

817037-3

면역 증진 건강기능식품 원료 개발  
유기 게르마늄 함유 고부가가치  
미나리 생산 및

최종 보고서

2019

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
기술사업화연구개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003183-01

# 유기 게르마늄 함유 고부가가치 미나리 생산 및 면역 증진 건강기능식품 원료 개발 최종 보고서

2020. 07. 17.

주관연구기관 / (주)아리바이오  
협동연구기관 / 영농조합 블루마운트  
협동연구기관 / 청주대 산학협력단

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

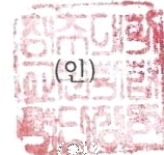
본 보고서를 “유기게르마늄 함유 고부가가치 미나리 생산 및 면역증진 건강기능식품 원료개발”(개발기간 : 2017.08.30. ~ 2019.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : (주)아리바이오 (대표자) 정재준



협동연구기관명 : 청주대학교 산학협력단 (대표자) 박호표



참여기관명 : 영농조합 블루마운트 (대표자) 안철호



주관연구책임자 : 서보승

협동연구책임자 : 이명선

참여기관책임자 : 안철호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	817037-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.08~ 2019.12	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	유기게르마늄 함유 고부가가치 미나리생산 및 면역증진 건강기능식품 원료개발			
연구책임자	서보승	해당단계 참여연구원 수	총: 19명 내부: 13명 외부: 6명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 19명 내부: 13명 외부: 6명	총 연구개발비	정부:725,000천원 민간:242,000천원 계:967,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)아리바이오 중앙연구원			참여기업명 청주대 산학협력단 영농조합 블루마운트	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

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		특 허 등 록 제 20399 12호									
		특 허 출원 특 허 출원 10-20 18-01 34119, 10-20 19-01 20592, 10-20 19-01 78376									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ GMP 시설에서 생산 조건 최적화(제조공정 확립)</li> <li>○ 자사에서 실시한 특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도, 범위에 대한 결과 보고서, 제품 안정성 대한 결과보고서 및 관련 공인시험성적서</li> <li>○ in vitro, In vivo 연구결과 시험군에서 정상 대조군 대비하여 농도 의존적으로 유의하게 감소 또는 증가 확인.</li> <li>○ GLP-기관 독성 시험 실시 및 보고서(단회투여, 90일 반복투여, 복귀돌연변이, 소핵시험, 염색체이상반응) 독성없음.</li> <li>○ ICH-GCP 기준의 인체적용시험 보고서(실시기관: 한국체육대학교 임상센터)</li> <li>○ “면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음” 로 신청 기능성 원료 신청</li> <li>○ 정량적 연구성과: 지식재산권 특허 출원 2건 (3건 완료), 특허 등록 1건 (1건 완료) 기술실시 1건 (1건 완료), 제품화 1건 (2건 완료), 고용창출 6명 (16명 완료), 논문SCI(E)급이상 2편(SCI(E)급 2편 submission, KCI급 1편 publish, 총 3편 완료)</li> <li>○ 성과목표 외 추가성과: 정책활용 1건, 기타 연구활용 1건, 매출액 1.34백만원</li> </ul>	보고서 면수  157
---	-------------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고농도 유기 게르마늄 미나리의 면역증진 고부가가치 건강기능식품 원료 및 제품 개발</li> <li>○ 게르마늄미나리의 안전성 확보             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포실험, 동물실험, 인체적용시험을 통한 안전성 확보</li> <li>- 독성시험: cell surviability test(MTT), 복귀돌연변이시험, 단회투여 경구독성 시험, 반복투여 경구독성시험, 체내소해시험</li> </ul> </li> <li>○ 게르마늄미나리의 기준규격 확보             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 영양성분(7종), 미생물검사(1종), 잔류농약검사(5종), 중금속검사(4종)를 통한 기준규격 설정(공인시험기관 성적서 포함)</li> <li>- 성상(색, 향, 맛), 지표(기능)성분 설정(공인시험기관 성적서 포함)</li> <li>- 지표성분 벨리테이션(특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직진성, 범위 등) 확보</li> </ul> </li> <li>○ 게르마늄미나리의 추출공정 및 제품화공정 확보             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 지표(기능)성분의 함량을 최적화시킨 lab, pilot, mass scale 공정 개발</li> <li>- 추출 용매, 온도, 시간, 필터, 살균, 건조방법 최적화 설정</li> <li>- 유통기한 설정: 가혹, 가속시험을 통한 안정한 유통기한 설정</li> </ul> </li> <li>○ 게르마늄미나리의 건강기능식품 기능성원료 인정 신청             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건강기능식품 기능성원료 신청요건 확보 후 “면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음” 기능성원료 인정 신청(식약처 인정)</li> </ul> </li> <li>○ 게르마늄미나리의 건강기능식품 제품화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 게르마늄미나리를 첨가한 건강기능식품 제품화</li> </ul> </li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<p>&lt;연구개발성과 목표 및 결과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지식재산권 :             <ul style="list-style-type: none"> <li>특허출원 2건 (10-2018-0134119, 10-2019-0178376, 10-2019-0120592, 3건 완료),</li> <li>특허등록 1건 (1건 완료, 제2039912호)</li> </ul> </li> <li>○ 기술실시 : 기술료 1건 (1건 완료, 자체 기술이전)</li> <li>○ 제품화 : 1건 (1건 완료)</li> <li>○ 고용창출 : 6명 (16명 완료)</li> <li>○ 논문: SCI(E)급이상 2편 (SCI(E)급 submission 2편, KCI급 1편, 총 3편 완료)</li> <li>○ 홍보전시: 1건 (제천한방바이오박람회 1건)</li> <li>○ 기타(타 연구활용 등): 1건 (1건 완료)</li> </ul> <p>&lt;성과 목표 외 추가 성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 정책활용: 2건</li> <li>○ 매출액: 13,344만원</li> </ul>

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 천연물의 기능우수성을 통한 국내산 원료에 대한 연구개발 투자 증대</li> <li>- 국내산 천연물의 건기식 기능성원료 인증을 통한 기술력증대로 해외 기능성 인증 신청을 위한 기반 구축</li> <li>- 기능성 제품을 통한 면역 기능 개선으로 건강한 사회구현</li> <li>- 우수한 품질의 국내산 농산물의 기능성 원료로의 개발을 통한 연구기반 구축과 더불어 다른 우수 농수축산물의 고기능성 제품화 기반 마련</li> <li>- 천연물의 기능성발굴을 통한 고부가가치 제품개발의 기초데이터 제공</li> <li>- 국내 건기식 개별인증 로드맵 뿐만 아니라 해외 건기식 인증 로드맵 구축을 통한 다른 원료의 단기간, 저비용으로 인증획득 추진 및 판로 확보</li> <li>- 기능성 평가를 위한 R&amp;D 모델 및 biomarker 구축을 통한 연구경쟁력 향상</li> </ul> </li> <li>○ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 기능성 제품을 통한 건강유지로 의료비 절감</li> <li>- 천연 원료로 기능성인증을 통한 미국, 일본, 유럽 등에 수출</li> <li>- 게르마늄미나리의 고부가가치화와 재배면적 증가를 통한 농가소득증대</li> <li>- 게르마늄미나리의 생산에 따른 농민들의 안정적인 판로 확보</li> <li>- 건강기능식품 시장에서 국산제품의 시장 점유율 확대</li> <li>- 국내 천연기능성원료 개발로 인한 농산물과 기능성 원료의 생산, 유통, 판매 그리고 기계제조업 부분의 고용확대(신규일자리 창출)와 소득 증대</li> <li>- 전문인력양성 및 채용, 기술력우위를 통한 글로벌 강소기업으로의 도약</li> </ul> </li> <li>○ 국내농산물의 우수성 확보를 위한 연구 기반 자료 제공</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>게르마늄</p>	<p>미나리</p>	<p>면역</p>	<p>사이토카인</p>	<p>NK 세포</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Germanium</p>	<p><i>Oenanthe Japonica</i></p>	<p>Immune</p>	<p>Cytokine</p>	<p>NK cell</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

# 〈 목 차 〉

1장 연구개발과제의 개요 .....	7
1절 연구개발 목적 .....	7
1. 고농도 유기 케르마늄 함유 미나리의 건강기능식품 소재 개발 및 제품화 ...	7
2절 연구개발 필요성 .....	7
3절 연구개발 동향 .....	7
4절 연구개발 범위 .....	8
1. 개발 내용 및 범위 .....	8
2. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계 .....	10
2장 연구수행 내용 및 결과 .....	18
1절 연구개발성과.....	18
1. 특허등록 .....	18
2. 특허출원 .....	19
3. 인체적용시험보고서 .....	21
4. GLP 독성시험 .....	24
5. GMP 3 batch 제조지시기록서 (아리바이오) .....	25
6. 3 batch 공인기관 시험성적서 (한국식품과학연구원) .....	26
7. <i>in vitro</i> 연구논문 .....	28
8. <i>in vivo</i> 연구논문 .....	29
9. 홍보전시 .....	34
2절 총괄과제가 있는 경우 세부과제별 결과 .....	35
1. 1차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과 .....	35
2. 1차년 협동기관(영농조합법인 블루마운트) 연구개발 및 결과 .....	39
3. 1차년 협동기관(청주대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과 .....	42
4. 2차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과 .....	43
5. 2차년 협동기관(영농조합법인 블루마운트) 연구개발 및 결과 .....	78
6. 2차년 협동기관(청주대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과 .....	84
7. 3차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과 .....	87
8. 3차년 협동기관(영농조합법인 블루마운트) 연구개발 및 결과 .....	121
9. 3차년 협동기관(청주대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과 .....	123
10. 사업성과 및 매출실적 .....	126
3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	128
1절 목표 .....	128
2절 목표 달성여부 .....	128
3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) .....	137
4장 연구결과의 활용 계획 등.....	138
붙임. 참고 문헌 .....	143
<별첨> 연구개발보고서 초록.....	148
<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서.....	150

# 1장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발 목적

1. 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 건강기능식품 소재 개발 및 제품화  
가. 고부가가치 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리 수경재배법 개발  
나. 고부가가치 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 건강기능식품 기능성원료 개발

## 2절 연구개발의 필요성

- 미나리는 그동안 단순 생산에만 의존하고 있어 출하에 따른 수급 불균형 초래
  - 미나리 생산량의 70~75%가 도매시장을 통해 출하되고 있음.
  - 월별 도매가격 변동 폭으로 인해 수급 및 가격불안정이 만성화 될 우려가 있음
- 미나리 2차 가공식품 개발 부재로 농가 소득 창출 한계가 있음.
- 지역 특화 작목인 미나리를 이용한 가공 제품 개발 및 유용한 기능성 분석을 통한 부가가치가 높은 가공 산업으로 육성 필요함.
  - 미나리는 숙취해소의 기능성이 널리 알려져 있으나 기능성 식품의 소재로 개발된 상품이 많지 않음.
  - 최근 소비자들의 경향이 제품의 고급 브랜드 및 다양한 제품을 선호하고 있어 다양한 제품개발이 요구되고 있음.

## 3절 연구개발 동향

- 무기게르마늄을 유기게르마늄화하기 위한 수단으로는 미생물, 효모(계란티제약(주))를 이용하기도 하였으며, 몇몇 연구자는 유기게르마늄 함유 식물체를 개발하기 위하여 벼, 상추, 일당귀와 인삼, 강활을 대상으로 시도함.
- 벼의 경우 Dakley and Volcani은 게르마늄 처리 시 식물독성으로 인해 벼의 생육이 억제되고 황화현상이 나타난다고 보고함.
- 토양 중 게르마늄 농도를 달리하여 벼를 재배하였을 때 게르마늄 5.0 mg kg<sup>-1</sup> 이상에서는 게르마늄 독성으로 잎에 황색반점이 발생하고 간장, 수장, 수수 및 수량이 급격히 감소하였으며, 벼의 부위별 게르마늄 함량은 벼짚 > 왕겨 > 현미 순으로 높았다고 함.
- 상추의 경우 토양 중 게르마늄 농도를 0.26~8.0 mg kg<sup>-1</sup>으로 달리하여 재배하였을 때 상추 식물체내 게르마늄 함량은 게르마늄 처리농도에 비례하여 많았으나 상추의 생육량은 차이가 없는 것으로 조사됨.



업소명	게란티제약(주)	등록일	2009-05-19
성상	황백 또는 황갈색의 분말로서 특유의 맛과 향이 난다	섭취량/섭취 방법	건강기능식품 원료로 사용
기능성	면역기능 증진에 도움(기타Ⅲ: 면역기능 증진에 도움을 줄 수 있으나 <b>인체에서의 확인이 필요함</b> )	기준규격	게르마늄: 3g/kg 조단백:40%이상

\* 건강기능식품 기능성 ‘등급제 폐지’ 공고로 현 2등급이상의 기준으로 인정기준 상향 조정(식품의약품안전처 공고 제2016-715호, 2016.11.21.)을 실시할 예정으로 게란티제약(주)의 게르마늄은 인체적용시험결과보고서를 제출하거나 기능성이 취소될 가능성이 있음.

## 4절 연구개발 범위

### <참여기관>

- 미나리(산형과, 콩과)의 gene library 구축
  - 미나리의 gene map 구축(원산지 판별, 원료의 표준화)
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 수경재배법 확립
  - 다변량 통계기법을 활용한 품종별 고농도 게르마늄(~240ppb)을 이용한 수경재배 최적 성장 조건 및 Ge함량 분석

### <주관기관>

- 유기 Ge 분석법 개발
  - 품종별 유기 게르마늄 함량 비교 및 경제성 평가
  - LC-MS, ICP 기반 유기 Ge 분석법 개발
- 고농도 유기 게르마늄 함유 농작물의 전성분 프로파일링
  - LC-MS/MS, LC-UV/Q-orbitrap 기반 유기 Ge농작물의 전성분 분석
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리추출물의 안전성 확보
  - *in vitro*, *in vivo*, clinical study를 통한 안전성 확보
  - 안전성 영역 (NOAEL, LD<sub>50</sub>) 설정
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 면역기능 개선 기능성 확보
  - 유기게르마늄 미나리 추출물의 면역증진 기능성 비교분석연구
  - *in vitro*, *in vivo*, clinical study를 통한 면역기능 증진 효과 연구
- 고농도 유기 게르마늄 함유 농산물의 가공방법 개발 및 제품화
  - 유기 Ge 고함량 가공방법(전처리, 분쇄, 추출, 농축, 건조 등) 개발
  - 제형화 연구 및 안정성 검증 실험
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리추출물의 건기식 개별인정형 원료 신청
  - MFDS 건기식 기능성원료(면역증강, 개별인정형)신청

### 1. 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

가. 주관연구기관((주)아리바이오) : 원료규격설정(중금속, 잔류농약의 건기식 원료 적합

및 국가공인성적서), 지표성분의 validation 실시(특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도 등에 대한 지표물질 validation), 생산규모의 증대를 위한 pilot, mass scale 추출제조공정 확립(10~50kg, 3ton 추출기에서의 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 필터방법, 건조방법, 수율 확립), 인체시험기관 선정(IRB 보유 병원 또는 대학), 인체적용시험용 시험약/위약 제조 (시험약과 위약의 구분이 유사한 색, 향, 맛으로 제조, 섭취량이 1.5g/일 이하의 용량으로 100명분 12주 분량), 인체적용시험을 위한 protocol(혈중 백혈구 수가 정상범위 중 낮은 범위에 속하거나 정상범위보다 다소 낮은 자)한 남녀 성인 피험자 100명(시험군 50명, 플라시보 50명), 12주간의 RCT, DB, placebo 대조시험, 검사항목: 인구학적조사, 음식섭취량, 혈청검사, NK cell(cell count, cell activity, T cell count(CD56 + CD5)), IL-6, TNF- $\alpha$ , CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell 비율) 등), CRF 작성, IRB승인신청 및 승인(임상기관 및 CRO 기관 선정, IRB신청 및 승인획득), 제형연구(tablet, capsule, powder)등에 대한 formulation 연구시작(온도안정성 등)

- 나. 협동연구기관(청산농업법인) : 미나리 품종 별 고농도 게르마늄을 이용한 수경재배 최적 성장조건 개발 (게르마늄 수의 게르마늄 함량에 따른 미나리의 성장속도 및 미나리 내 게르마늄 함량 비교), 게르마늄 미나리의 원료 규격설정 계속(식약처 ‘건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서’에 따른 설정)
- 다. 협동연구기관(청주대학교) : in vivo 효능평가 실험동물-설치류, 군분류-normal control, obese control, positive control(기인증원료), 땡땡이추출물투여군 high dose, middle dose, low dose, 투여- 1일 1~2회 강제경구투여 4주 이상, 관찰항목-체중, 식이섭취량, 장기검사, 혈청바이오마커, 조직검사 등), in vivo 독성시험(정상대조군, 게르마늄 미나리추출물 용량 그룹의 단회, 반복투여독성시험: non-GLP)

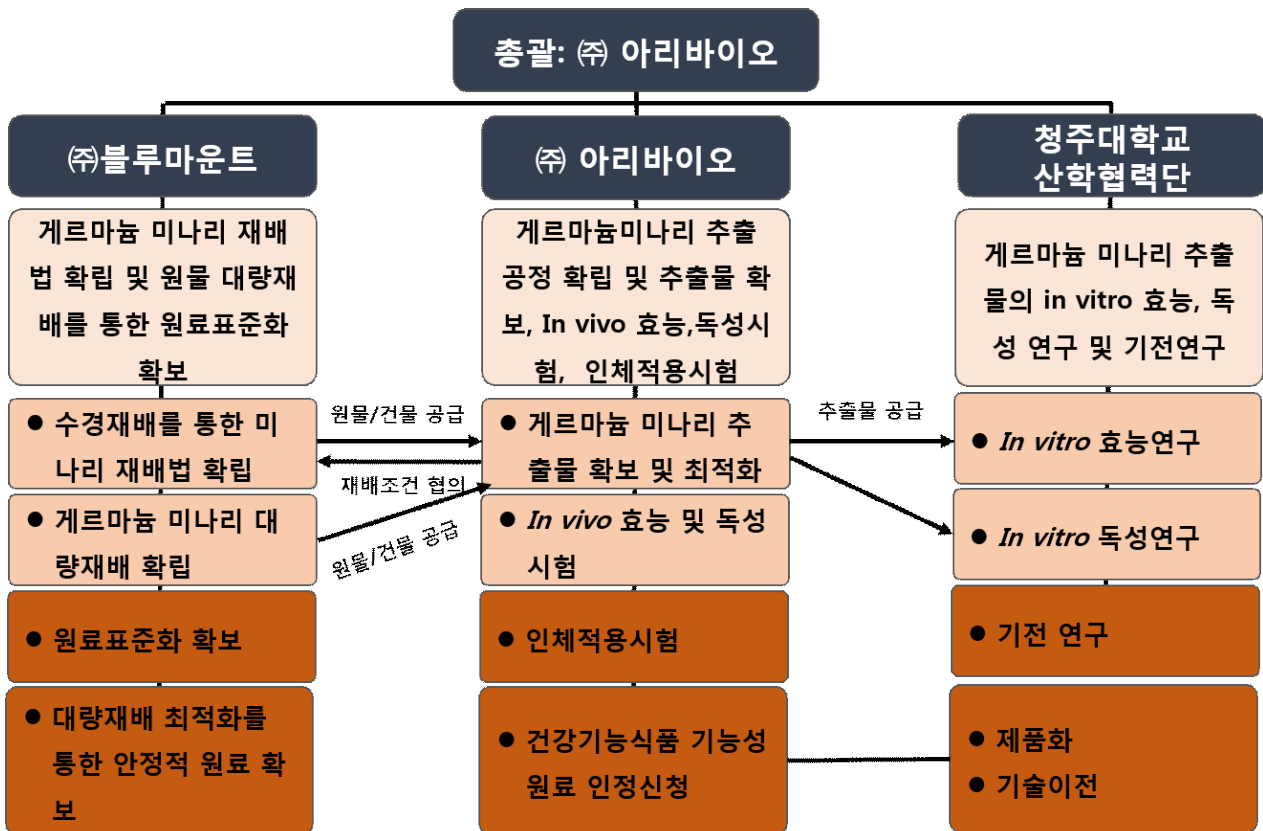


그림 . 각 기관별 연구내용 및 범위

## 2. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

### 가. 추진전략

- (1) 국내외 건기식 시장분석, 기술분석을 위하여 건기식 컨설팅기관, 건기식 시장분석기관, 박람회, 학술회의 등을 통하여 기술정보를 수집함.
- (2) 미나리 수경재배법 개발을 위한 전문가풀 (농업기술원, 생명연 등)을 확보하여, 정기적 자문회의를 통해 최신 지식과 대량생산의 성공가능성을 높임.
- (3) In vitro/in vivo 약리기전 탐색 및 검증 및 혈당개선 관련 신규 표적분자 도출을 위한 연구팀간의 정기적인 모임을 통해 발표, 평가함.
- (4) In vitro 1차 in vivo 효능시험 후 식약처 컨설팅(1차)을 통하여 인증방향 설정을 보완·수정하고, 독성시험 완료 후 2차 식약처 컨설팅을 통하여 인체적용시험 방향을 보완·수정하고, 인체시험완료 후 모듬토의 등을 통하여 건기식 획득을 위한 연구기간을 최소화.
- (5) 본 연구팀에서 진행되는 validation, 유해물질규격, 유통기한 설정 등을 전문가풀 (경기과학기술진흥원, 생명연, 카이스트, 대구한의대 등)을 활용하여 설정하고, 공인인증기관을 통하여 공인인증을 획득함.
- (6) 국내외 건기식 시장분석, 기술분석을 위하여 건기식 컨설팅기관, 건기식 시장분석기관, 박람회, 학술회의 등을 통하여 기술정보를 수집함.
- (7) In vitro 효능시험 후 식약처 컨설팅(1차)을 통하여 인증방향 설정을 보완·수정하고, 독성시험 완료후 2차 식약처 컨설팅을 통하여 인체적용시험 방향을 보완·수정하고, 인체시험완료 후 모듬토의 등을 통하여 건기식 인증획득.

- (8) 추출생산에 관한 전문가 자문을 통하여 수율, QC, QA 등의 부분을 보강함.
- (9) 자사에서 진행되는 구조분석, validation, 유해물질규격, 유통기한 설정 등을 전문가풀 (대구한의대, 경기과학기술진흥원, 생명연, 카이스트 등)을 동원하여 설정하고, 공인인증 기관을 통하여 공인인증을 받음.

#### 나. 연구개발방법

- (1) 유기 게르마늄함유 기능성 미나리의 생산기술 개발
  - (가) 고농도 유기 게르마늄 함유 기능성 미나리 생산기술 개발
    - ① 시중 유통 게르마늄 함유 미나리의 게르마늄 함량조사
    - ② 미나리의 게르마늄 수경재배 시 생육촉진 및 독성발생범위 구명
      - 미나리의 게르마늄 수경재배 시 생육촉진 및 독성 발생범위 구명은 게르마늄수의 농도별로 나누어 조사
  - (나) 게르마늄 흡수량 증대를 위한 재배법 개발
    - ① 미나리의 품종별 게르마늄 흡수 특성 구명
      - 최적 품종을 선정하기 위해 미나리 품종에 따른 게르마늄수를 사용한 수경재배 시 미나리의 품종별 생육특성, 무기성분 함량 변화, 부위별 게르마늄 함유량을 각각 조사
- (2) 게르마늄함유 기능성 미나리의 분석기술 개발
  - (가) 게르마늄 함량 분석법 개발
    - ① 기능성 미나리의 부위별 게르마늄 함량 분석
    - ② 기능성 미나리의 무기 및 유기 게르마늄 함량 분석
      - 기능성 미나리 함유 게르마늄의 총 함량과 유기 및 무기 게르마늄의 분석 (LC/MSMS, Q-Orbitrap Mass Spectrometer 등)을 통해 인체에 유효한 유기 게르마늄을 지표물질로 확보. 지표물질의 validation자료 확보 및 기능성 미나리 원료의 기준 규격 설정.
- (3) 고농도 유기 게르마늄 함유 기능성 미나리의 생산 공정 개발
  - (가) Pilot scale 생산 공정 개발
    - lab scale 과정에서 확립된 기능성 미나리 추출 또는 기능성 미나리 건조 분말 공정을 pilot (10~50kg) 생산 공정에 적용·실시함. 또한, 각 단계별 기능(지표)물질의 함량과 함께 수율변화를 측정함.
  - (나) 대량 생산 조건 최적화
    - Pilot scale에서 개발된 기능성 미나리의 추출((용매, 온도, 시간), 수율, filtering 조건, 분말화 조건) 또는 기능성 미나리 건조 분말화의 대량생산(1 ton) 공정 개선. 그리고, 각 단계별 기능(지표)물질의 함량 및 수율변화를 측정함.
- (4) 고농도 유기 게르마늄 함유 기능성 미나리의 안전성 및 효능 검증
  - (가) 유기 게르마늄을 함유한 미나리의 세포 시험

① 세포생존률

- 대식세포인 RAW 264.7 세포를 24-well plate에 well당  $5 \times 10^4$ 개로 분주한 후 세포배양조건에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 10% FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양. MTT용액 (0.5% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 well에 100 μL씩 넣고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 배양. 배양액을 제거한 다음 dimethylsulfoxide 용액 1000 μL씩을 넣고 10 분간 흔들. ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정.

② Cytokine 분석

- 대식세포인 RAW 264.7 세포에 시험물질을 일정시간 처치한 후 일정량의 자극원을 처치하여 37°C에서 일정시간 배양함. 원심분리 후 상층액을 취하고, cytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α 등)을 ELISA kit을 이용하여 측정.

③ NO 측정

- NO는 반감기가 5초 ~ 4분 이내의 매우 불안정한 유리 라디칼이기 때문에 NO측정은 실제적으로 불가능함. 따라서, Griess방법에 준해서 배양액에 포함되어 있는 NO<sub>2</sub>를 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생산을 산정함. 96 well plate의 각각의 well에 RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^5$  cell/ml를 분주하고 RAW 264.7 배양세포에 시료를 48시간 동안 처리한 후, 그 배양액을 ELISA reader를 이용하여 nitrite를 측정하고, 양성대조물질로는 lipopolysaccharide(LPS)를 사용함.

(5) 유기 게르마늄을 함유한 미나리의 반복 경구 투여 독성 및 효능 시험

(가) *In vivo* 안전성 확보 (non-GLP DRF)

- non-GLP (DRF) 경구 투여 독성시험을 실시하여 안전용량 설정, 유전독성(소핵시험) *in vivo* 안전성 확보

① 단회 투여 독성 시험

시험동물 : SD rat

시험물질 : 기능성 미나리 추출물

투여빈도 및 경로 : 단회, 경구 투여

시험구성 :

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0	암수 각 5마리
시험군-1	500	암수 각 5마리
시험군-2	1000	암수 각 5마리
시험군-3	2000	암수 각 5마리

관찰항목 : 폐사 및 임상증상 (daily), 체중, 부검소견

② 13주 반복 투여 독성 시험

시험동물 : SD rat

시험물질 : 기능성 미나리 추출물

투여빈도 및 경로 : 13주 반복 투여, 경구 투여

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0	암수 각 10마리
시험군-1	500	암수 각 10마리
시험군-2	1,000	암수 각 10마리
시험군-3	2,000	암수 각 10마리

시험군 구성 :

관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨 검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량, 부검 시 육안 검사 및 조직병리학적 검사.

### ③ 유전독성 (소핵시험)

시험물질인 기능성 미나리 추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토함.

시험동물 : ICR 마우스

시험용량 : 미나리 추출물 1,000, 500 및 250 mg/kg. 경구 투여

음성대조군 : 주사용수

양성대조군 : Mitomycin C

관찰 항목 : 24, 48, 72 시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발 빈도를 관찰.  
일반 증상 및 사망동물 관찰

시험군 구성 :

군	투여용량 (mg/kg)	투여경로	동물 수
Control	0	경구	5
GOE-1	250	경구	5
GOE-2	500	경구	5
GOE-3	1,000	경구	5
양성대조	2	복강내	5

#### (나) *In vivo* 효능 평가

- 대조군으로서 기 인증된 면역기능개선 기능성원료를 사용하며, 면역저하 모델에서의 체중, 장기무게, 혈액학적 분석, 혈액 생화학 분석, 비장세포 증식반응. 조직검사 등을 실시하여 면역 증진의 효능 검증

시험동물 : 6주령 Male SD rat

시험물질 : 기능성 미나리 추출물

유발물질 : CPA (Cyclophosphamide)

양성 대조군 :  $\beta$ -glucan

투여기간 및 투여방법 : 6주, 자유급식

면역억제 유발 : 미나리 추출물과  $\beta$ -glucan 투여시작 3일 및 1일 전 각각 150 mg/kg과 110 mg/kg의 CPA를 생리 식염수에 녹여 2회 복강 주사하여 면역억제를 유발시키고, 정상 대조군에서는 CPA대신 동량의 생리식염수를

동일한 방법으로 투여

시험방법 : CPA 투여 종료 1일 후, 군당 10마리씩 분류하여 실험에 사용  
 군구성 :

- 정상 대조군: CPA 비처리 후 멸균증류수 투여군
- CPA 대조군: CPA 면역억제 유발 후 멸균 증류수 투여군
- $\beta$ -glucan 투여군: CPA 면역억제 유발 후  $\beta$ -glucan 125 mg/kg 투여군
- 미나리 125 mg/kg 투여군: CPA 면역억제 유발 후 미나리 100 mg/kg 투여군
- 미나리 250 mg/kg 투여군: CPA 면역억제 유발 후 미나리 200 mg/kg 투여군
- 미나리 500 mg/kg 투여군: CPA 면역억제 유발 후 미나리 300 mg/kg 투여군

관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간  
 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량, 부검 시 육안 검사 및  
 조직병리학적 검사.

(6) 고농도 유기 게르마늄 함유 기능성 미나리의 인체적용시험

(가) 유기 게르마늄 함유 미나리의 면역기능 개선 기능성 확보

① 면역 증진 기전 확보

- 미나리의 면역 증진에 관여하는 표적분자 및 신호네트워크에 대한 효능을  
 세포수준에서 검증하고 효능기전을 확보함.
- 인체적용시험을 위한 protocol 작성, CRF작성, 시험물질제조, IRB 승인, 성공적  
 완료

<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin-bottom: 10px;"> <p><b>임상시험계획서</b></p> </div> <p><b>미나리추출물(GOE)의 면역 증진에</b>              미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주,              무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험</p> <p>Protocol No. : ARBIO_GOE              Version No. : 1.0              Version Date : 2017년 03월 18일</p> <p>㈜아진바이오 소구</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px; text-align: center;"> <p><b>Confidential</b></p> <p>본 임상시험계획서의 소용되거나 또는 모든 정보나 임상시험 계획서, 임상시험 후원연락처, 임상시험 담당자, 임상시험책임자(PI)의, 식약처관련정보를 무단 복제할 것으로 임상시험에 사용 또는 시용을 금지하는 사항에의 시험결과에 대한 사전 통보를 받고 복한 경우를 제외하고는 (주) 아진바이오는 사전 서명동의 없이 제3자에게 공개할 수 없습니다.</p> </div> <p style="text-align: right; font-size: small;">Confidential</p>	<p style="font-size: x-small;">(주)아진바이오              Clinical Study Protocol Protocol              No.: ARBIO_GOE              Version No.: 1.0 2017.03.18</p> <p><b>○ 임상시험계획서 요약</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td style="width: 15%;">임상시험 제목</td> <td>미나리 추출물의 유효성 증진에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험</td> </tr> <tr> <td>임상시험 목적</td> <td>연구도 전임사 부검후 필요로 228명 17 20명 1명 5명</td> </tr> <tr> <td>임상시험 시용대상</td> <td>가장대 일정한 기준특성과 일정한 고수 가장대학교 식용영양학과 일정한 고수</td> </tr> <tr> <td>임상시험 일시/기간</td> <td>가장대 일정한 일시/기간 일정한 부검후 필요로 774명 21</td> </tr> <tr> <td>임상시험 기관</td> <td>임상시험책임자(PI)의 임상시험 승인번호부하 12주</td> </tr> <tr> <td>임상시험 대상</td> <td>필요로 필요로 20세 이상과 성인 남성</td> </tr> <tr> <td>임상시험 목적</td> <td>일정한 20세 이상 성인 남성을 대상으로 미나리 추출물 섭취 시 대조제물 (placebo)과 비교하여 면역적 증가의 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.</td> </tr> <tr> <td>임상시험 한 계 / 기법 (연구/비연구)</td> <td>한 계 / 기법 (연구/비연구)</td> </tr> <tr> <td>한계 및 입원일</td> <td>입원일 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조</td> </tr> <tr> <td>임상시험 목적</td> <td>시험목적 : 미나리추출물 (GOE) 대조목적 : Placebo</td> </tr> <tr> <td>임상시험 목적 설계방법</td> <td>• 시험목적 : 1일 2회, 1회 2회씩 12주 (미나리추출물 1200mg/day) • 대조목적 : 시험목적과 동일한 방법으로 설계</td> </tr> <tr> <td>임상시험 목적 설계기간</td> <td>12주</td> </tr> </table> <p style="text-align: right; font-size: x-small;">Confidential</p>	임상시험 제목	미나리 추출물의 유효성 증진에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험	임상시험 목적	연구도 전임사 부검후 필요로 228명 17 20명 1명 5명	임상시험 시용대상	가장대 일정한 기준특성과 일정한 고수 가장대학교 식용영양학과 일정한 고수	임상시험 일시/기간	가장대 일정한 일시/기간 일정한 부검후 필요로 774명 21	임상시험 기관	임상시험책임자(PI)의 임상시험 승인번호부하 12주	임상시험 대상	필요로 필요로 20세 이상과 성인 남성	임상시험 목적	일정한 20세 이상 성인 남성을 대상으로 미나리 추출물 섭취 시 대조제물 (placebo)과 비교하여 면역적 증가의 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.	임상시험 한 계 / 기법 (연구/비연구)	한 계 / 기법 (연구/비연구)	한계 및 입원일	입원일 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조	임상시험 목적	시험목적 : 미나리추출물 (GOE) 대조목적 : Placebo	임상시험 목적 설계방법	• 시험목적 : 1일 2회, 1회 2회씩 12주 (미나리추출물 1200mg/day) • 대조목적 : 시험목적과 동일한 방법으로 설계	임상시험 목적 설계기간	12주
임상시험 제목	미나리 추출물의 유효성 증진에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험																								
임상시험 목적	연구도 전임사 부검후 필요로 228명 17 20명 1명 5명																								
임상시험 시용대상	가장대 일정한 기준특성과 일정한 고수 가장대학교 식용영양학과 일정한 고수																								
임상시험 일시/기간	가장대 일정한 일시/기간 일정한 부검후 필요로 774명 21																								
임상시험 기관	임상시험책임자(PI)의 임상시험 승인번호부하 12주																								
임상시험 대상	필요로 필요로 20세 이상과 성인 남성																								
임상시험 목적	일정한 20세 이상 성인 남성을 대상으로 미나리 추출물 섭취 시 대조제물 (placebo)과 비교하여 면역적 증가의 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.																								
임상시험 한 계 / 기법 (연구/비연구)	한 계 / 기법 (연구/비연구)																								
한계 및 입원일	입원일 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조																								
임상시험 목적	시험목적 : 미나리추출물 (GOE) 대조목적 : Placebo																								
임상시험 목적 설계방법	• 시험목적 : 1일 2회, 1회 2회씩 12주 (미나리추출물 1200mg/day) • 대조목적 : 시험목적과 동일한 방법으로 설계																								
임상시험 목적 설계기간	12주																								





(나) 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 가공 방법 개발 및 제품화

○ 유기 게르마늄 고함량 가공방법(전처리, 분쇄, 추출, 농축, 건조 등) 개발

다. 추진체계



라. 추진일정



## 2장 연구수행 내용 및 결과

### 1절 연구개발성과

#### 1. 특허등록 1건

특허 정보	등록	2019년 10월 29일	등록번호	제10-2039912호
출원인	주식회사 아리바이오, 영농조합법인 블루마운트			
발명자	정재준, 구세광, 서보승, 김대원, 안철호			
발명의 명칭	유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물			
비고	 <p><b>특허증</b> CERTIFICATE OF PATENT</p> <p>특허 Patent Number: 제 10-2039912 호</p> <p>출원번호 Application Number: 제 10-2018-0157123 호</p> <p>출원일 Filing Date: 2018년 12월 07일</p> <p>등록일 Registration Date: 2019년 10월 29일</p> <p>발명의 명칭 Title of the Invention: 유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물</p> <p>특허권자 Patentee: 등록사항란에 기재</p> <p>발명자 Inventor: 등록사항란에 기재</p> <p>위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.</p> <p>2019년 10월 29일</p> <p>특허청장 COMMISSIONER, KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE</p> <p>박원주</p> <p>QR코드로 현재기준 등록사항을 확인하세요</p>			

2. 특허출원 2건

특허 정보	출원	2018.12.07	출원번호	10-2019-0120592
출원인 명칭	주식회사 아리바이오 외 1명			
발명의 명칭	유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물			
비고	<p style="text-align: center;">관 인 생 략</p> <p style="text-align: center;"><b>출원번호통지서</b></p> <p>출원일자 2018.12.07          특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)          출원번호 10-2018-0157123 (접수번호 1-1-2018-1229403-04)          출원인명칭 주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0) 외 1명          대리인성명 박요창(9-2013-000987-4)          발명자성명 정재준 구세광 서보승 김대원 안철호          발명의명칭 유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물</p> <p style="text-align: center;"><b>특 허 청 장</b></p> <p style="text-align: center;">&lt;&lt; 안내 &gt;&gt;</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.              ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.              ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 &gt; 민원서식다운로드 &gt; 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식</p> <p>4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</p> <p>5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.              ※ 제도 안내 : <a href="http://www.kipo.go.kr">http://www.kipo.go.kr</a>-특허마당-PCT/마드리드              ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내              ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p> <p>6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.              ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000</p> <p>7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.</p> <p>8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.</p> </div>			

특허 정보	출원	2019.09.30	출원번호	10-2019-0120592
-------	----	------------	------	-----------------

출원인 명칭	주식회사 아리바이오			
--------	------------	--	--	--

발명의 명칭	세포독성을 억제하고 면역활성을 제공하는 유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물			
--------	---	--	--	--

출원번호 통지서 선택 출력

Page 1 of 3

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2019.09.30  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2019-0120592 (접수번호 1-1-2019-0997205-28)  
 출원인명칭 주식회사 아리바이오(1-2011-003629-0)  
 대리인성명 박요창(9-2013-000987-4)  
 발명자성명 정재준 서보승 강승우 최윤표 이의섭 김대원  
 발명의명칭 세포독성을 억제하고 및 면역 활성을 제공하는 유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물

## 특 허 청 장

비고

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/online/PrintApplPaperSelect.jsp>

2019-09-30

3. 인체적용시험보고서






<b>IRB</b>		한국체육대학교 기관생명윤리위원회 (1963-201903-BR-001-01)		
<b>제목</b>		미나리 추출물의 면역력 예방과 증진에 미치는 영향에 대한 인체적용 시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구		
<b>연구목적</b>		건강기능식품 기능성원료로서 미나리 추출물이 인체 섭취 시 안전성 및 면역 기능 저하 방지에 대한 기능성을 검증하고자 함.		
<b>연구유형</b>		인체적용시험	<b>IRB 구성 및 승인</b>	Y
<b>실험설계</b>		Double-blind	Randomized	Parallel
<b>대상자특징</b>	<b>대상자선정 (제외)기준</b>	1. 만 19세 이상 만 65세 이하의 남성 또는 여성으로서 건강하고 정상적인 신체 활동이 가능한 자 2. 말초혈액 WBC가 $4 \times 10^3/\mu\text{l}$ 이상 ~ $8 \times 10^3/\mu\text{l}$ 이하인 자 3. 본 시험의 연구 대상자로서 시험동의서에 서면 동의한 자		
	<b>특징</b>	29명의 시험군 (신장 $172.02 \pm 7.83\text{cm}$ , 체중 $82.35 \pm 16.93\text{kg}$ , BMI $27.69 \pm 4.46$ ) 29명의 대조군 (신장 $174.56 \pm 6.34\text{cm}$ , 체중 $86.23 \pm 15.53\text{kg}$ , BMI $28.15 \pm 3.96$ )		
<b>시험물질</b>		게르마늄미나리 추출분말(1,000mg/day: dextrin 포함)		
<b>시험디자인</b>	<b>대조군</b>	placebo	dextrin, brown color, 250mg/4정/2회/day, 1,000mg/day, 29명	
		positive	없음	
		negative	없음	
	<b>시험군</b>	게르마늄 미나리 추출분말, 250mg/4정/2회/day, 1,000mg/day, 29명		
<b>디자인</b>		성인(n= 58), 1,000mg/일, 12주 (RCT, DB)	섭취량	1,000mg/day
		· 사전(0주), 사후(12주)에서 바이오마커 및 안정성 측정 · 사전(0주), 6주, 사후(12주)에서 순응도 및 생체징후평가	섭취기간	12주
<b>식이조절</b>		평상시 식이습관 유지, 24시간 회상법으로 식이섭취량 측정		
<b>바이오마커</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- <sup>a</sup> 선천면역 : NK cell activity, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1, IL-6, IL-12.</li> <li>- <sup>b</sup> 적응면역 : IL-2, IFN-<math>\gamma</math>.</li> <li>- <sup>c</sup> 면역글로불린 : IgG1, IgG2, IgM.</li> </ul>		
<b>통계처리</b>		두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t 검정(independent t-test)을, 그렇지 않을 경우 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney's U test)을 수행함. 또, 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 대응 t 검정(paired t-test)을, 그렇지 않을 경우 윌콕슨의 부호순위검정(Wilcoxon's signed rank test)을 수행함. 연속형 변수의 정규성 검정은 샤피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk's test)을 이용함		
<b>시험결과</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 본 인체적용시험에서 실시한 시험군(미나리 추출물), 대조군의 12주간 투여</li> </ul>		

	<p>후 면역기능 저하 방지에 대한 기능성검증과 안전성을 평가한 결과 아래와 같은 결론을 나타냄.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 유효성 평가변수 결과 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선천면역 1차 유효성 평가변수인 <b>NK cell activity</b>에서 대조군대비 유의한 효과가 나타났다.</li> <li>- 적응면역 1차 유효성 평가변수인 <b>IL-2</b>에서 대조군대비 유의한 효과가 나타났다.</li> <li>- 적응면역 1차 유효성 평가변수인 <b>IFN-<math>\gamma</math></b>에서 대조군대비 유의한 효과가 나타났다.</li> </ul> </li> <li>• 안전성 결과 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 인체적용시험 기간 동안 총 58명에서 3건, 대조군 3명(3건)의 이상반응(경도 1)이 나타났지만, 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 모두 ‘관련이 없다고 생각됨’으로 시험책임자(전문의)에 의해 판단되었으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한, 이 3명의 대상자들은 투여를 일시중단(1-2일) 후 완전치유를 확인하고, 재투여 하여 12주 인체적용시험을 완료함.</li> <li>- 안전성 검사항목은 혈액학검사, 혈액화학검사, 면역혈청검사, 뇨검사로 나누어 평가하였고, 모든 항목이 정상범위 내에서 변화량이 나타나 안전성에는 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.</li> <li>- 인체적용시험에 참여한 인원 중 중대한 이상반응 발생은 없었으며, 시험물질과 관련된 어떠한 이상 반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단된다.</li> </ul> </li> <li>• 생체징후 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈압, 맥박, 체온의 분석 결과 섭취 기간에 따라 통계적 유의성은 나타나지 않았다.</li> </ul> </li> <li>• 유효성 평가변수 중 NK cell activity, IL-2, IFN-<math>\gamma</math> 항목에서 통계적 유의성을 나타내어, 12주간 미나리 추출물 섭취는 면역기능 저하방지에 긍정적 효과가 나타났다.</li> <li>• 안전성 평가항목은 이상반응 및 중대한 이상반응의 검사 소견이 나타나지 않아 미나리 추출물은 안전한 것으로 확인 되었다.</li> </ul>
비고	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정상 : 게르마늄 미나리 추출분말로서 이미·이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색 분말</li> <li>• Ge (기능 또는 지표성분) : <math>135 \pm 27 \mu\text{g/g}</math></li> <li>• 영양성분 : 열량 376.99Kcal/100g, 탄수화물 91.62%, 조지방 0.87%, 조단백질 0.68%, 수분 4.80%, 회분 2.03%, 나트륨 16.75mg/100g</li> </ul>





#### 4. GLP 독성시험

<p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">제르마늄(II)나리 추출물의 Sprague-Dawley 컷드를 이용한 단회 경구투여 독성시험</p> <p style="text-align: center;">시험번호: B18470</p> <p style="text-align: center;">㈜비이오텍스텍 우 28115 충청북도 청주시 흥덕구 오창읍 연구단지로 53</p> <p style="text-align: center;">- 138 -</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">제르마늄(II)나리 추출물의 Sprague-Dawley 컷드를 이용한 2주 반복 경구투여 독성시험 [Non-GLP]</p> <p style="text-align: center;">시험번호: B18471</p> <p style="text-align: center;">㈜비이오텍스텍 우 28115 충청북도 청주시 흥덕구 오창읍 연구단지로 53</p> <p style="text-align: center;">- 135 -</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">제르마늄(II)나리 추출물의 비급간을 이용한 단회 경구투여 독성시험</p> <p style="text-align: center;">시험번호: B18472</p> <p style="text-align: center;">㈜비이오텍스텍 우 28115 충청북도 청주시 흥덕구 오창읍 연구단지로 53</p> <p style="text-align: center;">1149</p>
<p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">제르마늄(II)나리 추출물의 새갈릴 이용된 복귀물연변이시험</p> <p style="text-align: center;">시험번호: B18473</p> <p style="text-align: center;">㈜비이오텍스텍 우 28115 충청북도 청주시 흥덕구 오창읍 연구단지로 53</p> <p style="text-align: center;">- 137 -</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">제르마늄(II)나리 추출물의 포유류 배양세포를 이용한 형색체이상시험</p> <p style="text-align: center;">시험번호: B18474</p> <p style="text-align: center;">㈜비이오텍스텍 우 28115 충청북도 청주시 흥덕구 오창읍 연구단지로 53</p> <p style="text-align: center;">- 139 -</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">제르마늄(II)나리 추출물의 태우스를 이용한 소백시험</p> <p style="text-align: center;">시험번호: B18475</p> <p style="text-align: center;">㈜비이오텍스텍 우 28115 충청북도 청주시 흥덕구 오창읍 연구단지로 53</p> <p style="text-align: center;">- 139 -</p>

5. GMP 3 batch 제조지시기록서 (아리바이오)

<p><b>제조지시 및 기록서</b>  MANUFACTURING ORDER &amp; RECORD</p> <p><b>【 제품명 : 게르마늄미나리 추출물 】</b></p> <p>【 제조번호 : ARSD8001 】  【 제조일자 : 2018.08.28 】  【 유통기한 : 2020.08.27 】</p> <p>  The Bridge of Life Science  <b>주식회사 아리바이오</b>  ARIBIO CO.,Ltd</p>	<p><b>제조지시 및 기록서</b>  MANUFACTURING ORDER &amp; RECORD</p> <p><b>【 제품명 : 게르마늄미나리 추출물 】</b></p> <p>【 제조번호 : ARSD9001 】  【 제조일자 : 2019.01.24 】  【 유통기한 : 2021.01.23 】</p> <p>  The Bridge of Life Science  <b>주식회사 아리바이오</b>  ARIBIO CO.,Ltd</p>	<p><b>제조지시 및 기록서</b>  MANUFACTURING ORDER &amp; RECORD</p> <p><b>【 제품명 : 게르마늄미나리 추출물 】</b></p> <p>【 제조번호 : ARSD9002 】  【 제조일자 : 2019.10.22 】  【 유통기한 : 2021.10.21 】</p> <p>  The Bridge of Life Science  <b>주식회사 아리바이오</b>  ARIBIO CO.,Ltd</p>
---	---	---

6. 3 batch 공인기관 시험성적서 (한국식품과학연구원) - 게르마늄함량, 중금속, 영양성분

<p>일련 제 2193호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 1          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 용인대로655 9A스퀘어 1504호          시험항목 게르마늄          의뢰일자 2019.01.24 유통기한 제조번호          2019.12.15</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 광석의 분말량          게르마늄(μg/100g)..... 15,852.49 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>	<p>일련 제 2194호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 2          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 용인대로655 9A스퀘어 1504호          시험항목 게르마늄          의뢰일자 2019.01.24 유통기한 제조번호          2019.12.15</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 광석의 분말량          게르마늄(μg/100g)..... 15,534.18 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>	<p>일련 제 2195호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 3          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 용인대로655 9A스퀘어 1504호          시험항목 게르마늄          의뢰일자 2019.10.22 유통기한 제조번호          2019.12.15</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 광석의 분말량          게르마늄(μg/100g)..... 15,061.09 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>
<p>일련 제 2196호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 1          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 수지구 용인로 42, 520호(시흥동, 용인 제2테크노밸리 경기 기업성장센터)          시험항목 납 3종          의뢰일자 2019.08.28 유통기한 제조번호          2019.12.16</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 총석의 분말량          납(Pb)(μg)..... 0.16          카드뮴(Cd)(μg)..... 0.03          수은(Hg)(μg)..... 0.00          비소(As)(μg)..... 2.36 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 18일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>	<p>일련 제 2197호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 2          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 수지구 용인로 42, 520호(시흥동, 용인 제2테크노밸리 경기 기업성장센터)          시험항목 납 3종          의뢰일자 2019.01.24 유통기한 제조번호          2019.12.16</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 총석의 분말량          납(Pb)(μg)..... 0.16          카드뮴(Cd)(μg)..... 0.03          수은(Hg)(μg)..... 0.00          비소(As)(μg)..... 2.36 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 18일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>	<p>일련 제 2198호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 3          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 수지구 용인로 42, 520호(시흥동, 용인 제2테크노밸리 경기 기업성장센터)          시험항목 납 3종          의뢰일자 2019.10.22 유통기한 제조번호          2019.12.16</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 총석의 분말량          납(Pb)(μg)..... 0.16          카드뮴(Cd)(μg)..... 0.03          수은(Hg)(μg)..... 0.00          비소(As)(μg)..... 2.36 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 18일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>
<p>일련 제 2199호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 1          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 용인대로655 9A스퀘어 1504호          시험항목 영양 7항목          의뢰일자 2019.08.28 유통기한 제조번호          2019.12.16</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 광석의 분말량          칼슘(Ca)..... 306.41(100g당)          인(P)..... 46.1          칼륨(K)..... 29.8(당초계수 6.25)          수분(%)..... 5.4          탄닌(%)..... 19.1          니트린(μg/100g)..... 750.80          불포화지방산(g/100g)..... 0.5 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 29일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>	<p>일련 제 2200호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 2          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 용인대로655 9A스퀘어 1504호          시험항목 영양 7항목          의뢰일자 2019.01.24 유통기한 제조번호          2019.12.16</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 광석의 분말량          칼슘(Ca)..... 306.41(100g당)          인(P)..... 46.1          칼륨(K)..... 29.8(당초계수 6.25)          수분(%)..... 5.4          탄닌(%)..... 19.1          니트린(μg/100g)..... 750.80          불포화지방산(g/100g)..... 0.5 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 29일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>	<p>일련 제 2201호</p> <p style="text-align: center;"><b>시험 성적서</b></p> <p>검 체 명 게르마늄 미나리 추출물 Batch 3          표 시 명 (주)이리바이오 대표 자 장재준          주 소 경기도 용인시 용인대로655 9A스퀘어 1504호          시험항목 영양 7항목          의뢰일자 2019.10.22 유통기한 제조번호          2019.12.16</p> <p>귀사가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>원료..... 광석의 분말량          칼슘(Ca)..... 306.41(100g당)          인(P)..... 46.5          칼륨(K)..... 29.2(당초계수 6.25)          수분(%)..... 5.4          탄닌(%)..... 19.1          니트린(μg/100g)..... 750.80          불포화지방산(g/100g)..... 0.4 μg</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 29일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          16001 경기도 의왕시 불광동 50 (포일동 690-4) T:02-3470-8200 F:02-553-2072</p> <p><small>이 성적은 재출판 권리에 한하여, 의뢰목적 이외의 상업 선전 등 상업용 및 자기홍보용사용으로 사용할 수 없음.</small></p>

6. 3 batch 공인기관 시험성적서 (한국식품과학연구원) - 잔류농약, 대장군군

<p>발판 제 21304 호</p> <h3 style="text-align: center;">시험 성적서</h3> <p>검체명: 계룡대농 이나라 추출물 Batch 1          회사명: (주)이리바리오          주소: 경기도 화성시 동탄대로635 91스퀘어 1504호          시험항목: HAC-04형제          의뢰업체: 재송물          제조일자: 2019.09.28          유통기한: /          접수일자: 2019.12.16</p> <p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>염산.....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 19일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          19201 경기도 의왕시 북동로 50 (오정동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> <p style="font-size: small;">이 성적은 재송물 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용, 선별, 변경, 사본, 복사, 무단 배포 및 기타 불법행위를 목적으로 사용할 수 없음.</p>	<p>발판 제 21305 호</p> <h3 style="text-align: center;">시험 성적서</h3> <p>검체명: 계룡대농 이나라 추출물 Batch 2          회사명: (주)이리바리오          주소: 경기도 화성시 동탄대로635 91스퀘어 1504호          시험항목: HAC-04형제          의뢰업체: 재송물          제조일자: 2019.01.24          유통기한: /          접수일자: 2019.12.16</p> <p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>염산.....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 19일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          19201 경기도 의왕시 북동로 50 (오정동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> <p style="font-size: small;">이 성적은 재송물 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용, 선별, 변경, 사본, 복사, 무단 배포 및 기타 불법행위를 목적으로 사용할 수 없음.</p>	<p>발판 제 21306 호</p> <h3 style="text-align: center;">시험 성적서</h3> <p>검체명: 계룡대농 이나라 추출물 Batch 3          회사명: (주)이리바리오          주소: 경기도 화성시 동탄대로635 91스퀘어 1504호          시험항목: HAC-04형제          의뢰업체: 재송물          제조일자: 2019.10.22          유통기한: /          접수일자: 2019.12.16</p> <p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>염산.....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....          염산(opp).....</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 19일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          19201 경기도 의왕시 북동로 50 (오정동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> <p style="font-size: small;">이 성적은 재송물 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용, 선별, 변경, 사본, 복사, 무단 배포 및 기타 불법행위를 목적으로 사용할 수 없음.</p>
<p>발판 제 21296 호</p> <h3 style="text-align: center;">시험 성적서</h3> <p>검체명: 계룡대농 이나라 추출물 Batch 1          회사명: (주)이리바리오          주소: 경기도 화성시 동탄대로635 91스퀘어 1504호          시험항목: 대장군군          의뢰업체: 재송물          제조일자: 2019.09.28          유통기한: /          접수일자: 2019.12.16</p> <p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>염산.....          대장군군.....</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          19201 경기도 의왕시 북동로 50 (오정동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> <p style="font-size: small;">이 성적은 재송물 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용, 선별, 변경, 사본, 복사, 무단 배포 및 기타 불법행위를 목적으로 사용할 수 없음.</p>	<p>발판 제 21297 호</p> <h3 style="text-align: center;">시험 성적서</h3> <p>검체명: 계룡대농 이나라 추출물 Batch 2          회사명: (주)이리바리오          주소: 경기도 화성시 동탄대로635 91스퀘어 1504호          시험항목: 대장군군          의뢰업체: 재송물          제조일자: 2019.01.24          유통기한: /          접수일자: 2019.12.16</p> <p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>염산.....          대장군군.....</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          19201 경기도 의왕시 북동로 50 (오정동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> <p style="font-size: small;">이 성적은 재송물 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용, 선별, 변경, 사본, 복사, 무단 배포 및 기타 불법행위를 목적으로 사용할 수 없음.</p>	<p>발판 제 21298 호</p> <h3 style="text-align: center;">시험 성적서</h3> <p>검체명: 계룡대농 이나라 추출물 Batch 3          회사명: (주)이리바리오          주소: 경기도 화성시 동탄대로635 91스퀘어 1504호          시험항목: 대장군군          의뢰업체: 재송물          제조일자: 2019.10.22          유통기한: /          접수일자: 2019.12.16</p> <p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>염산.....          대장군군.....</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국식품과학연구원</b>          19201 경기도 의왕시 북동로 50 (오정동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> <p style="font-size: small;">이 성적은 재송물 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용, 선별, 변경, 사본, 복사, 무단 배포 및 기타 불법행위를 목적으로 사용할 수 없음.</p>

7. *in vitro* 연구논문

학술지정보	Journal of herbal medicine		SCI구분	■ SCI	□ 비SCI
	Vol	계재연도	2020	페이지	
논문제목	Cytotoxicity, anti-osteoclastic differentiation, and antioxidant activities of <i>Oenanthe javanica</i> containing organic germanium in vitro				
연구목적	게르마늄 미나리 추출물에서 미나리의 항산화 활성과 게르마늄의 면역개선 효과를 토대로				
연구유형	in vitro 실험				
시험계	<ul style="list-style-type: none"> <li>일반 미나리 추출물과 게르마늄미나리 추출물을 RAW 264.7 cell에서 in vitro (cytotoxicity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging Activity, apoptosis, cell cycle</li> </ul>				
시험물질	<ul style="list-style-type: none"> <li>게르마늄미나리추출물</li> <li>일반미나리추출물</li> </ul>				
대조군	<p style="text-align: center;"> <input checked="" type="checkbox"/> control      <input checked="" type="checkbox"/> positive control      <input checked="" type="checkbox"/> negative control         </p>				
시험군	<ul style="list-style-type: none"> <li>일반 미나리 추출물과 게르마늄미나리 추출물을 RAW 264.7 cell에서 in vitro (cytotoxicity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging Activity, apoptosis, cell</li> </ul>				
바이오마커	Anti-oxidant, Apoptosis, Osteoclast, MAPK				
통계처리	항산화기능, 항염기능, 간세포생존율에 대한 평균(표준편차 산출), 집단간 차이 LSD test, Kruskal-Wallis H test				
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>O. javanica</i>는 청소를 통해 항산화 특성을 갖는 것으로 알려져 있어 반응성 산소 종. <i>O. javanica</i>의 항산화 활성을 높이기 위해 수경 재배를 통해 <i>O. javanica</i>와 유기 게르마늄 형태로 수확하여 추출 유기 게르마늄을 함유 한 <i>O. javanica</i>가 효과적인지 여부를 평가함.</li> <li>골다공증, RAW 264.7 세포 또는 PBMC를 사용하여 세포 독성, 파골 세포분화 및 항산화 활성을 평가함.</li> <li>결과적으로 유기 게르마늄 함유 <i>O. javanica</i>는 세포 독성, 세포 정지 및 초기 아포토시스를 갖지 않지만, 파골 세포 분화 및 MAPK 경로를 억제 할 수 있음.</li> <li>이 발견은 유기 게르마늄을 함유한 <i>O. javanica</i>는 골다공증 치료제로도 가능성이 있음을 확인함.</li> </ul>				
비고	Submission (제출일: 2020년 1월 13일) Manuscript ID: HERMED-S-20-00069)				

8. *in vivo* 연구논문 1

학술지정보	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition			SCI구분	□ SCI	■ 비SCI
	Vol	49	게재연도	2020	페이지	101-110
논문제목	Effect of Cytokine Reduction and Immune Modulation from Germanium <i>Oenanthe Javanica</i> extracts in <i>In vitro/In vivo</i>					
연구목적	일반 및 게르마늄 수경재배 미나리의 대식세포(Raw 264.7)와 정상 ICR 마우스에서의 면역활성 비교					
연구유형	<i>In vitro/In vivo</i> 실험					
시험계	<ul style="list-style-type: none"> <li>일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 <i>in vitro</i>에서 Raw 264.7 cell에서 LPS와 함께 농도별로 처리하여 NO 생성 및 cytokine 인자에 미치는 효능을 비교 분석함</li> <li>일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 <i>in vivo</i>에서 정상 ICR 마우스에 400mg/kg의 농도로 처리하여 NO, cytokine, NK cell 활성화에 미치는 효능을 비교 분석함</li> </ul>					
시험물질	<ul style="list-style-type: none"> <li>일반 수경재배 미나리: 추출 및 농축, 분무건조과정을 통해 생산된 시험물질</li> <li>게르마늄 수경재배 미나리: 추출 및 농축, 분무건조과정을 통해 생산된 시험물질</li> </ul>					
대조군	<p style="text-align: center;"> <span style="display: inline-block; width: 1em; height: 1em; background-color: black; margin-right: 0.5em;"></span> control                <span style="display: inline-block; width: 1em; height: 1em; background-color: black; margin-right: 0.5em;"></span> positive control                <span style="display: inline-block; width: 1em; height: 1em; background-color: black; margin-right: 0.5em;"></span> negative control         </p>					
시험군	<ul style="list-style-type: none"> <li>게르마늄 함량분석: ICP를 이용한 게르마늄 수경재배 미나리 추출물의 게르마늄 함량분석</li> <li>성분분석: UPLC, Q-orbitrap mass spectrometer를 이용한 게르마늄 수경재배 미나리 추출물의 성분 분석</li> <li><i>In vitro</i> 실험 : 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 <i>in vitro</i>에서 Raw 264.7 cell에서 LPS와 함께 농도별로 처리하여 NO 생성 및 cytokine 인자에 미치는 효능을 비교 분석</li> <li><i>In vivo</i> 실험 : 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 <i>in vitro</i>에서 Raw 264.7 cell에서 LPS와 함께 농도별로 처리하여 NO 생성 및 cytokine 인자에 미치는 효능을 비교 분석</li> </ul>					
바이오마커	NO production, Cytokine 측정 ( ELISA kit) , NK cell activity					
통계처리	NO, cytokine, NK cell activity에 대한 평균(표준편차 산출), 집단간 차이 LSD, T-test					
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>ICP를 이용하여 게르마늄 수경재배 미나리 추출물의 게르마늄 함량분석 결과 kg당 116.68 g의 게르마늄이 함유됨을 확인.</li> <li>UPLC, Q-orbitrap mass spectrometer를 이용하여 게르마늄 수경재배 미나리 추출물의 성분분석 결과, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, isorhametin과 같은 화합물들이 검출됨.</li> <li>Raw 264.7 cell에 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 처리한 시험군 (0, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) 모두에서 세포생존률에 미치는 영향이 없음</li> <li>Raw 264.7 cell에 Raw 264.7 cell에 LPS만 단독으로 처리한 군에서는 LPS를 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때 NO가 현저히 증가하였다. LPS 처리한 후 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 처리한 군에서는 12.5 ug/mL이상에서 두 시료 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 억제 하였으며, 일반 수경재배 미나리와 게르마늄 수경재배 미나리의 NO 생성 억제 효과를 비교하였을 때, 게르마늄 수경재배 미나리가 일반 수경재배 미나리보다 Raw 264.7 cell에서 더 높은 NO 생성 억제에 효과가 있음을 확인하였음.</li> <li>Raw 264.7 cell에 LPS를 처리한 후 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 각각 0, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 Raw 264.7 cell에 처리하여 24시간 동안 배양한 후 IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 cytokine을 측정하기 위해 ELISA kit assay(Bioassay Technology</li> </ul>					

	<p>Laboratory)를 진행하였음. IFN-<math>\gamma</math>를 제외한 4개의 cytokine의 경우 LPS를 처리하지 않은 Raw 264.7 대비 LPS를 단독 처리한 cell에서 모두 증가되었음을 확인하였으며, 또한 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물 처리와 LPS로 유도된 cell에서 모두 농도 10 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 농도에서부터 농도 의존적으로 점차적으로 감소하는 것을 확인함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 정상 ICR 마우스에 정상 대조군과 대비 일반 수경재배 미나리 추출물(OJ extracts) 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물(GO extracts) 모두 400 mg/kg 투여군에서 비장조직 내의 NO가 감소하는 경향을 확인함.</li> <li>• 정상 ICR 마우스에 정상 대조군과 대비 일반 수경재배 미나리 추출물(OJ extracts) 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물(GO extracts) 모두 400 mg/kg 투여군에서 비장조직 내의 IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-12와 같은 5가지의 cytokine 함량을 측정 한 결과 In vitro 실험과 동일하게 IFN-<math>\gamma</math>를 제외한 4가지의 사이토카인 인자는 정상 대조군과 비교하였을 때 감소하였으며, IFN-<math>\gamma</math>는 증가하는 경향을 확인하였음.</li> <li>• 정상 ICR 마우스에 정상 대조군과 대비 일반 수경재배 미나리 추출물(OJ extracts) 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물(GO extracts) 모두 400 mg/kg 투여군 강 및 복강 조직의 NK cell 활성을 <math>^{51}\text{Cr}</math> assay로 측정 한 결과 대조군과 비교하여 각각 33.33 및 64.50% 활성을 나타냄을 확인하였음.</li> </ul>
비고	<p style="text-align: center;">J. Korean Soc Food Sci Nutr. 49(1), 101-110(2020)</p>

8. in vivo 연구논문 2

학술지정보	Bioscience, Biotechnology and Biochemistry		SCI구분	■ SCI	□ 비SCI
	Vol		계재연도	2020	페이지
논문제목	Germanium-rich Water Dropwort, Oenanthe javanica Extracts Enhances Immune Responses on Cyclophosphamide-induced Immunosuppress Mouse Model				
연구목적	게르마늄 함유 미나리 추출물 (GO extracts)의 Cyclophosphamide 유발 면역억제 마우스 모델에 대한 면역조절효과 평가				
연구유형	In vivo 실험				
시험계	<ul style="list-style-type: none"> <li>체중의 변화, 가슴샘, 비장 및 악하 임파절 증량</li> <li>13 종류의 혈액학적 검사</li> <li>복강 및 비장 NK cell 활성화</li> <li>혈청 및 비장내 IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 and IL-12 함량</li> <li>RT-PCR을 이용한 비장내 NF-<math>\kappa</math>B, IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 및 IL-12 mRNA expressions 발현의 변화</li> <li>임파장기의 조직병리학적 변화 - 가슴샘 전체 및 피질두께, 비장 전체 및 백색수질의 두께, 백색 수질의 수</li> <li>비장조직내 CD3+, CD4+, CD8+, TNF-<math>\alpha</math>+, IL-1<math>\beta</math>+ 및 iNOS+ 면역반응세포 (Table 4)의 수</li> <li>악하임파절 전체 및 피질의 두께, 임파 여포의 수</li> <li>종 희생시 수거한 비장세포에 대한 MTT를 이용한 세포독성 및 비장세포 증식 활성화 및 B 세포 증식 촉진인자, Lipopolysaccharide 처리에 의한 비장 세포의 증식 활성화 측정</li> <li>최종 희생일에 수거한 골수 도말 표본에 대한 소핵실험을 통한 항돌연변이원성 - 다염적혈수수, 다염적혈구 비율 및 소핵다염적혈구의 수적 변화</li> </ul>				
시험물질	<ul style="list-style-type: none"> <li>GO 400 (GO 추출물 400 mg/kg 투여 및 CPA 유발 실험군)</li> <li>GO 200 (GO 추출물 200 mg/kg 투여 및 CPA 유발 실험군)</li> <li>GO 100 (GO 추출물 200 mg/kg 투여 및 CPA 유발 실험군)</li> </ul>				
대조군	<p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 40px;">■ control</span> <span style="margin-right: 40px;">■ positive control</span> <span>■ negative control</span> </p>				
시험군	<ul style="list-style-type: none"> <li>정상 매체 대조군 (멸균 증류수 투여 및 생리식염수를 투여한 정상 매체 대조군)</li> <li>CPA 대조군 (멸균 증류수 투여 및 CPA 유발 면역억제 매체 대조군)</li> <li>EAP (EAP 200 mg/kg 투여 및 CPA 유발 대조약물 투여군)</li> <li>GO 400 (GO 추출물 400 mg/kg 투여 및 CPA 유발 실험군)</li> <li>GO 200 (GO 추출물 200 mg/kg 투여 및 CPA 유발 실험군)</li> <li>GO 100 (GO 추출물 200 mg/kg 투여 및 CPA 유발 실험군)</li> </ul>				
바이오마커	MTT assay, MN test, organ weights, hematology, cytokine, NK cell activity, RT-PCR mRNA expression, Histopathology-Histomorphometry				
통계처리	각 데이터들에 대한 평균(표준편차 산출), 집단간 차이 LSD, MW test				
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>본 실험의 결과, CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 현저한 가슴샘, 비장 및 슬와 임파절 증량, 혈중 총 백혈구, 적혈구 및 혈소판의 수, HGB 및 HCT, 혈액 및 비장내 IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 및 IL-12 함량, 비장 내 NF-<math>\kappa</math>B, IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 및 IL-12 mRNA expressions 발현, 비장세포 및 복강 NK 세포 활성화의 감소가 가슴샘, 비장 및 슬와 임파절의 임파구 감소에 의한 조직병리학적 위축 소견, 비장 조직 내 CD3+, CD4+, CD8+, TNF-<math>\alpha</math>+, IL-1<math>\beta</math>+ 및 iNOS+ 면역반응세포의 수적 감소와 함께 확인함..</li> <li>CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ConA 및 LPS 유도 비장세포 증식률의 감소, 골수 세포 중 다염적혈구의 수 및 비율의 감소와 소핵다염적혈구의 수적 증가가 각각 확인함.</li> </ul>				



- CPA 유발 임파구 증식 억제성 면역억제 소견 및 돌연변이원성이 모든 3 용량의 GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg의 경구투여에 의해, 동일한 용량의 EAP 와 유사한 정도로 투여 용량 의존적으로 억제되었음.
- 최종 희생 시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 GO 추출물 처리군 (0.01-10 mg/ml)에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않았음.
- CPA 대조군을 포함하여 본 실험에 사용한 모든 마우스는 동일한 연령의 정상 ICR마우스의 체중 증가 범주 내에서 체중 증가를 각각 나타내었음. 즉, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화는 CPA 대조군에서 인정되지 않았으며, CPA 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화 역시 모든 3 용량의 GO 추출물 (100, 200, 400 mg/kg) 투여군과 EAP 200 mg/kg 군에서 42일간의 실험기간 동안 인정되지 않았음.
- 현저한 가슴샘, 비장 및 악하 임파절 중량의 감소가 CPA 투여에 의해 인정되었으나, 3 용량의 모든 GO 추출물 투여에 의해 동일 용량의 EAP 와 유사한 정도의 투여 용량 의존적인 CPA에 의한 임파 장기 중량 감소에 대한 억제 효과가 인정됨.
- 최종 희생 시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 GO 추출물 처리군 (0.01-10 mg/ml)에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 확인되지 않음
- 본 실험의 MTT 기반 비장세포 증식 효과 평가에서, CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ConA 및 LPS 유도 비장세포 증식률의 감소 각각 인정되었으나, CPA 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 ConA 및 LPS 유도 비장세포 증식률의 증가가 3 용량의 모든 GO 추출물 투여군에서 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 비교할 만한 CPA에 의한 ConA 및 LPS 유도 비장 세포 증식 감소 억제 효과를 나타내었음.
- CPA 대조군에서는 현저한 소핵다염적혈구의 수적 증가가 인정되었으나, CPA 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 소핵다염적혈구의 수적 감소가 3 용량의 모든 GO 추출물 투여군에서 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 인정되었음.
- CPA 대조군에서는 다염적혈구의 수 및 비율의 감소 역시 인정되었으나, CPA 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 다염적혈구의 수 및 비율의 증가가 모든 GO 추출물 투여군에서 동일한 용량의 EAP투여군과 유사한 정도로 인정되었음.
- 총 13 종류의 혈액학적 검사 결과, 정상 매체 대조군에 비해 총 백혈구 및 적혈구 수, HGB, HCT 및 혈소판 수의 유의성 있는 감소, 즉 조혈기계 현저한 억제에 의한 범백혈구 감소, 혈소판 감소 및 재생불량성 빈혈소견이 CPA 대조군에서 인정되었으며, 범백혈구 감소의 결과, 백혈구 분별 count의 변화는 인정되지 않았음.
- CPA 투여에 의한 조혈기계 억제에 기인한 총 백혈구 및 적혈구 수, HGB, HCT 및 혈소판 수의 감소가 GO 400, 200 및 100 mg/kg의 경구투여에 의해 동일한 용량의 EAP투여군과 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 억제 되었음.
- 혈액 및 비장 조직 내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 감소와 함께 비장 조직 내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 mRNA 발현의 감소가 CPA 투여에 의해 유발되었으나, GO 추출물의 면역 조절효과의 일환으로 판단되는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 cytokine의 함량 및 mRNA 발현 증가가 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 인정되었음.
- CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 복강 및 비장 NK 세포 활성화의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 복강 및 비장 NK 세포 활성화의 증가가, 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 인정되었음.
- CPA 투여에 의해 가슴샘 피질, 비장 백색수질 및 악하 임파절의 임파구 감소에 의한 임파장기의 현저한 위축이 초래되었으며, 비장 조직 내 면역담당 세포인 CD3+, CD4+, CD8+, TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + 및 iNOS+ 면역반응세포의 수적 감소 역시 인정되었음. 한편 GO

	<p>추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 현저한 가슴샘, 비장 및 악하 입과절 위축 억제 및 비장 조직 내 면역 담당세포의 수적 증가를 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 나타내었음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CPA 대조군에는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 비장 조직 내 NF-κB mRNA 발현의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 투여군에서는 CPA 대조군에 비해, 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 유의성 있는 비장 조직 내 NF-κB mRNA 발현의 증가가 각각 인정되었음.</li> <li>• 이상의 결과를 종합해 볼 때, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg은 적어도 본 실험의 조건 하에서, NF-κB 발현 증가와 관련된 T 및 B 세포와 NK 세포의 활성을 통해 CPA에 의한 조절억제에 따른 면역억제 및 돌연변이원성을 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적으로 현저히 억제하는 것으로 관찰되었음</li> <li>• 또한 최종 희생 시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 GO 추출물 처리군 (0.01-10 mg/ml)에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않았음.</li> </ul>
비고	<p style="text-align: center;">Submission (제출일: 2020년 1월 21일 Manuscript ID: BBB2000066)</p>

9. 홍보전시



2019년 제천 한방바이오산업엑스포

<p>스마트스프링 미나리 분말</p>	<p>미나린 미나리발효액</p>	<p>리프레쉬미 미나리추출발효액</p>

## 2절 총괄과제가 있는 경우 세부과제별 결과

### 1. 1차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과

1차년도 개발 목표
○ 주관연구기관((주)아리바이오) : 문헌조사, lab scale 추출조건 및 지표성분 method validation 확립

#### 가. 문헌조사

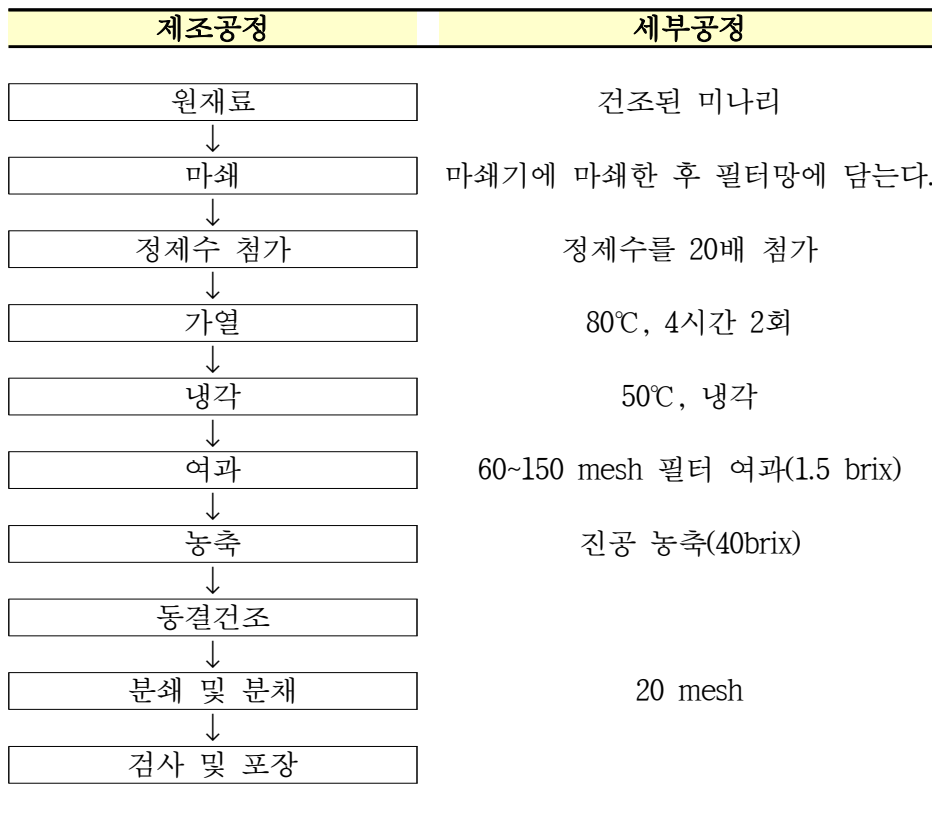
원료명	출처	관련 문헌 근거
미나리	한국 환경 농 학회지 27, 2 (2008)	게르마늄 처리 토양에서 미나리 생육 특성과 게르마늄 흡수 - 게르마늄 흡수량은 유기게르마늄인 Ge-132 처리에서 24.2mg/kg 로 가장 높았으며, 무기게르마늄인 Ge와 GeO <sub>2</sub> 처리에서 각각 12.9 및 11.8mg/kg 이었다.
미나리	한국 엔터 테 인 먼 트 산업 학회지 10, 6 (2016)	게르마늄 함유 농산물의 효능에 관한 연구 - 게르마늄함유 토지에 지하원수로 재배한 미나리에서 99.3mg/kg, 상추는 5.6mg/kg의 게르마늄이 검출되었고, 농축수로 재배한 미나리는 545.3mg/kg, 상추는 79.6mg/kg의 게르마늄이 검출되어서 미나리가 상추보다 게르마늄 흡수율이 높은 것으로 확인
미 나 리 의 식물	출 원 번 호 10-2006-003 4608	식물에 고농도의 게르마늄을 함유시키기 위한 양액 조성물 및 이를 이용한 식물의 재배방법 - 게르마늄의 독성을 키토산이 완화시켜 주어 게르마늄의 독성에 의해 식물이 고사되는 것을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 유기산 등이 고농도의 게르마늄이 함유됨에 따른 식물의 성장 억제를 방지하여 200~1,000mg/kg의 고농도의 게르마늄이 함유된 식물의 재배가 가능.
미 나 리 의 식물	출 원 번 호 10-2004-004 2371	게르마늄과 셀레늄이 동시에 함유된 식용, 약용, 식물류의 재배방법 - nitric Acid(HNO <sub>3</sub> )에 SeO <sub>2</sub> 를 산화시키고 ammonia를 이용하여 pH를 조정, 건조 후 다시 회수된 셀레늄 분말을 사용하여, 인체에 흡수율이 높으며 인체 이용성이 좋은 안전한 유기게르마늄과 셀레늄을 함유 하는 식물류를 생산
울금	출 원 번 호 10-2013-013 4061	게르마늄함유 울금의 재배방법 - 울금을 게르마늄 수용액에 침지 후 파종하고 재배 도중 게르마늄 수용액을 엽면시비함으로써, 관절염, 암, 백혈병, 척추전방전위증, 고엽제 후유증, 당뇨 등에 효능을 갖는 게르마늄을 다량 함유한 울금 재배방법
농산물	출원번호 특 1993-003225 5	유기 게르마늄(Ge-132)을 다량 함유하는 농산물 재배방법 - 무기 게르마늄을 함유하는 천연 광석을 채취하여 100 내지 600메쉬로 미세하게 분쇄고 소정량의 정수에 투입한 후 100 내지 200시간 동안 15 내지 30℃의 온도에서 저으면서 혼합, 분산, 용해시키며 물의 pH를 7 ~ 8로 유지시켜 수경재배육을 제조하여 수경재배와 유사

		한 방법으로 상기 수경재배육에서 목적하는 농산물을 재배육을 계속 순환시키면서 15 내지 30℃의 온도에서 pH를 7~8로 유지시키면서 수경재배
--	--	---

**결 론**

- NDSL, pubmed, 특허청 등에서 게르마늄 미나리에 관하여 검색. 게르마늄 미나리는 초기 개발 단계로 관련 자료가 거의 없음.
- 미나리가 다른 작물에 비해 중금속 흡수 능력이 뛰어나.

나. Lab scale 추출조건 실험



**결 론**

- 상기 공정 중, 마쇄이후의 추출조건 최적화 하기 위하여 수확한 미나리를 음건하여 열풍건조 (60℃, 24시간 건조)와 동결건조 등 건조조건에 따른 수율변화를 확인
- 또한, 추출온도와 시간에 따른 추출 수율을 변화.

다. 원재료(미나리 건조 분말) 분석 결과 (분석기관 : 한국기능식품연구원)

제 2007111020 호  
공시확인

### 시험·검사성적서

제출일	제출처(농산물)	제출일자 (년월일)	2017-11-06
제출인	김기호(농부)	영양	양주읍
주소	경기도 양주시 양양리 풍곡로228번길 25, 2층 205호 (양주읍, 풍곡리(내부리행정리))		
제출품목	중금속	검사항목명	2017-11-06
검사항목(특이)	중금속	검사항목	2007111020

본시험은 우리 연구원에 시험·검사하여본 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 번호명 : 2017-11-07  
 시험·검사 확인자 : 이영주

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목
BHC(mg/kg)	0.0658mg/kg	카드뮴
DDT(mg/kg)	0.0872mg/kg	중금속
aldrin(mg/kg)	0.0026mg/kg	수은
dieldrin(mg/kg)	0.0190mg/kg	비소

2017년 11월 17일  
**한국기능식품연구원**

중금속

제 2007111020 호  
공시확인

### 시험·검사성적서

제출일	제출처(농산물)	제출일자 (년월일)	2017-11-06
제출인	김기호(농부)	영양	양주읍
주소	경기도 양주시 양양리 풍곡로228번길 25, 2층 205호 (양주읍, 풍곡리(내부리행정리))		
제출품목	중금속	검사항목명	2017-11-06
검사항목(특이)	중금속	검사항목	2007111020

본시험은 우리 연구원에 시험·검사하여본 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 번호명 : 2017-11-07  
 시험·검사 확인자 : 이영주

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목
일반세균(g/g)	6,600,000/g	대장균
대장균	중량	대장균
대장균군	양성	대장균

2017년 11월 23일  
**한국기능식품연구원**

미생물

제 2007111020 호  
공시확인

### 시험·검사성적서

제출일	제출처(농산물)	제출일자 (년월일)	2017-11-06
제출인	김기호(농부)	영양	양주읍
주소	경기도 양주시 양양리 풍곡로228번길 25, 2층 205호 (양주읍, 풍곡리(내부리행정리))		
제출품목	중금속	검사항목명	2017-11-06
검사항목(특이)	중금속	검사항목	2007111020

본시험은 우리 연구원에 시험·검사하여본 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 번호명 : 2017-11-07  
 시험·검사 확인자 : 이영주

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목
BHC(mg/kg)	중량	카드뮴
DDT(mg/kg)	중량	중금속
aldrin(mg/kg)	중량	수은
dieldrin(mg/kg)	중량	비소
endrin(mg/kg)	중량	카드뮴

2017년 11월 23일  
**한국기능식품연구원**

잔류 농약

제 2007111020 호  
공시확인

### 시험·검사성적서

제출일	제출처(농산물)	제출일자 (년월일)	2017-11-06
제출인	김기호(농부)	영양	양주읍
주소	경기도 양주시 양양리 풍곡로228번길 25, 2층 205호 (양주읍, 풍곡리(내부리행정리))		
제출품목	중금속	검사항목명	2017-11-06
검사항목(특이)	중금속	검사항목	2007111020

본시험은 우리 연구원에 시험·검사하여본 결과는 다음과 같습니다.  
 시험·검사 번호명 : 2017-11-07  
 시험·검사 확인자 : 이영주

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목
열량(kcal/100g)	316.7kcal/100g	탄수화물
탄수화물(g/100g)	38.74%	조단백질
조단백질(g/100g)	30.47%	조지방
조지방(g/100g)	4.43%	수분
수분(g/100g)	7.53%	회분
회분(g/100g)	18.83%	나트륨
나트륨(mg/100g)	173.84mg/100g	불포화지방산
불포화지방산(g/100g)	2.11g/100g	

2017년 11월 23일  
**한국기능식품연구원**

영양분석

**결론**

- 건조 미나리 분말을 공인기관인 한국기능식품연구원에 분석 의뢰하여 결과를 획득. (잔류농약 : 5종 불검출(BHC, DDT, aldrin, dieldrin, endrin), 중금속 : 납 0.0658mg/kg, 카드뮴 0.0872mg/kg, 수은 0.0026mg/kg, 비소 0.0190mg/kg), 미생물 : 일반세균 6,600,000/g, 대장균 음성, 대장균군 양성, 영양분석 : 열량 316.7kcal/100g, 탄수화물 38.74%, 조단백질 30.47%, 조지방 4.43%, 수분 7.53%, 회분 18.83%, 나트륨 173.84mg/100g, 불포화지방산 2.11g/100g)  
 잔류 농약 5종은 모두 불검출이었고, 중금속 4종은 0.1PPM이하로 측정되었음. 미생물은 일반세균이 6,600,000/g으로 높게 측정되어 원재료에서 미생물 관리가 필요함.

라. Ge 미나리 추출조건 변화에 따른 추출물 회수율 비교

Ge-미나리 원물 100g	열풍건조 (60℃)		추출물 동결건조		최종 수율
	건조중량	건조비율	건조중량	건조율	
일반건조	8.88 g	8.8%	2.04 g (열수추출)	23.18%	2.04%
동결건조	7.04 g	7.04%	0.95 g (열수추출)	13.49%	0.95%

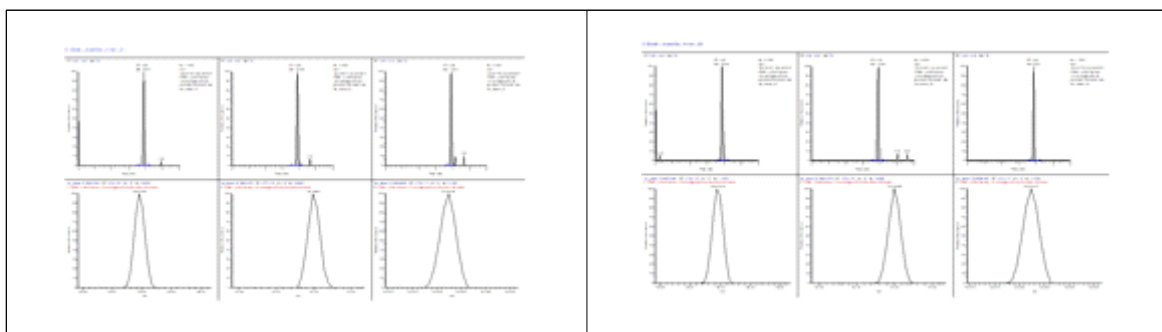
Ge-미나리 원물 200g	열풍건조 (60℃)		추출물 동결건조		최종 수율
	건조중량	건조비율	건조중량	건조율	
30% EtOH 추출	15.1 g	7.55%	2.51 g	16.6%	1.26%
열수추출 80℃, 1회	18.0 g	9.0%	3.97 g	22.1%	1.99%

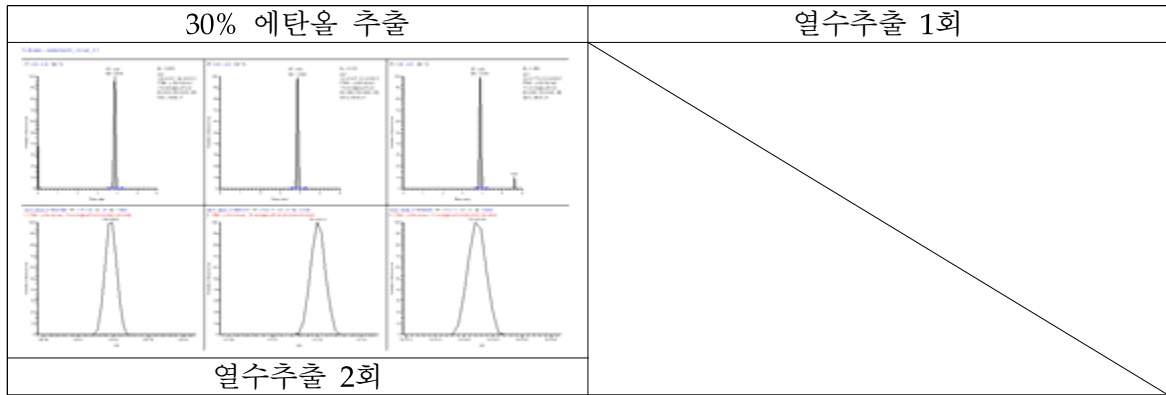
Ge-미나리 원물 2kg	열풍건조 (60℃)		추출물 동결건조		최종 수율
	건조중량	건조비율	건조중량	건조율	
열수추출 1회	167.8g	8.39%	48.35g	28.80%	2.40%
열수추출 2회	208.7g	10.43%	64.6g	30.9%	3.23%

**결론**

- Ge-미나리 건조비율은 크게 차이가 나지 않으나, 추출물의 추출효율은 동결건조 추출물이 열풍건조 추출물에 비하여 50%밖에 회수가 안된 원인은 추후 밝혀야 겠지만 향후 열풍건조로 진행하기로 함.
- 30% 에탄올 추출과 열수추출을 비교한 결과, 열수추출 효율이 높게 나와 향후 열수추출로 진행하기로 함.
- 추출규모를 10배로 하여 키운 결과, 열수추출 1회 처리에서도 수율이 올라갔고, 열수추출 2회를 진행한 결과 1회 추출보다 1.35배 증가된 양의 추출물을 얻음.

마. Ge 미나리 추출물 분석 결과 (분석기관 : 자사, 분석기기 : Q-orbitrap)





구분	(단위)	Ge미나리
Ge미나리분말 용액 농도	(mg/mL)	1
1ml 당 Ge-132 함량	(ng/mL)	12.19
Ge미나리분말의 Ge-132 함량	(ug/g)	12.19*

**결론**

- 30% 에탄올 추출이나 열수추출에서의 지표물질인 Ge-132의 함량은 차이가 없었고, 열수추출 횟수에 따른 Ge-132의 함량도 차이가 없었음. 세 가지 추출방법 30%에탄올 추출, 열수추출 1회, 열수추출 2회 에서 Ge미나리 분말의 유기게르마늄(Ge-132)의 함량은 약 12.19ug/g으로 추정됨.
- Q-Orbitrap 기기는 주 용도가 고분해능 정성분석용 기기이기 때문에 기기 특성상 정량범위가 좁음. 반면 MS/MS는 정량분석에 모든 게 맞춰진 기기이며 그 특성상 정량범위가 더 넓음. 시료농도가 범위를 벗어나는 위치에 있는 것으로 예상되며, 검량선에 weighting 을 X2으로 보정해주면 예상되는 실제 농도는 더 낮아지게 됨. 추후 LC/MS/MS로 정량분석법을 확립하고 Full validation을 진행 후 분석을 하면 정확한 함량값의 확보가 가능하리라고 판단됨. 현재 HPLC 및 LC/MS/MS를 이용한 분석법 개발 중.

**2. 1차년 협동기관(영농조합법인 블루마운트) 연구개발 및 결과**

**1차년도 개발 목표**

협동기관(영농조합법인 블루마운트) : 게르마늄 미나리 수경재배법 개발

가. 게르마늄 수경재배 성장 조건 개발

- 미나리 품종별 수경재배를 위하여 하기와 같은 게르마늄 농축수 저장조 (3t)와 급수장치, 수경재배용 시설을 갖추어 이중 비닐하우스에서 수경재배를 실시하였음.

나. 수경재배 조건





게르마늄수 급수장치

게르마늄수 저장조 3ton

수경재배시설

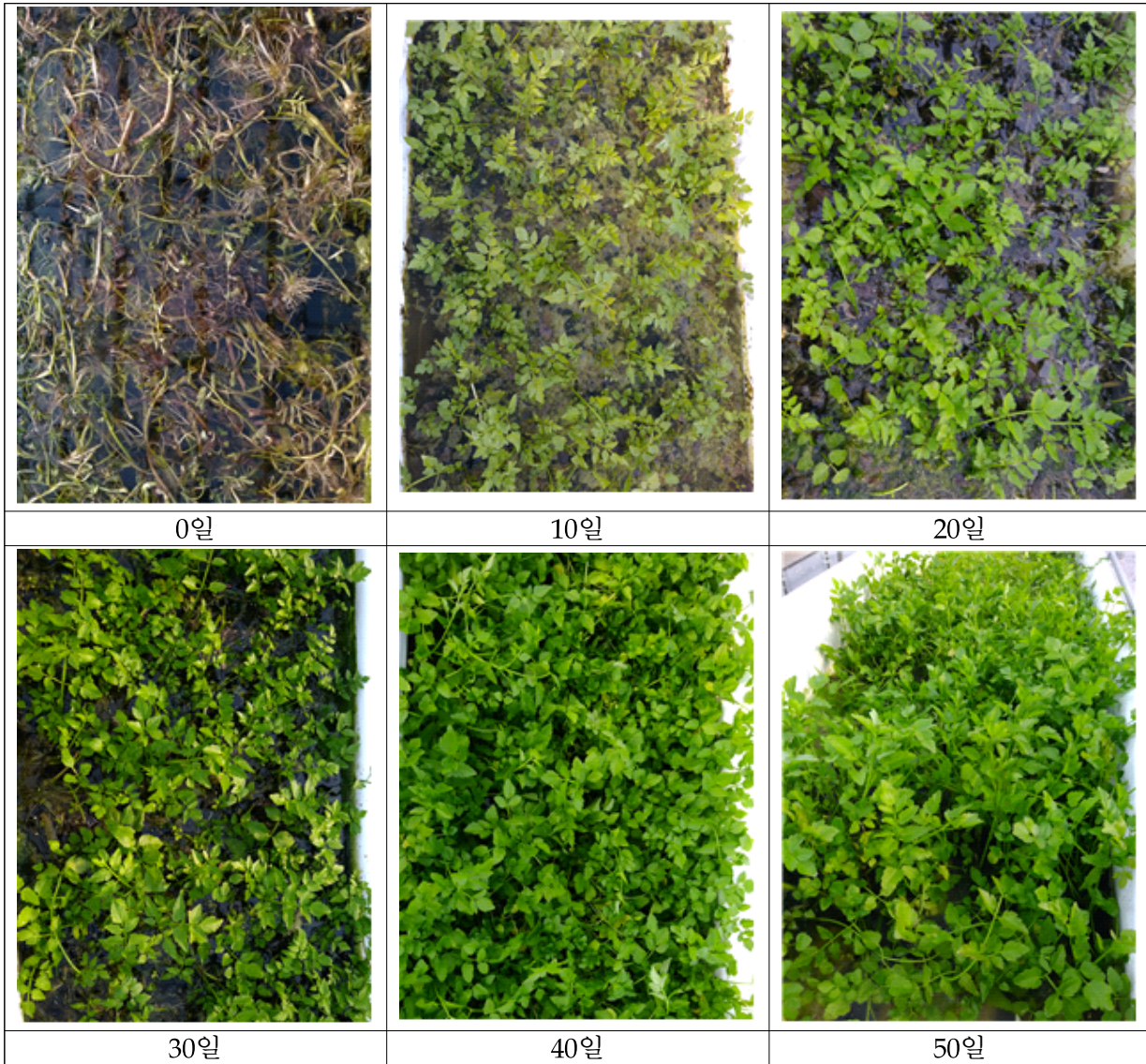
- 게르마늄 농축수(게르마늄 함량 3 PPM) 3ton에 시판 엽채류 비료(팜미나리 액제, 제조원 : (주)카프코) 5L를 투입함.
- 팜미나리 액제 조성 : 동물성 아미노산(닭털 가수분해물), 비타민, 질소, 인산, 칼륨, 붕소, 망간, 철 등



시판 엽채류 비료

- 수경재배 하우스의 실내온도는 25~30℃로 자동 조절함.
- 주간에는 시간당 10분씩 양액을 자동 순환 시킴.
- 야간에는 2 시간당 10분씩 양액을 자동 순환 시킴.
- 10일마다 3ton 저장조의 양액을 교체함.
- 40일간 미나리를 재배함.

다. 미나리 수경 재배 시간에 따른 미나리 성장 모습



**결 론**

- 게르마늄 농축수에서 수경 재배 시 30일이면 수확이 가능한 일반 미나리와는 달리, 성장속도가 다소 느려 40일 이상이 되어야 수확이 가능함. 40일 이상 재배 후 50일까지는 성장에 큰 차이가 없어 경제성 판단에 의하여 40일까지만 재배하는 것으로 함.
- 현재 게르마늄 함량별 성장속도 및 미나리에 함유되어있는 게르마늄 함량을 높이기 위한 조건들을 실험하는 중.

라. 게르마늄미나리 건조조건

- 수확한 미나리를 2일간 음건함.
- 60℃에서 48시간 건조함.
- 건조된 미나리를 분쇄하여 분말화 함. (수분 함량 : 약 5%)

마. 건조 게르마늄 미나리의 총 게르마늄 함량 (분석기관 : 기초과학연구소)



### 3. 1차년 협동기관(청주대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과

#### 1차년도 개발 목표

협동기관(청주대학교 산학협력단) : In vitro toxicity test

#### 가. *In vitro* 안전성 (cell viability; MTT assay)

##### (1) CCD-986sk 세포의 배양

- 본 실험에서는 fibroblast CCD-986sk 세포를 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 세포 성장을 위한 기본 배지로는 10% fetal bovine serum과 streptomycin sulfate (100  $\mu$ g/ml), penicillin G (100 units/ml), 10mM sodium bicarbonate를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium을 사용하여 humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 37°C의 조건으로 배양함.

##### (2) Ge 미나리추출물의 세포독성 시험

- 시료의 세포 독성 효과를 확인하기 위하여 CCD-986sk 세포를 96 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/ml로 접종하고 24시간배양 후, 시료를 처리하여 24시간 동안 배양함. 각 well에 MTS와 PMS를 20:1의 비율로 잘 혼합하여 처리하고 3시간 배양한 후, ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율 (% of control)을 계산함.

### 게르마늄 미나리 Cell Viability

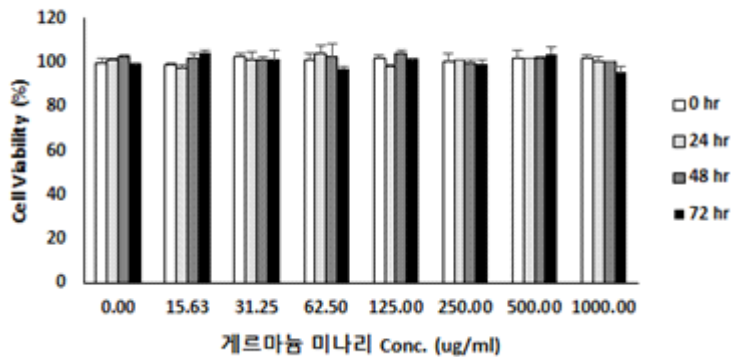


그림 . CCD-986sk cell에서의 cell viability 결과

#### 결론

- MTT assay를 이용하여 CCD-986sk 세포에 대한 독성실험 결과, 시료 농도 31.3~1,000µg/ml 에서 무처리군에 비해 모두 90%이상의 세포생존율을 보임.

#### 4. 2차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과

##### 2차년도 개발 목표

주관기관((주)아리바이오) : 게르마늄 미나리 및 추출물의 분석기술 개발, 생산공정 개발, 게르마늄 미나리 추출물의 안정성 시험, In Vitro 효능 및 독성 시험, In Vivo 효능시험, GLP 독성 시험, 임상시험약 준비, 임상시험 계약, 특허 및 논문

##### 가. 게르마늄 미나리 분석기술 개발

###### (1) 게르마늄 함량분석법 개발

- 게르마늄 미나리의 부위별 게르마늄 함량 분석 - 완료
- 게르마늄 미나리의 무기 및 유기 게르마늄 함량 분석
  - 기능성 미나리 함유 게르마늄의 총 함량과 유기 및 무기 게르마늄의 분석 (게르마늄함량분석에 사용된 기기는 Plasma atomic emission spectrophotometer (Shimatzu 9820 series)를 사용하였음, Q-Orbitrap Mass Spectrometer 등)을 통해 인체에 유효한 유기 게르마늄을 지표물질로 확보함.
  - 지표물질의 validation자료 확보 및 기능성 미나리 원료의 기준 규격을 설정함.

항목	기준	결과
특이성	지표성분 피크에 간섭인자 없음	없음
	지표성분에 대한 스펙트럼의 패턴이 일치	일치함
직선성	R <sup>2</sup> >0.99	0.9998
정확성	회수율 (%) : 95.0 - 105.0 %	99.65±1.12 %

정밀성	반복성 < 2.0 %	1.24 %
	실험실내정밀성 < 2.0 %	1.37 %
범위	직선성 평가시 결정	10 - 300 %
검출한계	직선성 결과에 의하여 계산	0.003 ug/ml
정량한계	직선성 결과에 의하여 계산	0.010 ug/ml

표 . 게르마늄 미나리 추출물 중의 게르마늄 벨리테이션

- 게르마늄 미나리의 게르마늄 함량을 측정한 결과, 다음과 같음.

구분	Elements	전처리 Dilution	측정 Dilution	Method blank	Raw data (mg/L)	Result (mg/kg)
총 게르마늄 함량	Ge	105.7344	9.99664	-0.0057	0.127	118.89
무기 게르마늄 함량	Ge	1	1	-0.0008	0.200	0.2
유기 게르마늄 함량	Ge-132					116.68

표 . 게르마늄 미나리의 무기/유기 게르마늄 함량

#### 결론

- 미나리 함유 게르마늄의 총 함량과 유기 및 무기 게르마늄함량분석에 사용된 기기는 Plasma atomic emission spectrophotometer (Shimatzu 9820 series)를 사용하였음, Q-Orbitrap Mass Spectrometer 등)을 통해 인체에 유효한 유기 게르마늄을 지표물질로 확보함.
- 지표물질의 validation자료 확보 및 기능성 미나리 원료의 기준 규격을 설정하였고, 측정 결과 총 게르마늄 함량은 118.89 mg/kg, 무기게르마늄 함량은 0.2 mg/kg, 유기게르마늄 함량은 116.68 mg/kg으로 확인됨.

#### 나. 게르마늄 미나리 추출물의 생산공정 개발

##### (1) Pilot scale의 생산공정 개발

- Lab. scale 과정에서 확립된 게르마늄 미나리 추출 또는 게르마늄 미나리 건조 분말을 pilot (10-50kg) 추출 생산 공정에 적용 · 실시함. 또한, 각 단계별 기능 (지표)물질의 함량과 함께 수율변화를 측정함.
- 당사에서는 pilot scale 추출법 확립을 위하여 게르마늄미나리 함유 미나리 건물 10kg을 정확히 달아 분쇄기로 곱게 분말화함.
- 추출조에 미나리 건물의 10배수의 정제수를 첨가하고 교반하면서 90-100℃에서 24시간 동안 추출을 진행함.
- 추출이 완료되면, 여과기에 5-10%의 식품용 규조토를 깔고 감압여과를 진행하여 여액을 회수함.
- 회수한 여과액은 농축기를 이용하여 80-90℃에서 감압농축을 실시함.

- 농축액을 동결건조기에 넣고, 동결건조를 진행하여 동결건조물을 확보함.

구분	중량 or 부피	Result (mg/kg)	공정 수율
건물	10 kg	131.9	100
여액	95 L	11	7.3
동결건조물	880	118.18	93.7 (6.8)

표 . Pilot 공정별 수율

(2) 대량 생산 조건 최적화

- Pilot scale에서 개발된 게르마늄 미나리의 추출 (용매, 온도, 시간), 수율, filtering 조건, 분말화 조건) 또는 기능성 미나리 건조 분말화의 대량생산(1 ton) 공정 개선. 그리고, 각 단계별 기능 (지표)물질의 함량 및 수율변화를 측정함.
- 당사에서는 GLP 독성시험 및 임상시험 용 시료 생산을 위하여 대량생산 규모에서 추출을 수행함.
- 게르마늄 미나리 건물 100 kg을 정확히 달아 분쇄기로 곱게 분말화함.
- 1.5t 추출조에 미나리 건물의 10배수의 정제수를 첨가하고 교반하면서 90-100℃에서 24시간 동안 추출을 진행함.
- 추출이 완료되면, filter press로 여과를 진행하여 여액을 회수함.
- 회수한 여과액은 농축태크에서 80-90℃에서 감압농축을 실시함.
- 농축액을 500L 동결건조기에 넣고, 동결건조를 진행하여 동결건조물을 확보함.

구분	중량 or 부피	Result (mg/kg)	공정 수율
건물	100 kg	136	100
여액	900 L		
동결건조물	10 kg	116.68	8.6

표 . 대량생산 공정별 수율

- 대량생산 공정에서 회수한 동결건조물을 효능 및 독성시험을 위하여 게르마늄 함량 시험분석을 완료하여 시험성적서를 첨부하였음.
- 게르마늄 미나리 추출물 동결건조물 게르마늄 함량: 116.68 ppm

**제품시험성적서**  
CERTIFICATE OF ANALYSIS

제품명 (Product Name)	제조업체/농산물명 (Manufacturer/Agri. Name)	제조번호 (Lot No.)	시험번호 (Analytical No.)	시험일자 (Date)	
대량생산물 (Bulk Sample)	2018-05-15	제조업체명 (Manufacturer)	2018-05-15	2018-05-15	
시험목적 (Test Item)	시험기준 (Specification)	시험방법 (Test Method)	시험결과 (Test Result)	시험비고 (Test Note)	
1. 외관 (Appearance)	분백색 분말 (White powder)	계량 (Weighing)	2018-05-15	2018-05-15	합격 (Pass)
2. 순량 시험 (Content)					
3. 순량 (%) (Content %)	순량 99.99% 이상 (Purity 99.99% or more)	계량 (Weighing)	2018-05-15	2018-05-15	합격 (Pass)
비고 (Remarks) : 무용기준 제조일자 115, 100, 100					
시험결과 (Results)	확인자 (Checked by)	승인자 (Approved by)	승인 일자 (Date)		
합격 (Pass)	01/08	[Signature]	2018-05-24		

**제품시험성적서**  
CERTIFICATE OF ANALYSIS

제품명 (Product Name)	제조업체/농산물명 (Manufacturer/Agri. Name)	제조번호 (Lot No.)	시험번호 (Analytical No.)	시험일자 (Date)	
대량생산물 (Bulk Sample)	2018-05-15	제조업체명 (Manufacturer)	2018-05-15	2018-05-15	
시험목적 (Test Item)	시험기준 (Specification)	시험방법 (Test Method)	시험결과 (Test Result)	시험비고 (Test Note)	
1. 외관 (Appearance)	분백색 분말 (White powder)	계량 (Weighing)	2018-05-15	2018-05-15	합격 (Pass)
2. 순량 시험 (Content)					
3. 순량 (%) (Content %)	순량 99.99% 이상 (Purity 99.99% or more)	계량 (Weighing)	2018-05-15	2018-05-15	합격 (Pass)
비고 (Remarks) : 무용기준 제조일자 115, 100, 100					
시험결과 (Results)	확인자 (Checked by)	승인자 (Approved by)	승인 일자 (Date)		
합격 (Pass)	01/08	[Signature]	2018-05-24		

그림 . Pilot 및 대량생산 동결건조물의 시험성적서

○ 공인기관 시험성적서

- 잔류 농약 검사: BHC, DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin과 같은 농약 성분시험 완료
- 미생물 검사: 일반세균, 대장균, 대장균군 3가지 항목에 대하여 시험완료
- 영양분석 검사: 게르마늄 미나리 추출물에 대한 영양분석 결과 탄수화물- 39.73%, 조단백질- 36.94%, 조지방- 0.57%, 수분- 8.73%, 회분- 14.03%, 나트륨- 657.21 mg/kg, 불포화지방산- 0.14 g/100 g 시험 완료
- 중금속 검사: 게르마늄 미나리 추출물에 대한 중금속 검사 결과 납, 카드뮴, 비소, 수은에 대한 시험 완료.
- 함량 분석: 게르마늄 함량분석은 한국식품과학연구원에 의뢰하였으며, 14,375 µg/100 g 으로 시험 완료.

**시험성적서**

제출자 (제출번호)	한국식품과학연구원	제출일자	2018.11.02
제출품명	게르마늄 미나리	제출량	100g
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원
제출목적	품질관리	제출목적	품질관리
제출일자	2018.11.02	제출일자	2018.11.02
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원
제출품명	게르마늄 미나리	제출량	100g
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원
제출목적	품질관리	제출목적	품질관리
제출일자	2018.11.02	제출일자	2018.11.02
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원

한국식품과학연구원

**시험·검사성적서**

제출번호	2018-05-15	제출일자	2018-05-15
제출품명	게르마늄 미나리	제출량	100g
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원
제출목적	품질관리	제출목적	품질관리
제출일자	2018-05-15	제출일자	2018-05-15
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원
제출품명	게르마늄 미나리	제출량	100g
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원
제출목적	품질관리	제출목적	품질관리
제출일자	2018-05-15	제출일자	2018-05-15
제출처	한국식품과학연구원	제출처명	한국식품과학연구원

그림 . 공인기관 시험성적서 (기능식품과학연구원, 한국식품과학연구원)

### 결 론

- Pilot scale 추출법 확립을 위해 게르마늄 수경배재 미나리 건물 10 kg을 가지고 파쇄, 추출, 건조토여과, 농축 건조 등의 추출공정을 진행함.
- Pilot scale에서 게르마늄 수경배재 미나리 건물은 131.9 mg/kg 게르마늄이 118.18 mg/kg 함유 되어있는 시료를 약 800 g 확보함.
- 대량생산 최적화를 위해 Pilot scale 생산공정을 참고하여 게르마늄 수경배재 미나리 건물 100kg을 가지고 추출공정을 진행함
- 게르마늄 수경배재 미나리 건물은 136.0 mg/kg 게르마늄이 116.68 mg/kg 함유 되어있는 시료를 약 10 kg 확보함.
- 대량생산 공정에서 회수한 동결건조물을 효능 및 독성시험을 위하여 게르마늄 함량 시험분석을 완료하여 시험성적서를 첨부하였고, 공인기관에 시험성적 의뢰를 하였음.
- 잔류 농약 검사( BHC, DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin) 불검출, 대장균, 대장균군 검사 불검출,
- 영양분석 검사 (탄수화물- 39.73%, 조단백질- 36.94%, 조지방- 0.57%, 수분- 8.73%, 회분- 14.03%, 나트륨- 657.21 mg/kg, 불포화지방산- 0.14 g/100 g) 중금속 검사 (납 - 0.1449 mg/kg, 카드뮴 0.0351 mg/kg, 수은 불검출, 비소 1.3152 mg/kg, 게르마늄 함량분석 (14,375 µg/100 g)의 공인기관 시험성적서 결과를 얻었음.

### (3) *In vivo* 효능 및 안전성 시험을 위한 게르마늄 미나리 추출물의 제조 및 안정성 시험

- *In vivo* 시험을 위하여 사용하는 게르마늄 미나리 추출물의 조제물에 대한 안정성을 실험
- 게르마늄함량분석에 사용된 기기는 Plasma atomic emission spectrophotometer (Shimatzu 9820 series)를 사용하였음.
- 시료의 제조는 저농도 (3.13 mg/ml), 고농도 (500 mg/ml) 2가지로 진행하였으며, 보관 조건과 시험기간은 상온 (25±2℃)에서 4시간까지의 안정성을 확인하였고, 냉장 (6±2℃)에서 8일간 안정성을 시험하였음.
- 시험결과, 상온 및 냉장에서 정상 및 게르마늄 함량의 차이가 없었음.

시료	농도	시간 (hour)	게르마늄 함량 (ppm)
G1	3.13mg/ml	0	0.37
		4	0.37
G2	500mg/ml	0	60.0
		4	57.6

표 . 상온에서 게르마늄 미나리 추출물의 안정성



시료	농도	시간 (일)	게르마늄 함량 (ppm)
G1	3.13mg/ml	0	0.34
		8	0.33
G2	500mg/ml	0	53.6
		8	54.9

표 . 냉장에서 게르마늄 미나리 추출물의 안정성

○ 안정성이 확보된 시료를 제공하여 in vitro/in vivo 효능 및 안전성을 시험하였음.

#### 결론

- 시료의 제조는 저농도 (3.13 mg/ml), 고농도 (500 mg/ml) 2가지로 진행하였으며, 보관조건과 시험기간은 상온 (25±2℃)에서 4시간까지의 안정성을 확인하였고, 냉장 (6±2℃)에서 8일간 안정성을 시험한 결과 안정하다고 판단됨.

#### (4) 게르마늄 미나리추출물의 in vivo 효능 평가

○ 대조군으로서 기 인증된 면역기능개선 기능성원료를 사용하며, 면역저하 모델에서의 체중, 장기무게, 혈액학적 분석, 혈액 생화학 분석, 비장세포 증식반응, 조직검사 등을 실시하여 면역 증진의 효능 검증

- ✓ 시험동물: SPF/VAF Outbred CrjOri:CD1 (ICR) 마우스
- ✓ 시험물질: 기능성 미나리 추출물
- ✓ 유발물질: CPA (Cyclophosphamide)
- ✓ 양성 대조군:  $\beta$ -glucan
- ✓ 투여기간 및 투여방법: 6주, 자유급식
- ✓ 면역억제 유발: 미나리 추출물과  $\beta$ -glucan 투여 시작 3일 및 1일 전 각각 200 mg/kg 과 110 mg/kg의 CPA를 생리 식염수에 녹여 2회 복강 주사하여 면역억제를 유발시키고, 정상 대조군에서는 CPA대신 동량의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여함.
- ✓ 시험방법: CPA 투여 종료 1일 후, 군당 10마리씩 분류하여 실험에 사용군 구성
  - 정상 대조군: CPA 비처리 후 멸균증류수 투여군
  - CPA 대조군: CPA 면역억제 유발 후 멸균 증류수 투여군
  - EAP ( $\beta$ -1,3-glucan으로 26 mg함유) 투여군: CPA 면역억제 유발 후  $\beta$ -glucan 200 mg/kg 투여군
  - 게르마늄 미나리 추출물 100 mg/kg 투여군: CPA 면역억제 유발 후 미나리 100 mg/kg 투여군
  - 게르마늄 미나리 추출물 200 mg/kg 투여군: CPA 면역억제 유발 후 미나리 200 mg/kg 투여군
  - 게르마늄 미나리 추출물 400 mg/kg 투여군: CPA 면역억제 유발 후 미나리 300

mg/kg 투여군

✓ 관찰항목 :

- 실험 물질 최종 42회 투여 24시간 후, 체중의 변화, 가슴샘, 비장 및 악하 임파절 중량, 13 종류의 혈액학적 검사 (Table 2), 혈청 및 비장내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-12 함량, 복강 및 비장 natural killer (NK) cell 활성화, realtime reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 비장 내 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 mRNA expressions 발현의 변화를 임파장기의 조직 병리학적 변화와 함께 관찰하였음.
- 또한 최종 희생 시 수거한 비장세포에 대한 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 이용한 세포독성 및 비장세포 증식 활성 평가를 수행하였음 (Chen et al., 2006).
- 항돌연변이원성을 최종 희생일에 수거한 골수 도말 표본에 대한 소핵실험 (micronucleus; MN test)를 통해 평가하였음 (Song et al., 2012; Lee et al., 2016).
- 가슴샘 전체 및 피질두께, 비장 전체 및 백색수질의 두께, 백색 수질의 수, 비장조직 내 CD3+, CD4+, CD8+, TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + 및 inducible nitric oxide synthases (iNOS)+ 면역반응세포의 수, 악하임파절 전체 및 피질의 두께, 임파 여포의 수를 조직형태계측학적 지표로 사용하였음.
- 본 실험에서 PB의 결과는 면역조절효과가 잘 알려져 있는  $\beta$ -1,3/1,6-glucan을 13% 함유한 EAP 200 mg/kg 경구투여군과 비교 평가하였음 (Yoon et al., 2010; Ku et al., 2012a; Kim et al., 2018).

(가) 체중의 변화

- 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화는 CPA 대조군에서 인정되지 않았으며, CPA 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화 역시 모든 3 용량의 게르마늄 미나리 추출물 (100, 200, 400 mg/kg) 투여군과 EAP 200 mg/kg 군에서 42일간의 실험기간 동안 인정되지 않았음.

Periods Groups	Body weights at:				Body weight gains [B-A]
	First test substance administration [A]*	First CPA treatment	Second CPA treatment	At sacrifice [B]*	
<b>Controls</b>					
Intact	31.54±2.23	40.02±2.37	39.47±2.43	34.60±2.46	3.06±0.93
CPA	31.41±1.85	39.92±1.99	38.94±2.01	34.08±2.06	2.67±0.89
<b>Reference</b>					
EAP	31.42±1.36	40.02±1.63	39.46±1.67	34.43±1.61	3.01±0.64
<b>GO extracts</b>					
400 mg/kg	31.44±1.33	39.82±1.70	39.28±1.86	34.21±1.91	2.77±0.69
200 mg/kg	31.67±1.79	40.15±1.93	39.46±1.93	34.49±1.98	2.82±1.20
100 mg/kg	31.34±1.62	39.52±1.67	38.65±1.83	33.92±1.88	2.58±0.76

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice, g

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan™)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*

\* All animals were overnight fasted (about 18 hrs; water was not restrict)

표 . Body Weight Gains in Intact or CPA-induced Immunosuppressive Mice

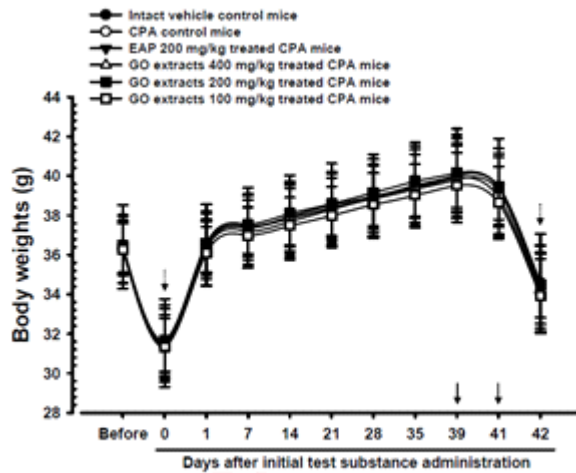


그림. Body weights changes in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 실험 전 기간인 42일 동안의 증체량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -12.75%의 변화를 나타내었으며, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 1,00, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 12.73, -3.37, 5.62 3.75%의 변화를 나타내었음.

(나) 비장세포에 대한 독성

- 최종 희생시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 게르마늄 미나리 추출물 처리군 (0.01 ~ 10 mg/ml)에서 무처리 대조군 (0 mg/ml)에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않았음.

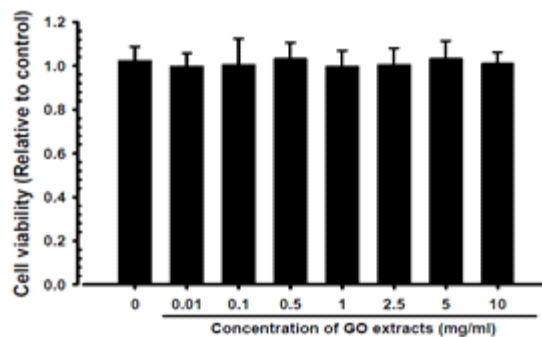


그림 . Effect of GO extracts on the normal splenocytes viability

- GO 추출물 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 및 10 mg/ml 처리군에서는 각각 무처리 대조군에 비해 -2.61, -1.79, 0.82, -2.45, -1.79, 0.82 및 -1.31%의 정상 비장세포 생존률의 변화를

나타내었음.

(다) ConA에 의한 비장세포 증식율에 대한 변화

- CPA 대조군의 최종 희생일에 수집 배양한 비장세포에서는 정상 매체 대조군의 비장 세포에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) ConA 유발 세포 증식률의 감소를 나타내었으나, EAP를 포함한 모든 실험 물질 투여군에서는 CPA 대조군의 비장 세포에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 현저한 ConA 유발 세포 증식률의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 CPA 유발 비장 세포 증식 감소 억제 효과를 투여 용량 의존적으로 나타내었음.

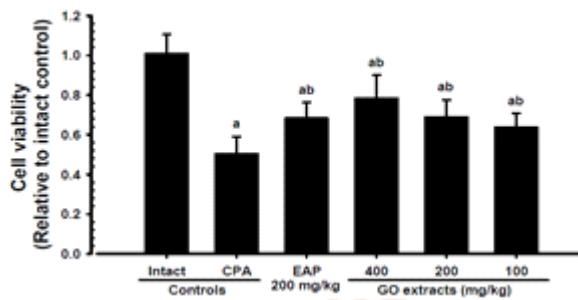


그림 . Effect on the ConA-induced splenocytes Proliferation

- ConA 유발 비장세포 증식률은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -50.20%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 36.06, 55.78, 37.25, 26.89%의 변화를 나타내었음.

(라) LPS에 의한 비장세포 증식율에 대한 변화

- CPA 대조군의 최종 희생일에 수집 배양한 비장세포에서는 정상 매체 대조군의 비장 세포에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) LPS 유발 세포 증식률의 감소를 나타내었으나, GO 추출물 400 mg/kg을 포함한 모든 실험 물질 투여군에서는 CPA 대조군의 비장 세포에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 현저한 LPS 유발 세포 증식률의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 CPA 유발 비장 세포 증식 감소 억제 효과를 투여 용량 의존적으로 나타내었음.

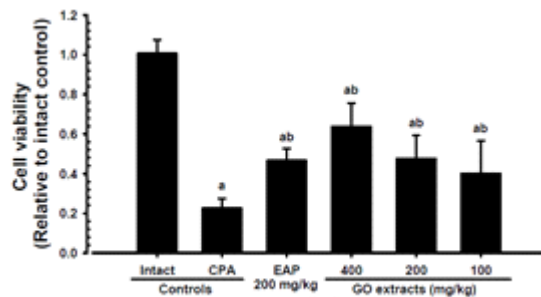


그림 . Effects on the LPS-induced Splenocytes Proliferation

- LPS 유발 비장세포 증식률은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -77.63%의 변

화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 107.11, 77.78, 111.11, 182.67%의 변화를 나타내었음.

(마) 골수세포에 대한 소핵실험의 결과

○ CPA 대조군의 최종 희생일에 수집 도말한 골수 세포에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 소핵다염적혈구의 수적 증가와 다염적혈구의 수 및 비율의 감소가 인정되었으나, GO 추출물 200 mg/kg을 포함한 모든 실험 물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 소핵다염적혈구의 수적 감소와 다염적혈구의 수 및 비율의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 CPA 유발 소핵다염적혈구의 증가와 다염적혈구의 수 및 비율감소 억제 효과를 투여 용량 의존적으로 나타내었음.

Index (Unit) Groups	Bone marrow cell smear cytology		
	MNPCE numbers (cells/2000 PCEs)	PCE numbers (cells/500 erythrocytes)	PCE/(NCE+PCE)
<b>Controls</b>			
Intact	1.00±0.67	145.30±9.39	0.29±0.02
CPA	89.30±16.78c	73.80±12.34a	0.15±0.02c
<b>Reference</b>			
EAP	43.10±15.86cd	98.80±10.96ab	0.20±0.02cd
<b>GO extracts</b>			
400 mg/kg	18.60±10.34cd	116.80±7.42ab	0.23±0.01cd
200 mg/kg	42.00±10.39cd	99.20±15.12ab	0.20±0.03cd
100 mg/kg	56.00±11.70cd	89.10±10.56ab	0.18±0.02cd

Values are expressed mean ± SD of 10 mice

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan™)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*

MN = Micronucleus; PCE = Polychromatic erythrocytes; NCE = Normochromatic erythrocytes; MNPCE = MN contained PCE

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  compared with CPA control mice by LSD test

c  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by MW test

d  $p < 0.01$  compared with CPA control mice by MW test

표 . Result of micronucleus assay on the bone marrow cells, collected from individual intact or CPA-induced immunosuppressive mice at sacrificed

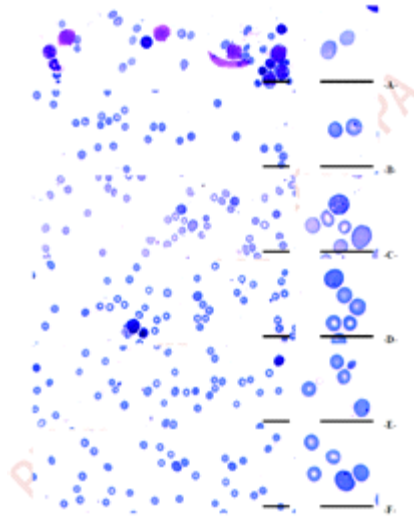


그림 . Representative cell smear cytological images of the bone marrow cells, collected from individual mice in each groups at sacrifice

- 소핵다염적혈구의 수 및 다염적혈구의 수 (비율)은 각각 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 8830.00 및 -49.21%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 -51.74, -37.29, -52.97, -79.17%의 소핵다염적혈구의 수적 변화를 나타내었고, 33.88, 20.73, 34.42, 58.27%의 다염적혈구의 수 및 비율의 변화를 각각 나타내었음.

(바) 골수세포에 대한 소핵실험의 결과

- CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 가슴샘, 비장 및 악하 임파절의 상대 및 절대 중량의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 100 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 가슴샘, 비장 및 악하 임파절 중량의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 CPA 유발 임파 장기 중량 감소 억제 효과를 투여 용량의존적으로 각각 나타내었음.

Organs (Unit) Groups	Absolute weights (g)			Relative weights (% of body weights)		
	Thymus	Spleen	LN	Thymus	Spleen	LN
<b>Controls</b>						
Intact	0.077±0.009	0.126±0.009	0.014±0.003	0.223±0.030	0.365±0.033	0.042±0.008
CPA	0.017±0.007a	0.052±0.011a	0.003±0.001c	0.050±0.019a	0.153±0.032a	0.007±0.004a
<b>Reference</b>						
EAP	0.037±0.006ab	0.074±0.012ab	0.006±0.001cd	0.107±0.016ab	0.215±0.038ab	0.017±0.004ab
<b>GO extracts</b>						
400 mg/kg	0.050±0.010ab	0.087±0.009ab	0.011±0.002cd	0.147±0.032ab	0.255±0.024ab	0.031±0.006ab
200 mg/kg	0.038±0.008ab	0.074±0.009ab	0.006±0.002cd	0.112±0.027ab	0.216±0.027ab	0.018±0.006ab
100 mg/kg	0.027±0.003ab	0.066±0.006ab	0.005±0.001cd	0.080±0.011ab	0.197±0.027a	0.015±0.004ab

Values are expressed mean ± SD of eight mice

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan™)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*

LN = Submandibular lymph node, left side

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  as compared with CPA control mice by LSD test

c  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by MW test

d  $p < 0.01$  as compared with CPA control mice by MW test

표 . Lymphatic Organ Weights in Intact of CPA-induced Immunosuppressive Mice

- 가슴샘 절대 및 상대 중량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -77.71 및 -77.64%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여 군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 115.20, 58.48, 123.98, 193.57%의 가슴샘 절대 중량의 변화를 나타내었고, 114.35, 60.95, 124.69, 196.05%의 가슴샘 상대 중량의 변화를 각각 나타내었음.
- 비장 절대 및 상대 중량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -58.74 및 -58.16%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여 군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 42.20, 28.00, 43.35, 68.02%의 비장 절대 중량의 변화를 나타내었고, 40.80, 29.11, 41.68, 67.05%의 비장 상대 중량의 변화를 각각 나타내었음.
- 악하 임파절 절대 및 상대 중량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -82.64 및 -82.49%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여 군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 140.00, 104.00, 148.00, 324.00%의 악하 임파절 절대 중량의 변화를 나타내었고, 138.78, 106.89, 147.67, 326.51%의 악하 임파절 상대 중량의 변화를 각각 나타내었음.

(사) 혈액학적 변화

- 총 13 종류의 혈액학적 검사 결과, 정상 매체 대조군에 비해 총 백혈구 및 적혈구 수, HGB, HCT 및 혈소판 수의 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 감소, 즉 조혈기계의 현저한 억제에 의한 범백혈구 감소, 혈소판 감소 및 재생불량성 빈혈소견이 CPA 대조군에서 인정되었으며, 범백혈구 감소의 결과, 백혈구 분별 count의 변화는 인정되지 않았다. 한편 이러한 CPA 투여에 의한 조혈기계 억제에 기인한 총 백혈구 및 적혈구 수, HGB, HCT 및 혈소판 수의 감소가 EAP 200 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여에 의해 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 억제 되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 조혈기계 억제 감소 효과를 각각 나타내었음.

Groups Items (Unit)	Controls		Reference	GO extracts		
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
WBC (K/ $\mu$ D)	7.60 $\pm$ 1.10	0.36 $\pm$ 0.09c	1.31 $\pm$ 0.37cd	2.45 $\pm$ 0.85cd	1.39 $\pm$ 0.34cd	1.09 $\pm$ 0.39cd
Differential count						
LYM%	78.39 $\pm$ 2.63	78.52 $\pm$ 2.68	79.18 $\pm$ 3.21	78.89 $\pm$ 2.26	78.82 $\pm$ 3.88	78.95 $\pm$ 3.31
NEU%	15.04 $\pm$ 2.29	15.13 $\pm$ 2.15	14.98 $\pm$ 2.24	15.11 $\pm$ 2.05	15.31 $\pm$ 3.20	15.27 $\pm$ 2.91
MONO%	4.38 $\pm$ 1.32	4.34 $\pm$ 1.07	3.91 $\pm$ 1.17	4.30 $\pm$ 1.09	4.22 $\pm$ 1.30	4.26 $\pm$ 1.28
EOS%	0.39 $\pm$ 0.15	0.38 $\pm$ 0.13	0.41 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.12	0.38 $\pm$ 0.15	0.38 $\pm$ 0.13
BASO%	0.35 $\pm$ 0.11	0.36 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.14	0.37 $\pm$ 0.13	0.34 $\pm$ 0.16	0.37 $\pm$ 0.09
RBC (M/ $\mu$ D)	8.09 $\pm$ 0.75	4.96 $\pm$ 0.55c	5.89 $\pm$ 0.38cd	6.32 $\pm$ 0.93cd	5.90 $\pm$ 0.56cd	5.64 $\pm$ 0.35cd
HGB (g/dl)	19.31 $\pm$ 1.21	12.45 $\pm$ 1.01a	14.24 $\pm$ 0.60ab	15.83 $\pm$ 1.15ab	14.30 $\pm$ 0.74ab	13.84 $\pm$ 0.66ab
HCT (%)	45.48 $\pm$ 2.37	29.06 $\pm$ 2.86c	33.84 $\pm$ 1.72cd	37.36 $\pm$ 4.21cd	33.94 $\pm$ 1.24cd	32.03 $\pm$ 0.68cd
MCV (fl)	56.62 $\pm$ 5.48	58.81 $\pm$ 4.07	57.53 $\pm$ 3.04	59.51 $\pm$ 4.35	58.10 $\pm$ 6.62	56.99 $\pm$ 3.20
MCHC (pg)	24.08 $\pm$ 2.82	25.34 $\pm$ 2.92	24.25 $\pm$ 1.89	25.37 $\pm$ 2.73	24.37 $\pm$ 1.61	24.64 $\pm$ 1.91
MCHC (g/dl)	42.67 $\pm$ 4.76	43.08 $\pm$ 4.01	42.17 $\pm$ 2.65	42.65 $\pm$ 3.50	42.22 $\pm$ 3.26	43.23 $\pm$ 2.37
PLT ( $\times 10^6$ K/ $\mu$ D)	160.94 $\pm$ 17.73	76.26 $\pm$ 10.93c	109.25 $\pm$ 13.70cd	133.47 $\pm$ 14.79cd	112.38 $\pm$ 6.83cd	99.16 $\pm$ 7.61cd

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice Full name of hematological items were listed in Table 2.

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan<sup>TM</sup>)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*

a p<0.01 as compared with intact control mice by LSD test

c p<0.01 as compared with intact control mice by MW test

b p<0.01 as compared with CPA control mice by LSD test

d p<0.01 as compared with CPA control mice by MW test

표 . Hematological values in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 총 백혈구 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -95.26%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 264.17, 201.67, 286.39, 579.44%의 변화를 나타내었음.
- 총 적혈구 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -38.70%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 18.90, 13.72, 18.92, 27.50%의 변화를 나타내었음.
- HGB 는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -35.53%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 14.38, 11.16, 14.86, 27.15%의 변화를 나타내었음.
- HCT는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -36.10%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 16.45, 10.22, 16.79, 28.56%의 변화를 나타내었다.
- PLT는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -52.62%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 43.26, 30.03, 47.36, 75.02%의 변화를 나타내었음.

(아) 혈중 cytokine - IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 변화



- CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 혈중 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 400 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 혈중 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 혈중 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량 감소 억제 효과를 각각 나타내었음.

Groups Items (Unit)	Controls		Reference		GO extracts	
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	86.79 $\pm$ 16.26	22.56 $\pm$ 10.37a	46.36 $\pm$ 10.82ab	64.34 $\pm$ 16.43ab	47.78 $\pm$ 11.78ab	38.20 $\pm$ 11.43ac
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	85.80 $\pm$ 11.96	17.45 $\pm$ 3.19a	41.02 $\pm$ 11.12ab	62.35 $\pm$ 14.86ab	42.86 $\pm$ 12.48ab	31.99 $\pm$ 14.08ab
IL-1 $\beta$ (ng/ml)	28.07 $\pm$ 7.44	5.73 $\pm$ 2.91d	11.88 $\pm$ 1.84df	16.45 $\pm$ 3.44df	11.97 $\pm$ 2.24df	10.30 $\pm$ 1.76df
IL-6 (pg/ml)	36.97 $\pm$ 15.23	6.58 $\pm$ 1.94d	15.66 $\pm$ 3.41df	22.74 $\pm$ 4.94ef	15.75 $\pm$ 2.80df	9.96 $\pm$ 2.76df
IL-12 (ng/ml)	18.89 $\pm$ 5.82	3.46 $\pm$ 2.25d	7.98 $\pm$ 1.49df	10.78 $\pm$ 2.09df	8.04 $\pm$ 1.22df	5.90 $\pm$ 1.43df

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from Aureobasidium pullulans SM-2001 (PolycanTM)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, Oenanthe javanica

IFN = Interferon; TNF = Tumor necrosis factor; IL = Interleukin

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  and c  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by LSD test

f  $p < 0.01$  as compared with CPA control mice by MW test

표 . Serum cytokine levels in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 혈중 IFN- $\gamma$  함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -74.01%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 105.48, 69.32, 111.78, 185.17%의 변화를 나타내었음.
- 혈중 TNF- $\alpha$  함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -79.66%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 135.02, 83.31, 145.59, 257.29%의 변화를 나타내었음.
- 혈중 IL-1 $\beta$  함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -79.58%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 107.22, 79.61, 108.88, 187.02%의 변화를 나타내었음.
- 혈중 IL-6 함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -82.21%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 138.08, 51.51, 139.57, 245.76%의 변화를 나타내었음.
- 혈중 IL-12 함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -81.66%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 130.40, 70.38, 132.19, 211.17%의 변화를 나타내었음.

(자) 비장조직내 cytokine - IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 변화

- CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 비장 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 200 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 비장 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 비장 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량 감소 억제 효과를 각각 나타내었음.

Groups Items (Unit)	Controls		Reference		GO extracts	
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
IFN- $\gamma$	310.84 $\pm$ 109.48	61.90 $\pm$ 16.12d	126.87 $\pm$ 33.13de	176.41 $\pm$ 28.43de	128.06 $\pm$ 20.36de	102.22 $\pm$ 30.78de
TNF- $\alpha$	112.83 $\pm$ 23.56	33.98 $\pm$ 15.61a	71.00 $\pm$ 16.37ab	82.49 $\pm$ 16.98ab	72.21 $\pm$ 15.75ab	62.79 $\pm$ 12.76ab
IL-1 $\beta$	70.33 $\pm$ 13.05	16.91 $\pm$ 6.65a	37.66 $\pm$ 11.66ab	50.51 $\pm$ 15.51ab	38.41 $\pm$ 11.60ab	30.43 $\pm$ 10.78ac
IL-6	81.51 $\pm$ 14.34	20.67 $\pm$ 7.93a	41.39 $\pm$ 10.83ab	56.94 $\pm$ 11.40ab	42.67 $\pm$ 10.78ab	32.96 $\pm$ 11.17ac
IL-12	594.66 $\pm$ 166.16	124.91 $\pm$ 46.78d	271.50 $\pm$ 51.55de	369.67 $\pm$ 138.66de	274.76 $\pm$ 87.86de	195.06 $\pm$ 20.02de

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice, pg/mg protein

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from Aureobasidium pullulans SM-2001 (PolycanTM)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, Oenanthe javanica

NF- $\kappa$ B = Nuclear factor- $\kappa$ B; IFN = Interferon; TNF = Tumor necrosis factor; IL = Interleukin

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  and c  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by LSD test

d  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by MW test

e  $p < 0.01$  as compared with CPA control mice by MW test

표 . Splenic cytokine contents in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 비장 IFN- $\gamma$  함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -80.09%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 104.96, 65.14, 106.88, 184.99%의 변화를 나타내었음.
- 비장 TNF- $\alpha$  함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -69.88%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 108.93, 84.77, 112.49, 142.73%의 변화를 나타내었음.
- 비장 IL-1 $\beta$  함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -75.96%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 122.76, 79.96, 127.18, 198.72%의 변화를 나타내었음.
- 비장 IL-6 함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -74.64%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 100.21, 59.42, 106.40, 175.44%의 변화를 나타내었음.
- 비장 IL-12 함량은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -78.99%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 117.36, 56.16, 119.96, 195.95%의 변화를 나타내었음.

(차) NK세포 활성의 변화

- CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 복강 및 비장 NK 세포 활성의 감소가 각각 인정되었으나, 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 복강 및 비장 NK 세포 활성의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 NK 세포 활성 감소 억제 효과를 각각 나타내었음.

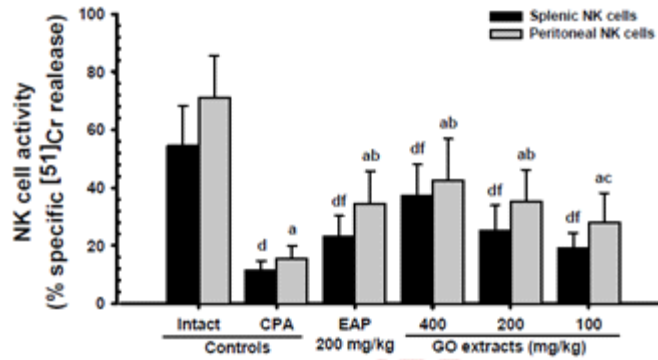


그림 . Effects on the NK cell activities

- 비장 NK 세포 활성은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -78.62%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 100.62, 64.23, 114.74, 220.89%의 변화를 나타내었음.
- 복강 NK 세포 활성은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -78.08%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 122.33, 79.08, 126.82, 173.16%의 변화를 나타내었음.

(카) 비장 조직 내  $NF-\kappa B$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  및  $IL-12$  mRNA expression의 변화

- CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 비장 조직 내  $NF-\kappa B$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  및  $IL-12$  mRNA expression의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 100 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 비장 조직 내  $NF-\kappa B$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  및  $IL-12$  mRNA expression의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 비장조직 내  $NF-\kappa B$  및 cytokine mRNA expression 감소 억제 효과를 각각 나타내었음.

Groups Items (Unit)	Controls		Reference		GO extracts	
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
NF- $\kappa$ B	1.03±0.07	0.22±0.09d	0.42±0.12de	0.62±0.16de	0.42±0.14de	0.33±0.05de
IFN- $\gamma$	1.00±0.06	0.21±0.06a	0.44±0.08ab	0.62±0.11ab	0.45±0.11ab	0.35±0.09ab
TNF- $\alpha$	1.02±0.08	0.17±0.06a	0.41±0.09ab	0.52±0.12ab	0.41±0.12ab	0.30±0.05ab
IL-1 $\beta$	1.01±0.06	0.26±0.06d	0.41±0.09de	0.63±0.16de	0.42±0.12de	0.34±0.06de
IL-6	1.03±0.07	0.30±0.07a	0.45±0.10ab	0.70±0.14ab	0.46±0.07ab	0.39±0.07ac
IL-12	1.01±0.05	0.29±0.09d	0.50±0.11de	0.70±0.19de	0.52±0.11de	0.42±0.08de

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice, relative expressions to intact control mice/GAPDH mRNA

CPA = Cyclophosphamide

EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan™)

Ge = Germanium

GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*

IFN = Interferon; TNF = Tumor necrosis factor; IL = Interleukin

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  and c  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by LSD test

d  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by MW test

e  $p < 0.01$  as compared with CPA control mice by MW test

#### 표 . Splenic cytokine mRNA expressions in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 비장 조직 내 NF- $\kappa$ B mRNA expression은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -78.95%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 93.52, 53.70, 95.37, 187.04%의 변화를 나타내었음.
- 비장 조직 내 IFN- $\gamma$  mRNA expression은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -79.06%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 107.62, 65.24, 115.24, 196.67%의 변화를 나타내었음.
- 비장 조직 내 TNF- $\alpha$  mRNA expression은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -82.99%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 134.48, 71.84, 135.06, 199.43%의 변화를 나타내었음.
- 비장 조직 내 IL-1 $\beta$  mRNA expression은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -74.60%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 60.31, 145.53, 61.87, 32.68%의 변화를 나타내었음.
- 비장 조직 내 IL-6 mRNA expression은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -71.11%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 50.84, 32.66, 53.87, 136.33%의 변화를 나타내었음.
- 비장 조직 내 IL-12 mRNA expression은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -71.77%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 73.08, 45.10, 81.82, 143.01%의 변화를 나타내었음.

#### (과) 조직 병리학적 변화

- 가슴샘의 조직병리학적 변화: CPA 대조군에서는, 정상 매체 대조군 비해 가슴샘 피질의 현저한 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 가슴샘 전체 및 피질 두께의 감소가 각각 인정되었다. 한편 EAP 200 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 가슴샘 전체

및 피질 두께의 증가가 각각 인정되었고, 특히 GO추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 가슴샘 위축 억제 효과를 각각 나타내었음.

Groups Items	Controls		Reference		GO extracts	
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
<b>Thymus-thickness</b>						
<b>Total (mm)</b>	1.23±0.13	0.51±0.10d	0.69±0.06df	0.86±0.10df	0.69±0.14df	0.61±0.06dg
<b>Cortex (μm)</b>	817.48±55.95	203.23±19.45a	296.98±51.98ab	355.41±45.67ab	302.39±37.78ab	255.83±55.53ac
<b>Spleen-thickness</b>						
<b>Total (mm)</b>	1.75±0.18	0.87±0.16a	1.25±0.15ab	1.49±0.19ab	1.27±0.10ab	1.18±0.11ab
<b>Cortex (μm)</b>	627.81±120.73	220.06±34.45a	344.92±45.27ab	503.63±75.51ab	347.52±40.54ab	318.68±34.04ab
<b>WP (N/mm<sup>2</sup>)</b>	21.50±3.44	9.00±1.05d	12.40±1.43df	16.40±2.37df	13.10±2.28df	11.60±1.26df
<b>Immunoreactive cells (numbers/mm<sup>2</sup>)</b>						
<b>CD3<sup>+</sup></b>	342.60±60.85	20.20±4.34d	177.50±26.13df	259.50±60.21df	182.10±30.41df	98.20±28.58df
<b>CD4<sup>+</sup></b>	150.00±25.27	12.40±4.43d	60.80±10.40df	128.70±29.39f	64.80±13.60df	45.30±19.56df
<b>CD8<sup>+</sup></b>	179.20±20.95	12.60±3.75d	97.80±13.70df	150.60±38.82f	104.80±20.07df	77.70±23.04df
<b>TNF-α<sup>+</sup></b>	293.50±84.24	10.60±4.97d	127.60±26.20df	186.40±34.28df	130.10±20.11df	89.40±23.84df
<b>iNOS<sup>+</sup></b>	183.40±25.80	13.40±4.01d	94.20±18.43df	168.60±43.88f	96.00±22.94df	57.40±21.10df
<b>IL-1β<sup>+</sup></b>	151.20±37.06	17.40±3.47d	82.80±16.05df	120.70±17.65ef	85.50±14.61df	73.50±18.39df
<b>LN - thickness</b>						
<b>Total (mm)</b>	1.16±0.12	0.51±0.09a	0.71±0.10ab	0.88±0.08ab	0.72±0.09ab	0.64±0.06ab
<b>Cortex (μm)</b>	778.66±119.86	241.01±43.37d	436.72±74.40df	625.36±108.21ef	439.10±60.96df	382.48±58.07df
<b>FO (N/mm<sup>2</sup>)</b>	23.60±3.86	8.20±2.20a	15.30±2.16ab	21.50±2.64ab	15.80±2.53ab	12.00±1.83ab

Values are expressed mean ± SD of 10 mice

CPA = Cyclophosphamide; EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan™); Ge = Germanium; GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*; N = Numbers; WP = White pulp; TNF = Tumor necrosis factor; IL = Interleukin; iNOS = Inducible nitric oxide synthases; LN = Submandibular lymph node, left sides; FO = Follicle

a p<0.01 as compared with intact control mice by LSD test

b p<0.01 and c p<0.05 as compared with CPA control mice by LSD test

d p<0.01 and e p<0.05 as compared with intact control mice by MW test

f p<0.01 and g p<0.05 as compared with CPA control mice by MW test

### Ⅹ . Histomorphometrical Analysis in Intact or CPA-induced Immunosuppressive Mice

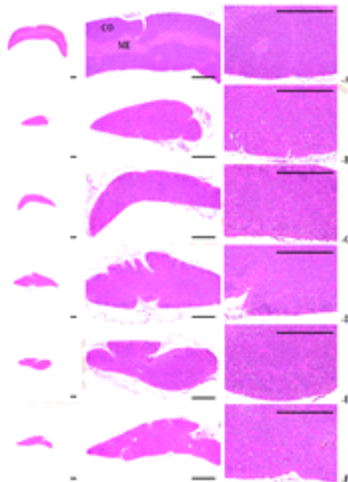


그림 . Representative histopathological images of the thymus, taken from intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 가슴샘 전체 두께는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -58.72%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 34.77, 19.84, 35.56, 68.96%의 변화를 나타내었음.
- 가슴샘 피질 두께는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -75.14%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 46.13, 25.88, 48.79, 74.88%의 변화를 나타내었다.
- 비장의 조직병리학적 변화: CPA 대조군에서는, 정상 매체 대조군 비해 비장 백색수질 부분의 현저한 임파구 감소를 특징으로 하는 위축이 인정되어, 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 비장 두께, 백색수질 직경 및 수의 감소, CD3+, CD4+, CD8+, TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + 및 iNOS+ 면역반응세포의 수적 감소가 각각 인정되었음.
- 한편 GO 추출물 400 mg/kg을 포함한 모든 실험물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 비장 두께, 백색수질 직경 및 수, CD3+, CD4+, CD8+, TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + 및 iNOS+ 면역반응세포의 수적 증가가 각각 인정되었고, 특히 GO추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 비장 임파구 감소 및 관련 위축 소견에 대한 억제 효과를 각각 나타내었음.

Groups Items	Controls		Reference	GO extracts		
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
<b>Thymus-thickness</b>						
Total (mm)	1.23±0.13	0.51±0.10d	0.69±0.06df	0.86±0.10df	0.69±0.14df	0.61±0.06dg
Cortex ( $\mu$ m)	817.48±55.95	203.23±19.45a	296.98±51.98ab	355.41±45.67ab	302.39±37.78ab	255.83±55.53ac
<b>Spleen-thickness</b>						
Total (mm)	1.75±0.18	0.87±0.16a	1.25±0.15ab	1.49±0.19ab	1.27±0.10ab	1.18±0.11ab
Cortex ( $\mu$ m)	627.81±120.73	220.06±34.45a	344.92±45.27ab	503.63±75.51ab	347.52±40.54ab	318.68±34.04ab
WP (N/mm <sup>2</sup> )	21.50±3.44	9.00±1.05d	12.40±1.43df	16.40±2.37df	13.10±2.28df	11.60±1.26df
<b>Immunoreactive cells (numbers/mm<sup>2</sup>)</b>						
CD3 <sup>+</sup>	342.60±60.85	20.20±4.34d	177.50±26.13df	259.50±60.21df	182.10±30.41df	98.20±28.58df
CD4 <sup>+</sup>	150.00±25.27	12.40±4.43d	60.80±10.40df	128.70±29.39f	64.80±13.60df	45.30±19.56df
CD8 <sup>+</sup>	179.20±20.95	12.60±3.75d	97.80±13.70df	150.60±38.82f	104.80±20.07df	77.70±23.04df
TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>	293.50±84.24	10.60±4.97d	127.60±26.20df	186.40±34.28df	130.10±20.11df	89.40±23.84df
iNOS <sup>+</sup>	183.40±25.80	13.40±4.01d	94.20±18.43df	168.60±43.88f	96.00±22.94df	57.40±21.10df
IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>	151.20±37.06	17.40±3.47d	82.80±16.05df	120.70±17.65ef	85.50±14.61df	73.50±18.39df
<b>LN - thickness</b>						
Total (mm)	1.16±0.12	0.51±0.09a	0.71±0.10ab	0.88±0.08ab	0.72±0.09ab	0.64±0.06ab
Cortex ( $\mu$ m)	778.66±119.86	241.01±43.37d	436.72±74.40df	625.36±108.21ef	439.10±60.96df	382.48±58.07df
FO (N/mm <sup>2</sup> )	23.60±3.86	8.20±2.20a	15.30±2.16ab	21.50±2.64ab	15.80±2.53ab	12.00±1.83ab

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice

CPA = Cyclophosphamide; EAP = Exopolymers purified from Aureobasidium pullulans SM-2001 (PolycanTM); Ge = Germanium; GO = Ge-rich water dropwort, Oenanthe javanica; N = Numbers; WP = White pulp; TNF = Tumor necrosis factor; IL = Interleukin; iNOS = Inducible nitric oxide synthases; LN = Submandibular lymph node, left sides; FO = Follicle

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  and c  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by LSD test

d  $p < 0.01$  and e  $p < 0.05$  as compared with intact control mice by MW test

f  $p < 0.01$  and g  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by MW test

표 . Histomorphometrical analysis in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

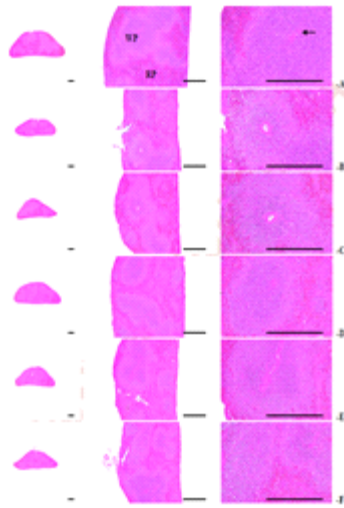


그림 . Representative histopathological images of the spleen, taken from intact or CPA-induced immunosuppressive mice

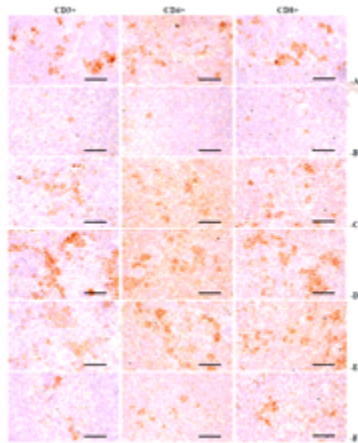


그림 . Representative immunohistochemical image of the CD3+, CD4+ and CD8+ cells on the spleen, taken from intact or CPA-induced immunosuppressive mice

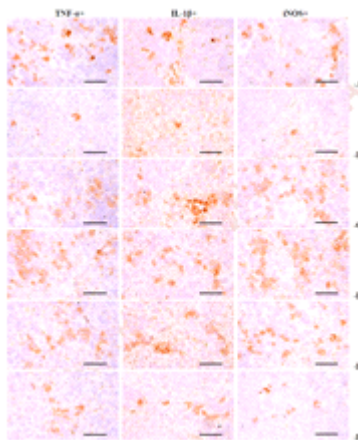


그림 . Representative immunohistochemical image of the TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + and iNOS+ cells on the spleen. taken from intact or CPA-induced immunosuppressive mice

- 비장 전체 두께는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -50.26%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 43.86, 35.48, 45.58, 71.41%의 변화를 나타내었음.
- 비장 백색수질의 직경은 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -64.95%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 56.74, 128.86, 57.92, 44.82%의 변화를 나타내었음.
- 비장 백색수질의 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -58.14%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 37.78, 28.89, 45.56, 82.22%의 변화를 나타내었음.
- 비장 CD3+ 세포 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -94.10%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 778.71, 386.14, 801.49, 1184.65%의 변화를 나타내었음.
- 비장 CD4+ 세포 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -91.73%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 390.32, 265.32, 422.58, 937.90%의 변화를 나타내었음.
- 비장 CD8+ 세포 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -92.97%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 676.19, 516.67, 731.75, 1095.24%의 변화를 나타내었음.
- 비장 TNF- $\alpha$ + 세포 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -96.39%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 1103.77, 743.40, 1127.36, 1658.49%의 변화를 나타내었음.
- 비장 IL-1 $\beta$ + 세포 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -92.69%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 602.99, 328.36, 616.42, 1158.21%의 변화를 나타내었음.
- 비장 iNOS+ 세포 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -88.49%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 375.86, 322.41, 391.38, 593.68%의 변화를 나타내었음.

(하) 악하 임파절의 조직병리학적 변화

- CPA 대조군에서는, 정상 매체 대조군 비해 임파절 피질의 현저한 임파구 감소에 따른 위축 소견이 인정되어, 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 악하 임파절 전체 및 피질 두께, 피질내 follicle 수의 감소가 각각 인정되었다. 한편 GO 추출물 200 mg/kg을 포함한 모든 실험 물질 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 임파절 전체 및 피질 두께, 임파절내 follicle 수의 증가가 각각 인정되었고, 특히 GO추출물은 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 CPA 유발 악하 임파절 임파구 감소 및 관련 위축 소견에 대한 억제 효과를 각각 나타내었음.



Groups Items	Controls		Reference	GO extracts		
	Intact	CPA	EAP	400 mg/kg	200 mg/kg	100 mg/kg
<b>Thymus-thickness</b>						
Total (mm)	1.23±0.13	0.51±0.10d	0.69±0.06df	0.86±0.10df	0.69±0.14df	0.61±0.06dg
Cortex ( $\mu$ m)	817.48±55.95	203.23±19.45a	296.98±51.98ab	355.41±45.67ab	302.39±37.78ab	255.83±55.53ac
<b>Spleen-thickness</b>						
Total (mm)	1.75±0.18	0.87±0.16a	1.25±0.15ab	1.49±0.19ab	1.27±0.10ab	1.18±0.11ab
Cortex ( $\mu$ m)	627.81±120.73	220.06±34.45a	344.92±45.27ab	503.63±75.51ab	347.52±40.54ab	318.68±34.04ab
WP (N/mm <sup>2</sup> )	21.50±3.44	9.00±1.05d	12.40±1.43df	16.40±2.37df	13.10±2.28df	11.60±1.26df
<b>Immunoreactive cells (numbers/mm<sup>2</sup>)</b>						
CD3 <sup>+</sup>	342.60±60.85	20.20±4.34d	177.50±26.13df	259.50±60.21df	182.10±30.41df	98.20±28.58df
CD4 <sup>+</sup>	150.00±25.27	12.40±4.43d	60.80±10.40df	128.70±29.39f	64.80±13.60df	45.30±19.56df
CD8 <sup>+</sup>	179.20±20.95	12.60±3.75d	97.80±13.70df	150.60±38.82f	104.80±20.07df	77.70±23.04df
TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>	293.50±84.24	10.60±4.97d	127.60±26.20df	186.40±34.28df	130.10±20.11df	89.40±23.84df
iNOS <sup>+</sup>	183.40±25.80	13.40±4.01d	94.20±18.43df	168.60±43.88f	96.00±22.94df	57.40±21.10df
IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>	151.20±37.06	17.40±3.47d	82.80±16.05df	120.70±17.65ef	85.50±14.61df	73.50±18.39df
<b>LN - thickness</b>						
Total (mm)	1.16±0.12	0.51±0.09a	0.71±0.10ab	0.88±0.08ab	0.72±0.09ab	0.64±0.06ab
Cortex ( $\mu$ m)	778.66±119.86	241.01±43.37d	436.72±74.40df	625.36±108.21ef	439.10±60.96df	382.48±58.07df
FO (N/mm <sup>2</sup> )	23.60±3.86	8.20±2.20a	15.30±2.16ab	21.50±2.64ab	15.80±2.53ab	12.00±1.83ab

Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice

CPA = Cyclophosphamide; EAP = Exopolymers purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (PolycanTM); Ge = Germanium; GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*; N = Numbers; WP = White pulp; TNF = Tumor necrosis factor; IL = Interleukin; iNOS = Inducible nitric oxide synthases; LN = Submandibular lymph node, left sides; FO = Follicle

a  $p < 0.01$  as compared with intact control mice by LSD test

b  $p < 0.01$  and c  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by LSD test

d  $p < 0.01$  and e  $p < 0.05$  as compared with intact control mice by MWtest

f  $p < 0.01$  and g  $p < 0.05$  as compared with CPA control mice by MW test

⌘ . Histomorphometrical analysis in intact or CPA-induced immunosuppressive mice

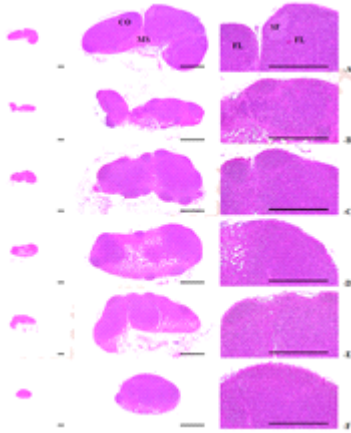


그림 . Representative Histopathological Image of the Left Submandibular LN, Taken from Intact or CPA-induced Immunosuppressive Mice

- 악하 임파절 전체 및 피질의 두께는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -56.10 및 -69.05%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 39.14, 24.46, 40.70, 72.60%의 전체 두께 변화를 나타내었고, 81.20, 58.70, 82.19, 159.47%의 피질 두께 변화를 각각 나타내었음.
- 악하 임파절내 follicle 수는 CPA 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 -65.25%의 변화를 나타내었으나, EAP 200 mg/kg, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 각각 CPA 대조군에 비해 86.59, 46.34, 92.68, 162.20%의 변화를 나타내었음.

### 결론

- 본 실험의 결과, CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 현저한 가슴샘, 비장 및 슬와 임파절 중량, 혈중 총 백혈구, 적혈구 및 혈소판의 수, HGB 및 HCT, 혈액 및 비장내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량, 비장 내 NF- $\kappa$ B, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 mRNA expressions 발현, 비장세포 및 복강 NK 세포 활성의 감소가 가슴샘, 비장 및 슬와 임파절의 임파구 감소에 의한 조직병리학적 위축 소견, 비장 조직 내 CD3+, CD4+, CD8+, TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + 및 iNOS+ 면역반응세포의 수적 감소와 함께 인정되었음.
- 따라서, 전형적인 조혈억제에 따른 면역억제 소견이 CPA처리에 의해 유발된 것으로 판단됨 (Chen et al., 2006; Yoon et al., 2010; Kim et al., 2018). 또한 CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ConA 및 LPS 유도 비장세포 증식률의 감소, 골수 세포 중 다염적혈구의 수 및 비율의 감소와 소핵다염적혈구의 수적 증가가 각각 인정되었음.
- 즉, CPA 투여에 의해 전형적인 T 및 B 세포 증식 억제 (Cerqueira et al., 2004; Chen et al., 2006) 및 관련 돌연변이원성 유전독성 소견 (Song et al., 2012; Lee et al., 2016)이 인정되었음.
- 한편 이러한 CPA 유발 임파구 증식 억제성 면역억제 소견 및 돌연변이원성이 모든 3 용량의 GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg의 경구투여에 의해, 동일한 용량의 EAP 와 유사한 정도로 투여용량 의존적으로 억제되었음.
- 또한 최종 희생 시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성

결과, 모든 GO 추출물 처리군 (0.01-10 mg/ml)에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않았음.

- 따라서 GO 추출물은 적어도 본 실험의 조건하에서, CPA에 의한 조혈억제에 따른 면역억제 및 돌연변이원성을 현저히 완화 시키는 것으로 판단되어, 새로운 천연 면역조절제로서의 개발 가치가 매우 높을 것으로 기대됨.
- CPA 대조군을 포함하여 본 실험에 사용한 모든 마우스는 동일한 연령의 정상 ICR마우스의 체중 증가 범주 내에서 체중 증가를 각각 나타내었음 (Fox et al., 1984; Tajima, 1989). 즉, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화는 CPA 대조군에서 인정되지 않았으며, CPA 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화 역시 모든 3 용량의 GO 추출물 (100, 200, 400 mg/kg) 투여군과 EAP 200 mg/kg 군에서 42일간의 실험기간 동안 인정되지 않았음.
- CPA 투여에 의한 골수 조혈작용 억제에 의한 말초 임파구 감소에 따른 임파 장기의 중량 감소는 이미 잘 알려져 있으며 (Miyachi et al., 1990; Yoon et al., 2010; Heroor et al., 2012), 본 실험의 결과에서도 현저한 가슴샘, 비장 및 악하 임파절 중량의 감소가 CPA 투여에 의해 인정되었으나, 3 용량의 모든 GO 추출물 투여에 의해 동일 용량의 EAP 와 유사한 정도의 투여 용량 의존적인 CPA에 의한 임파 장기 중량 감소에 대한 억제 효과가 인정되었다. 이러한 결과는 PB의 면역 조절 효과를 나타내는 간접적인 증거 중 하나로 판단됨.
- 세포독성 평가는 후보물질의 세포에 대한 독성을 평가하는 방법으로, 약리활성 물질들은 정상세포에 대한 세포독성은 낮고, 변성 세포에 대해 선택적으로 세포독성을 나타내어야 함 (Chargari et al., 2009; Park et al., 2014). 최종 희생 시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 GO 추출물 처리군 (0.01-10 mg/ml)에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않아, 적어도 본 실험의 조건하에서, GO 추출물은 정상 비장 세포에 대해 세포 독성 및 과도한 증식 촉진 효과도 나타내지 않는 것으로 판단됨.
- 본 실험의 MTT 기반 비장세포 증식 효과 평가에서, CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ConA 및 LPS 유도 비장세포 증식률의 감소 각각 인정되었으나, CPA 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 ConA 및 LPS 유도 비장세포 증식률의 증가가 3 용량의 모든 GO 추출물 투여군에서 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 EAP와 비교할 만한 CPA에 의한 ConA 및 LPS 유도 비장 세포 증식 감소 억제 효과를 나타내었음.
- 일반적으로 ConA는 T 세포의 증식을 촉진하고, LPS는 B 세포의 분열 증식을 유도 하는 것으로 알려져 있음 (Cerqueira et al., 2004; Chen et al., 2006). 따라서 본 실험의 MTT 기반 비장세포 증식 효과 평가의 결과는 GO 추출물의 CPA에 의한 T 및 B 세포 분열 및 증식 억제를 효과적으로 억제하는 간접적인 증거 중 하나로 판단됨.
- 마우스 골수 도말 표본을 이용한 소핵실험은 유전독성을 평가하는 데 있어서 가장 간단하고 확실한 평가로 알려져 있으며 (Renner, 1990), CPA는 대표적인 유전독성 물질 중 하나로 현저한 소핵다염적혈구의 증가, 즉 유전독성을 일으킴 (Song et al., 2012; Lee et al., 2016).
- 본 실험의 결과에서도, CPA 대조군에서는 현저한 소핵다염적혈구의 수적 증가가 인정되었으나, CPA 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 소핵다염적혈구의 수적 감소가 3 용량의 모든 GO 추출물 투여군에서 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 인정되었음.

- 한편 다염적혈구 (PCE/(PCE+NCE)) 의 비율은 실험 물질의 골수 세포에 대한 독성을 나타내는 지표로 이용되고 있음 (Heddle et al., 1984). 본 실험의 결과, CPA 대조군에서는 다염적혈구의 수 및 비율의 감소 역시 인정되었으나, CPA 대조군에 비해 투여 용량 의존적인 다염적혈구의 수 및 비율의 증가가 모든 GO 추출물 투여군에서 동일한 용량의 EAP투여군과 유사한 정도로 인정되었음.
- 이러한 결과는 적어도 본 실험의 소핵실험의 조건하에서 GO 추출물의 CPA에 의한 골수 세포 독성 억제 및 항돌연변이원성을 나타내는 명확한 직접적인 증거 중 하나로 생각됨.
- CPA는 전형적인 조혈기계 억제를 통한 면역억제제로, 혈중 백혈구 및 혈소판의 수적감소와 함께, HGB 및 HCT의 감소, 즉 재생불량성 빈혈을 동반함 (Sodikoff, 1999; Hu et al., 2005; Yoon et al., 2010).
- 본 실험의 결과에서도 총 13 종류의 혈액학적 검사 결과, 정상 매체 대조군에 비해 총 백혈구 및 적혈구 수, HGB, HCT 및 혈소판 수의 유의성 있는 감소, 즉 조혈기계 현저한 억제에 의한 범백혈구 감소, 혈소판 감소 및 재생불량성 빈혈소견이 CPA 대조군에서 인정되었으며, 범백혈구 감소의 결과, 백혈구 분별 count의 변화는 인정되지 않았음.
- 한편 이러한 CPA 투여에 의한 조혈기계 억제에 기인한 총 백혈구 및 적혈구 수, HGB, HCT 및 혈소판 수의 감소가 GO 400, 200 및 100 mg/kg의 경구투여에 의해 동일한 용량의 EAP 투여군과 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 유의성 있게 억제 되었음.
- 이러한 결과는 PB의 조혈촉진 작용을 통한 면역조절 효과를 나타내는 신뢰할만한 증거 중 하나로 판단됨.
- TNF- $\alpha$ 는 비장세포를 포함한 여러 종류의 세포에서 생산되는 대표적인 cytokine의 일종으로 T-림프구의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Samira et al., 2004). TNF- $\alpha$ 는 일반적으로 세포성 면역을 활성화 시키며, 항체 생산을 촉진하는 것으로 알려진 IL-2의 기능을 증가시킴 (Isaacs, 1995). 또한 IL-1은 대식세포, 수지상 세포, 임파구, 내피세포, 섬유세포 및 각질세포 등 다양한 세포에서 분비되는 또 다른 종류의 cytokine 으로 세포의 분비형태인 IL-1 $\beta$ 와 막 부착형인 IL-1 $\alpha$ 의 두 종류가 존재하며, 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음 (Unanue, 1995). IL-6는 다양한 감염과 주변 조직의 손상에 의한 염증을 유발할 정도의 화상과 같은 외상 등에 수반되어 Th2 세포 및 대식세포에 의해 분비되어 (Lan et al., 2015), 다양한 세균에 대항하는 중요한 역할을 수행함 (van der Poll et al., 1997). IL-12는 수지상 세포 (dendritic cell), 대식세포, 중성호성 백혈구 및 사람 B-lymphoblastoid 세포 에서 항원 자극에 반응하여 생산 분비되며 (Kaliński et al., 1997), IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  분비 자극을 통해 Th1 세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있음. 또한 IFN- $\gamma$ 는 CD8+ T 림프구, Th1 세포 및 NK 세포에서 분비되며, B 및 T 세포의 기능에 영향을 미치고, NK 세포와 대식세포의 기능을 강화시킴 (Isaacs, 1995). 일반적으로 CPA는 전형적인 면역억제제로 주로 T 림프구의 수를 현저히 감소시켜 다양한 cytokine의 분비를 억제시킴 (Miyachi et al., 1990; Xun et al., 1994; Yoon et al., 2010; Kim et al., 2018).
- 본 실험의 결과에서도 현저한 혈액 및 비장 조직 내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 감소와 함께 비장 조직 내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 mRNA 발현의 감소가 CPA 투여에 의해 유발되었으나, GO 추출물의 면역 조절효과의 일환으로 판단되는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 cytokine의 함량 및 mRNA 발현 증가가 동일한 용량의

EAP와 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 인정되었음.

- CPA에 의한 면역억제의 일환으로, NK cell 및 대식구 등 면역 담당세포의 기능이 현저히 억제되는 것으로 알려져 있고 (Du et al., 2008; Cho et al., 2014), 이들 면역 담당세포의 활성화는 현재 또 다른 개념의 면역 조절제 개발로 각광받고 있음 (Ha et al., 2004; Yu and Hwang, 2004).
- 본 실험의 결과에서도, CPA 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 복강 및 비장 NK 세포 활성화의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 복강 및 비장 NK 세포 활성화의 증가가, 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 인정되었음.
- 따라서 GO 추출물은 적어도 본 실험의 조건 하에서 NK 세포 활성을 통한 면역 조절 효과를 나타내는 것으로 판단됨.
- CPA에 의해 T 임파구의 현저한 수적 감소가 초래되며, 이로 인해 조직병리학적으로 비장, 임파절 및 가슴샘 등의 임파장기의 현저한 위축이 초래됨 (Miyachi et al., 1990; Yoon et al., 2010). T 세포는 항상 세포막의 표면에 전자비공유성으로 결합하는 항원 수용체, 즉 CD3로 통칭되는 4 종류의 당단백질을 가지고 있으므로, T 세포의 표면 marker로 이용되고 있음 (Yoon et al., 2010; Kim et al., 2018). 또한 CD4는 분자량 55 kD을 나타내는 단일쇄의 당단백질로 주로 helper T cell의 표면 marker로 이용되고 있고, CD8은 분자량 34 kD을 나타내는 subunit가 disulfide로 결합된 heterodimer 로 주로 cytotoxic T cell의 표면 marker로 이용되고 있음 (Burnet, 1995). 현재 CPA의 투여에 의해 이들 CD3+, CD8+, CD4+ 세포의 비장 내 감소가 이미 잘 알려져 있음 (Yoon et al., 2010; Kim et al., 2018).
- 본 실험의 결과에서도 CPA 투여에 의해 가슴샘 피질, 비장 백색수질 및 악하 임파절의 임파구 감소에 의한 임파장기의 현저한 위축이 초래되었으며, 비장 조직 내 면역담당 세포인 CD3+, CD4+, CD8+, TNF- $\alpha$ +, IL-1 $\beta$ + 및 iNOS+ 면역반응세포의 수적 감소 역시 인정되었음. 한편 GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여군에서는 CPA 대조군에 비해 유의성 있는 현저한 가슴샘, 비장 및 악하 임파절 위축 억제 및 비장 조직 내 면역 담당세포의 수적 증가를 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로, 투여 용량 의존적으로 나타내었음.
- 이러한 결과는, GO 추출물의 임파구 조절 촉진 효과에 의한 면역 조절 효과를 다시 한번 나타내는 명백한 증거 중 하나로 판단됨.
- NF- $\kappa$ B는 DNA의 전사, cytokine 생산 및 세포의 생존을 조절하는 단백질 복합체로, 거의 모든 세포에서 발견되며, 스트레스, cytokine, free radical, 중금속, 자외선, oxidized LDL, 세균 및 바이러스 등의 다양한 자극에 대한 생체의 방어 반응에 중요한 역할을 한다 [Brasier, 2006; Gilmore, 2006]. 특히 NF- $\kappa$ B는 신체 감염 방어에서 면역 조절에 중요한 역할을 수행하며, 항체의  $\kappa$  light chain의 구성 성분을 제공하기도 함 [Gilmore, 1999; Tian and Brasier, 2003]. 또한 NF- $\kappa$ B는 선천성 및 후천성 면역반응에 관여하는 다양한 유전자의 전사를 조절하는 가장 중요한 단백질임 [Smith et al., 2006].
- 본 실험의 결과에서, CPA 대조군에는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 비장 조직 내 NF- $\kappa$ B mRNA 발현의 감소가 각각 인정되었으나, GO 추출물 투여군에서는 CPA 대조군에 비해, 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적인 유의성 있는 비장 조직 내 NF- $\kappa$ B mRNA 발현의 증가가 각각 인정되었음.

- 이러한 결과는 GO 추출물의 면역조절 효과가 적어도 본 실험의 조건하에서 부분적으로나마 NF- $\kappa$ B 발현 조절을 통해 일어나는 결정적인 증거 중 하나로 판단됨.
- 이상의 결과를 종합해 볼 때, GO 추출물 100, 200, 400 mg/kg은 적어도 본 실험의 조건하에서, NF- $\kappa$ B 발현 증가와 관련된 T 및 B 세포와 NK 세포의 활성을 통해 CPA에 의한 조혈억제에 따른 면역억제 및 돌연변이원성을 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량 의존적으로 현저히 억제하는 것으로 관찰되었음
- 또한 최종 희생 시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 GO 추출물 처리군 (0.01-10 mg/ml)에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않았음.
- 따라서 GO 추출물은 비교적 독성이 낮은 새로운 천연 면역 조절제로서의 개발 가치가 높을 것으로 기대됨.

(가) 게르마늄 미나리추출물의 안정성 검증

- 게르마늄 미나리 추출물의 안전성 시험을 위하여 GLP기관인 (주)바이오톡스텍과 독성시험 계약을 맺고 단회투여독성시험, 2주 반복 용량결정시험, 비설치류 최대 내성용량결정시험, 13주 반복투여독성시험, 유전독성시험 (복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)을 수행하였음.

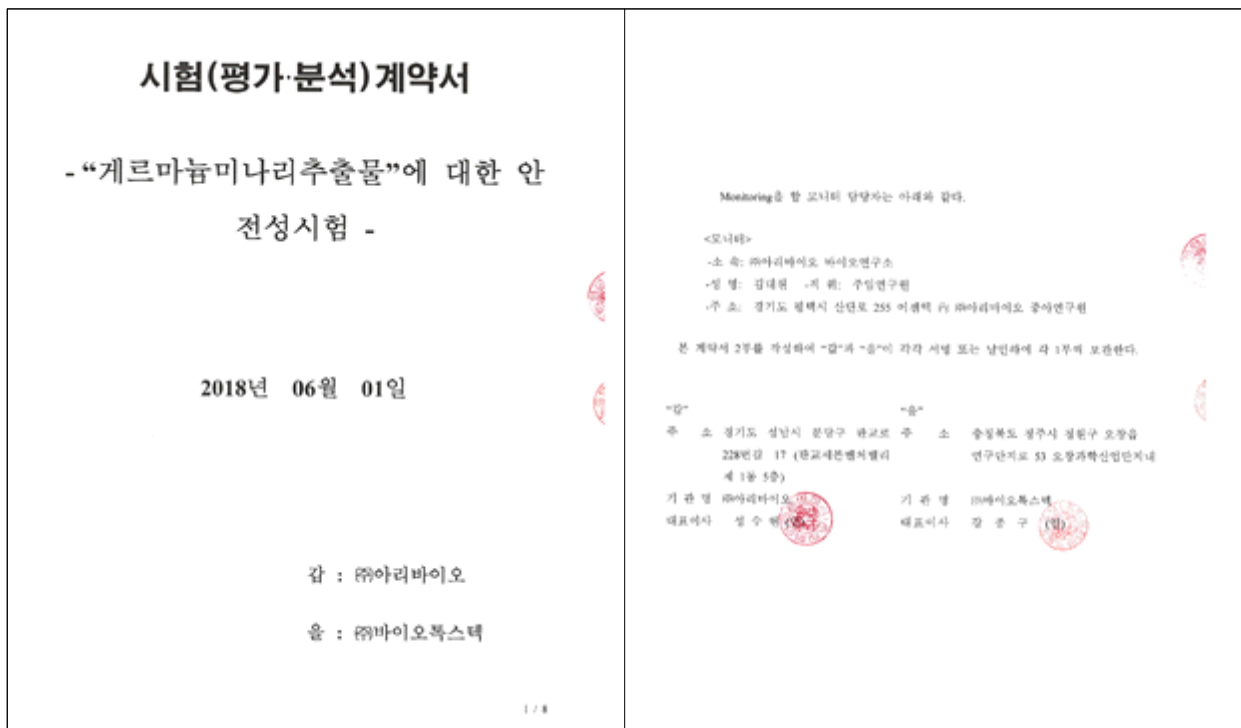


그림 . (주)아리바이오와 (주)바이오톡스텍 GLP 독성시험 계약서

① 단회 투여 독성 시험 (RB18470)

- 시험동물: SD (Sprague Dawley) rat
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 단회 경구 투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위함

입.

- 투여빈도 및 경로: 단회, 경구 투여
- 투여용량: 본 시험의 예비시험에서 5,000 mg/10 ml/kg에서 단회 투여 시 사망사례가 관찰되지 않아 5,000 mg/kg로 정하였음.
- 시험구성

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0	암수 각 5마리
시험군	5,000	암수 각 5마리

표 . 단회투여 독성시험 시험구성

- 관찰항목: 폐사 및 임상증상 (daily), 체중변화, 육안적 부검소견
- 결과
  - 사망유무: 관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었음.
  - 관찰기간 동안, 5,000 mg/kg 투여군에서는 투여 후 1일에 시험물질색변 (compound-colored stool)이 암수 전례, 점액변 (mucous stool)이 암수 각 2례가 관찰되었고, 암수 모두 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았음. 이는 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단됨.
  - 관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았음.
  - 부검 시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았음.

### 결 론

- 본 시험의 조건하에서 게르마늄 미나리 추출물을 랫드에 단회 경구 투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.

### ② 2주 반복투여 용량결정 (DRF) 시험 (RB18471)

- 시험동물: SD (Sprague Dawley) rat
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 반복 경구 투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 13주 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위함임.
- 투여빈도 및 경로: 2주 반복, 경구 투여
- 투여방법 및 용량: 매일 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 2주간 1일 1회 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg, 5,000 mg/kg 용량으로 위내 강제투여
- 시험구성

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0	암수 각 5마리
저용량군	1,250	암수 각 5마리
중용량군	2,500	암수 각 5마리
고용량군	5,000	암수 각 5마리

표 . 2주 반복투여 독성시험 시험구성, SD 랫드

○ 관찰항목: 폐사 및 임상증상 (daily), 체중변화, 사료섭취량 측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 검사, 조직병리학적 검사

○ 결과

- 일반증상: 관찰기간 동안, 암수 대조군, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았음. 시험물질색변 (compound-colored stool)이 1,250 mg/kg/day 투여군의 수컷 2-3마리 및 암컷 1-2마리에서 투여 13-14일에 관찰되었고, 2,500 mg/kg/day 투여군의 암수 4-5마리 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 암수 5마리에서 투여 2-14일에 관찰되었음. 이는 시험물질 과량 투여에 의한 착색변으로 판단되며, 다른 모든 검사 항목에서 독성 변화가 인정되지 않아 독성학적 의미는 없었음.
- 체중변화: 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았음.
- 사료 섭취량: 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았음.
- 혈액학적 검사: 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었음. 그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 용량 상관성이 없는 경미한 변동으로 독성학적 의미는 없었음.
- 혈액생화학적 검사: 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시 모든 측정 항목에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음.
- 장기중량: 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시 모든 측정 장기에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음.
- 부검: 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았음.

### 결 론

- 본 시험 조건하에서 게르마늄 미나리 추출물을 암수 랫드에 2주간 반복 경구투여한 결과, 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day로 설정해도 될 것으로 판단됨.

### ③ 비설치류 최대내성용량결정시험 (단회투여독성시험)

- 시험동물: Dog, Beagle (Orient Bio Inc., Republic of Korea)
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구 투여 시 나타나는 독성반응을



평가하기 위하여 실시함.

- 투여빈도 및 경로: 단회, 경구 투여
- 투여용량: 5일 간격으로 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg 3회 투여
- 시험구성

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0 → 0 → 0	암수 각 1마리
시험군	500 → 1,000 → 2,000	암수 각 2마리

표 . 비설치류 최대내성용량결정시험 시험구성

- 관찰항목 : 폐사 및 임상증상 (daily), 체중변화, 육안적 부검조건, 조직병리학적 검사
- 결과: 시험 진행 중.

④ 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험 (RB18473)

- 시험균주: 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*), 대장균 (*Escherichia coli*)
  - *Salmonella typhimurium* TA98
  - *Salmonella typhimurium* TA100
  - *Salmonella typhimurium* TA1535
  - *Salmonella typhimurium* TA1537
  - *Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101)
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 유전자돌연변이 유발성을 검토함.
- 시험구성

S9 mix	균주명	명칭	용량 (ug/plate)
-	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	2-NF	5.0
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	SA	1.5
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	SA	1.5
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	9-AA	80.0
	<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA(pKM101)	4-NQO	0.1
+	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	2-NF	1.0
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	SA	2.0
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	SA	3.0
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	9-AA	3.0
	<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA(pKM101)	4-NQO	2.0

표 . 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험구성

- 관찰항목 :
  - 성립조건: 음성 및 양성대조군에서의 평균 복귀돌연변이콜로니수가 historical control data

의 범위 내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것. 오염이 없을 것.

- 양성판정: 1개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 것.

**결론**

- 시험물질의 생육저해 없음.
- 시험물질의 침전 없음.
- 음성 (Negative)

⑤ 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험 (RB18474)

- 시험세포: CHL/IU 세포
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토함.
- 투여빈도 및 경로:
- 투여용량: 1,250 µg/mL, 2,500 µg/mL
- 시험구성

계열	S9 mix	균주명	조제량 (ml)			분주량 (ml/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성 (양성)대조물질 또는 시험물질	
단시간 처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.70		0.13	5
연속 처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5

표 . 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험구성

- 분석항목
  - 음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있을 것
  - Historical control data의 95% 범위 내에 있을 것

- 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 있을 것,
- 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열증기상이 300개 이상 관찰될 것
- 시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3단계 이상일 것

### 결 론

- 포유류 배양세포주 염색체이상 유발성을 확인한 결과 게르마늄 미나리 추출물은 음성 (Negative)으로 판명됨.

#### ⑥ 마우스를 이용한 소핵 시험 (RB18475)

- 용량결정시험
  - 용량설정시험의 용량: 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg
  - 용량설정시험 결과: 암수 모든 용량에서 일반증상의 이상 및 사망동물이 관찰되지 않음.
  - 용량설정시험 결과, 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험은 수컷만 사용함.
- 본 시험
- 시험세포: ICR 마우스
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토함.
- 투여빈도 및 경로:
- 투여용량: 미나리 추출물 1,000, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여
- 시험구성

군	투 여 용 량 (mg/kg)	투여횟수	투여경로	동물 수
Control	0	2	경구	5
저용량군	1,250	2	경구	5
중용량군	2,500	2	경구	5
고용량군	5,000	2	경구	5
양성대조	2	1	복강내	5

표 . 마우스를 이용한 소핵 시험구성

- 관찰 항목 : 24, 48, 72 시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발 빈도를 관찰, 일반 증상 및 사망동물 관찰
- 결과: 시험 진행 중

⑦ 13주 반복 투여 독성 시험 (RB18476)

- 시험동물: SD (Sprague Dawley) rat
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 13주 반복 경구 투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시함.
- 투여빈도 및 경로: 반복투여, 경구 투여
- 투여용량: 매일 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 2주간 1일 1회 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg, 5,00 mg/kg 용량으로 위내 강제투여
- 시험구성:

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0	암수 각 10마리
저용량군	1,250	암수 각 10마리
중용량군	2,500	암수 각 10마리
고용량군	5,000	암수 각 10마리

표 . 13주 반복투여 독성시험 시험구성, SD 랫드

- 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨 검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량, 부검 시 육안 검사 및 조직병리학적 검사.
- 결과: 투여 28일째까지 사망 개체 없었으며, 시험 진행 중.

(나) 게르마늄 미나리추출물의 임상시험약 준비

- 상기의 in vivo 효력시험과 GLP 안전성시험을 토대로 임상시험 CRO인 (주)제너럴바이오 테크와 당사와 협의를 통하여 일일 섭취량 2g/일 (1일 2회 2정복용, 500 mg/정)로 설정하여 임상시험약을 제조하기로 하였음.
- 당사는 임상시험약을 제조하기 위하여 부형제를 최소화하여 그래놀화하는 기술을 갖춘 제천에 위치한 당사 기능성식품 GMP 공장에서 수행할 예정임. 현재 임상시험약 캡슐 제형의 안정성을 시험하기 위하여 소량 제조하였음.



그림 . 당사 GMP 공장 및 임상시험약 캡슐제형

○ 임상 원료의 안정성 예비시험

- 임상원료의 안정성시험은 3개월까지 완료하여 정상 및 게르마늄 함량이 일정하게 유지되는 것을 확인하였음.

시간	정상	결과	게르마늄 함량	결과 (ppm)
1개월	연갈색 또는 진	확인	Ge로써,	116.18
3개월	갈색의 파우더	확인	100ppm이상	118.01

표 . 임상 원료의 안정성 시험

- 임상원물이 준비 되는대로 임상 대조 원물 (일반 정제수에서 재배한 미나리)과 임상시험용 원물 (게르마늄 미나리)이 확보 되는대로 제천 공장에서 추출시료를 확보하여 임상 원료 및 임상시료 (대조약, 시험약)를 제조할 예정임.

**결 론**

- 임상원료의 안정성시험은 3개월까지 완료하여 정상 및 게르마늄 함량이 일정하게 유지되는 것을 확인하였음.
- 임상원물이 준비 되는대로 임상 대조 원물 (일반 정제수에서 재배한 미나리)과 임상시험용 원물 (게르마늄 미나리)이 확보 되는대로 제천 공장에서 추출시료를 확보하여 임상 원료 및 임상시료 (대조약, 시험약)를 제조할 예정임.

(다) 게르마늄 함유 기능성 미나리의 인체적용시험

- 임상시험 CRO ((주)제너럴바이오텍) 위탁계약서
- 게르마늄 미나리의 인체적용시험을 위하여 임상 CRO 인 (주)제너럴바이오텍과 하기와

같은 업무계약을 맺고 임상시험을 진행할 예정임.

- 임상 프로토콜 및 CRF 개발
- 인체적용시험 IRB 승인
- 임상시험자료집 작성
- 설명문/동의서 등 기타부속서류 작성
- 대관업무 (IRB 시청/승인/유지)

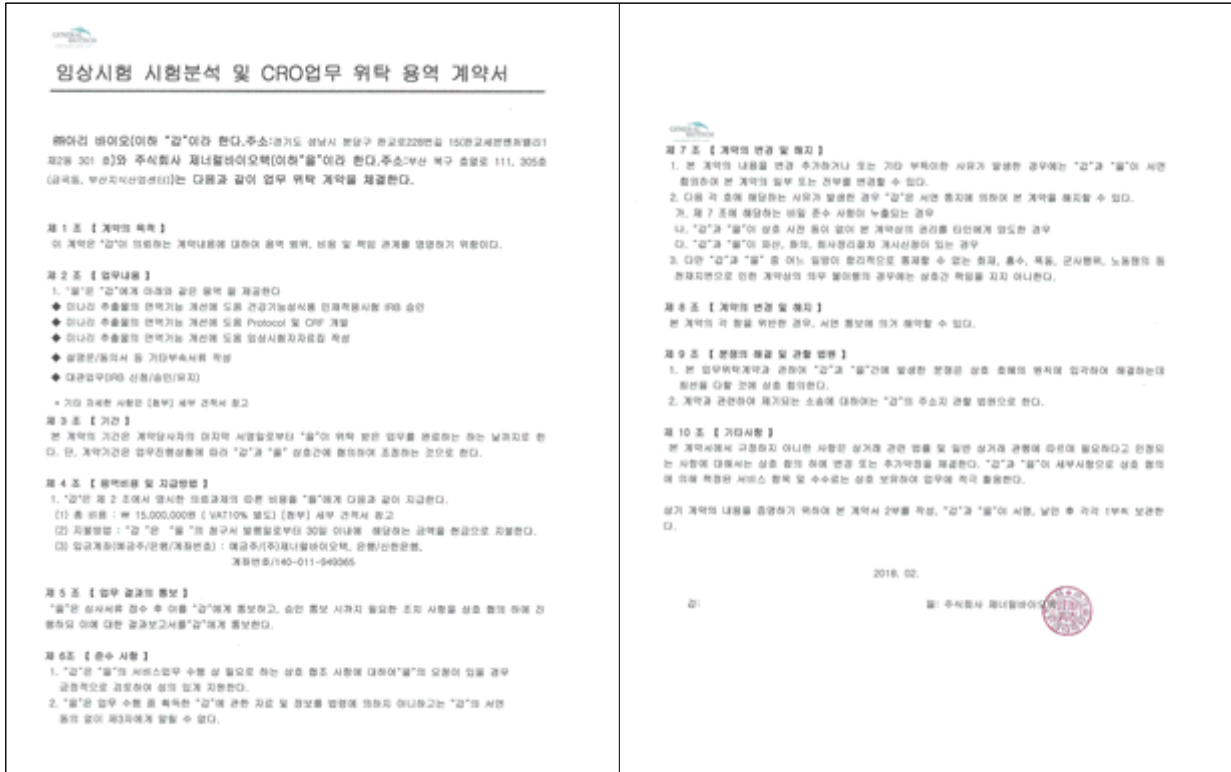


그림 . 임상 CRO 계약서

○ 임상 프로토콜 시놉시스 (안)

- 시험제목: 게르마늄 함유 미나리 추출물의 경구 섭취가 면역력 저하 방지에 미치는 영향 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험
- 시험대상자 수: 58명 (시험군 29명, 대조군 29명)
- 복용량: 2g/일 (1일 2정 2회 복용, 500 mg/캡슐), 총 4주
- 유효성 평가변수: 1차 평가 - NK cell activity, 2차 평가 - 말초혈액 WBC, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12
- 안전성 평가변수: 이상반응, 생체징후 및 문진에 의한 이상소견, 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화

임상시험 개요	
시험목적	게르마늄 함유 미나리 추출물의 경우 섭취가 면역력 저하 방지에 미치는 영향 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교, 인체적용시험
시험목적	게르마늄 함유 미나리 추출물을 활용한 면역 기능 저하 방지에 효과 있는 기능성 식품소재 개발
구분	Local <input checked="" type="checkbox"/> Mult <input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외
[실시기관]	OOO대학교병원
[시험책임자]	OOO대학교병원 OOO 교수
시험요원자	㈜아리바이오
시험디자인	무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조군 비교, 단일기관 인체시험
시험식품	시험식품 <input type="checkbox"/> 미나리 추출물 <input type="checkbox"/> 대조식품 <input type="checkbox"/> 전분
시험용 식품	[제형] 경질 캡슐
[복용량]	2g/일 (1일 2회 2회 복용, 500mg/캡슐), 총 4주
시험대상자	만 19세 이상 만 65세 이하의 건강하고 본 시험에 적합한 자
시험대상자 수	총 58명 (시험군: 29명, 대조군: 29명)
시험기간	IRB 승인일로부터 ~ 2019년 12월 31일
유요성 평가변수	1차 <ul style="list-style-type: none"> <li>NK cell activity</li> </ul> 2차 <ul style="list-style-type: none"> <li>말초혈액 WBC</li> <li>TNF-α</li> <li>IFN-γ</li> <li>IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12</li> </ul>
안전성 평가변수	1. 이상반응 2. 생체중량 및 문진에 의한 이상소견 3. 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화

임상시험 개요	
선정기준	1. 만 19세 이상 만 65세 이하의 건강한 자 2. 말초혈액 WBC가 4×10 <sup>9</sup> /L 이상 8×10 <sup>9</sup> /L 미만인 자 3. 정상적인 신체활동이 가능하며 지원자가 본 시험의 연구 대상자로서 시험동의를 서면동의한 자
제외기준	1. 최근 1년 이내 골절의 병력이 있는 자 2. 신장질환이 있거나 혈청 creatinine이 1.2mg/dl 이상인 자 3. 2+ 이상의 단백뇨가 있는 자 4. 간 질환이 있거나 AST 또는 ALT가 60IU/L 이상인 자 5. 당노병력이 있거나 공복혈당이 126mg/dl 이상인 자 6. 조절되지 않는 고혈압 환자나 협심증-심근경색증 등의 심장질환이 있는 자 7. 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자. 단 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외한다. 8. 위장관 질환을 받은 병력이 있는 자(영양 제외) 9. 스크리닝일 이전 2개월 이내에 항암이나 조약 복용 경험이 있는 자 10. 면역계 질환을 앓고 있는 자 11. 스크리닝일 이전 4주 이내에 면역력에 영향을 미칠 수 있는 의약품 또는 건강기능식품을 섭취한 경력이 있거나 이후 복용해야 하는 자 12. 시력 및 청력 등의 장애로 인한 일상적인 의사소통에 어려움 자 13. 본 시험에 비합리적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자 14. 임신이나 수유중인 경우 15. 본 임상시험 기간 중과 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 사람 16. 본 임상시험 전 3개월 이내 다른 임상시험에 참여했던 사람

### 연구 계약서

연구과제명 : 유기 게르마늄 함유 고부가가치 마나리 생산 및 면역증진 건강기능식품 개발  
 계약당사자 : ㈜아리바이오 대표이사 성 수 현 (이하 "갑"이라 한다)  
 한국체육대학교 산학협력단장 박 제 현 (이하 "을"이라 한다)  
 연구책임자 : 한국체육대학교 교수 조 인 호 (이하 "연구책임자"라고 한다)

상기 연구과제에 대하여 "갑"과 "을"은 다음과 같은 내용에 합의한다.

#### 제1조(목적 및 범위)

- 본 계약의 목적은 별첨 연구계획서의 연구목적과 같다.
- 본 계약의 범위는 별첨 연구계획서의 연구범위와 같고, 연구책임자가 연구완료 후 "갑"에게 제공하는 연구결과는 연구범위에 기술되어 있는 사항에 한한다.

#### 제2조(기간)

본 계약의 기간은 2018년 12월 26일부터 2019년 10월 31일까지이며, "갑"과 "을"의 합의에 의하여 연장할 수 있다.

#### 제3조(연구비 금액 및 지급조건)

- 연구비 총액은 금 일억사천삼백만원정( ₩143,000,000 )으로서, 전액 "갑"이 부담하며 "갑"은 아래와 같이 3회로 나누어서 "을"에게 지급한다(VAT포함)
- 본 연구에 소요되는 간접연구경비는 직접연구비의 10%이상으로 한다.
  - 1차 연구비 : 금 삼천삼백만원정( ₩33,000,000 )  
(계약체결 후 10일 이내 계좌이체)
  - 2차 연구비 : 금 오천오백만원정( ₩55,000,000 )  
(최종 피험자의 등록 및 투약 시)
  - 3차 연구비 : 금 오천오백만원정( ₩55,000,000 )  
(최종 피험자에 대한 임상시험과 모니터링 종료 시)
 (입금 계좌 : 국민은행 777501-04-096726, 예금주 : 한국체육대학교 산학협력단)

#### 제4조(연구보고서 제출)

연구책임자는 연구가 완료된 후 1개월 이내에 본 연구결과에 대한 최종보고서 3부를 "갑"에게 제출하여야 한다. 단, 중간보고서는 상호 협의하여 제출할 수 있다.

#### 제10조(비밀정보 책임의 부담)

- "갑" 또는 "을"이 본 연구 용역을 수행함에 있어 부득이하게 타인의 권리, 명예, 영업을 침해 하였을 경우 이에 대한 손해배상 책임을 청구할 수 있다.
- "갑" 또는 "을"이 연구결과 발표로 인해 피험자와 관련된 법률적 문제가 발생할 경우 이에 대한 책임을 부담 할 수 있다.
- "갑" 또는 "을"이 본 연구결과를 제3자에게 사전허가 없이 공개하거나 제3자에게 비밀하게 제공하였을 경우, 이에 대한 손해배상을 청구할 수 있다.

#### 제10조(계약의 해지)

- "을"과 연구책임자가 본 연구를 수행할 능력이 없다고 인정될 경우나 "갑"이 연구비 지급 조건 등을 이행하지 못할 경우에는, 상호 협의하여 본 계약을 해지할 수 있다.
- 제1항에 의하여 계약이 해지될 경우, 연구보고서는 해지된 날로부터 1개월 이내에 해지일까지의 내역을 정리하여 제출하고, 연구비는 계약 해지일을 기준으로 정산한다.

#### 제11조(계약의 해석)

연구수행에 필요한 사항으로서 본 계약서에 기재되어 있지 않은 사항은 "갑"과 "을"이 상호 협의하여 정한다.

#### 제12조(계약의 변경)

"갑"과 "을"은 서면합의에 의하지 아니하고는 본 계약의 내용을 변경할 수 없다.

#### 제13조(계약의 효력)

본 계약은 "갑"과 "을"이 서명 날인한 날부터 유효하다.

첨부 : 연구계획서 1부

2019년 1월 2일

"갑" : ㈜아리바이오 대표이사 성 수 현  
주 소 : 경기도 성남시 분당구 판교로 228길 15

"을" : 한국체육대학교 산학협력단장 박 제 현  
주 소 : 서울시 송파구 양재대로 1239

### 그림 . 임상시험 시놉시스 및 임상기관 계약서

- 인체적용시험을 위한 protocol 확정과 CRF 작성을 완료할 예정임.
- 현재 임상기관을 선정중에 있으며, 2018년 12월에 임상시험 대상자 enroll을 진행할 계획임.

## 결 론

- 게르마늄 미나리의 인체적용시험을 위하여 임상 CRO인 (주)제너럴바이오텍과 하기와 같은 업무계약을 맺고 임상시험을 진행할 예정.

## 5. 2차년도 협동기관(영농조합법인 블루마운트) 연구개발 및 결과

### 2차년도 개발 목표

협동기관(영농조합법인 블루마운트) : 게르마늄 미나리 생산기술개발, 게르마늄 흡수량 증대를 위한 재배법 개발

#### 가. 게르마늄 미나리 생산기술 개발

##### (1) 게르마늄 미나리 생산기술 개발

- 미나리 종자에 따른 성장조건 조사
- 하우스 재배에 적합한 미나리 종자의 선택을 위하여 미얀마산, 국산, 중국산 종자를 구입하여 재배한 결과, 미얀마산이 국산보다 생육이 좋게 나타남. 그러나, 국산의 생육이 낮아도 추후 경제성이 맞으면 국산 재배를 고려중임.

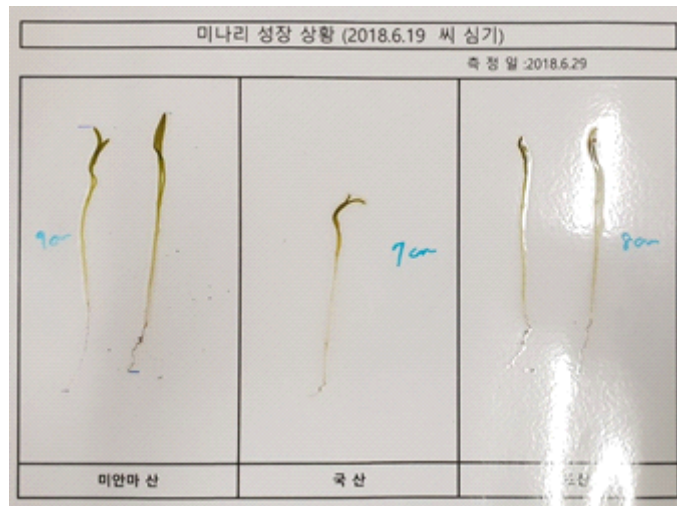


그림 . 미나리 종자별 생육 비교

##### (2) 시중 유통 게르마늄 미나리의 게르마늄 함량조사

- 시중에 유통중인 미나리 3종을 구매하여 미나리에 함유되어 있는 게르마늄 미나리의 함량을 분석하였음.



구분	Elements	전처리 Dilution	측정 Dilution	Method blank	Raw data (mg/L)	Result (mg/kg)
M1 (수경재배)	Ge	26.2881	1	-0.0072	0.0426	1.31
M2	Ge	114.338	1	-0.0057	0.249	3.5
M3	Ge	30.1677	9.9726	-0.0001	0.515	15.54

표 . 유통 미나리 3종의 게르마늄 함량 비교

(3) 미나리의 게르마늄 수경재배 시 생육촉진 및 독성발생범위 규명

- 미나리의 게르마늄 수경재배 시 생육촉진 및 독성 발생범위 규명을 위해 게르마늄수의 농도별로 나누어 조사

구분	공정수 내 Ge, Se, Si 함량 (ppm)			생육정도
	Ge	Se	Si	
공정수 2	10	0.5	140	40일까지 독성없이 자라 약 25~30cm로 자람.
공정수 4	20	1	380	10일까지 독성없이 약 5~10cm 자라다가 20일째 뿌리끝부분부터 썩음.
공정수 8	30	1	606	10일까지 독성없이 약 5~10cm 자라다가 15일째 뿌리끝부분부터 썩음.

표 . 게르마늄 공정수내 게르마늄 함량에 따른 생육양상

- 게르마늄수의 농도에 따른 결과, 공정수 4 (게르마늄 함량 20 ppm)와 8 (게르마늄 함량 30 ppm)에서 미나리의 생육이 10일까지는 동일하게 자라다가 공정수 4에서는 20일째, 공정수 8에서는 15일째부터 독성이 나타나 뿌리부터 썩어 죽는 것을 확인하였음.
- 이는 상기 데이터에서 표기한 바와 같이 게르마늄뿐만 아니라 공정수에 함유된 셀레늄 (Se) 및 실리카겔 (Si)의 농도에도 영향이 있을 것으로 추정됨.
- 각각의 주요 성분에 대한 추가적인 생육 독성은 공정수 2를 대조군으로 사용하여 각 성분을 맞추어 진행하고 있으나, 날씨의 영향으로 인하여 실내에서도 재배 시험을 할 수 있는 제천 LED 식물 육종 연구소에서 시험을 진행할 예정임.
- 향후 대량재배에서의 공정수 내 게르마늄 최대농도는 10 ppm으로 공정수를 공급하여 재배하는 것이 바람직 할 것으로 판단됨.

(4) 미나리의 고농도 게르마늄 함유 공정수에서 재배 시 독성 규명 및 게르마늄 함량

- 미나리의 게르마늄 수경재배 시 독성 규명을 위해 게르마늄수의 농도를 123 ppm으로 처리하여 초기 새싹부터 생육하는 양상을 확인한 후, 독성이 나타난 시점에서의 게르마늄 미나리 함량을 측정하였음.
- 미나리의 성장이 위의 결과와 같이 공정수 4와 8과 유사한 결과를 보이면서 뿌리부터 썩어들어가는 것을 확인하였음.
- 이는 이전의 결과와 같이 고농도의 게르마늄 상태의 용액속에서 독성으로 인한 뿌리의 사멸로 인하여 더 이상 성장을 못하여 미나리를 수확하여 미나리 내에서 함유된 게르마늄 함량을 측정하였음.

- 미나리 분말의 게르마늄 함량은 10.5 ppm으로 매우 낮게 나타났는데, 이는 오히려 고농도의 게르마늄수로 인한 독성으로 서서히 뿌리의 사멸이 생김으로써 게르마늄의 흡수가 저해되는 것으로 판단됨.

**시험결과서**

품목명 : 시중검교서 (2018-02-00000) 검출부도 품목명 : 시중검교서 (2018-02-00000)		발주기관 : 한국농수산식품유통공사 계약서 번호 :
1. 목적 2. 기명명 : 농산물품질관리원 3. 품목명 : 2018-02-000 4. 시험목적 : 품질관리원 5. 시험기간 : 2018-02-01 ~ 2018-02-01 6. 시험방법 :		
7. 시험결과 (단위: 소수점 이하 2자리까지 기재)		
게르마늄(Ge) 1		
검출수 (분말검교)	4.6	
(Ge 100% 소량검출량)	123	
게르마늄(Ge) 2		
검출수	10.5	
수정계수	10.5	
비고		

2018.02.01

인솔관 한국농수산식품유통공사	직권인 한국농수산식품유통공사
--------------------	--------------------

한국농수산식품유통공사

그림 . 고농도 공정수에서 재배한 게르마늄 미나리의 함량

**결론**

- 미얀마산이 국산보다 생육이 좋게 나타남. 그러나, 국산의 생육이 낮아도 추후 경제성이 맞으면 국산 재배를 고려중임.
- 시중 미나리의 게르마늄 함량을 분석한 결과, 1.31~15.54ppm으로 확인됨.
- 대량재배에서의 공정수 내 게르마늄 최대농도는 10 ppm으로 공정수를 공급하여 재배하는 것이 바람직 할 것으로 판단됨.
- 게르마늄 고농도 처리 시, 미나리 분말의 게르마늄 함량은 10.5 ppm으로 매우 낮게 나타났는데, 이는 오히려 고농도의 게르마늄수로 인한 독성으로 서서히 뿌리의 사멸이 생김으로써 게르마늄의 흡수가 저해되는 것으로 판단됨.

나. 게르마늄 흡수량 증대를 위한 재배법 개발

(1) 미나리의 부위별 게르마늄 흡수 특성 구명

- 최적 품종을 선정하기 위해 미나리 품종에 따른 게르마늄수를 사용한 수경재배 시 미나리의 품종별 생육특성, 무기성분 함량 변화, 부위별 게르마늄 함유량을 각각 조사하였음.
- 최적의 품종은 앞선 결과를 미루어 M3로 선정하여 재배를 진행했으며, 부위별 게르마늄 함량을 측정하였음.

구분	Elements	전처리 Dilution	측정 Dilution	Method blank	Raw data (mg/L)	Result (mg/kg)
잎	Ge	500	1	-0.0072	0.226	113
줄기	Ge	500	1	-0.0072	0.213	106
전체	Ge	500	1	-0.0072	0.231	115

표 . 미나리 부위별 게르마늄 함량

○ 잎, 줄기 및 전체에 대하여 게르마늄 함량을 분석한 결과, 게르마늄 함량 차이가 없어 경제성도 고려하여 전체를 모두 사용하는 것으로 정하였음.

(2) 미나리의 게르마늄 수경재배 최적화 확립

(가) 수경재배에서 씨앗 및 발근 차이에 따른 성장률 확인

- 씨앗과 발근을 달리하여 수경재배한 결과와 노지에서 재배한 미나리의 재배결과, 발근하여 재배한 미나리가 씨앗으로 재배한 미나리에 비하여 생육이 월등히 좋음.



그림 . 발근과 씨앗의 수경재배 생육 비교

- 추가로, 노지에서 키운 미나리의 생육이 수경재배보다 뛰어나 하우스 내에서 노지재배환경을 유사하게 만들어 수경재배와 비교를 진행하였음.

(나) 수경재배법에 따른 성장률 확인

- 수경재배, 수경재배/LED 재배와 상토재배 등의 게르마늄 미나리의 성장률 비교를 수행하였음.
- 성장속도는 수경재배 < 수경재배/LED < 상토재배에서 수경재배에 비하여 1.5, 2배의 성장속도로 수경재배 속도가 늦는 반면에 수경재배의 경우 잎이 좀 더 많이 생겨 전체 무게에서는 차이가 없었음.
- 그러나, 수경재배의 경우, 하우스에서의 오염관리가 쉽지가 않아 물때가 많이 끼는 단점이 있으며, 품질관리면에서도 관리가 용이하지 않아 향후 하우스내에서 상토재배가 오염관리 및 품질관리에 유리함.
- 상토수경재배와 LED를 추가하여 재배법을 확립하여 안정적인 원료공급 및 원료

표준화를 진행할 계획임.

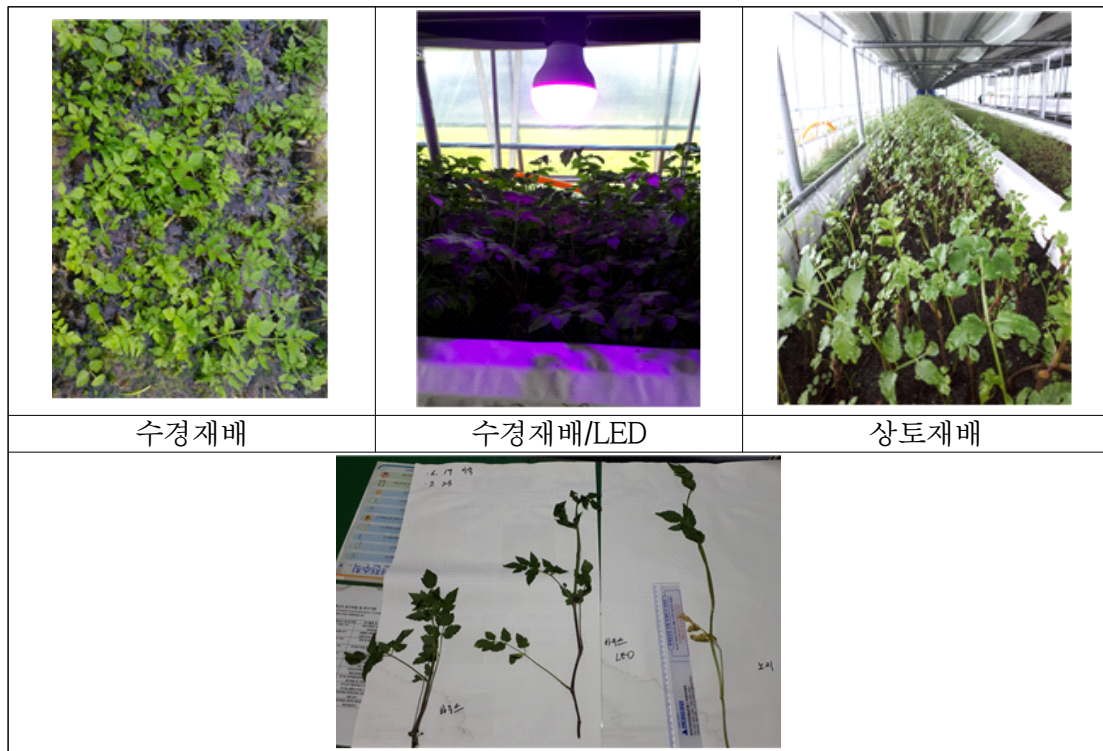


그림 . 재배법에 따른 게르마늄 미나리의 성장비교

(다) 하우스 내 수경/상토재배에서의 게르마늄 미나리 재배 방법

- ① 배지통 세척
  - 배지통을 세척함.
- ② 상토작업
  - 배지통에 모래를 깐다 (2~3cm)
  - 모래위에 bvb BC2 상토를 파쇄 후 배지 2/3정도 높이로 깐다.
  - Germanium 농축수를 넣어준다. (배지의 3/4정도)

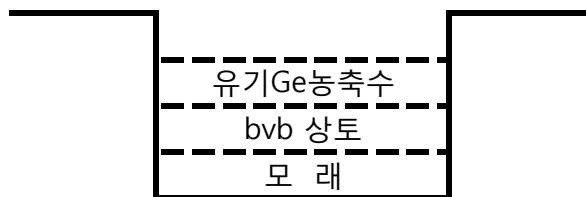


그림 . 상토작업 순서

- ③ 파 종
  - 준비된 배지에 미나리 씨앗을 이식함.
  - 씨앗을 이식 후 LED등을 켜 놓음.
- ④ 수분 공급 (반복)
  - 배지 온도는 20-25℃ (상온) 정도 유지를 위해 지하수 (13℃)와 유기 Germanium

- 농축수를 혼합하여 자동 순환시킴.
- 순환주기: 야간 2시간 10분씩
- 추가로 유기 Germanium과 영양을 혼합하여 살포함.
- 주기: 주 2회

⑤ 수확

- 재배 45일 후 수확하여 건조기에 건조시킴.
- 향후 대량 수경재배법의 변경 계획
  - 상기에서 제시한 하우스에서의 수경재배, 수경재배/LED, 상토재배 등의 미나리 재배 시기는 적어도 경제성 가치가 있는 시간인 30일 이상이 지나야 수확할 수 있음.
  - 이를 극복하기 위하여 미나리의 씨앗 또는 발근을 통하여 실내에서 기계장치를 통하여 시간을 단축할 수 있는 대량생산을 모색하고 있음.



그림 . 원통형 재배장치를 통한 미나리의 재배 계획

**결 론**

- 잎, 줄기 및 전체에 대하여 게르마늄 함량을 분석한 결과, 게르마늄 함량 차이가 없어 경제성도 고려하여 전체를 모두 사용하는 것으로 정하였음.
- 발근을 통하여 실내에서 기계장치를 통하여 시간을 단축할 수 있는 대량생산을 모색중.

**6. 2차년도 협동기관(청주대학교 산학협력단) 연구개발 및 결과**

**2차년도 개발 목표**

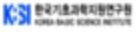
협동기관(청주대학교 산학협력단) : 게르마늄 미나리 추출물 *In Vitro* 독성 및 효능실험

가. 게르마늄 미나리 추출물의 효능검증

(1) 게르마늄 미나리 추출물의 세포 시험

## 시험결과서

장 목 : 시험결과서 (2018-IG-00078)

요청번호 한국기초과학지원연구원 043-840-8021, 8088	발주번호 IG-00078 제4기 (1/3)	
---	-------------------------------	--

1. 의뢰자  
 ○ 기관명 : 영주대학교  
 ○ 주소 : 05066  
 ○뢰일자 : 2018-01-18
2. 시험명/목적 : 토양 연구용
3. 시험대상물체/용액/시료명 :
4. 시험기간 : 2018-02-19 ~ 2018-02-22
5. 시험방법 :
6. 시험항목 (제4차 8차)
7. 시험결과 : 043-840-8021 24~25페이지 참조

	Ca	Mg	Ge	Ge	Fe	Mn
	%	%	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
일반 미나리건조분말	0.90	0.25	0.99	0.00	28.2	94.3
수경재Ge(미나리건조분말)	1.24	0.62	126	0.00	537	204
농약농해부종 건조분말	4.25	0.27	1.75	0.00	125	125
농약농해 Ge100용주	4.34	0.23	19.1	0.00	106	146
농약농해 Ge200용주	4.25	0.23	39.3	0.00	190	143
농약농해 Ge300용주	4.32	0.26	46.6	0.00	169	143

	Ge	Ca	Fe	Ge	Mg	Mn
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Ge 1 차 농축수	175	16.7	0.04	0.00	3.34	0.00
Ge 3 차 농축수	1803	15.5	0.01	0.00	3.49	0.00

상기 내용은뢰자가 제공한 시료에 대한 결과이며, 시료명은뢰자가 제시한 것으로  
 시험결과서의뢰자가 확인하시기바랍니다. (본문 참조)  
 시험결과서는 "출력"되어 사용 가능하며, 출력은 원본 출력과 다를 수 있습니다.



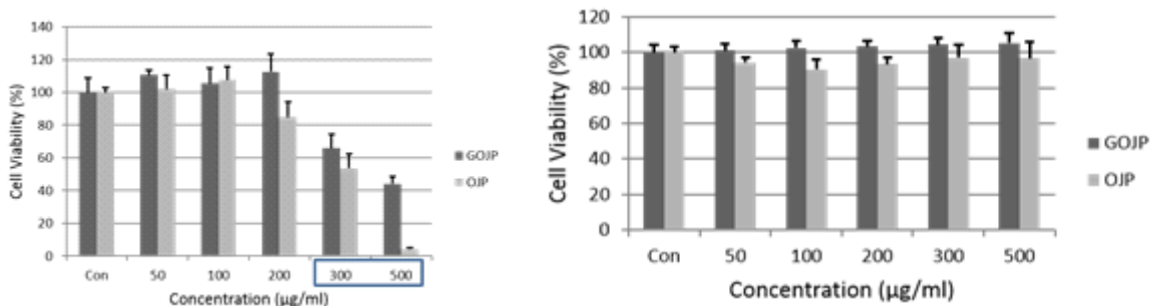
확인 2018.10.25. 	발행인 10/25 한국기초과학지원연구원장	승인인 10/25 
--	------------------------------	--

그림 . 대조군 OJP (미나리 추출물)과 시험군 GOJP (게르마늄 미나리 추출물)의 게르마늄 함량 성적서 (한국기초과학지원연구원)

(가) 세포생존률

○ 대식세포인 RAW 264.7 세포를 24-well plate에 well당 5×10<sup>4</sup>개로 분주한 후 세포 배양조건에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 10% FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양. Lipopolysaccharide (LPS, 1 μg/mL)를 처리한 후, 준비된 게르마늄 미나리 시료를 각각 농도 (31.25, 62.5, 125.0 250 μg/mL)로 처리함. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 대식세포인 RAW 264.7 세포를 48시간 동안 배양. CCK-8 solution을 well당 10 μL 씩 넣음. 1시간 후 Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정함.



A. FBS 함유되지 않은 DMEM에서의 cell viability      B. 10% FBS 함유 DMEM에서의 cell viability  
 그림 . 게르마늄 미나리 추출물의 FBS 유무 따른 cell viability

## 결론

- Lipopolysaccharide로 유도된 마우스 대식세포인 RAW 264.7 Mouse Macrophage에서 게르마늄 미나리 시료를 각 농도 (50, 100, 200, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리한 후 게르마늄이 함유되지 않은 대조군과 비교하였을 때, FBS를 함유하지 않았을 때 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 독성이 확인되었음. 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서는 OJ, GOJ 모두 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 독성이 없었음.

### (나) Cytokine 분석

- 대식세포인 RAW 264.7 세포에 시험물질을 일정시간 처리한 후 일정량의 자극원을 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 일정시간 배양함. 원심분리 후 상층액을 취하고, 염증성 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등)을 ELISA kit을 이용하여 측정함.

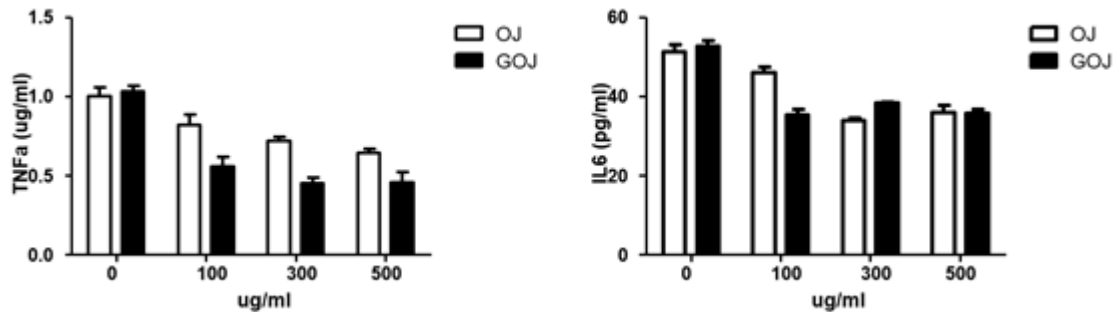


그림 . Inflammatory cytokine inhibition test in RAW 264.7 mouse macrophages. (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6, (C) TNF- $\alpha$ ; 24시간 동안 각 농도 (0, 100, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서의 염증성 cytokine 생성 억제능 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , as compared with positive control)

## 결론

- Lipopolysaccharide로 유도된 마우스 대식세포인 RAW 264.7 mouse macrophage에서 게르마늄 미나리 시료를 각 농도 (100, 200, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하였을 때, LPS 처리 후 게르마늄 미나리 시료 농도 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 처리 시 염증유발성 사이토카인 농도가 유의하게 감소함.

### (다) NO 측정

- NO는 반감기가 5초-4분 이내의 매우 불안정한 유리 라디칼이기 때문에 NO측정은 실제적으로 불가능함. 따라서, Griess 방법에 준해서 배양액에 포함되어 있는 NO를 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생산을 산정함. 96 well plate의 각각의 well에 RAW 264.7 세포를 1 X 10<sup>5</sup> cell/ml를 분주하고 RAW 264.7 배양세포에 시료를 48시간 동안 처리한 후, 그 배양액을 ELISA reader를 이용하여 NO를 측정하고, 양성대조물질로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용함.

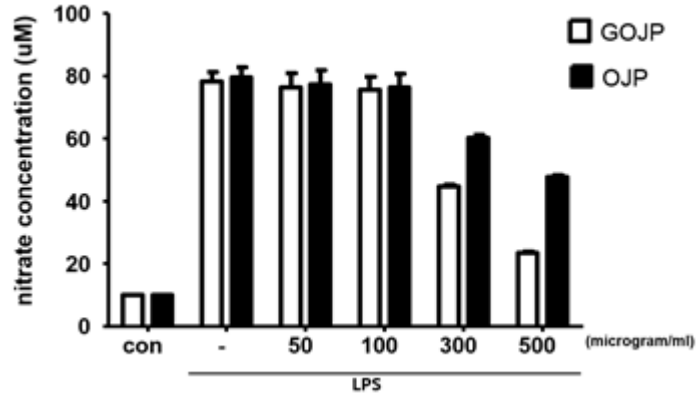


그림 . Nitric oxide inhibition test in RAW 264.7 Mouse Macrophages. Lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리 한 후, 게르마늄 미나리 시료의 각 농도 (50, 100, 125, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 48시간 동안의 nitric oxide 생성 억제능 비교 실험 결과 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , as compared with positive control)

**결론**

- Lipopolysaccharide로 유도된 마우스 대식세포인 RAW 264.7 mouse macrohage에서 게르마늄 미나리 시료를 각 농도 (31.25, 6.25, 125, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하였을 때, LPS 처리 후 게르마늄 미나리 시료 농도 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 처리 시 nitrate 농도가 유의하게 감소함. (\*\* $P < 0.01$ ).

**7. 3차년도 주관기관((주)아리바이오) 연구개발 및 결과**

가. GLP 독성시험 (Biototech)- 비설치류 최대내성용량결정시험 (단회투여독성시험, RB18476)

- 시험동물: Dog, Beagle (Orient Bio Inc., Republic of Korea)
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구 투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시함.
- 투여빈도 및 경로: 단회, 경구 투여
- 투여용량: 5일 간격으로 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg 3회 투여
- 시험구성

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0 → 0 → 0	암수 각 1마리
시험군	500 → 1,000 → 2,000	암수 각 2마리

표 . 비설치류 최대내성용량결정시험 시험구성

- 관찰항목 : 폐사 및 임상증상 (daily), 체중변화, 육안적 부검소견, 조직병리학적 검사
- 결과: 암수 각 2마리의 비글견에 시험물질을 500-→1,000>2,000mg/kg을 5일 간격으로



용량증가 단회 경구투여시, 암수모두 최대 내성용량 (MTD)는 2,000mg/kg을 상회함.

**결 론**

- 비설치류에서의 최대내성용량결정시험(MTD)에서 2,000mg/kg이상임.

나. GLP 독성시험 (Biototech)- 13주 반복 투여 독성 시험 (RB18476)

- 시험동물: SD (Sprague Dawley) rat
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 13주 반복 경구 투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시함.
- 투여빈도 및 경로: 반복투여, 경구 투여
- 투여용량: 매일 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 2주간 1일 1회 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg, 5,000 mg/kg 용량으로 위내 강제투여
- 시험구성:

시험군	투여용량 (mg/kg)	동물 수
Control	0	암수 각 10마리
저용량군	1,250	암수 각 10마리
중용량군	2,500	암수 각 10마리
고용량군	5,000	암수 각 10마리

표 . 13주 반복투여 독성시험 시험구성, SD 랫드

- 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨 검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량, 부검 시 육안 검사 및 조직병리학적 검사.
- 결과: 게르마늄 미나리추출물 대조군(주사용수), 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg으로 13주간 경구투여 결과, 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서 시험물질에 기인한 독성변화 없음. 조직병리학적 결과, 암수 5,000mg/kg/day에서 독성변화 없음.

**결 론**

- 13주 반복투여독성시험에서 암수 5,000mg/kg/day에서 독성 없음.

다. GLP 독성시험 (Biototech)- 마우스를 이용한 소핵 시험 (RB18475)

(1) 용량결정시험

- 용량설정시험의 용량: 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg
- 용량설정시험 결과: 암수 모든 용량에서 일반증상의 이상 및 사망동물이 관찰되지 않음
- 용량설정시험 결과, 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험은 수컷만 사용함.

(2) 본 시험

- 시험세포: ICR 마우스
- 시험물질: 게르마늄 미나리 추출물
- 시험목적: 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토함.
- 투여빈도 및 경로:
- 투여용량: 미나리 추출물 1,000, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여
- 시험구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여횟수	투여경로	동물 수
Control	0	2	경구	5
저용량군	1,250	2	경구	5
중용량군	2,500	2	경구	5
고용량군	5,000	2	경구	5
양성대조	2	1	복강내	5

표 . 마우스를 이용한 소핵 시험구성

- 관찰 항목 : 24, 48, 72 시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발 빈도를 관찰, 일반 증상 및 사망동물 관찰
- 결과: 시험 최고 용량 5,000mg/kg으로 공비 2 적용하여 2,500, 1,250mg/kg으로 수컷 마우스에서 시험한 결과, 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 차이가 없음. 음성 (Negative)

**결 론**

- 마우스를 이용한 소핵시험에서 음성 (Negative) 임.

라. 제형연구

(1) Pouch 및 capsule 제형의 제품화 제형 연구 최적화를 통한 제형을 확정하였음.



- 파우치 제형의 경우, 관능검사시 특유의 향으로 인하여 식감이 떨어질 우려가 있다는 의견이 대다수로 개발 보류함.
- 결과: 복용편이성으로 캡슐제형으로 하여 최종 출시 예정임.

**결 론**

- 최종 제형인 캡슐제형으로 제형 결정을 하여 출시 예정임.

마. GMP 시설에서 시제품원료 3batch 제조

- (1) 게르마늄미나리 건조물 3 batch 수령하여 GMP 시설하에서 대량생산 수행
  - 블루마운트에서 각 20kg의 게르마늄 미나리 건조파우더를 수령하였음.
- (2) 제조공정 및 제조기록서

대표 제조공정도 표 및 3batch

제조공정	세부 공정
원재료	게르마늄미나리 건물
↓	
파쇄	게르마늄미나리 건물을 파쇄기에 넣은 후 파쇄
↓	
가수 및 추출	게르마늄미나리 건물 파쇄물에 물 10배수 첨가 후 95~100℃에서 3~5시간 추출
↓	
여과	여과 필터 (50um, 5um)를 순차적으로 이용하여 여과 진행
↓	
농축	95℃에서 30~40brix 될때까지 농축
↓	
Spray dry	게르마늄 미나리 추출 농축액(30~40brix)의 고형분 함량으로 텍스트린과 1:0.1 첨가 후 spray dry 진행
↓	
혼합	Spray dry 건조물 (98%), 스티아린산 마그네슘 (1%), 이산화 규소 (1%) 혼합
↓	
원료	포장

Batch 1 제조기록서

--	--	--

# 제조지시 및 기록서

MANUFACTURING ORDER & RECORD

【제 품 명】 : 게르마늄이온기 수용액

【제조번호】 : ARSD001

【제조일자】 : 2018.08.28

【유통기한】 : 2020.08.27



The Bridge of Life Science  
주식회사 아리바이오  
ARIBIO CO.,Ltd

제조지시 및 기록서		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

구분	항목	Page	비고
제조지시	제조지시 및 기록서(본문)	1	
제조지시	제조지시 및 기록서(첨가제)	2	
제조지시	제조지시 및 기록서(용매)	3	
제조지시	제조지시 및 기록서(용기)	4	
제조지시	제조지시 및 기록서(용액)	5	
제조지시	제조지시 및 기록서(용기)	6	
제조지시	제조지시 및 기록서(용액)	7	
제조지시	제조지시 및 기록서(용기)	8	
제조지시	제조지시 및 기록서(용액)	9	

제조지시 및 기록서 (원료명)		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

제조지시 및 기록서 (수출목록)		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

제조지시 및 기록서 (분무순서)		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

제조지시 및 기록서 (분류)		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

모질 품질검사 기록서		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

제조지시 및 기록서 (최종 수확, 용산)		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

시험의뢰서		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

시험결과통보서		제조번호	제조일자
제 품 명	게르마늄이온기 수용액	제조번호	ARSD001
제 품 코드	0000 No. 0001-0003	제조일자	2018.08.28
제 품 단위	3.82 kg	제조시간	24 분
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준
제 품 성분	1 EA	제조인	김민준
제 품 성분	3.82kg+1EA	제조인	김민준

### 광명시험일자(연합)

주 소 명	ARIBIO	시험 일자	2019.01.24
시험 번호	ANS9001	주 소	아리비오
시험 일자	2019.01.24	시험 장소	아리비오

구분	항목	시험 일자	시험 번호	시험 장소	시험 결과
1. 광명	시험 일자	2019.01.24	ANS9001	아리비오	합격
	시험 번호	ANS9001	ANS9001	아리비오	합격
	시험 장소	아리비오	아리비오	아리비오	합격
	시험 결과	합격	합격	합격	합격

\* 광명 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

### 대생물시험일자

주 소 명	ARIBIO	시험 일자	2019.01.24
시험 번호	ANS9001	주 소	아리비오
시험 일자	2019.01.24	시험 장소	아리비오

구분	항목	시험 일자	시험 번호	시험 장소	시험 결과
1. 대생물	시험 일자	2019.01.24	ANS9001	아리비오	합격
	시험 번호	ANS9001	ANS9001	아리비오	합격
	시험 장소	아리비오	아리비오	아리비오	합격
	시험 결과	합격	합격	합격	합격

\* 대생물 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

### 시험의뢰서

주 소 명	ARIBIO	시험 일자	2019.01.24
시험 번호	ANS9001	주 소	아리비오
시험 일자	2019.01.24	시험 장소	아리비오

\* 시험의뢰서 작성 시, 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

### 시험결과통보서

주 소 명	ARIBIO	시험 일자	2019.01.24
시험 번호	ANS9001	주 소	아리비오
시험 일자	2019.01.24	시험 장소	아리비오

합격

2019.01.24

아리비오

### 제품시험성적서

#### CERTIFICATE OF ANALYSIS

구분	항목	시험 일자	시험 번호	시험 장소	시험 결과
1. 광명	시험 일자	2019.01.24	ANS9001	아리비오	합격
	시험 번호	ANS9001	ANS9001	아리비오	합격
	시험 장소	아리비오	아리비오	아리비오	합격
	시험 결과	합격	합격	합격	합격

\* 제품 시험 성적서 작성 시, 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

### 제품시험성적서

#### CERTIFICATE OF ANALYSIS

구분	항목	시험 일자	시험 번호	시험 장소	시험 결과
1. 대생물	시험 일자	2019.01.24	ANS9001	아리비오	합격
	시험 번호	ANS9001	ANS9001	아리비오	합격
	시험 장소	아리비오	아리비오	아리비오	합격
	시험 결과	합격	합격	합격	합격

\* 대생물 시험 성적서 작성 시, 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

### 제품시험성적서

#### CERTIFICATE OF ANALYSIS

구분	항목	시험 일자	시험 번호	시험 장소	시험 결과
1. 광명	시험 일자	2019.01.24	ANS9001	아리비오	합격
	시험 번호	ANS9001	ANS9001	아리비오	합격
	시험 장소	아리비오	아리비오	아리비오	합격
	시험 결과	합격	합격	합격	합격

\* 광명 시험 성적서 작성 시, 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

Batch 2 제조기록서

### 제조지시 및 기록서

#### MANUFACTURING ORDER & RECORD

【 제품명 : 세포아날기나리 추출물 】

【 제조번호 : ANS9001 】

【 제조일자 : 2019.01.24 】

【 유통기한 : 2021.01.23 】

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

### 제조지시 및 기록서

#### MANUFACTURING ORDER & RECORD

【 제품명 : 세포아날기나리 추출물 】

【 제조번호 : ANS9001 】

【 제조일자 : 2019.01.24 】

【 유통기한 : 2021.01.23 】

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

### 제조지시 및 기록서 (원료량)

#### MANUFACTURING ORDER & RECORD (Raw Material)

구분	항목	시험 일자	시험 번호	시험 장소	시험 결과
1. 광명	시험 일자	2019.01.24	ANS9001	아리비오	합격
	시험 번호	ANS9001	ANS9001	아리비오	합격
	시험 장소	아리비오	아리비오	아리비오	합격
	시험 결과	합격	합격	합격	합격

\* 원료량 기록서 작성 시, 시험 일자 및 시험 번호는 시험 일자 및 시험 번호에 따라 달라질 수 있습니다.

**ARIBIO**  
The Bridge of Life Science  
주식회사 아리비오  
ARIBIO CO., Ltd

재종지시 및 기록서 (순종/농축)		시험일자	시험번호
품목명	순종/농축	2019.07.24	20190724
시험종류	순종/농축	시험일자	시험번호
시험대상	순종/농축	시험일자	시험번호
시험방법	순종/농축	시험일자	시험번호
시험장소	순종/농축	시험일자	시험번호
시험인원	순종/농축	시험일자	시험번호
시험결과	순종/농축	시험일자	시험번호
시험비고	순종/농축	시험일자	시험번호

재종지시 및 기록서 (분유/건조)		시험일자	시험번호
품목명	분유/건조	2019.07.24	20190724
시험종류	분유/건조	시험일자	시험번호
시험대상	분유/건조	시험일자	시험번호
시험방법	분유/건조	시험일자	시험번호
시험장소	분유/건조	시험일자	시험번호
시험인원	분유/건조	시험일자	시험번호
시험결과	분유/건조	시험일자	시험번호
시험비고	분유/건조	시험일자	시험번호

재종지시 및 기록서 (순종)		시험일자	시험번호
품목명	순종	2019.07.24	20190724
시험종류	순종	시험일자	시험번호
시험대상	순종	시험일자	시험번호
시험방법	순종	시험일자	시험번호
시험장소	순종	시험일자	시험번호
시험인원	순종	시험일자	시험번호
시험결과	순종	시험일자	시험번호
시험비고	순종	시험일자	시험번호

모질 공성검사 기록서		시험일자	시험번호
품목명	모질 공성검사	2019.07.24	20190724
시험종류	모질 공성검사	시험일자	시험번호
시험대상	모질 공성검사	시험일자	시험번호
시험방법	모질 공성검사	시험일자	시험번호
시험장소	모질 공성검사	시험일자	시험번호
시험인원	모질 공성검사	시험일자	시험번호
시험결과	모질 공성검사	시험일자	시험번호
시험비고	모질 공성검사	시험일자	시험번호

포장지시 및 기록서 (지방 수합, 분산)		시험일자	시험번호
품목명	지방 수합, 분산	2019.07.24	20190724
시험종류	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호
시험대상	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호
시험방법	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호
시험장소	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호
시험인원	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호
시험결과	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호
시험비고	지방 수합, 분산	시험일자	시험번호

시험의뢰서	
품목명	시험의뢰서
시험종류	시험의뢰서
시험대상	시험의뢰서
시험방법	시험의뢰서
시험장소	시험의뢰서
시험인원	시험의뢰서
시험결과	시험의뢰서
시험비고	시험의뢰서

시험결과통보서	
품목명	시험결과통보서
시험종류	시험결과통보서
시험대상	시험결과통보서
시험방법	시험결과통보서
시험장소	시험결과통보서
시험인원	시험결과통보서
시험결과	시험결과통보서
시험비고	시험결과통보서

공정시험원지 (순종)	
시험종류	순종
시험대상	순종
시험방법	순종
시험장소	순종
시험인원	순종
시험결과	순종
시험비고	순종

매생질시험원지	
시험종류	매생질
시험대상	매생질
시험방법	매생질
시험장소	매생질
시험인원	매생질
시험결과	매생질
시험비고	매생질

시험의뢰서	
품목명	시험의뢰서
시험종류	시험의뢰서
시험대상	시험의뢰서
시험방법	시험의뢰서
시험장소	시험의뢰서
시험인원	시험의뢰서
시험결과	시험의뢰서
시험비고	시험의뢰서

시험결과통보서	
품목명	시험결과통보서
시험종류	시험결과통보서
시험대상	시험결과통보서
시험방법	시험결과통보서
시험장소	시험결과통보서
시험인원	시험결과통보서
시험결과	시험결과통보서
시험비고	시험결과통보서

### 제품시험성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS

호 소 명 (Product Name)	제조지시(ARSD) 주출물	호 소 번호 (Lot No.)	ARSD002	호 소 유형 (Product Type)	주출물
호 소 번호 (Lot No.)	2019-01-24	호 소 무게 (Net Weight)	3.82kg	호 소 용량 (Capacity)	1100(150)g
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg
호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg	호 소 용량 (Capacity)	3.82kg±15A	호 소 무게 (Net Weight)	3.82 kg

Batch 3제조기록서

### 제조지시 및 기록서 MANUFACTURING ORDER & RECORD

**【제 품 명 : 제브라놀에이리 주출물】**  
**【제조번호 : ARSD002】**  
**【제조일자 : 2019.10.22】**  
**【유통기한 : 2021.10.21】**



**주식회사 아리바이오**  
ARIBIO CO.,Ltd

### 제조지시 및 기록서

호 소 명 (Product Name)	제브라놀에이리 주출물	호 소 번호 (Lot No.)	ARSD002	호 소 유형 (Product Type)	주출물
호 소 번호 (Lot No.)	2019-01-24	호 소 무게 (Net Weight)	3.82kg	호 소 용량 (Capacity)	1100(150)g

**제조일자: 2019.10.22**  
**유통기한: 2021.10.21**

구 분	명 세	Page	비고
특 정	제조지시 및 기록서(제조기록서)	2	100%
수 출	제조지시 및 기록서(수출, 납품, 영수증)	3,4	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	5	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	6	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	7	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	8	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	9	100%

### 제조지시 및 기록서 (원료시험)

호 소 명 (Product Name)	제브라놀에이리 주출물	호 소 번호 (Lot No.)	ARSD002	호 소 유형 (Product Type)	주출물
호 소 번호 (Lot No.)	2019-01-24	호 소 무게 (Net Weight)	3.82kg	호 소 용량 (Capacity)	1100(150)g

**제조일자: 2019.10.22**  
**유통기한: 2021.10.21**

구 분	명 세	Page	비고
특 정	제조지시 및 기록서(제조기록서)	2	100%
수 출	제조지시 및 기록서(수출, 납품, 영수증)	3,4	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	5	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	6	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	7	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	8	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	9	100%

### 제조지시 및 기록서 (수출/납품)

호 소 명 (Product Name)	제브라놀에이리 주출물	호 소 번호 (Lot No.)	ARSD002	호 소 유형 (Product Type)	주출물
호 소 번호 (Lot No.)	2019-01-24	호 소 무게 (Net Weight)	3.82kg	호 소 용량 (Capacity)	1100(150)g

**제조일자: 2019.10.22**  
**유통기한: 2021.10.21**

구 분	명 세	Page	비고
특 정	제조지시 및 기록서(제조기록서)	2	100%
수 출	제조지시 및 기록서(수출, 납품, 영수증)	3,4	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	5	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	6	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	7	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	8	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	9	100%

### 제조지시 및 기록서 (분무제조)

호 소 명 (Product Name)	제브라놀에이리 주출물	호 소 번호 (Lot No.)	ARSD002	호 소 유형 (Product Type)	주출물
호 소 번호 (Lot No.)	2019-01-24	호 소 무게 (Net Weight)	3.82kg	호 소 용량 (Capacity)	1100(150)g

**제조일자: 2019.10.22**  
**유통기한: 2021.10.21**

구 분	명 세	Page	비고
특 정	제조지시 및 기록서(제조기록서)	2	100%
수 출	제조지시 및 기록서(수출, 납품, 영수증)	3,4	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	5	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	6	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	7	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	8	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	9	100%

### 제조지시 및 기록서 (분류)

호 소 명 (Product Name)	제브라놀에이리 주출물	호 소 번호 (Lot No.)	ARSD002	호 소 유형 (Product Type)	주출물
호 소 번호 (Lot No.)	2019-01-24	호 소 무게 (Net Weight)	3.82kg	호 소 용량 (Capacity)	1100(150)g

**제조일자: 2019.10.22**  
**유통기한: 2021.10.21**

구 분	명 세	Page	비고
특 정	제조지시 및 기록서(제조기록서)	2	100%
수 출	제조지시 및 기록서(수출, 납품, 영수증)	3,4	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	5	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	6	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	7	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	8	100%
회 계	제조지시 및 기록서(회계)	9	100%





## 결 론

- GMP 시설하에서 3 batch의 생산을 완료함.
- 게르마늄미나리 건조물 대비 3batch의 추출 결과, Batch 1추출 수율 16.8%, 수득량 3.36kg, Batch 1추출 수율 16.75%, 수득량 3.35kg, Batch 1추출 수율 16.6%, 수득량 3.32kg, 생산 완료함.




### 바. 게르마늄미나리 추출물의 공인기관성적서

#### (1) 게르마늄미나리 추출물 3 batch의 게르마늄 함량 결과

<p>시험 성적서</p> <p>검체명: 게르마늄 미나리 추출물 Batch 1</p> <p>시험일자: 2024.09.20</p> <p>시험결과: 15,852.49 ug/100g</p> <p>한국식품과학연구원</p>	<p>시험 성적서</p> <p>검체명: 게르마늄 미나리 추출물 Batch 2</p> <p>시험일자: 2024.09.20</p> <p>시험결과: 15,534.13 ug/100g</p> <p>한국식품과학연구원</p>	<p>시험 성적서</p> <p>검체명: 게르마늄 미나리 추출물 Batch 3</p> <p>시험일자: 2024.09.20</p> <p>시험결과: 15,061.09 ug/100g</p> <p>한국식품과학연구원</p>
Batch 1	Batch 2	Batch 3

- 게르마늄 미나리 추출물 3 batch 시료를 한국 식품과학연구원에 의뢰하여 게르마늄 함량 시험을 진행하였음.
- 게르마늄 미나리 추출물 batch 1은 15,852.49 ug/100 g, batch 2은 15,534.13 ug/100 g, batch 3의 경우 15,061.09 ug/100 g의 시험 결과를 얻었음.

#### (2) 게르마늄미나리 추출물 3 batch의 대장균균 시험 결과

 <p>시험성적서</p> <p>Batch 1</p>	 <p>시험성적서</p> <p>Batch 2</p>	 <p>시험성적서</p> <p>Batch 3</p>
---	--	---

- 게르마늄 미나리 추출물 3 batch 시료를 한국 식품과학연구원에 의뢰하여 대장균군 시험을 진행하였음.
- 게르마늄 미나리 추출물 batch 1, 2, 3 모두 대장균군은 불검출 되었음.

(3) 게르마늄미나리 추출물 3 batch의 잔류농약 결과

 <p>시험성적서</p> <p>Batch 1</p>	 <p>시험성적서</p> <p>Batch 2</p>	 <p>시험성적서</p> <p>Batch 3</p>
---	--	---

- 게르마늄 미나리 추출물 3 batch 시료를 한국 식품과학연구원에 의뢰하여 잔류농약(BHC, DDT, Adrin, Dieldrin, Endrin) 시험을 진행하였음.
- 게르마늄 미나리 추출물 batch 1, 2, 3 모두 잔류농약 BHC, DDT, Adrin, Dieldrin, Endrin 5종 모두 불검출 되었음.

(4) 게르마늄미나리 추출물 3 batch의 중금속 결과

 <p>시험 성적서</p> <p>Batch 1</p>	 <p>시험 성적서</p> <p>Batch 2</p>	 <p>시험 성적서</p> <p>Batch 3</p>
--	---	--

- 게르마늄 미나리 추출물 3 batch 시료를 한국 식품과학연구원에 의뢰하여 중금속(납, 카드뮴, 수은, 비소) 시험을 진행하였음.
- 게르마늄 미나리 추출물 batch 1의 경우 납 0.16 mg/kg, 카드뮴 0.03 mg/kg, 수은은 불검출, 비소 2.08 mg/kg이며, batch 2의 경우 납 0.15 mg/kg, 카드뮴 0.03 mg/kg, 수은은 불검출, 비소 2.26 mg/kg 이고, 마지막으로 batch 3의 경우 납 0.16 mg/kg, 카드뮴 0.03 mg/kg, 수은은 불검출, 비소 2.33 mg/kg으로 확인됨.

**결론**

- 게르마늄 함량의 경우 의뢰를 맡긴 3 batch를 포함한 자사에서 제조한 다른 batch들의 게르마늄 함량들을 비교하였을 때, 게르마늄 함량의 기준은 13,500 ug/100 g (135 ppm) ± 20%를 기준으로 정함.
- 대장균군과, 잔류농약 (BHC, DDT, Adrin, Dieldrin, Endrin) 5종 불검출.
- 중금속은 납 1 mg/kg이하, 카드뮴 0.3 mg/kg이하, 수은 납 0.1 mg/kg이하, 비소 3 mg/kg이하로 기준을 정함.

사. 인체적용시험 결과 (Clinical Study Report)

- (1) 제목: 미나리 추출물의 면역력 예방과 증진에 미치는 인체적용시험: 무작위 배정, 이중눈가림, 대조군 비교중심연구
- (2) 시험목적: 건강기능식품 기능성원료로서 미나리 추출물이 인체 섭취시 안전성 및 면역기능저하 방지에 대한 기능성을 검증하고자 함.
- (3) 인체적용시험실시기관: 한국체육대학교
- (4) 연구책임자: 조인호 교수
- (5) 공동 연구책임자: 김은국 (재활의학)
- (6) 인체적용시험기간: 2019.4.1.~2019.12.31.
- (7) 인체적용시험의 설계:
  - 시험디자인: 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조군 비교, 병행
  - 시험용식품: 시험식품 - 미나리추출물, 대조식품 - 텍스트린

제형 - 캡슐

복용량 - 1,000mg/일 (1일 2회, 1회 250mg 2캡슐), 총 12주

○ 대상자: 만 19세이상의 남성 또는 여성으로서 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자

○ 목표 연구대상자 수: 총 58명 (시험군 29명, 대조군 29명)

○ 유효성 평가 변수: 선천면역 - NK cell activity, 슐-a, IL-1, IL-6, IL-12

적응면역 - IL-2, IFN-r

○ 안전성 평가 변수: 이상반응, 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화, 소변검사 검사치의 비정상적 변화, 생체징후 및 문진에 의한 이상소견 여부

(8) 인체적용시험의 실시:

- 선정기준: 만 19세이상 만 65세이하의 남성 또는 여성으로서 건강하고 정상적인 신체활동이 가능한 자

말초혈액 WBC가  $4 \times 10^3/\mu\text{l}$  이상 ~  $8 \times 10^3/\mu\text{l}$  이하인 자

본 시험의 연구대상자로서 시험동의서에 서면동의한 자

- 제외기준: 최근 1년 이내 골절의 병력있는 자

신장질환이 있거나 혈청 creatinine이 1.2mg/dl 초과인 자

2+ 이상의 단백뇨가 있는 자

간 질환이 있거나 AST 또는 ALT가 60U/L 이상인 자

당뇨 병력이 있거나 조절되지 않는 당뇨병 환자

최근 2개월 이내 면역력에 영향을 미칠 수 있는 비타민, 프로바이오틱스, 인삼 홍삼 등 섭취한 자

조절되지 않는 고혈압 호나자나 협심증-심근경색증 등의 심장질환이 있는 자

정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자, 단 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외함.

위장관 절제술을 받은 병력이 있는 자 (맹장 제외)

(9) 유효성 평가 결과:

(가) 선천면역

variable	group	visit 1(n=48)	visit 4(n=48)	difference	t(p)*
		mean±SD	mean±SD	mean±SD	
NK cell activity (pg/mL)	시험군	1179.11±836.91	1420.36±725.86	241.24±706.20	-1.638(0.116)
	대조군	1074.46±820.48	822.16±662.49	-252.30±882.33	1.371(0.184)
	t(p)*	0.428(0.671)	2.919(0.006)	2.094(0.042)	
TNF-α (pg/mL)	시험군	4.65±1.17	5.66±1.88	1.01±1.66	-2.921(0.008)
	대조군	4.61±1.47	4.89±1.95	0.28±1.70	-0.786(0.440)
	t(p)*	0.098(0.923)	1.359(0.181)	1.474(0.148)	
IL-1 (pg/mL)	시험군	0.85±0.38	1.34±1.04	0.49±0.84	-2.804(0.010)
	대조군	0.91±0.25	1.04±0.26	0.13±0.30	-2.081(0.049)

	t(p)*	-0.579(0.566)	1.361(0.186)	1.937(0.059)	
IL-6 (pg/mL)	시험군	2.37±6.43	8.63±21.51	6.26±15.14	-1.984(0.060)
	대조군	2.99±10.05	7.83±21.20	4.84±11.65	-1.994(0.059)
	t(p)*	-0.249(0.805)	0.127(0.900)	0.356(0.723)	
IL-12 (pg/mL)	시험군	1.67±0.99	3.41±2.61	1.74±1.88	-4.440(<0.001)
	대조군	1.82±0.82	3.20±1.25	1.38±1.05	-6.331(<0.001)
	t(p)*	-0.573(0.569)	0.338(0.737)	0.796(0.430)	

\*: Compared within groups; p-value by Two-sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

- NK cell activity 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(1179.11±836.91pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(1420.36±725.86pg/mL) 변화량은 241.24±706.20pg/mL 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전(1074.46±820.48pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(822.16±662.49pg/mL) 변화량은 -252.30±882.33pg/mL 만큼 감소함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타남 (p=0.042).
- TNF- $\alpha$  변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(4.65±1.17pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(5.66±1.88pg/mL) 변화량은 1.01±1.66pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가함 (p=0.008). 대조군은 제품 복용 전(4.61±1.47pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(4.89±1.95pg/mL) 변화량은 0.28±1.70pg/mL 만큼 증가함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않음.
- IL-1 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(0.85±0.38pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(1.34±1.04pg/mL) 변화량은 0.49±0.84pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가함 (p=0.010). 대조군은 제품 복용 전(0.91±0.25pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(1.04±0.26pg/mL)로 변화량은 0.13±0.30pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였다(p=0.049). 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않음.
- IL-6 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(2.37±6.43pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(8.63±21.51pg/mL) 변화량은 6.26±15.14pg/mL 만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전(2.99±10.05pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(7.83±21.20pg/mL)로 변화량은 4.84±11.65pg/mL 만큼 증가함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않음.
- IL-12 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전(1.67±0.99pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(3.41±2.61pg/mL) 변화량은 1.74±1.88pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였음 (p=<0.001). 대조군은 제품 복용 전(1.82±0.82pg/mL)에 비하여 복용 12주 후(3.20±1.25pg/mL)로 변화량은 1.38±1.05pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가함(p=<0.001). 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음.

(나) 적응면역

variable	group	visit 1(n=48)	visit 4(n=48)	difference	t(p)*
		mean±SD	mean±SD	mean±SD	
IL-2	시험군	1.48±1.77	2.34±2.80	0.86±1.36	-3.011(0.006)

(pg/mL)	대조군	1.34±0.72	1.44±0.54	0.10±0.66	-0.709(0.486)
	t(p)*	0.346(0.731)	1.506(0.145)	2.397(0.021)	
IFN- $\gamma$ . (pg/mL)	시험군	9.73±8.82	18.71±14.08	8.98±6.12	-7.035(<0.001)
	대조군	9.98±3.93	15.33±6.00	5.35±4.28	-6.000(<0.001)
	t(p)*	-0.124(0.902)	1.060(0.295)	2.332(0.024)	

\*: Compared within groups; p-value by Two-sample t-test

\*\*: Compared within groups; p-value by Paired t-test

- IL-2 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전( $1.48 \pm 1.77$ pg/mL)에 비하여 복용 12주 후( $2.34 \pm 2.80$ pg/mL) 변화량은  $0.86 \pm 1.36$ pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였음 ( $p=0.006$ ). 대조군은 제품 복용 전( $1.34 \pm 0.72$ pg/mL)에 비하여 복용 12주 후( $1.44 \pm 0.54$ pg/mL) 변화량은  $0.10 \pm 0.66$ pg/mL 만큼 증가함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타났음 ( $p=0.021$ ).
- IFN- $\gamma$  변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전( $9.73 \pm 8.82$ pg/mL)에 비하여 복용 12주 후( $18.71 \pm 14.08$ pg/mL) 변화량은  $8.98 \pm 6.12$ pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였음 ( $p<0.001$ ). 대조군은 제품 복용 전( $9.98 \pm 3.93$ pg/mL)에 비하여 복용 12주 후( $15.33 \pm 6.00$ pg/mL) 변화량은  $5.35 \pm 4.28$ pg/mL 만큼 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.001$ ). 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타났음( $p=0.024$ ).

(다) 면역글로불린

variable	group	visit 1( $n=48$ )	visit 4( $n=48$ )	difference	t(p)*
		mean±SD	mean±SD	mean±SD	
IgG1 (mg/dL)	시험군	646.26±104.72	656.10±105.26	9.84±48.13	-0.980(0.338)
	대조군	683.97±153.21	670.96±131.41	-13.01±58.34	1.069(0.296)
	t(p)*	-0.975(0.335)	-0.423(0.674)	1.449(0.154)	
IgG2 (mg/dL)	시험군	449.57±142.46	464.17±139.70	14.61±38.95	-1.799(0.086)
	대조군	457.20±130.45	466.08±135.39	8.88±49.16	-0.866(0.396)
	t(p)*	-0.190(0.851)	-0.047(0.963)	0.438(0.663)	
IgM (mg/dL)	시험군	79.07±29.11	76.09±22.48	-2.99±9.63	1.487(0.151)
	대조군	103.65±46.21	100.70±45.58	-2.95±8.45	1.674(0.108)
	t(p)*	-2.158(0.038)	-2.322(0.027)	-0.014(0.989)	

\*: Compared within groups; p-value by Two-sample t-test

\*\*: Compared within groups; p-value by Paired t-test

- IgG1 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전( $646.26 \pm 104.72 \text{mg/dL}$ )에 비하여 복용 12주 후( $656.10 \pm 105.26 \text{mg/dL}$ ) 변화량은  $9.84 \pm 48.13 \text{pg/mL}$  만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전( $683.97 \pm 153.21 \text{mg/dL}$ )에 비하여 복용 12주 후( $670.96 \pm 131.41 \text{mg/dL}$ ) 변화량은  $-13.01 \pm 58.34 \text{mg/dL}$  만큼 감소함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음.
- IgG2 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전( $449.57 \pm 142.46 \text{mg/dL}$ )에 비하여 복용 12주 후( $464.17 \pm 139.70 \text{mg/dL}$ ) 변화량은  $14.61 \pm 38.95 \text{pg/mL}$  만큼 증가하였고, 대조군은 제품 복용 전( $457.20 \pm 130.45 \text{mg/dL}$ )에 비하여 복용 12주 후( $466.08 \pm 135.39 \text{mg/dL}$ ) 변화량은  $8.88 \pm 49.16 \text{mg/dL}$  만큼 증가함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음.
- IgM 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 제품 복용 전( $79.07 \pm 29.11 \text{mg/dL}$ )에 비하여 복용 12주 후( $76.09 \pm 22.48 \text{mg/dL}$ ) 변화량은  $-2.99 \pm 9.63 \text{pg/mL}$  만큼 감소하였고, 대조군은 제품 복용 전( $103.65 \pm 46.21 \text{mg/dL}$ )에 비하여 복용 12주 후( $100.70 \pm 45.58 \text{mg/dL}$ ) 변화량은  $-2.95 \pm 8.45 \text{mg/dL}$  만큼 감소함. 그룹과 반복 간에는 유의한 상호작용이 나타나지 않았음.

(라) 피로심각척도 설문

variable	group	visit 1( $n=48$ )	visit 3( $n=48$ )	visit 4( $n=48$ )	F( $p$ )*
		mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD	
정신적 피로	시험군	$2.29 \pm 0.81$	$2.24 \pm 0.73$	$2.23 \pm 0.78$	0.226(0.639)
	대조군	$2.27 \pm 0.61$	$2.00 \pm 0.61$	$2.18 \pm 0.70$	0.399(0.534)
	t( $p$ )***	0.082(0.935)	1.230(0.225)	0.239(0.812)	
신경계 기능 장애	시험군	$1.99 \pm 0.86$	$1.90 \pm 0.73$	$1.91 \pm 0.82$	0.444(0.512)
	대조군	$2.25 \pm 0.81$	$1.97 \pm 0.78$	$1.97 \pm 0.72$	0.048(0.095)
	t( $p$ )***	-1.061(0.295)	-0.325(0.747)	-0.255(0.800)	
졸리움	시험군	$2.69 \pm 0.98$	$2.60 \pm 0.82$	$2.50 \pm 0.96$	1.507(0.233)
	대조군	$2.73 \pm 0.61$	$2.42 \pm 0.73$	$2.62 \pm 0.80$	0.704(0.411)
	t( $p$ )***	-0.180(0.858)	0.798(0.429)	-0.436(0.665)	
신체적 부조화	시험군	$2.40 \pm 0.89$	$2.43 \pm 0.94$	$2.35 \pm 0.84$	0.167(0.687)
	대조군	$2.64 \pm 0.74$	$2.48 \pm 0.76$	$2.63 \pm 0.78$	0.003(0.959)
	t( $p$ )***	-1.005(0.320)	-0.207(0.837)	-1.198(0.237)	

variable	group	visit 1(n=48)	visit 3(n=48)	visit 4(n=48)	F(p)*
		mean±SD	mean±SD	mean±SD	
	시험군	2.22±0.85	1.96±0.82	2.12±0.88	1.045(0.318)
소진	대조군	2.10±0.68	2.03±0.70	2.09±0.72	0.009(0.926)
	t(p)**	0.511(0.612)	-0.322(0.749)	0.122(0.903)	

\*: Compared groups; p-value by Repeated measure ANOVA

\*\* : Compared within groups; p-value by Two-sample t-test

○ 0주(방문 1), 6주(방문 3), 12주(방문 4)에서 조사한 피로심각척도(Fatigue Severity Scale) 설문을 PP Set 으로 분석한 결과, 피로심각척도 항목(정신적피로, 신경계기능장애, 졸리움, 신체적부조화, 소진)에서 통계적 유의성은 확인하지 못하였음.

### 결론

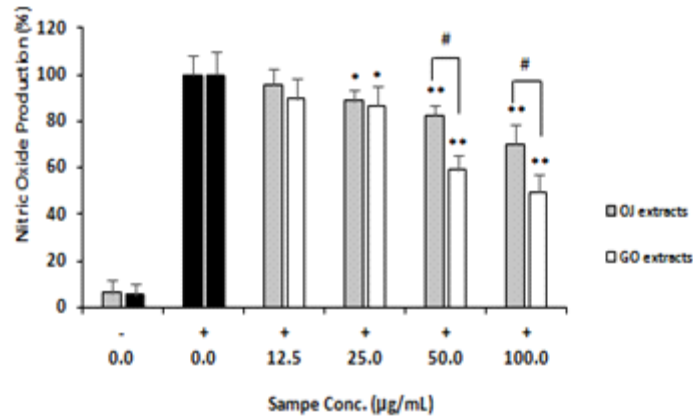
- 선천면역 1차 유효성 평가변수인 NK cell activity에서 대조군 대비 유의한 효과가 나타남.
- 적응면역 1차 유효성 평가변수인 IL-2에서 대조군 대비 유의한 효과가 나타남.
- 적응면역 1차 유효성 평가변수인 IFN-r에서 대조군 대비 유의한 효과가 나타남.
- 인체적용시험 기간동안 총 58명에서 3건 대조군 3명의 경도1의 이상반응이 나타났지만, 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 모두 ‘관련이 없다고 생각됨’ 으로 시험책임자 (전문의)에 의해 판단되었으며, 섭취기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
- 3명의 대상자들은 일시투여를 통하여 완전치유를 확인하고, 재 투여하여 인체적용시험 완료.
- 안전성검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 면역혈청학적검사, 뇨검사로 나누어 평가하였고, 모든 항목에서 정상범위내에서 변화량이 나타나 안전성에 이상이 없는 것으로 판단됨.
- 인체적용시험에 참여한 인원중 중대한 이상반응 발생은 없었으며, 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단됨.

아. Raw 264.7 cell에서의 일반미나리와 게르마늄미나리의 효능비교

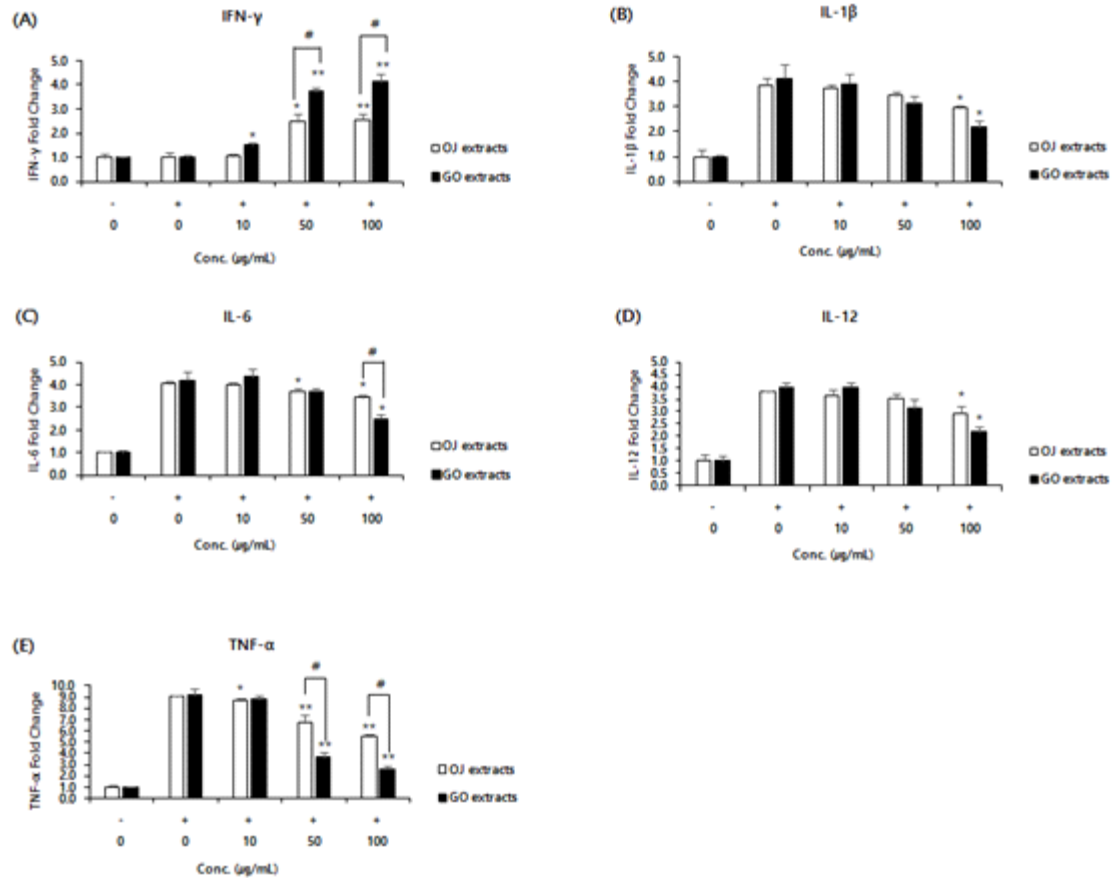
(1) 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물이 대식세포에 미치는 독성을 평가하기 위하여 Raw 264.7 cell에 추출물을 처리하여 24, 48시간 배양한 후 MTT assay를 실시함.

○ 시료의 농도를 0, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  첨가하여 배양한 결과 모든 농도에서 세포 생존율의 유의적인 차이를 보이지 않음.





- (2) LPS를 처리한 후 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 각각 0, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 Raw 264.7 cell에 처리하여 24시간 동안 배양함.
- IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 cytokine을 측정하기 위해 ELISA kit assay(Bioassay Technology Laboratory)를 진행함. IFN- $\gamma$ 를 제외한 4개의 cytokine의 경우 LPS를 처리하지 않은 Raw 264.7 대비 LPS를 단독 처리한 cell에서 모두 증가되었음을 확인하였으며, 또한 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물 처리와 LPS로 유도된 cell에서 모두 농도 10 µg/mL 농도에서부터 농도 의존적으로 점차적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었음.
  - TNF- $\alpha$ 의 경우 50 µg/mL 농도부터 일반 수경재배 미나리에 비해 게르마늄 수경재배 미나리에서 현저히 감소하는 경향을 확인하였으며, 100 µg/mL에서는 2배정도의 차이를 나타내는 것을 확인 할 수 있었음.
  - IL-1 $\beta$ , IL-6의 경우 100 µg/mL의 농도를 제외한 모든 농도에서 일반 수경재배 미나리와 게르마늄 수경재배 미나리 추출물을 처리한 cell에서 LPS를 단독 처리한 처리군과 비교하여 비슷하게 감소함을 확인 할 수 있었음.
  - IL-12의 경우 농도 의존적으로 점차 감소하였으며, 50 µg/mL의 농도에서부터 일반 수경재배 미나리에 비해 게르마늄 수경재배 미나리 추출물에서 더 감소하였음을 확인 할 수 있었음.
  - IFN- $\gamma$ 의 경우 위 4개의 cytokine과 다르게 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 추출물 처리와 LPS로 유도된 cell에서 모두 농도 10 µg/mL 농도에서부터 농도 의존적으로 점차적으로 증가하는 것을 확인하였으며, 일반 수경재배 미나리에 비해 게르마늄 수경재배 미나리 추출물에서 더 감소함을 확인할 수 있었음.



## 결론

- 일반 및 게르마늄 수경재배 미나리 모두 IFN- $\gamma$ 를 제외한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12의 cytokine이 농도 의존적으로 감소된 것으로 보아, 전염증성 및 염증성 cytokine에 영향을 미치는 것으로 확인 할 수 있었음.
- 일반 수경재배미나리에 비해 게르마늄 수경재배 미나리에서 IFN- $\gamma$ 는 증가 및 나머지 측정된 cytokine에서의 감소폭이 더 컸음을 확인 할 수 있었음.

자. 정상마우스모델에서의 일반미나리와 게르마늄미나리의 효능비교

- (1) 일반미나리추출물 (OJ)과 게르마늄미나리추출물(GO)의 면역조절 효과를 정상 ICR 마우스를 이용하여 직접 상호 비교 평가하고자 하였음.
- (2) 즉, 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400 mg/kg을 멸균 증류수에 용해시켜 10 ml/kg의 용량으로, 매일 1 회씩 14 일간 경구 투여하고, 실험 물질 최종 14회 투여 24시간 후, 체중, 비장 중량, 비장 조직 내 nitric oxide (nitrate/nitrite), interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량, 복강 및 비장 natural killer (NK) cell 활성의 변화를 각각 관찰하였음.
- (3) 본 실험에서 게르마늄미나리추출물의 결과는 동일 용량의 일반미나리추출물 투여군과 비교 평가하였음.
- (4) 실험동물: SPF/VAF Outbred CrjOri:CD1 (ICR) 마우스 (6주령 수컷, OrientBio, Seungnam, Korea; 체중 29 ~ 32 g) [ANNEX I 및 II]. 본 실험에서 모든 실험동물은 대

구한대학교 실험동물윤리위원회의 동물윤리 기준에 따라 취급하였으며, 사전승인 하에 실험을 실시하였음 [Approval No. DHU2019-014, February 27, 2019 (ANNEX III)]. 총 33마리의 마우스를 입수하여, 7일간 순화 시킨 다음, 체중이 일정한 마우스를 선정하여, 하기와 같이 군 당 10마리씩 3개 군으로 분리하여 사용하였음 (총 33수; 평균 체중  $34.46 \pm 1.41$  g, 32.40 ~ 36.80 g)

(5) 실험군 분리: (총 3개군; 군 당 10마리)

- 정상 매체 대조군 (멸균 증류수 투여 정상 매체 대조군)
- OJ 400 (일반미나리추출물 400 mg/kg 투여 실험군)
- GO 400 (게르마늄미나리추출물 추출물 400 mg/kg 투여 실험군)

Group	Animals	Test substances (mg/kg)	Animal No.
ARM064-GO: Immunomodulatory intercomparison in normal ICR mice			
Control	Intact mice	Distilled water 10 ml/kg, oral administration	M01~M10
Active	Intact mice	OJ extracts 400 mg/kg, oral administration	M11~M20
Active	Intact mice	GO extracts 400 mg/kg, oral administration	M21~M30

(6) 실험물질의 투여: OJ 및 GO 추출물의 투여 용량, 400 mg/kg은 이전 *in vivo* 모델에서의 효과 평가 실험 [Park et al., 2015; Ai et al., 2016] 및 본 연구자 등의 이전 CPA 유발 면역억제 마우스 실험에서의 면역조절 효과 평가 [ARM056-GO CPA, 2018]을 기준으로 설정하였음. OJ 및 GO 추출물을 멸균 증류수에 40 mg/ml의 농도로 용해 시킨 다음 10 ml/kg의 용량 (각각 400 mg/kg)으로 매일 1 회씩 14 일간 금속제 존데가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 강제 경구 투여하였음. 정상 매체 대조군에서는 동일한 경구 투여에 따른 보정 스트레스를 가하기 위해, 실험물질 대신 매체인 멸균 증류수만을 동일한 용량 및 빈도로 경구 투여하였음.

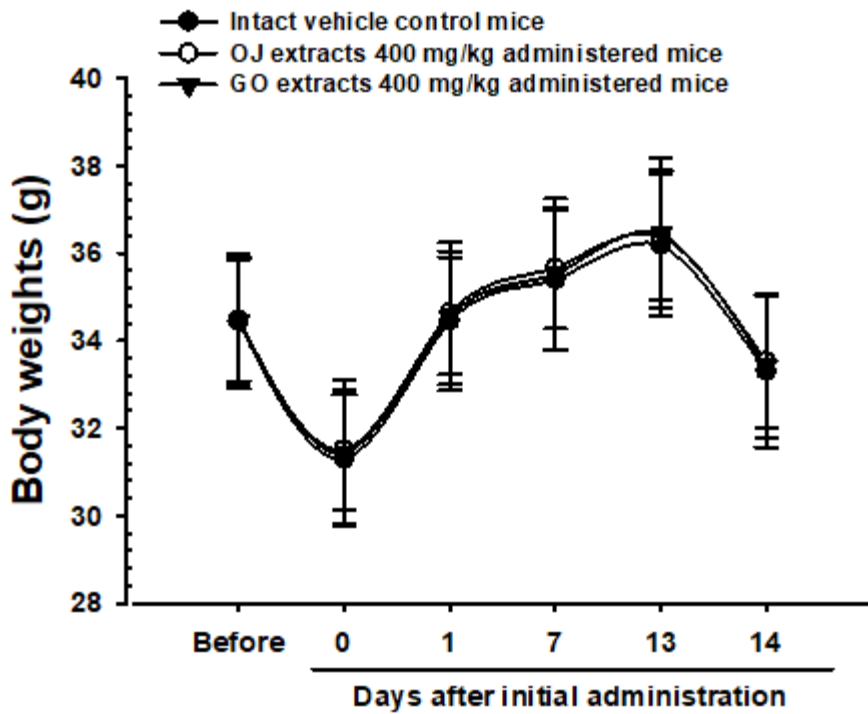
(7) 관찰항목: 체중, 비장 중량, 비장 조직 내 nitric oxide (nitrate/nitrite), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량, 복강 및 비장 NK cell 활성의 변화.

(8) 실험결과:

(가) 체중의 변화

- 총 14일간의 실험기간 동안 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화는 각각 인정되지 않았음.

Groups	Periods <u>Body weights</u> at:		Body weight gains [B-A]
	First test substance administration [A]*	At sacrifice [B]*	
Control			
Intact vehicle	31.30 $\pm$ 1.47	33.31 $\pm$ 1.74	2.01 $\pm$ 0.57
Test substance (400 mg/kg)			
OJ extracts	31.51 $\pm$ 1.37	33.54 $\pm$ 1.53	2.03 $\pm$ 0.61
GO extracts	31.43 $\pm$ 1.66	33.43 $\pm$ 1.65	2.00 $\pm$ 0.42



Values are expressed mean  $\pm$  SD of 10 mice, g

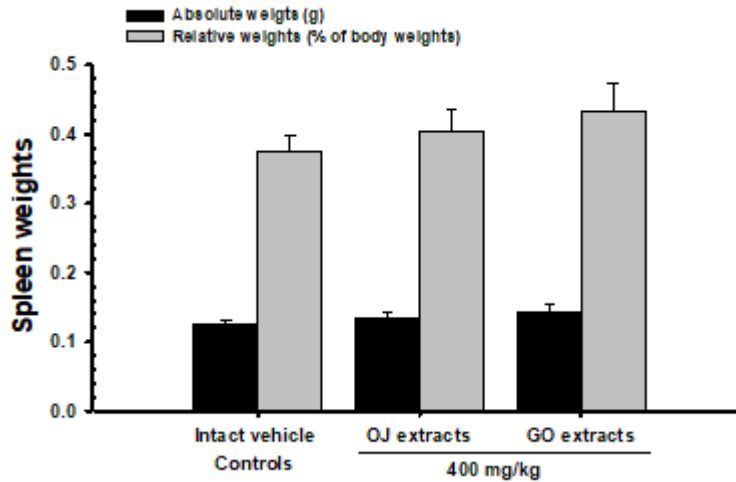
GO = Ge-rich water dropwort, *Oenanthe javanica*

OJ = General water dropwort, *Oenanthe javanica*

- 실험 전 기간인 14일 동안의 증체량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 1.00 및 -0.50%의 변화를 각각 나타내었음.

(나) 비장 중량의 변화

- OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서는 정상 매체 대조군에 비해 현저한 비장 중량의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 OJ 추출물 투여군 보다 더 우수한 비장 중량 증가 효과를 나타내었음.



- 비장 절대 중량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 8.18 및 15.72%의 변화를 각각 나타내었음.
- 비장 상대 중량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 7.45 및 15.40%의 변화를 각각 나타내었음.

(다) 비장 조직 내 nitric oxide와 cytokine - IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12함량의 변화

- OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 비장 조직 내 nitrate/nitrite (nitric oxide), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12 함량의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 OJ 추출물 투여군 보다 더 우수한 비장 조직 내 nitric oxide 및 cytokine 함량 증가 효과를 각각 나타내었음.

Items	Groups	Intact vehicle control	OJ extracts 400 mg/kg	GO extracts 400 mg/kg
Nitrate/nitrite ( $\mu\text{M/g}$ protein)		59.20 $\pm$ 19.37	82.00 $\pm$ 19.21 <sup>b</sup>	100.50 $\pm$ 17.88 <sup>a</sup>
IFN- $\gamma$ (pg/mg protein)		310.50 $\pm$ 98.28	467.00 $\pm$ 141.42 <sup>a</sup>	588.50 $\pm$ 106.50 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg protein)		114.40 $\pm$ 36.07	153.40 $\pm$ 30.61 <sup>b</sup>	183.40 $\pm$ 39.84 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg protein)		69.90 $\pm$ 14.45	93.60 $\pm$ 21.66 <sup>b</sup>	118.20 $\pm$ 26.93 <sup>a</sup>
IL-6 (pg/mg protein)		82.40 $\pm$ 18.89	107.60 $\pm$ 21.19 <sup>b</sup>	131.70 $\pm$ 27.92 <sup>a</sup>
IL-12 (pg/mg protein)		578.90 $\pm$ 104.04	703.00 $\pm$ 110.73 <sup>b</sup>	801.30 $\pm$ 117.58 <sup>a</sup>

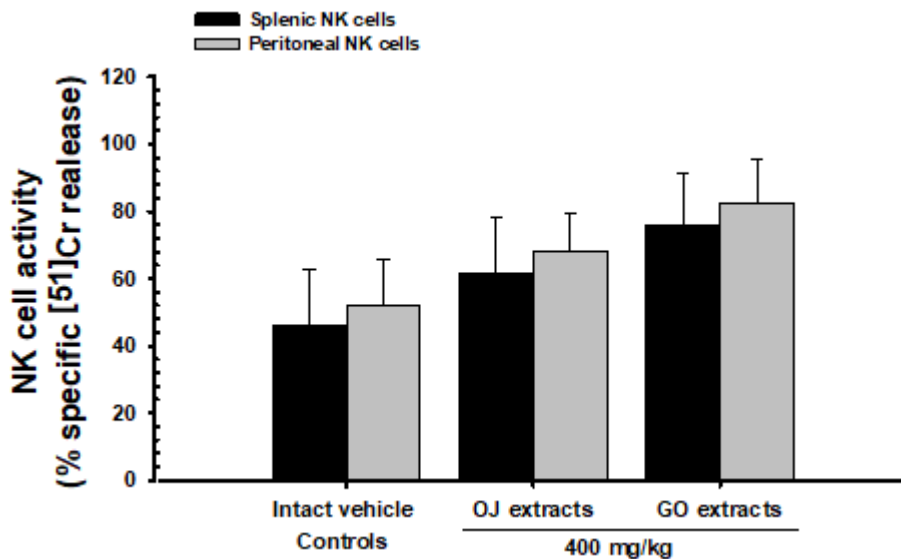
<sup>a</sup>  $p < 0.01$  and <sup>b</sup>  $p < 0.05$  as compared with intact control mice by LSD test

- 비장 nitrate/nitrite 함량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 38.51 및 69.76%의 변화를 각각 나타내었음.
- 비장 IFN- $\gamma$  함량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 50.40 및 89.53%의 변화를 각각 나타내었음.
- 비장 TNF- $\alpha$  함량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 34.09 및 60.31%의 변화를 각각 나타내었음.

- 비장 IL-1 $\beta$  함량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 33.91 및 69.10%의 변화를 각각 나타내었음.
- 비장 IL-6 함량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 30.58 및 59.83%의 변화를 각각 나타내었음.
- 비장 IL-12 함량은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 21.44 및 38.42%의 변화를 각각 나타내었음.

(라) NK 세포 활성의 변화

- OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 복강 및 비장 NK 세포 활성의 증가가 각각 인정되었으며, 특히 GO 추출물은 동일한 용량의 OJ 추출물 투여군 보다 더 우수한 복강 및 비장 NK 세포 활성 효과를 각각 나타내었음.



<sup>a</sup>  $p < 0.01$  and <sup>b</sup>  $p < 0.05$  as compared with intact control mice by LSD test

- 비장 NK 세포 활성은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 33.33 및 64.50%의 변화를 각각 나타내었음.
- 복강 NK 세포 활성은 OJ 및 GO 추출물 400 mg/kg 투여군에서 정상 매체 대조군에 비해 30.46 및 58.05%의 변화를 각각 나타내었음.

**결 론**

- 비장 NK cell 활성은 정상대조군 대비 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400mg/kg 처리군에서 33.33%, 64.5%의 증가를 나타냄.
- 복강 NK cell 활성은 정상대조군 대비 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400mg/kg 처리군에서 30.46%, 58.05%의 증가를 나타냄.
- 비장조직내에서의 NO 수치는 정상대조군 대비 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400mg/kg 처리군에서 30.57%, 42.23%의 감소를 나타냄. IL-1 $\beta$ 의 경우도 TNF- $\alpha$ 와 동일하게 대조군과 비교하여 각각 33.33%, 40.06% 감소함을 확인함. IL-6, 12의 경우도 정상 대조군과 비교하였을 때, 일반미나리추출물은 2개의 cytokine 인자들이 각각 23.30%, 17.96% 감소, 게르마늄미나리추출물의 경우 각각 38.52%, 29.09% 감소함을 확인함.
- IFN- $\gamma$ 의 경우 일반미나리추출물 및 게르마늄미나리추출물에서 모두 증가하는 경향을 보였으며, 각각 정상 대조군과 비교하여, 22.72%, 50.92% 증가함.

차. 미나리추출물에서의 추가 지표성분 설정 및 밸리데이션

(1) 추가 지표성분 규명

- 게르마늄미나리추출물의 추가 지표성분 분석을 위하여 Q-orbitrap LC/MS/MS를 이용하였음.

구분	게르마늄미나리		일반미나리	
	Area %	함량 (%)	Area %	함량 (%)
Caffeic acid	11,195,713	31.1	11,915,714	33.0
Neochlorogenic acid	4,540,049	11.8	4,540,049	12.5
Quercetin	274,421	0.7	246,494	0.7
Chlorogenic acid	14,999,886	39.2	12,760,914	35.4
Quercetin-3b-D-glucoside	2,875,418	7.5	2,491,706	7.0
Rutin	518,116	1.3	516,117	1.4
D-(-)-Quinic acid	1424,546	3.7	1,266,360	3.5
Isorhamnetin	2,007,746	5.2	1,930,532	5.3
7-Hydroxycoumarine	426,608	1.1	381,344	10.5
합계	38,262,503		36,049,230	

- 게르마늄미나리 추출물과 일반미나리 추출물의 전체 지표성분의 양과 개별 지표성분의 함량은 유사하게 나타남.
- 주요 지표성분중, 가장 많은 함량을 성분은 chlorogenic acid와 caffeic acid임.
- 이 중, Chlorogenic acid의 분해산물이 caffeic acid이므로 chlorogenic acid에 대한 지표성분의 밸리데이션을 확립하기로 함.

(2) 지표성분 (Chlorogenic acid)에 대한 밸리데이션

(가) 시스템적합성

- 게르마늄미나리추출분말의 함량시험에 대해 다음과 같이 시스템 적합성항을 설정함.
- 클로로젠산의 피크 Retention time 상대표준편차(RSD %)는 1.0% 이하로 나타났다.
- 클로로젠산의 피크면적 상대표준편차(RSD %)는 1.0% 이하로

나타났다.

- 클로로젠산의 대칭계수는 2.0 이하로 나타났다.
- 클로로젠산의 이론단수는 2000 이상으로 나타났다.
- 클로로젠산의 tailing factor는 2.0 이하로 나타났다.

(나) 시험기기 및 시약

① 시험기기

구분	회사	기기명	Model명	비고
HPLC	Agilent	Degasser	G1379A	
		Bin Pump	G1312A	
		ALS	G1313A	
		COLCOM	G1316A	
		DAD	G1315B	

② 시약

시약명	제조사	등급	기타
물	J.T.Baker	HPLC grade	
메탄올	J.T.Baker	HPLC grade	
아세트니트릴	J.T.Baker	HPLC grade	
인산	Sigma Aldrich	HPLC grade	
클로로젠산 (Chlorogenic acid)	HWI ANALYTIK GMBH, Germany	Reference Standard Assay : 94.98%	MF:C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> MW:354.3g/mol Product no.: 0050-05-90

③ 기준 및 시험방법

㉞ 함량시험법

㉟ 검액의 조제

- 검체 약 1g에 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 5ml을 가하여 1분 간 소니케이션 후 표선에 정용하여 15초간 균질화시킨 후 시험용액으로 사용하며, 시험용액을 0.45um 필터로 여과하여 고속액체크로마토그래프로 분석함.

㊱ 표준액의 조제

- 클로로젠산 표준품 8.4mg 정밀하게 달아 1000ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 100ml을 첨가하여 용해시킨 다음 80%메탄올을 넣어 표선에 맞추어 표준원액을 제조한 후 표준원액 2.5ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.

㊲ 시스템적합성



- 표준액을 가지고 위의 조건으로 시험을 6회 반복할 때 피크 retention time 상대표준편차는 1.0%이하, 피크면적의 상대 표준편차는 1.0 % 이하, 대칭계수는 2.0이하, tailing factor는 2.0 이하, 이론단수는 2000 이상이어야함.

㉔ 조작조건

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 326 nm)
- 칼럼 : 안지름 4.5 mm, 길이 25 cm인 스테인레스강관에 입자크기가 5  $\mu$ m의 액체크로마토그래프용 옥타데실실리카겔을 충전한 컬럼.
- 칼럼온도 : 상온
- 유량 : 1.0 ml/분
- 주입량 : 10  $\mu$ l
- 이동상 :  
이동상 A : 0.1% phosphoric acid in water  
이동상 B : 0.1% phosphoric acid in acetonitrile

클로로젠산 피크는 약 20분에 유출 된다.

시간(분)	이동상 A (vol%)	이동상 B (vol%)	Flow rate (flow/min)
0	100	0	1.0
30	75	25	1.0
31	0	100	1.0
45	0	100	1.0
46	100	0	1.0
56	100	0	1.0

㉕ 계산식

$$\text{검체중 함량 (ug/g)} = \frac{\text{시험용액의 농도값}^{\text{가)} \times \text{시험용액 총량}^{\text{나)} \times \text{희석배수}}{\text{검체 채취량}^{\text{다)}}$$

가) 시험용액의 농도값 (단위: ug/10ml)

나) 검체를 80% 메탄올로 용해시킨 후 시험용액 총량 (ml)

다) 검체 채취량(g)

㉖ 분석법 밸리데이션 시험방법

㉗ 시스템적합성

- 시스템적합성용 표준액 조제

클로로젠산 표준품 8.4mg 정밀하게 달아 1000ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 100ml을 첨가하여 용해시킨 다음 80%메탄올을 넣어 표선에 맞추어 표준원액을 제조한 후 표준원액 2.5ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.

○ 시스템적합성 분석

시스템적합성용 표준액 6개에 대하여 각각 주입하여 얻어진 결과로부터 피크 retention time 상대 표준편차, 피크면적 상대 표준편차, 대칭계수, tailing factor 및 이론단수를 구하고 전 과정을 시험일, 시험기기, 시험자를 변경하여 2회 수행함.

㉠ 함량 분석법 밸리데이션

○ 특이성

게르마늄 미나리추출분말 분석시 80%메탄올에 대한 클로로겐산의 선택적 분석 가능 여부 평가

○ 특이성 시험용 표준액 조제 (클로로겐산 2.1 $\mu$ g/ml 해당액):

클로로겐산 표준품 8.4mg 정밀하게 달아 1000ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 100ml을 첨가하여 용해시킨 다음 80%메탄올을 넣어 표선에 맞추어 표준원액을 제조한 후 표준원액 2.5ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.

○ 시험용액 조제

검체 약 1g에 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 5ml을 가하여 1분간 소니케이션 후 표선에 정용하여 15초간 균질화시킨 후 시험용액으로 사용하며, 시험용액을 0.45 $\mu$ m 필터로 여과하여 고속액체크로마토그래프로 분석함.

○ 특이성 분석

각 80% 메탄올 (Blank), 표준액, 시험용액을 동량주입하여 생성된 크로마토그램의 피크모양 및 피크면적으로부터 80% 메탄올에 의한 주성분 피크의 간섭 여부를 확인함.

㉡ 직선성

○ 표준원액 조제 : 클로로겐산 표준품 8.4mg 정밀하게 달아 1000ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 100ml을 첨가하여 용해시킨 다음 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤. (클로로겐산 8.4 $\mu$ g/ml 해당액)

○ 직선성 시험용 표준액 조제

- 10%표준액 (클로로겐산 0.21 $\mu$ g/ml) : 표준원액 0.25ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.
- 50%표준액 (클로로겐산 1.05 $\mu$ g/ml) : 표준원액 1.25ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.
- 100%표준액 (클로로겐산 2.10 $\mu$ g/ml) : 표준원액 2.50ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.
- 150%표준액 (클로로겐산 3.15 $\mu$ g/ml) : 표준원액 3.75ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.
- 300%표준액 (클로로겐산 6.30 $\mu$ g/ml) : 표준원액 7.50ml을 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤.

○ 직선성 분석

각 농도의 직선성 시험용 각 표준액을 주입한 후 각각 직선식을 구하고 각 직선식의 상관계수로부터 직선성을 평가함. 전 과정을 3회 수행함.

㉞ 정확성

○ 표준원액 : 클로로젠산 표준품 8.4mg 정밀하게 달아 1000ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 100ml을 첨가하여 용해시킨 다음 80%메탄올을 넣어 표선에 맞춤. (클로로젠산 8.4 $\mu$ g/ml 해당액)

○ 정확성 시험액 조제

I. 50%표준액 (클로로젠산 1.05 $\mu$ g/ml) spiking : 검체 1g에 10ml 용량플라스크에 넣고 표준원액 1.25ml을 넣은 후 80%메탄올 3.75ml을 첨가하여 1분간 소니케이션 후 80%메탄올을 표선에 정용하여 15초간 균질화시킨 후 0.45 $\mu$ m 필터로 여과하여 고속액체크로마토그래프로 분석함.

II. 100%표준액 (클로로젠산 2.10 $\mu$ g/ml) spiking : 검체 1g에 10ml 용량플라스크에 넣고 표준원액 2.50ml을 넣은 후 80%메탄올 2.50ml을 첨가하여 1분간 소니케이션 후 80%메탄올을 표선에 정용하여 15초간 균질화시킨 후 0.45 $\mu$ m 필터로 여과하여 고속액체크로마토그래프로 분석함.

III. 150%표준액 (클로로젠산 3.15 $\mu$ g/ml) spiking : 검체 1g에 10ml 용량플라스크에 넣고 표준원액 3.75ml을 넣은 후 80%메탄올 1.25ml을 첨가하여 1분간 소니케이션 후 80%메탄올을 표선에 정용하여 15초간 균질화시킨 후 0.45 $\mu$ m 필터로 여과하여 고속액체크로마토그래프로 분석함.

○ 정확성 분석

각 농도의 정확성 시험액 I, II, III을 주입한 후 평균회수율로부터 정확성을 평가함. 전 과정을 3회 수행함.

㉟ 정밀성

○ 정밀성 시험용액 조제

검체 약 1g에 10ml 용량플라스크에 넣고 80%메탄올 5ml을 가하여 1분간 소니케이션 후 표선에 정용하여 15초간 균질화시킨 후 시험용액으로 사용하며, 시험용액을 0.45 $\mu$ m 필터로 여과하여 고속액체크로마토그래프로 분석함.

○ 정밀성 분석

정밀성 시험용 검액 6개에 대하여 각각 주입하여 얻어진 결과에 대한 평균 및 상대표준편차로부터 정밀성을 평가함. 전 과정을 시험일, 시험자, 시험기기를 변경하여 2회 수행함.

㊱ 분석법 밸리데이션 평가 및 고찰

㊲ 분석법 밸리데이션

항목	기준	결과
시스템 적합성	Retention time RSD ≤ 1.0	1Day : 0.04 2Day : 0.05
	피크면적 RSD ≤ 1.0	1Day : 0.55 2Day : 0.74
	대칭계수 ≤ 2.0	1Day : 0.99 2Day : 1.04
	이론단수 ≥ 2000	1Day : 129774.2 2Day : 121759.2
	Tailing factor ≤ 2.0	1Day : 1.01 2Day : 0.97
특이성	주성분의 피크에 간섭인자 없음	없음
직선성	$R^2 > 0.999$	0.9998
정확성	회수율 98.0 - 102.0 %	100.14 ± 1.455
정밀성	반복성 RSD < 2.0 %	0.300
	실험실내 정밀성 RSD < 2.0%	1.019
범위	직선성 평가시 결정	10 ~ 300%
정량한계	직선성 결과에 의하여 계산	0.121 ug/ml
검출한계	직선성 결과에 의하여 계산	0.040 ug/ml

○ 지표성분의 Retention time 상대표준편차 RSD(%) 및 피크면적 상대표준편차 RSD(%)의 값을 1.0% 이하, 대칭계수를 2.0 이하, 이론단수를 2000이상, tailing factor를 2.0 이하로 관리하여 시스템의 정밀성과 정확성이 기준에 맞는 크로마토그래피시스템을 유지하도록 하였음.

㉔ 시험결과 및 RAW DATA

### 분석법 캘리베이션 결과보고서

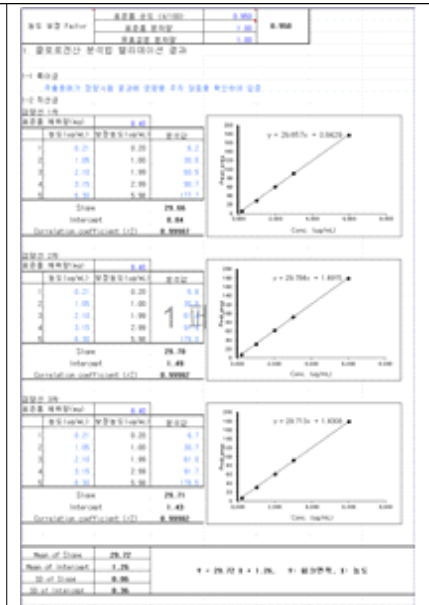
- 분석법(1)의 정확도를 평가하기 위한 캘리베이션 -

구분	시료번호	측정값	참조값	잔차
1	1	1.00	1.00	0.00
2	2	1.00	1.00	0.00
3	3	1.00	1.00	0.00
4	4	1.00	1.00	0.00
5	5	1.00	1.00	0.00

R² = 1.0000

#### 회귀분석 결과

Retention time (min)			Peak area (AU)		
구분	1 Day	2 Day	구분	1 Day	2 Day
1	19.8	20.0	1	80.2	80.8
2	19.8	20.0	2	80.3	80.3
3	19.8	20.0	3	80.2	80.5
4	19.8	20.0	4	80.7	80.7
5	19.8	20.0	5	80.0	80.7
6	19.8	20.0	6	80.8	80.7
Average	19.8	20.0	Average	80.4	80.8
SD	0.01	0.01	SD	0.31	0.44
RSD	0.04	0.05	RSD	0.36	0.54



#### 검량표

구분	시료번호	측정값	참조값	잔차	잔차 제곱	잔차 제곱의 평균	잔차 제곱의 표준편차
1	1	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Average	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
RSD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

#### 3 페이지

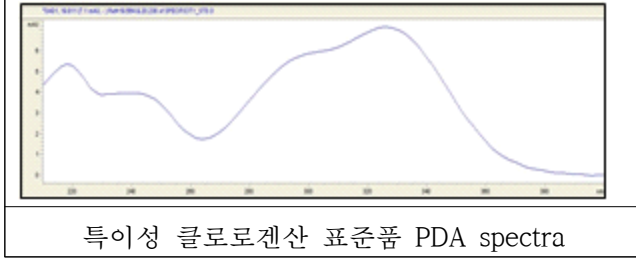
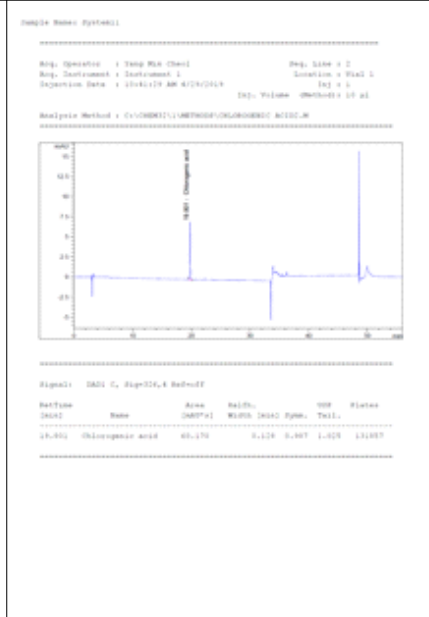
이 분석법은 특이성 클로로겐산에 대한 HPLC 분석을 위한 방법입니다. 이 분석법은 특이성 클로로겐산의 농도를 측정하는 데 사용됩니다.

1. 시료의 용해 및 농도 측정

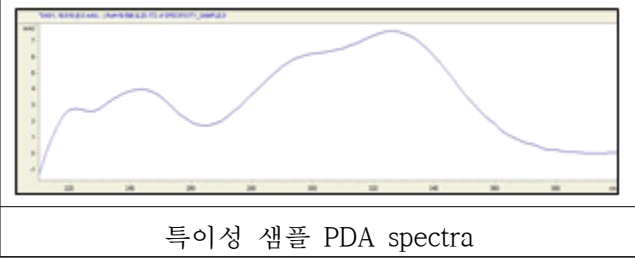
2. 시료 용액의 농도 측정

3. 분석 결과의 정확도를 평가하기 위한 방법

4. 분석 결과의 정확도를 평가하기 위한 방법

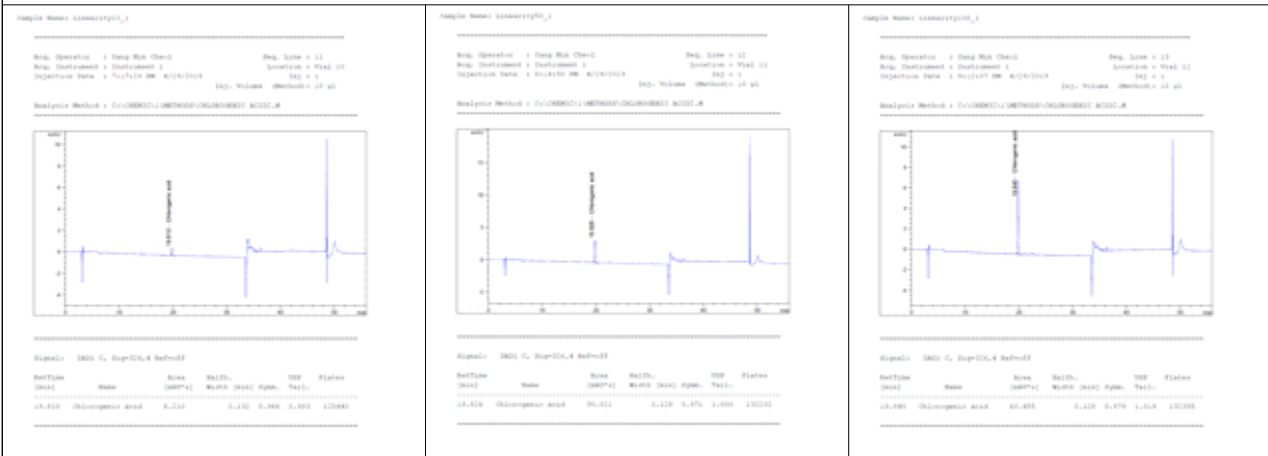


특이성 클로로겐산 표준품 PDA spectra

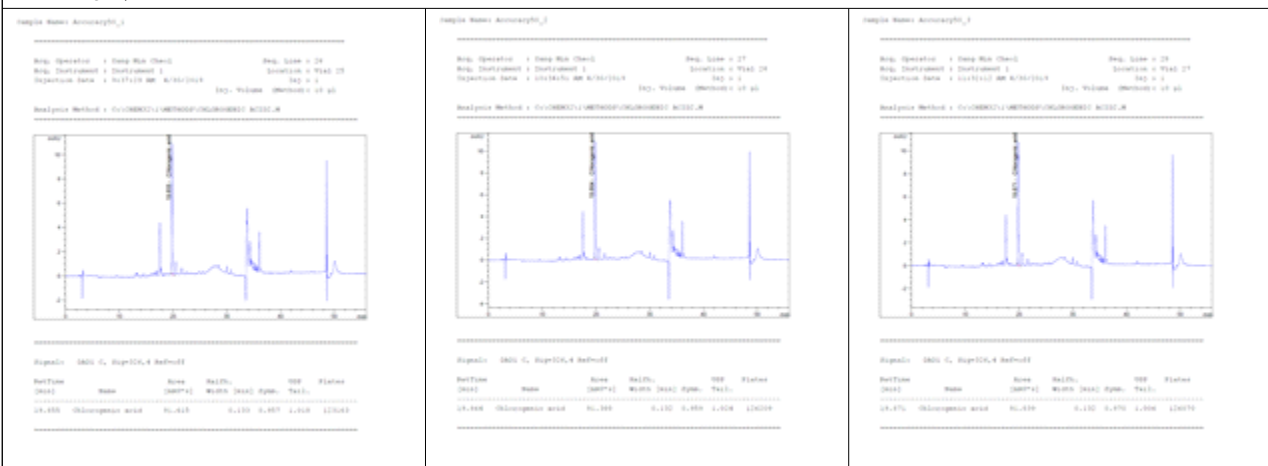


특이성 샘플 PDA spectra

● 직선성



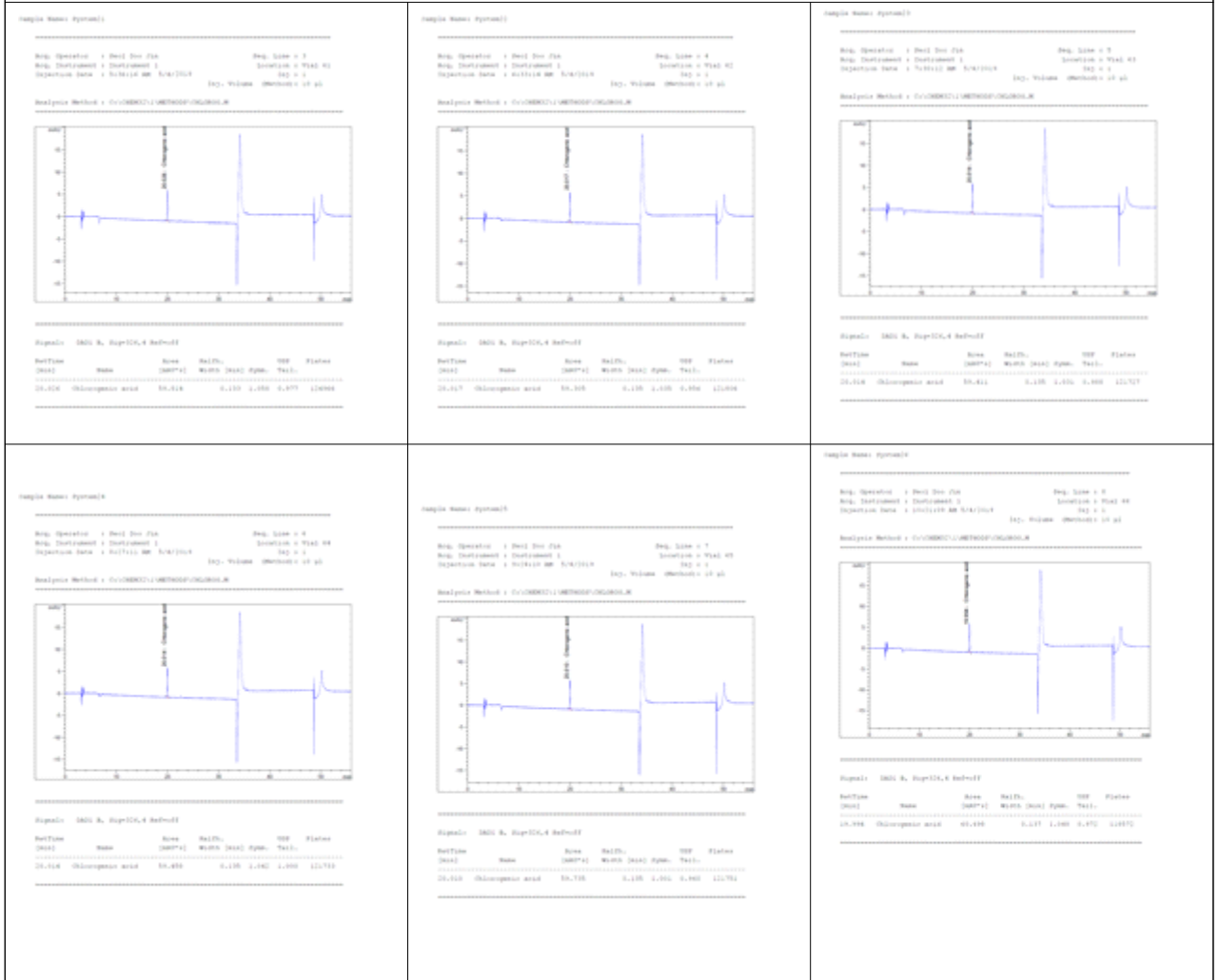
● 정확성



● 정밀성



● 반복성



○ 게르마늄미나리추추물의 chlorogenic acid 함량 결과

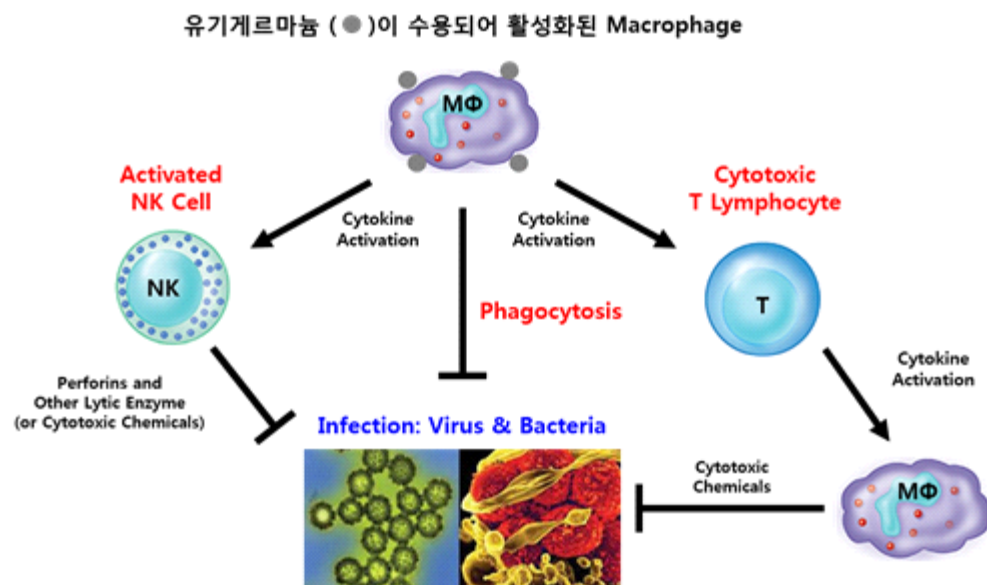
구분	Con.	Mean (ug/ml)	SD	RSD	Content (ppm)
Chlorogenic acid	19.60	19.50	0.48	2.47	1,950.36
	18.98				
	19.93				

## 결 론

- 미나리추출물의 LC/MS 분석결과, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, isorhamnetin등이 주요 지표성분으로 검출됨.
- 이들 성분들은 면역활성에도 영향을 끼치는 것으로 알려져 있음.
- Chlorogenic acid를 지표성분으로 하여 밸리데이션을 실시함.
- 게르마늄미나리추출물 내 chlorogenic acid의 함량은 0.195% 함유됨.

## 카. 기전연구

- (1) 세포실험에서 게르마늄 미나리 추출물에 의한 사이토카인 (IL-1b, IL-6) 등의 감소, NO의 감소, IFN-r의 증가를 확인함.
- (2) 정상 마우스 동물실험에서도 게르마늄 미나리 추출물에 의한 IFN-r의 증가와 NK cell의 활성화를 확인함.
- (3) 면역저하 동물모델에서는 게르마늄 미나리 추출물에 의한 처리를 통해 정상 대조군에 근접하는 용량의존적인 사이토카인 (IL-1b, IL-6, IL-12, TNF-a, IFN-r) 등의 변화와 NK cell 활성화를 확인함.
- (4) 게르마늄 미나리 추출물에 의한 Macrophage의 활성이 야기되어 NK cell, phagocytosis 그리고 cytotoxic T 활성화를 통한 cytotoxic chemical에 의한 감염원의 제거 및 면역증강에 도움을 주는것으로 판단됨.



## 결 론

- 게르마늄 미나리 추출물에 의한 Macrophage의 활성이 야기되어 NK cell, phagocytosis 그리고 cytotoxic T 활성화를 통한 cytotoxic chemical에 의한 감염원의 제거 및 면역증강에 도움을 주는것으로 판단됨.



타. 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청

[별지 제1호서식]

(앞쪽)

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서		처리기간		
		120일	60일	
신청인	대표자	정재준		
	업체명(기관명)	(주)아리바이오	영업의 종류 허가/신고/등록번호	제조업, 건강기능식품 20150008001
		소재지	(주소) 경기도 성남시 수정구 창업로 42, 520호 (전화번호) 070-746-2-9491	(Fax) 031-376-2980
	수입건강 기능식품	수리번호		
		수출국		
제조회사				
소재지				
원료명		케르마늄미나리추출물		
<p>「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.</p> <p style="text-align: right;">2020년 1월 10일</p> <p style="text-align: center;">신청인 정재준 (서명 또는 인)</p> <p>식품의약품안전처장 귀하</p>				
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 제출자료 1부</li> <li>2. 제출자료 수록 저장매체(CD 등) 1개</li> <li>3. 원료, 제품 또는 시제품</li> <li>4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품</li> <li>5. 국내·외 시험·검사기관이 발행한 시험성적서</li> </ol>		<p>수수료</p> <p>신규 1,900,000원</p> <p>변경 800,000원</p>		
<p>※ 제출자료</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 제출자료 전체의 총괄 요약본</li> <li>2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료</li> <li>3. 제조방법에 관한 자료</li> <li>4. 원료의 특성에 관한 자료</li> <li>5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</li> <li>6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</li> <li>7. 안전성에 관한 자료</li> <li>8. 기능성 내용에 관한 자료</li> <li>9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</li> <li>10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료</li> </ol>				

210mm×297mm[일반용지 60g/m<sup>2</sup>(재활용품)]

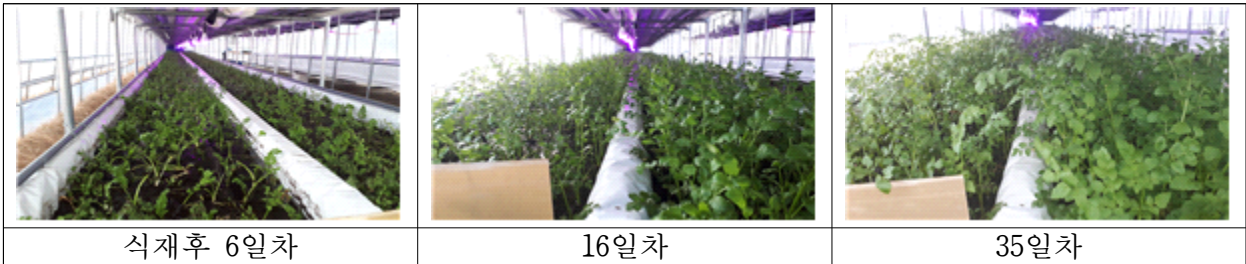
## 결 론

- 게르마늄 미나리 추출물의 건강기능식품 기능성원료 인정 신청 완료함.

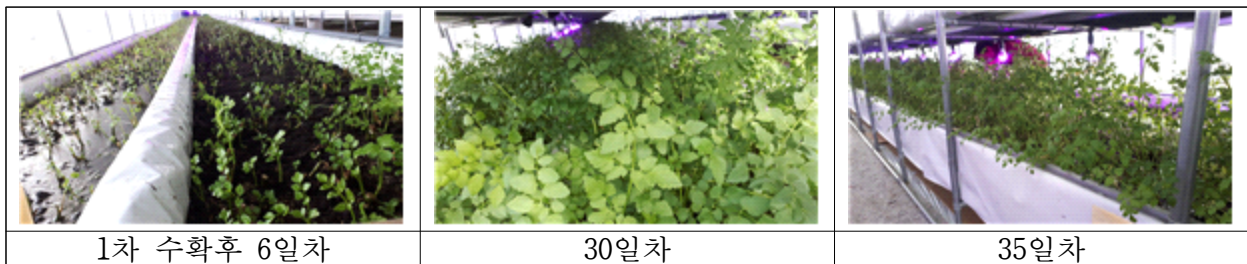
### 8. 3차년도 참여기관(블루마운트) 연구개발 및 결과

#### 가. 대량재배 생산 조건 확립

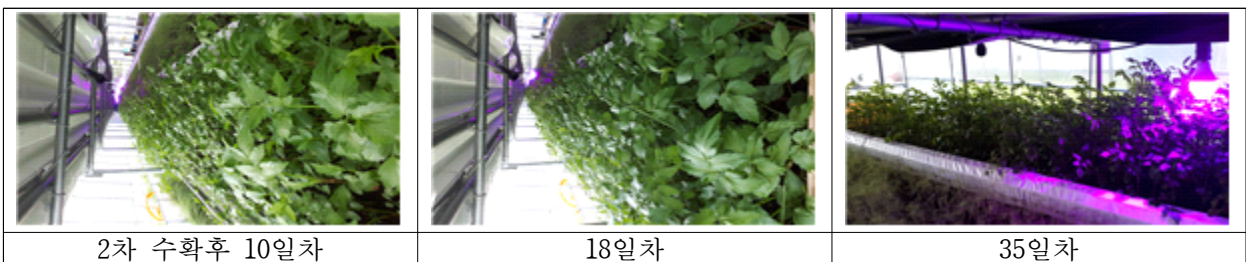
(1) 수경상토재배 대량생산 수행: 2019년 4월 1일~ 5월 6일



(2) 수경상토재배 대량생산 수행: 2019년 5월 13일~ 6월 18일



(3) 수경상토재배 대량생산 수행: 2019년 6월 28일~ 8월 3일



- 1~3차 대량생산을 수행하여 하기와 같은 수확량 확보하여 대량생산 시스템 완료함.
- 수확한 미나리의 건조: 60℃에서 3일동안 건조기에서 건조



수확횟수	원물 수확량 (kg)	건조량 (kg)	건조수율 (%)
1차	45	4.6	10.2
2차	43	4.25	9.9
3차	51	5.1	10

### 결 론

- 대량생산 확립 완료하여 3회에 걸쳐 원물 약 139kg 생산하였음.
- 대형 건조기를 통하여 건조수율 약 10%의 건조미나리를 확보함.

### 나. 임상시료 및 시제품용 게르마늄미나리

- 임상시료용 게르마늄 미나리 제공 완료
- 시제품용 게르마늄미나리 제공 완료



## 결론

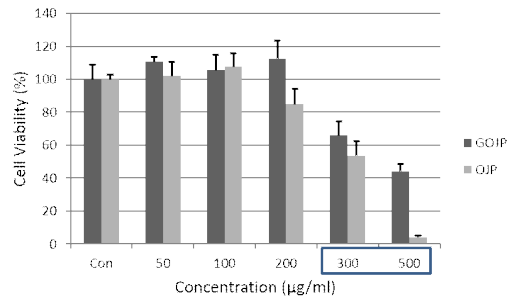
- 임상시료용 게르마늄 미나리 제공 완료
- 시제품용 게르마늄미나리 제공 완료

### 9. 3차년도 참여기관(청주대 산학협력단) 연구개발 및 결과

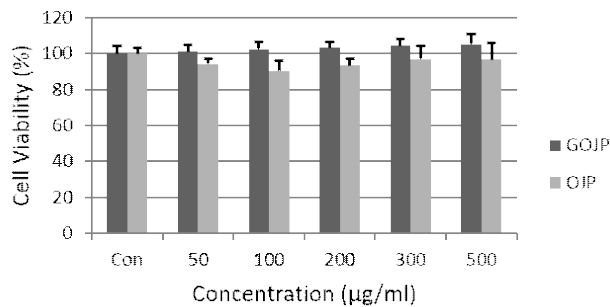
#### 가. 유기 게르마늄을 함유한 미나리의 세포 시험

##### (1) 세포생존률

- 대식세포인 RAW 264.7 세포를 24-well plate에 well당  $5 \times 10^4$ 개로 분주한 후 세포배양 조건에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 10% FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 갈아주고 일정농도의 시험물질을 처리하여 세포를 24시간 배양. MTT용액 (0.5% 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 well에 100  $\mu$ L씩 넣고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 배양. 배양액을 제거한 다음 dimethylsulfoxide 용액 1000  $\mu$ L씩을 넣고 10분간 흔들. ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정.



A. FBS 함유되지 않은 DMEM에서의 cell viability



B. 10% FBS 함유 DMEM에서의 cell viability

Fig . 게르마늄 미나리 추출물의 FBS 유무 따른 cell viability

## 결론

- Lipopolysaccharide로 유도된 마우스 대식세포인 RAW 264.7 Mouse Macrophage에서 게르마늄 미나리 시료를 각 농도 (50, 100, 200, 300, 500  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 후 게르마늄이 함유되지 않은 대조군과 비교하였을 때, FBS를 함유하지 않았을 때 300  $\mu\text{g/ml}$ 부터 독성이 확인되었음.
- 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서는 OJ, GOJ 모두 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 독성이 없었음.

## (2) Cytokine 분석

대식세포인 RAW 264.7 세포에 시험물질을 일정시간 처리한 후 일정량의 자극원을 처리하여 37°C에서 일정시간 배양함. 원심분리 후 상층액을 취하고, 염증성 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등)을 ELISA kit을 이용하여 측정함.

### ▶ 자연살해세포에서 선천성 면역증강 효과

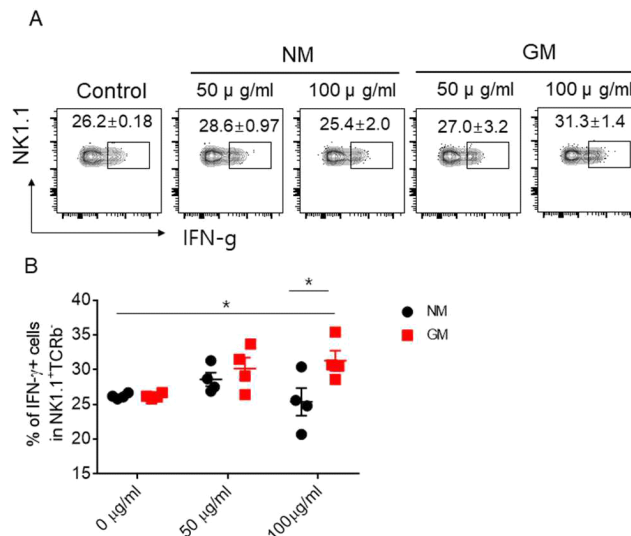


Figure 2. Effects of NM and GM on natural killer cell.

## 결론

- 마우스 비장에서 분리한 자연살해세포(Natural Killer cell, NK 세포)에 일반 미나리 추출물(NM)과 유기 게르마늄 함유 미나리 추출물(GM)을 각각 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 4일간 배양한 후 유세포분석기를 통해 IFN-g의 분비능을 측정하여 면역증강 효과를 확인하였음.
- 유기 게르마늄 함유 미나리 추출물 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 면역세포군에서 면역 활성화 사이토카인(cytokine)인 인터페론 감마(Interferon gamma, IFN gamma)의 발현이 대조군이나 일반 미나리 군에 비해 현저히 증가하였음.

(3) CD8T세포(획득면역세포)에서의 면역증강 효과

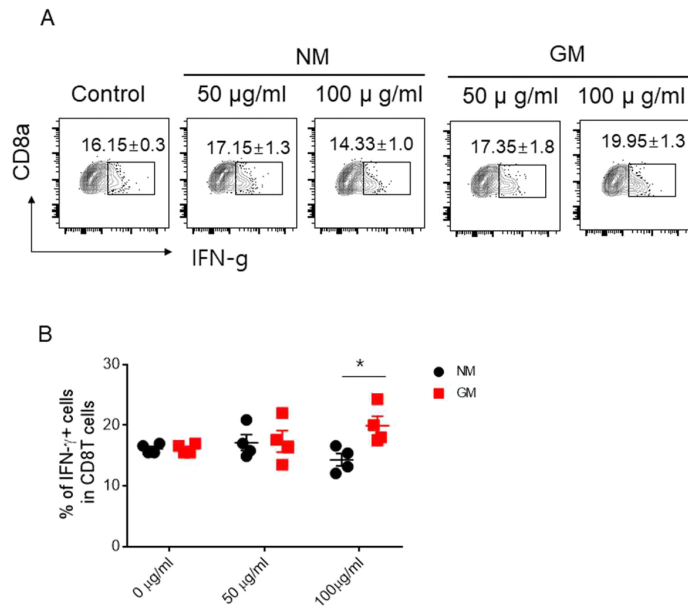


Fig . Effects of NM and GM on CD8a cells.

**결론**

- 일반 미나리 추출물 처리군에 비해 유기 게르마늄 미나리 추출물을 처리한 CD8 T림프구(CD8T cells)군에서 분비하는 인터페론 감마(Interferon gamma, IFN gamma)가 유의하게 증가하였음.
- 유기 게르마늄 함유 미나리 추출물에서 가장 면역증강 효과가 높은 농도는 100ug/ml였고, 이 농도로 처리시 대조군이나 일반미나리 추출물에 비해 마우스 비장의 면역세포중 자연살상세포 (NK 세포) 또는CD8 T림프구(CD8T세포)에서 인터페론 감마(Interferon gamma, IFN gamma)의 발현이 현저히 증가하는 것으로 나타나, 유기 게르마늄 함유 미나리 추출물의 면역증강 효과를 확인하였음.

(4) NO 측정

- NO는 반감기가 5초~4분 이내의 매우 불안정한 유리 라디칼이기 때문에 NO측정은 실제적으로 불가능함. 따라서, Griess방법에 준해서 배양액에 포함되어 있는 NO<sub>2</sub>를 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생산을 산정한다. 96 well plate의 각각의 well에 RAW 264.7 세포를 1 X 10<sup>5</sup> cell/ml를 분주하고 RAW 264.7 배양세포에 시료를 48시간 동안 처리한 후, 그 배양액을 ELISA reader를 이용하여 nitrite를 측정하고, 양성대조물질로는 lipopolysaccharide(LPS)를 사용함.

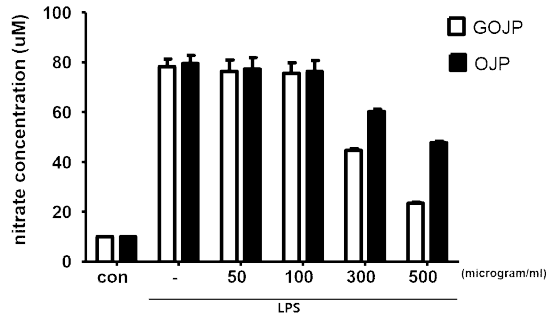


Figure . Nitric oxide inhibition test in RAW 264.7 Mouse Macrophages.

Lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL)를 처리 한 후, 게르마늄 미나리 시료의 각 농도 (50, 100, 125, 250 µg/mL)에서 48시간 동안의 nitric oxide 생성 억제능 비교 실험 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , as compared with positive control)

**결론**

- Lipopolysaccharide로 유도된 마우스 대식세포인 RAW 264.7 mouse macrohage에서 게르마늄 미나리 시료를 각 농도 (31.25, 6.25, 125, 250 µg/mL)로 처리하였을 때, LPS 처리 후 게르마늄 미나리 시료 농도 300 µg/ml 이상 처리 시 nitrate 농도가 유의하게 감소함. (\*\* $P < 0.01$ ).

10. 사업화성과 및 매출실적

○ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.13 억원
			향후 3년간 매출	1 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.013 억원
			향후 3년간 매출	0.5 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

○ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	1,000			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.14	1.5	3	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				



### 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 1절 목표

- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리 추출물의 면역 개선 건강기능식품 개발 (1~3년차)  
(종합연구내용) : 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리추출물의 고부가 가치형 추출물 및 핵심 지표/기능성 성분의 규명과 이의 목표 대비 약리 및 기전 평가를 확보함과 동시에 임상연구를 통한 농산물의 고부가가치화 창출 및 농가의 신규 수익모델 제시 및 국내외 면역개선 소비자 요구 충족형 기능성 식품 개발(산업화)을 연구 목표로 함
- 후보 농산물(산형과, 콩과)의 gene library 구축 (참여기관, 농업기술연구소)
  - 미나리의 gene map 구축(원산지 판별, 원료의 표준화)
- 고농도 유기 게르마늄 함유 농산물 수경재배법 확립 (참여기관, 농업법인 자체 기술개발)
  - 다변량 통계기법을 활용한 재배, 고농도 게르마늄(약 240ppb) 수경재배에 따른 농작물의 최적 성장 조건 및 Ge함량 분석
- 유기 Ge 분석법 개발 (아리바이오 자체 기술개발)
  - 품종 별 유기 Ge 함량 비교 및 경제성 평가
  - LC-MS, ICP 기반 유기 Ge 분석법 개발
- 고농도 유기 게르마늄 함유 농작물 추출물의 전 성분 프로파일링 (아리바이오 자체 기술 개발)
  - LC-MS/MS, LC-UV/Q-orbitrap 기반 고농도 유기 Ge 미나리의 전 성분 분석
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 안전성 확보 (아리바이오 위탁 기술개발)
  - in vitro, in vivo, clinical study를 통한 안전성 확보
  - NOAEL, LD<sub>50</sub> 함량설정
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 면역증진 기능성 확보 (아리바이오, CRO 위탁 기술 개발)
  - 고농도 유기 Ge함유 미나리 추출물의 면역증진 기능성 비교분석연구
  - in vitro, in vivo, clinical study를 통한 면역기능 증진 효과 연구
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리의 가공방법 개발 및 제품화 (아리바이오 자체 기술개발)
  - 유기 Ge 고함량 가공방법(전처리, 분쇄, 추출, 농축, 건조 등) 개발
  - 제형화 연구 및 안정성 검증 실험
- 고농도 유기 게르마늄 함유 미나리추출물의 건기식 개별인정형 원료신청 (아리바이오 자체 진행)
  - MFDS 건기식 기능성원료(면역증강, 개별인정형)신청

#### 2절 목표 달성여부

<Table 3-5> 연차별 연구개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)	연구결과
1차 년도	독성/효능자료 조사	특허, 논문, 정부보고서 등의 검색	100	○ 독성 조사 - 게르마늄 미나리는 초기 개발 단계로 관련 자료가 거의 없음.

(2017)				<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 과거(전통적) 섭취량 조사</li> <li>○ 효능조사 - 미나리가 다른 작물에 비해 중금속 흡수 능력이 뛰어나.</li> </ul>
	기능·지표물질 선정	지표물질 밸리데이션	100	○ 후보 지표 물질을 Ge-132로 설정을 하여 HPLC, HPLC/MS/MS로 분석 가능성 및 밸리데이션 가능성 확인 중
	원료 규격 설정	공인기관 성적서를 통한 규격 원재료 규격 설정	100	○ 건조 미나리 분말을 공인기관인 기능식품 연구원에 분석 의뢰하여 결과를 획득. (잔류농약 : 5종 불검출(BHC, DDT, aldrin, dieldrin, endrin), 중금속 : 납 0.0658mg/kg, 카드뮴 0.0872mg/kg, 수은 0.0026mg/kg, 비소 0.0190mg/kg), 미생물 : 일반세균 6,600,000/g, 대장균 음성, 대장균균 양성, 영양분석 : 열량 316.7kcal/100g, 탄수화물 38.74%, 조단백질 30.47%, 조지방 4.43%, 수분 7.53%, 회분 18.83%, 나트륨 173.84mg/100g, 불포화지방산 2.11g/100g)
	Lab. scale 추출조건 선정	온도, 용매 등에 따른 추출 조건 확립 및 원산지 별 지표성분 함량 및 수율 확인	100	○ 기본적인 열수추출을 바탕으로 온도, 시간, 추출 횟수 등에 따른 수율 및 지표물질 함량을 확인하여 추출공정 정립 중.
	게르마늄 미나리의 수경 재배	Ge 고함량 재배법 개발	100	○ 40일 재배 후 미나리의 게르마늄 함량은 약 40mg/kg로 측정 되었고, 성장속도가 일반 미나리 보다 느려 출하가 10일 정도 지연됨. 게르마늄 함량과 성장 속도를 높이기 위한 실험 진행 중.
	세포, 동물에서의 독성 평가	in vitro toxicity	100	○ MTS assay를 이용하여 CCD-986sk 세포에 대한 독성실험 결과, 시료 농도 1,000 µg/ml에서도 정상군에 비해 모두 90%이상의 세포생존율을 보임
2차년도 (2018)	품종별 미나리 생육조건 시험	하우스재배에 적합한 미나리 종자에 대한 생육조건을 시험함.	100	○ 미얀마산 종자가 생육이 좋음.
	품종 선택을 위한 시중 유통 미나리 중의 게르마늄 함량조사	시중 유통중인 미나리의 게르마늄 함량을 비교하였음.	100	○ 게르마늄 함량 1.31~15.54ppm으로 확인됨.
	게르마늄 미나리 수경재배시 독성 조사	게르마늄 농도별 공정수의 처리에 따른 미나리의 독성규명 진행하였음.	100	○ 게르마늄 함량 10ppm에서의 생육이 적합한 것으로 확인됨.
	고농도 게르마늄 공정수 재배시 독성 규명	123ppm이 함유된 공정수에 미나리 재배를 통한 재배양상 및 독성	100	○ 10일째 성장은 유사하였으나, 고농도 게르마늄으로 뿌리가 썩는 양상 나타남. 고농도 게르마늄 공정수에서 게르마늄 함량이 10.5ppm으로 흡수율이 떨어져 나옴.
	미나리의 부위별 게르마늄 흡수특성 규명	미나리의 품종을 선택하여 게르마늄 재배후 부위별 게르마늄 함량을 측정하였	100	○ 미나리 잎, 줄기, 전체 등에서 게르마늄 함량이 1006~115ppm으로 유사한 함량으로 전체를 사용하도록 함.

	음.		
미나리의 수경 재배 최적화	수경재배시 씨앗 및 발근 따른 성장률 확인	100	○ 노지>하우스(발근)>하우스(씨앗)등으로 순으로 성장률이 좋았음. 발근으로 하우스에서 상토재배 검토.
수경 재배법에 다른 성장률 조사	하우스내에서 수경재배, 수경재배/LED, 상토재배에 따른 성장률 비교	100	○ 하우스 내 상토재배가 수경재배보다 2배 성장률 좋고, LED를 사용하는 것이 1.5배의 성장률 보임. ○ 하우스 내 상토재배가 오염관리 및 품질관리가 용이.
대량 재배법의 최적화를 통한 대량재배 확립	하우스내에서 수경재배, 수경재배/LED, 상토재배 뿐만 아니라 원통형 수경 재배를 통하여 대량재배법 최적화를 수행할 예정	100	○ 경제성 및 편리성을 위하여 최적화 진행하고 있음.
게르마늄 미나리의 부위별 게르마늄 함량 분석	미나리의 품종을 선택하여 게르마늄 재래후 부위별 게르마늄 함량을 측정하였음.	100	○ 게르마늄 미나리 건물에서 131.9ppm, 추출물의 무기 게르마늄은 0.2ppm, 유기 게르마늄은 108.18pm 분석됨.
게르마늄 미나리의 무기 및 유기 게르마늄 함량 분석	당사 GMP 공장에서 보유한 ICP장비 및 LC/MS로 게르마늄 미나리 원물 및 추출물에서의 무기 및 유기 게르마늄의 함량 분석을 수행함.	100	○ Pilot 규모의 추출시, 게르마늄 미나리 회수율은 8.8%, 게르마늄 함량 회수율은 6.8%로 확인됨.
Pilot scale 생산공정 개발	게르마늄 미나리 10kg를 pilot 규모로 추출하여 공정별 수율 및 게르마늄 함량을 측정하였음.	100	○ 대량 추출 후, 농축, 동결건조하여 게르마늄 함량을 측정한 결과, 116.68ppm으로 확인됨.
대량 생산조건 확립	생산규모의 증대를 위한 mass scale 추출제조공정 확립(100kg, 추출기에서의 추출용매, 추출온도, 추출 시간, 추출횟수, 필터방법, 건조방법, 수율 확립)	100	○ 게르마늄 미나리 원료(100kg)를 최적의 추출조건과 동일한 추출조건으로 생산규모를 증대하여 대량 추출 후, 농축, 동결건조하여 게르마늄 함량을 측정한 결과, 116.68ppm으로 확인됨.
In vivo 독성 및 효능평가 시험 시료의 안정성 시험	In vivo 독성 및 효능평가 시험용 조제물의 냉장 8일 및 상온 4시간 안정성을 실시하였음.	100	○ 저농도, 고농도 게르마늄 미나리 추출물의 냉장 8일 및 상온 4시간동안 성상과 게르마늄 함량의 변화가 없이 안정하였음.
In vitro 에서의 RAW 264.7 세포 독성 및 효능시험	RAW 264.7에서 게르마늄 미나리 추출물의 세포 독성 및 효능시험을 수행함.	100	○ CCK assay를 이용하여 RAW 264.7 세포에 대한 생존률 실험 결과, LPS 처리 후 게르마늄 미나리 시료 농도 300 µg/ml 이하에서 정상군에 비해 모두 90%이상의 세포생존율을 보임. ○ NO 활성결과에서 nitrate ELSIA kit을 이용하여 RAW 264.7 세포에 대한 NO 활

				<p>성량을 확인한 결과, LPS 처리 후 게르마늄 미나리 시료 농도 300 µg/ml 이상 처리 시 nitrate 농도가 유의하게 감소함.</p> <p>○ Cytokine 생성 실험에서 TNFα와 IL-6의 ELSIA kit을 이용하여 RAW 264.7 세포에 대한 염증유발성 사이토카인의 분비량을 확인한 결과, LPS 처리 후 게르마늄 미나리 시료 농도 300 µg/ml 이상 처리 시 염증유발성 사이토카인 농도가 유의하게 감소함.</p>
CLP-CPA 질환동물 모델에서 <i>In vivo</i> 효능시험	기 입증된 면역기능개선 기능성원료를 대조군으로 하여 면역저하 모델 (CLP-CPA)에서의 체중, 장기무게, 혈액학적 분석, 혈액 생화학 분석, 비장세포 증식반응, 조직검사 등을 실시하여 면역 증진의 효능 검증하였음.	100	<p>○ 게르마늄미나리 추출물 400, 200 및 100 mg/kg은 적어도 본 실험의 조건 하에서, NF-<math>\kappa</math>B 발현 증가와 관련된 T 및 B 세포와 NK 세포의 활성을 통해 CPA에 의한 조절억제에 따른 면역억제 및 돌연변이원성을 동일한 용량의 EAP와 유사한 정도로 투여 용량의존적으로 현저히 억제하는 것으로 관찰되었음.</p> <p>○ 또한 최종 희생시 정상 매체 대조군에서 수집, 배양한 비장 세포에 대한 MTT 세포 독성 결과, 모든 게르마늄 추출물 처리군 (0.01 ~ 10 mg/ml)에서 무처리 대조군 (0 mg/ml)에 비해 의미 있는 세포 생존률의 변화는 인정되지 않았음.</p>	
GLP 독성시험 (Biototech)- 단회투여독성시험	단회 경구 투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하였음.	100	<p>○ 게르마늄 미나리 추출물을 랫드에 단회 경구 투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.</p>	
GLP 독성시험 (Biototech)- 반복투여독성시험	반복 경구 투여시 나타나는 독성반응을 평가하고, 13주 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하였음.	100	<p>○ 게르마늄 미나리 추출물을 암수 랫드에 2주간 반복 경구투여한 결과, 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000mg/kg/day로 설정해도 될 것으로 판단됨.</p>	
GLP 독성시험 (Biototech)- 비설치류 최대 내성용량결정시험	일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구 투여시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였음.	-	<p>○ 12월중 완료 예정.</p>	
GLP 독성시험 (Biototech)- 13주 반복투여독성시험	13주 반복 경구 투여시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시함.	-	<p>○ 12월중 완료 예정.</p>	
GLP 독성시험 (Biototech)-	히스티딘 요구성 인 살모넬라균 ( <i>Salmonella</i> )	100	<p>○ 시험물질의 생육저해 없음.</p> <p>○ 시험물질의 침전 없음. 음성 (Negative).</p>	

	유전독성시험 (복귀돌연변이 시험)	<i>typhimurium</i> )과 트립토판 요구성 인 대장균 ( <i>Escherichia coli</i> )을 이용하여 유전자돌연변이 유발성을 검토함.		
	GLP 독성시험 (Biototech)- 유전독성시험 (염색체이상 시험)	염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/1U) cell line)를 이용하여 검토함	100	○ 음성 (Negative).
	GLP 독성시험 (Biototech)- 유전독성시험 (소핵시험)	마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토함.	100	○ 용량결정 예비시험 결과, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg으로 본시험 진행 중. ○ 12월중으로 완료 예정.
	인체시험용 시험약/위약제조	인체적용시험용 대조약과 시험약을 생산하기 위하여 임상 원료의 예비 안정성과 생산을 수행하고 있음. 시험약과 위약의 구분이 유사한 색, 향, 맛으로 제조, 섭취량이 1,000mg/day의 용량으로 58명분 12주 분량	100	○ 임상원료 3개월 안정성 확인함. ○ 제천 GMP에서 임상시험 3kg씩 제조위해 원물 생산 중. ○ 갈색 capsule 제형 ○ 250mg capsule로 1일 2회, 1회 2capsule 복용 가능한 제형으로 제조 예정
	인체적용시험 IRB신청 및 승인	인체적용시험을 위한 protocol, CRF 작성, IRB 승인신청 및 승인	100	○ 미나리추출물의 면역력 예방과 증진에 미치는 인체적용시험 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교중심연구 ○ 임상기관-한국체육대학교/ CRO-제너럴바이오텍, IRB신청 및 승인 완료 ○ 만 19세이상 만 65세이하의 남성 또는 여성으로서 건강하고 정상적인 신체활동이 가능한자로서, 말포혈액 WBC가 $4 \times 10^3/\mu\text{l}$ 이상 ~ $8 \times 10^3/\mu\text{l}$ 이하인 자 ○ 유효성 평가항목: 선천면역, 적응면역, 면역글로불린등을 평가할 예정임.
	특허 출원	특허출원 “게르마늄이 함유된 미나리추출물” 진행함.	100	○ 특허출원번호 10-2018-0134119, 우선권주장 10-2018-0157123
3차년도 (2019)	GLP 독성시험 (Biototech)- 비설치류 최대 내성용량결정시험	일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구 투여시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였	100	○ 암수 각 2마리의 비글견에 시험물질을 500->1,000>2,000mg/kg을 5일 간격으로 용량증가 단회 경구 투여시, 암수모두 최대 내성용량 (MTD)는 2,000mg/kg을 상회함.

	협	음.		
GLP 독성시험 (Biotoxtech)- 13주 반복투여독성시험		13주 반복 경구 투여시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시함.	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 게르마늄 미나리추출물 대조군(주사용수), 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg으로 13주간 경구투여 결과, 체중, 사포섭취량, 안과학적 검사, 노검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서 시험물질에 기인한 독성변화 없음.</li> <li>○ 조직병리학적 결과, 암수 5,000mg/kg/day에서 독성변화 없음.</li> </ul>
GLP 독성시험 (Biotoxtech)- 유전독성시험 (소핵시험)		마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토함.	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시험 최고 용량 5,000mg/kg으로 공비 2 적용하여 2,500, 1,250mg/kg으로 수컷 마우스에서 시험한 결과, 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 차이가 없음.</li> <li>○ 음성 (Negative)</li> </ul>
제형연구		pouch, capsule, powder 등에 대한 formulation 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 게르마늄 미나리 추출물 분무건조과우더를 액상 소형과우치로 제조하여 보았음. - 잔존향이 남아 식감이 떨어짐.</li> <li>○ 게르마늄 미나리 추출물과 텍스트린 비율 각각 99:1 혼합 후 동결건조 진행. 이산화규소(1%), 스테아린산 마그네슘(1%)을 첨가하여 capsule 제형으로 개발완료. 이 제형으로 임상 진행</li> </ul>
시제품제작		GMP 시설하에서 건강기능식품 원료 제조	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시제품 원료 3batch 제조</li> <li>○ 건강기능식품 캡슐제형 1건</li> </ul>
기능성 원료의 공인기관 시험성적		잔류농약, 중금속, 미생물, 영양분석, 게르마늄 함량 : 3batch에 대한 공인기관 시험성적	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ (잔류농약 : 5종 불검출(BHC, DDT, aldrin, dieldrin, endrin), 중금속 : 납 0.0658mg/kg, 카드뮴 0.0872mg/kg, 수은 0.0026mg/kg, 비소 0.0190mg/kg), 미생물 : 일반세균 6,600,000/g, 대장균 음성, 대장균균 양성, 영양분석 : 열량 316.7kcal/100g, 탄수화물 38.74%, 조단백질 30.47%, 조지방 4.43%, 수분 7.53%, 회분 18.83%, 나트륨 173.84mg/100g, 불포화지방산 2.11g/100g), 게르마늄 함량.</li> </ul>
인체적용시험		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미나리추출물의 면역력 예방과 증진에 미치는 인체적용시험; 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 중심 연구</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선천면역 1차 유효성 평가변수인 NK cell activity에서 대조군 대비 유의한 효과가 나타남.</li> <li>○ 적응면역 1차 유효성 평가변수인 IL-2에서 대조군 대비 유의한 효과가 나타남.</li> <li>○ 적응면역 1차 유효성 평가변수인 IFN-r에서 대조군 대비 유의한 효과가 나타남.</li> <li>○ 인체적용시험 기간동안 총 58명에서 3건 대조군 3명의 경도1의 이상반응이 나타났지만, 인체적용시험용 식품</li> </ul>

				<p>과의 관련성에서 모두 ‘관련이 없다고 생각됨’으로 시험책임자 (전문의)에 의해 판단되었으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 3명의 대상자들은 일시투여를 통하여 완전치유를 확인하고, 재 투여하여 인체적용시험 완료.</li> <li>○ 안전성검사항목은 혈액학적검사, 혈액 화학적검사, 면역청학적검사,노검사로 나누어 평가하였고, 모든 항목에서 정상범위내에서 변화량이 나타나 안전성에 이상이 없는 것으로 판단됨.</li> <li>○ 인체적용시험에 참여한 인원중 중대한 이상반응 발생은 없었으며, 시험물질과 관련된 어떠한 이상반응이나 부작용이 나타나지 않아 안전한 물질로 판단됨.</li> </ul>
	기전연구	in vitro, in vivo, 인체 적용시험으로 이어지는 기전제시	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 게르마늄 미나리 추출물에 의한 Macrophage의 활성이 야기되어 NK cell, phagocytosis 그리고 cytotoxic T 활성화를 통한 cytotoxic chemical에 의한 감염원의 제거 및 면역증강에 도움을 주는것으로 판단됨.</li> </ul>
	기능성원료 신청	면역기능개선에 도움을 줌	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 게르마늄 미나리 추출분말 로서 1,000mg/일</li> <li>○ 지표성분: Ge 108~162ug/g</li> <li>○ 성장: 게르마늄 미나리 추출분말로서 이미·이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색 분말</li> </ul>
	특허	특허등록 및 특허출원	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 특허등록 제2039912호 “ 게르마늄 함유 미나리 추출물”</li> <li>○ 특허출원 10-2019-0120592 “세포독성을 억제 및 면역 활성을 제공하는 유기 게르마늄을 함유하는 미나리 추출물”</li> </ul>
추가 연구	in vivo 효능평가	정상마우스모델에서의 일반미나리와 게르마늄미나리의 효능비교	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 비장 NK cell 활성은 정상대조군 대비 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400mg/kg 처리군에서 33.33%, 64.5%의 증가를 나타냄.</li> <li>○ 복강 NK cell 활성은 정상대조군 대비 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400mg/kg 처리군에서 30.46%, 58.05%의 증가를 나타냄.</li> <li>○ 비장조직내에서의 NO 수치는 정상대조군 대비 일반미나리추출물과 게르마늄미나리추출물 400mg/kg 처리군에서 30.57%, 42.23%의 감소를 나타냄. IL-1β의 경우도 TNF-α와 동일하게 대조군과 비교하여 각각 33.33%, 40.06% 감소함을 확인함. IL-6, 12의 경우도 정상 대조군과 비교하였을 때, 일반미나리추출물은 2개의 cytokine 인자들이 각각 23.30%, 17.96% 감소,</li> </ul>

				<p>게르마늄미나리추출물의 경우 각각 38.52%, 29.09% 감소함을 확인함.</p> <p>○ IFN-<math>\gamma</math>의 경우 일반미나리추출물 및 게르마늄미나리추출물에서 모두 증가하는 경향을 보였으며, 각각 정상 대조군과 비교하여, 22.72%, 50.92% 증가함.</p>
미나리추출물에서의 추가 지표성분 설정 및 밸리데이션	게르마늄 미나리추출물에서의 추가 지표성분을 규명하고 이에 대한 밸리데이션을 수행	100	<p>○ 미나리추출물의 LC/MS 분석결과, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, isorhamnetin등이 주요 지표성분으로 검출됨.</p> <p>○ 이들 성분들은 면역활성에도 영향을 끼치는 것으로 알려져 있음.</p>	



<Table 3-6> 최종 연구개발 목표 달성도

성과목표	목표 달성여부	첨부
제조공정 확립 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 게르마늄미나리 건조물에 물을 20배 첨가하여 상온추출 진행. 착즙 및 여과 진행 후 원심분리과정과 농축을 진행하고, 게르마늄미나리 추출물과 텍스트린 비율 각각 99:1 혼합 후 분무건조 진행. 함습 방지를 위해 이산화규소(1%), 스테아린산 마그네슘(1%)을 첨가하여 최종원료 제조.</li> <li>○ 제조보고서 및 3 lot 생산한 작업지시서 첨부하였음.</li> </ul>	첨부-01
지표(기능)성분설정, 원료 규격 설정 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품공전, 건강기능식품공전, 식품첨가물공전의 규격에 부합하는 성상(색, 형태, 물성 등), 영양분석(단백질, 탄수화물, 지방, Na, 회분 등)의 공인시험 성적서 및 시험방법 첨부하였음</li> <li>○ 게르마늄 함량을 분석한 결과, 135±27ug/g 일정 함량이 유지되고 있으며, 기능(또는 지표)성분의 표준품도 일반적으로 상용화 되어 있으므로 추후 품질관리에 용이한 성분임을 확인하였음.</li> <li>○ 자사에서 실시한 특이성, 직진성, 정확도, 회수율, 정밀도, 범위에 대한 밸리데이션 결과보고서</li> <li>○ 자사에서 실시한 안정성에 대한 보고서</li> </ul>	첨부-02 첨부-03 첨부-04
전임상 효능평가 및 기전확인 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Raw를 이용하여 게르마늄미나리 추출물의 cytokine, INF-r, NK cell 활성화와 관련된 면역 효능을 검증하여 KCI급 논문 1편을 게재하였음</li> <li>○ CLP (면역저하 마우스) 모델에서의 체중, 혈청화학검사, 조직검사, cytokine, INF-r, NK cell activity 등을 실시하여 면역 개선의 효능을 확인하여 SCI급 논문 1편을 신청하였음.</li> <li>○ in vitro/in vivo 기전제시: in vitro 및 정상 마우스에서의 in vivo에서 게르마늄미나리추출물에 의한 cytokine의 감소, INF-r, NK cell 활성화를 통한 면역기능개선 효과를 확인하였음.</li> <li>○ 면역저하 동물모델에서의 in vivo 기전제시: 면역저하 edhanfahepf에서의 in vivo 연구에서 게르마늄미나리추출물에 의한 정상 수치까지에 근접하는 cytokine의 증가, INF-r, NK cell 활성화를 통한 면역기능개선 효과를 확인하였음.</li> </ul>	첨부-05 첨부-06 첨부-07 첨부-08 첨부-09
in vitro, in vivo 독성평가 [달성률 100%]	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주관기관 아리바이오에서는 GLP 기관(바이오톡스텍) 에서 단회독성, 4주 반복독성, 복귀돌연변이, 소핵시험, 염색제이 상시험을 실시하여 게르마늄미나리는 안전한 원료임을 확실히 입증하였음</li> </ul>	첨부-10 첨부-11 첨부-12 첨부-13 첨부-14

인체적용시험 [달성률 100%]	○ 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80%이상, 1,000mg/day 투여용량에서 biomarker 2개 이상 유의성 확보, 심각한 이상증상 없이 인체시험 기간 내에 시험완료한 임상기관 보고서	첨부-15
시제품제작 [달성률 100%]	○ GMP시설에서 확립된 제형의 시제품 생산(건강기능식품 및 기능성화장품) ○ 시제품 시안 2건 (소포장 차우치 1종, 캡슐제제 1종)	첨부-16 첨부-17
기능성 인증 신청 [달성률 100%]	○ 식약처 개별인정형 기능성 인정 신청 서류 작성 ○ “면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음” 으로 신청	첨부-18

<Table 3-7> 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수, 백만원)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	2	1		1	1	1	10		6			2	-	-	-	-	-	1	1
1차년도	-	-		-	-	-	-		2			-	-	-	-	-	-	-	-
2차년도	1	-		-	-	-	-		2			-	-	-	-	-	1	1	-
3차년도	2	1		1	1	1	13.4		12			2	1	-	-	-	-	-	1
소 계	3	1		1	1	1	13.4		16			2	1	-	-	-	1	1	1

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



- 목표 미달성 시 원인(사유): 홍보전시는 3차년도에 미나리 발효식품으로 개발하여 판매하고자 2019년도 제천한방바이오에 참가하여 제품소개를 한 바 있으나, 기능성식품으로는 기능성원료의 개별인정을 받은 후 개발목표 진행중이므로 개발이 안 되었음.
- 그 외, 모든 연구개발성과 및 성과목표 완료.
- 후속연구로는 본 연구성과를 바탕으로 in vitro 효능실험과 면역과민환자를 대상으로 인체적용시험을 통하여 게르마늄미나리의 “면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움” 을 주는 기능성 규명을 위한 연구 계획 중.
- 식약처 개별인정형 “면역기능개선에 도움을 줄 수 있음” 으로 인증을 획득 예정임.

## 4장 연구결과의 활용 계획 등

구분	구체적인 내용
활용계획 및 활용방안	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술적 측면               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 천연물의 기능우수성을 통한 국내산 원료에 대한 연구개발 투자증대</li> <li>- 국내산 천연물의 건기식 기능성원료 인증을 통한 기술력증대로 해외 기능성 인증 획득을 위한 기반구축</li> <li>- 기능성 제품을 통한 간기능 개선으로 건강한 사회구현</li> <li>- 우수한 품질의 국내산 농산물의 기능성원료로의 개발을 통한 연구기반 구축과 더불어 다른 우수 농수축산물의 고기능성화 기반마련</li> <li>- 천연물의 기능성발굴을 통한 고부가가치 제품개발의 기초데이터 제공</li> <li>- 국내 건기식 개별인증 로드맵 뿐만 아니라 해외 건기식 인증 로드맵 구축을 통한 다른 원료의 단기간, 저비용으로 인증획득 및 판로확보</li> <li>- 기능성 평가를 위한 R&amp;D 모델 및 biomarker 구축을 통한 연구경쟁력 향상</li> </ul> </li>   <li>○ 경제적·산업적 측면               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 농산물 수출품목의 다변화 및 수출증대</li> <li>- 기능성 농산물로서 소비자의 기능성 니즈 충족</li> <li>- 과학적 검증을 통한 고부가가치 Ge함유 미나리 생산으로 지역경제활성화</li> <li>- 고소득 작물로 인한 귀향인구 증대로 지역균형발전</li> <li>- 농민들의 수출경쟁력 강화로 FTA를 활용한 판매처 다변화</li> <li>- 고소득 작물로 인한 농가 소득증대와 안정적인 판로 확보</li> <li>- 국내 건강기능식품 시장의 국내산 원료 점유율 증대</li> <li>- 국민 건강증진에 따른 산업전반의 생산성 향상 및 의료비 절감</li> <li>- 농산물의 고부가가치화 기반기술 확보</li> <li>- 활용실적 및 기술인증 측면 활용방안</li> <li>- 식약처에 건강기능식품 기능성 원료 신청(면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음) 완료</li> <li>- 추후, “면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움”으로 추가 기능성 <u>인증 추진</u></li> </ul> </li> </ul>

	<p>○ 활용계획</p> <table border="1" data-bbox="432 248 1417 857"> <thead> <tr> <th colspan="2">구분</th> <th>활용 분야</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">제품화</td> <td>원료</td> <td>- 기존의 건기식 제품에 기능성 증강을 위한 첨가로 리뉴얼되는 제품 - 일반식품에 기능성 원료 첨가제품: 건강기능식품 (간기능 개선용), 우유 및 유제품류(요거트, 치즈 등), 대용식(인스턴트음식), 음료류</td> </tr> <tr> <td>완제품</td> <td>게르마늄 미나리를 주성분으로 하는 건강기능식품</td> </tr> <tr> <td>신산업</td> <td colspan="2">면역증강제 및 암치료 보조제</td> </tr> <tr> <td>원천기술</td> <td colspan="2">면역증강에 대한 면역저하 실험모델 확립 및 이를 통한 건강기능식품 기능성원료 개발 및 천연물신약 효능평가 모델로 활용</td> </tr> <tr> <td>후속연구</td> <td colspan="2">게르마늄 미나리의 기능성분 확보 및 이 성분의 천연물신약 (면역치료제)으로 개발</td> </tr> </tbody> </table>	구분		활용 분야	제품화	원료	- 기존의 건기식 제품에 기능성 증강을 위한 첨가로 리뉴얼되는 제품 - 일반식품에 기능성 원료 첨가제품: 건강기능식품 (간기능 개선용), 우유 및 유제품류(요거트, 치즈 등), 대용식(인스턴트음식), 음료류	완제품	게르마늄 미나리를 주성분으로 하는 건강기능식품	신산업	면역증강제 및 암치료 보조제		원천기술	면역증강에 대한 면역저하 실험모델 확립 및 이를 통한 건강기능식품 기능성원료 개발 및 천연물신약 효능평가 모델로 활용		후속연구	게르마늄 미나리의 기능성분 확보 및 이 성분의 천연물신약 (면역치료제)으로 개발	
구분		활용 분야																
제품화	원료	- 기존의 건기식 제품에 기능성 증강을 위한 첨가로 리뉴얼되는 제품 - 일반식품에 기능성 원료 첨가제품: 건강기능식품 (간기능 개선용), 우유 및 유제품류(요거트, 치즈 등), 대용식(인스턴트음식), 음료류																
	완제품	게르마늄 미나리를 주성분으로 하는 건강기능식품																
신산업	면역증강제 및 암치료 보조제																	
원천기술	면역증강에 대한 면역저하 실험모델 확립 및 이를 통한 건강기능식품 기능성원료 개발 및 천연물신약 효능평가 모델로 활용																	
후속연구	게르마늄 미나리의 기능성분 확보 및 이 성분의 천연물신약 (면역치료제)으로 개발																	
<p>추가 연구의 필요성 및 타 연구 응용</p>	<p>○ 후속 연구의 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역저하 및 질환관련 환자의 증가</li> <li>- 본 과제를 통해 in vivo 효능연구에서 게르마늄 미나리의 면역기능 개선에 긍정적 영향 확인</li> <li>- “면역기능개선에 도움을 줄 수 있음” 와 “면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움” 의 2중 기능성 획득을 통해 시장 진입 교두보로써 활약 기대</li> </ul> <p>○ 후속 연구내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- “면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움” 에 대한 In vitro/In vivo 추가 연구 진행</li> <li>- 면역질환 환자대상으로 인체적용시험 진행</li> </ul>																	
<p>기업화 추진방안</p>	<p>○ 상용화 형태 : 건강기능식품</p> <p>○ 수요처 : GS홈쇼핑, 네이처스팜, CJ제일제당, CJ healthcare, 굿지앤</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CJ 제일제당 건강기능식파트 건강식품센터와 개발소재에 대한 의견 교환 - 면역기능개선부분에 대한 개발요구</li> <li>- CJ healthcare: 제품개발센터와 건식원료(면역기능개선)에 대한 미팅</li> <li>- 신규소재 및 기능성에 대한 관심이 높음</li> <li>- 롯데홈쇼핑: 식품생활팀 MD(GS홈쇼핑 MD)와 신규소재에 대한 미팅 진행, 임상시험 제품 및 섭취를 기반으로 한 제품구성(예상 1일 2회, 1회 2정, 12주 복용분)</li> <li>- 네이처스팜: 대표이사과 약국전문유통에 대한 제품개발 의견교환</li> </ul>																	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 굿지앤: 스타 마케팅(현재 신동엽, 신현준) 활약</li> <li>○ 예상 단가 : 3~5만원(1개월 분)</li> <li>○ 개발 투입인력 및 기간 : 개발인력 20명, 개발기간 1년</li> </ul>
사업화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본사(제천)에 건강기능식품 GMP 제조시설 보유</li> <li>○ 본사에 건강기능식품 제품개발실 보유</li> <li>○ 본사에 제품디자인실 운영</li> </ul>
사업화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성원료 인정획득 후 완제품의 인정획득까지 3개월 이상이 소요됨으로 과제종류 후 1차년도에 완제 시제품이 나옴. 과제 종료전에 원료제품과 게르마늄 미나리 추출물이 부원료로 첨가된 건기식 제품 출시</li> <li>○ 소비자들의 반응분석과 시제품개선작업을 통하여 과제종류 후 2년차에 본격적인 상품판매를 개시함</li> </ul>
비즈니스 모델	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ BM 수립 배경: 면역 질환자가 급격히 증가되고 있으나 이에 대한 건강기능식품에 대한 연구는 활발하지 못함</li> <li>○ BM 목표 및 핵심경쟁요인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- BM 목표: 면역개선을 필요로 하는 사람들이 우선적으로 고려하는 제품</li> <li>- 핵심경쟁요인: 기존에 나와 있는 제품의 경우, 기능면에서 한정되거나 과학적인 근거가 부족하거나, 수입품인 경우이다. 그러나 게르마늄 미나리는 국내에서 생산되고 과학적인 근거제시와 광범위한 면역기능 개선으로서 영문으로도 친근하게 느껴지고 사랑스럽게 느껴지는 게르마늄 미나리로서 항산화능력이 다른 제품에 비하여 월등하기 때문에 효능면에서도 우수함</li> </ul> </li> <li>○ 목표 시장 구조 <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 경쟁기업 현황 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 게란티제약: 효모바이오게르마늄라는 제품으로 온라인 판매 중</li> </ul> </li> <li>(2) 경쟁구조 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개별인정형 원료인 경우 독점적인 공급 이점이 있기에 개발회사가 우선인 경우가 많음</li> <li>- 시장접근성이 제한되어 있어 시장성이 높은 원료를 가진 회사가 우월적 지위를 가짐</li> </ul> </li> <li>(3) 시장진입 장벽 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유통시장에서 기존의 원료에 대한 신뢰성과 신규원료에 대한 의문성</li> <li>- 홈쇼핑시장에서는 신규원료에 대한 호응이 높음</li> <li>- 게르마늄 미나리의 국내산 공급이 부족함</li> <li>- 현재 게르마늄미나리 추출물 원가가 높아 대량생산을 통한 원가절감이 필요</li> </ul> </li> </ol> </li> </ul>

	<p>▶ 수익 확보 전략</p> <p>(1) 주요 고객군</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 스트레스와 과로가 많은 직장인, 수험생, 승진준비자, 노화 진행자, 비만자 등</li> </ul> <p>(2) BM의 수익창출 방안</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 직접수익(원료와 제품의 판매)</li> </ul>
<p>일반식품으로서의 산업화 추진방안</p>	<p>▶ 상용화 형태 : 일반식품(가공식품, 간편식, 음료 등)</p> <p>▶ 수요처 : 네이처스팜, 지오영, 굿지앤</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 네이처스팜: 기존 미나리 추출물이 함유되어 있는 “스마트스프링” 과 “미나린” “리프레쉬미” 으로 사업화를 진행 중에 있으며, 추후 더 많은 제품을 출시 할 계획을 가지고 있음</li> </ul> <div data-bbox="427 840 1412 1052" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 지오영 : 아리바이오는 국내 약국 유통회사 “지오영” 과 업무협약을 진행하여, 제품개발부터 홍보/마케팅까지 시장진출을 성공적으로 이끌 수 있는 통합 비즈니스 형태를 갖추고 있음. 이에 게르마늄 미나리를 활용하여 제품개발 및 판매까지 지오영과 협업 진행</li> </ul> <div data-bbox="890 1310 997 1523" style="text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 굿지앤 스타 마케팅(현재 신동엽, 신현준)을 활용하여, 제품 홍보 진행 현재 일반 식품으로 2개 제품(강황 및 숙취음료)이 개발되었으며, 추후 게르마늄 미나리가 함유된 식품으로 시장 진출을 위해 협업 진행</li> </ul>
<p>국내산 게르마늄 미나리의 원물확보 방안</p>	<p>▶ 기업간 연계(공급계약)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 블루마운트 영농조합법인에서는 국내산 게르마늄 미나리의 사업화를 위한 게르마늄 미나리 재배 하우스를 2동 확보하고 있으며, 당사에서</li> </ul>

	<p>는 블루마운트에서 원료 수급을 받을 예정임.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 제천 한방바이오밸리 단지내 천연물LED재배연구소 활용 방안 (제천시-세명대 협업)</li> <li>- 아리바이오에서는 국내산 게르마늄 미나리 생산량 증가를 위해 계절적 제한이 있는 게르마늄 미나리 재배를 위한 부지 수급도 검토 중에 있으며, 제천에 위치한 천연물 LED 재배연구소와의 원료수급 계약을 통한 수경재배 게르마늄 미나리를 공급받기 위한 계획을 추진하고 있음.</li> </ul>
--	--

## 붙임. 참고문헌

1. Promphet P, Bunarsa S, Sutheerawattananonda M, et al. Immune enhancement activities of silk lutein extract from *Bombyx mori* cocoons. *Biological research*. 2014;47(1):15.
2. Grady C. HIV: epidemiology, immunopathogenesis, and clinical consequences. *The Nursing clinics of North America*. 1988;23(4):683-696.
3. Clark MA, Goheen MM, Cerami C. Influence of host iron status on *Plasmodium falciparum* infection. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:84.
4. Wagner H, editor *Immunomodulatory agents*. Proc. Alfred Benzon Symp.; 1983.
5. Heroor S, Beknal AK, Mahurkar N. Immunomodulatory activity of methanolic extracts of fruits and bark of *Ficus glomerata* Roxb. in mice and on human neutrophils. *Indian journal of pharmacology*. 2013;45(2):130.
6. Park J-C, Yu Y-B, Lee J-H. Isolation of Steroids and Flavonoids from the Herb of *Oenanthe javanica* Dc. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 1993;24.
7. Park JH, Cho JH, Kim IH, et al. *Oenanthe javanica* extract protects against experimentally induced ischemic neuronal damage via its antioxidant effects. *Chinese medical journal*. 2015;128(21):2932.
8. Kim TH, Ku SK, Bae JS. Persicarin is anti-inflammatory mediator against HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in CLP-induced sepsis mice. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(4):696-703.
9. Kwon D, Yoon S, Carter O, et al. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Angelica keiskei*, *Oenanthe javanica* and *Brassica oleracea* in the *Salmonella* mutagenicity assay and in HCT116 human colon cancer cells. *Biofactors*. 2006;26(4):231-244.
10. Lee C-H, Park J-H, Cho J-H, et al. Effect of *oenanthe javanica* extract on antioxidant enzyme in the rat liver. *Chinese medical journal*. 2015;128(12):1649.
11. Ai G, Huang Z-M, Liu Q-C, et al. The protective effect of total phenolics from *Oenanthe Javanica* on acute liver failure induced by D-galactosamine. *Journal of ethnopharmacology*. 2016;186:53-60.
12. Han Y-Q, Huang Z-M, Yang X-B, et al. In vivo and in vitro anti-hepatitis B virus activity of total phenolics from *Oenanthe javanica*. *Journal of ethnopharmacology*. 2008;118(1):148-153.
13. Nakamura T, Saito M, Aso H. Effects of a lactobacilli, oligosaccharide and organic germanium intake on the immune responses of mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2012:1201312783-1201312783.



14. Jung B-G, Lee J-A, Lee B-J. Antiviral effect of dietary germanium biotite supplementation in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of veterinary science*. 2013;14(2):135-141.
15. Jung M, Shin M-K, Cha S-B, et al. Supplementation of dietary germanium biotite enhances induction of the immune responses by foot-and-mouth disease vaccine in cattle. *BMC veterinary research*. 2014;10(1):179.
16. Nakamura T, Takeda T, Tokuji Y. The oral intake of organic germanium, Ge-132, elevates  $\alpha$ -Tocopherol levels in the Plasma and modulates hepatic gene expression profiles to promote immune activation in mice. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2015;84(3-4):0183-0195.
17. Chen X-T, Li J, Wang H-L, et al. Immunomodulating effects of fractioned polysaccharides isolated from Yu-Ping-Feng-Powder in cyclophosphamide-treated mice. *The American journal of Chinese medicine*. 2006;34(04):631-641.
18. Yoon H-S, Kim J-W, Cho H-R, et al. Immunomodulatory effects of *Aureobasidium pullulans* SM-2001 exopolymers on the cyclophosphamide-treated mice. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2010;20(2):438-445.
19. Song MY, Ku SK, Han JS. Genotoxicity testing of low molecular weight fucoidan from brown seaweeds. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(3-4):790-796.
20. Lee WH, Choi SH, Kang SJ, et al. Genotoxicity testing of *Persicariae Rhizoma* (*Persicaria tinctoria* H. Gross) aqueous extracts. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(1):123-134.
21. Kim JW, Choi J-S, Seol DJ, et al. Immunomodulatory effects of kuseonwangdoga-based mixed herbal formula extracts on a cyclophosphamide-induced immunosuppression mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018.
22. Ku SK, Kim JW, Cho HR, et al. Effect of  $\beta$ -glucan originated from *Aureobasidium pullulans* on asthma induced by ovalbumin in mouse. *Archives of pharmacal research*. 2012;35(6):1073-1081.
23. Cerqueira F, Cordeiro-Da-Silva A, Gaspar-Marques C, et al. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T-and B-lymphocyte proliferation. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2004;12(1):217-223.
24. Kruisbeek AM. Isolation of mouse mononuclear cells. *Current protocols in immunology*. 2000;39(1):3.1. 1-3.1. 5.
25. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*. 1986;94(1-2):57-63.

26. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Chemical mutagens*: Springer; 1976. p. 31-53.
27. Heddle J, Stuart E, Salamone M. The bone marrow micronucleus test in *Handbook of mutagenicity test procedures* (Kilbey, BJ, Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Eds.). Elsevier, Amsterdam; 1984.
28. Clark BD, Bedrosian I, Schindler R, et al. Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *Journal of Applied Physiology*. 1991;71(6):2412-2418.
29. Hubbell HR, Kvalnes-Krick K, Carter WA, et al. Antiproliferative and immunomodulatory actions of  $\beta$ -interferon and double-stranded RNA, individually and in combination, on human bladder tumor xenografts in nude mice. *Cancer research*. 1985;45(6):2481-2486.
30. Park JC, Lee YJ, Choi HY, et al. In vivo and in vitro antitumor effects of platycodin d, a saponin purified from platycodi radix on the h520 lung cancer cell. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014.
31. Shi S-R, Chaiwun B, Young L, et al. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1993;41(11):1599-1604.
32. Kim C, Kang M, Lee Y, et al. Bathing effects of various seawaters on allergic (atopic) dermatitis-like skin lesions induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene in hairless mice. *Evid Based Complement Altern Med*. 2015; 2015: 179185. Pubmed | Crossref | Others.
33. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*. 1981;6(2):145-151.
34. Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1997;24(3-4):294-296.
35. Choi J-S, Kim J-W, Park JB, et al. Blood glycemia-modulating effects of melanian snail protein hydrolysates in mice with type II diabetes. *International journal of molecular medicine*. 2017;39(6):1437-1451.
36. Lim JM, Lee YJ, Cho HR, et al. Extracellular polysaccharides purified from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 (Polycan) inhibit dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *International journal of molecular medicine*. 2018;41(3):1245-1264.
37. Acharya D SA. *Indigenous Herbal Medicines: Tribal Formulations and Traditional Herbal Practices*. 1st ed. Jaipur(India). 2008. (Aavishkar Publishers).

38. Kajaria D, Tripathi JS, Tiwari SK, et al. Immunomodulatory effect of ethanolic extract of Shirishadi compound. *Ayu*. 2013;34(3):322.
39. Fox JG. *Laboratory animal medicine*. Elsevier; 2015.
40. Tajima Yi, Horiuchi S. *Biological reference data book on experimental animals*. Soft Science, Tokyo. 1989:1-10.
41. MIYAUCHI A, KIRAMINE C, TANAKA S, et al. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice: flow cytometry analysis. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1990;162(2):147-167.
42. Chargari C, Toillon RA, MacDermid D, et al. Concurrent hormone and radiation therapy in patients with breast cancer: what is the rationale? *The lancet oncology*. 2009;10(1):53-60.
43. Renner H. In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutation Research Letters*. 1990;244(2):185-188.
44. Grochow LB. *Covalent-DNA binding drugs*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. (The Chemotherapy Source Book).
45. Hosseinimehr SJ, Karami M. Citrus extract modulates genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2005;57(4):505-509.
46. Hu Q, Xu J, Chen L. Antimutagenicity of selenium-enriched rice on mice exposure to cyclophosphamide and mitomycin C. *Cancer letters*. 2005;220(1):29-35.
47. Sodikoff CH. *Laboratory profiles of small animal diseases: a guide to laboratory diagnosis*. Mosby Inc.; 2001. (Ed. 3).
48. Samira S, Ferrand C, Peled A, et al. Tumor necrosis factor promotes human T-cell development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells*. 2004;22(6):1085-1100.
49. Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: *Immunology an introduction*. Vol. 155-69. Philadelphia: Saunders; 1995. (R. TI, editor.).
50. Unanue ER. The Mononuclear-Phagocytic System. In: *Immunology an introduction*. Philadelphia: Saunders; 1995. (R. TI, editor.).
51. Lan T, Chang L, Wu L, et al. IL-6 plays a crucial role in HBV infection. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2015;3(4):271.
52. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, et al. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*. 1997;176(2):439-444.

53. Kaliński P, Hilkens C, Snijders A, et al. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *The Journal of Immunology*. 1997;159(1):28-35.
54. Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993;260(5107):547-549.
55. Xun C, Thompson J, Jennings C, et al. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood*. 1994;83(8):2360-2367.
56. Du XF, Jiang CZ, Wu CF, et al. Synergistic immunostimulating activity of pidotimod and red ginseng acidic polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Archives of pharmacal research*. 2008;31(9):1153-1159.
57. Cho C-W, Han C-j, Rhee YK, et al. Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *International journal of biological macromolecules*. 2015;72:519-525.
58. Ha ES, Hwang SH, Shin K-S, et al. Anti-Metastatic activity of glycoprotein fractionated from *acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Archives of pharmacal research*. 2004;27(2):217-224.
59. Yu M-H, Im H-G, Lee H-J, et al. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2006;38(1):128-134.
60. Burnet M. The Helper T-Cell Responses. In: *Immunology an introduction*. Vol. 139. Philadelphia: Saunders; 1995. (editor TI, editor.).
61. Brasier AR. The NF- $\kappa$ B regulatory network. *Cardiovascular toxicology*. 2006;6(2):111-130.
62. Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680.
63. Gilmore TD. The Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999;18(49):6842.
64. Tian B, Brasier AR. Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent progress in hormone research*. 2003;58(1):95-130.
65. Smith EM, Gregg M, Hashemi F, et al. Corticotropin releasing factor (CRF) activation of NF- $\kappa$ B-directed transcription in leukocytes. *Cellular and molecular neurobiology*. 2006;26(4-6):1019-1034.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 유기게르마늄 함유 고부가가치 미나리생산 및 면역증진 건강기능식품 원료개발		
	(영문) Production of high value-added water celery containing organic germanium and development of ingredient of immune enhancement health functional foods		
주관연구기관	(주)아리바이오		주 관 연 구 (소속) (주)아리바이오
참 여 기 업	블루마운트 영농조합법인 청주대학교 산학협력단		책 임 자 (성명) 서보승
총연구개발비 (967,000 천원)	계	967,000	총 연 구 기 간 2017.08.30.~2019.12.31(2년5개월)
	정부출연 연구개발비	725,000	총 인 원 19명
	기업부담금	242,000	총 참 여 수 내부인원 13명
	연구기관부담금		외부인원 6명

○ 연구개발 목표 및 성과

- ✓ 게르마늄미나리 수경재배법 확립
  - 게르마늄미나리 수경재배 시설 확보 및 수경재배 최적화 완료
  - 게르마늄미나리 수경재배를 통한 대량생산 기술 확립
  - 시제품을 위한 원물 및 판로개척을 위한 게르마늄미나리 생산 완료
- ✓ 게르마늄미나리 추출물 제조기술 확립 및 생산기술
- ✓ 게르마늄 분석법 확립 및 밸리데이션을 통한 표준화 기술 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물 내 추가 지표성분 규명 및 밸리데이션을 통한 표준화 기술 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 in vitro 효능평가 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 in vivo 효능평가 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물과 일반미나리추출물의 in vivo 효능평가 비교 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 in vivo 독성평가 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 인체적용시험 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물 특허 등록 (제2039912호), 특허출원 3건
- ✓ 게르마늄미나리추출물 건강기능식품 기능성원료 신청

○ 연구내용 및 결과

- ✓ 게르마늄미나리 수경재배법 확립
  - 게르마늄미나리 수경재배 시설 확보 및 수경재배 최적화 완료: 상토수경재배 확립완료
  - 게르마늄미나리 수경재배를 통한 대량생산 기술 확립: 게르마늄미나리 대량재배시설 2동 확보
  - 시제품을 위한 원물 및 판로개척을 위한 게르마늄미나리 생산 완료: 게르마늄미나리 약 140kg

## 생산

- ✓ 게르마늄미나리 추출물 제조기술 확립 및 생산기술: 1톤 추출조, 1톤 농축조, Filter press, Spray dryer등을 통한 대량 추출, 농축, 건조 공정 확립하여 각 3.5~4kg 이상 생산
- ✓ 게르마늄 분석법 확립 및 밸리데이션을 통한 표준화 기술 완료: ICP, Q-orbitrap LC/MS/MS, HPLC 등을 통한 게르마늄 및 chlorogenic acid 분석법 및 밸리데이션 확립 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물 내 추가 지표성분 규명 및 밸리데이션을 통한 표준화 기술 완료: 게르마늄 미나리 추출물 내 지표성분의 ID 규명 및 chlorogenic acid의 밸리데이션 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 in vitro 효능평가 완료: *In vitro* 효능평가를 통하여 NO, cytokine (IL-1, IL6, IL12, TNF-a), IFN-r, NK cell activity를 확인 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 in vivo 효능평가 완료: 면역저하질환동물모델에서 *In vitro* 효능평가를 통하여 NO, cytokine (IL-1, IL6, IL12, TNF-a), IFN-r, NK cell activity를 확인 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물과 일반미나리추출물의 in vivo 효능평가 비교 완료: ICR 마우스에서 게르마늄 미나리추출물과 일반미나리추출물에서의 효능 비교를 실시하여 게르마늄의 면역기능 개선 효능을 확인 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 in vivo 독성평가 완료: GLP 기관인 켐온에서 게르마늄미나리추출물의 설치류에서 단회투여독성시험, 설치류에서 2주 반복투여독성시험, 설치류에서 13주 반복투여 독성시험, 비글견에서 단회 용량증가 독성시험 등에서 5,000mg/kg/day에서도 독성이 없음을 확인, 유전독성 (복귀돌연변이, 염색체이상시험, 소핵시험) 등에서 음성을 확인하여 고농도에서도 독성이 없음을 확인 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물의 인체적용시험 완료: 59명의 성인에서 12주동안 게르마늄미나리 추출물의 복용을 통한 선천면역(NK cell activity, TNF-a, IL-1, IL-6, IL-12), 적응면역(IL-2, IFN-r), 면역글로불린(IgG1, IgG2, IgM)을 평가한 결과, 대조군대비 유의성있는 결과를 확인 완료
- ✓ 게르마늄미나리추출물 특허 등록: “유기 게르마늄 미나리 추출물” 특허등록 제 3029912 호, 특허출원 10-2018-0134119, 10-2019-0178376, 10-2019-0120592, 3건 완료

## ○ 연구성과 활용실적 및 계획

- ✓ 국내산 농산물 수출품목의 다변화 및 수출증대
- ✓ 기능성 농산물로서 소비자의 기능성 니즈 충족
- ✓ 과학적 검증을 통한 고부가가치 Ge함유 미나리 생산으로 지역경제활성화
- ✓ 고소득 작물로 인한 귀향인구 증대로 지역균형발전
- ✓ 농민들의 수출경쟁력 강화로 FTA를 활용한 판매처 다변화
- ✓ 고소득 작물로 인한 농가 소득증대와 안정적인 판로 확보
- ✓ 국내 건강기능식품 시장의 국내산 원료 점유율 증대
- ✓ 국민 건강증진에 따른 산업전반의 생산성 향상 및 의료비 절감
- ✓ 농산물의 고부가가치화 기반기술 확보

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제 현황

		과제번호		817037-3	
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	기술사업화지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	유기게르마늄 함유 고부가가치 미나리생산 및 면역증진 건강기능식품 원료개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	(주)아리바이오			연구책임자	서보승
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2017.08.30.~2017.12.31	125,000	42,000	167,000
	2차년도	2018.01.01.~2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2019.01.01.~2019.12.31	300,000	100,000	400,000
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업	블루마운트 영농조합법인, 청주대학교 산학협력단				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2019년 12월 31일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)아리바이오	연구소장	서보승

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	817037-3		
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	기술사업화지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	유기케르마늄 함유 고부가가치 미나리생산 및 면역증진 건강기능식품 원료개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	(주) 아리바이오			연구책임자	서보승
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2017.08.30.~2017.12.31	125,000	42,000	167,000
	2차년도	2018.01.01.~2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2019.01.01.~2019.12.31	300,000	100,000	400,000
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업	블루마운트 영농조합법인, 청주대학교 산학협력단				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

### 2. 평가일 : 2019년 12월 31일

### 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)아리바이오	연구소장	서보승

### 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

<b>확약</b>	
-----------	--



## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 현재 국내에서는 면역기능 개선에 도움을 줄 수 있는 게르마늄 함유 식물 원료로 개발된 사항이 없음.
- 본 과제를 통한 게르마늄 함유 식품원료의 개별인정형 인증이 처음임.
- 고함량 게르마늄이 함유된 미나리의 재배기술과 추출기술 등을 포함한 원료제조기술 확립

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 게르마늄미나리 판매를 통한 농가소득원 확보
- 옥천 특용작물 재배 및 지역민 고용창출 발판 마련
- 개별인정형 인정후, 농가소득의 증대 및 건기식 판매를 통한 매출 증대

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 게르마늄활용 특용작물의 재배확대를 통한 농가소득 증대
- 주변 농가의 게르마늄 특용작물재배 기반 마련
- 게르마늄을 활용한 식품 및 건기식의 확대를 통한 매출 증대

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 지표성분 대량 추출기술 개발 및 지표성분 표준화 기술개발완료
- *in vitro* *in vivo* 효능 연구 및 MoA 규명 완료
- *in vivo* 독성 시험을 통한 안전성 확보
- 인체적용시험을 통한 안전성, 유효성 완료

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 자체 기술이전을 완료, 참여기업인 블루마운트 영농조합법인에서 게르마늄미나리의 판매를 통한 매출 (1,334만원).
- 특허등록 1건, 특허출원 3건, 논문 SCI급 2편 submission, 비SCI급 1편 publish 예정
- 총 16명의 고용창출 발생

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 2건	10	100	10-2018-0134119, 10-2019-0120592, 10-2019-0178376
특허등록 1건	10	100	게르마늄미나리 추출물 (제10-2039912호)
기술실시 1건	10	100	자체 기술실시로 개별인정 진행 중
제품화 1건	20	100	시제품 2건 완료 후, 최종 제품화 1건 완료
매출액 1천만원	20	134	게르마늄미나리 판매 134만원, 게르마늄나라분말함유 “스마트스프링” 판매 1200만원 매출 발생
논문 SCI 2건, 비 SCI 1건	-	-	KCI publish 1건, SCI submission 2건
고용창출 6명	20	100	과제로 인한 직간접적인 고용 창출 8명 달성
정책활용 1건	-	100	건강기능식품 규제관리 정책, 과제종료이후 추가 지원사업 정책제안 간담회
홍보실적 1건	5	100	2019년 제천한방바이오박람회 참가
기타 (연구활용) 1건	5	100	게르마늄 특용작물 재배 다양화 연구 진행
합계	100		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 게르마늄함유미나리의 “면역기능 개선에 도움을 줄 수 있음”에 도움을 주는 개별인정형 건강기능식품으로써의 과제를 수행함.</li> <li>- <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>에서의 안전성, 유효성을 확인하였고, 인체적용시험을 성공적으로 마침.</li> <li>- 이를 통한 특허 등록 1건과 특허출원 3건, 게르마늄미나리의 원물 및 상품화로 매출을 이루었음.</li> <li>- 향후 개별인정형 인증을 통한 매출증대 및 농가소득에 기여할 것임 .</li> </ul>
---

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 없음

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 과제의 목표인 개별인정형 신청 이후 면역개선에 도움을 주는 건강기능식품으로 개별인정을 받아 상품화를 진행하여 매출 증대에 기여할 것임.
- 청정 옥천에서 재배한 게르마늄미나리의 브랜드 마케팅을 통하여 홈쇼핑 진출을 진행할 것임.

## IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

### 1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

### 2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품	
연구과제명	유기게르마늄 함유 고부가가치 미나리생산 및 면역증진 건강기능식품 원료개발			
주관연구기관	(주)아리바이오		주관연구책임자	서보승
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	725,000	242,000		967,000
연구개발기간	2017. 08. 30. - 2019. 12. 31. ( 29개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 특허출원 2건, 특허등록 1건	특허출원 3건, 특허등록 1건 기존 목표 초과달성하였음.
② 기술실시 1건	기술실시 1건 기존 목표대로 달성하였음.
③ 제품화 1건	제품화 1건 기존 목표대로 달성하였음.
④ 매출액 천만원	매출액 1천 3.4백만원 기존 목표 초과달성하였음.
⑤ 고용창출 6명	고용창출 16명 기존 목표대로 달성하였음.
⑥ 논문 SCI 2편	논문 SCI 2편, 비 SCI 1편 기존 목표대로 달성하였음.
⑦ 정책활용	정책활용 2건
⑧ 홍보전시 1건	홍보전시 1건 (제천한방바이오박람회 참가) 기존 목표대로 달성하였음.
⑨ 기타활용 1건	게르마늄함유 브로콜리 재배 및 설포라판 함유 브로콜리 추출물 연구에 활용 기존 목표대로 달성하였음.
⑩ 인력양성	인력양성 4명

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		10		20	20		20								5	5		
최종목표	2	1		1		1	10		6		2				4		1	1		
연구기간내 달성실적	3	1		1		1	13.4		16		2	1					2	1	1	
달성율(%)	100	100		100		100	100		100		100						100	100		

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	게르마늄미나리 재배기술 확보
②	게르마늄미나리 대량 추출기술 및 제조기술
③	게르마늄미나리 추출물 분석기술 및 표준화
⋮	

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		V				V	V			
②의 기술				V				V		
③의 기술				V				V		
⋮										

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	게르마늄 브로콜리 재배를 통한 게르마늄 및 셀포라판의 함량 증대 연구에 활용 게르마늄 새싹삼 재배에 활용하여 고함량 Ginsenoside Re 증대연구
②의 기술	게르마늄브로콜리 및 게르마늄 새싹삼, 들의 등의 추출물 확보에 활용
③의 기술	Qorbitrap LC/MS/MS를 이용하여 Identification 및 표준화기술 적용
:	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시		
												SCI	비SCI							논문평균IF
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	10	10		10		20	20		20									5	5	
최종목표	2	1		1		1	10		6		2							1	1	
연구기간내 달성실적	3	1		1		1	13.4		16		2	1						1	1	1
연구종료후 성과창출 계획							10				1								1	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	게르마늄미나리추출물		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년 하반기
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

### 주 의

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