

발간등록번호

11-1543000-002768-01

쌍별귀뚜라미의 최적 생육조건 확립 및 알코올성 간 손상 보호용 기능성 식품 개발 최종보고서

2019. 6. 3.

주관연구기관 / 네이처텍(주)

협동연구기관 / 오상킨섹트(주)

협동연구기관 / 안동대학교 산학협력단

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “쌍별귀뚜라미의 최적 생육조건 확립 및 알코올성 간 손상 보호용 기능성 식품 개발” (개발기간 : 2017.12.21 ~ 2018.12.20)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 01. 21.

주관연구기관명 : (주)네이처텍

안 기 역 (인)

참 여 기 관 명 : 안동대학교 산학협력단

이 혁 재 (인)

참 여 기 관 명 : (주)오상킨섹트

이 준 석 (인)

주관연구책임자 : 이 영 철

참여기관책임자 : 김 준 호

참여기관책임자 : 김 철 학

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117103-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2017-12-21 ~ 2018-12-20	단 계 구 분	(1단계)/ (총 1 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	<p>쌍별</p> <p>귀뚜라미의 최적 생육조건 확립 및 알코올성 간 손상 보호용 기능성 식품 개발</p>			
연구책임자	이 영 철	해당단계 참여연구원 수	총: 23명 내부: 12명 외부: 11명	해당단계 연구개발비	정부:246,000천원 민간:82,000천원 계:328,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 23명 내부: 12명 외부: 11명	총 연구개발비	정부:246,000천원 민간:82,000천원 계:328,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)네이처텍/중앙연구소			참여기업명 안동대학교산학협력단 (주)오상킨섹트	
국제공동연구	상대국명:	상대국 연구기관명:			
위탁연구	연구기관명:	연구책임자:			
연구개발성과의 보안등급 및	일반				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

사유	
----	--

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

1. 부화 효율 증대 : 부화효율 90%이상 (50%이상 향상)
2. 산란율 : 채란 온도 선발 - 기존 채란 산란수 대비 25℃에서 700개 이상 채란 증대(기존 1000개 산란 - 결과 1700개 채란)
3. 약충 생존율 증대 : 약충 생존율 28~33% (8~13% 향상)
4. 열수 및 주정 추출물(70%, 100%)의 라디칼소거능 비교를 통해 열수추출물의 우수한 항산화 활성 확인
5. 쌍별귀뚜라미 추출물 투여로 감소하였고, 대조군 대비 쌍별귀뚜라미 추출물 처리 그룹이 중성지방을 30% 억제하는 것을 확인
6. Hepatic steatosis, apoptosis 및 bacterial endotoxin 에 대한 장점막 투과성에 대한 알코올의 반응을 추출물이 TUNEL signal을 69% 억제하며, c-caspase 3의 경우 68% 억제하는 것을 확인.
7. 지표성분성분 chondroitin sulfate sodium 선정, 분석법 개발 및 분석법 validation 완료
8. 표준추출물개발 및 공정개발을 통한 pilot 공정도 1건 작성 완료
9. 28일 독성실험을 통한 안전성 자료 및 원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 확보
10. 시제품 3종(일반식품 젤리1종, 건강기능식품 정제2종), 식약처 품목신고 완료.

보고서 면수
86

<국문요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 쌍별귀뚜라미의 최적 생육조건 확립을 통한 생산성 증대. • 쌍별귀뚜라미 추출 제조공정의 최적화를 통한 소재의 표준화 • 추출물의 알코올성 간 손상에 대한 보호 효능 검증 및 메커니즘 규명 • 추출물 소재의 대량생산시스템 확립 및 시제품화 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 부화 효율 증대 : 부화효율 90%이상 (50%이상 향상) • 산란율 : 채란 온도 선발 - 기존 채란 산란수 대비 25℃에서 700개 이상 채란 증대(기존 1000개 산란 - 결과 1700개 채란) • 약충 생존율 증대 : 약충 생존율 28~33% (8~13% 향상) • 열수 및 주정 추출물(70%, 100%)의 라디칼소거능 비교를 통해 열수추출물의 우수한 항산화 활성 확인 • 쌍별귀뚜라미 추출물 투여로 감소하였던, 대조군 대비 쌍별귀뚜라미 추출물 처리 그룹이 중성지방을 30% 억제하는 것을 확인 • Hepatic steatosis, apoptosis 및 bacterial endotoxin 에 대한 장점막 투과성에 대한 알코올의 반응을 추출물이 TUNEL signal을 69% 억제하며, c-caspase 3의 경우 68% 억제하는 것을 확인. • 지표성분성분 chondroitin sulfate sodium 선정, 분석법 개발 및 분석법 validation 완료 • 표준추출물개발 및 공정개발을 통한 pilot 공정도 1건 작성 완료 • 28일 독성실험을 통한 안전성 자료 및 원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 확보 • 시제품 3종(일반식품 젤리1종, 건강기능식품 정제2종), 식약처 품목신고 완료. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 기능성 식품소재로서 식용곤충의 사육에서부터 추출물 소재의 대량생산공정 및 기능성까지 아우르는 원천기술의 확보. • 식용곤충의 최적 생육조건 확립을 통한 관련 농가의 생산성 및 수익성 증대에 기여. • 고부가가치 기능성 제품 이미지를 통한 국내 식용곤충에 대한 소비자의 이미지 제고 및 관련 곤충 산업의 동반 성장 기대. • (주)네이처텍은 자체 유통/판매망인 유니베라를 중심으로 OEM/ODM 연계 업체인 한국야구르트, LG생활건강, 롯데헬스원, 종근당건강 등과 연계하여 국내 유통망 확장을 통한 판매로 진행, • 적극적인 해외 박람회 참석을 통한 해외영업 실시⇒ 스위스 Vitafoods Europe(5월), 태국 Thaifex(5월), 중국 HNC China(6월), 싱가포르 Vitafoods Aisa(9월), 베트남 Food Epo(11월) 등. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>쌍별귀뚜라미</p>	<p>식용곤충</p>	<p>생육조건</p>	<p>알코올성 간 손상</p>	<p>기능성 식품</p>

Purpose	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of optimum growth condition and increase in productivity for <i>Gryllus bimaculatus</i> • Standardization of <i>Gryllus bimaculatus</i> material with optimization of its extraction process • Evaluation of the protective effects and underlying mechanism of <i>Gryllus bimaculatus</i> extracts against alcoholic liver injury • Development of mass manufacturing system and test product using <i>Gryllus bimaculatus</i> extracts 				
R & D achievement	<ul style="list-style-type: none"> • Increase hatching efficiency : Hatching efficiency 90% or more (Improved by more than 50%) • The oviposition rate: Increase of more than 700 spawning at 25 °C.(oviposition :1000 eggs ⇒1700 eggs) • Increase survival rate : The survival rate 28~33% (Improved by 8~13%) • The hot-water extract of <i>Gryllus bimaculatus</i> has excellent antioxidative activity. • <i>Gryllus bimaculatus</i> extract treatment group inhibited 30% of triglycerides. • <i>Gryllus bimaculatus</i> extract reduces alcohol-induced Hepatic steatosis, hepatic apoptosis and bacterial endotoxin. (69% inhibition of TUNEL signal, 68% inhibition of c-caspase 3) • Development of analytical method and complete validation of analytical method, (Analytical marker: chondroitin sulfate sodium) • Completed Standard extract development and the flow chart of pilot production process. • Secure safety and stability data of raw materials. • Production of three prototypes.(One kind of general food jelly, two kinds of health functional food tablets). Completed item declaration at KFDA 				
R & D expectation effectiveness	<ul style="list-style-type: none"> • Securement of original technology for breeding, extracting process, and functionality of <i>Gryllus bimaculatus</i> • Enhancement of productivity and profitability of insect farms by establishment of optimum growth condition of <i>Gryllus bimaculatus</i> • Improvement of consumer acceptance for edible insects by imagification of a high-value functional product with <i>Gryllus bimaculatus</i> and accompanied growth of related industries field • Utilization of Naturtech network: using of domestic sales through Univera and sales through expansion of domestic distribution network using OEM / ODM.(KOREA YAKULT CO.,LTD, LG Household & Health Care CO.,LTD,.lottehealth1 CO.,LTD, Chong Kun Dang HealthcareCO.,LTD) • Actively conducting overseas sales through attendance at overseas expositions.⇒ Swiss (Vitafoods Europe), Thailand(Thaifex), China(HNC China) Singapore(Vitafoods Aisa), Vietnam(Food Epo). 				
영문핵심어	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Edible insects	Growth condition	Alcoholic liver injury	Functional food

< Contents >

1. Introduction of the research project	1
1-1 Research propose	1
1-2 Research background	1
1-3 Research scope	5
2. The research contents and result	6
2-1 Research strategy	6
2-2 Research Promotion System	7
2-3 Research Schedule	8
2-4 The research contents	9
A. Determination of optimum growth condition and increase in productivity for <i>Gryllus bimaculatus</i>	9
B. Evaluation of the protective effects and underlying mechanism of <i>Gryllus bimaculatus</i> extracts against alcoholic liver injury	25
C. Development of Functional Food for the protective effects of alcoholic liver injury using <i>Gryllus bimaculatus</i> extracts	35
2-5 Research conclusions	75
3. Goal and Contribution to related industry	80
3-1 Goal	80
3-2 Goal attainment	80
4. R&D Performance and Utilization Plan	82
4-1 Commercialization plan	82
4-2 Commercialization strategy	82
Reference	84

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1-1 연구개발 목적	1
1-2 연구개발의 필요성	1
1-3 연구개발 범위	5
2. 연구수행 내용 및 결과	6
2-1 연구개발 추진전략	6
2-2 연구개발 추진체계	7
2-3 연구개발 추진 일정	8
2-4 연구내용	9
가. 쌍별귀뚜라미의 사육환경 개선을 통한 생산성 증대	9
나. 쌍별귀뚜라미 추출물의 알코올성 간 손상에 대한 보호효능 검증 및 메커니즘 규명	25
다. 쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 알코올성 간 손상 보호용 기능성 식품 개발	35
2-5 연구 결론	75
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	80
3-1 목표	80
3-2 목표 달성여부	80
4. 연구결과의 활용 계획	82
4-1 사업화 계획	82
4-2 사업화 전략	82
붙임. 참고 문헌	84

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 쌍별귀뚜라미의 최적 생육조건 확립을 통한 생산성 증대.
- 쌍별귀뚜라미 추출 제조공정의 최적화를 통한 소재의 표준화.
- 추출물의 알코올성 간 손상에 대한 보호 효능 검증 및 메커니즘 규명.
- 추출물 소재의 대량생산시스템 확립 및 시제품화.

1-2. 연구개발의 필요성

- **곤충 자원을 이용한 식·약용 소재화 연구의 필요성**
 - 최근 식용곤충은 미래 식량자원의 다양성 확보와 가축 단백질 자원 공급의 한계성을 극복하기 위한 매우 중요한 대안 자원으로 인정받고 있으며, 이에 국제연합식량농업기구(FAO)는 국제 포럼에서 가장 경제성이 높고, 미래지속성을 지닌 단백질 공급원 대안으로써 식용 곤충을 제시한 바 있음.
 - 또한 가축에 비해 식용곤충은 사육 효율이 높고, 사육기간 중 훨씬 적은 양의 온실가스를 배출하여 환경에 매우 친화적이라는 장점이 있으며, 영양학적으로도 매우 우수한 단백질원으로써 평가되고 있음.
 - 이에, 선진국을 중심으로 국가 간 생물자원 확보차원에서 곤충자원 확보경쟁이 치열하며, 곤충의 활용범위는 무척 넓고 다양해서 새로운 형태의 자원으로 기존 기술과의 접목을 통한 융합연구로 새로운 산업분야 창출의 돌파구를 마련할 수 있다고 판단됨. 더욱이 전 세계적으로도 초기 단계인 만큼 곤충산업의 조기정착 및 유용곤충 산업화 방안을 모색하는 것은 무척 중요하며 시의적절하다고 할 수 있음.
 - 곤충 소재의 이러한 잠재적 가치로 인해 전 세계적으로 이를 식품원료로 인정하는 국가들이 증가하고 있는 추세이며, 국내에서도 쌍별 귀뚜라미를 포함한 7종류의 곤충 소재가 현재 식품원료로 등록되어 있음.
 - 2010년 곤충산업육성법 시행 후속으로 곤충 유래 고부가 바이오 신소재 개발을 통해 곤충산업을 활성화시키고 신소득 작목으로 육성할 필요성이 대두되어오고 있음. 곤충산업 육성을 위한 종합계획에는 곤충산업의 현황과 전망, 곤충산업의 지원방향 및 목표, 곤충산업의 육성 및 지원을 위한 중·장기 투자계획, 곤충산업 관련기술의 교육 및 전문인력의 육성방안, 곤충농가의 안정적인 소득증대를 위한 연구개발사업, 곤충생태에 대한 교육 및 이해증진방안, 지방자치단체의 곤충관련 사업 지원방안, 그 밖의 곤충산업의 발전을 위하여 대통령령으로 정하는 사항 등이 포함되어 있음.
 - 이에, 국내 식·의약용 곤충자원의 개발을 위한 국가연구과제는 해마다 증가하고 있는

추세에 있으며, 이는 미래 식·의약용 자원으로써 곤충소재의 높은 잠재적 가치에 대한 인식과 함께 관련 연구개발에 대한 중요성을 시사하고 있음.

- 지난 2011년부터 2016년까지 수행되었던 곤충유래 신바이오소재 탐색 및 기능성 관련 국가연구과제 검색 결과, 항염증 연구가 가장 많았고, 항생제 개발 및 피부질환 연구가 뒤를 이었으며, 이 외에도 제한적인 수준에 지나지 않아 곤충소재의 다양한 생리활성 규명 연구는 매우 미흡한 실정임. 더욱이 이들 연구 대부분이 곤충유래 특정 소재 발굴에 치중되어있어 곤충소재 자체를 이용한 기능성 및 가공적성과 대량생산 기술개발 연구는 거의 전무한 상태임.
- 특히, 곤충 소재 추출물은 다량의 생리활성 성분이 함유되어 있으나 대부분 경험적 효능으로 인지되어 왔으며, 따라서 보다 과학적이고 체계적인 접근방법을 통한 다양한 기능성 연구가 매우 필요한 실정임.

• 알코올성 간 손상에 대한 새로운 기능성 소재 개발의 필요성

- 알코올성 간(손상)질환 (Alcoholic Liver Disease, ALD)은 과도한 음주에 의해 간에서 나타나는 징후들을 포괄하는 것으로, 지방간, 알코올성 간염, 간섬유증 및 간경변을 대표적 간손상으로 볼 수 있음. 특히 음주자의 대부분이 지방간의 위험성을 가지며, 10~35%는 알코올성 간염, 15~20%는 알코올성 간경변으로 발전하는 것으로 보고되어, 알코올성 간손상은 연구자들로부터 지속적인 주목을 받고 있음.
- 한편, 현대사회에서 알코올성 간손상에 대한 위험성 및 발병률은 지속적으로 증가하고 있으며, 지난 6년간 ('10-' 15) 알코올성 간질환 진료비는 매년 꾸준히 증가하여 2010년 대비 2015년 진료비 증가율이 33.2%에 달함.

[연도별 진료형태별 알코올성 간질환 진료비 현황]

구분	2010	2011	2012	2013	2014	2015	증가율 ('10년 대비 ' 15년)
입원	45,029	50,928	53,430	57,160	59,374	65,293	45.0
외래	13,173	13,857	14,345	14,347	14,646	15,219	15.5
약국	14,617	14,987	15,730	15,616	15,947	16,482	12.8
전체	72,819	79,772	83,505	87,124	89,967	96,993	33.2

출처: 건강보험 알코올성 간질환 진료비 현황 (보건복지부, 2016)

- 또한, 지난 13년간 (04~16) ‘건강기능식품 기능성원료 인정 현황’ 을 보면 ‘간 건강’ 이 상위에 랭크되어 현대인들의 ‘간 건강’ 에 대한 관심과 걱정이 매우 높음을 반영하고 있음. 하지만, 현재까지 ‘간 건강’ 에 대해 개별인정 등록된 기능성 원료 10종 중, 단지 2종만이 알코올성 간손상에 대한 기능성으로 등록되어있어 이에 대한 체계적인 연구를 통한 기능성 소재의 다양성 확보가 매우 절실한 상황임.

[간 건강 기능성 원료 인정 현황]

• 간 건강에 도움

번호	원료명	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	브로콜리 스프라우트 분말	생리활성기능 3등급	sulforaphane	
2	표고버섯 균사체 추출물	생리활성기능 2등급	β -glucan	표고버섯균사체 추출물로서 1.8 g/일
3	밀크씨슬 추출물	생리활성기능 2등급	Silymarin	Silymarin으로 130 mg/일
4	표고버섯 균사체	생리활성기능 2등급	β -glucan	표고버섯균사체로서 350 mg/일
5	복분자 추출 분말	생리활성기능 2등급	Ellagic acid	복분자 추출분말로서 3,150 mg/일
6	발효울금	생리활성기능 3등급	Curcumin	발효울금로서 3 g/일
7	도라지 추출물	생리활성기능 2등급	Platycodin D	도라지 추출물로서 3 g/일

• 알코올성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움

번호	원료명	인정등급	기능(지표)성분	일이섭취량
1	헛개나무과병 추출물	생리활성기능 3등급	dihydromyricetin, Quercetin	헛개나무 과병추출분말로서 2,460 mg/일
2	유산균 발효 다시마추출물	생리활성기능 2등급	γ -aminobutyric acid	유산균 발효 다시마추출물로서 1.5 g/일

출처: 건강기능식품 기능성원료 인정현황 (식품의약품안전처, 2016)

• 쌍별귀뚜라미를 활용한 기능성 식품소재 개발

- 쌍별귀뚜라미 (Gryllus bimaculatus de Geer)는 메뚜기목 (Orthoptera), 귀뚜라미과 (Gryllidae) 곤충으로서 라오스, 인도네시아, 말레이시아, 아프리카 등에 분포하며, 2000년 전후로 일본에서 애완동물 사료로 사용하던 것을 소량씩 국내로 가져와 애완동물 사료 또는 민간요법에서 동물류 전통약재로서 사용되어 왔음.



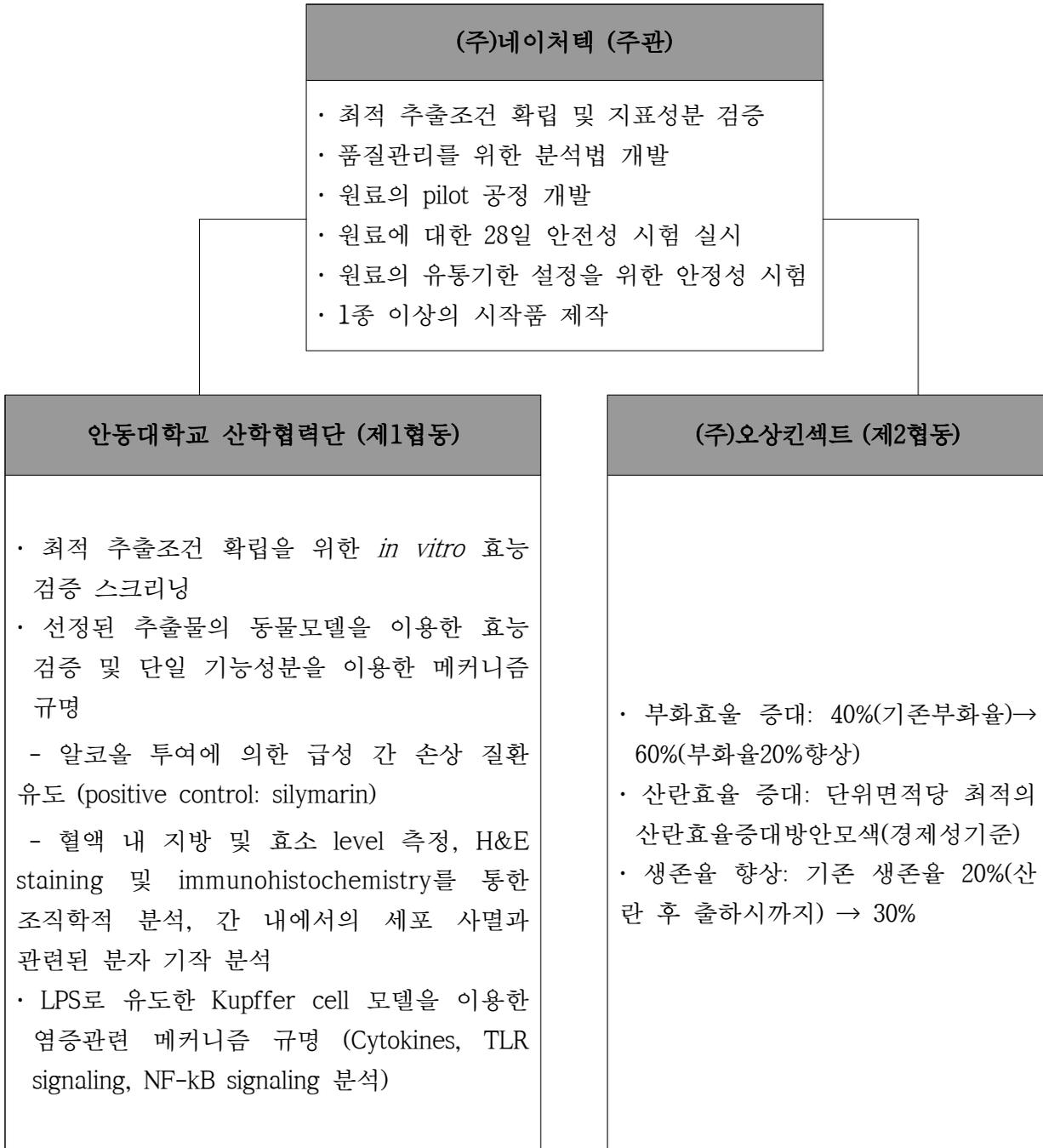
- 농촌진흥청이 2000년부터 귀뚜라미의 새로운 용도개발에 착수하여 분류, 기능성 검정, 활성

성분 분리, 청정 사육법 개발 및 약리독성 평가를 통해 귀뚜라미의 식약용 곤충으로서의 일부 과학적 검증 연구 성과를 보유하고 있음.

- 쌍별귀뚜라미는 월동 기간을 거치지 않고 온도만 맞으면 사계절 번식이 가능하며 단백질 함량이 62% 이상으로 높고 사육통에서 집단사육이 가능한 장점들이 있어 앞으로 산업화에 적극 활용될 수 있을 것으로 판단됨.
- 그러나, 국내에서의 쌍별귀뚜라미에 대한 연구는 아직 시작단계이며, 특히 사육환경 개선 및 대량생산 시스템 구축을 위한 연구는 이의 상업화를 위해서는 필수적이나 현재는 미흡한 상태임.
- 최근, 쌍별귀뚜라미의 새로운 용도 개발의 일환으로 이의 추출물을 이용한 간보호 효능 검증이 시도되었으며, 사염화탄소에 의한 간 손상 유도모델에서 쌍별귀뚜라미 추출물의 효능이 확인된 바 있음 (안 등, 2002).
- 하지만, 알코올성 간손상 모델에서 쌍별귀뚜라미의 효능에 대한 연구는 현재까지 전무하며, 따라서보다 체계적인 검증 시스템을 통해 이의 간보호 효능을 확인하고, 추출물에 함유되어있는 특정 활성물질에 대한 작용기전을 규명하는 연구가 매우 필요할 것으로 사료됨.
- 식용곤충에 대한 국민적 인식이 낮은 현시점에서 곤충의 기능성 소재화에 대한 연구와 이의 성공적인 수행은 향후 식용곤충에 대한 사회적 인식 개선과 함께 관련 연구개발 분야를 전략적으로 선점할 수 있는 중요한 계기가 될 것이라 판단됨.

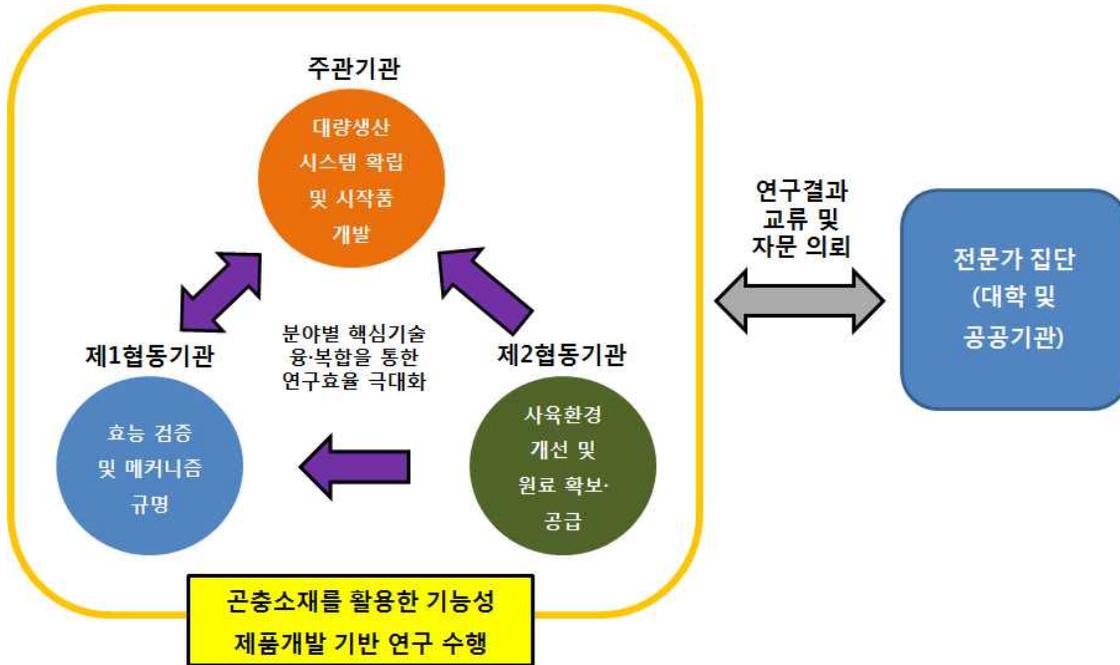
1-3. 연구개발 범위

- **주관연구기관 [(주)네이처텍]** : 추출 제조공정의 최적화를 통한 소재의 표준화, 공정개발 확립 및 시제품화
- **협동연구기관 1 [안동대학교 산학협력단]** : 쌍별귀뚜라미 추출물의 알코올성 간 손상에 대한 보호 효능 검증 및 메커니즘 규명
- **협동연구기관 2 [(주)오상킨섹트]** : 쌍별귀뚜라미의 사육환경 개선을 통한 생산성 증대.



2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진전략



• 연구팀 수행 방법

- ‘(주)오상킨섹트’가 보유하고 있는 체계적인 식용곤충 사육 시설과 오랜 경험을 바탕으로 곤충 소재의 생산성 증대를 위한 최적 사육조건 (온도, 습도, 사육밀도 및 사료 조성) 확립
- 다양한 천연물 소재화 기술을 보유하고 있는 ‘(주)네이처텍’의 기술력과 노하우를 기반으로 한 쌍별귀뚜라미 소재의 최적 추출조건 확립 및 사육조건 지표성분 표준화
- 선행연구를 바탕으로 제품화의 최종단계를 위한 일련의 공정을 설계함으로써 연구라는 up-stream 단계와 생산이라는 down-stream 단계를 효율적으로 연결, 제품화에 필요한 경제성 및 효율성 등을 고려한 최적의 공정을 개발.
- *In vitro* 및 *in vivo* 표준모델을 이용한 추출물 소재의 체계적 효능 검증 및 작용기전 규명
- 건강기능식품/ICH의 유통기한 설정가이드라인에 근거한 안정성 시험 실시
- ‘(주)네이처텍’의 계열사인 ‘유니베라(Univera)’와 연계하여 향후 개발된 제품의 국내·외 유통망 확보

2-2. 연구개발 추진체계

(주)네이처텍	안동대학교 산학협력단	(주)오상킨세트
쌍별귀뚜라미 추출물을 활용한 간 보호 소재 개발을 통한 시제품 제작	추출물의 알코올성 간 손상에 대한 보호 효능 검증 및 메커니즘 규명	쌍별귀뚜라미의 사육환경 개선을 통한 생산성 증대
이영철 외 9명	김준호 외 5명	김철학 외 4명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> • 최적 추출조건 확립 및 지표성분 검증 • 품질관리를 위한 분석법 개발 • 원료의 pilot 공정 개발 • 원료에 대한 28일 안전성 시험 실시 • 원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 시험 • 1종 이상의 시제품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> • 최적 추출조건 확립을 위한 <i>in vitro</i> 효능 검증 스크리닝 • 선정된 추출물의 동물모델을 이용한 효능 검증 및 단일 기능성분을 이용한 메커니즘 규명 • LPS로 유도한 Kupffer cell 모델을 이용한 염증관련 메커니즘 규명 (Cytokines, TLR signaling, NF-kB signaling 분석) 	<ul style="list-style-type: none"> • 부화효율 증대: 40%(기존부화율)→60%(부화율20%향상) • 산란효율 증대: 단위면적당 최적의 산란효율증대방안모색(경제성기준) • 생존율 향상: 기존 생존율 20%(산란 후 출하시까지) → 30%

2-3. 연구개발 추진 일정

일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	원료 확보 및 공급	■					■								김철학((주)오상킨섹트)
2	지표성분 검증 및 최적 추출조건 확립	■	■	■											이영철 ((주)네이처텍)
3	추출 조건별 <i>in vitro</i> 효능 검증 스크리닝	■	■	■											김준호 (안동대학교)
4	유충사육조건 규명	■	■	■	■	■	■								김철학((주)오상킨섹트)
5	산란효율성 규명			■	■	■	■	■	■	■	■	■			김철학((주)오상킨섹트)
6	생산성 증대방안 확립									■	■	■			김철학((주)오상킨섹트)
7	표준화 및 품질관리를 위한 분석법 개발 및 확립			■	■	■	■	■	■	■	■	■			이영철 ((주)네이처텍)
8	효능 검증 및 메커니즘 규명 (<i>in vivo</i>)				■	■	■	■	■	■	■	■			김준호 (안동대학교)
9	효능 검증 및 메커니즘 규명 (<i>in vitro</i>)				■	■	■	■	■	■	■	■			김준호 (안동대학교)
10	Pilot 공정개발					■	■	■	■	■	■	■			이영철 ((주)네이처텍)
11	원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 시험							■	■	■	■	■			이영철 ((주)네이처텍)
12	시제품 제작을 위한 제품 처방 개발							■	■	■	■	■			이영철 ((주)네이처텍)
13	시제품 제작											■	■		이영철 ((주)네이처텍)

2-4. 연구내용

가. 쌍별귀뚜라미의 사육환경 개선을 통한 생산성 증대

(1) 쌍별귀뚜라미의 생태 특성 및 사육 방식

① 생태 특성에 대한 문헌조사

쌍별귀뚜라미는 식약처에 식용곤충의 원료로 등재된 이후 국내외 많은 사람들의 관심과 주목을 받고 있는 종 중에 하나이다. 쌍별귀뚜라미가 산업적으로 양산되기 위해서는 기본적으로 생태 특성에 대한 기초적인 연구가 진행되어야 하는데 현시점에서는 각 영기별 기간 및 특성에 대한 일부 특성만 연구되어 있는 실정이며 산업적으로 생산하기 위한 자료가 부족한 실정이다. 국내에 자생하고 있는 왕귀뚜라미에 대한 연구자료에는 영기별 사육 자료 및 생육 특성에 대한 자료가 있지만 왕귀뚜라미는 1년에 1회 발생하고 알로 월동하는 곤충이며, 쌍별귀뚜라미는 고온 다습한 동남아 지역에 분포하는 종으로 알로 월동하는 특성이 없이 연중 생활환이 순환되는 종으로 왕귀뚜라미와는 특성이 크게 차이가 발생한다.

Table 1. Research data of the Korean on *Gryllus bimaculatus*

연구 제목	연구기관 및 출처	발행연도
쌍별귀뚜라미 대량사육 기술개발	전남농업기술원	2014
왕귀뚜라미 연중 수시공급체계 확립	농진청	2006
왕귀뚜라미 인공사육 기술개발	충남농업기술원	2001
먹이, 온도, 광조건 및 바닥재가 쌍별귀뚜라미 개체군의 생육에 미치는 영향	석사학위논문	2010
쌍별귀뚜라미의 사육밀도가 섭식량, 성충사망률 및 부화 약충수에 미치는 영향	농진청연구과제 한국잠사학회지	2013
국내 도입종인 쌍별귀뚜라미의 산란 및 온도별 알 발육	한국토양동물학회 지	2007

Table 2. Management method and feeding condition of *Gryllus bimaculatus*

사육단계	사진	관리방법	발육기간	사육조건
채란 및 알		<ul style="list-style-type: none"> - 먹이공급 - 산란판은 매일 또는 격일로 1~2주간 투입 - 습도유지(물은 배지에 분무함) 	약 13일	25~30℃
어린약충		<ul style="list-style-type: none"> -산란 후 약 13일 후 부화하기 시작하여 약 1주일간 부화 - 빛이나 바람으로 분리 - 사육통장 1,000~2000 	40~50일	27~30℃
약충		<ul style="list-style-type: none"> - 먹이(사료, 야채)공급 - 습도유지(물을 배지에 분무함) 	40~50일	27~30℃
성충		<ul style="list-style-type: none"> - 성충이 되면 필요에 따라 증식용과 판매용으로 구분하여 활용함 	약20일	27~30℃

출처: 산업곤충 사육기준 및 규격(농진청:2013)

국내에서 쌍별귀뚜라미가 산업곤충으로 관심을 받으면서 이에 대한 연구가 진행되고 있는 실정이며 농진청(2013)에서 발간된 산업곤충 사육기준 및 규격에 나온 자료에는 쌍별귀뚜라미의 생육기간이 25~30℃ 조건에서 난에서 성충까지 100일~110일 소요되는 것으로 제시되었으나 실제 농가에서 사육진행되고 있는 실정은 40일~55일에 이루어지는 과정으로 세부적으로 적용 가능한 연구가 필요한 실정이다.

② 국내에서 쌍별귀뚜라미의 사육 형태

국내의 쌍별귀뚜라미의 사육 형태는 사육용기 형태에 따라 크게 3가지로 구분할 수 있으며, 첫 번째 사육형태는 다용도박스 사육 형태로 60x30x30cm 미만의 플라스틱 용기로 소량의 개체군 관리가 용이한 형태, 두 번째 사육 형태는 150x60x50cm의 플라스틱 포장박스 형태의 용기를 활용하는 사육방법으로 첫 번째 사육 형태보다 양산형 형태로 신규 농가에서 많이 사용하고 있는 형태이다. 세 번째 사육 형태는 비닐 터널식 형태로 선반에 규격에 따라 사육 규모를 원하는 크기에 맞추어 조절하여 사육하는 형태로 두 번째 사육방법에서 발전된 양산 규목의 사육 형태라고 할 수 있다.



Fig. 1. Domestic breeding type of *Gryllus bimaculatus* in Korea

(2) 부화효율 증대

생산효율 증대에 있어 부화율은 초기 생산량에 영향을 미치는 중요한 부분으로 부화율이 약 40%(정,2007)로 생산성이 매우 떨어지는 것으로 나타났다. 이번 실험은 부화율을 증대시키기 위해서 부화율에 미치는 요인을 규명하여 생산성 증대에 반영하기 위한 목적으로 실행되었다. 부화율에 미치는 요인으로 외부충격, 부화온도, 부화 습도를 대상으로 하였다.

① 외부자극을 준 난의 난 기간 및 부화율

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험처리구 : 20℃, 25℃, 30℃, 35℃
- 사육용기 : 지름 9cm x 높이 1cm의 petri dish
- 시험공시충 : 산란 후 3시간 이내의 알 사용
- 부화시 사용 배지 : 참나무발효톱밥(1-2mm크기)
- 시험장비: Low Temp incubator HB-103S, ESH2185, VS-705D
- 반복수 : 각 처리구별 50개씩
- 방 법 : 성충 1,000마리 사육구에서 3시간 동안 채란 받은 알 중 각 처리구별로 50개씩 분리하여 petri dish에 수분함량 65%의 참나무 발효톱밥에 인큐베이터 내부 상대습도 $80 \pm 10\%$ 조건에서 난 기간 및 부화율을 측정하였다. 이번 실험에 사용된 알은 채란받은 배지에서 인위적으로 알을 분리하여 처리구별로 일정 수량을 맞추는 과정에서 난에 외부 충격이 가해진 개체의 부화 상태를 점검한 실험이다.



Fig. 2. Egg separation of *Gryllus bimaculatus* for hatching test

○ 시험결과

온도별 난 기간은 Table 3과 같으며 35°C에서 8.6일로 가장 짧았다. 부화율은 48%~54%로 큰 차이를 보이지 않았다. 정(2007)의 자료에서 부화율이 약 35%~42% 전후를 나타낸 것과 비교할 때 약 10%가 향상된 결과이지만 산업적으로 활용하기에는 경제성이 부족한 형태이다. 이번 실험에서 채란된 알을 한 개씩 분리하면서 난에 직접적인 접촉을 통한 난 스트레스로 부화율이 감소된 것으로 사료된다.

Table 3. Egg period and rate of hatching of *Gryllus bimaculatus* with external stimulation

Type	20°C	25°C	30°C	35°C
Period of egg (Day)	38±0	18.8±1.3	9.2±0.4	8.6±0.5
Hatching rate (%)	54%	52%	50%	48%
Repetition (n)	50	50	50	50

② 외부자극을 주지 않은 난의 난 기간 및 부화율

이전 실험에서 난에 외부자극을 주어 부화율을 점검한 결과 부화율이 50% 전후의 결과를 나타내었기 때문에 이번 실험은 채란된 배지에서 난을 분리하지 않고 채란 배지 자체로 처리구별 부화를 유도하였다.

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험처리구 : 20°C, 25°C, 30°C, 35°C
- 사육용기 : 지름 9cm x 높이 1cm의 petri dish
- 시험공시층 : 산란 후 3시간 이내의 알 사용

- 부화시 사용 배지 : 참나무발효톱밥(2-3mm 크기)
- 시험장비 : Low Temp incubator HB-103S, ESH2185, VS-705D
- 방 법 : 성충 1,000마리 채란박스에서 3시간 동안 채란 받은 알을 각 처리구별로 채란 petri dish에 채란을 받은 후 인큐베이터 내부 상대습도 $80 \pm 10\%$ 에 난 기간 및 부화율을 측정하였다.

○ 시험결과

온도별 난 기간은 Table 4와 같으며, 표3과 비교시 35°C 처리구에서 난 기간이 약 2일 정도 차이가 발생하였다. 외부자극을 최소화한 처리구의 부화율은 각 처리구별로 96.5% 이상으로 외부자극이 있는 처리구에 비해 부화율이 40%이상 높게 나타났다. 이번 실험으로 쌍별귀뚜라미의 부화에 미치는 요인 중 난의 외부 충격에 대한 부분이 부화율에 큰 영향을 주는 것으로 나타났으며, 온도별 부화율은 차이는 거의 나타나지 않았다. 일반적으로 35°C의 고온에서는 난의 부화율이 감소되는 특성을 보이나 이번 실험에서 부화율이 96.5% 이상으로 높게 나타난 것으로 보아 쌍별귀뚜라미는 동남아시아의 고온 지역에서 서식하는 특성이 잘 반영된 것으로 판단된다.

Table 4. Egg period and rate of hatching of *Gryllus bimaculatus* without external stimulation

Type	20°C	25°C	30°C	35°C
Period of egg (Day)	38.3±0.8	16.3±0.5	9.3±0.5	7.1±0.4
Hatching rate (%)	98.3%	97.5%	96.5%	97.6%
Repetition (n)	530	733	844	575

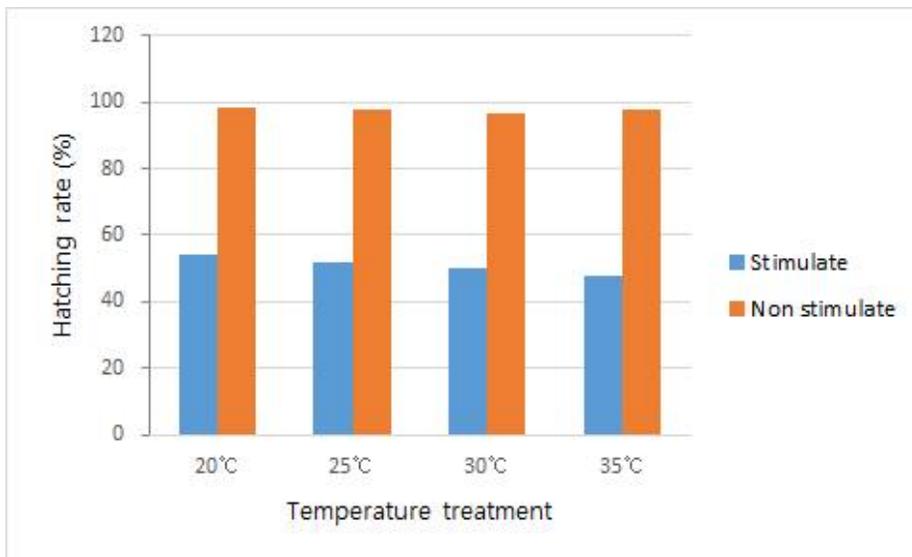


Fig. 3. Comparison of hatching rate between the stimulate and without stimulate of the eggs

③ 대기 중 상대습도에 따른 난 기간 및 부화율

부화율에 영향을 미치는 요인 중 가장 많은 영향을 미치는 것이 습도라고 추정되어 부화율 향상에 있어서 점검해야 할 부분이라 판단되어 이 실험을 진행하였다.

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험처리구 : 부화 습도 30%, 50%, 70%, 90%처리구
- 시험장비 : Low Temp incubator HB-103S, ESH2185, VS-705D
- 사육용기 : 지름9cm x 높이 1cm의 petri dish
- 시험공시충 : 산란 후 3시간 이내의 알 사용
- 부화시 사용 배지 : 수분 65% 참나무발효톱밥(2-3mm크기)
- 방 법 : 쌍별귀뚜라미 성충 1,000여마리 사육구에서 3시간 채란받은 용기를 각 각의 인큐베이터에서 온도 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 대기 중 상대습도가 30%, 50%, 70%, 90%의 조건에서 부화된 약충을 매 24시간 간격으로 측정하였다.

○ 시험결과

습도에 따른 난 기간은 30%, 50%, 70%, 90% 각각 9.4일, 9.1일, 7.4일, 7.1일이었으며 부화율은 각각 41.8%, 66%, 82%, 90.2%이었다. 습도가 낮을수록 부화율은 감소하였으며 습도가 높을수록 난 기간이 짧게 나타났다. Table 4의 자료와 비교할 때 70%처리구와 90%처리구의 난 기간이 9.3일과 7.11~7.36일로 동일한 30°C 에서 실험한 결과이나 2일의 차이가 발생한 결과가 나타났다. 이 부분에 대한 것은 추후 보완 검증해보아야 할 것으로 사료된다.

Table 5. Oviposition period and hatching rate according to different relative humidity

Type	30%	50%	70%	90%
Period of egg (Day)	9.4 ± 0.7	9.1 ± 0.9	7.4 ± 0.6	7.1 ± 0.4
Hatching rate (%)	41.8%	66.0%	82.0%	90.2%
Repetition (n)	158	545	289	245

부화율을 높이기 위해 부화에 영향을 미치는 요인을 검증한 결과 채란 후 쌍별귀뚜라미의 난에 외부충격을 최소화하고 습도는 최소 90%이상의 조건에서 부화를 유도할 경우 부화율 90% 이상을 기대할 수 있으며 부화 습도가 높을수록 난 기간이 단축되는 특성이 나타났다으나 추후 반복 검증이 필요하다.

(3) 산란율 증대를 위한 요인 선발

생산성 증대를 위해서는 동일한 조건에서 일정한 기간에 일정 수량 이상의 산란을 유도하는 것이 생산성 증대에 대한 기초적 자료로 무엇보다 중요하다. 이번 실험에서는 온도에 따른 산란특성을 확인하여 최적의 산란율 증대에 대한 자료를 검증하려고 하였다. 또한 채란 기간 중 쌍별귀뚜라미의 산란 경향성을 파악하여 어떤 온도에서 얼마간 채란을 유도하는 것이 효율적인지 파악하려고 하였다.

① 온도에 따른 산란특성

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험처리구 : 채란 온도 20℃, 25℃, 30℃, L:D=10:14, 70%RH
- 시험장비 : Low Temp incubator HB-103S, ESH2185, VS-705D
- 사육용기 : 지름 12cm x 높이 8cm의 투명한 플라스틱용기
- 시험공시충 : 성충으로 우화 후 3일된 개체 1쌍씩 처리, 각 처리구별 5반복
- 채란 배지 : 3cm x 3cm x 3cm의 수분 70%의 floral foam
- 방 법 : 채란은 매일 일정한 시간에 채란 배지를 교체하여 30일간 난수를 확인하였다. 성충의 먹이는 농가에서 급여하는 먹이로 미강(쌀겨) 85%, 어분 15%를 혼합한 먹이를 급여하였으며, 수분은 지름 5cm petri dish에 숨을 넣어 5ml씩 급여하였고, 상추 2g씩 매일 급여하였다. 산란된 배지는 3일 후 분해하여 난 수를 파악하였다.



Fig. 4. Containers and laying medium to check egg numbers

○ 시험결과

30일간 채란한 결과 20℃, 25℃, 30℃ 처리구의 총 평균 산란수는 각각 269개, 1710개, 1042개로 25℃ 처리구에서 가장 많은 산란수를 나타내었다. 30일간 매일 채란한 결과 약

23일까지 산란을 하였으며, 산란패턴은 Fig.5와 같다. 일반적으로 농가에서 쌍별귀뚜라미 채란은 통상적으로 5일에서 7일까지 채란을 받으며 채란 후 출하를 하는 형태로 운영하고 있다. 채란 시작 후 7일경의 누적 평균 산란율은 20℃, 25℃, 30℃ 처리구별로 각각 80%, 39%, 54%(Fig.6)로 누적 평균 산란수는 217개, 667개, 562개(Fig.7)이었다. 25℃와 30℃ 처리구에서 성충 채란 시작 후 개체별 산란능력의 39%~54%인 개체당 약 500~600개의 채란 받은 후 성충으로 출하하는 것은 성충 생존율 및 품질을 감안할 경우 유리할 것으로 사료된다.

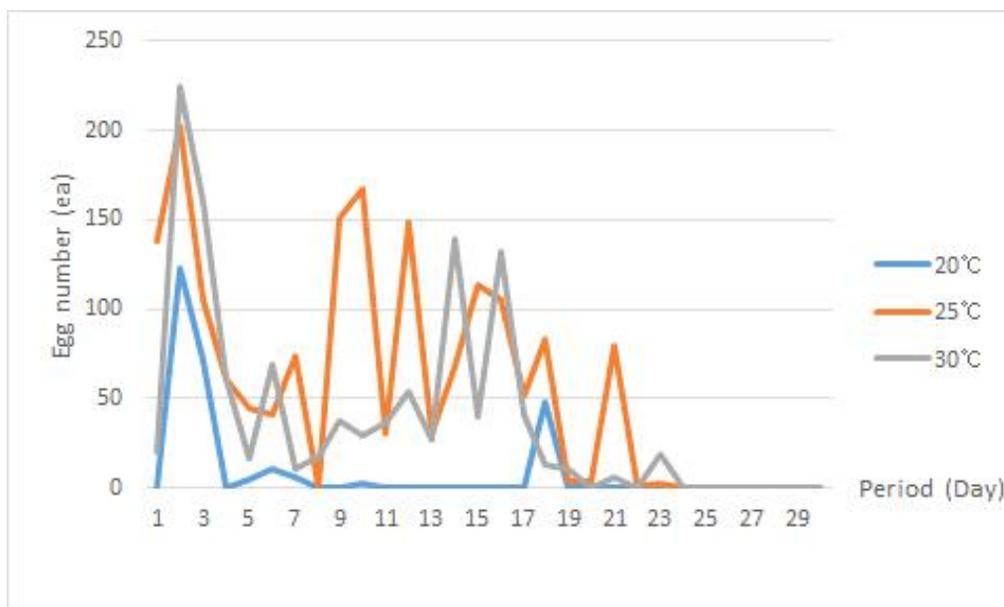


Fig. 5. Oviposition tendency by different temperature for 30 days

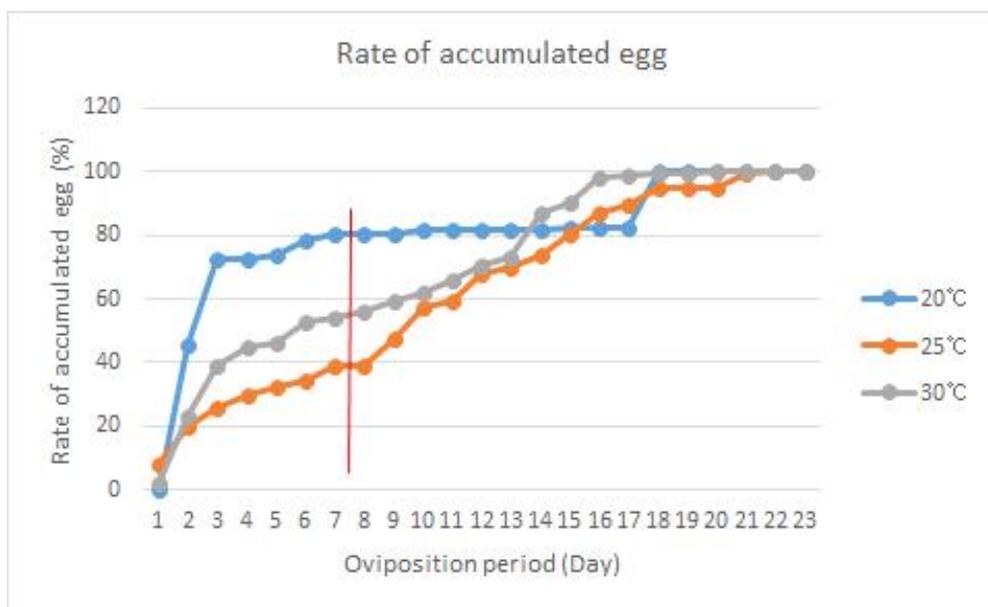


Fig. 6. Accumulated scattering rate during oviposition period

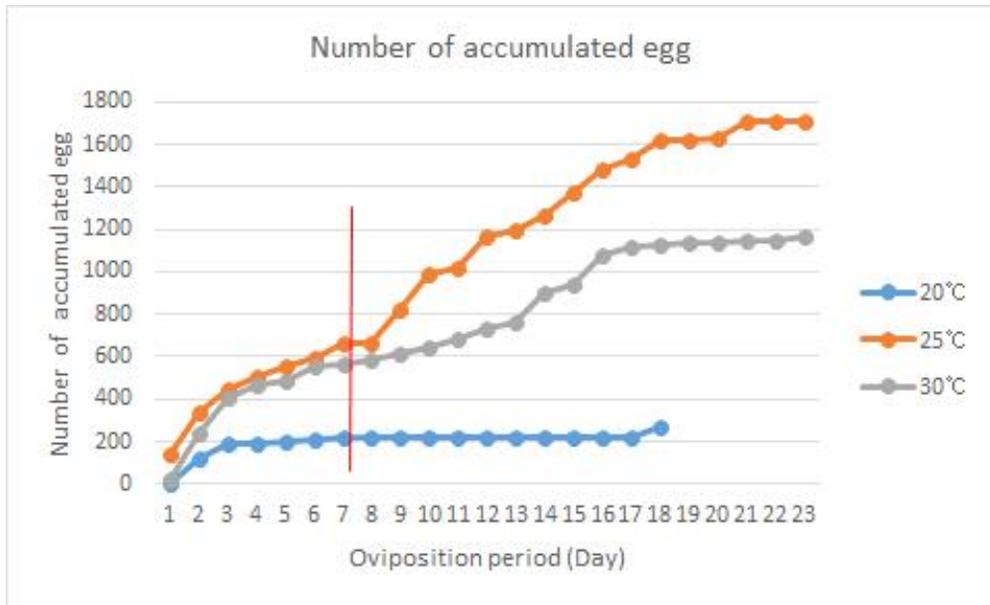


Fig. 7. Accumulated egg numbers for 30 days

② 성충사료 급여시 물과 상추를 급여한 처리구의 산란수 비교

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험환경 : 채란 온도 30°C, L:D=10:14, 70%RH
- 사육용기 : 지름 12cm x 높이 8cm의 투명한 플라스틱용기
- 시험 공시충 : 성충으로 우화 후 3일된 개체1쌍씩 처리, 각 처리구별 5반복
- 채란 배지 : 3cm x 3cm x 3cm의 수분 70%의 floral foam
- 처리구 : 성충의 먹이로 사료+물을 급여한 처리구, 사료+물+상추를 급여한 처리구
- 방 법 : 채란은 매일 일정한 시간에 채란 배지를 교체하여 30일간 난수를 확인하였다. 성충의 먹이는 농가에서 급여하는 먹이로 미강(쌀겨) 85%, 어분 15%를 혼합한 먹이를 급여하였으며, 수분만 급여한 처리구와 수분과 상추를 급여한 처리구로 비교 실험하였다.

○ 시험결과

쌍별귀뚜라미 사육 농가의 경우 일반적으로 성충 먹이 급여시 사료와 물만 급여하는 경우와 사료, 물, 야채를 급여하는 경우가 있다. 이와 같은 형태에서 어떤 형태가 산란수가 많고 효율적인지에 대한 필요성으로 실험을 진행하였다. 그 결과 상추를 급여한 처리구가 급여하지 않은 처리구에 비해 30일간 400여개 이상 많은 산란수를 나타내었다. 하지만 사료와 물만 급여한 처리구의 경우 5반복 중 2반복은 암컷이 약 150개씩 산란하고 산란하지 않은 개체이기 때문에 하위 2개체의 암컷 산란수를 빼고 상위 3반복의 암컷 평균을 측정하였을 경우는 두 처리구의 산란수는 큰 차이를 보이지 않았다. 추가적으로 많은 반복의 실험이 진행되어야 결과치에 대한 경향성 오차가 줄어들 것으로 판단된다.

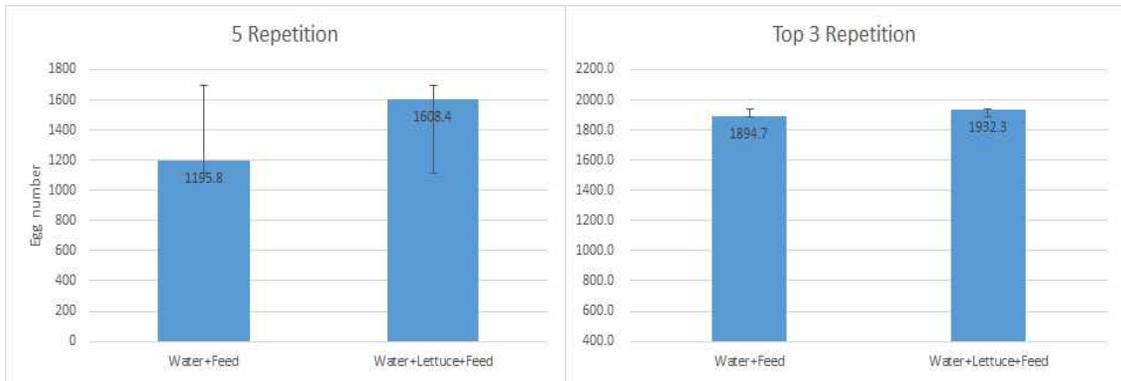


Fig. 8. Comparison of average egg numbers with water and lettuce

(4) 약충 생존율 증대를 위한 방안 모색

① 사육밀도에 따른 생육특성

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험환경 : 온도 $29 \pm 1^\circ\text{C}$, L:D=10:14, 70%RH
- 사육용기 : 150cm x 60cm x 50cm의 플라스틱용기
- 시험 공시충 : 부화 후 1일 이내 개체
- 처리구 : 3,000마리, 5,000마리, 10,000마리, 15,000마리, 20,000마리 처리구 3반복 총 159,000개체의 공시충 사용
- 방법 : 사육 용기에 종이로 된 계란판(29.5cm x 29.5cm x 5cm)을 세로로 세워 표면을 늘리는 방법으로 처리구당 60개씩 넣어 실험을 진행하였다. 유충의 먹이는 일반농가에서 사용하는 방법으로 쌀겨(미강)와 어분 15%를 혼합하여 급여하였으며, 수분 보충을 위해 각 처리구별로 물병으로 수분을 공급하였으며, 상추를 함께 급여하였다. 사육 기간은 5주간으로 진행하였으며 성충 수확은 37일에 진행하였다. 부화한 약충을 개체별로 일정량을 분배하여 넣기 위해 부화한 약충 1g씩 무게를 측정하여 3반복으로 하여 유충을 확인한 결과 평균 마리수는 1008마리로 1개체의 평균무게는 1.08mg이었다. 각 처리구별 마리수는 무게를 기준으로 분배하였다.

○ 시험결과

37일간 3,000마리, 5,000마리, 10,000마리, 15,000마리, 20,000마리 처리구의 평균 생존율은 각각 34%, 31%, 28%, 21%, 18%를 나타냈으며, 처리구별로 생산된 쌍별귀뚜라미의 평균 무게는 각각 1,483g, 2,106g, 2,673g, 3,473g, 3,967g으로 20,000마리 처리구에서 생체충 총량이 가장 높게 나타났다. 이번 실험 결과 150cm x 60cm x 50cm의 용기의 사육밀도는 총 생산량을 기준으로 볼 때 15,000마리 이상의 사육 밀도로 사육하는 것이 타당할 것을 판단 된다.

Table 6. Characteristics of harvesting each treatment

Type	3,000	5,000	10,000	15,000	20,000
Average survival count	1,006	1,535	2,778	3,091	3,670
Survival rate (%)	33.5	30.7	27.8	20.6	18.4
Average product (weight of <i>G.bimaculatus</i>) (g)	1,483	2,106	2,673	3,473	3,967
An average weight of body (g)	1.47	1.37	0.96	1.12	1.08
Dried weight (g)	312	450	706	792	909
Dryness factor to live weight (%)	21.0	21.4	26.4	22.8	22.9

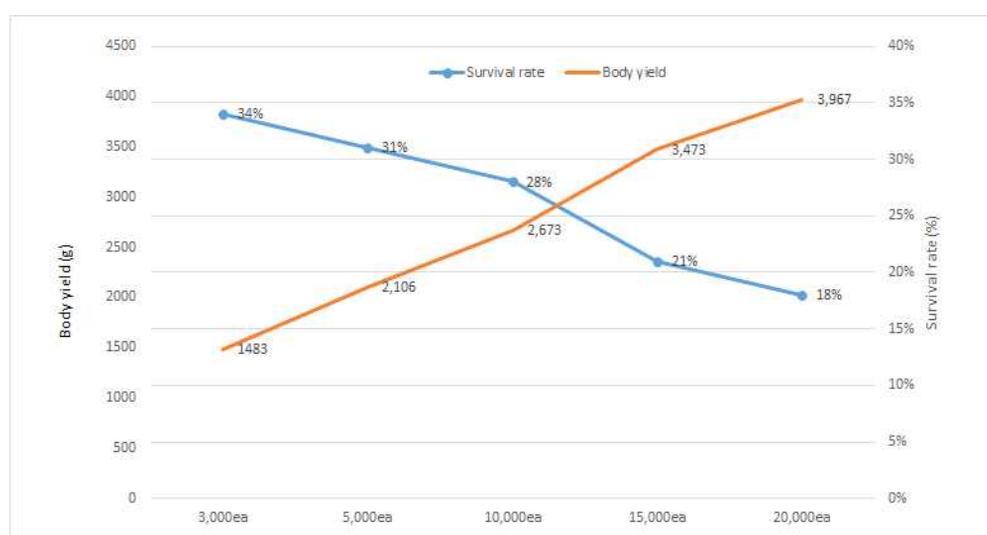


Fig. 9. Average survival rate and total biomass by treatment area according to the breeding density

각각의 처리구를 5주간 주 1회 약충의 무게를 측정한 결과 사육 밀도가 가장 낮은 3,000 마리 처리구가 개체 무게가 가장 높게 나타났으며 밀도가 높을수록 개체 평균 무게가 낮게 나타났다(Fig. 10, Fig. 11).

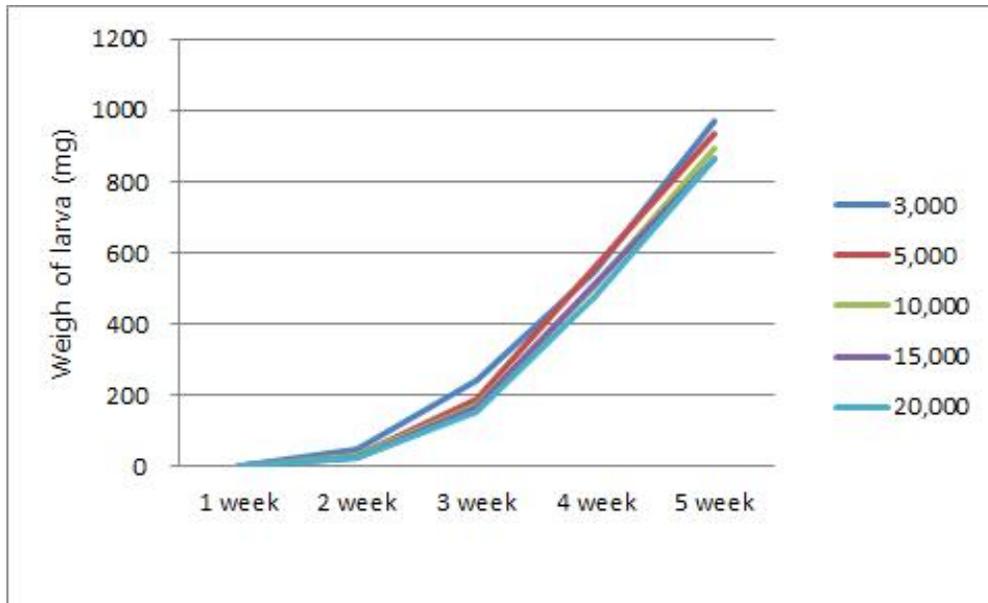


Fig. 10. Change in the weight of *Gryllus bimaculatus* in five weeks

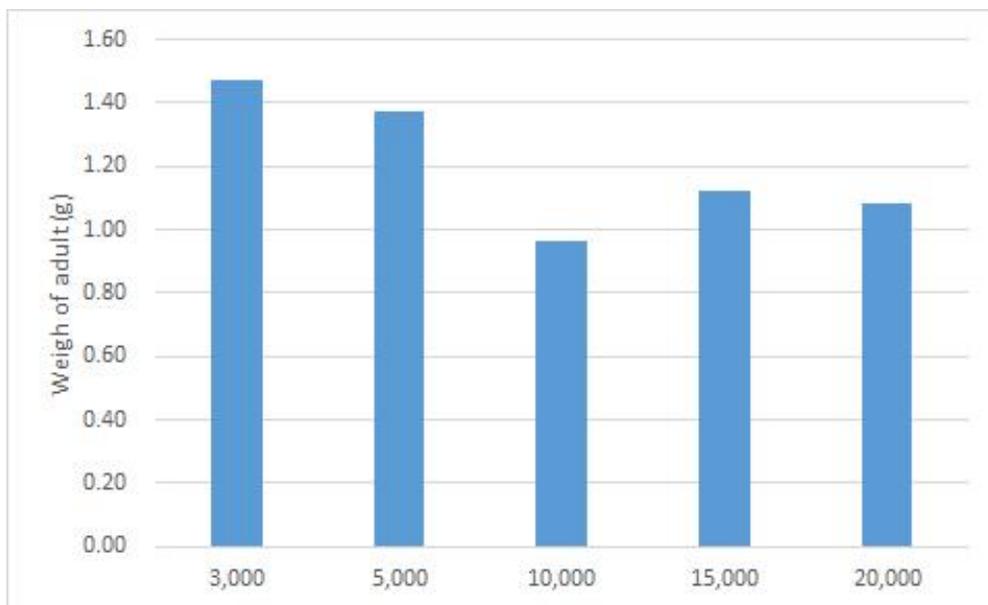


Fig. 11. Average weigh at harvest by each treatment.

채소를 급여한 무게를 제외하고 사료만 급여한 기준으로 볼 때 쌍별귀뚜라미 1kg 생산하기 위해서는 1.23kg~1.42kg의 사료를 섭취하였다(Table 6).

Table 7. Feed efficiency by each treatment

Type	Food consumption (g)	Product (g)	Efficiency of feeding (%)	Food quantity for product 1kg (kg)
3,000	1,184	1,483	125	0.8
5,000	1,708	2,106	123	0.8
10,000	3,237	2,673	83	1.2
15,000	4,277	3,473	81	1.2
20,000	5,343	3,967	74	1.3

일정한 용기에 밀도를 달리하여 사육한 경우 성비에 영향을 미치는지 알아보기 위해 암수 성비를 조사한 결과 처리구별 성비의 차이는 매우 적었으나 20,000개체 처리구의 경우 암컷의 비율이 다소 높게 나타났지만 전체 개체수를 볼 때 암수 성비는 51% : 49%로 큰 차이를 보이지 않았다(Table 8).

Table 8. Sex ratio of breeding test insect

Type	3,000	5,000	10,000	5,000	20,000	Total
Female (%)	49.3	47.8	48.2	49.1	56.5	51.0
Male (%)	50.7	52.2	51.8	50.9	43.5	49.0
Repetition (n)	3,017	4,606	8,334	9,272	11,011	36,240



Fig. 12. Breeding room inside



Fig. 13. Harvesting process

② 물과 채소 급여 처리구의 생육 특성 비교

○ 실험의 재료 및 방법

- 시험환경 : 온도 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, L:D=10:14, 70%RH
- 사육용기 : 55cm x 30cm x 27cm의 플라스틱용기
- 시험 공시충 : 부화 후 1일 이내 개체
- 처리구 : 물+사료 급여처리구, 물+사료+채소(상추) 급여처리구
- 방 법 : 사육 용기(다용도박스)에 종이 계란판을 넣고 갓 부화한 약충을 1,000마리씩 3반복 처리하였다. 5주간 두 처리구의 성장상태를 파악하기 위해서 주 1회 5주간 5회 측정하여 성장비교 및 생존율을 측정하였다.

○ 결과

5주간 두 처리구를 비교한 결과 사료+물+상추의 처리구가 물+사료 처리구의 비해 1.5배 체중이 높게 나타났으며, 생존율도 12.4%가 높게 나타났다(Table 9). 사료와 물만 급여한 처리구에 비해 채소(상추)를 급여한 처리구가 생존수, 체중 모두 높게 나타나 쌍별귀뚜라미 사육에는 채소를 급여하는 것이 긍정적인 결과를 나타냈다.

Table 9. Survival ratio comparison between only water and both water and vegetable

Type	Survial number	Survival rate (%)	Average weight of harvested in the 5 week (mg)
Water+Food	154	15.4	556
Lettuce+Water+Food	279	27.8	860

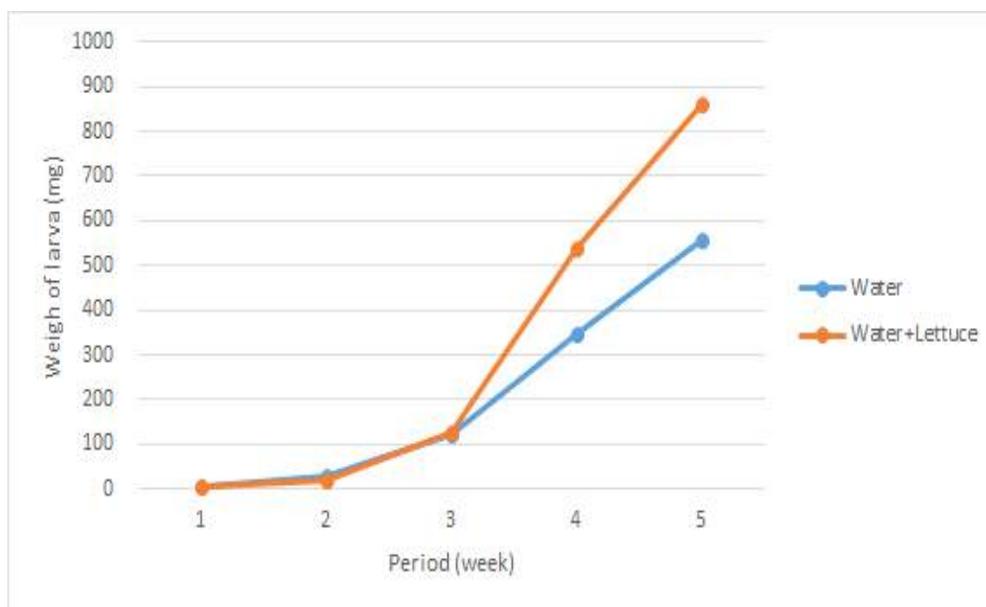


Fig. 14. Changes in the weight of *Gryllus bimaculatus* for five weeks, between only water and both water and vegetable

③ 생육된 쌍별귀뚜라미의 중금속 안정성

쌍별귀뚜라미는 2016년 식약처에서 식품원료로 인정하여 등재되었으며 식품안전성 기준으로 납 0.3 mg/kg 이하, 카드뮴 0.3 mg/kg 이하 규정되어 있어 생산된 쌍별귀뚜라미의 중금속 함량을 검사하였으며 2종의 중금속은 불검출 되었다. 또한 기존 사육농가들의 사료의 조단백 함량을 검사한 결과 21.8%, 21.5%이었으며, 시험 중 생산된 쌍별귀뚜라미의 조단백 함량은 57.7%이었다.

Table 10. Report of heavy metal residual inspection(Pb, Cd, As)

NO.	시료명(국문/영문)	시험의뢰일	시험검사성적서 발급일	시험항목	결과
1	쌍별귀뚜라미건조분	2018/08/28	2018/09/05	납, 카드뮴	불검출
2	A업체 사료	2018/09/20	2018/10/05	조단백	21.5%
3	B업체 사료	2018/09/20	2018/10/05	조단백	21.8%
4	쌍별귀뚜라미 건조분	2018/06/26	2018/07/04	조단백	57.7%



시험성적서 번호 F690101/LF-CTSAYFN18-30207R18 발행일: 2018. 10. 05 페이지: 1 / 1

고객명: 농업회사법인 주식회사 오성컨퍼트
주소: 충청남도 예산군 오가면 중사로 552-60

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN18-30207R18
제품명 : 시료-3
아이템 번호 : 시료입고일 2018.09.20
시험기간 : 2018. 09. 20 - 2018. 10. 04
시험성적서의 용도 : 참고용
참고 : 본 시험성적서는 이전에 발행한 성적서 번호 "F690101/LF-CTSAYFN18-30207"를 대체합니다.

시험항목	단위	시험방법	경량한계	결과
조단백질	%	식품공전, Protein Analyzer	-	21.5

주) (1) 불검출 = 경량한계 이하
(2) g/100g = %(w/w)
(3) - = No Regulation
(4) ** = 단위없음

*** 끝 ***



시험성적서 번호 F690101/LF-CTSAYFN18-30208 발행일: 2018. 10. 04 페이지: 1 / 1

고객명: 농업회사법인 주식회사 오성컨퍼트
주소: 충청남도 예산군 오가면 중사로 552-60

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN18-30208
제품명 : 시료-4
아이템 번호 : 시료입고일 2018.09.20
시험기간 : 2018. 09. 20 - 2018. 09. 28
시험성적서의 용도 : 참고용

시험항목	단위	시험방법	경량한계	결과
조단백질	%	식품공전, Protein Analyzer	-	21.8

주) (1) 불검출 = 경량한계 이하
(2) g/100g = %(w/w)
(3) - = No Regulation
(4) ** = 단위없음

*** 끝 ***



시험성적서 번호 F690101/LF-CTSAYFN18-28541 발행일: 2018. 09. 05 페이지: 1 / 1

고객명: 농업회사법인 주식회사 오성컨퍼트
주소: 경기도 구리시 건원대로34번길 7

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN18-28541
제품명 : 귀뚜라미 건조분
아이템 번호 : 입고일자 : 2018.08.28
시험기간 : 2018. 08. 28 - 2018. 09. 04
시험성적서의 용도 : 참고용

시험항목	단위	시험방법	경량한계	결과
조단백질	%	식품공전, Protein Analyzer	-	57.7
납	mg/kg	식품공전, ICP/MS	0.08	불검출
카드뮴	mg/kg	식품공전, ICP/MS	0.04	불검출
비소	mg/kg	식품공전	0.05	3.22

주) (1) 불검출 = 경량한계 이하
(2) g/100g = %(w/w)
(3) - = No Regulation
(4) ** = 단위없음

*** 끝 ***



시험성적서 번호 F690101/LF-CTSAYFN18-18025 발행일: 2018. 07. 04 페이지: 1 / 1

고객명: 농업회사법인 주식회사 오성컨퍼트
주소: 충청남도 예산군 오가면 중사로 552-58

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN18-18025
제품명 : 귀뚜라미 건조분
아이템 번호 : 2018-05-05
시험기간 : 2018. 08. 28 - 2018. 07. 04
시험성적서의 용도 : 참고용

시험항목	단위	시험방법	경량한계	결과
조단백질	%	식품공전, Protein Analyzer	-	57.7
납	mg/kg	식품공전, ICP/MS	0.08	불검출
카드뮴	mg/kg	식품공전, ICP/MS	0.04	불검출
비소	mg/kg	식품공전	0.05	3.22

주) (1) 불검출 = 경량한계 이하
(2) g/100g = %(w/w)
(3) - = No Regulation
(4) ** = 단위없음

*** 끝 ***

Fig. 14. Result of heavy metal residual inspection

나. 쌍별귀뚜라미 추출물의 알코올성 간 손상에 대한 보호효능 검증 및 메커니즘 규명

① 연구방법

㉞ 재료 및 제조방법

7종의 곤충 소재(갈색거저리 유충, 누에번데기, 백강잠, 벼메뚜기, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이 유충, 흰점박이꽃무지 유충)를 대상으로 각 열수 및 에탄올 추출물을 제조하였다. 각 추출물들은 농축 및 동결 건조를 거쳐 분말화하여 모든 실험에 이용하였다.

㉟ 항산화 활성 측정 실험

○ DPPH 라디칼 소거능 측정

곤충추출물 50 μ L와 DPPH시약 1450 μ L를 30분간 암반응시킨 후, 517 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. Vitamin C를 표준물질로 설정하여 표준물질에 대한 등가비교로 나타내었다.

○ ABTS 라디칼 소거능 측정

곤충추출물 30 μ L와 ABTS시약 1470 μ L를 10분간 암반응시킨 후, 734 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. Vitamin C를 표준물질로 설정하여 표준물질에 대한 등가비교로 나타내었다.

㊱ 조직학적 및 단백질 지표

조직학적 지표 분석을 위하여 H&E, Immunofluorescence (IF) 를 실시였다. 염색방법은 각각의 protocol을 준수하였으며, 단백질 지표 또한 Immunoblot (IB) 방법을 이용하여 분석하였다.

○ Immunoblot (IB)

면역학적 방법으로 시그널 단백질을 검출하기 위하여 Immunoblot을 실시하여 분석하였다. 단백질 추출을 위하여 RIPA buffer를 사용하였다. 동물조직을 RIPA buffer에 용해한 후 단백질 정량을 하였다. 정량된 샘플은 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 한 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 3% BSA를 함유한 TBST에 담그고 1시간동안 blocking 처리 후 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 TBST로 5분마다 3회 세척하였다. 그리고 2차 antibody를 이용하여 상온에서 1시간 반응 후 TBST로 10분마다 3회 세척하였다. 단백질의 발현정도를 분석하기 위해 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 이용하여 분석하였다.

○ Immunofluorescence (IF)

적출한 동물조직을 파라핀을 이용하여 3 μ m의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 파

라핀의 제거를 위해 xylene, ethanol을 이용하여 합수시킨 후 50 mM TBS (0.05% tween 20) 용액을 이용하여 antigen retrieval과정을 진행하였다. 0.5% TritonX-100 in PBS 용액에 10분간 담근 후 blocking buffer에서 1시간 동안 blocking 과정을 실시하였다. 그 후 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS로 5분마다 3회 세척하였다. 그리고 2차 antibody를 이용하여 상온에서 1시간 반응 후 PBS로 10분마다 3회 세척하였다. DAPI가 함유되어 있는 mounting용액을 이용하여 mounting 과정을 수행한 후 형광현미경을 이용하여 각 단백질의 발현 위치를 관찰하였다.

㉞ 동물실험

동물실험을 위하여 C57BL/6 6주령 암컷 쥐를 이용하여 1주일간의 적응기간 후, 총 2주간 200 mg/kg의 농도로 쌍별귀뚜라미 추출물 (GBE)을 경구 투여 하였다. 이에 대한 음성대조군으로 동일 부피의 생리식염수를 사용하였고 양성대조군으로 동일 농도의 silymarin을 사용하였다. 이후, 간 손상을 유발하기 위해 알코올 투여를 실시하였고, 6 g/kg의 농도로 12시간 간격을 두어 3번 투여한 뒤 6시간 뒤에 해부하여, 혈액, 간, 장 조직을 적출하여 분석에 이용하였다.

㉟ 세포실험

세포실험을 위하여 쥐의 대식세포주의 일종인 RAW 264.7 세포를 5% CO₂, 37°C 습윤 배양기에서 배양하였다. 상기 배양세포에 쌍별귀뚜라미 추출물을 처리한 후 1시간 뒤에 LPS 500 ng/ml을 처리하여 염증반응을 유도하였다. LPS 처리 후 30분 뒤 세포를 회수하여 IB 방법을 통하여 대표적 염증 반응의 세포기작으로 알려진 MAPK의 활성도를 측정하였다. 또한, 염증반응의 대표적 지표로 사용되는 염증성 사이토카인을 측정하기 위해 상기세포를 배양한 후, 쌍별귀뚜라미 추출물 처리 1 시간 뒤에 LPS 500 ng/ml을 처리 후 6시간 뒤 상층액을 회수하여 ELISA법으로 대표적 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 를 측정하였다. 또 다른 염증반응의 대표적 지표로 사용되는 Nitric oxide 함량을 측정하기 위해 LPS 처리 후 24시간 뒤에 상층액을 회수하여 Griess시약반응 후 540 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

Table 11. list of primary antibody

Primary antibody	Clone	Company	Catalog No.	Dilution
FAS	Polyclonal	Thermo	Pa1-32355	1:1000 (WB)
ACC	Polyclonal	Thermo	Pa5-17564	1:1000 (WB)
SREBP-1	Polyclonal	Thermo	Pa1-46142	1:500 (WB) 1:200 (IF)
c-Caspase3	Polyclonal	Cell signaling	#9662	1:1000 (WB) 1:300 (IF)
c-PARP	E51	ABcam	ab32064	1:2000 (WB)
Lamin B	C-20	Santa Cruz	Sc-6216	1:2000 (WB)
Bcl-2	100/D5	ABcam	ab692	1:500 (WB)
p53	Pab 1801	Santa Cruz	Sc-98	1:1000 (WB)
8-OH-dG	15A3	ABcam	Ab62623	1:200 (IF)
MDA	11E3	NOVUS	NBP2-59367	1:50 (IF)
IL-1 β	Polyclonal	ABcam	Ab9722	1:50 (IF)
F4/80	C-7	Santa Cruz	Sc-377009	1:300 (IF)
LPS	WN1 222-5	Hycult Biotech	HM6011	1:100 (IF)
p-JNK	EPR5693	ABcam	Ab124956	1:1000 (WB)
JNK	EPR16797-211	ABcam	Ab179461	1:1000 (WB)
p-p38	Polyclonal	ABcam	Ab47363	1:1000 (WB)
p38	M138	ABcam	Ab31828	1:1000 (WB)
TLR4	Polyclonal	ABcam	Ab13867	1:1000 (WB)
p-MLCK	Polyclonal	ABcam	Ab200809	1:1000 (WB)
p-ROCK	Polyclonal	ABcam	Ab203273	1:1000 (WB)
p-srcFK	D49G4	Cell signaling	#6943	1:1000 (WB)
β -actin	C4	Santa Cruz	Sc-47778	1:2000 (WB)

② 연구결과

㉞ 식용곤충 추출물의 항산화 활성

알코올성 간손상 보호에 있어서 항산화 활성이 중요한 역할을 차지하므로, 식품의약품안전처에서 식품원료로 인증한 7종의 곤충 추출물의 항산화 활성을 평가하였다. 열수, 70% 에탄올 및 100% 에탄올을 추출용매로 하여 각각의 항산화 활성을 평가한 결과, 열수 추출을 통한 쌍별귀뚜라미의 항산화능이 상대적으로 높은 것을 확인하였다. 또한 7종의 곤충 소재 중 쌍별귀뚜라미의 경우 활성산소가 주요원인으로 작용하는 노화 및 비만에 보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있지만 알코올성 간손상 및 질환에 대한 상기 소재의 보호 효과는 미미한 상태이며, 더욱이 이에 대한 분자기작의 연구는 이루어지고 있지 않

고 있는 실정임. 이에 쌍별귀뚜라미 소재의 알코올성 간손상 및 질환에 대한 보호효과를 증명하고 더 나아가 이에 대한 분자기작을 증명하여 상기 소재의 기능성 식품으로의 가능성을 증명하고자 한다(Fig. 15).

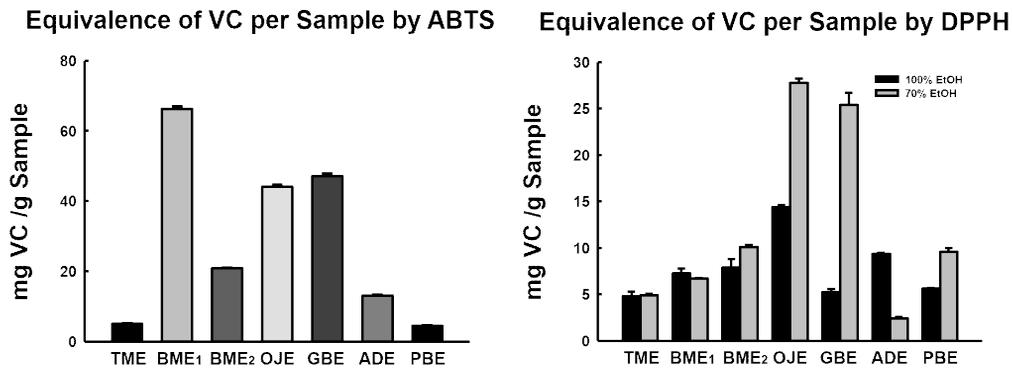


Fig. 15. Antioxidant capacity of edible insects.

VC: Vitamin C, TME: 갈색거저리유충 (*Tenebrio molitor*), BME1: 누에번데기 (*Bombyx mori*), BME2: 백강잠 (*Bombyx mori*), OJE: 벼메뚜기 (*Oxya japonica*), GBE: 쌍별귀뚜라미 (*Gryllus bimaculatus*), ADE: 장수풍뎅이유충 (*Allomyrina dichotoma*), PBE: 흰점박이꽃무지유충 (*Protaetia brevitarsis*)

㊤ 알코올성 지방간 유도에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 보호 효과

본 연구에서, 12시간 간격으로 알코올을 3회 투여할 시 (6 g/kg) 유의적으로 지방간이 유도된 것을 확인하였으며, 이는 급성 알코올성 간 손상 모델에 대한 이전 연구결과와 일치하였다. 간 조직 내에서 알코올 투여에 의해 과량이 lipid droplet 축적된 것을 확인하였고 (Fig. 16 A), triglyceride 함량 또한 알코올 투여시 증가하였지만 ((Fig. 16 B) 쌍별귀뚜라미 추출물 투여로 감소하였고, 대조군 대비 쌍별귀뚜라미 추출물 처리 그룹이 중성 지방을 30% 억제하는 것을 확인하였다, 이에 쌍별귀뚜라미 추출물이 알코올성 지방간 현상을 보호함을 확인하였다.(Fig. 16).

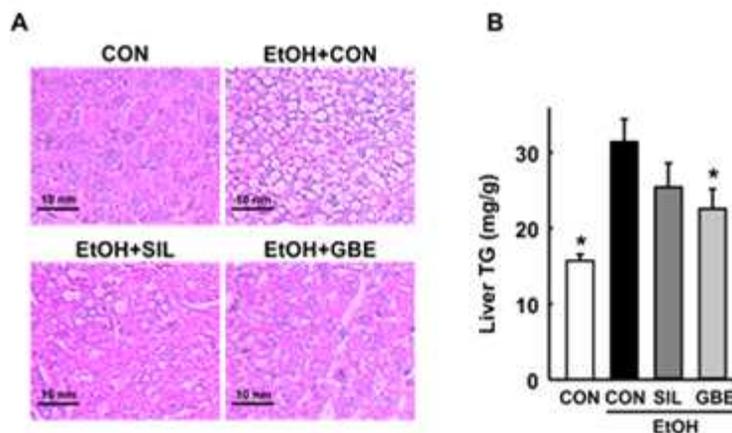


Fig.16. Protective effects of GBE against alcohol-induced hepatic steatosis.

(A) Representative H&E staining of the liver, (B) Liver TG contents, CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatus*. Data are shown as means \pm SEM (n =

4 for A and n = 8 for B). * $P < 0.05$ vs EtOH control group.

㊤ 알코올성 지방생합성 유도에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 보호 효과

지방생합성의 대표적인 지표인 FAS와 ACC, SREBP-1의 단백질 발현량을 확인하였다. SREBP-1의 경우 IF를 통해 단백질의 발현 위치를 확인할 수 있었고 알코올 투여그룹에서 증가한 후 쌍별귀뚜라미 추출물의 투여시 감소되는 것을 확인하였다. 나머지 해당 지표들 역시 이 알코올 투여 그룹에서 증가한 것을 보였고, 쌍별귀뚜라미 추출물의 투여시 유의적으로 감소되는 것을 IB를 통해 확인하였다. 이에 쌍별귀뚜라미 추출물이 알코올에 의한 지방간 억제에 있어 positive control로 사용된 silymarin 보다 더 효과적임을 증명하였다(Fig. 17).

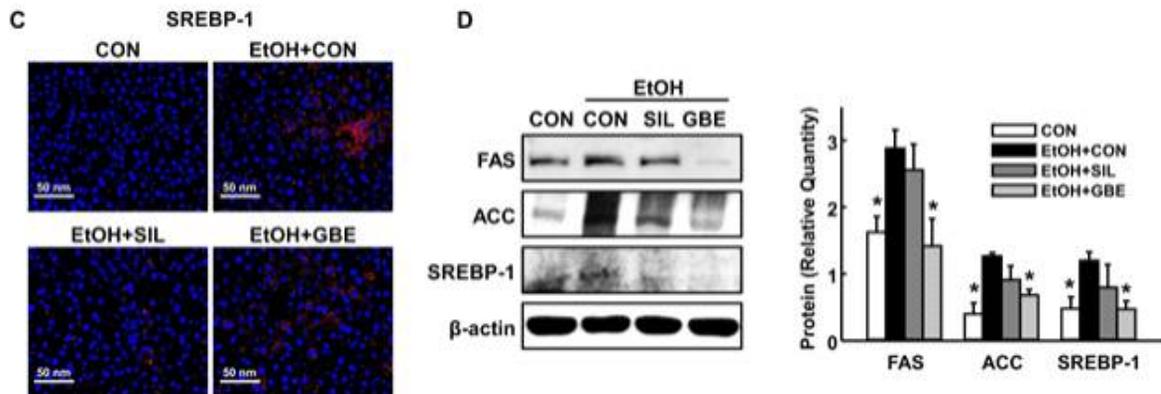


Fig. 17. Protective effects of GBE against alcohol-induced hepatic steatosis.

(C) Representative immunohistochemical staining for hepatic SREBP-1 (red), (D) Western blot of hepatic FAS, ACC, and SREBP-1 expression with quantitative data. CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatu s*. Data are shown as means \pm SEM (n = 4 for C and n = 8 for D). * $P < 0.05$ vs EtOH control group.

㊤ 알코올에 의해 유도된 hepatic apoptosis에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 보호 효과

Apoptosis에 의한 간 손상은 알코올성 간 질환의 대표적인 병리학적 요인으로 알려져 있다. 이를 확인하기 위해 TUNEL 분석을 실시하고 apoptosis의 주요 지표들의 단백질 수준을 조사하였다. 알코올 처리 그룹에서 TUNEL signal과 c-caspase 3의 증가된 수준을 통해(Fig. 18. A, B) 간 조직에서의 apoptosis를 확인할 수 있었다. TUNEL의 경우 대조군 대비 쌍별귀뚜라미 추출물을 처리 그룹이 TUNEL signal을 69% 억제하며, c-caspase 3의 경우 68% 억제하는 것을 확인하였다. 또한 immunoblot 기법을 통하여 cleaved PARP 및 lamin B, cleaved caspase-3의 단백질 발현이 증가된 것과 Bcl-2 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이들 지표들은 쌍별귀뚜라미 추출물 처리시 유의적인 수준으로 억제되었으며, 더욱이 DNA 손상 반응에 의해 증가되고 pro-apoptotic factor의 전사 활성화를 유도하는 종양 억제 인자 p53은 알코올 처리그룹에서 증가 되었으나, 쌍별귀뚜라미 추출물 처리 그룹에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 18. C).

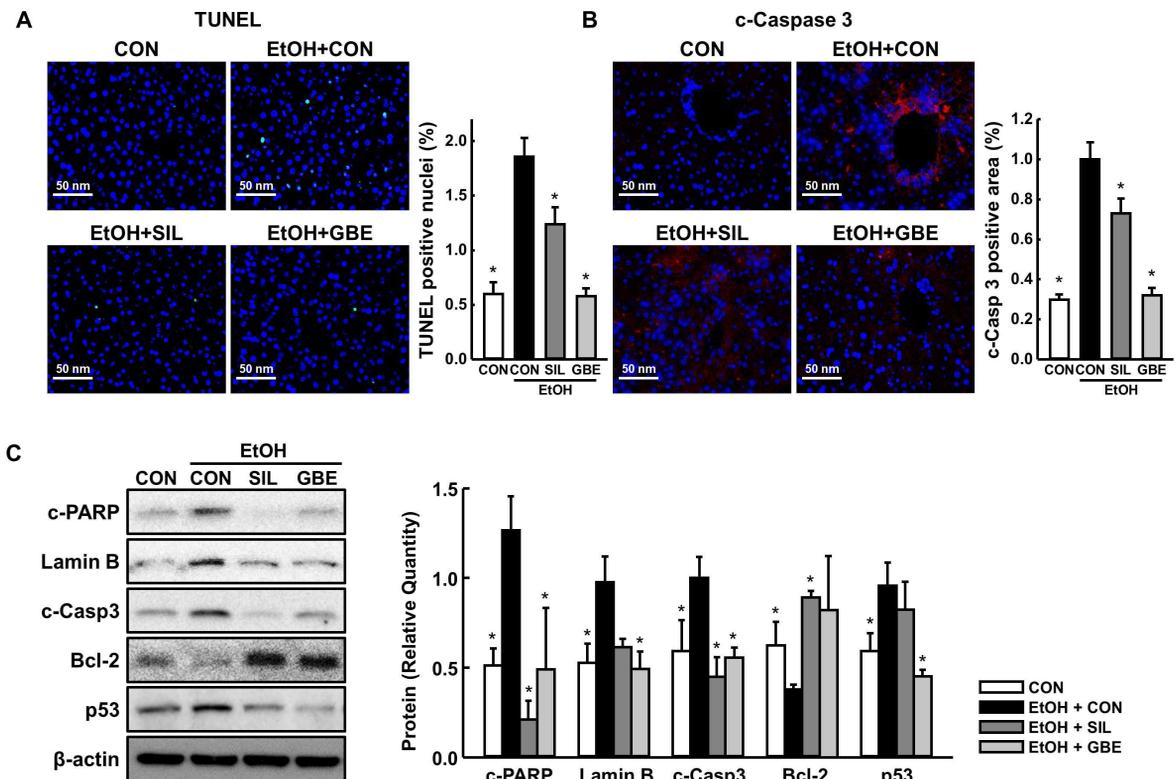


Fig 18. Protective effects of GBE against alcohol-induced hepatic apoptosis and oxidative stress.

Representative immunohistochemical staining of liver for (A) TUNEL (green) and (B) cleaved caspase-3 (red) with corresponding quantitative data. (C) Western blot of hepatic cleaved PARP, lamin B, cleaved caspase-3, Bcl-2, and p53 expression with quantitative data. CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatus*. Data are shown as means \pm SEM (n = 4 for A, B and n = 8 for C). * P < 0.05 vs EtOH control group.

㊦ 알코올에 의해 유도된 간 조직 내 산화스트레스에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 보호 효과

알코올에 의해 과생성된 ROS는 산화적 스트레스를 통해 apoptosis를 유도하기 때문에 산화스트레스의 주요 지표들의 단백질 수준을 측정하였다. Immunofluorescence를 통해 알코올 처리에 의해 증가된 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG)과 malondialdehyde (산화적 DNA 손상과 지질 과산화의 대표 생성물)이 silymarin과 쌍별귀뚜라미 추출물 처리에 의해 감소된 것을 확인하였다(D, E). 이에 쌍별귀뚜라미 추출물이 ROS에 의한 산화스트레스 억제를 통해 상기 알코올성 hepatic apoptosis를 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

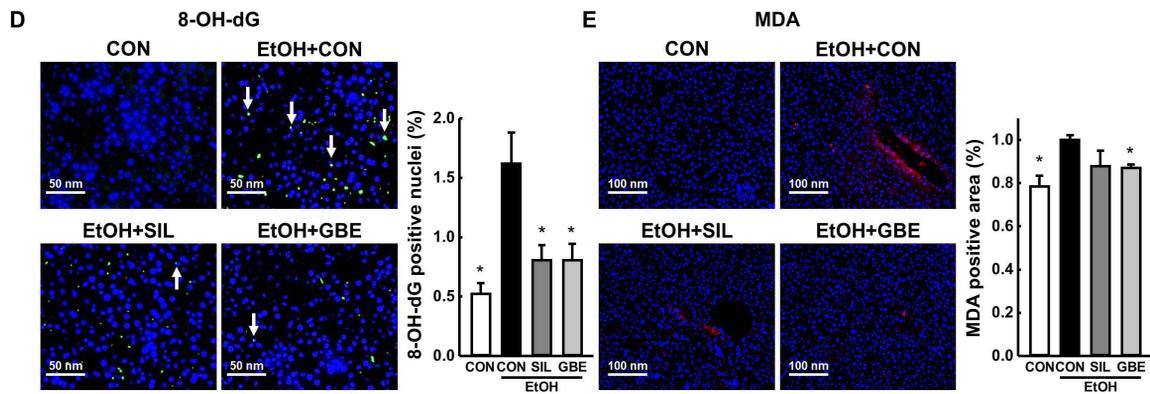


Fig 19. Protective effects of GBE against alcohol-induced hepatic apoptosis and oxidative stress.

Representative immunohistochemical staining of liver for (D) 8-OHdG (green) and (E) malondialdehyde (red) with corresponding quantitative data. CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatus*. Data are shown as means \pm SEM (n = 4). * P < 0.05 vs EtOH control group.

㉞ 알코올에 의해 유도된 간 조직 내 Kupffer cell infiltration 과 염증반응에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 억제 효과

Kupffer cell 활성화와 관련된 염증 반응은 만성 및 급성 알코올성 간 손상에 야기시키는 주요 메커니즘으로 알려져 있다. 간 조직 내 Kupffer cell의 활성을 확인하기 위해 대표적 마커인 F4/80 발현량을 immunofluorescence를 통하여 관찰하였다. F4/80는 알코올 처리그룹에서 발현되는 것을 확인하였으며, silymarin 및 쌍별귀뚜라미 추출물 처리에 의해 감소된 것을 확인하였다 (Fig. 20. A). 또한 알코올 처리그룹에서 증가된 LPS 와 IL-1 β 의 발현량이 silymarin과 GBE에 의해 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 20. B, C).

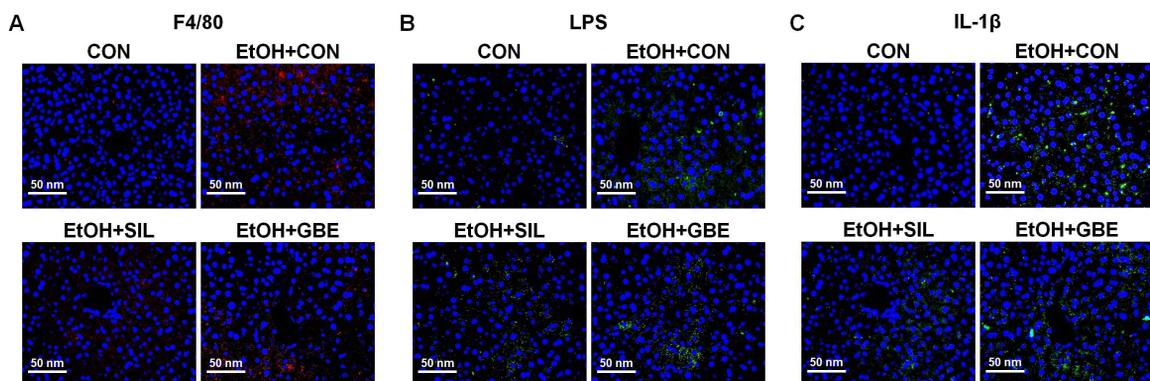


Fig 20. Effects of GBE on alcohol-induced Kupffer cells activation and LPS-stimulated inflammatory response in macrophages.

Representative immunohistochemical staining of liver for (A) F4/80 (red, Kupffer cells marker), (B) lipopolysaccharide (green), and (C) interleukin-1 β (green). CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatus*. Data are shown as means \pm SEM (n = 4). * P < 0.05 vs EtOH control group.

㉔ LPS-induced macrophage (Kupffer cell model) 에서 inflammatory signaling에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 억제 효과

장내 endotoxin은 toll-like receptor 4 (TLR4) 신호 전달을 통한 Kupffer cell 활성화의 유도인자로 작용하기 때문에, Kupffer cell 활성화의 모델로서 대식세포의 일종인 RAW 264.7 세포주를 사용하여 세포실험을 수행하였다. 쌍별귀뚜라미 추출물의 처리는 LPS에 의해 증가된 NO 및 IL-6의 방출을 감소시켰을 뿐 아니라 LPS에 의한 TLR4 발현의 증가와 JNK 및 p38의 인산화를 감소시켰다. 이는 쌍별귀뚜라미 추출물이 endotoxin 및 TLR4 매개 MAPK 신호를 억제함으로써 Kupffer cell 활성화를 억제시킬 수 있음을 보여준다.

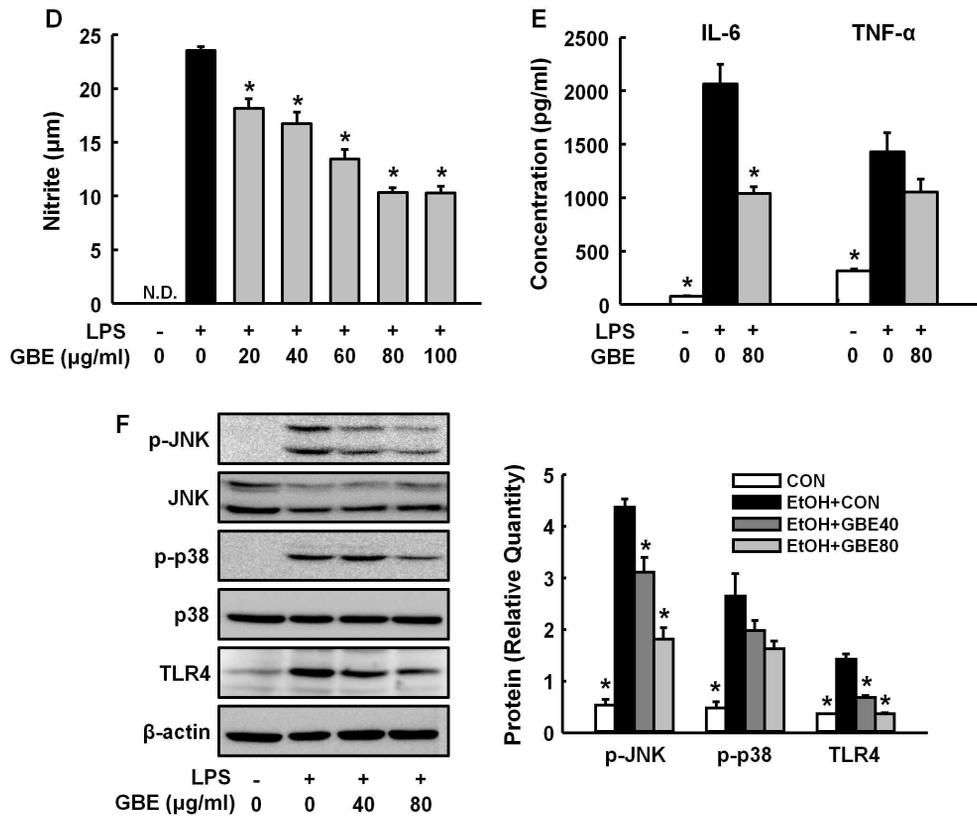


Fig 21. Effects of GBE on alcohol-induced Kupffer cells activation and LPS-stimulated inflammatory response in macrophages.

The released levels of (D) nitrite, (E) interleukin-6, and tumor necrosis factor- α from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. (F) Western blot of p-JNK, total JNK, p-p38, total p38 and TLR4 from macrophage cell extracts with quantitative data. CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatus*. Data are shown as means \pm SEM (n = 6). * $P < 0.05$ vs LPS control group.

㉕ 알코올에 의해 유도된 장 투과성 증가와 장내 산화스트레스에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 보호 효과

알코올은 tight junction 단백질의 인산화를 통해 장 투과성을 증가시키고, endotoxin의 간으로의 유입에 의한 inflammation을 유도하였다. 알코올 투여에 의한 장 조직 내 용모의

구조적 변화를 통해 장조직의 손상 여부를 확인하였을 때, 장 조직 내 용모의 손상이 일어났으며, 쌍별귀뚜라미 추출물과 실리마린 처리그룹에서 손상이 감소됨을 H&E 염색법을 통해 확인하였다(Fig. 22. A). 특히 쌍별귀뚜라미 추출물은 알코올에 의한 장내 MLCK 및 ROCK, SrcFK 단백질(tight junction의 주요 지표들)의 phosphorylation 수준을 억제하였으며, 알코올 투여에 의해 증가된 8-OH-dG의 발현량이 감소됨을 확인하였다 (Fig. 22. B, C). 이에 알코올에 의해 유도되는 tight junction remodeling 과 이로 인한 장 투과성 증가를 쌍별귀뚜라미 추출물이 억제하며, 이는 산화스트레스의 억제 작용과 관련이 있음을 확인하였다.

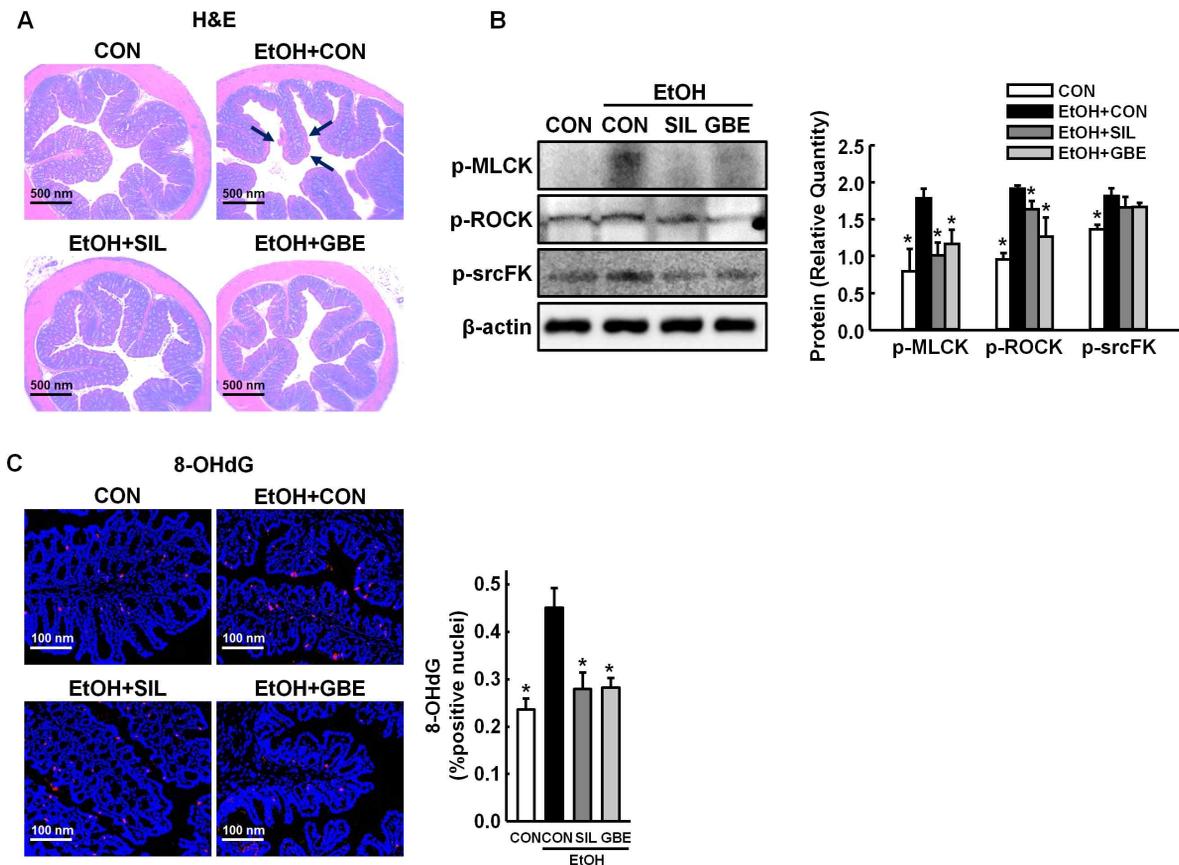


Fig 22. Protective effects of GBE against alcohol-induced intestinal hyperpermeability and oxidative stress

(A) Representative H&E staining of the small intestine, (B) Western blot of intestinal p-MLCK, p-ROCK, and p-srcFK with quantitative data, (C) Representative immunohistochemical staining for intestinal 8-OHdG with quantitative data. CON, control; SIL, silymarin; GBE, water extract of *G. bimaculatus*. Data are shown as means \pm SEM (n = 4 for A and C and n = 8 for B). * $P < 0.05$ vs EtOH control group.

Ⓣ 알코올성 간 손상에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 억제 작용기전

알코올에 의해 유도된 ROS와 산화스트레스의 증가는 지질생합성 과정의 활성화를 통한 hepatic steatosis 와 DNA damage response를 통한 apoptosis를 증가시켰다. 또한 ROS는 gut barrier disruption 과 LPS의 간 조직 내 침투를 야기시키며, 이는 kupffer cell

activation을 통한 염증반응의 증가를 유도하였다. 본 연구에서 쌍별귀뚜라미 추출물은 장 및 간 조직 내에서 ROS에 의해 유도되는 산화스트레스를 억제함으로써 알코올에 의해 유도되는 간 손상에 대해 보호작용을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

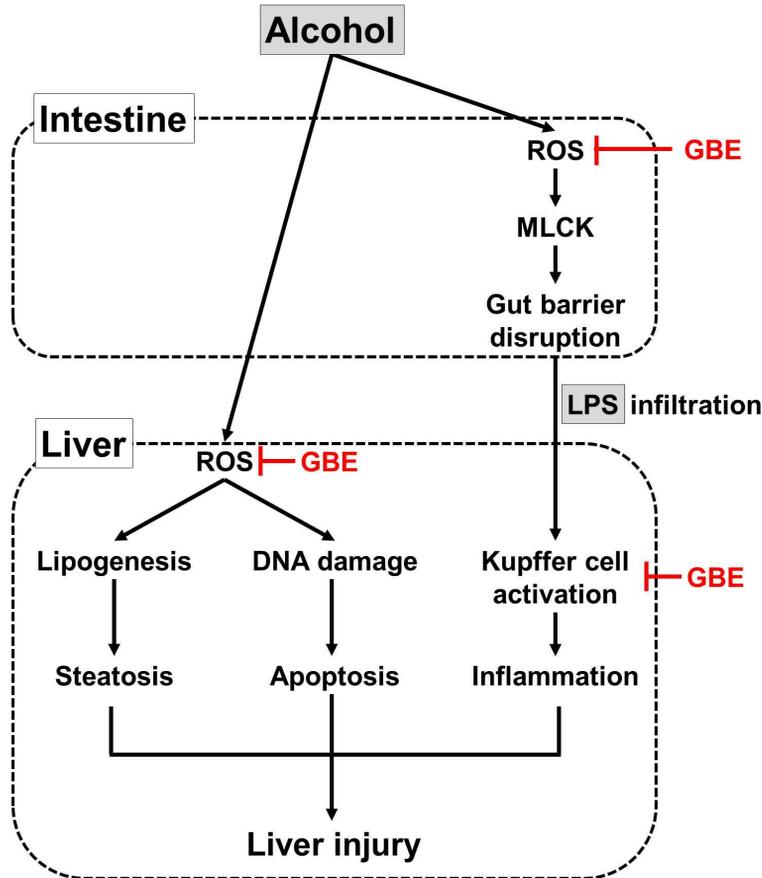


Fig 23. Proposed mechanism of protection of GBE against alcohol-induced liver injury. Black and red lines indicate stimulatory and inhibitory actions, respectively.

㉔ 건강기능식품 기능성평가 가이드라인 (간 건강)에 포함된 바이오마커 비교

본 연구에서 측정된 바이오마커 중 [기능성평가 가이드라인]에 제시된 목록에 포함되는 지표들은 간 기능 관련 효소(ALT, AST), 간 세포 사멸(caspase, Bcl-2, p-p38), 조직병리학적 변화(H&E), 간 중성지방, 지방합성 및 분해 관련 효소와 전사인자, 지질과산화물(MDA), cytokines(IL-6, TNF-alpha, IL-1beta) 등이며, 향후 기능성분 규명에 대한 연구를 통해 간 섬유화, 생체 이물 배설 및 인슐린저항성에 대한 유효성 평가를 추가적으로 실시 할 필요가 있다고 판단된다.

다. 쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 알코올성 간 손상 보호용 기능성 식품 개발

① 문헌연구를 통한 지표성분 선정

쌍별귀뚜라미의 일반적으로 알려진 주요성분은 단백질이며, 이번 연구에서 건강기능성 식품 개발을 위하여 문헌연구를 통하여 지표성분을 선정하였다. 문헌연구를 통해 후보물질로서 glycosaminoglycan을 선정하였고, Glycosaminoglycan 중 hyaluronic acid 와 Chondroitin sulfate sodium 두 물질이 liver injury 및 hepatotoxicity에 보호 효능이 있음을 문헌 조사를 통해 확인되었다.

Table 11. References of compounds effects

Compounds	Effects	References
Glycosaminoglycan	Anti-inflammatory effect on adjuvant-treated chronic arthritis	Ahn, M. Y., et al., 2014
Glycosaminoglycan	Antilipidemic effect	Ahn, M. Y., et al., 2016
Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate sodium	Protective effect of acute liver injury	Campo, G. M., et al., 2004
Chondroitin sulfate sodium	Protective effect of hepatotoxicity	Ha, B. J. et al., 2003

쌍별귀뚜라미 추출물의 콘드로이친황산함량을 공인분석기관에서 분석결과 Fig. 24 와 같이 2.38%로 확인되었다.

그러나 이는 콘드로이친황산이 쌍별귀뚜라미 추출물의 기능성분 후보물질 중 하나임을 의미하며, 향후 콘드로이친황산을 포함한 다른 후보 물질들과 함께 이들의 효능 검증을 위한 추가 연구가 필요하다고 판단됨.

제 D2018091694 호 문서확인												
시험·검사성적서												
제품명	쌍별귀뚜라미추출물	제조일자 (유통기한)										
의뢰인	업체명	고려대학교 세종산학협력단	성명									
	주소	세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511, 고려대학교 세종캠퍼스 내										
계좌번호		접수년월일	2018-09-17									
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018091694									
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-10-11 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>리알루론산(mg/g)</td> <td>불검출</td> <td>한아름</td> </tr> <tr> <td>판드로이친황산(%)</td> <td>2.38%</td> <td>강혜진</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 합니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과안은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 10월 11일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p> <p style="text-align: center;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	리알루론산(mg/g)	불검출	한아름	판드로이친황산(%)	2.38%	강혜진
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원										
리알루론산(mg/g)	불검출	한아름										
판드로이친황산(%)	2.38%	강혜진										



Fig. 24. Result of Chondroitin sulfate sodium content.

② 쌍별귀뚜라미 표준추출물 개발

㉞ 실험방법

- 추출 조건 확립

분쇄한 쌍별귀뚜라미 분말에 15배의 정제수 그리고 70% 주정을 각각 첨가하여 4시간 동안 환류 추출하여 각각의 추출물의 추출 수율, 조단백질 함량 그리고 지표성분의 함량을 확인하였다.

- 추출 시간 및 온도 조건확립

분쇄한 쌍별귀뚜라미 분말에 15배의 정제수 첨가하여 6시간 동안 100℃ 환류 추출 그리고 65℃ 12시간 환류추출하여 각각 추출 시간에 따른 추출물의 추출 수율을 확인하였다.

㉞ 실험 결과

- 추출 용매 조건 확립

정제수와 70% 주정을 이용하여 환류추출한 결과 추출수율은 70% 주정 추출물이 14%로 높게 나타났으며, Chondroitin sulfate sodium 함량은 정제수 추출방법이 2.5%로 높게 나타났다. 항산화 실험결과를 바탕으로 추출용매를 정제수로 결정하였다(Table 12).

Table 12. Result of extraction solvent condition

	Extraction Yield(%)	Crude protein(%)	Chondroitin sulfate sodium
Water extract	12%	66.2%	2.5%
70% EtOH extract	14%	66.2%	0.5%

- 추출 시간 조건 및 온도 조건확립

선행연구에서 사용한 추출방법인 65°C 12시간과 최적의 생산단가를 고려한 100°C 6시간을 비교한 결과 100°C 추출조건에서 65°C 보다 높은 추출 수율이 확인되었다. 이 결과를 바탕으로 추출온도는 100°C 추출 시간은 6시간으로 결정하였다.

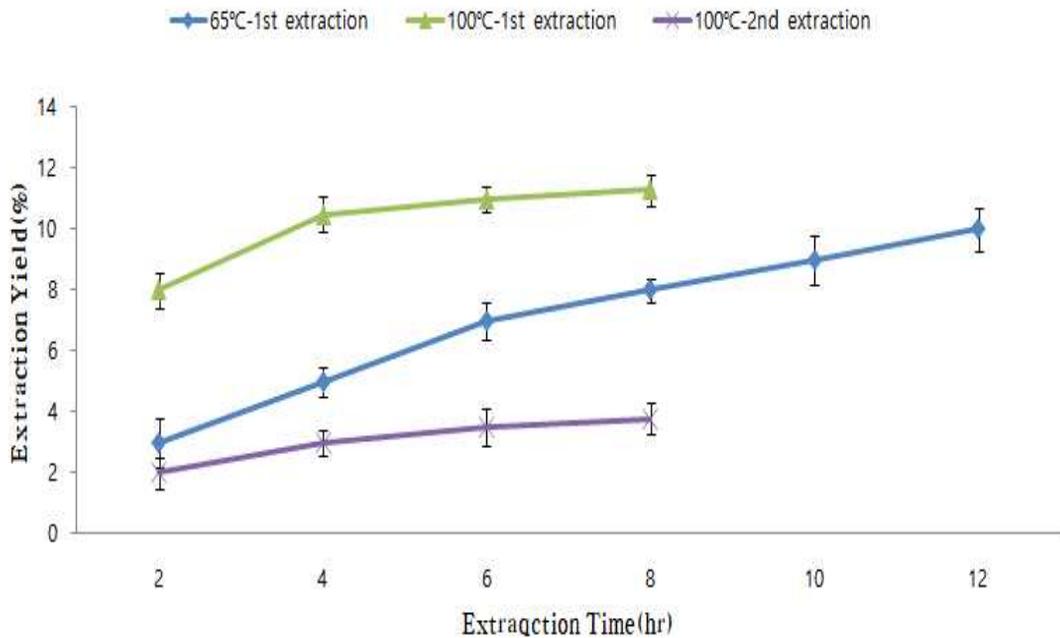


Fig. 25. Result of extraction yield by time and temp..

③ 표준화 및 품질관리를 위한 분석법 개발 및 확립

㉔ 분석법개발

○ HPLC 조건

- 컬럼: Shodex Sugar KS-801, 300 x 8mm, Shodex Sugar KS-G, 50 x 6mm (guard column)
- 컬럼온도: 35°C
- 유속: 0.5 ml/min.

- 주입량: 10 μ l
- 검출기: UV 210 nm
- Runtime: 35 min.
- 이동상: 100% 10mM phosphate buffer

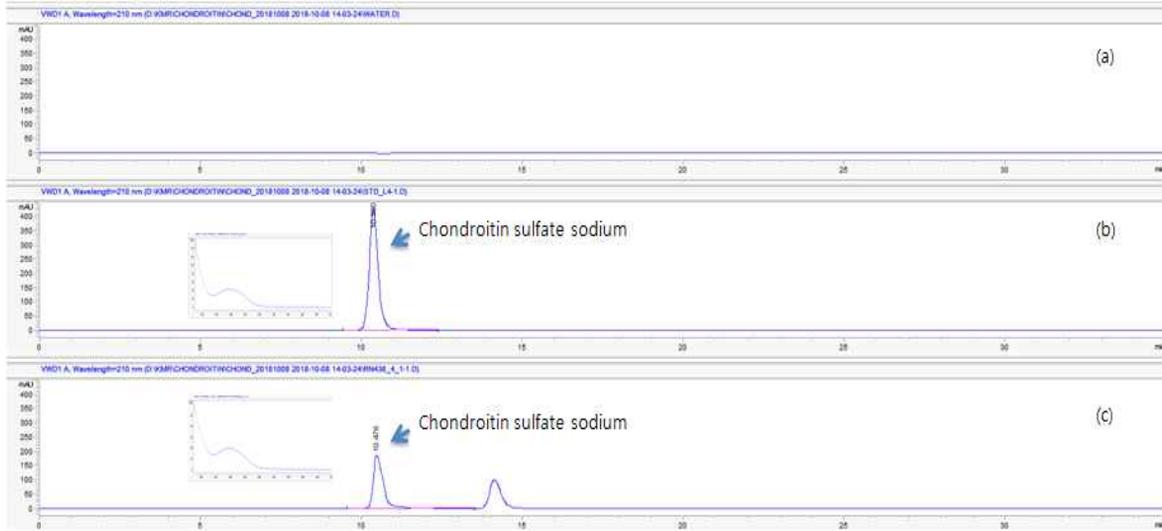


Fig. 26. HPLC chromatogram of extraction solvent(a), standard(b) and Extract of *Gryllus bimaculatus*.

㊤ 분석법 validation

○ 목적

쌍별귀뚜라미 추출물의 분석법은 Chondroitin sulfate sodium 확인 및 정량을 위한 HPLC/UV 법으로, 외부표준물질, ionexchange resin gels(sulfonated styrene-divinylbenzene copolymer), UV detector와 이동상으로는 인산 buffer를 사용하였다.

이 분석법의 검증은 직선성, 반복성, 검출한계, 정량한계, 정확성(회수율) 및 정밀성 등을 평가하여 검증하였다.

○ 직선성

Chondroitin sulfate sodium의 표준물질을 분석농도의 25%~400%에 해당하는 다섯 개의 농도에서 평가한 결과, 상관계수 (r^2)가 0.999 이상의 직선성을 확인하였다.

Ingredient	Range(ug/ml)	Correlation coefficient (r^2)
Chondroitin sulfate sodium	0.064-0.101ug/ml	0.9999

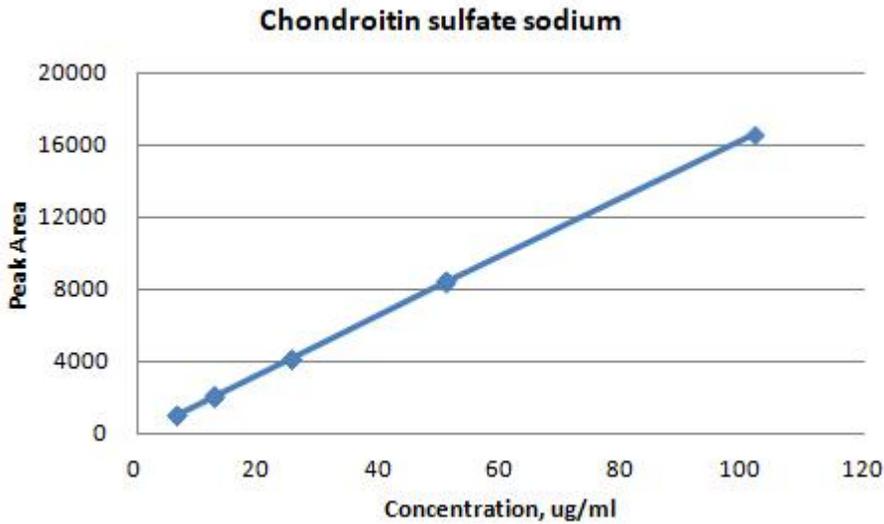


Fig. 27. Linearity of Chondroitin sulfate sodium.

○ 검출한계 및 정량한계

본 분석법의 검출한계 및 정량한계는 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 결정하였고, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma / S$$

여기서 σ 는 y 절편의 표준편차이고, S는 검량선의 기울기이다.

Ingredient	Slope	Standard deviation of y intercept	Detection limit (ug/mL)	Quantitative Limit (ug/mL)
Chondroitin sulfate sodium	164.08	21.95	0.44	1.34

○ 정확성(회수율)

시료 RN438-4-1에 표준품을 시료 분석농도의 50%, 100%, 200%가 되도록 각각 첨가한 후 회수율을 측정하였다. 실험한 농도 범위에서 99.40% ~ 101.29%의 회수율을 나타내었다.

Table 13. Recovery test(accuracy) result of HPLC method validation

Sample	Sample conc. (ug/ml)	Add conc. (ug/ml)	Detection conc. (ug/ml)	Theoretical conc. (ug/ml)	Recovery (%)
RN438-4-1	12.60	12.75	25.68	25.35	101.29
RN438-4-1	12.60	25.50	38.38	38.10	100.73
RN438-4-1	12.60	51.00	63.22	63.60	99.40

○ 정밀성

정밀성은 쌍별귀뚜라미 추출물 3 Lot에 대하여 한 시료당 세 개의 시료 용액을 준비하여 평가하였다. 아래 Table에서 볼 수 있는 바와 같이 Chondroitin sulfate sodium의 상대표준편차는 2% 이하였다.

Table 14. Precision test result of HPLC method validation(unit: %)

Code	Content(%)	Average(%)	RSD
RN438-4-1-1	2.25		
RN438-4-1-2	2.26	2.25	0.61
RN438-4-1-3	2.24		
RN438-4-2-1	2.23		
RN438-4-2-2	2.21	2.22	0.68
RN438-4-2-3	2.23		
RN438-4-3-1	2.24		
RN438-4-3-2	2.25	2.24	0.46
RN438-4-3-3	2.24		

○ 반복성

반복성은 표준용액을 6회 반복 주입하여 평가하였다. 머무름 시간 및 peak 면적에 대한 Chondroitin sulfate sodium의 상대표준편차는 1% 이하였다.

Table 15. Repeatability test result of HPLC method validation

NO	Chondroitin sulfate sodium			
	Peak area	Relative standard deviation (%)	R.T (min)	RSD (%)
1	4200.74	0.03	10.38	0.02
2	4200.10		10.38	
3	4200.55		10.38	
4	4198.16		10.38	
5	4198.21		10.38	

○ 특이성

추출용매, 표준용액 및 쌍별귀뚜라미 추출물의 크로마토그램을 비교함으로써 본 분석법의 특이성을 확인하였다. Fig. 2의 크로마토그램에서 보는 바와 같이 표준용액과 쌍별귀뚜라미 추출물에서의 Chondroitin sulfate sodium의 peak area는 추출용매의 크로마토그램에서 발견되지 않았다. 따라서 이 분석법은 Chondroitin sulfate sodium 확인 및 정량에 특이성을 갖는 분석법이라 할 수 있다.

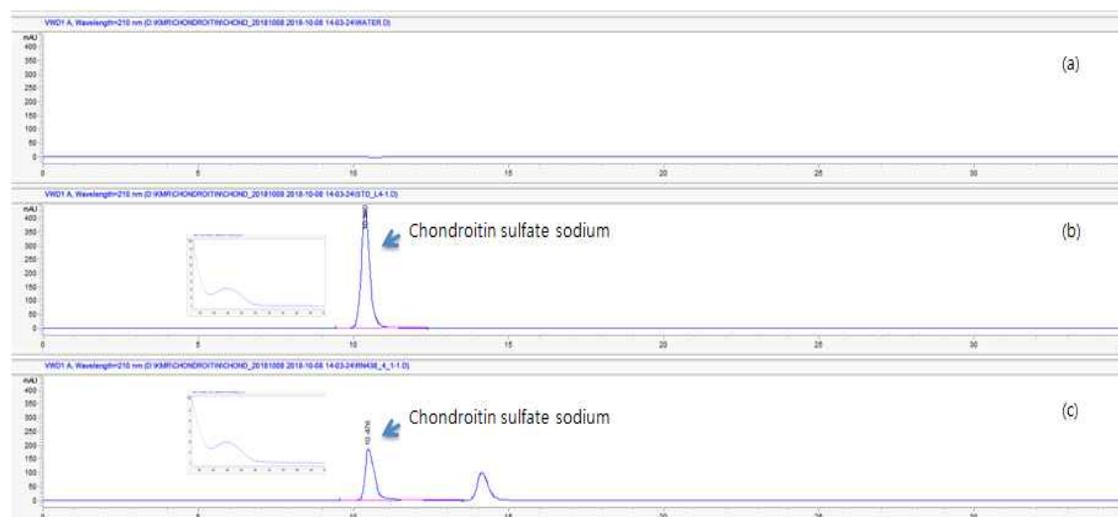


Fig. 28. HPLC chromatogram of red clover and hop complex.

(a) extraction solvent, (b) standar, (c) Extract of *Gryllus bimaculatus*

○ 결론

HPLC/UV를 사용하여 Chondroitin sulfate sodium을 정량하는 이 분석법이 적합한 방법임을 검증하기 위하여 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성 등에 대하여 평가하였다. 검증결과 이 분석법은 쌍별귀뚜라미 추출물에서 Chondroitin sulfate sodium을 정량

할 수 있는 적합한 방법이라는 것이 검증되었다.

④ 원료 Pilot 생산공정개발

㉞ 실험 방법

- 생산 효율성을 높이기 위한 수율 증대실험

용매비를 15배에서 10로 감소하여 1회차 4시간 추출 2회차 3시간 3회차 3시간 추출하여 추출 수율을 비교하였다.

- 여과 조건 확립

추출물을 이용하여 3 um, 100 um 그리고 200 um 하우징 필터를 이용하여 여과 시 여과 압력 확인하였다(유속 50 L/min, 필터길이 250 mm).

- 건조 조건 확립

디스크형 spray dryer를 이용하여 디스크 rpm에 따른 분말의 회수율을 확인하였다.

㉟ 실험 결과

- 생산 효율성을 높이기 위한 수율 증대실험

추출 수율을 높여 생산단가를 낮추기 위하여 추출용매와 추출시간을 줄이는 실험을 실시하였다. 100°C 6시간 추출결과 추출 수율은 11%이고, 1차 추출 100°C 4시간 추출수율은 10.5% 그리고 2차 추출 100°C 3시간은 추출수율은 3%로 확인되었다. 2회 추출 총 수율은 13.5%로 100°C 6시간 1회 추출 대비 18.5% 추출 수율이 증가하였다. 이 결과를 바탕으로 100°C 1차 4시간 2차 3시간으로 추출조건을 결정하였다.

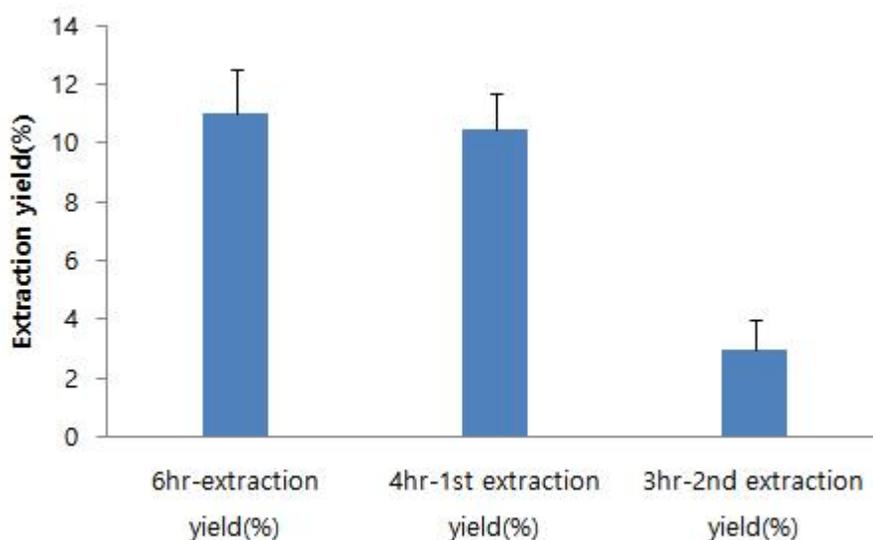


Fig. 29. Result of extraction yield by extraction times.

- 여과조건 확립

80°C 추출액을 하우징 필터를 이용하여 여과 입도에 따른 압력을 측정한 결과 두 추출에 모두 여과 시 내압이 발생하지 않았다. 따라서 일반적으로 추출물 제조공정에 사용되는

하우징필터, 필터백, 필터프레스 등 모든 필터를 사용 가능할 것으로 사료되며, 여과 입도 사이즈는 3um로 결정하였다.

Table 16. Internal pressure by filter particle size.

	Filter particle size		
	200 um	100 um	3 um
<i>Gryllus bimaculatus</i> Extract	0 kg/cm ²	0 kg/cm ²	0 kg/cm ²

- 건조 조건 확립

대량생산을 위해 spray dryer를 사용하여 DISC 회전 수에 따른 수율을 측정한 결과 20,000 rpm에서는 작은 분말 입자가 배기 쪽으로 배출되었고, 16,000 rpm에서는 챔버 벽면에 큰 분말입자가 붙는 현상이 발생하여 가장 적합한 회전 수는 18,000으로 사료된다. 이 결과를 바탕으로 기존에 Lab에서 사용해온 진공건조, 동결건조 그리고 대량생산에 사용되는 spray dryer 모두 건조공정에 사용 가능할 것으로 판단된다.

Table 17. Yield of *Gryllus bimaculatus* extract by spray dryer disc rpm

		Condition		
Yield(Brix%)		30 Brix %		
Pump(Hz)		40 Hz		
Inlet temp.		180 °C		
Out temp.		100 °C		
Cyclon pressure		70 kPa		
DISC rpm	16,000	18,000	20,000	
Yield(%)	88%	95%	93%	

㊤ 공정도

Pilot 제조공정 공정도는 Fig. 30과 같다.

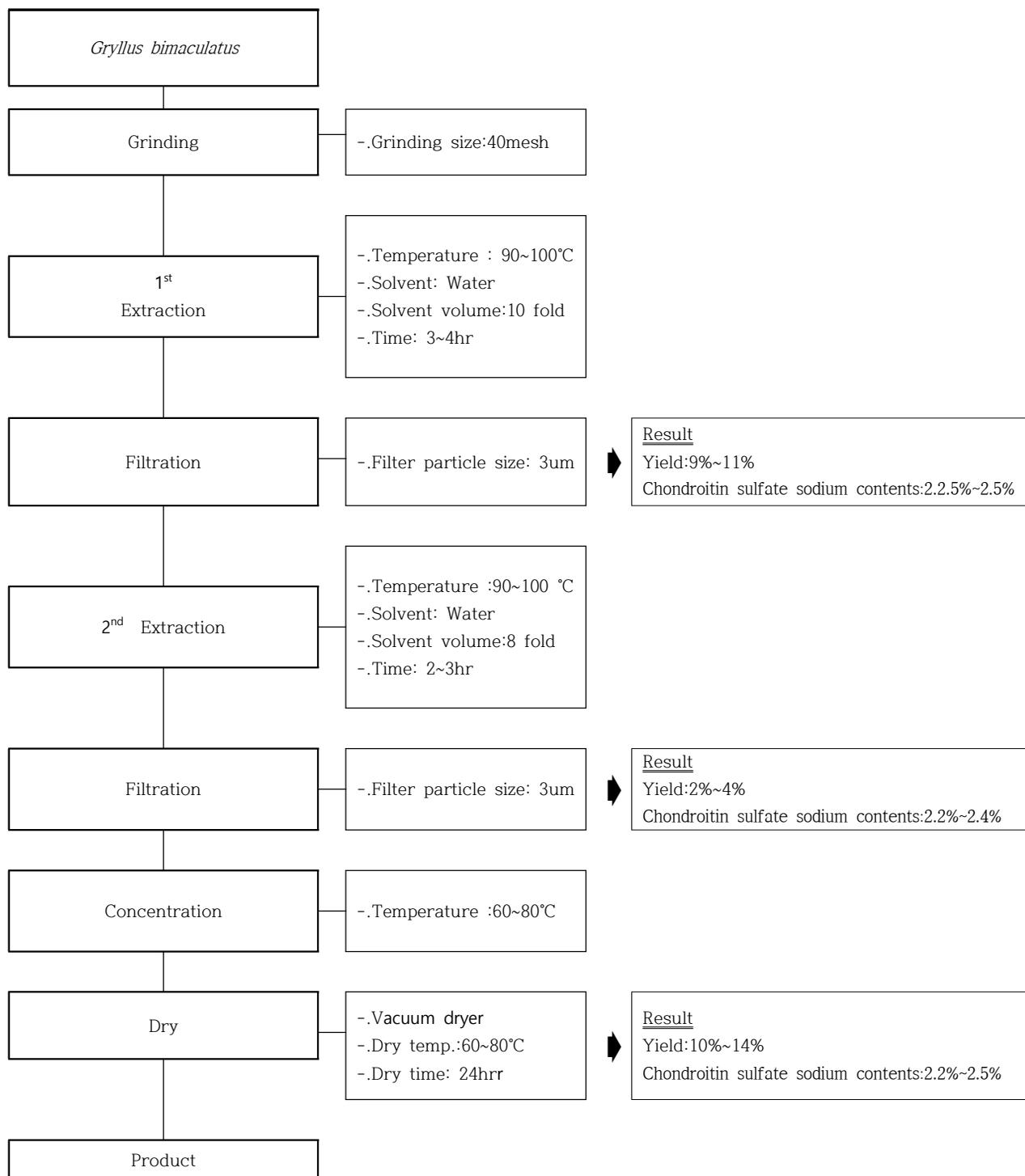


Fig. 30. Flow chart of pilot process

㉔ Pilot 공정 validation

- 실험 방법

Pilot 공정을 이용하여 250L-scale로 3회 반복하였다.

- 실험결과

250L scale로 3 batch 추출한 결과 아래 Table 18과 같이 수율과 지표성분 함량이 Lab-scale과 비슷한 결과를 보였다.

Table 18. Result of scale-up validation

	<i>Gryllus bimaculatus</i> extract		
	Batch 1	Batch 2	Batch 3
Yield	13.8%	14%	13.5%
Chondroitin sulfate sodiumContent	2.3%	2.29%	2.35%

㉕ 원료 기준규격

이상의 결과를 바탕으로 Table 19와 같이 기준규격을 정하였다.

Table 19. Specification of *Gryllus bimaculatus* extract

ATTRIBUTE	SPECIFICATION
Color and Appearance	brown powder
Loss on Drying	NMT 10%
Assay:	
Chondroitin sulfate sodium	NLT 2%
Crude protein(%)	NLT 60%
Particle Size	NLT 90% pass-60 mesh
Heavy Metals (Pb, Cd, Hg,As)	NMT 10 ppm
Arsenic	NMT 2 ppm
Total Aerobic Plate Count	
Total	NMT 1,000 cfu/g
Total Coliforms	Not detected
Mold & Yeast	NMT 1,000 cfu/g

⑤ 원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 실험

㉞ 원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 실험방법

쌍별귀뚜라미 추출물 안정성은 식품의약품안전청 고시 제 2011-15호(식품 등의 유통기한 설정 기준)를 근거로 하여 장기보존 및 가속 조건 하에서 보존하면서 성장, 수분, 미생물(세균, 진균 및 대장균군) 및 기능성분의 함량(Chondroitin sulfate sodium)에 대하여 시험하여 평가 진행 중이다.

㉟ 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성시험

쌍별귀뚜라미 추출물 NT-IPET-S1의 검체에 대하여 1년까지는 3개월 단위로 그 이후부터는 6개월 단위로 24개월의 안정성시험을 진행하여 안정성을 평가할 예정이다. 당해년도에는 9개월 실험을 완료하였다.

Table 20. Long-term stability test results

Month	Appearance	Moisture(%)	*CSS(%)	Total aerobic plate count	Mold and yeast	Total coliforms
0	Conform	4	2.26	<50 cfu/g	N.D	N.D
3	Conform	4	2.24	<50 cfu/g	N.D	N.D
6	Conform	4	2.25	<50 cfu/g	N.D	N.D
9	Conform	4	2.25	<50 cfu/g	N.D	N.D
12						
18						
24						

*Chondroitin sulfate sodium

㊱ 가속보존조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험

레드클로버 및 호프 복합물 NT-IPET-S1의 검체에 대하여 0, 1, 3, 6개월에서 안정성시험을 진행하여 안정성을 평가하였다. 0~6개월 시험결과는 모든 시험 항목의 기준에 적합하여, 가속보존조건에서 쌍별귀뚜라미 추출물의 안정성이 확인되었다.

Table 21. Short-term stability test results

Month	Appearance	Moisture(%)	*CSS(%)	Total aerobic plate count	Mold and yeast	Total coliforms
0	Conform	4	2.26	<50 cfu/g	N.D	N.D
1	Conform	4	2.24	<50 cfu/g	N.D	N.D
3	Conform	4	2.25	<50 cfu/g	N.D	N.D
6	Conform	4	2.25	<50 cfu/g	N.D	N.D

*Chondroitin sulfate sodium

㉔ 원료에 대한 28일 안전성실험

암수 Sprague-Dawley Rat을 이용하여 쌍별귀뚜라미 추출물을 28일간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하며 추출물에 대한 안전성을 평가하고 14일간의 회복군을 설정하여 추출물의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

㉕ 실험방법

○ 실험물질 용량 및 실험군 설정

모든 시험은 시험물질 쌍별귀뚜라미 추출물 1,000, 2,000, 3,000 mg/kg의 3개의 용량과 대조군(증류수)을 설정하여 주시험군은 암수 각각 10마리로 구성하였다. 또한, 대조군 및 3,000 mg/kg 투여군은 암수 각각 5마리를 추가하여 회복군을 설정하였다.

암수 각 50마리를 선발하여 순화종료일(군분리일)에 실시하였다. 선발한 동물은 각 군의 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 대조군 및 고용량군은 주 실험군 및 회복군을 포함한 군당 15마리, 저용량군 및 중용량군의 주 실험군만을 포함하여 군당 10마리로 실험군을 설정하였다.

○ 안전성 지표 측정

관찰기간 동안, 모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 반사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 투여개시일(투여전), 투여 개시 후부터 투여 28일까지 주 1회 체중을 측정하고, 회복기간에도 주 1회 체중을 측정하였다. 또한 부검일에 체중을 측정하나 절식 체중임으로 체중평가에서 제외하였다. 투여기간 및 회복기간에 1일간의 섭취량을 측정하여 1일간의 평균섭취량을 산출하였다.

○ 실험종료

모든 실험동물에 대하여 부검 전 약 16시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액의 2 ml을 EDTA에 넣은 후, 혈구 분석기로 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 혈액생화학 분석기를 이용하여 분석하였다(Table 22, 23). 전신의 장기 및 조직에 대한 육안검사를 실시하고 심장, 간, 신장, 비장, 부신, 고환, 난소, 폐 및 자궁 장기에 대한 무게를 측정하였다.

Table 22. Hematology parameters for 4 weeks safety study in rat model

Parameters	Unites	Method
Total erythrocyte count(RBC)	$\times 10^6$ cells/ μ L	Flow cytometry
Hemoglobin(HGB)	g/dL Flow	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
Hematocrit(HCT)	%	Calculated
RBC indices Mean corpuscular volume (MCV) Mean corpuscular hemoglobin (MCH) Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	fL pg g/dL	Flow cytometry Calculated Calculated
Total leukocyte count(WBC)	$\times 10^3$ cells/ μ L	Flow cytometry, Peroxidase stain
WBC differential count Neutrophils(NEU) Lymphocytes(LYM) Monocytes(MONO) Eosinophils(EOS) - Basophils(BASO)	%	

Table 23. Clinical chemistry parameters for 4 weeks safety study in rat mode

Parameters	Unites	Method
Alanine aminotransferase(ALT)	U/L	JSCC method (UV kinetic)
Aspartate aminotransferase(AST)	U/L	JSCC method
Alkaline phosphatase(ALP)	U/L	4-Nitrophenyl-phosphate 2Na(JSCC Transferable)
Blood urea nitrogen(BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
Creatinine(Crea)	mg/dL	Jaffe
γ -glutamyltranspeptidase(GGT)	U/L	IFCC
Total bilirubin(T-bili)	mg/dL	Vanadate oxidation method
Total protein(TP)	g/dL	Biuret method
Albumin(Alb)	g/dL	BCG method
Lactate dehydrogenase(LDH)	U/L	JSCC method
Total cholesterol(T-Chol)	mmol/L	CHOD PAP
Triglycerides(TG)	mmol/L	GPO PAP
Glucose	mmol/L	Hexokinase
calcium(Ca)	mmol/L	Arsenazo III chromogene
Na, K, Cl	mmol/L	potentiometry

㊤ 실험결과

○ Mortality

28일간 후보소재의 반복경구투여 기간 동안 암수 후보소재 투여군에서 (1,000, 2,000, 3,000 mg/kg) 사망례는 관찰되지 않았으며 이상증세는 나타나지 않았다(Table 24, 25). 또한 14일간의 회복기간 동안에 암수 모두 시험 물질 3,000 mg/kg 투여군에서 사망례 및 이상 증세는 나타나지 않았다(Table 26, 27).

Table 24. Mortality of 4 weeks oral toxicity study in SD rat(Male)

Group/dose (mg/kg)	No. of animals	Week					Mortality (dead/total)	
		0	1	2	3	4		
Main group	G1 (0 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10
	G2 (1,000 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10
	G3 (2,000 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10
	G4 (3,000 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10

Table 25. Mortality of 4 weeks oral toxicity study in SD rat(Female)

Group/dose (mg/kg)	No. of animals	Week					Mortality (dead/total)	
		0	1	2	3	4		
Main group	G1 (0 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10
	G2 (1,000 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10
	G3 (2,000 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10
	G4 (3,000 mg/kg)	10	0	0	0	0	0	0/10

Table 26. Mortality of 2 weeks recovery study after 4 weeks oral treatment in SD rat(Male)

Group/dose (mg/kg)	No. of animals	Week						Mortality (dead/total)		
		0	1	2	3	4	5		6	
Recovery group	G5 (0 mg/kg)	5	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G6 (3,000 mg/kg)	5	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 27. Mortality of 2 weeks recovery study after 4 weeks oral treatment in SD rat(Female)

Group/dose (mg/kg)	No. of animals	Week							Mortality (dead/total)	
		0	1	2	3	4	5	6		
Recovery group G5 (0 mg/kg)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
G6 (3,000 mg/kg)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

○ 체중 및 사료 섭취량 변화

- 투여 기간과 회복기간 동안에 후보소재 투여군과 대조군의 비교시 유의성 있는 체중 변화가 나타나지 않았다(Table 28, 29, 30, 31).

Table 28. Body weight of 4 weeks oral toxicity study in SD rat(Male)

Group/dose (mg/kg)	Values	Week					
		0	1	2	3	4	
Main group	G1 (0 mg/kg)	Mean	246.92	291.67	347.45	380.73	427.44
		SD	7.76	6.86	9.49	12.13	12.24
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	246.64	294.20	346.97	391.45	430.08
		SD	6.98	8.47	9.70	18.94	18.19
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	246.82	290.09	346.63	380.28	421.75
		SD	6.61	11.83	15.81	18.00	22.32
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	246.67	290.67	344.61	378.04	419.42
		SD	6.85	8.72	9.13	14.22	16.09

Table 29. Body weight of 4 weeks oral toxicity study in SD rat(Female)

Group/dose (mg/kg)	Values	Week					
		0	1	2	3	4	
Main group	G1 (0 mg/kg)	Mean	175.07	196.20	214.36	227.94	243.58
		SD	5.68	8.40	14.89	16.56	23.42
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	175.04	196.67	214.68	227.43	237.66
		SD	5.76	8.40	11.39	10.10	10.19
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	175.05	192.75	210.01	226.19	234.09
		SD	5.55	7.56	9.63	12.37	12.99
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	175.04	189.60	208.13	224.26	238.71
		SD	5.50	7.15	12.27	15.04	18.41

Table 30. Body weight of 2 weeks recovery study after 4weeks oral toxicity study in SD rat(Male)

Group/dose (mg/kg)	Values	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	246.90	291.57	346.98	363.14	424.09	460.40	483.55
		SD	7.23	8.68	9.14	11.59	12.37	17.03	20.17
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	246.84	289.95	339.28	367.19	409.11	441.79	464.79
		SD	7.30	6.27	12.08	16.33	12.48	19.58	21.96

Table 31 Body weight of 2 weeks recovery study after 4weeks oral toxicity study in SD rat(Female)

Group/dose (mg/kg)	Values	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	175.29	197.13	215.89	230.08	243.69	261.02	269.87
		SD	5.84	7.12	9.98	9.70	11.86	16.14	17.17
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	175.16	193.67	208.57	227.31	237.92	253.56	262.78
		SD	5.75	4.62	5.16	7.32	7.20	7.08	10.70

- 투여 기간과 동안에 후보소재 투여군과 대조군의 비교시 수컷 2,000 mg/kg 투여군에서 투여 2, 4주차 그리고 3,000 mg/kg 투여군에서 투여 2주차에 유의성 있는 사료섭취량 감소가 관찰되었다(Table 32, 33). 이러한 사료섭취량 변화는 우발적으로 관찰되며, 후보소재 투여에 기인한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 암컷의 후보소재 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다.

Table 32. Food consumption of 4 weeks oral toxicity study in SD rat(Male)

Group/dose (mg/kg)	Values	Week					
		0	1	2	3	4	
Main group	G1 (0 mg/kg)	Mean	25.92	26.48	28.64	28.06	26.96
		SD	1.09	1.50	0.90	1.36	1.41
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	26.66	25.95	26.41	27.09	26.29
		SD	2.82	3.04	3.26	1.51	2.01
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	26.03	24.93	25.38*	25.74	24.57*
		SD	1.65	1.63	2.13	2.24	1.32
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	24.95	25.13	26.68*	26.02	26.34
		SD	2.25	1.50	1.59	1.88	1.64

* $p < 0.05$ vs G1

Table 33. Food consumption of 4 weeks oral toxicity study in SD rat(Female)

Group/dose (mg/kg)	Values	Week					
		0	1	2	3	4	
Main group	G1 (0 mg/kg)	Mean	17.37	18.07	17.24	16.53	17.01
		SD	1.16	1.37	1.97	1.66	1.41
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	16.53	17.82	16.84	17.01	17.09
		SD	1.65	1.31	1.00	1.81	0.74
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	15.65	16.90	16.48	16.69	17.36
		SD	0.78	1.42	1.80	1.75	1.20
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	16.14	18.07	16.52	17.60	17.79
		SD	2.58	1.56	2.12	2.21	1.38

○ 혈액학적 변화

암수 시험물질 투여군에서 후보소재에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 혈액학적 검사 항목에서 유의적으로 증가한 항목으로는 수컷 1,000 mg/kg 투여군에서 MCH(Mean corpuscular hemoglobin), 2,000 mg/kg 투여군에서 BASO(Basophils) 가 관찰되었다. 하지만 나타난 결과 모두 정상 수치 (MCH 19.7~20.7 pg , BASO<1%)내의 변화이고 후보소재 농도 의존적으로 변화하는 결과가 나타나지 않았으며 회복기간 동안에 변화하지 않았다. 그러므로 시료에 대한 독성학적 의미는 아닌 것으로 판단된다(Table 34, 35).

Table 34. Hematology of repeated oral dose toxicity study in SD rat(Male).

Group/dose(mg/kg)	Values	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting(%)					
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	
Main group	G1 (0 mg/kg)	Mean	7.65	14.00	42.43	55.48	18.31	33.02	1123.60	5.80	17.21	79.04	1.62	1.15	0.04
		SD	0.42	0.68	2.04	1.69	0.43	0.46	147.34	1.43	5.15	5.19	0.50	0.47	0.05
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	7.30*	13.80	41.54	56.96	18.92*	33.22	1180.90	5.45	17.36	79.26	1.61	1.07	0.17
		SD	0.30	0.63	1.93	1.82	0.60	0.25	195.38	1.60	5.11	5.59	0.67	0.34	0.29
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	7.54	13.88	41.72	55.44	18.44	33.25	1229.40	5.13	18.53	77.75	1.54	1.27	0.11*
		SD	0.42	0.57	1.81	1.87	0.72	0.50	153.54	1.43	3.69	3.57	0.41	0.66	0.06
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	7.42	14.03	42.14	56.84	18.91	33.29	1111.20	4.73	19.07	77.46	1.35*	1.31	0.08
		SD	0.45	0.68	2.02	1.74	0.76	0.52	131.30	1.89	8.21	8.71	0.46	0.80	0.06
Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	7.99	14.52	44.10	55.24	18.22	32.98	1067.00	8.60	18.02	77.74	2.08	1.46	0.18
		SD	0.41	0.41	1.61	1.67	0.59	0.52	199.71	1.53	6.17	6.79	0.33	0.64	0.11
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	7.71	13.86	42.26	54.80	17.98	32.78	1162.60	5.95*	21.76	74.44	1.92	1.44	0.12
		SD	0.10	0.50	1.13	1.43	0.54	0.43	91.57	1.80	4.34	4.93	0.50	0.47	0.08

* $p < 0.05$ vs G1

Table 35. Hematology of repeated oral dose toxicity study in SD rat(Female).

Group/dose(mg/kg)	Values	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting(%)					
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	
Main group	G1 (0 mg/kg)	Mean	7.28	13.82	40.89	56.22	19.00	33.86	1175.50	3.17	12.97	83.27	1.24	1.82	0.08
		SD	0.19	0.45	1.11	1.34	0.49	0.52	291.29	1.49	4.86	5.65	0.41	1.43	0.09
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	7.26*	13.69	40.44	55.79	18.91*	33.92	1139.80	2.97	21.49	73.80	1.56	2.59	0.06
		SD	0.54	0.82	2.60	1.99	0.81	0.42	198.73	0.80	9.90	11.79	0.51	2.28	0.05
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	7.41	13.93	41.37	55.87	18.82	33.69	1046.40	3.81	16.09	79.68	1.31	2.17	0.06
		SD	0.24	0.49	1.51	1.34	0.42	0.33	175.07	1.22	4.70	4.73	0.33	1.24	0.05
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	7.23	13.70	40.36	55.78	18.96	33.95	899.40*	3.42	20.34	76.15	1.30	1.61	0.06
		SD	0.30	0.53	1.70	0.70	0.33	0.51	315.66	0.87	11.73	11.83	0.30	0.81	0.07
Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	7.44	13.80	40.60	54.65	18.55	34.00	1180.00	3.75	12.75	83.90	1.55	1.23	0.10
		SD	0.41	0.41	1.13	2.45	0.54	0.56	116.47	0.87	1.20	1.07	0.58	0.17	0.00
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	7.14	13.72	39.84	55.96	19.26	34.46	1182.60	2.51*	14.70	81.96	1.38	1.52	0.04
		SD	0.49	0.56	1.19	2.60	0.55	0.70	144.45	0.40	4.82	5.12	0.37	0.23	0.05

* $p < 0.05$ vs G1

○ 혈액생화학적 변화

혈액생화학적 검사 항목에서 수컷 1,000 mg/kg 투여군에서 TP(Total Protein)의 변화가 유의성 있게 증가하였지만 모든 군에서 정상 수치 (4~7 g/dL) 내의 변화이며 회복기간 동안 정상적인 수치의 결과를 나타낸다. 그러므로 후보소재에 대한 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 암컷에서 2,000, 3,000 mg/kg 시료 투여군에서 ALT(Alanine aminotransferase) 및 Na(Sodium)의 결과가 유의적으로 증가하였지만 모든 군에서 정상 수치 (ALT 32~98 IU/L, Na) 내의 변화이며 시료의 용량의존성이 관찰되지 않았다. 2,000 mg/kg 시료 투여군에서 AST(Aspartate aminotransferase) 결과가 유의적으로 증가하는 결과가 나타나는데 정상수치 (47~172.2 IU/L) 내의 변화이다. 회복군의 경우 3,000 mg/kg 시료 투여군의 ALT, AST, Na는 유의적인 변화가 관찰되지 않는 것으로 보아 회복기간 동안 정상적으로 돌아오 것으로 관찰되었다. 또한 간 기능 관련 항목 중 하나인 간 무게의 경우 정상적으로 나타난 것으로 보아 시료의 문제라고 판단되지 않는다(Table 36, 37).

Table 36. Clinical chemistry of repeated oral dose toxicity study in SD rat(Male)

Group/dose (mg/kg)	Values	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	T-Bil (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	GLU (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	
Main group	G1 (0mg/kg)	Mean	35.51	76.02	226.50	0.01	264.20*	0.01	13.20	0.19	5.61	3.27	1.40	75.90	43.00	168.39	10.37	7.55	141.44	4.82	164.84
		SD	3.36	3.59	36.62	0.02	87.37	0.01	1.19	0.03	0.21	0.09	0.10	22.54	15.26	17.42	0.36	0.26	1.96	0.24	2.07
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	36.90	76.78	208.20	0.01	337.90	0.01	12.31	0.17	5.86*	3.32	1.32	77.00	42.60	161.69	10.34	7.23	139.91	4.64	169.38
		SD	5.38	14.18	39.26	0.01	190.03	0.01	1.49	0.04	0.22	0.18	0.17	13.24	24.64	20.92	0.51	0.52	2.99	0.43	2.31
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	32.64	69.81	215.60	0.00	224.50	0.00	12.24	0.16	5.77	3.24	1.28*	83.20	39.30	168.82	10.15	7.19	138.80*	4.60	162.67*
		SD	4.12	8.86	40.40	0.01	77.18	0.01	1.69	0.03	0.14	0.10	0.05	13.47*	9.87	17.30	0.20	0.52	1.66	0.23	1.66
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	33.87	76.53	240.60	0.03	256.80	0.01	12.69	0.14*	5.78	3.23	1.27*	82.60	38.80	169.33	10.24	7.73	139.90	4.51*	163.83
		SD	3.84	8.43	41.10	0.03	104.07	0.01	1.44	0.04	0.32	0.13	0.09	18.03	24.33	23.85	0.32	0.87	1.53	0.31	1.18
Recovery group	G5 (0mg/kg)	Mean	28.70	81.66	179.10	0.59	744.80	0.03	13.32	0.20	3.90	3.30	1.27	91.00	43.40	169.02	10.12	7.53	139.30	5.00	160.40
		SD	2.46	8.54	31.69	-	245.56	0.02	0.80	0.04	0.21	0.16	0.10	16.17	12.74	20.91	0.23	0.88	2.32	0.36	2.31
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	31.76	106.54*	186.00	-	1546.20	0.03	13.64	0.18	5.82	3.26	1.27	89.40	40.00	163.18	10.22	7.18	139.38	4.90	161.18
		SD	3.09	14.31	32.95	-	872.13	0.02	1.53	0.04	0.28	0.13	0.04	12.44	11.40	25.04	0.62	0.40	1.23	0.22	0.67

* $p < 0.05$ vs G1

Table 37. Clinical chemistry of repeated oral dose toxicity study in SD rat(Female)

Group/dose (mg/kg)	Values	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	T-Bil (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	GLU (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	
Main group	G1 (0mg/kg)	Mean	28.31	64.44	111.50	0.02	215.50	0.03	15.67	0.28	6.87	3.95	1.36	97.60	34.60	154.20	10.61	6.30	138.28	4.10	163.36
		SD	4.76	11.15	36.66	0.05	83.67	0.02	3.28	0.06	0.37	0.19	0.05	10.99	6.96	27.94	0.30	0.78	1.03	0.29	1.34
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	32.90	74.18	109.00	0.01	183.30	0.05	13.77	0.29	7.17	4.01	1.27*	105.90	29.80	144.54	10.86	6.61	139.04	3.93	162.99
		SD	6.99	16.72	20.31	0.03	35.00	0.07	3.01	0.06	0.65	0.38	0.09	22.15	8.34	21.07	0.41	0.96	1.22	0.32	1.81
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	37.82*	87.00*	115.20	0.00	264.00	0.04	14.77	0.30	7.05	3.99	1.31*	92.60	30.70	148.58	10.71	6.42	139.92*	3.94	164.19
		SD	6.75	28.32	42.36	0.00	149.62	0.03	2.88	0.03	0.45	0.23	0.05	13.62	4.92	17.71	0.30	0.86	1.15	0.21	1.54
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	33.37*	73.41	102.60	0.00	284.60	0.04	14.44	0.31	7.14	4.11	1.36	96.50	38.60	166.49	10.94	6.26	139.62*	3.81*	163.47
		SD	3.03	17.02	28.73	0.00	167.40	0.02	1.83	0.06	0.49	0.27	0.11	17.07	12.38	18.75	0.59	0.78	1.17	0.22	1.40
Recovery group	G5 (0mg/kg)	Mean	34.94	89.40	65.00	-	285.40	0.09	14.24	0.32	7.60	4.28	1.29	115.40	35.80	159.76	11.30	5.78	138.76	4.02	161.20
		SD	7.34	53.94	26.50	-	244.91	0.04	1.55	0.04	0.22	0.08	0.04	12.38	12.48	28.31	0.20	0.77	0.79	0.18	1.60
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	39.24	109.83	78.20	-	316.60	0.04	16.80	0.31	7.50	4.14	1.28	106.60	29.80	146.78	10.84*	5.76	139.76	3.96	162.24
		SD	36.49	64.90	17.75	-	156.56	0.03	2.60	0.02	0.34	0.13	0.05	17.37	7.76	14.80	0.29	0.57	1.39	0.19	1.97

* $p < 0.05$ vs G1

○ 절대 및 상대 장기 무게 변화

절대 장기 무게의 변화에서 수컷 시료투여군의 비장 무게가 유의적으로 감소가 나타났지만 면역력 저하와 연관된 혈액학적 변화가 관찰되지 않았다(Table 38, 39). 그리고 비장의 무게는 회복기간 동안 정상적인 수치가 나타나는 것으로 보아 시료에 대한 독성학적 의미는 없다고 판단된다. 그 외의 암수 후보소재 투여군 및 회복군의 투여군에서 후보소재에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

Table 38. Absolute organ weight of repeated oral dose toxicity in SD rat (Male, Female)

Sex	Group dose(mg/kg)	Values	Heart	Lung	Spleen	Liver	Kidney	Adrenal	Testis	Epididymis	
Male	G1 (0 mg/kg)	Mean	1.176	1.371	0.891	11.864	3.958	0.052	3.402	1.020	
		SD	0.134	0.135	0.087	1.031	0.295	0.009	0.383	0.090	
	Main group	G2 (1.000 mg/kg)	Mean	1.114	1.336	0.831	12.254	3.970	0.076	3.446	1.017
			SD	0.061	0.103	0.075	0.750	0.170	0.086	0.221	0.099
		G3 (2.000 mg/kg)	Mean	1.125	1.319	0.826	12.179	2.899	0.050	3.394	1.021
			SD	0.084	0.089	0.081	1.179	0.261	0.008	0.411	0.094
		G4 (3.000 mg/kg)	Mean	1.154	1.349	0.747*	11.954	3.091	0.052	3.318	0.961
			SD	0.070	0.066	0.068	1.012	0.173	0.010	0.356	0.084
	Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	1.277	1.435	0.891	13.922	3.115	0.090	3.549	1.239
			SD	0.111	0.049	0.169	1.790	0.269	0.082	0.216	0.168
		G6 (3.000 mg/kg)	Mean	1.173	1.385	0.818	12.540	3.118	0.050	3.512	1.177
			SD	0.073	0.043	0.115	0.834	0.070	0.004	0.340	0.088
Female	G1 (0 mg/kg)	Mean	0.705	1.038	0.498	7.066	1.748	0.096	0.087	0.525	
		SD	0.080	0.082	0.088	0.930	0.121	0.105	0.021	0.123	
	Main group	G2 (1.000 mg/kg)	Mean	0.640	1.024	0.562	7.189	1.823	0.064	0.065	0.525
			SD	0.149	0.053	0.205	0.798	0.134	0.007	0.013	0.086
		G3 (2.000 mg/kg)	Mean	0.693	1.019	0.485	7.061	1.730	0.062	0.059	0.517
			SD	0.051	0.082	0.063	0.598	0.148	0.007	0.011	0.052
		G4 (3.000 mg/kg)	Mean	0.727	1.002	0.468	7.390	1.847	0.065	0.060	0.556
			SD	0.073	0.056	0.059	0.702	0.204	0.007	0.013	0.039
	Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	0.792	1.102	0.524	8.317	1.971	0.072	0.051	0.548
			SD	0.057	0.044	0.028	1.073	0.180	0.009	0.009	0.060
		G6 (3.000 mg/kg)	Mean	0.755	1.055	0.546	7.618	1.904	0.074	0.050	0.601
			SD	0.041	0.045	0.137	0.396	0.111	0.013	0.006	0.105

* $p < 0.05$ vs G1

Table 39. Relative organ weight of repeated oral dose toxicity in SD rat (Male, Female)

Sex	Group dose(mg/kg)	Values	Heart	Lung	Spleen	Liver	Kidney	Adrenal	Testis	Epididymus	
Male	G1 (0 mg/kg)	Mean	0.283	0.329	0.214	2.851	0.735	0.012	0.818	0.245	
		SD	0.029	0.026	0.020	0.186	0.062	0.002	0.085	0.021	
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	0.265	0.318	0.198	2.913	0.730	0.018	0.820	0.249	
		SD	0.014	0.021	0.018	0.154	0.038	0.021	0.053	0.028	
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	0.272	0.319	0.200	2.945	0.701	0.012	0.821	0.247	
		SD	0.016	0.014	0.014	0.229	0.045	0.002	0.087	0.022	
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	0.282	0.329	0.182 *	2.913	0.754	0.013	0.811	0.235	
		SD	0.017	0.015	0.015	0.190	0.039	0.002	0.097	0.023	
	Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	0.272	0.306	0.190	2.967	0.334	0.014	0.379	0.130
			SD	0.019	0.010	0.019	0.342	0.019	0.018	0.029	0.015
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	0.263	0.310	0.183	2.804	0.345	0.006	0.392	0.130	
		SD	0.020	0.012	0.023	0.149	0.011	0.001	0.040	0.012	
Female	G1 (0 mg/kg)	Mean	0.297	0.438	0.209	2.967	0.739	0.039	0.028	0.222	
		SD	0.020	0.023	0.027	0.224	0.067	0.040	0.007	0.057	
	G2 (1,000 mg/kg)	Mean	0.274	0.439	0.241	3.080	0.782	0.027	0.028	0.225	
		SD	0.060	0.020	0.088	0.294	0.051	0.003	0.006	0.039	
	G3 (2,000 mg/kg)	Mean	0.302	0.444	0.211	3.069	0.752	0.027	0.026	0.225	
		SD	0.022	0.035	0.030	0.182	0.045	0.003	0.004	0.022	
	G4 (3,000 mg/kg)	Mean	0.309	0.428	0.200	3.143	0.784	0.028	0.026	0.238	
		SD	0.027	0.044	0.036	0.300	0.071	0.003	0.006	0.033	
	Recovery group	G5 (0 mg/kg)	Mean	0.304	0.424	0.201	3.187	0.379	0.014	0.009	0.210
			SD	0.019	0.019	0.005	0.305	0.013	0.001	0.002	0.021
	G6 (3,000 mg/kg)	Mean	0.299	0.417	0.217	3.011	0.369	0.015	0.010	0.237	
		SD	0.017	0.028	0.059	0.154	0.032	0.002	0.002	0.035	

* $p < 0.05$ vs G1

○ 부검시 육안적 소견 사항

주시험군의 암수 후보소재 투여군 및 회복군의 투여군에서 후보소재 투여에 기인한 영향으로 판단되는 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다(Table 40).

Table 40. Necropsy findings of repeated oral dose toxicity study in SD rat(Male, Female)

Organ/Findings	Gender	Male	Female
	Group / Dose (mg/kg)	-	-
No. of animals	-	-	-

㉞ 가공적성 검토를 통한 시제품 처방 개발 및 생산 방법 확립

㉞ 연구목적

쌍별귀뚜라미 추추물을 이용하여 다양한 제형의 처방 개발을 통한 제품화 방안을 확립하고, 각각 개발 성상별 제품을 비교하여 시장에 맞는 제형을 선정하여 최종 시제품 제작 및 품목제조보고를 목적으로 하였다.

㉞ 재료 및 방법

○ 액상 재료

쌍별귀뚜라미추출분말(제조사/판매원: (주)네이처텍), 프락토올리고당(제조사: Beneo/ 판매원: 오지메이테크), 시클로덱스트린시럽(제조사/판매원: 인그리디언코리아), 쌍화농축액(제조사/판매원: (주)새롬비엔에프), 배농축액(제조사/판매원: GAT GIVAT HAIM COOPERATIVE), 무수구연산(제조사/판매원: 제이에스푸드), 난소화성말토덱스트린(제조사/판매원: MATSUTANI), 쌍화향(제조사/판매원: (주)제이에프아이), 모과향(제조사/판매원: (주)한빛향료), 복합황금추출물(제조사/판매원: 테코스), 밀크씨슬추출물분말(제조사: PLANTEX/판매원: (주)유니프라임), 어성초추출물분말(제조사/판매원: 대호양행), 헛개나무열매농축액(제조사/판매원: 삼영식품원료공업(주)), 인삼농축액(제조사/판매원: (주)네이처텍)

○ 정제 재료

쌍별귀뚜라미추출분말(제조사/판매원: (주)네이처텍), 밀크씨슬추출물분말(제조사: PLANTEX/판매원: (주)유니프라임), 홍경천추출물(제조사: Finzelberg GmbH&co.KG/ 판매원: (주)지큐바이오), 미결정셀룰로스(제조사/판매원: MINGTAI CHEMICAL CO.,LTD.), 해조칼슘과립(제조사: Superior Powders Ltd/ 판매원: 향림산업(주)), 칼슘CMC(제조사/판매원: (주)보락), 헛개나무추출분말(제조사/판매원: 삼영식품원료공업(주)), 이산화규소(제조사/판매원: PT PQ SILICA INDONESIA), 스테아린산마그네슘(제조사/판매원: PETER GREVEN ASUA SDN), 난소화성말토덱스트린(제조사/판매원: MATSUTANI), 프락토올리고당분말(제조사: Beneo/ 판매원: 오지메이테크), 어성초추출물분말(제조사/판매원: 대호양행), 쌀배아추출물분말(제조사: ORYZA OIL&FAT CAMICAL CO.,LTD/ 판매원: 네이처텍), 차가버섯추출물분말(제조사/판매원: 대호양행), 비타민B2(제조사/판매원: DSM), 비타민B1염산염(제조사/판매원: DSM Nutritional Products GmbH), 비타민B6염산염(제조사/판매원: DSM), 히드록시프로필메틸셀룰로스(제조사/판매원: 삼성정밀화학), 글리세린지방산에스테르(제조사/판매원: ESTEROL SDN BHD)

○ 젤리 재료

쌍별귀뚜라미추출분말(제조사/판매원: (주)네이처텍), 액상고과당(제조사/판매원: 삼양제넥스), 열대과일혼합농축액(제조사/판매원: Gan Shmuel Foods Ltd), 텍스트린(제조사/판매원: San soon seng food industries sdn. Bhd.), 강황추출물(제조사/판매원: (주)하티), 푸드젤A(제조사/판매원: (주)한국카라겐), 난소화성말토덱스트린(제조사/판매원: MATSUTANI), 쌍화농축액(제조사/판매원: (주)새롬비엔에프), 수용성밀크씨슬(제조사: PLANTEX/판매원: (주)유니프라임), 젯산칼슘(제조사/

판매원: PURAC BIOCHEM), 무수구연산(제조사/판매원: 제이에스푸드), 천연피치망고향(제조사/판매원: (주)한빛향료), 구연산나트륨(제조사/판매원: QingDao Fuso Refining & Processing), 어성초추출물분말(제조사/판매원: 대호양행), 헛개나무열매농축액(제조사/판매원: (주)엠에스씨), 수크랄로스(제조사/판매원: JK Sucralose Inc.)

○ **쌍별귀뚜라미 음료 처방실험**

- 향을 제외한 1차 원료(쌍별귀뚜라미추출물, 정제수, 프락토올리고당, 쌍화농축액, 배농축액, 무수구연산, 복합황금추출물, 밀크씨슬추출분말, 헛개나무열매농축액, 인삼농축액)를 투입 후 90℃에서 30분간 교반하였다.
- 2차 원료인 모과향을 투입 후 75℃에서 20분간 교반하였다.
- 용해된 것을 확인하고 증발된 수분을 보정 후 40℃까지 상온에서 냉각하였다.
- 100 mesh를 이용하여 여과 후 용기에 충전하여 살균 및 냉각을 실시하였다.

○ **귀뚜라미 정제 처방실험**

- 귀뚜라미추출분말, 밀크씨슬추출분말 또는 홍경천추출물, 결정셀룰로스, 해조갈슘, 스테아린산마그네슘, 프락토올리고당분말, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 글리세린지방산에스테르를 칭량하여 20 mesh 체과망을 사용하여 원료를 체과 후 10~30분간 균질하게 혼합하였다.
- 타정기(KT15SS)를 이용하여 최종혼합물 650 mg, 경도 150 N 이상으로 타정하였다.
- 타정된 정제를 코팅기(KC50FS)를 이용하여 코팅하였다.



Fig. 31. Rotary tablet machine(KT15SS) and auto tablet coating machine(KC50FS)

○ **제형 안정성 평가 방법**

- 마손도 측정기(FRV 2000)를 이용하여 정제의 강도를 측정함. 낙하 횟수를 100회로 설정하여 측정 전후의 정제 무게를 확인하여 마손 정도를 확인하였다.



Fig. 32 Friability tester(FRV 2000)

- 봉해도 시험을 위하여 시험기에 만들어진 쌍별귀뚜라미 정제를 넣고 물을 시험액으로 하여 30분간 상하 운동을 실시함. 시험 완료 후 정제의 용해 상태를 관찰하여 잔류물의 유무를 확인하였다.



Fig. 33. Disintergration tester

○ 쌍별귀뚜라미 젤리 처방실험

- 정제수에 액상과당을 넣고 75℃ 까지 가온하였다.
- 혼합제제, 텍스트린을 혼합하여 투입 후, 젯산칼슘, 구연산삼나트륨을 차례로 투입하였다.
- 분말원료인 쌍별귀뚜라미추출물, 수크랄로스, 어성초추출물, 난소화성말토텍스트린과 액상원료인 수용성밀크씨슬, 헛개나무열매추출물, 쌍화농축액, 무수구연산을 넣고 교반 후 수분을 보정함.
- 항온수조를 이용하여 80℃ 에서 30분간 incubation을 실시하였다.

㊦ 연구 결과

○ 귀뚜라미 음료 제조

쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 액상 음료제품 생산 가능여부를 확인하기 위하여 쌍별귀뚜라미추출분말, 프락토올리고당, 쌍화농축액, 배농축액, 무수구연산, 모과향, 복합황금추출물, 밀크씨슬추출물분말, 헛개나무열매농축액, 인삼농축액을 칭량하여 1차 액상 처방실험을 Fig.

34와 같이 실시하였다.

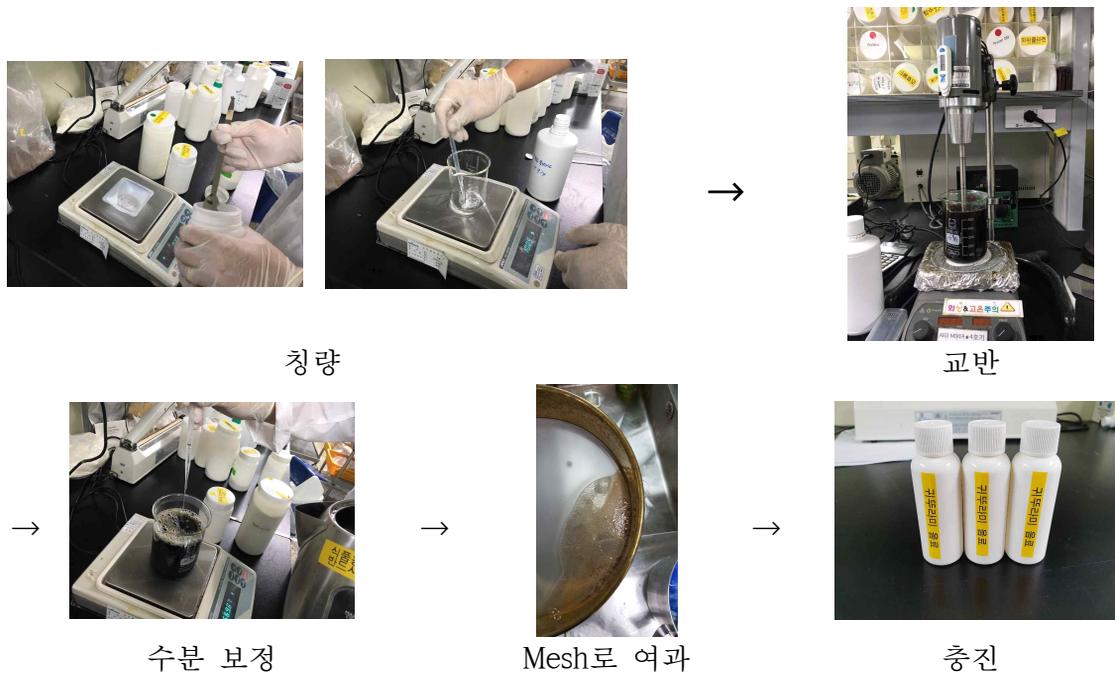


Fig. 34 Manufacturing process of drink

1차 음료 처방실험에서 맛이 시고 씹쓸하며 단맛이 부족하다는 것과 시제 다음날 침전물이 발생하는 것을 확인되어, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 1차 처방에서 모과향을 제외하고 시클로텍스트린분말, 매실과즙농축액, 난소화성말토덱스트린, 쌍화향, 어성초추출물분말을 추가하여 2차 처방실험을 실시하였다. 2차 처방실험 결과에서 1차 처방실험 때 문제가 되었던 맛과 향이 개선된 것을 확인하였으나 1차 때와 마찬가지로 침전물이 생기며 mesh로 걸러내었을 때 잔여물이 남는 것을 확인되었다 (Fig. 35). 액상의 경우 1차 처방실험에서 맛과 향에 대한 문제점이 발견되어 2차에서 일부 부원료를 변경하여 맛, 색상 및 향미를 개선하였으나, 여과 시 잔여물이 남는 것을 확인되었다. 액상 제품의 경우 미생물에 대한 오염을 방지하기 위하여 중성이 아닌 산성의 pH로 생산 및 유통이 필요하다. 쌍별귀뚜라미 추출물을 액상 제품에 이용하였을 때 단독으로 용해 시 완전히 용해되어 문제가 없으나 오염 방지를 위해 pH를 낮추는 과정에서 용해물의 응집이 발생하여, 이러한 문제점들로 인하여 액상 제품 개발에 쌍별귀뚜라미 추출물이 적합하지 않다고 판단된다.



Fig. 35. Debris after filtering

○ 쌍별귀뚜라미 정제 제조

식용곤충의 경우 아직까지 소비자들에게 원료 외형에 대한 거부감이 있어 분말화를 통한 다양한 제품 적용 연구가 진행되고 있다. 또한 건강기능식품 시장에서 제형 중 가장 많은 비율을 차지하는 것이 정제이며, 이러한 이유들로 쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 정제의 개발이 적합할 것으로 판단되어 사용 가능여부를 확인하기 위한 처방실험을 실시하였다.

- 처방실험

정제 생산 가능여부를 확인하기 위하여 귀뚜라미추출분말, 밀크씨슬추출분말, 결정셀룰로스, 해조칼슘, 스테아린산마그네슘, 프락토올리고당분말을 칭량하여 정제 제조를 실시하였으며, 코팅제로는 히드록시프로필메틸셀룰로스과 글리세린지방산을 이용하였다. 중량 650 mg, 경도 150 N으로 타정을 Fig. 36과 같이 실시하였다. Fig. 37과 같이 이상 없이 정제화 되는 것을 확인하였다.

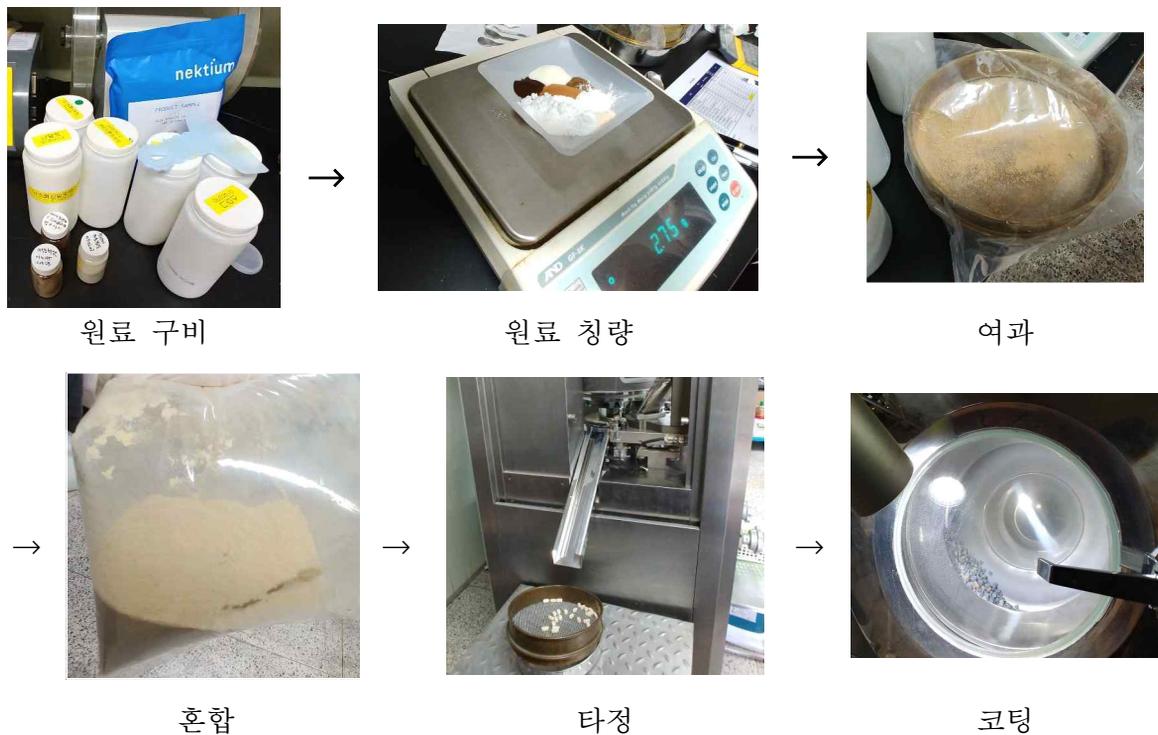


Fig. 36. Manufacturing process of tablet

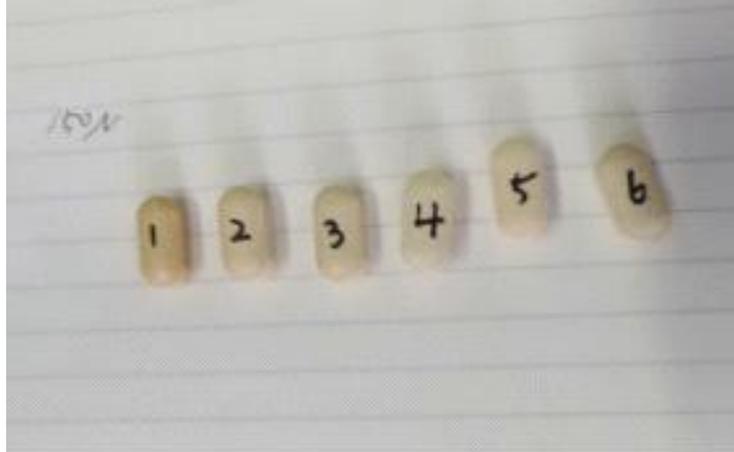


Fig. 37. Tablet with *Gryllus bimaculatus* extract

1차 처방실험 결과를 토대로 간보호 효과를 보강하기 위하여 부원료를 첨가하였음. 추가한 부원료는 헛개나무추출물분말, 어성초추출물분말, 쌀배아추출물분말, 차가버섯추출물분말, 난소화성말토덱스트린이며 1차와 동일 조건 (중량 650 mg, 경도 150 N)으로 타정을 실시하였고, 1차 처방실험과 같이 이상 없이 타정이 완료되는 것을 확인하였다. (Fig.38 A). 간보호 외에 피로개선 기능성을 위하여 고시형 원료인 홍경천추출물을 이용하여 쌍별귀뚜라미 추출물과 같이 정제를 위한 제형 테스트를 실시하였으며, 이상 없이 타정되는 것을 확인하였다(Fig. 38 B).



Fig. 38. Tablet with *Gryllus bimaculatus*, milk thistle and *Rhodiola rosea* extract

- 안정성 평가

마손도 시험은 정제의 물리적 강도를 나타내는 방법의 하나로써 정제의 취급, 포장 및 운반 중 정제가 파손에 견딜 수 있는 능력평가로 활용되며, 평가 결과 마손도 시험 전후 무게 차가 0.3% 미만으로 확인되어, 이는 정제의 강도가 적합하다는 것을 확인하였다. 붕해도 테스트는 고형제가 위장관내에서 완전히 용해되는지 확인하는 실험으로써 각 정제가 시험액(물)에서 30분 후 완전히 용해되는 것이 확인되었다(Fig. 39).

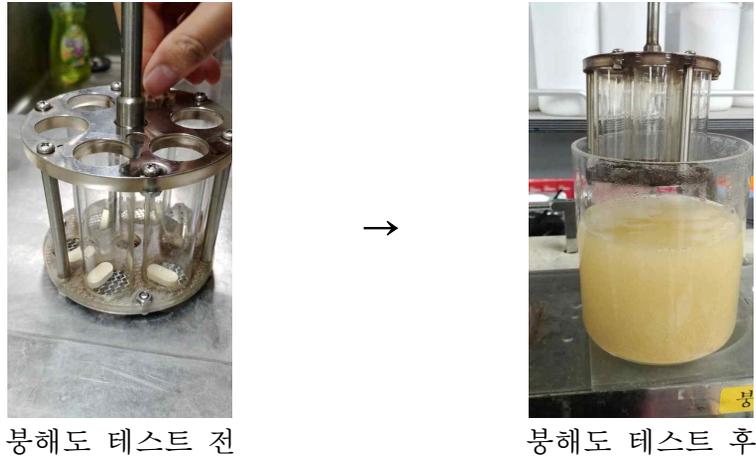


Fig. 39. Result of disintegration test.

1차 처방실험에서 타정에는 문제가 없음을 확인하였고, 정제에 추가 기능성을 강화하기 위하여 밀크씨슬추출물 또는 홍경천추출물을 추가하여 실험을 진행 시 1차 때와 마찬가지로 문제없이 타정되는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 조성 및 제조공정을 확립하고 pilot test를 통한 시제품 생산을 진행하였다.

○ 쌍별귀뚜라미 젤리 제조

현재 건강기능식품 시장에서 소비자들에 큰 호응을 얻어 그 비중이 점차적으로 증가하고 있는 젤리 제형에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물 적용 가능성 처방실험을 실시하였다.

- 처방실험

쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 젤리 제품 생산 가능 여부를 확인하기 위하여 처방실험을 실시하였다. 실험을 위하여 쌍별귀뚜라미추출물, 강황추출물, 액상과당, 텍스트린, 혼합제제, 난소화성말토덱스트린, 쌍화농축액, 젯산킬슘, 수용성밀크씨슬, 구연산삼나트륨, 헛개나무열매추출물, 무수구연산, 여성초추출물, 수크랄로스를 이용하여 Fig. 40과 같이 실시하였다. Fig. 41과 같이 이상 없이 젤화 되는 것을 확인하였다.

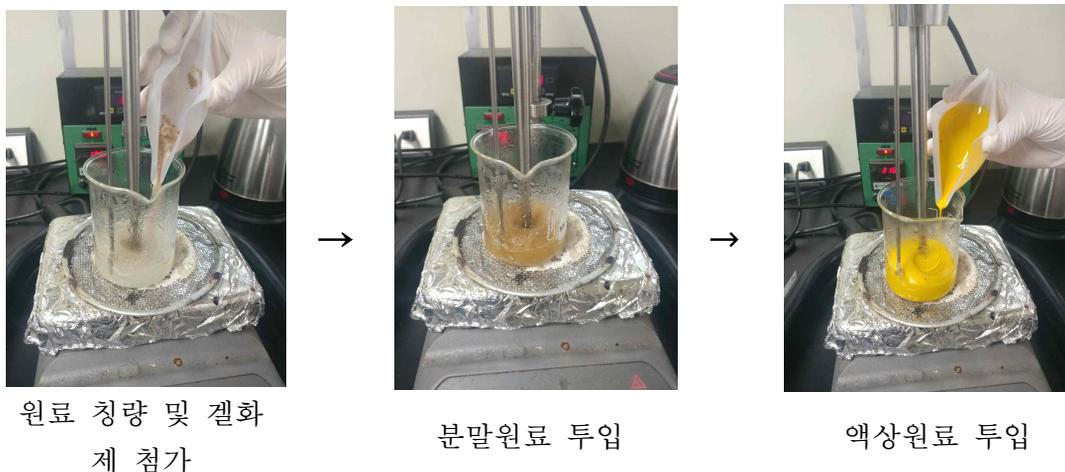


Fig. 40 Manufacturing process of jelly



Fig. 41. Jelly with *Gryllus bimaculatus* extract

1차 실험 결과를 토대로 소비자 기호에 맞는 맛과 향을 보강하기 위하여 열대과일농축액 및 피치망고향을 첨가하여 젤리를 제조함. 제조 과정 중 젤리의 점도가 너무 높아 손실이 다량 발생하여, 이는 강황추출물의 비율이 높아 발생한 문제로 사료되어 강황추출물 함량을 낮추어 추가 제조 실험을 진행하여 확인하였다. 최종 처방실험 결과를 바탕으로 쌍별귀뚜라미 추출물을 첨가한 젤리 조성 및 제조공정을 확립하였으며 pilot test를 통한 시제품 생산을 실시하였다

⑧ 시제품 제작

- 처방실험을 토대로 다음과 같이 시제품 처방을 확정하였다 (Table 41).

Table 41. Composition of tablet

원료명	처방 (%)	
	귀뚜라미·밀크씨슬 정제	귀뚜라미·홍경천 정제
귀뚜라미추출분말	3.00	3.00
밀크씨슬추출분말	20.00	-
홍경천추출분말	-	15.385
미결정셀룰로스	66.95	66.962
해조칼슘과립	3.00	3.00
칼슘CMC	-	3.00
헛개나무추출분말	2.00	-
스테아린산마그네슘	1.00	1.00
난소화성말토텍스트린	1.00	3.00
프락토올리고당분말	1.00	3.00
어성초추출분말	0.50	-
쌀배아추출물분말	0.50	0.10
차가버섯추출물분말	0.50	-
이산화규소	-	1.00
비타민B1 염산염	-	0.001
비타민B2	-	0.001
비타민B6 염산염	-	0.001
히드록시프로필메틸셀룰로스	0.50	0.50
글리세린지방산에스테르	0.05	0.05
합계	100.00	100.00

- 다음과 같이 제품 규격을 설정하였으며 검사를 완료하였다(Fig. 42).

귀뚜라미·밀크씨슬 정제	
시험항목	기준규격
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 제피정제
실리마린	130 mg/1,300 mg(표시량의 80% ~ 120%)
핵산	5.0 mg/kg이하 이어야 한다.
납	1.0 mg/kg이하 이어야 한다.
카드뮴	0.5 mg/kg이하 이어야 한다.
총 수은	0.5 mg/kg이하 이어야 한다.
총 비소	1.0 mg/kg이하 이어야 한다.
대장균군	음성 이어야 한다.
붕해도	60분 이내 붕해되어야 한다.

문서확인번호 : 3H1B-U1BM-QAJU-ASRS

시험·검사성적서

농림축산검역본부 국립수의과학검역원 제038호

발행번호	R20181221-0181	접수번호	180129913-001	
검사완료일	2018-12-21	접수완료일	2018-12-03	
제품명	귀뚜라미밀크씨슬			
(품목)제조번호	품목제조신고번호			
유형·제질·품목명	밀크씨슬(가공)프루스 마리아누스) 추출물			
제조(수입)일	2018-11-30	유원(출원유지)기간		
성명	양기억	업체명	(주)세이치텍	
뢰뢰자	(27858)총복 진원군 총평면 용정길 29(용정리) 전화번호: 043-530-7944 팩스번호: 043-532-8999 전자우편: bwkim@naturetech.co.kr			
제조원	업체명	소재지	제조국	
시험·검사목적	식품(제조·수입)품목허가(신고)용검사			
시험·검사 항목 및 결과				
시험·검사항목	시험·검사기준	시험·검사결과	판정	비고
성상	고유의 색채와 향미를 가지며, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 제피정제 이어야 한다.	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회황색의 제피정제	적합	
실리마린(%)	표시량의 80% ~ 120%	112%(145mg/1300mg)	적합	130mg/1300mg
핵산(mg/kg)	5.0이하	0.1	적합	
납(mg/kg)	1.0이하	0.0	적합	
카드뮴(mg/kg)	0.5이하	0.0	적합	
총 수은(mg/kg)	0.5이하	0.0	적합	
총 비소(mg/kg)	1.0이하	0.9	적합	
대장균군	음성	음성	적합	
붕해시험	적합	적합(제피정제: 60분이내 붕해)	적합	

귀뚜라미·홍경천 정제	
시험항목	기준규격
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회갈색의 제피정제
실리마린	6 mg/1,300 mg(표시량의 80% ~ 120%)
핵산	5.0 mg/kg이하 이어야 한다.
납	1.0 mg/kg이하 이어야 한다.
카드뮴	0.5 mg/kg이하 이어야 한다.
총 수은	0.5 mg/kg이하 이어야 한다.
총 비소	1.0 mg/kg이하 이어야 한다.
대장균군	음성 이어야 한다.
붕해도	60분 이내 붕해되어야 한다.

문서확인번호 : UWYH-DW88-S9U4-PM0J

시험·검사성적서

농림축산검역본부 국립수의과학검역원 제038호

발행번호	R20181221-0040	접수번호	180129913-001	
검사완료일	2018-12-21	접수완료일	2018-12-03	
제품명	귀뚜라미홍경천			
(품목)제조번호	품목제조신고번호			
유형·제질·품목명	홍경천 추출물			
제조(수입)일	2018-11-30	유원(출원유지)기간		
성명	양기억	업체명	(주)세이치텍	
뢰뢰자	(27858)총복 진원군 총평면 용정길 29(용정리) 전화번호: 043-530-7944 팩스번호: 043-532-8999 전자우편: bwkim@naturetech.co.kr			
제조원	업체명	소재지	제조국	
시험·검사목적	식품(제조·수입)품목허가(신고)용검사			
시험·검사 항목 및 결과				
시험·검사항목	시험·검사기준	시험·검사결과	판정	비고
성상	고유의 색채와 향미를 가지며, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회갈색의 제피정제 이어야 한다.	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 회갈색의 제피정제	적합	
실리마린(%)	표시량의 80% ~ 120%	83%(5.0mg/1300mg)	적합	6mg/1300mg
핵산(mg/kg)	5.0이하	0.1	적합	
납(mg/kg)	1.0이하	0.0	적합	
카드뮴(mg/kg)	0.5이하	0.0	적합	
총 수은(mg/kg)	0.5이하	0.0	적합	
총 비소(mg/kg)	1.0이하	0.9	적합	
대장균군	음성	음성	적합	
붕해시험	적합	적합(제피정제: 60분이내 붕해)	적합	

Fig. 42. Examination test of cricket tablet

- 확정된 처방비를 바탕으로 다음의 제조공정으로 시제품 생산을 실시하였다(Table 42).

Table 42. Pilot test of tablet

	원료투입	조건	시간
Step 1	칭량된 원료[밀크씨슬추출물분말, 미결정셀룰로스, 쌍별귀뚜라미추출물분말, 해조칼슘과립, 헛개나무추출분말, 스테아린산마그네슘, 난소화성말토덱스트린, 프락토올리고당분말, 어성초추출물분말, 썬베이추출물분말, 차가버섯추출물분말]를 20 mesh 체과망을 사용하여 원료를 체과하여 혼합기에 투입한다.	-	-
Step 2	혼합기에서 10 ~ 30분간 균질하게 혼합한다.	-	10 ~ 30 분
Step 3	최종혼합물을 규격에 적합하도록 타정기를 이용하여 타정한다.	650 mg ± 3% 예압 32 ~ 36, 분압 18 ~ 32, 경도 150 N 이상	-
Step 4	코팅기를 이용하여 코팅한다.	Atomizing air pressure 2 ~ 4 bar, Pan speed 2 ~ 15, Temp[정제표면온도 28 ~ 32°C, 배출온도 30 ~ 45°C], Spray rate 150 ~ 400 g/min, Drying air volume 2000 ~ 3060 cu.m/hr	-
Step 5	반제품을 벌크포장한다.	-	-



원료 투입



타정



코팅



선별



시제품

Fig. 43. Pilot test of tablet

발급번호 : 116V-R08K-NSJC-SFK6-V0-J0

제 20040020004261 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 제 20040020004 호

○ 업 소 명 : (주)네이치텍

○ 소 재 지 : 충청북도 진천군 초량면 동정길 29-8

○ 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업

○ 제 품 명 : 흉경천 정제 (유형: 흉경천 추출물)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)
 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

2019년 01월 23일

대전지방식품의약품안전청



발급번호 : 116V-R08K-NSJC-SFK6-V0-J0

제품명	흉경천 정제
섭취방법	1일 1회, 1회 2정(1,300 mg)씩 충분한 물과 함께 섭취하시기 바랍니다.
섭취 시 주의사항	1) 영·유아, 어린이, 임신부의 수유부, 알러르기 체질, 치통을 받고 계신 분은 섭취 전 구입처 또는 고객 상담실로 문의 주시기 바랍니다. 2) 어린이에게 섭취시키고자 하는 경우에는 구입처로 문의 하시고 섭취 시 보호자의 관찰 하에 섭취하도록 하십시오. 3) 건강섭취량을 확인하신 후 섭취하십시오. 4) 섭취자의 건강상태에 따라 특이반응이 나타날 수 있습니다. 이 경우 섭취를 중단하신 후 구입처로 문의하시기 바랍니다.
포장방법	병 포장, PTP포장
포장단위	1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 120정/병, 세트상자
포장재질	폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), PTP포장 (염화비닐수지(PVC)+ 알루미늄호일(AI-Foil) 또는 염화비닐비닐수지(PVDC)+알루미늄호일(AI-Foil))
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 노란색의 제과정제
기능성내용	스트레스로 인한 피로개선에 도움을 줄 수 있음.
제조방법	1) 제품의 제조에 사용되는 식품 또는 첨가물은 건강기능식품, 식품공전 및 식품첨가물관련의 기준 규격에 적합한 원료를 사용한다. 2) 청량한 원료[충청천추출물분말, 결정살포로스, 프락토올리고당분말, 카복시메틸셀룰로스칼슘, 알라기쿠마리추출물분말, 액조칼슘, 말트덱스트린, 스타이리안산마그네슘, 이산화규소, 알베아추출물분말, 비탄닌(아연산, 붕산염), 비탄닌(66당산염)]을 첨가후 혼합한다. 3) 혼합이 완료된 후 단정기로 이송한다. 4) 최종조질장치 및 건조조질장치를 조절하여 중량 및 경도를 조절한다. 5) 최종제품을 포장하여 단정한다. 6) 규격기에 개량된 정제수, 발효주정, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 글리세린지방산에스테르를 투입 후 충분한 교반한다. 7) 단정된 정제에 코팅액을 분사하여, 코팅한다. 8) 최종규격 한 검체를 채취하여 반제품 시험을 의뢰한다.

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 116V-Q02K-ASRC-SF16-989M

제 20040020004262 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 제 20040020004 호

○ 업 소 명 : (주)네이치텍

○ 소 재 지 : 충청북도 진천군 초량면 동정길 29-8

○ 영업의 종류 : 건강기능식품전문제조업

○ 제 품 명 : 알크씨슬 정제 (유형: 알크씨슬(카르투스 마리아) 누스) 추출물

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성)
 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

2019년 01월 23일

대전지방식품의약품안전청



발급번호 : 116V-Q02K-ASRC-SF16-989M

제품명	알크씨슬 정제
섭취방법	1일 1회, 1회 2정씩 충분한 물과 함께 섭취하시기 바랍니다.
섭취 시 주의사항	1) 알러르기 반응이 나타나는 경우에는 섭취 중단 2) 설사, 위통, 복부팽만 등의 위장관계 장애가 나타나는 경우에는 섭취에 주의(1) 영·유아, 어린이, 임신부와 수유부, 알러르기 체질, 치통을 받고 계신 분은 섭취 전 구입처 또는 고객 상담실로 문의 하시기 바랍니다. 2) 어린이에게 섭취시키고자 하는 경우에는 구입처로 문의 하시고 섭취 시 보호자의 관찰 하에 섭취하도록 하십시오. 3) 건강섭취량을 확인하신 후 섭취하십시오. 4) 섭취자의 건강상태에 따라 특이반응이 나타날 수 있습니다. 이 경우 섭취를 중단하신 후 구입처로 문의하시기 바랍니다. 5) 알러르기 반응이 나타나는 경우에는 섭취를 중단하여 주시기 바랍니다. 6) 설사, 위통, 복부팽만 등의 위장관계 장애가 나타나는 경우에는 섭취에 주의하여 주시기 바랍니다.
포장방법	병, PTP 포장
포장단위	1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 120정/병, 세트상자
포장재질	폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), PTP포장 (AI-Foil+PET, AI-Foil+PVC, AI-Foil+PE)
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황색의 제과정제
기능성내용	1) 간 건강에 도움을 줄 수 있음
제조방법	1) 제품의 제조에 사용되는 식품 또는 첨가물은 건강기능식품, 식품공전 및 식품첨가물관련의 기준 규격에 적합한 원료를 사용한다. 2) 청량한 원료[말크씨슬추출물분말, 결정살포로스, 알라기쿠마리추출물분말, 액조칼슘, 알베아추출물분말, 스타이리안산마그네슘, 말트덱스트린, 프락토올리고당분말, 아성추출물분말, 알베아추출물분말, 차기버섯추출물분말]을 첨가후 혼합한다. 3) 혼합이 완료된 후 단정기로 이송한다. 4) 최종조질장치 및 건조조질장치를 조절하여 중량 및 경도를 조절한다. 5) 최종제품을 포장하여 단정한다. 6) 규격기에 개량된 정제수, 발효주정, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 글리세린지방산에스테르를 투입 후 충분한 교반한다. 7) 단정된 정제에 코팅액을 분사하여, 코팅한다. 8) 최종규격 한 검체를 채취하여 반제품 시험을 의뢰한다.

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

Fig. 44. Item manufacturing report of jelly

④ 최적 쌍별귀뚜라미 젤리 제조

Table 43. Composition of jelly

원료명	처방 (%)
쌍별귀뚜라미추출물	1.00
액상과당	25.00
열대과일혼합농축액	7.00
텍스트린	5.00
강황추출물	0.30
혼합제제	1.50
난소화성말토덱스트린	1.00
쌍화농축액	0.50
수용성밀크씨슬	0.50
젖산칼슘	0.50
무수구연산	0.30
천연피치망고향	0.30
구연산삼나트륨	0.20
어성초추출물분말	0.10
헛개나무열매농축액	0.10
수크랄로스	0.02
정제수	56.68
합계	100.00

- 제품규격은 다음과 같이 설정하였다. (Fig. 44)

Naturetech (주) 네이처텍	제품표준서		문서번호	FEVI-E390
	쌍별귀뚜라미 젤리		제정일자	2018.12.07
			제정번호	00
			페이지	4 / 17
1. 제품 설명서(HACCP)				
제품명	쌍별귀뚜라미 젤리	약호	EVI	
식품유형	기타가공품	신고증번호	19860443015-286	
품목제조보고연월일	2018.12.07	고객사	네이처텍	
제조(포장)단위	15g*1, 2, 3, 5, 10, 14, 20, 25, 28, 30, 60, 100, 200, 300, 400, 600 포 중	제조일	네이처텍	
성분해당비율	5페이지 참조	법적규격	네이처텍	
원제품규격 (식품공정규격)	구분	법적규격	사내규격	
	성상	고유의 색채와 향미를 가지고 이며, 이취가 없어야 한다. 대장균군: n=5, c=1, m=0, M=10	이단, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 밀양색 ~ 적갈색의 밀린	대장균군: n=5, c=1, m=0, M=10 밀린세균수: 100 cfu/g 이하 리스티니아 모노사이토제니시스 음성
	생물학적 항목	-	-	중금속 및 대장균 음성 *연 1회 중금속 시험에 포함되어 유해성 평가시 적용 포함함.
	화학적 항목	-	-	-
물리적 항목	습내용량: 허용오차 ± 9.0% 이들들이 충족되어서는 안된다.	-	습내용량: 허용오차 ± 9%(13.65g~16.35g) 이들들이 충족되어서는 안된다.	-
보관, 유통상 주의사항	습기가 적고 피사균을 방지 하는 서늘한 곳에 보관하시고, 개봉 후에는 변질될 수 있으므로 바로 섭취			
포장방법 및 재결	15g* 1, 2, 3, 5, 10, 14, 20, 25, 28, 30, 60, 100, 200, 300, 400, 600 포 중 / 폴리에틸렌 (PE), 종이			
표시사항	제품명, 내용량, 식물의 유출, 원재료 및 원형, 섭취방법 및 섭취방법, 섭취시 주의사항, 보관방법 및 주의사항, 열량* 기능성분, 포장재질, 압송일 및 소재지, 반출 및 도착지, 소비자상담실, 소비자분쟁해결기 위해 대표 고객 또는 본사 안내, 불만제출권시, 제조번호, 유통기한, 부원 및 항시품 신고번호, 유통기한 기호 등 표시			
제품의 용도 및 기능성 내용	1. 섭취 방법 1일 1회, 1회 1포(15g)를 씹어서 섭취 2. 섭취 시 주의사항 ① 섭취 시 육질상태, 소화불량에 증상이 있을 경우 섭취를 중단하십시오. ② 개인에 의해 상태에 따라 이상 증상이 생길 경우 섭취를 중단하십시오. ③ 섭취 후 제품에 이상이 있는 경우 섭취를 중단하십시오. ④ 특정 성분 증상에 알레르기 제작용 성분 성분을 확인 후 섭취 하십시오. ⑤ 개봉 시 포장재에 의해 상처를 입을 위험이 있고, 개봉 시 내용물이 흘러나올 수 있으므로 즉시 소비 하십시오.			
유통기한	제조일로부터 18개월			
비고	-			

Fig. 45. Product specification of cricket jelly

- 확정된 처방비를 바탕으로 다음의 제조공정으로 시제품 생산을 실시하였다(Table 44).

Table 44. Pilot test of tablet

	원료투입	조건	시간
Step 1	젤리 제조 탱크에 액상과당을 투입하고, 혼합제제, 덱스트린, 수크랄로스를 혼합하여 투입 및 분산	25.0°C ± 3°C	-
Step 2	젤리 제조 탱크에 차가운 정제수 투입 및 80.0°C ± 3°C 까지 가온 혼합제제 용해	80.0°C ± 3°C	-
Step 3	내용물에 분말원료(구연산삼나트륨, 젯산칼슘)를 혼합하여 투입하고 용해	78.0°C ± 3°C	-
Step 4	내용물에 분말원료(쌍별귀뚜라미 추출물, 난소화성말토크스트린, 어성초추출물분말)를 혼합하여 투입하고 용해	78.0°C ± 3°C	
Step 5	내용물에 액상원료[열대과일농축액, 강황추출물(수용성커큐민), 쌍화농축액, 수용성밀크씨슬, 헛개나무열매농축액-엘]을 투입하고 용해	78.0°C ± 3°C	
Step 6	82°C ± 3°C 에서 30분간 배치 살균(감압)	78.0°C ± 3°C	30분
Step 7	구연산을 투입하고 용해 후 당도 보정	82.0°C ± 3°C	-
Step 8	40 mesh(420 µm) 여과 후 충전호퍼로 이송	78.0°C ± 3°C	-
Step 9	충전호퍼 온도를 75°C 이상으로 유지	75.0°C ± 3°C	-
Step 10	초기 내용량(15g/포) 충전	75.0°C ± 3°C	15g/포
Step 11	1~2일 간, 10~20°C 이하에서 에이징	75.0°C ± 3°C	-
Step 12	포장작업(벌크포장)	20.0°C 이하	-



원료 투입 및 혼합



충진 및 포장



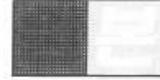
중량 확인



시제품

Fig. 46. Pilot test of jelly

- 최종 확정된 처방으로 품목제조보고를 완료하였다(Fig. 47).



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)		
	안기억	1963년 10월 18일		
	주소	전화번호	5325144	
	충청북도 진천군 초평면 용정길 29-8		휴대전화	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호		
	(주)내이치텍	19860443015		
	소재지	충청북도 진천군 초평면 용정길 29-8		
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호	19860443015286
	제품명	쌍별귀두라미 젤리		
	유통기한	제조일로부터 18개월		
	품질유지기한	-		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	15g * 1, 2, 3, 5, 10, 14, 20, 25, 28, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180포 등		
	성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 노란색의 젤리		
	품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 ■ 알러진증 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 12월 07일
보고인 안기억

진천군수 귀하

품목보고번호	19860443015-286				
처리부서	미래도시국 환경위생과	처리자성명	오종환	처리일자	2018년 12월 10일

Fig. 47. Item manufacturing report of jelly

- 유통기한 설정

쌍별귀뚜라미 젤리 유통기한의 경우 제조 및 유통, 보관의 상태가 유사한 기존 제품을 바탕으로 설정하였다. (Fig. 48).

유통기한 설정사유서

제 품 명	쌍별귀뚜라미 젤리			
1. 유통성분에 대한 검토				
o 원료의 구성 및 함량				
-부원료 : 기타과당, 말대과일분홍색소, 엷산, 감황수출물, 혼합제제(무드젤), 난소화성일당덱스트린, 쌍별귀뚜라미 추출물, 발효농축액, 알곡씨줄 농축액, 알산칼슘, 특수고안산, 천연향료(과자향고향), 구연산산나트륨, 아성조추출분말, 헛개나무열매농축액, 수크랄로스, 감황수				
o 원료의 특성				
- 제조 공정 시 혼련 및 고 시 철저한 원료실증(미생물, 미화학적실증)을 거쳐 멸균, 조제, 충전 및 포장한다.				
- 포장 시 포장형태는 1개포장재질은 충전 포장하며 포장완료상태에서의 외부로부터 공기유입이나 기타이물 혼입이 방지되고 미생물 등의 오염이 없는 형태임.				
- 제조공정에 따른 본제품의 제조공정은 각 공정마다 미생물 등의 오염이 없도록 철저하게 관리되고 있으며, 또한 제품 함유된 영양소 성분들의 각 제조공정에 따른 물리적 또는 화학적 변화가 최소화되어 당해 규격에 적합하도록 중간 품질관리를 실시하고 있어 최종제품의 품질보존에도 문제가 없는 제품임.				
2. 제조공정 및 포장형태의 검토				
o 제조공정도				
원료구입 및 선별 -> 칭량 -> 혼합 -> 용해 -> 살균 -> 충전 및 포장 -> 검사 -> 출하				
o 포장차질 및 형태				
-본 제품의 포장형태는 포 포장, 박스포장으로 포장 완료상태에서 외부로부터의 공기유입이나 수분흡수가 방지되고 자외선이 차단되어 미생물 등의 오염이 없이 완제품 저장시에도 안정한 상태를 유지할 수 있음				
o 제조공정에 따른 보존성의 검토				
-본 제품의 제조공정은 각 공정마다 미생물 등의 오염이 없도록 철저하게 관리되고 있어 제품의 부패, 변질에 영향을 주는 미생물이 최종제품에 존재하지 않는 상태임				
-제품에 함유된 영양소성분들의 각 제조공정에 따른 물리적 또는 화학적 변화가 최소화 되고, 당해 규격에 적합하도록 중간 품질관리를 실시하고 있어 최종제품의 품질보존에도 문제가 없음				
3. 유통조건 및 유사제품의 비교				
o 포장의 기후조건에서 유통되고 보관, 전열, 소비자 보관 등은 고온다습하거나 저사광선을 피해 서늘한 곳에 보관할 것을 권장하고 있음				
o 유사제품과의 비교				
제품명	회사명	등록신고번호	유통기한	등록일자
뉴뉴 콜리겐 워터젤리	한국바이오파마	19950443100223	18개월	2019.03.07
4. 최종결론				
o 본 제품에 대한 유통기한을 18개월로 예측하고, 이를 설정하였을 경우의 내용으로 볼 때 제품의 유통조건 및 제조공정과 보관방법으로 인하여 제품의 보존성은 확보될 수 있으며, 유통기한이 18개월 이상 되어되거나 유통기한이 18개월만 유사제품과 비교해도 품질관리에 문제가 없을 것으로 사료됨				
o 더불어 유통과정중의 품질변화나 부적합사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 본 제품의 유통기한을 18개월로 설정하고자 함				

기존 유통제품 유통기한 비교서

제품명	쌍별귀뚜라미 젤리	뉴뉴 콜리겐 워터젤리
업체명	네이처릭	한국바이오파마
유통기한	18개월	18개월
식품유형	기타과당제품	기타과당제품
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 노란색의 젤리	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 노란 분홍색-붉은 갈색의 유통성있는 반고체
포장재질	밀봉포장/플리메일렌	밀봉포장/플리메일렌
유통 및 보존조건	실온유통	실온유통
보존료 사용여부	없음	없음
유당,유채리여부	없음	없음
살균 및 멸균방법	82℃±3℃, 30분±5분	80℃±3℃, 30분±5분
유통기한설정실험여부	없음	없음
기타	-	19950443100223 2018-03-07

상기와 같이 기존 유통제품 유통기한 비교서를 제출합니다.

2018년 12월 06일

보고인 : 안 기 역 (인)

Fig. 48. Report of expiration date

2-5 연구 결론

○ 부화효율 증대

부화효율을 증대시키기 위해 산란된 알의 자극 유무가 부화율에 미치는 요인, 온도, 습도가 부화율에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

실험한 결과 난에 자극을 준 처리구는 부화율이 약 50% 전후이었으며, 난에 자극을 주지 않은 처리구는 부화율이 90%이상이었다.

상대습도(30%, 50%, 70%, 90%)에 따른 부화율을 조사한 결과 상대습도가 증가할수록 부화율이 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 초기 채란 받는 배지의 수분 상태와 연관된 것이라 판단되며 상대습도가 낮을수록 채란배지의 수분을 감소시켜 부화율에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 상대습도가 높을수록 부화 기간이 조금씩 감소하는 경향이 나타났다.

이전 부화율에 대한 연구 결과(Her, 2014, Oh 2010, Jung 2007)는 약 35.8~86.7%와 다소 차이가 있으나 이와 같은 결과는 부화조건에서 상대습도와 부화처리 과정 중 알의 외부충격으로 인한 결과로 사료된다.

부화율에 영향을 미치는 요인 중 온도와 습도를 달리하여 부화율에 미치는 요인을 조사하였다. 온도(20℃, 25℃, 30℃, 35℃)에 따른 부화특성을 조사한 결과 20℃ 이상의 조건에서 부화율의 차이는 거의 없었으며, 온도가 높아짐에 따라 부화기간은 38.3일에서 7.1일로 크게 단축되었다. 이전 연구 결과(Oh, 2010)는 20℃의 부화율은 40%미만, 온도가 증가함에 따라 부화율이 향상되며, 35℃에는 86.7%의 결과와 다소 차이가 있었다.

○ 산란율 증대를 위한 요인 선발

산란특성 조사결과 25℃에서 1,710개로 가장 많은 산란수가 나타났으며, 20℃에서 210개의 산란수를 나타냈으나 이는 실험 전 28℃ 조건에서 사육된 환경에서 발육된 알로 산란처리 후 3일 이내에 산란된 결과라 사료되며, 20℃에서는 정상적인 산란이 이루어지지 않을 것으로 판단된다. 이전 연구결과(Her, 2014, Oh 2010, Jung 2007)와 비교시 산란수는 각각 1100개 전후, 500~700개, 648개로 이번 실험과 다소 차이가 있으며, 산란 환경에 대한 조건이 명확히 제시되지 않아 직접적인 비교는 어려운 상황이다.

농가에서 쌍별귀뚜라미를 사육하는 형태에서 큰 차이는 채소를 급여하여 사육하는 방법과 급여하지 않는 방법으로 나눌 수 있다. 이번 실험에서 두 가지 사육방법을 비교한 결과 채소를 급여한 경우가 생존율과 생산량이 각각 1.8배, 2.5배로 모두 높게 나타났으며, 어린 약충일수록 사료보다 채소를 선호하는 형태가 관찰되었다. 이번 실험에 사용된 사료의 조단백질 함량은 21.8%이었으며, 산란계사료, 비육돈사료, 육계사료의 조단백질 함량은 15.5~20%(Her et al., 2014)로 약 6% 이내로 차이가 있었다.

○ 약충 생존율 증대

쌍별귀뚜라미의 사육밀도에 따른 특성을 조사한 결과 일정한 사육용기(150cm x 60cm x 50cm)에서 사육밀도가 높을수록 개체 평균 무게는 감소하는 결과가 나타났으나 15,000개

체 이상의 밀도에서는 개체 평균 무게가 감소하지 않은 결과가 나타났다. 일반적으로 곤충을 사육할 경우 일정한 공간에서 일정 밀도 이상의 개체수를 사육하면 성충으로 생존하여 살아남는 개체수와 크기의 한계점을 나타내는 경우가 많은데 이번 실험에서도 15,000개체 이상 처리구에서 개체 평균 무게가 감소하지 않은 결과로 유추해 볼 때 최소 개체 평균 무게의 밀도는 15,000개체가 적정한 것으로 사료된다. 생존율에서 밀도가 증가하면 생존율이 감소하는 결과가 나타났으며 10,000개체의 처리구에서 생존율이 28%로 생존율적인 측면에서 볼 때 사육밀도는 10,000처리구가 적정할 것으로 사료된다. 총 생산량적인 측면에서는 밀도가 높을수록 생산량이 증가하였으나 10,000개체 처리구와 15,000개체 처리구의 생산량은 동일하였다. 채소를 포함한 사료 요구율의 결과에서 10,000개체 처리구는 3.3이었으나 15,000개체, 20,000개체 처리구에서는 4.3, 4.5로 사료 요구율이 크게 향상하였다. 이와 같은 결과를 종합적으로 볼 때 150cm x 60cm x 50cm 사육용기를 기준으로 적정 사육 밀도는 10,000개체의 밀도가 적정한 것으로 사료된다.

쌍별귀뚜라미의 성비는 큰 유의차는 없었으며, 2016년 식약처에 식품원료로 등재되었으며 식품안전성 기준으로 납 0.3 mg/kg 이하, 카드뮴 0.3 mg/kg 이하 규정되어 있어 생산된 쌍별귀뚜라미의 중금속 함량을 검사한 결과 두 가지의 중금속은 불검출 되었다. 또한 기존 사육농가들의 사료 조단백 함량을 검사한 결과 21.8%, 21.5%이었으며, 시험 중 생산된 귀뚜라미의 조단백함량은 57.7%로 나타났다.

쌍별귀뚜라미의 대량생산을 위해서는 생산효율을 높여 생산량과 경제성을 갖추는 것이 무엇보다 중요하며 생산효율을 높이기 위해서는 단위 면적당 사육밀도, 부화효율, 산란효율, 사육환경에 대한 부분으로 이번 연구결과가 쌍별귀뚜라미의 대량사육 방법에 일부 활용되는 계기가 될 것으로 기대된다.

○ 쌍별귀뚜라미의 최적 추출조건 확립을 위한 in vitro 효능 검증 스크리닝

알코올에 의한 간 손상과 이로 인해 발생하는 질환 (Alcoholic Liver Disease, ALD)은 모두 과도한 음주 섭취에 의해 간에서 나타나는 질환성 징후들을 포괄하는 것으로, 이러한 대표적 징후 및 질환은 지방간염, 간섬유증 및 간경변을 포함한다. 이러한 간 손상 및 질환은 알코올의 간 내 대사 작용으로 인해 발생하는 활성산소 (ROS)가 주요 원인으로 알려져 있으며, 따라서 알코올에 의한 간 손상 및 질환에 대한 보호 효과를 줄 수 있는 기능성 식품의 개발에 항산화 기능이 있는 식품의 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

식용곤충은 가축 사육에 비해 사육과정 중에 발생하는 온실가스 배출량이 적고 물 소비량이 적어 친환경적인 가치를 인정받고 있으며, 육류에 비해 단백질 및 비타민의 함량이 월등히 높아 영양학적인 가치 또한 우수하다. 더욱이, 최근의 많은 연구를 통해 식용곤충의 항산화 기능에 대한 보고가 꾸준히 제시되고 있으므로, 이를 통한 식용곤충의 기능성 식품 개발은 미래식량의 가능성 및 대중화에 대한 근거로 작용하여 이에 대한 과학기술적 연구가 급속히 증가하고 있는 실정이다.

국내 식품원료로 등록되어 있는 7종의 곤충 소재 중 쌍별귀뚜라미의 경우 활성산소가 주요원인으로 작용하는 노화 및 비만에 보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 하지만, 알코올성 간 손상 및 질환에 대한 상기 소재의 보호 효과는 아직 미미한 상태이며, 더욱이 이에 대한 분자기작의 연구는 전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구를

통하여, 쌍별귀뚜라미 소재의 알코올성 간손상 및 질환에 대한 보호효과를 증명하고 더 나아가 이에 대한 분자기작을 증명하여 상기소재의 기능성식품으로의 가능성을 증명하고자 하였다.

○ 선정된 추출물의 알코올성 간 손상에 대한 동물모델을 이용한 효능 검증 및 메커니즘 규명

간에서 알코올이 대사되면서 생성되는 활성산소에 의해 직접적으로 손상을 받는 간조직에 대한 분석을 간조직 내 apoptosis와 지방간의 발생여부를 통해 분석하였으며, 분석기법으로 IB 및 IF 조직염색을 이용하여 증명하였다. 알코올성 간손상의 대표적 지표인 지방간을 확인하기 위해 조직학적 분석을 실시하였을 때, 다량의 lipid droplet이 알코올 투여 그룹에서 관찰되었으며 쌍별귀뚜라미 추출물의 투여시 감소되는 것을 확인하였으며, 지방생합성의 대표적인 지표인 FAS와 ACC, SREBP-1 또한 동일한 경향을 보여 쌍별귀뚜라미 추출물이 알코올에 의한 지방간 억제에 효과가 있음을 증명하였다.

체내로 들어온 알코올은 간에서 분해되며 과량의 활성산소를 발생시키고, 이는 p53을 매개로 한 apoptosis를 활성화시켜 간 손상을 유발하였다. 이에, p53과 p53을 매개로 한 apoptosis 기작에 관여하는 다양한 지표들의 간 조직내 발현량이 알코올에 의해 증가함을 확인하였으며, 쌍별귀뚜라미에 의해 유의적으로 감소함을 확인하였다. 알코올에 의한 간조직의 산화적 손상을 확인하기 위해 MDA와 8-OH-dG의 활성을 조직학적으로 관찰한 결과 쌍별귀뚜라미 추출물을 투여한 그룹에서 유의적으로 상가지표가 감소하는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 쌍별귀뚜라미의 항산화능에 의한 것임을 증명하였다.

○ Kupffer cell 모델을 이용한 추출물의 염증관련 메커니즘 규명

장내로 들어온 알코올 또한 장내 활성산소를 증가시켜 장막의 손상을 유도하며, 그 결과 장막 투과성의 증가로 인한 장내 미생물의 간 유입을 유발한다. 이에, 알코올에 의한 장 손상 및 쌍별귀뚜라미의 보호효과를 장조직의 조직학적 분석을 통해 확인하였다. 알코올에 의한 장내미생물의 간으로의 유입은 간조직 특정대식세포의 일종인 Kupffer 세포를 활성화시킨다. 이를 확인하기 위해 Kupffer 세포의 대표지표인 F4/80를 조직학적으로 확인하였고, 알코올 투여에 의해 상기세포의 활성이 증가함을 확인하였으며 쌍별귀뚜라미 추출물 처리 그룹에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이는 알코올에 의한 장막의 손상 및 장내 미생물의 간으로의 유입으로 인한 Kupffer 세포의 활성이 쌍별귀뚜라미에 의해 효과적으로 저해됨을 의미한다. 이러한 효과의 분자기작 규명을 위해 수행한 *in vitro* 세포실험을 통해, 장내미생물의 대표적 대식세포 활성화인자로 알려진 LPS에 의해 쥐 대식세포의 일종인 RAW 264.7 세포의 염증반응이 증가됨을 NO, cytokine, 및 MAPK의 활성을 통해 확인하였으며, 쌍별귀뚜라미 추출물에 의해 효과적으로 저해됨을 규명하였다.

쌍별귀뚜라미 추출물에서 유래된 glycosaminoglycan이 항염증 작용과 혈액내 지질을 감소시킨다는 것은 명백하게 보고되고 있다. 또한, carbon tetrachloride에 의해 유도된 Rat의 간섬유화 모델에서 glycosaminoglycan에 속하는 hyaluronic acid 와 chondroitin-4-sulphate

이 간내에서 항산화 효소의 활성을 강화시켜 간손상을 감소시켰다. 이러한 연구들은 glycosaminoglycan이 쌍별귀뚜라미 추출물 내에서 하나의 활성 물질로서의 가능성을 제시하고 있다. 실제로 glycosaminoglycans은 간의 세포외기질의 주요 구성성분이며 몇몇 연구는 간손상의 진행에 따라 glycosaminoglycans의 생리적인 수준에서 유의적인 증가를 관찰함으로써 간의 회복동안에 glycosaminoglycan이 중요한 기능을 가진다는 것을 제시하고 있다. 본 실험을 통해 알코올의 섭취로 인해 증가한 활성산소가 간 손상의 주요원인으로 작용함을 간 및 장조직의 손상을 통해 확인하였고, 쌍별귀뚜라미의 항산화능을 통해 효과적으로 저해될 수 있음을 증명하여 상기 소재의 기능성 식품으로의 가능성을 시사한다.

○ 표준화 및 품질관리를 위한 분석법 개발 및 원료 Pilot 생산공정개발

Glycosaminoglycan을 구성하는 성분 중 하나인 chondroitin sulfate sodium를 지표성분으로 선정하여 품질관리의 정확성과 신속성을 위하여 HPLC/UV를 이용한 분석법을 완료하였으며, HPLC/UV를 사용하여 Chondroitin sulfate sodium을 정량하는 이 분석법이 적합한 방법임을 검증하기 위하여 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성 등에 대하여 평가하였다. 검증결과 이 분석법은 쌍별귀뚜라미 추출물에서 Chondroitin sulfate sodium을 정량할 수 있는 적합한 방법이라는 것이 검증되었다.

원료 Pilot 생산공정개발을 위하여 여러 가지 공정변수를 이용하여 추출, 여과, 농축 그리고 건조공정을 확립하였다. 완료된 공정도를 바탕으로 Pilot 공정 validation을 실시한 결과 Lab-scale과 비슷한 결과를 보였다. 이상의 결과를 바탕으로 Pilot 공정 및 기준규격을 정하였다.

○ 원료의 유통기한 설정을 위한 안정성 실험

쌍별귀뚜라미 추출물 안정성은 식품의약품안전청 고시 제 2011-15호(식품 등의 유통기한 설정 기준)를 근거로 하여 장기보존 및 가속 조건 하에서 보존하면서 성상, 수분, 미생물(세균, 진균 및 대장균군) 및 기능성분의 함량(Chondroitin sulfate sodium)에 대하여 시험하여 평가 진행 중이며, 가속조건에서는 원료의 안정성이 확인되었다.

○ 원료에 대한 28일 안전성 실험

암수 Sprague-Dawley Rat을 이용하여 쌍별귀뚜라미 추출물을 28일간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하며 추출물에 대한 안전성을 평가하고 14일간의 회복군을 설정하여 추출물의 가역성 여부를 확인한 결과 안전성이 확인되었다.

○ 가공적성 검토를 통한 시제품 처방 개발 및 시제품 제작

연구단계에서는 표준화된 쌍별귀뚜라미 추출물을 이용하여 소비자들에게 친근하게 다가갈 수 있는 제형 개발 연구를 목표로 건강기능식품 및 일반식품들 중에서 일반적으로

유통되는 제형인 액상, 정제 그리고 젤리 중 쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 최적의 제형을 확인하고자 연구를 진행하였다. 액상의 경우 1차 처방실험에서 맛과 향에 대한 문제점이 발견되어 2차에서 일부 부원료를 변경하여 맛, 색상 및 향미를 개선하였으나, 액상제품의 pH에 따라 여과 시 잔여물이 남는 것을 확인되어 유통과정 중 제품의 품질에 문제가 발생하므로 액상제품은 적합하지 않다고 판단된다. 건강기능식품 제형 중 가장 많은 비율을 차지하는 것이 정제로 쌍별귀뚜라미 추출물을 이용한 정제의 개발이 적합할 것으로 판단되어 제형 가능여부를 확인하기 위한 처방실험을 실시하였다. 1차 처방실험에서 타정에는 문제가 없음을 확인되어, 정제에 추가 기능성을 강화하기 위하여 밀크씨슬추출물 또는 홍경천추출물을 추가하여 실험을 진행 시 1차 때와 마찬가지로 문제없이 타정되는 것을 확인되었다. 이를 바탕으로 조성 및 제조공정을 확립하고 pilot test를 통한 시제품 생산을 완료하였으며 품목제조보고를 완료하였다. 현재 건강기능식품 시장에서 소비자들에 큰 호응을 얻어 그 비중이 점차적으로 증가하고 있는 젤리 제형에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물 적용 가능성 처방실험을 실시하였다. 1차 처방실험에서 젤리 적용가능성을 확인하였으며 1차 평가에서 문제점으로 지적된 맛과 향에 대한 개선을 위하여 2차 실험에서 일부 향 및 농축액을 추가하여 처방실험을 완료하여 최종 처방실험 결과를 바탕으로 쌍별귀뚜라미 추출물을 첨가한 젤리 조성 및 제조공정을 확립하였으며 pilot test를 통한 시제품 생산을 실시하였고 정제와 마찬가지로 규격 설정 및 품목제조보고를 완료하였다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 쌍별귀뚜라미의 사육환경 개선을 통한 생산성 증대 (부화율 20%, 생존율 10%, 산란효율 증대)
- 추출 제조공정의 최적화를 통한 소재의 표준화 및 공정개발 확립 (파일럿 테스트를 통한 제조 공정도 1건 이상)
- 추출물의 알코올성 간손상에 대한 보호 효능 검증 및 메커니즘 규명 (대조군 대비 간 내 중성지방 30%, hepatic apoptosis 50% 이상 억제)
- 시작품 제작 (1종 이상)

3-2. 목표 달성여부

○ 연구목표

목 표	목 표 치	가중치 (%)	달성도 (%)	당초연구목표 대비 연구결과
쌍별귀뚜라미의 사육환경 개선을 통한 생산성 증대	부화율 20%, 생존율 10%, 산란효율 증대)	30%	120%	- 부화율 : 90%이상 50% 증대 - 산란효율 : 기존 채란 산란수 대비 25℃에서 700개 이상 채란 증대(기존 1000개 산란 - 결과 1700개 채란) - 생존율 : 약충 생존율 28~33% (8~13% 향상)
추출물의 알코올성 간손상에 대한 보호 효능 검증 및 메커니즘	대조군 대비 간 내 중성지방 30%, hepatic apoptosis 50% 이상 억제	30%	100%	- 대조군 대비 간 내 중성지방 30% 억제 - Hepatic apoptosis (TUNEL 69%, c-caspase 68% 억제)
추출 제조공정의 최적화를 통한 소재의 표준화 및 공정개발 확립	파일럿 테스트를 통한 제조 공정도 1건 이상	10%	100%	- 공정도 1건 - 제품기준규격 1건
시작품 제작	1종 이상	30%	120%	- 시제품 3종(일반식품 젤리1종, 건강기능식품 정제2종)
합계		100%		

○ 연구개발 성과 목표

목 표	목 표 치	가중치(%)	달성도(%)	성과결과
특허출원	1건	20%	100%	특허 출원1건
제품화	시제품 1건	40%	120%	일반식품 젤리1종 건강기능식품 정제2종
고용창출	2명	20%	120%	정규직 3명 고용
학술발표	2건	20%	100%	한국식품과학회 정기학술대회, BEXCO 2018.06.29 한국농약과학회 작물보호분야 공동 국제학술대회, 광주 컨벤션센터, 2018.10.24
합계		100%		

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1 사업화 계획

가. 생산계획

구분		(2022 년) 개발 종료 후 4년	(2023 년) 개발 종료 후 5년	(2024 년) 개발 종료 후 6년
국 내	시장점유율(%)	0.2	0.3	0.4
	판매량(단위: Box)	3,600	5,400	7,000
	판매단가(원)	150,000/3개월분	150,000/3개월분	150,000/3개월분
	국내매출액(백만원)	300	540	810
해 외	시장점유율(%)	0.01	0.02	0.04
	판매량(단위: Box)	700	1,000	7,000
	판매단가(\$)	-	-	-
	해외매출액(백만\$)	0.1	0.14	1
당사 생산능력1)		50 ton/일	50 ton/일	50 ton/일

나. 투자계획

항목		(2019년) 개발 종료 후 1년	(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년
매출원가1)		640	950	2180
판매관리비2)		256	380	592
자본적 지출	토지	1,000		
	건물/구축물		2,000	
	기계장치등		1,000	1,000
자본적지출 합계		1,000	3,000	1,000

4-2 사업화 전략

가. 사업화 전략

- 제품의 마케팅, 홍보, 광고, 판매 전략 수립 (관계사인 유니베라 한국 및 유니젠 미국, 유니베라 미국 및 기존 고객사 등과 연계)
- 기존 판매점 및 대리점을 이용한 제품 판매, 신규 판매라인 개척
- 국외 식품박람회 참가를 통한 제품 홍보, 광고, 마케팅 및 판매
- 수출 대상 국가별 선호 제형, 제품, 기능성, 인허가에 따른 마케팅 및 판매
- 오프라인 및 온라인 마켓 확대
- 천연물 기반 비즈니스 모델 개발

나. 국내·외 마케팅 전략

전 략	내 용
상용화 사업화 전략	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 전입상 (유효성 및 안전성 평가)을 완료 - 전입상이 완료되면 일반 기능성 식품으로 제품 개발 - 인체 적용시험 진행 후 식약처 개별인정 획득 - 잘 구축된 판매망과 마케팅 전략에 의해 사업화
건강 기능성 효과에 따른 제품군 분리	<ul style="list-style-type: none"> - 기존 판매망 이용 일반가공품 유통 및 판매 라인업 구성 - 고객 맞춤형 접근을 위한 타겟형 제품군 라인업 구성 - 건강 기능 및 효능별 제품군 라인업 구성
상품 디자인	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성만을 강조하여 제품을 판매하는 것이 아니라 소비자가 느끼는 감성을 충분히 충족시켜 줄 수 있는 제품 디자인 - 단순한 디자인만이 아닌 과학적인 효능 및 안전성 검증 자료 인용을 통한 소비자 신뢰성 확보를 위한 제품 디자인 구상
시장 세분화	<ul style="list-style-type: none"> - 대상의 세분화 : 위험군, 예방군 등의 고객 세분화 - 건식 및 일반식품의 차별화 - 판매루트의 강화 및 세분화 - 가격의 다양화
제품과 소비자의 연결고리 창조	<ul style="list-style-type: none"> - 소비자가 무엇을 원하는지 찾아내고 소비자가 들여야 할 기회비용을 생각하며, 지속적인 소비자와의 커뮤니케이션을 통해 가장 큰 편의를 제공할 제품 (가치) 창조
소비자 체험 기회 제공	<ul style="list-style-type: none"> - 소비자 신뢰도 제고 - “건강한 대한민국 만들기” 캠페인 <ul style="list-style-type: none"> ▶ CO-WORK업체와 병행하여 추진 ▶ 해외 환자 대상 매출의 1% 기부 등 - 농가와 함께 성장하는 이미지 제고 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 농가의 이익창출/건강 유지 - 소비자 다양한 체험(힐링캠프) <ul style="list-style-type: none"> ▶ 농가의 부가적 이익 창출(관광 등) ▶ 힐링하우스 운영 : 가족단위/그룹단위 체험프로그램 운영
트렌드 파악 및 재창조	<ul style="list-style-type: none"> - 끊임없이 변화하는 건강기능식품 시장 트렌드를 빠른 시간내에 파악 - 트렌드를 따라가는 것에서 만족하지 않고 트렌드를 이끄는 기업 마인드로써 시장 주도
주문식 마케팅	<ul style="list-style-type: none"> - 효율적 마케팅 툴을 소비자가 원하는 형태로 제공 - 고객 맞춤형을 목표로 소비자 소리에 귀기울여 원투원 마케팅 진행 - 관심정보물을 지속적으로 제공함으로써 소비자의 알아야 할 권리 존중 - 좋은 이미지의 파워브랜드를 활용함으로써 소비자가 믿고 살 수 있는 브랜드 마케팅 전략 수립
효능에 대한 과학적 근거 입증	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 소재의 기존 및 신규 기능성 자료 확보 및 홍보 - 과학적 데이터가 확보된 건강 기능성 식품 판매 전략 수립 <ul style="list-style-type: none"> : 권장 섭취량, 안전성, 기능성 전입상 자료 공개 - 치료 목적보다 장기간 섭취로 예방차원에서의 섭취 권장 - 타 제품과의 비교분석을 통한 제품 우수성 홍보 및 소비자들의 신뢰성 확보
동반상승 효과	<ul style="list-style-type: none"> - 관련 업체들의 협력을 통한 동반 시장 진출 방안 모색 - 식품 박람회 등 제품 전시를 통한 제품 홍보 및 판매
해외박람회 참가	<ul style="list-style-type: none"> - 스위스 Vitafoods Europe - 태국 Thaifex - 중국 HNC China - 싱가포르 Vitafoods Aisa - 베트남 Food Epo
고객 관리	<ul style="list-style-type: none"> - 고정 고객 및 팬 확보 등 지속적인 고객 관리 - 고객 평가 및 희망사항을 브랜드 만들기에 반영 - 고객 로열티 강화 집중 - 소비자 트렌드에 대한 대응 - 소비자 참여 프로그램

붙임. 참고문헌

- 김광희 (1994) 곤충의 산업적 이용기술. 농촌진흥청. pp.45.
- 김창효 (1993) 곤충의 사육법. 경상대학교 출판부. pp. 229~237.
- 농진청 (2013) 산업곤충사육기준 및 규격
- 농진청 (2014) 산업곤충도감
- 농진청 (2014) 산업곤충표준사육매뉴얼
- 농진청 (2014). 식용곤충사육표준지침
- 농진청 (2015) 식용곤충안전사육매뉴얼
- 농진청 (2015) 곤충산업실태조사 보고서
- 농진청 (2016) 국내외곤충산업별 연구동향분석
- 농진청 (2017) 산업곤충대량사육실습기술
- 전남농업기술원 (2014) 귀뚜라미 대량사육기술 개발
- Ahn MY, Ryu KS, Park BY, Kim DW, Kim IS, Kim SH (2000) Effects of cricket supplements on the chicken meats and its eggs. Korean J Poult Sci 27(3), 197~202.
- Ahn MY, Lee YW, Ryu KS, Lee HS, Kim IS, Kim JW, Lee YK, Kim ES, Kim YS (2002) Effects of cricket supplements on the chicken meats and its eggs. Korean J Food Technol 34(4), 684~687.
- Choo JK, Choi EH (1983) Studies on the geographic adaptation of field cricket. Korean J Entomol 13, 47~53.
- Iba M, Nagano T, Urano A (1995) Effects of population density of growth, behavior and levels of biogenic amines in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. Zool Sci 12, 695~702.
- Jung CE, Bae YH (2007) Oviposition and temperature-dependent egg hatching by the field cricket, *Gryllus bimaculatus* De Geer(Orthoptera: Gryllidae). Korean J Soil Zool 12(1~2), 28~32.
- Keum ES, Kim JW, Park DS, Jung CE (2012) Morphological and genetic comparison of *Teleogryllus emma* and *Gryllus bimaculatus*(Orthoptera: Gryllidae) used for feed insect industry. Korean J Soil Zool 16(1~2), 42~46.
- Kim NJ, Hong SJ, Seol KY, Kim SH, Ahn NH, Kim MA (2007) Effect of temperature on development and reproduction of the emma field cricket, *Teleogryllus emma*(Orthoptera: Gryllidae). Int J Indust Entomol 15(1), 69~73.
- Merkel G (1977) The effects of temperature and food quality on the larval development of *Gryllus bimaculatus*(Orthoptera; Gryllidae). Oecologia(Berl) 30, 129~140
- Oh YN (2010) Effect of foods, temperature, light and bed materials on the development of *Gryllus bimaculatus*(Insecta; Orthoptera; Gryllidae) population. Daejin University Master's thesis pp. 15~17.
- Simmons LW (1986a) Inter-male competition and mating success in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*(De Geer). Anim Behav 34(2), 567~579.
- Simmons LW (1986b) Female choice in the field cricket *Gryllus bimaculatus*(De Geer). Anim Behav 34(5), 1463~1470.
- Tregenza T, Wedell N (1998) Benefits of multiple mates in the cricket

Gryllus bimaculatus. *Evolution* 52(6), 1726-1730.

Ghosh Dastidar, S.; Warner, J. B.; Warner, D. R.; McClain, C. J.; Kirpich, I. A. Rodent Models of Alcoholic Liver Disease: Role of Binge Ethanol Administration. *Biomolecules* 2018, 8, 3.

Luedde, T.; Kaplowitz, N.; Schwabe, R. F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 2014, 147, 765-783. e4.

Haupt, S.; Berger, M.; Goldberg, Z.; Haupt, Y. Apoptosis—the p53 network. *J. Cell Sci.* 2003, 116, 4077-4085.

Wang, K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis.* 2015, 5, e996.

Zeng, T.; Zhang, C.-L.; Xiao, M.; Yang, R.; Xie, K.-Q. Critical roles of Kupffer cells in the pathogenesis of alcoholic liver disease: from basic science to clinical trials. *Front Immunol.* 2016, 7, 538.

Tsai, T. H.; Tam, K.; Chen, S. F.; Liou, J. Y.; Tsai, Y. C.; Lee, Y. M.; Huang, T. Y.; Shyue, S. K. Deletion of caveolin-1 attenuates LPS/GalN-induced acute liver injury in mice. *J. Cell. Mol. Med.* 2018, 22, 5573-5582.

Bala, S.; Marcos, M.; Kodys, K.; Csak, T.; Catalano, D.; Mandrekar, P.; Szabo, G. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor α (TNF α) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 1436-1444.

Purohit, V.; Bode, J. C.; Bode, C.; Brenner, D. A.; Choudhry, M. A.; Hamilton, F.; Kang, Y. J.; Keshavarzian, A.; Rao, R.; Sartor, R. B. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol* 2008, 42, 349-361.

Shen, L.; Black, E. D.; Witkowski, E. D.; Lencer, W. I.; Guerriero, V.; Schneeberger, E. E.; Turner, J. R. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J. Cell Sci.* 2006, 119, 2095-2106.

MacKay, C. E.; Shaifta, Y.; Snetkov, V. V.; Francois, A. A.; Ward, J. P.; Knock, G. A. ROS-dependent activation of RhoA/Rho-kinase in pulmonary artery: role of Src-family kinases and ARHGEF1. *Free Radic. Biol. Med.* 2017, 110, 316-331.

Ahn, M. Y.; Han, J. W.; Hwang, J. S.; Yun, E. Y.; Lee, B. M. Anti-inflammatory effect of glycosaminoglycan derived from *Gryllus bimaculatus* (a type of cricket, insect) on adjuvant-treated chronic arthritis rat model. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 2014, 77, 1332-1345.

Ahn, M. Y.; Hwang, J. S.; Kim, M.-J.; Park, K.-K. Antilipidemic effects and gene expression profiling of the glycosaminoglycans from cricket in rats on a high fat diet. *Arch. Pharm. Res.* 2016, *39*, 926–936.

Campo, G. M.; Avenoso, A.; Campo, S.; D'Ascola, A.; Ferlazzo, A. M.; Calatroni, A. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chem. Biol. Interact.* 2004, *148*, 125–138.

Ha, B. J.; Lee, . Y. The Effect of Chondroitin Sulfate against CCl₄-Induced Hepatotoxicity. *Biol. Pharmaceutic. Bull.* 2003, *26*, 622–626.

Laurence DJ, Higginson JM. Detection and estimation of chondroitin sulphate in submicrogram quantities as a complex on acrylamide gel. *J Chromatogr.* 1969 Mar 11;40(1):145-51.

Okamoto H, et., al. Development of a novel analytical method for determination of chondroitin sulfate using an in-capillary enzyme reaction. *J Chromatogr A.* 2004 Apr 30;1035(1):137-44.

ICH guideline, validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005

식품의약품안전처, 생체시료분석법 벨리데이션 해설서, 2010

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.