

11-1543  
000-002  
770-01

발간등록번호

11-1543000-002770-01

생강과  
계피를  
활용한  
장건강  
개선  
개별  
인정형  
건강  
기능식품  
개발  
최종  
보고서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

생강과 계피를 활용한 장건강  
개선 개별인정형 건강기능식품  
개발 최종보고서

2019. 03. 29

주관연구기관 / (주)메디앤바이오  
협동연구기관 / 서울과학기술대학교  
한국식품연구원

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생강과 제피를 활용한 장건강 개선 개별인정형 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 11.

주관연구기관명 : (주)메디엔바이오 (대표자) 박옥남

협동연구기관명 : 서울과학기술대학교 산학협력단 (대표자)

협동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자)



주관연구책임자 : 박옥남

협동연구책임자 : 김지연

협동연구책임자 : 김종태

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	11601203	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	생강과 계피를 활용한 장건강 개선 개별인정형 건강기능식품 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	박 옥 남	해당단계 참여연구원 수	총: 7명 내부: 8명 외부: 15명	해당단계 연구개발비	정부:200,000천원 민간:67,000천원 계:267,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 16명 내부: 9명 외부: 7명	총 연구개발 비	정부:570,000천원 민간:191,000천원 계:761,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)메디앤바이오, 서울과학기술대학교, 한국식품연구원			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

### 9대 성과 등록·기탁번호

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

## 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

## 보고서 면수

- 문헌조사와 선행연구 등을 토대로 장건강 기능성 소재 개발
  - 대상 원재료 선정 및 원료 표준화 완료
  - 대량생산을 위한 공정 표준화 완료
  - 유효성분 탐색 및 장건강과의 메커니즘 규명
  - 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
- 논문발표 3건, 특허출원 2건, 특허등록 1건, 기술이전 1건, 학술발표 5건, 인력양성 4건, 고용창출 2건, 시제품 1건
- 연구 성과 기반 제품의 판매를 위한 총판 판매조직과 계약 완료

## <요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>&lt;연구목적&gt; ○본 연구는 천연물 생강 및 계피를 아임계수 추출 후 복합을 통하여 장건강 기능성 소재 개발 및 제품화</p> <p>&lt;연구내용&gt; ○<i>In vitro</i>, 동물시험을 통한 생강 및 계피 아임계 추출물 최적복합 비율 확립 ○<i>In vitro</i> 시험을 통한 계피 추출물의 염증 억제능 확인 ○동물시험을 통해 대장염 증상 완화 효능 확인 ○생강·계피 복합물의 장건강 기능성 작용 기전 연구 ○생강 및 계피 아임계 추출물의 최적 추출 조건 검토 ○장 건강 개선 인체적용시험 실시</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>○생강 및 계피 아임계 추출물의 대량생산 소재화 및 기준규격 설정 ○생강 주정 및 계피 아임계수 추출물 대량생산을 위한 최적 추출 공정 확립 ○계피의 지표물질 및 기준규격 설정 완료, 지표물질 분석법 확립. ○계피 추출물의 장 건강 개선 작용기전 규명 ○장 건강 개선 효능 평가 기술 확보 ○계피 추출물을 주원료로 한 시제품 생산 완료 ○계피 추출물의 배변활동 원활 기능성 인정을 목적으로 건강기능식품 개별인정형 서류 작성 및 신청 완료</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○장건강 개선 건강기능식품 개별인정 원료 등록 및 장건강 개선 건강기능식품 제품 개발 ○계피 추출물을 주원료로 하는 건강기능식품 개발 ○다양한 기능성 원료가 사용된 추가 제품 생산 ○다양한 유통채널 진입 통한 매출 발생 ○장 건강 개선 기능성 소재로 해외시장 개척 ○프리바이오틱스 소재로 계피 추출물·유산균 복합제품으로 개발</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	계피	아임계수	장 건강	프리바이오틱스	생강

## <SUMMARY>

Purpose & Contents	<p>&lt;The purpose of study&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○The aim of this research is to develop functional material for intestinal health through ginger and cinnamon by extracting with subcritical water</li> </ul> <p>&lt;The contents of study&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○Establishing of optimum ratio of ginger and cinnamon extracts through <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> experiment</li> <li>○Confirmation of the anti-inflammatory effects of cinnamon extracts by <i>in vitro</i> experiment</li> <li>○Confirmation of the protective effect of cinnamon extracts against colitis to conduct <i>in vivo</i> experiment</li> <li>○A study on mechanism of ginger and cinnamon mixtures</li> <li>○Establishment of an optimal and standard process of effective ingredient extraction</li> <li>○Clinical study for functional material</li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○Setting standard benchmark and experimental methods using index ingredient</li> <li>○Establishing an optimal extraction process for the purpose of mass production</li> <li>○Investigation of the mechanism of cinnamon on intestinal health improvement</li> <li>○Production of prototype with cinnamon as the main ingredient</li> <li>○Licensing of the individual authorized health food material for the purpose of recognizing effect of cinnamon extracts about intestine function improvement</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○Development of functional foods related to the improvement of intestinal health</li> <li>○Development of functional food with cinnamon extract as the main ingredient</li> <li>○Developing products using a variety of functional materials</li> <li>○Increased sales through entry into various distribution channels</li> <li>○The entry of cinnamon extract into overseas markets</li> <li>○Development of functional foods containing prebiotics and lactic acid bacteria</li> </ul>				
Keywords	Cinnamon	Subcritical water	Intestinal health	Prebiotics	Ginger

## < CONTENTS >

1. Overview of Research and Development Challenges .....	8
1-1 Purpose of the study .....	8
1-2 Background of the study .....	9
2.. The status of domestic and overseas technical development .....	13
2-1 The status of domestic technical development .....	13
2-2 The status of overseas technical development .....	21
2-3 Pre-research contents and results .....	23
3. Contents and Results of Study .....	33
3-1 Materials and methods .....	33
3-2 Results of Study .....	57
4. Performance of R&D and Application Plans .....	133
5. Level of Achievement and Contribution .....	153
6. lan for utilization of research results .....	158
7. References .....	159

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	8
1-1 연구개발 목적 .....	8
1-2 연구개발의 필요성 .....	9
2. 연구개발 대상의 국내·외 현황 .....	13
2-1 국내 기술 수준 및 시장 현황 .....	13
2-2 국외 기술 수준 및 시장 현황 .....	21
2-3 선행 연구 내용 및 결과 .....	23
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	33
3-1 연구개발 방법 .....	33
3-2 연구내용 및 결과 .....	57
4. 연구개발 성과 및 활용계획 .....	133
5. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	153
6. 연구결과의 활용계획 .....	158
7. 참고 문헌 .....	159

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서



# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

본 연구는 생강과 계피추출물을 이용하여 장건강을 타겟으로 최적복합비율 선정, 원료표준화 연구, 제재화연구, 기전연구, 인체적용시험 등 건강기능식품 기능성 원료로 개발하는 것으로 목적으로 함.



- 생강 및 계피추출물의 대량생산 소재화 및 기준규격 설정
  - 생강과 계피의 원재료 표준화
  - 생강과 계피추출물의 대량생산 공정 조건 설정 및 소재화
  - 대량생산 원료의 기준규격 설정

- In vitro, 동물시험을 통한 생강 및 계피추출물 최적복합 비율 선정
  - Caco-2 cell line에 염증 유도, 염증억제 최적 생강추출물 및 계피추출물 복합비율 선정
  - 유익한 유산균(Lactobacillus 등) 증식 최적 생강추출물 및 계피추출물 복합비율 선정
  - 상기 실험을 통해 선정된 복합비율 2-3 조건 이용 DSS 유도 동물시험을 통한 최적 기능성 복합비율 확인
  
- 생강 및 계피추출물의 최적추출조건 확립
  - 생강 및 계피의 유효 지표성분 분리 및 분석
  - 생강 및 계피의 아임계 추출에 의한 추출수율 및 특성분석
  - 생강 및 계피의 주정에 의한 추출수율 및 특성분석
  - 반응표면분석법에 의한 아임계 추출공정 최적화
  
- 동물시험에서 용량 의존적 기능성 확인, 생강 및 계피추출물 복합물의 장건강 기능성 기전 연구
  - 1차년도 선정 생강추출물과 계피추출물의 복합물 이용, DSS 유도 동물모델에서의 장건강(장염 증 억제 및 장내 유익 유산균 증식) 기능성 확인
  - 동물시험에서의 장염증 억제/장내 유익균 증식 기전 규명, 인체적용시험 유래 혈액 및 분변에서의 장건강 기능성 작용기전 확인
  
- 장건강 개선 인체적용시험 수행
  
- 건강기능식품 개별인정형 원료 신청 서류 작성

## 1-2. 연구개발의 필요성

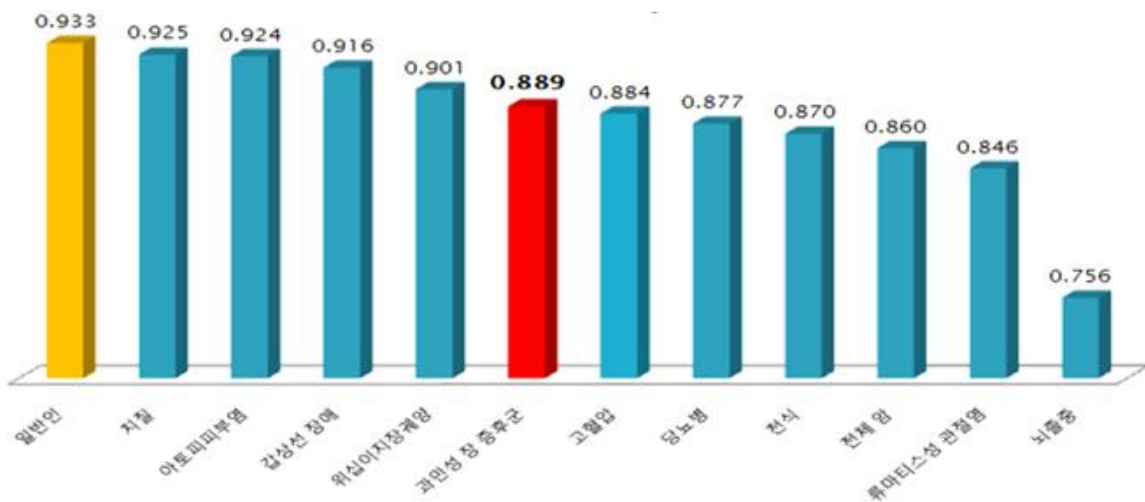
### 1. 연구 개발의 개요

가. 식습관의 서구화로 인한 장 관련 질환 증가

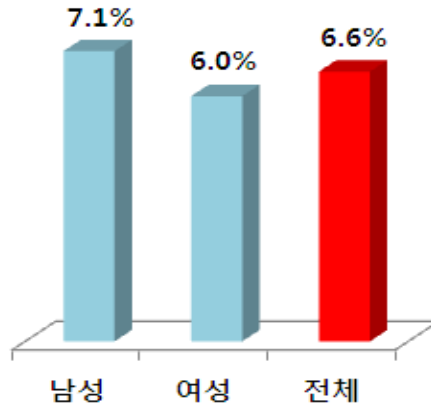
- 장은 피부처럼 외부와 맞닿아 있어 외부 물질의 1차 방어선으로서 장 건강의 악화는 장 질환뿐만 아니라 인체 곳곳에 질환을 유발시킬 수 있으며, 특히 장의 permeability의 증가로

인한 다양한 독소 투과의 증가는 acne, Crohn's disease, Cystic fibrosis, endotoxemia, food allergies, liver dysfunction, intestinal infection 등의 다양한 질환의 유발율을 증가시킴.

- 서유럽에서는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)는 전체 인구의 0.5~1%를 차지하고 있다고 보고하고 있음. 이들 염증성 장 질환은 환경적 요인, 가족력, 흡연력 등이 영향을 미치지만 그 중에서도 식이 섭취와 관련이 매우 높음. 특히 지방과 당이 많은 식품의 섭취, 동물성 지방과 단백질의 섭취가 높아지면 염증성 장 질환이 유발된다고 알려져 있음.
- 염증성 장 질환 이외에도 과민성 장 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)은 삶의 질을 좌우하는 주요한 생활 습관 관련 질환으로 알려져 있음. 과민성 장 증후군은 뇌신경과의 관련성이 매우 높다고 알려져 있으나 최근에는 장 내의 낮은 염증성 상태도 과민성 장 증후군의 발병에 관련이 있다고 보고되고 있어 염증성 장 질환과의 관련성이 점차 높아지고 있음.
- 과민성 장 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)은 복통 혹은 복부불쾌감, 배변 후 증상의 완화, 배변 빈도 혹은 대변의 형태의 변화 등 특징적인 증상들이 만성적으로 반복되는 기능성 위장관 질환으로 유병률은 전체 6.6% (남자 7.1%, 여자 6%)(그림 1), 삶의 질 수준은 0.889로 치질(0.925), 아토피피부염(0.924)보다 낮은 수치임



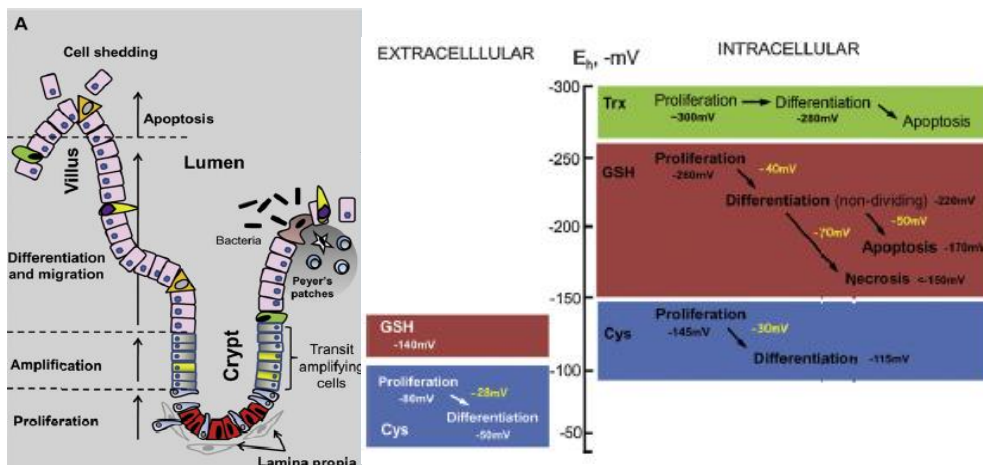
<그림 1. 삶의 질 평가도구인 EQ-5D에 의한 질환에 따른 삶의 질 수준 평가, ref: 2>



<그림 2. 과민성 장 증후군 유병률, ref: 2>

나. 장의 독특한 환경과 항산화/항염증 시스템의 중요성

- 장관의 상피는 장관 내 산화에 의하여 유도된 산화적 손상을 당하기 쉬움. 장관 점막의 보존은 GSH/GSSG와 Cys/CySS의 장관 내 산화환원 상태에 의하여 유지되고, 장관 내 산화환원 상태는 영양분의 흡수, 점막의 유동성, 장관 내 미생물 균총에도 영향을 줌.
- 장관 상피층은 crypt부터 villus로 이동하며 세포 분화와 성숙, 사멸의 turn-over 과정이 4~5일 간격으로 매우 빠르게 일어나는 가장 증식적인 조직 중 하나임. 이런 turn-over 과정은 Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch, BMP pathway뿐만 아니라 각 위치의 산화적 환경(세포 내 GSH/GSSG의 전위는 증식 때에 -260mV와 -240mV 사이에서, 분화 때에 -220에서 200mV, 아포토시스 때에 -170에서 -150mV 사이에서 변화함)에 의해 매우 미세하게 조절됨. 장 점막의 산화적 스트레스는 이러한 독특한 산화환원전위 조절의 파괴로부터 일어나며, 산화환원 신호전달의 변화는 염증, 암과 같은 장관의 퇴화적 질병의 발달에 기여할 수 있음(그림 3).



<그림 3. 장관상피세포의 life-cycle과 산화환원전위, ref: 3>

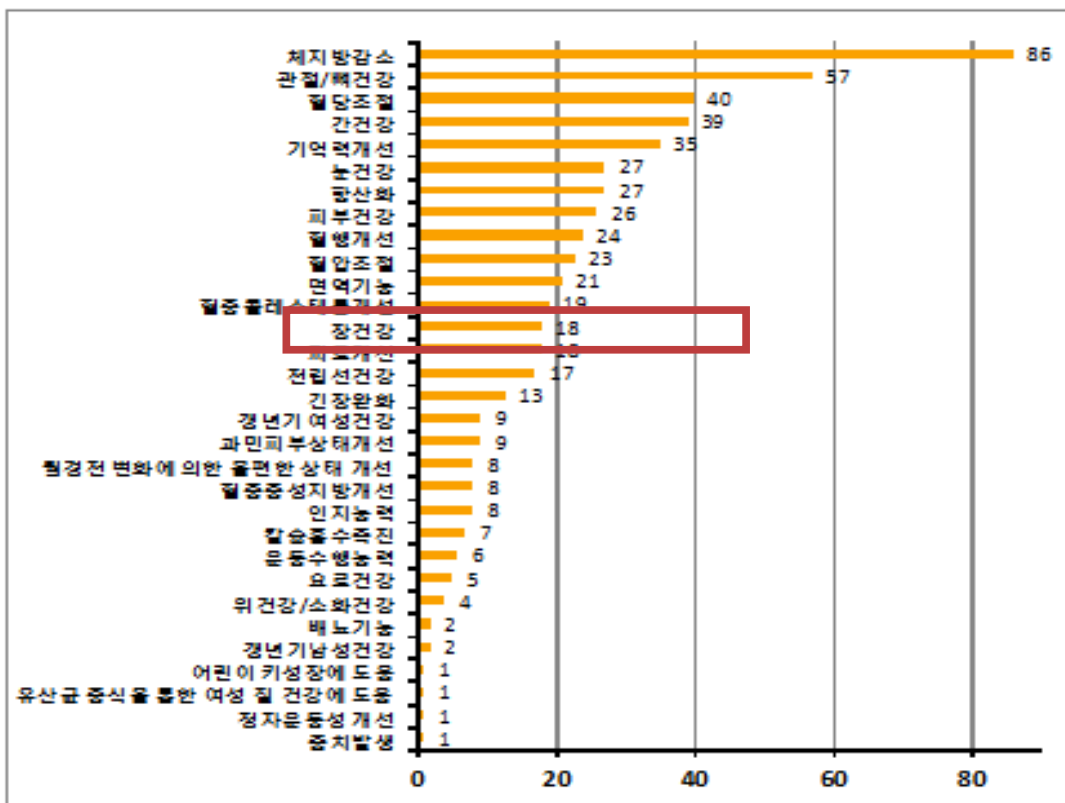
- GSH/GSSG와 Cys/CySS, thioredoxin/thioredoxin disulfide (Trx/TrxSS)는 세포 내 주요 산화환원 시스템이고, 이것들은 각각 효소 반응이나 대사 과정의 조절에서 산화환원을 조절하는 기능을 함. 세포 내 소기관인 미토콘드리아, 핵, ER, 세포질에서의 산화환원 신호전달은 각각 특이적으로 그 전위값이 다르며, 각 소기관의 서로 다른 산화환원 전위의 차이는 그 기관의 특이적인 생물학적 또는 대사적 기능에 적합하게 되어 있음.
  
- 과도한 염증적 세포-유도적 ROS의 생성과 조직 산화적 스트레스는 장기 장관 염증의 개시와 발달에서 핵심에 있음. 조직 GSSG 증가와 GSH 합성 감소는 IBD 환자에서 점막 염증의 심각성이나 점막 GSH 함량 감쇠와 관련되어 있음.
  
- 또한 장의 상피부위의 기능은 장 환경으로 들어오는 pathogen, toxins, 항원 등이 순환계로 들어오는 것을 막아주는 기능을 하고 있음. 이러한 기능을 하는 tight junction은 장의 물리적 장벽을 결정짓는 주요한 부분으로서 장관 상피세포의 lateral membrane의 apical 부위에 위치하고 있는 multipleprotein complex임. Tight junction을 통해 여러 전해질, 이온, 수분들이 통과할 수 있도록 조절하고 있음. 이 부위에는 4개의 integral transmembrane protein (occludin, claudins, junctional adhesion molecule, tricellulin)이 있다고 알려져 있으며 이들 단백질은 intracellular plaque protein인 zonula occludens (ZO), claudin 등의 단백질과 연결되어 있음 (4).

## 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 2-1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### 1. 기술현황

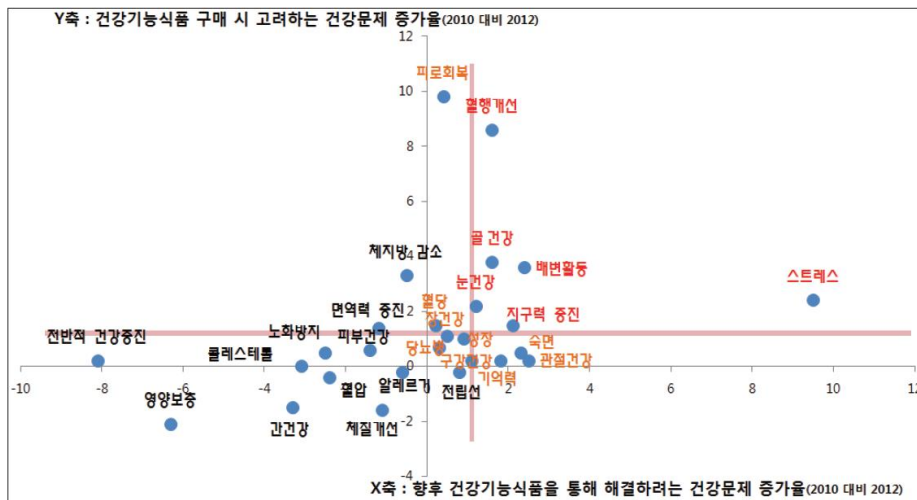
- 최근 우리나라에서는 평균수명의 연장, 초고령사회의 진입, 생활수준의 향상 등에 따라 삶의 질에 대한 의식이 높아지면서 웰빙(well-being)이나 로하스(LOHAS, lifestyles of health and sustainability) 등과 같은 건강 지향적 사회 트렌드가 형성되었음.
- 이와 더불어 식생활의 서구화에 따른 생활습관병의 증가로 건강기능식품에 대한 관심과 그 수요가 늘어나고 있는 것이 현실이며, 이에 따라 국내 건강기능식품 개발 또한 2004년 건강기능식품에 관한 법률의 시행 이후 꾸준히 증가하고 있음.
- 최근 식약처의 자료에 따르면 2015년 12월 기준으로 기능성 종류는 31종이며, 개별인정원료는 243종으로서 장건강 관련 기능성은 중간순위를 차지하고 있음.



- 장건강 건강기능식품 기능성원료의 종류는 아래의 표와 같으며 대부분의 원료가 난소화성 올리고당, 수용성식이섬유, 유산균 임.

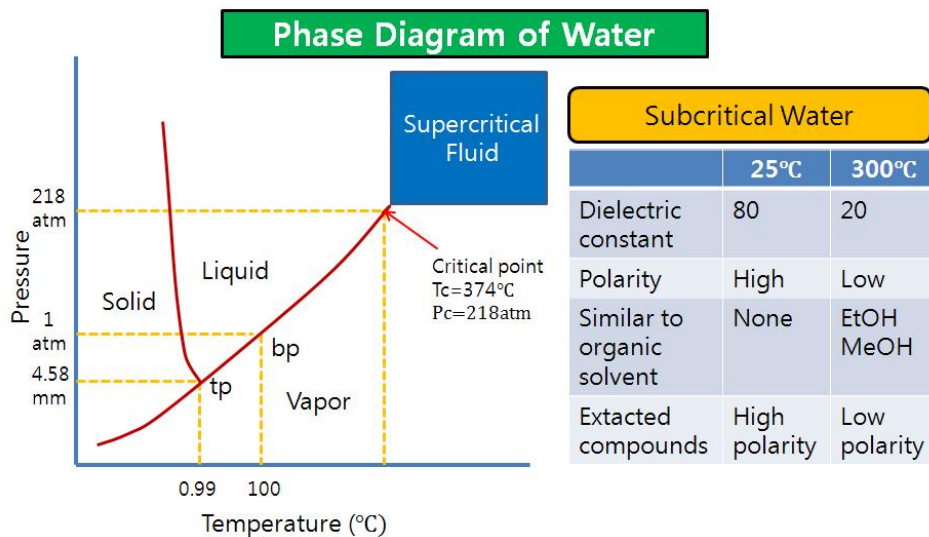
기 능 성		기 능 성 원 료	건수
장 건강	장내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움	갈락토올리고당, 구아검가수분해물, 대두올리고당, 라피노스, 락투로스파우더, 밀전분유래 난소화성말토덱스트린, 이소말토올리고당, 자일로올리고당, 커피만노올리고당 분말, 프락토올리고당	10
	면역을 조절하여 장 건강에 도움	프로바이오틱스(VSL#3)	1
	배변활동 원활에 도움	대두올리고당, 라피노스, 목이버섯, 무화과페이스트, 분말한천, 이소말토올리고당, 자일로올리고당, 커피만노올리고당, 프락토올리고당	9

- 천연물을 이용한 장건강 기능성원료의 개발은 오메가-3 지방산, 플라보노이드 등의 성분을 중심으로 항산화/항염증 기전 기반한 in vitro 및 동물 대상 연구들이 진행되고 있으나 인체적용시험까지 수행하여 소재화된 기능성 원료는 현재까지 없는 것으로 파악됨.
- 반면 “건강기능식품 산업동향 보고서(농업기술실용화재단, 2013.12)”에 의하면 건강기능식품 기능성 원료로 개발되는 소재 중 기술사업화가 유망한 분야 중 하나로 장건강이 언급되고 있음. (※ 기술사업화의 경우 연구개발이나 기술이전처럼 기술공급자와 기술수요자 간의 관계보다는 소비자들의 니즈에 영향을 많이 받으므로 소비자들의 현재 및 미래 니즈의 변화를 중심으로 매트릭스 분석한 결과임)



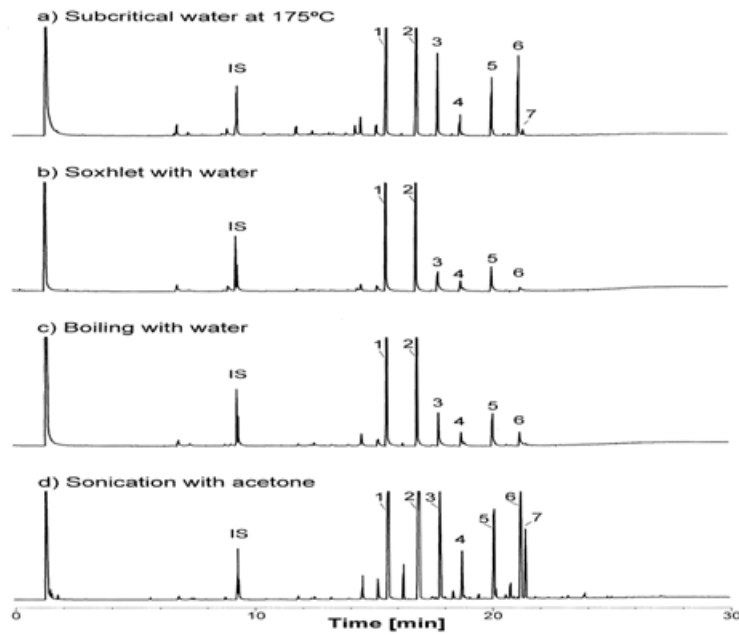
<사업화 유망 분야 매트릭스 분석>

- 따라서 전통적인 스토리를 가지고 있는 천연물 소재를 이용하여 장건강 관련 기능성 원료의 개발은 건강기능식품으로서의 소비자 니즈를 손쉽게 충족시켜줄 수 있는 유망한 분야라고 판단됨.
- 식품산업에서 압력을 수반하는 고압 또는 아임계 추출은 상전이(phase transition)를 수반함으로써 물질전달속도를 증가시켜 세포 침투율 뿐만 아니라, 2차 대사물질의 확산을 증진시키므로 천연 원료로부터 플라보노이드 같은 유용성분의 추출에 활용할 수 있음. 포도 부산물로부터 안토시아닌 같은 생리활성물질을 추출할 경우 열수추출(70°C, 1시간)에 비하여 추출수율 증가(2배)로 효율성 증가는 물론 추출물 중에 함유된 2차 대사물질의 항산화 활성도가 높은 것으로 보고됨.
- 아임계수(subcritical water)는 압력 1~22 MPa, 온도 100~374°C 조건에 존재하는 물로서 25°C의 물이 유리전이상수가 80임에 비하여, 200 및 300°C에서의 아임계수는 각각 35 및 20을 나타내는데, 이것은 그림 1에서 보는 바와 같이 에틸알코올이나 메틸알코올과 같은 유기용매와 같은 특성을 보여 추출효율을 높일 수 있음. 특히 이온생성은 25°C에서  $10^{-14}$ , 아임계수 상태에서는  $10^{-11}$ 로 변하게 되는 것인데, 이는 물이 고온에서 해리가 용이함을 뜻함. (그림 4)



<그림 4. 아임계수의 상도표 및 특성>





<그림 5. 추출방법에 따른 KAVA추출물의 GC\_FID 크로마토그램>

- 이러한 아임계수의 특성을 이용한 아임계 추출은 종래의 유기용매 추출이 갖는 낮은 추출율, 긴 추출시간, 제품에 잔존하는 독성유기물 등과 같은 문제점을 해결하기 위한 대체기술로 활용할 수 있음. 그림. 2는 태평양섬에 자생하는 기능성 음료의 원료로 사용되는 kava (*Piper methylsticum*) 뿌리의 추출물의 추출방법에 따른 추출 시 추출물의 GC-FID 크로마토그램을, 표. 1은 추출방법 및 조건에 따른 총 kava lactone 수율을 나타낸 것임. Soxlet 및 가열추출은 아임계 추출방법 보다 50% 이하의 추출수율을 보였으며, 아세톤을 용매로 초음파 추출(18시간)의 추출물 수율을 기준으로 kava lactone의 70% 및 80% 이상의 추출율을 얻기 위한 아임계 추출조건은 각각 100°C에서 120분 이상 및 175°C에서 20분 이상인 것으로 확인할 수 있어, 아임계 추출조건에서 추출온도와 추출시간은 상호 비례적인 관계가 성립함을 알 수 있음.

표 1. 추출방법 및 조건에 따른 총 kava lactone 수율

K a v a lactones (KL)	추출조건						
	아임계수, 100°C		아임계수, 175°C		Soxhlet, 물	가열, 물	초음파, 아세톤
	60분	120분	10분	20분	6시간	2시간	18시간
총 KL (mg/g)	81±5	90±6	80±13	104±10	48±6	57±16	125±6

- 한편, 탄소수 8~18에 해당하는 포화지방산의 물에 대한 용해도를 증진시키기 위하여 60~

230℃ 및 5~15 MPa의 아임계 조건에서 caprylic acid, capric acid lauric acid, myristic acid, palmitic acid 및 stearic acid 등의 지방산의 용해도를 측정된 결과, 압력은 용해도에 큰 영향을 주지 않았으나, 지방산의 용해도는 온도가 증가함에 따라서 높았다. 특히, 160℃ 이상에서는 물분율 용해도의 대수는 각 지방산의 절대온도의 역수에 비례적인 상관관계가 성립됨을 확인하였다. 이러한 결과는 용해된 지방산 분자를 함유하는 물은 고온에서 일정한 용액을 형성함을 의미함.

- 생리활성 소재를 추출하기 위한 방법으로 아임계 추출공정이 점차적으로 활용되고 있는데, 최적 추출조건은 대상 원료에 따라서 많은 차이를 보인다. 적포도 껍질로부터 안토시아닌을 생산하는 아임계 추출온도는 100~110℃가 적절하였으며, 아마인(flaxseed)으로부터 페놀화합물인 lignan을 추출하는 아임계 조건은 160℃, 5.2 MPa이 최대 추출율을 보였다. 아임계 추출에 의하여 cow cockle seed로부터 사포닌을 추출하기 위하여 물과 에탄올 및 메탄올 용매의 농도(50, 80, 100%)에 따른 추출조건은 seed의 농도 12%에서 125℃가 적합하였으며, 수용성 추출물중의 사포닌성분의 조성은 수용성 에탄올과 메탄올 추출물과 차이를 보였다.
- 이외에 기능성 보리음료, 열대 약용식물로부터 생리활성 물질생산, canola meal로부터 항산화 물질추출 등과 같은 적용 사례에 비추어 볼 때 아임계 추출기술은 식품산업에서 재래적인 추출공정을 대체할 수 있는 효율적인 기술로 발전할 가능성이 크다고 볼 수 있음.

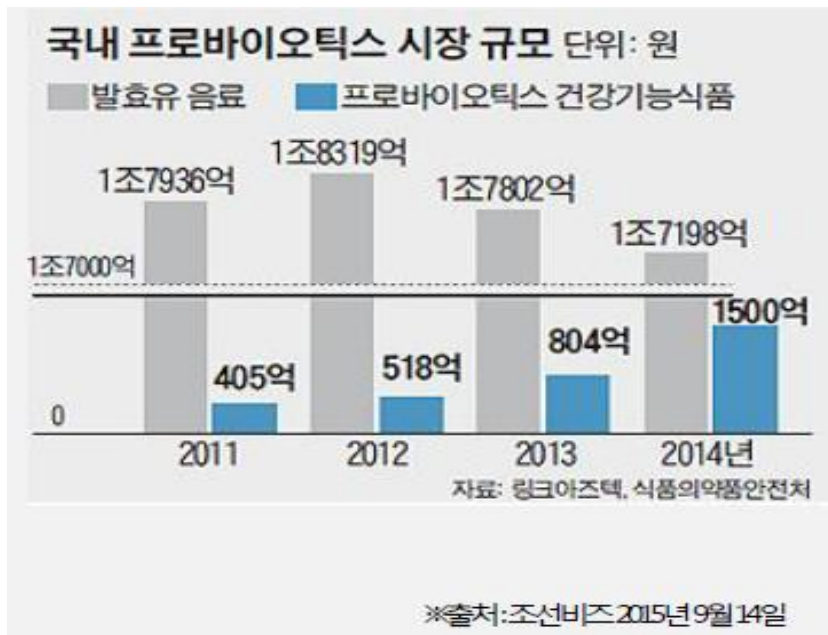
## 2. 시장현황

### ▪ 장 건강 치료제 현황

장 건강과 관련된 질병은 크게 (1)염증성 장질환, (2)과민성 대장증후군, (3)변비 등으로 분류되며 증상에 따라 다양한 의약품이 치료제로 사용되고 있음. (예 - 아래 표 :과민성 대장증후군, 출처: 메디칼옵저버,2014.07.30.). 특히 장의 근본적인 면역 개선 및 치료를 위해 프로바이오틱스 시장이 급격히 성장하는 추세임.

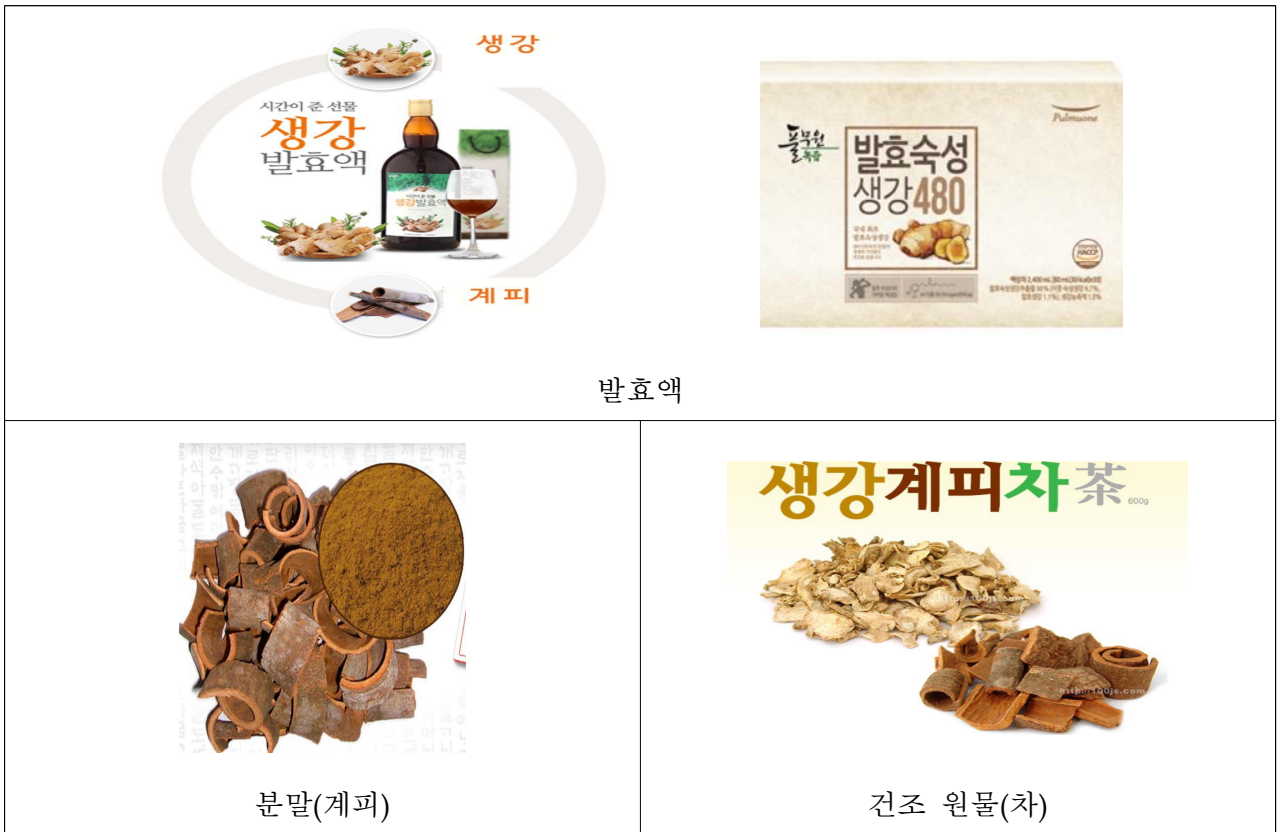
표. 과민성대장증후군의 잠재적 치료제		
분류	기전	대표 약제
진경제	무스카린성 수용체와 평활근의 칼슘채널 길항제	시메트로피움 브로마이드, 디사이클로마인, 하이오신부틸브로마이드, 메베베린, 오티로늄 브로마이드, 페퍼민트오일, 피나베움 브로마이드, 트리메부틴 말리에이트
지사제	뮤-이편수용체 효현제	로페라미드
삼투성하제	삼투성, 자극제	비사코딜, 락툴로오즈, 구연산마그네슘, 황산마그네슘, 폴리에틸렌 글리콜
부피형성하제	수화작용을 통한 대변을 묽게 팽창시키는 작용	메칠셀룰로오즈, 감분초, 일기울
수용체 표적 신약	5-HT 길항제와 효현제	알로세트론, 실란세트론, 나로나프라이드, 프루카로프라이드, 라모세트론, 테기세로드
	염화물채널 활성제	루비프로스톤
	GC-C 효현제	리나몰로타이드
	NK1 수용체 길항제	에즐로피란트, TAK637
	키파-이편수용체 효현제	아시마돌린
	알파2-교감신경 수용체 효현제	AGN203818, 클로니딘, 솔라베그론
	CCK1 수용체 길항제	록시글루타이드
소마토스타틴 수용체 효현제	옥트레오티이드	
신경정신약	삼환계항우울제	아미트립릴린, 데시프라민, 독세핀, 이미프라민, 트라마프라민
	SSRIs	시탈로프라, 플루옥세틴, 파록세틴, 벤라팍신
	정신과적치료	생체자기제어, 인지행동치료, 역동적 정신치료, 최면요법, 이완훈련
프로바이오틱스	장내미생물군 균형유지	VSL-3, 젯산균, 비피더스균
대변이식 (Fecal transplantation)	활성 미생물 추가	비위관삽입, 관장 또는 대장내시경 이용
항염제	비만세포안정제, PAR-2 억제제, TRPV 수용체 1, 4형 차단제	캡사제핀, GB88, 케토티펜, RN1734
항생제	장내 미생물군 억제	네오마이신, 리팍시민
기타	항중증안화성물질	멜라토닌
	담즙산결합수지	콜레스티라민
	염증 감소	디옥시메타이드
음식	면역 강화	참다래
보완대체의학(CAMs) 치료		침술요법, 아로마요법, 생강, 허브, 홀리스틱의학, 동종요법, 마사지, 반사요법

- 장 건강 관련 건강기능식품 시장은 프로바이오틱스 제품으로 집중되어 있음. 2014년 프로바이오틱스의 시장규모는 약 1500억원으로 3년 동안 300% 이상의 성장을 했으며, 이는 장 건강과 면역력 증진에 대한 소비자의 인식이 증가한 이유로 분석됨.
- 최근에는 김치/장/젓갈 등 국내 전통 식품에서 추출한 ‘한국형 유산균’을 이용한 제품이 대세를 이루고 있음. (ex : CJ제일제당 / 프로바이오틱 등)



▪ 계피, '생강'을 사용한 장 건강 제품 사례

계피와 생강을 혼합한 일반식품 제품 사례는 있으나 장건강 기능을 강조하는 건강기능식품 제품은 없음. 그러나 동의보감을 비롯한 전통 의학서적과 민간의 구전을 통하여 계피와 생강이 장 건강에 좋다고 알려져 있어 소비자들이 다양한 형태로 혼합하여 음용하고 있음.



3. 지식재산권현황

- 현재까지 계피와 생강 복합물을 활용한 장관면역, 염증성 장질환, 변비, 대장염 및 배설에 관한 특허는 없는 것으로 조사되었음.
- **장관면역** 관련 국내특허는 총 2,738건 이며, 이중 생강 관련특허는 128건, 계피 관련특허는 84건이었으며, 주요 관련 특허로는 “당귀, 천궁, 갈근, 작약, 숙지황, 황기, 홍삼, 건강, 감초, 계피 및 대추로 이루어진 한방혼합 침출차 조성물 및 그 제조방법 (등록번호 10-1166883)”으로 다양한 한방소재를 단순 혼합한 침출차 조성물임
- **염증성장질환** 관련 국내특허는 총 7,155건 이며, 이중 생강 관련특허는 99건, 계피 관련특허는 103건이었으며, 주요 관련 특허로는 “배 및 생강의 혼합 발효물을 포함하는 면역 증

강용 조성물(출원번호 10-2015-0096237)”로 면역증강을 통해 염증성장질환, 아토피성 질환, 염증질환 개선이 가능한 특허기술과 “계피 추출물을 유효성분으로 함유하는 장내 균총 개선 및 면역기능 증진용 조성물(등록번호 10-0842053)”로 장내 유산균증식 및 장관면역활성을 나타내는 계피조성물에 관한 특허기술로 본 연구팀이 보유하고 있는 기술 특허임

- **변비** 관련 국내특허는 총 3,901건이며, 이중 생강 관련특허는 665건이며, 계피 관련특허는 284건이었으며, 주요 관련 특허로는 “변비 치료용 조성물(등록번호 10-0435825)”로 회장 수축운동 촉진 효과와 장의 연동 운동 촉진 효과를 통한 변비 개선제 특허임.
- **대장염** 관련 국내특허는 총 5,216건이며, 이중 생강 관련특허는 67건이며, 계피관련 특허는 75건이었으며, 주요 관련 특허로는 “한약재 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염증용 식품 및 약학 조성물(등록번호 10-1337389)”로 생강을 포함한 염증예방용 식품 조성물 특허임
- 본 연구에서는 항염증 작용이 우수한 생강추출물과 장내유산균 증식 및 장관면역활성이 우수한 계피추출물 복합물의 항염증 시너지 효과와 장내 유산균 증식 및 면역활성을 통해 대장염 개선 및 염증성 장질환 개선 조성물 지식재산권을 확보하고자 함

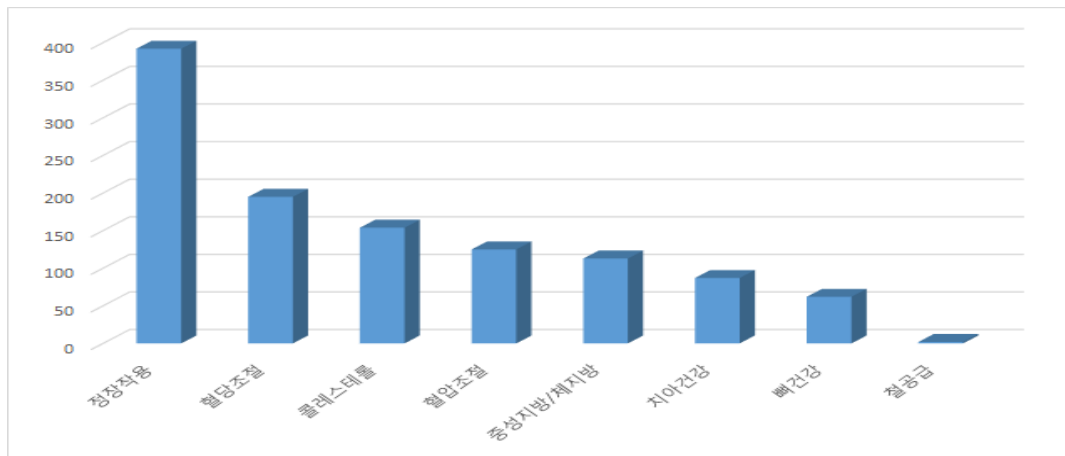
(4) 표준화현황

- **생강**은 식품의 기준규격에 이명으로 건강으로 되어 있으며, 학명은 *Zingiber officinale Roscoe*, 식품으로 사용가능한 부위는 뿌리줄기로 되어 있음
- **계피**는 식품의 기준규격에 학명은 *Cinnamomum aromaticum*, 식품으로 사용가능한 부위는 계지(어린가지)와 육계(줄기껍질)로 되어 있음
- **계피**는 대한약전에서는 육계로 명칭을 변경하여 사용하고 있으며, 지표성분 기준규격은 cinnamic acid 함량 0.03% 으로 설정하고 있음

## 2-2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### 1. 기술현황

- 해외에서는 일본을 중심으로 생활습관병 중의 하나로 간주되고 있는 장건강 기능성소재에 관한 관심이 매우 높음. 2014년도 기준 일본 특정보건용식품으로 인정된 품목 1,130건 중 장건강 기능성으로 인정받은 품목은 392품목으로 가장 많은 비율을 차지하고 있으나 이들 원료 역시 올리고당, 유산균류, 식이섬유류가 전부인 상황임



- Pubmed에서 키워드 ‘gastrointestinal health’로 최근 1년 출판된 문헌을 검색한 결과 3816 개 문헌이 검색되었음. 이들 문헌 중 식품 및 식품소재를 이용하여 장건강을 연구한 논문은 54개임.
- 54건의 논문 중 유제품관련 논문 20건, 유산균 11건, 불포화지방산 6건, 비타민 D 5건, 곡류 4건, 양배추 2건, 버섯 2건, 해초류 2건, 두류 2건으로 유제품 및 유산균의 비율이 57.4%로 가장 높았음.
- 이들 문헌을 연구유형별로 분류하면 in vitro 시험 14건, 동물시험 13건, 임상시험 27건으로 인체에서의 효능을 검증하는 연구는 많으나 그 대부분이 유제품 및 유산균이며 기전을 규명하기 위한 연구는 그리 활발하지 않은 것으로 판단됨.
- 국내 뿐 아니라 국외에서도 천연물을 이용한 장건강 기능성원료의 개발은 오메가-3 지방산, 플라보노이드 등의 성분을 중심으로 항산화/항염증 기전 기반한 in vitro 및 동물연구들이 진행되고 있으나 인체적용시험까지 수행하여 소재화된 기능성 원료는 현재까지 없는 것으로 판단됨.

## 2. 시장현황

- 2009년 세계 장 건강식품 시장은 17조였으나 2013년에는 22조로 25% 가량 증가함. (표 2)
- 시장의 93% 이상을 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 - 유산균 제품이 선점하고 있으며, 발효균은 6% 이내임.(그림 6)

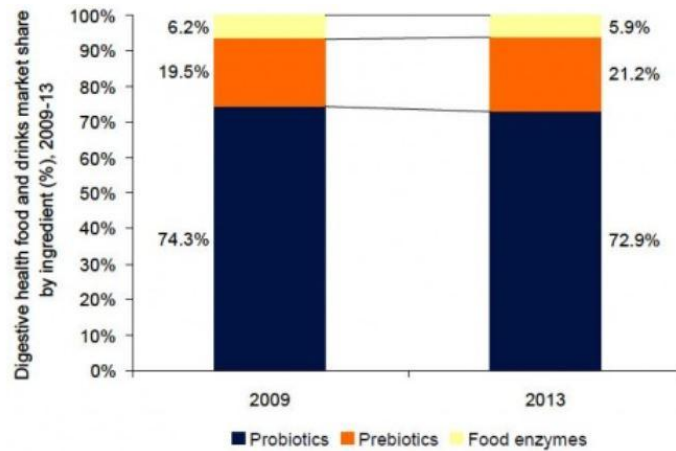
**Table 4: Value of global digestive health food and drinks market by region (\$bn), 2009-13**

Region	2009	2010	2011	2012	2013	CAGR 2009-13
Asia-Pacific	11.3	12.0	12.8	13.6	14.5	6.3%
Americas	2.6	2.8	2.9	3.0	3.3	6.6%
Europe	2.5	2.7	3.0	3.1	3.3	7.1%
Middle East and Africa	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	12.6%
<b>Total</b>	<b>16.6</b>	<b>17.7</b>	<b>18.9</b>	<b>20.0</b>	<b>21.4</b>	<b>6.5%</b>

Source: Business Insights

BUSINESS INSIGHTS

<표 2. 전 세계 장건강 식품 및 음료 시장 규모>



<그림 6. 장 건강 식품 점유율>

## 3. 지식재산권현황

- 계피와 생강을 활용한 장관면역증진, 장 트러블 개선과 같은 장건강 개선에 관련한 특허기술은 특허 검색되지 않음.
- 생강과 계피 복합물 해외특허는 15건이 검색되었으며, 향균, 체지방감소, 탈모, 부종, 당뇨 개선 조성물 특허임.
- 생강과 대장염 관련 해외 특허는 6건이 검색되었으며, 주요특허로는“ Nutritional supplements and methods of using same”특허로 강황, 생강, 서양고추냉이 조성물을 통한

관절염증 개선 특허임

- 계피와 항염증 관련 미국특허는 13건이 검색 되었으며, 항알러지, 항당뇨, 항곰팡이, 항암조성물 특허가 검색되었음

#### 4. 표준화현황

##### (가) Ginger extract

① JIAHERB : Shaanxi Jiahe Phytochem Co., Ltd

- Name : **Ginger Extract**
- Specification : **5.0% 10.0% 40.0%Gingerols** (Test By HPLC)
- Efficacy: Digestive system

②Baoji AoSen Bio-Tech

- GMP Certified factory supply Water Soluble Ginger Extract Gingerol Powder Gingerols 1%-5%;

##### (나) Cinnamon extract (<http://www.best-dietary-supplements.com>)

- Active ingredient: **Cinnamaldehyde**
- Color : Brown to whit
- Specification : 5 %-30% ( Test method:HPLC/UV )
- Packaging : Aluminum foil packaging within 5 kg or 25 kg/ bucket

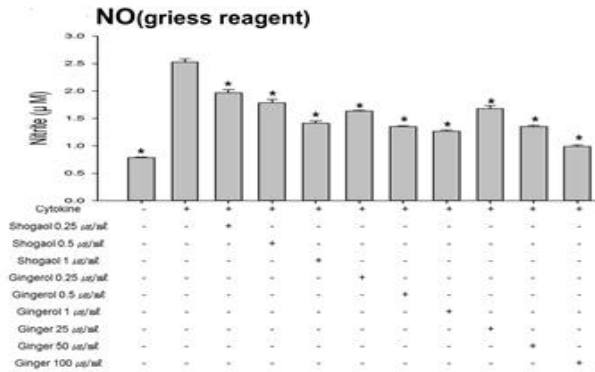
### 2-3. 선행연구 내용 및 결과

#### 1. 생강 관련 선행 연구 내용

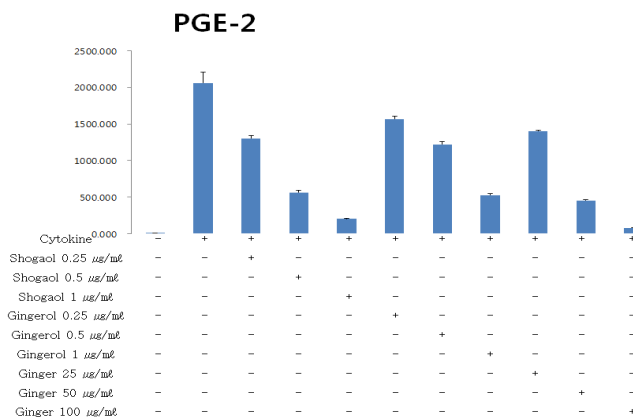
- 본 연구팀에서는 예로부터 소화기계에 효능이 있다고 알려진 생강을 에탄올로 추출한 추출물을 사용하였으며 생강추출물에 주요한 성분으로 알려진 6-gingerol과 6-shogaol을 함께 실험하여 비교한 바 있음.
- 염증유도효과는 NO, IL-8, IL-6, PGE2를 확인하여 비교하였으며 iNOS, COX-2의 mRNA 발현량도 확인하였음. 또한 NF- $\kappa$ B의 활성화에 미치는 영향도 함께 검증하였음.
- Proinflammatory cytokines cocktail인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , LPS를 proliferative 상태에 있는 Caco-2 cell line에 처리하였을 때 이용 염증성 스트레스 유도 물질인 NO와 PGE2의 생성이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있음. 생강추출물 및 6-shogaol, 6-gingerol을 처



리하였을 때 농도 의존적으로 증가된 NO 및 PGE2의 생성이 유의하게 감소되는 것을 확인할 수 있었음. NO의 생성은 PGE2의 생성에 비해 민감하게 증가되지는 않으나 유의적으로 cocktail에 의해 증가되고 생강추출물 및 주요 성분들인 6-shogaol, 6-gingerol에 의해 유의적으로 감소됨이 확인됨. (그림 7, 8)

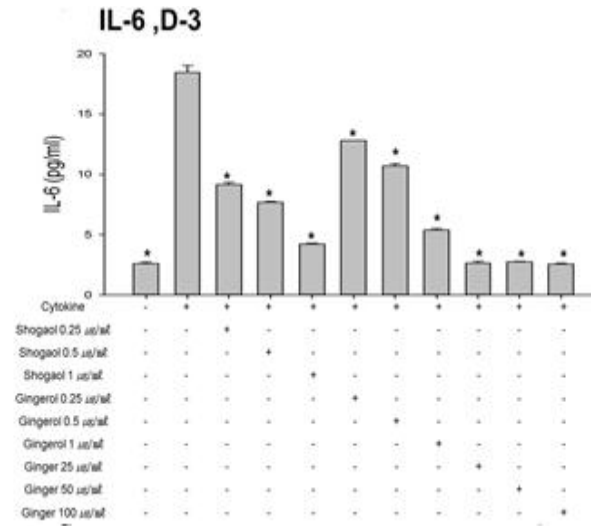


<그림 7. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 NO 생성 저해>

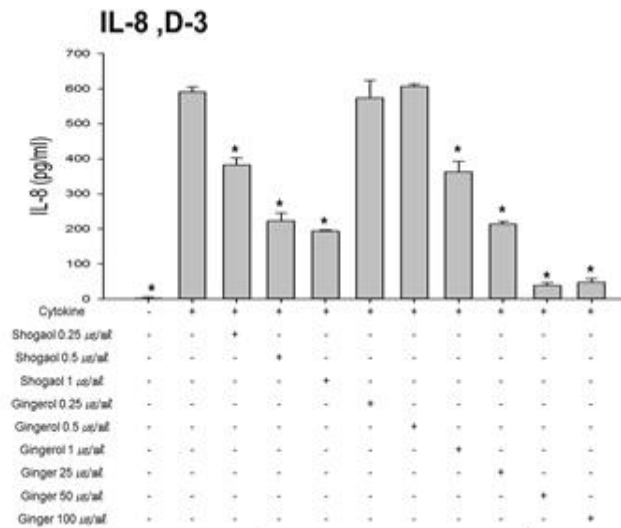


<그림 8. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 PGE-2 생성 저해>

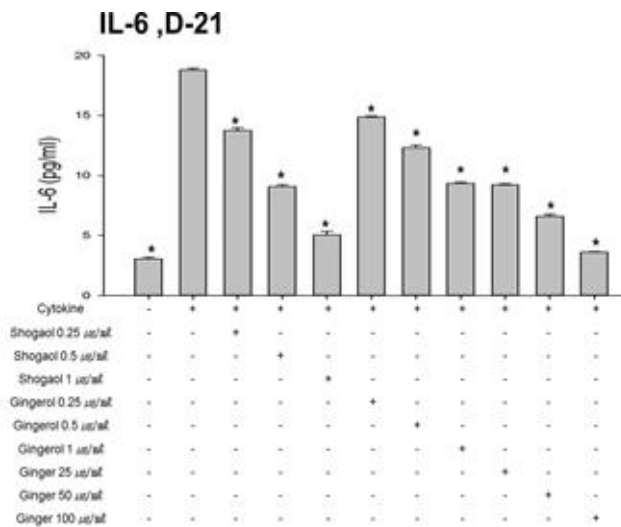
- 이 외에도 Caco-2 cell이 생성하는 염증성 chemokine인 IL-8과 염증성 사이토카인 IL-6의 생성량도 확인하였음. Proinflammatory cytokine cocktail에 의해 IL-6, IL-8의 수준이 유의하게 증가하였고 생강추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 모두 농도 의존적으로 IL-8, IL-6의 수준을 낮추었음.(그림9, 10) 이러한 효과는 proliferating 세포 뿐 아니라 분화가 완료된 21일 동안 배양한 세포에서도 동일하게 확인할 수 있었음.(그림11, 12)



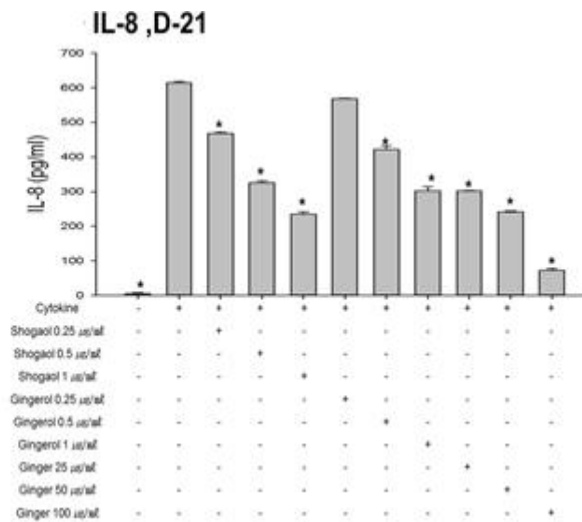
<그림 9. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 IL-6 저해>



<그림 10. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 IL-8 저해>

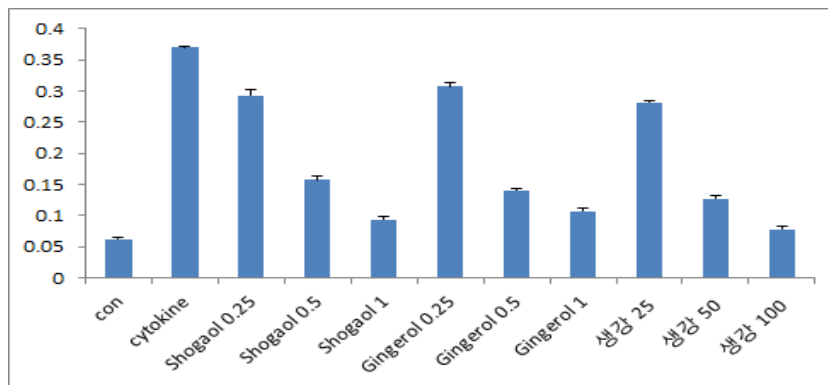


<그림 11. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 분화가 완료된 세포에서의 IL-6 저해>



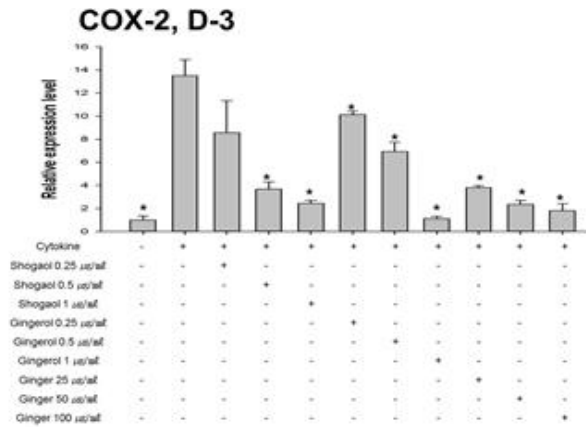
<그림 12. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 분화가 완료된 세포에서의 IL-8 저해>

- 이들 염증성 cytokine들은 전사인자인 NF-κB의 활성화에 의해 증가됨. 본 연구에서는 proliferating cell을 이용하여 cocktail 처리 시와 생강추출물 처리 시의 NF-κB 활성을 비교한 결과 염증성물질들의 증가와 같이 NF-κB의 활성이 증가하며 생강추출물들의 처리 시 활성이 유의하게 감소되는 것을 확인할 수 있었음.(그림 13)

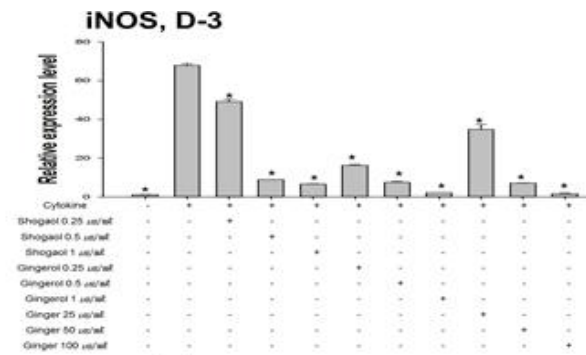


<그림 13. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 NF-κB 활성 저해 >

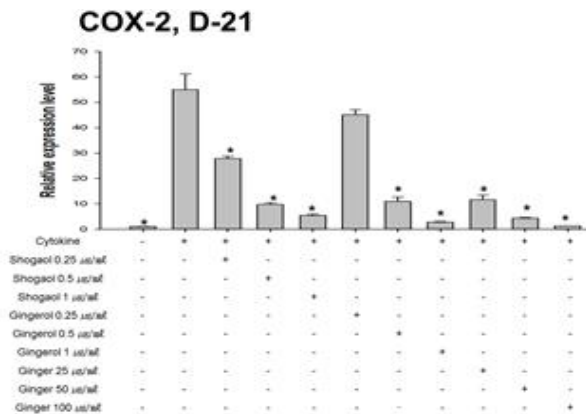
- 또한 NF-κB 활성화 통해 증가된 iNOS, COX-2 mRNA가 유의하게 감소되는 것 역시 real-time PCR을 통해 확인하였음.(그림14, 15, 16)



<그림 14. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 COX-2 mRNA 생정 저해>



<그림 15. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 iNOS mRNA 생정 저해>

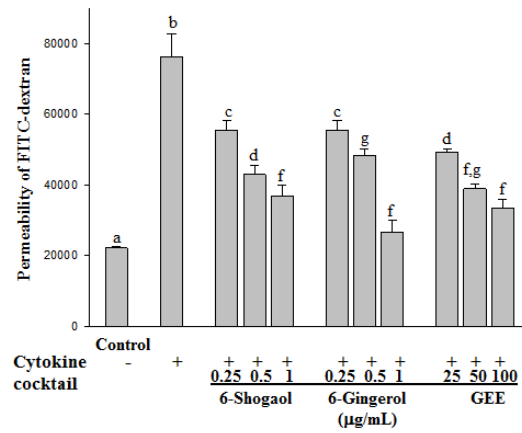


<그림16. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 분화가 완료된

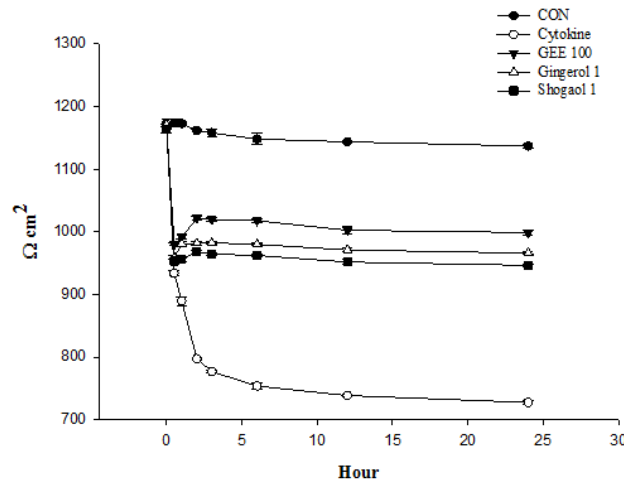
세포에서의 COX-2 mRNA 생정 저해>

- 생강의 염증억제 기전에 기반하여 tight junction barrier 기능에도 좋은 영향을 줄 수 있음이 확인되었음.(그림17)
- 생강추출물을 미리 처리한 Caco-2 cell line에 염증성 사이토카인들을 처리하면 염증반응에 의

해 벌어진 세포 간극이 생강추출물에 의해 보호되는 결과가 본 연구팀 연구 내용을 통해 확인된 바 있음.(그림18)



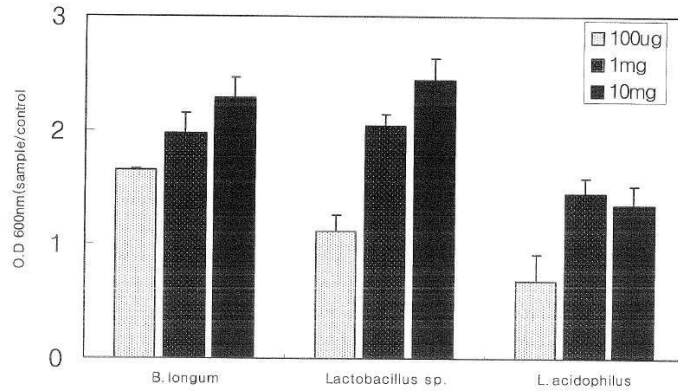
<그림 17. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 Tight junction permeability>



<그림 18. 생강 추출물, 6-shogaol, 6-gingerol 농도별 TEER 측정>

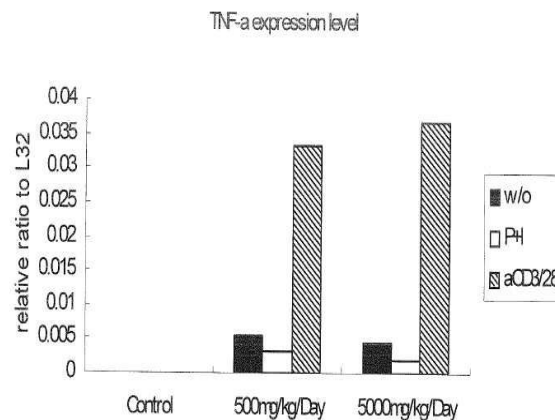
2. 계피 관련 선행 연구 내용 (특허 등록: 10-0842053)

- 계피열수추출물의 장내 유익균 증식 효과를 확인하여 대조군에 비해 최대 2.4배 *Lactobacillus sp.*의 생육을 촉진하였고, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* 균주도 계피추출물의 농도가 증가함에 따라 균주의 생육 활성비가 증가하였음.(그림 19)

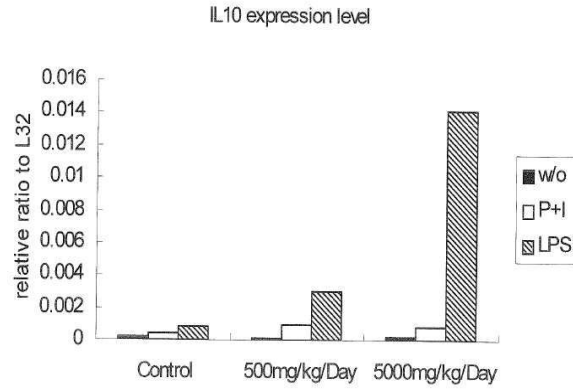


<그림19. 계피 추출물 농도별 장내유익균 생육활성>

- 계피추출물의 구강 투여 시 장관면역체계에 미치는 영향을 알아보기 위해 500mg/kg/day, 5000mg/kg/day를 10일 동안 경구투여한 후 마우스의 spleen, lymph node, mesentric lymph node, Lamina propria mononuclear cell을 분리하여 실험하였음.
- 마우스 장 림프절의 T-cell 및 B-cell이 분비하는 cytokine mRNA 발현양을 측정하기 위해 PMA와 Ionomycin을 이용한 세포자극과 CD3와 CD28, LPS를 이용한 면역반응을 유도한 후 mRNA의 발현양을 측정해 본 결과 TNF- $\alpha$ 는 CD3와 CD28 항체로 유도한 경우(그림20)가 IL-10은 LPS로 자극한 경우가 mRNA 발현이 급격히 늘어남을 확인하였음.(그림21)

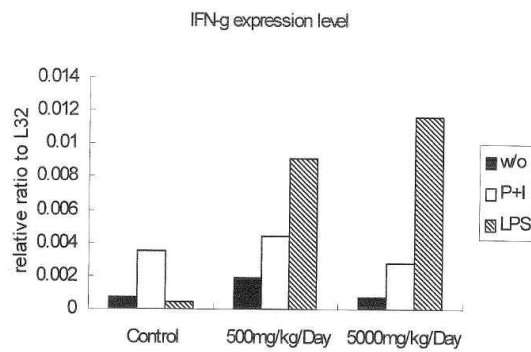


<그림 20. 처리물질에 따른 TNF- $\alpha$  발현량>

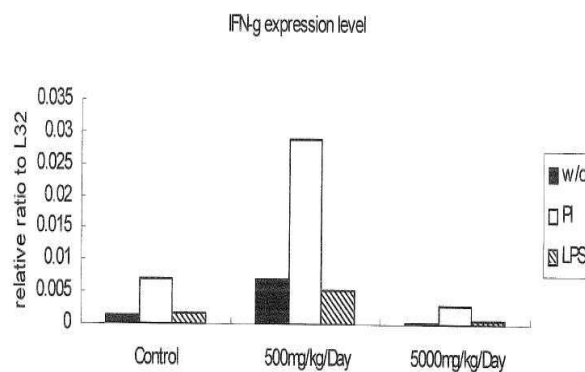


<그림 21. 처리물질에 따른 IL-10 발현량>

- 또한 IFN- $\gamma$ 는 자극에 관계없이 농도의존적으로 발현양이 증가하는 경향을 보였으며,(그림22) 장의 외피세포 바로 아래에 위치해 있는 Lamina propria mononuclear cell의 계피추출물에 대한 반응을 본 결과 PMA와 Ionomycin 자극에 대해 IFN- $\gamma$  발현이 급격히 증감함을 확인하였음.(그림23)

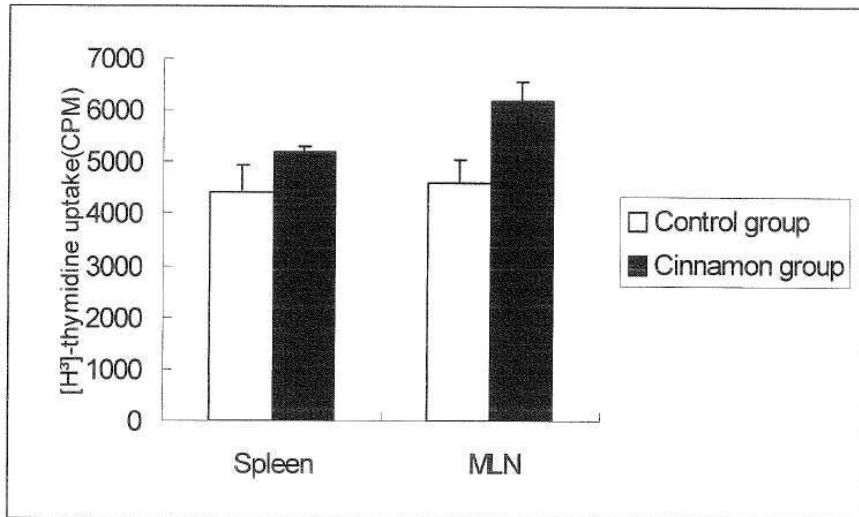


<그림 22. 처리물질에 따른 IFN- $\gamma$  발현량>



<그림 23. 계피 추출물 처리에 따른 IFN- $\gamma$  발현량>

- 계피추출물의 마우스의 비장과 장 림프절 T-cell 분열에 미치는 영향을 평가해 본 결과 PBS에 비해 계피추출물을 투여한 T-cell의 spleen과 장 림프절 모두에서 높은 분열 능력을 나타냄을 확인하였음.(그림 24)

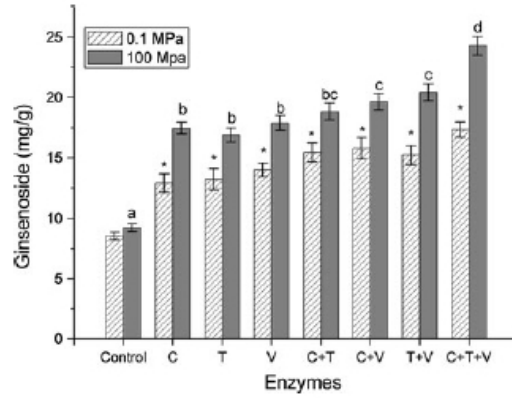


<그림 24. 계피 추출물 처리에 따른 spleen 장 림프절에서의 분열 능력>

### 3. 아임계 추출 기술 관련 선행 연구 내용

- 한국식품연구원 기관 주요사업으로 “식품고압기술개발사업”(2000-2014년, 5년)을 수행하여 고압 및 아임계 추출기술에 대한 기술축적(관련 논문 26편)과 관련 특허기술(10건)을 확보하고 있음.
- 고압조건(100 MPa, 50℃)에서 탄수화물 분해효소를 작용시켜 수삼분해물을 생산하는 연구를 수행하여 분해효소 종류에 따른 인삼 고유의 향미유지와 진세노사이드 함량이 증진된 인삼음료 제품생산 기술을 확보하였음.
- 고압조건(100 MPa, 50℃)에서 효소 3종(Cellulase, Amylase, Cellulase Mixture)을 수삼에 복합적으로 적용하여 획득한 인삼추출분해물의 진세노사이드 성분중 Re(2.79배), Rf(1.79배), Rc(1.4배), Rb2(1.46배), Rb3(3.18배), Rd(6배) 등이 증가한 결과를 보였음. 특히 인삼의 주요 성분인 Rg1과 Rb1이 3.73배 증가 하였고, metabolite인 Rh1, Rg2 및 Rg3 성분이 1.73배 증가하였음.(Biotechnol.Lett.35,1017-1022(2013)).(그림 25)





<그림 25. 압력에 따른 수삼 추출물의 진세노사이드 함량 >

- 고압분해 및 추출병행 기술로 유티단백질을 분해하여 분자량 1 kDa 이하의 저분자 단백질 펩타이드 음료 생산기술을 확보하였음.
- 고압분해를 통하여 녹용으로부터 chondroitin sulfate를 추출하는 연구에서 고압 범위는 75 또는 100 MPa, 고압분해 시간은 4시간, 고압분해 온도는 40℃ 범위가 최적 추출율을 보였음 (Biotech. Repo. 4, 14-20 (2014)).
- 고압분해 및 추출기술은 현재 기업체로 기술이전하여 대량생산을 위한 생산공장 설립을 추진하고 있으며, 상품화를 위한 제품다양화 연구도 추진중에 있음.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

#### 3-1 연구개발 방법

##### 1. 연구개발 추진전략 및 방법

- 생강 및 계피추출 복합물 제조(lab scale 10 kg 단위 및 pilot scale 1,000 kg 단위)
  - (주)메디앤바이오(주관기관)는 대량 생산 관련 개발 담당  
원재료 원산지 및 품질 관리  
대량생산을 위한 pilot scale 공정 표준화
  - 한국식품연구원(협동기관)은 생산 공정 표준화(lab scale)를 위한 추출 용매, 추출 조건 확립
  
- 생강 및 계피추출물 및 복합물의 기능성 확인 연구 및 최적 비율 도출
  - 서울과학기술대학교(협동기관)는 각 추출물의 장건강 기능성 소재 인증을 위한 확인 연구  
각 추출물의 염증 억제능 확인  
추출 용매 및 추출 조건별 추출물 항산화 능력 확인  
기능성 확인 연구를 통한 생강과 계피의 최적 비율 도출
  
- NMR, LC/MS를 이용한 지표물질(biomarker) 선정
  - (주)메디앤바이오(주관기관)와 서울과학기술대학교(협동기관)는 장건강 기능성 소재 개발 생산을 위한 지표물질을 NMR과 LC/MS를 이용하여 구조 규명
  
- 인체적용 시험용 시료 생산
  - (주)대호양행의 GMP 생산시설을 이용한 인체적용 시험용 시료 생산
  
- 표준화 된 원료의 건강기능식품 제형화
  - 제형의 안정성 및 다양화를 위해 초미세 분말화, 분말의 기능성 물질 안정성 테스트
  
- 유통기한 설정을 위한 가혹시험
  - 원료의 안정성 실험, 지표성분 경시변화 및 함량 실험, 유통 안정성, 미생물 검사, 관능 검사

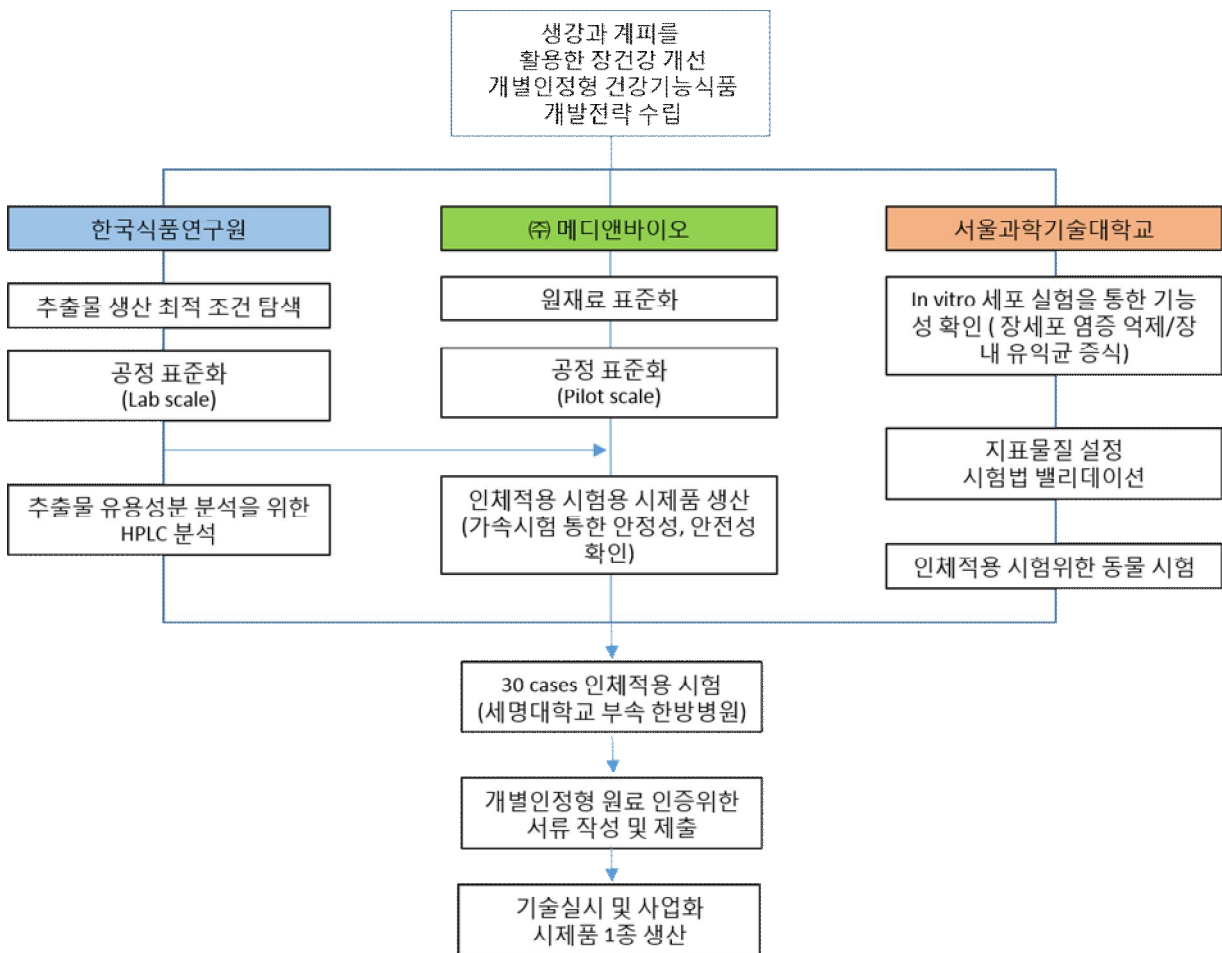
○ 인체적용시험

- GCP규정에 따른 30 cases 이상의 인체적용시험을 통해 장 건강 개선 및 면역 개선 가능성 및 안전성 검증

○ 개별인정 신청

- 식품의약품안전처에 관절건강 개선 기능성 원료 인증 신청

2. 연구개발 추진체계



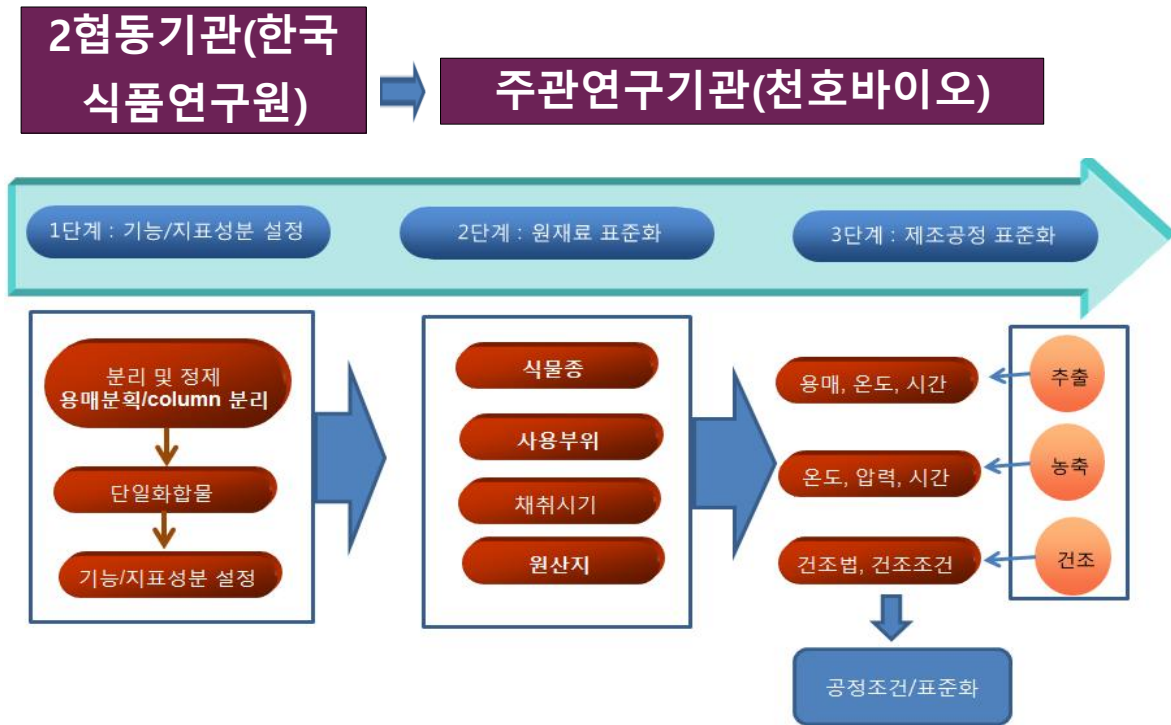
기관명	주요 담당 업무
(주) 메디앤바이오	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 문헌통한 관절건강 기능성 소재 정보 수집</li> <li>- Pilot scale 제조 공정 개발</li> <li>- 생산 공정 최적화 및 원료 경제성 확보</li> <li>- 원료 제형화</li> <li>- 인체적용 시험용 시험제품 생산</li> <li>- 원료 가속시험 통한 유통기한 설정</li> <li>- 인체 적용 시험 시행</li> <li>- 개별인정형 원료 인증 신청을 위한 서류 작성 및 제출</li> <li>- 사업화 위한 시제품 제작</li> </ul>
서울과학기술 대학료	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 계획 수립 및 자료 조사</li> <li>- 생강추출물, 계피추출물, 생강계피복합추출물의 장세포 염증 억제 확인</li> <li>- 생강추출물, 계피추출물, 생강계피복합추출물의 장내 유익균 증식능 확인</li> <li>- 동물 실험 : DSS유도 동물모델에서의 장건강 기능성 확인</li> </ul>
한국식품연구원	<p>생강 계피 복합물의 장건강 개선을 위한 최적 추출조건 확립(lab scale)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추출 용매, 추출 온도, 추출 시 압력, 추출 시간 별 수율</li> </ul>

- 본 연구는 장건강에 효과적이라 알려진 생강과 계피를 이용하여 장건강 기능성 소재를 개발하고자 함.
- 생강과 계피의 추출 최적 조건을 탐색하고, 복합 추출물 생산에 필요한 원재료의 최적 비율을 확인하며 대량 생산 공정의 표준화를 통해 안정적 원료 공급이 가능토록 하고자 함.
- 표준화된 공정으로 생산된 추출물의 효과 효능 및 그 작용 메커니즘을 규명하여 소재에 대한 과학적 근거를 확보하고자 함.
- 본 연구를 통하여 취득한 지적재산권을 활용한 마케팅 추진으로 원활한 시장 진입이 가능할 것으로 예상됨.

- 기관별 세부 추진 전략

가. 주관연구기관: (주)천호바이오

(1) 생강 및 계피의 대량생산 공정 조건설정 및 기준규격 설정



(가) 원료 검토

- 연구하고자하는 원료가 식품으로 사용가능한 원료인지, 제한적 사용원료인지, 식품에 사용할 수 있는 부위인지 원료검토 함

(나) 원재료 표준화

- 원재료의 표준화를 위해서는 식물종의 기원, 사용한 식물의 부위, 성장 및 재배조건(원산지 및 재배조건), 채취시기, 저장조건 등을 고려해야 함 .

(다) 제조공정 표준화

- 제조공정 표준화시 고려해야 할 사항은 추출법, 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 건조방법 등이 있음.

(라) 기준규격 설정

- 제품의 기준규격 항목은 성상, 기능/지표성분의 함량, 유해물질에 대한 것으로, 기준규격 설정방법은 표준화 과정의 결과를 각 항목별로 설정함.

(마) 원료 품목신고

- 일반식품으로 품목신고를 하여 우선 일반식품으로 사업화 할 수 있도록 소재화를 완료함

(2) 인체적용시험 수행

(가) 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 대상자 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, 연구대상자의 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]

① 선정기준

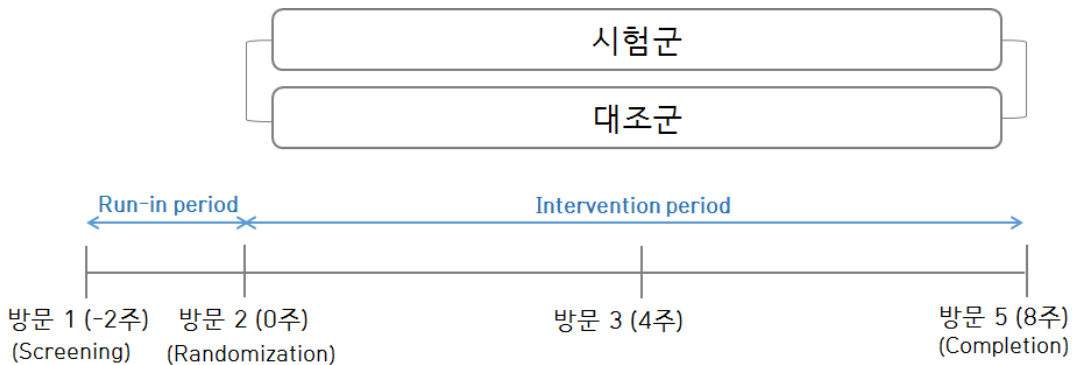
- 본 연구에 참여를 동의하고 서면 동의서에 서명한 자
- 만 20세 이상의 성인 남녀
- 설사형 과민성 대장증상이 있는 성인

② 제외기준

- 첫 방문 전 1주 이내에 과민성 대장증후군 치료제 복용자
- 첫 방문 전 4주 이내에 다음에 해당하는 자
  - 프로바이오틱스 제품을 지속적으로 섭취한 자
  - 항생제 또는 항염증제 복용자
- 다음 질환에 해당하는 자: 간기능 장애, 신기능 장애
- 임산부, 수유부, 알코올 중독자, 정신질환자
- 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자

[시험디자인]

무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교시험



자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 연구대상자 선정, 제외기준에 의해 적합여부를 판정 받음. 선정된 연구대상자는 2주 이상의 run-in period 이후 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정되고, 8주간 대조식품 또는 시험식품을 섭취하며, 0, 4, 8주에 방문하여 관련 바이오마커를 분석함.

[기능성 평가]

시험관, 동물시험 결과에 따라 다음 중 선별

구분	바이오마커
변의 굳기 및 형태	Bristol stool scale 등
소화관 운동능	대장통과시간(intestinal transit time)
	장관 운동능
임상 증상	배변 횟수, 변 굳기, 통변감 등
	설사 빈도, 설사 수준 등
점막 장벽 기능	불편감 수준: 복부통증, 복부 더부룩함 또는 복부팽만 등
	장 투과성 검사(intestinal permeability test)
	장내 세균 전위 평가(bacterial translocation)

	점막 장벽 온전성(mucosal barrier integrity)
	뮤신 분비 및 유전자 발현
과도한 염증반응	사이토카인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 등
조직 변화	조직학적 손상 정도 및 병변
세균 동정 및 세균수	유익균(비피더스균, 락토바실러스균 등), 유해균(병원성 대장균, 황색포도상구균 등)

[안전성 평가]

이상반응, 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 임상병리검사 (일반혈액검사 및 뇨 검사)

[식이 생활습관 조절]

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

[시험/대조식품 라벨링]

시험/대조식품은 다음의 내용이 기재된 동일한 라벨(고유코드는 대상자별로 상이함)을 제작하여 부착함.

- “인체적용시험용‘이라는 표시
- 제품명
- 의뢰사(또는 제조사)
- 제조번호
- 유효기간
- 보관방법
- 섭취방법
- 고유코드: 무작위 배정표에 따라 기록
- “인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음”이라는 표시

[이중맹검의 유지]

- 이중맹검 유지를 위하여 각 연구대상자별 배정군 내역은 연구책임자가 봉인된 상태로 관리하며, 중대한 이상반응 발생으로 부득이하게 열람이 필요한 경우를 제외하고는 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않음.
- 시험담당자는 선정된 연구대상자의 무작위배정번호와 일치하는 고유코드가 부착된 식품을 연구대상자에게 공급함.



- 인체적용시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여유분을 사용함으로써 맹검을 유지함.
- 연구대상자의 배정 및 식품의 배포와 관련된 정보는 연구 과정에 직접 참여하지 않는 제 3자가 관리함.

#### [무작위배정]

- 연구대상자 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 경우에 한하여, 방문 2(0주)에 연구대상자가 등록되는 순서대로 무작위 배정번호를 부여함.
- 무작위 배정번호에 따라 연구대상자가 어느 군에 배정될지는 연구와 독립된 제 3자에 의하여 시험 시작 전에 준비된 ‘computer generated random list’에 따름
- 무작위배정방법은 block randomization 방법에 의해 대조군:시험군 = 1:1로 배정하며 두 군간에 남녀의 비율은 최대한 동일하도록 배정함.
- 시험은 이중맹검으로 진행되므로 대상자가 어느 군에 배정되었는지 연구가 종료될 때까지 연구자와 연구대상자에게 공개되지 않음.

#### [방문별 주요 조사/관찰항목]

##### ① 방문 1 (스크리닝 방문)

- 서면동의서 획득
- ID 배부
- 인구학적 조사 (성별, 생년월일, 연령)
- 병력 조사
- 건강기능식품 및 의약품 섭취 조사
- 음주력 및 흡연력 조사
- 신체계측 (신장, 체중, BMI)
- 활력징후 (맥박, 혈압, 체온)
- 선정평가 (ROME III questionnaire, 임신반응검사 등)
- 식습관 평가 및 식사 교육
- 적합성 평가

##### ② 방문 2 (0주 방문)

- 무작위배정
- 건강기능식품 및 의약품 섭취 변화 조사
- 신체계측 (신장, 체중, BMI)
- 활력징후 (맥박, 혈압, 체온)
- 임상병리검사 (혈액, 뇨 검사)
- 기능성 평가

- 지침 준수여부 확인 및 식사지침 재교육
- 시험/대조식품 배부

③ 방문 3 (4주 방문)

- 건강기능식품 및 의약품 섭취 변화 조사
- 신체계측 (신장, 체중, BMI)
- 활력징후 (맥박, 혈압, 체온)
- 기능성 평가
- 지침 준수여부 확인 및 식사지침 재교육
- 반납식품 회수 및 순응도 확인
- 시험/대조식품 배부

④ 방문 4 (8주 방문)

- 건강기능식품 및 의약품 섭취 변화 조사
- 신체계측 (신장, 체중, BMI)
- 활력징후 (맥박, 혈압, 체온)
- 임상병리검사 (혈액, 뇨 검사)
- 기능성 평가
- 지침 준수여부 확인
- 반납식품 회수 및 순응도 확인

[이상반응 점검]

- 연구대상자로 하여금 이상반응 발생여부를 자발적으로 보고하도록 하며, 그 외에 인체적용시험기간 동안 시험담당자의 면담 및 문진 등 진료를 통하여 이상반응을 확인함.
- 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 시험식품과 관련하여 취해진 조치 및 시험식품과의 인과관계, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함됨.
- 발열, 자/타각적 증상, 임상병리학적 검사를 종합적으로 점검함

[순응도 확인]

방문 1(0주), 방문 2(4주)에 시험/대조식품의 배부상황에 대하여 기록하고, 방문 2(4주), 방문 3(8주)에 시험/대조식품의 잔량을 점검하여 순응도를 확인함.

순응도

= 실제 섭취한 시험/대조식품 개수 ÷ 섭취해야 할 시험/대조식품 개수 x 100

(나) 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

(다) 연구대상자 생명 윤리 및 안전 확보

① 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

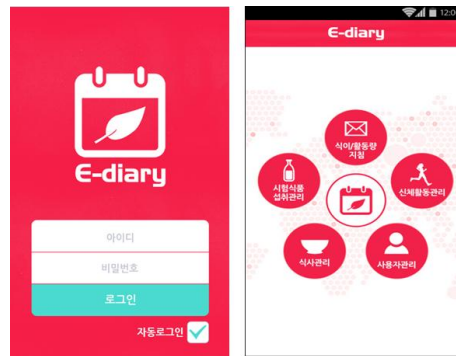
- 연구 시작 전 IRB 승인 획득
- 연구진행 중 IRB 변경, 보고 절차 진행: 연구계획 변경, 연구종료, 결과보고 등

② 연구대상자 보상보험 가입

- 인체적용 시험 연구 도중 예기치 못한 이상반응으로부터 연구대상자를 보호하기 위해 연구대상자 보상보험가입

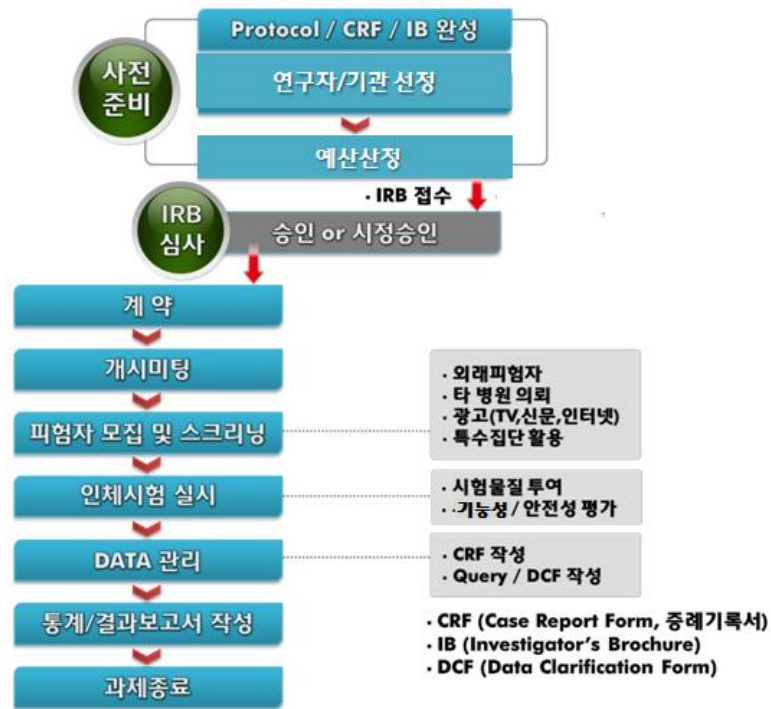
(라) IRB 승인 후 인체적용시험 수행 및 총괄 관리

- 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/대조식품 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>

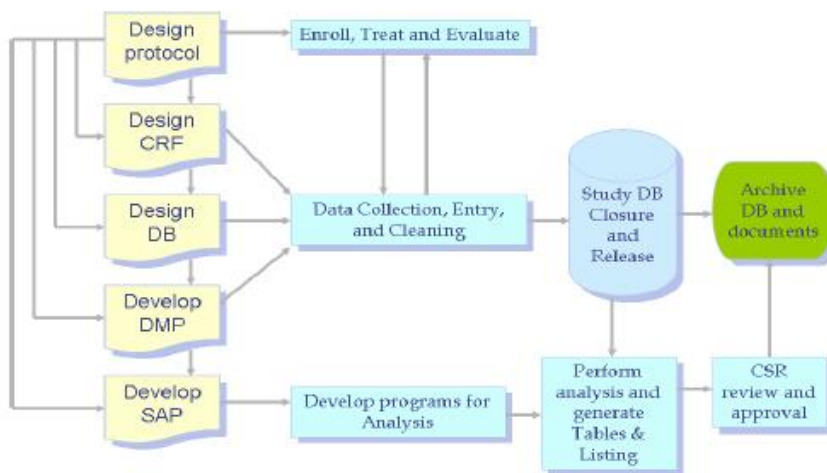
- 전자증례기록서(electronic case report form) 시스템으로 데이터를 실시간 모니터링
- 숙련된 모니터요원이 주기적인 모니터링을 수행하여 증례기록서 입력 데이터를 원자료와 비교하여 데이터의 정확성 확인



### 인체적용시험 진행절차

#### (마) 데이터 관리 및 통계 분석

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



### 인체적용시험의 자료 관리

(3) 건강기능식품 개별인정형 원료 신청 서류 작성 및 신청

- 본 연구과제를 통해 생강 및 계피의 원료 표준화, 안전성, 기능성 평가를 완료 후 개별인정형 원료 허가를 위해 아래와 같은 제출자료를 작성하여 개별인정형 신청을 추진함.

<개별인정 허가를 위한 제출자료 리스트>

연번	제출자료
<b>1. 제출자료 전체의 총괄 요약본</b>	
<b>2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료</b>	
2.1	기원
2.2	개발경위
2.3	국내·외 인정·허가 현황
2.4	국내·외 사용 현황
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료 함께 제출</b>	
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
<b>4. 원료의 특성에 관한 자료</b>	
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



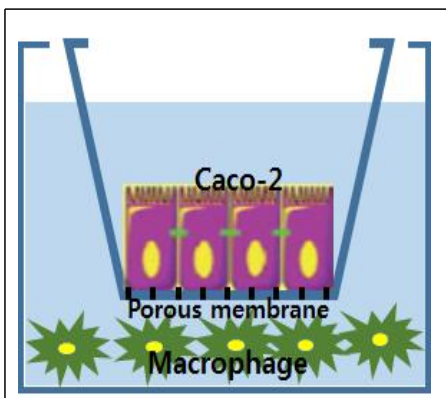
나. 제1협동연구기관: 서울과학기술대학교

(1) *In vitro* 실험

(가) 세포실험을 통한 장세포 염증억제 확인

Trans well plate의 epical side에 intestinal epithelial cell line인 Caco-2 세포를 21일 동안 분화시키고 Basal side에 Macrophage cell line RAW264.7 세포를 48시간 배양하여 소장벽을 모델화 함. Raw264.7 세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 이용 염증을 유발하여 장벽에 과염증 물질을 노출시킨 뒤 다양한 비율의 생강·계피 추출물을 가하여 면역반응 조절 물질을 확인함. 사이토카인은 면역세포에서 생성되는 수용성 단백질로서 이들은 하나의 네트워크를 형성하여 세포의 증식과 활성화, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시키고 사이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요함. 사이토카인들을 측정하기 위해서 Sandwich ELISA법을 이용하여 세포 상층액에 포함되어있는 사이토카인들을 정량하여 염증과 면역반응의 유의적인 감소 및 증가를 확인하고 최적 복합비율을 확인함.

TJ permeability는 transepithelial electrical resistance (TEER)을 이용하여 확인하고, 각각의 시간 마다 TEER을 측정함 예정임 (0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 h). Tight junction protein인 ZO-1, occludin, claudin-1,3,4, JAM의 mRNA 발현량 및 이들 단백질의 translocation을 확인하고자 함. 염증유도효과는 NO, IL-8, IL-6, PGE<sub>2</sub>를 확인하여 비교하고자 하며, iNOS, COX-2의 mRNA 발현량도 확인할 계획임. Nuclear factor kappa B (NF-κB)와 MAPK signaling pathways는 pro-inflammatory cytokines의 합성과 분해를 조절하고 염증성 스트레스 조건을 조절한다고 알려져 있음. NF-κB와 MAPK 중 ERK, JNK, p38의 인산화 정도를 확인하여 생강 및 계피 아임계 추출물의 효과를 확인하고자 함.



염증성 장질환인 inflammatory bowel disease, Crohn's disease 등은 intestinal barrier function이 많이 손상되는 것으로 알려져 있는데, 이는 장내 염증이 발생하면 chemokine 중의 하나인 IL-8이 분비되고, IL-8은 염증이 일어난 부위에 여러 neutrophil을 끌어들이게 됨. 이를 구현하기 위한 *in vitro* 모델 중에 가장 좋은 모델은 소장세포와 macrophage cell line을 transwell을 이용하여 co-culture한 후 LPS 등을 이용하여 염증을 유도하는 것임

## (나) 장내유익균 증식능 확인

장내 유익균 지표로 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*의 생육 활성에 미치는 영향을 확인함. 배지에 생강과 계피의 여러 가지 배합비율이 첨가된 배지를 만들고 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*의 전배양액을 배지에 접종하여 배양한 후, O.D(Optical Density)를 측정하여 균의 생육상태를 확인함. 직경 6 mm 디스크 페이퍼에 여러 가지 배합비율의 시료를 적하한 후, 디스크 페이퍼를 균한 배지 위에 일정 간격을 두고 배치하여 상기 균주를 배양한 후 생육 활성환의 크기를 관찰함으로써 추출물의 장내 유익균에 생육 활성 효능을 확인함.

## (2) *In vivo* 실험

### (가) DSS 유도 동물에서의 장건강 기능성 확인

BLAB/c 마우스에게 5% DSS (Dextran sulfate sodium)를 경구 섭취시키면 대장염을 유발할 수 있음. 초기 병변은 주로 좌측대장에 발생하며 혈변, 체중 감소, 대장의 축소 및 점막 궤양 등이 생김. 점막의 식세포 내에 DSS가 섭취되어 있고 호중구가 주로 침윤함. 시간이 지나면서 형질세포 및 림프구 등이 침윤하게 되고 만성 염증의 소견을 띠게 됨. 염증을 유도한 마우스에 *in vitro* 실험결과 선정된 생강·계피 추출물을 공급하여 희생한 뒤 얻은 조직을 이용하여 조직의 손상정도와 조직 중 함유되어있는 면역조절인자들을 통해 생강·계피 추출물의 효과를 확인함.

DSS(Dextran Sulfate Sodium)는 장관면역질환(IBD) 유도하고, 관련 물질들의 장관염증 억제 효과를 확인하는 대표적인 유도 물질임. DSS는 heparin-like polysaccharide로써 각 glucose마다 sulfate groups그룹을 포함하고 있음. DSS는 일반적으로 rat, mice, hamsters 등의 급성·만성 염증을 일으키는 실험의 모델로써 사용되고 있으며, 음용수로 DSS를 섭취 시킬 경우, 급성·만성의 대장염을 유도 시킬 수 있음. DSS로 대장염을 유도 시킨 경우, 대장 표면의 궤양, 장점막 손상, 사이토카인들과 염증성 mediators의 생산, leukocyte infiltration과 같은 사람의 Crohn's disease와 유사한 몇 가지의 특징적인 병리학적 증세를 보임. 형태학적으로 DSS 유도된 model에서 유의적으로 체중이 감소하며, colon의 길이가 짧아지고, 설사와 혈변을 보임. DSS의 메커니즘은 직접적으로 결장 상피조직에 독성으로 작용하여 macrophage의 활성화를 일으키고, 대장 내 microflora를 바꿈으로써 대장염을 일으키는 것으로 보고됨. 따라서 생강·계피 추출물의 장 건강 기능성 확인을 위한 이 연구의 IBD 유도 모델로써 적합함.

NF- $\kappa$ B, MAPK 등 각종 염증성 cytokines 분비 촉진 단백질 발현량 확인. NF- $\kappa$ B는 스트레스, 사이토카인, 자유 라디칼 산화된 LDL 등의 자극에 대한 반응과 관련이 있음. 다양한 원인에 의해 발생한 염증에 의해 그 발현량이 증가하고, TNF- $\alpha$  및 IL-6의 발현을 촉진시킴. 따라

서 부적절한 NF- $\kappa$ B의 발현은 염증과 관련이 있음. 산화적 스트레스로 인해 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 p38 MAPK(mitogen-activated protein kinase)가 인산화되고, 각종 염증성 사이토카인들의 분비를 촉진시킴.

각종 염증성 사이토카인에 노출된 장벽은 ZO-1, occludin, E-cadherin과 같은 장벽을 유지해주는 단백질의 분해를 야기시켜 장벽의 선택적인 투과성을 붕괴시키고 염증 반응을 야기하게 됨. 따라서 RT-PCR과 조직 염색 등을 이용하여 단백질 발현량을 확인하고 장벽 손상의 완화 정도를 확인함.

### (3) 인체적용시험

#### (가) 인체적용연구 유래 시료 분석을 통한 장건강 기능성 확인

시험대상자의 분변에서 pH, 수분함량, 미생물 대사체인 단쇄지방산, 바이오제닉아민류, 인돌 및 페놀류 등과 유익균·유해균을 확인해 추출물이 장내 균총 변화에 미치는 영향을 분석함.

다. 제 2 협동연구기관 : 한국식품연구원

#### (1) RSM을 활용한 생강 및 계피의 최적추출조건을 확립(아임계, 주정추출)

한국식품연구원이 구축하고 있는 아임계 추출공정 장치는 그림 26과 같으며, 생강 및 계피 유효성분 추출을 위한 예비실험을 통하여 추출조건을 설정 후 최적 추출조건을 확립함

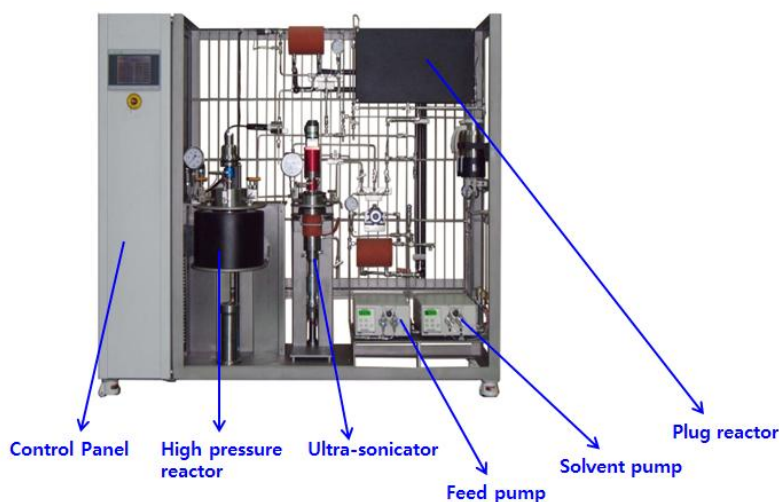


그림 26. 아임계 추출장치

생강 및 계피로부터 정유성분을 추출하기 위한 아임계 최적 추출조건 확립을 위하여 아임계 온도, 압력 및 추출시간의 공정변수에 따른 반응표면분석 실험법의 실험설계(3요소×3수준)를 통하여 실시하고 통계적 자료 처리 후 최적추출 조건을 확립함

기능성 원료가 생산되었을 때 항상 일정한 기능성을 나타낼 수 있는지를 확인할 수 있는 마커로 제품의 표준화를 위해서 반드시 설정되어야하고 관리되어야 함

(2) 기능성분 및 지표성분 설정

- 기능성분 : 성분 자체가 단일성분 또는 높은 함량으로 존재하여 기능성을 나타내거나, 이러한 기능성분이 일정수준 이상으로 함유된 원료에서 기능성을 확인할 수 있는 성분
- 지표성분 : 제조공정의 표준화를 관리할 수 있고, 원재료의 사용여부를 확인할 수 있는 성분
- 기능/지표성분 분석법 밸리데이션 : 선정된 기능/지표성분의 분석시험법이 재현성이 있는지 검증하는 방법으로 분석에 사용되는 오차가 허용되는 정도를 과학적으로 입증하는 것임

< 밸리데이션 평가방법 >

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

• 연차별 세부 추진 전략

가. 1차년도

(1) 개발 목표

- 주관연구기관(천호바이오) : 생강 및 계피 아임계 추출물의 대량생산 소재화 및 기준규격 설정
- 협동연구기관 1(서울과학기술대학교) : 생강 및 계피 아임계 추출물의 장건강 기능성 최적 복합비율 확립
- 협동연구기관 2 (한국식품연구원) : 생강 및 계피 아임계 추출물의 최적추출조건 확립

(2) 개발 내용 및 범위

- (가) 주관연구기관(메디엔바이오) : 생강 및 계피 아임계 추출물의 대량생산 소재화 및 기준규격 설정

생강과 계피의 원재료 표준화

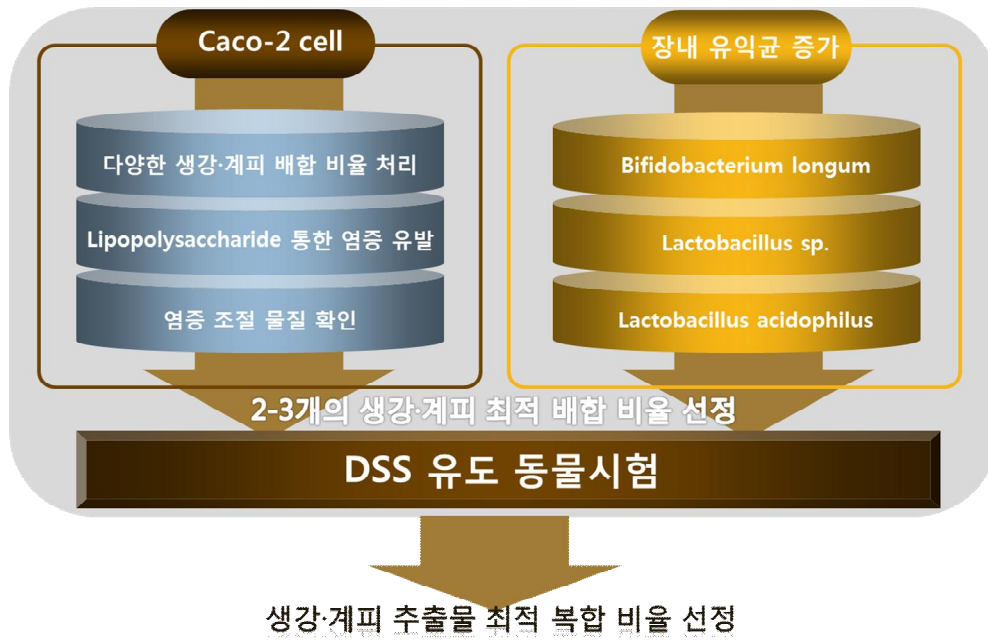
생강과 계피 아임계 추출물의 대량생산 공정 조건 설정 및 소재화

대량생산 원료의 기준규격 설정

(나) 협동연구기관1 (서울과학기술대학교)

*In vitro*, 동물시험을 통한 생강 및 계피 아임계 추출물 최적복합 비율 선정

- Caco-2 cell line에 염증 유도, 염증억제 최적 생강 및 계피 아임계 추출물 복합비율 선정
- 유익한 유산균(*Lactobacillus* 등) 증식 최적 생강 및 계피 아임계 추출물 복합비율 선정
- 상기 실험을 통해 선정된 복합비율 2-3 조건 이용 DSS 유도 동물시험을 통한 최적 기능성 복합비율 확인 : 생강 및 계피추출물 복합물의 여러 비율로 제조된 시료를 2주간 경구투여한 후 3-4% DSS 함유 음용수를 1주일간 추가 급수, 1주일 후(복합물 3주 경구투여, DSS 1주 급수) 장내 질병 score/장길이/체중/장조직변화 확인
- 복합물의 기능성 상승효과를 확인하기 위해 각각의 단일소재를 비교군으로 설정하여 실험 진행



(다) 협동연구기관 2 ( 한국식품연구원 ) : 생강 및 계피추출물의 최적추출조건 확립

- ① 생강 및 계피의 유효 지표성분 분리 및 분석
  - 원료 생강과 계피의 유효 지표성분을 HPLC를 사용하여 분석함
- ② 생강 및 계피의 아임계 추출에 의한 추출수율 및 특성분석
  - 원료 전처리 방법에 따른 효율성, 품질특성 분석  
(통생강, 세절생강, 편상계피, 분말계피)
  - 추출 및 농축단계에서 효능성분 분석 및 함량 변화 분석
  - 아임계 추출공정 경제성 및 품질특성 차이 분석  
(열수추출 및 70% 에탄올 추출공정 대비 아임계 추출 비교실험)
- ③ 생강 및 계피의 에탄올에 의한 추출수율 및 특성분석
  - 에탄올을 사용한 효능성분 분석
  - 에탄올 추출물과 아임계 추출물의 특성 비교 분석
- ④ 반응표면분석법에 의한 아임계 추출공정 최적화

나. 2차년도

(1)개발 목표

- 주관연구기관 ( 천호바이오 ) : 장 건강 개선 인체적용시험용 개시
- 협동연구기관1 ( 서울과학기술대학교 ) : 동물시험에서 용량의존적 기능성 확인

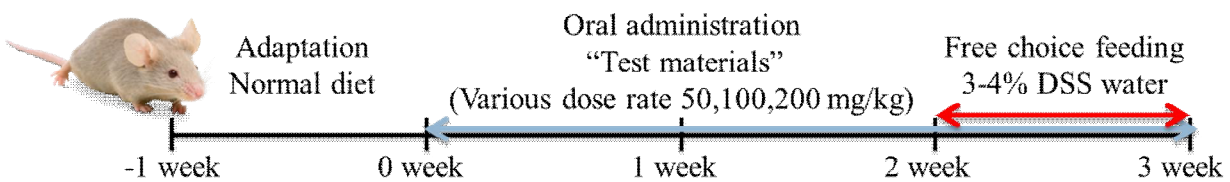
(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관(메디엔바이오)

- ① 인체적용시험 샘플 제조
- ② 인체시험 개시
- ③ 원료의 유통기한 안정성 시험

(나) 협동연구기관1 (서울과학기술대학교)

- ① 1차년도 선정 생강 및 계피 아임계 추출물의 복합물 이용, DSS 유도 동물모델에서의 장 건강(장염증 억제 및 장내 유익 유산균 증식) 기능성 확인
- ② 생강 및 계피 아임계 추출물 복합물을 2주간 섭취시킨 후 3-4% DSS 함유 음용수 1주일간 추가 급수
- ③ 1주일 후(복합물 3주 경구투여, DSS 1주 급수) 장내 질병 score/장길이/체중/장조직 변화/염증성 사이토카인 함량/관련 mRNA 변화량 확인



나. 3차년도

(1) 개발 목표

(가) 주관연구기관(메디엔바이오) : 장 건강 개별인정 인체시험 완료 및 개별인정 신청

(나) 협동연구기관1 (서울과학기술대학교) : 생강 및 계피 아임계 추출물 복합물의 장 건강 기능성 기전 연구

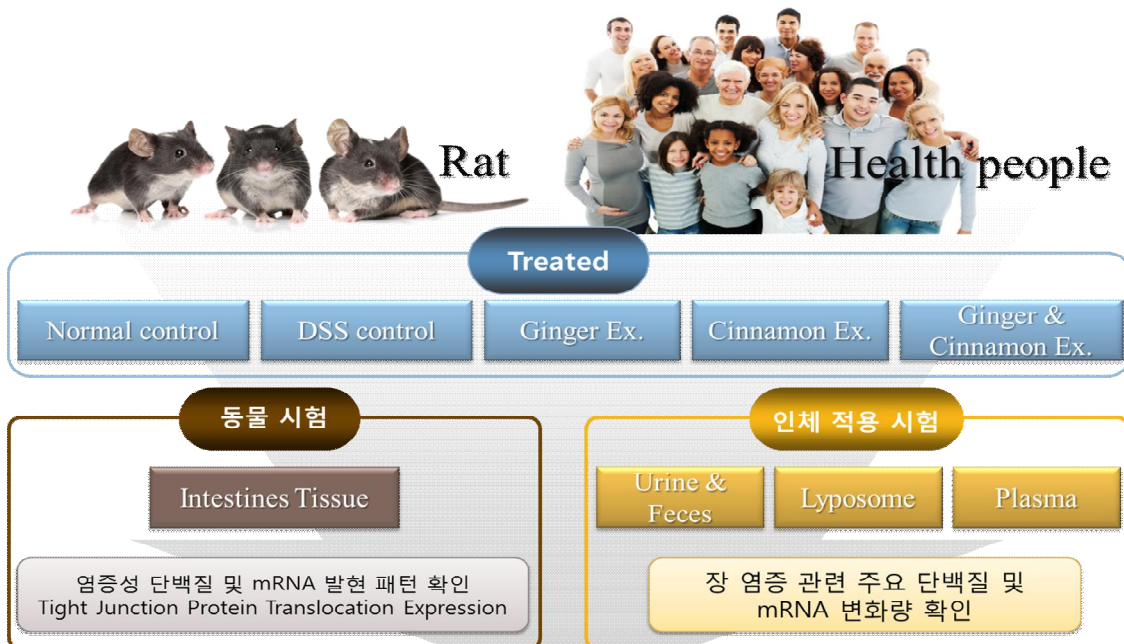
(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관(천호바이오)

- ① 인체적용시험 완료
- ② 제품의 유통기한 안정성 시험
- ③ 개별인정 신청을 위한 공인기관 시험성적서 준비
- ④ 개별인정 신청 서류 작성

(나)협동연구기관1 (서울과학기술대학교)

- ① 동물시험에서의 장염증 억제/장내유익균 증식 기전 규명, 인체적용시험 유래 혈액 및 분변에서의 장 건강 기능성 작용기전 확인
- ② DSS 유도 동물모델 이용 생강 및 계피 아임계 추출물 복합물의 장 건강 기능성 기전 규명
- ③ 시험군: 정상대조군, DSS 유도 대조군, 생강추출물, 계피추출물, 생강 및 계피 아임계 추출물 복합물
- ④ 바이오마커: 장 조직에서의 염증성 단백질 및 mRNA 발현 패턴 확인, tight junction 관련 단백질 translocation, 발현량 변화 확인
- ⑤ 인체적용연구 유래 혈액, 혈액세포, 분변 시료 이용 장 염증 관련 주요 단백질 및 mRNA 변화량 확인



**생강·계피 추출물 장 건강 기능성 작용기전 확인**



### 3. 연구개발 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자(소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	원재료의 표준화														곽연길 (천호바이오)
2	기능성원료의 최적추출조건 확립														김종태 (한국식품연구원)
3	생강 및 계피추출물의 최적 복합비율 선정														김지연 (서울과학기술대학교)
4	동물시험을 통한 최적복합비율 확인														김지연 (서울과학기술대학교)
5	생강 및 계피복합추출물의 대량생산조건개발														곽연길 (천호바이오)
2차년도															
1	인체적용시험용 샘플 제조														곽연길 (천호바이오)
2	인체시험실시 (CRO 계약, IRB 신청 등)														곽연길 (천호바이오)
3	원료의 안정성테스트														곽연길 (천호바이오)
4	동물시험을 통한 용량반응 확인														김지연 (서울과학기술대학교)
5	작용기전 확인을 위한 동물시험														김지연 (서울과학기술대학교)
3차년도															
1	기준규격 및 유해물질 공인시험성적														김연석 (메디앤바이오)
2	인체시험완료														김연석 (메디앤바이오)
3	개별인정 자료준비														김연석 (메디앤바이오)
4	작용기전 확인을 위한 동물시험														김지연 (서울과학기술대학교)
5	유래 시료 바이오마커 분석														김지연 (서울과학기술대학교)
6	식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 허가에 필요한 서류작성 및 신청서 제출														박옥남 (메디앤바이오) 김지연 (서울과학기술대학교)
7	시제품 제작														박옥남 (메디앤바이오)
8	기호도 조사														박옥남 (메디앤바이오)

## 3-2 연구 내용 및 결과

### 1. 대상 원재료 선정

문헌 조사와 선행 연구를 바탕으로 생강과 계피를 최종 원재료로 1차년 연구를 진행함.

실험 진행 중, 생강 추출물의 수율이 매우 낮으며, 생강 계피 복합추출물과 계피 단독추출물간의 기능성 차이가 크지 않은 점을 발견하여 원재료 가격 등 산업화를 위한 여러 경제성을 고려해 생강을 원재료에서 제외하고 계피만으로 소재 개발 연구를 완료함.

#### 가. 계피

- (1) 학명 : *Cinnamimum cassia*(L.) Presl / *Cinnamimum aromaticum* Nees
- (2) 이명 : 시나몬, Cassia, Chinese cinnamon
- (3) 사용부위 : 줄기껍질

### 2. 생강·계피 복합물의 장 건강 개선 소재 개발 최적 추출조건 확립위한 세포 실험

#### 가. 생강 및 계피의 최적 추출조건 확립을 위한 예비 실험

##### (1) 실험재료

계피와 생강 원료는 경기도 성남시 소재 농협매장에서 구입하여 계피는 10, 40 메쉬 및 편상(가로 2cm × 세로 10cm × 두께 0.2 cm)으로 전처리 분쇄하여 사용하였으며, 생강은 건조생강은 가로 2cm × 세로 1.5 × 두께 0.2cm 재원으로, 생물 생강은 편상(가로 3cm × 세로 2cm × 두께 1cm) 재원으로 세절하여 사용함.

##### (2) 예비실험을 위한 계피 및 생강 추출물 제조

###### (가) 계피의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출

열수추출물은 일정량의 시료에 10배량의 증류수(w/v)를 가한 후 환류냉각기가 장치된 mantle에서 95℃를 유지하며 3시간 교반 추출하여 여과지(Watman No.4, Maidstone, England)로 여과한 다음 동결건조하여 분석 시료로 사용함. 70% 주정 추출은 환류냉각기를 이용해 80℃에서 3시간 교반 추출하였다. 아임계 추출은 계피에 열수추출과 동일한 가수량으로 증류수를 가하고 아임계 추출장치(TFS-3000, Innoway Co., Korea)에서 공정변수에 따른 조건으로 추출 후 추출물을 4℃에서 원심분리(11,000 × g, 5분)하여 여과

(Watman No.4, Maidstone, England)한 다음 동결건조하여 분석 시료로 사용하였다. 40 메쉬 입자 크기의 계피를 열수, 70% 주정 추출 및 아임계 예비실험을 위한 추출조건은 표 3과 같음.

추출방법	열수		아임계
용매	water	70% 에탄올	water
시료 (g)	300	300	30
용매 volume (ml)	3000	3000	300
추출시간 (min)	180	180	40
추출 온도 (°C)	95	80	110
교반속도 (RPM)	200	200	-
압력(bar)	상압	상압	50
시료 번호	CE-03	CE-04	CE-05

<표 3. 계피의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출 조건>

#### (나) 생강의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출

건조 생강은 일정량의 시료에 증류수 26.7배(w/v), 생물 생강은 증류수 5.4배(w/v)를 가한 후 환류냉각기가 장치된 mantle에서 95°C를 유지하며 3시간 교반 추출하여 여과지 (Watman No.4, Maidstone, England)로 여과한 다음 동결건조하여 분석 시료로 사용함. 70% 주정 추출은 환류냉각기가 장치된 mantle에서 80°C를 유지하며 3시간 교반 추출하였다. 아임계 추출은 아임계 추출장치(TFS-3000, Innoway Co., Korea)를 이용하여 온도는 각각 110°C, 추출시간은 110 분, 압력은 50 bar로 하여 추출하여 추출물을 4°C에서 원심분리(11,000 × g, 5분)하여 여과(Watman No.4, Maidstone, England)한 다음 동결건조하여 분석 시료로 사용함.

### (3) 추출 용매별 생강 및 계피의 추출수율 및 특성분석

#### (가) 생강의 열수 및 70% 주정, 아임계 추출

생강의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출결과를 표 4에 나타내었고 그림 27에 열수 및 아임계 추출단계별 원료 및 추출물 상태를 나타내었다. 열수추출의 경우 건조생강이 생물생강에 비하여 추출율이 높게 나타났는데, 이는 추출 전 시료의 재원에 영향을 받은 원인으로 해석되며, 향후 상업적 생산에서 추출율과 분리정제를 고려한 생강의 원료 전처리 방법을 고려해야 할 것으로 판단됨. 주정추출에서는 생물생강이 건조생강 보다 추출율이 높게 나타났음. 이는 생물상태로 존재하는 생강 세포벽에서 가열에 의한 유용성분의 물질이동이 보다 용이하게 전개됨으로서 추출율 또한 증가하게 되는 것으로 해석된다. 건조생강의 아임계 추출율은 열수 및 70% 주정 보다 각각 20% 및 29% 높은 결과를 보임.

추출방법	시료	추출조건							추출율 (%)
		용매	시료 (g)	용매 volume (ml)	추출온도 (℃)	추출시간 (min)	교반속도 (rpm)	압력 (bar)	
열수추출	건조생강	water	150	4000	95	180	200	상압	14.56
	생물생강		557	3000					11.93
주정추출	건조생강	70%	150	4000	80				12.88
	생물생강	주정	557	3000					16.00
아임계수 추출	건조생강	water	15	400	40	110	200	50	18.20
	생물생강		-	-	-	-	-	-	-

<표 4. 생강의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출율>



<그림 27. 생강의 열수 및 아임계 추출 단계별 원료 및 추출물>

(가)계피의 열수 및 70% 주정, 아임계 추출

계피의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출결과를 표 4에 나타내었고 그림 28에 열수 및 아임계 추출단계별 원료 및 추출물 상태를 나타냄. 생강과 달리 용매에 따라 추출율의 큰 차이가 없는 것으로 판단되어 계피의 주요 방향성분 및 항산화 활성을 측정하기로 결정함.

추출방법	추출조건							추출율 (%)
	용매	시료 (g)	용매 volume (ml)	추출시간 (min)	추출온도 (°C)	교반속도 (RPM)	압력 (bar)	
열수추출 (CE-03)	water	300	3000	180	95	200	상압	8.42
주정추출 (CE-04)	70% 주정	300	3000	180	80	200	상압	10.38
아임계수 추출 (CE-05)	water	30	300	40	110	200	50	11.01

<표 5. 계피의 열수, 70% 주정 및 아임계 추출율 >



<그림 28. 계피의 열수 및 아임계 추출 공정단계별 원료 및 추출물>

(4) 추출 용매에 따른 계피의 주요성분 분석

계피 추출물의 주요성분에는 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde 등이 있으며, 대표적인 독성물질에는 coumarin이 있다고 알려져 있다. 계피의 주요 성분을 HPLC(Agilent technologies 1260 infinity, USA)를 통해 분석함. 분석용 칼럼은 ZORBAX Eclipse XDB-C18(250mm × 4mm, 5µm, Agilent technologies, USA)을 사용하였으며, 이동상은 아세토니트릴(acetonitrile, A), 0.02% 수용성 아세트산(Aqueous acetic acid, B)를 사용함.

Sigma(Sigma Aldrich Co., ST. Louis, Mo, USA)에서 구입한 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde, coumarin 의 표준품을 각각 메탄올에 녹여 1mg/ml의 농도로 제조한 후 0, 20, 40, 60, 80 µg/mL의 농도로 희석한 후 0.45µm PVDF syringe filter를 이용해 여과한 후 분

석에 사용하였고 HPLC 분석조건은 표6과 같음.

HPLC	Agilent technologies 1260 Infinity		
column	ZORBAX Eclipse XDB-C18, 250mm X 4 mm, 5 um, Agilent technologies		
Column temperature	20°C		
Solvent	(A) Acetonitrile (B) 0.02% aqueous acetic acid		
Gradient	Time (min)	A	B
	0	10	90
	60	50	50
	65	10	90
	70	10	90
Flow rate	1 ml/min		
Injection volume	20 ul		
Detection	280 nm 250 nm for cinnamyl alcohol		

<표 6. 계피 주요성분 분석을 위한 HPLC 분석 조건>

열수(CE-05) 및 70% 에탄올(CE-04) 및 아임계수(CE-05) 추출에 따른 계피 추출물의 유용성분 및 독성물질 함량 검사 결과를 표7에 나타냄. cinnamic acid 함량의 경우 4.13 mg/g 으로 70% 에탄올 추출이 가장 높았으며, cinnam aldehyde 함량은 아임계수 추출이 가장 높았다. coumarin 함량은 열수 추출이 12.27 mg/g 으로 가장 낮은 것을 확인함.

추출용매	mg/g		
	coumarin	cinnamic acid	cinnam aldehyde
열수	12.27±0.19	3.72±.014	47.78±0.06
70% 에탄올	22.03±0.78	4.13±0.04	52.36±4.13
아임계	14.23±0.18	3.77±0.71	52.89±0.06

<표 7. 계피 주요성분 분석 결과>

#### (5) 예비실험 방법

##### (가)사용균주 배양

장내 유익균의 지표로 *Bifidobacterium longum* KCCM11953, *Lactobacillus sp.* KCCM32821, *Lactobacillus acidophilus* KCCM32820를 사용함. *B. longum*는 Reinforced Clostridial Media (RCM, Difco, Sparks, NV, USA)배지를 이용하였고, *Lactobacillus sp.*와 *L. acidophilus*는 MRS broth (Difco, Sparks, NV, USA)에 접종하여 37 °C 혐기적 조건 (BBL GasPak, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 으로 활성화시켜 사용함.

(나) 장내 세균의 생육에 미치는 영향 조사

장내 세균의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해 Modified EG (Eggerth Gagnon) 액체배지를 사용하였다. 생강 및 계피 추출물을 동결건조시켜 만든 추출물을 0.1, 1, 10 mg/mL 농도로 첨가한 Modified EG broth에 활성화시킨 각 균의 전배양액을 접종하여 혐기적으로 37 °C에서 24시간 배양한 후 600 nm에서 O.D. (optical density)를 측정함.

(다) 세포 배양

사람의 장상피세포인 Caco-2 세포와 마우스의 대식세포인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용함. Caco-2 세포는 1% nonessential amino acid (MEM-NEAA) (Gibco, Rockville, MD, USA), 100 U/mL penicillin-100 mg/mL streptomycin (Gibco, Rockville, MD, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, Cholet, France)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biowest, Nuaille, Cholet, France) 배지를 사용하였고, RAW264.7 세포는 10% FBS, 1% HEPES (1M) (Gibco, Rockville, MD, USA)와 100 U/mL penicillin-100 mg/mL streptomycin가 함유된 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 및 37 °C가 유지되는 배양기에서 계대배양함.

(라) Co-culture system

Caco-2 세포를 6-transwell의 상층부 (apical side) (0.4 µm pore size; Corning Costar Corp., USA)에 1×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 seeding 함. 세포 배지는 2-3일에 한 번씩 교체했으며, 21일 동안 배양하였음. RAW264.7 세포는 transwell의 하층부 (basolateral side)에 1×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 seeding 하였고, 48시간 배양하였음. 48시간 후, co-culture에서 시료의 효과를 확인하기 위해 생강 및 계피 추출물을 transwell 상층부에 처리함. 처리된 농도는 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay를 통해 결정하였다. 24시간 후, 2 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 transwell 하층부에 처리하고 48시간 동안 37 °C에서 방치함.

(마) Transepithelial electrical resistance (TEER) 측정

생강 및 계피 추출물을 transwell 상층부에 처리하여 24시간 배양한 후 LPS를 하층부에 첨가함. Millicell® ERS instrument (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 LPS를 처리하기 전에 0시간, 처리한 후로부터 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48시간 때 TEER을 측정하였고 복합물과 LPS 처리에 따른 상층부와 하층부 간의 TEER 값은 3반복으로 행해졌으며, Ω (resistance) × cm<sup>2</sup> (surface area of the monolayer)로 계산함.

#### (바) Permeability 측정

Transepithelial permeability는 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran (FITC-dextran; 4 kDa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 세포 투과성을 측정하여 확인함. 상층부에서 Caco-2 세포를 통과한 FITC-dextran (100 µg/mL)의 형광도를 하층부에서 측정하였다. 즉, FITC-dextran을 상층부에 첨가하고 48시간 후, 하층부의 배지를 300 µL씩 새로운 96 well plate에 옮겨 fluorescence spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 excitation wavelength 485 nm와 emission wavelength 535 nm에서 형광도를 측정하였음.

#### (사) Nitrite 및 염증성 사이토카인 함량 확인

Caco-2 세포 배양액 내의 nitrite 함량 측정은 Griess 반응을 이용하여 실시하였음. 상층액을 모아 11,000 g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액 100 µL와 Griess reagent 100 µL를 혼합한 후 빛을 차단하여 10분간 방치하였음. 흡광도는 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였으며, sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 작성하여 함량을 계산하였음. Griess reagent는 5% phosphoric acid와 1% sulfanilamide를 혼합한 후, 0.1% N-((1-naphthyl)ethylenediamine) dihydrochloride 용액을 동량으로 혼합하여 사용하였고 상층액의 PGE<sub>2</sub>, IL-6, IL-8 및 TNF-α 수준은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였음. 각각의 사이토카인 농도는 표준물질의 표준곡선을 사용하여 450 nm에서 확인하였음.

#### (아) RNA 추출 및 qRT-PCR

총 RNA는 TRIzol을 사용하여 배양된 세포로부터 추출되었고 세포에 TRIzol을 넣은 후, 5분 후에 클로로포름을 첨가하고 동량의 이소프로판올과 혼합하였음. RNA-to-cDNA Kit를 사용하여 역전사법으로 cDNA를 합성하고 Step-One-Plus RT-PCR 시스템으로 Universal Probe Library (UPL) probe 방법을 사용하여 qRT-PCR을 진행하였음. RNA의 상대적 양은 β-actin의 양에 대해 표준화하여  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법을 사용하여 계산하였음.

#### (자) NF-κB 활성 확인

배양된 Caco-2 세포 내의 NF-κB 활성은 nuclear extraction kit를 이용하여 세포로부터 핵을 추출하고 ELISA kit를 사용하여 450 nm에서 확인하였음.

#### (차) Western blot

배양된 Caco-2 세포를 PBS로 3회 세척한 후 membrane에서 떼어내어 원심분리하고 pellet에 lysis bufer를 가하여 -20 °C에서 20분동안 방치하였음. 12,000 rpm으로 5분 동안 원심분리를 하여 상층액을 모으고, 모은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하였음. 단백질을 30 µg을 2×sample buffer에 넣고 90 °C에서 2분간 불활성화 시켜



10% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 하였고 전기영동된 SDS polyacrylamide gel을 polyvinylidene fluoride로 transfer 한 후 5% BSA 또는 skim milk에서 1시간 동안 blocking 함. 1차 항체는 1:1000의 비율로 4 °C에서 overnight 하였으며, 그 후 TBST buffer로 5분간 3번 washing 하였다. 2차 항체는 1:2000의 비율로 희석하여 2시간 상온에서 부착시킨 후 TBST buffer로 5분간 3번 washing 하였고 ECL을 처리한 membrane을 암실에서 X-ray flim에 감광시켜 현상하였음.

#### (카) Immunofluorescence

Transwell의 상층부에서 배양된 Caco-2 세포를 PBS로 씻고 4% paraformaldehyde에서 15분간 고정시킨 후, 세포를 0.25% Triton X-100로 10분 동안 투과성 처리한 후 5% BSA로 1시간 blocking 하였음. 모든 단계 사이에 세포를 PBS로 3회 세척하였으며 세포를 1차 항체로 2시간 동안 배양한 다음 2차 항체로 1시간 동안 표지하였음. Transwell에서 membrane을 제거하고 DAPI가 함유되어 있는 antifade reagent를 슬라이드 글라스에 올렸음. 실온의 어두운 곳에서 24시간 동안 방치한 후 공초점레이저스캐닝현미경을 사용하여 세포를 관찰하였음.

#### (6) 예비실험 결과

##### (가) MTT assay를 이용한 실험조건 확립

Caco-2 세포에 생강 및 계피추출물을 농도별로 72시간 처리한 경우, 시료를 처리하지 않은 CON 세포와 비교하였을 때 80% 이상 세포 생존율을 확인하여 이후 실험은 200 µg/mL을 최고농도로 설정하여 실시함.

##### (나) 생강 추출물의 장내 세균 생육 촉진 활성

물로 처리한 대조군과 생강추출물을 처리한 실험군의 O.D. 값을 비교하여 나타내었다(그림 29). 생강추출물을 포함한 액체배지에서 장내 유익균의 생육 활성정도를 측정한 결과, 생강에탄올추출물(GEE) 10 mg/mL 처리군은 대조군과 비교하였을 때 *B.longum*, *L.sp.*, 및 *L.acidophilus*를 1.5배 정도 증식시켰고, 생강아임계 추출물(GSE) 10 mg/mL 처리군은 장내 유익균을 약 3배, 계피열수추출물(CWE) 10 mg/mL 처리군은 *Lacidophilus*을 약 5배, *L.sp.*을 약 3배, *B.longum*을 약 2배 정도 증식시킴.

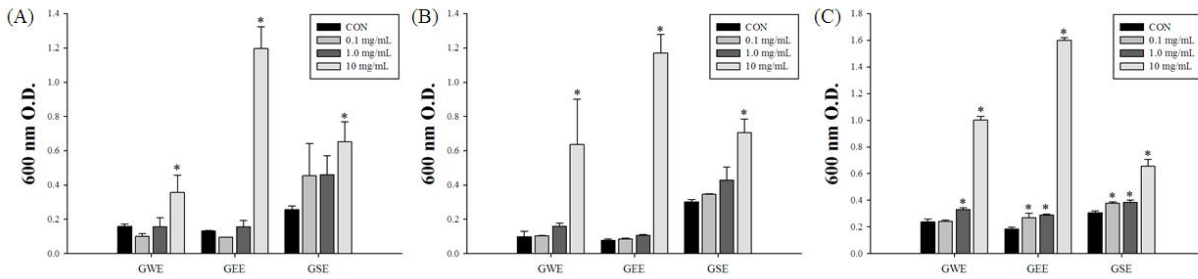


그림 29. Effects of ginger extracts on growth of intestinal bacteria by modified EG broth. (A) *Bifidobacterium longum*, (B) *Lactobacillus sp.*, (C) *Lactobacillus acidophilus*. \* Significant different from the CON values by ANOVA followed by Dunnett's test ( $p < 0.05$ ). CON, control, GWE hot water extract, GEE 70% ethanol extract, GSE subcritical water extraction

#### (다) 생강추출물의 항염증 효과

생강추출물이 LPS에 의한 Caco-2 세포의 TEER 감소를 억제할 수 있는지 확인하였음. LPS 처리 후 24시간 후부터 TEER 값의 유의적 차이가 보이기 시작해서 48시간이 경과하였을 때에는 LPS 처리군에서 저항값이 약 32% 유의하게 감소함을 확인할 수 있었는데 (그림 30(A)), 생강추출물의 효과는 생강물추출물(GWE), 생강아임계 추출물(GSE), 생강에탄올추출물(GEE) 순으로 좋았음.

NO는 체내 방어기능, 신호전달, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있어 중요한 역할을 하나 NO가 정상 이상으로 상승되어 산소와 결합한 peroxynitrite(ONOO-)가 생성되면 조직의 염증을 유발시키게 되며, 손상, 유전자 변이 및 신경 손상을 주게 됨. 생강추출물을 Caco-2 세포에 24시간 처리한 후 RAW264.7 세포에 LPS를 48시간 처리한 결과, LPS군에서 NO가 유의적으로 증가했으며, 생강추출물에서 감소함 (그림 30(B)). 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 생성량도 LPS군에서 증가하였고, 생강추출물에서 감소하였으며, 생강에탄올추출물의 효과가 가장 좋은 것을 확인함(그림 30(C),(D)).

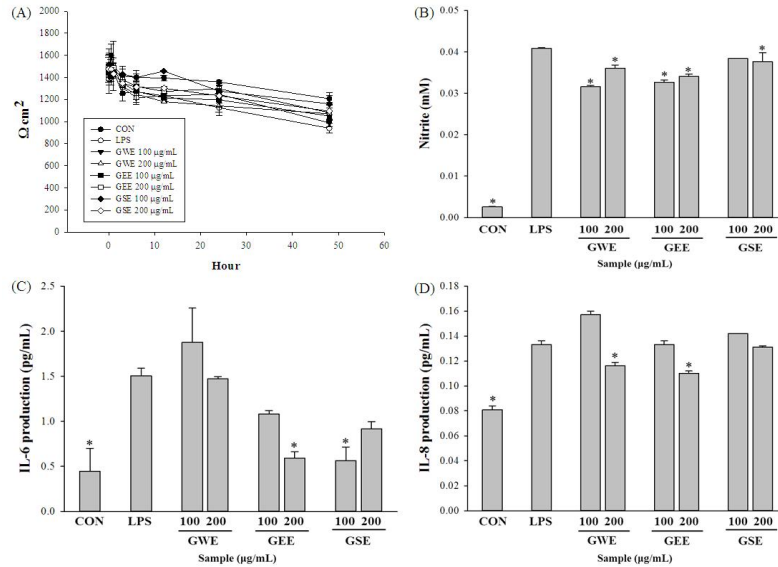


그림 30. (A) Time course of TEER value, (B) Concentration profile of Nitrite, (C) IL-6 production, and (D) IL-8 production. \* Significant different from the LPS values by ANOVA followed by Dunnett's test ( $p < 0.05$ ). CON, control; LPS, lipopolysaccharide, GWE hot water extract, GEE 70% ethanol extract, GSE subcritical water extraction

(라) 계피추출물의 장내 세균 생육 촉진 활성

물로 처리한 대조군과 계피추출물을 처리한 실험군의 O.D. 값을 비교하여 나타냄. 계피추출물을 포함한 액체배지에서 장내 유익균의 생육 활성정도를 측정된 결과, 추출물의 양을 늘릴수록 균주의 생육이 증가하여 모든 추출물의 10 mg/mL 처리군이 높은 O.D.값을 나타냄. (그림 31). 장내유익균의 증식은 모든 계피 추출물에서 확인됨. 계피에탄올추출물(CEE) 10 mg/mL 처리군은 대조군과 비교하였을 때 *B.longum*, *L.sp.*, 및 *L.acidophilus*를 3배 정도 증식시켰으며, 계피아임계 추출물(CSE) 10 mg/mL 처리군은 2.5배, 계피열수추출물(CWE) 10 mg/mL 처리군은 2배 정도 증식시키는 것을 확인하였음.

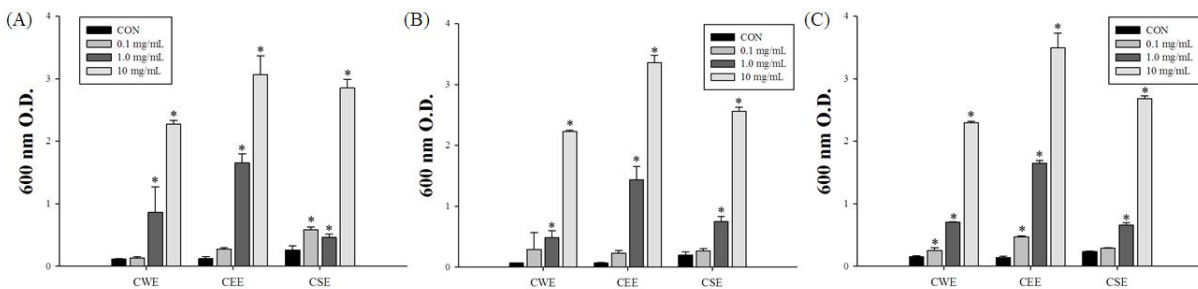


그림 31. Effects of cinnamon extracts on growth of intestinal bacteria by modified EG broth. (A) *Bifidobacterium longum*, (B) *Lactobacillus* sp., (C) *Lactobacillus acidophilus*. \* Significant different from the CON values by ANOVA followed by Dunnett's test ( $p < 0.05$ ). CON, control, CWE hot water extract, CEE 70% ethanol extract, CSE subcritical water extraction

(마) 계피추출물의 항염증 효과

계피추출물이 LPS에 의한 Caco-2 세포의 TEER 감소를 억제할 수 있는지 확인함. TEER 측정 결과로, LPS 처리에 의해 세포의 TEER 값이 유의적으로 감소한다는 것을 확인하였음.(그림 32). 48시간이 경과하였을 때 LPS 처리군에서 TEER 값이 대조군에 비해 약 25% 정도 더 감소함을 확인하였음(그림 32.(B)). LPS 처리가 Caco-2 세포의 tight junction을 손상시킨다는 것을 확인할 수 있었으나 반면에, 계피추출물 전처리하는 LPS로 감소된 TEER 값의 감소를 억제함. 계피추출물 처리군은 대조군과 비슷하거나 더 높은 TEER 값을 나타내었으며( $p < 0.05$ ) (그림 32.(B)) 계피아임계 추출물(CSE)이 계피열수추출물(CWE)과 계피에탄올추출물(CEE) 보다 약간 높은 TEER 값을 나타냄.

계피추출물이 tight junction을 통한 FITC-dextran의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위해 FITC-dextran을 처리하고 48시간 후에 관찰하였음. 그림 32.(C)에서 보이는 바와 같이 LPS 처리군에서 FITC-dextran flux가 약 1.5배 증가되었으나 계피추출물 처리군에서 LPS 처리로 인한 FITC-dextran flux가 대조군과 비슷하게 감소됨.( $p < 0.05$ ). 계피에탄올추출물 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 군에서 가장 낮은 값을 확인함(그림 32.(C)).

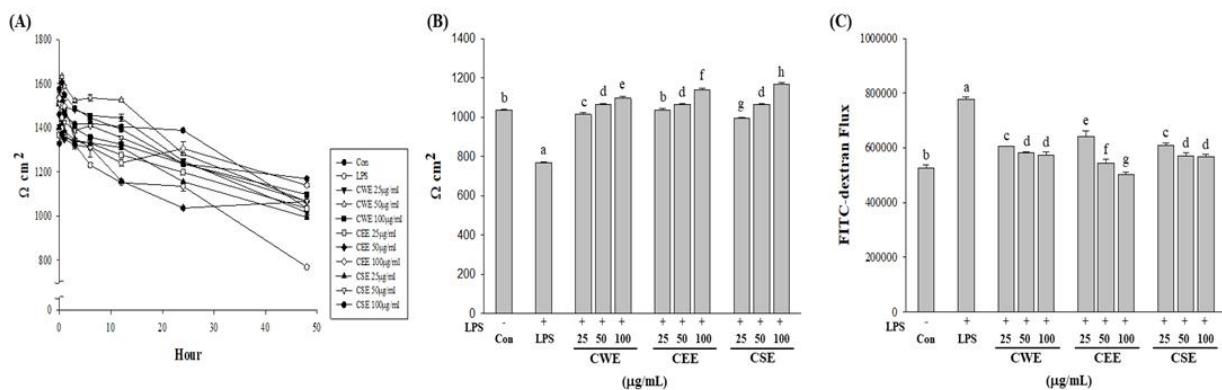
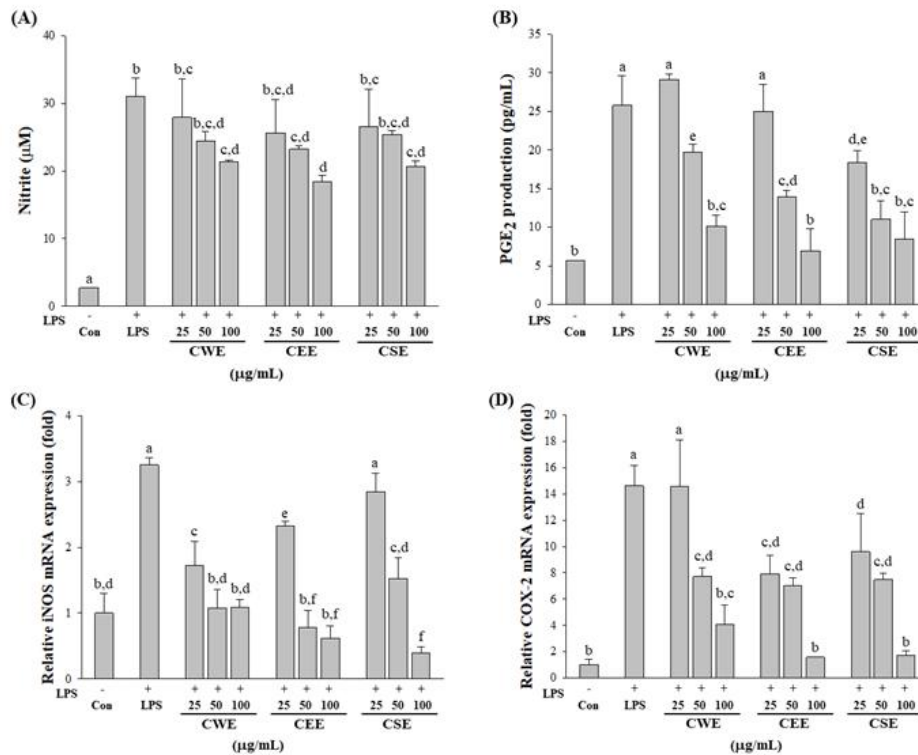


그림 32. (A) Time course of transepithelial electrical resistance (TEER) value, (B) protective effects of cinnamon extracts on TEER value at 48 h, and (C) FITC-dextran flux. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). Con control, LPS lipopolysaccharide, CWE hot water extract, CEE 70% ethanol extract, CSE subcritical water extraction

Co-culture 에서 계피추출물이 LPS로 유도된 NO 생성량에 영향을 미치는지 알아보기 위해 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS 처리 후, NO를 상층부의 세포 상층액에서 측정함. LPS 처리군은 대조군에 비하여 nitrite를 약 30배 정도 증가시킨(그림 33) 반면 계피추출물 처리군은 LPS로 유도된 nitrite 생성량을 감소시켰으며,  $\text{PGE}_2$  함량도 계피추출물 처리군에서 유의적으로 감소함( $p < 0.05$ ). Nitrite와  $\text{PGE}_2$  결과와 비슷하게 iNOS와 COX-2 mRNA 발현량도 계피추출물 처리군에서 감소하였는데( $p < 0.05$ ), LPS 처리군에서 iNOS와 COX-2 mRNA 수준은 대조군과 비교하였을 때 약 3배와 14배 정도 증가한 반면 계피추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군과 비슷하거나 더 낮은 발현량을 나타냄.



**그림 33.** Concentration profile of cytokines and relative mRNA expression levels of the genes. The levels of (A) nitrite and (B) PGE<sub>2</sub> were analyzed from the collected culture supernatants using commercially available ELISA kits. Relative mRNA expression profiles of (C) iNOS and (D) COX-2 were measured by qRT-PCR as described in the experimental procedures. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). Con control, LPS lipopolysaccharide, CWE hot water extract, CEE 70% ethanol extract, CSE subcritical water extraction

계피추출물이 장내 염증과 관련된 다른 사이토카인에 영향을 미치는지 알아보기 위해, IL-6, IL-8, 및 TNF- $\alpha$ 의 수준을 분석함. iNOS와 COX-2 결과와 동일하게, LPS로 인해 염증성 사이토카인의 함량과 mRNA 발현량이 증가하였으나 계피추출물은 이러한 IL-6, IL-8, 및 TNF- $\alpha$ 의 함량과 mRNA 발현량의 증가를 농도 의존적으로 감소시켰으며( $p < 0.05$ ) 세 가지 추출물 중 계피아임계 추출물의 효과가 가장 좋았음. (그림 34).

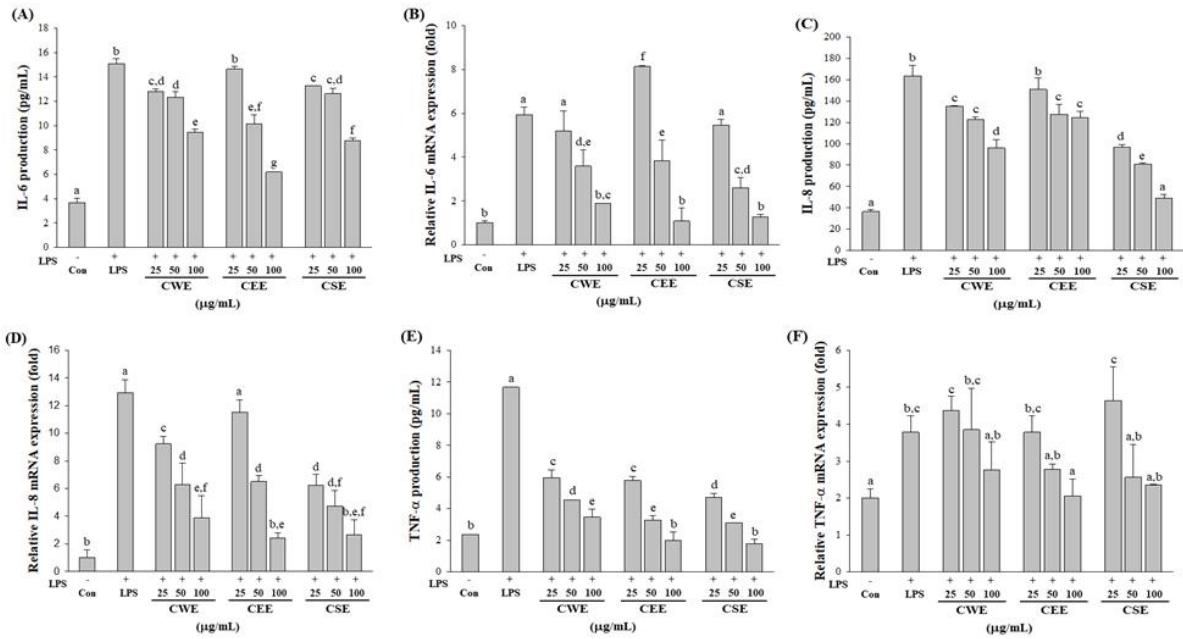


그림 34. Protein and mRNA levels of pro-inflammatory cytokines. The levels of (A) IL-6, (C) IL-8, and (E) TNF- $\alpha$  were analyzed from the collected culture supernatants using commercially available ELISA kits. Relative mRNA expression levels of (B) IL-6, (D) IL-8, and (F) TNF- $\alpha$  were measured by qRT-PCR as described in the experimental procedures. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). Con control, LPS lipopolysaccharide, CWE hot water extract, CEE 70% ethanol extract, CSE subcritical water extraction

계피추출물의 NF- $\kappa$ B 전사 억제에 대한 효과를 평가하기 위해 NF- $\kappa$ B 활성을 측정함. LPS 처리군에서 NF- $\kappa$ B 활성은 대조군에 비해 약 9배 정도 증가함. 반면 계피추출물은 유의적으로 NF- $\kappa$ B 활성을 억제하였는데( $p < 0.05$ ), 계피아임계 추출물이 계피열수추출물과 계피에탄올추출물 보다 더 좋은 효과를 나타낸 것을 확인함(그림 35).

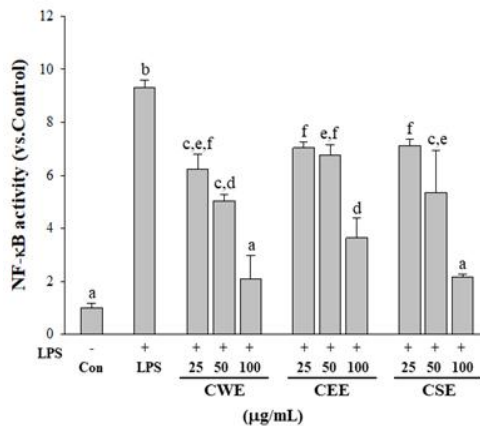


그림 35. The effect of cinnamon extracts on NF- $\kappa$ B activity. NF- $\kappa$ B activity was quantified using an ELISA kit. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). Con control, LPS lipopolysaccharide, CWE hot water extract, CEE 70% ethanol extract, CSE subcritical water extract

(바) 계피 아임계 추출물의 NF-κB pathway 억제와 tight junction 강화 효과

대조군과 비교했을 때, LPS 처리군에서 JNK, NF-κB, IKKαβ, 및 p38MAPK의 인산화가 증가함. 계피아임계 추출물을 처리한 경우, LPS로 유도된 JNK, NF-κB, IKKαβ, 및 p38MAPK의 활성이 억제되었으며( $p < 0.05$ ) (그림 36), 계피아임계 추출물 100 μg/mL은 대조군과 비슷하게 JNK, NF-κB, IKKαβ, 및 p38MAPK의 인산화를 감소시킴.

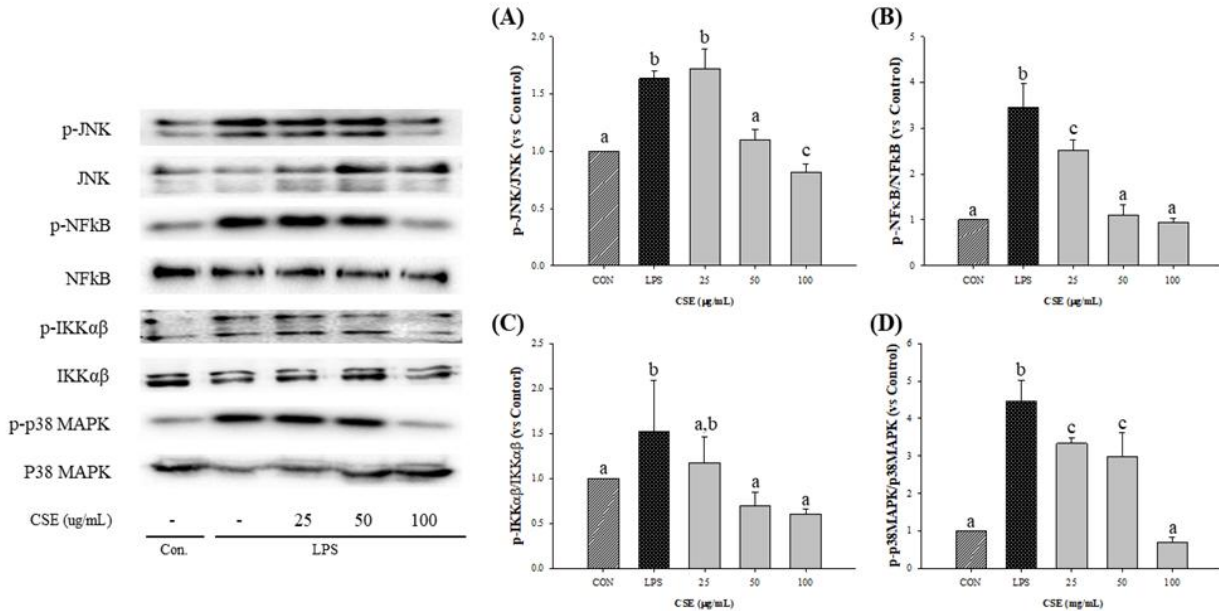


그림 36. The effect of CSE on NF-κB signaling pathway. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). Con control, LPS lipopolysaccharide, CSE subcritical water extraction

계피아임계 추출물 처리에 따른 Caco-2 세포에서의 tight junction의 메커니즘을 확인하기 위해, tight junction 단백질의 발현량을 확인하였음(그림 37). 계피아임계 추출물 100 μg/mL에서 ZO-1, occludin, 및 claudin-1의 mRNA와 단백질 발현량은 대조군과 비교했을 때 유의적으로 증가함( $p < 0.05$ ).

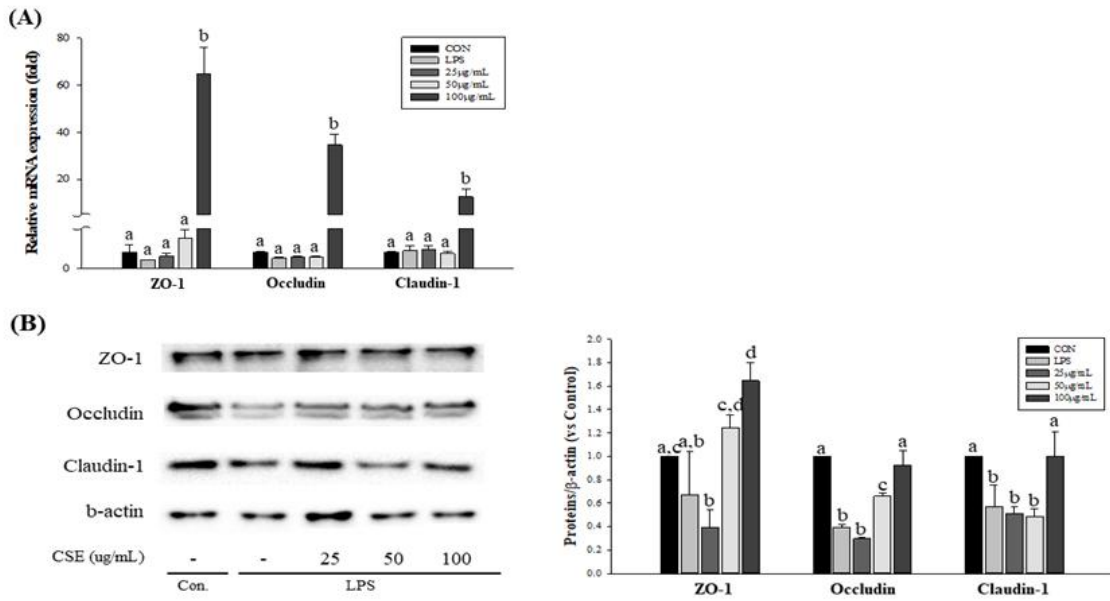


그림 37. The effect of CSE on the expression of tight junction proteins. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). Con control, LPS lipopolysaccharide, CSE subcritical water extraction

Confocal fluorescent microscopy로 확인한 결과, 계피아임계 추출물은 ZO-1, occludin, 및 claudin-1의 면역형광 강도를 LPS 처리군에 비해 증가시킨 것을 확인함.(그림 38).

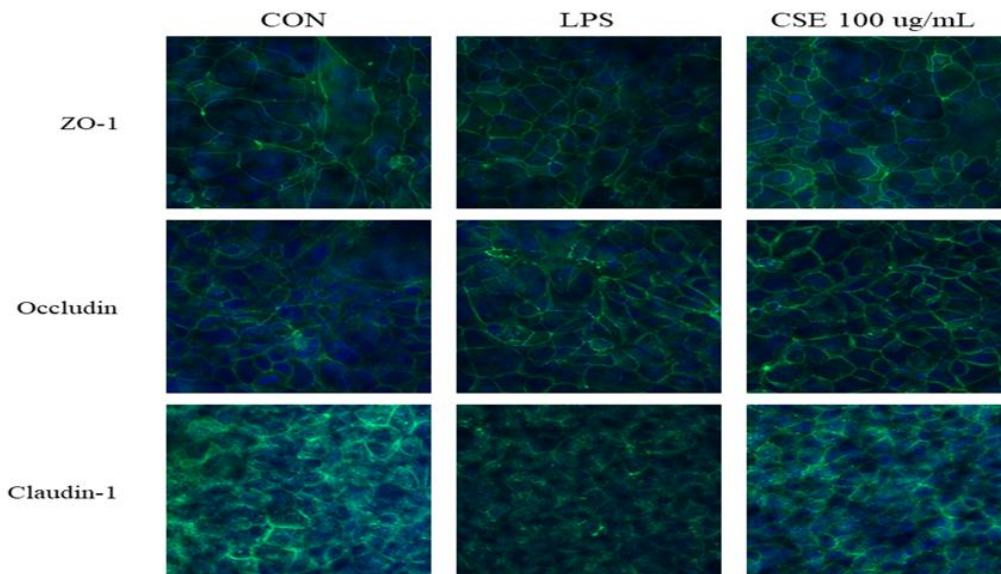


그림 38. The effect of CSE on subcellular distribution of the tight junction protein ZO-1, occludin and claudin-1 in Caco-2 cells. Immunofluorescence images of control, LPS, and CSE (100  $\mu$ g/mL). ZO-1, occludin and claudin-1 (green). Nuclei are presented in blue (DAPI).



나. 최적 추출 조건 확립 및 시험생산

(1) RSM(Response Surface Method, 반응표면분석) 기법을 활용한 생강 및 계피 추출 최적 조건 확립

(가) 추출 용매 결정

추출 용매에 따른 계피 추출물의 *in vitro* 시험에서 다른 용매와 비교하여 높은 효과를 보여주고 계피의 주요 성분인 cinnamic acid 및 cinnamaldehyde 추출이 비교적 효율적이며, 독성물질인 coumarin 추출능력이 낮은 아임계수를 용매로 사용하기로 결정함.

(나) 생강 및 계피의 추출 최적 조건

계피 아임계수 추출공정의 최적 조건 확립을 목적으로 Box-Behnken design(3 수준 3요인)을 이용하였다. 추출에 영향을 미치는 온도(110~130℃), 시간(20~60분), 압력(2~6MPa)을 독립변수로 설정하여 축값을 포함한 3수준에서 실험을 진행하였으며 반응표면분석법을 이용하여 최적 추출 조건을 탐색한 결과 최적 추출 조건은 추출온도 130℃, 추출압력 5MPa, 추출시간 40분인 것으로 분석됨.

생강 주정 추출공정의 최적 조건 확립을 목적으로 Box-Behnken design(3 수준 3요인)을 이용하였다. 추출에 영향을 미치는 온도(5~70℃), 시간(30~90분), 주정 농도(0~70%)를 독립변수로 하고, 15가지 조건으로 추출된 주정 추출물 Run1~15 생강 주정 추출물 (표 8)에 대한 TEER, NO, permeability 값을 측정함. 반응표면분석법을 이용하여 TEER NO, permeability 값들이 최적이 되는 추출 조건을 탐색한 결과 최적 추출 조건은 추출온도 50℃, 주정 농도 50%, 추출시간 35분인 것으로 분석됨.

**표 8. Box behnken design**

- independent factors : 추출온도, 추출시간, 압력
- Levels : 3 levels (-1, 0, 1)

Factors	Levels		
	Low(-1)	Central(0)	High(+1)
(X1)Temperature(℃)	110	120	130
(X2) Extraction time(min)	20	40	60
(X3) Pressure(MPa)	2	4	6
Run	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1

9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

<표 8. 15가지 조건으로 추출된 계피 아임계수 추출물>

**표 9. Box behnken desing**

- independent factors : 추출온도, 추출시간, 주정농도
- Levels : 3 levels (-1, 0, 1)

Factors	Levels		
	Low(-1)	Central(0)	High(+1)
(X1)Temperature(℃)	50	60	70
(X2) Extraction time (min)	30	60	90
(X3) Ethanol concentration(%)	0(DW)	35	70
Run	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

(1) 확립된 추출 조건을 기반으로 기능성 확인 연구용 pilot scale 생산

(가) In vitro 및 in vivo, 인체적용시험에 필요한 생강 주정 추출물 및 계피 아임계수 추출물 생산함.

RSM 기법으로 분석하여 최적 추출 조건을 확립하였으나 경제성을 고려하여 계피 추출물의 추출 조건을 조정하여 생산하였다.

계피 원물 100kg을 아임계수 추출하여 10.25kg의 계피 추출물과 건강 50kg을 주정 추출하여 12.8kg의 건강 추출물을 생산하였으며, 생산 수율은 계피 약 11%, 생강 약 12%였다.



계피 아임계수 추출 분말



건강(건조생강) 주정 추출분말  
(30% 건강 추출물+ 70% 부형제)

(주)대호양행	제 조 지 시 기 록 서 ( 계 피 추 출 분 말 )			문서번호		DHP-201-207	
				보존	3년	Page	1/6

제 품 명	계피추출분말						
-------	--------	--	--	--	--	--	--

Lot No.	천호바이오-01	유통기한	-	제조단위	kg		
제조지시일	2017.09.19	제조시작일	2017.09.19	제조완료일	2017.09.26		
성상 및 유형	갈색의 분말			제조지시자	김상준		

No	Lot No	시험번호	원 료 명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	칭량자	확인자
1			계피추출물 (고형분 100%로서)	100		13.6		최형재
합계				100				최형재

칭량시 확인사항	저울 영점 확인	확인	
	칭량실 온·습도 확인	온도 : 26.1 °C	습도 : 30 %

특기사항

공정명	추출/농축	배 합	건조(SD)	기 타
제조일자	2017.09.19 ~ 09.20	2017.09.26	2017.09.26	
공정투입량	100	13.6	13.6	
실제생산량	13.6	13.6	9.8	
수 율(%)	13.6%	100%	72.06%	

비 고 천호바이오 - 서우용	결 재		
	제조관리책임자	품질관리책임자	총괄책임자

계 피 추 출 분 말 제 조 지 시 기 록 서

## 제 품 시 험 성 적 서

결 재	담당자	품질 관리인
		

제품명 : 계피추출분말(임가공)

시 험 항 목	규 격 기 준	시 험 결 과	비 고
성 상	고유의 색택과 향미를 가지 고 이미 · 이취가 없어야 한다.	적합	
이물	적합	적합	
타르색소	불검출	불검출	
수분(%)	8.0이하	적합	
일반세균(cfu/g)	1,000이하	실험중	
대장균군(/g)	음성	실험중	
제조연월일	2017년09월26일		
Lot No.	천호바이오-01		
판 정	적 합		

상기와 같이 건본시험성적서를 제출합니다  
2017년 09월 28일

주식회사 대 호 양 행 품 질 관 리 과  
경기도 화성시 팔탄면 덕우리 84-28  
대표전화 : (031)354-8321 팩스 : (031)354-8323



계피 추출 분말 시험성적서

(주)대호양행	제 조 지 시 기 록 서 (건강주정추출분말)		문서번호		DHP-201-207	
			보존	3년	Page	1/6

제 품 명	건강주정추출분말				
-------	----------	--	--	--	--

Lot No.	천호바이오-02	유통기한	-	제조단위	kg
제조지시일	2017.09.20	제조시작일	2017.09.20	제조완료일	2017.09.26
성상 및 유형	갈색의 분말			제조지시자	김상준

No	Lot No	시험번호	원 료 명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	칭량자	확인자
1			건강추출물 (고형분100%로서)	30		5.55	오	최희재
2	2017.09.09		덱스트린	70		12.96	오	최희재
합계				100			오	최희재

칭량시 확인사항	저울 영점 확인	행 인	
	칭량실 온-습도 확인	온도 : 22 °C	습도 : 17 %

특기사항

공정명	추출/농축	배 합	건조(SD)/완포장	기 타
제조일자	2017.09.20~09.21	2017.09.26	2017.09.26	
공정투입량	70	12.51	12.41	
실제생산량	5.55	12.51	12.40	
수 율(%)	11.11%	100%	66.99%	

비 고	결 재		
	제조관리책임자	품질관리책임자	총괄책임자
	오	kw	오

건강 주정 추출 분말 제조지시기록서

## 제 품 시 험 성 적 서

결 계	담당자	연구 소장
		

제품명 : 건강주정추출분말(임가공)

시 험 항 목	규 격 기 준	시 험 결 과	비 고
성 상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미 · 이취가 없어야 한다.	적합	
이물	적합	적합	
타르색소	불검출	불검출	
수분(%)	8.0이하	적합	
일반세균(cfu/g)	1,000이하	실험중	
대장균군(/g)	음성	실험중	
제조연월일	2017년09월26일		
Lot No.	천호바이오-02		
판 정	적 합		

상기와 같이 제품시험성적서를 제출합니다.

2017년 09월 28일

주식회사 대 호 양 행 품 질 관 리 과

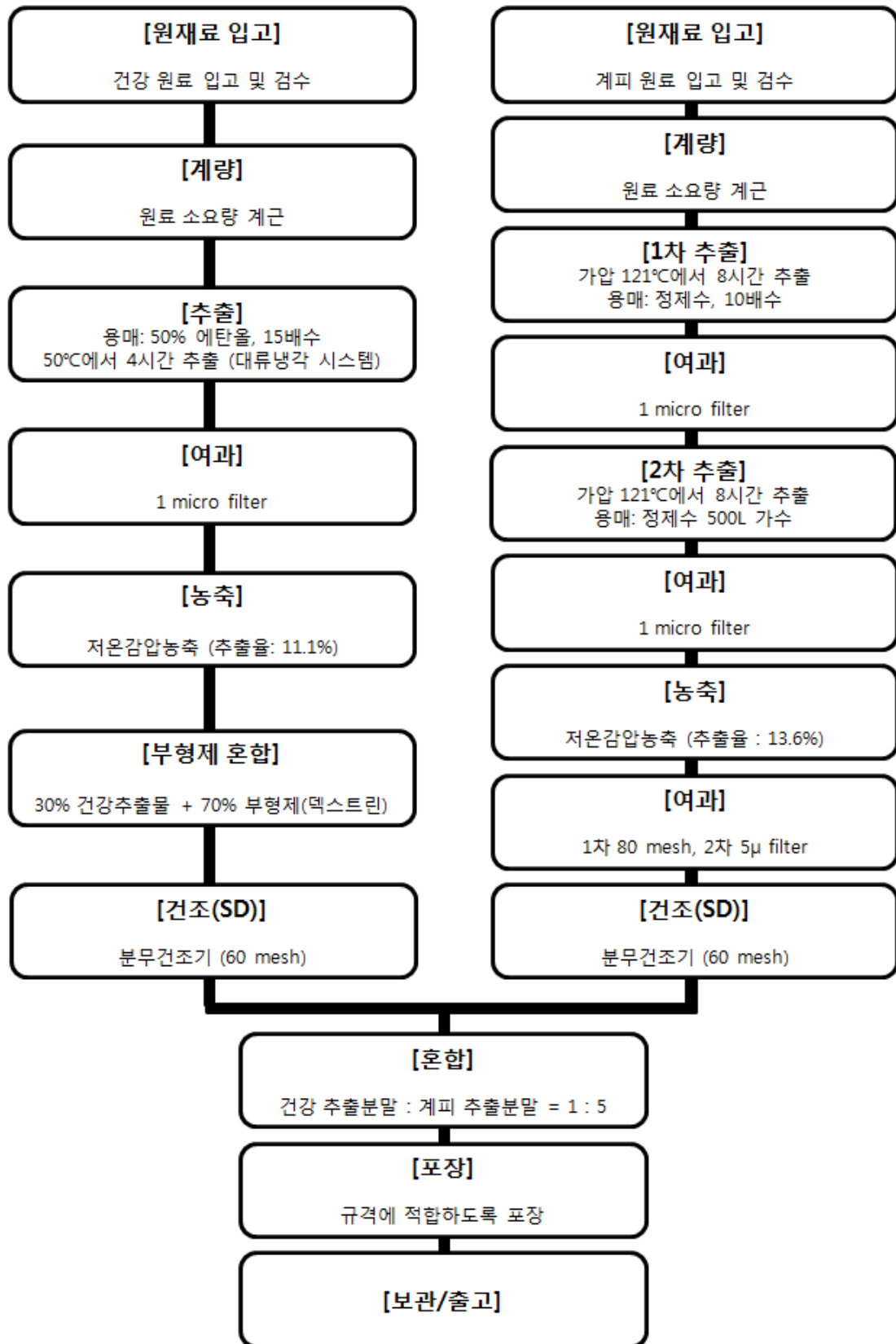
경기도 화성시 팔탄면 온천로 49-4

대표전화 : (031)354-8321 팩스 : (031)354-8323

www.daehocorp.co.kr



건강 주정 추출물 시험성적서



건강·계피 복합물 제조 공정도



### 3. 생강 및 계피 추출물 복합물의 기능성 확인 연구

가. *In vitro* 및 *in vivo* 시험을 통하여 생강 및 계피 추출물 장 건강 기능성 최적 복합 비율 확립

#### (1) *In vitro* 시험

##### (가) 생강, 계피 복합물의 장내 세균 생육 촉진 활성

생강계피 복합물에 대한 장내 세균의 활성 효과를 측정하기 위해 Modified EG 액체배지에 생강계피 복합물을 비율별로 처리한 결과를 그림 39에 나타내었다. 장내 유익균인 *B. longum*와 *Lactobacillus* sp.는 모든 생강계피복합물과 계피추출물에서 대조군과 유의적인 차이를 나타내었고, 유익균인 *L. acidophilus*는 생강추출물, 모든 생강계피복합물 및 계피추출물에서 대조군과 유의적인 차이를 나타냄( $p < 0.05$ ). 생강계피 복합물의 생강:계피 비율을 10:0으로 처리한 결과, 장내 유익균인 *B. longum*, *Lactobacillus* sp. 균주의 생육이 감소하는 경향을 나타냈고 유익균인 *L. acidophilus*의 생육은 유의적으로 증가함( $p < 0.05$ ). *B. longum*은 생강:계피 7:1, 3:1, 1:1 및 1:5 복합물에서 최대 생육 활성이 나타났고, *Lactobacillus* sp.는 생강:계피 5:1, 3:1, 1:5, 1:7 및 0:10 복합물에서 가장 높은 생육 활성을 보였으며, *L. acidophilus*는 생강:계피 1:5, 1:7 및 0:10 복합물에서 최대 생장을 나타냄. 생강계피 복합물은 장내 유익균인 *B. longum*, *Lactobacillus* sp.와 *L. acidophilus* 균주의 생육을 촉진시켰고 특히, 1:5 복합물이 세 가지 장내 유익균의 생육을 모두 최대로 상승시키는 것으로 관찰됨.

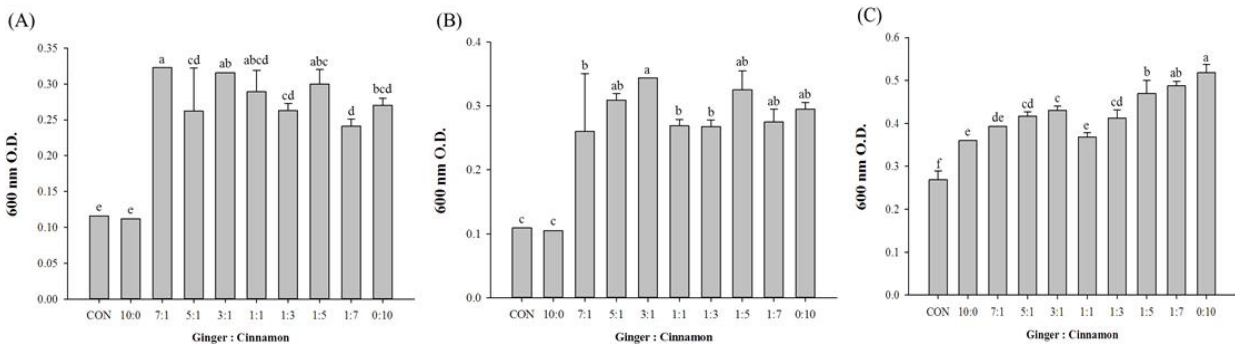


그림 39. Effects of Ginger and Cinnamon extract mixtures on growth of intestinal bacteria by modified EG broth. (A) *Bifidobacterium longum*, (B) *Lactobacillus* sp., (C) *Lactobacillus acidophilus*. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CON, control

(나) 생강계피 복합물의 항염증 효과

생강계피 복합물이 LPS에 의한 Caco-2 세포의 TEER 감소를 억제할 수 있는지 확인하였다. TEER 측정 결과로, LPS 처리에 의해 세포의 TEER 값이 유의적으로 감소한다는 것을 확인함(그림 40). 48시간이 경과하였을 때 LPS 처리군에서 TEER 값이 약 60% 정도 감소하였고, 대조군에 비해 TEER 값을 약 16% 정도 더 감소시킴(그림 40. (B)). LPS 처리가 Caco-2 세포의 tight junction을 손상시킨다는 것을 확인할 수 있었던 반면 생강계피 복합물 전처리는 LPS로 감소된 TEER 값의 감소를 억제함. 생강:계피 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 복합물은 대조군보다도 TEER 값이 증가하였으며, 생강:계피 1:3 복합물이 가장 좋은 효과를 나타냄(그림 40. (B)).

생강계피 복합물이 TJ를 통한 FITC-dextran의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위해 FITC-dextran을 처리하고 48시간 후에 관찰한 결과. Fig. 14(C)에서 보이는 바와 같이 LPS 처리군에서 FITC-dextran flux가 약 1.5배 증가함. 그러나 생강계피 복합물 처리군에서 LPS 처리로 인한 FITC-dextran flux가 감소되었다. 생강:계피 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 복합물은 대조군과 유사한 결과를 보여줌(그림 40.(C)).

Co-culture 에서 생강계피 복합물이 LPS로 유도된 NO 생성량에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 2 µg/mL의 LPS 처리 후, NO를 상층부의 세포 상층액에서 측정함. LPS 처리군은 대조군에 비하여 NO를 약 40배 정도 증가시킴(그림 40.(D)). 반면 생강계피 복합물 처리군은 LPS로 유도된 NO 생성량을 감소시켰으며, 여러 복합물 중 생강:계피 1:1, 1:5와 1:7 복합물이 약 2배씩 감소시켜 가장 좋은 효과를 나타냄.

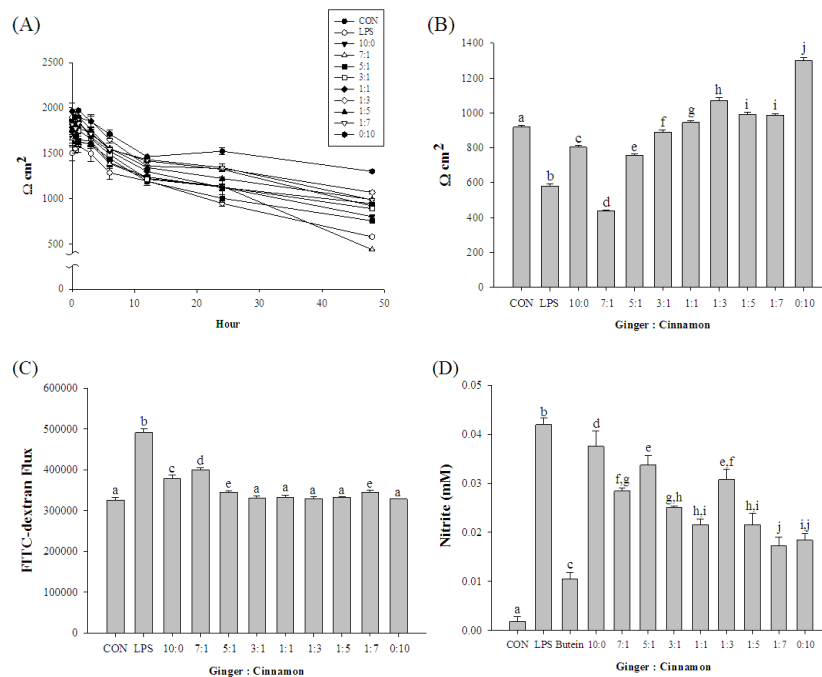


그림 40. (A) Time course of TEER value, (B) protective effects of ginger and cinnamon extract mixtures on TEER value at 48 h, (C) FITC-dextran flux., and (D) Concentration profile of Nitrite. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CON, control; LPS, lipopolysaccharide

(2) *In vivo* 실험 방법

(가) 동물

본 실험에 사용한 동물은 5주령 female BALB/c 마우스로 체중이 19 g 전후의 것을 사용하였으며, 1주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 실험 수행함. 구입한 마우스는 12 시간 dark-light cycle로 조절한 실험실 내에서 물과 사료는 충분한 양을 공급하여 사육함. (이화여자대학교 동물실험윤리위원회 IACUC No. 17-037 및 18-033)

(나) 시료 투여 및 대장염 유도

실험동물은 1주일간의 적응기간을 가진 뒤 무게를 측정하고 임의로 각 군당 8마리씩 나누어서 실험을 수행함. 정상군과 DSS 유도군은 증류수, 생강균, 계피균, 및 생강계피복합물군은 생강, 계피추출물, 또는 생강계피복합물을 증류수에 희석하여 21일간 시험물질을 경구 투여함. DSS의 농도는 5%로 정하였으며, 정상군을 제외하고 시료 투여 후 15일째부터 음수에 녹인 5% DSS를 7일간 자유롭게 섭취하게 하여 대장염을 유도하였고, 실험기간 중 3일에 한 번씩 개체별 체중, 식이량과 음수량을 측정하였고, 동일한 시간대에 동일한 저울을 사용하여 측정함. DSS 섭취 시작일부터는 매일 체중, 식이량, 음수량을 측정함.

(다) 혈청 분리 및 대장 길이 측정

실험동물은 희생 12시간 전에 절식시켰으며, CO<sub>2</sub> 로 마취하고 안와채혈 진행한 후 채취한 혈액은 실온에서 30분 정도 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 -80 °C에서 냉동 보관하였으며, 채혈 직후 대장을 분리하여 생리식염수에 담가 겉에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거한 뒤 대장의 길이를 측정하고 -80 °C에서 냉동 보관함.

(라) Disease activity index (DAI) 측정

대장염의 정도를 나타내는 질병 활동성 지표 (DAI)는 table 3에 따라 체중 감소율, 대변의 상태, 직장 출혈 정도에 근거하여 계산하였음. DAI 값은 체중 감소율 + 변의 상태 + 출혈 정도를 더한 값임.

표 10. Criteria for disease activity index

Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Fecal bleeding
0	<0	Normal	Normal
1	1-5	-	-
2	6-10	Soft	Slightly bloody
3	11-15	Loose	Bloody
4	>15	Diarrhea	Severely bloody

(마) 조직학적 관찰

실험동물의 대장을 적출하여 생리식염수를 사용하여 깨끗이 씻어 10% 중성 포르말린 용액에 넣어 고정시킨 뒤 조직학적 평가를 위해 파라핀 조직표본을 제작하여 각 조직표본을 4 μm 두께로 절편함. 조직학적 검사를 위해 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색하고 광학 현미경을 이용하여 관찰함.

(바) Myeloperoxidase (MPO) 활성 확인

대장 조직의 MPO 활성은 MPO 활성 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 평가하였음. 잘린 대장의 무게를 측정된 다음 MPO 분석 용액에 넣고 균질기로 균질화한 후 13,000g에서 10분 동안 원심분리 하였고, 상층액을 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였음. MPO standard를 사용하여 표준곡선을 작성하여 sample의 MPO 활성을 계산하였다. MPO 활성은 units/mg tissue로 표시함.

(사) 대장조직에서 염증성 사이토카인 확인

대장조직을 lysis buffer에 넣고 균질화한 후 13,000g에서 10분 동안 원심분리 하였음. 상층액을 이용하여 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α를 ELISA kit (Abnova Ltd., Cambridge, UK) 매뉴얼에 따라 측정하였고 상층액의 총 단백질 함량은 BCA 단백질 함량 측정 kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 측정함.

(아) 대장조직에서 qRT-PCR 확인

총 RNA는 TRIzol을 사용하여 마우스의 대장조직으로부터 추출하였음. 대장조직에 TRIzol을 넣고 5분 후에 클로로포름을 첨가하고 동량의 이소프로판올과 혼합하였음. RNA-to-cDNA Kit를 사용하여 역전사법으로 cDNA를 합성하고 Step-One-Plus RT-PCR 시스템으로 Universal Probe Library (UPL) probe 방법을 사용하여 qRT-PCR을 진행함. RNA의 상대적 양은 GAPDH의 양에 대해 표준화하여 2<sup>-ΔΔCT</sup> 방법을 사용하여 계산함.

표 11. Primers used for qRT-PCR analysis in colon

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	aagagggatgctgcccttac	ccattttgtctacgggacga
IL-1β	agttgacggaccccaaaag	agctggatgctctcatcagg
IL-6	gctaccaaaactggatataatcagga	ccaggtagctatggtactccagaa
TNF-α	tcttctcattcctgcttgtgg	ggtctgggccatagaactga
ZO-1	aatcatccgactcctcgtc	cagttggctccaacaaggtaa
Occludin	gtccgtgaggccttttga	ggtgcataatgattgggtttg
E-cadherin	atcctcgcctgctgatt	accaccgttctctcccgta
Mucin-1	ctgttcaccaccatcgac	cttggagggaagaaaacc
Mucin-2	gcagccacagatcccaaa	ggtgggtcccctgaagt

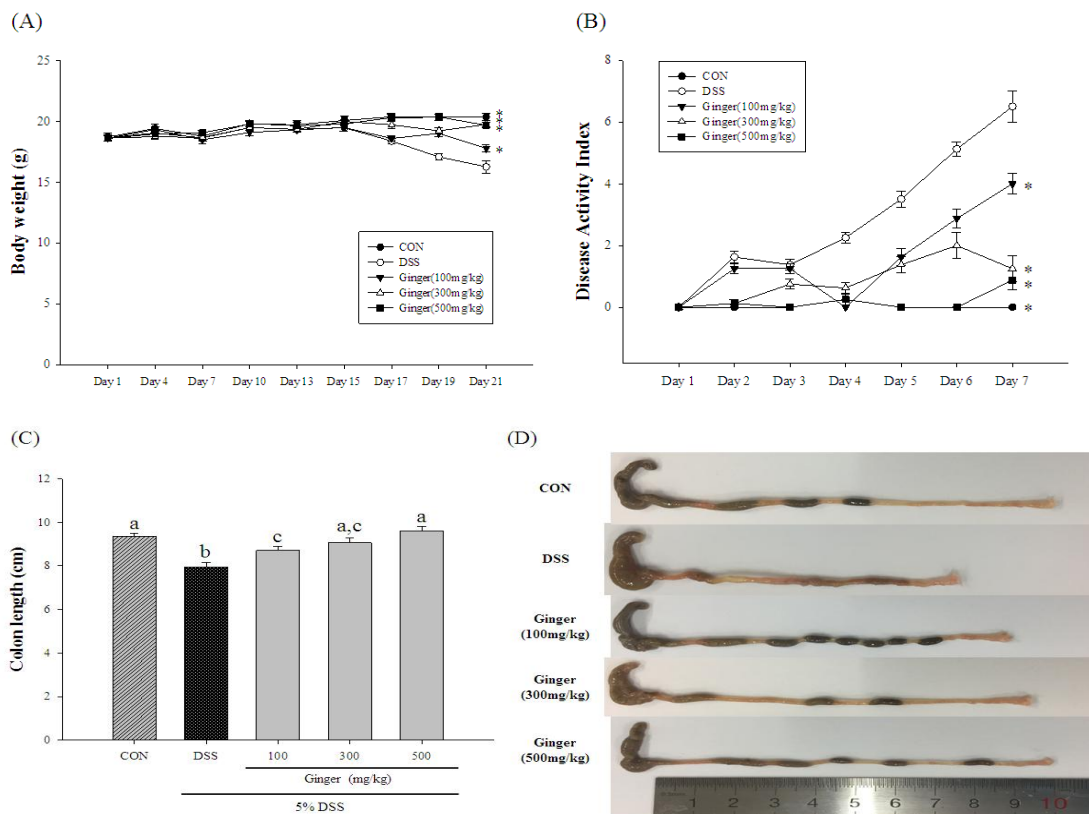
### (3) *In vivo* 실험 결과 및 최적 복합비율 선정

#### (가) 생강 추출물 섭취 후 체중 및 DAI, 대장 길이의 변화

5% DSS 섭취에 의해 궤양성 대장염이 유도된 DSS군의 체중은 약 12% 감소되었고 CON군(정상대조군)은 체중이 약 8% 증가함. 생강추출물 투여군(Ginger군)은 DSS군 보다 체중이 증가하였고, 생강추출물 300 mg/kg B.W.과 500 mg/kg B.W. 투여군의 체중은 약 6% 증가하였고 최종 체중은 대조군과 비슷하게 나타남.(그림 41.(A)).

DSS 섭취 7일동안 마우스의 체중 변화, 변의 형태 변화와 변에 피가 섞인 정도에 따라 질환 활성 지표(disease activity index, DAI)로 평가함. DAI는 DSS 섭취일이 지날수록 증가하였으며, DSS군은 DSS 섭취 7일째 6.5점으로 나타났고, CON군은 0.0점으로 나타남. 생강추출물 투여군은 각각 4.0점, 1.3점, 그리고 0.9점으로 나타나 유의적으로 개선됨(그림 41.(B)).

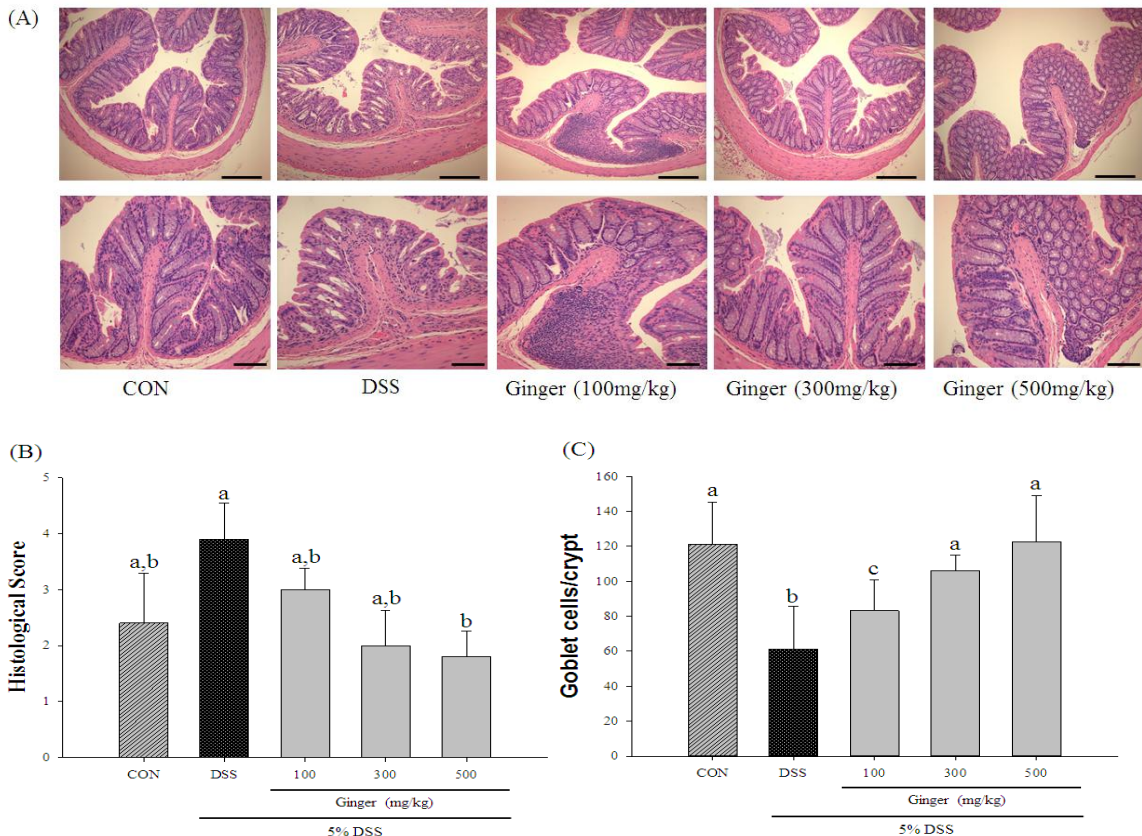
5% DSS 섭취에 의해 궤양성 대장염이 유도된 마우스의 대장은 항문에서 회맹부(ileocecal junction)까지의 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지의 길이를 측정하여 나타냄. DSS군의 대장의 길이는 7.9 cm로 CON군 9.4 cm에 비해 약 16%가 축소되어 DSS 섭취로 궤양성 대장염이 유도되었음을 확인하였고 생강추출물 투여군의 대장 길이는 각각 8.7cm, 9.1 cm, 그리고 9.6 cm로 DSS군보다 유의적으로 길게 나타나 대장염의 증상이 완화되었음을 확인함.(그림 41.(C),(D)).



**그림 41.** Effect of ginger extracts on clinical symptoms and colon shortening in DSS-induced colitis. (A) Body weight was recorded simultaneously on the experimental days; (B) The score of disease activity index; (C) DSS-induced shortened colon was significantly ameliorated by ginger extracts; (D) Representative colons of each group. (\*  $p < 0.05$  compared to the DSS group)

(나) 생강 추출물 섭취 후 대장의 조직학적 변화

마우스에서 매일 DSS 처리로 인한 설사 및 대변 혈액은 결장 감염 및 장벽 장애를 수반한다. DSS로 처리한 마우스 대장에서의 조직학적 절편에서 심각한 담낭 파괴와 염증 세포 침투를 확인함.(그림 42.(A)). 생강추출물은 대장염의 조직병리학적 증상을 감소시키는데 조직학적 점수는 대조군과 비교하여 DSS군에서 약 1.6 배 증가하였으나 생강추출물 투여군에서 대조군과 유사하게 감소하였음(그림 42.(B)). 생강추출물은 조직학적 점수에서 농도 의존적으로 감소시키는 결과를 나타내었고, DSS군에서 점액을 분비하는데 관여하는 배상세포 (goblet cell)의 수는 대조군과 비교하여 감소하였음(그림 42.(C)), 생강추출물 투여군은 농도 의존적으로 배상세포가 증가하였고 생강추출물 500 mg/kg B.W. 투여군은 대조군과 가장 유사한 결과를 확인함.



**그림 42.** Histopathological features of colons from BALB/c mice with 5 % DSS-induced colitis. Hematoxylin and Eosin staining. Magnification 100 × (bar = 100 mm), 200 × (bar = 200 mm). Ginger extracts effectively attenuated (B) histopathological changes and increased (C) goblet cells in the colon with 5 % DSS-induced colitis.

(다) 생강 추출물 섭취 후 대장에서 MPO 활성의 변화

MPO 활성은 근위부 대장에서 염증 세포 침투를 확인하기 위해 평가함. 조직학적 점수와 유사하게 DSS군의 MPO 활성은 대조군에 비해 1.3 배 높았으며, 생강추출물 투여군은 DSS에 의해 유도된 MPO 활성을 유의적으로 억제함.(그림 43)

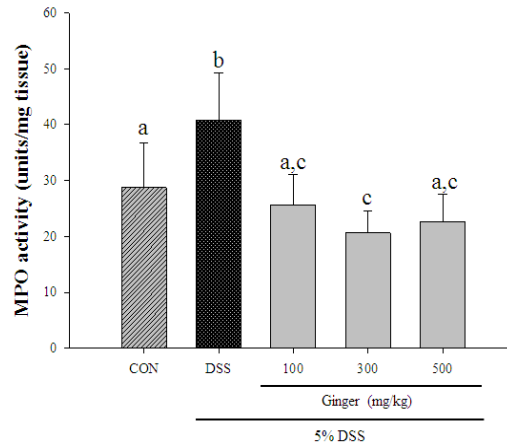


그림 43. Effect of ginger extracts on MPO activity in the colon of DSS-induced BALB/c mice.

(라) 생강 추출물 섭취 후 대장에서 염증성 사이토카인의 함량 및 발현 변화

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인은 대장염 형성에 주요 역할을 함. 이러한 염증성 사이토카인을 차단함으로써 마우스의 대장 염증을 개선시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위해 염증이 있는 대장 조직에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도를 정량화하였음. DSS군에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 농도는 대조군에 비해 1.6 배, 5.0 배, 그리고 6.0 배 이상 증가하였으나 생강추출물을 경구 섭취한 마우스의 대장 조직에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도는 DSS군의 농도와 비교하였을 때 유의하게 감소하였음.(그림 44.(A)).

qRT-PCR은 DSS 유도 마우스의 대장에서 계피아임계 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 모든 실험군에 대해 수행하였음.. DSS는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 염증성 mRNA 발현 수준을 유의하게 증가시켰으며(그림 44.(B)), 이들은 각각 약 20 배, 8 배 및 14 배 증가 하였다. 생강추출물은 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 강하게 억제하였는데, IL-6 및 TNF- $\alpha$  결과에서 생강추출물은 농도 의존적인 감소를 보였으며, 생강추출물 500 mg/kg B.W. 투여군은 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현이 대조군과 유사하거나 더 낮은 수준을 확인함.

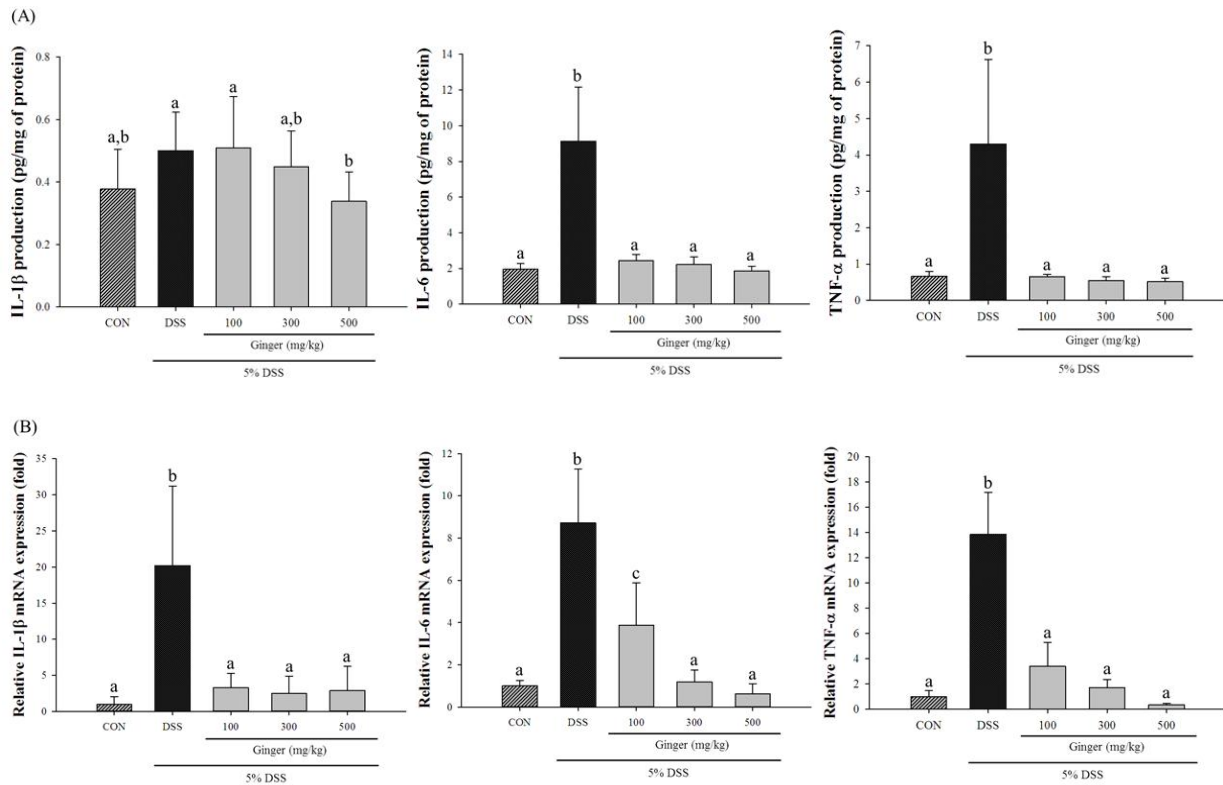


그림 44. Effect of ginger extracts on inflammatory cytokines and mRNA levels in the colon. (A) Concentration profile of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ; (B) Relative mRNA expression profiles of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ .

(마) 생강 추출물 섭취 후 대장에서 tight junction 단백질의 발현 변화

장 점막 장벽에 지속적인 염증과 손상은 IBD의 발생 및 발병에 중요한 역할을 함. 그러므로 대장에서의 ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1 및 mucin-2를 포함한 장벽 기능 관련 단백질의 수준에 대한 생강추출물의 영향을 추가로 확인함.(그림 45). DSS군에서 ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1, mucin-2의 발현은 각각 5.0 배, 1.6 배, 3.0 배, 1.2 배, 그리고 1.4 배 감소하였는데 생강추출물은 대장 점막에서 tight junction 단백질의 mRNA 발현 수준을 향상시킴. 생강추출물 500 mg/kg B.W. 투여군에서 ZO-1, occludin, mucin-1, mucin-2는 대조군의 mRNA 발현 수준보다 1.4 배, 2.4 배, 1.4 배, 그리고 1.6 배 높았으며(그림 45.(A),(B),(D),(E)), DSS군과 비교하여, E-cadherin은 생강추출물 500 mg/kg B.W. 투여군에서 약 2 배 높은 수치를 보여줌.(그림 45.(C)).



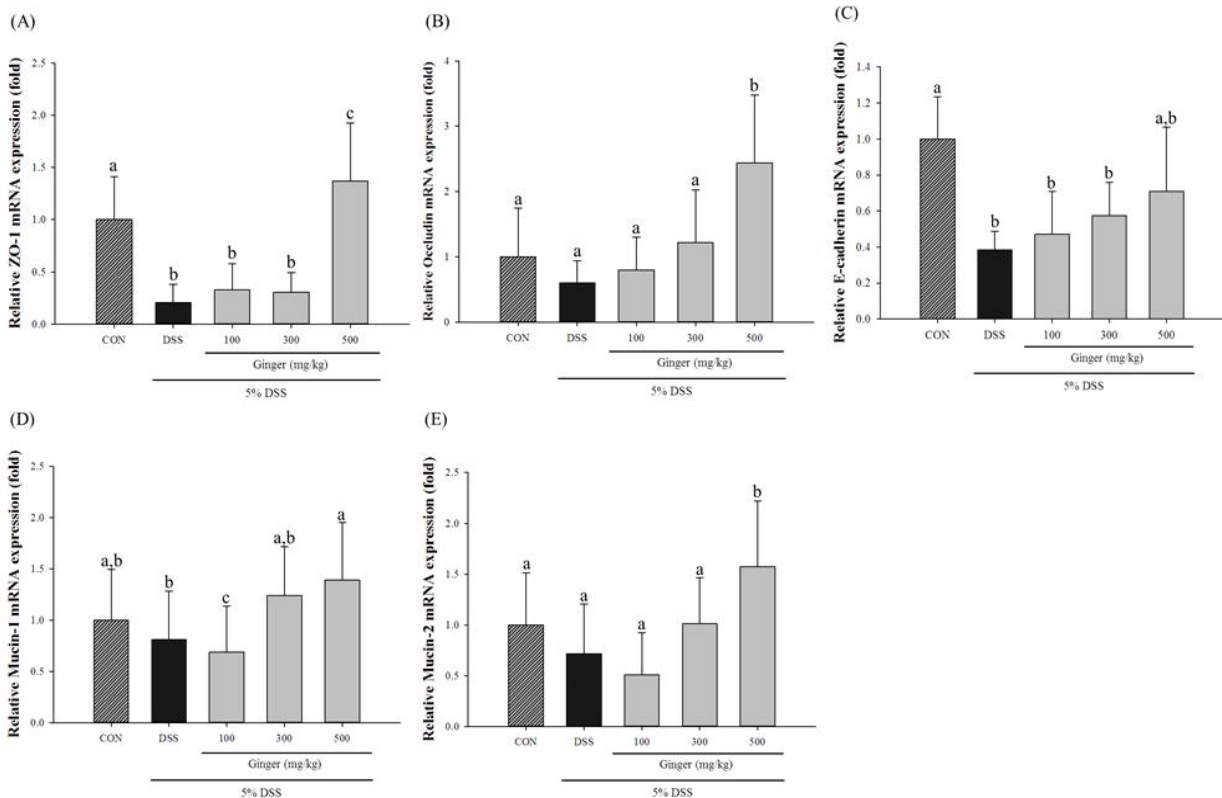


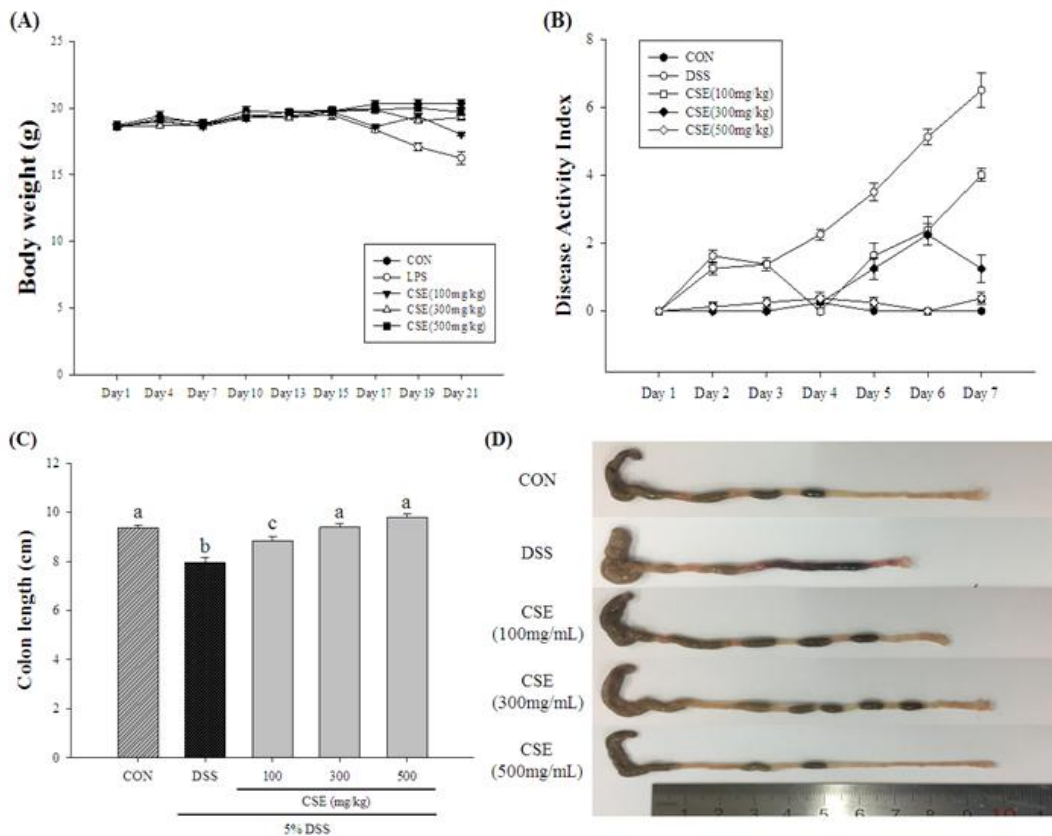
그림 45. Effect of ginger extracts on relative mRNA expression of tight junction proteins in the colon. Relative mRNA expression profiles of (A) ZO-1; (B) occludin; (C) E-cadherin; (D) mucin-1; (E) mucin-2.

(바) 계피 아임계수 추출물 섭취 후 체중 및 DAI, 대장 길이의 변화

5% DSS 섭취에 의해 케양성 대장염이 유도된 DSS군의 체중이 약 12% 감소하였음 CON군(정상대조군)은 체중이 약 8% 증가하였음. 계피아임계 추출물 투여군(CSE군)은 DSS군 보다 체중이 증가하였고, 계피아임계 추출물 투여군의 체중은 약 6% 증가하였고 최종 체중은 대조군과 비슷하게 나타남(그림 46.(A)).

DSS 섭취 7일 동안 마우스의 체중 변화, 변의 형태 변화와 변에 피가 섞인 정도에 따라 질환 활성 지표(disease activity index, DAI)로 평가하였음. DAI는 DSS 섭취일이 지날 수록 증가하였으며, DSS군은 DSS 섭취 7일째 6.5점으로 나타났고, CON군은 0.0점으로 나타났다. 계피아임계 추출물 투여군은 각각 4.0점, 1.3점, 그리고 0.4점으로 나타나 유의적으로 개선됨을 확인함.(그림 46.(B)).

5% DSS 섭취에 의해 케양성 대장염이 유도된 마우스의 대장은 항문에서 회맹부(ileocecal junction)까지의 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지의 길이를 측정하여 나타냄. DSS군의 대장의 길이는 7.9 cm로 CON군 9.4 cm에 비해 약 16%가 축소되어 DSS 섭취로 케양성 대장염이 유도되었음을 확인하였다. 계피아임계 추출물 투여군의 대장 길이는 각각 8.8cm, 9.4 cm, 그리고 9.8 cm로 DSS군보다 유의적으로 길게 나타나 대장염의 증상이 완화되었음을 확인함(그림 46.(C),(D)).



**그림 46.** The effect of CSE on clinical symptoms and colon shortening in DSS-induced colitis. (A) Body weight was recorded simultaneously on the experimental days; (B) the score of disease activity index; (C) DSS-induced shortened colon was significantly ameliorated by CSE; (D) representative colons of each group. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CSE subcritical water extraction

(사) 계피 아임계수 추출물 섭취 후 대장의 조직학적 변화

계피아임계 추출물은 대장염의 조직병리학적 증상을 감소시킴(그림 47). 조직학적 점수는 대조군과 비교하여 DSS군에서 약 1.6 배 증가하였으나 계피아임계 추출물 투여군에서 대조군과 유사하게 감소하였음을 확인함(그림 47.(B)). DSS군에서 점액을 분비하는데 관여하는 배상세포 (goblet cell)의 수는 대조군과 비교하여 감소하였으나 (그림 47. 21(C)), 계피아임계 추출물 투여군에서는 농도 의존적으로 증가하였고, 계피아임계 추출물 500 mg/kg B.W. 투여군이 대조군과 가장 유사함을 확인함.

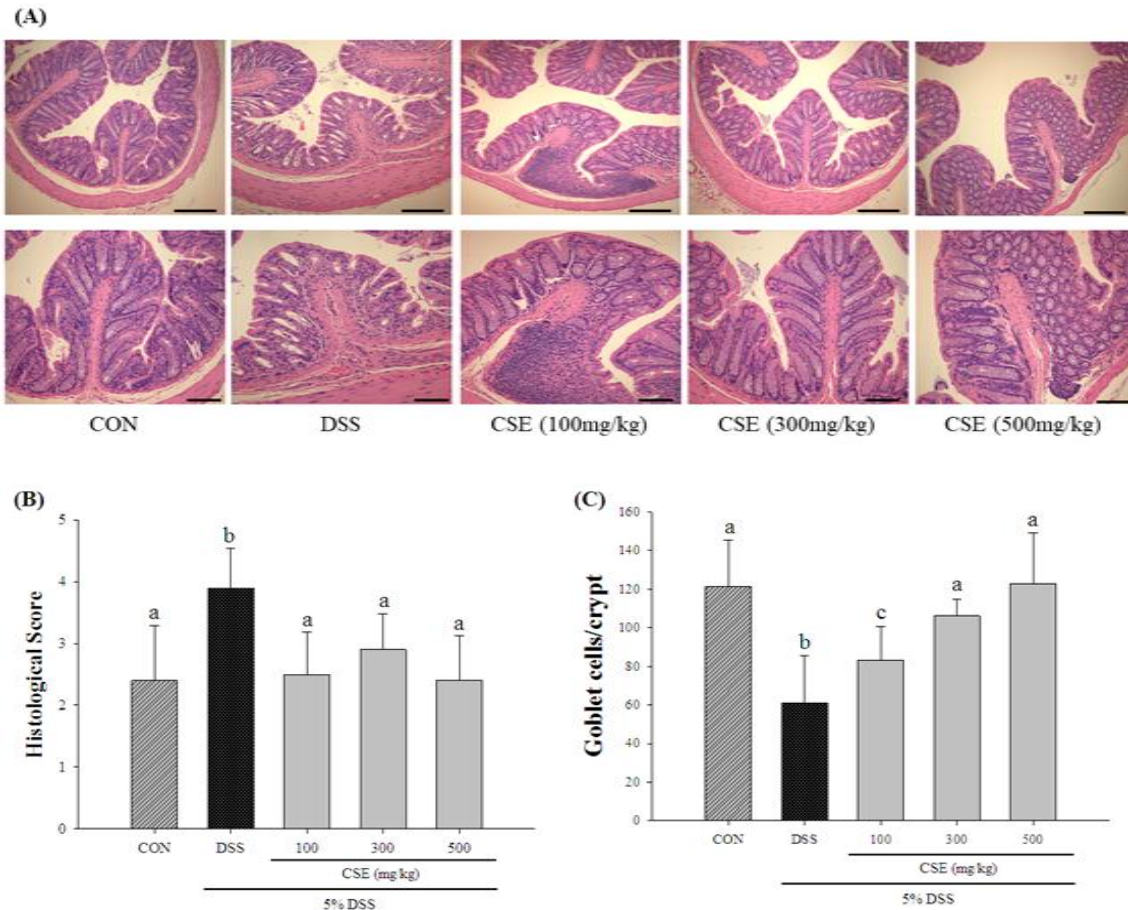
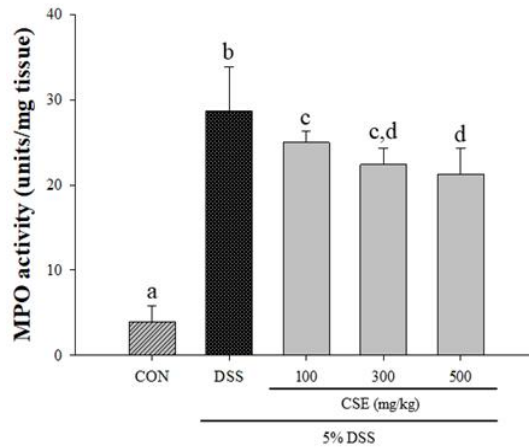


그림 47. The effect of CSE on colonic histopathological changes. (A) Histopathological features of colons from BALB/c mice with 5% DSS-induced colitis. Hematoxylin and Eosin staining. Magnification 100X (bar = 100 mm), 200X (bar = 200 mm). CSE effectively attenuated (B) histopathological changes and increased (C) goblet cells in the colon with 5% DSS-induced colitis. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CSE subcritical water extraction

(아) 계피 아임계수 추출물 섭취 후 대장에서 MPO 활성의 변화

MPO 활성은 근위부 대장에서 염증 세포 침투를 확인하기 위해 평가하였음. 조직학적 점수와 유사하게 DSS군의 MPO 활성은 대조군보다 7.4 배 높았으며 계피아임계 추출물 투여군은 DSS에 의해 유도된 MPO 활성을 농도 의존적으로 억제함.(그림 48).



**그림 48.** The effect of CSE on myeloperoxidase activity in the colon of DSS-induced BALB/c mice. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CSE subcritical water extraction

(자) 계피 아임계수 추출물 섭취 후 대장에서 염증성 사이토카인 함량 및 발현 변화

염증이 있는 대장 조직에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도를 확인하고 계피아임계 추출물의 효과를 비교하였음. DSS군에서 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 농도는 대조군에 비해 1.6 배, 5.0 배, 그리고 6.0 배 이상 증가함. 그러나 계피아임계 추출물을 경구 섭취한 마우스의 대장 조직에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도가 계피아임계 추출물을 투여하지 않은 대장염 유발 마우스 (DSS군)의 농도와 비교하였을 때 유의하게 감소함.(그림 49.(A)).

qRT-PCR은 DSS 유도 마우스의 대장에서 계피아임계 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 모든 실험군에 대해 수행하였음. DSS는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 염증성 mRNA 발현 수준을 유의하게 증가시켰으며(그림 49.(B)), 이들은 각각 약 20 배, 8 배 및 14 배 증가 함. 대조군에서 관찰된 것과 비교하여 계피아임계 추출물은 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 효과적으로 억제함을 확인함. 계피아임계 추출물 투여군에서 IL-6는 농도 의존적으로 감소하였고, IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  수준은 시험된 모든 계피아임계 추출물 투여군에서 대조군의 수준과 유사함을 확인함.

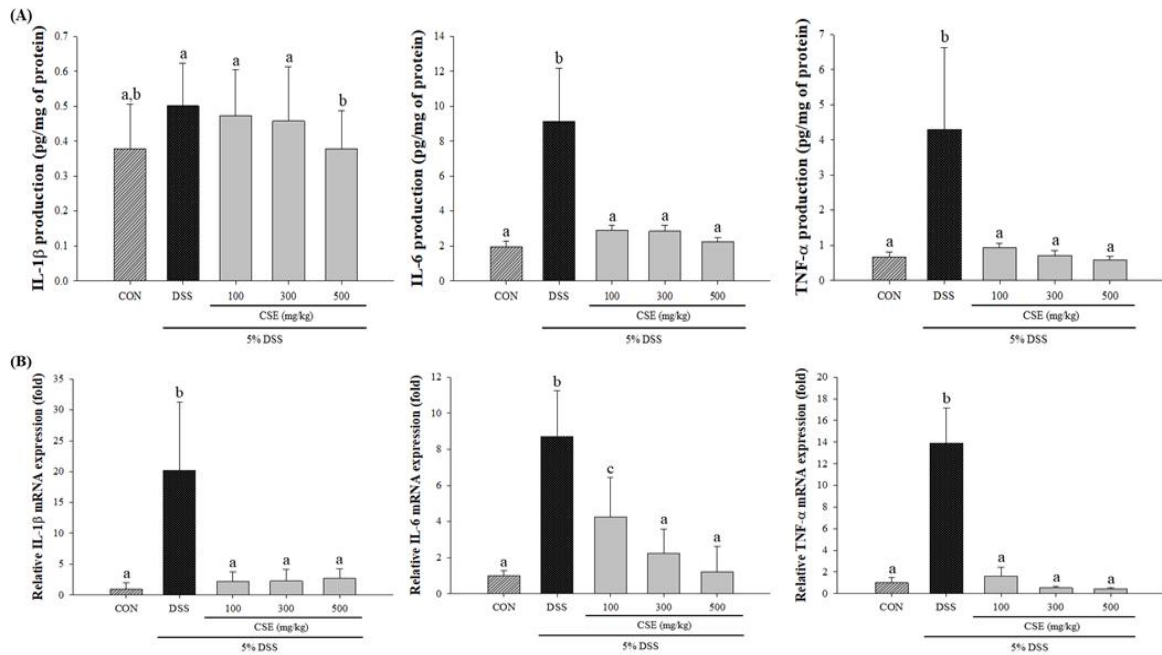


그림 49. The effect of CSE on inflammatory cytokines and mRNA levels in the colon. (A) Concentration profile of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ; (B) Relative mRNA expression profiles of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ . Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CSE subcritical water extraction

(차) 계피 아임계수 추출물 섭취 후 대장에서 tight junction 단백질의 발현 변화

장 점막 장벽에 지속적인 염증과 손상은 IBD의 발생 및 발병에 중요하다. 그러므로 대장에서의 ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1 및 mucin-2를 포함한 장벽 기능 관련 단백질의 수준에 대한 계피아임계 추출물의 영향을 추가로 확인함.(그림 50). DSS군에서 ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1, mucin-2의 발현은 각각 5.0 배, 1.6 배, 3.0 배, 1.2 배, 1.4 배 감소하였고, 계피아임계 추출물은 대장 점막에서 tight junction 단백질의 mRNA 발현 수준을 향상시킴. 계피아임계 추출물 500 mg/kg B.W. 투여군에서 ZO-1, occludin, mucin-1, mucin-2는 대조군의 mRNA 발현 수준보다 1.5 배, 1.3 배, 1.4 배, 1.9 배 높았음.(그림 50. (A),(B),(D),(E)). DSS군과 비교하여, E-cadherin은 계피아임계 추출물 500 mg/kg B.W. 투여군에서 약 2 배 높은 수치를 나타냄(그림 50. (C)).

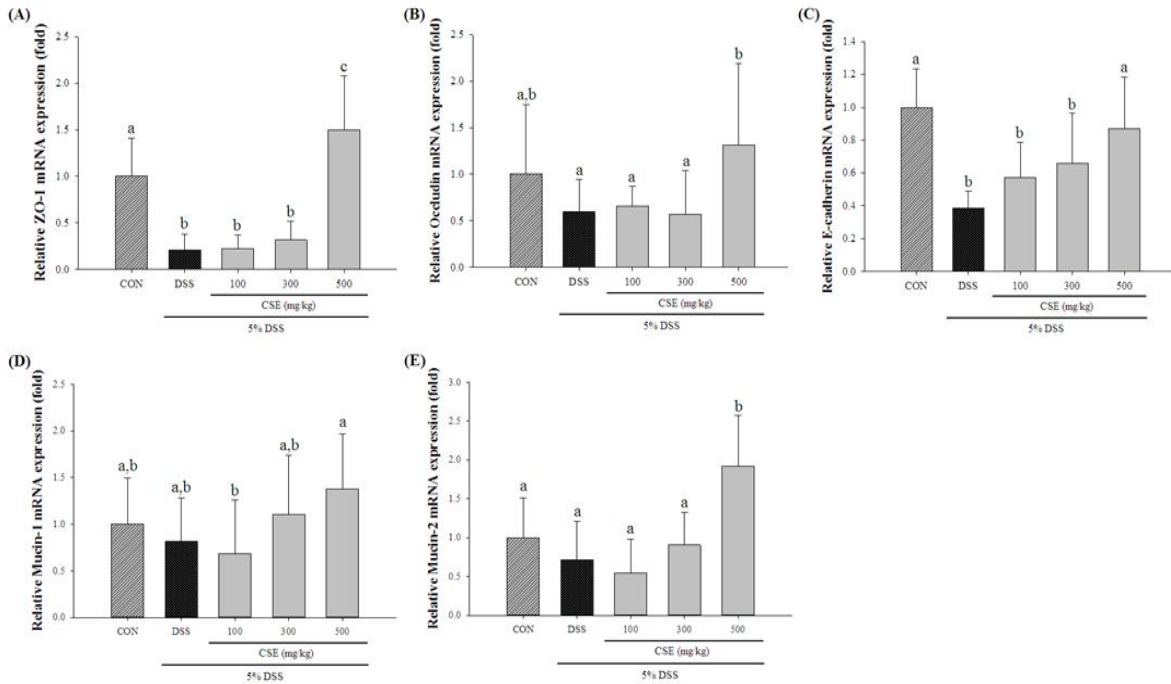


그림 50. The effect of CSE on relative mRNA expression of tight junction proteins in the colon. Relative mRNA expression profiles of (A) ZO-1; (B) occludin; (C) E-cadherin; (D) mucin-1; (E) mucin-2. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). CSE subcritical water extraction

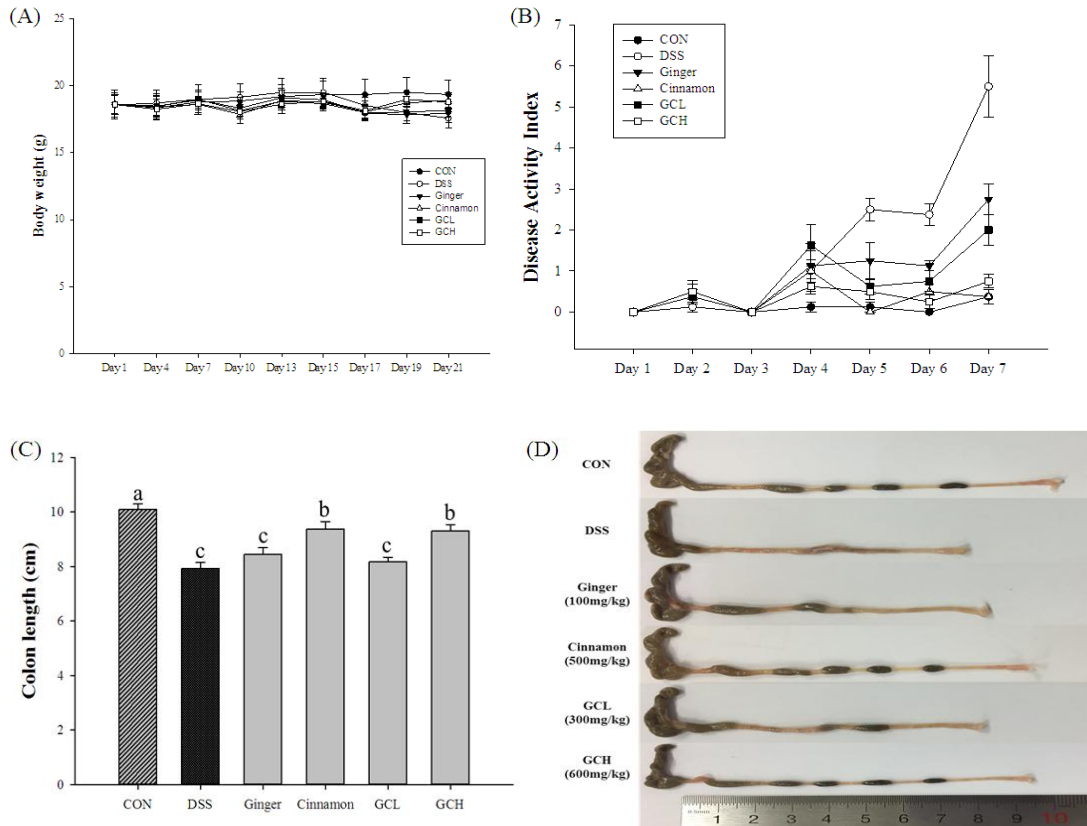
(카) 생강, 계피 복합물 섭취 후 체중 및 DAI, 대장 길이의 변화

5% DSS 섭취에 의해 궤양성 대장염이 유도된 DSS군의 체중은 약 5% 감소되었고 CON군(정상대조군)은 체중이 약 4% 증가됨. 생강추출물 투여군(Ginger군)은 약 4%의 체중이 감소하였으나, 계피추출물 투여군(Cinnamon군)은 약 2%의 체중이 증가하였으며 저농도 생강계피복합물 투여군(GCL군)은 약 2% 체중이 감소하였으나, 고농도 생강계피복합물 투여군(GCH군)은 약 1% 체중이 증가함(그림 51.(A)).

DSS 섭취 7일동안 마우스의 체중 변화, 변의 형태 변화와 변에 피가 섞인 정도에 따라 질환 활성 지표(disease activity index, DAI)로 평가하였음.. DAI는 섭취일이 지날수록 증가하였으며, DSS군은 DSS 섭취 7일째 5.5점으로 나타났고, CON군은 0.4점으로 나타남. 생강추출물 투여군, 계피추출물 투여군, 저농도 생강계피복합물 투여군 및 고농도 생강계피복합물 투여군은 각각 2.7점, 0.4점, 0.8점 그리고 2점으로 나타나 유의적으로 개선되었음을 확인함(그림 51. (B)).

5% DSS 섭취에 의해 궤양성 대장염이 유도된 마우스의 대장은 항문에서 회맹부(ileocecal junction)까지의 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지의 길이를 측정하였음. DSS군의 대장의 길이는 7.9 cm로 CON군 10.1 cm에 비해 약 21.8%가 축소되어 DSS 섭취로 궤양성 대장염이 유도되었음을 확인하였고, 생강추출물 투여군, 계피추출물 투여군, 저농도 생강계피복합물 투여군 및 고농도 생강계피복합물 투여군의 대장 길이는 각각 8.4cm, 9.4 cm, 8.2 cm 그리고 9.3 cm로 DSS군보다 유의적으로 길게 나타나 대장염의 증상이 완

화됨을 확인함.



**그림 51.** The effect of ginger and cinnamon extract mixtures on clinical symptoms and colon shortening in DSS-induced colitis. (A) Body weight was recorded simultaneously on the experimental days; (B) the score of disease activity index; (C) DSS-induced shortened colon was significantly ameliorated by ginger and cinnamon extract mixtures; (D) representative colons of each group. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). GCL 300 mg/kg B.W. of ginger and cinnamon mixture, GCH 600 mg/kg B.W. of ginger and cinnamon mixture

(타) 생강, 계피 복합물 섭취 후 대장의 조직학적 변화

계피아임계 추출물은 대장염의 조직병리학적 증상을 감소시켰다. 조직학적 점수는 대조군과 비교하여 DSS군에서 약 5 배 증가하였으나 생강추출물 투여군, 계피추출물 투여군 및 고농도 생강계피복합물 투여군에서 대조군과 유사하게 감소함을 확인함.(그림 52).

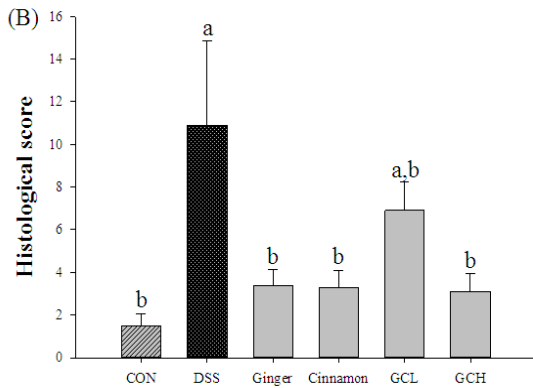
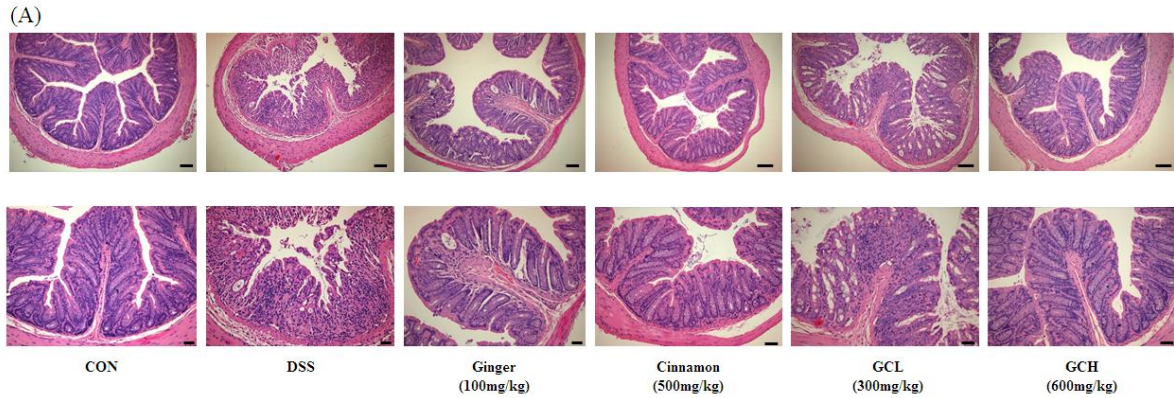
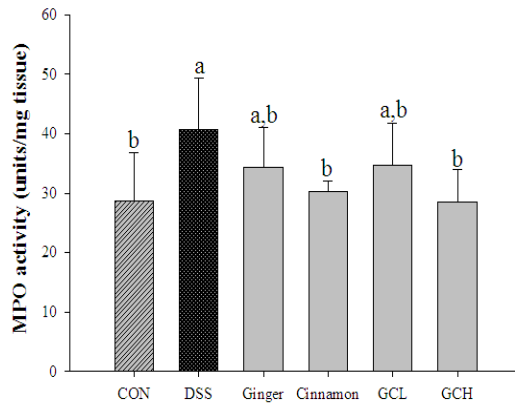


그림 52. (A) Histopathological features of colons from BALB/c mice with 5 % DSS-induced colitis. Hematoxylin and Eosin staining. Magnification 100 × (bar = 100 mm), 200 × (bar = 200 mm). Ginger and cinnamon extract mixtures effectively attenuated (B) histopathological changes. GCL 300 mg/kg B.W. of ginger and cinnamon mixture, GCH 600 mg/kg B.W. of ginger and cinnamon mixture

(과) 생강, 계피 복합물 섭취 후 대장에서 MPO 활성의 변화

MPO 활성은 근위부 대장에서 염증 세포 침투를 확인하기 위해 평가하였다(그림 53). 조직학적 점수와 유사하게 DSS군의 MPO 활성은 대조군보다 1.3 배 높았다. 생강추출물, 계피추출물 및 생강계피복합물 투여군 모두 DSS군 보다 MPO 활성을 감소시키는데, 생강추출물 투여군 보다 계피추출물 투여군의 효과가 더 좋았으며, 계피추출물 투여군과 생강계피복합물 투여군의 효과는 비슷하게 나타남.





**그림 53.** The effect of ginger and cinnamon extract mixtures on MPO activity in the colon of DSS-induced BALB/c mice. Different letters above the bars indicate significant differences (Duncan's multiple range test;  $p < 0.05$ ). GCL 300 mg/kg B.W. of ginger and cinnamon mixture, GCH 600 mg/kg B.W. of ginger and cinnamon mixture

(하) 생강, 계피 추출물의 최적 복합비율 설정

동물 실험 결과 장 건강 개선 효과 및 시생산 원료의 경제성, 향후 사업화를 고려하여 계피 단독 추출물의 기능성 소재화를 연구를 진행하기로 결정하였으며, 이에 계피추출물을 이용한 시제품으로 인체적용시험을 수행하기로 함.

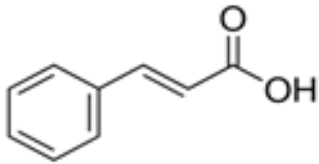
나. 지표성분 기준규격 및 분석법 확립을 통한 표준화

(1) 지표성분 및 기준규격 설정

(가) 지표성분 설정 근거

대한민국 약전에 따르면 육계는 cinnamic acid 0.03% 이상으로 기능성분에 대한 함량 규격이 설정되어 있으며, 계피 추출물은 계피를 물로 단순 추출한 원료이기 때문에 cinnamic acid를 지표성분으로 설정하여 함량 관리를 통하여 원료 표준화하기로 결정함.

**cinnamic acid 특성**

Structural formula	
Chemical name	신남산(cinnamic acid)
CAS number	140-10-3
Molecular formula	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCO <sub>2</sub> H
Molar weight	148.1586
Melting point	132-135°C
Solubility	수용성

(나) 지표성분 분석법 확립

대한민국약전 육계에 있는 cinnamic acid 정량법을 그대로 적용하여 분석함.

■ 공인시험방법	출처: 대한민국약전
<p>1. 장비와 재료</p> <p>1.1 실험실 장비 및 소모품</p> <p>1.1.1 부피플라스크(100 mL)</p> <p>1.1.2 HPLC용 유리병</p> <p>1.1.3 데시케이터</p> <p>1.1.4 초음파추출기</p> <p>1.1.5 HPLC vials</p> <p>1.1.6 HPLC cap</p> <p>1.1.7 1.7mL tube</p> <p>1.2 분석장비</p> <p>1.2.1 Shiseido SI-2 series HPLC system</p> <p>1.2.2 자외부흡광광도검출기</p> <p>1.2.3 Shiseido Capcell Pack C18 MG II S-5(250 x 4.6mm; I.D, 5<math>\mu</math>m)</p> <p>2. 표준물질 및 일반시약</p> <p>2.1 표준물질</p> <p>2.1.1 신남산(cinnamic acid)</p> <p>분자식 : <math>C_6H_5CHCHCO_2 H</math>, 분자량 : 148.1586 CAS No. : 140-13-3</p> <p>2.2 일반시약</p> <p>2.2.1 메탄올(Methanol)</p> <p>2.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)</p> <p>2.2.3 아세트산(Acetic acid)</p> <p>2.2.4 증류수(Distilled water)</p> <p>3. 시험과정</p> <p>3.1 표준용액 제조</p> <p>3.1.1 신남산 표준품(미리 실리카겔데시케이터에서 12시간 이상 건조한다) 약 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 표준액으로 한다.</p> <p>3.2 시험용액 제조</p> <p>3.2.1 검체 약 1 g을 정밀하게 달아 메탄올 50 mL를 넣어 1시간 동안 초음파 추출한다.</p> <p>3.2.2 여과하여 메탄올을 넣어 정확하게 50mL로 하여 검액으로 한다.</p> <p>3.3 정량</p>	

3.3.1 검액 및 표준액 10 µL씩을 가지고 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여  
 검액 및  
 표준액의 피크면적 AT 및 AS를 측정한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

항목	조건
검출기	자외부흡광도계 (측정파장 280nm)
칼럼	안지름 4~6 mm, 길이 15~25 cm인 스테인레스강관에 5~10µm의 액체크로마토그래프용옥타데실실리카겔을 충전한다.
칼럼온도	상온
이동상	물·아세트니트릴·아세트산(100)혼합액(68 : 30 : 2)
유량	1.0 mL/분

4.2 계산

신남산(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHCHCO<sub>2</sub> H)의 양 (mg) : 신남산표준품의 양(mg) X AT/As X 1/2


(다) 지표성분 기준규격 설정 근거

기존 지표성분 기준규격은 3.25 mg./g 으로 설정하였으나, 수확 계절에 따른 지표물질 함량 편차가 큰 것을 확인함.

따라서 추출물의 경우 표시량의 80~120%을 원칙으로 하나 이 경우에는 실제 모니터링 결과의 근거가 있으므로 분석결과 중 최소값인 0.4 mg/g을 기준규격으로 설정함.

자사분석분석(서울과학기술대학교)		공인검사기관분석(한국기능식품연구원)			
반복	1반복	반복	1반복	2반복	3반복
Lot No		Lot No			
Lot1	1.7	Lot1	3.04	3.06	3.02
Lo2	1.8	Lo2	3.29	3.25	3.22
Lot4	0.5	평균	3.14		
Lot5	0.5				
Lot6	0.4				
Lot7	0.9				
Lot8	0.9				
Lot9	1.0				
Lot10	1.9				
Lot11	2.0				
Lot12	2.1				

Lot13	0.6	
Lot14	0.6	
Lot15	0.6	
Lot16	1.0	
Lot17	1.1	
Lot18	1.2	
Lot19	4.1	
Lot20	4.1	
Lot21	4.1	
평균	1.56	
전체 평균		1.91



제 112017111463 호  
문서확인

### 시험·검사성적서

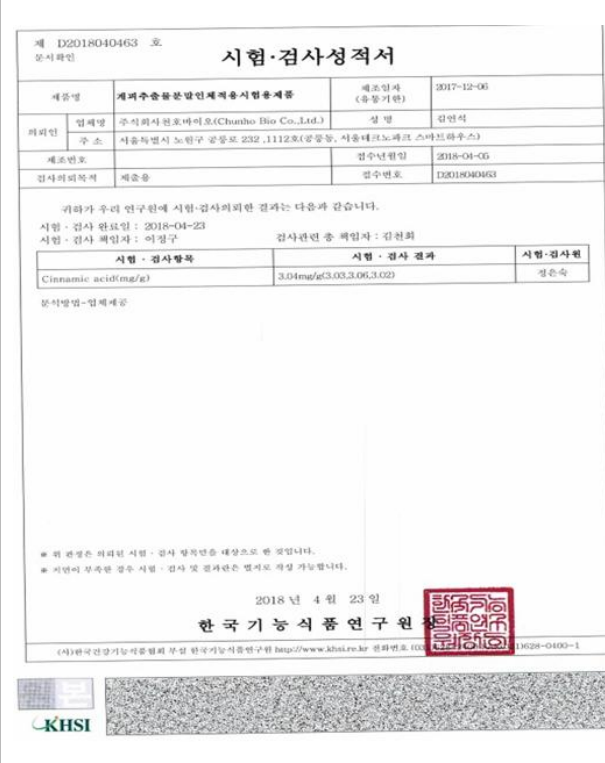
제출자	제외출물명	제조일자 (유통기한)	제조번호
제외자	업체명	소재지	소재지
주 소	주소	제조연월일	제조번호
검사목적	제출용	검수번호	검수번호

본부가 우리 연구원에 시험·검사뢰뢰를 준다는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 완료일: 2018-04-23  
 시험·검사 책임자: 이정희      검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Cinnamic acid(mg/g)	3.04mg/g(3.03, 3.05, 3.02)	정은숙

2017년 11월 24일  
한국기농식품연구원

2018-0400-1



제 D2018040463 호  
문서확인

### 시험·검사성적서

제출명	제외출물분할인제외출물	제조일자 (유통기한)	2017-12-06
제외명	업체명	소재지	소재지
주 소	주소	제조연월일	제조번호
검사목적	제출용	검수번호	검수번호

본부가 우리 연구원에 시험·검사뢰뢰를 준다는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 완료일: 2018-04-23  
 시험·검사 책임자: 이정희      검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Cinnamic acid(mg/g)	3.04mg/g(3.03, 3.06, 3.02)	정은숙

2018년 4월 23일  
한국기농식품연구원

2018-0400-1

cinnamic acid 공인기관 시험 검사 성적서

제조 Lot 별 지표물질 함량 분석 성적서									
제품명	계피추출분말 인체적용 시험용 제품								
식품유형	기타식품	제조일자	2017. 12. 06						
의뢰인	업체명	㈜메디엔바이오	성명	박 옥 남					
	주소	서울시 노원구 공릉로 232 서울과학기술대학교 테크노파크 1112호							
시험 기간	2018. 12. 06 - 2018. 12. 14								
시험항목	지표물질(cinnamic acid)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
지표물질 (mg/g)	1.9	2.0	2.1	0.6	0.6	0.6	1.0	1.1	1.2
<p>◎ HPLC 분석 조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· HPLC 제조사 및 모델명 : Shiseido S I -2 series HPLC system</li> <li>· 검출기 제조사 및 모델명 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)</li> <li>· 칼럼 : Shiseido Capcell Pak II S-5 (250 x 4.6 mm; i.d., 5µm)</li> <li>· 이동상 : 3차중류수:아세트니트릴:아세트산 = 68:30:2</li> <li>· 표준품 : 신남표준품</li> <li>· 유량 : 1.0 mL/분</li> </ul>									

◎ 분석실 : 서울과학기술대학교 기능성식품실험실

◎ 분석자 : 김지연 (서울과학기술대학교 식품공학과 교수)

2018년 12월 18일

분석자 확인 :

김지연

### 지표물질 함량 분석 성적서

<b>제품명</b>		계피추출분말 인체적용 시험용 제품													
<b>식품유형</b>		기타식품	<b>제조일자</b>	2017. 12. 14											
<b>의뢰인</b>	<b>업체명</b>	(주)메디앤바이오	<b>성명</b>	박 옥 남											
	<b>주소</b>	서울시 노원구 공릉로 232 서울과학기술대학교 테크노파크 1112호													
<b>시험 기간</b>		2018. 03. 10 - 2018. 03. 16													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="text-align: center;">실험항목</th> <th colspan="3" style="text-align: center;">시료명 (mg/g)</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">#1</th> <th style="text-align: center;">#2</th> <th style="text-align: center;">#3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">지표물질 (cinnamic acid)</td> <td style="text-align: center;">4.1</td> <td style="text-align: center;">4.1</td> <td style="text-align: center;">4.1</td> </tr> </tbody> </table>					실험항목	시료명 (mg/g)			#1	#2	#3	지표물질 (cinnamic acid)	4.1	4.1	4.1
실험항목	시료명 (mg/g)														
	#1	#2	#3												
지표물질 (cinnamic acid)	4.1	4.1	4.1												
<p>◎ HPLC 분석 조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· HPLC 제조사 및 모델명 : Shiseido S I -2 series HPLC system</li> <li>· 검출기 제조사 및 모델명 : 자외부흡광광도계 (측정파장 257 nm)</li> <li>· 칼럼 : Shiseido Capcell Pak II S-5 (250 x 4.6 mm; i.d., 5µm)</li> <li>· 이동상 : (A) 1% 아세트산이 함유된 물 / (B) 1% 아세트산이 함유된 아세토니트릴 0-30 min, 10-60% (B); 30-40 min, 60-100% (B); 40-55 min, 100% (B)</li> <li>· 표준품 : 신남표준품</li> <li>· 유량 : 1.0 mL/분</li> </ul>															

◎ 분석실 : 서울과학기술대학교 기능성식품실험실

◎ 분석자 : 김지연 (서울과학기술대학교 식품공학과 교수)

2018년 12월 18일

분석자 확인 :

김지연

### 제조 Lot 별 지표물질 함량 분석 성적서

제품명	계피추출분말 인체적용 시험용 제품																																					
식품유형	기타식품	제조일자	2017. 12. 06																																			
의뢰인	업체명	㈜메디앤바이오	성명	박 옥 남																																		
	주소	서울시 노원구 공릉로 232 서울과학기술대학교 테크노파크 1112호																																				
시험 기간	2018. 12. 06 - 2018. 12. 14																																					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">실험항목</th> <th colspan="9">지표물질(cinnamic acid)</th> </tr> <tr> <th>#1</th> <th>#2</th> <th>#3</th> <th>#4</th> <th>#5</th> <th>#6</th> <th>#7</th> <th>#8</th> <th>#9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>지표물질 (mg/g)</td> <td style="text-align: center;">1.7</td> <td style="text-align: center;">1.8</td> <td style="text-align: center;">1.8</td> <td style="text-align: center;">0.5</td> <td style="text-align: center;">0.5</td> <td style="text-align: center;">0.4</td> <td style="text-align: center;">0.9</td> <td style="text-align: center;">0.9</td> <td style="text-align: center;">1.0</td> </tr> </tbody> </table>										실험항목	지표물질(cinnamic acid)									#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	지표물질 (mg/g)	1.7	1.8	1.8	0.5	0.5	0.4	0.9	0.9	1.0
실험항목	지표물질(cinnamic acid)																																					
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9																													
지표물질 (mg/g)	1.7	1.8	1.8	0.5	0.5	0.4	0.9	0.9	1.0																													
<p>◎ HPLC 분석 조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· HPLC 제조사 및 모델명 : Shiseido S I -2 series HPLC system</li> <li>· 검출기 제조사 및 모델명 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)</li> <li>· 칼럼 : Shiseido Capcell Pak II S-5 (250 x 4.6 mm; i.d. 5µm)</li> <li>· 이동상 : 3차중류수:아세토니트릴:아세트산 = 68:30:2</li> <li>· 표준품 : 신남표준품</li> <li>· 유량 : 1.0 mL/분</li> </ul>																																						

◎ 분석실 : 서울과학기술대학교 기능성식품실험실

◎ 분석자 : 김지연 (서울과학기술대학교 식품공학과 교수)

2018년 12월 14일

분석자 확인 :

*김지연*

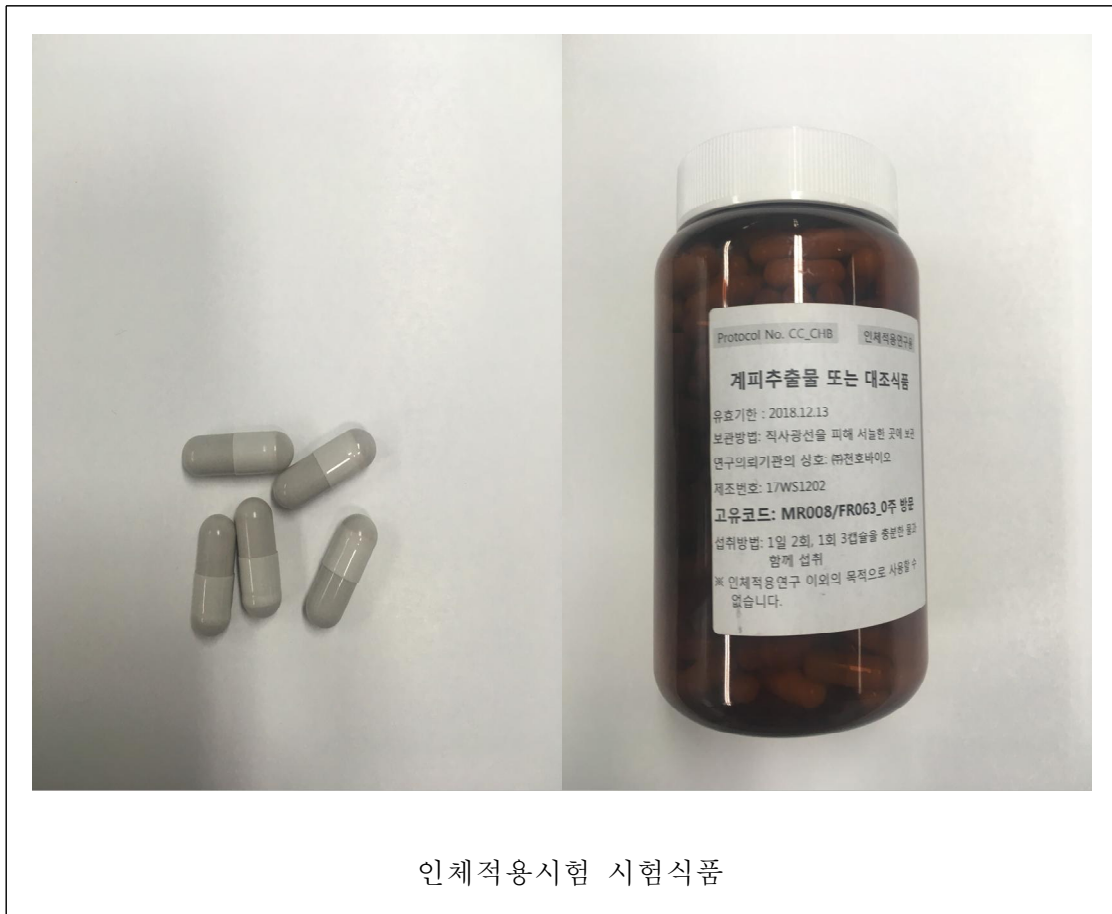
다. 장 건강 개선 인체적용시험 수행

(1) 인체적용시험용 샘플 생산

(가) 시험식품 및 대조식품 생산

	시험식품	대조식품
식품의 유형	기타가공품	기타가공품
주성분	계피 추출물	전분, 카라멜 색소
함량	계피 추출물 400mg	전분 382mg
제형	캡슐	
보관방법	상온(유통기한 2년)	
섭취방법	1일 2회, 1회 3캡슐을 물과 함께 섭취	

<인체적용시험용 시제품 특징>



인체적용시험 시험식품



(나) 유해물질 및 지표물질, 영양성분 분석 의뢰

잔류농약 58종 및 대장균군 검사결과 미검출임을 확인하였으며, 중금속 검사 결과 기준 규격 이내 임을 확인함.

### 시험 성적서

발급번호 : H17000073

접수번호	1710-3048	검사목적	재용출
제품명	계피 추출분말	제조일자	
제품유형		유통기한	..
업소명	주식회사 찬호바이오(Chunho Bio Co.,Ltd.)	의뢰인	김연석
소재지	서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호(공릉동, 서울테크노파크 스타타워우스)	검사원명	
접수날일	2017.10.26	검사완료일	2017.11.02

#### 시험 결과

o 불검출 - 잔류농약 58종목

Acetamidip, Alrazine, Azoxystrobin, BHC(γ-BHC 외 함), Lindane(γ-BHC), Boscalid, Bifenthrin, Captaf, Carbaryl, Carbofuran, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyromazine, DDT(p,p-DDE, p,p-DDD, o,p-DDT, p,p-DDT), Diazinon, Dichlorvos, Difenotol, Dimethoate, Endosulfan(Endo-sulfan과 Endosulfan Sulfate의 합), Ethion, Fenitrothion, Fenhexamide, Fenitrothion, Fenvalerate, Fenpropathrin, Flubendiamide, Fludioxonil, Flufenoxuron, Imazalil, Iprodione, Isoprothiolane, Malathion, Methomyl (Methomyl과 Thiodicarb의 합), Methidathion, Methoxyfenozide, Pflubazurazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenothiaz, Phosmet, Pirimicarb, Pyridinipos-methyl, Prochloraz (Prochloraz와 2,4,6-Trichlorophenol의 합 포함하고 있는 대사산물의 합), Procymidone, Profenofos, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Quintozene, Thiamectoxam, Tolclofos-methyl, Triadimenol, Triazophos, Triflumizol, Triflururon

카드뮴(mg/kg) : 불검출  
 납(mg/kg) : 0.02  
 비소(mg/kg) : 0.27  
 총비소(mg/kg) : 0.21  
 세균수(g/ml) : 0  
 대장균군 : 불검출

\*비 고 : 식약처제품종 개발인증원

2017년 11월 02일

(주) 한국분석기술연구원

이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 성분 분석 및 상업용에 사용할 수 없음.  
 주소 : 부산시 동구 초량1동 1213-17 해운빌딩 3층, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298.  
 양식번호(KATRI-P-24-01) | 개정번호(0) | 개정일자(2006.12.15)

### 시험 성적서

발급번호 : G170015808

접수번호	1710-3053	검사목적	참고용
제품명	계피 추출분말	제조일자	
제품유형		유통기한	..
업소명	주식회사 찬호바이오(Chunho Bio Co.,Ltd.)	의뢰인	김연석
소재지	서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호(공릉동, 서울테크노파크 스타타워우스)	검사원명	
접수날일	2017.10.26	검사완료일	2017.11.06

#### 시험 결과

시험항목	기준규격	검출량	1일영양성분기준치(%)
열량(kcal/100g)		319.4	-
탄수화물(g/100g)		77.6	24
조지방분(g/100g)		2.4	4
조지방분(g/100g)		0.2	0
니트린(mg/100g)		444.1	22
수분(g/100g)		9.3	-
회분(g/100g)		11.1	-

\*비 고 : 2016년 1월 1일 시행(식약처 고시 제2016-140호)에 따른 1일영양성분 기준치에 따라 계산된 값입니다.  
 위 결과는 작성당 시점의 결과를 바탕으로 하며, 분량 당 함산치가 변동하였나 포장 전 보너드인 성 격사와 영양 표시 관련 정보(세이트) (<http://www.mfds.go.kr/nuis/1/01/mex.do>)를 참고하시어 재 확인 후 사용하시기 바랍니다.

2017년 11월 08일

(주) 한국분석기술연구원

이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 성분 분석 및 상업용에 사용할 수 없음.  
 주소 : 부산시 동구 초량1동 1213-17 해운빌딩 3층, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298.  
 양식번호(KATRI-P-24-01) | 개정번호(0) | 개정일자(2006.12.15)

## 시험식품 원료의 잔류농약 58종 및 영양성분, 중금속, 대장균군 검사성적서

제 D2017122373 호  
본사확인

### 시험·검사성적서

제품명	AA-S	제조일자 (유통기한)	
의뢰명	주식회사 찬호바이오(Chunho Bio Co.,Ltd.)	성명	김연석
주 소	서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호(공릉동, 서울테크노파크 스타타워우스)	주 소	서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호(공릉동, 서울테크노파크 스타타워우스)
제품번호	17WS1233	접수날일	2017-12-28
검사의뢰목적	참고용	검사번호	D2017122373

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 완료일 : 2018-01-08  
 시험·검사 책임자 : 이장규      검사원명 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.042mg/kg	유미진
카드뮴(mg/kg)	0.0089mg/kg	유미진
비소(mg/kg)	0.0977mg/kg	유미진
총수은(mg/kg)	불검출	조유

\* 위 결과는 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 \* 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판독은 필요로 작성 가능합니다.

2018년 1월 8일

한국농식품연구원

(4)한국농산물품질관리원 부산 분원(농식품연구원) <http://www.khri.or.kr> 전화번호 051-9628-0400-1

제 D2017122378 호  
본사확인

### 시험·검사성적서

제품명	Placebo(계피)	제조일자 (유통기한)	2017-12-13
의뢰명	주식회사 찬호바이오(Chunho Bio Co.,Ltd.)	성명	김연석
주 소	서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호(공릉동, 서울테크노파크 스타타워우스)	주 소	서울특별시 노원구 공릉로 232, 1112호(공릉동, 서울테크노파크 스타타워우스)
제품번호		접수날일	2017-12-28
검사의뢰목적	재용출	검사번호	D2017122378

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 완료일 : 2018-01-04  
 시험·검사 책임자 : 이장규      검사원명 총 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0109mg/kg	유미진
카드뮴(mg/kg)	0.0096mg/kg	유미진
총수은(mg/kg)	불검출	조유
중비소(mg/kg)	0.0061mg/kg	유미진

\* 위 결과는 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 \* 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판독은 필요로 작성 가능합니다.

2018년 1월 4일

한국농식품연구원

(4)한국농산물품질관리원 부산 분원(농식품연구원) <http://www.khri.or.kr> 전화번호 051-9628-0400-1


## 시험식품 및 대조식품 중금속 검사성적서

(다) 안정성 확보

유통기한 설정을 위한 2개월 동안 가속시험을 진행하였으며, 품질지표의 변화에 대한 시험결과를 회귀분석하고 우리나라 연간 온도별 예상 유통일수를 적용하여 아레니우스식으로 산출한 결과 시험제품의 유통기한 47개월 이상임을 확인하였으며, 제품의 유통과정중의 일어날 수 있는 변질요인과 품질관리상 이상이 없을 것으로 판단되는 시점을 모두 고려하여 24개월로 설정함.

[별지 제3호 서식]

**유통기한 설정 사유서**

제 품 명	"계피추출분말"
식 품 의 유 형	기타 가공품
보존 및 유통 방법	실온(○) / 상온( ) / 냉장( ) / 냉동( ) / 기타( )
유통 기 한	제조일로부터 24개월
시험수행기관종류	자사( ) / 의뢰(○) / 생략( )
시험수행기관명	(주)천호바이오
유통기한 설정근거	
<p>1) 제품 생산 전 생산에 사용되는 기계 및 기구류의 세척을 실시하여 생산 과정 중 이물의 혼입이 없도록 위생적인 작업실에서 생산하며 현장 종사자의 위생관리 실시.</p> <p>2) 본 제품을 유통과정 중 미생물 발육, 이물질의 혼입을 방지하기 위해 식품 포장용으로 제작된 포장재에 밀봉·포장함.</p> <p>3) 미생물학적 오염지표인 대장균군의 적정여부를 검사하고 성상과 이물, 지표물질을 감별하여 자가 품질 검사 합격제품만을 보관 유통함.</p> <p>4) 유통기한 설정시험을 실시한 결과 위생적인 공정에서 제조되고 밀폐·포장하여 실온에서 유통되므로 가속시험결과 이상의 추가 품질 변화 요인이 없다 판단됨.</p> <p>따라서 상기 시험결과에 따라 24개월의 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 03월 20일</p> <p style="text-align: right;">제출인 : (주)천호바이오 </p>	

#### 4. 계피 추출물의 배변활동 및 장내균총 개선 기능성과 안전성을 확인하기 위한 인체적용연구

##### 가. 수행 개요

###### (1) 인체적용연구의 배경

우리가 섭취한 음식물은 위와 소장에서 주로 소화, 흡수되고 흡수되지 않은 잔여물은 대장에서 분해된 후 남은 찌꺼기는 직장을 통해 배설됨. 장은 외부로부터 유입된 물질들이 접촉되는 주요 장소로서 장의 표면을 이루고 있는 점막에서는 음식물, 병원균 등 외부로부터 유입된 물질과 장내 미생물의 상호작용이 이루어지며, 다양한 외부 자극으로부터 우리 몸을 보호해주는 중요한 역할을 담당함.

따라서 장 고유의 기능인 음식물의 소화, 흡수, 분해, 배설의 기능뿐 만 아니라, 장 내 유익균과 유해균 균형, 면역 기능을 포함하는 장 방어 기능이 적절하게 유지될 때 건강한 장이라고 할 수 있음. 하지만, 서구화된 식습관 및 생활습관은 장내 염증반응의 증가, 전해질 및 수분의 불균형, 장내 미생물의 불균형 등을 초래하여 다양한 장질환의 발병 가능성을 높이고 있음.

최근에는 장관에서의 과도한 염증반응이 장의 화학적, 물리적 기능을 저해하여 설사와 같은 배변장애와 더불어 복부 팽만 등의 불편감을 증가시킴으로써 삶의 질에 큰 영향을 미치는 보고되고 있음. 이는 장내 균총의 불균형과도 관련성이 있는 것으로 알려지면서, 생리활성성분을 함유한 안전한 식품소재를 통해 장내 균총 개선 및 과도한 염증반응을 억제시킴으로써 장 건강을 유지시키려는 노력이 활발히 이루어지고 있음. 하지만, 현재까지 장 건강 관련 건강기능식품 기능성 원료로 인정받은 식품소재를 보면, 올리고당, 식이섬유, 유산균 등에 집중되어 있어 다양한 제품화가 가능한 신소재 개발에 대한 요구가 증대되고 있는 실정임.

계피는 전통적으로 오랜 섭취경험이 있는 소재이며, 본 연구에서 섭취하게 되는 계피 추출물은 계피를 물을 사용해 2회 단순 추출하여 제조한 안전한 소재임. 선행연구를 통해 계피추출물이 친염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 발현을 낮추는 것이 확인되어 설사로 인해 배변에 불편함을 호소하는 성인을 대상으로 계피추출물의 배변활동 및 장내 균총 개선 기능성과 안전성을 확인하고자 함.

(2) 인체적용시험 기능성 평가 원칙에 따른 인체적용시험 연구계획서 개발

○연구계획서 요약

연구제목	생강·계피 추출 복합물의 배변활동 및 장내균총 개선 기능성과 안전성을 확인하기 위한 인체적용연구
연구의뢰자 및 지원기관	(주)메디앤바이오 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)
연구책임자	세명대학교 부속 제천한방병원 한방2 내과 김기태 교수
공동연구자	세명대학교병원 부속 제천한방병원 한방내과 신선미 교수 서울과학기술대학교 식품공학과 김지연 교수
연구담당자	세명대학교병원 부속 제천한방병원 한방내과 정누리 전공의 서울과학기술대학교 식품공학과 김민서 연구원
연구기관명 /주소	세명대학교병원 부속 제천한방병원(충북 제천시 세명로 66) 서울과학기술대학교 식품공학과(서울특별시 노원구 공릉로 232) * 연구대상자 모집 및 방문은 세명대학교 부속 제천한방병원에서 이루어지며, 일부 인체유래물 분석은 서울과학기술대학교에서 수행됨.
연구기간	IRB 승인일 ~ 2018년 10월 31일
연구대상자	설사로 인해 배변에 불편함을 호소하는 성인
연구목적	평소에 설사를 자주하는 성인 남녀를 대상으로 생강·계피 추출 복합물의 섭취가 배변활동 및 장내균총 개선과 안전성에 미치는 영향을 평가함
연구디자인	8주간 섭취, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 연구
시험식품	생강·계피 추출 복합물이 함유되어 있는 캡슐 (계피 추출 분말 400 mg/캡슐)
대조식품	Placebo (계피 추출 분말이 함유되어 있지 않고, 덱스트린을 주원료로 하는 시험식품과 성상이 동일한 캡슐)
섭취방법	1일 2회, 1회 3캡슐을 충분한 물과 함께 섭취 (계피 추출 분말 2,400mg/일)
연구방법	<p>방문 1 / -2주 (Screening)    방문 2 / 0주 (Randomization)    방문 3 / 4주    방문 4 / 8주 (Completion)</p> <p>스크리닝 검사    기능성평가 임상병리검사    기능성평가    기능성평가 임상병리검사</p> <p>방문 1(-2주)에 자의에 의해 인체적용연구 동의서에 서명한 지원자는 선정·제외기준에 따라 적합성 여부를 판정 받는다. 선정된 대상자는 2주간의 run-in period 후 방문 2(0주)에 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군에 무작위 배정되어 8주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한 후 기능성 바이오마커를 분석한다.</p>

연구대상자 수	각 군당 목표 대상자수는 35명(중도탈락률 25% 고려)으로 선정기준에 적합한 대상자를 총 70명 등록시키기로 한다.
연구대상자 선정기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정한다. 1)본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2)만 20세 이상의 성인 3)설사로 인해 배변에 불편함을 호소하는 성인 - Rome III criteria(functional diarrhea)에 따름
연구대상자 제외기준	다음에 기술된 조건에 해당되는 자를 제외시킨다. 1)첫 방문 4주 이내에 다음에 해당하는 자 - 프로바이오틱스(유산균 등), 프리바이오틱스(식이섬유, 올리고당류 등) 제품 등 장기능에 영향을 주는 제품을 일주일 이상 지속적으로 섭취한 자 - 항생제 또는 항염증제를 일주일 이상 지속적으로 복용한 자 2)다음 질환에 해당하는 자 - 과민성대장증후군, 알코올 중독, 심혈관질환 (조절되지 않는 고혈압 포함), 면역질환, 정신질환 - 간기능 장애(AST 또는ALT가 정상범위 상한치의 3배 이상인 경우) - 신기능 장애(Creatinine이 정상범위 상한치의 1.5배 이상인 경우) 3)평소 식이섬유 섭취량이 높은 자(Recommended Food Score>36) 4)시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자 5)첫 방문 4주 이내에 다른 임상연구에 참여한 자 6)임산부 또는 수유부 연구자가 본 연구에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 자
식이, 생활습관 지침	Run-in period부터 연구 종료 시까지 아래 사항을 준수하되, 이외의 사항은 평소 식이 및 생활습관을 유지 1) 계피 또는 이를 함유하는 식품 섭취 금지 2) 프로바이오틱스(유산균 등), 프리바이오틱스(식이섬유, 올리고당류 등) 제품 섭취 금지 3) 식이섬유소가 다량 함유된 과일 및 채소 과량 섭취 제한 과일 및 채소 과량 섭취 제한(과일·과일주스 ≤ 2회 분량/일, 채소류 ≤ 6회 분량/일) 4) 환류(해조류환, 채소환 등), 엑기스류(양파즙, 마늘즙, 흑마늘즙, 호박즙, 배즙, 포도즙 등) 섭취 금지 5) 한약재 및 제외기준에 명시된 약물 섭취 금지 연구대상자간 영양소 섭취량의 변화를 비교하기 위해 스마트폰 앱 또는 일지로 방문 전 평소 식이를 대표할 수 있는 3일(평일 2일, 주말 1일)의 식이 섭취 내용 작성
기능성 평가	1)설문조사 [0, 4, 8주] -배변습관: 배변횟수, 설사 횟수, 변의 굳기·형태(Bristol stool scale) 등 2) 대장통과시간(colonic transit time test) [0, 8주] 3) 변 대사체, 유익균·유해균(비피더스균, 락토바실러스균, 병원성 대장균, 황색포도상구균 등) 동정 등 [0, 8주]
안전성 평가	이상반응, 활력징후(맥박, 혈압, 체온), 임상병리검사(일반혈액검사 및 소변 검사)

## 인체적용연구 대행(CRO) 계약서

㈜천호바이오(이하 "갑"이라고 한다)와 ㈜바이오푸드씨알오(이하 "을"이라고 한다)는 "생강계 피복합물"(이하 "계약원료"라고 한다)의 인체적용연구 대행(CRO)에 대하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

### 제 1 조 (목적)

"갑"이 "을"에게 "계약원료"의 인체적용연구에 대한 전반적인 업무를 대행시키는 것으로, 그 대가로 대행료를 지급하며, "을"은 "계약원료"의 인체적용연구를 수탁 받아 수행 한다. 본 계약은 이에 대한 쌍방간의 권리와 의무 및 조건을 명시하기 위한 것이다.

### 제 2 조 (인체적용연구 대행(CRO)의 개요 및 업무의 범위)

1) "인체적용연구 대행(CRO)"이란 건강기능식품 기능성원료 인정을 득하기 위한 목적으로 인체적용연구를 수탁 받아 연구자 및 시험기관 선정을 통해 시험을 진행하고 결과보고서를 제출하는 전반적인 대행업무를 일컫는다. "갑"이 "을"에게 위탁하는 대행업무의 범위와 각 업무에 대한 비용은 첨부 와 같다.

2) "갑"과 "을"은 계약기간 중 별도 협의로 모든 항목의 대행업무 범위를 조정할 수 있다.

### 제 3 조 (대행기간)

본 계약의 기간은 계약체결일로부터 제 2 조에서 정한 대행업무가 완료될 때까지로 함을 원칙으로 한다. 업무가 완료될 때까지 소요될 것으로 예상되는 기간은 「첨부: 업무 범위 및 견적」에 명시된 것과 같다. 상기 예상 소요기간은 평균적으로 소요되는 예상 기간을 나타낸 것이고 상황에 따라 변동될 수 있으며, 행정관련 소요기간은 보완여부나 보완내용에 따라 소요일정이 가변적이므로 변동될 수 있다.

### 제 4 조 (대행료의 지급)

1) "갑"은 "을"이 발행한 세금계산서를 수령한 날로부터 10일 이내에 "을"에게 대행료를 현금으로 지급하며, 지급방법은 각각의 업무시점에 따라 다음과 같이 지급한다. 대행료의 총액은 일금 [ ] 십만원 [ ] 부가세 별도)이다.

① 대행료 총액의 약 51%인 일금 [ ] 부가세 별도)은 계약체결 후 "을"의 경비 청구서를 받고 상기와 같이 지급한다.

② 대행료 총액의 약 49%인 일금 [ ] 부가세 별도)은 인체적용연구 2018년 8월 31일까지 상기와 같이 지급한다.

(별지15호 서식)

## 표준계약서 양식

### 연구계약서(研究契約書)

(주)천호바이오 (이하, (갑)이라 한다.)와 세명대학교 산학협력단 (이하, (을)이라 한다.)는 생강과 계피를 활용한 장건강 개선 개별인정형 건강기능식품 개발에 관한 연구에 대하여 다음과 같이 연구계약을 체결한다.

#### 제 1조 (목적 및 범위)

본 계약의 목적은 별첨 연구계획서의 연구목적과 범위와 같고, (을)이 연구완료 후 (갑)에게 제공하는 연구결과는 연구범위에 기술되어 있는 사항에 한한다.

#### 제 2조 (연구기간)

본 계약의 연구기간은 [IRB승인일]로부터 [2018. 10. 31] 까지로 한다.  
단, (갑)과 (을) 쌍방간의 합의에 의하여 조정할 수 있다.

#### 제 3조 (연구비 지급조건)

본 연구에 소요되는 총 연구비는 금 [ ] 원정 (W [ ] VAT 별도로 하며, (갑)은 다음과 같이 (을)에게 현금으로 지급한다.

- ① 선급금(49%) : 금 [ ] 계약체결 후 10일 이내 현금지급
- ② 잔 금(51%) : 금 [ ] IRB승인 6개월 후 현금지급

#### 제 4조 (연구결과보고 등)

(을)은 연구기간 만료일 후 1개월 이내에 본 연구결과에 관한 최종보고서(1부)를 (갑)에게 제출한다. 연구중간보고 및 연구수행과 관련한 연구기록과 접근은 쌍방합의에 의하여 별도로 정할 수 있다.

#### 제 5조 (신의성실 및 상호협조)

- ① (갑)과 (을)은 신의를 가지고 본 계약의 각 조항을 성실히 이행하여야 한다.
- ② (을)은 전 연구과정을 통하여 (갑)의 요청 시 연구내용에 관하여 협의하여야 하며 필요시 기술지도를 하여야 하고, (갑)도 연구에 필요한 모든 서류와 물건 및 관련자료를 (을)에게 적극 협조하여야 한다.

○연구 진행 일정

Period	Screening	Intervention			
		1	2	3	4
Visit	1	2	3	4	
Week	-1	0 <sup>1)</sup>	4	8	
Window period			±5d	-3d ~ +7d	
연구대상자 동의	✓				
인구학적 특성(성별, 생년월일, 연령)	✓				
스크리닝	ROME III 설문지	✓			
검사	AST, ALT, creatinine <sup>2)</sup>	✓			
병력 조사	✓				
약물·건강기능식품 섭취 조사	✓	✓	✓	✓	
식습관 조사(Recommended Food Score)	✓	✓	✓	✓	
활력징후(맥박, 혈압, 체온)	✓	✓	✓	✓	
임신반응검사 <sup>3)</sup>	✓	✓	✓	✓	
적합성 평가	✓				
무작위배정		✓			
식이·생활습관 교육	✓	✓	✓		
식이·생활습관 모니터링 <sup>4)</sup>		✓	✓	✓	
신체계측(체중, 신장 <sup>5)</sup> , BMI)		✓	✓	✓	
활동량 조사(International Physical Activity questionnaire)		✓	✓	✓	
음주력·흡연력 조사		✓	✓	✓	
임상병리검사(혈액, 소변 검사) <sup>6)</sup>		✓		✓	
기능성 평가 <sup>7)</sup>		✓	✓	✓	
시험·대조식품 배부		✓	✓		
반납식품 회수 및 순응도 확인 <sup>8)</sup>			✓	✓	
이상반응 확인	✓	✓	✓	✓	

(3) 인체적용 시험 변 및 대장통과시간 분석 방법

(가) 변 pH 및 수분함량 측정

변의 pH는 변 2 g 정도를 15 mL conical tube에 넣은 후 분변 부피 5배에 해당하는 증류수를 분변에 가하여 균질화 하였다. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액에서 pH 미터기를 이용하여 pH를 측정함.

변의 수분함량은 변 1 g 정도를 알루미늄 디쉬에 넣고 습중량을 측정하였다. 변을 dry oven에서 105 °C, 16시간 동안 건조시켰다. 테시케이터에서 식힌 후 건조량을 측정하였다. 습중량과 건조량의 차이를 습중량으로 나누어 수분함량을 계산하였음.

(나) 변 단쇄지방산 분석

변 0.2 g에 PBS 2 mL를 넣고 균질화한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였음. 상층액 500 µL와 acetonitrile 500 µL를 1.7 mL tube에 넣고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였음. 상층액 500 µL에 ISTD인 2-ethylbutyric acid를 넣은 후 분석함. Calibration은



acetonitrile에 녹인 acetic acid, propionic acid, butyric acid, iso-butyric acid, valeric acid, 및 iso-valeric acid의 표준용액을 섞은 후 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM, 0.625 mM에서 수행되었음.

**표 12. GC condition for short chain fatty acid analysis in feces**

GC	Agilent Technologies 6890N
Column	Agilent DB WAX 30.0 m X 0.25 m X 0.25 $\mu$ m
Column temp.	80 $^{\circ}$ C부터 10 $^{\circ}$ C/min 로 200 $^{\circ}$ C까지 올린 후 5분 유지
Carrier gas	N <sub>2</sub>
Flow rate	1.0 mL/min
Injector temp.	200 $^{\circ}$ C
Flame ionization detector temp.	250 $^{\circ}$ C

(다) 변 바이오제닉아민류 분석

변 0.2 g에 0.4 M HClO<sub>4</sub> 3 mL와 ISTD인 heptylamine을 최종농도 5  $\mu$ g/mL가 되도록 넣어 균질화한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 이용하여 유도체화를 진행하였음. 유도체화는 상층액 200  $\mu$ L에 1M NaOH 100  $\mu$ L, saturated sodium bicarbonate solution 75  $\mu$ L 및 아세톤에 녹인 1% dansylchloride 500  $\mu$ L를 넣고 40  $^{\circ}$ C에서 45분 동안 방치하였음. 암모니아수를 25  $\mu$ L씩 넣고 다시 40  $^{\circ}$ C에서 30분 동안 방치한 후 acetonitrile 250  $\mu$ L를 넣어 용액을 균질화 하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 HPLC 분석에 사용하였다. Calibration은 0.01 M HClO<sub>4</sub>에 녹인 agmatine, methylamine, ethylamine, pyrrolidine, dimethylamine, propylamine, tryptamine, butylamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine, 및 spermine의 표준용액을 섞은 후 0.4 M HClO<sub>4</sub> 로 희석하여 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078  $\mu$ g/mL에서 수행되었음.

**표 13. HPLC condition for biogenic amines analysis in feces**

HPLC	Shiseido SI-2 series HPLC system
Ex and Em	250 nm and 540 nm
Flow rate	0.65 mL/min
Injection volume	10 µL
Column	Shiseido Capcell Pak C18 MG II S-5 (250 × 4.6 mm; i.d., 5 µm)
Column temp.	40 °C
Solvent A	0.2 M ammonium acetate (pH 5) : water : acetonitrile = 10:60:30
Solvent B	0.2 M ammonium acetate (pH 5) : water : acetonitrile = 10:5:85
Solvent gradient	0 min : A 100% B 0%
	1 min : A 80% B 20%
	4 min : A 80% B 20%
	19-27 min : A 0% B 100%
	27.1-38 min : A 100% B 0%

(라) 변 인돌 및 페놀류 분석

변 0.2g에 acetonitrile 1 mL를 넣고 균질화한 후 20분 동안 초음파 처리한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 500µL를 GC vial에 넣고 ISTD인 4-isopropylphenol을 1 mM 넣은 후 분석하였다. Calibration은 acetonitrile에 녹인 indole, p-cresol, skatole 및 phenol의 표준용액을 섞은 후 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM, 31.3 µM에서 수행되었음.

**표 14. GC condition for indoles and phenols analysis in feces**

GC	Agilent Technologies 6890N
Column	Agilent DB 17 30.0 m X 0.25 m X 0.25 µm
Column temp.	50 °C부터 10 °C/min 로 270 °C까지
Carrier gas	N <sub>2</sub>
Flow rate	1.5 mL/min
Injector temp.	220 °C
Flame ionization detector temp.	220 °C

(마) 변 유익균 및 유해균 분석

표 15에 나와있는 미생물 균주는 한국미생물보존센터 (KCCM)와 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에서 분양받아 사용하였음. 분양받은 미생물 균주는 건조필름법으로 균수를 확인한 후 DNeasy ultraclean microbial kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 추출한 후 qRT-PCR에 사용하였음. 변의 DNA는 우선 변 0.2g을 15mL tube에 소분한 후 stool DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 추출함. 변의 유익균 및 유해균 정량분석을 위한

qRT-PCR은 Roche Light Cycler 96 system을 이용하였고 PCR tube에 SYBR Green with low ROX (Dynebio) 10  $\mu$ L, DNA 1  $\mu$ L, forward primer 1  $\mu$ L, reverse primer 1  $\mu$ L, 및 NF water 7  $\mu$ L를 넣었음. 표준곡선은 미생물 균주에서 추출한 DNA를  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ 로 희석하였고 샘플은 5 ng/ $\mu$ L로 희석하여 qRT-PCR을 진행하였으며, qRT-PCR 조건은 95  $^{\circ}$ C에서 10분 동안 preincubation 후 95  $^{\circ}$ C에서 10초, 60  $^{\circ}$ C에서 15초, 75  $^{\circ}$ C에서 15초간 40 cycles을 진행하였고 95  $^{\circ}$ C에서 10초, 65  $^{\circ}$ C에서 60초, 97  $^{\circ}$ C에서 1초간 melting 단계를 수행함.

표 15. Primers used for qRT-PCR analysis in feces

Target organism	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Atopobium parvulum</i> ATCC 33793 (KCTC 13805)	accgctttcagcagggga	acgccaatgaatccggat
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456 (KCTC 3202)	tcgcgtcctggtgtgaaag	ccacatccagcagtcac
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 (KCTC 3171)	agcagtagggaatcttcca	caccgctacacatggag
<i>Ruminococcus productus</i> DSM 2950 (KCTC 15607)	ggtggcaaagccattcgggt	gttacgggacggtcagag
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 (KCCM 12098)	atgcaagtcgagcgag)g	tatcgcggtattaatctctccttt
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 7757 (KCTC 5768)	ggtaccttcaaaggaagcac	gggatttcaccctgactta
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20478 (KCTC 11304)	cccttattgttagttgcatcatt	actcgttgacttcccattgt
<i>Escherichia coli</i> DSM 6897 (KCTC 1039)	gtaatacctttgctcattga	accagggtatctaactcctgtt

(바) 대장통과시간 분석

대장통과시간검사는 표지자(콜로마크) 섭취 후 복부 촬영을 통해 표지자 배출을 확인하여 장 운동을 평가하는 방법임. 표지자 섭취 후 72시간 및 144시간 후 횡경막과 치골이 포함되도록 양아위 단순복부촬영을 실시하여 각각 남아 있는 표지자 수를 더하여 1.2배 한 값을 대장통과시간으로 정의함.

(사) 통계처리

측정된 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈으며, *in vitro* 데이터는 SPSS program (20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였고, *in vivo* 데이터는 Statistical Analysis System version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 분석함. 일원배치분산분석을 실시한 후 유의적 차이가 있는 경우 다중비교분석법인 Duncan's multiple range test one-way ANOVA를 활용하여 유의수준  $p < 0.05$ 에서 비교함.

(4) 인체적용시험 변 및 대장통과시간 분석 결과

(가) 변 pH 및 수분함량 측정

시험대상자 변의 pH와 수분함량을 분석한 결과, pH는 0주보다 8주에서 대조군 (placebo)과 계피군(cinnamon)에서 모두 증가하였으며, 변의 수분함량은 대조군에서 감소하였으나 계피군에서는 약간 증가함

표 16. pH and water content in feces

Variables	Placebo	Cinnamon
pH		
Week 0	6.4 ± 0.1	6.7 ± 0.1
Week 8	6.6 ± 0.1	6.8 ± 0.1
Water (%)		
Week 0	79.6 ± 1.0	79.2 ± 1.0
Week 8	77.9 ± 1.0	80.9 ± 1.0

(나) 변 단쇄지방산 분석

시험대상자 변의 단쇄지방산을 분석한 결과, 대조군에서는 0주보다 8주에서 모든 단쇄 지방산 함량이 감소함을 확인하였으며, 계피군에서는 0주보다 8주에서 acetic acid와 iso-butyric acid 함량이 증가함.

표 17. Short chain fatty acid in feces (mg/g)

Variables	Placebo	Cinnamon
Acetic acid		
Week 0	0.532 ± 0.009	0.517 ± 0.009
Week 8	0.526 ± 0.009	0.524 ± 0.009
Propionic acid		
Week 0	0.445 ± 0.006	0.450 ± 0.006
Week 8	0.442 ± 0.006	0.446 ± 0.006
Butyric acid		
Week 0	0.287 ± 0.001	0.287 ± 0.001
Week 8	0.286 ± 0.001	0.286 ± 0.001
Iso-butyric acid		
Week 0	0.579 ± 0.011	0.561 ± 0.011
Week 8	0.569 ± 0.011	0.573 ± 0.011
Valeric acid		
Week 0	0.389 ± 0.002	0.389 ± 0.002
Week 8	0.387 ± 0.002	0.388 ± 0.003
Iso-valeric acid		

Week 0	0.493 ± 0.002	0.499 ± 0.002
Week 8	0.492 ± 0.002	0.497 ± 0.002

(다) 변 바이오제닉아민류 분석

시험대상자 변의 바이오제닉아민류를 분석한 결과, 대조군에서는 0주보다 8주에서 agmatine, pyrrolidine, dimethylamine, 및 spermine의 함량이 증가하였으며, 다른 바이오제닉아민류는 감소함. 계피군에서는 0주보다 8주에서 pyrrolidine, dimethylamine, putrescine, tyramine, 및 spermidine의 함량이 증가하였으며, 다른 바이오제닉아민류는 감소함.

표 18. Biogenic amines in feces (µg/g)

Variables	Placebo	Cinnamon
Agmatine		
Week 0	217.6 ± 101.6	429.4 ± 98.2
Week 8	282.0 ± 98.1	27.2 ± 105.6
Methylamine		
Week 0	1762.1 ± 251.2	1658.1 ± 258.9
Week 8	1091.1 ± 261.6	910.5 ± 270.4
Ethylamine		
Week 0	2966.1 ± 362.2	3895.3 ± 358.5
Week 8	2910.3 ± 357.5	3363.3 ± 363.2
Pyrrolidine		
Week 0	560.6 ± 140.5	210.9 ± 153.3
Week 8	661.8 ± 142.8	452.3 ± 153.3
Dimethylamine		
Week 0	127.2 ± 80.7	300.0 ± 79.0
Week 8	306.9 ± 77.5	327.4 ± 80.0
Propylamine		
Week 0	513.1 ± 62.4	404.1 ± 63.0
Week 8	460.4 ± 64.1	390.7 ± 61.4
Tryptamine		
Week 0	28.3 ± 5.9	19.3 ± 5.8
Week 8	12.6 ± 6.0	2.7 ± 6.2
Butylamine		
Week 0	2817.0 ± 460.4	3331.9 ± 455.0
Week 8	2200.8 ± 472.1	1915.8 ± 492.2
Phenylethylamine		
Week 0	129.9 ± 24.1	95.6 ± 26.1
Week 8	115.1 ± 25.6	86.1 ± 26.1
Putrescine		

Week 0	3591.2 ± 595.0	3919.3 ± 599.8
Week 8	3225.8 ± 599.3	4447.6 ± 604.1
Cadaverine		
Week 0	2557.2 ± 292.4	3345.1 ± 296.1
Week 8	2096.6 ± 296.1	2787.8 ± 300.1
Histamine		
Week 0	436.6 ± 71.6	447.5 ± 70.5
Week 8	324.7 ± 73.7	370.4 ± 69.9
Tyramine		
Week 0	3598.8 ± 754.2	3730.3 ± 754.2
Week 8	3538.1 ± 764.1	3956.2 ± 756.4
Spermidine		
Week 0	471.7 ± 51.3	404.8 ± 52.1
Week 8	329.5 ± 53.6	501.4 ± 53.6
Spermine		
Week 0	1069.7 ± 116.6	911.3 ± 120.6
Week 8	1120.5 ± 120.6	885.1 ± 116.6
Total amine		
Week 0	27183.8 ± 2319.0	27374.5 ± 2354.5
Week 8	23136.3 ± 2338.3	26106.1 ± 2374.7

(라) 변 인돌 및 페놀류 분석

시험대상자 변의 인돌류 및 페놀류를 분석한 결과, 대조군에서는 0주보다 8주에서 모든 인돌류 및 페놀류가 증가함. 계피군에서는 skatole을 제외하고 0주보다 8주에서 indole, phenol, 및 p-cresol 함량이 감소함.

표 19. Indoles and phenols in feces (mg/g)

Variables	Placebo	Cinnamon
Indole		
Week 0	20.3 ± 1.9	21.6 ± 2.0
Week 8	21.9 ± 1.9	16.9 ± 2.0
Skatole		
Week 0	2.3 ± 0.8	1.6 ± 0.8
Week 8	3.8 ± 0.8	2.4 ± 0.8
Phenol		
Week 0	0.2 ± 0.7	3.7 ± 0.7
Week 8	0.7 ± 0.7	3.1 ± 0.7
p-Cresol		
Week 0	28.9 ± 4.4	24.3 ± 4.7
Week 8	31.4 ± 4.6	22.9 ± 4.7

(마) 변 유익균 및 유해균 분석

시험대상자 변의 유익균 및 유해균을 분석한 결과, 대조군에서는 0주보다 8주에서 *Atopobium* spp., *Ruminococcus productus*, *Desulfovibrio* spp.는 감소하였으며, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*는 증가함. 개피군에서는 0주보다 8주에서 *Atopobium* spp., *Escherichia coli*는 증가하였으며, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Desulfovibrio* spp., *Enterococcus* spp.는 감소함.

표 20. Bacterial numbers in feces (log10/g)

Variables	Placebo	Cinnamon
<i>Atopobium</i> spp.		
Week 0	5.12 ± 0.65	5.35 ± 0.66
Week 8	4.65 ± 0.67	5.85 ± 0.67
<i>Bifidobacterium</i> spp.		
Week 0	6.86 ± 0.07	7.10 ± 0.07
Week 8	7.02 ± 0.07	7.09 ± 0.07
<i>Lactobacillus</i> spp.		
Week 0	8.15 ± 0.02	8.22 ± 0.02
Week 8	8.17 ± 0.02	8.22 ± 0.02
<i>Ruminococcus productus</i>		
Week 0	8.37 ± 0.02	8.34 ± 0.03
Week 8	8.36 ± 0.02	8.34 ± 0.03
<i>Clostridium perfringens</i>		
Week 0	7.26 ± 0.04	7.32 ± 0.04
Week 8	7.31 ± 0.04	7.24 ± 0.04
<i>Desulfovibrio</i> spp.		
Week 0	7.62 ± 0.05	7.56 ± 0.06
Week 8	7.55 ± 0.06	7.39 ± 0.05
<i>Enterococcus</i> spp.		
Week 0	8.30 ± 0.01	8.31 ± 0.01
Week 8	8.31 ± 0.01	8.27 ± 0.01
<i>Escherichia coli</i>		
Week 0	8.44 ± 0.04	8.44 ± 0.04
Week 8	8.45 ± 0.04	8.48 ± 0.04

(바) 대장통과시간 분석

시험대상자의 대장통과시간을 분석한 결과 계피 추출물 섭취군에서 대장통과시간이 유의적으로 증가함.

표21. Colonic transit time test

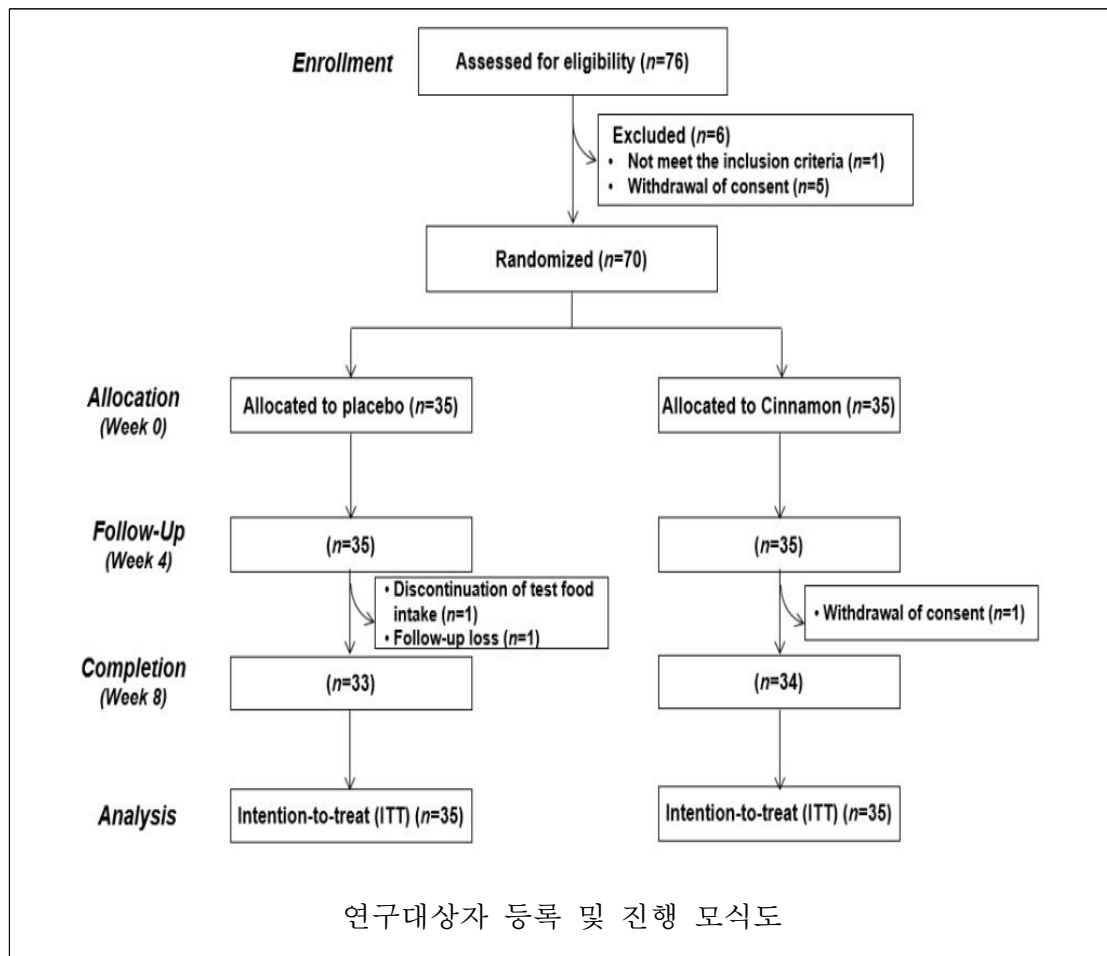
Variables	Placebo	Cinnamon
Week 0	25.6 ± 3.4	19.2 ± 3.4
Week 8	15.6 ± 3.4	21.7 ± 3.4

(5) 인체적용시험 연구 결과

(가) 연구대상자 등록 및 진행

총 76명을 스크리닝하여 70명의 연구대상자를 선정하였음.. 스크리닝에서 탈락한 6명은 선정기준에 적합하지 않은 자 1명(연령 미달) 및 동의 철회 5명임.

대조군과 시험군에서 각각 35명 무작위 배정되어 8주간 연구가 진행되었으며, 8주 동안 대조군에서 2명(시험식품 섭취 임의 중단 1명, 추적실패 1명)과 시험군에서 1명(동의철회)이 중도 탈락하여 최종적으로 67명이 완료함.





(나) 안정성 평가

활력징후 검사 결과 일부 지표에서 군내 섭취 전후 비교 시 유의적인 차이가 있었으나 임상적으로 유의미한 변화는 없었음.

혈액과 소변의 임상병리검사 결과 일부 지표에서 군간 비교 및 군내 섭취 전후 비교 시 유의적인 차이가 있었으나 임상적으로 유의미한 변화는 없었음.

이상반응이 보고된 연구대상자는 대조군 3명(3건)과 시험군 4명(4건)이었고, 증상정도는 모두 경도였다. 시험식품과의 관련성은 모두 명확한 관련이 없는 것으로 보고됨. 이상반응의 발생, 종류, 증상정도 및 시험식품과의 관련성은 모두 군간 유의적인 차이가 없었음.

시험기간 중 약물 섭취는 Anatomical Therapeutic Chemical(ATC) 코드에 따라 분류하였음. 약물을 섭취한 대상자는 대조군 3명(3건)과 시험군 5명(7건)이었고, 섭취여부 및 섭취종류에 따라 군간 유의적인 차이는 없었으며, 시험기간 중 건강기능식품을 섭취한 자는 없었다.

(다) 결론

본 연구는 평소 설사로 인해 배변에 불편함을 호소하는 성인 남녀를 대상으로 계피추출물 2,400mg 섭취가 배변활동 및 장내 균총 개선과 안전성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수행됨. 총 76명을 스크리닝하여 선정기준에 부합하는 70명을 대조군 또는 시험군으로 무작위 배정하였고 시험기간 동안 대조군에서 2명(시험식품 섭취 임의 중단 1명, 추적실패 1명)과 시험군에서 1명(동의철회)이 중도 탈락하여 최종적으로 67명이 완료함. 선정결과 등록된 대상자들의 연령은 평균 40.3±2.1세였고 남녀 비율은 군간 유사하였으며, 기저시점에서 특성은 군간 유의적인 차이가 없었음.

5. 계피 추출물의 건강기능식품 개별인정형 원료 신청

가. 계피 추출물의 안전성 및 섭취근거 확보

(1) 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

(가) 국내·외 인정 및 사용현황

우리나라에서 원재료인 계피는 식품공전에 등재되어 있어 식품으로 사용 가능하다 (식품의 기준 및 규격 제 2018-91호, 별표 1)

고유번호	명칭	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	사용부위
------	----	-----------------	----------	------

A가015300	계피	시나몬, Cassia, Chinese cinnamon	Cinnamomum cassia (L.) Presl / Cinnamomum aromaticum Nees	가지(계지), 줄기껍질
----------	----	-------------------------------------	--	-----------------

대한민국약전에 “육계”로 등재되어 있으며, 생막 및 생약제제 원료로도 사용되고 있으며, 건강기능식품 개별인정형 원료 중 유사 원료인 계피추출분말은 혈당조절의 기능을 인정 받음.

계피는 의약품 및 건강기능식품, 식품 등으로 다양하게 섭취하고 있으며, 의약품의 경우 단일 성분으로 제조되기보다 다른 생약제와 함께 섭취하는 복합제의 형태가 주를 이루고 있음. 일반식품으로는 건조된 계피 조각을 우려서 차로 마시거나 향신료로서 음식에 첨가하여 섭취하거나 계피 가루를 환으로 만들어 섭취하는 형태가 주를 이룸. 건강기능식품의 경우 계피를 주원료로 사용한 제품은 없으며 부원료로 사용한 제품만이 판매되고 있음.

#### (나) 국외 인정 및 사용현황

미국의 경우 cinnamon, cinnamon bark extract, cinnamon bark oil 등이 FDA에 의해 EAFUS(Everything Added to Food in the United States) 중 ASP(독성시험 자료가 충분히 축적되어 있어 안전한 것으로 인정된 물질)로 분류되어 있음.

중국의 경우 계피는 중국약전, 중약대사전, 중화본초 외에도 중국 국가식품약품감독관리국이 공고한 보건식품 원료 목록표에 등재되어 있어 보건식품으로 사용이 가능함.

국외의 경우 계피는 의약품보다는 건강기능식품 및 식품첨가제로의 사용이 주를 이루고 있다. 계피 추출물의 표시 효능은 면역 기능 향상, 정상 혈당 유지, 항산화가 대부분이며 1회 섭취량은 계피분말 기준으로 500mg~2,000mg으로 제품별 권장 섭취량이 상이함.

#### (2) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법 설정

##### (가) 유해물질규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군, 농약)의 규격 및 근거

건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정에 따라 분석과 섭취량을 고려하여 최소함량으로 관리될 수 있도록 설정함.

신청원료의 일일섭취량 2.4g과 분석결과를 고려하여 납 1.0 ppm 이하, 총비소 0.5 ppm 이하, 카드뮴 0.1 ppm 이하, 총수은 0.1 ppm 이하로 기준규격을 설정하였으며, 공인검사기관인 한국기능식품연구원에 의뢰하여 계피 추출물의 중금속 함량을 분석한 결과, 설정한 규격에 적합함을 확인함.

대장균군의 규격을 음성으로 설정하였으며, 한국기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과 음성임을 확인함.

수입식품등 검사에 관한 규정의 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목 58종에 대한 검사를

의뢰하여 분석한 결과 58종 모두 불검출임을 확인함.

항목		시험법 근거
중금속	납 총비소 카드뮴 총수은	식품공전 제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질 9.1. 중금속
대장균	대장균군	식품공전 제8. 일반시험법 4. 미생물 시험법 4.7. 대장균군
잔류농약	잔류농약 58 항목	식품공전 제8. 일반시험법 7. 식품 중 잔류농약 분석법 7.1.2.2. 다중농약다성분분석법

### (3) 적정 섭취량 및 섭취방법 설정

#### (가) 적정 섭취량 및 설정 근거

마우스 대상 동물시험을 경구투여로 연구를 수행하여 기능성을 확인하였기 때문에 인체 적용시험 또한 같은 투여방법으로 연구를 수행하였으며, 대부분의 해외제품에서 사용한 캡슐로 시험제품을 생산함.

5% DSS 함유 음용수를 급수하여 장 염증을 유도한 마우스 대상 연구 결과, 계피 추출물 500mg/kg을 섭취시켰을 때 양성대조군 대비 질환 활성 지표(Disease Activity Index, DAI)가 유의적으로 개선됨을 확인하였으며, 이를 근거로 계피 추출물로서 하루 2,400mg섭취량을 설정함.

Human Equivalent dosage (HED) = Animal dose (mg/kg) multiplied by Animal Km / Human Km

$$= 0.5 \text{ g/kg} \times 60 \text{ kg} \times (3 \div 37) = 2.43 \text{ g}$$

$$* \text{ Km} = \text{body weight (kg)} \div \text{surface area (m}^2\text{)} \text{ (Mouse, 3; human, 37)}$$

#### 나. 계피 추출물의 작용기전

##### (1) *In vitro* 및 *in vivo*, 인체적용시험 연구 결과로 추측한 작용기전

###### (가) *In vitro*

Caco-2 세포와 Microphage cell line Raw 264.7 세포를 이용하여 소장벽을 모델화 하

여 시험을 수행하였다. 세포에 Lipopolysaccharide를 이용 염증을 유발하여 장벽에 과염증 물질을 노출시킨 후 계피 추출물을 가하여 결과를 확인함.

시험관 시험 상 계피 추출물은 염증이 유발된 소장벽 모델의 Tight junction protein 발현량 증가와 함께 투과성을 감소시키는 것을 확인하였으며, 친염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키고 염증 관련 인자 NF- $\kappa$ B 활성을 지연시키는데 도움을 주는 것을 확인함.

#### (나) 계피 추출물의 동물시험에서 작용기전

DSS(Dextran Sulfate Sodium)를 섭취시켜 대장염이 유발된 동물에게 계피 추출물을 섭취시킨 후 희생하여 얻은 샘플을 이용하여 조직 손상정도와 혈액 중 함유되어 있는 면역조절 인자들을 확인함.

동물시험 결과 계피 추출물의 섭취는 각종 염증성 사이토카인 생성을 줄여 Tight junction을 유지 해주는 단백질의 분해를 막아 유해한 분자들이 장 상피세포를 투과하는 것을 막는데 도움을 줌. 이로 인해 유해한 분자들이 장 상피를 통과하여 혈중으로 유입되어 면역체계가 과다하게 감작되어, 친염증성 사이토카인의 분비가 증가하는 것을 막아 염증반응을 줄이는데 도움을 줌. 이는 대장염의 주 증상인 대장 길이 감소를 개선시킴과 동시에 혈변 및 변의 정도, 체중 감소 정도를 나타내는 질환활성지표 개선에 도움을 줌.

#### (다) *In vitro* 및 *In vivo* 시험과 인체적용시험을 기반으로 추측한 인체 내 작용기전

과도한 염증반응은 주로 장내 미생물 불균형을 동반하면서 나타나는데, 계피 추출물의 섭취는 *Enterococcus* spp. 성장을 억제시키고 변 내 대사체 함량을 감소시켜 장 건강 개선에 도움을 줌. 염증성 장 질환의 주 증상인 짧아진 대장 길이로 인하여 단축되어 있던 대변의 대장통과시간이 대장염 증상의 완화로 대장 길이가 길어짐에 따라 길어지게 되고 설사 개선에 도움을 줌.

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

위 건명의 민원을 접수하였습니다.

**개별인정형 원료 인증 신청 접수증**

## 5. 계피 아임계수 추출물의 사업화

### 가. 시제품 개발 계획 및 시제품 생산

#### (1) 장 건강 제품 및 계피 제품 시장 조사

우리나라에 출시된 계피 제품들은 원물 또는 원물 단순히 분쇄한 가루 형태가 대부분으로 계피를 주원료로 사용하기 보다는 향신료 또는 조미료로 사용하는 것이 대부분임.

식이보충제의 형태의 해외 계피 제품들의 경우 계피 분말 또는 계피 추출물을 주원료로 한 캡슐이 대부분을 차지하고 있으나, 칼슘, 크롬, 알파 리포산 등 다양한 원료가 같이 첨가되어 있는 것을 확인함. 또한 이 해외 제품에 대한 한국인의 수요가 있는 것으로 조사되었으며, 기대하는 효능은 수족냉증 개선, 혈액순환 개선, 혈당 조절 등으로 다양하다. 이를 바탕으로 계피를 주원료로 한 제품에 대한 한국인의 충분한 수요가 있음을 파악하였으며, 해외 제품들 또한 제형의 다양성이 부족함을 확인함.

현재 우리나라에 출시된 프리바이오틱스 제품 대다수가 프락토올리고당을 주원료로 사용한 분말 제형 제품으로 다른 원료를 사용한 제품은 희소한 것으로 조사됨.

#### (2) 계피 추출물 적용이 가능한 다양한 제형 탐색

계피 추출물의 최종 제형은 분말이나 농축액으로도 생산이 가능하기 때문에 다양한 제형에 적용이 가능한 장점을 가지고 있음.

건강기능식품의 기준 및 규격에 정의 되어있는 제품의 형태에는 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트, 젤리, 바, 필름이 있으며, 적용 가능한 모든 제형의 제품을 고려하였으나, 기존 제품과의 차별성 및 시장성 확보, 트렌드 반영을 목적으로 건강기능식품 또는 일반식품 유형의 액상스틱 형태로 제작하기로 결정함.

(3)시제품에 들어갈 부원료 및 최적 레시피 결정

제품명	건강기능식품(I)	건강기능식품(II)	일반식품(I)	한방에 속편한 하루 계피
식품유형	건강기능식품	건강기능식품	액상차	액상차
원료	계피 농축액 알로에베라겔 프락토올리고당 아연 갈근 농축액 등	계피 농축액 난소화성 말토덱스트린 치커리추출물 분말 프락토올리고당 등	계피 농축액 감초 초피나무 육두구 복령 등	계피농축액 식물혼합농축액 프락토올리고당

계피 농축액 및 알로에베라겔, 아연 등이 함유된 최초 시험제품인 건강기능식품(I)을 생산하여 자체 관능평가를 진행 하였으나, 금속성의 맛이 느껴지는 문제점을 발견하여 내부 회의를 통하여 새로운 배합비인 건강기능식품(II)를 결정함.

결정된 배합비로 시험 제작된 2종에 대해 소비자 블라인드 테스트 진행 후 맛과 향 등에 대한 희망사항을 확인한 후 테스트 결과를 바탕으로 자사 고문단 및 업계 관계자의 의견을 수용하여 관능적 만족을 목적으로 건강기능식품 원료 대신 한약 원료를 사용하기로 결정함.

한약 원료 선택에 있어 한약 생산 전문가 및 중의학 전문가의 자문을 구해 전통 한약 처방 방법에 따른 제품 레시피인 일반식품(I)을 결정함.

결정된 레시피로 최종 시제품 생산을 진행하려 하였으나, 원료수급 및 생산단가 문제로 인하여 원료를 변경하여 최종 레시피인 한방에 속편한 하루 계피를 확정하였으며, 현재 트렌드를 반영하여 주원료 및 부원료 컨셉에 맞는 디자인을 확정함.

(4) 계피 농축액 및 시제품 생산

주원료인 계피 농축액은 (주)대호양행에서 생산하였으며 계피 220kg을 생산에 투입하여 계피 농축액 199kg을 생산하였다. 약 90%의 추출율을 확인하였으며, 이는 인체적용시험용 제품 생산과 비교하여 약 30% 높아진 수치임.

시제품 생산업체는 (주)진산사이언스로 품목제조보고는 2018년 11월 22일 완료하였으며, 제품명은 한방에 속편한 하루 계피로 식품유형은 액상차임.

시제품의 제형은 액상으로 충격에 취약하며 파우치에 손상을 입을시 다른 제품들이 오염될 확률이 상대적으로 높기 때문에 케이스의 흡습을 줄이기 위해 종이에 라미네이트 코팅을 하여 방수성능을 높임.

충격으로 인한 손상방지를 목적으로 60개의 스틱을 3개의 단상자에 20개씩 개별 포장하였으며 인케이스에 머리패드 및 간지를 추가하여 충격을 줄임과 동시에 흔들림을 방지함.





시제품 이미지

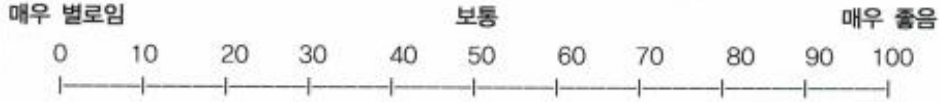




## 제품 섭취 후 설문

No 20

1. 본 제품의 전체적인 맛에 대한 선호도를 점수로 표현하여 주십시오.



2. 본 제품의 맛에 대하여 개선되어야 할 부분을 적어주십시오.

3. 본 제품 섭취 후 섭취 전과 비교하여 아래 증상들의 개선 정도를 평가하여 주십시오.

A) 설사 빈도

- ① 줄어 들었음 ② 약간 줄어 들었음 ③ 변함없음 ④ 약간 잦아짐 ⑤ 잦아짐

B) 변비 정도

- ① 개선됨 ② 약간 개선됨 ③ 변함없음 ④ 약간 심해짐 ⑤ 심해짐

C) 복부 더부룩함 정도

- ① 개선됨 ② 약간 개선됨 ③ 변함없음 ④ 약간 심해짐 ⑤ 심해짐

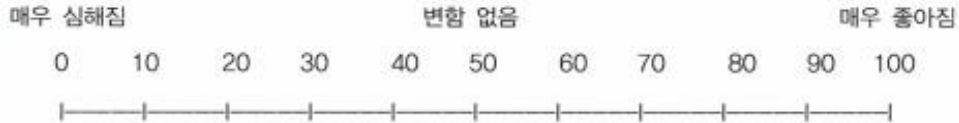
D) 배변 후 잔변감

- ① 개선됨 ② 약간 개선됨 ③ 변함없음 ④ 약간 심해짐 ⑤ 심해짐

F) 피부 상태(여드름, 발진 등)

- ① 개선됨 ② 약간 개선됨 ③ 변함없음 ④ 약간 심해짐 ⑤ 심해짐

G) 상기 증상들의 개선 정도를 종합하여 점수로 표현해 주십시오.



4. 본 제품을 구매할 의향이 있으십니까?

- ① 있다(5번 질문으로) ② 없다(6번 질문으로)

5. 본 제품을 구매 하신다면 얼마까지 지불할 의향이 있으십니까?(한 세트 60포 기준)

- ① 3~5 만 원 ② 5~7 만 원 ③ 7~10 만 원 ④ 10~15 만 원 ⑤ 20 만 원 이상

6. 본 제품의 적정 가격을 평가하여 주십시오(한 세트 60포 기준)

- ① 3~5 만 원 ② 5~7 만 원 ③ 7~10 만 원 ④ 10~15 만 원 ⑤ 20 만 원 이상

### (5) 시제품 소비자 설문조사 결과

계피추출물 시제품인 ‘한방애 속편한 하루 계피’를 50명의 일반 소비자에게 제공하고 조사한 설문의 결과는 다음과 같음.

기호도 조사 기간은 2018년 12월 10일 ~ 2019년 2월 28일까지 시행되었으며, 주요 대상자는 평소 복부 불편감을 인지하고 있는 건강한 성인으로 총 남성 25명, 여성 25명이였다. 이중 20대 5명(남2/여3), 30대 5명(남1/여4), 40대 15명(남8/여7), 50대 15명(남10/여5) 60대 이상 10명(남4/여6)의 분포를 보임.

### 대상자 기본 정보

항목	구분	대상자수(백분율)		합계	
성별	남성	25(50%)		50(100%)	
	여성	25(50%)			
연령	20대	남성	2(4%)	5(10%)	
		여성	3(6%)		
	30대	남성	1(2%)	5(10%)	
		여성	4(8%)		
	40대	남성	8(16%)	15(30%)	50(100%)
		여성	11(22%)		
	50대	남성	10(20%)	15(30%)	
		여성	5(10%)		
	60대 이상	남성	4(8%)	10(20%)	
		여성	6(12%)		
거주지	서울	15(30%)		50(100%)	
	경기도	10(20%)			
	경상남도	10(20%)			
	충청도	6(12%)			
	전라도	5(10%)			
	경상북도	4(8%)			

섭취 전 설문지를 통해 계피 섭취에 대한 선호도, 계피 효능에 대한 인지정도, 현재 느끼는 문제점에 대해 조사함.

계피 섭취 선호에 대한 질문에 보통 20명(40%), 좋아한다 13명(26%), 매우 좋아한다(20%), 좋아하지 않는다 7명(14%)로 응답했으며, 계피의 효능은 기타 소화촉진(10%), 염증 반응억제(10%), 혈당조절(4%)에 대해 안다고 답한 대상자가 있었으나 76%의 대상자가 모른다고 답하였음.

### 계피 섭취 선호도

선호도	대상자수(백분율)
매우 선호한다	5(10%)
선호한다	13(26%)
보통이다	20(40%)
좋아하지 않는다	12(24%)
합 계	50(100%)

### 계피 효능에 대한 인지도

인지도	대상자수(백분율)
잘 모른다	38(76%)

염증반응억제	5(10%)
혈당조절	2(4%)
면역개선	12(24%)
장 건강개선	0(0%)
심혈관질환예방	0(0%)
기타	5(10%)
합 계	50(100%)

장 건강 관련 질문으로 변비 또는 설사·위장장애·복부 더부룩함·잔변감 유무, 피부 질환 유무 및 면역 관련으로 추위 인지 정도 및 감기·바이러스 질환 노출 정도를 제공함. 또한 상기 증상으로 인해 느끼는 불편 정도를 ‘전혀 불편하지 않다’ 0점~‘일상 생활에 지장이 심하다’ 100점으로 놓고 점수를 통해 표현하도록 함. 불편 정도가 보통인 점수 50점인 대상자가 48%로 가장 많았으며, 불편증상이 생활에 지장을 주는 점수인 70점·80점 6%, 60점 30%였고, 생활에 지장을 주지 않는 40점은 10%로 나타남.

섭취 후 설문지를 통해 시제품의 맛 선호도, 맛에 대한 불만사항, 불편증상 개선 정도, 제품화 시 구매의향 및 구매 희망 가격에 대해 조사함.

대상자들의 맛에 대한 선호도는 맛있다 100점~맛없다 0점으로 설정한 점수로 나타내도록 하였는데 50점 이하로 나타난 대상자가 96%로 대체적으로 맛이 없다는 응답(30점 10%, 40점 68%, 50점 18%, 70점 2명)을 주었으며, 계피향의 부족, 한약맛이 너무 강함, 멍멍한 맛임 등의 의견을 수렴함.

증상의 변화에 있어서는 설사증상의 완화 32%, 변비 증상 완화 38%, 복부팽만감 개선 92%, 잔변감 개선 30%, 피부상태 개선 40%로 나타났으며 섭취 전 불편증상을 기준으로 현재 개선된 상태를 불편점수로 환산한 점수는 90점 9명(18%), 80점 5명(10%), 70점 30명(60%), 50점 6명(12%)로 나타남.

향후 제품 판매 시 구매의향 조사에서는 30명(60%)에서 구매의사가 있다고 나타났으며, 1개월 분량 판매가는 5~7만원(44명, 88%)이 가장 높은 비율로 나타남.

#### (6) 시판 제품 생산 준비

- 제품의 제형 : 당사 자체 기호도 조사 결과에 나타난 맛에 대한 거부감을 제거하기 위해 제형은 캡슐로, 포장의 형태는 1회 섭취량을 1포에 포장하는 멀티팩으로 결정함.
- 제품의 특징 : 계피추출물은 설사증상이 있는 일반인의 설사증상 개선을 통한 영양흡수율 상승으로 인한 건강회복 및 건강유지가 주요 목적이므로 영양 보충을 위해 멀티비타민, 미네랄을 첨가하기로 하였다. 또한 프리바이오틱스와 프로바이오틱스를 함께 배합하므로 신바이오틱스(SYN biotics)를 제공할 수 있음.

계피는 예로부터 소화촉진 및 위장장애 개선의 목적으로 민간에서 다양하게 활용하던 식재료이므로 생약으로서의 계피 효능을 동시에 기대할 수 있음. 이는 기호도 조사 대상자의 응답으로도 일부 확인되었으며 단순 프리바이오틱스 제품이나 프로바이오틱스 제품과 가장 큰 차이점이라 할 수 있음.

현재 시판되는 ‘배변활동 원활에 도움’ 기능성 원료는 목이버섯, 무화과페이스트, 분말한천, 이소말토올리고당, 자일로올리고당, 커피만노올리고당, 프락토올리고당이 있으나 기능성 설

사 증상의 완화에 도움이 된다는 연구결과는 찾을 수 없었음.

- 제품의 유형 : 고시형 장 건강 원료인 유산균 함유제품
- 예상 제품 판매가 : 8~10만원/1개월
- 예상 출시 시기 : 2019년 6월

## 4. 연구개발 성과 및 활용계획

### 1. 연구성과 목표 달성

성과 목표	사업화지표										연구기반지표										
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍 보		기 타 (타 연구 활용 등)		
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시			
												SC I	비 SC I							논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건				
가중치																					
최종목 표	2	2	0	1	0	3			2	0	1	2	1		3	3	2	0	0	0	
1차 년도	목 표	1							1						1	1					
	실 적	1							1						1	1					
2차 년도	목 표	1										1	1		1	1	1				
	실 적	1										1	1		2	1	1				
3차 년도	목 표		1		1		1				1	1			1	1	1				
	실 적		1		1		1				1	1			2						
소 계	목 표	2	1	0	0	0	1			1	0	1	2	1		3	3	2	0	0	0
	실 적	2	1	0	0	0	1			1	0	1	2	1		5	3	4			
소 계		0	1	0	0	0	2			2	0	1	0	0		0	0	0	0	0	0
합 계		2	1	0	1	0	3			2	0	1	2	1		3	3	2	0	0	0

2. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	Vol. (No.)	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재연도	등록번호
1	Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in a coculture model of intestinal epithelial Caco-2 cells and RAW264.7 macrophages	Applied Biological Chemistry	Min Seo Kim	60(5)	대한민국	Korean Society for Applied Biological Chemistry	SCI	2017	Online ISSN 2468-0842 Print ISSN 2468-0834
2	Effect of Ginger and Cinnamon Extract Mixtures on the Growth of Intestinal Bacteria and intestinal inflammation	Journal of Applied Biological Chemistry	Min Ju Kim	60(4)	대한민국	Korean Society for Applied Biological Chemistry	비SCI	2017	Online ISSN 2234-7941 Print ISSN 1976-0442
3	Ginger attenuates inflammation in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis	Food Science and Biotechnology	Min Seo Kim	27(5)	대한민국	Korean Society of Food Science and Technology	SCI	2018	Online ISSN 2092-6456 Print ISSN 1226-7708

(1) Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in a coculture model of intestinal epithelial Caco-2 cells and RAW264.7 macrophages

Appl Biol Chem  
DOI 10.1007/s13765-017-0311-y

Online ISSN 2468-0842  
Print ISSN 2468-0834



ARTICLE

## Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in a coculture model of intestinal epithelial Caco-2 cells and RAW264.7 macrophages

Min Seo Kim<sup>1</sup> · Ji Yeon Kim<sup>1</sup>

Received: 28 July 2017 / Accepted: 10 August 2017  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

**Abstract** Cinnamon is the bark of *Cinnamomum japonicum* SIEB, which possesses anti-microbial, anti-tyrosinase, and antioxidant activities. However, studies on the intestinal health benefits of cinnamon are scarce. Therefore, we were aimed at assessing the potential anti-inflammatory action of cinnamon extracts in a cellular model of intestinal inflammation. Cinnamon extracts were prepared using hot water extract and 70% ethanol extract. Prior to inducing inflammation, co-cultured Caco-2 cells with RAW264.7 cells were treated with the cinnamon extracts. Lipopolysaccharide (LPS) was treated to induce inflammation in RAW264.7 cells. Compared to LPS-treated groups, the cells treated with cinnamon extracts maintained high transepithelial electrical resistance and decreased tight junction permeability, similar to that shown by control Caco-2 cells. In addition, cinnamon extract-treated cells showed decreased levels of inflammatory cytokines, namely nitrite (NO), PGE<sub>2</sub>, interleukin (IL)-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . These results show that cinnamon may serve as a probable agent for the development of functional supplements for maintenance of gastrointestinal health.

**Keywords** Caco-2 · Cinnamon · Co-culture · Gut barrier integrity · Gut inflammation

### Introduction

Intestinal cells react to inflammatory expression released by penetrated neutrophils and T cells via activation of various intracellular signal transduction pathways to limit the gene expressions associated with intestinal inflammation [1, 2]. Immune homeostasis in epithelial tissues is controlled by multiple mechanisms including integration of microbial, toxic chemicals, and allergens into immune regulatory circuits that maintain a healthy immune system, promote effective defense, and inhibit inordinate and potentially precarious inflammatory responses. [3, 4]. Several intestinal diseases such as inflammatory bowel disease (IBD) [5], nonalcoholic steatohepatitis [6], and nonalcoholic fatty acid liver disease [7] loosen tight junctions (TJs) and lead to leaky gut syndrome. IBD is characterized by increased intestinal inflammation and TJ permeability, which is closely associated with the increase in inflammatory cytokines including prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), interleukin (IL)-6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in the intestine and blood [8, 9]. Because the weakness of TJs contributes to various diseases or exacerbations, strengthening the function of the intestine through increase in TJs interaction can prevent or alleviate these diseases. Dietary ingredients and phytochemicals including flavonoids and phenolic chemicals have been known to prevent TJ damage induced by inflammatory cytokines in many studies [4, 10, 11].

Cinnamon is the bark of *Cinnamomum japonicum* SIEB, an evergreen tall tree belonging to the family Lauraceae, and resource plant widely used as a food owing to its spicy and sweet flavor [12]. *C. japonicum* has been known to have anti-microbial, anti-tyrosinase, and antioxidant properties [13]. Cinnamic acid and cinnamaldehyde, the key

✉ Ji Yeon Kim  
jiyeonk@seoultech.ac.kr

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

Published online: 18 August 2017

Springer



## (2) Effect of Ginger and Cinnamon Extract Mixtures on the Growth of Intestinal Bacteria and intestinal inflammation



### Effect of ginger and cinnamon extract mixtures on the growth of intestinal bacteria and intestinal inflammation

Min Ju Kim<sup>1</sup> · Min Seo Kim<sup>1</sup> · Sung Tae Kang<sup>1</sup> · Ji Yeon Kim<sup>1</sup>

### 생강계피 복합물이 장내 유익균 증식 및 염증조절 기능에 미치는 영향

김민주<sup>1</sup> · 김민서<sup>1</sup> · 강성태<sup>1</sup> · 김지연<sup>1</sup>

Received: 16 August 2017 / Accepted: 13 September 2017 / Published Online: 31 December 2017  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

**Abstract** We aimed to assess the potential growth-promoting effects of ginger and cinnamon mixtures (GCM) on intestinal bacteria and their anti-inflammatory effects in a cellular model of intestinal inflammation. *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus* sp., and *Lactobacillus acidophilus* served as intestinal bacteria. Further, in the inflammatory co-culture model, Caco-2 cells co-cultured with RAW264.7 cells were treated with GCM before the addition of lipopolysaccharide (LPS) to induce inflammation in RAW264.7 cells. Addition of GCM to modified Eggerth Gagnon media at a ginger:cinnamon ratio of 1:5 increased the growth of *B. longum*, *Lactobacillus* sp., and *L. acidophilus* compared to that of the control. In a cellular model, compared to LPS-treated groups, GCM-treated groups maintained high transepithelial electrical resistance at ginger:cinnamon ratios of 1:1, 1:3, 1:5, and 1:7 and decreased the tight junction permeability at 3:1, 1:1, 1:3, and 1:5 ratios, similar to that shown by the control groups. In addition, GCM-treated groups showed decreased levels of nitrite at 1:1, 1:5, and 1:7 ginger:cinnamon ratios. Based on these results, it can be concluded that among the various combinations of GCM, the ginger:cinnamon ratio of 1:5 is the optimal composite ratio that shows positive effects on the intestinal beneficial bacteria and in

anti-inflammation.

**Keywords** Anti-inflammation · Cinnamon · Extract mixtures · Ginger · Intestinal bacteria

### 서 론

인체의 장내에 존재하는 100조의 세균들은 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체성분을 이용하여 증식하고 분변으로 배출된다(Park 등, 2010). 장내 세균총들은 장관 내에 증식함으로써 상호공생관계에 의해 세균총의 균형을 정상적으로 유지하거나 길항 관계에 의하여 유해 미생물의 증식을 억제하고 있다(Fuller 1992). 장내 미생물들 이외에 장세포들 또한 염증과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 다양한 세포 내 신호전달경로의 활성화를 통해 여러 염증 신호에 반응한다(Beatrice 등, 2009; Romier-Crouzet 등, 2009; Wullaert 등, 2011; Olejnik 등, 2016). 장관 내에서의 염증반응은 tight junction (TJ)을 붕괴시켜 장누수증후군(leaky gut syndrome)을 초래한다. 항염증 활성을 가지는 플라보노이드 및 페놀 화합물과 같은 식이성분이 염증성 사이토카인에 의해 유도된 TJ 손상을 예방한다는 많은 연구가 보고되고 있다(Ji 등, 2006; Jeong 등, 2011; Suzuki와 Hara 2011; Ulluwishewa 등, 2011; Kim 2016).

생강(Ginger)은 생강과(*Zingiber officinale* Roscoe)에 속하는 다년생 초본식물로 특유의 매운맛과 방향성 향기를 지니고 있어 전 세계적으로 널리 애용되고 있으며, 우리나라에서도 식품과 음료 등에 많이 사용되고 있는 향신료 중의 하나이다(Kim과 Ahn 1993; Sung 2010). 생강추출물에 관한 연구로 Yang 등(1992)이 생강추출물의 항위염·항궤양 작용을 입증하였고, 생강의 항균성에 관하여 식중독 세균에 대한 증식저해작용 연

Ji Yeon Kim   
E-mail: jiyeonk@seoultech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Republic of Korea

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

### (3) Ginger attenuates inflammation in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis

Food Sci Biotechnol  
https://doi.org/10.1007/s10068-018-0438-6



## Ginger attenuates inflammation in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis

Min Seo Kim<sup>1</sup> · Ji Yeon Kim<sup>1</sup>

Received: 26 June 2018 / Revised: 6 July 2018 / Accepted: 12 July 2018  
© The Korean Society of Food Science and Technology and Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

**Abstract** This study assessed the anti-inflammatory effect of ginger extract on colitis by 5% dextran sulfate sodium (DSS) in BALB/c mice. The mice were administered either distilled water or three doses of ginger extracts for 21 days. We evaluated the change in clinical and histopathological signs and cytokine and gene expression levels. Contrary to the DSS group, the ginger groups increased body weight and inhibited shortening of the colon. DAI values and colon injury in the ginger groups were lower than that in the DSS group. Ginger groups obviously inhibited the myeloperoxidase activity and cytokine and mRNA concentrations of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , but not of intestinal barrier proteins zonula occludens (ZO)-1, occludin, E-cadherin, mucin-1, and mucin-2 in colon tissues. Our results suggest the protective effect of ginger against DSS-induced colitis and that ginger could be utilized to prevent and treat irritable bowel disease.

**Keywords** Colitis · Dextran sulfate sodium · Ginger · Inflammation · Inflammatory bowel disease

### Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC), is associated with inflammation that recurs in the digestive system, without specific

pathology. It is promoted by the abnormal immune reaction of the pathogens in the cell and intestinal flora, due to which inflammation occurs in the digestive system (Podolsky, 2002). Patients with IBD show frequent symptoms of melena, mucous and bloody stool, diarrhea, weight loss, abdominal pain, and anemia (Carter et al., 2004; Verhave et al., 1990). Cytokines appear to play a leading role in regulating IBD-related clinical symptoms, namely, intestinal inflammation, diarrhea, rectal bleeding, furuncle formation, and complications such as the incidence of colitis-related neoplasms (Neurath, 2014; Strober et al., 2002). Use of natural products, e.g. plant extracts or plant derivatives, has been shown to suppress IBD, and hence, is increasing worldwide. Many studies, examined in vitro and/or in vivo, have shown that plant extracts and plant derivatives, including *Prunus mume*, *Gardenia jasminoides*, *Zingiber officinale*, and *Garcinia cambogia*, adjust the level of numerous inflammatory cytokines or inflammatory agents and intercellular adhesion molecule expression to exert their anti-inflammatory effect (Awaad et al., 2013; Debnath et al., 2013). In addition, many extracts were also shown to be effective in clinical studies (Triantafyllidi et al., 2015).

Ginger is a perennial herbaceous plant belonging to *Zingiber officinale* Roscoe. It has a unique spicy and aromatic flavor, and is widely used throughout the world. Ginger has been proved to have anti-inflammatory, antioxidant, anti-gastritis, anti-ulcer, and antimicrobial activities (Ali et al., 2008; Chrubasik et al., 2005). The main ingredients of ginger are zingerones, paradols, gingerols, and shogaols, which occur in the oleoresin of ginger rhizome phenolics (Jung et al., 2018; Luettig et al., 2016). These compounds have been demonstrated to possess antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer properties (Chung et al., 2009; Dugasani et al., 2010; Fan et al.,

✉ Ji Yeon Kim  
jyjeonk@seoultech.ac.kr

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

3. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표명	발표자	발표일시	장소
1	한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회	Use of ginger and cinnamon extract for enhancing the growth of beneficial bacteria and anti-inflammatory properties	김민서	16.11.02	제주국제컨벤션 센터 (대한민국)
2	한국식품과학회 국제학술대회 (우수포스터상 수상)	Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in intestinal epithelial Caco-2 cells co-cultured with RAW264.7 macrophage cells	김민서	17.06.23	제주국제컨벤션 센터 (대한민국)
3	국제건강기능식품 학술대회 (우수포스터상 수상)	Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon effects in a co-culture model of intestinal epithelial Caco-2 cells and RAW264.7 macrophages	김민서	17.10.24	군산새만금컨벤션 센터 (대한민국)
4	미국영양학회	Anti-inflammatory effects of cinnamon in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis	김경진	18.06.11	보스턴 Hynes Convention Center (미국)
5	한국식품과학회 국제학술대회	Anti-inflammatory effects of ginger in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis	김민서	18.06.29	부산 벅스코 (대한민국)

# Use of Ginger and Cinnamon Extract for Enhancing the Growth of Beneficial Bacteria and Anti-inflammatory Properties

Min Seo Kim<sup>1</sup>, Yun Young Kim<sup>1</sup>, Lee Seon Kim<sup>1</sup>, Min Ju Kim<sup>1</sup>, Kyeong Jin Kim<sup>1</sup>, Ji Sun Youn<sup>1</sup>, Ji Yeon Kim<sup>1†</sup>, Yeon Seok Kim<sup>2</sup>, Youn Gil Kwak<sup>2</sup>, Young-hee Jo<sup>3</sup>, Dong-june Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Republic of Korea  
<sup>2</sup>Chunho Bio, <sup>3</sup>Korea Food Research Institute

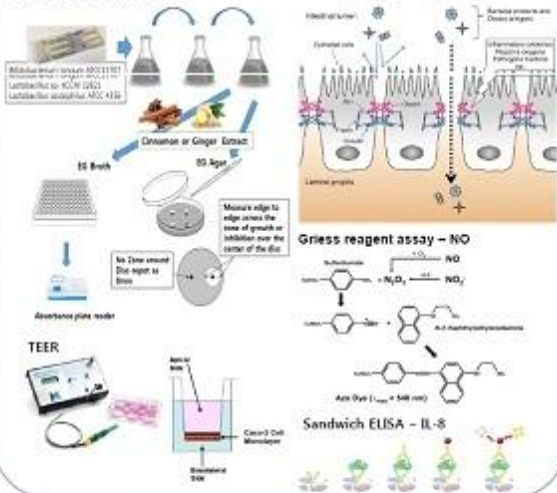
## Abstract

Traditionally, ginger and cinnamon have been prescribed for diseases of the digestive system. The extracts of ginger and cinnamon were prepared using the subcritical water extraction (SWE), enzyme treatment, alcoholic extraction, and dried powder. The effect of each extract on the growth of intestinal beneficial bacteria (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus* sp., and *Lactobacillus acidophilus*) was tested. Liquid culture experiments showed that, as the amount of ginger and cinnamon extract increased, the growth of intestinal beneficial bacteria increased and consequently the ratio of O.D. value to growth also increased. Experiments with agar diffusion method revealed that all intestinal beneficial bacteria showed a broad growth zone in solid media with discs containing 10 mg/disc of ginger and cinnamon extract. A cellular model of intestinal inflammation, obtained by differentiating Caco-2 cell for 21 days, was treated with ginger and cinnamon extract. Compared to LPS-treated Caco-2 cells, the cells treated with ginger and cinnamon extracts showed maintained high transepithelial electrical resistance, similar to that shown by control Caco-2 cells. In contrast, the Caco-2 cells treated with ginger and cinnamon extracts showed decreased levels of inflammatory cytokines such as interleukin-8 and nitric oxide, compared to those in the LPS-treated cells. These results show that ginger and cinnamon extract may be developed as functional supplements to maintain gastrointestinal health.

Acknowledgement: IPET\_16601203

## Materials and Method

### Growth Activity of Intestinal Beneficial Bacteria



## Result

Liquid culture experiments showed that, as the amount of ginger and cinnamon extract increased, the growth of intestinal beneficial bacteria increased and consequently the ratio of O.D. value to growth also increased (Fig. 1). Compared to LPS-treated Caco-2 cells, the cells treated with ginger and cinnamon extracts showed maintained transepithelial electrical resistance, similar to that shown by control Caco-2 cells (Fig. 2). The Caco-2 cells treated with ginger and cinnamon extracts showed decreased levels of NO but not decreased IL-8 (Fig. 3, 4).

## References

- Sutherland J, Miles M, Hedderley D, Li J, Denoy S, Sutton K, Lauren D. In vitro effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *Int J Food Sci Technol*. 2009
- Seng-Kwe Chuan, Feng-Liang Wu, Wei-Chen Tai and Cho-Sin Changchien. The effects of Ginger on Gallbladder Motility in Healthy Male Humans. *J Neurogastroenterol Motil*. 2011
- Cao AD, Aze AR, Azeoga FG, Bello FA, Akintemes TA, Ogunniyi EB. Effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on growth performance, nutrient digestibility, serum metabolites, gut morphology, and microflora of growing guinea fow. *Trop Anim Health Prod*. 2013
- Liu D, Gao M, Hu Y, Liu T, Yan J, Luo Y, Yun M, Yang M, Zhang J, Guo L. Effect of sanhuangweiji powder, anti-rheumatic drug, and ginger-conditioned aqueous extract on the treatment of rheumatoid arthritis with peptic ulcer: a randomized controlled study. *J Tradit Chin Med*. 2015.
- Drobnik VN, Kim WA, Tschankov EV, Varanova SO. Influence of a specific ginger combination on gastropathy conditions in patients with osteoarthritis of the knee or hip. *J Altern Complement Med*. 2012

Fig. 1

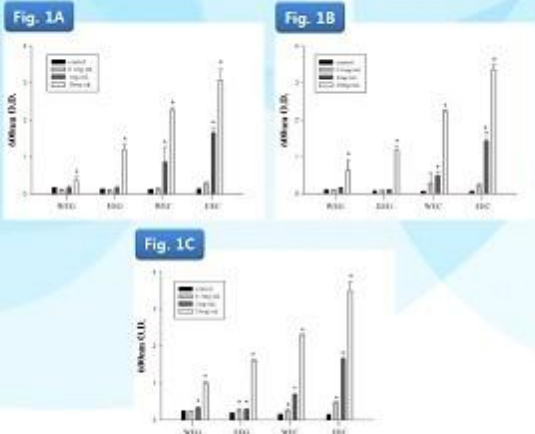


Figure 1. Effect of WEG, EG, WEC, EEC on growth of intestinal bacteria by modified EG broth. Fig. 1A: *B. longum*, Fig. 1B: *Lsp*, Fig. 1C: *Lactobacillus*. WEG (Water Extract of Ginger), EG (Ginger Extract of Ginger), WEC (Water Extract of Cinnamon), EEC (Ethanol Extract of Cinnamon)

Fig. 2

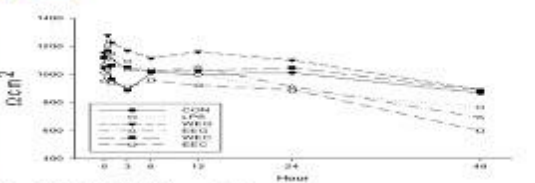


Figure 2. LPS induced TEER decrement in Co-culture.

Fig. 3

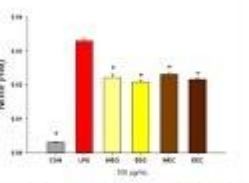


Figure 3. Concentration profile of NO in Co-culture stimulated with LPS.

Fig. 4

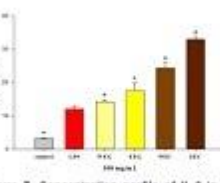


Figure 4. Concentration profile of IL-8 in Co-culture stimulated with LPS.

## Conclusion

These results show that ginger and cinnamon extract may be developed as functional supplements to maintain gastrointestinal health.



## Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in intestinal epithelial Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophage cells

Min Seo Kim<sup>1\*</sup>, Yun Young Kim<sup>1</sup>, Min Ju Kim<sup>1</sup>, Ji Yeon Kim<sup>1†</sup>  
Yeon Seok Kim<sup>2</sup>, Youn Gil Kwak<sup>2</sup>, Chong-Tai Kim<sup>3</sup>, Young-hee Jo<sup>3</sup>, Dong-june Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Republic of Korea  
<sup>2</sup>Chunho Bio, <sup>3</sup>Korea Food Research Institute

### Abstract

The objective of this study was to assess the potential anti-inflammatory action of cinnamon extracts in a cellular model of intestinal inflammation. The extracts of cinnamon were prepared using hot water extraction (HWE), alcohol extraction (AE), and subcritical water extraction (SWE). Prior to inducing inflammation, Caco-2 cells, which had been co-cultured with RAW 264.7 cells, were treated with the cinnamon extracts. Inflammation was induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW 264.7 cells. Compared to LPS-treated co-cultured Caco-2 cells, the SWE-treated cells maintained high transepithelial electrical resistance, similar to that shown by control Caco-2 cells. Out of the cinnamon extracts described previously, SWE showed the greatest protective effect. Additionally, compared to HWE- and AE-treated cells, SWE-treated cells showed decreased levels of inflammatory cytokines such as interleukin-8 and nitric oxide. These results show that SWE may have potential in the development of functional supplements for maintenance of gastrointestinal health. (SPET\_19801205)

### Objectives

The aim of this study was to assess its anti-inflammatory effect of treatment of cinnamon extracts in a cellular model of intestinal inflammation.

### Materials and Method

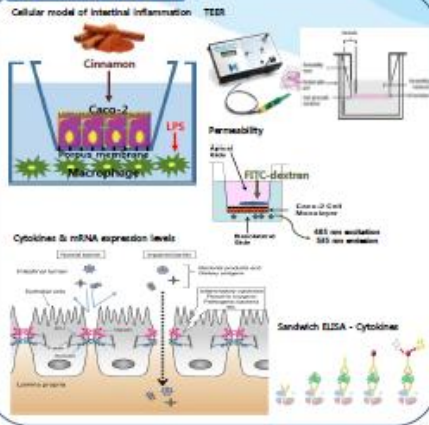


Fig 1.

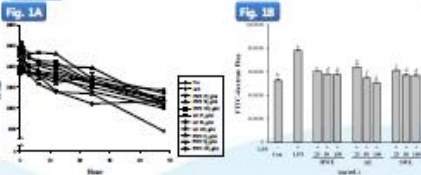


Figure 1. The course of TEER value (A) and FITC-dextran flux (B) in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 6-transwell insert plate at  $2.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon extracts that were added to the apical side of co-culture system. Then LPS was added to the basolateral side and the inside was incubated 48h. Different letters on bars mean significant differences by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). HWE, hot water extract; AE, alcohol extract; SWE, subcritical water extract; LPS, lipopolysaccharide.

### Result

- Compared to LPS-treated co-cultured Caco-2 cells, the cinnamon extracts treated cells maintained high transepithelial electrical resistance and permeability similar to that shown by control Caco-2 cells (Fig 1).
- Cinnamon extracts cells showed decreased levels of inflammatory cytokines and relative mRNA expression (Fig 2 & 3).

### Conclusion

Cinnamon extracts exhibited intestinal anti-inflammatory activity by inhibiting various inflammatory cytokines. These results show that cinnamon extracts may be developed as functional supplements to maintain gastrointestinal health.

### References

1. Zhang Y, Zhang Y, Kawanishi K, Yamashita T, Mizuno M (2008) In vitro model to evaluate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Microbiol and Immunol* 52: 585-593 doi:10.1002/mic.2028
2. Kim MS, Kim YH, Lee JY, Kim SH, Ko HC, Han SJ, Kim Y (2015) Inhibitory activity of *Zinnia officinalis* and related to its secondary metabolite compounds in intestinal epithelial Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophages via nuclear receptor and caspase-3/9. *Int J Mol Sci* 16: 2015-2023
3. Han Y, Kim SH, Cho H, Kim Y, Kim Seokwon, Y. Chung H (2017) The anti-inflammatory effect of licorice root through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Caco-2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 43: 18-28 doi:10.1016/j.jnbi.2017.01.010
4. Kim YH, Kawanishi CK, Kim YH, Kawanishi A, Kawanishi M, Han SH (2016) TGF- $\beta$ 1 gene-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires TGF- $\beta$ 1 receptor 1-mediated activation of p38. *Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 305: G587-595 doi:10.1152/ajpgi.00173.2016

Fig 2.

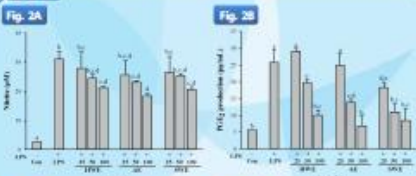


Fig 2C.

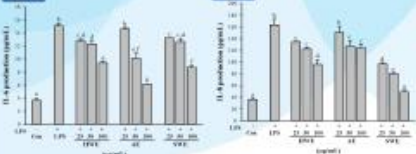


Fig 2E.

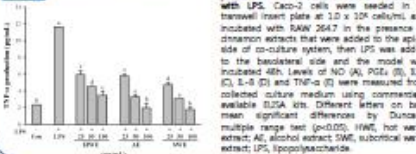


Figure 2. Concentration profile of cytokines production in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 6-transwell insert plate at  $2.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon extracts that were added to the apical side of co-culture system, then LPS was added to the basolateral side and the model was incubated 48h. Levels of NO (A), PGE<sub>2</sub> (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and TNF- $\alpha$  (E) were measured from collected culture medium using commercially available ELISA kits. Different letters on bars mean significant differences by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). HWE, hot water extract; AE, alcohol extract; SWE, subcritical water extract; LPS, lipopolysaccharide.

Fig 3.

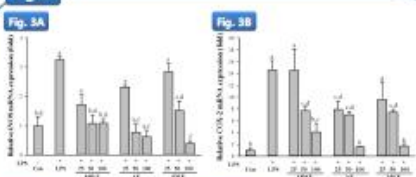


Fig 3C.

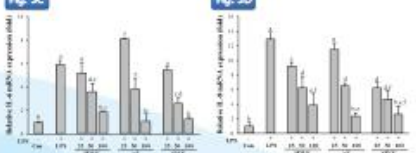


Fig 3E.

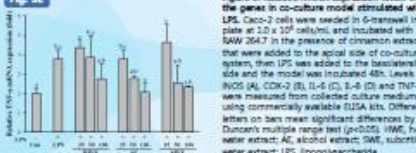


Figure 3. Relative mRNA expression levels of the gene in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 6-transwell insert plate at  $2.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon extracts that were added to the apical side of co-culture system, then LPS was added to the basolateral side and the model was incubated 48h. Levels of iNOS (A), COX-2 (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and TNF- $\alpha$  (E) were measured from collected culture medium using commercially available ELISA kits. Different letters on bars mean significant differences by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). HWE, hot water extract; AE, alcohol extract; SWE, subcritical water extract; LPS, lipopolysaccharide.

제17-25호



우수포스터상

P11-058

성명 및 소속 : Minseo Kim\*, Yunyoung Kim, Minju Kim, Jiyeon Kim,  
Yeonseok Kim<sup>1</sup>, Youngil Kwak<sup>1</sup>, Chongtai Kim<sup>2</sup>, Younghee Jo<sup>2</sup>,  
Dongjune Choi<sup>2</sup>  
*Seoul National University of Science and Technology, Korea,*  
*<sup>1</sup>Chunho Bio, Korea, <sup>2</sup>Korea Food Research Institute, Korea*

제목 : Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in intestinal  
epithelial Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophage cells

위의 사람은 2017 한국식품과학회 국제학술대회의  
포스터발표에서 창의력과 신선함이 돋보이는 우수한  
연구 결과를 발표하였기에 상장을 수여합니다.

2017년 6월 23일

사단 한국식품과학회  
회장 박 현 진



(3) 국제건강기능식품 학술대회(우수포스터상 수상)

## Intestinal Anti-inflammatory Effects of Cinnamon Effects in a Co-culture Model of Intestinal Epithelial Caco-2 Cells and RAW 264.7 Macrophages

Min Seo Kim<sup>1\*</sup>, Ji Yeon Kim<sup>1†</sup>, Yeon Seok Kim<sup>2</sup>, Youn Gil Kwak<sup>2</sup>, Chong-Tai Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Republic of Korea  
<sup>2</sup>Chunho Bio, <sup>3</sup>Korea Food Research Institute

### Abstract

In this study, we aimed to assess the potential intestinal barrier function and anti-inflammatory action of cinnamon-substituted water extracts (CSE) in a cellular model of intestinal inflammation. Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 cells were treated with the various concentrations of CSE. Inflammation was induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW 264.7 cells. Compared to LPS-treated groups, CSE-treated groups maintained high transepithelial electrical resistance and decreased tight junction permeability, similar to that shown by control Caco-2 cells. Also, CSE-treated groups showed decreased levels of inflammatory cytokines and mRNA such as iNOS, PGE2, interleukin (IL) 6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . In addition, CSE increased expression of tight junction proteins while inhibited that of inflammatory proteins. These results show that CSE may serve as a potential agent for the development of functional supplements to maintain gastrointestinal health. (SPI-1, TRIC12-2)

### Objectives

The aim of this study was to assess the potential intestinal barrier function and anti-inflammatory action of treatment of cinnamon-substituted water extracts in a cellular model of intestinal inflammation.

### Materials and Method

**Cellular model of intestinal inflammation**

### Fig. 1.

**Fig. 1.** Time course of TEER values (A) and FITC-Dextran flux (B) in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 8-well insert plate at  $1.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon-substituted water extracts that were added to the apical side of co-culture system. Raw 264.7 was added to the basolateral side and the model was incubated with. Different letters on bars mean significant difference by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). CSE, control LPS, lipopolysaccharide.

### Fig. 2.

**Fig. 2.** Relative mRNA expression levels of the tight junction genes in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 8-well insert plate at  $1.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon-substituted water extracts that were added to the apical side of co-culture system. Raw 264.7 was added to the basolateral side and the model was incubated with. Levels of ZO-1 (A), Occludin (B), Claudin-1 (C), Claudin-2 (D), Claudin-3 (E) and Occludin (F) were measured from cultured cells. Different letters on bars mean significant differences by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). CSE, control LPS, lipopolysaccharide.

### Fig. 3.

**Fig. 3.** Concentration profile of cytokines production and IP-10 activity in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 8-well insert plate at  $1.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon-substituted water extracts that were added to the apical side of co-culture system. Raw 264.7 was added to the basolateral side and the model was incubated with. Levels of iNOS (A), PGE2 (B), IL-6 (C), IL-8 (D) and TNF- $\alpha$  (E) were measured from collected culture medium using commercially available ELISA kits. Different letters on bars mean significant difference by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). CSE, control LPS, lipopolysaccharide.

### Fig. 4.

**Fig. 4.** Relative mRNA expression levels of the genes in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 8-well insert plate at  $1.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon-substituted water extracts that were added to the apical side of co-culture system. Raw 264.7 was added to the basolateral side and the model was incubated with. Levels of ZO-1 (A), Occludin (B), Claudin-1 (C), Claudin-2 (D) and Claudin-3 (E) were measured from cultured cells. Different letters on bars mean significant difference by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). CSE, control LPS, lipopolysaccharide.

### Fig. 5.

**Fig. 5.** Representative Western blots of the genes in co-culture model stimulated with LPS. Caco-2 cells were seeded in 8-well insert plate at  $1.0 \times 10^6$  cells/ml, and incubated with RAW 264.7 in the presence of cinnamon-substituted water extracts that were added to the apical side of co-culture system. Raw 264.7 was added to the basolateral side and the model was incubated with. Proteins of ZO-1 (A), Occludin (B), Claudin-1 (C) and Claudin-2 (D) using  $\beta$ -tubulin as loading control and phosphorylated p-IRK1 (E) and p-IRK2 (F) were measured from cultured cells. Different letters on bars mean significant difference by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). CSE, control LPS, lipopolysaccharide.

### Result

- Compared to LPS-treated co-cultured Caco-2 cells, the Cinnamon-substituted water extracts treated cells maintained high transepithelial electrical resistance and permeability, higher or similar to that shown by control Caco-2 cells. (Fig. 1)
- Cinnamon-substituted water extracts treated cells showed increased mRNA expression of tight junction proteins (Fig. 2)
- Cinnamon-substituted water extracts treated cells showed decreased levels of inflammatory cytokines and relative mRNA expression. (Fig. 3 & 4)
- Cinnamon-substituted water extracts treated cells showed increased tight junction protein expression and decreased phosphorylation of IRK1 and p-IRK2. (Fig. 5)

### Conclusion

Cinnamon-substituted water extracts exhibited high intestinal barrier function and intestinal anti-inflammatory activity by increasing various tight junction proteins and inhibiting various inflammatory cytokines. These results show that cinnamon-substituted water extracts may be developed as functional supplements to maintain gastrointestinal health.

### References

- Takase T, Hattori Y, Katsura K, Hattori T, Mizuno H (2008) In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. Biomedical and Biopolymers research communication 374:563-568 doi:10.1016/j.bbr.2008.07.001
- Kim MS, Kim YS, Lee JY, Ma RC, Yu HC, Kim YJ (2015) Inhibitory and cytoprotective activity of flavonoid compounds isolated from *Epigallocatechin gallate* on inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophage cells. *Food and Nutrition Research* 59:104-112
- Shao Y, Wang PS, Sun B, Qian Y, Ren Qianke H, Zhang B (2017) Zinc enhances intestinal epithelial barrier function through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Caco-2 cells. *The Journal of Cellular Biochemistry* 142:1828-1835 doi:10.1002/jcb.23113
- Ma TY, Hattori TK, Hsu YP, Akiba Y, Pothan S, Nara S, Nishihara H, Horiuchi T, Pappas MD (2009) Tight junctions regulate intestinal epithelial tight junction permeability require IP-10/ CXCR3 interaction. *Journal of physiology* 580:G1067-G1079 doi:10.1113/jphysiol.2009.1973.000

**서울과학기술대학교**  
SEoul NATIONAL UNIV. OF SCIENCE & TECHNOLOGY



# Poster Award

*Presented to*

**ISNFF 2017**  
October 22-25, 2017  
GSCO, Gamsan, Jeonbuk, Korea

**Min Seo Kim, Ji Yeon Kim, Yeon Seok Kim,  
Youn Gil Kwak, and Chong-Tai Kim**

*Seoul National University of Science and Technology, Chunho Bio,  
Korea Food Research Institute, Republic of Korea*

**Intestinal Anti-Inflammatory Effects of Cinnamon Effects in a Co-Culture Model of Intestinal  
Epithelial Caco-2 Cells and RAW 264.7 Macrophages**

*In recognition of an outstanding poster presentation at the 10th International  
Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods-ISNFF 2017 in Gunsan,  
Republic of Korea on October 22-25, 2017.*

**October 24, 2017**

**Jong-Bang Eun, PhD**  
Chair of Scientific  
Committee, ISNFF 2017

**Dong-Hwa Shin, PhD**  
Local President,  
ISNFF 2017

**Cesarettin Alasalvar, PhD**  
Chair, ISNFF

**Fereidoon Shahidi, PhD**  
Principle Founder, ISNFF



# Anti-inflammatory Effects of Cinnamon in a Mouse Model of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis

Kyeong Jin Kim\*, Ji Sun Youn<sup>1</sup>, Min Seo Kim<sup>1</sup>, Ji Yeon Kim<sup>1†</sup>, Yeon Seok Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Republic of Korea, <sup>2</sup>Chunho Bio

## Abstract

This study aimed to evaluate the anti-inflammatory effects of cinnamon on colitis induced by 5% dextran sulfate sodium (DSS) in BALB/c mice. The experimental animals were divided into five groups: control, DSS-induced colitis, 100, 300, and 500 mg/kg of cinnamon. The mice were fed distilled water or cinnamon extracts once a day for 21 days. Colitis was induced from day 14 to 21 by administration of 5% DSS in drinking water. We evaluated the change in weight, colon length, and the pathological disease activity index (DAI). Compared to the mice in the DSS group, those in the cinnamon groups showed an increase in body weight at 21 days. The cinnamon extracts significantly decreased the shortening of the colon. The length of the colon of mice receiving 500 mg/kg cinnamon increased to 9.8 cm, whereas that of the mice receiving DSS was 8.0 cm. The mean DAI in the cinnamon groups was significantly lower than that in the DSS group since day 4. Administration of 500 mg/kg cinnamon was associated with the highest decrease in the DAI by 0.375 points. Our results indicate that cinnamon has protective effects against DSS-induced colitis. Therefore, we concluded that cinnamon may be used for the prevention and treatment of irritable bowel syndrome (IBS). (IPET\_116012-3)

## Objectives

The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of cinnamon extract on colitis induced by 5% dextran sulfate sodium (DSS) in BALB/c mice.

## Materials and Method

### DSS colitis model



Fig 1.

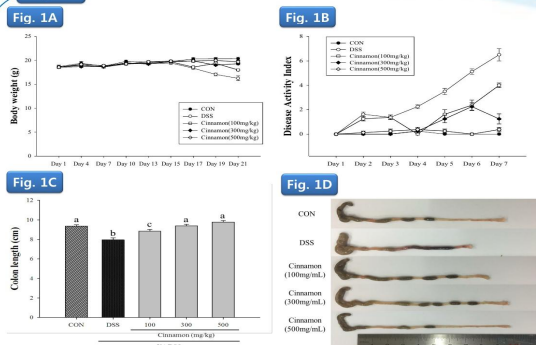


Figure 1. Effects of cinnamon extracts on clinical signs in DSS-induced colitis. (A) Body weight was measured at the same time on the experimental days. (B) Disease activity index score in the five study groups. (C) DSS-induced shortened colon was significantly improved by cinnamon extracts. (D) Representative colons of each group.

Fig 2.

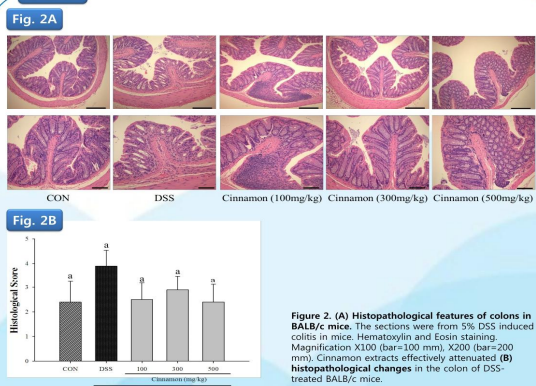


Figure 2. (A) Histopathological features of colons in BALB/c mice. The sections were from 5% DSS induced colitis in mice. Hematoxylin and Eosin staining. Magnification X100 (bar=100 μm), X200 (bar=200 μm). Cinnamon extracts effectively attenuated (B) histopathological changes in the colon of DSS-treated BALB/c mice.

## References

- Neurath, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 2014, 14, 329-342.
- Zhao, L.; Xiao, H.T.; Mu, H.X.; Huang, T.; Lin, Z.S.; Zhong, L.L.D.; Zeng, G.Z.; Fan, B.M.; Lin, C.Y.; Bian, Z.X. Magnolol, a natural polyphenol, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Molecules* 2017, 22.
- Coccon, H.S.; Murthy, S.N.; Shah, R.S.; Siederer, D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993, 69, 238-249.
- Podolski, D.K. Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med* 2002, 347, 417-429.
- Strober, W.; Fuss, J.J.; Blumberg, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002, 20, 495-549.
- Walsh, M.J.; Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of colitis. *Curr Protoc Pharmacol* 2009, Chapter 5, Unit 5.55.
- Cho, J.Y.; Chang, H.J.; Lee, S.K.; Kim, H.J.; Hwang, J.K.; Chang, H.S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci* 2007, 80, 932-939.

Fig 3.

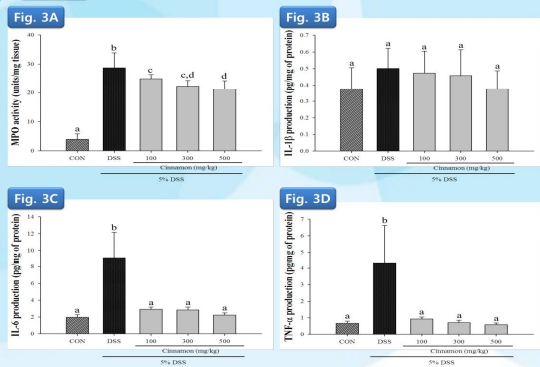


Figure 3. Effects of cinnamon extracts on the MPO activity and levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α of colon in DSS-induced colitis. (A) MPO activity; (B) IL-1β; (C) IL-6; (D) TNF-α

Fig 4.

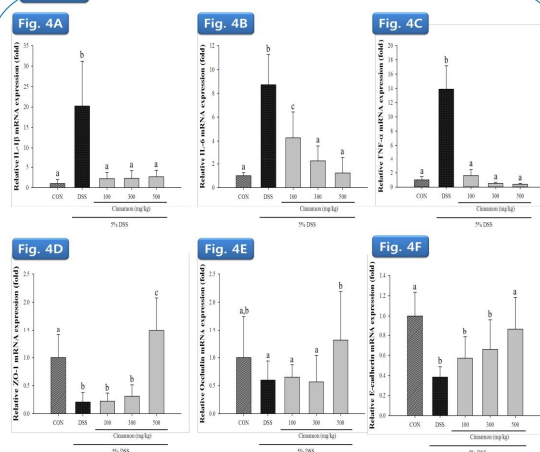


Figure 4. Effects of cinnamon extracts on relative mRNA expression of the genes of colon in DSS-induced colitis. (A) IL-1β; (B) IL-6; (C) TNF-α; (D) ZO-1; (E) Occludin; (F) E-cadherin

## Result

- As shown in Figure 1A, body weight dramatically dropped by DSS induction compared to control and cinnamon extract groups. The body loss caused by DSS treatment was significantly improved in mice receiving cinnamon extracts.
- DSS administration for 7 days resulted in severe diarrhea, blood in stool and body weight loss integrated as remarkably high disease activity index (DAI). Daily administration of cinnamon extracts at doses of 100-500 mg/kg significantly reduced these effects compared with DSS group (Figure 1B).
- The mean lengths of the colon in mice treated with DSS were statistically shorter than that of control group. Cinnamon extracts treatment significantly improved the symptoms (Figure 1C,D).
- Severe crypt destruction and inflammatory cell infiltration were observed in the histological sections from DSS-treatment mice. The histological scores were also substantially decreased in the cinnamon extract groups (Figure 2A,B).
- MPO activity in the proximal colon of DSS group was higher than the control group, which was significantly suppressed in the cinnamon extract groups (Figure 3A).
- The oral administration of cinnamon extracts significantly reduced the concentrations of IL-6 and TNF-α in the colonic tissue compared with the DSS-induced mice and markedly down-regulated the expression of the cytokines (Figure 3B,C,D).
- DSS significantly evoked the levels of pro-inflammatory mRNA expression including IL-1β, IL-6 and TNF-α in mice colons, but, cinnamon extracts inhibited inflammatory mRNA expression (Figure 4A,B,C).
- After treated with cinnamon extract (500 mg/kg), the mRNA expression levels of TJ proteins ZO-1, occludin and E-cadherin were significantly increased in colonic mucosa (Figure 4D,E,F).

## Conclusion

In conclusion, in order to investigate the effect of the cinnamon extracts on colitis, cinnamon extracts were orally administered and colitis was induced by DSS. Tissue pathology, inflammatory cytokine and TJ proteins were observed, as a result, the cinnamon extracts showed improvement in colitis.

## Anti-inflammatory effects of ginger in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis

Min Seo Kim<sup>1\*</sup>, Kyeong Jin Kim<sup>1</sup>, Jain Nam<sup>1</sup>, Ye Eun Park<sup>1</sup>, Ji Yeon Kim<sup>1†</sup>, Yeon Seok Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Seoul National University of Science and Technology, Seoul, Republic of Korea, <sup>2</sup>Chunho Bio

### Abstract

This study aimed to evaluate the inhibitory effects of ginger ethanol extract on colitis induced by 5% dextran sulfate sodium (DSS) in Balb/c mice. The mice were fed distilled water or three different doses of ginger extracts once a day for 21 days. In vivo model of colitis was induced using 5% (w/v) DSS. We evaluated the change in weight, colon length, disease activity index (DAI) and gene expressions. Compared to the DSS group, the ginger groups showed an increase in body weight at 21 days. The ginger extracts decreased the shortening of the colon. The mean DAI in the ginger groups was significantly lower than that in the DSS group since day 4. Histological colon injury and myeloperoxidase (MPO) activity induced by DSS-induced colitis was reduced. Ginger groups obviously inhibited the mRNA of IL-6 and IL-1 $\beta$  in colon tissues, but not that of tight junction proteins ZO-1 and occludin. Our results indicate that ginger has protective effects against DSS-induced colitis. Therefore, we concluded that ginger may be used for the prevention and treatment of irritable bowel syndrome (IBS). (IFET\_11612-3)

### Objectives

The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of ginger extract on colitis induced by 5% dextran sulfate sodium (DSS) in BALB/c mice.

### Materials and Method

#### DSS colitis model



### Fig. 1.

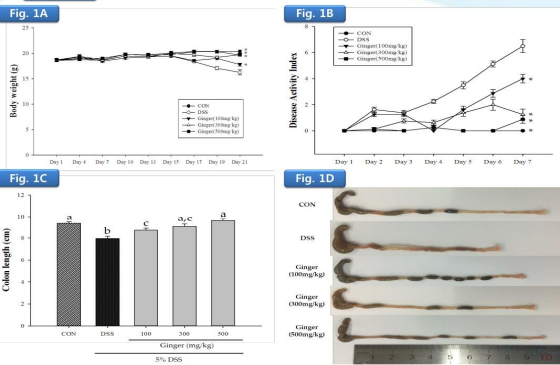


Figure 1. Effects of ginger extracts on clinical signs in DSS-induced colitis. (A) Body weight was measured at the same time on the experimental days; (B) Disease activity index score; (C) DSS-induced shortened colon was significantly improved by ginger extracts; (D) Representative colons of each group.

### Fig. 2.

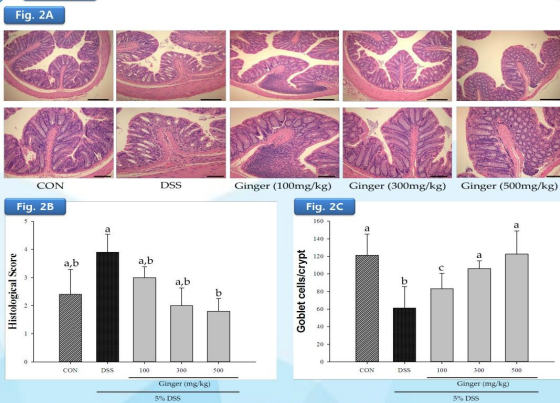


Figure 2. (A) Histopathological features (H&E staining) of colons in BALB/c mice. Magnification X100 (bar=100  $\mu$ m). X200 (bar=200  $\mu$ m). Ginger extracts effectively attenuated (B) histopathological changes and (C) the number of goblet cells in the colon.

### References

- Neurath M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 2014, 14, 329-342.
- Zhao, L.; Xiao, H.T.; Ma, H.X.; Huang, T.; Lin, Z.S.; Zhong, L.L.D.; Zeng, G.Z.; Fan, B.M.; Lin, C.Y.; Bian, Z.X. Magnolol, a natural polyphenol, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Molecules* 2017, 22.
- Cooper, H.S.; Murthy, S.N.; Shah, R.S.; Sedergran, D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993, 69, 238-249.
- Podolsky, D.K. Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med* 2002, 347, 417-429.
- Srinber, W.; Foss, L.J.; Blumberg, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002, 20, 495-549.
- Waldner, M.J.; Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of colitis. *Curr Protoc Pharmacol* 2009, Chapter 5, Unit 5.55.
- Cho, J.Y.; Chang, H.J.; Lee, S.K.; Kim, H.J.; Hwang, J.K.; Chan, H.S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-carophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci* 2007, 80, 932-939.

### Fig. 3.

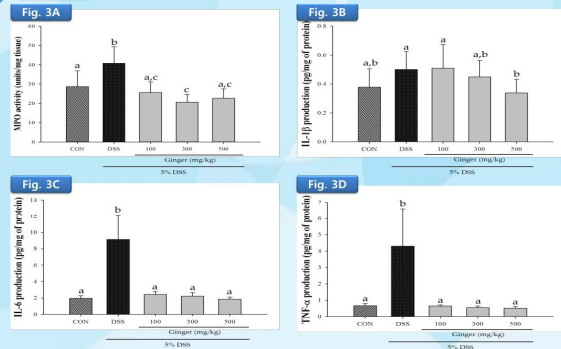


Figure 3. Effects of ginger extracts on the MPO activity and levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  of colon in DSS-induced colitis. (A) MPO activity; (B) IL-1 $\beta$ ; (C) IL-6; (D) TNF- $\alpha$

### Fig. 4.

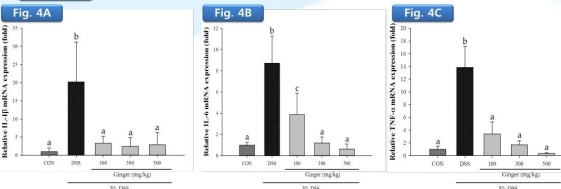


Figure 4. Effects of ginger extracts on relative mRNA expression of the genes of colon in DSS-induced colitis. (A) IL-1 $\beta$ ; (B) IL-6; (C) TNF- $\alpha$

### Fig. 5.

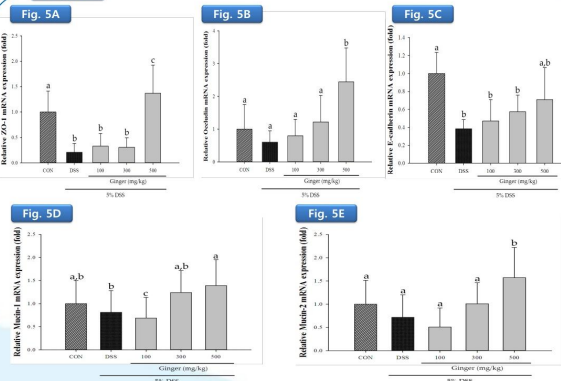


Figure 5. Effects of ginger extracts on relative mRNA expression of the genes of colon in DSS-induced colitis. (A) ZO-1; (B) Occludin; (C) E-cadherin; (D) Mucin-1; (E) Mucin-2

### Result

- Body weight dramatically dropped by DSS induction compared to control group. The body weight loss caused by DSS treatment was significantly improved in ginger group (Figure 1A). DSS administration for 7 days resulted in severe diarrhea, blood in stool and body weight loss integrated as remarkably high disease activity index (DAI). Daily administration of ginger extracts significantly reduced these effects compared with DSS group (Figure 1B). The mean lengths of the colon in mice treated with DSS were statistically shorter than that of control group. Cinnamon extracts treatment significantly improved the symptoms (Figure 1C,D).
- Severe crypt destruction and inflammatory cell infiltration were observed in the histological sections from DSS-treated mice. Ginger extracts decreased the histological scores and increased the number of goblet cells (Figure 2).
- MPO activity in the proximal colon of DSS group was higher than the control group, which was significantly suppressed in the ginger groups (Figure 3A). The oral administration of ginger extracts significantly reduced the concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the colon compared with the DSS group (Figure 3B,C,D).
- DSS significantly evoked the levels of pro-inflammatory mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in mice colons, but, ginger extracts inhibited inflammatory mRNA expression (Figure 4).
- After treated with ginger extract (500 mg/kg), the mRNA expression levels of TJ proteins ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1 and mucin-2 were significantly increased in colonic mucosa (Figure 5).

### Conclusion

In conclusion, in order to investigate the effect of the ginger extracts on colitis, ginger extracts were orally administered and colitis was induced by DSS. Tissue pathology, inflammatory cytokine and TJ proteins were observed, as a result, the ginger extracts showed improvement in colitis.

4. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
						<b>C-06-04</b>			
1	특허	신남알데하이드-고함유 계피 추출물의 제조 방법 및 이의 용도	(주)천호 바이오 외 1명	2016.11.17.	10-2016-0153620				50 : 50
2	특허	생강 추출물 및 계피 추출물을 포함하는 장 건강 개선용 식품 조성물	김연석 외 4명	2017.10.31	10-2017-0143638	김연석 외 4명	2018.12.07	10-1928892	50 : 50

관인생략

**출원번호 통지서**

출원일자 2016.11.17  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2016-0153620 (잠수번호 1-1-2016-1124837-41)  
 출원인명칭 (주)천호바이오(1-2012-042879-6) 외 1명  
 대리인성명 윤대훈(9-2012-000100-1)  
 발명자성명 김중태 영진수 조영희 최동준 김연석 객연길 김지연  
 발명의명칭 신남알데하이드-고함유 계피 추출물의 제조 방법 및 이의 용도

**특 허 칭 장**

<<안내>>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
\* 납부사양호 : 0131(기안과도) \* 납수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객변호 정보변경(광정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
\* 특허로(query.go.kr) 접속 \* 민원서비스(다음포도) \* 특허민원사항과제 및지 4대요서서
- 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 인건서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
\* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr> \* 위임인(PCT)알고이드  
\* 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원료 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특고환허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허부효사유가 될 수 있습니다.
- 기타 심사 절차에 관한 사항은 통병단 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략

**출원번호 통지서**

출원일자 2016.11.17  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2016-0153620 (잠수번호 1-1-2016-1124837-41)  
 출원인명칭 (주)천호바이오(1-2012-042879-6) 외 1명  
 대리인성명 윤대훈(9-2012-000100-1)  
 발명자성명 김중태 영진수 조영희 최동준 김연석 객연길 김지연  
 발명의명칭 신남알데하이드-고함유 계피 추출물의 제조 방법 및 이의 용도

**특 허 칭 장**

<<안내>>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
\* 납부사양호 : 0131(기안과도) \* 납수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객변호 정보변경(광정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
\* 특허로(query.go.kr) 접속 \* 민원서비스(다음포도) \* 특허민원사항과제 및지 4대요서서
- 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 인건서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
\* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr> \* 위임인(PCT)알고이드  
\* 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원료 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특고환허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허부효사유가 될 수 있습니다.
- 기타 심사 절차에 관한 사항은 통병단 안내서를 참조하시기 바랍니다.



5. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	코드번호 C-06-06									
			현 황									
			학위별				성별		지역별			
박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타		
1	인력양성	2018		1			1	1				
2	인력양성	2019		1			1	1				
3	인력양성	2019		1			1	1				
4	인력양성	2019		1			1	1				

6. 고용창출

No	사업화명	사업화업체	2016년	2018년	○○○○년	○○○○년	○○○○년	합계
1		(주)메디엔바이오	1명	1명	명	명	명	2명
	합계		1명	1명	명	명	명	2명

## 7. 교육지도

### (1) 2016년 교육지도

○주관 : (주)메디앤바이오

○일시 : 2016년 10월 19일 10:00 - 12:00 시

○장소 : 서울테크노파크 6층

○참석자 : 건강기능식품 업계 및 농업 관련자

○주제 : 건강기능식품 소재 개발 및 개별인정형 기능성 원료

(발표자 - 김연석 (주)메디앤바이오 대표)



### (2) 2017년 교육지도

○주관 : (주)메디앤바이오

○일시 : 2017년 3월 30일 18시 30분 ~ 20시 00분

○장소 : 서울과학기술대학교 청운관 243호

○참석자 : 건강기능식품 업계 관련자 및 교육 희망자

○주제 : 건강기능식품 시장 현황

(발표자 - 김연석 (주)메디앤바이오 대표)



(3) 2018년 교육지도

○주관 : (주)메디앤바이오

○일시 : 2018년 10월 04일 13시 ~ 15시

○장소 : 한국보건복지인력개발원

○참석자 : 건강기능식품 업계 관련자 및 교육 희망자

○주제 : 건강기능식품 시장현황과 시장구조 및 소비자 실태  
(발표자 - 김연석 (주)메디앤바이오 대표)



8. 기술실시

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	자기실시	계피추출물 생산기술	(주)메디앤바이오	2018.12.20	4,060,000	0

9. 기술인증

No	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		
1	농림식품	농림축산식품부	농림식품 신기술인증	-	-	대한민국

○1차 서류·면접 심사 결과

67.7점으로 아쉽게 탈락하였음. 기능성 관련 내용 추가하여 2019년 상반기 인증신청 진행할 예정임.

## 농림식품신기술인증제 '18년도 하반기 1차 서류·면접 심사 결과

순번	선형 기술명	선형기관	심사결과		
			심사 결과	평균 점수	후보자 수
1	어업계수 추종을 통한 다기능성 식품 향료개발을 위한 계피 추종물 제조기술	해다앤에이코	최선정	67.7	-
<b>종합 심사 의견</b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 맛, 건강, 특히 면역증강 효과를 보이는 계피의 향분류 어업계 추종하는 기술임. 면역활성 효과를 갖는 개별성분별로 실험을 위한 준비라고 있는 계피추종물에 대한 객관적이고 과학적인 근거가 되는 학술지 게재 확보 등이 없는 상태임</li> <li>- 추종방법에 대한 비문 효과관련 데이터 제시가 필요할 것으로 판단되며 제시한 특허 내용과 허교와 하는 추종방법이 상이한 점에 대한 설명이 요구됨. 또한 특허 기술어업에 관한 발명상의 공익성과 명확한 식용 제시가 요구됨</li> <li>- 특허를 대상으로 영수, 주장 및 어업계수 추종 효과 <i>clarum albedum</i> 발명항에서는 어업계수 추종 이 가장 효과적이었다나 추종물내 함수 4.42%, 주향 16.48%, 어업계수 11.69%로 나타내 주향추종에 비해 추종물내 크게 증가하였다고 보지 어렵다고 생각됨. 추종시간에 단위효과는 다른 추종에 비해 우수하고 추종이 증가한 결과는 인질질/ TSS와 수지 및 MO 분할 감소율이 어업계수에서 가장 우수하다고 하였으나 예교 부호가 부족함/ 음분물질 추종에 대한 어업계수 어용과 연구가 확대되고 있으나 예로운 기술 어리 어기에는 다소 부족하고 기술 제공항에서도 발명력이 높지 않다고 기록됨</li> <li>- 본 기술은 '다른 방법으로 추종한 계피 추종물 제조기술'의 추종효과 및 향내 균종 개선 효과 등을 대 대한 구체적인 데이터가 제시되어있지 아니하여, 실험기술의 효과를 인정하기 어려운 것으로 평가됨/ 실험처리조건과 보고서에 의하면 '어업계수를 통한 계피 추종물 제조 기술'이 공시되어 있고, '계피 추종물중 음분성분으로 함유하는 향내 균종 개선- 기술'이 공시되어 있으므로, 발후, 실험기술과 공시 기술을 구체적으로 대적인 자료물질 함량 데이터 및 효과 데이터를 보완해야 할 것으로 평가됨</li> <li>- 어업계수 추종을 통한 다기능성 식품향료 개발을 위한 계피 추종물 제조기술로 표기함에 사용되어 된 편집 공백을 적용한 추종기술로 어업계수를 통한 추종 제조방법은 널리 이용되고 있는 방법으로 새로운 기술은 아니, 객체를 이용한 향 건강 개발식품은 전무하므로 장건강 음료개발은 상업화 가능하다고 보 여짐. 어업계 추종과 다른 추종법과 비교하여 어업계 추종을 위한 고가의 어업계 추종물에 있어서의 비문 등을 통해 가격경쟁력 가능성의 확인 필요</li> </ul>					

## 10. 기술적 · 경제적 성과

### (1) 다양한 효과, 효능을 가진 프리바이오틱스 원료 개발

현재 우리나라에서 프리바이오틱스 원료로 사용되는 프락토올리고당은 대장 내 유해균 성장을 억제하며 비피더스균의 증식을 촉진하는 것이 주된 기능으로 프락토올리고당 자체 생리활성 기능은 아직 발견된 바 없다.

대부분 제품들이 분말 제형으로 분말 제형의 제품은 유아 및 고령의 연하곤란 증상 보유자 섭취 시 기도폐색 등의 위험이 있어 섭취 연령 및 대사에 제한이 있다.

자사가 개발한 계피 추출물은 장내 유익균 활성 기능 및 장내 염증 억제, 면역 기능 증진 효과에 대한 과학적 근거를 보유한 다기능성 프리바이오틱스 원료로 분말뿐 아니라 액상으로도 생산이 가능하여 다양한 제형에 적용이 가능하며, 단일 원료 섭취로 다양한 효능을 기대할 수 있다.

### (2) 친환경 기술 활성화

식품을 추출할 때는 주로 물 또는 유기화합물이 용매로 사용되며, 원료의 특성에 따라 추출 방법과 용매를 달리 사용한다. 유기용매를 이용한 추출은 식품원료 생산 후 버려지는 용매에 의한 환경오염 문제와 용매회수 및 추출물 잔존 유기용매 제거를 위한 추가공정 수행에 따른 생산비 증가 문제를 야기한다.

아임계수 추출은 추출시간이 짧은 친환경 공법으로 물을 용매로 사용하여 유기용매 잔류에 따른 인체 유해성에 반해 안전성을 제공하는 추출 공법으로 생리활성 성분을 추출하기 위한 방법으로 아임계수 추출법이 점차적으로 활용되고 있으나 실용화 사례는 아직 소수이다.

1980년대 아임계수 공정에 관한 특허가 등록된 이후 20여 년이 지났으나 현재 효율적인 상용화 사례는 미미한 실정이나, 아임계수 추출은 안전성, 경제성, 친환경 등의 장점이 있으며, 물성변화, 기능성 강화, 공정 최적화, 수율 향상, 원가절감 목적으로 활용도가 높은 유망한 기술 분야이다.

비상용화 기술을 활용한 제품 개발은 관련 산업에 활기를 주며, 이와 관련된 연구 또한 증가할 것으로 기대한다.

### (3) 경제적 성과

현재 건강기능식품 원료는 수입비중이 크기 때문에 국내 기술로 생산되는 기능성 소재로 그 가치가 높다 할 수 있다. 본 연구를 통해 개발된 계피 추출물은 제품 개발 및 개별 기능성 인정 등 제품 부가가치 향상에 과학적 근거 자료로 활용할 수 있는 임상시험 결과를 제시함으로써 해당 원료 및 관련 제품의 기능성을 제시하고 상품성 및 부가가치를 높이는데 기여한다 할 수 있다..



11. 사업화 성과 및 매출실적

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-억원	
			향후 3년간 매출	150억원	
		관련제품	개발후 현재까지	-억원	
			향후 3년간 매출	20억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 0.005%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : -% 국외 : -%	
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : -%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

(2) 매출 성과

항 목	세 부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2		
	소요예산(백만원)		50		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	150	200
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	10	15
		국외	-	0.005	0.01
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		프로바이오틱스가 함유된 복합 장 건강 기능성식품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	-	-
	수 출		-	-	-

## 5. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 1. 목표 달성도

가. 목표 달성여부

(1) 협동연구기관 1(서울과학기술대학교)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2016)	• 생강 및 계피추출물 복합물의 기능성 확인 연구	• 생강 및 계피 추출물의 장 건강 기능성 최적 복합비율 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Caco-2 cell line과 RAW264.7 cell line co-culture model 설정</li> <li>생강 및 계피추출물의 TEER 확인</li> <li>NO, IL-6, IL-8 생성 저해능 확인</li> </ul>
		• 유익한 유산균 증식 최적 생강 및 계피 아임계 추출물 복합비율 선정	100	• 생강 및 계피추출물의 <i>B.longum</i> , <i>L.sp.</i> , 및 <i>L.acidophilus</i> 에 대한 생육 촉진 기능 확인
		• DSS유도 동물실험을 통한 선정 복합비율 기능성 확인	100	• DSS 유도 대장염 마우스 모델 설정
2차 년도 (2017)	• 생강 및 계피추출물 복합물의 기능성 확인 연구	• RSM 기법으로 추출된 생강추출물의 장 건강 기능성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Co-culture 모델에서 TEER, permeability 확인</li> <li>NO 생성 저해능 확인</li> </ul>
		• 유익한 유산균 증식 최적 생강추출물 확인	100	• RSM 기법으로 추출된 생강추출물의 <i>B.longum</i> , <i>L.sp.</i> , 및 <i>L.acidophilus</i> 에 대한 생육 촉진 기능 확인
		• 유익한 유산균 증식 최적 생강 및 계피추출물 복합비율 선정	100	• 생강계피복합물의 비율에 따른 <i>B.longum</i> , <i>L.sp.</i> , 및 <i>L.acidophilus</i> 에 대한 생육 촉진 기능 확인
		• 생강 및 계피 추출물의 장 건강 기능성 최적 복합비율 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생강계피복합물 비율 설정 (생강:계피 = 10:0, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 0:10)</li> <li>Co-culture 모델에서 TEER, permeability 확인</li> <li>NO 생성 저해능 확인</li> </ul>
		• 계피 추출물의 추가적인 기전	100	• 계피 열수추출물, 에탄올추출물, 아임계

				<ul style="list-style-type: none"> <li>추출물의 항염증 효과 확인</li> <li>Permeability 및 염증 관련 단백질 (PGE<sub>2</sub>, TNF-α) 확인</li> <li>염증 관련 인자 (iNOS, COX-2, IL-6, IL-8, TNF-α)의 mRNA 발현량 확인</li> <li>NF-κB 활성화 확인</li> </ul>
		확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>계피아임계 추출물의 항염증 및 tight junction 관련 기능성 확인</li> <li>NF-κB 경로에 관여하는 인자 (JNK, NF-κB, IKKαβ, p38MAPK) 확인</li> <li>Tight junction 관련 단백질인 ZO-1, occludin, 및 claudin-1의 mRNA 발현량, 단백질량, localization 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>DSS 유도 동물실험을 통한 선정 복합비율의 기능성 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생강계피복합물의 DSS 유도 모델에서 기능성 확인</li> <li>체중 및 대장길이 변화 확인</li> <li>질병 활동성 지표 (DAI) 측정</li> <li>대장 내 조직학적 변화 확인</li> <li>대장 조직에서 염증 관련 효소인 MPO 확인</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생강추출물의 DSS 유도 모델에서 기능성 확인</li> <li>체중 및 대장길이 변화 확인</li> <li>질병 활동성 지표 (DAI) 측정</li> <li>대장 내 조직학적 변화 확인</li> <li>대장 조직에서 염증 관련 효소인 MPO 확인</li> <li>대장 조직에서 염증 관련 인자 (IL-1β, IL-6, 및 TNF-α)의 단백질량 및 mRNA 발현량 확인</li> <li>대장 조직에서 tight junction 관련 단백질인 ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1, 및 mucin-2의 mRNA 발현량 확인</li> </ul>
3차년도 (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>생강 및 계피추출물 복합물의</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DSS 유도 동물에서 계피 추출물의 장 건강 기능성</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>체중 및 대장길이 변화 확인</li> <li>질병 활동성 지표 (DAI) 측정</li> <li>대장 내 조직학적 변화 확인</li> </ul>

	기능성 확인 연구	확인		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장 조직에서 염증 관련 효소인 MPO 확인</li> <li>• 대장 조직에서 염증 관련 인자 (IL-1<math>\beta</math>, IL-6, 및 TNF-<math>\alpha</math>)의 단백질량 및 mRNA 발현량 확인</li> <li>• 대장 조직에서 tight junction 관련 단백질인 ZO-1, occludin, E-cadherin, mucin-1, 및 mucin-2의 mRNA 발현량 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체적용연구 유래 시료 분석을 통한 장 건강 기능성 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시험대상자의 분변에서 pH, 수분함량, 미생물 대사체인 단쇄지방산, 바이오제닉아민류, 인돌 및 페놀류 등과 유익균·유해균 분석</li> </ul>

(2) 협동연구기관 2(한국식품연구원)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생강 및 계피추출물의 최적추출조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생강 및 계피의 유효 지표성분 분리 및 분석</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 계피 추출물의 유효 지표성분을 HPLC를 사용하여 분석</li> <li>• 추출용매 별 계피 추출물의 항산화활성 측정 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생강 및 계피의 아임계수 추출에 의한 추출수율 및 특성분석</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생강의 원료 전처리(건조생강, 생물생강)에 따른 추출을 분석 완료</li> <li>• 계피의 아임계수 추출에 의한 추출수율 및 주요성분 분석 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생강 및 계피의 에탄올에 의한 추출수율 및 특성 분석</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생강 및 계피의 에탄올을 용매로한 추출의 수율 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 반응표면분석법에 의한 아임계수 추출 공정 최적화</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 반응표면분석법에 의한 생강 및 계피의 아임계수 추출 최적 조건을 분석하여 확립</li> </ul>

(3) 주관연구기관(메디앤바이오)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>생강 및 계피 아임계 추출물의 대량생산 소재화 및 기준규격 설정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생강과 계피의 원재료 표준화</li> </ul>	70%	<ul style="list-style-type: none"> <li>표준화 하여 생산하였으나 지표물질 함량 미달</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>생강과 계피 아임계 추출물의 대량생산 공정 조건 설정 및 소재화</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>대량생산 공정 조건 설정 및 소재화 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>대량생산 원료의 기준규격 설정</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>대량 생산 원료 기준규격 설정 완료</li> </ul>
2차 년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용 시험 및 원료 안정성 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 샘플 제조</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험용 위약 및 샘플 제작 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 실시</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 준비</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>원료 유통기한 안정성 시험</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>유통기한 안정성 시험 수행</li> </ul>
3차 년도 (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 완료 및 건강기능식품 개별인정형 원료 신청</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 완료</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>제품의 유통기한 안정성 시험 완료</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>유통기한 안정성 시험 완료</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개별인정형 원료 신청을 위한 공인기관 시험성적서 준비</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개별인정형 신청에 필요한 공인기관 시험성적서 준비 완료</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개별인정형 원료 신청 서류 작성</li> </ul>	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개별인정형 원료 신청 완료</li> </ul>

나. 관련분야 기여도

(1) 생약제제에 대한 인식 개선

- 한국소비자원 조사에 따르면 주요 10개 시장 중 한약 및 한약제 시장이 소비자들로부터 신뢰성 측면에서 가장 낮은 평가를 받았고, 우선적 개선 사항으로 지적된 것이 안전성 문제이다.
- 생약은 조제 기준 자체가 없거나 안전성·유효성 검사가 일부 면제되어 품질관리 및 안정성 측면에서 지속적인 우려가 제기됨.
- 과학적 근거를 바탕으로 계피의 유효성 및 안전성을 입증한 제품 출시는 생약 제제의 인식 개선에 도움이 될 것임.

(2) 기존 원료와 차별화되는 장 건강 기능성 원료 제공

- 장 건강 관련 건강기능식품 시장 매출액은 2014년 2,133억 원에서 2017년 3,086억 원으로 약 44% 가량 성장하였으며, 프로바이오틱스 제품과 프리바이오틱스 제품이 큰 부분을 차지하였다. 이중 프로바이오틱스의 매출이 약 70%를 차지하고 있으나 최근 프리바이오틱스에 대한 소비자들의 관심이 커짐에 따라 관련 제품 출시 또한 점차 늘어나고 있는 추세임.
- 미국의 시장조사 기관 Global Market Insights는 전 세계 프리바이오틱스 시장은 2016년 기준 35억 달러 규모의 시장을 형성중이며, 2016~2023년 연평균 11.6% 성장을 지속할 것으로 전망하였음. 미국의 시장조사 기관 Grand View Research에 따르면 같은 기간 전 세계 프로바이오틱스 시장 연평균 성장률은 약 7.5%로 예측되었음.
- 장 건강 건강기능식품 시장은 프로바이오틱스 제품에 집중되어 있었으나, 선진 국에서는 프리바이오틱스의 중요성이 대두되면서 프로바이오틱스 성장률을 추월 하고 있음. 그러나 기존 프리바이오틱스 제품들의 주원료는 프락토올리고당으로 소비자들의 선택지가 부족한 것이 사실임.
- 예로부터 널리 사용되어온 천연물 계피를 원료로 하는 장 건강 기능성제품이 성공적으로 시장에 진입한다면 목표 매출 달성뿐 아니라 천연물 원료 연구 활성화에 도움이 될 것이라 판단됨.

## 6. 연구결과의 활용계획

### 1. 제품화를 통한 시장진입

#### (1) 건강기능식품 개별인정형 원료 인정 획득

○현재 건강기능식품 개별인정형 원료 신청을 완료한 상태로 개별 인정 획득 후 계피를 주 원료로 하여 배변 활동 원활에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 형태의 제품을 생산하는 것을 계획중임.

#### (2)다양한 기능성 원료가 추가된 제품 생산

○타겟 고객층의 기호도 및 선호도 높은 원료를 첨가하여 다양한 고객맞춤형 제품으로 소비자층을 확대할 예정임.

○생산된 시제품의 관능적 우수함 목적으로 대추농축액, 글루코만난 등이 함유된 시험제품을 제작해봤으며, 다양한 배합비를 확보하였음

○분말의 용해성을 증진시키는 공법을 계피 추출물에 적용하여 생산한 원료를 기반으로 하여 장 건강과 대사증진에 도움이 되는 것으로 알려진 현미미강효소를 원료로 추가한 과립제품을 검토중에 있음.

○정부 지원사업으로 연구개발한 신뢰할 수 있는 원료를 사용하여 객관적으로 우수한 품질 신뢰를 가지고 있는바 기능성 생약 제품으로 고급화된 패키지 디자인과 맛을 가지고 시장에 진입한다면 기업 및 제품의 이미지 개선 및 매출향상에 크게 도움이 될 것으로 기대됨.

#### (3)다양한 유통채널 진입

○기존 자사 제품 거래경험이 있는 협력 관계의 인플루언서를 통해 제품의 판매 가능성을 타진하고 유통채널에 적합한 제품 요소를 파악하여 본 생산에 반영한 제품 생산으로 매출 상승을 유도할 예정임.

○로드샵 입점을 목표로 MD에게 시제품을 제안하여 입점 가능성을 확인하고, 로드샵 유통에 필요한 Needs를 파악하여 본 생산 시 로드샵 입점에 필요한 사항을 반영하여 맞춤 제품을 생산하여 유통할 예정임.

○생산한 시제품을 활용하여 소비자 니즈를 파악하고 제품 생산에 적용함으로써 유통채널 별, 타겟별 맞춤제품의 출시를 통한 시장 확대를 기대하고 있음.

## 7. 참고문헌

- Tanoue T, Nishitani Y, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M. In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(3):565-9.
- Kim CY. Inhibition of Interleukin-1 $\alpha$ -induced Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability by Curcumin Treatment in Caco-2 Cells. *J Life Sci.* 2016;26(9):1082-1087.
- Cho YJ. Anti-inflammatory Effect of Jatrorrhizine from *Phellodendron amurense* in Lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 Cells. *J Appl Biol Chem.* 2011;54(2):114-119.
- Kim KM, Kim YS, Lim JY, Min SJ, Ko HC, Kim SJ, Kim Y. Intestinal anti-inflammatory activity of *Sasa quepaertensis* leaf extract by suppressing lipopolysaccharide-stimulated inflammatory mediators in intestinal epithelial Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophage cells. *Nutr Res Pract.* 2015;9(1):3-10.
- M. T. Saarinen. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in intestinal digesta and feces by reversed phase HPLC. *Chromatographia.* 2002;55(5):297 - 300.
- 박규용, 김민철, 우강용, 이나경, 백현동. GC 및 GC/MSD를 이용한 주요 분변 부패산물 신속분석법. *KSBB Journal.* 2003;18(1):74-77.
- Flickinger EA, Schreijen EM, Patil AR, Hussein HS, Grieshop CM, Merchen NR, Fahey GC Jr. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *J Anim Sci.* 2003;81(8):2008-18.
- Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V, Leonard C, Gibson GR, Tuohy KM. Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr.* 2008;99(1):110-20.
- Timm DA, Thomas W, Boileau TW, Williamson-Hughes PS, Slavin JL. Polydextrose and soluble corn fiber increase five-day fecal wet weight in healthy men and women. *J Nutr.* 2013;143(4):473-8.
- Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, Mättö J, Kassinen A, Krogius L, Saarela M, Korpela R, Palva A. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(2):373-82.
- 한성희, 이오영. 한국인에서 과민성 장 증후군의 유병률 : 로마기준 II를 적용한 표본 인구 설문조사. *대한소화관운동학회지* 2016; 12: 183
- Global Market Insights. 2017. Prebiotics Market Size By Ingredient (Inulin, GOS, FOS, MOS), By Application (Animal Feed, Food & Beverages [Dairy, Cereals, Baked Goods,



Fermented Meat, Dry Foods], Dietary Supplements [Food, Nutrition, Infant Formulations]), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2017 - 2024

주 의

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