

11-154300
0-002769-
01

발간등록번호

11-1543000-002769-01

경제성 · 흡수율이 증진된 뼈건강소재 및 제품개발 최종보고서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품개발사업 R&D Report

경제성 · 흡수율이 증진된 뼈건강소재 및 제품개발 최종보고서

2019. 03. 29.

주관연구기관 / (주)유담
협동연구기관 / 단국대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “경제성·흡수율이 증진된 떡건강소재 및 제품개발(국민 떡건강 프로젝트)”(개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08.

주관연구기관명 : (주)유담 (대표자) 김 홍 석
협동연구기관명 : 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (대표자) 김 철 현



주관연구책임자 : 김 홍 석
협동연구책임자 : 오 충 훈
박 소 영
김 철 현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	31606203	해 당 단 계 연 구 기 간	2018. 01. 01 ~2018. 12. 31	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	경제성·흡수율이 증진된 뼈건강소재 및 제품개발 (국민 뼈건강 증진 프로젝트)			
연구책임자	김 홍 석	해당단계 참여연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 29명 내부: 29명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 780,000천원 민간: 260,000천원 계: 1,040,000천원
연구기관명 및 소속부서명	단국대학교 천안캠퍼스			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	보고서 213-218 p 참조		-	-	-	-	-	-	-	-	-

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

보고서 면수

- 뼈 건강 증진 소재 개발 및 제품 적용성 연구
 - 뼈 건강 증진 지역특산물 및 한방 소재 기능성 능력 탐색
 - ALP 활성 측정 및 골 강화 작용 측정을 통하여 조골세포 분화 촉진효과가 우수한 땅콩새싹과 작약 선발
 - TRAP 활성도 측정 및 골다공증동물모델 활용을 통한 땅콩새싹 및 작약의 파골세포분화억제 효과 확인 완료
 - 유단백 가수분해물 기능성 검증과 칼슘흡수 촉진 유펩타이드 생성 발효균주의 기능성 검증 및 제품적용가능성 검증 완료

- 지역특산물 및 한방 뼈 건강 기능 소재 활용 뼈 건강 유제품 3종의 제품화
 - 칼슘흡수증진+뼈건강소재 포함 우유 ‘나를위한땅콩새싹우유’ 1종 개발 완료
 - 뼈건강증진 소재 활용 ‘나를위한 땅콩새싹 요거트, 나를위한 작약 요거트음료’ 2종 개발 완료
 - 개발 제품의 뼈형성촉진능력 검증, 뼈파괴억제능력 검증 완료

- 신제품 3종 출시를 위한 개발된 제품의 상품화

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○체내 흡수율 및 활용도, 가공적성이 증진된 지역특산물 및 한방 소재 뼈 건강 기능 소재 2종 이상 개발 ○지역특산물 및 한방 뼈 건강 기능 소재를 활용한 뼈 건강 유제품 3종 이상 개발 ○골 형성에 영향을 미치는 뼈 건강 소재 탐색 연구 <ul style="list-style-type: none"> -충청권 지역특산물을 포함한 6종 이상의 뼈 건강 증진 기능성 탐색 및 1종 이상의 유효물질 도출 -뼈 건강 증진 한방소재 6종 이상 기능성 탐색 및 1종 이상 유효물질 도출 -충청권 지역특산물과 한방소재 추출물, 분리 동정된 유효물질의 라이브러리 구축 및 활용방안 탐색 -칼슘 흡수 증진 우유 유래 기능성 가수분해 조성물 및 유단백 소재 도출 -뼈 건강 증진 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 유효성 검증 ○뼈 건강 증진 소재 개발 및 제품 적용성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 유효 추출물 및 유효성분의 제품화를 위한 최적 포뮬러 개발 - 추출물의 대량 추출법, 지표성분 설정 및 분석법 개발 등 제품 표준화 기반 확보 - 소재 흡수율 증진을 위한 복합 소재 개발 연구 ○ 뼈 건강 특성화 우유 및 유제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 칼슘 흡수 증진 우유제품 개발 1종 - 뼈 건강 증진 소재를 활용한 2종 이상의 유제품 개발 - 칼슘 흡수 증진+뼈건강소재의 복합 포뮬러 포함한 우유 또는 유제품 개발 - 개발된 제품의 뼈 건강 증진 효과 검증 및 기존 제품과의 비교분석 ○ 개발된 제품의 상품화 <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 제품 판매를 위한 마케팅 전략 수립 및 유통 채널 확보 - 해외 수출을 위한 타당성 검토 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ (사업화 지표) 특허등록 6건, 기술이전 2건, 기술제품 상용화 3건 이상 및 고용 창출, 매출발생 등 ○ (지적재산권 출원) SCI급 논문 5편, 비 SCI급 2건 ○ (기술적 성과) 뼈 건강 소재 2종이상 개발, 제품화 3종 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 뼈 건강 복합 기능성 소재 및 개발제품에 대한 연구 결과를 토대로 골격계 질환 예방을 위한 제품 개발 기초 자료 제공 및 제시를 통해 산업체 및 연구자의 시행착오 감소로 국내 연구 경쟁력 및 제품 상용화를 제고 ○ 국내 천연물 소재에 우유 유래 가수단백질 및 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주를 이용한 뼈 건강 기능 우유(1종) 및 유제품(2종)의 신제품 개발을 통한 국내 시장 경쟁력 및 소비자 신뢰성을 확보하고 골격계 질병에 취약한 동남아 해외 수출 시장 확보 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>뼈 건강</p>	<p>칼슘 흡수 촉진</p>	<p>천연물소재</p>	<p>유단백소재</p>	<p>우유 제품 개발</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>bone health</p>	<p>calcium absorption promotion</p>	<p>Natural material</p>	<p>milk protein material</p>	<p>milk products development</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	229
4. 연구결과의 활용 계획 등	237

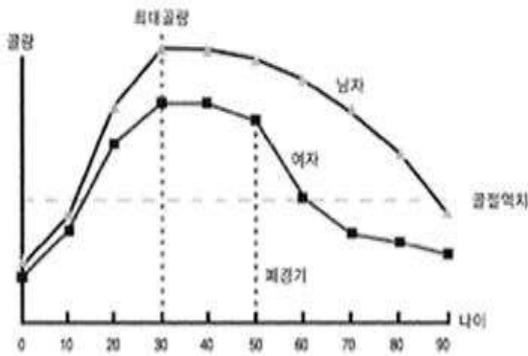
<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

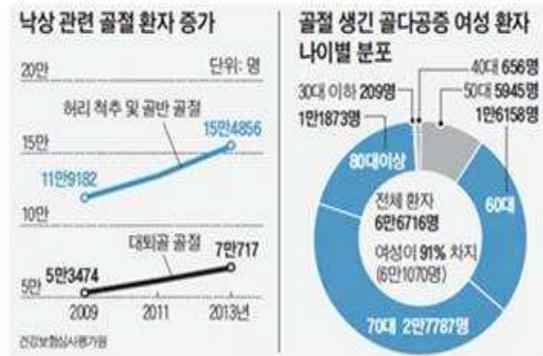
1-1. 연구개발 목적

○ 인구 고령화에 따른 뼈 건강식품 개발의 필요성

- 노화와 함께 찾아오는 신체적인 변화 중 하나로 골량의 감소를 들 수 있음. 골량은 30세 때 최대를 이룬 후 서서히 감소하게 되는데 특히 여성의 경우 폐경기 후 급속하게 감소함. 이런 골량의 감소는 여성에게, 특히 폐경기 후 여성에게 낙상 관련 골절률이 높은 것과 직접적인 연관이 있음



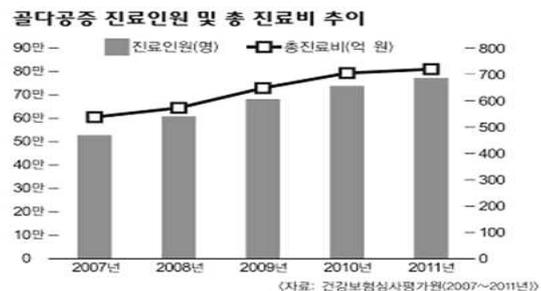
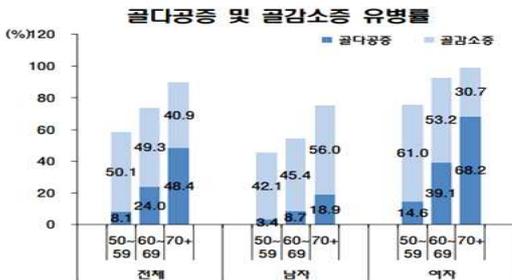
< 연령별 골량 변화 >



< 낙상 관련 골절 환자 증가 및 골절 생긴 골다공증 여성 환자 나이별 분포 >

*출처 : 보건 의료통계 (2013)

- 골다공증의 유병률은 매년 증가하고 있음. 국민건강영양조사(2009)에 따르면 50세 이상 성인 골다공증 유병률은 남자 8.1%, 여자 38.7%로 50세 이상 인구의 5명 중의 1명을 차지할 만큼 큰 비중을 차지하며, 연령 증가에 따른 유병률 역시 큰 증가 추세를 보이고 있음. 또한 건강보험심사평가원에 따르면 총 진료비 역시 2007년 535억 원에서 2011년 722억 원으로 5년간 187억 원이 증가(35%)한 것으로 나타나 골다공증에 대한 사회적 부담도 크게 가중되고 있음을 확인할 수 있음



< 골다공증 유병률 추이(좌) 및 골다공증 총 진료비 추이(우) >

*출처: 국민건강영양조사(2009), 건강보험심사평가원(2012)

- 반면, 청소년기의 골 무기질화는 적절한 영양 공급, 칼슘과 인의 적정 섭취, 근육량의 증가 및 체중부하, 갑상선, 부갑상선, 성선, 그리고 뇌하수체 호르몬 및 여러 성장과 관련된 인자들의 상호작용을 통해 일어나는 복잡한 과정이고, 요추골의 골밀도가 급격히 증가하는 시기는 여아 10-11세 사이, 남아 12-13세 이므로 여아가 남아보다 2년 정도 앞서고, 대퇴골경의 골밀도 역시 여아가 남아보다 2년 정도 앞서 증가하였음
- 부적절한 식생활로 인해 성장기 어린이의 골격성장 및 젊은 여성층의 골격 유지에도 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며, 사춘기에 따른 골밀도는 사춘기가 시작되면서 골밀도의 증가가 빨라지고 후기 사춘기에 급격한 증가세를 보임
- 최대 골량(peak bone mass)의 70~80%가 유전적(vitamin D receptor gene, estrogen receptor gene, collagen type I alpha 1 gene 등)으로 결정되며 호르몬 인자들과 사춘기 시작 연령 등에 따라 골밀도, 뼈 강도 등이 다르게 나타남

칼슘 섭취에 따른 대퇴골 골밀도_여자
(2007-2008 KNHANES 자료 분석)

SEX	AGE	Adjusted ¹⁾			Adjusted ²⁾			
		mean	P (vs Q1)	p for trend	mean	P (vs Q1)	p for trend	
Women	10-19	Q1	0.8519	-		0.8456	-	
		Q2	0.8380	0.2158	0.671	0.8424	0.7420	0.908
		Q3	0.8340	0.1263		0.8350	0.2989	
		Q4	0.8434	0.5105		0.8443	0.9112	
	Q1	0.8731	-	0.8717		-		
	20-64	Q2	0.8819	<0.05	0.364	0.8795	<0.05	<0.05
		Q3	0.8795	0.1130		0.8800	<0.05	
		Q4	0.8795	0.1418		0.8830	<0.01	
		Q1	0.6995	-		0.7016	-	
	65+	Q2	0.7045	0.4295	<0.01	0.7063	0.4409	<0.05
		Q3	0.7108	0.0909		0.7084	0.3105	
		Q4	0.7199	<0.01		0.7189	<.05	

1) adjusted for age and energy intake

2) adjusted for age, BMI, energy and sodium intake

자료: 최영신 외, 질병관리본부 용역과제 2012

< 칼슘 섭취에 따른 대퇴골 골밀도_여자 >

*출처 : 질병관리본부 용역과제(2012)

- 최대 골량의 20~30%가 환경요인에 의한 영향으로 특히 칼슘, 비타민 D, 단백질 영양 및 운동 등이 연관됨. 연구결과에 따르면 칼슘 영양이 골밀도 증가에 결정적 역할을 하며 칼슘 섭취량을 1일 1500 mg까지 증가시키면 골격에 양호한 효과를 나타내고 그 이상에서는 효과 없는 것으로 보고됨

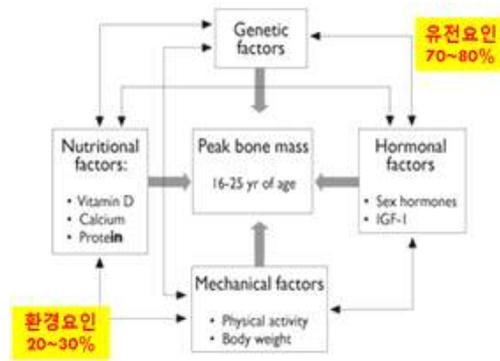


FIGURE 1. PHYSIOLOGICAL DETERMINANTS OF PEAK BONE MASS. THE BLACK ARROWS ILLUSTRATE THE INTERDEPENDENCY OF THE 4 TYPES OF FACTORS

Bonjour J-P et al., Salud Publica Mex (2009) 51 suppl 1:S5-S17

< 요인에 따른 골격 질병 발생 원인 >

*출처 : Salud Publica Mex(2009)

1-2. 연구개발의 필요성

- 최근 산업화와 과학의 발달로 경제수준이 높아지면서 생활양식의 편의성을 강조하는 자동화시스템의 증가로 신체활동량이 많이 감소되었으며, 부적절한 식생활로 인해 성장기 어린이의 골격성장 및 젊은 여성층의 골격 유지에도 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 보고됨
- 또한 초 고령화 사회에 진입하면서 골다공증이 노인들의 대표적인 질환으로 빈번하게 발생하여 중요한 임상적 문제로 인식되고 있음
- 현재 국내에서는 해조류 등 천연물 유래 뼈 건강소재에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있으나 흡수율과 가격경쟁력 측면에서 유제품을 비롯한 식품산업 분야 적용이 제한되어 주로 흡수율이 낮은 칼슘 또는 고가의 외국산 칼슘 및 칼슘 흡수촉진 소재를 활용하고 있음
- 따라서 이 연구에서는 국내 천연물을 활용하여 체내 흡수율과 가공적성이 증진된 뼈 건강기능 소재를 개발하고 이를 활용한 뼈 건강 유제품을 개발하여 정체된 시장 확대를 유도하고, 대부분 수입에 의존하고 있는 뼈 관련 소재를 국내산 천연물로 소재를 개발하여 수입 대체 효과를 얻고자 함



○ 또한 이 연구결과를 바탕으로 습한 기후로 인한 관절 질환이 고질적인 국가문제로 대두되고 있으며 경제력 향상으로 유제품 소비가 증가하고 있는 동남아 시장에 적극 진출하여 새로운 해외 시장을 개척하고자 함

1-3. 연구개발 범위

○주관연구기관 (주)유담

- 주관기관인 (주)유담은 남양유업 생산관리 부서에서의 14년 경력을 바탕으로 한 20 경력의 유가공 장인이 설립한 회사로서 2007년 설립 이래 토비코 등의 유산균 전문기업 및 단국대학교 등의 산학협력단과 중소기업청, 지식경제부 등이 주관하는 유산균 및 발효 유제품분야 산학연 연구를 공동수행 하였음
- 기능성을 갖춘 프리미엄급 발효유제품이 주력분야인 (주)유담은 2010년 과제수행 결과 신제품 개발 및 특허 출원한 ‘미강 발효유’와 ‘자스민 요구르트’, 국내 최초로 개발된 ‘수박 라이코펜 요구르트 레드’는 그 기능성과 우수성을 인정받아 ‘2013년 서울 COEX 전국 산학협력 EXPO’ 우수성과 및 ‘부산 BECXO 지역희망 기업박람회’ 산학협력 연구제품 우수사례로 추천받아 전시하였으며 ‘한요구르트’와 ‘모닝플레인산양 요구르트’등의 특정 소비자를 위한 소비시장을 타겟으로 일부 고급 백화점에 판매한 경험이 있음
- 또한 금번 과제 이전 수행 완료한 과제를 통해 유제품 개발 노하우를 바탕으로 품질관리기준 및 대량생산시스템 설정 등의 제품화 관련 선행연구를 수행하였음



조아유플레인요구르트
3kg



유담휘핑크림 10kg



조아유스파게티소스
2kg



플레인올리고발효유, 말기발효유
200ml, 500ml

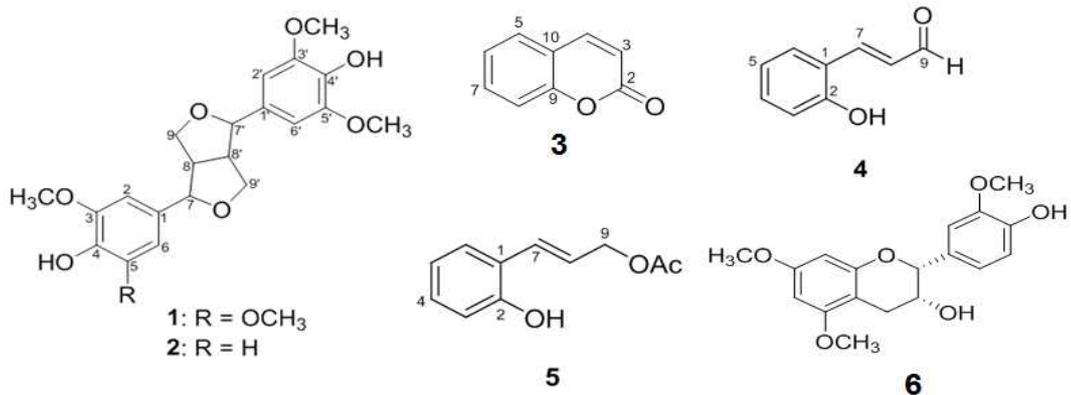


수박요구르트 레드
150g

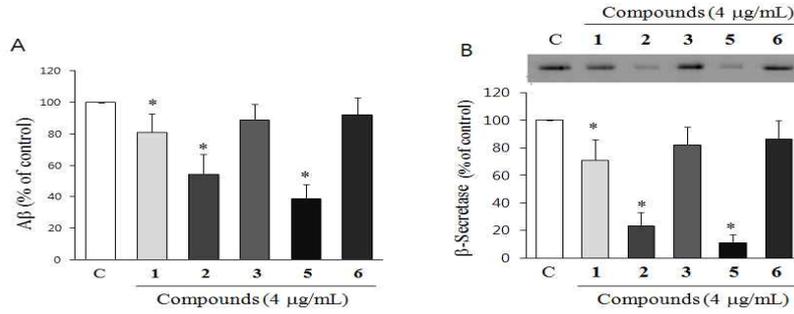
○협동연구기관 1 (단국대 약학과 박소영 교수)

1) 육계로부터 베타-아밀로이드 생성억제 유효물질 도출

- 계수나무(Cinnamomum cassia Blume)의 줄기껍질을 사용하는 육계는 전통적으로 향신료로 사용되어 왔으며 진통, 항균, 구풍, 해열 등의 용도로 사용되어 왔음. 육계 추출물이 치매의 원인물질로 알려진 베타-아밀로이드의 생성을 효과적으로 억제함. 따라서 육계에 함유된 유효성분을 activity-guided isolation을 활용하여 분리함. 그 결과 6종의 페닐프로파노이드 유도체 [syringaresinol (1), medioresinol (2), coumarin (3), 2-hydroxycinnamaldehyde (4), cryptamygin A (5), 3',5,7-trimethoxy epicatechin (6)]가 분리되었음

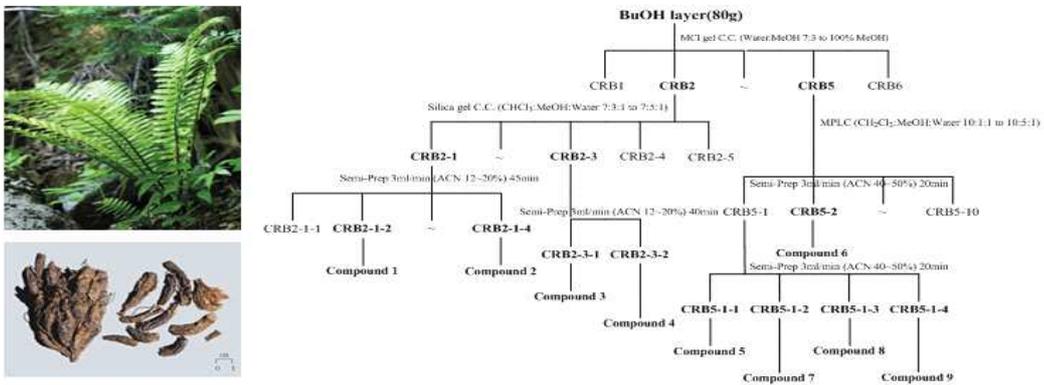


- 그 중 medioresinol (2) 과 cryptamygin A (5) 가 가장 뛰어난 활성을 보였는데 (IC₅₀ = 18.0, 10.2 μM), 이들은 β-secretases 라는 효소를 억제하여 베타-아밀로이드 생성을 억제하는 것으로 확인됨

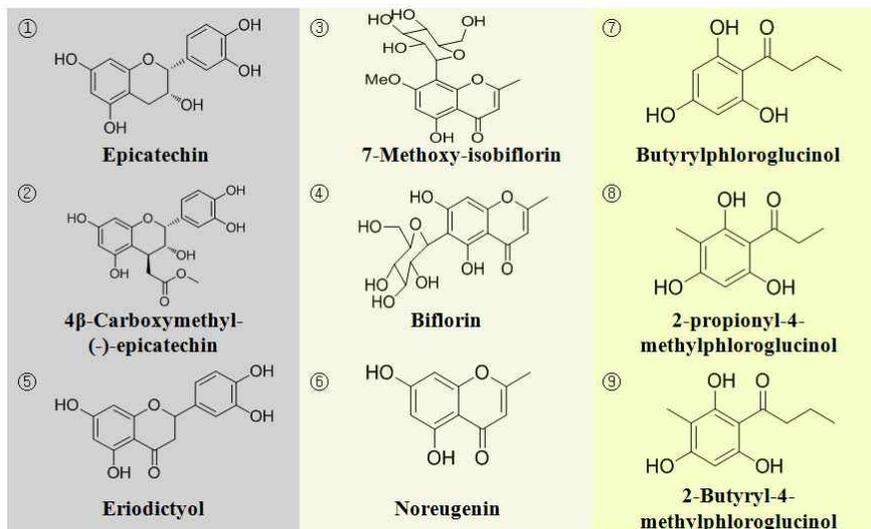


2) 관중으로부터 베타-아밀로이드 생성 억제 유효물질 도출

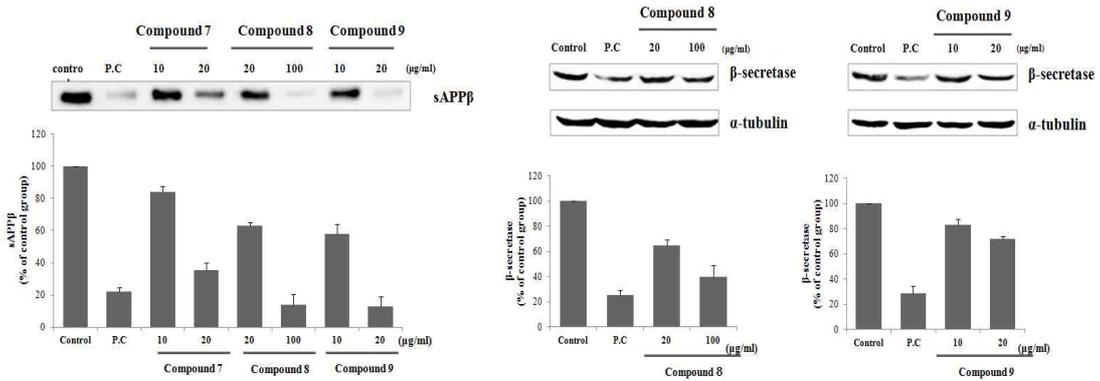
- 관중은 고사리과의 식물로 관중 (*Dryopteris crassirhizoma*)의 뿌리를 사용하는 생약으로 전통적으로 구충제로 사용됨. 본 연구실의 실험 결과에 따르면 관중 부탄올 추출물이 탁월한 베타-아밀로이드 생성 효능을 보여 activity-guided isolation법을 이용하여 유효성분들을 분리 정제함



- 그 결과 3종의 플라보노이드, 3종의 크로몬, 3종의 플로로글루시놀류가 분리되었음

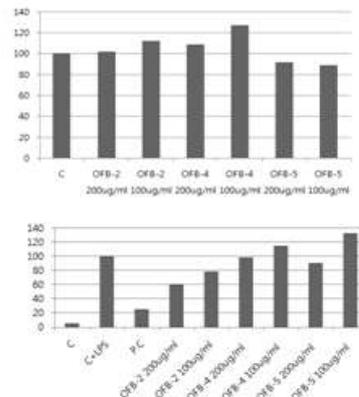
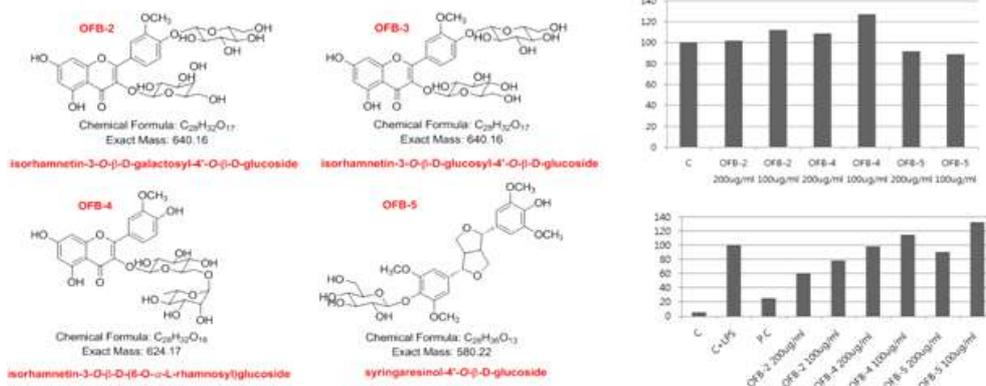


- 9종의 분리된 화합물 중 2개의 크로몬과 3개의 플라보글루시놀이 효과적으로 베타-아밀로이드의 생성을 억제하였는데 그 활성은 기작은 β -secretases 라는 효소 억제를 통해 이루어짐



3) 천연초로부터 골 염증 억제 유효성분 도출

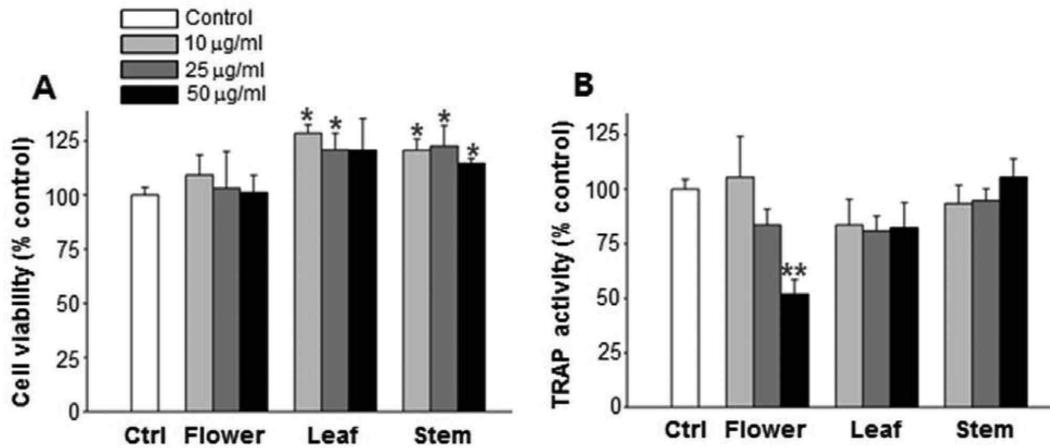
- 손바닥선인장으로 알려진 천연초는 민간에서 다양한 용도로 사용되고 있으나 그 효과가 과학적으로 검증된 것은 미미함. 본 연구에서는 천연초 열매에서 골 염증을 억제하는 플라보노이드 류 3종과 리그난 1종을 분리하였으며 그 중 isoramnetin 계열의 플라보노이드 류가 염증 억제 활성을 보임



○협동연구기관 2 (단국대 치의예과 오충훈 교수)

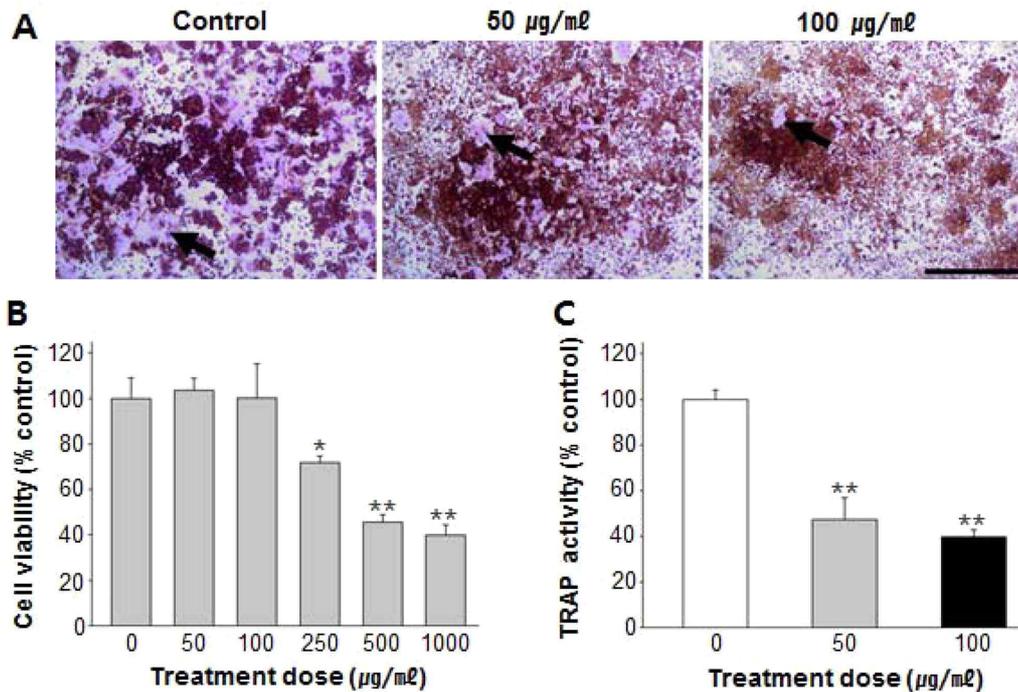
1) 흰 무궁화 꽃 추출물의 항산화 활성과 골 흡수의 억제 효과

- RAW 264.7 cell을 receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL) (50 ng/mL)를 포함한 분화배지에서 4일간 배양하면 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase)에 강하게 염색되는 다핵세포가 다량으로 관찰됨. 흰 무궁화 꽃 처리군의 50 μ g/ml (51.99%) 에서 대조군에 비하여 현저하게 감소된 TRAP 활성을 보임 (p < 0.01). 반면 잇과 줄기의 모든 농도에서는 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않아 파골세포 분화 억제에는 영향을 미치지 않음



< 흰 무궁화꽃에서 과골세포 세포독성 및 분화정도 실험결과 >

- 단핵구/대식세포에서 발현하는 RANK에 RANKL가 결합하여 분화된 TRAP 양성 세포는 RANKL, interleukin-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 염증인자에 의해 자극되면 세포끼리 융합되어 다핵형 TRAP 양성 세포로 분화됨. 흰 무궁화 꽃 추출물을 세포 독성이 나타나지 않는 세포 안정 수준의 농도에서 과골세포의 TRAP 활성도는 대조군에 비교하여 50 $\mu\text{g/ml}$ (47.28%)과 100 $\mu\text{g/ml}$ (39.74%)에서 현저하게 낮은 활성도를 보임

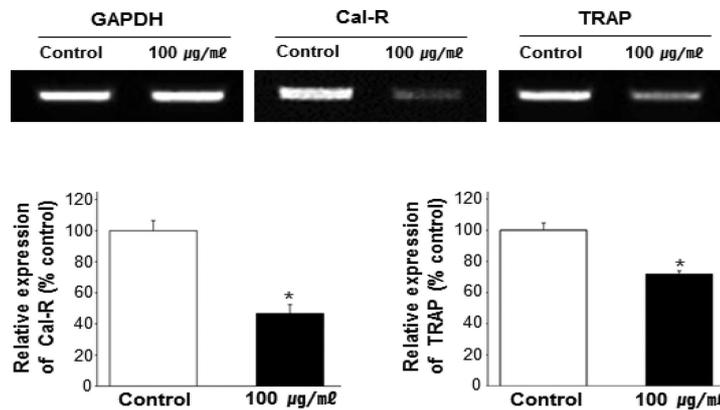


< 흰 무궁화꽃에서 과골세포 분화정도 실험결과 >

- RANKL은 과골세포의 분화 초기 단계에 c-Fos의 유도하여 NFATc1의 발현에 중요한 역할을 한다고 알려짐. NFATc1은 과골세포의 특이 유전자인 cathepsin K, TRAP, 칼시토닌 수용체(calcitonin receptor, Cal-R), osteoclastassociated receptor (OSCAR) 및

β -integrin 등의 발현을 촉진시킴으로써 파골세포 분화 및 기능을 활성화시킴. 더욱이 Cal-R와 TRAP은 실제적으로 골 흡수 작용에 관여하여 골 기질을 흡수한다고 알려짐. 흰 무궁화 꽃 추출물에 의한 성숙파골세포의 골 기질 흡수단계에서 Cal-R와 TRAP의 mRNA 발현양 변화를 분석한 결과, 흰 무궁화 꽃처리군의 Cal-R 발현양은 100 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 46.69%로 현저하게 감소되었고, TRAP 발현양 역시 대조군에 비해 71.98%로 현저하게 감소함

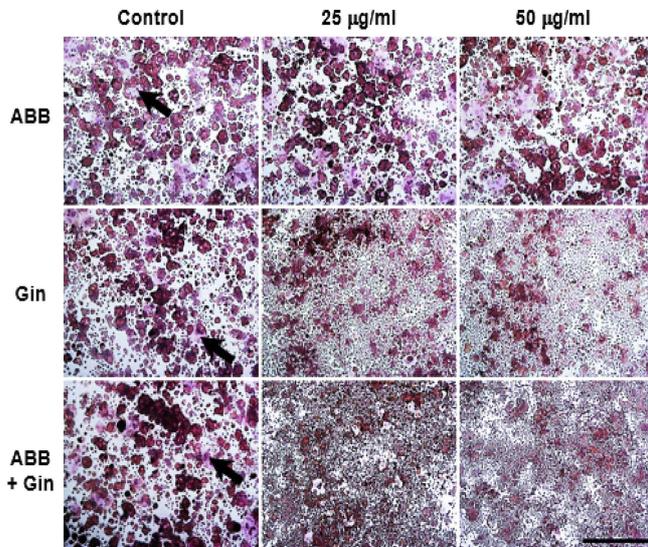
- 따라서 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 특이 지표인 TRAP 효소 활성의 억제와 마찬가지로 흰 무궁화 꽃 추출물에 의해서 Cal-R와 TRAP의 mRNA 발현 역시 유의하게 억제되고 있음



< 흰 무궁화꽃에서 파골세포 분화유전자들의 발현정도 실험결과 >

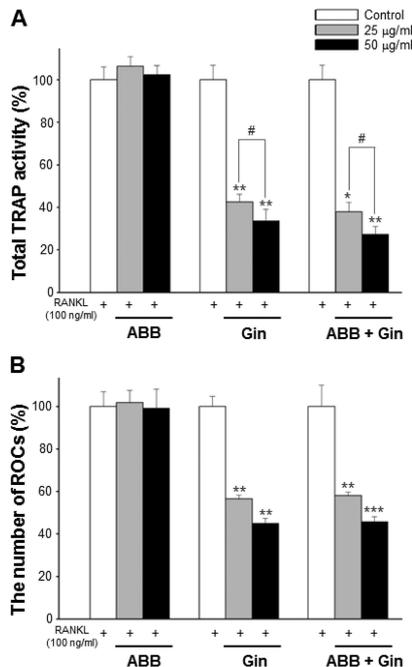
2) 우슬과 인삼 열수추출 혼합물의 파골세포와 조골세포 분화 효과

- 우슬과 인삼의 TRAP 양성 파골세포 분화 억제 우슬과 인삼의 TRAP 양성 파골세포 분화 억제 우슬추출물 25와 50 μ g/ml 농도 처리군에서 대조군과 유사한 파골세포 분화 형태를 보이는 반면, 인삼 추출물이 포함된 실험군(인삼 단독 처리군과 우슬과 인삼 혼합 처리군)의 모든 농도에서 대조군에 비해 현저하게 감소된 ROC와 융합되지 않은 단핵의 전파골세포와 불규칙 모양 형태 파골세포(irregular shaped osteoclast, IOC)가 풍부하게 관찰됨. RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화과정 중에 우슬은 영향을 미치지 못하였으나 인삼이 파골세포 분화 억제에 직접적으로 관여함



<우슬과 인삼추출물에서의 파골세포 억제효과>
 Round-shaped osteoclast (ROC) formation derived from RAW264.7 cell under different concentration of ABB and Gin. TRAP staining was performed after 3 days of culture, representing TRAP + multinucleated cells. Arrow indicates that ROC formation is obvious, and rarely was formed in the Gin contained groups. Scale bar = 500 µm. Control; only RANKL treatment, ABB; Achyranthes bidentata Blume, Gin; Panax ginseng, ABB + Gin; Achyranthes bidentata and Panax ginseng mixture.

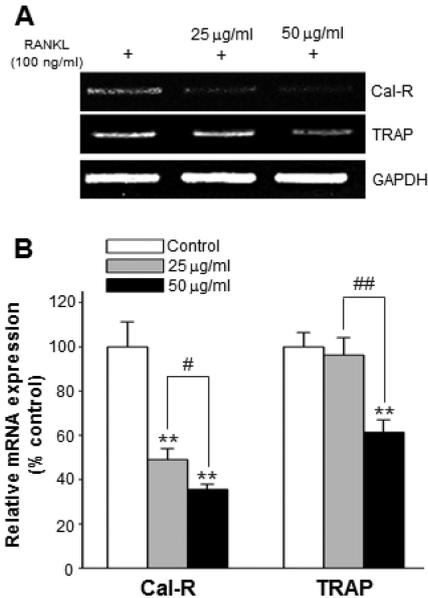
- 우슬 추출물의 TRAP 활성도는 농도와 관계없이 대조군과 유의한 차이가 없었지만, 인삼 추출물 25와 50 µg/ml의 모든 농도에서 각각 43.51%와 55.19%의 현저히 감소함. 우슬과 인삼 혼합물 역시 25µg/ml(42.03%)와 50µg/ml (54.40%) 농도에서 뚜렷하게 감소됨. TRAP 활성과 마찬가지로 ROC 수 역시 인삼을 포함한 모든 군의 25와 50µg/ml 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소됨



<우슬과 인삼추출물에서의 파골세포 억제효과>
 Gin contained groups inhibits RANKL- induced osteoclast differentiation from RAW264.7 cell. (A); Total osteoclasts including ROC and irregular shaped osteoclast (IOC) evaluated by TRAP solution assay. (B); ROC cells counted under a light microscope. Each column represents mean ± SD (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) vs Control. #p < 0.05 as compared to the 25µg/ml treatment. Control; only RANKL treatment ABB; Achyranthes bidentata Blume, Gin; Panax ginseng, ABB + Gin; Achyranthes bidentata and Panax ginseng mixture.

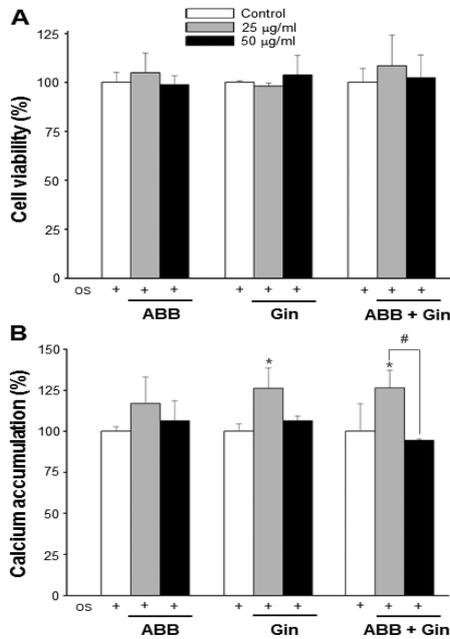
- 우슬과 인삼의 파골세포 분화 유도인자 억제. 성숙 파골세포의 골 기질 흡수단계에서 우슬과 인삼 추출물에 의한 Cal-R와 TRAP의 mRNA 발현량 변화를 분석한 결과, 우슬과 인삼을 동량으로 혼합물의 25 µg/ml(50.96%)와 50 µg/ml (64.43%)의 모든 농도에서 Cal-R의 현저한 감소율과 25 µg/ml에 비해 50 µg/ml 농도에서도 유의하게

감소됨. TRAP 발현양 역시 우슬과 인삼 혼합물에서 대조군과 비교하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 현저한 감소율 (38.66%)과 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도와 비교하여도 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 34.95%의 유의한 감소율을 나타냄



<우슬과 인삼추출물에서의 파골세포 억제효과>
 ABB and Gin mixture group inhibits RANKL-induced gene expression in the resorption stage of osteoclast differentiation. RAW264.7 cells were treated with RANKL in the different concentration of ABB and Gin mixture. RT-PCR was performed to detect the expression of the indicated genes, and performed with 25 cycles. Each column represents mean \pm SD (**p < 0.01) vs Control. #p < 0.05 and ##p < 0.01 as compared to the 25 $\mu\text{g/ml}$ treatment. Control; only RANKL treatment, Cal-R; calcitonin receptor, TRAP; tartrate resistant acid phosphate.

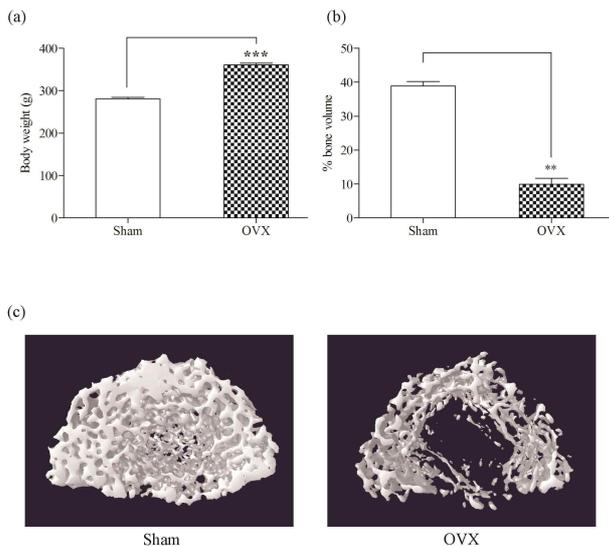
- 우슬과 인삼의 조골세포 분화 효과. 골 조직에 존재하는 조골세포와 유사하여 골기질의 축적, 석회화와 성장요소 및 대사 변화 등(Choi and Koh, 2003)의 연구에 이용되고 있는 MC3T3-E1 세포에 우슬과 인삼 열수추출물을 처리하여 세포증식 및 세포 생존율에 따른 세포 독성평가와 석회화 결절(calcium accumulation) 형성의 관찰함. Alizarin red에 염색된 석회화 결절을 용해하여 흡광도를 측정한 결과 인삼 추출물의 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도 (25.96 %), 우슬과 인삼 혼합물 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도(26.41 %)에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가함



<우슬과 인삼추출물에서의 파골세포 억제효과>
 Effect of Gin and ABB on the cytotoxicity and calcium accumulation of MC3T3-E1 cells. (A); Osteoblastic cell viability were treated in media with osteogenic induction reagents (OS) and different concentration of Gin and ABB for 24 hours. (B); Calcium accumulation was assessed after 21 days of culturing. Each column represents mean \pm SD (*p < 0.05, **p < 0.01) vs Control. #p < 0.05 as compared to the 25 g/ml treatment. Control; only RANKL treatment, ABB; Achyranthes bidentata Blume, Gin; Panax ginseng, ABB + Gin; Achyranthes bidentata and Panax ginseng mixture.

3) 골다공증유도확인을 위한 대퇴골 미세전산단층촬영

- 난소 절제술군과 위 수술군에서 각각 2마리씩 무작위적으로 개체를 선정하여 희생 후 대퇴골을 미세전산 단층 촬영함. 대퇴골의 해면골이 전체 조직에서 차지하고 있는 부피 비율을 확인한 결과 난소 절제술군이 $10 \pm 2.5\%$ 로 위 수술군의 $38.9 \pm 1.8\%$ 대비하여 75% 감소된 것을 확인함(p<0.01)



< 난소적출술 후 골다공증 유도모델 >

Results of ovariectomy surgery. Eight weeks after surgery, compared to sham and ovariectomized rat. (a) Compare the weight of sham and ovariectomized rat. (b) Percent bone volume of analysis region. (c) Micro-CT 3D image of distal femur. All values are mean \pm SEM **p<0.01, ***p<0.001 for the values of the OVX-vehicle group compared with Sham

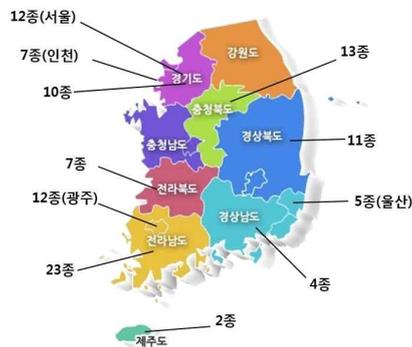
○협동연구기관 3 (단국대 동물자원학과 김철현 교수)

- 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 김철현 교수 연구팀에서는 선행연구를 통해 전국 각 지역의 김치 및 전통식품에서 유산균 300여종을 분리·동정하여 다양한 한국 통식품 유래 유산균 자원을 확보하고 있으며, 후보 유산균 선발을 위한 형태학적 특성과 생화학적 특성, 유산균의 담즙산 내성 및 내산성 실험, β -galactosidase activity 측정 등의 선행연구

를 수행하여 우수한 유산 균주들을 다수 확보하고 있음

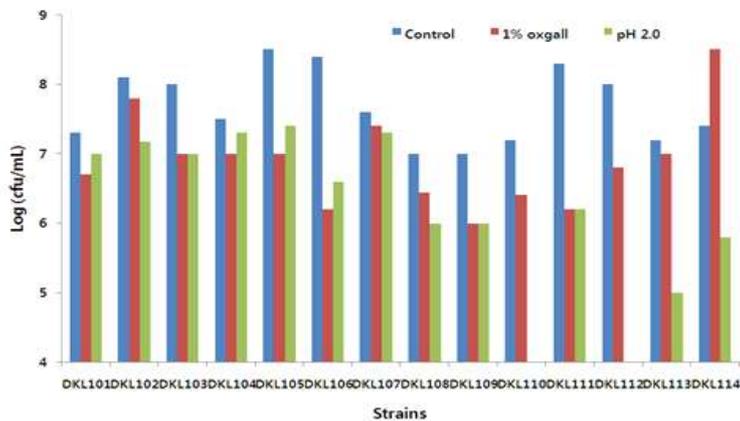
- 선행연구를 통하여 한국 전통식품 유래 유산균들의 유단백질 함량에 따른 발효 패턴을 확인할 수 있었으며, 추후 연구 과제를 수행하기 위한 기술적 노하우와 분석기술을 확보 하였음
- 2013년 주식회사 토비코, 단국대 김철현 교수 연구팀, 미국 조지아 주립대 면역질환센터 강상무 교수 연구팀은 세계식품학회(IFET, International Food Technologist) 에서 유산균의 항산화 및 항인플루엔자 연구결과를 발표하였으며, 우수한 결과가 나온 유산균을 본 과제에 활용할 계획임
- 따라서 본 연구팀은 풍부한 유산균 발효에 대한 연구 경험과 충분한 선행연구를 통해 연구를 수행 할 수 있는 고유단백 함유 발효유 개발 노하우와 분석기술을 보유하고 있으며, 이를 수행 할 수 있는 연구원을 보유하고 있음

1) 균주 Screening을 통한 한국 전통식품 유래의 유산균 확보



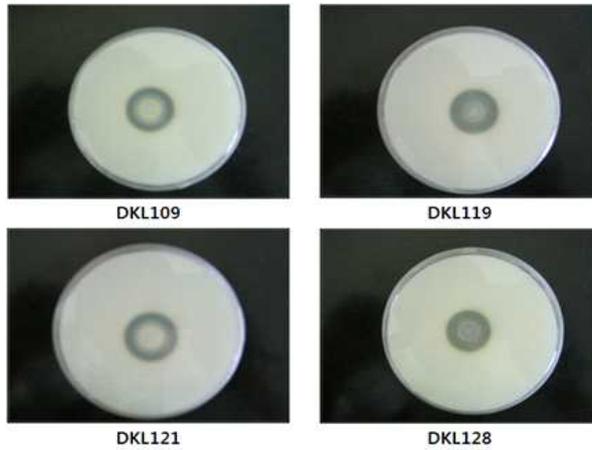
<한국 전통식품 유래의 유산균 확보>

2) 기초생리활성(내산성 및 담즙산 내성) 실험을 통한 유산균 선발



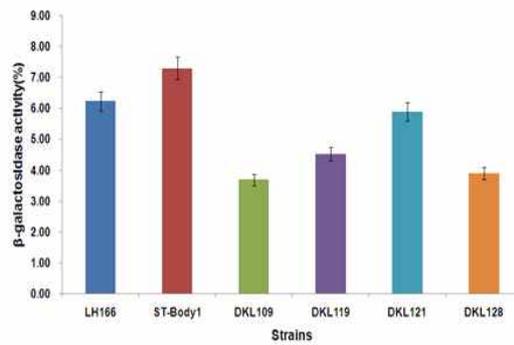
<유산균 선발 : 내산성 및 담즙산 내성 측정>

3) 기초생리활성(유단백질 분해활력) 실험을 통한 유산균 선발



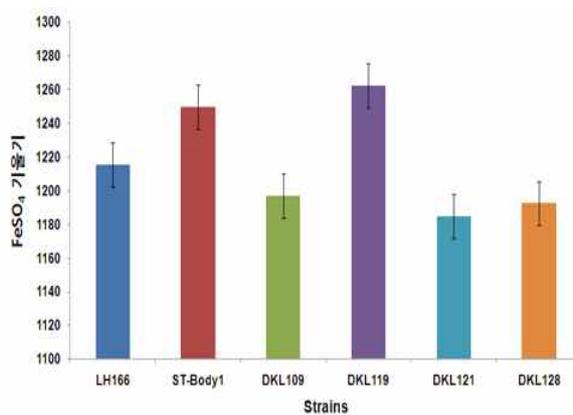
<유산균 선발 : 유단백질 분해활력 측정>

4) 기초생리활성(β -galactosidase(유당분해효소) 활성능) 실험을 통한 유산균 선발



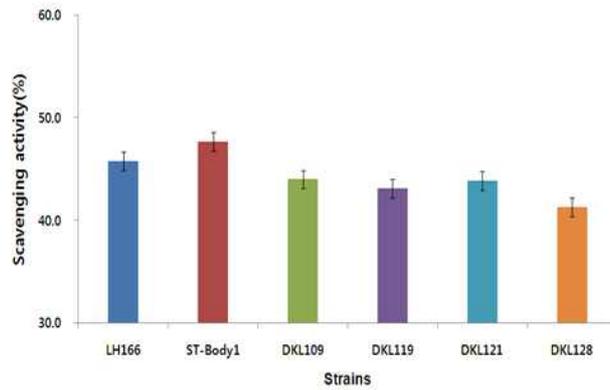
<유산균 선발 : β -galactosidase(유당분해효소) 활성능 확인>

5) 항산화(FRAP assay) 실험을 통한 유산균 선발



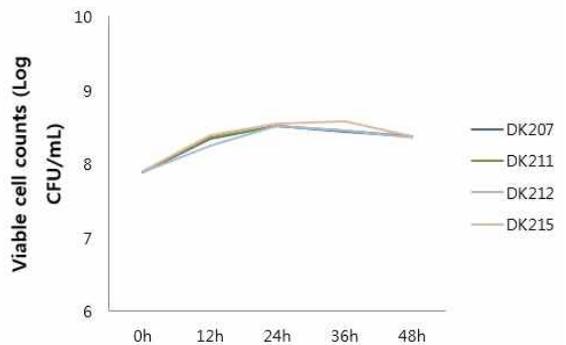
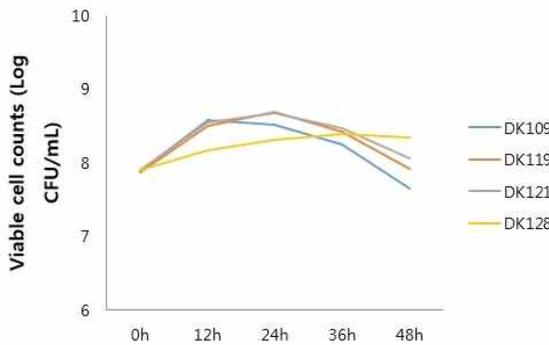
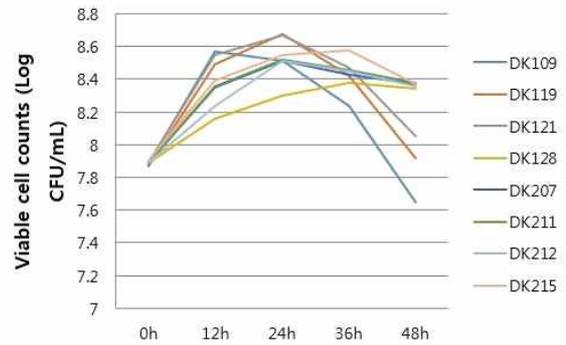
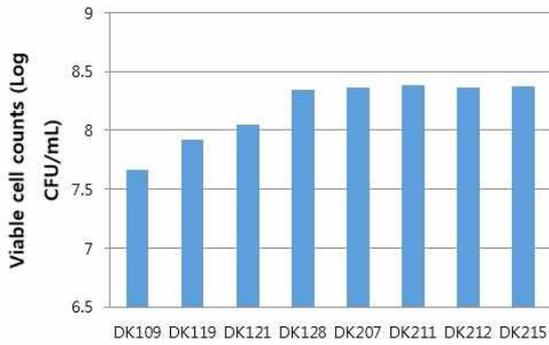
<유산균 선발 : FRAP assay를 이용한 항산화효과 측정>

6) 항산화(DPPH assay) 실험을 통한 유산균 선발

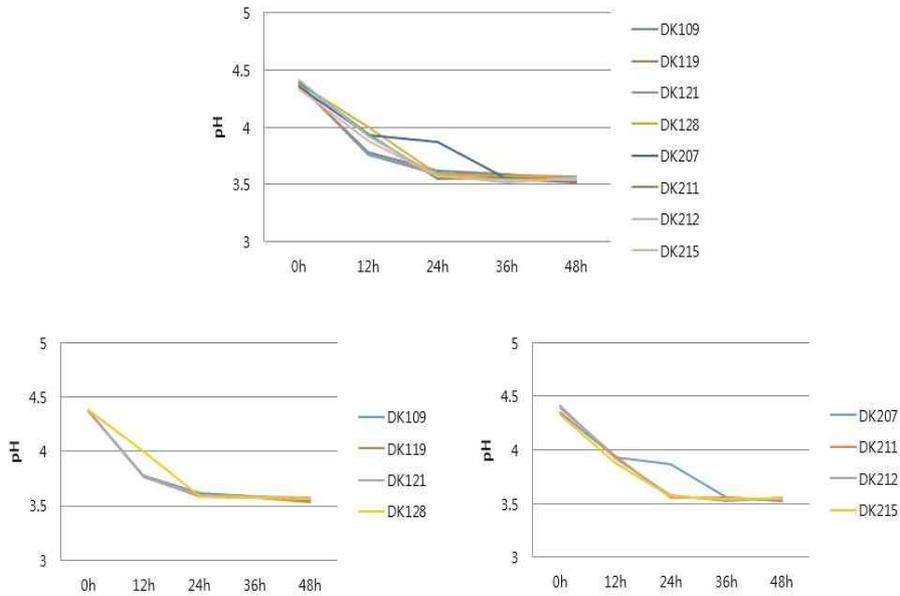


<유산균 선발 : DPPH assay를 이용한 항산화효과 측정>

7) 후보 선발 균주의 시간대별 pH 및 생균수 측정

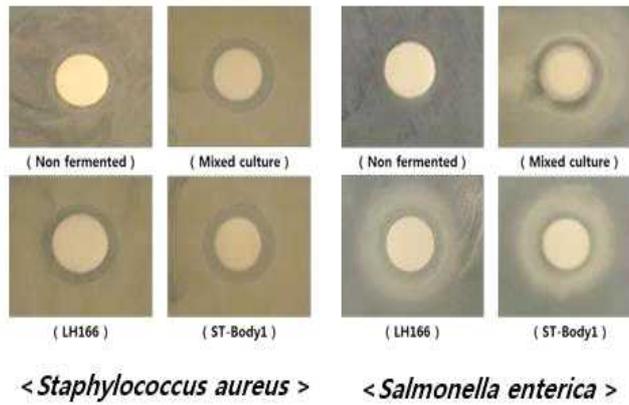


<후보 선발 균주의 시간별 pH 측정>

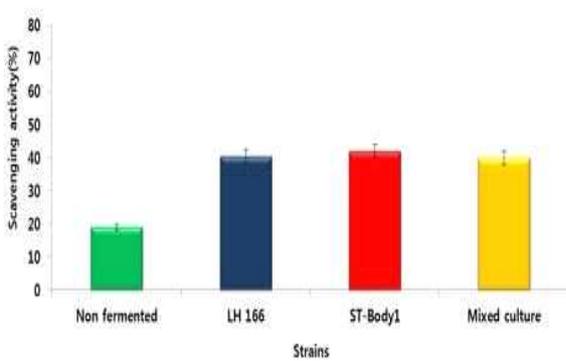


<후보 선발 균주의 시간별 생균수 측정>

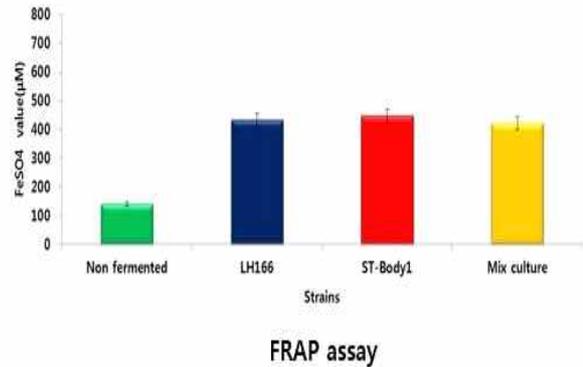
8) 고단백 유청발효음료의 안정성 검증 효능평가



<고단백 유청발효음료 개발을 위한 후보 선발 균주의 항균활성 확인>



<고단백 유청발효음료의 항산화 활성(DPPH)>



<고단백 유청발효음료의 항산화 활성(FRAP assay)>

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진전략·방법 및 추진체계

2-1-1. 연구개발 추진전략 및 방법

◎ 주관연구기관 (주유담)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	개발 물질 대량생산공 정설정	<ul style="list-style-type: none"> • 각 협동연구기관 개발 물질의 제품 적용성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 협동3 개발 물질 제품적용성 탐색 및 균질 조건설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 협동3에서 제공한 개발 물질을 시유에 적용해본 결과 배합물내의 충분리현상이 발생하였음. 충분리 완화를 위해 균질조건을 설정 • 협동1에서 제공한 땅콩 추출물의 제품적용성 탐색 예정
		<ul style="list-style-type: none"> • 각 협동연구기관 개발 물질의 추출 및 제조 대량생산 공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 협동3 개발 물질 대량생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 협동3에서 제공한 가수분해물 제조 방법을 기반으로 대량생산공정설정 완료 • 협동1에서 제공한 땅콩 추출물의 제품적용성 완료 후 대량생산공정 설정
	개발 제품 (우유) 배합 비 설정	<ul style="list-style-type: none"> • 개발 제품(우유) 원료 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> • 개발 제품(우유) 원료 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> • 2차년도 출시 예정인 개발 제품(우유)의 원료 탐색 완료
		<ul style="list-style-type: none"> • 각 협동연구기관 개발 물질 함유 개발 제품(우유) 배합비 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 배합비 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 협동1, 3에서 제공한 개발 물질을 각각의 함량으로 배합 후 각 물질의 기능성 최적화 조건 설정을 통한 배합비 1차 선정 후 관능검사를 통한 배합비 개선

2차 년도 (2017)	개발 제품 (우유) 품질 관리기준 설정 및 대량 생산공정 설정	<ul style="list-style-type: none"> 원재료, 배합 및 살균 등 개발 제품(우유)의 미생물학적, 이화학적 품질관리기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유)의 미생물학적, 이화학적 품질관리기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유)의 미생물학적 온도 조건별 저장성 실험을 통한 유통기한 내에서의 일반세균수/대장균수 기준치 이내 달성 확인 개발제품(우유)의 이화학적 온도 조건별 저장성 실험을 통한 유통기한 내에서의 원유 기준치 이내 달성 확인
		<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유) 대량 생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유) 대량 생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유)의 Lab scale 제작에서 pilot scale로의 scale up 가능성 확인 및 대량생산공정 설정
	개발 제품 (우유) 신제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유) 시제품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유) 시제품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 제작을 통한 대량생산 공정 확립
		<ul style="list-style-type: none"> 관능검사를 통한 배합비 개선 	<ul style="list-style-type: none"> 관능검사를 통한 배합비 개선 	<ul style="list-style-type: none"> 경쟁제품(타사 우유)과의 관능검사를 통한 개발 제품(우유)의 관능적 특성 확인
		<ul style="list-style-type: none"> 브랜드 네이밍 및 용기선정 후 신제품 출시 	<ul style="list-style-type: none"> 브랜드 네이밍 및 용기선정 후 신제품 출시 	<ul style="list-style-type: none"> 용기선정 : Polyethylene terephthalate(PET) 용량 : 200 mL 네이밍 : 뽕사랑 칼슘우유 시제품 제작을 통한 신제품 출시 준비
	3차 년도 (2018)	개발 물질의 대량 생산공 정 설정	<ul style="list-style-type: none"> 협동연구기관 개발 물질의 제품 적용성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 제품 적용성 확인을 위한 물리·화학적 및 관능적 특성 확인

		<ul style="list-style-type: none"> 개발 물질의 추출 및 제조 대량생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 추출물 및 작약추출물의 추출 및 제조 방법을 제품 개발의 상업적 용도에 따라 대량생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 대량생산공정 설정
개발 제품의 원료 및 배합비 설정		<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품의 품질관리기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 품질관리기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품의 품질관리기준 설정을 위해 유통기한 안정성 설정 실험 등을 통한 품질관리기준 설정 완료
		<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품의 대량생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 대량생산공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> Lab scale로 개발된 개발 제품의 Pilot scale화를 통한 대량생산공정 설정 완료
개발 제품의 시제품 제작		<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품의 시제품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 배합비 설정을 통한 시제품 제작 후 관능성 개선을 통한 배합비 재설정 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료 시제품의 관능성 개선을 통한 배합비 확립
신제품 출시		<ul style="list-style-type: none"> 신제품 3종 출시를 위한 브랜드 네이밍 및 용기선정 	<ul style="list-style-type: none"> 신제품 출시를 위한 브랜드 네이밍 및 용기선정 	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 신제품 출시를 위한 브랜드 네이밍 및 용기선정

■ 개발 물질 대량생산공정 설정

○ 협동3 개발 물질 제품적용성 탐색

- 협동3에서 개발한 우유 유래 단백질 가수분해물의 제품적용성을 탐색하기 위해 협동3에서 제공한 가수분해물을 시유(서울우유, Korea)에 배합기를 이용하여 배합 후 적용가능성을 탐색함
- 협동3에서 제공한 개발 물질을 시유에 적용해본 결과 다음과 같이 배합물 내 층분리현상이 발생함



< 기존 공정 탐색 >



< 교반기 높이 조정 >



< 교반기 높이 설정 >



< 반응 온도 설정 >



< 최적 살균 온도 및 시간 설정 >



< 공정 개선 전 거품 발생 모습 >



< 공정 개선 후 거품 발생 해결 모습 >

○ 개발 제품(우유) 원료 탐색

- 2차년도 출시 예정인 개발 제품(우유)의 원재료 및 부자재 설정을 위해 시장조사를 실시함. 시장조사 결과 개발 제품(우유)는 그 기능성에 초점을 맞춰 협동기관의 개발 물질 첨가 후 식품공전 의거 유가공품 중 강화우유 규격에 맞추어 원료를 설정함

제 2. 축산물별 기준 및 규격

1. 유가공품

유가공품이라 함은 원유 또는 유가공품을 원료로 하여 가공한 우유류, 저지방우유류, 무지방우유류, 유당분해우유, 가공유류, 산양유, 말효유류, 버터유류, 농축유류, 유크림류, 버터류, 치즈류, 분유류, 유청류, 유당, 유단백기수분해식품, 조제유류, 아이스크림류, 아이스크림분말류, 아이스크림믹스류 등의 제품을 말한다.

가. 우유류

(1) 정의

우유류라 함은 원유 또는 원유에 비타민이나 무기질을 강화하여 살균 또는 멸균 처리한 것이거나, 살균 또는 멸균 후 유산균, 비타민, 무기질을 무균적으로 첨가한 것 또는 유가공품으로 원유성분과 유사하게 환원한 것을 살균 또는 멸균처리한 것을 말한다.

(2) 축산물가공품의 유형

(가) 우유 : 원유를 살균 또는 멸균처리한 것을 말한다(원유 100%).

(나) 강화우유 : 우유에 비타민 또는 무기질을 강화한 것을 말한다(원유 100%, 단, 강화제 제외).

(다) 환원유 : 유가공품으로 원유성분과 유사하게 환원하여 살균 또는 멸균처리한 것으로 유고형분(전지방분유와 성분규격이 같은 것) 11% 이상의 것을 말한다.

(라) 유산균첨가우유 : 우유에 유산균을 첨가한 것을 말한다(원유 100%, 단, 유산균 제외).

출처 : 식품의약품안전처, 축산물의 가공기준 및 성분규격 (2015.8.25)

○ 각 협동연구기관 개발 물질 함유 개발 제품(우유) 배합비 설정

- 협동1, 3에서 제공한 개발 물질을 각각의 함량으로 배합 후 각기 물질의 유효성을 검증(협동2)하여 최적 배합비 설정, 관능검사를 통해 당류, 천연향 등을 통한 관능성 개선 후 최종 시제품 배합비를 설정할 예정임



〈균질기〉

〈발효탱크〉



〈포장기〉

〈시제품 출하〉

○ 시제품 제작

- 협동1, 3에서 제공한 개발 물질을 각각의 함량으로 배합기로 배합 후 설정한 균질 조건으로 균질한 뒤 발효탱크로 설정한 온도로 살균 후 포장, 출하 과정을 거쳐 시제품을 제작할 예정임

■ 각 협동연구기관 개발 물질 함유 개발 제품(우유) 배합비 설정

- 협동1, 3에서 제공한 개발 물질을 각각의 함량으로 배합 후 각기 물질의 유효성을 검증하여 최적 배합비 설정, 관능검사를 통해 당류, 천연향 등을 통한 관능성 개선 후 최종 시제품 배합비를 설정함
- 관능검사는 단국대학교 천안캠퍼스 교직원 및 주관기관 직원 40대 이상 성인 30명을 대상으로 실시하였으며 개발물질 함유 혼합액의 포도당 첨가 농도 및 향을 종류별로 첨가하였을 경우 각각의 쓴맛(Bitterness), 단맛(Sweetness), 신맛(Sourness), 조직감(Texture), 점도(Viscosity) 및 전반적 기호도(Overall taste)를 7점 척도법으로 실행하였음

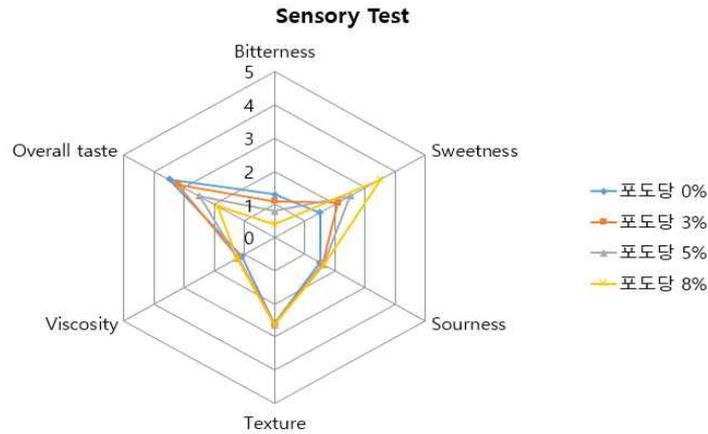


Fig. 1. Sensory test results of calcium-fortified milk added glucose.

- (Fig. 1)기존 배합비에 포도당을 첨가하여 관능검사를 진행한 결과 단맛(Sweetness)에서 포도당 미첨가 개발물질 함유 혼합액보다 포도당 첨가 개발물질 함유 혼합액이 점차적으로 점수가 증가하는 경향을 보였으나 전체적 기호도(Overall taste)에서 포도당 미첨가한 개발물질 함유 혼합액의 점수가 가장 높았음

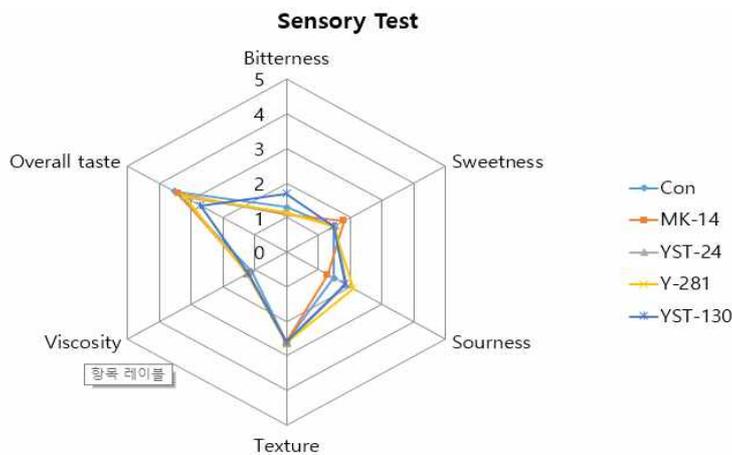


Fig. 2. Sensory test results of calcium-fortified milk added Flavor.

*Con : not added flavor

*MK-14 : added Milk flavor(Milk Flavor K-141957, KPC, Korea) 0.05%

*YST-24 : added Yogurt flavor(Yogurt ST-2468, SATIS, Korea) 0.05%

*Y-281 : added Yogurt flavor(요구르트 향 2810055,SAMJUNG, Korea) 0.05%

*YST-130 : added Yogurt flavor(YOGURT 130328, NOCKS CO, Japan) 0.05%

- (Fig. 2)기존 배합비에 Milk flavor, Yogurt flavor를 각각 0.05%씩 첨가하여 관능검사를 진행한 결과 전체적 기호도(Overall taste)에서 향 첨가 및 무첨가의 유의적인 차이가 확인되지 않았음. 따라서, 개발물질 함유 혼합액에 대하여 가장 기호도가 높은 포도당 미첨가 개발물질 함유 혼합액을 시제품 배합비로 확립함

Table. 1. 시제품 배합비

배합원료명	배합비율(%)
원유	99.792236
유단백가수분해물(DKMH110)	0.1
땅콩새싹 추출물	0.05
비타민 A	0.00007
비타민 B2	0.000175
비타민 D	0.000001
비타민 E	0.001
칼슘	0.1
젖산결	0.0065
엽산	0.000018
합계	100

■ 개발 제품(우유) 품질관리기준 및 대량생산공정 설정

○ 원재료, 배합 및 살균 등 개발 제품(우유)의 미생물학적, 이화학적 품질관리기준 설정

- 칼슘강화우유 시제품의 안정성 및 이화학적 품질특성을 확인하기 위해 온도 저장 조건별에 따른 일반세균수, 대장균수를 측정함. 실험에는 식품공전(식품의약품안전청 고시) 미생물 시험법에 따라 최확수법(Automated MPN)을 이용하였음

Table. 2. 칼슘강화우유 시제품의 온도 조건별 저장성

	이화학적특성	Counts(CFU/mL)							
		0 day	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day
5℃ (냉장조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1.0×10 ¹	2.0×10 ¹	2.0×10 ¹
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
15℃ (유통조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	1.0×10 ¹	2.0×10 ¹	5.0×10 ¹	2.0×10 ²
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
25℃ (고온조건)	일반세균수	N.D	1.0×10 ¹	2.0×10 ¹	3.5×10 ¹	2.0×10 ²	3.0×10 ²	5.0×10 ²	1.0×10 ³
	대장균수	N.D	N.D	N.D	1.0×10 ¹	2.0×10 ¹	1.0×10 ²	2.0×10 ²	2.3×10 ²

*N.D : 미검출

- 칼슘강화우유 시제품에 대한 저장조건별 세균수 변화 조사에 따른 세균수는 냉장조건(5 ℃)에서 저장 10일 까지 모두 세균수 기준치(2만 이하/mL)이내였고, 유통조건(15 ℃) 보관 시 저장 6일까지는 기준치 이내였으나 저장 8일부터 세균수 기준치를 초과하기 시작했음. 고온조건(25 ℃) 보관시에는 저장 4일째부터 세균수 기준치를 초과하기 시작함
- 칼슘강화우유 시제품의 안정성 및 이화학적 품질특성을 확인하기 위해 온도 저장 조건별에 따른 산도, pH를 측정함. 실험에는 식품공전(식품의약품안전청 고시) 식품별 규격 확인 시험법에 따라 실험을 진행하였음

Table. 3. 칼슘강화우유 시제품의 온도 조건별 pH 및 산도 변화

	이화학적특성	Counts(CFU/mL)							
		0 day	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day
5℃ (냉장조건)	산도	0.15	0.15	0.15	0.16	0.18	0.18	0.18	0.20
	pH	6.44	6.44	6.44	6.42	6.40	6.35	6.35	6.31
15℃ (유통조건)	산도	0.15	0.15	0.16	0.16	0.17	0.19	0.20	0.24
	pH	6.44	6.44	6.43	6.42	6.41	6.38	6.36	6.34
25℃ (고온조건)	산도	0.15	0.16	0.19	0.21	0.24	0.29	0.35	0.42
	pH	6.44	6.42	6.40	6.39	6.34	6.25	6.10	5.88

- 칼슘강화우유 시제품에 대한 저장조건별 식품별 규격 확인 시험법에 따른 pH는 냉장조건(5 ℃)에서 저장 10일 까지 모두 적정 pH(6.7~6.4)이내였고, 유통조건(15 ℃) 보관시 저장 15일까지는 기준치 이내였으나 저장 18일부터 pH 기준치를 초과하기 시작했음. 고온조건(25 ℃) 보관시에는 저장 6일째부터 세균수 기준치를 초과하기 시작함
- 산도는 냉장조건(5 ℃)에서 저장 18일 까지 모두 적정 산도(0.18% 이하)이내였고, 유통조건(15 ℃) 보관시 저장 12일까지는 기준치 이내였으나 저장 15일부터 세균수 기준치를 초과하기 시작했음. 고온조건(25 ℃) 보관시에는 저장 6일째부터 적정 산도 기준치를 초과하기 시작함

- 칼슘강화우유 시제품의 안정성 및 이화학적 품질특성을 확인하기 위해 온도 저장 조건별에 따른 전체적인 기호도 및 분리도를 검사함 전체적 기호도에서는 이미, 이취가 나는 정도를 표시(+)하였으며 분리도에서는 칼슘강화우유 시제품의 층분리 현상을 나타내는 정도를 표시(+)하였음

Table. 4. 칼슘강화우유 시제품의 온도별 전체적 기호도 및 분리도

	이화학적특성	Counts(CFU/mL)							
		0 day	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day	18 day	21 day
5℃ (냉장조건)	전체적 기호도	+	+	+	+	+	+	+	+
	분리도	+	+	+	+	+	+	+	+
15℃ (유통조건)	전체적 기호도	+	+	+	+	+	+	++	++
	분리도	+	+	+	+	+	+	+	++
25℃ (고온조건)	전체적 기호도	+	+	+	+	+	++	++	++
	분리도	+	+	+	+	+	++	++	++

*(+) : 전혀 아니다, (++) : 조금 그렇다, (+++) : 매우 그렇다

- 칼슘강화우유 시제품에 대한 저장조건별 전체적 기호도 및 분리도를 조사해본 결과 전체적 기호도에서는 냉장조건(5 ℃)에서는 저장 10일까지 모두 기준이 되는 이미, 이취가 없다고 느꼈으며, 유통조건(15 ℃)보관 시 15일까지는 기준치 이내였으나 저장 18일부터 조금 그렇다고 느꼈음. 고온조건(25 ℃) 보관 시에는 저장 15일째부터 조금 그렇다고 느꼈음
- 분리도에서는 냉장조건(5 ℃)에서는 저장 10일까지 모두 층분리 현상이 발견되지 않았으며, 유통조건(15 ℃)보관 시 18일까지는 기준치 이내였으나 저장 21일부터 층분리 현상이 발견됨. 고온조건(25 ℃) 보관 시에는 저장 15일째부터 층분리 현상이 발견됨
- 칼슘강화우유 시제품의 저장기간인 21일 중 품질에 대한 급속한 변질과 같은 변화를 보여주지 않으므로 유통기한 설정 시제품 생산, 품질관리 규격 설정 및 신제품 출시에 바람직한 영향을 줄 수 있을 것으로 예상되어 최종 유통기한을 10일로 설정함

- 품질관리 기준 설정을 위해 신제품으로 출시될 칼슘강화유(뼈사랑 칼슘우유)의 품질관리 기준서를 다음과 같이 설정함

Table. 5. 칼슘강화유(뼈사랑 칼슘우유)의 품질관리기준서

1. 제품명	뼈사랑칼슘우유		
2. 제품 유형 및 성상	- 제품유형 : 강화우유 - 성상 : 고유의 색택(유백색~황색)과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없음		
3. 품목제조(변경) 보고연월일	최초: 2017년 10월 31일 변경:		
4. 작성자 및 작성연월일	- 작성자 : 김홍석 - 작성연월일 : 2017년 10월 20일		
5. 성분배합비율	원유(99.683574%), 유단백질 가수분해물(0.1%), 땅콩새싹 추출물(0.05%), vit. A(0.00007%), vit. B(0.000175%), vit D(0.000001%), vit E(0.001%), 칼슘(0.1%), 철분(0.0065%), 엽산(0.000018%) 합계(100%)		
6. 제조(포장)단위	폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리프로필렌 또는 캔에 200 mL, 250 mL, 500 mL, 1,000 mL		
7. 완제품의 규격	구 분	법적 규격	사내 규격
	성상	고유의색택과향미를가진액상으로 서이미·이취가없어야한다.	고유의색택과향미를가진액상으로 서이미·이취가없어야한다.
	생물학적 항목	· 대장균군:n=5,c=2,m=<3,M=10 · Listeriamonocytogenes: n=5, c=0, M=0 / 25g · Salmonellaspp:n=5,c=0,M=0/2 5g · Staphylococcus aureus: n=5, c=0, M=0 / 25g	· 대장균군:n=5,c=2,m=<3,M=10 · Listeriamonocytogenes: n=5, c=0, M=0 / 25g · Salmonellaspp:n=5,c=0,M=0/2 5g · Staphylococcus aureus: n=5, c=0, M=0 / 25g
	화학적 항목	· 유지방(%) : 3.0이상 · 조지방(%) : 2.7이상 · 유당(%) : 1.0이상	· 좌동
	물리적 항목	· 이물:금속성2 mm이상불검출 비금속성 3 mm이상 불검출	· 좌동
8. 포장방법 및 재질	- 포장방법 : 제품을 내포장재에 투입한 후 외포장재에 포장 - 포장재질 · 내포장재: PE / · 외포장재: 종이박스		
9. 유통기한	제조일로부터 10일		
10. 제품용도	- 소비대상 : 일반인을 포함한 불특정 다수인 - 섭취방법 : 직접음용하거나 원료로 사용한다.		
11.보관·유통상의 주의사항	냉장상태(0~10 ℃)에서 보관 및 유통, 개봉 후 빠른 시간내에 섭취		
12.기타필요사항	<ul style="list-style-type: none"> •영업장 및소재지:주식회사유담,충남천안시서북구직산읍남산2길65 •고객상담실:041-415-1518 •개봉 후에는 냉장보관하시거나 빨리 드시기 바랍니다. •제품상부에맑은액체가생기는유청분리는우유에서유래된성분이오니안심하시고 잘 흔들어 드시기 바랍니다. 		

	<ul style="list-style-type: none"> •이 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상 받을 수 있습니다. •부정, 불량식품 신고는 국번없이 1399
--	--

○ 개발 제품(우유) 대량생산공정 설정

Table. 6. Pilot scale 칼슘강화우유 제조

원유함량 (%)	단백질 가수분해물 (%)	땅콩새싹 추출물 (%)	비타민 첨가 (%)	균질 (bar)	살균	
					(°C)	(sec)
99.79	0.1	0.05	0.001246	150	95	30

- 칼슘강화우유 시제품 제조를 위한 개발 제품의 Lab scale에서의 최적 공정조건을 토대로 제품 대량 생산시스템 확립 및 표준공정기준 설정을 위해 칼슘강화우유 배합비를 10 L 제조한 후 150 bar로 균질 과정을 거쳤음
- 이 후 균질액을 95 °C waterbath에서 30초간 살균한 뒤 온도가 10 °C 이하로 내려갈 때까지 냉각하여 Pilot scale로 제조하였음
- 그 결과, Lab scale 수준에서 관찰되는 개발 우유 제품 수준의 맛이 저하되어 대용량으로 제조시 이에 다른 방법을 모색하여 Pilot scale로서의 생산공정을 확립하고자 함

Table. 7. 최종 대량생산공정방법 설정

원유함량 (%)	단백질 가수분해물 (%)	땅콩새싹 추출물 (%)	비타민 첨가 (%)	균질 (bar)		살균	
				1차	2차	(°C)	(sec)
99.68	0.1	0.05	0.001246	150	80	95	30

- 이후, 기존의 Lab scale에서 Pilot scale로서의 맛 저하 문제로 인해 150 bar로 1차 균질만 하던 공정 조건에서 150 bar 1차 균질 및 80 bar 2차 균질을 추가로 진행하여 발효탱크에서 300 L를 제조하였음
- 그 결과, Lab scale 수준의 발효액을 제조했으며, 대량생산 공정 조건으로 설정하고자 함

■ 개발 제품(우유) 신제품 출시

○ 개발 제품(우유) 시제품 제작

- 시제품 생산을 위해 칼슘강화우유 시제품 제조 공정 방법을 통한 시제품 생산을 진행하였음

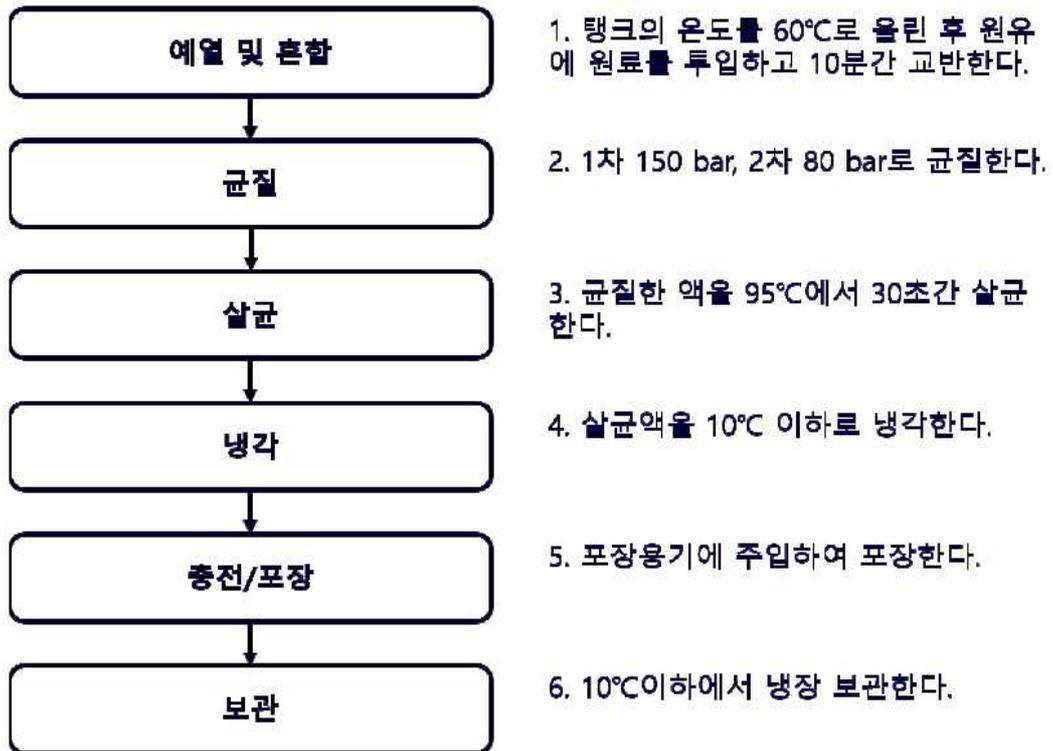


Fig. 3. 시제품 제작을 위한 대량생산공정 프로세스



Table. 8. Preparation of a sensory test of calcium-fortified milk.

평가 준비	내용
패널	<ul style="list-style-type: none"> - 대상 : 단국대학교 천안캠퍼스 교직원 및 주관기관 직원 (40대 이상의 관능검사 유경험자) - 인원 : 30명
시료	<ul style="list-style-type: none"> - 섭취방법 : 제품섭취시와 동일(음용형태) - 양 : 200 mL - 온도 : 우유류(7~10 ℃), 물(20 ℃) - N사의 칼슘강화우유(A), M사의 칼슘강화우유(B), 본 과제 칼슘강화우유(C) - 시료 및 입가심물(상온) 제공
용기	<ul style="list-style-type: none"> - 이취를 일으키지 않는 일회용컵
시점	<ul style="list-style-type: none"> - 생산 직후의 시료는 금하며, 생산 후 2일(우유 최소 숙성기간) 후 진행
제공순서	<ul style="list-style-type: none"> - 두 가지 이상의 시료이므로 순서 조합의 다양화 및 조합별 동일한 횟수로 제공 (ex. ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA) - 제공 순서상 까다로울 경우 임의의 순서로 제공 (한 가지 순서로 제공시, 오류 발생)
표시	<ul style="list-style-type: none"> - 3자리 난수 적용(1, 4, 7 지양)
환경	<ul style="list-style-type: none"> - 밝고 쾌적하며 편안한 공간 - 시료세팅을 위한 별도 공간 확보
평가실시	<ul style="list-style-type: none"> - 평가 30분 이내에 물 이외의 음식물 섭취를 금함 - 시료 준비는 별도의 공간에서 미리 준비함 - 시료에 관한 설명을 하지 아니함 - 평가지 제공 후, 시료와 물을 함께 제공하여 한 시료를 충분히 음용할수 있게 함 - 평가 중이나 평가 완료 후 패널간의 대화는 금함

제공된 시료를 드시고 아래의 평가별로 평가 해주시기 바랍니다.
 평가일 : _____ 이름 : _____ 시료번호 : _____

1. 단맛

매우 약함		보통		매우 강함
1	2	3	4	5

2. 신맛

매우 약함		보통		매우 강함
1	2	3	4	5

3. 떫은맛

매우 약함		보통		매우 강함
1	2	3	4	5

4. 쓴맛

매우 약함		보통		매우 강함
1	2	3	4	5

5. 무게감

매우 약함		보통		매우 강함
1	2	3	4	5

6. 전체적인맛

매우 약함		보통		매우 강함
1	2	3	4	5

Fig. 7. Evaluation paper of a sensory evaluation of calcium-fortified milk.

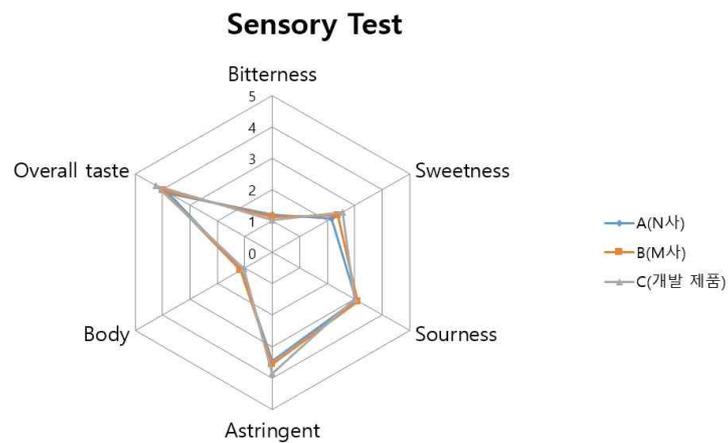


Fig. 8. Sensory test results of calcium-fortified milk.

- 관능검사 결과 제품 A(N사), B(M사) 및 개발 제품에 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 이는 칼슘강화유 특성상 일반 원유에 비해 칼슘강화유가 비타민, 칼슘 등의 미네랄이 소량 첨가되었고 세 제품의 제조공정이 같으므로 관능적 특성까지 큰 차이를 보이지 않는 것으로 판단됨

○ 브랜드 네이밍 및 용기선정 후 신제품 출시

1) 개발 제품(칼슘강화우유)

원재료명	배합비(%)
원유	99.792236
유단백가수분해물 (DKMH110)	0.1
비타민 A	0.00007
비타민 B2	0.000175
비타민 D	0.000001
비타민 E	0.001
칼슘	0.1
젖산균	0.0065
엽산	0.000018
합계	100

- 1) 제품명 : 뽀사랑 칼슘우유
- 2) 유단백가수분해물 : 0.1%
- 3) 품목유형 : 강화우유
- 4) 유통기한 : 제조일로부터 20일
- 5) 용기 : Polyethylene terephthalate(PET)

- 칼슘강화우유의 신제품명은 ‘뽀사랑 칼슘우유’로 선정하였으며, 용기선정에 Polyethylene terephthalate(PET)로 선정함

■ 개발물질의 대량생산공정 설정

○ 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 제품 적용성 확인

- 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 제품 적용성 확인을 위한 농도별 제품 적용성 테스트를 진행하였음. 땅콩새싹 추출물과 작약 추출물을 각 기본 배합비에 농도별(0.05, 0.1, 0.5%)로 첨가하여 용해성을 탐색하였음
- 그 결과, 땅콩새싹 추출물은 0.5%의 농도에서 땅콩의 기름 성분으로 인한 배합 후의 층분리 현상으로 제품 적용성이 떨어지는 것을 확인하였음

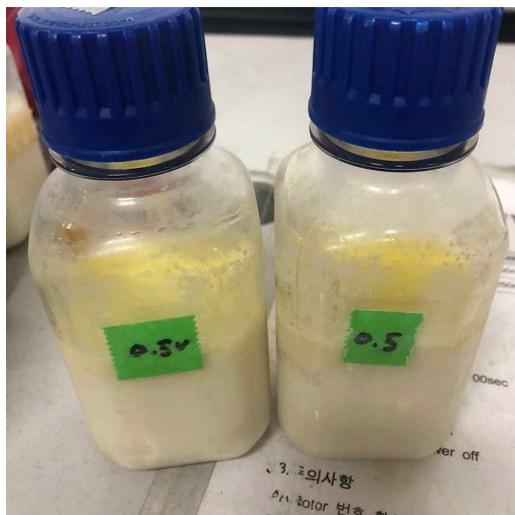


Fig. 9. 땅콩새싹추출물 0.5% 첨가 발효유

- 땅콩새싹추출물 배합과 동일한 방법으로 작약 추출물의 농도를 설정하여 제품 적용 테스트를 진행한 결과, 작약 추출물 역시 0.5%의 농도에서 용해성이 떨어져 고형분이 육안으로 관찰되는 결과를 낳았음. 이 외에 농도에서는 제품으로의 적용에 문제가 없다고 판단되었음. 따라서 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 배합 시 농도를 0.5% 이하로 설정하기로 함



Fig. 10. 작약추출물 0.5% 첨가 발효유음료

○ 개발소재의 대량생산공정 설정

- 협동1, 2의 개발 소재인 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 대량생산공정 설정을 위하여 천연물의 Lab scale 추출법을 Pilot scale로 scale up하여 추출을 진행하였음
- 땅콩새싹 및 작약을 취하여 추출할 용매를 넣고 12시간 추출 후 감압농축을 이용하여 용매를 날리고 무게를 측정하는 방식을 사용하였음

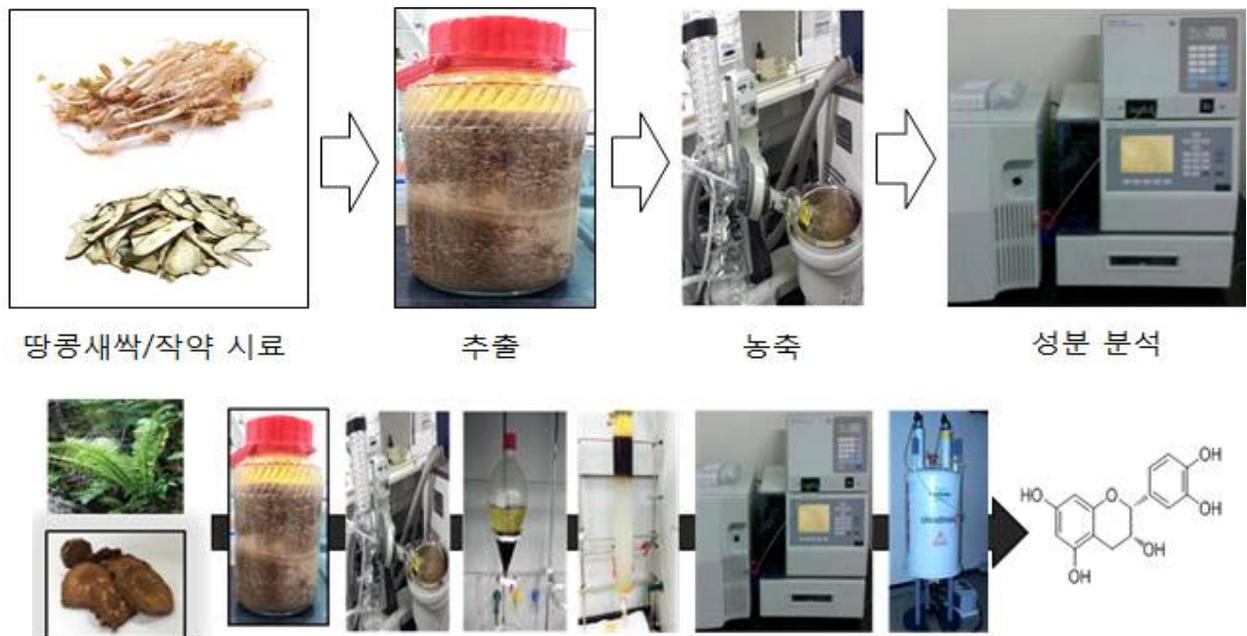


Fig. 11. 천연물 소재(땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물)의 대량생산공정

- 협동3의 개발 소재인 유산균의 대량생산공정 설정을 위하여 유산균주의 Lab scale 배양법을 Pilot scale로 scale up하여 진행하였음
- 협동3에서 제공한 선발 발효유산균주의 대량생산공정 개발을 위해 DK 109(*L. plantarum*)의 배양조건을 탐색하였음. DK 109를 MRS agar에서 48시간 배양시킨 후 3 L flask를 사용하여 MRS broth에 배양 적정온도인 37 °C에서 통성 혐기성 조건으로 정치배양하였으며, 배양 시간별 생균 활성의 변화를 탐색하였음

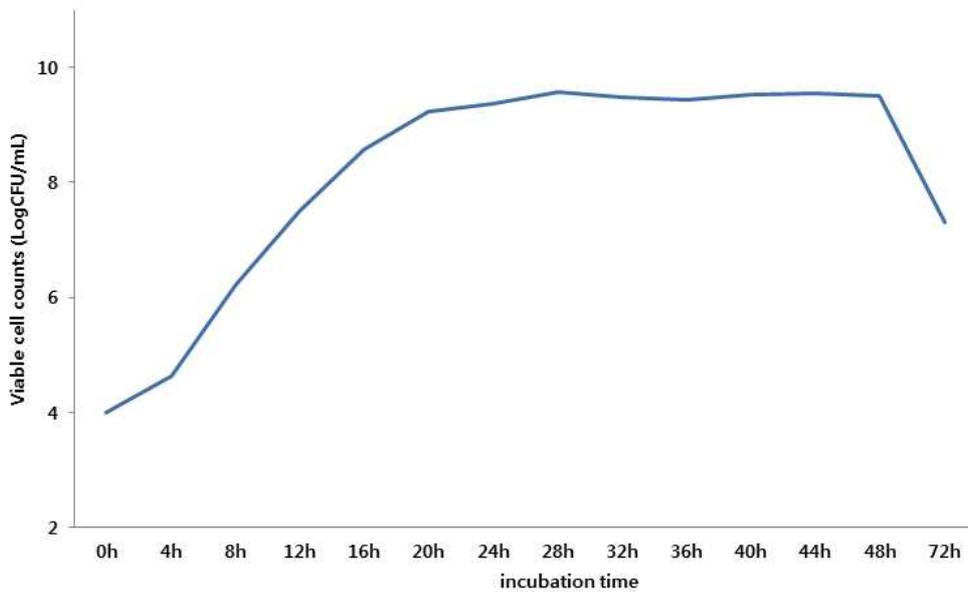


Fig. 12. Viable cell counts of DK 109(*L. plantarum*)

- DK 109(*L. plantarum*)의 대량 배양 결과 배양 시간 44시간까지 생균활성에 문제가 없는 것으로 판단되어 발효유 및 발효유음료의 접종 과정을 거치기 전 배양 방법을 위 방법과 같이 설정하여 분말형태로 대량생산 실시하였음



Fig. 13. DK 109(*L. plantarum*)의 Pilot scale 생산공정

■ 개발제품의 원료 및 배합비 설정

- 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 원료 및 배합비 설정

- 개발 예정 제품인 발효유 및 발효유음료의 원료 및 배합비 설정을 위하여 뼈 건강 타겟에 맞게 1차년도에 개발한 가수분해 유청 단백질(펩타이드 가수분해물)을 첨가하기로 하였으며, 협동기관에서 개발한 천연물 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물을 발효유 및 발효유음료에 각각 첨가하기로 하여 배합비를 설정하였음
- 선발 유산균주인 DK 109(*L. plantarum*)는 유산균 제조 전문 기업인 (주)토비코를 통해 DVS type 형태로 제공받아 제조하여 사용하였으며, 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물은 천연물 제조 전문 기업인 (주)웰런비엔에프를 통하여 액상 추출물 형태로 제공받아 제조하였음

Table. 9. 땅콩새싹 발효유 배합비

땅콩새싹 발효유 배합비 / 1 L 기준		
재료	단위(g)	비율(%)
탈지분유	140	14
유단백 가수분해물	1	0.1
땅콩새싹추출물	5	0.05
함수결정포도당	30	3
유산균	50	0.5
바닐라향	0.25	0.025
정제수	823.25	82.325

Table. 10. 작약 발효유음료 배합비

작약 발효유음료 배합비 / 1 L 기준		
재료	단위(g)	비율(%)
유단백 가수분해물	1	0.1
작약 추출물	1	0.1
함수결정 포도당	50	5
유산균	0.2	0.02
배 향	0.25	0.025
정제수	947.55	94.755

■ 개발 제품의 품질관리기준 및 대량생산공정 설정

○ 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 품질관리기준 설정

- 선발유산균주 함유 땅콩새싹 발효유와 작약 발효유음료의 최적 발효 조건을 바탕으로 최종 선발된 DK 109(*L. plantarum*)를 이용한 시제품을 제조하였고, 저장기간에 따른 품질 특성 확인하였음
- 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 온도 조건별 저장성에 따른 일반세균수, 대장균수를 측정하기 위해 식품공전(식품의약품안전청 고시) 미생물 시험법에 따라 일반세균수 측정에

는 표준평판법을, 대장균수 측정에는 정성시험(유당배지법)을 이용하였음

Table. 11. 땅콩새싹 발효유의 온도 조건별 미생물 시험 결과

	이화학특성	Counts(CFU/mL)					
		0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
5℃ (냉장조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
15℃ (유통조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
25℃ (고온조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	2.0×10 ²
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃ (고온조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

*N.D : 미검출

- 5, 15, 25, 35 ℃에 보관한 땅콩새싹 발효유를 7일 간격으로 35일 경과시까지 관찰한 결과 유통기한 완료시점인 8일 경과시까지 대부분 균이 검출되지 않았음.
- 그러나 고온 조건으로 갈수록 유통기한이 완료되는 시점에 일반 세균이 검출되었음
- 발효유가 멸균이 아닌 살균 제품이었기 때문에 최초 제품에서 극소량의 균이 남아 있다가 적절치 못한 온도보관에 따라 균이 증식될 수 있는 것으로 사료됨

Table. 12. 작약 발효유음료의 온도 조건별 저장성

	이화학특성	Counts(CFU/mL)					
		0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
5℃ (냉장조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
15℃ (유통조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
25℃ (고온조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
35℃ (고온조건)	일반세균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1.0×10 ¹
	대장균수	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

*N.D : 미검출

- 5, 15, 25, 35 °C에 보관한 작약 발효유음료 또한 7일 간격으로 35일 경과시까지 관찰한 결과 유통기한 완료시점인 8일 경과시까지 대부분 균이 검출되지 않았으나 고온조건의 유통기한이 완료되는 시점에 일반세균이 검출되었음
- 발효유음료가 멸균이 아닌 살균 제품이었기 때문에 최초 제품에서 극소량의 균이 남아 있다 가 적절치 못한 온도보관에 따라 균이 증식될 수 있는 것으로 사료됨. 시중 유통 온도 및 매대 온도인 10 °C에서는 유통기한내 이상이 없음을 확인함

Table. 13. 온도 조건별 저장기간에 따른 땅콩새싹 발효유의 pH 및 산도 변화

	이화학특성	pH 및 적정산도					
		0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
5°C (냉장조건)	pH	4.39	4.38	4.36	4.35	4.33	4.32
	산도(%)	0.119	0.120	0.122	0.125	0.127	0.130
15°C (유통조건)	pH	4.39	4.37	4.36	4.34	4.32	4.31
	산도(%)	0.119	0.121	0.123	0.126	0.129	0.131
25°C (고온조건)	pH	4.39	4.38	4.35	4.33	4.29	4.24
	산도(%)	0.119	0.124	0.131	0.137	0.140	0.146
35°C (고온조건)	pH	4.39	4.38	4.33	4.29	4.25	4.21
	산도(%)	0.119	0.121	0.128	0.135	0.140	0.148

- 5, 15, 25, 35 °C에 보관한 땅콩새싹 발효유를 7일 간격으로 35일 동안 pH 및 산도 (APHA, 1995)를 측정 한 결과 저장기간이 길어짐에 따라 산 생성이 많아져 pH값이 낮아짐을 확인할 수 있었음

- pH값이 일정 수치 이하로는 떨어지는 경향이 보이지 않았는데, 이는 발효유 내에서 산 생성 이후 사멸되는 균의 영향을 받을 것으로 판단되었으며, 산도 또한 저장기간이 길어짐에 따라 상승하는 것을 확인할 수 있었음

Table. 14. 온도 조건별 저장기간에 따른 작약 발효유음료의 pH 및 산도 변화

	이화학특성	pH 및 적정산도					
		0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
5°C (냉장조건)	pH	4.23	4.22	4.20	4.19	4.17	4.16
	산도(%)	0.014	0.015	0.017	0.019	0.020	0.023
15°C (유통조건)	pH	4.23	4.21	4.19	4.17	4.15	4.14
	산도(%)	0.014	0.016	0.018	0.020	0.022	0.025
25°C (고온조건)	pH	4.23	4.20	4.16	4.11	4.06	4.01
	산도(%)	0.014	0.020	0.026	0.032	0.038	0.046
35°C (고온조건)	pH	4.23	4.20	4.14	4.10	4.03	3.94
	산도(%)	0.014	0.021	0.029	0.034	0.041	0.050

- 5, 15, 25, 35 °C에 보관한 작약 발효유음료를 7일 간격으로 35일 동안 pH 및 산도 (APHA, 1995)를 측정한 결과 저장기간이 길어짐에 따라 산 생성이 많아져 pH 값이 낮아짐을 확인할 수 있었음
- pH값이 일정 수치 이하로는 떨어지는 경향이 보이지 않았는데, 이는 발효유 내에서 산 생성 이후 사멸되는 균의 영향을 받을 것으로 판단되었으며, 산도 또한 저장기간이 길어짐에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 이에 따라 품질관리 기준 설정을 위해 신제품으로 출시될 땅콩새싹발효유(나를위한 땅콩새싹 요거트) 및 작약 발효유음료(나를위한 작약 요거트음료)의 품질관리 기준서를 다음과 같이 설정함

Table. 15. 땅콩발효유(나를위한 땅콩새싹 요거트)의 품질관리기준서

1. 제품명	나를위한 땅콩새싹 요거트		
2. 제품 유형 및 성상	- 제품유형 : 농후발효유		
	- 성상 : 고유의 색택(유백색~황색)과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없음		
3. 품목제조 보고 및 보고번호	- 보고일: 2018년 12월 03일 - 품목제조 보고번호 : 2004044800229		
4. 작성자 및 작성연월일	- 작성자 : 김홍석		
	- 작성연월일 : 2018년 12월 03일		
5. 성분배합비율	정제수82.325%, 탈지분유14%, 함유결정포도당3%, 유산균0.5%, 유단백 가수분해물0.1%, 땅콩새싹추출물0.05%, 바닐라향0.025% 합계 100(%)		
6. 제조(포장)단위	폴리에틸렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리프로필렌, 병 또는 캔 용기에 80ml~1000ml 또는 벌크 포장		
7. 완제품의 규격	구 분	법적 규격	사내 규격
	성상	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.
	생물학적 항목	· 대장균군:n=5,c=2,m=<3,M=10 · Listeriamonocytogenes: n=5, c=0, M=0 / 25g · Salmonellaspp:n=5,c=0,M=0/25g · Staphylococcus aureus: n=5, c=0, M=0 / 25g	· 대장균군:n=5,c=2,m=<3,M=10 · Listeriamonocytogenes: n=5, c=0, M=0 / 25g · Salmonellaspp:n=5,c=0,M=0/25g · Staphylococcus aureus: n=5, c=0, M=0 / 25g
		· 무지유고형분(%) : 8.0이상 · 유산균 : 1 x 10 ⁸ 이상 · pH : 4.3~4.7	· 좌동
	물리적 항목	· 이물:금속성 2 mm 이상 불검출 · 비금속성 3 mm 이상 불검출	· 좌동
8. 포장방법 및	- 포장방법 : 제품을 내포장재에 투입한 후 외포장재에 포장		

재질	- 포장재질 · 내포장재: PET / · 외포장재: 종이박스
9. 유통기한	- 제조일로부터 20일
10. 제품용도	- 소비대상 : 일반인을 포함한 불특정 다수인 - 섭취방법 : 직접음용하거나 원료로 사용한다.
11.보관·유통상의 주의사항	냉장상태(0~10 ℃)에서 보관 및 유통, 개봉 후 빠른 시간내에 섭취
12.기타필요사항	<ul style="list-style-type: none"> · 영업장 및소재지:주식회사유담,충남천안시서북구직산읍남산2길65 · 고객센터:041-415-1518 · 개봉 후에는 냉장보관하시거나 빨리 드시기 바랍니다. · 제품상부에맑은액체가생기는유청분리는우유에서유래된성분이오니안심하시고 잘 흔들어 드시기 바랍니다. · 이제품은공정거래위원회고시소비자분쟁해결기준에의거교환또는보상받을수있습니다. · 부정,불량식품신고는국번없이1399

Table. 16. 작약 발효유음료(나를위한 작약 요거트 음료)의 품질관리기준서

1. 제품명	나를위한 작약 요거트 음료		
2. 제품 유형 및 성상	- 제품유형 : 유산균음료 - 성상 : 고유의 색택(유백색~황색)과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없음		
3. 품목제조 보고 및 보고번호	보고일: 2018년 12월 03일 품목제조 보고번호 : 2014044903211		
4. 작성자 및 작성연월일	- 작성자 : 김홍석 - 작성연월일 : 2018년 12월 03일		
5. 성분배합비율	정제수(94.755%), 함수결정포도당(5%), 작약추출액(0.1%), 유단백 가수분해물(0.1%), 배향(0.025%) 유산균(0.02%) 합계(100%)		
6. 제조(포장)단위	폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리프로필렌 또는 병에 100mL~1000mL, 벌크		
7. 완제품의 규격	구 분	법적 규격	사내 규격
	성상	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.
	생물학적 항목	· 유산균수: 1 mL당 1×10^6 이상 · 대장균군: $n=5, c=1, m=0, M=10$	· 유산균수: 1 mL당 1×10^6 이상 · 대장균군: $n=5, c=1, m=0, M=10$
	화학적 항목	· 당도 : 4.5~4.9 · pH : 3.8~4.3 · 보존료 : 불검출	좌동
	물리적 항목	· 이물 - 금속성 2 mm 이상 불검출 - 비금속성 3 mm 이상 불검출	좌동
8. 포장방법 및 재질	- 포장방법 : 제품을 내포장재에 투입한 후 외포장재에 포장 - 포장재질 · 내포장재: PET / · 외포장재: 종이박스		

9. 유통기한	- 제조일로부터 20일
10. 제품용도	- 소비대상 : 일반인을 포함한 불특정 다수인 - 섭취방법 : 직접 음용하거나 원료로 사용한다.
11. 보관·유통상의 주의사항	- 냉장상태(0~10 ℃)에서 보관 및 유통, 개봉 후 빠른 시간내에 섭취
12. 기타필요사항	<ul style="list-style-type: none"> • 영업장 및 소재지 : 주식회사 (주)유담, 충남 천안시 서북구 직산읍 남산2길 65 • 고객센터 : 041-415-1518 • 개봉 후에는 냉장보관 하시거나 빨리 드시기 바랍니다. • 제품 상부에 맑은 액체가 생기는 유청 분리는 우유에서 유래된 성분이니 안심하시고 잘 흔들어 드시기 바랍니다. • 이 제품은 공정거래위원회고시 소비자분쟁해결기준에의거 교환 또는 보상 받을 수 있습니다. • 부정, 불량식품 신고는 국번없이 1399

○ 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 대량생산공정 설정

- 협동기관3 단국대학교에서 Lab scale로 개발된 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 배합비의 Pilot scale화에 따른 대량생산공정을 설정하였음

<p style="text-align: center;">[원유 계량 및 가온]</p> 	<p style="text-align: center;">[과정설명]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제품 배합 작업 시 필요한 원료 입고 및 확인 - 분말원료 : 원료보관창고에 보관 후 계량 사용 - 탱크에 투입 후 40 ℃에서 가온
<p style="text-align: center;">[배합 및 살균]</p> 	<p style="text-align: center;">[과정설명]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 정량 계량된 원료를 믹서를 이용, 혼합 및 용해 - 살균(95±2 ℃, 90 sec)

[냉각 및 Brix 측정]



[과정설명]

- 냉각(12 ± 2 °C)된 배합액의 당도 측정

[저장·이송]



[과정설명]

- 배합액의 저장·이송

[부재료 투입]



[과정설명]

- 부재료 투입 후 교반하며 용해

[살균 및 냉각]



[과정설명]

- 배합액의 살균(95 ± 2 °C, 90 sec) 및 냉각($38-40$ °C)

[유산균 접종]



[과정설명]

- 유산균(DK 109(*L. plantarum*))
접종

[배양]



[과정설명]

- 유산균 배양 및 발효

[냉각 및 써지탱크 이송]



[과정설명]

- 냉각(12 ± 2 °C) 후 써지탱크 이
송

[충진]



[과정설명]

- 제조 완료된 제품액 이송 및 용
량에 맞게 용기에 충전

■ 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 시제품 제작

○ 관능검사를 통한 배합비 개선

- 칼슘강화우유의 관능적 검사를 위해 단국대학교 축산 및 식품 연구실에 재학중인 연구원(석사과정급 이상의 관능검사 유경험자) 패널 30명을 대상으로 5점 척도법을 사용하여 개발 제품과 경쟁제품과의 선호도 조사를 실시함

Table. 17. Preparation of a sensory test of yoghurt and yoghurt beverage.

평가 준비	내용
패널	- 대상 : 단국대학교 천안캠퍼스 교직원 및 주관기관 직원 (40대 이상의 관능검사 유경험자) - 인원 : 30명
시료	- 섭취방법 : 제품섭취시와 동일(음용형태) - 양 : 200 mL - 온도 : 발효유류(7~10 ℃), 물(20 ℃) - N사의 칼슘강화우유(A), M사의 칼슘강화우유(B), 본 과제 칼슘강화우유(C) - 시료 및 입가심물(상온) 제공
용기	- 이취를 일으키지 않는 일회용컵
시점	- 생산 직후의 시료는 금하며, 생산 후 2일(우유 최소 숙성기간) 후 진행
제공순서	- 두 가지 이상의 시료이므로 순서 조합의 다양화 및 조합별 동일한 횟수로 제공 (ex. ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA) - 제공 순서상 까다로울 경우 임의의 순서로 제공 (한 가지 순서로 제공시, 오류 발생)
표시	- 3자리 난수 적용(1, 4, 7 지양)
환경	- 밝고 쾌적하며 편안한 공간 - 시료세팅을 위한 별도 공간 확보
평가실시	- 평가 30분 이내에 물 이외의 음식물 섭취를 금함 - 시료 준비는 별도의 공간에서 미리 준비함 - 시료에 관한 설명을 하지 아니함 - 평가지 제공 후, 시료와 물을 함께 제공하여 한 시료를 충분히 음용할수 있게 함 - 평가 중이나 평가 완료 후 패널간의 대화는 금함

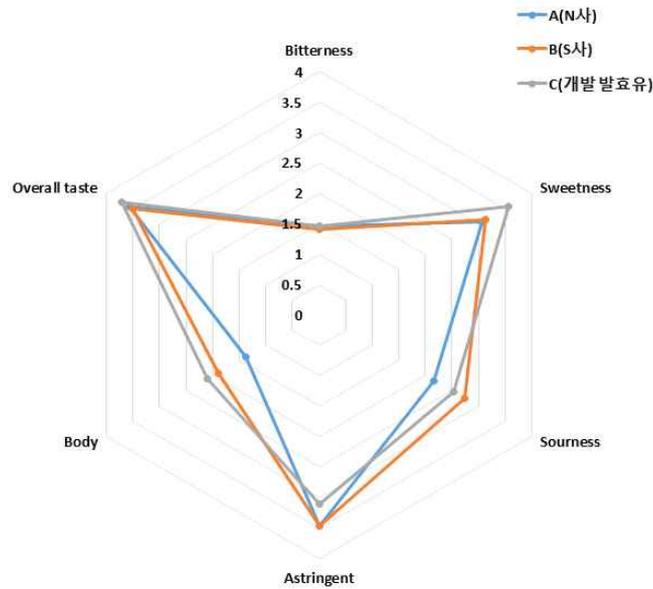


Fig. 14. Sensory test results of yogurt.

- 관능검사 결과 제품 A(N사), B(S사) 및 개발 발효유에 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 하지만 다른 제품과는 달리 땅콩새싹 추출물이 첨가된 개발 발효유의 경우 Body감을 비롯한 전체적인 부분에서 좋은 관능성을 보였음

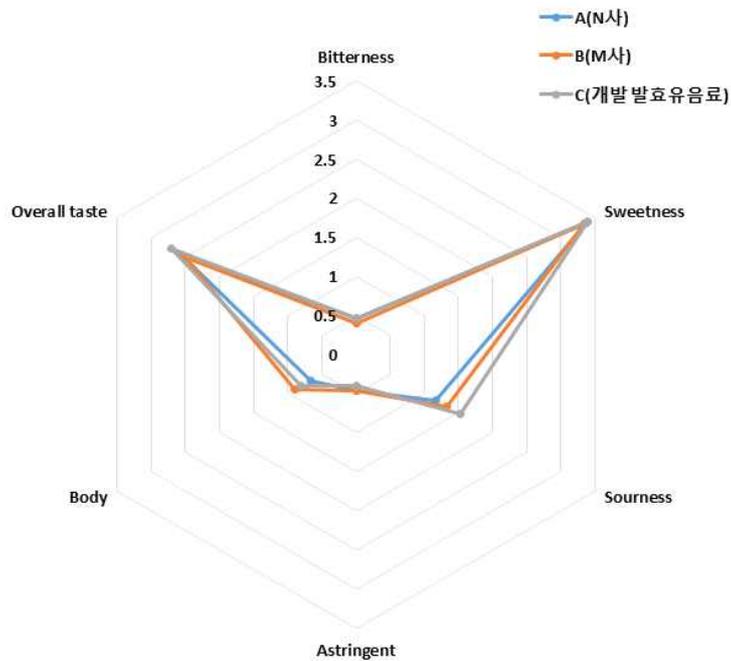


Fig. 15. Sensory test results of yogurt beverage.

- 관능검사 결과 제품 A(N사), B(M사) 및 개발 제품에 유의적인 관능적 특성의 차이가 나타나지 않았기 때문에 펩타이드 가수분해물 및 작약 추출물의 농도를 조절할 필요성이 없는 것으로 판단되었음

○ 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 시제품 제작

- 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 시제품 제작을 위해 대량생산공정 과정을 거쳐 시제품을 제작하였음



원유이송



혼합



살균 및 냉각



접종 및 배양



충진



밀봉

Fig. 16. 시제품 제작 공정 사진

■ 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료 신제품 출시

○ 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료 브랜드 네이밍 및 신제품 출시

- 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 신제품 출시를 위해 제품명 및 용기선정을 완료하였음

Table. 18. 땅콩새싹 발효유 신제품 배합비

원재료명	배합비(%)
탈지분유	14
유단백가수분해물	0.1
땅콩새싹 추출물	0.05
함수결정포도당	3
유산균	0.5
바닐라향	0.025
정제수	82.325
합계	100

- 1) 제품명 : 나를위한 땅콩새싹 요거트
- 2) 무지유고형분 : 13.8%
- 3) 품목유형 : 농후발효유
- 4) 유통기한 : 제조일로부터 20일
- 5) 용기 : 폴리에틸렌테레프탈레이트
- 6) 품목제조보고번호 : 2004044800229

- 땅콩새싹 발효유의 신제품명은 ‘나를위한 땅콩새싹 요거트’로 선정하였으며, 용기선정에 내포장재로 PET, 외포장재로 종이박스를 선정함

Table. 19. 작약 발효유음료

원재료명	배합비(%)
유단백가수분해물	0.1
작약추출물	0.1
함수결정포도당	5
유산균	0.02
배향	0.025
정제수	94.755
합계	100

- 1) 제품명 : 나를위한 작약 요거트 음료
- 2) 품목유형 : 유산균음료
- 3) 유통기한 : 제조일로부터 20일
- 4) 용기 : 폴리에틸렌테레프탈레이트
- 5) 품목제조보고번호 : 2014044903211

- 작약 발효유음료의 신제품명은 ‘나를위한 작약 요거트 음료’로 선정하였으며, 용기선정에 내포장재로 PET, 외포장재로 종이박스를 선정함

- 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료 두 제품의 품목제조신고 및 제품 디자인을 완료하였음

도 수	8도	작업명	나를 위한 땅콩새싹 요거트
CMYK	WHITE	규 격	224mm x 91mm
115C	476C	담 당	푸드마스터그룹 / 담당디자이너 '권혜서' 010 2785 4516
PANTONE SOLID COATED		전 달	
		사 명	

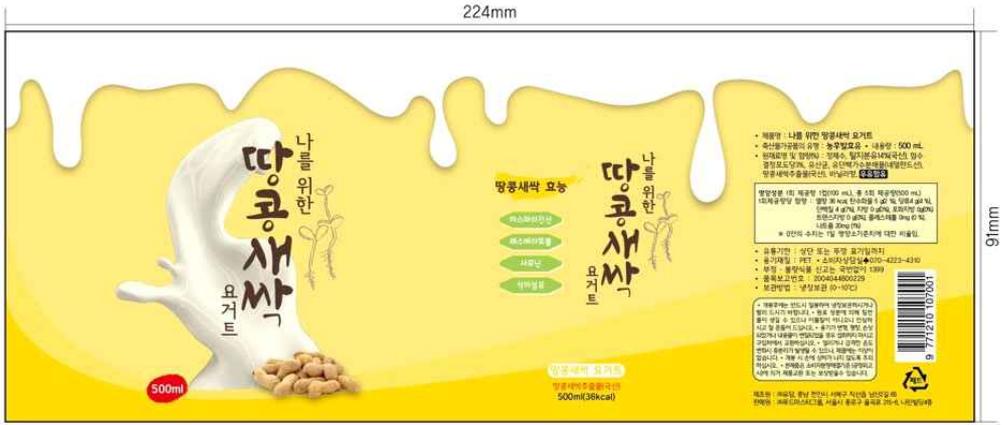


Fig. 19. 땅콩새싹 발효유(나를 위한 땅콩새싹 요거트) 디자인 도안

도 수	8도	작업명	나를 위한 작약 요거트
CMYK	WHITE	규 격	224mm x 91mm
7418C	476C	담 당	푸드마스터그룹 / 담당디자이너 '권혜서' 010 2785 4516
PANTONE SOLID COATED		전 달	
		사 명	

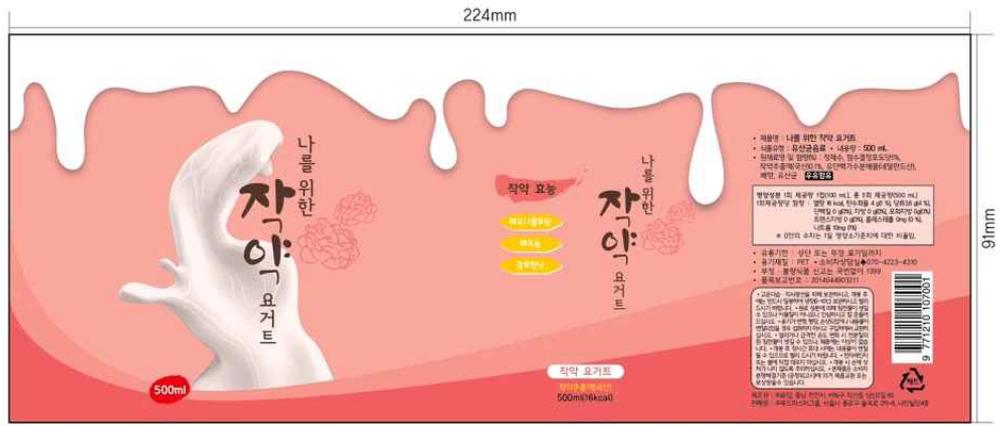


Fig. 20. 작약 발효유음료(나를 위한 작약요거트음료) 디자인 도안

◎협동연구기관 1 (단국대 약학과 박소영 교수)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	뼈 건강 증 진 천연물 소재 개발	• 지역 특산물 소재 선 별및 추출	• 지역 특산물 선별	• 포도, 인삼 등 총 7 종의충청 지역 특산 물을 선별, 시료를 확보하였고, 그 외 뼈 건강에 도움이 되고 활용도가 높은 천연물 (땅콩 새싹 등 7종) 선별, 확보 하였음
			• 에탄올 추출	• 시료 중 생체는 100% 에탄올로 추 출하였고, 건체는 80% 에탄올로 추출 한 후 동결건조 하 여 총 14종의 에탄 올 추출물 확보함
			• 열수 추출	• 모든 시료는 100% 물로 열수 추출한 후(식약처 기준) 동 결건조 하여 총 15 종의 열수추출물 확 보함
	• 천연물 소재의 뼈건 강 활성 스크리닝	• ALP 활성도 측정	• 땅콩새싹, 수박과육 농축액 등 총 29종 의 에탄올 추출물 및 열수 추출물에 대해 ALP 활성을 측정하였으며 이 중 8종의 천연물 추출 물에서 활성이 있는 것을 확인됨 • 8종의 천연물 추출 물 중 땅콩류 (볶은 땅콩, 땅콩새싹)의 활성이 높아 두 천 연물의 분획층의 활 성을 비교 연구 중	

				이며 그 결과를 바탕으로 차년도 실험의 시료로 사용하고 자 함
		<ul style="list-style-type: none"> 천연물 추출물 라이브리리 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 기 구축된 천연물라이브리리를 활용하고자 천연물 추출물을 천연자원연구센터에 기탁함 	<ul style="list-style-type: none"> 14종의 천연물에서 추출한 29종의 추출물을 각각 200 mg씩 천연 자원 연구센터에 기탁함
2차 년도 (2017)	뼈 건강 증진 천연물 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> 지역 특산물 소재 뼈 건강 관련 활성 성분 분리 및 동정 	<ul style="list-style-type: none"> 지역특산물 소재 선정 	<ul style="list-style-type: none"> ALP 활성이 높았던 볏짚과 땅콩새싹 에탄올 추출물을 선별하여 용매 분획하였으며 각 분획층의 ALP활성을 확인한 결과 땅콩새싹의 에틸아세테이트 층이 가장 뛰어난 활성을 보여 최종 선정함
			<ul style="list-style-type: none"> 지역특산물 소재 대량 추출 및 분획 	<ul style="list-style-type: none"> 선정된 땅콩새싹 생체를 에탄올로 대량추출 (총 3 kg) 완료함. 이후 3개의 층으로 분획하여 분획층을 확보함
			<ul style="list-style-type: none"> 유효성분 분리 및 동정 	<ul style="list-style-type: none"> ALP 활성이 높았던 땅콩새싹 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획층에서 각종 크로마토그래피법을 활용하여 물질분리를 진행하였으며 총 3개의 물질을 확보함. 이 물질들을 NMR, MS를 통해 구조동정을 진행중임
		<ul style="list-style-type: none"> 한방 소재 선별 및 추출 및 뼈건강 활성 	<ul style="list-style-type: none"> 한방 소재 선별 및 추출 	<ul style="list-style-type: none"> 작약 등 총 12종의 한방소재 선별, 시료

		스크리닝, 한방소재 추출물 라이브러리 구축	<ul style="list-style-type: none"> • 시료 중 생체는 에탄올로 추출하였고, 건체는 80% 에탄올로 추출한 후 동결건조 하여 총 12종의 에탄올 추출물을 확보함 • 시료는 열수 추출한 후(식약처 기준) 동결건조 후 총 12종의 추출물 확보함 	
			<ul style="list-style-type: none"> • ALP 활성도 측정 및 추출물 라이브러리 구축 • 작약, 자소엽 등 총 12종의 에탄올 추출물 및 열수 추출물에 대한 ALP 활성을 측정하였음 • 12종의 한방소재에서 추출한 24종의 추출물을 각각 20mg씩 소분하여 천연 자원 연구센터에 기탁함 	
3차 년도 (2018)	뼈 건강 증 진 천연물 소재 개발	• 한방 소재 유효성분 분리 동정 및 뼈 건 강 활성 스크리닝	• 한방 소재 유효성분 분리 동정 및 뼈 건 강 활성 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> • 작약 추출 완료 후 3개의 층으로 분획하여 분획층을 확보함 • ALP 활성이 높았던 작약 추출물의 에틸아세테이트 분획층에서 총 8개의 순물질을 확보하였으며, NMR, MS를 통해 구조동정을 완료함 • 분리된 8개의 물질에 대한 ALP활성 측정, 4-O-methylmoudanpioside C, 4-O-methylbenzoylox

				ypaeoniflorin, Oxypaeoniflorin, Benzoyl paeoniflorin, Albiflorin 의 ALP 활성 증가효과를 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 뽕 건강 유효성분의 라이브러리 구축과 뽕 건강 추출물 소재의 표준화 및 대량추출 기반 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 뽕 건강 유효성분의 라이브러리 구축과 뽕 건강 추출물 소재의 표준화 및 대량추출 기반 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 4-O-methylmoudanpioside C, 4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin, Oxypaeoniflorin, Benzoyl paeoniflorin, Albiflorin 의 HPLC 분석 및 지표성분 설정 완료함 • 조건별 추출물들의 Oxypaeoniflorin 함량 확인 및 추출법을 확립함 • 천연 자원 연구센터에 기탁함

○ 지역 특산물 선별

- 뽕 건강에 효능이 있다고 알려진 충청 지역 특산물 중 충남 천안시의 포도(머루포도, 거봉, 청포도), 금산군의 인삼(분말), 충북 청주군의 수박(수박과육 농축액, 수박과피 분말), 보은군의 대추 등 총 7종의 시료를 선별·확보함

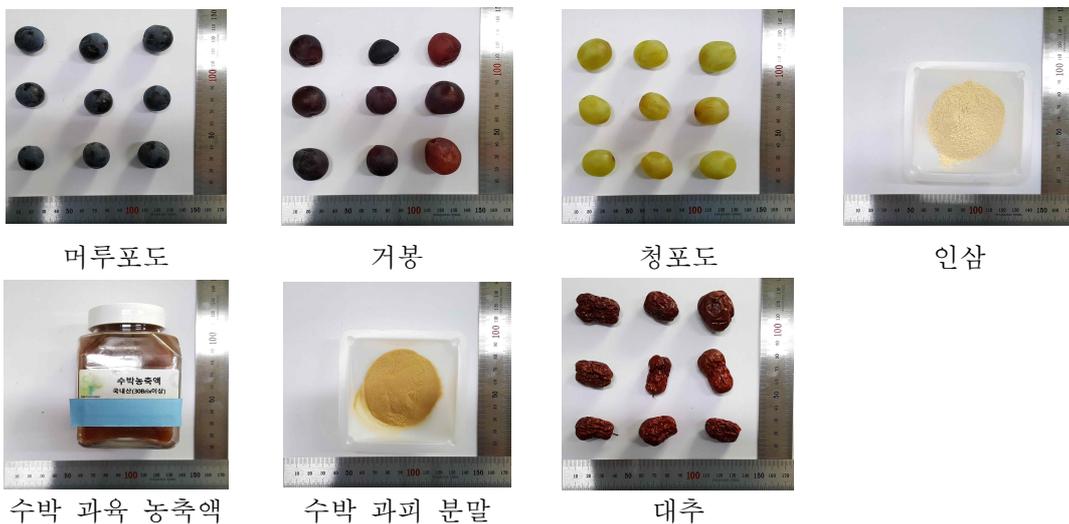


Fig. 1. 지역 특산물 시료

○ 뼈 건강 천연물 선별

- 충남 지역 특산물외에도 뼈 건강에 도움이 되고 식품 및 유제품으로의 활용도가 높은 천연물 9종을 선별하여 이에는 땅콩 새싹 및 견과류(땅콩, 아몬드), 다양한 베리류(아사이베리 분말, 크랜 베리) 등이 포함됨

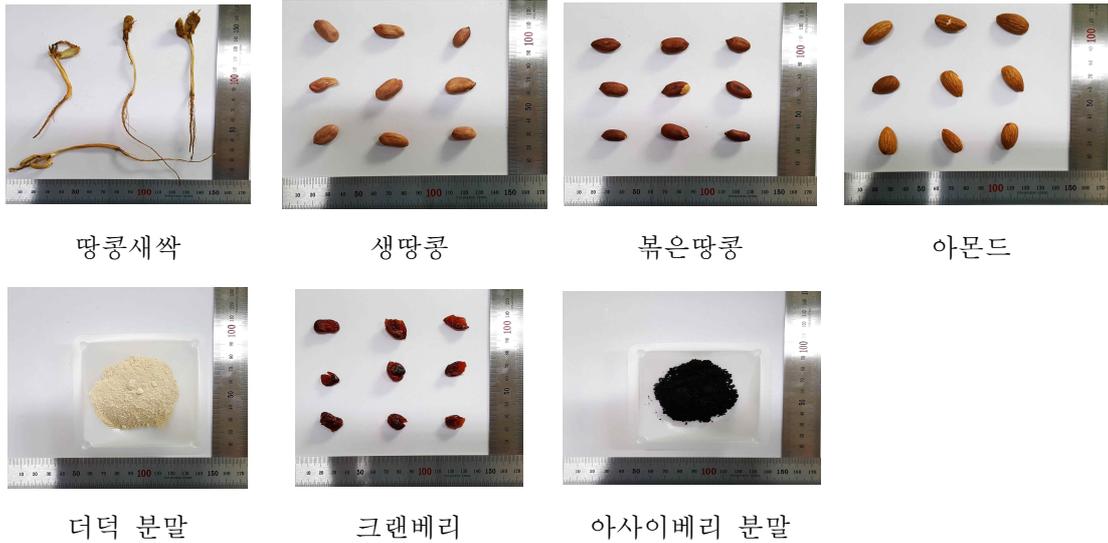


Fig. 2. 뼈 건강에 도움이 되는 천연물 시료

- 에탄올 추출: 천연물 성분을 효율적으로 추출하기 위해 수분을 포함하고 있는 생체의 경우 40g의 시료를 100% 에탄올로 3회 추출하였으며 견체의 경우 20g을 80% 에탄올로 3회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압농축기를 활용하여 유기용매를 제거한 후 12시간동안 동결 건조하여 다음과 같이 추출물을 확보함

Table. 1. 천연물 시료의 에탄올 추출물

시료명	학명	시료 무게(g)	추출물 무게(g)	원산지	추출용매
생땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	20	1.36	국내산	Ethanol 100v/v%
볶은땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	20	1.1	국내산	Ethanol 80v/v%
땅콩새싹생체	<i>Arachis hypogaea</i>	600	18.7	국내산	Ethanol 100v/v%
땅콩새싹건체	<i>Arachis hypogaea</i>	20	7.50	국내산	Ethanol 80v/v%
아몬드	<i>Prunus dulcis</i>	20	1.37	국내산	Ethanol 80v/v%
거봉포도	<i>Vitis vinifera</i> 'Kyoho'	40	4.01	국내산	Ethanol 100v/v%
머루포도	<i>Vitis vinifera</i>	40	6.92	국내산	Ethanol 100v/v%
청포도	<i>Vitis spp</i>	40	5.57	국내산	Ethanol 100v/v%
크렌베리	<i>Vacciniumm acrocarpom</i>	20	16.28	국내산	Ethanol 80v/v%
아사이베리	<i>Euterpe oleracea</i>	20	1.18	미국산	Ethanol 80v/v%
수박과육농축액	<i>Citrullus vulgains</i>	* 20mL	30.48	국내산	Ethanol 100v/v%
인삼	<i>Panax ginseng</i>	20	5.43	국내산	Ethanol 80v/v%
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>	20	2.36	국내산	Ethanol 80v/v%
대추	<i>Zizyphus jujuba</i>	20	4.88	국내산	Ethanol 80v/v%

○ 열수 추출: 전통적인 탕제법을 도입하기위해 열수 추출, 즉 시료의 4배 (생체 160mL, 건체80mL)에 해당하는 물을 넣고 가열하여 물의 양이 절반으로 줄어들었을 때(평균 6시간) 까지 끓여서 추출함 (식약처 기준). 모든 추출액은 여과하여 12시간동안 동결 건조하여 다음과 같이 추출물을 확보함

Table. 2. 천연물 시료의 열수 추출물

시료명	학명	시료 무게(g)	추출물 무게(g)	원산지	추출용매
생땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	20	2.62	국내산	D.W 100v/v%
볶은땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	20	0.7	국내산	D.W 100v/v%
땅콩새싹생체	<i>Arachis hypogaea</i>	200	7.56	국내산	D.W 100v/v%
땅콩새싹건체	<i>Arachis hypogaea</i>	20	3.5	국내산	D.W 100v/v%
아몬드	<i>Prunus dulcis</i>	20	1.45	국내산	D.W 100v/v%
거봉포도	<i>Vitis vinifera</i> 'Kyoho'	40	5.9	국내산	D.W 100v/v%
머루포도	<i>Vitis vinifera</i>	40	6.75	국내산	D.W 100v/v%
청포도	<i>Vitis spp</i>	40	8.31	국내산	D.W 100v/v%
크렌베리	<i>Vacciniumm acrocarpom</i>	20	16.89	국내산	D.W 100v/v%
아사이베리	<i>Euterpe oleracea</i>	20	2.32	미국산	D.W 100v/v%
수박과육농축액	<i>Citrullus vulgains</i>	* 20mL	4.94	국내산	D.W 100v/v%
수박과피	<i>Citrullus vulgains</i>	20	15.98	국내산	D.W 100v/v%
인삼	<i>Panax ginseng</i>	20	2.04	국내산	D.W 100v/v%
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>	20	2.09	국내산	D.W 100v/v%
대추	<i>Zizyphus jujuba</i>	20	11.56	국내산	D.W 100v/v%

■ 천연물 소재의 뼈 건강 활성 스크리닝

○ 29종의 에탄올 또는 열수추출물의 MC3T3-E1 세포주에 대한 세포독성

- ALP assay에 앞서 29종의 에탄올 또는 열수추출물(100 ug/mL)의 MC3T3-E1 세포주에 대한 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 시행하였음

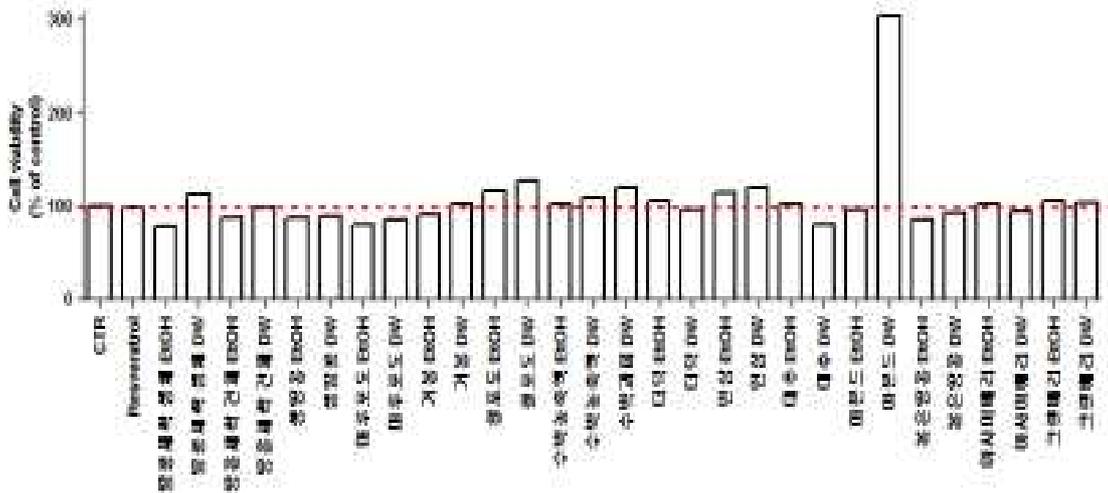


Fig. 3. 29종의 에탄올 또는 열수추출물의 세포 독성

○ MC3T3-E1 세포를 이용한 ALP 활성 측정 방법을 구축함. 먼저 가장 적절한 분화 기간을 설정하기 위해 MC3T3-E1 세포 2×10^4 개의 세포를 α -MEM 배지로 분주하고 overnight 동안 배양하였음. 세포의 분화를 유도하기 위해 α -MEM 배지에 dexamethasone 0.1 μ M, vitamin C 50 μ M, β -glycerophosphate 10mM을 넣은 분화배지를 만들어 샘플(control, resveratrol)과 함께 2일, 3일, 4일간 배양하였음

○ 이후 분화한 세포의 세포막을 lysis buffer를 사용해 lysis 시키고 pNPP (기질) 50 μ 과 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 뒤 흡광도의 변화를 microplate reader를 이용하여 405nm에서 측정하였음. 그 결과 2일에서 가장 큰 ALP 활성도가 나타났으며 따라서 이 후의 연구에서는 ALP assay는 분화를 시작한지 2일 후에 시행함

<분화배지 배양일에 따른 ALP 활성의 변화 >

배양일	2일	3일	4일
ALP 활성도(%)	100	99	96

(2일간 분화한 세포의 수치를 기준으로 ALP 활성도를 표현함)

○ 다음으로 ALP 측정을 위한 96-well format에 가장 적절한 세포수를 설정하기 위해 MC3T3-E1 세포 1×10^4 , 1.5×10^4 , 2×10^4 개의 세포를 96 well plate에 seeding한 후 overnight 동안 배양하였음. 분화를 유도하기 위해 α -MEM 배지에 dexamethasone 0.1 μ M, vitamin C 50 μ M, β -glycerophosphate 10mM을 넣어 분화배지를 만들어

샘플(control, resveratrol)과 함께 2일간 배양시킴. 이후 분화한 세포의 세포막을 lysis buffer를 사용해 lysis 시키고 pNPP (기질) 50 μ L 과 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 뒤 흡광도의 변화를 microplate reader를 이용하여 405nm에서 측정하였음. 그 결과 2x10⁴개의 세포를 seeding 하였을 때 ALP 활성도가 가장 높게 나타나 향후 연구에서는 2x10⁴개/96-well 의 세포를 사용함

<세포수에 따른 ALP 활성의 변화>

세포 수	1x10 ⁴	1.5x10 ⁴	2x10 ⁴
ALP 활성(%)	77	79	100

(2x10⁴ 개의 세포수를 기준으로 하였을 때의 ALP 활성도를 표현함)

○ MC3T3-E1 세포주를 이용한 Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정

- MC3T3-E1 세포를 이용한 ALP 활성을 측정하기 위해 2x10⁴개의 세포를 96-well plate 에 α -MEM 배지로 분주하고 overnight 동안 배양하였음. 분화를 유도하기 위해 α -MEM 배지에 dexamethasone 0.1 μ M, vitamin C 50 μ M, β -glycerophosphate 10mM을 넣은 분화 배지를 만들어 샘플과 함께 2일간 배양함. 이후 분화한 세포의 세포막을 lysis buffer를 사용해 lysis 시키고 pNPP (기질) 50 μ 과 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 뒤 흡광도의 변화를 microplate reader를 이용하여 405nm에서 측정하였음. 이 때 사용한 천연물 시료의 최종 농도는 100 μ g/mL 임. ALP 활성은 DMSO만을 처리한 컨트롤군에 대한 퍼센트로 표현하였음

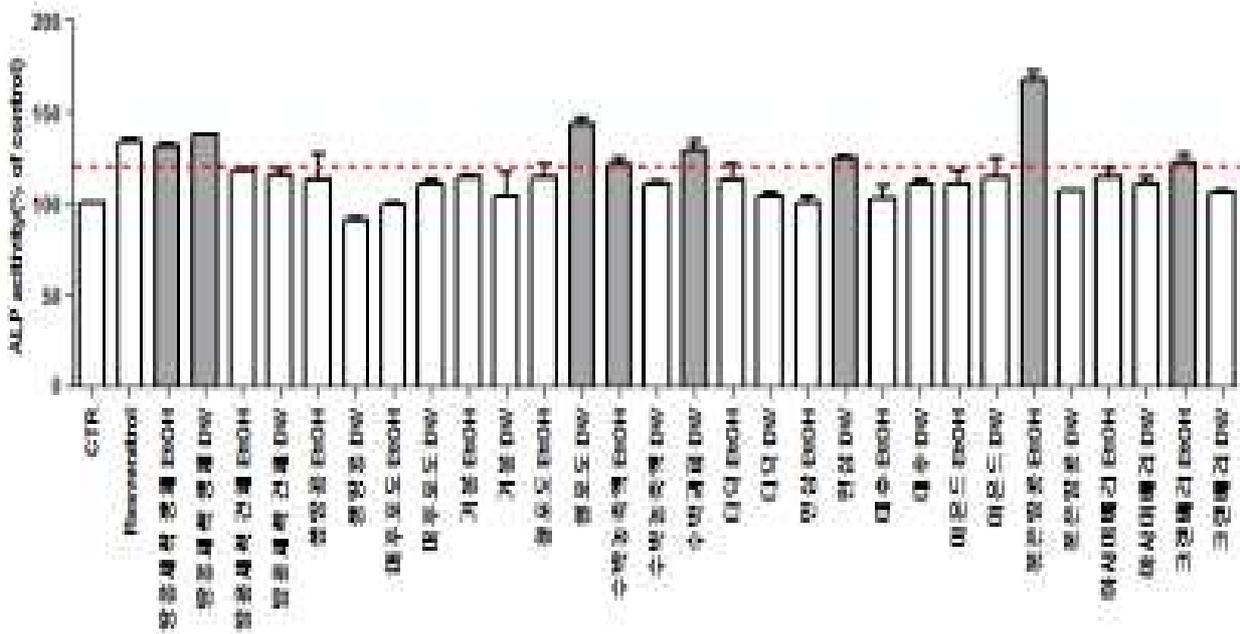


Fig. 4. 29종의 에탄올 또는 열수추출물의 ALP activity

Table. 3. 29종의 에탄올 또는 열수추출물의 ALP 활성도

시료	ALP 활성도(%)
control	100
Resveratrol(positive control)	134
땅콩새싹 생체 EtOH 추출물	132
땅콩새싹 생체 DW 추출물	138
땅콩새싹 건체 EtOH 추출물	118
땅콩새싹 건체 DW 추출물	111
생땅콩 EtOH 추출물	114
생땅콩 DW 추출물	91
머루포도EtOH 추출물	99
머루포도 DW 추출물	111
거봉 EtOH 추출물	115
거봉 DW 추출물	105
청포도 EtOH 추출물	114
청포도 DW 추출물	144
수박 과육 농축액 EtOH 추출물	122
수박 과육 농축액 DW 추출물	110
수박 과피 DW 추출물	129
더덕 EtOH 추출물	113
더덕 DW 추출물	104
인삼 EtOH 추출물	100
인삼 DW 추출물	125
대추EtOH 추출물	103
대추DW 추출물	111
아몬드 EtOH 추출물	110
아몬드 DW 추출물	114
볶은땅콩EtOH 추출물	168
볶은땅콩 DW 추출물	107
아사이베리 EtOH 추출물	115
아사이베리 DW 추출물	112
크랜베리 EtOH 추출물	123
크랜베리 DW 추출물	107

- ALP 활성 측정 결과 땅콩새싹 생체의 에탄올 및 열수 추출물, 수박 과육 농축액의 에탄올 추출물, 수박 과피의 열수 추출물, 인삼 열수추출물, 볶은땅콩 에탄올추출물, 크랜베리 에탄올추출물, 청포도 열수추출물 등을 포함한 총 8종의 추출물 활성이 높았음
- 이 중 활성이 상대적으로 높은 볶은 땅콩 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 4개의 층으로 분획하여 ALP 활성을 측정함. 그 결과 에틸아세테이트층이 가장 높은 활성을 나타냄

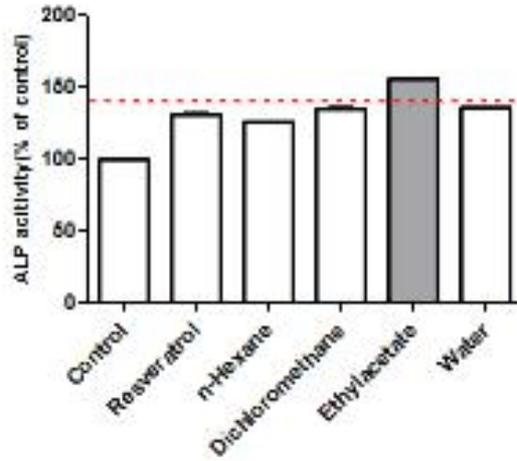


Fig. 5. 붉은땅콩 추출물 분획물의 ALP activity

Table. 4. 붉은땅콩 추출물 분획물의 ALP 활성도

시료	ALP활성도
control	100%
Resveratrol(positive control)	130%
n-Hexane layer	125%
Dichloromethane layer	134%
Ethylacetate layer	155%
water layer	135%

- 따라서 붉은땅콩 에탄올 추출물의 분획물 중 에틸아세테이트 층을 <협동2> 에 시료로 제공함
- 타 시료들에 비하여 땅콩류 (붉은땅콩, 땅콩새싹) 의 ALP활성이 모두 높게 측정되어, 땅콩류에 우선 순위를 두고 연구를 진행하고자 함. 따라서 땅콩류 에탄올, 열수 추출물을 용매 극성에 따라 분획하고 그 분획층들의 ALP 활성도를 비교한 후 활성이 좋은 분획층을 향후 연구를 위한 시료로 사용할 예정임

■ 천연물 추출물 라이브러리 구축

- 기 구축된 천연물라이브리리를 보유하고 있는 천연자원연구센터에 본 연구 결과 도출된 천연물 추출물을 기탁함으로써 라이브리리를 활용하고자 함. 이를 위해 14종의 천연물에서 추출한 총 29종의 천연물 추출물을 각각 200 mg씩 천연자원연구센터에 기탁함

■ 지역 특산물 소재 유효성분 분리 및 동정

○ 선정된 소재의 추출 및 분획

- 1차년도 연구결과 확보된 조골세포 분화촉진 활성이 높게 나왔던 붉은땅콩 에탄올(EtOH) 추출물과 땅콩새싹 EtOH 추출물을 용매분획하여 디클로로메테인 (DCM), 에틸아세테이트

(EA), 물 (DW) 층을 획득함 (Fig. 6)

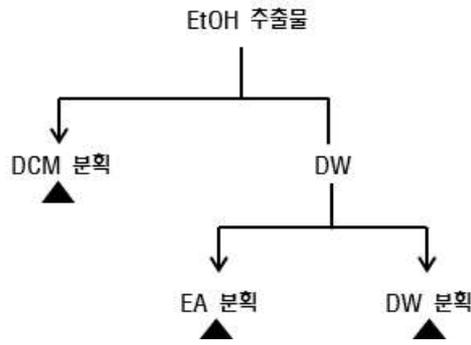
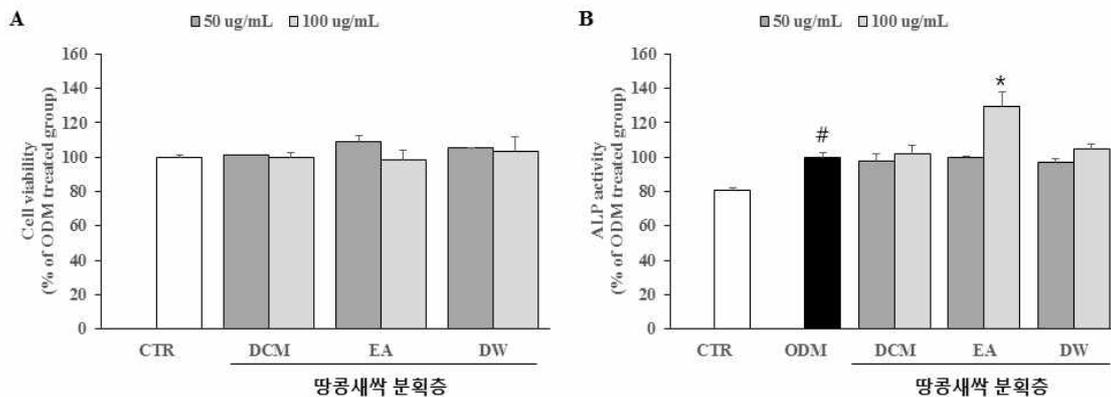


Fig. 6. 붉은땅콩과 땅콩새싹의 용매분획 개요
(DCM: 디클로로메테인층, EA: 에틸아세테이트층, DW: 물층)

- 두 가지 천연물 소재에서 얻어진 각 분획층의 뼈건강 활성스크리닝을 위해 MC3T3-E1 세포를 이용하여 먼저 MTT 방법을 이용하여 세포독성을 확인한 후 뼈세포 분화 정도를 알 수 있는 Alkaline phosphatase (ALP) 활성정도를 측정함
- MTT의 경우 5×10^3 개를 96 well plate에 seeding 한 후 각각의 시료와 분화배지를 처리하고 5일 후 MTT용액을 넣어 세포독성을 확인함 ALP활성은 처음에는 2×10^4 개를 96 well plate에 seeding하였으나 확연한 결과차이를 얻기 위하여 5×10^4 개를 12 well plate에 seeding하여 분화배지로 교체하고 5일간 시료처리를 한 후 ALP 활성도를 확인함. 분화배지와 시료처리는 2일에 한번씩 시행함
- 결과 전 시료에서 세포독성을 확인할 수 없었고, 땅콩새싹 EA층에서 농도 구배적으로 안정적인 효능을 확인할 수 있었고, 활성성분 분리 규명을 위하여 대량추출, 물질 분리를 실시함 (Fig. 7.)



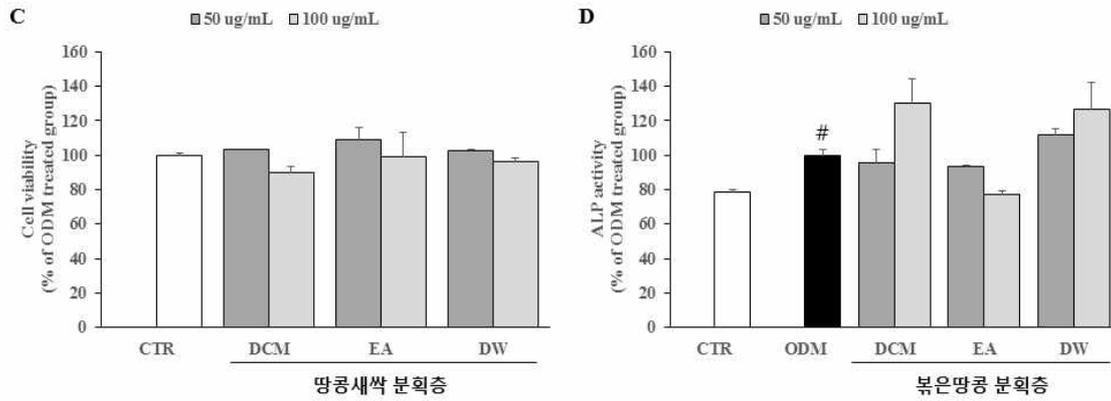


Fig. 7. 땅콩새싹과 볶은땅콩 분획층의 세포독성 및 ALP 활성 변화

*A: 땅콩새싹, B: 볶은 땅콩

*C: 땅콩새싹, D: 볶은 땅콩

*CTR: 일반배지, ODM : 분화배지

*통계적 유의성 : #p < 0.05, CTR vs. ODM, *p < 0.05, ODM vs 시료

○ 땅콩새싹의 대량 추출

- 땅콩 (Fig. 8.(좌))은 불포화지방산이 많고 비타민 E가 풍부하며 올레인산, 리놀산, 카페익산, 레스베라트롤 등 다양한 페놀성 화합물을 함유하고 있어 콜레스테롤 개선, 동맥경화 예방, 노화방지 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있음
- 특히 땅콩새싹의 경우 최근에 개발된 땅콩관련 식품소재로 항암, 항산화에 좋은 레스베라트롤 성분이 땅콩에 비하여 높은 함량을 가지고 있다고 알려져 있으며 각종 페놀성 성분이 다량 함유되어 있다고 보고되어 많이 이용되고 있음



Fig. 8. 땅콩(좌) 과 땅콩새싹(우) 그림

- 뼈 건강에 효능이 있다고 알려진 충청 지역 특산물 중 ALP 활성이 높았던 땅콩새싹 생체 EA 분획층을 충분히 확보하고자 대량추출을 진행함

- 땅콩새싹 대량 추출: 땅콩새싹 3 kg의 시료를 헥산 2 L씩 3회 기름을 제거하는 과정을 거침(defatting). 이후 100% 에탄올로 3회 추출하였고 추출액은 여과하고 감압농축하여 유기용매를 제거한 후 최종적으로 12시간동안 동결 건조하여 총 110 g 추출물을 확보함



Fig. 9. 땅콩새싹의 대량 추출 과정. 좌로부터 땅콩새싹 생체, 추출조, 감압농축기

○ 용매 분획

- 땅콩새싹 에탄올 추출물을 물 2 L에 현탁한 후 유기용매 DCM, EA, DW 3개의 층으로 분획하여 분획층 각각 45, 5, 35 g 을 확보함

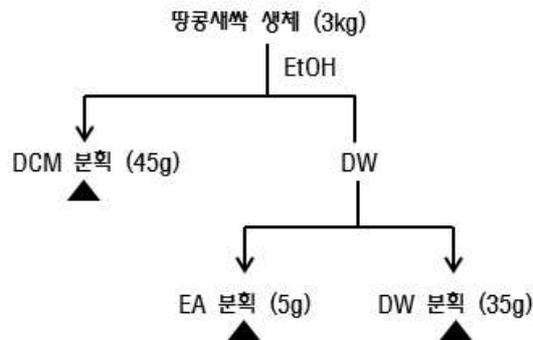


Fig. 10. 땅콩새싹 에탄올 추출물 용매 분획 개요

○ 유효성분 분리

- ALP활성이 상대적으로 좋았던 EA 분획층에서 유효성분 분리를 진행하였음. 총 3개의 물질을 분리함. 기본적으로 순상 컬럼 크로마토그래피법을 이용하였고, 용매는 클로로포름(chloroform)과 메탄올(methanol)의 조합으로 실험을 진행함
- 박층 크로마토그래피법을 이용하여 분획을 나누고 농축하고 다시 컬럼 크로마토그래피를 반복 실시하는 방법으로 최종적으로 3가지 물질을 분리하고 ALP활성을 확인하였으며, 동시에 물질들의 구조 동정을 위하여 핵자기공명 (NMR) 스펙트럼과 MS data 측정을 의뢰하였음

- EA층 물질분리: 땅콩새싹에서 추출한 EA 층 5 g를 순상 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리를 진행함. 고정상은 실리카겔을 사용하였으며 이동상 조건은 클로로포름: 메탄올 = 9 : 1로 진행함. 진행과정에서 박층 크로마토그래피법을 이용하여 254 nm 형광과 바닐린 황산 발색을 기준으로 총 10개의 구간으로 나눔(PSE1~10, 용매조건 클로로포름: 메탄올 : 물 = 9 : 2 : 0.2)



Fig. 11. EA 층 박층 크로마토그래피 254 nm



Fig. 12. EA 층 박층 크로마토그래피 황산 발색

- Compound 1 분리: PSE8에서 물질분리를 진행함. 이동상조건 클로로포름: 메탄올 = 10 : 0.5 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. 진행과정에서 박층 크로마토그래피법을 이용하여 Compound 1의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PSE8-1을 획득함. 이후 PSE8-1을 이동상조건 클로로포름: 메탄올 = 10: 0.5 하여 순상 컬럼 크로마토그래피로 재정제하여 흰색 성상의 Compound 1을 8 mg 획득함
- Compound 2 분리: PSE2에서 물질분리를 진행함. 이동상조건 클로로포름: 메탄올 = 9 : 1 하여 Medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 진행함. 진행과정에서 UV 검출기를 활용하여 254 nm에서 피크가 높았던 구간을 모음. 이후 박층 크로마토그래피법을 이용하여 Compound 2의 함량을 확인한 후 감압 농축을 진행하여 흰색 성상의 Compound 2

을 24 mg 획득함

- Compound 3 분리: PSE5에서 물질분리를 진행함. 용매조건 클로로포름: 메탄올 = 9:0.5 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. 진행과정에서 박층 크로마토그래피법을 이용하여 Compound 3의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PSE5-1을 획득함. 이후 PSE5-1을 용매조건 클로로포름: 메탄올 = 10: 0.5 하여 순상 컬럼 크로마토그래피로 재정제하여 노란색 성상의 Compound 3을 40 mg 획득함

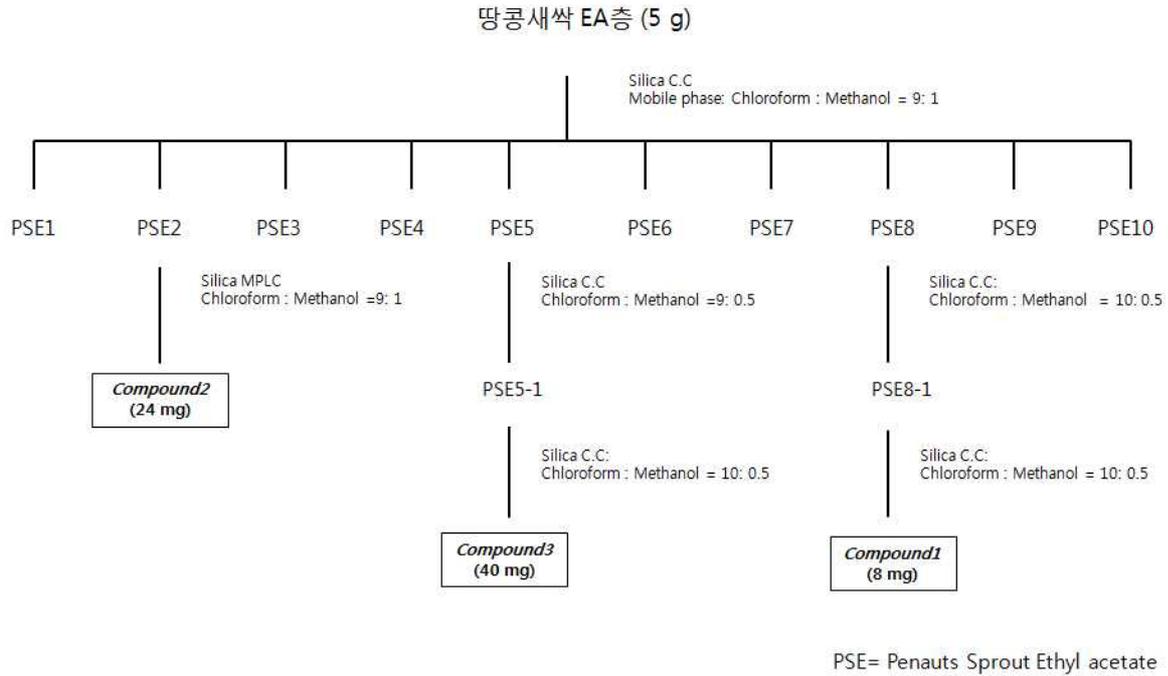


Fig. 13. 땅콩새싹 EA 분획층의 유효성분 분리 과정 개요

○ 분리된 물질의 구조 동정

- 분리된 물질의 함량 및 순도를 알아보기 위해 박층 크로마토그래피를 진행함 (용매조건 클로로포름: 메탄올 : 물 = 9 : 2 : 0.2)



Fig. 14. 분리한 유효성분의 박층 크로마토그래피 확인

- 물질분리를 통해 얻은 세 가지 물질들(compound 1, 2, 3) 을 NMR 및 MS 분석을 의뢰하여 각 스펙트럼을 확보하였고 현재 물질의 구조 동정을 완료함
- Compound 1의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 및 MS 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Adenine으로 구조 동정을 완료함

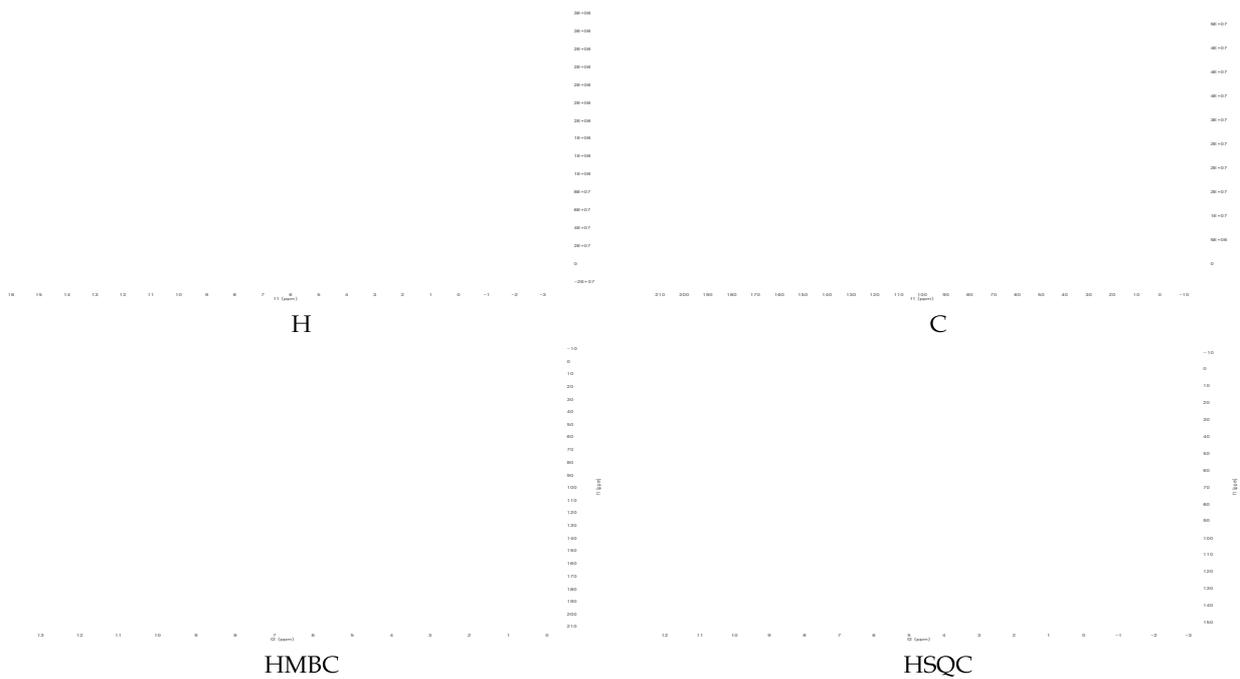


Fig. 15. Compound 1 의 NMR 스펙트럼

[1-1] LC-MS Chromatogram : Compound 1.(RT : 0.87)

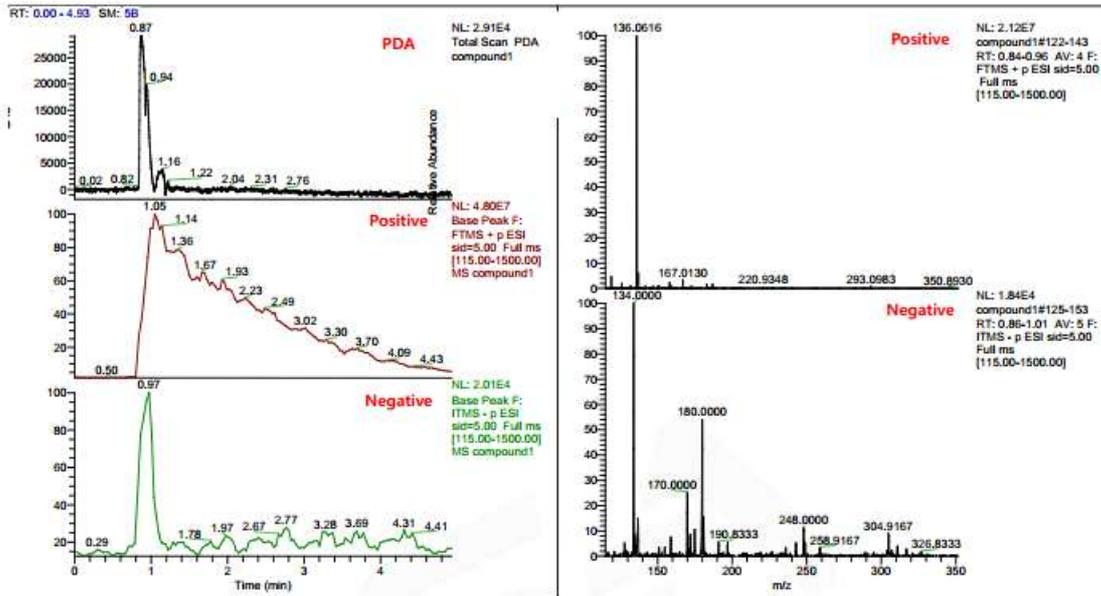


Fig. 16. Compound 1 의 MS 스펙트럼

- Compound 2의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 및 MS 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Thymine으로 구조 동정을 완료함

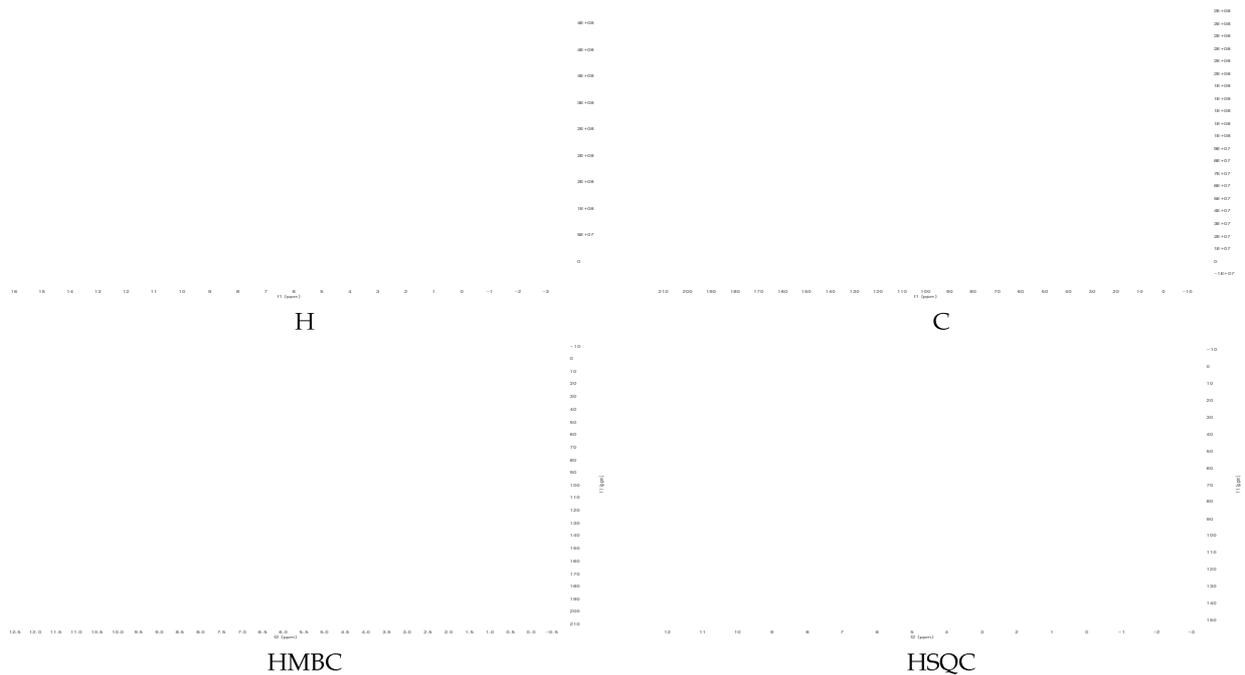


Fig. 17. Compound 2 의 NMR 스펙트럼

[2-1] LC-MS Chromatogram : Compound 2.(RT : 1.29)

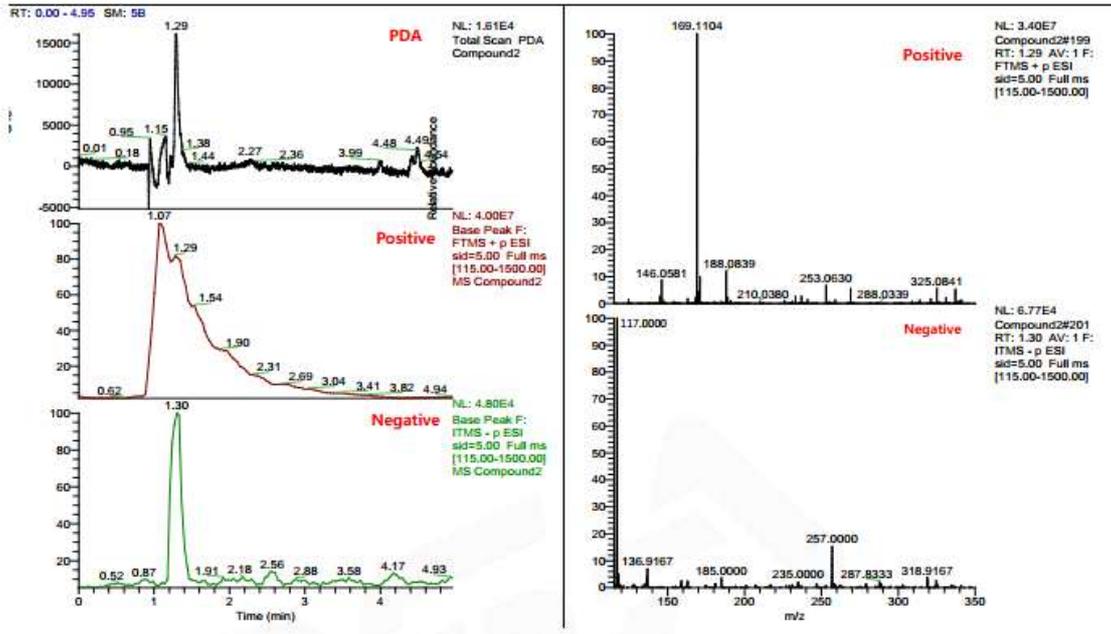


Fig. 18. Compound 2 의 MS 스펙트럼

- Compound 3의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 및 MS 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Uracil으로 구조 동정을 완료함

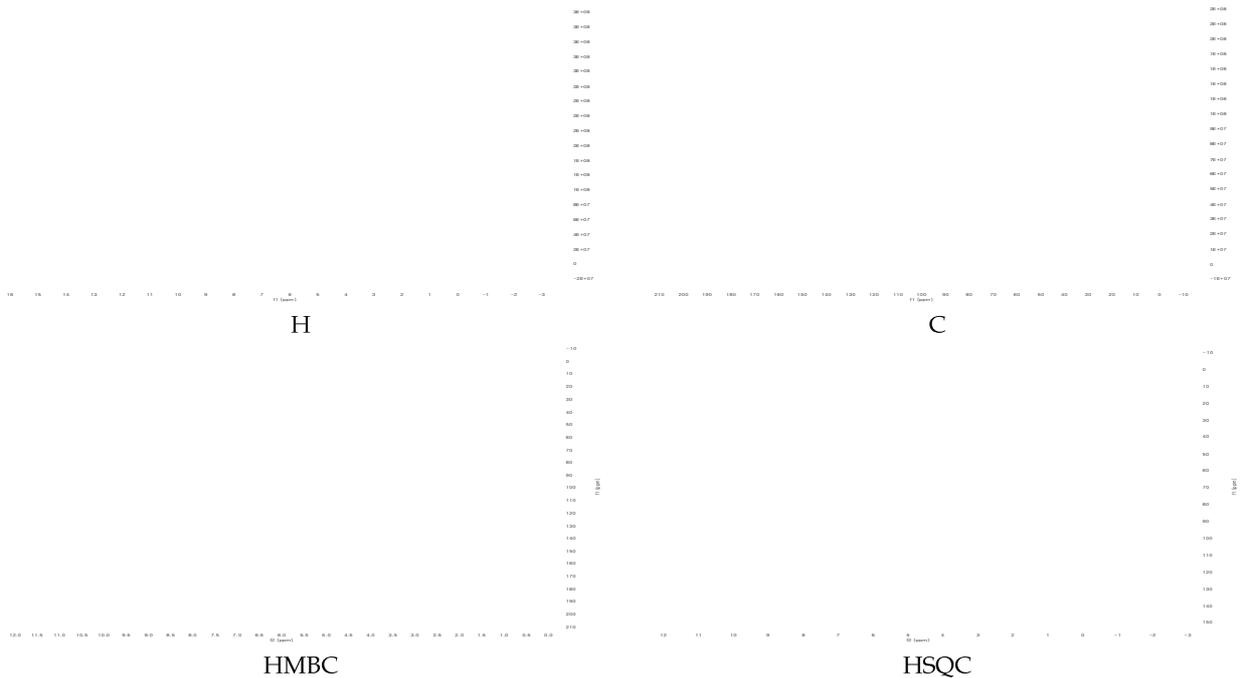


Fig. 19. Compound 3의 NMR 스펙트럼

[3-1] LC-MS Chromatogram : Compound 3.(RT : 1.05)

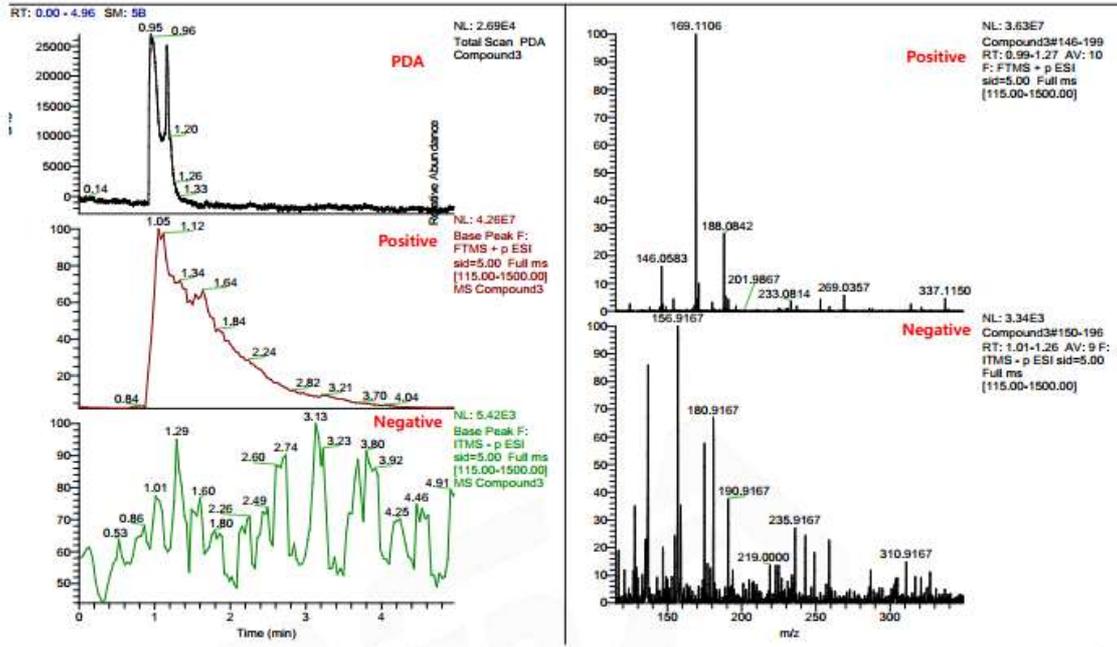
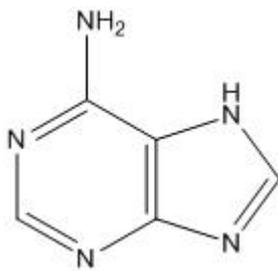
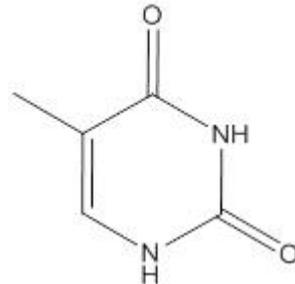


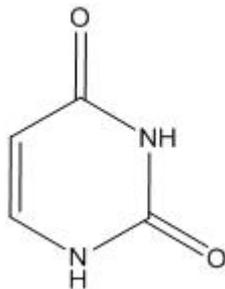
Fig. 20. Compound 3의 MS 스펙트럼



Adenine (1)



Thymine (2)



Uracil (3)

Fig. 21. 분리된 물질들의 구조 동정 결과

○ 분리된 물질의 ALP활성 측정

- MC3T3-E1 세포를 이용하여 위에서 언급한 방법과 동일한 방법으로 세포독성과 ALP 활성

을 확인하였음

- 그 결과 모든 시료에서 세포독성을 확인할 수 없었고 (>80%), compound 2와 3에서는 ALP 활성이 분화배지보다 현저히 높게 관찰되었음

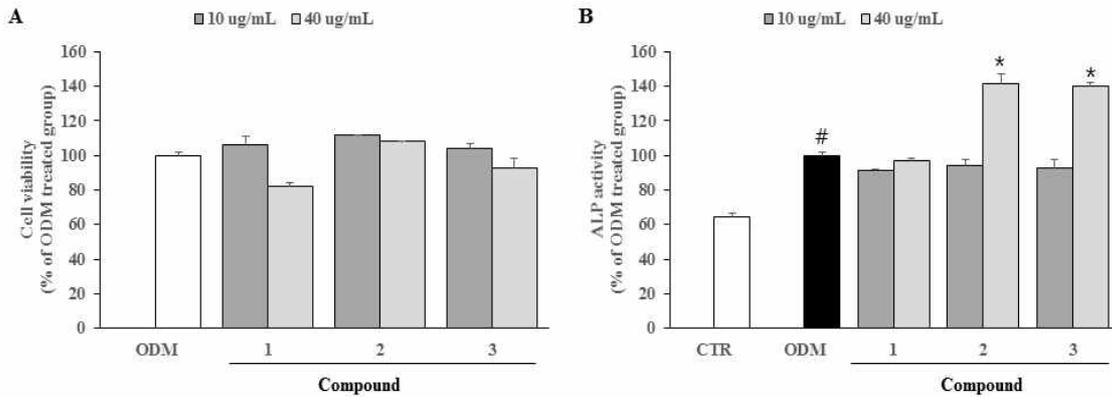


Fig. 22. 분리된 물질의 세포독성 (A) 및 ALP (B) 활성

*일반배지 : NM, 분화배지 : ODM

*통계적 유의성 : #p < 0.05, CTR vs. ODM, *p < 0.05, ODM vs 시료

○ 2협동에 시료전달

- 분리된 compound 1, 2, 3을 각 100 mg/mL 농도로 맞추어 시료를 전달함

■ 한방 소재 선별 및 뼈건강 활성 스크리닝

○ 한방소재 확보

- 뼈 건강에 도움이 되고 식품 및 유제품으로의 활용도가 높을 수 있는 한방소재 총 12종, 작약, 해동피, 백질러, 접골목, 익모초, 산수유, 연자육, 도토리, 백수오, 신선초, 곽향, 자소엽을 선별하여 확보함



Fig. 23. 뼈 건강에 도움이 되는 한방소재 시료

○ 한방소재 추출물 확보

- 한방소재를 효율적으로 추출하기 위해 추출법을 두 가지로 나누어 실시하였음
- 에탄올 추출: 식품에 적용할 수 있는 유기용매인 EtOH를 이용하여 한방소재를 추출하였음. 시료를 80% EtOH를 이용하여 3회 추출하고 여과 후 감압농축하여 유기용매를 제거한 후 12시간동안 동결 건조하여 다음과 같이 추출물을 확보하였음(Table. 5)

Table. 5. 한방소재 시료의 에탄올 추출물

시료명	학명	시료 무게(g)	추출물 무게(g)	원산지	추출용매
연자육	<i>Nelumbo nucifera</i>	20	1	국내산	EtOH 80v/v%
도토리	<i>Quercus acutissima</i>	20	1	국내산	EtOH 80v/v%
작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	30	4	국내산	EtOH 80v/v%
자소엽	<i>Perilla frutescens var. acuta</i>	200	23	국내산	EtOH 80v/v%
백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	200	21	국내산	EtOH 80v/v%
신선초	<i>Angelica keiskei</i>	200	41	국내산	EtOH 80v/v%
곽향	<i>Agastache rugosa</i>	200	31	국내산	EtOH 80v/v%
해동피	<i>Kalopanax pictus</i>	150	14	국내산	EtOH 80v/v%
백질려	<i>Tribulus terrestris</i>	100	7	국내산	EtOH 80v/v%
접골목	<i>Sambucus williamsii var. coreana</i>	20	1	국내산	EtOH 80v/v%
익모초	<i>Leonurus japonicus</i>	20	1	국내산	EtOH 80v/v%
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	100	8	국내산	EtOH 80v/v%

- 두 번째 방법은 전통적인 탕제법에서 착안하여 열수 추출, 즉 시료의 4배에 해당하는 물을 넣고 가열하여 물의 양이 절반으로 줄어들었을 때(평균 6시간)까지 끓여서 여과, 감압농축하여 12시간 동결 건조후 다음과 같이 추출물을 확보하였음(Table. 6)

Table. 6. 한방소재 시료의 열수 추출물

시료명	학명	시료 무게(g)	추출물 무게(g)	원산지	추출용매
연자육	<i>Nelumbo nucifera</i>	20	1	국내산	DW
도토리	<i>Quercus acutissima</i>	20	1	국내산	DW
작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	30	12	국내산	DW
자소엽	<i>Perilla frutescens var. acuta</i>	200	22	국내산	DW
백수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	200	14	국내산	DW
신선초	<i>Angelica keiskei</i>	200	30	국내산	DW
곽향	<i>Agastache rugosa</i>	200	13	국내산	DW
해동피	<i>Kalopanax pictus</i>	150	16	국내산	DW
백질러	<i>Tribulus terrestris</i>	20	1	국내산	DW
접골목	<i>Sambucus williamsii var. coreana</i>	150	15	국내산	DW
익모초	<i>Leonurus japonicus</i>	100	5	국내산	DW
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	100	22	국내산	DW

○ 한방 소재의 뼈 건강 활성 스크리닝

- 위에서 언급한 방법과 같이 MC3T3-E1 세포를 이용하여 한방소재 추출물의 세포독성과 ALP 활성을 측정함. 한방소재 12종 에탄올추출물을 10과 50 ug/mL의 농도로 세포독성과 ALP 활성 정도를 확인한 결과 전 시료에서 세포독성을 확인할 수 없었고, 작약, 자소엽, 연자육, 해동피에서 농도 구배적으로 ALP 활성이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 해동피에서만 확인되었음(Fig. 24)

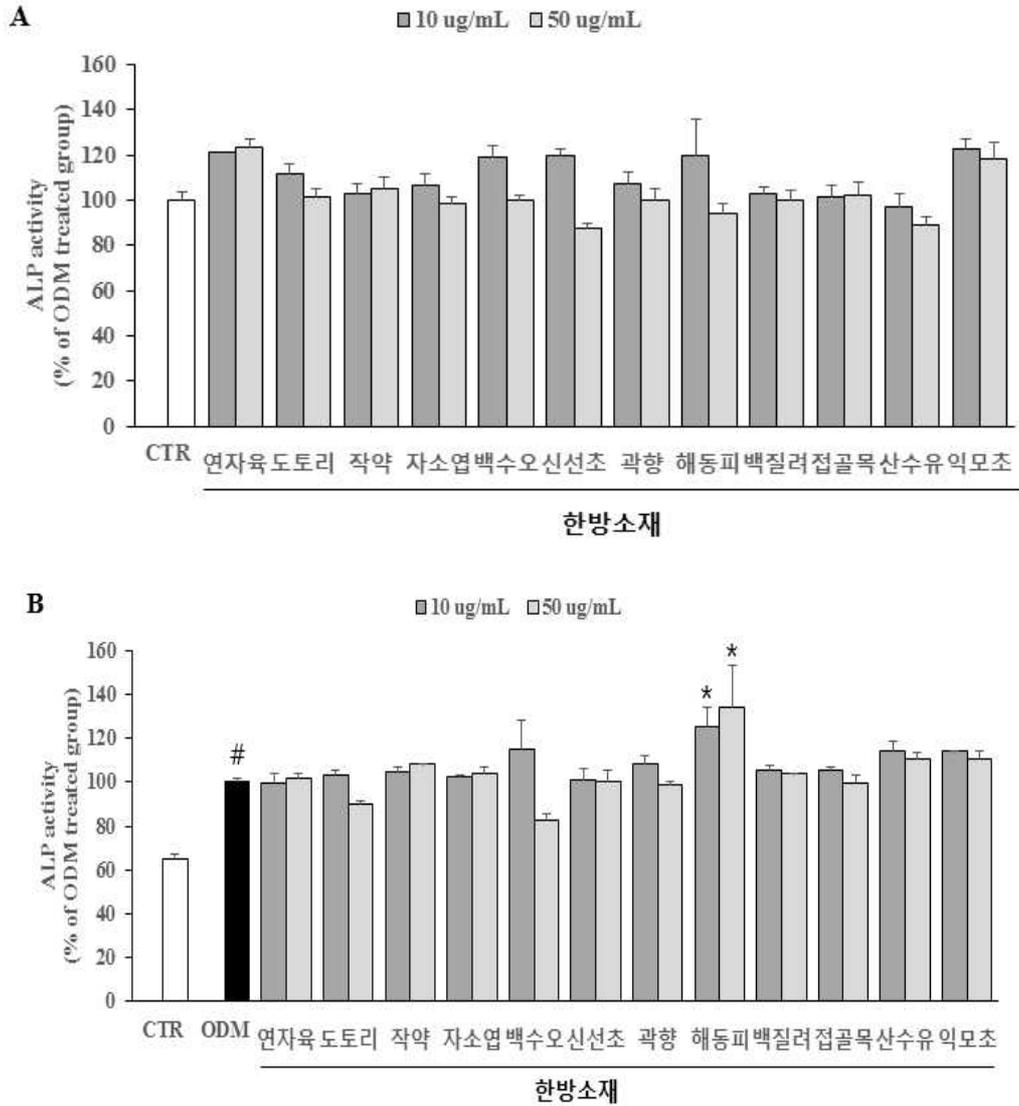


Fig. 24. 한방소재 에탄올 추출물 세포독성 (A) 과 ALP (B) 활성
 *일반배지 : NM, 분화배지 : ODM

- 한방소재 12종 열수 추출물을 100 ug/mL의 농도로 세포독성과 ALP 활성 정도를 확인하였고, 결과 작약, 자소엽, 백수오, 신선초, 곽향, 백질러, 접골목, 익모초에서 ALP 활성이 증가된 것이 관찰되었음

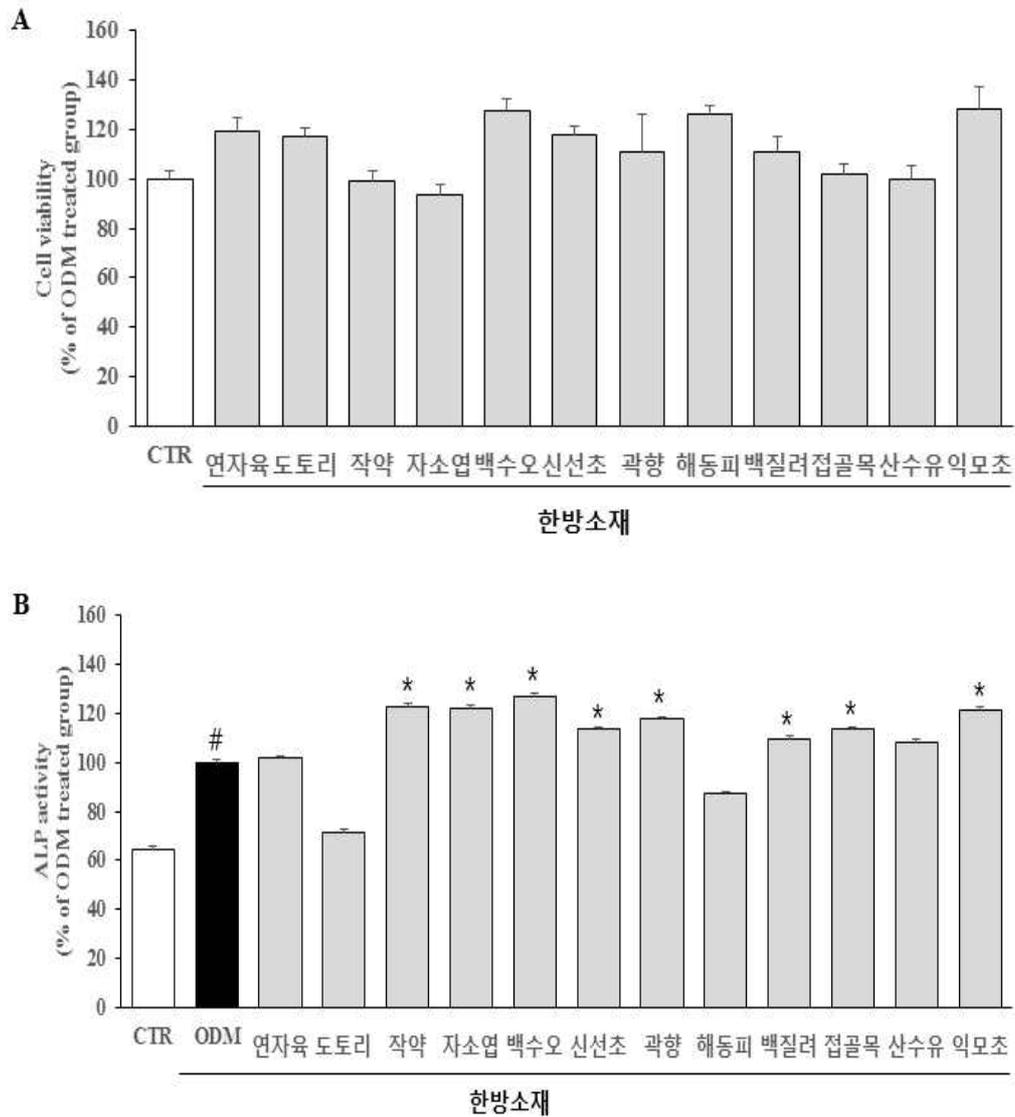


Fig. 25. 한방소재 열수 추출물의 세포독성 (A) 과 ALP (B) 활성
 *일반배지 : NM, 분화배지 : ODM

○ 2 협동에 시료전달

- 작약, 자소엽 에탄올 추출물과 열수추출물, 연자육 에탄올 추출물을 각 100mg/mL 농도로 맞추어 시료를 전달함

■ 한방소재 추출물 라이브러리 구축

- 기 구축된 한방소재 라이브러리를 보유하고 있는 천연자원연구센터에 본 연구 결과 도출된 천연물 추출물을 기탁함으로써 라이브러리를 활용하고자 함. 이를 위해 12종의 한방소재에서 추출한 총 24종의 한방소재 추출물을 각각 20 mg씩 천연자원연구센터에 기탁함

○ 선정된 소재의 추출 및 분획

- 2차년도 연구결과 조골세포 분화촉진 활성이 높게 나왔던 작약 에탄올(EtOH) 추출물을 용매 분획하여 헥산 (*n*-Hexane, Hx), 디클로로메테인 (Dichloromethane, DCM), 에틸아세테이트 (Ethyl acetate, EA), 물 (Water, DW) 층으로 분획하여 감압 농축함. (Fig. 26)

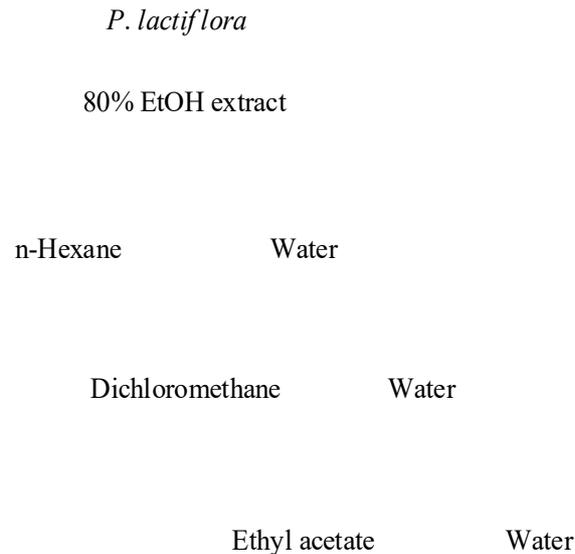


Fig. 26. 작약 에탄올 추출물의 용매분획 개요.

- 작약 에탄올 추출물의 4개 분획층의 조골세포 분화 촉진능을 MC3T3-E1 세포를 이용하여 측정함. 먼저 MTT 방법을 이용하여 세포독성을 확인한 후 뼈세포 분화 정도를 알 수 있는 Alkaline phosphatase (ALP) 활성정도를 측정함
- MTT의 경우 5×10^3 개의 세포를 96-well plate에 seeding 한 후 시료와 분화배지를 처리하고 5일 후 MTT 용액을 넣어 세포독성을 확인함. ALP활성은 5×10^4 개의 세포를 12-well plate에 seeding하여 분화배지로 교체하고 5일간 시료처리를 한 후 ALP 활성도를 확인함. 분화배지와 교체는 2일에 한번씩 시행함
- 그 결과 모든 분획층에서 세포독성은 나타나지 않았음. 반면 ALP 활성은 작약 EA층에서 농도 구배적으로 안정적인 ALP 활성 증가를 나타냄. 따라서 작약 EA층으로부터 활성 성분 분리 규명을 시행함(Fig. 27)

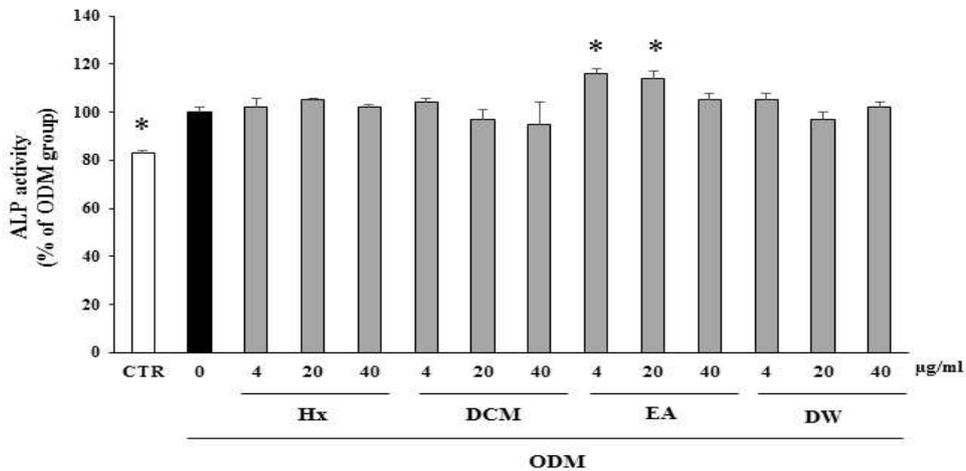
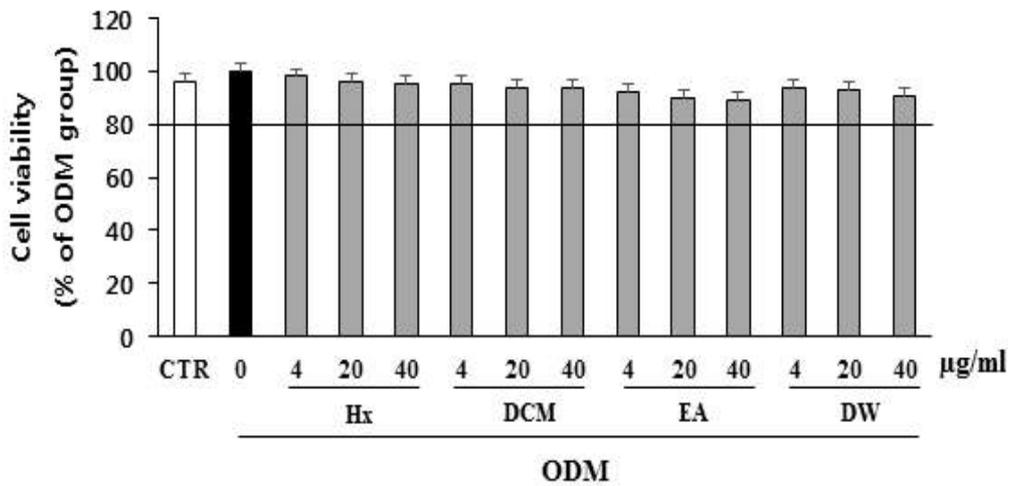


Fig. 27. 작약 에탄올 분획층의 세포독성 및 ALP 활성 변화

*Hx : 헥산, DCM:디클로로메테인, EA:에틸아세테이트, DW:물, CTR:일반배지, ODM:분화배지

* $p < 0.05$, compared to ODM-treated group

○ 작약의 대량 추출

- 작약 (Fig. 28)은 주로 동시베리아, 중국, 일본, 우리나라에서 많이 재배되고 있음. 모노르펜글리코사이드, 페놀, 탄닌 등의 성분을 함유하고 있으며 진정작용, 항염증작용, 항알러지 작용, 항면역작용, 혈액순환개선작용을 가지고 있음. 오래전부터 사용되었으며 재배가 어렵지 않아 민간치료제로 많이 사용되어 왔음. 최근 연구에서는 작약의 지표성분인 파이오니플로린의 항염증작용, 항면역작용을 가진다는 보고가 되어있어 많이 사용되고 있음



Fig. 28. 작약꽃(좌)과 작약 건체(우) 그림

- 뼈 건강에 효능이 있다고 알려진 한방소재 중 ALP 활성이 높았던 작약 EA 분획층을 충분히 확보하고자 대량추출을 진행함
- 작약 대량 추출: 작약 3 kg의 시료를 80% 에탄올로 3회 추출하였고 추출액은 여과하고 감압 농축하여 유기용매를 제거한 후 최종적으로 12시간동안 동결 건조하여 총 814 g추출물을 확보함



Fig. 29. 작약 대량 추출 과정. 좌부터 작약 건체, 추출조, 감압농축기

○ 용매 분획

- 작약 에탄올 추출물을 물 2 L에 현탁한 후 헥산(*n*-Hexane), 디클로로메테인(Dichloromethane), 에틸아세테이트 (Ethyl acetate), 물(Water) 4개의 층으로 분획하여 분획층 각각 2.5, 13.2, 90.2, 622 g 을 확보함

○ 유효성분 분리

- ALP활성이 가장 좋았던 작약 에틸아세테이트 분획층에서 유효성분 분리를 진행하였음
- 작약에서 추출한 EA 층 90.2 g를 순상 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리를 진행함. 고정상은 실리카겔을 사용하였으며 이동상 조건은 클로로포름: 메탄올 = 10 : 1.5로 진행함. 진행 과정에서 박층 크로마토그래피법을 이용하여 254 nm 형광과 바닐린 황산 발색을 기준으로 총 13개의 구간으로 나눔 (PA 1~13, 용매조건 클로로포름: 메탄올 : 물 = 9 : 2 : 0.2)

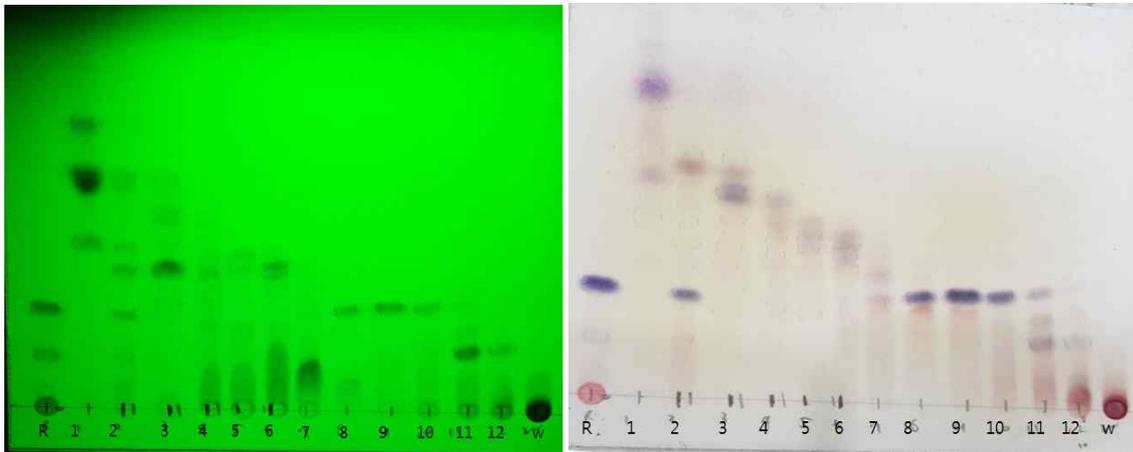


Fig. 30. 작약 아틸아세테이트 층의 박층 크로마토그래피 (254 nm UV 조사, 황산발색)

- Compound 1 분리: PA 6에서 이동상조건 디클로로메테인 : 메탄올 = 10 : 0.5 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 1의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA 6-10을 획득함. 이후 PA 6-10을 이동상조건 디클로로메테인: 메탄올 = 10 : 0.3 으로 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. 재정제하여 PA 6-10-5를 획득함. 이후 PA 6-10-5를 이동상조건 아세토나이트릴 10% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 흰색 성상의 Compound 1을 8.1 mg 획득함
- Compound 2 분리: 앞서 진행한 Compound 1의 실험과정과 동일하게 진행하여 PA 6-10-6 을 획득함. 이후 PA 6-10-6 을 이동상조건 아세토나이트릴 10% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 흰색 성상의 Compound 2를 10.2 mg 획득함
- Compound 3 분리: PA 11에서 이동상조건 클로로포름: 메탄올 = 9 : 1 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 3의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA11-7을 획득함. 이후 PA 11-7을 이동상조건 디클로로메테인: 메탄올 = 10 : 0.5 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 PA 11-7-1을 획득함. 이후 PA 11-7-1을 이동상조건 아세토나이트릴 20% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 흰색 성상의 Compound 3를 12.1 mg 획득함
- Compound 4 분리: PA 12에서 이동상조건 메탄올 30% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 4의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA12-5를 획득함. 이후 PA 12-5를 이동상조건 아세토나이트릴 20% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 노란색 성상의 Compound 4를 10.2 mg 획득함
- Compound 5 분리: PA 5에서 이동상조건 디클로로메테인: 아세톤 = 7 : 3 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 5의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA5-6을 획득함. 이후 PA 5-6을 이동상조건 아세토나이트릴 10% 하여 Sephadex

LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 노란색 성상의 Compound 5를 12.1 mg 획득함

- Compound 6 분리: PA 2를 이동상조건 클로로포름: 메탄올 = 10 : 1 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 6의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA 2-10을 획득함. 이후 PA 2-10 을 이동상조건 메탄올 30% 하여 Sephadex LH-20 으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 PA 2-10-1을 획득함. 이후 PA 2-10-1을 이동상 조건 메탄올 30% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 흰색 성상의 Compound 6를 10.3 mg 획득함
- Compound 7과 Compound 8 분리: PA 3에서 이동상조건 클로로포름: 메탄올 = 10 : 1 하여 순상 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 7의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA 3-9을 획득함. 이후 PA 3-9을 이동상조건 아세트나이트릴 20% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 흰색 성상의 Compound 7 12.1 mg 과 Compound 8을 10.1 mg 획득함
- Compound 9 분리: PA 6-11 에서 이동상조건 아세트나이트릴 30% 하여 Sephadex L H-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행함. Compound 9의 함량이 많은 구간만 모아서 감압농축을 하여 PA 6-11-1 을 획득함. 이후 PA 6-11-1 을 이동상조건 아세트나이트릴 10% 하여 Sephadex LH-20으로 컬럼 크로마토그래피를 진행하여 흰색 성상의 Compound 9을 10.2 mg 획득함

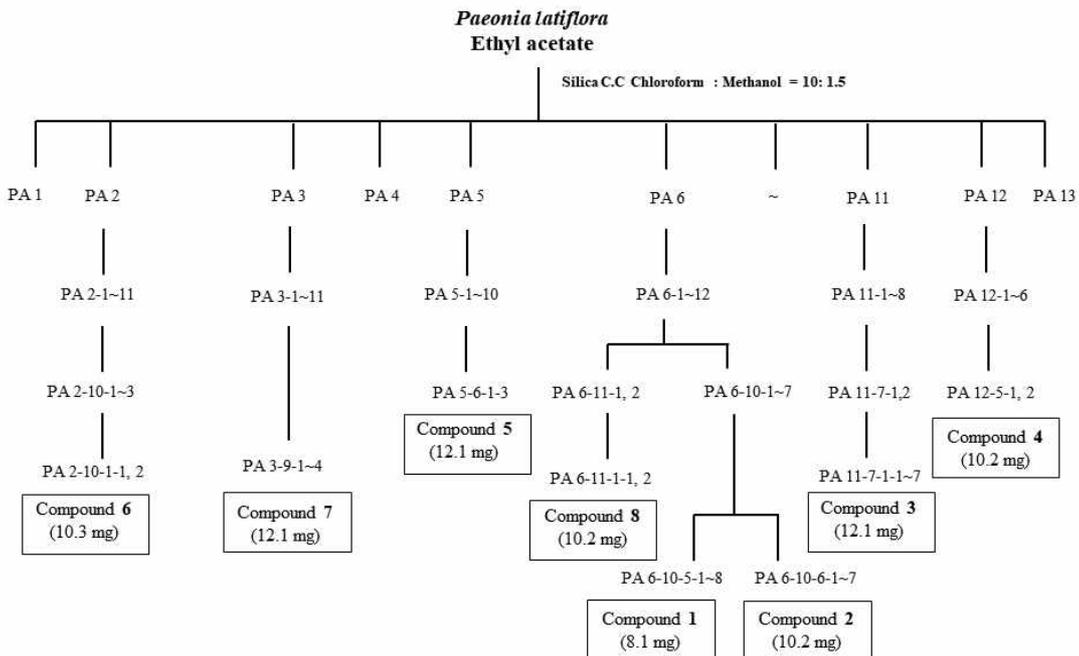


Fig. 31. 작약 에틸아세테이트 분획층의 유효성분 분리 과정 개요

○ 분리된 물질의 구조 동정

- 물질분리를 통해 얻은 아홉 가지 물질들 (compound 1~8)을 NMR 및 MS 결과를 바탕으로 구조 분석을 및 동정을 완료함
- Compound 1의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 및 MS 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 4-O-methylmoudanpioside C 로 구조 동정을 완료함

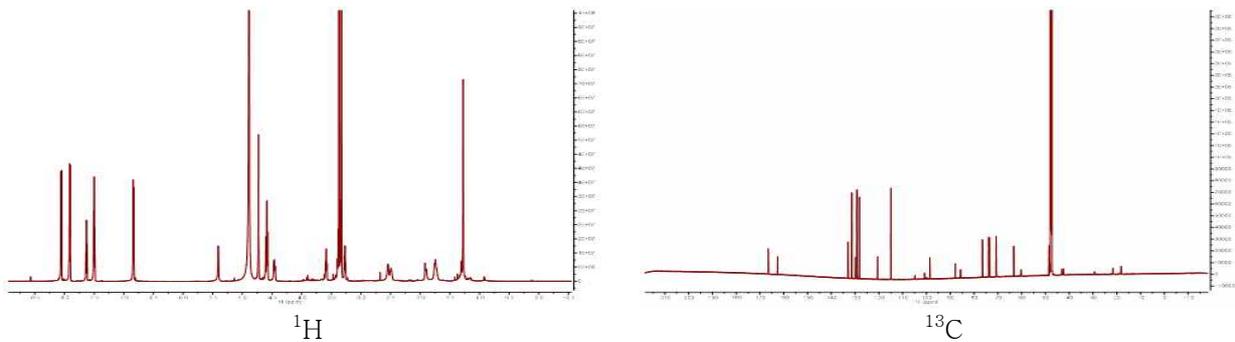


Fig. 32. Compound 1 의 NMR 스펙트럼

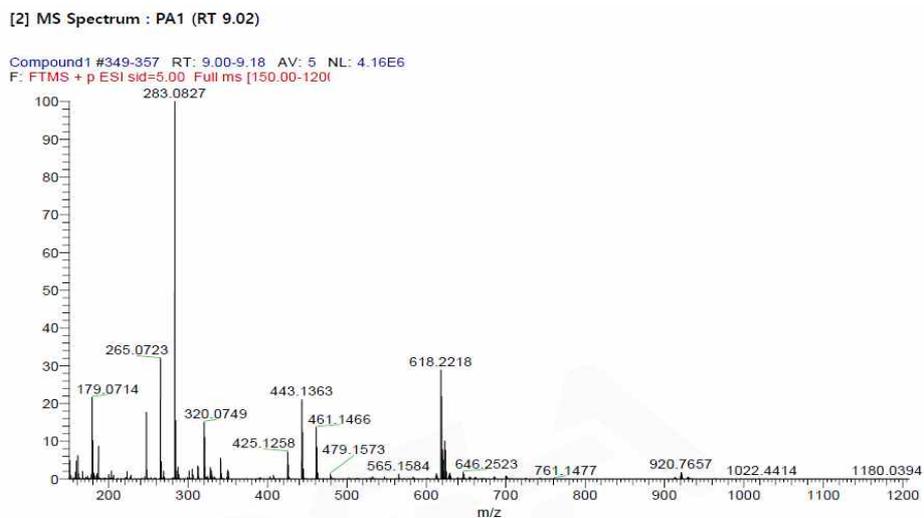


Fig. 33. Compound 1 의 MS 스펙트럼

- Compound 2의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 및 MS 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin 로 구조 동정을 완료함

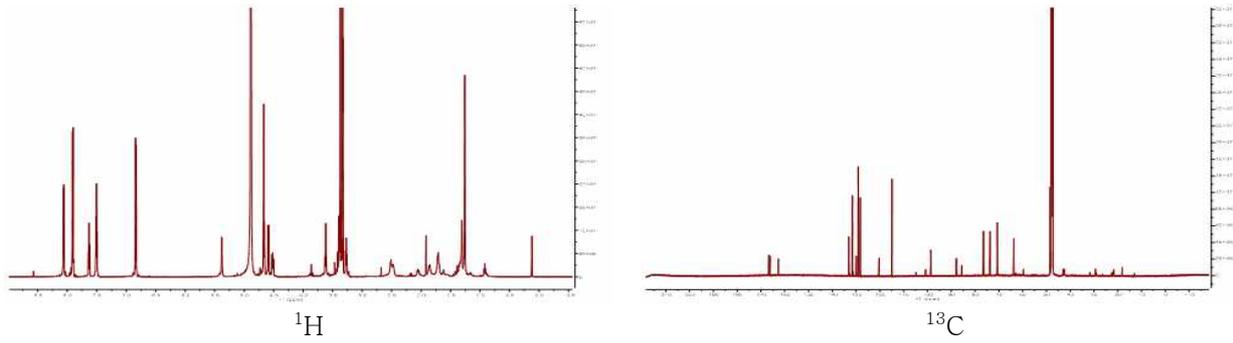


Fig. 34. Compound 2의 NMR 스펙트럼

[4] MS Spectrum : PA2 (RT 9.51)

Compound2 #369-376 RT: 9.48-9.63 AV: 4 NL: 1.90E6
 F: FTMS + p ESI sid=5.00 Full ms [150.00-1200]

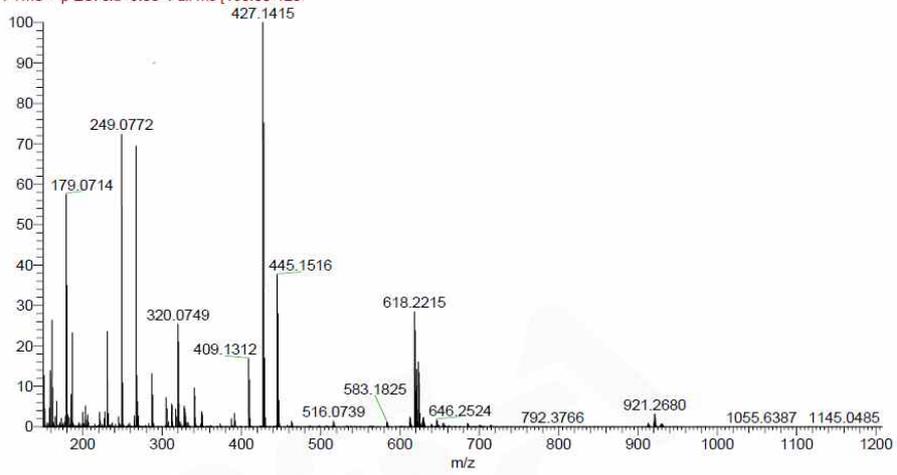


Fig. 35. Compound 2의 MS 스펙트럼

- Compound 3의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 및 MS 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Oxypaeoniflorin 로 구조 동정을 완료함

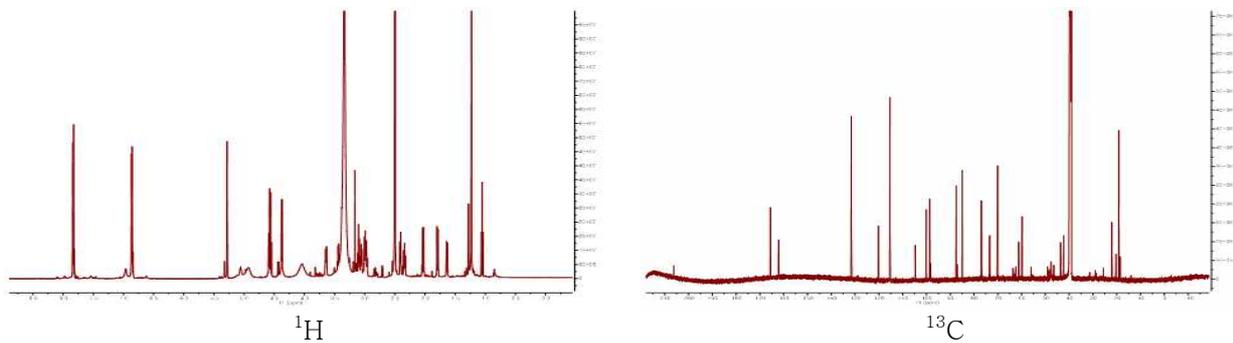


Fig. 36. Compound 3의 NMR 스펙트럼

[6] MS Spectrum : PA3 (RT 3.41)

Compound3 #146-149 RT: 3.41-3.46 AV: 2 NL: 3.79E6
 F: FTMS + p.ESI sid=5.00 Full ms [150.00-1200.00]

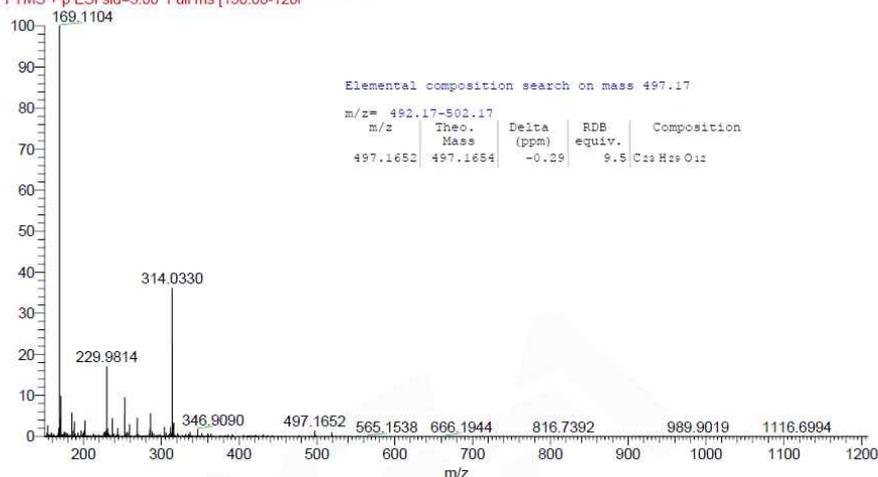


Fig. 37. Compound 3의 MS 스펙트럼

- Compound 4의 구조 분석: ^1H NMR 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 (+) catechin 로 구조 동정을 완료함
- Compound 5의 구조 분석: ^1H NMR 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Catechuic acid 로 구조 동정을 완료함

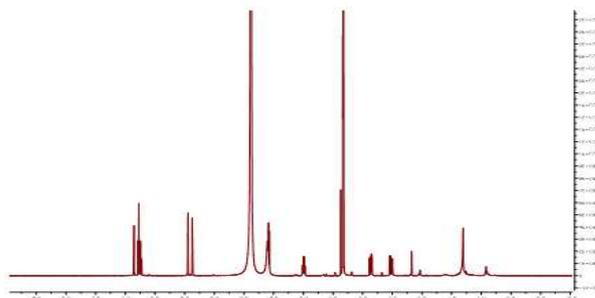


Fig. 38. Compound 4 의 NMR 스펙트럼

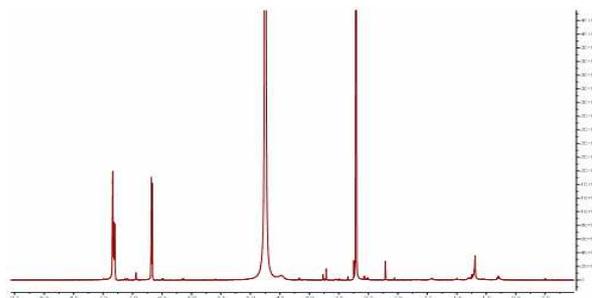


Fig. 39. Compound 5 의 NMR 스펙트럼

- Compound 6의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Paeoniflorin 로 구조 동정을 완료함

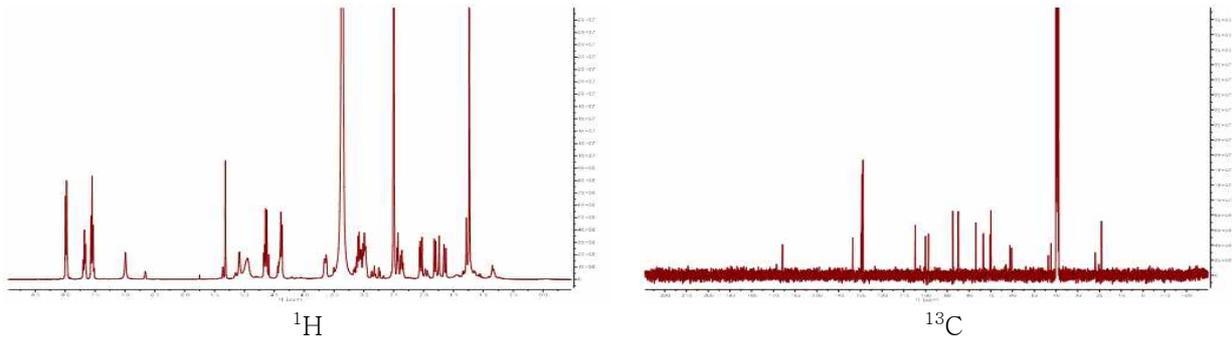


Fig. 40. Compound 6의 NMR 스펙트럼

- Compound 7의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Benzoylpaeoniflorin 로 구조 동정을 완료함

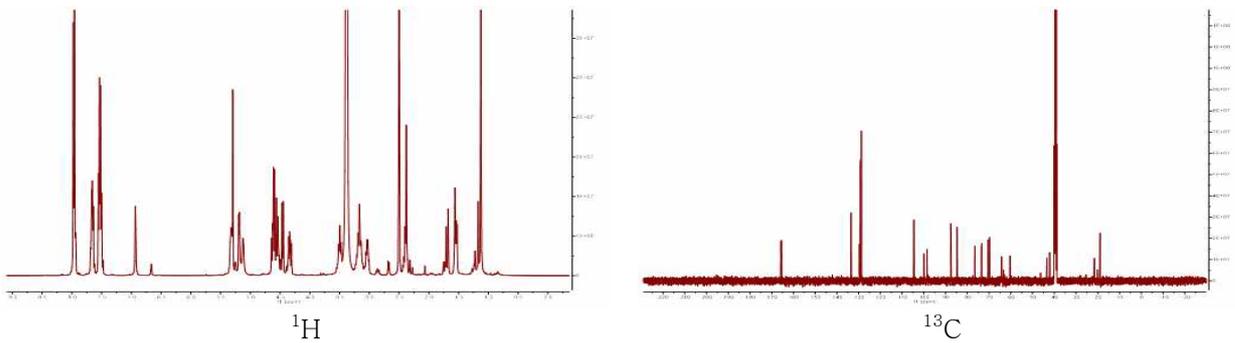


Fig. 41. Compound 7의 NMR 스펙트럼

- Compound 8의 구조 분석: ^1H , ^{13}C NMR 결과, 참고문헌을 기반으로 구조 분석을 진행함. 그 결과 Albiflorin 로 구조 동정을 완료함

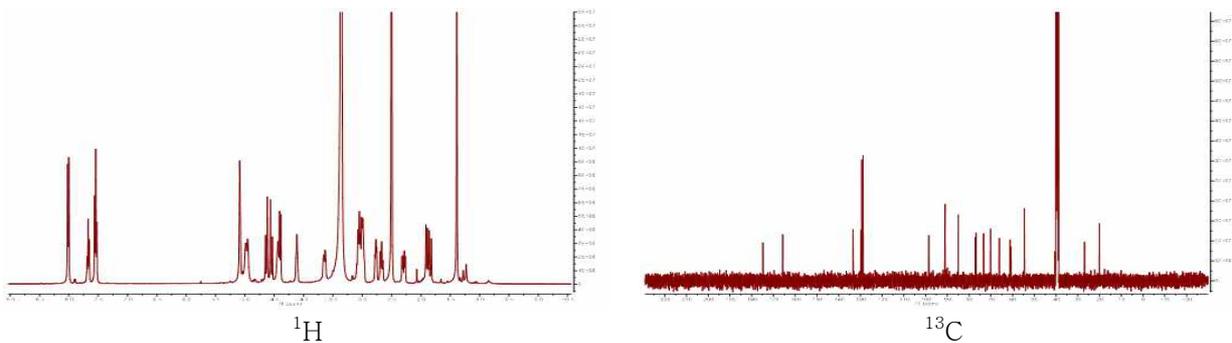
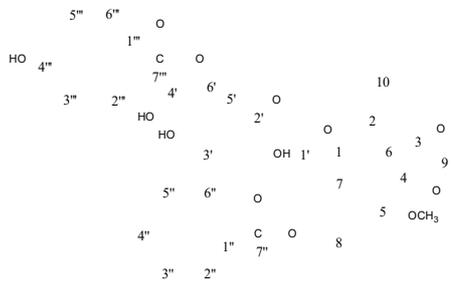
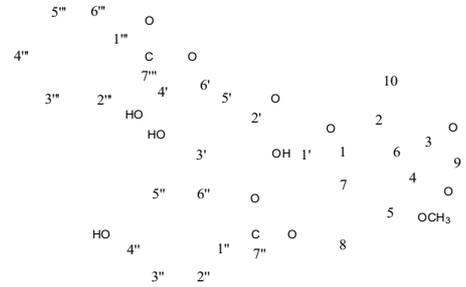


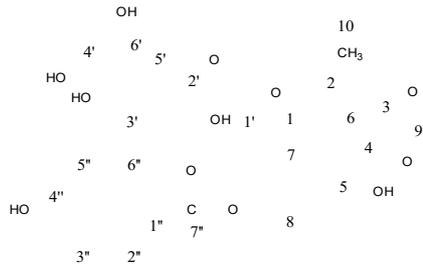
Fig. 42. Compound 8의 NMR 스펙트럼



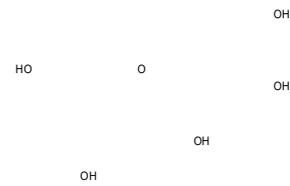
4-O-methylmoudanpioside C (1)



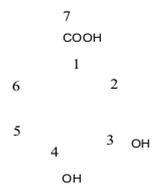
4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin (2)



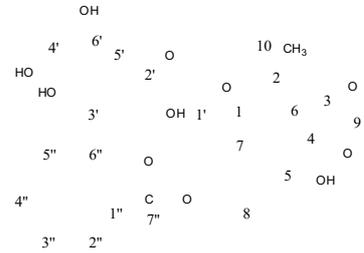
Oxypaeoniflorin (3)



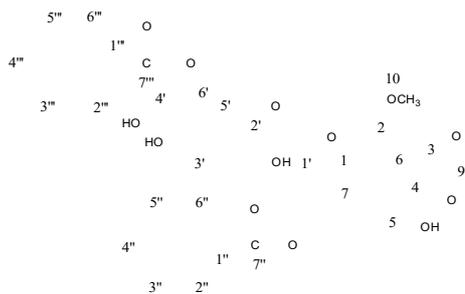
(+) catechin (4)



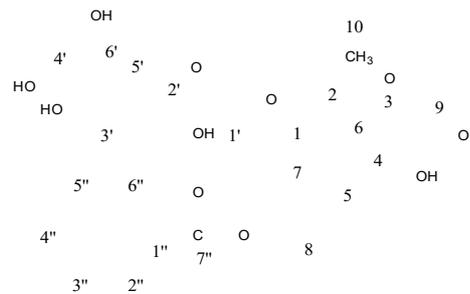
Catechuic acid (5)



Paeoniflorin (6)



Benzoylpaeoniflorin (7)



Albiflorin (8)

Fig. 43. 분리된 물질들의 구조동정 결과

○ 분리된 물질의 ALP활성 측정

- MC3T3-E1 세포를 이용하여 위에서 언급한 방법과 동일하게 ALP 활성을 확인하였음

- 그 결과 compound 1, 2, 3, 7, 8에서는 ALP 활성이 분화배지보다 현저히 높게 관찰되었음

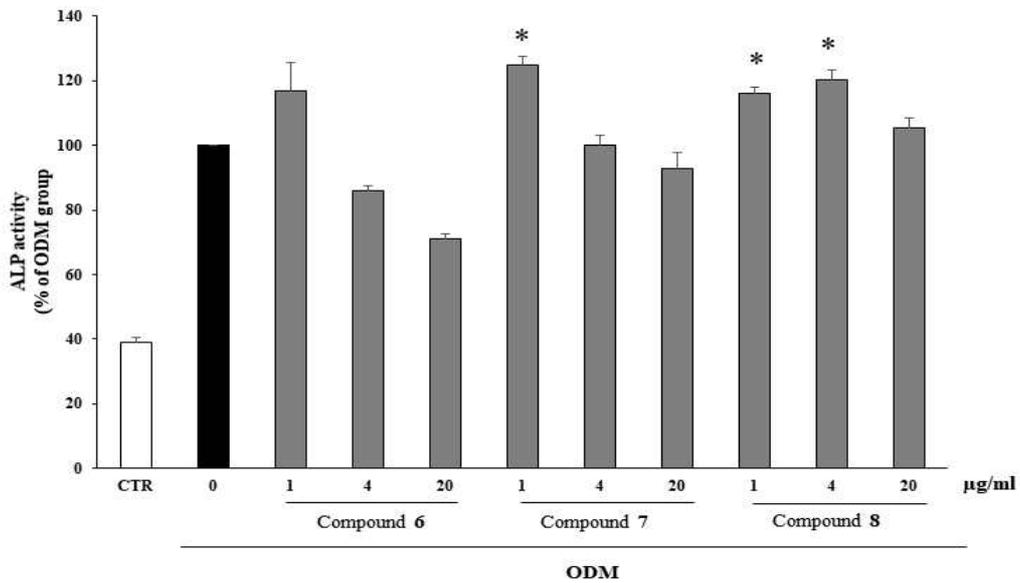
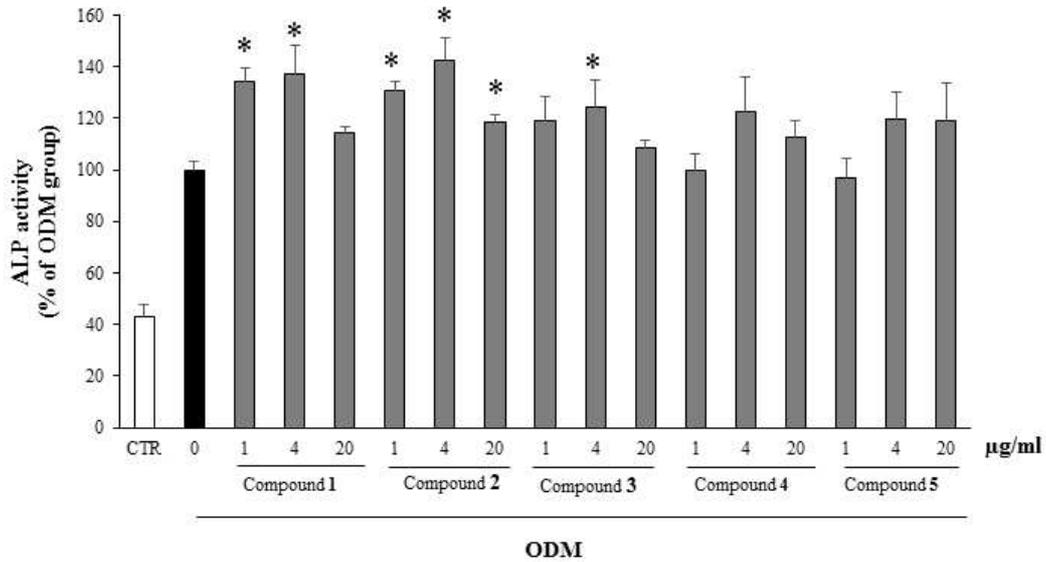


Fig. 44. 분리된 물질의 ALP 활성측정

*CTR : 일반배지, ODM : 분화배지

* $p < 0.05$ compared to ODM-treated group

○ 추출법 확립 및 추출물 표준화

- 작약에 함유된 활성 성분을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 추출법을 확립하기 위해서 실험을 진행함. 작약 건체 5 g을 각각 상온, 40, 60 °C 온도에서 0, 10, 20, 40% 에탄올을 이용하여 추출한 후 감압 농축하여 추출물을 확보함. 그 결과 60 °C에서 추출을 진행하였을 때 비교적 많은 추출물을 확보함

Table. 7. 추출조건에 따른 작약 추출물의 무게 (g)

에탄올 함량	추출 온도		
	상온	40℃	60 ℃
10%	0.836	0.858	0.967
20%	0.845	0.896	0.937
40%	0.991	0.865	0.951
D.W	0.932	0.944	0.933

- 확보한 5개의 활성 성분의 추출물 내 함량을 확인하기 위하여 HPLC 분석을 진행함. 각 추출물을 40 mg/mL 농도로 만든 후 5개 활성 성분 (4-O-methylmoudanpioside C, 4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin, Oxypaeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin, Albiflorin)의 함량을 피크 면적 값으로 계산하여 분석함. HPLC 분석법은 대한약전의 수록된 Paeoniflorin 검출 시험법과 동일하게 진행함

Table. 8. 대한약전 수록 Paeoniflorin HPLC 검출시험법(이동상 A: 물, 이동상 B: 아세토나이트릴)

시간(분)	이동상 A (Vol%)	이동상 B (Vol%)
0	90	10
15	90	10
30	80	20
45	65	35
48	50	50
55	50	50

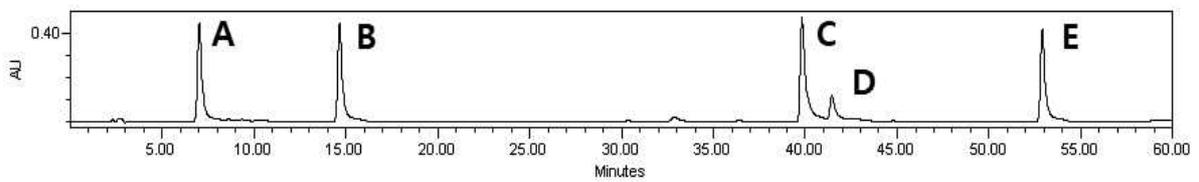


Fig. 45. 작약에서 분리된 활성물질의 HPLC 동시분석 크로마토그램

- *A: Oxypaeoniflorin
- *B: Albiflorin
- *C: 4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin
- *D: 4-O- methylmoudanpioside C
- *E: Benzoylpaeoniflorin

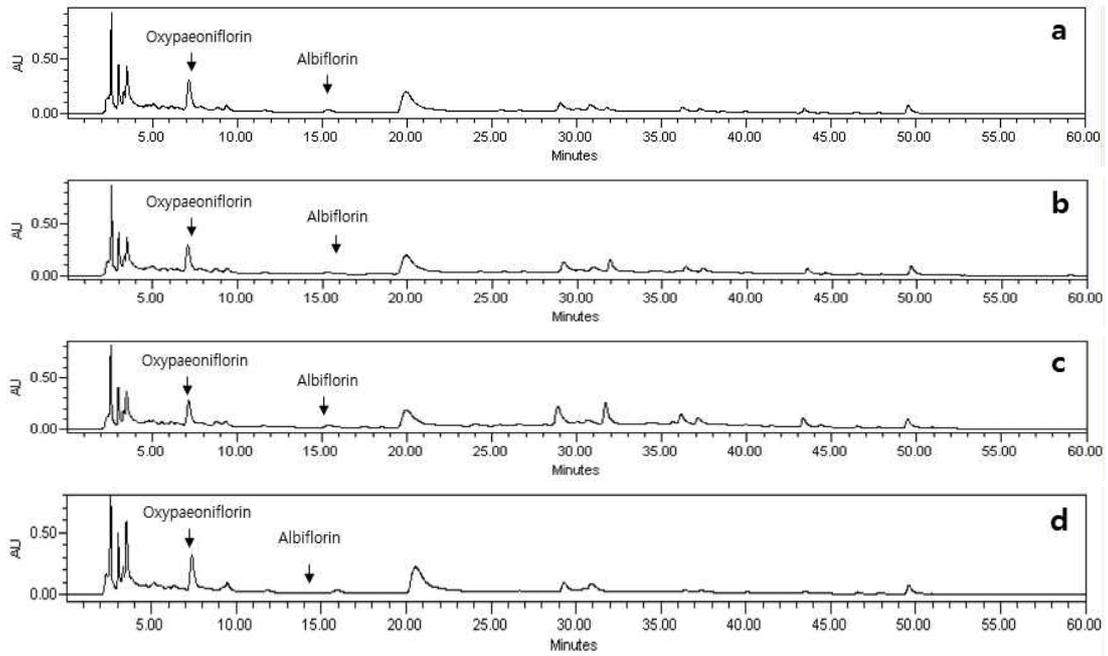


Fig. 46. 40 °C 추출 조건에서의 추출물 HPLC 크로마토그램

*a: 10% 에탄올 추출물, b: 20% 에탄올 추출물, c: 40% 에탄올 추출물, d: D.W 추출물

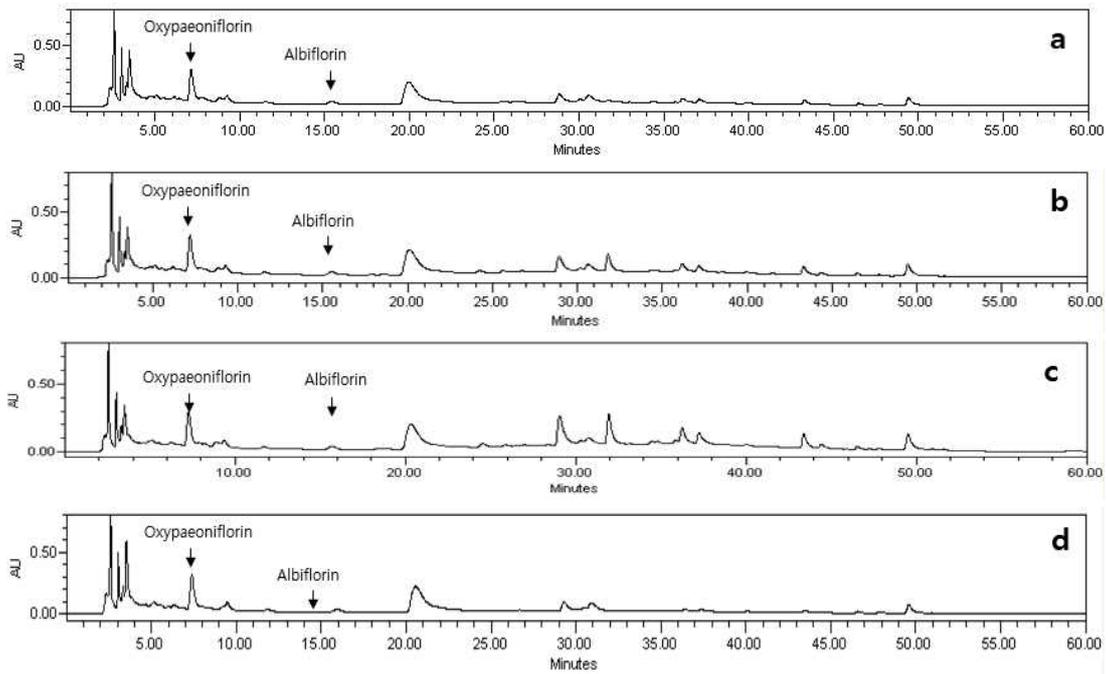


Fig. 47. 60 °C 추출 조건에서의 추출물 HPLC 크로마토그램

*a: 10% 에탄올 추출물, b: 20% 에탄올 추출물, c: 40% 에탄올 추출물, d: D.W 추출물

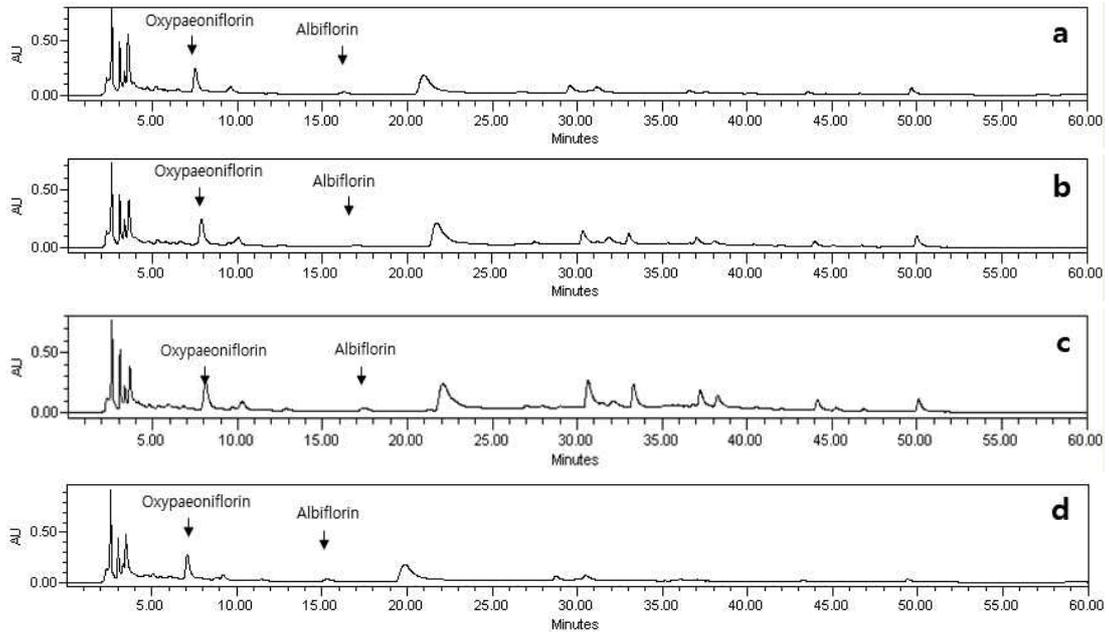


Fig. 48. 상온 추출 조건에서의 추출물 HPLC 크로마토그램

*a: 10% 에탄올 추출물, b: 20% 에탄올 추출물, c: 40% 에탄올 추출물, d: D.W 추출물

- 그 결과 Oxypaeoniflorin의 함량을 확인하였으며 모든 추출물에서 4-O-methylbenzoylo xypaeoniflorin, 4-O-methylmoudanpioside C, Benzoylpaeoniflorin 의 함량은 미미함
- 지표성분으로 설정한 Oxypaeoniflorin 의 추출물 내의 함량을 구하기 위해 HPLC 분석을 진행함. Oxypaeoniflorin을 농도별로 5회 분석을 진행 후 검량선을 작성함. 작성한 검량선 식에 추출물내의 Oxypaeoniflorin 면적값을 대입하여 함량을 확인함

Table 9. 추출조건에 따른 작약 추출물의 Oxypaeoniflorin 면적값 (Area)

에탄올 함량	추출 온도		
	상온	40℃	60℃
10%	3073348	3789573	3552811
20%	3657993	4022325	3572123
40%	4020861	4153314	4504268
D.W	3683907	4022325	3968640

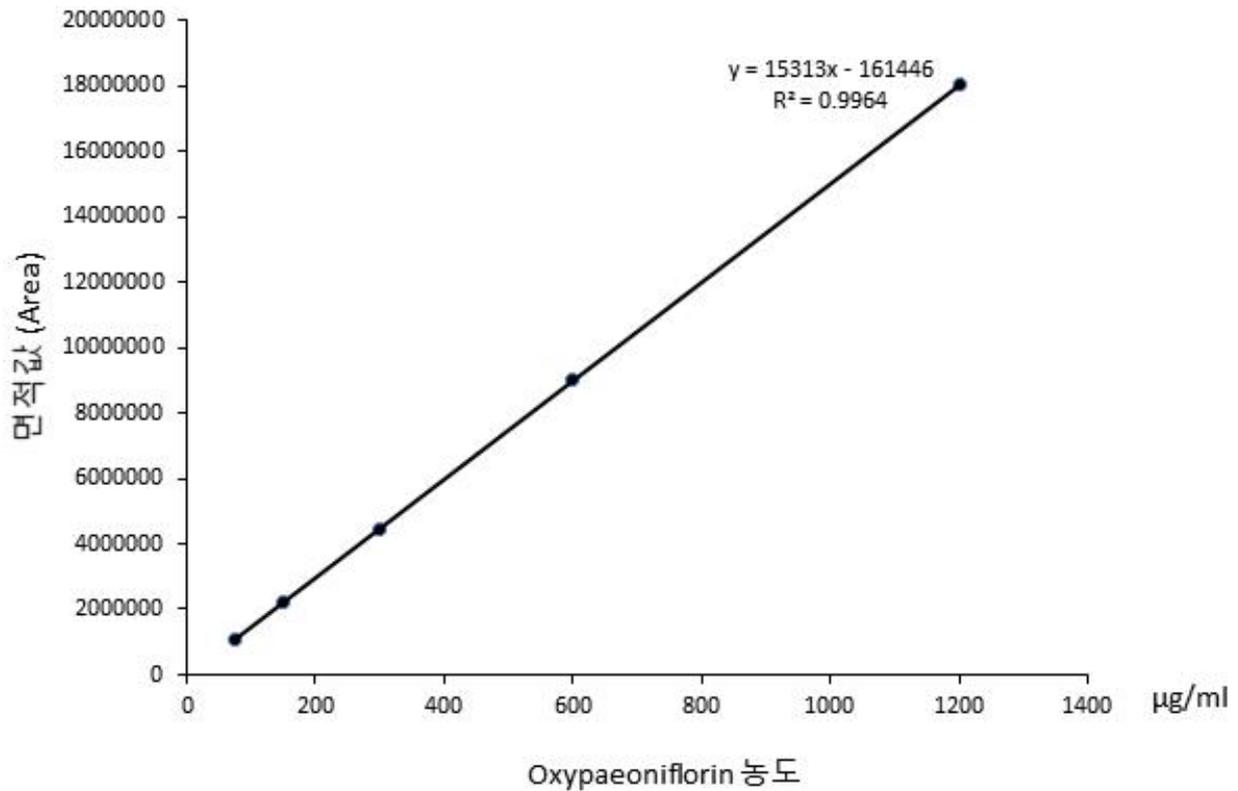


Fig. 49. Oxypaeoniflorin 농도별 HPLC 크로마토그램 검량선

Table 10. 추출조건에 따른 작약 추출물의 Oxypaeoniflorin 함량 (µg/mg)

에탄올 함량	추출 온도		
	상온	40℃	60℃
10%	0.528	0.645	0.606
20%	0.624	0.683	0.610
40%	0.683	0.704	0.762
D.W	0.628	0.683	0.674

- 검량선 작성 후 값을 대입한 결과 60℃, 40% 추출물에서의 Oxypaeoniflorin 함량이 가장 높게 나옴. 이를 통해 40%, 60℃ 조건에서의 추출법을 지표성분 추출법으로 확립함

○ 유효성분 라이브러리 구축

- 기 구축된 유효성분 라이브러리를 보유하고 있는 천연자원연구센터에 본 연구결과 도출된 유효성분을 기탁함으로써 라이브러리를 활용하고자 함. 이를 위해 작약에서 분리한 총 3종의 유효성분을 각각 5 mg 씩 천연자원연구센터에 기탁함

◎ 협동연구기관 2 (단국대 치의예과 오충훈 교수)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	뼈 건강소재 효능검증	• 뼈형성촉진 유효지표물질발 굴	• BMPs를 이용한 분석	• 유효 지표물질로 우수함
		• 뼈형성촉진 유효소재발굴	• 볶은 땅콩에서 분 석	• 볶은 땅콩 에탄올 추출물이 우수함
2차 년도 (2017)	뼈 건강소재 효능검증	• 천연물기원 • 뼈형성촉진 능력검증	• RUNX2, BSP, OCN, OPN 등 조골세포분 화 유전자발현	• 땅콩새싹 추출물의 compound 1,2,3에 서 조골세포 분화 효과 우수함
		• 한방물질기원 • 뼈형성촉진 능력검증	• Alizarin red S 염색 / CPC 추출	• 한방물질 중 작약 추출물의 조골세포 분화효과가 우수함
		• 뼈파괴억제 유효지표물질발 굴	• Tacrolimus를 이 용한 분석	• 면역억제제를 처 리하여 파골세포 분 화억제 확인
		• 뼈 파괴 억제 유효소재발굴	• ROC 염색, TRAP 활성	• 땅콩새싹 추출물 처리 시 파골세포 의 분화 억제 효과 우수 • 한방소재는 작약에 서 파골세포분화 억제효과 우수
		• 복합소재, 신제품 유효성검 증	• 골다공증 동물모델 활용	• 골다공증 동물 모 델에 타크로리무스 를 처리시 파골세 포분화억제효과 우 수 • 땅콩새싹 및 볶은 땅콩 처리시 골밀 도와 골미네랄 수 치가 증가하는 것 을 확인

3차 년도 (2018)	뼈 파괴 억제 유효소재 및 유효지표물질 발굴 (세포발굴)	<ul style="list-style-type: none"> 2차년도에 발굴한 한방소재 물질(작약)의 뼈 형성 능력 검증 	<ul style="list-style-type: none"> RUNX2, ALP, Osteocalcin, Osterix, Osteopontin 유전자 발현 	<ul style="list-style-type: none"> 각 유전자별 작약 처리 시 25, 50µg/mL에서 조골세포의 분화가 촉진됨
	골다공증 동물모델 유효성검증 (동물모델)	<ul style="list-style-type: none"> 뼈파괴 억제성 유효소재 검증 	<ul style="list-style-type: none"> c-fms, c-fos, NFATc1, DC-STAMP, calcitonin receptor, c-src, TRAP 유전자 발현 	<ul style="list-style-type: none"> 각 유전자별 작약 처리 시 25µg/mL에서 파골세포 분화가 억제됨
	골다공증 동물모델 유효성검증 (동물모델)	<ul style="list-style-type: none"> 골다공증 동물모델 유효성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 난소절제수술을 통해 골다공증 동물모델을 만들어 한방소재(작약) 효과 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 난소절제술 모델에 작약 100mg/mL 처리 시 골다공증 예방 효과를 확인함

■ 뼈형성 촉진 유효 지표물질 발굴

○ 쥐의 골수에서 추출한 D1 cell과 쥐의 머리뼈에서 추출한 전조골세포인 MC3T3-E1 cell에 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone를 통해 유도 조골세포로 유도 후 BMP-2,9(25ug/mL) 을 이용한 골 생성 능력을 비교함으로써, 천연 물질 소재의 골다공증 예방, 관리 유효성 증명을 위한 지표물질로 사용하여 실험을 진행함

○ Alkaline Phosphatase 측정

- 천연 소재물의 골다공증 예방, 관리 유효성 최적 농도 측정을 위해 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone을 통한 조골세포 유도 후, 대조물질 BMPs을 D1 cell에 처리하여 조골세포 분화정도 확인함. ALP의 활성도는 p-nitrophenyl phosphate disodium hexahydrate(pNPP)의 비율을 통해서 확인
- D1 cell에서 조골세포의 분화를 확인하기 위해서 조골세포 분화 마커인 Alkaline phosphatase(ALP) 활성도를 측정함. 음성대조군인 ODM 배지에 비해 BMP-2, 9를 첨가할 경우 ALP농도는 각각 약 1.43와 1.64배 활성이 증가됨

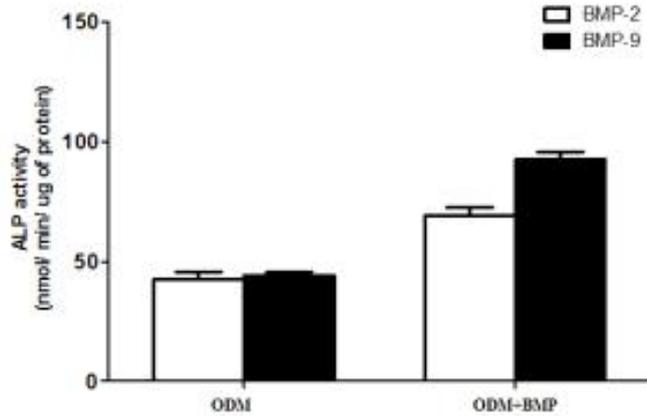


Fig. 1. D1 Cell에서의 Alkaline Phosphatase 측정

- MC3T3-E1 cell에서 조골세포의 분화를 확인하기 위해서 조골세포 분화 마커인 Alkaline phosphatase (ALP) 활성도를 측정하였음. 음성대조군인 ODM 배지에 비해 BMP-2, 9를 첨가할 경우 ALP농도는 각각 약 1.3와 1.6배 활성이 증가되는 것을 관찰함

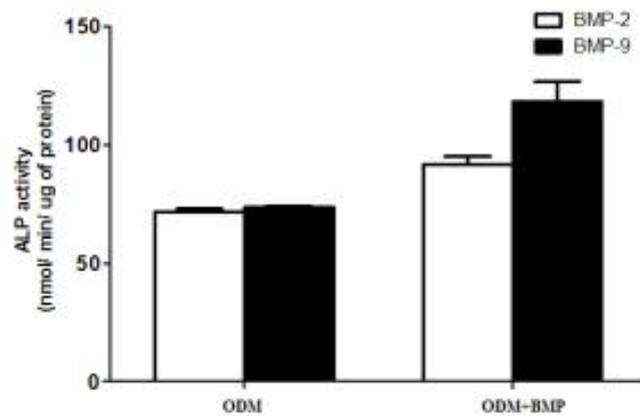


Fig. 2. MC3T3-E1 Cell에서의 Alkaline Phosphatase 측정

○ 골광화작용 측정

- 천연 소재물의 골다공증 예방, 관리 유효성 최적 농도 측정을 위해 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone을 통한 조골세포 유도 후, 대조물질 BMPs을 D1 cell, MC3T3-E1 cell에 처리하여 골광화 가능성은 Alizarin red S 염색법을 통해 확인함
- CPC 분석: 칼슘 침착 정도를 Alizarin Red S 염색법을 이용하여 측정함으로써 골 생성 증가 효능을 시각화한 후, 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride(CPC)로 mineralization을 정량화함으로써 최적 효능 범위를 측정함
- D1 cell에 BMP-2,9에 의한 조골세포 분화 영향을 더 알아보기 위하여 칼슘의 침착정도를 관찰 할 수 있는 Alizarin red S 염색을 수행함. 그림에서 보는 바와 같이 ODM에서 보다

BMP2 혹은 BMP9를 첨가한 경우 조골세포 분화가 촉진되는 것을 확인함

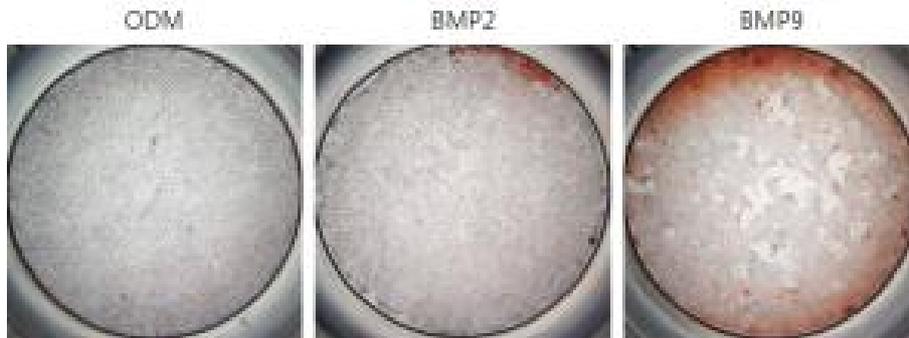


Fig. 3. D1 cell 에서의 BMP-2,9 처리 후 골광화작용 측정

- CPC분석을 통해 정량화 해보면, ODM에서 보다 BMP2 혹은 BMP9를 첨가한 후 골광화 작용이 각각 5.1과 7.1배 정도 증가함

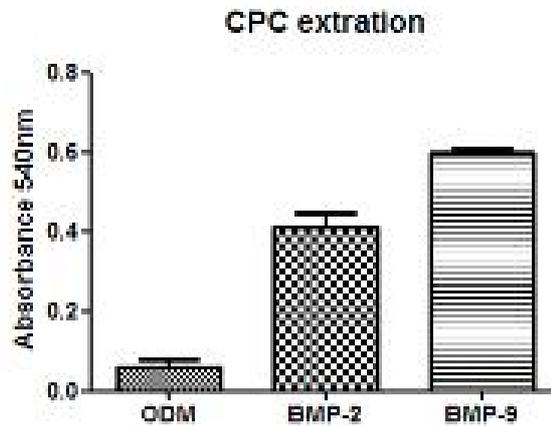


Fig. 4. D1 cell에서 BMP-2,9 처리 후 CPC분석

- MC3T3-E1 cell에 BMP-2,9에 의한 조골세포 분화 영향을 더 알아보기 위하여 칼슘의 침착 정도를 관찰 할 수 있는 Alizarin red S 염색을 수행함. 그림에서 보는 바와 같이 ODM에서 보다 BMP2 혹은 BMP9를 첨가한 경우 조골세포 분화가 촉진되는 것을 확인함



Fig. 5. MC3T3-E1 cell에서 BMP-2,9 처리 후 골광화작용 측정

- CPC분석을 통해 정량화해보면, ODM에서보다 BMP2 혹은 BMP9를 첨가한 후 골광화 작용이 각각 4.4와 5.9배 증가함

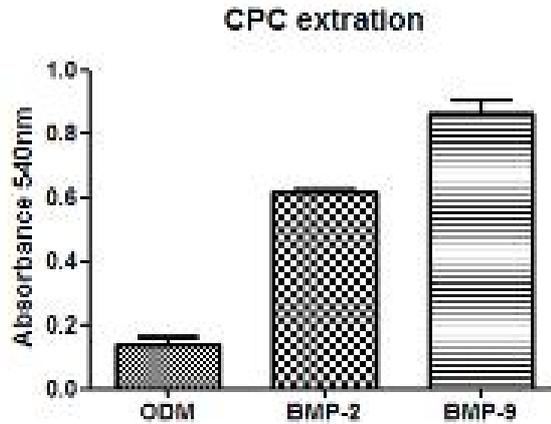
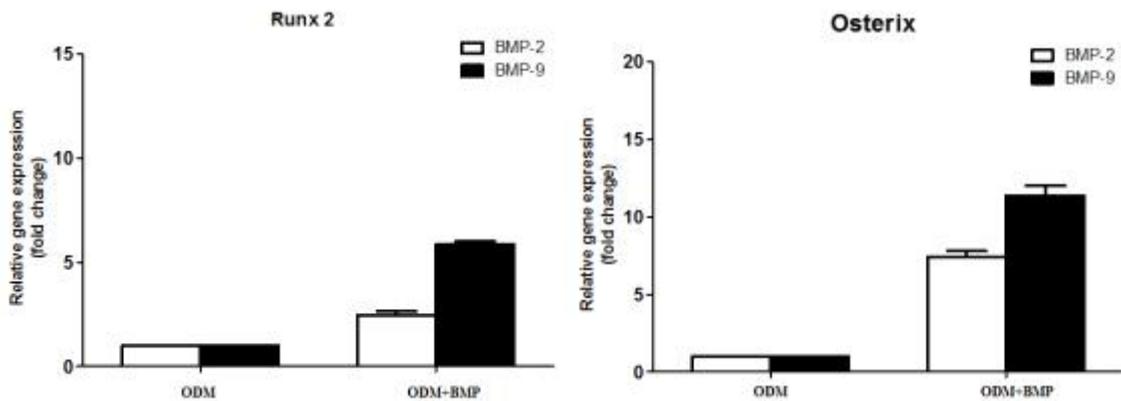


Fig. 6. MC3T3-E1 cell에서 BMP-2,9 처리 후 CPC분석

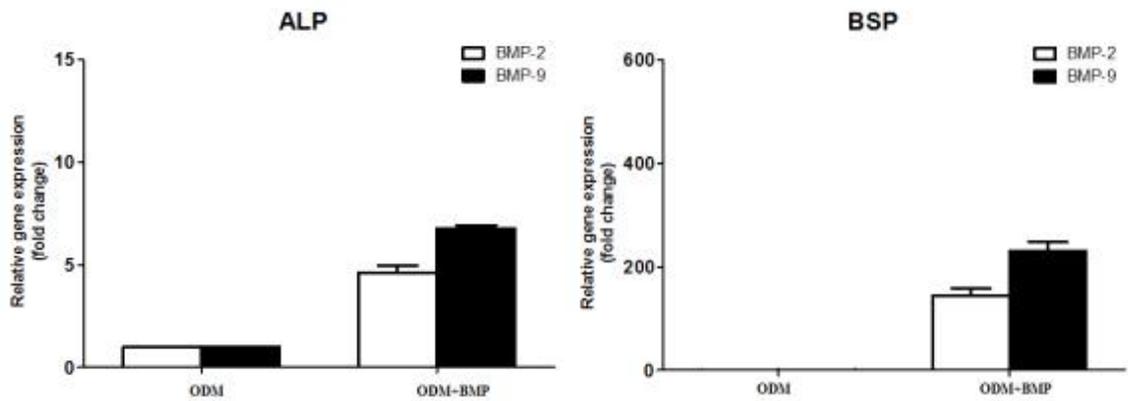
○ Gene expression

- glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone을 통한 Osteoblast 유도 후, 지표물질 BMP-2,9 을 D1 cell, MC3T3-E1에 처리하여 조골 세포의 분화에 지표로 활용되는 분화 초기마커 Runx2와 Osterix, 중기마커인 ALP와 BSP, 후기마커인 OCN와 OPN 등의 특이 마커들의 유전자 발현을 qPCR로 비교분석함

<초기마커유전자-D1 cell>



<중기마커유전자-D1 cell>



<후기마커유전자-D1 cell>

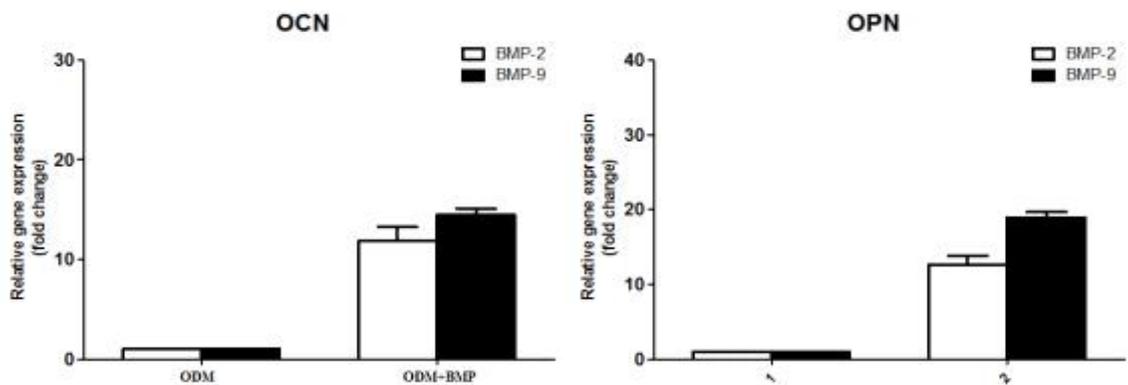
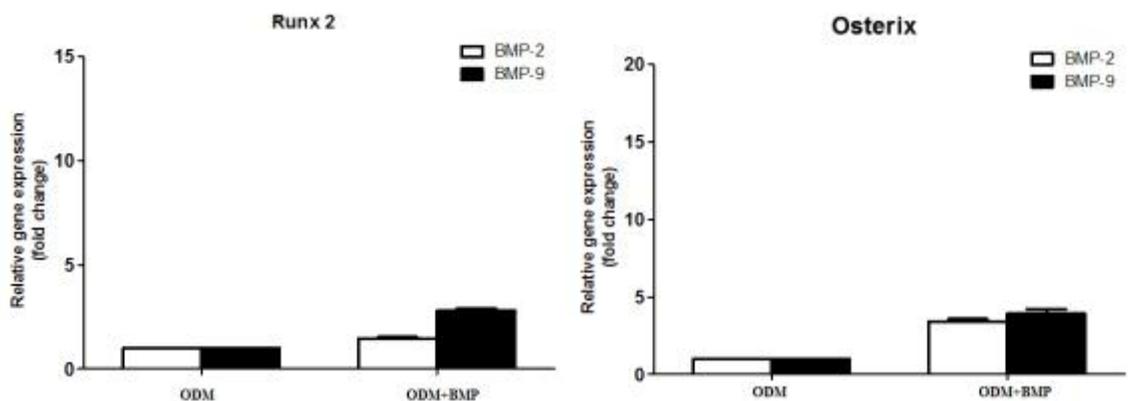


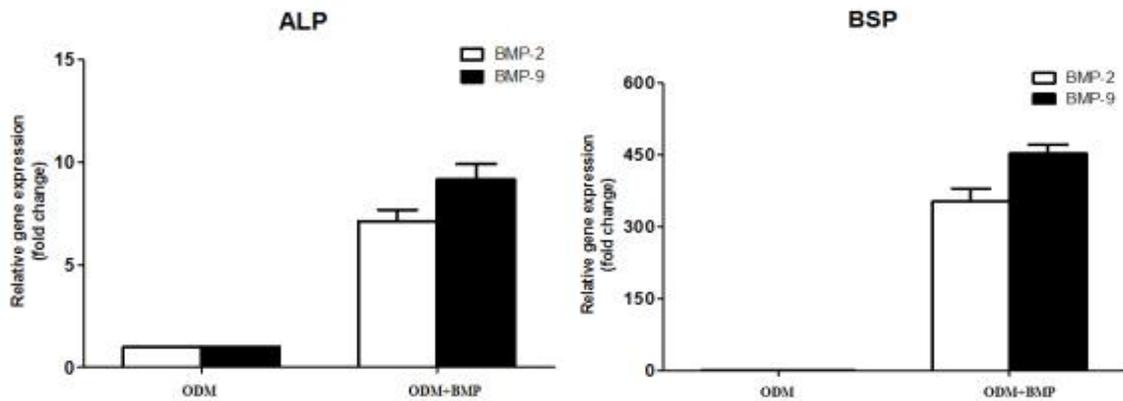
Fig. 7. D1 Cell에서 osteoblast 관련 초, 중, 후기 유전자 발현 분석

- 그래프에서 보는 바와 같이 D1 cell에서 ODM에서 보다 BMP2 혹은 BMP9를 첨가한 경우 조골세포분화에 관련된 초기, 중기, 후기 유전자들의 발현이 모두 증가되는 것을 확인함. 각 유전자 별로 Runx2는 BMP2, 9에서 2.47배, 5.85배 증가. Osterix는 7.42배, 11.36배 증가. ALP는 4.61배, 6.78배 증가. BSP는 143.93배, 230.87배 증가. OCN은 11.81배, 14.42배 증가. OPN은 12.65배, 18.91배 증가함

<초기마커유전자-MC3T3-E1 cell>



<중기마커유전자-MC3T3-E1 cell>



<후기마커유전자-MC3T3-E1 cell>

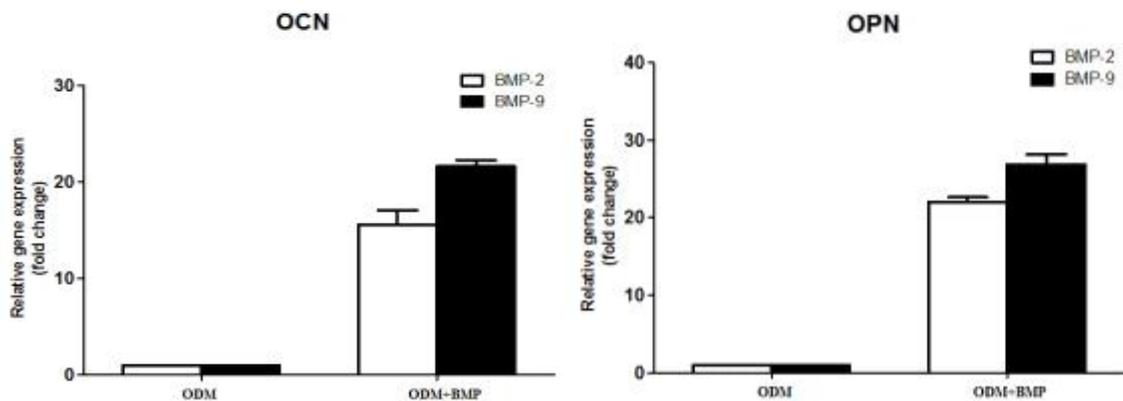


Fig. 8. MC3T3-E1 cell에서 osteoblast 관련 초, 중, 후기 유전자 발현 분석

- 그래프에서 보는 바와 같이 MC3T3-E1 cell에서 ODM에서 보다 BMP2 혹은 BMP9를 첨가한 경우 조골세포분화에 관련된 초기, 중기, 후기 유전자들의 발현이 모두 증가되는 것을 확인함. 각 유전자 별로 Runx2는 BMP2, 9에서 1.45배, 2.805배 증가. Osterix는 3.43배, 3.9배 증가. ALP는 7.12배, 9.14배 증가. BSP는 352.8배, 452.35배 증가. OCN은 15.54배, 21.61배 증가. OPN은 21.96배, 26.83배 증가함

■ 뼈형성 촉진 유효 소재물질 발굴

○ 골광화작용 측정

- 천연 소재물 중 1협동과제에서의 성분 중 ALP활성이 우수한 볏짚 에탄올 추출물의 골다공증 예방, 관리 유효성 최적 농도 측정을 위해 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone을 통한 조골세포 유도 후, 볏짚 에탄올 추출물을 D1 cell, MC3T3-E1 cell에 처리하여 골광화 가능성은 Alizarin red S 염색법을 통해 확인함
- CPC 분석: 칼슘 침착 정도를 Alizarin Red S 염색법을 이용하여 측정함으로써 골 생성 증가 효능을 시각화한 후, 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride(CPC)로 mineralization을 정량화함으로써 최적 효능 범위를 측정함

- D1 cell에 볶은 땅콩 에탄올 추출물에 의한 조골세포 분화 영향을 더 알아보기 위하여 칼슘의 침착정도를 관찰 할 수 있는 Alizarin red S 염색을 수행함. 그림에서 보는 바와 같이 양성대조물질인 BMP2 혹은 BMP9를 처리한 경우와 비슷하게 볶은 땅콩 에탄올 추출물 첨가한 경우 조골세포 분화가 촉진되는 것을 확인함



Fig. 9. D1 cell에 볶은 땅콩 에탄올 추출물 처리 후 조골세포분화 골광화분석 확인

- CPC분석을 통해 정량화 해보면, ODM(CTL)에서 보다 볶은 땅콩 에탄올 추출물을 첨가한 후 골광화 작용이 약 5.7배 정도 증가함

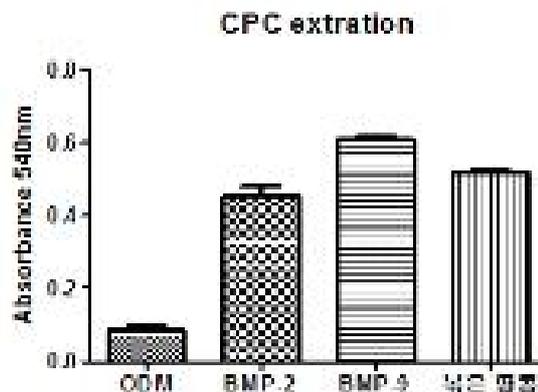


Fig. 10. D1 cell에 볶은 땅콩 에탄올 추출물 처리 후 조골세포분화 CPC 분석

- MC3T3-E1 cell에 볶은 땅콩 에탄올 추출물에 의한 조골세포 분화 영향을 더 알아보기 위하여 칼슘의 침착정도를 관찰 할 수 있는 Alizarin red S 염색을 수행함. 그림에서 보는 바와 같이 양성대조물질인 BMP2 혹은 BMP9를 처리한 경우와 비슷하게 볶은 땅콩 에탄올 추출물을 첨가한 경우 조골세포 분화가 촉진되는 것을 확인함



Fig. 11. MC3T3-E1 cell에 볏은 땅콩 에탄올 추출물 처리 후 조골세포분화 골광화분석 확인

- CPC분석을 통해 정량화 해보면, ODM(CTL)에서 보다 볏은 땅콩 에탄올 추출물을 첨가한 후 골광화 작용이 약 4.8배 정도 증가함

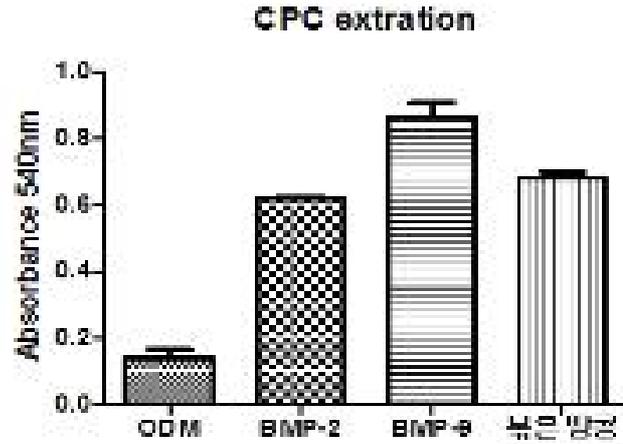


Fig. 12. MC3T3-E1 cell에 볏은 땅콩 에탄올 추출물 처리 후 조골세포분화 CPC 분석

■ 천연물기원 뼈형성촉진 능력검증

○ 쥐의 머리뼈에서 추출한 전조골세포인 MC3T3-E1 cell에 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone를 통해 유도 조골세포로 유도 후 골 생성 능력을 비교함으로써, 천연 물질 소재의 골다공증 예방, 관리 유효성 증명을 위한 지표물질로 사용하여 실험을 진행함

○ 골광화작용 측정

- 천연 소재물의 골다공증 예방, 관리 유효성 최적 농도 측정을 위해 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone을 통한 조골세포 유도 후, 협동 1팀에서 전달 받은 천연물 땅콩새싹 분획물(5종)을 MC3T3-E1 cell에 처리하여 조골세포 분화 영향을 더 알아보기 위하여 칼슘의 침착정도를 관찰 할 수 있는 Alizarin red S 염색을 수행함

○ 천연물기원 소재

- 협동 1과정팀에서 전달 받은 천연물 땅콩새싹 EtOH추출물, 땅콩새싹 EA추출물, 땅콩새싹 EA층 compound 1, 땅콩새싹 EA층 compound 2, 땅콩새싹 EA층 compound 3을 실험에 사용함

- MC3T3-E1 세포에 조골세포 분화를 유도하기 위해 Osteogenic differentiation medium (ODM)을 처리하여 양성대조군으로 사용하였고 협동 1팀에서 전달 받은 땅콩새싹 (5 분획물) 추출물을 MC3T3-E1 세포에 각 농도별(0.7-100ug/mL)로 처리하고 3일마다 교체하여 3주 동안 실험 진행하여 칼슘침착정도를 확인함

* ODM; 10 mM β -glycerophosphate, 50 uM Ascorbic acid, 100 nM Dexamethasone를 처리한 배지(조골세포 분화유도 배지)

땅콩새싹 천연물(5 분획물)-1주차

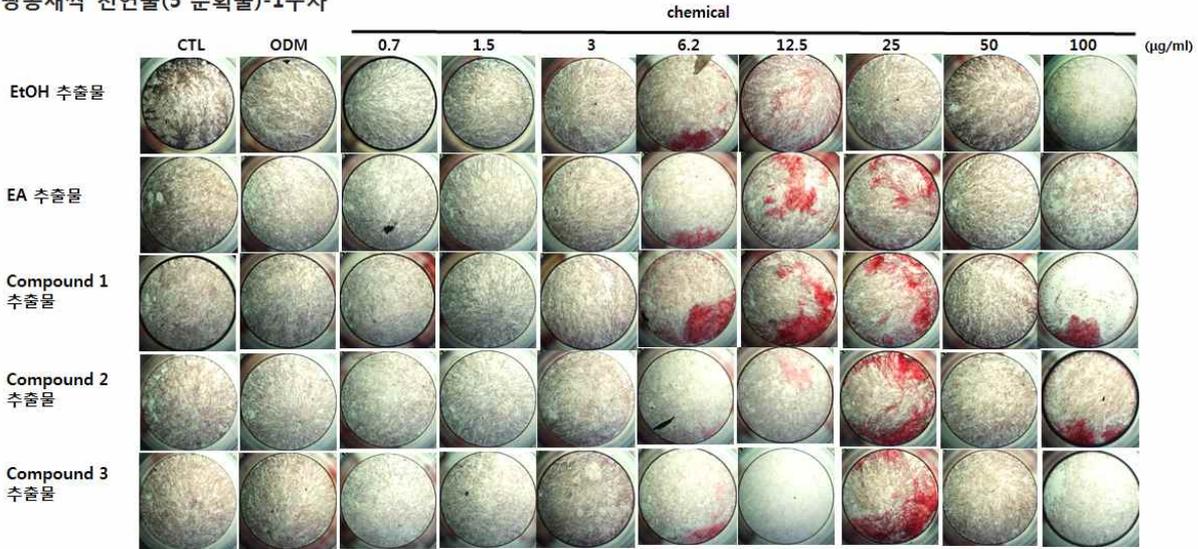
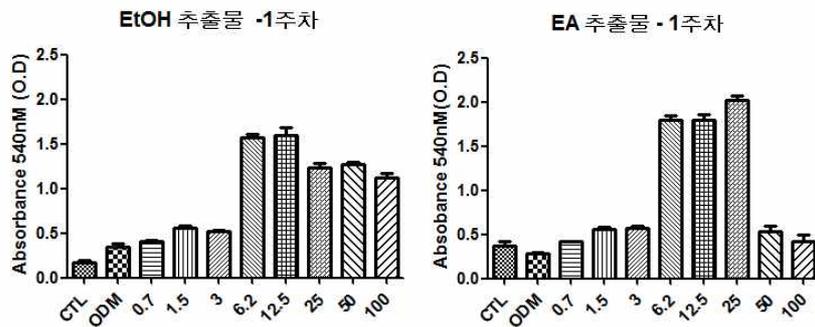


Fig. 13. MC3T3-E1 cell 에서의 땅콩새싹 천연물 처리 1주후 골광화작용 측정

- 협동 1팀에게 전달 받은 천연물질 땅콩새싹 (5 추출물)을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 농도별로 3일에 한 번씩 배지를 교체 해주면서 3주 동안 처리함
- 그 결과 1주차에서는 CTL과 ODM에서 칼슘침착정도가 관찰 되지 않았으며 또한 5개의 모든 추출물에서 저농도인 0.7-3 ug/mL에서는 조골세포 분화가 관찰되지 않았음. 그러나 6ug/mL에서부터 1주차에서 조골세포의 분화가 점차 증가되는 것이 나타났으며 특히 ethyl acetate (EA)로 분획한 추출물중 compound 1, 2, 3가 25 ug/mL 농도에서 조골세포 분화가 촉진되는 것을 관찰함

○ CPC 분석

- 칼슘 침착 정도를 Alizarin Red S 염색법을 이용하여 측정함으로써 골 생성 증가 효능을 시각화한 후, 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride(CPC)로 mineralization을 정량화함으로써 최적 효능 범위를 측정함



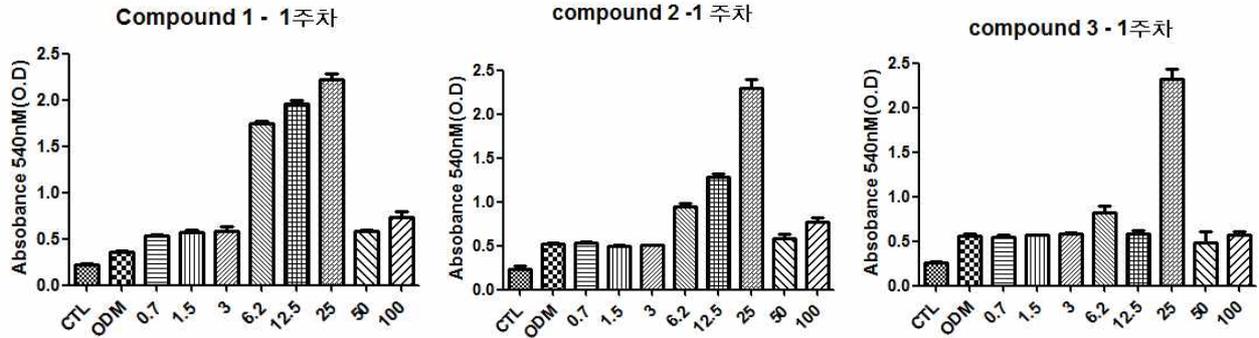


Fig. 14. MC3T3-E1 cell 땅콩새싹 천연물 처리 1주후 CPC분석

- 천연물 땅콩새싹 5 분획물을 1주 동안 처리하여 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride (CPC)를 이용하여 수치화함
- 땅콩새싹 EtOH 추출물에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 2, 2, 2.8, 2.7, 7.7, 8.2, 6.8, 6.3, 5 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 추출물에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 1.4, 1, 1.4, 1.4, 4.3, 4.6, 5, 1.4, 0.8 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 분획물중 Compound 1에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 1.8, 2.6, 3, 2.6, 8, 10, 11, 3 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 분획물중 Compound 2에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 2.2, 2.7, 2.5, 2.6, 5, 6, 10.1, 3.2 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 분획물중 Compound 3에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 2, 2.2, 2.3, 2.4, 3.5, 2.5, 8.8, 2.7 배 증가됨을 확인함
- 각 추출물을 비교하였을 때 1주차에서는 EA로 추출한 compound 1,2,3추출물들이 25 ug/mL에서 가장 높은 조골세포 분화 양상을 보임

땅콩새싹 천연물(5 분획물)-2주차

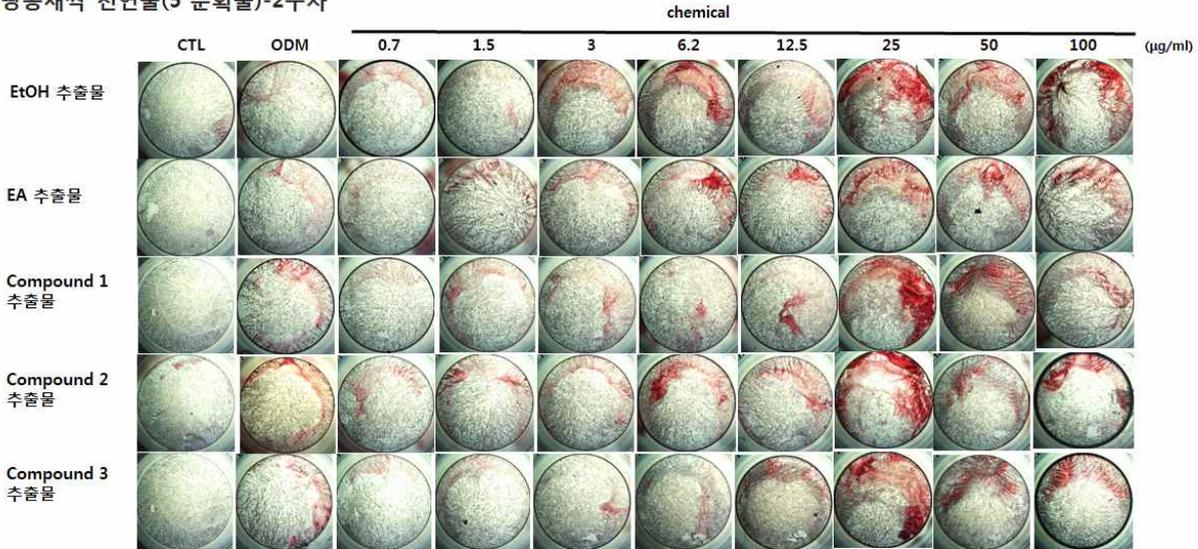
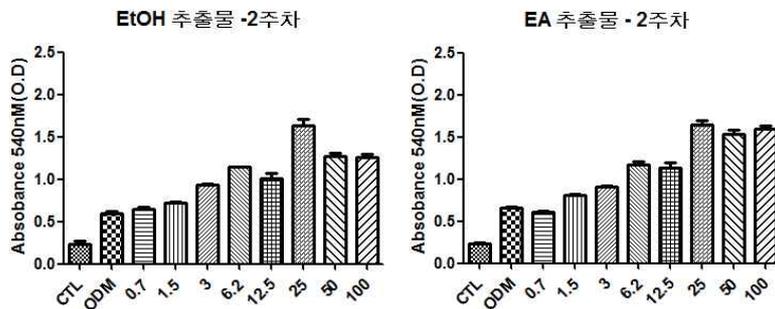


Fig. 15. MC3T3-E1 cell 에서의 땅콩새싹 천연물 처리 2주 후 골광화작용 측정

- 협동 1에서 전달받은 천연물질 땅콩새싹(5 분획물)을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 농도별로 3일에 한번 씩 배지를 교체해주면서 3주 동안 처리함.
- 그 결과 2주차에서 CTL과 비교하여 양성대조군인 ODM은 칼슘침착정도가 증가 되는 것을 확인하였으며, 또한 모든 추출물에서 저농도(0.7-3 ug/mL)에서 미미하지만 ODM배지만 처리한 대조군과 비슷한 양상으로 조골세포 분화가 관찰됨
- 또한 고농도 (25-100 ug/mL)에서는 조골세포의 분화가 ODM만 처리한 배지 보다 더 증가 된 것을 확인함. 특히 ethyl acetate(EA)로 분획한 추출물중 compound 1, 2, 3가 25 ug/mL에서 조골세포 분화가 촉진되는 것을 관찰함

○ CPC 분석

- 칼슘 침착 정도를 Alizarin Red S 염색법을 이용하여 측정함으로써 골 생성 증가 효능을 시각화한 후, 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride(CPC)로 mineralization을 정량화함으로써 최적 효능 범위를 측정함



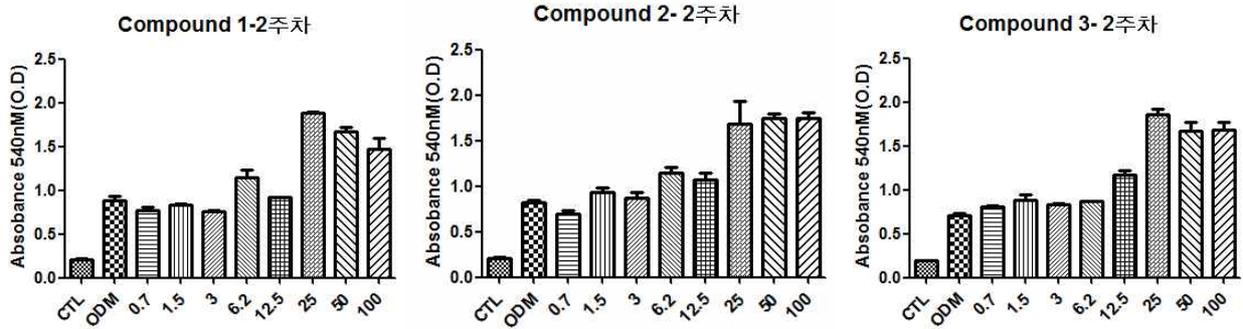


Fig. 16. MC3T3-E1 cell 땅콩새싹 천연물 처리 2주후 CPC분석

- 천연물 땅콩새싹 5 분획물을 2주 동안 처리하여 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride (CPC)를 이용하여 수치화함
- 땅콩새싹 EtOH 추출물에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 3, 3.4, 3.6, 4.6, 5.8, 4.6, 8.7, 6.3, 6 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 추출물에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 2.7, 2.4, 3.2, 3.6, 5, 4.2, 7, 5.8, 6.3 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 분획물중 Compound 1에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4.4, 3.7, 4.1, 3.8, 5, 4.6, 9.4, 8.7, 7.7 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 분획물중 Compound 2에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4, 3.4, 4.2, 3.9, 6, 5, 10, 8.2, 8.4 배 증가됨을 확인함
- 땅콩새싹 EA 분획물중 Compound 3에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 3.8, 4.1, 3.9, 4.1, 4.4, 6, 9.4, 9.4, 7.6 배 증가됨을 확인함
- 2주차에서는 ODM 분화가 CTL에 비해 증가 되었으며 추출물 처리 시 저 농도에서는 ODM 분화와 유사하게 분화가 진행이 되었으며 특히 EA로 추출한 compound 1,2,3 25 ug/mL 에서 가장 높은 조골세포 분화 양상을 보임

땅콩새싹 천연물(5 분획물)-3주차

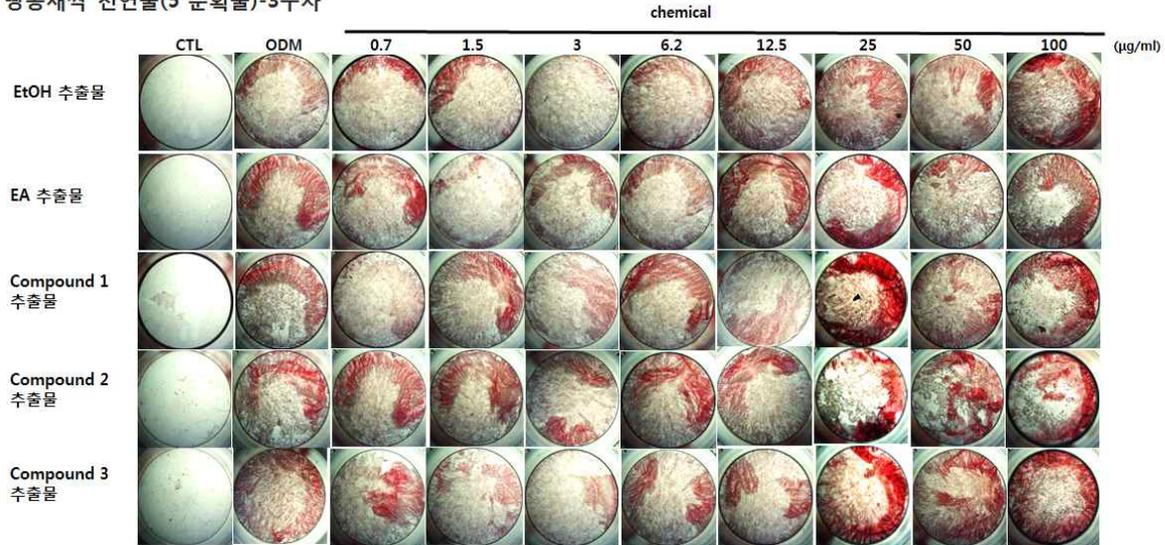
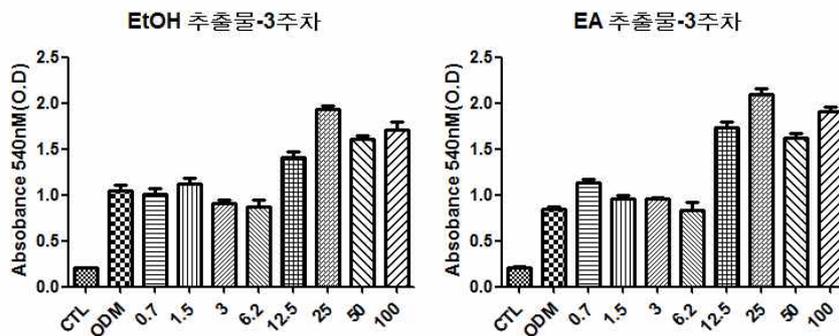


Fig. 17. MC3T3-E1 cell에서의 땅콩새싹 천연물 처리 3주 후 골광화작용 측정

- 협동 1에서 전달받은 천연물질 땅콩새싹(5 분획물)을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 농도별로 3일에 한번씩 배지를 교체해주면서 3주동안 처리함. 그 결과 3주차에서 CTL과 비교하여 양성대조군인 ODM은 칼슘침착정도가 증가 되는 것을 확인하였으며, 또한 모든 추출물에서 저 농도(0.7-3 ug/mL)에서는 ODM배지만 처리한 대조군과 비슷한 양상으로 조골세포 분화가 관찰됨
- 또한, 고농도 (25-100 ug/mL)에서는 조골세포의 분화가 ODM만 처리한 배지 보다 더 증가된 것을 확인함. 특히 ethyl acetate (EA)로 분획한 추출물중 compound 1, 2, 3가 25 ug/mL에서 조골세포 분화가 활발히 일어나는 것을 관찰함. 그림에서 보는 것과 같이 땅콩새싹 추출물에서는 3주 때 결과보다는 시기를 앞당겨 1주, 2주 때 조골세포 분화가 더 촉진되는 것을 확인함

○ CPC 분석

- 칼슘 침착 정도를 Alizarin Red S 염색법을 이용하여 측정함으로써 골 생성 증가 효능을 시각화한 후, 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride(CPC)로 mineralization을 정량화함으로써 최적 효능 범위를 측정하였음



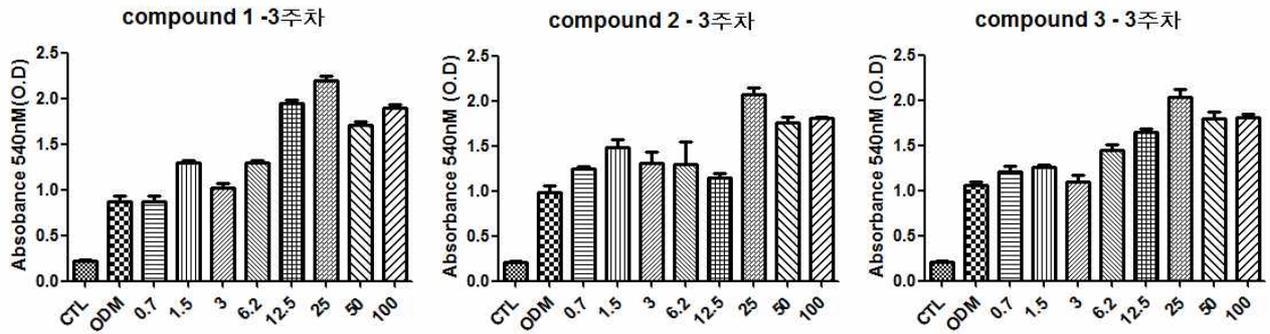


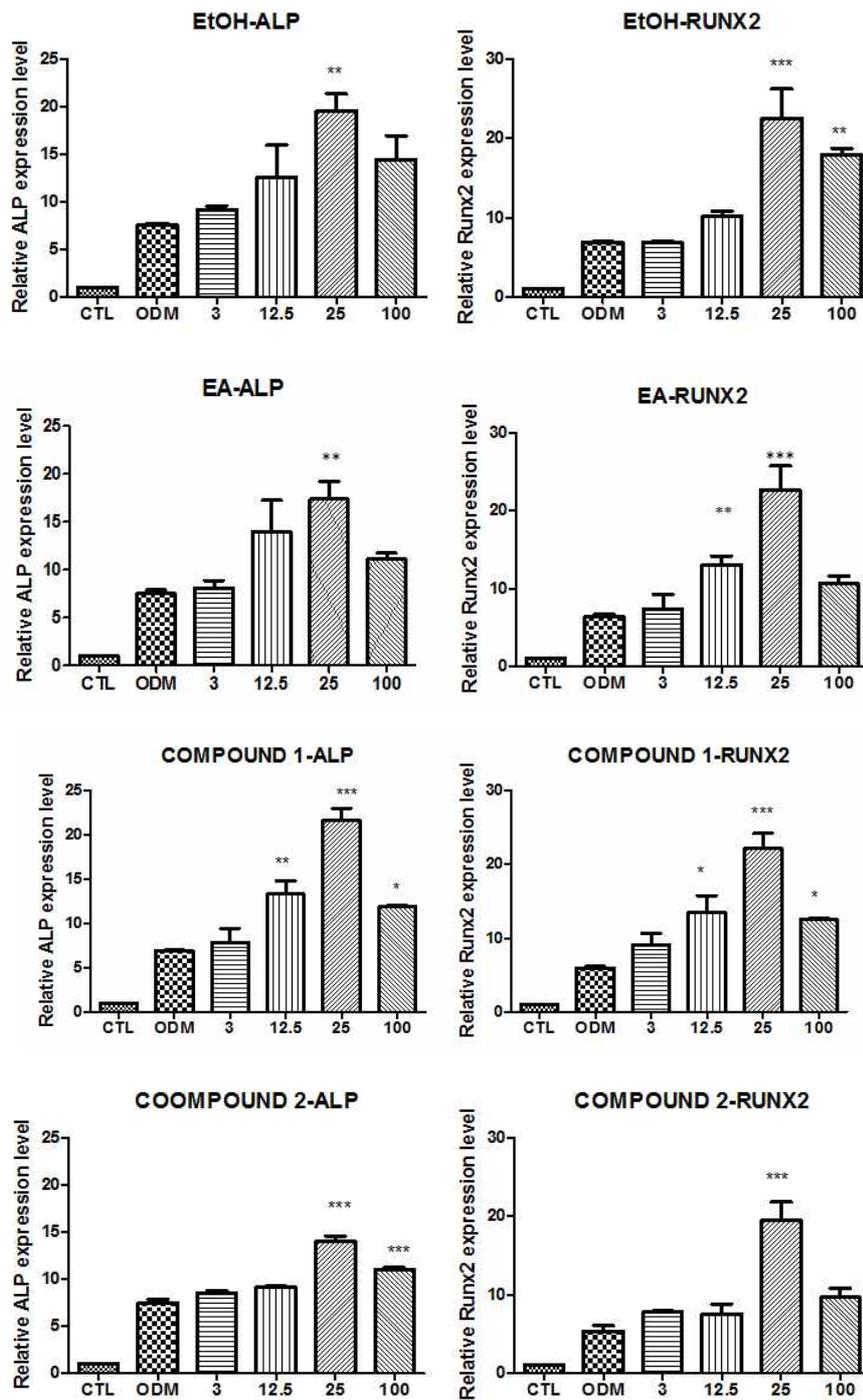
Fig. 18. MC3T3-E1 cell 망콩새싹 천연물 처리 3주후 CPC분석

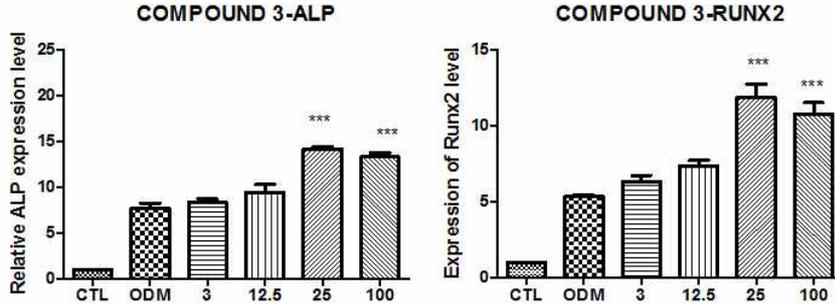
- 천연물 망콩새싹 5 분획물을 3주 동안 처리하여 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride (CPC)를 이용하여 수치화함
- 망콩새싹 EtOH 추출물에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 5.5, 5.6, 6.1, 4.5, 4.9, 6.7, 9.4, 8.2, 9.4 배 증가됨을 확인함
- 망콩새싹 EA 추출물에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4.1, 5.7, 4.8, 4.6, 4.6, 7.8, 9.4, 7.3, 9 배 증가됨을 확인함
- 망콩새싹 EA 분획물중 Compound 1에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 5.2, 4, 5.5, 3.6, 5.6, 8.2, 8.5, 6.4, 8.2 배 증가됨을 확인함
- 망콩새싹 EA 분획물중 Compound 2에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 5.7, 5.6, 6.3, 5.4, 6.3, 3.5, 8.6, 7.3, 7.9 배 증가됨을 확인함
- 망콩새싹 EA 분획물중 Compound 3에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4.9, 6, 6, 4.7, 6.6, 7.5, 8.6, 8.6, 8.5 배 증가됨을 확인함
- 3주차에서는 ODM 분화가 CTL에 비해 증가 되었으며 추출물 처리 시 저 농도에서는 ODM 분화와 유사하게 분화가 진행이 되었으며 특히 EA로 추출한 compound 1,2,3 25ug/mL에서 가장 높은 조골세포 분화 양상을 보임

○ 정량 PCR 분석법

- 골분화 특이마커들 발현 정도를 관찰하기 위해 TRIZOL(Invitrogen; 미국)을 이용해 배양된 세포의 total RNA를 추출한 후, iScript™ cDNA 합성 키트 (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해 cDNA를 제작하였음. PCR 프라이머는 바이오니아(Daejeon; Korea)에서 구입함. SYBR Green 형광 염색을 이용하여 StepONE Plus real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA)을 수행함.
- PCR 과정은 섭씨 90도에서 변성과정을 15초동안 거치고, 섭씨 60도로 다시 온도를 60초

동안 낮추어 DNA 가닥을 분리시킴. 그 후에 증폭시켜서 정량 PCR 분석법을 수행함. 사용된 프라이머 염기서열은 다음과 같음





- 조골세포 분화정도를 더 확실히 알아보기 위해 분화 유전자 발현을 qPCR을 이용하여 조사하였음. 먼저 증기 발현마커로 알려진 ALP와 초, 중, 후기 마커 Runx2는 땅콩새싹 천연물을 각각 14일 동안 처리한 후 확인함
- 땅콩새싹 분획물중 각각 모든 분획물에서 25ug/mL에서 높은 발현양상을 확인함 (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significant compared with ODM)

■ 한방물질기원 뼈형성촉진 능력검증

○ 귀의 머리뼈에서 추출한 전조골세포인 MC3T3-E1 cell에 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone를 통해 유도 조골세포로 유도 후 골 생성 능력을 비교함으로써, 천연물질 소재의 골다공증 예방, 관리 유효성 증명을 위한 지표물질로 사용하여 실험을 진행함

○ 골광화작용 측정

- 한방 소재물의 골다공증 예방, 관리 유효성 최적 농도 측정을 위해 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone을 통한 조골세포 유도 후, 협동 1팀에서 전달 받은 한방물질 3종을 MC3T3-E1 cell에 처리하여 조골세포 분화 영향을 더 알아보기 위하여 칼슘의 침착정도를 관찰 할 수 있는 Alizarin red S 염색을 수행하였음

○ 한방물질기원 소재

- 협동 1과정팀에서 전달 받은 작약, 소엽, 연자육을 실험에 사용함

- MC3T3-E1 세포에 조골세포 분화를 유도하기 위해 Osteogenic differentiation medium (ODM)을 처리하여 양성대조군으로 사용하였고 협동 1팀에서 전달 받은 작약, 소엽, 연자육 추출물을 MC3T3-E1 세포에 각 농도별(0.7-100ug/mL)로 처리하고 3일마다 교체하여 3주 동안 실험 진행하여 칼슘침착정도를 확인함

* ODM; 10mM β -glycerophosphate, 50uM Ascorbic acid, 100nM Dexamethasone를 처리한 배지. (조골세포 분화유도 배지)

한방소재 후보물질 - 작약

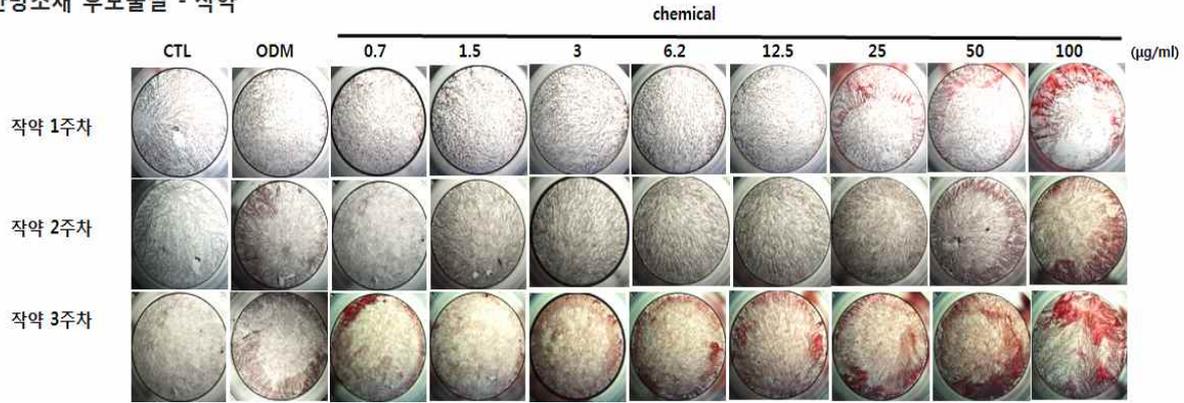


Fig. 19. MC3T3-E1 cell 한방소재 작약추출물 처리 후 글광화작용 측정

- 협동 1팀에게 전달받은 한방소재 물질 작약을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 농도별로 3일에 한번씩 배지를 교체 해주면서 3주 동안 처리함. 그 결과 1, 2주차에서는 ODM 배지만 처리한 실험군과 비교하여 조골세포분화 양상을 관찰하지 못하였으나 3주차에서는 ODM배지 만큼 저농도에서 조골세포 분화가 관찰 되었고 25ug/mL이상의 농도에서는 분화가 점차 증가하는 것을 확인함

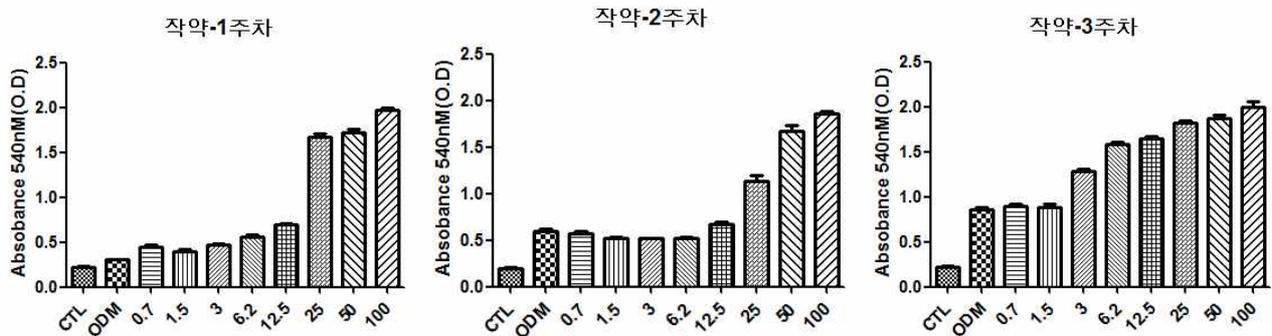


Fig. 20. MC3T3-E1 cell 한방소재 작약추출물 처리 후 CPC 추출

- 한방소재 작약을 1,2,3주 동안 처리하여 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride (CPC)를 이용하여 수치화함
- 작약 추출물 1주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 1.3, 1.6, 1.5, 1.7, 2.1, 2.7, 6.5, 6.7, 8배 증가됨을 확인함
- 작약 추출물 2주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 3.2, 2.5, 2.5, 2.5, 2.6, 3, 5, 7.9, 9 배 증가됨을 확인함
- 작약 추출물 3주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 3.4, 3.8, 3.8, 5.2, 6.4, 6.6, 7.4, 7.6, 8.3 배 증가됨을 확인함

- 3주차에서는 ODM 분화가 CTL에 비해 증가 되었으며 작약 추출물 처리 시 저 농도에서는 ODM분화와 유사하게 분화가 진행 되었으며, 고농도로 처리할수록 조골세포 분화가 증가 되는 것을 확인함

한방소재 후보물질 - 소엽

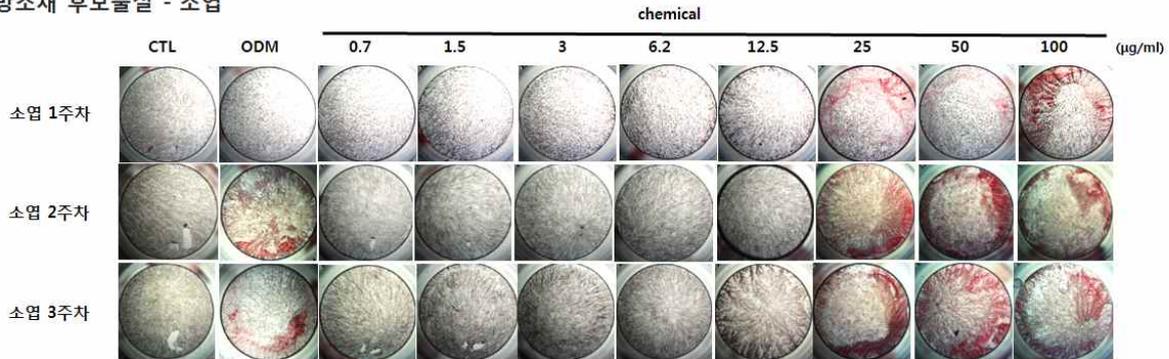


Fig. 21. MC3T3-E1 cell 한방소재 소엽추출물 처리 후 골광화작용 측정

- 협동 1팀에게 전달 받은 한방소재 물질 소엽을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 농도별로 3일에 한번씩 배지를 교체 해주면서 3주 동안 처리함. 그 결과 1, 2, 3 주차 때 저농도에서는 ODM 배지만 처리한 실험군과 비교하여 조골세포분화 양상을 관찰되지 않았으며, 오히려 조골세포 분화를 저해하는 것처럼 보였음. 결론적으로 소엽 한방물질은 조골세포로 분화하는데 큰 차이가 없음을 확인함

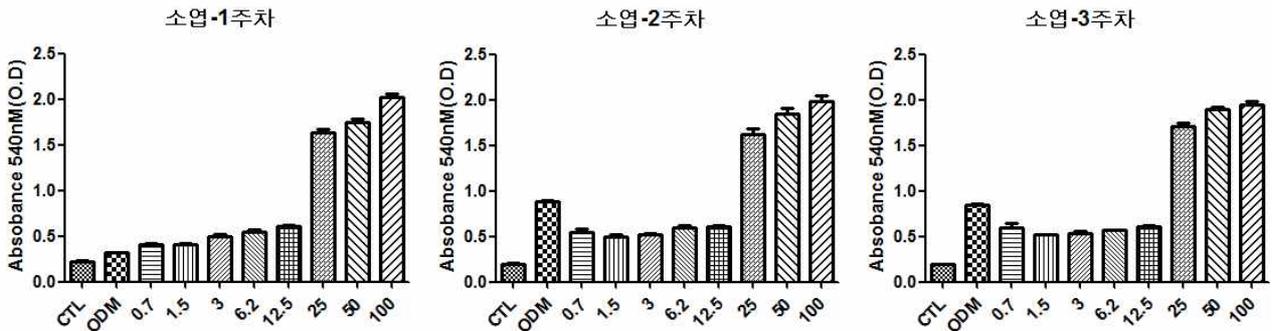


Fig. 22. MC3T3-E1 cell 한방소재 소엽추출물 처리 후 CPC 추출

- 한방소재 소엽을 1, 2, 3주 동안 처리하여 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride (CPC) 를 이용하여 수치화함
- 소엽 추출물 1주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 1.4, 1.6, 1.7, 2, 2.5, 2.5, 6.7, 7, 8.8 배 증가됨을 확인함
- 소엽 추출물 2주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4.3, 2.3, 2.1, 2.5, 2.7, 3, 7.2, 8.9, 9.1 배 증가됨을 확인함

- 소엽 추출물 3주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4.4, 2.7, 2.6, 2.6, 3, 3.1, 8.5, 10, 9.8 배 증가됨을 확인함
- 3주차에서는 ODM 분화가 CTL에 비해 증가 되었으며 소엽 추출물 처리 시 저 농도에서는 ODM 분화보다 조골세포 분화가 저해 양상이 보였으며, 고농도로 처리할수록 조골세포 분화가 증가 되는 것을 확인함

한방소재 후보물질 - 연자육

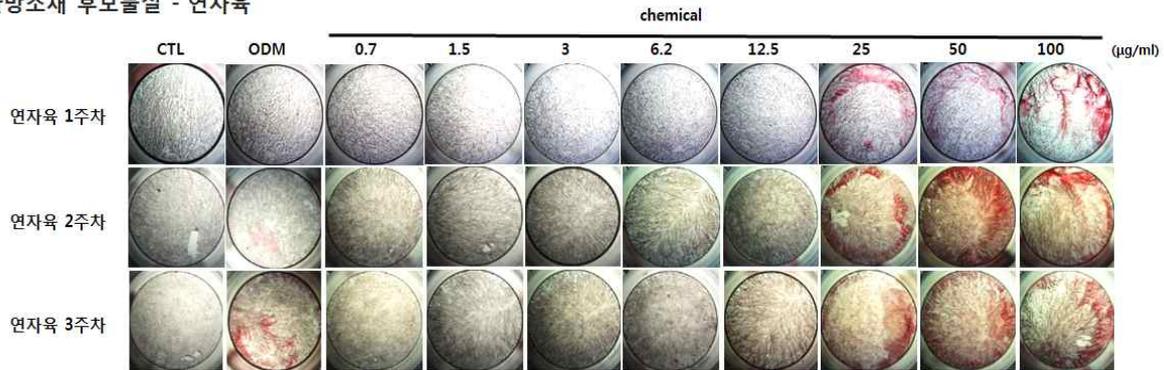


Fig. 23. MC3T3-E1 cell 한방소재 연자육추출물 처리 후 골광화 측정

- 협동 1팀에게 전달 받은 한방소재 물질 연자육을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 농도별로 3 일에 한번씩 배지를 교체 해주면서 3주 동안 처리함. 그 결과 1, 2, 3 주차 때 저농도에서는 ODM 배지만 처리한 실험군과 비교하여 조골세포분화 양상을 관찰되지 않았으며, 오히려 조골세포 분화를 저해하는 것처럼 보였음. 결론적으로 연자육 한방물질은 조골세포로 분화하는데 큰 차이가 없음을 확인하였음

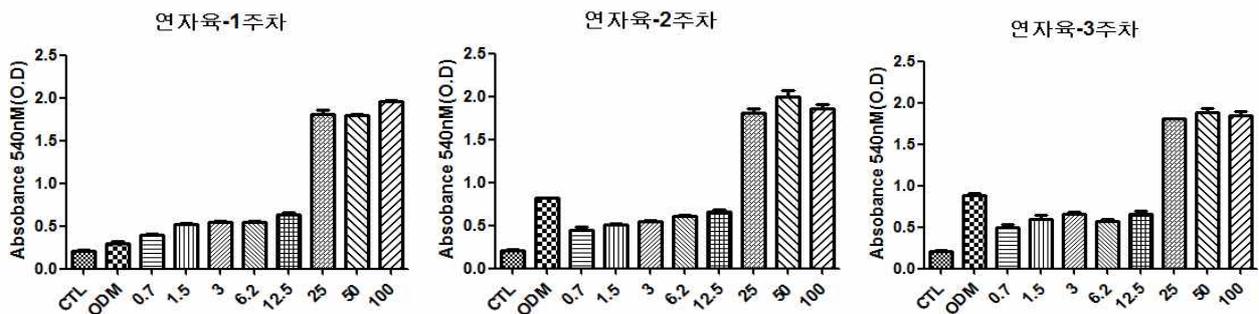


Fig. 24. MC3T3-E1 cell 한방소재 연자육추출물 처리 후 CPC 추출

- 한방소재 연자육을 1,2,3주 동안 처리하여 칼슘을 녹이는 Cetylpyridinium chloride (CPC) 를 이용하여 수치화함
- 연자육추출물 1주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 1.7, 2, 2.6, 2.7, 2.8 3.0, 9.4, 9.1, 9.8 배 증가됨을 확인함

- 연자육 추출물 2주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 3.7, 1.9, 2.2, 2.5, 2.8, 2.8, 7.8, 9.6, 8.8 배 증가됨을 확인함
- 연자육추출물 3주차에서는 CTL과 비교하여 각 농도별로 (0.7, 1.5, 3, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 ug/mL) 4.4, 2, 2.4, 3, 2.6, 3.2, 8.7, 9.5, 90 배 증가됨을 확인함
- 3주차에서는 ODM 분화가 CTL에 비해 증가 되었으며 연자육추출물 처리 시 저 농도에서는 ODM 분화보다 조골세포 분화가 저해 양상이 보였으며, 고농도로 처리할수록 조골세포 분화가 증가 되는 것을 확인함

■ 뼈파괴억제 유효지표물질발굴

- 뼈파괴억제 유효지표물질발굴을 위한 검증계 구축을 위해, RAW264.7 배양 및 파골세포 분화유도법 그리고 지표물질을 발굴함. 뼈파괴세포 분화억제제로 알려진 물질들을 확인하고자 함

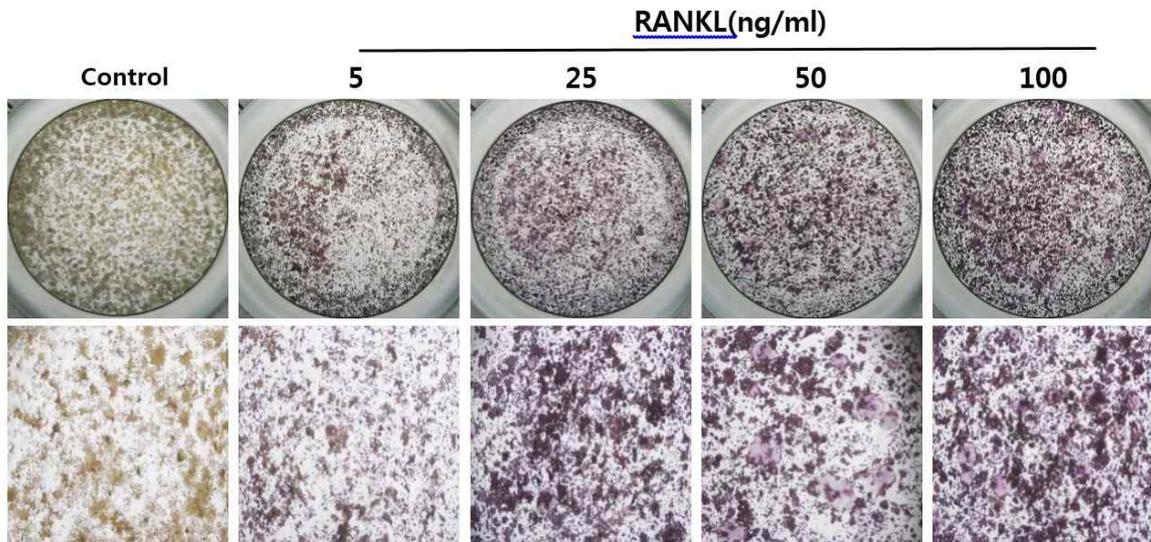


Fig. 25. RANKL stimulated TRAP Staining and formation of TRAP-positive multinucleated cells in RAW264.7 Cells

- RAW264.7 세포에 receptor activator of nuclear factor- κ b ligand (RANKL)을 농도를 비례하여 첨가하여, 농도에 비례하여 파골세포 분화가 유도되는지 알아보기 위해 5~100 ng/mL을 첨가하여 TRAP 염색법으로 둥근 모양의 파골세포(ROC) 개수와 TRAP 용액 분석법으로 TRAP 활성도를 측정함. TRAP 염색법을 한 결과, 저농도인 5ng/mL보다는 고농도로 갈수록 파골세포 분화가 더 유도되는 것을 확인하였으며 가장 고농도인 100ng/mL에서 가장 활발히 유도되는 것을 확인함

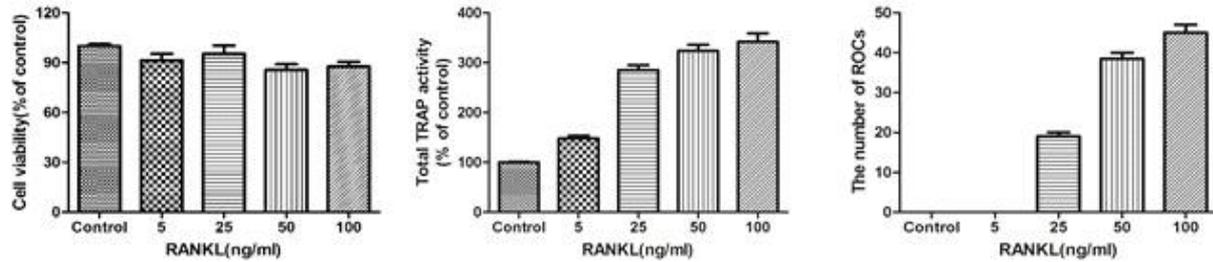


Fig. 26. RANKL dose-dependent induced total TRAP activity, and ROC formation in RAW264.7 Cells

- RANKL 농도별에 대한 세포 생존률을 알아보았음. 세포 생존률은 대조군과 비교하였을 때, RANKL을 농도별로 친 그룹과 비슷하였음. TRAP 활성도 측정에서, 대조군의 활성도를 100%로 잡았을 때 RANKL(5 ng/mL)의 활성도는 150%, RANKL(25 ng/mL)이 300%, RANKL(50 ng/mL)이 350%, 그리고 RANKL(100 ng/mL)에서 370%로 농도별에 비례하여 TRAP 활성도가 증가하였음
- TRAP 염색 후, 둥근모양의 파골세포 수(ROC)를 계수하였음. 대조군과 RANKL(5 ng/mL)에서는 ROC가 발견되지 않았음. RANKL(25 ng/mL)에서는 well당 약 20개의 ROC가 발견되었음. RANKL(50 ng/mL)에서는 평균 40개의 ROC가 발견되었음. 마지막 RANKL(100 ng/mL)에서는 평균 약 47개의 ROC가 발견되었음
- TRAP 염색법, TRAP 용액 활성도, 그리고 둥근 파골세포 모양의 분석으로 RANKL 농도에 비례하여 파골세포 분화가 증가하는 것을 앞에서 확인하였기 때문에, 파골세포 분화 마커 중 하나인 NFATc1을 RT-PCR과 q-PCR으로 증명하였음. RANKL(5~100ng/mL) 농도 순으로 첨가하였음
- RT-PCR 수행한 결과 대조군 보다 RANKL을 첨가한 그룹에서 NFATc1의 발현이 증가한 것을 확인하였는데 농도에 비례하여 증가되었음. 또한, q-PCR에서도 마찬가지로 RANKL 농도에 비례하여 NFATc1의 발현이 증가하였음. 대조군의 NFATc1 발현 폴드 체인지를 1로 잡았을 때, RANKL(5ng/mL)에서 약 2.5, RANKL(25ng/mL)에서 약 3.8, RANKL(50ng/mL)에서 약 4배 발현이 되었고, 마지막 농도인 RANKL(100ng/mL)에서는 약 5배 발현되었음

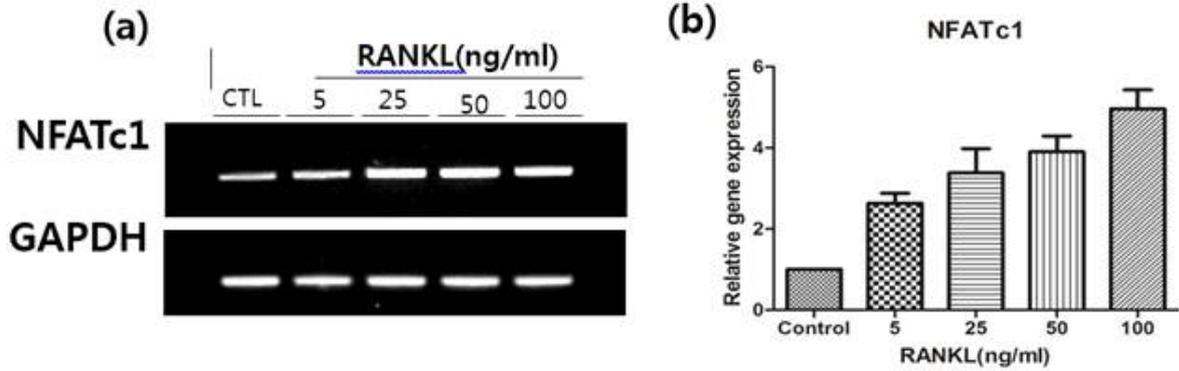


Fig. 27. RANKL induced NFATc1 gene expression levels during osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells

- 타크로리무스(Tacrolimus,FK506)가 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW264.7 세포에 RANKL(50 ng/mL)과 타크로리무스를 농도별로 첨가하여 TRAP 염색법으로 둥근 모양의 파골세포(ROC) 개수와 TRAP 용액 분석법으로 TRAP 활성도를 측정하였음. 타크로리무스의 사용한 농도는 0.01 nM~20 uM임
- 타크로리무스가 세포생존률에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 다음으로 MTT 분석법을 하였음(Fig. 13a). 타크로리무스(0.01 nM ~10uM)에서는 대조군과 비교하였을 때 100% 내외로 세포 생존률에 영향이 없으나, 가장 고농도의 20 uM에서의 세포 생존률은 약 60%임
- TRAP 활성도를 알아보았음. RANKL(50 ng/mL)을 처리한 well의 TRAP 활성도 값을 100%로 환산하였음. 타크로리무스(0.1 nM~10 uM)의 TRAP 활성도는 RANKL과 비슷한 100%내외이고, 가장 고농도인 20 uM에서의 TRAP 활성도는 10%임
- 마지막으로 둥근 모양의 파골세포(ROC)를 측정하였음. RANKL(50 ng/mL)을 처리한 well의 ROC 개수를 100%로 환산하였음. 타크로리무스(0.01 nM)의 ROC %는 약 90%, 0.1 nM 은 약 63%임. 타크로리무스(1 nM)에서는 ROC %는 약 5%이고 타크로리무스 10 nM부터는 ROC가 형성되지 않은 0%임

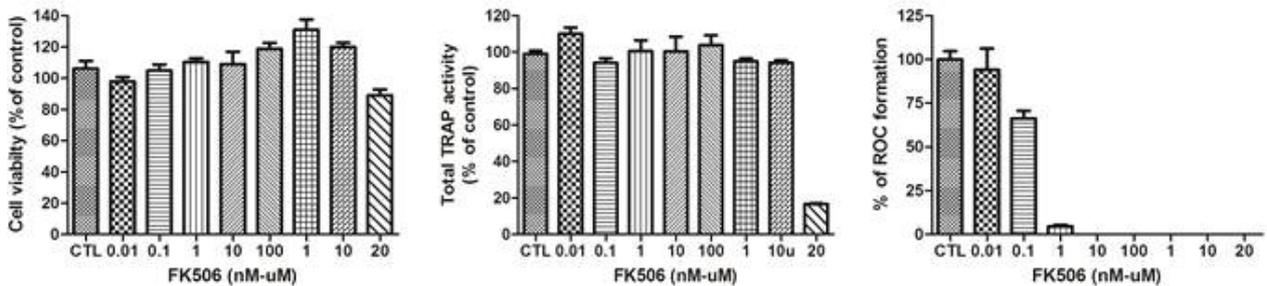


Fig. 28. FK506 inhibited total TRAP activity, and ROC formation in RAW264.7 Cells

- 타크로리무스로 인한 NFATc1의 유전자 발현 ; TRAP 염색법, TRAP 용액 활성화도, 그리고 등근 파골세포 모양의 분석으로 타크로리무스에 의하여 파골세포 분화가 억제되는 것을 앞에서 확인하였기 때문에, 파골세포 분화 마커 중 하나인 NFATc1을 RT-PCR과 q-PCR으로 증명하였음

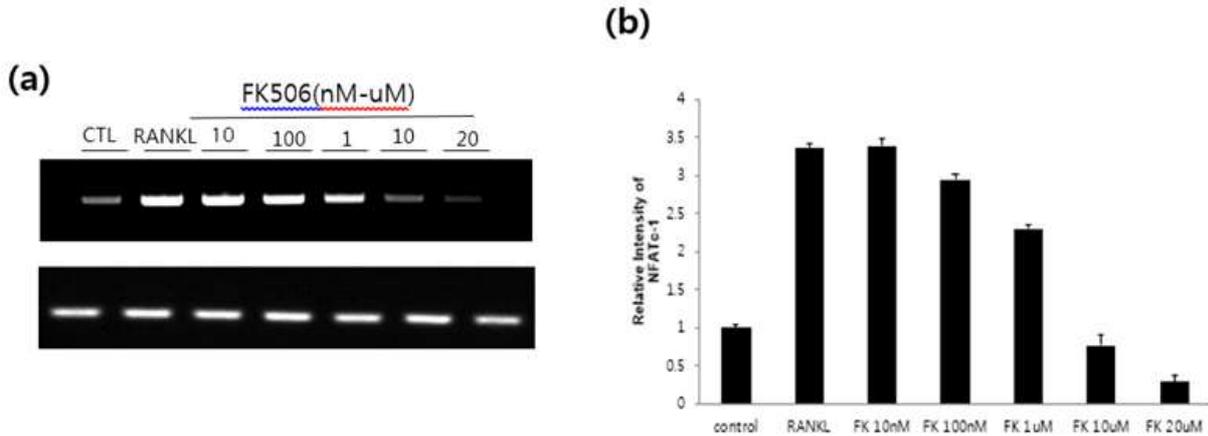


Fig. 29. FK506 inhibits NFATc-1 expression

- RANKL(50 ng/mL)과 타크로리무스(10 nM~20 uM) 농도 순으로 첨가하였음. RT-PCR 결과 RANKL을 첨가한 그룹보다 타크로리무스를 첨가한 그룹에서 농도에 비례하여 NFATc1의 발현이 감소한 것을 확인하였음. 또한, q-PCR에서도 마찬가지로 타크로리무스 농도에 비례하여 NFATc1의 발현이 감소하였음
- 아무것도 처리하지 않은 대조군의 NFATc1 유전자 발현 폴드 체인지 값을 1로 하였을 때, RANKL의 폴드 체인지 값은 약 3.8임. 타크로리무스 100 nM 은 약 3이며, 고농도인 10 uM의 폴드 체인지 값은 약 1.3임을 확인하였음

■ 뼈 파괴 억제 유효소재발굴

- 단핵구/대식세포의 일종인 RAW264.7 세포에서 receptor activator of nuclear factor-kb ligand(RANKL)을 첨가하여 파골세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였음
- RANKL은 면역계에서의 효과와 뼈 재생과 리모델링에 관여하는 것으로 알려져 있는데 근육, 흉선, 간, 소장, 대장을 포함한 여러 조직과 장기에서 분비됨. 체내, 성장 및 면역기능에 중요한 역할을 하며 특히 뼈 성장에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 본 실험에서는 양성대조군으로 RANKL 100 ng/mL 을 사용하였음
- 천연물기원 소재
 - 협동1과정팀에서 전달 받은 천연물 땅콩새싹 EtOH추출물, 땅콩새싹 EA추출물, 땅콩새싹 EA층 compound 1, 땅콩새싹 EA층 compound 2, 땅콩새싹 EA층 compound 3을 실험에 사용함

○ 세포 생존율 확인

- 협동 1과정팀에서 전달 받은 천연물 땅콩새싹 추출물 (5 분획물)을 RAW 264.7 세포에 처리한 후 세포독성이 있는지 확인하기 위해 MTT assay 확인함

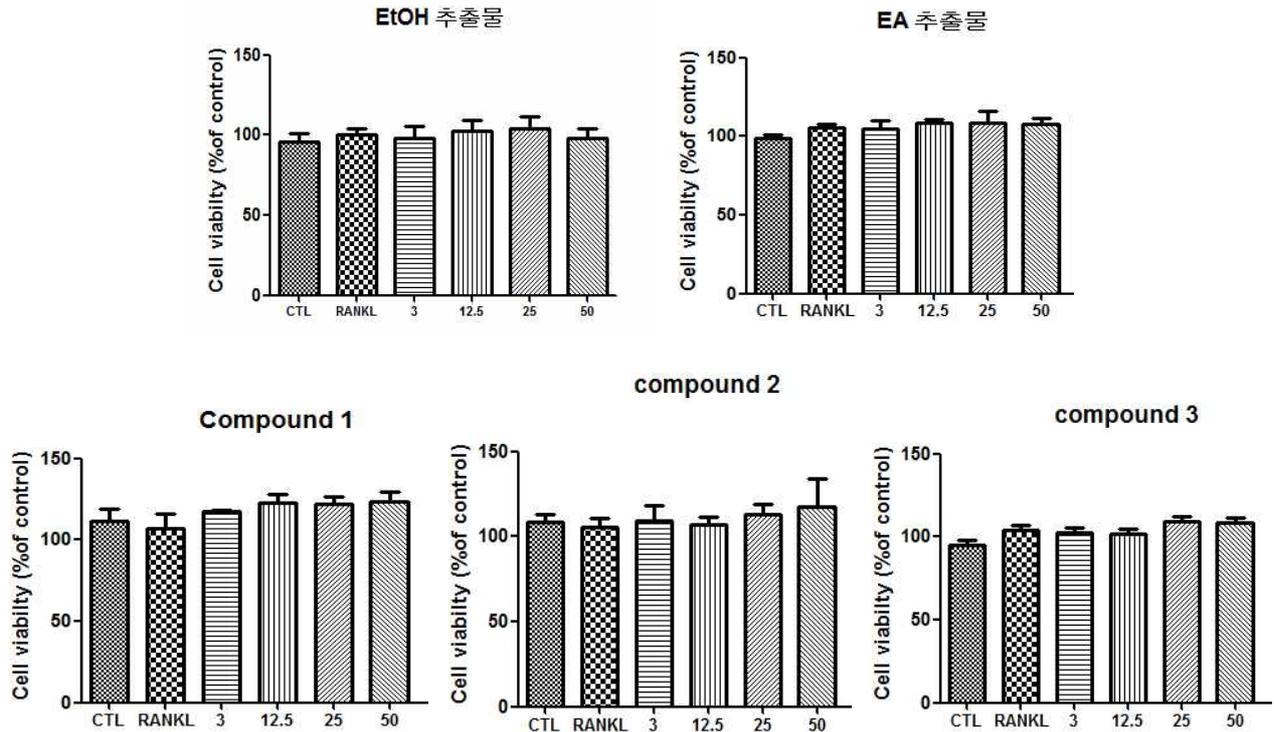


Fig. 30. RAW 264.7 cell에 땅콩새싹 추출물 처리 한 후 세포독성측정

- 협동 1에서 전달받은 땅콩새싹 추출물들을 Raw 264.7 cell에 처리하여 세포독성이 있는지 먼저 확인하였음. 그 결과 모든 추출물에서 세포독성은 없는 것으로 확인되었음

○ TRAP 염색법

- 천연물 땅콩새싹 추출물을 처리한 뒤, 농도에 따른 골분화능력을 측정하기 위하여 TRAP 염색법을 수행하였음. TRAP에 염색된 세포를 광학 현미경으로 관찰하여 둥근모양의 파골세포 분화를 확인하였음

○ TRAP 활성도 측정

- 파골세포 분화가 증가되면 TRAP이라는 효소가 증가하게 됨. 천연물 땅콩새싹 추출물들을 처리한 뒤 골분화능력을 TRAP 효소의 활성도로 확인하였음

땅콩새싹 천연물 EtOH 추출물

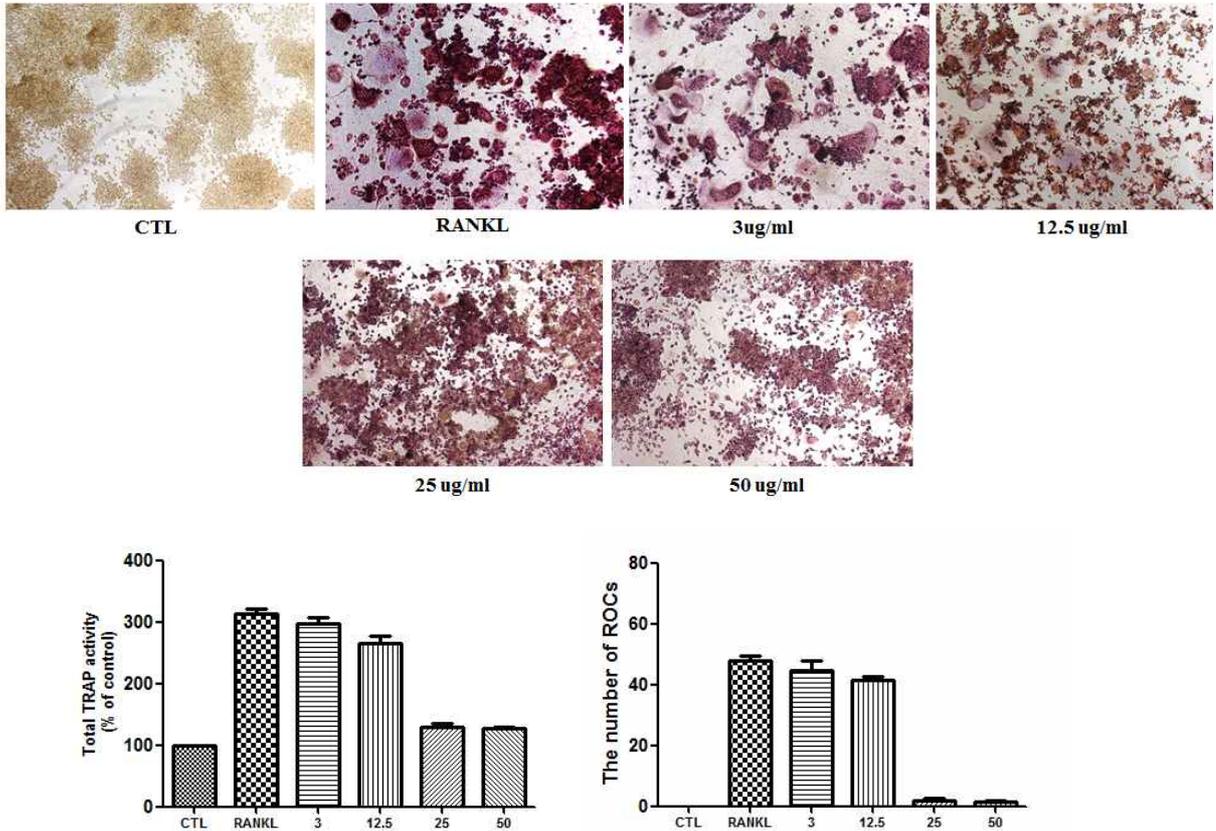


Fig. 31. RAW 264.7 cell에 땅콩새싹 EtOH 추출물 처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성화도 측정

- 협동 1에서 전달받은 땅콩새싹 EtOH 추출물을 이용하여 RAW 264.7 cell에 각 농도 별로 처리 하여 둥근모양의 파골세포 수 (ROC)를 확인하였음
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리 하였을 시 둥근모양의 파골세포 모양 이 확인되었음. 협동 1에서 받은 땅콩새싹 EtOH 추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리 하였음. 그 결과 25 ug/mL에서부터 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인하였으며 12.5 ug/mL 이하에서는 분화억제효과가 없었음. ROC의 수를 세어본 결과 현저히 25ug/mL에서 둥근모양 파골세포 수가 감소되는 것을 확인함
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으 며, 땅콩새싹 EtOH 추출물 처리시 25 ug/mL에서부터 TRAP 활성이 낮아지는 것을 확인함

땅콩새싹 천연물 EA 추출물

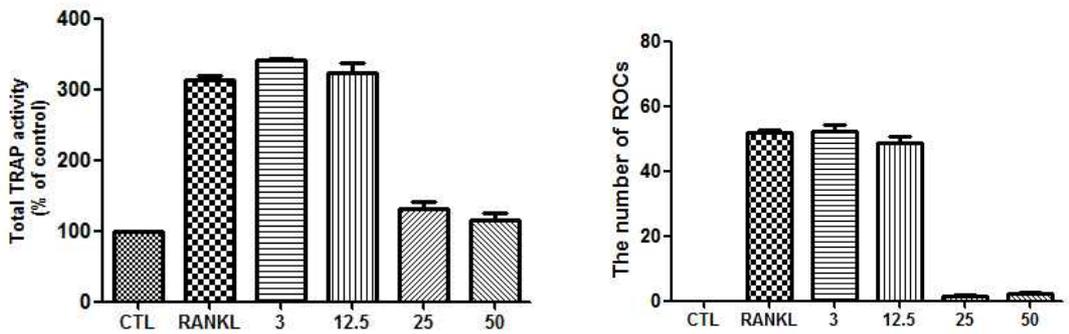
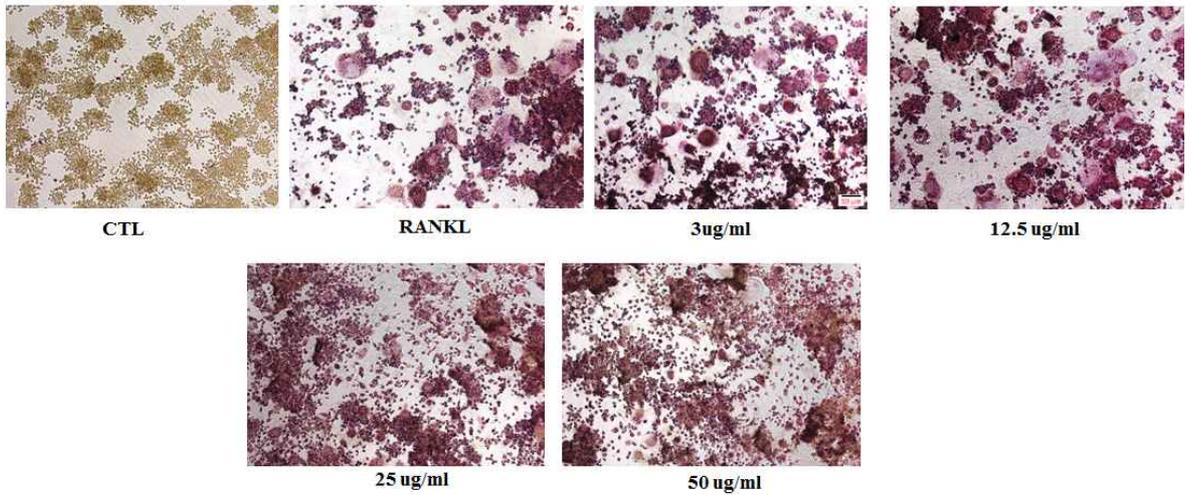


Fig. 32. RAW 264.7 cell에 땅콩새싹 EA추출물 처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성도 측정

- 협동 1에서 전달받은 땅콩새싹 EA추출물을 이용하여 RAW 264.7 cell에 각 농도 별로 처리 하여 둥근모양의 파골세포 수 (ROC)를 확인함
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100ng/mL)을 처리하였을 시 둥근모양의 파골세포 모양이 확인됨. 협동 1에서 받은 땅콩새싹 EA 추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리함. 그 결과 25 ug/mL에서부터 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인하였으며, 12.5 ug/mL 이하에서는 파골세포분화 억제 효과가 없었음. ROC의 수를 세어본 결과 현저히 25 ug/mL에서 둥근모양 파골세포 수가 감소되는 것을 확인함
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 땅콩새싹 EA추출물 처리 시 25ug/mL에서부터 TRAP 활성이 낮아지는 것을 확인함

땅콩새싹 EA 분획층 compound 1

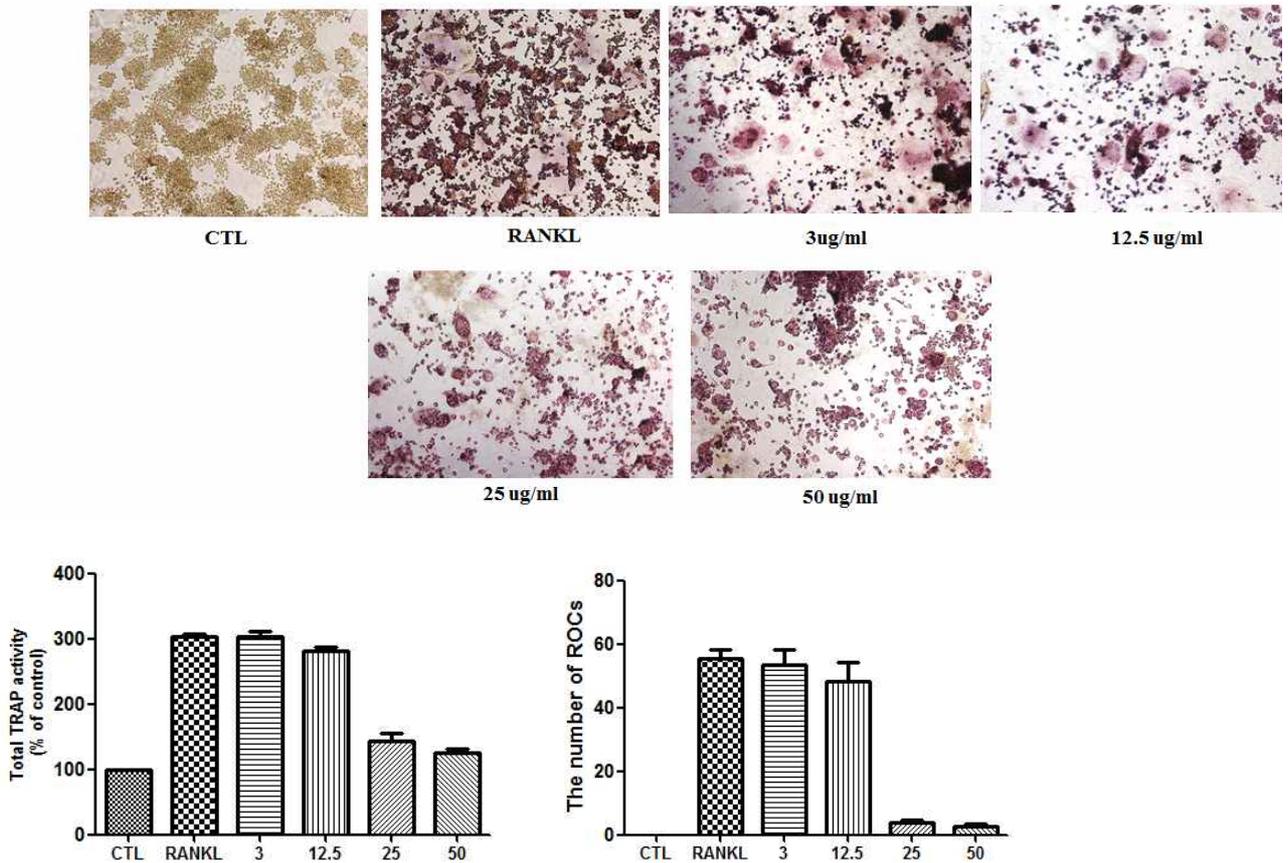


Fig. 33. RAW 264.7 cell에 땅콩새싹 EA 분획층 Compound 1처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성도 측정

- 협동 1에서 전달받은 땅콩새싹 EA 분획층 compound 1 추출물을 RAW 264.7 cell에 각 농도별로 처리하여 둥근모양의 파골세포수(ROC)를 확인함
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리하였을 시 둥근모양의 파골세포 모양이 확인됨. 협동 1에서 받은 땅콩새싹 EA 분획층 중 compound 1 추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리한 결과 25 ug/mL에서부터 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인하였으며, 12.5 ug/mL 이하 농도에서는 파골세포분화 억제 효과가 없었음. ROC의 수를 세어본 결과 현저히 25 ug/mL에서 둥근모양 파골세포 수가 감소되는 것을 확인함
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 땅콩새싹 EA분획층 compound 1 처리 시 25ug/mL에서부터 TRAP 활성이 낮아지는 것을 확인함

땅콩새싹 EA 분획층 compound 2

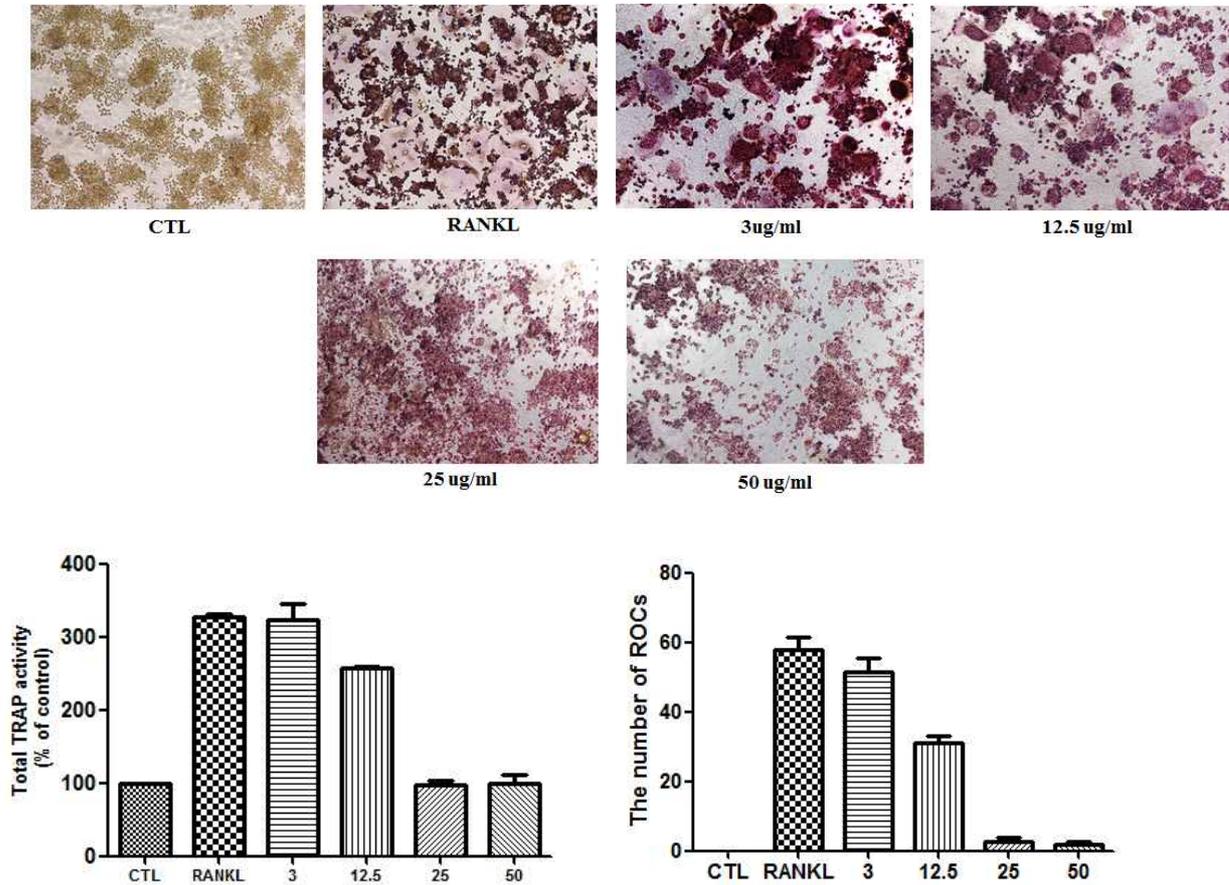


Fig. 34. RAW 264.7 cell에 땅콩새싹 EA 분획층 Compound 2처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성화도 측정

- 협동 1에서 전달받은 땅콩새싹 EA 분획층 compound 2 추출물을 RAW 264.7 cell에 각 농도별로 처리하여 둥근모양의 파골세포 수(ROC)를 확인함
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리 하였을 시 둥근모양의 파골세포 모양이 확인됨. 협동 1에서 받은 땅콩새싹 EA 분획층 중 compound 2 추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리한 결과 25 ug/mL에서부터 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인 하였으며, 12.5 ug/mL 이하에서는 파골세포분화 억제 효과가 없었음. ROC의 수를 세어본 결과 현저히 25 ug/mL에서 둥근모양 파골세포 수가 감소되는 것을 확인함
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 땅콩새싹 EA분획층 compound 2 처리 시 25 ug/mL에서부터 TRAP 활성이 낮아지는 것을 확인함

땅콩새싹 EA 분획층 compound 3

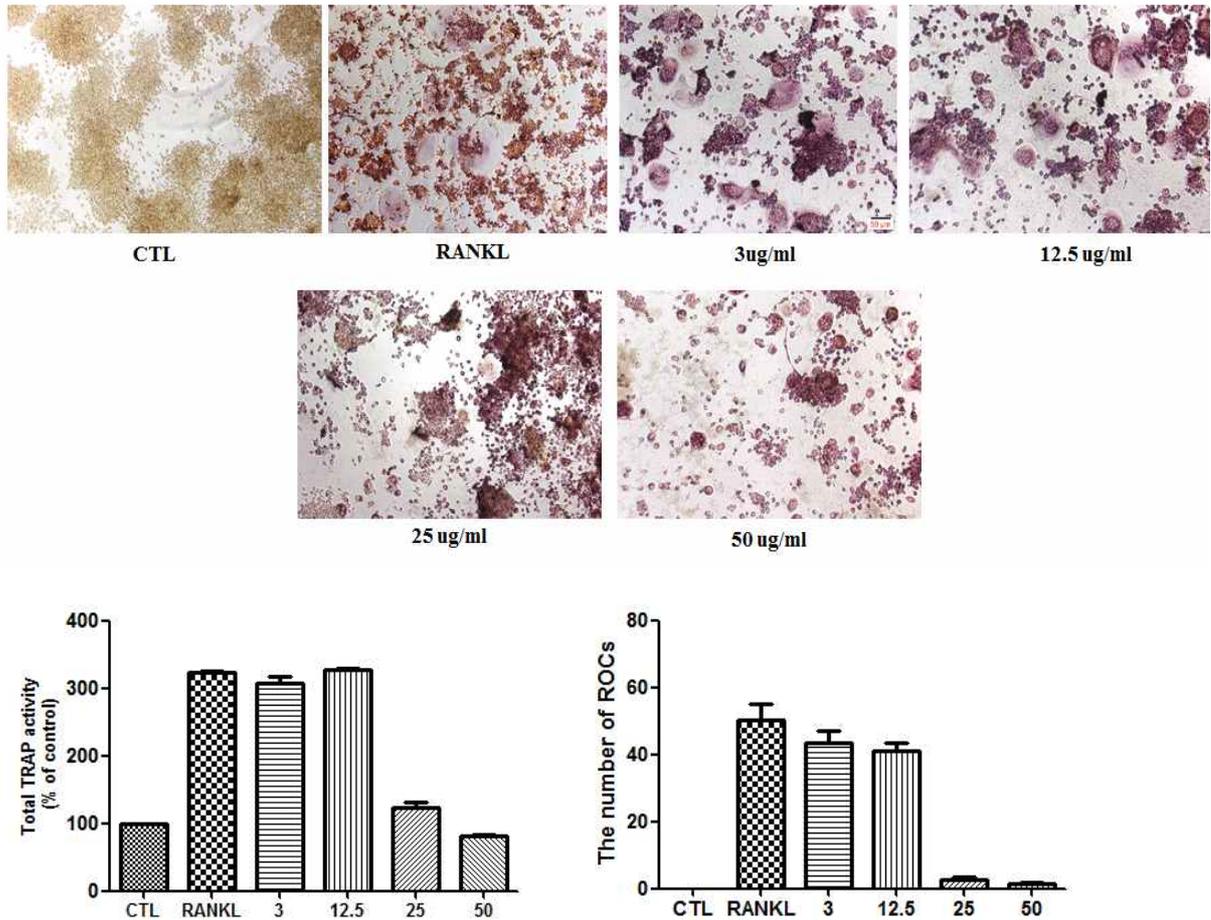


Fig. 35. RAW 264.7 cell에 땅콩새싹 EA 분획층 Compound 3처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성도 측정

- 협동 1에서 전달받은 땅콩새싹 EA 분획층 compound 3 추출물을 RAW 264.7 cell에 각 농도별로 처리하여 둥근모양의 파골세포수(ROC)를 확인함
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리 하였을 시 둥근모양의 파골세포 모양이 확인됨. 협동 1에서 받은 땅콩새싹 EA 분획층 중 compound 3 추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리한 결과 25 ug/mL에서부터 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인하였으며, 12.5 ug/mL 이하에서는 파골세포분화 억제 효과가 없었음. ROC의 수를 세어본 결과 현저히 25 ug/mL에서 둥근모양 파골세포 수가 감소되는 것을 확인함
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 땅콩새싹 EA분획층 compound 3처리 시 25 ug/mL에서부터 TRAP 활성이 낮아지는 것을 확인하였음

○ 한방물질 기원 소재

- 협동 1에서 전달받은 작약추출물, 소엽추출물, 연자육추출물을 실험에 사용함

○ 세포 생존율확인

- 협동 1에서 전달받은 한방소재 작약, 소엽, 연자육을 RAW 264.7 세포에 처리한 후 세포독성이 있는지 확인하기 위해 MTT assay 확인

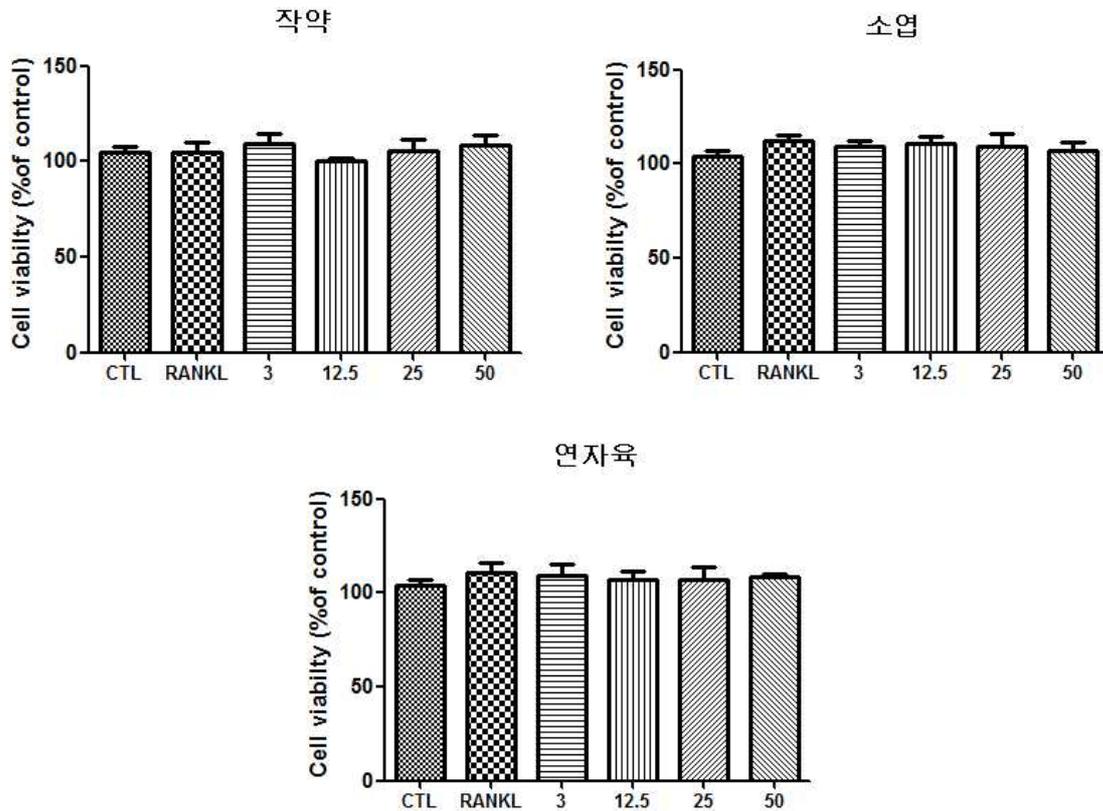


Fig. 36. RAW 264.7 cell에 한방소재 물질(3종) 처리 한 후 세포독성측정

- 협동 1에서 전달받은 한방소재 추출물들을 Raw 264.7 cell에 처리하여 세포독성이 있는지 먼저 확인함. 그 결과 모든 작약, 소엽, 연자육추출물들에서 세포독성은 없는 것으로 확인됨

○ TRAP 염색법

- 한방물질 3종을 처리한 뒤, 농도에 따른 골분화능력을 측정하기 위하여 TRAP 염색법을 수행하였음. TRAP에 염색된 세포를 광학 현미경으로 관찰하여 둥근모양의 파골세포 분화를 확인함

○ TRAP 활성화 측정

- 파골세포 분화가 증가되면 TRAP이라는 효소가 증가하게 됨. 한방소재 추출물인 작약, 소엽, 연자육을 처리한 뒤 골분화능력을 TRAP 효소의 활성화도로 확인하였음

한방소재 작약 추출물

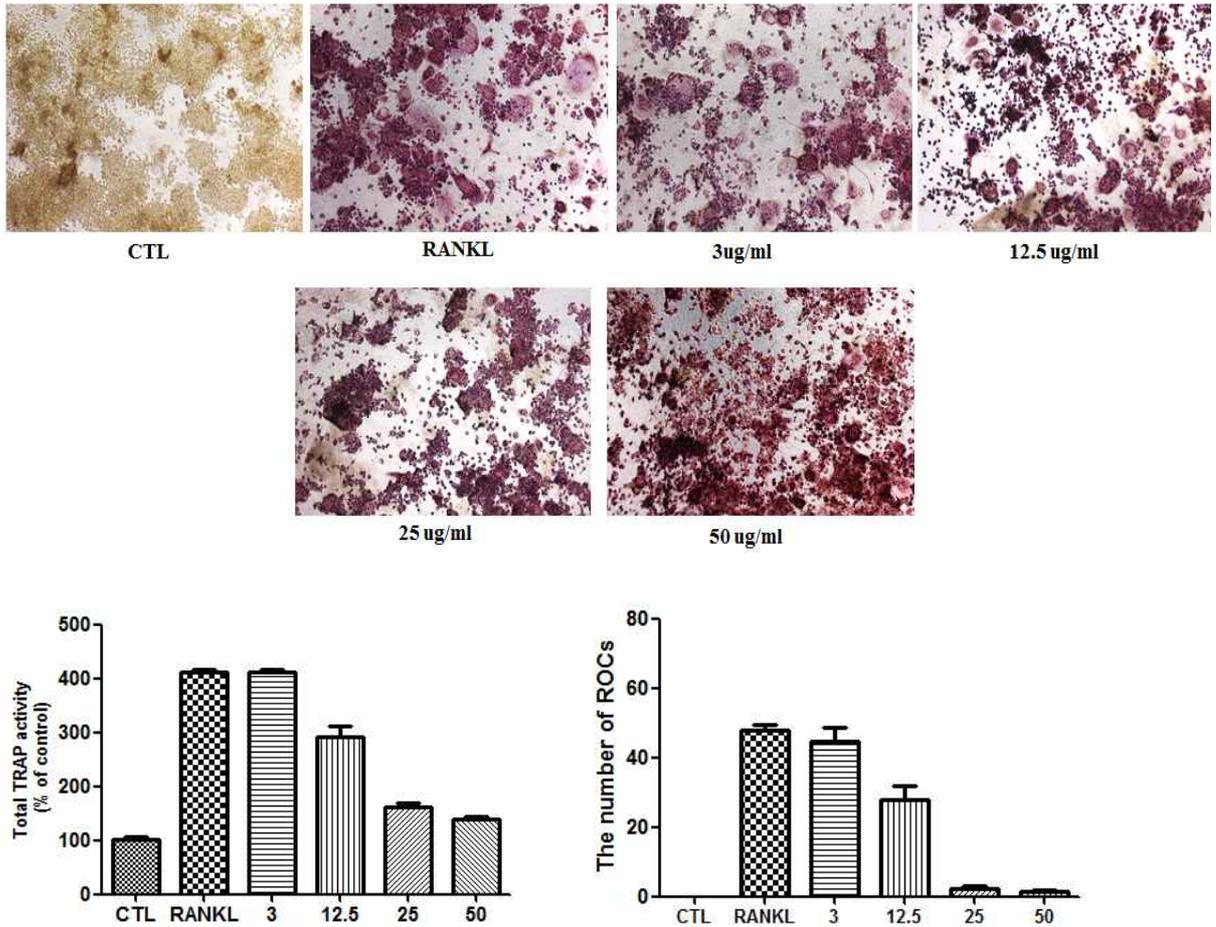


Fig. 37. RAW 264.7 cell에 한방소재 작약추출물 처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성도 측정

- 협동 1에서 전달받은 한방소재 작약추출물을 RAW 264.7 cell에 각 농도별로 처리하여 등근모양의 파골세포수(ROC)를 확인하였음
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리하였을 시 등근모양의 파골세포 모양이 확인되었음. 작약추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리한 결과 25 ug/mL에서부터 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인하였으며, 12.5 ug/mL 이하에서는 파골세포분화 억제 효과가 없었음
- ROC의 수를 세어본 결과 현저히 25ug/mL에서 등근모양 파골세포 수가 감소되는 것을 확인함
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 한방소재 작약 추출물 처리 시 25ug/mL에서부터 TRAP 활성이 낮아지는 것을 확인하였음

한방소재 소엽 추출물

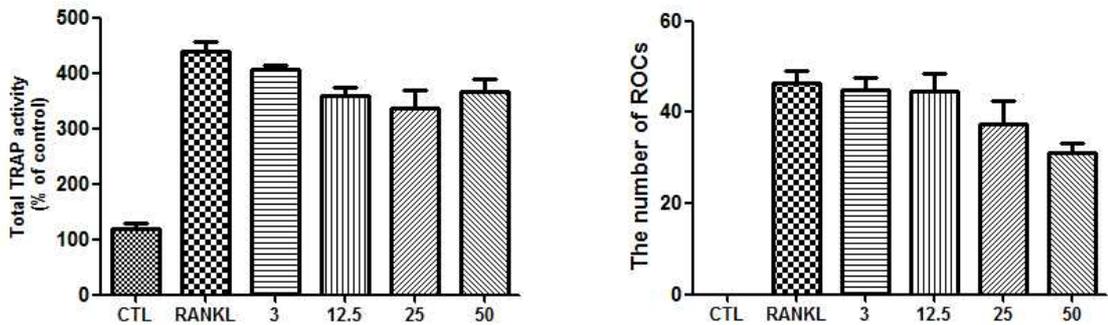
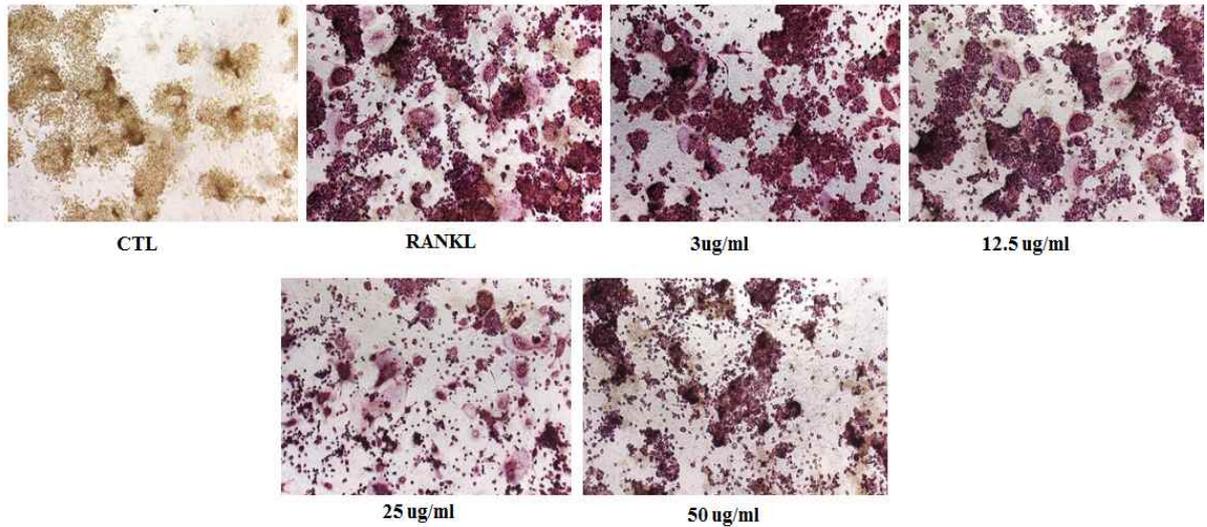


Fig. 38. RAW 264.7 cell에 한방소재 소엽추출물 처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성화 측정

- 협동 1에서 전달받은 한방소재 소엽추출물을 RAW 264.7 cell에 각 농도별로 처리하여 등근모양의 파골세포수(ROC)를 확인하였음
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리하였을 시 등근모양의 파골세포 모양이 확인되었음. 소엽추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리한 결과 모든 농도에서 파골세포 분화억제가 나타나지 않았음. 소엽추출물은 파골세포 분화억제에 큰 효과가 없는 것으로 사료됨
- ROC의 수를 세어본 결과 RANKL 처리한 대조군과 소엽추출물을 처리한 실험군하고 큰 차이가 없음을 확인하였음
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 한방소재 소엽 추출물 처리 시 모든 농도에서 TRAP활성이 없는 것으로 확인되었음

한방소재 연자육 추출물

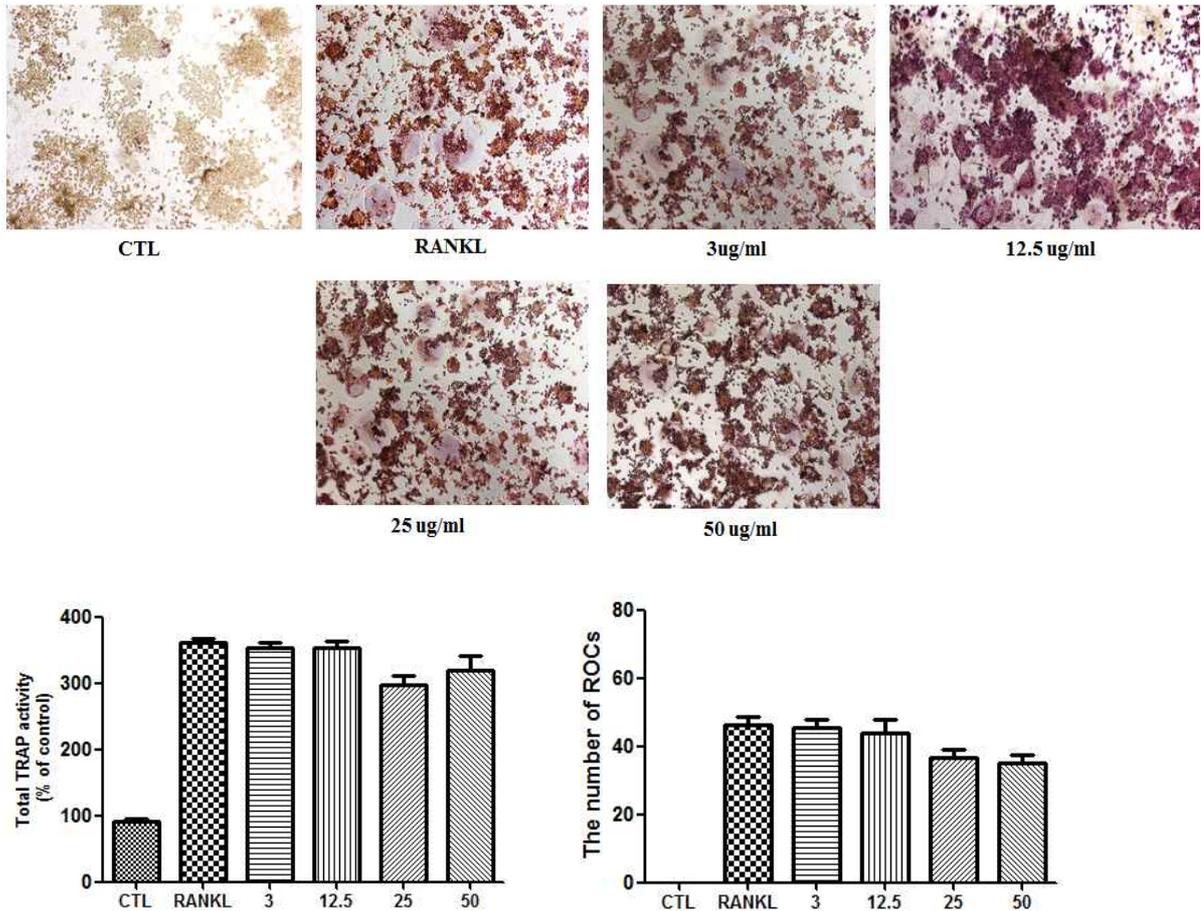


Fig. 39. RAW 264.7 cell에 한방소재 연자육추출물 처리 한 후 ROC 염색 및 TRAP 활성도 측정

- 협동 1에서 전달받은 한방소재 연자육추출물을 RAW 264.7 cell에 각 농도별로 처리하여 둥근모양의 파골세포수(ROC)를 확인하였음
- 그림에서 보는 것과 같이 RANKL(100 ng/mL)을 처리하였을 시 둥근모양의 파골세포 모양이 확인되었음. 연자육추출물을 3, 12.5, 25, 50 ug/mL로 처리한 결과 모든 농도에서 파골세포 분화 억제 효과가 나타나지 않았음. 연자육추출물은 파골세포 분화억제에 큰 효과가 없는 것으로 사료됨
- ROC의 수를 세어본 결과 RANKL 처리한 대조군과 연자육추출물을 처리한 실험군하고 큰 차이가 없음을 확인하였음
- TRAP activity를 확인한 결과 CTL에 비해 RANKL만 처리한 군에서 활성이 높게 나타났으며, 한방소재 연자육추출물 처리 시 모든 농도에서 TRAP활성이 없는 것으로 확인되었음

■ 복합소재, 신제품 유효성검증

○ 유효성검증을 위해 방선균에서 추출한 tacrolimus 농도별로 첨가하여 뼈건강 의약품으로 각광받고 있는 alendronate(ADN)와 예방효과가 잘 알려진 발효 타크로리무스를 활용하여 천연물질 소재의 골다공증 예방, 관리 유효성 증명을 위한 지표물질로 사용하여 동물실험을 진행하였음

- 난소절제술 후 12주간 사육한 뒤 각 그룹간의 몸무게의 변화를 비교 관찰하였음. 몸무게는 매주 약물을 투여하기 전에 측정하였음. 1주차 투여 직전 난소절제수술을 시행한 실험군의 몸무게는 361.8 ± 31 g이었고, 위수술군의 몸무게는 307.7 ± 13.5 g이었고, 투여 시작 후 1주일간은 난소절제술군과 위수술군 관계없이 전체적으로 몸무게가 4% 감소하였으나 1주 이후 몸무게가 점진적으로 1~2% 증가되었음. 1주차를 제외하고 모든 실험동물에서 급격한 몸무게의 변화는 관찰되지 않았음

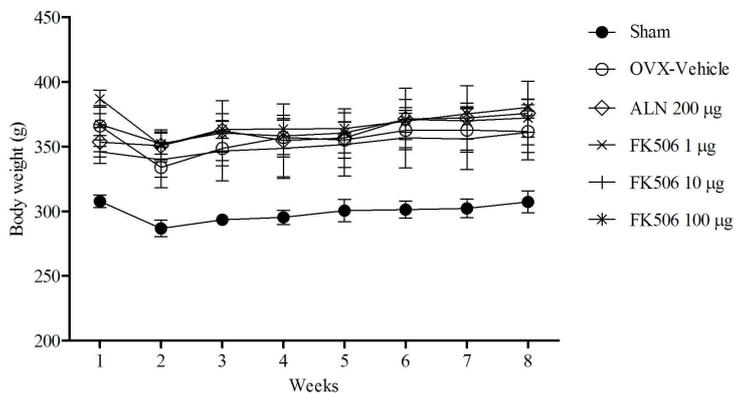


Fig. 40. Time course of body weight

- Alendronate(ADN)와 타크로리무스 투여를 마친 실험동물을 희생시킨 후 간과 신장을 분리하여 무게를 비교하였음. 간의 무게는 평균 6.7 ± 0.6 g으로 모든 실험군에서 통계학적 유의성이 없음 ($p > 0.05$). 신장은 807.9 ± 56.8 mg이었고, 모든 실험군 사이에서 유의성은 없었음 ($p > 0.05$)

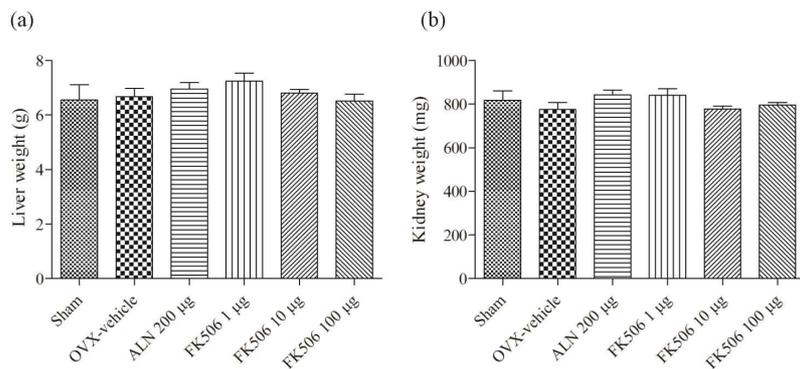


Fig. 41. Organs weight of experiment groups

- 무게 측정된 장기들은 5% PFA에 고정한 뒤 파라핀 포매 한 뒤 조직슬라이드를 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 수행하였음. 모든 그룹들의 간에서 염증반응이나 간조직의 파괴는 발견되지 않았으며 신장의 사구체 파괴는 일어나지 않았음

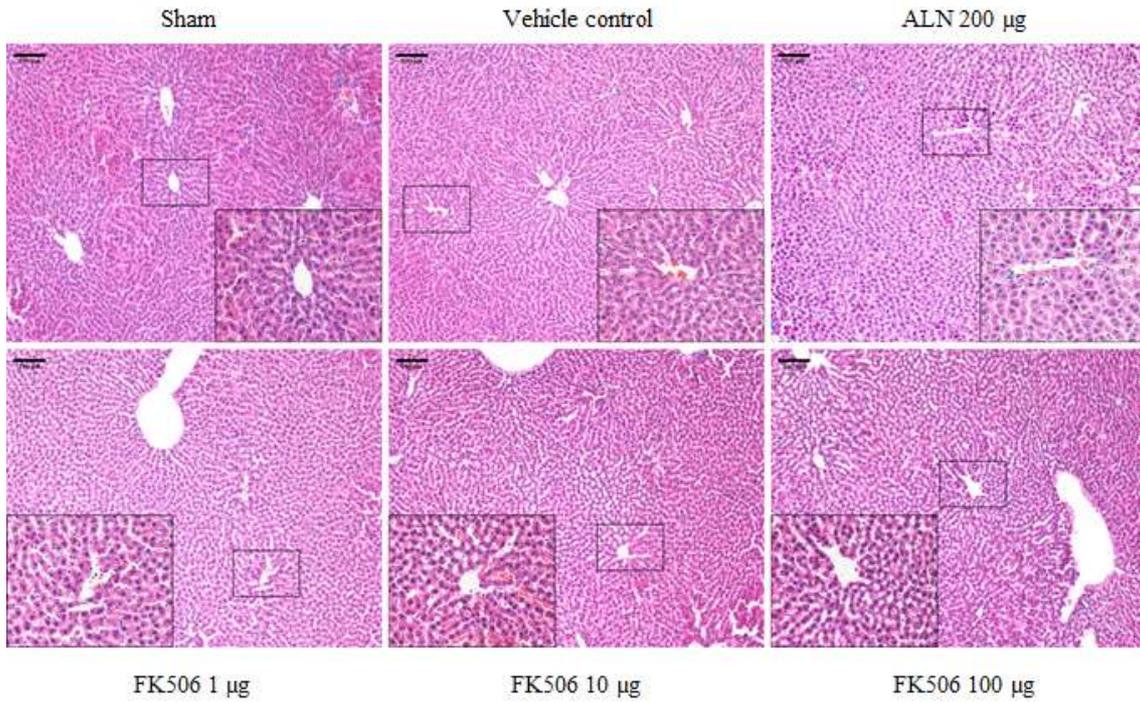


Fig. 42. Histological observation of rats Liver

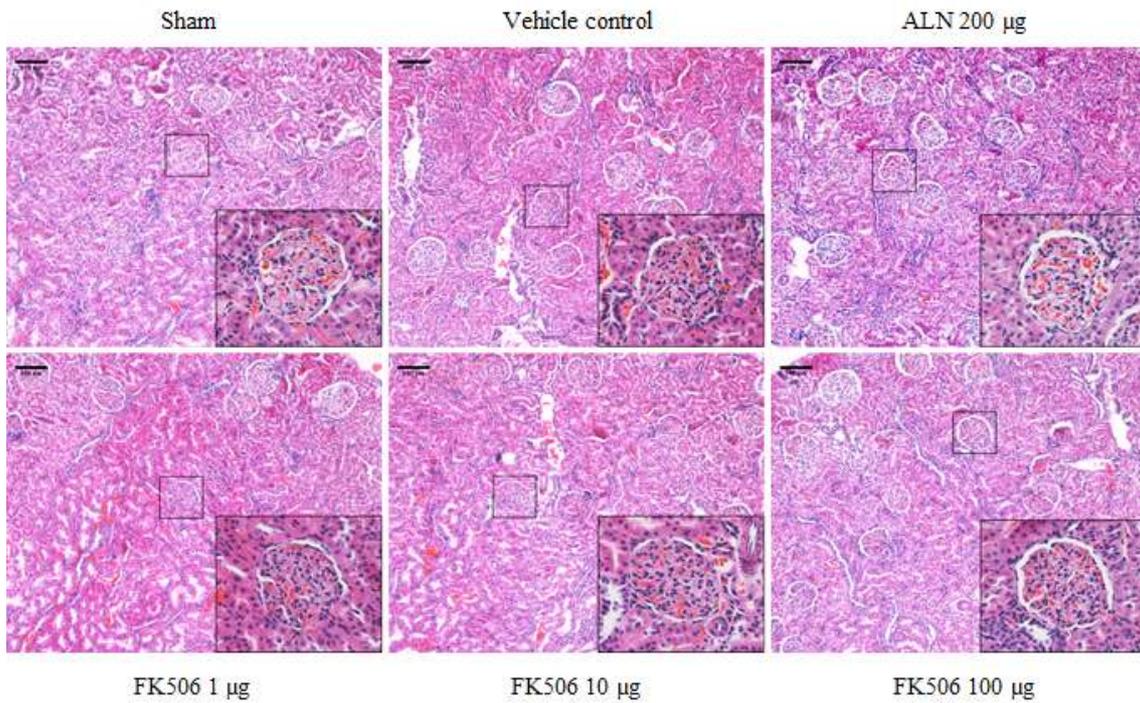


Fig. 43. Histological observation of rats kidney

- 난소절제수술 후 2주후(초기모델), 4 주후(중기모델), 12주후(말기모델)에 골다공증 치료용 혹은 예방용 물질 섭취후 효과를 분석하였음. 각 동물모델을 희생시킨 뒤 대퇴골을 분리하여 5% PFA 고정 후 Skyscan 1176 을 이용하여 미세전산 단층 촬영 및 분석을 실시하였음. 골다공증 치료제인 alendronate는 골다공증 유발 후 초기 중기 후기 모델 모두에서 효과를 나타내었음. 예방효과가 있다고 알려진 타크로리무스는 초기 중기모델에서는 대조양물인 alendronate와 비슷한 효과를 나타내었지만 말기모델에서는 효과가 매우 적게 관찰되었음

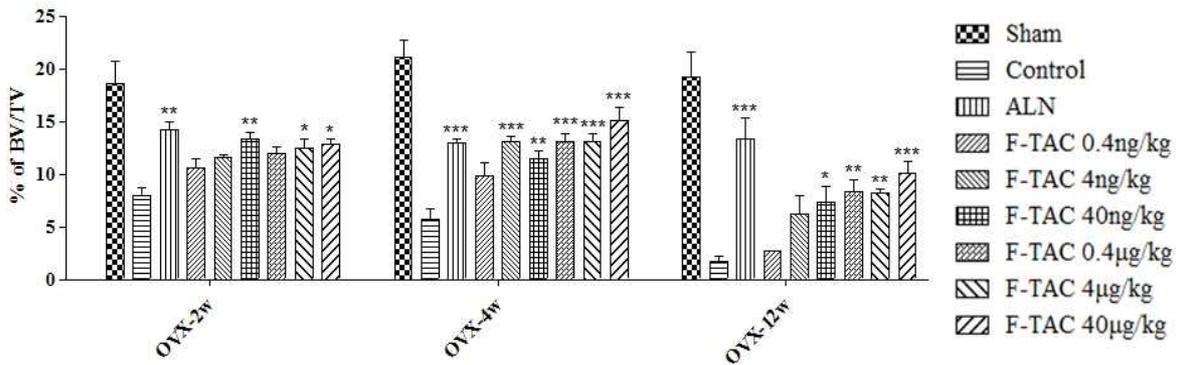


Fig. 44. Result of micro CT analysis(BV/TV)

- 이러한 현상은 마이크로CT결과를 기초로 한 3D 결과에서도 동일하게 관찰되었음

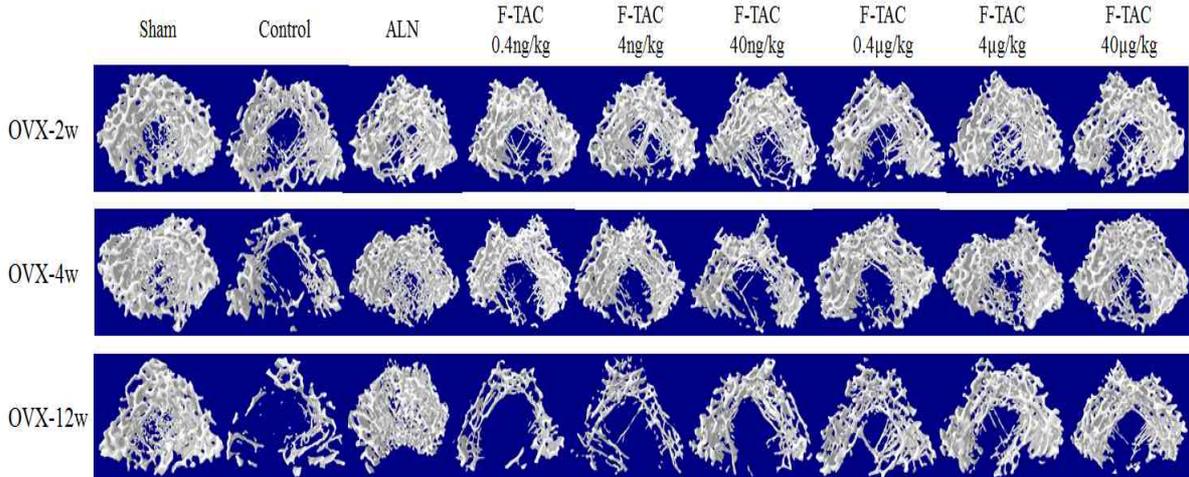


Fig. 45. 3D image of analysis on the distal femoral bones

○ Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색

- 4중후 조직표본을 TRAP 염색하여 TRAP 활성을 갖으며 다핵을 형성하는 파골세포를 광학 현미경을 이용해 40×, 200× 배율로 관찰하였음. 성장판 밑의 다핵을 갖으며, 붉게 염색된 세포의 단위부피 (mm⁻¹)당 수를 세었음. 위수술군은 6.3±1.2개의 파골세포가 관찰되었으며 (p<0.001), 난소절제술-위약투여군은 23±4.6개의 파골세포가 관찰되었음. 알렌드로네이트 200 µg/kg 투여군은 8±2개의 파골세포가 관찰되었고 (p<0.01), 타크로리무스는 1 µg/kg 에서 21.3±3.1 개, 10 µg/kg 에서 24.6 ± 2.5 개, 100 µg/kg 에서 15.3 ± 1.5 개의 파골세

포가 관찰되었음 ($p < 0.05$)

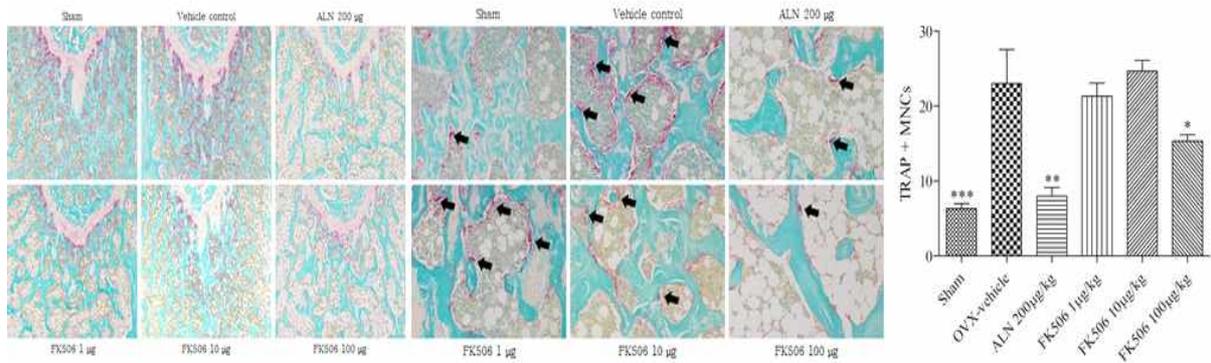


Fig. 46. Histological observation of femur TRAP Stain

○ Goldner's masson trichrome 염색

- 4주 후 조골세포의 활성을 확인하기 위해 Goldner's MT 염색을 실시하였음. 해면골 표면에 핵이 염색되어 있고 세포 단일층을 이루고 있는 조골세포를 200×의 배율로 관찰하였음 (Fig. 24a). 성장판 밑에서 해면골 표면에 단일층을 이루고 있으며 핵과 세포질이 각각 염색되어있는 조골세포의 수를 세었음. 위수술군은 23.3 ± 2.8 개의 조골세포가 관찰되었으며, 난소절제술-위약투여군은 25 ± 3 개의 조골세포가 관찰되었음. 양성대조군인 알렌드로네이트 200 µg/kg 투여군은 27.6 ± 5.1 개의 조골세포가 관찰되었고, 타크로리무스는 1 µg/kg 에서 22.6 ± 3.8 개, 10 µg/kg 에서 24 ± 3.6 개, 100 µg/kg 에서 32.3 ± 3 개의 조골세포가 관찰되었음

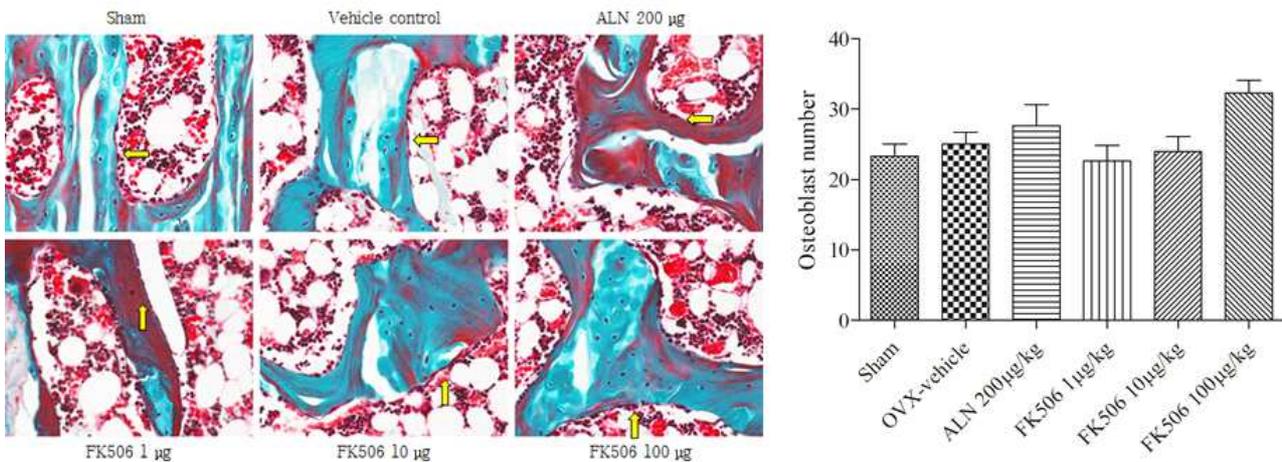


Fig. 47. Histological observation of femur Goldner Masson Trichrome Stain

- 조직실험에서 이약물은 파골세포 생성억제 효과는 보였지만 조골세포에는 영향을 주지 않는 것을 확인하였음

■ 신제품 유효성검증 (난소적출 골다골증 모델)

○ 본 연구에서는 땅콩새싹과 볶음땅콩 추출물을 활용하여 난소적출을 통하여 골다공증을 유발시킨 실험쥐에 12주간 농도별로 급여 후 실험동물의 골밀도 변화와 혈중 지표의 변화확인을 통한 골대사에 미치는 효과를 알아보려고 실시하였음

○ 땅콩새싹 추출물과 볶음 땅콩 추출액을 제조하여 정제수와 땅콩새싹 및 볶음 땅콩 추출물을 정제수와 혼합하여 존대를 이용하여 위내 급여하였음

○ 실험동물

1) 사육 조건

- 실험 동물은 22 ± 2 °C 및 상대습도 $50 \pm 10\%$, 12 시간 명암 주기로 설정된 SPF 사육실에서, 폴리카보네이트 케이지에서 사육하였고 난소절제 수술이전까지 1주간 순화시켜서 사용하였음
- Sprague-Dawley 계 암컷 흰쥐를 사용하였으며 160 g 내외의 4주령 흰쥐 100두를 공시하여 대조군 10두를 제외한 90두를 난소적출 수술을 실시하여 2주간 적응기간을 거친후 220 g 전후의 건강한 흰쥐를 사용하였음
- 실험동물은 졸레틸을 사용하여 전신마취한 후 체모 및 무균처리를 하고 흰쥐의 등부위 중앙으로부터 양측면으로 1 cm부위를 1 cm 가량 절개한 다음 다른 장기에 손상이 가해지지 않도록 주의하여 난소를 확인하여 봉합용 실로 난소를 결찰한 뒤 양측의 난소를 모두 절제하였음. 난소 절제 후 각 장기들은 복강 내로 채워치 시킨 다음 봉합용 실로 봉합하였다 (Fig. 36). 수술 후에는 동물용 항생제를 3일간 투여하여 감염을 방지하였음



Fig. 48. Description of ovariectomy in female rats

2) 실험군 설정

- 실험군 당 개체 수는 시험 결과의 통계적 유의성을 평가할 수 있는 수인 10마리씩 8개 군

80두를 선발하여 실험동물을 각 군에 10마리씩 무작위로 배정하여 8군으로 나누었으며 Table. 4와 같이 난소 적출 술을 시행하지 않고 기본사료를 급여한 normal control군(NC), 난소 적출 후 기본사료를 급여한 ovariectomized control군(OC), 난소 적출한 실험쥐에 볶음 땅콩 추출물 50 mL/kg/day (RP1), 100 mL/kg/day (RP2), 150 mL/kg/day (RP3) 투여군과 난소 적출한 실험쥐에 땅콩 새싹 추출물 50 mL/kg/day (PS1), 100 mL/kg/day (PS2), 150 mL/kg/day (PS3) 급여군으로 나누어 12주간 경구투여하였음 (Fig. 37)



Fig. 49. Administration of by gavage

3) 체중 및 사료섭취량

- 볶음 땅콩과 땅콩 새싹 추출물 식이에 의한 흰쥐의 체중 변화를 알아보기 위해 1주일 단위로 오전10~11시에 체중을 측정하였으며, 사료섭취량과 음수량은 1주일에 두 번씩 일정시간에 측정하였음

4) 혈액 채취 및 장기무게

- 실험동물을 희생시키기 전 12시간 절식시킨 후, desiccator안에 ether를 적당량 취하여 마취시킨 뒤 하복부를 개복하였음. 멸균주사기를 이용하여 복대동맥에서 혈액을 채취한 뒤 신장, 비장, 폐, 간을 적출하였음. 적출한 신장, 지라, 간은 주변의 조직을 모두 제거 하고, 생리식염수로 혈액을 씻은 후 무게를 측정하였음 (Fig. 38)



Fig. 50. Dissection of rat organs, liver, spleen, kidney, lung and uterus

5) 대퇴골 골밀도 및 골미네랄 측정

- 실험종료 후 랫드를 희생시켜 적출한 대퇴골은 골격에 붙어있는 근육, 인대 및 지방을 제거하고 건조한 후 골밀도 및 골미네랄 함량을 방사선 골밀도 측정기(pDEXA X-ray bone densitometer, Norland Co., USA)를 사용하여 측정하였음. 해상도는 1.0×1.0 mm, 스피드는 20 mm/sec, 샘플의 길이는 1.60 cm, 폭(너비)은 3.90 cm로 설정하여 측정하였음

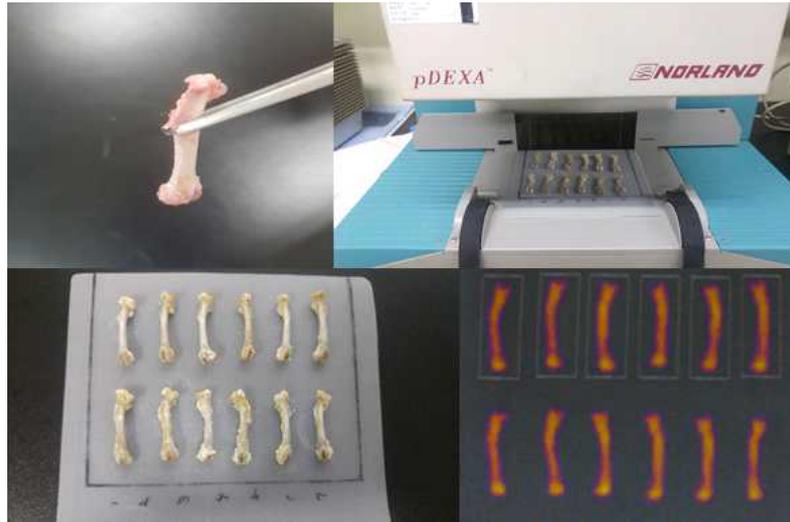


Fig. 51. Bone mineral density measurement of rats using pDEXA X-ray bone densitometer

6) 혈청지질 및 생화학적 지표

- 실험동물의 복대동맥으로부터 채취한 혈액은 실온에서 30분 방치 후 3,000 rpm, 4 °C, 15분간 원심분리(Avanti centrifuge J-20XP, BECKMAN COULTER., USA)하여 분리된 혈청을 -70 °C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였음. ALT, AST, ALP, Triglyceride, total cholesterol, calcium은 자동 생화학분석기인 Cobas-C 111 (Roche, U.S.A)을 이용하여 분석하였음

7) 통계처리

- 실험결과는 mean±SD로 나타냈으며 실험결과의 유의성은 Student's t-testdp 의해 검정하였음

○ 체중 변화

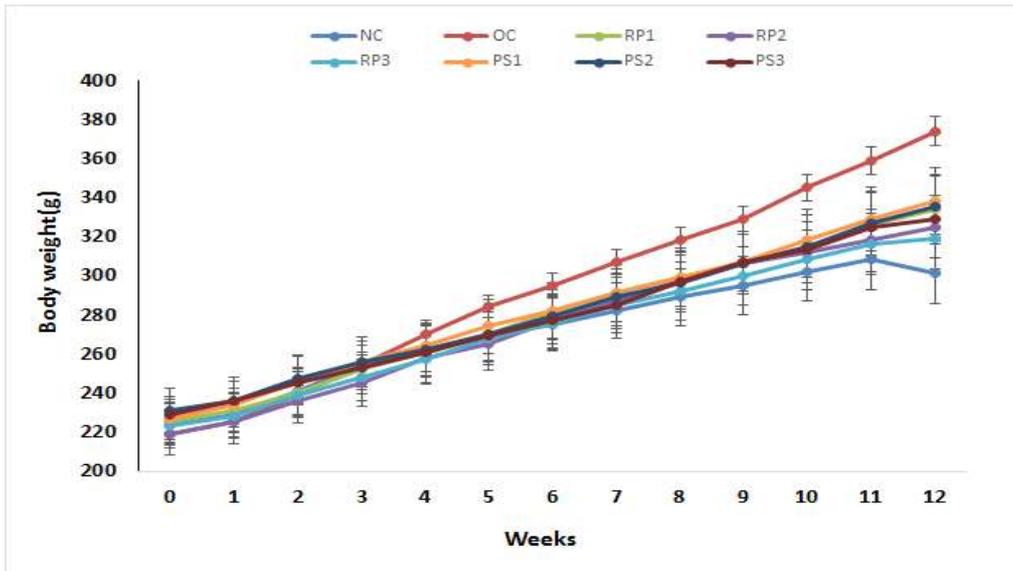


Fig. 52. Effects of Arachis hypogaea Sprout extract and roasted Arachis hypogaea extract on body weight change of experimental rats

NC : non-treated group

OC : administrated with D.W.(1mL) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

RP : administrated with roasted Arachis hypogaea extract 50 mL/kg/day (RP1), 100 mL/kg/day (RP2), 150 mL/kg/day (RP3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

PS : administrated with Arachis hypogaea Sprout 50 mL/kg/day (PS1), 100 mL/kg/day (PS2), 150 mL/kg/day (PS3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

- 실험기간 동안의 평균체중 변화는 정상군(NC)이 229.2 ± 6.45 g에서 292.6 ± 9.52 g으로 증가하였으나, 난소적출 대조군(OC)의 체중이 225.35 ± 6.53 g에서 373.26 ± 13.25 g으로 정상 대조군에 비하여 유의하게 증가하였음($P < 0.05$). 땅콩새싹 추출물과 볶음땅콩 추출물 투여군은 대조군에 비해서는 증가하였으나, 난소적출 대조군에 비해서는 감소하는 경향을 보였음
- 실험군에 실험식이를 급여하는 12주 동안의 체중 변화는 Fig. 1에 보는 바와 같이 4주까지는 정상군과 난소적출군에서 체중증가율이 차이를 보이지 않았으나 5주 이후부터 차이를 보이기 시작하여 지속적으로 높아지는 경향을 보였고 난소적출후 땅콩새싹 추출물과 볶음 땅콩 추출물을 투여한 군에서 난소적출 대조군에 비하여 점차 체중증가율이 낮아지는 경향을 보였음.
- 실험종료시기인 투여 12주차에는 볶음땅콩 추출물 100 mg 투여군과 150 mg투여군은 난소적출 대조군에 비해 유의성있는 체중 감소를 나타내 땅콩 새싹추출물과 볶음 땅콩 추출물 투여시 체중증가율이 감소하는 것으로 나타났음

○ 혈액성분의 변화

Table. 1. Effects of Arachis hypogaea Sprout extract and roasted Arachis hypogaea extract on Serum Parameters in Ovariectomized Rats

	Albumin (g/dL)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	ALP(U/L)	Total-cholesterol(mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Ca(mg/dL)
NC	6.1±0.12	124.3±12.24	64.2±8.26	182.4±21.42	108.5±7.32	104.6±9.82	10.9±0.42
OC	4.5±0.10	145.3±15.45	58.2±9.24	168.2±16.86	128.7±7.54	68.4±5.45	10.1±0.38
RP1	4.9±0.11	128.5±11.22	57.8±7.42	182.4±16.88	124.3±6.23	78.5±4.82	10.5±0.28
RP2	5.2*±0.14	131.4±14.23	63.4±6.85	179.5±21.04	119.4*±5.42	82.4±7.25	10.5±0.44
RP3	5.1±0.09	126.2*±10.27	61.8±5.58	192.3*±18.25	121.7±4.84	84.2*±6.76	10.7*±0.38
PS1	4.6±0.12	132.4±11.54	62.3±6.83	175.6±21.04	118.7*±6.22	77.4±6.45	10.4±0.29
PS2	5.2*±0.13	128.4±9.62	61.5±7.82	178.3±16.78	122.1±5.83	75.2±5.82	10.4±0.43
PS3	4.9±0.12	126.5*±11.34	65.7*±8.24	188.4*±17.23	120.4±7.22	88.4*±7.25	10.5±0.32

Values were expressed as mean±SD *P<0.05, significantly different from negcontrol group

NC : non-treated group

OC : administrated with D.W.(1mL) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

RP : administrated with roasted Arachis hypogaea extract 50 mL/kg/day (RP1), 100 mL/kg/day (RP2), 150 mL/kg/day (RP3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

PS : administrated with Arachis hypogaea Sprout 50 mL/kg/day (PS1), 100 mL/kg/day (PS2), 150 mL/kg/day (PS3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

- 혈액화학치 검사결과 난소적출 대조군은 정상군에 비해 Albumin, Triglyceride와 Calcium은 유의하게 감소(P<0.05)하였고 Total-cholesterol과 AST는 유의하게 증가(P<0.05)하였음. 난소 적출후 땅콩 새싹 추출물을 투여한 그룹에서는 Albumin은 볶음땅콩 추출물 100 mg 투여군과 땅콩새싹 추출물 100 mg 투여군에서 난소적출 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였음
- 혈청 내 주요 지질로는 cholesterol과 triglyceride 등이 있으며 혈청 내 cholesterol의 증가는 관상동맥 심질환의 위험도를 증가시킴. 그러므로 폐경 후 여성이나 난소를 적출한 여성에게 투여될 약물은 혈청 내 지질을 증가시키지 않아야함. 이 실험에서 Total-cholesterol은 난소적출군에서 정상대조군에 비해 높아졌으나 실험물질 투여군에서 유의한 감소를 나타내지 않았음
- Calcium은 정상대조군에 비해 난소적출군에서 감소하였으며 실험물질 투여후 다소 증가하는 경향을 보였고 볶음땅콩 추출물 150 mg 투여군에서 난소적출 군에 비해서 유의성 있는 증가가 나타났음

- AST는 심근경색이나 근육질환의 경우에도 증가하나, ALT는 간세포 손상 시 특이하게 상승하므로 간세포 손상에 의한 상관성이 AST보다 높음.
- AST는 난소적출군이 정상대조군에 비하여 높아지는 경향을 보였으나 실험물질 투여후 유의성 있는 변화를 보이지 않았고, ALT, ALP의 경우 난소적출 대조군이 정상대조군에 비해서 낮아지는 결과를 보였고 실험군에서는 볶음 땅콩 추출물 150 mg 투여군과 땅콩새싹 추출물 150 mg 투여군에서 유의성있는 차이를 나타냈음 (Table. 1)

○ 내부장기 무게

Table. 2. Effect of Arachis hypogaea Sprout extract and roasted Arachis hypogaea extract on body weight change of experimental rats

	Liver(g)	Spleen(g)	Kidney(g)	Lung(g)	Uterus(g)
NC	11.28±0.78	0.68±0.02	2.72±0.46	1.93±0.18	2.13±0.21
OC	10.02±0.56	0.62±0.03	2.41±0.42	1.58±0.22	1.42±0.15
RP1	10.85±0.44	0.67±0.02	2.48±0.29	1.73±0.19	1.75±0.22
RP2	11.26±0.48	0.75±0.01	2.55±0.31	1.62±0.27	1.64±0.32
RP3	10.98±0.42	0.70±0.02	2.52±0.35	1.68±0.30	1.82±0.41
PS1	10.45±0.34	0.64±0.02	2.42±0.26	1.70±0.25	1.65±0.36
PS2	11.28±0.56	0.72±0.03	2.44±0.34	1.86±0.31	1.82±0.41
PS3	10.86±0.42	0.68±0.01	2.56±0.29	1.76±0.29	1.75±0.37

Values were expressed as mean ±SD *P<0.05, significantly different from negcontrol group

NC : non-treated group

OC : administrated with D.W.(1mL) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

- 난소 적출하여 골다공증을 유발시킨 실험쥐에 땅콩 새싹 추출물과 볶음땅콩 추출물을 12주간 급여 후에 희생하여 내부 장기무게를 측정한 결과 Table. 2와 같이 나타났음. 간, 신장, 폐, 비장의 경우 NC군에 비하여 낮은 수준을 나타내었고 난소 적출군에서 땅콩 새싹 추출물과 볶음땅콩 추출물의 급여가 장기의 무게에 유의성있는 변화를 나타내지는 못하는 것으로 나타났음
- 그러나 자궁의 무게는 정상 대조군에 비하여 난소적출 군에서 유의하게(P<0.05) 감소하였으며 땅콩 새싹 추출물과 볶음땅콩 추출물 투여군에서 난소적출 대조군에 비하여 증가하여 자궁의 장기무게에는 영향을 미치는 것으로 나타났음

○ 골밀도(Bone mineral density, BMD) 및 골미네랄(Bone mineral content, BMC)

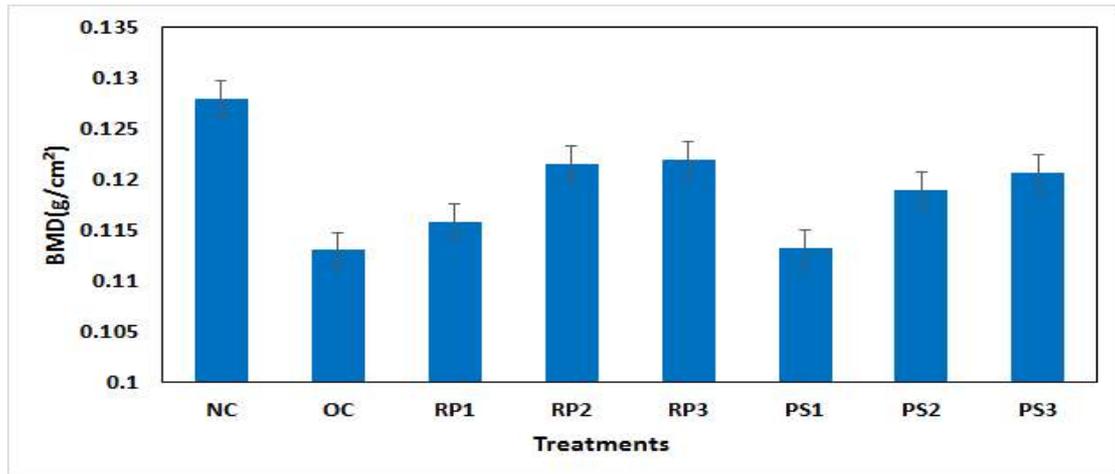


Fig. 53. Effects of Arachis hypogaea Sprout extract and roasted Arachis hypogaea extract on femur bone mineral density (BMD) of experimental rats

All values are means±SE. Means with different superscript are significantly different($p < 0.05$)

NC : non-treated group

OC : administrated with D.W.(1mL) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

RP : administrated with roasted Arachis hypogaea extract 50 mL/kg/day (RP1), 100 mL/kg/day (RP2), 150 mL/kg/day (RP3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

PS : administrated with Arachis hypogaea Sprout 50 mL/kg/day (PS1), 100 mL/kg/day (PS2), 150 mL/kg/day (PS3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

- 실험동물에서 골 소실 정도를 측정하기 위해 골밀도와 골미네랄을 측정한 결과 난소 적출 수술을 시행 하지 않은 NC군은 각각 $0.128 \pm 0.034 \text{ g/cm}^2$, $0.387 \pm 0.039 \text{ g}$ 을 나타내었음
- 반면에 난소 적출 수술로 인하여 OC군은 각각 $0.113 \pm 0.031 \text{ g/cm}^2$, $0.332 \pm 0.035 \text{ g}$ 으로 정상대조군에 비해 낮은 골밀도와 골미네랄 수치를 나타냈음. 땅콩 새싹 추출물과 볶음땅콩 추출물을 투여한 실험쥐에서 골밀도와 골미네랄 수치는 OC군과 비교하였을 때 땅콩새싹 추출물과 볶음땅콩 추출물을 투여한 모든 그룹에서 증가하는 경향을 보였으며, 특히 볶음땅콩 추출물 100 mg과 150 mg 투여군에서 $0.121 \pm 0.034 \text{ g/cm}^2$ 와 $0.378 \pm 0.042 \text{ g}$ 으로 각각 난소적출 대조군에 비하여 7.0%와 13.8%의 유의성 있는 증가를 보였고, 땅콩새싹 추출물은 150 mg 투여군에서 $0.121 \pm 0.041 \text{ g/cm}^2$ 와 $0.370 \pm 0.038 \text{ g}$ 으로 7.0%와 8.4%의 증가율을 나타내었음.
- 이 결과는 Park 등(2010)은 콜라겐을 다량 함유한 말뚝 추출물의 효과에 관한 연구에서 난소 적출한 흰쥐의 골밀도를 7.6% 증가시켜 정상 대조군과 비슷한 수준으로 회복시키는데 효과가 있다고 한 보고와 유사하게 나타났음

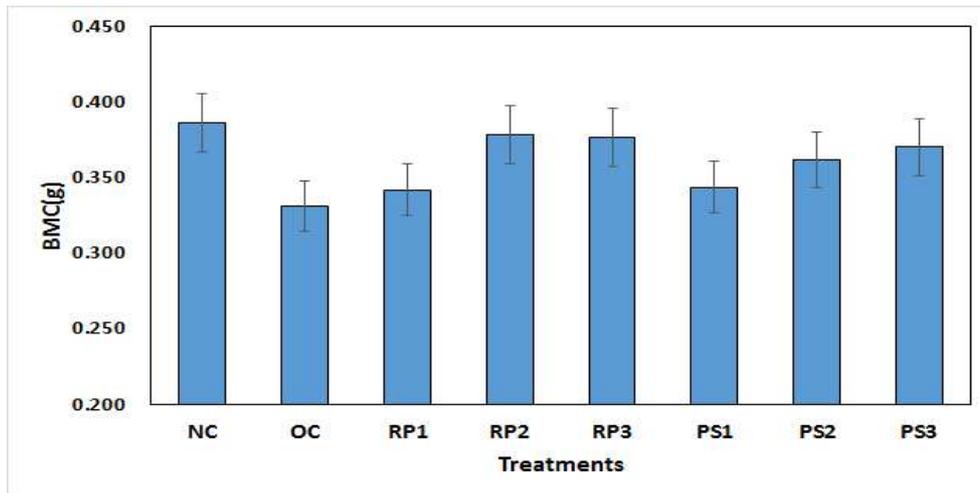


Fig. 54. Effects of *Arachis hypogaea* Sprout extract and roasted *Arachis hypogaea* extract on femur bone mineral content (BMC) of experimental rats

All values are means \pm SE. Means with different superscript are significantly different ($p < 0.05$)

NC : non-treated group

OC : administrated with D.W.(1mL) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

RP : administrated with roasted *Arachis hypogaea* extract 50 mL/kg/day (RP1), 100 mL/kg/day (RP2), 150 mL/kg/day (RP3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

PS : administrated with *Arachis hypogaea* Sprout 50 mL/kg/day (PS1), 100 mL/kg/day (PS2), 150 mL/kg/day (PS3) daily by oral gavage 12 weeks in ovariectomized rats

■ 2차년도에 발굴한 한방소재물질(작약)의 뼈 형성 능력 검증

○ 귀의 머리뼈에서 추출한 전조골세포인 MC3T3-E1 cell에 glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone를 통해 조골세포로 유도 후 2차년도에서 발굴한 한방소재물질인 작약을 이용하여 골 생성 능력을 비교하고 골다공증 예방을 위한 실험을 진행함

○ MC3T3-E1 세포에 조골세포 분화를 유도하기 위해 Osteogenic differentiation medium (ODM)과 골다공증 치료제 중 가장 강력한 골흡수 억제제인 bisphosphonate 제제로서 알려진 Alendronate 양성대조군으로 사용하였음. 2차년도에서 검증한 한방소재 물질 작약을 이용하여 MC3T3-E1 세포에 각 농도별(12.5-100 ug/mL)로 처리하고 3일마다 교체하여 각 유전자 별로 7,14일 동안 실험 진행하여 실험을 확인함

* ODM; 10mM β -glycerophosphate, 50uM Ascorbic acid, 100nM Dexamethasone를 처리한 배지 (조골세포 분화유도 배지)

○ 정량 PCR 분석법

- 골분화 특이마커들 발현 정도를 관찰하기 위해 TRIZOL(Invitrogen; 미국)을 이용해 배양된 세포의 total RNA를 추출한 후, iScript TM cDNA 합성 키트 (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해 cDNA를 제작하였음. PCR 프라이머는 바이오니아(Daejeon; Korea)에서 구입함. SYBR Green 형광 염색을 이용하여 StepONE Plus real time PCR system (Applied)

Biosystems, Foster City, USA)을 수행함. PCR 과정은 섭씨 90도에서 변성과정을 15초동안 거치고, 섭씨 60도로 다시 온도를 60초 동안 낮추어 DNA가닥을 분리시킴. 그 후에 증폭시켜서 정량 PCR 분석법을 수행함. 골생성분화 특이마커자들의 프라이머는 다음과 같이 사용하였음 (Table. 3)

Table. 3. 골생성분화 특이마커자들의 프라이머

Mouse			
mALP (alpl)	F	CTGGTGAAGGAGGCAGGATT	296
	R	CGTTCACCGTCCACCACCTT	
mRunx2 (cbfa1)	F	CGGGAACCAAGAAGGCACAGAC	423
	R	TGAAGCACCTGCCTGGCTCTT	
mOsterix (sp7)	F	GGCGTTCTACCTGCGACTGC	440
	R	AGGCGAAGTGGGAAGATCGGG	
mOCN (bglap)	F	ACTCTGCTGACCCTGGCTGC	249
	R	GATGCGTTTGTAGGCGGTCTTC	
mOPN (SPP1)	F	GCTGGTGCCTGACCCATCTC	290
	R	CGACTGTAGGGACGATTGGAGTG	

Early marker

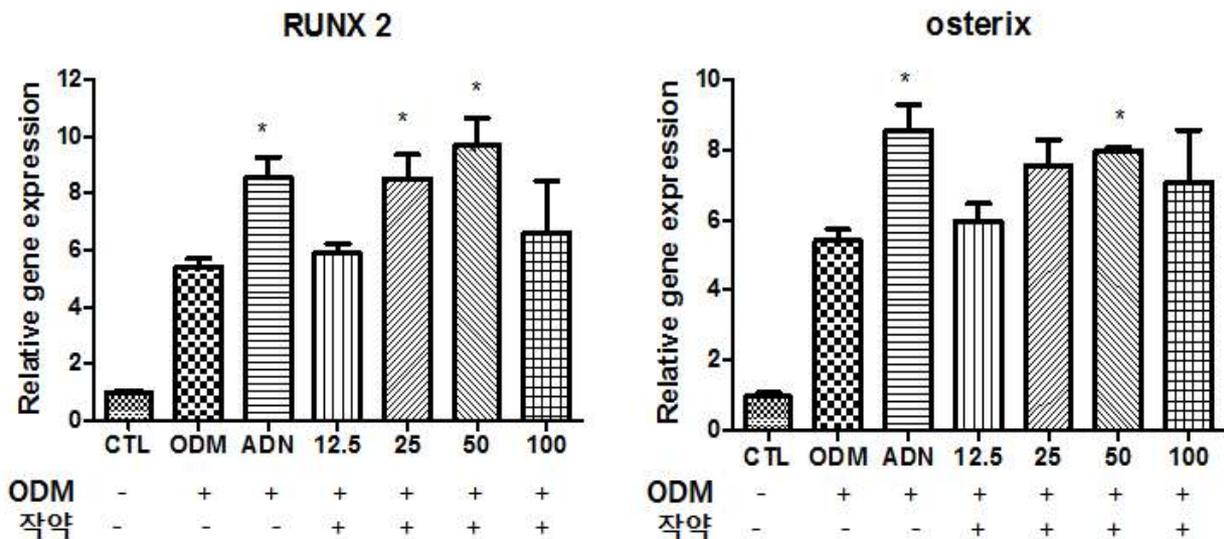


Fig. 55. 약물을 처리 한 MC3T3-E1 세포에서 조골세포 초기 분화 마커 발현양 확인

- 조골세포 분화 단계에서 초기 단계 마커로 알려진 RUNX2와 Osterix를 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, 먼저 Runx2 마커자를 확인한 결과 ODM 배지를 처리한 군에서 RUNX2는 약 5.42정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 5배 정도 증가 하였으며, 골다공증 치료제로 알려진 Alendronate(ADN)군은 약 8.55정도 발현율을 확인함. 이는 ODM 대비 1.5배정도 더 증가하는 것을 확인함

- 또한, 한방소재물질인 약물을 처리한 결과 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 ODM 군보다 1.5, 1.7배정도

증가하는 것을 확인함. 양성대조물질인 ADN 만큼 발현율이 증가 되는 것을 관찰함. 12.5, 100 µg/mL에서는 ODM군 큰 차이가 없음을 확인함. 다음 Osterix를 확인한 결과 ODM 군과 ADN군은 마찬가지로 CTL 대비 약5, 8.5배정도 증가 하였으며 작약을 농도별로 처리한 결과 50 µg/mL에서 ODM 군에 비해 1.5배 정도 더 증가하는 것을 확인함. ADN 군보다는 미비하지만 증가하는 것을 확인함

Middle marker

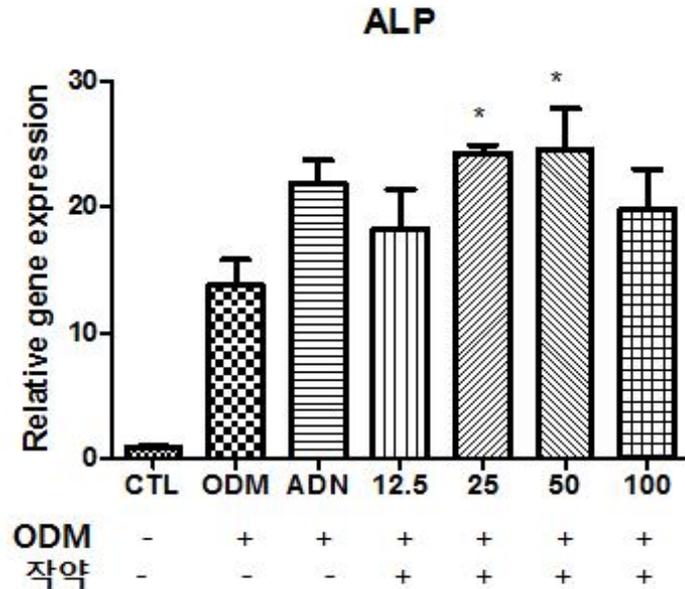


Fig. 56. 작약을 처리 한 MC3T3-E1 세포에서 조골세포 증기 분화 마커 발현양 확인

- 조골세포 분화 단계에서 증기 단계 마커로 알려진 ALP를 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, ODM 배지를 처리한 군은 약 13.81 발현율을 보였으며, 이는 CTL 대비 13배정도 증가하였음. 골다공증 치료제로 알려진 Alendronate(ADN)군은 약 21.93 발현율이 나타났으며 이는 ODM 대비 1.58배정도 더 증가하는 것을 확인함
- 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 25, 50 µg/mL에서 24.33, 24.57의 발현율을 보였으며, 이는 ODM 군보다 1.76, 1.77배정도 증가하는 것을 관찰함. ADN 군보다 조금 더 증가하는 양상을 보였으며 12.5, 100 µg/mL에서는 ODM군 큰 차이가 없음을 확인함

Late marker

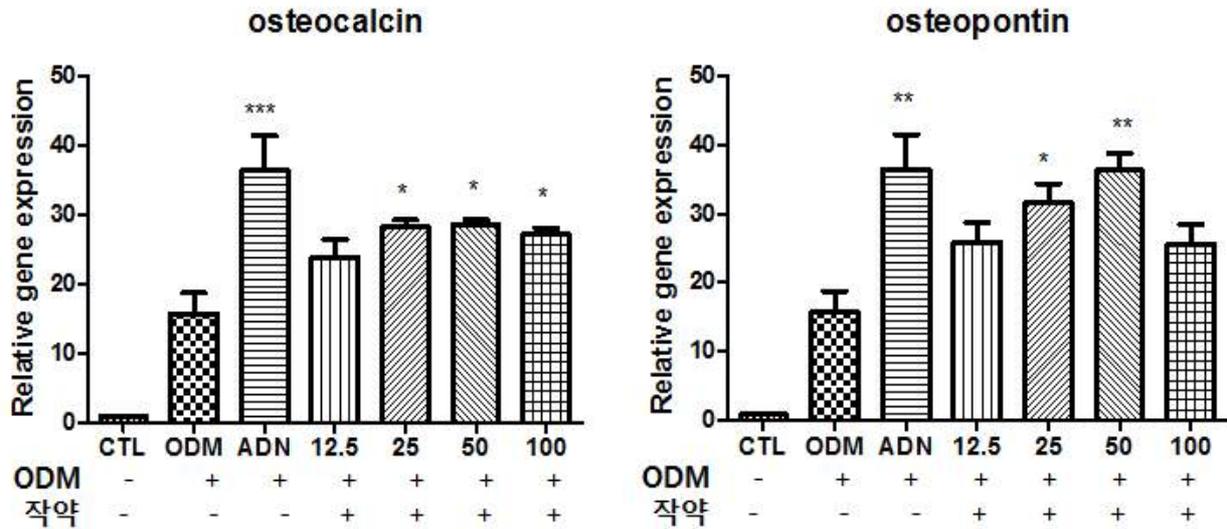


Fig. 57. 작약을 처리 한 MC3T3-E1 세포에서 조골세포 후기 분화 마커 발현양 확인

- 조골세포 분화 단계에서 후기 단계 마커로 알려진 Osteocalcin과 Osteopontin을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, 먼저 Osteocalcin 마커자를 확인한 결과 ODM 배지를 처리한 군에서 Osteocalcin는 약 15.87정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 16배정도 증가하였으며, 골다공증 치료제로 알려진 Alendronate(ADN)군은 약 36.45정도 발현율을 확인함
- 이는 ODM 대비 2.3배정도 더 증가하는 것을 확인함. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 ADN 만큼 발현율이 증가하는 것은 아니지 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 ODM 군보다 1.8, 1.8, 1.7배정도 증가하는 것을 확인함. 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 ODM군에 비교하여 유의성있는 결과가 나타나지 않음
- 다음 Osteopontin를 확인한 결과 ODM 군과 ADN군은 마찬가지로 CTL 대비 약15, 37배정도 증가 하였으며 작약을 농도별로 처리한 결과 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 ODM 군에 비해 2, 2.3 배 정도 더 증가하는 것을 확인함. ADN군 만큼 유사하게 증가하는 것을 확인. 12.5, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 큰 효과가 없는 것을 확인함
- 정량 PCR 분석법을 이용하여 각 분화단계별로 발현율을 확인하였으며, 작약 추출물을 처리하였을 경우 양성대조군인 ADN 만큼 발현율이 증가하는 마커자들도 있었으며 ADN 보다 더 증가하는 유전자들을 확인함. 이로 인해 각 단계 마커자들을 분석해보았을 때 작약 추출물 농도 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 조골세포 분화를 촉진하는 것으로 사료되어짐

■ 뼈파괴 억제성 유효소재 검증

○ 한방소재 작약추출물이 단핵구/대식세포의 일종인 RAW264.7 세포에서 receptor activator of nuclear factor- κ b ligand(RANKL)을 첨가하여 파골세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였음. RANKL은 면역계에서의 효과와 뼈 재생과 리모델링에 관여하는 것으로 알려져 있는데 근육, 흉선, 간, 소장, 대장을 포함한 여러 조직과 장기에서 분비됨. 체내, 성장 및 면역기능에 중요한 역할을 하며 특히 뼈 성장에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 본 실험에서는 양성대조군으로 RANKL 100 ng/mL 과 면역억제제로 알려진 FK506 (Tacrolimus) 10 μ M을 사용하였음

○ 정량 PCR 분석법

- 뼈파괴 특이마커들 발현 정도를 관찰하기 위해 TRIZOL(Invitrogen; 미국)을 이용해 배양된 세포의 total RNA를 추출한 후, iScript TM cDNA 합성 키트 (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용해 cDNA를 제작하였음. PCR 프라이머는 바이오니아(Daejeon; Korea)에서 구입함. SYBR Green 형광 염색을 이용하여 StepONE Plus real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA)을 수행함. PCR 과정은 섭씨 90도에서 변성과정을 15초동안 거치고, 섭씨 60도로 다시 온도를 60초 동안 낮추어 DNA가닥을 분리시킴. 그 후에 증폭시켜서 정량 PCR 분석법을 수행함

○ 뼈 파괴 단계는 크게 4단계로 나누어 짐. Commitment stage, Differentiation stage, Fusion stage, Resorption stage 로 나눔

Commitment stage

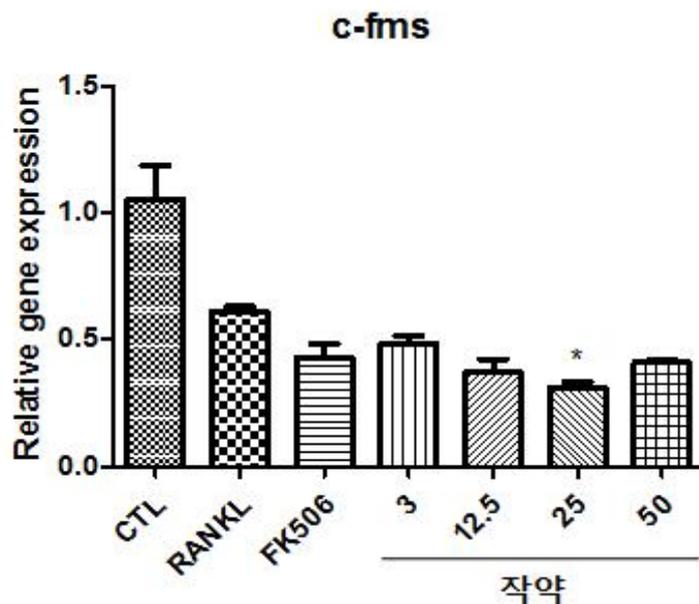


Fig. 58. 작약을 처리 한 Raw 264.7 세포에서 파골세포 commitment stage 분화 마커 발현양 확인

- 파골세포 분화 단계에서 commitment stage 마커로 알려진 c-fms을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 0.61정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 0.58배정도 감소 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 0.42정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 1.42배정도 더 감소하는 것을 확인함
- 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506 만큼 발현율이 감소되는 것을 확인함. 특히 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 RANKL 군보다 1.95배정도 감소하는 것을 확인함. 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았음

Differentiation stage

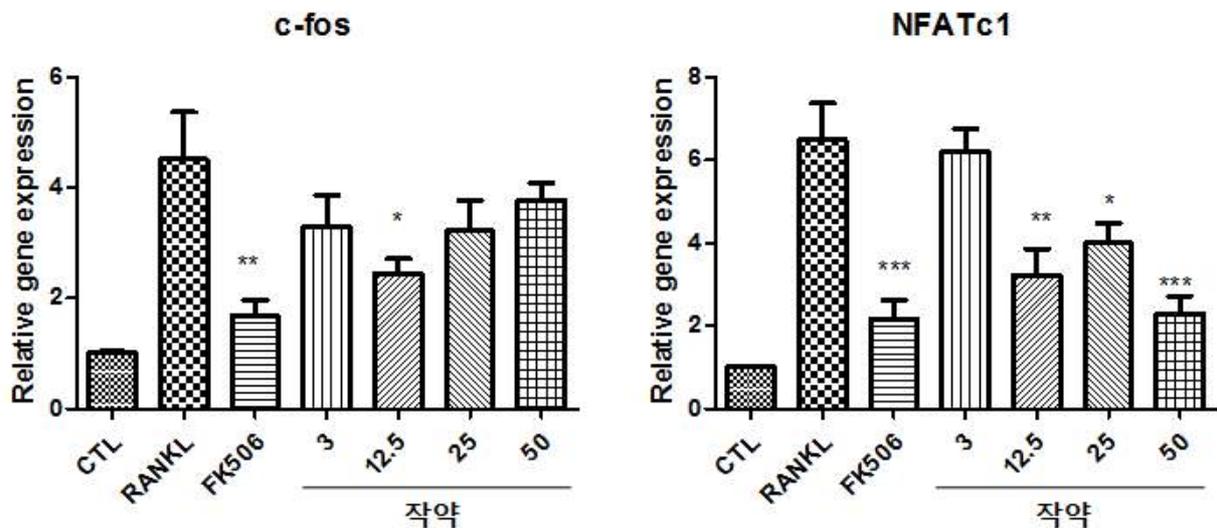


Fig. 59. 작약을 처리 한 Raw 264.7 세포에서 파골세포 differentiation stage 분화 마커 발현양 확인

- 파골세포 분화 단계에서 Differentiation stage 마커로 알려진 c-fos, NFATc1을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 4.52정도 발현율을 나타냄
- 이는 CTL 대비 4.5배정도 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 1.67정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 2.7배정도 감소하는 것을 확인함. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506만큼은 아니지만 발현율이 감소되는 것을 확인함. 특히 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 RANKL 군보다 약 1.84배정도 감소하는 것을 확인함. 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았음
- NFATc1을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 6.5정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 6.4배정도 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 2.17

정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 2.9배정도 감소하는 것을 확인함. 또한, 한방소재 물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506만큼 발현율이 감소되는 것을 확인함. 특히 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 RANKL 군보다 약 2.01, 1.62, 2.83배정도 감소하는 것을 확인함. 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 유의성이 나타나지 않았음

Fusion stage

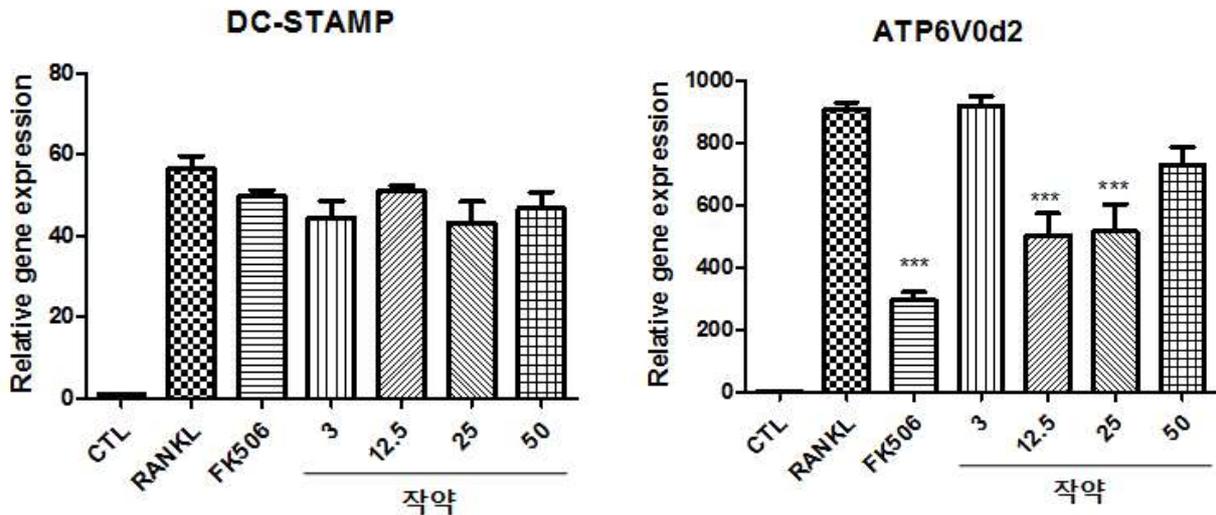


Fig. 60. 작약을 처리 한 Raw 264.7 세포에서 파골세포 fusion stage 분화 마커 발현양 확인

- 파골세포 분화 단계에서 fusion stage 마커로 알려진 DC-STAMP, ATP6V0d2를 확인한 결과 RANKL을 처리한 군에서 약 56.51정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 약 56.8배정도 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 49.85정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 0.8배정도 감소하는 것을 확인하였으나 큰 유의성이 없는 것으로 나옴. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 모든 농도에서 RANKL과 비교하여 큰 차이 없는 발현율을 확인함
- 또 다른 마커자인 ATP6V0d2를 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 910.17정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 850배 이상 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 294.5정도 발현율을 확인함
- 이는 RANKL 대비 3배정도 감소하는 것을 확인함. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506만큼 발현율이 감소되는 것은 아니었으나 어느 정도 유의성 있는 결과를 확인함. 특히 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 RANKL 군보다 약 1.8, 1.7 배정도 감소하는 것을 확인함. 3, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 유의성이 나타나지 않았음

Resorption stage

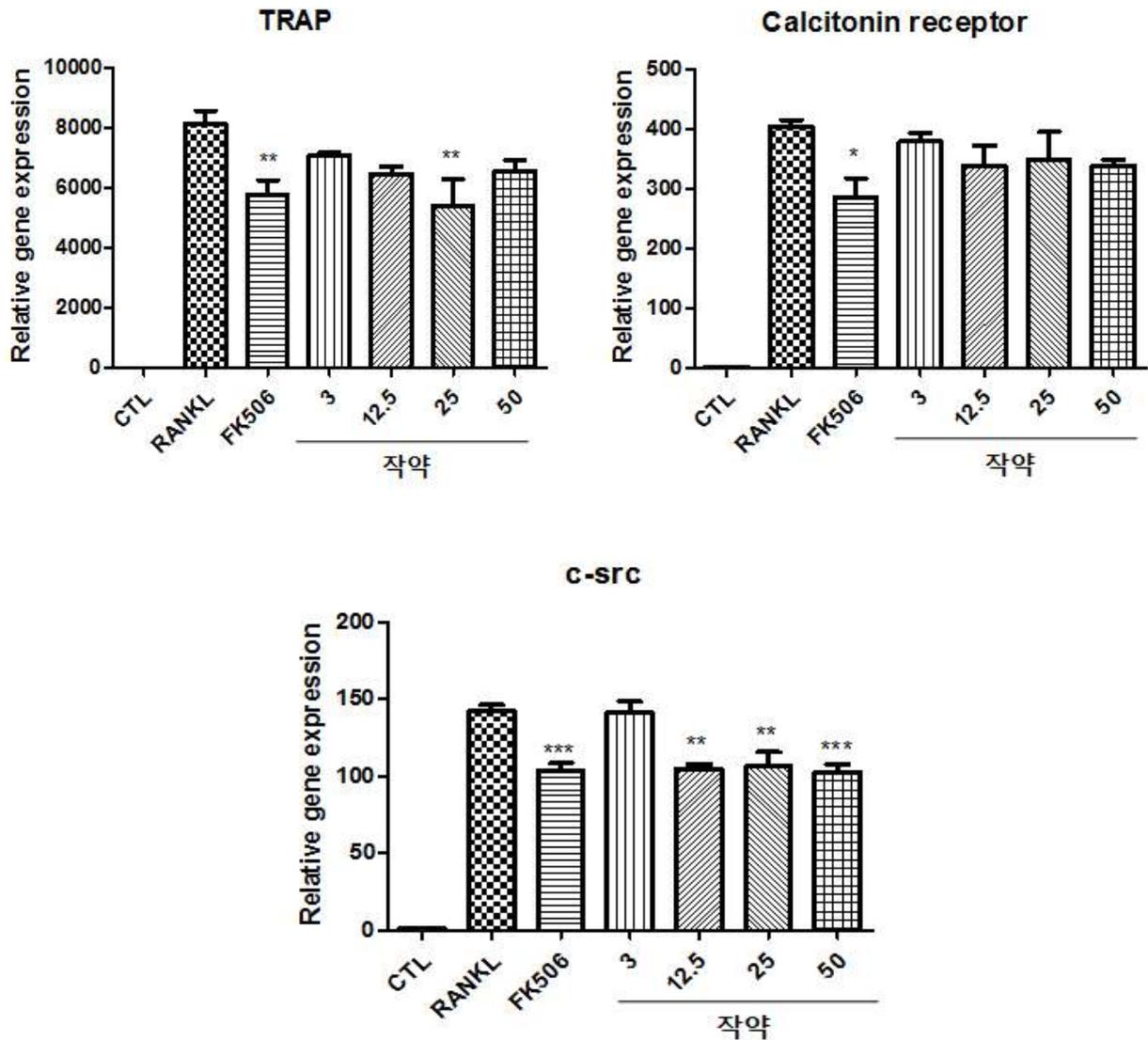


Fig. 61. 작약을 처리 한 Raw 264.7 세포에서 파골세포 resorption stage 분화 마커 발현양 확인

- 뼈 파괴에서 가장 마지막 단계로 뼈를 흡수하는 단계로 알려진 resorption stage의 마커로는 TRAP, Calcitonin receptor, c-src이 있으며 먼저 TRAP을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 8932.25정도 발현율을 나타냄
- 이는 CTL 대비 7600배 이상 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 6521.47정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 1.36배정도 감소하는 것을 확인함. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506만큼 감소되는 것을 확인함. 특히 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 RANKL 군보다 약 1.5배정도 감소하는 것을 확인함. 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았음

- 다른 후기 마커자인 Calcitonin receptor을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 405.23정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 428배 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 286.17정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 1.41배정도 감소하는 것을 확인함. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506만큼 유의성있게 감소되는 농도는 확인하지 못함
- 또 다른 후기 마커 c-src을 확인한 결과 CTL은 음성대조군으로써 CTL을 기준으로 그래프화 하였으며, RANKL을 처리한 군에서 약 142.6정도 발현율을 나타냄. 이는 CTL 대비 134배 증가 하였으며, 면역억제제이며 파골세포 분화를 억제 시키는 것으로 알려진 FK506 군은 약 103.9정도 발현율을 확인함. 이는 RANKL 대비 1.37배정도 감소하는 것을 확인함. 또한, 한방소재물질인 작약을 처리한 결과 양성대조물질인 FK506만큼 유의성있게 감소되는 것을 확인함. 특히 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 RANKL 군보다 약 1.4배정도 이상 유의성있게 감소되는 것을 관찰함
- 정량 PCR 분석법을 이용하여 각 분화단계별로 발현율을 확인하였으며, 작약 추출물을 처리하였을 경우 양성대조군인 FK506 만큼 발현율이 감소하는 마커자들도 있었으며 FK506 보다 더 감소하는 유전자들을 확인함. 이로 인해 각 단계 마커자들을 분석해보았을 때 작약 추출물 농도 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 파골세포 분화 억제를 촉진하는 것으로 사료되어짐

■ 골다공증 동물모델 유효성 검증

- 골다공증 치료제로 알려진 Alendronate(ADN)는 현재 각광 받는 치료제이지만 최근 부작용도 많이 발생하고 있는 약물임. 본 과제의 한방소재물질인 작약의 골다공증 예방 효과를 확인함으로써 ADN만큼 좋은 치료제로써의 효능을 입증하기 위해 동물실험을 진행하였음
- 실험동물은 성적으로 성숙하는 6주령으로 150 ± 20 g의 Sprague Dawley Rat(SD-Rat)을 (주)코아텍에서 구입하였음. 본 실험은 단국대학교 실험동물운영위원회 표준 운영 가이드라인에 따라 실시하였으며, 실험동물은 단국대학교 치과대학 동물사육실에서 사육하였음. 사육 환경은 $24\pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $60\pm 5\%$, 명암 주기는 12시간 간격(오전 9시 점등-오후 9시 소등)으로 조명이 자동으로 조절되는 환경에서 사육함. 식이는 기본 사료(고형 사료, (주)코아텍, Korea)와 식수에는 제한을 두지 않았음. 실험동물은 입고 후에 2주간 순화 기간을 두면서 일반적 외상 또는 증상이 없는지 관찰하였고, 체중 증감에 문제가 없는지 확인하였음
- 골다공증 모델을 만들기 위해 실험동물에 난소 절제술을 실시함. Rompun(Bayer, Germany)과 Zoletil 50(Virbac, France)을 3:1 비율로 혼합하여 1 mL/kg 의 농도로 복강 투여 하여 전신 마취시킴. 양측 측 복부 털을 제거하고 70% 에탄올로 소독하였으며, 피부, 근육층, 복막을 약 3 cm 가량 절개하고 난소를 노출시킨 다음, 난소 밑 부분을 마이크로틸 실크(4-0, 19 mm, 3/8C, 45 cm, ETHICON, USA)로 묶고 난소를 절제함. 이후에 복막, 근육층, 피부를 차례대로 블랙 실크(SK441, 4-0, 21 mm, 3/8C, 50 cm, (주)아이리, Korea)로

불합하였음. 위수술군인 Sham군은 난소를 절제하지 않았지만 같은 수술 과정을 진행함. 수술 직후 모든 실험동물의 감염을 예방하기 위하여 항생제(Gentamicin injection, ㈜동신제약, Korea)를 0.2 mg/kg 농도로 1회 근육 주사하였으며 골다공증 유도 기간은 2주를 두어 방치함 (Fig. 62)

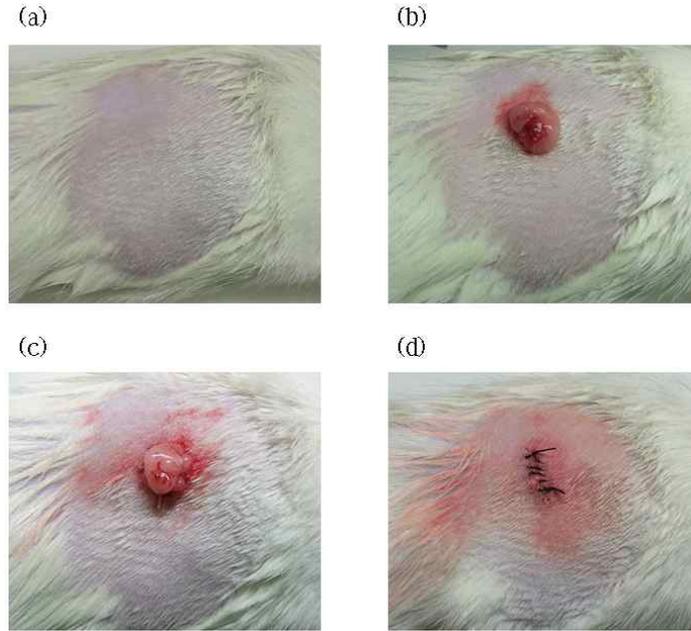


Fig. 62. 실험동물 난소절제술 단계

○ 실험동물의 신뢰성과 재현성을 확보하기 위해 모든 실험 그룹은 2주간의 순화 기간을 가진 뒤, 2주간의 골다공증 유도 기간을 거쳤으며, 난소는 제거하지 않았지만, 절개는 실시한 그룹(Sham군)과 골다공증을 유발시킨 그룹(Estrogen-deficient ovariectomized, OVX군), 그리고 골다공증 치료제인 Alendronate(ADN, 200 µg/kg)를 경구 투여한 그룹(ADN군)으로 나눔. 약물을 경구 투여한 그룹은 (1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg)으로 구분하여 경구 투여하였음. 약물은 생리식염수에 녹여 사용했으며, 투여 기간은 8주로 동일시 함(Fig. 9). 경구 투여를 각 그룹에 5마리씩 진행하고 무게가 비슷한 3마리를 선별하여 이후 실험을 수행함

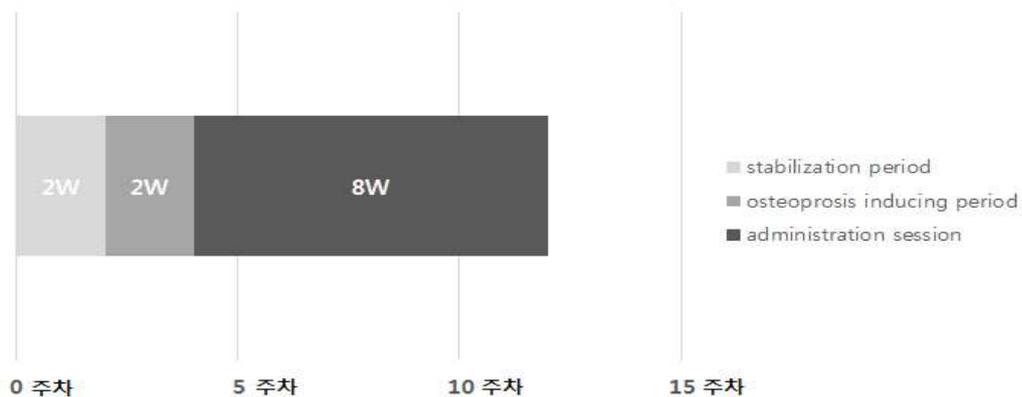


Fig. 63. 실험동물 난소절제술 디자인

○ 순화 기간(적응 기간, Acclimation period) 2주 뒤, 실험동물 SD-Rat에게 난소 절제술을 시행하고 2주간 골다공증 유도 기간을 가진 후 무게는 골다공증 유도 기간 2주와 이후 약물을 경구 투여한 8주간에 측정하였음. Sham군, OVX군, ADN군, 투여군의 10주간의 체중 변화를 일주일에 한 번씩 측정하여 기록함(Fig. 64)

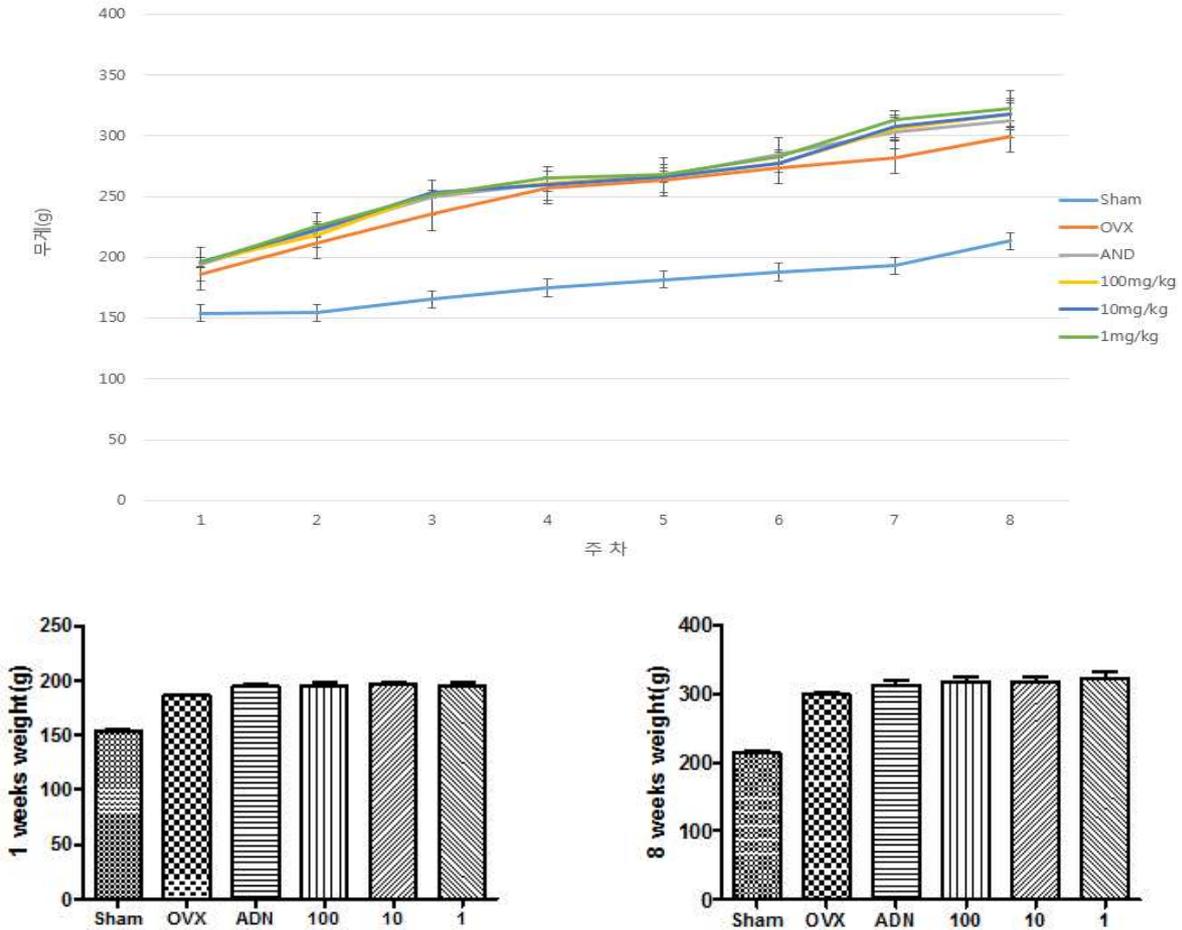


Fig. 64. Time course of body weight

- 난소절제술 후 8주간 약물을 투여하였으며 각 그룹간의 몸무게의 변화를 비교 관찰함. 몸무게는 매주 약물을 투여하기 전에 측정하였음. 1주차 투여 직전 난소절제술을 시행한 지 2주 된 실험군의 몸무게는 186.24 ± 1.85 g이었고, 위수술군의 몸무게는 154.13 ± 2.5 g이었음. 투여 시작 후 투여 종료(8주)까지 난소절제술군은 위수술군 그룹과 비교하여 몸무게가 증가 되는 것을 확인하였으나 난소절제술군에서 각 실험그룹들의 몸무게는 큰 차이가 없음을 확인함

○ 시료수집 및 보관

- 골다공증을 8주간 유도하였고 8주 째에 골다공증 확인을 위하여 모든 그룹의 쥐를 희생시켰음. 희생 전 모든 그룹에서 소변을 각 마리당 1-2 mL 씩 채취하였으며 채취한 소변은 eppen tube에 나눠 ice에 보관하였으며, 그 후 18시간 절식 시킨 후 dimethyl ether(sigma, USA)를 사용해 가스마취 시켰음. 마취시킨 쥐를 개복하여 하대정맥에 주사기

로 혈액을 약 10 mL 정도 채취하였고 채취한 혈액은 혈장(plasma)을 얻기 위해 채취한 즉시 5 mL을 EDTA blood collection tube에 넣어주고 즉시, 위아래로 흔들어준 뒤 1000 g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 이용함

- 또한 혈청(Serum)의 경우 채취한 혈액에서 conical tube 에 5 mL 넣고, 4 °C에서 밤새 응고 시킨 후 1000 g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 이용함. 혈액 채취가 끝난 다음 방혈하여 피를 모두 뺀 후 간과 신장을 적출하여 장기에 붙어있는 지방이나 근육은 깨끗이 제거하고 생리식염수에 조직을 세척하여 여과지로 수분을 제거한 후 4% PFA(paraformaldehyde, in phosphate-buffered saline;PBS, Sigma, USA)를 이용하여 고정하였음. 대퇴골은 적출 후 지방 인대, 근육 등의 부착물들을 제거 한 후 4% PFA 에 고정하였음

○ Urinary deoxypyridinoline(DPD), pyridinoline(PYD) 활성 확인

- 골흡수 지표로 알려져 있는 Urinary deoxypyridinoline(DPD), pyridinoline(PYD)는 골흡수 시, 콜라겐 분해에 의해 혈중으로 방출되어 체내에서는 거의 대사되지 않고 소변으로 배출되며 소변 중에 포함된 양은 식이에 거의 영향을 받지 않아 골흡수 지표로 특이성이 높다고 알려져 있으며, 본 실험에서는 Rat DPD, PYD ELISA Kit(Elabscience)을 이용하여 실험을 수행함 (Fig. 65)

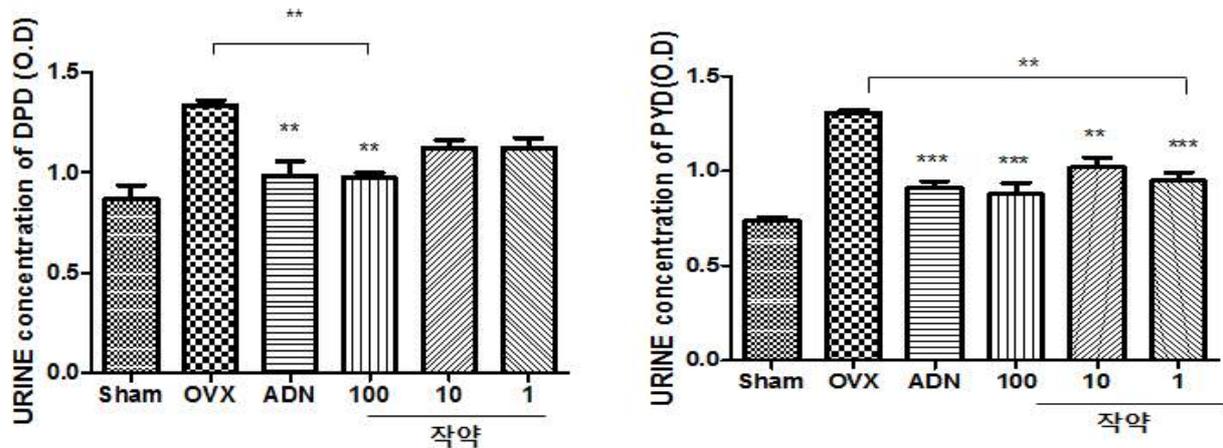


Fig. 65. 골흡수 지표로 알려진 DPD, PYD 측정을 통해 한방소재 물질의 작약 효과확인

- 채취한 Urine에서 DPD를 확인한 결과 OVX 군에서 약 1.51배±0.04 정도 증가되는 것을 관찰 하였고 골다공증 예방효과로 뛰어난 ADN 처리 후 DPD의 농도는 1.35배 감소하여 Sham 그룹과 비슷하게 줄어드는 것을 확인함. 또한 선별된 한방 소재의 작약을 100mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg 처리하여 확인한 결과 작약 100 mg/kg에서 DPD의 농도가 ADN만큼 감소되는 것을 확인함 (p<0.0005). PYD 또한 채취한 urine에서 확인한 결과 OVX군에서 약 1.85배±0.03 정도 증가되는 것을 관찰 하였고 ADN 처리 후 PYD의 농도가 감소하는 것을 확인하였으며 작약을 농도별로 처리한 결과 100, 10, 1 mg/kg에서 OVX와 비교하여 1.49, 1.3, 1.36배 감소하는 것을 확인함 (p<0.0001)

○Serum total alkaline phosphatase (ALP) 활성 확인

- ALP는 조골세포 분화 초기 마커로 알려져 있으며, 골아세포에서 분비되는 효소로 조골세포의 활성을 반영하지만 혈청 ALP의 반은 뼈에서 유리됨. 혈청샘플을 이용하여 Bone alkaline phosphatase(bALP)수치를 TRACP & ALP Assay Kit(Takara, Korea)를 사용하여 평가함 (Fig. 66)

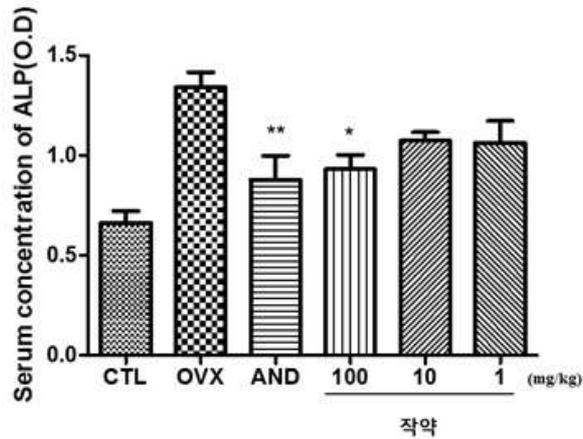


Fig. 66. 혈청에 유리된 ALP 측정을 통해 한방소재 물질의 작용 효과확인

- OVX 그룹에서 ALP의 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였고 ADN을 처리한 그룹에서는 혈청의 ALP 수준이 약 1.53배 정도 급격히 낮아지는 것을 확인 하였음. 또한 한방소재 물질 작용을 처리 하였을 경우 100 mg/kg에서 ADN 그룹만큼 혈청 ALP의 활성이 감소되는 것을 확인하였으나 작용 10 mg/kg, 1 mg/kg에는 큰 차이가 없는것으로 관찰됨

○ Serum Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 활성 측정

- TRAP의 경우 골 흡수단계 마커로 알려져 있으며, 각종 효소를 분비하여 골흡수를 일으키는 데, 이 중 acid phosphatase를 포함한다고 알려져있음. Acid phosphatase는 파골세포 이외에 전립선, 혈소판, 적혈구, 비장 등에 존재하는 리보솜 효소로 파골세포에 존재하는 효소인 L-tartrtae에 저항성이 있어 tatrte-resistand acid phosphatase라 함 (Fig. 67)

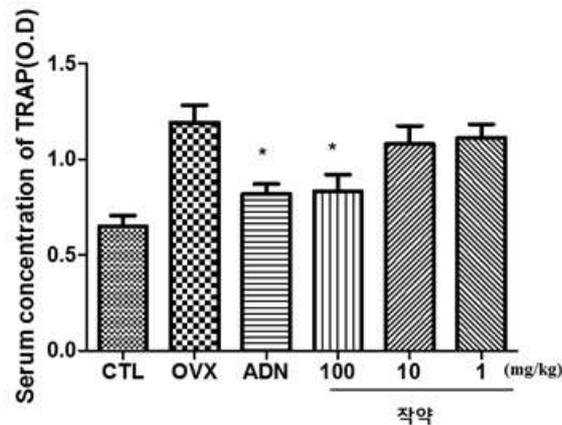


Fig. 67. 골흡수단계 마커자인 TRAP 측정을 통해 한방소재 물질의 작용 효과확인

- 파골세포 특이 효소인 TRAP 활성을 대조군과 비교 평가하였으며 OVX 그룹에서 TRAP의 활성도가 높게 나타나는 것을 확인 함. ADN를 처리한 그룹에서는 TRAP의 활성도가 약 1.38배정도 감소하였으며 한방소재 물질 작약을 처리 하였을 경우 100 mg/kg에서 ADN 그룹만큼 TRAP의 활성이 감소 됨. 그러나 작약 10 mg/kg, 1 mg/kg에는 큰 차이가 없는 것으로 확인되었음

○ 골흡수 관련 Osteocalcin 활성 측정

- 골아세포osteoblast의 두번째 특이적 마커는 오스테오칼신osteocalcin(OC)이며, 비콜라겐 뼈 기질 단백질non-collagenous bone matrix proteins의 약15%를 구성하고 있음. α-carboxylglutamic acid protein으로 알려진 OC는 작고 (5.9 kDa), 비타민 K-의존적인 hydroxyapatite (Ca²⁺)- binding protein으로, 골아세포에서 발현됨
- OC의 조직 특이적 발현은 골형성에 대한 전반적인 세포 활성의 훌륭한 지표가 됨. 이 단백질의 17, 21 및 24에 위치한 3 α-carboxylglutamic acid (Gla) 잔기들은 칼슘 결합을 담당 하며, 뿐만 아니라 OC 합성은 비타민 D와 비타민 K 양쪽에 의존적이며, 비타민K가 glutamic acid 잔기들의 α-carboxylation을 자극하는 동안 비타민 D는 직접적으로 OC 합성을 유도함. 골형성에서 OC의 정확한 기능은 잘 알려져 있지 않지만, 피드백 메커니즘을 통해 골 리모델링에 관여하는 것으로 추정됨(Fig. 68)

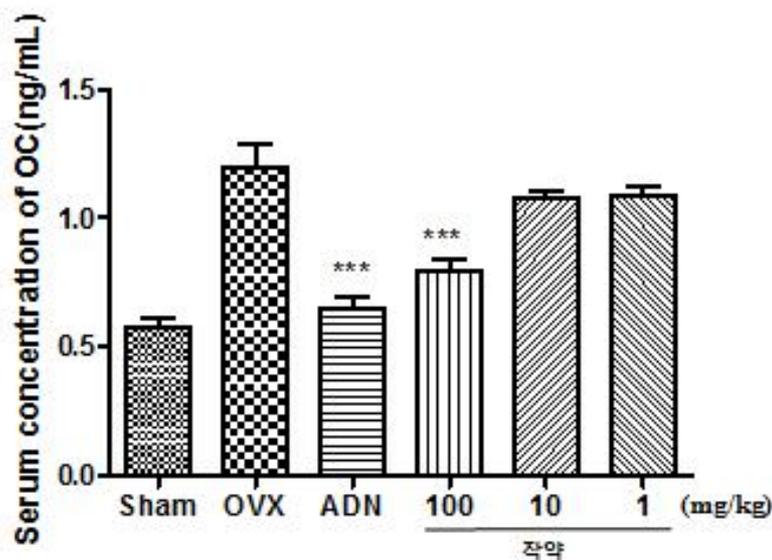


Fig. 68. 골아세포의 분화 관련 마커 OC 측정을 통해 한방소재 물질의 작약 효과확인

- OVX 그룹에서 osteocalcin(OC)의 활성도가 높게 나타나는 것을 확인함. ADN를 처리한 그룹에서는 OC의 활성도가 약 1.83배 정도 감소하였으며 한방소재 물질 작약을 처리 하였을 경우 100 mg/kg에서 ADN 그룹만큼 OC의 활성이 1.5배 감소 되는 것을 확인함. 그러나 작약 10 mg/kg, 1 mg/kg에는 큰 차이가 없는 것으로 관찰됨

○ 동물모델의 작약 투여 시 간 독성검사

- 전처리 하기 전에 조직 과정을 방해하는 고정액 주성분을 제거하기 위해 수집한 간과 신장 시료를 흐르는 물에 12시간 동안 충분히 수세(Washing)함. 조직 성분의 변형과 위축을 막기 위해 에탄올의 농도를 70%, 90%, 95%, 100% 순으로 점차 높여 탈수(Dehydration)를 수행함. 각 농도에서 1시간 처리하고, 에탄올 100% 농도에서는 2시간 처리한 후 조직을 에탄올과 자일렌(Xylen)(Sigma, USA)(1:1) 혼합액에 90분, 자일렌에 180분 동안 처리하여 투명(Cleaning) 과정을 거쳤으며 이후 액체 파라핀을 통해 4시간 동안 침투(Infiltration) 시키고, 포매(Embedding) 하였음. 마지막으로 조직 표본을 박절기(HM 315 microtome, Walldorf, Germany)를 이용하여 5 μ m 두께로 박절(Cutting) 하여 조직 절편을 만들었음
- 절삭된 조직 표본을 자일렌, 자일렌과 에탄올 (1:1) 혼합액, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 증류수에 걸쳐 탈파라핀, 재수화 시킴. 재수화 된 조직 표본은 사전에 필터 된 Harris 헤마톡실린(Simga, USA)에서 20분간 염색하였으며 염색 후 흐르는 물에 수세하여 과염색 된 헤마톡실린을 제거함. 조직 표본을 증류수에 다시 수세한 뒤, 1% acid-alcohol에 1~2번 담구어 세포질에 염색된 헤마톡실린을 제거 하였음. 핵만 염색된 것을 확인 한 후 0.3% 암모니아수에서 20초간 발청함. 발청 과정을 거친 조직표본은 에오신 에서 2분간 세포질을 염색하고 80% 에탄올에서 수세한 뒤 탈수과정을 거치고 자일렌으로 투명화 한 후 마운트 용액과 커버글라스를 이용해 조직을 밀봉한 후 현미경 관찰 함 (Fig. 69)

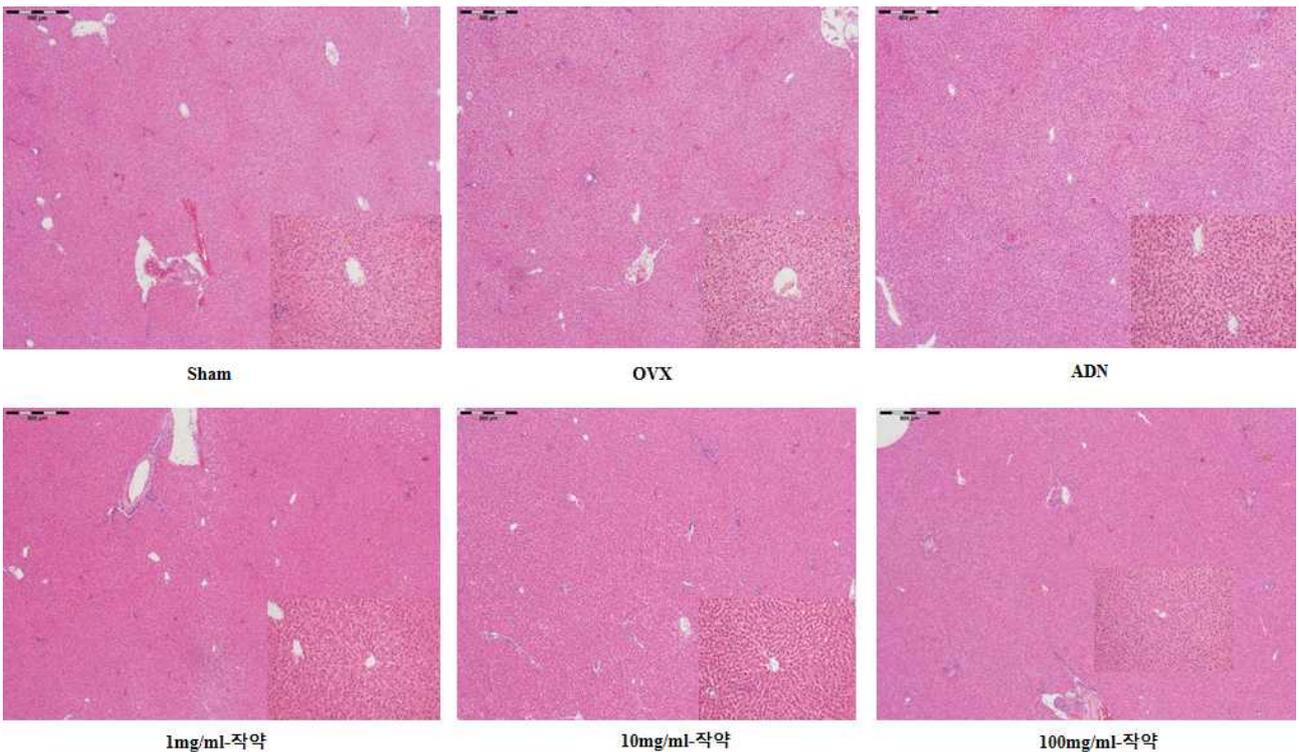


Fig. 69. 난소절제술에 작약을 처리한 후 간 독성 염색

- 난소절제술 수술 후 8주간 동안 ADN, 작약 100 mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg 투여를 마친 실험동물을 희생시킨 후 간을 분리하여 4% PFA 에 고정한 뒤 파라핀 포매한 뒤 조직 슬라이드를 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 수행함.
- 대부분의 만성간독성의 시작은 간세포 내에 지방이 축적되는 지방간으로 나타나며, 심한 경우 섬유화가 진행되는 일명 간경화가 되는데 이러한 변화가 모든 그룹들에서 관찰되지 않음을 확인하였으며, 급성간독성의 경우 중심정맥 주변에서 간세포가 괴사하는 일명 zone 3 necrosis, 간세포 사이에 염증세포침윤 소견이 보이거나 역시 관찰되지 않았음

○ 동물모델의 작약 투여 시 신장 독성검사

- 전처리하기 전에 조직 과정을 방해하는 고정액 주성분을 제거하기 위해 수집한 간과 신장 시료를 흐르는 물에 12시간 동안 충분히 수세(Washing)함. 조직 성분의 변형과 위축을 막기 위해 에탄올의 농도를 70%, 90%, 95%, 100% 순으로 점차 높여 탈수(Dehydration)를 수행함.
- 각 농도에서 1시간 처리하고, 에탄올 100% 농도에서는 2시간 처리한 후 조직을 에탄올과 자일렌(Xylen)(Sigma, USA)(1:1) 혼합액에 90분, 자일렌에 180분 동안 처리하여 투명(Cleaning) 과정을 거쳤으며 이후 액체 파라핀을 통해 4시간 동안 침투(Infiltration) 시키고, 포매(Embedding) 하였음. 마지막으로 조직 표본을 박절기(HM 315 microtome, Walldorf, Germany)를 이용하여 5 μ m 두께로 박절(Cutting) 하여 조직 절편을 만들었음
- 절삭된 조직 표본을 자일렌, 자일렌과 에탄올 (1:1) 혼합액, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 증류수에 걸쳐 탈파라핀, 재수화 시킴. 재수화 된 조직 표본은 사전에 필터 된 Harris 헤마톡실린(Simga, USA)에서 20분간 염색하였으며 염색 후 흐르는 물에 수세하여 과염색된 헤마톡실린을 제거함. 조직 표본을 증류수에 다시 수세한 뒤, 1% acid-alcohol에 1~2번 담구어 세포질에 염색된 헤마톡실린을 제거하였음
- 핵만 염색된 것을 확인 한 후 0.3% 암모니아수에서 20초간 발청함. 발청 과정을 거친 조직 표본은 에오신 에서 2분간 세포질을 염색하고 80% 에탄올에서 수세한 뒤 탈수과정을 거치고 자일렌으로 투명화 한 후 마운트 용액과 커버글라스를 이용해 조직을 밀봉한 후 현미경 관찰함 (Fig. 70)

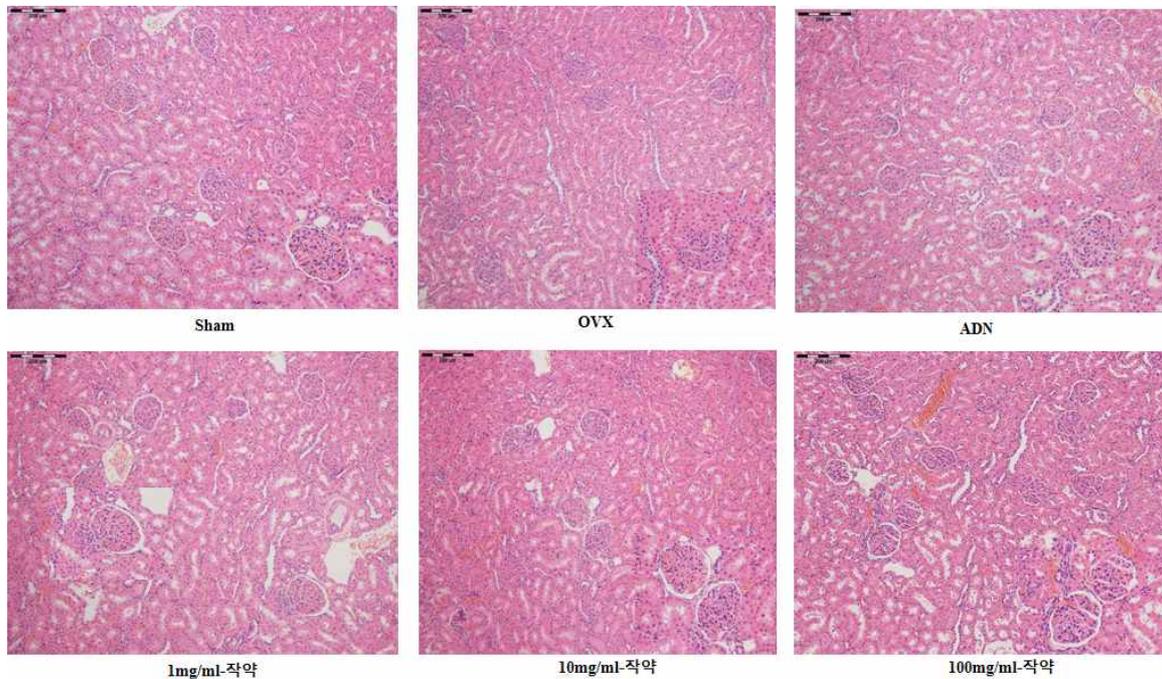


Fig. 70. 난소절제술에 작약을 처리 한 후 신장 독성 염색

- 난소절제술 수술 후 8주간 동안 ADN, 작약 100 mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg 투여를 마친 실험동물을 희생시킨 후 신장을 분리하여 4% PFA 에 고정한 뒤 파라핀 포매한 뒤 조직 슬라이드를 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 수행함. 대부분의 신장독성은 세뇨관괴사나 세뇨관 및 사구체 내로의 염증세포 침윤으로 확인되나 이러한 변화가 모든 그룹들에서 관찰되지 않음

○ 대퇴골의 미세전산 단층 촬영 및 분석

- 4% PFA에 의해 고정이 온전히 이루어진 대퇴골을 고해상도 미세 전산 단층 촬영기 (Three-dimensional micro focus computed tomography; micro-CT, Sky-Scan 1176, Skyscan, Kontich, Belgium)를 사용하여 촬영함.
- 촬영할 때 X-ray 열에 의해 마르는 것을 방지하기 위해 일반 비닐 랩으로 시료를 감쌌으며 X-ray 정렬은 해당 기계 소프트웨어 자체 정렬 시스템으로 하였고, 프로그램 설정은 2000×1336(medium), 카메라 초점은 18 μ m, 필터는 1 mm Aluminium으로 설정함. 대퇴골 스캔하고 분석 소프트웨어(CT-analyzerTM, Skyscan, Kontich, Belgium)를 사용함. 모든 시료들은 해부학적 구조가 동일하게 정렬하고, 성장판에서 1.8 mm 떨어진 부분에서 2.2 mm 의 두께를 범위를 잡아 분석함
- 분석은 해면골(Sponge bone, 소주골)을 분리하고 지정하여 무기질화된 소주골 체적에 대한 총 체적 비율(Bone volume/Total volume, BV/TV), 소주골의 두께(Trabecular thickness), 소주골의 수(Trabecular numbers) 자료 평균을 가지고 산출하였고, 대퇴골의 2차 단면 이미지와 3차 입체 이미지를 생성함(Fig. 70)



Source	Condition
X-ray voltage	70 kV
X-ray current	300 μ A
Filter	Al 1 mm
Image pixel size	18 μ m
Camera resolution	High
Tomographic rotation	180°
Rotation step	0.4°
Frame averaging	4

Skyscan 1176

Fig. 70. Micro Computed Tomography Scan 분석

- 난소절제수술 후 8주 모델에 골다공증 치료제인 ADN와 한방소재 물질 작약을 투여 후 효과를 분석함. 각 동물모델을 희생시킨 뒤 대퇴골을 분리하여 4% PFA 고정 후 Skyscan 1176 을 이용하여 미세전산 단층 촬영 및 분석을 실시함. 골다공증 치료제인 ADN은 골다공증 유발 후 8주 모델 모두에서 효과를 나타내었음. 2차년도 파골세포에서 한방소재 물질인 작약을 처리 하였을 때 골다공증 예방효과가 있음을 확인하였음. 골다공증 유발한 동물 모델에서도 마찬가지로 작약을 8주간 100 mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg 씩 투여한 결과 대조약물인 ADN과 비교함 (Fig. 71)

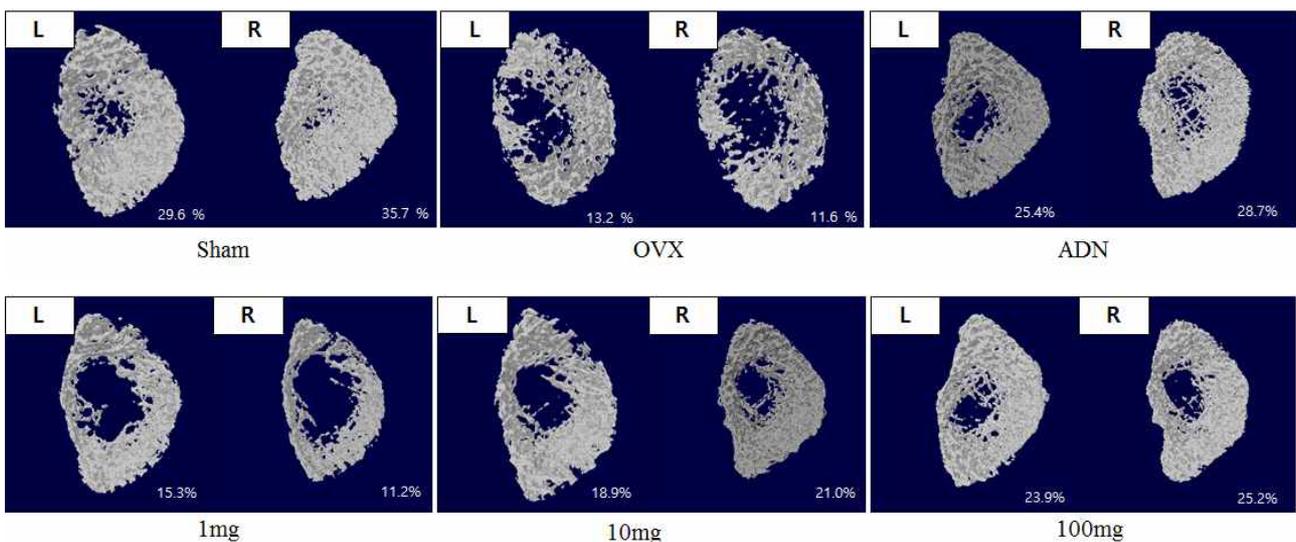
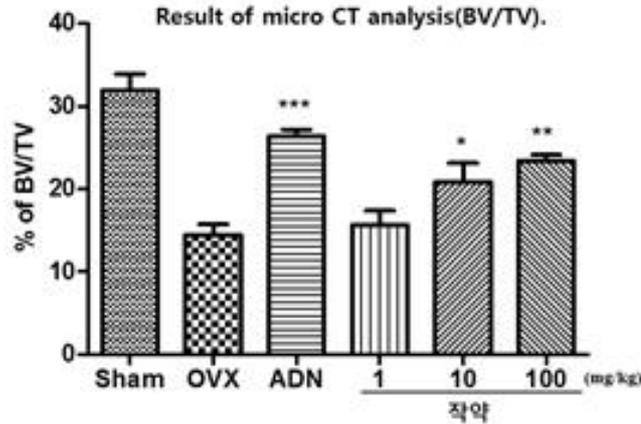


Fig. 71. 작약을 처리한 대퇴골 micro-CT 촬영



- 위수술군(Sham) 분석결과 뼈 부피(bone volume(BV)/ tissue volume(TV))가 왼쪽 대퇴골에서는 $29.6 \pm 5.28\%$ 이고, 오른쪽 대퇴골의 경우 $35.7 \pm 3.23\%$ 였으며, 난소절제술 수술(OVX)군에서 왼쪽 대퇴골에서는 $13.2 \pm 2.93\%$ 이고, 오른쪽 대퇴골의 수치는 $11.6 \pm 3.38\%$ 임을 확인함
- 또한 골다공증 치료제로 알려져 있는 Aledronate(ADN)은 왼쪽대퇴골의 경우 $25.4 \pm 1.67\%$ 이고, 오른쪽 대퇴골에서는 $28.7 \pm 1.67\%$ 수치가 나타남. 뼈 부피(BV/TV)가 ADN의 처리하였을 시 Sham만큼 증가되는 것을 확인하였음
- 작약 1 mg/kg 투여한 결과 왼쪽 대퇴골에서는 $15.3 \pm 4.25\%$ 이고, 오른쪽 대퇴골의 경우 $11.2 \pm 3.16\%$ 였음. 작약 10 mg/kg를 투여한 결과 왼쪽 대퇴골에서 $18.9 \pm 3.24\%$ 이고, 오른쪽 대퇴골의 경우 $21.0 \pm 4.26\%$ 였음
- 작약 100 mg/kg를 투여한 결과 왼쪽 대퇴골에서 $23.9 \pm 3.78\%$ 이고, 오른쪽 대퇴골은 $25.2 \pm 3.45\%$ 였음. 골 밀도를 측정한 결과 골다공증을 유발한 군에서는 뼈 부피가 감소되는 것을 확인하였으며 양성대조군이며 골다공증 치료제로 알려진 ADN를 처리한 결과 Sham그룹 만큼 뼈 부피가 증가되는 것을 관찰하였음
- 2차년도 결과에서 골다공증 치료제로써의 효과를 보인 한방소재 후보물질인 작약을 농도별로 처리한 결과 1, 10mg/kg에서 뼈 부피는 ADN만큼 수치가 증가되는 것을 관찰할 수 없었음. 작약 100 mg/kg를 투여 했을 때 대조 양성군인 ADN만큼 뼈 부피의 수치가 증가 되는 것을 확인하여 작약 100 mg/kg가 골다공증치료제로써의 가능성이 있음이 사료됨

○ 작약 추출물 경구 투여시 Tb.N(개수) 측정

- 소주골 수(Tb.N)을 측정함으로써 소주골의 수가 적을수록 뼈 파괴가 증가 하며 소주골의 수가 많을수록 뼈 파괴가 적음. 한방소재 물질 작약 100 mg/kg 투여가 ADN 만큼 골형성에 영향을 미치는 것을 확인함(Fig. 72)

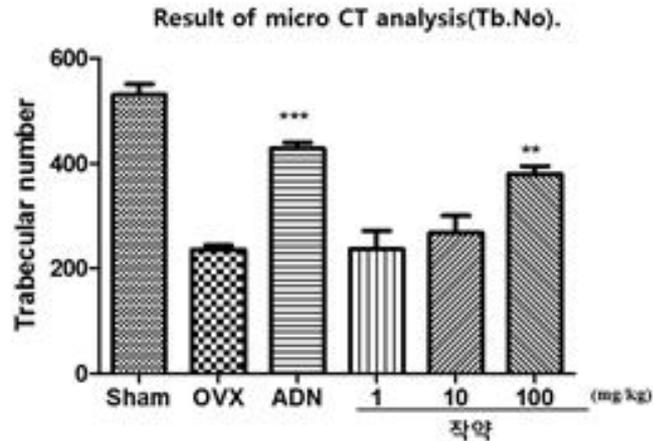


Fig. 72. 작약을 처리한 난소절제술군에서 소주골의 개수

- 위수술군의 소주골 수는 대략 580개로 나타났으며 이에 반해 난소절제술군에서 소주골의 수는 약 254개로 현저히 감소됨을 확인하였음. 양성대조군으로 알려진 ADN을 처리한 결과 소주골의 수는 약 436개로 증가하는 것이 관찰됨. 한방소재 물질인 작약 추출물을 농도별로 처리한 결과 각 소주골의 수가 1, 10 mg/kg에서는 큰 변화가 없었으나 100 mg/kg에서는 약 383개로 ADN 군만큼 소주골의 수가 증가하는 것을 확인함. 이로 인해 한방소재 물질 작약 100 mg/kg 투여가 ADN 만큼 골형성에 영향을 미치는 것을 확인함

○ 작약 추출물 경구 투여 시 Tb.Th(두께) 측정

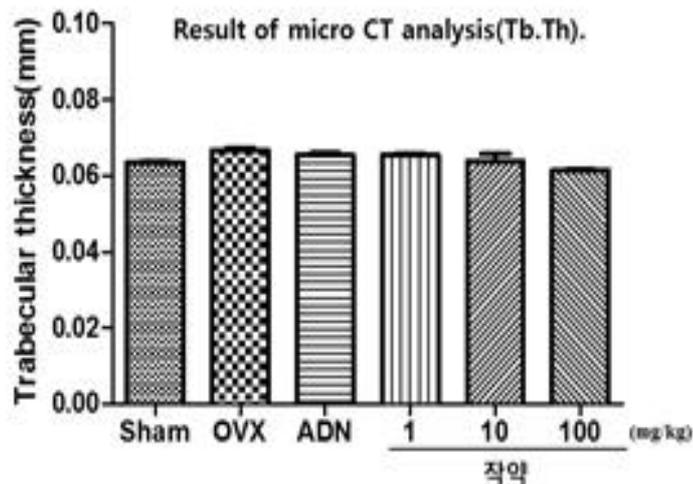


Fig. 73. 작약을 처리한 난소절제술군에서 소주골의 개수

- 작약 경구투여 시, 모든 그룹에서의 소주골 두께(Tb.Th) 측정결과가 최소 0.066667 ± 0.007638 , 최대 0.069333 ± 0.004163 값으로 유사한 값을 보였음 (Fig. 73)

○ 대퇴골의 TRAP 염색

- 조직표본의 파라핀을 제거하고 재수화 시켜준 뒤 37 °C의 basic stock solution (sodium acetate; 112 mM, sodium tartrate; 50 mM, pH 4.9, in distilled water, Sigma, USA)에 Naphthol AS-BI phosphate substrate; 44 mM (in 2-Ethoxyethanal, Sigma, USA)을 첨가하여 1 시간동안 오븐에서 반응시킴
- 반응 후 basic stock solution에 sodium nitrate solution (470 mM, Sigma, USA) 과 pararosaniline dye solution (164 mM, in 2 N HCl, Sigma, USA)을 동일 비율로 섞은 용액을 넣고 12분간 37 °C에서 염색함. 염색된 조직표본을 증류수로 수세한 뒤 0.02% Fast green (in distilled water, Sigma, USA)로 대조염색한 후 재탈수, 투명화 과정을 거친 후 마운트용액과 커버글라스를 이용해 밀봉함 (Fig. 74)

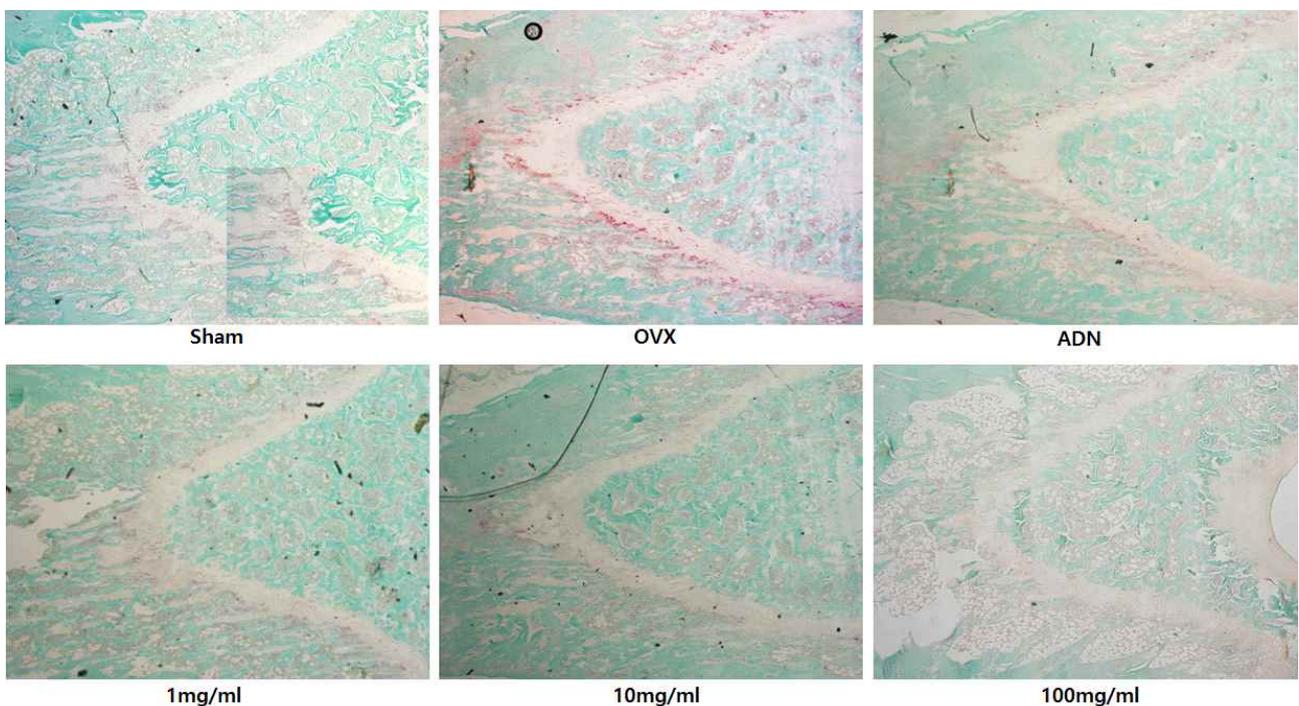


Fig. 74. Histological observation of femur TRAP Stain

- 조직표본을 TRAP 염색 하여 TRAP 활성을 갖으며 다핵을 형성하는 파골세포를 광학현미경을 이용해 40×, 200× 배율로 관찰함(Fig. 21). 성장판 밑의 다핵을 갖으며 붉게 염색된 세포의 단위부피(mm⁻¹)당 수를 세었음.
- 위수술군은 6.3±1.2개의 파골세포가 관찰되었으며 (p<0.001), 난소절제술-위약투여군은 23±4.6개의 파골세포가 관찰되었음. ADN 200 μg/kg 투여군은 8±2개의 파골세포가 관찰되었고(p<0.01), 약 농도별로 처리 시 1 mg/kg에서 22.3±2.7개, 10 mg/kg 에서 15.3±1.3개, 100 mg/kg 에서 10.3±1.4개의 파골세포가 관찰됨(p<0.05)

◎ 협동연구기관 3 (단국대 동물자원학과 김철현 교수)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	• 단백질 분해 효소의 작용 조건에 따른 유단백질 가수분해 특성	• 효소 작용 조건에 따른 유단백질 가수분해율 측정	• 단백질 가수분해 효소 선발 및 단백질 가수분해도(DH; %) 측정	• 10% WPC solution에 1%(w/w, 단백질 기준)으로 효소를 첨가하여 210분동안 30분 간격으로 가수분해도(DH; %)를 확인한 결과, Alcalase 2.4 L의 가수분해도가 타 효소보다 우수하였으며, 전기영동을 통하여 가수분해물의 mw 및 가수분해 정도를 확인함
		• SDS-PAGE를 통한 가수분해 유단백질 profile 조사	• SDS-PAGE를 통한 유단백질 가수분해물 profile 조사	• SDS-PAGE를 이용하여 10% WPC solution 가수분해물의 전기영동을 통한 pattern을 확인한 결과, 가수분해도가 높을수록 BSA, α-LA, β-LG의 분해도가 증가하는 경향을 보였으며, 선발 효소 중 Alcalase가 가장 우수함 • 추후 최적 효소처리 조건 설정 완료를 통해 가수분해율을 높힐 예정
	• 최적 효소 처리 조건 설정	• pH, 온도 및 효소량에 따른 유단백질 함량 및 가수분해율 측정을 통한 최적 처리 조건 설정	• 선발 가수분해 효소의 최적 pH, 온도 및 효소량 설정을 통한 최적 처리조건 설정	• 선발된 단백질 가수분해 효소의 최적 pH 및 온도 설정은 Table. 4.와 같이 최적 조건 설정을 완료하였으며, 추후 효소첨가량에 따른 가

				수분해율 변화 및 복합효소처리를 통한 유단백질 가수분해율 변화를 SDS-PAGE를 통해 확인하여 최적 효소 처리 조건 설정 완료
2차 년도 (2017)	• 유단백질 가수분해물의 정제된 분리물에 대한 기능성 검증	• 유단백질 가수분해물의 분리 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> • Gel filtration을 이용한 유단백질 가수분해물 분리 • HPLC를 이용한 유단백질 가수분해물의 정제 	<ul style="list-style-type: none"> • FPLC에서 Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 HR column을 이용하여 유단백질 가수분해물을 100 μL로 분리한 결과 Alcalase 2.4L의 가수분해물은 총 Fraction 1~7, Neutrase는 Fraction 1~5로 나타남 • HPLC를 이용한 유단백질 가수분해물의 정제를 통해 아미노산 구성을 확인함
		• 유단백질 가수분해물의 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 유단백질 가수분해물의 칼슘 가용화능 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 유리칼슘함량 측정 실험을 진행한 결과 기존 상용화된 CPP보다 높은 칼슘 가용화능을 보이는 분획물은 나타나지 않음 • 그러나, CPP 대비 분획물 제조 원가가 더 저렴하여 향후 가격 경쟁력을 확보 가능할 것으로 판단됨
		• 유단백질 가수분해물의 항염 효과 측	• ELISA kit(TNF- α , IL-1, IL-6)를 이용	

			<p>정(ELISA)</p> <ul style="list-style-type: none"> 유단백질 가수분해물의 항산화능 측정 (DPPH, ABTS, Frap assay 등) 	<p>한 RAW cell의 항염 효과를 측정을 위해 세포독성실험 (MTT assay) 및 NO assay를 진행한 결과 가수분해물의 분리물의 분자량이 작아질수록 항염효과가 증가하는 경향을 확인하여 진행중인 ELISA kit에 대한 추후 결과를 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> 유단백질 가수분해물의 분획물에 대한 각각의 항산화능 (ABTS, Frap, Hydroxyl assay)을 측정한 결과 Alkalase에 Fraction 6에서 가장 높은 항산화능을 보임
	<ul style="list-style-type: none"> 칼슘 흡수 촉진 유 펩타이드 생성 발효 균주 개발 및 기초생리활성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 후보 발효균주의 기초생리활성을 통한 발효균주 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 후보 발효균주의 기초생리활성(내산성, 담즙산내성, β-galactosidase, 단백질 분해능)을 통한 1차선발 1차 선발균주의 유단백질 정량, 펩타이드 농도 및 가용성 칼슘 변화량 측정을 통한 2차 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 후보 발효균주의 기초생리활성 실험을 진행한 결과 총 10종의 유산균을 1차 선발함 1차 선발균주의 유단백질 정량 및 펩타이드 농도 및 가용성 칼슘 변화량을 측정한 결과 총 3종의 유산균을 선발
3차년도 (2018)	<ul style="list-style-type: none"> 칼슘 흡수 촉진 유 펩타이드 생성 발효 균주 	<ul style="list-style-type: none"> 후보 발효균주의 유단백질 정량 및 펩타이드 농도 측정을 통한 발효균주의 최종 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 유단백질 정량 및 Free-amino nitrogen 측정과 Non-protein nitrogen 측정을 통 	<ul style="list-style-type: none"> 1차 선발균주의 유단백질 정량 및 FAN, NPN을 통한 3종의 발효균주 선발 완료(DK 109(L.

최종선발		한 발효균주의 최종 선발	<i>plantarum</i> , DK 121(<i>L. paracasei</i>), DK 128(<i>L. casei</i>)
<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주의 최적 배양 조건 및 제품 적용성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 최적 배지 성분 조성 및 최적 배양조건 설정과 제품 적용성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC 및 TLC를 이용한 최적 배지 성분 조성 설정과 발효균주의 성장변화 탐색을 통한 제품 적용성 검증 및 최적 배양조건 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 균주 1종의 HPLC 및 TLC를 이용한 최적 배지 설정과 성장변화 탐색을 통한 배양조건 설정
<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주의 기능성 검증을 통한 최종 발효균주 선발 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주 3종의 항염 효과 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주 3종의 세포독성 및 NO 생성량 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효균주 3종의 MTT, NO 측정을 통한 세포 독성 및 NO생성량 검증
	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주 3종의 항산화능 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주 3종의 항산화능 측정 (ABTS, DPPH, Hydroxyl radical scavenging assay) 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효균주 3종의 상용균주 대비 항산화능 검증
	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주 3종의 가용성 칼슘변화량 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주 3종의 가용성 칼슘변화량 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효균주 3종의 가용성 칼슘 변화량 검증
<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 발효패턴 및 기능성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 발효시간별 pH, T·A, 생균수 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 발효시간별 pH, T·A, 생균수를 측정하여 발효패턴 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 발효패턴 탐색을 통한 제품으로서의 가능성 검증 완료
	<ul style="list-style-type: none"> • 개발 발효유 및 발효유음료의 항염효과 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 항염효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 항염효과 측정을 통한 기능성 검증 완료
	<ul style="list-style-type: none"> • 개발 발효유 및 발효유음료의 가용성 칼슘변화량 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 가용성 칼슘변화량 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효유 및 발효유음료의 칼슘함량 측정을 통한 기능성 검증 완료

■ 단백질 분해 효소의 작용 조건에 따른 유단백질 가수분해 특성

○ 단백질 분해 효소 선발

- 우유 유래 단백질 가수분해물 제조를 위해 기질(casein, whey protein)의 가수분해 효소는 식품제조에 사용이 가능한 상업용 protease인 Flavourzyme, protamex, Neutrase, Alcalase 및 Pepsin을 기질의 1%(w/w, 단백질 기준) 첨가하여 최적 pH 및 온도로 설정하여 3h 반응 후 DH(Degree of hydrolysis; %)값을 확인하여 기질 가수분해도를 측정함

Table. 1. Protein hydrolysis enzymes

Enzymes	Origin	Temperature (°C)	pH	E/S ratio	Manufacturer
Protamex	<i>Bacillus sp.</i>	50-55	6.0-7.5	1/100	Novozymes, Denmark
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	45-55	4.5-7.5	1/100	Novozymes, Denmark
Neutrase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	50-55	6.0-7.0	1/100	Novozymes, Denmark
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6.5-8.5	1/100	Novozymes, Denmark
Pepsin	porcine gastric mucosa	37	2.0	1/100	Sigma, U.S.A

Table. 2. Absorbance of Casein and Whey protein Hydrolysis treated 3 hours by various proteolytic enzymes

Substrate	Control	Pepsin	Alcalase	Neutrase	Protamex	Flavourzyme
Casein	0.207 ±0.0064	0.205 ±0.0019	0.166 ±0.0034	0.234 ±0.0031	0.254 ±0.0127	0.210 ±0.0113
Whey protein	0.305 ±0.0037	0.276 ±0.0026	0.195 ±0.0049	0.262 ±0.0036	0.381 ±0.0164	0.272 ±0.0098

*Casein : Casein from bovine milk (Sigma, U.S.A)

*Whey protein : Whey protein concentrate - 80 (Marquez bros. Int, U.S.A)

*Absorbance is determination about TNBS assay using UV/Vis spectrophotometer(Δ340nm)

○ 개발 제품(우유)의 첨가 가수분해물 기질 선발

- 우유 유래 단백질 가수분해물 제조를 위해 WPC-30, WPC-60, WPC-80, Casein from bovine milk, WPC-80(Whey protein concentrate-80, U.S.A)을 구매하여 각각 개발 제품(우유)의 적용 가능성(용해도, 기능성, 제품 안정성 및 공정 가능 기질 등) 검토를 통해 2차년도 개발 예정인 가수분해물 첨가 제품의 기질을 선발함

Table. 3. Whey protein concentrate (WPC-80) certificate of analysis

Chemical	contents (%)	Method
Protein (Dry basis)	62.08	Kjeldahl, APHA
Moisture	1.55	Vacuum Oven, APHA
Fat	5.80	Mojonnier, APHA
pH	6.45	5% solution

○ 단백질 가수분해물 제조

- 우유 유래 단백질 가수분해물 제조하기 위해 10% WPC-80 solution을 제조함. 10% WPC-80 solution은 앞선 검토를 통해 선발 된 WPC-80(Whey protein concentrate-80, U.S.A)를 Fig. 2.과 같은 방법으로 멸균 정제수에 10% (w/v)으로 배합하여 배합, 살균 및 냉각 과정을 거쳐 제조 후 4 °C에서 보관하며 7일 이내로만 가수분해물 제조 시료로 사용함
- 가수분해물 제조시 주관기관인 (주)유담 보유 배양기에서 제조가 가능하도록 10% WPC-80 solution 제조 공정을 설계하였으며, 살균 공정 중 whey protein은 같은 우유 유래 단백질인 casein에 비해 낮은 온도에서 열변성이 쉽게 일어나므로 적절한 살균조건을 설정하기 위해 Lab.scale상의 살균 방법을 기준으로 65, 80 및 95 °C에서 각각 30, 15, 5분 살균을 진행하였음

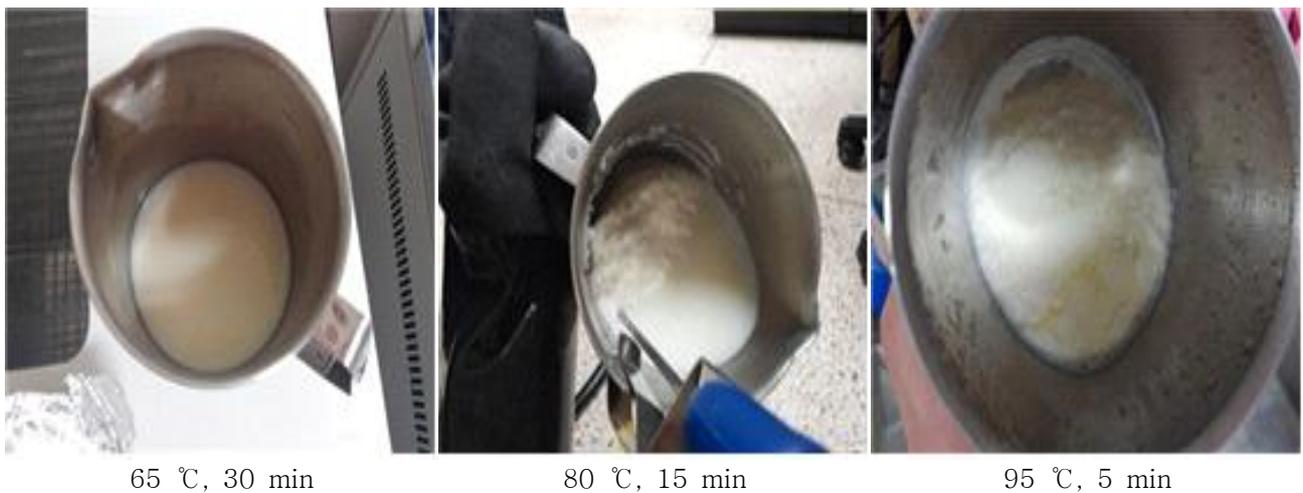


Fig. 1. Denaturation protein according to sterilization conditions of 10% WPC-80 solution

- Fig. 1.에서 보는 바와 같이 65 °C에서 30분간 살균한 처리군을 제외한 2가지 살균 조건은 whey protein의 열변성에 의해 응고가 일어남을 관찰할 수 있음. LTLT(65 °C, 30min) 살균법을 제외한 살균방법은 추후 제조공정에 있어 큰 문제점으로 작용할 것으로 사료되며 가수분해물의 제품적용 시 다음과 같은 살균 공정을 설정할 예정임

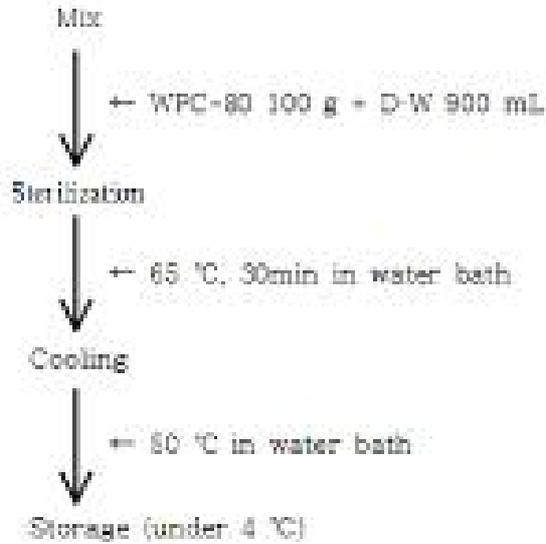


Fig. 2. Process for 10% whey protein solution of WPC-80

○ 단백질 가수분해 효소 조건 설정

- 단백질 가수분해 효소 조건은 Table.4.의 조건으로 설정하여 진행하였으며, 기질은 WPC-80을 사용함. 또한, Pepsin의 경우 최적 pH 조정 중 pH가 낮아짐에 따라 WPC의 단백질 응집현상으로 인하여 제품 적용성에 문제가 있음으로 판단되어 총 4개의 가수분해 효소로 가수분해물을 제조함

Table. 4. Condition of the whey protein solution hydrolysis enzymes

Enzymes	Origin	Temperature (°C)	pH	E/S ratio	Manufacturer
Protamex	<i>Bacillus sp.</i>	50	7.0	1/100	Novozymes, Denmark
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	50	7.0	1/100	Novozymes, Denmark
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	7.0	1/100	Novozymes, Denmark
Neutrase	<i>Bacillus amyoliquefaciens</i>	50	7.0	1/100	Novozymes, Denmark

- 가수분해 효소의 최적 pH 설정은 1 N-NaOH로 적정하였으며 기질은 Fig. 1.과 같은 방법으로 10% whey protein solution을 제조하여 실험에 사용하였음. E/S ratio는 단백질 기준 1% (w/w) 비율로 첨가하여 가수분해를 240분간 반응하며 30분 간격으로 가수분해도 (DH; %)를 측정함(Fig. 3.)

$$DH(\%) = h/h_{hot} \times 100$$

h : 가수분해시 생성된 α-amino group protein의 농도 (meqv/g)

h_{hot} : 단백질 1g 당 아미노산의 농도 (meqv/g)

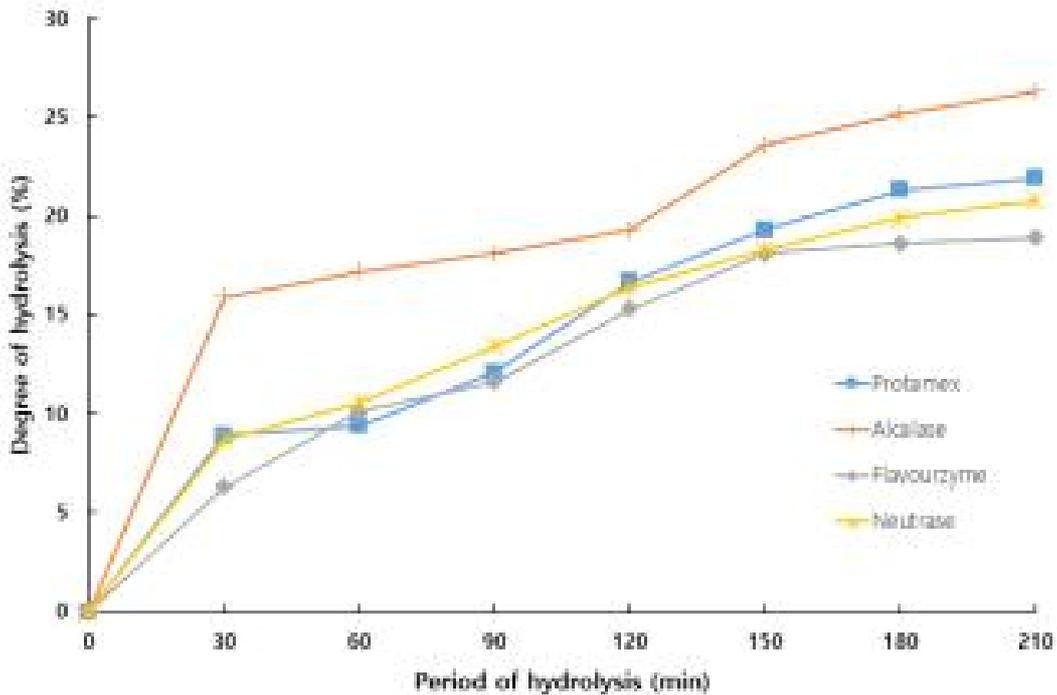


Fig. 3. Changes in degree of hydrolysis (DH) of the whey protein solutions during hydrolysis by various proteolytic enzymes

*Reactions were carried out in a water bath at 50°C

*All enzymes were applied at the concentration of 1 : 100 (w/w, protein) to the solution

○ SDS-PAGE를 통한 단백질 가수분해물의 profile 조사

- 10% WPC-80 solution의 시간대별 가수분해물의 분자량 분포를 확인하기 위하여 LaemmLi의 방법에 따라 SDS-PAGE에 의해 측정함. 분자량 측정은 240분동안 30분 간격으로 효소반응 종료 후 15% acrylamide gel을 제조하여 전기영동 후 gel을 염색, 탈색하였음. 분자량 측정을 위한 표준단백질(marker)로는 Precision Plus Protein Dual Xtra standards(Bio-Rad, U.S.A)를 사용함

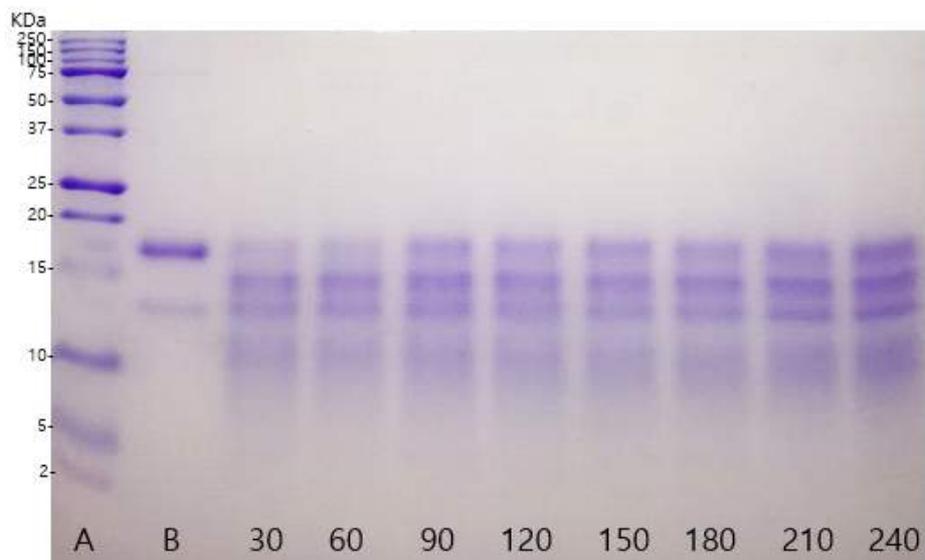


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of 10% WPC-80 solution hydrolyzed with protamex at 50 °C for each times
 *protamex : Protamex (Novozymes, Denmark)
 *A : Precision plus protein dual xtra standards (Bio-rad, U.S.A)
 *B : 10% WPC-80 solution after pasteurization(65 °C, 30 min)

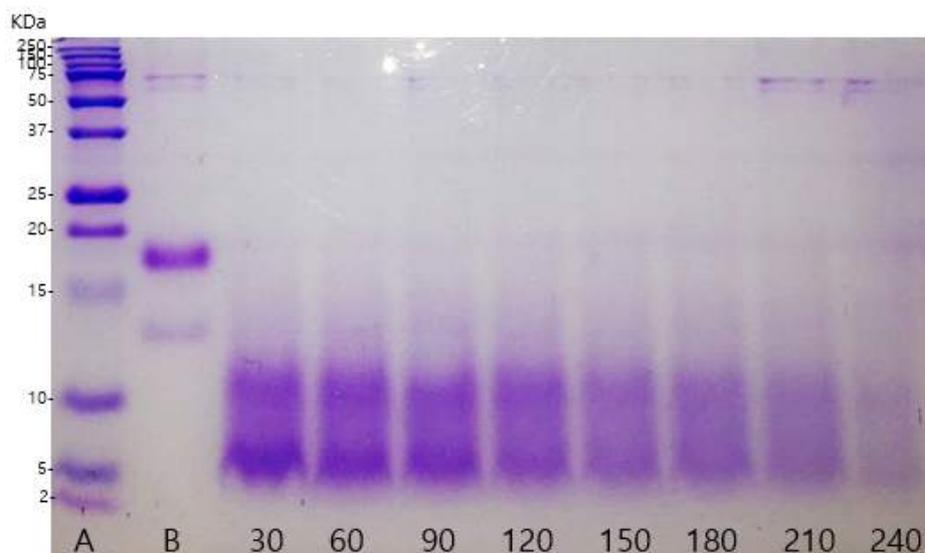


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of 10% WPC-80 solution hydrolyzed with alcalase at 50 °C for each times
 *alcalase : Alcalase 2.4L (Novozymes, Denmark)
 *A : Precision plus protein dual xtra standards (Bio-rad, U.S.A)
 *B : 10% WPC-80 solution after pasteurization(65 °C, 30 min)

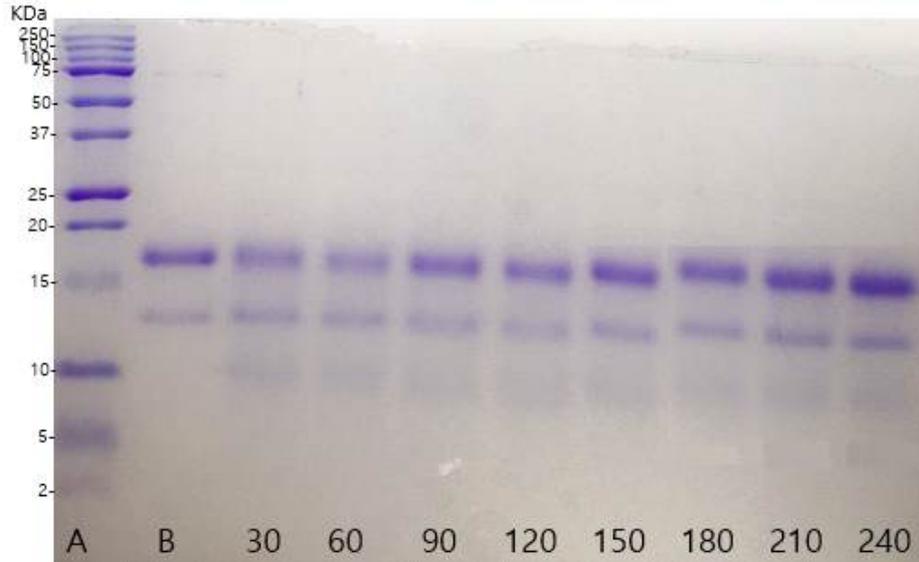


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of 10% WPC-80 solution hydrolyzed with flavourzyme at 50 °C for each times
 *flavourzyme : Flavourzyme (Novozymes, Denmark)
 *A : Precision plus protein dual xtra standards (Bio-rad, U.S.A)
 *B : 10% WPC-80 solution after pasteurization(65 °C, 30 min)

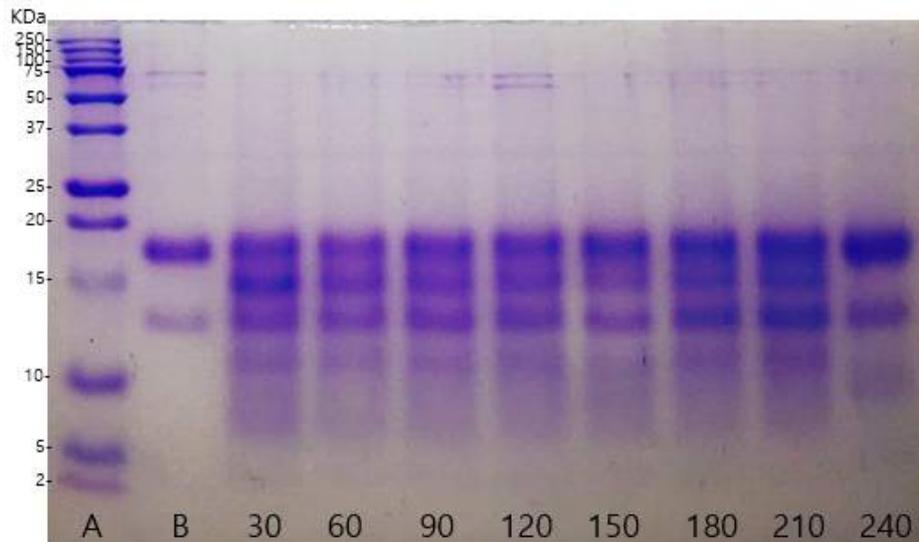


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of 10% WPC-80 solution hydrolyzed with neutrase at 50 °C for each times
 *neutrase : Neutrase 0.8L (Novozymes, Denmark)
 *A : Precision plus protein dual xtra standards (Bio-rad, U.S.A)
 *B : 10% WPC-80 solution after pasteurization(65 °C, 30 min)

- Fig. 4~7.과 같이 전기영동을 이용하여 SDS-PAGE pattern을 확인해 보았으며, Alcalase 2.4L를 이용한 10% WPC-80 solution의 가수분해물의 각 시간대별 pattern은 Fig. 5.에서 나타난 바와 같이 BSA, α -LA 및 β -LG는 반응시작 후 신속하게 가수분해되어 반응종료시간인 240분에서는 완전히 가수분해됨. 이는 Fig. 3.의 가수분해도(DH; %)와 측정값과 비례

적으로 나타남

- Fig. 4.와 7.에서 보이는 바와 같이 Protamex와 Neutrase의 경우 α -LA와 β -LG 사이의 약 15kDa에서 특이적으로 가수분해물이 관찰됨. 이에 추후 gel filtration을 통하여 그 기능성 및 구조를 확인할 예정임
- 다음과 같은 결과를 바탕으로 추후 효소 첨가량 변화에 따른 가수분해율(DH, %) 및 복합 효소 처리를 통한 가수분해도 변화 pattern을 분석하여 최적 효소처리 조건 설정 완료 후 주관기관에서 대량생산공정에 적용할 예정임

■ 유단백질 가수분해물의 분리 및 정제

○ Gel filtration을 이용한 유단백질 가수분해물 분리

- Alcalase 2.4L, Neutrase 0.8L를 이용한 10% WPC-80 solution 각각의 가수분해물을 제조하여 전기영동을 통한 SDS-PAGE pattern을 확인한 후 Fig. 8, Fig. 9로 나타내었으며 이를 토대로 FPLC를 이용한 Gel filtration을 진행함

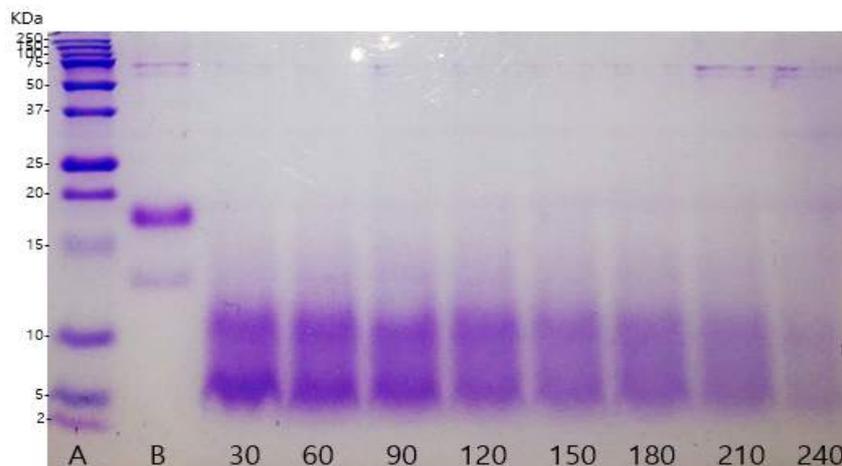


Fig. 8. SDS-PAGE patterns of 10% WPC-80 solution hydrolyzed with alcalase at 50 °C for each times

*alcalase : Alcalase 2.4L (Novozymes, Denmark)

*A : Precision plus protein dual xtra standards (Bio-rad, U.S.A)

*B : 10% WPC-80 solution after pasteurization(65 °C, 30 min)

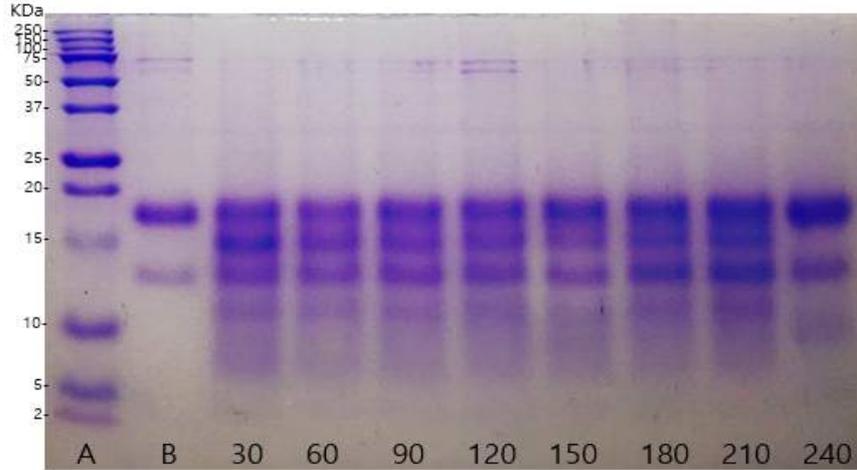


Fig. 9. SDS-PAGE patterns of 10% WPC-80 solution hydrolyzed with neutrase at 50 °C for each times

*neutrase : Neutrase 0.8L (Novozymes, Denmark)

*A : Precision plus protein dual xtra standards (Bio-rad, U.S.A)

*B : 10% WPC-80 solution after pasteurization(65 °C, 30 min)

- 전기영동을 통한 SDS-PAGE pattern을 토대로 우유 유래 단백질 가수분해물을 분자량별로 분리하기 위해 Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution 컬럼을 이용한 FPLC system으로 가수분해물 분리를 진행함
- running buffer(0.05 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.0)을 이용하여 유량 1.0 mL/min으로 검출기(Detector) 280nm에서 가수분해물 100 μL를 주입하여 유단백질 가수분해물을 분리함

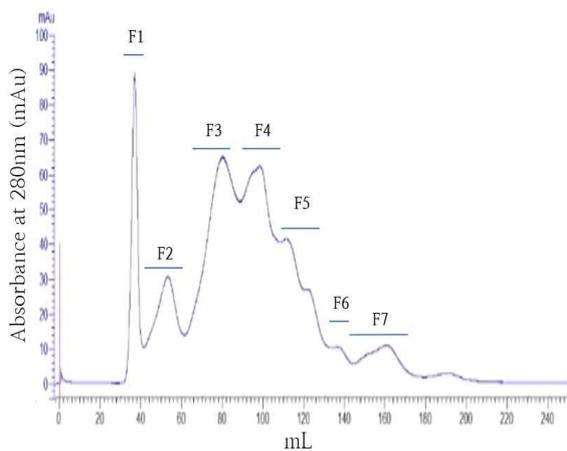


Fig. 10. Separation of WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L in FPLC system on Hiprep 16/60 Sephacryl S-100R column

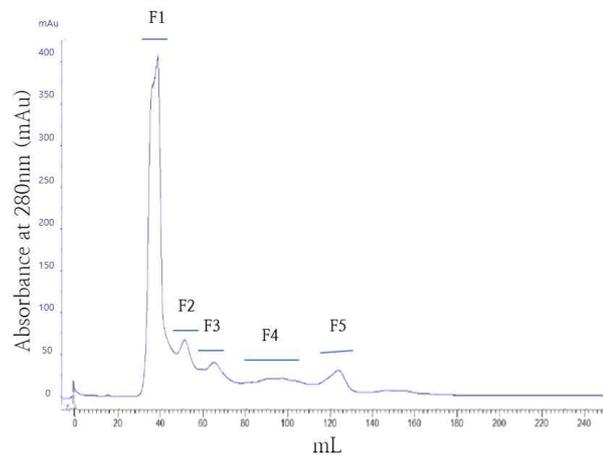


Fig. 11. Separation of WPC hydrolysates using Neutrase 0.8L in FPLC system on Hiprep 16/60 Sephacryl S-100R column

- FPLC를 이용한 분자량별 유단백질 가수분해물의 분획물 분리를 진행한 결과, Alcalase를

이용한 유단백질 가수분해물은 Fraction 1~7의 분획물을 분리하였으며, Neutrase를 이용한 유단백질 가수분해물은 Fraction 1~5의 분획물을 분리하였음

- 각각의 분자량별 분획물은 Amicon Ultra-15 Centrifugal filters Ultracel-3k를 이용하여 1/10로 농축한 후 0.2µm syringe filter로 filtration한 다음 -20℃에서 보관하여 샘플로 사용함

○ HPLC를 이용한 유단백질 가수분해물의 정제

- 이온교환 크로마토그래피를 이용한 유단백질 가수분해물 분획물 정제를 진행하였으며 0.2 M sodium citrate loading buffer (pH 2.2)를 이동상으로 AA analyzer (Biochem 20, Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 분석 진행하였음

Table. 5. Amino acid composition of whey protein concentrate (WPC) and peptide fraction eluted from ion-exchange chromatography of Alcalase and Neutrase hydrolysate

AA	WPC (%)	Alcalase F-1 (%)	Neutrase F-1 (%)
Asp	7.55	4.13	4.34
Thr	8.49	2.27	ND
Ser	6.53	2.45	2.75
Glu	17.80	6.81	6.53
Pro	8.27	ND	ND
Gly	3.87	ND	ND
Ala	9.07	18.38	18.17
Val	4.90	3.19	2.98
Cys	0.68	7.02	7.83
Met	1.66	2.56	ND
Ile	4.93	3.23	4.20
Leu	10.36	7.18	6.95
Thr	1.73	ND	ND
Phe	2.81	16.58	17.26
Lys	8.29	17.97	19.44
His	1.42	5.88	5.64
Arg	1.63	2.35	3.91
Total molar ratio	100.00	100.00	100.00

*peptide fraction : Peptides less than 10 kDa

*Alcalase and Neutrase hydrolysate : The WPC hydrolysate was produced by thermal denaturation of the WPC (100℃ for 10 min), followed by treatment with Alcalase and Neutrase (1% on a protein basis) for 120 min

*ND : Not determined

- 분석 진행 결과 Alcalase 2.4 L를 이용한 가수분해물 분획물에서는 총 14종의 아미노산이 확인되었으며, Neutrase 0.8 L를 이용한 가수분해물 분획물에서는 총 12종의 아미노산이 확인됨

■ 유단백질 가수분해물의 기능성(항염, 항산화) 검증

○ 유단백질 가수분해물의 칼슘 가용화능 측정

- 유단백질 가수분해물의 칼슘 가용화능을 측정하기 위해 각각의 분획물에 대한 Quantichrom calcium assay kit (DICA-500, Bioassay systems, U.S.A)을 이용한 유리칼슘함량 측정실험을 진행하였음
- 96-well에 가수분해물 분획물과 Standard를 5 μ L 분주한 후 working reagent 200 μ L 혼합 후 상온에서 3분간 반응시킨 다음 Microplate reader의 흡광도를 613 nm으로 설정하여 흡광도를 측정하였으며 control(대조군)로 CPP를 이용하였음

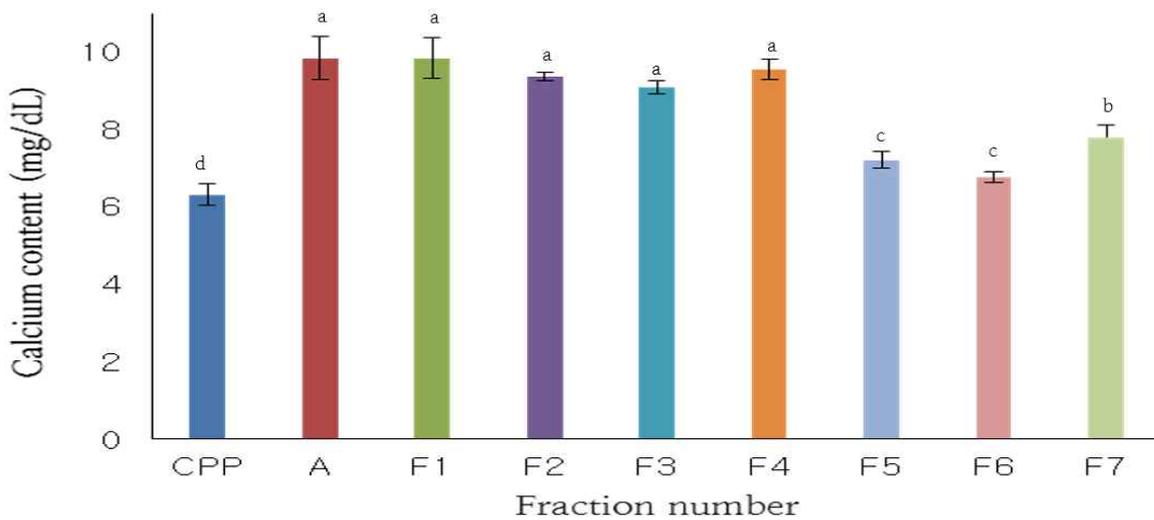


Fig. 12. Comparison of calcium assimilation by separations of WPC hydrolysates each fractions using Alcalase 2.4 L

*CPP : casein phosphopeptide

*A : WPC hydrolysates using Alcalase 2.4 L(novozymes, Denmark)

*F# : Fraction number in FPLC system

*All samples protein concentration were 200 μ g/mL

*All value were mean \pm SD of triplicates

*a-d means with the same letter in a column are not significantly different at $p < 0.05$

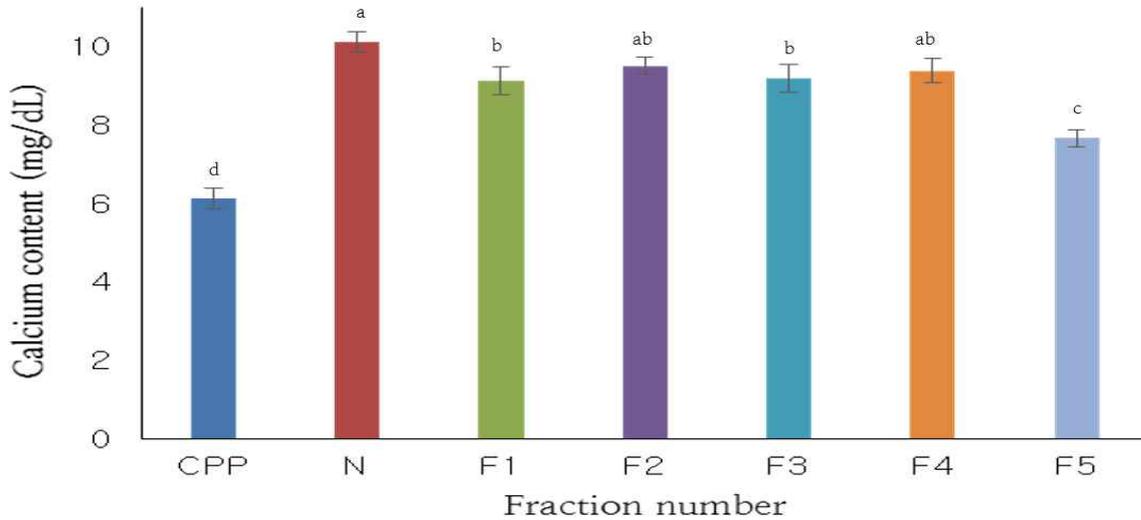


Fig. 13. Comparison of calcium assimilation by separations of WPC hydrolysates each fractions using Neutrase 0.8 L

*CPP : casein phosphopeptide

*N : WPC hydrolysates using Neutrase 0.8 L(novozymes, Denmark)

*F# : Fraction number in FPLC system

*All samples protein concentration were 200 ug/mL

*All value were mean±SD of triplicates

*a-d means with the same letter in a column are not significantly different at p<0.05

- 유리칼슘함량 측정실험을 진행한 결과 Fig. 6과 같이 기존 상용화된 CPP보다 높은 칼슘 가용화능을 보이는 분획물은 나타나지 않음

- 그러나, CPP 대비 가수분해물을 이용한 분획물에 대한 원가가 더 저렴하여 이는 향후 대량 생산 공정 및 신제품 판매시 산업적 비용절감으로 가격 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단

○ 유단백질 가수분해물의 항염 효과 측정

- 항염 효과 측정을 위한 실험에는 단국대학교에서 분양받은 RAW264.7 macrophage cell(Cheonan, Korea)을 이용하였으며 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin이 혼합된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지에서 배양하여 실험에 사용함

- 유단백질 가수분해물의 항염 효과를 측정하기 위해 1차적으로 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물에 대한 세포독성을 확인하기 위한 세포독성실험(MTT assay)을 진행하였음. Alcalase와 Neutrase를 이용한 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물에 대한 칼슘 함량을 5 ug/mL, 15 ug/mL, 30 ug/mL로 정량하여 분주한 후 MTT 시약을 혼합한 후 흡광도를 측정하였음

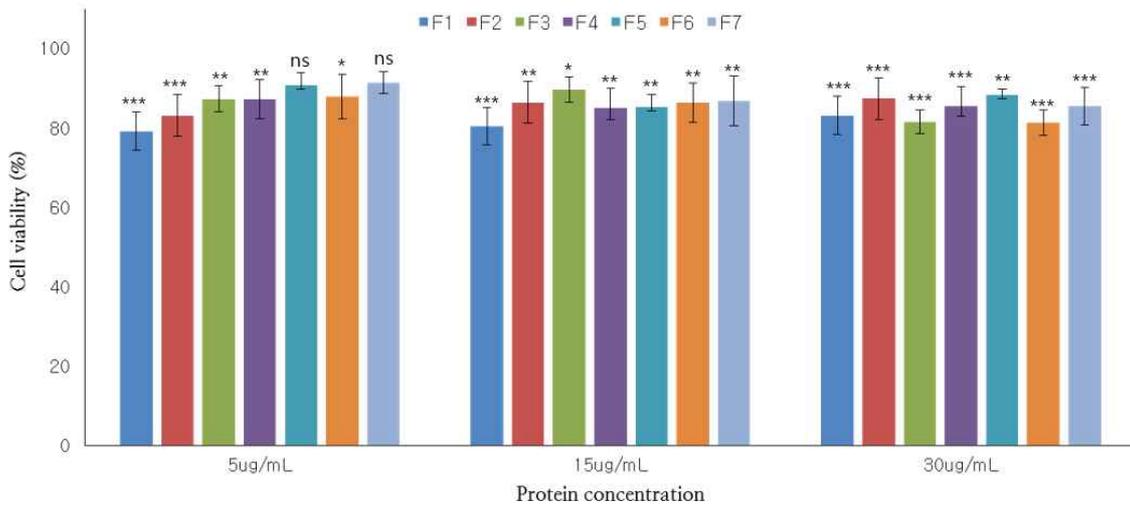


Fig. 14. Effect of fraction of WPC hydrolysates using Alcalase 2.4 L cytotoxicity in RAW 264.7 cell

*All value were mean±SD of triplicates determination from 1 way ANOVA Dunnett's Multiple comparison test (p<0.05, significant compared with un-treated control; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significant compared with positive control(101.247%))

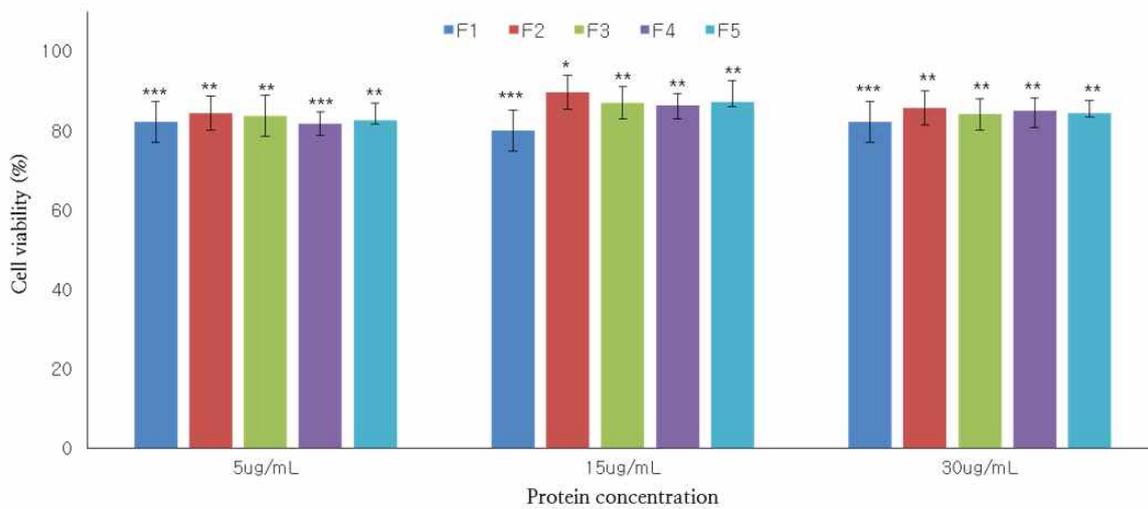


Fig. 15. Effect of fraction of WPC hydrolysates using Neutrase 0.8 L cytotoxicity in RAW 264.7 cell

*All value were mean±SD of triplicates determination from 1 way ANOVA Dunnett's Multiple comparison test (p<0.05, significant compared with un-treated control; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significant compared with positive control(101.247%))

- 유단백질 가수분해물의 세포독성실험(MTT assay)을 진행한 결과, Alcalase와 Neutrase를 이용한 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물 모두 80% 이상의 생존률(cell viability)을 보이는 것을 확인하여 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물의 세포독성이 없는 것으로 판단하고 이를 기준으로 NO assay와 ELISA kit 실험을 진행하였음

- 유단백질 가수분해물의 함염 효과를 측정하기 위해 염증성 질환 유발 원인물질인 nitric oxide(NO)를 이용한 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물에 대한 NO assay 실험을 진행하였음
- Alcalase와 Neutrase를 이용한 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물에 대한 칼슘 함량을 5 ug/mL, 15 ug/mL, 30 ug/mL로 분주한 후 Lipopolysaccharide(LPS)로 염증을 유도하고 이 때 생성되는 nitric oxide(NO)를 Griess reagent와 반응시킨 후 흡광도를 측정하였음

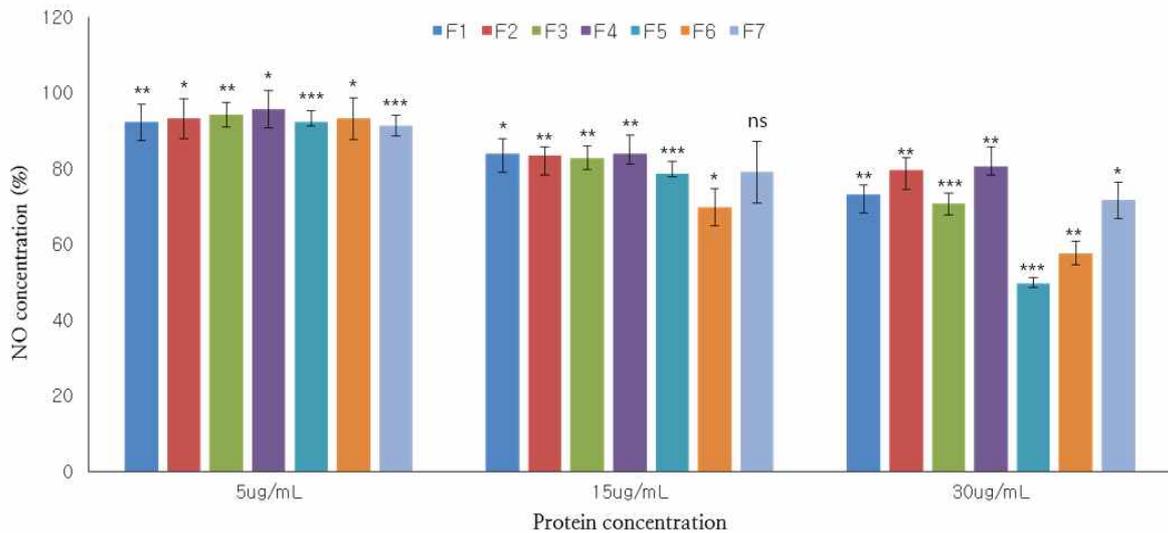


Fig. 16. Effect of fraction of WPC hydrolysates using Alcalase 2.4 L cytotoxicity in RAW 264.7 cell

*All value were mean±SD of triplicates determination from 1 way ANOVA Dunnett's Multiple comparison test (p<0.05, significant compared with un-treated control;

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significant compared with positive control(101.247%))

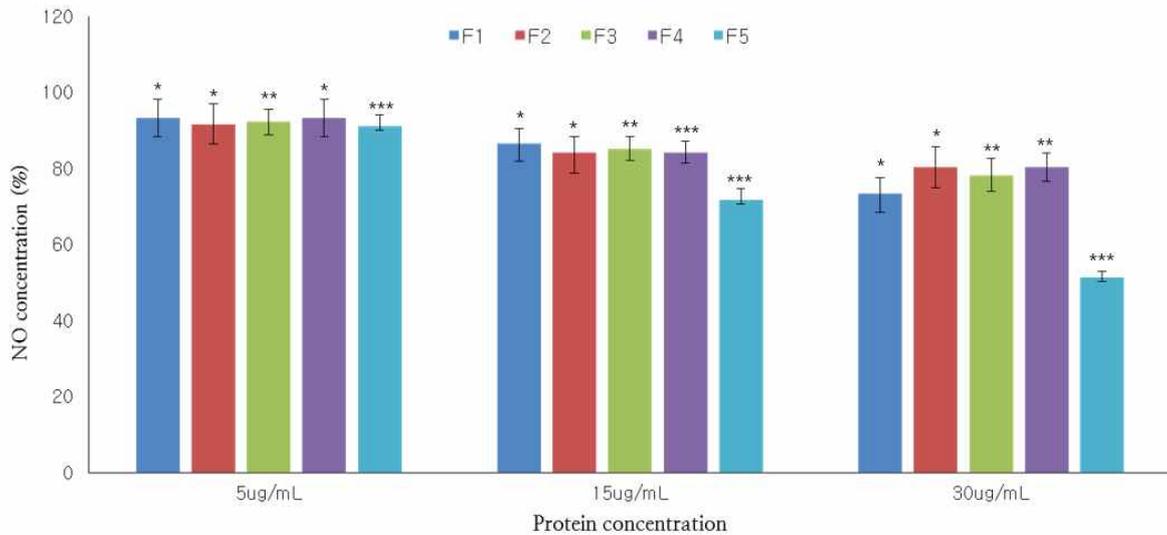


Fig. 17. Effect of fraction of WPC hydrolysates using Neutrased 0.8 L cytotoxicity in RAW 264.7 cell

*All value were mean±SD of triplicates determination from 1 way ANOVA Dunnett's Multiple comparison test (p<0.05, significant compared with un-treated control;

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significant compared with positive control(101.247%))

- 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물에 대한 NO assay 실험을 진행한 결과 Alcalase와 Neutrased를 이용한 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물에서 갈수록 최고 농도인 30 ug/mL로 분획물을 접종하였을 때 각각의 Fraction 5가 가장 좋은 경향을 보임

- 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물의 함량이 높아질수록 nitric oxide(NO) 생성량이 낮아지는 경향을 확인하였으며, ELISA kit(TNF-α, IL-1, IL-6)을 통해 가수분해물의 분자량 분획물에 의한 염증유발 사이토카인인 조절능을 확인하는 실험을 진행함

○ 항염효과 검증

- 염증성 사이토카인의 발현 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7세포에서 농도별 유단백질 가수분해물의 Alcalase 분획물인 A5, Neutrased 분획물인 N5, N6, N7을 샘플로 사용하여 LPS로 유도하였음

- RAW 264.7 세포에 전처리한 유단백질 가수분해물의 분획물(300, 400, 500, 600, 700, 800 μg/mL)을 농도별로 Treatment하여 1시간 동안 전처리 한 후 0.05 μg/mL의 LPS를 6시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 TNF-α, IL-1, IL-6의 생성 변화를 ELISA kit(KOMA, Korea) 를 사용하여 실시하였음

- 전처리한 유단백질 가수분해물의 분획물 50 μl를 assay diluent 100 μl와 함께 anti-mouse IL-1, anti-mouse IL-6, anti-mouse TNF-α가 부착된 well에 첨가하여 반응시킨 후 biotinylated detection antibody를 첨가하였음. PBS buffer로 3-4번 워싱 후

streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 부착된 peroxidase conjugate를 검출하고, 1 M H₂SO₄ 100 μl를 첨가하여 반응을 종료시킴

- well은 microplate reader로 450 nm 흡광도를 측정하였음. Cytokine의 표준곡선은 linear doseresponse standard curve를 이용하여 농도정량 하였음

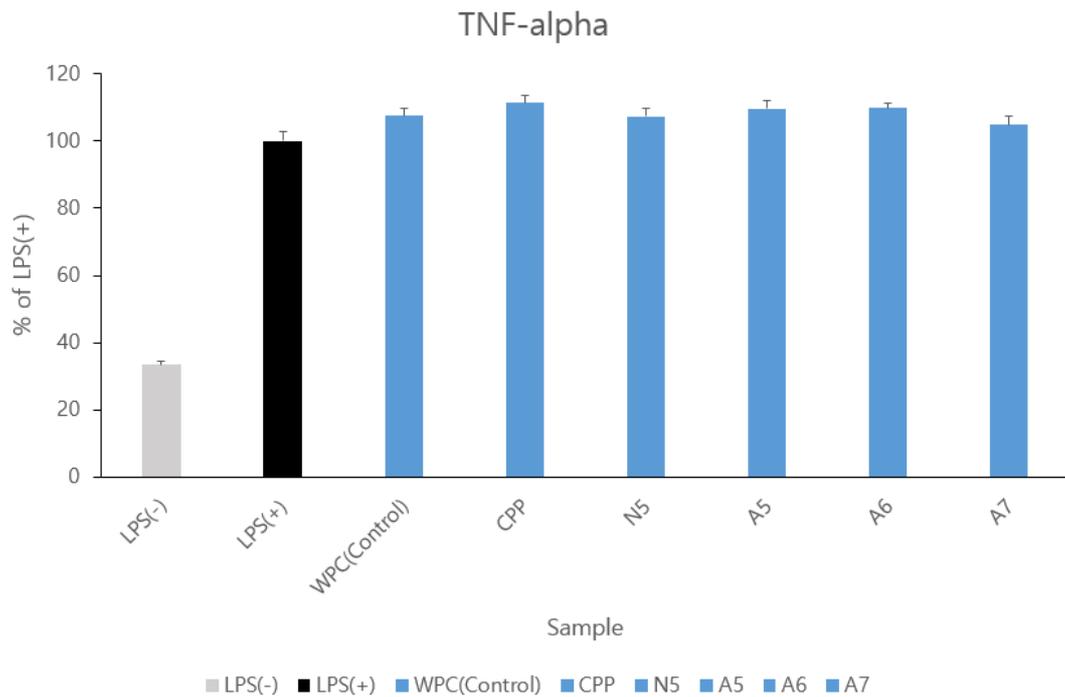


Fig. 18. Comparison of TNF-α production of plant in LPS-unstimulated RAW264.7 cells

*All value were mean±SD of triplicates

*All sample treated LPS-unstimulated

- TNF-α 생성량을 측정하였을 때 가수분해물의 분획물은 LPS 미처리 control군보다 높은 생성량을 보임.(Fig. 18) N5, A5, A6, A7은 각각 107.38±0.95, 109.67±3.95, 109.90±0.93 및 104.90±3.97%의 생성량을 보였음. 모든 분획물 시료가 control군에 비해 높은 사이토카인 생성능을 확인하였음

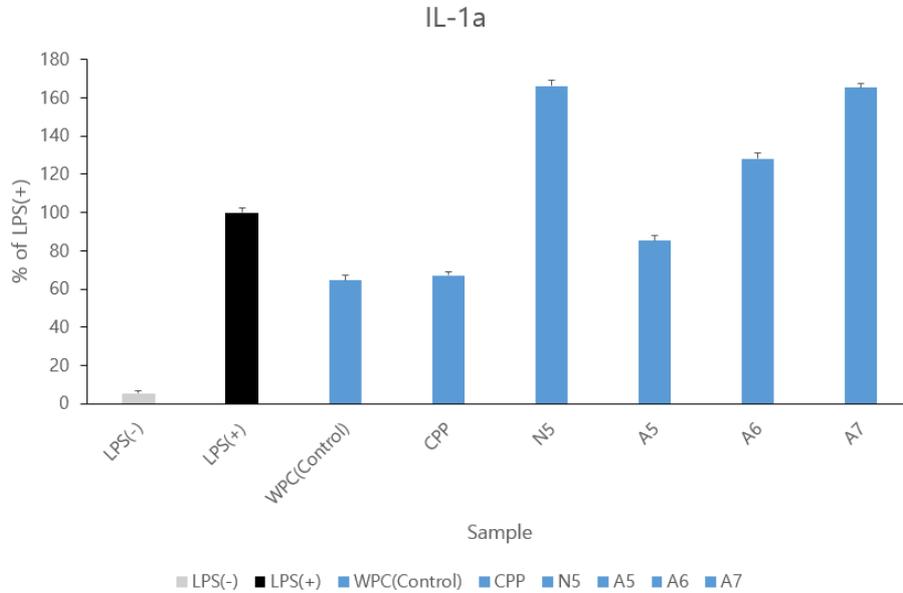


Fig. 19. Comparison of IL-1a production of plant in LPS-unstimulated RAW264.7 cells
 *All value were mean±SD of triplicates
 *All sample treated LPS-unstimulated

- IL-1a 생성량을 측정하였을 때 선발균주는 LPS 미처리 control군보다 전반적으로 높은 생성량을 보임(Fig. 19). N5, A5, A6, A7은 각각 166.24 ± 0.05 , 85.31 ± 0.03 , 128.23 ± 0.03 및 $165.23 \pm 0.07\%$ 의 생성량을 보였음. 특히, N5는 LPS 미처리 control군보다 약 2배정도 높은 사이토카인 생성능을 확인하여 분획물에 대한 면역증진효과가 기대됨

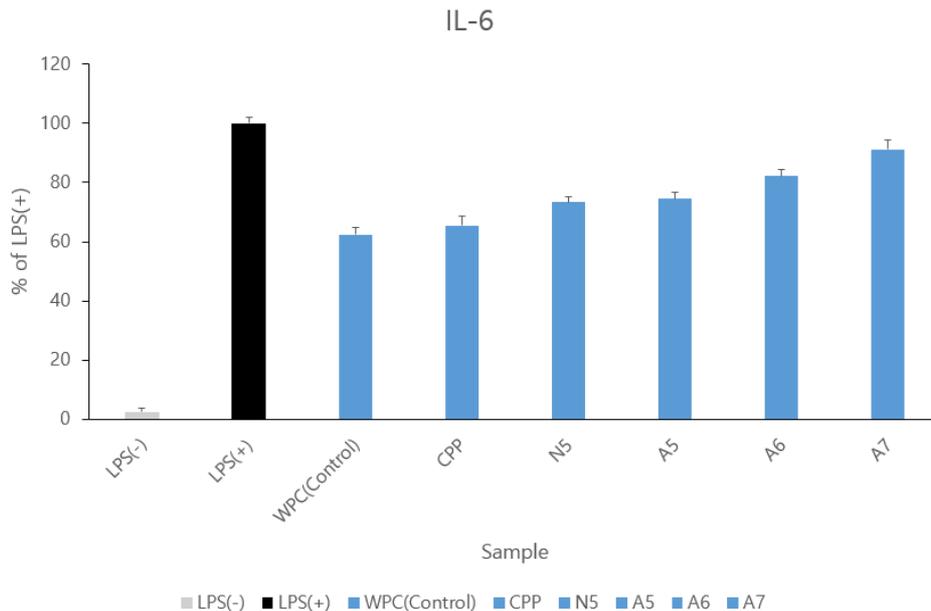


Fig. 20. Comparison of IL-6 production of plant in LPS-unstimulated RAW264.7 cells
 *All value were mean±SD of triplicates
 *All sample treated LPS-unstimulated

- IL-6 생성량을 측정하였을 때 선발균주는 LPS 미처리 control군보다 전반적으로 높은 생성량을 보임.(Fig. 20) N5, A5, A6, A7은 각각 73.33 ± 0.22 , 74.57 ± 0.31 , 82.16 ± 0.12 및 $91.26\pm 0.54\%$ 의 생성량을 보였음. 모든 샘플에서 유리억제효과가 있는 것을 확인함
 - 특히, N5는 LPS 미처리 control군보다 약 2배정도 높은 사이토카인 생성능을 확인하여 유단백질 분획물로서의 면역증진효과를 확인하였으며 모든 유단백질 가수분해물의 분획물에서 LPS 미처리 control군보다 전반적으로 높은 사이토카인 생성량을 보이는 것을 확인함
- 유단백질 가수분해물의 항산화능 측정(FRAP, ABTS, Hydroxyl assay 등)
- 분리 및 정제한 유단백질 가수분해물의 항산화능(FRAP assay)을 측정하기 위해 Alcalase와 Neutrase를 이용한 유단백질 가수분해물의 분자량별 분획물 각각에 FRAP 시약을 혼합하여 상온에서 30분 반응시킨 후 흡광도를 측정함
 - 분리 및 정제한 유단백질 가수분해물의 항산화능(ABTS, assay)을 측정하기 위해 가수분해물의 분자량별 분획물 각각에 ABTS 시약을 혼합하여 상온에서 6분 반응시킨 후 흡광도를 측정함
 - 분리 및 정제한 유단백질 가수분해물의 항산화능(Hydroxyl assay)을 측정하기 위해 가수분해물의 분자량별 분획물 각각에 0.75 mM 1,10-phenanthroline, PBS, 2.5 mM FeSO₄, H₂O를 혼합하여 상온에서 90분 반응시킨 후 흡광도를 측정함

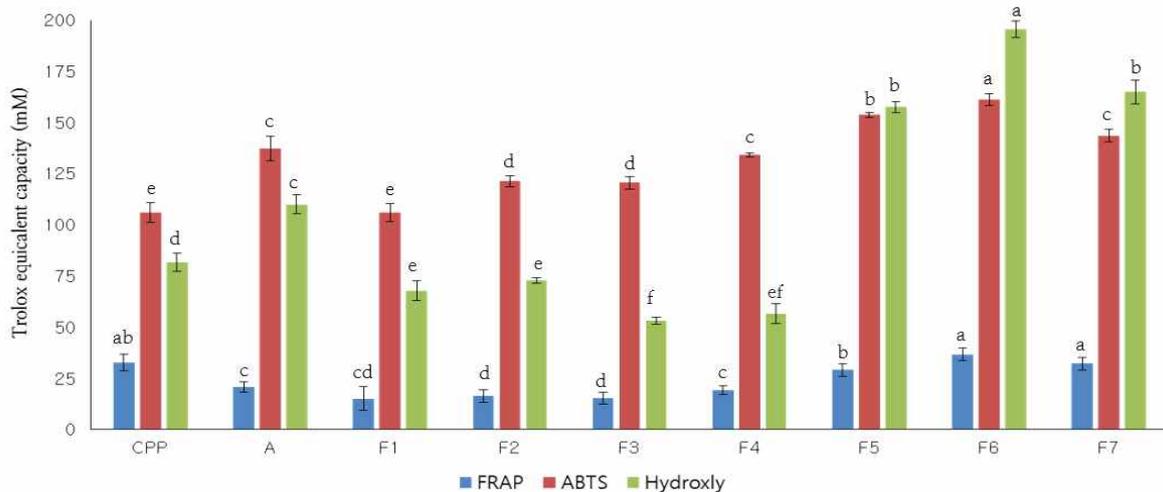


Fig. 20. Antioxidant activities(FRAP, ABTS, Hydroxyl assay) of separations of WPC hydrolysates each fractions using Alcalase 2.4 L

*CPP : casein phosphopeptide

*A : WPC hydrolysates using Alcalase 2.4 L(novozymes, Denmark)

*F# : Fraction number in FPLC system

*All samples protein concentration were 200 ug/mL

*All value were mean±SD of triplicates

*a-d means with the same letter in a column are significantly different at $p < 0.05$

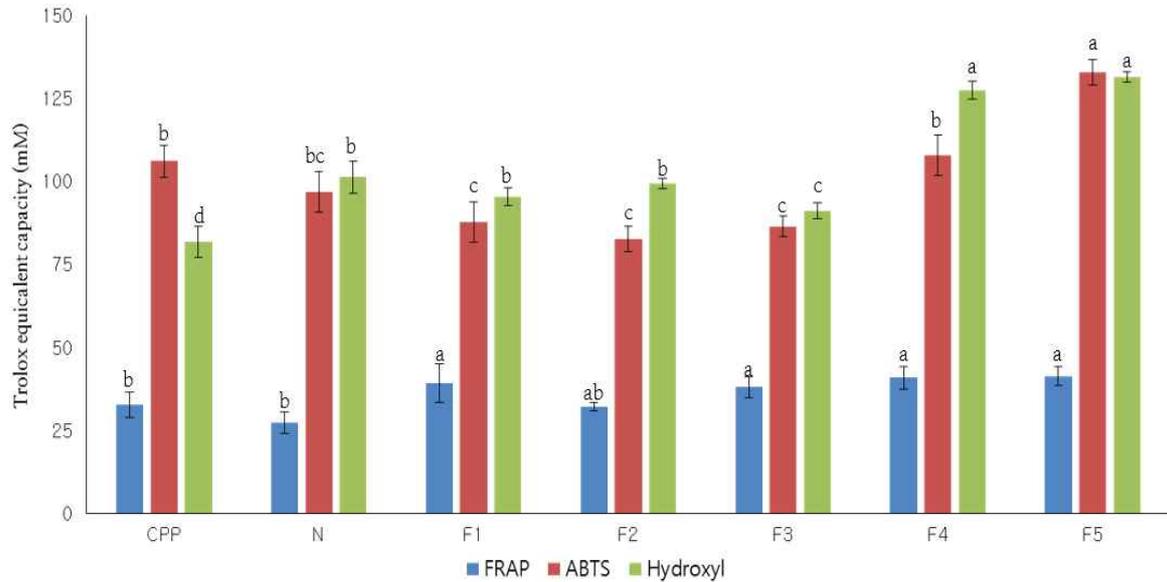


Fig. 21. Antioxidant activities(FRAP, ABTS, Hydroxyl assay) of separations of WPC hydrolysates each fractions using Neutralse 0.8 L

*CPP : casein phosphopeptide

*A : WPC hydrolysates using Alcalase 2.4 L(novozymes, Denmark)

*F# : Fraction number in FPLC system

*All samples protein concentration were 200 ug/mL

*All value were mean±SD of triplicates

*a-d means with the same letter in a column are significantly different at p<0.05

- 각각의 가수분해물 분자량별 분획물의 항산화(FRAP, ABTS, Hydroxyl assay)을 측정한 결과 Alcalase 2.4 L를 이용한 가수분해물의 분자량별 분획물 중 Fraction 6에서 가장 높은 항산화능을 보였음.
- Neutralse 0.8 L를 이용한 가수분해물의 분자량별 분획물에서는 Fraction 5가 가장 높은 항산화능을 보여 유단백질 가수분해물의 분자량이 작아질수록 높은 항산화능을 보이는 것을 확인함

■ 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주 개발 및 기초생리활성 확인

- 후보 발효균주의 기초생리활성(내산성, 담즙산내성, β-galactosidase, 단백질 분해능)을 통한 1차선발
- 단국대학교 김철현 교수 연구팀에서 보유하고 있는 한국전통식품 유래 후부 균주 30종에 대한 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효균주의 내산성, 담즙산 내성을 측정하기 위해 pH 2.0으로 조정된 배지와 1% Oxgall을 첨가한 배지에서 2시간 후 생균수를 확인하였음

Table. 6. Identification of DK strains(lactic acid bacteria isolated from korean traditional fermented foods) with the 16s-rRNA

Sample name	Species
DK109	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK119	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK121	<i>Lactobacillus paracasei</i>
DK128	<i>Lactobacillus casei</i>
DK201	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK202	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK203	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK204	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK205	<i>Lactobacillus brevis</i>
DK206	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK207	<i>Lactobacillus casei</i>
DK208	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK209	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK210	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK211	<i>Lactobacillus casei</i>
DK212	<i>Lactobacillus casei</i>
DK213	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK214	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK215	<i>Lactobacillus paracasei</i>
DK301	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK303	<i>Lactobacillus plantarum</i>
DK304	<i>Lactobacillus pentosus</i>
DK305	<i>Leuconostoc citreum</i>
DK306	<i>Weissella cibaria</i>
DK307	<i>Weissella cibaria</i>
DK308	<i>Weissella cibaria</i>
DK309	<i>Weissella cibaria</i>
DK310	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK311	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK312	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK313	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK314	<i>Weissella confusa</i>
DK315	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK316	<i>Lactobacillus sakei</i>
DK317	<i>Weissella cibaria</i>
DK318	<i>Weissella cibaria</i>

Table. 7. Acid tolerance of DK strains(lactic acid bacteria isolated from korean traditional fermented foods)

Strains	Counting (Log CFU/mL)		Survival rate (%)
	0 h	2 h	
DK109	8.83	8.13	92.07
DK119	9.48	8.30	87.55
DK121	8.15	7.48	91.78
DK128	7.30	7.00	95.89
DK201	9.00	N.D	-
DK202	9.30	N.D	-
DK203	8.48	8.00	94.34
DK204	9.30	N.D	-
DK205	7.48	N.D	-
DK206	9.30	N.D	-
DK207	9.48	7.00	73.84
DK208	8.60	N.D	-
DK209	9.00	N.D	-
DK210	9.30	N.D	-
DK211	9.90	7.30	73.84
DK212	9.78	7.00	73.74
DK213	9.30	N.D	-
DK214	9.30	N.D	-
DK215	8.78	8.30	94.53
DK301	9.70	N.D	-
DK303	9.60	7.32	76.25
DK304	9.00	N.D	-
DK305	9.48	N.D	-
DK306	8.00	N.D	-
DK307	8.00	N.D	-
DK308	7.48	N.D	-
DK309	7.30	N.D	-
DK310	8.00	N.D	-
DK311	7.30	7.01	96.02
DK312	8.30	N.D	-
DK313	10.00	N.D	-
DK314	8.48	N.D	-
DK315	8.70	N.D	-
DK316	8.78	8.48	96.58
DK317	9.60	N.D	-
DK318	9.60	N.D	-

*The strains were incubated in modified pH 2.0 MRS broth containing HCl at 37°C for 2h

*N.D : Not detected < 10⁶

Table. 8. Bile acid tolerance of DK strains(lactic acid bacteria isolated from korean traditional fermented foods)

Strains	Counting (Log CFU/mL)		Survival rate (%)
	0 h	24 h	
DK109	8.23	8.03	97.56
DK119	7.30	7.00	95.89
DK121	8.15	8.00	98.16
DK128	7.59	8.70	114.62
DK201	8.70	7.00	80.46
DK202	9.60	N.D	-
DK203	7.30	7.00	95.89
DK204	7.00	N.D	-
DK205	7.00	7.00	100
DK206	7.30	N.D	-
DK207	7.36	7.00	95.11
DK208	8.00	N.D	-
DK209	8.78	8.48	86.58
DK210	9.48	8.15	85.97
DK211	9.00	9.00	100
DK212	9.48	8.70	91.77
DK213	8.90	7.30	82.02
DK214	7.30	N.D	-
DK215	9.00	9.26	102.88
DK301	9.60	8.45	88.02
DK303	8.78	8.30	94.53
DK304	7.30	7.00	95.89
DK305	7.90	7.00	88.61
DK306	8.30	N.D	-
DK307	8.00	7.00	87.5
DK308	8.08	7.00	86.63
DK309	7.95	7.48	94.09
DK310	7.30	7.00	95.89
DK311	8.00	7.30	91.25
DK312	9.60	7.00	78.92
DK313	9.70	N.D	-
DK314	9.70	N.D	-
DK315	8.32	7.60	91.35
DK316	7.30	7.26	99.45
DK317	9.48	7.00	73.84
DK318	9.48	7.00	73.84

*The strains were incubated in modified at 37 °C for 24 h in MRS broth containing 1.0% Oxgll

*N.D : Not detected < 10⁶

- 단국대학교 김철현 교수 연구팀에서 보유하고 있는 한국전통식품 유래 후부 균주 36종에 대한 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효균주의 내산성, 담즙산 내성을 측정된 결과, 내산성에서는 12종의 DK 균주가 생존률 70% 이상을 보였으며 담즙산 내성에서는 17종의

DK 균주가 90% 이상의 생존율을 보임

- 내산성과 담즙산 내성 모두 좋은 경향을 보인 DK균주 12종을 1차 선발 후보 균주로 선정하여 이후 실험을 진행함
- 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효균주의 단백질 분해능을 확인하기 위해 Well diffusion 방법을 응용하여 실험함. 탈지유 한천 배지 상에서 주입한 균 주위의 생성된 환을 보고 선발된 유산균의 유단백질 분해능에 대한 활성을 확인함

Table. 9. Proteolytic activity of DK strains and commercial strains in skin milk agar plate

Strains	Clear zone (mm)
DK109	17.7±5.6
DK119	15.7±4.5
DK121	15.7±5.0
DK128	19.8±4.8
DK203	18.3±4.0
DK207	13.3±0.6
DK211	11.0±2.1
DK212	10.7±3.9
DK215	16.2±2.3
DK303	15.3±0.4
DK311	5.6±2.1
DK316	9.3±0.6

- 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효균주 12종에 대한 단백질 분해능을 확인하기 위해 Well diffusion 방법을 응용하여 실험한 결과 10종의 DK 균주가 Clear zone이 10 mm 이상을 나타내어, 높은 유단백질 분해능을 보인 DK 균주 10종을 1차 선발 후보 균주로 선정함
- 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효균주의 β -galactosidase를 측정하기 위해 MRS broth에서 배양한 후 ONPG(Sigma, USA) 용액을 이용하여 후보 발효균주의 β -galactosidase 활성을 확인하였음

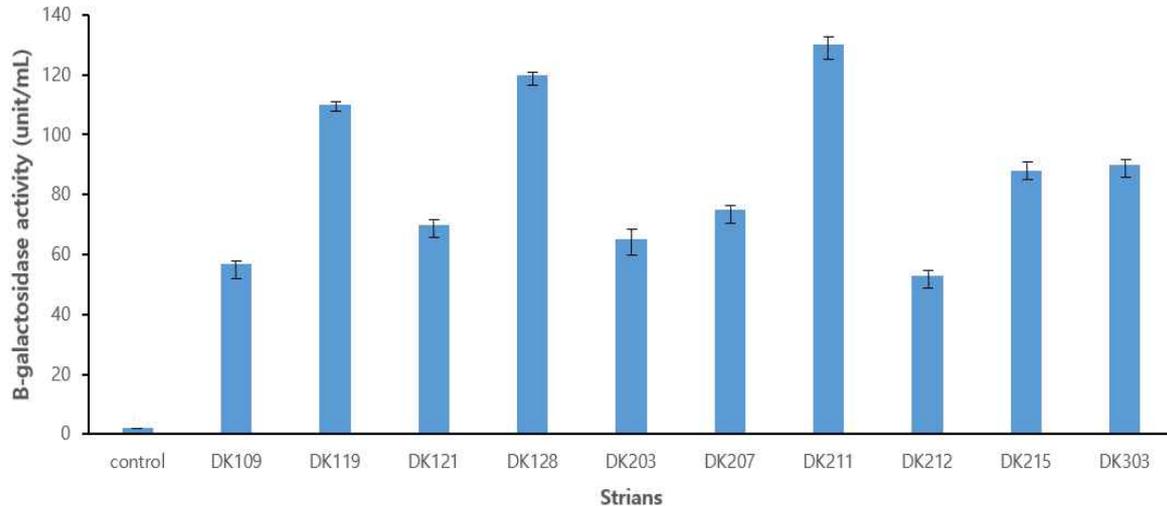


Fig. 22. β -galactosidase activity of DK strains

*All value were mean \pm SD of triplicates determination from 1 way ANOVA Dunnett's Multiple comparison test ($p < 0.05$, significant compared with un-treated control;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant compared with positive control(101.247%)

- 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효균주의 β -galactosidase를 측정하기 위해 MRS broth에서 배양한 후 ONPG(Sigma, USA) 용액을 이용하여 β -galactosidase 활성을 확인한 결과 10종의 DK 균주 모두 50 unit/mL 이상의 β -galactosidase 활성을 보임
- 단국대학교 김철현 교수 연구팀에서 기 보유하고 있는 한국전통식품 유래 후부 균주 36종 후보 발효균주의 기초생리활성 실험을 진행한 결과 내산성, 담즙산 내성, 단백질 분해능, β -galactosidase 활성이 좋은 경향으로 나타난 총 10종의 DK 균주를 1차 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 후보 발효 균주로 선발함
- 1차 선발균주의 유단백질 정량, 펩타이드 농도 및 가용성 칼슘 변화량 측정을 통한 2차 선발
 - 가용성 칼슘 변화량 측정을 위해 모든 후보 발효균주는 원유 92%, 탈지분유 5%, 올리고당 3% 발효균주 0.002%(w/v) 접종량으로 하여 37 °C waterbath에서 12 h 동안 발효한 발효액을 실험 시료로 사용하였음
 - 1차 선발균주 10종의 가용성 칼슘 변화량 측정을 위해 Quantichrom calcium assay kit (DICA-500, Bioassay systems, U.S.A)을 이용한 유리칼슘함량 측정실험을 진행하였으며 96-well에 선발균주 배양액과 Standard를 5 μ L 분주한 후 working reagent 200 μ L 혼합 후 상온에서 3분간 반응시킨 다음 흡광도를 측정하였으며 control(대조균)은 기존 배합비에 발효되지 않은 배합액을 이용하였음

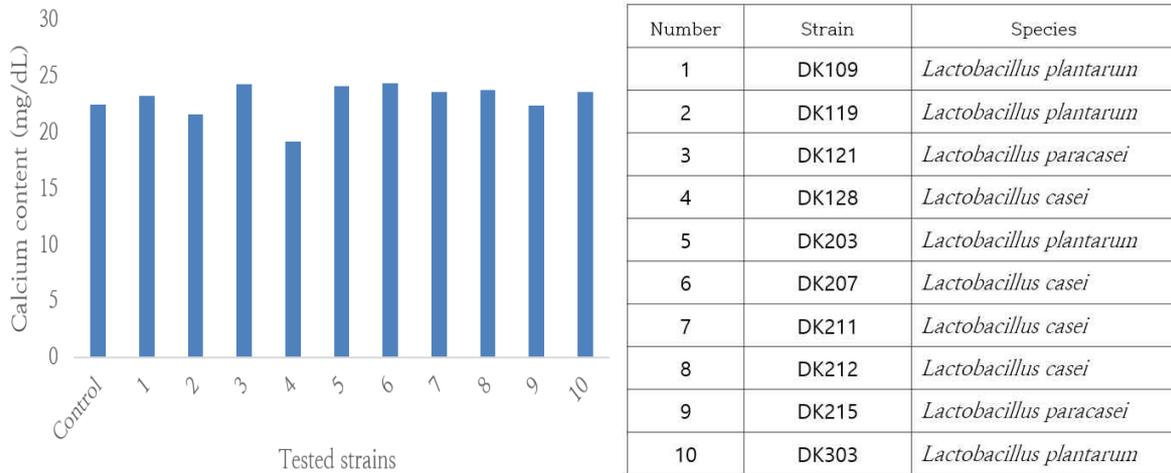


Fig. 23. Comparison of calcium assimilation by DK strain

*control was not fermented solution

*All samples were fermented by 37 °C, 12 h and inoculation 0.002% (w/v)

*Calcium assimilation measured by Calcium Assay kit(DICA-500, Bioassay sys)

- 1차 선발균주 10종의 가용성 칼슘 변화량 측정을 위한 유리칼슘함량 측정실험을 진행한 결과 DK 109, DK 128, DK215 3종이 다른 DK 균주보다 낮은 유리칼슘함량을 가지는 것을 확인함

○ 유단백질 정량 및 펩타이드 농도 측정(Free-amino nitrogen, Non-protein nitrogen)을 통한 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주의 2차 선발(3종)

- 1차 선발된 후보균주를 10% 환원탈지유에 성장 촉진 인자인 glucose와 mineral solution을 각각 2, 1% 첨가하여 제조된 배지에 2% 수준으로 접종하고, 24시간 배양시킨 후 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 유단백질 정량 측정을 실시함

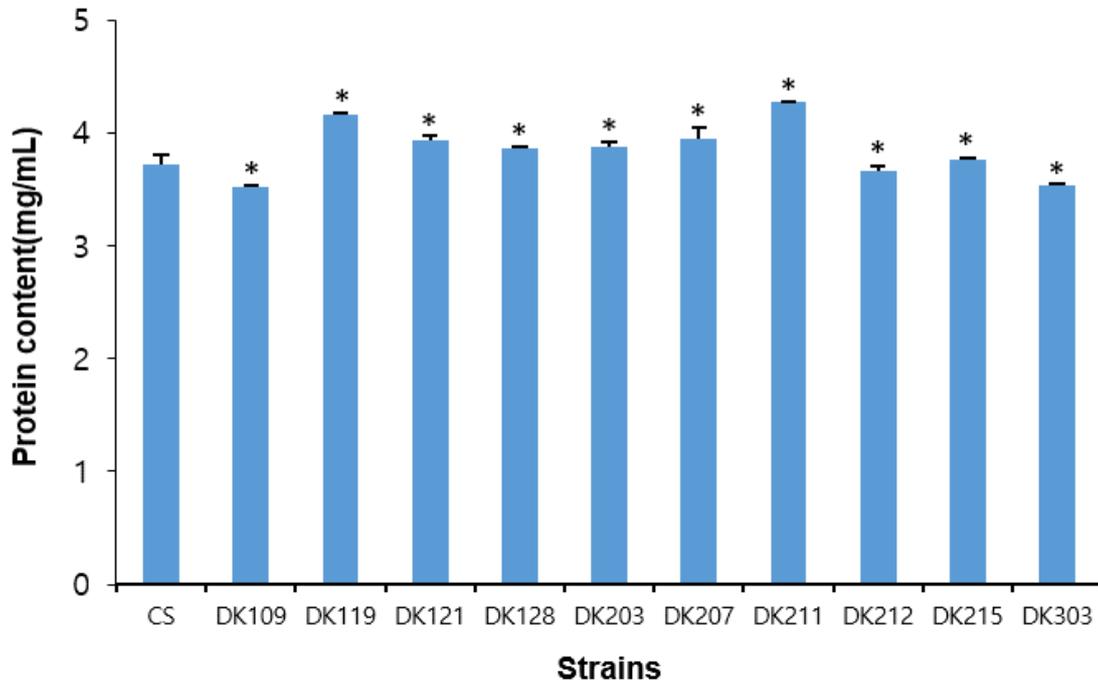


Fig. 24. Comparison of protein content of strains isolated from Kimchi and commercial strain

*CS : Commercial strain (LA-5 (Chr. Hansen, Denmark))

*All value were mean±SD of triplicates

*Protein content measured by protein assay kit II (Bio-Rad, U.S.A)

*All strains were incubated at skim milk 10%, glucose 3% and mineral(KH₂PO₄) 1%

*Statistical difference : *p<0.05 CS vs LAB

- 선발 후보균주 10종의 유단백질 정량 결과 10종의 균주 중 DK 109(*L. plantarum*), DK 212(*L. casei*) 및 DK 303(*L. plantarum*)은 각각 3.51, 3.66, 3.53 mg/mL의 단백질 함량을 보임. 동일한 조건 하에 대조균인 상업용 균주 LA-5(*L. acidophilus*)보다 낮은 단백질 함량을 보여 단백질 분해능이 높은 것으로 가정되었음
- 선발 후보균주의 단백질분해 효소 작용으로 인한 단백질 분해도를 측정하기 위해 Free amino nitrogen (FAN)과 Non-protein nitrogen (NPN) 실험을 통해 펩타이드 농도 측정을 진행하였음
- FAN 농도의 정량 측정을 위해 10종의 후보균주를 MRS broth에서 2차 계대 배양 후 10% 환원탈지유에 2% 수준으로 접종하고, 24시간 배양시킨 후 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였음. 2:1의 비율로 상등액과 ninhydrin solution을 혼합한 후 16분 동안 중탕 가열한 뒤 5 mL의 dilution solution을 첨가하고, 570nm에서 흡광도를 측정하였음
- 효소의 분해 작용에 의해 생성되는 NPN의 함량 측정은 FAN 농도 측정과 동일한 방법으로

상등액 회수 후 24% TCA 용액 2 mL과 혼합한 뒤 30분간 정치 후 여과하여 시료를 준비함. 그 후, 시료 0.25 mL 와 alkaline copper 시약 5 mL, 증류수 0.25 mL를 혼합하여 15분간 정치 후 1 N phenol 시약 0.5 mL를 첨가하여 30분간 발색 유도 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였음

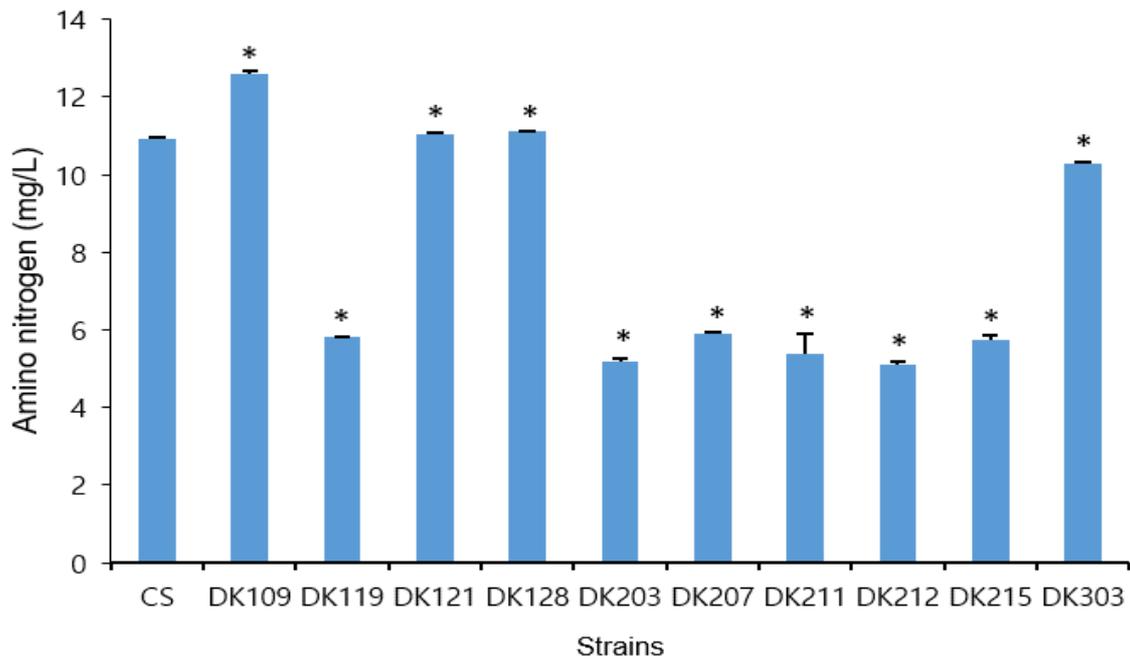


Fig. 25. Comparison of peptide production of strains isolated from Kimchi and commercial strain at Free amino nitrogen (FAN) assay

*CS : Commercial strain (LA-5 (Chr. Hansen, Denmark))

*All value were mean±SD of triplicates

*Statistical difference : *p<0.05 CS vs LAB

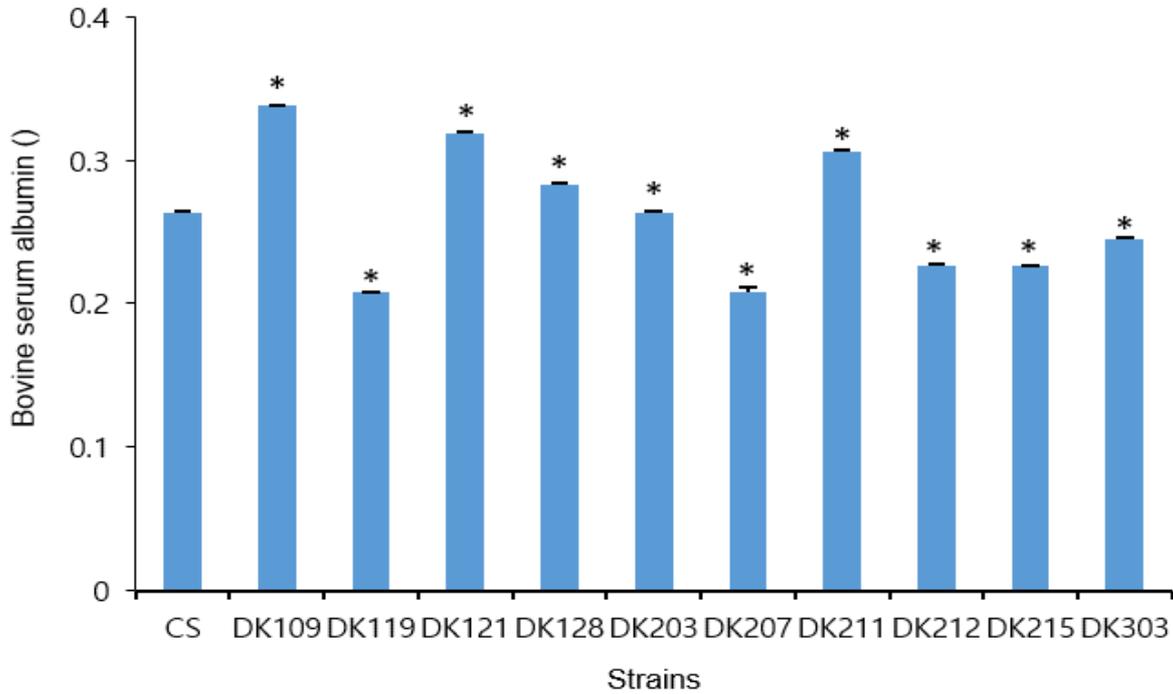


Fig. 26. Comparison of peptide production of strains isolated from Kimchi and commercial strain at Non-protein nitrogen (NPN) assay

*CS : Commercial strain(LA-5 (Chr. Hansen, Denmark))

*All value were mean±SD of triplicates

*Statistical difference : *p<0.05 CS vs LAB

- 펩타이드 농도 측정 결과 DK 109(*L. plantarum*), DK 121(*L. paracasei*) 및 DK 128(*L. casei*) 균주가 대조균인 상업용 균주 LA-5(*L. acidophilus*)보다 FAN 함량이 높은 것을 확인할 수 있었음. 또한 DK 109, DK 121, DK 128 및 DK 211(*L. casei*) 균주는 LA-5보다 NPN 함량이 높았음. 일부 DK 균주가 상업용 균주보다 펩타이드 함량이 높은 것을 확인하였음
- 2차년도 기초생리활성 및 유단백질 정량과 펩타이드 농도 측정에 따라 우수 균주 3종 DK 109(*L. plantarum*), DK 121(*L. paracasei*), DK 128(*L. casei*)을 2차 선발하였음

■ 선발 발효균주 3종의 최적 배양조건 및 제품 적용성 검증

○ 선발 발효균주 3종의 최적 배양조건 및 제품 적용성 검증을 위한 환원탈지유 농도별 발효 균주의 성장 변화 탐색

- 선발 발효균주 3종의 최적 배양조건 설정 및 제품 적용성 검증을 위해 10, 12, 14%의 환원 탈지유 배지에 대한 생균수, pH 및 산도를 측정하였으며, 환원탈지유 함유량 별 펩타이드 농도를 측정하여 최종 함량을 결정하였음

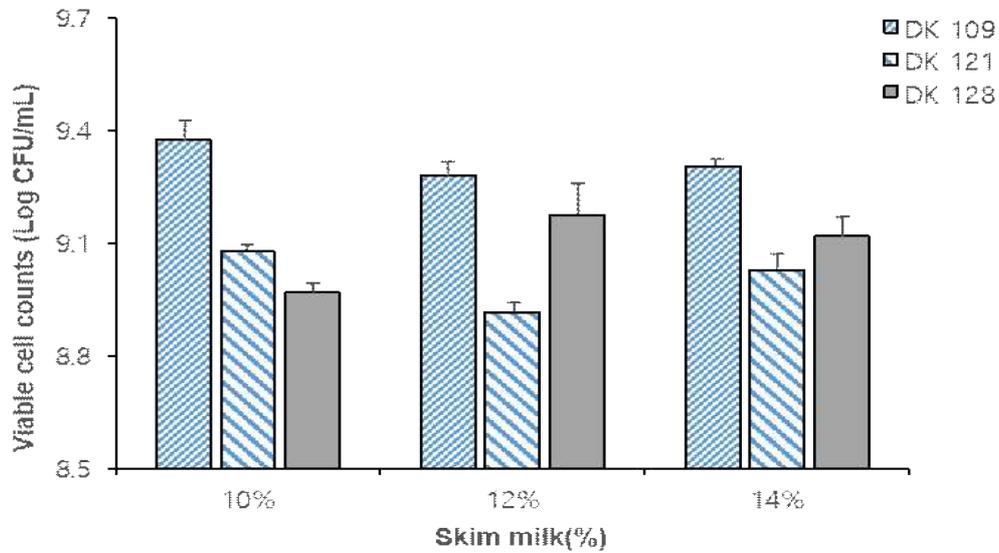


Fig. 27. Change in viable cell counts of candidate strain at various skim milk medium

*All value were mean±SD of triplicates

*All samples were cultured at 37 °C

*Samples were cultured in 10%, 12% and 14% skim milk each

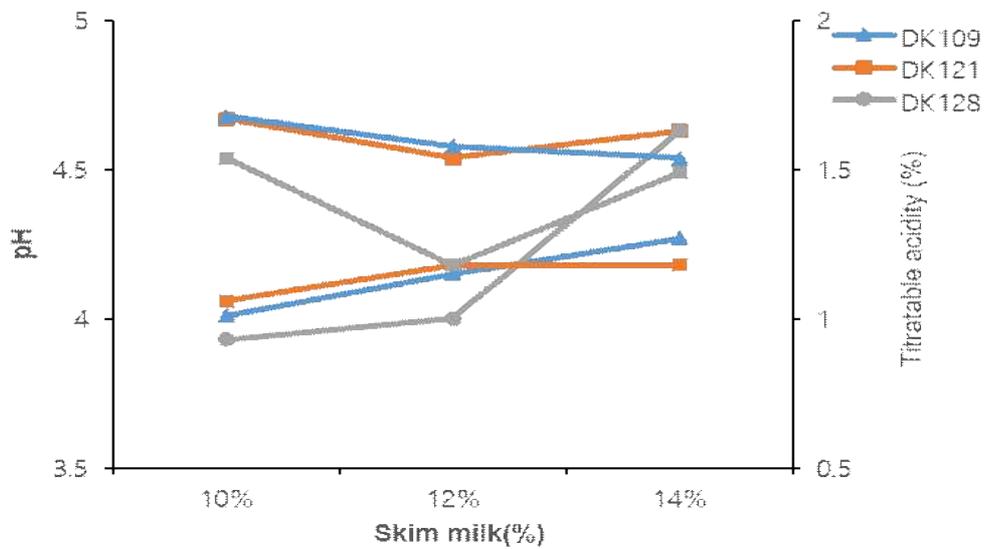


Fig. 28. Change in pH titratable acidity of candidate strain at various skim milk medium

*All value were mean±SD of triplicates

*All samples were cultured at 37 °C

*Samples were cultured in 10%, 12% and 14% skim milk each

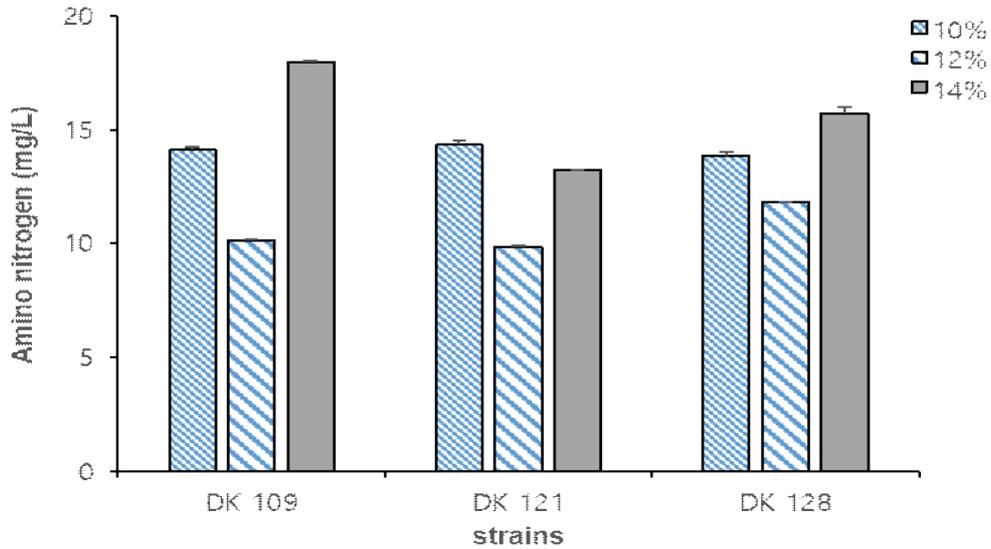


Fig. 29. Free amino nitrogen (FAN) of candidate strain with various skim milk medium

*All value were mean±SD of triplicates

*Samples were cultured in 10%, 12% and 14% skim milk each

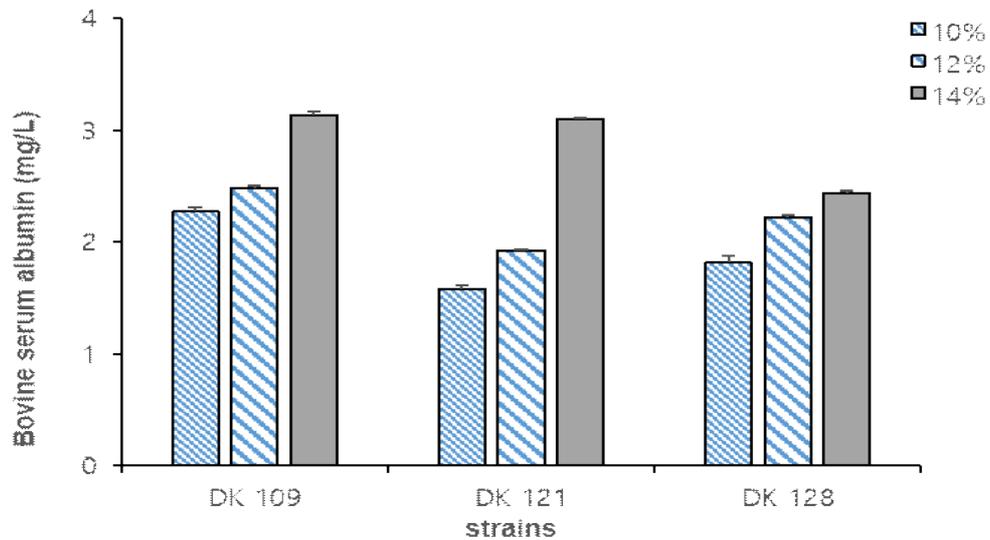


Fig. 30. Non-protein nitrogen (NPN) of candidate strain with various skim milk medium

*All value were mean±SD of triplicates

*Samples were cultured in 10%, 12% and 14% skim milk each

- 선발 발효균주 3종을 14% 환원탈지유 배지에서 배양하였을 때의 생균수가 가장 높았으며, 적정 pH 및 산도를 보이는 것을 확인하였음. 또한 FAN(Free-amino nitrogen)과 NPN(Non-protein nitrogen)실험을 통한 펩타이드 농도 측정 결과, 14%의 환원탈지유 배지에서 배양하였을 때 3종의 균주 모두 FAN과 NPN 함량이 높았음
- 따라서 생균수, pH, 적정 산도 및 펩타이드 농도 측정에 따라 발효유의 적정 생균수와 pH 및 산도를 보였던 환원탈지유 14%를 최적 배양조건으로 결정하였으며, 발효유 및 발효유음

료의 제품 적용 가능성을 확인하였음

- 선발 발효균주 3종의 최적 배양조건 및 제품 적용성 검증을 위한 HPLC 및 TLC 분석
 - 선발 발효균주 3종의 배양 중 유리당 및 이용당 측정을 위해 HPLC 및 TLC 분석하기 전, 먼저 각 Chromatography의 분석 조건을 설정하였음

Table. 10. Condition of TLC(Thin layer chromatography)

구분	조건
Stationary phase	Silica gel
Mobile phase	Chloroform : Methanol : D.W = 90 : 20 : 2
UV-detector	254 nm / 365 nm
Color reaction	Sulfuric acid(H ₂ SO ₄)

Table. 11. HPLC condition

Instrument	Condition
Detector	Reflective Index Detector (Waters, USA)
Column	Carbohydrate column (Waters, USA)
Mobile phase	Acetonitrile : DW = 8 : 2 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Oven temperature	25 °C
Injection vol.	10 uL

- 발효균주의 전처리 방법은 12-16시간 간격으로 MRS broth에서 3회 계대배양한 후 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고, Mobile phase와 비율별로 혼합하여 최적 비율 탐색 후 Sample로 사용함
- 후보 발효균주 3종의 제품 적용 가능성을 확인하였기 때문에, 후보 발효균주 3종의 기능성 검증 후 최종 선발되는 1종의 균주의 당분석을 통해 최적 배양배지 및 조건을 설정하기로 하였음. 따라서, 발효균주의 Chromatography 분석 조건과 전처리 방법만을 확립하였음

■ 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주 3종의 기능성 검증

- 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주의 항염 효과 측정
 - 선발균주 3종의 항염효과 검증을 위해 마우스의 RAW 264.7 대식세포를 (KCLB; Korea) 구입하여 사용하였음. 배지는 10% FBS가 함유된 DMEM(Welgene, South Korea) 배지를 이용하여 37 °C 5% CO₂ incubator에서 배양하여 사용하였음. 세포는 75 T 플라스크에 배양하였으며 배지는 2일마다 교환해 주었음
 - RAW 264.7 세포에 염증반응을 유도하기 위해 세포는 96well plate(2×10⁴/well)에 DMEM 배지를 분주하고 3시간 동안 부착시킴. 발효균주 3종의 전처리를 위하여 7.000 rpm에서 10

분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 상등액을 샘플로 사용하였음. 이후 전처리한 샘플을 농도별(300, 400, 500, 600, 700, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하고 1시간 후에 LPS (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 20시간 처리하였음

- 발효균주 3종의 세포독성을 측정하기 위해 MTT-based cytotoxicity assay를 시행하였음. 전처리된 발효균주 3종에 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포를 20시간 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 넣고 3시간 배양시킴. 이후 lysis buffer를 가하여 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였음
- 발효균주 3종의 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 측정하였음. 발효균주 3종과 LPS를 20시간 처리한 세포의 상등액 50 μl 와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 2% phosphoric acid, 0.1% α -naphthylethylene diamide dihydrochloride) 50 μl 를 혼합하여 상온에서 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 데이터를 분석하였음

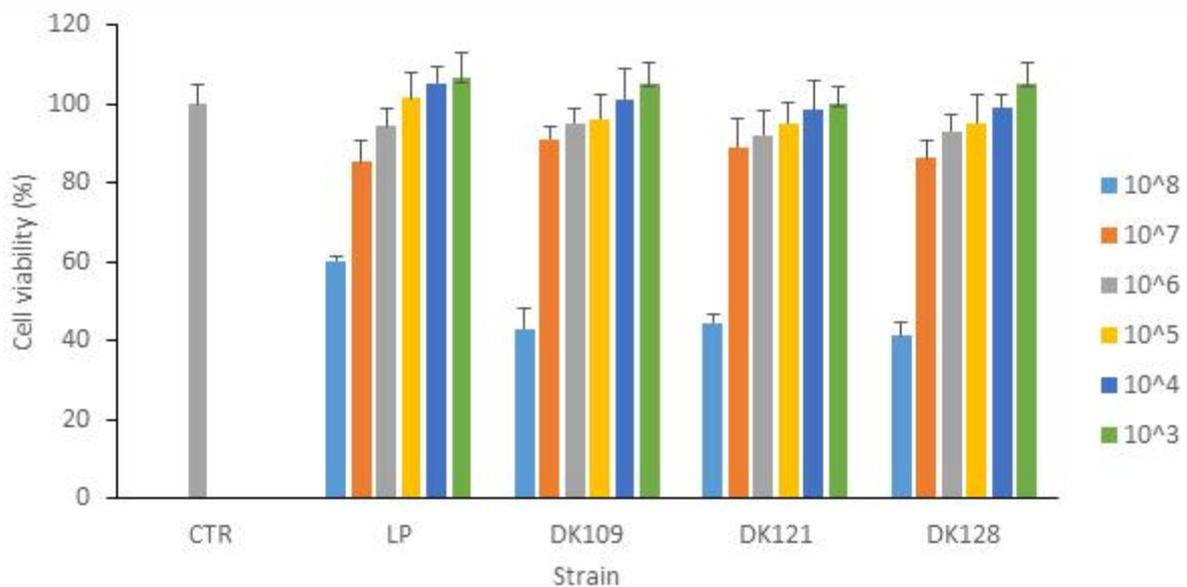


Fig. 31. Effect of selected LAB strains cytotoxicity in RAW 264.7 cell

*LP : Commercial strain LP(*L. plantarum*)

*All samples were pretreated each strains 2h at 37 °C and then control treated LPS(0.05mg/ μL) 20h at 37 °C

*All values are presented as mean \pm standard error mean from triplicates

- 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 96 well에 5×10^4 cells/well당 의 농도로 처리한 세포독성 MTT assay 결과, 상용균주인 LP(*L. plantarum*)를 포함하여 10⁸을 제외한 농도에서 세포독성 또는 성장촉진 작용을 확인할 수 없었음. 또한, 10⁸을 제외한 농도 모두에서 80% 이상의 생존율을 확인하였음

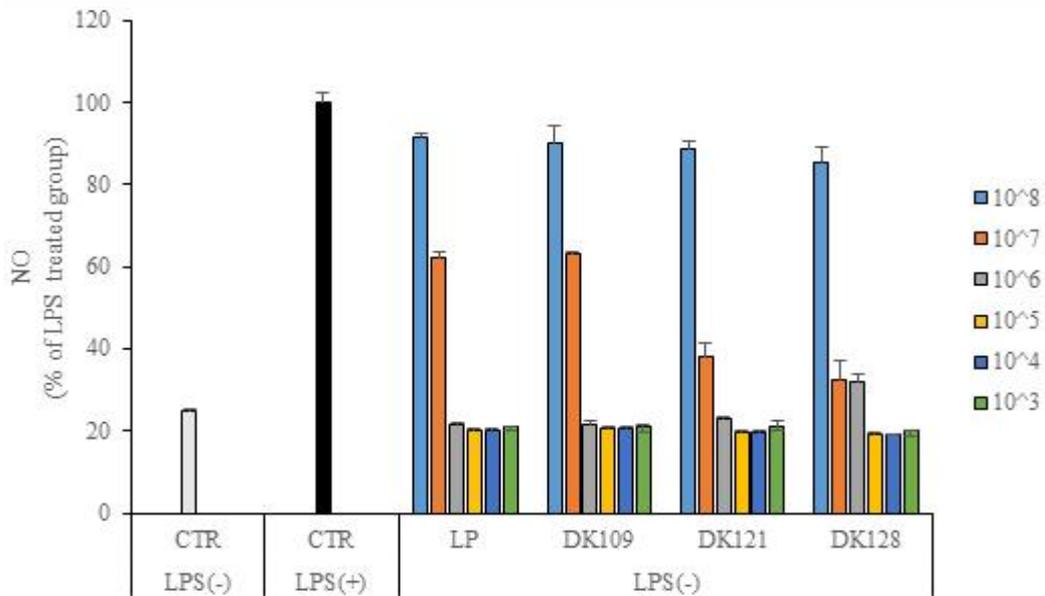


Fig. 32. The inhibitory effects of selected strains on non-LPS-induced NO production

*LP : Commercial strain LP(*L. plantarum*)

*All samples were pretreated each strains 2h at 37 °C and then control treated LPS(0.05mg/uL) 20h at 37 °C

*All values are presented as mean±standard error mean from triplicates

- LPS는 박테리아 표면에 존재하는 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide)로 숙주에 대한 면역반응을 일으키는 항원으로 사용할 수 있는 물질로 알려져있음

- NO는 이러한 면역반응에 의해 생성되는 물질로서 MTT assay에서 세포독성을 보였던 10⁸을 제외하고 보면 10⁷의 농도에서 면역반응을 자극시키는 것을 확인할 수 있었음. 또한 10⁷에서는 상용균주보다 더 큰 면역자극반응을 확인할 수 있었음

- 위 실험은 발효균주의 최종선발을 위한 실험으로 세포독성 조사와 NO 생성량만을 확인하였음. 이 후, 위 실험과 더불어 발효균주의 항산화능 측정 및 가용성 칼슘 변화량 측정 결과를 통한 최종선발 발효균주 1종을 적용한 발효유 및 발효유음료의 항염효과를 통해 기능성을 검증하는 것으로 결정하였음

○ 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주의 항산화능 측정

- 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주 3종의 항산화능을 측정하기 위해 발효균주 3종을 12-16시간 간격으로 MRS broth에서 3차 계대배양한 후 14% 환원탈지유에 2% 수준으로 접종하여 배양시켰음. 이 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하고, 유단백질의 응고를 위해 상등액의 pH를 0.1 M HCl을 사용하여 4.0으로 조정하였으며, 45 °C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였음

- 상등액의 pH를 다시 0.1 NaOH를 사용하여 7.0으로 조정한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 Sample로 사용하였음

- 항산화능 측정에는 DPPH, ABTS, FRAP assay 방법을 사용하였으며, DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해 전처리한 Sample과 DPPH 시약을 1:1 비율로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였음
- ABTS 라디칼 소거능 측정을 위해 전처리한 Sample과 ABTS 시약을 1:100 비율로 혼합하여 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였음
- FRAP 활성 측정을 위해 전처리한 Sample과 FRAP 시약을 1:19 비율로 혼합하여 상온에서 30min 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였음

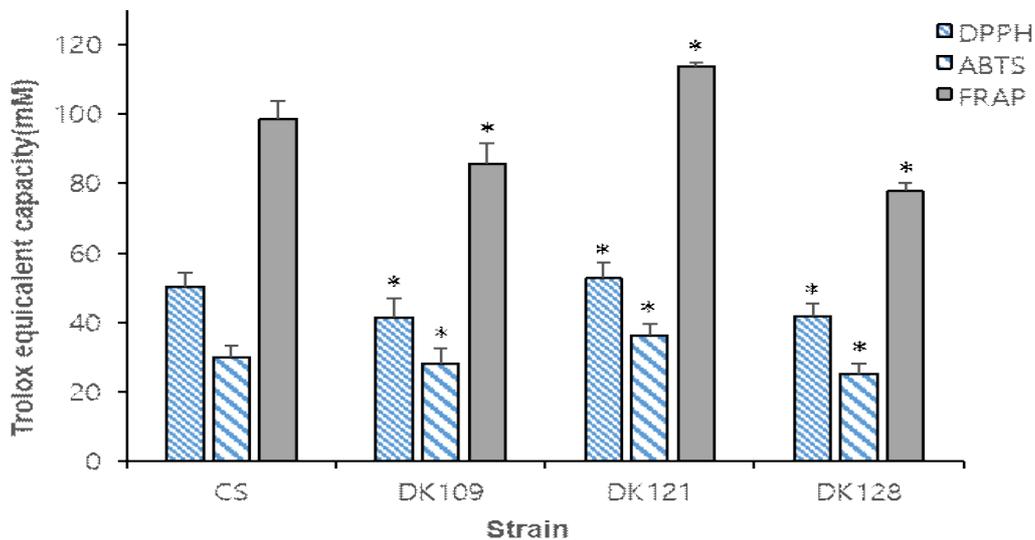


Fig. 33. Antioxidant activity of candidate strain with selected incubation medium

*CS : Commercial strain(LA-5 (Chr. Hansen, Denmark))

*All value were mean±SD of triplicates

*All strains were precultured with 14% skim milk, 3% glucose at 37 °C for 24 h

*Statistical difference : *p<0.05 CS vs LAB

- 항산화능 측정(DPPH, ABTS, FRAP assay) 실험에서 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, DK 109(*L. plantarum*), DK 121(*L. paracasei*) 및 DK 128(*L. casei*)의 활성은 각각 41.46 ± 0.21 , 52.96 ± 0.24 , 41.54 ± 0.18 mM로 DK 121이 가장 높은 활성을 보였으며, ABTS 라디칼 소거능 측정 결과 각각 28.13 ± 2.02 , 36.3 ± 1.32 , 25.06 ± 1.54 mM의 활성을 보였음. FRAP 활성능 측정 실험에서도 DK 121이 가장 높은 항산화능을 보였음

○ 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주의 가용성 칼슘 함량 측정

- 선발 발효균주 3종의 가용성 칼슘 함량을 측정하기 위해 MRS broth에서 12-16시간 간격으로 3차 계대배양한 균주를 14% 환원탈지유가 포함된 배지에 2%수준으로 접종한 후 Quantichrom calcium assay kit(BioAssay systems, U.S.A)를 사용하여 가용성 칼슘 함량을 측정하였음

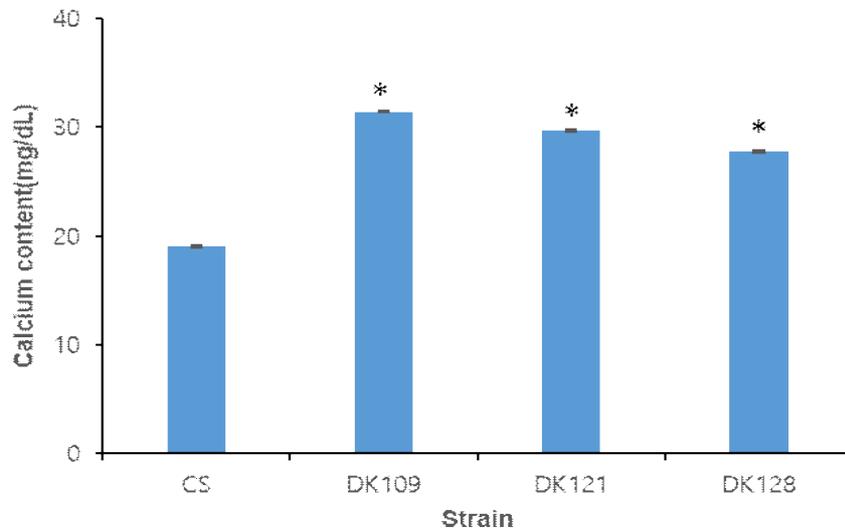


Fig. 34. Calcium assimilation of candidate strain with selected incubation medium

*CS : Commercial strain (LA-5 (Chr. Hansen, Denmark))

*Calcium assimilation measured by Calcium assay kit (DICA-500, Bioassay sys, USA)

*All value were mean±SD of triplicates

*All strains were precultured with 14% skim milk, 3% glucose at 37 °C for 24 h

*Statistical difference : *p<0.05 CS vs LAB

- 선발 발효균주 3종의 가용성 칼슘 함량을 측정 결과, 3종의 DK 균주 모두 비교균인 상업용 균주 LA-5(*L. acidophilus*)보다 높은 칼슘 함량을 보였으며, DK 109(*L. plantarum*)는 31.46 mg/dL로 가장 높은 칼슘 함량을 나타냄
- 발효균주 3종의 기능성 검증에서 항염효과 측정 결과 10^8 을 제외한 나머지 농도에서는 세포독성을 관찰할 수 없었으며, NO 측정 실험에서 10^7 이 면역자극 반응에 유효한 결과를 보였음.
- 또한, 항산화능에서 DK 121(*L. paracasei*)이 가장 높은 값을 보였으나, 칼슘 흡수를 촉진시키는 펩타이드 생성 균주 타겟과 환원탈지유에서의 성장 패턴 변화의 결과에 따라 최종 발효유 집중 균주로서 DK 109(*L. plantarum*)를 발효균주로 최종 선발하였음

■ 최종 선발 발효균주의 최적 배양배지 및 조건 설정

○ 선발 발효균주의 최적 배양배지 및 조건 설정을 위한 Chromatography 분석

- 선발 발효균주의 최적 배양배지 및 조건 설정을 위하여 TLC 및 HPLC를 이용하여 당 분석을 진행하였음. 기초생리활성 및 제품적용성 검증과 기능성 검증을 통하여 선발된 DK 109(*L. plantarum*)균주와 최종 선발 전 후보균주였던 DK 121(*L. paracasei*), DK 128(*L. casei*)균주를 모두 사용하여 균주 간 성분의 차이점을 확인하였음

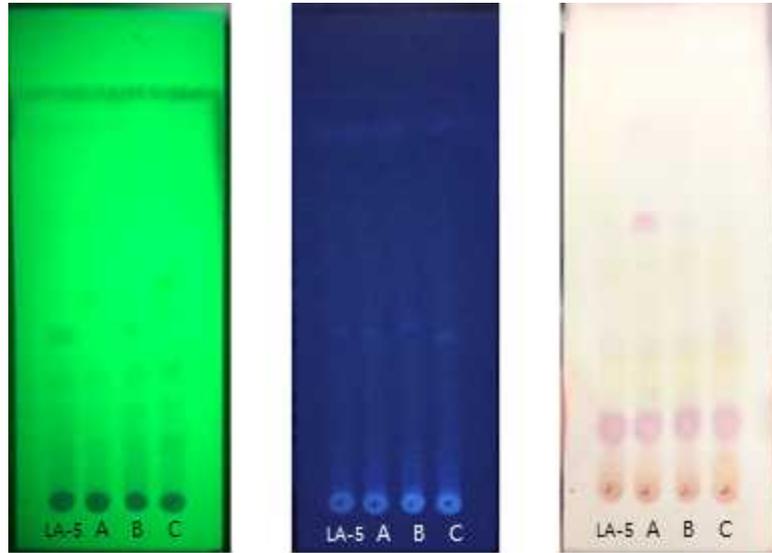


Fig. 35. TLC(Thin layer chromatography) of DK strain and LA-5.

* LA-5 : Commercial strain(*Lactobacillus acidophilus*-5)

*A : DK 109 (*Lactobacillus plantarum*)

*B : DK 121 (*Lactobacillus paracasei*)

*C : DK 128 (*Lactococcus casei*)

*All the spots were made five.

- TLC 분석 결과, DK 109(*L. plantarum*) 균주에서 DK 121(*L. paracasei*) 및 DK 128(*L. casei*)와는 다른 지표 물질을 찾을 수 있었음. 이에 따라 DK 109의 HPLC 분석을 진행함

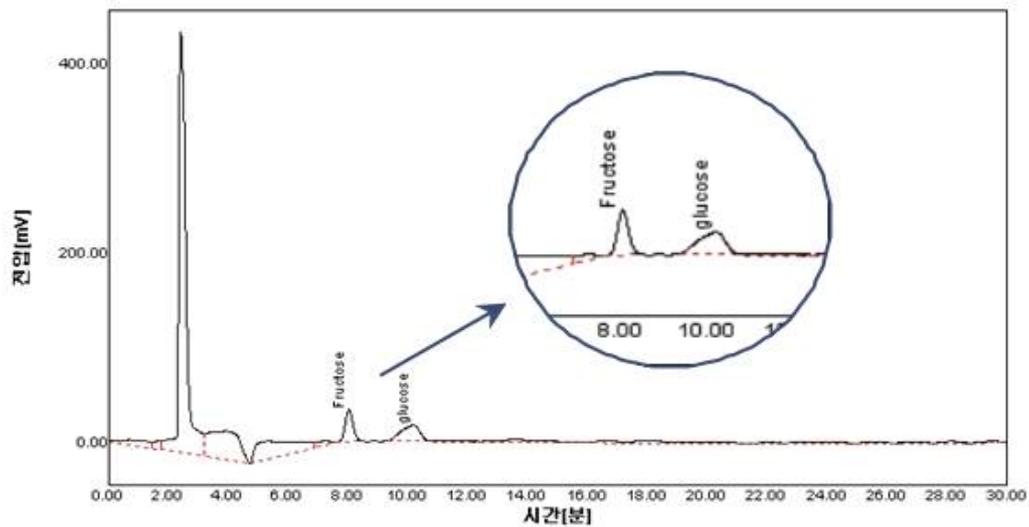


Fig. 36. HPLC(High performance liquid chromatography) of DK strains.

- 최종 선발균주의 HPLC 분석 결과, Fructose와 glucose로 추정되는 물질이 검출되었음. 이에 따라 Fructose 및 Glucose를 첨가한 배지에 접종 후, 배양 시간별 적정산도, pH 및 생균수를 측정하였음

Table. 12. 당 첨가 배지에서의 DK 109(*L. plantarum*)의 성장변화 탐색

Sample	T·A(%)	pH	count(CFU/mL)
당첨가배지	0.27	5.31	-
0 h	0.27	5.26	2.20×10^7
4 h	0.29	5.23	4.80×10^7
8 h	0.32	5.21	5.60×10^7
12 h	0.37	5.09	1.20×10^8
16 h	0.46	4.92	1.40×10^8
24 h	0.54	4.63	1.43×10^8

- 최종 선발균주를 당첨가 배지에 배양한 결과, 시간이 지남에 따라 pH는 감소, 균수는 증가하는 경향을 보임. 이 후 당첨가배지를 선발균주의 최적배지 조건으로 설정하였음

■ 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주를 이용한 발효유 및 발효유음료 개발

○ 발효유 및 발효유음료의 부가소재 농도 설정을 위한 발효패턴 탐색

- 땅콩새싹 발효유 개발을 위해 협동기관1(약학대학)에서 전달받은 땅콩새싹추출물 및 주관연구기관(주유담)에서 전달받은 발효유 배합비에 따라 농도별(0, 0.05, 0.1%)로 배합하여 선발균주인 DK 109(*L. plantarum*)를 접종하고, 땅콩새싹추출물 발효유의 발효패턴을 탐색하였음

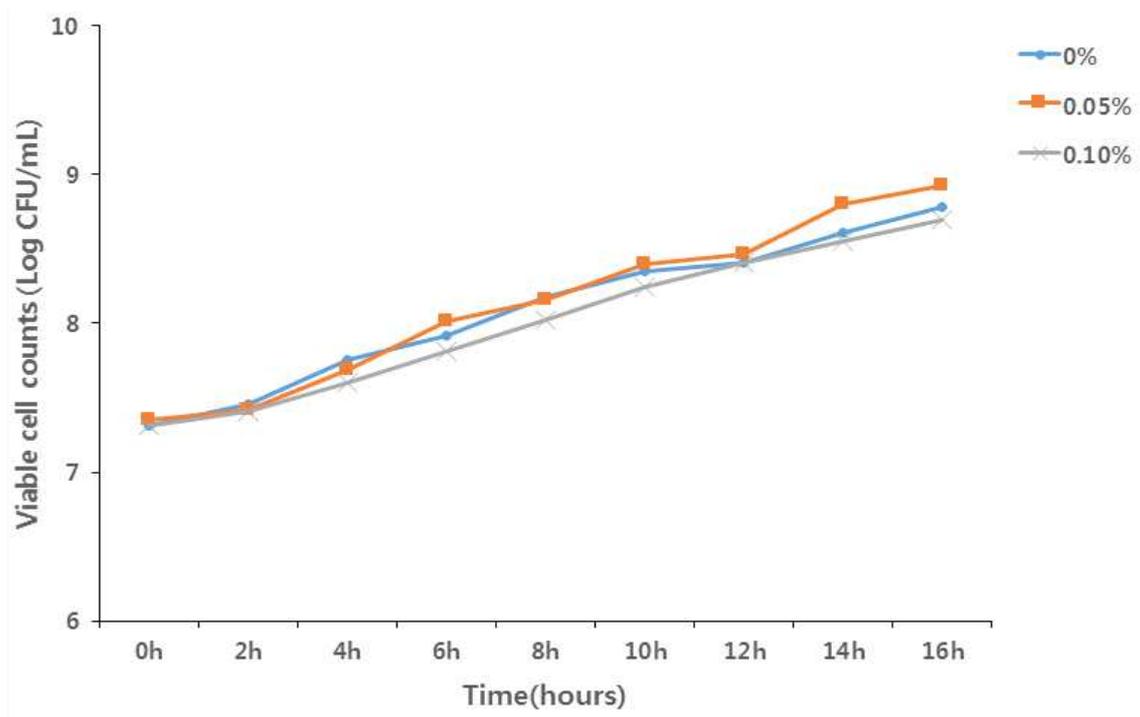


Fig. 38. Changes of viable cell counts of yogurts inoculated with *L. plantarum* DK 109 during the fermentation time

*0, 0.05, 0.1% : Concentration of extract

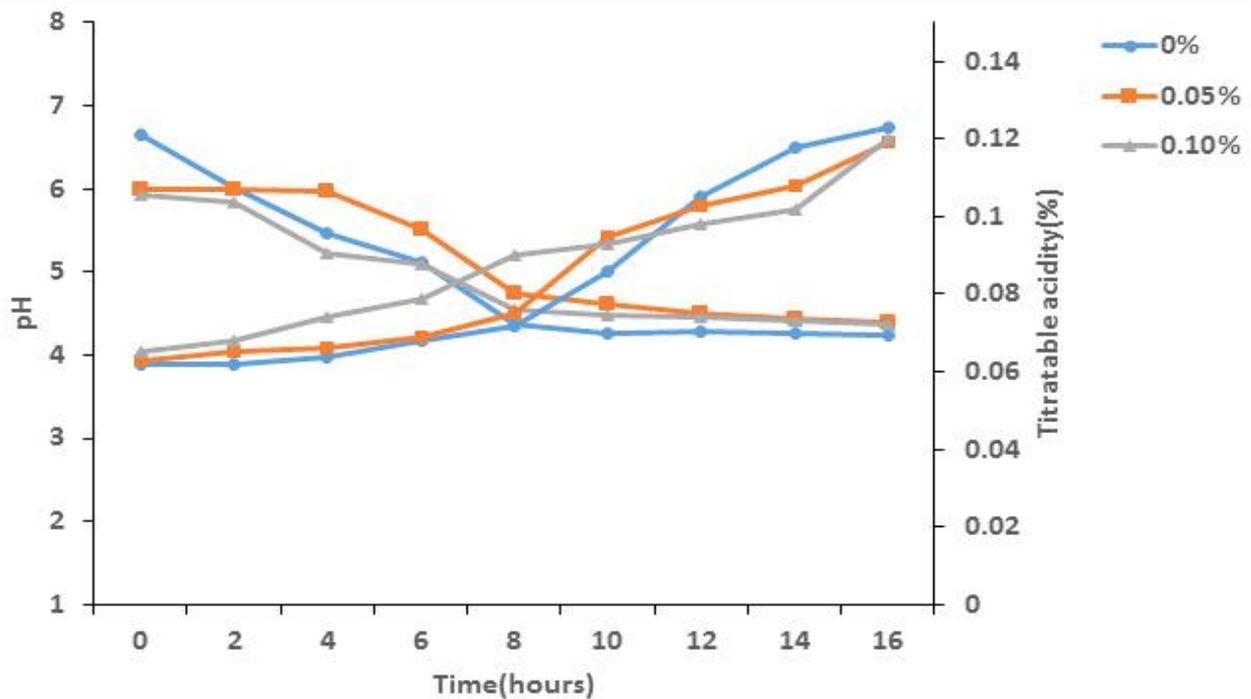


Fig. 39. Changes of PH and titratable acidity of yogurts with yogurts inoculated with *L. plantarum* DK 109 during the fermentation time

*0, 0.05, 0.1% : Concentration of extract

- 땅콩새싹추출물 발효유의 발효패턴 확인 결과, 0.05% 함유 발효유가 발효 종료시간인 16시간에 가장 생균수가 높았으며, 발효유의 적정 pH 및 산도에 도달함을 확인하였음. 또한 0.1% 함유 발효유는 적정 pH 및 산도에 도달하기 전 점도가 딱딱한 커드를 형성하여 제품 적용성이 낮다고 판단하였음. 따라서 0.05%를 최종 땅콩새싹추출물 농도로 결정하였음
- 작약 발효유음료 개발을 위해 협동기관1(약학대학)에서 전달받은 작약추출물 및 주관연구기관(㈜유담)에서 전달받은 발효유음료 배합비에 따라 농도별(0, 0.05, 0.1%)로 배합하여 선발균주인 DK 109(*L. plantarum*)를 접종하고, 땅콩새싹 발효유의 발효패턴 탐색법과 동일한 방법으로 작약추출물 발효유음료의 발효패턴을 탐색하였음

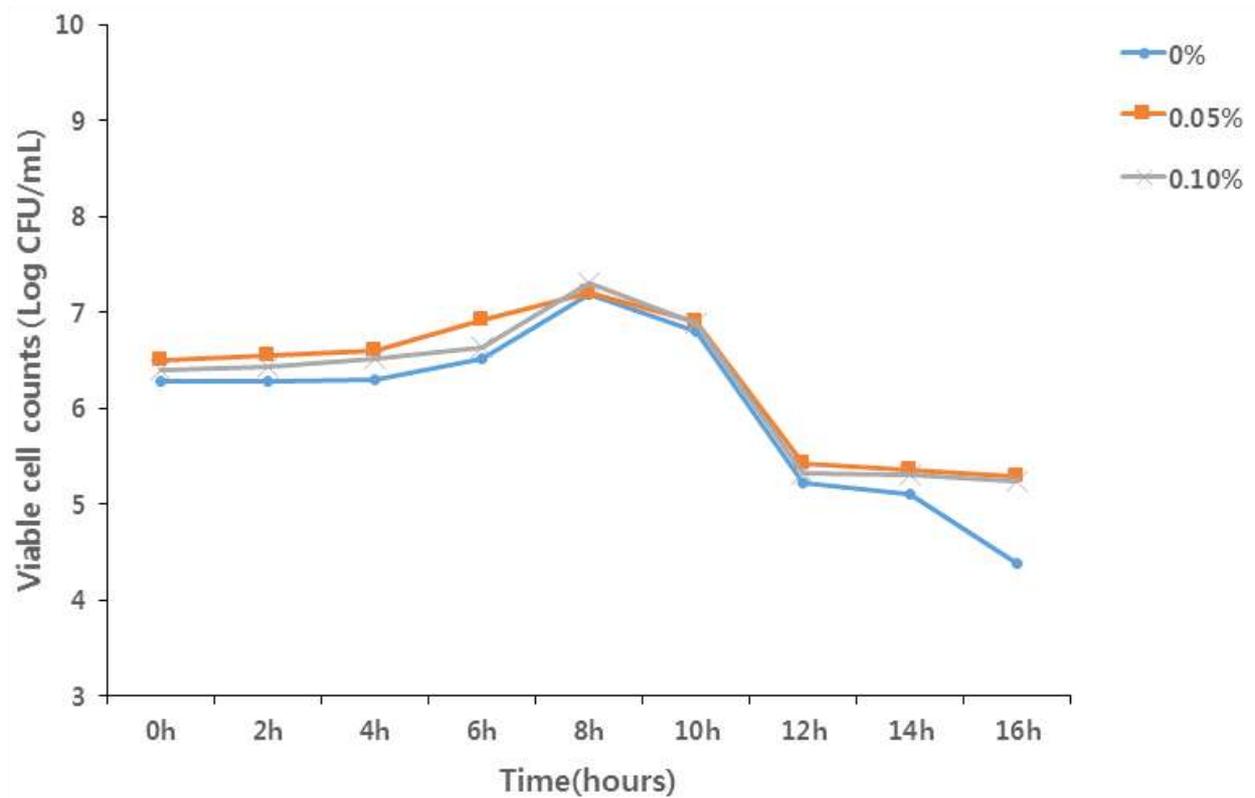


Fig. 40. Changes of viable cell counts of yogurt beverage inoculated with *L. plantarum* DK 109 during the fermentation time

*0, 0.05, 0.1% : Concentration of extract

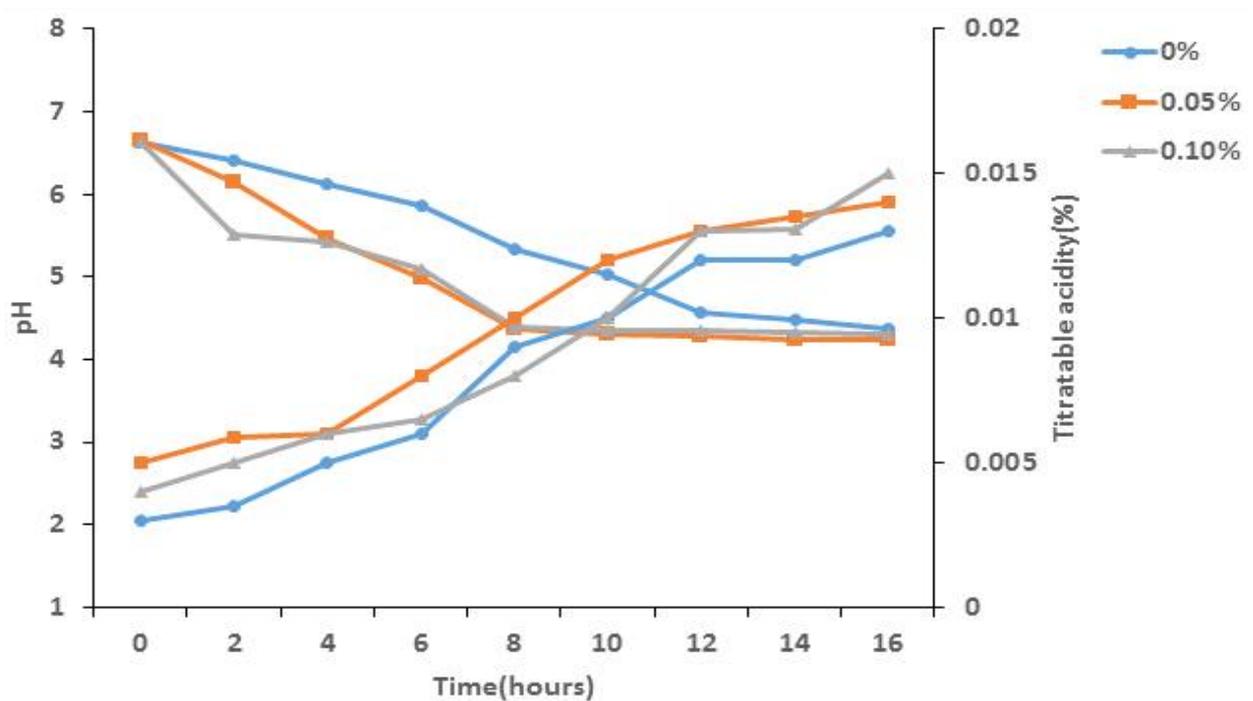


Fig. 41. Changes of PH and titratable acidity of yogurt beverage with yogurts inoculated with *L. plantarum* DK 109 during the fermentation time

*0, 0.05, 0.1% : Concentration of extract

- 땅콩새싹추출물 배합과 동일한 방법으로 작약추출물 발효유음료의 발효패턴을 탐색한 결과, 0.1%의 농도에서의 pH와 산도의 변화 속도가 가장 안정적이었음.
- 가장 높은 생균수에 도달하는 8시간 기준으로 적정 pH 및 산도에 도달함을 확인하였음. 이에 따라, 작약추출물 발효유음료의 작약 농도를 0.1%로 설정하였음
- 또한 무첨가 발효유 및 무첨가 발효유음료와 비교하였을 때, 땅콩새싹추출물과 작약추출물을 함께 배합하였을 경우 상대적으로 발효패턴이 안정적임을 확인하여 발효균주와의 시너지스트를 확인할 수 있었음
- 연구 결과를 주관연구기관 (주)유담에 전달하여 배합비 설정에 있어 근거를 마련하였음

■ 개발 발효유 및 발효유음료의 기능성 검증

○ 개발 발효유 및 발효유음료의 가용성 칼슘 함량 측정

- 땅콩새싹 발효유의 가용성 칼슘 함량을 측정하기 위해 발효유의 전처리 과정을 거침.
- 발효유를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하고, 유단백질의 응고를 위해 상등액의 pH를 0.1 M HCl을 사용하여 4.0으로 조정하였으며, 45 °C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 전처리하였음
- 상등액의 pH를 다시 0.1 NaOH를 사용하여 7.0으로 조정한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 Sample로 사용하였으며, Quantichrom calcium assay kit(BioAssay systems, U.S.A)를 사용하여 가용성 칼슘 함량을 측정하였음
- 가용성 칼슘 함량 실험의 대조군으로는 땅콩새싹 무첨가 발효유를 사용하였으며, 비교군으로는 칼슘흡수율이 우수하여 뼈 건강 소재로 활용되는 CPP(Casein phosphopeptide)를 활용하여 CPP 첨가 발효유를 사용하였음

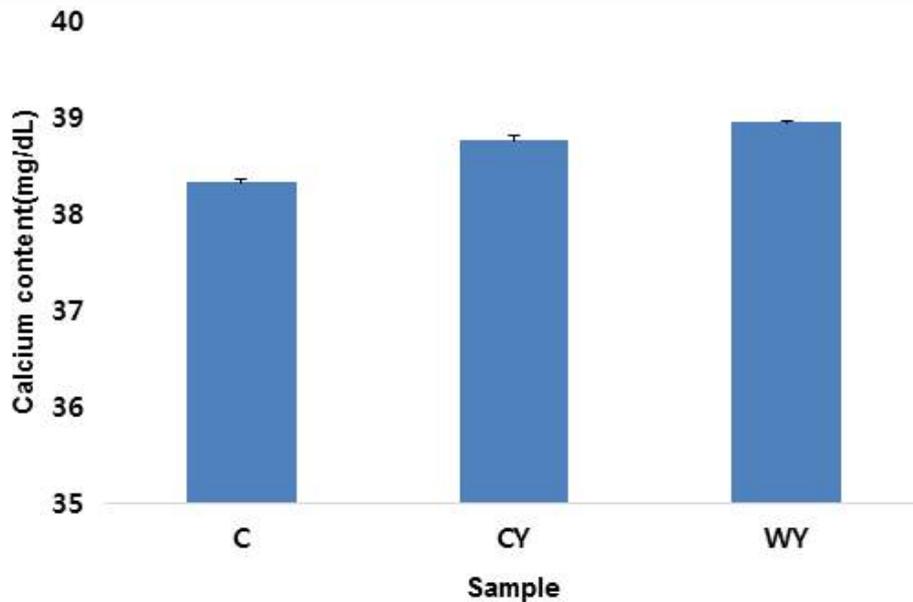


Fig. 42. Calcium assimilation of fermented milk

*C : control of fermented milk

*CY : Yogurt was added CPP(casein phosphopeptide)

*WY : Yogurt was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark)

*Calcium assimilation measured by Calcium assay kit (DICA-500, Bioassay sys, USA)

*All value were mean \pm SD of triplicates

- 땅콩새싹 발효유의 가용성 칼슘 함량 측정 결과, 대조군인 땅콩새싹 무첨가 발효유, 비교군인 CPP 첨가 발효유 및 땅콩새싹 발효유의 칼슘 함량은 각각 38.33%, 38.76% 및 38.95%로 땅콩새싹 발효유의 칼슘 함량이 가장 높게 측정되었음
- 작약 발효유음료의 가용성 칼슘 함량을 측정하기 위해 Quantichrom calcium assay kit(BioAssay systems, U.S.A)를 사용하여 가용성 칼슘 함량을 측정하였음
- 대조군으로는 작약 무첨가 발효유음료를 사용하였으며, 비교군으로는 CPP 첨가 발효유음료를 사용하였음

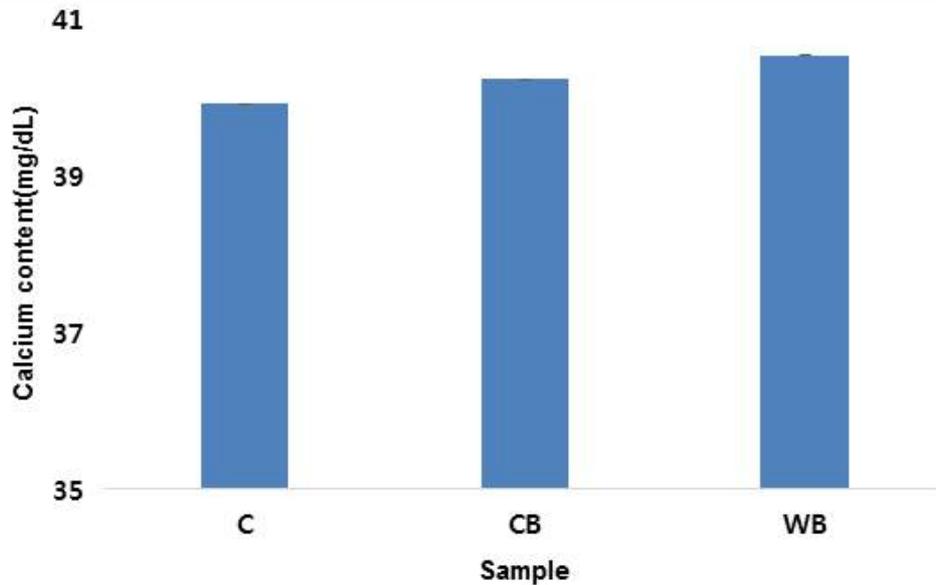


Fig. 43. Calcium assimilation of fermented milk beverage

*C : control of fermented milk beverage

*CB : Yogurt beverage was added CPP(casein phosphopeptide)

*WB : Yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark)

*Calcium assimilation measured by Calcium assay kit (DICA-500, Bioassay sys, USA)

*All value were mean±SD of triplicates

- 작약 발효유음료의 가용성 칼슘 함량 측정 결과, 대조군인 작약 무첨가 발효유음료와 비교하였을 때, CPP 첨가 발효유음료와 가수분해한 WPC 첨가 발효유음료의 칼슘 함량이 높게 측정되었음

○ 개발 발효유 및 발효유음료의 항산화능 측정

- 땅콩새싹 발효유의 항산화능을 측정하기 위해 발효유를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하고, 유단백질의 응고를 위해 상등액의 pH를 0.1 M HCl을 사용하여 4.0으로 조정하였으며, 45 °C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 전처리하였음

- 상등액의 pH를 다시 0.1 NaOH를 사용하여 7.0으로 조정한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 Sample로 사용하였음

- 항산화능 측정에는 ABTS, DPPH, Hydroxyl radical scavenging assay 방법을 사용하였으며, ABTS 라디칼 소거능 측정을 위해 전처리한 Sample과 ABTS 시약을 1:100 비율로 혼합하여 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였음

- DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해 전처리한 발효유 Sample과 DPPH 시약을 1:1 비율로 혼

합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였음

- Hydroxyl 라디칼 소거능 측정을 위해 전처리한 발효유 Sample과 0.75 mM 0,10-phenanthroline, PBS buffer, 2.5 mM FeSO₄ 및 20 mM H₂O₂를 1:1:1:1:1 비율로 혼합하여 37 °C의 항온수조에서 1시간 30분간 반응시킨 후 536 nm에서 흡광도를 측정하였음
- 각 항산화능 측정 실험에서의 검정곡선 지표로는 Trolox(Vit.E)를 사용하였으며, 대조군으로는 땅콩 무첨가 발효유를, 비교군으로는 CPP 첨가 발효유를 사용하였음

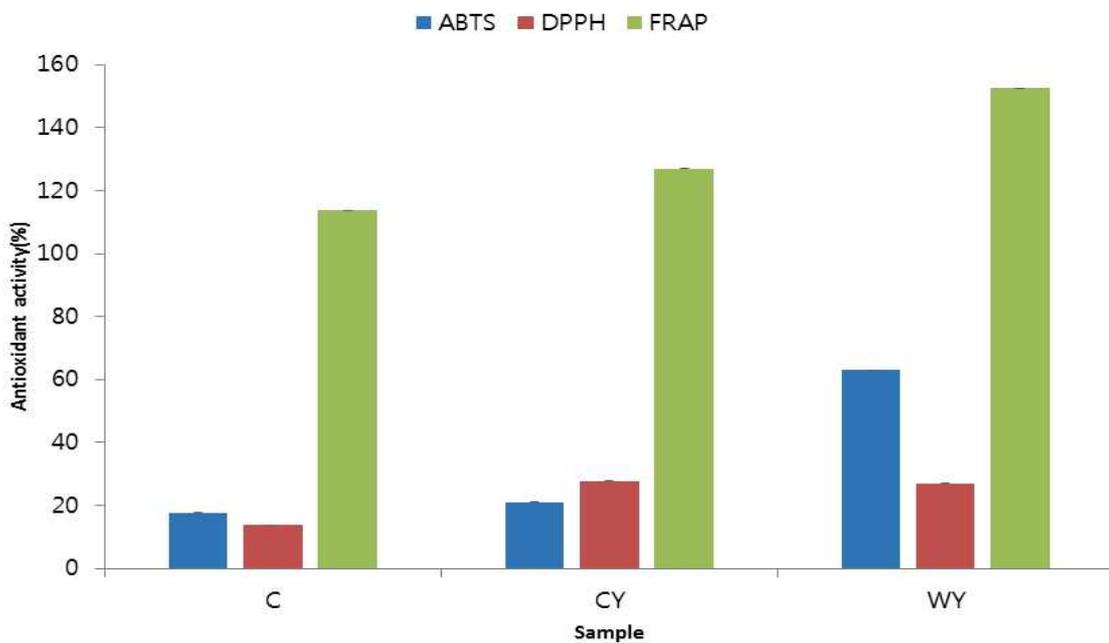


Fig. 44. Antioxidant activity of fermented milk.

*C : control of fermented milk beverage

*CY : Yogurt beverage was added CPP(casein phosphopeptide).

*WY : Yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*All value were mean±SD of triplicates.

- ABTS, DPPH, Hydroxyl radical scavenging 방법을 이용한 항산화 활성 측정 결과, 대조군인 땅콩새싹 무첨가 발효유 및 비교군인 CPP첨가 발효유보다 가수분해한 WPC 및 땅콩새싹 첨가 발효유의 항산화 활성이 높게 측정되었음
- 땅콩새싹 발효유의 항산화 활성 측정에 이어 작약 발효유음료의 항산화능을 측정하기 위해 ABTS, DPPH, Hydroxyl radical scavenging assay 방법을 사용하였으며, ABTS 라디칼 소거능 측정을 위해 Sample과 ABTS 시약을 1:100 비율로 혼합하여 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였음

- DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해 발효유음료 Sample과 DPPH 시약을 1:1 비율로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였음
- Hydroxyl 라디칼 소거능 측정을 위해 발효유음료 Sample과 0.75 mM 0,10-phenanthroline, PBS buffer, 2.5 mM FeSO₄ 및 20 mM H₂O₂를 1:1:1:1:1 비율로 혼합하여 37 °C의 항온수조에서 1시간 30분간 반응시킨 후 536 nm에서 흡광도를 측정하였음
- 각 항산화능 측정 실험에서의 검정곡선 지표로는 Trolox(Vit.E)를 사용하였으며, 대조군으로는 작약 무첨가 발효유음료를, 비교군으로는 CPP 첨가 발효유음료를 사용하였음

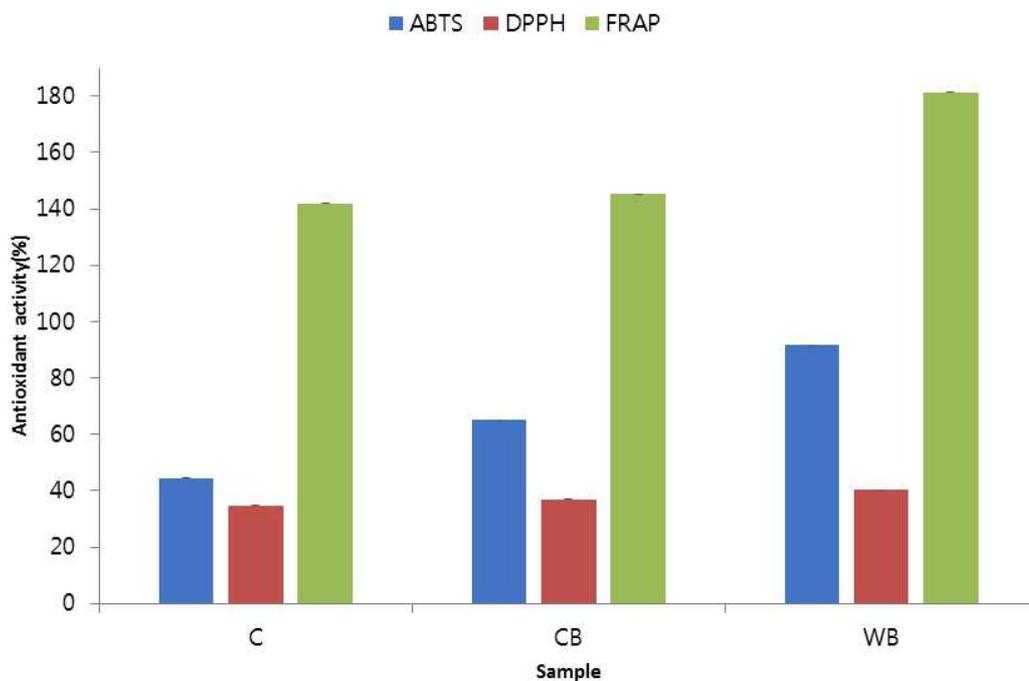


Fig. 45. Antioxidant activity of fermented milk.

*C : control of fermented milk beverage

*CB : Yogurt beverage was added CPP(casein phosphopeptide).

*WB : Yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*All value were mean±SD of triplicates.

- 항산화능 측정(ABTS, DPPH, Hydroxyl radical scavenging assay)실험 결과, 대조군인 작약 무첨가 발효유음료 및 비교군인 CPP첨가 발효유음료보다 가수분해한 WPC 및 작약 첨가 발효유음료의 항산화 활성이 높게 측정되었음

○ 개발 발효유 및 발효유음료의 항염 효과 측정

- 개발한 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 항염효과 검증을 위해 마우스의 RAW 264.7

대식세포를 (KCLB; Korea) 구입하여 사용하였음

- 배지는 10% FBS가 함유된 DMEM(Welgene, South Korea) 배지를 이용하여 37 °C 5% CO₂ incubator에서 배양하여 사용하였음. 세포는 75 T 플라스크에 배양하였으며 배지는 2 일마다 교환해 주었음
- RAW 264.7 세포에 염증반응을 유도하기 위해 세포는 96 well plate(2×10^4 /well)에 DMEM 배지를 분주하고 3시간 동안 부착시킴
- 땅콩새싹 발효유의 전처리를 위하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 상등액을 샘플로 사용하였음. 이후 전처리한 발효유 샘플과 발효유음료 샘플을 농도별(100, 70, 50, 30, 10, 1%)로 처리하고 1시간 후에 LPS(0.05 µg/mL)를 20시간 처리하였음
- 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 세포독성을 측정하기 위해 MTT-based cytotoxicity assay를 시행하였음
- 전처리된 발효유와 발효유음료에 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포를 20시간 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 넣고 3시간 배양시킴. 이후 lysis buffer를 가하여 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였음
- 발효유 및 발효유음료의 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 측정하였음. 발효유 및 발효유음료와 LPS를 20시간 처리한 세포의 상등액 50 µl와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 2% phosphoric acid, 0.1% α-naphthylethylene diamide dihydrochloride) 50 µl를 혼합하여 상온에서 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 데이터를 분석하였음
- 땅콩새싹 발효유의 대조군으로는 땅콩새싹 무첨가 발효유, 비교군으로는 CPP 첨가 발효유를 사용하였으며, 작약 발효유음료의 대조군으로는 작약 무첨가 발효유음료, 비교군으로는 CPP 첨가 발효유음료를 사용하였음

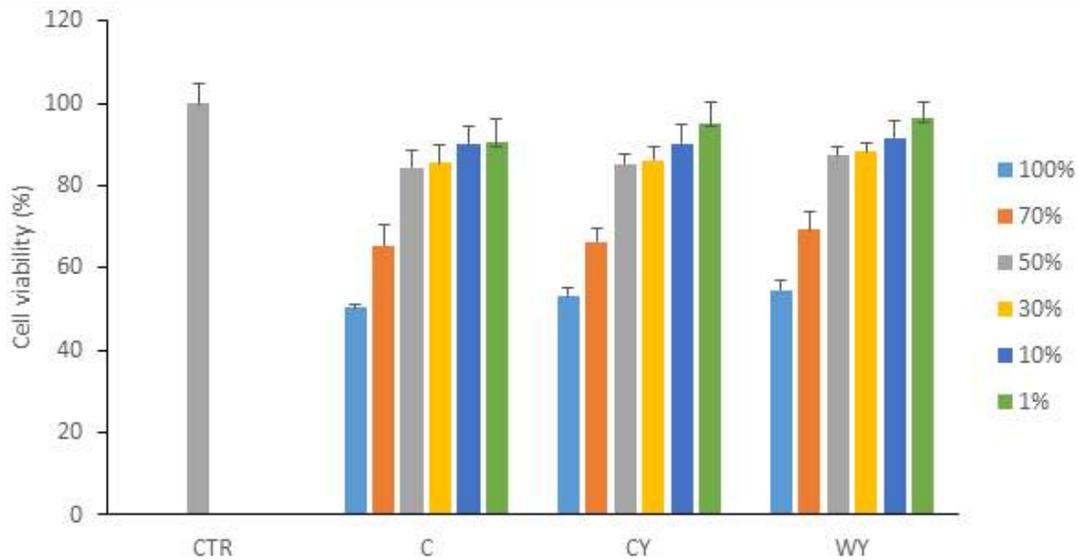


Fig. 46. Cytotoxicity of yogurt in RAW 264.7 cell

*C : control of fermented milk.

*CY : Yogurt was added CPP(casein phosphopeptide).

*WY : Yogurt was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*All value were mean±SD of triplicates.

- 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 96 well에 5×10^4 cells/well당 의 농도로 처리한 땅콩새싹발효유의 세포독성 MTT assay 결과, 100%와 70%의 농도를 제외한 농도에서 세포 독성 또는 성장촉진 작용을 확인할 수 없었음

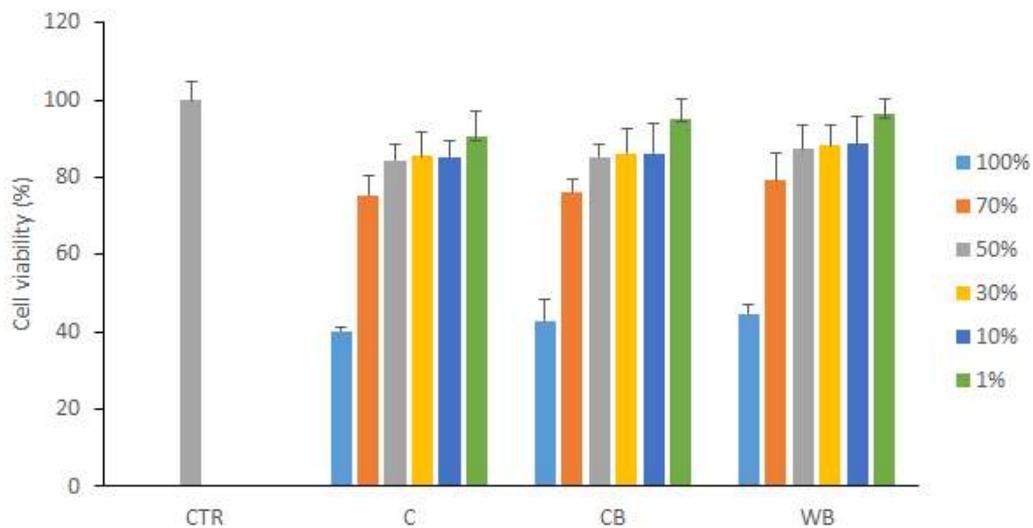


Fig. 47. Cytotoxicity of yogurt beverage in RAW 264.7 cell

*C : control of fermented milk beverage

*CB : Yogurt beverage was added CPP(casein phosphopeptide).

*WB : Yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*All value were mean±SD of triplicates.

- 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 96 well에 5×10^4 cells/well당 의 농도로 처리한 약 발효유음료의 세포독성 MTT assay 결과, 100%와 70%의 농도를 제외한 농도에서 세포 독성 또는 성장촉진 작용을 확인할 수 없었음

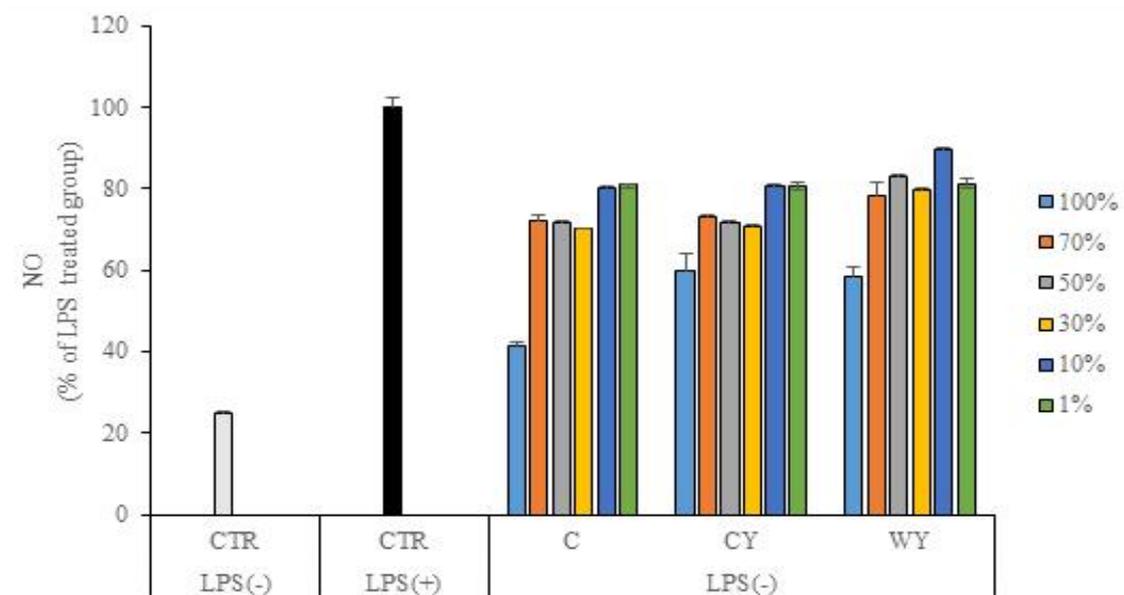


Fig. 48. The inhibitory effects of yogurt on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cell

*C : control of fermented milk beverage

*CY : Yogurt was added CPP(casein phosphopeptide).

*WY : Yogurt was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*All value were mean \pm SD of triplicates.

- MTT assay에서 세포독성을 보였던 100%와 70%의 농도를 제외하고 보면 10%의 농도에서 면역반응을 자극시키는 것을 확인할 수 있었음
- 또한 본 연구에서의 개발 제품인 발효유의 모든 농도에서서는 대조군 및 비교군보다 더 큰 면역자극반응을 확인할 수 있었음

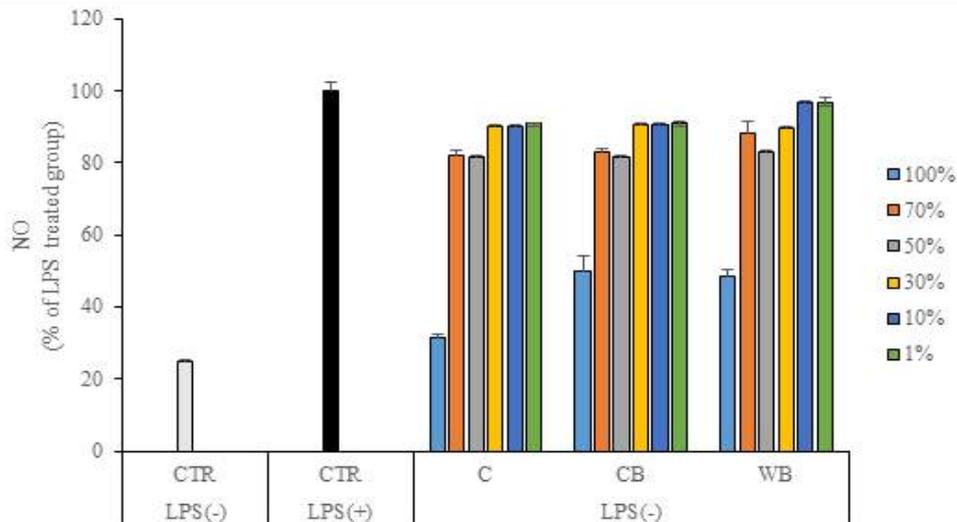


Fig. 49. The inhibitory effects of yogurt beverage on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cell

*C : control of fermented milk beverage

*CB : Yogurt beverage was added CPP(casein phosphopeptide).

*WB : Yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*All value were mean±SD of triplicates.

- 약액 발효유음료도 땅콩새싹 발효유와 마찬가지로 MTT assay에서 세포독성을 보였던 100%와 70%의 농도를 제외하고 보면 10%의 농도에서 면역반응을 자극시키는 것을 확인할 수 있었음
- 또한 본 연구에서의 개발 제품인 약액 발효유음료의 모든 농도에서서는 대조군 및 비교군보다 더 큰 면역자극반응을 확인할 수 있었음
- 염증성 사이토카인의 발현 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에서 땅콩새싹 발효유 및 약액 발효유음료 시제품의 농도별 상등액을 LPS로 유도하였음
- RAW 264.7 세포에 MTT assay에서 세포독성을 보이지 않은 농도로 1시간 동안 전처리한 후 0.05 mg/mL의 LPS를 6시간동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 IL-1a와 IL-6의 생성 변화를 ELISA kit(Koma, korea)를 사용하여 탐색하였음
- 땅콩새싹 발효유 및 약액 발효유음료 50 μ L을 assay diluent 100 μ L과 함께 anti-mouse IL-1a 및 IL-6가 부착된 well에 첨가하여 반응시킨 후 biotinylated detection antibody를 첨가하였음
- PBS buffer로 3-4번 워싱 후 streptavidin-horseradich peroxidase conjugate를 첨가하여 부착된 peroxidase conjugate를 검출하고, 1 M H₂SO₄ 100 μ L을 첨가하여 반응을 종료시켰음

- well은 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Cytokine의 표준 곡선은 linear doseresponse standard curve를 이용하여 농도정량 하였음

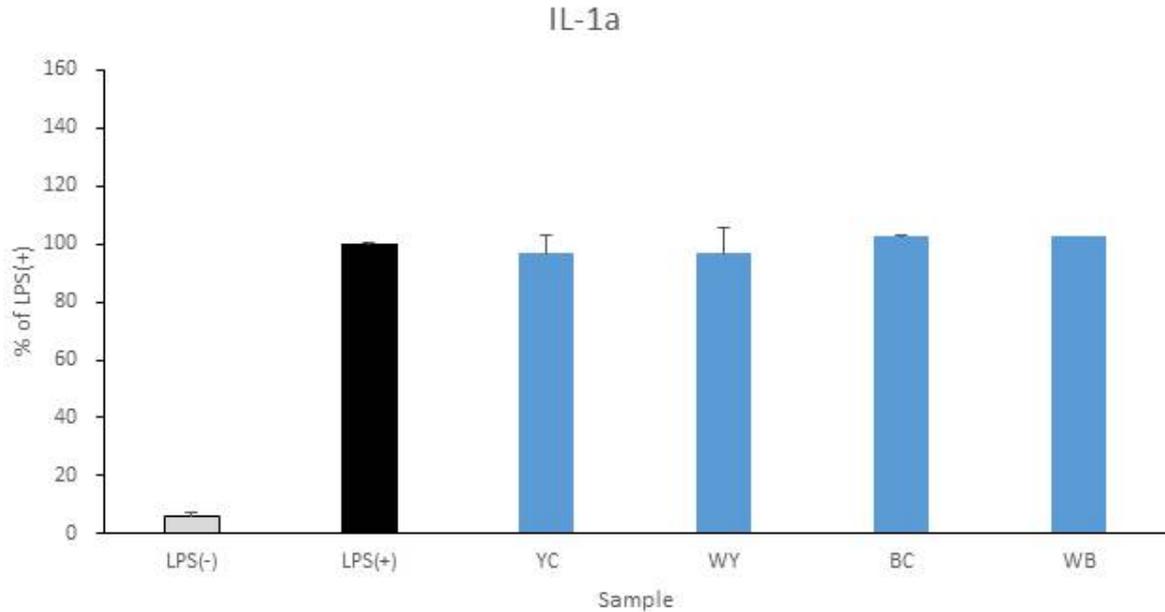


Fig. 50. Comparison of IL-1a production of products in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

*YC : yogurt control

*WY : Yogurt was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*BC : yoghurt beverage control

*WB : yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*Data are expressed as mean±SD(n=4)

*All sample treated LPS-stimulated.

- IL-1a 생성량을 측정하였을 때 샘플은 LPS 처리 control과 전반적으로 유의한 생성량을 보였음
- 특히, 본 연구에서의 개발 제품인 땅콩새싹 발효유(WY)와 작약 발효유음료(WB)는 각각의 Control 각각의 LPS 처리 control군보다 높은 사이토카인 생성능을 확인하여 제품개발시 면역증진효과가 기대됨

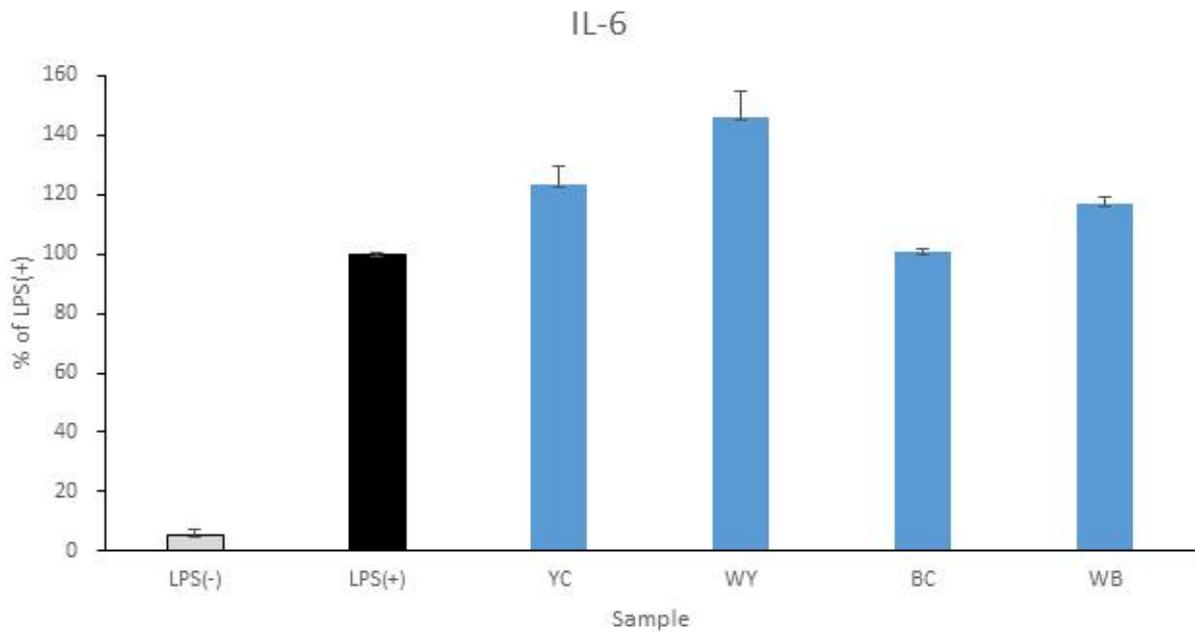


Fig. 51. Comparison of IL-6 production of products in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

*YC : yogurt control

*WY : Yogurt was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*BC : yoghurt beverage control

*WB : yogurt beverage was added 10% WPC hydrolysates using Alcalase 2.4L(novozymes, Denmark).

*Data are expressed as mean±SD(n=4)

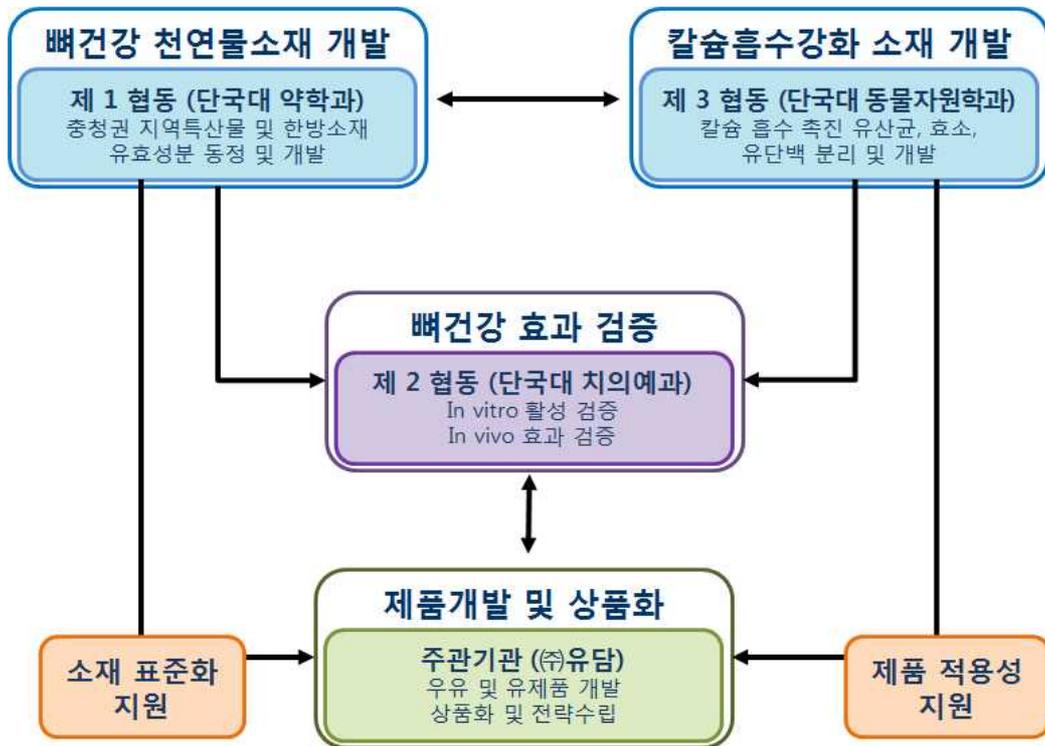
*All sample treated LPS-stimulated.

- IL-6 생성량을 측정하였을 때 샘플들은 LPS 처리 control군과 비교하였을 때 NO생성을 증가 및 억제하는 결과를 보였음. 특히 본 연구에서의 개발 제품인 땅콩새싹 발효유는 LPS 처리 control군 및 다른 Sample보다 높은 사이토카인 생성능을 확인하여 면역증진효과를 확인하였음. 따라서, 개발제품은 면역증진 제품으로서의 효과가 기대됨

- 실험에서 사용된 비교군 CPP(Casein phosphopeptide) 소재는 칼슘흡수율이 우수하여 뼈 건강 소재로 다수 이용되고 있음. 아래 표와 같이 본 연구에서 개발된 유청단백질 유래 칼슘 흡수촉진 펩타이드는 타 첨가물 없이 유산균의 대사에 따른 분해로 생성되는 펩타이드로서 가공비 및 기 개발 물질의 첨가 없이 제품생산이 가능해 매우 경제성이 있을 것으로 예상됨

구분	기준	가격 (kg, 원)	연구소재 (천연물)	가격 (kg, 원)	비고
칼슘흡수촉진 소재	CPP (칼슘흡수 촉진 펩타이드)	270,000	펩타이드 혼합물	25,000	세계적으로 활용되고 있는 정제된 펩타이드인 CPP대비 펩타이드 혼합물의 칼슘흡수 제고율은 낮은 반면 예상 가격은 1/10로 가격경쟁력이 매우 높음

2-1-2. 연구개발 추진체계



연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	초고령화 대비 뼈 건강 천연신소재 활용 유제품 개발	주관연구책임자 (김홍석)의 총 22명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	(주)유담	6명
대학	단국대학교	16명
국공립(연)		
출연(연)		
기타		

(주)유담	단국대학교 1	단국대학교 2	단국대학교 3
과제명	과제명	과제명	과제명
연구책임자명 (김홍석)의 5명	연구책임자명 (박소영)의 3명	연구책임자명 (오충훈)의 5명	연구책임자명 (김철현)의 5명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
뼈 건강 증진 우유, 유제품 개발 및 상품화	뼈 건강 증진 천연물소재 개발	뼈 건강 효과검증 및 동물실험	칼슘 흡수 촉진 소재 개발

2-2. 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	개발물질 대량생산공정 설정														5,000	김홍석 (주)유담
2	개발 제품(우유) 원료 탐색														5,000	김홍석 (주)유담
3	개발 제품(우유) 배합비 설정														10,000	김홍석 (주)유담
4	충청권 지역특산물 확보														10,000	박소영 (단국대 1)
5	지역특산물 추출														20,000	박소영 (단국대 1)
6	지역특산물 ALP 활성 스크리닝														20,000	박소영 (단국대 1)
7	활성 추출물 선별														5,000	박소영 (단국대 1)
8	추출물 라이브러리 구축														5,000	박소영 (단국대 1)
9	뼈형성촉진 유효소재발굴														3,000	오충훈 (단국대 2)
10	뼈형성촉진 유효지표물질발굴														3,000	오충훈 (단국대 2)
11	결과보고서작성														-	오충훈 (단국대 2)
12	유단백질 가수분해 특성														10,000	김철현 (단국대 3)
13	최적 효소처리 조건 설정														10,000	김철현 (단국대 3)

2차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	개발제품(우유) 품질관리기준 및 대량생산공정 설정														5,000	김홍석 ((주)유담)
2	개발제품(우유) 시제품 제작														5,000	김홍석 ((주)유담)
3	브랜드 네이밍 및 용기선정, 신제품 출시														10,000	김홍석 ((주)유담)
4	지역특산물 유효 성분 분리														30,000	박소영 (단국대 1)
5	지역특산물 유효 성분 동정														15,000	박소영 (단국대 1)
6	한방소재 확보														10,000	박소영 (단국대 1)
7	한방소재 추출														20,000	박소영 (단국대 1)
8	한방소재 ALP활성 스크리닝														20,000	박소영 (단국대 1)
9	한방소재 추출물 라이브러리 구축														5,000	박소영 (단국대 1)
10	뼈형성촉진 유효소재검증														40,000	오충훈 (단국대 2)
11	뼈과피억제 유효소재발굴														40,000	오충훈 (단국대 2)
12	뼈과피억제 유효소재검증														20,000	오충훈 (단국대 2)
13	유단백질 가수분해물 분리 및 정제														15,000	김철현 (단국대 3)
14	유단백질 가수분해물 기능성 검증														15,000	김철현 (단국대 3)
15	칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주 개발														10,000	김철현 (단국대 3)

3차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	개발 제품(발효유, 발효유음료) 품질관리기준 및 대량생산공정 설정	■	■	■	■	■	■								5,000	김홍석 (주)유담
2	개발제품(발효유, 발효유음료) 시제품 제작							■	■	■					5,000	김홍석 (주)유담
3	브랜드 네이밍 및 용기선정, 신제품 출시								■	■	■	■	■		10,000	김홍석 (주)유담
4	한방소재 유효성분 분리	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	박소영 (단국대 1)
5	한방소재 유효성분 동정							■	■	■	■	■	■	■	15,000	박소영 (단국대 1)
6	뼈건강 유효성분 라이브러리 구축											■	■	■	5,000	박소영 (단국대 1)
7	활성 추출물의 지표성분 설정 및 분석법 확립				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	박소영 (단국대 1)
8	활성 추출물의 추출법 확립				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	박소영 (단국대 1)
9	조기골다공증모델 유효소재검증	■	■	■	■	■									40,000	오충훈 (단국대 2)
10	중기골다공증모델 유효소재검증					■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	오충훈 (단국대 2)
11	결과분석					■	■	■				■	■	■	-	오충훈 (단국대 2)
12	칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주 최적 배양조건 설정	■	■	■	■										10,000	김철현 (단국대 3)
13	발효균주 기능성 검증			■	■	■	■	■							15,000	김철현 (단국대 3)
14	발효균주 제품적용성 및 발효패턴 확인						■	■	■	■	■	■	■	■	15,000	김철현 (단국대 3)

2-3. 연구개발성과

2-3-1. 논문 게재 성과

No	게재 연도	논문명	저자명	학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분	ISSN
1	2016. 12.19	<i>Lactobacillus plantarum</i> isolated from kimchi suppress food allergy by modulating cytokine production and mast cells activation	So-Young Park	Journal of Functional Foods	29	국외	SCI	1756-4646
2	2017. 02.01	Bone regeneration potential of sub-microfibrous membranes with osteogenic induction of rBMSC for tissue engineering	오충훈 외 1명	Tropical Journal of Pharmaceutical Research	16	국외	SCI	1596-5996
3	2017. 02.01	<i>Lactobacillus plantarum</i> isolated from kimchi suppress food allergy by modulating cytokine production and mast cells activation	So-Young Park 외 5명	Journal of functional foods : the official journal of the International Society for Nutraceuticals Functional Foods	29	국외	SCI	1756-4646
4	2017. 11.11	Constituents from <i>Scutellaria barbata</i> Inhibiting Nitric Oxide Production in LPS-Stimulated Microglial Cells	So-Young Park 외 4명	Chemistry&Biodiversity	14	국내	SCI	1612-1872
5	2017. 12.20	Functional properties of yogurt added with specific peptides derived from whey proteins	Ji-Young Won 외 3명	Journal of Milk Science and Biotechnology	35 (4)	국외	비SCI	2508-3635

6	2018. 05.11	Complete Genome Sequence of Bacillus subtilis Strain DKU_NT_03, Isolated from a Traditional Korean Food Using Soybean (Chung-gook-jang) for High-Quality Nattokinase Activity	오충훈 외 2명	Genome announcements	6 (25)	국외	비SCI	2169-8287
7	2018. 12.20	Immune-enhancing screening of fourteen plants on murine macrophage RAW 264.7 cells	박소영 외 4명	Tropical Journal of pharmaceutical research	18 (1)	국내	SCI	1596-5996

2-3-2. 특허성과

No	출원(등록)연도	특허명	출원인(등록인)	출원국	등록·기탁번호
1	2017.06.07	땅콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단	대한민국	10-2017-0071025
2	2017.06.07	새싹땅콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단	대한민국	10-2017-0071026
3	2018.09.14	땅콩새싹으로부터 추출된 레스베라트롤을 포함하는 조성물 및 레스베라트롤의 추출 방법	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (오충훈, 신장인, 이예진, 방만석)	대한민국	10-2018-0110320
4	2018.09.27	곽향 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역력 증진용 조성물	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (박소영)	대한민국	10-2018-0115341
5	2018.11.07	작약 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (박소영)	대한민국	10-1918206-0000
6	2018.12.14	과골세포 분화 억제 또는 조골세포 분화 촉진 기전을 통한 골다공증 치료용 작약 추출물 함유 조성물	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (오충훈, 신장인, 이예진, 방만석)	대한민국	10-2018-0162318

<특허 증빙자료>

1. 땅콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2017.06.07
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0071025 (접수번호 1-1-2017-0543355-18)
출원인명칭 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단(1-2012-037172-1)
대리인성명 이동훈(9-2011-000491-3)
발명자성명 박소영 조은상
발명의명칭 땅콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스도우미 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 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.
- 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>-특허(마음)-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개성타이만, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법

2. 새싹땅콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2017.06.07
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0071026 (접수번호 1-1-2017-0543356-64)
출원인명칭 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단(1-2012-037172-1)
대리인성명 이동훈(9-2011-000491-3)
발명자성명 박소영 조은상
발명의명칭 새싹땅콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 약제학적 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스도우미 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 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.
- 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>-특허(마음)-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개성타이만, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법

3. 땅콩새싹으로부터 추출된 레스베라트롤을 포함하는 조성물 및 레스베라트롤의 추출 방법

출원번호통지서

1의 4페이지

관인생략

출원번호통지서

출원 일자 2018.09.14
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(001)
출원 번호 10-2018-0110320 (접수번호 1-1-2018-0917453-46)
출원인 명칭 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단(1-2012-037172-1)
대리인 성명 이후석(9-2014-001405-9)
발명자 성명 오충준 신장인 방만석 이예진
발명의 명칭 땅콩새싹으로부터 추출된 레스베라트롤을 포함하는 조성물 및 레스베라트롤의 추출 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입일수중에 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), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원인 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 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허대양-PCT/마드리드>
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원료 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원료 미공개상태이면, 우선권로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특허출원서(PTOSB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

<http://www.patent.go.kr/isp/kiponet/ir/receipt/online/app/NoOfficAct.so>

2018-09-14

4. 곱향 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역력 증진용 조성물

출원번호통지서

출원 일자 2018.09.27
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(4)
출원 번호 10-2018-0115341 (접수번호 1-1-2018-0957243-92)
출원인 명칭 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단(1-2012-037172-1)
대리인 성명 김연욱 특허법인(9-2005-100002-8)
발명자 성명 박수영 김성권
발명의 명칭 곱향 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역력 증진용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입일수중에 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), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원인 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 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허대양-PCT/마드리드>
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원료 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원료 미공개상태이면, 우선권로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특허출원서(PTOSB39)]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
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조 제1항 미라 단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

5. 작약 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물



6. 파골세포 분화 억제 또는 조골세포 분화 촉진 기전을 통한 골다공증 치료용 작약 추출물 함유 조성물

출원번호통지서 1의 4페이지

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.12.14
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2018-0162318 (접수번호 1-1-2018-1260366-74)
 출원인명칭 단국대학교 전안엘피스 산학협력단(1-2012-037172-1)
 대리인성명 이후석(9-2014-001405-9)
 발명자성명 오홍준 신장민 방만석 이예진
 발명의명칭 파골세포 분화 억제 또는 조골세포 분화 촉진 기전을 통한 골다공증 치료용 작약 추출물 함유 조성물

특허청장

<< 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, 납부지번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부지번호: 011(가평로) = 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 (특허고객번호 정보변경(경정), 장정신고서)을 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스(도문도) > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의결서 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. 국내 출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내 출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허대당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간: 특허 실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허청의 출원서류 기종은 우리나라와 유사하나 출원서, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허청에 [전자특허청(PTOSB39)]을 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

2-3-3. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Korean Society of Food Science and Technology	박소영, 조은상	2017.06.23	ICC Jeju,	south korea
2	Nutrition Congress 2017	박소영	2017.06.30	Madrid	Spain
3	Korean Society of Food Science and Technology	김철현, 강필구	2017.06.21	ICC Jeju,	south korea
4	한국생약학회	이예진, 오충훈, 이수지	2017.11.23	성남	south korea
5	한국식품영양과학회	이예진, 오충훈	2017.11.8~10	경주	south korea
6	Nutrition and Dietetics Conference	박소영	2018.06.12	Dublin	Ireland
7	KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	김철현, 김홍석, 원지영, 김다영	2018.06.28	Busan	south korea
8	대한생리학회	이예진	2018.10.25	원주	south korea

2-3-4. 전문연구 인력양성

No	기준 년도	현 황										
		학위별				성별		지역별				
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	2016	-	1	2	-	2	1	-	3	-	-	-
2	2017	-	4	2	-	3	3	-	6	-	-	-
3	2018	-	4	5	-	3	6	-	9	-	-	-

2-3-5. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	유산균과 건강	'유산균과 건강'을 주제로 국민안전처 및 타 기관 공무원 초청 특강	국민안전처 교육원 2층 종합강의실	1	2016.12.07	40
2	뼈건강과 천연물 추출물 의약품	뼈건강과 관련된 천연물 및 천연물 추출물에 대한 이해	단국대학교 정책경영 대학원	1	2017.01.12	30

3	건강기능식품 산업의 이해와 산업체계	건강기능식품의 개념 및 산업동향 및 관리체계에 대한 이해	단국대학교 치과대학 202호	1	2017.01.18~ 2017.02.28	15
4	관절염 건강에 도움이 되는 천연물 신약의 개발	천연물을 소재로 한 신약 연구 및 천연물 신약과 천연물유래 의약품 및 화합물 의약품	단국대학교 치과대학 202호	1	2017.01.18~ 2017.02.28	40
5	노년과 약 이야기	노년 질환(골다공증 등)의 치료제 및 의약품 복용법	단국대학교 정책경영 대학원	1	2017.04.12	30
6	우유의 영양학적 가치 및 시장동향	우유의 기본 이해 및 영양학적 가치 및 시장소비동향에 대한 이해	(주)유담 회의실	1	2017.05.16.	10
7	우유 미생물과 유산균	우유 미생물에 대한 이해 및 관리와 유산균의 특성에 대한 이해	(주)유담 회의실	1	2017.06.12.	10
8	건강기능식품 산업의 관리체계 및 기술동향	건강기능식품의 관리체계에 대한 유형별 이해와 기술연구개발 동향에 대한 분석	단국대학교 치과대학 202호	1	2017.06.26.	13
9	식품의 품질관리 및 검사의 이해	식품의 전반적인 품질관리에 대한 단계별 이해 및 식품 검사 및 관능검사 개념에 대한 이해	(주)유담 회의실	1	2017.07.10.	9

10	우유 유제품의 품질관리	우유 유제품에 대한 공급과정에서의 품질과정 및 품질체계와 가공처리에 대한 이해	(주)유담 회의실	1	2017.08.07.	11
11	유제품의 활용방안 및 시장동향	유제품에 대한 활용방안 및 유제품 생산 및 시장동향에 대한 전반적인 이해	(주)유담 회의실	1	2017.09.20.	9
12	노화와 뼈 건강	노화에 대한 내용과 이에 따른 뼈 건강에 관련된 내용	단국대학교 정책경영 대학원	1	2018.04.04	30
13	의약품과 뼈 건강	의약품에 대한 이해와 뼈 건강 및 뼈 관련 의약품에 대한 이해	단국대학교 치과대학 202호	1	2018.07.03	20
14	원유의 생산체계	착유시의 Composition과 유선 분포 및 원유의 생산체계	(주)유담 임직원 회의실	1	2018.10.17	5
15	유제품 국내외 수출 및 생산동향	낙농산업의 전체적인 동향	(주)유담 임직원 회의실	1	2018.10.18	5
16	우유의 성분조성	원유의 등급과 규격 및 우유의 여러가지 성분 조성에 관한 설명	단국대학교 생명자원과학관 414호	1	2018.11.19	20
17	우유의 전반적인 이해	낙농 및 유가공분야의 주요 현황 및 시장규모와 기본적인 우유의 영양학적 가치 등에 관하여 설명함	단국대학교 생명자원과학관 415호	1	2018.11.26	8

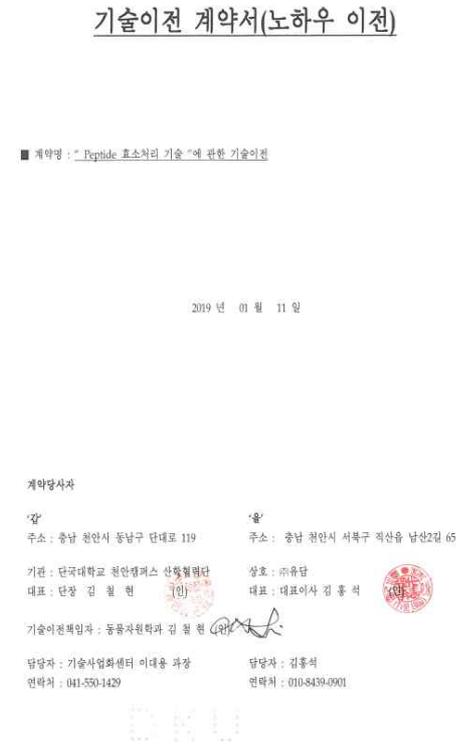
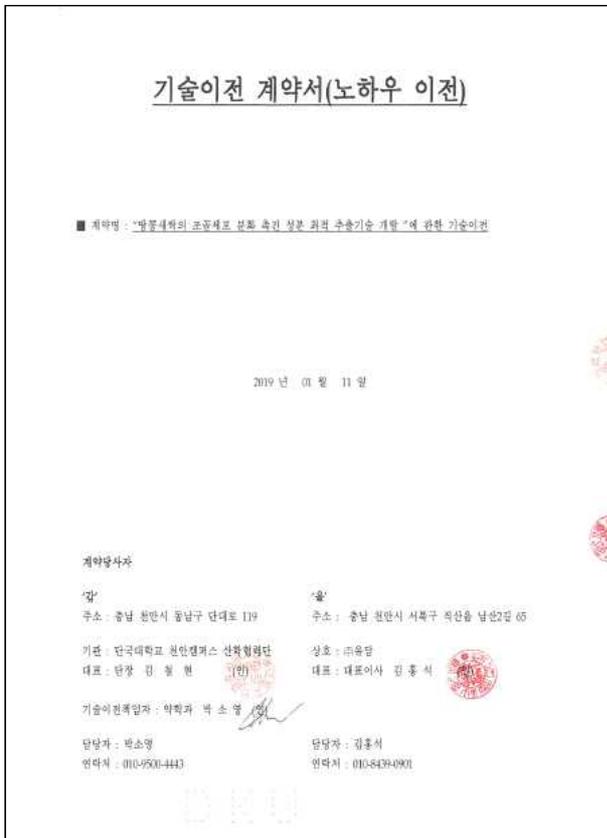
18	유제품의 제조공정	다양한 종류의 유제품의 제조공정과 유제품 부산물의 종류 및 특징	단국대학교 생명자원과학관 415호	1	2018.11.27	20
19	HACCP의 역사 및 개요	HACCP의 개요 및 전체적인 체계와 기대효과 등 HACCP의 전반적인 내용에 대하여 설명	단국대학교 생명자원과학관 415호	1	2018.12.03	5
20	유제품의 제품동향	유가공산업 제품 동향 및 주요 유제품 트렌드와 소비 전망에 관하여 설명함	(주)유담 연구소 회의실	1	2018.12.20	10

2-4. 연구결과

2-4-1. 기술적 성과

2-4-1-1) 기술이전

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	노하우 이전	땅콩새싹의 조글세포 분화 촉진 성분 최적 추출기술 개발	(주)유담	2019.01.11	-	-
2	노하우 이전	Peptide 효소처리 기술	(주)유담	2019.01.11	-	-



<기술이전 계약서(노하우 이전)>

2-4-1-2) 제품화

- 본 과제 연구개발사업을 통하여 개발된 제품 3종(땅콩새싹 우유, 땅콩새싹 발효유, 작약 발효유음료)의 제품화로 현재 품목제조신고 완료하였음

발급번호 : 1200-ET02-1A5R-0FMX-CXF1



품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 김종석		생년월일(법인번호)	
	주소 충청남도 천안시 서북구 남산2길 65		전화번호	
			휴대전화	
영업소	명칭(상호) (주)유달		영업허가번호 20040448002	
	소재지 충청남도 천안시 서북구 남산2길 65			
제품정보	품목의 유형	김호우유	농림축산식품 제조신고번호	2004044800230
	제품명	나물뽕한글콩새싹우유		
	유통기한	제조일부터 15일		
	용재료 또는 성분명, 배합비율	뽕장애 기재		
	용도 용법	뽕장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	뽕장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	일련, 180-1000, 1800, 2300, 3000, 5000, 10000mL, 병크		
	원산지	유래색의 원산지		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [C]해당 없음		
	알러진원 물질 해당여부	[]예 [C]아니오		
기타				

*육신을 위생관리법 제25조 및 같은 법 시행규칙 제37조제1항에 따라 위의 품목을 제조하였음을 보고합니다.

2019년 01월 07일

보고인 김종석

충청남도지사 귀하

품목신고번호	20040448002-30	처리부서	충청남도 농림축산식품정책과	처리지성명	박효선	처리일자	2019년 01월 08일
--------	----------------	------	----------------	-------	-----	------	---------------



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>)을 통해 지체 없이 확인할 수 있습니다.



품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 김홍석		생년월일(법인번호)	
	주소 충청남도 천안시 서북구 남산2길 65		전화번호	
			휴대전화	
영업소	명칭(상호) (주)유당		영업허가번호 20040448002	
	소재지 충청남도 천안시 서북구 남산2길 65			
제품정보	품목의 유형	농후발효유	등록요청 품목 제조보고번호	2004044800229
	제품명	나를위한 땅콩새싹 요거트		
	유통기한	제조일로부터 20일		
	원재료 또는 성분명, 비합비용	맛장에 기재		
	용도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	일봉, 80g~1000g 또는 박크 포장		
	성상	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미? 이취가 없음		
	고열량·저염양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [O]해당 없음		
	알칼민중 축산물 해당여부	[]예 [O]아니오		
기타				

「축산물 위생관리법」 제25조 및 같은 법 시행규칙 제37조제1항에 따라 위의 품목을 제조하였음을 보고합니다.

2018년 12월 03일

보고인 김홍석

충청남도지사 귀하

품목보고번호	20040448002-29				
처리부서	충청남도 농정국 동물방역위생과	처리자성명	박효선	처리일자	2018년 12월 05일



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



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 김홍석		생년월일(법인번호)	
	주소 충청남도 천안시 서북구 남산2길 65		전화번호	
			휴대전화	
영업소	명칭(상호)		영업등록번호	
	(주)유담		20140449032	
	소재지 충청남도 천안시 서북구 남산2길 65			
제품정보	식품의 유형	유산균음료	요청하는 품목제조 보고번호	2014044903211
	제품명	나들위한 작약 요거트 음료		
	유통기한	제조일부터 20일		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 별첨비율	뫇장애 기재		
	용도 용법	뫇장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	뫇장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	밀봉, 100mL~1000mL, 병크		
	성상	고유의 색채와 향미를 가지고 이미, 이취가 없음		
품목의 특성 <input type="checkbox"/> 고열량 · 저열량 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input type="checkbox"/> 알러지성 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오				
기타				

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

2018년 12월 03일

보고인 김홍석

충청남도 천안시장 귀하

품목보고번호	20140449032-11				
처리부서	농업환경국 식품안전과	처리자성명	유연옥	처리일자	2018년 12월 03일



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

<제품 3종의 품목제조보고서>

도 수	8도	작업명	나를 위한 망풍새싹 요거트
CMYK	WHITE	규 격	224mm x 91mm
115C 476C 별적		담 당	무드마스터그룹 / 담당디자이너 '권혜서' 010 2785 4516
PANTONE SOLID COATED		전 달 사 람	



도 수	8도	작업명	나를 위한 착약 요거트
CMYK	WHITE	규 격	224mm x 91mm
7418C 476C 별적		담 당	무드마스터그룹 / 담당디자이너 '권혜서' 010 2785 4516
PANTONE SOLID COATED		전 달 사 람	



<디자인 도안>

2-4-2. 경제적 성과

2-4-2-1) 사업화성과 및 매출실적

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	4.1억원	
			향후 3년간 매출	50억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	0억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 1.2% 국외 : 0%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0% 국외 : 0%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			50위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			20위

2-4-2-2) 사업화계획 및 매출실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1		
	소요예산(백만원)		60		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			4.1	50	70
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.1	1.2	1.7
		국외	0	0	0
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		본 기술을 토대로 성장기 어린이 및 청소년을 대상으로하는 젤리 형태의 제품 개발(2020년)			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	2	30	50	
	수 출		10	30	

2-4-2-3) 고용창출

○ 본 과제 연구개발사업을 통한 고용창출효과로 현재 주관연구기관인 (주)유담에서 1명을 채용하여 고용창출하였음

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 체내 흡수율 및 활용도, 가공적성이 증진된 천연물 유래 뼈 건강 기능 소재 2종 이상 개발
- 천연물 유래 뼈 건강 기능 소재를 활용한 뼈 건강 유제품 3종 이상 개발

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	기관	세부연구목표	연구결과	달성률 (%)
1차 년도 (2016)	주관기관 (주)유담	각 협동연구 기관 개발 물 질의 제품 적 용성 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 협동3에서 제공한 개발 물질을 시유에 적용해본 결과 배합물내의 층분리현상이 발생하였음. 따라서 층분리 완화를 하기위해 균질조건을 설정하였음 • 협동1에서 제공한 볶은 땅콩 추출물의 제품적용성 탐색 완료함 	100
		각 협동연구 기관 개발 물 질의 추출 및 제조 대량생 산 공정 설정	<ul style="list-style-type: none"> • 협동3에서 제공한 가수분해물 제조 방법을 기반으로 대량생산공정 설정을 완료함 • 협동1에서 제공한 볶은 땅콩 추출물의 제품적용성 완료 후 대량생산공정 설정 완료함 	100
		개발 제품(우 유) 원료 탐 색	<ul style="list-style-type: none"> • 2차년도 출시 예정인 개발 제품(우유)의 원료 탐색 완료 	100
		각 협동연구 기관 개발 물 질 함유 개발 제품(우유) 배합비 설정	<ul style="list-style-type: none"> • 협동1, 3에서 제공한 개발 물질을 각각의 함량으로 배합 후 각기 물질의 기능성 최적화 조건 설정을 통한 배합비 1차 선정 후 관능검사를 통한 배합비 개선 예정 	100
	협동기관1 단국대학교 약학대학	지역 특산물 소재 선별 및 추출	<ul style="list-style-type: none"> • 포도, 인삼 등 총 7종의충청 지역 특산물을 선별, 시료를 확보하였고, 그 외 뼈 건강에 도움이 되고 활용도가 높은 천연물 (땅콩 새싹 등 7종) 선별, 확보하였음 • 시료 중 생체는 100% 에탄올로 추출하였고, 건체는 80% 에탄올로 추출한 후 동결건조 하여 	100

			<ul style="list-style-type: none"> 총 14종의 에탄올 추출물 확보 모든 시료는 100% 물로 열수 추출한 후 (식약처 기준) 동결건조 하여 총 15종의 열수추출물 확보 	
		천연물 소재의 뼈 건강 활성 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> 땅콩새싹, 수박과육 농축액 등 총 29종의 에탄올 추출물 및 열수 추출물에 대해 ALP 활성을 측정하였으며 이 중 8종의 천연물 추출물에서 활성이 있는 것을 확인됨 8종의 천연물 추출물 중 땅콩류 (볶은땅콩, 땅콩새싹)의 활성이 높아 두 천연물의 분획층의 활성을 비교 연구 중이며 그 결과를 바탕으로 차년도 실험의 시료로 사용하고자 함. 	100
		천연물 추출물 라이브러리 구축	<ul style="list-style-type: none"> 14종의 천연물에서 추출한 29종의 추출물을 각각 200 mg씩 천연 자원 연구센터에 기탁함 	100
협동기관2 단국대학교 치과대학		뼈 형성 촉진 유효지표물질 발굴	<ul style="list-style-type: none"> 쥐의 골수에서 추출한 D1 세포와 전조골세포인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 조골세포로 유도한 후 BMPs를 이용하여 골 생성 능력을 비교하였으며 천연 물질 소재의 유효성을 증명을 위한 지표물질로 우수 함을 확인함 	100
		뼈 형성 촉진 유효소재발굴	<ul style="list-style-type: none"> 협동과정 1에서 전달 받은 볶은 땅콩을 이용하여 D1 세포와 MC3T3-E1 세포를 이용하여 골 광화 작용을 확인하여 칼슘의 침착정도를 관찰하였으며 그 결과 볶은땅콩 에탄올 추출물이 뼈 형성 촉진에 우수함을 확인함 	100
협동기관3 단국대학교 동물자원학 과		단백질 분해 효소 작용 조건에 따른 유단백질 가수분해 특성 확인	<ul style="list-style-type: none"> 효소 작용 조건에 따른 유단백질 가수분해를 측정을 완료하였음 SDS-PAGE를 통한 가수분해 유단백질 profile 조사를 완료하였음 	100
		최적 효소처리 조건 설정	<ul style="list-style-type: none"> 선발 가수분해 효소의 최적 pH, 온도 및 효소량 설정을 통한 최적처리조건 설정을 완료하였음 	100
2차 년도 (2017)	주관기관 (주)유담	원재료, 배합 및 살균 등 개발 제품(우유)의 미생물학적, 이화학적 품질관리	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유)의 미생물학적(일반세균수/대장균수) 온도 조건별 저장성 실험을 통한 유통기한 내에서의 일반세균수/대장균수 기준치 이내 달성 확인 개발제품(우유)의 이화학적(pH 및 산도) 온도 조건별 저장성 실험을 통한 유통기한 내에서의 	100

		기준 설정	원유 기준치 이내 달성 확인	
		개발 제품(우유) 대량생산 공정 설정	<ul style="list-style-type: none"> 개발 제품(우유)의 Lab scale 제작에서 pilot scale로의 scale up 가능성 확인 및 대량생산공정 설정 	100
		개발 제품(우유) 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 제작을 통한 대량생산 공정 확립 	100
		관능 검사를 통한 배합비 개선	<ul style="list-style-type: none"> 경쟁제품(타사 우유)과의 관능검사를 통한 개발 제품(우유)의 관능적 특성 확인 	100
		브랜드 네이밍 및 용기선정 후 신제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> 용기선정 : Polyethylene terephthalate(PET) 용량 : 200 mL 네이밍 : 빼사랑 칼슘우유 시제품 제작을 통한 신제품 출시 준비 	100
	협동기관1 단국대학교 약학대학	지역 특산물 소재 빼 건강 관련 활성 성분 분리 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> ALP 활성이 높았던 볏은땅콩과 땅콩새싹 에탄올 추출물을 선별하여 용매 분획하였으며 각 분획층의 ALP활성을 확인한 결과 땅콩새싹의 에틸아세테이트 층이 가장 뛰어난 활성을 보여 최종 선정함 선정된 땅콩새싹 생체를 에탄올로 대량추출(총 3 kg) 완료함. 이후 3개의 층으로 분획하여 분획층을 확보함 ALP 활성이 높았던 땅콩새싹 에탄올 추출물 에틸아세테이트 분획층에서 각종 크로마토그래피법을 활용하여 물질분리를 진행하였으며 총 3개(Adenine, Thymine, Uracil)의 순물질 확보, NMR, MS를 통해 구조동정을 완료함 	100
	협동기관1 단국대학교 약학대학	한방 소재 선별 및 추출 및 빼 건강 활성 스크리닝, 한방소재 추출물 라이브리리 구축	<ul style="list-style-type: none"> 작약 등 총 12종의 한방소재 선별, 시료를 확보하였음 시료 중 생체는 에탄올로 추출하였고, 건체는 80% 에탄올로 추출한 후 동결건조 하여 총 12종의 에탄올 추출물 확보 시료는 열수 추출한 후 (식약처 기준) 동결건조 후 총 12종의 추출물 확보. 작약, 자소엽 등 총 12종의 에탄올 추출물 및 열수 추출물에 대한 ALP 활성을 측정하였음 12종의 한방소재에서 추출한 24종의 추출물을 각각 20 mg씩 소분하여 천연 자원 연구센터에 기탁함 	100
	협동기관2 단국대학교	천연물 기원 빼 형성 촉진	<ul style="list-style-type: none"> 협동기관 1과정팀에서 전달 받은 천연물 소재 땅콩새싹 추출물 5분획물(EtOH, EA, 	100

치과대학	능력검증	Compound 1,2,3)을 이용하여 1,2,3주차 까지 골광화 작용을 측정하였음 • 그 결과 땅콩새싹 추출물의 compound 1,2,3에서 조골세포 분화 촉진 효과가 우수함을 확인함	
	한방물질기원 뼈 형성 촉진 능력검증	• 협동기관 1과정팀에서 전달 받은 한방소재물질 작약, 소엽, 연자육 3가지 물질을 이용하여 골광화 작용을 1,2,3주차까지 측정하였음 • 그 결과 작약추출물의 조골세포 분화 촉진효과가 우수함을 확인함	100
	뼈 파괴 억제 유효 지표물질 발굴	• 뼈 파괴세포 분화억제제로 알려진 물질을 확인하고자 TRAP 염색법으로 둥근 모양 파골세포 개수와 염색을 수행하였음 • 그 결과 면역 억제제로 알려진 타크로리무스(fk506)가 파골세포분화 억제에 효과가 뛰어난 것을 확인함	100
	뼈 파괴 억제 유효소재발굴	• 협동과정 1기관에서 전달받은 천연물 땅콩새싹 5분획물(EtOH, EA, Compound 1,2,3)을 TRAP 염색법 및 ROC 개수와 TRAP 활성도를 측정함 • 또한 협동과정 1기관에서 전달받은 한방소재물질 작약, 연자육, 소엽을 이용하여 TRAP 염색법 및 ROC 개수와 TRAP 활성도를 측정함 • 그 결과 땅콩새싹 추출물 처리 시 파골세포의 분화 억제 효과가 우수 하였음 • 한방소재 물질에서는 작약이 파골세포 분화 억제효과가 우수하였음	100
	복합소재, 신제품 유효성 검증	• 골다공증동물모델을 활용 하였으며, 타크로리무스(FK506)을 처리하여 파골세포분화억제 효과를 확인함 • 땅콩새싹 및 볶은땅콩을 처리하여 골밀도와 골미네랄 수치를 확인함	100
	협동기관3 단국대학교 동물자원학과	가수분해물의 분리 및 정제	• Gel filtration을 이용한 유단백질 가수분해물 분리 • HPLC를 이용한 유단백질 가수분해물의 정제
유단백질 가수분해물의 기능성 검증	• 유단백질 가수분해물의 칼슘 가용화능 측정 • 유단백질 가수분해물의 항염 효과 측정(ELISA) • 유단백질 가수분해물의 항산화능 측정(DPPH, ABTS, Frap assay 등)	100	
후보 발효균	• 후보 발효균주의 기초생리활성(내산성, 담즙산내	100	

		주의 기초생리활성을 통한 발효균주 선발	성, β -galactosidase, 단백질 분해능)을 통한 1차 선발 • 1차 선발균주의 유단백질 정량, 펩타이드 농도 및 가용성 칼슘 변화량 측정을 통한 2차 선발	
3차 년도 (2018)	주관기관 (주)유담	협동연구기관 개발 물질의 제품 적용성 확인	• 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 제품적용성 확인을 통한 최대 농도 설정 완료	100
		개발 물질의 추출 및 제조 대량생산공정 설정	• 땅콩새싹 추출물 및 작약 추출물의 대량생산공정 설정	100
		개발 제품의 품질관리기준 설정	• 개발 제품의 품질관리기준 설정을 위해 유통기한 안정성 설정 실험 등을 통한 품질관리기준 설정 완료	100
		개발 제품의 대량생산공정 설정	• Lab scale로 개발된 개발 제품의 Pilot scale화를 통한 대량생산공정 설정 완료	100
		개발 제품의 시제품 제작	• 땅콩새싹 발효유 및 작약 발효유음료의 시제품 제작 완료	100
		신제품 3종 출시를 위한 브랜드 네이밍 및 용기선정	• 신제품 3종(땅콩새싹 우유, 땅콩새싹 발효유, 작약 발효유음료)의 출시를 위한 브랜드 네이밍 및 용기선정 완료(땅콩새싹 우유는 1차년도에 완료하였음)	100
	협동기관1 단국대학교 약학대학	한방 소재 유효성분 분리 동정 및 뼈 건강 활성 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> • 선정된 작약 건체(3 kg) 를 에탄올로 추출 완료 후 3개의 층으로 분획하여 분획층을 확보함 • ALP 활성이 높았던 작약 추출물의 에틸아세테이트 분획층에서 각종 크로마토그래피법을 활용하여 총 8개 (4-O-methylmoudanpioside C, 4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin, Oxypaeoniflorin, (+) catechin, Catechuic acid, Paeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin, Albiflorin)의 순물질을 확보하였으며. NMR, MS를 통해 구조동정을 완료함 • 분리된 8개의 물질에 대한 ALP활성 측정, 4-O-methylmoudanpioside C, 4-O-methylbenzoyloxypaeoniflorin, Oxypaeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin, Albiflorin 의 ALP 활성 증가효과를 확인함 	100
뼈 건강 유효	• 4-O-methylmoudanpioside C,	100		

		<p>성분의 라이 브러리 구축 과 뼈 건강 추출물 소재 의 표준화 및 대량추출 기 반 확립</p>	<p>4-O-methylbenzoyloxy paeoniflorin, Oxypaeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin, Albiflorin 의 HPLC 분석을 진행하였으며 소재의 표준화를 위해 Oxypaeoniflorin을 지표성분으로 설정함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 조건별 추출물들의 Oxypaeoniflorin 함량을 확인하여 가장 함량이 높았던 40%, 60 °C 조건을 추출법으로 확립함 • 분리한 유효성분을 소분하여 샘플저장용 vial에 보관함, 확보된 유효성분 중 일부를 각각 5 mg 씩 소분하여 천연 자원 연구센터에 기탁함 	
<p>협동기관2 단국대학교 치과대학</p>	<p>한방소재물질 (작약)의 뼈 형성 능력 검 증</p>		<ul style="list-style-type: none"> • 전조골세포인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 조골세포로 유도 한 뒤 양성대조군(ODM, ADN)들과 2차년도에 발굴한 한방소재 물질인 작약을 세포에 처리하여 조골세포분화 촉진을 확인함 • 조골세포 분화로써의 초,중,후기 단계의 발현 마커자들을 이용하여 정량화 PCR을 확인함 • 그 결과 작약을 처리 하였을 시 각 단계별 유전자 들을 확인한 결과 25, 50µg/mL에서 조골세포 분화가 촉진되는 것을 확인함 	<p>100</p>
	<p>뼈과괴 억제 성 유효소재 검증</p>		<ul style="list-style-type: none"> • RAW264.7세포에 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시킨 뒤 양성대조군(FK506)과 2차년도에 발굴한 한방소재 물질인 작약을 세포에 처리하여 파골세포 분화 억제를 확인함 • 파골세포 분화 단계의 4단계의 발현 마커자들을 이용하여 정량화 PCR을 확인함 • 그 결과 작약을 처리 하였을 시 각 단계별로 유전자들을 확인한 결과 25µg/mL에서 파골세포 분화가 억제되는 것을 확인함 	<p>100</p>
	<p>골다공증 동 물모델 유효 성 검증</p>		<ul style="list-style-type: none"> • 골다공증동물 모델로 유도하기 위해 난소절제술을 수행하여 2주간 유도하였으며 그 후 8주 동안 한방소재 물질인 작약을 농도별로 처리 하였음 • 8주뒤에 동물모델의 뇨를 채취하고 동물을 희생시킨 후 각 장기별로 샘플을 모아 간, 신장독성효과 , DPD, PTD, ALP, TRAP 활성도 체크, 골밀도측정 및 골 TRAP 염색을 확인함 • 그 결과 난소절제술 모델에서 작약 100mg/kg 처리 시 양성대조군과 비교하여 골다공증 예방효과를 확인함 	<p>100</p>

협동기관3 단국대학교 동물자원학 과	선발 발효균 주의 최적 배 양조건 및 제 품 적용성 검 증	<ul style="list-style-type: none"> • 환원탈지유의 농도별 성장변화 탐색을 통한 제 품 적용 가능성 검증 완료 • TLC, HPLC를 통한 당성분 확인 및 최적 배지 설정 완료 	100
	선발 발효균 주의 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 발효균주의 세포독성 및 NO 생성량 확인 • 발효균주의 항산화능 검증 및 가용성 칼슘함량 측정을 통한 기능성 검증 	100
	칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균 주를 이용한 발효유 및 발 효유음료 개 발과 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 선발 발효균주를 이용한 발효유 및 발효유음료 의 발효패턴 탐색을 통한 땅콩새싹과 작약추출 물의 농도 설정 • 발효유 및 발효유음료의 항염효과, 항산화능 및 가용성 칼슘 함량 측정을 통한 기능성 검증 완 료 	100

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

○ 논문 1건

- 현재 담당 연구원의 석사학위 졸업논문으로 금년 상반기 중 SCI급 학술지에 투고 예정임

○ 기술인증 1건

- 금번 연구결과와 연관된 뼈관련 주요 시장인 노인층을 대상으로 한 고령친화식품 KS인증과 농림식품신기술(NET)인증을 추진하였음
- 고령친화식품 KS인증의 경우 금년 1월까지 농림축산식품부와 식품의약품안전처와 관련 기 준과 규정에 관한 협의가 이루어지고 있어 최종 관련 근거 규정이 설정되면 추진할 예정임
- 농림식품신기술(NET)인증의 경우 해당 요건에 관한 사항을 사전 협의 하였으나 당해 연구 결과는 기존의 기술들을 활용한 새로운 소재와 제품중심으로 이를 개발하기 위한 신기술 공 정 등이 포함되지 않아 신기술인증 요건에는 부합되지 않는 것으로 판단되어 금번 연구결과 를 활용한 공정개선과 품질관리기법에 관한 신기술을 지속적으로 개발하고자 함

○ 홍보전시 2건

- 금번 출시 예정인 신제품을 성장기 청소년과 노인층을 대상으로 한 제품 세분화를 통해 aT 한국농수산식품유통공사 센터 등과 연계하여 기후로 인한 관절질환 등이 이슈화 되고있는 동남아시아 수출에 적극 활용하고자 함
- 따라서 이와 관련된 동남아시아 지역 전시회 등 제품 홍보에 적극 참여하고자 함

○ 정책활용 2건

- 향후 예상되는 고령친화식품 시장 확대에 적극적으로 대응하기 위해 금번 연구결과를 현재 진행중인 고령친화식품 KS인증 관련 규정 수립 등에 필요한 정책자료로 적극 활용하고, 관련 정부부처사업에 배관된 분야 기본 정책자료로 활용할 수 있도록 최선을 다하고자 함

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 뼈 건강 복합 기능성 소재 및 개발제품에 대한 연구 결과를 토대로 골격계 질환 예방을 위한 제품개발 기초 자료 제공 및 제시를 통해 산업체 및 연구자의 시행착오 감소로 국내 연구 경쟁력 및 제품 상용화를 제고
- 국내 천연물 소재에 우유 유래 가수분해 단백질 및 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주를 이용한 뼈 건강 기능 우유(1종) 및 유제품(2종)의 신제품 개발을 통한 국내 시장 경쟁력 및 소비자 신뢰성을 확보하고 골격계 질병에 취약한 동남아 해외 수출 시장 확보
- 금번 연구결과를 바탕으로 뼈관련 식품시장의 주요 타겟층인 유아기, 청소년기, 중장년층 등으로 제품을 세분화하여 뼈관련 전문 제품브랜드로 확장하고자 함
- 최근 급속히 성장하고 있는 반려동물 시장에 있어 반려동물 중 가장 많은 분포를 가지고 있는 소형견의 경우 지속적인 육종과 개량으로 선천적인 골격계 질환을 가지고 있는 경우가 많으며 이로 인해 반려동물 유제품이 지속적으로 출시되고 있음
- 금번 과제에 주관기관인 (주)유담은 기존의 유제품 및 음료 전용 공장 이외에 과감한 투자를 통해 국내 유일의 반려동물 유제품 생산 전용 공장을 확보하고 있음
- 따라서 금번 개발된 제품과 기술을 적극적으로 활용하여 최근 급속히 성장하고 있는 반려동물 시장에 여 국내 최초로 서울우유에서 판매중인 펫 전용 우유를 출시한 경험과 기술을 바탕으로 골격계가 취약한 반려동물을 대상으로 한 전용 유제품을 출시하여 확대되는 시장을 선점하고자 함



<시제품>



<디자인 도면>

<별첨> 자체평가의견서

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		31606203	
사업구분	고부가가치식품개발사업				
연구분야	식품개발			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	경제성·흡수율이 증진된 뼈건강소제 및 제품개발(국민 뼈건강 증진 프로젝트)			과제유형	(기초,응용,개발✓)
연구기관	(주)유담			연구책임자	김홍석
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.07.07. - 2016.12.31	180,000	60,000	240,000
	2차연도	2017.01.01. - 2017.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2018.01.01. - 2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	계	2016.07.07. - 2018.12.31	780,000	260,000	1,040,000
참여기업	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단				
상대국	-	상대국연구기관	-		

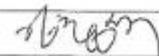
2. 평가일 : 2019. 02.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)유담	대표이사	김홍석

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약 

1. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

- 뼈 건강 복합 기능성 소재 및 개발제품에 대한 분야별 전문기관과의 협업을 통해 얻어진 연구 결과를 토대로 골격계 질환 예방을 위한 제품 개발이 적절하게 이루어져 향후 국내 시장 개척과 해외수출에 필요한 제품 경쟁력을 확보함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 금번 연구결과를 바탕으로 뼈관련 식품시장의 주요 타겟층인 유아기, 청소년기, 중장년층 등으로 제품을 세분화하여 뼈관련 전문 제품브랜드로 확장하고자 함
- 주관기관인 ㈜유담은 기존의 유제품 및 음료 전용 공장 이외에 과감한 투자를 통해 국내 유일의 반려동물 유제품 생산 전용 공장을 확보하고 있음
- 따라서 금번 개발된 제품과 기술을 적극적으로 활용하여 최근 급속히 성장하고 있는 반려동물 시장에 국내 최초로 서울우유에서 판매중인 펫 전용 우유를 출시한 경험과 기술을 바탕으로 골격계가 취약한 반려동물을 대상으로 한 전용 유제품을 출시하여 확대되는 시장을 선점하고자 함

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 국내 천연물 소재에 우유 유래 가수단백질 및 칼슘흡수촉진 유 펩타이드 생성 발효균주를 이용한 뼈 건강 기능 우유(1종) 및 유제품(2종)의 신제품 개발을 통한 국내 시장 경쟁력 및 소비자 신뢰성을 확보하고 골격계 질병에 취약한 동남아 해외 수출시장 확보에 적극 활용할 수 있음
- 상기 제시된 바와 같이 향후 세분화하여 뼈관련 전문 제품브랜드로 확장하고 반려동물시장 진입과 해외 수출에 적극 활용할 수 있음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 연구 수행기간 동안 유제품 전문 생산기관과 유산균 및 발효, 천연물 및 배관련 소재 효능 검증 분야 등 각 분야의 전문가 그룹간 수차례의 자체 연구관련 회의 및 세미나 등을 개최하며 연구목표 달성을 위한 협업 체계와 팀웍이 매우 우수하였음
- 이러한 협업체계를 통해 기업의 신제품 출시와 성공을 위해 각 기관별 연구수행 목표달성에 최선을 다하는 모습을 확인하였음
- 금번 과제수행기간 이후에도 신제품 출시와 시장진입을 위해 지속적으로 협의하고 후속연구를 위해 최선을 다하고 있음

5. 공개발표 된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

- 연구기간 중 총 5편의 SCI급 논문을 포함한 7편의 논문발표와 특허출원 5건, 특허등록 1건, 매출 및 고용창출과 3종의 신제품 출시 및 10건의 학술발표 등 다양한 성과를 거두었으며, 금년부터 신제품 출시에 따른 매출증가가 예상됨

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
지식재산권, 기술실시(이전)	20	100	양호함
사업화	50	100	양호함
학술성과	10	95	양호함
인력양성	15	100	양호함
교육지도	5	80	양호함
합계	100점	-	-

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 뼈 건강 복합 기능성 소재 및 개발제품에 대한 분야별 전문기관과의 협업을 통해 얻어진 연구 결과를 토대로 골격계 질환 예방을 위한 제품 개발이 적절하게 이루어져 향후 국내 시장 개척과 해외수출에 필요한 제품 경쟁력을 확보할 수 있었던 좋은 기회였음
- 금번 연구결과를 바탕으로 뼈 관련 식품시장의 주요 타겟층인 유아기, 청소년기, 중장년층 등으로 제품을 세분화하여 뼈 관련 전문 제품브랜드로 확장하고, 최근 급속히 성장하고 있는 반려동물 시장에 여 국내 최초로 서울우유에서 판매중인 펫 전용 우유를 출시한 경험과 기술을 바탕으로 골격계가 취약한 반려동물을 대상으로 한 전용 유제품을 출시하여 확대되는 시장을 선점할 수 있을 것으로 기대됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 연구수행 결과 일부 성과지표 목표달성은 미비한 부분이 있었지만, 분야별 전문가들간의 적극적인 협력과 성실한 연구수행을 통해 기업의 최종 목표인 제품경쟁력이 있는 신제품 출시와 향후 기업의 미래성장동력이 될 수 있는 기술력 및 해외수출 교두보를 확보함과 동시에 산업적 파급효과를 거둘 수 있는 연구결과를 얻었으므로 이를 평가에 반영해 주시길 요청함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 주관기관인 ㈜유담은 금번 연구결과를 통해 얻어진 신제품을 전문유통기업인 ㈜푸드마스터 그룹과 독점판매계약을 맺고 국내외 시장에 진입하고자 함
- 이를 통해 뼈관련 식품시장의 주요 타겟층인 유아기, 청소년기, 중장년층 등으로 제품을 세분화하여 뼈관련 전문 제품브랜드로 확장하고, 확보한 연구결과를 바탕으로 최근 급속히 성장하고 있는 반려동물 시장에 뼈전문 유제품을 적극 출시하고자 함
- 금번 농림축산식품부의 지원을 바탕으로 전문가 그룹과의 협업과 공동연구를 통해 기업의 소중한 경쟁력을 확보있도록 해주신데 대해 깊이 감사드리며 향후 조치에 대해 성실하게 협력토록 하겠습니다.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--