자연적인 폐경은 병리적 원인을 동반하지 않으면서 무월경이 12개월간 지속되는 경우로

정의되고 있음

- 폐경은 노화로 일어나는 자연스러운 현상의 일부이나 일부 여성에게 있어서는 폐경 이후 인지능력 저하, 수면장애, 골밀도 감소, 불안, 우울 등의 부작용을 경험하고 있으며, 우리나라 여성의 75% 이상이 폐경 이후 나타나는 증상 중 1개 이상을 경험하고 있다고 보고하고 있음
- 특히, 평균연령의 증가와 다양한 분야에서 사회적으로 진출하고 있는 여성들의 삶의 변화에 중년 이후 삶의 질을 저하시키는 갱년기 증상들을 완화시키는 것은 사회적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있음
- 특히, 폐경 이후 나타나는 증상들은 정신적 증상과 신체적 증상으로 구분될 수 있는데 정신적 증상 중 중 국내 여성을 대상으로 한 대표적 증상은 기억력 저하(82.2%), 만성피로(84.1%), 근력 저하(81.3%), 피부 변화(82.6%)등이 중요한 증상으로 나타났고, 그중 심하게 나타나는 증상으로 기억력 저하와 만성 피로로 조사되고 있음
- 또한, 육체적 증상으로는 여성 호르몬 감소에 의해서 뼈내의 칼슘의 저하가 나타나 뼈의 강도가 낮아지는 골다공증이 대표적 증상으로 나타날 수 있음
- 이러한 갱년기 증상을 완화하기 위해서 여성 호르몬 치료가 다수 수행되고 있으나 호르몬 치료 후에 여성에게서 유방암의 발병율이 증가하는 것으로 인식되고 있는데, 이는 유방암의 발병율이 여성호르몬에 노출되는 기간에 비례한다는 것으로 추정되고 있음
- 또한, 여성호르몬만을 단독으로 처방할 경우 자궁내막암의 발병율 증가가 보고되고 있으나, 황체호르몬과 병행 투여시에는 오히려 자궁내막암 예방 효과가 있는 것으로 보고되어 호르몬 치료가 개인적 차이를 통해서 다양한 반응으로 나타날 수 있다는 것을 의미하고 있음
- 따라서, 일반적으로 섭취되고 있는 식품에서 갱년기 증상을 완화 할 수 있는 기능성 소재를 통해서 갱년기를 자연스럽게 극복할 수 있도록 하는 식이 요법에 대한 관심이 급증하고 있으며, 이를 반영 하듯 최근에는 여성 갱년기 증상을 완화할 수 있는 건강기능식품 소재가 전국적으로 소비자들의 각광을 받았음
- 건강기능식품으로서의 기능성 소재는 현재 석류추출물, 백수오 등 복합추출물, 회화나무추출물 등이 인정되어 있으나 아직까지 일반 식품 중에서 과학적 검증을 통해 갱년기 증상중 기억력 개선 및 골다공증 개선과 같은 기능을 가진 소재와 제품의 개발은 미진한 편임
- 사회적으로 삶의 질 향상에 대한 관심이 높아지고, 소득의 향상으로 갱년기와 관련된 시장은 지속적으로 증가할 것으로 예상되고 있어 이에대해서 건강기능식품과 더불어 일상에서 쉽게 섭취할 수 있는 일반 식품의 장기 섭취를 통해서 갱년기증상을 극복할 수 있는 연구개발이 필요할 것으로 판단됨
- 그러나, 이러한 사회적 관심의 증대에 따라서 현재도 많은 식품 원료로서 식물 추출물들을 이용한 갱년기 장애 개선, 골다공증 개선 등의 기능으로 판매되고 있는 제품 중 구체적인 작용 타겟과 작용기작은 명확하지 않은 경우가 많아 지속적으로 소비자들이 애호하는 제품은 매우 한정적인 상황임

- 따라서, 명확한 작용기전이 규명과 이를 바탕으로 한 갱년기 증상을 개선할 수 있는 효능을 과학적으로 증명된 제품의 개발을 통해 국내외에서 보다 확고한 시장을 형성할 수 있을 것으로 판단되며, 특히 해외 개발 소재가 아닌 국내 농산물을 기반으로 하여 국내 기술로서 개발된 소재는 국내 농산물에 대한 자국민의 우수한 인식을 바탕으로 하여 시장에서 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단됨
- 또한, 국내 농산물 기반의 갱년기 여성 건강 개선 소재 및 제품의 개발은 현재 세계적인 시장 개방화에 위기를 맞고 있는 국내 농업계의 새로운 고부가가치화를 꾀함으로써 식품산업 및 농산업 양측에 걸쳐 높은 성과를 낼 수 있을 것으로 판단됨
- 특히, 갱년기 여성 건강 개선 소재 시장에서 외국산 농산물의 혼입으로 심각한 사회적 문제가 발생한 상황을 볼 때 국내에서 개량한 종자를 통해 직접적인 종자 관리가 가능하기 때문에 이러한 외래종의 혼입으로부터 안전한 농산물 재배와 제품 생산이 가능할 것으로 판단됨

슈퍼홍미의 갱년기 증상 개선 기능 - 선행연구 결과

- 기능성 성분을 강화하는 것을 목적으로 하여 육종학으로 새로이 개발된 신품종인 슈퍼홍미는 이름에서 알 수 있듯이 갈색을 띄는 flavonoid 성분의 함량이 높아 외관적으로 갈색 또는 붉은색을 나타내어 슈퍼홍미라 명명되었음



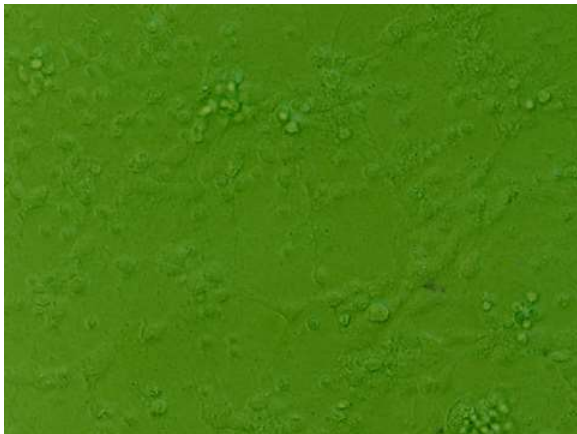
그림 7. 슈퍼홍미

- 슈퍼홍미에 대한 일반적 작물학적 특징은 일반 벼에 비하여 폭이 넓고, 부피가 상대적으로 큰 반면 밀도가 상대적으로 낮은 것으로 나타났음

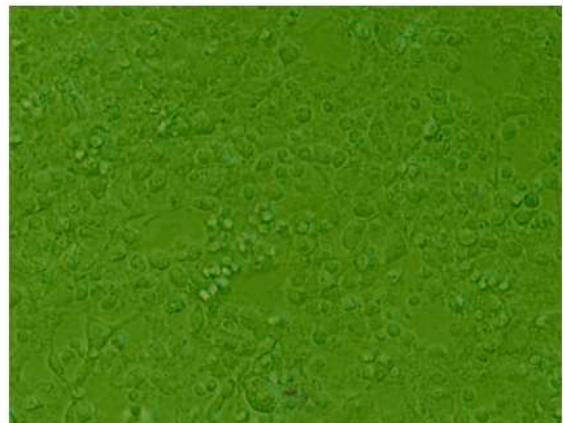
표 5. 슈퍼홍미 및 일반 벼품종의 식물학적 특징 차이

	수분 (%)	1000립중 (g)	보정1000립중 (g) (14%)	길이 (mm)	폭(mm)	장폭비	부피 (ml)	밀도 (g/ml)
호품	11.2	27.97	28.88	6.96 ^E	3.51 ^{CD}	1.98	25	1.16
대립벼1	11.2	42.34	43.72	8.51 ^{BCD}	3.9 ^A	2.18	38	1.15
흑진주	11.1	24.46	25.28	8.37 ^{CD}	3.14 ^F	2.67	25	1.01
슈퍼홍미	12.1	32.81	33.53	9.05 ^A	3.91 ^A	2.32	36	0.93
F-Value				26.27	38.27			

- 슈퍼홍미는 높은 폴리페놀 또는 플라보노이드 함량을 바탕으로 하여 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 기대되고 있으며, 특히 뇌 세포의 보호기능에 대한 연구에서 뇌세포의 보호기능이 있는 것으로 나타나 갱년기중 여성의 기억력 저하와 같은 증상에 대한 장기적인 완화의 기능이 예상될 수 있음



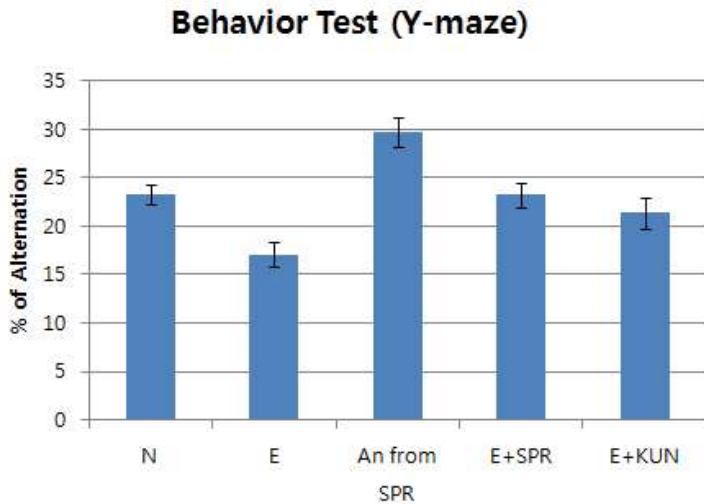
비투여군



투여군

그림 8. 초대배양 뇌세포에서 슈퍼홍미의 투여에 의한 신경세포 보호 효과

- 이를 바탕으로 슈퍼홍미를 시험용 쥐에게 투여한 후 Y-maze 시험을 통해서 기억력 개선 효과를 수행한 결과 에탄올 투여로 인하여 나타나는 기억력 저하에 대한 개선 기능이 뚜렷한 것으로 나타나 갱년기 증상중 기억력 저하에 대한 개선효과가 우수하게 나타날 것으로 기대가 됨



< 그림 - 에탄올 투여 후 기억력 회복 효과 >

- 또한, 슈퍼홍미가 갱년기 여성에게서 나타나는 증상을 완화할 수 있음을 확인하기 위하여 난소절제된 시험동물에게서 슈퍼홍미 추출물을 4주간 투여 한 혈액중의 BSALP와 ALP를 측정 한 결과에서 슈퍼홍미 추출물의 투여군이 난소 절제 후 나타나는 증상을 완화하고 있는 것으로 나타나 슈퍼홍미가 골다공증, 기억력 저하 등과 같은 갱년기 여성 건강 장애를 개선하는데 효능이 우수한 것으로 판단되었음

표 6. 슈퍼홍미 투여가 난소절제된 시험동물에서 증상 보호 효과

	Sham	OVX	OVX-SH
BSALP	12.3 ± 0.4	14.7 ± 0.9	12.5 ± 0.4
ALP	14.5 ± 3.2	23.4 ± 5.2	16.0 ± 2.7

- 상기의 선행 연구 결과들을 종합할 때 기능성 성분이 강화되도록 품종 개량 된 슈퍼홍미는 갱년기 증상에 대한 완화 효과를 가질 수 있는 것으로 추정될 수 있음
- 따라서, 본 연구개발에서는 품종개량 신제품인 슈퍼홍미를 기반으로 하여 골다공증을 중심으로 한 여성 갱년기 개선 식품 소재 및 제품을 개발하고자 하며, 이를 위하여 1) 슈퍼홍미의 기능성 연구 및 활용 제품 개발을 통한 갱년기 증상 개선용 식품 개발, 2) 슈퍼홍미의 품종 확대를 위한 추가 기능성 강화 종자 개량 및 표준화, 3) 슈퍼홍미를 이용한 식품 소재와 제품의 품질 안정성 규명, 4) 슈퍼홍미의 활성성분 분리 및 지표성분 설정이라는 이라는 네가지 목표를 통해 경쟁력 있는 제품을 개발하여 사업화가 성공적으로 이루어질 수 있도록 연구 목표를 구성하고 달성하고자 함
- 슈퍼홍미는 국내의 기술로 품종개량된 신규 기능성 품종으로 자유시장하에서 국내 농산물의 해외 농산물에 대한 경쟁력을 향상시킬 수 있는 적절한 작물로 판단되며, 본 연구개발을 통해 그 활용 영역을 확대함으로써 국내 농산물의 새로운 작물 자원의 확보와 국내 농산물을 이용한 고부가가치화 식품 개발을 통해 농산물 판로 확대에 기여할 수 있을 것으로 판단됨

2. 연구수행 내용 및 결과

제 1 장 슈퍼홍미로부터 기능(지표) 성분의 분리 및 설정

1. 슈퍼홍미추출물로부터 생리활성물질 분리정제

가. 슈퍼 홍미 추출

- 슈퍼홍미 500 g에 메탄올 (0.1% Trifluoroacetic acid)을 6 L를 넣고 혼합한 후 40°C에서 2 시간 동안 교반하였다. 추출액은 Centrifuge (Hanil Industrial Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 8000 rpm, 30분, 4°C에서 원심분리 하여 상등액을 Watman No.1 필터로 필터 하였다. 필터액을 Rotary vacuum evaporator (EYELS Japan)를 사용하여 용매를 제거한 후 freeze dryer TD5070R(lishin Lav CO., Yangju Korea) 사용하여 동결건조 하여 사용 하였다.



그림.1. 홍미 추출에 따른 수율

나. HPLC의 흡광도 변화에 의한 활성물질 분리

생리활성물질을 가지는 슈퍼홍미의 효율적인 분리 및 분석을 위해 HPLC(agilent)를 이용하여 흡광도별 (260-520nm)분석을 하였다.

표 1. 흡광도 변화(260-520nm)에 의한 활성물질 분석조건

Mobile Phase	A : Distilled water B : 100% Me-OH
Column	Luna C18
Detector	Agilent 1260 DAD
Flow	1.0 ml/min
Column Temp.	40°C

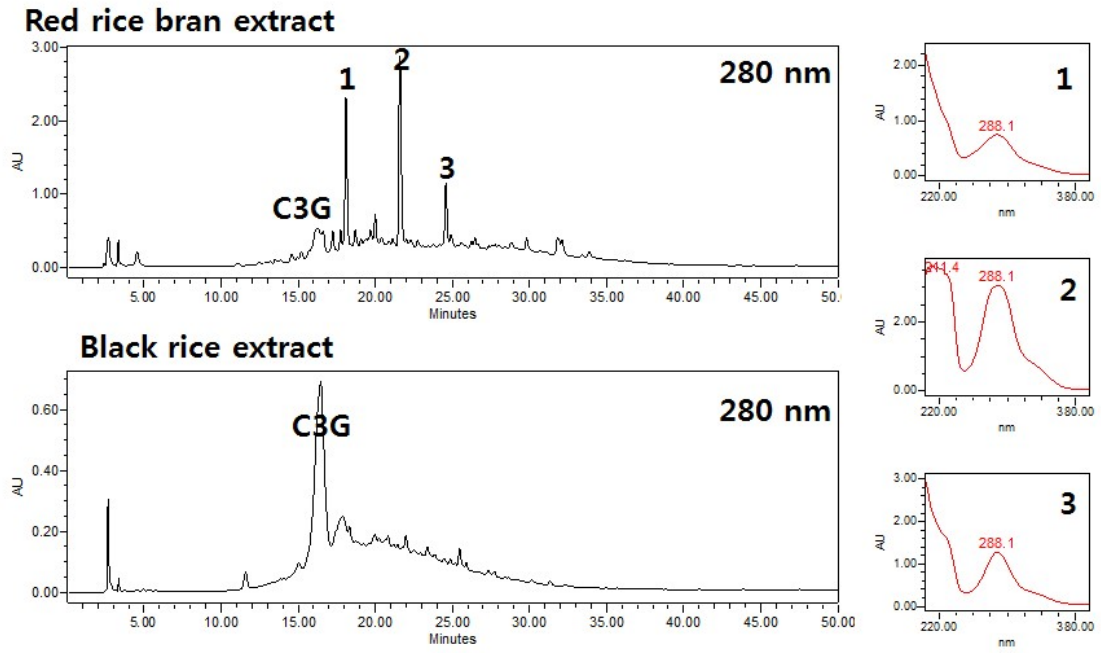


그림.2 . UV 280nm에서 슈퍼 홍미 추출물과 흑미 추출물을

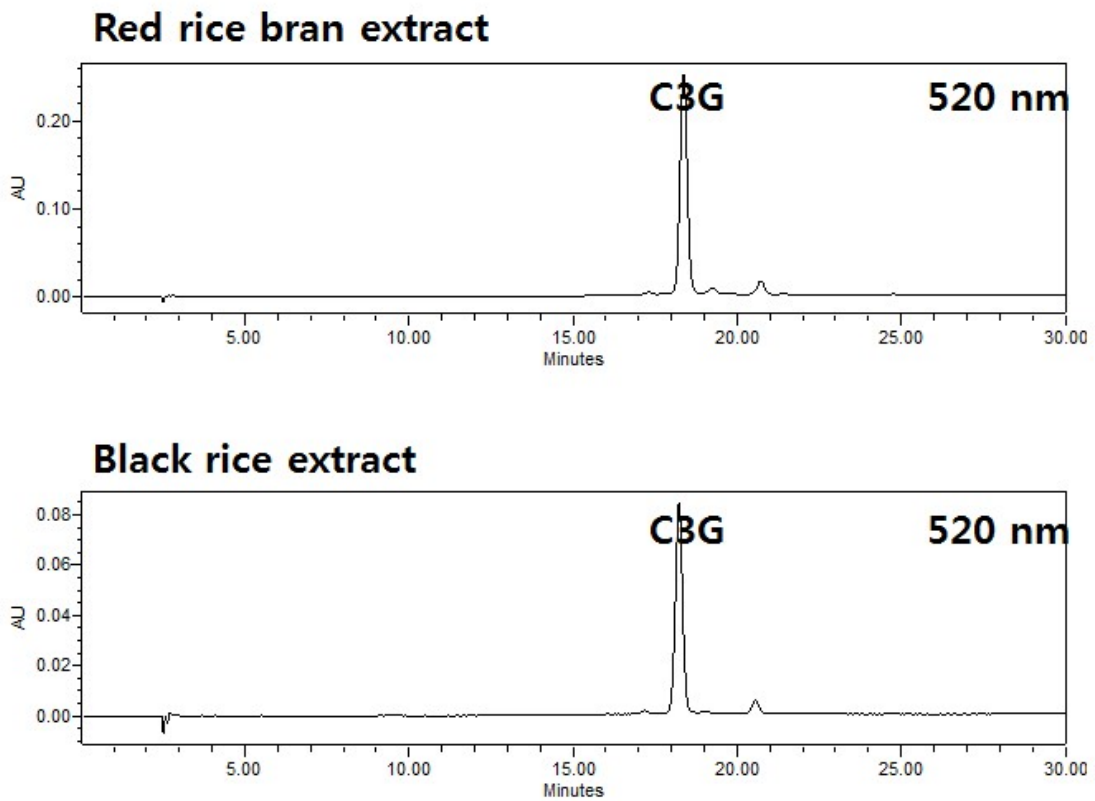


그림.3. UV 520nm에서 홍미 추출물과 흑미 추출물을 분석

- 흡광도를 달리하여 분석한 홍미 추출물과 흑미 추출물을 표.1 과 같은 조건으로 HPLC를 이용하여 분석한 결과 (그림.3) 280nm로 분석 하였을 경우 가장 많은 물질이 검출 되었다. 흡광도가 520 nm에서 Cyanidin-3-Glucoside (C3G)을 확인하였다.

다. HPCCC와 HPLC 흡광도 변화에 의한 활성물질 분리

- 생리활성물질을 가지는 슈퍼홍미의 효율적인 분리 및 분석을 위해 HPCCC (preparative scale, MIDI)를 이용하여 280, 520 nm에서 분리하였다..

표 2. 흡광도 변화(280, 520 nm)에 의한 활성물질 분석조건

Mobile Phase	TBME:n-BuOH:MeCN:Water:TFA (1:7:1:5:0.05)
Detector	Agilent 1260 DAD
Flow	5.0 ml/min
Loading amount	10 g

표 3. 흡광도 변화(280 nm)에 의한 활성물질 분석조건

Mobile Phase	n-hexane:ethyl acetate:methanol:water (2:8:4:6)
Detector	Agilent 1260 DAD
Flow	3.0 ml/min

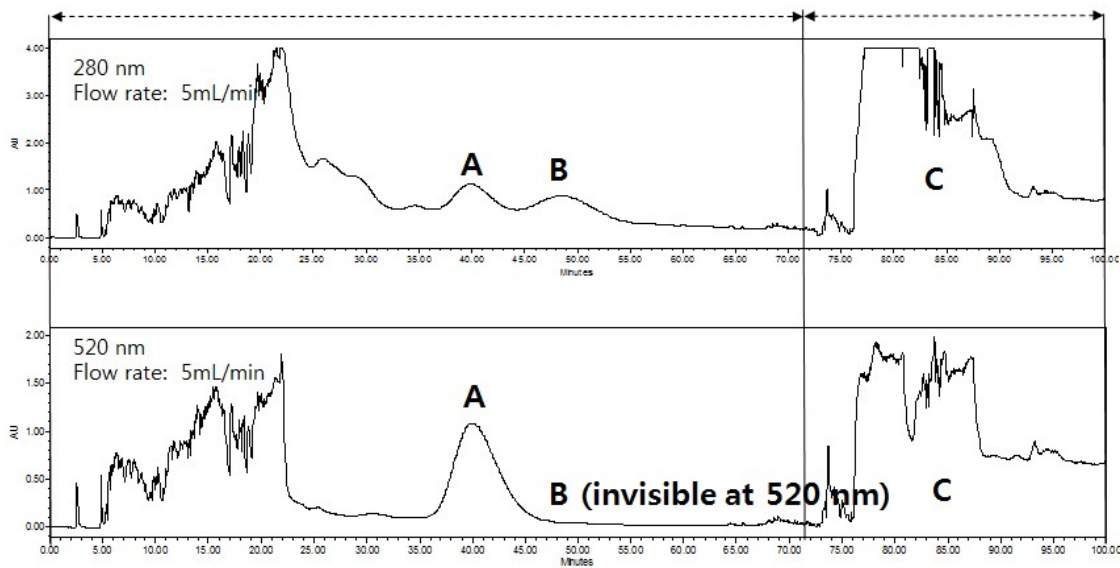


그림.3. 홍미 추출물의 HPCCC 분석

- 표1 조건을 이용하여 HPLC를 분석결과 그림.3과 같이 나타났다. Fraction A, B, C 세 부분으로 분리를 하였다. Fraction A는 Compound 1, Fraction B는 Compound 2로 분리 하였다. 이중에 Fraction C 부분은 표.3 조건으로 HPLC 분석하여 Compound 3, 4를 얻었다.

라. compound 4가지의 구조동정

- 홍미 추출물에서 분리한 화합물들 네 가지를 1H-NMR, 13C-NMR을 이용하여 분석 하였다.

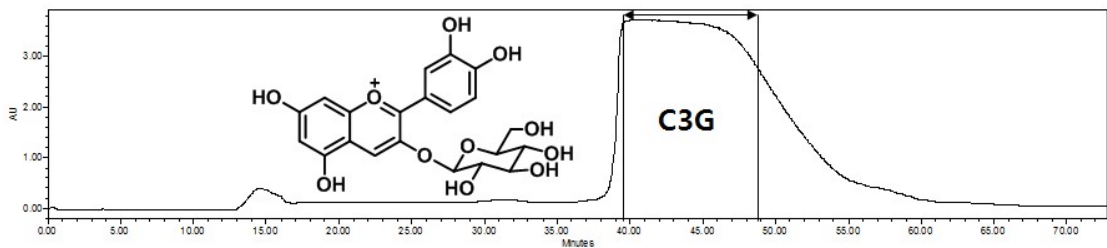


그림.4. Compound 1에 대한 구조분석

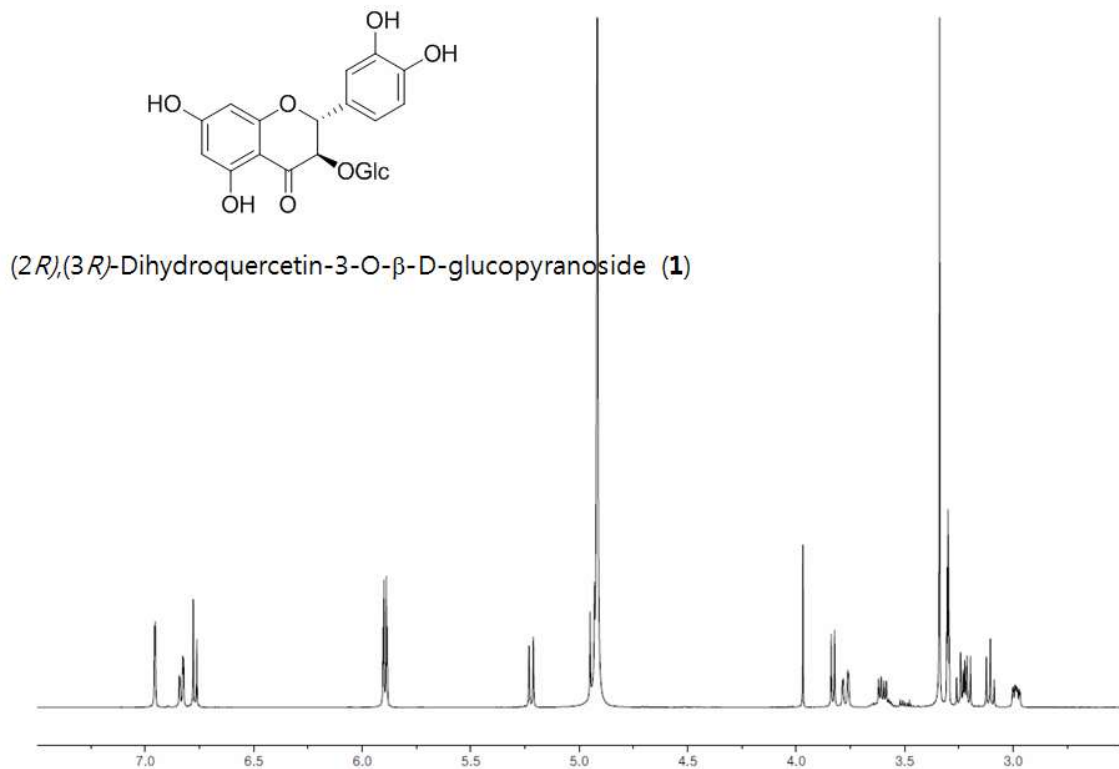


그림.5. Compound 2에 대한 구조분석

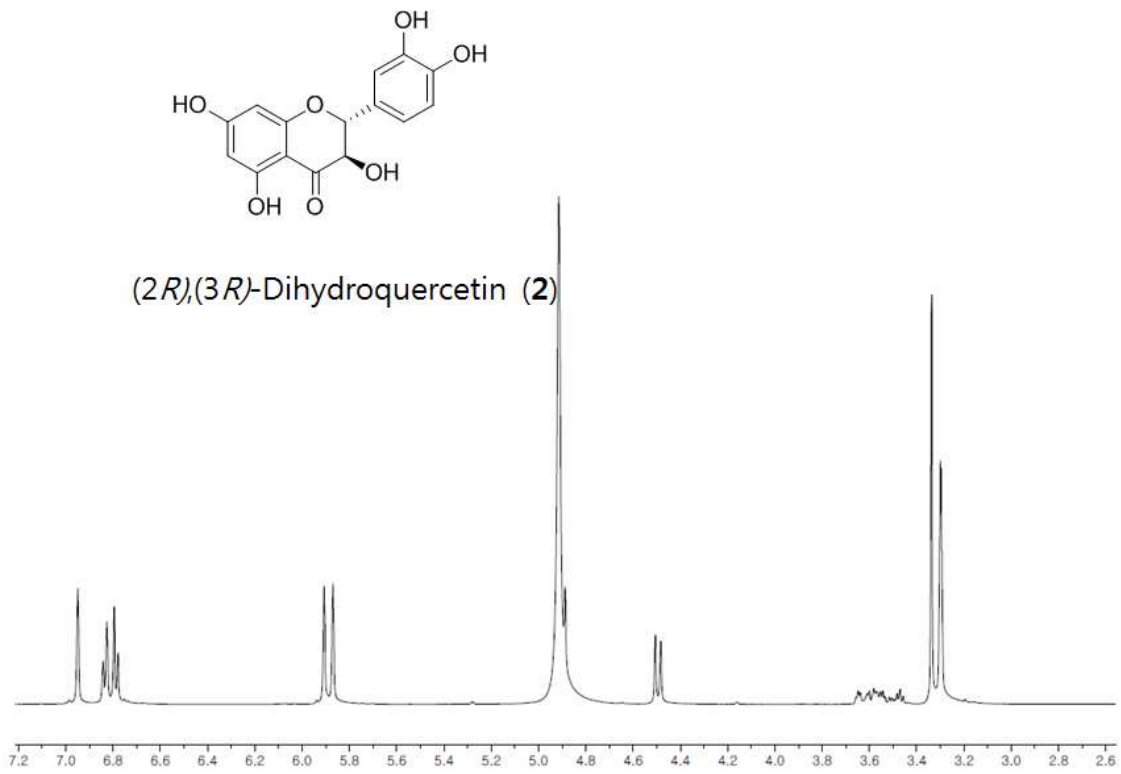


그림.6. Compound 3에 대한 구조분석

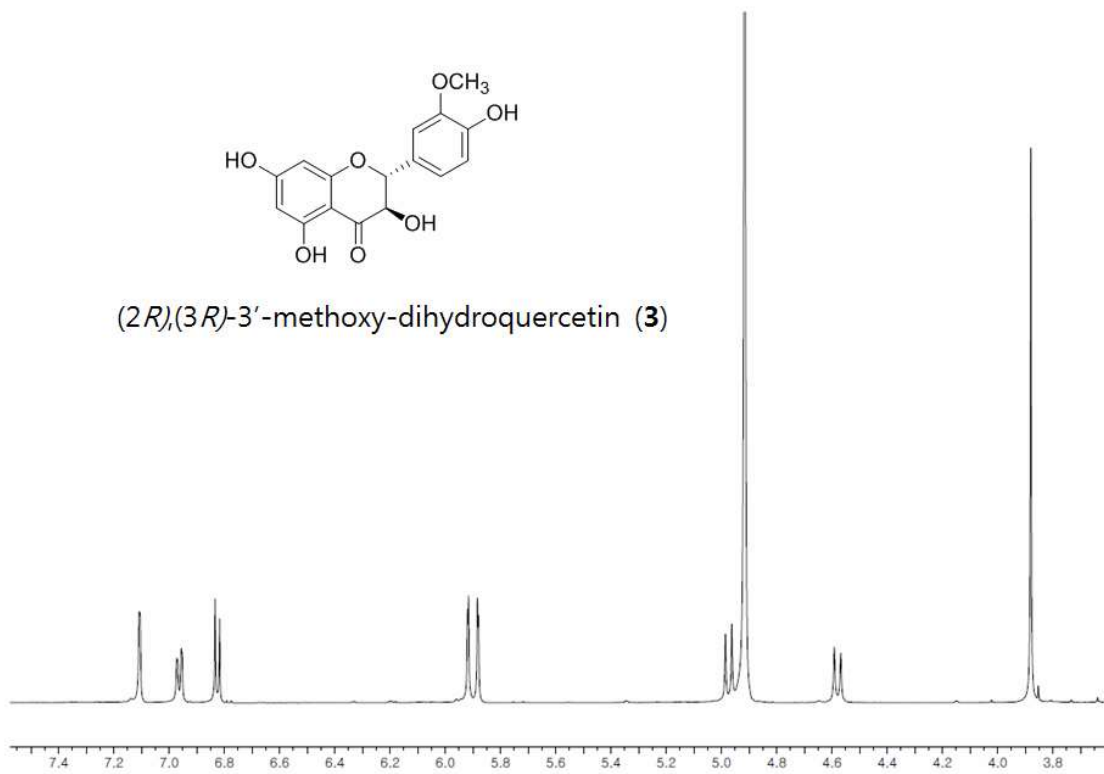


그림.7. Compound 4에 대한 구조분석

- 각 Compound를 분석한 결과 1번 compound는 흑미 등의 색소 성분인 Cyanidine-3-glucoside(C3G)로 규명되었는데 이는 슈퍼홍미의 계통의 모본이 슈퍼자미인 것에 유래된 것으로 보이며, 각 성분의 함량 등을 비교 분석하였을 때 Compound 3인 (2R),(3R)-Dihydroquercetin이 가장 유력한 지표성분 후보로 설정되었으며, 이 성분의 통상명은 Taxifolin임
- Taxifolin은 양과등에 존재하는 기능성분으로 대사성 질환의 예방 및 치료에 유효성이 있어 중년 갱년기 여성의 건강 개선에 도움을 줄 수 있는 성분으로 추정되어 당 물질을 본 연구의 지표성분으로 수립하였음

마. 추출 방법의 결정

- 슈퍼홍미에 미강을 분리한 후 배아를 g당 10 ml의 주정을(0, 20, 50, 70, 95%) 넣고 혼합한 후 40℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 추출액은 Centrifuge (Hanil Industrial Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 8000 rpm, 30분, 4℃에서 원심분리 하여 상등액을 Watman No.1 필터로 필터 하였다. 필터액을 Rotary vacuum evaporator (EYELS Japan)를 사용하여 용매를 제거한 후 freeze dryer TD5070R(lishin Lav CO., Yangju Korea) 사용하여 동결건조 하여 사용 하였다.

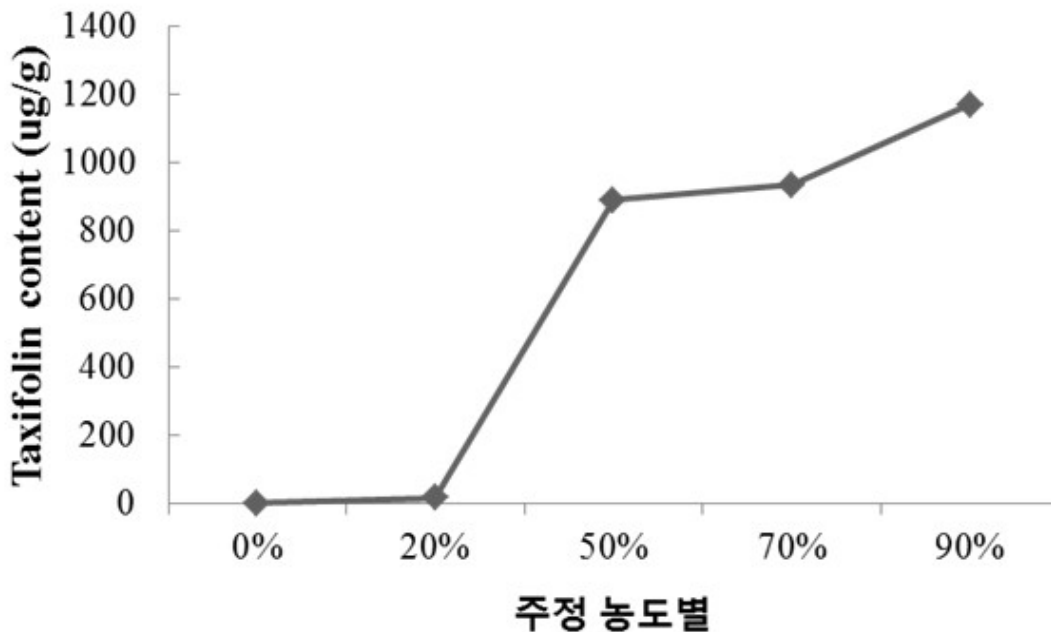


그림.8. 주정 농도별 추출에 따른 Taxifolin 함량 변화

- 홍미 배아 내에 주정 추출에 따른 Taxifolin 함량 결과는 그림.3에 나타내었다.

Taxifolin의 경우 주정 농도가 증가함에 따라 Taxifolin 함량도 증가하는 걸 보여주고 있다. 이러한 결과를 토대로 홍미 배아는 50% 주정으로 추출한다.

바. 대량 추출 방법

- 슈퍼홍미 배아를 100 g당 1L의 50% 주정을 넣고 혼합한 후 40℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 추출액은 Centrifuge (Hanil Industrial Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 8000 rpm, 30분, 4℃에서 원심분리 하여 상등액을 Watman No.1 필터로 필터 하였다. 침전물은 위와 같은 방법을 3회 반복 하였다. 필터액은 Rotary vacuum evaporator (EYELS Japan)를 사용하여 용매를 제거한 후 freeze dryer TD5070R(lishin Lav CO., Yangju Korea) 사용하여 동결건조 하였다. 홍미 추출물은 41.16g (수율 13.72%)의 시료를 생산하였다.

2. 슈퍼홍미 추출분말의 지표성분에 대한 기준시험법 개발

가. LC-MS/MS를 이용한 슈퍼홍미 추출물의 지표성분에 대한 기준시험법 개발

(1) LC-MS/MS(Q Exactive and UPLC system)를 활용한 정량성이 개선된 기시법 개발

- 지표물질 분석의 수월성 및 범용성 검증이 필요함에 따라서, 슈퍼홍미 지표성분인 Taxifolin 기시법 개발을 위해 낮은 함량에도 분석이 가능하기 위하여 DAD 장비 대신에 MS Spectrum에서 검출이 용이한 방법을 개발하여 아래와 같이 Taxifolin 분석법 확립 하였음 (표 4)
- Taxifolin의 기준시험법 개발을 위한 직선성 농도범위는 1 ~ 1,000 ng/ml 로 설정하고 Taxifolin 표준품의 정량범의는 직선성을 나타내는 농도로 표시하고, 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 R^2 을 구하여 품질관리에 적합한 직선성을 나타내는지 확인 하였음.
- 이러한 검출범위의 검출 최소한계는 추후 Taxifolin을 이용한 다양한 인체 및 동물실험시 발생하는 지표물질의 체내 대사체 분석 및 분포 검증과 같은 Absorption, Distribution, Metabolites, and Elimination (ADME) 데이터 확보에 필수적인 요소로 판단됨

표 4. 지표성분의 분석조건 (LC-MS/MS)

LC	Vanquish™ Flex Quaternary UHPLC (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)		
Mobile phase	A: Distilled water (0.1% Formic acid) B: Me-OH (0.1% Formic acid)		
Column	Hypersil GOLD™ (1.9 μm / 1 x 100 mm) Thermo Fisher Scientific		
Auto sample Tem.	10 $^{\circ}\text{C}$		
Flow (ml/min)	0.100 ml/min		
Column Temperature	30 $^{\circ}\text{C}$		
Full MS	Resolution	70,000	
	AGC target	3e6	
	Maximum IT	200 ms	
	Scan range	150 to 2,000 m/z	
HESI source	Sheath gas flow	45	
	Aux gas flow	12	
	Sweep gas flow	2	
	Spray voltage (kV)	3.52	
	Spray current (μA)	29.70	
	Capillary temp ($^{\circ}\text{C}$)	250	
	S-lens RF level	-	
	Aux gas heater temp ($^{\circ}\text{C}$)	350	
Mobile condition	min	A solution (%)	B solution (%)
	0	98	2
	5	98	2
	35	40	60
	50	0	100
	55	0	100
	60	98	2
	65	98	2
	71	98	2

Taxifolin 검량곡선

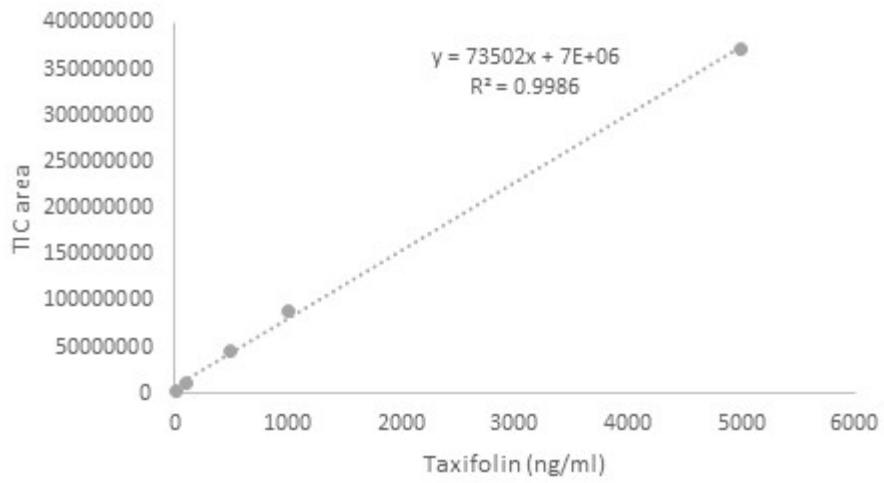


그림 9. Taxifolin 표준품의 검량곡선 (Taxifolin 1 ~ 5,000 ng/mL)

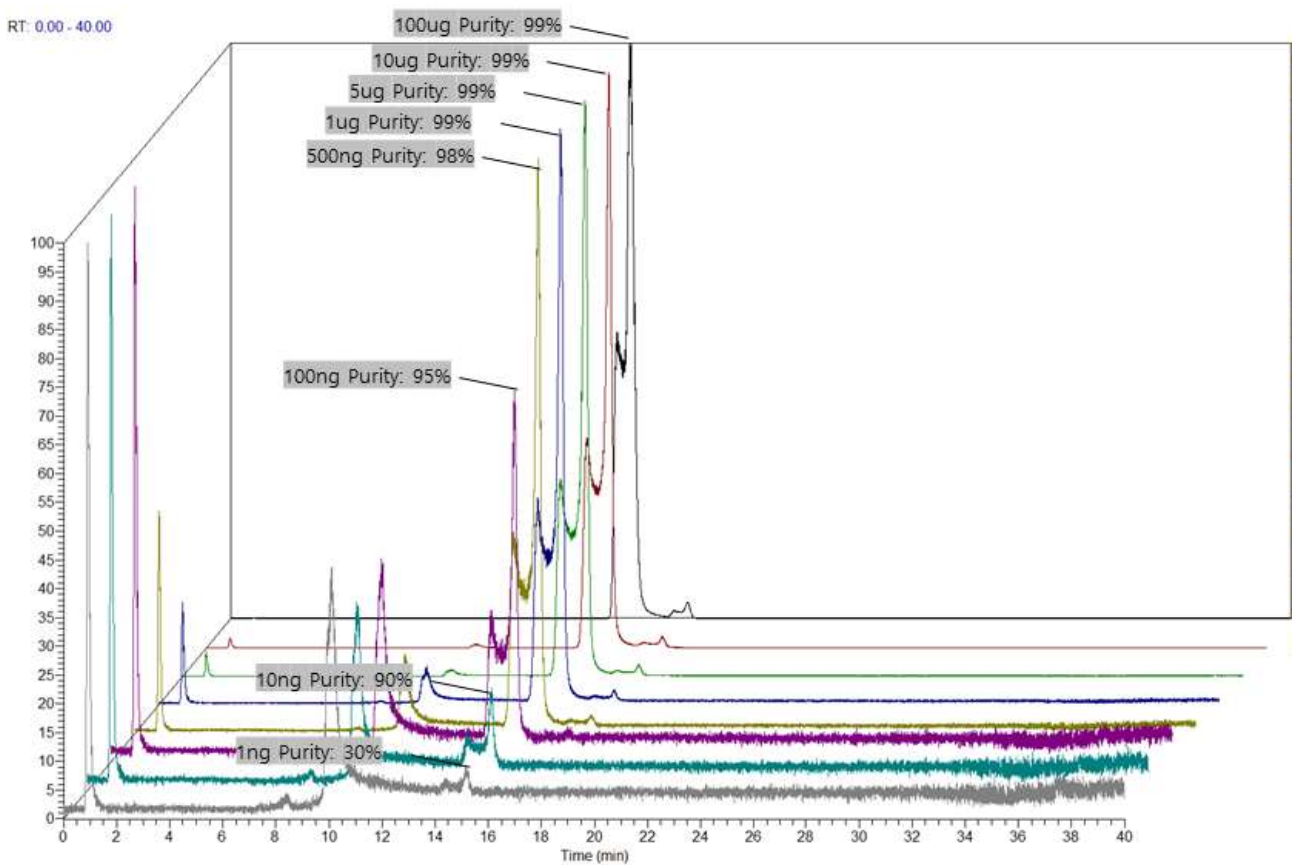
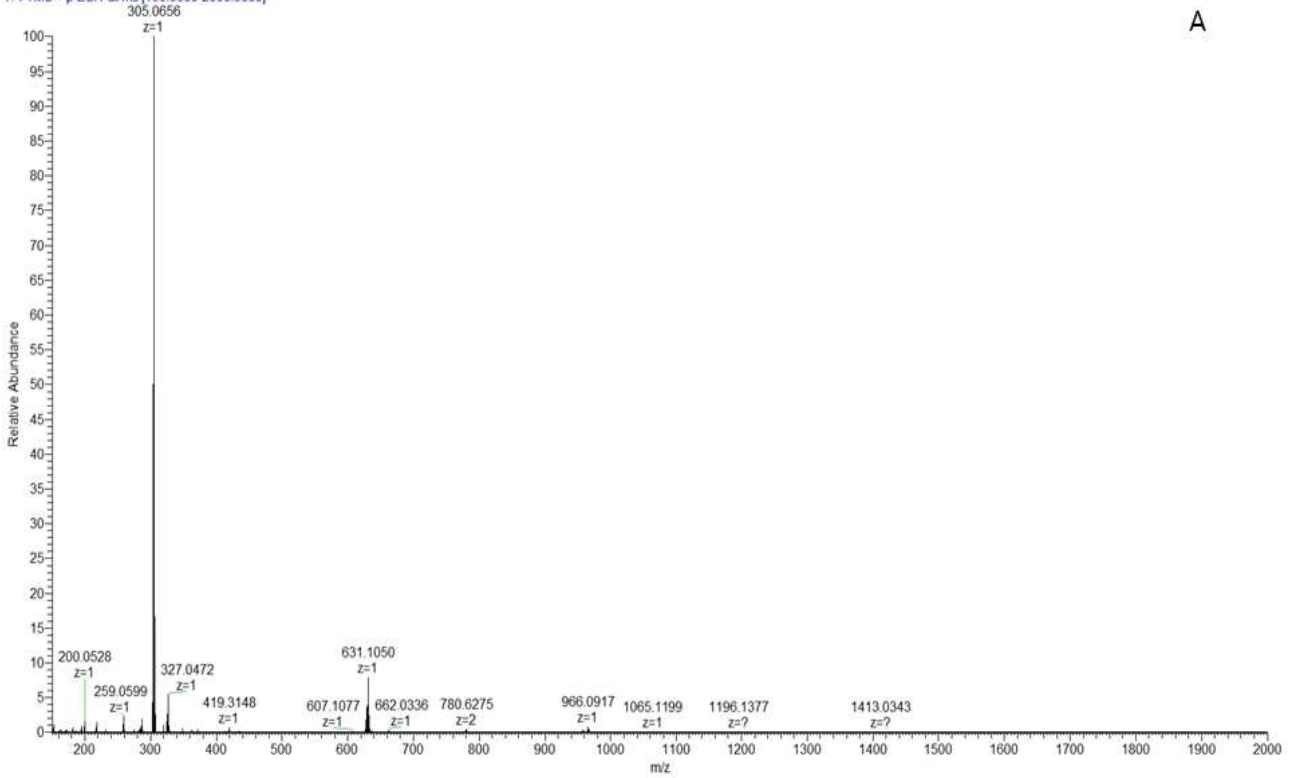


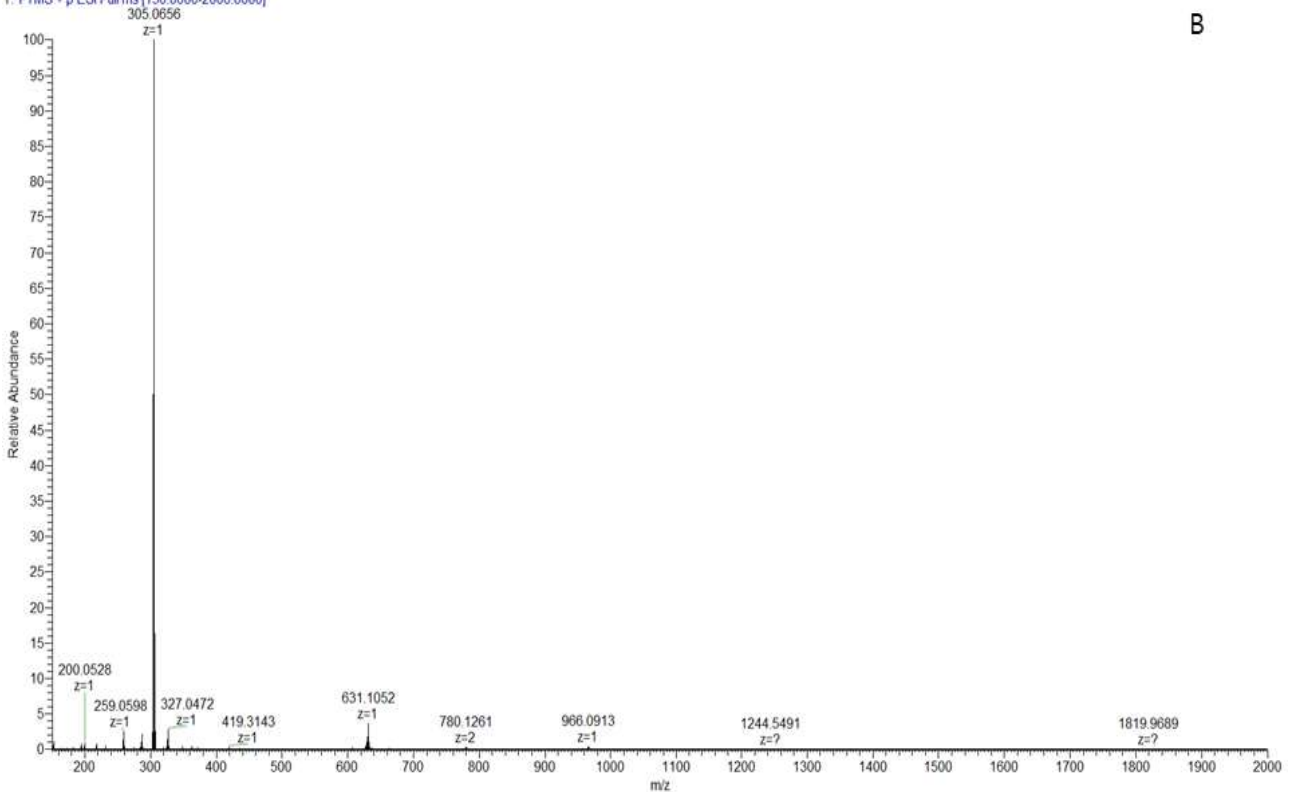
그림 10. LC-MS/MS로 나타낸 Taxifolin 표준품의 분석 Total ion current (TIC) chromatogram

taxifolin_100ug #4146 RT: 14.55 AV: 1 NL: 3.14E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.0000-2000.0000]



A

taxifolin_100ug #4378 RT: 15.01 AV: 1 NL: 5.95E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.0000-2000.0000]



B

그림 11. MS Spectrum으로 나타낸 Taxifolin 표준품의 Mass값 (A: 14.56, B: 15.05 min)

- Taxifolin의 직선성 농도범위는 10 ~ 5,000 ng/ml로 taxifolin 표준품의 정량범위는 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며. 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 R^2 을 구하여 품질관리에 적합한 직선성을 나타내는지 확인 하였음 (그림 10 및 그림 11)

- 정확한 Taxifolin의 물질 규명을 MS-Spectrum으로 확인한 결과 14.56, 15.05분의 peak는 동일 물질로 확인됨 (그림 3). Taxifolin 표준품의 정량범위와 직선성을 나타내는 농도를 확인하기 위해 실험한 결과. 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 ug/ml의 농도에서 면적비를 이용한 검량선을 나타내었을 때 $R^2 = 0.9986$ 으로 높은 직선성을 나타내었고, 이때 검출 최소한계는 10 ng/ml이었으며 검출최대한계는 5 ug/mL으로 그 이상과 이하에서 검출은 되나 검량선에 높은 직선성을 나타낼 수가 없음. 향후 추출물 제조 및 공정시 품질관리를 위한 함량분석에 있어서 편리성을 최대화 할 수 있을 것으로 판단됨.

(2) Triple-Quadrupole LC-MS/MS 를 활용한 정량성이 확보된 기시법 개발

- Triple-Quadrupole LC-MS/MS 에서 검출이 용이한 방법을 개발하여 아래와 같이 Taxifolin 분석법 확립 하였음 (표 5)

표 5. Triple-Quadrupole LC-MS/MS를 이용한 지표성분의 분석조건

LC	Triple-Quadrupole LC-MS/MS (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)		
Mobile phase	A: Distilled water (0.1% Formic acid) B: Me-OH (0.1% Formic acid)		
Column	Poroshell 1200 EC-C18 (1.9 μ m / 2.1 x 150 mm) Thermo Fisher Scientific		
Auto sample Tem.	10 $^{\circ}$ C		
Flow (ml/min)	0.200 ml/min		
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C		
Full MS	Resolution	70,000	
	AGC targer	3e6	
	Maximum IT	200 ms	
	Scan range	150 to 2,000 m/z	
HESI source	Sheath gas flow	30	
	Aux gas flow	18	
	Sweep gas flow	2	
	Spray voltage (kV)	3.52	
	Spray current (μ A)	100	
	Capillary temp ($^{\circ}$ C)	250	
	S-lens RF level	-	
	Aux gas heater temp ($^{\circ}$ C)	350	
Mobile condition	min	A solution (%)	B solution (%)
	0	98	2
	5	85	15
	35	40	60
	36	5	95
	40	5	95
	45	98	2

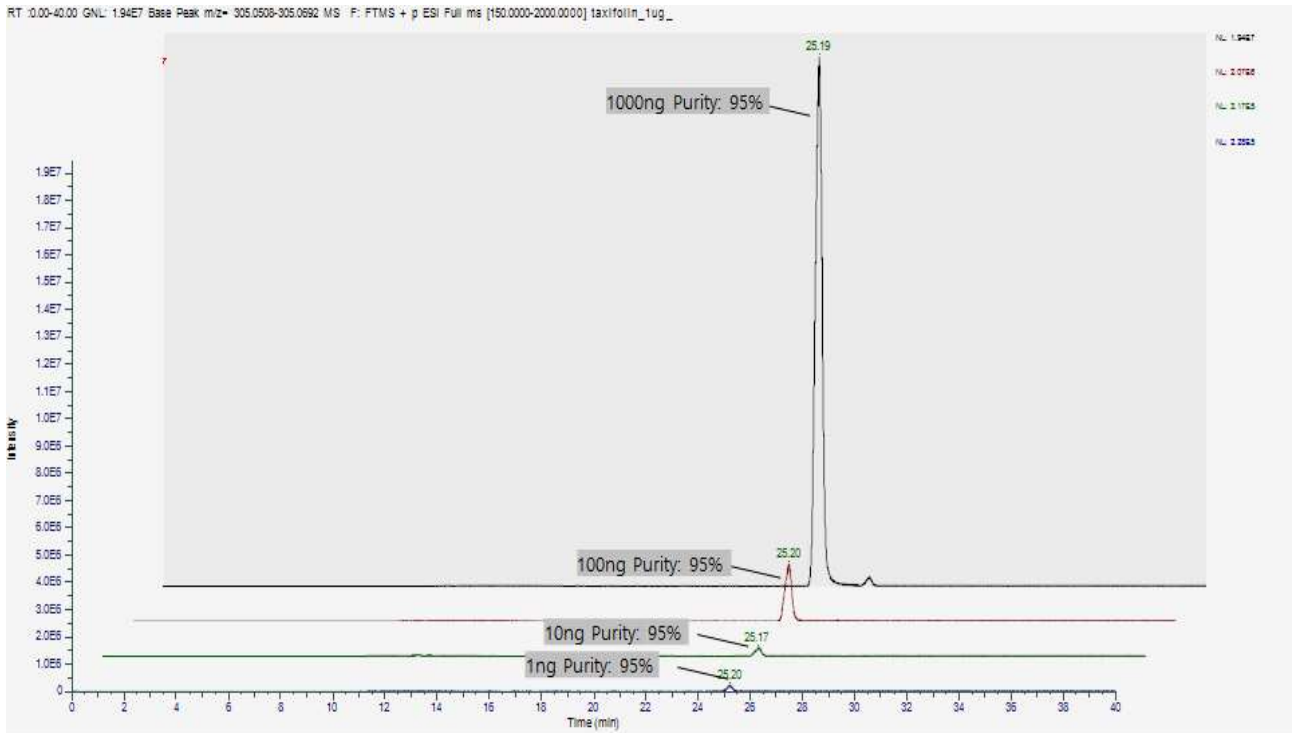


그림 12. LC-MS/MS로 나타낸 Taxifolin 1 ~ 1,000 ng 표준품의 분석
Base Peak Chromatogram

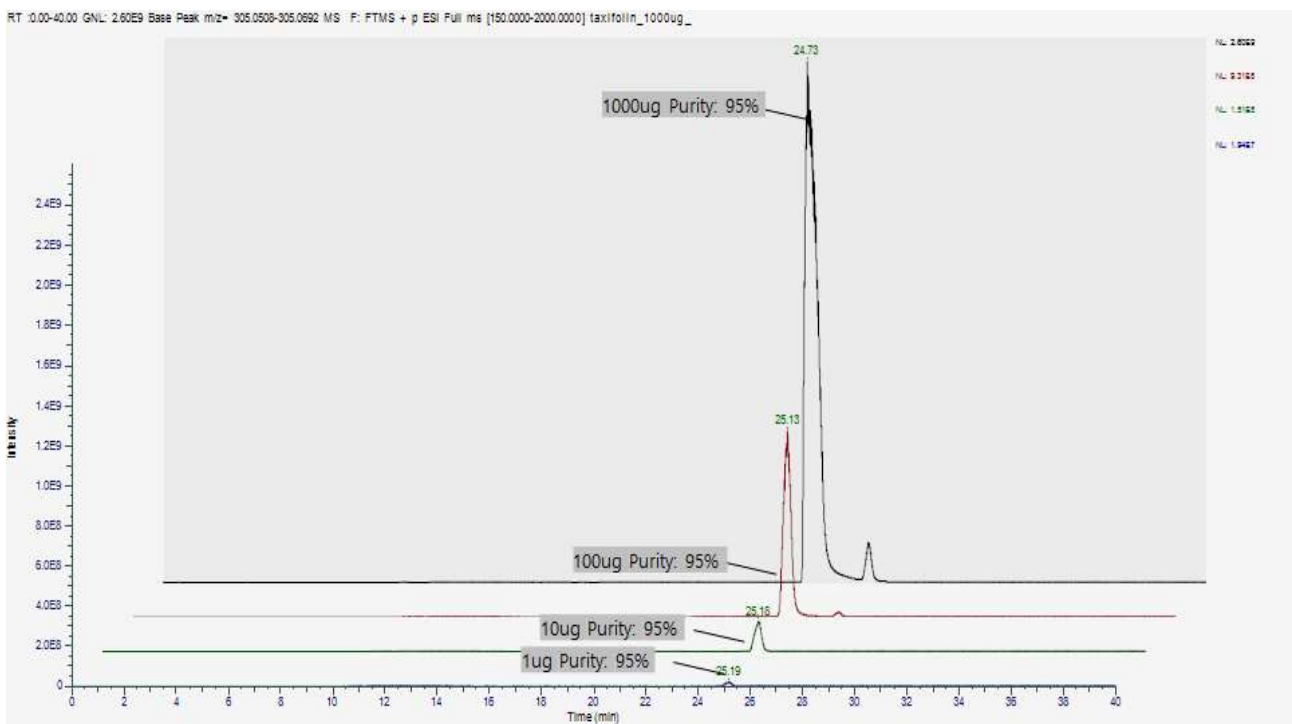


그림 13. LC-MS/MS로 나타낸 Taxifolin 1 ~ 1,000 ug 표준품의 분석
Base Peak Chromatogram

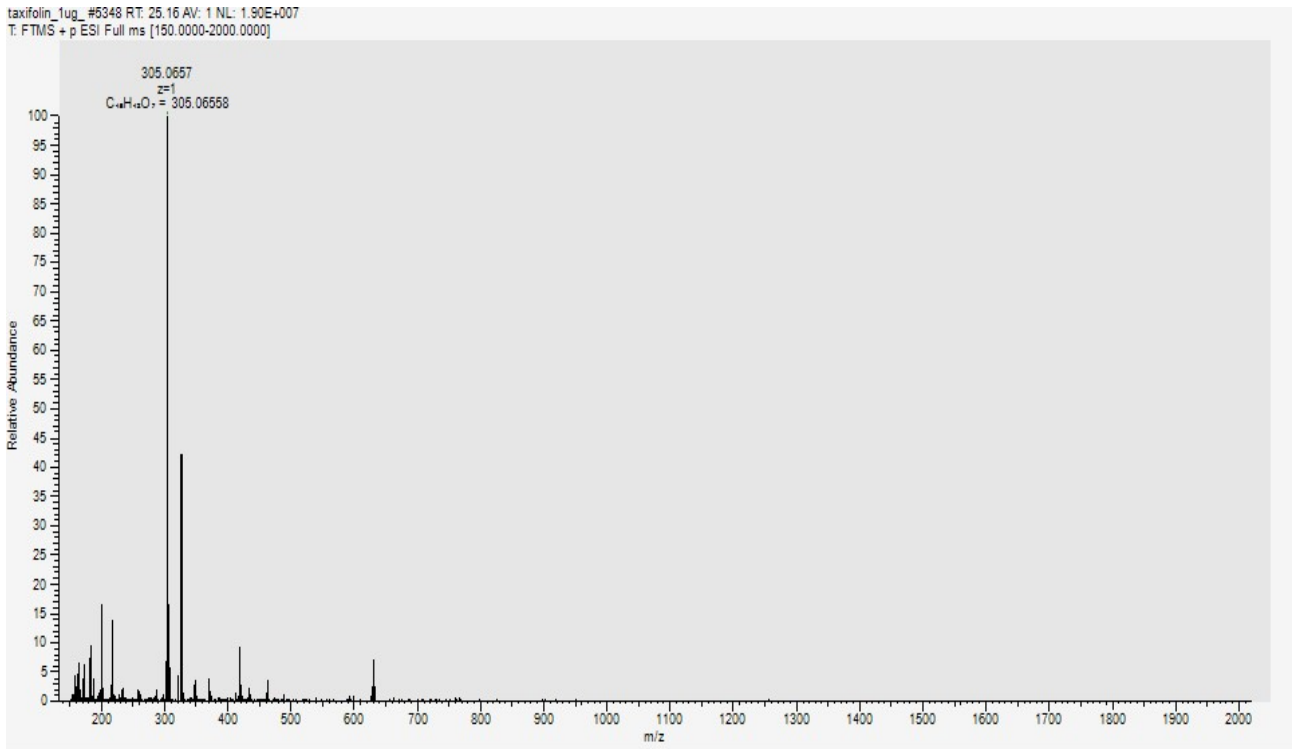


그림 14. MS Spectrum으로 나타낸 Taxifolin 표준품의 Mass값

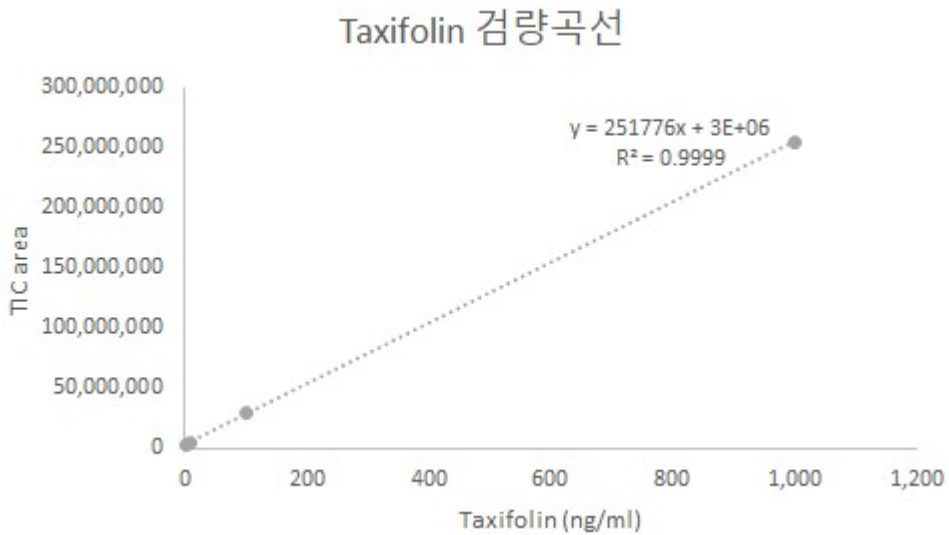


그림 15. Taxifolin 표준품의 검량곡선 (Taxifolin 1 ~ 1,000 ng/mL)

- Taxifolin의 직선성 농도범위는 1 ~ 1,000 ng/ml로 Taxifolin 표준품의 정량범위는 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며, 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 R^2 을

구하여 품질관리에 적합한 직선성을 나타내는지 확인 하였음 (그림 13 및 그림 14)

- 24. 50분대의 물질 규명을 MS-Spectrum으로 확인한 결과 305.05 으로 Taxifolin MS-Spectrum과 동일함으로 Taxifolin 물질로 확인됨 (그림 15). Taxifolin 표준품의 정량범위와 직선성을 나타내는 농도를 확인하기 위해 실험한 결과. 1, 10, 100, 1,000 ng/ml의 농도에서 면적비를 이용한 검량선을 나타내었을 때 $R^2 = 0.9999$ 으로 높은 직선성을 나타내었고, 이때 **검출 최소한계는 1 ng/ml**이었으며 검출최대한계는 10 ug/mL으로 그 이상과 이하에서는 검출은 되나 검량선에 높은 직선성을 나타낼 수가 없음. 향후 추출물 제조 및 공정 시 품질관리를 위한 함량분석에 있어서 편리성을 최대화 할 수 있을 것으로 판단됨.

나. LC-UV를 이용한 기준 시험법의 개발

(1) Taxifolin 분석법의 제정

- 슈퍼홍미 추출물에서 분리된 Taxifolin {(2R),(3R)-Dihydroquercetin}의 분석 조건은 차후 기능성 소재로의 생산 및 품질관리를 위하여 아직까지 보급률이 높지 않은 LC-MS/MS보다 일반적인 HPLC를 통한 분석법 제정을 수행하였으며, 범용적으로 사용되는 C18 컬럼을 UV에 따른 분석조건 확립 실험을 표 6 및 표 6의 방법으로 진행 하였음

표.6 C18 Column을 이용한 HPLC-ELSD 분석 조건

Mobile Phase	A : D.W B : Me-OH
Column	TOSOH TSK-GEL C ₁₈ column
Detector	ELSD 2000 / Alltech
Flow	1 ml/min
Column Temp.	30
Detector con.	gas (N ₂ 1.7 L/min), Tem.70°C

표.7. C18 Column을 이용한 HPLC-DAD 분석 조건

Mobile Phase	A : D.W B : 60% Me-OH(pH 2.4)
Column	TOSOH TSK-GEL C ₁₈ column
Detector	Agilent DAD 1260
Flow	1 ml/min
Column Temp.	30

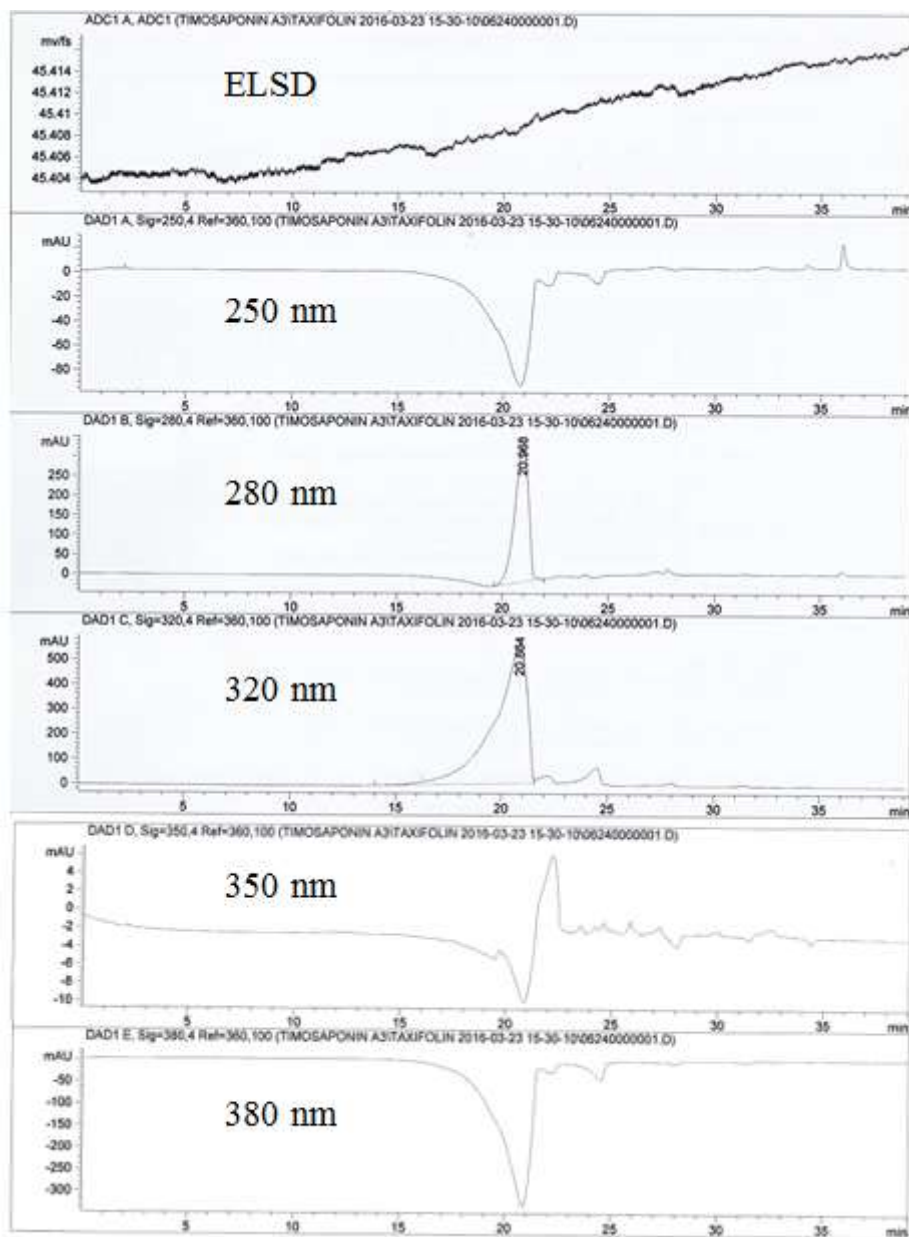


그림.16. C18 column을 이용한 HPLC 분석 (ELSD, UV)결과

- 슈퍼홍미 추출물의 지표성분인 Taxifolin을 HPLC를 이용한 정량 분석방법을 확립하기 위해 표.6 과 같은 방법으로 분석하였다. Detector로 ELSD와 UV를 사용하여 분석한 결과, ELSD에서는 피크가 검출되지 않았지만 UV(250 ~ 380)nm 에서는 20min에서 피크가 검출이 되었다. 이러한 결과를 보아 Taxifolin은 C18 column에서 물질이 분리가 되는 것으로 사료됨.

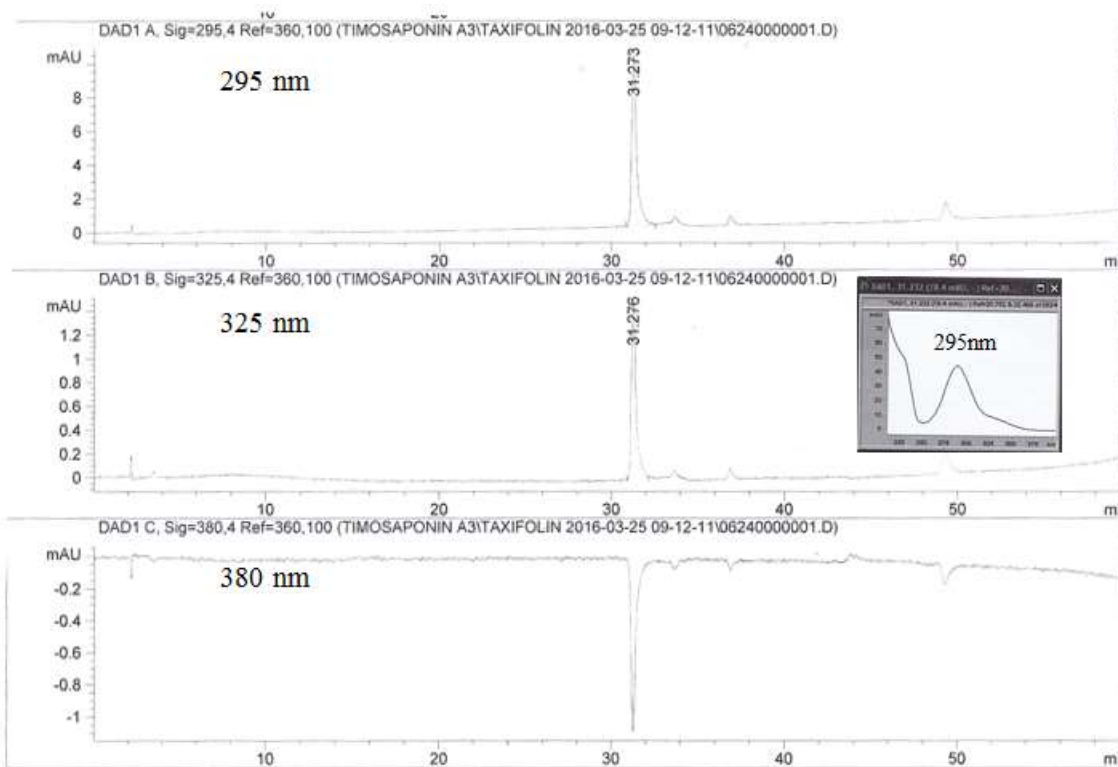


그림.17. C18 column을 이용한 HPLC-DAD 분석 결과

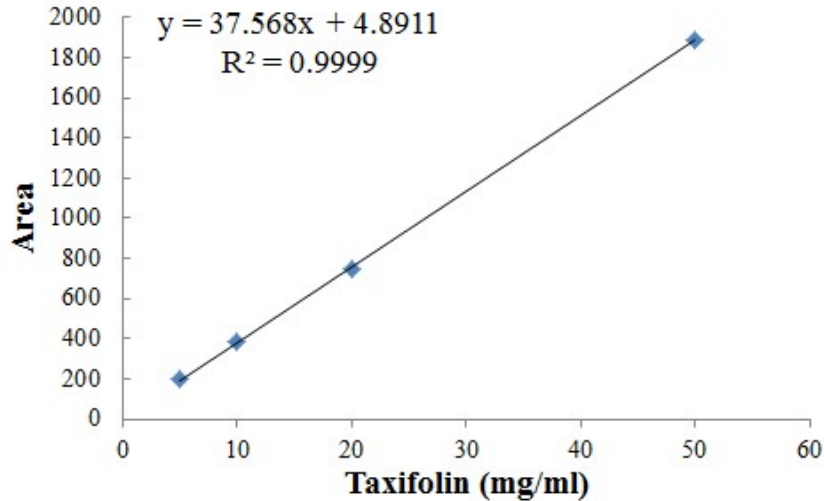


그림.18. Taxifolin의 정량곡선

- 홍미 추출물의 지표성분인 Taxifolin을 HPLC를 이용한 정량 분석 방법 확립하기 위해 기존에 분석 방법에서 보완된 표.5와 같은 방법으로 분석하였다. Detector로는 UV만 사용 하여 분석하였다. 보완된 분석 방법으로 사용시 효과적으로 분리가 되는 것을 확인 할 수 있었음
- 그리고 표.5, 그림.11 같은 조건으로 정량성이 있는지 확인하기 위하여 홍미 추출물의 지표성분인 Taxifolin의 직선성 농도범위를 5 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 하여 정량곡선을 측정하였다. 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 R2를 구하여 양호한 직선성을 확인한 결과 5 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ 구간에서 R2 = 0.9999로 매우 유의적인 상관성을 나타내었다.
- 주정 추출물을 통해서 생리활성 물질인 Taxifolin의 함량을 HPLC를 통해 측정한 결과 55.90 $\mu\text{g}/10 \text{ mg}$ (함량/추출물 무게)으로 확인 되었음(그림 19)

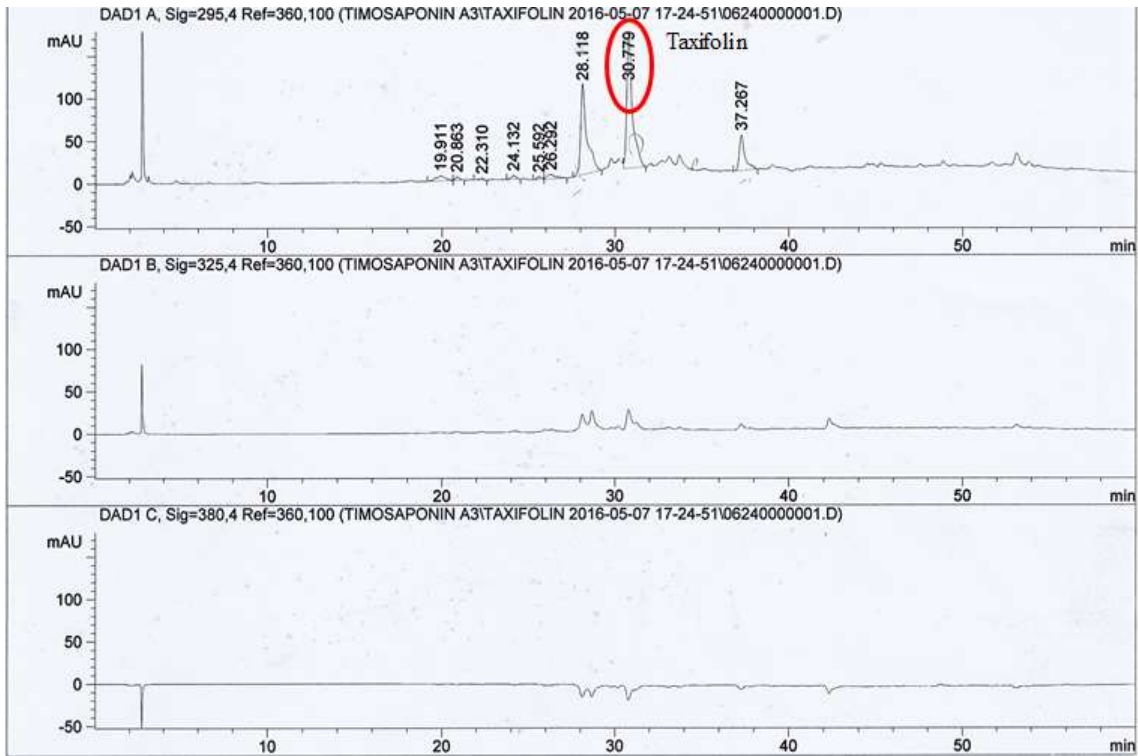


그림 19. 홍미 추출물의 Taxifolin 함량 분석 (10 mg/ml)

(2) HPLC를 활용한 범용성이 확보된 기준시험법의 확정

- 개별인정형 신청시 지표물질 분석의 수월성 및 범용성이 필수임. 따라서 슈퍼홍미 지표성분인 Taxifolin 기시험법의 범용성 확보를 위해 LC-MS/MS분석법을 보다 단순화 하기 위해 고가의 일반적인 DAD에서 검출이 용이한 방법을 개발하여 아래와 같이 Taxifolin 분석법 확립 하였음 (표 8)

표 8. 지표성분의 분석조건

항목	조건
Mobile Phase	A : Distilled water B : 60% Me-OH (pH 2.4)
Column	ODS - 80TM (TOSOH 4.5*150)
Detector	Agilent 1260 DAD
Flow	1.0 ml/min
Detector	295nm
Column Temp.	30℃

- 본 분석법에 의한 Taxifolin의 직선성 농도범위는 5 ~ 1000 ug/ml로 Taxifolin 표준품의 정량범의는 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며. 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 R^2 을 구하여 품질관리에 적합한 직선성을 나타내는지 확인 하였음 (그림 1 및 그림 2)

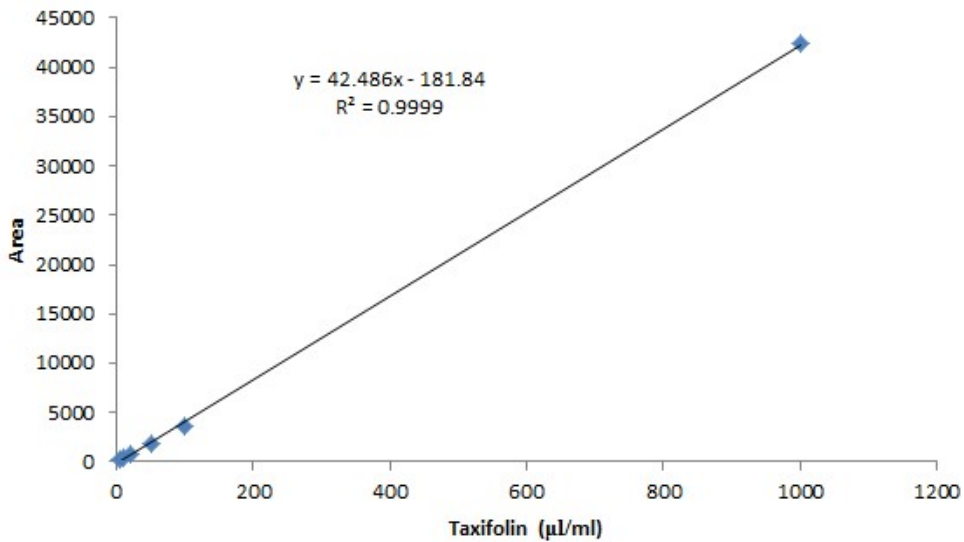


그림.20. Taxifolin 표준품의 검량곡선 (Taxifolin 5 ~ 1,000 ug/mL)

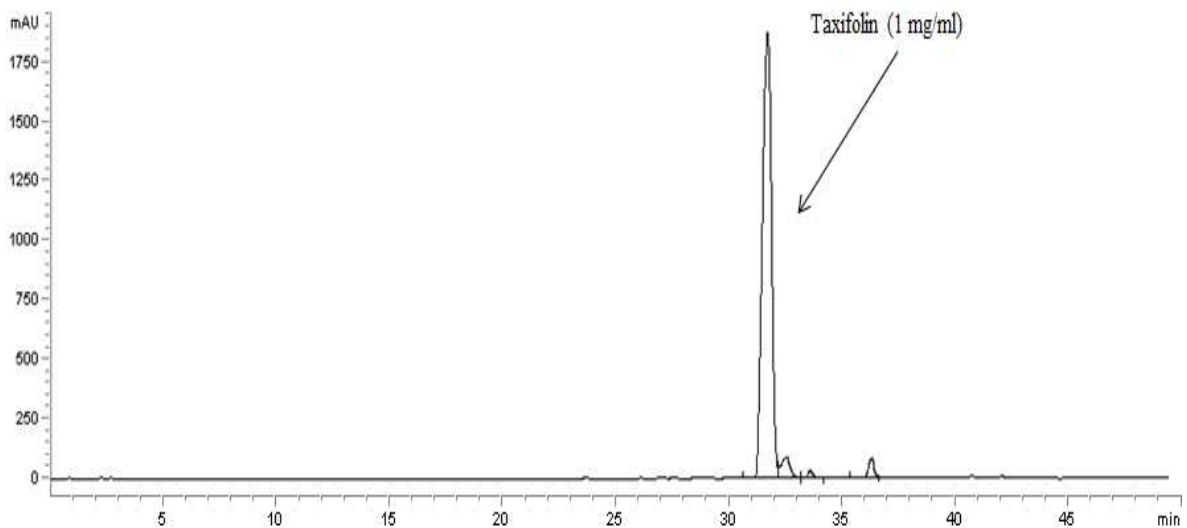


그림.21. HPLC로 나타낸 Taxifolin 표준품의 분석 peak (Taxifolin 1 mg/ml)

- Taxifolin 표준품의 정량범위와 직선성을 나타내는 농도를 확인하기 위해 실험한 결과. 5, 10, 20, 50, 100, 1000 ug/ml의 농도에서 면적비를 이용한 검량선을 나타내었

을 때 $R^2 = 0.9999$ 으로 높은 직선성을 나타내었고, 이때 검출 최소한계는 5 ug/ml이었으며 검출최대한계는 1,000 ug/mL로 LC-MS/MS를 이용한 정량분석법에 비하여 최소 검출한계는 1,000배 이상 높은 농도를 나타내었으나 실질적으로 상업적으로 이용시 LC-MS/MS를 이용한 품질관리가 널리 보급될 수 없다는 점을 감안할 때 향후 추출물 제조 및 공정 시 품질관리를 위한 함량분석에 있어서 편리성을 확보할 수 있을 것으로 판단되며, 실제 슈퍼홍미추출물의 제조시 나타나는 taxifolin 함량을 감안할 때 품질관리용 시험방법으로 충분한 효율을 가질 수 있을 것으로 판단됨

3. 슈퍼홍미의 고순도 지표물질의 확보 및 물질 동정

가. 고순도 지표물질의 확보

- 공정 및 소재 표준화를 비롯하여 인체적용시험용 시료의 제작 및 최적 재배 조건 등의 연구를 수행하기 위하여 지표성분으로 선정 된 taxifolin의 고순도 표준품이 필요함에 따라 슈퍼홍미 50g을 그림.4.과 같은 방법으로 실험을 진행 한 후 지표물질인 Taxifolin (purity $\geq 95\%$)을 90 mg 분리정제 완료함.

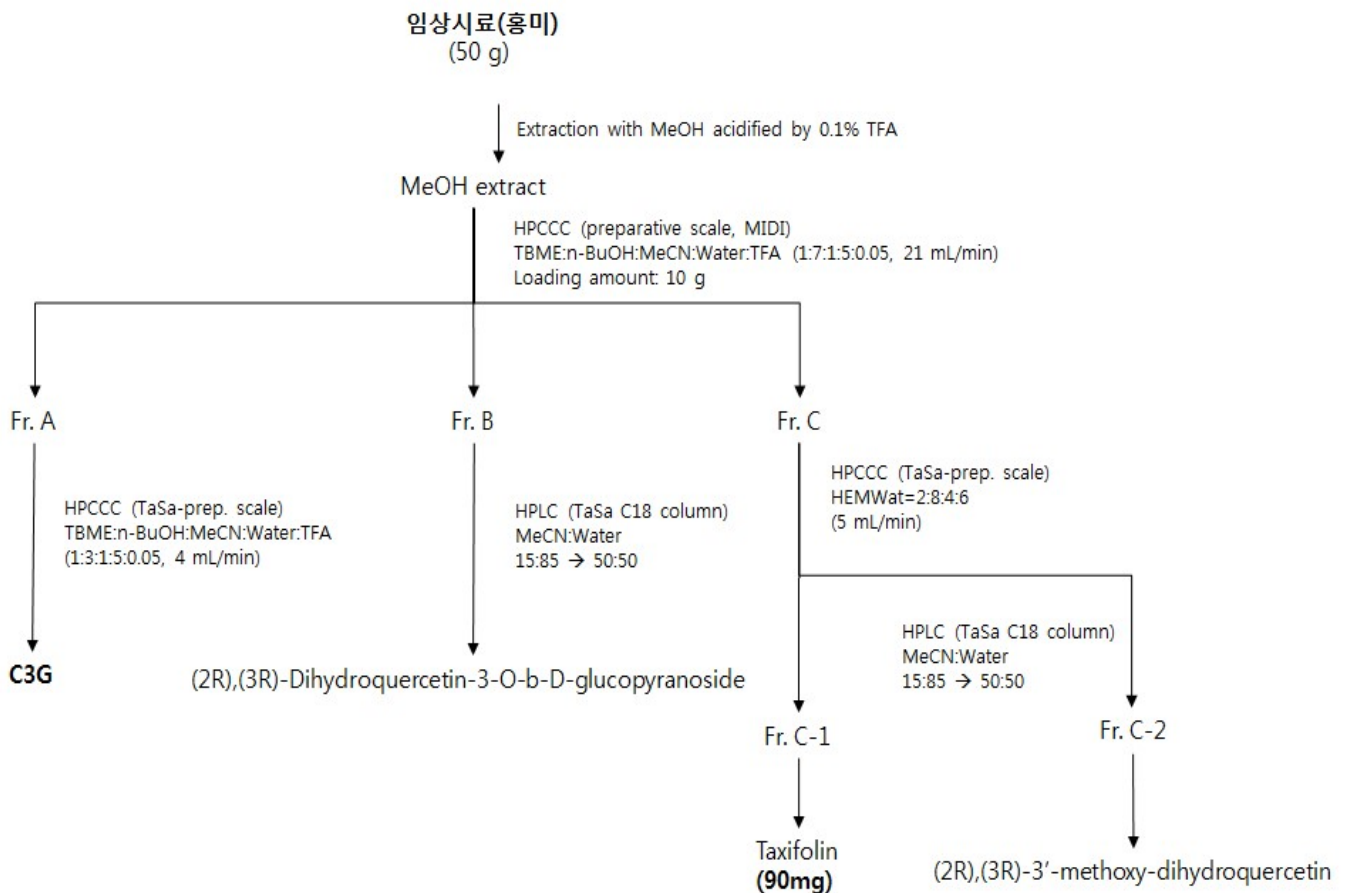


그림.22 .슈퍼홍미 추출물내에 지표물질 분리정제 과정

- 확보된 고순도 지표물질인 Taxifolin (purity $\geq 95\%$) 90 mg 은 향후 협동기관 및 주 관기관에 표준품으로 제공하여, 함량 분석 및 안정성 시험에 사용토록 공여하였음

나. 활성 물질의 분리 동정

- 또한, 정제과정에서 총 5종의 추가 활성물질들을 확보 할 수 있었으며, 이들을 분리정 제하여 순도 90%이상의 표준품을 확보하고, NMR 연구와 LC-MS/MS를 활용한 구조 동정을 수행 하였음 (그림 4)

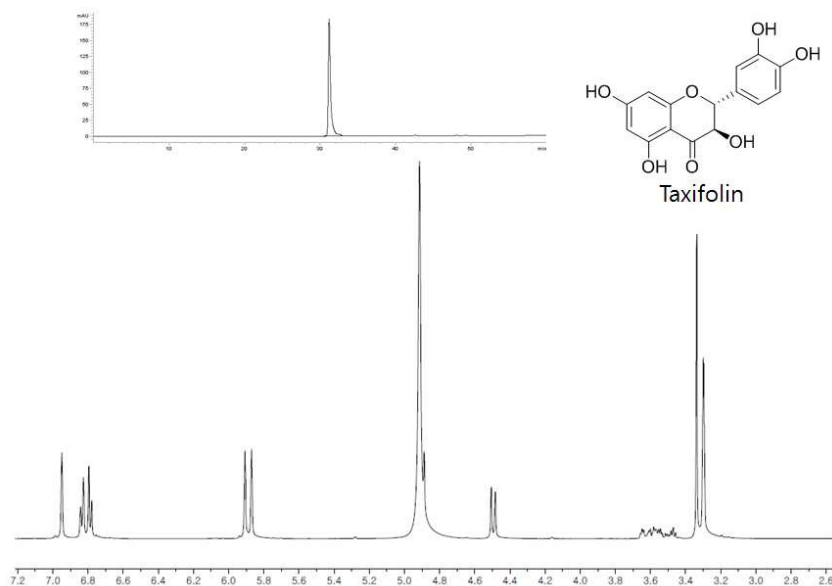


그림.23. 정제된 Taxifolin의 purity 및 구조분석

- 그 결과 Cyanidin 3-glucoside (1), Taxifolin mono-glycoside (2), Methyltaxifolin mono-glycoside (3), Taxifolin (4), Methyltaxifolin (5) 종의 활성물질을 확인 할 수 있었음
- LC-MS/MS를 이용한 TIC (Total ion chromatogram)과 UV spectrum, 분자량 분석 결과는 그림 5와 같았음.
- 또한 HPLC (High Pressure count current chromatography)를 활용하여, 각각의

spectrum별 Prep-LC를 수행한 결과는 그림 6과 같이, 각각의 활성물질들을 fractionation 하였으며, 반복 작업을 통해 각각의 활성물질의 양을 확보 할 수 있었으며, 확보된 1부터 5 까지의 활성물질들을 NMR (C, H-NMR, 2D-NMR) 작업을 통해 구조를 동정 하였음.

그림 24. HPLC/PDA/QTOF-MS analysis of SBE. A: UV, negative and positive ion mode total ion chromatogram (TIC) of SBE, B: UV spectrum of peaks 1-5, C: MS spectra (negative ion mode) of peaks 1-5, D: MS spectra (positive ion mode) of peaks 1-5, and E: Predicted molecular formula and theoretical mass values of 1-5.

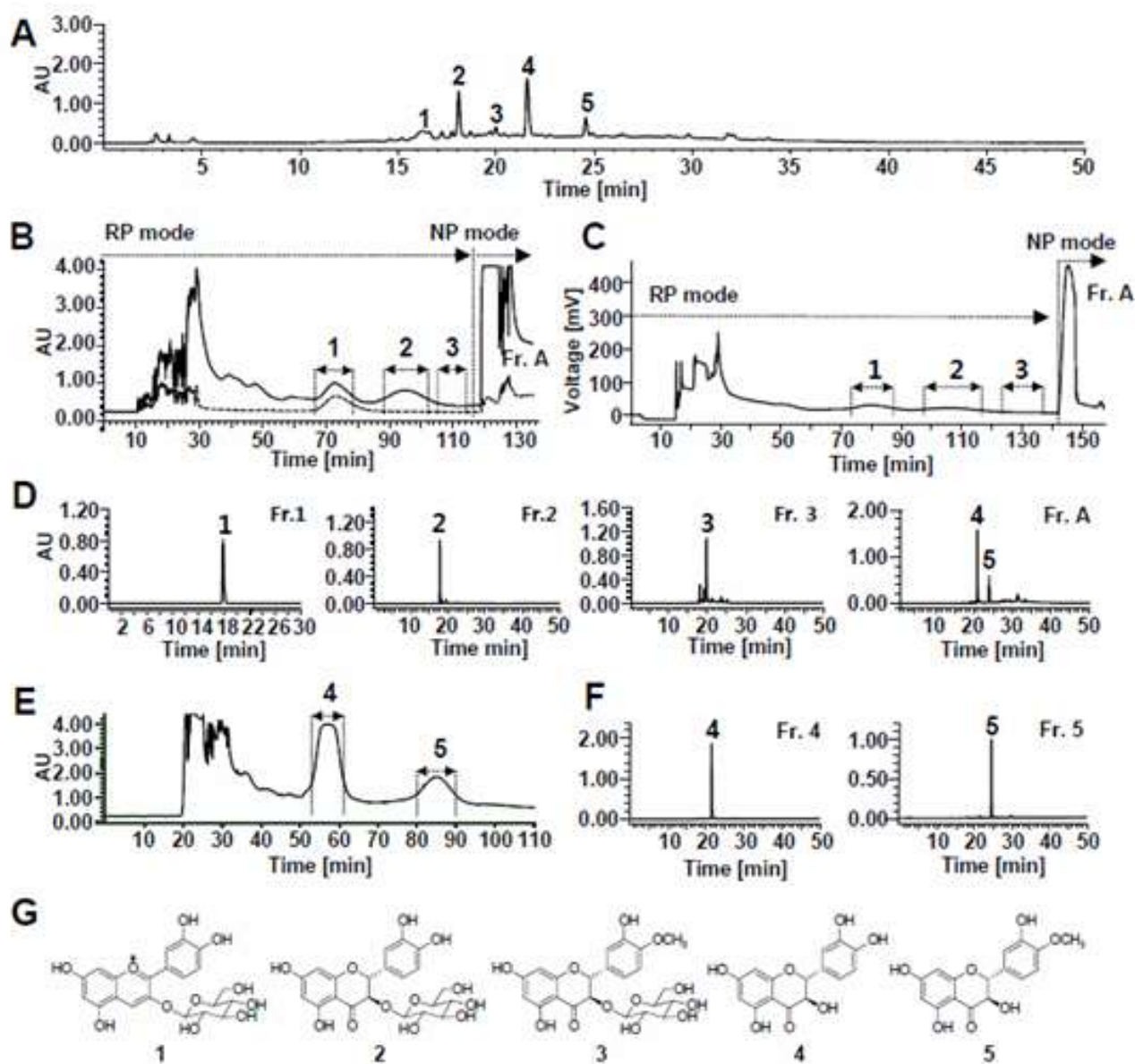


그림 25 A: HPLC/PDA chromatogram of SBE. B: dual mode semi-preparative scale HPCCC (Spectrum) for SBE at flow rate 3.0 mL/min; solid line: UV 280 nm, and dotted line: UV 520 nm. C: dual mode preparative scale HPCCC (Midi) for SBE at flow rate 21.0 mL/min; detection wavelength at 280 nm. D: HPLC chromatograms for HPCCC peak fractions 1-3 and fraction A (Fr. A); detection wavelength at 280 nm. E: semi-preparative scale HPCCC (Spectrum) for Fr. A at flow rate 3.0 mL/min. F: HPLC chromatograms for HPCCC peak fractions 4-5; detection wavelength at 280 nm. G: Chemical structures of 1-5 from superhongmi extract. compound 1: cyanidin 3-glucoside, 2: (2R,3R)-taxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside, 3: (2R,3R)-4'-O-methyltaxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside, 4: (2R,3R)-taxifolin, and 5: (2R,3R)-4'-O-methyltaxifolin.

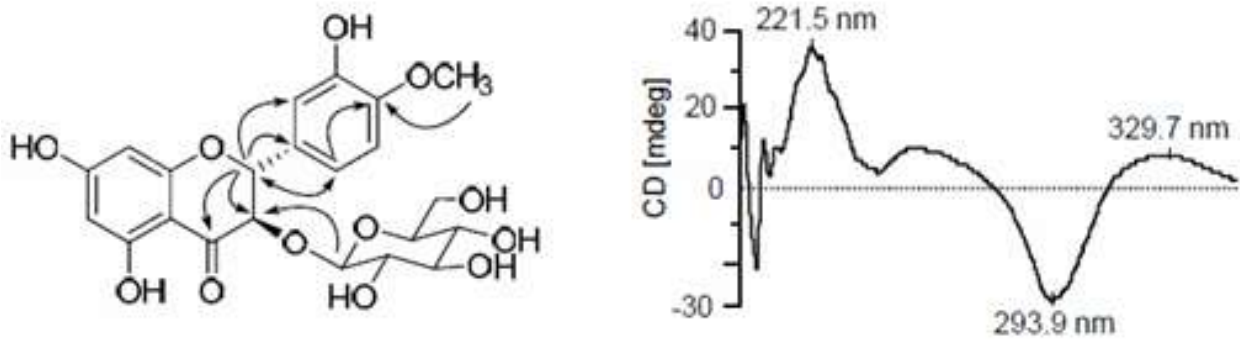


그림 26 . Key HMBC correlation and CD spectrum of Methyltaxifolin mono-glycoside

4. LC-UV를 이용한 Taxifolin 기준시험법의 유효성(Validation) 검증

○ 슈퍼홍미는 상기의 연구결과를 통해서 taxifolin을 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이에 대해서 설정된 분석 방법중 품질관리에 용이하게 설정된 LC-UV를 이용한 방법을 최종 기준시험법으로 선택하여 유효성 검증을 실시하였음

- 시료의 전처리

- : 시료 0.2 g을 추출용매 각 30 mL로 추출
- : 추출액 30 mL을 Wantman No. 2 여과지로 감압여과 실시
- : 여과액을 0.4um filter를 이용하여 여과

- LC 분석 조건

- : Column : CapcellPak C18 UG120 (4.6mm X 250mm)
- : Detector : DAD (295 nm)
- : Injection volume 20 uL
- : 이동상 D.W. (A) , 60% MeOH (pH 2.4) (B)

○ 당 분석 방법의 validation을 위하여 다음과 같은 항목을 수행하였음

- 분석방법의 적합성
- 특이성
- 직선성
- 정확성
- 정밀성
- LOD, LOQ 및 MDL

가. 분석방법의 적합성 확인

- 분석법의 적합성을 확인하기 위하여 3.0 mg/kg의 농도로 표준품을 제조한 후 3회에 걸쳐 각 시료를 3 반복으로 측정을 한 결과는 표 2와 같으며, 기준은 평균대비 표준편차의 비율이 3.0% 이하로 판단하였을 때 각각의 반복 분석 시 CV는 각 0.31%, 0.83%, 1.28%로 기준에 적합함을 확인하였음

표 9. Taxifolin 분석법의 시스템 적합성

No.	시료농도 (mg/g)	측정값 (mg/kg)	CV(%)
1	3.04	2.99	0.31%
		3.02	
		3.00	
2	3.07	3.03	0.83%
		3.09	
		3.01	
3	3.10	3.00	1.28%
		3.10	
		2.98	

나. 분석방법의 특이성

- 분석 방법의 특이성을 확인하기 위하여 Taxifolin 표품과 Taxifolin이 검출되지 않는 백미 분말 및 건강기능식품의 부형제로 다수 사용되는 텍스트린, 자일리톨과 시료 농도 2.0 mg/g의 농도를 가지는 슈퍼홍미 추출물 분말을 1:1로 혼합한 후 taxifolin를 회수하여 분석한 결과는 표 3과 같이 나타났으며, 회수율이 기준치인 80%~120%에 적합하여 분석의 특이성이 있는 것으로 판단되었음

표 10. Taxifolin 분석법의 특이성

배경시료	시료농도 (mg/g)	측정값 (mg/kg)	회수율(%)
백미분말	1.00	0.94	94.0
		0.93	93.0
		1.01	101.0
텍스트린	1.00	0.95	95.0
		0.92	92.0
		0.99	99.0
자일리톨	1.00	1.04	104.0
		0.97	97.0
		0.95	95.0

다. 분석방법의 직선성

- 분석 방법의 직선성을 확인하기 위하여 표준 시료의 농도를 0.5mg/g에서 50.0 mg/g의 농도까지 5개 농도에 대해서 정량을 수행한 후 표준곡선상에서 직선성을 설정한 결과는 표 4와 같이 나타났음

표 11. Taxifolin 분석법의 직선성

No	시료의 농도						표준곡선의 지표		
	0.5	2.0	5.0	10.0	25.0	50.0	slope	intercept	r
1	0.4	1.8	5.2	10.7	24.6	50.5	1.032	-0.778	0.9984
2	0.5	1.9	5.4	10.2	25.5	51.1	1.019	-0.584	0.9994
3	0.5	1.8	4.8	9.5	25.2	48.9	0.981	1.008	0.9996

- 0.5 mg/g, 2.0 mg/g, 5.0 mg/g, 10.0 mg/g, 25.0 mg/g, 50.0 mg/g의 농도에 대한 표준곡선을 3회 반복 측정하였고, 각 반복마다의 기울기는 1.032, 1.019 및 0.981로 나타났으며, Y절편은 -0.779, -0.584 및 1.008로 확인되었음
- 또한, 각 반복 분석에 대한 상관관계는 1회 반복시 0.9984, 2회시 0.9994, 3회시 0.9996으로 나타나 직선성이 매우 우수한 것으로 판정되었으며, 차후 시료의 분석에

사용될 충분한 수준을 보유한 것으로 보임

라. 분석방법의 정밀성

- 정밀성 확인을 위하여 1.0 g/kg, 5.0 g/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg의 농도로 시료를 제작한 후 각 농도를 일내(intra-day) 분석을 실시한 결과는 표 5와 같이 분석되었음

표 12. Taxifolin 분석법의 정밀성 : 일내 분석(intra-day)

	시료농도 (mg/kg)	측정값 (mg/kg)			평균 (mg/kg)	S.D. (mg/kg)	RSD(%)
		1	2	3			
Intra-day	1.00	0.98	1.03	1.03	1.01	0.03	2.85
	5.00	5.21	5.05	5.20	5.15	0.09	1.74
	20.00	19.57	20.05	19.88	19.83	0.24	1.23
	50.00	50.04	49.27	48.50	49.27	0.77	1.56

- 일내분석에서 1.0 mg/kg, 5.0 mg/kg, 20.0 mg/kg 및 50.0 mg/kg의 농도에서 3회 반복 분석 결과에서 각 농도별 RSD% (CV)는 2.85%, 1.74%, 1.23% 및 1.56%를 나타내었으며, 1.0 mg/kg의 농도에서 2.0% 이상의 상대적으로 높은 RSD%가 검출되어 실제 정량 수치에서는 1.0 mg/kg을 삭제하는 것이 바람직하다고 보여짐

- 정밀성의 추가 확인을 위하여 일간(Inter-day) 분석을 실시하였음.

표 13. Taxifolin 분석법의 정밀성 : 일내 분석(iner-day)

	시료농도 (mg/kg)	측정값 (mg/kg)			평균 (mg/kg)	S.D. (mg/kg)	RSD(%)
		1	2	3			
Inter-day	1.00	0.95	0.92	0.99	0.95	0.04	3.68
	5.00	4.95	4.83	4.88	4.89	0.06	1.23
	20.00	19.49	19.57	20.01	19.69	0.28	1.42
	50.00	50.20	48.93	49.55	49.56	0.64	1.28

- 정밀성 확인을 위한 일간 분석 결과에서도 1.0 mg/kg의 농도에서는 RSD(%)가 5%내

로 나타 이를 통해 차후 LOQ 또는 MDL을 1.0 mg/kg 이상으로 설정을 추진하고자 함

마. 분석방법의 정확성

표 14. Taxifolin 분석법의 정확성 분석

	시료농도 (mg/g)	측정값 (mg/kg)			평균 (mg/g)	S.D. (mg/g)	Mean Accuracy(%)
		1	2	3			
Intra-day	5.00	5.10	4.95	4.95	5.00	0.09	100.0
	10.00	9.85	9.78	9.93	9.85	0.08	98.5
	25.00	24.62	24.85	23.90	24.46	0.50	97.8
	50.00	48.81	49.06	50.07	49.3	0.67	98.6
Inter-day	5.00	4.99	5.07	5.04	5.03	0.04	100.7
	10.00	9.92	9.88	10.04	9.95	0.08	99.5
	25.00	25.75	26.03	25.77	25.85	0.16	103.4
	50.00	48.97	50.08	51.22	50.09	1.13	100.2

○ 분석 방법의 정확성을 확인하기 위하여 정밀성과 동일하게 일내분석(intra-day)와 일간분석(inter-day)로 구분하여 정확성을 확인하였음

○ 정확성 분석에서 일내분석(inter-day)의 경우 5.0 mg/g에서 100.0%, 10.0 mg/g에서 98.5%, 25 mg/kg에서 97.8%, 50.0 mg/kg에서 98.6%를 보여 일내분석에서 높은 정확성을 보인 것으로 판단되며, 일간분석(intra-day)의 경우에도 5.0 mg/g에서 100.7%, 10.0 mg/kg에서 99.5 mg/kg, 25.0 mg/kg에서 103.4%, 50.0 mg/kg에서 100.2%를 나타내어 일간 및 일내 분석에서 모두 정확성은 기준을 만족하는 것으로 판단되었음

바. 방법 최저 정량 한계 (MDL)

○ 본 분석 방법의 방법 최저 정량 한계 (Method Detection Limit, MDL)를 산출하기 위하여 LOD (0.08 mg/g)과 LOQ (0.14 mg/g)를 통해 LOQ의 2배의 해당 되는 농도인 6.3 mg/kg을 시료의 주성분과 유사한 텍스트린에 스파이킹 하여 시료를 제조한 후 7

반복으로 해당 시료를 분석하였으며, 그 결과는 표 8과 같이 나타났음

표 15. Taxifolin 분석법의 방법 최저 정량 한계 (MDL)

No	시료농도 (mg/g)	측정값 (mg/g)	평균 (mg/g)	S.D. (mg/g)	RSD(%)
1		0.29			
2		0.24			
3		0.27			
4	0.28 mg/g	0.26	0.26	0.02	1.4
5		0.29			
6		0.25			
7		0.28			
MDL			0.11 mg/g		

제 2장 슈퍼홍미 추출물의 제조공정 확립 및 표준화

1. 슈퍼홍미 추출물의 제조 공정의 수립

가. 주정 농도에 따른 슈퍼홍미 추출물의 수율 확인

- 슈퍼홍미로부터 건강기능식품 원료를 개발하기 위하여 슈퍼홍미에 함유된 기능성 성분을 추출하는 공정을 수립하고자 하였음
- 슈퍼홍미 추출물의 제조는 선행연구결과 및 제3협동 과제에서 중요 기능성 성분 또는 지표성분으로 추정되는 Taxofolin으로 선정되었으며, 주정에서 추출 회수 가능성이 높을 것으로 감안하여 주정 추출을 수행하였음
- 또한, 원곡을 그대로 추출을 사용하였을 때 원곡의 탄수화물 성분등이 기능성 성분의 추출 및 농축 공정에서 부정적인 영향을 줄 것으로 추정되어 슈퍼홍미를 탈곡하여 미강만을 수득하여 추출에 사용하였음
- 주정추출물의 수율을 확인하기 위하여 30%, 50%, 70%의 주정 농도에서 원물의 10배수의 용매를 가하여 4시간 동안 주정환류 조건하에서 슈퍼홍미 미강을 추출한 결과는 다음과 같음

표 17. 주정 30% 주정 추출물에서의 수율

제조공정	중량(kg, L)	고형분(%)	수율(%)
슈퍼홍미 원곡	100.0	89.3	100
탈곡 미강	9.40	88.2	9.3
주정 환류추출(8.2 brix)	46.4	8.2	4.3
농축	18.2	22.9	4.7
분무건조 (50% dextrin 포함)	3.7	95.7	4.0

표 18. 주정 50% 주정 추출물에서의 수율

제조공정	중량(kg, L)	고형분(%)	수율(%)
슈퍼홍미 원곡	100.0	89.3	100
탈곡 미강	9.40	88.2	9.3
주정 환류추출(7.3 brix)	46.4	7.3	3.8
농축	18.2	23.5	4.8
분무건조 (50% dextrin 포함)	3.7	95.3	3.6

표 19. 주정 70% 주정 추출물에서의 수율

제조공정	중량(kg, L)	고형분(%)	수율(%)
슈퍼홍미 원곡	100.0	89.3	100
탈곡 미강	9.40	88.2	9.3
주정 환류추출(4.7 brix)	49.2	4.7	3.8
농축	13.7	26.2	4.8
분무건조 (50% dextrin 포함)	3.6	94.2	3.8

○ 상기의 결과와 같이 주정 30, 50, 70%에서 각각 추출하였을 경우 최종 산물의 수율은 50% dextrin 포함하였을 때, 4.0%, 3.6%, 3.9%이고, dextrin 제외시 예상 수율은 2.0%, 1.8%, 1.95%로 큰 차이는 나타내지 않았음

○ 제3협동과제에서 지표물질로 선정 한 taxifolin의 수율은 50% 주정 추출물에서 가장 높은 수율을 보이는 것으로 확인되었으며, 대량 생산에서의 수율 확인을 위하여 각 농도별로 추출 된 시료의 taxifolin 함량을 측정한 결과는 다음과 같음

표 20. 주정 농도별 추출물에서의 taxifolin 함량 비교

제조분말	건조물 중량 (kg)	Taxifolin 함량 (g/kg)	총 Taxifolin 함량 (g)
30% 주정	3.7	1.9	7.03
50% 주정	3.7	2.3	8.51
70% 주정	3.6	2.2	7.92

- 제3협동과제의 결과에 따르면 50% 주정 추출물에서 5.5 g/kg의 함량을 나타낸 결과에 비할 때 각 주정 추출물에서 taxifolin의 함량은 1.9 ~ 2.3 g/kg으로 Lab scale에서 추출한 결과에 비하여 낮은 농도를 보였으며, 실제 제작된 각 추출물들이 50%의 dextrin이 부형제로 포함되었다는 것을 감안할 때 2.8 ~ 4.6 g/kg의 농도로 상대적으로 낮은 것으로 나타났음
- 특히, 최종 건조물이 부형제로 사용된 50%의 dextrin을 제거할 경우 슈퍼홍미 원곡 대비 수율이 2.0%, 1.8%, 1.8%로 매우 낮은 것을 감안할 때 생산 수율의 향상 및 taxifolin을 보다 효율적으로 추출할 수 있는 추출 공정이 차후 필요할 것으로 판단됨

나. 건조방법에 따른 수율 변화

- 또한, 제3협동과제에서 상대적으로 높은 taxifolin의 수율이 동결건조를 통해 나타난 것임을 감안할 때 실제 동결건조로 하였을 때의 수율 변화를 비교를 그림 15와 같이 하여 비교 분석하였을 때 결과는 표 21과 같이 나타났음



그림 27. 슈퍼홍미 추출물(50% 주정 추출)의 건조 방법별 비교

표 21. 건조 방법에 따른 수율 변화

제조공정	중량(kg, L)	고형분(%)	수율(%)
슈퍼홍미 원곡	100.0	89.4	100
탈곡 미강	10.5	89.1	10.5
주정 환류추출 (8.8 brix)	45.5	8.8	4.5
농축	25.8	20.4	5.9
분무건조	3.5	96.3	3.9
동결건조	1.4	94.5	1.5

- 동결건조시에는 분무건조와 달리 부형제가 첨가되지 않아 상대적으로 낮은 최종 중량을 나타내었으며, 분무건조의 수율은 슈퍼홍미 원물 대비 약 3.9%이며, 부형제가 50%가 추가되었음을 감안할 때 1.95%정도의 수율을 얻을 수 있었음
- 반면에 동결건조물은 최종 중량이 1.4 kg으로 슈퍼홍미 원곡 대비 1.5%정도의 수율을 얻어 건조 과정상에서 분무건조대비 약 0.4%정도가 낮은 수율을 나타내었는데, 이는 동결건조 등의 대량 생산 공정 적용 시 건조 된 건조물을 다시 분쇄를 하여야 되는 공정을 거치기 때문에 상대적으로 공정 로스가 다량 발생한 것으로 추정되며, 차후 사업화를 위한 대량 생산시에 이러한 로스는 많이 감소될 것으로 예상됨
- 분무건조와 동결건조시에 taxifolin 함량을 비교한 결과는 표 22과 같이 나타났음

표 22. 건조 방법에 따른 taxifolin의 함량 변화

제조분말	건조물 중량 (kg)	Taxifolin 함량 (g/kg)	총 Taxifolin 함량 (g)
분무건조	3.5	2.4	8.4
동결건조	1.4	4.8	6.7

- 분무건조시 taxifolin 함량은 이전의 추출에서와 유사하게 2.4 g/kg의 함량으로 부형제의 영향을 제외할 시 4.8 g/kg으로 나타났으며, 동결건조시에는 4.8 g/kg으로 나타나 건조 방법에 따른 수율 차이는 없는 것으로 확인되었음
- 그러나, 개별인정형 등록시 1일 지표성분의 섭취량을 기준으로 할 때 분무건조시에 50%의 부형제 첨가 영향으로 1일 섭취량이 2배로 증가할 수 있어 2차년도 이후 1일

섭취량과 제품의 개발 방향이 결정되면 최종적으로 분무건조와 동결건조의 최종 공정을 선택하여 진행해야 할 것으로 판단됨

다. 반복 추출 따른 수율의 변화

- 상기에서 결정된 추출 방법 (슈퍼홍미 미강 분리, 50% 주정 10배수로 환류 추출, 분무건조)에 따라 3회에 걸쳐 반복 추출하였을 때 최종 수율 및 taxifolin의 함량을 측정한 결과는 다음과 같음

표 23. 반복 추출에 따른 수율 및 지표성분의 함량 변화

제조분말	수율 (%)	Taxifolin (g/kg)
1회	3.6	2.3
2회	3.9	2.4
3회	4.0	2.2
평균	3.8 ± 0.2	2.3 ± 0.1

- 상기의 결과에서 3회 반복시 수율은 3.8 ± 0.2 %, taxifolin의 함량은 2.3 ± 0.1 kg/g의 함량을 나타내어 반복 추출에 따른 재현성이 높은 것으로 판단됨
- 상기의 결과에 따라 3회째 추출한 표준화 된 원료에 대해서 제2협동과제에게 제공함으로써 동물 시험등의 기본 원료로서 사용하도록 하였음

2. 슈퍼홍미 추출물 제조공정의 표준화

- 슈퍼홍미로부터 건강기능식품 원료를 개발하기 위하여 전년도 연구에서 슈퍼홍미의 지표성분으로 설정 된 taxifolin을 기준 삼아 원료 제조 공정을 확정하였으며 그 요약은 그림 28 과 같음



< 그림 28. 슈퍼홍미 추출물의 제조공정도 >

- 상기의 방법으로 공정을 개별인정형 원료 등록을 위하여 요구 되는 3반복 생산시 지표성분인 taxifolin 농도 변화를 관찰하여 공정을 표준화 하고자 하였으며, 각 생산 시 200 L 이상으로 추출용매를 사용하여 실제 생산 조건에 근접하게 추출을 시행하여 생산 수율 및 지표성분 함량을 관찰하였음(표 24)
- 3회 반복 추출 하였을 때 최초 원곡의 taxifolin 함량은 0.61 mg/g의 농도로 나타났으며, 3반복시 주정환류 추출 공정에서 0.35~0.42 mg/g의 농도로 추출이 되는 것을 확인하였으며, 농축 공정을 통해 0.81 ~ 0.91 mg/g의 농도로 농축되는 것을 확인할 수 있었음
- 최종 분무 건조 후 제조 된 슈퍼홍미 추출분말의 taxifolin 함량은 3회 반복 추출을 통해서 1.77 mg/g, 1.85 mg/g, 1.70 mg/g으로 나타났으며, 평균적으로 1.77 mg/g의 함량을 보였으며, 건강기능성식품상 지표성분의 함량은 설정 규격의 80 ~ 120% 통상적으로 한정되기 때문에 최종 taxifolin의 규격 함량을 1.80 mg/g의 농도로 설정할 경우 1.44 mg/g (80%)~ 2.16 mg/g (120%)으로서 설정 할 수 있을 것으로 판단되었으며, 최종적으로 3회 반복 추출물중 2회차 추출물 (1.85 mg/g taxifolin)을 제2협동과제의 활성평가용 시료로서 제공하였음

표 24. 슈퍼홍미 추출물의 공정별 3회 반복 생산에 따른 taxifolin 함량 변화

NO	공정명	고형분(%)	taxifolin 함량 (mg/g)
1	슈퍼홍미 원곡	87.3	0.61 ± 0.03
	주정 환류추출액	15.1	0.35 ± 0.01
	농축액	27.7	0.81 ± 0.02
	분무건조물	98.1	2.42 ± 0.11
2	슈퍼홍미 원곡	87.3	0.61 ± 0.02
	주정 환류추출액	15.3	0.39 ± 0.01
	농축액	28.2	0.91 ± 0.3
	분무건조물	98.5	2.35 ± 0.15
3	슈퍼홍미 원곡	87.3	0.61 ± 0.02
	주정 환류추출액	15.0	0.42 ± 0.01
	농축액	28.1	0.80 ± 0.05
	분무건조물	98.5	2.67 ± 0.09

○ 상기의 3반복 추출물에 대하여 개별인정형 등록을 위하여 식품의약품안전처가 지정한 식품위생기관중 건강기능식품협회 부설 한국건강기능식품연구소에 Taxifolin 분석법의 세팅 및 공인기관성적서에 각 반복 시료당 3회 반복시험으로 의뢰한 결과는 다음과 같음

○ 상기와 같이 3회 반복 추출에 의한 시험결과 슈퍼홍미 추출분말의 지표성분인 taxifolin 함량은 2.68 ~ 2.86 mg/kg의 함량으로 균일한 함량을 보여 제조공정의 표준화가 시행되었음을 확인할 수 있었음


제 D2018080987 호 문서화인				시험·검사성적서							
제품명	홍미추출분말(슈퍼홍미)		제조일자 (유통기한)	2017-04-27							
의뢰인	업체명	(주)이름	성명	황성주, 유양원							
	주소	강원 춘천시 퇴계농공로 111(퇴계동)									
제조번호	70427	접수년월일	2018-08-10								
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018080987								
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-09-10 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김현희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 30%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Taxifolin(mg/g)</td> <td>2.68(2.65,2.69,2.69)</td> <td>장내인</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-업체제공</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	Taxifolin(mg/g)	2.68(2.65,2.69,2.69)	장내인
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
Taxifolin(mg/g)	2.68(2.65,2.69,2.69)	장내인									
<p>※ 위 분석은 피뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관련 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 9월 10일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 </p> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsire.kr 전화번호 (031)528-2400 FAX번호 031)528-0490-1</p>											



그림 29. 슈퍼홍미 추출분말의 Taxifolin 함량 공인시험성적서


제 D2018080986 호 봉시하인				시험·검사성적서							
제품명	홍미추출분말(슈퍼홍미)		제조일자 (유통기한)	2018-07-25							
의뢰인	업체명	(주)이름	성명	황성주, 유양원							
	주소	강원 춘천시 외계농공로 111(외계동)									
제조번호	80725		접수년월일	2018-08-10							
검사의뢰목적	참고용		접수번호	D2018080986							
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-09-10 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 33%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 33%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Taxifolin(mg/g)</td> <td>4.82mg/g(4.84,4.80,4.83)</td> <td>장내인</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-업체제공</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	Taxifolin(mg/g)	4.82mg/g(4.84,4.80,4.83)	장내인
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
Taxifolin(mg/g)	4.82mg/g(4.84,4.80,4.83)	장내인									
<p>※ 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 9월 10일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p> <div style="text-align: right;">  </div> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 http://www.kbsi.re.kr 전화번호 (051) 428-2300 FAX (051) 428-10628-0400-1</p>											



그림 30. 슈퍼홍미 추출분말의 Taxifolin 함량 공인시험성적서

제 D2018080985 호 분석확인				시험·검사성적서							
제품명	홍미추출분말(슈퍼홍미)		제조일자 (유통기한)	2018-07-27							
의뢰인	업체명	(주)이룸	성명	황성주, 유양원							
	주소	강원 춘천시 퇴계능공로 111(외계동)									
제조번호	80727	접수년월일	2018-08-10								
검사의의목적	품질용	접수번호	DX2018080985								
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-09-10 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김진희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Taxifolin(mg/g)</td> <td>2.86mg/g(2.87,2.88,2.83)</td> <td>장내인</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-일체제공</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	Taxifolin(mg/g)	2.86mg/g(2.87,2.88,2.83)	장내인
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
Taxifolin(mg/g)	2.86mg/g(2.87,2.88,2.83)	장내인									
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 9월 10일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 장</p>											
<p>(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (051) 709-11628-0400-1</p>											



그림 31. 슈퍼홍미 추출분말의 Taxifolin 함량 공인시험성적서

제 3장 슈퍼홍미 추출물의 기능성 검증

1. 슈퍼홍미 추출물의 in vitro 여성호르몬 유사 효과 검증 (E-assay)

- 슈퍼홍미 추출물의 여성호르몬 유사효과는 유방암 유래 암세포주 MCF-7 cell을 이용한 E-screen assay는 Perez 등의 실험방법에 의해 실험하였다. 에스트로젠 효과를 평가하기 위해 양성대조군인 17β-estradiol과 상대비교를 하였으며 SRB방법에 의해 세포성장을 측정함
- 제3협동과제로부터 제공 받은 슈퍼홍미 추출물(55ug taxifolin/g)과 추청버 추출물을 이용하여 MCF-7 cell에 대한 증식비율을 조사한 결과, 추청버는 100ppm 까지 농도 별로 점차 증가하다가 500ppm에서 대조군대비 세포의 증식이 억제되었음을 확인할 수 있었고, 슈퍼홍미에서는 농도가 증가됨에 따라 점차 대조군대비 세포증식의 억제되고 있음을 확인할 수 있었음.
- 슈퍼홍미 추출물을 농도별로 투여하여 시간대별로 MCF-7 cell의 증식효과를 조사한 결과, 모든 농도에서 48시간 까지는 셀의 증식효과가 크게 나타나지 않았으나, 50ppm, 100ppm에서는 48시간부터 14 % 이상의 셀 증식효과가 나타나기 시작하였다. 72시간 이후부터 14 % 이상 증가하기 시작하여, 최대 증식 효과 시간인 144시간에는 60% 이상 증식시키는 효과를 나타내었다. 50ppm까지는 농도 의존적으로 증식효과가 나타나 것으로 조사되었음.

표 25. 슈퍼홍미 추출물의 시간대별 에스트로젠 활성

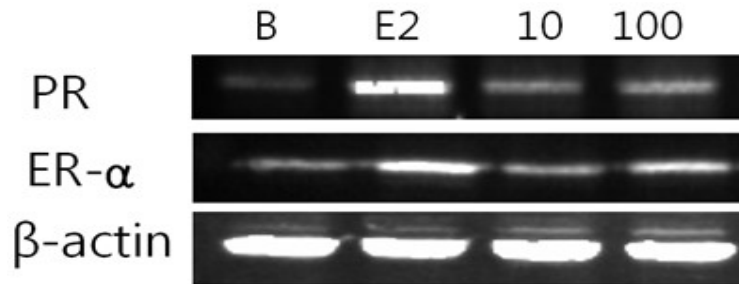
슈퍼홍미비	Proliferation (%)				
	0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
24시간(1일)	1.8±1.1	2.6±2.8	5.8±2.4	13.1±0.9	9.4±2.7
48시간(2일)	5.9±2.1	6.7±1.3	10.5±2.3	17.8±0.9	14.2±5.7
72시간(3일)	16.4±5.8	18.4±2.6	20.5±4.3	22.4±1.2	21.3±4.2
96시간(4일)	39.5±4.6	39.4±1.2	46.1±2.3	46.5±6.4	41.6±5.6
120시간(5일)	51.2±2.6	51.7±3.9	51.8±4.3	60.8±3.	51.2±5.4
144시간(6일)	57.1±3.9	57.1±3.9	52.4±4.2	61.2±2.4	63.1±5.7

- 슈퍼홍미 추출물의 에스트로젠 활성은 모든 농도에서 75% 이상 높게 나타나는 것으로 효과가 관찰됨

표 26. 슈퍼홍미 추출물의 에스트로겐 활성

	에스트라디올(10pM)	REA(%)				
		0.1ppm	1ppm	10ppm	50ppm	100ppm
REA(%) 평균	100	75.6	78.5	78.4	79.8	81.5
S.D	5.42	2.85	2.41	1.65	5.42	3.45

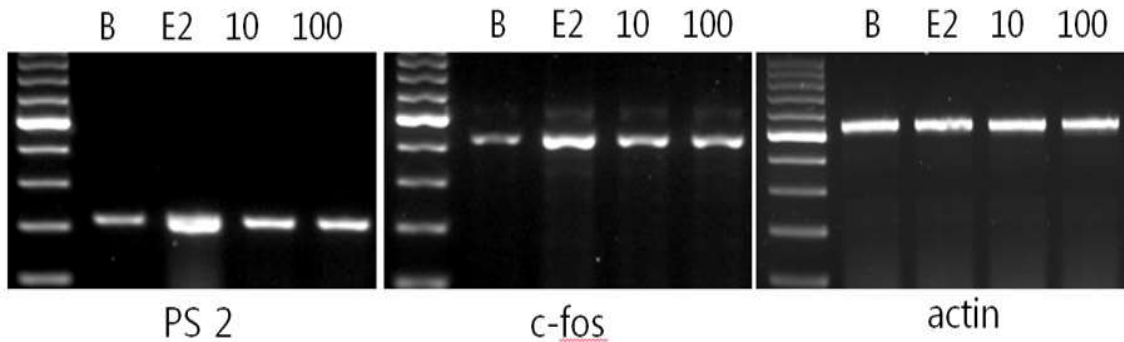
- 슈퍼홍미 추출물이 에스트로겐에 미치는 영향을 단백질 수준에서 조사하기 위하여 MCF-7 세포주에 싼 품종별로 시료를 조사하고 24시간 배양한 후 세포 내에 에스트로겐 활성과 관련된 단백질을 확인하였다. 에스트로겐에 의해서 PR은 합성이 유도되었고, 반대로 ER- α 는 억제되었으며, 공시재료의 70% 에탄올 추출물을 처리한 결과 모든 품종에서 에스트로겐과 유사한 결과를 확인함(그림 32)



<그림 32. 슈퍼홍미 추출물의 MCF-7 cells에서 PR과 ER- α 단백질 발현에 대한 영향>

* B:control, E2:17 β -estradiol 10 μ , 슈퍼홍미 추출물: 10, 100ppm

- 슈퍼홍미 품종이 에스트로겐 생합성에 미치는 영향을 RNA 발현조절 부위에서 판단하기 위하여 cytokine C-fos, pS-2의 전사량을 확인하였다. 대조약물로 사용한 17 β -estradiol(lane E2)과 비교해 봤을 때 의미있는 수준의 영향을 보이는 것으로 조사되었다(그림 33)



< 그림. 33. 슈퍼홍미 추출물의 MCF-7 cell에서 c-fos 와 pS2 mRNA 발현에 대한 영향 >
 B:control, E2:17β-estradiol 10pμ, 슈퍼홍미: 10, 100ppm

2. 슈퍼홍미 원물 급여에 의한 갱년기 유도 모델 흰쥐의 대사개선효능 검증

- 슈퍼홍미 급여에 의한 갱년기 유도 모델 흰쥐의 대사 개선효능을 검증하기 위해 10주령의 난소제거 수술을 받은 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley) 24마리를 구입하여 총 3군(대조군, 슈퍼홍미, 발아슈퍼홍미, n=8)으로 나누었음. 수술 후 2주간의 회복기간을 거친 후 AIN-93G를 기본 base로 하여 슈퍼홍미를 혼합한 식이를 급여하면서 8주동안 사육한 후 희생하여 실험에 필요한 혈액 및 장기 등을 적출하여 사용하였음
- 일반적으로 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인한 대사이상은 비만을 야기 시키는데, 여성의 경우 폐경으로 인한 에스트로겐 저하는 체내 에너지 저장율의 증가가 비만인 원인이 될 수 있다. 8주 동안의 실험식이 급여 종료 후의 체중은 난소절제 대조군이 가장 높은 증가량을 보였으며, 주당 식이섭취량과 식이효율 역시 각각 181.58 g, 0.16로 유의적으로 높게 나타났다. 슈퍼홍미군들 간에서는 발아시킨 슈퍼홍미를 섭취한 군에서 일반슈퍼홍미보다 체중이 감소하였다. 또한 장기중량에서는 슈퍼홍미의 간 무게를 제외한 실험군들간의 유의적인 차이는 없었으나 지방무게를 비교한 결과 대조군>슈퍼홍미>발아슈퍼홍미 순으로 나타났다

표 27. 슈퍼홍미 급여에 따른 폐경유도 흰 쥐의 체중변화 및 장기중량 측정

	대조군	슈퍼홍미	발아슈퍼홍미
Initial weight (g)	229.24 ± 1.25 ^a	228.32 ± 1.18 ^a	228.14 ± 0.79 ^a
Final weight (g)	402.65 ± 5.33 ^c	388.69 ± 4.92 ^{b*}	374.25 ± 5.41 ^a
Weight gain (g)	174.68 ± 5.63 ^c	160.24 ± 4.72 ^{b*}	148.32 ± 3.30 ^a
Feed intake (g/week)	181.58 ± 4.32 ^c	162.25 ± 3.20 ^{b*}	149.44 ± 3.41 ^a
Feed intake ratio	0.16 ± 0.00 ^c	0.14 ± 0.00 ^{b*}	0.12 ± 0.00 ^a
<i>Organ weight (g/100g)</i>			
Liver	2.88 ± 0.01 ^c	2.57 ± 0.02 ^{b*}	2.50 ± 0.01 ^a
Heart	0.26 ± 0.01 ^b	0.23 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.01 ^a
Kidney	0.40 ± 0.01 ^a	0.39 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.04 ^a
<i>White adipose tissue weight (g/100g)</i>			
	10.26 ± 0.19 ^c	9.04 ± 0.19 ^{b*}	8.56 ± 0.12 ^a

Values are means ± SE (n =8). Means in the same row per parameter with different letters are significantly different at P < 0.05 by Tukey's range test. (*) on the germinated rice group indicates significant difference (P <0.05) by independent t-test between germinated and non-germinated samples.

- 슈퍼홍미 급여에 따른 난소제거 흰쥐의 혈장 지질, 당질 및 adiponectin 측정 결과, 중성지질은 대조군에서 4.59 ± 0.04 mmol/L을 나타낸 반면 슈퍼홍미 군에서는 4.04 ± 0.04 mmol/L로 유의하게 감소하였으며 발아슈퍼홍미(3.58 ± 0.04 mmol/L)에서도 감소된 것을 확인할 수 있었음
- 총콜레스테롤 함량에서도 슈퍼홍미 및 발아슈퍼홍미에서 감소되었으며, 유리지방산 수준은 발아슈퍼홍미군이 대조군에 비해 약 23% 감소한 것으로 나타났고, 폐경이후 estradiol-17β의 농도 변화가 총콜레스테롤, 중성지질 및 LDL 콜레스테롤을 증가시킬 뿐만 아니라 HDL 콜레스테롤 수치를 감소시켜 혈관 손상을 일으키는 원인이 될 수 있는데, 본 실험 결과 슈퍼홍미와 발아슈퍼홍미 섭취군에서는 이를 방지할 수 있을 것으로 기대됨
- 실험동물의 혈당수치를 측정한 결과 발아슈퍼홍미군을 제외하고는 실험 종료시점에서의 공복혈당이 개시시점보다 증가한 것을 알 수 있었으며, 인슐린 저항성을 평가하는 방법인 Homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR)에서는 대

조군이 유의적으로 높은 값을 나타내어 당뇨병 발생위험이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 혈장 인슐린 농도 측정결과, 대조군이 4.93 ± 0.03 mU/L로서 실험군들보다 유의적으로 높은 수준을 보였는데 이는 인슐린 저항증으로 인해 계속적으로 인슐린을 분비하는 전형적인 제 2형 당뇨병의 증상 중의 하나로 폐경으로 인한 호르몬 분비 변화가 인슐린 receptor 감작 기능 저하를 가져와 초래된 결과로 판단됨

- 당질 및 지질대사 조절에 중요한 역할을 하는 adiponectin의 농도는 발아슈퍼홍미군이 가장 높았으며 슈퍼홍미군도 대조군보다 유의적으로 향상되었다. estradiol은 지방조직에서의 렙틴 분비를 유도하여 정상적인 수준을 유지하지만, 초기폐경이후 급격한 호르몬 저하로 인해 렙틴 또한 농도가 감소하게 되는데 본 실험결과 대조군보다 실험군들의 렙틴 수준이 감소한 것으로 보아 호르몬 변화로 인한 결과로 예상됨
- 비만세포에서 생산되는 호르몬의 일종인 레지스틴과 염증 유발 물질인 TNF- α 의 농도는 당뇨 및 비만 발병률과 양의 상관관계를 가지고 있는데 본 실험결과 슈퍼홍미 및 발아슈퍼홍미군에서 대조군보다 유의적으로 감소한 것으로 나타나 이 기능성 쌀이 폐경이후 발생할 수 있는 대사질환에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

표 28. 슈퍼홍미 급여에 폐경유도 흰 쥐의 따른 혈장 profile 분석

	대조군	슈퍼홍미	발아슈퍼홍미
Triacylglycerol(mmol/L)	4.59 ± 0.04 ^c	4.04 ± 0.04 ^{b*}	3.58 ± 0.04 ^a
Total Cholesterol(mmol/L)	9.98 ± 0.07 ^c	8.91 ± 0.05 ^{b*}	8.04 ± 0.03 ^a
HDL-C(mmol/L)	3.25 ± 0.12 ^a	3.33 ± 0.08 ^a	3.68 ± 0.01 ^{b*}
Free fatty Acid(mmol/L)	4.02 ± 0.03 ^c	3.69 ± 0.03 ^{b*}	3.11 ± 0.01 ^a
Blood glucose (mmol/L)			
Initial	4.98 ± 0.02 ^a	5.01 ± 0.02 ^a	5.08 ± 0.02 ^a
Final	6.98 ± 0.05 ^c	5.11 ± 0.03 ^{b*}	4.78 ± 0.03 ^a
HOMA Score(IR)	1.49 ± 0.00 ^c	0.97 ± 0.02 ^{b*}	0.78 ± 0.00 ^a
Plasma insulin (mU/L)	4.93 ± 0.03 ^c	3.91 ± 0.05 ^b	3.39 ± 0.01 ^a
Hepatic glycogen (mg/g liver)	94.68 ± 2.26 ^b	149.25 ± 2.78 ^a	152.88 ± 3.07 ^a
Adiponectin (ng/mL)	0.26 ± 0.03 ^a	0.48 ± 0.03 ^b	0.71 ± 0.06 ^{c*}
Leptin (ng/mL)	3.76 ± 0.27 ^a	3.32 ± 0.33 ^a	3.36 ± 0.26 ^a
Resistin (ng/mL)	32.55 ± 0.12 ^c	22.88 ± 1.43 ^{b*}	18.25 ± 1.05 ^a
TNF-a (µg/mL)	9.58 ± 0.81 ^c	7.25 ± 0.58 ^{b*}	4.51 ± 0.12 ^a

Values are means ± SE (n =8). Means in the same row per parameter with different letters are significantly different at P < 0.05 by Tukey's range test. (*) on the germinated rice group indicates significant difference (P<0.05) by independent t-test between germinated and non-germinated samples.

○ 슈퍼홍미 및 발아슈퍼 홍미의 급여가 폐경을 유도한 흰 쥐의 지질대사 및 당질대사에 미치는 영향을 측정한 결과 많은 양의 열량 섭취 및 높은 식이효율은 체내 과도한 에너지와 지방을 계속 축적하고, 체내에서 이용되는 지방산의 상당량은 식이지방을 통해 공급되므로 이는 대사 조절에 영향을 미칠 수 있음.

○ 지방산 합성관련 효소인 FAS(fatty acid synthase)에 의해 지방산의 길이가 연장되고, ME(malic enzyme)는 지방산 합성에 필요한 조효소인 NADPH를 공급하는 역할을 하는데, 본 실험결과 FAS와 ME는 대조군에서 가장 높은 활성을 보였으며, 발아슈퍼홍미는 대조군에 비해 FAS와 ME가 각각 35%, 23% 감소한 것으로 나타났다. CPT(carnitine palmitoyl transferase)는 지방산 합성의 시작단계 조효소인 malonyl coenzyme A(malonyl-CoA)을 억제하는 효소로 발아슈퍼홍미군에서 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 베타 산화는 미토콘드리아에서 지방산이 분해되어 아세틸 조효소 A(acetyl-CoA)와 NADH, FADH2를 생산하는 과정인데, 과도한 지방섭취, 지방조직의

로부터의 지방산 유입 증가, 지방산 신생과정의 가속화 현상 등은 지방 산화의 감소를 가져올 수 있다. 본 실험의 베타산화 측정 결과 대조군 및 슈퍼홍미군간에는 유의적인 차이가 없었으나 발아슈퍼홍미군은 대조군 및 슈퍼홍미군에 비해 각각 2.4배, 2.1배 향상된 것으로 나타났음

- 한편 당질대사 관련 효소 중 GK(glucokinase)는 간에서의 혈당 조절에 직접 관여하는 효소로 활성이 높을 때 당신생합성 관련 효소인 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)를 억제시킬 수 있는데 본 실험 결과 대조군에 비해 GK는 실험군들이 높게 나타났으며 PEPCK는 유의적으로 억제시킨 것으로 나타났다. Glucose-6-phosphatase (G6Pase)는 혈중 glucose 수치를 유지하는데 있어 매우 중요한 효소로, 간에서 gluconeogenesis (glucose 합성)과 glycogenolysis (glycogen 분해)과정의 최종단계에서 발생하는 glucose-6-phosphate를 glucose로 가수분해하는 역할을 하는데 당뇨로 인해 체내 혈당이 높을 때 활성이 높으며, 슈퍼홍미 및 발아슈퍼홍미군에서는 대조군보다 유의적으로 감소했으며 특히 발아슈퍼홍미군에서는 대조군보다 3.3배 감소한 것으로 나타났음
- 이로서 난소절제 이후 감소된 여성호르몬으로 인해 변화되는 지질 및 당질대사 관련 효소들이 슈퍼홍미 급여에 의해 지방생합성 및 산화, 당신생 합성 등을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료됨

표 29. 슈퍼홍미 급여에 따른 폐경유도 흰 쥐의 지질 및 당질대사 효소 활성화 측정

	대조군	슈퍼홍미	발아슈퍼홍미
지질대사 효소 활성(nmol/min/mg protein)			
FAS	23.68 ± 1.07 ^c	17.98 ± 0.95 ^{b*}	15.14 ± 1.13 ^a
ME	36.25 ± 2.12 ^b	33.32 ± 1.08 ^{b*}	28.68 ± 2.01 ^a
CPT	12.63 ± 0.82 ^a	17.01 ± 0.72 ^b	25.18 ± 0.92 ^c
beta-oxidation	1.35 ± 0.13 ^a	1.50 ± 0.12 ^a	3.25 ± 0.42 ^{b*}
당질대사 효소 활성(nmol/min/mg protein)			
GK	1.55 ± 0.11 ^a	2.91 ± 0.02 ^{b*}	2.95 ± 0.02 ^b
G6pase	73.45 ± 2.13 ^b	69.57 ± 1.85 ^b	45.26 ± 1.21 ^a
PEPCK	3.58 ± 0.26 ^c	2.78 ± 0.22 ^{b*}	1.08 ± 0.07 ^a

Values are means ± SE (n =8). Means in the same row per parameter with different letters are significantly different at P < 0.05 by Tukey's range test. (*) on the germinated rice group indicates significant difference (P <0.05) by independent t-test between germinated and non-germinated samples.

- 여성에서 골감소는 폐경 후 에스트로젠의 분비저하에 의해 발생할 수 있는데, 슈퍼홍미의 급여가 폐경이 유도된 흰 쥐의 골대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 골형성 및

골흡수등의 생화학지표를 분석하였음

- 혈중 에스트로겐의 주된 성분인 17β -estradiol은 폐경 이후 현저히 감소하게 되고, 폐경이후 관상동맥 질환의 위험이 증가하는 것은 여성호르몬과도 관련이 있다. 본 실험 결과 17β -estradiol 농도는 대조군과 슈퍼홍미군과는 유의적인 차이가 없었으나 발아슈퍼홍미는 이들에 비해 약 43% 증가한 것으로 나타났으며, 부갑상선 호르몬 농도(Intact PTH) 역시 발아슈퍼홍미군이 대조군과 슈퍼홍미군보다 약 19% 증가한 것으로 확인되었다. 한편, Ca 농도는 실험군들과 유의적인 차이를 보이지 않았는데 이는 혈중 칼슘 항상성을 유지하기 위함으로 추정됨
- Osteocalcin 은 골아세포에 의해 합성된 단백질로 비타민 D에 의하여 합성이 촉진되고, 특이도가 높아 조골세포의 활동성을 평가하고 골형성 지표로서 쓰이고 있으며, ALP 역시 골아세포에서 생성되어 혈중으로 분비되기 때문에 골형성 표지자로서 사용된다. Osteocalcin의 농도는 발아현미군에서 감소경향을 나타내었으나 통계적으로 유의적인차이는 없었으며, ALP 역시 군들간의 유의적인 차이가 없었다. 골흡수 표지자로는, 뼈의 주 기질성분인 콜라겐의 교차결합물 (collagen cross-links)인 PYR(pyridinoline)과 DPD(deoxypyridinoline)의 교차 결합은 콜라겐 섬유의 아미노 말단과 카르복시 말단에서 일어나는데, 이 부위를 측정하는 NTx-1(N-telopeptide of collagen cross-links)와 CTx-1(C-telopeptide of collagen cross-links)가 대표적이며, 본 실험에서 NTx-1은 대조군에 비해 슈퍼홍미는 20%, 발아슈퍼홍미는 34% 감소하였고, CTx-1 대조군에 비해 슈퍼홍미와 발아현미가 각각 22% 그리고 44% 감소하여 기능성 쌀이 파골세포에 의한 골흡수를 어느정도 억제할 수 있는 것으로 확인되었음

< 표 30. 슈퍼홍미 급여에 따른 폐경유도 흰 쥐의 골대사 biomaker 측정 >

	대조군	슈퍼홍미	발아슈퍼홍미
17-β-estradiol (ng/mL)	0.47 ± 0.03 ^a	0.52 ± 0.02 ^a	0.87 ± 0.05 ^{b*}
Intact PTH (pg/mL)	22.58 ± 0.63 ^b	21.22 ± 1.02 ^{b*}	18.05 ± 0.57 ^a
Calcium (mg/dL)	9.65 ± 0.53 ^a	10.68 ± 0.43 ^a	10.58 ± 0.58 ^a
Osteocalcin (ng/mL)	13.89 ± 0.23 ^b	13.56 ± 0.73 ^{b*}	12.07 ± 0.34 ^a
Bone ALP (μg/L)	<0.50 ± 0.00	<0.50 ± 0.00	<0.50 ± 0.00
NTx-1 (nmol/L)	181.58 ± 2.37 ^c	145.25 ± 1.23 ^{b*}	121.44 ± 3.45 ^a
CTx-1 (nmol /mL)	23.71 ± 0.85 ^c	18.69 ± 0.65 ^{b*}	13.29 ± 1.58 ^a

Values are means ± SE (n =8). Means in the same row per parameter with different letters are significantly different at P < 0.05 by Tukey's range test. (*) on the germinated rice group indicates significant difference (P <0.05) by independent t-test between germinated and non-germinated samples.

- 활성 산소종은 노화 및 성인병을 비롯한 여러 대사 장애의 주요 원인중의 하나이며, 이런 산화적 대사물을 조절 할 수 있는 항산화제가 주목을 받고 있는데, 슈퍼홍미의 항산화능을 알아보기 위해 폐경이 유도된 흰 쥐의 항산화 효소 활성을 비교해보았다. SOD(superoxide dismutase)와 CAT(catalase) 활성도는 간조직에서 대조군보다 유의적으로 높은 활성을 보였으며, GSH-Px(glutathione peroxidase) 활성은 군들간의 유의적인 차이를 보이지 않았음
- 항산화 물질인 glutathione은 환원형 glutathione(GSH)과 산화형 glutathione(GSSG)으로 존재하는데, 체내 환원형 glutathione 수준이 높을 때 항산화 작용이 원활히 수행될 수 있다. GR(Glutathione reductase)은 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 변환시키는 반응을 촉매함으로써 glutathione의 항산화 작용을 간접적으로 도울 수 있는데 슈퍼홍미 및 발아슈퍼홍미 급여군에서 대조군보다 높은 활성을 보였으며, 특히 발아슈퍼홍미군에서 대조군에 비해 약 4배 정도 활성이 증가한 것으로 나타났음
- 한편, HDL-콜레스테롤의 표면에 붙어있는 항산화 효소인 paraoxonase(PON)는 HDL-콜레스테롤의 산화보호 작용을 하는데 높은 PON의 활성은 심혈관계 질환을 예방 할 수 있다. 본 실험 결과 발아슈퍼홍미군에서 유의적으로 가장 높은 활성을 보였으며 선행 결과인 HDL-콜레스테롤과 유사한 경향을 나타내어 슈퍼홍미가 체내 산화적 대사를 조절할 수 있는 항산화제로서의 항산화 및 심혈관계 질환 예방에 있어 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보임

표 31. 슈퍼홍미 급여에 따른 폐경유도 흰 쥐의 항산화 대사 효소 활성화 측정

	대조군	슈퍼홍미	발아슈퍼홍미
<i>Hepatic enzymes (nmol NADPH /min/mg protein)</i>			
SOD	11.28 ± 0.17 ^a	14.25 ± 0.06 ^b	16.25 ± 0.06 ^c
GSH-Px	3.25 ± 0.12 ^a	3.33 ± 0.08 ^a	3.68 ± 0.01 ^{b*}
CAT	0.11 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.03 ^{b*}	0.39 ± 0.01 ^{c*}
GR	1.14 ± 0.01 ^a	2.51 ± 0.02 ^b	4.58 ± 0.04 ^{c*}
PON	0.13 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.03 ^{b*}

Values are means ± SE (n =8). Means in the same row per parameter with different letters are significantly different at P < 0.05 by Tukey's range test. (*) on the germinated rice group indicates significant difference (P <0.05) by independent t-test between germinated and non-germinated samples.

3. 슈퍼홍미 추출물의 섭취에 의한 in vivo에서의 기능성 검증

(1) 슈퍼홍미추출물이 체중 및 식이효율에 미치는 영향

- 폐경기 이후 여성 건강 개선 효과를 확인하기 위하여 난소를 제거하여 폐경이 유도된 시험동물 모델에 대해서 제1세부과제에서 제공한 슈퍼홍미 추출물 (taxifolin 함량 2.3 mg/g)을 급여하며 효과를 확인하고자 하였음
- 10주령 Sprague dawley rat을 8주간 사육 하면서 물은 자유수로 제공을 하였으며, 식이는 AIN93M식이에 슈퍼홍미 추출물 농도를 각각 1g/kg, 5g/kg으로 제조 한 후 자유급식을 한 결과는 표 ??와 같음
- 8주 동안 각 군간의 식이 섭취는 유사하였으나, 체중 증가 변화는 비 난소절제군이 1.73g/day로 난소절제군에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었고, 난소절제 군 간에서는 고농도의 슈퍼홍미 추출물 섭취군이 2.40g/day로 일반식이군 3.62g/day에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내어 이에 따른 식이효율은 SHAM군이 가장 낮았으며, 그 다음으로는 OVX-HSH군, OVX-LSH군, OVX-AIN93군 순으로 유의적 차이를 나타냄을 확인하였음

표 32. Effects of Superhongmi extract on body weight gain and Feed intake

	SHAM	OVX-AIN93M	OVX-LSH	OVX-HSH
Initial weight (g)	225.33±1.20 ^a	228.00±1.00 ^a	224.67±3.71 ^a	227.67±1.86 ^a
Final weight (g)	322.07±2.36 ^a	430.69±4.89 ^c	377.53±3.13 ^b	361.81±4.02 ^b
Weight gain (g/day)	1.73±0.04 ^a	3.62±0.07 ^d	2.73±0.04 ^c	2.40±0.05 ^b
Feed intake (g/day)	21.76±0.15 ^a	21.30±0.15 ^a	21.86±0.15 ^a	21.41±0.14 ^a
FER	0.08±0.00 ^a	0.17±0.00 ^d	0.12±0.00 ^c	0.11±0.00 ^b

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

FER, Food Efficiency ratio = body weight/feed intake

(2) 슈퍼홍미 추출물 투여가 장기조직 및 지방무게에 미치는 영향

- 8주 사육 후 장기 무게를 측정한 결과는 표 16과 같이 나타났으며, 심장과 신장의 무게는 각 군간의 유의적 차이를 나타나지 않았지만, 간은 OVX-AIN93M군이 다른 군들에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었음
- 지방의 경우 신장지방은 OVX-AIN93M군이 높은 값을 나타내었으며 그 다음으로 OVX-LSH군, OVX-HSH군으로 측정되었고, 사타구니 지방의 무게는 난소절제군에 비해 비 난소절제군이 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며 난소절제군간에는 유의적 차이는 없었으나, AIN93M군이 슈퍼홍미 추출물 섭취군에 비해 높은 값을 나타내었음

표 33. Effects of Superhongmi extract on organ weight and adipotissue weight

	SHAM	OVX-AIN93M	OVX-LSH	OVX-HSH
<i>Organ weight (g)</i>				
Liver	10.01±0.46 ^b	7.80±0.29 ^a	10.21±0.11 ^b	10.48±0.20 ^b
Heart	1.04±0.04 ^a	1.08±0.04 ^a	1.11±0.02 ^a	1.06±0.04 ^a
Kidney	2.22±0.03 ^a	1.91±0.05 ^a	2.13±0.16 ^a	2.08±0.03 ^a
<i>White adipose tissue weight (g)</i>				
Perirenal	13.72±0.50 ^{ab}	21.04±2.45 ^c	19.41±1.62 ^{bc}	11.30±0.42 ^a
Inguinal	5.58±2.41 ^a	18.73±0.21 ^b	15.99±0.76 ^b	13.42±0.27 ^b

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

(3) 슈퍼홍미 추출물 투여가 혈중 지질 농도에 미치는 영향

- 슈퍼홍미 추출물 섭취가 혈중 지질농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 plasma에서 에스테르형과 비에스테르형 콜레스테롤의 총칭인 total cholesterol(TC)과 total glycerol(TG)을 측정하였으며 그 결과는 표 17과 같이 나타났음
- 난소절제군 중 일반식이 섭취군이 다른 군에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, TC에서는 높은 농도 슈퍼홍미군이, TG에서는 낮은 농도 슈퍼홍미군이 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며, 이에 따라 지단백중 콜레스테롤을 간과 말초조직으로 운반하는 LDL-cholesterol을 측정한 결과, OVX군 중 일반식이군이 가장 높은 값을 나타내었음

내었고 그 다음으로 LSH군, HSH군 순으로 나타났음

- 말초 혈관에 있는 콜레스테롤을 간으로 운반 처리하는 HDL-cholesterol은 LDL-cholesterol과 반대로 난소절제군 중 AIN93M군이 유의적으로 낮았으며 HSH군이 유의적으로 높은 값을 나타내었고, 이러한 결과에 따라 동맥경화 지수인 AI는 HSH군, LSH군, AIN93M군 순으로 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, 간 기능 지표 인자인 GOT, GPT도 AIN93M군이 유의적으로 가장 높은 값을 나타내어 슈퍼홍미 투여가 유의적인 효과를 보이는 것으로 관찰 되었음

표 34. Effects of Superhongmi extract on the plasma lipid profile in OVX rats

	SHAM	OVX-AIN93 M	OVX-LSH	OVX-HSH
TC(mg/dL)	153.16±0.18 ^a	180.31±0.41 ^d	171.26±1.04 ^c	156.98±1.00 ^b
TG(mg/dL)	83.38±4.09 ^a	214.32±4.88 ^d	129.16±0.68 ^b	187.13±3.55 ^c
HDL-C(mg/dL)	62.22±0.50 ^d	36.78±1.32 ^a	44.44±1.18 ^b	57.45±0.72 ^c
LDL-C(mg/dL)	60.31±0.56 ^a	107.47±1.27 ^d	92.56±1.26 ^c	68.13±0.76 ^b
HTR(%)	40.63±0.35 ^d	20.40±0.72 ^a	25.95±0.67 ^b	36.60±0.39 ^c
AI	1.46±0.02 ^a	3.92±0.18 ^c	2.86±0.10 ^b	1.73±0.03 ^a
GOT(karman/ml)	5.88±0.10 ^a	7.78±0.13 ^c	6.16±0.05 ^a	6.78±0.19 ^b
GPT(karman/ml)	2.87±0.06 ^a	4.65±0.03 ^d	3.22±0.06 ^b	3.76±0.11 ^c

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

TG, total glycerol; TC, total cholesterol;

HDL-cholesterol, high density lipoprotein cholesterol;

LDL-cholesterol, low density lipoprotein cholesterol = total cholesterol-HDL cholesterol-total cholesterol/5;

HTR(%) = (HDL-cholesterol/total cholesterol)×100;

AI(atherogenic index)=(total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol;

GOT, glutamic oxalate transaminase; GPT, glutamic pyruvate transaminase.

(4) 슈퍼홍미 추출물 투여가 간과 지방조직의 지질대사 활성도에 미치는 영향

- 체내 콜레스테롤 및 지방산 합성관련 효소인 FAS, ME의 실험 결과 간조직과 지방조직에서 OVX군에 비해 SHAM군이 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며 간조직의 FAS, ME에서는 OVX군 중 높은 농도의 슈퍼홍미 추출물이 낮은 값을 나타내고 있으며, 지방조직에서의 ME는 OVX군 중 낮은 농도의 슈퍼홍미 추출물군이 유의적으로 낮은 값을 나타내었음

- 지방산 산화관련 효소인 β -oxidation은 OVX군이 SHAM군에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며 슈퍼홍미 추출물간에는 낮은 농도가 높은 농도에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었음
- 이러한 결과로 보았을 때 슈퍼홍미 추출물을 섭취하였을 경우 지방산 합성은 저하되며, 지방산이 에너지로 전환되는 것이 증가되어 체내 지방량을 저하시키는데 긍정적인 효과를 나타낼 것으로 생각됨

표 35. Lipid-regulating enzyme and β -oxidation activities in OVX rats fed with normal diet and superhongmi extract diet

	SHAM	OVX-AIN93M	OVX-LSH	OVX-HSH
<i>Hepatic enzyme activity (nmol/min/mg protein)</i>				
FAS	1.35±0.03 ^a	9.60±0.49 ^c	9.60±0.07 ^c	7.12±0.04 ^b
ME	6.16±0.53 ^a	32.51±1.24 ^c	30.89±0.66 ^c	14.78±0.51 ^b
β -oxidation	2.43±0.19 ^c	0.69±0.11 ^a	1.30±0.08 ^b	0.72±0.04 ^a
<i>Adipocyte enzyme activity (μmol/min/mg protein)</i>				
FAS	5.75±0.66 ^a	16.99±0.66 ^c	10.49±0.15 ^b	9.08±0.22 ^b
ME	305.36±2.14 ^a	419.89±5.16 ^d	335.66±6.69 ^b	380.81±3.88 ^c
β -oxidation	22.95±1.36 ^c	0.10±0.00 ^a	1.68±0.08 ^a	11.64±1.11 ^b

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

(5) 혈장 Leptin, Adiponectin, TNF- α 농도 측정

- Leptin과 adiponectin은 지방세포에서 분비되는 단백질로 지방대사와 insulin 감수성 조절 등의 역할을 함으로써 비만관련 대사질환에 영향을 미치는 것으로, 이중 Leptin은 주로 피하지방에서 생성되는 것으로 지방량과 비례관계를 가지는 것으로 보고되어 있으며, 실험결과 OVX군 중 슈퍼홍미 추출물 급여군이 일반 식이 군에 비해 유의적으

로 낮은 값을 나타내었음

- Adiponectin은 insulin 감수성과 관련 있는 단백질로 슈퍼홍미 급여군 중 LSH군이 4.78ug/mL로 HSH군 5.06ug/mL에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며, 염증반응 촉진 인자인 TNF- α 실험결과 OVX군 중 LSH 군이 35.86ng/mL로 측정되어 유의적으로 낮은 값을 나타내었고, 그 다음으로 HSH군이 42.11ng/mL, AIN93M군이 53.17ng/mL 순으로 측정되었음

표 36. Plasma adipokine levels of OVX rats fed with normal diet and superhongmi extract diet

	Leptin(ng/ml)	Adiponectin(μ g/ml)	TNF- α (ng/ml)
SHAM	1.88 \pm 0.02 ^a	4.61 \pm 0.06 ^a	12.42 \pm 0.68 ^a
OVX-AIN93M	2.27 \pm 0.08 ^b	5.27 \pm 0.04 ^b	53.17 \pm 1.34 ^d
OVX-LSH	1.92 \pm 0.01 ^a	4.78 \pm 0.06 ^a	35.86 \pm 0.34 ^b
OVX-HSH	1.97 \pm 0.02 ^a	5.06 \pm 0.02 ^b	42.11 \pm 0.62 ^c

Values are means \pm SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

(6) 슈퍼홍미 추출물 투여가 혈장, 적혈구의 과산화지질 수준에 미치는 영향

- TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 는 활성산소로 인한 지방산화로 생성되는 과산화물이 분해될 때 생성되는 최종산물로 지방산화에 의한 활성산소 생성을 반영하는 대표적인 산화스트레스 표준물질으로서, 산화적 스트레스로 인하여 free radical이 체내에 축적 되고, 이로 인해 조직과 지질의 산화에 의해 발생하는 것으로써, 체내에 축적이 되면 다양한 질병뿐 아니라 노화를 야기하는 것으로 보고 되어 있음
- 실험결과 혈장과 적혈구 각각에서 OVX군이 SHAM군에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, OVX군 중 슈퍼홍미 추출물 섭취군이 일반식이 섭취군에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었고, 슈퍼홍미 추출물 간에는 유의적 차이는 나타나지 않았지만, LSH군이 HSH군 보다 혈장 TBARS에서는 0.2nmol/mL, 적혈구 TBARS에서는 0.93nmol/g Hb 높은 것으로 나타났음

표 37. Plasma and Erythrocyte TBARS levels in OVX rats fed with normal diet and superhongmi extract diet

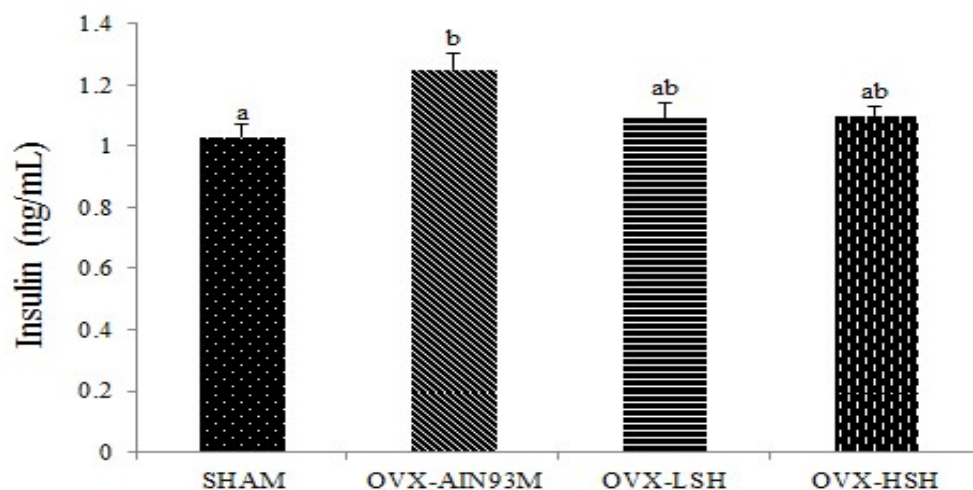
	Plasma TBARS (nmol/mL)	Erythrocyte TBARS (nmol/g Hb)
SHAM	11.76±0.59 ^a	9.43±0.21 ^a
OVX-AIN93M	20.43±0.81 ^c	18.29±0.40 ^c
OVX-LSH	18.15±0.41 ^b	12.22±0.23 ^b
OVX-HSH	17.95±0.66 ^b	11.29±0.36 ^b

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

(7) 슈퍼홍미 추출물 투여가 혈장 Insulin 농도에 미치는 영향

○ Insulin은 혈당을 조절하는 역할을 하는데 췌장 β-세포의 기능이 저하되면 insulin농도가 저하되어 당뇨 및 비만등이 유도된다. 실험결과 OVX군에서 LSH군은 1.09ng/mL, HSH군은 1.10ng/mL로 차이가 나타나지않았으나, AIN93M은 1.25ng/mL로 슈퍼홍미 추출물 섭취 군에 비해 높은 값을 나타낸 것을 확인하였음



Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

그림 34. Plasma Insulin in OVX rats with fed normal diet and Superhongmi extract diet

(8) 슈퍼홍미 추출물 투여가 간, 신장 조직의 당질대사 관련 효소에 미치는 영향

- GK는 췌장 β-세포에서 insulin분비를 증가시키는 역할을 하는 것으로 간, 신장 조직에서 OVX군 중 일반식이군과 낮은 농도의 슈퍼홍미섭취군 간에는 유의적 차이가 없었지만 저농도 슈퍼홍미 섭취군에 비해 고농도슈퍼홍미 섭취군은 약 1.76배 유의적으로 높은 값을 나타내었음
- 당신생경로에 관여하는 효소인 G6pase는 OVX군 중 슈퍼홍미군이 일반식이 군에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었고, 이 결과 슈퍼홍미가 갱년기 발생 중 혈당강하에 긍정적인 영향을 미칠것으로 사료 됨

표 38. Effects of glucose regulating enzyme activity in OVX rats fed with normal diet and superhongmi extract diet

	SHAM	OVX-AIN93M	OVX-LSH	OVX-HSH
<i>Hepatic Enzyme activity (nmol/min/mg protein)</i>				
G6pase	30.85±0.88 ^a	63.00±0.39 ^c	53.98±1.70 ^b	49.47±1.61 ^b
GK	19.28±0.12 ^c	1.43±0.05 ^a	2.20±0.20 ^a	3.89±0.42 ^b
<i>Kidney tissue enzyme activity (μmol/min/mg protein)</i>				
G6pase	40.02±1.47 ^a	86.56±2.23 ^c	67.01±2.58 ^b	66.61±1.46 ^b
GK	8.55±0.12 ^d	2.25±0.09 ^a	5.44±0.17 ^b	6.38±0.23 ^c

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

(9) 슈퍼홍미 추출물 투여가 항산화 효소 활성도에 미치는 영향

- ROS는 생체가 산화적 스트레스를 받으면 생성이 되며, 이가 축적이 되면 불포화지방산, 지질 등이 파괴되어 산화적 반응을 일으키게 되며, 이로 인해 심혈관계 질환 및 당뇨병 등이 유발하는 것으로 알려져 있음

- 항산화 효소인 SOD(Superoxide dismutase), CAT (Catalase), GPX (Glutathione peroxidase), GR(Glutathione Reductase), PON(Paraoxonase)이 free radical, H2O2 등을 제거함으로써 지질과산화물이 다른 조직에 손상 주는 것을 막아주는 역할을 하고 있어 이들 효소의 활성 증가는 인체 건강 개선이 유익한 역할을 하는 것으로 추정되고 있음
- 실험결과, 간조직에서의 GPx는 OVX-AIN93군에 비해 OVX-HSH군은 1.6배, OVX-LSH군은 약 1.47배 높은 값을 나타내었으며, GR은 난소 절제 군간에 비교시 AIN93군은 6.60nmol/min/mg protein, LSH군과 HSH군은 각각 9.36nmol/min/mg protein, 7.89nmol/min/mg protein로 일반식이군에 비해 슈퍼홍미 추출물 섭취군이 높은 값을 나타내었고, PON은 AIN93군에 비해 슈퍼홍미 저농도, 고농도 섭취군이 약 6.5배, 8.5배 높은 값을 나타내었다.

표 39. Effects of antioxidant enzyme activity in OVX rats fed with normal diet and superhongmi extract diet

	SHAM	OVX-AIN93M	OVX-LSH	OVX-HSH
<i>Hepatic enzymes(nmol/min/mg protein)</i>				
GPx	2.39±0.13 ^b	1.45±0.03 ^a	2.13±0.08 ^b	2.32±0.02 ^b
CAT	2.12±0.08 ^b	1.48±0.07 ^a	1.88±0.10 ^{ab}	1.48±0.22 ^a
GR	11.25±0.50 ^c	6.60±0.25 ^a	9.36±0.30 ^b	7.89±0.27 ^{ab}
PON	0.23±0.01 ^c	0.02±0.00 ^a	0.13±0.02 ^b	0.17±0.01 ^b
<i>Kidney tissue enzyme activity (μmol/min/mg protein)</i>				
GPx	2.03±0.09 ^c	1.55±0.12 ^a	1.66±0.05 ^{ab}	1.76±0.06 ^{bc}
CAT	1.32±0.10 ^b	0.82±0.01 ^a	0.82±0.02 ^a	0.86±0.01 ^a
GR	21.45±0.63 ^b	16.14±0.15 ^a	16.20±0.27 ^{ab}	17.66±0.16 ^{ab}

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

(12) 슈퍼홍미 투여가 혈장의 골밀도 인자에 미치는 영향

- 골흡수표지자인 NTX, CTX는 농도가 증가될수록 고관절 골절 위험이 증가한다고 알려져 있으며, 조골세포에서 생성되어 분비되는 Osteocalcin은 골 흡수, 재형성에 관여를 하는 지표로서 활용되고 있음
- 슈퍼홍미를 난소 절제 한 시험동물에 투여 한 실험결과 골 흡수, 재형성에 관여하는 Osteocalcin의 농도는 난소절제군 간에 유의적 차이는 나타나지 않았지만, CTX, NTX 각각의 실험에서 고농도 홍미추출물 섭취군은 AIN93군에 비해 약 2배, 5배 낮은 값을 나타낸 것을 확인할 수 있었고, 저농도 홍미 추출물 섭취군의 NTX는 AIN93군에 비해 낮았지만 유의적 차이는 없었던 반면 CTX의 실험결과는 AIN93군에 비해 LSH군이 약 2.2배 낮은 값을 나타내었음
- 여성호르몬인 17-β-estradiol은 갱년기 여성에게서 낮은 농도를 나타내는데 이에 따라 골밀도에도 영향을 미치는 호르몬이다. 실험결과 난소절제군에서 고농도의 슈퍼홍미군이 높은 값을 나타낸 것을 확인하였으며, 부갑상샘에서 분비되는 호르몬인 Parathormone은 84개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 혈중 Ca 농도를 증가시키는 역할을 한다. 실험결과 슈퍼홍미 추출물 섭취 군이 저농도 섭취군이 25.94pg/mL, 고농도섭취군이 25.82pg/mL로 AIN93군 값인 24.94pg/mL에 비해 높은 값을 나타내었지만, 유의적 차이는 확인되지 않았음

표 40. Effect of plasma bone mineral density in OVX rats fed with normal diet and superhongmi extract diet

	SHAM	OVX-AIN93	OVX-LSH	OVX-HSH
CTX-1(ug/mL)	1.53±0.11 ^a	5.66±0.24 ^b	2.54±0.15 ^c	1.67±0.17 ^a
NTX(nmol/L)	100.33±3.33 ^a	247.00±10.0 ₀ ^b	230.33±8.82 ^b	127.00±5.77 ^a
Osteocalcin(ng/mL)	11.59±0.90 ^b	6.48±0.02 ^a	6.97±0.39 ^a	6.12±0.75 ^a
17-β-estradiol(ng/mL)	2.62±0.09 ^c	1.81±0.04 ^a	2.30±0.03 ^b	2.48±0.01 ^{bc}
Parathormone(pg/mL)	29.83±0.50 ^b	24.94±0.44 ^a	25.94±0.81 ^a	25.82±0.19 ^a

Values are means±SE (n=10). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

SHAM, Sham operated + AIN93M; OVX-AIN93M, Ovariectomized + AIN93M; OVX-LSH, Ovariectomized + AIN93M+Low dose superhongmi; OVX-HSH, Ovariectomized + AIN93M + High dose superhongmi.

- 이상의 결과를 종합 할 때 여성의 경우 폐경으로 인한 에스트로겐 저하는 체내 에너지 저장율의 증가가 비만의 원인이 될 수 있는데 특히 40~60대 여성에서 고지혈증이 발생할 위험이 높은 이유는 폐경기 에스트로겐 호르몬 감소와 연관이 깊으며 에스트로겐은 콜레스테롤을 낮춰 혈관을 보호하는 역할을 할 수 있음
- 국민건강보험공단의 분석자료에 따르면 고지혈증환자를 연령대별로 분석한 결과에 따르면 60대가 가장 많았고(9702명) 뒤이어 70대(7450명), 50대(7175명) 순으로 나타났으며, 분석결과를 살펴보면 남성환자는 40대 3702명에서 50대 5095명으로 1393명(1.4배) 늘어난 데 비해 여성환자는 40대 2596명에서 50대 9277명으로 6681명(3.6배) 증가, 여성이 40대에서 50대로 이행되는 시기 고지혈증환자가 가장 많은 것으로 나타났음
- 또한 여성호르몬이 감소됨에 따라 대사기능이 저하되는데, 선행연구로 진행되었던 폐경유도 동물 실험에 의해 지질, 당질, 항산화 그리고 골대사 대사 개선 효과가 확인된 슈퍼홍미 추출물 소재에 대해 그 유효성을 재확인 할 수 있을 것으로 보이며, 폐경기 여성의 건강 개선효과를 추가적으로 차년도 인체적용 시험을 통하여 확인할 수 있을 것으로 판단됨

4. 인체적용시험을 통한 슈퍼홍미 추출분말의 기능성 검증

- 본 연구를 통하여 제 1세부과제 및 제3협동과제를 통하여 지표성분의 규명 및 표준화가 완료 된 소재를 통하여 세포시험 및 동물시험에서 폐경기 이후 나타날 수 있는 여성 호르몬 감소로 인한 부정적인 반응을 감소시키고 건강을 개선할 수 있음에 대한 기능성 근거 자료를 확보하였으며, 3차년도에는 표준화 된 제조공정을 통해 최종 확정된 원료로 갱년기 이후 여성 건강 개선을 위한 인체적용시험을 실시할 예정임
- 이를 위하여 경북대학교에 설치 된 생명윤리심의위원회를 통하여 인체적용시험에 대한 생명윤리심의를 통해 인체적용시험을 실시하였으며, 생명윤리심의위원회의 심의 결과 및 연구 계획서는 다음과 같음

생명윤리심의위원회 심의 결과통지서

접수번호: 2017-51-1

연구과제명	국 문	갱년기 이후 여성건강 개선용 기능성 쌀 품종개발 및 건강기능성식품 소재화		
	영 문	Development of functional food ingredients using improved rice for		
연구책임자	성명	직위	소속	
	강미영	교수	생활과학대학식품영양학과	
심사결과	승인			

심사일자	2017년05월28일		
승인일자	2017년05월28일	승인번호	KNU 2017-0051
지속심의일정 (지속심의 보고서 일정)	해당없음		
종료보고서 일정			
심사결과 내용			

상기 연구계획을 본 위원회의 규정에 따라 심의하여 결과를 통보합니다.

2017년06월07일

경북대학교 생명윤리심의위원회 위원장 (인)

그림 35. 경북대학교 생명윤리심의위원회 IRB 승인서

2. 연구방법

2-1) 연구방법개요

연구목적	슈퍼홍미의 주정 추출물 소재가 체내 지질, 당질 및 항산화 및 골 대사에 미치는 영향을 알아보고자 함
연구배경	<ul style="list-style-type: none"> - 슈퍼홍미는 갈색을 띠고 있으며, 기능성 증진을 위한 목적으로 육종된 신품종임 - 슈퍼홍미 추출물은 <i>in vitro</i> 실험에서 에스트로겐 유사활성을 나타냄을 확인하였으며, 난소절제 된 시험동물에게 슈퍼홍미 추출물을 급여한 <i>in vivo</i> 실험에서는 당질, 지질, 항산화 관련 바이오마커 실험에서 갱년기유도 흰쥐의 대사 개선에 긍정적인 효과가 있는 것을 확인하였음 - 상기의 선행 연구 결과들을 종합할 때 기능성 성분이 강화되도록 품종 개량 된 슈퍼홍미 추출물은 갱년기 이후 여성의 갱년기 증상에 대한 완화 효과를 가질 수 있는 것으로 추정될 수 있음 - 따라서, 본 연구개발에서는 품종개량 신품종인 슈퍼홍미를 기반으로 하여 여성 갱년기 개선 식품 소재 및 제품을 개발하고자 함
실시기간	IRB 승인 후 2017년 09월 04일 - 2017년 11월 30일
연구 내용 (연구 방법 개요)	<p>본 연구에서는 45세 이상 60세 미만의 여성 중 자궁절제술 및 폐경으로 인해 1년 이상 무월경중인 갱년기 여성 대상으로 슈퍼홍미 주정 추출물 소재를 12주간 시행되는 이중맹검법, 무작위배정, 위약대조 연구임. 모든 대상자들이 복용 완료 후 혈장의 당질, 지질, 항산화 및 골 대사 관련 바이오마커를 분석하여, 개별인정형 건강기능식품 원료성분 인정을 획득하기 위한 과학적 기초자료를 도출하고자 함</p>

2-2) 피험자 모집방법

피험자 모집방법	포스터 광고를 통한 모집
피험자의 동의 취득 절차	피험자들에게 연구 및 주정추출물 소재에 관한 정보를 충분히 제공 한 후 서명 등이 포함된 동의서를 작성하여 취득함

2-3) 피험자의 선정기준 및 제외기준

피험자 선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 45세 이상 80세 미만의 여성 중 자궁절제술 및 폐경으로 인해 1년 이상 무월경중인 갱년기 여성 2. 인체 시험 동의서에 서명 동의한 참가자 중 심각한 질병이 없는 여성
피험자 제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 6개월 전에 호르몬 대체 요법을 시행하였거나, 시행중인 피험자. 2. 뇌졸중, 심질환인 심부전, 심근경색, 협심증이 있는 피험자. 3. 조절되지 않는 고혈압 피험자. 4. 약성중양, 급성협각능내장 등 병력이 있는 피험자. 5. 신기능 장애 또는 간 기능 장애가 있는 피험자 6. 최근 3개월 이내 스테로이드제나, 갑상선 호르몬 또는 흡수, 대사 배설에 영향을 주는 약물 등과 같이 체중에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있는 피험자. 7. 본 시험의 주정 추출물 이외에 시험에 영향을 줄 수 있는 항산화제나 타 건강 기능성 식품을 계속 섭취하는 피험자. 8. 저복 회식 등으로 음주를 자주 해야 하는 피험자. 9. 개인적인 일정으로 인해 연구 일정을 따르기 어려운 피험자.

2-4) 목표 피험자의 수 및 산출근거

피험자 수	30						
피험자 수 산정근거 및 통계방법 (실험결과에 기초한 N수 계산)	산출근거 : 두 군간 평행설계 - 차이검정 (가) 차이검정 : 시험군과 대조군에서 건강기능식품의 효과가 차이가 있는지를 보기 위한 검정으로 u_t 를 시험군에서의 1차 기능성 평가변수의 평균값, u_c 를 대조군에서의 1차 기능성 평가변수의 평균값이라 할 때 차이 검정에 대한 귀무가설 H_0 과 대립가설 H_1 은 다음과 같음 $H_0 : u_t = u_c \text{ vs. } H_1 : u_t \neq u_c$ (나) 피험자수 산정식 $N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}) \times S^2 \times (1 + 1/K)}{(U_t - U_c)^2}$ N = 피험자 수 $Z_{\alpha/2}$ = 유의수준으로 제 1종 오류, 대개 α 값은 0.05 (5%)를 사용한다. α 값을 적게 할수록 필요한 sample 수는 증가함. Z_{β} = 검정력을 나타내는 것으로써 제 2종 오류를 1- β 이하로 유지함, 대개 0.8 (80%)를 사용함 S^2 = 표준오차 K = 시험군/대조군의 할당비, 대개 비율은 1임. u_t = 시험군의 평균값 u_c = 대조군의 평균값 $S^2 = \frac{(d1 - D)^2 + (d2 - D)^2}{n - 1}$ (다) 예비실험 결과 - 슈퍼홍미 미강 추출물 소재를 이용한 난소 질제 Sprague-Dawley(SD) rat의 대사 증후군 검정연구(2017) <div style="text-align: right;">(mean \pm SE)</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">plasma TBARS (mmol/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Control</td> <td style="text-align: center;">20.43 \pm 0.81 (n=10)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Test</td> <td style="text-align: center;">17.10 \pm 0.66 (n=10)</td> </tr> </tbody> </table>		plasma TBARS (mmol/L)	Control	20.43 \pm 0.81 (n=10)	Test	17.10 \pm 0.66 (n=10)
		plasma TBARS (mmol/L)					
	Control	20.43 \pm 0.81 (n=10)					
	Test	17.10 \pm 0.66 (n=10)					
	피험자 수 (N)를 구하기 위해 위에 제시된 예비 실험 결과를 수식에 대입 $N = 12.52$						
	즉 본 연구, 슈퍼홍미 주정 추출물소재의 대사관련 증후군 개선 평가에서 유의한 결과를 얻기 위해 필요한 최소 N 수는 군당 13명 임.						

2-5) 연구 디자인(해당되는 경우 ○ 표시)

비교군 설정 (해당되는 경우)	○
무작위 배정 (해당되는 경우)	○
눈가림법 (해당되는 경우)	○

2-6) 인체시험 시험물질 투여 방법 (해당되는 경우)

시험물질 투여량	0.7g/day
투여방법	캡슐형태
투여기간	12주
투여기간 등 설정 근거	<p>- 인체시험 1일 복용량 산정근거 :슈퍼홍미 미강 추출물 소재를 이용한 난소 절제 Sprague-Dawley(SD) rat의 대사 증후군 검증연구결과에 준하여 설정</p> <p>① SD-rat의 평균 체중은 (initial weight + final weight)/2 로 산출함 - 슈퍼홍미 섭취군 체중 : (227.67g + 368.95g)/2 = 298.31g</p> <p>② 식이 섭취는 21.355g/day, 이 중 슈퍼홍미 추출물은 0.5% 함유 - 0.107g/day</p> <p>③ 위의 결과에 따라 SD-rats의 슈퍼 홍미 추출물 섭취는 0.11g/298.31g 섭취하였으며, 이것을 체중 60kg 인 사람을 기준으로 환산 할 경우 - 슈퍼 홍미 추출물 → 22.12g/60kg</p> <p>④ 슈퍼자미 미강은 각각 22.39g 에 안전계수 1/30 적용 → 약 0.7g 으로 환산됨. <참고: 순수물질(의약품)일 경우 22.39g 에 안전계수 1/100 적용 → 0.2g/day.></p> <p>⑤ 따라서, 슈퍼 홍미 주정 추출물의 인체시험을 위한 인체의 최대1일 복용량을 0.7g 으로 정함.</p>

2-8) 예측 부작용 및 사용상의 주의사항

예측 부작용	미강은 일상적으로 섭취하는 쌀 소재로, 본 실험을 할 경우 하루 식사 동안 섭취하는 쌀의 양에 비해 미미하므로 무독성이라 사료됨
주의사항	- 이상반응 발생 시 즉시 연구책임자 및 담당자에게 연락하여 주시고 연구책임자의 지시에 따라 주시기 바랍니다. 추가로 검사를 더 받을 필요가 있는 경우 검사를 받아야 합니다. - 검사일정 및 시험제품 섭취 일을 준수하여 주시기 바랍니다.

2-9) 관찰항목, 관찰검사 방법 및 임상 바이오마커 검사항목(해당되는 경우)

항목	<ol style="list-style-type: none"> 스크리닝 시 신장, 체중, BMI지수, waist/hip ratio, 나이 및 설문조사, 혈압 등 관찰 스크리닝 후 본 연구 시작시 및 총미 주정 추출물 소재 섭취 종료 후 공복혈당 검사 및 채혈을 통한 지질대사(TG, TC, HDL, LDL, leptin, adiponectin), 당질대사(insulin, glucagon), 항산화 대사 관련효소(SOD, TBARS, catalase, GPx), 골대사 관련효소(osteocalcin, ALP activity, estradiol)을 측정하여 관찰함
검사방법	<ol style="list-style-type: none"> 지질대사 관련 바이오마커 측정 <ul style="list-style-type: none"> 혈청 중 TG, TC, HDL, leptin, adiponectin 검사는 각각의 Human kit를 사용하여 ELISA reader로 측정함 LDL cholesterol 측정은 Friedewald(1972)의 공식을 이용하여 계산함 $[LDL-C] = [TC] - [TG/5] - [HDL-C]$ 당질대사 관련 바이오마커 측정 <ul style="list-style-type: none"> 혈청 중 insulin, glucagon 검사는 각각의 Human kit를 사용하여 ELISA reader로 측정함 항산화 대사 관련 바이오마커 측정 <ul style="list-style-type: none"> Superoxide dismutase (SOD): 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund의 방법(1974)으로 측정함. 효소활성 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는 단백질의 양으로 정함 Catalase (CAT): Abei (1974)의 방법을 이용하여, H₂O₂의 흡광도 변화와 H₂O₂의 몰흡광계수로 H₂O₂의 농도를 구한 다음 감소된 H₂O₂를 nmol/min/mg protein으로 계산하여 그 효소활성도를 측정함 Glutathione peroxidase (GSH-Px): Paglia와 Valentine의 방법(1967)으로 산화형 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH에 의하여 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소하는 정도를 측정함. 효소활성 단위는 1분간 1 nmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타냄 지질과산화물 함량 측정 (TBARS 분석): 적혈구 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis 등 (1964)의 방법을 이용함. 혈장 및 간조직 분쇄물을 이용하여 TBA 반응산물의 양을 535 nm에서 흡광도를 측정함. MDA 표준용액은 tetramethoxypropane을 가수분해하여 조제하여 TBA-MDA chromopore 표

	<p>준곡선을 얻고, 이 곡선으로부터 TBA 반응물질의 양을 MDA equivalent로 산출함</p> <p>4. 골대사 관련 바이오마커 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> - osteocalcin, ALP activity, estradiol 검사는 각각의 Human kit를 사용하여 ELISA reader로 측정함
--	--

2-10) 통계분석 원칙 및 방법

<p>통계분석 방법</p>	<p>본 연구결과에 대한 통계적 분석은 SPSS package를 이용하여 student's t-test 분석을 하였으며, 모든 측정치는 mean ± SE로 나타냄. 검정시 유의 수준은 $p < 0.05$에서 검정함</p>
--------------------	---

(1) 피검자의 일반 특성

- 본 연구는 45세 이상, 60세 미만의 여성 중 폐경으로 인해 1년 이상 무월경증의 갱년기 여성을 대상으로 슈퍼홍미 주정 추출물을 소재로 하여 12주간 시행되는 이중맹검법, 무작위 배정, 위약 대조 연구로서 대조군 및 시험군은 각기 13명으로 총 26명을 대상으로 실시하였음

표 41. The average values of anthropometric measurements and changes after superhongmi intakes in subjects.

	Control ³⁾	SH ⁴⁾	P-value
<i>Initial</i>			
Age (years)	53.70±0.70	54.1±0.72	0.695
Height (cm)	160.19±1.10	158.55±0.69	0.227
Weight (kg)	59.47±1.59	60.55±1.74	0.652
BMI (kg/m ²) ¹⁾	22.98±0.57	23.56±0.79	0.561
WHR ²⁾	0.823±0.010	0.839±0.006	0.198
<i>Final</i>			
Age (years)	53.70±0.70	54.1±0.72	0.695
Height (cm)	160.19±1.10	158.55±0.69	0.227
Weight (kg)	59.43±1.65	60.52±1.76	0.656
BMI (kg/m ²)	23.04±0.61	23.32±0.74	0.772
WHR ²⁾	0.826±0.011	0.833±0.009	0.614

Values are means ± SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test.

Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) BMI: Body Mass Index

2) WHR: Waist Hip Ratio

3) Control: The menopausal women with dextrin intakes

4) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

- 무작위 배정을 통해 나누어진 피험자들의 신체적 특성을 분석하여 표 41에 나타내었고, 실험 전 대조군(Control group)과 슈퍼홍미군(Superhongmi group)의 나이, 신장, 체중, BMI 및 WHR에서 유의적 차이가 없었다. 또한 12주 후 대조군(Control group)은 플라시보 시료, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)은 슈퍼홍미 시료군을 섭취한 결과 나이, 신장, 체중, BMI 및 WHR에서 유의적으로 나타내지 않았다.

(2) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 콜레스테롤 및 지질 대사에 미치는 영향

- 갱년기에는 난소에서 난포의 고갈로 인해 에스트로겐의 분비가 감소하며, 에스트로겐은 우리 몸의 지질대사, 음식 섭취와 에너지 대사 등에 관여하는데 이 호르몬의 감소로 인해 혈청 지질농도가 증가하여 고콜레스테롤혈증 등의 관상동맥질환 등의 위험에 노출될 가능성이 높으며, 이에 따라 슈퍼홍미 추출물 투여 후 피검자의 지질대사에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 42와 같음

표 42. TG and TC activities in the serum of menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
TG ¹⁾ (mg/dl)	0week	141.98±1.81	141.58±2.50 ^b	0.899
	4weeks	142.64±1.75	140.09±2.30 ^b	0.393
	8weeks	141.36±1.84	139.92±2.30 ^b	0.634
	12weeks	143.86±1.01	130.79±2.11 ^a	0.000***
TC ²⁾ (mg/dl)	0week	190.55±1.16	188.71±2.88 ^b	0.568
	4weeks	189.37±1.26	187.20±3.25 ^{ab}	0.549
	8weeks	187.30±1.20	182.74±1.95 ^{ab}	0.070
	12weeks	189.79±0.88	176.97±2.49 ^a	0.000***

Values are means ± SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test.

Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) TG: Triglyceride

2) TC: Total Cholesterol

3) Control: The menopausal women with dextrin intakes

4) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

- 혈청 중성지질(TG, Triglyceride) 수준은 대조군(Control group)에서 0주차와 12주차 간 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0주차에 141.58±2.50 mg/dl에서 12주차에 130.79±2.11 mg/dl으로 유의하게 감소하였고, 또한 12주차에 대조군(Control group)이 143.86±1.01 mg/dl보다 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 130.79±2.11 mg/dl로 낮은 값을 나타내었으며 유의적 차이를 보여주었음

- 혈청 총 콜레스테롤(TC, Total Cholesterol) 수준은 대조군(Control group)에서 0주차와 12주차 간 유의적 차이가 없었으나, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0주차에 188.71±2.88 mg/dl에서 12주차에 176.97±2.49 mg/dl로 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며, 또한 12주차에 대조군(Control group)은 189.79±1.01 mg/dl, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)은 176.97±2.49 mg/dl로 대조군에 비해 유의적으로 감소된 결과를 보여주었음

(3) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 HDL 및 LDL에 미치는 영향

- 폐경과 지질대사 관계에 있어서 폐경이나 난소 절제 시 에스트로겐의 감소는 HDL-cholesterol (high density lipoprotein cholesterol) 및 apolipoprotein A-I 의 감소를 초래하고 LDL-cholesterol (low density lipoprotein cholesterol)은 증가하여 심혈관계질환의 발병률이 증가하는 것으로 보고되어 있으며 이에 따라 폐경기 이후 추출분말의 섭취가 LDL-C 및 HDL-C에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 43과 같음

표 43. Plasma HDL-C and LDL-C level in menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
HDL-C ¹⁾ (mg/dL)	0 weeks	45.22±1.46	44.16±2.14 ^a	0.689
	4 weeks	42.16±1.37	45.12±1.88 ^a	0.226
	8 weeks	43.34±1.52	48.02±1.40 ^{ab}	0.040*
	12 weeks	46.23±1.66	52.74±2.13 ^b	0.030*
LDL-C ²⁾ (mg/dL)	0 weeks	113.72±0.59	114.29±0.78 ^b	0.571
	4 weeks	111.76±0.79	112.98±0.38 ^b	0.194
	8 weeks	110.77±1.02	109.23±0.41 ^a	0.180
	12 weeks	110.61±0.79	107.92±0.90 ^a	0.042*

Values are means ± SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test.

Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) HDL-C: High Density Lipoprotein Cholesterol

2) LDL-C: Low Density Lipoprotein Cholesterol

3) Control : The menopausal women with dextrin intakes

4) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

- 본 실험 결과 혈장 HDL-C 측정에서 대조군(Control group)은 실험 시작 시점과 종료 시점 간 유의적 차이가 없었으나, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0주차에 44.16 ± 2.14 mg/dl이었고 12주차에 52.74 ± 2.13 mg/dl으로 유의적으로 증가한 결과를 보여주었다. 그리고 대조군(Control group)에 비해 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 8주차와 12주차에서 HDL 농도가 유의적으로 높았다. 한편, 혈장 LDL-C 측정에서 대조군(Control group)의 LDL-C의 변화가 유의적이지 않았으나, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0주차에 114.29 ± 0.78 mg/dl이었고 12주차에 107.92 ± 0.90 mg/dl로 유의하게 감소하였다. 그리고 대조군(Control group)에 비해 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 12주차에 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

(4) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 Apolipoprotein에 미치는 영향

- Apolipoprotein은 지질의 운반체로서 그 중 apolipoprotein A-1 (apoA1)은 동맥경화의 억제인자이고, apolipoprotein B (apoB)는 동맥경화 촉진인자로 동맥경화증과 유의한 상관성이 있다고 알려져 있으며, 특히 높은 수준의 ApoB의 농도는 관상동맥 질환의 주요한 인자중의 하나로 알려져 있으며, 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 Apolipoprotein에 미치는 영향은 표 44와 같음
- ApoA1에서 농도를 측정한 결과, 대조군(Control group)이 0 주차와 12 주차에서 유의적인 차이가 없었으나, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0 주차에 비해 12 주차에서 유의적 차이가 나타나지 않았지만 증가하는 추세를 보였다. 또한 대조군(Control group)에 비해 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이가 없었지만 0 주차에서 비슷한 수준을 나타내었다가 12 주차에서 높은 값으로 나타내었음
- ApoB에서 대조군(Control group)과 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0, 4, 8, 12 주차에 모두 유의적 차이를 나타내지 않았다. 또한 대조군(Control group)과 슈퍼홍미군(Superhongmi group)과의 비교 시에도 뚜렷한 유의적 차이는 보이지 않았음

표 44. Apo A1, Apo B100 level in menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
Apo A1 ¹⁾ (mg/dL)	0 weeks	121.35±9.26	121.71±7.67	0.976
	4 weeks	117.66±9.36	126.34±6.59	0.463
	8 weeks	117.80±7.26	130.09±7.14	0.247
	12 weeks	115.13±8.31	130.13±5.42	0.157
Apo B ²⁾ (mg/dL)	0 weeks	104.86±2.06	101.60±1.13	0.194
	4 weeks	102.34±2.29	100.79±0.96	0.548
	8 weeks	103.55±1.45	103.00±0.90	0.757
	12 weeks	99.12±1.65	103.03±1.73	0.124

Values are means ± SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test.

Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) Apo A1: Apolipoprotein A1

2) Apo B: Apolipoprotein B100

3) Control : The menopausal women with dextrin intakes

4) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

(5) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 지질 대사 호르몬에 미치는 영향

○지방산 산화 대사 경로에 관여하는 효소의 유전자인 acyl-CoA oxidase 1 (ACOX) 은 지방산(fatty acid) 합성을 감소시키고 혈중 TG 농도를 낮추어 지질이화 작용을 조절 함으로써 지방무게와 몸무게 감소를 유도하고 energy balance를 조절하는 역할을 하는데 슈퍼홍미 추출분말 섭취 후 ACOX1 alc PPAR에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 45와 같음

표 45. ACOX1, PPAR- α level in menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
ACOX1 ¹⁾ (ng/ml)	0week	5.74±0.39	5.86±0.55	0.861
	4weeks	5.65±0.49	6.18±0.57	0.487
	8weeks	5.35±0.35	6.17±0.45	0.175
	12weeks	4.94±0.32	7.68±0.65	0.002**
PPAR- α ²⁾ (ng/ml)	0week	6.80±0.46	6.93±0.46	0.839
	4weeks	5.89±0.41	7.00±0.49	0.107
	8weeks	5.96±0.31	7.13±0.53	0.084
	12weeks	6.01±0.43	7.09±0.60	0.169

Values are means \pm SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's Range Test.

Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at $p < 0.05$ by independent sample t-test. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

1) ACOX1: Acyl-Coenzyme A Oxidase 1

2) PPAR- α : Peroxisome Proliferator Activated Receptor α

3) Control : The menopausal women with dextrin intakes

4) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

○ 본 연구에서 ACOX1 수준은 대조군(Control group)이 4, 8, 12 주차에 약간 감소하는 경향을 보였으며 유의적 차이가 없었으며, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 4, 8, 12 주차에 증가하는 경향을 보였으며, 대조군(Control group)에 비해 12 주차에 유의하게 높은 값으로 나타내었음

○ PPAR- α 는 핵수용체의 하나로서 활성화 시 지방산 수송단백질 및 long-chain acyl-CoA synthase 발현을 유도하여 미토콘드리아 내로의 지방산 흡수를 증가시키고, acyl-CoA oxidase 및 CPT-1의 발현을 증가시켜 지방산 산화를 증가시키는데 본 연구에서 PPAR- α 수준은 대조군(Control group)이 0 주차에 비해 4, 8, 12 주차에 약간 감소하는 경향을 보였으며 유의적 차이가 없었고, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이가 없었지만 일정한 수준이 유지된 것을 보였음

(6) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 당질 대사에 미치는 영향

- 혈장 glucose 수준은 대조군(Control group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이가 없었지만 약간 증가하는 경향을 보였다. 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 8 주차에 유의하게 높았지만 0, 4, 12 주차에 비슷한 수준이 유지되어 있는 것으로 관찰되었음
- 대조군(Control group)에 비해 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 4, 12 주차에 유의하게 낮았으며 두 그룹의 glucose 수준이 모두 정상범위에 속하였다. 또한, Insulin 수준은 대조군(Control group)과 슈퍼홍미군(Superhongmi) 모두 12주동안 군간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났으며, 공복 혈중 인슐린 농도 및 혈당을 이용한 HOMA IR은 인슐린 저항성을 평가하는 지표로 이용되는데 실험결과 대조군(Control group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 실험종료 시점에서 대조군에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보여주었음 (표 46)
- 비만유전자에서 생산되는 렙틴은 지방조직의 양과 비례하므로 비만자의 혈청 렙틴의 농도가 정상 체중자에 비하여 높게 나타나는 것이 특징인데, 연구에서 leptin 수준은 대조군(Control group)과 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 대조군(Control group)에 비해 슈퍼홍미군(Superhongmi group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이가 나타나지 않았음 (표 47)

表 46. Changes of Glucose, insulin activities and HOME-IR in the plasma of menopausal women, with superhongmi intakes.

		Control ²⁾	SH ³⁾	p-value
Glucose (mg/dl)	0week	83.91±2.80	82.78±2.61 ^{ab}	0.772
	4weeks	87.24±1.49	77.99±1.81 ^a	0.001**
	8weeks	91.56±2.80	86.97±1.59 ^b	0.181
	12weeks	90.63±2.40	81.32±1.66 ^{ab}	0.007**
Insulin (uIU/ml)	0week	13.29±0.71	14.30±1.30	0.510
	4weeks	13.82±0.85	12.27±0.88	0.225
	8weeks	12.09±0.67	13.16±0.91	0.362
	12weeks	13.23±1.30	11.47±0.38	0.226
HOMA-IR ¹⁾	0week	2.72±0.06	2.87±0.18 ^b	0.449
	4weeks	2.96±0.13	2.34±0.13 ^a	0.005**
	8weeks	2.70±0.07	2.80±0.15 ^{ab}	0.555
	12weeks	2.92±0.22	2.29±0.04 ^a	0.013*

Values are means ± SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12). Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance; HOMA-IR= (Glucose×Insulin) / 405 (Glucose in mass units mg/dl)

2) Control : The menopausal women with dextrin intakes

3) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

표 47. TNF- α , Leptin and Adiponectin level in menopausal women with superhongmi intakes.

	Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value	
TNF- α ¹⁾ (pg/ml)	0week	19.90 \pm 0.67	20.98 \pm 0.38 ^b	0.188
	4weeks	20.02 \pm 0.58	18.91 \pm 0.35 ^a	0.128
	8weeks	20.83 \pm 0.69	18.86 \pm 0.57 ^a	0.045*
	12weeks	20.92 \pm 0.55	18.50 \pm 0.32 ^a	0.003**
Leptin (ng/ml)	0week	14.47 \pm 0.25	14.51 \pm 0.23	0.914
	4weeks	14.76 \pm 0.18	14.42 \pm 0.16	0.178
	8weeks	14.80 \pm 0.41	14.33 \pm 0.31	0.380
	12weeks	14.89 \pm 0.22	14.34 \pm 0.14	0.052
Adiponectin (μ g/ml)	0week	7.74 \pm 0.18	7.95 \pm 0.49	0.698
	4weeks	7.49 \pm 0.36	7.55 \pm 0.34	0.899
	8weeks	7.34 \pm 0.24	7.29 \pm 0.42	0.918
	12weeks	6.84 \pm 0.17	7.91 \pm 0.42	0.034*

Values are means \pm SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's Range Test.. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at $p < 0.05$ by independent sample t-test. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

1) TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

2) Control : The menopausal women with dextrin intakes

3) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

- 폐경 전 비만 여성에서 감소된 혈중 아디포넥틴 농도는 대사증후군에 관련된 인자들과 밀접한 관련이 있었고, 내장지방의 증가에 따른 혈중 아디포넥틴의 감소는 인슐린저항성과 관련이 있다는 연구 결과가 있으며, 본 연구에서 adiponectin 수준은 대조군(Control group)이 0 주차에 비해 12 주차에 유의적 차이가 없었지만 0 주차에 7.74 \pm 0.18 μ g/ml이었고 12 주차에 6.84 \pm 0.17 μ g/ml으로 감소하는 추세를 보였으며, 12 주차에 대조군(Control group)에 비해 슈퍼홍미군(Superhongmi group)의 아디포넥틴 농도가 유의적으로 증가하여 대사증후군 예방에 긍정적인 효과가 있을 것으로 보인다

표 48. DPP4 and GC level in menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
DPP4 ¹⁾ (ng/ml)	0 weeks	20.34±0.87	20.46±0.82 ^b	0.920
	4 weeks	19.96±1.02	20.03±0.77 ^b	0.960
	8 weeks	19.25±1.19	18.54±0.85 ^{ab}	0.637
	12 weeks	19.90±1.54	17.00±0.64 ^a	0.115
GC ²⁾ (pg/ml)	0 weeks	55.31±0.66	55.62±0.30 ^b	0.677
	4 weeks	54.25±0.95	53.61±0.50 ^a	0.559
	8 weeks	56.69±0.85	53.40±0.50 ^a	0.007**
	12 weeks	56.97±1.00	52.29±0.61 ^a	0.002**

Values are means ± SE(n=12). Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) DPP4: dipeptidyl peptidase 4

2) GC: Glucagon

3) Control : the menopausal women with dextrin intakes

4) SH: the menopausal women with superhongmi intakes

- 폐경 후 여성에서는 폐경 전과 달리 인슐린저항성이 증가하여 대사증후군의 유병률이 증가하고 그 결과로 심혈관 질환이 증가하게 되는데, 이러한 변화는 폐경 후 여성이 폐경 전의 몸무게는 유지하면서 지방을 제외한 체중 (lean body mass)과 근육량은 감소하는 반면에 복부 지방이 증가하여 남성형 체형으로 변화하기 때문인 것으로 알려져 있음
- 식사 후 장에서 분비되는 인크레틴 호르몬을 빠르게 분해하는 효소인 DPP4를 억제 하면 고혈당에 의한 인슐린 분비를 증가시키고 글루카곤의 분비를 감소시켜 혈당을 강하시켜서 체내 혈당 조절을 할 수 있는데, 폐경 후 여성을 대상으로 DPP4 효소 활성화와 골밀도와의 연관성을 조사한 연구 결과를 보면, 혈액에서 DPP4 효소의 활성이 높은 군에서 골밀도가 낮은 것으로 보고되었는데 본 실험결과 8주 이후에 유의적으로 감소하여 슈퍼홍미 추출물의 섭취가 골밀도 저하에 어느 정도 억제 할 수 있을 것으로 추정됨
- 글루카곤(glucagon)은 인슐린과 반대 작용을 하는 단백질성 호르몬이다. 체내 혈당이 떨어지면 췌장의 알파세포(α cell)에서 분비되어 간에서 글리코젠(glycogen)을 포도당으로 분해시켜 혈당을 유지한다. 이 알파 세포들은 에스트로겐에 매우 감수성이 높아

글루카곤 분비를 조절 할 수 있는데 실험결과 슈퍼홍미 그룹에서의 글루카곤 분비가 감소된 것으로 보아 에스트로겐 대체요법으로서의 효능을 확인하였고 나아가 심혈관 위험은 높이지 않으면서 2형 당뇨병 발병 위험도 줄일 수 있는데 도움이 될 것으로 추정 됨

(7) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 간독성에 미치는 영향

○간 손상 지표로 사용되는 GOT, GPT는 심장이나 간에 대량 존재하는데 간 세포가 손상되면 혈중으로 분비되어 검출량이 증가된다. GOT, GPT 측정 결과에서 대조군 (Control group)이 0, 4, 8, 12 주차에 유의적 차이를 나타내지 않았다. 슈퍼홍미군 (Superhongmi group)이 GOT의 경우 0 주차에 12.19±0.43 karmen/ml에서 12 주차에 10.41±0.36 karmen/ml으로 유의하게 감소하였고 대조군(Control group)에 비해 12 주차에 유의적 차이를 나타내었다. GPT의 경우 0 주차에 10.24±0.21 karmen/ml에서 12 주차에 8.86±0.21 karmen/ml으로 유의하게 감소하였고 대조군(Control group)에 비해 12 주차에 유의적 차이를 나타내었음

표 48. GOT, GPT level in menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
GOT ¹⁾ (karmen/ml)	0week	12.18±0.29	12.19±0.43 ^b	0.985
	4weeks	12.20±0.34	11.51±0.54 ^{ab}	0.299
	8weeks	12.21±0.22	11.47±0.30 ^{ab}	0.068
	12weeks	12.20±0.15	10.41±0.36 ^a	0.001**
GPT ²⁾ (karmen/ml)	0week	10.14±0.27	10.24±0.21 ^b	0.769
	4weeks	10.16±0.19	10.25±0.21 ^b	0.754
	8weeks	10.20±0.44	9.97±0.33 ^b	0.682
	12weeks	10.17±0.37	8.86±0.21 ^a	0.010*

Values are means ± SE. Control group (n=12), Superhongmi group (n=12).

Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) GOT: Glutamic Oxaloacetic Transaminase

2) GPT: Glutamate Pyruvic Transaminase

3) Control: The menopausal women with dextrin intakes

4) SH: The menopausal women with superhongmi intakes

(8) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 항산화 활성에 미치는 영향

- 체내 항산화 방어 시스템은 산화적 손상으로부터 DNA의 변이, 지질의 산패 및 단백질 변성과 같은 다양한 활성 산소의 독성으로부터 보호하는 역할을 수행하고 있으며, 노화에 따라 체내 항산화 시스템의 약화는 다양한 성인성 질환 및 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 체내 항산화 시스템에 대한 슈퍼홍미 추출분말의 섭취 효과를 측정하는 결과는 표 50과 같음

표 50. Glutathione and TBARS¹⁾ activities in the plasma of menopausal women, with superhongmi intakes.

		Control ²⁾	SH ³⁾	p-value
Glutathione (nM)	0 weeks	320.14±1.78	321.62±1.86	0.576
	4 weeks	318.72±1.73	321.67±1.28	0.193
	8 weeks	318.50±1.89	323.00±2.24	0.147
	12 weeks	318.38±1.76	326.30±1.63	0.005**
TBARS ¹⁾ (μM)	0 weeks	2.16±0.08	2.38±0.10 ^b	0.121
	4 weeks	2.11±0.09	1.91±0.10 ^a	0.143
	8 weeks	2.24±0.10	1.88±0.13 ^a	0.038*
	12 weeks	2.37±0.09	1.83±0.13 ^a	0.004**

Values are means ± SE(n=12). Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

2) Control : the menopausal women with dextrin intakes

3) SH: the menopausal women with superhongmi intakes

- 본 연구에서 생체내 대표적 비효소성 항산화 시스템인 대조군 glutathione 수치는 1차 채혈 (0week)부터 4차 (12week)까지 군간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 슈퍼홍미 급여군의 glutathione 수치를 보면 4차 때는 1차보다 더 높은 수준이 제시되어 있었지만 4군 간에 유의적 차이가 없었다. 실험 시작 시점과 종료시점간의 유의적 차이는 없었으나, 종료시점에서의 대조군과 비교시 슈퍼홍미그룹이 유의적으로 증가한 것으로 나타났음

- 활성 산소에 의해 체내 지질은 과산화지질물로 전환되어 세포에 대한 산화적 손상을 유발하고 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 과산화지질에 대한 측정 지표로 사용되는 TBARS의 실험결과 대조군은 1차 채혈(0week)부터 4차(12week)까지 군간의 유의적 차이가 없었고, 슈퍼홍미군에서는 섭취기간이 길어질수록 체내 지질과산화물이 유의적으로 감소하여 슈퍼홍미의 섭취가 여성호르몬 감소로 증가하는 과산화 지질량을 감소하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 추정 됨.

표 51. AOPP , SOD1 level in the plasma of menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ³⁾	SH ⁴⁾	p-value
AOPP ¹⁾ (ng/ml)	0 weeks	28.56±3.58	28.67±4.69 ^b	0.986
	4 weeks	25.96±4.19	17.65±1.94 ^a	0.103
	8 weeks	25.44±4.21	16.53±1.59 ^a	0.079
	12 weeks	26.47±4.15	14.08±1.90 ^a	0.017*
SOD1 ²⁾ (ng/ml)	0 weeks	1.37±0.01	1.35±0.05	0.689
	4 weeks	1.38±0.03	1.39±0.03	0.840
	8 weeks	1.36±0.04	1.45±0.05	0.160
	12 weeks	1.40±0.02	1.49±0.02	0.010*

Values are means ± SE(n=12). Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) AOPP: advanced oxidation protein products

2) SOD1: superoxide dismutase1

3) Control : the menopausal women with dextrin intakes

4) SH: the menopausal women with superhongmi intakes

○산화매개성 단백질 손상지표인 고급산화단백질산물 (advanced oxidation protein products; AOPP)은 비만과 당뇨병 환자에게서 증가하기 때문에 산화스트레스와 염증으로 유발되어지는 조직 손상의 신뢰성 있는 마커로서 간주되어 지며, 비만에서는 당대사를 모니터링 하는데 도움이 되는 지표로 사용되어 왔음

- 슈퍼홍미 급여군에서는 섭취 기간에 따라 유의하게 감소하는 결과를 보여주었다, 생리학적으로 AOPP는 일생 동안 연령이 증가함에 따라 소량으로 증가하는데, 높아진 AOPP의 농도는 당뇨병에서 많이 관찰되어지며, 당뇨병에서 AOPP의 형성은 산화와 항산화 불균형과 염증에 의해 유도되므로 슈퍼홍미 섭취가 체내 단백질 산화를 억제시키는데 도움을 주는 것으로 판단됨

○ 폐경이후 여성에서의 에스트로겐 부족은 산화질소 생성효소 생성을 증가시키고 SOD 농도를 감소시키는데 산화질소의 농도가 증가하게되면 조골세포 활성을 저하시키고, 에스트로겐 부족에 기인하는 폐경 후 골밀도 감소는 활성산소의 생성이 조골세포와 파골세포의 생성과 활성화에 영향을 줄 수 있고, 골밀도 감소의 중요한 원인 중에 하나가 될 수 있는 것으로 보고되고 있어 SOD의 활성화에 대한 실험결과 12주차의 슈퍼홍미 급여군의 SOD수준은 유일하게 증가한 것으로 확인되었음

표 52. BDNF and serotonin activities in the plasma of menopausal women, with superhongmi intakes.

		Control ²⁾	SH ³⁾	p-value
BDNF ¹⁾ activities (pg/ml)	0week	646.97±5.08 ^{ab}	644.67±7.46	0.802
	4weeks	654.30±6.67 ^b	657.13±3.80	0.719
	8weeks	646.56±8.11 ^{ab}	664.61±4.41	0.071
	12weeks	626.60±4.53 ^a	667.64±9.08	0.001***
Serotonin activities (ng/ml)	0week	153.39±5.47	154.97±4.07	0.820
	4weeks	154.21±4.87	157.89±2.65	0.521
	8weeks	153.29±2.98	159.29±2.26	0.133
	12weeks	154.69±4.52	163.17±5.56	0.042*

Values are means ± SE(n=12). Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

2) Control : the menopausal women with dextrin intakes

3) SH: the menopausal women with superhongmi intakes

○ 신경영양인자인 Brain Derived Neurotrophic Factor(BDNF)는 중추신경계(Central Nervous System, CNS)에 다양한 영향을 미치는 신경친화성 단백질 인자로서 신경손상 개선에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 자연 발생 폐경이 더 늦을 경우 기억력 보존에 도움이 될 수 있는데 이는 기억 생성을 돕고 기억을 저장하는 BDNF를 코딩하는 유전자를 에스트로겐 수용체에 기인하여 조절하기 때문인 것으로 보고되고 있음

○ 이번 실험에서 대조군의 BDNF 수준은 12주 후 감소 경향을 보였으나, 실험군에서는 12주 동안의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 실험 종료 후의 대조군과 실험군 비교 시 대조군이 유의하게 감소한 것으로 나타나 향후 기억력에 도움이 될 것으로 판단됨

- Serotonin은 기분을 조절할 뿐만 아니라, 식욕, 수면, 근 수축과 관련한 많은 기능에 관여한다. 또한 사고기능과 관련하기도 하는데 기억력, 학습에 영향을 미치며, 행복감 및 만족감 등을 느끼는 데 필요한 것으로 잘 알려져 있다. 이번 실험에는 대조군 및 실험군의 serotonin 수치가 실험 시작부터 종료시점까지 각 군간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 그러나, 실험 종료시점에서의 실험군은 대조군보다 유의적으로 높은 결과를 보여주었음

(9) 슈퍼홍미 추출물 섭취 후 여성호르몬 농도에 미치는 영향

- 여성에서 성호르몬의 혈중 농도는 나이가 들에 따라 감소하게 되며, 이런 변화가 성기능에 영향을 미친다. 특히 성호르몬의 변화는 외부 생식기의 외형적 위축뿐 아니라 혈관, 신경, 정신심리학적 면에서도 영향을 미칠 수 있어 폐경후 나타나는 정신적, 외형적 변화를 유도하는 가장 큰 원인으로 볼 수 있으며, 이러한 여성호르몬의 변화에 대해서 슈퍼홍미 추출물의 섭취가 주는 영향을 관찰한 결과는 표 53과 같음

표 53. 17-Beta Estradiol, Progesterone level in menopausal women with superhongmi intakes.

		Control ¹⁾	SH ²⁾	p-value
17-Beta Astradiol (pg/ml)	0 weeks	20.22±0.96 ^b	19.21±1.68	0.611
	4 weeks	18.29±1.05 ^{ab}	19.65±2.55	0.632
	8 weeks	15.96±0.87 ^a	19.74±1.25	0.026*
	12 weeks	15.53±0.85 ^a	20.45±1.24	0.006**
Progesterone (ng/ml)	0 weeks	0.72±0.03 ^b	0.74±0.02	0.616
	4 weeks	0.66±0.03 ^{ab}	0.69±0.04	0.523
	8 weeks	0.59±0.02 ^a	0.68±0.03	0.013*
	12 weeks	0.57±0.04 ^a	0.70±0.03	0.019*

Values are means ± SE(n=12). Means in the same column with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's Range Test. Significant difference between the means of menopausal women with dextrin and superhongmi intakes at p<0.05 by independent sample t-test. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

1) Control : the menopausal women with dextrin intakes

2) SH: the menopausal women with superhongmi intakes

- 본 실험결과 섭취기간에 따라 대조군에서는 호르몬의 혈중 농도가 유의적으로 감소하는 반면에 슈퍼홍미 그룹에서는 12주 동안에 호르몬 변화가 없는 것으로 나타났다. 12주차에서는 대조군보다 슈퍼홍미군에서 호르몬 농도가 30% 증가한 한 것을 보여주었다. Progesterone은 체온상승, 혈당조절, 체지방감소, 이노작용에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이번 실험에서 control군의 Progesterone 수치는 실험 시작 시점으로 기간에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 슈퍼홍미 급여군에서는 12주동안 일정한 수준을 유지한 것으로 나타나 폐경으로 인해 급격하게 감소되는 호르몬 수치를 어느 정도 늦출 수 있는 효과가 있는 것으로 판단됨
- 상기의 결과를 종합할 때 슈퍼홍미 추출물의 섭취는 폐경으로 인하여 나타나는 여성의 신체적 변화에 대해서 슈퍼홍미 추출물이 효과적으로 방어함으로서 폐경 후 여성 건강 개선이 슈퍼홍미 추출물이 유익한 기능을 나타낼 수 있을 것으로 판단됨
- 상기의 유효성 평가 결과 및 제품 표준화 결과에 따라서, 슈퍼홍미 추출물에 대한 기능성 및 다음과 같이 산정하고자 함

- 원료명 : 슈퍼홍미 추출분말
- 슈퍼홍미추출분말로서 1일 적정 섭취량 : 0.7 g
- 지표성분 Taxifolin 으로서 1일 적정 섭취량 : 1.9 mg/day (1.52 mg ~ 2.28 mg)
- 기능성 : 폐경기 이후 여성의 건강 개선 (혈당 및 지질 대사 개선)

제 4장 슈퍼홍미 추출물의 개별인정형 등록을 위한 규격 설정

- 상기의 연구결과로부터 얻어진 슈퍼홍미 추출분말의 건강기능식품으로서의 규격 설정 원료로서 이용 가능한 슈퍼홍미 품종의 쌀을 추출/농축 및 분무건조를 통하여 생산되어지며, 슈퍼홍미추출분말의 규격은 FAO/WHO의 PTWI 및 MADL, KFDA 의 ‘건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정’ 내 [유해물질규격설정항목 기준]을 참고로 하여 설정하였음
- 원료로서 갖추어야 한다고 판단되는 일반적인 규격 4항목(성상, 이물, 지표성분 함량, 대장균군)을 기본적인 규격으로 하며, 건강기능식품의 건진성 및 안전성을 확보하기 위하여 중금속 중 총수은, 총비소, 카드뮴, 납을 추가하여 총 8가지 항목, 즉, 성상, 이물, C3G 함량, 총수은, 총비소, 카드뮴, 납, 대장균군을 슈퍼홍미추출분말의 규격으로 설정하고자 함

1. 슈퍼홍미 추출분말의 영양성분

- 앞선 연구의 조건으로 생산 된 슈퍼홍미 추출분말의 영양성분을 확인하기 위하여 공인 시험기관으로 위탁 분석을 실시한 결과는 다음과 같으며, 통상적인 미강 추출분말과 큰 차이는 없는 것으로 나타남

표 54. 슈퍼홍미 추출분말의 영양성분 구성

항목	결과
열량 (kCal / 100 g)	387.57
탄수화물 (%)	80.32
조단백질 (%)	8.81
조지방 (%)	3.45
나트륨 (g/100g)	134.96
포화지방산 (g/100g)	0.83
트랜스지방산 (g/100g)	0.01
콜레스테롤	불검출

제 D2018080988 호
분서확인

시험·검사성적서

제품명	홍미추출분말(슈퍼홍미)		제조일자 (유통기한)	2018-07-27
의뢰인	업체명	(주)이론	성명	황성주, 유양원
	주소	강원 춘천시 퇴계농공로 111(퇴계동)		
제조번호	80727	접수년월일	2018-08-10	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018080988	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-08-24
 시험·검사 책임자 : 이정구
 감사관련 총 책임자 : 김진희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
열량(Kcal/100g)	387.57Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	80.32%	한아름
조단백질(%)	8.81%	김경숙
조지방(%)	3.45%	이수경
나트륨(mg/100g)	47.36 mg/100g	김세미
당류(과당,포도당,자당,맥아당,유당)(mg/g)	134.96mg/g	박해민
포화지방산(g/100g)	0.83g/100g	장혜진
트랜스지방산(g/100g)	0.01g/100g	장혜진
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	김은지

- * 위 관정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- * 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 8월 24일

한국기능식품연구원장



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031) 220-1100 FAX 10628-0400-1



KHSI



2. 슈퍼홍미 추출분말의 안전성 근거

- 쌀은 아시아의 주식으로서, 수천년 전부터 사용해온 식품이다. 하지만, 미강을 식품원료로 이용하고자 하는 시도는 현미가 백미보다 건강에 유용한 기능성을 보유했다는 연구결과들이 발표되면서부터임
- 슈퍼홍미 추출분말은 품종 개량 된 벼 품종인 슈퍼홍미로부터 미강을 분리 한 후 추출 농축하여 제조 되는 것으로, 이러한 제조 공정에서 고형분의 함량 및 지표성분인 taxifolin 함량을 종합적으로 계산하여 보았을 때 슈퍼홍미 추출분말은 약 52배 농축된 것으로 농축배수 기준으로 슈퍼홍미추출분말의 1일 섭취량 0.7 g/day를 가정할 때 약 36 g의 슈퍼홍미를 섭취하는 것으로 환산할 수 있음
- 미국 국립보건원(National Institute of health)에서 운영하는 세계 최대 생명공학, 생명과학, 의학 저널 검색 사이트인 Pubmed 및 독성물질정보 사이트인Toxline, HSDB에서 해당 신청원료와 연관된 키워드인 ‘rice, taxifolin, Superhongmi’ 로 검색해 보았을 때, 부작용에 대한 보고는 없음
- 유색미를 주식으로 하여 섭취하는 경우에 자료는 없으나, 통상적으로 주식인 쌀의 1일 섭취는 150~300 g으로 제시되고 있어 슈퍼홍미 추출분말은 우리의 섭취 범위내에 있는 것으로 판단할 수 있어 별도의 안전성 시험을 필요로 하지 않는 것으로 판단됨
- 또한, 1일 0.7g을 12주간 섭취한 인체적용시험에서도 시험군에서 특이적인 부작용이나 간 기능 지표의 상승 등이 나타나지 않아 슈퍼홍미 추출분말 0.7 g/day의 섭취는 인체에 충분히 안전한 섭취량이라고 판단됨

3. 안전성 관련 규격의 설정

- 안전성 규격 중 잔류 동물용 의약품 및 잔류 용매는 그 사용 범주에 해당하지 않으므로 확인이 필요하지 않는 것으로 판단되었고, 잔류농약에 대한 안전성 검증을 위해 국내 [수입식품등 검사지침]에 따른 잔류농약 검사항목 중 정밀검사 대상 농약 49종을 시험을 공인분석을 통하여 실시한 결과 모두 불검출이 확인되어 농약에 대한 규격은 설정하지 아니하였음 (그림 ??)

제 D2017090316 호
문서화인

시험·검사성적서

제품명	홍미추출물	제조사 (유동기한)	
의뢰인	업체명	(주)이룸	실명
	주소	강원 춘천시 퇴계동공로 111.1층(퇴계동)	
제조번호		검수년월일	2017-09-05
검사의뢰목적	참고용	검수번호	D2017090316

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2017-09-12

시험·검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김철희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수
DDT(mg/kg)	불검출	김용수
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
BHC(mg/kg)	불검출	김용수
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김용수



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captan(mg/kg)	불검출	김용수
Quintozene(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수
Tolclofos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenarimol(mg/kg)	불검출	김용수
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김용수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Pirimicarb(mg/kg)	불검출	김용수
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수

* 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 * 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별도로 작성 가능합니다.

2017년 9월 12일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 무설 한국기능식품연구원 <http://www.kfsi.re.kr> 전화번호 (031-822-1100) 10628-0400-1



KFSI



○ 이외에 원료로서 갖추어야 한다고 판단되는 일반적인 규격 4항목(성상, 이물, 지표성분 함량, 대장균군)을 기본적인 규격으로 하며, 건강기능식품의 건전성 및 안전성을 확보하기 위하여 중금속 중 총수은, 총비소, 카드뮴, 납을 추가하여 총 8가지 항목, 즉, 성상, 이물, C3G 함량, 총수은, 총비소, 카드뮴, 납, 대장균군을 슈퍼홍미추출분말의 규격으로 설정하고자 하며,

가. 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말
고유의 색택과 형태 및 이미, 이취와 관련하여 제시하는 것으로서, '성상시험법'을 통하여 검증함

나. 이물 : 불검출
비위생적인 이물의 혼입을 관리하기 위하여 '건강기능식품공전 제5.일반시험법 6.이물시험법 1) 체분별법에 따라 검증함

다. 지표성분 (Taxifolin) 함량: 2.5 mg/g (표시량의 80~120%)
해당 원료의 지표성분을 나타내는 것으로 제품생산과정 중의 정량 오차, 시험적 오차, 제품원료 오차에 대하여 수준의 유의적 차이를 두어 지표성분 규격은 80~120%내에서 관리 할 수 있을 것으로 판단됨

라. 중금속 (공인분석 진행중)
현재 슈퍼홍미 추출분말 원료에 대한 중금속 (수은, 카드뮴, 납, 비소) 함량에 대해서는 공인분석 결과를 통해서 다음과 같이 결과를 도출함

(1) 총수은 : 0.5ppm

FAO/WHO의 합동 식품첨가물 전문가회의(JECFA) 에서 설정된 수은의 PTWI(Provisional Tolerable Weekly Intake; 주간잠정섭취허용량)은 0.005mg/kg bw 이며, 슈퍼홍미추출분말의 하루 섭취량인 0.7 g/day 을 기준으로 가정하면, 1일 최대 수은 허용량은 $[0.005(\text{mg/kg bw}) \cdot 60(\text{kg bw})] / [0.7(\text{g/day}) \cdot 7 \text{ day}]$ 의 수식에 적용하여, 6.1 ppm 이다. 즉, 설정된 규격 0.5ppm 에 비하여 13배의 안전계수가 적용된 수치이므로, 총수은 0.5ppm 의 규격 설정은 충분히 타당하다고 판단됨

또한, 해당 원료의 총수은 함량 규격은 0.5ppm 이하로서, 해당 원료의 1일 최대섭취량이 0.7 g 일 때, 원료로 인한 최대 수은 노출량은 0.35 ug/day 이며, 이는 건강기능식품 기능성 원료 인정 및 기준규격 인정에 관한 규정' 내 별표 2 의 [유해물질규격설정항목]에서 총수은에 대한 규격 2.1ug/day 이하 범위로서, 규격으로서 충분히 타당한 규격으로 판단됨

(5) 총비소 : 3 ppm 이하

WHO 에서 설정된 비소의 MADL(Maximum Allowable Daily Body Load) 즉, 1일 체내 최대 허용량은 0.05 mg/kg bw/day이다. 슈퍼홍미추출분말의 하루 최대 섭취량인 0.7 g/day

을 기준으로 가정하면, 1일 최대 비소 허용량은 $[0.05(\text{mg}/\text{kg bw}) 60(\text{kg bw})]/[0.7(\text{g}/\text{day})]$ 의 수식에 적용하여, 600 ppm이다. 즉, 설정된 규격 3 ppm 에 비해서 약 200배 (소수점 버림)이며, 정하고자 하는 규격은 하루 최대 섭취 가능한 함량 약 200 배의 안전계수가 적용된 수치이므로, 비소 3 ppm 의 규격 설정은 충분히 타당함 또한, 해당 원료의 비소 함량 규격은 3 ppm 이하로서, 해당 원료의 1일 최대섭취량이 0.7 g 일 때, 원료로 인한 최대 비소 노출량은 2.1 ug/day이다. 이는 건강기능식품 기능성 원료 인정 및 기준규격 인정에 관한 규정' 내 별표 2 의 [유해물질규격설정항목]에서 비소에 대한 규격 150 ug/day 의 0.07배로, 규격으로서 충분히 타당한 것으로 판단됨

(6) 납 : 0.2ppm

FAO/WHO 의 합동 식품첨가물 전문가회의(JECFA) 에서 설정된 납의 PTWI(Provisional Tolerable Weekly Intake; 주간잠정섭취허용량)은 0.025mg/kg bw 이다. 슈퍼홍미추출분말의 하루 최대 섭취량인 0.7 g/day을 기준으로 가정하면, 최대 납 섭취량은 $[0.025(\text{mg}/\text{kg bw}) 60(\text{kg bw})]/[0.7(\text{g}/\text{day}) 7 \text{ day}]$ 의 수식을 적용하여, 30.6 ppm 이다. 즉, 설정된 규격 0.2ppm 에 비하여 60 배의 안전계수가 적용된 수치이므로, 납 0.2ppm의 규격 설정은 충분히 타당함

또한, 해당 원료의 납 함량 규격은 0.2ppm 이하로서, 해당 원료의 1일 최대섭취량이 0.7 g일 때, 원료로 인한 납 노출량은 0.14 ug/day 이다. 이는 '건강기능식품 기능성 원료 인정 및 기준규격 인정에 관한 규정' 내 별표 2 의 [유해물질 규격설정항목]에서 납에 대한 규격 10.8 ug/일 이하이므로, 규격으로서 충분히 타당하다고 판단됨

(7) 카드뮴 : 0.2ppm

FAO/WHO 의 합동 식품첨가물 전문가회의(JECFA) 에서 설정된 카드뮴의 PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake; 주간잠정섭취허용량)은 0.007mg/kg bw 이다. 슈퍼홍미추출분말의 하루 최대 섭취량인 0.7 g/day을 기준으로 가정하면, 최대 카드뮴 섭취량은 $[0.007(\text{mg}/\text{kg bw}) 60(\text{kg bw})]/[2 (\text{g}/\text{day}) 7 \text{ day}]$ 의 수식을 적용하여, 85ppm 이다. 즉, 설정된 규격 0.2ppm 에 비하여 370배의 안전계수가 적용된 수치이므로, 카드뮴 0.2ppm의 규격 설정은 충분히 타당하다고 판단됨

또한, 해당 원료의 카드뮴 함량 규격은 0.2ppm 이하로서, 해당 원료의 1일 최대섭취량이 0.7 g일 때, 원료로 인한 카드뮴 노출량은 0.14 ug/day 이다. 이는 건강기능식품 기능성 원료 인정 및 기준규격 인정에 관한 규정' 내 별표 2 의 [유해물질규격설정항목]에서 카드뮴에 대한 규격 3.0 ug/일 이하이므로, 규격으로서 충분히 타당함

마. 대장균군 : 음성

대장균군은 사람, 동물의 장관내에 서식하고 있기 때문에, 원료 중에 대장균군이 존재한다는 것은 제조과정 중에 사람 또는 동물의 분변에 의해 오염의 가능성이 있는 것으로 판단하기 때문에 따라서, 식품 원료의 미생물 오염의 지표로서 대장균군을 설정하여 관리가 필요하며 음성으로 관리하고자 함

- 상기의 설정된 기준, 규격에 대한 시험 방법은 표 6 과 같이 식품공전 및 건강기능식품공전법을 기준으로 설정하였으며, 지표성분은 taxifolin 이 기존의 식품 분석법에 공인시험법이 등재되어 있지 않아 제3협동과제에서 확립한 taxifolin 시험법을 이용함
- 표 55에 따라 설정 된 방법에 따라 슈퍼홍미 추출물의 시험분석 결과는 표 56과 같이 모든 규격을 만족하는 것으로 나타났으며, 이에 따라 개별인정형 등록을 위한 슈퍼홍미 추출분말의 규격 설정을 완료하였음

표 55. 개별인정형 기능성 원료로 신청하고자 하는 원료의 규격항목 및 분석방법

No.	시험항목	시험방법
1	성상	식품공전 제 9. 일반시험법 19. 성상시험법
2	이물	건강기능식품공전 제 5. 일반시험법 6. 이물시험법 1) 체분별법
3	Taxifolin 함량	당 연구과제에서 자체 개발한 시험법 사용
4	총수은	건강기능식품공전 제 5. 일반시험법 5. 유해성금속시험법 3) (5)수은 금아말감법
5	총비소	건강기능식품공전 제 5. 일반시험법 5. 유해성금속시험법 2)(2)ICP 법
6	납	건강기능식품공전 제 5. 일반시험법 5. 유해성금속시험법 2)(2)ICP 법
7	카드뮴	건강기능식품공전 제 5. 일반시험법 5. 유해성금속시험법 2)(2)ICP 법
8	대장균군	건강기능식품공전 제 5. 일반시험법 7. 미생물시험법 5)대장균군

표 56. 슈퍼홍미 추출물의 설정 규격에 대한 시험 분석 결과

No.	시험항목	단위	설정규격	결과
1	성상	-	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말
2	이물	-	불검출	불검출
3	taxifolin 함량	mg/g	2.50	2.68
4	총수은	ppm	0.5 이하	0.0119 mg/kg
5	총비소	ppm	3.0 이하	0.9811 mg/kg
6	납	ppm	0.2 이하	0.0847 mg/kg
7	카드뮴	ppm	0.2 이하	0.0061 mg/kg
8	대장균군	음성	음성	음성

제 D2018080989 호
문서화인

시험·검사성적서

제품명	홍미추출분말(슈퍼홍미)	제조일자 (유통기한)	2018-07-27	
의뢰인	업체명	(주)이룸	성명	황성주, 유양원
	주소	강원 춘천시 화계농공로 111(외계동)		
제조번호	80727	접수년월일	2018-08-10	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018080989	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일: 2018-08-22

시험·검사 책임자: 이정구

검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0847mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0061mg/kg	류미진
중수은(mg/kg)	0.0119mg/kg	조용

* 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

* 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별도로 작성 가능합니다.

2018년 8월 22일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031-839-9111) 11628-0400-1



KHFI



제 D2018080991 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	홍미추출분말(슈퍼홍미)	제조일자 (유통기한)	2018-07-26	
의뢰인	업체명	(주)이람	성명	황성주, 유양원
	주소	강원 춘천시 퇴계농공로 111(퇴계동)		
제조번호	80726	접수년월일	2018-08-10	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018080991	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-08-24

시험·검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
총비소(mg/kg)	0.9811mg/kg	류미진

※ 위 관청은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

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

2018년 8월 24일

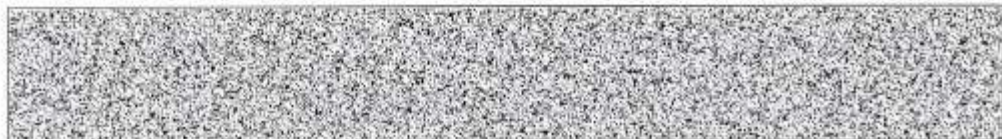
한국기능식품연구원장



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



KHSI



4. 슈퍼홍미 추출물의 안정성 검증

- 슈퍼홍미 추출분말의 유통/가공중 안정성을 확인하기 위하여 제3협동과제에 제공한 슈퍼홍미 추출 분말을 다양한 온도 조건에서 보관하며 지표성분인 taxifolin의 함량 및 소재의 성상을 관찰하여 소재의 예상되는 품질 유지기한을 산출하고자 하였으며, 품질 지표는 다음의 표 57과 같음
- 슈퍼홍미 추출분말의 품질 유지기한을 예상 24개월로 설정 시 가속시험에서 최소 12주 이상의 저장 기간이 필요하여 총 12주로 설정하였음

표 57. 품질안정성 검증을 위한 품질 지표 및 시험방법

품질지표		실험방법	품질한계
이 화 학	색도	LAB 색차계(Minolta, Japan)를 이용한 기기 측정	ΔE 4.0이하
	수분	적외선 수분측정기(Kett, Japan)을 이용한 기기 측정(105 ℃, 20분)	3% 이하
미생물	대장균군	식품공전 제1.3.8.2 대장균군	음성
지표 성분	Taxifolin	본 보고서에서 수립 된 Taxifolin 측정법	1,44 mg/g 이하

가) 보관 기간중 수분함량 관찰

- 슈퍼홍미 추출분말의 품질 안정성 확인을 위하여 보관기간 중 수분함량을 가속 조건하에서 측정한 결과는 표 13과 같이 나타났으며, 최초 1.6 ± 0.2 %에서 최종 보관 이후 최대 1.9 ± 0.1 %로 최대 0.3% 증가하였으나, 기준으로 설정한 3.0%에 미달하여 보관 기간중 수분 함량이 증대되지는 않는 것으로 추정되나, 포장 패키징에 따라서 수분 함량에는 차이를 나타낼 수 있으며 텍스트린이 높은 농도로 함유되어 있음을 감안할 때 방습용 포장재의 사용은 필수적일 것으로 판단됨

표 58. 슈퍼홍미 추출분말의 가속조건하에서 수분함량의 변화

Moisture content (%)							
Temperature/ Humidity	Storage period(weeks)						
	0	2	4	6	8	10	12
25 °C/ 75 %R.H.	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1
35 °C/ 90 %R.H.		1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
60 °C/ 60 %R.H.		1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.2

나) 보관 기간중 색도 관찰

○ 슈퍼홍미 추출물의 품질 안정성을 확인하기 위하여 상기에서 얻어진 슈퍼홍미 추출분말을 25°C, 35°C, 60°C에서 보관하며 12주간, 4주간 간격으로 색도를 측정하며 12주가 경과한 상태에서 결과는 표 59과 같음

표 59. 슈퍼홍미 추출분말의 가속조건하에서 색도함량의 변화

Color difference							
Temperature/ Humidity	Hunter value	Storage period(weeks)					
		2	4	6	8	10	12
25°C/ 75%R.H.	ΔE	0.63	0.84	0.88	0.91	0.94	0.6
		± 0.22	± 0.35	± 0.09	± 0.37	± 0.25	± 0.19
35°C/ 90%R.H.		1.22	1.34	1.77	2.21	2.44	2.67
		± 0.25	± 0.38	± 0.41	± 0.20	± 0.31	± 0.30
60°C/ 60%R.H.		0.96	1.42	2.11	2.52	2.95	3.07
		± 0.18	± 0.22	± 0.33	± 0.14	± 0.20	± 0.25

○ 슈퍼홍미 추출물의 보관온도에 따른 색도의 변화를 확인한 결과 온도가 상승하고, 보관시간이 경과할수록 색도 변화가 나타나고 있으나 일반적으로 가시적인 변화의 폭을 Hunter value (ΔE)가 4.0 이상일 경우로 하고 있어 색상의 변화가 크게 나타나지는 않는 것으로 판단됨

다) 보관 기간중 대장균군의 변화

- 슈퍼홍미 추출물의 품질 안정성을 확인하기 위하여 상기에서 얻어진 슈퍼홍미 추출분말을 25℃, 35℃, 60℃에서 보관하며 12주간, 4주간 간격으로 위생 지표인 대장균군을 분석한 결과는 표 60과 같음

표 60. 슈퍼홍미 추출분말의 가속조건하에서 대장균군의 변화

대장균군 (cfu/g)							
Temperature/ Humidity	Storage period(weeks)						
	0	2	4	6	8	10	12
25 °C/ 75 %R.H.	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
35 °C/ 90 %R.H.		음성	음성	음성	음성	음성	음성
60 °C/ 60 %R.H.		음성	음성	음성	음성	음성	음성

라) 보관 기간중 지표성분의 변화

- 슈퍼홍미 추출물의 품질 안정성을 확인하기 위하여 상기에서 얻어진 슈퍼홍미 추출분말을 25℃, 35℃, 60℃에서 보관하며 12주간, 4주간 간격으로 지표성분인 taxifolin의 함량을 측정하며 8주가 경과한 상태에서 결과는 표 61과 같음

표 61. 슈퍼홍미 추출분말의 가속조건하에서 지표성분의 변화

Taxifolin 함량 (mg/g)							
Temperature/ Humidity	Storage period(weeks)						
	0	2	4	6	8	10	12
25 °C/ 75 %R.H.	1.85 ± 0.20	1.89 ± 0.28	1.83 ± 0.15	1.91 ± 0.14	1.82 ± 0.08	1.85 ± 0.04	1.80 ± 0.04
35 °C/ 90 %R.H.		1.78 ± 0.10	1.80 ± 0.24	1.78 ± 0.20	1.84 ± 0.18	1.89 ± 0.05	1.79 ± 0.06
60 °C/ 60 %R.H.		1.80 ± 0.07	1.75 ± 0.28	1.60 ± 0.09	1.60 ± 0.21	1.58 ± 0.07	1.55 ± 0.07

- 슈퍼홍미 추출물의 보관 온도별 지표성분 taxifolin 함량을 측정한 결과는 35℃ 보관에서 8주간 비교적 안정한 것으로 나타났으나 60℃ 보관 시 저하하는 경향을 보이고 있으나 최저 규격인 1.44 mg/g에 비교할 때는 안정적인 값을 나타내는 것으로 확인할 수 있었음
- 상기와 같이 분석된 결과 각 항목별로 측정된 품질 유지기한은 수분함량, 색도 및 대장균 항목에서는 안정적인 것으로 나타났으나 지표성분인 taxifolin 함량에서 12주 경과시 최초값 대비 약 12%정도의 감소가 나타는 경향을 보이고 있음
- 상기와 같이 분석된 결과 각 항목별로 측정된 품질 유지기한은 지표성분인 taxifolin 함량에서 26.2개월로 가장 낮게 나타났으며, 설정된 품질유지기한에 안전계수 0.8를 산정하였을 때 최종 유통기한 18.8개월로 나타나 18개월 유통기한을 가질 수 있을 것으로 판단되었음

표. 62. 슈퍼홍미 추출분말의 유통기한 설정

Quality index	Quality limit	Shelf life (Months)
Color difference (ΔE)	4.0	35.2
수분 (%)	5.0	-
대장균군	0	-
Taxifolin 함량 (mg/kg)	1.44	26.2

제 5장 슈퍼홍미의 안정적 공급을 위한 재배기술 및 재배적지의 선정

1. 슈퍼홍미의 재배적지의 선정

가. 일장 및 온도반응에 따른 기능성분의 함량변화

○ 기상요인들 중에서 벼의 생육에 영향이 큰 것에는 온도와 일조시간 및 일사량 등이 있는데, 벼 생육단계별로 이들 요인에 대한 요구도에 차이가 있다. 영양생장기까지는 온도가 벼 생육에서 가장 영향력 있는 요인이지만 출수 후부터는 종실생산에 관련 하는 동화 전류 과정에는 온도와 더불어 일조시간에 크게 영향을 받는다. 기상 조건에 따른 작물의 기상생산력을 출수 전 10일부터 출수 후 30일 까지의 평균기온과 일조시간, m^2 당 영화 수를 대입하여 산출하는데, 2015년의 출수 전 10일(10DBH)부터 출수 후 30일(30DAH)까지의 평균기온과 일조시간은 평년 보다 모든 기간에 걸쳐 높았으나, 일조시간의 경우는 출수 전 10일(10DBH)의 경우는 평년보다 비슷했으나, 출수 후 30일(30DAH)의 경우에는 반대로 길었음

○] 2015년의 출수기(8월 중·하순)의 최고기온은 27.2~28.5℃, 최저기온은 20.1~20.3℃, 평균기온은 23.1~23.6℃, 일장은 13.57~13.2시간이었다. 2015년 출수기에는 고온을 경과하였으며, 2014년과 2015년의 경우 일장은 거의 고정적으로 변이를 보이지 않았다(표 63).

표 63. The day length of each growth stage in the year 2014 and 2015.

Years	1~7 DAT	8~39 DAT	36~54 DAT	16~30 DBH	5~15 DBH	1~4 DBH	1~19 DAH	20~30 DAH	31~40 DAH
2014	14.56	14.66	14.47	14.13	13.74	13.49	13.13	12.53	12.13
2015	14.54	14.65	14.42	14.06	13.65	13.40	13.08	12.42	12.02

* DAT : Days After Transplanting, DBH : Days Before Heading

1~ 7 DAT (1~ 7 Days After Transplanting) : Rooting Period.

8~39 DAT (8~39 Days After Transplanting) : Effective Tillering Period.

36~54 DAT (36~54 Days After Transplanting) : Uneffective Tillering Period.

16~30 DBH (16~30 Days Before Heading) : Panicle Formation Period.

5~15 DBH (5~15 Days Before Heading) : Reduction Division Period.

1~ 4 DBH (1~ 4 Days Before Heading) : Flowering & Fertilization Period.

1~19 DAH (1~19 Days After Heading) : Ripening Period.

20~30 DAH (20~30 Days After Heading) : Ripening Period.

31~40 DAH (31~40 Days After Heading) : Ripening Period.

- 일조시간은 2015년의 활착기(1~7DAT)는 2014년보다 약 32시간이 짧았고, 2015년의 유효분얼기(8~39DAT)는 2014년보다 약 36시간이 길었으며, 2015년의 무효분얼기(36~54DAT)는 2014년보다 약 37시간이 길었고, 반면에 2015년의 감수분열기(5~15DBH)와 개화기(1~4DBH)는 2014년보다 약 44시간과 약 28시간이 짧았다. 그리고 2015년의 등숙기 1~19DAH의 경우에는 2014년보다 약 36시간이 길었고, 2015년의 등숙기 20~30DAH의 경우에는 2013년보다 약 27시간이 길었으며, 2015년의 등숙기 31~40DAH의 경우에는 2014년보다 약 10시간이 짧았음

나. 등숙기 적산온도에 따른 유색미의 현미 수량과 기능성분 함량

- 유색미의 색소 집적 과정과 관련하여 2015년의 실험결과를 보면, 출수일 8월 23일부터 기능성분 함량이 최대가 되는 시기는 9월 15일로 출수 후 24일이며, 2014년은 출수일 8월 20일부터 이미 30일이 경과한 시기인 9월 20일이 C3G 함량이 최대인 시기로 판단되었음
- 흑자색 미 종피에 색소 집적은 수정 후 10일부터 급격히 증가 하여 수정 후 20일경에 최대함량에 도달하며 그 이후에는 상대적으로 전분의 축적이 많아지므로 색소 함량은 오히려 적게 평가되는 것으로 보고된 바 있고, 개화 후 15일부터 25일경 사이에 종자의 색소 발현 비율이 급격히 증가하여 종자 내 적자색 색소가 흑자색으로 운기가 나면서 진하게 되는 시기는 개화 후 25일에서 40일경이었다는 보고와 2015년 기능성분 함량이 최대가 되는 시기와는 다소 차이가 있으나 유사한 경향을 보였음
- 조생흑찰을 실험 품종으로 오(2014)는 출수 후 40일간 일평균기온이 22℃ ~ 24℃ 범위에서 안토시아닌 함량은 유의적으로 증가하였으며, 현미 수량과 기능성분 함량을 고려한 적정 수확 시기는 출수 후 적산온도가 900℃~1,000℃ 범위였다고 보고하였는데 일평균기온은 본 실험의 결과와 비슷하였으나, 적산온도에서 약 100℃~200℃의 차이를 보였다. 이것은 품종 및 재배지역에 따른 기상 요인에 기인한 것으로 보임
- 표 64에서 보는 바와 같이 2015년은 천립중, 즉 현미 수량이 고정되는 시기인 9월 23일은 등숙기 적산온도가 803.7℃로 출수 후 35일(35DAH : 일평균기온 23.0℃)에 해당하고, 5일 뒤인 9월 28일은 등숙기 적산온도가 893.1℃로 출수 후 40일(40DAH : 일평균기온 22.3℃)로, 이들 등숙기 적산온도는 일평균기온으로 판단 시 최적 출수기 조건 및 만한의 범위인 출수 후 40일간의 일평균기온 21~23℃에 해당되었고, 등숙률도 이 두 기간 사이에 91.3~95.1%로 최고 등숙률에 근접하였음

표 64. The accumulated temperature (AT), C3G content, weight of 1000 grains (GWT) of brown rice, and ratio of ripened grains to total grains (RPG) of each ripening phase in the year 2015.

Ripening phase	30DAH	35DAH	40DAH	45DAH	50DAH
Date	Sep.18	Sep.23	Sep.28	Oct.3	Oct.8
AT	690.5	803.7	893.1	986.4	1082.8
C3G	1424.7	1070.3	471.6	423.8	371.4
GWT	24.8	25.1	24.7	24.7	24.8
RPG	88.9	91.3	95.1	95.0	94.3

※DAH : Days After Heading, AT : Accumulated Temperature(°C),
 C3G : C3G Content(mg/100g), GWT : 1000 Grain Weight(g),
 RPG : Ratio of Ripened Grain(%).

- 2014년과 2015년의 기능성분의 함량의 연차변이를 등숙기간별로 분석하면, 일평균 기온의 경우, 2015년이 2014년보다는 일평균기온이 1.4°C~1.6°C 저온을 경과하였다. 일조시간의 경우, 2014년의 283시간, 2015년이 335시간으로 2015년이 52시간 길었 으며, 일교차는 2014년이 10.4°C, 2015년이 11.3°C로 2014년보다 2015년의 일교차 가 크게 나타난 결과로 2015년이 2014년에 비하여 기능성분 함량이 높게 나타남
- 종합적으로, 2014년의 적정 수확 시기는 등숙률, 현미수량과 기능성분 함량을 고려 할 시 출수 후 35~40일이 경과한 등숙기 적산온도가 803.7~893.1°C 범위인 때가 적당한 것으로 판단되며, 2015년의 적정 수확 시기는 등숙률, 현미수량과 기능성분 함량을 고려 할 시 출수 후 39~44일이 경과한 등숙기 적산온도가 835.3~919.2°C 범위인 때가 적당한 것으로 판단됨
- 기능성 쌀 품종 슈퍼홍미의 등숙기 적산온도는 등숙률, 현미수량과 기능성분 함량 등 을 고려할 때 연차에 따라 차이가 있으며, 출수 후 35일에서 44일이 경과한 등숙기 적 산온도가 803.7~919.2°C 범위인 때가 최적 수확 시기로 평가되었으며, 기능성 품종별 지역별 분석이 필요할 것으로 판단됨

다. 슈퍼홍미 기능성분 함량의 연차별 비교

- 슈퍼홍미의 주정 추출물을 통해서 생리활성 물질인 Taxifolin의 함량을 HPLC를 통해 측정한 결과 55.90 $\mu\text{g}/10\text{ mg}$ (함량/추출물 무게)으로 확인 되었으며, 슈퍼홍미의 종실 외부적으로 배와 배유를 구분하여 탁시폴린 성분함량을 분석한 결과, 종피에서만 106.6mg/100g이 측정되었음(표 65)

표 65. Taxifolin content of embryo, endosperm, and pericarp in Superhongmi variety

	content (mg./100g seed)
endosperm	0
embryo	0
pericarp and seed coat	106.60 mg/100g seed coat

- 유색미 품종간에 Taxifolin 표 66 및 그림 36에서 보는바와 같이 2015년도에는 Taxifolin 성분이 적진주, 홍진주, 건강홍미에서는 나타나지 않았으며, 2016년도에는 적진주, 홍진주에만 나타나지 않았으며 건강홍미에서는 0.82mg/100g, 슈퍼홍미는 24.16, 슈퍼홍미의 돌연변이종인 15074, 15075, 15189, 15190은 24.16mg/100g, 10.66mg/100g, 10.70mg/100g, 19.97mg/100g, 14.57mg/100g 이 함유 되었으며, 기존의 홍미에서는 taxifolin이 거의 탐색되지 않았고, 건강홍미에서 미량 탐색되었음

표 66. Varietal difference of taxifolin content in colored rice (mg/100g)

Variety	2015	2016
Jeokjinju	-	-
Hongjinju	-	-
Keonganghongmi	-	0.82 \pm 0.02
Superhongmi	67.72 \pm 6.01	24.16 \pm 0.11
15074	26.35 \pm 0.47	10.66 \pm 0.05
15075	60.33 \pm 0.26	10.70 \pm 0.17
15189	35.64 \pm 2.18	19.97 \pm 0.15
15190	24.73 \pm 2.09	14.57 \pm 0.05

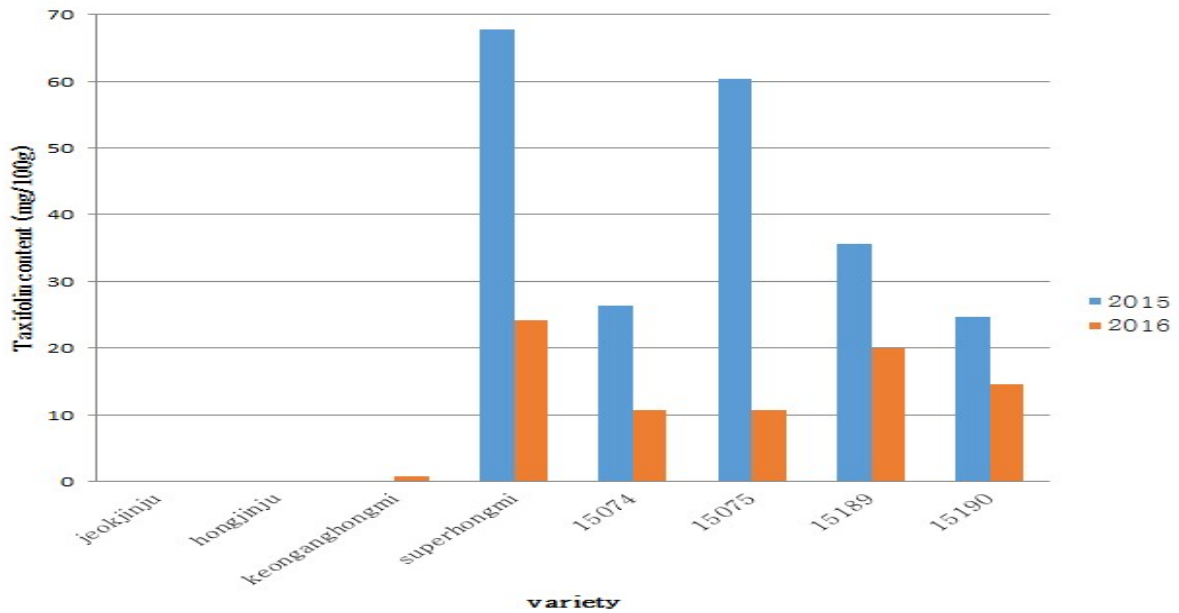


그림 36. Varietal difference of taxifolin content in colored rice.

- 연차간에는 전체적으로 2015년에 함량이 높았고, 2016년에는 낮아지는 경향을 보였는데, 이는 taxifolin의 함량이 환경적 영향을 많이 받는 것으로 판단되어짐
- 즉, 등숙기의 기상의 영향이 벼의 활성성분의 함량 변화에 크게 작용하는 것으로 보이며, 이에 따라 슈퍼홍미 출수일인 9월3일 이후의 기상을 비교하면 2015년이 2016년에 비해 강수량이 유의하게 낮았고, 평균기온은 높은 것을 확인할 수 있었음

라. 질소 시비에 따른 기능성분의 함량 변화

- 단백질은 세포구성성분의 주요인자이며 또한 기능성성분을 이루는 성분이면서 기능성 성분 합성을 위한 효소들을 구성한다. 이러한 단백질은 주로 질소로 이루어지며 질소의 시비량에 따라 수량구성요소와 쌀 품질 등이 변화한다. 생산량이 주요 목표였던 7-80년대에는 질소의 과투입이 수량성 향상에 크게 기여하면서 점점 더 많은 양의 질소가 시비되었다. 그러나 과도한 질소 투입은 식물체 키를 키우고 줄기를 약하게 하여 수확기에 벼가 넘어지는 도복현상이나 이삭도열병, 잎도열병 등의 병해충의 피해를 증가시켰고, 백미의 배유 부분에 하얀 복백현상을 일으키는 주요인으로 알려지면서 쌀 품질의 저하를 가져오는 요인으로 보고됨
- 기능성 품종에서는 이러한 질소시비의 차이가 실제 성분 함량에 어떠한 영향이 있는지 알려진 바가 없는 상태이며, 이를 위해 소비, 관행, 과비로 질소시비를 나누어 기능성 성분 함량의 차이를 보고자 하였음

- 질소 시비수준 구획별 10a당 5kg, 9kg, 13kg으로 3구역으로 이양하여 Taxifolin 함량을 분석한 결과 DAF 30일에는 (소비-표준-과비) 56.57mg/100g, 62.3mg/100g, 53.47mg/100g이고, DAF 40일에는 20.48mg/100g, 24.85mg/100g, 28.85mg/100g이며, DAF 50일에는 13.24mg/100g, 22.35mg/100g, 11.41mg/100g이 함유되어 있었다(표 67)
- 이와 같은 결과로 보아 Taxifolin 성분은 질소시비량에 따른 함량 변화는 미미한 것으로 보아 표준재배법에 따른 시비가 되어야 한다고 판단되었다.

표 67. Taxifolin content according to Nitrogen fertilization

비료 투입량	DAF	Content (mg/100g)
소 비 (5-5-6)	DAF30 (10/ 8)	56.57
	DAF40 (10/18)	20.48
	DAF50 (10/28)	13.24
관 행 (9-5-6)	DAF30 (10/ 8)	59.27
	DAF35 (10/13)	49.48
	DAF40 (10/18)	28.13
	DAF45 (10/23)	24.96
	DAF50 (10/28)	22.35
	DAF55 (11/02)	14.21
과 비 (13-5-6)	DAF30 (10/ 8)	53.47
	DAF40 (10/18)	28.85
	DAF50 (10/28)	11.41

마. 등숙 시기별 Taxifolin 함량의 변화

- 슈퍼홍미의 등숙 기간별 Taxifolin 함량 실험을 한 결과를 보면, 출수후 30일부터 출수후 55일차 중 Taxifolin 함량이 가장 높은 것은 Table. 10.에서 보는 바와 같이 출수 후 30일인 10월 8일로 판단되었고, 출수 후 일자가 지날수록 탁시폴린 함량은 점점 떨어져 출수 후 55일차에는 14.21(mg/100g)로 낮아짐

슈퍼홍미 품종의 출수 후 taxifolin 함량 변화

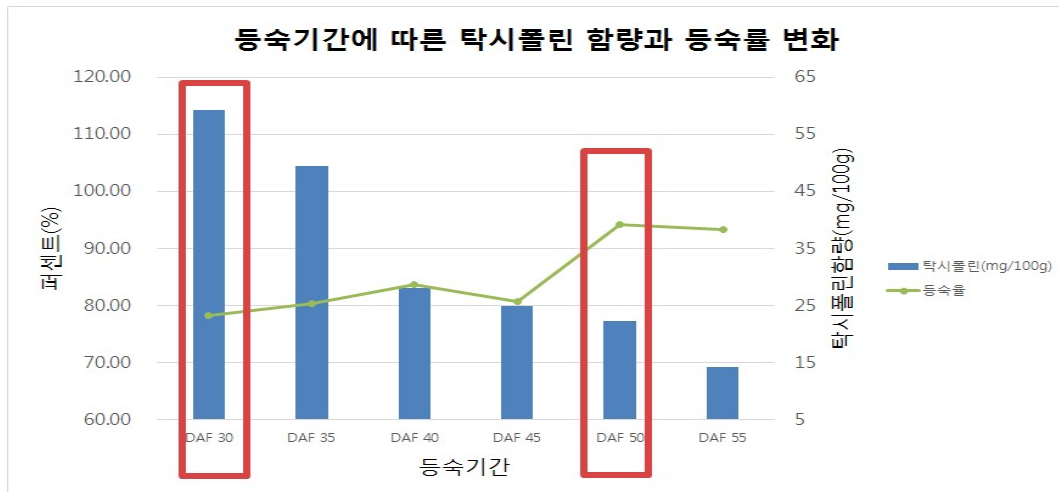
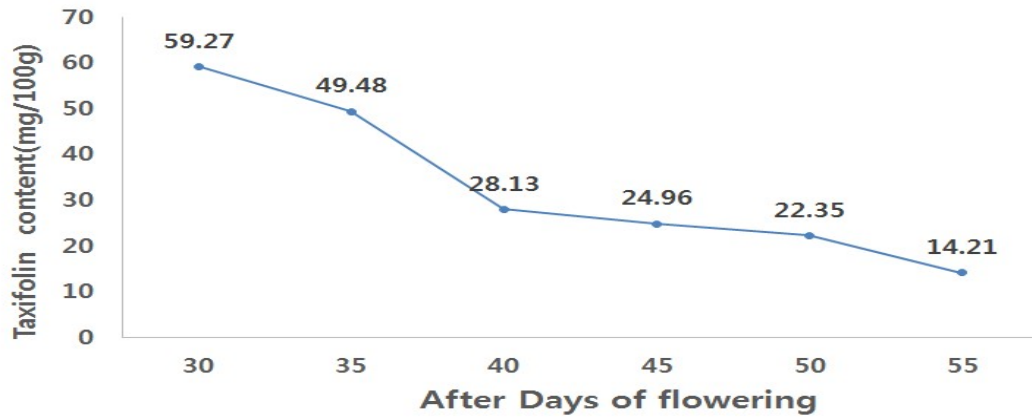


그림 37. 슈퍼홍미 품종의 출수 및 등숙기간에 따른 지표성분의 함량 변화

- Ryu(2014)에 의해 보고한 흑미 종피에서 색소의 집적이 수정 후 10일부터 급격히 증가해서 수정 후 20일경에 최대치의 함량에 도달하며 그 이후로 전분 축적이 많아지면서 색소 함량은 상대적으로 적게 함유되는 것으로 보고하였다. 본 시험의 Taxifolin 함량을 살펴보면 출수 후 30일부터 점차적으로 함량이 낮아지는 것을 볼 수 있음
- 이는 전분함량이 축적됨으로 상대적으로 Taxifolin 함량이 낮아지는 것으로 보이며, 출수 후 일자별 등숙률의 변화를 보면 출수 30일 경에 80% 정도에 도달하고, 45일까지 크게 변화가 없다가 출수 후 50일경에 90% 이상으로 증가하는 결과를 보였음

바. 재배지역별 비교를 통한 슈퍼홍미 재배지역의 선택

- 2017년도 세종(중부지방)에서 재배된 슈퍼홍미와 2018년도 진도(남부지방)에서 재배된 슈퍼홍미간의 비교를 통하여 재배적지의 선정을 수행하였음 (표. 68)

표 68. 재배지역별 슈퍼홍미의 출수율 비교

품종 특성	슈퍼자미				슈퍼홍미				
	세종시 (중부평야)	진도군 (서남부해안)			세종시 (중부평야)	진도군 (서남부해안)			
	2016년	2017년	2018년		2016년	2017년	2018년		
과 중 일	4. 25.	5. 17.	5.8	5.21	-	5. 22.	5.8	5.21	
육묘 (육묘기간)	(28일묘)	꽃트모 (28일묘)	일반모 (17일묘)	일반모 (14일묘)	(28일묘)	일반모 (25일묘)	일반모 (17일묘)	일반모 (24일묘)	
이양방법	손모내기 (3본/주)	손모내기 (2본/주)	손모내기 (2본/주)	손모내기 (2본/주)	손모내기 (3본/주)	손모내기 (1본/주)	손모내기 (3본/주)	손모내기 (3본/주)	
재식거리	30×15cm	30×15c m	30×15c m	30×15c m		30×15c m	30×15c m	30×15c m	
이 양 일	5. 28..	6. 15.	5. 25.	6. 15.	6. 3.	6. 15.	5. 25.	6. 15.	
초장	간장	74.9	99.9	89.3	86.2	94.7	120.0	112.0	99.4
	수장	19.9	19.8	20.3	19.3	19.3	21.0	18.7	19.6
수수(이삭수)	10.6	10.6	13.1	13.9	7.4	15.0	14.1	12.5	
출수시	8. 22.	8. 24.	8. 10.	8. 24.	9. 2.	9. 1.	8. 20.	8. 30.	
출수기	8. 25.	8. 27.	8. 13.	8. 27.	9. 5.	9. 4.	8. 23.	9. 2.	
출수전	8. 28.	8. 30.	8. 17.	8. 31.	9. 8.	9. 7.	8. 27.	9. 6.	
총입수	132.3개	125.3개	119.7개	86.5개		131.3개	100.9개	82.7개	
완전입수	118.5개	108.6개	99.8개	70.3개		113.3개	83.7개	74.8개	
입실률	89.6%	86.7%	83.4%	81.2%	81.7%	84.8%	82.9%	90.5%	
현미천립중	26.2g	24.9g			26.8g	25.7g			
현미수량 (kg/10a)	629	500			519	475			

- 대조군으로 현재 대량재배가 진행되고 있는 슈퍼자미 품종을 선정하여 슈퍼홍미의 재배지역별 자료를 분석하였으며, 2018년도 추수가 11월 진행되어, 보고일 현재 시험 분석이 진행중이나, 현재까지의 산출된 결과를 볼 때 슈퍼자미와 동등하게 슈퍼홍미도 중부지역보다는 남부지역에서의 재배시 수율 및 지표성분 함량이 우수할 것으로 추정되며, 특히, 이양시기를 빠르게 하고 수확시기를 늦출 경우 색소 집적이 증대하여 지표성분의 함량이 증대할 것으로 예상되어 차후 대량 재배지역의 선정시 남부지역을 중심으로 계약재배를 진행하도록 할 예정임 (그림 38)



그림 38. 이앙시기에 따른 슈퍼홍미의 색소 직접도 비교

2. 슈퍼홍미 품종 판별을 위한 DNA 분석법의 확립

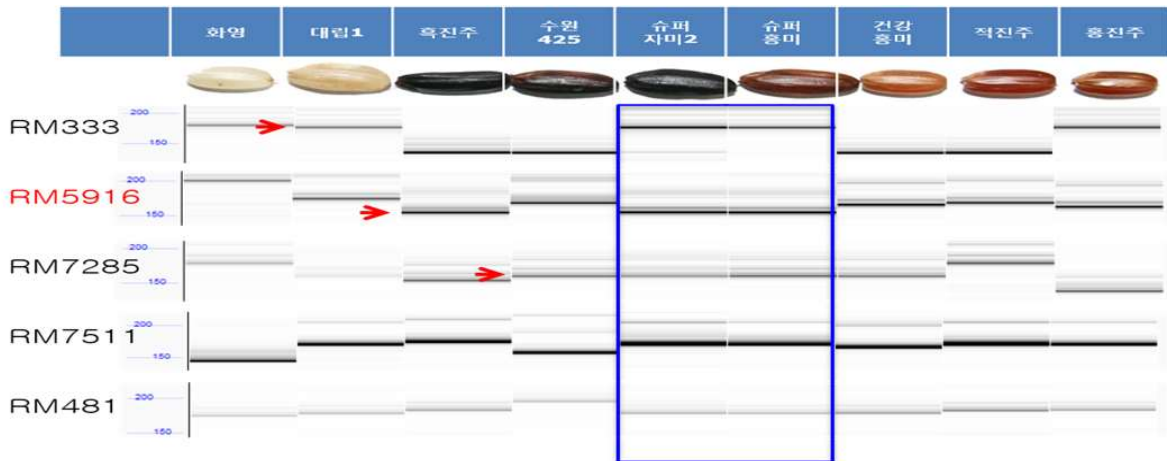
가, 슈퍼홍미의 품종 판별을 위한 DNA 마커 개발

- 벼에서 갈색 종피는 Rc, Rd 두 개의 비대립 유전자의 상보적 효과에 의해 결정되는 것으로 알려져 있으며, Rc 유전자는 종피에 갈색(brown)을 나타내고, Rd는 더욱 진하게 하는 것으로 보고되어 있음
- 따라서 Rc_Rd_는 적갈색으로 Rc_rdrd는 갈색으로 표현하기도 하며, Rc 유전자는 7번 염색체에 Rd 염색체는 1번 염색체에 위치한 것으로 보고된 바 있고 반면 흑자색 종피 형질은 Pb(Prp-b)와 Pp(Prp-a) 유전자의 유전형상으로 알려져 있으며, Pp(Prp-a)가 없는 경우에는 갈색이 된다고 보고 됨에 따라, DFR, OSBI, Rc 유전자의 유무를 통해 종피색을 결정할 수 있는 분자마커로 사용가능함이 보고 된 바 있음
- 개발된 우수한 벼 품종의 유통질서를 확보하고 품종의 순도를 유지하기 위해 품종 판별법의 개발은 매우 중요한데 국내에서도 SSR 마커를 이용한 품종 판별, STS 마커를 이용한 품종 판별 기술이 개발된 바 있으며, 농산물 품질관리원 등에서 활용되고 있어 이에 대해서 슈퍼홍미 품종의 유지 관리 및 차후 대량 생산 체계하에서 고품질의 슈퍼홍미 벼품종의 안정적인 공급을 위하여 슈퍼홍미 품종의 분자 마커 개발을 실시하였음
- 종피색 관련 유전자 탐색을 위해 보고된 CAPs, STS 마커를 사용하였고, 품종 구분을 위해서는 공우성 마커인 SSR 마커를 사용하여 분석을 실시하였고, 각각에 사용된 primer의 염기서열은 표 69와 같음

표 69. Primers used in the SSR, CAPs and Indel analysis

Locus name	Primers sequence (5' - 3')	Tm.	Expected size	Remark
CAPS Ra (Pb)	Fw: CGTCCATTCACAGGGTA Rv: CAGCAGATGAGGCAAAC	55	White pericarp : 858bp Red pericarp : 653 +203	CAPs (BamH1)
CAPS DFR	Fw: CGCTTGCTTGACTCTGACAA Rv: GCTTGACCACCTCGTTTCTCC	60	White pericarp : 143bp Red, purple pericarp : 91 + 52 bp	CAPs (Taq α 1)
Rc3s20 / Rc3s21	Fw: AAAGGTACCAAAGATCGCAG Rv: CCATTTCCCTTCTGTCACAG	55	White pericarp : 424bp Red pericarp : 438bp	InDel (14bp deletion)
RM0333	Fw: GTACGACTACGAGTGTCAACAA Rv: GTCTTCGCGATCACTCGC	55	201	SSR (TAT)19(CTT)19
RM5916	Fw: GCTATAAGAATCGTATTAAG Rv: TACTGCTATTAAGTCAGAA	55	189	SSR (ATT)16
RM7285	Fw: GCGGCTATTGTAAGTGTGTTG Rv: TATSTGAGTGCCACATGACG	55	182	SSR (ATCT)15
RM7511	Fw: GAAGCCATGTCCTTTTCTG Rv: CACAGCGAACGTGATGTCTC	55	194	SSR (TATC)14
RM481	Fw: TAGCTAGCCGATTGAATGGC Rv: CTCCACCTCCTATGTTGTTG	55	169	SSR (CAA)12

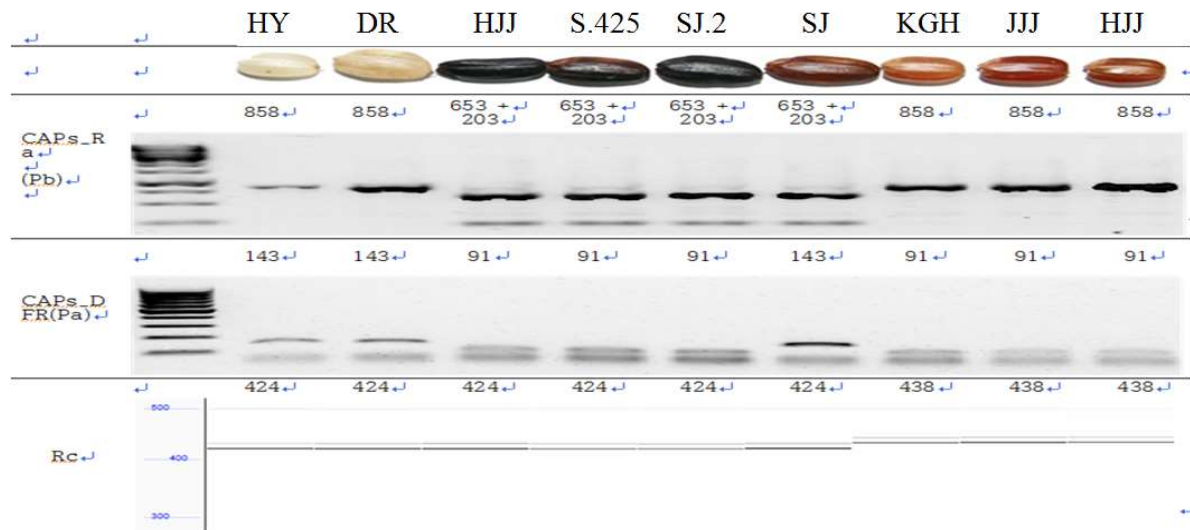
- RM0333, RM5916, RM7285, RM7511, RM481 유전자에 대한 분석 결과 슈퍼홍미는 기존에 품종인 적진주, 홍진주, 건강홍미 등과 비교할 때 RM0333, RM5916, RM7285 등에서 홍미등과 유전적 차별성을 나타내고 있으며, 오히려 흑진주, 슈퍼자미 등의 흑미 계열의 품종과 유사한 유전적 특성을 나타내고 있는 것으로 확인되었음(그림 38)



HY:Hwayoung, *DR. 1*: Daeripbyeo 1, *HJJ*:Heugjinju, *S.425*:Suwon 425, *SJ. 2*: Superjami 2, *SH*: Superhongmi, *KGH*: Keonganghongmi, *JJJ*: Jeokjinju, *HJJ*: Hongjinju

그림 38. DNA marker assay among several pigmented rice varieties

- Ra와 DFR 유전자 비교에서 DFR 기준의 홍미 품종 계열 및 흑미 품종 계열과 차별화 되어 DFR 탐색에서 슈퍼홍미의 특이적 유전체가 나타는 것으로 확인되었음 (그림 39)
- 따라서, 상기의 2종의 프라이머 세트에 의한 유전자 관별을 통해서 슈퍼홍미 품종이 기존의 홍미 계열 품종 및 흑미 계열 품종과의 차별성을 가지고 품종 감별이 가능한 것으로 판단된다.



HY:Hwayoung, *DR. 1*: Daeripbyeo 1, *HJJ*:Heuginju, *S.425*:Suwon 425, *SJ. 2*: *Superjami 2*, *SH*: Superhongmi, *KGH*:Keonganghongmi, *JJJ*: Jeokjinju, *HJJ*: Hongjinju

그림 39. Genetic difference of DFR and Ra genes among pigmented rice varieties

제 6장 슈퍼홍미 추출분말을 이용한 건강기능식품 시제품의 개발

1. 슈퍼홍미 추출분말을 이용한 시제품 개발

가. 슈퍼홍미 추출분말을 이용한 캡슐 제품의 개발

- 본 연구개발을 통하여 개발 된 슈퍼홍미 추출분말의 상품화를 위하여 다양한 제형으로 시제품의 개발을 추진하였음
- 건강기능식품은 다양한 제형이 존재하나 실질적으로 폐경기 여성에게 가장 적합한 제형은 캡슐(소프트 캡슐)형태의 제형이 가장 일반적이라 여겨지며 또한 감마-리놀렌산과 같이 갱년기 여성 건강에게 유용한 성분을 부형제로 사용할 수 있다는 장점이 있어 1차적으로 소프트 캡슐 제형에 대한 시제품을 개발하였음
- 시제품의 개발시 본 연구에서 인체적용시험을 통해 기능성을 확인한 슈퍼홍미 추출분말의 규격은 1일 0.7 g의 슈퍼홍미 추출분말의 섭취이며, 이를 위하여 1캡슐당 450mg을 선택하여 1일 2회, 1회 2캡슐을 섭취하도록 설계하였으며, 1`캡슐당 슈퍼홍미 추출분말의 함량은 180mg (총 0.72g)으로 설정하였음
- 개발 된 캡슐 타입의 시제품의 배합비 및 성형 된 캡슐의 사진은 다음과 같음



그림 40. 캡슐타입의 슈퍼홍미 추출분말 함유 시제품

표 70. 슈퍼홍미 추출분말이 함유 된 캡슐 제품의 배합비

원료명	배합비	비고
슈퍼홍미 추출분말	40	1캡슐당 180 mg
보라지종자유 (감마리놀렌산 20%)	41.73	
토코페롤	0.2	
호박씨유	8.2	
밀납	4.5	
대두레시틴	3.5	
피크노제놀	1.85	
비타민D3 혼합제제	0.02	
합계	100%	

- 상기에서 개발 된 슈퍼홍미 추출분말 함유 소프트 캡슐 시제품은 슈퍼홍미 특유의 붉은색 기운을 강조하기 위하여 일반적으로 사용되는 짙은 갈색 또는 검은색의 캡슐 피막을 사용하지 않고 투명 피막을 사용하여 내용물의 색상이 외부로 보여질 수 있도록 제작하였음
- 또한, 부형제 개념으로 사용 된 보라지종자유는 건강기능식품의 고시형 기능성 원료로서 당 연구개발에서 개발 된 슈퍼홍미 추출분말과 더불어 갱년기 이후 여성의 건강 개선에 도움을 줄 수 있는 원료로서 선택하여 사용하였음
- 상기에서 제작 된 슈퍼홍미 추출분말의 건강기능식품상에 설정 된 규격항목에 대하여 분석을 실시한 결과는 다음과 같이 나타나 모두 만족하는 것으로 확인되었음

표 71. 슈퍼홍미 함유 캡슐 제품의 건강기능식품 규격

항목	규격	분석결과
성상	활갈색의 정제 제품	적합
이물	불검출	불검출
붕해도	5분 이내 완전 붕해	적합
Taxifolin 함량 (지표성분)	1.75 mg/4캡슐 (1.4 mg ~ 2.1 mg)	1.9 mg/4캡슐
대장균군	음성	음성

- 상기에서 제작 된 슈퍼홍미 추출분말 함유 캡슐 제품에서 지표성분인 taxifolin의 함량을 8주간 저장하며 저장성을 확인한 결과는 다음과 같음

표 72. 슈퍼홍미 추출분말 함유 캡슐 제품의 저장시 지표성분의 변화

taxifolin (mg/g)			
Temperature/ Humidity	Storage period(weeks)		
	0	4	8
25 °C/ 75 %R.H.	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.7 ± 0.1
35 °C/ 90 %R.H.		1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1
45 °C/ 60 %R.H.		1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1

- 3개 온도에서 지표성분의 함량을 측정한 결과 8주 보관시 까지 차이가 나타나지 않아서 상기 캡슐 제품에서 지표성분 안정성은 확보된 것으로 판단됨

나. 슈퍼홍미 추출분말을 이용한 겔 형태의 제품 개발

- 본 연구개발을 통하여 개발 된 슈퍼홍미 추출분말이 함유 된 건강기능식품의 개발을 위하여 일반적으로 사용되는 캡슐 및 정제 이외에 섭취의 편의성 및 관능을 증시하기 위한 겔 타입의 시제품을 개발하였음

- 시제품의 개발 시 본 연구에서 인체적용시험을 통해 기능성을 확인한 슈퍼홍미 추출분말의 규격은 1일 0.7 g의 슈퍼홍미 추출분말의 섭취이며, 젤 타입의 제품의 경우 1회 섭취분량이 20 g으로 충분한 양을 확보 할 수 있어 1일 1회 섭취에 전체양을 섭취할 수 있도록 계획하였으며, 미생물학적 안정성 및 관능을 위하여 다양한 과일 농축액을 활용하여 제품에 적용하였음

표 73. 젤 타입의 슈퍼홍미 추출분말 함유 제품의 배합비

원료명	배합비	비고
슈퍼홍미 추출분말	3.5	1회 섭취량 0.7 g
배농축액	16.5	
백포도농축액	13.0	
석류발효초	6.2	
푸드젤	1.6	
콜라겐	1.0	
식물혼합농축액	0.5	
젯산칼슘	0.5	
무수구연산	0.32	
구연산삼나트륨	0.30	
카라기난	0.20	
복합황금추출물	0.10	
세븐베리농축액	0.01	
아로니아농축액	0.01	
정제수	56.26	
합계	100%	

- 개발 된 시제품은 짙은 갈색의 젤 타입의 제품으로 목 또는 양갱과 같은 형태로 성형 되기 때문에 포장재에서 일부씩 절취하여 쉽게 씹어 먹을 수 있도록 설계되었으며, 성형 된 후의 제품 사진은 다음과 같음



그림 41. 슈퍼홍미가 함유 된 젤타입 시제품

- 개발 된 시제품은 겔 형태이외에 주위에 수분함량이 높아 물기가 일부 기포를 형성하기도 하나 섭취상에는 문제가 없으며, 차후 포장시에 이러한 기포들을 없앨 수 있도록 할 예정임
- 상기에서 개발 된 시제품의 건강기능식품 규격 분석 결과는 다음의 표 75와 같음

표 74. 슈퍼홍미 함유 젤 제품의 건강기능식품 규격

항목	규격	분석결과
성상	활갈색의 정제 제품	적합
이물	불검출	불검출
Taxifolin 함량 (지표성분)	1.75 mg/20 g (1.4 mg ~ 2.1 mg)	1.8 mg/20 g
대장균군	음성	음성

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 본 연구개발의 최종 목표는 다음과 같음

■ 슈퍼홍미를 활용한 여성 갱년기장애 개선용 건강지향 식품 개발 및 산업화

■ 품종 개량을 통하여 여성건강 개선을 위한 플라보노이드 고 함유 슈퍼홍미의 대량 생산 및 안정적인 수요처 확보

■ 슈퍼홍미 적용 제품의 대사성질환 개선 및 여성 갱년기장애 개선 효능 및 작용기전 구명

○ 상기의 최종 목표를 달성하기 위하여 하기와 같은 세부과제별 목표를 통해 연구개발을 수행하였음

주관연구기관(제1세부과제)

- 기능성 신품종 쌀을 이용한 식품 소재의 대량 생산 및 공정 최적화
- 기능성 신품종 쌀 유래 식품 소재의 저장 안정성 검증
- 기능성 신품종 쌀 유래 식품소재를 활용한 제품 개발
- 기능성 신품종 쌀 유래 식품소재를 활용한 기능성 식품 개발 및 유통기한 안정성 검증
- 개발 제품의 판매 확대를 위한 마케팅 자료의 구축

제1협동과제

- 생리활성물질 고함유 쌀 품종 재배적지 선정 및 재배기술 확보
- 생리활성 물질 고함유 쌀 계통전개
- 생리활성 물질 고함유 쌀 품종 등록 및 대량 재배 체제 구축
- 생리활성 물질 고함유 쌀 분자 표지 마커 개발

제 2협동과제

- 슈퍼홍미 추출물의 in vitro 여성 갱년기 장애 개선 기능 및 작용기전 구명
- 슈퍼홍미 유래 기능성 원료 급여에 의한 갱년기 모델 흰쥐의 대사성 질환(비만, 당뇨, 고지혈증, 골다공증) 개선효능 검증 및 작용기작 구명
- 슈퍼홍미 유래 기능성 원료 및 제품의 인체 적용 시험

제 3 협동과제

- 슈퍼홍미로부터 기능성 물질 추출물 및 분획물 조제
- 기능성 물질 추출물로부터 기능성분을 분리
- 분리한 활성 기능성분의 구조 동정
- 슈퍼홍미를 이용한 기능성 소재의 표준화 확립

3-2. 목표 달성여부

연구개발의 세부 목표	연구목표의 수행
<p>주관과제(제1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 신제품 쌀을 이용한 식품 소재의 대량 생산 및 공정 최적화 ○ 기능성 신제품 쌀 유래 식품 소재의 저장 안정성 검증 ○ 기능성 신제품 쌀 유래 식품소재를 활용한 제품 개발 ○ 기능성 신제품 쌀 유래 식품소재를 활용한 제품의 유통기한 안정성 검증 ○ 개발 제품의 판매 확대를 위한 마케팅 자료의 구축 	<p>슈퍼홍미를 이용한 대량 생산 체계 구축 (500L 급 생산) 건조방법/추출방법에 따른 공정 최적화 완료 3반복 생산 및 지표성분 분석에 따른 공정 표준화 완료</p> <p>생산 된 슈퍼홍미 추출분말 기능성 소재의 품질 규격 설정 가속 시험을 통한 유통기한 설정 (18개월)</p> <p>캡슐타입 / 젤타입의 갱년기 이후 여성건강 개선용 기능성 제품의 개발 및 제형 다변화</p> <p>캡슐 타입 시제품에 대한 가속 시험을 통한 저장안정성의 규명</p> <p>개발 소재의 개별인정형 등록을 위한 자료 구축</p>
<p>제1협동과제</p> <ul style="list-style-type: none"> ○생리활성물질 고탍유 쌀 품종 재배적지 선정 및 재배기술 확보 ○생리활성 물질 고탍유 쌀 계통전개 ○생리활성 물질 고탍유 쌀 품종 등록 및 대량 재배 체제 구축 ○생리활성 물질 고탍유 쌀 분자 표지 마커 개발 	<p>이앙기, 등숙기 등의 조건 변화에 따른 슈퍼홍미의 재배량 및 기능성분 함량 비교 및 이를 통한 재배적지 (남부지방) 선정</p> <p>슈퍼홍미 품종의 대량 공급 대비를 위한 안정적 종자확보</p> <p>시비 방법, 수확방법 등 재배 기술의 최적화 및 전라남도 진도, 군산 영농조합등과의 협약에 따른 계약재배지역 확보로 대량생산 공급 체계 구축</p> <p>슈퍼홍미 품종 분별을 위한 DNA마커 발굴 및 유사 유색미 품종과의 비교 분석을 통한 분석법 유효화</p>

연구개발의 세부 목표	연구목표의 수행
제2협동과제	
○ 슈퍼홍미 추출물의 in vitro 여성 갱년기 장애 개선 기능 및 작용기전 구명	in vitro상에서 슈퍼홍미 추출물의 여성 호르몬 유사효과 및 당질/지질 개선 능력 검증
○ 슈퍼홍미 유래 기능성 원료 급여에 의한 갱년기 모델 흰쥐의 대사성 질환 (비만, 당뇨, 고지혈증, 골다공증) 개선효능 검증 및 작용기작 구명	in vivo 시험에서 슈퍼홍미 원물 및 슈퍼홍미 추출물 투여에 의한 대사성 질환 개선 효과 검증
○ 슈퍼홍미 유래 기능성 원료 및 제품의 인체 적용 시험	경북대학교 IRB 심의 후 폐경기 이후 여성을 대상으로 한 대사성 질환 및 골대사 관련 인체적용시험을 통한 슈퍼홍미 추출분말의 유효성 검증
제3협동과제	
○ 슈퍼홍미로부터 기능성 물질 추출물 및 분획물 조제	슈퍼홍미 미강으로부터 주정 농도별 추출 공정 비교를 통한 최적 추출 조건 선택하고, 주정 추출로부터 각 극성별 분획의 분획물 제조
○ 기능성 물질 추출물로부터 기능성분을 분리	슈퍼홍미로부터 신규 지표 후보성분 5종을 분리동정하였으며, 그 중 Quercetin 유도체인 Taxifolin을 지표(기능)성분 후보로 선정
○ 분리한 활성 기능성분의 구조 동정	슈퍼홍미로부터 분리된 5종의 신규 화합물에 대한 구조 동정 완료
○ 슈퍼홍미를 이용한 기능성 소재의 표준화 확립	지표성분으로 선정된 taxifolin에 대한 기준시험법을 LC-UV 또는 LC-MS/MS를 통한 기준 시험법의 제정 및 상호 비교를 통한 최적 방법 선정

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

가. 개별인정형 신청 지연 중

- 상기 목표 중 연구기간중 개별인정형 등록을 위한 개별인정형 신청 서류를 식품의약품 안전처로 제출하고자 하였으나, 관련 논문의 게재 지연 및 인체적용시험 최종 결과에 대한 IRB 승인 지연으로 미접수 상태임
- 개별인정형 신청을 위한 자료가 거의 완료 된 상태로 개별인정형 신청서의 초안이 작성된 상태이며, 상기의 논문 게재 및 인체적용시험의 IRB 승인이 완료되는데로 식품의약품안전처로 개별인정형 등록 신청 예정임

나. 2018년도 재배적지 선정 연구결과 일부 미도출

- 재배적지 선정을 위해서 2018년도에 전라남도 진도에서 진행중인 슈퍼홍미 대량 재배에 관한 연구는 11월 수확이후 보고서 제출일 현재 수확물에 대한 분석이 종료되지 못하여 재배적지에 대한 완전한 연구결과를 제출하지 못하였음
- 상기 결과를 완료하는데로 최종 보고서 보완시 보완하거나 또는 관련 자료의 논문 게재등을 통해서 완료할 계획임

4. 연구결과의 활용 계획 등

(1) 활용방안

- 본 연구개발에서는 국내외; 종자 개발 기술력으로 자체 개발된 고기능성을 가진 신품종 쌀을 이용하여 갱년기 여성 건강 개선 기능이 있는 새로운 농산물 자원을 개발하여 활성의 과학적 검증, 소재 및 원료의 표준화, 유효성 검증 등을 통해 과학적으로 효능이 규명되고 작용기전을 확인한 갱년기 여성용 제품으로 개발하고자 하며, 이는 원재료의 기능성 강화부터 최종 제품 개발에 이르기까지 순수 국내 기술력으로 개발되는 것으로 국내 농산물을 이용한 자체 개발 소재라는 점에서 상품화시 경쟁력이 있을 것으로 판단됨
- 본 과제를 통해 개발된 갱년기 여성 건강 개선용 식품 원료 및 제품은 1차적으로 식품 산업에 국내 기술력으로 국내 농산물을 이용한 제품 개발이라는 측면에서 상대적 경쟁력을 갖춘 제품으로서 자리매김할 수 있을 것이며, 2차적으로는 FTA 하에서 농산물 시장의 개방에 따라 위기에 처한 농산물에 고 기능성의 프리미엄 쌀 품종을 개발하고 보급함과 동시에 그 수요처를 확보함으로써 농산위에 안정적인 수입원으로서 적용할 수 있어 식품 산업과 농 산업의 동시 발전을 꾀할 수 있는 연구 개발로서 활용 가능함
- 본 과제를 통해 개발된 소재는 식품의약품안전처로 개별인정형 원료로서 등록함으로써 국내 개발 된 신품종 쌀을 이용한 건강기능식품 소재로서 활용 할 수 있으며, 이와 동시에 슈퍼홍미를 이용한 생식 제품 또는 일반 식품의 소재 (두유 등의 음료 적용)로서도 활용이 가능하며, 이에 따라 하기와 같이 상용화 전략을 구축할 계획임

1) 슈퍼홍미 및 슈퍼홍미 관련 제품의 생산 계획

구분		2020년	2021년	2022년
국 내	슈퍼홍미생산량(kg)	3,000	10,000	20,000
	판매량(단위: set)	10,000	30,000	70,000
	판매단가(원)	150,000	150,000	120,000
	국내매출액(백만원)	1,500	4,500	84,000
당사 생산능력		OEM 생산 계획		

2) 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. BM 수립 배경

- 최근 우리나라는 급속한 경제성장과 생활수준 향상으로 평균연령이 비약적으로 증대

하고 있으며, 이에 따라 과거 장수에 대한 단순한 희망보다는 삶의 질의 향상에 대해서 높은 관심을 가지게 되었으며, 우리나라 여성의 평균연령은 2000년 78.6세에서 2012년 84세로 급속도로 증가하고 있으며, 이는 여성들의 삶이 평균적으로 폐경이후 20~30년간을 지내게 되어 폐경 이후 여성들의 변화된 삶을 살게 됨

- 폐경이란 여성에서 난소의 기능 저하로 정상적인 월경 현상이 중지되는 현상 또는 시전으로 정의되고 있는데, 자연적인 폐경은 병리적 원인을 동반하지 않으면서 무월경이 12개월간 지속되는 경우로 정의되고 있으며, 폐경은 노화로 일어나는 자연스러운 현상의 일부이나 일부 여성에게 있어서는 폐경 이후 인지능력 저하, 수면장애, 골밀도 감소, 불안, 우울 등의 부작용을 경험하고 있으며, 우리나라 여성의 75% 이상이 폐경 이후 나타나는 증상 중 1개 이상을 경험하고 있다고 보고하고 있음
- 특히, 평균연령의 증가와 다양한 분야에서 사회적으로 진출하고 있는 여성들의 삶의 변화에 중년 이후 삶의 질을 저하시키는 갱년기 증상들을 완화시키는 것은 사회적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있으며, 이에 대한 사회적 비용 지출이 지속적으로 증가하고 있음
- 또한, 육체적 증상으로는 여성 호르몬 감소에 의해서 뼈내의 칼슘의 저하가 나타나 뼈의 강도가 낮아지는 골다공증이 대표적 증상으로 나타날 수 있음
- 이러한 갱년기 증상을 완화하기 위해서 여성 호르몬 치료가 다수 수행되고 있으나 호르몬 치료 후에 여성에게서 유방암의 발병율이 증가하는 것으로 인식되고 있는데, 이는 유방암의 발병율이 여성호르몬에 노출되는 기간에 비례한다는 것으로 추정되고 있음
- 따라서, 일반적으로 섭취되고 있는 식품에서 갱년기 증상을 완화 할 수 있는 기능성 소재를 통해서 갱년기를 자연스럽게 극복할 수 있도록 하는 식이 요법에 대한 관심이 급증하고 있으며, 이를 반영하듯 최근에는 여성 갱년기 증상을 완화할 수 있는 건강기능식품 소재의 개발이 진행되었고, 건강기능식품으로서의 기능성 소재는 현재 석류추출물, 백수오 등 복합추출물, 회화나무추출물 등이 인정되어 있으며, 이중 백수오 등 복합 추출물은 단일 400억 이상의 매출을 기록한 것으로 보여 건강기능식품으로서 여성 갱년기 개선 시장은 충분한 시장을 가지고 있는 것으로 판단됨
- 그러나, 이러한 사회적 관심의 증대에 따라서 현재도 많은 식품 원료로서 식물 추출물들을 이용한 갱년기 장애 개선, 골다공증 개선 등의 기능으로 판매되고 있는 제품 중 구체적인 작용 타겟과 작용기작은 명확하지 않은 경우가 많아 지속적으로 소비자들이 애호하는 제품은 매우 한정적인 상황이기에, 여성 건강 개선용 기능성 식품 소재의 개발 모델은 국내를 포함하여 세계적인 시장성을 확보하여 수익 창출이 가능한 비즈니스 모델로 판단됨

나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- 갱년기 증상을 가진 중년 이상의 여성을 대상으로 한 건강기능식품 소재 및 제품 개발을 통한 수익 창출

(2) 핵심경쟁요인

- 여성갱년기 건강 개선 기능 - 갱년기 증상의 개선 기능 / 대사성 질환 예방 기능
- 기능성 소재의 허가 여부 - 해당 기능성 소재의 식품의약품안전처에 의한 개별인정형 건강기능식품으로의 등록 여부
- 시장 공급 능력 : 해당 제품의 생산, 영업을 위한 참여 기업의 역량

다. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황

- 여성 갱년기 개선 건강기능식품 경쟁 업체
 - 백수오등복합추출물 : 2015년 이전 개별인정형 원료 개발사인 네츄럴엔도텍은 건강기능식품중 여성 갱년기 시장의 대부분을 점유하였음
 - 회하나무열매 추출물 : 2015년 백수오등 복합 추출물의 품종 오염 문제로 시장에서 경쟁력이 저하 된 후 집중적인 마케팅 실시

(나) 경쟁구조

- 여성 갱년기 건강 개선 시장은 2010년 이전까지는 갱년기의 대표적 증상 중 하나인 골다공증 등의 대사성 질환을 개선하기 위한 이소플라본, 칼슘 등의 건강 기능 식품 섭취가 대부분이었으나 개별인정형 제도 하에서 여성 건강 개선용 개별인정형 상품의 출시로 보다 전문적인 건강기능식품 시장이형성되었음
- 여성 갱년기 건강 시장은 2015년 이전까지 네츄럴엔도텍이 대부분의 시장을 점유하고 있었으나, 품종 오염 문제로 인하여 전 제품회 회수 명령 등으로 인하여 소비자 신뢰를 상실하였고, 또 다른 개별인정형 원료인 회하나무열매추출물, 석류 추출물 등이 집중적인영업을 실시하고 있으나 과거 백수오 등 복합 추출물만큼의 시장을 회복하지 못하고 있음

- 즉, 여성 갱년기 건강기능식품 시장은 백수오등 복합 추출물의 판매량으로 볼 때 연 500억원 이상의 큰 시장을 형성하고 있으나 2015년 이후 특이적 원료의 공급 부재로 경쟁력 있는 원료의 투입 시 시장 점유율을 확보 할 수 있을 것으로 판단됨

(2) 시장진입 장벽

- 여성 갱년기 개선 증상에 대한 기능성 소재는 식품의약품안전처로부터 개별인정형 등록을 득하여야 하는 것이 가장 큰 시장 진입 장벽으로 추정됨

라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

- 1단계 : 자체 유통을 통해 갱년기 증상을 완화하고자 하는 여성 고객의 엔드 유저를 대상으로 한 자체 영업망(방문판매, 홈쇼핑)을 통해공급 (B2C)
- 2단계 : 개별인정형원료를 방문판매 및 다단계, 홈쇼핑 등 건강기능식품을 제조공급하는 기업에 대해 원료 공급 (B2B)

(2) BM의 수익창출 방안

- 기능성 원료의 개발, 대량 공급 체계의 확보 및 참여기업 자체유통망 보유 등을 통해서 중간 마진없이 최선의 가격구조를 형성할 수 있으며, 이를 통해 타원료에 비하여 높은 수익이 창출이 가능할 것으로 판단됨
- 현재 원료를 생산하기 위한 원물인 슈퍼홍미는 시장 확보를 통한 대량 공급 과정에서 대량재배기술의 확보, 대량 생산공정 등의 최적화를 통해 지속적인 원가절감이 가능하며, 추가적 수익 창출 확보

(2) 기대성과

< 기술적 측면 >

- 급격히 변화하고 있는 기후환경에 대응 하여 기능성 품종의 온도, 일장 반응에 따른 품종 개량을 진행함, 이에 따라 고기능성 품종의 재배지역을 확대하고 기후변화에 준비할 수 있음
- 본 과제는 수입산에 밀려 위기를 맞고 있는 국내 쌀 재배 농가에 품종 개량된 기능성 품종을 보급하고 이를 활용한 식품 개발을 통해 초기 활용처를 확보함으로써 국내 쌀

산업의 부가가치화와 경쟁력을 확보하는 하나의 방법을 제시함으로써 국내 농산물을 기반으로 한 기능성 식품 원료 제품을 개발 할 수 있음

○ 본 연구개발이 성공리에 종료될 시 다음과 같은 추가 파급효과를 가져 올 것으로 판단 됨

① 시장의 높은 요구에도 불구하고 현재까지 해외 개발 소재에 의존성으로 국내 개발 소재를 요구하는 시장 상황에서 과학적으로 입증된 기능을 가진 제품을 개발함으로써 갱년기 여성 건강 개선 그리고 이로 인해 파생될 수 있는 삶의 질 저하 예방을 통해 삶의 질 향상에 도움을 주어 국민건강 향상에 이바지 하며,

② 국내 자체 개발 품종 개량 농산물을 이용한 기능성 원료 및 제품 개발분야는 현재까지 연구가 미진한 부분으로 국내에서 농산물을 기반으로 한 기능성 원료 기술 개발 및 제품화를 통해 관련 기술의 노하우를 습득함으로써 해당 분야에서 국가적 경쟁력을 확보 하며,

③ 특히, 중소기업과 대학, 연구소간의 장점을 결합한 공동연구개발을 수행함으로써 산학연 공동연구개발에 대한 좋은 모델로서 활용할 수 있을 것으로 판단 됨

<경제/산업적 측면>

○ 한미 FTA 협정에 따른 식품시장의 국제적인 무한 경쟁 및 국가식량안보 차원에서의 국내산 품종에 우위를 점하기 위한 방법으로 고기능성 원료 및 제품의 개발과 효능의 우수성을 입증하는 연구가 필요한 상황임

○ 국내에서 생산성 향상에 대한 품종개량 종자의 보급률은 높은 편이나 기능성 강화 품종의 경우 상대적으로 보급률이 매우 떨어지는 편이다. 그러나 본 연구개발을 통해 고기능성으로 품종 개량된 신품종 쌀의 성공적인 상품화를 통해 국내에서의 기능성 강화 품종 개량 연구를 촉진함으로써 종자 산업에 활기를 넣을 수 있을 것으로 판단됨

○ 해외에서의 동양의학에 대한 관심도가 점차 증가하고 있는 시점에서 국내산 소재를 활용한 기능성 식품의 개발은 해외 수출 뿐만 아니라 본 연구개발이 성공적으로 종료 될 경우 수입 대체 효과가 매우 클것으로 판단되며, 또한 해외시장에서도 과학적 검증을 통해 강력한 경쟁력을 가지고 해외 수출을 진행 할수 있을 것으로 판단됨

○ 2013년 현재 국민의 대다수가 갱년기 증상을 가지고 있는 것으로 보고되어 본 연구개발의 결과물은 국민의 보건의료비 절감에도 상당부분 도움을 줄 것으로 전망됨

○ 창조경제에 대한 정부의 관심도가 증가하고 있는 시점에서 국내 개발된 품종개량 농

산물을 활용한 고기능성 원료 및 제품의 개발은 해외소재를 활용하여 건강기능식품을 제조한 국내 기업체에 파급효과가 클 것으로 사료되며, 기능성 소재의 개발 경쟁을 촉진하여 기술력 발전에 큰 역할을 할 수 있을 것으로 판단됨

- 결론적으로 국내에서 품종개량 되어 개발된 고기능성 쌀 품종의 재배지역 확대를 통한 대량생산을 이용하여 갱년기 여성 건강 개선용 식품 원료 제품으로의 개발은 농업 및 식품 업계의 경쟁력 향상과 더불어 국민 건강과 삶의 질 향상에 기여할 수 있을 것으로 예상됨