

11-1543
000-002
773-01

발간등록번호

11-1543000-002773-01

우슬등
유산균
발효
복합물을
이용한
관절건강
기능성
소재 및
건강
기능
식품
개발

최
종
보
고
서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발 R&D Report

우슬등 유산균 발효
복합물을 이용한
관절건강 기능성소재 및
건강기능식품 개발
최종보고서

2019. 03. 29

주관연구기관 / (주)메디앤바이오
협동연구기관 / 신라대학교산학협력단

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “우슬등 유산균발효 복합물을 이용한 관절건강 기능성소재 및 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 03 . 20 .

주관연구기관명 : (주) 메디앤바이오 (대표자) 박옥남
협동연구기관명 : 신라대학교 산학협력단 (대표자) 김성훈



주관연구책임자 : 박 옥 남
협동연구책임자 : 김안드레

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116033-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.07.07. - 2018.12.31	단 계 구 분	(3년)/ (3년)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	우슬등 유산균발효 복합물을 이용한 관절건강 기능성소재 및 건강기능식품 개발			
연구책임자	박 옥 남	해당단계 참여연구원 수	총: 13명 내부: 8명 외부: 5명	해당단계 연구개발비	정부:200,000천원 민간: 67,000천원 계: 267,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 11명 외부: 6명	총 연구개발비	정부:560,000천원 민간:188,000천원 계: 748,000천원
연구기관명 및 소속부서명	총괄(주관기관): (주)메디앤바이오 제1세부: (주)메디앤바이오 제1협동: 신라대학교 산학협력단			참여기업명 (주) 메디앤바이오	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」제24조의4에 따른 분류(보안과제 및 일반과제) 및 결정사유 5가지에 해당되지 않음
----------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

- 문헌조사와 선행연구 등을 토대로 관절건강 기능성 소재 개발
 - 대상 원재료 선정 및 원료 표준화 완료
 - 대량생산을 위한 공정 표준화 완료
 - 유효성분 탐색 및 관절 건강과의 메커니즘 규명
 - GLP기관 독성시험을 통한 안전성 확인
 - 지표성분 선정 및 검사법 설정
 - 가속시험을 통한 안정성 확인
 - 지표물질·유해성분 기준규격 설정
 - 인체적용 시험을 통한 소재의 기능성 확인
 - 개별인정형 원료 인증을 위한 서류 작성 및 신청 완료
- 시제품 1종 제작 완료
 - 소비자 기호도 조사 진행 중
 - 다양한 제형(캡슐, 정제, 과립 등)의 제품 개발 진행 중
- 논문 게재(비SCI) 2건, 투고(SCI) 2건, 특허 출원 2건, 특허 등록 1건, 학술발표 5건, 인력양성 6명, 고용창출 2명, 기술실시 1건, 기술인증 신청 1건
- 연구 성과 기반 제품의 판매를 위한 총판 판매조직과 계약 완료

보고서 면수

121 페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>유산균 발효 한약재를 이용한 골관절염 개선 건강기능식품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 발효한약재 복합물의 골관절염 개선 위한 최적 추출조건 확립 ○ 발효한약재 복합물의 원료 표준화 및 지표성분 분석법 확립 ○ 발효한약재 복합물의 대량생산 제조공정 표준화 및 기준규격 설정 ○ 발효한약재 복합물의 골관절염 개선 메카니즘 시험 ○ 발효한약재 복합물의 골관절염 개선 동물시험 효능 검증 ○ 발효한약재 복합물 활용 골관절염 개선 인체적용시험 ○ 발효한약재 복합물을 활용한 골관절염 개선 건강기능식품 개별인정 서류 작성 및 신청 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한약재의 생물전환 기술을 활용한 골관절염 개선 기능성 소재개발 기술 확보 ○ 생물전환기술을 통한 한약재 내 기능성분의 생체이용률 증진 기술 확보 ○ 생물전환 된 우슬, 땅두릅, 녹각 등의 골관절염 개선 메카니즘 규명 ○ 산업화에 적합한 최종 원재료 설정 및 배합비 확정 ○ 산업화를 위한 원료 표준화 및 대량생산 공정표준화 완료 ○ 골관절염 개선 효능 평가 기술 확보 ○ 골관절염 개선 기능성 소재의 지표성분 분리 및 분석기술 확보 ○ 생물전환 기술로 개발된 기능성 소재의 인체적용 시험을 통한 기능성 확인 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 골관절염개선 건강기능식품 개별인정 원료 등록 및 골관절염 개선 건강기능식품 제품 개발 ○ 골관절염 개선 기능성소재로 해외시장 개척 ○ 고령자용 및 운동선수용 등 다양한 용도의 복합제품으로 개발 ○ 국내 약용작물 재배농가 소득 향상 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>한약재</p>	<p>골관절</p>	<p>유산균</p>	<p>생물전환</p>	<p>개별인정</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>traditional herb</p>	<p>bone joint</p>	<p>lactic acid bacteria</p>	<p>bio conversion</p>	<p>individual approval</p>

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<Summary>

<p>Purpose and Contents</p>	<p>Health functional foods development for improving osteoarthritis using lactic-acid fermented traditional herbs</p> <ul style="list-style-type: none">○ Establishing optimal extraction condition of marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs for improving osteoarthritis○ Establishing standardization of raw materials and analytical method of marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs○ Standardization of manufacturing processes for mass production and standard setting for marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs○ Mechanism test for osteoarthritis improvement of marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs○ Efficacy verification with animal testing of marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs○ Human Studies on osteoarthritis improvement using marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs○ Complete and submit the application for individual approval of functional food for improving osteoarthritis using marker compounds in lactic-acid fermented traditional herbs
<p>Research and developments output</p>	<ul style="list-style-type: none">○ Guarantee of functional materials development technology for osteoarthritis improvement by bioconversion of traditional herbs○ Establish bioavailability enhancement technology of traditional herbs by bioconversion○ Investigate mechanism of improving osteoarthritis by bioconverted <i>Achyranthes Japonica Nakai</i>, <i>Aralia Continentalis Kitagawa</i>, <i>Cervus nippon Temminck</i>, etc○ Set final raw materials suitable for industrialization, combination percentage○ Finalize standardization of raw materials, mass production process for industrialization.○ Establish evaluation technique of the effectiveness of improving osteoarthritis○ Establish analytical method and analysis technique of functional materials for improving osteoarthritis○ Verify functionality by human studies for functional materials using bioavailability

<p>Application plan of R&D output (Desired effect)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Registration of individual approval of functional food for improving osteoarthritis and product development ○ Overseas Market Development by functional material for improving osteoarthritis and product development ○ Complex product development with variety of applications for the aged and athletes, etc ○ Income increase of local medicinal plant growers 				
<p>Keywords</p>	<p>traditional herb</p>	<p>bone joint</p>	<p>lactic acid bacteria</p>	<p>bio conversion</p>	<p>individual approval</p>

< **Content** >

1. Introduction of Research	1
1-1 Purpose of R & D	1
1-2 Necessity of R & D	1
1-3 R & D scope	9
2. Contents and Results of Research & Development	10
2-1 Research & Development methods	10
2-2 Research content and the result	33
2-3 Research & Development results	100
3. Target achievement and contribution to related field	112
3-1 Performance Evaluation methods	112
3-2 Purpose and achievement	112
3-3 Cause of failure and back-up plan	115
3-4 Contribution to related field	115
4. Plan to use research results	118
4-1 Technology transfer from the cooperative enterprise	118
4-2 Production complete units by using patented material	118
4-3 Distribution and marketing	119
4-4 Diversification of texture	119
note. Referances	120

<Enclosure> Self evaluation written opinion from supervision research Institution

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1-1 연구개발 목적	1
1-2 연구개발의 필요성	1
1-3 연구개발 범위	9
2. 연구수행 내용 및 결과	10
2-1 연구개발 방법	10
2-2 연구 내용 및 결과	33
2-3 연구개발 성과	100
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	112
3-1 성과 평가방법	112
3-2 목표 및 달성여부	112
3-3 목표 미달성 원인 및 차후대책	115
3-4 관련 분야 기여도	115
4. 연구결과의 활용 계획 등	118
4-1 협동기관에서의 기술 이전	118
4-2 특허 소재를 이용한 완제품 제작	118
4-3 유통 및 마케팅	119
4-4 제형의 다양화	119
붙임. 참고 문헌	120

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

유산균발효 한약재를 이용한 관절건강에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재 개발

이에 본 연구에서는 1) 한약재 발효 복합 추출물의 퇴행성 관절염 및 척추 관절염 예방 완화 특성 조사, 물질 분리 및 생리기능성 연구, 2) 유산균 발효 한약재를 이용한 건강기능식품 개별 인정형 소재 개발, 3) 건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 2종 개발을 목표로 연구를 수행 하였음.

1-2. 연구개발의 필요성

1. 연구 개발의 개요

- 평균 수명 연장으로 관절염과 같은 퇴행성질환에 대한 관심이 크게 증가
- 스테로이드성 또는 비스테로이드성 관절염치료제(의약품)는 약물 의존성이나 부작용이 많아 부작용이 없는 건강기능식품 등의 대체방안이 요구되어지고 있는 실정
- 관절건강에 대표적인 건강기능식품인 글루코사민과 콘드로이틴의 위기
 - 미국국립보건원 발표 (2008. 6.17) - 6개월간의 비교시험에서 글루코사민과 콘드로이틴이 '통증감소'에 있어서 위약보다 단 4%만의 효과가 있다고 발표
 - 한국보건의료원발표(2010.1.27. 데일리팝) - 한양대 류마티스병원장 배상철 교수팀이 연구한 결과 글루코사민과 콘드로이틴제제의 과학적 근거평가에서 관절염환자의 통증감소, 기능성 향상, 관절강 소실 예방에 대한 효과 평가에서 효과적이라고 결론 내리기에는 근거가 낮다고 발표
 - 류마톨로지 학술지 발표 - 80명의 관절염환자를 대상으로 글루코사민과 위약을 비교한 결과 '통증개선'에 있어 위약과 비교해 효과차이가 없다고 발표
- 글루코사민과 황산콘드로이틴 및 그외 약효가 미미한 관절건강기능식품을 대체할 소재가 절실히 필요
 - 골관절 관련 통증완화 또는 염증완화 등의 우수한 효능과 함께 부작용과 의존 위험이 적은 기능성 원료가 관절건강관련 시장을 대체해 나갈 것으로 예상됨
- 우리나라의 경우 골관절 질환 관련 기능성식품 시장은 글루코사민을 중심으로 2009년 기준 연간 1천억 원에 이르는 것으로 보고되어 있으나, 2010년 한국보건의료연구원이 공개한

글루코사민과 콘드로이틴 제제 사용현황 조사와 평가보고서에 글루코사민의 골관절염에 대하여 효능이 없다는 보고가 있는 후 글루코사민과 관련된 건강기능식품 시장이 위축되고 있는 실정

- 골관절 질환 관련 시장에서의 문제점 보완과 더불어 기능성이 검증된 안전한 소재의 개발 필요
- 본 연구에서는 유산균 복합발효 공법을 이용하여 우슬, 독활, 녹각 등 천연물을 이용한 관절건강 기능성 식품 개발을 통하여 내수 시장 확보 및 대외 수출 경쟁력을 확보하고자 하였음
- 우슬(牛膝)은 비름과(*Amaranthaceae*)의 쇠무릎(*Achyranthes radix*)의 뿌리를 기원으로 하여 한국과 일본, 중국에 분포하여 자라며, 한약재 등으로 사용되어지고 있음. 최근 연구가 조금씩 진행되어 천연물 의약품으로 사용되고 있으나 유산균 발효 등의 소재개발까지는 진행되어있지 않음
- 관절염에 효과적이라 알려진 한약재인 우슬, 독활, 녹각의 단독 사용 또는 병행 사용이 관절염 또는 관절 통증 개선에 미치는 효과를 확인함으로 가장 효과적인 소재의 개발이 가능할 것이라 사료됨
- 선별된 추출물들의 성분분석 및 발효추출물들의 생리활성물질 규명과 관절염 개선 효과를 체계적으로 연구하고, 그 결과를 토대로 생산공정기술 개발과 밸리데이션 및 표준화를 통한 기능성 식품 소재의 확보가 필요함
- 유산균 발효 생물전환 기술은 유효성분의 생체이용률을 높이고 독성을 감소시키는 등의 효과가 알려져 있는 바, 관절염 증상 개선과 관련된 성분 및 효능을 증가시킨 발효물을 개발하고, 발효물 생산법 표준화를 통해 퇴행성 관절염 통증 완화를 비롯한 관절건강 기능성소재의 개발은 퇴행성질환을 주로 앓고 있는 고령자에게 보다 효과적인 기능을 제공하는 소재가 될 것으로 사료됨
- 우슬, 독활, 녹각 등 한약재의 유산균 발효를 이용한 생물전환 방법으로 관절건강 기능성 원료 개발 및 기능성, 안전성 평가 수행. 기능성원료 유효성 평가는 *in vitro* 및 *in vivo* 효능 평가 및 메커니즘 규명을 통해 생산된 기능성원료를 대상으로 인체적용시험을 진행하여 기능성 소재로서 사용 가능성을 탐색 함
- 우슬, 독활, 녹각 유산균 발효추출물의 건강기능식품 기능성원료 제품화 연구로 pilot scale(1,000kg) 규모의 제조공정 연구, 기능성식품 제제 및 제형 연구, 기능성식품 원료 및 제제 안정성 평가(가속, 실온), 유용물질의 전임상 및 기능성식품 인체적용 시험(전문기관 의뢰)을 수행하여 기능성식품 개별인정형 원료 인증을 신청하였음

2. 연구개발 대상의 국내외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

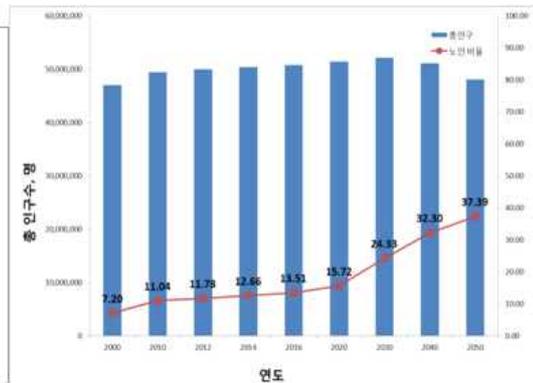
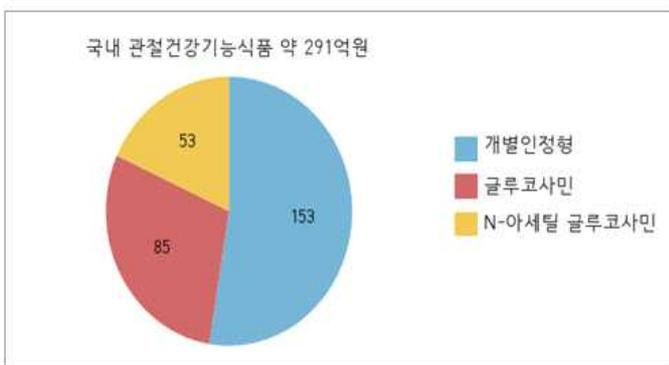
(1) 기술현황

- 우슬, 독활, 녹각은 음료, 환, 분말 등 단순 추출물을 활용한 일반식품형태로 이용되거나 건강기능식품의 부원료로 이용되고 있으며, 우슬, 독활, 녹각에 함유되어 있는 기능성분의 추출수율증대 및 생체이용률을 높이기 위한 특이적인 가공기술개발에 대한 보고는 없는 상태임
- 우슬 및 독활은 건강기능식품 기능성원료로 아직 등재되어 있지 않은 원료이며, 건강기능식품 개별인정 원료로의 등재를 위한 연구도 아직 미미한 실정임
- **건강기능식품 관절건강 개별인정 원료 현황**
Fatty Acid Complex, MSM, N-아세틸글루코사민, 가시오가피 등 복합추출물, 강황추출물, 글루코사민, 닭가슴연골분말, 로즈힙분말, 보스웰리아 추출물, 비즈왁스알코올, 전칠삼추출물등 복합물, 지방산복합물, 차조기등복합추출물, 초록입홍합추출오일, 호프추출물, 황금추출물 등 복합물
- 우리나라의 경우 약 4,000여 종의 식물자원을 이용하여 관절 질환에 대한 연구를 지속하고 있으나 가시오가피, 우슬 등의 생약복합제제의 추출성분만을 이용한 연구 진행 중 임. 아직 생물전환기술을 이용한 생약복합제의 생체이용률을 증진, 생약복합제 섭취 시 관능 개선, 신소재 개발과 같은 연구는 활발히 진행되고 있지 않음
- 생물전환기술을 통한 건강기능식품 소재 개발을 위해서는 생산공정의 표준화, 우수한 생물전환 균주의 확보, 기능성분 및 지표성분의 분리 및 분석에 관한 기술개발이 수반되어야 함
- 퇴행성 관절염 치료제 현황

구분	대량생산	적용방법	치료단계	주요 제품
진통소염제	가능	경구 투여	초기	세레브렉스, 조인스정, 레일라, 낙소졸, 비모보, 신바로
히알루론산 치료제	가능	주사 투여	초기	히알루마, 하이히알주, 히루안플러스주, 하이알주, 아라간주, 시노비안주
자가세포 치료제	불가능	수술	중기	카티셀, 아티셀, 콘드론
줄기세포 치료제	가능	수술	중기	카티스템
유전자세포 치료제	가능	주사 투여	중기	티슈진-C(임상 3상 완료)
인공관절	가능	수술	말기	Fixed Bearing System, Triathlon Total Knee Sytem

출처: 동부증권(2014년)

(2) 시장현황



- 관절 관련 건강기능식품의 국내시장 규모는 약 291억 원, 이중 글루코사민 제품이 약 85억 원, N-아세틸글루코사민 제품이 약 53억 원, 개별인정형 제품이 약 153억 원 (2013년)
* 자료출처: 농업기술실용화재단

- 2007년 1,000억 원의 매출액을 나타냄으로써 국내 건강기능식품 중 가장 큰 비중을 차지했던 글루코사민이 2010년 실제 관절건강에 큰 효용이 없다는 보건의료연구원의 연구 결과가 언론사를 통해 보도되면서 (한겨레 <http://www.koreahealthlog.com/1622>) 매출이 급락

- ‘우슬, 독활, 녹각’을 사용한 관절 제품 사례

사례1) 우슬 뿌리와 녹각을 달인 진액 제품

- 제조사 : 비땅산야초 / 가격 : 60팩/ 18만원

사례 2) 우슬과 식물성 소재를 혼합하여 만든 환 제품들

- 제조사 : 엘에스과학생명/생생스림, 가격 : 1만원/2만 5천원 (1통)



사례 3) 우슬과 식물성 소재를 말려 차로 마시는 제품
 - 제조사 : 몽테베르거 가격 : 3만원 (1세트)



(3) 경쟁기관현황

- 천연물 진통소염제의 경우 SK케미칼의 조인스정, 한국피엠지의 레일라, 녹십자의 신바로 등
- 관절염관련 천연물 진통소염제의 경우 녹제초와 낙석등(동아에스티), 은행엽과 인삼(서울제약), 금은화와 지모(함소아제약), 향기와 노린재나무 잎(YD생명과학) 등이 임상진행 중

(4) 지식재산권현황

- 우슬, 독활, 녹각 복합추출물은 통상적으로 사용되는 추출, 발효방식을 이용하거나, 특허된 기구를 이용하여 추출 후 발효를 진행할 예정으로 기능성 위주의 내용을 검토하였음.
- 현재까지 우슬, 독활, 녹각 복합물로 골관절염 및 허리통증 개선에 특허된 특허는 없는 것으로 조사되었음.
- 골관절염 및 허리통증 개선과 관련이 있는 유효특허는 26건이 검색되었으나 다양한 여러 소재들이 단순 혼입된 복합물 조성물 형태의 특허기술임

(5) 표준화현황

- 우슬은 ecdysterone과 inokosterone로 표준화 연구(한국 및 중국 지역에서 수집된 우슬의 모니터링을 통한 지표성분의 함량기준 설정, 분석과학 vol.25 no.4 (2012년 8월) pp.250-256))가 있었고, 독활과 녹각에 대한 표준 규격에 대해서는 검색된 바 없음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

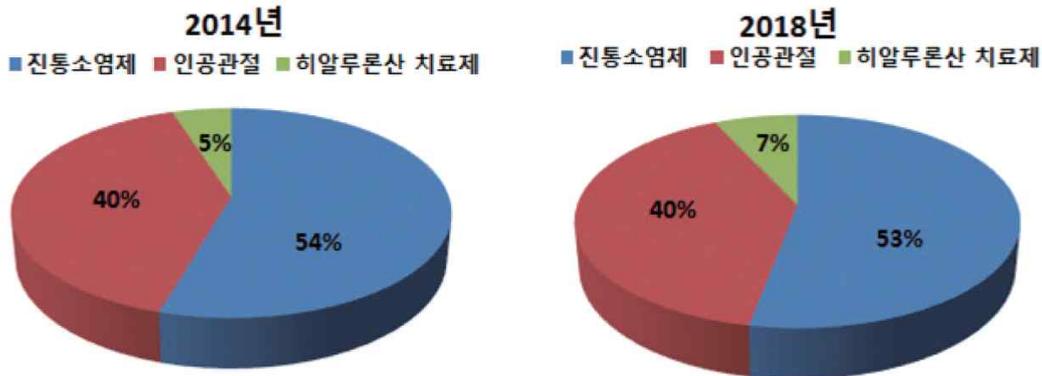
- 일본에서는 우슬의 oleanolic계 saponin, steroid계 inokosterone, ecdysone β -sitosterol 등의 성분이 항종양 활성을 보였다고 일부 보고되고 있음

(2) 시장현황

- 관절염관련 시장은 2010년 306억 달러에서 연평균 3%로 성장하여 2018년 406억 달러 규모의 시장을 형성할 것으로 전망
- 급속화 되는 인구 고령화로 세계 퇴행성 관절염 환자 수는 지속적으로 증가하고 있음
세계인구의 약 10~15%가 퇴행성 관절염을 앓고 있으며 노년층 10명 중 8명에서 발병함
(출처 과학과 기술, 한국과학기술단체, '10년)
- 관절염 치료비는 2010년 306억 달러에서 연평균 3% 성장하여 2018년 406억 달러 규모의 시장을 형성할 것으로 전망

(단위: 억 달러, %)

구분	'10년	'11년	'12년	'13년	'14년	'15년	'16년	'17년	'18년	연평균 증가율	
의약품	진통소염제	169	175	180	185	191	197	202	209	215	3.0 ¹⁾
	히알루론산	14	15	16	18	19	21	23	25	27	9.1
의료 기기	인공관절	123	127	132	136	141	147	152	158	164	3.6
합계	306	317	328	339	351	365	377	392	406	3	



출처: 보건산업진흥원(2015년), 크리스탈지노믹스(2013년) 재가공

< '11년 기준 연평균 3%의 성장률을 감안한 수치임 >

주) 세포 치료제 관련 시장자료 부족으로 세포 치료제 시장을 제외하였고 진통소염제 시장은 크리스탈지노믹스 ('13년), 히알루론산 치료제 시장은 Transparency Market Research('14년), 인공관절 시장은 보건산업진흥원('15년) 자료를 바탕으로 산정함 (출처: 보건산업진흥원(2015년), 크리스탈지노믹스(2013년) 재가공)

- 퇴행성 관절염 치료 시장은 진통소염제와 인공관절이 전체 시장의 94%('14년)를 점유하고 있으며 히알루론산 치료제는 상대적으로 낮은 시장 점유율을 보임
 - '14년 진통소염제는 54%(191억 달러), 인공관절은 40%(141억 달러)이며, '18년에는 두 시장 비율이 93%(406억 달러)로 유사한 수준을 나타낼 것으로 전망
 - '14년 히알루론산 치료제는 5%(19억 달러)로 시장 비율 변화가 낮을 것으로 전망

(3) 경쟁기관현황

- 본 연구와 관련된 한약재 유산균 발효를 통한 관절건강 기능성 소재 생산 경쟁기관은 없음

(4) 지식재산권현황

- 본 연구와 관련된 한약재 유산균 발효를 통한 관절건강 기능성 소재는 지식재산권이 없음

(5) 표준화현황

- 우슬은 대한약전 생약 및 생약제제에 등재 되어 있으며, 확인시험 및 순도시험, 건조감량. 17.0 % 이하(6 시간). 회분(10.0 % 이하). 산불용성회분에 대한 규격이 설정되어 있음
- 녹각은 대한약전 외한약 규격집에 성상과 등급에 대한 규격만이 설정되어 있음
- 독활은 대한약전외한약(생약)규격집에 수재된 생약으로 Continentalic acid를 확인시험을 통해 확인하도록 하고 있음

3. 연구개발의 중요성

- 노인인구의 증가로 관절건강에 대한 관심과 관련시장이 늘어나고 있는 추세
- 스테로이드성 또는 비스테로이드성 관절염치료제(의약품)와 달리 약물 의존성이나 부작용이 없는 건강기능식품을 이용한 관절건강치료 대체방안의 필요성 요구
- 글루코사민과 황산콘드로이틴 및 약효가 미미한 관절건강기능식품을 대체할 소재 필요성 증가
 - 식품의 형태로 효과가 우수하고, 부작용과 의존 위험이 적은 기능성 원료가 관절건강관련 시장을 대체할 것으로 예상됨
- 허리통증은 디스크, 퇴행성 척추 관절염, 염좌, 골절 등의 요인으로 발생하며, 퇴행성 척추 관절염의 경우 만성질환으로 단순 소염·진통제만으로는 그 질환의 효과적 조절에 어려움 있음
- 관절염에 사용되는 기존 치료제 또한 장기간 복용에 따른 부작용으로 노년층 환자들에게 많은 불편을 초래하고 있는 실정
- 머크사의 바이옥스와 화이자사의 벡스트라의 회수조치로 관절염 치료제 시장 위축
- 아세트아미노펜이나 트라마돌과 같은 진통제 및 COX-2 저해제를 포함하는 NSAIDs계 약물이 주로 사용되고 있으며 이들 대부분은 근본적인 연골재생이 불가능하고 장기간 투여 시 부작용을 일으키므로 주의가 필요함
- 우리나라의 경우 골관절 질환 관련 기능성식품 시장은 글루코사민을 중심으로 2009년 기준 연간 1천억 원에 이르는 것으로 보고되어 있으나, 2010년 한국보건의료연구원이 공개한 글루코사민과 콘드로이틴 제제 사용현황 조사와 평가보고서에 글루코사민의 골관절염에 대하여 효능이 없다는 보고가 있는 후 글루코사민과 관련된 건강기능식품 시장이 위축되고 있는 실정
- 골관절염 관련 건강기능식품 시장에서의 다양한 문제점들을 보완하는 기능성 및 안전성이 담보된 소재의 개발이 필요함

1-3. 연구개발 범위

1. 문헌을 통한 관절건강 기능성 소재에 대한 정보 수집
2. 원료 표준화
 - 원재료 선정
 - 지표물질 설정 및 분석 기술 확보
 - 가속 실험 통한 안전성 및 안정성 확인
3. 공정 표준화
 - Lab scale 최적 공정 확립
 - Lab scale 생산공정 기반 Pilot scale 최적 공정 확립
4. 소재 기능성 확인 및 메커니즘 규명 (in vitro, in vivo, 인체적용시험)
 - in vitro 실험 : 각 소재의 기능성 확인 및 경제성을 담보하는 원재료 선정, 배합비 결정
 - in vivo 실험 : 전임상 실험 진행
 - 인체적용시험 : 골관절염 대상자 30 cases
5. 소재의 사업화
 - 기술실시
 - 제품화

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1 연구개발 방법

1. 연구개발 추진전략 및 방법

- 유산균 한약재 발효추출물 제조(lab scale 10 kg 단위 및 pilot scale 1,000 kg 단위)
 - (주)메디앤바이오(주관기관)는 한약재의 유산균 발효 소재 관련 개발 담당
 - 우슬, 독활, 녹각 등 한약재의 원산지 및 품질관리
 - 유산균 발효 최적화를 위한 소재의 물성연구
 - 신라대학에 구비되어 있는 GMP시설을 이용해 발효 한약재 추출물을 제조
 - 신라대학은(협동기관) 유산균 발효 관련 개발 담당
 - 유산균 선별, 유산균 배양 조건 확립 등
 - 발효 한약재의 추출 조건 확립

- NMR, LC/MS를 이용한 지표물질(biomarker) 선정
 - (주)메디앤바이오(주관기관)와 신라대학교(협동기관)는 관절건강 기능성 소재 개발 생산을 위한 지표물질을 NMR과 LC/MS를 이용하여 구조 규명

- 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색
 - 신라대학교(협동기관)는 관절건강 기능식품 소재 기능성 인증을 위한 Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a, COX-2 등의 생리 활성 기능을 측정

- 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색
 - 신라대학교(협동기관)는 관절건강 기능식품 소재 기능성 인증을 위한 뼈성장과 관련된 생리활성인 MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등을 측정

- 대량생산 공정 확립
 - Pilot scale(1,000 kg)의 한약재 유산균 발효 공정 개발

- 일반독성 및 유전독성 시험
 - 한국건설생활환경시험연구원(KCL)

- 인체적용 시험용 시료 생산
 - 신라대학교 GMP 생산시설을 이용한 인체적용 시험용 제품 생산

- 표준화 된 원료의 건강기능식품 제형화
 - 제형의 안정성 및 다양화를 위해 초미세 분말화, 분말의 기능성 물질 안정성 테스트

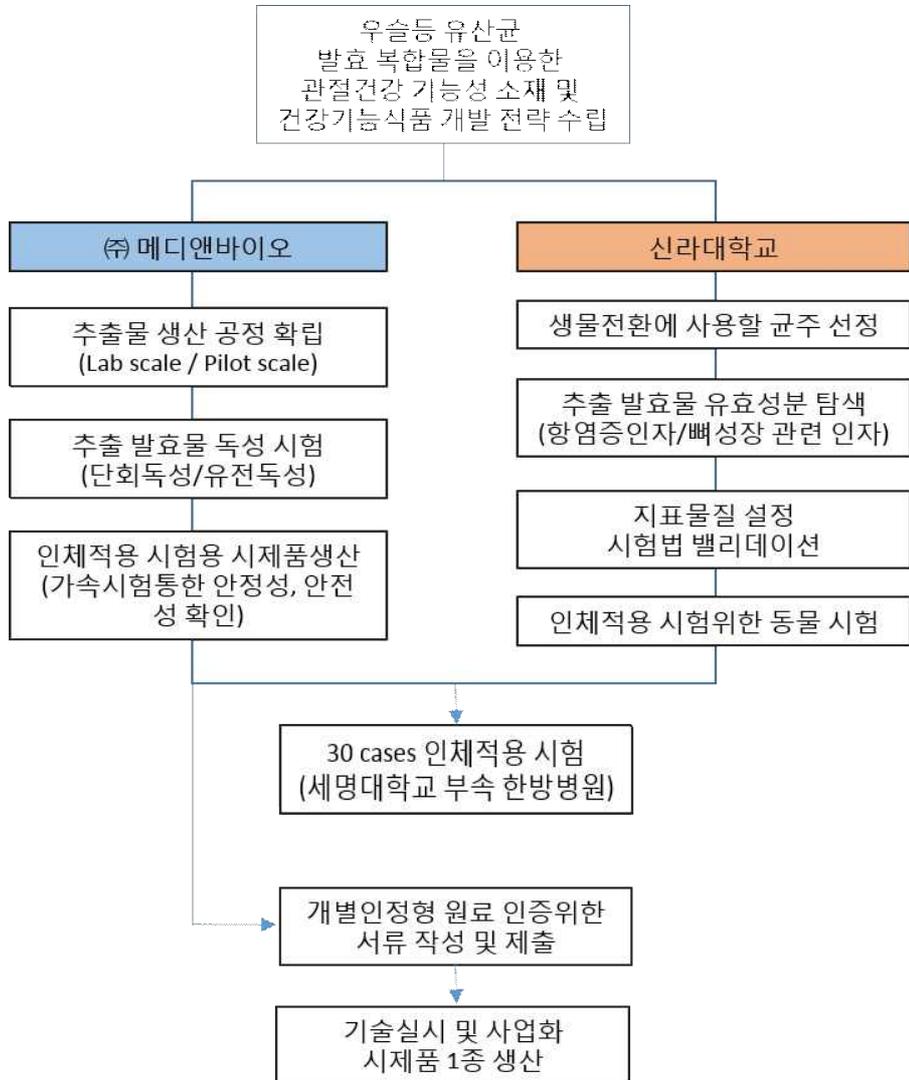
- 지표성분 분석법 밸리데이션
 - HPLC를 이용한 우슬, 땅두릅의 밸리데이션

- 유통기한 설정을 위한 가혹시험
 - 원료의 안정성 실험, 지표성분 경시변화 및 함량 실험, 유화 안정성, 미생물 검사, 관능검사

- 인체적용시험
 - GCP규정에 따른 30 cases 이상의 인체적용시험을 통해 관절 통증 완화 기능성 및 안전성 검증

- 개별인정 신청
 - 식품의약품안전처에 관절건강 개선 기능성 원료 인증 신청

2. 연구개발 추진체계



기관명	주요 담당 업무
(주) 메디앤바이오	<ul style="list-style-type: none"> - 문헌통한 관절건강 기능성 소재 정보 수집 - lab scale/Pilot scale 유산균 배양 통한 한약재 발효 제조 공정 개발 - 생산 공정 최적화 및 원료 경제성 확보 - 원료 제형화 - 추출발효물 독성시험 진행(GLP 기관) - 인체적용 시험용 시험제품 생산 - 원료 가속시험 통한 유통기한 설정 - 인체 적용 시험 시행 - 개별인정형 원료 인증 신청을 위한 서류 작성 및 제출 - 사업화 위한 시제품 제작
신라대학교	<ul style="list-style-type: none"> - 계획 수립 및 자료 조사 - 한약재 발효에 사용될 가장 효과적인 유산균 발효조건 탐색 - 발효한약재 시료 추출물 확보 - NMR, LC/MS를 이용한 지표물질 선정 - LC/MS를 이용한 지표물질 및 제품의 finger print 분석을 통한 제품 표준화 - 유효성분 탐색(in vitro) : 함염증 관련인자 실험, 뼈성장 관련인자 실험 - 동물 실험 : 골관절염 동물모델에서의 추출물 효능 실험, 폐경기 골다공증 동물모델에서 추출발효물의 효능

[그림. 연구 세부 추진 체계 및 전략]

- 본 연구는 우슬 등 생약 원재료에 생체전환 기술 적용으로 관절건강 기능성 소재를 개발하여 생체이용률을 높이고, 과학적 효과 효능이 검증된 소재를 개발하고자 함.
- 관절 건강에 유용하다 알려진 생약소재를 문헌을 통해 탐색하고 그 효과 효능 및 작용 메커니즘을 규명함으로써 과학적 근거를 확보하고자 함.
- 복합 추출물의 생산에 필요한 원재료의 최적 비율을 확인하고, 대량 생산 공정의 표준화를 통해 안정적 원료 공급이 가능토록 하고자 함.
- in vitro, in vivo, 인체적용시험을 통해 개발된 소재의 기능성을 과학적으로 검증하고자 함.
- 본 연구를 통하여 취득한 지적재산권을 활용한 마케팅 추진으로 원활한 시장 진입이 가능할 것으로 예상됨.

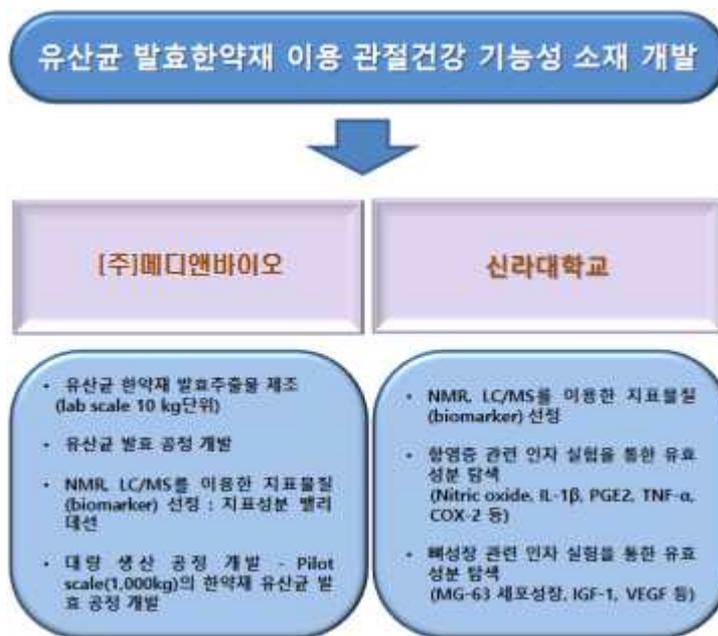
• 연차별 세부 추진 전략

가. 1차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관(메디앤바이오) : 유산균 발효 한약제 lab scale(10kg 이하) 생산 기술 개발 및 표준화
- 협동연구기관(신라대학교) : 유산균 발효 한약제의 항염 활성 및 골형성 촉진 활성 측정

(2) 개발 내용 및 범위



(가) Lab scale 유산균 배양을 통한 한약제 발효 제조공정 개발

한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행(KCTC)에서 분양을 받아 MRS배지(Difco Co.)에 계대배양 한 후 실험을 수행 한다. 유산균의 복합배양에 사용한 한약제는 4℃, 4,000×g에서 10분간 원심분리 하여 침전물을 제거한 후 pH를 6.3으로 조정하여 121℃, 15분간 멸균하며, 유산균의 생육을 증대시키기 위해 당밀이 함유된 brown sugar를 각각 1%(w/v)와 5%(w/v)로 첨가한다. 복합배양 시 유산균은 각각 10⁸ CFU/mL의 stock액을 제조한 후 한약 40 mL(50 mL tube, Corning Co.)에 각각의 stock액 10 μL를 혼합하여 접종하며, 유산균이 혼합 접종된 한약은 37℃에서 정치배양 한다.

본 연구에 사용한 발효용 유산균은 *Lactobacillus brevis* KCTC 3498, *Lactobacillus*

casei KCTC 3109, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635, *Lactobacillus fermentum* KCTC 3112, *Lactobacillus helveticus* KCTC 3545, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* KCTC 3108 등 3 종 이상을 발효한 한약재를 선별 사용한다.

(나) 우슬 등 한약재의 발효추출물 표준화 및 유효성분 탐색(*in vitro*)

- 열수추출방법을 이용하여 우슬 등 한약재 및 발효한약재 시료의 추출물 확보

본 연구팀은 한약재추출물을 유산균의 한 종류인 *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 발효하였고 이들의 관절염관련 생리활성을 측정해보았다. 따라서 1차년도는 *Lactobacillus* 속 중 *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis* 등의 유산균발효를 통해 얻은 한약재추출물들을 스크리닝하여 보다 좋은 효능의 발효추출물을 선별하고자 한다.

- NMR, LC/MS를 이용한 지표물질(biomarker) 선정

건강기능식품 효능 검증과 제조 및 품질관리에 사용될 지표물질을 NMR, LC/MS를 이용하여 분석한다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 Varian Unity Inova 500MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하며, D_2O 용매를 사용 하고 ppm 단위로 나타낸다.

활성물질 정량을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)조건은 다음과 같이 mobile phase는 methanol : water(80 : 20) 에서 μ Bondapak C18 (3.9 x 300 mm) 컬럼이나 이와 동등한 성능의 컬럼을 사용하고, 280 nm에서 측정한다. 본 연구의 결과는 SAS system을 이용하여 ANOVA분석 후 $\alpha = 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정한다.

- 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide(NO), IL-1 β , PGE2, TNF- α , COX-2 등)

① Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되어 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하고 또한 활성화된 대식세포는 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하게 된다. 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, TNF- α 및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다.

② 대식세포에서 IL-1 β 측정

본 시험법은 mouse macrophage cell인 Raw246.7 cell을 이용하여 LPS를 처리 하였을 때

유도 되는 염증 반응에서 생성되는 다양한 매개체중 하나인 IL-1 β 의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정함으로써 염증반응의 정도를 측정 한다.

③ PGE2

본 시험법은 mouse macrophage cell인 Raw246.7 cell을 이용하여 LPS를 처리 하였을 때 유도 되는 염증 반응에서 생성되는 다양한 매개체중 하나인 PGE2의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정함으로써 염증반응의 정도를 측정 한다.

④ TNF- α

혈청 및 비장 세포 TNF- α 측정: 시험 종료 후 마우스 안와정맥총에서 채혈한 후 원심분리를 이용하여 분리한 혈청과 비장세포 상등액에 대하여 TNF- α 변화량을 ELISA kit을 이용하여 정량한다.

⑤ COX-2

혈청 및 비장 세포 내 IFN- γ 측정: TNF- α 측정과 마찬가지로 시험 종료 후 마우스 안와정맥총에서 채혈한 후 원심분리를 이용하여 분리한 혈청과 비장세포 상등액에 대하여 IFN- γ 의 변화량을 ELISA kit을 이용하여 정량한다.

- 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등)
골아세포인 MG-63세포 배양시 유산균 한약재 발효 추출물을 첨가하여 세포성장물과 IGF-1, VEGE 등을 측정하여 그 유효성을 알아본다.

(다) 대량 생산 공정 개발

- Pilot scale(1,000kg)의 생산 한약재 유산균발효 공정 개발



그림 21. 협동연구기관에서 보유한 5톤 규모 배양기 및 농축기

- 생산 공정 최적화 및 원료 경제성 확보

(라) 지표성분 시험법 확립 및 시험법 밸리데이션

- 선정된 기능/지표성분의 분석시험법이 재현성이 있는지 검증하는 방법으로 분석에 사용되는 오차가 허용되는 정도를 과학적으로 입증하는 것임

〈 밸리데이션 평가방법〉

항목	정의	적용		
		기능성분		유해물질 (정량)
		정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	분순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예
정확성 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도	예	아니오	예
정밀성 (Precision)	균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예
정량한계 (Quantitation Limit)	적절한 정밀성과 정확성을 가진 결과값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	아니오	아니오	예
직선성 (Linearity)	시험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예
범위 (Range)	적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)의 하한값 및 상한값 사이의 영역	예	아니오	아니오

나. 2차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관(메디앤바이오) : 유산균 발효 한약제 pilot scale(1,000kg 이상) 생산 기술 개발 및 표준화
- 협동연구기관(신라대학교) : 인체적용시험을 위한 동물시험

(2) 개발 내용 및 범위

관절건강 기능성 소재 대량생산 개발 및 임상시험



(가) 대량 생산 공정 확립

- Pilot scale(1,000kg)의 생산 한약재 유산균발효 공정 개발



그림 21. 협동연구기관에서 보유한 5톤 규모 배양기 및 농축기

- 생산 공정 최적화 및 수율, 기준규격 설정

(나) 인체적용시험을 위한 동물시험

- 골관절염 동물모델에서 우슬 등 복합추출발효물의 효능 시험
- 혈액내 항염지표 COX, TNF- α , IL-1 β 검사

골관절염 동물모델(mouse)에 우슬 등 복합추출발효물을 경구투여 후 혈액을 채취하여 COX, TNF- α , IL-1 β ELISA kit을 이용하여 정량한다.

- 폐경기 골다공증 동물모델에서 우슬 등 복합추출발효물의 효능
- 조직학적 변화 확인
- 혈액내 골형성지표(Osteocalcin) 및 골흡수지표(C-telopeptidex)검사

(다) 일반 독성 시험

- 우슬 등 복합추출발효물의 단회투여 독성 등 일반독성시험(GLP기관 : 켄온)

(라) 인체적용 시험용 시료 생산

- 신라대학교 GMP 생산시설을 이용한 인체적용 시험용 제품 생산

(마) 인체적용시험

- GCP규정에 따른 30 cases의 예비 인체적용시험을 통해 허리 통증 완화 기능성 및 안전성 검증
- 인체시험 내용

① 인체적용시험 기능성 평가 원칙에 따른 인체적용시험 연구계획서(protocol) 개발

[인체적용시험 기능성 평가 원칙]

- IRB 승인 획득
- 인체적용시험은 이중맹검법, 플라시보 대조법, 무작위 배정법 적용
- 시험 목적 설정 : 목적의 적합성, 합리성, 명확성 등
- 연구대상자 선정, 제외 기준 설정: 해당 기능성에 적합한 피험자 그룹 선정
- 실험에 대한 충분한 이해 및 동의 획득
- 시험물질 용량 선정
- 대조군/시험군 선정 : 정확한 대조군 분리 및 진행, 무작위 배정
- 기능성 바이오마커: 해당 기능성 검증에 적합한 바이오마커 선정
(작용기전별, 시험관시험, 동물시험 평가법과의 상관성 검토)
- 식이 가이드라인 설정, 피험자의 최적 순응도 관리
- 결과 판정 기준 : 시험 전 명확히 제시 필요, 목적에 적합해야 함
- 모니터링 방법 적합성, 시험기간 내 이상반응 모니터링
- 시험 중지 또는 endpoint 설정 적합성

[연구대상자]

- 노화로 인한 관절 불편함을 호소하는 성인 (WAMAC pain 점수로 선별)
- 관절에 영향을 줄 수 있는 의약품이나 질환이 있는 자는 제외

[중재기간] : 12주

[바이오마커]

- 기능성 마커 : 시험관, 동물시험 결과에 따라 다음 중 선별

구분	바이오마커
Subjective biomarkers	통증 점수(VAS) WOMAC: pain, stiffness, function
Objective biomarkers	방사선학적 검사
	Blood: CTX-II, MMPs, COMP, CRP, ESR, IL-6, TIMP, MDA, fructosamine 등
	Urine: CTX-II 등

- 안전성 마커

이상반응, 활력징후, 임상병리검사(일반혈액검사 및 뇨 검사)

[식이 생활습관 조절]

- 관절건강에 영향을 미칠 수 있는 식이, 약물복용 제한하되 이외의 것은 평소 식이 및 생활습관 유지하도록 함
- 연구 참여기간 동안 식이섭취 및 활동량 수준 조사

② 전자증례기록서(electronic case report form) 시스템 도입으로 데이터 관리 위한 편리성 및 신뢰도 확보

- 안정적이고 체계적인 데이터 통합관리가 가능한 전자증례기록서 개발
- 연구의 목적, 연구모델의 특성(항상성 모델 등)에 따른 DB spec 개발 및 화면 구성: 연구 대상자별 정보관리, 데이터 모니터링 정보 관리, DB template 생성, 사용자 이력 및 수정사항 로그 관리 시스템 적용
- 전자 기반의 데이터 입력 시스템 활용으로 데이터 입력의 신속성을 통해 인체연구 데이터 획득에 대한 편리성 확보
- 확보된 인체연구 데이터 실시간 모니터링을 통해 데이터 오류를 신속히 파악하고, 실시기관을 주기적으로 방문하여 근거문서(source documents)와 전자증례기록서 검증을 통해 데이터 신뢰도 확보
- 인체연구 종료 후 연계 중과제 팀에 통계분석에 필요한 데이터셋을 신속히 제공



전자증례기록서

③ 연구대상자 생명 윤리 및 안전 확보

생명윤리 및 안전에 관한 법률(법률 제10605호)에 따라 기관윤리위원회(IRB) 승인절차 추진 및 IRB 대응

□ IRB 제출문서 개발

- 연구자 자료집(investigators' brochure)
- 연구계획서(protocol)
 - 인체적용시험의 실시기관명 및 주소
 - 인체적용시험의 책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명
 - 인체적용시험 시험식품 등을 관리하는 담당자
 - 인체적용시험 의뢰자명 및 주소
 - 인체적용시험의 목적 및 배경
 - 인체적용시험 디자인 및 시험방법
 - 연구대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자의 수 및 그 근거
 - 인체적용시험의 기간
 - 관찰항목·검사항목 및 관찰검사방법
 - 예측 부작용 및 사용상의 주의사항
 - 중지·탈락 기준
 - 효과 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)
 - 부작용을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법
 - 피해자 보상에 대한 규약
 - 연구대상자의 안전보호에 관한 대책
 - 그 밖에 임상시험을 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항

- 증례기록서(CRF)
 - 자료 수집항목 검토 및 문항지 개발
 - 자료 관리 및 데이터 점검이 가능한 자료 관리체계 고려

- 연구대상자 동의를 위한 설명문 및 동의서
 - 연구대상자 동의서의 구성 요소 검토
 - 이해할 수 있는 용어로 작성
 - 적절한 구성과 양식 활용
 - 적절한 연구대상자 동의 절차로 구성

- 연구대상자 모집 광고문 등

□ IRB 대응

- 연구 시작 전 IRB 승인 획득
- 연구진행 중 IRB 변경, 보고 절차 진행: 연구계획 변경, 연구종료, 결과보고 등

④ 연구대상자 보상보험 가입

- 인체 연구 도중 예기치 못한 이상반응으로부터 연구대상자를 보호하기 위해 연구대상자 보상보험가입

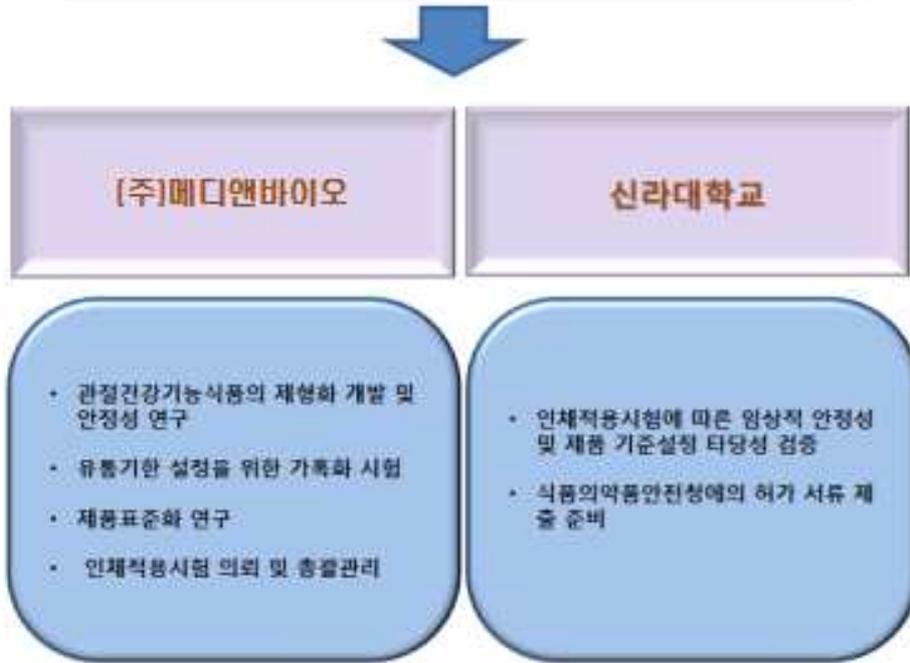
다. 3차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관(메디앤바이오) : 관절건강기능식품 소재 제형화 및 표준화, 인체적용시험
- 협동연구기관(신라대학교) : 식품의약품안전처 허가서류 제출

(2) 개발 내용 및 범위

유산균 발효한약재 이용 관절건강 기능성 소재 생산



(가) 표준화된 원료의 건강기능식품 제형화

- 초미세분말 제조기술을 활용한 음료 또는 정제, 캡슐 시제품 제작
 - 추출물의 농축 농도에 따른 건조분말 소재의 입도, 흐름성, 흡습성 시험
 - 진공동결건조(300kg/1 batch에 물 증발량), 분무건조(100kg/1hr에 물 증발량), 진공건조(300kg/1 batch에 물 증발량) 방법에 따른 건조분말 소재의 최적화 공정 개발
- 최적 가공적성을 위한 유동층 과립 공정 확립
 - 유동층 과립건조기 용량 : 100kg/1 batch

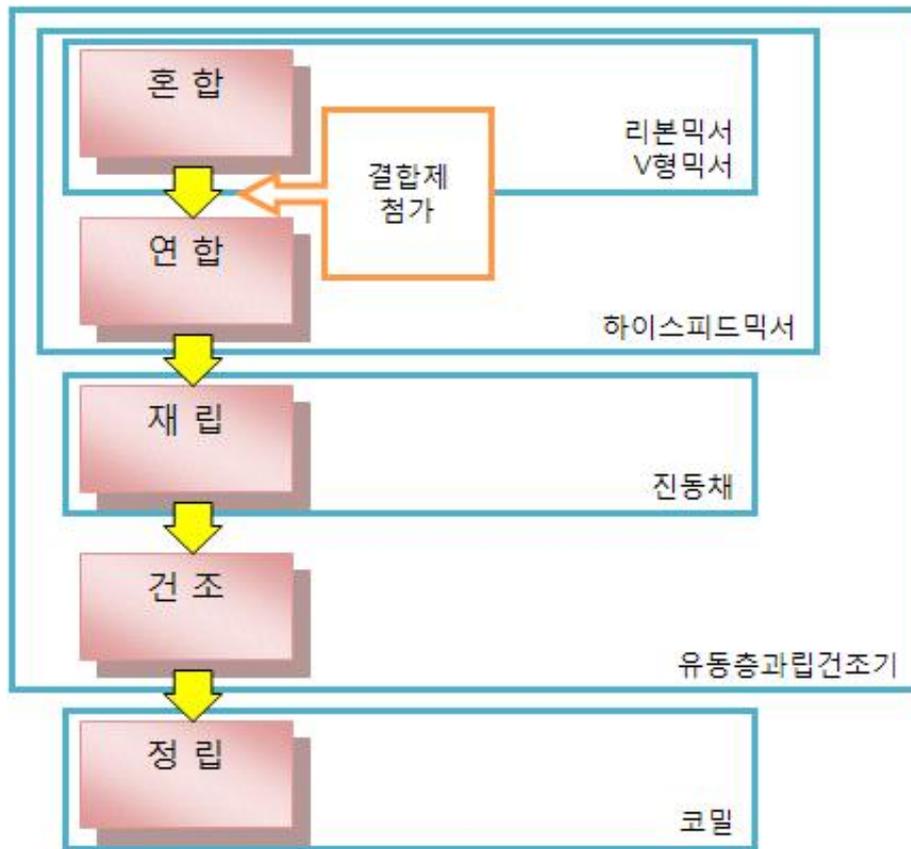


그림 22. 최적 가공적성을 위한 유동층 과립 공정 확립

- 기능성 소재 분말의 안정성
 - 가속시험 및 장기시험에 의한 맛, 향, 색, pH, 수분함량, 지표성분, 미생물 변화 검증

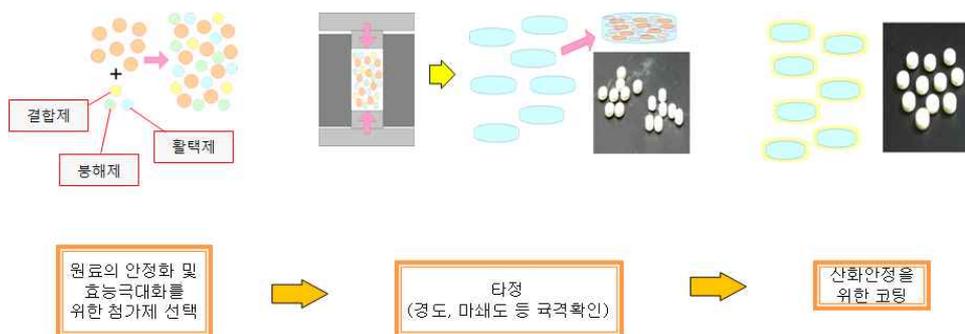


그림 23. 기능성 소재를 이용한 정제 가공 공정

(나) 유통기한 설정을 위한 가속시험

- 원료의 안정성 실험
 - 지표성분 경시변화 및 함량 실험

- 유화 안정성

시료의 유화 안정성은 저장 기간 동안 침전발생 여부를 확인하기 위함으로, 내용물이 흔들리지 않도록 조심스럽게 샘플링하여 침전 발생 여부를 확인 후 분리된 층의 두께를 측정함.

- 미생물 검사

저장기간 중 해양자원(굴, 곰피) 드링크의 미생물 검사는 일반세균수, 대장균군, 황색포도상구균, 효모·곰팡이 항목에 대하여 실시함.

- 관능검사

저장 중 관능검사 결과는 5 °C저장 샘플을 대조구로 하여 다른 온도에서 보관한 시료와 비교하여 1-5점의 관능점수를 부여하며, 제품의 상품가치가 상실되는 지점을 2.5점으로 하여 색, 맛, 전반적인 기호도에 대하여 나타냄.

(다) 제품 표준화

- LC/MS를 이용한 지표물질 및 제품의 finger print 분석을 통한 제품 표준화

(라) 인체적용시험

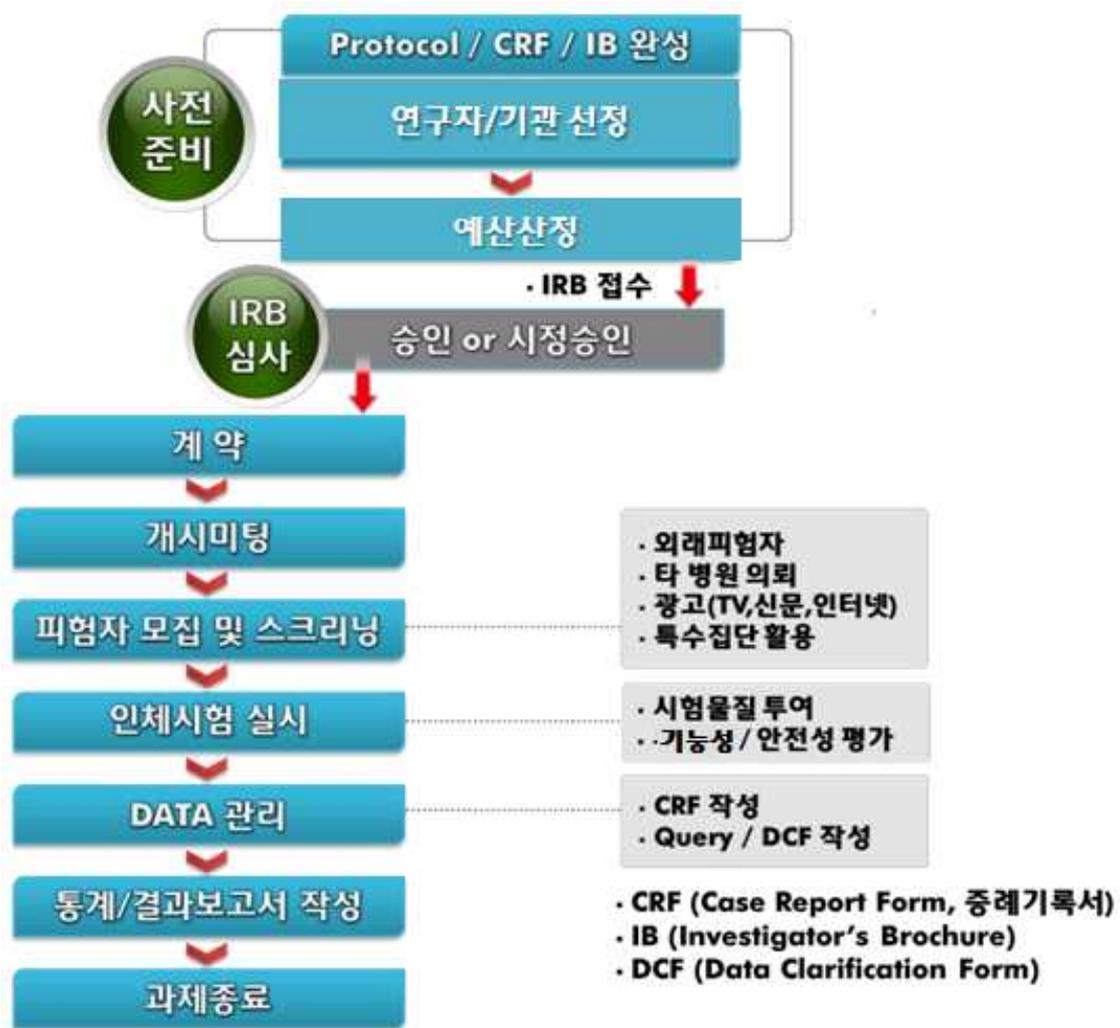
① IRB 승인 후 인체적용시험 수행 및 총괄 관리

- 병원 또는 대학과 연계하여 인체연구 수행
- WHO 또는 US NIH의 clinical trial registry에 등록하여, 국제적 기준에 준하는 연구 진행
- 선정/제외 기준에 따른 연구대상자 스크리닝 및 모집 실시
- 스마트폰 기반의 연구대상자 관리 시스템 활용을 통해 연구대상자 스스로가 시험/대조 식품 섭취현황, 식사·운동 지침 준수여부를 관리할 수 있도록 하여 연구 참여도를 높임. 또한 연구 결과 해석에 혼란을 줄 수 있는 식이, 운동, 생활습관 관련 요인을 실시간 모니터링함으로써 혼란변수를 최소화함



〈스마트폰 Application〉

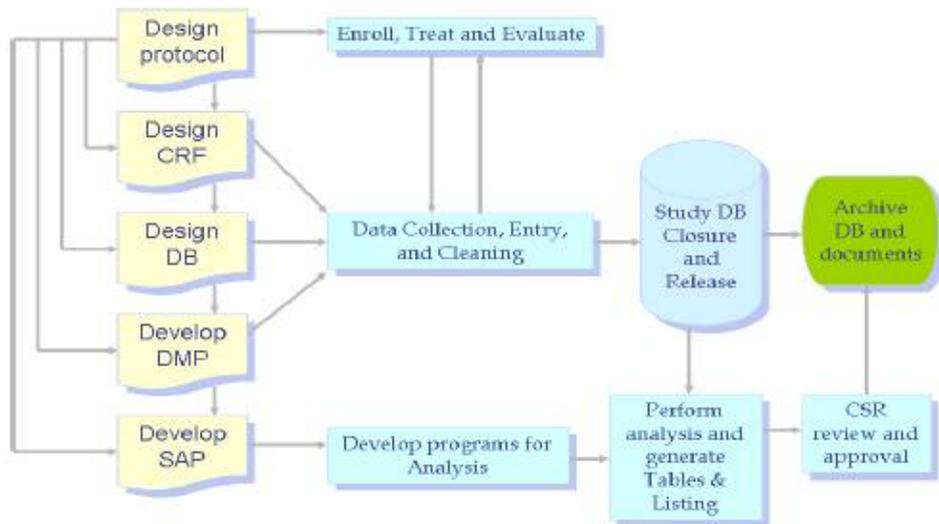
- 전자증례기록서(electronic case report form) 시스템으로 데이터를 실시간 모니터링
- 숙련된 모니터요원이 주기적인 모니터링을 수행하여 증례기록서 입력 데이터를 원자료와 비교하여 데이터의 정확성 확인



인체적용시험 진행절차

② 데이터 관리 및 통계 분석

- 최종 자료확인
- 무작위배정 코드 등 외부자료 loading
- 데이터베이스 마감(locking)
- 자료관리를 위한 문서 보관



인체적용시험의 자료 관리

(마) 식품의약품안전처에 개별인정 허가를 위한 서류 작성 및 신청

- 식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 허가에 필요한 구비서류 및 신청서 준비
 - 인체적용시험, 동물시험, 시험관시험, 총설, 메타분석, 전통적 사용 근거자료 등 본 소재에 대한 관절건강 관련 자료들을 토대로 KFDA 개별인정형 건강기능식품으로 신청함
 - 개별 인정형 인정 시, 원재료의 안전성 및 제조공정까지 모두 평가함
 - 공정표준화를 통한 기준규격 설정이 중요함. 지표성분 또는 기능성분 설정으로 기준규격을 설정함
 - 안전성 및 기능성 자료를 토대로 ‘관절건강개선’ 기능성으로 개별 인정형 허가를 신청함
 - 기능성자료로는 전임상 및 인체시험을 통해 입증된 결과로 게재된 학술지나 GCP 인체시험보고서를 제출함
 - KFDA에서는 제출한 기능성 개별 자료의 유형과 질, 전체자료의 양, 일관성, 활용성을 종합 검토하여 기능성을 표시하기 위한 과학적 근거의 정도를 평가하게 됨

<개별인정 허가를 위한 제출자료 리스트>

연번	제출자료
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본	
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료	
2.1	기원
2.2	개발경위
2.3	국내·외 인정·허가 현황
2.4	국내·외 사용 현황
3. 제조방법 및 그에 관한 자료 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료 함께 제출	
3.1	제조공정표
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부
3.4	단위공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화
3.5	단위공정별 수율 변화
4. 원료의 특성에 관한 자료	
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거
4.3	영양성분정보자료

5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료	
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거 ※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법 (자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료	
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등) ※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : 라)		
7.1	섭취근거 정보	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	
7.3	섭취량 평가 정보	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	
7.5	독성시험	단회투여독성시험
		3개월 반복투여독성시험
		유전독성시험
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료		
8.1	시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) / 유사원료 (논문 편)
8.2	동물시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) / 유사원료 (논문 편)
8.3	인체적용시험	신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료		
9.1	섭취량 및 근거	
9.2	섭취방법 및 근거	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료		
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	

3. 연구개발 추진일정

1차년도									
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정							책임자 (소속기관)
		6	7	8	9	10	11	12	
1	계획수립 및 자료조사	■	■	■	■				곽연길 (천호바이오) 김안드레 (신라대학교)
2	Lab scale 유산균 배양을 통한 한약재 발효 제조공정 개발	■	■	■	■	■			곽연길 (천호바이오)
3	열수추출방법을 이용하여 우슬 등 한약재 및 발효한약재 시료의 추출물을 확보		■	■	■	■	■	■	곽연길 (천호바이오) 김안드레 (신라대학교)
4	Pilot scale(100~500kg)의 생산 한약재 유산균발효 공정 개발	■	■	■					곽연길 (천호바이오) 김안드레 (신라대학교)
5	NMR, LC/MS를 이용한 지표물질(biomarker) 선정	■	■	■	■				곽연길 (천호바이오) 김안드레 (신라대학교)
6	항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a, COX-2 등)				■	■	■	■	김안드레 (신라대학교)
7	뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등)				■	■	■	■	김안드레 (신라대학교)
8	골관절염 동물모델에서 우슬 등 발효한약재 추출물의 효능 시험						■	■	김안드레 (신라대학교)
9	혈액내 항염지표 COX, TNF- α , IL-1 β 검사						■	■	김안드레 (신라대학교)

2차년도														
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	생산 공정 최적화 및 원료 경제성 확보	■	■	■	■									곽연길 (전호바이오)
2	한약제 유산균 발효추출물의 단회투여 독성 등 일반독성시험 (GLP기관)	■	■	■										곽연길 (전호바이오)
3	폐경기 골다공증 동물모델에서 우슬 등 발효한약재 추출물의 효능		■	■	■	■	■	■						김안드레 (신라대학교)
4	조직학적 변화 확인		■	■	■	■	■	■						김안드레 (신라대학교)
5	혈액내 골형성지표 (Osteocalcin) 및 골흡수지표 (C-telopeptidex) 검사		■	■	■	■	■	■						김안드레 (신라대학교)
6	인체적용 시험용 제품 생산						■	■	■	■	■	■	■	곽연길 (전호바이오)
7	GCP규정에 따른 30 cases의 예비 인체적용시험을 통해 관절통증 완화 기능성 및 안전성 검증						■	■	■	■	■	■	■	곽연길 (전호바이오)

3차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	GCP규정에 따른 30 cases 이상의 인체적용시험을 통해 관절 통증 완화 기능성 및 안전성 검증 계속														김연석 (메디앤바이오)
2	원료 및 제품의 안정성 실험														김연석 (메디앤바이오) 김안드레 (신라대학교)
3	표준화된 원료의 건강기능식품 제형화														김연석 (메디앤바이오)
4	LC/MS를 이용한 지표물질 및 제품의 finger print 분석을 통한 제품 표준화														김안드레 (신라대학교)
5	식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 허가에 필요한 서류작성 및 신청서 제출														박옥남 (메디앤바이오) 김안드레 (신라대학교)
6	시제품 제작														박옥남 (메디앤바이오)
7	기호도 조사														박옥남 (메디앤바이오)

2-2 연구 내용 및 결과

1. 대상 원재료 선정

문헌 조사와 선행 연구를 바탕으로 우슬, 독활(땅두릅), 녹각을 최종 원재료로, *Lactobacillus plantarum*을 발효 유산균으로 선정하여 1차년 연구를 진행하였다.

우슬, 독활(땅두릅), 녹각은 파우더 상태로 (주)제이앤디(부산, 대한민국)로부터 구입하였고, 유산균 발효에 사용된 *Lactobacillus plantarum*(KCTC No. 3108)은 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 *L.plantarum*은 MRS broth(Difco Co.)에 접종한 뒤 37°C, 250rpm에서 7일 동안 배양한 후 집균하여 사용하였다.

실험 진행 중, 녹각 추출물의 굳는 현상으로 소재의 사업화 용이성이 저하되고 개발 원료에서의 지표물질 설정에 어려움이 발생하였으며, 녹각추출물 함유 원료와 녹각추출물 제외 원료에서의 기능성을 비교한 결과 녹각추출물 함유 여부가 기능성에 미치는 영향은 매우 크지 않음을 확인하였다. 이에 원재료 가격 등 산업화를 위한 여러 경제성을 고려해 녹각을 원재료에서 제외하고 우슬, 독활(땅두릅)만으로 소재 개발 연구를 완료하였다.

가. 우슬

- (1) 학명 : *Achyranthes japonica nakai*
- (2) 이명 : 쇠무릎
- (3) 사용부위 : 뿌리

나. 독활

- (1) 학명 : *Aralia continentalis kitagawa*
- (2) 이명 : 땅두릅
- (3) 사용부위 : 뿌리

2. 유효성분 탐색 (활성물질 추적 및 단일물질 분리)

가. 한약재 파우더(우슬, 독활, 녹각 및 이들의 혼합물)의 열수추출물, 주정추출물을 이용한 유산균 발효 추출물 제조

문헌자료와 선행연구를 토대로, 열수추출은 한약재(우슬, 독활(땅두릅), 녹각 및 이들의 혼합물 파우더)를 한약 추출기에 첨가하여 100°C 이하에서 2시간 동안 가열을 한 후 추출하였고, 주정추출은 한약재 파우더에 70% 주정을 첨가하여 37°C에서 48시간동안 추출하였다.



그림 1. 열수 추출 후(상단), 주정 추출 후(하단)의 한약재

열수추출, 주정추출 모두 여과, 농축 과정을 거친 후 일부는 -70°C 에 냉각 후 7일간 동결 건조 하여 시료로 사용하였고, 나머지는 추출물 중량의 1%에 해당하는 *L.plantarum*을 첨가하여 37°C 에서 본 배양하였다. 배양 24h, 72h, 120h, 168h에 각각 sampling 후 7일간 동결 건조하여 최종 시료로 사용하였다.



그림 2. 열수추출, 주정추출 후 그리고 유산균 발효 후 동결건조 한 추출물

나. 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 기능성 탐색

(1) 조골세포 활성 세포의 배양

Human osteoblast-like cell인 MG-63 cell은 한국세포주은행에서 분양 받아 연구실에서

계대배양 하여 사용하였다.

MG-63 세포를 세포 배양접시에 부착시키고 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)와 10% FBS(Welgene)를 첨가한 DMEM(Welgene)을 사용하여 배양하였으며, 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C 유지하였고, 5% CO₂를 계속하여 공급하였다.

배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하며 cell counting 시 세포를 혼합한 배지와 Tryphan blue 용액을 1:1로 혼합하고, cell counter(countess, invitrogen)를 이용하여 tryphan blue에 의해 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하였다.

(2) 조골세포 활성 확인을 위한 세포독성 시험 (CCK assay)

(가) 측정 방법

MG-63 osteoblast-like cell의 증식 측정은 단시간에 대량 검색이 가능한 CCK assay 방법을 사용하여 측정하였다. 96-well plate(Corning)에 6×10^3 cells/well로 cell을 100 μ l씩 분주한 다음 24시간 동안 37°C CO₂ incubator에서 배양 한 후 발효 전 후의 열수 및 주정 추출물을 농도 별(0, 200, 400, 600, 800, 1,000 μ g/ml)로 처리하여 24시간 배양하였고, 각 well당 CCK reagent(20 μ l/well)를 첨가한 후 2시간 동안 37°C에서 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 처리 군은 3 well씩 3회 반복실험을 하였고, 발효산물에 대한 세포 증식효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 아무것도 처리하지 않은 DMEM용액에 배양한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(나) 측정 결과

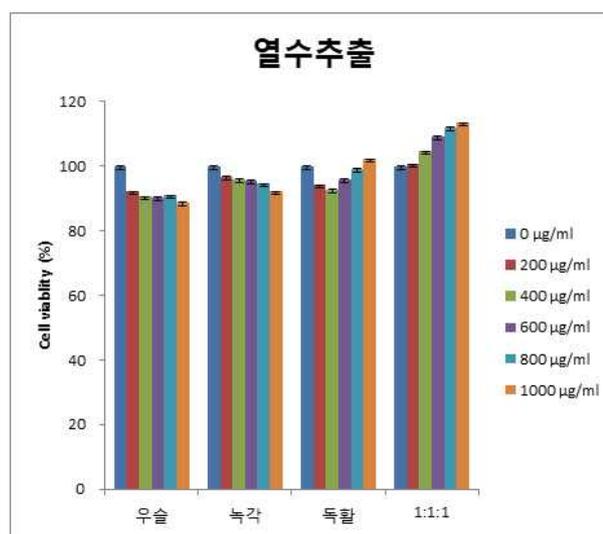


그림 3. 농도에 따른 한약재 열수 추출물들의 독성 측정 결과 그래프

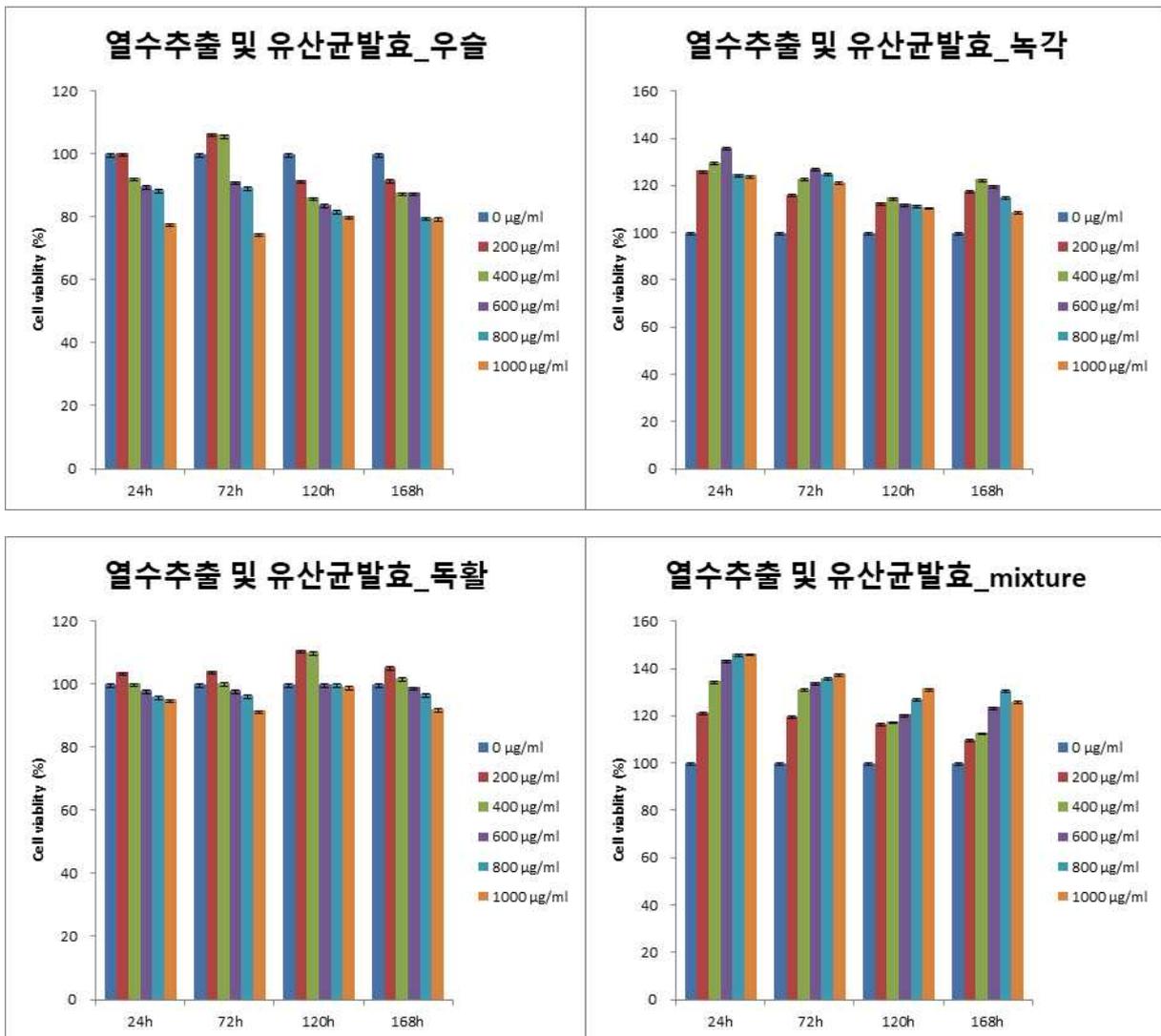


그림 4. 농도에 따른 한약재 열수추출 및 유산균발효물의 발효시간 별 독성 측정 결과 그래프

- 열수추출물들의 세포독성은 나타나지 않음 (그림 3).
- 우슬, 녹각, 독활의 유산균 발효는 우슬의 경우 600 µg/ml의 농도까지 168시간동안 발효 후에도 cell viability가 90% 이상으로 독성을 나타내지 않았고, 녹각, 땅두릅의 경우도 168시간 동안 발효 후에도 100% 독성을 나타내지 않음 (그림 4).
- 우슬, 독활, 녹각의 경우 각각 추출물을 농도 의존적으로 10% 내외의 독성을 나타내었으나 복합추출물의 경우 농도와 상관없이 독성이 없는 것으로 나타남.
- 우슬, 녹각, 독활 혼합추출물의 경우 1000 µg/ml의 농도에서 168시간 이상 혼합 발효할 경우에는 생존율이 120%를 넘어 세포 독성이 완전 제거되는 것으로 나타남.

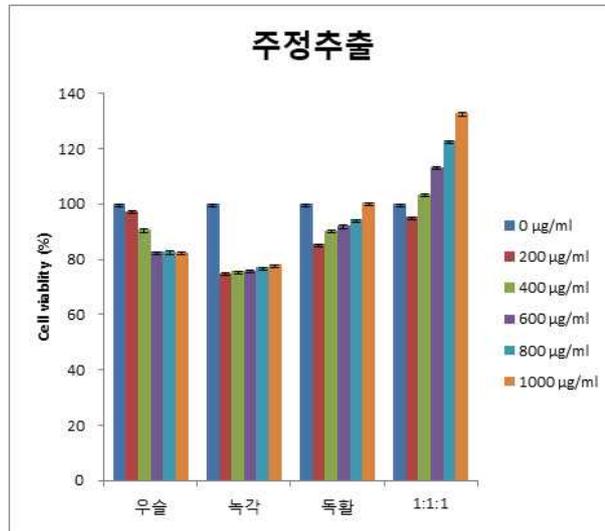


그림 5. 농도에 따른 한약재 주정 추출물들의 독성 측정 결과 그래프

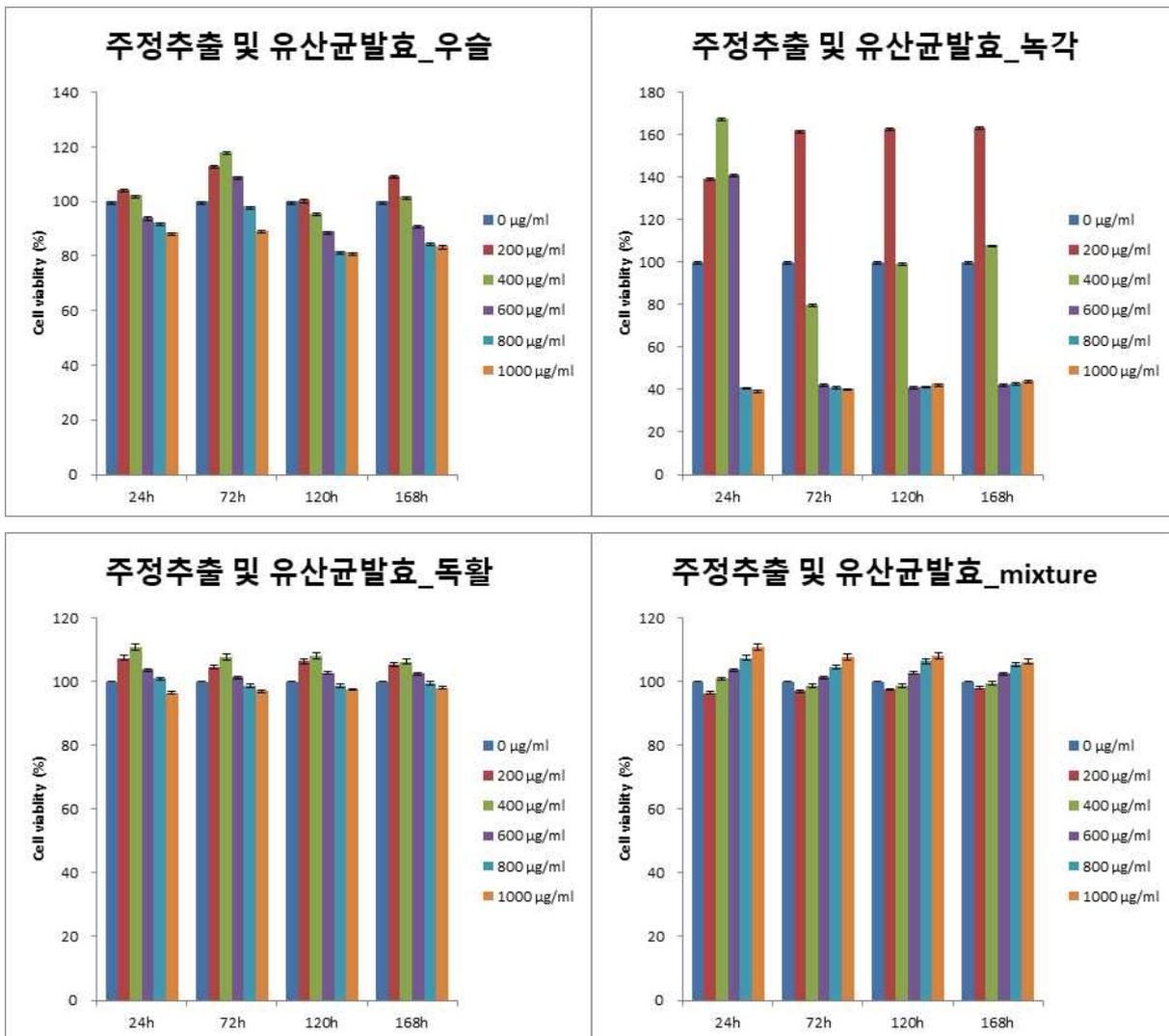


그림 6. 농도에 따른 한약재 주정추출 및 유산균발효물의 발효시간 별 독성 측정 결과 그래프

- 각 한약재들의 단독 주정추출물의 경우 농도 의존적으로 10~20% 독성을 나타내었으나, 혼합 추출물의 경우 독성이 나타나지 않음.
- 우슬 주정추출 발효물은 최대 20%의 독성을, 녹각은 40%의 독성을 나타낸 반면 독활 주정추출 발효물은 독성을 나타내지 않음 (그림 6).
- 혼합 주정추출 발효물의 경우 독성이 전혀 나타나지 않았고, 이러한 결과는 주정추출만으로 나타나는 독성을 발효과정을 통하여 독성이 완전 제거되는 우수한 결과임.
- 열수추출물 보다 항염증 효과가 뛰어난 우슬, 녹각, 독활의 한약재 주정추출물이 독성 때문에 그 사용이 어려웠으나, 본 연구팀의 유산균 발효 과정을 통해 독성이 모두 제거됨으로써 안전성을 확보할 수 있게 됨.

(3) VEGF 측정

(가) 측정 방법

- 혈관 내피세포 성장인자(VEGF)의 측정은 human VEGF quantikine ELISA kit(R&D systems)를 이용하여 분석함.
- Standard와 배양액 sample 200 μ l에 assay diluent 50 μ l를 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 3번 세척. 그 후 VEGF conjugate 200 μ l를 첨가하여 다시 37°C에서 2시간 반응시킴. 3번 세척과정을 거친 후 기질 용액 200 μ l를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 stop solution 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지.
- Sample당 3번 반복하여 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값은 450 nm에서 540 nm의 값을 빼어 계산한 결과 값으로 나타냄.

(나) 측정 결과

Control로 사용한 MG-63 cell의 경우 1300pg/ml의 농도로 VEGF를 생성한 반면 우슬의 경우에는 2350pg/ml, 독활의 경우에는 2330pg/ml의 VEGF를 생성하였고, 복합추출물의 경우에는 2340pg/ml의 VEGF를 생성하여 대조군에 비해 실험군의 효과가 우수함을 확인하였다.

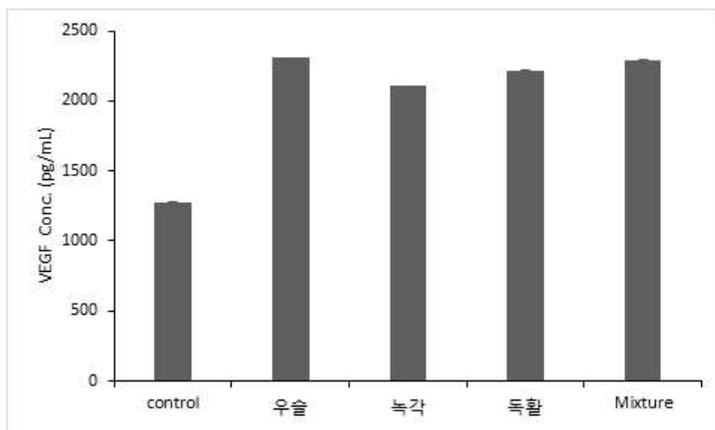


그림 7. 한약재 발효 열수추출물들을 MG-63 세포에 처리하였을 때 생성되는 VEGF 분비 측정 그래프

(4) MG-63 cell 성장인자 활성 측정을 위한 Q-plex array

(가) 측정 방법

- MG-63 osteoblast-like cell의 VEGF, EGF와 IGF-1 성장인자 활성 측정을 위해 Q-plex array를 측정함.
- 한약재 추출물에 의해 생성되는 성장인자를 측정하기 위해 MG-63 cell을 1.5×10^6 cells/dish의 농도로 100 mm dish에 분주한 뒤 한약재 추출물 시료를 $400 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 48시간 동안 배양함. 세포 배양액을 수거하여 원심분리 과정을 거친 상등액을 -20°C 에 보관하여 시료로 사용.

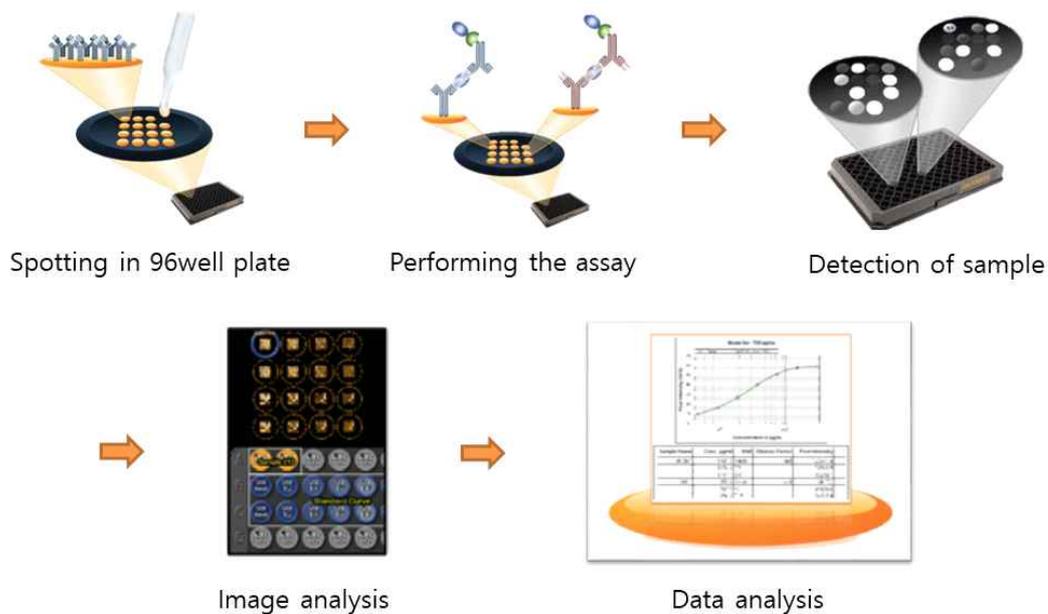


그림 8. Q-plex array 방법

(나) 측정 결과

우슬, 녹각, 독활의 각각 단독 열수 추출물 또는 주정 추출물과 이들의 혼합 열수 또는 주정 추출물의 발효 전, 후 세포 성장 관련 인자들의 영향을 살펴보았을 때, 열수 추출물 또는 열수 추출 유산균 발효물들이 주정 추출물보다 우수한 것으로 나타났다(그림 10).

또한 우슬, 녹각, 독활의 단독추출물보다 복합추출 발효물에서 세포 성장 관련 인자에 대한 긍정적 영향이 높게 나타났다.

	VEGF			EGF			IGF-1		
	O.D1	O.D2	Conc.(pg/ml)	O.D1	O.D2	Conc.(pg/ml)	O.D1	O.D2	Conc.(pg/ml)
1-1	0.1491	0.1219	0.06425	0.0526	0.0542	0.0534	0.0602	0.0607	0.06045
1-2	0.1317	0.1192	0.0542	0.0419	0.0523	0.0471	0.0612	0.0623	0.06175
1-3	0.1582	0.1349	0.0753	0.0506	0.0529	0.05175	0.0575	0.0562	0.05685
1-4	0.1344	0.1187	0.0553	0.0523	0.0519	0.0521	0.0642	0.0654	0.0648
2-1	0.1171	0.1229	0.04875	0.0529	0.0537	0.0533	0.0582	0.0608	0.0595
2-2	0.1097	0.1081	0.03765	0.0522	0.0494	0.0508	0.0658	0.0729	0.06935
2-3	0.1102	0.1141	0.0409	0.0514	0.0492	0.0503	0.0793	0.0677	0.0735
2-4	0.145	0.1527	0.0776	0.0549	0.0531	0.054	0.0615	0.0602	0.06085
3-1	0.1407	0.1432	0.0707	0.0524	0.0536	0.053	0.0601	0.0603	0.0602
3-2	0.1427	0.1511	0.07565	0.0522	0.0538	0.053	0.0652	0.0643	0.06475
3-3	0.1349	0.1392	0.0658	0.0538	0.0523	0.05305	0.0626	0.0619	0.06225
3-4	0.1376	0.1344	0.06475	0.0552	0.0523	0.05375	0.0684	0.0627	0.06555
4-1	0.0779	0.1383	0.03685	0.057	0.0555	0.05625	0.0675	0.0654	0.06645
4-2	0.1407	0.1286	0.0634	0.0544	0.0487	0.05155	0.0587	0.0595	0.0591
4-3	0.1425	0.1337	0.06685	0.0475	0.0456	0.04655	0.0586	0.061	0.0598
4-4	0.1287	0.1323	0.05925	0.0514	0.0517	0.05155	0.0559	0.0619	0.0589
5-1	0.0989	0.1138	0.0351	0.0516	0.053	0.0523	0.0559	0.0604	0.05815
5-2	0.1091	0.1222	0.0444	0.0511	0.0518	0.05145	0.059	0.0586	0.0588
5-3	0.099	0.0984	0.02745	0.0545	0.051	0.05275	0.0617	0.0656	0.06365
5-4	0.0928	0.0973	0.0238	0.0535	0.0534	0.05345	0.065	0.0676	0.0663
6-1	0.1148	0.1064	0.03935	0.0533	0.0525	0.0529	0.0821	0.0651	0.0736
6-2	0.1125	0.1033	0.03665	0.0551	0.0403	0.0477	0.0594	0.0613	0.06035
6-3	0.1184	0.1019	0.0389	0.0431	0.0444	0.04375	0.0624	0.0656	0.064
6-4	0.0948	0.1223	0.0373	0.0545	0.0515	0.053	0.0553	0.0612	0.05825
7-1	0.1056	0.1173	0.0402	0.0524	0.0555	0.05395	0.0649	0.0653	0.0651
7-2	0.1086	0.1203	0.0432	0.0532	0.0527	0.05295	0.0675	0.0699	0.0687
7-3	0.1127	0.1309	0.05055	0.0554	0.0563	0.05585	0.0645	0.0634	0.06395
7-4	0.1192	0.1291	0.0529	0.0528	0.0533	0.05305	0.0434	0.0462	0.0448
8-1	0.0888	0.0939	0.0201	0.0527	0.0534	0.05305	0.0435	0.0485	0.046
8-2	0.081	0.0886	0.01355	0.0508	0.0534	0.0521	0.0428	0.0498	0.0463
8-3	0.0696	0.0759	0.0015	0.0499	0.0532	0.05155	0.043	0.0437	0.04335
8-4	0.0686	0.0684	-0.00275	0.0569	0.0561	0.0565	0.043	0.0429	0.04295

그림 9. Q-plex array raw data

Cell Line: MG-63		Water Extract		Ethanol Extract	
		w/o LAB	With LAB	w/o LAB	With LAB
우슬	성장 관련 인자 (VEGF, EGF, IGF-1)	농도 가장 높음	발효 1일차 가장 좋지만 w/o LAB 보다 농도 낮음	Water extract 보다 농도 낮음	발효 7일차 가장 좋지만 w/o LAB와 큰 차이 없음
녹각		농도 가장 높음	발효시 w/o LAB보다 농도 2배이상 높음 발효 3일차 가장 좋음(w/o의 2배)	Ethanol extract 중 가장 높은 농도이지만, water extract보다 농도 낮음	발효 필요 없음
독활		농도 가장 높음	발효 필요 없음	농도 낮음	발효 1일차 농도 높지만 water extract보다 낮음
Mixture		발효 필요	발효 3일차 가장 좋음	농도 낮음	발효 필요 없음

그림 10. MG-63 cell의 Q-plex array 결과 분석

(5) 결론

MG-63 osteoblast-like cell에 대한 우슬, 독활, 녹각 단독 추출 발효물의 성장인자 활성화 작용은 열수추출 발효물에서 보다 우수한 효능이 관찰되었고, 단독 추출발효물에 비해 복합추출 발효물에서 긍정적인 효과가 보다 우수하였다. 이는 발효가 성장관련 인자 생성에 synergy 효과를 더하는 것으로 사료된다.

다. 항염증 관련 인자 실험을 통한 기능성 탐색

(1) RAW264.7 macrophage cell 배양

RAW264.7 macrophage는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다.

RAW264.7 macrophage cell의 배양 시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였다. 10% FBS(Welgene)와 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)를 첨가한 DMEM(Welgene)을 사용하여 배양하였고, 배양액은 2~3일에 한번 씩 교체하였다.

cell counting 시 세포를 혼합한 배지와 Tryphan blue 용액을 1:1로 혼합하고, cell counter(countess, invitrogen)를 이용해 tryphan blue에 의해 염색되지 않은 살아 있는 세포를 계수하였다.

(2) RAW264.7 macrophage cell 활성 측정을 위한 Q-plex array

(가) 측정 방법

한약재 추출물이 LPS의 자극에 의해 생성되는 cytokine의 생성량에 미치는 효과를 측정하기 위해 RAW264.7 macrophage cell을 1.5×10^6 cells/dish의 농도로 60 mm dish에 분주한 뒤 약 24시간 동안 배양한 후, LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 24시간 동안 염증을 유도시킨 후 한약재 추출물 시료를 400 μ g/ml의 농도로 처리하였다. LPS를 처리하지 않은 세포 배양액을 positive control로, LPS만을 처리한 세포 배양액을 negative control로 설정하고 24시간 후 세포 배양액을 수거하여 원심분리 과정을 거친 상등액을 -20°C에 보관하여 시료로 사용하였다.

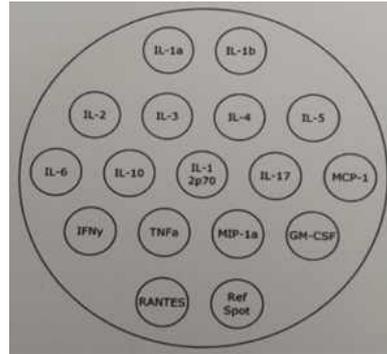
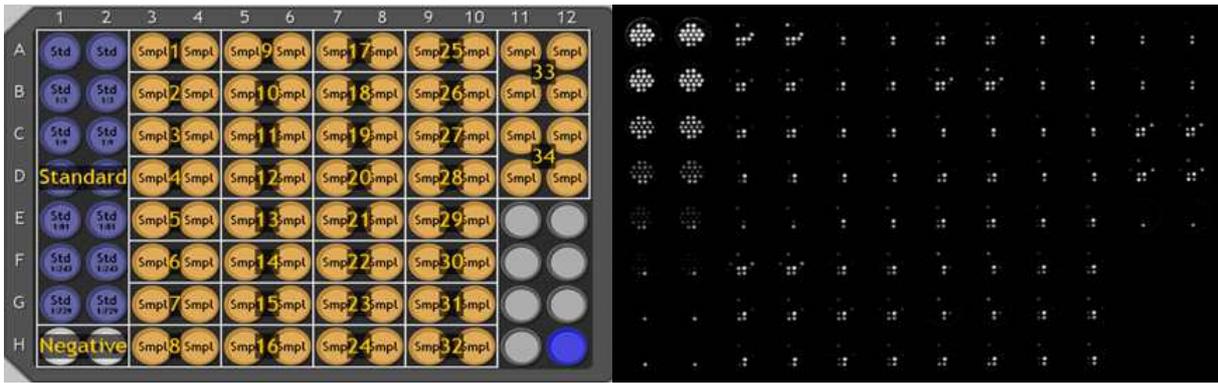


그림 11. Q-plex array시 사용된 signal 사진(상단) 및 standard로 사용되는 antigen의 spot 위치(하단)

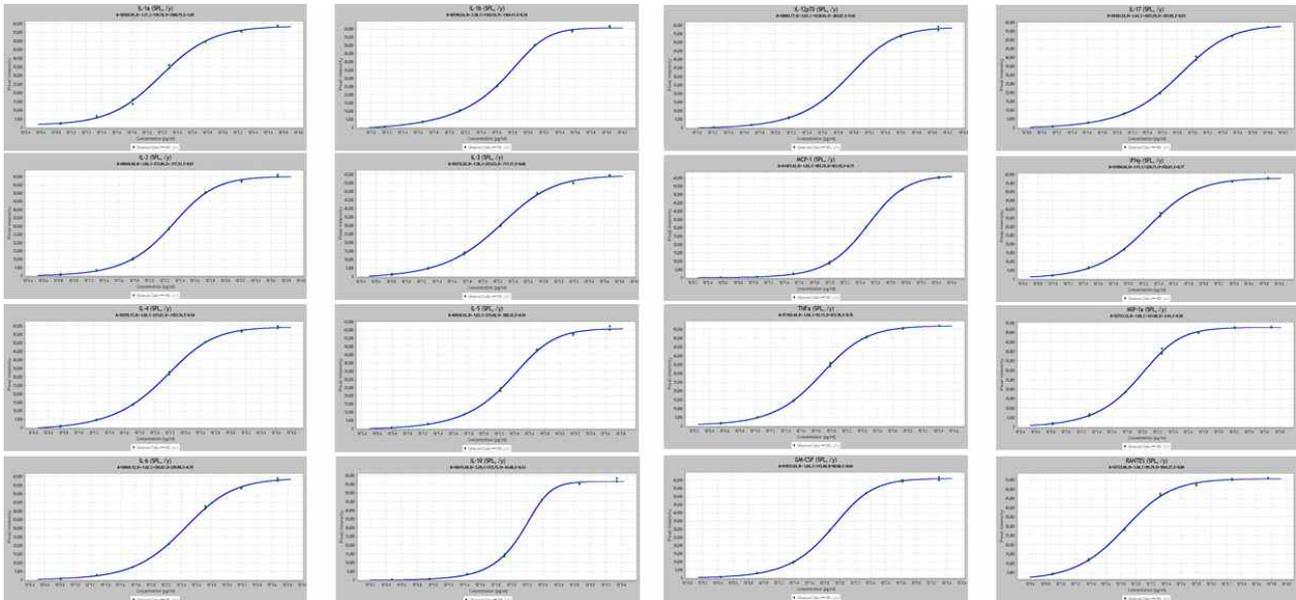


그림 12. Q-plex array standard curve

	IL-1a (pg/ml)	IL-1b (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-3 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12p70 (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	IFN γ (pg/ml)	TNFa (pg/ml)	MIP-1a (pg/ml)	GM-CSF (pg/ml)	RANTES (pg/ml)
1-1	425.29	92.81	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	24.18	< 12.31	82.6	< 9.53	256.42	> 4316.36	232.67	191.8
1-2	69.04	17.2	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	81.08	< 29.05	18.62	< 12.31	223.43	< 9.53	144.38	> 4316.36	5.87	> 225.55
1-3	59.42	17.35	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	42.86	< 29.05	< 15.59	< 12.31	89.34	< 9.53	61.54	> 4316.36	2.84	178.46
1-4	47.38	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	28.45	< 9.53	15.47	1503.27	< 2.41	29.93
2-1	64.76	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	27.36	< 2.41	< 7.73
2-2	101.05	28.55	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	145.98	< 29.05	< 15.59	< 12.31	419.13	< 9.53	226.22	> 4316.36	21.21	160.17
2-3	74.43	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	113.88	< 9.53	33.16	> 4316.36	2.65	129.84
2-4	48.28	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	51.47	< 9.53	4.24	> 4316.36	< 2.41	23.58
3-1	39.57	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	17.17	< 9.53	< 3.37	701.41	< 2.41	< 7.73
3-2	47.07	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	41.88	< 9.53	12.67	< 6.53	< 2.41	50.69
3-3	46.32	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	32.55	< 9.53	8.19	1706.4	< 2.41	34.23
3-4	41.33	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	21.19	< 9.53	< 3.37	790.75	< 2.41	12.53
4-1	78.54	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	494.56	< 2.41	< 7.73
4-2	57.79	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	29.36	< 29.05	< 15.59	< 12.31	65.11	< 9.53	44.59	> 4316.36	< 2.41	59
4-3	57.2	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	50.77	< 29.05	< 15.59	< 12.31	135.89	< 9.53	69.91	> 4316.36	4.86	114.91
4-4	62.28	16.8	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	25.23	< 29.05	< 15.59	< 12.31	76.92	< 9.53	41.5	> 4316.36	3.97	43.01
5-1	63.91	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	28.62	< 29.05	< 15.59	< 12.31	77.38	< 9.53	48.73	> 4316.36	< 2.41	206.41
5-2	199.21	58.04	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	107.89	< 29.05	24.97	< 12.31	488.89	< 9.53	384	> 4316.36	34.43	> 225.55
5-3	81.24	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	18.82	< 12.31	18.36	< 9.53	< 3.37	> 4316.36	2.51	< 7.73
5-4	57.54	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	60.26	< 9.53	38.62	< 6.53	< 2.41	143.74
6-1	65.84	15.13	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	35.46	< 9.53	38.35	> 4316.36	< 2.41	83.28
6-2	152.82	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	21.42	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	1560.54	27.88	< 7.73
6-3	131.99	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	21.96	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	512.67	40.4	< 7.73
6-4	62.1	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	53.27	< 9.53	19.36	> 4316.36	< 2.41	113.44
7-1	45.7	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	685.74	< 2.41	< 7.73
7-2	47.39	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	< 12.49	< 9.53	5.77	735.28	< 2.41	8.27
7-3	64.17	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	18.39	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	1685.54	< 2.41	< 7.73
7-4	65.65	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	920.45	< 2.41	< 7.73
8-1	54.81	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	28.15	< 9.53	15.2	> 4316.36	< 2.41	26.87
8-2	54.24	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	44.56	< 9.53	21.18	> 4316.36	< 2.41	51.84
8-3	84.09	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	23.35	< 12.31	65.18	< 9.53	32.91	> 4316.36	< 2.41	51.4
8-4	77.16	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	17.59	< 12.31	37.98	< 9.53	25.2	> 4316.36	< 2.41	16.2
P cont	30.03	< 14.79	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	< 22.73	< 29.05	< 15.59	< 12.31	< 12.49	< 9.53	< 3.37	178.76	< 2.41	< 7.73
N cont	144.35	31.82	< 21.60	< 6.40	< 5.68	< 5.55	83.99	< 29.05	< 15.59	< 12.31	493.86	< 9.53	130.78	> 4316.36	< 2.41	> 225.55

그림 13. Q-plex array raw data

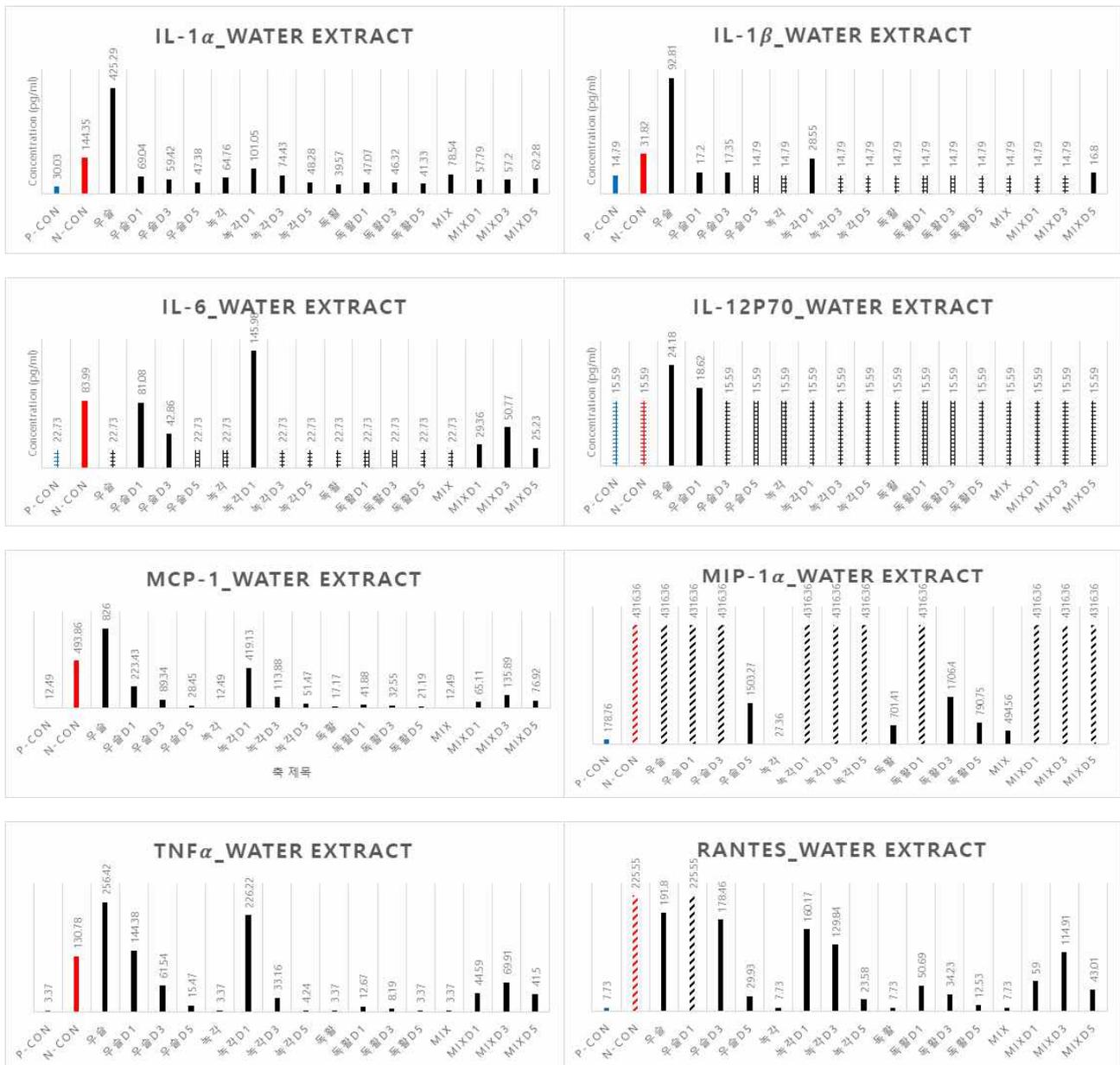


그림 14. 한약재 열수 추출물의 Q-plex array 결과 그래프

(나) 측정 결과

LPS에 의해 유도된 negative control에 비해 우슬추출물을 제외한 모든 sample들이 생성 저해능이 있음을 나타냈고, IL-1 β 의 경우도 우슬 열수추출물을 제외하고 모두 억제 효과가 있음을 나타내었다(그림 14).

IL-6의 경우 negative control에 비해 우슬 3, 5일 열수추출발효물과 녹각 3, 5일 발효추출물, 독활 열수추출물 및 발효 1, 3, 5일 추출물 모두 억제 효과를 나타냈으며 혼합발효물 또한 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

TNF- α 의 경우 우슬 3, 5일 발효물, 녹각 추출물 및 녹각 3, 5일 발효물이 생성 억제 효과를 나타냈으며, 독활 열수 추출물과 1, 3, 5일 발효물이 모두 억제효과를 갖는 것으로 나타났다.

혼합발효추출물의 경우 열수추출물에 비해 cytokine 억제효과가 저하되어 나타났지만 negative control에 비해 TNF- α 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

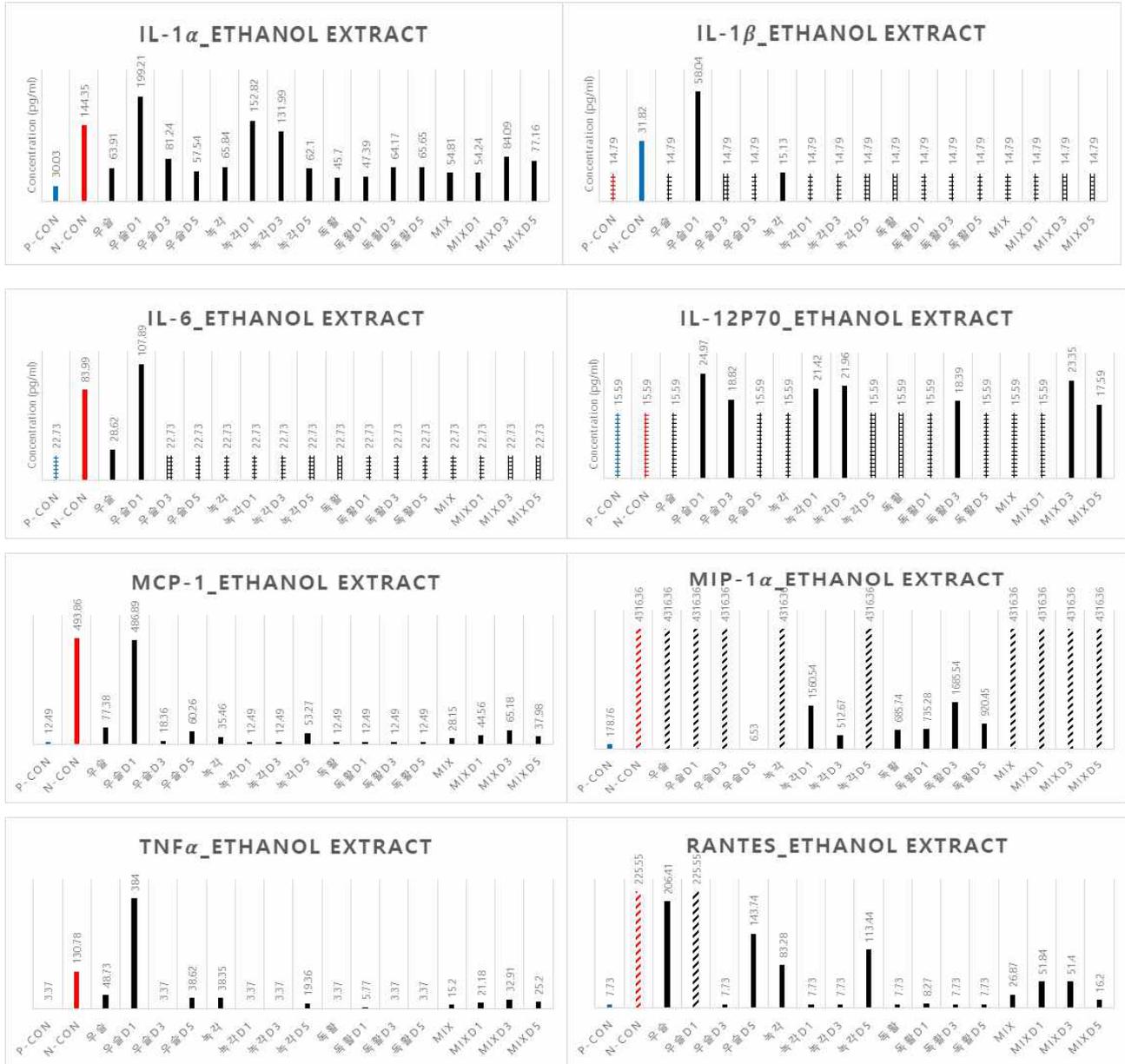


그림 15. 한약재 주정 추출물의 Q-plex array 결과 그래프

IL-1의 경우, 우슬 주정추출물 3, 5일 발효물이 negative control에 비해 발생률이 낮았으며, 녹각의 경우 발효 5일 추출물이, 독활의 경우 주정추출물과 발효물이 모두 IL-1 α 의 저해력을 나타내었다(그림 15).

혼합 주정 추출물과 이들의 발효물질 모두 IL-1 α 의 저해력을 나타내었고, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 경우도 우슬 주정 추출물의 1일 발효물을 제외한 모든 sample이 저해효과를 갖는 것으로 나타났다.

RAW264.7	Water Extract		Ethanol Extract	
	w/o LAB	With LAB	w/o LAB	With LAB
IL-1 α	-	<ul style="list-style-type: none"> Negative control(n-con)에 비해 2배 이상 낮은 농도 발효일 증가할수록 농도 낮아짐 	<ul style="list-style-type: none"> Negative control에 비해 2배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con에 비해 약 1.5배 정도 높은 농도 발효일 증가할수록 농도 낮아짐
IL-1 β	-	<ul style="list-style-type: none"> Positive control(p-con)과 같은 농도 발효일 증가할수록 농도 낮아짐 	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con에 비해 높지만 발효일 증가할수록 낮아짐 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con에 비해 3배 이상 높지만 발효일 증가할수록 낮아짐 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 비슷한 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con에 비해 3배 이상 높지만 발효일 증가할수록 낮아짐 발효 3, 5일자는 w/o LAB보다 낮은 농도지만 유의적 차이 없음
IL-12p70	<ul style="list-style-type: none"> P-con/n-con에 비해 1.5배 높은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con 보다 약간 높은 농도 보이지만 발효일 증가할수록 낮아짐 	<ul style="list-style-type: none"> P-con/n-con에 비해 1.5배 높은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con 보다 약간 높은 농도 보이지만 발효일 증가할수록 낮아짐
MCP-1	-	<ul style="list-style-type: none"> 발효일 증가할수록 농도 낮아짐 발효 5일자는 p-con과 비슷한 농도 	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 7배 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con과 같은 농도지만 발효 3일자 p-con과 비슷한 농도
MIP-1 α	-	<ul style="list-style-type: none"> 발효 3일자까지는 농도 높아 측정 불가 발효 5일자 3배 정도 농도 낮아짐 	-	<ul style="list-style-type: none"> 발효 3일자까지는 농도 높아 측정 불가 발효 5일자 30배 정도 농도 낮아짐
TNF α	-	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con과 같은 농도지만 발효시 유의적으로 농도 낮아짐 	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 2.5배 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con에 비해 3배 이상 높지만 발효일 증가할수록 낮아짐 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요
RANTES	<ul style="list-style-type: none"> N-con보다 낮은 농도지만 p-con에 비해 높음 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con과 비슷한 농도 보이지만 발효일 증가할수록 낮아짐 발효 5일자 가장 좋음 	<ul style="list-style-type: none"> N-con보다 낮은 농도지만 p-con에 비해 높음 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con과 비슷한 농도 보이지만 발효일 증가할수록 낮아짐 발효 3일자 가장 좋음
NO	<ul style="list-style-type: none"> N-con보다 2배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자 가장 좋음 	<ul style="list-style-type: none"> N-con보다 2배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자 가장 좋음

그림 16. 우슬 추출물의 Q-plex array 결과 분석

RAW264.7	Water Extract		Ethanol Extract	
	w/o LAB	With LAB	w/o LAB	With LAB
IL-1 α	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 2배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효일 증가할수록 낮은 농도 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 2배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3일자는 n-con과 비슷한 농도 발효 5일자 w/o LAB와 같은 농도 발효 불필요
IL-1 β	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con과 비슷하지만 발효일 증가할수록 낮아짐 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> P-con보다 높은 농도지만 유의적 차이 없음 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3, 5일 모두 p-con과 같은 농도
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1일자는 n-con보다 2배 정도 높은 농도지만 발효일 증가할수록 낮아짐 발효 3, 5일 p-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3, 5일 모두 p-con과 같은 농도
IL-12p70	<ul style="list-style-type: none"> 농도 낮아 측정 불가 	<ul style="list-style-type: none"> 농도 낮아 측정 불가 	<ul style="list-style-type: none"> 농도 낮아 측정 불가 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3일은 농도 약간 높지만 발효 5일자 낮아짐
MCP-1	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 비슷한 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효일 증가할수록 낮은 농도 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> P-con보다 3배정도 높은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3일 p-con과 같은 농도로 가장 좋음
MIP-1 α	<ul style="list-style-type: none"> P-con에 비해 6배 낮은 농도로 가장 좋음 	<ul style="list-style-type: none"> 농도 높아 측정 불가 	<ul style="list-style-type: none"> 농도 높아 측정 불가 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 3일 가장 좋음
TNF α	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효일 증가할수록 낮은 농도 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 4배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3일 가장 좋음
RANTES	<ul style="list-style-type: none"> P-con과 같은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효일 증가할수록 낮은 농도 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 3배 정도 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 1, 3일 가장 좋음
NO	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 1.5배 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 효과 없음 	<ul style="list-style-type: none"> N-con에 비해 2배 이상 낮은 농도 	<ul style="list-style-type: none"> 발효일 증가할수록 농도 낮아짐

그림 17. 녹각 추출물의 Q-plex array 결과 분석

RAW264.7	Water Extract		Ethanol Extract	
	w/o LAB	With LAB	w/o LAB	With LAB
IL-1 α	▪ P-con과 비슷한 농도로 가장 좋음	▪ 발효일 증가할수록 낮은 농도 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요	▪ P-con보다 1.5배 높지만 n-con보다 3배 이상 낮은 농도	▪ 발효 시 농도 높아짐 ▪ 발효 불필요
IL-1 β	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가
IL-6	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가
IL-12p70	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효 3일차 농도 높아짐 ▪ 발효 불필요
MCP-1	▪ P-con과 비슷한 농도로 가장 좋음	▪ 발효일 증가할수록 낮은 농도 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가
MIP-1 α	▪ P-con보다 3배 이상 높은 농도지만 가장 좋음	▪ 발효 1일차 농도 높아 측정 불가 ▪ 발효시 농도 낮아짐	▪ P-con보다 3배 이상 높은 농도지만 가장 좋음	▪ 발효 1일차 가장 좋음 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요
TNF α	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효일 증가할수록 낮은 농도 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효일 증가할수록 낮은 농도 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요
RANTES	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효일 증가할수록 낮은 농도 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효일 증가할수록 낮은 농도 ▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요
NO	▪ N-con 보다 1.5배 낮은 농도	▪ 발효일 증가할수록 농도 낮아짐	▪ N-con에 비해 2배이상 낮은 농도	▪ 발효일 증가할수록 농도 낮아지지만 w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요

그림 18. 독활 추출물의 Q-plex array 결과 분석

RAW264.7	Water Extract		Ethanol Extract	
	w/o LAB	With LAB	w/o LAB	With LAB
IL-1 α	▪ P-con에 비해 2배 이상 높은 농도지만 n-con에 비해 2배정도 낮은 농도	▪ 발효 1, 3일차 가장 좋음	▪ N-con에 비해 2배 이상 낮은 농도	▪ 발효 1일차 w/o LAB와 비슷
IL-1 β	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효 1, 3일차 농도 낮음(측정 불가)	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가
IL-6	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효시 5일차에 가장 낮은 농도 ▪ w/o LAB가 효과 더 좋으므로 발효 불필요	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가
IL-12p70	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효시 농도 높아짐 ▪ 발효 불필요
MCP-1	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효시 농도 높아짐 ▪ 발효 불필요	▪ P-con보다 농도 2배 높지만 유의적으로 큰 차이 없음	▪ 발효시 농도 높아짐 ▪ 발효 불필요
MIP-1 α	▪ P-con에 비해 2배 이상 높은 농도이지만 가장 좋음	▪ 농도 높아 측정 불가	▪ 농도 높아 측정 불가	▪ 농도 높아 측정 불가
TNF α	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ 발효 불필요	▪ P-con에 비해 4배 정도 높은 농도 ▪ N-con에 비해 8배 정도 낮은 농도	▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요
RANTES	▪ 농도 낮아 측정 불가	▪ w/o LAB 효과 좋으므로 발효 불필요	▪ P-con에 비해 3배 이상 높은 농도 ▪ N-con에 비해 7배 정도 낮은 농도	▪ 발효 3일차 가장 낮은 농도
NO	▪ N-con에 비해 2배이상 낮은 농도	▪ 발효 1일차 가장 좋음	▪ N-con에 비해 2배이상 낮은 농도	▪ 발효 7일차 가장 좋음

그림 19. Mixture 추출물의 Q-plex array 결과 분석

(3) 우슬 및 독활 단일추출물의 사이토카인 생성량 측정

(가) 측정 방법

RAW264.7 macrophage cell을 1.5×10^6 cells/dish의 농도로 60 mm dish에 분주한 뒤 약 24 시간 동안 배양하고, LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 동안 염증을 유도시킨 후 우슬 및 독활 추출물 시료를 $400 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다.

LPS를 처리하지 않은 세포 배양액을 positive control로, LPS만을 처리한 세포 배양액을 negative control로 설정하고 24시간 후 세포 배양액을 수거하여 원심분리 과정을 거친 상등액을 -20°C 에 보관하여 시료로 사용하였다.

			IL-1 β	IL-6	TNF α
Positive control			9.90 \pm 3.55 ^b	19.84 \pm 1.14 ^b	0.30 \pm 1.33 ^a
Negative control			37.66 \pm 1.58 ^c	336.16 \pm 0.91 ^d	36.48 \pm 17.34 ^d
Hot water extract	Aj	Not fermented	17.43 \pm 0.52 ^d	5.20 \pm 0.52 ^a	18.10 \pm 0.80 ^c
		fermented	13.98 \pm 0.35 ^c	7.57 \pm 0.35 ^a	15.50 \pm 1.46 ^{b,c}
	Ac	Not fermented	10.40 \pm 0.91 ^b	6.49 \pm 0.80 ^a	13.75 \pm 0.91 ^{b,c}
		fermented	8.28 \pm 1.62 ^b	4.13 \pm 1.62 ^a	9.30 \pm 1.44 ^{ab,c}
Ethanol extract	Aj	Not fermented	12.98 \pm 0.21 ^c	437.09 \pm 0.03 ^c	8.85 \pm 3.60 ^{ab,c}
		fermented	8.10 \pm 1.07 ^b	4.02 \pm 1.07 ^a	4.55 \pm 7.35 ^{ab}
	Ac	Not fermented	12.98 \pm 6.86 ^c	272.64 \pm 5.31 ^c	12.75 \pm 3.67 ^{b,c}
		fermented	5.00 \pm 0.64 ^a	2.15 \pm 0.64 ^a	10.05 \pm 4.76 ^{ab,c}

그림 20. 우슬 및 독활 시료별 사이토카인 측정 결과(Aj: 우슬, Ac: 땅두릅)

(나) 측정 결과

LPS만을 처리한 군에서 IL-1 β 는 37.66 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 대조군(9.90 pg/mL)에 비해 높은 증가를 보였으나, 다른 모든 군에서 유의적으로 IL-1 β 의 생성을 억제하였고, 특히 우슬 주정추출발효물에서 8.10 pg/mL, 독활 주정추출발효물에서 5.00 pg/mL로 각각 78%, 87% 수준까지 IL-1 β 의 생성이 감소되었다.

IL-6의 경우 LPS만을 처리한 군에서 336.16 pg/mL로 높은 증가를 보였으나 우슬 및 독활 열수추출물에서 positive control군 보다 유의적으로 감소하였고, 우슬 주정추출발효물과 독활 주정추출발효물에서 각각 4.02, 2.15 pg/mL로 positive control (19.84 pg/mL)보다 IL-6의 생성을 보다 더 감소시켰다.

TNF- α 의 경우 LPS만을 처리한 군에서 36.48 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 군(0.30 pg/mL) 보다 99% 높아졌으나, 독활 열수추출발효물에서 9.30 pg/mL, 독활 주정추출발효물에서 10.05 pg/mL, 우슬 주정추출발효물에서 4.55 pg/mL로 positive control군과 유의적 차이가 나지 않는 농도까지 감소효과를 보였다.

(4) 우슬의 추출용매별 항염증 효과

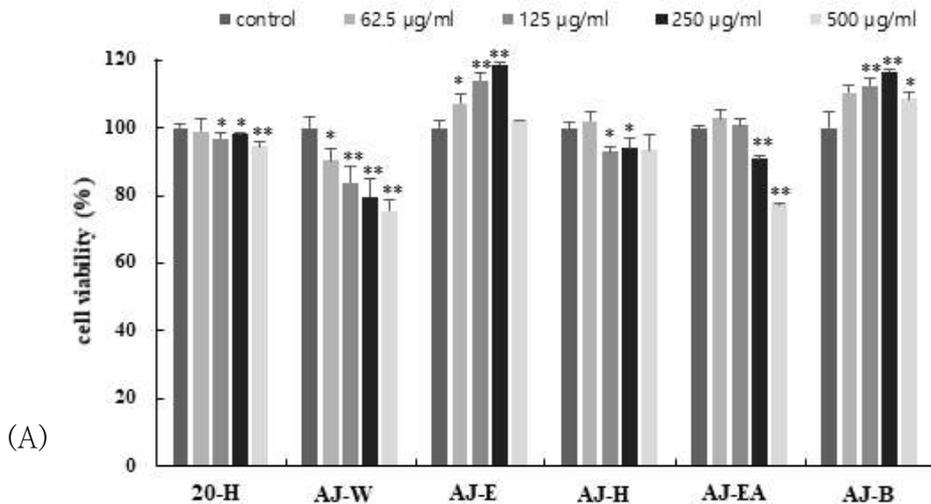
(가) 시료 제조

우슬(AJ)은 우슬 무게의 5배에 해당하는 멸균수를 첨가하고, *L. plantarum*로 발효한 우슬 (AJ-LP)은 우슬 무게의 5배에 해당하는 멸균수와 함께 우슬 무게의 1%에 해당하는 *L. plantarum*을 첨가한 후 37 °C shaking incubator에서 3일 동안 배양하였다.

3일간의 배양 완료 후 AJ와 AJ-LP에 우슬 무게의 5배에 해당하는 물(W), 에탄올(E), 헥산(H), 아세트산에틸(EA), 부탄올(B) 용매를 각각 따로 추가하여 37 °C shaking incubator에서 1 일 동안 추출하였으며, 추출액을 3,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리 하여 Whatman No. 2 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과한 후 감압 농축 (EYELA Rotary Evaporator N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)하여 동결건조 후 시료로 사용하였다.

(나) 시료 농도에 따른 세포독성 확인을 위한 RAW264.7 세포의 CCK assay를 실시

RAW264.7 세포를 6×10^3 cells/well의 농도로 96-well plate에 분주한 후 24 hr 동안 배양하여 부착시키고, 각 시료 및 대조군을 농도별(0, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 24 hr 동안 배양한 후, CCK solution을 10% (v/v) 비율로 넣고 2 hr 동안 반응시킨 후 microplate reader (multiskan, thermo scientific, Korea)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.



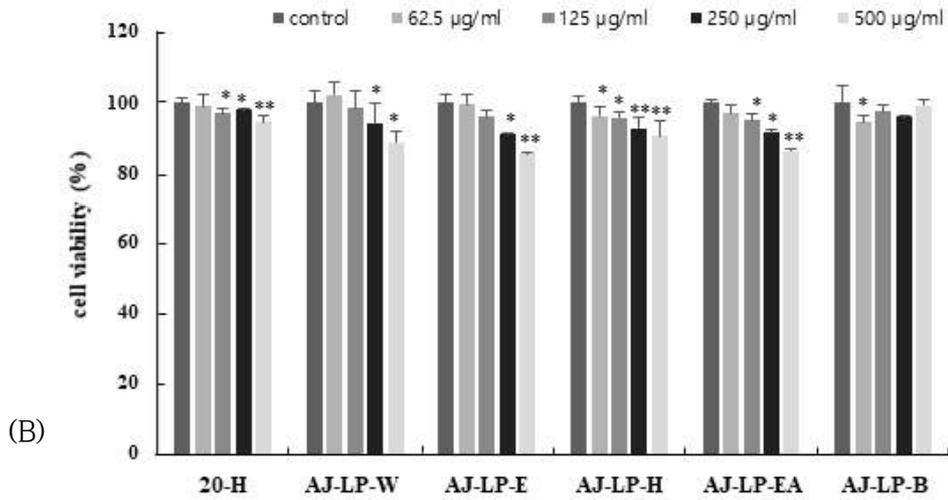
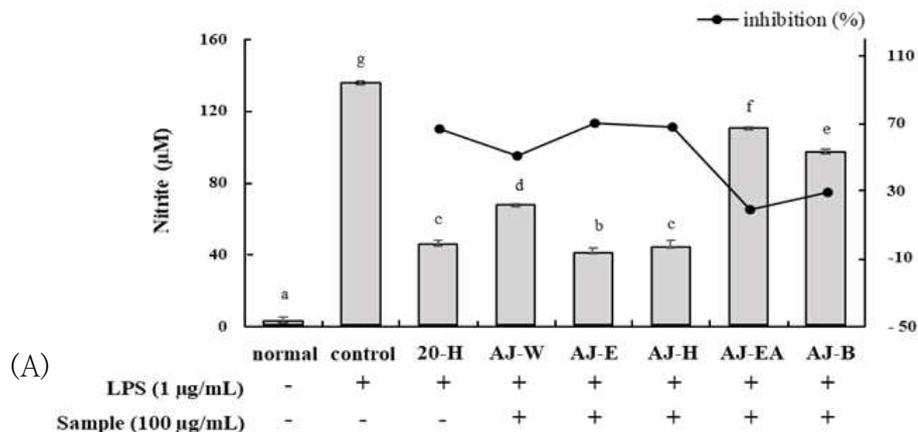


그림 21. 추출용매별 발효 전 우슬(A)과 발효 후 우슬(B)의 세포 독성 측정 결과

측정 결과 AJ와 AJ-LP를 각각의 용매로 추출한 시료 및 대조군(20-H)을 농도별(0, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 결과 대조군에서는 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. AJ에서는 125 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 80% 이상의 생존율을(A), AJ-LP에서는 250 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다(B). 따라서 모든 시료가 RAW264.7 세포에서 독성을 가지지 않는 것을 확인하였으며 시료의 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 하여 이후 실험을 진행하였다.

(다) AJ와 AJ-LP의 추출용매별 NO 생성 저해능

염증반응이 활성화되면 L-arginine에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 NO가 합성되며, 과도한 NO 생성은 염증의 심화와 그로 인한 조직의 손상을 초래한다. 따라서 AJ와 AJ-LP의 추출용매별 NO 생성 저해능을 알아보기 위해 RAW264.7 세포를 LPS로 자극시킨 후, 시료 및 대조군을 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가하여 NO 억제 활성을 분석하였다.



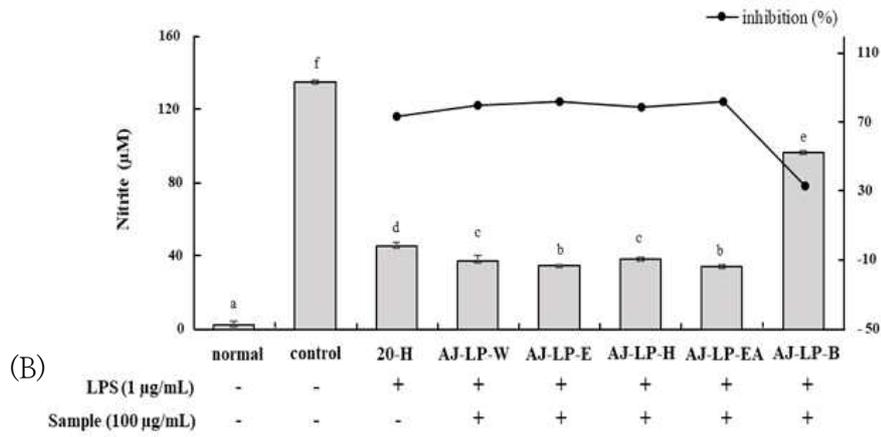
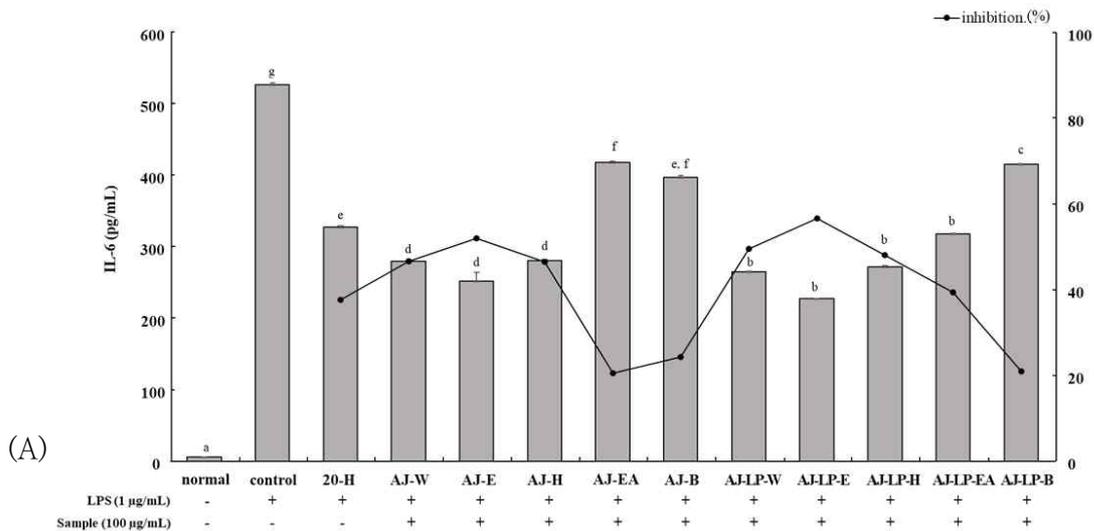


그림 22. 추출용매별 발효 전 우슬(A)과 발효 후 우슬(B)의 NO 측정 결과

AJ와 AJ-LP의 추출용매별 NO 생성 저해능 측정 결과 LPS만 처리한 control군이 normal 군에 비해 NO 생성량이 많은 것으로 보아 염증이 유도된 것으로 확인되었고, 대조군은 control군에 비해 66%의 NO 생성 저해율을 나타내었다. AJ를 E, H, W, B, EA로 추출한 시료가 control군에 비해 각각 69.9, 67.6, 50.3, 28.5, 18.6%의 NO 생성 저해율을 나타내었다 (A). AJ-LP를 EA, E, W, H, B로 추출한 시료는 control군에 비해 각각 74.6, 74.2, 72.2, 71.6, 28.4%의 NO 생성 저해율을 나타내었다(B). 따라서 AJ를 E와 H로 추출한 시료와 AJ-LP를 W, E, H, EA로 추출한 시료는 대조군에 비해 NO 억제 효능이 뛰어남을 알 수 있었다.



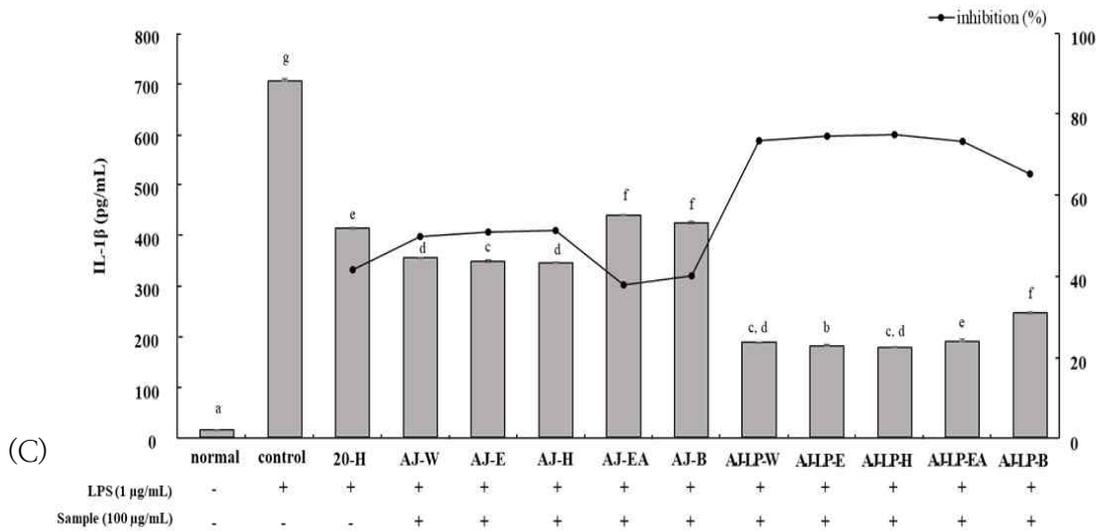
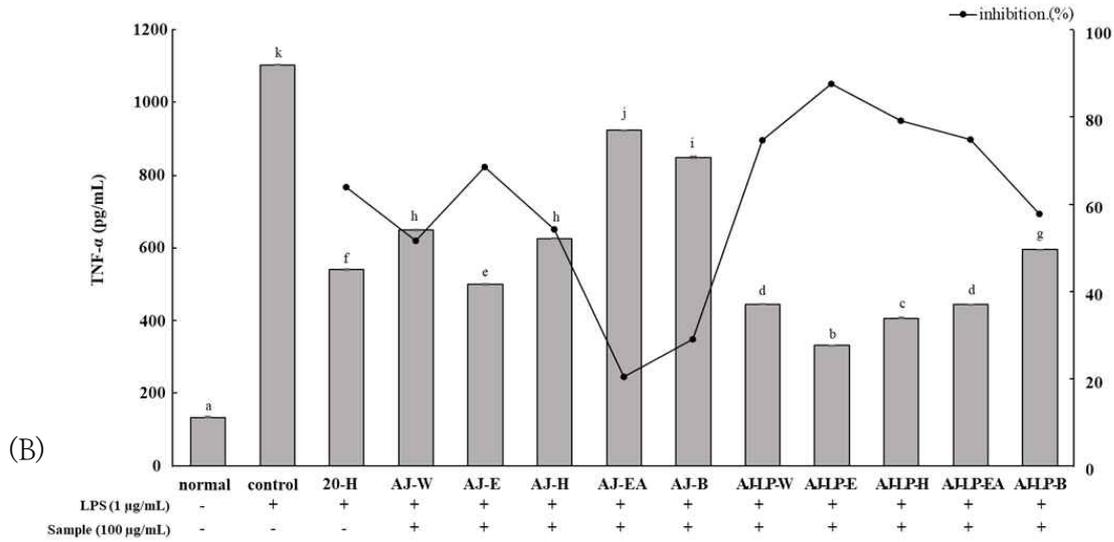


그림 23. 추출용매별 발효 전 우슬과 발효 후 우슬의 cytokine 측정 결과

(라) AJ와 AJ-LP의 추출용매별 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

시료가 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 생성되는 pro-inflammatory cytokine (IL-6, TNF- α , IL-1 β)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

측정 결과 IL-6의 결과에서 control군이 527.3 pg/mL, 대조군은 328.4 pg/mL로 나타났고, AJ를 H, W, E로 추출한 시료가 각각 281.6, 280.9, 252.5 pg/mL, AJ-LP에서는 EA, H, W, E로 추출한 시료가 각각 318.9, 272.8, 265.6, 228.2 pg/mL의 농도로 대조군에 비해 IL-6 생성량이 낮았으며, 특히 AJ-LP-E가 control군에 비해 56.7%, 대조군에 비해 30.5%로 가장 높은 IL-6 저해율을 나타내었다(A).

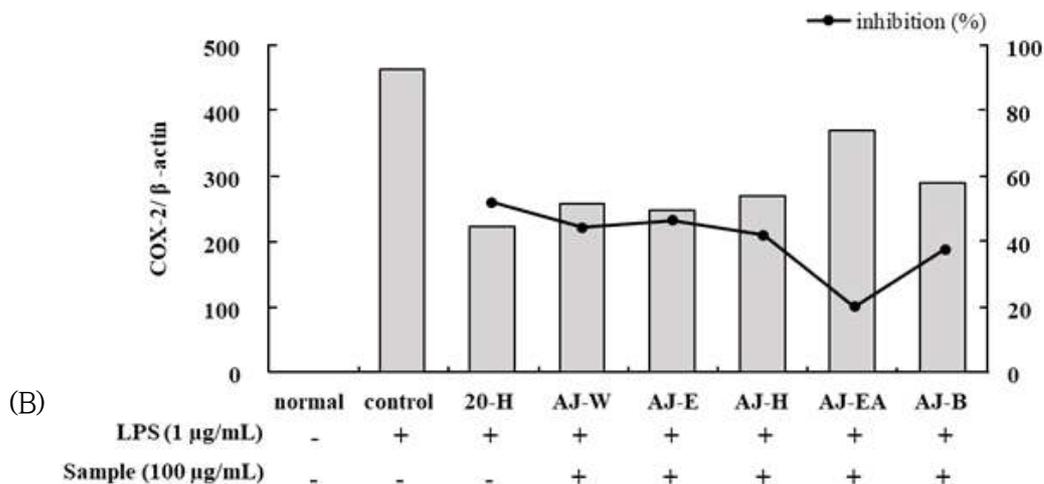
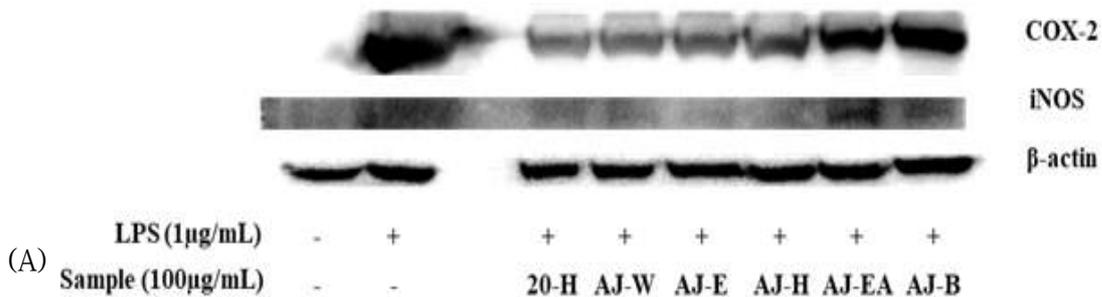
TNF- α 의 결과에서 control군은 1103.7 pg/mL, 대조군은 540.3 pg/mL로 대조군이 control

군에 비해 51.0%의 저해율을 나타냈고, AJ를 E로 추출한 시료와 AJ-LP를 E, H, EA, W로 추출한 시료는 control군에 비해 각각 54.7%와 70.0, 63.2, 59.8, 59.6%로 대조군보다 높은 저해율을 보였다. 특히, AJ-LP-E는 control군에 비해 70.0%, 대조군에 비해 38.6%로 가장 높은 TNF- α 저해 효과를 나타내었다(B).

IL-1 β 의 결과에서 control군은 704.0 pg/mL, 대조군은 412.6 pg/mL로 대조군이 control군에 비해 41.4%의 IL-1 β 저해율을 나타냈고, AJ를 H, E, W로 추출한 시료와 AJ-LP를 H, E, W, EA, B로 추출한 시료가 control군에 비해 51.0, 50.6, 49.6%와 74.7, 74.3, 73.3, 73.0, 65.1%의 IL-1 β 저해율을 나타내었다(C).

AJ-LP를 B로 추출한 시료는 앞에서 살펴본 IL-6, TNF- α 생성억제 효과에서 대조군보다 비교적 낮은 저해 효과를 보였으나, IL-1 β 에서는 대조군에 비해 높은 저해 효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 유산균으로 우슬을 발효했을 때 발효하지 않은 우슬에 비해 cytokine 분비량이 더 적다는 것을 알 수 있었으며, 에탄올로 추출한 시료가 다른 추출 용매를 사용하였을 때보다 IL-6, TNF- α 뿐만 아니라 IL-1 β 에서 control군에 비해 cytokine 분비량이 50% 이상 현저히 감소한다는 것을 확인하였다.



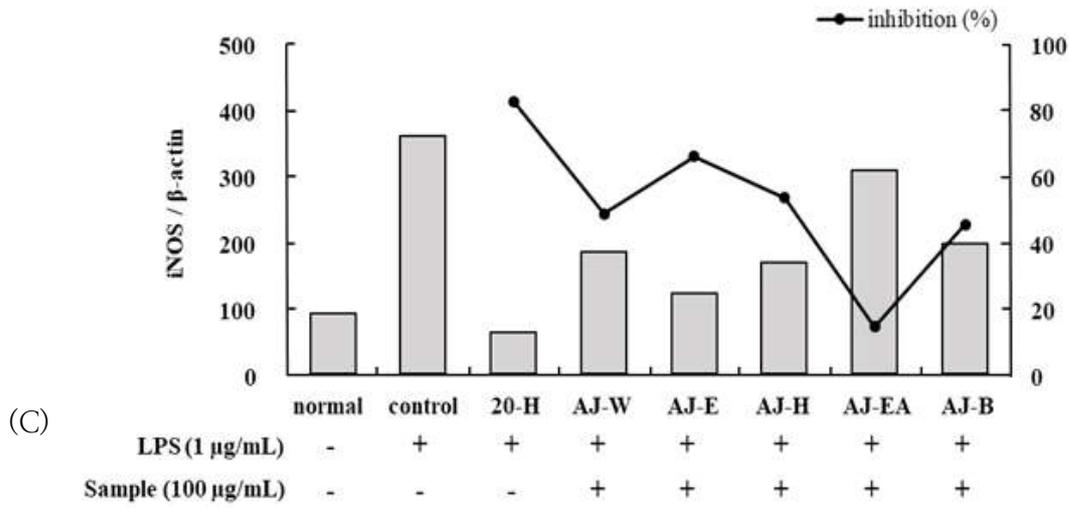
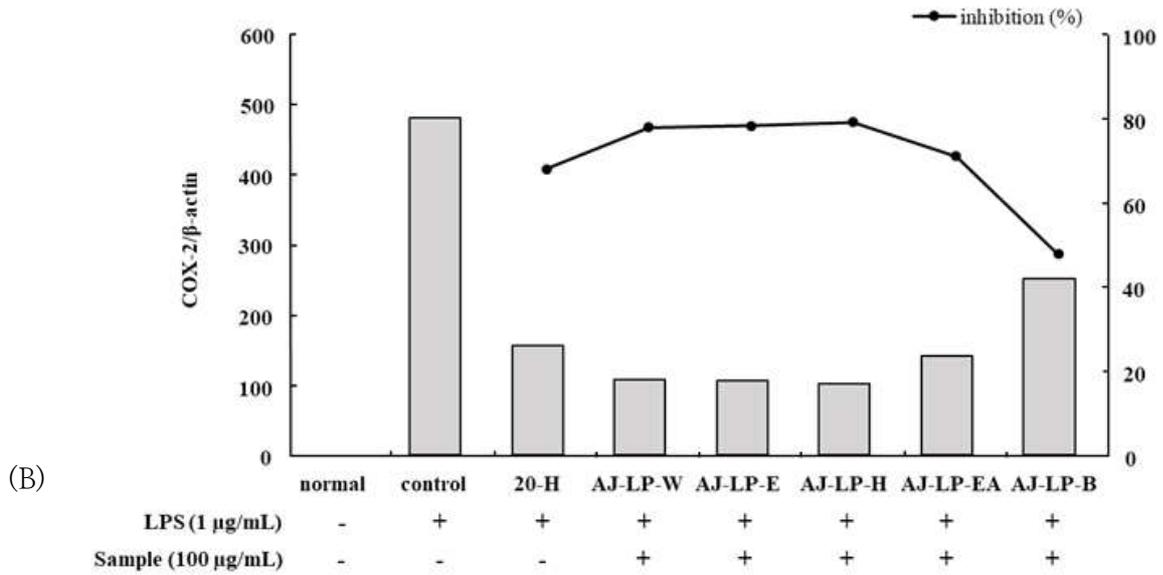
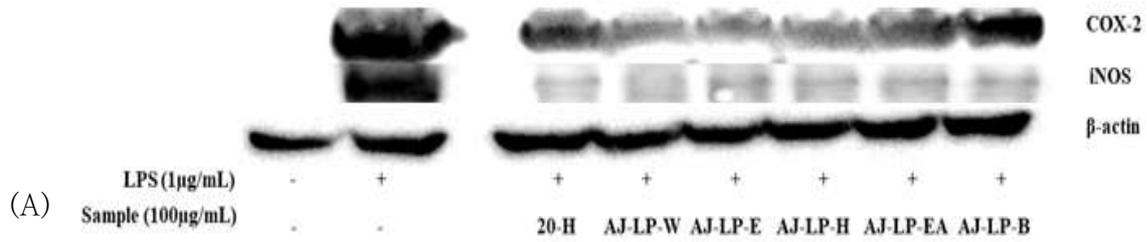


그림 24. 추출용매별 발효 전 우슬의 western blot 측정 결과



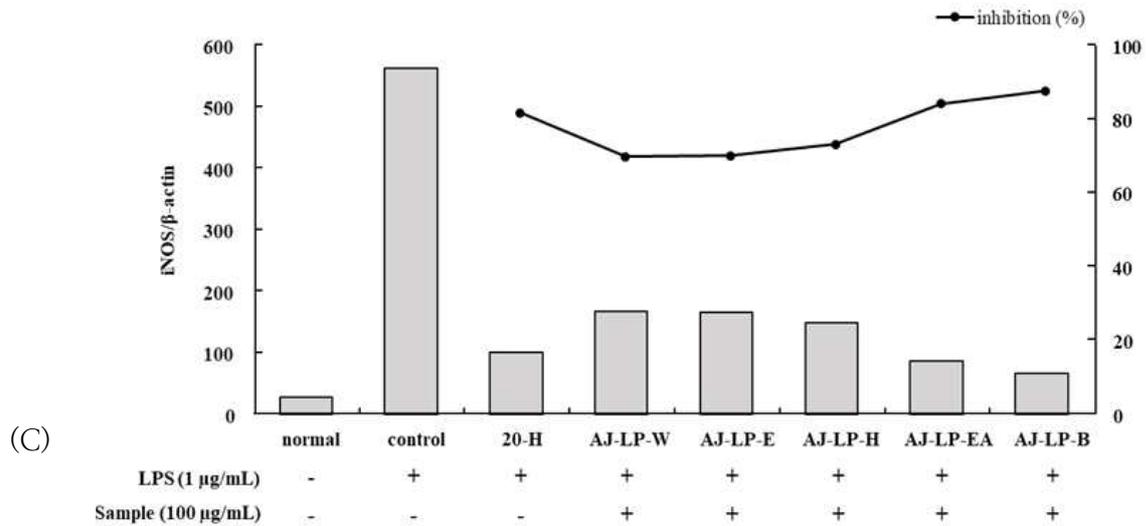


그림 25. 추출용매별 발효 후 우슬의 western blot 측정 결과

(마) AJ 와 AJ-LP의 COX-2 및 iNOS 발현 저해 효과 확인

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 AJ (그림 24)와 AJ-LP (그림 25)의 COX-2 및 iNOS 발현 저해 효과를 알아보기 위해 western blot을 수행하고, 세포의 발현 정도에 차이가 없는 house keeping gene으로 β -actin을 측정하여 COX-2와 iNOS의 발현율을 비교하였다.

측정 결과 AJ의 용매별 COX-2 발현 결과 control군에 비해 대조군은 52%의 저해율을 보였고, AJ의 용매별 추출 시료 중 E가 46.4%로 높은 저해 효능을 보였으며 EA가 20.0%로 가장 낮은 저해 효능을 보였다(그림 24(B)).

AJ의 용매별 iNOS 발현결과 control군에 비해 대조군이 82.6%의 저해율로 가장 높았으며 다음으로는 E가 66.2%로 저해율이 높았다(그림 24(C)).

AJ-LP의 용매별 COX-2 발현 결과 대조군은 control군에 비해 67.7%의 저해율을 나타냈으며, H, E, W, EA는 control군에 비해 78.9, 78.0, 77.7, 70.7%의 저해율로 대조군보다 높게 나타났다(그림 25(B)).

AJ-LP의 용매별 iNOS 발현은 control군에 비해 모든 군에서 70% 이상의 저해율을 나타냈고 AJ-LP-B가 88.1%로 가장 높은 iNOS 저해율을 나타내었다(그림 25(C)).

이러한 결과로 보아 AJ군에 비해 AJ-LP군이 COX-2 및 iNOS 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 판단된다.

(5) 독활의 추출용매별 항염증 효과

(가) 시료 제조

독활 파우더의 5배에 해당하는 증류수, ethanol, hexane, butanol, ethyl acetate를 첨가한 군과, 독활 파우더 중량의 1%에 해당하는 *Lactobacillus plantarum*을 접종하여 37°C에서 3일간 발효시킨 후 증류수, ethanol, hexane, butanol, ethyl acetate를 첨가한 군으로 나누어 37°C shaking incubator에서 2시간 동안 추출을 수행한 후, 추출물을 Whatman No. 2 (Whatman, Lawrence, KS, USA) 여과지로 여과시킨 후 rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압 농축 후 동결건조기로 건조하여 얻은 분말을 본 실험의 추출물로 사용하였다.

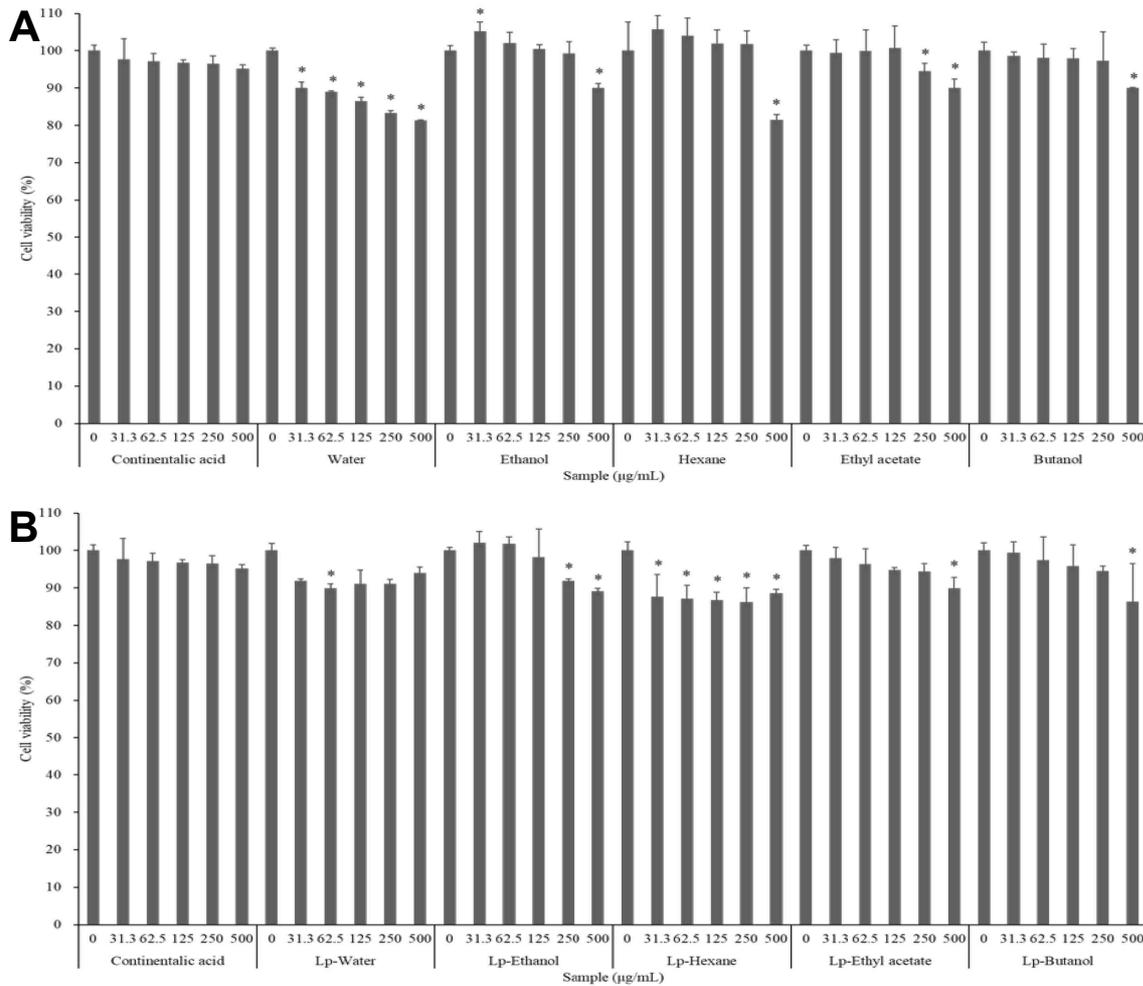


그림 26. 발효 전 땅두릅과 발효 후 땅두릅의 세포 독성 측정

(나) 세포 독성 측정위한 CCK assay 시행

세포 독성은 CCK assay 방법을 사용하여 측정하였고, 추출 용매별 독활 추출물들과 유산균 발효 독활 추출물들을 각각 0, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml의 농도로 RAW264.7 세포에 처리하여 24시간 배양한 후 분석하였다.

CCK assay 시행 결과 땅두릅을 water, ethanol, hexane, ethyl acetate, butanol을 이용하여 추출한 추출물에서 water 추출 군을 제외하고 125 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 80% 이상의 생존력을 나타내었고(A), 독활을 *L. plantarum*으로 발효한 후 추출한 추출물들 중에서는 hexane 군에서 유의적으로 생존율이 낮게 나타났으나 모든 군에서 125 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 90% 이상의 생존율을 나타내었다(B). Lp-water 군과 Lp-ethanol 군에서는 증식 효과도 관찰되었다. 따라서 이후의 실험에서는 독성을 나타내지 않는 최고 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도로 결정하여 실험을 수행하였다.

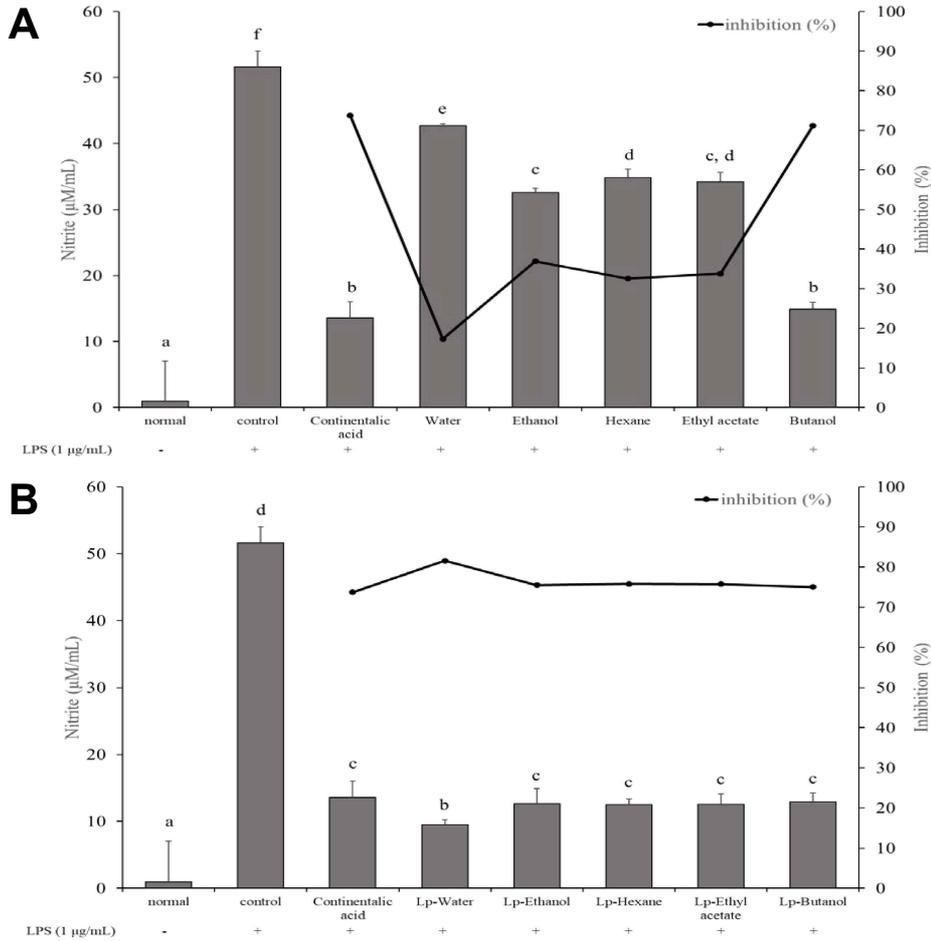


그림 27. 발효 전 땅두릅과 발효 후 땅두릅의 NO 생성량 측정

(다) 독활의 추출용매별 NO 생성량 감소 효과

LPS를 처리한 대조군에 비해 모든 군에서 유의적으로 NO 생성량이 감소하였다.

독활의 지표물질로 알려져 있는 continentalic acid 처리군에서는 대조군에 비해 $73.72 \pm 2.47\%$ 감소하였으며 butanol 군은 $71.20 \pm 1.11\%$ 로 continentalic acid군과 유의적 차이 없는 NO 생성 저해율을 나타내었다(A). Ethanol군과 hexane군이 각각 36.96 ± 0.69 , $32.59 \pm 1.32\%$ 순서로 저해율이 높았다.

*L. plantarum*으로 발효한 후 추출한 추출물에서는 모든 군에서 대조군에 비해 70% 이상의 저해율을 나타내었는데, Lp-water군에서 $9.51 \pm 0.71 \mu\text{M}$ 의 NO 생성량으로 An 등의 연구[2]에서 독활 열수추출물의 NO 생성량인 $30.64 \pm 0.79 \mu\text{M}$ 보다 낮으며 저해율도 $81.60 \pm 0.71\%$ 로 가장 높게 나타났다(B).

이상의 결과로, 독활을 *L. plantarum*으로 발효 후 추출할 시 NO 생성을 억제시킴으로 감염 반응에 대한 초기 면역기능에 대한 활성도가 높을 것이라 판단된다.

(라) 독활의 추출용매별 COX-2 / iNOS / 염증성 사이토카인 발생 억제능 측정

① COX-2 / iNOS / 염증성 사이토카인 측정 방법(RT-PCR)

RAW264.7 세포(2×10^6 cells/well)에 각 추출물(6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하여 1 시간동안 배양한 후 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 24시간 동안 배양하여 상층액을 제거한 후 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1 ml을 첨가하여 2분 동안 방치한 후 chloroform을 넣고 10초간 vortexing하고, 15분 동안 원심분리(13,572x g, 4°C)를 수행한 후 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어주었다.

15분 동안 원심분리(13,572x g, 4°C)를 수행한 후 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-treated water (Bioneer, Korea) 20 μl 에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

AccuPower RT/PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 사용하여 45°C에서 30분, 94°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA로 합성하였고, 94°C에서 30초 동안 denaturation 시키고 56°C에서 30초 동안 annealing 시킨 후, 72°C에서 1분 동안 extension 시키는 cycle을 35회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5분 동안 PCR machine (Takara, Japan)에서 수행하였다.

각 PCR products는 1.2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30분 동안 전기영동으로 확인하였다.

표 1. RT-PCR에 사용된 각 primer의 염기서열

Gene	Forward primer (from 5' to 3')	Reverse primer (from 3' to 5')	Size
COX-2	TTG AAG ACC AGG AGT ACC GC	GGT ACA GT CCC ATG ACA TCG	324
iNOS	CTG CAG CAC TTG GAT CAG GAA CCT	GGG AGT AGC CTG TGT GCA CCT GGA	311
IL-1 β	AAG CTC TCC ACC TCA ATG GAC A	A	453
IL-6	TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC	GTC TGC TCA TTC ACG AAA ABB GAG	139
TNF- α	GCG ACG TGG AAC TGG CAG AAG	GTG TAA TTA AGC CTC CGA CTT G	354
GAPDH	GAA GCT CAT CTC TCC TAT GTG CTG	TCC ATG CCG TTG GTT AGG AGG	450
	GC	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	

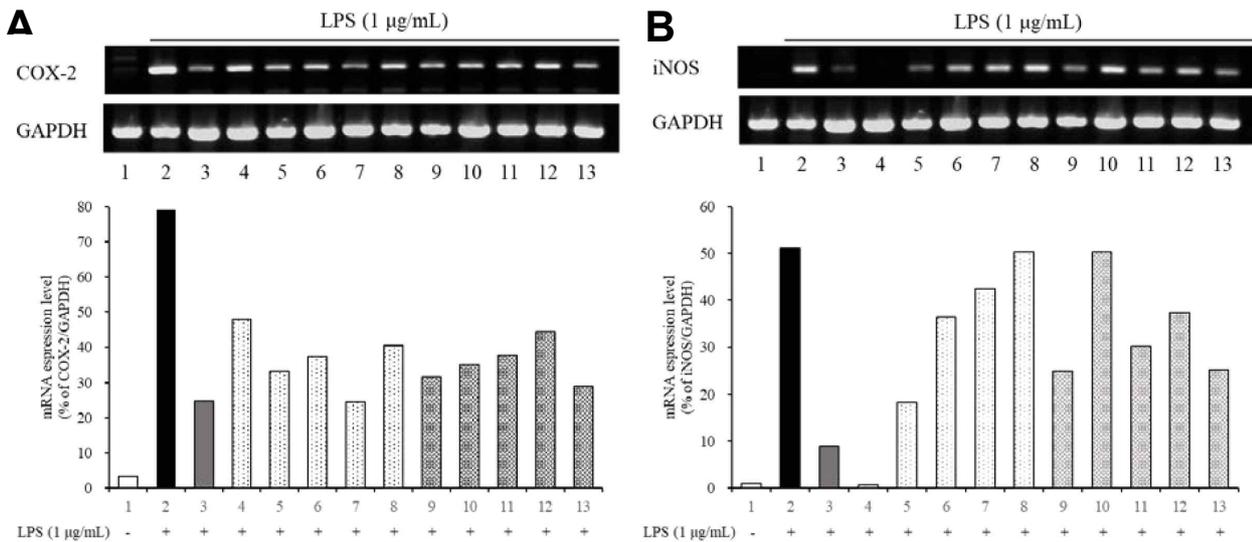


그림 28. 발효 전 땅두릅과 발효 후 땅두릅의 COX-2 및 iNOS 발현 결과

② COX-2 / iNOS / 염증성 사이토카인의 작용 기전

COX-2와 iNOS는 면역세포의 활성을 유도하여 다량의 염증성 매개체를 생합성하는데 관여한다고 알려져 있다. COX-2는 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하는 효소로 염증과 같은 병적인 환경에서 혈관내피세포, 대식세포, 조골세포 등에서 분비되며, COX-2의 억제제는 염증의 억제뿐만 아니라 암 치료에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 현재 알려진 COX-2의 선택적 억제제로 celecoxib, rofecoxib 등이 있다.

NOS는 산화질소합성효소로서 NOS에 의해 산화질소가 생성되며, eNOS (endothelial NOS), nNOS (neuronal NOS)와 iNOS (inducible NOS)의 3가지 형태가 존재한다. 이들 중 eNOS와 nNOS는 칼슘 농도에 의존적이며 자극에 대한 반응이 아닌 세포내에서 항시 발현되어 있는 효소로서 일시적으로 소량 발현된다. 반면에 iNOS는 염증자극에 의해 지속적으로 다량 생성됨으로써 LPS 등에 의해 유도되면 장기간 동안 다량의 산화질소 농도를 생성하며 염증반응을 촉진시킨다.

RAW264.7 세포와 같은 대식세포가 활성화되면 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 cytokine을 분비하며 Cytokine은 일반적인 염증과정과 조혈작용 및 면역반응 등에 관련된 모든 세포들의 작용을 조절한다.

IL-1 β 는 T세포를 활성화시키며, T세포에서 분비되는 cytokine의 활성을 증진시키는 등의 역할을 하고, IL-6는 면역반응, 조혈작용과 염증을 조절하는데 관여하는 cytokine으로서 다른 cytokine과 협동하여 상승작용을 나타내며 면역글로불린 합성 증진 및 plasma cell 분화 유도 등 다양한 작용을 한다. TNF- α 는 T림프구의 성장 및 활성 등을 조절하며 암세포의 용해를 유도함으로써 항암 작용을 나타내기도 하지만 지나치게 다량 분비되면 염증 및 면역반응에 관여하게 되며 혈압강하, 혈관 확장 및 투과성 증가로 인한 혈장의 손실을 일으킨다.

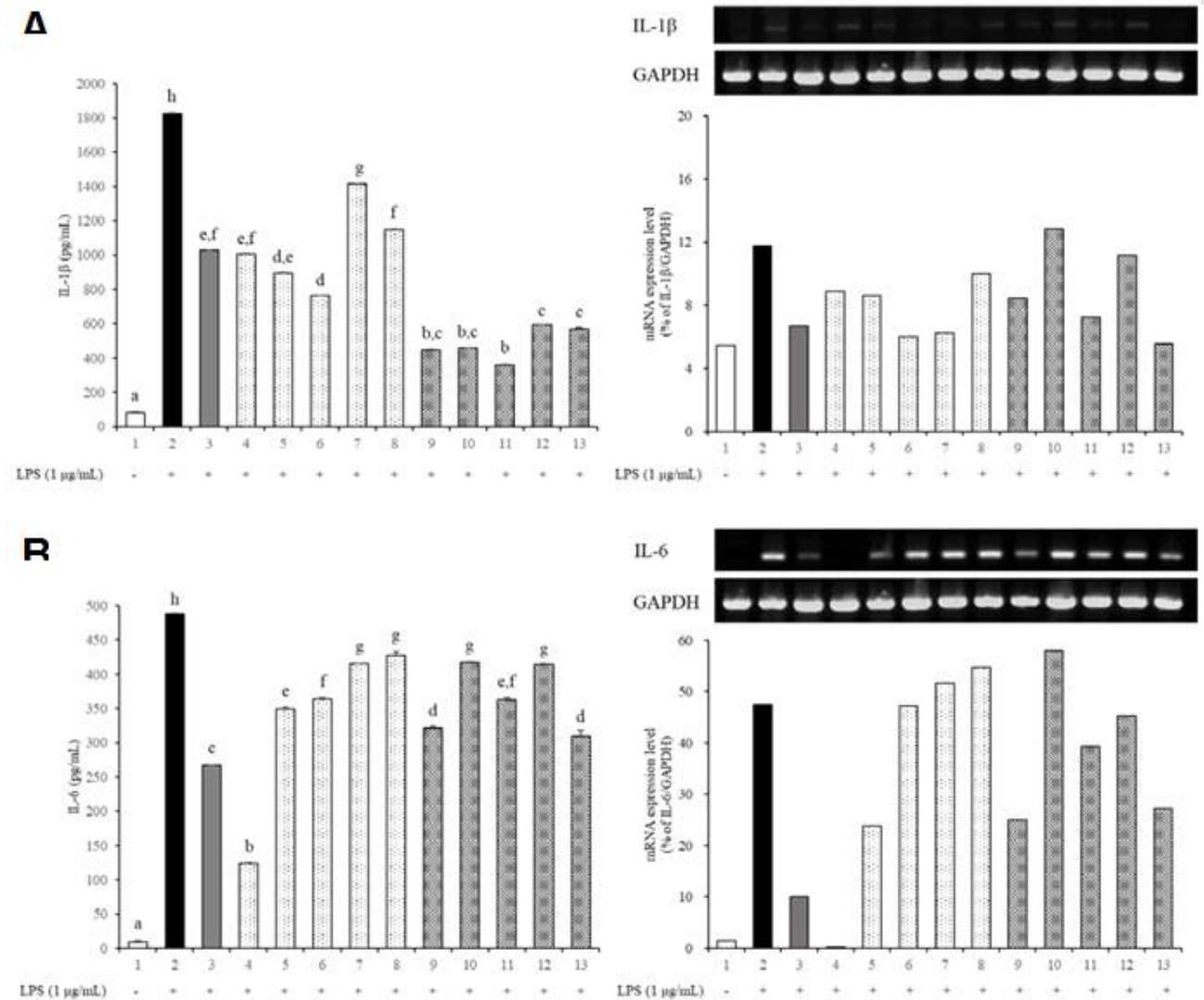
③ 측정 결과

추출 용매별 독활추출물과 *L. plantarum*으로 발효 후 용매별로 추출한 독활추출물에서 COX-2 mRNA의 발현량은 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 거의 발현되지 않았으나 LPS 자극군에서 현저하게 증가하였으며, 추출물을 처리한 모든 군에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(A).

독활의 지표물질로 알려진 continentalic acid 군은 LPS 자극군에 비해 31.12%까지 COX-2 mRNA의 발현량이 감소하였으며 ethyl acetate군이 31.00%, Lp-butanol군이 36.53%, Lp-water군이 39.80% 순으로 감소하였다.

iNOS mRNA의 발현량도 LPS 자극군에서 현저히 증가하였으며, water 추출 군에서 1.13%까지 감소하여 LPS를 처리하지 않은 군(4.10%)보다도 낮은 발현율을 보였다(B).

따라서 땅두릅 유산균 발효추출물이 COX-2, iNOS 유전자 발현을 조절하여 염증예방 및 면역기능 증진에 도움이 되는 기능성 소재로서의 응용가능성이 있을 것으로 사료된다.



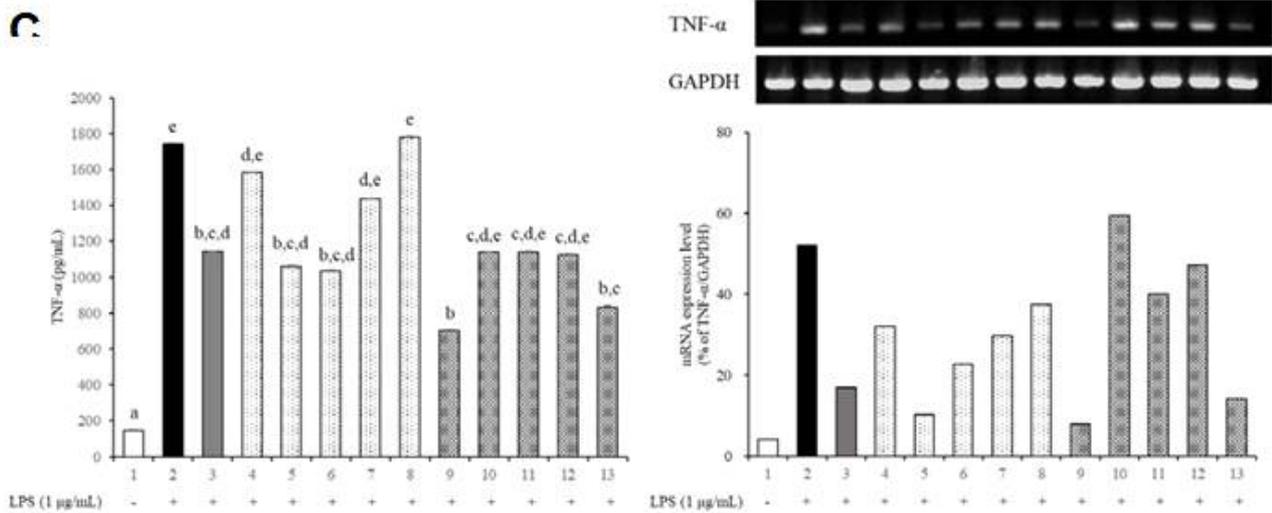


그림 29. 발효 전 땅두릅과 발효 후 땅두릅의 cytokine 생성 결과

IL-1 β 의 생성량은 대조군에서 82.17 pg/ml이었으나, LPS 자극군에서 1825.17 pg/ml로 유의한 상승을 보였으며 *L. plantarum*으로 발효 후 추출한 모든 추출물군에서 독활의 지표물질인 continentalic acid (1031.08 pg/ml)보다 유의적으로 감소하였다(A). Lp-hexane, Lp-water, Lp-ethanol군 순서로 각각 359.08, 445.92, 456.67 pg/ml의 농도로 유의한 감소를 나타내었으며, IL-1 β mRNA 발현량은 대조군에 비해 LPS 자극군에서 증가하였고, LP-ethanol군과 Lp-ethyl acetate군을 제외한 나머지 군에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 관찰되었다.

IL-6의 생성량은 대조군에서 8.46 pg/ml이었으나, LPS 자극군에서 487.90 pg/ml로 유의한 상승을 보였으며 water 추출군에서 123.57 pg/ml로 독활의 지표물질인 continentalic acid (267.74 pg/ml)보다 유의적으로 감소하였다(B). Lp-butanol, Lp-water군 순서로 각각 309.38, 320.86 pg/ml의 농도로 유의한 감소를 나타내었고, IL-6 mRNA 발현량은 대조군에 비해 LPS 자극군에서 현저히 증가하였으며, water군에서 대조군보다도 낮은 발현량을 나타내었다.

TNF- α 의 생성량은 대조군에서 146.53 pg/ml이었으나, LPS 자극군에서 1743.78 pg/ml로 유의한 상승을 보였으며 ethanol군, hexane군과 *L. plantarum*으로 발효 후 추출한 모든 추출물군에서 LPS 자극군보다 유의적으로 감소하였고(C), Lp-water, Lp-butanol군 순서로 각각 701.56, 833.38 pg/ml의 농도로 유의한 감소를 나타내었다. TNF- α mRNA 발현량은 대조군에 비해 LPS 자극군에서 증가하였으며, LP-ethanol군을 제외한 나머지 모든 군에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 관찰되었다.

3. 우슬 및 땅두릅 혼합 시제품용 유산균 발효 추출물 제조

선행연구를 토대로 우슬과 땅두릅을 각각 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1 그리고 5:1 비율로 혼합한 후, 70% 주정으로 37°C에서 48시간동안 추출하였다. 추출물을 Filter paper를 이용하여 감압여과한 후 용액층을 vacume rotary evaporater로 농축하여 시료를 얻고, 농축물의 1%에 해당하는 *L.plantarum*을 첨가하여 37°C에서 60시간 동안 본 배양시킨 후 7일간 동결 건조하여 최종 시료로 사용하였다.

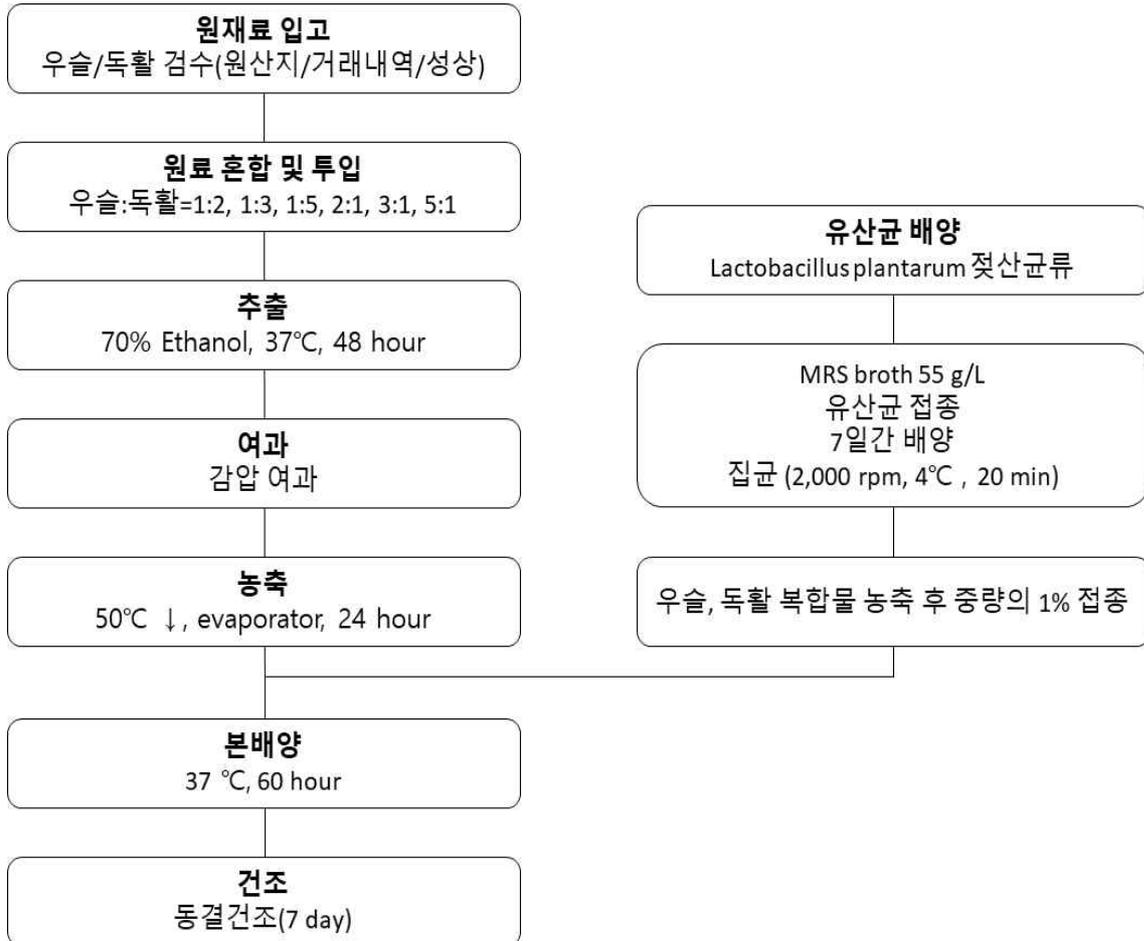


그림 30. 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균 발효 복합물 제조공정도



그림 31. 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균 발효 후 동결건조한 추출물

가. 우슬 및 독활 혼합 유산균 발효 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다. 시료 50 μ l에 동량의 1 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 실온에서 6분간 반응시킨 후, 2% Na₂CO₃ 포화용액 100 μ l를 가하여 30분간 반응시켜 ELISA Reader를 사용하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였고, 지표 물질인 gallic acid의 표준검량곡선을 작성하여 시료에 함유된 폴리페놀 화합물의 함량을 측정하였다.

나. 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균 발효 추출물의 총 플라보노이드 함량 측정

각 샘플의 1 mg을 증류수 1 mL에 녹여 그 중 100 μ L와 diethyleneglycol 1 mL을 혼합하고 1N NaOH 100 μ L를 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 200 μ L씩 96 well plate에 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정, 이때 총 플라보노이드 함량은 naringin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

Aj:Ac	1:2	1:3	1:5	2:1	3:1	5:1
Total polyphenol contents (μ g/mg)	73.79 \pm 1.65 ^a	76.08 \pm 2.86 ^{ab}	76.86 \pm 2.02 ^b	104.48 \pm 1.42 ^c	102.59 \pm 1.28 ^c	77.98 \pm 1.56 ^b
Total flavonoids contents (μ g/mg)	1.40 \pm 0.90 ^a	1.37 \pm 0.89 ^a	1.16 \pm 0.20 ^a	2.98 \pm 0.56 ^c	2.46 \pm 0.94 ^b	2.07 \pm 1.08 ^b

그림 32. 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균 발효 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

다. 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균발효 추출물이 MG-63 세포의 성장률에 미치는 영향

(1) 실험 방법

배양한 MG-63 세포를 세포수 1×10^5 cells/dish로 조정하여 100 mm dish에 분주한 후, 세포의 성장률을 측정하였다. Tryphan blue 용액과 1:1로 반응하여 염색되지 않는 살아 있는 세포를 이틀에 한 번씩 10일간 계수하였으며, 도립현미경을 이용하여 20배 배율로 관찰하였다.

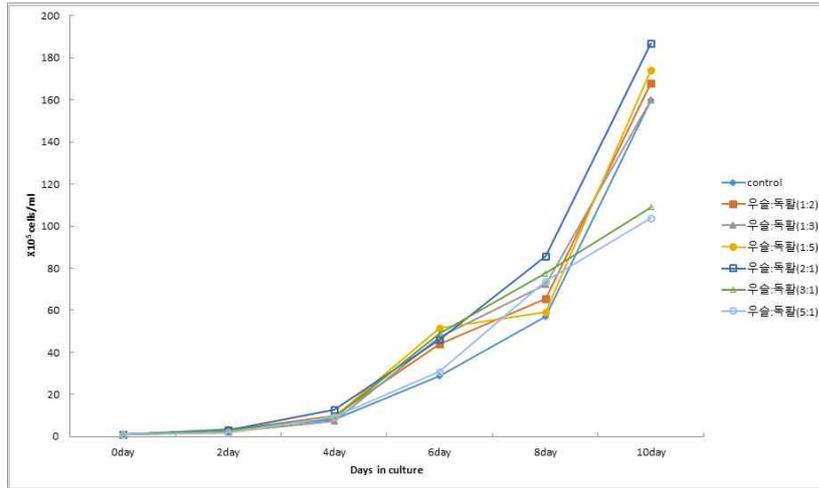


그림 33. 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균발효 추출물 처리 시 MG-63 세포의 성장 그래프

(2) RAW264.7 macrophage 세포독성 시험 (CCK assay)

우슬과 독활 유산균 복합추출물을 세포에 처리하기 위한 최고 농도를 결정하기 위하여 CCK assay를 통해 세포독성을 확인하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 6×10^3 cells/well의 농도가 되도록 조절한 후 각 well에 100 μ L씩 분주하고 이것을 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 다음 복합추출물을 0, 200, 400, 600, 800, 1000 μ g/mL 농도가 되도록 배지에 희석하여 첨가하였다. 시료 첨가 후 24시간 동안 배양시켜 CCK reagent를 주입하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(%) = (1-시료 처리군의 흡광도 / 대조군의 흡광도) × 100의 계산식으로 정량화하였다.

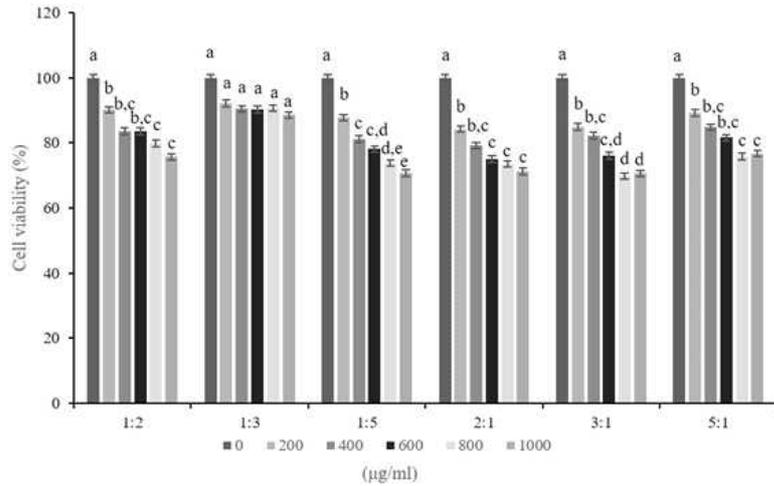


그림 34. 농도에 따른 우슬, 땅두릅 복합비율별 독성 측정 결과 그래프

(3) 우슬 및 독활 혼합 유산균발효 추출물의 NO(nitric oxide) 생성능 측정

(가) 측정 방법

우슬 및 땅두릅 혼합 유산균발효 추출물의 면역 증강능력을 확인하기 위하여 Griess method를 이용하여 RAW264.7 세포의 배양 상등액 중의 NO 생성 농도를 정량함으로써 측정하였다. RAW264.7 세포를 1.5×10^5 cell/dish의 농도로 60 mm dish에 분주하고, 24시간 후 1 µg/mL의 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 24시간 배양하였다.

우슬 및 독활 유산균 복합추출물을 CCK assay 결과에 따라 독성이 없는 최대 농도인 400 µg/mL로 처리하여 24시간 후 상등액을 이용하여 실험을 진행하였고, 양성대조군으로는 LPS를 처리하지 않은 세포의 상등액을 사용하였으며, 음성대조군으로는 1 µg/mL의 LPS만을 처리한 세포의 상등액을 사용하여 실험하였다.

상등액 100 µl와 동량의 griess reagent를 혼합하여 상온에서 15분 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정, 이때 표준곡선의 작성은 sodium nitrite를 이용하였다.

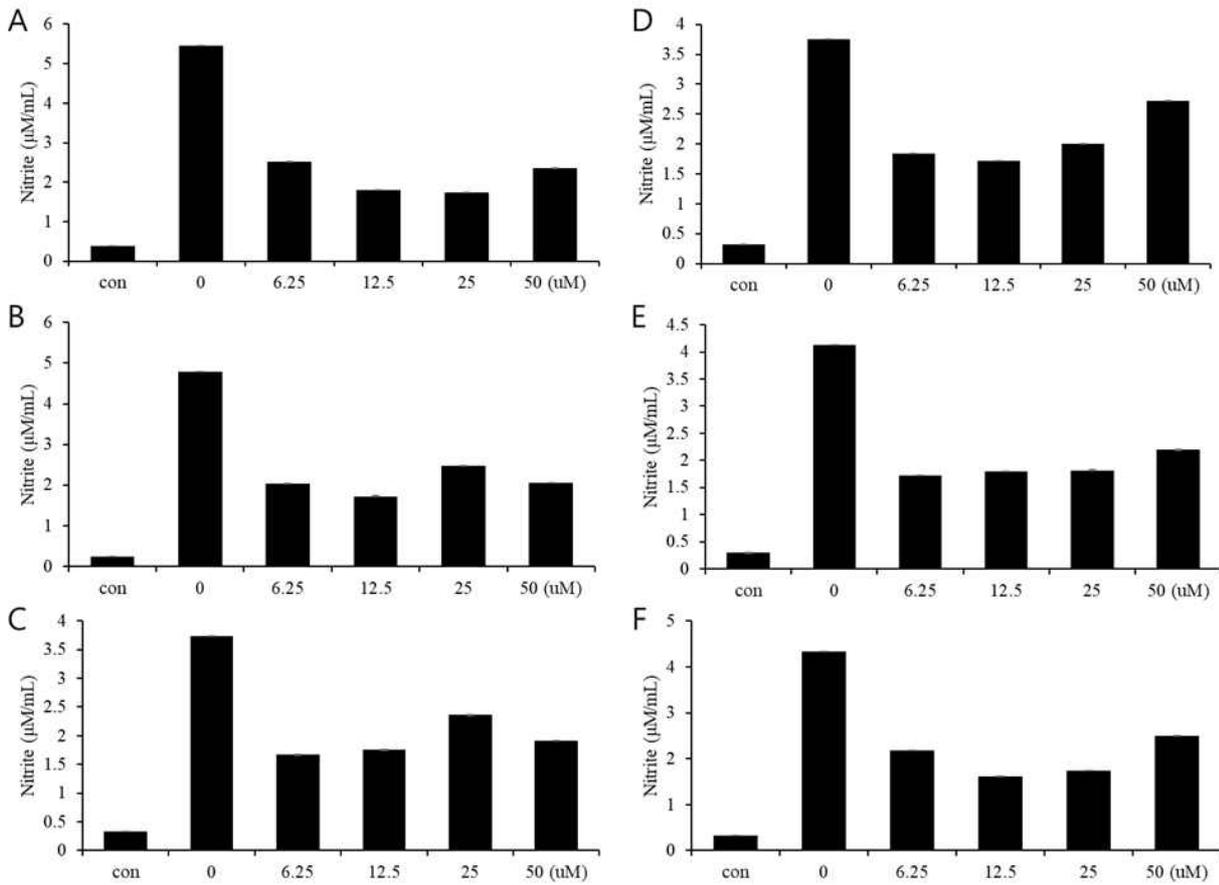


그림 35. 우슬 및 땅두릅 복합비율별 NO 생성능 측정 결과 그래프
(우슬:땅두릅=1:2(A), 1:3(B), 1:5(C), 2:1(D), 3:1(E), 5:1(F))

(나) 측정 결과

LPS의 처리에 의한 RAW264.7 세포에서 NO 생성의 증가는 우슬과 독활 복합추출물 처리군에서 모두 감소되는 것으로 확인되었다.

라. 우슬 및 독활 혼합 유산균발효 추출물의 염증 관련 사이토카인 생성량 측정

(1) 측정 방법

우슬 및 땅두릅 혼합 유산균발효 추출물이 LPS의 자극에 의해 생성되는 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 의 생성량에 미치는 효과를 측정하기 위해 RAW264.7 대식세포를 1.5×10^6 cells/dish의 농도로 60 mm dish에 분주한 뒤 약 24시간 동안 배양한 후 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 24시간 동안 염증을 유도하였다. 염증이 유도된 세포에 6가지 우슬 및 독활 혼합 유산균발효 추출물 시료를 각각 처리하고, 24시간 후 세포 및 세포 배양액을 이용하여 PCR 및 ELISA assay로 사이토카인 생성량을 측정하였다.

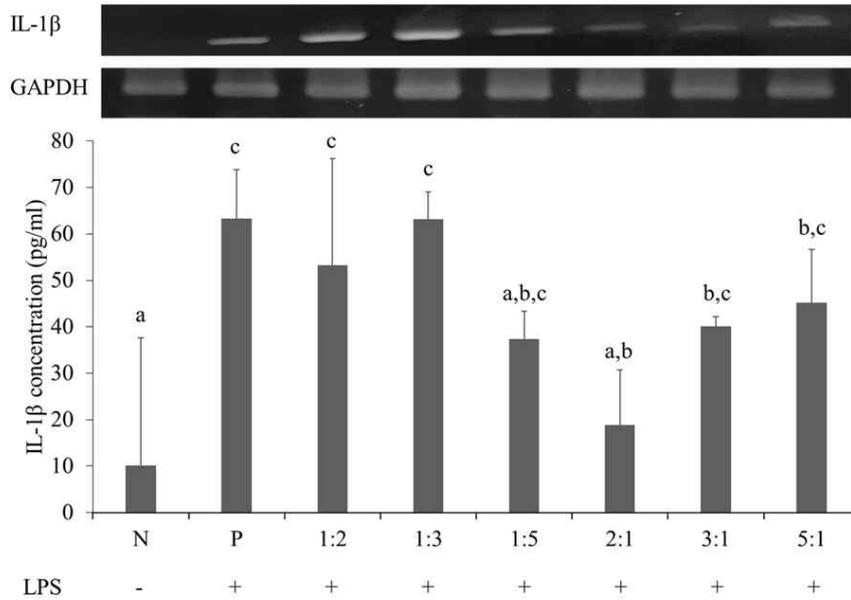


그림 36. 우슬 및 땅두릅 복합비율별 IL-1 β 측정 결과 그래프

(2) 측정 결과

ELISA assay 결과 LPS만을 처리한 군에서 IL-1 β 는 63.26 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 대조군(10.12 pg/mL)에 비해 높은 증가를 보였으나, 우슬:독활=2:1, 1:5, 3:1 비율에서 각각 18.81, 37.35, 40.14 pg/mL로 IL-1 β 의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 특히 2:1의 비율에서는 70% 수준까지 IL-1 β 의 생성이 감소하였으며, IL-1 β mRNA 발현량은 대조군에 비해 LPS 자극 군에서 증가하였다. LP-ethanol군과 Lp-ethyl acetate군을 제외한 나머지 군에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 관찰되었다.

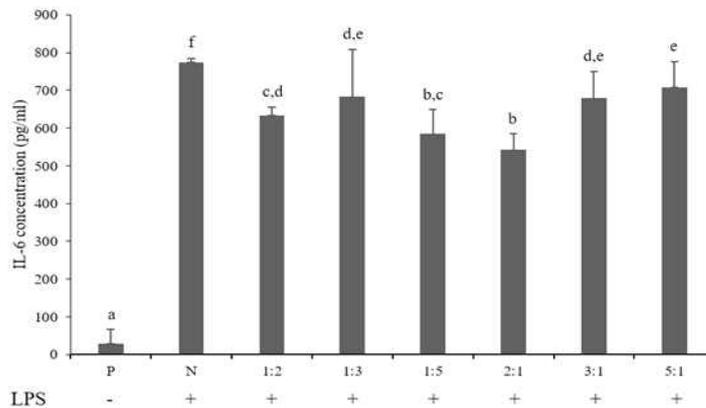


그림 37. 우슬 및 독활 복합비율별 IL-6 측정 결과 그래프

IL-6의 경우는 LPS만을 처리한 군에서 774.49 pg/mL로 높은 증가를 보였으나, 3:1, 1:2, 1:5 비율에서 각각 678.98, 633.52, 584.76 pg/mL로 감소하였고, 특히 2:1 비율에서 542.68 pg/mL로 30% 감소효과를 보였으며, IL-6 mRNA 발현량은 대조군에 비해 LPS 자극군에서 현저히 증가하였고 water군에서 대조군보다 낮은 발현량을 나타내었다.

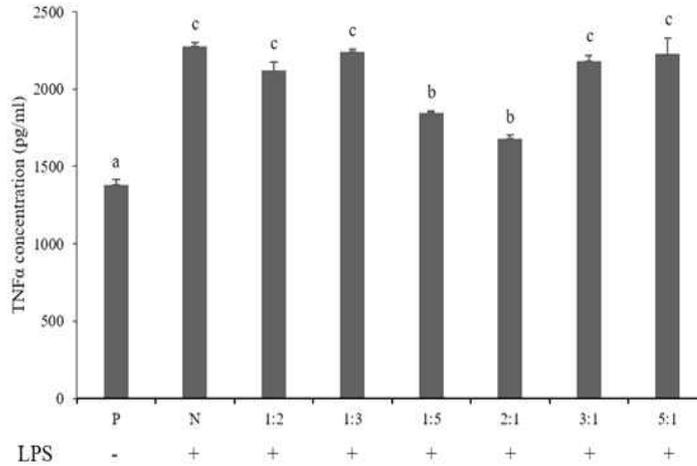


그림 38. 우슬 및 땅두릅 복합비율별 TNF- α 측정 결과 그래프

TNF- α 의 경우 LPS만을 처리한 군에서 2275.68 pg/mL로 LPS를 처리하지 않은 군(1379.47 pg/mL) 보다 39% 높아졌지만, 1:5 비율에서 1847.02 pg/mL, 2:1 비율에서 1679.11 pg/mL로 각각 19%, 26% 감소효과를 보였고, TNF- α mRNA 발현량은 대조군에 비해 LPS 자극군에서 증가하였으며, LP-ethanol군을 제외한 나머지 모든 군에서 유전자의 발현이 감소하는 것으로 관찰되었다.

(3) 결론

우슬 : 독활 2:1 비율 추출발효물에서 면역 관련 사이토카인 생성에 가장 효과적인 것으로 판단 되어 최종 시제품 생산은 우슬 : 독활 = 2:1 비율로 확정하였다.

4. 동물실험

가. 실험 조건

본 연구에 사용된 동물은 Sprague-Dawley 계의 6주령 된 흰쥐(암컷)로서 (주)샘타코 바이오 코리아에서 분양받아 동물실험실 환경에 7일간 적응시킨 후 사용하였고, 적응 기간 동안 동물실험실의 온도는 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 내외, 명암주기는 12시간 단위로 조절하였으며 실험기간 내내 사료와 물을 제한 없이 적당량을 충분히 공급하였다.

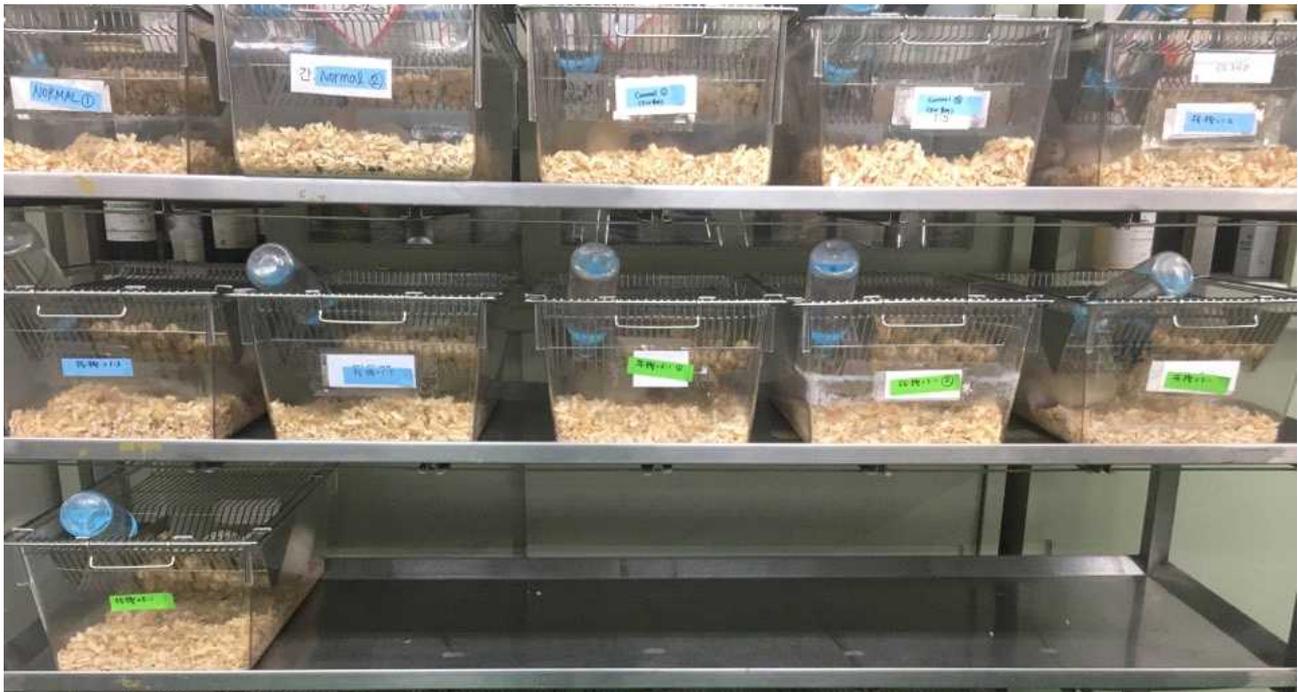


그림 39. 실험에 사용된 SD-rats 사진

나. 시료의 투여 및 기간

총 40마리의 실험동물을 8 군(normal, control, 1:2, 1:3, 1:5, 2:1, 3:1, 5:1)으로 나누어 normal 군을 제외한 모든 군에 LPS (300 μ g/Kg)를 복강 주사하여 염증을 유발시킨 후, 24 시간 뒤부터 normal군과 control군은 0.9% 증류수 2 ml을, 실험군은 각각의 시료 200 mg을 증류수 2 mL에 혼합하여 zoned needle을 이용하여 매일 오전 10시경에 1일 1회 2주간 경구 투여하였다.



그림 40. LPS 복강주사 사진



그림 41. 경구투여 사진

다. 혈액 분석

경구투여 종료 후 24시간 절식시킨 실험동물을 CO₂chamber를 이용해 절식사 시킨 후 혈액을 채취하여 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 분리. 혈청으로 유리된 TNF- α 와 PGE₂의 생성을 ELISA kit (R&D systems Inc., Minneapolis, USA)를 사용하여 제공회사의 실험방법에 따라 측정하였다.

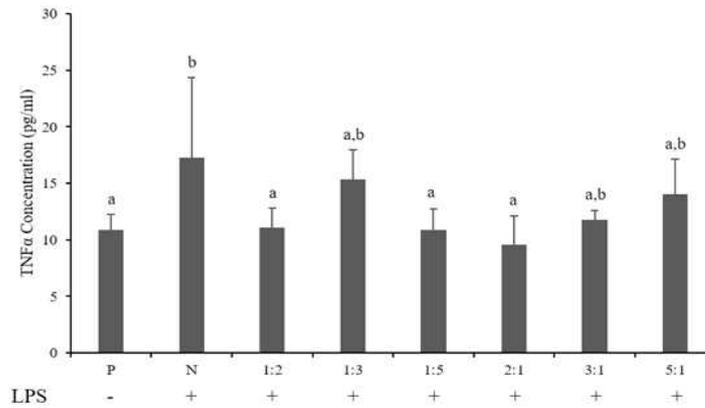


그림 42. Rat serum에서 우슬 및 땅두릅 복합비율별 TNF- α 측정 결과 그래프

라. 측정 결과

TNF- α 는 LPS만을 처리한 군에서 17.25 pg/ml로 LPS를 처리하지 않은 대조군(10.88 pg/ml)에 비해 유의적인 증가를 보였으며, 우슬:독활=2:1, 1:5, 1:2 비율에서 각각 9.60, 10.85, 11.08 pg/ml로 TNF- α 의 생성을 유의적으로 억제하였으며, 특히 2:1 비율에서 LPS만을 처리한 군 보다 44% 감소효과가 있음을 확인하였다.

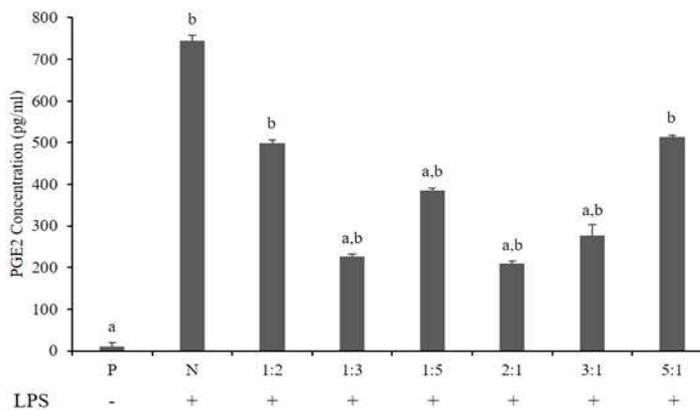


그림 43. Rat serum에서 우슬 및 땅두릅 복합비율별 PGE₂ 측정 결과 그래프

PGE₂는 LPS만을 처리한 군에서 743.85 pg/ml로 LPS를 처리하지 않은 대조군(9.60 pg/ml)에 비해 높은 증가를 보였으며, 우슬:땅두릅=2:1, 1:3, 3:1 비율에서 각각 208.86, 226.61, 276.45 pg/ml로 PGE₂의 생성을 유의적으로 억제하는 것으로 확인하였다.

5. NMR을 이용한 발효 전 후 물질 변화 측정

^1H -NMR spectrum은 Varian Unity Inova 500MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, D_2O 용매를 사용 하였고 ppm 단위로 나타내었다.

시제품으로 생산된 우슬:땅두릅=2:1 주정 추출물과 2:1 열수 추출물 그리고 1:5 주정 추출물의 발효 전 후 물질 변화를 측정하였고(그림 44, 45, 46). 이러한 발효를 통한 물질 변화가 cytokine 억제 효과와 성장인자 촉진에 기여한다는 분석 결과를 얻었다.

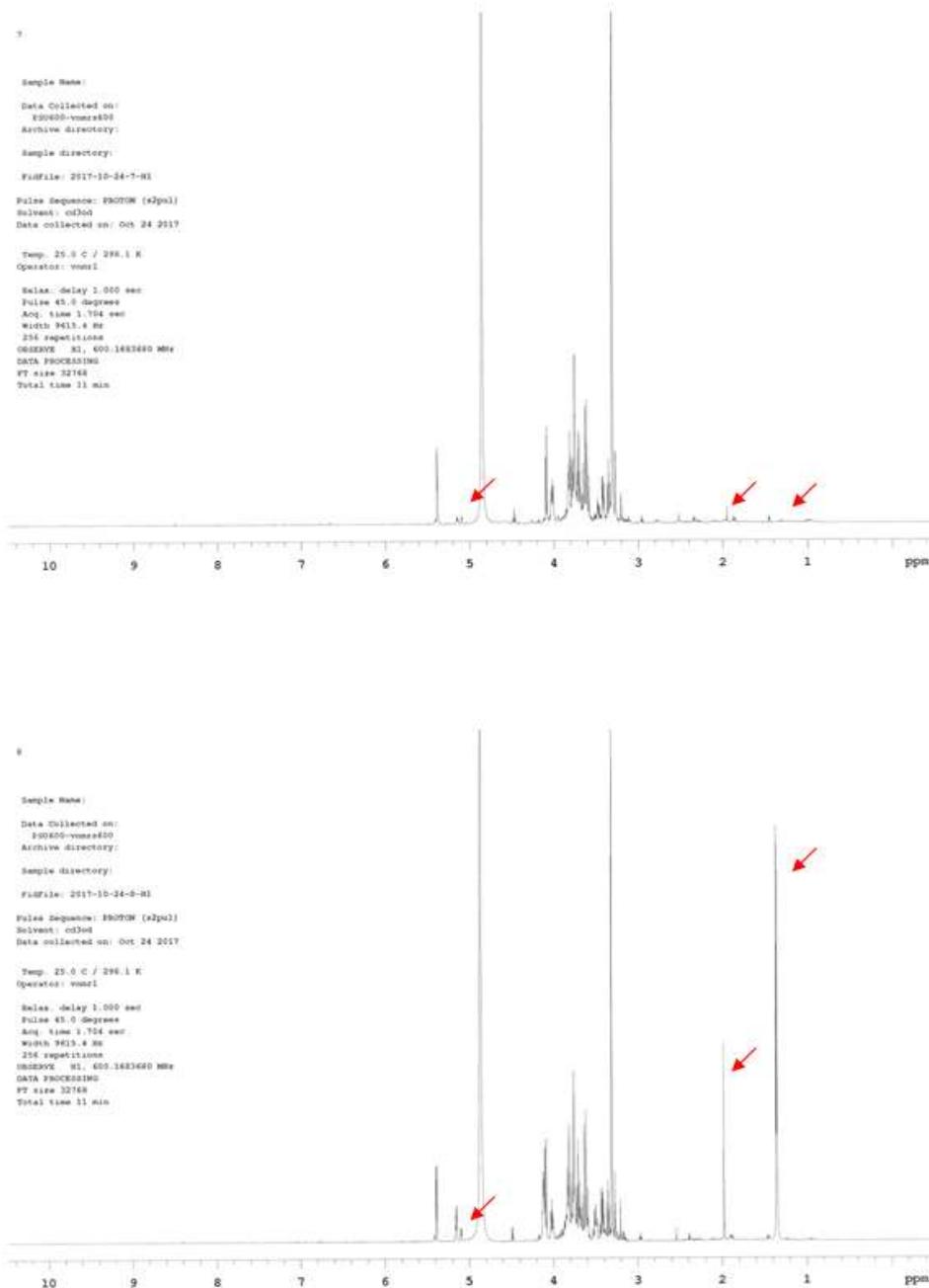


그림 44. 유산균 발효 전(상)과 발효 후(하) 우슬:땅두릅=1:5 열수추출물의 NMR data

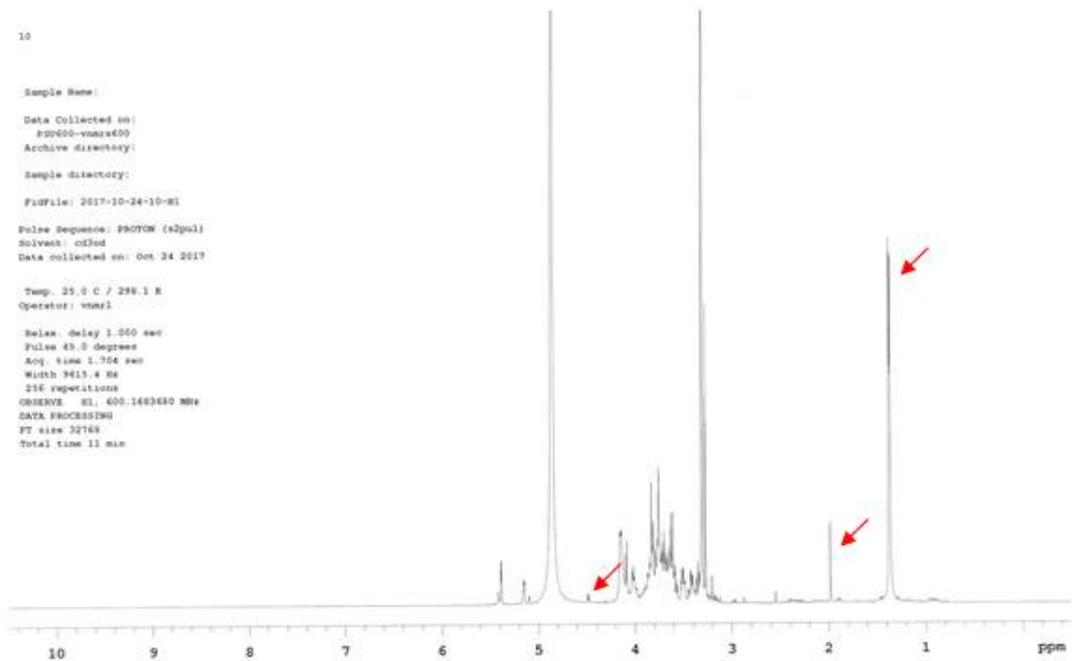
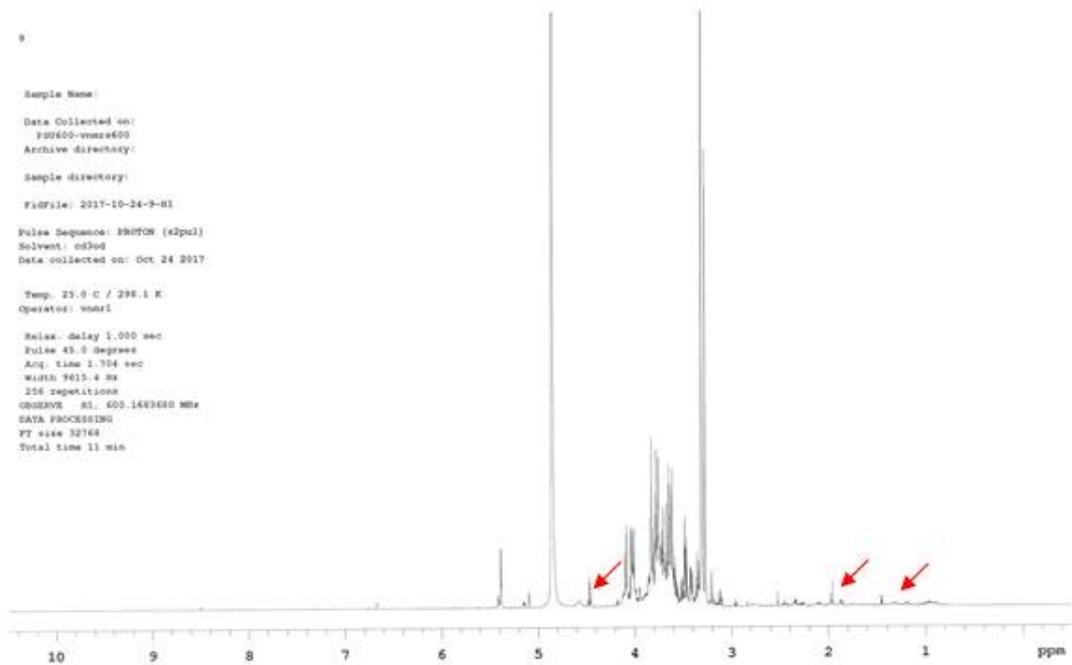
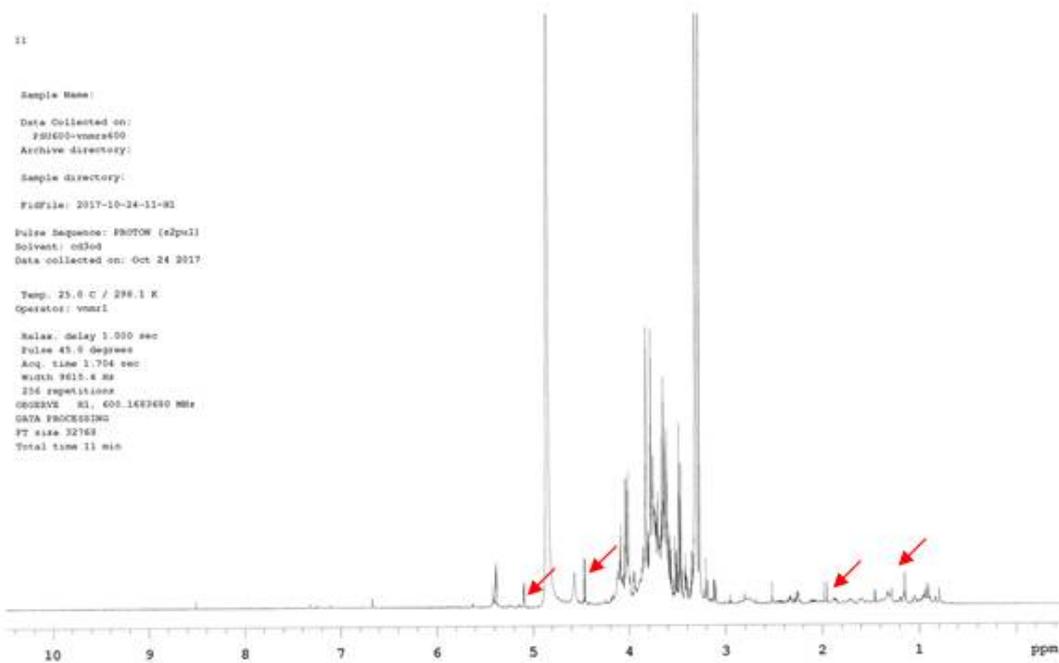


그림 45. 유산균 발효 전(상)과 발효 후(하) 우슬:팡두릅=2:1 열수추출물의 NMR data

11

Sample Name:
Data Collected on:
90400-vv0460
Archive directory:
Sample directory:
File: 2017-10-24-11-M1
Pulse Sequence: PROTON (s2pu1)
Solvent: cd3od
Data collected on: Oct 24 2017
Temp: 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.704 sec
Width 9415.4 Hz
256 repetitions
OBSERVE H1, 400.1483680 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 11 min



12

Sample Name:
Data Collected on:
90400-vv0460
Archive directory:
Sample directory:
File: 2017-10-24-12-M2
Pulse Sequence: PROTON (s2pu1)
Solvent: cd3od
Data collected on: Oct 24 2017
Temp: 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.704 sec
Width 9415.4 Hz
256 repetitions
OBSERVE H1, 400.1483680 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 11 min

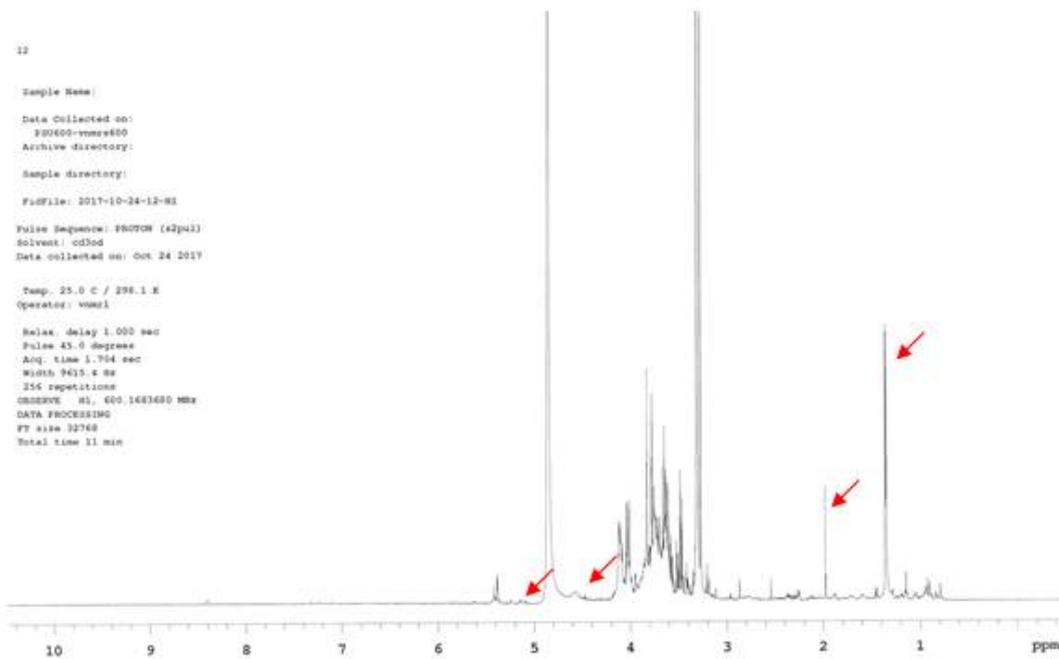


그림 46. 유산균 발효 전(상)과 발효 후(하) 우슬:팡두름=2:1 주정추출물의 NMR data

6. GLP기관 독성시험을 통한 안전성 확인

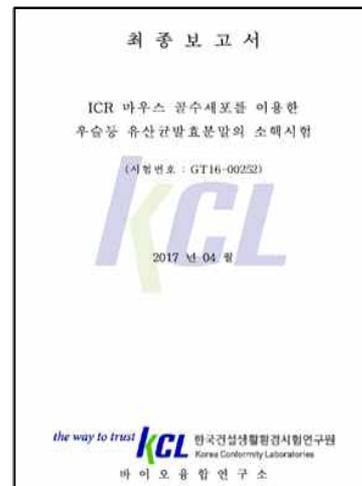
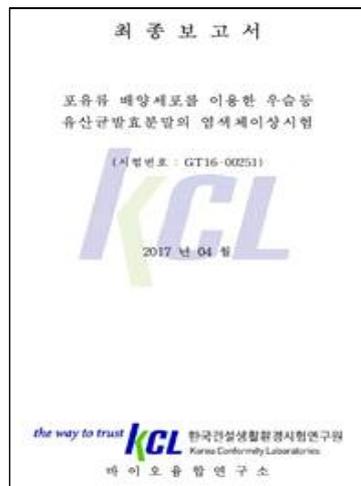
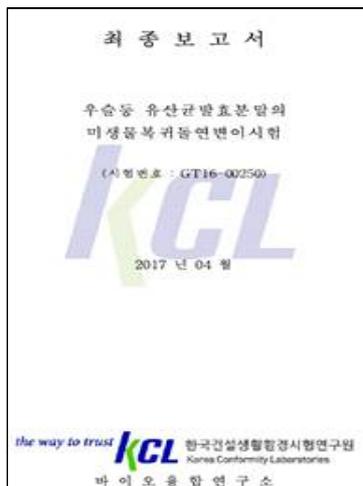
가. 일반 독성

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2,000mg/kg BW 단회 경구투여 독성시험 결과, 우슬등 유산균발효복합물 투여로 기인한 사망례, 일반증상의 이상이 관찰되지 않았음. (GLP기관 수행, 시험번호 GT16-00249)



나. 유전 독성

우슬등 유산균발효복합물 투여로 돌연변이, 염색체이상 및 소핵을 유발하지 않았음. (GLP기관 수행, 시험번호 GT16-00250(미생물복귀돌연변이시험), 시험번호 GT16-00251(염색체이상시험), 시험번호 GT16-00252(소핵시험))



7. 지표성분 선정

가. 지표성분 명칭 및 설정 근거

대한민국 약전에서 우슬을 증명하기 위한 정성시험에는 20-Hydroxyecdysone (ecdysterone)을, 독활(땅두릅)을 증명하기 위한 정량시험에는 Continentalic acid를 이용하고 있으며, 우슬 등 복합추출발효물은 우슬과 독활(땅두릅)을 주원재료로 사용하므로 각각의 지표성분을 20-Hydroxyecdysone(ecdysterone)과 Continentalic acid로 설정하였다.

나. HPLC 밸리테이션을 통한 지표성분 분석(Waters e2695)

(1) 사용 표준품

우슬(*Achyranthes japonica*, ACJA2008) 표준품, 독활(*Aralia continentalis*, ARCO2012) 표준품 및 독활의 지표성분인 continentalic acid(2008)는 한국식품의약품안전처에서 구입하였고, 우슬의 지표성분인 ecdysterone(20-hydroxyecdysone)는 (주)시그마알드리치코리아에서 구입하여 실험에 사용하였다.



그림 47. HPLC 분석에 사용된 표준품 및 지표성분



그림 48. 지표성분 분석에 사용된 HPLC

(2) 우슬 지표성분의 HPLC 분석

(가) 표준용액 제조

- ① 20-hydroxyecdysone 5mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 50ml가 되게 정용한 후 이 용액 10ml를 정확하게 취하여 이동상을 이용하여 100ml로 맞춰 표준액으로 사용.
- ② 표준액을 단계적으로 희석하여 각각 100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 검량선용표준용액을 제조.
- ③ 각각의 검량선용 표준용액을 컬럼에 10 μl 주입하고 HPLC 분석을 실시하여 크로마토그램을 얻어냄.
- ④ 얻어낸 크로마토그램의 peak data를 plot하여 정량분석을 위한 검량선을 작성.

(나) 시험용액 제조

- ① 우슬 표준품과 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균발효 추출물은 2g을 정밀하게 달아 묽은 에탄올 (50%) 100ml를 넣어 녹인 후 멤브레인 필터(0.45 μm)로 여과하여 사용.
- ② 10 μl 를 주입하여 HPLC분석을 실시함.

(다) 분석조건

Item	Condition
Column	SunFire C18(4.6*300mm, 5μm)
Flow rate	1.0 ml/min
Oven Temp.	25°C
UV detector	245 nm
Injection vol.	10μl
Mobile phase	0.08% Formic acid : Acetonitrile = 17:3(v/v)

※ 시료는 UV 검출기(Waters 2489 UV/Vis Detector) 및 Empower3 software를 활용하여 정량 분석함.

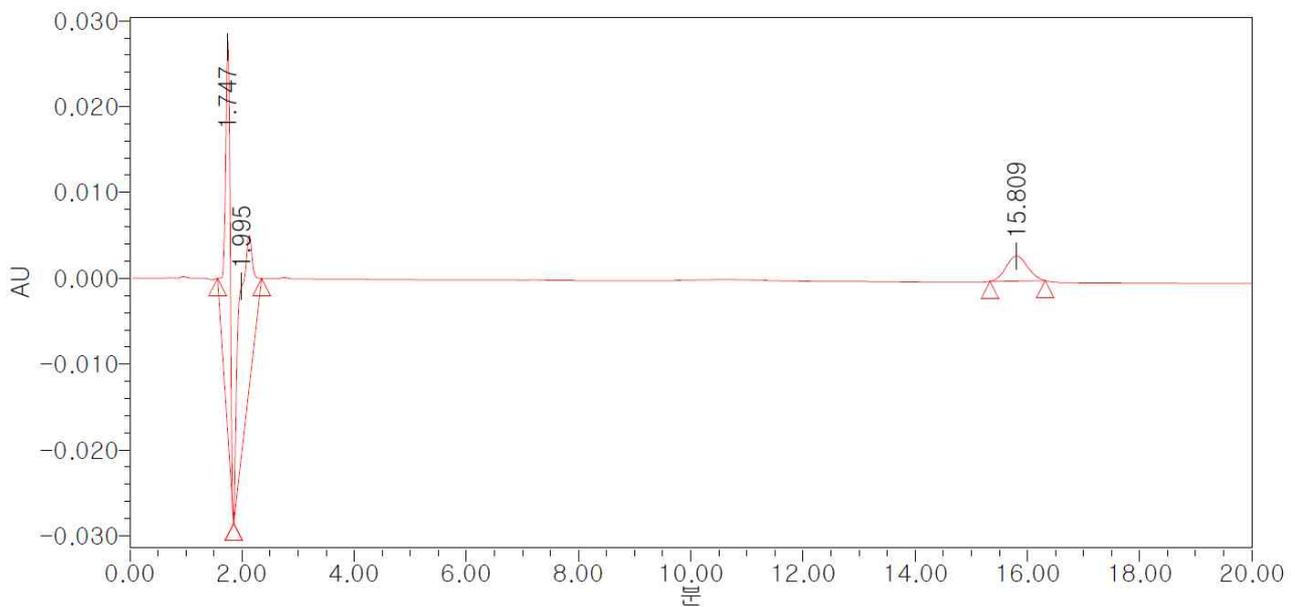


그림 49. 20-hydroxyecdysone의 HPLC spectrum

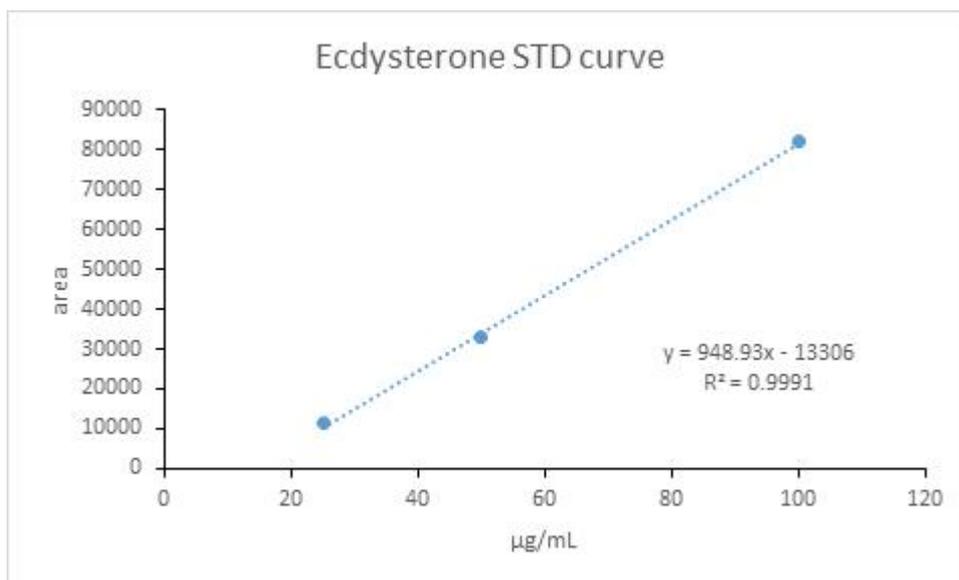


그림 50. 20-hydroxyecdysone 검량선

(라) 측정 결과

- 그림 49는 우슬(*Achyranthes japonica*)의 biomarker인 20-hydroxyecdysone의 HPLC spectrum으로 RT 15.809분에 검출되었다.

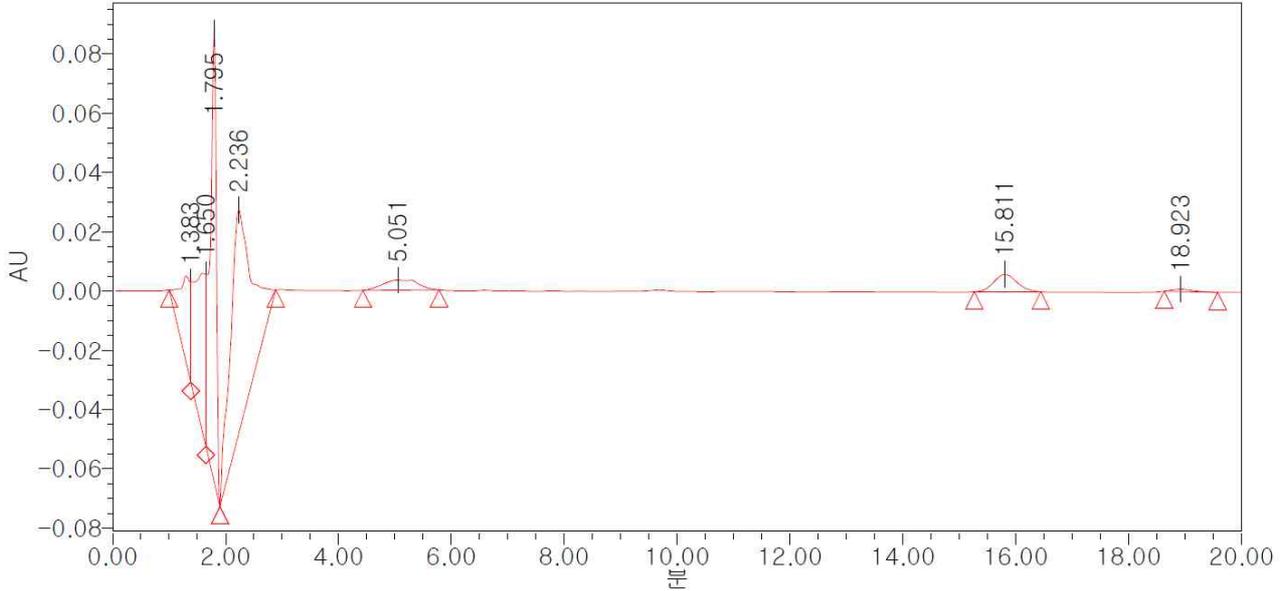


그림 51. 우슬(*Achyranthes japonica*, ACJA2008) 표준품의 HPLC spectrum

- HPLC spectrum에서와 같이 ecdysterone은 우슬에 함유되어 있는 고유한 물질임(그림49, 51). Ecdysterone 검량선에 따라 우슬 표준품 20mg/ml에는 154.4 μ g/ml의 ecdysterone이 함유되어있다는 것을 알 수 있었다.

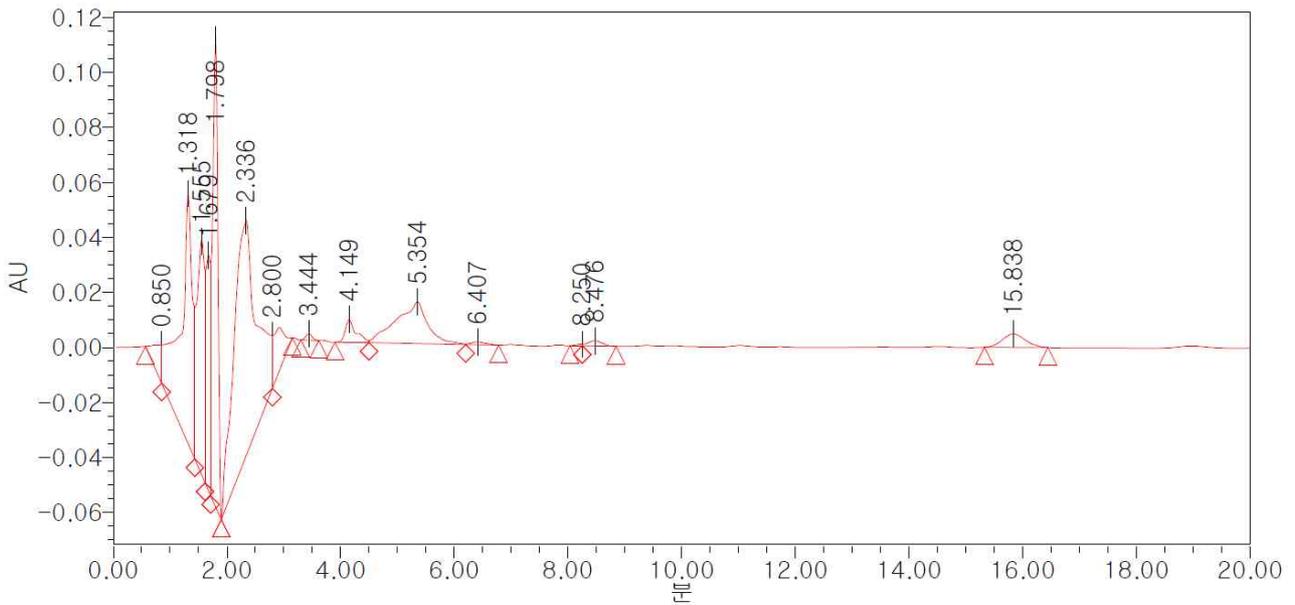


그림 52. 우슬:땅두릅=2:1 주정 추출물의 HPLC spectrum

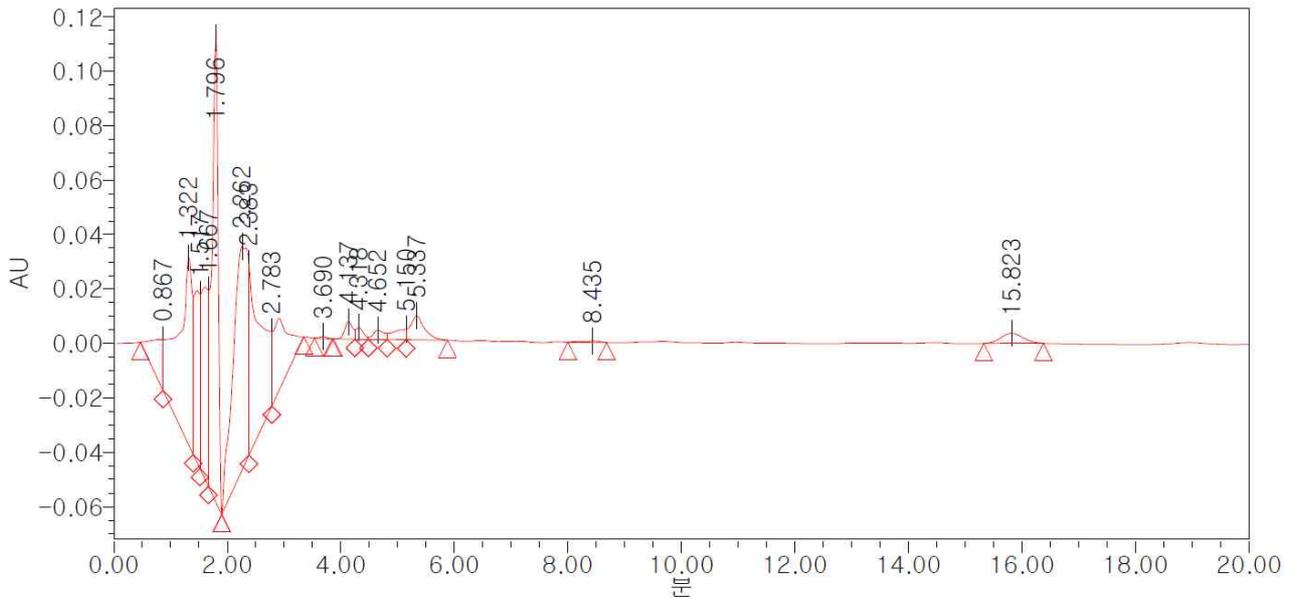


그림 53. 우슬:땅두릅=2:1 주정 추출 유산균 발효물의 HPLC spectrum

우슬과 독활 2:1 주정 추출물의 발효 여부에 따른 HPLC spectrum으로 우슬의 biomarker 인 ecdysterone이 함유되어 있음을 알 수 있었다(그림 52, 53).

우슬과 독활 2:1 주정 추출물은 RT 15.838분에 검출되며, 검량선에 따라 20mg/ml 속에 ecdysterone 127.4 μ g/ml이 함유되어 있었고, 우슬과 독활 2:1 주정 추출 유산균 발효물은 RT 15.823분에 검출되며, 20mg/ml 속에 97.8 μ g/ml의 ecdysterone이 함유되어 있었다.

(3) 땅두릅 및 지표성분의 HPLC 분석

(가) 표준용액 제조

- ① Continentalic acid 2mg을 10ml 에탄올에 녹여 표준액으로 사용.
- ② 표준액을 단계적으로 희석하여 각각 200, 100, 50, 25, 12.5 μ g/ml의 농도로 검량선용 표준용액을 제조.
- ③ 각각의 검량선용 표준용액을 컬럼에 10 μ l 주입하고 HPLC 분석을 실시하여 크로마토그램을 얻음.
- ④ 얻어낸 크로마토그램의 peak data를 plot하여 정량분석을 위한 검량선을 작성함.

(나) 시험용액 제조

- ① 땅두릅 표준품과 우슬 및 땅두릅 혼합 유산균발효 추출물은 2g을 정밀하게 달아 묽은 에탄올 100ml를 넣어 녹인 후 멤브레인 필터(0.45 μ m)로 여과함.
- ② 10 μ l를 주입하여 HPLC분석을 실시함.

(다) 분석조건

Item	Condition
Column	SunFire C18(4.6*300mm, 5μm)
Flow rate	1.0 ml/min
Oven Temp.	25°C
UV detector	245 nm
Injection vol.	10μl
Mobile phase	Acetonitrile : Water : TFA = 65:35:0.1 (v/v/v)

※ 시료는 UV 검출기(Waters 2489) 및 Empower3 software를 활용하여 정량 분석함.

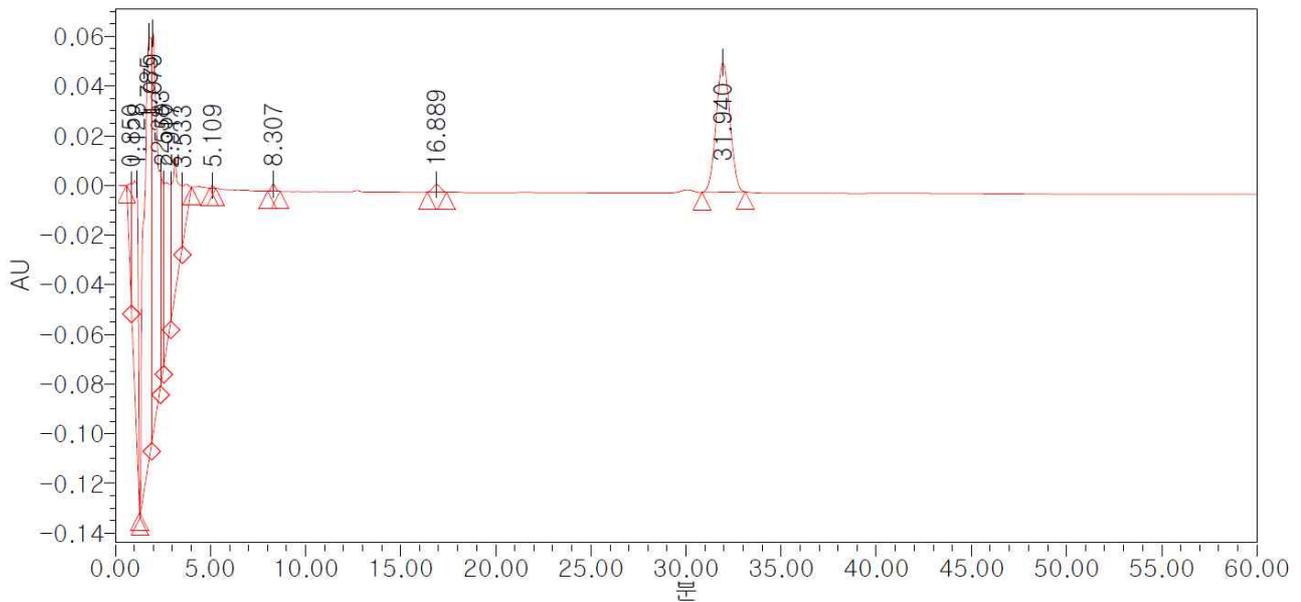


그림 54. Continentalic acid의 HPLC spectrum

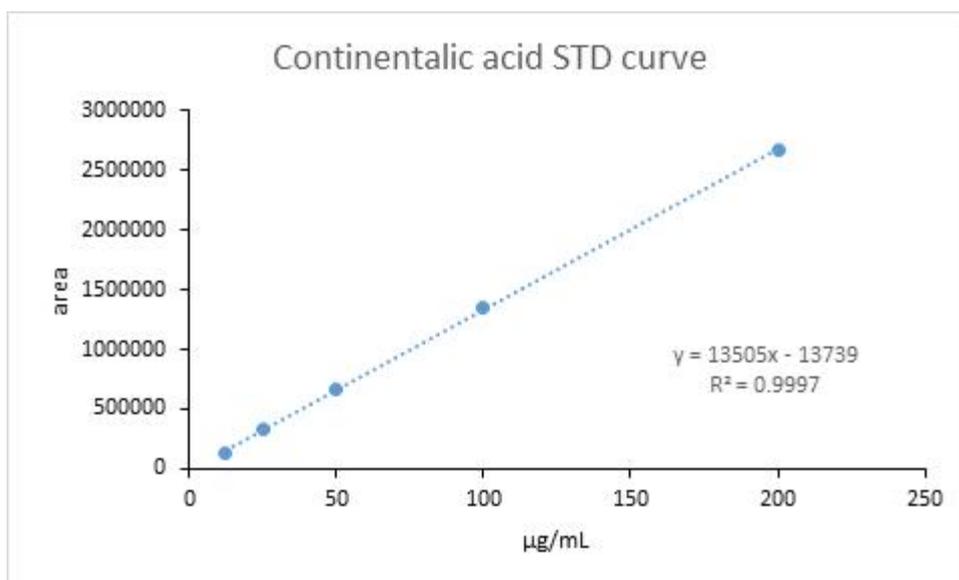


그림 55. Continentalic acid 검량선

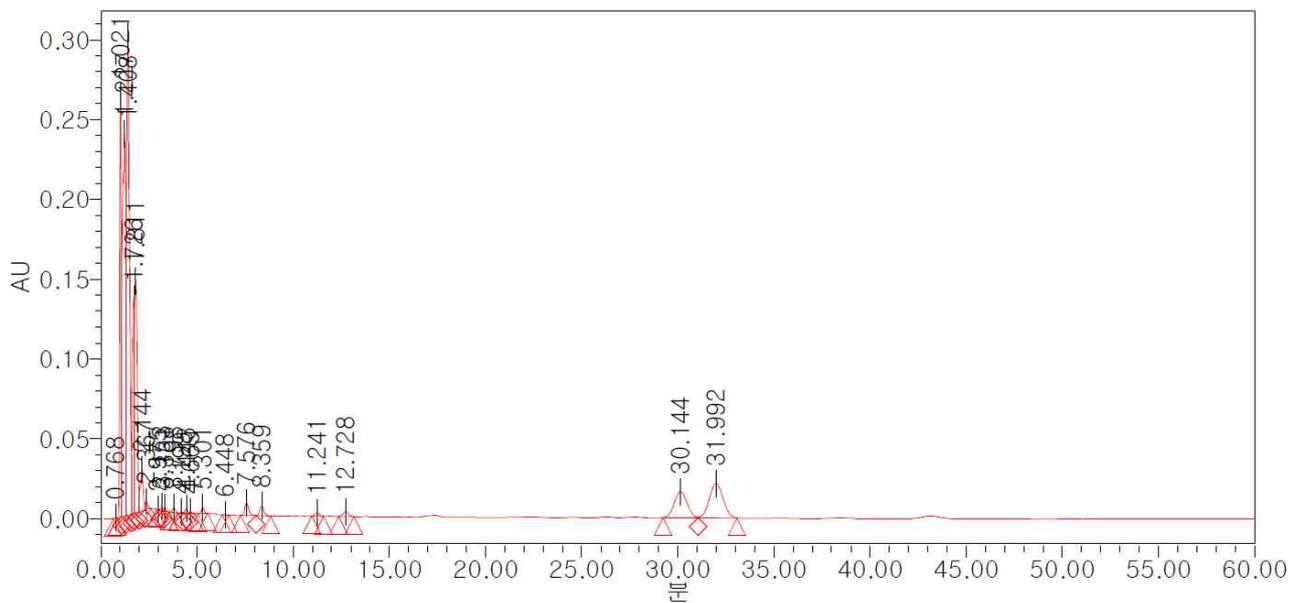


그림 56. 땅두릅(*Aralia continentalis*, ARCO2012)의 HPLC spectrum

(라) 측정 결과

그림 54는 독활(*Aralia continentalis*)의 biomarker인 Continentalic acid의 HPLC spectrum 이고, 그림 56은 식품의약품안전처에서 제공하는 독활 표준품의 HPLC spectrum으로 RT 31.9에서 검출되었다. Continentalic acid 검량선에 따라 독활 표준품 20mg/ml에는 80.92 μ g/ml의 ecdysterone이 함유되어있다는 것을 알 수 있었다.

8. 표준화 및 안정성 확인

가. 원재료 표준화

우슬의 학명은 *Achyranthes japonica nakai* 이며, 쇠무릎이라 부르기도 한다. 땅두릅은 독활의 이 명으로, 학명으로는 *Aralia continentalis Kitagawa* 라고 불린다. 두 원재료 모두 국내산을 사용하였으며, 사용 부위는 뿌리이다.

나. 대량생산을 위한 제조공정 표준화

Lab scale 제조공정을 기반으로 Pilot scale 제조공정 개발을 진행하였으며, Industrial scale 제조공정 개발을 완료하였다. 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 건조방법 등을 고려하여 공정을 표준화 하였다.

제조공정	식품, 식품첨가물	조건	지표성분 함량변화 (mg/g)	수율 (kg)
원재료(우슬, 독활) 입고		우슬/독활 검수 (원산지/거래내역/성상)	우슬: 20-hydroxyecdysone 5.62 / 독활: continentalic acid 2.11	102
↓				
원료 혼합 및 투입	우슬 : 독활 2 : 1			
↓				
1차 추출	50% 주정 9~10배수	50% 주정, 50℃, 4시간 (대한주정라이프社 발효주정 사용, 주세법상 규격에 적합함을 확인함)		913
↓				
여과		부직포 1μm filter 감압여과 진공도 : 400~600mmHg		
↓				
2차 추출	50% 주정 9~10배수	1차 추출조건과 동일	20-hydroxyecdysone 미검출 / continentalic acid 미검출	852
↓				
여과		부직포 1μm filter 감압여과 진공도 : 400~600mmHg		
↓				
농축		1차·2차 여과액 합하여 농축. 60-70℃ 이하, 진공도 : 400~600mmHg 20~25Brix 11~13시간	20-hydroxyecdysone 5.71 / continentalic acid 2.37	210
↓				
배양액 제조 및 살균	MRS broth	농축액+MRS broth 5.5g/L, 혼합 후 살균 (80~85℃, 1시간)		211.155
↓				
유산균 접종	유산균 (L.plantarum)	L.plantarum) 씨드배양액 1% 접종		
↓				
본배양		37℃, 60시간 배양 교반 120RPM/min	20-hydroxyecdysone 5.71 / continentalic acid 2.14	212.655
↓				



여과(80mesh), 실활(95°C, 1시간)

maltodextrin 고형분 대비 maltodextrin 50% 배합

319

분무건조
Inlet 175°C,
Outlet 80°C,

20-hydroxyecdysone 5.73 /
continentalic acid 2.64

73.4

다. 가속시험

시제품 모니터링을 통해 지표성분, 성장, 이물, 미생물 등 안전성과 안정성을 확인하였다.

가속시험 기간 : 2017년 12월~ 2018년 5월까지 총 6개월

지표물질 분석 성적서						
제품명	우유,당두류 복합분말 인체적용시험용 제형					
식용유형	기타식용	제조일자	2017.12.06			
업체명	원천호바이오	성명	김 영 석			
위탁인 주소	서울시 노원구 상동로 232 서울과학기술대학교 테크노파크 1112호					
시험 기간	2017.12.20-2018.06.19					
실험항목	차등 온도	환사율				
지표물질 (ecdysterone) (mg/g)	25°C	5.6	5.6	5.7	5.3	5.2
	35°C	5.7	5.3	5.6	5.2	5.2
	45°C	5.7	5.3	5.3	5.3	5.4
	49°C	5.7	5.3	5.3	5.3	5.4
© HPLC 분석 조건 - HPLC 제조사 및 모델명 : water사 42695 - 감출기 제조사 및 모델명 : (지정부출용량로계 (측정피장 245 mm) waters사 2489 LN/VIS Detector - 컬럼 : SunFire C18 Sun 4.6X300mm column - 이동상 : 0.05% 포름산-에세트산-메탄올 혼합용액(1:3) - 주출물 : 20-적드록시에디손(C27H44O7) : 480.63, 제조사 시가(마일도기자사) - 용량 : 1.0 ml/분 © 분석실 : 신라대학교 HACCP/GMP 전문인증시험실업단 © 분석자 : 김연드래(신라대학교 제약공학과 교수) 2018년 07월 20일 분석자 확인: 김연드래						

지표물질 분석 성적서						
제품명	우유,당두류 복합분말 인체적용시험용 제형					
식용유형	기타식용	제조일자	2017.12.06			
업체명	원천호바이오	성명	김 영 석			
위탁인 주소	서울시 노원구 상동로 232 서울과학기술대학교 테크노파크 1112호					
시험 기간	2017.12.20-2018.06.19					
실험항목	차등 온도	환사율				
지표물질 (continentalic acid) (mg/g)	25°C	2.92	2.78	2.88	2.6	2.7
	35°C	2.9	2.79	2.84	2.9	2.6
	45°C	2.91	2.76	2.9	2.7	2.6
	49°C	2.91	2.76	2.9	2.7	2.6
© HPLC 분석 조건 - HPLC 제조사 및 모델명 : water사 42695 - 감출기 제조사 및 모델명 : (지정부출용량로계 (측정피장 205 mm) waters사 2489 LN/VIS Detector - 컬럼 : Phenomenex C18 (4.6X300mm) Sun - 이동상 : 아세트산:메탄올 : 0.1% Trifluoroacetic acid (65 : 35) - 주출물 : Continentalic acid - 용량 : 0.5 ml/분 © 분석실 : 신라대학교 HACCP/GMP 전문인증시험실업단 © 분석자 : 김연드래(신라대학교 제약공학과 교수) 2018년 07월 20일 분석자 확인: 김연드래						

검사 결과 요약			
제품명 : 우유, 당두류 복합분말 분말 (시제품) 검사처 : ㈜ 다인내추럴 기업부설 연구소			
시험항목	상위(재용규격의 색차)	이물	대량균수
규격	현상적의 분말	불검출	음성
17.12.19	-	적합	적합
17.12.26	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합
18.01.02	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합
18.01.09	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합
18.01.19	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합
18.03.23	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합
18.04.23	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합
18.05.21	RT	적합	적합
	35°C	적합	적합
	45°C	적합	적합

9. 기준규격 설정

가. 성장

이미, 이취가 없고 고유의 향미와 색택을 가진 분말.

나. 지표성분의 함량

(1) 시제품 생산된 시료의 HPLC 분석

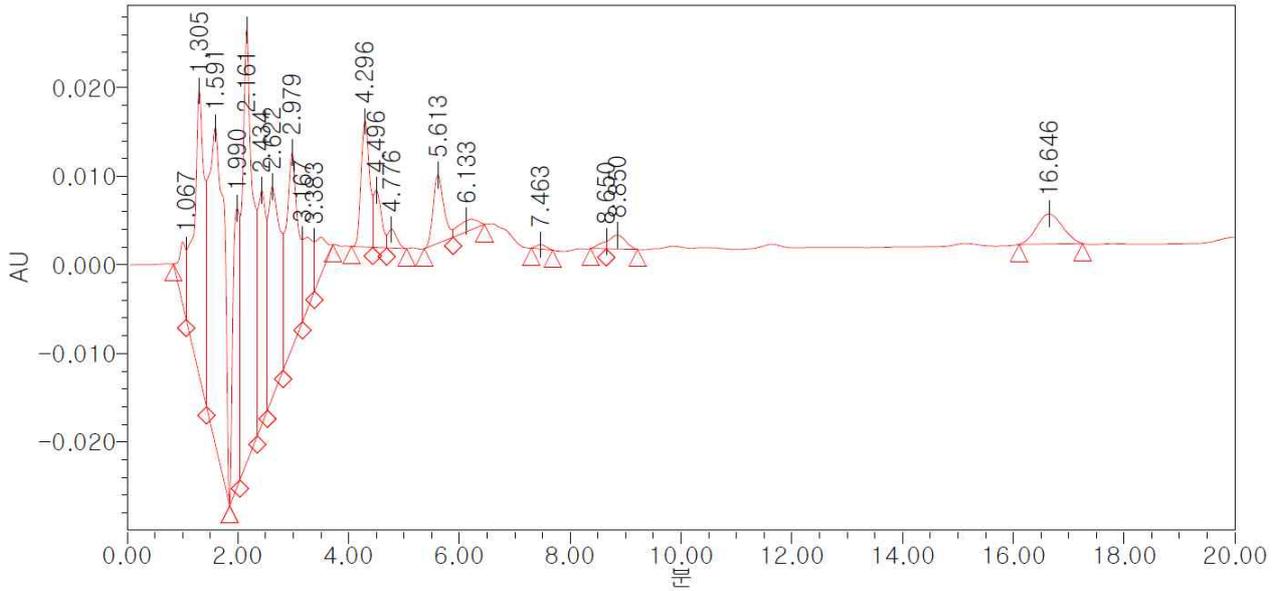


그림 57. 시제품의 우슬 지표성분 분석 HPLC spectrum

생산된 시제품 시료에서 우슬의 지표성분은 RT 16.646분에 검출되었고, Ecdysterone 검량선에 따라 시제품 20mg/ml에는 103.5 μ g/ml의 ecdysterone이 함유되어있다는 것을 알 수 있었다.

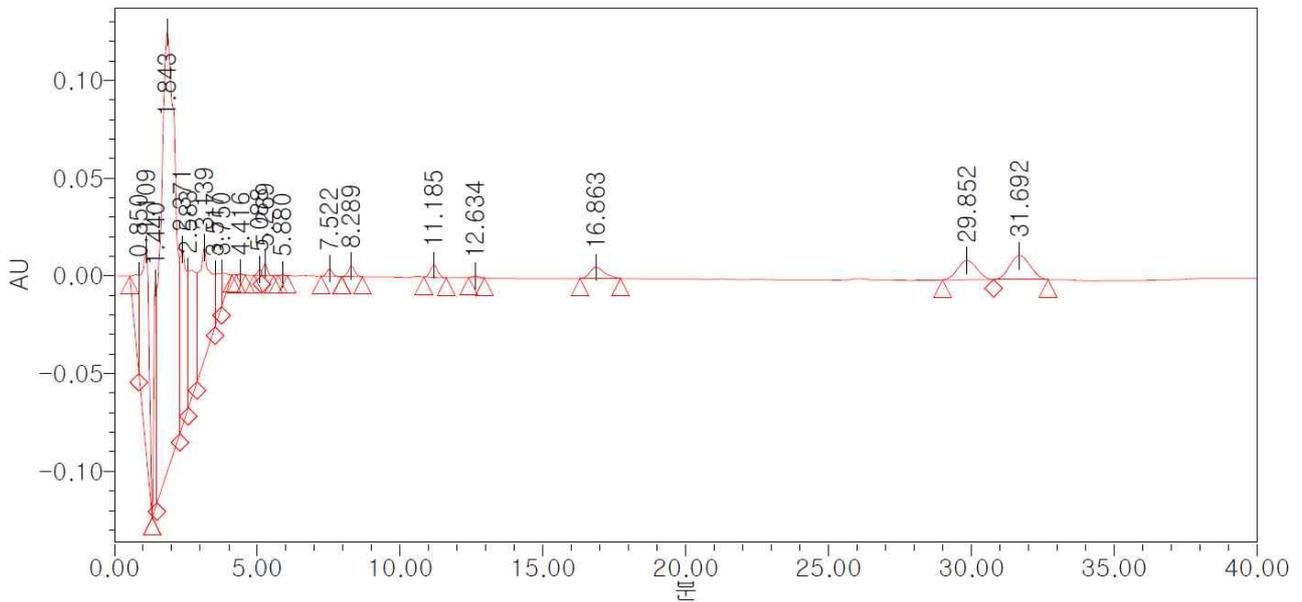


그림 58. 시제품의 땅두릅 지표성분 분석 HPLC spectrum

생산된 시제품 시료에서 독활의 지표성분은 RT 31.692분에 검출되었고, Continentalic acid 검량선에 따라 독활 표준품 20mg/ml에는 46.5 μ g/ml의 continentalic acid가 함유되어있다는 것을 알 수 있었다.

(2) 지표성분 기준규격 설정

밸리테이션을 통해 확립한 시험법으로 8Lot 시료의 지표성분 함량을 확인하고, 그 평균값을 지표성분 기준규격으로 설정하였다.

20-hydroxyecdysone(ecdysterone): 5.185 mg/g (4.1~6.2 mg/g)

continentalic acid: 2.5575 mg/g (2.0~3.06 mg/g)

Lot No.	우슬	독활
#1	5.73	2.33
#2	4.87	2.34
#3	5.13	2.62
#4	5.1	2.61
#5	5.19	2.66
#6	5.14	2.62
#7	5.14	2.64
#8	5.18	2.64
평균	5.185	2.5575

(3) 유해물질 규격설정

유해물질의 규격은 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 (식약처 고시 제2014-26호)의 [별표2] 유해물질규격설정항목에 따라 분석값과 섭취량을 고려하여 최소 함량으로 관리될 수 있도록 설정하였다.

-
- 납: 0.5 mg/kg 이하
 - 총비소: 0.2 mg/kg 이하
 - 카드뮴: 0.01 mg/kg 이하
 - 총수은: 0.01 mg/kg 이하
 - 대장균군: 음성
 - 중금속(58종): 불검출
-

10. 시험식품 제조 및 인체적용시험 완료

가. 시험식품 및 대조식품 제조

(1) 시험식품

- 주성분: 우슬·독활 유산균 발효복합물
- 제형: 캡슐(Capsule)
- 중량: 500mg(우슬·독활 유산균 발효복합물 500mg/캡슐 함유)
- 섭취방법: 1일 2회, 1회 2캡슐씩 충분한 물과 함께 섭취
- 보관방법: 직사광선과 습기를 피하고 건냉한 곳에 보관

(2) 대조식품

- 주성분: 전분
- 제형: 캡슐(Capsule)
- 중량: 500mg(우슬·땅두릅 유산균 발효복합물 미함유)
- 섭취방법: 1일 2회, 1회 2캡슐씩 충분한 물과 함께 섭취
- 보관방법: 직사광선과 습기를 피하고 건냉한 곳에 보관



시험식품

대조식품



포장

(3) 시험식품 및 대조식품 배합비

(배합비 %)

원료명	시험식품	대조식품
우슬·땅두릅 유산균 발효복합물	99.01	-
전분	-	96.31
스테아린산마그네슘	0.99	0.99
카라멜색소 분말1호	-	2.57
AF 치자황600 색소	-	0.13
총합	100.00	100.00

(4) 유통기한 설정

8주간의 가속시험 결과를 근거하여 시험제품의 유통기한은 12개월로 설정하였다.

[별지 제3호 서식]

유통기한 설정 사유서

제 품 명	“우슬, 땅두릅 복합분말”
식 품 의 유 형	기타 가공품
보존 및 유통 방법	실온(○) / 상온() / 냉장() / 냉동() / 기타()
유통 기 한	제조일로부터 12개월
실험수행기관종류	자사(○) / 의뢰() / 생략()
실험수행기관명	(주)천호바이오
유통기한 설정근거	
<p>1)제품 생산 전 생산에 사용되는 기계 및 기구류의 세척을 실시하여 생산 과정 중 이물질의 혼입이 없도록 위생적인 작업실에서 생산하며 현장 종사자의 위생관리 실시.</p> <p>2)제품 특성상 원재료를 주정을 첨가하여 50℃이상에서 4시간 이상 2회 추출 후 중균 접종 발효 후 95℃에서 1시간 이상 살균, 분무건조함으로 미생물 오염이 최소화 됨.</p> <p>3)본 제품을 식품 포장용으로 제작된 포장재에 유통과정 중 미생물 발육, 이물질의 혼입을 방지하기 위해 밀봉·포장함.</p> <p>4)미생물학적 오염지표인 대장균군의 적정여부를 검사하고 성상과 이물, 지표물질을 감별하여 자가 품질 검사 합격제품만을 보관 유통함.</p> <p>5)유통기한 설정실험을 실시한 결과 위생적인 공장에서 제조되고 밀폐포장하여 실온에서 유통되므로 가속시험결과 이상의 추가 품질 변화 요인이 없다 판단됨. 따라서 상기 시험결과에 따라 12개월의 유통기한이 적합하다는 결론을 얻음.</p>	
<p>상기와 같이 유통기한 설정 사유서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 별지 제2호 서식의 실험 결과보고서</p> <p style="text-align: center;">2018년 02월 20일</p> <p style="text-align: right;">제출인 : (주)천호바이오 </p>	

나. 인체적용시험

(1) 개요

- 과업명: 우슬·땅두릅 유산균 발효복합물의 관절건강 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구
- 의뢰기관: (주)메디앤바이오
- 수탁기관: 바이오푸드씨알오
- 시험기관: 세명대학교 부속 제천한방병원, 서울과학기술대학교 식품공학과
- 연구기간: 2018년 4월 2일(첫 연구대상자 동의일) ~ 2018년 7월 13일(마지막 연구대상자 최종 방문일)
- 연구대상: 노화로 인해 무릎관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인
- 시험식품: 우슬·땅두릅 유산균 발효복합물이 함유되어 있는 캡슐(우슬·땅두릅 유산균발효복합물 500 mg/캡슐)
- 기능성평가

1) 설문지 조사

- VAS [0, 4, 8, 12주]
- WOMAC [0, 4, 8, 12주]

2) 방사선학적 검사 [0, 12주]

- 안전성 평가: 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 임상병리검사(일반혈액검사 및 소변 검사), 이상반응

(2) 시험대상자

- 연구대상자 수: 각 군당 목표 대상자수는 35명(중도탈락률 25% 고려)으로 선정기준에 적합한 대상자를 총 70명 등록하였음.

	대조군	시험군	합계
최종 평가 연구대상자수	26	26	52
Drop-out(25%) 고려 연구대상자수	35	35	70

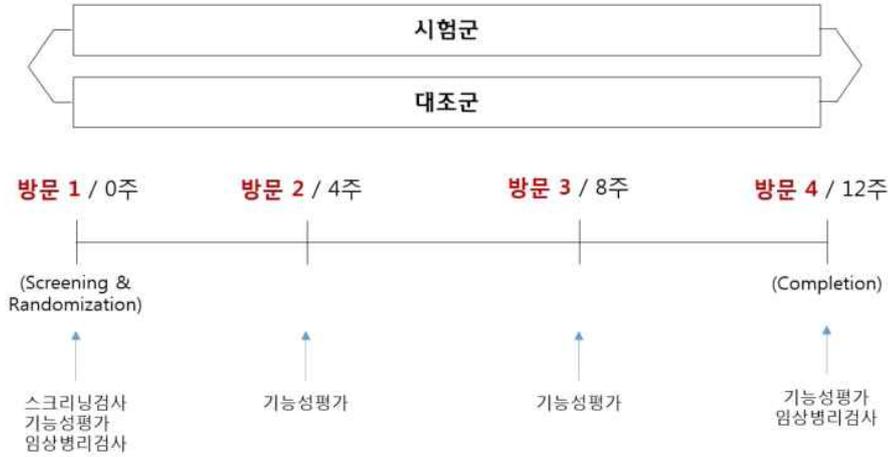
- 선정기준: 다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정하였음.

- 1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자
- 2) 만 50세 이상 남녀
- 3) 무릎관절에 불편을 호소하는 자

(Kellgren-Lawrence grade 1, 2에 해당하는 자)

(3) 연구 방법

- 섭취방법: 1일 2회, 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취
- 섭취기간: 12주(84일)
- 모식도:



- 연구 일정 및 항목

Period		Intervention			
Visit		1	2	3	4
Week		0	4	8	12
Window period			± 5d	± 5d	-3d ~ +7d
연구대상자 동의		✓			
인구학적 특성(성별, 생년월일, 연령)		✓			
신체계측(신장 ³⁾ , 체중, BMI)		✓	✓	✓	✓
활력징후(맥박, 혈압, 체온)		✓	✓	✓	✓
병력 조사		✓			
약물-건강기능식품 섭취 조사		✓	✓	✓	✓
스크리닝검사	Kellgren-Lawrence grade ²⁾	✓			
	ESR, AST, ALT, creatinine ³⁾	✓			
	임신반응검사 ⁴⁾	✓	✓	✓	✓
적합성 평가 ⁵⁾		✓			
무작위배정		✓			
응주력·흡연력 조사		✓			
기능성평가	VAS, WOMAC	✓	✓	✓	✓
	방사선허격 검사	✓ ⁶⁾			✓
임상병리검사(혈액, 소변 검사) ⁷⁾		✓			✓
활동량 조사(International Physical Activity Questionnaire)		✓	✓	✓	✓
식습관 조사(Recommended Food Score)		✓			
식이-생활습관 교육		✓	✓	✓	
식이조사 및 생활습관 모니터링 ⁸⁾		✓	✓	✓	✓
시험·대조식품 배부		✓	✓	✓	
반납식품 회수/순응도 확인			✓	✓	✓
이상반응 확인		✓	✓	✓	✓

(4) 결과

(가) 연구대상자 등록 및 기저특성

총 82명을 스크리닝하여 선정기준에 부합하는 70명을 대조군 또는 시험군으로 무작위 배정하였고, 시험기간 동안 대조군에서 2명(동의철회 2명)과 시험군에서 6명(동의철회 6명)이 중도 탈락하여 최종적으로 62명 참여 완료.

선정결과 등록된 연구대상자들의 연령은 60.9 ± 0.7 세였고 남녀 비율은 군간 유사하였음. ITT의 경우 기저시점에서의 특성은 군간 유의적인 차이가 없었고, PP의 경우 BMI가 대조군이 시험군보다 유의적으로 높았으며($P=0.047$) 그 외 지표는 모두 군간 유의적인 차이가 없었음.

(나) 기능성 평가

① 설문지 조사 (VAS, WOMAC)

: 기저시점 대비 각 방문시점의 변화량을 비교한 결과, 대조군 대비 시험군에서 다음의 효과를 확인함.

㉞ ITT 분석

- VAS score($P=0.038$)와 WOMAC stiffness score($P=0.002$)가 유의적으로 감소하였고, WOMAC total score($P=0.087$)와 function score($P=0.077$)는 감소 경향을 보임.
- 12주간 유의적인 차이를 보인 열량 섭취량과 활동량으로 설문지 조사결과를 보정한 결과, VAS score($P=0.041$)와 WOMAC stiffness score($P=0.002$)가 유의적으로 감소하였고, WOMAC total score($P=0.084$)와 function score($P=0.072$)는 감소 경향을 보여, 보정을 하지 않은 결과와 유사함을 확인함.

㉟ PP 분석

- WOMAC stiffness score($P=0.003$)가 유의적으로 감소하였고, VAS score($P=0.076$), WOMAC total score($P=0.089$)와 function score($P=0.078$)는 감소 경향을 보임.
- 군간 유의적인 차이가 있었던 '기저시점의 BMI, 12주 동안의 열량 섭취량과 활동량'으로 설문지 조사결과를 보정한 결과, WOMAC stiffness score($P=0.003$)가 유의적으로 감소하였고, VAS score($P=0.084$), WOMAC total score($P=0.085$)와 function score($P=0.073$)는 감소 경향을 보여, 보정을 하지 않은 결과와 유사함을 확인함.

② 방사선학적 검사

: ITT와 PP의 모든 지표에서 군간 유의적인 차이가 없었음.

(다) 안전성 평가 (TT / PP)

① 활력징후 및 임상병리검사(혈액검사 및 뇨검사)

: 모든 지표에서 임상적으로 유의미한 변화는 없었음.

② 이상반응

: 시험식품과 명확히 관련된 이상반응은 보고되지 않았고, 이상반응의 발생, 종류, 증상정도 및 시험식품과의 관련성은 모두 구간 유의적인 차이가 없었음.

Protocol No. AA_CHB
Version No. 1.1

Confidential

인체적용연구 계획서

우슬·땅두릅 유산균 발효복합물의
관절건강 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한
인체적용연구

Protocol No. : AA_CHB
Version No. : 1.0
Version Date : 2017.11.30.

Confidential

본 인체적용연구 계획서에 포함된 정보는 (주)한진바이오와 세명대학교 부속 계천병원의 독점재산이며 무단으로 공개하거나 제 3자에게 관련 정보가 유출되었을 경우 관련 기관에 통보하여 법적 조치를 취할 수 있습니다. 본 계획서는 연구용 문서 또는 평가기 위한 용이로만 사용할 수 있으며, (주)한진바이오와 세명대학교 부속 계천병원의 동의가 없을 경우 내용의 사용, 공개, 출판 및 기타 발표를 할 수 없습니다.

연구계획서

증례기록서

Electronic Case Report Form

우슬·땅두릅 유산균 발효복합물의 관절건강 개선
기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구

Protocol No. : AA_CHB
CRF Version No. : 1.1
Version Date : 2018.02.08

인체적용연구 실시기관	세명대학교 부속 계천병원
인체적용연구 책임자	조나영 교수
인체적용연구 담당자	
Screening No.	
Subject Initial	
Random No.	

전자 증례기록 결과지

세명대학교부속계천병원
경과통지서
Version 1.0

발령통지서

2018년 09월 17일에 접수된 연구신청서에 대하여 세명대학교부속계천병원 연구기관 생명윤리위원회에서 심의하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

연구과제명	우슬·땅두릅 유산균 발효복합물의 관절건강 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구					
연구책임자	성명	조 나 영	소속	세명대학교	직위	조교수
심의대상	<input type="checkbox"/> 연구계획서(신규)	<input type="checkbox"/> 중대한 이상반응				
	<input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완)	<input type="checkbox"/> 위험/이탈사건				
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획변경	<input type="checkbox"/> 연구대상자/결과보고				
	<input type="checkbox"/> 지속성/중간보고	<input type="checkbox"/> 기타 :				
심의일자	2018년 09월 21일		심의장소	세미나실		
심의결과	<input type="checkbox"/> 정식심사	<input checked="" type="checkbox"/> 신속심사	<input type="checkbox"/> 지속심사	<input type="checkbox"/> 반려	<input type="checkbox"/> 심사면제	
	<input checked="" type="checkbox"/> 승인	<input type="checkbox"/> 시정승인	<input type="checkbox"/> 보완	<input type="checkbox"/> 반려	<input type="checkbox"/> 중지/보류	
승인일자	2018년 09월 29일		연구 승인기간	2018.02.27 ~ 2019.02.26		
승인번호	2018-01-04		관련근거	별첨		
	<input type="checkbox"/> 연구계획 심의서	<input type="checkbox"/> 심의결정 신청서	<input type="checkbox"/> 서명동의서	<input type="checkbox"/> 서명동의서	<input type="checkbox"/> 참가자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서
심의내역	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서 (우슬 포함)	<input type="checkbox"/> 서명동의서	<input type="checkbox"/> 참가자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서
심의의견	<input type="checkbox"/> 이월승인사유 (연구자)	<input type="checkbox"/> 지속심사 신청서	<input type="checkbox"/> 이월승인 신청서	<input type="checkbox"/> 이월승인 신청서	<input type="checkbox"/> 이월승인 신청서	<input type="checkbox"/> 이월승인 신청서
	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서	<input type="checkbox"/> 연구대상자 동의서
심의의견	2018년 02월 27일 "승인"의 상기 결정에 대하여 2018년 09월 17일 연구책임자가 제출한 변경계획서와 이를 반영한 서명 동의서 신속심사에서 검토한 결과, 용역위원 3명 중 2명이 "승인"에 관하여 본 과정의 최종 심사 의견을 "승인"으로 결정합니다.					

SMJCH Version 4.2
November 03, 2017

IRB 승인

Protocol No. AA_CHB
Version No. 1.0

연구대상자 보상에 대한 규약

1. 목적

(1) 유선조사원은 인체적용연구의 진행에 임하여 연구대상자의 신체적 손상(사망 포함)이 발생 하는 경우 일시적 비용 또는 징계 차보할 수 있는 손실보상(타인의 지출)이 청구될 수 있을 정도의 손상에 대해서도 보상한다. 해당되는 신체적 손상의 고충 차지과정에서 발생하는 손상 또한 보상한다.

(2) 인체적용연구의 진행에 의한 신체적 손상이면, 인체적용연구 계획서에 따라 합의된 인체적용 연구용 직물 및 형태질 과정 또는 개입으로 인한 손상으로, 인체적용연구에 참여하지 않았을 경우에는 발생하지 않았을 손상을 의미한다.

2. 다음 경우에는 보상하지 아니한다.

(1) 유선조사원의 고의·과실에 인연되지 않았거나 연구에 사용되지 않는 인체적용연구용 사용으로 발생한 손상

(2) 인체적용연구용 직물의 섭취로 인해 유발된 결과 나타내지 않거나 또는 이득을 제공하지 못한 경우

(3) 서로 합의된 인체적용연구 계획서에서 미발행으로서 미가된 손상

(4) 대상자 또는 보호자의 무응답에 의하여 초래된 손상에 연구대상자의 무응답에 의하여 고충되지

3. 보상평가 기준

(1) 보상수준은 손상의 분할, 중증도, 지속성 여부 등에 적합한 액수이며, 한도의 법정에 의해 의사 손상에 대해 일반적으로 지급되는 것과 동일하게 한다.

(2) 보상수준에 대해 연구대상자와 유선조사원 사이에 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여 한다.

유선조사원은 앞에서 언급한 여러 제반 내용을 참고하여, 대상자가 본 인체적용연구에 의해 어떠한 불이익이라도 받지 않도록 주의하며, 만약 연구에 의해 손상이 발생할 경우 연구대상자 보상에 대한 규약에 의거하여 적용될 것임을 서약합니다.

2017년 11월 14일
유선조사원 대표이사 김 연 역

연구대상자 보상 규약

11. 시제품 제작 및 소비자 기호도 조사

가. 시제품 제작

(1) 제형 및 디자인 설정

기능성식품에서의 제형은 단순히 모양을 만드는 기술이 아닌, 기능성 성분의 안정성, 용해도, 첨가제와의 상호작용 등 물리화학적 성질을 고려하고, 보관 중 주변 환경으로부터의 안전성과 소비자 선호도까지 고려해야 하는 복합적 고도기술이며, 개봉할 때의 편의성은 제품의 효능과 안전에 대한 고객들의 척도가 되기도 한다. 이러한 시장 인식을 고려하여, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말 등 기존 6개 제형과 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바, 필름 등 확대 7개 제형, 총 13개 제형에 대한 검토를 거쳐 최적 제형인 액상으로 최종 제형을 설정하였고, 간편함과 편리함을 추구하는 소비 트렌드를 반영하여 선택한 액상 제형을 보다 용이하게 섭취할 수 있도록 스틱 파우치 형태의 포장으로 결정하였다.

우슬 등 복합추출발효물은 아직 개별인정형 원료로 인정받지 못하여 유형은 액상차로 결정하였다.



(2) 우슬등 복합추출발효물 생산

원재료 독활과 우슬은 (주)제이앤디를 통해 검사원료품으로 공급받아 (주)대호양행에서 표준공정도에 따라 생산하였다. 국내산 우슬과 독활의 공급에 있어 한약 도매상을 통해 500kg/월 수급이 가능함을 확인하였다. 향후 월 3,000세트(원료 기준 200kg/원재료 기준 300kg)이상 판매가 가능한 판매처 확보 시 GAP인증 농가와의 계약재배를 통해 원재료 수급 및 원재료 품질관리를 진행할 예정이다.

(3) 부형원료 탐색 및 배합비 설정

원료의 맛·기능 향상을 위한 부형 원료를 탐색하여 최종 부형 원료 3종을 선택하였다.

천연물 기반의 제품 컨셉을 유지하기 위하여 생약추출물 중 관절건강에 도움이 되는 성분과 일반적 골관절염 대상자가 고령자임을 감안하여 보약개념의 생약 복합 추출물을 혼합하였다. 또한 섭취의 기호성을 제공하기 위해 꿀을 첨가하여 생약의 쓴맛을 보완하였다.

-개발 원료와 부형 원료의 배합비를 설정함.

No.	원재료명	배합비율(%)
1	우슬 등 복합추출 발효물	10.00
2	용안육 등 추출물	3.00
3	꿀	1.50
4	식물혼합추출물	27.00
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11	정제수	58.50
합 계		100.00

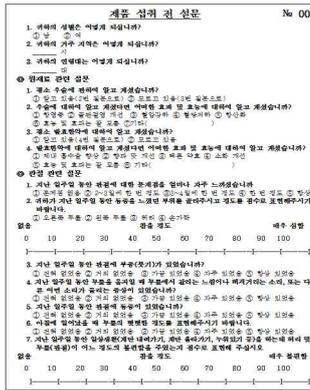
(4) 개발 원료를 이용한 시제품 제작



- 제품명 : 한방애 즐거운 산책 우슬
- 식품의 유형 : 액상차
- 품목보고번호 : 20080467100-68
- 내용량 : 10ml X 20포 X 3박스(600ml)
- 원료명 및 함량 : 정제수, 식물혼합농축액(국산)27%, 우슬등유산균발효복합물(국산)10%, 용안육등추출물(국산)3%, 꿀(국산) 1.5%
- 섭취량 : 1일 2회, 1회 1포씩 그대로 섭취하십시오.
- 섭취 시 주의사항
 - 특이체질 및 알러지체질의 경우 성분을 확인하시고 섭취하십시오.
 - 섭취 후 복통, 알레르기, 기타 증상이 나타나면 섭취를 중단하시고 약사 또는 의사와 상의하십시오.
 - 간혹 침전물이 생길 수 있으나 품질에는 문제가 없으니 안심하고 드십시오.
 - 제품을 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의한 상처를 입을 수 있으니 주의 하십시오.
 - 포장에 변형, 팽창, 손상되었거나 내용물이 변질, 변색되었을 경우 섭취하지 마십시오.
 - 파우치 포장 그대로 전자레인지에 가열하지 마십시오.
 - 이 제품은 난류, 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토, 아황산류, 호두, 닭고기, 오징어, 조개류, 잣을 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다.
- 보관상 주의사항 : 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관하시고 개봉 후에는 변질 될 수 있으므로 바로 섭취하십시오.
- 내포장재질 : 폴리에틸렌(PE)
- 반품 및 교환처 : 구입처
- 제조원 : (주)진산사이언스
- 유통기한 : 2019. 12. 23

(5) 평가용 설문지 제작 및 소비자 기호도 조사

원재료에 대한 소비자 인식, 생체전환기술에 대한 인지정도 등을 조사하기 위한 섭취 전 설문지와 섭취 후 제품에 대한 기호성과 소비자가 인지한 제품의 기능성을 평가하기 위한 섭취 후 설문지를 자체 제작하였으며, 관절건강에 도움을 받고 싶어 하는 소비자 50명을 대상으로 샘플 테스트 진행하였다.



기호도 조사 결과 대상자는 20대 2명, 30대 4명, 40대 10명, 50대 25명, 60대 4명, 70대 이상 5명이었으며 원재료인 우슬 및 발효생약에 대하여 거의 모든 대상자가 모른다(88%)고 답을 하였다. 제품 섭취 후 본인이 인지하는 효과는 뻣뻣함 감소가 가장 높은 비중(72%)을 차지하였으며, 통증은 약간 개선이 가장 높은 비중(68%)을 차지하였으며, 효과 효능 인지에 있어서 연령대가 높을수록(50대 이후) 섭취 후 단시일 내에 효과를 인지하였고, 젊은층(40대 이하)에서는 섭취 완료 후 섭취 전에 비해 불편증상을 수치화한 점수가 감소하였음을 인지하였다. 50명의 대상자 중 30명에서 제품 판매 시 구매 의사를 나타냈으며 적정 가격은 7~10만원 52%, 5~7만원 38%으로 나타났다. 또한 맛에 대한 선호도에 있어서 한약 맛이 부담스럽다는 의견이 대다수를 차지(78%)하였음.

(6) 시판 제품 생산 준비 및 홍보 마케팅 활용 방안

- 제품의 제형 : 당사 자체 기호도 조사 결과에 나타난 맛에 대한 거부감을 제거하고 효과의 인지가 고령층에서 빠른 점을 적용하여 제품의 제형은 캡슐로 결정함. 고령자의 경우 당뇨 등의 질환에 노출되는 경우가 많으므로 당의 섭취를 최소화하기 위한 방법임.
 - 제품의 유형 : 고시형 관절건강 원료(N아세틸글루코사민 또는 MSM)를 배합하여 건강기능식품 ‘관절건강 개선에 도움 제품’으로 개발 중 임.
 - 예상 제품 판매가 : 8~10만원/1달
 - 마케팅 포인트 :
 - 원료의 기능성, 안정성, 생약에 대한 불신 불식, 섭취의 간편성, 생약의 복합 기능성
- ① 예로부터 사용하던 생약을 가공하여 기능성에 대한 과학적 근거를 제공하는 원료임.
 - ② 세포실험에서 조골세포 활성세포의 증가 및 항염 효과를 확인하였음.
 - ③ 동물실험에서 염증억제 효과를 확인하였음.
 - ④ 인체적용시험에서 관절의 뻣뻣함 감소 및 통증 감소 효과를 확인하였음.
 - ⑤ ‘골관절염의 예방 또는 치료용 조성물’ 특허 등록(등록번호 10-1928881)완료된 원료임.
 - ⑥ 원료의 독성검사 및 유해물질 검사를 통해 안전성을 확보한 제품임.
 - ⑦ 유산균 발효를 통해 발효한약의 장점을 제공하는 원료임.
 - ⑧ 6개월간의 가속실험을 통해 성분의 안정성을 확인한 원료임.
 - ⑨ 생약인 우슬, 독활이 지닌 생리활성물질을 간편하게 섭취할 수 있는 원료임.

기존 관절기능 개선 소재와 개발 소재의 비교

유형	종류	효능	내용
고시형 원료	글루코사민 & 콘드로이친	연골조직 구성성분	효능 미약으로 미국시장에서 퇴출, 병용제품으로 출시
	칼슘 및 비타민D	관절/뼈 건강을 유지	영양보충
개별인정 기능성 원료	뮤코다당·단백, N-아세틸글루코사민	연골의 구성성분 합성 증가 및 연골기질분해 억제	관절/뼈에 필요한 구성성분 공급
	대두이소플라본	골 흡수 및 골형성의 균형을 통해 뼈기능을 개선	
	MSM	콜라겐을 만드는데 중요한 미네랄 성분으로 연골성분 공급	염증반응에 영향을 주어 관절 건강에 도움
	초록입홍합추출오일복합물/유니케스틴케이황금	염증을 유발하는 물질 또는 이를 주로 생성하는 세포의 수를 감소	
가시오가피 등 복합추출물	통증완화/연골손상물질 생성 감소, 염증관여물질 조절, 부종억제(동물실험)		
개발 소재	우슬등 복합추출발효물	통증완화, 염증관여물질 조절, 항산화물질인 폴리페놀 함유, 부종감소, 관절 뻣뻣함 개선	장기간 섭취 가능, 조골세포 활성세포 증식 촉진(in vitro 실험)염증 완화(in vitro, in vivo 실험), 뻣뻣함 개선 및 통증경감(인체적용실험)

12. 건강기능식품 소재 개별인정 신청

가. 개별인정 신청을 위한 서류 작성

(1)제출자료 리스트

- 제출자료의 총괄 요약본
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- 제조방법 및 그에 관한 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
- 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 안전성에 관한 자료
- 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

[제출자료 요약본]

제 1장, 제출자료의 종합 요약본

□ 전체 내용 요약

항 목	주요 내용
1. 원료명	우솔은 복합우솔잎추출물
2. 원재료	우솔, 특활
3. 지표성분	우솔(20-hydroxyecdysone, (ecdysterone)), 특활(continentalic acid)
4. 제조공정	재료 분쇄 → 투입(우솔, 특활) → 추출 → 냉각 → 여과 → 농축 → 탈수 → 건조 → 포장/포장
5. 규격 및 시험방법	1) 성분 - 고유의 색채와 향미를 가지고, 이차 미취가 없음. 2) 지표성분: 우솔(20-hydroxyecdysone(ecdysterone)) → 5.185mg/g(4.1~6.2 mg/g) 특활(Continentalic acid) → 2.5575mg/g(2.0~3.06 mg/g) 3) 나: 0.5 mg/kg 이하 지: 총비소: 0.2mg/kg 이하 5) 카드뮴: 0.01mg/kg 이하 6) 중수소: 0.03mg/kg 이하 7) 대장균군: 음성 지표성분 시험법 20-hydroxyecdysone(ecdysterone) → 공인시험방법(식품의약품안전처) Continentalic acid → 공인시험방법(대한민국약전) 규격외인용량 DDT, BHC, ALDRIN, ENDRIN 및 폴시나렌서 58종의 잔류농약 검사 결과 모두 불검출
6. 안전성	위사불검출 나 □ 안전성 평가 □ 국내 1. 우솔 - 우솔은 식품군에서 "식품에 제한적으로 사용될 수 있는 용료"로 분류되어 있음. - 우솔은 대한약전 성분 및 생약제제에 등재되어 있음. 2. 특활 - 특활은 식품군에서 "식품에 제한적으로 사용될 수 있는 용료"로 분류되어 있음. - 특활은 대한약전 및 약학영어규격집에 수재된 성분으로 사용 가능함. □ 국외

1-6

제 1장, 제출자료의 종합 요약본

항 목	주요 내용
안전성 정보	1. 우솔 1) 캐나다 - "Natural Health Product - Traditional Chinese Medicine Ingredients"에 등재되어 natural health product에 사용 가능함. 2) 호주 - "Therapeutic Goods (Permissible Ingredients) Determination"에 등재되어 complementary medicine에 사용 가능함 3) 중국 - <보건의품> 용료 목록에 등재되어 있음. - <중국약전>, <중약대사전>, <중화본초>에 등재되어 있음. 2. 특활 1) <중국약전>, <중약대사전>, <중화본초>에 등재되어 있음.
	□ 안전성 정보: DB 1. 우솔 - AHP Monograph → 우솔을 말린 형태로 30일간 60g/kg/d 경구투여에서 혈액지표, 간, 신장에 이상 없음. - Natural Medicines Comprehensive Database → 보고된 부작용 없음. - Tradimed → 임상부는 신중하게 사용할 것. → 과도한 섭취 시 사용 금지 2. 특활 - NDSL → 단회 경구투여 후 14일간 관찰할 결과, 사망을 유발하는 기관 투입결과, 체중 등에서 유의한 변화가 없음.
섭취량 평가	□ 섭취량 평가의 섭취량 - 2 g/일 □ 약용 섭취량 - 우솔과 특활 복합용: 우솔 75g과 원추종 37.5g까지 한배 물에 달 아 섭취함. - 우솔과 특활: 각각 37.5g까지 물 또는 꿀에 달아 섭취함.
인체적용시험	□ 활용전후 및 임상재료에서 모든 지표에서 임상적으로 유의적인 변화는 없었으며, 시험시점과 영약적 관련성 이상반응은 보고되지 않았고, 이상반응의 발생, 종류, 증상 정도 및 시험시점과의 관련성은 모두 중간 유의적인 차이가 없음.

1-7

제 1장, 제출자료의 종합 요약본

항 목	주요 내용
특성 시험	□ 단위투여시험 → 우솔은 일수우솔 추출물 복합추출물추출물 2,000mg/kg BW 수준으로 단위투여시험 특성시험 결과, 우솔은 유산균발효촉진효과를 위해 기인한 사망률, 일반중량의 이상이 관찰되지 않았음. (GLP기관 수형, 시험번호 GT16-00249) □ 복귀동물번이시험 → 대상동물에게 적용우솔과 관계없이 모든 군주에서 음성대조군과 비교하여 정상으로 판단할 만한 복귀동물 수의 증가를 관찰할 수 있었음. (GLP기관 수형, 시험번호 GT16- 00250) □ 수역시험 → 시험동물들 투여한 각 군에 있어서 대장질 저질구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음대조군에 비해 모든 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았음. 또한 세포독성에서도 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았으며, 일반중량 및 저중량에서도 특이한 일반중량 및 유의한 재분포는 관찰되지 않았음. (GLP기관 수형, 시험번호 GT16-00252) □ 영태제어시험 → 음대조군과 이상중기상의 빈도 비교하였을 때 시험동물들 처리한 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 증가 관찰할 수 있었음. (GLP기관 수형, 시험번호 GT16-00251) □ 2주 반복투여시험 → 일반중량, 저중, 노경상, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량에 있어서 시험동물들에 의한 영향으로 사르되는 통계적으로 유의성 있는 변화 및 특이중량은 관찰되지 않았음. 또한 조직병리학적 검사 결과, 부형제 투여군 대비 임대투여용량 후이군에 있어 시험동물들 투여로 사르되는 특이 병변 중량은 관찰되지 않았음.
	기타 시험
7. 기능성	신장 기능성 관할 건강에 도움 2 g/일 일일섭취량 □ [용사원료] 우솔 및 특활의 용사원료는 모든 4현을 통한 결과물을 종합해 볼 때, 우솔은 NOx 관련물질 cytoline 발현을 억제하는 기능 및 골다공증 증상과 분해에 대한 효과가 확인되었으며, 특활은 단식세포 면역 활성을 증진시키는 기능이 확인되었음.

1-8

제 1장, 제출자료의 종합 요약본

항 목	주요 내용
안전성 정보	[용사원료] 우솔은 골다공증 유도 관찰을 생쥐에서 자가화제와 양분공급의 정성을 억제함으로써 항관절염 효능이 인정되었음.
	[신장기능성] 만 50 세 이상 남녀 및 투여관찰이 불변을 투여하는 자를 대상으로 12 주 동안 2,000 mg/일 일일 섭취, VAS 및 WOMAC 모두 유의적으로 감소되었음. 이상의 결과를 통해 좋은 증거 개선에 따라 관절염 개선의 기능이 확인되었음.
기타 시험	-
호, 배고	-

1-9

(2) 접수

○ 건강기능식품 기능성원료 인정을 위한 신청 완료. (접수번호20181113417)

접수증	
접수번호: 20181113417 접수일자: 2018.12.26	
민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
신청번호	5685512
민원인 (대표 또는 대리인)	YIN LAN(20130308157)
처리예정일	2019.06.20
처리주관부서	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀(-)
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하셔야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하셔야 민원서류를 수령하실 수 있습니다.
수수료	1,900,000

위 건명의 민원을 접수하였습니다.

2-3 연구개발 성과

1. 논문게재 성과 (게재 1건, 게재예정 1건, 투고 2건)

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Enhancement of the Anti-inflammatory Activities of Aralia continentalis Kitagawa Extracts Fermented by Lactobacillus plantarum	Journal of Life Science	우영민	Vol.28. No.12. 1438-1447.	대한민국	비 SCI	2018. 12.22	ISSN (Print) 1225-9918 ISSN (Online) 2287-3406
2	Enhancement of anti-inflammatory activity of Lactobacillus plantarum fermented by Achyranthes Japonica on extraction solvents.	Applied Chemistry for Engineering	조은솔	Vol.30. No.2. 145-150	대한민국	비 SCI	2019. 04.10 (예정)	pISSN 1225-0112 eISSN 2288-4505
3	Anti-inflammatory Effects of Achyranthes japonica nakai and Aralia continentalis Kitalis Kitagawa Complex Water Extraxacts on LPS-stimulated RAW264.7 Macrophage	Journal of Food Biochemistry	우영민	미정	대한민국	SCI	투고	투고증 첨부
4	Anti-inflammatory effects of the combined extracts of Achyranthes japonica Nakai and Aralia continentalis Kitagawa.	Data in brief	우영민	미정	미국	SCI	투고	투고증 첨부

Enhancement of the Anti-inflammatory Activities of *Aralia continentalis* Kitagawa Extracts Fermented by *Lactobacillus plantarum*

Young Min Woo², Ok Ju Kim², Eun Sol Jo², Min Young Jo¹, Mee Young Ahn¹, Sang-Hyeon Lee¹, Jong-Myung Ha¹ and Andre Kim^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Korea

²Natural Science Institute, Silla University, Busan 46958, Korea

Received October 22, 2018 / Revised October 29, 2018 / Accepted November 8, 2018

논문 1

논문게재예정증명원

한 공 화 : 2018-4117

2018. 12. 28.

논문접수번호 : KH2018-102

논 문 제 목 : 추출 용매에 따른 *Lactobacillus plantarum* 발효 우슬의 항염증 효과 증진

저 자 명 : 조은솔, 우영민, 김옥주, 조민영*, 안미영**, 이재화***, 하종명***,
김안드레****

소 속 : 신라대학교 자연과학연구소, *신라대학교 일반대학원 바이오과학과,

**신라대학교 제약공학과

채 택 일 : 2018. 12. 18.

논문 2

**Anti-inflammatory Effects of *Achyranthes japonica nakai*
and *Aralia continentalis Kitagawa* Complex Water Extracts
on LPS-stimulated RAW264.7 Macrophage**

Journal:	<i>Journal of Food Biochemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Woo, Young Min JO, EUN SOL Ok Ju, Kim Ahn, Mee Young Lee, Young-Ho Lee, Sang-Hyeon Ha, Jong-Myung; Silla University, Kim, Andre; Silla University, Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, College of Medical and Life Sciences, Busan, 140, Baegyang-daero 700 beon-gil, Sasang-gu, 46958, Republic of Korea
Keywords:	<i>Achyranthes japonica nakai</i> (Aj), <i>Aralia continentalis Kitagawa</i> (Ac), anti-inflammatory, macrophage, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, iNOS, COX2

SCHOLARONE™
Manuscripts

Manuscript Number:

Title: Anti-inflammatory effects of the combined extracts of *Achyranthes japonica* Nakai and *Aralia continentalis* Kitagawa.

Article Type: Data Article

Corresponding Author: Professor Andre Kim, Ph.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Young Min Woo

Order of Authors: Young Min Woo; Ok Ju Kim; Eun Sol Jo; Su Jin Kim; Young-Ho Lee; Mee Young Ahn, Ph.D.; Sang-Hyeon Lee, Ph.D.; Jong-Myung Ha, Ph.D.; Andre Kim, Ph.D.

Abstract: This study investigated the anti-inflammatory effects of mixed extracts of AJ and AC (ratios of 1:2, 1:3, 1:5, 2:1, 3:1 and 5:1) on RAW264.7 macrophages and evaluated the anti-inflammatory effects of the mixed extracts of AJ and AC by measuring IL-1 β , IL-6, and TNF α using the ELISA kit assay. In particular, the formation of nitric oxide (NO) was found to decrease in the group treated with the combined extracts of AJ and AC at all ratios. In particular, extracts of ratio of 2:1 (AJ:AC) decreased the formation of NO level that is approximately 60% of the group treated with only lipopolysaccharide (LPS). Also, extracts of ratio of 2:1 (AJ:AC) reduced the production of IL-1 β , IL-6, TNF α and PGE2 with statistical significance. Volunteers over the age of 50 who complain of discomfort in knee joints were selected as the experimental subjects. The subjects took daily administration of 2,000 mg of the combined extracts of ratio of 2:1 (AJ:AC) for 12 weeks. A survey (VAS (Visual Analog Scale), WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index)) was conducted after the 12 weeks of oral administration. The experimental group showed the change between each visit and baseline time compared with the control group. In the ITT analysis, VAS score and WOMAC stiffness score decreased significantly. And the WOMAC total score and function score tended to decrease. In the PP analysis, the WOMAC stiffness score was significantly decreased and the VAS and WOMAC total and function scores were decreased. There was no significant difference in all parameters of ITT and PP in radiological examinations.

개인정보 비공개

2. 특허 성과 (출원 2건, 등록 1건)

No.	특허명	국명	출원			등록		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
1	골관절염의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)메디앤바이오	2017.10.30	10-2017-0142645	(주)메디앤바이오	2018.12.07	제1928881호
2	녹각 발표물의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 녹각발효물	대한민국	신라대학교 산학협력단	2017.10.31	10-2017-0143849			

출원번호통지서

출원일자 2017.10.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2017-0142645 (접수번호 1-1-2017-1074192-28)
 출원인명칭 (주)천호바이오(1-2012-042879-6)
 대리인성명 윤대웅(9-2012-000100-1)
 발명자성명 김언석 김안드레 곽언길 오현정 주현진 우영민 하종명 김옥주 조은슬
 발명의명칭 골관절염의 예방 또는 치료용 조성물

특허등록원부

특 허 번 호	제 1928881 호
---------	-------------

[권 리 란]

표시번호	등 록 사 항			
1번	출원연월일	2017년 10월 30일	출원번호	2017-0142645
	특허결정(심결)연월일	2018년 10월 18일	청구범위의 항수	9
	분류기호	A61K 36/21, A61K 36/25, A23L 33/105		
	발명의 명칭	콜관질염의 예방 또는 치료용 조성물		
	존속기간(예정)만료일	2037년 10월 30일		
2018년 12월 07일 등록				

[특 허 료 란]

제 01 - 03 년분 (2018.12.07 ~ 2021.12.07) 금 액 118,800 원(중기업)	2018년 12월 07일 납입
---	------------------

[특 허 권 자 란]

(최종권리자) 주식회사 메디앤바이오 (131311-*****) 서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호 (공릉동, 서울테크노파크 스마트하우스)	
순위번호	등 록 사 항
1번 (등록권리자)	주식회사 메디앤바이오(131311-*****) 서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호 (공릉동, 서울테크노파크 스마트하우스) 2018년 12월 07일 등록

이하여백

특허 1

출원 번호 통 지 서

출원 일자	2017.10.31
특기 사항	심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(CDP20170454)
출원 번호	10-2017-0143849 (접수번호 1-1-2017-1079949-45)
출원인 명칭	신라대학교 산학협력단(2-2005-042499-4)
대리인 성명	특허법인 천지(9-2008-100061-9)
발명자 성명	김안드레 우영민 하종명 김옥주 조은솔
발명의 명칭	녹각 발효물의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 녹각 발효물

특허 2

3. 학술발표 (총 5건)

번호	제목 / 학회	발표자	발표일시	장소	국명
1	anti-inflammatory and bone growth effects of korean medicinal herbs(achyranthis radix, araliae continentalis radix, antler) fermented by lactobacilus /한국유전자세포치료학회	송아람	16.12.05	서울대학교 어린이병원 1,2 강의실	대한민국
2	Effects of Medicinal Haerb Extracts on the Growth and Differentiation of MG-63 Human Osteoblast-like Cells / 한국응용생명화학학회	우영민	17.06.15	부산 해운대 그랜드 호텔	대한민국
3	Anti-Inflammatory Effects of Different Extraction Ratio from Achyranthes Japonica and Aralia continentalis on RAW264.7 Macrophages /한국미생물생명공학회	우영민	17.06.28	부산 BEXCO	대한민국
4	Effects of Achyranthes japonica(Aj) and Aralia continentalis(Ac) mixture on osteoblast growth / 2018한국응용생명화학학회	조민영	18.06.18	ICC JEJU	대한민국
5	Anti-inflammatory Effects of Different Extraction Ratio from Achranthes japonica and Aralia continentalis on RAW264.7 Macrophages /2018한국응용생명화학학회	우영민	18.06.18	ICC JEJU	대한민국

4	Anti-inflammatory and Bone Growth Effects of Korean medicinal herbs (Achyranthis Radix, Araliae continentalis radix, antler) fermented by Lactobacillus Plantarum
	A-Ram Song, Jong-Myung Ha and Andre Kim 1
	Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan

발표 1

PFM-35	<p>Effects of Medicinal Herb Extracts on the Growth and Differentiation of MG-63 Human Osteoblast-like Cells</p> <p>Young Min Woo¹, Yuanyuan Dong¹, Jong Myung Ha^{1,2}, Andre Kim^{2*}</p> <p>¹Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate school, Silla University, Busan 46958, Korea, ²Department of Pharmaceutical Engineering, Graduate school, Silla University, Busan 46958, Korea</p>
--------	---

발표 2

A-18	<p>Anti-inflammatory Effects of Different Extraction Ratio from <i>Achyranthes japonica</i> and <i>Aralia continentalis</i> RAW264.7 Macrophages</p> <p>Young Min WOO¹, Yuan Yuan DONG¹, Jong Myung HA¹ and Andre KIM^{2*}</p> <p>¹Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan, Korea. ²Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan, Korea.</p>
------	--

발표 3



Effects of *Achyranthes japonica* (Aj) and *Aralia continentalis* (Ac) mixture on osteoblast growth

Min Young Jo¹, Ok Ju Kim², Young Min Woo², Eun Sol Jo², Jong Myung Ha¹ and Andre Kim^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea. ²Department of Natural Science Institute, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea.

Abstract

Achyranthes japonica (Aj) is known to be effective for pain, diarrhea, hypertension, rheumatism, osteoarthritis, and *Aralia continentalis* (Ac) is known to be effective for osteoarthritis, arthritis, and rheumatism. This study was conducted to investigate the effects of ALP (alkaline phosphatase) activity of *Achyranthes japonica* (Aj) and *Aralia continentalis* (Ac) mixed extracts (ratio of 1: 2, 1: 3, 1: 5, 2: 1, 3: 1, 5: 1) Vascular endothelial growth factor (VEGF) was investigated. The toxicity of osteoblasts was determined by CCK analysis. VEGF and ALP of Aj and Ac mixed extracts were evaluated by ELISA. Compared with different ratio, Aj:Ac=2:1 ratio has much more potency. Therefore, this extract may be helpful for the new bone formation process.

발표 4



Anti-Inflammatory Effects of Different Extraction Ratio from *Achyranthes japonica* and *Aralia continentalis* on RAW264.7 Macrophages

Young Min WOO², Ok Ju KIM², Eun Sol JO², Min Young JO¹, Jong Myung HA¹ and Andre KIM^{1*}

1) Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

2) Department of Natural Science Institute, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

Abstract

Achyranthes japonica nakai (Aj) is a perennial herb under the Amaranthaceae family. Oriental or herbal medicines show extensive effects through the combined actions of various ingredients. *Aralia continentalis* Kitagawa (Ac) is a perennial herb under the Araliaceae family and is also referred to as *sealis*. Fermented oriental medicines improve the formulation and processing method of oriental medicines as well as their pharmacological functions by maximizing both the internal absorption and bioavailability of medicinal properties. In doing so, they can create new demands for oriental medicines and help develop high-value oriental medicines. This study investigated the anti-inflammatory effects of Aj and Ac mixed extracts (1:2, 1:3, 1:5, 2:1, 3:1 and 5:1 ratio) on RAW264.7 macrophages. Cell toxicity was determined by CCK assay. We evaluated the anti-inflammatory effects of Aj and Ac mixed extracts by measuring IL-1 β , IL-6 and TNF α by ELISA kit assay. Aj and Ac mixed extracts inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-1 β and TNF α in LPS-stimulated macrophages. Compared with different ratio, Aj:Ac=2:1 ratio has much more potency and inhibited the production of TNF α in LPS-induced RAW264.7 cells. The present results show that Aj and Ac mixed extracts have potent anti-inflammatory effects on RAW264.7 macrophages. Therefore, this extracts may be utilized as a good source of functional foods for protection against inflammatory diseases.

발표 5

4. 인력양성 (학사 4 / 석사 2)

- 학사(4명): 황하빈, 성신혜, 강민지, 정지현
- 석사(2명): 송아람, 동원일

제 201709002 호 졸업예정증명서 성 명 : 정지현	제 20017-03077 호 졸업예정증명서 성 명 : 성신혜	제 2017-0307 호 학위수여예정증명서 성 명 : 동원일
개인정보 비공개		
신라대학교 총장	신라대학교 총장	신라대학교 총장
제 13018-012237 호 졸업예정증명서 성 명 : 황하빈	제 13018-012540 호 졸업예정증명서 성 명 : 정지현	제 D2017-003122 호 학위수여증명서 성 명 : 송아람
개인정보 비공개		
신라대학교 총장	신라대학교 총장	신라대학교 총장

5. 고용창출 (총 2인)

- (주) 메디앤바이오 오현정 2016.09.01.
- (주) 메디앤바이오 김수진 2018.01.01.

출력일시 : 2017.01.17 10:28

**4대 사회보험
사업장 가입자 명부**

발급번호	20170117117444	발급일시	2017-01-17 10:28	사업장 관리번호	12586054580
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험	
사업장등록번호	125-86-05458	125-86-05458	125-86-05458	125-86-05458	
사업장명칭	주식회사 창동바이오 (Chungho Bio Co., Ltd.)				

■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 2

출력일시 : 2018.08.06 09:10

**4대 사회보험
사업장 가입자 명부**

발급번호	20180806884562	발급일시	2018-08-06 09:10	사업장 관리번호	12586054580
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험	
사업장등록번호	125-86-05458	125-86-05458	125-86-05458	125-86-05458	
사업장명칭	주식회사 창동바이오 (Chungho Bio Co., Ltd.)				

■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 2

개인정보 비공개

1) 위 확인서는 4대사회보험 정보연계시스템에서 제공하는 자료이며, 발급사실 확인은 발급일로부터 90일 이내 세무서로 문의 가능합니다. (www.4insure.or.kr)의 [동영상 친화여부 확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.

1) 위 사업장 가입자 명부는 4대사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계받아 제공하는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일 이내 4대사회보험 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 [발급사실확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.

6. 기술실시

○ 자체 기술 실시를 통한 시제품 제작

- 계약명: 우슬등 복합추출 발효물 생산기술
- 계약일: 2018.12.13.
- 실시기간: 특허만료일까지
- 지재권 종류: 특허등록
- 실시권 유형: 직접실시

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품기술개발사업		연구과제번호	11603303	
	연구과제명	우슬등 유산균 발효 복합물을 이용한 관철건강 기능성 소재 및 건강기능식품 개발				
	연구기관명	(주)메디엔바이오	연구책임자	박옥남	참여기업명 (주)메디엔바이오	
	연구협약일	2016.07.07	연구기간	2016.07.07~2018.12.31		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계	
335,000,000		188,000,000		523,000,000		
기술실시계약 및 기술실시계약 및	계약(활용)명	우슬등 복합추출 발효물 생산기술				
	계약(활용)일	2018.12.13	실시(활용)기간	특허만료일까지		
	지재권 종류	특허등록	실사권 유형	직접 실시		
	• 지재권이 특허(출원 등록) 인 경우	명 칭	골관절염의 예방 또는 치료용 조성물			
		번호	제 1928881호	일자	2018년 12월 7일	

개인정보 비공개

기술료산정내역	● (단위: 천원) : 335,000(정부출연금) X 10%(기술료 징수율) X 20%(기술료 감면 80%) X 70%(일시납 추가 감면 30%) = 4,690					
기술료	정액기술료		정상기술료		기타 조건	
	상선납부예정일	징수(납부)금액	착수기본료	징수(납부)예정일		징수(납부)금액
	2019.03.10	4,690,000	매출에 따른 기술료	해당없음		해당없음
				징수(납부)시작일		결산일
				해당없음		해당없음
		징수(납부)종료일		징수율		
계	4,690,000		매출액의 ()%			
기타특기사항	<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 연구개발과제협약서 사본 1부.</p> <p style="text-align: center;">2018년 12월 13일 주관연구기관 메디엔바이오의 대표  농림식품기술기획평가원장 귀하</p>					

7. 기술 인증 (신청 1건)

○ 개발 원료 생산 기술 신기술 인증 신청.

- 인증명: 농림식품 신기술(NET)인증제
- 인증기관: 농림식품기술기획평가원
- 신청 기술명: 골관절염의 치료·예방용 식품소재 개발을 위한 발효생약 양산(量産) 기술

연구결과 미첨부로 인하여 2년 내 상용화에 무리가 있다는 심사 의견을 반영하여 인체적용 시험 및 소재 개발 연구 결과를 첨부한 내용으로 2019년 상반기 내 기술인증 신청 예정임.

농림식품신기술인증제 '18년도 하반기 1차 서류·면접 심사 결과

순번	신청 기술명	신청기관	심사결과		
			심사 결과	평균 점수	유효기간
1	골관절염의 치료·예방용 식품소재 개발을 위한 발효 생약 양산(量産) 기술	메디안바이오	미선정	69.0	-
종합 심사 의견					
<ul style="list-style-type: none"> - 본 신청기술은 우슬과 독활 복합물을 우산균 발효를 통해 생성된 물질의 골관절염 치료 예방용 식품소재 개발로서 실질적으로 본 물질이 골관절염의 치료예방용을 타겟으로 한 연구결과보다는 전반적으로 일반적인 항염증에 대한 사항으로 제시가 되어있음. 이러한 결과로는 본 사업의 목적인 현재로서는 2년 내 개발된 신기술 활용하여 상용화를 하기에는 무리가 있어 보임. - 우슬과 독활을 선정하여 소재개발 기술을 완성하였는데, 이 두 가지 소재의 유효성 자료 확보가 매우 중요한데 이 부분이 좀 미흡한 것 같음. 효능·기전·성분 등이 규명되어야 제품력과 기술이 인정될 것임. 핵심기술로 주장한 우산균 발효에 의한 성분 변화, 효능 강화 등에 대한 근거 자료 확보가 미흡함(배합 비율이 중요할지 모르나, 그보다 더 중요한 것은 왜 배합하면 효능이 강화되는지에 대한 자료 확보가 미흡) - 선행특허조사결과 보고서에 의하면 "우슬 및 독활 복합제"가 공지되어 있고, "우산균을 이용한 발효기술"이 공지되어 있으며, "대량생산 제조공정" 또한 공지되어 있으므로, 향후, "우슬과 독활의 신정기술의 배합비"에 따른 효과 및 "그 추출물의 우산균 발효물"에 따른 지표물질 함량 데이터 및 효과 데이터를 보완해야 할 것으로 평가됨 - 두 생약 추출물을 우산균으로 발효하여 골관절염에 유효한 식품개발이 목표이나, 추출물과 발효물의 효능 비교가 없어 발효이유가 무엇인지 설명이 더 필요한(지표성분변화, 그 지표성분이 활성성분인지 증명 필요) - 발효 후 발효용 배지 등 제거 공정이 없어서 제품의 품질을 유지 가능한지 의문시 됨. 예상판매가는 유통비용 등을 감안이 더 필요한 거 같아 경쟁제품들과의 원가 비교를 더 검토 요망 - 기능성으로 제시한 골관절염의 개선 효과를 표시광고에 활용하기 위해서는 현 시점에서는 건강기능식품의 개별인정 원료 확보가 전제되어야 하나, 현재 인체시험 등을 진행하고 있는 단계수준으로 신청 전임 - 우산균 발효를 통한 실험방법은 신기술이라 보기 힘들다 사업화는 가능하다고 봄. 건강기능성 식품 개별인정을 통한 기능성 원료 인증을 통해 제품화를 추진하기 바람. 개별인정형 시험결과를 통해 인체적용을 위한 산업화의 경우 1일 섭취량과 개선효과 시험 결과가 필요 					

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 성과 평가방법

- 건강기능식품 원료 표준화 유무
- 우슬등 유산균 복합발효 제조 공정 개발 및 대량생산 제조 공정 표준화 완료 여부
- NMR, LC/MS를 이용한 관절염 관련 지표물질(biomarker) 선정 여부
- 항염증 관련 인자(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a, COX-2 등) 및 뼈성장 관련 인자(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등)와의 상호작용 확인
- 시작용품 제작 및 독성시험 진행 여부
- 골관절염 동물모델에서 우슬등 유산균 복합발효물의 효능 검사를 통한 인체적용 섭취량 결정
- 일반독성 및 유전독성 시험
- 인체적용 시험용 시료 생산
- 인체적용시험 개시
- 관절건강관련 임상시험 30 case이상 유효 결과치 도출
- 관절건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 개별인정 신청서 제출 유무

3-2. 목표 및 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	연구결과
1차년도 (2016)	유산균발효 한약재의 원료 표준화	• 유산균 발효 한약재 lab scale(10kg 이하) 생산 기술 개발 및 표준화	100	• Lab scale 유산균 배양 을 통한 한약재 발효 제조 공정 개발	• Lab scale 유산균 배 양을 통한 한약재 발효 제조공정 개발
				• Pilot scale(100~500 kg) 의 생산 한약재 유산균발효 공정 개발	• Pilot scale(100~500kg) 의 생산 한약재 유산균발 효 공정 개발
	유산균발효 한약재의 관절건강 개선 기능성 연구	유산균 발효 한약재의 항염 활성 및 골형성 촉진 활성 등 생리활성 측정	100	• 열수추출방법을 이용하 여 우슬 등 한약재 및 발효 한약재 시료의 추출물을 확 보	• 열수추출방법을 이용 하여 우슬 등 한약재 및 발효한약재 시료의 추출 물을 확보 완료
				• NMR, LC/MS를 이용	• NMR을 이용한 지표

				한 지표물질(biomarker) 선정	물질(biomarker) 선정 완료: 지표물질 ecdysterone
				<ul style="list-style-type: none"> 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a, COX-2 등) 	<ul style="list-style-type: none"> 세절된 한약재 유산균 발효물을 이용한 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a 등) 완료
				<ul style="list-style-type: none"> 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등) 	<ul style="list-style-type: none"> 세절된 한약재 유산균 발효물을 이용한 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등) 완료
2차년도 (2017)	유산균발효 복합물의 원료 표준화	유산균 발효 복합물 대량생산 기술 개발 및 표준화	100	<ul style="list-style-type: none"> 열수추출방법을 이용하여 우슬 등 한약재 및 발효한약재 시료의 추출물을 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 열수추출방법을 이용하여 우슬 등 한약재 및 발효한약재 시료의 추출물을 확보 완료
				<ul style="list-style-type: none"> NMR, LC/MS를 이용한 지표물질(biomarker) 선정 	<ul style="list-style-type: none"> NMR을 이용한 지표물질(biomarker) 선정 완료 HPLC를 이용한 지표물질(biomarker) 선정 완료
				<ul style="list-style-type: none"> 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a, COX-2 등) 	<ul style="list-style-type: none"> 세절된 한약재 유산균발효물을 이용한 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a 등) 완료 파우더 한약재 유산균발효물을 이용한 항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, PGE2, TNF-a 등) 완료
유산균발효 한약재의 관절건강 개선 기능성 연구	유산균 발효 한약재의 항염활성 및 골형성 촉진 활성 등 생리활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등) 	<ul style="list-style-type: none"> 세절된 한약재 유산균발효물을 이용한 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등) 완료 파우더 한약재 유산균발효물을 이용한 뼈성장 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(MG-63 세포성장, IGF-1, VEGF 등) 완료 	
			<ul style="list-style-type: none"> 골관절염 동물모델에서 우슬 등 발효한약재 추출물의 효능 시험 	<ul style="list-style-type: none"> 동물실험승인번호 획득 SUACUC-2016-022 동물실험과제명 : 유산균발효 한약재를 이용한 관절건강 기능성소재 및 건강기능식품 개발 	
			<ul style="list-style-type: none"> 혈액내 항염지표 COX, TNF-α, IL-1β 검사 		
	한약재 유산균	GLP기관을	100	<ul style="list-style-type: none"> 일반 독성 시험 (단회투여) 	시험기관: KCL

	발효 추출물의 일반독성시험	통한 독성 시험		독성) • 유전 독성 시험 (돌연변이, 염색체이상, 소핵유발)	한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소 (시험번호 GT16-00249/ GT16-00250/ GT16-00251/ GT16-00252)
	인체적용시험	인체적용 시험용 제품 생산	100	인체적용 시험용 식품 제조	OEM을 통해 인체적용시험을 위한 시험 식품 및 대조 식품 제조 (OEM기관: 다인 네추럴)
		GCP규정에 따른 30cases의 예비 인체적용시험을 통해 관절통증 완화 기능성 및 안전성 검증	100	인체적용시험을 통한 관절통증 완화 기능성 및 안전성 검증 진행	세명대학교 부속 한방병원, 바이오푸드CRO와 용역 계약, 인체적용시험 진행.
3차년도 (2018)	인체적용시험	GCP규정에 따른 30cases의 예비 인체적용시험을 통해 관절통증 완화 기능성 및 안전성 검증	100	인체적용시험을 통한 관절통증 완화 기능성 및 안전성 검증 완료	인체적용시험 완료 및 연구결과 보고서 작성.
	유산균발효 한약재의 관절건강 개선 기능성 연구	유산균 발효 복합물 대량생산 기술 개발 및 표준화	100	항염증 관련 인자 실험을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, IL-6, TNF-a, COX-2, iNOS 등)	파우더 한약재 유산균발효물을 이용한 항염증 관련 인자 실험(western blot 및 PCR)을 통한 유효성분 탐색(Nitric oxide, IL-1b, IL-6, TNF-a, COX-2, iNOS 등) 완료
				원료 및 제품의 안정성 실험	생산된 시제품의 HPLC를 이용한 지표물질(biomarker) 분석 완료
				LC/MS를 이용한 지표물질 및 제품의 finger print 분석을 통한 제품 표준화	생산된 시제품의 HPLC를 이용한 지표물질(biomarker) 분석 (1달 간격, 6개월간 분석 완료)
			식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 허가에 필요한 서류작성 및 신청서 제출	서류작성 및 접수 완료	

	시제품 제작	개발 원료를 활용한 시제품 제작	100	우슬등 복합추출 발효물을 활용한 시제품 제작	OEM기관: 진산사이언스
	기호도 조사	시제품 조사를 통한 기호도 조사	80	자체 설문지 제작 및 설문 조사를 통한 기호도 조사 실행	기능성 및 기호성 조사 현재 진행 중.
		전문가 자문	100	전문가 자문을 통한 부원료 변경 추진	설문 결과 및 전문가 자문 피드백을 통한 부원료 및 제형의 변화 모색.

3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

개발 원료를 활용해 제작한 시제품으로 기호도 조사를 진행하고 있으며, 차후계획은 4. 연구 결과 활용계획에서 설명함.

3-4. 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

가. 기술의 독창성

- (1) 국내 관절/뼈건강 건강기능식품 원료는 고시형과 개별인정형을 합쳐 총 22개이나, 글루코사민 등 시장 점유율이 높은 기존 원료가 건강에 크게 유효하지 않다는 보고와 천연물 유래 개별인정 원료들(뼈/관절)이 용매를 이용한 단순추출물 또는 추출물의 혼합물이 대부분이라는 점에서 기존 원료를 넘어선 새로운 소재의 원료가 요구되는 실정.
- (2) 본 기술은 두 가지 이상 천연물 원료의 배합을 최적화하여 복합 추출하고, 생물전환 기술을 적용해 원료의 기능성 향상을 실현시킨 기술로서, 기 인증된 고시형, 개별인정형 원료들과 차별화된 독창성을 보유한다고 볼 수 있음.

나. 기술 경쟁력

- (1) 본 개발 원료는 농림식품기술기획평가원 주관 고부가가치식품개발사업 과제를 통한 연구결과에 근거하여, 천연물 발효를 통해 유효성분의 생체이용률을 향상시키고, 두 천연물 원재료의 시너지가 발휘되는 최적비율 복합 추출을 통해 세포 독성이 완화되는 것을 입증하였음.

- (2) 뼈 성장 인자 촉진 및 염증 유발 인자 억제를 통한 면역 개선에 도움을 줄 수 있는 다기능성 원료임을 증명하였고, 단일 원료로 여러 효과를 얻을 수 있는 경쟁력 있는 원료임을 알 수 있음.
- (3) 본 연구로 자사가 개발한 우슬 등 복합추출 발효물은 ‘골관절염의 예방 또는 치료용 조성물’ 특허등록을 통해 유사소재의 시장 진입을 차단함으로써 제도적으로 소재의 독창성과 기술성이 유지될 것으로 사료됨.

다. 기술 수준

- (1) 발효를 이용한 기능성 식품은 몇몇 시판 중이나, 관절건강 개선을 주목적으로 한 관절건강 개선 제품은 현재까지 없는 것으로 확인되며, 특히 우슬과 독활을 혼합 발효한 소재 개발은 진행되지 않은 상태임.
- (2) 국내에서 천연물 생물 전환을 이용한 기능성 소재 개발은 아직 출발선상에 있음. 당사는 개발 원료를 식품의약품안전처로부터 관절건강 기능소재 개별인정을 획득하여 건강기능식품으로 상품화할 예정임. 이로써 국내 시장에 새로운 소재의 기능성 원료를 제공하고 기술수준을 혁신시킬 수 있을 것이라 사료됨.
- (3) 지식재산권 및 원천기술 확보, 골관절 건강 개선 및 통증 감소 효능평가 기술의 확보로 향후 다양한 질환개선 소재 개발이 활발해 질 것으로 예상함.
- (4) 개별인정 획득 후, 건강기능식품, 의약품 등 사용할 수 있는 응용 범위가 넓어 그 사용이 매우 광범위해 질 것으로 기대됨.

2. 경제적 측면

가. 국산 원재료 사용으로 인한 수급의 용이성

- (1) 현재 건강기능식품 원료는 수입 원료의 비중이 크므로 국산 자원을 활용한 기능성 소재는 그 가치가 높음. 본 개발의 주 원재료로 이용되는 우슬, 독활은 전통의학의 치료수단인 동시에 우리나라의 대표적인 신토불이 농산물임.
- (2) 국내에서 출하되는 고유 한약재 원료는 산업화 시 원료의 수급이 용이한 동시에 외화절약에 기여하고, 국내 농가의 안정적 수익 창출을 가능하게 함.

나. 수출 경쟁력

- (1) 세계 전통의약시장 규모는 2,000억 달러('08년) → 5조 달러('50년)로 지속적 성장이 추정되고, 한국과학기술정보연구원 기술동향분석보고서(2013)에서는 '미국인들의 상당수가 천연재료를 사용한 기능성식품이 부작용을 완화시킬 수 있다는 점에서 의약품을 대체할 수 있을 것으로 선호'한다고 말함.
- (2) 국외 한약재 시장 성장규모 및 천연물에 대한 높은 호감도로 미루어 볼 때 생약활용 기능성식품 시장은 보다 활발해질 것으로 전망됨.
- (3) 현재까지 국내외 우슬과 독활 복합발효물을 이용한 골관절염 개선에 특화된 특허는 없는 것으로 조사되며, 특히 국외에서는 우슬과 독활을 주원료로 한 제품 자체가 존재하지 않아 수출시장 경쟁력에서도 우위를 차지할 수 있음.

3. 산업적 측면

- (1) 발효생약은 약리적인 기능성 및 제형 개량과 포제 방법 향상으로 새로운 수요 창출 및 고부가가치 제품개발이 가능하여 지역 농업사회 발전에 이바지 가능함. 본 개발 원료는 국내산 작물에 개발한 발효공법을 더해 고부가가치 창출이 가능하고, 이를 통해 생약복합물 원료개발 사업에 활기를 줄 수 있음.
- (2) 최근 생약재와 관련한 다양한 인프라 육성을 위해 농가와 지방자치단체가 협약을 맺는 등 국가적으로도 방법을 모색 중인 가운데 생약활용 기능성 소재 개발은 재배 농가 소득 증대와 일자리 창출에 기여하고 관련 식품 산업의 성장을 촉진시킬 수 있음.

4. 사회문화적 측면

- (1) 통계 의학적으로 이용되어오던 생약은 그 메커니즘에 대한 의문으로 유효성과 안정성, 안전성 등이 의심받아 왔으나, 본 연구의 개발 원료는 약리작용과 골관절염 관련인자의 유의적 상관관계 분석 및 활성물질 탐색을 통해 기능성 및 안전성을 현대적 검증체계로 증명함으로써 생약에 대한 근원적 불신을 해소함.
- (2) 이로써 생약에 대한 인식을 개선 및 소비자의 신뢰를 향상 시키고, 관련 시장 제품의 매출 증대를 통해 경제 발전 및 국민 건강 증진에 이바지할 수 있음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1 협동기관에서의 기술 이전

- 개발 특허명: 골관절염의 예방 또는 치료용 조성물 (제1928881호)
- 특허 지분
: (주)메디앤바이오(주관기관) 70%, 신라대학교 산학협력단(협동기관) 30%
- 협동기관 지분 30%를 주관기관으로 이전 예정.
- 계약 체결 후 ‘(주)메디앤바이오’가 특허권리 100%를 소유함.

4-2 특허 소재를 이용한 완제품 제작

(1) 시제품을 통한 기호도 조사

- 시장성과 소비 트렌드를 반영해 액상 스틱파우치 형태의 시제품을 제작함.
- 자체 제작한 설문지를 이용해 맛, 향, 기능성 등 시제품 시장성 조사 진행 중에 있음.

(2) 설문 조사와 자문단 피드백을 통한 완제품 제작

- 기호도 조사를 통해 개발 원료의 ‘쓴 맛’, ‘아린 맛’ 등 문제점을 발견함.
- 중의학 박사 고문단 자문으로, 시장성·기호성 증진을 위한 부형 원료를 처방받아 새로운 샘플 제작을 준비하는 중임.
- 보완 제작한 샘플의 기호도 조사 후 완제품을 출시, 건강기능식품 시장 진입을 통해 매출을 창출할 계획임(2019년 하반기 예정).

4-3 유통 및 마케팅

- 총판 조직과의 독점 판매 계약을 통해 off-line 판매 유통 경로 확보.
- 온라인, 홈쇼핑, 박람회 등을 이용해 온오프라인을 병행한 유통 판매 추진 예정.
- 판매유통 방안

판매유통 방안	
구분	추진계획
온라인채널	- 국내 온라인 채널 입점을 통한 판매유통채널 확보 - 대형 오픈마켓, 소셜커머스, 종합몰, 전문몰 등
홈쇼핑	- 국내 메이저 TV홈쇼핑 판매를 통한 판매유통채널 확보 - 롯데, 현대, GS, NS, CJ 등
통신판매	- 광고, 신문, 잡지를 통한 판매유통채널 확보
방문판매	- 국내 방문판매 전문 업체를 통한 판매유통채널 확보
직영판매점	- 국내 직영판매점을 통한 판매유통채널 확보 - 약국, 마트, 백화점, 건강기능식품전문매장 등
박람회	- 건강기능식품 박람회 또는 식품 관련 박람회 참가를 통한 판매 연계
인플루언서 마케팅	- 후기 전문 블로거나 영향력 있는 유저들을 활용해 국내 판매유통채널 연계
서포터즈 운영	- 서포터즈 운영을 통한 국내 판매유통채널 연계

4-4 제형의 다양화

- 국내외 선진기업들은 ‘이색제형 전쟁’에 돌입해 젤리형 영양 제품이나 스틱젤리 제품, 소프트·하드 캡슐형 유산균 제품 등 독특한 제형의 제품을 잇달아 출시하고 있음.
- 국가식품클러스터 또한 건강기능식품기업의 니즈(Needs, 욕구)가 제형개발임을 간파하여 ‘기능성식품 제형센터’ 건립에 투자할 예정이며, 건강기능식품 중소기업이 소비자 니즈 맞춤형 제형개발을 도울 수 있도록 기술 지원, 적합성 평가, 시제품제작 등을 통해 제형기술의 기반을 마련할 것이라 밝힘.
- 제형에 대한 니즈를 충족시키기 위해 개발 원료 제형의 다양화를 모색함.
- 찬물에도 잘 녹는 특허 공법을 적용한 차별화 제형 변화를 검토 중에 있음.

붙임. 참고문헌

1. An, S. M., Kim, H. G., Choi, E. J., Hwang, H. H., Lee, E. S., Beak, J. H., Bhu, Y. C. and Ko, J. S. 2014. Screening for antiinflammatory activities in Extracts from korean herb Medicines. *J. Soc. Cosmetic Sci. Korea* **40**, 95–108.
2. Aono, K., Isobe, K., Kiuchi, K., Fan, Z. H., Ito, M., Takeuchi, A., Miyachi, M., Nakashima, I. and Nimura, Y. 1997. *In vitro* and *in vivo* expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines. *J. Cell. Biochem.* **65**, 349–358.
3. Cha, J. H., Kim, Y. S., Lee, E. M. 2010. Effects of *Prunellae Spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J. Orien. Obstet. Gynecol.* **23**, 91–100.
4. Choi, W. S., Kwon, H. S., No, R. H., Choi, G. P. and Lee, H. Y. 2013. Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**, 303–311.
5. Dang, N. H., X. F. Zhang, M. S. Zheng, K. H. Son, H. W. Chang, H. P. Kim, K. H. Bae and S. S. Kang. 2005. Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 28–33.
6. Ha, Y. B., Park, J. H., Jang, J. W., Lim, D. W. and Kim, J. E. 2016. Comparative study for anti-inflammatory and anti-obesity effect of fractions from leaf and stem of *Sasa borealis*. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **30**, 229–235.
7. Jeong, H., Kim, H., Ju, E., Lee, S. G., Kong, C. S. and Seo, Y. 2017. Antiinflammatory activity of solvent-partitioned fractions from *Atriplex gmelinii* C. A. Mey. in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Life. Sci.* **2**, 187–193.
8. Jin, K. S., Lee, J. Y., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2014. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract. *J. Life Sci.* **24**, 713–720.
9. Kang, C. H., Koo, J. R. and So, J. S. 2012. Inhibitory effects of *Aralia cordata* Thumb extracts on nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophage cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 621–627.
10. Kim, C. M. and Park, Y. K. 2009. The effects of different extracts of *Ostercicum koreanum* on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Kor. J. Herbology* **24**, 169–178.

11. Kim, P. K., Jung, K. I., Choi, Y. J. and Gal, S. W. 2017. Anti-inflammatory effects of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts in LPS-induced RAW 264.7 Cells. *J. Life. Sci.* **9**, 986–993.
12. Kim, S. I., Lee, S. M., Lee, C. Y., Son, H. J., Hwang, D. Y., Lee, H. and Kim, D. S. 2016. Antimicrobial activity and characteristics of *Asparagus Cochinchinensis* fermented with lactic acid bacteria. *Food Eng. Prog.* **20**, 278–284.
13. Lee, K. H. and Rhee, K. H. 2015. Screening of anti-Inflammatory herbs having the activation of MAPK family proteins. *Kor. J. Food Nutr.* **28**, 343–350.
14. Lee, S. G., Jo, D. J., Chang, H. J. and Kang, H. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aralia continentalis* Kitagawa. *J. Naturopath.* **4**, 10–14.
15. Mun, O. J., Kwon, M. S., Bae, M. J., Ahn, B. N., Fatih, K., Kim, M. H., Lee, S. H., Yu, K. H., Kim, Y. Y., Seo, Y. W. and Kong, C. S. 2015. Anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiformis* extracts fermented with *Lactobacillus casei* in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **30**, 38–43.
16. Padwad, Y., Ganju, L., Jain, M., Chanda, S., Karan, D., Banerjee, P. K. and Sawhney, R. C. 2006. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 46–52.
17. Park, H. J., Hong, M. S., Lee, J. S., Leem, K. H., Kim, C. J., Kim, J. W. and Lim, S. 2005. Effects of aralia continentalis on hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother. Res.* **19**, 511–513.
18. Turini, M. E. and DuBois R. N. 2002. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **53**, 35–57.
19. Yang, S. A., Im, N. K., Jhee, K. H. and Lee, I. S. 2008. Effects of *Aralia continentalis* Kitagawa on antiplatelet and antioxidative activities. *J. Life Sci.* **18**, 357–362.
20. Yu, A R., Park, H. Y., Choi, I. W., Park, Y. K., Hong, H. D. and Choi, H. D. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1521–1527.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.