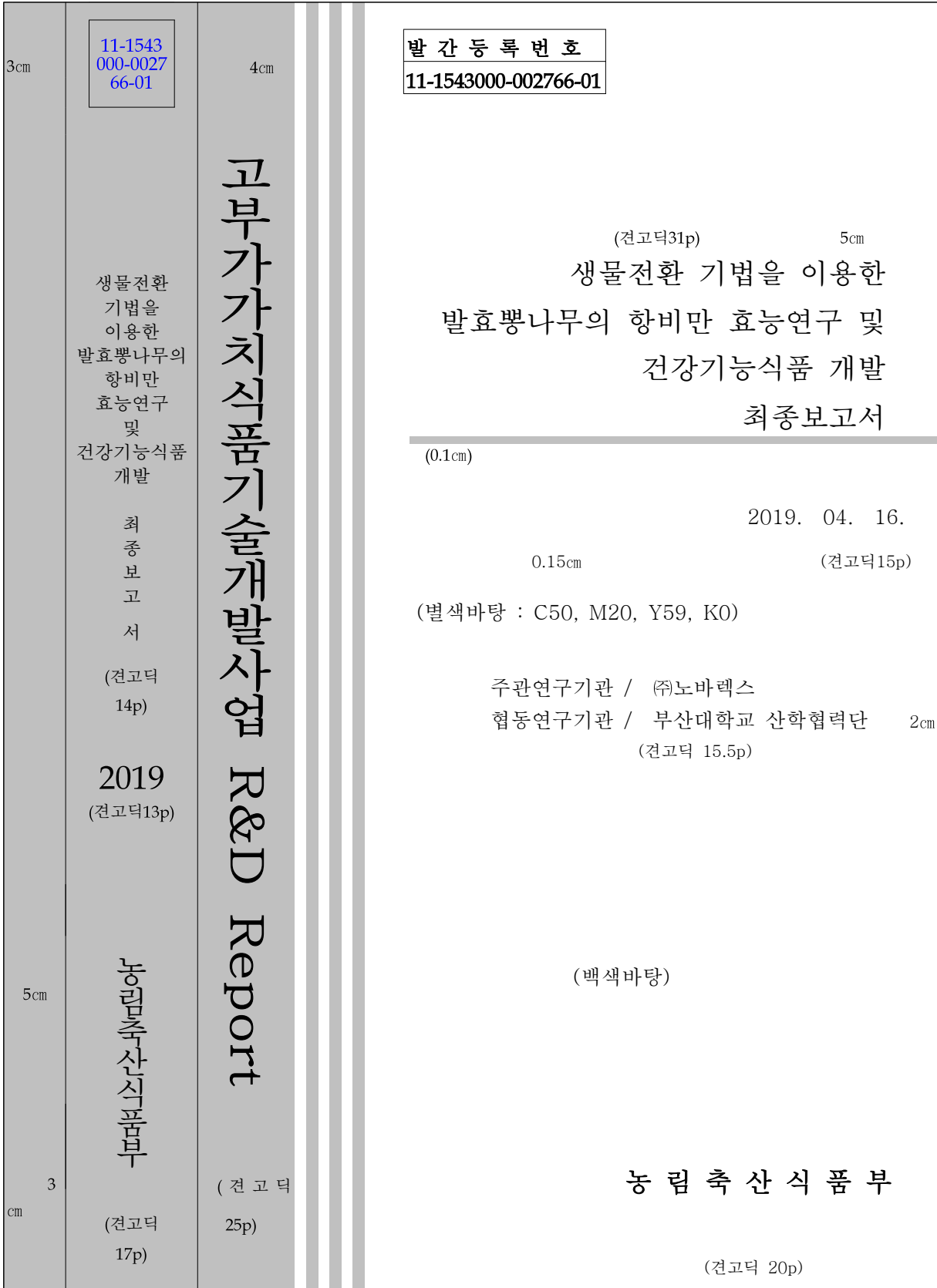


<표지>

(뒷면) (옆면)

(앞면)



※ 최종보고서 표지 작성시 과제명이 길 경우 글씨 크기 변경 가능

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고부가가치식품기술개발사업”(개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2018. 12. 31)  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 16.

주관연구기관명 : (주)노바렉스 (대표자) 권 석 형 (인)

협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단 (대표자) 윤 석 영 (인)

주관연구책임자 : 김 경 미

제1협동연구책임자 : 최 영 환

제2협동연구책임자 : 황 대 연

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	116027-3	해 당 단 계 연구 기 간	3차년도	단 계 구 분	3차년/3차년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	생물전환 기법을 이용한 발효빵나무의 항비만 효능연구 및 건강기능식품 개발			
연구책임자	김 경 미	해당단계 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 13 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:190,000천원 민간: 65,000천원 계:255,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 40 명 내부: 40 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:510,000천원 민간:175,000천원 계:685,000천원
연구기관명 및 소속부서명				참여기업명  (주)노바렉스	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제
-------------------------	-------

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											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

동충하초 균주를 이용하여 최적 발효 조건을 확립하였으며, 항비만 효능을 검증한 소재 개발을 완료하였음. 발효팽잎추출물 내 유효성분 profiling 및 순수물질을 분리, 지표성분 cordycepin, quercetin 함량 분석을 완료하였음. 비만모델을 이용하여 발효팽잎추출물 항비만 효능 평가 및 작용기전 연구를 완료하였고, GLP 기관을 통해 단회투여, 유전독성, 반복투여독성을 수행하여 발효팽잎추출물의 안전성을 확보하였으며, 연구실적을 바탕으로 SCI논문 6편, 비SCI 논문 3편, 총 9편의 논문을 게재 완료하였고, 특허출원 5건을 완료하였음. 항비만 관련 건강기능식품 제품 8건 개발을 완료하였으며, 제품 개발, 생산 및 품질관리를 위한 8명의 고용 창출을 이루었음.

223



<국문 요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뽕나무의 항비만 효능을 증대시킬 수 있는 균주의 발굴 및 발효방법 개발</li> <li>○ 발효균의 생리활성 성분의 함량을 증가시킬 수 있는 발효방법의 개발로 뽕나무의 효능을 강화한 항비만 효능 소재 개발</li> <li>○ 발효비용을 최소화하여 제품개발이 가능한 발효배지 소재의 발굴</li> <li>○ 뽕나무와 발효물의 성분 profiling을 통한 뽕나무와 발효미생물의 지표성분 동시 분석방법 개발</li> <li>○ 추출공정별 지표성분 함량 분석 및 최종 발효공정 소재의 표준화</li> <li>○ 발효공정 추출물의 in vitro, in vivo 및 간이임상 효능검증을 통한 기능성 검증</li> <li>○ 발효 뽕나무 추출물의 안전성 확보</li> <li>○ 항비만 효능을 보이는 건강기능식품 개발 및 개별인정형 소재로의 개발 가능성 확보</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동중하초 균주를 이용하여 최적 발효 조건 확립 및 항비만 효능을 검증한 소재 개발 완료</li> <li>○ 발효뽕잎추출물 내 유효성분 profiling 및 순수물질 분리 완료</li> <li>○ 비만모델을 이용하여 발효뽕잎추출물 항비만 효능 평가 및 작용기전 연구 완료</li> <li>○ GLP 기관을 통한 단회투여, 유전독성, 반복투여 수행하여 안전성 평가 완료</li> <li>○ 지적재산권 확보(SCI 논문 6편, 비SCI 논문 3편, 특허출원 5건)</li> <li>○ 발효뽕잎추출물을 이용하여 건강기능식품 제품 개발 8건 완료</li> <li>○ 제품 개발, 생산 및 품질관리를 위한 고용 8명 창출</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 균의 생리활성 성분이 강화된 발효뽕나무 추출물은 항비만 효과 외에도 뽕나무가 가지고 있는 다양한 효능을 적용하여 제품개발에 활용이 가능함</li> <li>○ 뽕나무의 원재료 또는 발효공정추출물 소재를 이용한 항비만 효능이 검증되고 표준화된 건강기능식품의 산업화</li> <li>○ 발효를 통한 균의 생리활성성분 함량의 강화는 다른 기능성식품 소재를 발효시킴으로써 효능 증대효과가 필요한 소재에 응용 가능</li> <li>○ 다양한 제품을 요구하는 소비자의 욕구를 충족할 수 있는 국내에서 재배하여 공급이 가능한 항비만 뽕나무 소재의 개발로 국내 소비 촉진과 뽕나무의 고기능성 부가가치 창출로 재배농가의 소득 향상</li> <li>○ 원료 또는 발효소재의 생리활성 검증방법 및 뽕나무의 추출물 또는 발효공정추출물로부터 효능성분의 순수분리 기술은 타 생물자원 연구에 활용 가능</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	뽕나무	발효	항비만	건강기능식품	기능성원료
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Mulberry	Fermentation	Anti-obesity	Health Functional Food	Functional Ingredient

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## <Summary in English>

<p>Purpose and Content of Research</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Excavation of strain that can increase anti-obesity effect of mulberry and development of fermentation method</li> <li>○ Development of a fermentation method capable of increasing the content physiologically active components of fermenting <i>Cordyceps militaris</i> to develop an anti-obesity effect ingredient that enhances the efficacy of mulberry</li> <li>○ Excavating fermentation medium materials that can be used for product development with minimal fermentation costs</li> <li>○ Development of a simultaneous analysis method of the indicator component of the fermenting <i>Cordyceps militaris</i> of mulberry through the component profiling of the mulberry fermentation product</li> <li>○ Analysis of content of indicator components by extraction process and standardization of final fermentation process ingredient</li> <li>○ Functional verification through verification of in vitro, in vivo and simple clinical effects of fermentation process extract</li> <li>○ Ensuring the safety of fermented mulberry extract</li> <li>○ Development of healthy functional food showing anti-obesity effect and possibility of development with individual approval ingredients</li> </ul>				
<p>Outcome of R&amp;D</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Establishment of optimal fermentation conditions and development of ingredients proving anti-obesity effect using <i>Cordyceps militaris</i></li> <li>○ Profiling of active ingredient in fermented mulberry leaf extract and complete separation of pure substance</li> <li>○ Completed research on fermented mulberry leaf extract anti-obesity efficacy evaluation and action mechanism using obesity model</li> <li>○ Complete safety assessment by performing single dose, genotoxicity, repeated dosing through GLP agency</li> <li>○ Securing intellectual property rights (6 SCI papers, 3 non-SCI papers, 5 patent applications)</li> <li>○ Completed development of health functional food product using fermented mulberry leaf extract 8 cases</li> <li>○ Creation of 8 employees for product development, production and quality control</li> </ul>				
<p>Plan to utilize R&amp;D outcome (expected effect)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fermented mulberry extract enriched with physiologically active ingredients of <i>Cordyceps militaris</i> can be used for product development by applying various effects of mulberry in addition to anti-obesity effect</li> <li>○ Industrialization of standardized health functional foods with proven anti-obesity effect using raw material of mulberry or fermentation process extract ingredient</li> <li>○ Enhancement of the content of physiologically active ingredients of <i>Cordyceps militaris</i> through fermentation can be applied to ingredients requiring an effect increasing effect by fermenting other functional food ingredients</li> <li>○ The development of an anti-obesity mulberry ingredient that can be cultivated and supplied in Korea that can meet the demand of consumers demanding various products will improve the income of the cultivator by promoting domestic consumption and creating high value added value of mulberry</li> <li>○ The method of validating physiological activity of raw materials or fermentation ingredients and the pure separation technology of efficacy components from extracts of mulberry or fermentation process extracts can be used for research on other biological resources</li> </ul>				
<p>Key words (within 5)</p>	<p>Mulberry</p>	<p>Fermentation</p>	<p>Anti-obesity</p>	<p>Health Functional Food</p>	<p>Functional Ingredient</p>

## < Table of Contents >

Submission letter .....	1
Report Summary .....	2
Summary in Korean .....	4
Summary in English .....	5
Table of Contents in English .....	6
Table of Contents in Korean .....	7
1. Outline of R&D Project .....	8
1-1. Outline of R&D .....	8
1-2. Importance of R&D .....	10
1-3. Contents and Results of previous research .....	15
1-4. Scope of R&D .....	26
2. Contents and Results of Research .....	28
2-1. Promotional strategy and Method of R&D .....	28
2-2. System of R&D .....	32
2-3. Schedule of R&D .....	38
2-4. Outcome of R&D .....	39
2-5. Results .....	45
3. Achievement goal and contribution to related field .....	208
3-1. Objective .....	208
3-2. Whether to objective achieve .....	215
3-3. Reasons for failure to achieve the goal and future measures	219
4. Plan for utilization of research results .....	220
Attachment. Reference .....	223

# 〈 목 차 〉

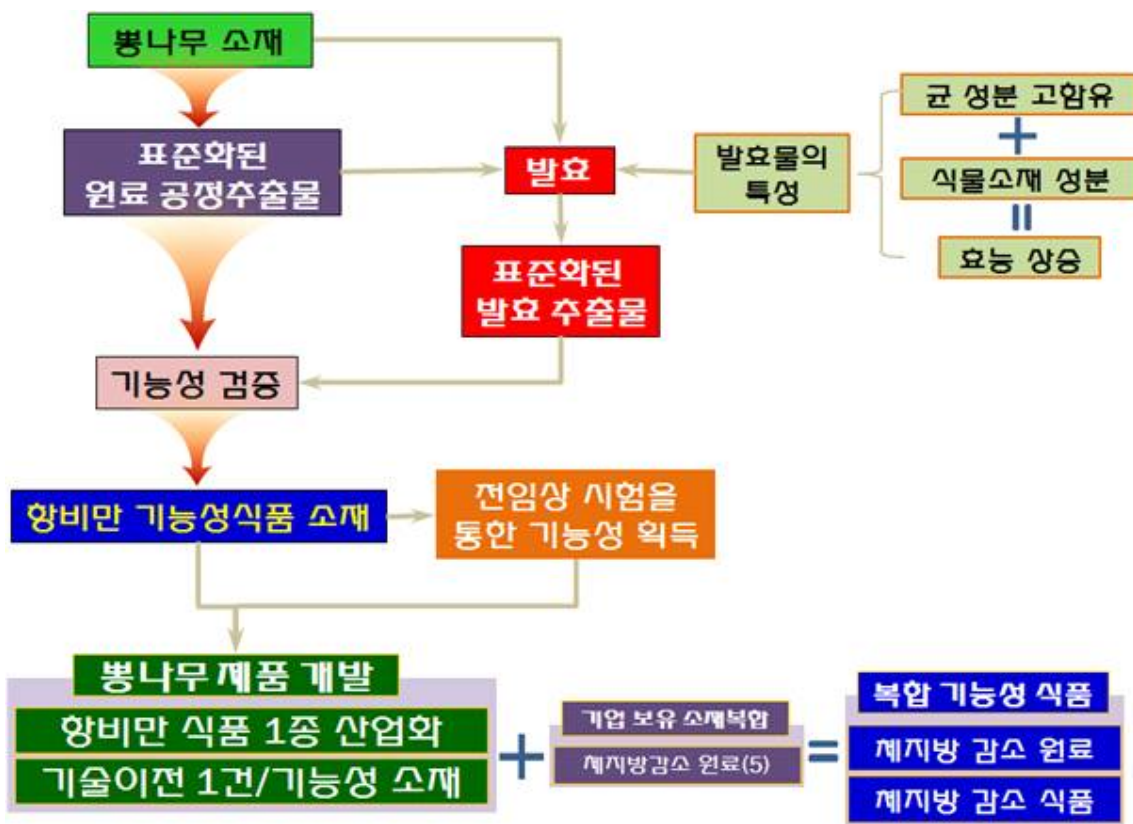
제출문 .....	1
보고서 요약서 .....	2
국문요약문 .....	4
영문요약문 .....	5
영문목차 .....	6
목차 .....	7
1. 연구개발과제의 개요 .....	8
1-1. 연구개발의 개요 .....	8
1-2. 연구개발의 중요성 .....	10
1-3. 선행연구의 내용 및 결과 .....	15
1-4. 연구개발 범위 .....	26
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	28
2-1. 연구개발 추진전략 및 방법 .....	28
2-2. 연구개발 추진체계 .....	32
2-3. 연구개발 추진일정 .....	38
2-4. 연구개발성과 .....	39
2-5. 연구결과 .....	45
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	208
3-1. 목표 .....	208
3-2. 목표 달성여부 .....	215
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) .....	219
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	220
붙임. 참고 문헌 .....	223

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 개요

### 가. 연구개발의 개요

- (1) 다양한 기능성 식품의 소재로 이용되고 있는 빵나무의 발효를 통한 효능 증대
- (2) 발효 빵나무 추출물의 성분 profiling(발효 산물 효능물질) 및 새로운 기능성 물질의 발굴
- (3) 발효 빵나무 추출물의 기능성을 확대시킬 수 있는 추출방법 및 항비만 효능을 보이는 기능성 식품소재 제조공정 방법 개발
- (4) *In vitro* 및 *in vivo* 항비만 효능 검증 및 작용 기전 규명
- (5) 임상시험 : 간이인체적용시험을 통한 항비만 효능 검증
- (6) 발효 빵나무 추출물의 안전성 평가 : 단회투여독성, 유전독성, 반복투여독성
- (7) 발효 빵나무 소재를 이용한 항비만 효능 건강기능성 제품 개발



<항비만 효능 소재 및 제품 개발의 개념도>

나. 핵심기술의 내용

- (1) 뽕나무의 항비만 효능을 증대시킬 수 있는 균주의 발굴 및 발효방법 개발
- (2) 발효균의 생리활성 성분의 함량을 증가시킬 수 있는 발효방법의 개발로 뽕나무의 효능을 강화한 항비만 효능 소재 개발
- (3) 발효비용을 최소화하여 제품개발이 가능한 발효배지 소재의 발굴
- (4) 뽕나무와 발효물의 성분 profiling을 통한 뽕나무와 발효미생물의 지표성분 동시 분석방법 개발
- (5) 추출공정별 지표성분 함량 분석 및 최종 발효공정 소재의 표준화
- (6) 발효공정 추출물의 *in vitro*, *in vivo* 및 간이임상 효능검증을 통한 기능성 검증
- (7) 발효 뽕나무 추출물의 안전성 확보
- (8) 항비만 효능을 보이는 건강기능식품 개발 및 개별인정형 소재로의 개발 가능성 확보

다. 핵심기술의 용도

- (1) 핵심 제품 개발 : 발효 뽕나무 추출물의 안전성 평가 완료 후 항 비만 효능 건강기능식품 18건 이상 개발
- (2) 발효 뽕나무 추출물의 항비만 효능 건강기능식품 기능성 소재 개발
- (3) 항비만 효능을 가진 발효 뽕나무 소재의 기능성 식품 개발
- (4) 최종 제품의 개념도

**개기능성 식품의 개요**

명칭	개발제품의 용도
주요 특징	- 지표성분 함량 기준의 표준화된 제품 - 개별인정형(생리활성기능 3급)
주요 용도	- 체지방 감소 기능성 식품
타켓 시장	미국, 일본, 유럽, 중국 등 아시아
개발 배경	품질인증 국제시장 개척 제품 개발 - 지표성분 고함량 품질 인증 제품 - 체지방 감소를 통한 국민 건강 증진
경제적인 기대성과	- 3~10천원/KG 뽕나무 → 수십만원/KG 품질인증 뽕 (10억 목표)

**항비만 제품의 이미지**



- 뽕나무 단일 소재**
- 복합 원료/제품 개발**

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 사회 문화적 측면에서 항비만 기능성식품 개발의 필요성

- (1) 현재 판매되고 있는 비만 치료약물의 주요 부작용은 약물 중독과 자살충동, 기분장애, 심장질환의 위험성을 증가시키기 때문에 식욕억제제의 경우는 미국에서는 phendimetrazine 은 DEA class III(상대적으로 중독 및 의존성이 높은 위험한 약물), diethylpropion, mazindol, phentermine 은 DEA class IV로 분류하여 규제약물로 관리.
- (2) 세계보건기구(WHO)에서는 비만을 사회적 질병으로 규정하여 비만의 심각성을 알렸으며, 세계의 비만 발병률은 1980년부터 2008년 사이에 2배 가까이 증가하여 전 세계 인구의 약 11% (남 2억명, 여 3억명)가 비만환자 (BMI 30 kg/m<sup>2</sup> 이상)인 것으로 알려져 세계적으로 공중보건을 위협하는 심각한 문제로 인식됨.
- (3) 비만의 심각성은 비만이 다른 질병을 유발하는 원인으로 지목되고 있는데, 최근 영국에서 500만 명을 대상으로 비만 코호트 추적 및 관찰 결과 비만이 제2형 당뇨병, 고지혈증, 자궁암, 담낭암, 간암, 신장암, 치매 및 암 발생 위험을 10~41%(BMI지수 5 증가 시) 증가시키고, 평균수명도 감소되며, 건강위험도도 함께 증가되기 때문에 비만 치료에 대한 수요가 꾸준히 증가.
- (4) 국내에서도 2010년 국민건강영양조사 자료를 분석한 결과 정상체중인 사람에 비해 비만인 사람은 당뇨병, 고혈압, 이상지혈증이 동반될 위험이 2배 이상 높게 나타남.
- (5) 이러한 문제로 인하여 경제 산업적 측면에서의 중요성이 인식되어 세계 각국에서 항비만제 개발에 집중 투자를 하고 있으며, 비만을 억제시킬 수 있는 제품의 개발은 급속도로 증가하여 2025년경에는 미국에서 가장 많이 팔리고 있는 암 치료제 시장을 넘어설 수도 있을 것으로 예측하고 있으나, 현실적으로 수요를 충족시켜 줄만한 효과적인 제품이 시장에 나와 있지는 못한 상태임.
- (6) 최근 전문의약품인 비만치료제의 부작용이나 건강의 위해 가능성으로 인해서 시장에서 퇴출되거나 사용에 대한 우려가 급증하고 있으며, 보건산업의 패러다임이 질병치료에서 질병예방으로 바뀜으로 인하여 건강기능식품 개발의 필요성이 급증하고 있음.

### 나. 체지방 감소 기능성 시장에서 신소재의 요구도 증가

- (1) 지금까지 체지방 감소 기능성 건강기능식품 소재는 약 20여종이며, 그중 시장 트렌드를 주도했던 원료는 잔티젠, CLA, 가르시니아 캄보지아, 마테추출물, 망고 추출물 등 5~6종임.
- (2) 대사증후군(metabolic syndrome)의 정의 및 기준은 아직도 정립 단계에 있으나, 복부 비만(민족성 특성을 고려한 허리둘레 기준치 적용)이 있으면서 고중성지방혈증, 낮은 HDL-콜레스테롤, 고혈압, 당뇨병(또는 높은 공복혈당)의 4가지 대사 이상 중 2개 이상을 가지며, 생활습관성 질환을 동반하는 복합 위험인자군으로 정의함(2004. 5. International Diabetes Federation, IDF). 일반적으로 비만인 사람은 정상인 보다 동맥경화는 4배, 당뇨병은 2배, 고혈압은 3배, 심장질환은 3배의 위험을 가지고 있음.

- (3) 현재까지 개발된 체지방 감량용 약물들은 습관성이 있거나 대부분이 식욕감퇴 유도를 통해 체중감량을 달성하게 하므로, 체중감량 효능이 나타난다 해도 삶의 질적 수준은 상대적으로 저하된다고 볼 수 있음.
- (4) 인구 노령화, 체중조절 등 건강에 대한 관심과 욕구는 세계적인 이슈이며 이를 해결할 수 있는 제품의 개발은 전 세계적으로 부가가치가 높은 상품이 될 것이라 생각됨.
- (5) 새로운 항비만 소재의 개발은 늘 새롭고 효과적인 항비만 소재를 찾는 다이어트 시장에서 기존의 항비만 소재와 함께 다이어트 시장을 확대시킬 수 있을 것으로 예상되며, 항비만 관련소재는 항당뇨 기능성과 연관성이 높아 향후 유사시장으로 시장 확대가 기대됨.
- (6) 국내산 뽕나무를 이용한 새로운 소재의 개발은 주로 수입에 의존하던 항비만 건강기능성 식품 소재에 대한 대체 역할을 수행하며, 기능성 및 안전성에 관한 국가 인증을 통해 개발소재에 대한 대외신뢰도가 향상되어 해외시장확보에 용이할 것으로 생각됨.
- (7) 고부가가치 식품개발사업을 통해 국내 뽕나무를 이용하여 새로운 항비만 효능을 보이는 기능성 소재의 개발은 국내 다이어트 시장을 이끌 뿐 아니라, 국내 농가의 소득 창출에 이바지 할 수 있을 것으로 기대됨.
- (8) 뿐만 아니라 국내 우수 기능성 원료의 산업화를 통해 나고야 의정서 발취에 따른 각 국의 생물자원 보호 정책이 심해지는 세계정세에서 국내 건강기능식품 산업이 나아가야 하는 방향을 제시할 수 있는 것이라 생각됨.

다. 뽕나무의 소재와 발효를 통한 기능성 제품개발의 필요성

- (1) 최근 식품 섭취는 단순히 열량과 영양소를 공급하는 차원을 넘어서 질병의 예방과 치료에 효과가 있다는 사실이 알려지면서 다양한 식품의 생체조절기능에 대한 기능성 식품 신소재 개발의 패러다임의 변화.



< 농산물 등 식물자원을 이용한 기능성 식품 신소재 개발의 뉴 패러다임 >

- (2) 생물전환(biotransformation)은 인체에 쉽게 흡수될 수 있는 형태의 저분자 천연물로 분해와 소량의 유효성분을 대량 생산할 수 있는 방법으로서 건강기능성식품의 개발 대안으로 부각되고 있으며, 이는 웰빙을 중요시하는 시대의 요구에 따라 화학적 공정을 통한 인위적인 원료보다는 천연물 원료의 선호.



- (3) 본 연구에 사용할 균주는 동충하초 균주로서 주요성분인 cordycepin은 항비만, 항당뇨, 항암 등의 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있음.
- (4) 발효는 친환경 가공기술로서 미생물의 작용을 통해 식품에 좋은 맛과 향, 조직감 등을 부여하고 영양성분과 기능성 향상, 생리활성 작용의 증대, 함유된 생리활성물질이 저분자화로 소화 흡수의 용이함 등이 알려지면서 세계적으로 건강기능성 장수식품으로서 인식됨.
- (5) 따라서 다양한 천연물을 대상으로 생물전환기술을 접목함으로써 보다 안전하고 우수한 기능을 가지는 기능성 식의약품 소재를 개발할 필요성이 대두 되고 있음.

#### 라. 뽕나무를 이용한 항비만 연구의 필요성

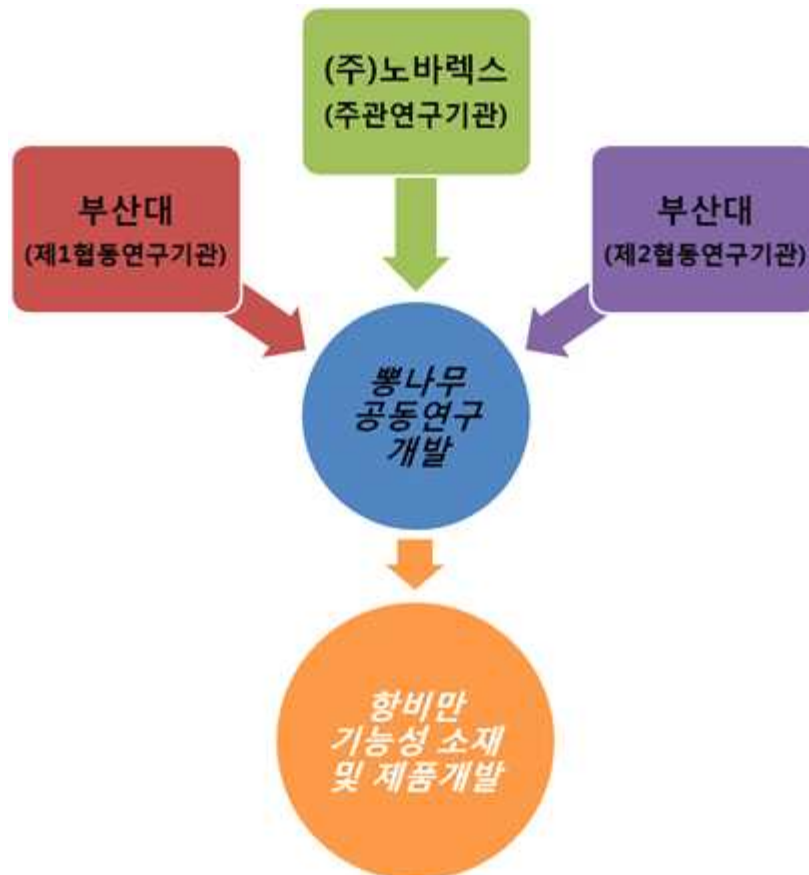
- (1) 항비만 효과에 대한 뽕잎이나 오디의 효용성에 대해서는 이미 오래 전부터 잘 알려져 왔으나 근래 뽕잎에 있는 플라보노이드 화합물 또는 1-deoxynojirimycin(DNJ)이 체지방 축적 억제에 대한 임상 효과가 보고되고 있음.
- (2) 뽕나무는 alkaloid 화합물 [1 - deoxynojirimycin (DNJ), N - methyl - 1 - deoxynojirimycin], 식물성 스테롤화합물 ( $\beta$  - sitosterol, campesterol,  $\beta$  - sitosterol glycoside,  $\beta$  - ecdysone과 inosterol), Flavonoid 화합물 (rutin, quercetin, isoquercetin, moracetin, morusin, mullberrin, mullberrochromene 및 cyclomullberrin), Antocyanin 화합물 (cyanidin 3 - glucoside (C3G)와 cyanidin 3 - rutinoside), 페놀화합물(resveratrol과 moracin 배당체), 휘발성화합물(guaiacol, eugenol, methy salicylate, phenylacetaldehyde, benzaldehyde,  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA) 등의 다양한 생리활성 물질이 보고됨.
- (3) 뽕나무 산물은 다양한 생리활성 성분을 다량 함유하고 있기 때문에 항비만, 항당뇨, 항산화, 항고혈압, 항암, 항노화 등의 효능을 가진 웰빙 건강식품 소재로서 인기가 매우 높음.
- (4) 뽕나무가 지니고 있는 특유의 유용 기능성 물질을 분리하거나 대량 생산하여 기능성식품 및 화장품의 신소재로 활용하는 연구는 미흡한 실정임.
- (5) 비만을 비롯한 암, 심장병, 고혈압, 심근경색증, 동맥경화증, 당뇨병 및 치매 등의 생활습관병의 예방 및 치료를 위해서는 안전성이 높은 천연물 유래 기능성 신소재 및 건강기능식품의 개발이 절실히 요구되고 있는데, 뽕나무가 비만에 효과가 있는 최적의 소재로 판단됨.

#### 마. 뽕나무의 발효를 통한 소재 및 기능성 식품 개발의 필요성

- (1) 대부분의 기능성 원료는 수입에 의존하고 있는 현 시점에서 연구개발을 통해서 한국인의 체질에 맞는 국내산 원료를 이용한 대사증후군 소재 개발은 재배농가의 소득증대와 농촌 지역 창조경제 활성화 가능.
- (2) 뽕나무의 기능성을 증대시킬 수 있는 발효방법 또는 가공공정법의 개발로 항비만과 항당뇨 효과를 과학적으로 규명하여 규격화하여 고품질 기능성식품을 제조하는 기술개발을 통한 제품을 다양화가 요구되고 있음.
- (3) 주관연구기관은 건강기능식품 전문 OEM/ODM 제조업체로서 제품개발 기술력을 토대로 뽕나무를 이용하여 항비만 효능을 보이며 다양한 대사증후군 개선 및 예방에 도움을 줄

수 있는 건강기능성 식품 제품 개발을 추진하여 우리나라 국민 모두가 건강한 삶, 질이 높은 행복한 삶을 영위해 나갈 수 있는 밑거름이 될 것임.

- (4) 제1협동연구기관은 다년간의 뽕나무 연구 수행 노하우와 연구 내용을 바탕으로 뽕나무를 다양한 종류의 추출 조건(발효추출, 단순추출 등)을 통해 항비만 효능을 보이는 새로운 기능성 원료의 추출법을 확립하고 원료의 표준화 및 기능(지표)성분 규격 설정.
- (5) 제2협동연구기관은 제1협동연구기관에서 개발한 뽕나무 추출물을 이용하여 항비만 효능 검증을 수행하고, 과학적인 근거를 바탕으로 항비만 효능을 보이는 제품 개발에 유용한 정보를 제공함.



< 항비만 기능성 소재 및 제품개발 추진 체계 >

바. 뽕나무를 이용한 항비만 기능성 소재 개발 핵심기술

(1) 주관연구기관 : (주)노바렉스

- (가) 기능성 소재의 규격설정 및 추출물의 대량생산
- (나) 항비만 효능 건강기능식품 제품 개발 및 사업화

(2) 제1협동연구기관

- (가) 뽕나무의 항비만 효능을 증대시킬 수 있는 발효균주 및 발효방법 개발
- (나) 기능성성분 validation 및 profiling

(3) 제2협동연구기관

(가) 지방세포의 배양 및 항비만효능 검증기술

(나) 비만모델동물에서 비만유발 및 확인 기술

(다) 비만모델동물을 이용한 항비만물질의 효능평가 기술



사. 정부 지원의 필요성

- (1) 고령화 사회로 진입으로 인하여 건강보험료 지출증가와 조세부담이 커지게 됨에 따라 건강한 실버생활을 위한 건강기능식품 시장의 확대는 세계적인 추세이며, 건강지향에 대한 수요증가로 체지방 감소 기능식품 시장의 확대가 예상됨.
- (2) 미국은 인구의 절반이상이 과체중이고 이중 3분의 1 이상이 비만 환자로 알려져 있으며, 미국 전체 의료비의 약 20.6%인 1920억불(약 219조원)을 비만질환 관리 및 치료비용으로 사용하여 추가 의료비용이 급속하게 증가될 것으로 예상.
- (3) 우리나라에서도 국민건강영양조사에 의하면 19세 이상의 성인 3명중 1명이 비만(32.4%)으로 분류되어, 이에 따른 진료비 지출도 2007년 1조 9천억 원에서 2011년 2조 7천억 원으로 급증.
- (4) 따라서 본 연구의 수행에 의해서 개발된 기능성 소재는 대부분의 수입에 의존하고 있는 현 시점에서 연구개발을 통해서 한국인의 체질에 맞는 국내산 원료를 이용한 항비만 소재 개발은 재배농가의 소득증대와 농촌지역 창조경제 활성화 가능.
- (5) 뽕나무의 기능성을 증대시킬 수 있는 발효방법 또는 가공공정법의 개발로 항비만 효과를 과학적으로 규명하고, 규격화된 제조공정 소재를 이용하여 다양한 고품질 기능성식품의 개발이 가능할 것임.
- (6) 참여기업의 제품개발 기술력을 토대로 다양한 대사증후군 개선 및 예방에 도움을 줄 수 있는 제품개발을 추진하여 우리나라 국민 모두가 건강한 삶, 질이 높은 행복한 삶을 영위해 나갈 수 있는 밑거름이 될 것임.

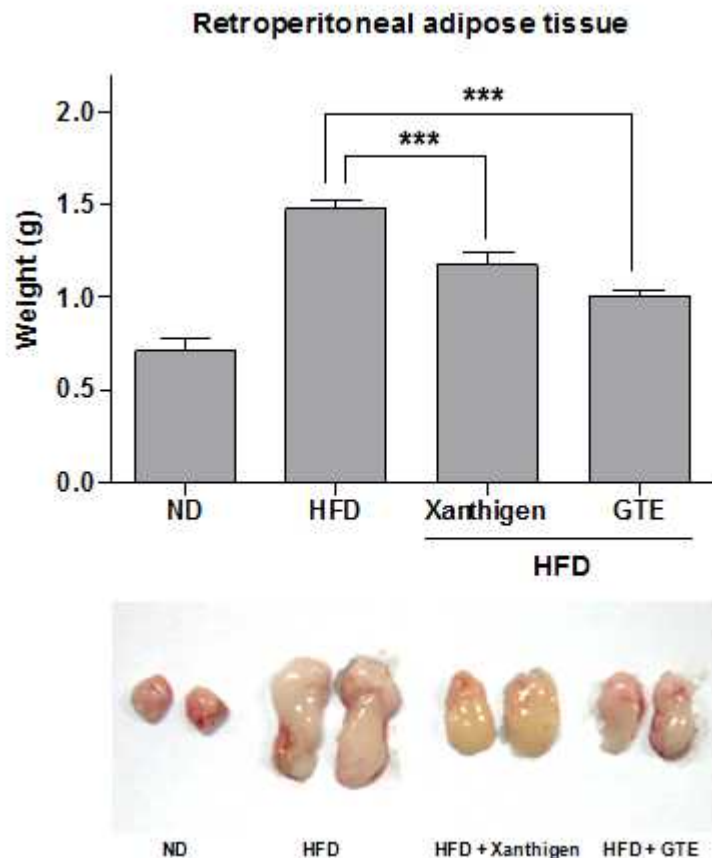
### 1-3. 선행연구 내용 및 결과

가. 주관연구기관 : ㈜노바렉스

#### (1) 선행연구 내용

##### (가) 미역등복합추출물(잔티젠)의 체지방 감소 기능성 원료 개발

- ① 안전성 평가 : GLP 기관으로부터 2주 DRF 반복독성, 3개월 반복독성, 유전독성(염색체이상, 소핵시험) 시험을 수행하여 미역 등 복합추출물의 안전성 평가 완료.
- ② 체지방감소 생리활성 검증 : 미역 등 복합추출물을 동물에 경구 투여하여 실질적인 체지방량 및 복부지방 감소량 등을 측정하여 체지방 감소 메커니즘을 규명하고, 시너지 효과를 나타내는 원료의 선정 및 최적 배합비를 검토하여 체지방 감소 기능성 평가 수행.
- ③ 기능성소재개발 : 원료 기준규격, 안전성, 기능성 자료 등을 모두 취합하여 개별인정 신청 서류를 작성하여 식약처 제출하고 체지방 감소 기능성 개별인정 허가 1건 완료.
- ④ 미역 등 복합물의 완제품 개발 : 식약처로부터 체지방감소 기능성 원료로 개별인정 받은 미역 등 복합추출물을 이용하여 다이어트 제품 연구 & 개발하여 항비만 개선 컨셉트 완제품 품목신고 1건 완료.
- ⑤ 제품 안정성 실험 : 식약처 유통기한 설정 가이드라인에 따라 미역 등 복합추출물 원료 1건, 항비만 개선 컨셉 완제품 2건의 안정성 평가를 실시하여 유통기한 2년 목표 설정.







<2015 고객이 신뢰하는 브랜드 대상 및 잔티젠 출시 제품>

③ 항비만 체지방 감소 기능성 원료 개발에 따라 본 사업의 주관연구기관의 매출은 2013년 48,722백만 원, 2014년 67,134백만 원으로 전년 대비 37.8% 상승하였고, 2015년은 82,743백만 원의 매출 실적을 보임. 당사는 매년 우수 인력을 고용하여 2013년 138명, 2014년 150명, 2015년 180명으로 채용인력이 증가하고 있어 지역 내 경제 활성화에도 이바지 하고 있음.

구 분	세부 내역			비 고
	2013년	2014년	2015년	
매출(백만원)	48,722	67,134	82,743	표준재무제표증명 기준
고용인력(명)	138	150	180	자사 정규직 기준
잔티젠 매출 (백만원)	-	8,000	10,000	자사 제조 기준 매출

④ 따라서 항비만 효능 기능성 원료 개발 및 사업화 성공 사례를 바탕으로 뽕나무를 이용한 항비만 효능을 보이는 기능성 소재 개발 및 이를 이용한 고부가가치 제품 개발 및 상품화를 통해 뽕나무 재배 농가에는 원료 생산량을 늘려 농가 소득 창출 증대 및 자사 매출 증대뿐 아니라 지역경제 활성화에 이바지 하고자 함.



나. 제1협동연구기관 : 부산대학교

(1) 선행연구 내용

- (가) 본 과제외의 협동연구기관으로서 제1협동 과제를 수행하는 부산대학교 천연물연구실을 운영하고 있는 최영환 교수팀에서는 식물자원으로부터 천연물을 순수분리하여 구조동정에 관한 연구를 수행하여 5종의 신물질(schisandrene, Petatewalide B,  $\alpha$ -iso-cubebenol,  $\alpha$ -iso-cubebene,  $\alpha$ -iso-cubebenoate)을 보고.
- (나) 약 70여종의 천연물을 순수분리하여 구조동정을 한 후에 학술지에 보고.
- (다) 최근 본 과제와 관련된 뽕나무 연구를 수행하여 SCI논문 1편(Mori folium inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK in SW1353 human chondrocytes)이 게재되었으며, 뽕나무 잎으로부터 3종의 물질과, 꾸지뽕나무 열매로부터 4종의 물질을 순수분리하여 구조를 동정.
- (라) 또한 감초와 딸기를 발효하여 발효 추출물의 주요 성분을 분석하였으며 특히 균이 생산한 물질을 대량으로 증가시켜 효능을 3배 이상 증가시키는 발효방법을 개발하여 특허를 준비 중에 있음. 뽕나무의 발효를 시작하여 그 효능을 검증. 그 외에도 다양한 천연물을 활용한 기능성 소재 발굴 및 사업화를 진행 중임.
- (마) 2011년 이후 특허 출원 27건, 등록 16건.

(2) 선행연구 결과

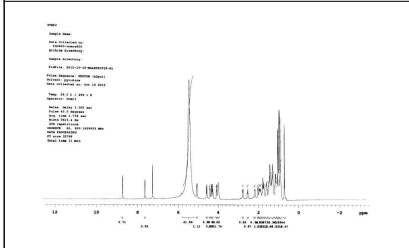
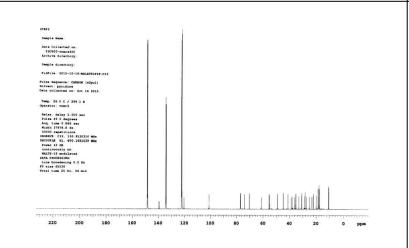
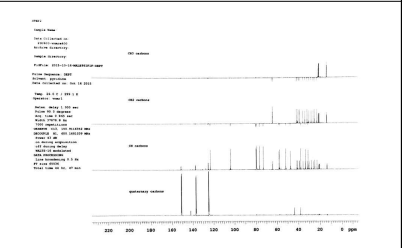
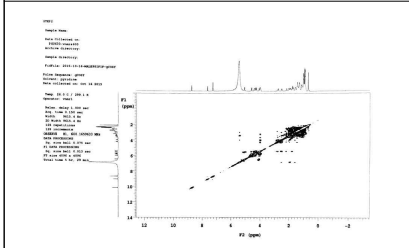
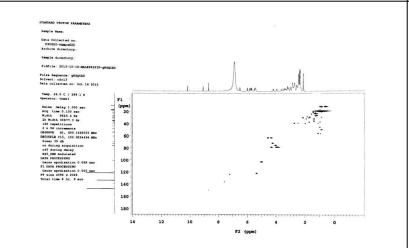
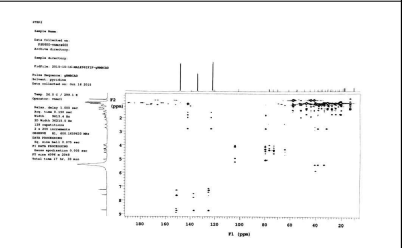
(가) 뽕나무 잎 추출물의 골관절염 효과 검증

- ① 전 염증성 사이토카인인 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 골관절염의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 뽕잎은 우리나라의 전통의약에서 당뇨, 간염, 협압강하 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 뽕잎이 골관절염의 효능에 관한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 SW1353 human chondrocytes세포에서 뽕나무의 물추출물이 in vitro에서 IL-1 $\beta$ 의 효과억제와 NF- $\kappa$ B와 MAPK pathway를 통한 MMPs, iNOS) 및 COX-2억제 효과를 조사하였다. 뽕잎 물 추출물은 SW1353 cells에서 유도된 MMP-1과 MMP-13이 release되어서 IL-1 $\beta$ 를 감소시키는 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 세포독성을 나타내지 않는 농도에서 농도 의존적으로 MMP-1과 MMP-13의 단백질과 mRNA의 발현을 억제시켰다. 뽕잎 물 추출물은 IL-1 $\beta$ 에 의해서 유도된 NO and PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시켰으며, iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 SW1353 chondrocytes에서 뽕잎 물 추출물이 NF- $\kappa$ B 또는 p38 MAPK의 활성의 억제를 통하여 MMP-1, MMP-13 및 염증조절인자의 발현과 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 뽕잎 물 추출물이 관절염 환자에게서 나타는 질환조직 연골의 콜라겐매트릭스 파열에 대한 연골조직의 파괴를 보호하는 치료제로서 개발 가능성이 있을 것으로 기대된다.

(나) 뽕나무로부터 생리활성 성분의 순수분리 및 구조동정(뽕나무잎 4종, 꾸지뽕 3종)

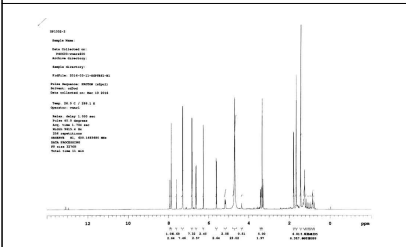
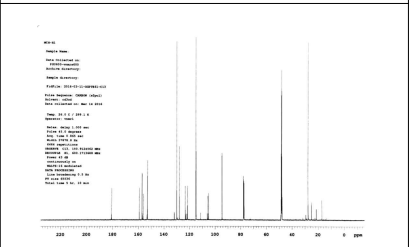
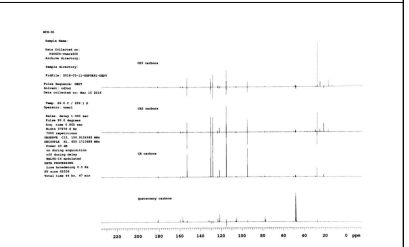
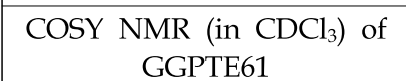
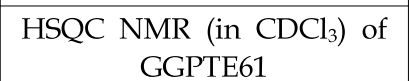
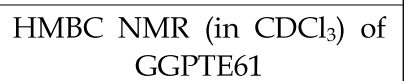
① 뽕나무 잎으로부터 순수분리한 성분 4종 중 1가지 성분의 H-NMR, Carbon-NMR, Dept-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum의 예시.

② 본 소재의 구조를 특허 등의 이유로 인하여 정확하게 밝힐 수 없음.

H <sup>1</sup> NMR (600 MHz in Pyridine) of MALE98IFIF	C <sup>13</sup> NMR (150 MHz in Pyridine) of MALE98IFIF	Dept NMR (150 MHz in Pyridine) of MALE98IFIF
		
COSY NMR (in Pyridine) of MALE98IFIF	HSQC NMR (in Pyridine) of MALE98IFIF	HMBC NMR (in Pyridine) of MALE98IFIF
		

③ 꾸지뽕 열매로부터 순수분리한 성분 3종 중 1가지 성분의 H-NMR, Carbon-NMR, Dept-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum의 예시.

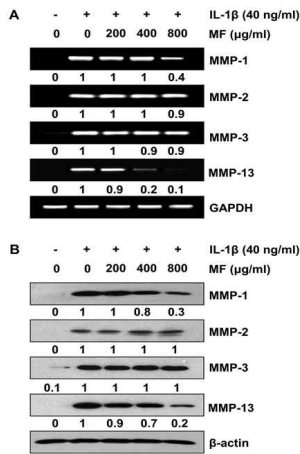
④ 본 소재의 구조를 특허 등의 이유로 인하여 정확하게 밝힐 수 없음. (현재 강한 항암효과가 있는 것으로 나타남)

H <sup>1</sup> NMR (600 MHz in CDCl <sub>3</sub> ) of GGPTE61	C <sup>13</sup> NMR (150 MHz in CDCl <sub>3</sub> ) of GGPTE61	Dept NMR (150 MHz in CDCl <sub>3</sub> ) of GGPTE61
		
COSY NMR (in CDCl <sub>3</sub> ) of GGPTE61	HSQC NMR (in CDCl <sub>3</sub> ) of GGPTE61	HMBC NMR (in CDCl <sub>3</sub> ) of GGPTE61
		

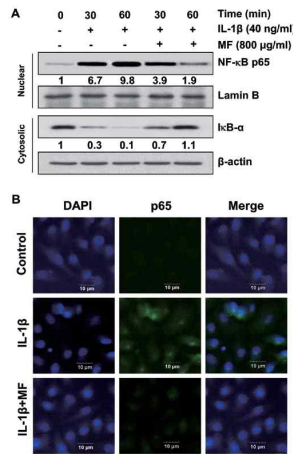


(다) 감초의 발효시 균이 생산한 주요성분 함량 증대 및 발효물의 항염증 효능 증대

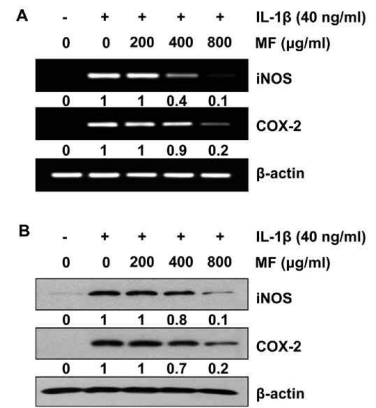
- ① 감초 원물과 MM균으로 발효한 발효물의 MeOH추출물의 항염증 효능을 비교한 결과, 원물은 IC<sub>50</sub>(μg/ml)이 약 71이었으나, 발효물은 21.06으로서 약 3배정도 효능이 증가되었으며, 특히 물 추출물은 비발효물은 효과가 없었으나, 발효물은 31.04로서 MeOH추출물과 유사한 효과를 나타냄. 그러나 PP균 발효물은 전혀 효과가 없었음.



Effects of Mori folium water extract (MF) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in interleukin-1β (IL-1β)-stimulated SW1353 chondrocytes.

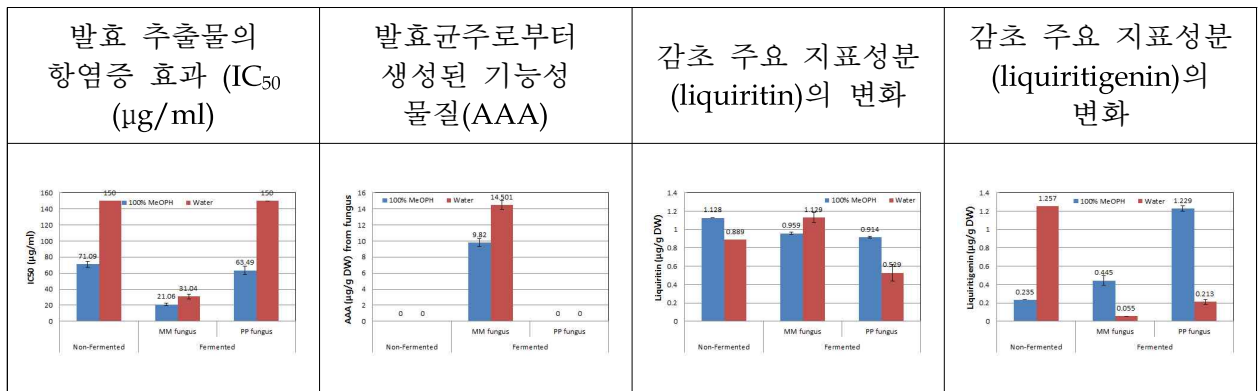


Inhibition of nuclear factor-κB (NF-κB) nuclear translocation by Mori folium water extract (MF) in interleukin-1β (IL-1β)-stimulated SW1353 chondrocytes.



Inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by Mori folium water extract (MF) in interleukin-1β (IL-1β)-treated SW1353 chondrocytes.

- ② MM균으로 발효하였을 경우에는 MM균이 생산하는 주요 생리활성성분(AAA)이 MeOH 추출물에서는 9.82 mg/g dry weight, 물 추출물에서는 14.501 mg/g dry weight이 함유되어 있었으나, PP균으로 발효하였을 경우에는 AAArk 전혀 생성되지 않았음.
- ③ 감초의 주요 지표성분인 liquiritin은 MM균으로 발효 시에는 거의 차이가 없었으나, PP균으로 발효 시에는 현저히 감소하였음.
- ④ 감초의 주요 지표성분인 liquiritigenin은 MM균과 PP균 발효 시에 현저히 감소하였음.
- ⑤ 따라서 감초의 발효 시에 효능 증가는 균이 생산하는 물질인 AAA에 의해서 증가되는 것으로 생각됨.



(라) 딸기의 발효 시 균이 생산한 주요성분 함량 증대 및 발효물의 항염증 효능 증대

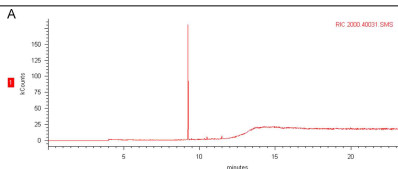
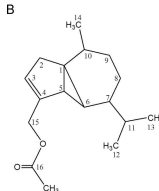
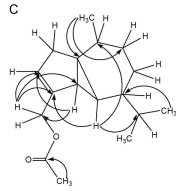
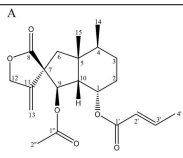
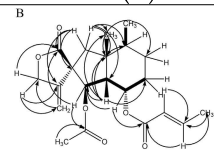
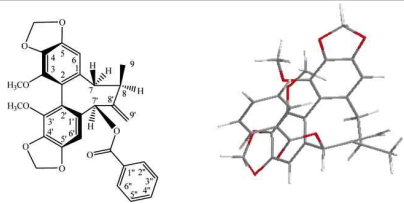
- ① MM균과 PP균으로 발효 후 발효 추출물의 NO생성 억제 효과를 비교한 결과, 비발효 추출물은 200 µg/ml의 농도까지 전혀 NO생성 억제효과가 없었으나, MM균 발효 추출물의 IC<sub>50</sub>은 22.5와 29.57 µg/ml로서 항염증 효과가 매우 높았으나, PP균 발효 추출물은 124.25 µg/ml으로서 효능이 약간 증가하였다.
- ② 발효균이 생성하는 기능성물질인 AAA는 발효 방법에 따라서 약간의 차이는 있었으나, MM균은 2.211 µg/g DW로서 많은 양을 생산하였으나, PP균은 AAA를 전혀 생성하지 않았으며, 효능이 현저히 감소하였다.
- ③ 또한 딸기의 주요 지표성분인 ellagic acid가 2종의 균으로 발효시에 관측되지 않았으며, quercetin은 현저히 감소하였다.

발효 추출물의 항염증 효과 (IC <sub>50</sub> (µg/ml))	발효균주로부터 생성된 기능성 물질(AAA)	딸기 주요 지표성분 (ellagic acid)의 변화	딸기 주요 지표성분 (quercetin)의 변화																																																
<table border="1"> <caption>발효 추출물의 항염증 효과 (IC<sub>50</sub>)</caption> <tr><th>조건</th><th>IC<sub>50</sub> (µg/ml)</th></tr> <tr><td>SFPS0</td><td>200</td></tr> <tr><td>SOPS0</td><td>200</td></tr> <tr><td>S100P</td><td>124.25</td></tr> <tr><td>S50P</td><td>22.25</td></tr> <tr><td>S25P</td><td>29.57</td></tr> </table>	조건	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	SFPS0	200	SOPS0	200	S100P	124.25	S50P	22.25	S25P	29.57	<table border="1"> <caption>발효균주로부터 생성된 기능성 물질(AAA)</caption> <tr><th>조건</th><th>AAA (µg/g DW)</th></tr> <tr><td>SFPS0</td><td>0</td></tr> <tr><td>SOPS0</td><td>0</td></tr> <tr><td>PP fungus</td><td>0</td></tr> <tr><td>S100P</td><td>2.211</td></tr> <tr><td>S25P</td><td>0.6235</td></tr> </table>	조건	AAA (µg/g DW)	SFPS0	0	SOPS0	0	PP fungus	0	S100P	2.211	S25P	0.6235	<table border="1"> <caption>딸기 주요 지표성분 (ellagic acid)의 변화</caption> <tr><th>조건</th><th>Ellagic acid (mg/g DW)</th></tr> <tr><td>SFPS0</td><td>0.787</td></tr> <tr><td>SOPS0</td><td>0.308</td></tr> <tr><td>S100P</td><td>0</td></tr> <tr><td>S50P</td><td>0</td></tr> <tr><td>S25P</td><td>0</td></tr> </table>	조건	Ellagic acid (mg/g DW)	SFPS0	0.787	SOPS0	0.308	S100P	0	S50P	0	S25P	0	<table border="1"> <caption>딸기 주요 지표성분 (quercetin)의 변화</caption> <tr><th>조건</th><th>Quercetin (mg/g DW)</th></tr> <tr><td>SFPS0</td><td>0.019</td></tr> <tr><td>SOPS0</td><td>0.0301</td></tr> <tr><td>S100P</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>S50P</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>S25P</td><td>0.021</td></tr> </table>	조건	Quercetin (mg/g DW)	SFPS0	0.019	SOPS0	0.0301	S100P	0.01	S50P	0.01	S25P	0.021
조건	IC <sub>50</sub> (µg/ml)																																																		
SFPS0	200																																																		
SOPS0	200																																																		
S100P	124.25																																																		
S50P	22.25																																																		
S25P	29.57																																																		
조건	AAA (µg/g DW)																																																		
SFPS0	0																																																		
SOPS0	0																																																		
PP fungus	0																																																		
S100P	2.211																																																		
S25P	0.6235																																																		
조건	Ellagic acid (mg/g DW)																																																		
SFPS0	0.787																																																		
SOPS0	0.308																																																		
S100P	0																																																		
S50P	0																																																		
S25P	0																																																		
조건	Quercetin (mg/g DW)																																																		
SFPS0	0.019																																																		
SOPS0	0.0301																																																		
S100P	0.01																																																		
S50P	0.01																																																		
S25P	0.021																																																		

(마) 신물질의 순수분리 및 효능

- ① α-iso-cubebenol과 α-iso-cubebene은 항염증, 신경질환 효과 등 다양한 효과를 나타내는 물질로 증명되었으며, 다수의 물질 및 효능특허가 등록되었음.

본 연구팀의 신물질	물질 구조	SCI게재 논문 (Pubmed search)	기타
α-iso-cubebenol	<p>Identification of α-iso-cubebenol as a novel molecule that stimulates anti-inflammation. Structure of α-iso-cubebenol (A). Key HMBC correlations of α-iso-cubebenol (B).</p>	8편	Biochemical and Biophysical Research Communications 391 (2010) 1687 - 1692
α-iso-cubebene	<p>(A) Structure of α-iso-cubebene. (B) Key HMBC correlations of</p>	6편	Biochemical and Biophysical Research Communications 379 (2009) 928 - 932

	a-isocubebene.		
$\alpha$ -cubebene	<p>A</p>  <p>B</p>  <p>C</p>  <p>Structure of <math>\alpha</math>-cubebene. GC chromatogram(A), structure(B), and HMBC of <math>\alpha</math>-cubebene(C).</p>	2편	J. of Ethnopharmacology 153(2014): 242 - 249
Petatewalide B	<p>A</p>  <p>B</p>  <p>Structure of petatewalide B (A) and HMBC of petatewalide B(B).</p>	1편	J. of Ethnopharmacology 178(2016): 17 - 24
Schisandrene	 <p>Structure and computer-generated perspective drawing of schisandrene (13).</p>	1편	J. Natural. Products. 69(2006): 356-359

(바) 오미자 유래 화합물 순수 분리

- ① 오미자에서 lignan계 화합물인 Schisandrene(본 연구자의 신물), Schisandrin, Schisandrin (3), Schisandrin A, Schisandrin C, Gomisin A, Gomisin B, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin K, Gomisin N, Benzoylgomisin H, Angeloylgomisin H, Tigloylgomisin H 및 신규 화합물인 a-Iso-cubebenol, a-Iso-cubebene를 순수 분리한 바 있음.

Table 1. Structures of Lignans from Fruits of *S. chinensis*

R-biphenyl configuration											S-biphenyl configuration													
No.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>	No.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>	
1	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	8	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>				H	
2	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	9	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>					H	
3	OH	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	10	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>				H	
4	OH	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	H		11	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>					Angeloyloxy	
5	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Angeloyl-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	12	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Benzoyloxy					
6	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Tigloyl-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	13	=CH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>					Benzoyloxy	
7	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Benzoyl-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H													

(사) 쥐오줌풀로부터 순수 분리한 리그난 성분과 플라보노이드 등을 동시분석 할 수 있는 시스템 구축과 시중에서 판매되고 있는 제품의 함량 분석 - Journal of AOAC에 게재

- ① 쥐오줌풀 소재로부터 직접 분리하여 구조를 동정한 lignans, chlorogenic acid 및 flavonoids와 시약회사로부터 구입한 valerenic acids, and valpotrates의 HPLC 동시분석법을 확립하였으며, 시판되고 있는 쥐오줌풀 제품을 수집하여 함량을 비교분석하였다.

K. NISHIMIZU ET AL. JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL, VOL. 95, NO. 2, 2002

**DIETARY SUPPLEMENTS**

**Chemical Fingerprinting of Valeriana Species: Simultaneous Determination of Valerenic Acids, Flavonoids, and Phenylpropanoids Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection**

Table 1. Calibration data [regression equation and correlation coefficient (R<sup>2</sup>) and limit of detection (LOD) for analytes 1-8 and 11]

Analyte	Regression equation (Y vs. weighting)	R <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	Signal (mV)
1	$y = 1.02 \times 10^4 x + 1.20 \times 10^2$	0.9998	0.3	225
2	$y = 1.84 \times 10^4 x + 2.30 \times 10^2$	0.9998	0.5	225
3	$y = 1.15 \times 10^4 x + 1.70 \times 10^2$	0.9998	0.3	225
4	$y = 1.21 \times 10^4 x + 1.20 \times 10^2$	0.9998	0.5	225
5	$y = 2.54 \times 10^4 x + 3.00 \times 10^2$	0.9998	0.5	225
6	$y = 1.48 \times 10^4 x + 1.20 \times 10^2$	0.9998	0.3	225
7	$y = 2.02 \times 10^4 x + 1.70 \times 10^2$	0.9998	0.1	225
8	$y = 1.79 \times 10^4 x + 1.20 \times 10^2$	0.9998	0.3	225
11	$y = 4.65 \times 10^4 x + 2.20 \times 10^4$	0.9998	0.1	225

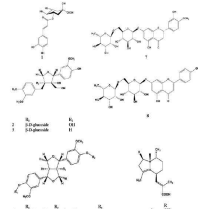


Figure 1. Structures of chlorogenic acid, lignans, flavonoids, and valerenic acids. Numbered compounds are identified in text.

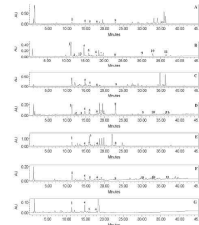


Figure 2. Comparison of chromatograms at 225 nm of V. procerus Karst (A), V. officinalis L. (B), V. officinalis Nutt. (C), V. A. Group (D), V. schwanberg (E), V. officinalis (F), V. officinalis (G), an extract of dietary supplement containing V. officinalis L. (H), and an extract of dietary supplement containing V. procerus Karst (I).

(아) HPLC를 이용한 당귀 coumarins 성분 8종의 분석방법 확립 및 성분 기준의 유사종의 분류

- ① 본 연구는 *Angelica gigas* 뿌리의 MeOH 추출물로부터 분리한 8종의 coumarins 함량을 분석하기 위한 단순하고 특이한 분석방법을 개발하기 위하여 수행되었다. *Angelica gigas*의 뿌리에 함유되어 있는 coumarins는 acetonitrile (0.1% acetic acid)-water(0.1% acetic acid)-reagent alcohol를 이용한 gradient system으로 분석하여 주요성분의 분석 validation을 확립.

**Simultaneous Determination of Eight Coumarins in *Angelica gigas* and in Various Other Angelical Species by High Performance Liquid Chromatography and Comparative Micro-Morphology Study of Angelical Species**

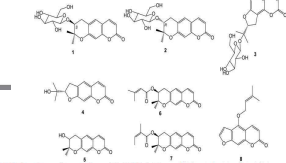
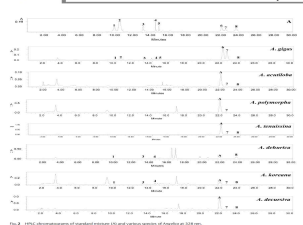


Table 1. Regression equation, correlation coefficient (R<sup>2</sup>), limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for analytes 1-8

Analyte	Regression Equation	R <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.1	0.3
2	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.15	0.5
3	$Y = 8.70 \times 10^3 X$	0.9998	0.2	0.6
4	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.1	0.3
5	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.1	0.3
6	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.1	0.3
7	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.1	0.3
8	$Y = 2.20 \times 10^4 X$	0.9996	0.1	0.3

(자) 오미자로부터 순수 분리한 그리난 성분의 HPLC 분석

- ① 오미자는 다양한 생리활성 성분을 가지고 있는 전통적인 동양의 약용식물 중의 하나이다. 오미자의 과실에 함유되어 있는 8종의 리그난 성분을 분석하기 위한 최적의 방법을 개발.

**Quantitative Determination of Lignan Constituents from *Schisandra chinensis* by Liquid Chromatography**

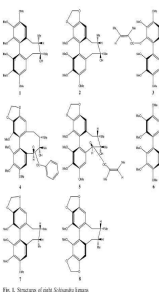
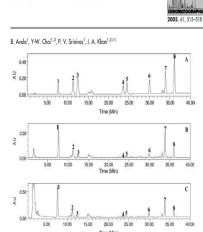


Table 1. Calibration data [regression equation and limit of detection (LOD) for compounds from 1-8 and the percentage of lignan in the different plant species (A-E)]

Lignan	Regression Equation	LOD (µg/ml)	A	B	C	D	E
1	$y = 1.61 \times 10^4 x$	0.50	0.60 (0.07)	0.57 (0.2)	0.52 (0.0)	0.63 (0.0)	0.51 (0.0)
2	$y = 4.24 \times 10^3 x$	0.50	0.25 (0.2)	0.37 (0.0)	0.34 (0.7)	0.30 (0.4)	0.24 (0.0)
3	$y = 1.81 \times 10^4 x$	0.50	0.30 (0.2)	0.21 (0.7)	0.22 (0.5)	0.22 (0.0)	0.23 (0.4)
4	$y = 3.12 \times 10^3 x$	0.40	0.01 (0.0)	0.05 (0.0)	0.04 (0.7)	0.05 (0.5)	0.05 (0.0)
5	$y = 4.01 \times 10^3 x$	0.50	0.01 (0.0)	0.01 (0.0)	0.01 (0.5)	0.01 (0.7)	0.02 (0.0)
6	$y = 1.61 \times 10^4 x$	0.50	0.01 (0.0)	0.01 (0.0)	0.01 (0.5)	0.01 (0.4)	0.01 (0.2)
7	$y = 5.81 \times 10^3 x$	0.20	0.00 (0.0)	0.01 (0.0)	0.00 (0.0)	0.01 (0.2)	0.01 (0.7)
8	$y = 1.81 \times 10^4 x$	0.20	0.25 (0.0)	0.21 (0.0)	0.24 (0.7)	0.27 (0.0)	0.24 (0.2)

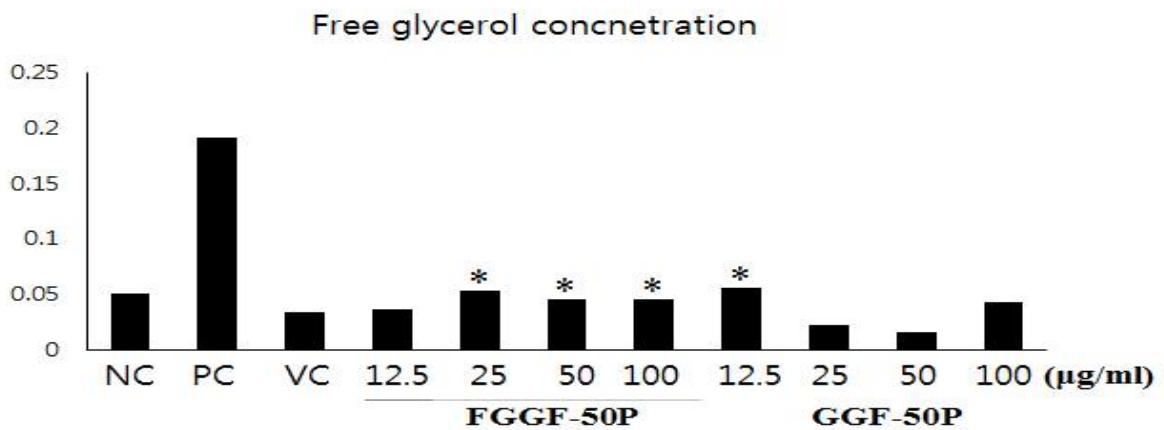
Percent RSD (n = 3) given in parenthesis

다. 제2협동연구기관 : 부산대학교 황대연 교수

(1) 항비만 천연물의 개발에 대한 선행연구 결과

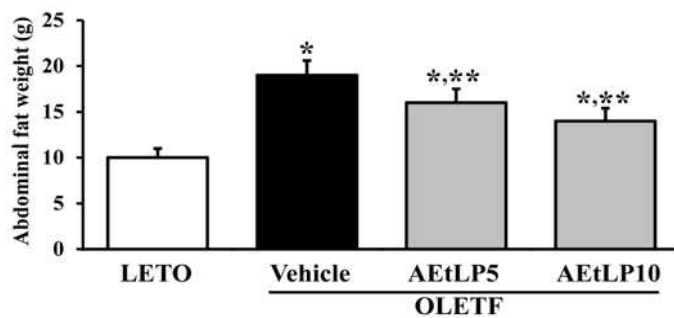
(가) 뽕나무 발효추출물의 항비만 효능

- ① 꾸지뽕 중간 발효추출물을 랫드의 지방세포에 24시간 동안 처리하여 예비실험으로서 glycerol assay를 실시한 결과, 일부 추출물에서 glycerol 생성량을 유의적으로 증가시키는 효과 확인



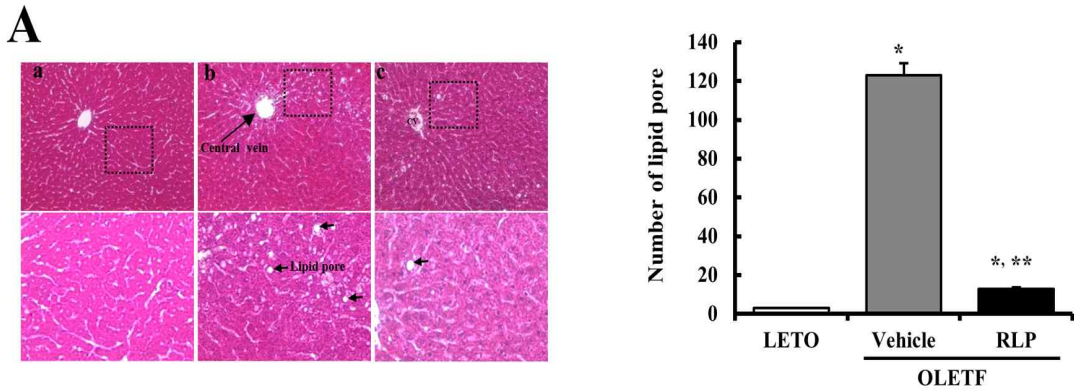
(나) 맥문동 추출물이 복부지방을 억제하는 효능 규명

- ① 맥문동 추출물이 OLETF 랫드의 복부지방의 무게를 유의적으로 억제하는 효과 규명함

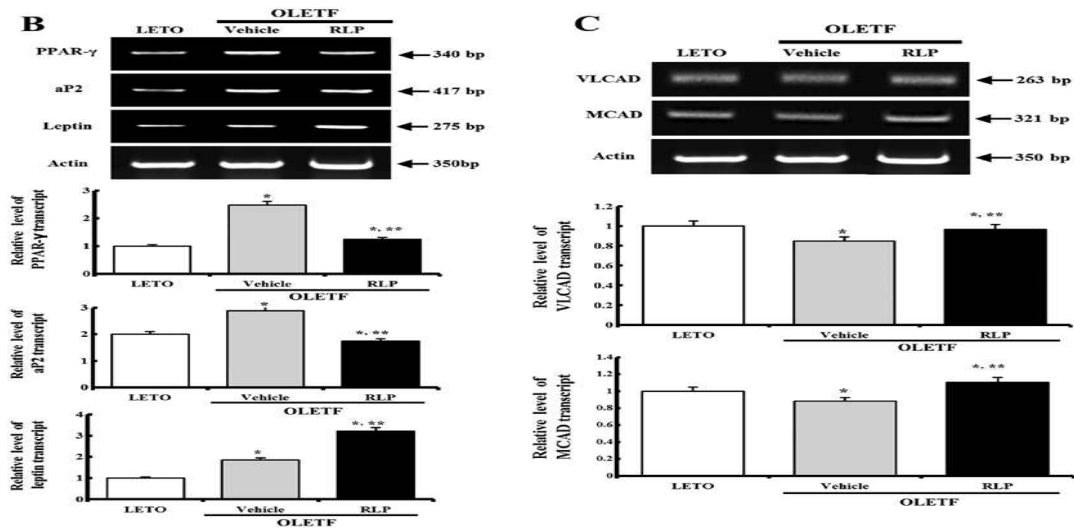


(다) 맥문동 증속으로 제조된 홍문동 추출물이 OLETF랫드의 지방형성 억제 효능 규명

- ① 홍문동 추출물을 3주동안 OLETF랫드에 투여한 결과, 간조직에서 지방의 형성이 유의적으로 감소함을 관찰함



- ② 홍문동 추출물이 복부지방의 산화에 관여하는 PPAR $\gamma$ , aP2 등 다양한 유전자의 발현을 억제하는 효능이 있음을 관찰함





#### 1-4. 연구개발의 범위

##### 가. 주요 기능(또는 규격)

- (1) 뽕나무의 효과를 증대시킬 수 있는 발효 추출물의 항비만 건강기능성 식품 개발(뽕나무의 효능 2배 이상 증대)
- (2) 균이 생산한 생리활성 성분의 함량 증대, 발효에서 만들어진 새로운 물질 및 뽕나무 지표 성분으로 표준화된 항비만 효능 증강형 발효뽕나무 소재 개발
- (3) 발효 뽕나무 추출물 안전성 평가 완료 : 단순 물, 주정 추출이 아닌 발효로 인해 건강기능식품 기능성원료로 개발하기 위해 안전성 평가 완료
- (4) 발효 뽕나무 추출물 건강기능식품 제품 개발을 위한 안정성(stability) 평가
- (5) 항비만 효능 검증 완료 : 기능성 평가(시험관시험, 동물시험, 기전연구, 인체적용시험 등)를 수행하여 발효 뽕나무 추출물의 항비만 효능 검증 완료
- (6) 항비만 효능을 보이는 건강기능식품 제품 개발

##### 나. 주요 생리활성 증대 효과

- (1) 현재 추출물에서 나타내는 항비만 효능을 2배 이상 증가
- (2) 발효 뽕나무 추출물의 항비만 효능 검증 완료(단순추출, 발효추출에 따른 생리활성 효능 비교)
- (3) 간이 인체적용시험 수행을 통해 섭취량, 섭취기간, 바이오마커 등을 선정하여 항비만 효능 검증 인체적용시험 생리활성 모델 구축 완료

##### 다. 주요 성능치

- (1) 발효 추출물의 성분분석과 효능검증을 통한 발효 뽕나무소재의 항비만 효과의 과학적인 증명.

구 분	뽕나무	발효	개선효과
발효	단순 추출물	균 성분 + 뽕나무 성분 함유	- 기능성 2배 이상 증대
지표성분	뽕나무 성분	뽕나무 생물전환 + 균 성분의 표준화	- 균 생리활성 성분의 시너지 효과
효능검증	논문 게재를 위한 실험	식약처 기준에 근거한 실험	- 전 임상 시험 완료
효능증대	추출방법 개선	균 성분	- 균 생산 효능성분 함유
제품 개발공정	제품의 지표성분	소재-제조공정 단계별 표준화	- 표준화된 제조공정을 통한 제품개발을 최우선 목표로 연구
최종제품	단순 추출물	효능 검증 전임상 항비만 제품 개발	- 5종 제품 개발

라. 핵심 기술

- (1) 항비만 효능을 나타내는 표준화된 빵나무 건강기능성 제품 개발.(세계 Top 3)
- (2) 균의 효능성분과 빵나무 효능성분의 시너지효과를 나타내는 발효법 개발.(세계 Top 1)
- (3) 항비만 효능을 증대시킬 수 있는 빵나무 발효 균주 발굴.
- (4) 균의 효능성분 함량을 증대시킬 수 있는 발효방법 개발.(세계 Top 5)
- (5) 생물전환 방법을 이용한 발효빵나무 추출물의 균의 성분과 빵나무 성분의 profiling.
- (6) 발효물 및 추출공정별 지표성분의 표준화.
- (7) In vitro 및 in vivo 항비만 작용기작 규명.
- (8) 비만모델동물을 이용한 빵나무 추출물의 항비만 효능평가.
- (9) 항비만 효능 발효빵나무 소재의 작용기전 연구 및 독성평가.

마. 적용범위(또는 서비스)

- (1) 소아 및 노인성 대사성 질환 개선 토털 프로그램(운동요법, 식습관개선, 건강기능식품 섭취로 인한 예방 등)에 활용.
- (2) 국내 자생 농산물 또는 약초의 기능성 검증 및 활용을 위한 기능성원료 개발 프로세스에 활용.



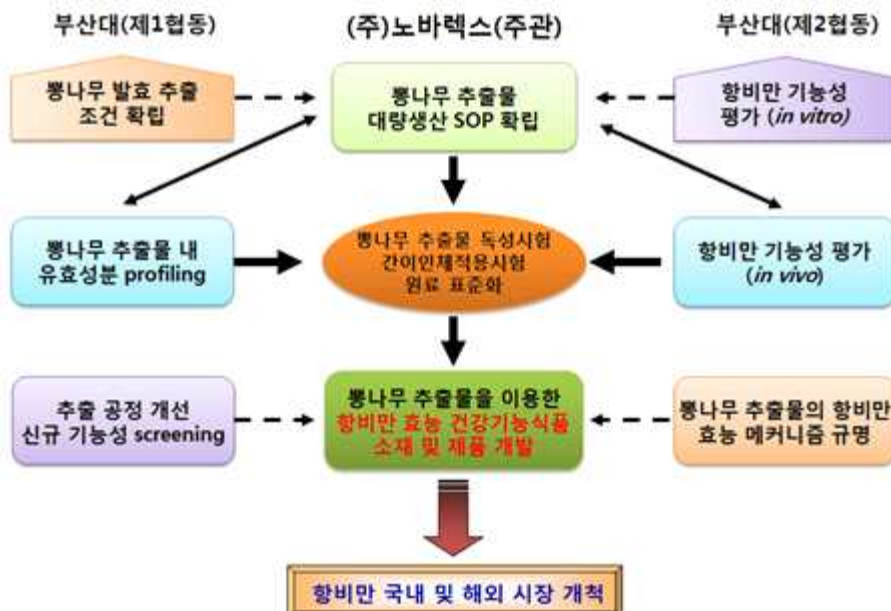


## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구개발 추진전략 및 방법

#### 가. 항비만 기능성을 가진 제품 개발 추진 전략

- (1) 국내는 물론 국외에서도 대사증후군에 대하여 매우 높은 관심을 보이고 있으며, 이를 개선하기 위한 연구개발 및 새로운 소재에 대한 끊임없는 수요에도 불구하고 국내산 원료를 이용한 기능성 원료와 식품 등이 많이 개발되어 있지 않은 현실임.
- (2) 뽕나무 산물의 경우 예로부터 식품으로 널리 섭취되어 있는 안전한 원료로 부작용도 없고 원료 확보가 용이한 장점이 있음. 수입산 원료는 원재료에 대한 불확실한 정보로 인해 소비자로부터 하여금 불안감을 높여줄 수 있으며, 국제 유가, 환율 등에 의한 가격 변동이 심한 단점이 있음. 국내산 뽕나무 산물은 국내 자연 소재로 국민들이 안심하고 섭취할 수 있는 원료를 이용하고, 뽕나무 산물 재배 농가의 소득 증대를 도모하고 나아가 지역 경제를 활성화 시켜 국가 경쟁력을 확보할 수 있음.
- (3) 본 과제에 참여하고 있는 (주)노바렉스는 국내 최대 건강기능식품 기능성원료 개별인정 누적 건수를 보유한 건강기능식품 전문 제조업체로서 우수한 기술력과 연구력을 바탕으로 국내 뽕나무 산물을 이용한 대사증후군에 효과적인 제품 개발할 수 있는 능력이 있으며, 당사와 협력 관계에 있는 고객사의 요구에 맞는 제품을 개발 할 수 있음.
- (4) 뽕나무추출물을 이용한 항비만 효능 건강기능식품 소재 및 제품 개발을 위하여 제2협동기관에서는 효능 검증을 진행하고, 주관기관에서는 간이인체적용시험을 수행하여 항비만 효능을 확보하고자 함. 간이인체적용시험을 수행하여 항비만 효능에 대한 경향을 살펴볼 수 있을 것으로 기대되며, 개별인정 신청을 위하여 식약처에서 인정되는 범위의 인체적용시험 자료가 제출되어야 할 것으로 생각됨. 따라서 간이인체적용시험 결과를 바탕으로 항비만 효능 또는 대사성질환에 효과를 확실하게 검증할 수 있는 식약처의 인체적용시험 가이드에 준하여 설계하여 추가로 진행될 수 있도록 추진함.



## 나. 기술정보 수집

- (1) 각 분야 별로 기술의 이해와 교류를 위해 전문가 활용 정례화 및 국내외 포럼, 워크숍, 학술대회에 적극적으로 참여.
- (2) 주관연구기관인 (주)노바렉스는 2019년 1월 현재 국내에서 건강기능식품 기능성원료 개별 인정을 누적 건수 35건으로 가장 많이 받은 기업으로서 항비만 효능을 갖는 뽕나무 기능성 소재를 이용한 제품 개발 및 산업화 의지가 매우 높고, 기 보유하고 있는 소재와 혼합을 통한 새로운 기능성제품의 개발에 활용이 가능할 것으로 생각됨.
- (3) 부산대학교 최영환 교수 연구팀은 선행 연구에서 식물자원으로부터 기능성 성분의 순수 분리 및 구조동정으로 5개의 신물질을 발굴하였으며, 순수분리한 천연물의 생리활성 효과에 관한 논문을 최근 3년간 35편 이상 게재, 다수의 특허권과 치매에 효능을 가진 제품 개발을 위해서 HPLC분석 방법과 시험방법의 타당성(밸리데이션) 확립하여 임상시험을 준비 중에 있으며, 사업화를 수행하고 있는 (주)노바렉스와 전반적인 기술정보 교류에 따른 공동 체계 구성. 또한 최근에는 약용작물을 발효하여 효능을 증대시킬 수 있는 방법을 개발하였으며 그 효능은 균이 생성하는 주요 생리활성 물질이 효능을 높인다는 것을 증명하였으며, 균이 합성하는 물질 및 식물의 성분분석을 한 후에 특허를 준비하고 있음.
- (4) 부산대학교의 황대연 교수팀은 비만 동물모델을 개발하여 다양한 맥문동의 가공품의 효능을 검증하여 논문을 보유하고 있으므로 발효뽕나무의 항비만 효과 및 작용기작에 관한 연구를 수행할 수 있는 능력을 보유하고 있음.

## 다. 전문가 확보

- (1) 전문가 네트워크를 통한 효과적 기술개발 정보 공유
- (2) 전문가 초빙 및 네트워크 구성
  - (가) 본 연구진은 이미 다양한 식물자원으로부터 생리활성 성분의 순수분리, 구조 동정, *in vitro* 및 *in vivo* 생리활성 검증, 건강기능성 식품개발 등에 충분한 경험을 가지고 있는 전문가로 구성되어 있으며, 필요시에 미국의 천연물연구소와 추가적인 협력을 계획하고 있음.
  - (나) 분기당 1회 이상의 세부과제별 정보 공유 및 세미나를 통한 정보공유 및 연구 개발 방향 설정.
  - (다) 연구 성과의 국제학술지 발표 및 게재를 적극 추진함.

<분기당 세부과제별 정보 공유 및 세미나 계획>

구 분		주관연구	제1협동연구	제2협동연구	비 고
2016년	3/4분기	지표성분 분석법 확립	뽕나무 최적 부위 발굴	in vitro 항비만 조건 설정	주관연구 세미나 주관
	4/4분기	안전성 평가 및 시제품 개발	효능 성분 함량 증가법 개발	동물시험 모델 구축	제1협동 세미나 주관
2017년	1/4분기	항비만 바이오마커 검토	실험실적 SOP 개발	in vivo 동물모델 확립	제2협동 세미나 주관
	2/4분기	대량생산 SOP 확립	균의 효능 증대법 개발	in vivo 동물모델 확립	주관연구 세미나 주관
	3/4분기	소비자 동향 및 제품 컨셉트 설정	발효뽕나무 추출 조건 확립(고수율)	in vivo 효능 검증	제1협동 세미나 주관
	4/4분기	제품 개발 및 안정성 평가	지적재산권 내용 공유	in vivo 효능 검증	제2협동 세미나 주관
2018년	1/4분기	간이인체적용시험 관련 시험 디자인 공유	균 생성 효능 성분 profiling	항비만 그전 연구 수행	주관연구 세미나 주관
	2/4분기	항비만 복합 제품 개발	뽕나무 효능 성분 profiling	항비만 메커니즘 규명	제1협동 세미나 주관
	3/4분기	복합 원료 개발 후보군 선정	유효성분 순수 분리 및 구조동정	항비만 효능 평가	제2협동 세미나 주관
	4/4분기	대사성 증후군 효능 추가 검토	항비만 효능 새로운 성분 발굴	추가 기능성 검토	주관연구 세미나 주관

라. 다른 기관과의 협조방안

- (1) 산학연 컨소시엄 및 국제 학술 활동을 통한 사업수행 : 최신 연구동향은 학술 논문 검색과 관련 연구기관의 보고서를 중심으로 파악하고 조사된 기술동향에 따라서 진행되는 연구를 수정 및 보완함으로써 과제 목표 달성.
- (2) 뽕나무 원료 확보를 위해서 뽕나무 재배농가, 유사한 가공공장과 지속적으로 연구 결과를 공유하며, 부산대학교 BIT 융합기술 연구소에 구축되어 있는 고가장비와 식품의약품안전청으로부터 인증 받은 부산대학교 청정동물실험센터를 통해 동물 실험을 수행하고 자 함.

마. 연구개발의 목표 달성과 문제점 해결을 위하여 적용하려는 연구개발방법론(접근방법)

(1) 연구개발 방향

(가) 제품개발을 위해서 최초 시발소재를 제품개발 가능한 용매와 추출방법으로 접근

(나) 실험 초기부터 추출단계별로 지표성분 분석 등을 통하여 표준화된 제품화 공정법으로 실험 수행

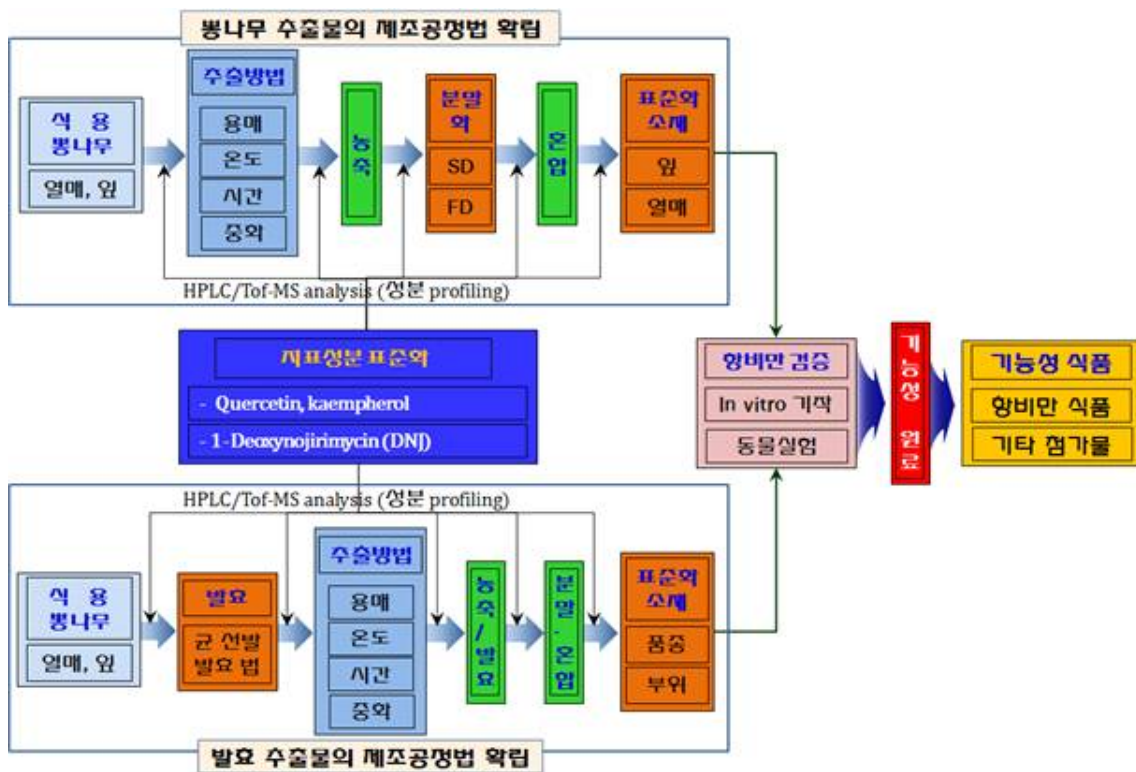
(다) 표준화된 가공방법에 의해서 만들어진 추출물을 발효 후 기능성 발효 원료로 개발

(2) 제품 개발 방향

(가) 기능성 뽕나무 발효 원료 개발: 항비만 효능을 가진 기능성 발효원료 소재개발

(나) 가공공정을 선 수립한 후 표준화된 공정추출물을 이용한 효능 검증 및 지표성분 표준화

(다) 추출농축된 추출물의 성분 표준화 → 발효 → 효능 검증 → 성분 표준화 → 기능성 원료로 사용



<표준화 기능성 원료 소재 개발 및 항비만 제품 개발 전략>

## 2-2. 연구개발 추진체계

### 가. 국내·외 수준과 우리 여건의 종합적인 평가

- (1) 2012년 대비 약 9.9% 증가하여 국내 식품시장 규모의 증가가 현저함.
- (2) 국내 식품시장 규모는 54조 6,902억원(2013년)이었으며, 2013년 업종별 생산액은 건강기능식품이 40.8%로서 시장규모는 1조 7,920억 원으로서 최근 5년간 연평균성장률은 11.5%로 2009년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있음.
- (3) 2012년 세계 건강기능식품(Global Nutrition Industry) 시장규모는 약 3,464억 달러(전년 대비 7.1% 성장)이며, 국가별 건강기능식품 시장규모는 미국이 325억 달러로 전체 시장의 33.8%, 유럽 159억 달러(16.5%), 중국 119억 달러(12.4%), 일본 106억 달러(11.0% 등의 순으로 나타나 미국이 가장 큰 시장을 형성하고 있음.
- (4) 건강기능식품 시장의 이러한 성장은 소비자들의 건강에 대한 관심 증대와 소득수준 향상, 인구 고령화의 영향에 따른 것으로 분석되며 앞으로 건강 기능식품의 시장이 증가할 것으로 예상함.
- (5) 식품의약품안전처의 개별인정현황 자료에 의하면 대사증후군(체지방, 혈압, 혈당조절, 혈압조절, 혈중중성지방)과 관련된 소재가 전체 인정 소재 중 32.6%에 달하며, 이미 건강기능식품 업계에서도 대사증후군의 개선연구가 가장 활발하게 진행됨(2014년 식품의약품안전처의 개별인정현황 자료).

세부 또는 협동과제별 연구과제의 추진 체계와 과제의 최종목표인 뽕나무 산물과 발효소재를 이용한 건강기능성 또는 식의약품의 산업화를 위한 추진체계를 다음과 같이 요약하여 설명할 수 있다.

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	생물전환 기법을 이용한 발효빵나무의 항비만 효능연구 및 건강기능식품 개발	주관연구책임자 (김경미)외 총 12명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	1	6
대학	1	7
국공립(연)		
출연(연)		
기타		

<b>(주)노바렉스-주관연구</b>
발효 빵나무를 이용한 항비만 효능 기능성 원료 및 건강기능식품 개발
김경미 외 5명
<b>담당기술개발내용</b>
사업 총괄, 대량생산 SOP 확립, 안전성 평가, 간이인체적용시험, 빵나무 추출물을 이용한 항비만 효능 건강기능식품 제품 개발

<b>부산대학교-제1협동</b>
빵나무 발효조건 확립 및 지표성분 profiling
최영환 외 3명
<b>담당기술개발내용</b>
발효방법 개발, 발효물의 성분함량 증대와 profiling, 지표성분 분석방법 확립

<b>부산대학교-제2협동</b>
발효 빵나무 항비만 효능 평가
황대연 외 2명
<b>담당기술개발내용</b>
항비만 효능 평가(시험관시험, 동물시험, 기전연구)

나. 항비만 효능을 가진 제품 개발 추진체계

- (1) 뽕나무 산물을 이용하여 당사는 추출 조건(단순, 발효)을 검토하여 주관, 협동기관에 기능성 효능 검토를 위한 원료를 공급함. 또한 대량생산 공정추출법 개발을 통하여 기능성 원료를 확보하고 이를 이용하여 2차연도에 분말, 츄어블 형태의 일반식품을 개발하고, 2~3차연도 이후에는 체지방 개선을 위한 기능성 제품 개발을 추진함.
- (2) 건강기능식품 기능성원료 개별인정형 소재 개발을 위하여 안전성 자료 및 인체적용시험등을 추가로 진행하여 국내 소재를 이용한 대사증후군에 효능을 보이는 원료를 개발하여 국내 뿐 아니라 해외 시장 개척

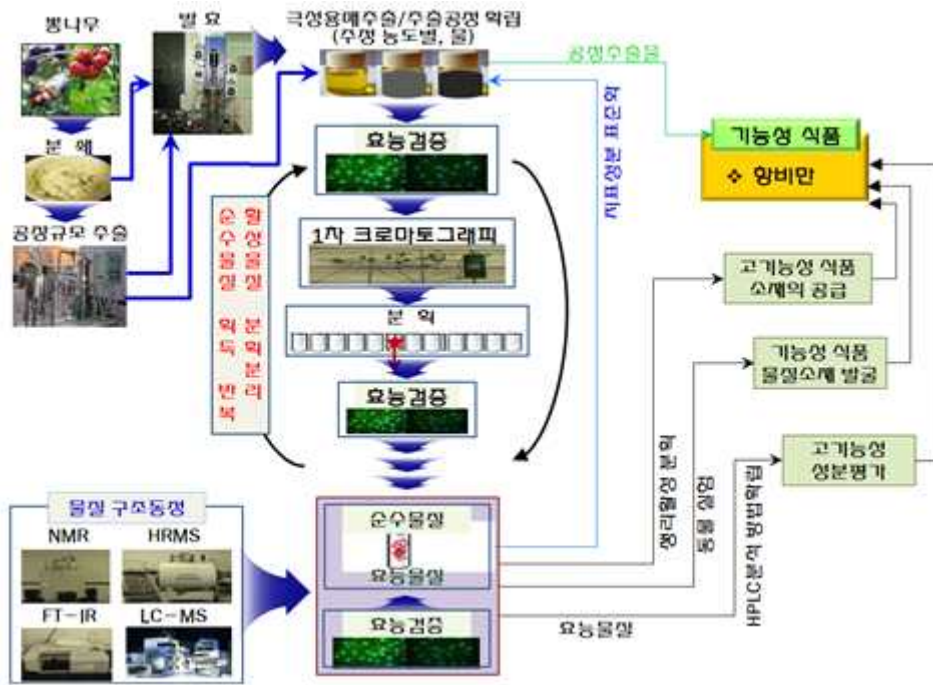


<제품개발 모식도>

다. 고기능성 원료 개발을 위한 추출공정 및 효능 검증을 위한 추진체계

- (1) 본 연구팀의 한약재들을 이용한 생리활성 성분분리와 구조동정, 지표성분을 이용한 HPLC분석 방법 및 시험방법의 타당성(벨리데이션) 확립, 생리활성 작용 기전 규명에 관한 연구를 다년간 수행하여 축적된 노하우와 기술을 활용하여 본 연구를 추진함
- (2) 본 과제에 참여하고 있는 연구진은 연구논문, 특허, 연구결과의 산업화에 우수한 실적을 가진 각각의 세부와 협동과제 책임자들로 구성되어 있으며, 주관기관인 (주)노바렉스는 국내 건강기능성식품 인정 2위 기업으로서 세부과제 간에 긴밀한 협조로 최적의 추출공정법, 발효공정법, 유효성분 도출, in vitro와 in vivo 효능 검증을 통하여 유기적인 협력체계하에서 항비만 효능을 가진 제품의 개발이 가능할 것임
- (3) 연구개발의 목표 달성에 적용하려는 연구개발 방법론 : 세부과제별 유기적인 협력 체계를 통하여 다음의 그림과 같이 모든 기술과 결과를 공유하면서 연구 수행





<빵나무 산물로부터 효능 성분 발굴 및 기능성 원료의 표준화 모식도>

라. 고기능성 빵나무 소재개발을 위한 발효방법 개발 및 향비만 효능 검증

- (1) 1협동 연구팀이 축적된 노하우인 생물자원으로부터 기능성성분의 순수분리 및 구조동정 기술과 생리활성 성분의 분석을 기반으로 하여 발효물로부터 새로운 기능성 성분을 발굴하고 성분 validation 방법을 확립하여 제품개발에 응용함
- (2) 또한 발효 시에 균이 생산하는 성분의 함량증대 방법을 확립하여 식물 소재가 가지고 있는 성분의 시너지 효과를 내게 함으로서 효능을 증대시킬 수 있는 방법을 개발하여 실제 제품 개발에 응용



<빵나무 발효 추출물의 향비만 제품 개발 모식도>



마. 뽕나무 원재료 공정추출물 또는 발효추출물을 이용한 제품 개발 및 산업화

- (1) 본 과제의 참여기관이 보유한 개별인정 건강기능식품 개발에 대한 노하우를 세부 또는 협동과제와 유기적인 연계를 통해서 기능성식품을 개발함
- (2) 1세부, 2세부 및 1협동과제에서 개발된 기능성 원료의 효능을 검증한 후 공정 단계별 성분표준화, 최종 제품에 대한 효능 검증으로 등으로 기능성이 검증된 제품 개발
- (3) 연구개발의 목표 달성에 적용하려는 연구개발 방법론 :
  - (가) 1세부와 2세부 및 1협동이 개발한 공정추출물 또는 발효추출물의 기능성을 향상시키기 위해서 과제간의 기술과 결과를 공유하면서 최상의 기능성을 가진 소재로서 제품 개발 목표.
  - (나) 국내산 뽕나무 산물 추출물 원료의 기능성을 확보하기 위하여 주관, 협동기관에 연구결과를 토대로 개별인정 프로세스를 통해 대사증후군 개선을 위한 기능성 소재 개발을 추진함.
- (4) 기능성원료를 획득하기 위하여 원료에 대한 표준화, 안전성, 기능성이 확보하여 효능과 성분표준화된 제품 개발을 목표로 함
- (5) 추후 생리활성기능 등급을 확보하기 위하여 안전성 자료(독성, 섭취량 평가, 인체적용시험 등)와 인체적용시험 등이 추가로 진행되어야 함



<제품 개발 프로세스>

바. 뽕나무 원료 및 발효 체지방 개선 소재개발을 위한 세부과제별 유기적인 협력체계

(1) 뽕나무의 제품개발을 목표로 한 본 연구과제는 1) 발효물의 유효성분의 분석한 후, 표준화 항비만 효능을 가진 물질 소재의 개발, 2) 발효물, 효능성분 및 최종 제품의 in vitro 와 in vivo에서 작용기전 규명, 3) 뽕나무 발효 또는 단순 추출물의 제조공정, 기준규격 설정 및 효능검증을 통한 건강기능성 식품개발에 관한 3과제로 구성되어 있다. 분기당 1회 이상 결과를 공유할 수 있는 세미나 개최와 유기적인 상호 연계를 통하여 결과를 서로 공유함으로써 최상의 결과와 항비만 효과를 가지는 제품 산업화를 도출할 계획

(2) 이러한 목적을 달성하기 위해서

(가) 주관기관인 (주)노바렉스는 과학적 근거를 통해 항비만 효능이 규명된 공정추출물 또는 발효 제조공정 소재를 이용하여 건강기능성 식품 또는 식의약품으로 개발하여 세계시장에서 판매할 계획임.

(나) 부산대학교 생명자원대학 최영환 교수팀은 뽕나무 추출물 또는 발효물로부터 유효성분의 발굴 및 기능성 제품 소재 관련 신규 Hit물질 identification을 수행하여 고기능성 선도물질 발굴과 chemical fingerprinting분석기술을 이용한 발효물질의 metabolomics연구를 수행. 이 과정에서 발굴된 성분 또는 대사체를 이용하여 제품을 표준화시킴으로서 과학적 근거를 기반으로 한 발효물의 제조공정법을 학립하여 제품 개발을 위한 기준규격을 설정할 것임.

(다) 부산대학교 황대연 교수님은 기능성 원료 및 발효물의 항비만 효능을 in vitro에서 검증하고 작용기작에 관한 분자학적 메커니즘을 규명하며 이를 질환동물 모델에 적용하여 식품소재의 과학적 근거 자료 제시할 것임.

(3) 뽕나무 추출물과 발효추출물을 이용한 항비만 기능성 소재와 제품개발을 위한 분야별 연구 추진체계는 다음과 같이 요약할 수 있음.



<세부과제별 유기적인 연계를 통한 제품개발 체계도>

### 2-3. 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	계획수립 및 자료조사														전 기관
2	최적 빵나무 부위 발굴													10,000	최영환 (제1협동)
3	효능증대 발효균 선정													20,000	최영환 (제1협동)
4	균의 효능성분 함량 증가법 개발													20,000	최영환 (제1협동)
5	In vitro 항비만 조건 설정													5,000	황대연 (제2협동)
6	발효추출물의 In vitro 효능 검증													12,500	황대연 (제2협동)
7	항비만 동물실험 모델 구축													12,500	황대연 (제2협동)
8	지표성분 분석법 확립(Validation)													4,500	김경미 (주관기관)
9	발효물 대량생산 조건 검토													15,000	김경미 (주관기관)
10	발효빵나무의 안전성 평가													20,000	김경미 (주관기관)
11	시제품 개발 1건													15,000	김경미 (주관기관)
2차년도															
1	균의 효능성분 증대법 개발													25,000	최영환 (제1협동)
2	실험실적 SOP개발													25,000	최영환 (제1협동)
3	발효빵나무 추출조건 확립													10,000	최영환 (제1협동)
4	In vitro 동물모델 확립													20,000	황대연 (제2협동)
5	In vivo 효능 검증													30,000	황대연 (제2협동)
6	빵나무 추출물 대량생산 SOP확립													25,000	김경미 (주관기관)
7	빵나무 추출물의 안전성 평가													30,000	김경미 (주관기관)
8	제품 개발 2건													25,000	김경미 (주관기관)
3차년도															
1	발효 빵나무의 성분 profiling													40,000	최영환 (제1협동)
2	발효빵나무의 유효성분 검증													30,000	최영환 (제1협동)
3	항비만 작용기전 규명													20,000	황대연 (제2협동)
4	발효 빵나무의 항비만 효과 검증													20,000	황대연 (제2협동)
5	간이 인체적용시험 수행													30,000	김경미 (주관기관)
6	제품 개발 16건													30,000	김경미 (주관기관)
7	다양한 기능성 검토													20,000	김경미 (주관기관)

2-4. 연구개발성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																			
최종목표	4	3				18	1,500		17			6	2			2		2	
1차 년도	목표	2																	
	실적	2																	
2차 년도	목표	1				2	50		2			2	1						
	실적	2				-	-		3			3	2	2	1				
3차 년도	목표	1	1			6	150		5			2	1			2		2	
	실적	1				8	-		5			3	1	1	3				
4차 년도	목표																		
	실적																		
5차 년도	목표																		
	실적																		
소 계	목표	4	1			8	200		7			4	2			2		2	
	실적	5	-			8	-		8			6	3	3	4				
종료 1차년도		1				4	200		4			1							
종료 2차년도		1				3	300		3			1							
종료 3차년도						3	500		3										
종료 4차년도							100												
종료 5차년도							200												
소 계		2				10	1,300		10			2							
합 계	4	3				18	1,500		17			6	2			2		2	

가. 국내외 논문게재 성과

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Hepatoprotective Effect of Gallotannin-enriched Extract Isolated from Gall on Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity in HepG2 Cells	Pharmacogn. Mag.	Jun Go	13	대한민국	Publication of Phcog Net	SCI	2017. 11. 07	
2	Ethanol extracts collected from the Styela clava tunic alleviate hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl <sub>4</sub> ) through inhibition of hepatic apoptosis, inflammation, and fibrosis	J Toxicol Pathol	Eun Kyoung Koh	30	대한민국	Japanese Society of Toxicologic Pathology	SCI	2017. 08. 28	
3	Effects of aqueous extract from red Liriope platyphylla on phthalic-anhydride-induced atopic dermatitis in Interleukin-4/Luciferase/Consensus non-coding sequence-1 transgenic mice evaluated in terms of luciferase signal and general phenotype biomarkers	Journal of Traditional Chinese Medicine	Moon Hwa Kwak	37(4)	대한민국	Elsevier	SCI	2017. 08. 15	

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
4	Lipolytic effect of novel extracts from mulberry ( <i>Morus alba</i> ) leaves fermented with <i>Cordyceps militaris</i> in the primary adipocytes derived from SD rats	Laboratory Animal Research	Mi Rim Lee	33(3)	대한민국	한국실험동물학회	비SCI	2017. 06. 17	
5	Lipolysis effect of daucoesterol isolated from mulberry ( <i>Morus alba</i> ) leaves	생명과학회지	최영환		대한민국	한국생명과학회	비SCI	2017. 12.	
6	Biocompatibility of a PLA-based composite containing hydroxyapatite derived from waste bones of dolphin <i>Neophocaena asiaeorientalis</i>	Journal of the Australian Ceramic Society	Mi Rim Lee	55	대한민국	Springer Singapore	SCI(E)	2018. 06. 21	
7	Anti.obesity effect in high.fat.diet.induced obese C57BL/6 mice: Study of a novel extract from mulberry ( <i>Morus alba</i> ) leaves fermented with <i>Cordyceps militaris</i>	EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE	Mi Rim Lee	17	대한민국	Spandidos publications	SCI(E)	2018. 08. 14	

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
8	The Anti-Inflammatory Effects of Fermented Herbal Roots of Asparagus cochinchinensis in an Ovalbumin-Induced Asthma Model	Journal of Clinical Medicine	Jun Young Choi	7	대한민국	MDPI	SCI(E)	2018. 10. 22	
9	Inhibition of endoplasmic reticulum stress in high-fat-diet-induced obese C57BL/6 mice: Efficacy of a novel extract from mulberry (Morus alba) leaves fermented with Cordyceps militaris	Laboratory Animal Research	Mi Rim Lee, Su Ji Bae	34(4)	대한민국	한국실험동물학회	비SCI	2018. 12. 09	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Annual Meeting of Japanese Association of Laboratory Animal Science	Mi Rim Lee	2017.05.25-27	빅 팔레트 후쿠시마	일본
2	한국실험동물학회 국제학술대회	Mi Rim Lee	2017.08.23-25	연세대학교	대한민국
3	2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology	Mi Rim Lee	2018.09.17-19	COEX	대한민국

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	MWRZ23ICIR			2017
2	MWRZ23IDIGIJ			2017
3	MWRZ29IG			2017

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	항비만 효능 증진을 위한 발효빵잎을 포함하는 조성물	대한민국	최영환, 황대연, 정재철, 김경미	2016.11.29	10-2016-016584				100
2	항비만 효능 증진을 위한 빵나무 잎으로부터 분리한 화합물	대한민국	최영환, 황대연, 정재철, 김경미	2016.11.30	10-2016-0161725				100
3	빵나무 잎 추출물을 포함하는 지방분해 활성용 조성물	대한민국	최영환, 퀴루, 이취, 황대연, 정재철, 김경미	2017.10.26	10-2017-0140149				100



No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
4	빵잎으로부터 분리한 MWRZ23ICIR의 PPAR- $\gamma$ signalling 억제물 통한 항비만 조성물	대한민 국	최영환, 귀루, 이취, 황대연, 정재철, 김경미	2017.10 .30	10-2017-0 142554				100
5	항비만 효과가 우수한 발효빵잎 추출물의 제조방법	대한민 국	최영환, 황대연, 정재철, 김경미, 귀루	2018.11 .27	10-2018-0 148424				100

마. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	전문 연구원	2017		1				1			1		
2	전문 연구원	2018		3				3			3		

## 2-5. 연구결과

### 가. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

#### [요약]

1차년도에는 제1협동과제에서 다양한 발효균주와 발효조건에서 추출물을 제조하여 항비만 물질 성분을 분석하고 제2협동과제에서는 제1협동과제에서 제조된 추출물에 대한 항비만 효능을 지방세포주를 이용하여 평가하여 최종적으로 최적발효조건을 확립하였음. 이를 기반으로 주관연구기관에서는 대량생산조건을 확립하고 추출물질에 대한 단회독성과 유전독성 평가를 실시하였음. 이를 통하여 우수한 항비만 효능을 갖는 추출물의 최적 발효조건을 확립하고자 하였음.

#### (1) 뽕나무 추출물 대량생산 조건 확립

##### (가) 발효 뽕나무 추출물의 기능성분에 대한 자료 조사

- ① 뽕나무, 뽕잎에 주로 많이 존재하는 유효성분인 1-Deoxynojirimycin의 효능 및 분석법 등을 검토하기 위해 자료조사 해 본 결과 지방세포분화 억제 등 항비만의 효능을 갖고 있는 것으로 조사됨.

No	논문제목	기능성	저널	메커니즘	게재 연도
1	1-Deoxynojirimycin: Occurrence, Extraction, Chemistry, Oral Pharmacokinetics, Biological Activities and In Silico Target Fishing		Molecules	Review	2016
2	Mulberry 1-Deoxynojirimycin Inhibits Adipogenesis by Repression of the ERK/PPAR $\gamma$ Signaling Pathway in Porcine Intramuscular Adipocytes	항비만	J. Agric. Food Chem	지방세포에서 1/2/Peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathway 조절	2015
3	Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice		Food Chem	$\beta$ -oxidation system, augmented adiponectin level 조절	2013
4	Anti-adipogenic effect of mulberry leaf ethanol extract in 3T3-L1 adipocytes		Nutr. Res	지질생성과 지방세포분화 억제	2014
5	1-Deoxynojirimycin isolated from Bacillus subtilis improves hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in high-fat-fed mice		Food Chem	hepatic p-AMPK/AMPK and PGC-1 $\beta$ mRNA	2015
6	Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice		Food Chem	$\beta$ -oxidation system, lipid accumulation 억제	2013

② 균주를 이용하여 발효한 빙나무 발효추출물의 유효성분인 cordycepin 많이 존재하는 유효 성분인 1-Deoxynojirimycin의 효능 및 분석법 등을 검토하기 위해 자료조사 해 본 결과 항비만 및 항염증 효능을 갖고 있는 것으로 조사됨.

No	논문제목	기능성	저널	메커니즘	게재 연도
1	Effect of Cordyceps militaris extract and active constituents on metabolic parameters of obesity induced by high-fat diet in C58BL/6J mice	항비만	J Ethnopharmacol	adipocyte differentiation, pancreatic lipase activity 억제	2014
2	Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin		Br J Pharmacol	mTORC1-C/EBPβ-P PARγ pathway 조절을 통한 adipogenesis, adipocyte differentiation 억제	2012
3	Anti-adipogenic activity of Cordyceps militaris in 3T3-L1 cells		Nat Prod Commun	adipocytes differentiation 억제	2011
4	A direct protein kinase B-targeted anti-inflammatory activity of cordycepin from artificially cultured fruit body of Cordyceps militaris	항염증	Pharmacogn Mag	AKT 관련 signaling pathway 조절을 통한 염증조절	2015
5	Role of Cordycepin and Adenosine on the Phenotypic Switch of Macrophages via Induced Anti-inflammatory Cytokines		Immune Netw	cytokines (IL-1beta,10,1ra/ TNF-alpha,beta), chemokines (CX3CR1, RANTES) 조절을 통한 염증조절	2009

(나) 대량생산 조건 검토(추출 수율 5% 이상)

- ① 제1협동연구기관에서 보유하고 있는 동충하초 균을 이용하여 실험실 조건에서 발효를 진행함. Potato Dextrose broth 배지를 이용하여 1차 균 접종을 한 다음 병입에 각각 10, 20, 50%씩 균을 접종하여 배양 진행 중. 배양 완료 후 주정 또는 물을 이용하여 추출한 다음 추출물 내 유용성분인 cordycepin, quercetin 등을 분석하여 비교하였음.



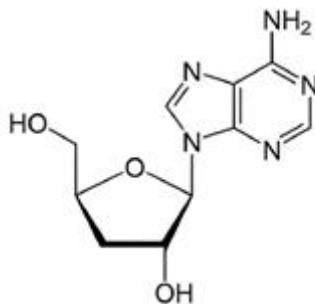
② 유효성분 분석방법

㉞ Cordycepin

- 시험방법의 요약 : 본 시험법은 시료 중 cordycepin을 추출 용액에 녹인 후 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 254 nm에서 정량분석함.

- 표준물질 : Cordycepin

분자식 :  $C_{10}H_{13}N_5O_3$ , 분자량 : 251.25, CAS No. : 73-03-0



- 시험과정 : Cordycepin 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 50% 메탄올을 가하여 정용한다. 시료를 적당량 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣은 후 50% 메탄올로 표선까지 맞춘다. 시험용액을 0.45  $\mu$ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

- 기기분석 : 고속액체크로마토그래피 조건

항목	조건
주입량	20 $\mu$ L
검출기 파장	254 nm
컬럼온도	30 $^{\circ}$ C
이동상	A : 0.1% 포름산 용액, B : 100% 아세토니트릴
유속	0.5 mL/분

- 이동상 조건

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	100	0
10	90	10
20	90	10
30	80	20
40	70	30
50	0	100
55	0	100

- 계산 :

$$\text{Cordycepin 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C}{D}$$

A : 시험용액중의 cordycepin의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

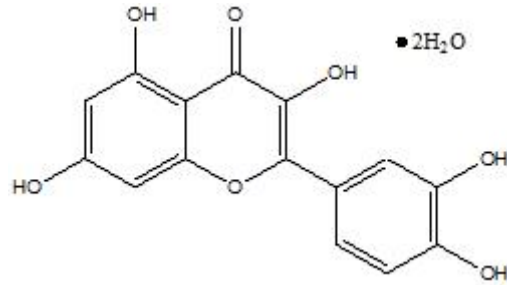
D : 시료무게(g)

㉞ Quercetin(건강기능식품의 기준 및 규격의 플라보놀 배당체 분석법에 준하여 시험)

- 시험방법의 요약 : 본 시험법은 시료 중 플라보놀 배당체(퀘페롤, 퀘르세틴, 이소람네틴의 합)를 가수 분해 시킨 후 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 370 nm에서 정량분석함.

- 표준물질 : 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 :  $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ , 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3



- 시험과정 : 희석용액의 조제[희석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)], 표준용액의 조제[퀘르세틴 이수화물 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다(퀘르세틴 이수화물 (mg)  $\times$  302/338 = Quercetin (mg)], 시험용액 제조[시료 약 300 mg을 칭량하여 가수분해용 삼각플라스트에 취한 후 10 mL 희석용액을 가한다. 90°C 수용상에서 1시간 동안 가수분해한다. 가수분해된 용액을 50 mL 부피플라스크에 넣은 후 메탄올로 표선까지 맞춘다. 시험용액을 0.45  $\mu$ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.]

- 기기분석 : 고속액체크로마토그래피 조건

항목	조건
주입량	20 $\mu$ L
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	35°C
이동상	0.1% 인산을 함유한 아세토니트릴 : 0.1% 인산용액 = 40 : 60
유속	1.0 mL/분

- 계산 :

$$\text{퀘르세틴 (Quercetin) 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A : 시험용액중의 퀘르세틴의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

D : 전환 계수(Quercetin = 2.504)

E : 시료무게(g)





- ㉔ 일반증상(단회경구투여 최종보고서 Table 2) : 관찰기간 동안, 암수 대조군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 1 일에 시험물질색변(compound-colored stool)이 암수 전례에서 관찰되었으나, 투여 후 2 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단된다.
- ㉕ 체중변화(단회경구투여 최종보고서 Figure 1, Figure 2, Table 3) : 관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.
- ㉖ 육안적 부검소견 : 부검시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

④ 결론

본 시험의 고건 하에서 발효빵나무잎 추출물을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

Table 2. Summary of Clinical Signs

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Days after dosing													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NOA: No Observable Abnormality

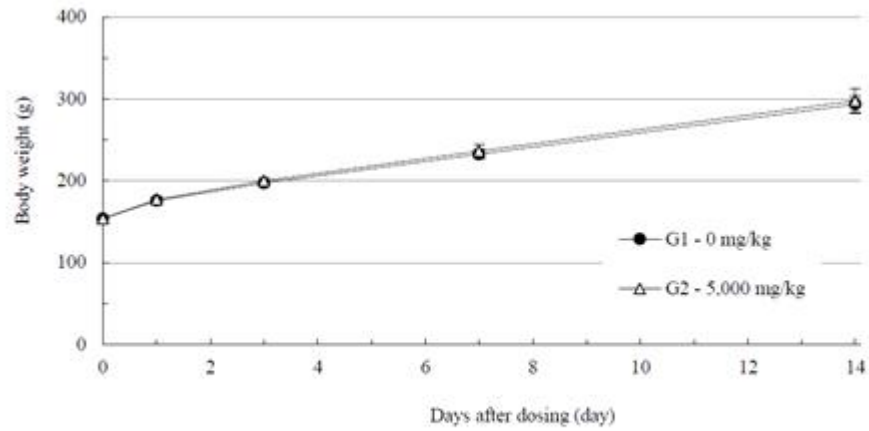


Figure 1. Body Weights in Male SD Rats

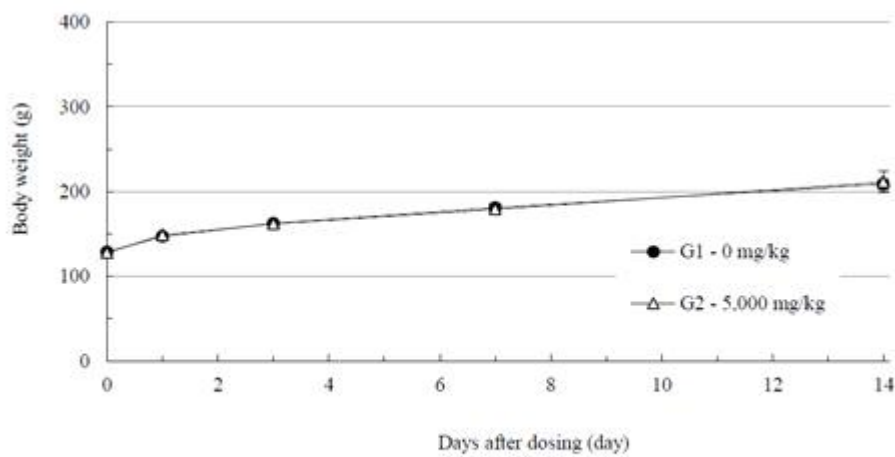


Figure 2. Body Weights in Female SD Rats

Table 3. Mean Body Weights

Sex	Group / Dose (mg/kg)		Days after dosing					(g)
			0	1	3	7	14	Gain 0 ~ 14
Male	G1 0	Mean	153.6	175.4	196.9	232.3	293.2	139.6
		S.D.	2.6	4.5	3.6	6.1	9.8	11.3
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	153.6	177.0	199.8	236.1	297.6	144.0
		S.D.	3.0	3.6	4.0	8.4	15.1	12.7
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	Mean	128.6	146.9	162.4	180.9	208.5	79.9
		S.D.	3.0	2.3	2.1	4.1	6.9	7.8
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	127.9	148.6	161.9	179.1	211.3	83.5
		S.D.	2.9	2.7	3.5	6.3	12.3	12.2
		N	5	5	5	5	5	5

## (나) 소핵시험

① GLP 기관인 바이오톡스텍을 통해 발효빵나무잎 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험을 수행하였음.

② 시험의 요약 :

시험물질 발효빵나무잎 추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발 유무를 평가하기 위하여 ICR 마우스를 이용하여 24시간 간격으로 2회 경구투여하여 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 2,500, 1,250 및 625 mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 최고용량은 5,000 mg/kg으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500 및 1,250 mg/kg의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

용량설정시험에서, 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험은 소핵유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였다.

본시험의 결과 시험물질군의 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 발효빵나무잎 추출물은 마우스 골수세포에 대하여 소핵유발은 없는 것으로 판단된다.

③ 결과 및 고찰

㉠ 일반증상 관찰(소핵시험 최종보고서 Table 5) : 관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

㉡ 체중변화(소핵시험 최종보고서 Table 6) : 관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중변화는 확인되지 않았다.

Table 5. Clinical Signs of Main Study in Male ICR Mice

Group	Dose (mg/kg)	Route	Animal ID	Clinical signs	1 <sup>st</sup> dosing		2 <sup>nd</sup> dosing		1 day after 2 <sup>nd</sup> dosing
					immediately after dosing	2 hours after dosing	before dosing	immediately after dosing	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	1101	-	-	-	-	-
				1102	-	-	-	-	-
				1103	-	-	-	-	-
				1104	-	-	-	-	-
				1105	-	-	-	-	-
				1201	-	-	-	-	-
				1202	-	-	-	-	-
				1203	-	-	-	-	-
				1204	-	-	-	-	-
				1205	-	-	-	-	-
Test substance	Fermented Mulberry leaves Extract	2,500	P.O.	1301	-	-	-	-	-
				1302	-	-	-	-	-
				1303	-	-	-	-	-
				1304	-	-	-	-	-
				1305	-	-	-	-	-
				1401	-	-	-	-	-
				1402	-	-	-	-	-
				1403	-	-	-	-	-
				1404	-	-	-	-	-
				1405	-	-	-	-	-
A Positive control	MMC	2	I.P.	1501	-	-	-	-	-
				1502	-	-	-	-	-
				1503	-	-	-	-	-
				1504	-	-	-	-	-
				1505	-	-	-	-	-

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

MMC: Mitomycin C

-: No observable abnormality

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

㉔ 소핵 유발 출현빈도(소핵시험 최종보고서 Table 7) : 시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다 ( $p < 0.01$ ). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

㉕ 시험의 성립 : 음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있었다. 또한, 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data (Table 8)의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였기 때문에 본시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것으로 판단하였다.

Table 6. Body Weights of Main Study in Male ICR Mice

Group	Dose (mg/kg)	Route	Animal ID	Body weight (g)		
				before 1 <sup>st</sup> dosing	1 day after 2 <sup>nd</sup> dosing	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	1101	34.2	33.9
				1102	37.2	35.3
				1103	33.8	33.9
				1104	34.7	34.1
				1105	35.6	35.5
				Mean	35.1	34.5
				S.D.	1.35	0.80
Test substance	1,250	P.O.	1201	36.9	36.0	
			1202	34.4	34.4	
			1203	35.7	35.1	
			1204	33.8	33.7	
			1205	34.2	33.2	
			Mean	35.0	34.5	
			S.D.	1.28	1.11	
	2,500	P.O.	1301	35.4	34.8	
			1302	37.0	36.3	
			1303	35.5	35.7	
			1304	33.6	32.5	
			1305	33.0	32.6	
			Mean	34.9	34.4	
			S.D.	1.60	1.75	
5,000	P.O.	1401	36.3	35.9		
		1402	34.4	34.7		
		1403	34.6	34.2		
		1404	34.8	35.0		
		1405	37.6	36.1		
		Mean	35.5	35.2		
		S.D.	1.38	0.81		
<sup>A</sup> Positive control	MMC	2	IP.	1501	37.3	35.3
				1502	33.6	32.8
				1503	34.3	32.6
				1504	34.8	33.3
				1505	33.7	32.6
				Mean	34.7	33.3
				S.D.	1.52	1.16

P.O.: Per Os,

IP.: Intraperitoneal

S.D.: Standard Deviation

MMC: Mitomycin C

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

Table 7. Results of Main Study in Male ICR Mice

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after dosing	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	172 / 500	3 / 4,000
					1102	143 / 500	0 / 4,000
					1103	168 / 500	2 / 4,000
					1104	162 / 500	3 / 4,000
					1105	164 / 500	1 / 4,000
					Total	809 / 2,500	9 / 20,000
					%(Mean±S.D.)	32.4 ± 2.24	0.045 ± 0.033
	1.250	P.O.	24	1201	180 / 500	1 / 4,000	
				1202	143 / 500	1 / 4,000	
				1203	148 / 500	3 / 4,000	
				1204	166 / 500	2 / 4,000	
				1205	154 / 500	3 / 4,000	
				Total	791 / 2,500	10 / 20,000	
					%(Mean±S.D.)	31.6 ± 2.98	0.050 ± 0.025
Test substance	Fermented Mulberry leaves Extract	2,500	P.O.	24	1301	163 / 500	3 / 4,000
					1302	158 / 500	1 / 4,000
					1303	148 / 500	2 / 4,000
					1304	156 / 500	2 / 4,000
					1305	156 / 500	1 / 4,000
					Total	781 / 2,500	9 / 20,000
					%(Mean±S.D.)	31.2 ± 1.08	0.045 ± 0.021
	5,000	P.O.	24	1401	170 / 500	2 / 4,000	
				1402	160 / 500	0 / 4,000	
				1403	134 / 500	1 / 4,000	
				1404	150 / 500	2 / 4,000	
				1405	143 / 500	1 / 4,000	
				Total	757 / 2,500	6 / 20,000	
					%(Mean±S.D.)	30.3 ± 2.82	0.030 ± 0.021
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	152 / 500	209 / 4,000
					1502	166 / 500	272 / 4,000
					1503	156 / 500	236 / 4,000
					1504	158 / 500	246 / 4,000
					1505	148 / 500	294 / 4,000
					Total	780 / 2,500	1,257†† / 20,000
					%(Mean±S.D.)	31.2 ± 1.36	6.285 ± 0.820

P.O. : Per Os.

I.P. : Intraperitoneal

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Nomochromatic erythrocyte

S.D. : Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

Significant difference from negative control by Mann-Whitney test: †† p &lt;0.01

Table 8. Historical Control Data

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE)							
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (mg/kg)	N	MNPCE/PCE (%) (Mean±S.D.)	Range [MNPCE/PCE] (%)		95% control limit <sup>a)</sup> [MNPCE/PCE]
					MIN	MAX	
Negative control	24	0	32	0.042 ± 0.019	0.007	0.077	<13
	48	0	20	0.031 ± 0.013	0.002	0.060	<10
Positive control	24	2	32	6.119 ± 1.275	4.988	7.250	-

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes							
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (mg/kg)	N	PCE/(NCE+PCE) (%) (Mean±S.D.)	Range [PCE/(NCE+PCE)] (%)		
					MIN	MAX	
Negative control	24	0	32	30.66 ± 3.006	25.96	35.36	
	48	0	20	28.64 ± 3.509	24.49	32.79	
Positive control	24	2	32	29.39 ± 3.864	24.72	34.07	

Negative control: Water for injection, Normal saline injection, Corn oil, 0.5% methyl cellulose 1500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, etc.

Positive control: Mitomycin C (2 mg/kg, I.P., single dosing)

N: The total number of micronucleus test.

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 6, 2013 to Mar. 17, 2017.

The range was calculated by the control limit of X derived from  $\bar{X}-R$  value.

a) Poisson-based 95% control limits of the historical negative control data.

-: No data

#### ④ 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 발효뽕나무잎 추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성은 음성으로 판단하였다.

#### (다) 복귀돌연변이

- ① GLP 기관인 바이오독스텍을 통해 발효뽕나무잎 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 수행하고 있음.
- ② 시험목적 : 시험물질 발효뽕나무잎 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 검토한다.
- ③ 시험재료 및 방법
- ④ 시험물질 : 발효뽕나무잎 추출물 (Fermented Mulberry leaves Extract)



㉔ 음성대조물질 : 주사용수 (본 시험의 부형제인 주사용수를 선택한다.)

㉕ 양성대조물질

명칭	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

㉖ 균주

- 종 및 균주명 : *Salmonella typhimurium* TA98

*Salmonella typhimurium* TA100

*Salmonella typhimurium* TA1535

*Salmonella typhimurium* TA1537

*Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101)

- 선택이유 : 변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용하고 있으며, 가이드라인에서 추천하는 균주를 사용한다.

- 각 균주의 유전자형

종	균주명	유전자형	
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfaΔ uvrB</i> (pKM101)
	TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfaΔ uvrB</i> (pKM101)
	TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfaΔ uvrB</i>
	TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfaΔ uvrB</i>
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA(pKM101)	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i> (pKM101)

㉗ 용량설정시험

- 용량 : 가이드라인에서 추천하는 5,000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 시험물질균 설정. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정.

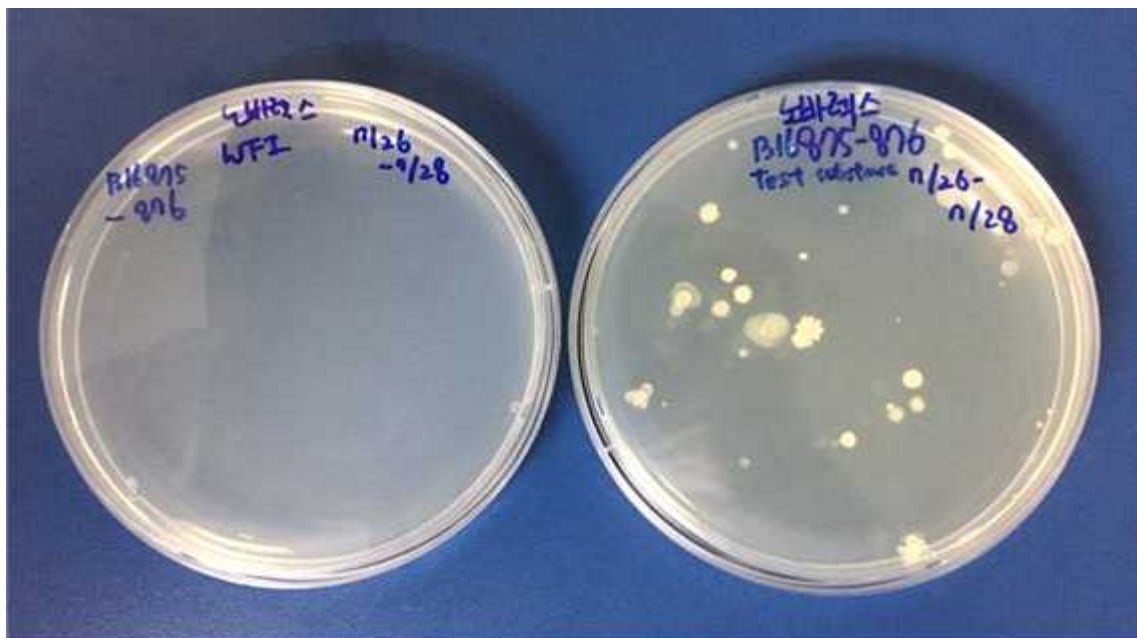
- 본 시험의 용량설정 : 용량설정시험의 결과, 생육저해와 시험물질의 침전이 관찰되지 않는 경우에는 5,000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625 및 313  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 시험물질균을 설정. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정. 생육저해가 관찰되는 경우에는 생육저해가 관찰된 가장 낮은 용량을 본시험의 최고 용량으로 하고, 생육저해가 관찰되지 않는 용량을 4단계 이상 확보하기 위하여 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 6단계의 시험물질균을 설정. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정. 생육저해가 관찰되지 않고 시험물질의 침전이 관찰되는 경우에는 침전이 관찰된 용량 중 복귀변이콜로니수의 계측에 영향이 없는 최고용량을 본시험의 최고용량으로 설정하

고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 5단계의 시험물질군을 설정. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정.

㉞ 본시험

- 시험방법 : 본시험은 프리인큐베이션법으로 실시. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2 계열로 함. 본시험은 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하여 2회 실시. 각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군 및 S9 mix 존재유무를 식별한 번호를 기입.
- 처리방법 : 대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질 100  $\mu$ L를 각 튜브에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500  $\mu$ L 및 각 균주현탁액 100  $\mu$ L를 넣은 후, 20분간 진탕배양 (37 $^{\circ}$ C, 90 rpm)한다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 2 mL 씩 넣어 vortexing하고, 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 균힘. 대사활성화 존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500  $\mu$ L 대신에 S9 mix 500  $\mu$ L를 넣음. 그 외의 처리는 동일하게 실시.
- 무균검사 : 잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위하여, 시험물질 최고용량 100  $\mu$ L, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500  $\mu$ L 및 S9 mix 500  $\mu$ L를 튜브에 각각 넣고, 20분간 진탕배양 (37 $^{\circ}$ C, 90 rpm). 진탕 종료 후, top agar를 넣어 vortexing하고, nutrient broth 한천평판 배지에 중층하여 실온에서 균힌다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 약 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인한다.

㉟ 시험물질의 오염 test 결과 : 시험물질의 오염 test 결과 오염이 확인되어, 멸균된 시험물질의 재입수가 필요하다는 내용을 전달받아 멸균을 재 진행하였으며, 멸균 재 진행 결과 오염이 확인되지 않아서 용량설정시험을 수행함.



㊱ 용량설정시험결과

- 생육저해 : 없음

- 시험물질의 침전 : 없음
- 본시험 용량을 설정하여 시험 진행 중

균주명	S9 mix	본 시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

(라) 염색체이상

- ① GLP 기관인 바이오독스텍을 통해 발효뽕나무잎 추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 수행하고 있음.
- ② 시험목적 : 시험물질 발효뽕나무잎 추출물의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토한다.
- ③ 시험재료 및 방법
- ㉠ 시험물질 : 발효뽕나무잎 추출물 (Fermented Mulberry leaves Extract)
- ㉡ 음성대조물질 : 주사용수 (본 시험의 부형제인 주사용수를 선택한다.)
- ㉢ 양성대조물질

명칭	보관조건	제조사
Mitomycin C (MMC)	냉장	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

㉣ 세포주

- 명칭 : CHL/IU
- 선택이유 : 검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용되고 있으며 가이드라인에서도 추천하는 CHL/IU 세포주를 선택한다.
- 입수 및 보관 : CHL/IU 세포는 2011년 11월 24일에 American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)에서 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.)을 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)이 들어있는 75 cm<sup>2</sup> 플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기 (MCO-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다.

<CHL/IU 세포의 특성>

ATCC® Catalog No.	CRL-1935
Lot No.	3375917
Modal chromosome number	25
동물	<i>Cricetulus griseus</i> (hamster, Chinese)
장기	폐
형태	섬유아세포
생육특징	부착형
Doubling time	약 15시간

CHL/IU 세포는 Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이크로플라즈마 오염유무에 대해 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.)을 배양플라스트에 기하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다.  $1 \times 10^6$  cells/mL가 되도록 FBS를 첨가하고, DMSO의 최종농도가 10%가 되도록 첨가한 후, 동결 보관용 튜브에 분주하였다. 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에서 하루동안 보관한 후, 액체질소탱크로 옮겨 사용시까지 보관하였다.

㉞ 용량설정시험

- 용량 : 용량설정시험의 최고용량은 시험물질이 식품인 것을 고려하여 5,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군을 설정한다.
- 처리방법 : 전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리한다. 한 용량당 1 well을 사용한다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리한다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질	
단시간 처리법	-	음성대조	2.7	-	0.3	2
		시험물질	2.7		0.3	2
	+	음성대조	2.7	0.5	0.3	2
		시험물질	2.7		0.3	2
연속처리법	-	음성대조	2.7	-	0.3	2
		시험물질	2.7		0.3	2

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, well내를

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)으로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양한다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리한다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양한다. 시험물질의 침전은 시험물질의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰한다. 시험물질 처리 후, 음성대조군 및 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압을 측정한다. 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압이 음성대조군과 비교하여 1.0 및 50 mOsm/kg 이상 변화하는 경우에는 모든 시험물질군의 pH 및 삼투압을 측정한다. 또한, pH 변화로 인하여 배지의 색 변화가 관찰될 경우, 해당용량군의 pH를 측정한다.

- Relative Population Doubling (RPD)의 산출

용량설정시험의 전배양시, satellite대조군으로 세포독성확인용 well 플레이트 (1 well)를 제작한다.

Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 RPD를 구한다.

$$RPD (\%) = \frac{(\text{No. of population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

$$\text{Population doubling} = [\log (\text{Post-treatment cell number}/\text{Initial cell number})]/\log 2$$

- 본시험의 용량설정 : 용량설정시험의 결과, 세포독성이 없고 시험물질 처리종료시에 침전이 관찰되지 않는 경우에는 5,000 µg/mL를 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500 및 1,250 µg/mL의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다.

세포독성이 있고 시험물질 처리종료시에 침전이 관찰되는 경우에는 세포증식을 50% 이상 (약 55%) 억제하는 용량과 침전이 관찰된 용량에서 RPD 측정에 영향이 없는 최고용량 중 낮은 용량을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 4단계 이상의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다.

세포독성이 없고 시험물질 처리종료시에 침전이 관찰된 경우에는 침전이 관찰된 용량 중 RPD 측정에 영향이 없는 최고용량을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 3단계 이상의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다.

㉞ 본시험

- 처리방법 : 전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리한다. 한 용량당 2개의 플레이트를 사용한다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리한다.

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

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, 플레이트 내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양한다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리한다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양한다.

시험물질의 침전은 시험물질의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시 (Colcemid 처리전)에 각 용량별로 관찰한다. 용량설정시험에서 pH 및 삼투압을 측정된 결과, 음성대조군과 비교하여 pH 및 삼투압이 1.0 및 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않는 경우에는 본시험에서 pH 및 삼투압을 측정하지 않는다. 단, pH 변화로 인하여 배지의 색 변화가 관찰될 경우, 해당용량군의 pH를 측정한다.

- RPD의 산출 : RPD 측정은 용량설정시험과 동일한 방법으로 실시하며, 각 용량당 1 well을 사용한다. satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수관을 이용하여 계수하여 RPD를 구한다.
- 검체제작 : 배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Gibco, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 µg/mL 되도록 첨가하여 세포분열을 중지시켜 정지시킨다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Gibco, U.S.A.)을 처리하여 플레이트 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000 rpm 에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Republic of Korea) 한다. 상등액을 버리고 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5 mL 첨가 하여 37°C에서 20분간 처리한다. 냉각고정액 (methanol:acetic acid = 3:1) 1 mL를 첨가한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한다. 그 후, 냉각고정액 5 mL를 첨가한 후, 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 고정한다. 이러한 고정작업을 1회 반복한다. 소량의 냉각고정액에 세포를 부유시킨 후, 슬라이드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 검체 슬라이드를 제작한다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드번호를 기입한다. 3% Giemsa 염색액으로

약 20분간 염색하고, 초순수로 세척 및 건조한 후, 봉입제 (Entellan® new, Merck, Germany)로 봉입한다.

㉔ 관찰

검체 슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시한다.

단시간처리법에서 양성의 결과를 얻었을 경우에는 연속처리법의 슬라이드 관찰은 실시하지 않는다. 단, 양성의 결과를 명확히 하기 위하여, 연속처리법의 슬라이드 관찰을 실시할 수도 있다. 염색체 관찰 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능한 3단계 이상을 설정한다. 각 용량당 300개의 분열중기상을 현미경 (400 ~ 1,000배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 관찰한다. 염색체이상은 구조이상, 수적이상 및 기타로 구분한다.

구조이상에 대해서는 염색분체절단 (chromatid break, ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange, cte), 염색체절단 (chromosome break, csb), 염색체교환 (chromosome exchange, cse), 염색분체갭 (chromatid gap, ctg), 염색체갭 (chromosome gap, csg) 및 단편화 (fragmentation, frg)를 관찰한다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화로 기록한다. Gap은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로 정의한다. 또한, 수적이상에 대해서는 배수체 (polyploidy, pol) 및 핵내배화 (endoreduplication, end)를 관찰한다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록한다. Gap에 대해서는 gap이 관찰되는 세포를 포함 또는 미포함하는 이상세포를 구분하여 기록한다. 기타 (other)는 구조이상 및 수적이상에 포함되지 않는 이상으로 종류와 수를 기록한다.

㉕ 용량설정시험결과

- 세포독성 (약 55% 세포증식을 억제하는 용량)

단시간처리법(S9-)	226.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
단시간처리법(S9+)	1992 $\mu\text{g}/\text{mL}$
연속처리법(S9-)	122.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- 시험물질의 침전 : 단시간처리법(S9-/ +), 연속처리법 (S9-) 없음

- 시험물질의 침전 : 없음

- 본시험 용량 : 단시간처리법 대사활성비존재하 및 존재하, 연속처리법 대사활성화비존재하의 약 55% 세포독성이 예상되는 용량을 본시험의 고용량으로 하고, 판독 가능한 3용량 확보를 위하여 이하 공비 2로 총 4단계 용량을 설정하여 시험 진행 중

계열	S9 mix	본시험의 용량 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
단시간처리법	-	250, 125, 62.5, 31.3
	+	2,000, 1,000, 500, 250
연속처리법	-	125, 62.5, 31.3, 15.6

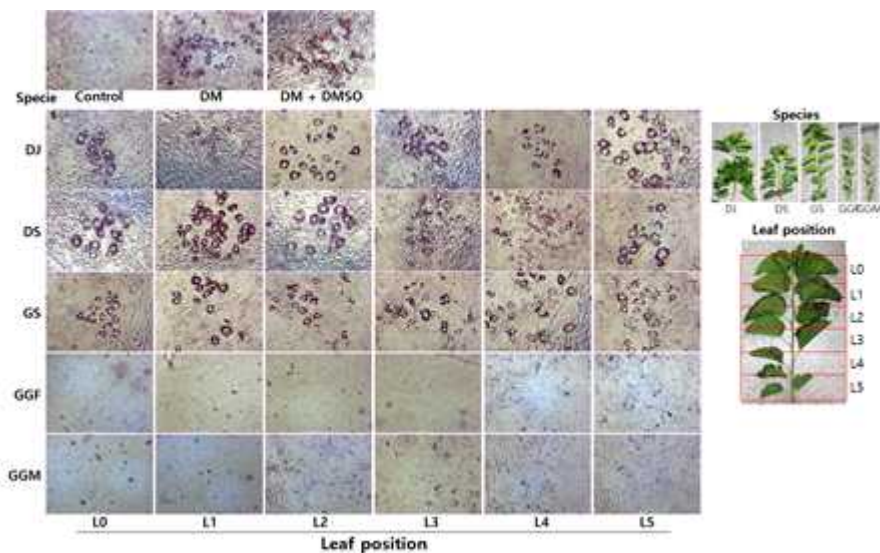


(3) 뽕나무 종의 항비만 효능 스크리닝

(가) 뽕나무의 품종 및 뽕잎의 위치별 항비만(anti-adipogenesis) 효능 평가

① 부산대학교 농장에서 재배하고 있는 DJ(대자뽕), DS(대상뽕), GS(과상 2호), GGF(가시없는 꾸지뽕), GGM(가시있는 꾸지뽕), 수집종인 LDS alc L-Q 뽕잎의 위치에 따라서 상위엽으로부터 L0, L1, L2, L3, L4 및 가장 하위엽을 L5로 분류하여 75% 에탄올로 추출한 다음 200 µg/ml를 3T3-L1 세포주에 처리한 다음 Oil Red O 염색 결과(A; 200x) 및 나타난 지방구(lipid droplet)의 OD값을 나타낸 것임. 뽕잎의 추출물은 잎의 위치 즉 L0, L1, L2, L3, L4 및 L5의 추출물을 200 µg/ml로 처리시에 어떠한 잎에서도 3T3-L1 preadipocyte에서도 lipid droplet이 감소되지 않았으나, 가시 없는 꾸지뽕, 가시 있는 꾸지뽕, 꾸지뽕의 뿌리는 약 50% 이상으로 현저히 감소시켰음(Fig. 1).

A



B

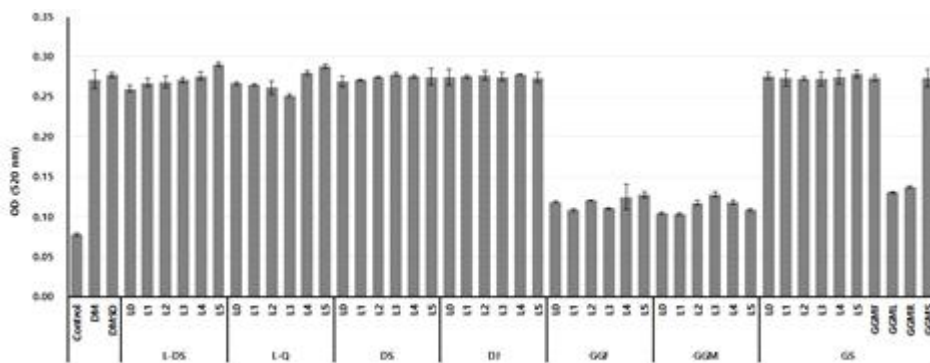


Figure 1. Mulberry leaves extract inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 mM rosiglitazone, 10 mg/ml insulin and 1 mM dexamethasone (differentiation medium). Extracts were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 $\times$  (A). Values present as mean  $\pm$  SD (n=3).

(나) 꾸지뽕의 항비만 효능 스크리닝

① 꾸지뽕 잎의 위치별 항비만 효능을 검증하기 위하여 각각의 추출물 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과 과실과 줄기 추출물은 효과가 없었으나 뿌리와 잎의 위치에 관계없이 모두 효과가 우수한 것으로 나타났음(Fig. 2).

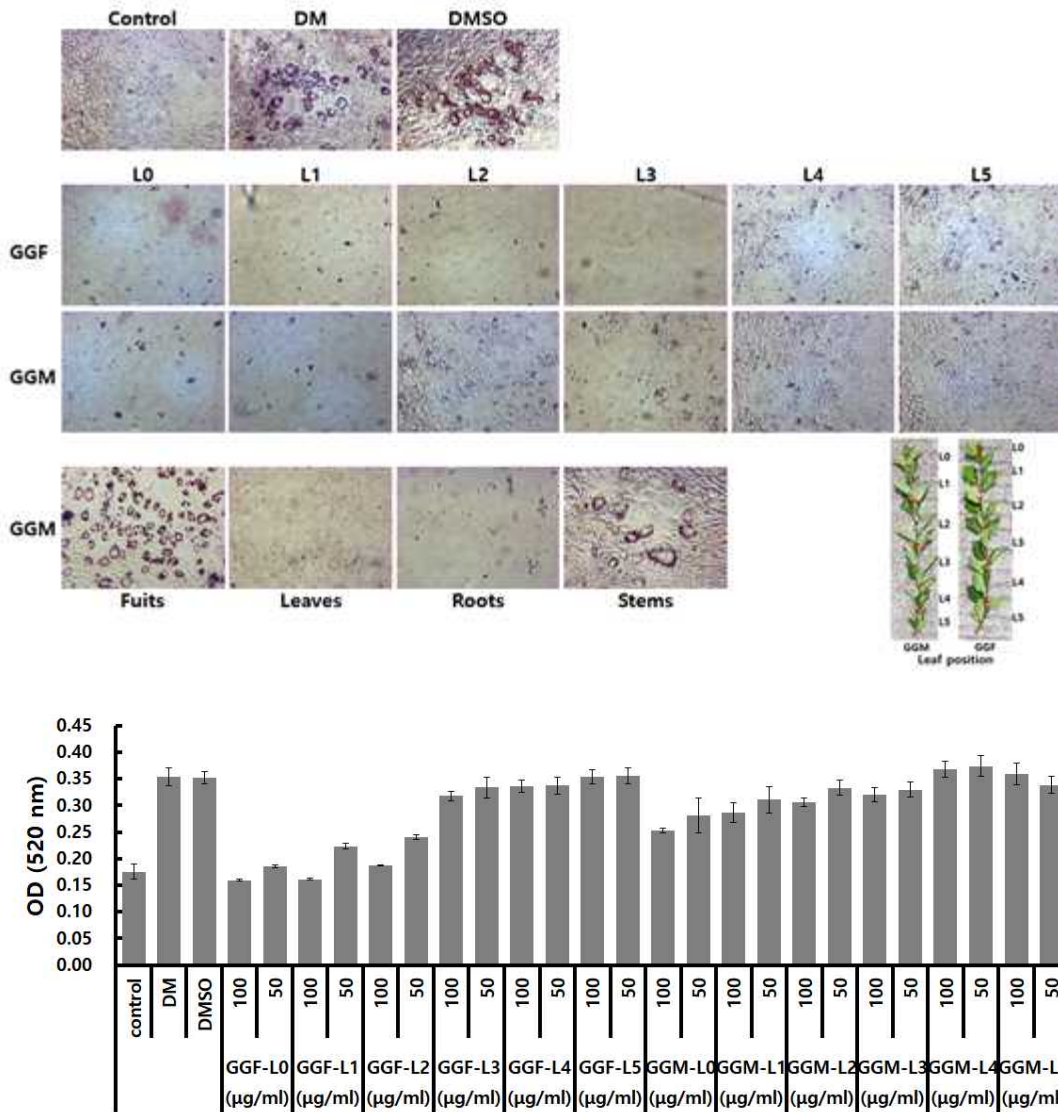


Figure 2. Ggijpong extracts inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 mM rosiglitazone, 10 mg/ml insulin and 1 mM dexamethasone (differentiation medium). Extracts (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 $\times$  (A). Values present as mean  $\pm$  SD (n=3).

② 따라서 꾸지뽕의 효능을 농도별로 조사하기 위해서 GGF-L3(가시 없는 꾸지뽕의 중간엽), GGM-L3(가시 있는 꾸지뽕의 중간엽), GGML(잎의 위치를 구분하지 않은 잎) 및 뿌리를 70% 에탄올로 추출한 다음 효능을 검증한 결과는 다음 그림에서 보는 바와 같음. GGMR 이 농도 의존적으로 가장 효과가 좋았으며, 다음은 GGF-L3, GGM-L3, GGML로서 구분하지 않은 잎이 가장 효과가 낮은 것으로 나타났음(Fig. 3).

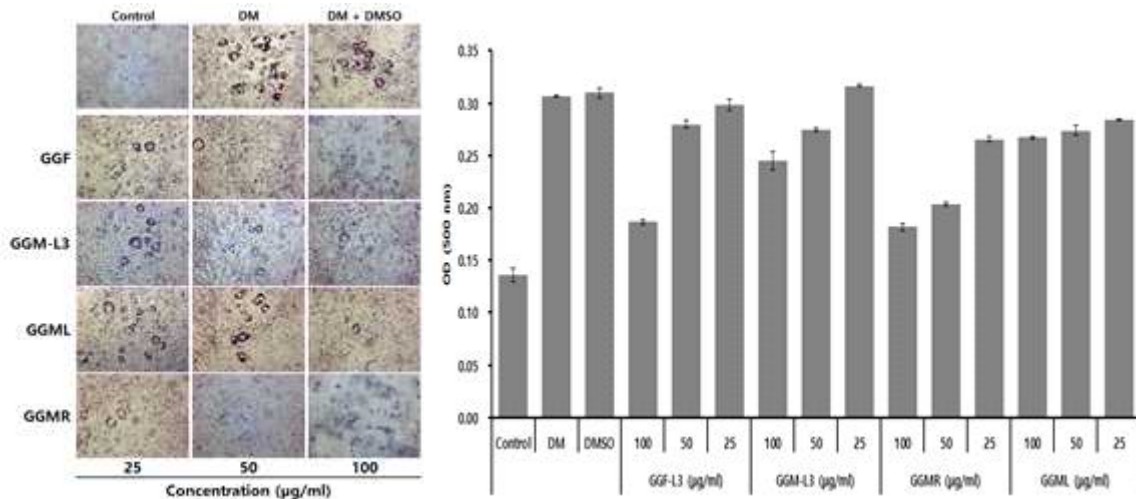


Figure 3. Ggijpong extracts inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 mM rosiglitazone, 10 mg/ml insulin and 1 mM dexamethasone (differentiation medium). Extracts were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 $\times$  (A). Values present as mean  $\pm$  SD (n=3).

#### (다) 항비만 효능 검증을 통한 소재의 screening

① 따라서 일반 뽕잎은 항비만 효능을 전혀 나타내지 않았으므로 두 종류의 동충하초 균인 *Cordyceps militaris* 및 *Paecilomyces tenuipes*와 뽕잎 및 번데기의 양을 조절하여 혼합하여 발효시킨 다음 항비만 효과를 조사하였다. 발효물을 75% 에탄올, 50% 에탄올 및 물 추출물에 대해서 각각을 추출한 다음 제2협동과제에서 free glycerol assay를 실시하였다.

#### (4) 항비만 효능 검색을 위한 세포주 확립

##### (가) 비만세포주 확보 및 배양조건 확립

- ① 뽕나무의 비만세포 항비만효능 연구하기 위하여 3T3-L1 세포주를 한국세포주은행 (Korean Cellline Bank, KCLB)에서 구입하여 사용하였음(Figure 1). 항비만 관련 소재연구나 기작연구에는 일반적으로 mouse embryo로부터 유래된 지방전구세포인 3T3-L1 세포주를 사용하며, 지방전구세포의 증식, 성숙지방세포로의 분화 및 성숙지방세포의 증식 과정의 조절기전의 연구에 사용되고 있음. 3T3-L1 세포주는 swiss mouse embryo에서 유래된 지방전구세포(preadipocyte)로 fibroblast의 일종으로서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin (Cambrex)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건의 incubator에서 배양하였음. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 80~90% 정도 성장하면 계대시켰음(Fig. 4).

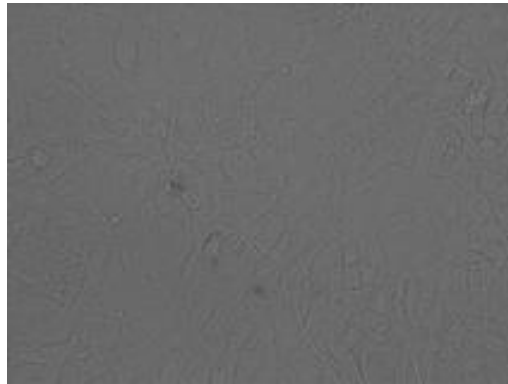
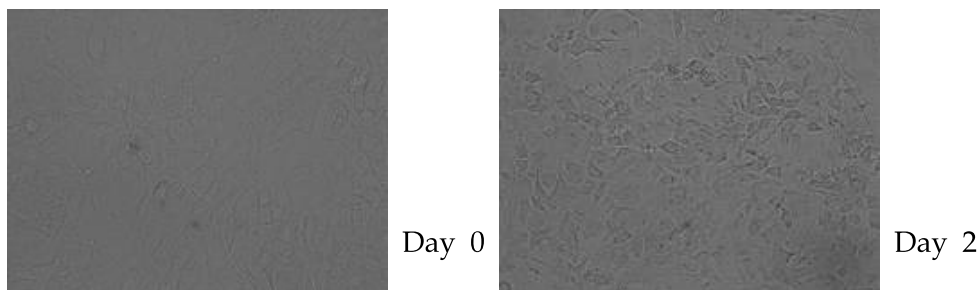


Figure 4. 3T3세포주의 배양형태

- ② 3T3-L1 세포주의 분화는 세포가 90% 이상 플라스크에 자라난 후, 2일(Day 0) 후에 insulin, methylisobutylxanthine, dexamethasone이 첨가된 10% FBS/DMEM 분화용배지로 교환하여 2일 추가 배양하였음(Day 2). 10% FBS/DMEM에 insulin이 함유된 배지로 교환하여 2일 더 배양하고(Day 4), 10% FBS/DMEM 배지로 교환하여 세포 내에 지방이 증가될 때 까지 배양하였음(Day 6). 배양 후 Oil-red O staining을 실시하여 지방세포의 분화 정도를 확인하였음(Fig. 5, 6).



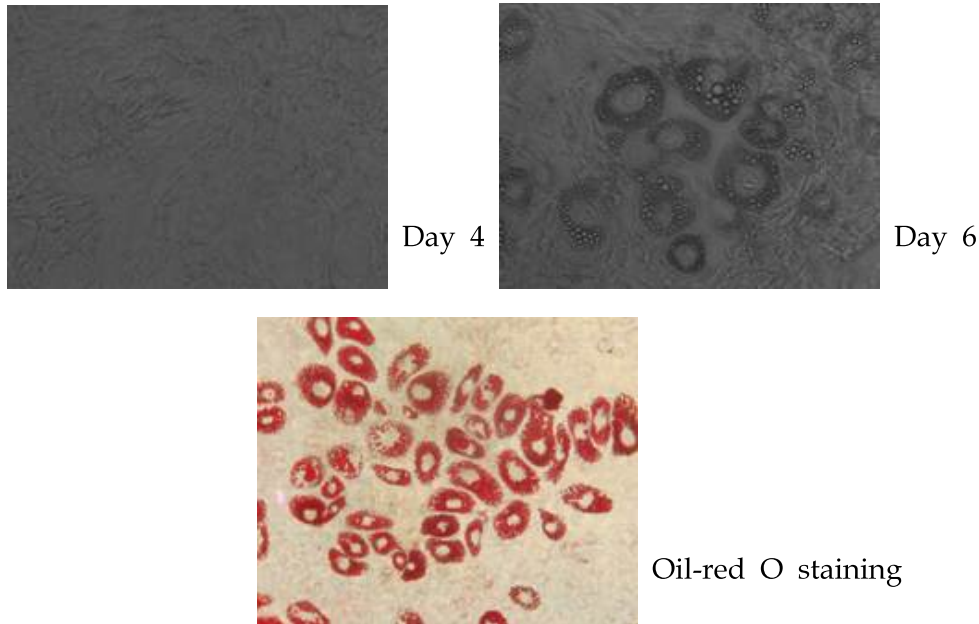


Figure 5. 3T3-L1 세포주의 분화

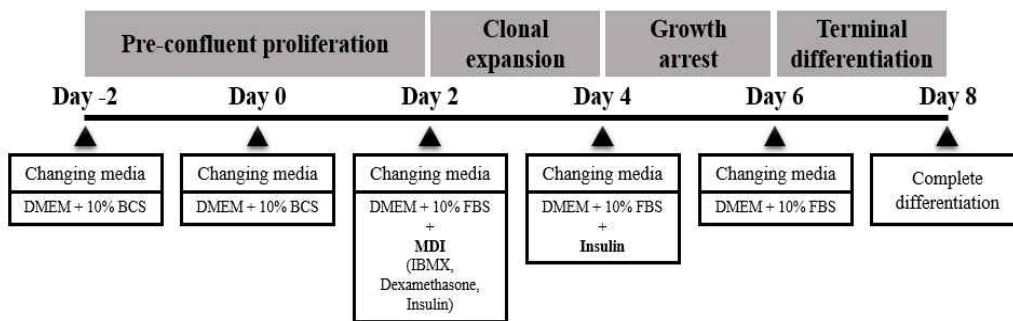


Figure 6. 3T3-L1 세포주의 분화 방법

(나) 지방조직으로부터 primary 세포분리 및 배양조건 확립

- ① 비만세포주를 확보하기 위하여 9~10주령 SD rat를 안락사 시킨 후, 지방조직을 채취하여 1% (BSA 함량) Krebs-Ringer solution(KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaCl 125 mM, Glucose 5 mM, HEPES 25 mM)에서 세척하였음. 세척한 지방조직을 collagenase solution(0.3% Collagenase Type 1과 1% BSA를 함유한 Krebs-Ringer solution)에 옮겨 담고 가위로 잘게 잘라주고 Shaking incubator (150 rpm, 37°C)에서 1시간 배양하였음. 배양 후 100 uM (Falcon, 352360) 짜리 pore size를 갖는 ell strain을 이용하여 여과하여 세포를 수집하였음. 수집된 용액은 15 ml tube에 10 ml 씩 옮겨 담고 1000 rpm, 1 분간 centrifuge를 하여 상층액을 따고 1% (BSA 함량) Krebs-Ringer solution을 동일 볼륨 넣어서 흔들어준 뒤, 1000 rpm, 20 초간 centrifuge를 하는 것을 두 번 반복하여 adipocyte 세척하였음. 세척 후 상층액을 따서 3% (BSA 함량) Krebs-Ringer solution을 이용하여 24 well에 분주하였음(Fig. 7). 1시간 배양 후(Fig. 8), 샘플을 처리하고 24시간 후에 free glycerol assay를 실시하였음.



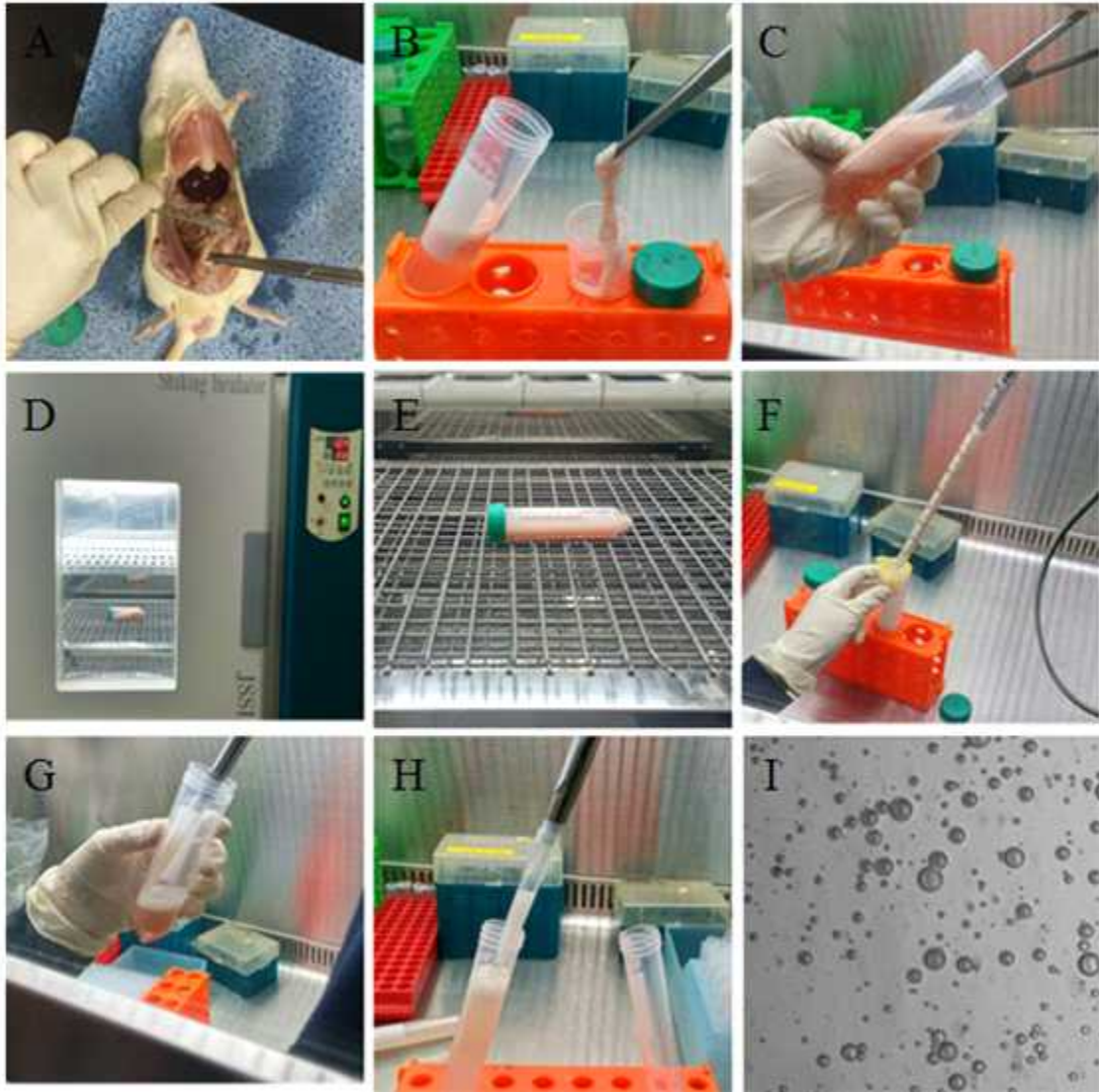


Figure 7. Primary 세포분리 방법

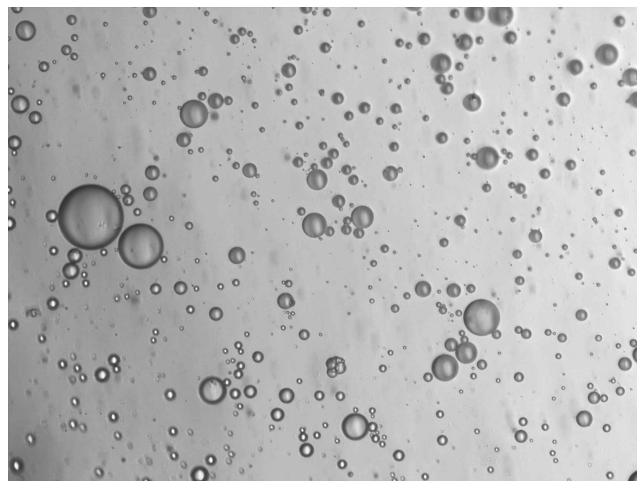


Figure 8. Primary 지방세포의 배양형태

(5) *In vitro* 효능평가

(가) 뽕나무의 비만세포 항비만 효능 평가

① 제1협동으로부터 발효뽕나무 추출물시료 118개(Table 1)를 제공받아 뽕나무의 비만세포 항비만효능 평가하기 위하여 지방조직으로부터 분리한 primary 세포를 이용하여 free glycerol assay를 실시하였음. 지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 triglyceride가 분해 되면 glycerol과 지방산으로 나누어지는데 인체의 경우 glycerol은 세포 외 혈액으로 유리 되어 간으로 이송하게 됨. 마찬가지로 지방세포계에서는 유리된 glycerol의 함량이 지방구 내 triglyceride의 분해 정도를 간접적으로 나타내는 측도가 됨. Free glycerol assay는 발효추출물이 처리된 24 well의 세포배양액을 마이크로튜브에 옮겨 담고, 65°C water bath에서 15분간 배양 후 1,000 rpm, 3 min centrifuge를 실시하여 상층액을 수집하였음. 수집한 시료는 10λ씩 96-well plate에 넣고 Free Glycerol Reagent 200λ를 넣어 교반기에서 200 rpm, 15 min간 반응시킨 후, 540 nm 파장에서 흡광도 측정하였음. 표준곡선 이용하여 농도계산을 하였음(Fig. 9).

$$* \text{글리세롤 함량} = \frac{(A_{standard} - A_{blank})}{(A_{sample} - A_{blank})} \times \text{glycerol standard 농도}$$

$A_{sample}$  = 시료 처리한 well의 흡광도

$A_{blank}$  = 배지만 처리한(Negative control) well의 흡광도

$A_{standard}$  = Glycerol standard 처리한 well의 흡광도

Table 1. 뽕나무 발효추출물 시료

번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명
1	MA16	21	MRPP71	41	4S1-W	61	6S3-95	81	3M6-50	101	6M1-W
2	MA60	22	MRPC3	42	4S1-50	62	6S4-W	82	3M6-95	102	6M1-50
3	MA89	23	MRPC5	43	4S1-95	63	6S4-50	83	4M1-W	103	6M1-95
4	MA98	24	MRPP3	44	4S2-W	64	6S4-95	84	4M1-50	104	6M2-W
5	SY	25	MRPP5	45	4S2-50	65	3M1-W	85	4M1-95	105	6M2-50
6	MRL	26	S-W	46	4S2-95	66	3M1-50	86	4M2-W	106	6M2-95
7	PC3	27	S-50	47	4S3-W	67	3M1-95	87	4M2-50	107	6M3-W
8	PC5	28	S-95	48	4S3-50	68	3M2-W	88	4M2-95	108	6M3-50
9	PC7	29	3S1-W	49	4S3-95	69	3M2-50	89	4M3-W	109	6M3-95
10	PP3	30	3S1-50	50	4S4-W	70	3M2-95	90	4M3-50	110	6M4-W
11	PP5	31	3S1-95	51	4S4-50	71	3M3-W	91	4M3-95	111	6M4-50
12	PP7	32	3S2-W	52	4S4-95	72	3M3-50	92	4M4-W	112	6M4-95
13	M-W	33	3S2-50	53	6S1-W	73	3M3-95	93	4M4-50	113	6M5-W
14	M-50	34	3S2-95	54	6S1-50	74	3M4-W	94	4M4-95	114	6M5-50
15	M-95	35	3S3-W	55	6S1-95	75	3M4-50	95	4M5-W	115	6M5-95
16	P-W	36	3S3-50	56	6S2-W	76	3M4-95	96	4M5-50	116	6M6-W
17	P-50	37	3S3-95	57	6S2-50	77	3M5-W	97	4M5-95	117	6M6-50
18	P-95	38	3S4-W	58	6S2-95	78	3M5-50	98	4M6-W	118	6M6-95
19	MR2	39	3S4-50	59	6S3-W	79	3M5-95	99	4M6-50		
20	MRPC71	40	3S4-95	60	6S3-50	80	3M6-W	100	4M6-95		

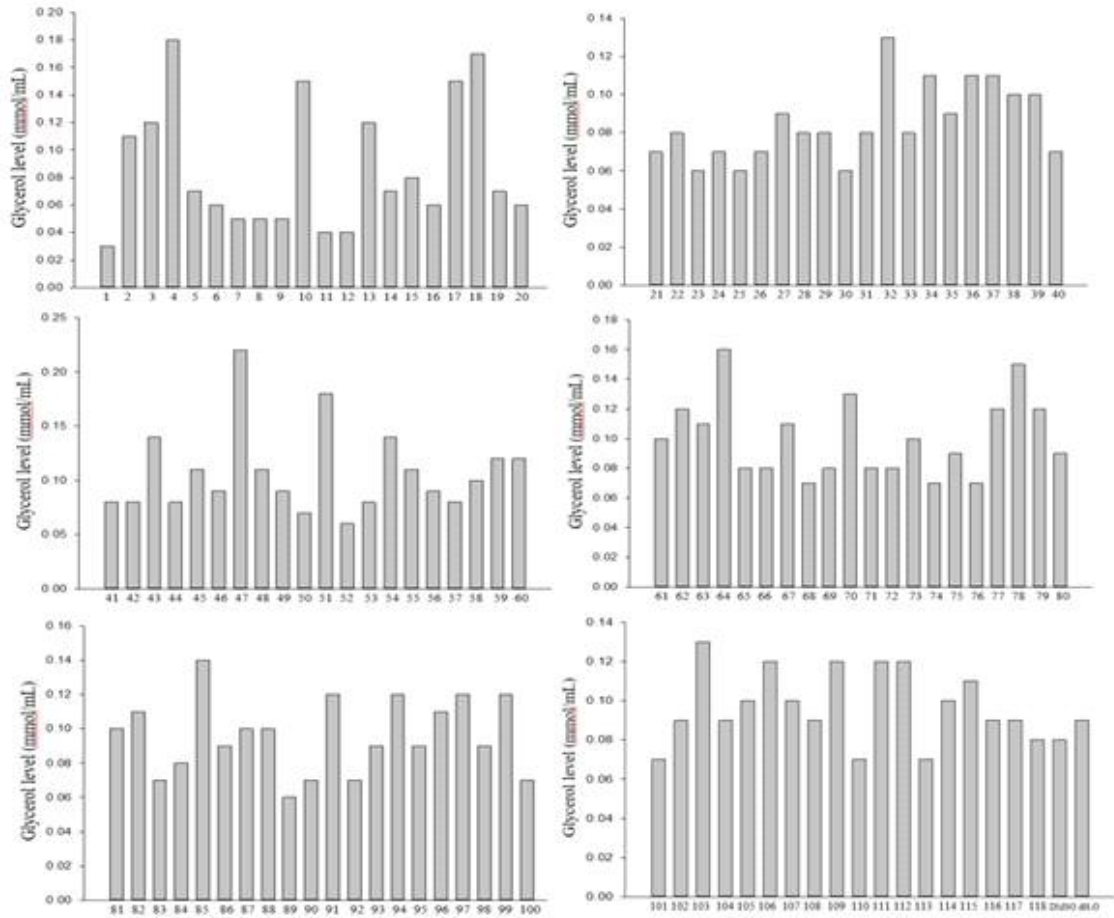


Figure 9. Primary 지방세포에서 glycerol release에 미치는 전체 뽕나무추출물의 효능평가

② 그 결과, negative control 인 DMSO와 dH<sub>2</sub>O 보다 글리세롤 농도가 높은 물질 20가지를 선택하였음(Table 2). 선택된 뽕나무 샘플 20가지를 400, 200, 100 ug/ml의 농도에서 농도 의존적인 반응을 확인하기 위하여 free glycerol assay를 재실시하였음.

Table 2. 1차 검색결과 기능성이 확인된 발효추출물 시료( 20종)

번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명
1	MA98	5	6S3-W	9	3M2-95	13	4M3-95	17	6M2-95
2	PP3	6	6S3-50	10	3M5-50	14	4M4-95	18	6M3-95
3	P-50	7	6S4-W	11	3M5-95	15	4M6-50	19	6M4-50
4	P-95	8	6S4-95	12	4M1-95	16	6M1-95	20	6M4-95



③ 그 결과, P-95, 3M2-95, 3M5-50, 3M5-95, 4M1-95, 4M3-95, 4M4-95에서 negative control 인 DMSO와 dH2O 보다 글리세롤 농도가 증가하였으며, 이러한 증가는 농도의존적인 경향으로 나타났음(Fig. 10). 이상의 결과로부터 3M2-95와 4M1-95가 기능성제품으로 가능성이 높음을 확인하였음.

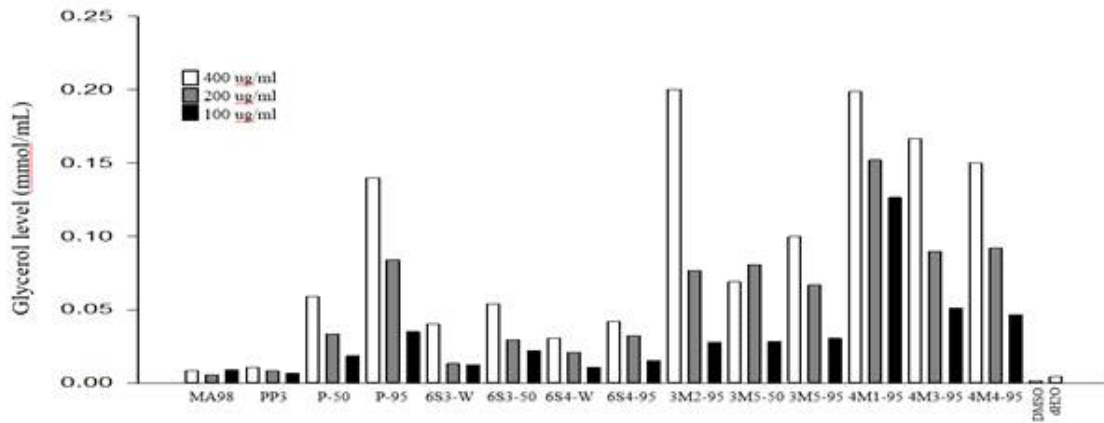


Figure 10. Primary 지방세포에서 glycerol release에 미치는 선택된 뽕나무추출물의 효능

(나) 항비만 효능 작용기전에 미치는 영향분석

① 위의 결과를 바탕으로 항비만 효능이 뛰어난 뽕나무 발효추출물 2 가지(4M1-95, 4M3-95)를 선정하여 항비만 효능 작용기전을 분석하고자 하였음. 지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 triglyceride (TG)가 분해되기 위해서는 adrenergic receptor에 agonist가 결합하여 cAMP를 증가시키며 PKA가 활성화되며 이하 지방 분해 인자들을 phosphorylation 시키게 됨. 따라서 제1협동으로부터 발효뽕나무 추출물 시료를 제공받은 뽕나무의 비만세포 항비만 효능을 평가하기 위하여 지방조직으로부터 분리한 primary 세포를 이용하여 cAMP assay를 실시하였음. 비만세포주를 확보하기 위하여 9~10주령 SD rat를 안락사 시킨 후, 지방조직을 채취하여 1% (BSA 함량) Krebs-Ringer solution(KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaCl 125 mM, Glucose 5 mM, HEPES 25 mM)에서 세척하였음.

세척한 지방조직을 collagenase solution(0.3% Collagenase Type 1과 1% BSA를 함유한 Krebs-Ringer solution)에 옮겨 담고 가위로 잘게 잘라주고 Shaking incubator (150 rpm, 37°C)에서 1시간 배양하였음. 배양 후 100 µM (Falcon, 352360) 짜리 pore size를 갖는 ell strain을 이용하여 여과하여 세포를 수집하였음. 수집된 용액은 15 ml tube에 10 ml 씩 옮겨 담고 1000 rpm, 1 분간 centrifuge를 하여 상층액을 따고 1% (BSA 함량) Krebs-Ringer solution을 동일 볼륨 넣어서 흔들어준 뒤, 1000 rpm, 20 초간 centrifuge를 하는 것을 두 번 반복하여 adipocyte 세척하였음. 세척 후 상층액을 따서 3% (BSA 함량) Krebs-Ringer solution을 이용하여 24 well에 분주하였음. 4×10<sup>5</sup> 세포/ml 만큼 분주하고, Vehicle 처리군 (dH<sub>2</sub>O, DMSO), 뽕나무 추출물의 처리군 (100, 200, 400 µg/ml), Isoproterenol 처리군 (Positive control, 10 µM)으로 분류하였음.

1시간 배양 후, 샘플을 처리하고 24시간 후에 세포 배양액을 마이크로 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm, 3 min centrifuge를 실시하여 상층액을 수집하였음. cAMP의 농도는 cAMP ELISA kit (STA-500, Cell Biolabs Inc., San Diego, USA)를 이용하여 제조사의 권장법에 따라 측정하였음. 준비된 배양액과 Acetylation reagent (10  $\mu$ l)를 혼합하여 acetylation 반응을 유발하고, 혼합시료 50  $\mu$ l, peroxidase cAMP tracer conjugate 25  $\mu$ l, Rabbit anti-cAMP polyclonal antibody 50  $\mu$ l를 goat anti-rabbit antibody coated plate에 첨가하여 2시간동안 상온에서 반응하였음. 반응액을 제거하고, substrate solution 100  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 10분 동안 추가반응 후 stop solution 100  $\mu$ l로 반응을 종료시켰음. 최종적으로 반응액의 흡광도를 VersaMax Elisa Microplate Reader (molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였음.

2 가지의 뽕나무 추출물 모두 농도의존적으로 cAMP 방출량이 증가하였으며 4M3-95에서 가장 높은 방출량을 나타내었음(Fig. 11).

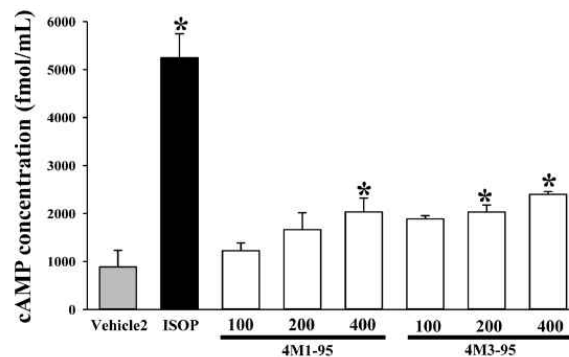


Figure 11. 뽕나무 추출물의 Rat primary 지방세포에 대한 cAMP 방출량

(다) 세포주에 미치는 독성평가

- 뽕나무 샘플이 3T3-L1 세포주의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 3T3-L1 세포주에 각각의 추출물을 400  $\mu$ g/ml의 농도로 24시간 처리한 후 세포생존율을 측정하였음. 세포 생존율은 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co. USA)방법을 통하여 분석하였음. MTT는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존율을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있음. 먼저 3T3-L1 cell을 96 well (5 x 10<sup>4</sup> cells/well)에 분주하여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (dH<sub>2</sub>O, DMSO), 뽕나무 샘플을 처리하고, 24시간 동안 배양하였음. 배양용 배지를 제거하고, 새 배지 200  $\mu$ l와 MTT용액을 50  $\mu$ l 첨가한 뒤, 4시간 동안 추가 배양하였음. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 well 내의 용액을 제거하고 Dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Co.) 용액을 150  $\mu$ l씩 넣어 formazan을 녹였음. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였음. 그 결과 뽕나무 추출

물 처리로 인한 세포 독성은 20개의 시료에서는 high toxicity가 관찰되었고 22개의 시료는 low toxicity를 나타내며 나머지는 유의적인 독성이 관찰되지 않았음(Fig. 12).

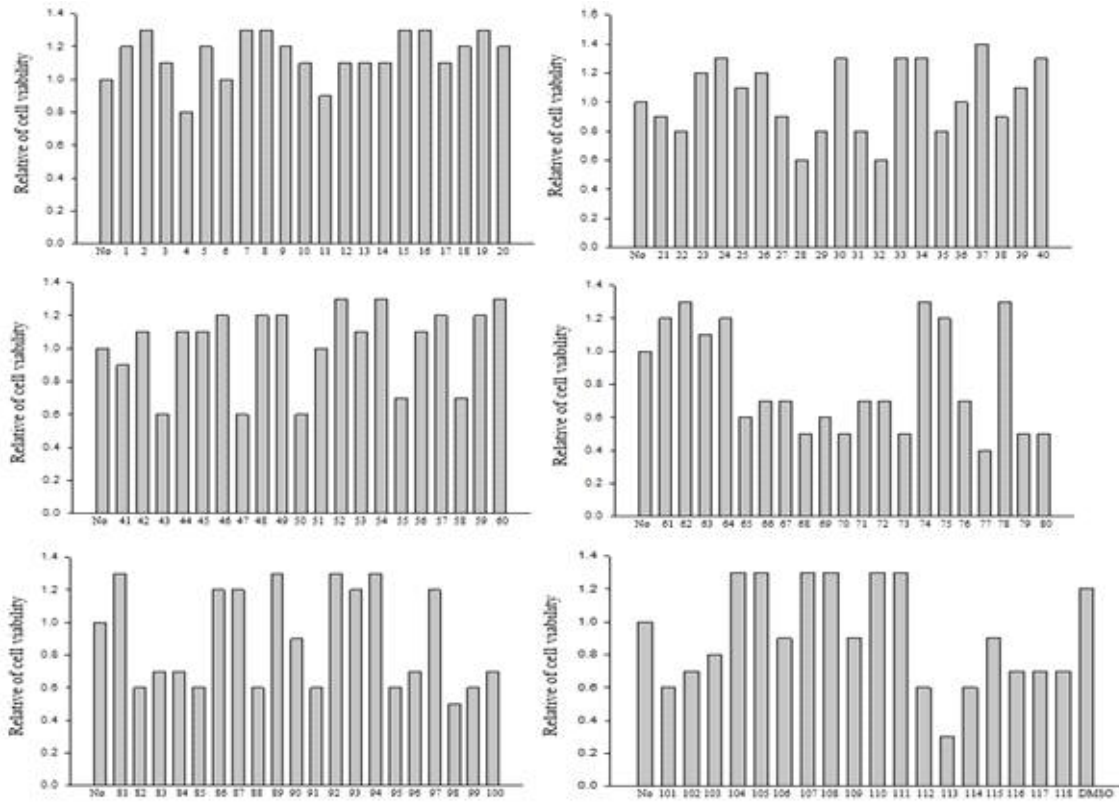


Figure 12. 3T3-L1 세포주에서 뽕나무추출물의 세포독성

**Table 3.** 독성 유무에 따른 시료의 분류

독성 구분	시료명
<b>High toxicity</b> (60% 이하의 세포생존률)	4S1-95, 4S3-W, 4S4-W, 3M2-W, 3M2-95, 3M3-95, 3M5-W, 3M5-95, 3M6-W, 3M6-95, 4M1-95, 4M2-95, 4M3-95, 4M5-W, 4M6-W, 4M6-50, 4M6-95, 6M4-95, 6M5-W, 6M5-50,
<b>Low toxicity</b> (80~60%의 세포생존률)	MA98, MRPC3, S-95, 3S2-W, 6S1-95, 6S2-95, 3M1-W, 3M1-50, 3M1-95, 3M2-50, 3M3-W, 3M3-50, 3M4-95, 4M1-W, 4M1-50, 4M5-50, 6M1-W, 6M1-50, 6M1-95, 6M6-W, 6M6-50, 6M6-95
<b>Nontoxicity</b> (80% 이상의 세포생존률)	MA16, MA60, MA89, SY, MRL, PC3, PC5, PC7, PP3, PP5, PP7, M-W, M-50, M-95, P-W, P-50, P-95, MR2, MRPC71, MRPP71, MRPC5, MRPP3, MRPP5, S-W, S-50, 3S1-W, 3S1-50, 3S1-95, 3S2-50, 3S2-95, 3S3-W, 3S3-50, 3S3-95, 3S4-W, 3S4-50, 3S4-95, 4S1-W, 4S1-50, 4S2-W, 4S2-50, 4S2-95, 4S3-50, 4S3-95, 4S4-50, 4S4-95, 6S1-W, 6S1-50, 6S2-W, 6S2-50, 6S3-W, 6S3-50, 6S3-95, 6S4-W, 6S4-50, 6S4-95, 3M4-W, 3M4-50, 3M5-50, 3M6-50, 4M2-W, 4M2-50, 4M3-W, 4M3-50, 4M4-W, 4M4-50, 4M4-95, 4M5-95, 6M2-W, 6M2-50, 6M2-95, 6M3-W, 6M3-50, 6M3-95, 6M4-W, 6M4-50, 6M5-95

㉔ MTT assay를 통한 뽕나무 추출물의 독성평가

- MTT assay, cAMP assay, Glycerol release assay를 통하여 Screening을 진행한 결과, 4M1-95, 4M3-95의 발효 뽕나무 추출물이 항비만 효과가 있었고 농도별로 처리하였을 때 독성을 평가하고자 하였음.
- 뽕나무 추출물의 농도별 독성을 평가하기 위해 지방세포주인 3T3-L1을 96 well plate에  $5 \times 10^4$ 세포/well 만큼 분주하고 24시간동안 배양기에서 배양한 후 No 처리군, Vehicle 처리군(DMSO) 뽕나무 추출물 처리군(100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 분류하여 각 처리군은 다양한 물질로 처리한 후 24시간동안 세포배양기에 배양 후 MTT assay를 진행하였음.
- 그 결과, 4M3-95에서는 전 농도에서 독성이 나타나지 않았으나 4M1-95에서는 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 독성이 나타났음(Fig. 13).

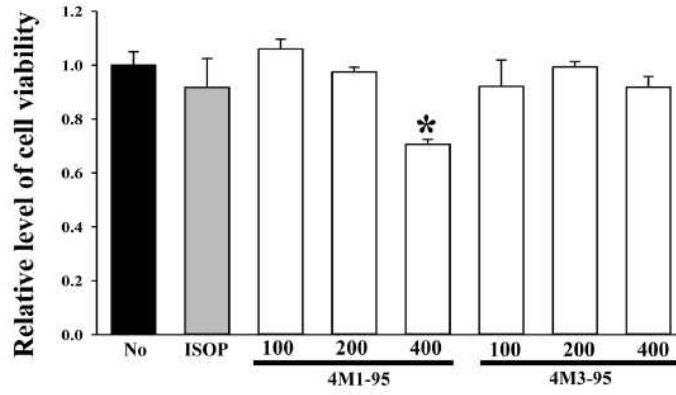


Figure 13. 선별된 뽕나무 추출물의 농도별 3T3-L1 세포독성

- 위 결과를 종합하였을 때, 독성이 없으며 가장 뛰어난 항비만 효능을 가지는 뽕나무 추출물인 4M3-95를 선택하여 동물실험을 실시하고자 하였음.

## 나. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

### [요약]

2차년도에는 1차년도에 확립된 기반을 바탕으로 주관연구기관에서는 발효추출물의 대량생산을 위한 SOP를 확립하고 반복투여독성평가를 실시하여 허가에 필요한 자료를 마련하였습니다. 제1협동과제에서는 최적발효조건에서 추출물의 profiling을 실시하고 지표성분을 설정하여 표준화된 발효조건을 규명하였으며, 제2협동과제에서는 지방세포에서 확인된 효능을 비만모델동물을 이용하여 지방의 분해 효능과 지방축적 억제효능을 평가하였습니다.

#### (1) 뿔나무 추출물 대량생산 SOP 확립

##### (가) *Cordyceps militaris* 균을 이용한 뿔나무 발효방법 설정

발효추출 전문업체를 통한 뿔나무 추출물 대량생산 SOP 확립을 위한 조건 검토

##### ① 재료 및 방법

##### ㉠ 원재료

- 원재료 1 : *Cordyceps militaris* 균주
- 원재료 2 : 뿔잎

##### ㉡ 발효방법 : *Cordyceps militaris* 균주를 이용한 뿔나무 발효방법

- 건조한 뿔잎 300 g을 배양용기에 넣는다.
- 증류수를 건조한 뿔잎에 500 mL 첨가한다.
- 30분간 고압 증기멸균(121℃, 1.2기압, 30분, autoclave)
- 배양된 균주 150 mL 첨가한다.
- 25℃에서 30일 배양한다.

##### ㉢ 추출 방법 : 배양된 동충하초 뿔잎 발효물(원물 250 g, 최종 무게 800 g)에 70%의 주정(10배)을 이용하여 80℃에서 4시간 동안 추출하였으며, 60 mesh를 이용하여 여과하여 원물 추출 잔사를 제거하였습니다. 추출액은 감압 진공농축(55-58℃)을 통하여 잔류 주정을 제거하고 3.5 brix까지 농축을 시켰음. 동결건조와 분무건조 방법으로 농축액을 건조하여 분말을 생산하였습니다.

#### (나) 발효뿔잎추출물 기준규격 설정

##### ① 유효성분 함량 분석을 통한 기준규격 설정

㉔ 발효빵잎추출물의 유효성분인 Quercetin과 Codycepin 분석을 통해 기준규격을 설정하였음. 최적의 건조 조건을 확립하기 위하여 동결건조와 분무건조 분석을 진행하였으며, 각각의 건조방법을 이용하여 분말을 제조하였고, 유효성분은 1차년도 유효성분 분석방법을 바탕으로 진행하였으며, 각 성분의 함량은 다음과 같음.

㉕ Quercetin 분석 결과

구분	샘플No.	함량	평균	비고
동결건조	1-1	0.3889 mg/g	0.3840 mg/g	부형제 첨가 ×
	1-2	0.3997 mg/g		
	1-3	0.3633 mg/g		
Dextrin 1 : 고품분 1 (분무건조)	2-1	0.3000 mg/g	0.3156 mg/g	부형제 첨가 ○
	2-2	0.3281mg/g		
	2-3	0.3186mg/g		
Dextrin 2 : 고품분 1 (분무건조)	3-1	0.2074mg/g	0.2073 mg/g	부형제 첨가 ○
	3-2	0.2014mg/g		
	3-3	0.2130mg/g		

㉖ Cordycepin 분석 결과

구분	샘플No.	함량	평균	비고
동결건조	1-1	29.0180 mg/g	29.2720 mg/g	부형제 첨가 ×
	1-2	29.1322 mg/g		
	1-3	29.6658 mg/g		
Dextrin 1 : 고품분 1 (분무건조)	2-1	6.0015 mg/g	6.1733 mg/g	부형제 첨가 ○
	2-2	6.0627 mg/g		
	2-3	6.4557 mg/g		
Dextrin 2 : 고품분 1 (분무건조)	3-1	3.7502 mg/g	3.7247 mg/g	부형제 첨가 ○
	3-2	3.7473 mg/g		
	3-3	3.6767 mg/g		

㉗ 건조방식과 부형제 함량을 달리한 발효빵잎추출물 샘플의 함량 분석을 진행하였으며, 각각 동결건조, 분무건조 중 고품분과 부형제 비율을 달리하여 분석을 진행한 결과, Quercetin은 0.3840, 0.3156, 0.2073 mg/g의 함량을 보였고, Cordycepin은 29.2720, 6.1733, 3.7247 mg/g의 함량으로 분석됨.

㉔ 함량 분석 결과 F/D 방식으로 건조한 원료의 함량이 가장 좋은 결과 값을 얻었지만, 부형제 미첨가에 따른 흡습의 문제, 제조 단가 상승 등 상용화 문제 등으로 인하여 분무건조 (Dextrin : 고휘분 = 1 : 1) 방식으로 건조한 원료를 선정하기로 내부 협의 진행

㉕ 따라서 뽕잎을 원재료로 동충하초 균을 이용하여 발효 한 다음 주정추출 후 분무건조 하는 제조방법을 확정하였으며, 추출된 원료의 지표성분에 대한 기준규격을 다음과 같이 설정하였음[Quercetin 기준규격 : 0.3 mg/g (80~120%), Cordycepin 기준규격 : 6.0 mg/g (80~120%)]

시험의뢰 및 성적서					
TEST REQUEST & REPORT					
고유번호 Code No.		종명 Material		제조번호 Lot No.	의뢰처 Requested by
		뽕잎동충하초추출물			2017-IR-10-4001 소재연구팀
수량 Quantity	제조일자	제조(공급)처 Supplier	의뢰일 Date.test request		시험원료요청일자
20g			2017. 10. 13.		
불부적인 Additional information 3반복 실험 부탁드립니다. 분석 후 남은 시료는 반환 부탁드립니다.				1. 공주관 번호 → Lot F/D 2. 공주관 S/D	
				시험의뢰	
				담당	확인
				신지현	김민아
접수일	시험번호 Analytical No.	시료채취자 Sampled by	시료채취일 Date. sampled	시료채취장소 Place sampled	시료채취량 Amount of sample
포장상태 Condition of package	라벨상태 Condition of label	저장상태 Condition of storage	시료채취자 의견 Comment of sampler		접수결재
		실온보관			담당
					확인
					김민아
					10/13
					김민아
					10/13
시료명 Sample name	시험 항목 Item	시험기준 Specifications	시험결과 Results	시험자 Tested by	시험일 Date tested
뽕잎동충하초추출물	Quercetin	-	0.3840mg/g	신지현	2017.10.23
뽕잎동충하초추출물	Cordycepin	-	29.272mg/g	0(채)	2017.10.25
Dextrin 1: Brix 1	Quercetin	-	0.3156mg/g	신지현	2017.10.23
"	Cordycepin	-	6.1133mg/g	0(채)	2017.10.25
Dextrin 2: Brix 1	Quercetin	-	0.2073mg/g	신지현	2017.10.23
"	Cordycepin	-	3.7247mg/g	0(채)	2017.10.25
판정결과 Results	확인 Checked by		승인 Approved by		승인일자 Date
	김민아		신지현		2017.10.25





(다) *Cordyceps militaris* 균을 이용한 발효빵잎추출물 대량생산 SOP 확립

① 확립된 추출방법을 통하여 scale-up을 통한 대량생산 SOP를 확립하였으며, 제조공정도를 확립하였음.

발효빵나무 추출물 제조공정도

제조공정	세부사항	수율
원재료	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빵잎 100 kg</li> <li>• 멸균 진행(121℃, 30분)</li> </ul>	45 kg
↓		
배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 배양된 균주 50 L 이용하여 발효</li> </ul>	
↓		
추출	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 70% 주정을 원물 대비 10배 첨가하여 80℃, 4시간 추출</li> </ul>	
↓		
여과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60 mesh 이용, 잔사 제거</li> </ul>	
↓		
농축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3.5 brix</li> </ul>	
↓		
분무건조	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고형분 대비 부형제 1:1로 첨가</li> </ul>	
↓		
포장	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 균질화 후 포장</li> </ul>	6 kg

(2) 발효뽕나무잎 추출물의 안전성(반복투여독성) 평가

① GLP 기관인 바이오독스텍을 통해 발효뽕나무잎 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주 반복 경구투여 시험을 수행하였음.

② 시험목적 : 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 발효뽕나무잎 추출물을 4 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

③ 시험의 요약 :

본 시험은 시험물질인 발효뽕나무잎 추출물을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 4 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거로 사용하고자 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 의 각 3 개 용량과 대조군 (주사용수)을 설정하여 암수 각 군당 5 마리에 4 주간 경구 투여하였다.

관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중측정 및 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

투여기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

일반증상 관찰 결과, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변이 관찰되었고, 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 유연이 관찰되었다.

체중측정 결과, 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 체중증가 억제경향이 관찰되었고, 사료섭취량의 감소 또는 감소경향이 관찰되었다.

혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 부검 결과, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

이상으로, 발효뽕나무잎 추출물을 암수 랫드에 4 주간 반복 경구 투여한 결과, 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day 로 설정해도 될 것으로 판단된다.

④ 시험재료 및 방법

㉠ 시험물질 : 발효뽕나무잎 추출물(Fermented Mulberry leaves Extract)

㉔ 시험계 : 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

㉕ 투여 : 경구투여

㉖ 군구성 및 투여용량

- 군구성

군		투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg)	동물수(개체번호)	
				수컷	암컷
G1	대조군	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
G2	저용량군	1,250	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)
G3	중용량군	2,500	10	5(1301~1305)	5(2301~2305)
G4	고용량군	5,000	10	5(1401~1405)	5(2401~2405)

- 투여용량설정 : 단회투여 독성시험 결과, 5,000 mg/10 mL/kg 용량에서 사망례 및 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 본 시험의 투여용량은 시험의뢰자와의 협의에 따라, 5,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2를 적용하여 2,500 및 1,250 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2를 적용하여 2,500 및 1,250 mg/kg/day를 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다..

㉗ 관찰 및 검사

- 일반증상 관찰 : 투여기간 동안 (4 주) 1 일 1 회 일반증상을 관찰하고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다.

- 체중측정 : 투여개시일 (투여전), 투여 개시 후 주 1 회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다.

- 사료섭취량 측정 : 투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1 일간의 섭취량을 측정하고, 투여기간에는 7 일간의 섭취량을, 투여 4 주째는 6 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다.

- 혈액학적 검사 : 모든 동물에 대하여 부검전 약 18 시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane 으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1 mL 을 EDTA 함유 tube 에 넣은 후, 혈구 분석기 (XN-V, SYSMEX, JAPAN)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
적혈구수 (total erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6/\mu\text{L}$	Hydrodynamic focusing DC detection
혈색소량 (hemoglobin concentration, HGB)	g/dL	Cyanide-free SLS-hemoglobin method
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	Pulse height detection
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Calculated
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	Calculated
혈소판수 (platelet count, PLT)	$\times 10^3/\mu\text{L}$	Hydrodynamic focusing DC detection
백혈구수 (total leukocyte count, WBC)	$\times 10^3/\mu\text{L}$	Flow cytometry method

- 혈액생화학적 검사 : 혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm 으로 10 분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기 (7180, HITACHI, Japan)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	U/L	JSCC
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	U/L	JSCC
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)	U/L	JSCC
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
크레아티닌 (creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe
총단백 (total protein, TP)	g/dL	Biuret
알부민 (albumin, Alb)	g/dL	BCG
A/G ratio	-	Calculated
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPS
혈당 (glucose, Glu)	mg/dL	Hexokinase-G6PDH

- 부검 : 모든 동물에 대해서 투여 29 일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락 사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

- 장기중량 측정 : 모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 좌우가 있는 장기(#)는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.

- 뇌 (brain)
- 간 (liver)
- 신장# (kidney)
- 심장 (heart)
- 비장 (spleen)

- 조직병리학적 검사 : 부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환은 Davidson 고정액에 고정한 후, 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였다.

- 뇌 (brain)
- 갑상선 (thyroid gland)
- 폐 (기관지 포함) (lung including bronchi)
- 심장 (heart)
- 비장 (spleen)
- 부신 (adrenal gland)
- 십이지장 (duodenum)
- 회장 (ileum)
- 결장 (colon)
- 췌장 (pancreas)
- 부고환 (epididymis)
- 자궁 (uterus)
- 흉선 (thymus)
- 부갑상선 (parathyroid gland)
- 간 (liver)
- 신장 (kidney)
- 위 (stomach)
- 공장 (jejunum)
- 맹장 (cecum)
- 직장 (rectum)
- 고환 (testis)
- 난소 (ovary)

조직병리학적 검사를 실시하지 않아, 시험 종료 후 고정한 장기는 폐기한다.

⑤ 결과 및 교찰

㉔ 일반증상(4주 반복 경구투여 최종보고서 Table 1) :

관찰기간 동안, 암수 대조군, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

시험물질색변 (compound-colored stool)이 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 4 일부터 관찰되기 시작하여 투여 종료시까지 암수 모든 동물에서 관찰되었다. 또한, 유연 (salivation)이 5,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1 마리에서 투여 26 및 28 일에 관찰되었다. 상기의 증상들은 시험물질의 과량 투여 또는 물리화학적 자극 등의 시험물질에 의한 영향으로 판단된다.

Table 1. Summary of Clinical Signs

Sex: Male			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 1,250	5	Compound-colored stool	5
G3 2,500	5	Compound-colored stool	5
G4 5,000	5	Compound-colored stool Salivation (after dosing)	5 1
Sex: Female			
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
G2 1,250	5	Compound-colored stool	5
G3 2,500	5	Compound-colored stool	5
G4 5,000	5	Compound-colored stool	5

Table 1. (Continued)

Sex: Male																
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5	3	1	4	4	1	1				1	
G3 2,500	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5			2								
G4 5,000	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5			5	5	5	5	5	5	5	5	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
G2 1,250	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5		
G3 2,500	5	Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
G4 5,000	5	Compound-colored stool Salivation (after dosing)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		

NOA: No Observable Abnormality

Table 1. (Continued)

Sex: Female																
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5	3	1	3	3	3	3	2	2	2	2	2
G3 2,500	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5			2	1	1	1					
G4 5,000	5	NOA Compound-colored stool	5	5	5			5	5	4	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
G2 1,250	5	NOA Compound-colored stool	3	3	1	1	2	2	1	1	1	1						
G3 2,500	5	Compound-colored stool	2	2	4	4	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5		
G4 5,000	5	Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		

NOA: No Observable Abnormality

㉔ 체중변화(4주 반복 경구투여 최종보고서 Figure 1, 2, Table 2) :

암수 1,250 및 2,500 mg/kg/day 투여군과 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 체중증가 억제경향이 관찰되어 추후 진행하는 장기독성시험에서 주의 깊은 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

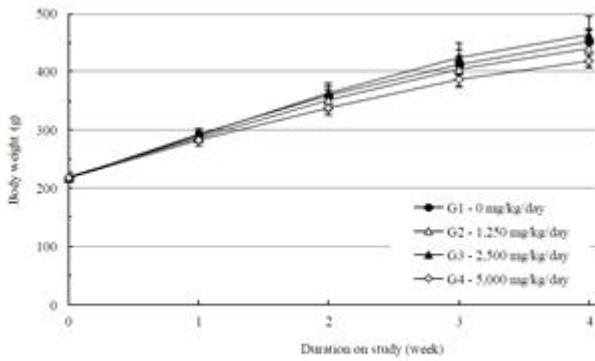


Figure 1. Body Weights in Male SD Rats

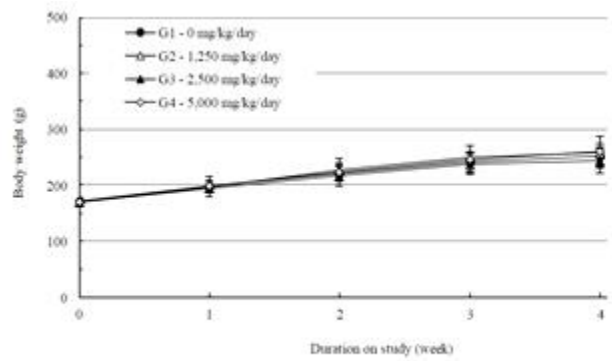


Figure 2. Body Weights in Female SD Rats

Table 2. Mean Body Weights

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	217.5	293.0	358.4	411.8	450.9
	S.D.	5.5	4.9	10.5	16.3	22.2
	N	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	218.6	285.6	350.7	405.0	440.2
	S.D.	7.8	12.3	24.2	32.6	31.9
	N	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	217.4	290.8	363.0	423.6	464.4
	S.D.	4.4	12.2	18.2	26.1	30.7
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	218.3	283.1	338.1	386.9	419.2
	S.D.	4.4	3.6	6.0	12.7	13.1
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	170.9	198.1	221.1	241.9	252.9
	S.D.	8.1	9.0	13.9	16.4	21.4
	N	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	170.3	197.0	228.2	249.9	258.8
	S.D.	7.3	10.1	10.9	9.9	10.1
	N	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	169.5	194.6	216.2	237.8	244.3
	S.D.	7.3	14.6	17.7	18.7	22.7
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	169.3	197.6	222.8	246.7	260.4
	S.D.	8.6	16.8	24.2	23.5	27.0
	N	5	5	5	5	5



㉔ 사료섭취량(4주 반복 경구투여 최종보고서 Table 3) :

암수 1,250 및 2,500 mg/kg/day 투여군과 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사료섭취량의 감소 또는 감소경향이 관찰되어 추후 진행되는 장기 독성시험에서 주의 깊은 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

Table 3. Mean Food Consumption

Sex Male		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	31.7	33.8	37.6	37.8	39.1
	S.D.	1.5	1.3	2.2	2.9	4.1
	N	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	31.1	31.9	35.3	36.1	36.3
	S.D.	2.2	2.6	3.8	3.6	2.2
	N	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	29.4	30.7	35.0	36.7	36.3
	S.D.	2.9	3.6	4.2	4.6	3.4
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	29.6	29.9	31.6	31.7	32.1 **
	S.D.	2.2	1.1	1.1	2.4	1.7
	N	5	5	5	5	5

Sex Female		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	22.1	22.8	23.6	24.1	24.5
	S.D.	2.9	1.6	2.0	2.4	2.9
	N	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	21.8	21.5	23.1	23.7	23.7
	S.D.	3.1	1.8	2.2	1.3	1.7
	N	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	21.8	21.6	22.8	22.8	22.8
	S.D.	2.5	2.1	1.5	1.9	3.1
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	22.0	20.9	22.5	23.0	23.8
	S.D.	2.0	2.6	2.3	3.1	3.2
	N	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: \*\* p<0.01.

㉔ 혈액학적 검사(4주 반복 경구투여 최종보고서 Table 4) :

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 측정 항목에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

Table 4. Mean Hematological Parameters

Sex: Male		Group / Dose (mg/kg/day)	RBC ( $\times 10^6$ / $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ / $\mu$ L)	WBC ( $\times 10^3$ / $\mu$ L)
						MCV	MCH	MCHC		
						(fL)	(pg)	(g/dL)		
G1 0	Mean	7.63	15.1	43.0	56.3	19.8	35.2	1034	10.52	
	S.D.	0.19	0.2	1.0	1.6	0.4	0.3	44	1.10	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	Mean	7.87	15.5	44.0	56.0	19.7	35.1	961	12.13	
	S.D.	0.18	0.3	0.8	1.0	0.4	0.4	220	3.74	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	Mean	7.87	15.5	44.2	56.2	19.6	35.0	1066	12.02	
	S.D.	0.32	0.7	1.7	1.5	0.5	0.4	124	1.47	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	7.96	15.6	44.6	56.0	19.5	34.9	973	9.75	
	S.D.	0.22	0.4	1.0	1.3	0.5	0.3	118	0.69	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	

Sex: Female		Group / Dose (mg/kg/day)	RBC ( $\times 10^6$ / $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ / $\mu$ L)	WBC ( $\times 10^3$ / $\mu$ L)
						MCV	MCH	MCHC		
						(fL)	(pg)	(g/dL)		
G1 0	Mean	7.91	15.3	42.8	54.3	19.4	35.7	1028	5.87	
	S.D.	0.66	0.6	2.2	2.0	0.9	0.5	86	1.09	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	Mean	7.89	15.3	42.9	54.3	19.4	35.7	1159	6.87	
	S.D.	0.22	0.7	1.9	1.2	0.5	0.3	173	1.68	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	Mean	8.03	15.2	42.6	53.0	18.9	35.7	1029	7.63	
	S.D.	0.39	0.8	1.8	1.1	0.4	0.6	127	2.29	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	7.93	14.9	42.2	53.3	18.8	35.2	1044	7.38	
	S.D.	0.41	0.7	1.6	1.4	0.5	0.3	64	2.22	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	

㉕ 혈액생화학적 검사(4주 반복 경구투여 최종보고서 Table 5) :

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 측정 항목에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

Table 5. Mean Clinical Chemistry

Sex: Male							
Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1 0	Mean	26.6	89.0	523.3	150	13.6	0.51
	S.D.	2.6	16.6	149.4	8	1.2	0.01
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	28.5	82.3	569.3	136	12.7	0.51
	S.D.	4.9	13.4	78.7	22	2.2	0.03
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	23.9	77.3	519.5	138	13.3	0.49
	S.D.	3.9	25.1	94.5	14	1.4	0.03
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	25.8	80.8	509.3	159	12.0	0.49
	S.D.	6.7	17.0	102.9	23	0.9	0.04
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio
G1 0	Mean	65	47	5.4	2.3	0.73
	S.D.	5	10	0.2	0.1	0.06
	N	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	67	39	5.4	2.3	0.77
	S.D.	16	13	0.2	0.1	0.04
	N	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	69	41	5.7	2.4	0.74
	S.D.	23	25	0.3	0.1	0.04
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	51	48	5.3	2.3	0.78
	S.D.	5	13	0.1	0.1	0.04
	N	5	5	5	5	5

Table 5. (Continued)

Sex: Female							
Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1 0	Mean	27.1	78.7	327.4	126	15.2	0.52
	S.D.	7.1	12.8	75.0	22	1.7	0.10
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	22.5	76.9	366.6	112	13.8	0.49
	S.D.	3.0	15.9	71.3	8	0.7	0.10
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	25.3	71.6	313.0	118	13.7	0.50
	S.D.	2.9	10.9	68.8	19	1.4	0.09
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	20.3	79.0	322.2	130	13.0	0.53
	S.D.	3.0	20.6	44.2	20	2.5	0.04
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio
G1 0	Mean	70	15	5.7	2.6	0.85
	S.D.	12	7	0.3	0.2	0.08
	N	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	73	13	5.9	2.7	0.83
	S.D.	17	4	0.2	0.0	0.06
	N	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	73	16	5.8	2.7	0.87
	S.D.	17	8	0.2	0.2	0.08
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	69	13	5.7	2.6	0.87
	S.D.	13	5	0.2	0.1	0.12
	N	5	5	5	5	5

㉔ 장기중량(4주 반복 경구투여 최종보고서 Table 6, 7) :

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 경미한 변동으로 용량상관성이 없거나, 연관된 항목에서의 변화가 인정되지 않아 독성학적 의미는 없었다.

Table 6. Mean Absolute Organ Weights

Sex Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	417.2	2.11	1.41	13.32	0.76	3.05
	S.D.	24.9	0.04	0.13	1.36	0.09	0.18
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	411.0	2.00 #	1.41	12.85	0.81	2.98
	S.D.	31.1	0.03	0.11	2.14	0.13	0.16
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	430.3	2.12	1.52	14.35	0.88	3.18
	S.D.	27.7	0.14	0.15	1.75	0.08	0.19
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	389.5	1.99	1.30	11.81	0.66	2.69 *
	S.D.	15.2	0.07	0.04	0.93	0.03	0.25
	N	5	5	5	5	5	5

Sex Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	235.9	1.89	1.03	7.09	0.49	1.88
	S.D.	18.5	0.07	0.09	0.84	0.09	0.17
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	243.2	1.89	0.96	7.26	0.57	1.86
	S.D.	7.8	0.11	0.04	0.23	0.01	0.11
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	230.9	1.91	0.97	7.24	0.57	1.84
	S.D.	20.9	0.10	0.08	1.47	0.13	0.17
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	242.6	1.86	0.95	7.31	0.54	1.93
	S.D.	24.6	0.08	0.12	0.80	0.08	0.18
	N	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Steel test: # p<0.05.

Significantly different from control by Dunnett's t-test: \* p<0.05.

Table 7. Mean Relative Organ Weights

Sex Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	417.2	0.51	0.34	3.19	0.18	0.73
	S.D.	24.9	0.03	0.02	0.24	0.02	0.04
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	411.0	0.49	0.35	3.12	0.20	0.73
	S.D.	31.1	0.03	0.02	0.35	0.02	0.07
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	430.3	0.50	0.35	3.33	0.21	0.74
	S.D.	27.7	0.05	0.02	0.22	0.02	0.04
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	389.5	0.51	0.33	3.03	0.17	0.69
	S.D.	15.2	0.02	0.02	0.18	0.01	0.06
	N	5	5	5	5	5	5

Sex Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	235.9	0.80	0.44	3.00	0.21	0.80
	S.D.	18.5	0.08	0.02	0.21	0.04	0.09
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	243.2	0.78	0.39 **	2.99	0.24	0.77
	S.D.	7.8	0.04	0.01	0.08	0.01	0.04
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	230.9	0.83	0.42	3.12	0.24	0.79
	S.D.	20.9	0.04	0.01	0.41	0.05	0.02
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	242.6	0.77	0.39 **	3.01	0.22	0.80
	S.D.	24.6	0.07	0.02	0.12	0.02	0.08
	N	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: \*\* p<0.01.

④ 부검 : 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

⑥ 결론

본 시험 조건하에서, 발효빵나무잎 추출물을 암수 랫드에 4 주간 반복 경구 투여한 결과, 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day 로 설정해도 될 것으로 판단된다.



(3) 제품개발

- ① 발효빵인추출물에 대한 품목제조보고 완료
- ② 발효추출 전문 제조업체인 (주)글루칸에서 확립한 발효빵인추출물 대량생산 조건을 바탕으로 원료를 생산하고 품목제조보고를 진행하였음.

발급번호 : 02XQ-0HA2-1YEU-70ZE-HDH5



### 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 조형래		생년월일(법인번호) 1968년 01월 06일	
	주소 경상남도 진주시 문산읍 월아산로950번길 25-15(1,2층)		전화번호	
			휴대전화	
영업소	명칭(상호) (주)글루칸		영업등록번호 20140601224	
	소재지 경상남도 진주시 문산읍 월아산로950번길 25-15(1,2층)			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2014060122468
	제품명	통일종종하초분말		
	유통기한	제조일부터24개월		
	품질유지기한	제조일로부터24개월		
	원재료 또는 성분명, 해할비율	핏장에 기재		
	용도 용법	핏장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	핏장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	1kg,2.5kg,5kg,10kg,20k,100kg,200kg,500kg		
	성상	고유의 색을 가진 미세분말로 약한 특이취를 가짐		
	품목의 특성	<input checked="" type="checkbox"/> 고열량·저영양 식품 해당 여부    [ ]에 [ ]아니오 [O]해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 알칼리성 식품 해당 여부        [ ]에 [O]아니오		
기타				

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

2018년 10월 22일

보고인 조형래

경상남도 진주시장 귀하

품목보고번호	20140601224-68				
처리부서	보건소 위생과	처리자성명	박태경	처리일자	2018년 10월 23일



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

② 체지방감소 기능성 원료 제품 동향 검토

㉔ 식품의약품안전처에서 발간한 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황(2016. 12., 발간등록번호 11-147100-000047-14)에서 체지방 감소 기능성 원료는 27건(5개 고시된 원료로 전환)임.

기능성		기능성원료	건수
체지방 감소	체지방 감소에 도움	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17, L-카르니틴타르트 레이트, 가르시니아카보지아껍질추출물, 공액리놀렌산(유리지방산), 공액리놀렌산(트리글리세라이드), 그린마떼추출물, 그린커피빈추출물, 깻잎추출물, 녹차추출물, 대두배아추출물등복합물, 돌외잎주정추출분말, 락토페린(우유정제단백질), 레몬밤 추출물 혼합분말, 마테열수추출물, 미역 등 복합추출물(잔티젠), 발효식초석류복합물, 보이차추출물, 서목태(취눈이콩) 펩타이드 복합물, 식물성유지 디글리세라이드, 와일드망고 종자추출물, 중쇄지방산(MCFA)함유 유지, 콜레우스포스콜리추출물, <u>키토산</u> , <u>키토올리고당</u> , <u>팟사과추출폴리페놀</u> , <u>핑거루트추출분말</u> , 히비스커스등복합추출물	27

22 체지방 감소

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
1	히비스커스등 복합추출물	제2004-7호	생리활성기능 2등급	① Chitosan ② (+)-allo-hydroxy citric acid lactone ③ L-carnitine	히비스커스등 복합추출물로서 2,079 mg/일	체지방 감소는 반드시 식사조절과 운동이 병행되어야 효과적임
2	공액리놀렌산 (유리지방산) (고시된 원료로 전환)	제2005-12호	생리활성기능 2등급	① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀렌산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2~4 g/일	① 위장 장애가 발생할 수 있음 ② 영유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 병행하는 것이 바람직함
		제2005-13호			공액리놀렌산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 1.4~4.2 g/일 (3.4 g/일)	
		제2005-16호			공액리놀렌산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA	



번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
				② cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA	+cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2~4 g/일	
		제2005-18호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9, cis-11 CLA +trans-9, trans-11 CLA 1,7~4 g/일	
		제2005-21호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2~4 g/일(3,4 g/일)	
		제2006-21호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2,5~4 g/일	① 위장 장애가 발생할 수 있음 ② 영유아, 임산부는 섭 취를 삼가 ③ 식사조절 운동을 병행 하는 것이 체지방감소에 효과적임
		제2006-28호			공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2,0~4,0 g/일	
		제2008-4호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA ③ trans-9, trans-11 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2,0~4,0 g/일	① 위장장애가 발생할 수 있으므로 주의 ② 영유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 병행하는 것이 바람 직함

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
		제2008-38호		공액리놀레산 (cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA, cis-9, cis-11 CLA, trans-9, trans-11 CLA)	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2.5~4 g/일	
		제2008-68호		① 총 공액리놀레산 ② cis-9, trans-11 CLA+ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 1.7~4.0 g/일	
		제2009-7호				
		제2009-48호		공액리놀레산	공액리놀레산 으로서 1.4~4.0 g/일	
3	공액리놀레산 (트리글리세 라이드) (고시된 원료로 전환)	제2005-14호	생리활성기능 2등급	① 총 공액리놀레산 (cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA, cis-9, cis-11 CLA, trans-9, trans-11 CLA) ② cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 1.4~4.2 g/일 (3.4 g/일)	① 위장장애가 발생 할 수 있으므로 주의 ② 영·유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 병행하는 것이 바람 직함
		제2005-17호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2~4 g/일	① 위장장애가 발생할 수 있으므로 주의
		제2005-19호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA 2.5~4 g/일	② 영유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 병행하는 것이 바람 직함
		제2005-22호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA+ cis-9,cis-11CLA+	

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
				② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	trans-9,trans-11CLA 2~4 g/일(3.4 g/일)	
		제2006-22호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA+ cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2.5~4 g/일	
		제2007-18호		① cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA + cis-9, cis-11 CLA + trans-9, trans-11 CLA ② cis-9, trans-11 CLA ③ trans-10, cis-12 CLA ④ cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA ⑤ trans-9,trans-11 CLA	공액리놀레산 으로서 cis-9,trans-11CLA+ trans-10,cis-12CLA +cis-9,cis-11CLA+ trans-9,trans-11CLA 2~4 g/일	① 위장장애가 발생 할 수 있으므로 주의 ② 영유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동병행 은 체지방 감소에 효과적임
		제2008-33호		① 총 공액리놀레산 ② cis-9, trans-11 CLA + trans-10, cis-12 CLA	공액리놀레산으로서 1.7~4.0 g/일	① 위장 장애가 발생할 수 있으므로 주의 ② 영유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 병행하는 것이 바람 직함
		제2008-47호	총 공액 리놀레산 으로서 2~4 g/일			
		제2008-53호	공액리놀레산 으로서 1.7~4.0 g/일			
		제2009-6호	공액리놀레산 으로서 1.7~4.0 g/일			
4	그린미떼추출물	제2006-20호	생리활성기능 3등급	① Chlorogenic acid ② Triterpene saponin	-	-
		제2008-52호	생리활성기능 2등급	Chlorogenic acid	Green Mate Extract EFLA® 92D 로서 3 g/일	-
		제2010-7호				
5	가르시니아 캄보지아껍질 추출물 (고시원 원료로)	제2008-3호	생리활성기능 1등급	Total (-)-HCA	가르시니아 캄보지아껍질 추출물 로서 총 (-)-HCA 750~2,800 mg/일	임산부와 수유기 여성은 섭취를 피하는 것이 좋음
		제2008-60호				
		제2008-61호				

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
	전환 가르시니아 캄보지아 추출물)	제2008-83호				
		제2009-14호				
		제2009-32호				
		제2009-33호				
		제2009-34호				
		제2009-35호				
		제2009-36호				
		제2009-41호				
		제2009-42호				
		제2009-53호				
		제2009-56호				
		제2009-57호				
		제2009-64호				
		제2009-65호				
		제2009-68호				
		제2009-69호				
		제2009-71호				
		제2009-74호				
		제2009-77호				
	제2009-82호					
	제2009-95호					
	제2010-5호					① 임신부와 수유기 여성 은 섭취를 피하는 것이 좋음 ② 간장 신장 심장 기능 에 이상이 있는 경우 섭취에 주의  ※ 제2010-5호에만 적용 되는 주의사항
6	대두배아 추출물등 복합물	제2008-6호	생리활성기능 2등급	① Daidzin, Glycitin, Genistin의 합 ② L-carnitine	APIC 대두배아 추출물등 복합물 로서 700 mg/일	① 알레르기성 비염 천식 우유 알레르기 반응을 나타내는 사람 섭취 주의 ② 임신부, 수유기 여성 및 어린이는 섭취에 주의

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
7	중쇄지방산 (MCFA) 함유 유지	제2009-20호	생리활성기능 2등급	Caprylic acid, Capric acid의 합	일반 식용유 섭취방법과 동일	-
		제2014-6호		카프릴산(Caprylic acid)과 카프릭산(Capric acid)의 합으로서96~144 mg/g		
8	식물성유지 디글리세라이드	제2009-21호	생리활성기능 2등급	Diacylglyceride	일반 식용유 섭취방법과 동일	-
9	플레우스 포스폴리 추출물	제2009-47호	생리활성기능 2등급	Forskolin	플레우스 포스폴리 추출물 로서 500 mg/일	① 항응고제 또는 혈압 조절제를 복용하거 나 혈압이 낮은 분은 섭취 주의 ② 임신부, 수유여성, 어린이 섭취 주의
	플레우스 포스폴리 추출물	제2011-42호 제2012-5호				임산부, 수유여성, 어린이는 섭취에 주의
10	갯잎추출물	제2009-83호	생리활성기능 2등급	Ursolic acid	갯잎추출물 (PF501) 로서 2.7 g/일	유·소아, 임신부 및 수 유부 여성은 섭취 주의
11	L-카르니틴 타르트레이트	제2010-50호	생리활성기능 2등급	L-carnitine	L-카르니틴 으로서 2 g/일	-
		제2012-19호				
12	레몬 밤 추출물 혼합분말	제2010-24호	생리활성기능 2등급	① 레몬 밤 (rosmarinic acid) ② 뽕나무잎 (1-Deoxynojirimycin) ③ 인진쑥 (6,7-Dimethylesculetin)	레몬 밤 추출물 혼합분말 로서 1,380 mg/일	① 알레르기 반응이 나 타날 경우 섭취중단 ② 섭취 후 진정작용이 나타날 수 있으므로 주의 ③ 어린이, 임신부 수유 부 섭취주의
13	녹차추출물 (고사된 원료로 전환)	제2010-34호	생리활성기능 2등급	Catechin	카테킨 으로서 0.3~0.5 g/일	카페인 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있으므로 주의
		제2010-49호				
		제2010-61호				
		제2011-4호				
		제2011-5호				



번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
		제2011-8호				
		제2011-9호				
		제2011-18호				
14	서리태 (쥐눈이콩) 펩타이드 복합물	제2010-53호	생리활성기능 2등급	① Arginine ② Leucine	서리태(쥐눈이콩) 펩타이드복합물 로서 4.5 g/일	-
15	키토올리고당	제2012-23호	생리활성기능 2등급	Chito oligosaccharide	키토올리고당 으로서 3 g	게 또는 새우에 알레르 기가 있는 사람 섭취 주의 (게 또는 새우를 원 재료 로 사용한 경우에 한함)
16	마테열수 추출물	제2013-2호	생리활성기능 3등급	Chlorogenic acid	마테열수추출물 로서 3 g/일	-
17	돌외잎주정 추출분말	제2013-3호	생리활성기능 2등급	Damulin A	돌외잎주정추출분말 로서 450 mg/일	과량섭취시 위장 장애 (구토와 위장운동 증가) 가 발생할 수 있음
		제2013-8호	생리활성기능 2등급			
18	핑거루트추출 분말	제2013-5호	생리활성기능 2등급	Panduratin A	핑거루트추출분말 로서 600 mg/일	-
19	락토페린 (우유정제 단백질)	제2013-8호	생리활성기능 2등급	Lactoferrin	락토페린 으로서 300 mg/일	우유 및 유제품 알레르 기가 나타나는 사람 섭 취 주의
20	미역등 복합 추출물(잔티젠)	제2013-10호	생리활성기능 3등급	① Fucoxanthin ② Punicic acid	미역등 복합 추출물(잔티젠) 으로서 600 mg/일	① 암산부, 수유부는 섭 취 시 주의 ② 석류 알레르기가 있는 사람 섭취 주의 ③ 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람섭취 주의
21	키토산 (고시된 원료로 전환)	제2013-21호	생리활성기능 2등급	Chitosan 80% 이상	키토산으로서 3.0~4.5 g/일	게 또는 새우에 알레르기가 있는 사람은 섭취에 주의 (게 또는 새우를 원재료로 사용한 경우에 한함)
		제2013-24호	생리활성기능 2등급	Chitosan(글루코사민으로서) 80% 이상 함유		

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
22	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17	제2014-5호	생리활성기능 3등급	유산균( <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17)	<i>Lactobacillus gasseri</i> rBNR17 로서 6x10 <sup>10</sup> CFU/일	산성도가 낮은 음료나 뜨거운 물과 함께 복용하는 것을 피하는 것이 좋음
23	발효식초석류 복합물	제2014-20호	생리활성기능 2등급	초산(Acetic acid), 엘라직산(Ellagic acid)	발효식초석류복합물 로서 22 mL/일	① 임신부, 수유부 섭취 주의 ② 공복에 섭취하거나 과다 섭취 시 속쓰림 등 위에 자극을 느낄 수 있음
		제2014-57호				
24	보이차추출물	제2014-7호	생리활성기능 2등급	Gallic acid	보이차추출물 로서 1 g/일	① 카페인이 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음 ② 임신부, 수유부, 어린이, 질병치료 중 환자 섭취 주의
25	와일드밍고 종자추출물	제2014-28호	생리활성기능 2등급	식이섬유	아프리카민고 종자추출물 로서 300 mg/일	임산부 및 수유 여성은 섭취에 주의
		Ellagic acid				
26	그린커피빈 추출물	제2014-31호	생리활성기능 2등급	Chlorogenic acid	그린커피빈 추출물 로서 400 mg/일	① 임신부와 수유기 여성, 유아, 어린이는 섭취에 주의 ② 카페인이 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음
27	팻사과추출 폴리페놀	제2015-9호	생리활성기능 2등급	총 폴리페놀	팻사과추출폴리페놀 로서 600 mg	사과에 알레르기가 있으신 분은 섭취 시 주의

㉞ 유사 기능성 원료 제품화 검토

- 현재 판매되고 있는 항비만 기능성 제품의 검토를 통하여 기존 제품군과의 비교를 통한 새로운 배합비 개발 및 시장 진출 계획 수립



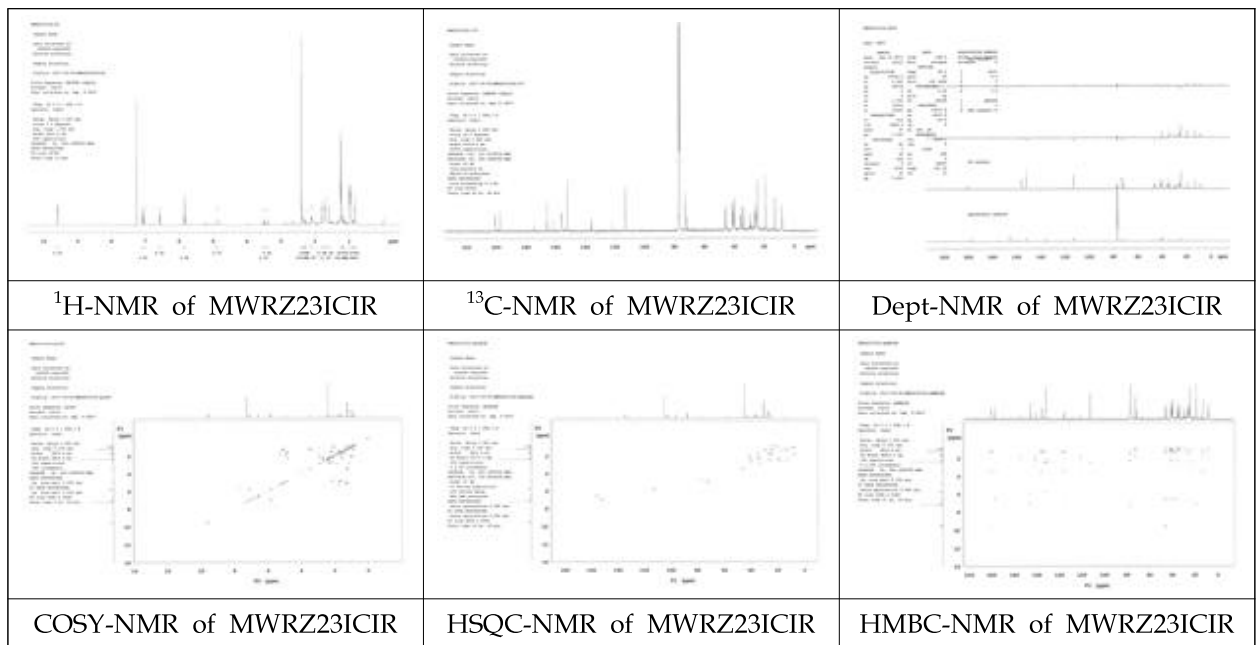
[건강기능식품 체지방 관련 제품군]

(4) 균이 생성하는 효능성분의 함량 분석

① 빵잎으로부터 순수 분리한 성분

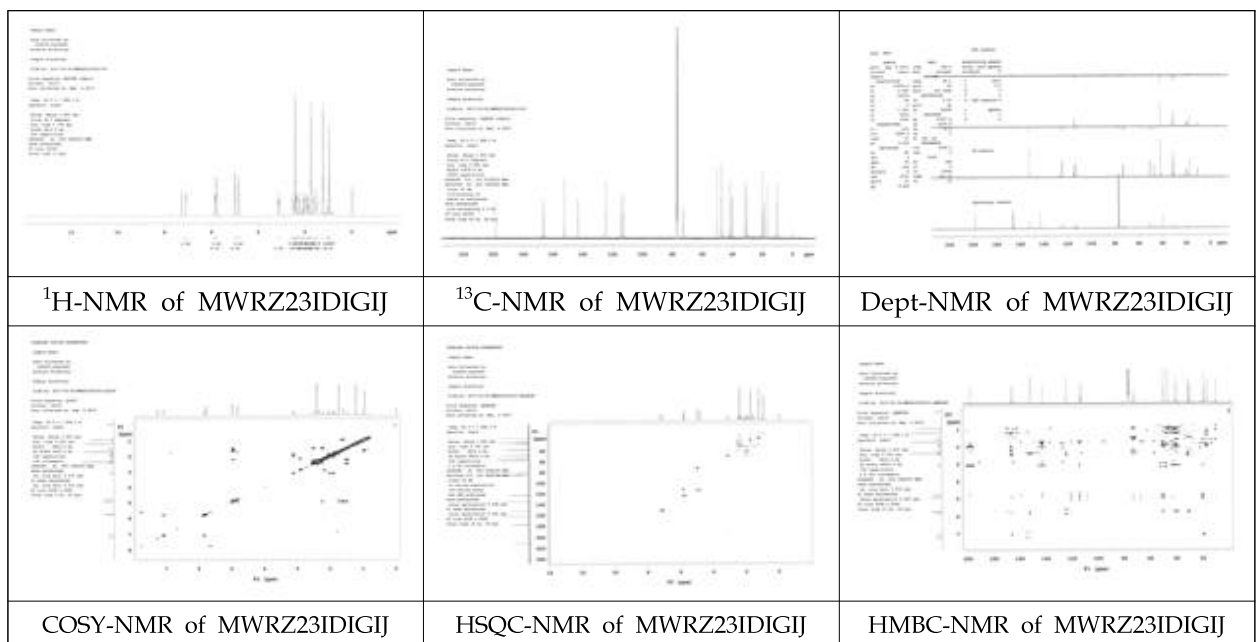
㉠ 빵 잎으로부터 순수분리한 MWRZ23ICIR 성분

- 빵잎으로부터 순수분리한 본 성분은 구조를 동정 중에 있으며, 특허 출원 등으로 인하여 구조는 추후에 보고할 계획임.



㉡ 빵 잎으로부터 순수분리한 MWRZ23IDIGIJ 성분

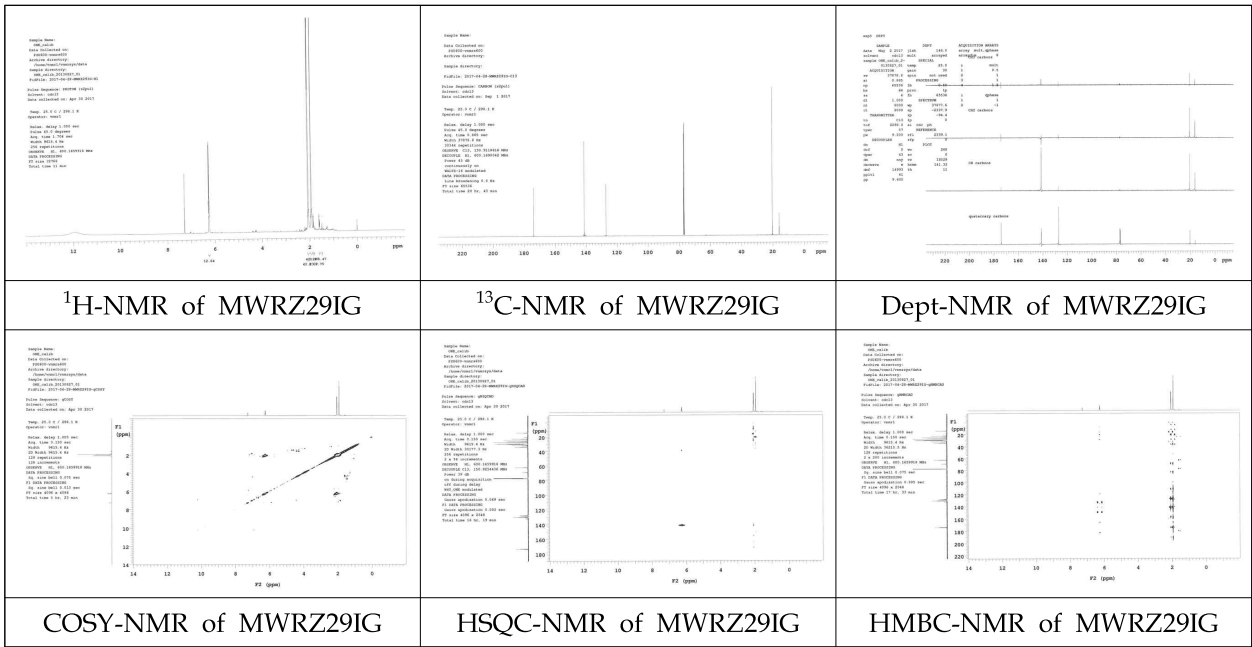
- 빵잎으로부터 순수분리한 본 성분은 구조를 동정 중에 있으며, 특허 출원 등으로 인하여 구조는 추후에 보고할 계획임.





㉔ 뽕 잎으로부터 순수분리한 MWRZ29IG 성분

- 뽕잎으로부터 순수분리한 본 성분은 구조를 동정 중에 있으며, 특허 출원 등으로 인하여 구조는 추후에 보고할 계획임.



② *Cordycepin militaris* 균주의 첨가량에 따른 발효물의 Cordycepin 함량 분석

㉔ 액체 발효한 *Cordycepin militaris* 균주를 각각 5%, 10%, 20%, 30%의 첨가하여 4주동안 발효시킨 다음 70% EtOH, 50% EtOH 및 물로 추출한 추출물의 cordycepin 함량을 분석한 결과, 뽕잎 대비 배양균주의 양이 적을수록 cordycepin의 함량은 증가하는 경향이었음(Fig. 14).

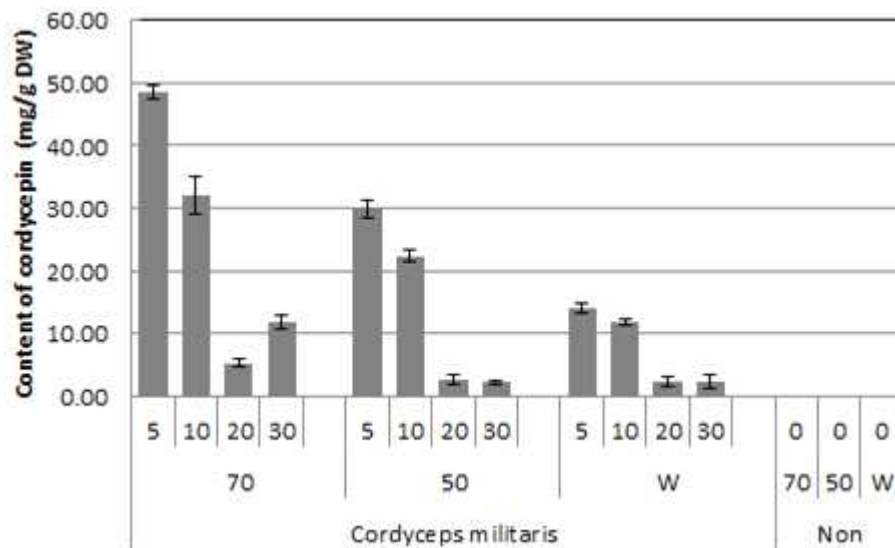


Figure 14. Effect of percent of cultured medium on cordycepin content.

③ 뽕잎으로부터 daucosterol의 순수분리 및 lipolysis 효과

㉔ 뽕잎으로부터 daucosterol의 순수분리

- 뽕잎으로부터 순수분리한 본 성분은 구조를 동정 중에 있으며, 특히 출원 등으로 인하여 구조는 추후에 보고할 계획임. 본 연구에서는 아시아 지역에서 전통 한약재로 사용되는 뽕나무 잎의 지방분해 활성에 관여하고 있는 물질을 스크린하기 위하여 뽕잎 분말을 헥산, 에틸 아세테이트 및 메탄올로 순차 추출하였음. 뽕 잎의 EtOAc 추출물로부터 daucosterol 이 순수분리 하였음(Fig. 15).

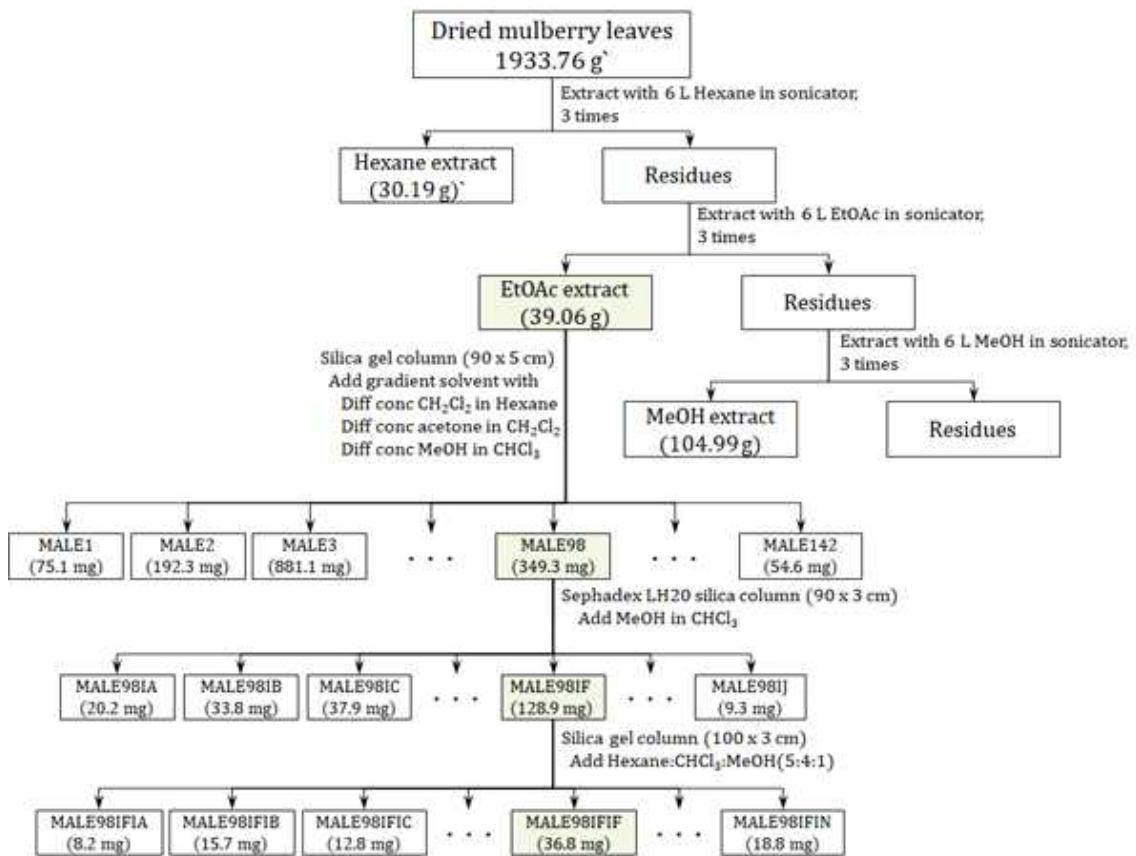


Figure 15. Extraction and isolation scheme of the daucosterol from mulberry leaves (*Morus alba*).

㉕ 순수분리한 성분의 구조동정

- 순수분리한 MALE98IFIF의 구조는  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC 및 HMBC 등의 NMR 스펙트럼 분석에 의해 Daucosterol로 밝혀졌음(Table 4, Fig. 16).

Table 4.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz in pyridine),  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz in pyridine) and HMBC spectroscopic data of daucosterol

Position	$\delta_{\text{C}}$		$\delta_{\text{H}}$	HMBC
C-1	32.90	CH <sub>2</sub>	1.439, br	28.88
C-2	28.88	CH <sub>2</sub>	2.186, d, $f=11.4$ 1.073, br	37.97 54.92, 35.04, 32.90
C-3	76.99	CH	4.006, br	101.17, 37.97
C-4	37.97	CH <sub>2</sub>	2.768, d, $f=13.2$ 2.520, t	139.60, 120.57, 76.99, 35.57, 28.88
C-5	139.60	C		
C-6	120.57	CH	5.403, br	37.97, 35.37, 30.73
C-7	30.84	CH <sub>2</sub>	2.030, d, $f=12.0$ 1.952, d, $f=17.4$	
C-8	30.73	CH	1.439, br	120.57, 49.01
C-9	49.01	CH	0.977, s	55.51, 35.57, 30.73,
C-10	35.57	C		
C-11	19.95	CH <sub>2</sub>	1.480, s	
C-12	38.63	CH <sub>2</sub>	2.030, d, $f=12.0$ 1.153, d, $f=10.2$	41.15, 10.65
C-13	41.15	C		
C-14	55.51	CH	0.977, s	49.01, 41.15
C-15	23.17	CH <sub>2</sub>	1.588, br	
C-16	25.05	CH <sub>2</sub>	1.299, br	
C-17	54.92	CH	1.153, d, $f=10.2$	41.15, 17.69, 10.65
C-18	10.65	CH <sub>3</sub>	0.771, s	55.51, 41.15, 38.63
C-19	17.89	CH <sub>3</sub>	0.977, s	49.01, 35.57
C-20	35.04	CH	1.439, br	17.69
C-21	17.69	CH <sub>3</sub>	1.073, d, $f=4.2$	54.92, 35.04
C-22	36.15	CH <sub>2</sub>	1.073, d, $f=4.2$ 1.761, t	54.92, 35.04
C-23	27.20	CH <sub>2</sub>	1.892, br 1.299, br	44.70, 28.14
C-24	44.70	CH	1.073, d, $f=4.2$	28.14, 22.06, 18.65, 18.09
C-25	28.14	CH	1.724, t, br	44.70, 27.20, 18.09
C-26	18.09	CH <sub>3</sub>	0.918, br	44.70, 28.14, 18.65, 18.09
C-27	18.65	CH <sub>3</sub>	0.929, br	44.70, 22.06, 18.09
C-28	22.06	CH <sub>2</sub>	1.299, br 1.350, t	44.70, 28.14, 10.83
C-29	10.83	CH <sub>3</sub>	0.929, t?	44.70, 22.06
Glucoside moiety				
C-1'	101.17	CH	5.066, d, $f=7.8$	77.143, 76.89
C-5'	77.14	CH	4.335, t	73.90, 70.30
C-2'	77.11	CH	4.335, t	
C-3'	73.90	CH	4.048, t	101.17, 77.14, 76.01
C-4'	70.30	CH	4.277, t	77.14, 77.11
C-6'	61.41	CH <sub>2</sub>	4.579, d, $f=12.0$ 4.412, dd, $J=12.0/4.8$	77.14, 70.30 77.14

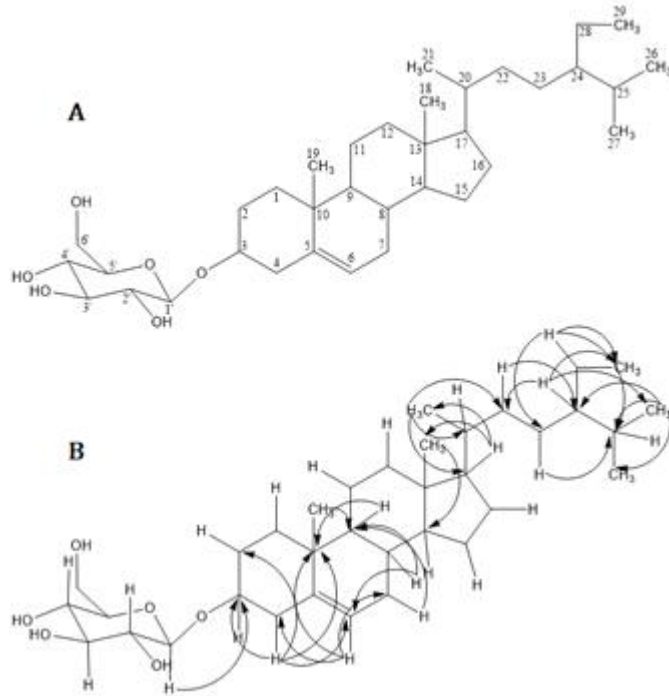


Figure 16. Structure (A) and key HMBC (B) of daucosterol.

㉔ 빵잎으로부터 순수분리한 daucosterol의 lypolysis 효과

- Daucosterol은 농도 의존적으로 지질분해 효과를 나타내었는데, 본 연구의 결과로부터 빵나무 잎으로부터 순수분리한 daucosterol의 지질분해 활성은 다양한 질병을 치료하기 위한 천연물 소재 또는 지표성분으로서 활용이 가능할 것으로 생각됨(Fig. 17).

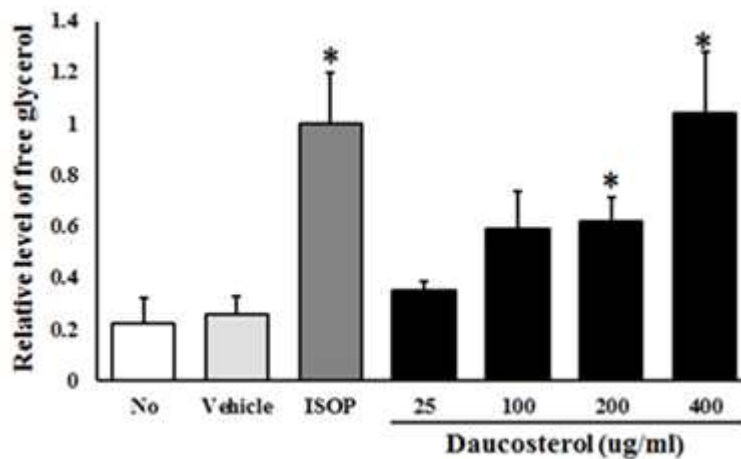


Figure 17. Dose dependent response of daucosterol on the lipolytic activity. The cell viability was measured in 3T3-L1 cells treated with 25, 100, 200 and 400  $\mu\text{g/ml}$  of daucosterol. The free glycerol release was measured in the supernatant of primary adipocytes treated with daucosterol. The data shown represent the means  $\pm$ SD of three replicates. \*,  $p < 0.05$  relative to the Vehicle treated group. ISOP; isoproterenol.

④ 빵잎 분리물질의 PPAR- $\gamma$ 신호 전달 억제를 통한 비만억제 효과

㉠ MWRZ23ICIR순수분리 물질의 1일 후의 지방세포 분화 억제 효과

- 빵잎으로부터 순수분리한 MWRZ23ICIR를 3T3-L1 cell line에 처리하여 지방세포 분화 억제 효능을 검증한 결과 10 $\mu$ g/ml의 저농도에서 지방세포의 분화를 현저하게 억제하였음(Fig. 18).

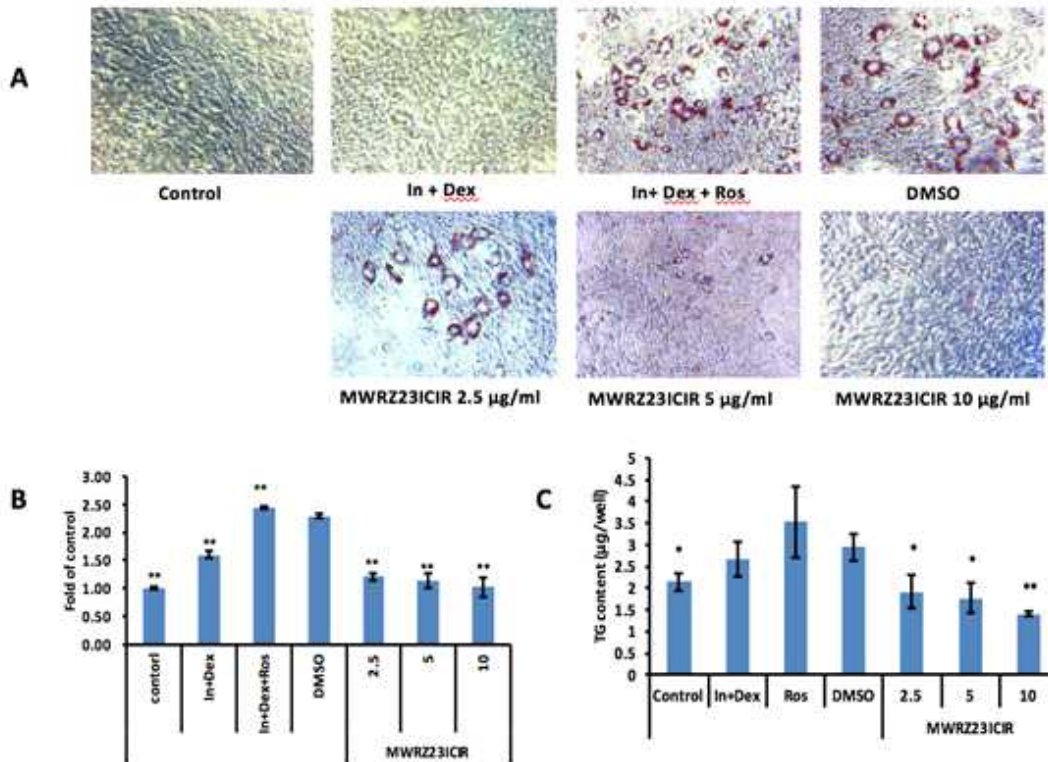


Figure 18. MWRZ23ICIR inhibits adipocytes differentiation in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cells were induced by insulin, dexamethasone and rosiglitazone. Then stained with oil red O for taking pictures (200X), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection at 500 nm. A, MWRZ23ICIR inhibits adipocytes differentiation. B, MWRZ23ICIR decreased OD values of oil red O. C, MWRZ23ICIR decreased TG content in differentiated adipocytes. Values present as mean  $\pm$  SD, \*\* as  $p < 0.01$  vs DMSO group.

- 3T3-L1 cell line에서 MWEZ23ICIR가 adipogenesis억제 메카니즘을 확인하기 위하여 처리 24시간 후에 western blot assay를 한 결과, C/EBP- $\alpha$  and C/EBP- $\beta$ 는 변화하지 않았으나, PPAR- $\gamma$ 는 농도 의존적으로 감소하였음(Fig. 19).

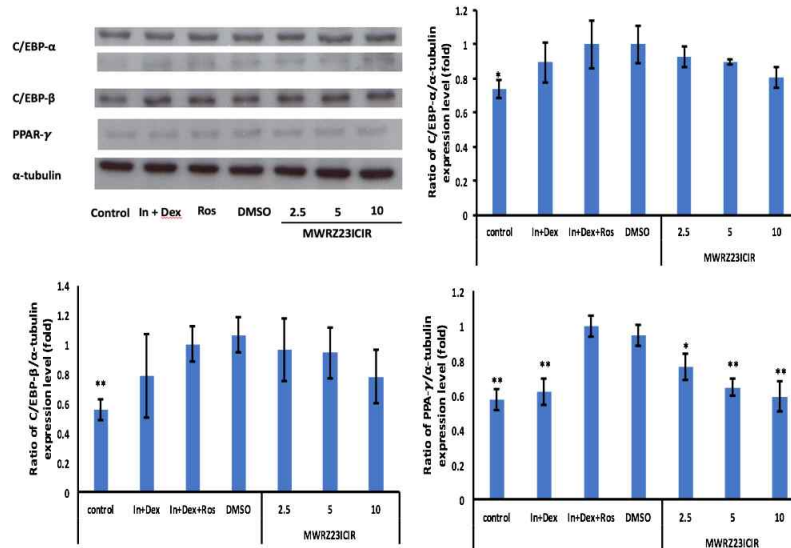


Figure 19. MWRZ23ICIR inhibited expression of PPAR-  $\alpha$  at the time point of 24 hrs. After treatment with MWRZ23ICIR for 24 hrs in differentiation medium, total proteins were extracted using RIPA buffer, and analysis by Western Blot, the results showed that MWRZ23ICIR inhibited expression of PPAR-  $\alpha$  dose-dependently. Values present as mean  $\pm$  SD, \* as  $p<0.05$  DMSO group.

㉞ MWRZ23ICIR순수분리 물질의 8일 후의 지방세포 분화 억제 효과

- 처리 8일 후에 C/EBP- $\beta$ /PPAR- $\gamma$ /A-FABP pathway의 총 단백질을 분석한 결과, MWRZ23ICIR가 C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  및 A-FABP의 발현을 현저하게 억제하였음 (Fig. 20).

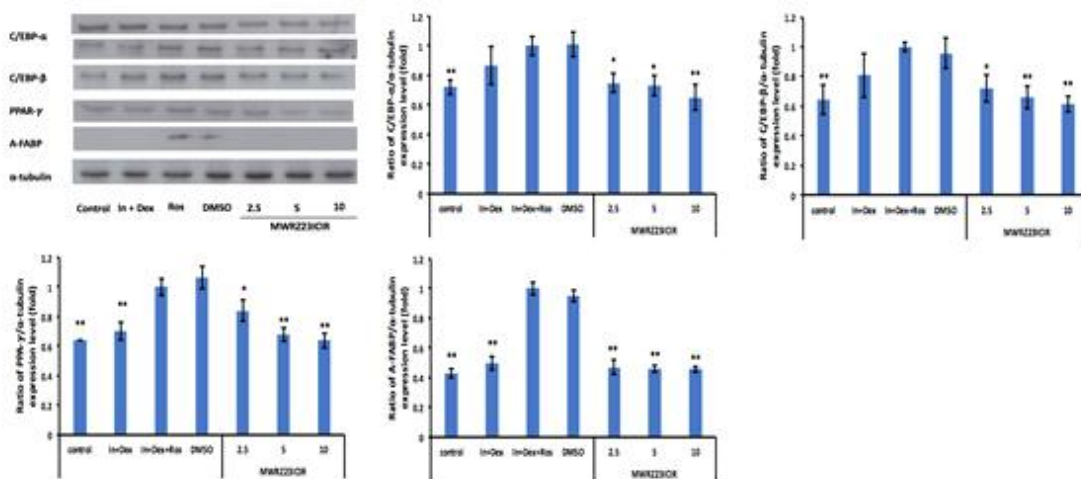


Figure 20. MWRZ23ICIR inhibited expression of PPAR-  $\alpha$  at the time point of 8 days. After treatment with MWRZ23ICIR for 8 days in differentiation medium, total proteins were extracted using RIPA buffer, and analysis by Western Blot, the results showed that MWRZ23ICIR inhibited expression of C/EBP- $\alpha$ , C/EBP-  $\beta$ , PPAR-  $\gamma$  and A-FABP depending on dosage increasing. Values present as mean  $\pm$  SD, \* as  $p<0.05$  vs DMSO group.



(5) 효능분석을 위한 모델동물 확립

① 비만질환 모델동물의 확보 및 모델동물의 대량생산

㉔ 본 실험에 사용된 마우스의 종은 C57BL/6로서 고지방사료에서 비만, 당뇨 및 동맥경화에 감수성이 높고, 비만실험에 사용되는 Zucker rat(fa/fa), C57BL/6 ob/ob 마우스보다 가격이 낮아 항비만 실험에 기본적인 실험과 약물의 비임상 단계에서 실험동물로 널리 사용하고 있는 마우스임. 샘타코에서 구입하여 1주일간의 순화과정을 거친 후, 비만을 유발하기 위하여 고지방식이를 급식하였음. 고지방사료는 Rodent Diet with 60% kcal% fat #D12492 (Research Diets, Inc., New Brunswick, USA)를 이용하였음(Table 5, Fig. 21). 고지방사료는 총 칼로리의 60%가 지방인 사료로서 장기간 급여하는 경우 비만을 유발하게 됨.

Table 5. 고지방사료의 조성

Product #D12492	gm%	kcal%
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
<b>Total kcal/gm</b>	<b>5.24</b>	<b>100</b>

Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
<b>Total</b>	<b>773.85</b>	<b>4057</b>



Figure 21. 고지방 사료

㉔ 샘타코에서 4주령의 C57BL/6 마우스를 구입하여 1주일간의 순화과정을 거친 후, 70마리의 마우스에게 고지방식이를 12주간 자유급식하도록 하여 비만질환 마우스 모델을 생산하였음. 12주간 고지방식이를 급여하고 주 1회 체중 변화량을 측정하였을 때, 9주부터 일반식이를 급여한 마우스에 비하여 유의적인 체중 증가를 확인할 수 있었으며 외관상 마우스의 모습에서도 체중 증가를 육안으로 확인할 수 있었음(Fig. 22, 23).

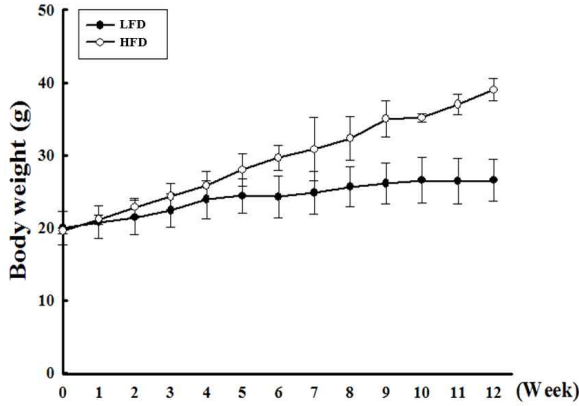


Figure 22. 일반식이 군과 고지방식이 군의 체중 변화

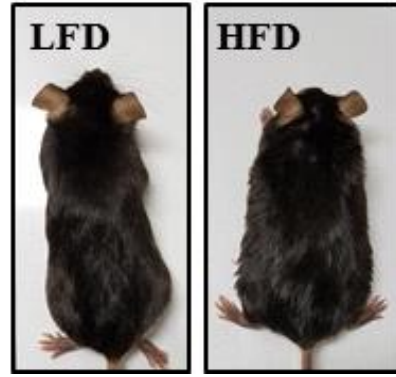


Figure 23. 12주간 일반식이를 급여한 군과 고지방식이를 급여한 군의 마우스

② 비만질환 유발조건 및 기초 생리자료 확보

㉞ 비만 질환 마우스 모델 유발 조건

Table 6. 비만 질환 마우스 모델 유발 조건

동물명	주령(체중)	성별	사료	급식기간	체중 증가율
C57BL/6N	5주령 (20g)	수컷	Rodent Diet with 60% kcal% fat	12주	200%

㉞ 비만질환 모델동물의 이 섭취량 및 식이 효율

- 비만이 유발된 C57BL.6 마우스의 기초 생리자료를 확보하기 위하여 매주 수요일 오전 10시에 식이 섭취량과 체중을 측정하여 식이효율을 측정하였음. 식이효율은 체중 증가량/식이 섭취량으로 계산하였음. 고지방식이는 일반식이에 비하여 칼로리의 함량이 높아 섭취하는 중량이 일반식이에 비하여 낮게 측정되었음(Fig. 24). 식이효율은 고지방식이 군에서 일반식이 군보다 높았음(Fig. 25).

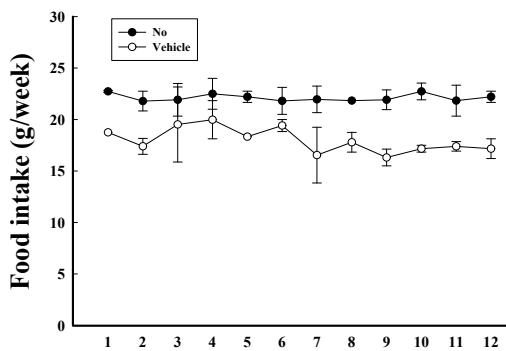


Figure 24. 12주간 고지방식이를 급여하였을 때 식이섭취량 변화

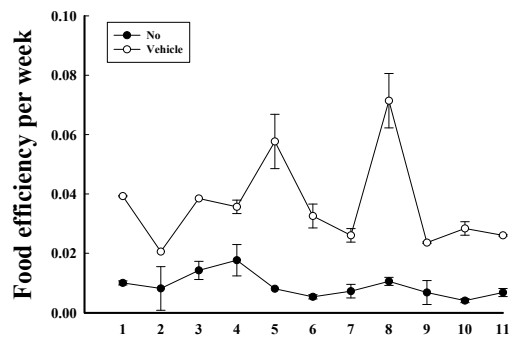


Figure 25. 12주간 고지방식이를 급여하였을 때 식이효율 변화



㉔ 비만질환 모델동물의 복부 지방 및 간 조직의 무게 및 조직학적 변화

- 고지방식이 급여 후 실험동물을 안락사시킨 다음 복부를 절개하여 복부 지방 조직과 간 조직을 적출하고, 생리식염수를 이용하여 혈액 및 이물질을 제거한 다음 무게를 측정하였음. 육안으로도 고지방식이의 복부 지방량의 증가를 확인할 수 있었으며(Fig. 26) 복부 지방 조직 무게/체중, 간 조직 무게/체중으로 나타내어 일반식이와 고지방식이간의 복부지방과 간 조직의 중량 차이를 비교한 결과 고지방식이를 급여한 그룹에서 지방과 간 무게 모두 증가하였음(Fig. 27).



Figure 26. 12주간 일반식이를 급여한 군과 고지방식이를 급여한 군의 마우스의 복부지방

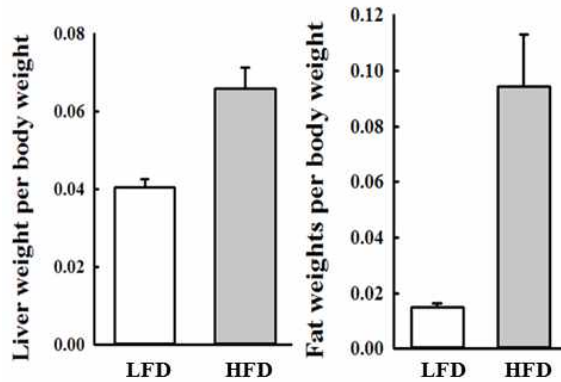


Figure 27. 12주간 일반식이를 급여한 군과 고지방식이를 급여한 군의 마우스의 체중 당 간, 체중 당 지방무게

- 채취한 mouse의 복부 지방조직을 H&E 염색 후 현미경으로 관찰한 결과, 고지방 식이 군에서 복부 지방조직의 지방세포 크기가 일반식이군과 비교하여 현저히 증가하였음(Fig. 28).

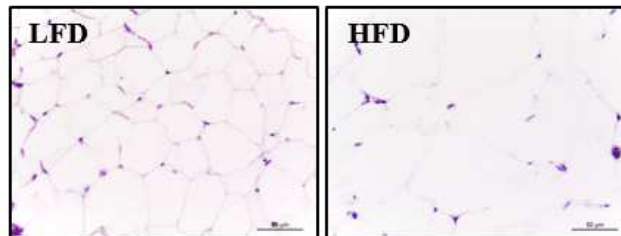


Figure 28. 12주간 일반식이를 급여한 군과 고지방식이를 급여한 군의 마우스의 복부지방의 조직학적인 변화

㉕ 비만질환 모델동물의 혈액에서의 생화학적 비만 지표 인자 변화

- 안락사 후 복부대정맥에서 혈액을 채취하여 간, 신장 독성 지표들의 변화를 조사하기 위해 혈청을 분석한 결과 ALP, BUN의 수치에서는 고지방식으로 인한 변화는 관찰되지 않았으나 ALT, AST, Crea의 수치에서 증가하는 경향을 나타내었음(Fig. 29).

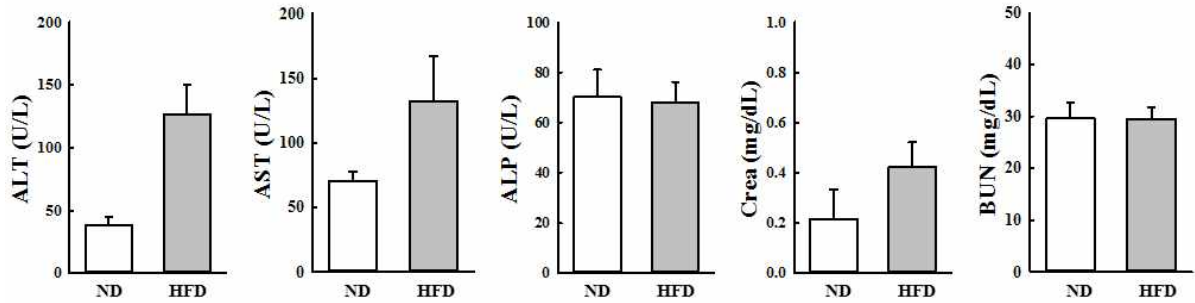


Figure 29. 12주간 일반식이를 급여한 군과 고지방식이를 급여한 군의 혈액에서 간, 신장 독성 지표변화

- 안락사 후 복부대정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분석한 결과 total cholesterol, HDL, LDL, TG, TC, Glucose 수치가 일반식이에 비하여 고지방식이 군에서 높아졌음 (Fig. 30). 이와 같은 결과는 일반적으로 포화지방산이 많이 함유된 동물성지방의 섭취 결과로 혈중 콜레스테롤 농도가 증가되는 연구결과와 일치함.

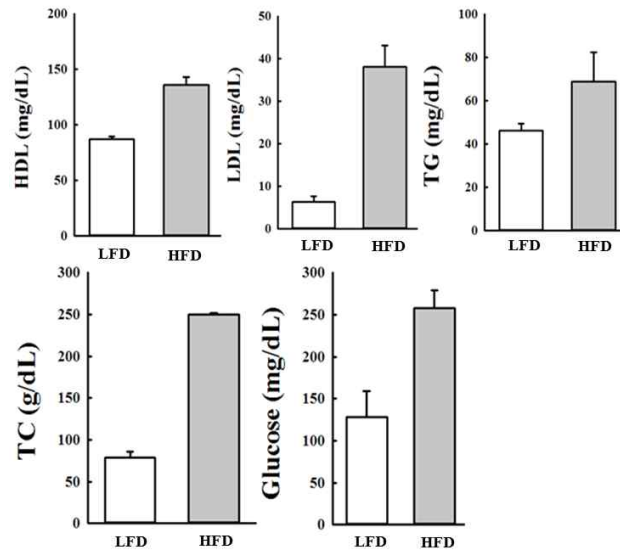


Figure 30. 12주간 일반식이를 급여한 군과 고지방식이를 급여한 군의 마우스의 혈청에서 생화학적 변화

- 위 결과로 보아, HFD를 12주간 C57BL/6 마우스에 급여하여 비만이 유도되었다는 것을 확인하였고 발효 빵나무 추출물의 효능을 분석하는 모델동물로 이용하였음.

(6) *In vivo* 생리활성 효능

① 모델동물을 활용한 발효빵나무추출물(4M3-95)의 생리활성(항비만)효능 분석

㉠ 4M3-95

- 제1협동으로부터 제공받은 발효빵나무 추출물 시료 중, primary 세포를 이용하여 lipolysis 효과 확인을 통해 screening 진행 후, 가장 효과가 좋다고 판단된 4M3-95 물질로 동물실험을 진행하였음. 실험동물은 4주령의 마우스를 수령하여 1주일 동안 환경에 적응시킨 후, 4주령이 되었을 때에 일반식이(4% fat diet)를 공급하는 ND 그룹, 고지방식이를 공급하는 HFD 그룹으로 나누었음. HFD 그룹은 vehicle로 Olive Oil + 1% DMSO를 투여하는 그룹과 고지방식이를 공급하면서 빵나무 추출물 (4M3-95)을 투여하는 그룹으로 나누어 12주간 고지방식이를 급여하였고(Fig. 31), 주 5회 빵나무 추출물을 경구투여하였으며 주 1회 식이섭취량과 체중을 확인하였음(Fig. 32). 실험은 12 주간 진행 후, 마취하고 혈액 채취 및 지방, 간 조직을 적출하였음.



Figure 31. 항비만 효능연구를 위한 경구투여      Figure 32. 마우스의 체중측정

- 발효 빵나무 추출물이 비만이 유발된 마우스에서 체중에 미치는 변화에 대해 분석하기 위해 매 주 수요일 오전 10시에 체중을 측정하였음. 고지방식이 급여 군은 일반식이 급여 군에 비하여 유의성 있게 증가하였으나 추출물과 Vehicle은 체중에서는 큰 변화를 나타내지 않았음(Fig. 33). 육안으로 관찰한 mouse의 외관 또한 일반식이 군에 비하여 고지방식이 군에서 체중 증가를 확인 할 수 있었고 Vehicle 과 4M3-95투여 군에서 큰 차이가 나타나지 않았음(Fig. 34).

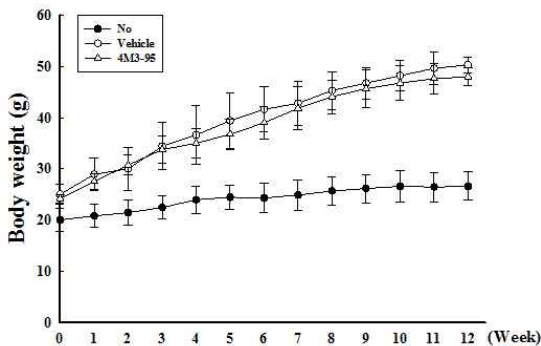


Figure 33. 12주간 4M3-95의 경구투여에 따른 체중변화



Figure 34. 12주간 4M3-95를 경구투여한 마우스

- 4M3-95의 장기간 섭취가 체지방 축적 및 지방간 형성 억제를 동반하는지 확인하기 위하여 체지방의 무게와 간의 무게를 측정하였음. 그 결과, 체지방 무게는 HFD 그룹이 No 그룹에 비하여 유의적으로 증가하였고, 4M3-95투여 그룹은 Vehicle에 비하여 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 지방 축적억제에 소량 효과가 있음을 확인 할 수 있었음. 체중 당 간의 무게는 HFD 그룹이 No 그룹에 비하여 유의적으로 증가하였을 뿐만 아니라 4M3-95투여 그룹은 Vehicle에 비하여 유의적으로 감소하였음.
- 4M3-95는 복부 내장지방의 증가를 억제시켰으며, 지방간에 의해 증가된 간의 무게가 4M3-95의 투여로서 간의 무게가 일반식이 군과 유사할 정도로 회복시켰음. 따라서 4M3-95의 지속적인 투여가 지방량을 감소시키는 것으로 사료됨(Fig. 35, 36).



Figure 35. 12주 동안 4M3-95를 경구투여한 마우스의 복부 지방량 변화

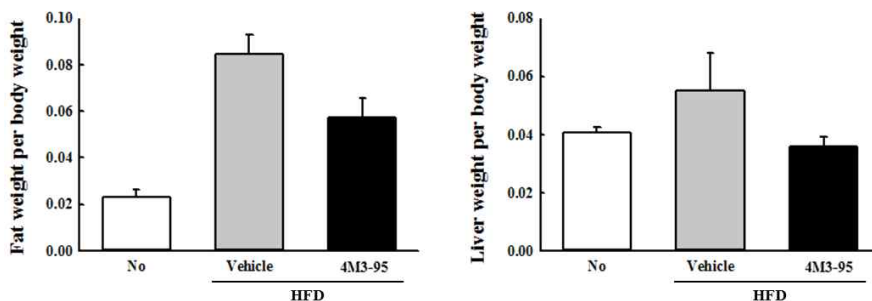


Figure 36. 12 주 동안 4M3-95를 경구투여 한 마우스의 체중 당 지방, 체중 당 간 무게의 변화

- 채취한 혈액은 혈청분리튜브(BD)에 넣은 후, 원심분리 (2000×g, 15 min)하여 혈청을 분리하였음. 분리한 혈청은 automatic serum analyzer (HITACHI 747, Tokyo, Japan)을 이용하여 비만지표인자들인 total cholesterol, triglyceride, glucose, low density lipoprotein, high density lipoprotein을 분석하였음. Cholesterol은 세포막을 생성하고 유지하는데 필수적인 성분으로 세포내 수송, 세포신호전달, 신경전도 등에 중요한 역할을 수행함. 체내에서 대부분의 cholesterol은 혈류에 녹지 않으며, 지단백질에 의해 운반됨. 혈액에 있는 지질 단백질은 chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), intermediate density lipoprotein (IDL), high density lipoprotein (HDL)등이 있고, 혈중 cholesterol의 증가는 동맥경화, 심장병, 심근경색 등의 원인이 됨. 이러한 cholesterol은 혈중지질농도의 감소와 밀접한 관계가 있음.

- Total cholesterol은 LDL, HDL, triglyceride (TG)로 구성됨. Low density lipoprotein (LDL) 과 High density lipoprotein (HDL)은 Triglyceride (TG)의 운송 lipoprotein이며 TG는 지방의 최종 저장 형태로서 음식물로부터 흡수되거나 간과 소장에서 지방산으로부터 합성되어 체내 TG의 저장에 기여하게 됨.
- 본 연구 결과에서는 4M3-95 투여에 따라 LDL가 Vehicle 그룹에 비해 유의적인 감소를 보였으며, TC, Glucose가 Vehicle 그룹에 비하여 소량 감소하였음. TG의 양은 특별한 변화가 나타나지 않았으며 HDL에서 소량 증가하였음(Fig. 37).

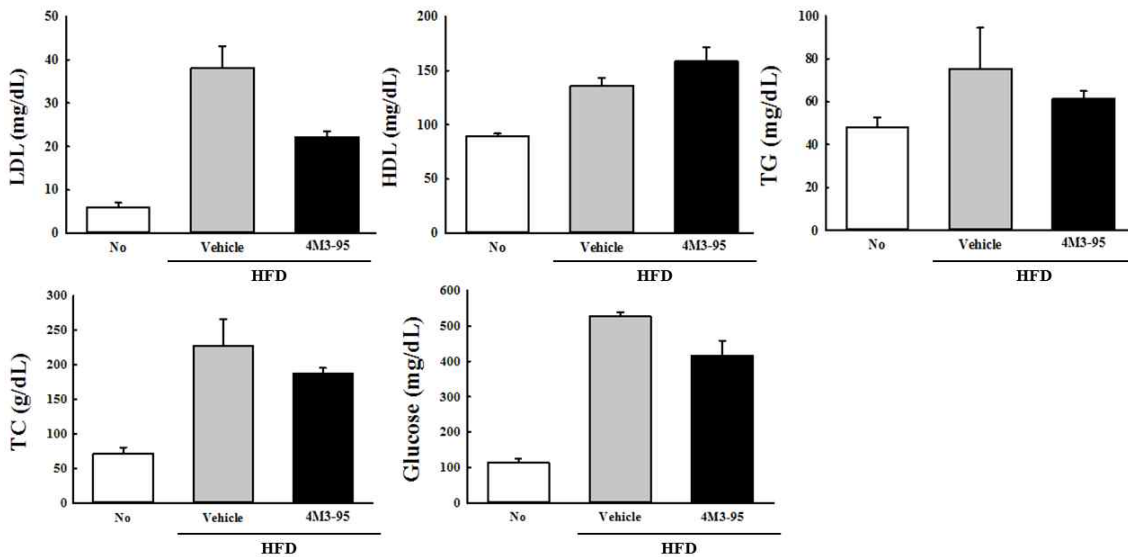


Figure 37. 12 주간 4M3-95의 경구투여에 따른 혈청학적 지표 변화

② 비만질환의 발병기전에 미치는 뽕나무의 작용기전 분석 및 연구

㉠ 발효 뽕나무 추출물의 adipogenesis 관련 전사 인자에 미치는 영향

- 일반적으로 소비하는 에너지의 양 보다 섭취한 에너지의 양이 많은 경우, 잉여 에너지는 TG의 형태로 지방세포에 축적되게 됨. 그 과정은 지방을 저장할 수 있는 지방 세포의 수가 증가하는 과정(adipogenesis)으로 인한 hyperplasia와 지방 안에 TG가 축적되는 과정(lipogenesis)으로 인한 hypertrophy가 유발됨. 우선 adipogenesis 과정은 glucose, insulin 등과 같은 adipogenic factor에 의해 전사인자인 C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ 의 발현량이 늘어나게 되고, 그로인해 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 양이 증가하게 되며 지방세포의 증식이 일어나게 됨. 따라서 HFD로 유도된 비만 마우스에서는 과도한 에너지 섭취로 인하여 adipogenesis 관련 전사인자들의 발현량이 증가하게 되며 지방세포의 수가 증가하게 됨.
- 간 조직으로부터 RNA를 분리하여 qPCR을 통해 adipogenesis와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하고자 하였음. 12 주간의 투여 후 마취하여 PBS를 이용하여 관류를 진행하였음. 이후 간 조직을 적출한 뒤 PBS에 세척하였고 액체 질소에 급속냉동 후 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였음. 마우스의 간 조직 50 mg을 적출하여 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였음. RNA Bee zol에 포함된 RNA는 chloroform을 이용하여 추출한 후

isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였음. 분리된 전체 RNA는 nanodrop (Allsehng, china)을 이용하여 양을 측정하고 1 µg을 RT 반응에 사용하였음. RT 반응은 RNA에 Oligo dT (invitrogen, 18418-012)를 처리하고, 70°C에서 10분 동안 반응하여 Oligo dT를 RNA에 결합시킨 뒤 5× 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II (invitrogen, 8064'014, 200 U/µl)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 42°C에서 50분 동안 RT 반응을 수행하였음. RT 반응이 끝나면 RNaseH (invitrogen, 18021-071)를 처리하여 37°C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해함. 합성된 cDNA를 주형으로 qPCR으로 실시함.

- qPCR은 특정 primer가 포함된 cDNA template (2 µl),와 2× Power SYBR Green (6 µl; Toyobo Co., Osaka, Japan)을 처리하여 지방대사 관련 유전자에 영향을 알아보기 위해 시행하였음. PPAR-γ의 primer는 F: 5' - GAG TTC ATG CTT GTG AAG GAT GCA AGG - 3', R: 5' - CAT ACT CTG TGA TCT CTT GCA CG - 3', C/EBPα의 primer는 F: 5' - GTG GAC AAG AAC AGC AAC GAG TAC C - 3', R: 5' - GGA ATC TCC TAG TCC TGG CTT GC - 3'를 이용하였음. qPCR은 95 °C에서 15초 동안 변성시킨 후 70 °C에서 60초간 annealing과 extension을 진행하였음. 형광 강도는 각 사이클의 연장 단계의 끝에서 측정되었고 모든 샘플의 형광 강도에 대한 임계값은 수동으로 설정되었음. PCR의 산물이 PCR 증폭의 지수상 동안이 형광 강도 문턱 값을 초과하는 반응 사이클을 임계주기 (Cq)로 간주하였음. 표적 유전자의 발현은 Livak과 Schmittgen의 방법에 따라 일정한 형광 강도에서 Cqs의 비교에 근거하여 housekeeping 유전자인 β-actin의 발현에 비례하여 정량화하였음.
- 그 결과, PPAR-γ는 고지방식이 급여에 따라 발현량이 증가하였으나 4M3-95 물질의 투여로 발현량이 감소하였음. 반면 C/EBPα는 고지방식이 급여로 인해 소량 증가하였고 4M3-95 물질 투여에 따라 발현량이 감소하였으나 그 발현량의 차이에 유의성은 없었음(Fig. 38). 즉, 4M3-95는 PPAR-γ의 발현량을 억제시키는 효과는 있으나 C/EBPα에 대한 발현량 억제 효과는 없었음.

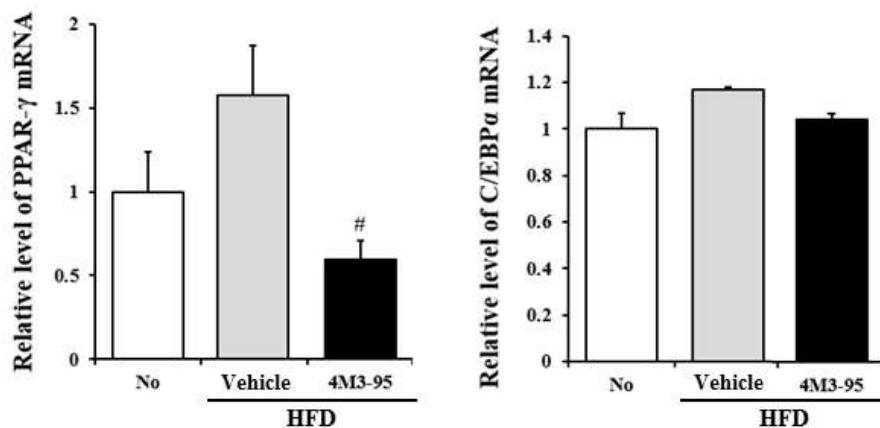


Figure 38. 12 주간의 4M3-95 물질의 경구투여에 따른 간에서 Adipogenesis 관련 인자들의 발현량 변화



㉔ 발효 뽕나무 추출물의 lipogenesis 관련 전사 인자에 미치는 영향

- Lipogenesis란 acetyl-CoA가 TG로 변환되는 과정을 의미한다. aP2 (adipocyte protein 2)는 세포 밖에 존재하던 free fatty acid (FFA)를 지방세포 안으로 수송시켜주는데 중요한 역할을 하며 aP2에 의해 세포 안으로 수송된 FFA는 세포내 대사작용에 의해 acyl-CoA로 변환되며 Lipogenesis 과정에 의해 TG가 생성되고 adipocyte 내의 lipid pool에 축적됨.
- 4M3-95의 lipogenesis에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간에서 RNA를 분리해 qPCR을 진행하였음. aP2와 FAS 모두 HFD 급여에 의해 증가하였다가 4M3-95의 투여로 인해 감소하였음(Fig. 39).

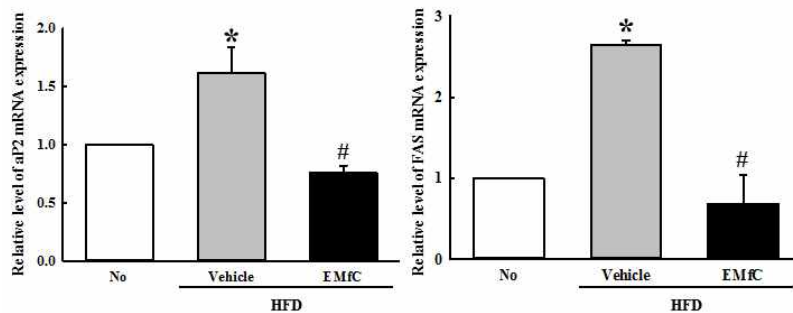
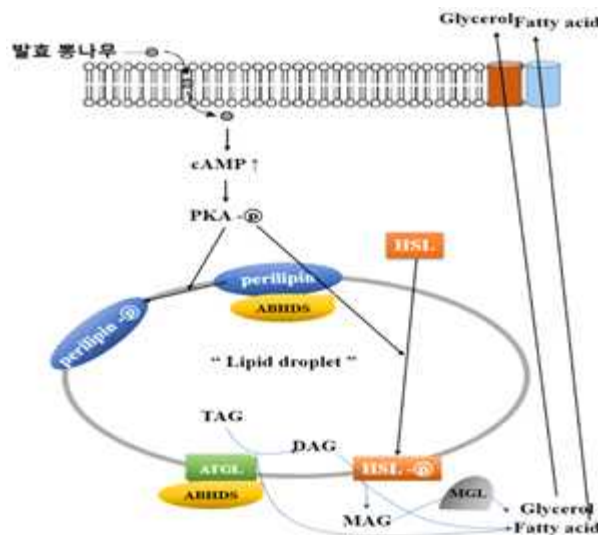


Figure 39. 12주간 4M3-95 물질의 경구투여에 따른 간에서 lipogenesis 관련 인자들의 발현량 변화

㉔ 발효 뽕나무의 Lipolysis 관련 단백질들의 발현량에 미치는 영향

- Lipolysis는 지방세포 안에 TG의 형태로 축적되어 있던 지방의 형태가 ATGL, HSL, MGL 등의 lipase 작용으로 인해 glycerol과 fatty acid로 분해되는 과정을 의미함. 평소 지방세포의 지방구는 perilipin이라는 단백질로 둘러싸여있어 lipase의 출입을 막고 있음. 그러나 adrenergic agonist가 adrenal receptor에 작용함으로써 cAMP 양이 증가하게 되고 PKA의 phosphorylation으로 인해 perilipin 단백질이 phosphorylation이 됨에 따라 lipase의 출입을 가능하게 하고 지방구에 저장되어있던 TG가 분해됨(Fig. 40).



- 간 조직을 50 mg 정량하여, PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리함. 분리된 단백질의 농도는 BCA protein assay kit (Thermo, USA)를 이용하여 정량하고, 30 µg의 단백질을 western blot에 사용하였음. 먼저 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간동안 blocking 하였고 각 membrane은 actin, perilipin, p-perilipin, HSL, p-HSL, ATGL (cell signaling)의 1차 항체로 4°C에서 12 시간 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였음.
- 4M3-95의 투여에 따른 lipolysis 관련 protein의 발현량을 확인하고자 Western blot을 실시한 결과 고지방식이에 의해 비만이 유도된 마우스에서 TG의 함량이 높아짐에 따라 TG의 항상성 유지를 위하여 lipolysis 관련 protein의 발현이 증가하였고, 4M3-95 투여한 군에서는 protein의 발현량이 감소하였음을 통해, 축적된 TG의 양이 적다고 사료됨 (Fig. 41).
- Lipolysis 관련 protein들의 phosphorylation에 대한 변화는 다음과 같음. 고지방식이에 의하여 TG의 항상성 조절을 위하여 증가된 perilipin의 phosphorylation이 4M3-95 투여로 인하여 더욱 촉진되어 지방구 안으로 lipase들이 작용할 수 있게 하였음. 반면 HSL의 phosphorylation은 일반식이에서보다 고지방식이에서 발현양이 감소하고, 4M3-95 투여에 따라 더욱 증가하는 경향을 나타내었음(Fig. 42).
- 따라서, 2차년도 실험결과를 종합해서 작용기전을 정리하면 발효빵나무 추출물은 PPAR $\gamma$  mRNA의 전사량을 감소하여 adipogenesis 과정을 억제함으로써 항비만 효과를 나타내는 것으로 사료됨(Fig. 43).
- 또한, 발효빵나무 추출물은 aP2와 FAS 단백질의 발현량을 감소시킴으로써 lipogenesis 과정을 억제하여 항비만효과를 유도하는 것으로 사료됨(Fig. 44).
- 더불어 발효빵나무 추출물은 cAMP의 양을 증가시켜 perilipin과 HSL 단백질을 phosphorylation 시키고 ATGL 단백질 합성을 증가시킴으로써 lipid droplet의 TG를 glycerol과 fatty acid로 분해시켜 lipolysis를 촉진시키는 것으로 사료됨(Fig. 45).

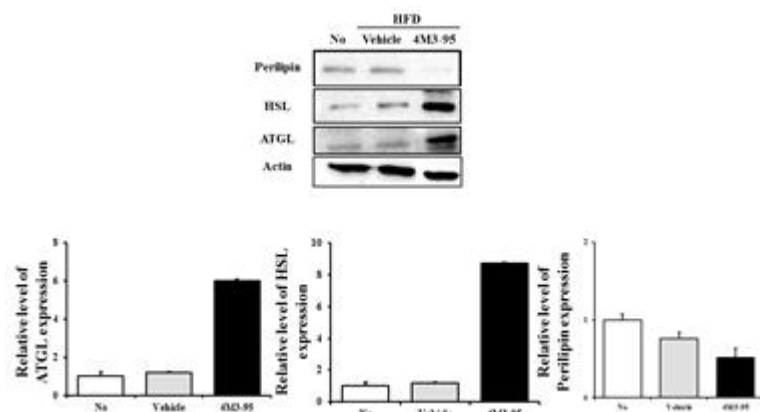


Figure 41. 12주간의 4M3-95물질의 경구투여에 따른 지방 분해 단백질의 발현 변화



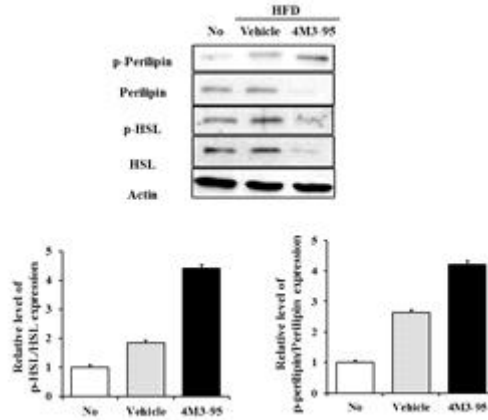


Figure 42. 12주간의 4M3-95 물질의 경구투여에 따른 지방 분해 단백질의 phosphorylation 변화

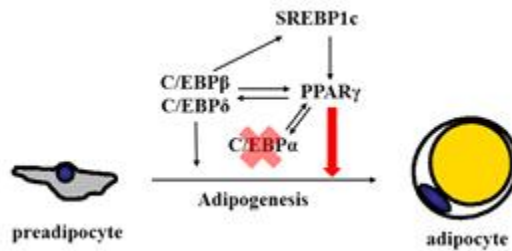


Figure 43. 4M3-95의 anti-adipogenesis mechanism

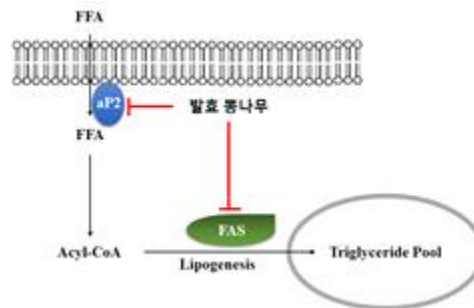


Figure 44. 4M3-95의 anti-lipogenesis mechanism

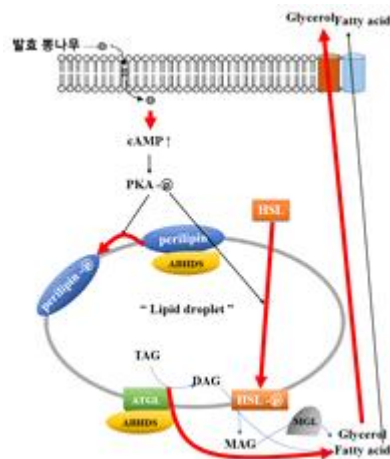


Figure 45. 4M3-95의 lipolysis mechanism

③ 지방조직 등의 조직학적 특성 분석

㉔ 4M3-95

- 채취한 지방 조직 및 간 조직은 7:3으로 나누어 protein 및 RNA 추출을 위한 냉동보관용과, 파라핀 section 용으로 나누었음. 냉동보관용은 채취 직후 액체질소에 넣어 동결시킨 후 -80℃에 보관하였음. 파라핀 section용 지방 조직 및 간 조직들은 10% neutral formalin 용액에서 고정 후, 적절한 크기로 절단하여 카세트에 넣고 조직처리기(Thermo Shandon Ltd., Thermo Fisher Scientific, UK)로 에탄올 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1~2시간 처리 후 xylene으로 4시간, paraffin에서 4시간 처리하였음. 이후 조직은 paraffin embedding station (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GmbH, Nussloch, Germany)로 4 μm 두께로 박절하였음. 박절한 조직은 H&E (Sigma-Aldrich co.)로 염색하고, 지방세포의 크기 및 지방간 상태 등을 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였음. HFD+Vehicle 그룹의 간 조직과 No 그룹의 간 조직을 비교하였을 때 고지방식으로 인해 간에서 지방구가 중심정맥을 중심으로 보였음. 12주간 4M3-95를 장기간 경구투여 한 후 간의 조직변화에서는 지방구의 수가 줄어들고 고지방식으로 인해 macrovesicular 단계까지 진행되었던 지방간이 microvesicular 지방간 단계까지만 진행되었음(Fig. 46).
- 지방 조직에서 adipocyte의 크기 변화를 통하여 4M3-95 물질의 지방 축적억제 효과를 확인하였을 때 고지방식으로 인해 adipocyte의 크기가 증가하였던 변화가 4M3-95의 장기투여를 통해 감소하였음. ImageJ 프로그램을 통해 그룹 별 adipocyte의 크기를 5회 측정하여 평균낸 결과를 통해서도 같은 결과를 나타내었음(Fig. 47).

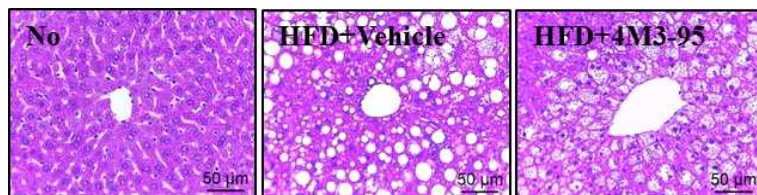


Figure 46. 4M3-95의 투여로 인한 간의 조직학적 변화

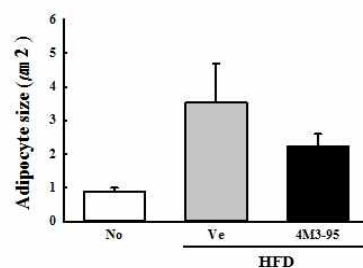


Figure 47. 4M3-95의 투여로 인한 복부 지방의 조직학적 변화

④ 빵나무와 다른 기능성 물질의 효능비교 분석

- 빵나무의 다른 기능성 물질을 효능 비교하기 위하여 현재 시중에 판매되고 있는 항비만 치료제인 Orlistat을 이용하여 동물실험을 진행하였음. Orlistat은 췌장 리파아제 작용 억제제로서 지방을 섭취하였을 때 지방은 분자량이 크기 때문에 그 자체로 흡수되지 않고 췌장의 담즙에 있는 리파아제를 통해 유화작용이 일어나 TG가 glycerol 과 fatty acid로 분해되어 소장으로 흡수됨. Orlistat은 이 췌장 리파아제에 결합하여 TG의 glycerol과 fatty acid로의 분해를 억제시켜 지방의 흡수를 막아 체중 증가를 억제하는 효과를 가지고 있는 약물임 (Fig. 48).

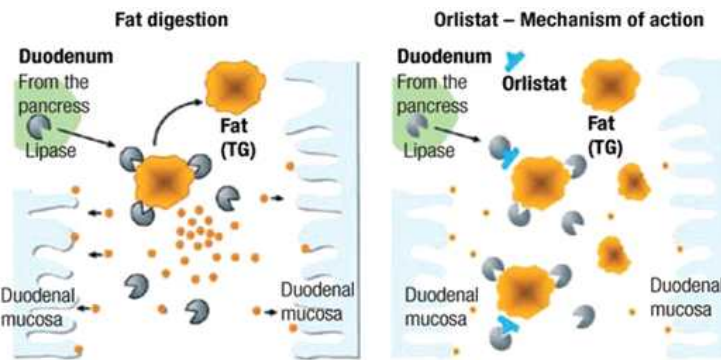


Figure 48. Orlistat의 작용기전

- FDA 승인을 받고 비만 환자들에게 투여되고 있는 많은 약물들이 있지만 대부분 주사제로 투여하는 경우가 많고, 본 연구에서는 4M3-95 경구투여시의 항비만 효과에 대해 조사하고자 하였으므로 orlistat을 효능비교 약물로 선택하였음.
- 동물실험은 샘타코에서 C57BL/6 마우스 7주령을 주문하였고 1주일 순화 후 8주령부터 진행하였음. 12주간 고지방식이를 급여하여 비만 마우스모델을 생산하였으며, 그와 동시에 Vehicle 그룹으로서 Olive Oil + 1% DMSO 경구투여그룹, Orlistat (10 mg/ml) 경구투여 그룹, 4M3-95 (50 mg/ml) 경구투여그룹으로 나누었음. 주 5회 orlistat 및 4M3-95를 경구 투여 하였으며 주 1회 식이섭취량과 체중을 확인하였음. 실험은 12 주간 진행 후, 마취하고 혈액 채취 및 지방, 간 조직을 적출하였음.
- 12주간의 투여 기간 동안의 체중 변화를 나타내었음. 고지방식이 급여에 따라 일반식이 군에 비하여 유의적인 체중증가를 나타내었으며 Orlistat투여 그룹이나 4M3-95 투여 그룹에서는 큰 체중 감소는 일어나지 않았으나 소량의 체중감소를 확인하였음(Fig. 49).
- Fig. 50은 투여 12 주간의 식이효율을 비교한 그래프이며, 식이효율은 식이섭취량/체중증가량 으로 계산하였음.

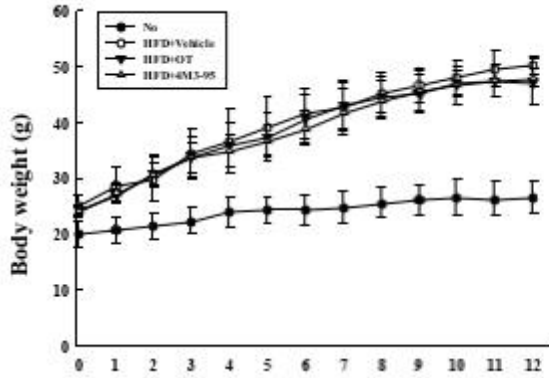


Figure 49. 물질 투여에 따른 체중변화

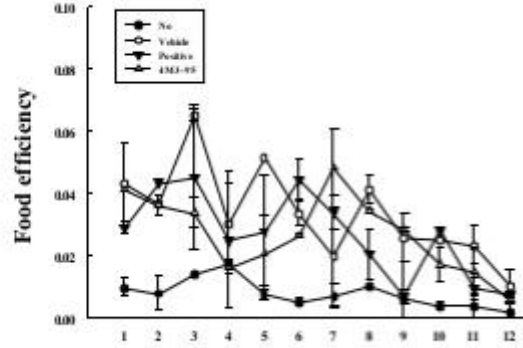


Figure 50. 물질 투여에 따른 식이효율 변화

- 12주간의 물질 투여 후 복부 지방을 채취하여 확인한 결과 고지방식이로 인해 복부 지방의 양이 무게도 증가하였으며 육안으로도 관찰할 수 있었음. 또한 orlistat이나 4M3-95의 물질 투여로 인해 지방의 양은 유의적으로는 감소하지 않았으나 소량 감소하는 경향을 나타내었음. 고지방식이를 급여하였을 때 지방간의 진행으로 간의 무게가 증가하였으며 orlistat, 4M3-95 모두 정상 수준까지 회복하는 경향을 나타내었으나, 신장의 무게에는 변화를 관찰할 수 없었음(Fig. 51).

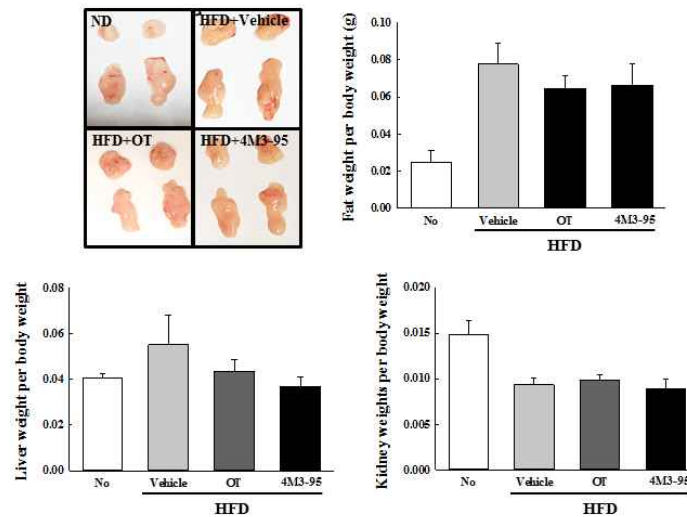


Figure 51. 물질 투여에 따른 간, 지방 조직의 변화

- Orlistat과 4M3-95의 장기 투여에 따른 비만 마우스모델에서 혈청학적 변화를 알아보기 위하여 12주간의 경구 투여 이후 마취하여 혈액을 채취하였고 혈청분리튜브(BD)에 넣은 후, 원심분리 (2000×g, 15 min)하여 혈청을 분리하였음. 분리한 혈청은 automatic serum analyzer (HITACHI 747, Tokyo, Japan)을 이용하여 비만지표인자들인 total cholesterol, triglyceride, glucose, low density lipoprotein, high density lipoprotein을 분석하였음.

- TG의 양에서는 고지방식이 군 간에 유의적인 변화가 없었으나 고지방식이로 인해 증가하였던 LDL의 양이 orlistat과 4M3-95의 투여로 유의적이게 감소하며 변화가 가장 크게 나타났음. 4M3-95는 기능성 물질인 orlistat보다는 감소량이 적으나 vehicle 그룹에 비하여 유의

적으로 감소하였음. HDL은 고지방식이의 급여로 인해 고지방식이 군에서 모두 일반식이군보다 HDL의 증가를 나타내었으며 OT보다 4M3-95의 증가량이 소량 더 증가했음. TC와 glucose의 양 또한 고지방식이의 급여로 인해 일반식이군보다 증가하였고 orlistat은 vehicle 그룹에 비교하여 유의적으로 감소하였으며 4M3-95는 유의적인 감소는 아니지만 소량 감소하였음(Fig. 52).

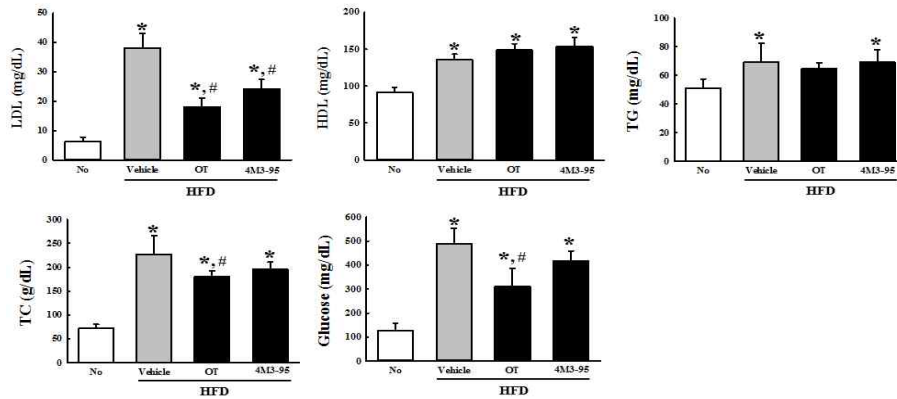


Figure 52. 물질 투여에 따른 혈청에서의 생화학적 지표 변화

- 조직에서 orlistat과 4M3-95의 장기간 경구투여로 인한 항비만 효과를 비교하기 위해 채취한 지방 조직 및 간 조직은 7:3으로 나누어 protein 및 RNA 추출을 위한 냉동보관용과, 파라핀 section용으로 나누었음. 냉동보관용은 채취 직후 액체질소에 넣어 동결시킨 후 -80°C에 보관하였다. 파라핀 section용 지방 조직 및 간 조직들은 10% neutral formalin 용액에서 고정 후, 적절한 크기로 절단하여 카세트에 넣고 조직처리기(Thermo Shandon Ltd., Thermo Fisher Scientific, UK)로 에탄올 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1~2시간 처리 후 xylene으로 4시간, paraffin에서 4시간 처리하였음. 이후 조직은 paraffin embedding station (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GmbH, Nussloch, Germany)로 4 μm 두께로 박절하였음. 박절한 조직은 H&E (Sigma-Aldrich co.)로 염색하고, 지방세포의 크기 및 지방간 상태 등을 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였음. HFD+Vehicle 그룹의 간 조직과 No 그룹의 간 조직을 비교하였을 때 고지방식으로 인해 간에서 지방구가 중심정맥을 중심으로 보였음. 12주간 orlistat를 장기간 경구투여 한 후 간의 조직변화에서는 지방구의 수가 줄었으며 4M3-95도 orlistat 만큼 지방구가 현저히 줄어들었음(Fig. 53).

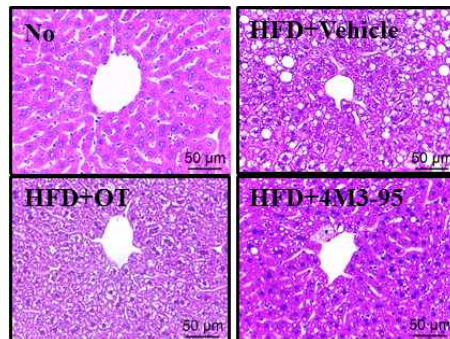


Figure 53. 물질 투여에 따른 간의 조직학적 변화



- 지방 조직의 변화에서도 orlistat과 4M3-95의 지방 축적 억제 효과를 확인할 수 있었으며 지방 세포의 크기 변화를 측정하기 위해 ImageJ 프로그램을 통해 그룹 별 adipocyte의 크기를 5회 측정하여 평균 낸 결과를 통해서도 같은 결과로 4M3-95와 orlistat을 비교하였을 때 orlistat 만큼 지방 세포의 크기가 줄어들어 지방 축적 억제 효과를 나타내었음(Fig. 54).

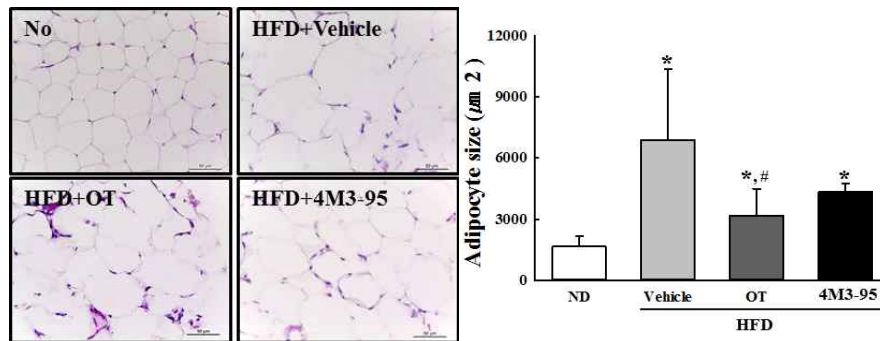


Figure 54. 물질 투여에 따른 지방의 조직학적 변화 및 지방세포의 면적 변화

- 간에서 adipogenesis 관련 전사인자들의 발현량을 비교하기 위하여 RNA Bee zol을 이용하여 RNA를 추출하여 RT PCR로 cDNA를 합성 한 후 qPCR을 통해 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현량을 비교하였음.
- PPAR- $\gamma$ 는 고지방식으로 인해 발현량이 증가하였고, orlistat의 투여로 발현량이 일반식이 급여 군과 비슷한 정도로 발현량이 감소하였으며 4M3-95 투여 군은 orlistat 보다 더 낮은 수치의 발현량을 나타냈음. C/EBP $\alpha$ 의 발현량도 고지방식으로 인해 증가하였고 orlistat으로 인해 그 발현량이 감소하였음. 그러나 4M3-95 투여군에서는 소량 감소하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음(Fig. 55).

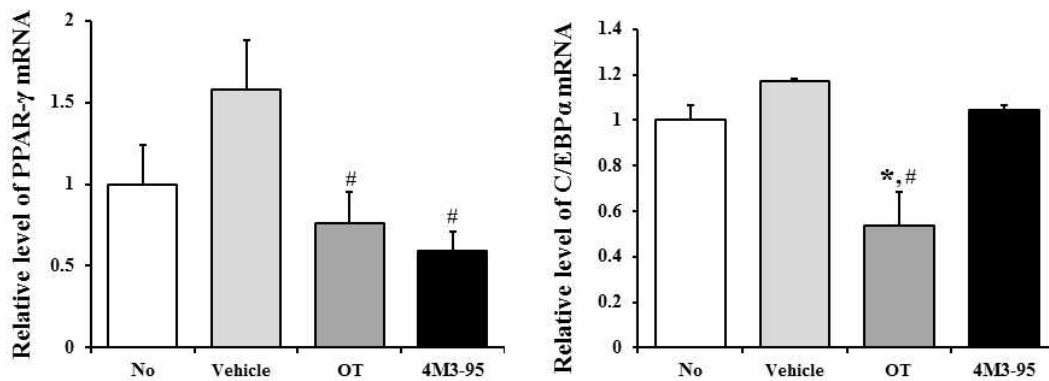


Figure 55. 물질 투여에 따른 adipogenesis 관련 전사인자들의 mRNA 발현량 변화

- Lipolysis 관련 단백질들의 물질투여에 따른 발현량 변화를 알아보기 위해 간 조직에서 PRO-PREP solution을 이용하여 단백질을 추출하여 western blot을 진행하였음. Perilipin, HSL ATGL 모두 고지방식에 의하여 발현량이 증가하였다가 orlistat과 4M3-95의 투여로 발현량이 감소하였음(Fig. 56).

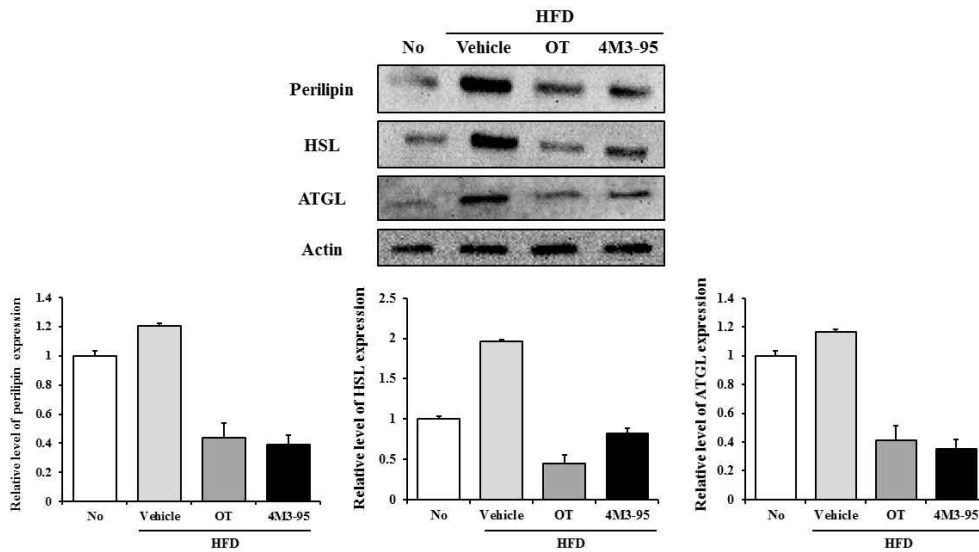


Figure 56. 물질 투여에 따른 lipolysis 단백질들의 발현 변화

- 물질 투여에 따른 lipolysis 단백질들의 phosphorylation 양의 변화를 확인하기 위하여 간 조직에서 PRO-PREP solution을 이용하여 단백질을 추출하여 western blot을 진행하였다. perilipin, HSL의 phosphorylation 양을 확인한 결과 perilipin의 경우 고지방 식이에 의해 증가하였고 orlistat과 4M3-95의 투여로 더욱 인산화 되었으며 4M3-95는 orlistat보다 더 높은 증가량을 나타내었다. HSL은 고지방 식이로 인해 인산화된 HSL의 양이 감소하였고 orlistat과 4M3-95의 투여로 인해 인산화된 HSL의 양이 더욱 감소하였다. 특히 4M3-95의 경우 유의적으로 감소하였다 (Fig. 57).

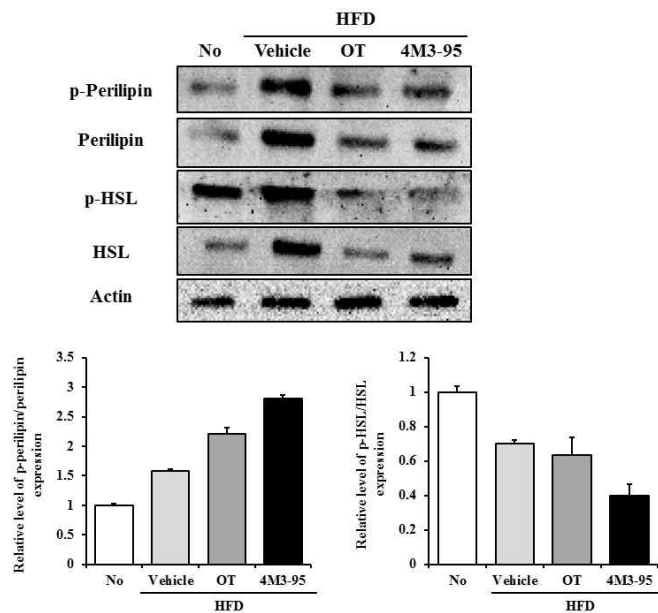


Figure 57. 물질 투여에 따른 lipolysis 단백질들의 phosphorylation 변화

## 다. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

### [요약]

3차년도에서는 주관연구기관은 실험동물을 이용한 단회독성시험과 반복투여독성 시험 결과를 바탕으로 체지방감소 기능성 확보를 위한 복합원료 연구 및 체지방감소 기능성을 가지는 건강기능식품의 제품개발을 수행하였음. 제1협동과제에서 발효과정에서 생성되는 지표성분을 기반으로 기능성물질의 분리와 생물전환기술의 기반을 마련하였으며, 제2협동과제에서는 뽕나무를 이용하여 제조된 추출물의 약리효능작용을 평가하고 그 작용기전을 비만모델 동물과 지방세포주를 이용하여 분석하였음. 이를 통하여 대량생산된 뽕나무추출물이 항비만 제품으로서 작용기전을 제시하고, 대량생산을 통한 제품화와 식약처 허가를 위한 기반을 확립하였음.

### (1) 체지방감소 기능성 확보를 위한 복합원료 연구

#### (가) 체지방감소 기능성 복합원료 개발

##### ① 개요

건강기능식품은 단일원료 뿐만 아니라 여러 가지 원료들의 배합을 통한 개발도 가능하므로, 발효뽕잎추출물 자체의 항비만 효과 뿐 아니라 항비만 원료로 알려진 다른 기능성 원료들을 이용하여 최적의 배합원료를 개발하고자 함.

기존의 자료 검색을 통해 각 원료의 작용기전을 분류하고, 작용기전이 유사할 경우 적은 양으로 동일 효과를 나타내는 원료를 우선 선정, 작용기전이 다를 경우 무조건 선정하는 원칙으로 배합 물질을 구성하고자 함.

##### ② 원료 리스트

##### ㉠ 발효뽕잎추출물

##### ㉡ 새싹보리추출물

##### ㉢ 녹차추출물

##### ㉣ 미역추출물

##### ㉤ 발아콩배아추출물

##### ㉥ 백편두추출물



(나) 각 원료에 대한 항비만 효과

① 발효빵잎추출물

㉠ 유효성분 및 함유량

- 과거 빵잎은 주로 양잠산업용 누에의 먹이로 이용해 왔으나, 양잠산업이 활기를 잃자 빵잎, 열매, 껍질 및 뿌리 등을 식·의약용 소재로 활용하기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있으며, 특히, 빵잎에 함유된 다양한 생리활성물질을 활용하기 위한 연구들이 많이 이루어지고 있음.
- 빵잎은  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)와 rutin의 함량이 높고, 이들 성분에 의해 항암, 항염, 항산화, 항고지혈증 및 혈압조절, 그리고 체중조절에 효과가 있음이 알려져 있음.
- GABA와 rutin은 특히, 빵잎을 발효 했을 때 그 함량이 더 높아지는데 발효 시간별로 변화하는 GABA와 rutin의 함량은 Fig. 58과 Fig. 59에 정리되어 있음.

샘플(Sample)	수율(Yield) (mg/gDW)	가바 함량( $\mu$ g/gDW)
1. 24h 발효 빵잎	252.3	1398.03 $\pm$ 3.48
2. 10h 발효 빵잎	268.7	425.62 $\pm$ 1.14
3. 첫서리 빵잎	277.0	1346.33 $\pm$ 2.64
4. 빵잎	281.5	Tr(trace amount)
	고형물함량	가바 함량
	Solid content (mg/ml)	GABA content ( $\mu$ g/ml)
5. 빵잎음료	1.7775 (≈71.1mg/40ml)	7.78 $\pm$ 0.64

Figure 58. 발효빵잎 추출물의 GABA 함량

샘플(Sample)	수율(Yield)(mg/gDW)	루틴함량 (Rutin content)( $\mu$ g/gDW)
1. 24h 발효 빵잎	252.3	1047.23 $\pm$ 5.62
2. 10h 발효 빵잎	268.7	1781.91 $\pm$ 2.24
3. 첫서리 빵잎	277.0	1643.14 $\pm$ 2.87
4. 빵잎	281.5	700.32 $\pm$ 2.15
	고형물함량	루틴함량
	(Solid content)(mg/ml)	(Rutin content) ( $\mu$ g/ml)
5. 빵잎음료	1.7775 (≈71.1mg/40ml)	585.47 $\pm$ 1.13

Figure 59. 발효빵잎 추출물의 Rutin 함량

㉔ 세포 실험계

- 세포이름 : 3T3-L1

- 단일 성분인지 추출물인지 기재 : 추출물

- 처리한 물질의 농도 및 시간 : 0, 0.25, 0.5, 1, 2 (mg/ml) 24, 48 (H)

- 측정 지표 요약

- Cell viability assay : 비발효 빵잎과 발효 빵잎 추출물 처리에 따른 3T3-L1 cell의 viability 변화를 평가하고자 CCK-8 assay를 실시하였음. 그 결과, 0.5 mg/ml 농도 이하에서 90% 이상의 생존율을 보였으며, 이를 통해 비발효 빵잎과 발효 빵잎이 낮은 독성을 가지는 안전한 소재임을 확인함(Fig. 60)

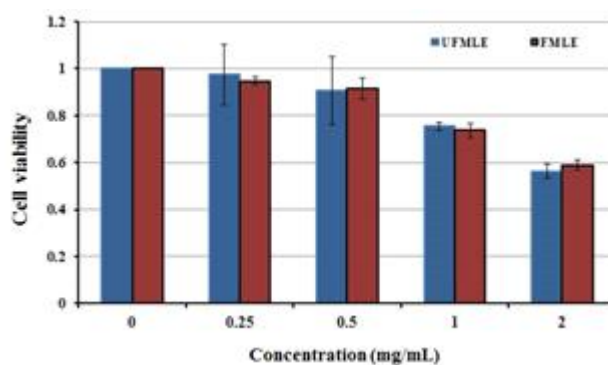


Figure 60. 발효 빵잎 추출물 처리에 따른 3T3-L1 cell의 생존율 변화

- Lipid formation assay : 비발효 빵잎과 발효 빵잎 추출물 처리에 따른 3T3-L1 cell에 대한 분화억제 효과를 확인하기 위해, 0.5mg/ml의 농도를 이용하여 실험을 진행함(Fig. 61, 62) Positive control인 EGCG는 대조군 대비 63.61±0.53% 지방축적을 보이며, 비발효 빵잎은 84.07±3.07%, 그리고 발효 빵잎 75.74±3.26%의 지방축적을 나타내어 발효를 통해 빵잎의 지방분화억제 활성이 약 10% 가량 증가됨을 확인할 수 있었음.

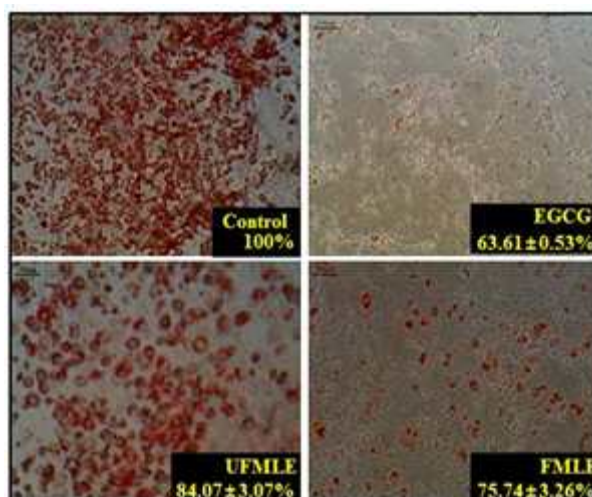


Figure 61. 발효 빵잎 추출물 처리에 따른 3T3-L1 cell의 지방분화 억제효과

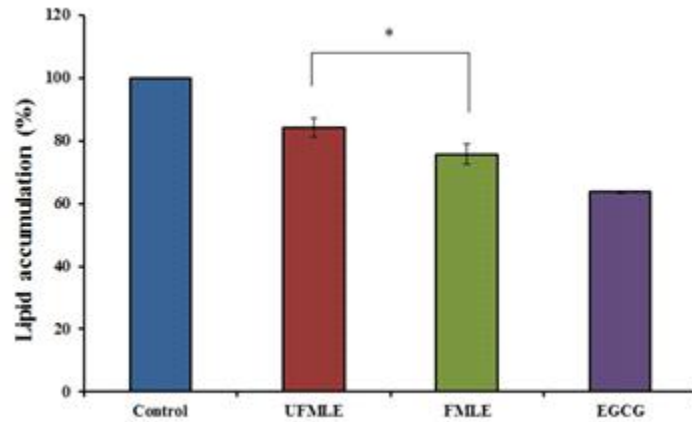


Figure 62. 발효 뽕잎 추출물 처리에 따른 3T3-L1 cell의 지방축적 억제효과

㉔ 동물 실험계

- 동물종 : male ICR, SPF/VAF outbred mice, 4주
- 투여물질 : 추출물
- 투여물질의 농도 및 시간 : 식수로 1%의 뽕잎차, 발효 뽕잎차를 8주간 공급
- 측정 지표 요약
  - Body weight, Food intakes, Calorie intakes : 뽕잎차 (UMI group), 발효 뽕잎차 (FMI group)을 8주간 식수로 급여하면서 항비만 효과와 관련하여 체중증가율, 식이섭취량 및 식이효율 등을 관찰함(Fig. 63). 주당 체중증가량은 NC ( $0.86 \pm 0.03$  g), UMI ( $0.74 \pm 0.01$  g), FMI ( $0.69 \pm 0.02$ ) 순으로 나타났고 실험시작 2주 후부터는 NC군에 비해 UMI와 FMI군 모두에서 지속 적으로 낮은 체중증가율을 보였음. 식이 섭취량은 NC군에 비해 오히려 UMI군과 FMI군은 20.78 및 15.77% 각각 증가하였고, calorie 섭취량 또한 식이섭취량과 유사한 결과를 나타내었음. 음용수 대신으로 섭취한 차 열수추출물의 양은 UMI군과 FMI군에서 NC군에 비해 53~56% 정도 많이 섭취하였으며 UMI군 과 FMI군과의 유의차는 없었음.

Measurements	NC <sup>a</sup>	UMI <sup>b</sup>	FMI <sup>b</sup>
Initial body weight (g)	29.81±1.42	29.45±1.16 <sup>b</sup>	30.28±1.26
Final body weight (g)	36.70±2.20	35.40±1.64	35.83±1.19
Feed intakes (g/week)	43.52±2.35 <sup>b</sup>	52.56±3.08 <sup>a</sup>	50.24±3.65 <sup>a</sup>
Calorie intakes(kcal/week)	162.28±8.76 <sup>b</sup>	195.85±11.47 <sup>a</sup>	187.39±13.61 <sup>a</sup>
Weight gain(g/week)	0.86±0.03 <sup>a</sup>	0.74±0.01 <sup>b</sup>	0.69±0.02 <sup>b</sup>
Water intakes(mL/week)	54.16±4.32 <sup>b</sup>	84.56±6.30 <sup>a</sup>	83.12±6.51 <sup>a</sup>
FER <sup>1)</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>

Figure 63. 발효 뽕잎 추출물 처리에 따른 항비만 효과

Effects of unfermented and fermented mulberry leaf tea 1% infusion instead of water on body weight, feed intakes and feed efficiency ratio of mouse fed a normal diets for 8 weeks.

② 새싹보리추출물

㉠ 유효성분 및 함유량

- 새싹보리에는 Polycosanol과 Saponarin으로 알려진 기능성 성분들이 다량 함유되어 있으며, 일반적으로 새싹보리의 Polycosanol 함유량은 분말 100 g당 최대 342 mg, Saponarin은 새싹보리를 구성하고 있는 폴리페놀 화합물 중 약 80% (1,150mg/100g) 함유되어 있음(Fig. 64, 65).

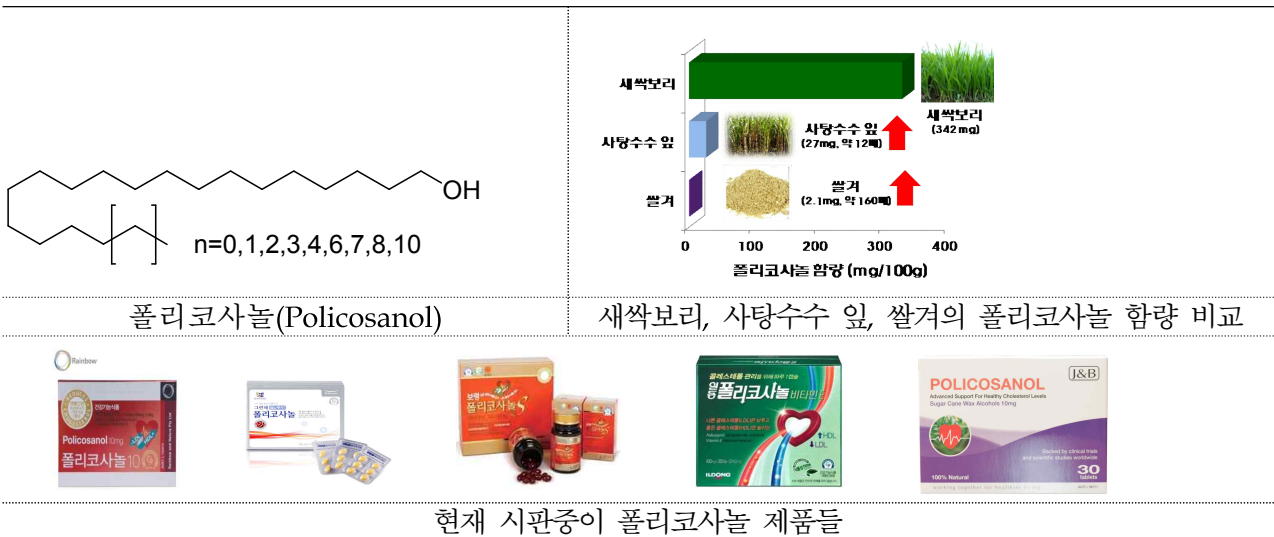


Figure 64. 새싹보리의 Polycosanol 성분

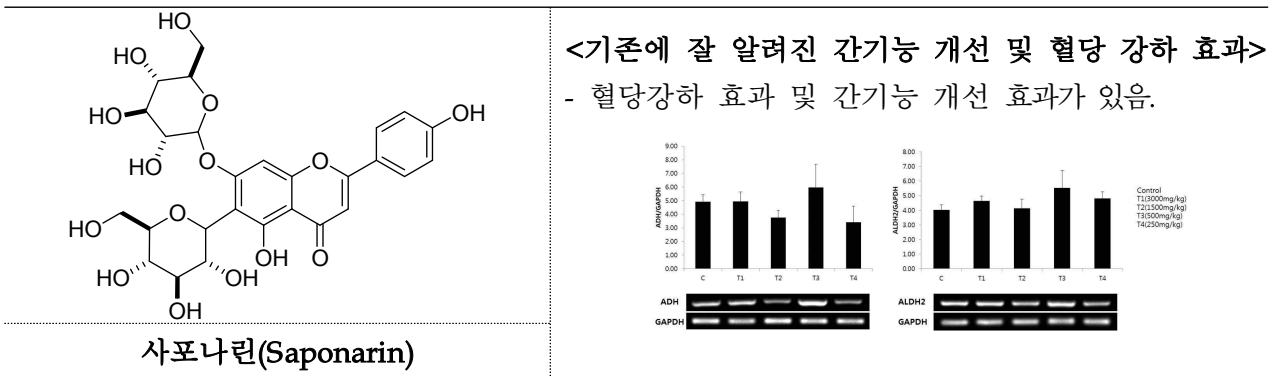


Figure 65. 새싹보리의 Saponarin 성분

㉡ 세포 실험계

- 세포이름 : 3T3-L1
- 단일 성분인지 추출물인지 기재 : 추출물 (분말 100 g의 1L 증류수를 첨가하여 105°C 온도에 3 시간 동안 3 회 가열하여 추출한 뒤 여과하여 불순물을 제거함. 추출한 시료는 동결 건조 시킨 후 28.8%의 회수율을 얻어 실험 시료 BS; 새싹보리 추출물로 사용함)
- 처리한 물질의 농도 및 시간 : 125, 250, 500, 1000 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 의 농도로 6일 이상 처리. (3T3-L1 cell의 분화 유도시점부터 BS 함께 처리해주고, 실험 시작일까지 2일 간격으로 DMEM 교체)

- 측정 지표 요약

- Lipid formation assay : 분화가 완료된 지방세포를 Oil-Red-O staining을 이용하여 BS가 지방분화에 미치는 영향을 알아봄. 그 결과 BS를 처리하지 않고 분화를 유도하였을 때 지방구가 활발하게 형성되었으나, BS를 처리하였을 경우에는 농도 의존적으로 지방구의 형성이 현저하게 감소됨(Fig. 66).

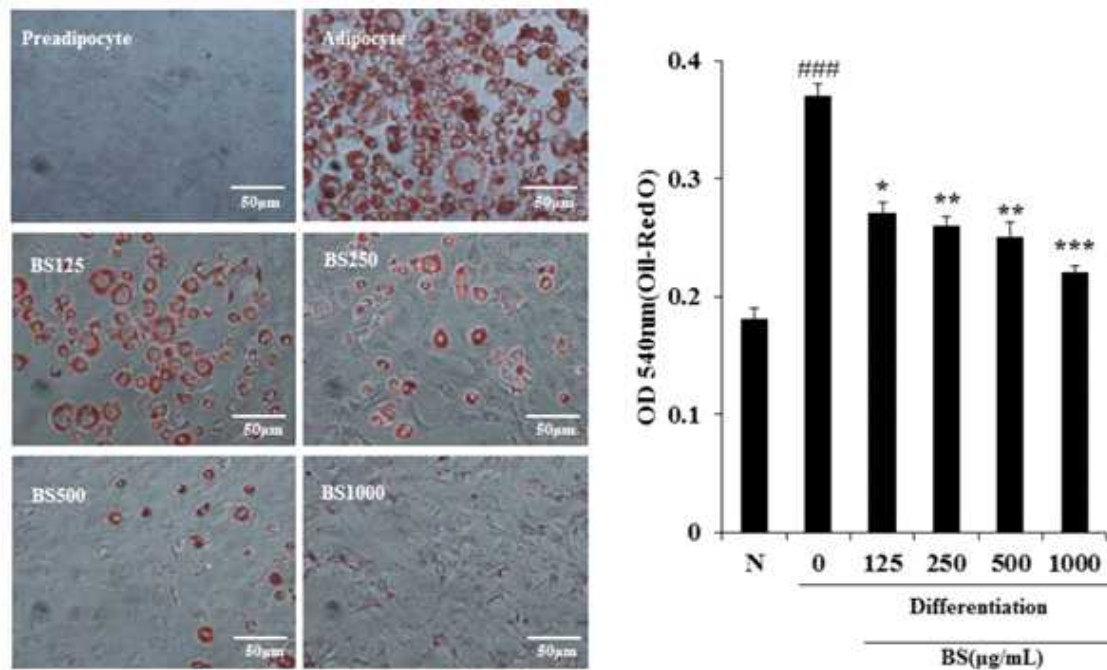


Figure 66. 새싹보리가 지방분화에 미치는 영향

- Adipogenic transcription factor expression level assay : C/EBP $\alpha$  와 PPAR $\gamma$  의 발현은 백색지방세포에서 나타나는 지방구 생성 및 triglyceride의 축적과 함께 지방세포의 비대 및 생성을 초래하며, 또한 FABP4, FAS 등과 같은 지방합성 관련 유전자의 발현을 조절함. C/EBP $\alpha$  와 PPAR $\gamma$  는 비만치료에 있어 핵심적인 유전자이며, 그림 4.에서 볼 수 있듯이 분화를 유발하였을 경우 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  의 발현이 현저하게 증가하였지만 BS 처리에 의하여 농도 의존적인 감소가 유발 됨. 또한, FABP4 및 FAS 경우에도 BS 처리에 의하여 현저하게 감소하였음을 확인함. 따라서, BS는 분화가 유도된 3T3-L1 cell에서 C/EBP $\alpha$  와 PPAR $\gamma$  발현을 조절하여 지방구 생성을 억제함에 따라 비만치료에 효과적인 것을 기대할 수 있음(Fig. 67).



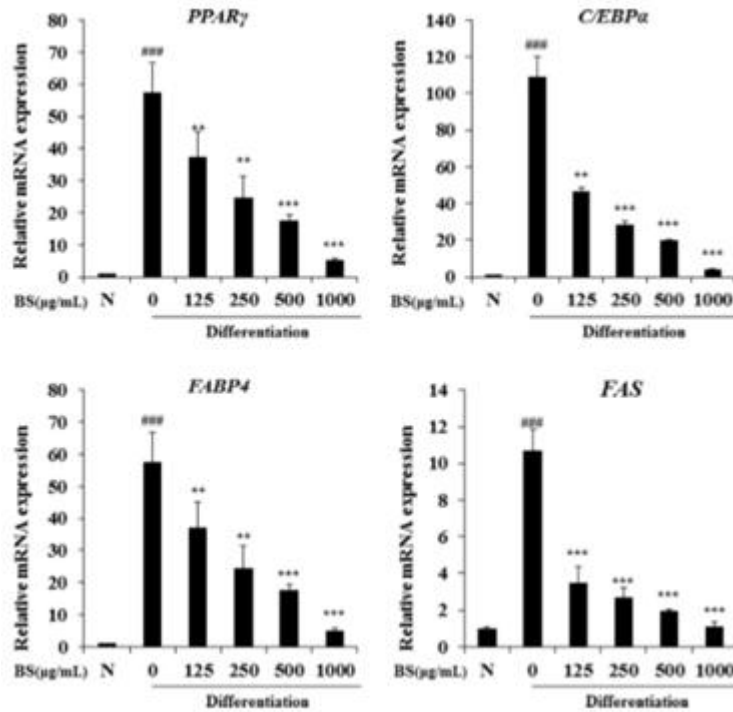


Figure 67. 새싹보리가 지방분화 관련 유전자에 미치는 영향

㉔ 동물 실험계

- 동물종 : Male C57BL/6, 6주 (1주 동안 안정화)
- 투여물질 : 추출물
- 투여물질의 농도 및 시간 : 100, 300, 500 (mg/kg) 농도로 6주간 경구 투여
- 측정 지표 요약
- Body weight : High fat diet (60% Fat)와 함께 BS를 경구투여한 후 실험동물의 body weight 변화는 Fig. 68과 같음. High fat diet 그룹은 정상식이 그룹에 비해 유의적으로 body weight 증가가 유도 되었으며, BS 투여군에서는 High fat diet에 의해 증가된 body weight가 6주차에 유의적으로 감소함. 특히, BS 500 mg/kg 투여군에서는 체중 증가량이 눈에 띄게 감소됨.

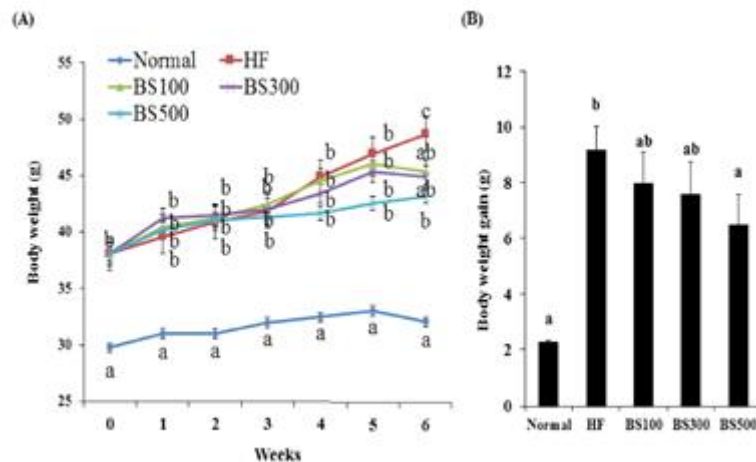


Figure 68. 새싹보리가 체중변화에 미치는 영향

- Organ weight : 간 및 부고환 지방의 무게는 High fat diet의 영향으로 정상식이 그룹에 비해 유의적으로 증가하였으며, 이는 High fat diet에 의해 간 및 지방조직 내에 콜레스테롤 및 중성지방 등이 축적 된 것으로 사료됨. 하지만, BS 투여에 의해 간 무게 및 지방조직 무게의 역제가 관찰되었음(Fig. 69)

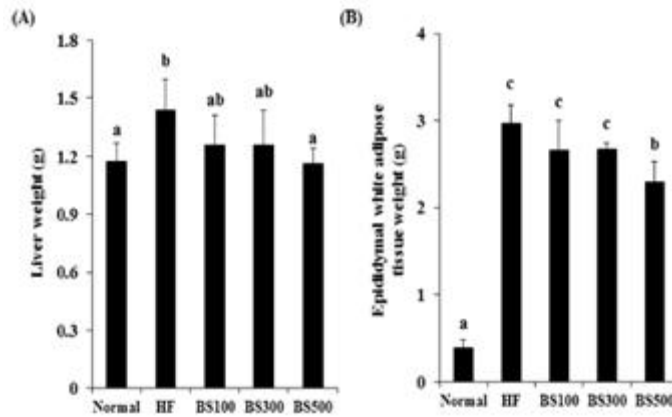


Figure 69. 새싹보리가 간 및 지방조직 무게에 미치는 영향

- Lipid formation assay : H&E staining을 통하여 간 및 White adipose tissue에 속하는 부고환지방의 형태를 관찰한 결과 정상식이 그룹에 비하여 high fat diet 그룹의 간조직에서는 정상식이 그룹에 비해 많은 지방구가 관찰되었으며, BS 투여군에서는 지방구가 감소한 것을 볼 수 있음. High fat diet 그룹은 정상식이 그룹에 비하여 지방조직 내 지방세포의 크기가 증가한 반면, BS 투여군에서는 농도의존적으로 지방세포의 크기가 감소함(Fig. 70)

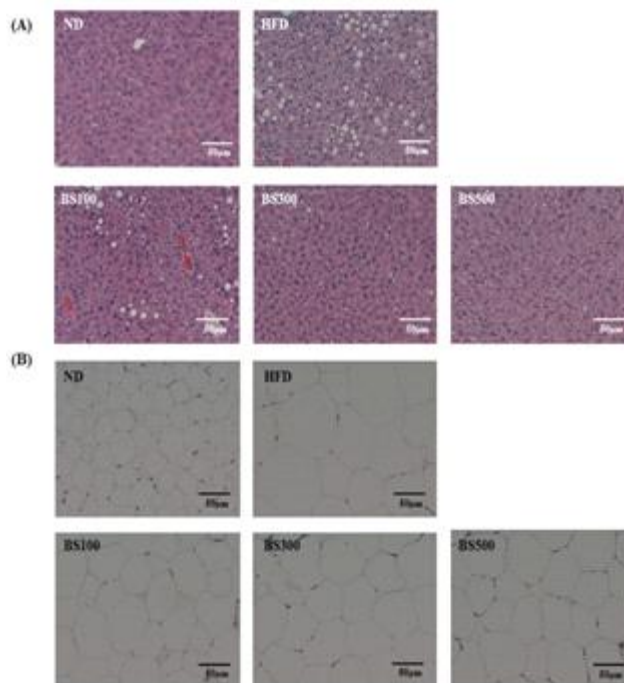


Figure 70. 새싹보리가 간 및 지방조직 내 지방축적에 미치는 영향

Effects of BS on hepatic fat accumulation (A) and size of adipocyte (B) in mice fed a high-fat-diet (200X).



③ 녹차추출물

㉔ 유효성분 및 함유량

- 녹차의 성분은 기후, 계절, 차 품종 및 잎의 나이에 따라 크게 달라지지만 일반적으로 신선한 녹차 잎에는 36%의 polyphenol이 함유되어 있으며, 그 중 Catechin이 총 polyphenol의 48~55%를 차지하며 구성하고 있음.
- Catechin은 주요한 4가지 화합물로 구성되어 있으며(Fig. 71), 이들 물질에 의해 녹차의 약리학적 특성이 나타남. 그 중에서도 EGCG는 가장 큰 비율을 차지하며 Catechin을 구성하고 있음.

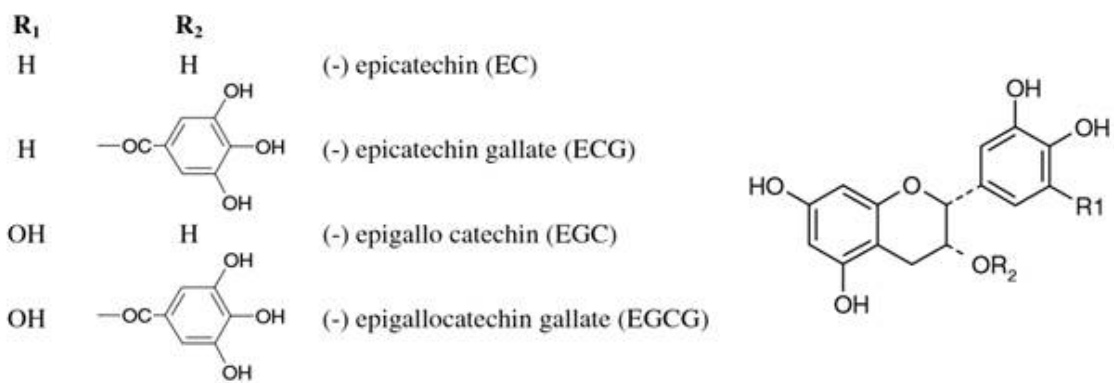


Figure 71. 주요 Catechin의 화학 구조

- 녹차의 유효성분은 Catechin 외에도 Caffeine (1~5%), Tannins 또는 Phenolin substances (5~27%), 그리고 Flavonol 계열의 물질 등으로 구성되어 있음(Fig. 72).

Active ingredient	Content (g/kg dry leaves)
Caffeine	36.0
<b>Catechins</b>	
Epicatechingallate	15.2
Epigallocatechin	46.0
Epigallocatechin gallate	129
Epicatechin	0.9
<b>Major catechins</b>	<b>191</b>
<b>Flavonols</b>	
Myricetin	0.8
Quercetin	1.8
Kaempherol	2.6

Figure 72. 녹차의 유효성분 함유량

㉔ 세포 실험계

- 세포이름 : 3T3-L1

- 단일 성분인지 추출물인지 기재 : 단일성분, EGCG

- 처리한 물질의 농도 및 시간 : 0, 50, 100, 200 ( $\mu$ M) 농도를 3, 6, 12, 24 (H)/ DAY-6 처리 함.

- 측정 지표 요약

- Apoptosis assay : Laser Scanning Cytometry (LSC) assay를 이용, EGCG를 0, 50, 100, 200 ( $\mu$ M)로 24시간 처리 하였을 때 total cell의 변화(Fig. 73A)와 3, 6, 12, 24 시간별로 total apoptotic cells의 변화량(Fig. 73B)을 살펴보았음. EGCG를 처리하였을 때, 3T3-L1 cell의 apoptotic cell 증가량을 확인할 수 있으며, 특히 200 $\mu$ M에서 total apoptotic cell이 가장 많이 증가하는 것을 볼 수 있음.

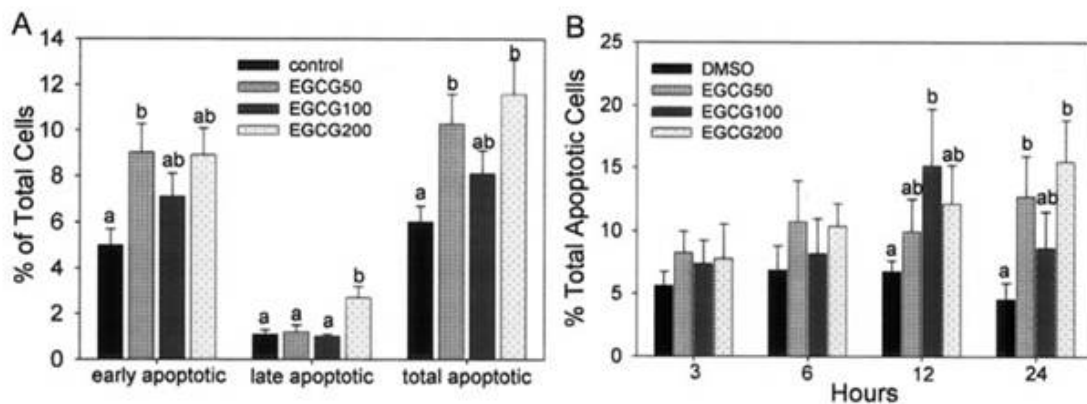


Figure 73. EGCG 처리에 의한 3T3-L1 cell의 apoptosis 변화

(Twenty-four hour (A) and time course (B) EGCG effect on apoptosis of mature adipocytes as measured by LSC. Means with different letters are different,  $p < 0.05$ .)

ATerminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) Image 분석을 이용해 LSC assay를 통해 확인 된 EGCG에 의한 3T3-L1 cell의 apoptosis 변화를 한번 더 확인하였으며, TUNEL image assay에서는 단일농도인 200 $\mu$ M의 EGCG를 이용하여 실험 진행함. LSC assay와 유사한 경향성을 보이며 특히, Mature adipocytes에 EGCG 처리에 의한 apoptosis가 유발되는 것을 확인할 수 있음(Fig. 74).

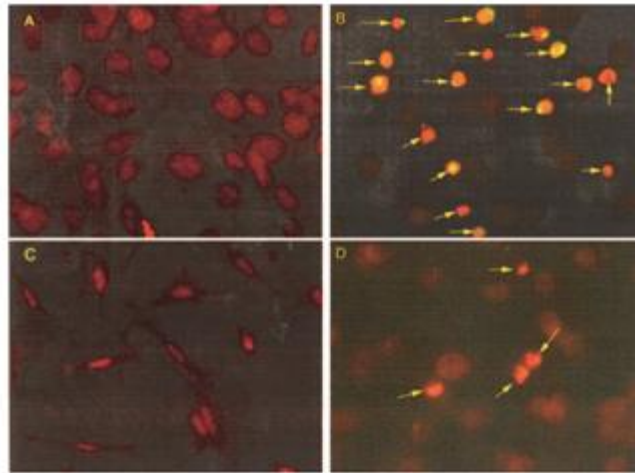


Figure 74. TUNEL image

(A) Control (DMSO) treatment showing no TUNEL signal but only PI staining for normal intact nuclei. (B) EGCG treatment (200  $\mu$  M) for 6 days during adipogenesis showing bright condensed nuclei, as indicated by arrows for apoptotic cells. (C) Preadipocytes treated for 24 hours with 200  $\mu$  M EGCG showing no TUNEL-positive staining; PI staining for intact nuclei only. (D) Mature adipocytes treated with 200  $\mu$  M EGCG for 24 hours; arrows indicate apoptotic cells (400).

- Lipid formation assay : Oil-Red-O staining을 이용하여, EGCG를 0, 50, 100, 200 ( $\mu$  M) 농도로 6일 동안 처리했을 때 3T3-L1 cell의 지질 생성을 비교함. 그 결과 EGCG 농도 의존적으로 지질 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있음(Fig. 75).

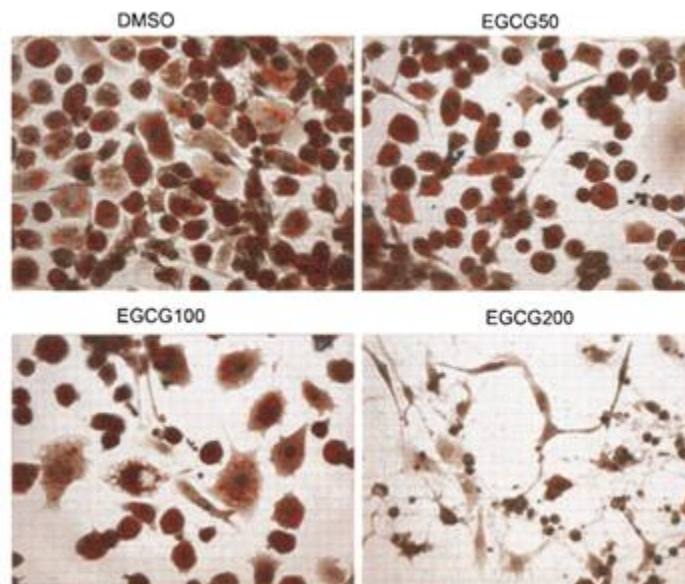


Figure 75. Oil-Red-O staining

Images were obtained at Day 6 of differentiation with EGCG treatment. (A) DMSO-treated control. (B) 50  $\mu$  M EGCG. (C) 100  $\mu$  M EGCG. (D) 200  $\mu$  M EGCG (400).

㉔ 동물 실험계

- 동물종 : Male New Zealand black (NZB) mice, 4주
- 투여물질 : 추출물, TEAVIGOt (containing min 94% EGCG, max 5% other catechins (max 3% epicatechin gallate), max 0.1% gallic acid, and max 0.1% caffeine.)
- 투여물질의 농도 및 시간 : 식수로 0%, 0.5%, 1% (w/w) TEAVIGOt를 4주간 공급
- 측정 지표 요약
  - Body weight : High fat diet (60% Fat)와 함께 BS를 경구투여한 후 실험동물의 body (Containing w/w, 17% protein, 15% fat, and 42% carbohydrates provided in powdered form) 식이와 함께 0%, 0.5%, 1% (w/w)의 TEAVIGOt를 식수로 4주간 공급하였을 때, body weight와 food intake를 비교하였음. 그 결과 TEAVIGOt 농도 의존적으로 body weight가 감소하는 것을 확인할 수 있음(Fig. 76A).

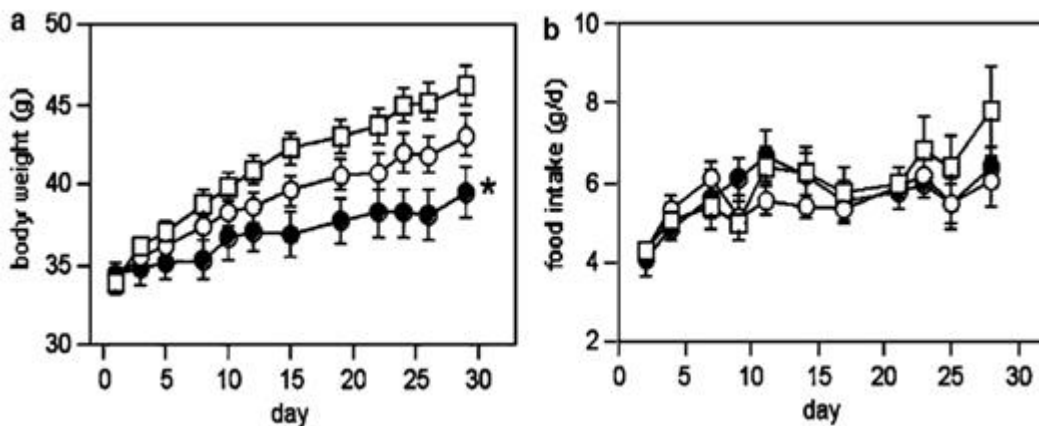


Figure 76. HFD 및 EGCG 4주 공급에 의한 Body weight (A) 와 Food intake (B)의 변화 EGCG at 0.5% (open circles) or 1% (closed circles). Control values are presented as open squares. Asterisks indicate significant differences from control values ( $P<0.05$ , ANOVA).

- Body fat and lean body mass 비교 : body weight와 같은 조건의 실험 결과 TEAVIGOt 농도 의존적으로 body fat이 감소하는 것을 확인할 수 있음(Fig. 77A).

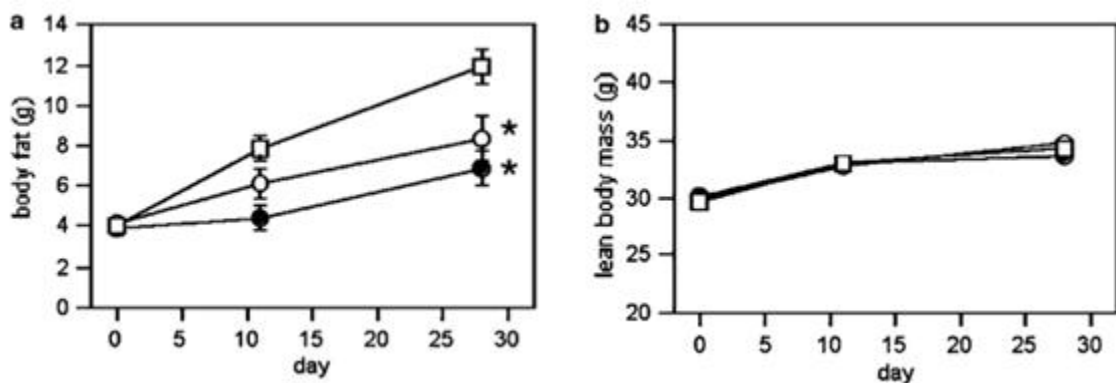


Figure 77. HFD 및 EGCG 4주 공급에 의한 Body fat (A) 과 Lean body mass (B)의 변화 EGCG at 0.5% (open circles) or 1% (closed circles). Control values are presented as open squares. Asterisks indicate significant differences from control values ( $P<0.05$ , ANOVA).

- Organ weight and Blood metabolites : body weight, body fat과 같은 조건의 HFD+ 0%, 0.5%, 1% (w/w)의 TEAVIGOt를 식수로 4주간 공급하였을 때, Organ weight, plasma metabolites의 변화를 살펴 봄. 그 결과 Epididymal WAT의 무게가 TEAVIGOt 농도 의존적으로 감소되는 것을 볼 수 있으며, plasma metabolites에서는 Triglycerides (mmol)의 감소를 확인할 수 있음(Fig. 78). 위 결과들을 토대로 TEAVIGOt (containing min 94% EGCG, max 5% other catechins (max 3% epicatechin gallate), max 0.1% gallic acid, and max 0.1% caffeine.)의 공급으로 인한 항 비만효과 및 지질 축적의 억제효과를 기대할 수 있음.

	Control	EGCG 0.5%	EGCG 1%	P-value (ANOVA)
<i>Organ weights</i>				
Epididymal WAT (g)	1.16 ± 0.11	0.83 ± 0.12*	0.68 ± 0.25*	0.014
Liver (g)	1.54 ± 0.06	1.39 ± 0.05	1.45 ± 0.06	NS
Stomach (g)	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.01	NS
<i>Plasma metabolites</i>				
Blood glucose (mg/dl)	196 ± 9.8	187 ± 11.6	174 ± 9.2	NS
Triglycerides (mmol)	1.38 ± 0.13	1.02 ± 0.06*	1.15 ± 0.07	0.041
Cholesterol (mmol)	6.54 ± 0.12	6.49 ± 0.16	6.99 ± 0.13	0.034
NEFA (mmol)	1.60 ± 0.20	1.31 ± 0.08	1.47 ± 0.10	NS

Figure 78. HFD 및 EGCG 4주 공급에 의한 Organ weight와 Blood metabolites의 변화  
NS: not significant. \*Significantly different (P<0.05) from control.

#### ④ 미역추출물

##### ㉞ 유효성분 및 함유량

- 미역의 유효성분은 Carotenoid계 성분인 Fucoxanthin과 Fucoidan으로 함유량은 미역의 종류, 추출물을 취득하기 위해 사용되는 용매, 기간 등에 따라 크게 달라짐.

##### ㉞ 세포 실험계

- 세포이름 : 3T3-L1
- 단일 성분인지 추출물인지 기재 : 단일성분, EGCG
- 처리한 물질의 농도 및 시간 : 에탄올 추출물 (건조 미역 100 g당 에탄올 1L 를 첨가하여 70°C, 3시간 동안 추출GKA. 미역 에탄올 추출물은 20분간 708×g 로 원심 분리하여 상등액만 분리함. 분리된 상등액을 0.45 μm filter로 여과하여 감압 농축과정과 동결건조를 통해 미역 에탄올 추출물을 제조함.)
- 측정 지표 요약
  - Triglyceride accumulation assay : 미역 에탄올 추출물이 지방세포의 분화 및 triglyceride

축적에 미치는 영향을 확인하기 위하여 3T3-L1 cell을 Mature adipocytes cell로 유도하여 0~50  $\mu\text{g/ml}$  의 농도로 미역 에탄올 추출물을 첨가함. 분화 유도 8일 째, 분화가 완료된 Mature adipocytes cell에 Oil red O staining을 하였으며, 염색된 lipid droplet을 iso-propanol로 추출한 후 ELISA reader를 이용하여 triglyceride 함량을 분석함. Fig. 79에 나타난 바와 같이 정상배지에서 분화된 지방세포와 비교해 볼 때, 미역 에탄올 추출물을 첨가한 배지에서 지방세포 내 축적된 triglyceride 함량이 감소함.

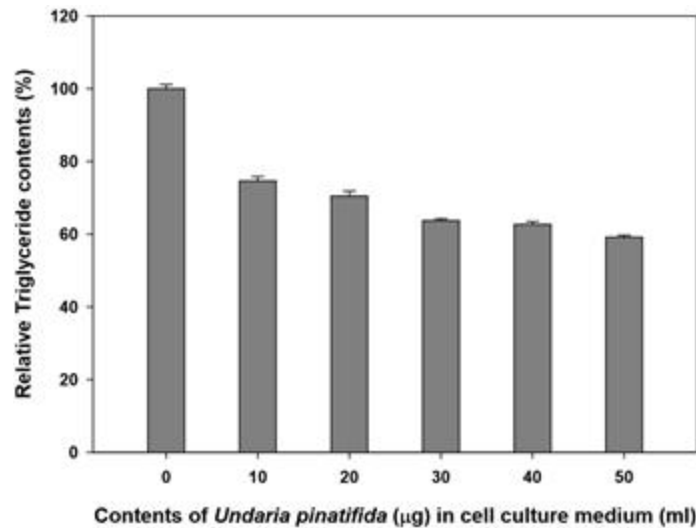


Figure 79. *U. pinnatifida* 에탄올 추출물이 Triglyceride 축적에 미치는 영향

- Adipogenic transcription factor expression level assay : 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화는 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있음.

PPAR  $\gamma$ 는 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 촉진시키며, PPAR  $\gamma$ 의 발현량 증가는 지방세포의 증가를 의미하며, Leptin과 HSL은 지방세포에서 특이적으로 분비되는 호르몬과 효소로 지방세포 증가에 관한 지표로 사용됨.

미역 에탄올 추출물이 PPAR  $\gamma$ , Leptin, HSL의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 Western blot과 RT-PCR을 이용하여 mRNA 및 단백질 단계에서 확인함(Fig. 80).

그 결과, HSL은 mRNA와 단백질 수준에서 차이가 없었으며, PPAR  $\gamma$ 와 Leptin의 발현은 미역 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하였음.

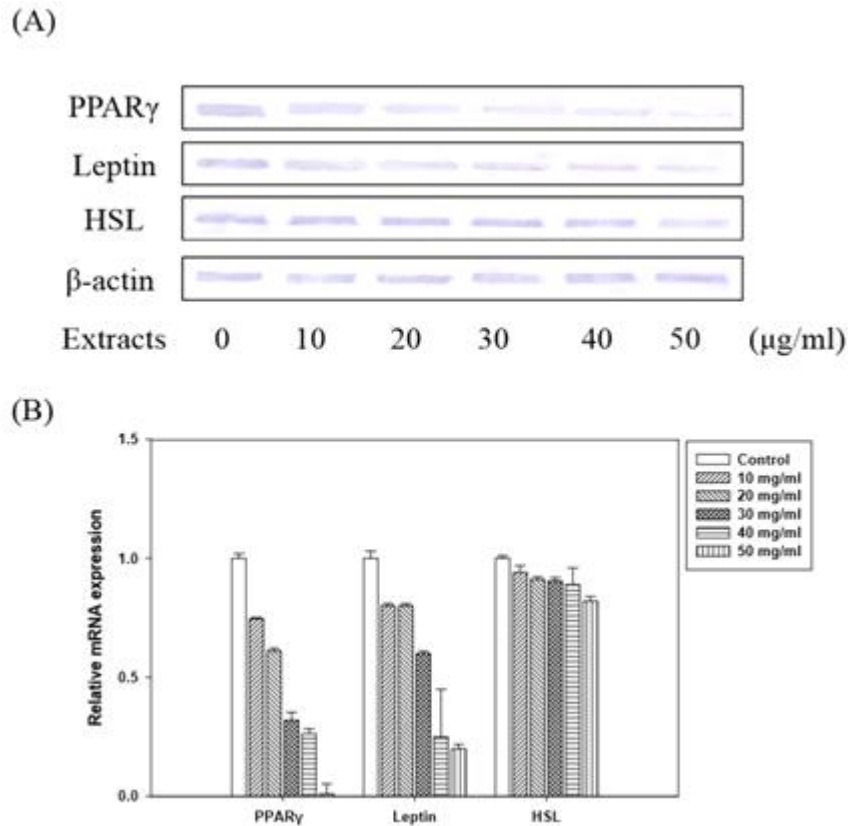


Figure 80. *U. pinnatifida* 에탄올 추출물이 Adipogenic transcription factor expression level에 미치는 영향

Effects of *U. pinnatifida* ethanol extracts on PPAR $\gamma$ , Leptin and HSL in adipocytes determined by western blot (A) and RT-PCR (B) analysis. 3T3-L1 cell in media with different concentrations of *U. pinnatifida* ethanol extracts were differentiated into adipocytes for 8 days.  $\beta$ -actin was used as an internal control. Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

㉔ 동물 실험계

- 동물종 : Male C57BL/6j mice, 5주, 2주 동안 안정화
- 투여물질 : 추출물과 단일물질 둘 다 사용함. 추출물(UEFx Group; 건조 시킨 *U. pinnatifida* 50 kg을 에탄올 (1:6,v/v) 추출을 통하여 추출물을 획득한 후 원심 분리를 통하여 상등액을 회수하고, 상등액을 응축시킨 다음 동결 건조하여 사용함), 단일 물질(Fx Group; 순수하게 정제된 Fucoxanthin을 사용함)
- 측정 지표 요약
  - Food intake, body weight, visceral fat pad weight : 총 4개의 그룹 (NC; Control, HC; high-fat diet, UEFx; high-fat diet with 0.69% *U. pinnatifida* ethanol extract in 0.02% fucoxanthin, Fx; high-fat diet with 0.02% fucoxanthin)으로 분류 후 9 주 동안 high fat diet (3% corn oil and 17% lard, wt/wt)와 0.02% Fucoxanthin을 식수로 공급한 결과 high fat diet 에 의한 body weight의 증가를 *U. pinnatifida* ethanol extract 와 fucoxanthin 공급에 의해 억제되는 것을 볼 수 있음. White adipose tissue 무게 역시 high fat diet 에 의해 증가되는데, 이는 *U. pinnatifida* ethanol extract 와 fucoxanthin 공급에 의해 감소되는 것을 볼 수 있음(Fig. 81).



	NC	HC	UEFx	Fx
<i>Body weight (g)</i>				
Initial	19.42 ± 0.29	19.62 ± 0.30	19.25 ± 0.25	19.25 ± 0.25
Final	31.01 ± 0.45a	35.43 ± 1.07 <sup>b</sup>	34.51 ± 1.05 <sup>b</sup>	33.97 ± 0.79 <sup>b</sup>
Food Intake (g/day)	4.46 ± 0.21 <sup>c</sup>	3.48 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.22 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.32 ± 0.12 <sup>ab</sup>
FER (%)	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>
<i>White adipose tissue (g/100 g body weight)</i>				
Epididymal	42.04 ± 1.26 <sup>a</sup>	57.10 ± 1.74 <sup>c</sup>	52.32 ± 1.26 <sup>b</sup>	51.16 ± 1.78 <sup>b</sup>
Perirenal	18.22 ± 0.65 <sup>a</sup>	21.72 ± 0.92 <sup>b</sup>	20.85 ± 1.13 <sup>ab</sup>	20.70 ± 0.82 <sup>ab</sup>

Figure 81. *U. pinnatifida* 에탄올 추출물이 body weight 및 white adipose tissue weight 변화에 미치는 영향

abcMeans in the row not sharing a common letter are significantly different between groups at  $p < 0.05$ .

- Epididymal adipocytes size assay : 총 4개의 그룹 (NC; Control, HC; high-fat diet, UEFx; high-fat diet with 0.69% *U. pinnatifida* ethanol extract in 0.02% fucoxanthin, Fx; high-fat diet with 0.02% fucoxanthin)으로 분류 후 9 주 동안 high fat diet (3% corn oil and 17% lard, wt/wt)와 0.02% Fucoxanthin을 식수로 공급한 결과 Epididymal adipocytes의 size가 NC group 보다 HC group에서 더 큰 것을 볼 수 있음. 하지만 *U. pinnatifida* ethanol extract 와 fucoxanthin 공급에 의해 HC group에 비해 adipocytes size가 현저하게 감소되는 것을 볼 수 있음(Fig. 82). 위 결과들을 통해 *U. pinnatifida* ethanol extract 이 순수하게 정제된 fucoxanthin 과 함께 high fat diet에 의한 body weight와 white adipose tissue 무게의 증가를 억제하고, epididymal adipocytes size를 감소시킴으로써 미역추출물이 항비만 효과가 있음을 기대할 수 있음.

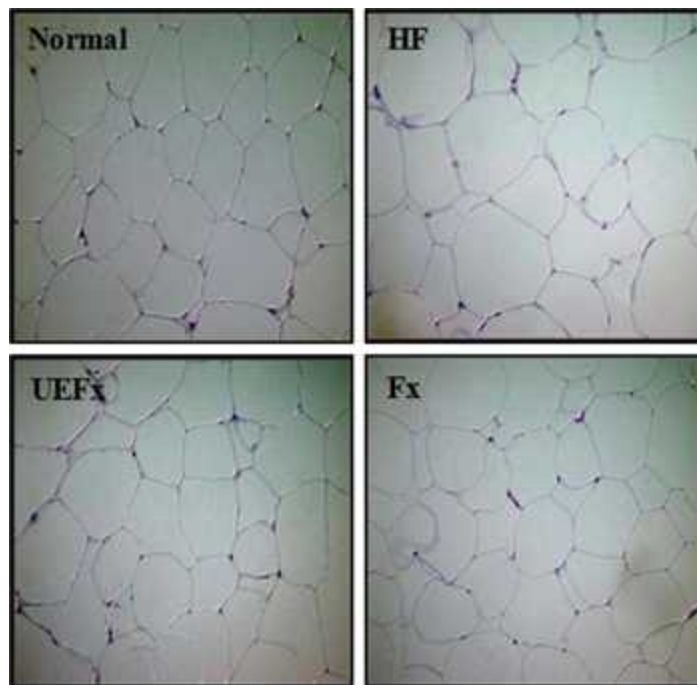


Figure 82. *U. pinnatifida* 에탄올 추출물이 Epididymal adipocytes size 변화에 미치는 영향

Effects of *Undaria pinnatifida* ethanol extract supplementation on light micrography of epididymal adipocyte in high-fat diet-induced obese mice ( $\times 200$ ). NC, normal diet control group; HC, high-fat diet control group; UEFx, *U. pinnatifida* ethanol extract, which contain an equivalent amount of 0.02% fucoxanthin, supplemented group with a high-fat diet; Fx, 0.02% fucoxanthin supplemented group with a high-fat diet.

⑤ 콩 발아배아추출물

㉔ 유효성분 및 함유량

- 콩 발아배아 추출물의 유효성분은 Soyasaponin과 Isoflavone으로 콩 고유의 기능성 물질이 많이 함유되어 있으며, 국내에서는 농촌진흥청에서 연구된 “대풍2호” 품종이 활발하게 연구가 진행됨. 수입산 콩 발아배아 추출물과 대풍2호 콩 발아배아 추출물의 Soyasaponin과 Isoflavone 함량은 크게 차이가 나는데 함량은 Fig. 83과 같음.

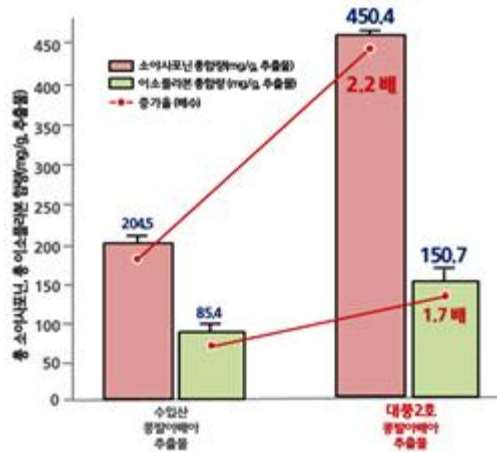


Figure 83. 국내산과 수입산 콩 발아배아 추출물의 Soyasaponin과 Isoflavone 함량 차이

㉕ 세포 실험계

- 세포이름 : 3T3-L1
- 단일 성분인지 추출물인지 기재 : 추출물
- 처리한 물질의 농도 및 시간 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 의 콩 발아배아 추출물을 24, 72 (H) 처리함
- 측정 지표 요약
  - Cell viability assay : 콩 발아배아 추출물에 의한 지방전구세포 3T3-L1 cell의 생존율을 분석하고자 50, 100, 200, 300, 400, 500 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도의 콩 발아배아 추출물을 3T3-L1 cell에 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTT 용액의 추가에 의하여 형성된 비수용성의 formazan을 dimethyl sulfoxide 용액으로 용해시켰으며, 595 nm에서 상기 용해된 formazan의 흡광도를(optical density; O.D. value) 측정함으로써 상대적인 cell viability (%)를 평가하였음. 그 결과, Fig. 84A에서 볼 수 있듯이, 콩 발아배아 추출물은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였음.

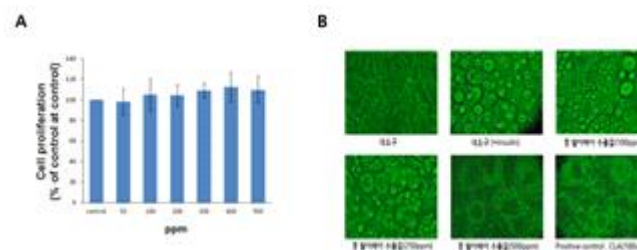


Figure 84. 콩 발아배아 추출물이 세포 생존율과 지방분화에 미치는 영향

㉔ 동물 실험계

- 동물종 : Male ICR mice, 5w, 1주 동안 안정화
- 투여물질 : 콩 발아배아 추출물
- 투여물질의 농도 및 시간 : 60 mg/kg 농도로 1일 1회 씩 10주간 경구 투여
- 측정 지표 요약
- Body weight : High fat diet (60% Fat)와 함께 콩 발아배아 추출물을 10주간 60 mg/kg 농도로 1일 1회 씩 10주간 경구 투여한 결과 대조군(60% fat diet; High fat diet 단독)에 비해 23% body weight가 감소되는 것을 볼 수 있음(Fig. 85).

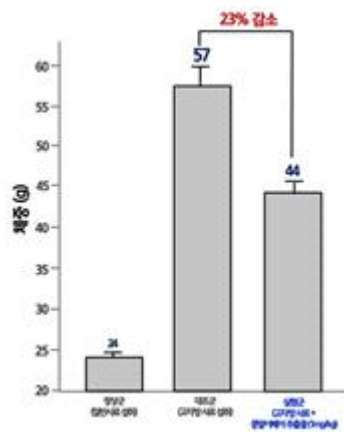


Figure 85. 콩 발아배아 추출물에 의한 Body weight의 변화

- Abdominal fat accumulation : High fat diet (60% Fat)와 함께 콩 발아배아 추출물을 10주간 60 mg/kg 농도로 1일 1회 씩 10주간 경구 투여한 결과 복강지방의 부피가 대조군 대비 약 42% 감소되는 것을 볼 수 있음(Fig. 86).

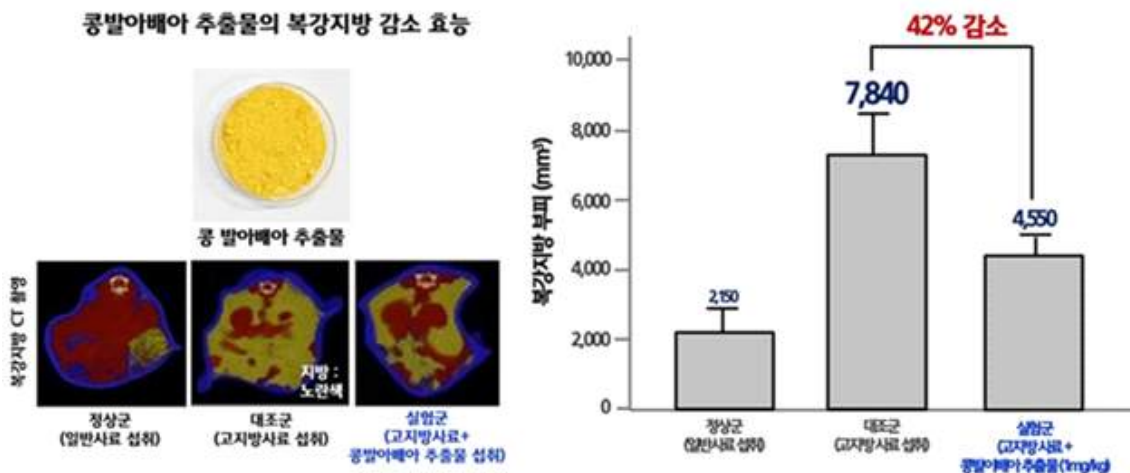


Figure 86. 콩 발아배아 추출물에 의한 복강지방 부피의 변화

High fat diet (60% fat)와 함께 콩 발아배아 추출물을 10주간 60mg/kg 농도로 1일 1회 씩 10주간 경구 투여한 결과 지방 조직 내 지방세포 크기의 감소가 대조군 대비 약 45% 감소 됨(Fig. 87).

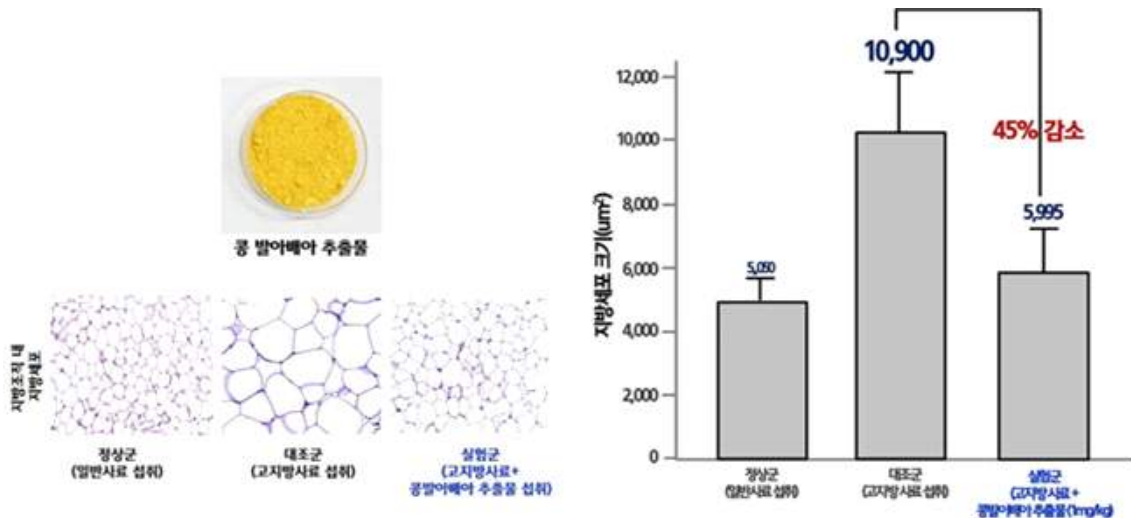


Figure 87. 콩 발아배아 추출물에 의한 지방 조직 내 지방세포 크기의 변화

⑥ 백편두추출물

㉞ 유효성분 및 함유량

- 백편두(*Dolichos lablab* Linne)는 국내에서 일부 재배되고 있으나 연간 총생산량이 매우 소량이며, 가격 또한 고가에 유통되고 있음. 따라서 미얀마 및 인도 지역에서의 생산과 공급이 꾸준히 증가하고 추세임. 따라서, Fig. 88 유효성분의 함량은 미얀마산 백편두를 이용한 것임.

- 백편두 추출물의 유효성분은 saponin계 화합물로서, 동일한 분석조건에서 추출 용매에 따른 화합물의 함량차이는 Fig. 88과 같음.

추출용매 (v/v)	Chikusetsusaponin IVa		Soyasaponin Bb/Soyasaponin I		Sandosaponin A	
	mg/kg	%weight	mg/kg	%weight	mg/kg	%weight
100%물	358.6	0.036	55.4	0.006	69.0	0.007
25%주정+75%물	627.1	0.063	76.5	0.008	60.6	0.006
50%주정+50%물	1725.7	0.173	160.9	0.016	148.8	0.015

Figure 88. 백편두 추출물 내 saponin계 화합물의 함량

- 정량분석 결과, 3종의 saponin계 화합물 중 Chikusetsusaponin IVa 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, Chikusetsusaponin IVa의 구조는 Fig. 89와 같음.

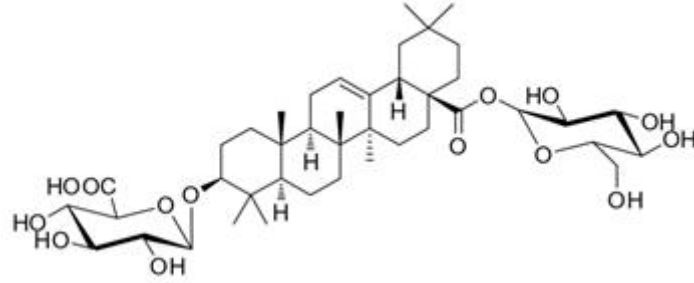


Figure 89. Chikusetsusaponin IVa 화학적 구조

㉔ 세포 실험계

- 세포이름 : 3T3-L1

- 단일 성분인지 추출물인지 기재 : 추출물(백편두 에탄올 추출물; DLL-Ex), 단일물질 (Chikusetsusaponin IVa; CS-IVa) 둘 다 사용

- 처리한 물질의 농도 및 시간 : DLL-Ex 0, 10, 30, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )/ CS-Iva 0, 1, 3, 10 ( $\mu\text{g/ml}$ ), DAY-3

- 측정 지표 요약

- Lipid formation assay : DLL-Ex와 CS-IVa가 지질 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Oil red O staining을 사용하여 분화 된 지방세포에서 세포 내 지질 축적을 측정함. 그 결과 DLL-Ex 및 CS-IVa 처리는 vehicle-treated 세포와 비교하여 세포 내 지질 함량을 상당히 감소시킨 것을 볼 수 있음(Fig. 90).

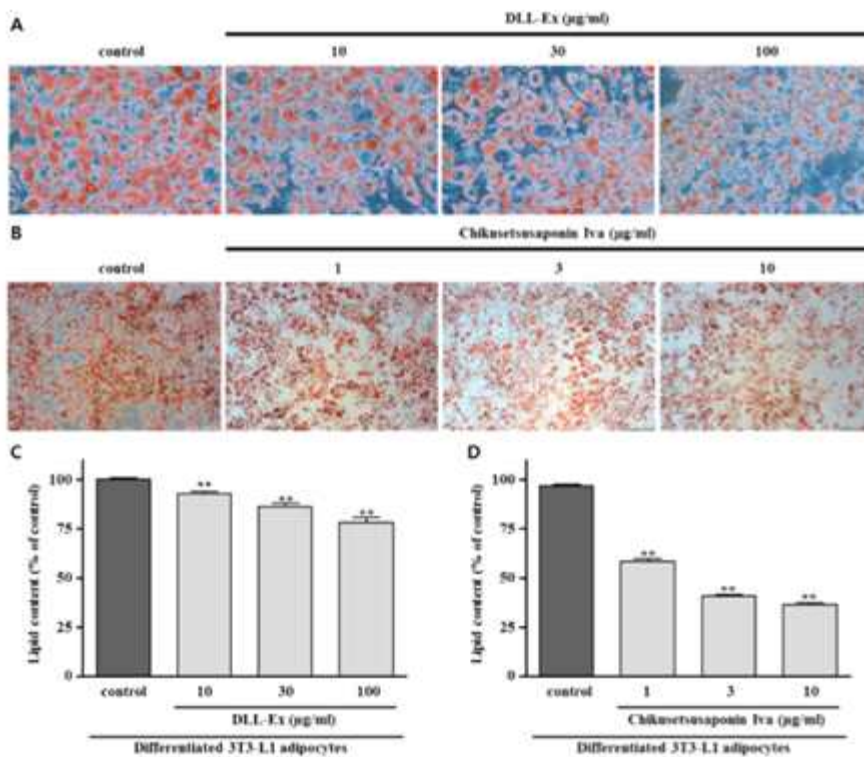


Figure 90. 3T3-L1 cell에서 지질 축적에 대한 DLL-Ex 및 CS-IVa의 효과

(A,C) Inhibitory activity of DLL-Ex on lipid content; (B,D) Inhibitory activity of CS-IVa on lipid content. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$ .



- Protein expression of lipogenic genes assay : 분화 된 지방세포에서 CS-IVa가 lipogenic genes의 protein expression level에 미치는 영향을 살펴보기 위해 FABP4와 Fatty acid synthase의 expression level을 분석함. 그 결과, CS-IVa 10  $\mu$ g/ml 처리에 의해 분화 된 지방세포에서 FABP4와 Fatty acid synthase의 expression level이 감소하는 것을 볼 수 있음(Fig. 91)

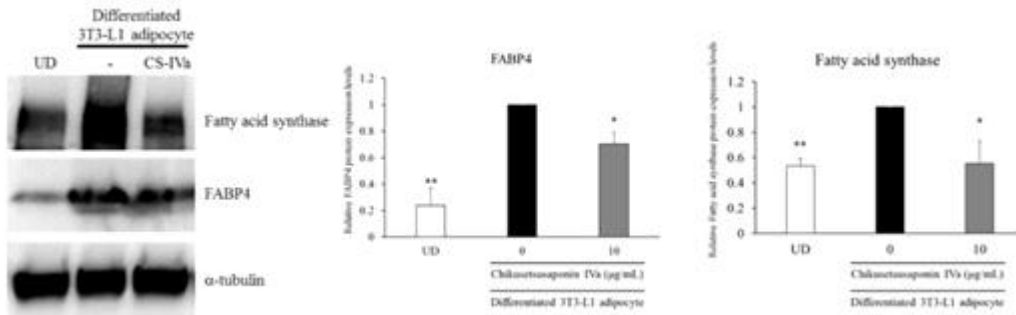


Figure 91. CS-IVa에 의한 lipogenic genes의 변화

㉔ 동물 실험계

- 동물종 : male C57BL/6J mice, 7w
- 투여물질 : 추출물
- 투여물질의 농도 및 시간 : 25 mg/kg/day 의 농도로 9주 동안 실험 진행
- 측정 지표 요약

- Change in body weight, liver tissues, and blood biochemical parameters : 9주간의 High fat diet (60% Fat)와 함께 25mg/kg/day 의 농도로 백편두 추출물을 투여한 결과 (HD25) body weight의 증가를 억제하고, liver 내의 지질함량 억제와 함께 liver steatosis 를 억제하는 것을 확인할 수 있음(Fig. 92A, B). 그리고 High fat diet(60% Fat)에 의해 증가된 glucose, TC, TG, LDL-C 및 FFA의 혈중 농도를 백편두 추출물이 감소시킴(Fig. 92C).

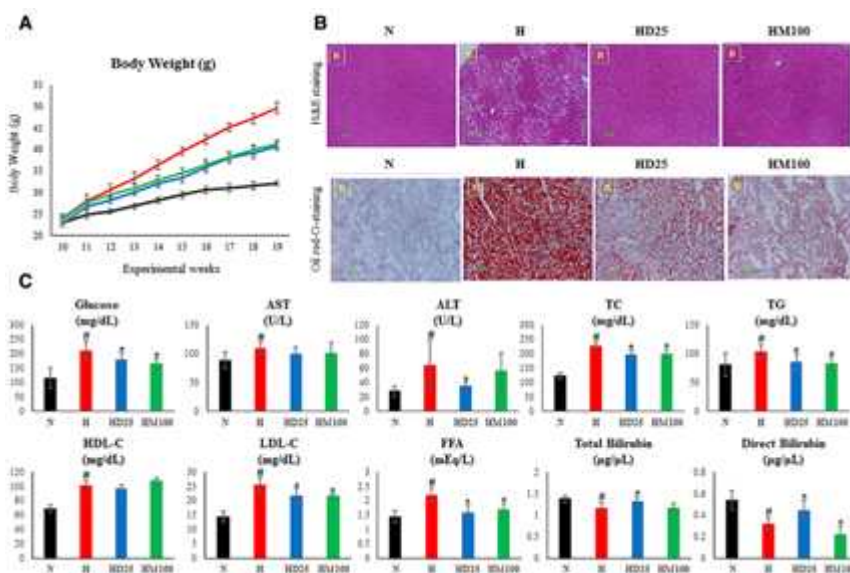


Figure 92. 백편두 추출물에 의한 체중 및 간, 혈액 내 생화학적 지표들의 변화

(다) 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 세포독성 평가

- ① 각각의 추출물에 의한 3T3-L1 지방전구세포의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행함. 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 안정화 시킨 후, 시료를 농도별로 희석한 배지를 처리하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건의 incubator에서 48시간을 배양함. 배양 후 MTT 시액 10  $\mu$ l를 각 well 에 첨가하여 다시 1시간 배양하고 그 배양액을 450 nm에서 흡광도 측정
- ② 발효콩잎추출물, 새싹보리추출물, 녹차추출물, 미역추출물, 발아콩배아추출물, 백편두추출물 각각을 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 처리했을 때, 발효콩잎추출물, 새싹보리추출물, 녹차추출물, 미역추출물, 발아콩배아추출물은 모든 농도에서 모든 추출물이 90% 이상의 생존율을 보였고, 위상차 현미경으로 관찰한 결과 세포의 형태적 손상이 관찰되지 않았음(Fig. 93).

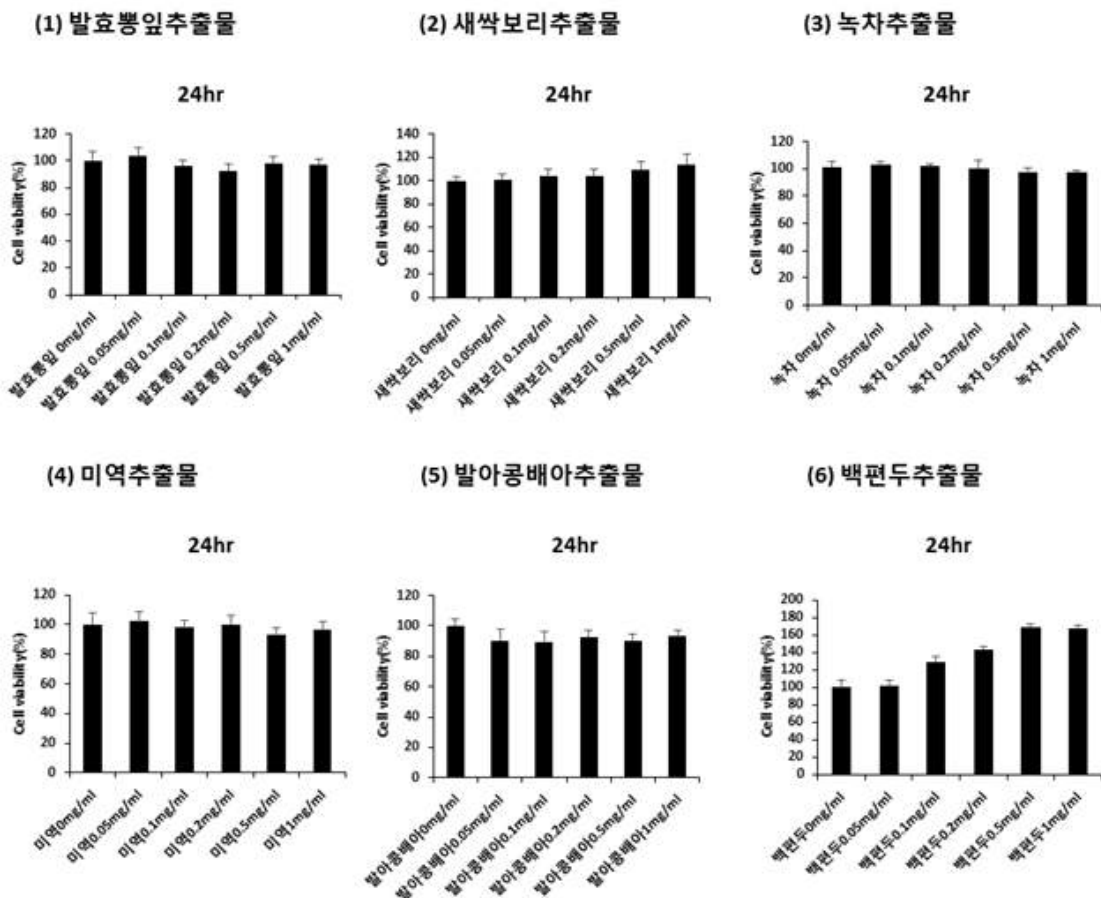


Figure 93. 체지방 복합원료 개발을 위하여 각 원료별 세포생존율 측정 결과



(라) PPAR $\gamma$  luciferase assay를 통한 각 추출물의 adipogenic potential 스크리닝

- ① HepG2 세포에 PPRE를 형질전환 시킨 후 각각의 추출물을 처리하고 8시간 경과 시 luminometer를 이용하여 PPRE의 발현정도를 평가함.
- ② PPAR $\gamma$ 는 지방조직에서 주로 발현하며 지방산 축적과 당대사를 조절함. PPAR $\gamma$ 에 의하여 활성화된 유전자들은 지방세포에 의한 adipogenesis와 지방유입을 촉진함. HepG2 세포에 ROSI 10 mM을 처리하면 무처리와 비교 시 유의적으로 PPAR $\gamma$ 가 발현되는 것일 확인됨. 각 원료별 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 처리를 하면 모든 원료의 모든 농도에서 유의적으로 PPAR $\gamma$ 의 발현이 억제되는 것을 확인하였음. 특히 녹차추출물의 경우 0.1 mg/mL 농도로 처리 시 가장 좋은 PPAR $\gamma$  발현 억제 효과를 보임(Fig. 94).

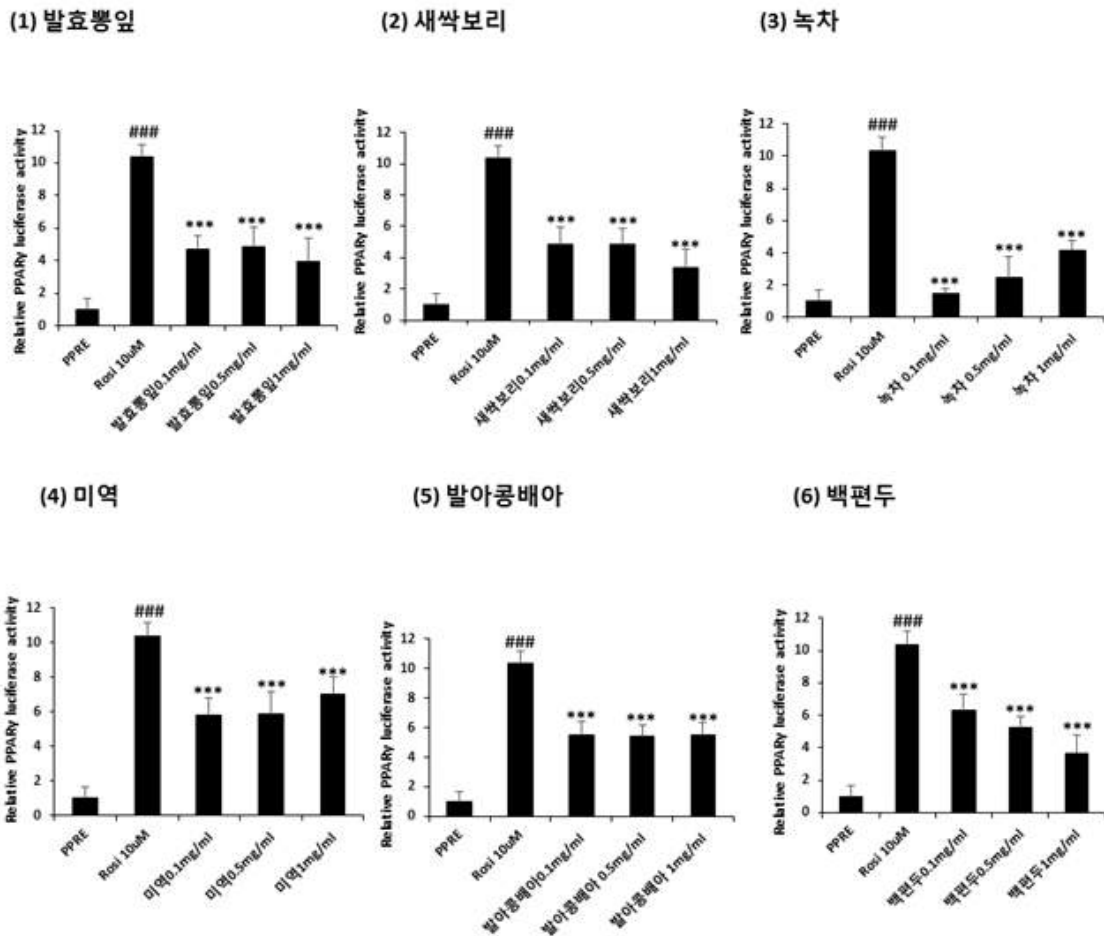
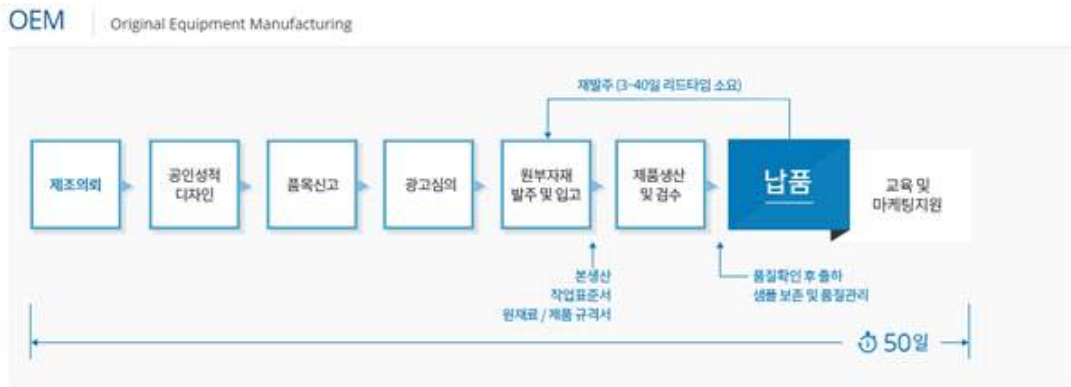
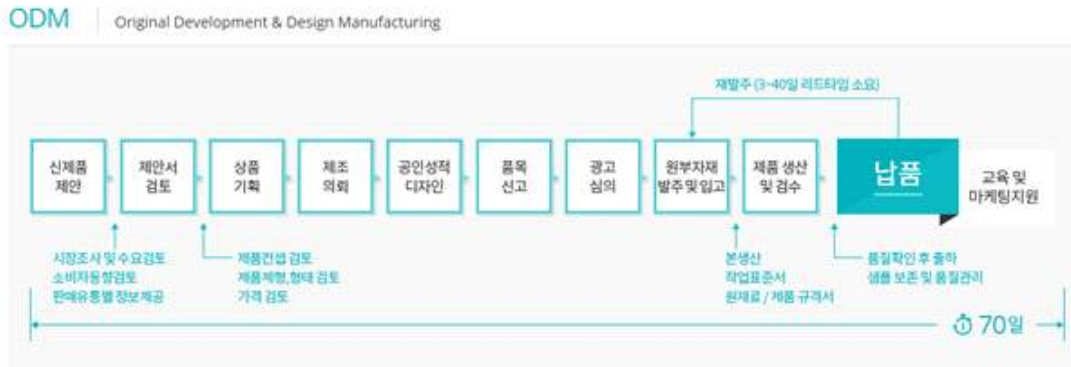


Figure 94. 체지방 복합원료 개발을 위하여 각 원료별 PPAR $\gamma$  luciferase activity 측정 결과

(2) 뽕나무 추출물과 체지방 감소 기능성원료를 이용한 제품 개발

(가) ㈜노바렉스의 ODM, OEM 사업

(주)노바렉스는 당사가 보유한 기술력과 KNOW-HOW를 바탕으로 상품의 기획에서부터 개발, 생산, 품질관리 및 출하에 이르는 전 과정에 대한 서비스를 제공하는 ODM 방식과 고객사의 NEEDS에 따라 생산, 납품하는 OEM 방식을 구축하고 있음.



(주)노바렉스는 ISO9001, SQF, HACCP, GMP, HALAL, CCM 등 국내·외 기관 인증을 통해 소비자들이 믿을 수 있는 위생적인 제품을 제조함.



(나) 발효빵잎추출물을 이용한 체지방 감소 기능성 식품 제품 개발

① 제품개발 프로세스

발효빵잎추출물 이용한 제품을 개발하기 위하여 다음과 같은 프로세스로 진행됨. 유단백 가수분해물을 주 원료로 하여 다양한 부 원료들과 배합하여 최적의 배합비를 선정하고 시제 검토를 통해 품목제조신고를 위해 공인분석 및 5대 영양소 분석을 수행하고, 나온 결과를 바탕으로 식약처에 품목제조신고가 완료된 후 당사 생산 process에 따라 BOM을 입력하고 본 생산이 진행 됨(Fig. 95).

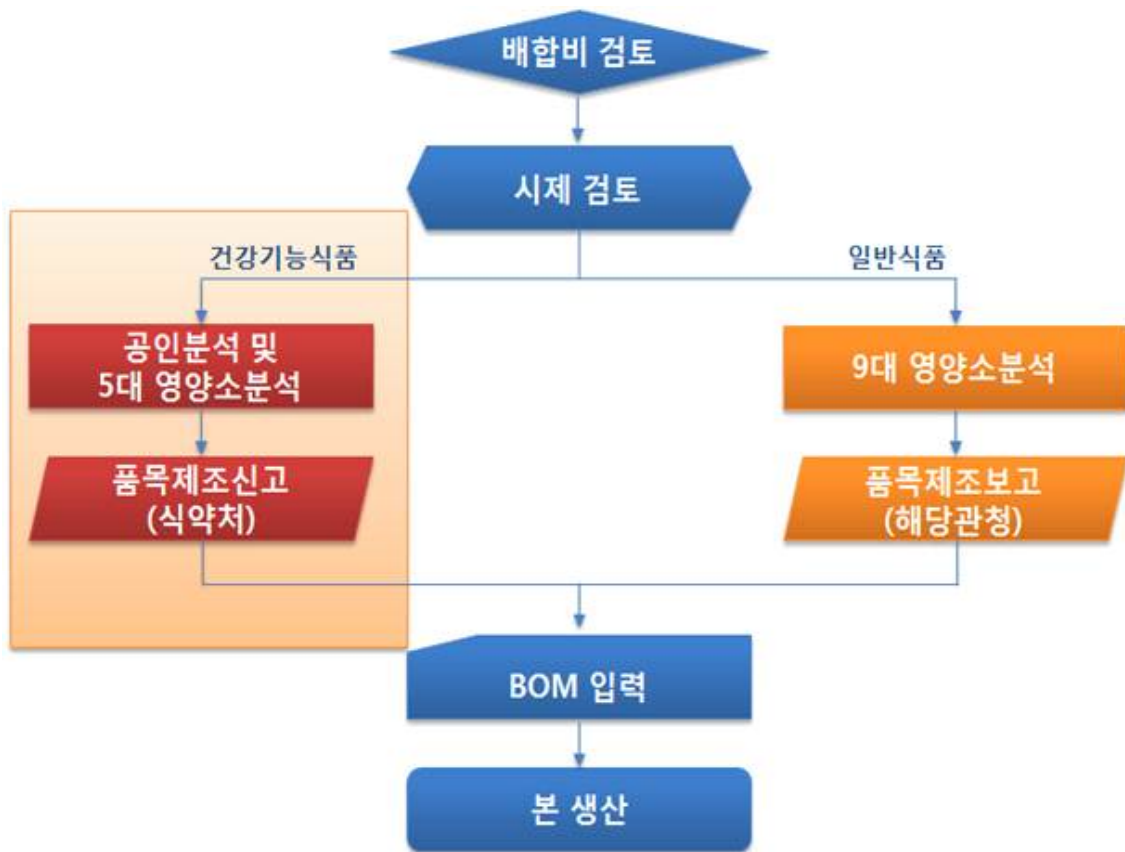


Figure 95. 건강기능식품 및 일반식품 제품개발 process

② 품목제조신고 처리절차

㉠ 신고대상

건강기능식품제조업의 허가를 받은 자가 건강기능식품을 제조하고자 하는 때에는 그 품목의 제조방법설명서 등 보건복지부령이 정하는 사항을 지방식품의약품안전청장에게 품목제조신고를 하여야 함

㉔ 관련규정

건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법시행규칙 제8조

㉕ 신고기관

식품의약품안전청(민원실)

㉖ 구비서류

건강기능식품품목제조신고서

제조방법설명서

원료 또는 성분의 명칭과 함량

유통기간설정 사유서

기준·규격의 검사성적서(건강기능식품의 기준·규격 제품에 한함)

③ 발효빵잎추출물을 이용한 체지방 감소 기능성 식품 제품개발

㉗ 배합비 검토



- 발효빵잎추출물은 현재 체지방감소 기능성에 대한 연구를 수행하고 있으며, (주)글루칸에서 동충하초 발효, 주정 추출 후 분말화하는 대량생산조건을 확립하였으며, 품목제조보고를 완료하여 일반식품의 원료 또는 건강기능식품의 부원료로 사용 가능함.

- 따라서 체지방감소에 효과가 있는 기존의 기능성 원료(녹차추출물, CLA, 가르시니아카보지아추출물 등)를 주원료로 하여 다양한 제형(연질캡슐, 경질캡슐, 정제, 파우더 등)을 검토하여 연질캡슐 2건, 경질캡슐 1건, 정제 3건, 파우더 2건, 총 8건의 제품개발을 추진하였음.



㉔ 제품명 : 슬리밍 녹차

제품명	슬리밍 녹차
섭취방법	1일 1회, 1회 2캡슐을 물과 함께 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	카페인 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음. 특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	PTP포장/박스포장
포장단위	1,200 mg × 1C(1.20 g), 2C, 4C, 6C, 8C, 10C, ...
성상	진한갈색의 내용물을 함유한 적색의 연질캡슐
기능성내용	①항산화 · 체지방감소 · 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	녹차추출물분말(고시형), 포도씨앗유, 밀납, 레시틴, 뽕잎동충하초분말, 젤라틴, 글리세린, D-소비톨액, 안나토색소

품목제조신고서	시제품 사진
	

㉔ 제품명 : 슬리밍 씨엘에이

제품명	슬리밍 씨엘에이
섭취방법	1일 2회, 1회 1캡슐을 물과 함께 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	①위장장애가 발생할 수 있음②영유아, 임산부는 섭취를 삼가야 함③식사조절, 운동을 병행하는 것이 체지방 감소에 효과적임. 특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	병포장/박스포장
포장단위	930 mg × 1C(0.93 g), 2C, 4C, 6C, 8C, 10C, ...
성상	노란하양색의 내용물을 함유한 갈흑색의 연질캡슐
기능성내용	①과체중인 성인의 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	공액리놀레산(고시형), 야자유, 뽕잎동충하초분말, 젤라틴, 글리세린, D-소비톨액, 카카오색소

품목제조신고서	시제품 사진
	

㉔ 제품명 : 슬리밍 가르시니아 분말 에이

제품명	슬리밍 가르시니아 분말 에이
섭취방법	1일 3회, 1회 1포를 물과 함께 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	포/박스포장
포장단위	4150 mg × 1P(4.15 g), 3P, 6P, 9P, 12P, 15P, ...
성상	빨간 주황색의 분말을 포함한 탁한 자줏빛 분홍색의 분말
기능성내용	①탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	가르시니아카보지아 추출물(고시형), 흰강낭콩추출물, 아로니아농축분말, 에리스리톨, 덱스트린, 동결건조딸기분말, 뽕잎동충하초분말, 이산화규소, 딸기향코튼, 효소처리스테비아, 이산화규소

품목제조신고서	시제품 사진



㉔ 제품명 : 슬리밍 가르시니아 분말 비

제품명	슬리밍 가르시니아 분말 비
섭취방법	1일 1회, 1회 1포(5,000 mg)를 물 80 mL에 타서 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	스틱포장/박스포장
포장단위	5000 mg × 1포(5.0 g), 2포, 3포, 4포, 5포, 6포, ...
성상	연한 노란색의 분말
기능성내용	①탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	가르시니아카모보지아 추출물(고시형), 자일리톨, 레몬농축분말, 구연산, 레몬향분말, 에리스리톨, DL-사과산, 유자향분말, 뽕잎동충하초분말, 이산화규소, 수크랄로스

품목제조신고서	시제품 사진
 <p>신고번호 : 198-27(제)제27994105</p> <p>제 200400200081928 호</p> <p><b>건강기능식품 품목제조신고증</b></p> <p>○ 영입허가(번호) : 제 2004000008 호</p> <p>○ 영 수 영 : 주식회사 노르비스</p> <p>○ 소·제·자 : 충청북도 충주시 청원구 오창읍 자갈길 04</p> <p>○ 영입의 종류 : 건강기능식품제조업</p> <p>○ 제·분·명 : 슬리밍 가르시니아 분말비 (원형: 가르시니아카모보지아 추출물)</p> <p>제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (위쪽 작성)          *건강기능식품에 관한 법률 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품용품제조신고를 수리합니다.</p> <p>2018년 12월 27일</p> <p>대전지방식품의약품안전청장</p>	



㉞ 제품명 : 슬리밍 가르시니아 캡슐

제품명	슬리밍 가르시니아 캡슐
섭취방법	1일 3회, 1회 3캡슐(1캡슐 560 mg)을 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	병포장/박스포장
포장단위	560 mg × 1C(0.56 g), 3C, 9C, 18C, 27C, 36C, ...
성상	밝은 회황색의 내용물을 함유한 투명경질캡슐
기능성내용	①탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	가르시니아카보지아 추출물(고시형), 흰강낭콩추출물, 유당분말, 텍스트린, 뽕잎동충하초분말, 커피원두추출물분말, 이산화규소, 유산균혼합분말

품목제조신고서	시제품 사진
	

㉔ 제품명 : 슬리밍녹차정제 에이

제품명	슬리밍녹차정제 에이
섭취방법	1일 1회, 1회 2정(1정당 700 mg)을 물과 함께 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	카페인 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음. 특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	PTP포장/박스포장, 병포장/박스포장
포장단위	700 mg × 1정(0.70 g), 2정, 4정, 6정, 8정, 10정, ...
성상	점막이를 포함한 흐린 황갈색 장방형의 투명 제피정제
기능성내용	①항산화 · 체지방 감소 · 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	녹차추출물(고시형), 결정셀룰로스, 덱스트린, 뽕잎동충하초분말, 카복시메틸셀룰로스칼슘, 스테아린산마그네슘, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 글리세린지방산에스테르혼합제용액

품목제조신고서	시제품 사진
	

㉠ 제품명 : 슬리밍녹차정제 비

제품명	슬리밍녹차정제 비
섭취방법	1일 1회, 1회 2정(1정당 1000 mg)을 물과 함께 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	카페인 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음. 특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	PTP포장/박스포장, 병포장/박스포장
포장단위	1000 mg × 1정(1.0 g), 2정, 4정, 6정, 8정, 10정, ...
성상	호린갈색 장방형의 투명제피정제
기능성내용	①항산화 · 체지방 감소 · 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	녹차추출물분말(고시형), 결정셀룰로스, 유당분말, 뽕잎동충하초분말, 카복시메틸셀룰로스칼슘, 스테아린산마그네슘, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 글리세린지방산에스테르혼합제제용액

품목제조신고서	시제품 사진

㉔ 제품명 : 슬리밍녹차정제 씨

제품명	슬리밍녹차정제 씨
섭취방법	1일 1회, 1회 3정(1정당 800 mg)을 물과 함께 섭취하십시오
섭취 시 주의사항	카페인 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음. 특정질환, 특이체질, 알레르기체질, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있으므로 원료를 확인하시고, 섭취전에 전문가와 상담하시기 바랍니다.
포장방법	PTP포장/박스포장, 병포장/박스포장
포장단위	800 mg × 1정(0.80 g), 3정, 6정, 9정, 12정, 15정, ...
성상	흐린 갈색 점박이가 있는 백색 장방형의 투명제피정제
기능성내용	①항산화 · 체지방 감소 · 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
원재료명 또는 성분명	녹차추출물분말(고시형), 결정셀룰로스, 덱스트린, 뽕잎동충하초분말, 카복시메틸셀룰로스칼슘, 스테아린산마그네슘, 이산화규소, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 글리세린지방산에스테르혼합제제용액

품목제조신고서	시제품 사진
	

(3) 발효를 통해서 만들어진 균의 특성과 썩나무의 특성을 나타낼 수 있는 biomaker의 profiling

(가) 재료 및 방법

① 연구재료

주요 썩나무 종은 부산대학교 밀양캠퍼스에서 재배하고 있는 과상, 대상2호 및 수집종 2종 및 꾸지뽕을 사용하였음. 발효용 썩잎은 경북 상주에서 구입하여 재료로 사용하였음.

② 주요성분 분석을 위한 추출

수집종 및 발효 썩잎 0.5 g을 15 ml conical tube에 넣고 각각의 용매 10 ml 넣고 초음파 추출기에서 1시간 추출한 다음 3,000 rpm에서 10분간 centrifuge하여 상등액을 회수하였음. 회수하고 남은 침전물에 각각의 용액 10 ml을 가하여 추출하는 방식으로 3회 추출하여 모은 다음 최종 volume을 30 ml로 조정하여 HPLC분석용 또는 추출함량을 계산하였음.

③ 시약 및 기기

HPLC 분석 및 시료의 추출에 사용한 유기용매는 Fisher scientific (Fisher scientific Korea, Seoul, Korea)의 HPLC급 용매를 사용하였음. 그 외는 모두 특급시약을 사용하였다. HPLC 분석기기는 Agilent 1100 Series LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)의 system controller, photodiode array detector (PDA), auto sample injector, degasser를 사용하였으며 HPLC column은 Phenomenex사의 Luna C18 column (150×4.6 mm, 5 μm, Phenomenex, USA)을 사용하였음.

④ HPLC 동시분석 방법 확인

동충하초의 주요성분인 cordycepin과 썩나무의 주요성분인 pelargonidin, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin-3-D-glucoside, P-coumaric acid, fisetin, quercetin, cinnamic acid, cinchonine, kaempferol, catechin, callistephin, cyanidin-3-Glucoside의 함량을 확인하였음. 표준품의 정량분석은 용매별 추출물을 0.45 μm syringe filter(Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하였음. 본 실험에서 사용한 고성능액체크로마토그래피(HPLC)는 Agilent 1100 series (Agilent Technologies Inc., CA, USA)이고, 칼럼은 역상 (reverse phase) 칼럼인 Luna C18 (5 μm, 4.6 mm×150 mm), 검출기는 UV detector (254 nm)를 사용하였음. 이동상은 0.025% formic acid (A용액)과 acetonitrile (B용액)을 사용하였고 펌프 프로그램을 통해 gradient를 설정하였으며 유속은 0.8 ml/min로 하였음. 제조된 각각의 용액을 autosampler로 10 μl씩 주입하여 분석실험을 실시하였음. 이동상 용매의 조성과 gradient 조건은 Table 7에서 보는 바와 같이 다양한 조건으로 설정하여 분석실험을 수행하였음. HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 회귀직선방정식에 대입하여 각각 표준물질의 함량을 구했으며 각각의 시료에 대해 3회 반복하여 지표성분의 함량을 산출하였음. HPLC를 이용한 분석법의 신뢰도와 재현성을 검증하기 위해서 ICH 가이드라인에 의한 분석을 수행하였음. 직선성(linearity)은 다섯 개의 농도별로 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(X축)와 피크 면적비(Y축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상관계수를 구하여 확인하였음.

Table 7. Condition of HPLC analysis

Parameters	Values
Instrument	Agilent 1100 series
Solvent	0 min B 0%, 28 min B 100%, 35 min B 100%, 45 min B 20%
A	0.25% Formic acid in distilled water
B	Acetonitrile
Column	Luna C18 (2) column (Phenomenex, 250 × 4.6 mm ID: 5 $\mu$ m)
Run time	60 min
Flow rate	0.5 mL/min
Detector	PDA 254, 260, 320 nm (Slit width = 4)
Column temp.	30 $^{\circ}$ C

## ⑤ 동충하초 균주 배양

균주는 PDA 또는 MEA 평판배지에서 4 $^{\circ}$ C에서 보존하면서 30일 간격으로 계대배양 하였음. 균사 생장을 위해 PDA 또는 MEA 평판배지를 이용하였고 항온배양기에서 25 $^{\circ}$ C로 7일간 배양하였음. PDB 또는 MEB 배지는 300 ml 삼각플라스크에 100 ml씩 각각 넣어 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 살균한 다음 냉각시켜 사용하였음. PDA 평판배지에서 7일간 배양된 균사의 가장자리 부위를 직경 5 mm코르크 보러를 사용하여 각각 3조각을 채취하여 PDB와 MEB 액체배지에 접종한 후 25 $^{\circ}$ C에서 7일간 진탕배양(150 rpm)하여 액체 종균을 생산하였음.

## ⑥ 동충하초 고체발효 및 검액의 조제

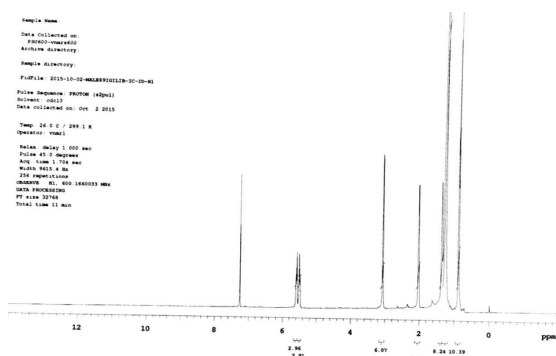
잘게 파쇄한 빵잎에 번데기를 25%와 50%로 잘 섞어서 비닐봉지에 넣은 후, 121 $^{\circ}$ C에서 30분간 고온가압 멸균한 후 상온에서 30분간 식혔음. 각각의 배지에 동충하초 액체종균 현탁액을 5%(v/w) 수준으로 접종하여 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C의 배양기에서 4주간 고체발효 시켰음. 발효물을 분쇄기로 완전히 분말화 한 다음 검체 3.0 g에 95%와 50% 에탄올 및 증류수를 각각 10 ml 넣어 1시간 초음파하여 추출한 다음, 3,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하고, 9 ml을 다시 첨가하여 2회 반복하여 초음파 추출한 용액을 모두 합하여 총량을 30 ml로 조정하였음. 추출액 5 ml을 취하여 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였음. 나머지 25 ml을 Whatman filter paper No 2 (No. 2 filter paper, Whatman, Clifton, NJ, USA)로 필터하여 rotary vacuum evaporator (rotavator R-200, Büchi, Flawil, Switzerland)로 45 $^{\circ}$ C에서 감압 농축한 다음 분석 자료로 사용하였음.



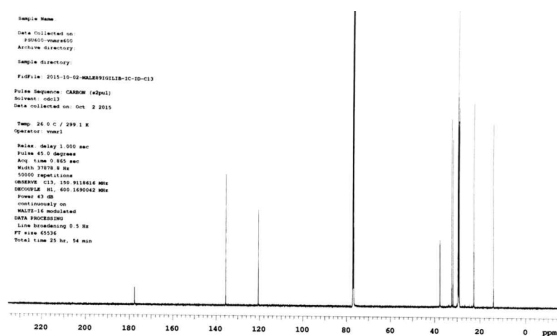
(나) 빵잎으로부터 순수분리

① MALE89IGILIB의 순수분리

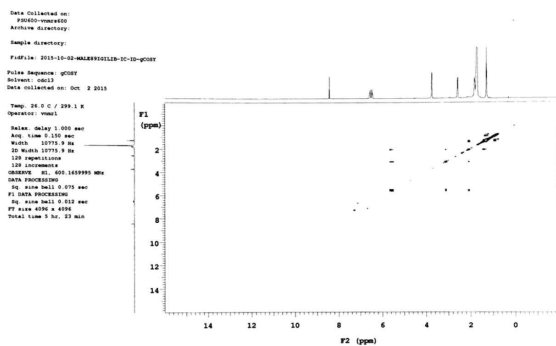
- MALE89IGILIB 성분의 구조동정:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Dept 90, Dept 135, gCOSY, HSQC 및 HMBC spectrum을 이용하여 물질의 구조를 확인하였음. Carbon이 10개인 화합물로서, 항비만 효과는 거의 없는 화합물로서 추후에 다른 생리활성을 검정하여 효과가 있을 경우에는 특허 출원과 관계가 있으므로 다음 보고서에서 구조를 공개할 계획임.



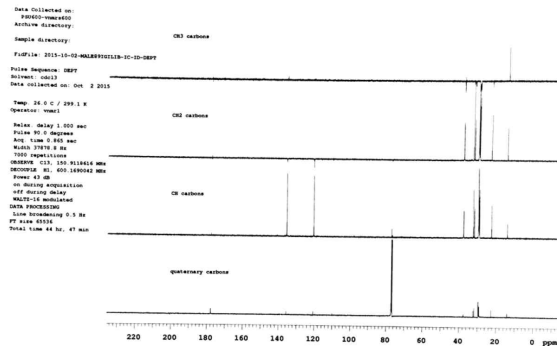
$^{13}\text{H}$ -NMR of MALE89IGILIB in  $\text{CDCl}_3$



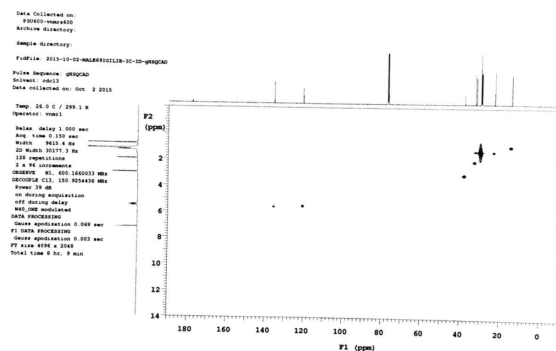
$^{13}\text{C}$ -NMR of MALE89IGILIB in  $\text{CDCl}_3$



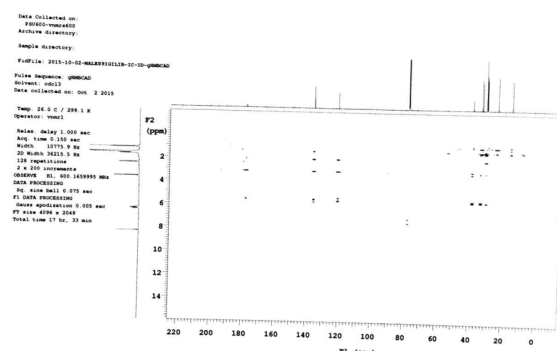
COSY-NMR of MALE89IGILIB in  $\text{CDCl}_3$



Dept-NMR of MALE89IGILIB in  $\text{CDCl}_3$



HSQC-NMR of MALE89IGILIB in  $\text{CDCl}_3$

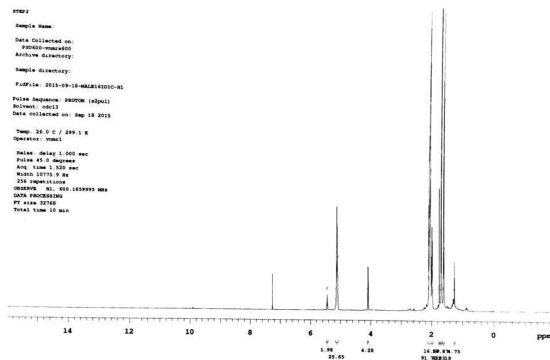


HMBC-NMR of MALE89IGILIB in  $\text{CDCl}_3$

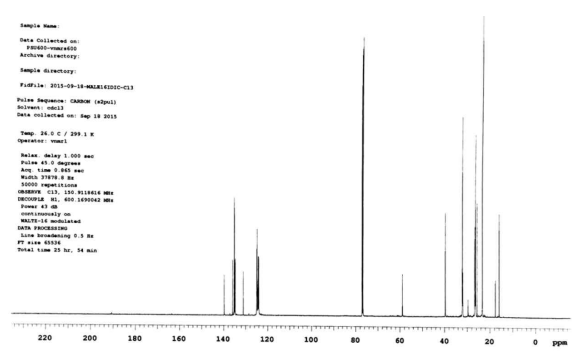
Figure 96. 1D and 2D-NMR spectrum of MALE89IGILIB compound from mulberry leaves.

## ② MALE16IDIC의 순수분리

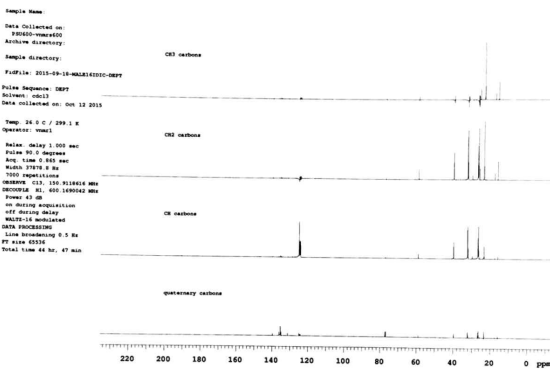
- MALE16IDIC 성분의 구조동정:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Dept 90, Dept 135, gCOSY, HSQC 및 HMBC spectrum을 이용하여 물질의 구조를 확인하였음. Carbon이 16개인 화합물로서, 항비만 효과는 거의 없는 화합물로서 추후에 다른 생리활성을 검정하여 효과가 있을 경우에는 특허출원과 관계가 있으므로 다음 보고서에서 구조를 공개할 계획임.



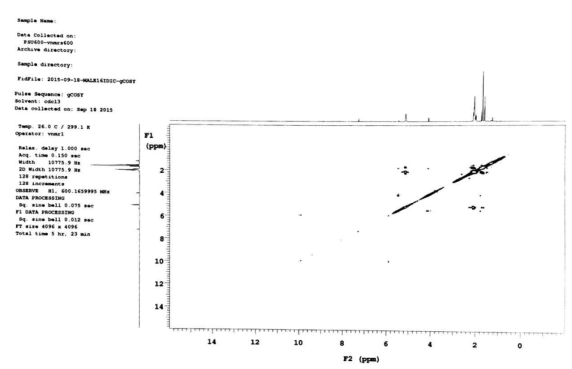
$^1\text{H}$ -NMR of MALE16IDIC in  $\text{CDCl}_3$



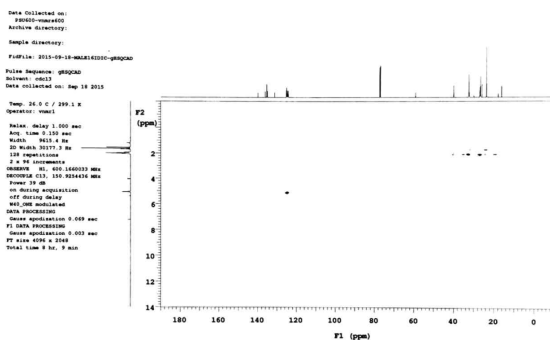
$^{13}\text{C}$ -NMR of MALE16IDIC in  $\text{CDCl}_3$



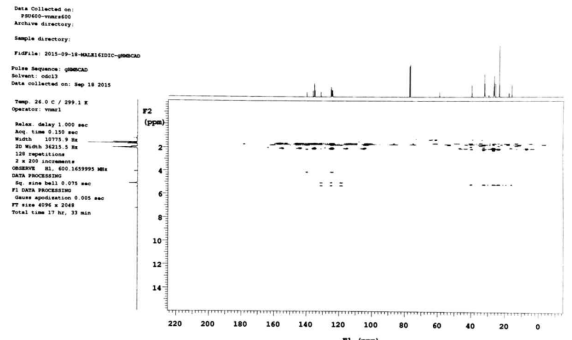
DEPT-NMR of MALE16IDIC in  $\text{CDCl}_3$



COSY-NMR of MALE16IDIC in  $\text{CDCl}_3$



HSQC-NMR of MALE16IDIC in  $\text{CDCl}_3$

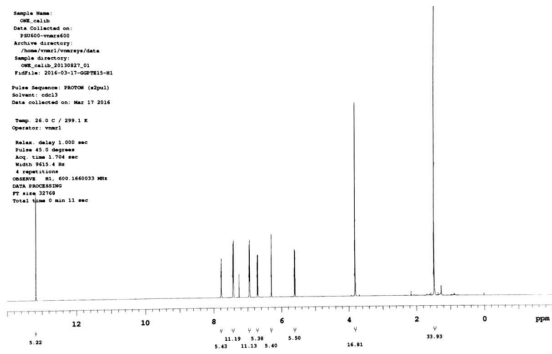


HMBC-NMR of MALE16IDIC in  $\text{CDCl}_3$

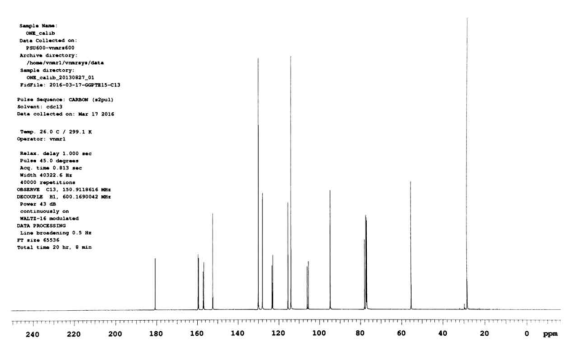
Figure 97. 1D and 2D-NMR spectrum of MALE16IDIC compound from mulberry leaves.

③ 빵잎으로부터 GGPE15의 순수분리

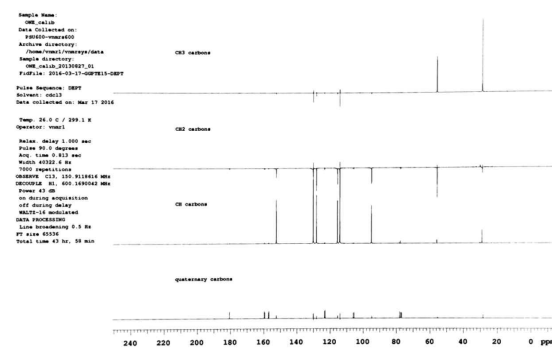
- GGPE15 성분의 구조동정:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Dept 90, Dept 135, gCOSY, HSQC 및 HMBC spectrum을 이용하여 물질의 구조를 확인하였음. Carbon이 18개인 화합물로서, 항비만 효과는 거의 없는 화합물로서 추후에 다른 생리활성을 검정하여 효과가 있을 경우에는 특허출원과 관계가 있으므로 다음 보고서에서 구조를 공개할 계획임.



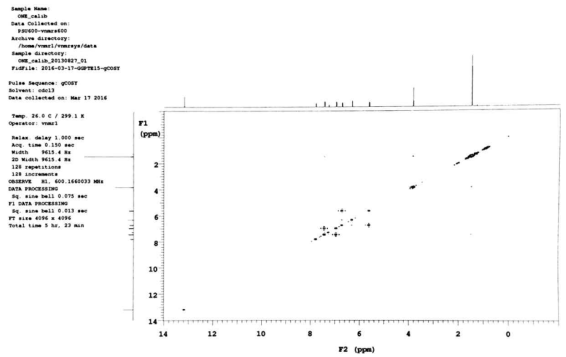
$^{13}\text{H}$ -NMR of GGPE15 in  $\text{CDCl}_3$



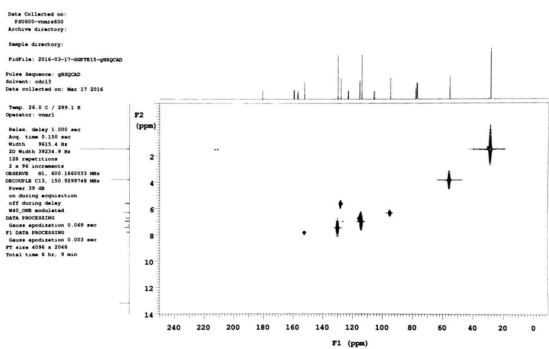
$^{13}\text{C}$ -NMR of GGPE15 in  $\text{CDCl}_3$



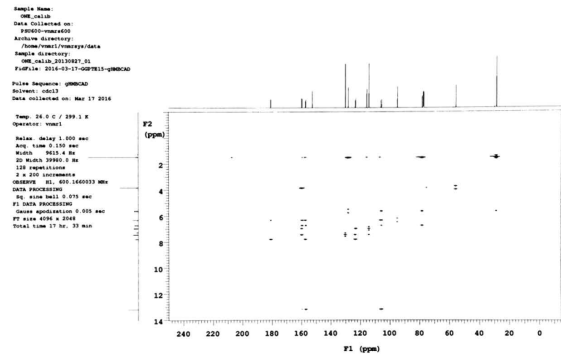
Dept-NMR of GGPE15 in  $\text{CDCl}_3$



COSY-NMR of GGPE15 in  $\text{CDCl}_3$



HSQC-NMR of GGPE15 in  $\text{CDCl}_3$

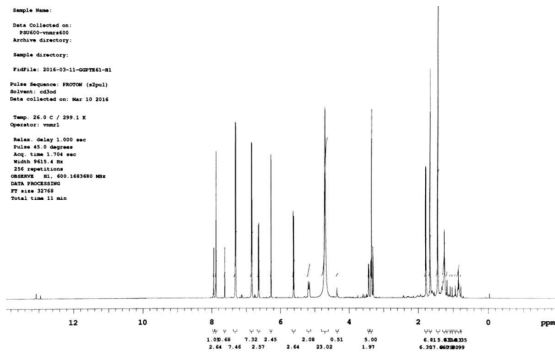


HMBC-NMR of GGPE15 in  $\text{CDCl}_3$

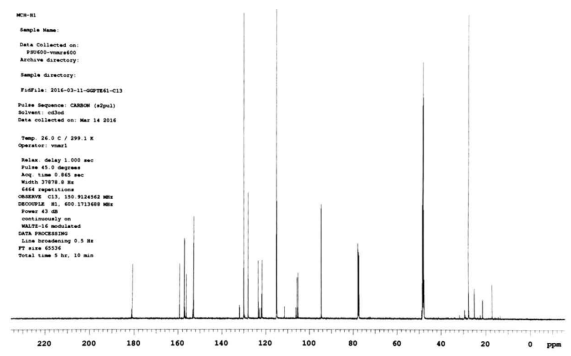
Figure 98. 1D and 2D-NMR spectrum of MALE16IDIC compound from mulberry leaves.

④ 빵잎으로부터 GGPE61의 순수분리

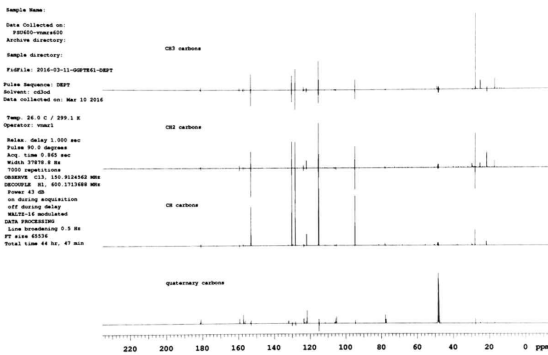
- GGPE61 성분의 구조동정:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Dept 90, Dept 135, gCOSY, HSQC 및 HMBC spectrum을 이용하여 물질의 구조를 확인하였음. Carbon이 17개인 화합물로서, 항비만 효과는 거의 없는 화합물로서 추후에 다른 생리활성을 검정하여 효과가 있을 경우에는 특허출원과 관계가 있으므로 다음 보고서에서 구조를 공개할 계획임.



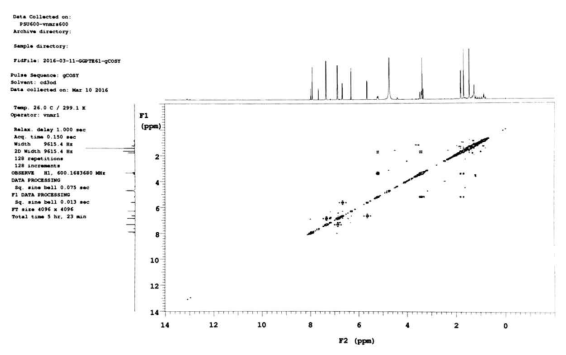
$^{13}\text{H}$ -NMR of GGPE61 in  $\text{CDCl}_3$



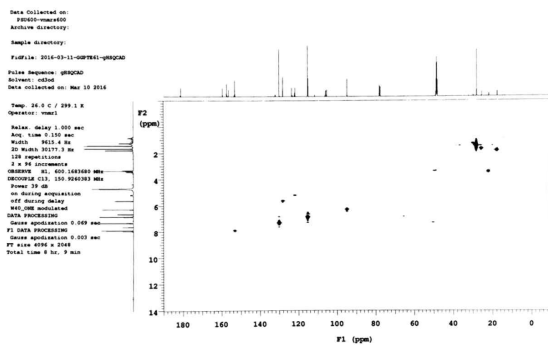
$^{13}\text{C}$ -NMR of GGPE61 in  $\text{CDCl}_3$



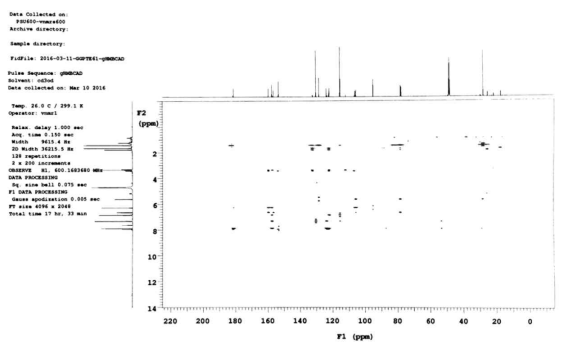
Dept-NMR of GGPE61 in  $\text{CDCl}_3$



COSY-NMR of GGPE61 in  $\text{CDCl}_3$



HSQC-NMR of GGPE61 in  $\text{CDCl}_3$



HMBC-NMR of GGPE61 in  $\text{CDCl}_3$

Figure 99. 1D and 2D-NMR spectrum of MALE16IDIC compound from mulberry leaves.

(다) 뽕잎에 번데기 첨가량에 따른 추출 수율 및 cordycepin의 함량 분석

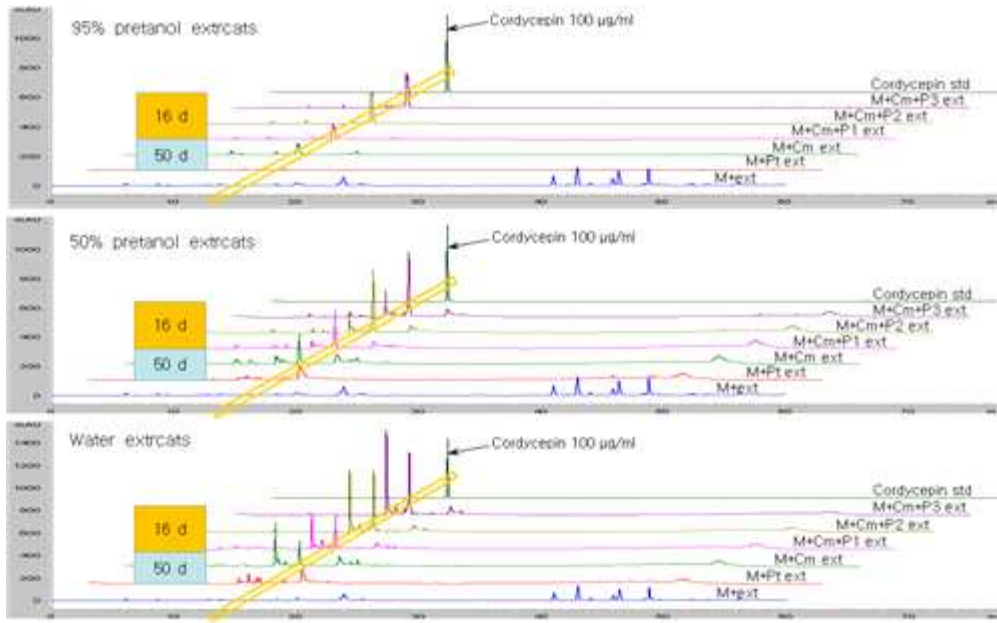
① 뽕잎에 번데기의 함량을 0%, 25% 50%로 첨가시킨 처리와 번데기만(100%)에 밀리타리 동충하초와 눈꽃동충하초로 발효한 발효물을 70% 에탄올과 물로 80℃와 100℃에 추출한 다음 추출수율을 비교한 결과는 아래의 표 8 및 그림 100에서 보는 바와 같음. 번데기를 50% 첨가한 후에 100℃에서 물로 추출한 경우에 추출률이 12.38%로서 가장 높았다. 전체적으로 고온에서 추출함량이 많았으며, 70% 알코올보다는 물로 추출하였을 때에 추출수율이 높았음. 각각의 추출물에 대해서 cordycepin의 함량을 비교한 결과, 눈꽃 동충하초로 발효시킨 경우에는 검출되지 않았으나, 밀리타리 동충하초로 발효시켰을 경우에는 모든 추출물에서 검출되었음. 추출용매는 50% 에탄올로 추출하였을 때에 cordycepin의 함량이 가장 많았으며, 뽕잎에 50%의 번데기를 첨가시켰을 경우에 가장 함량이 많았으며, 다음은 25% 번데기 첨가였다. 100% 번데기 또는 뽕잎만으로 발효시켰을 경우에는 cordycepin의 함량이 유사하게 가장 낮았음. 이때의 성분 profile을 TLC로 비교한 결과는 다음 그림 101에서 보는 바와 같았음. 또한 번데기를 첨가하지 않은 발효 50%번데기 첨가 및 번데기만으로 발효한 발효물의 cordycepin의 함량은 50% 번데기 첨가 시에 가장 많았으며, cyanidin-3-glucoside와 fisetin은 번데기만으로 발효시에 가장 많았으며, 번데기 첨가 함량이 낮을수록 함량이 적었음. 그러나 quercetin은 번데기 무첨가와 50%번데기 첨가 시에는 차이가 거의 없었으나 100% 번데기만으로 발효시에는 함량이 현저히 감소하였음.

Table 8. Extracting yields affected by fermenting medium with *Cordyceps militaris* and extracting conditions

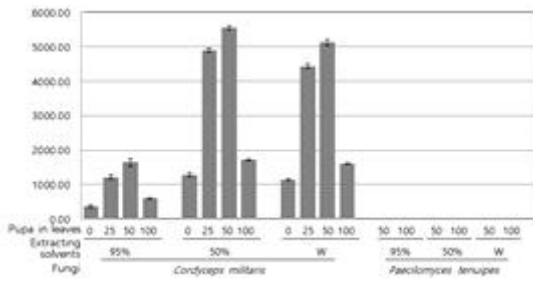
% pupa in mulberry leaves	Extraction		Yield (g)/100 g FW
	Temp. (°C)	EtOH (%)	
100%	80°C	70%	5.76
	100°C	70%	8.68
	100°C	Water	7.50
0%	80°C	70%	6.07
	100°C	70%	7.52
	100°C	Water	9.65
25%	80°C	70%	6.16
	100°C	70%	6.97
	100°C	Water	8.81
50%	80°C	70%	8.27
	100°C	70%	7.82
	100°C	Water	12.38

*Cordyceps militaris*균 배양

A



B



C

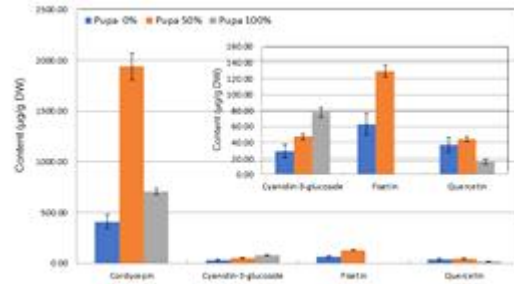


Figure 100. Chromatogram (A) and Content (µg/ml) of cordycepin (B and C) affected by fermenting medium with *Cordyceps militaris* and extracting conditions

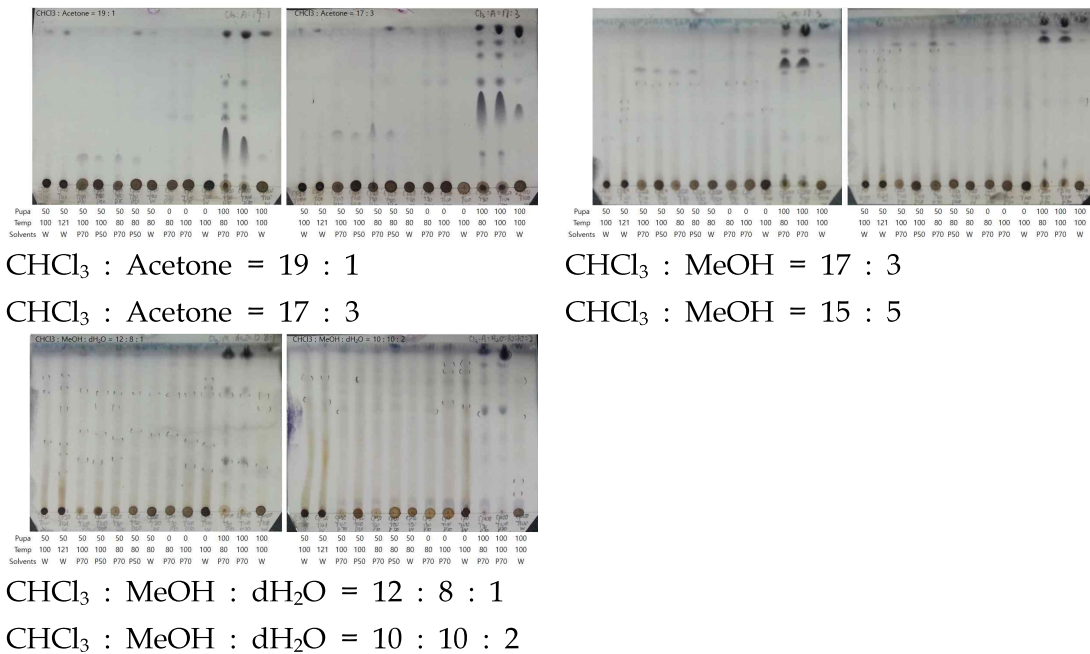


Figure 101. TLC chromatogram of fermented mulberry extracts

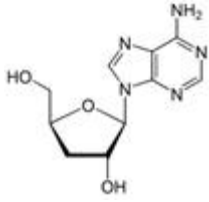
(라) 뽕잎의 생리활성 분석 조건 확립

① 문헌 분석을 통한 딸기의 주요성분을 분석하기 위하여 현재까지 보고된 주요성분 14종을 시약회사로부터 구입하여 분석방법을 확립하였음. 국내에서 재배되고 있는 주요 품종과 육성중인 계통의 생리활성물질의 함량을 분석한 자료를 기반으로 하여 동충하초의 주요성분인 cordycepin과 뽕나무의 주요성분인 pelargonidin, chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin-3-D-glucoside, P-coumaric acid, fisetin, quercetin, cinnamic acid, cinchonine, kaempferol, catechin, callistephin, cyanidin-3-Glucoside 등 15종의 회귀직선식, 검출한계 (LOD)와 정량한계(LOQ) 값을 구하여 동시분석방법을 확립하였음(Table 9, Fig. 102, 103).

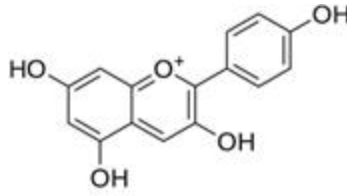
Table 9. Linear regression, calibration curve LOD, LOQ data at 254 nm for biological active compounds from mulberry.

Compounds	Correlation coefficient	Range (µg/ml)	Regression equation	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Cordycepin	0.9997	1-100	$y = 18.11X - 5.54$	0.174	0.573
Pelargonidin	0.9989	1-100	$y = 8.11x - 22.02$	0.474	1.563
Chlorogenic acid	0.9989	1-100	$y = 15.57x - 2.42$	0.212	0.701
Caffeic acid	0.9989	0.5-50	$y = 35.49x + 8.86$	0.080	0.263
Quercetin-3-D-glucoside	0.9989	1-100	$y = 25.82x - 16.23$	4.333	13.100
P-Coumaric acid	0.9999	2.5-50	$y = 15.25x - 2.13$	0.639	2.108
Fisetin	0.9995	0.5-50	$y = 48.56x - 21.71$	1.929	6.366
Quercetin	0.9999	0.5-50	$y = 73.44x - 25.34$	1.467	4.842
Cinnamic acid	0.9997	0.5-50	$y = 1.27x - 2.33$	1.438	4.746
Cinchonine	0.9999	2.5-100	$y = 3.46x - 2.55$	1.467	4.842
Kaempferol	1.0000	0.5-50	$y = 42.70x + 9.91$	1.067	3.520
Catechin	0.9999	10-100	$y = 2.77x - 1.78$	1.052	3.471
Callistephin	0.9999	2.5-100	$y = 17.32x + 3.75$	0.903	2.981
Cyanidin-3-Glucoside	0.9999	5-100	$y = 13.17x - 7.55$	1.857	6.128

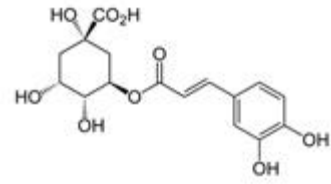




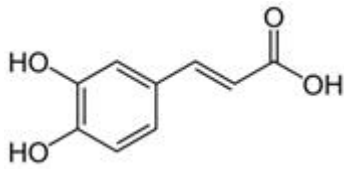
Cordycepin



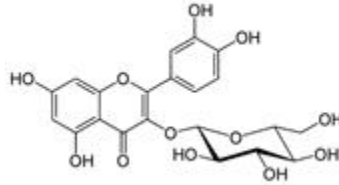
Pelargonidin



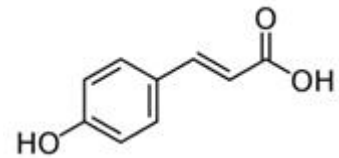
Chlorogenic acid



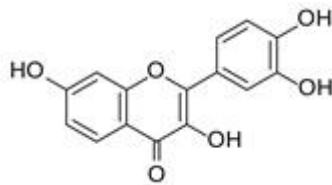
Caffeic acid



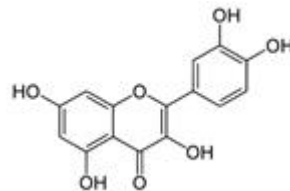
Isoquercetin =  
Quercetin-3-β-D-glucoside



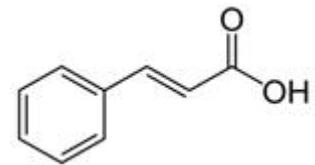
p-Coumaric acid



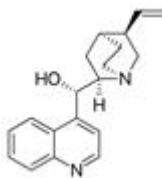
Fisetin



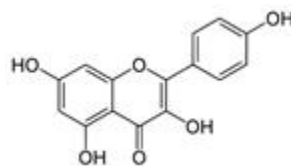
Quercetin



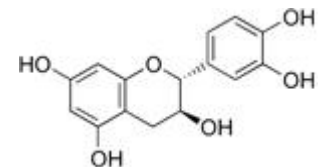
t-Cinnamic acid



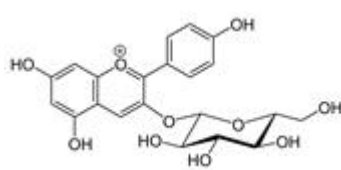
Cinchonine



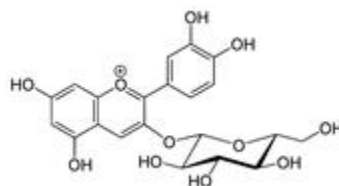
Kaempferol



(+)-Catechin

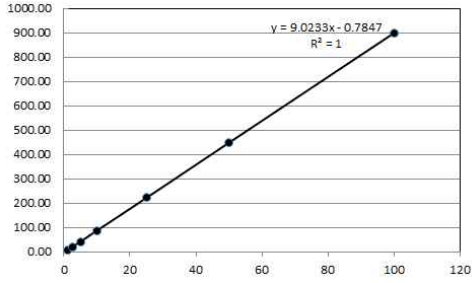


Callistephin

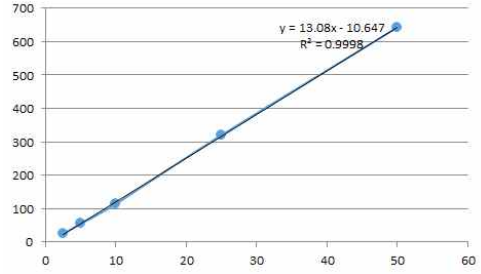


Cyanidin-3-Glucoside

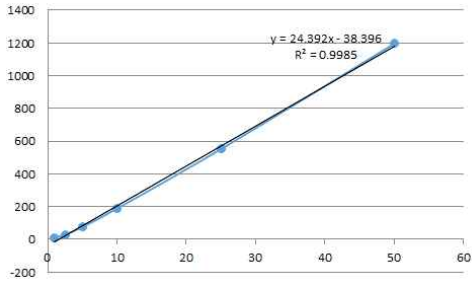
Figure 102. Structure of biological compounds from mulberry.



Cordycepin



Chlorogenic acid

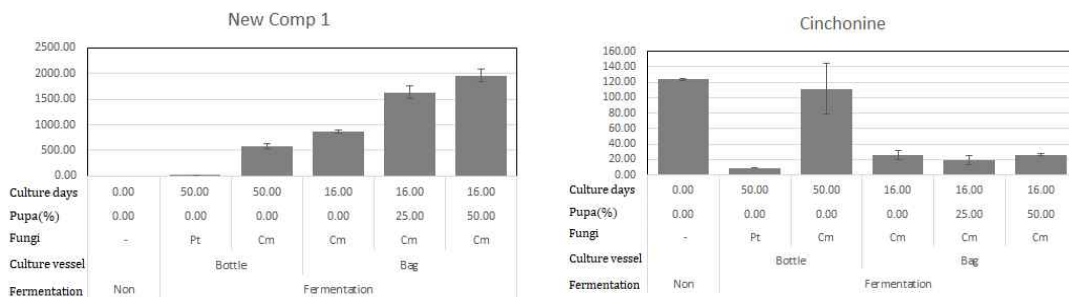


Quercetin-3-D-glucoside

Figure 103. Linear response of peak area against cordycepin, chlorogenic acid and quercetin-3-D-glucoside concentration

(마) 병 및 봉지 발효물 추출물의 기능성 성분 함량 분석

① 발효시에 새로이 만들어지는 성분인 New comp 1은 눈꽃동충하초를 배양병에서 발효시켰을 경우에는 거의 만들어지지 않았으나, 비닐봉지에서 고체 배양시에는 번데기의 첨가량이 많을수록 함량이 증가하는 경향이있음. Cinchonine은 밀리타리스 동충하초로 배양병에서 배양하였을 때에 현저히 증가하였으나, 다른 처리에서는 거의 차이가 없었음. Quercetin-3-glucuronide는 발효함으로서 함량이 현저히 감소하였음. Kaempferol은 번데기를 첨가하였을 경우에는 거의 검출되지 않았으며, Fisetin도 발효를 함으로서 현저히 감소하였음(Fig. 104).



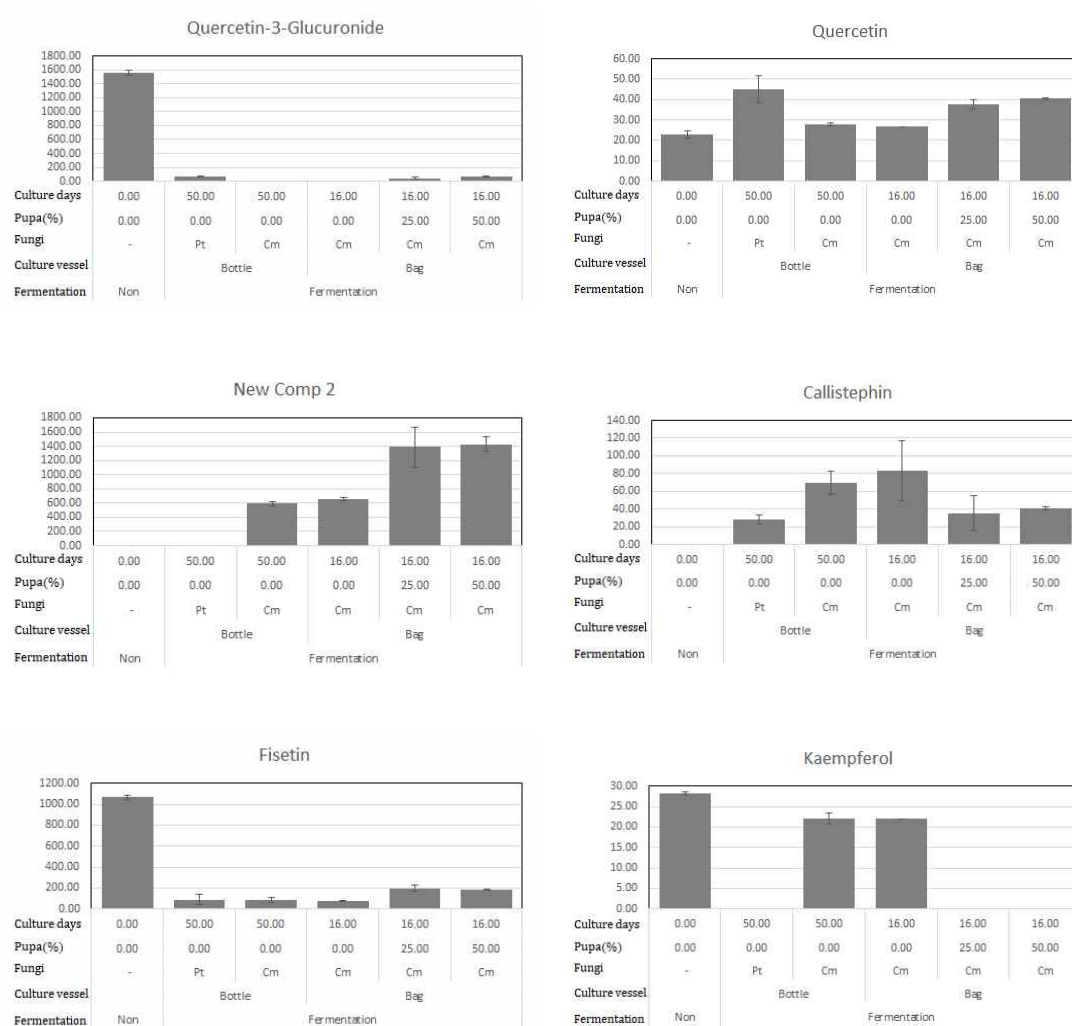


Figure 104. Content of biological active compounds of fermented with *Cordyceps militaris*. Mulberry leaves mixed with pupa and then fermented with *Cordyceps militaris*.

(바) 50% 번데기가 첨가된 빵잎 발효 추출물의 생리활성 성분 함량 분석

① 빵잎(non)과 발효빵잎(fermented)을 MeOH, 50% MeOH 및 물 추출물의 기능성 성분을 조사한 결과, *Cordyceps militaris* 동충하초 균의 주요성분인 cordycepin의 함량은 미발효 빵잎에서는 검출되지 않았으나, 물로 추출하였을 때에 가장 많았으며, MeOH 용매의 농도가 높을수록 감소하였음. Pelargonidin의 함량은 발효를 함으로서 증가하였으며, 50% MEOH와 물 추출물은 함량이 약 670  $\mu\text{g/g}$  샘플로서 유사하였으나, MeOH 추출물은 현저히 감소하였음. Chlorogenic acid도 발효를 함으로서 현저히 증가하였으며, 50% MEOH 추출물에서 함량이 가장 많았음. Isoquercetin과 Caffeic acid는 발효를 함으로서 함량이 현저히 감소하였으며 50% MEOH 추출물에서 함량이 가장 많았음(Table 10).

Table 10. Content of biologically active compounds in non-fermented and fermented mulberry containing 50% silkworm pupa extracts.

Solvents	Fermentation states	Code	Content ( $\mu\text{g/g}$ )									
			Cordycepin		Pelargonidin		Chlorogenic acid		Isoquercetin		Caffeic acid	
MeOH	Non	MLP70	ND		373.6 $\pm$	52.9	12982.5 $\pm$	586.4	8955.3 $\pm$	447.0	2480.6 $\pm$	83.2
	Fermented	ML4WP70	3737.3 $\pm$	288.0	749.1 $\pm$	129.7	3487.7 $\pm$	309.5	939.3 $\pm$	164.9	1558.3 $\pm$	135.4
50% MeOH	Non	MLP70	ND		464.5 $\pm$	56.6	4950.1 $\pm$	226.7	14589.9 $\pm$	283.4	4043.6 $\pm$	196.9
	Fermented	ML4WP70	4793.2 $\pm$	526.8	2208.8 $\pm$	566.1	6072.8 $\pm$	817.8	2383.0 $\pm$	318.9	2422.1 $\pm$	314.2
Water	Non	MLP70	ND		469.7 $\pm$	42.5	4413.0 $\pm$	23.7	2564.2 $\pm$	2 8.5	3793.7 $\pm$	87.5
	Fermented	ML4WP70	5120.3 $\pm$	393.7	1897.1 $\pm$	451.6	5597.5 $\pm$	631.5	8933.0 $\pm$	1911.8	2226.5 $\pm$	257.6

*Mulberry containing 50% silkworm pupa were fermented with C. militaris for 4 weeks at 25°C. Non-fermented mulberry and fermented strawberry were extracted with MeOH, 50% MeOH and water for each sample. Each value was expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 3), ND indicates not detected.*

(사) 최적의 발효 썬잎의 기능성 성분 함량 profiling

- ① 이상의 결과로부터 cordycepin을 다량으로 함유할 수 있는 방법은 썬잎에 50%의 번데기를 첨가한 배지에서 cordycepin의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으나, 중국산 번데기를 사용할 경우에는 표준화가 어려울 것으로 판단되어서 번데기를 첨가하지 않은 썬잎을 발효하여서 사용하기로 결정하였음. 이러한 발효 기술은 주관기관인 (주)노바렉스에 기술을 이전하여서 (주)노바렉스에서 발효하여 생산한 발효물을 추출물하여 소재로 사용하였음. 각각의 샘플을 70% 알콜로 추출한 다음 건조한 샘플을 100% 메탄올, 50% 메탄올 및 물로 추출한 추출물의 생리활성 성분을 조사한 결과는 다음 표에서 보는 바와 같음(Table 11).
- ② ML4WP70와 G-FMAA의 70% 에탄올 추출물의 cordycepin의 함량은 물로 추출시에 가장 많았으며, pelargonidin도 ML4WP70와 G-FMAA에서 발효하지 않은 MLP70보다 현저히 증가하였음. 그러나 chlorogenic acid, isoquercetin 및 caffeic acid은 발효를 함으로서 현저히 감소하였음(Fig. 105).

Table 11. Content of biological active compounds in non-fermented and fermented mulberry extracts according to different extracting methods and solvents.

Solvents	Sample	Content ( $\mu\text{g/g}$ sample)				
		Cordycepin	Pelargonidin	Chlorogenic acid	Isoquercetin	Caffeic acid
MeOH	MLP70	0.0 $\pm$ 0.0	373.6 $\pm$ 52.9	12982.5 $\pm$ 586.4	8955.3 $\pm$ 447.0	2480.6 $\pm$ 83.2
	ML4WP70	3737.3 $\pm$ 288.0	749.1 $\pm$ 129.7	3487.7 $\pm$ 309.5	939.3 $\pm$ 164.9	1558.3 $\pm$ 135.4
	G-FMAA	1781.2 $\pm$ 157.6	380.6 $\pm$ 36.6	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
	N-MAW	0.0 $\pm$ 0.0	142.2 $\pm$ 45.4	1032.9 $\pm$ 184.9	323.3 $\pm$ 63.5	721.0 $\pm$ 167.4
	N-MAA	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	926.2 $\pm$ 25.4	473.5 $\pm$ 7.2	511.9 $\pm$ 8.9
50% MeOH	MLP70	0.0 $\pm$ 0.0	464.5 $\pm$ 56.6	4950.1 $\pm$ 226.7	14589.9 $\pm$ 283.4	4043.6 $\pm$ 196.9
	ML4WP70	4793.2 $\pm$ 526.8	2208.8 $\pm$ 566.1	6072.8 $\pm$ 817.8	2383.0 $\pm$ 318.9	2422.1 $\pm$ 314.2
	G-FMAA	6975.9 $\pm$ 81.9	1250.1 $\pm$ 37.9	114.1 $\pm$ 47.9	151.4 $\pm$ 103.3	104.8 $\pm$ 27.3
	N-MAW	0.0 $\pm$ 0.0	676.4 $\pm$ 38.6	3859.7 $\pm$ 34.4	1344.9 $\pm$ 120.5	2059.2 $\pm$ 16.2
	N-MAA	0.0 $\pm$ 0.0	409.2 $\pm$ 8.1	4405.5 $\pm$ 67.8	2322.8 $\pm$ 74.7	1957.3 $\pm$ 35.8
Water	MLP70	0.0 $\pm$ 0.0	469.7 $\pm$ 42.5	4413.0 $\pm$ 23.7	2564.2 $\pm$ 8.5	3793.7 $\pm$ 87.5
	ML4WP70	5120.3 $\pm$ 393.7	1897.1 $\pm$ 451.6	5597.5 $\pm$ 631.5	8933.0 $\pm$ 1911.8	2226.5 $\pm$ 257.6
	G-FMAA	7018.5 $\pm$ 187.6	1207.6 $\pm$ 35.5	64.7 $\pm$ 17.3	118.2 $\pm$ 29.8	70.2 $\pm$ 13.2
	N-MAW	0.0 $\pm$ 0.0	580.8 $\pm$ 35.4	2815.1 $\pm$ 115.9	553.8 $\pm$ 67.0	1184.5 $\pm$ 73.2
	N-MAA	0.0 $\pm$ 0.0	502.1 $\pm$ 30.7	2594.2 $\pm$ 207.5	674.6 $\pm$ 93.8	1042.2 $\pm$ 64.1

Mean  $\pm$  SD

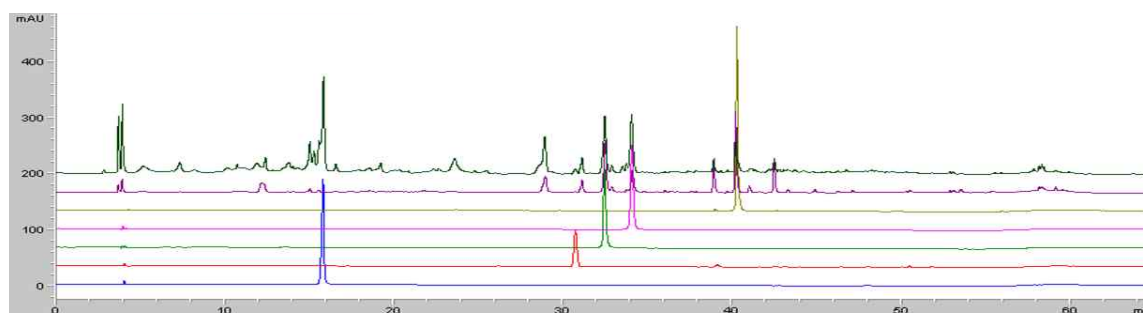


Figure 105. HPLC chromatogram of fermented and non-fermented mulberry extracts. Blue color: Cordycepin, red color: Pelargonidin, green color: chlorogenic acid, purple color: Isoquercetin, basic color: caffeic acid.

(아) 기능성 소재의 항비만 효능 검증

① 최적 발효 추출물인 ML4W-P70의 항비만 효능 검증

㉠ 재료 및 방법

- 밀리타리스 동충하초의 배양 : 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 PDA 또는 MEA 평판배지에서 4°C에서 보존하면서 30일 간격으로 계대배양하였음. 군사생장을 위해 PDA 또는 MEA 평판배지를 이용하였고 항온배양기에서 25°C로 7일간 배양하였음. PDB 또는 MEB 배지는 300 ml 삼각플라스크에 100 ml씩 각각 넣어 121°C에서 15분간 살균한 다음 냉각시켜 사용하였음. PDA 평판배지에서 7일간 배양된 균사의 가장자리부위를 직경 5 mm 코르크 보러를 사용하여 각각 3조각을 채취하여 PDB와 MEB 액체배지에 접종한 후 25°C에서 7일간 진탕배양(120 rpm)하여 액체 종균을 생산하였음.
- 발효빵잎의 제조 : 빵잎 및 번데기 혼합물의 발효를 위해 우선 분말 빵잎에 빵잎 중량 대비 25% 번데기(silkworm pupa)를 첨가하고, 상기 혼합물을 10 cm x 50 cm의 오토클레이브 가능한 비닐에 넣었음. 비닐은 현대오토클레이브(Hyundai Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 121°C에서 60분간 고온가압 멸균한 후 상온에서 30분간 식혔음. 본 발명에 따른 발효 빵잎 추출물의 항비만 효과를 더욱 더 높이기 위하여, 그 후 빵잎 및 번데기 혼합물에 준비한 밀리타리스 동충하초 균사체를 액체 종균의 형태로 혼합물 중량 대비 5%(v/w) 수준으로 접종하고 25±1°C의 배양기에서 4주간 발효시켜 발효빵잎을 제조하였음.
- 발효빵잎 추출물의 제조 : 준비한 발효빵잎을 분쇄기로 완전히 분말화한 다음 검체 3.0 g에 70%(v/v) 에탄올을 10 ml 넣어 1시간 초음파하여 추출하고, 3,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하고, 남은 분말에 에탄올 9 ml을 다시 첨가하여 첫 번째 추출과 동일한 방법으로 2회 반복하여 초음파 추출한 용액을 모두 합하여 총량을 30 ml로 조정하였음. 추출액 5 ml을 취하여 0.45 µm 시린지 필터(syringe filter)로 여과한 여액을 HPLC분석용 검액으로 사용하였음. 남은 25 ml을 회전증발기로 용매를 완전히 증발시킨 다음 항비만 효능 검액으로 사용하였음.
- 세포배양 : 지방전구세포인 3T3-L1 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Korea)에서 구매하여 10% FBS, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> 및 25 mM 헤페스가 함유된 DMEM (Gibco, Gland Island, NY, USA)에서 배양하였음(배양 배지). 48-웰 플레이트에서 100% confluence에 도달하면, 상기 세포들을 10 µM 로시글리타존, 10 µg/ml 인슐린 및 1 µM 텍사메타손이 함유된 배지에서 배양하여 분화를 유도하였음(분화 배지). 분화 배지는 2일 후 추가적인 48시간 동안 새로운 배지로 교체되고, 2일마다 분화 배지로 보충되었음.
- 세포 내 지방 축적 확인 : 분화 과정에서 DMSO에 용해된 빵잎 추출물(MLP70) 및 발효빵잎 추출물(ML4WP70)을 분화 배지에 첨가하여 3T3-L1 지방전구세포의 지방구(lipid droplet) 생성에 미치는 영향을 관찰하였음. 분화 유도 8일째에 지방세포(adipocyte)를 PBS

로 세척한 후, 실온에서 20분 동안 4% 파라포름알데히드를 사용하여 고정시키고, 4°C에서 30분간 Oil red O로 염색하였음. 염색 후, 과량의 염료를 제거하고 PBS를 플레이트를 2번 세척한 후 Motic 현미경(Motic, Xiamen, China)을 사용하여 사진을 촬영하였음. 분화된 3T3-L1 세포에 함유된 중성지방 농도를 측정하기 위해 Oil red O로 염색된 지방세포에 150  $\mu$ l 이소프로판올을 첨가한 후, 각 웰에서 100  $\mu$ l씩을 다른 96-웰 플레이트로 옮기고 BioTek elisa reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용해 흡광도 500 nm에서 O.D.값을 측정하였음.

- 글루코스 및 트리글리세라이드 농도 측정 : 트리글리세라이드(triglyceride)는 글루코스(glucose)와 함께 세포의 중요한 에너지원으로 사용되지만 여분의 트리글리세라이드는 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용하며, 다양한 질환의 원인이 되기도 함. 따라서 지방세포 분화 과정에서 DMSO에 용해된 뽕잎 추출물(MLP70) 및 발효뽕잎 추출물(ML4WP70)을 분화 배지에 첨가하여 본 발명에 따른 발효뽕잎 추출물의 지방세포 내 글루코스 흡수 및 트리글리세라이드 축적억제 효과를 확인하였음. 이를 위해, 분화 유도 8일째에 시판용 글루코스 검출 키트(아산 제약)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 각 웰의 배지에서 글루코스 농도를 측정하였음. 또한, 5% triton X-100 (Bioshop, Burlington, Ontario, Canada)을 사용하여 각 웰에서 트리글리세라이드를 추출하고, 시판용 TG 검출 키트(아산 제약)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 트리글리세라이드 농도를 정량화하였음.
- 웨스틴 블랏 : 발효뽕잎 추출물이 지방세포분화 관련 전사인자(adipogenic transcription factor)들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 웨스틴 블랏을 수행하였음. 3T3-L1 세포를 24시간 또는 8일 동안 배양배지(대조군), 분화 배지, 서로 다른 농도의 ML4WP70이 함유된 분화 배지에서 배양하고, PBS로 1회 세척한 후 세포를 수확한 뒤 이를 RIPA 버퍼(150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl 및 1mM 페닐메탄설폰일 플루오라이드)에 넣고 30분간 얼음에서 분해하였음. 세포 용해물을 4°C에서 12,000g로 15분간 원심분리한 후, 상층액에 4 x 로딩버퍼(BioRad, Hercules, CA, USA) 및 2-메르캅토에탄올(BioRad, Hercules, CA, USA)을 넣고 95°C에서 7분 동안 가열하여 전기영동용 시료를 만들고, 단백질을 단백질 마커와 함께 12% SDS PAGE를 통하여 분리하였으며 PVDF 막으로 분리된 단백질을 이동시켰음. 막은 1% BSA/PBST 버퍼(0.1% Tween-20/PBS)를 사용하여 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하였음. 그 후 1차 항체를 3% BSA-PBST 용액으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰음. PBST 용액으로 5분씩 3회 세척하고 난 후 HRP-접합된 2차 항체를 상온에서 1시간동안 반응시킨 다음 PBST 용액으로 5분씩 3회 세척하였음. ECL검출 키트(Thermo Scientific, Rocford, IL, USA)를 사용하여 발광시키고 Image J소프트웨어(Wayne Rasband, NIH, USA)를 사용하여 특정 단백질의 발현 양을 분석하였음.
- 지방세포분화 관련 전사인자의 발현 억제능 확인 : 지방 생성 및 지질 축적은 지방전구세포의 지방세포로의 분화에 영향을 미치는 많은 전사인자(transcript factors)에 의해 조절되며, PPAR- $\gamma$ 는 지방세포 A-FABP(Adipocyte fatty acid-binding protein, 지방산 결합 단백질)



질), FAS(Fatty acid synthase, 지방산 합성효소), LPL(lipoprotein lipase, 지단백질리파제), HMGCR(3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-조효소 A 환원 효소)과 같이 지질 합성 및 지질 축적에 결정적인 역할을 수행하는 인자들을 조절함. 또한, PPAR- $\gamma$ 는 Glut4(Glucose transporter type 4, 글루코스 전달체 4)의 발현 조절을 통해 글루코스 흡수를 조절함. 발효팽잎 추출물의 각 인자 발현에 대한 영향을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 수행하고 그 결과를 나타내었음.

㉔ 발효팽잎 추출물의 생리활성 성분 분석

- 발효시키지 않은 팽잎 추출물(MLP70)을 대조군으로 하여, 발효팽잎(ML4WP70)을 70% EtOH 추출한 추출물의 생리활성 성분을 분석하고, 그 결과를 표 12에 나타내었음. 각 값은 평균  $\pm$  표준편차(n = 3)로 나타내었고, ND는 검출되지 않음을 나타냄.

Table 12. Content of biologically active compounds in non-fermented and fermented mulberry containing 50% silkworm pupa extracts.

Fermentation states	Code	Content ( $\mu\text{g/g}$ )				
		Cordycepin	Pelargonidin	Chlorogenic acid	Iso-quercetin	Caffeic acid
Non-fermented	MLP70	ND	469.7 $\pm$ 42.5	4413.0 $\pm$ 23.7	2564.2 $\pm$ 28.5	3793.7 $\pm$ 87.5
Fermented	ML4WP70	5120.3 $\pm$ 393.7**	1897.1 $\pm$ 451.6**	5597.5 $\pm$ 631.5*	8933.0 $\pm$ 1911.8**	2226.5 $\pm$ 257.6**

Mulberry containing 50% silkworm pupa were fermented with *C. militaris* for 4 weeks at 25°C. Non-fermented mulberry and fermented strawberry were extracted with 70% ethanol. For HPLC analysis, extracts were dissolved in water for each sample. Each value was expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 3), ND indicates not detected, \* as  $p < 0.05$  vs MLP70 group, \*\* as  $p < 0.01$  vs MLP70 group.

- 위의 표에 나타낸 바와 같이, 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 주요성분인 코디세핀(cordycepin)의 함량은 미발효 팽잎에서는 검출되지 않았으나, 70% 에탄올로 추출하였을 때에 가장 많이 검출되었음. 펠라르고니딘(Pelargonidin)의 함량은 발효에 따라 약 2배정도 증가하였음. 클로로젠산(chlorogenic acid), 이소케르세틴(isoquercetin) 및 카페인산(caffeic acid)는 발효에 따라 함량이 감소하였음.

㉕ 발효팽잎의 생리활성 촉진

- 발효팽잎 추출물(ML4WP70)은 팽잎 추출물(MLP70)에 비해 우수한 지방세포 분화 억제능을 나타냄을 확인하였음. ML4WP70 처리군의 경우 MLP70 처리군에 비해 저농도에서도 지방구의 개수가 현저히 적게 나타남을 확인하였음(Fig. 106A). 또한, MLP70 처리군의 경우

100  $\mu\text{g/ml}$  및 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 높은 농도에서만 유의적인 지방세포 분화 억제능을 보인 반면, ML4WP70 처리군의 경우 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  및 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 적은 농도에서도 지방세포 분화를 효과적으로 억제함을 확인하였음(Fig. 106B).

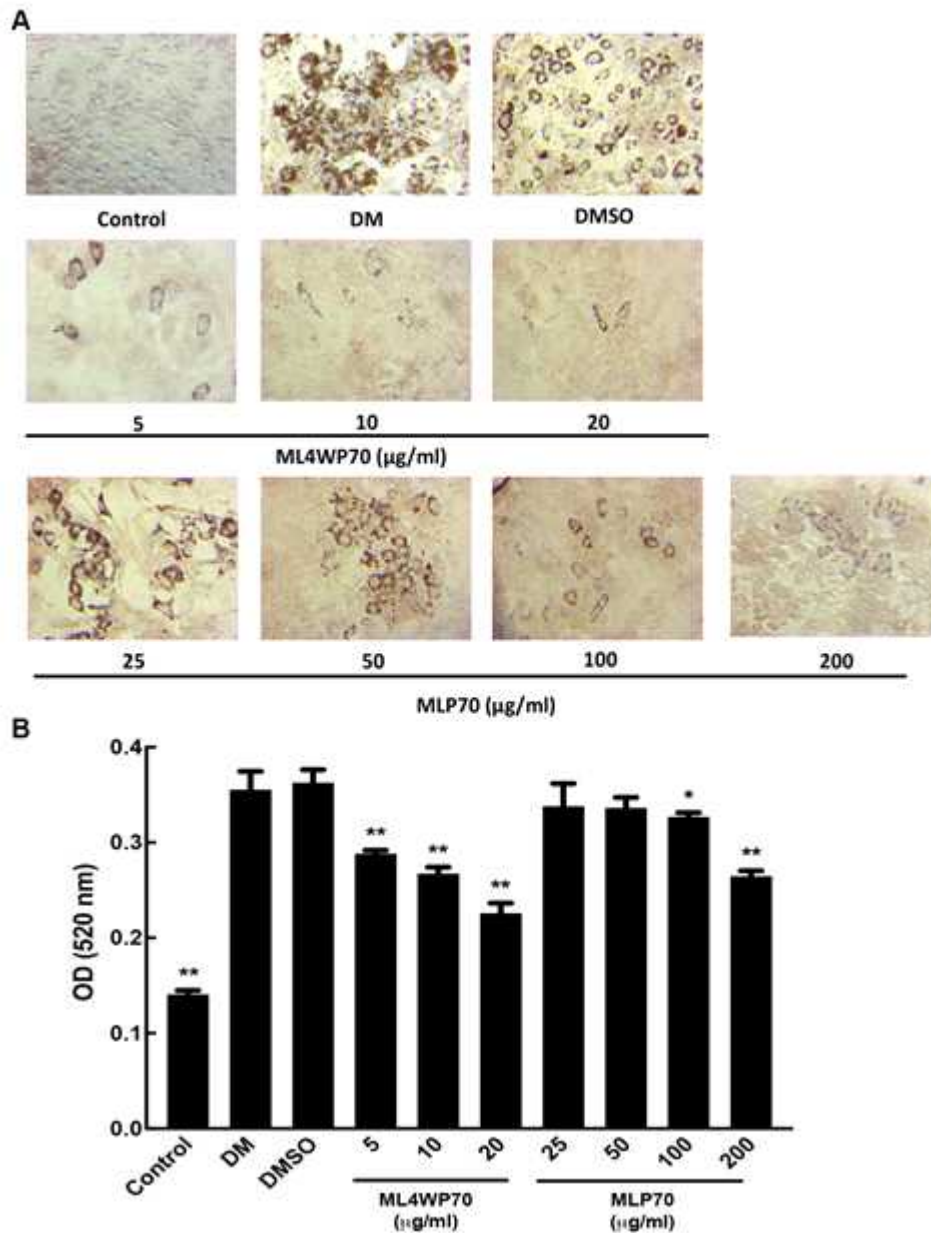


Figure. 106. Fermented extract inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 nM rosiglitazone, 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin and 1 nM dexamethasone (differentiation medium). ML4WP70 and MLP70 were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 $\times$  (A). Values present as mean  $\pm$  SD (n=3), \* as  $p < 0.05$  vs differentiation medium with DMSO group, \* as  $p < 0.05$  vs differentiation medium with DMSO group, \*\* as  $p < 0.01$  vs differentiation medium with DMSO group.

㉔ 글루코스 및 트리글리세라이드 함량 분석

- 지방세포 내 트리글리세라이드의 함량은 ML4WP70 처리군에서 유의하게 감소하여, 발효빵 잎 추출물은 지방세포에서 트리글리세라이드 생성을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였음(Fig. 107A). 또한, 지방세포 내 포도당 소비량을 평가하기 위하여 세포 배양배지 내 포도당 함량을 분석한 결과, 포도당 흡수는 ML4WP70 처리군에서 농도의존적으로 유의하게 감소함을 확인하였음(Fig. 107B).

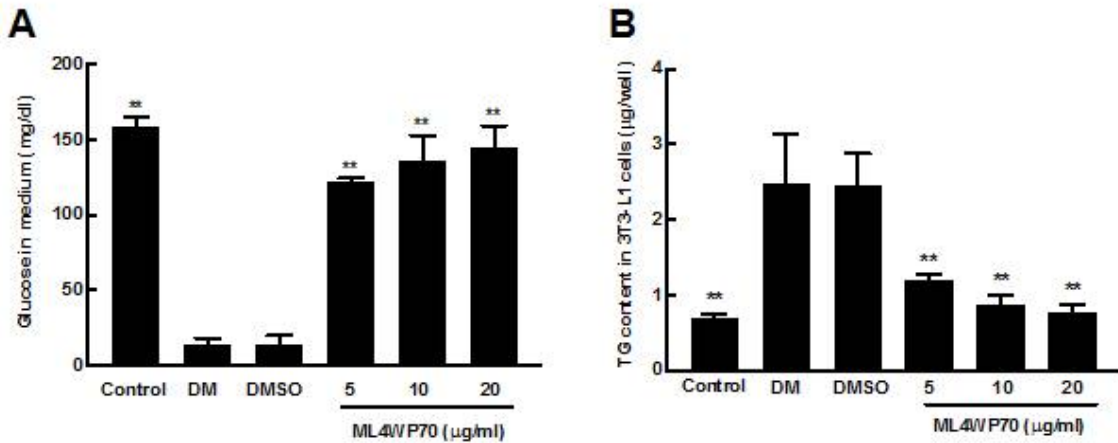


Figure 107. Fermented extract decreased glucose intake and TG content in differentiated 3T3-L1 cell line. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 M rosiglitazone, 10 g/ml insulin and 1 M dexamethasone (differentiation medium). ML4WP70 was added to the medium at the same time and cultured for 8 days. Medium of each well were collected to determine glucose content, ML4WP70 suppressed glucose uptake (A). TG were extracted using 5% triton X-100 and determined quantity using a commercial TG kit according to protocol. ML4WP70 decreased TG content and glucose intake in differentiated 3T3-L1 cell line (B). Values present as mean ± SD (n=3), \* as p<0.05 vs differentiation medium with DMSO group, \*\* as p<0.01 vs differentiation medium with DMSO group.

㉕ PPAR-γ의 발현 억제능 확인

- PPARs (Peroxisome proliferator activated receptor) 패밀리 중 하나인 PPAR-γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-γ)는 지방세포 특이적인 유전자로 in vitro와 in vivo에서 지방 생성을 조절하는 것으로 알려져 있음. 발효빵잎 추출물의 PPAR-γ 발현 억제능을 확인하기 위하여 PPAR-γ의 발현량을 분석하고 그 결과를 Fig. 118에 나타내었음. 발효빵잎 추출물은 24시간 및 8일 시점 모두에서 PPAR-γ의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 억제시킴을 확인하였음. 24시간 시점에서, 10 µg/ml 및 25 µg/ml 농도의 ML4WP70은 PPAR-γ의 발현을 DMSO와 비교하여 각각 72.9%와 51.3%로 유의하게 감소시켰음(Fig. 108A). 8일째 되는 시점에서 5 µg/ml, 10 µg/ml 및 25 µg/ml 농도의 ML4WP70은 PPAR-γ의 발현을

DMSO와 비교하여 각각 69.6%, 60.4% 및 48.5%로 유의하게 감소시켰음(Fig. 108B). 즉, ML4WP70 처리 시 PPAR- $\gamma$ 의 단백질 수준은 대조군에 비해 모든 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 감소됨을 확인하였음.

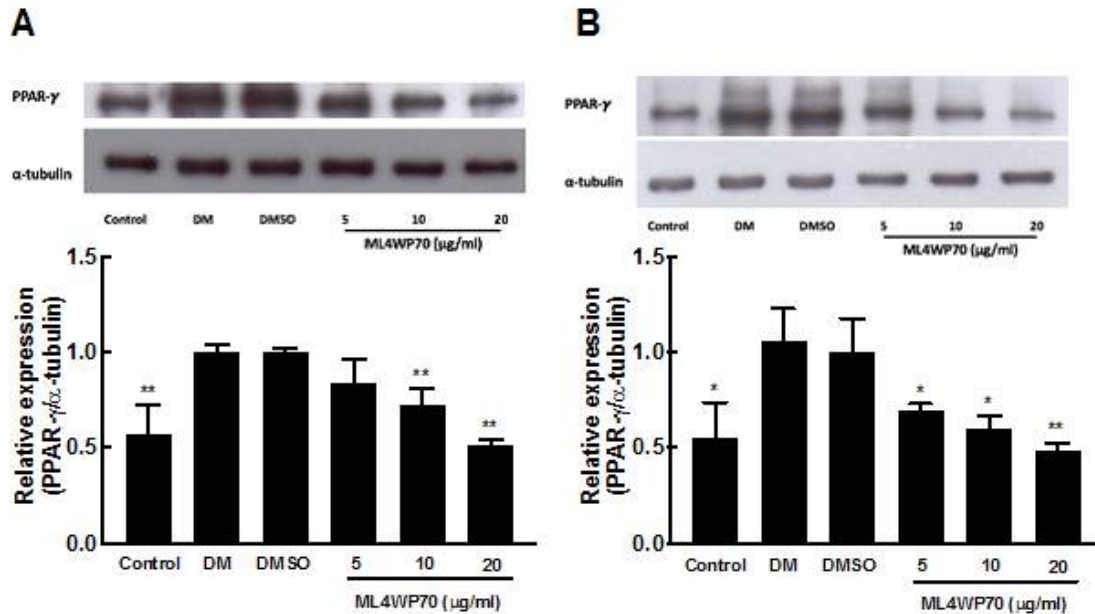


Figure 108. Fermented extract inhibited expression of PPAR- $\alpha$  at the time point of 24 h (A) and 8 days (B). *3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 M rosiglitazone, 10 g/ml insulin and 1 M dexamethasone (differentiation medium). The cells were treated with ML4WP70 for 24 hrs and 8 days, total proteins were extracted using RIPA buffer, and analysis by Western Blot. The results showed that fermented extract inhibited expression of PPAR- $\alpha$  both at time point of 24 h and 8 days. Values present as mean  $\pm$  SD (n=3), \* as  $p < 0.05$  vs vs differentiation medium with DMSO group, \*\* as  $p < 0.01$  vs differentiation medium with DMSO group.*

㉞ 지방세포분화 관련 전사인자의 발현 억제능 확인

- Fig. 109에 나타낸 바와 같이, 발효빵잎 추출물은 PPAR- $\gamma$  표적 유전자인 HMGCR, A-FABP, CD36, LPL, FAS 및 Glut4의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 억제시킴을 확인하였음. 따라서 발효빵잎 추출물은 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포분화 관련 전사인자인 PPAR- $\gamma$  및 PPAR- $\gamma$ 의 표적 유전자의 발현을 억제함으로써 지방구 및 트리글리세라이드의 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 효과적으로 억제시키는바, 우수한 항비만 효과를 가지고 있음을 확인하였음.

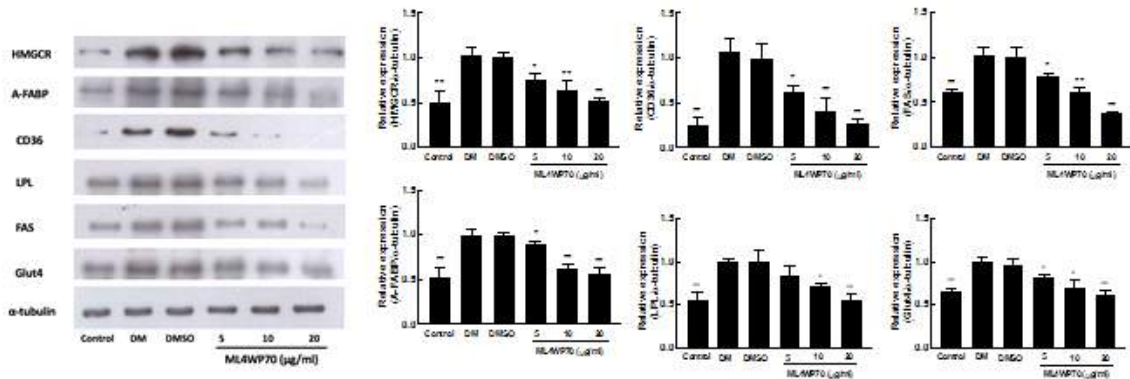


Figure 109. Fermented extract inhibited expression of PPAR- $\alpha$ 's target genes in differentiated 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 M rosiglitazone, 10 g/ml insulin and 1 M dexamethasone (differentiation medium). After treatment with MLAWP70 for 8 days, total proteins were extracted using RIPA buffer, and analysis by Western Blot. The results showed that FSP25E50 inhibited expression of PPAR- $\alpha$ 's target gene at the time point of 8 days. Values present as mean  $\pm$  SD (n=3), \* as  $p < 0.05$  vs DMSO group, \*\* as  $p < 0.01$  vs DMSO group.

㉔ 빵나무 주요 성분인 chlorogenic acid의 항비만 효과 검증

- 빵나무의 주요성분인 chlorogenic acid는 지방세포 분화 억제능을 나타냄을 확인하였음. Chlorogenic acid의 처리는 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  및 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 적은 농도에서도 지방세포 분화를 효과적으로 억제하였음. 지방세포 내 트리글리세라이드의 함량을 유의하게 감소하여, 발효빵잎 추출물은 지방세포에서 트리글리세라이드 생성을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였음. 또한, 지방세포 내 포도당 소비량을 평가하기 위하여 세포 배양배지 내 포도당 함량을 분석한 결과, 포도당 흡수는 chlorogenic acid 처리 시에 농도 의존적으로 유의하게 감소함을 확인하였음. Chlorogenic acid의 작용기작에 관해서는 연구를 수행 중에 있으며, 이러한 결과는 빵잎 발효 추출물에 대한 유효성분으로서 표준이 될 수 있는 좋은 결과로 생각됨(Fig. 110).

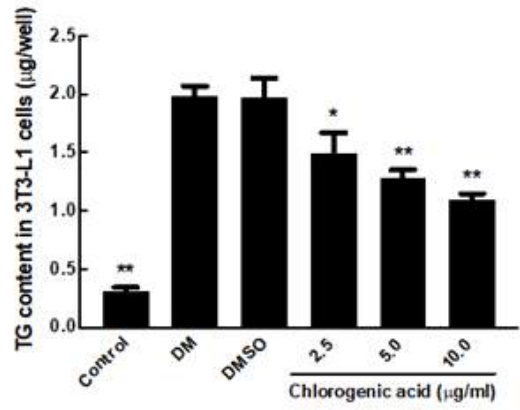
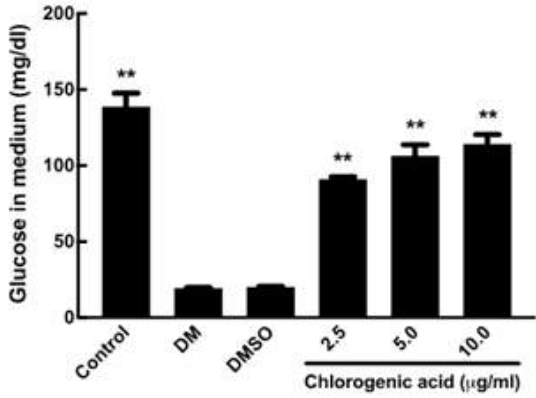
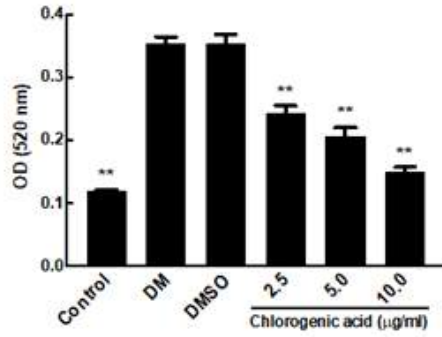
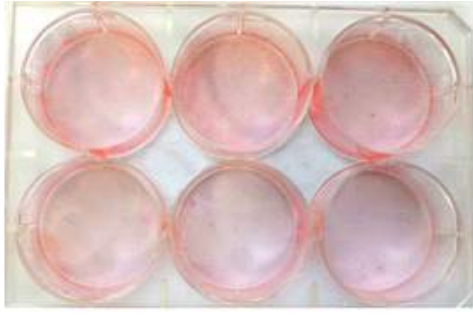
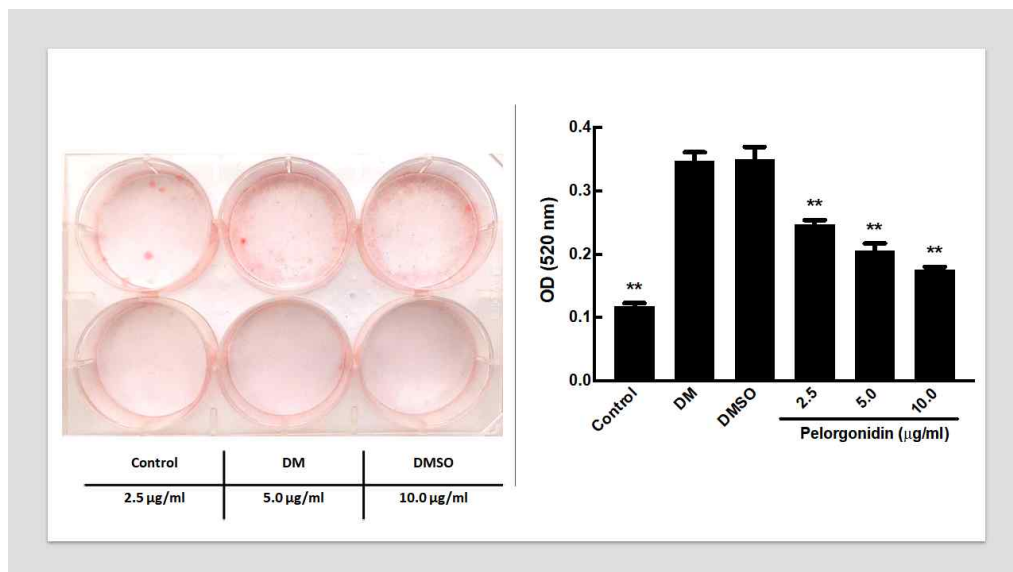
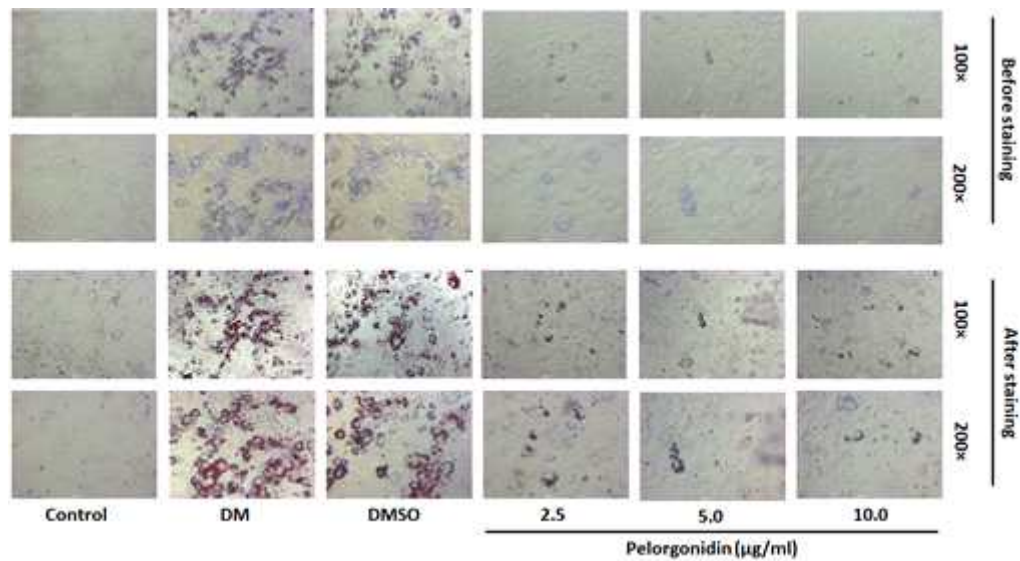


Figure 110. Chlorogenic acid inhibited adipogenesis and decreased glucose intake and TG content in differentiated 3T3-L1 cell line.. 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 M rosiglitazone, 10 g/ml insulin and 1 M dexamethasone (differentiation medium). MLWP70 and MLP70 were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 (A). Values present as mean ± SD (n=3), \* as p<0.05 vs differentiation medium with DMSO group, \*\* as p<0.01 vs differentiation medium with DMSO group.

㉠ 뽕나무 주요 성분인 pelarginidin의 항비만 효과 검증

- 뽕나무의 주요성분인 pelarginidin도 chlorogenic acid와 유사한 지방세포 분화 억제능을 나타냄을 확인하였음. Pelargonidin의 처리는 2.5 µg/ml, 5 µg/ml 및 10 µg/ml의 적은 농도에서도 지방세포 분화를 효과적으로 억제하였음. Pelargonidin의 작용기작에 관해서는 연구를 수행 중에 있으며, 이러한 결과는 뽕잎 발효 추출물에 대한 유효성분으로서 표준이 될 수 있을 것으로 생각됨(Fig. 111).



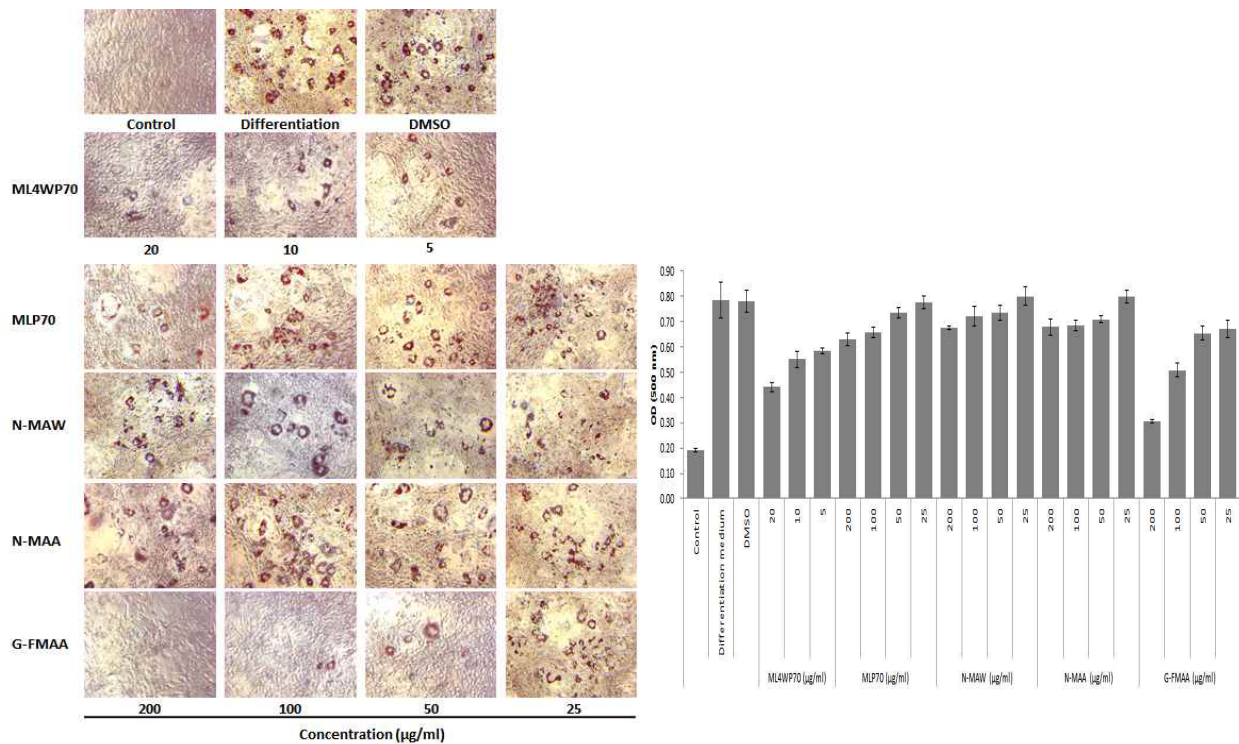


**Figure 111. Pelargonidin inhibited adipogenesis and decreased glucose intake and TG content in differentiated 3T3-L1 cell line..** *3T3-L1 cell line* was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 M rosiglitazone, 10 g/ml insulin and 1 M dexamethasone (differentiation medium). MLWP70 and MLP70 were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 (A). Values present as mean  $\pm$  SD (n=3), \* as  $p < 0.05$  vs differentiation medium with DMSO group, \* as  $p < 0.05$  vs differentiation medium with DMSO group, \*\* as  $p < 0.01$  vs differentiation medium with DMSO group.



㉔ 최적의 발효 빵잎의 항비만 효능 검증 스크리닝

- 추출방법에 따른 추출물의 지방세포 분화 억제능을 나타냄을 확인하였음. ML4WP70의 처리는 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 적은 농도에서도 지방세포 분화를 효과적으로 억제하였음. 반면 G-FMAA처리는 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 농도 의존적으로 효과가 양호하였으며, MLP70과 N-MAW는 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서도 아주 낮은 효과를 나타내었음(Fig. 112).



**Figure 112. Different fermentation-extracts inhibited adipogenesis in 3T3-L1 cell line.** 3T3-L1 cell line was maintained DMEM containing 10%, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and induced adipogenesis with culture medium including 10 M rosiglitazone, 10 g/ml insulin and 1 M dexamethasone (differentiation medium). ML4WP70 and MLP70 were added to medium in the whole inducing period. Cells stained with oil red O for taking pictures (A), after that, stained oil red O were dissolved using iso-propanol for OD value detection (B). Pictures were taken at 200 (A). Values present as mean  $\pm$  SD (n=3), \* as  $p < 0.05$  vs differentiation medium with DMSO group, \* as  $p < 0.05$  vs differentiation medium with DMSO group, \*\* as  $p < 0.01$  vs differentiation medium with DMSO group.

#### (4) 약리작용기전 연구

##### ① 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물 효과 비교

미발효 뽕잎 추출물과 동충하초 발효물, 동충하초 발효 뽕잎 추출물의 항비만 효능을 비교하기 위하여 랫드의 지방조직에서 분리한 primary 세포를 이용하여 glycerol assay와 cAMP assay를 실시하였음. 비만세포주를 확보하기 위하여 8주령의 SD rat를 안락사 시킨 후 복강 내 지방조직을 채취하여 1% BSA (Bovine serum albumin)를 함유한 Krebs-Ringer solution (KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaCl 125 mM, Glucose 5 mM, HEPES 25 mM)에서 세척하였음.

세척한 지방조직은 0.1% type 1 collagenase와 1% BSA를 함유한 Krebs-Ringer solution에 옮겨 담고 가위로 잘게 잘라 shaking incubator에서 150 rpm 으로 37°C, 45분 배양하였음. 배양 후 100 μm pore size를 가진 cell strainer를 이용하여 여과한 뒤 수집된 용액은 1000rpm 1분간 centrifuge하여 세포를 수집하였음. 상층의 세포는 15 ml tube에 5 ml 씩 나누어담고 동량의 1% BSA를 함유한 Krebs-Ringer solution으로 2회 세척하였음. 세척 후 상층의 세포는 24 well plate에 3% BSA를 함유한 Krebs-Ringer solution에 분주하였다. 1 시간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양한 후 각각의 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물을 100, 200, 400 μg/ml의 농도로 처리한 뒤 24시간 incubation 후 assay를 실시하였음.

##### ㉔ glycerol release assay를 통한 뽕나무 추출물의 항비만 효능 분석

- 지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 triglyceride가 분해되면 glycerol과 fatty acid로 나누어짐. 지방세포계에서는 유리된 glycerol의 함량이 지방구 내 triglyceride의 분해 정도를 간접적으로 나타내는 척도가 됨. 따라서 비만세포 내에서 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물의 항비만 효능을 평가하기 위하여 지방조직으로부터 분리한 primary 세포를 이용하여 free glycerol assay를 실시하였음.

- 먼저 랫드의 일차지방세포를 2×10<sup>5</sup> 세포/well만큼 분주하고 Isoproterenol 처리군 (Positive control, 10 μM), 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물 100, 200, 400 μg/ml 처리군으로 분류함. 각 well에 다양한 물질로 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 상층액을 준비하였음. 준비된 배양액을 65°C 항온수조에서 15분간 방치한 후, 1,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 수확하였음. 준비된 상층액(10 μl)과 glycerol reagent (200 μl, Sigma-Arlrich, USA)를 혼합하여 200 rpm에서 15분 동안 상온에서 진탕배양하여 540 nm에서 Molecular Dvices VERSA max plate reader (Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였음. 글리세롤의 함량은 다음 식에 대입하여 측정하였음.

$$* \text{글리세롤 함량} = \frac{(A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})} \times \text{glycerol standard 농도}$$

$A_{sample}$  = 시료 처리한 well의 흡광도

$A_{blank}$  = 배지만 처리한(Negative control) well의 흡광도

$A_{standard}$  = Glycerol standard 처리한 well의 흡광도

- 일차세포에서 배지로 분비된 free glycerol은 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물 모두 농도 의존적인 증가량을 보였으며 발효뽕잎 추출물에서 가장 높은 분비량을 확인 할 수 있었음(Fig. 113).

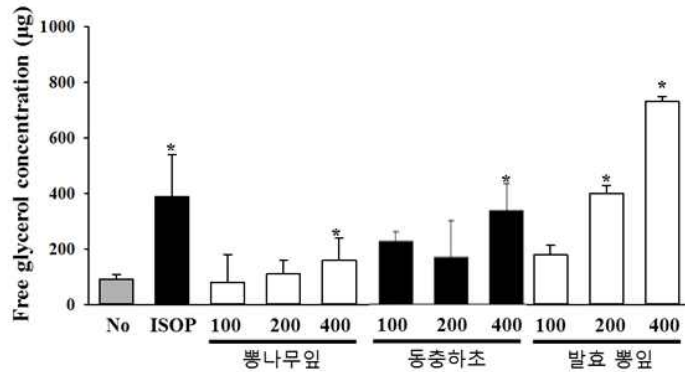


Figure 113. 다양한 추출물의 랫드 일차지방세포에 대한 free glycerol 방출량

#### ㉔ cAMP assay를 통한 뽕나무 추출물의 항비만 효능 분석

- 지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 triglyceride (TG)가 분해되기 위해서는 adrenergic receptor에 agonist가 되어 cAMP를 증가시켜 활성화된 PKA가 이차 지방 분해 단백질들을 phosphorylation 시키게 됨(Fig. 114). 따라서 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물의 항비만 효능을 평가하기 위하여 지방조직으로부터 분리한 primary 세포를 이용하여 cAMP assay를 실시하였다. 확보한 비만세포주를 24well plate에  $4 \times 10^5$  cell/well 만큼 분주한 후 각각의 뽕잎추출물, 동충하초 발효물, 뽕잎의 동충하초 발효 추출물을 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 세포와 세포 배양액은 마이크로 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm, 3min centrifuge를 실시하여 상층액을 수집하였다. cAMP의 농도는 cAMP ELISA kit (STA-500, Cell Biolabs Inc., San Diego, USA)를 이용하여 제조사의 권장법에 따라 측정하였다. 준비된 배양액과 Acetylation reagent (10 µl)를 혼합하여 acetylation 반응을 유발하고, 혼합시료 50 µl, peroxidase cAMP tracer conjugate 25 µl, Rabbit anti-cAMP polyclonal antibody 50 µl를 goat anti-rabbit antibody coated plate에 첨가하여 2시간동안 상온에서 반응하였다. 반응액을 제거하고, substrate solution 100 µl를 첨가하여 상온에서 10분 동안 추가반응 후 stop solution 100 µl로 반응을 종료시켰음. 최종적으로 반응액의 흡광도를 VersaMax Elisa Microplate Reader (molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

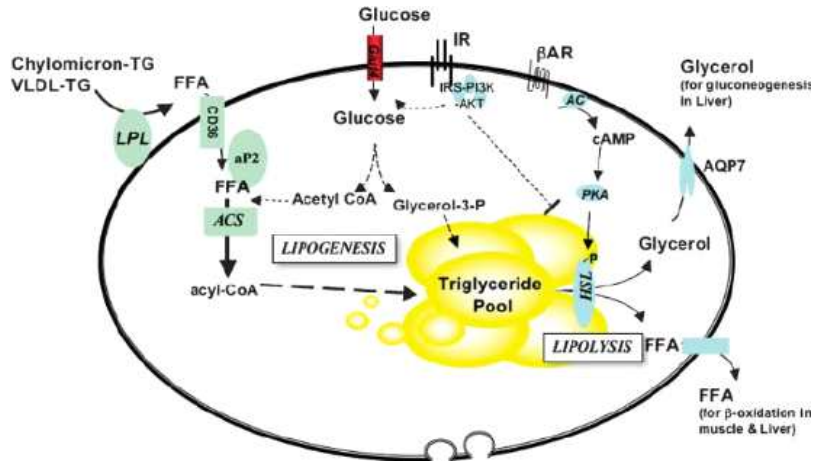


Figure 114. 지방세포 내의 지방합성 및 지방분해 메커니즘

- 뽕나무잎은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 동충하초 발효물을 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서, 발효뽕잎은 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의적으로 cAMP의 농도가 증가함을 확인하였음 (Fig. 115).

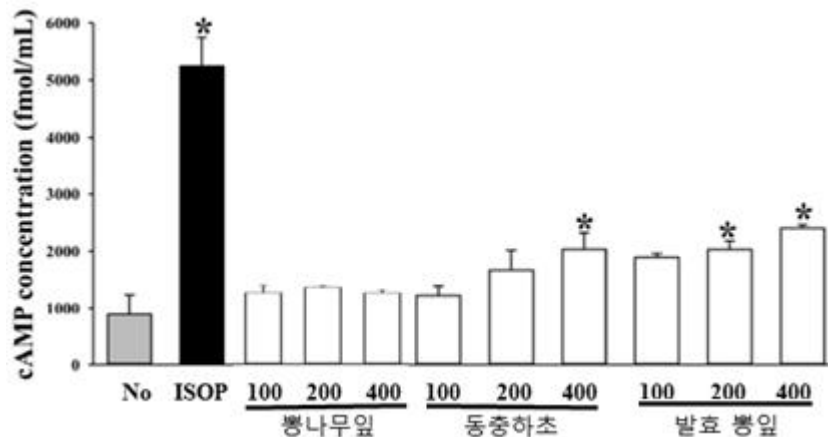


Figure 115. 다양한 추출물의 랫드 일차지방세포에 대한 cAMP 방출량

② 발효뽕잎추출물의 항비만 작용메커니즘 연구

㉠ Inflammation 작용기전 연구

- 비만은 대사질병중 하나로서 당뇨나 심혈관계 질환을 포함한 다양한 질병을 유발함. 최근에는 비만에 의한 염증반응이 질병을 더욱 심각하게 만든다고 밝혀진바 있음. 따라서 2차년도에서 50%의 번데기 가루와 10%의 동충하초균(*cordyceps militaris*)을 4주간 발효시켜 95% 에탄올에 추출한 발효 뽕나무 추출물(extract from mulberry leaves fermented with *cordyceps militaris*, EMfC)이 adipogenesis (PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ )와 lipogenesis (aP2, FAS)를 억제함으로써 항비만 효과를 확인함에 따라, 비만에 의한 염증작용의 영향을 알아보고자하였음.

- 간 조직 내의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 12주간 발효콩잎 추출물을 투여한 후 채취한 간 조직들은 10% neutral formalin 용액에서 고정 후, 적절한 크기로 절단하여 카세트에 넣고 조직처리기(Thermo Shandon Lyd., Thermo Fisher Scientific, UK)로 에탄올 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1~2시간 처리 후 xylene으로 4시간, paraffin에서 4시간 처리하였음. 이후 조직은 paraffin embedding station (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GmbH, Nussloch, Germany)로 4  $\mu$ m 두께로 박절하였음. 박절한 조직은 Hematoxylin과 eosin (Sigma-Aldrich co.)로 염색하고, 지방세포의 크기 및 지방간 상태 등을 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였음. 간 조직 내의 지방간 완화효과를 확인할 수 있었으며 축적된 지방방울의 수도 Vehicle 그룹에 비하여 유의적으로 감소하였음 (Fig. 116).

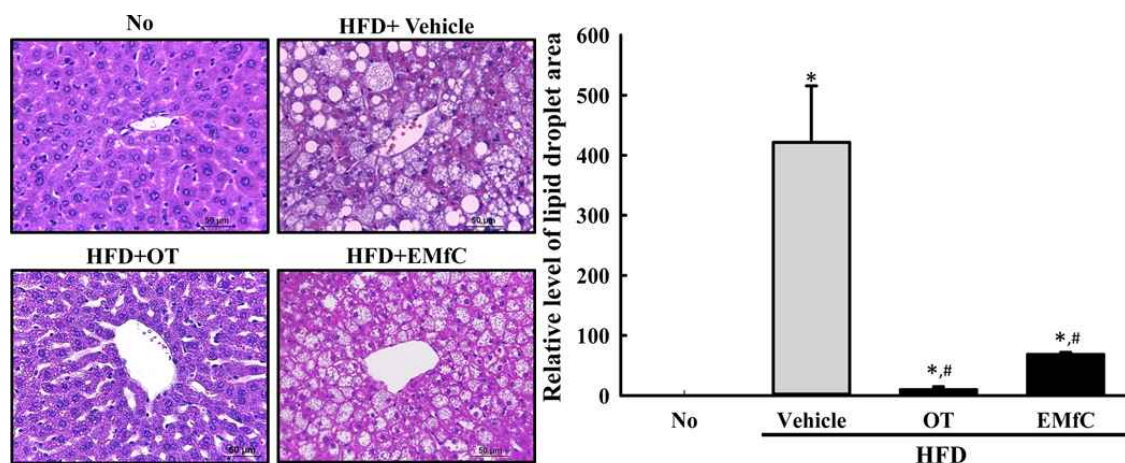


Figure 116. 발효콩잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 변화

- 비만은 ER (endoplasmic reticulum) 스트레스, 저산소증(hypoxia), 산화적 스트레스의 기전 등에 의해 지방세포에서 염증을 유발하는 cytokine의 생성을 증가시킴. 비만세포(mast cell)는 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있는 세포로 주로 결합조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증반응에 관여함. 이 세포는 특히 과립내의 화학매개체와 cytokine 등을 분비하면서 염증의 초기반응과 후기반응을 일으키고 만성적으로 염증을 지속시키는데 주요한 역할을 함. 발효콩잎추출물의 투여에 따른 항비만 효능에 따른 염증반응에 대한 효과를 관찰하고자 간 조직내의 mast cell의 분포를 확인하기 위해 toluidine blue staining을 실시하였음. Paraffin embedding station으로 4  $\mu$ m 두께로 박절한 조직은 xylene에서 5분 반응시켜 파라핀을 제거한 후 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올에서 각각 1분 반응시켜 수화시켰음. dH<sub>2</sub>O에서 5분 세척한 후 0.5% toluidine blue solution에서 5분 반응시킨 뒤 70%, 80%, 95%, 100% 에탄올에서 각각 20초 반응시켜 탈수시켰음. 이후 xylene에서 3번 3분씩 반응시켜 rotimount 용액을 이용해 mounting 하였음. 그 결과 발효콩잎추출물의 투여에 따라 완화된 지방간에서 mast cell의 수도 vehicle에 비하여 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었음(Fig. 117).



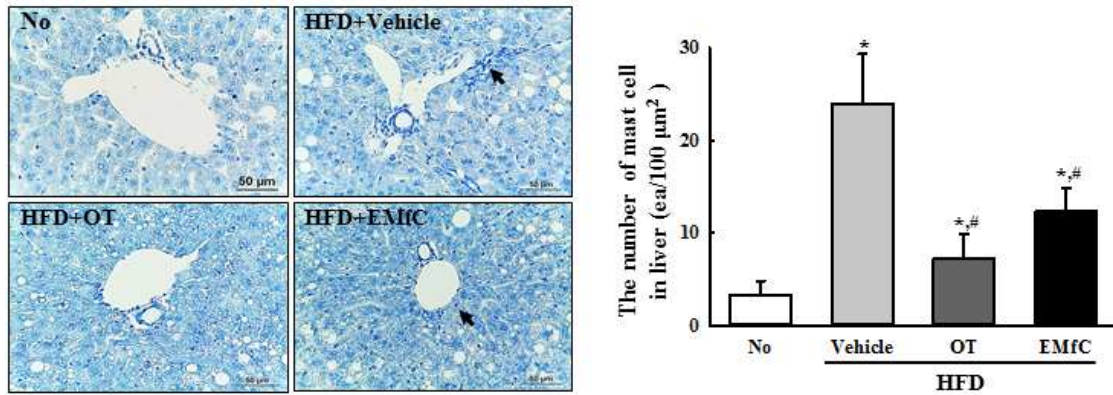


Figure 117. 발효콩잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직의 비만세포 수 변화

- 염증 인자에 의하여 자극된 세포는 JNK, p38, ERK를 phosphorylation시켜 이하 염증유발 단백질들을 번역하는 다양한 전사인자들의 발현시키게 함(Fig. 118). 12주간 발효 콩나무 추출물을 투여한 마우스의 간 조직 내의 JNK, p38, ERK를 phosphorylation을 확인하기 위해 간 조직 30 mg을 정량한 뒤, PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였음. 분리된 단백질의 농도는 BCA protein assay kit (Thermo, USA)를 이용하여 정량하고, 30 μg의 단백질을 western blot에 사용하였음. 먼저 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간동안 blocking 하였고 각 membrane은 actin, JNK, phospho JNK, p38, phospho p38, ERK, phospho ERK (cell signaling)의 1차 항체로 4°C에서 12 시간 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였음.

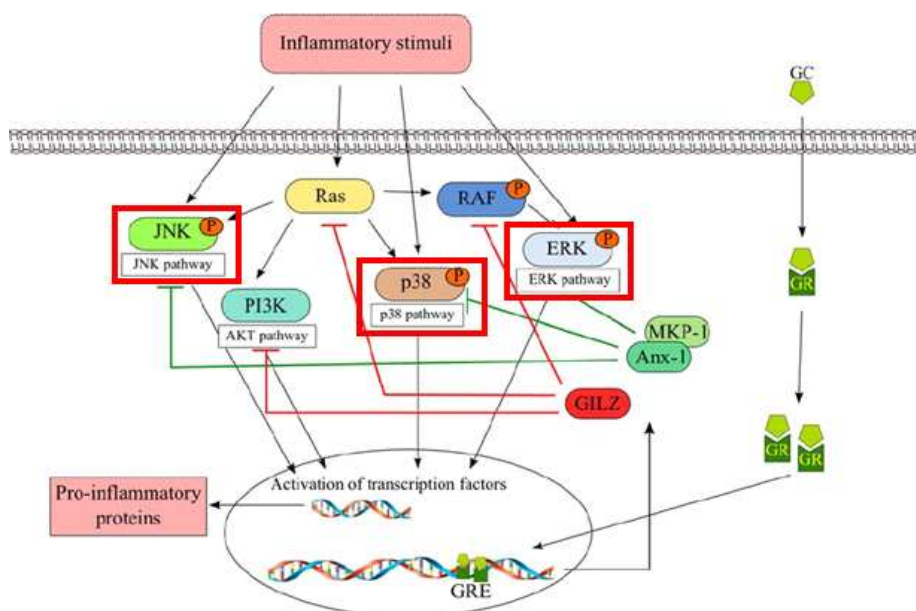


Figure 118. 염증 자극원에 의한 MAPK 신호전달과정

- 고지방식이로 인해 증가된 JNK, p38, ERK의 인산화는 발효빵잎 추출물의 투여로 완화된 것을 확인할 수 있었다. JNK의 인산화가 가장 크게 유의적으로 감소하였으며 ERK의 인산화에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았음(Fig. 119).

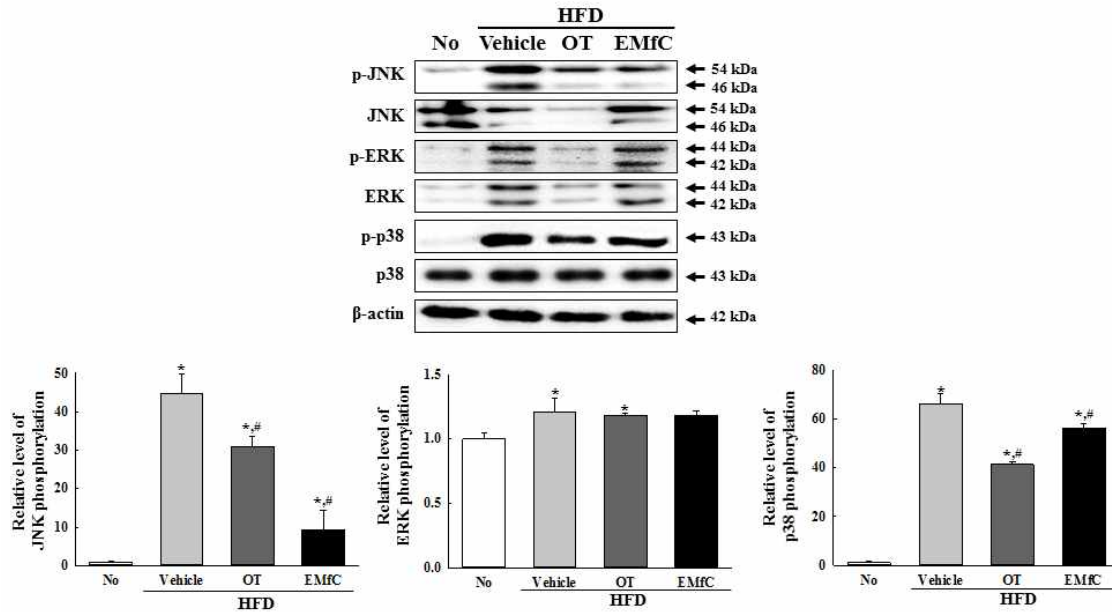


Figure 119. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직의 MAPK 인산화

- 고지방식이로 유발한 비만질환동물모델에서 발효빵잎 추출물의 항염증효과를 확인하기 위하여 간 조직으로부터 RNA를 분리하여 qPCR을 통 pro-inflammatory cytokine 들의 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하고자 하였음. 발효빵잎 추출물을 12 주간의 투여 후 마취하여 PBS를 이용하여 관류를 진행하였음. 이후 간 조직을 적출한 뒤 PBS에 세척하였고 액체 질소에 급속냉동 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였음. 마우스의 간 조직 50 mg을 적출하여 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였다. Trizol에 포함된 RNA는 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였음. 분리된 전체 RNA는 nanodrop (Allsehng, china)을 이용하여 양을 측정하고 1  $\mu\text{g}$ 을 RT 반응에 사용하였음. RT 반응은 RNA에 Oligo dT (invitrogen, 18418-012)를 처리하고,  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 반응하여 Oligo dT를 RNA에 결합시킨 뒤 5 $\times$  완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II (invitrogen, 8064'014, 200 U/ $\mu\text{l}$ )를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 후  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 50분 동안 RT 반응을 수행하였음. RT 반응이 끝나면 RNaseH (invitrogen, 18021-071)를 처리하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해함. 합성된 cDNA를 주형으로 qPCR으로 실시하였음.
- qPCR은 특정 primer가 포함된 cDNA template와 SYBR Green (Toyobo Co., Osaka, Japan)을 처리하여 지방대사 관련 유전자에 영향을 알아보기 위해 시행하였음. iNOS의 primer는 F: 5'-CAC TTG GAG TTC ACC CAGT-3', R: 5'-ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC-3'; COX-2의 primer는 F: 5'-CAG GTC ATT GGT GGA GAG GTG TATC-3', R: 5'-CCA



GGA GGA TGG AGT TGT TGT AGA G-3'; TNF- $\alpha$ 의 primer는 F: 5'-CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3', R: 5'-TTG ACC TCA GCG CTG ACT TG-3', IL-1 $\beta$ 의 primer는 F: 5'-GCA CAT CAA CAA GAG CTT CAG GCA G-3', R: 5'-GCT GCT TGT GAG GTG CTG ATG TAC-3', IL-6의 primer는 F: 5'-TTG GGA CTG ATG TTG TTG ACA-3', R: 5'-TCA TCG CTG TTG ATA CAA TCA GA-3', NF- $\kappa$ B의 primer는 F: 5'-TGA TGA CAT ACT CCC ACA AG-3', R: 5'-CAA TAT CCC CAG ACC TAA C-3'를 이용하였음. qPCR은 95°C에서 15초동안 변성시킨 후 70°C에서 60초간 annealing과 55°C에서 extension을 진행하였음. 형광 강도는 각 사이클의 연장 단계의 끝에서 측정되었고 모든 샘플의 형광 강도에 대한 임계값은 수동으로 설정되었음. PCR의 산물이 PCR 증폭의 지수상 동안이 형광 강도 문턱 값을 초과하는 반응 사이클을 임계주기 (Cq)로 간주하였음. 표적 유전자의 발현은 Livak과 Schmittgen의 방법에 따라 일정한 형광 강도에서 Cqs의 비교에 근거하여 housekeeping 유전자인  $\beta$ -actin의 발현에 비례하여 정량화하였음.

- Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 모두 고지방식으로 유발된 비만에 의하여 증가하였으며 발효빵잎 추출물의 처리로 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었음. 또한 자유라디칼을 생성해 염증반응을 더욱 자극하는 NO를 생성하는 인자인 iNOS 및 프로스타글란딘을 생성하게 하여 염증 및 통증을 유발하게 하는 COX-2의 mRNA 발현양도 비만질환동물모델에서 발효빵잎추출물에 의해 유의적으로 감소하였음. 따라서 발효빵잎추출물의 투여로 고지방식으로 유발한 비만질환모델에서 항염증 효능이 있음을 확인할 수 있었음(Fig. 120).

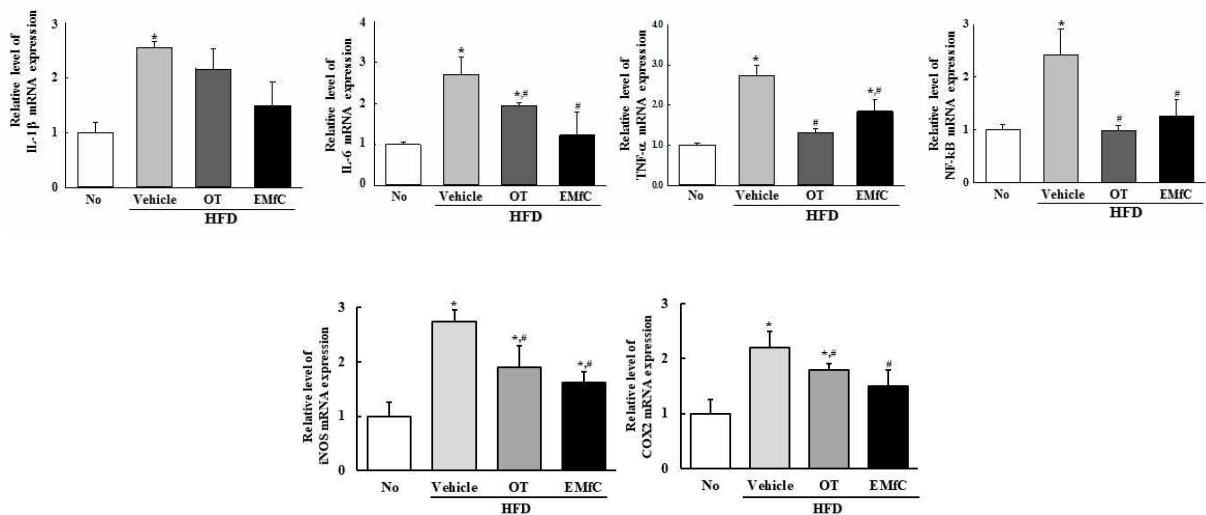


Figure 120. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 inflammatory cytokine의 mRNA 발현

㉞ ER stress 작용기전 연구

- 소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 핵막으로부터 이어져 가지를 친 것 같은 막성분의 구조임. 소포체의 종류 중 하나인 조면소포체는 리보솜이 붙어있어 mRNA에서 단백질로 번역된 후 접힘(folding)과 조립(assembly), 당화(glycation)등의 단계를 거쳐 활성을 가지는 단백질로 합성함. ER stress는 크게 네 가지로 구분할 수 있는데, 첫 번째는 리보솜에서 단백질의 번역을 억제하여 소포체 내로 단백질이 생성되어 유입되는 것을 억제함. 두 번째는 BiP (binding immunoglobulin protein)의 chaperon 발현을 증가시켜 단백질을 folding 능력을 향상시킴. 세 번째는 folding 되지 않았거나 잘못 folding된 단백질을 세포내에서 분해하여 제거함. 마지막으로 네 번째는 소포체 자체적으로 앞의 세 가지 반응을 이용해 회복할 수 없을 정도로 심각한 경우 apoptosis 반응으로 손상된 세포를 자연사함. ER stress는 소포체 막에 위치한 세 가지 수용체 PERK (pancreatic ER kinase), IRE-1 $\alpha$  (inositol-requiring 1 $\alpha$ ), ATF6 (activating transcription factor)에 의하여 신호전달이 이루어짐. Bip가 PERK에 결합하면, eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ )를 인산화하며 ATF4의 발현을 증가시켜 자극된 CHOP (C/EBP homologous protein)는 apoptosis를 유발함. 지방조직에서, 영양과다, 과도한 단백질 합성, 인슐린 저항성에 의한 국소적인 글루코스 부족, 혈관생성의 부족에 의하여 소포체가 정상적인 단백질을 합성하지 못하게 되며 이를 방어하고 극복하기 위한 ER stress 반응이 유발됨(Fig. 121).

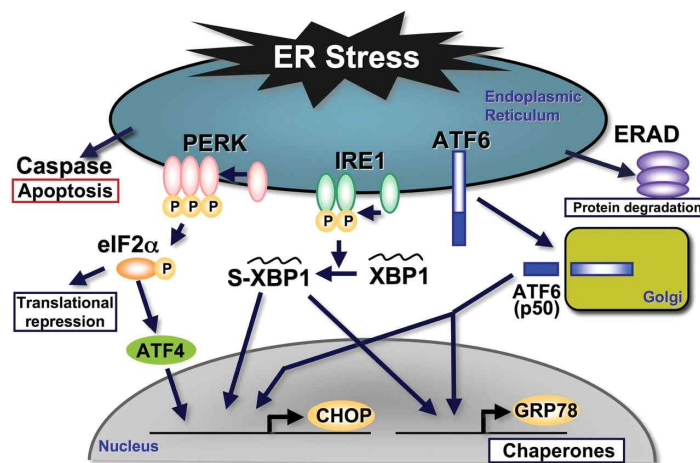


Figure 121. ER stress 반응 과정

- 12주간 발효콩잎추출물을 투여한 마우스의 간 조직 내의 ER stress 보호효과를 확인하기 위해 ER stress 반응의 대표인자인 eIF2 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ 의 인산화와 CHOP 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 실시한 결과 고지방식으로 유발된 비만에 의한 지방간으로 증가된 ER stress가 발효콩잎추출물의 투여로 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었음(Fig. 122).

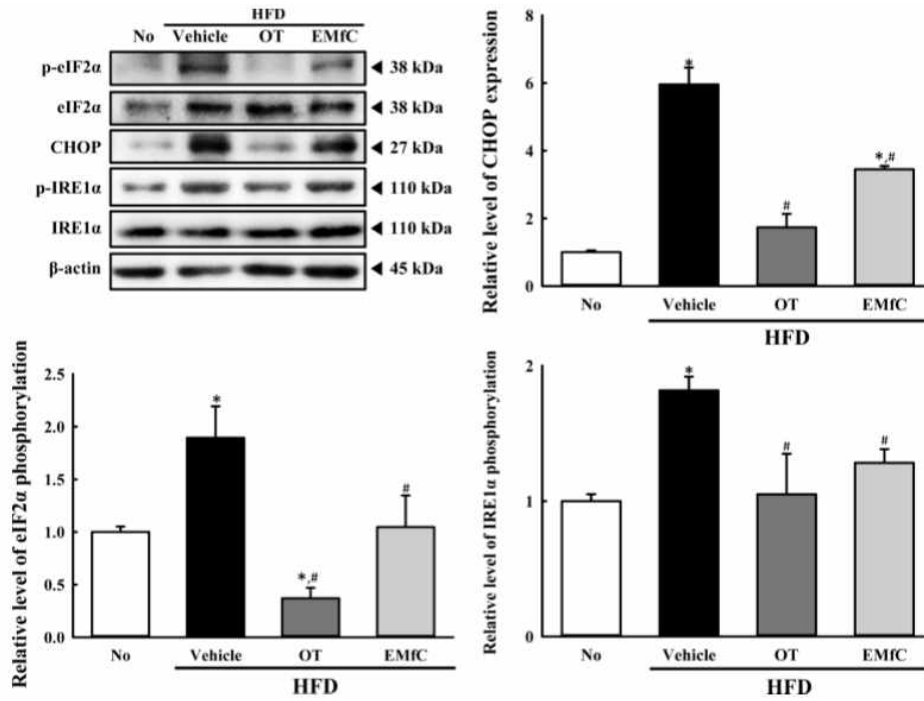


Figure 122. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 ER stress 주요 인자들의 발현

- ER stress 반응에 의한 apoptosis 반응을 확인하기 위해 간 조직의 Caspase 3, Bcl-2, Bax의 단백질 발현량을 확인한 결과 고지방식으로 유발된 비만질환동물에서 증가된 apoptosis가 12주간 발효빵잎추출물의 투여로 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었음(Fig. 123).

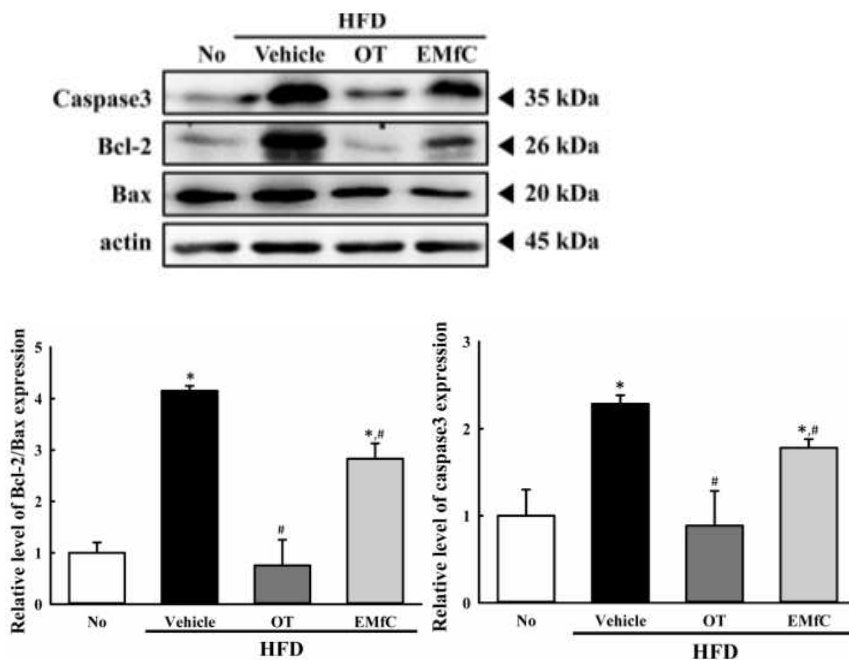


Figure 123. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 apoptosis 주요 인자들의 발현

㉔ Autophagy 작용기전 연구

- Autophagy (자가소화작용)는 세포내에서 불필요하거나 기능하지 않는 세포구성성분을 자연적으로 분해하는 파괴 기작으로서 대부분의 조직에서는 세포 구성요소의 지속적인 대사회전을 위해 기본적인수준으로 항상 일어나고 있음. 그러나 영양 결핍이나 산화적손상과 같은 스트레스를 받으면 오토파지가 정상수준에서 보다 활성화되어 생존에 필요한 에너지를 만들고 영양분을 재활용함. 최근 연구에서, autophagy가 심장질환, 간질환, 암, 신경퇴화, 감염, 대사질환 등 사람의 다양한 병리학적인 질병 예방에 관여하고 있으며 이 작용을 조절하는 물질은 추후 개발 가능성이 높음. 또한 ER stress는 autophagy를 촉진해 apoptosis를 방어한다고 밝혀진 바 있음. 뿐만 아니라, 염증반응에 의하여 분비된 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 cytokine들이 autophagy를 조절하는 역할을 함. 실제로 TNF- $\alpha$ 는 Akt/PKB, c-jun N-terminal signaling을 통해 LC3와 beclin-1의 발현을 촉진시키고 이는 autophagy에 의한 세포사멸을 초래함(Fig. 124).

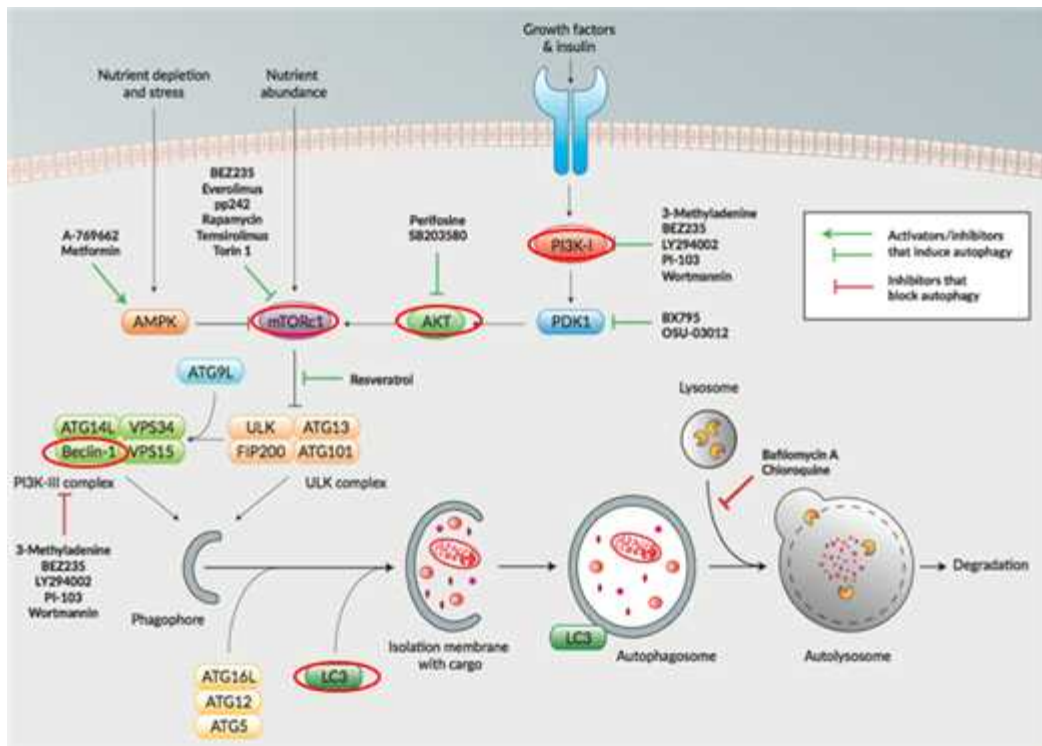


Figure 124. Autophagy 과정

- 고지방식이로 유발된 비만 마우스에서 autophagosome의 형성에 관여하는 becline, LC3 단백질의 양이 증가한 것을 western blot을 통해 확인하였으며 12 주간 발효빵잎추출물의 투여로 발현양이 감소하는 것으로 보아 autophagy 작용이 Vehicle 투여군에 비하여 유의적으로 감소함을 확인하였음(Fig. 125).

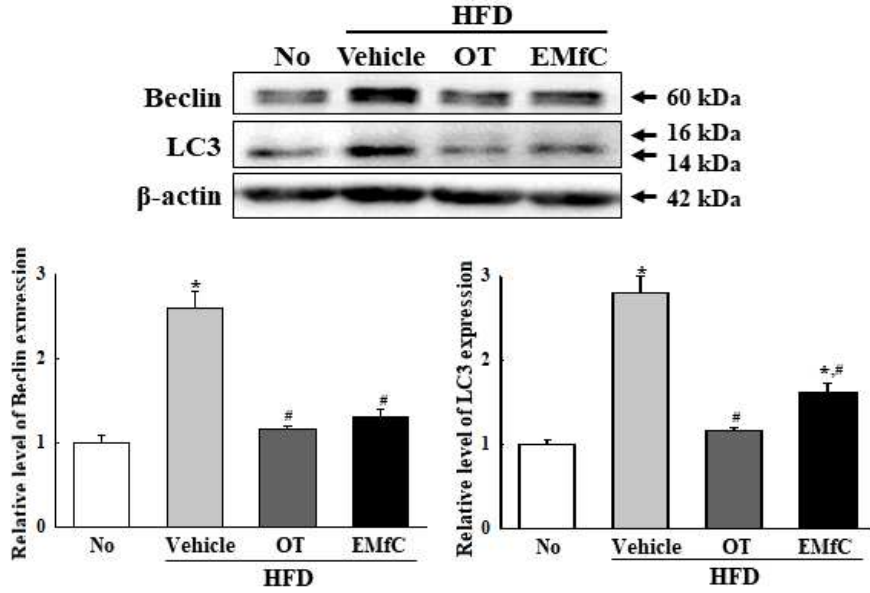


Figure 125. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 autophagy 주요 인자들의 발현

- Autophagy 작용을 조절하는 PI3K/Akt/mTOR pathway의 단백질을 western blot을 실시한 결과 PI3K와 Akt는 Vehicle 투여군에서 감소하였던 인산화가 발효빵나무 추출물의 투여로 증가하였으며 mTOR의 인산화는 Vehicle 투여군에 유의적으로 감소하였음(Fig. 126).

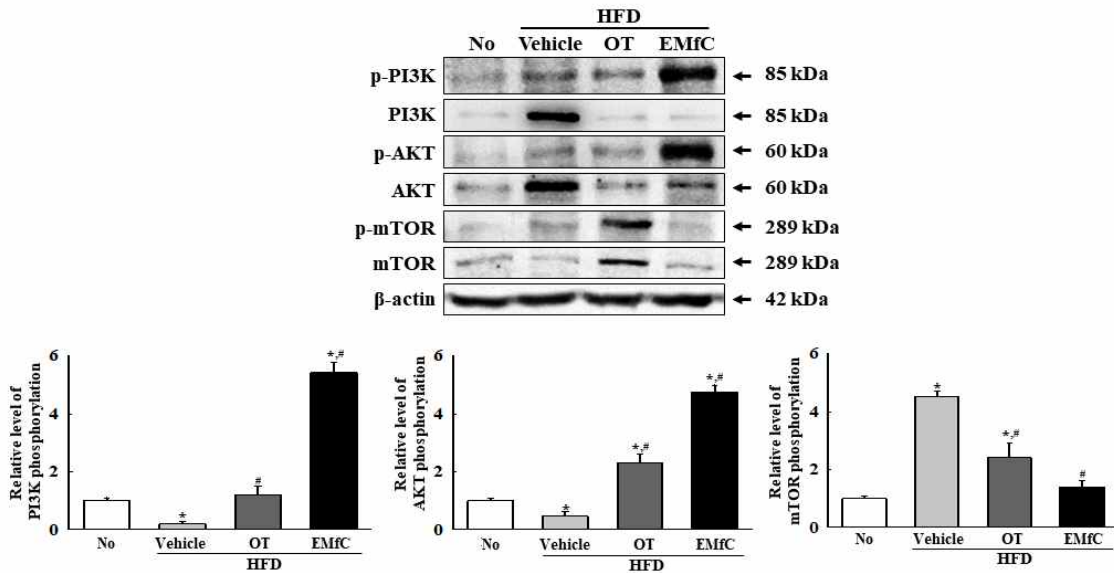


Figure 126. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 autophagy 조절인자들의 발현

- Autophagosome을 형성하는 phagophore의 신장을 촉진시키는 Atg4의 mRNA의 발현양 또한 발효빵잎 추출물 투여군에서 Vehicle 투여군에 유의적으로 감소하였음(Fig. 127).

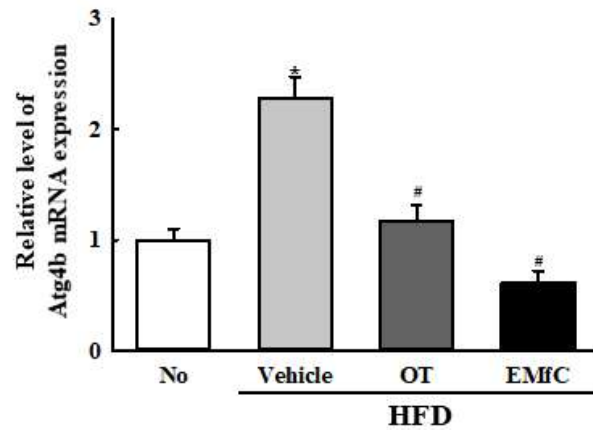


Figure 127. 12주간 발효빵잎 추출물(EMfC)의 12주 투여에 따른 간 조직 autophagosome 형성인자의 mRNA 발현

- 따라서 발효빵잎추출물은 고지방식으로 유발한 비만질환동물에서 autophagy 작용을 억제하는 효능이 있다는 것으로 사료된다.

### ③ 빵나무제품의 약리효능 평가

#### ㉞ 약물 반응 확인을 위한 투여량 조사

- 빵나무제품의 투여량에 따른 반응 차이를 확인하기 위하여 실험동물은 4주령의 마우스를 수령하여 1주일 동안 환경에 적응시킨 후, 4주령이 되었을 때에 일반식이(4% fat diet, ND)를 공급하는 ND 그룹, 고지방식이(60% fat diet, HFD)를 공급하는 HFD 그룹으로 나누었다. HFD 그룹은 vehicle로 0.5% carboxymethylcellulose (CMC)를 투여하는 그룹과 고지방食이를 공급하면서 빵나무 추출물을 투여하는 그룹으로 나누어 8주간 고지방食이를 급여하였고 주 5회 빵나무 추출물을 경구투여 하였으며 주 1회 식이섭취량과 체중을 확인하였음. 실험은 8 주간 진행 후, 마취하고 혈액 채취 및 지방, 간 조직을 적출하였음.
- 빵나무제품이 비만이 유발된 마우스에서 체중에 미치는 변화에 대해 분석하기 위해 매 주 수요일 오전 10시에 체중을 측정하였음. 고지방식이 급여 군은 일반식이 급여 군에 비하여 유의성 있게 하였으며, 7주부터 발효빵잎추출물 200, 400 mg/kg 그룹에서는 vehicle 그룹에 비하여 유의적인 차이를 관찰 할 수 없었으나, 100 mg/kg 투여군에서 유의적인 체중 감소를 나타내었음(Fig. 128).

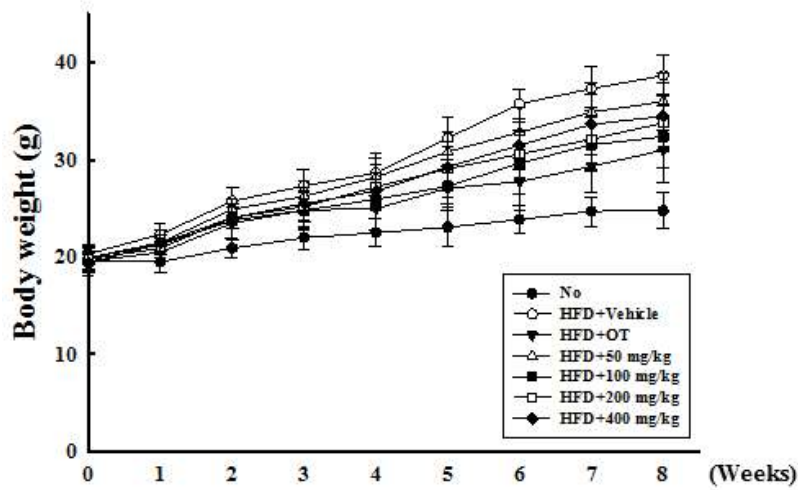


Figure 128. 8주간 빵나무제품의 경구투여에 따른 체중변화

- 빵나무제품이 식이효율에 미치는 영향을 알아보기 위해 주 1회 식이섭취 양에 따른 체중변화량을 계산하여 식이효율의 변화를 확인하였음. 식이효율은 다음과 같은 식에 따라 나타내었음.

$$\text{식이효율}(\text{food efficiency}) = \frac{\text{체중증가량}}{\text{식이섭취량}}$$

- 8 주간의 투여기간동안 초기 1-3 주, 중기 4-6 주, 후기 7-8 주 세 기간으로 나누어 분석한 결과, 초기와 후기에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 중기 4-6 주에서 Vehicle에 비교하여 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음(Fig. 129).

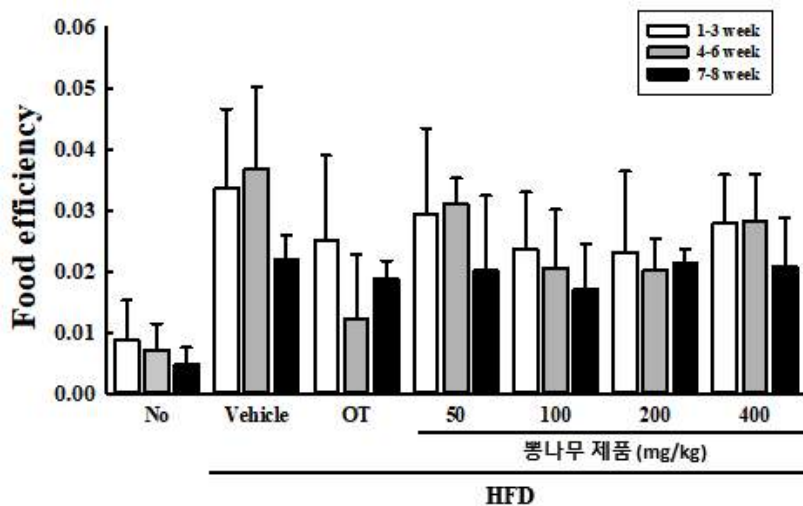


Figure 129. 빵나무제품의 경구투여에 따른 식이효율



- 뽕나무제품의 장기간 섭취가 혈액 내 비만지표인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여 8 주간 경구투여 이후 부검 12시간 전 절식시켰음. 마취 후 혈액을 채취하여 혈청분리튜브(SST)에 넣은 후, 원심분리(1,500×g, 15 분)하여 혈청을 분리하였음. 분리한 혈청으로 혈중 low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), total cholesterol (TC), glucose를 분석하였음.
- Total cholesterol은 LDL, HDL, triglyceride (TG)로 구성됨. Low density lipoprotein (LDL)과 High density lipoprotein (HDL)은 Triglyceride (TG)의 운송 lipoprotein이며 TG는 지방의 최종 저장 형태로서 음식물로부터 흡수되거나 간과 소장에서 지방산으로부터 합성되어 체내 TG의 저장에 기여하게 됨. 본 연구 결과에서 LDL, TC은 HFD에 의해 vehicle 그룹에서 증가하였으나 발효뽕잎추출물 100 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소하였으며 HDL과 TG는 고지방식이에 의하여 증가하였고 뽕나무제품의 투여에 의한 유의적인 변화는 관찰할 수 없었음(Fig. 130).

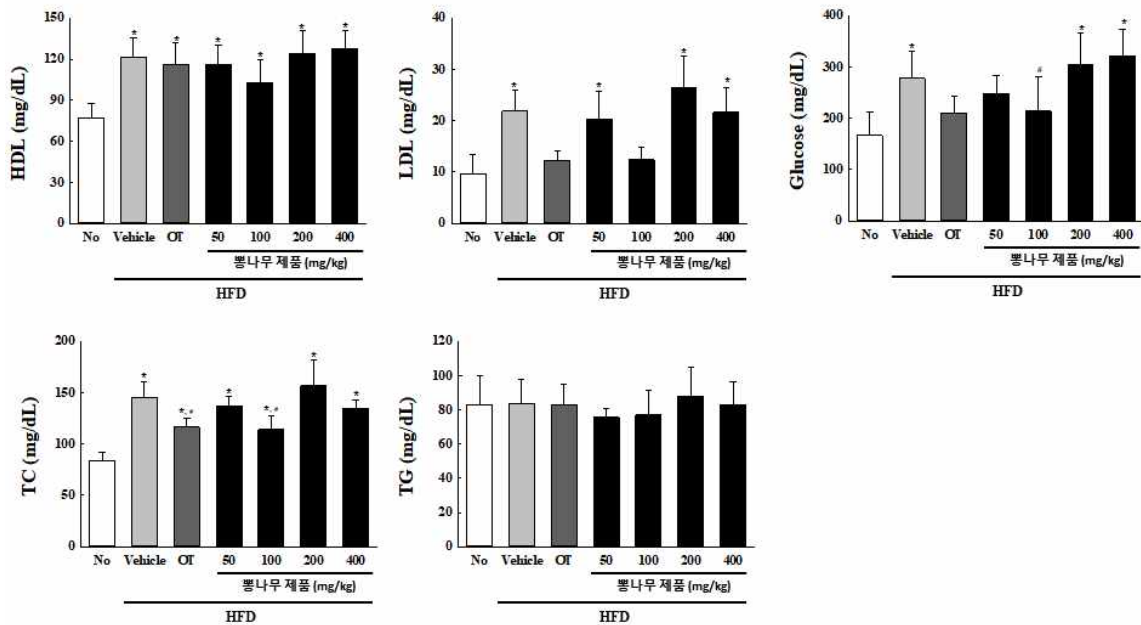


Figure 130. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 혈청 내 비만지표인자의 변화

- 발효뽕잎추출물의 장기간 섭취가 체지방 축적 및 지방간 형성 억제를 동반하는지 확인하기 위하여 체지방의 무게와 간의 무게를 측정하였음. 그 결과, 고지방식이에 의하여 증가한 복강 내 지방의 무게는 100 mg/kg의 뽕나무제품의 투여로 유의적으로 감소하였으며 간의 무게에는 어떠한 유의적인 변화를 관찰할 수 없었음(Fig. 131).

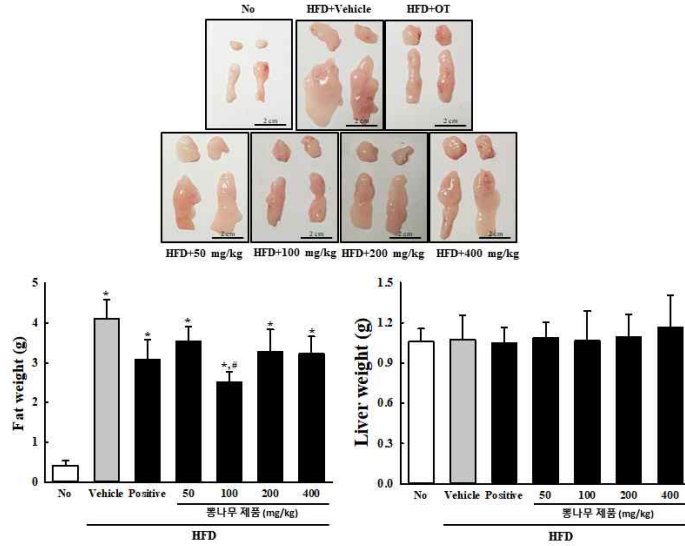


Figure 131. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 지방 및 간 조직의 무게변화

- 지방조직의 세포내 지방축적에 뽕나무제품이 미치는 영향을 확인하기 위해 고지방식으로 유발한 비만질환동물모델에서 8주간 제품을 투여한 후 복강 내 고환부위 지방을 채취하여 조직처리 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하였음. 지방세포의 크기를 측정한 결과 뽕나무 제품 100 mg/kg 의 농도에서 Vehicle 그룹에 비하여 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었음(Fig. 132).

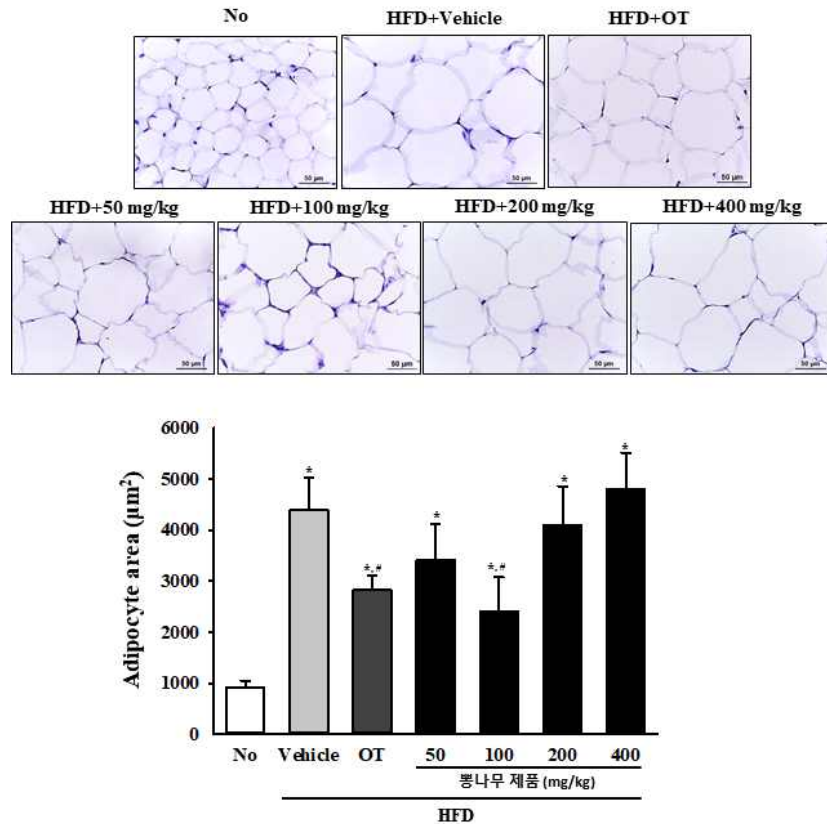


Figure 132. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 지방조직의 조직학적 변화

- 간 조직의 세포내 지방축적에 뽕나무제품이 미치는 영향을 확인하기 위해 고지방식으로 유발한 비만질환동물모델에서 8주간 제품을 투여한 후 간 조직을 채취하여 조직처리 후 hematoxylin과 eosin으로 염색한 결과 고지방식이에 의하여 Vehicle 그룹에서 지방간을 관찰할 수 있었으며 macro vesicle 형태를 띠는 지방방울 또한 관찰할 수 있었음. 이에 반하여 100 mg/kg 뽕나무제품의 투여군에서는 micro vesicle 형태를 띠는 지방방울의 형성을 관찰할 수 있었으며 간 조직 내 지방방울의 수도 100 mg/kg 투여군에서 Vehicle 그룹과 비교하여 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었음(Fig. 133).

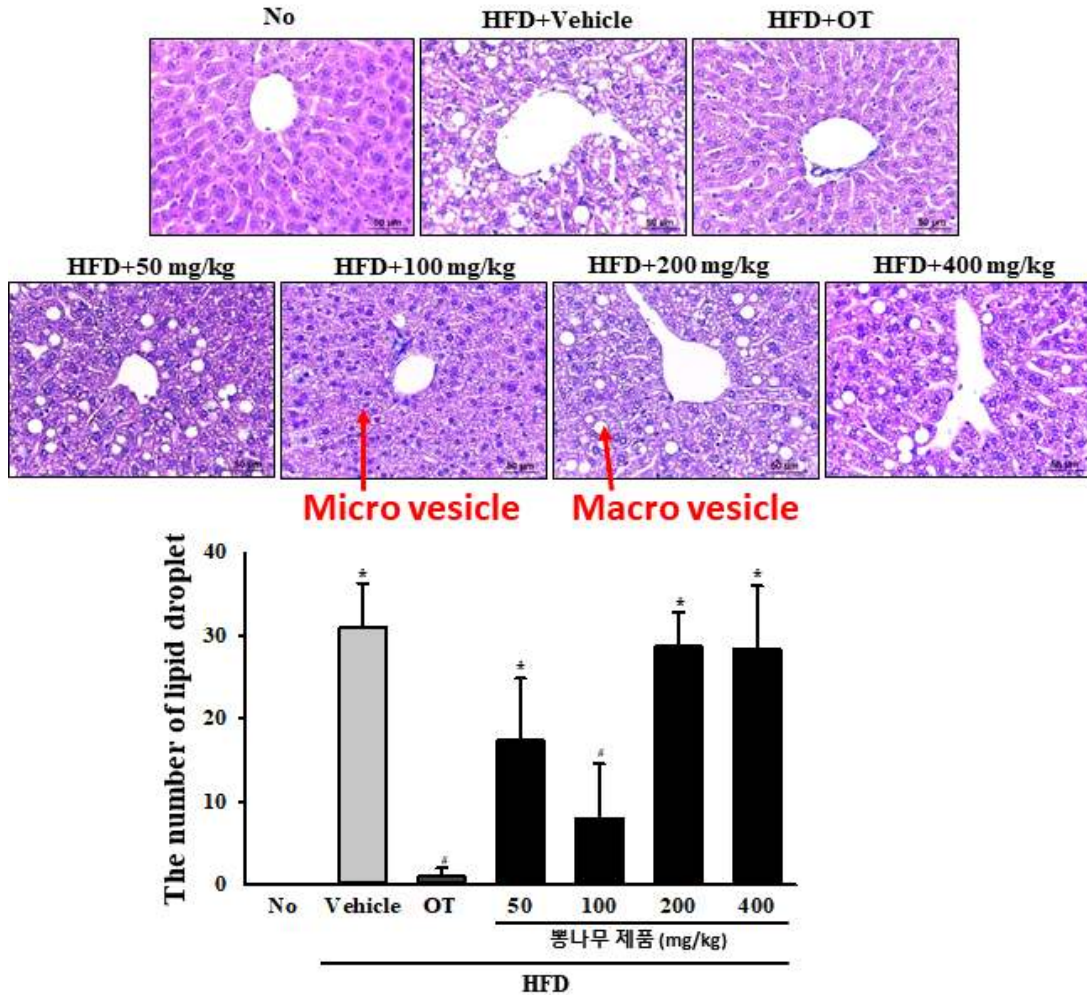


Figure 133. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 간조직의 조직학적 변화

- 8주간 뽕나무제품을 투여한 후 OCT compound로 간 조직을 얼려 동결박절한 절편으로 Oil red O staining을 통하여 간 조직 내 축적된 지방을 확인한 결과 뽕나무 제품의 투여로 간 조직 내 축적되는 지방이 감소한 것을 확인할 수 있었으며 100 mg/kg 농도의 뽕나무 제품에서 가장 큰 감소를 확인할 수 있었음(Fig. 134).

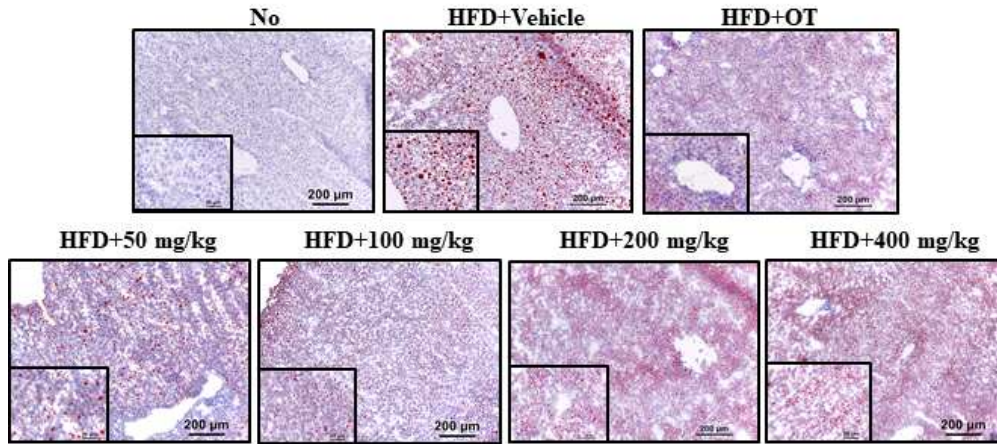


Figure 134. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 간조직의 지방 축적 변화

- 간에서 adipogenesis 및 lipogenesis 관련 전사인자들의 발현양을 비교하기 위하여 RNA Bee zol을 이용하여 RNA를 추출하여 cDNA를 합성 한 후 qPCR을 통해 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현양과 aP2와 FAS의 발현양을 비교하였음. Adipogenesis 관련 전사인자인 PPAR- $\gamma$ 는 뽕나무제품 50 mg/kg 에서는 Vehicle 투여군과 유사한 수준으로 일반식이에 비교하여 유의적으로 증가하였으나 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서는 Vehicle 투여군과 유의적인 차이는 없지만 감소하는 경향을 나타내었음. C/EBP $\alpha$ 의 발현양은 고지방식이에 의하여 Vehicle 투여군에서 일반식이군에 유의적으로 증가하였으며 뽕나무제품의 투여군 전체 농도에서 Vehicle 투여군에 유의적으로 감소하였음. Lipogenesis 관련인자인 aP2와 FAS 모두 고지방식이에 의하여 증가한 Vehicle 그룹에 비교하여 뽕나무제품 투여군 전체 농도에서 유의적인 감소를 확인할 수 있었음(Fig. 135).

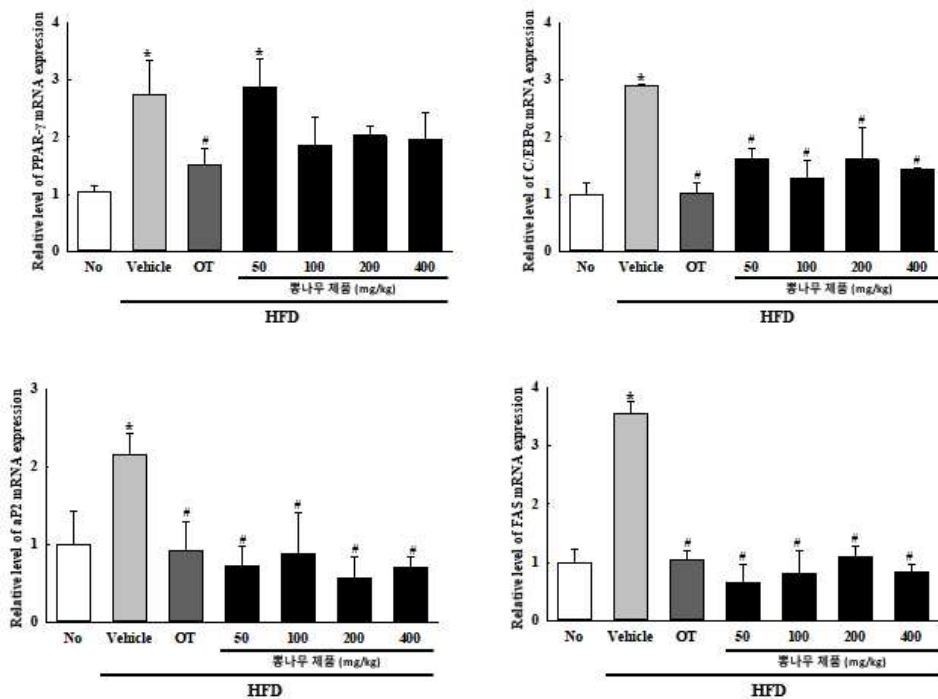


Figure 135. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 adipogenesis 및 lipogenesis 관련 전사인자들의 발현양 변화



- 뽕나무제품 투여에 따른 lipolysis 단백질들의 phosphorylation 양의 변화를 확인하기 위하여 간 조직에서 PRO-PREP solution을 이용하여 단백질을 추출하여 western blot을 진행하였음. Perilipin 단백질의 인산화와 ATGL 단백질의 발현양은 뽕나무제품 투여군 전체농도에 서 Vehicle 그룹에 비하여 유의적으로 증가하였으나 HSL 단백질의 인산화는 50, 100 mg/kg의 농도에서만 유의적으로 증가하였음(Fig. 136).

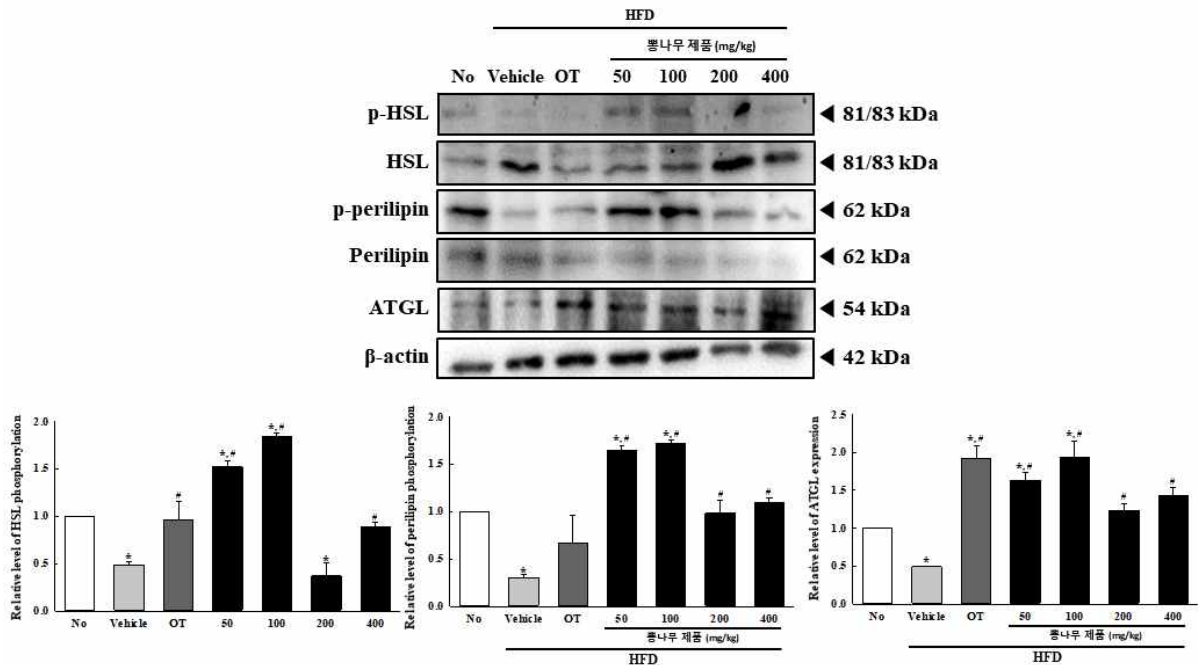


Figure 136. 뽕나무제품의 경구투여에 따른 lipolysis 단백질들의 발현 변화

- 다음과 같은 분석결과의 토대로 *in vivo* 수준에서 뽕나무제품의 적정 투여량은 주 5회 투여 할 경우 100 mg/kg임을 확인하였음.

㉠ 뽕나무제품의 항비만 효능 지속시간 연구

- 뽕나무제품의 지속시간을 확인하기 위하여 3T3-L1 (ATCC)을 이용하여 *in vitro* 단계에서 실험을 진행하였음. 3T3-L1 세포주는 swiss mouse embryo에서 유래된 fibroblast의 형태를 띠고 있는 지방전구세포(preadipocyte)로서 10% BCS (bovine calf serum)와 DMEM으로 배양하다가 10% FBS (fetal bovine serum)와 1 μM dexamethasone, 0.5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 10 μg/ml insulin의 자극에 의하여 round shape의 adipocyte로 분화하는 특성을 가지고 있음.
- 우선, 뽕나무제품의 *in vitro* 수준에서 최적 농도를 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml 농도에서 발현하는 PPAR-γ 전사인자의 양을 mRNA 수준에서 확인하기 위해 분화유도물질과 함께 뽕나무제품을 처리한 후 48시간 뒤 RNA를 추출해 qPCR을 실시한 결과 100 μg/ml 농도에서 가장 adipogenesis 억제효과가 우수하였음(Fig. 137).

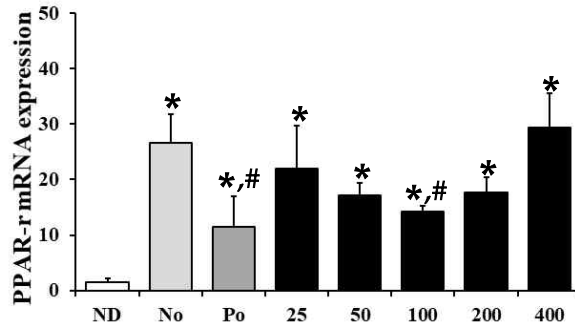


Figure 137. 뽕나무 제품의 PPAR- $\gamma$  발현양에 미치는 영향

- 위 결과에 따라 뽕나무제품의 adipogenesis 억제지속시간을 확인하기 위해 6 well plate에  $3 \times 10^5$  cell/well 만큼 세포를 분주한 뒤 100% confluent한 상태에서 2일 후에 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 분화유도물질인 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 10  $\mu$ g/ml insulin와 함께 뽕나무제품을 처리하였음. 2일 뒤부터는 뽕나무제품의 처리 없이 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 insulin을 처리하였으며 2일 배양 후에는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 교환을 하며 배양하였음. 효능 지속시간은 뽕나무제품 처리를 중단한 시점부터 12, 24, 48, 72 시간 뒤 RNA를 추출하여 cDNA를 제조한 뒤 qPCR을 통해 PPAR- $\gamma$ 의 발현양을 비교하여 뽕나무제품을 처리하지 않은 Vehicle 그룹과 유사한 수준으로 회복되는 시간을 통해 확인하고자 하였음. 뽕나무제품의 처리를 중단한 시간에 따라 PPAR- $\gamma$ 의 발현양이 증가하는 양상을 보였으며 72시간이 지나도 Vehicle그룹과 유의적으로 발현양이 감소하였음. 따라서 뽕나무제품의 adipogenesis 억제 효과는 72 시간 이상 지속될 것으로 사료됨(Fig. 138).

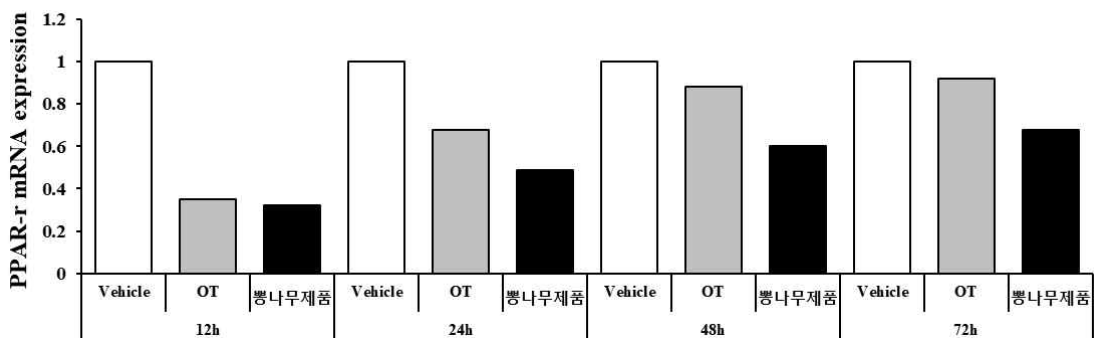


Figure 138. 뽕나무 제품 처리를 중단한 후 시간에 따른 PPAR- $\gamma$ 의 발현양 분석

- 뽕나무 제품의 lipolysis 효능 지속시간을 확인하기 위하여 3T3-L1 세포를 Fig. 27과 같은 일정으로 mature adipocyte로 분화시킨 후 0.5% FBS를 함유한 DMEM으로 24시간 배양하여 starvation 시킨 후 100  $\mu$ g/ml 농도의 뽕나무제품을 처리하였음. 뽕나무제품 처리 1, 2, 4, 6, 12, 24시간 뒤 상층액을 따서 micro centrifuge tube에 옮긴 후 65°C에서 15분 반응시킨 후 1,000 rpm, 4°C에서 3분 동안 원심분리 후 상층액 10  $\mu$ l과 glycerol reagen 200  $\mu$ l를 10분 동안 상온에서 진탕배양하여 540 nm파장에서 읽었음. 그 결과 24시간까지 lipolysis 효능을 지속하는 것을 확인하였으며 그 이상 지속 가능할 것임으로 사료됨(Fig. 139).

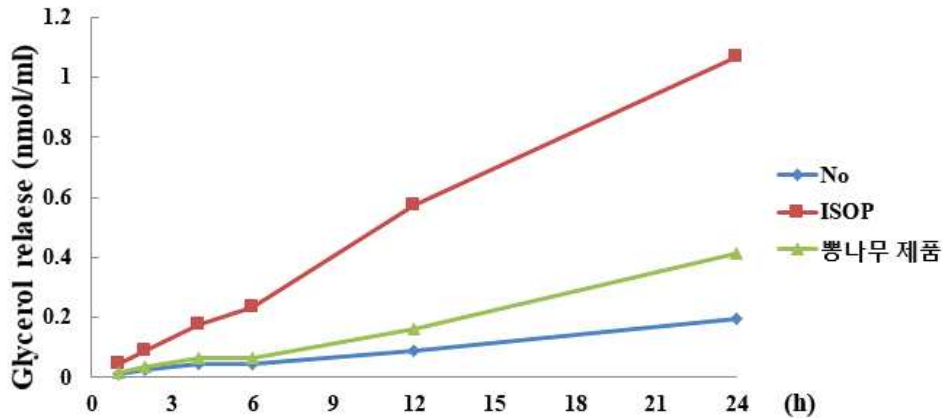


Figure 139. 방출된 누적 glycerol 양

㊤ 대사체 분석을 통한 효능확인 지표탐색 (Metabolomics analysis)

- 대사체 반응성 조사는 특정 생명현상 및 물질대사를 밝히기 위하여 생물학적 시료에 존재하는 모든 저분자량 대사물질을 검출, 정량 분석하는 것임. 특히, 대사체란 세포 또는 유기체 내에서의 상호작용에 의해 생성되는 최종 산물, 즉 표현 형질이기 때문에 여러 가지 세포 내 메커니즘을 이해하는데 결정적인 정보를 제공함. 또한 이를 통해 질병의 진단, 약물의 효과 검증이 가능함. 이러한 대사체 분석을 위해 8주간 뽕나무제품을 고지방식이의 급여와 동시에 경구투여한 뒤 채취한 간 조직으로 4 mM TSP를 포함하는 300 ul의 D2O 용액에 넣어주었음. 이후 voltexing을 통해 잘 섞어주었고 NMR spectrometry를 사용하여 48시간 이내로 측정하여 분석하였음. 모든 스펙트럼은 26°C에서 Varian Unity Inova 600 MHz spectrometer operating를 사용하여 측정되었음. 이후 모든 분석데이터들은 NMR suite Professional software를 통해 Microsoft Excel로 변환되어 비교분석 하였음.
- 고지방식으로 변화된 아미노산은 asparagine, serine, histidine, glycin, arginine, taurine, tyrosine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysin 이였으며 이들 중 뽕나무제품의 투여로 유의적으로 정상수준만큼 회복한 아미노산은 asparagine, serine, arginine, lysine, tyrosine, phenylalanine, valine, leucine, isoleucine 이였음. 특히, 100 mg/kg 농도에서는 모든 아미노산이 Vehicle 투여군에 유의적으로 회복된 것을 확인하였음(Fig. 140).



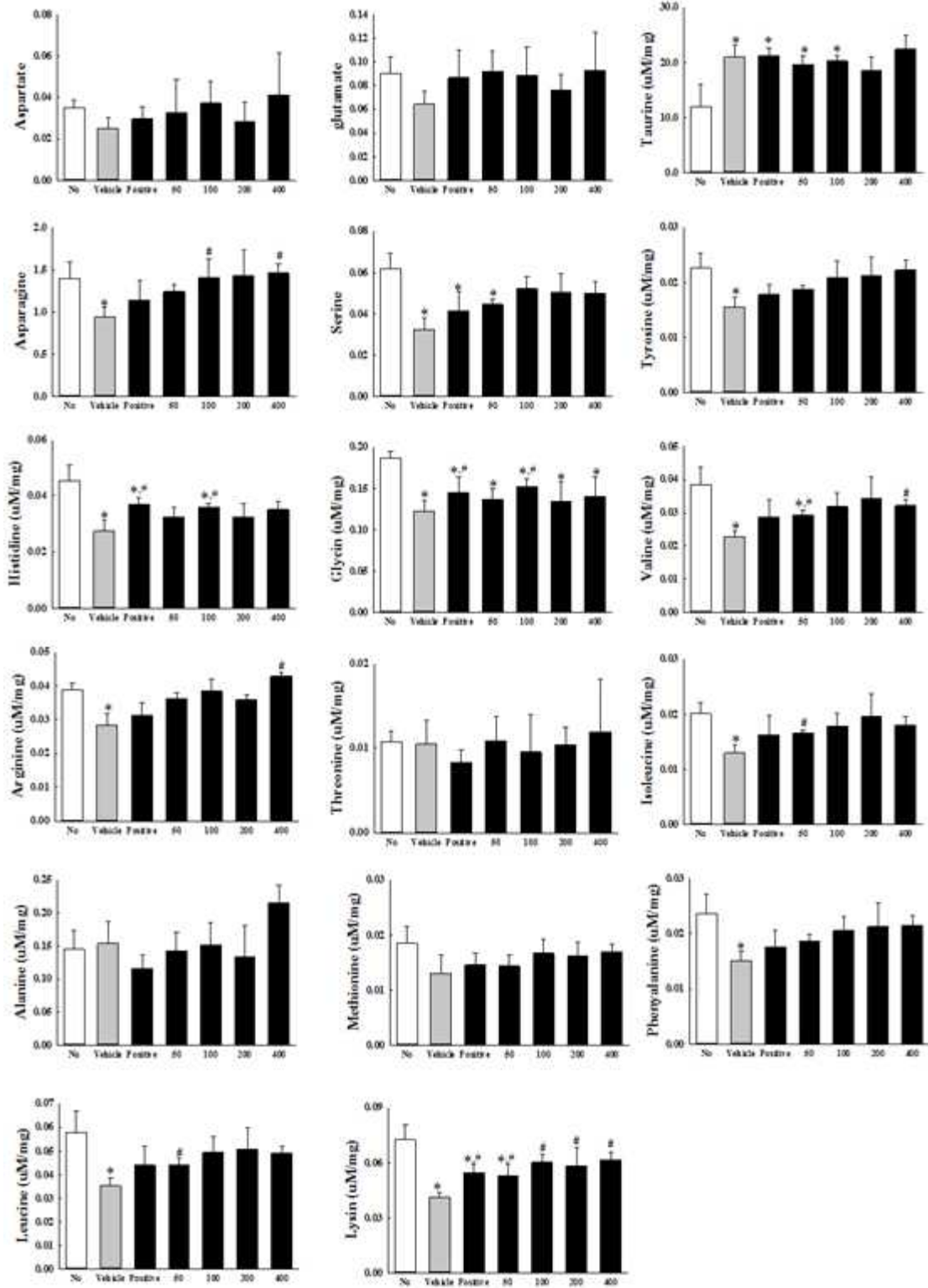


Figure 140. 8주간 뽕나무제품의 경구투여에 따른 간 조직 내 17가지 아미노산 변화

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억 원
			향후 3년간 매출	3억 원
		관련제품	개발후 현재까지	0억 원
			향후 3년간 매출	0억 원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.0% 국외 : 0.0%
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5% 국외 : 0.0%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 8.0% 국외 : 1.0%
			향후 3년간 매출	국내 : 13.0% 국외 : 1.5%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		50위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		40위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	복합원료를 이용하여 체지방감소기능성을 가지는 개별인정형 원료로 개발하기 위하여 투자 및 개발 제품 영업 등 사업화 추진			
	소요예산(백만원)	300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	3	6	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	2	5
국외		0	0.1	0.3	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	체지방감소 기능성 원료들과의 복합원료 제품화 및 스틱젤리 등의 다양한 유형의 제품 개발 추진			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	0.5	3	
	수 출	0	0.1	0.3	

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

##### 가. 최종목표 내용

- (1) 최적 발효 균주와 썩나무 소재의 스크리닝, 균의 효능성분을 추가한 썩나무 소재의 최적 발효방법을 이용한 항비만 효능 소재 개발
- (2) 균의 생리활성 성분의 함량이 증대된 발효썩나무의 지표성분 표준화 및 항비만 효능 증강형 항비만 발효 썩나무 소재 개발
- (3) 발효 조건 규명 및 발효 추출물의 성분 profiling 및 지표성분 cordycepin 10 mg/g 이상 표준화
- (4) 산업화를 위한 대량 배양방법 개발 및 발효 추출물의 대량 공급
- (5) 비만모델을 이용한 항비만 효능 평가 및 작용기전 연구
- (6) 발효썩나무 추출 수율 10% 이상
- (7) 시험관 시험 1건, 동물시험 1건, 기전연구 1건, 간이임상 1건 수행하여 항비만 효능 검증을 수행하여 논문 8편(SCI 6편, 비SCI 2편) 게재, 특허 4건 출원, 3건 등록
- (8) 썩나무 발효 추출물의 단회투여 1건, 유전독성 3건, 반복투여 1건을 수행하여 안전성 평가 완료
- (9) 썩나무 추출물 항비만 관련 제품 개발 18건 이상, 상품화를 통한 매출액 2억 원 이상 창출
- (10) 제품 개발, 생산 및 품질관리를 위한 고용 17명 이상

##### 나. 연차별 개발목표 및 내용

##### (1) 연차별 개발 내용

##### (가) 1차년도

##### ① 개발목표

- ㉔ 주관연구기관(노바렉스) : 썩나무 추출물 대량생산 조건 검토, 안전성(단회투여, 유전독성)평가, 제품 개발 1건 이상
- ㉕ 제1협동연구기관(부산대학교) : 최적 발효 균주와 썩나무 소재의 스크리닝, 균의 효능성분을 추가한 썩나무 소재의 최적 발효방법을 이용한 항비만 효능 소재 개발을 통한 특허 출원 2건
- ㉖ 제2협동연구기관(부산대학교) : 비만세포주를 이용한 항비만 효능물질 검색

② 개발 내용 및 범위

㉠ 주관연구기관(노바렉스) :

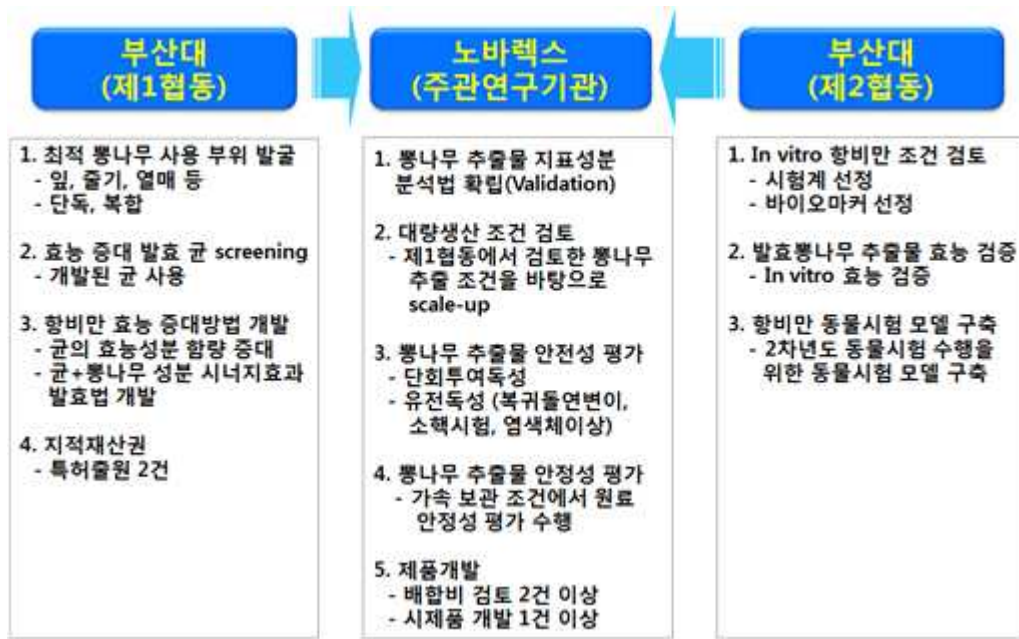
- 뽕나무 추출물 지표성분 분석법 확립(Validation)
- 대량생산 조건 검토(추출 수율 5% 이상)
- 뽕나무 발효 추출물의 안전성 평가[GLP 기관에서 단회투여독성, 유전독성(복귀돌연변이, 소핵시험, 염색체이상) 수행]
- 뽕나무 추출물 원료 안정성 평가(stability test)
- 제품 개발 수행

㉡ 제1협동연구기관(부산대학교) :

- 배지와 뽕나무의 첨가 비율 등을 조합한 발효공정법 개발
- 균의 생리활성 물질의 함량을 증대시킬 수 있는 배지 및 배양방법의 개발
- HPLC를 이용한 분석 밸리데이션 확립 및 원물에서부터 추출 공정별 함량분석을 통한 기능성식품의 개발을 위한 제조공정 지원(균주와 뽕나무의 주요 지표성분 함량 분석)
- 뽕나무 추출물 또는 발효 추출물로부터 기능성 소재발굴(제2협동 연계) 및 대사체분석 (metabolimics)을 통한 바이오마커 탐색
- 고기능성 발효 식의약품 개발을 위한 발효 소재와 미생물 선정 및 발효공정의 제조 표준화 확립
- 특허 출원 2건

㉢ 제2협동연구기관(부산대학교) : 비만세포주를 이용한 항비만 효능물질 검색

- 항비만 효능 검색을 위한 세포주 확립
- 비만세포주 등 확보 및 배양조건 확립
- 지방조직으로부터 primary 세포분리 및 배양조건 확립
- In vitro 효능 평가
- 뽕나무의 비만세포 항비만효능 평가
- 항비만 효능 작용기전에 미치는 영향분석
- 세포주에 미치는 독성평가



(나) 2차년도

① 개발목표

- ㉠ 주관연구기관(노바렉스) : 썩나무 추출물 대량생산 SOP 확립, 안전성(반복투여독성)평가, 제품 개발 2건 이상, 매출 5천만 원 이상, 고용 2명 이상
- ㉡ 제1협동연구기관(부산대학교) : 최적 발효조건 규명 및 발효 추출물의 성분 profiling 및 지표성분 표준화를 통한 SCI 논문 1편, 비SCI 논문 1편, 특허출원 1건
- ㉢ 제2협동연구기관(부산대학교) : 비만모델동물을 이용한 항비만 효능평가, SCI 논문 1편

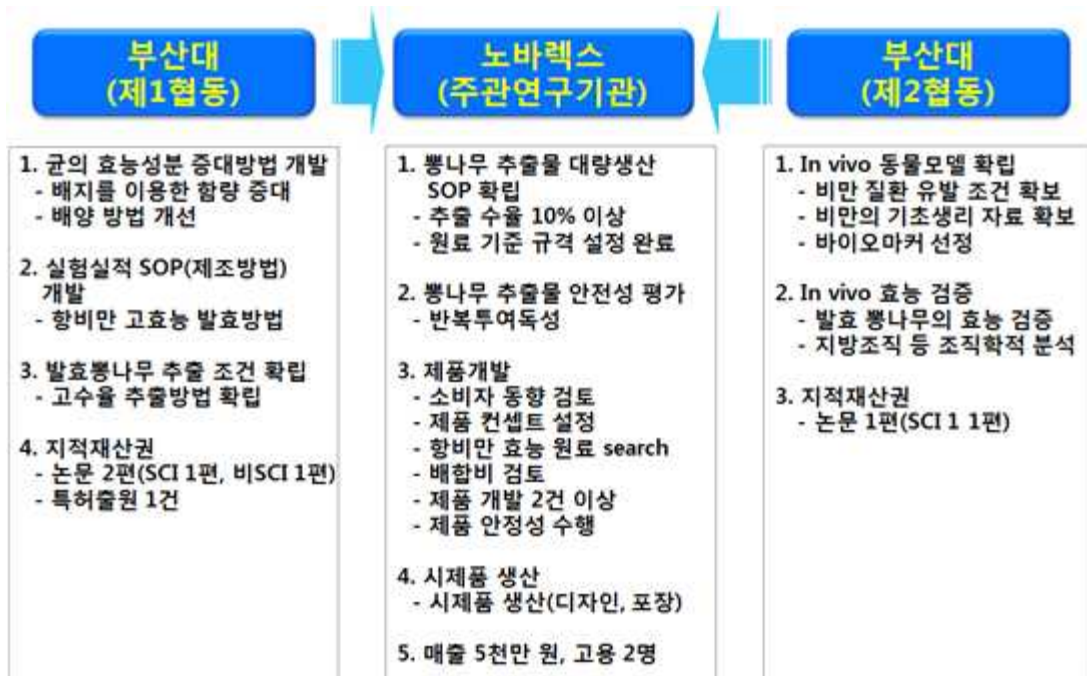
② 개발 내용 및 범위

- ㉠ 주관연구기관(노바렉스) :
  - 썩나무 추출물 대량생산 SOP 확립(추출 수율 10% 이상)
  - 기능성원료 기준 규격 설정 완료
  - 썩나무 발효 추출물의 안전성 평가(GLP 기관에서 반복투여독성 수행하여 안전성 확보)
  - 썩나무 추출물 항비만 제품개발 및 시제품 생산 2건 이상, 상품화를 통한 매출 5천만 원 이상, 고용 2명 이상
- ㉡ 제1협동연구기관(부산대학교) :
  - 균이 생성하는 효능성분(항비만, 면역증강, 항당뇨, 항염증 및 항암 등의 효과)의 함량 증대 방법 개발
  - 항비만 효과를 나타내는 추출공정법 개발(원재료, 추출시간, 용매, 분말화, 제품 등의 단계별 발효 방법 개발)

- 바이오마커를 이용한 기능성 식품 소재(항비만)의 품질인증을 위한 평가방법 개발
- 지표성분인 cordycepin과 quercetin 함량을 측정을 위한 HPLC column 및 동시분석조건 개발
- 유효성분 기준의 바이오마커를 이용한 기능성 발효 썩나무 소재의 품질 평가
- 지표성분을 이용한 원료 및 추출공정, 최종제품 및 시제품의 함량분석을 통한 기준 규격 설정(지표성분 cordycepin 10 mg/g 이상 표준화)
- 논문 2편(SCI 1편, 비SCI 1편), 특허 출원 1건

㉔ 제2협동연구기관(부산대학교) :

- 효능분석을 위한 모델동물 확립
- 비만질환 모델동물의 확보 및 모델동물의 대량생산
- 비만질환 유발조건 및 기초 생리자료 확보
- In vivo 생리활성 효능
- 모델동물을 활용한 발효썩나무의 생리활성(항비만) 효능 분석
- 비만질환의 발병기전에 미치는 썩나무의 작용기전 분석 및 연구
- 지방조직 등의 조직학적 특성분석
- 썩나무와 다른 기능성물질의 효능비교 분석
- 논문 1편(SCI 1편)



(다) 3차년도

① 개발목표

- ㉔ 주관연구기관(노바렉스) : 썩나무 추출물 간이인체적용시험 수행, 제품개발 6건 이상, 매출 1.5억 원 이상, 고용 5명 이상

㉔ 제1협동연구기관(부산대학교) : 산업화를 위한 대량 배양방법 개발 및 발효 추출물의 대량 공급 등의 연구를 통한 SCI 논문 1편, 특허등록 1건

㉕ 제2협동연구기관(부산대학교) : 항비만 효능물질의 작용기전 연구, 논문 3편(SCI 1편, 비SCI 2편), 특허 출원 1건

## ② 개발 내용 및 범위

㉖ 주관연구기관(노바렉스) :

- 빵나무 추출물의 건강기능식품 개별인정형 기능성 원료로 개발 추진하기 위해 간이인체 적용시험을 수행하여 항비만 효능 검증 확인, 인체적용시험 수행에 앞서 식약처의 인체 적용시험 계획서 사전검토 등 신청 추진
- 항비만 외 다양한 기능성 추가 검토하여 복합 기능성을 갖는 빵나무 추출물 원료 개발 추진. 지표성분 분석법은 식품공전, 건강기능식품공전, 대한약전 등 공인된 분석법을 바탕으로 설정하며, 그 외 공인된 분석법이 아닐 경우 validation 진행 추진
- 빵나무 추출물과 체지방 감소 건강기능식품 기능성원료(잔티젠, 녹차추출물, 가르시니아 캄보지 추출물 등)를 첨가하여 항비만 제품개발 6건 이상, 상품화를 통한 매출 1.5억 원 이상, 고용 5명 이상

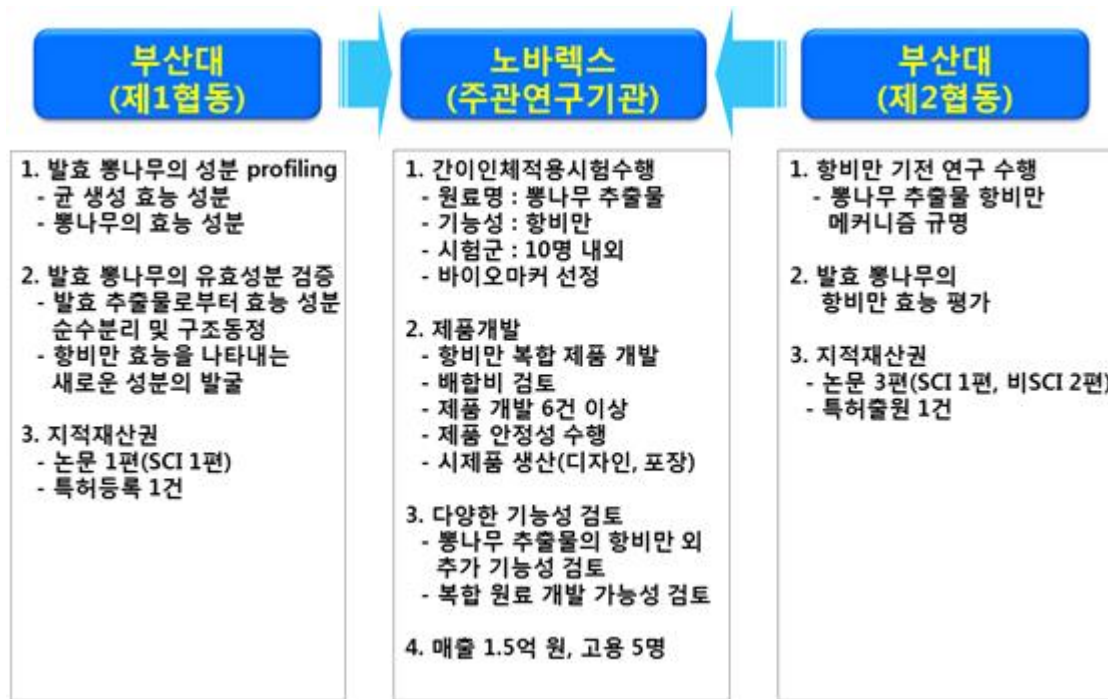
㉗ 제1협동연구기관(부산대학교) :

- 발효를 통해서 만들어진 균의 특성과 빵나무의 특성을 나타낼 수 있는 biomarker의 profiling
- 발효를 통해서 생합성된 생리활성 성분의 순수분리, 구조동정 및 순수분리한 유효성분(바이오마커)으로서 함량 측정방법 개발
- 고기능성 발효 식의약품 개발을 위한 발효 소재와 미생물 선정 및 발효공정의 제조 표준화를 확립하고 발효 과정 중에 생성되는 기능성 물질의 분리와 구조동정 기술을 확립함으로써 생물전환(biotransformation) 기술의 기반 마련 및 이를 통한 항비만 소재 개발
- 빵나무 소재로부터 항비만 효능을 가진 성분의 순수분리 및 구조 동정 후 기능성 소재 발굴
- 논문 1편(SCI 1편), 특허 등록 1건

㉘ 제2협동연구기관(부산대학교) :

- 약리작용기전 연구
- 빵나무의 항비만 작용 메커니즘 연구
- 빵나무제품의 약리효능 평가
- 논문 3편(SCI 1편, 비SCI 2편), 특허 출원 1건





다. 연구개발 성과 및 평가방법

(가) 연구개발 성과 평가방법

성과지표명	세부항목	성과지표명	세부항목
지식재산권	<ul style="list-style-type: none"> <li>특허출원 : 특허출원명세서</li> <li>특허등록 : 특허 등록증</li> </ul>	기술인증	기술·제품 인증 등
논문/학술발표	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내외 논문(SCI, 비SCI) : 게재증명서 또는 게재 논문</li> <li>국내외 학술발표 : 포스터</li> </ul>	인력양성	연구인력 활용/양성
기술거래	기술이전, 기술료	정책활용	정책건의, 정책반영 등
교육지도	교육지도(현장컨설팅)	홍보/전시	신문, 방송, 저널, 전시회 등
사업화	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품화 : 품목제조신고</li> <li>고용창출 : 근로계약서, 4대 보험 가입증명서</li> <li>매출액 : 세금계산서</li> </ul>	기타	국제화협력, 타 연구개발 활용 등

(단위 : 백만원, 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책활용홍보		기타(타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문				학술발표	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI						
최종 목표	4	3				18	1,500		17			6	2			2		2	
1차년도	2					-	-		-										
2차년도	1					2	50		2			2	1						
3차년도	1	1				6	150		5			2	1		2			2	
4차년도																			
5차년도																			
소 계	4	1				8	200		7			4	2		2			2	
종료 1차년도		1				4	200		4			1							
종료 2차년도		1				3	300		3			1							
종료 3차년도						3	500		3										
종료 4차년도							100												
종료 5차년도							200												
소 계		2				10	1,300		10			2							
합 계	4	3				18	1,500		17			6	2		2			2	

3-2. 목표 달성여부

가. 최종 목표 대비 달성여부

내용	진행 사항	달성도
최적 발효 균주와 썩나무 소재의 스크리닝, 균의 효능성분을 추가한 썩나무 소재의 최적 발효방법을 이용한 항비만 효능 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>동충하초 균주를 이용하여 최적 발효 조건 확립 및 항비만 효능을 검증한 소재 개발 완료</li> </ul>	100%
균의 생리활성 성분의 함량이 증대된 발효썩나무의 지표성분 표준화 및 항비만 효능 증강형 항비만 발효 썩나무 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효썩잎추출물 표준화 및 항비만 효능을 가진 기능성 소재 개발 완료</li> </ul>	100%
발효 조건 규명 및 발효 추출물의 성분 profiling 및 지표성분 cordycepin 10 mg/g 이상 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효썩잎추출물 내 유효성분 profiling 및 순수물질 분리 완료</li> <li>지표성분 cordycepin, quercetin 함량 분석 완료</li> </ul>	100%
산업화를 위한 대량 배양방법 개발 및 발효 추출물의 대량 공급	<ul style="list-style-type: none"> <li>제1협동연구기관으로부터 대량 배양 방법 개발 기술에 대한 노하우 주관 연구기관에 전수 및 발효 추출물 공급 완료</li> </ul>	100%
비만모델을 이용한 항비만 효능 평가 및 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>비만모델을 이용하여 발효썩잎추출물 항비만 효능 평가 및 작용기전 연구 완료</li> </ul>	100%
발효썩나무 추출 수율 10% 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>썩잎 45 kg 이용하여 발효썩잎추출물 6 kg 생산 완료(추출 수율 13%)</li> </ul>	100%
사업기간 내 시험관 시험 1건, 동물시험 1건, 기전연구 1건, 간이임상 1건 수행하여 항비만 효능 검증을 수행하여 논문 7편 (SCI 4편, 비SCI 3편) 게재, 특허 4건 출원, 1건 등록	<ul style="list-style-type: none"> <li>SCI 논문 게재 6편</li> <li>비SCI 논문 게재 3편</li> <li>특허 출원 5건</li> </ul>	94%
썩나무 발효 추출물의 단회투여 1건, 유전독성 3건, 반복투여 1건을 수행하여 안전성 평가 완료	<ul style="list-style-type: none"> <li>GLP 기관을 통해 단회투여 1건, 유전독성 3건, 반복투여 1건 수행 완료</li> <li>LD<sub>50</sub> 5,000 mg/kg 이상</li> </ul>	100%
사업기간 내 썩나무 추출물 항비만 관련 제품 개발 8건 이상, 상품화를 통한 매출액 2억 원 이상 창출	<ul style="list-style-type: none"> <li>썩나무 추출물을 이용한 항비만 관련 건강기능식품 제품 개발 8건 진행</li> <li>매출액 창출을 위해 자사 영업부서를 통해 협력사에 제품 홍보 진행 중</li> </ul>	80%
사업기간 내 제품 개발, 생산 및 품질관리를 위한 고용 7명 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품 개발, 생산 및 품질관리를 위한 고용 8명</li> </ul>	114%

나. 세부기관별 목표 대비 달성여부

(1) 주관연구기관 : (주)노바렉스

개발목표		진행사항	달성도 (%)
1차년도	빵나무 추출물 대량생산 조건 검토	<ul style="list-style-type: none"> <li>빵나무 발효추출물 내 지표성분인 cordycepin, quercetin 분석법 조사</li> <li>실험실 조건에서 추출 조건 확립(추출 수율 5% 이상)</li> </ul>	100
	안전성(단회투여, 유전독성) 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>GLP 기관(KCL, 바이오톡스텍, KTR, 캡온)으로부터 견적 비교</li> <li>GLP 기관 선정 : 바이오톡스텍</li> <li>단회투여, 유전독성 평가 수행</li> </ul>	100
	제품 개발 1건 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>체지방 감소 기능성 원료 현황 조사</li> <li>제품의 컨셉, 배합비 등 검토 완료</li> </ul>	100
2차년도	빵나무 추출물 대량생산 SOP 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>빵나무 발효 추출물 추출 조건 검토 완료(scale up)</li> <li>제조공정 확립 완료(추출 수율 10% 이상)</li> <li>지표성분 분석하여 기준 규격 설정 완료</li> </ul>	100
	안전성(반복투여독성) 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>암수 SD 랫드를 이용하여 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응 평가</li> <li>1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day의 각 3개 용량으로 투여 시 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과 없었음</li> </ul>	100
	제품 개발 2건 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>관련 제품 개발을 위한 자료 조사 수행</li> <li>제품 배합비 검토 진행</li> </ul>	100
	매출 5천만 원 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효빵잎추출물에 대한 연구결과 등을 바탕으로 영업부서를 통해 고객사에 원료 소개 등 진행</li> </ul>	90
	고용 2명 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>고용창출 3명</li> </ul>	150
3차년도	간이인체적용시험 수행	<ul style="list-style-type: none"> <li>간이인체적용시험을 위해 CRO와 미팅 등 진행</li> <li>발효빵잎추출물 단독 사용 시 용량의존적인 효과를 확인 할 수 없었음.</li> <li>더 효과적인 체지방 감소 효능을 확인하기 위하여 다른 원료들과 복합 사용하여 시너지 효과를 극대화하기 위해 복합 원료에 대한 항비만 효능 검증 중</li> </ul>	80
	제품개발 6건 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>체지방감소 기능성 원료(녹차추출물, 씨엘에이, 가르시니아카보지아추출물)와 함께 건강기능식품 제품개발 8건 완료</li> </ul>	133
	매출 1.5억 원 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>건강기능식품의 부원료로 하여 발효빵잎추출물 제품개발 8건 완료</li> <li>영업부서를 통해 고객사에 원료 및 제품에 대한 홍보 진행 중</li> </ul>	90
	고용 5명 이상	<ul style="list-style-type: none"> <li>연구개발 및 품질관리를 위한 고용창출 5명</li> </ul>	100

(2) 제1협동연구기관 : 부산대학교 산학협력단 최영환 교수

개발목표		진행사항	달성도 (%)
1차년도	최적 발효 균주와 썩나무 소재의 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 썩나무 소재+동충하초 균주를 이용한 배양 방법 및 추출용매에 따른 효능을 검증하여 소재 선정</li> <li>▪ 썩나무 소재+동충하초 균주+발효원을 추가하여 발효 효율 및 lipolysis를 향상시킬 수 있는 소재 개발</li> <li>▪ 발효원의 첨가 농도를 다르게 하여 lipolysis를 향상시킬 수 있는 최적의 농도 규명</li> <li>▪ HPLC를 이용하여 썩나무의 몇 가지 성분 분석 방법 확립</li> </ul>	100
	균의 효능성분을 추가한 썩나무 소재의 최적 발효방법을 이용한 항비만 효능 소재 개발을 통한 특허 출원 2건	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항비만 효능 증진을 위한 발효썩잎 개발을 통한 특허 2건 출원 완료</li> </ul>	100
2차년도	최적 발효조건 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 썩나무 잎+밀리타리스 동충하초 균주를 이용한 배양방법, 배양기간 및 액체배양 한 후에, 추출용매에 따른 효능 검증을 검증하여 소재 선정</li> <li>▪ 썩나무 잎+밀리타리스 동충하초 균주+발효원으로 발효 시 효과는 발효원을 추가하는 것이 좋은 것으로 나타났으나, 발효원의 표준화와 공급에 문제가 있을 것으로 생각되어 썩나무 잎+밀리타리스 동충하초 균주 발효물 사용하기로 결정</li> <li>▪ 대량배양 방법을 주관기관에 기술 이전</li> </ul>	100
	발효 추출물의 성분 profiling 및 지표성분 표준화를 통한 SCI 논문 1편, 비SCI 논문 1편, 특허출원 1건	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 해당 연구 성과를 이용하여 특허 출원 2건 완료</li> <li>▪ 비SCI 논문 1편 게재</li> </ul>	100
3차년도	산업화를 위한 대량 배양방법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>C. militaris</i> 균주와 썩잎을 발효시에 균의 생리활성물질인 cordycepin의 함량 증대법 개발</li> <li>▪ 항비만 효과를 10배정도 증대방법로 참여 업체에서 소재 활용</li> </ul>	100
	발효 추출물의 대량 공급 등의 연구를 통한 SCI 논문 1편, 특허등록 1건	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 논문 1편 투고 후 review 중</li> </ul>	80

(3) 제2협동연구기관 : 부산대학교 산학협력단 황대연 교수

개발목표		진행사항	달성도 (%)
1차년도	비만세포주를 이용한 항비만 효능물질 검색	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항비만 효능 검색을 위한 세포주 확립</li> <li>- 3T3미분화 지방세포주의 확립 및 분화조건 확립 완료</li> <li>- SD랫드의 복부지방으로부터 primary 지방세포 분리조건 확립</li> <li>▪ <i>In vitro</i> 효능 평가</li> <li>- 발효빵나무 추출물 120개의 lypolysis 효능을 평가하여 우수한 효능을 나타내는 20개 시료를 선별하고 2차 스크리닝으로 우수한 2개 시료선정</li> <li>- 항비만능이 우수한 시료의 작용기전을 단백질 혹은 cAMP 등의 분석으로 진행</li> <li>- 발효빵나무 추출물 120개와 3T3-L1 비만세포주에 미치는 독성분석 완료</li> </ul>	100
2차년도	비만모델을 이용한 항비만 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 고지방사료를 장기간 투여하는 방식으로 비만모델을 대량생산완료</li> <li>▪ 비만질환을 유발하기 위한 투여기간, 투여량 등의 조건확립하고 지방 조직학적 특성 등 기초생리자료 확보 완료</li> <li>▪ 발효빵나무 추출물의 처리에 의해 지방무게의 감소 등 항비만 효능 확인</li> <li>▪ 지방의 분해와 관련된 단백질 등의 변화, 지방조절단백질의 발현 등의 변화를 분석함</li> </ul>	100
	SCI 논문 1편	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ SCI 논문 3건 게재</li> <li>▪ 비SCI 논문 2건 게재</li> <li>▪ 학술발표 2건</li> </ul>	500
3차년도	항비만 효능물질의 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inflammation, ER stress, Autophagy 작용기전 연구 완료</li> <li>▪ Lipogenesis, adipogenesis, lipolysis 항비만 작용기전 연구 완료</li> <li>▪ Adipogenesis, lipolysis 지속시간 및 대사체 분석 완료</li> </ul>	100
	논문 3편 (SCI 1편, 비SCI 2편)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ SCI 논문 3편 게재</li> <li>▪ 비SCI 논문 1편 게재</li> <li>▪ 학술발표 1건</li> </ul>	133
	특허출원 1건	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 해당 연구 성과를 이용하여 특허 명세서 작성 중</li> </ul>	80

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

목표 미달성 내용	목표 미달성 원인(사유)	차후대책
간이임상 1건 수행	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 동물시험을 통해 체지방 감소 가능성을 확보하고 간이인체적용시험을 수행하여 개별인정형 원료로 개발을 추진하고자 하였음</li> <li>▪ 발효팽유허출물 단독 사용 시 용량의존적인 효과를 확인 할 수 없었으며, 체지방감소에 대한 명확한 메커니즘 확보 어려움</li> <li>▪ 더 효과적인 체지방 감소 효능을 확인하기 위하여 체지방 감소에 효과를 보이는 다른 원료들과 복합 사용하여 시너지 효과를 극대화하기 위해 간이임상 수행 잠시 보류</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 복합원료에 대한 체지방 감소 기능성 검토 수행하여 단독 사용보다 더 효과적인 최적의 복합원료 선정하여 기능성 자료 확보</li> <li>▪ 동물시험을 통해 확보된 복합원료를 이용하여 인체적용시험을 수행</li> <li>▪ 인체적용시험 수행 후 개별인정형 원료로 개발하여 지속적인 개발 추진</li> </ul>
특허 등록 1건	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 특허 출원 이후 등록을 위해 심사 청구, 의견보정 등 상당한 기일이 소요 됨</li> <li>▪ 현재 특허 등록을 위해 검토 진행 중</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 과제 종료 이후에도 특허 등록을 위해 후속 조치를 진행할 예정</li> </ul>
상품화를 통한 매출액 2억 원 이상 창출	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현재 건강기능식품 부원료로 하여 8건의 제품 개발 완료</li> <li>▪ 영업부서를 통해 (주)노바렉스의 고객사들에 원료 및 제품에 대한 홍보를 진행하고 있으나, 체지방 감소 기능성을 표시할 수 없기 때문에 기존의 기능성 표시를 할 수 있는 원료들과의 경쟁력에서 다소 밀립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 새로운 체지방 감소 기능성에 대한 소비자의 니즈는 꾸준히 증가하기 때문에 기능성 표시가 가능한 개별인정형 원료로의 개발을 지속적으로 추진하여 신제품 출시를 통한 매출액 창출 도모</li> </ul>



#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 국내 · 외 식품대기업 등 외부 네트워크 활용 방안

(1) (주)노바렉스는 식품대기업(CJ, 남양유업, 한국야쿠르트, 대상 등), 제약&약국(종근당, 일동, 유한양행, 온누리약국체인 등), 화장품&생활(LG 생활건강, KT&G, 휴롬, 아모레퍼시픽 등) 국내 굴지의 기업들뿐 아니라, Blackmores(호주), GNC(미국) 등 전 세계적으로 건강기능식품을 판매하는 외국계 업체들과의 사업 파트너십을 형성하고 있고, 실제로도 많은 제품들이 공동연구 및 개발되어 출시되어 판매되고 있음. 아울러 국내 뿐 아니라 미국, 태국, 베트남, 일본 등으로도 원료 또는 제품들이 수출되고 있음.



(2) (주)노바렉스는 이미 미역등복합추출물(잔티젠)을 이용하여 체지방감소에 효능을 보이는 원료를 연구&개발하여 개별인정형 원료로 인정을 받았으며, 이를 바탕으로 발효병양 추출물을 이용한 항비만 효능을 갖는 건강기능식품 소재 개발 및 제품화하여 지역 내 고용증진, 국내 산 원료를 이용한 체지방감소 시장으로의 진입 및 선점 효과를 가져와 회사 내 매출 증대뿐만 아니라 제조·판매 브랜드 이미지를 높여 갈 것으로 확신함.

(3) 고부가가치식품기술개발사업을 통하여 발효병양추출물은 단순히 개발에만 그치는 것이 아니라 실제 사업화를 통하여 비만 등 대사성 증후군의 고통에서 국민들의 건강을 지켜주는 건강한 제품으로 개발하여 국내 굴지의 대기업들 뿐 아니라, 해외 여러 업체들에 다시 수출시켜 국가 경쟁력을 키우는데 큰 공헌을 할 수 있도록 노력할 것임. 그러기 위해서는 다수의 연구 인력을 보유하고 제품 개발 추진력, 사업을 성공시킬 수 있는 know-how 등을 고려하여 (주)노바렉스가 연구개발 결과를 이용하여 지속적으로 사업을 추진하려고 함.



< (주)노바렉스 해외 네트워크 >

## 나. 사업의 파급 효과

### (1) 기술적 측면

(가) 빵잎을 이용한 단순 추출 보다 동충하초 균주를 이용하여 발효 후 추출한 발효빵잎추출물에 더 많은 유효성분들과 항비만 효과가 뛰어난 것을 본 연구를 통해 확인하였음. 따라서 기존의 원재료를 이용하여 단순 추출이 아닌 발효를 진행하여 빵잎이 본래 가지고 있는 유효성분 뿐 아니라 발효를 통해 균주가 가지고 있는 유효성분들의 함량 극대화 및 기존의 단순 제품군들과 차별화를 가질 수 있어 발효 기술의 최고 보유국과 동등 또는 그 이상 수준의 기술력에 도달하였음.

(나) 항비만 효능 생리활성 검증을 위하여 동물시험을 진행하였으며, 발효빵잎추출물 뿐 아니라 다른 원료들과의 복합으로 사용하여 시너지 효과를 입증하여 단독 사용 시 보다 더 우수한 체지방 감소 기능성 효능을 입증하면 우수한 기능성을 가지는 새로운 체지방 감소 기능성 원료를 찾는 다이어트 제품을 구매하고자 하는 소비자들의 니즈를 충족시킬 수 있고, 제품화 기술을 국제화 시킬 것으로 기대됨.

(다) 발효빵잎추출물의 체지방 감소 기능성 획득을 위하여 인체적용시험 등을 지속적으로 개발할 계획이며 당사만의 개별인정 획득 프로세스를 통하여 이미 국내에서 가장 많은 개별인정 누적 건수를 보유한 노하우를 바탕으로 발효빵잎추출물의 체지방 감소 기능성을 획득 할 수 있음.

(라) 발효빵잎추출물의 항비만 효능을 입증하여 (주)노바렉스의 우수한 기술력을 바탕으로

다양한 제품군(경질캡슐, 연질캡슐, 스틱, 구미젤리, 스틱 젤리 등)으로 개발을 추진하여 당사의 여러 협력사들과의 공동 개발을 추진하여 경쟁력 있는 제품을 개발하여 국내 뿐 아니라 국제적인 일류 제품을 생산 및 판매 할 수 있을 것으로 기대됨.

(마) 이미 다수의 체지방 감소 기능성 원료를 개발하여 식약처로부터 개별인정을 받은 경험과 노하우를 바탕으로 발효빵잎추출물을 이용하여 국내 건강기능식품의 체지방 감소 기능성을 획득하여 새로운 체지방 감소 기능성 소재를 확보할 수 있을 것으로 기대되며, 국내 다이어트 시장 성장 도모 및 확대할 수 있을 것으로 기대되고, 대사증후군 시장을 끌 수 있는 선두주자로 발돋움 할 수 있을 것으로 판단됨.

## (2) 경제적 · 산업적 측면

### (가) 매출 효과

- ① 비만은 비만으로 그치는 것이 아니라 각종 질병의 원인이 될 수 있으며, 정신적인 질병까지 유발할 수 있음. 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 고혈압, 지방간, 담낭질환 등이 대표적인 비만과 관련된 질병임.
- ② 다이어트 시장은 매년 새로운 기능성 원료에 대한 니즈가 있으며, 체지방감소 원료들의 매출은 꾸준히 증가하고 있음. 발효빵잎추출물의 체지방 감소 기능성 원료로 개발이 완료된다면, 새로운 다이어트 원료에 대한 관심도와 함께 매출 상승효과를 보일 수 있을 것으로 기대됨. 발효빵잎추출물의 체지방 감소 기능성을 갖는 기능성 원료와 건강기능식품으로의 제품 개발은 당사의 매출 증대 뿐 아니라 다이어트 시장의 활성을 불러일으켜, 시장 확대가 기대됨.

### (나) 수출 효과

- ① 발효빵잎추출물의 과학적인 연구 내용을 바탕으로 국내 뿐 아니라 당사의 해외 파트너들과의 협업을 통해 시장의 확보가 용이할 것으로 보이며, 당사의 우수한 품질의 제품을 해외로 수출하여 국가 경쟁력을 확보하고 수출 증대로 이어져 당사의 기업 가치를 상승시킬 수 있음.

### (다) 고용 효과

- ① 당사는 지역 내 우수한 연구 인력과 생산 인력을 확보하기 위하여 끊임없이 노력하고 있음. 발효빵잎추출물의 체지방 감소 기능성 소재 및 제품 개발이 이루어지면 관련 분야의 우수 인력의 확보가 필요해 고용 창출 효과를 보일 것이며, 나아가 지역경제 활성화를 도모함.

## 붙임. 참고문헌

1. 등록특허 10-1067979, 대한민국 특허청
2. 정중훈, 전북대 박사학위논문, 유산균 이용 빵잎 발표물의 항비만 효과 및 천연물 소재의 항비만 평가를 위한 *Rhodospiridium toruloides* 모델 시스템 개발
3. 이상일 외 5명, 한국산학기술학회지, 정상식이 마우스의 체중과 간 조직 항산화계 효소 활성화에 미치는 *Monascus pilosus* 발효 빵 잎차 열수추출물의 효과
4. 농촌진흥청 보도자료, 영양만점, 생활습관병 해결사 '새싹보리'
5. 강병만 외 5명, 韓藥作誌(*Korean J. Medicinal Crop Sci.*), 2017, 25(6), 367-374
6. A. Perva-Uzunalic *et al. Food Chemistry*, 2006, 96, 597-605
7. Lin, Della-Fera, and Baile, EGCG Induces Apoptosis of Adipocytes. *OBESITY RESEARCH*, 2005, 13(6)
8. S Klaus *et al., International Journal of Obesity*, 2005, 29, 615-623
9. 공개특허 10-2014-0002923, 순천대학교 산학협력단
10. 김혜진·강창한·김성구, *Journal of Life Science*, 2012, 22(8), 1052-1056
11. Park *et al., Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49, 727-733
12. 농촌진흥청 보도자료, 국내산 '콩 발아배아'로 건강하게 비만 탈출
13. 연차보고서, 백편두 추출물을 활용한 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품 개발, 연구개발 특구진흥재단
14. Jun Yin *et al., Nutrients*, 2018, 10, 1221
15. D. H. Suh *et al. Mol. Nutr. Food Res.* 2017, 61(8), 1600895
16. Kim MK *et al., Endoplasmic Reticulum stress and Diabets*, 2008
17. Shin KH *et al., The role of autophagy in the pathogenesis of atherosclerosis*, 2016

## <뒷면지>

### 주 의

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