

317039
-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
고부가가치식품기술사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003648-01

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화

2021년 8월 23일

2021

주관연구기관 / (주)자연과 효소
협동연구기관 / (재)전주농생명소재연구원
협동연구기관 / 동아대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

식·약용곤충/발효 미생물 복합소재를
활용한 고부가가치의 간기능 개선
물질의 발굴 및 식품 산업화

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화”(개발기간 : 2017.06.15~ 2021.06.30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021.08.23

주관연구기관명 : (주)자연과 효소 (대표자) 김정옥

협동연구기관명 : (재)전주농생명소재연구원 (대표자) 오병준

협동연구기관명 : 동아대학교 산학협력단 (대표자) 김성제



주관연구책임자 : 김정옥

협동연구책임자 : 정찬현

협동연구책임자 : 안희영

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

최종보고서										보안등급				
중앙행정기관명										일반[<input checked="" type="checkbox"/> , 보안[]				
전문기관명										고부가가치식품기술사업				
공고번호										317039-4				
농림축산식품부										사업명				
농림식품기술기획평가원										내역사업명				
317039-04-1-CG000										총괄연구개발 식별번호				
										연구개발과제번호				
										317039-4				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0306. 곤충 자원/병리	50%	LB1703. 식품발효학	50%									
	농림식품과학기술분류	C503001 식약용곤충	30%	PA0102식품미 생물.발효	30%	PA201 기능성 식품 및 소재	20%	CA0199 기타농생명신소재.시스템	20%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문												
		영문												
연구개발과제명		국문		식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화										
		영문		Development and industrialization of high-value-added liver function improving substances using composite materials derived from food&medicinal insect/fermenting microorganisms										
주관연구개발기관		기관명		(주)자연과 효소		사업자등록번호		592-86-00522						
		주소		(우) 46048		법인등록번호		180111-1064433						
연구책임자		성명		김정욱		직위		대표						
		연락처		직장전화		051-723-9446		휴대전화						
				전자우편				국가연구자번호						
연구개발기간		전체		2017. 06. 15 - 2021. 06. 30 (4년 개월)										
		단계 (해당 시 작성)		1년차		2017. 06. 15 - 2017. 12. 31 (6개월)								
				2년차		2018. 01. 01 - 2018. 12. 31 (1년 개월)								
				3년차		2019. 01. 01 - 2019. 12. 31 (1년 개월)								
				4년차		2020. 01. 01 - 2021. 06. 30 (1년 6개월)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발비 외 지원금			
		현금		현금		현금		현금		현금		현금	합계	
총계		1,268,000		43,800		394,200				1,311,800	394,200	1,706,000		
1단계		1년차		210,000		7,000		63,000				217,000	63,000	280,000
		2년차		480,000		16,100		144,900				496,100	144,900	641,000
		3년차		345,000		11,500		103,500				356,500	103,500	460,000
		4년차		233,000		9,200		82,800				242,200	82,800	325,000
공동연구개발기관 등		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고		
		공동연구개발기관		동아대학교		안희영		교수				역할 기관유형		
				(재)전주농생명소재연구원		정찬현		선임연구원				공동 정부출연		
		위탁연구개발기관		(주)랩투메디씨알오		주보선		대표				위탁 중소기업		
		연구개발기관 외 기관		엠에스글로벌바이오(주)		김인덕		과장				참여기업 중소기업		
연구개발담당자 실무담당자		성명		김정욱		직위				대표				
		연락처		직장전화		051-723-9446		휴대전화						
				전자우편				국가연구자번호						

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021년 08월 23일

연구책임자: 김정욱

주관연구기관의 장: (주)자연과효소 대표 김정욱

협동연구기관의 장: (재)전주농생명소재연구원장 오병준

협동연구기관의 장: 동아대학교 산학협력단장 김성재

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



〈 보고서 요약서 〉

과제명 (연구기관, 책임자)	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화					
	주관기관	공동연구개발 기관 (1협동)	공동연구개발 기관 (2협동)	위탁연구개발 기관	참여기업	
	(주)자연과효소 김정욱	(재)전주농생명 소재연구원	동아대학교 산학협력단	(주)랩투메디 씨알오	엠에스글로벌 바이오(주)	
연구기간	2017.06.15.~ 2021.06.30.(4년)	'17년	'18년	'19년	'20년	총 예산 (정부출연금, 억)
		2.10	4.80	3.45	2.33	12.68
연구목적	<p>○ (배경) 미래 식량자원 및 약용자원으로 주목받는 곤충자원과 한국의 전통 발효식품의 미생물을 접목한 복합소재를 활용하여 고부가가치 간기능 개선물질을 소재화하고 이를 이용한 식품 개발을 통해 “곤충산업”과 “식품산업”의 동반성장에 기여하고 함.</p> <p>○ (목적) ■ 유용 발효미생물/식약용 곤충 등의 복합소재를 활용한 고부가가치 간기능 개선 물질의 산업화를 통해 국가 전략 산업인 곤충산업과 식품산업의 동반성장 견인 ; 곤충 소재의 미래농업 자원화 등 가치부각과, 우수성 홍보를 위한 과학적 입증자료 구축 및 산업화 ■ 유용 발효미생물/식·약용곤충 복합소재를 이용한 고부가가치 기능성 소재개발 및 상품화 ; 유용 발효미생물/식약용 곤충 복합소재 개발 및 기능성 식품 소재화 ; 유용 발효미생물/식약용 곤충 복합소재를 활용한 간기능 개선 음료 및 타정형 제품 개발 및 상품화.</p>					
핵심연구 내용 및 성과	핵심연구내용	성과				
	분말 제조조건 확립 및 표준화	<p>-지표물질 후보1 : 글루타치온 함량 분석 결과 발효후, 증가한 것을 확인</p> <p>-지표물질 후보2 : 유리아미노산 측정 결과 발효 후 생성되는 아미노산 확인(GABA)</p> <p>-지표물질 후보3 : 폴리감마글루탐산 함량 분석</p> <p>[고찰] 지표 후보 물질의 발효전후 함량 비교를 통해 물질 선별 후 식약처 문의 결과 지표물질은 '특이성, 대표성, 안정성, 용이성' 특성을 가져야 하므로 이에 부합되는 지표물질 확인 : 최종적으로 '폴리감마글루탐산'을 지표 성분으로 설정</p> <p>[제조공정 확립] 표준생산공정도, 식품 품목제조보고서</p>				
						

안전성 평가
(음료 및 타정형 제품)

1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 독성시험 결과(공인기관:바이오톡스텍)
 • 경구투여 독성시험(단회, 2주, 13주) 5,000mg/kg/day로 설정
 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단
 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상유발성은 음성으로 판단
 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성은 음성으로 판단
 2. 흰점박이꽃무지유충발효분의 잔류농약 검사결과 (공인기관:한국분석기술연구원)
 • 3Lot : 잔류농약(Aldrin, BHC, DDT, Dieldrin, Endrin) 불검출
 3. 대장균.군, 중금속 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원)
 • 대장균.군 : 음성
 • 중금속 : 식품공전 기준치 이하

개발제품의 간 기능개선효능 검증
(혈액 및 간지질 함량측정)

문 명

유용 미생물을 이용한 발효곰팡이가 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과

Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향

Metabolomics analysis of medicinal insect *Protaetia brevitarsis* after *Bacillus subtilis* fermentation

1.알코올성 간손상 동물 모델에서 약용곤충 발효복합 소재들의 간기능 개선 효능 검증
 2.동물모델 조직에서 간 기능 개선 효능 분석 (*in vivo*)
 3.대사물질 성분들의 간기능 개선 및 효능 분석 (세포)
 ※임상시험결과 일부그룹에서 간기능개선 경향은 나타나지만 유의성은 높지 않음

개발건수	개발제품	유형
[제품1] 음료		<출시> - 숙취해소 식품-혼합음료
[제품2] 환	곰팡이환	<시제품> - 간기능개선 식품-기타가공품-환제품
[제품3] 타정	더이앤멀티비타민미네랄	<출시> - 복합소재 함유 건강기능식품-비타민(타정)
[제품4] 타정	케이벵이	<시제품> - 복합소재 함유 식품-기타가공품(타정)

개발제품 관련 매출 발생 (50,000천원 이상)

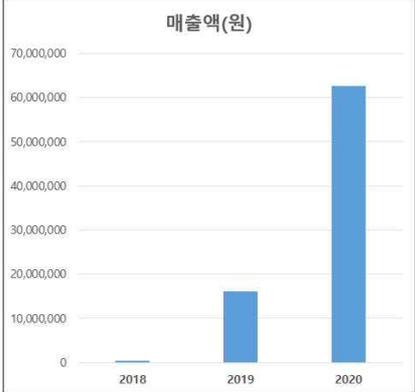
연도	개발제품	유형	매출액(원)
2018	곰메이트	식품-혼합음료	337,844
2019	곰메이트	식품-혼합음료	16,107,658
2020	곰메이트	식품-혼합음료	47,109,522
2020	더이앤멀티비타민미네랄	건강기능식품-비타민(타정)	15,400,000
합 계 (세금계산서 기준)			78,955,024

특허 출원 : 6건, 특허 등록 : 4건

허

NO	특허명	출원인	출원일	출원번호	등록 NO	등록인	등록일	등록번호
1	발효곰팡이 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	동아대학교 산학협력단	18.04.20	10-2018-0045905	1	동아대학교 산학협력단 (주)자연과 효소	20.02.25	10-2083275
2	발효갈색거저리 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	동아대학교 산학협력단	18.05.31	10-2018-0062887	2	동아대학교 산학협력단 (주)자연과 효소	19.11.19	10-2048309
3	발효 흰점박이꽃무지 유충 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물	(재)전주농생명소재연구원	18.08.24	10-2018-0098974	3	(주)자연과 효소	20.04.01	10-2098079
4	폴리감마글루탐산 함량이 증진된 흰점박이꽃무지 유충 발효물의 분말의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 폴리감마글루탐산 함량이 증진된 흰점박이꽃무지 유충 발효물의 분말	(주)자연과 효소	18.12.28	10-2018-0171975	4	(주)자연과 효소	21.05.12	10-2253265
5	발효갈색거저리추출물을유효성분으로함유하는간기능개선용조성물	(재)전주농생명소재연구원	20.12.02	10-2020-0166789				
6	쌍별귀뚜라미추출물의발효물을유효성분으로함유하는항염증및주름개선용조성물	(재)전주농생명소재연구원	20.12.02	10-2020-0166781				

		SCI : 5건, 비SCI :5건					
NO		저자	국내외 구분	학술지명	학술지 볼륨번호	출판 일자	SCI 구분
1	유용 미생물을 이용한 발효 곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	심소연 외 3명	국내	생명과학회지	28(7)	18.07.30	비SCI (KCI)
2	The Extract of Edible Alga <i>Petalonia binghamiae</i> Suppresses TGF-β1-or H2O2-Induced Liver Fibrogenesis in LX-2 and HepG2 Cells	Young- Ji Choi, 외 8명	국외	Natural product communicatio ns	13(6)	18.07.31	SCI
3	유용 미생물을 이용한 발효 갈색거저리 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과	장성호 외 4명	국내	생명과학회지	28(8)	18.08.01	비SCI (KCI)
4	The <i>Chaenomeles sinensis</i> Extract has the Potential to Exhibit Antioxidant Activity or Attenuate Liver Damage	Young- Ji Choi, 외 4명	국외	Natural product communicatio ns	13	18.08.01	SCI
5	<i>Bacillus subtilis</i> 를 이용한 발효곰팡이 분말 추출물의 최적배양조건에 따른 경시적 변화	장 성 호 외 4명	국내	한국식품저장유통학회	26(1)	19.02.01	비SCI (KCI)
6	FERMENTED ORIENTAL MEDICINAL INSECT EXTRACT HAS A SYNERGISTIC EFFECT ON INHIBITING TGF-β1-OR H2O2-INDUCED HEPATIC FIBROGENESIS IN LX-2 AND HEPG2 CELLS	YOUNG- J I CHOI 외 5명	국외	Acta Poloniae pharmaceutic a	76(3)	19.06.01	SCI
7	Solid state fermentation process with <i>Aspergillus kawachii</i> enhances the cancer-suppressive potential of silkworm larva in hepatocellular carcinoma cells	Hyun- D ong Cho 외 5명	국외	BMC complementa ry and alternative medicine	19	19.07.01	SCI
8	<i>Bacillus subtilis</i> 를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향	심소연 외 3명	국내	The Korean Society of Food Preservation	26(7)	19.12.30	비SCI (KCI)
9	Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation	In-Sun Park 외 3명	국외	Türk biyokimya dergisi = Turkish journal of biochemistry	45(2)	20.04.24	SCI
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M1 (KACC 93023)으로 발효한 갈색 거저리 유충이 비알코올성 지방간 유발 흰 쥐에 미치는 영향	심소연 외 3명	국내	생명과학회지	30(5)	20.03.06	비SCI (KCI)
학술발표	13편						
고용창출	4명						

<p>대표성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충 자원과 미생물 자원을 활용하여 간기능 개선에 도움을 줄 수 있는 식품 소재를 in-vitro, in-vivo, 세포실험, 독성실험을 통해 개발하여 관련된 10편의 논문과 핵심 특허 4편을 출원 및 등록 완료 ○ 위 연구 결과를 활용한 소재를 함유한 숙취해소용 음료 “굼메이트”, 간기능개선 환제품 “굼벥이환”, 굼벥이발효분말 함유 “더이엔멀티비타민미네랄”(건강기능식품), 케이벥이(과채가공품) 4종을 출시 ○ 2018년말 출시한 굼메이트는 2020년 말까지 63,555,024원 매출 달성, 2020년 출시한 더이엔멀티비타민미네랄은 15,400,000원(세금계산서 기준) 매출 달성 ○ 2021년 출시된 케이벥이(K-벥이, 과채가공품)는 마카추출물과 굼벥이발효분말을 함유하여 활력 증진 식품으로 소비자 반응 우수 ○ 향후 다양한 제품군에 투입하여 굼벥이를 포함한 곤충자원의 식품 원료 활용도를 지속적으로 증진시킬 수 있는 계기 마련 및 영업력 확충 (곤충자원 식품 소재 영업 활성화) 	 <p>[대표성과1] 숙취해소음료 “굼메이트”</p>  <p>[대표성과2] 멀티비타민 “더이엔멀티비타민미네랄”</p>
<p>연구의 의의 및 파급효과</p>	 <p>[파급효과1] 연도별 매출 기여도</p>	 <p>[파급효과2] 가공식품의 곤충자원 활용도</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전 세계적으로 곤충자원의 식량 자원화가 진행되는 시대적 상황에서 국내에서도 본 과제를 통해 곤충자원을 전통 발효 미생물과 결합한 복합소재로 식량자원 및 식품소재로 활용 방안과 활용 모델을 제시. ○ 향후 다양한 제품군에 투입하여 굼벥이를 포함한 곤충자원의 식품 원료 활용도를 지속적으로 확장시킬 수 있는 계기 마련하여 국내 식품 시장에 곤충자원의 활용을 증대시킴으로써 곤충산업 발전에 이바지. ○ 곤충자원을 단일 식품소재가 아닌 미생물과 발효하여 기능성이 함유된 응용된 식품소재 개발의 가능성을 제시함으로써 곤충자원의 식량 자원화에 보다 폭넓은 접근법과 소비자 만족도를 이끌어 낼 수 있는 계기를 마련. ○ 주관기업 (주)자연과효소에 1명, 참여기업 엠에스글로벌바이오(주) 3명 신규인력 채용으로 고용 확대. ○ 본 연구 기간동안 공동연구기관 동아대학교에서는 학사, 석사, 박사 8명의 해당 분야의 인력양성 및 학술발표 13편으로 연구 역량 강화. 	

<p>특이사항 (연구수행 중 에피소드, 연구수행 계기 등)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식약용 곤충 중 누에와 이를 활용한 선행연구 성과가 우수한 동아대 연구진과 본 과제에 대한 적극적인 추진 노력을 해주신 (재)전주농생명소재연구원 연구진과 식품소재 연구에 관심이 높은 본사 (주)자연과효소가 함께 열정적으로 추진한 결과물. ○ 간기능 개선 임상 타겟이 초기 in-vitro, in-vivo 실험 결과 비알콜성 간손상 모델로 설정하여 설계중 알콜성 간손상 모델에 대한 개선 기능이 좀 더 우수하여 변경 ○ 굽벙이(흰꽃무지유충)과 미생물 발효를 통한 시제품 브랜드를 “K(케이)-벙이”로 결정하여 상표출원을 진행한 상태이며 곤충자원을 활용한 식품 브랜드화 <div data-bbox="1150 495 1407 692" style="text-align: right;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기초적인 선행연구(in-vitro, in-vivo) 기간에 비해 임상시험이 시작함과 동시에 코로나 19라는 재난적 상황이 닥쳐서 대학병원에서는 여러 차례 임상 대상자 모집이 중단되어 연기를 거듭하며 나온 임상 결과가 기대에 못미치는 아쉬운 상황이지만 선행연구 결과(논문, 특허)를 활용한 다양한 식품 시제품 출시를 통한 곤충자원의 식품 활용도를 극대화 할 수 있도록 지속적인 노력중.
<p>용어해설</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 흰꽃무지유충 : 학명으로 일반적으로 굽벙이로 통용되는 식약용 곤충 ○ 거저리 : 시중에 밀웜으로 많이 알려진 식약용 곤충

< 요약 문 >

사업명		고부가가치식품기술사업				총괄연구개발 식별번호			
내역사업명						연구개발과제번호		317039-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0306. 곤충 자원/병리	50%	LB1703. 식품발효학	50%				
	농림식품 과학기술분류	C503001 식약용곤충	30%	PA0102식품 미생물.발효	30%	PA201 기능성식 품 및 소재	20%	CA0199 기타농생명신소재. 시스템	20%
총괄연구개발명									
연구개발과제명		식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화							
전체 연구개발기간		2017. 06. 15 - 2021. 06. 30 (4년)							
총 연구개발비		총 1,706,000천원 (정부지원연구개발비: 1,268,000천원, 기관부담연구개발비 : 438,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)							
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(2단계) 종료시점 목표(7단계)		
연구개발과제 유형									
연구개발과제 특성									
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ■ 유용 발효미생물/식약용 곤충 등의 복합소재를 활용한 고부가가치 간기능 개선 물질의 산업화를 통해 국가 전략 산업인 곤충산업과 식품산업의 동반성장 견인 ; 곤충 소재의 미래농업 자원화 등 가치부각과, 우수성 홍보를 위한 과학적 입증자료 구축 및 산업화 ■ 유용 발효미생물/식·약용곤충 복합소재를 이용한 고부가가치 기능성 소재개발 및 상품화 ; 유용 발효미생물/식약용 곤충 복합소재 개발 및 기능성 식품 소재화 ; 유용 발효미생물/식약용 곤충 복합소재를 활용한 간기능 개선 음료 및 타정형 제품 개발 및 상품화. 							
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식약용곤충을 포함하는 소재의 간기능 개선 기능성 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 약용곤충의 고분자물질을 발효(분해)하여 생성된 기능성 펩타이드 및 대사물질의 간기능 효능 분석 - 세포독성평가 및 발효산물의 함량/성분 분석을 통한 약리효과의 타당성 검증 - 간기능 개선 기능성 평가(in vitro, in vivo) - 간기능 개선 소재 지표성분 설정 - 간기능 개선 기능성 작용기전 규명 ○ 식약용곤충발효분말의 유용성분 발효조건 확립 및 분말 소재화 <ul style="list-style-type: none"> - 발효 균주에 따른 최적 고품 발효조건 확립 및 표준화 - 고품 발효조건 확립 후 지표물질 분석 및 비교 - 최적 발효조건을 scale-up 및 대량생산 공정 확립 ○ 식약용곤충발효분말의 기능성 소재를 이용한 기능성 음료 개발 <ul style="list-style-type: none"> - In vitro에서 발효분말과 소재들의 기능성 스크리닝을 통한 제품의 최적화 - 동물모델을 이용하여 기능성 음료의 간기능 개선 효능 검증 ○ 식약용곤충발효분말의 기능성 소재를 혼합하여 타정형 기능성식품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - In vivo에서 기능성 소재의 간기능 개선을 지니는 제품의 최적화 - 동물모델을 이용하여 기능성 정제식품 기능성 평가 ○ 식약용곤충을 함유하는 기능성 식품 원료 개별 인증 획득 <ul style="list-style-type: none"> - 소재 생산의 공정 표준화 및 대량생산 공정 확립 - 소재에 대한 안전성 확립(독성평가 등, GLP기관 위탁) - 인체적용시험에 의한 소재의 유효성 입증 - 건강기능식품으로 개별인정 신청 및 획득 ○ 개별인정형 기능성 제품개발 및 산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 원료 대량 생산 공정 확립 및 설비 구축 - 건강기능식품 등록을 위한 규격화, 표준화 추진 - 기능성 제품 개발, 판매전략 및 매출 창출 							

연구개발성과

< 핵심성과 >

항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
1	제조조건 확립 및 표준화 (총 아미노산 및 펩타이드복합물 함량 측정)	10	대조군과 비교하여 유효 함량 수치 확인	시료 수 3개 이상	식품공전 참조	한국식품연구원 또는 동급기관을 통하여 공인시험성적서 획득
2	시제품의 안전성 평가 (음료 및 타정형 제품)	10	-	2건	식품공전 참조	한국식품연구원 또는 동급기관을 통하여 영양성분 및 독성시험에 대한 공인시험성적서 획득
3	개발제품의 간 기능개선효능 검증 (혈액 및 간지질 함량측정)	20	대조군과 비교하여 유의적인 수치감소 확인	시험당 시료 수 3개 이상	논문 참조	대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 이상 통계적 유의성이 검증된 감소치
4	개발제품 출시 (음료 및 타정형 제품)	20	3건	3건	제품출시	제품출시
5	개발제품 관련 매출 발생	10	50백만원 이상	50백만원 이상	-	관련 계산서
6	특 허	10	-	3 이상	-	특허 출원/등록
7	논 문	20	-	10 이상	-	KCI 5편/SCI 5편
합계		100				

< 전략성과 >

- 기능성 소재에 대한 지표성분 3건 이상
- 고용창출, 매출발생 등 상용화 목표성과 제시 (시장 창출 혹은 시장 점유율)
- 건강기능식품소재 개발 전임상 효능평가 3건 이상
- 개발제품 관련 매출 발생 50백만원 이상
- 유효성분의 건강기능식품 원료 개별 인정형 획득 1건

■ 개발 대상 기술·제품의 중요성 및 파급효과

(1) 기술적 측면

- (가) 식약용곤충발효분말을 이용한 고품발효 기술에 대한 노하우 축적됨.
- (나) 식약용곤충발효분말을 이용하여 다양한 가공식품 개발 기술 습득이 가능함.
- (다) 식약용곤충발효분말의 기능성 제품의 개발에 따른 곤충산업에서 버려지는 부산물들을 대량적으로 활용할 뿐만 아니라, 가공처리를 통한 저장성 문제 해결이 가능할 수 있음.
- (라) 간 기능 개선 효능을 가지는 개발 제품 제조에 대한 기술적 노하우 습득됨.
- (마) 간 기능 개선 평가 체계의 구축으로 연구 인프라 및 우수 고급연구인력 양성할 수 있음.
- (바) 질병 제어 기반연구의 기초자료 제공으로 인접학문분야에 응용 및 발전에 기여될 것이라 판단됨.

(2) 경제·산업적 측면

- (가) 곤충을 이용한 가공식품 제조에 따라 한국 미래의 선도 곤충산업으로 육성 가능함.
- (나) 식약용곤충발효분말을 이용한 간 기능 개선 효능을 지닌 기능성 제품개발에 따른 고부가가치 창출 기대됨.
- (다) 정체된 곤충 소비 시장에서 신규제품 개발을 통해 매출 및 수출 증대될 것으로 예상함.
- (라) 자체브랜드 상품화 및 수출상품화로 인해 외화 획득에 기여될 것으로 기대됨.
- (마) 생물자원을 이용한 가공식품개발로 인해 바이오산업의 활성화 촉진 및 고용 창출확대가 될 것으로 판단됨.
- (바) 연구 참여 대학원생의 창업 및 관련기업에의 취업 촉진이 가능할 것임.

■ 상용화 기술 개발 목표

- (1) 발효된 누에를 주원료로 한 분말 개발 및 기능성 식품 소재화
- (2) 식약용곤충발효분말을 이용한 고지혈증 및 지방간 억제 효능 음료와 타정형 제품 개발 및 상품화
 - (가) 발효 곰벵이 소재 활용
 - (나) 발효 거저리 소재 활용

연구개발성과
활용계획 및
기대 효과

■ 사업화 계획

○ 사업화 전략

(1) 대학교 등 외부 네트워크 활용 방안

- 식약용곤충발효분말의 생리활성 연구 및 노하우를 보유한 참여기관(동아대학교)을 통하여 기능성 검증 후, 기능성 제품 개발 및 상품화할 것임

(2) 시장진입을 위한 단계적 전략



(3) 홍보, 마케팅 및 판로개척

(가) 국내: 주관기업 쇼핑몰 판매, 대형 포털 오픈 마켓 및 한국식 드럭스토어 입점.

(나) 국외: 참여기관인 한국한세무역회사 활용하여 현재 수출 진행 중인 업체에 수출 예정임.

■ 정부지원 필요성

본 과제에서는 식약용곤충분말에 발효기법을 접목하여 두 가지 형태의 기능성 제품을 개발할 예정임. 본 연구진들은 기능성 제품 연구 및 개발에 대한 다양한 노하우를 지니고 있기에 단 기간에 두 가지의 제품을 상품화 및 상품화를 이룩하기 위한 산업화 비용 및 투자비용이 많이 들기에 정부의 지원이 필요함. 또한 침체되어 있는 곤충산업시장에 활성화를 불러 일으킬것으로 사료됨.

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	공개											
	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화학물	신품종	
연구개발성과의 등록·기탁 건수	10	4	1		1			생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명		규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)		비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호	
국문핵심어 (5개 이내)	약용 곤충			간기능		제품화		발효		생물전환		
영문핵심어 (5개 이내)	Medicinal insect			Liver function		Productization		Fermentation		bioconversion		

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료

- 1) 독성시험결과 최종보고서
- 2) 인체적용시험 결과보고서
- 3) 초록
- 4) 자체평가 의견서
- 5) 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

[연구개발 목표]

- **유용 발효미생물/식·약용곤충 등의 복합소재를 활용한 고부가가치 간기능 개선 물질의 산업화를 통해 국가 전략 산업인 곤충산업과 식품산업의 동반성장 견인**
 - ; 곤충 소재의 미래농업 자원화 등 가치부각과 우수성 홍보를 위한 과학적 입증자료 구축 및 산업화

- **유용 발효미생물/식·약용곤충 복합소재를 이용한 고부가가치 기능성 소재개발 및 상품화**
 - ; 유용 발효미생물/식·약용곤충 복합소재 개발 및 기능성 식품 소재화
 - ; 유용 발효미생물/식·약용곤충 복합소재를 활용한 간 기능 개선 음료 및 타정형 제품 개발 및 상품화

[연구개발 내용]

○ 식약용곤충을 포함하는 소재의 간 기능 개선 기능성 규명

- 약용곤충의 고분자물질을 발효(분해)하여 생성된 기능성 펩타이드 및 대사물질의 간 기능 효능 분석
- 세포독성평가 및 발효산물의 함량/성분 분석을 통한 약리효과의 타당성 검증
- 간 기능 개선 기능성 평가(in vitro, in vivo)
- 간 기능 개선 소재 지표성분 설정
- 간 기능 개선 기능성 작용기전 규명

○ 식약용곤충발효분말의 유용성분 발효조건 확립 및 분말 소재화

- 발효 균주에 따른 최적 고품 발효조건 확립 및 표준화
- 고품 발효조건 확립 후 지표물질 분석 및 비교
- 최적 발효조건을 scale-up 및 대량생산 공정 확립

○ 식약용곤충발효분말의 기능성 소재를 이용한 기능성 음료 개발

- *In vitro*에서 발효분말과 소재들의 기능성 스크리닝을 통한 제품의 최적화
- 동물모델을 이용하여 기능성 음료의 간 기능 개선 효능 검증

○ 식약용곤충발효분말의 기능성 소재를 혼합하여 타정형 기능성식품 개발

- *In vivo*에서 기능성 소재의 간 기능 개선을 지니는 제품의 최적화
- 동물모델을 이용하여 기능성 정제식품 기능성 평가

○ 식약용곤충을 함유하는 기능성 식품 원료 개별 인증 획득

- 소재 생산의 공정 표준화 및 대량생산 공정 확립
- 소재에 대한 안전성 확립(독성평가 등, GLP기관 위탁)
- 인체적용시험에 의한 소재의 유효성 입증
- 건강기능식품으로 개별인정 신청 및 획득

○ 개별인정형 기능성 제품개발 및 산업화

- 원료 대량 생산 공정 확립 및 설비 구축
- 건강기능식품 등록을 위한 규격화, 표준화 추진
- 기능성 제품 개발, 판매전략 및 매출 창출

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2017)	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화	약용곤충 발효복합 소재의 최적 추출조건 확립	추출용매, 온도 및 시간을 고려한 최적 추출조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 식용 가능한 유산균 3종, 고초균 1종, 효모 1종, 곰팡이 1종의 총 6종의 미생물을 이용한 약용곤충 3종 각각 발효 진행 - 각각의 발효소재들의 기능적 특성을 비교하여 발효 소재 선별 - 선별된 발효소재의 최적 발효조건 탐색(온도별, 시간별, 균주점종량을 달리하여 각각 발효 진행하여 기능성 비교) - 최종적으로 흰점박이꽃무지유충과 고초균이 혼합된 발효복합소재를 본 연구의 핵심소재로 사용하고자 함
		약용곤충 발효복합 소재의 영양성분 및 지표성분 분석 및 분석법 벨리데이션	HPLC 분석법을 이용한 약용곤충 발효복합 소재의 영양성분 및 지표성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 기존의 흰점박이꽃무지유충분말은 다른 약용곤충인 거저리, 번데기에 비해 폴리감마글루탐산 함량이 높음 - 고초균을 이용한 흰점박이꽃무지유충분말의 발효과정을 통해 폴리감마글루탐산이 기존대비 상승되는 것을 확인 - 흰점박이꽃무지유충은 단백질이 약 50% 이상이며 아미노산 중 프롤린, 글루탐산이 고함량되어 있음 - 지표성분으로 폴리감마글루탐산, 글루탐산, 프롤린, GABA 등으로 후보군을 설정하였고, 안정적으로 지표물질로서 적합한 물질로 최종 선별 예정
2차 년도 (2018)	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(대량생산 및 제품 안정성평가) -(주)자연과효소	약용곤충 최적 발효 복합소재의 대량추출공정 확립	최적발효소재의 pilot plant 및 대량추출공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - Lab scale 상의 제조 공정을 pilot plant화 시켜 대량생산 시 발생할 수 있는 다양한 변수인자에 대한 연구 - 추출공정 적용 시 높은 생산단가 및 낮은 수율, 오염인자노출 등으로 추출 적용은 본 소재 생산에 매우 비효율적인 공정으로 확인 - 추출공정을 삭제하고, 발효물 자체(분말)로 공정설계 진행
			대량 생산된 최적 발효소재의 영양성분 및	<ul style="list-style-type: none"> - 각종 영양성분을 선별하여 공인기관 의뢰 분석 진행

		<p>지표성분 분석 및 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 약용곤충 모두 단백질 함량이 48~50% 이상을 보이고 다음으로 지방산의 함량이 높았음 - 약용곤충 중 흰점박이꽃무지 유충의 구성아미노산 분석 결과 proline과 glutamic acid 함량이 가장 높았으며, 이는 타 연구결과와 일치하는 경향을 나타냄 - 약용곤충 중 흰점박이꽃무지 유충의 지방산 분석 결과 palmitic acid 및 oleic acid 가장 높아 이 또한 타 연구의 결과와 일치하여 지표성분으로 진행가능 여부 분석 진행 <p>[발효곰팡이(고초균/흰점박이꽃무지 유충 발효)]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 글루타치온 함량 분석: 발효후 증가한 것을 확인: 지표물질 후보1 - 유리아미노산 측정 결과 발효 후 생성되는 아미노산 확인 (GABA, carnosine): 지표물질 후보2 - 폴리감마글루탐산 함량 분석: 지표물질 후보3 - 지표 후보 물질의 발효전후 함량 비교를 통해 물질 선별 후 식약처 문의 결과 지표물질은 '특이성, 대표성, 안정성, 용이성' 특성을 가져야 하므로 이에 부합되는 지표물질 확인 <p>: 최종적으로 '폴리감마글루탐산'을 지표성분으로 설정</p>	
	<p>약용곤충 최적 발효 복합소재의 대량발효조건 확립 및 소재화 공정 표준화</p>	<p>최적발효소재의 대량발효조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 동아대 연구팀에서 개발된 공정을 참고하여 pilot 테스트 진행 - 경제성 등 효율성을 고려한 대량 생산 스케일에 맞는 균주 최적 배양조건 및 발효조건 확인 <p>- 위의 발효조건을 토대로 재현성 테스트 진행: 재현성 기준은 외부 성상 및 지표 물질을 기준으로 확인</p>	
	<p>약용곤충 최적 발효 복합소재를 이용한 기능성 원료 시제품 개발</p>	<p>대량생산된 약용곤충 최적발효소재를 이용한 기능성 원료 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품을 제작을 위한 GMP 시설을 갖춘 기관 탐색중 - 시제품 중 하나인 타블렛 제조를 위한 타블렛 레시피 작성 	
	<p>약용곤충 발효 복합소재의 전임상 시험</p>	<p>GLP 전문기관을 통한 단회투여 독성시험, 90일</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GLP 독성시험기관과의 미팅을 통해 시험 전 필요자료 및 확보데 	

		수준에서의 안전성 검증(동물실험)	반복투여 독성시험 등 평가	이터 관한 토의 - 독성시험 진행방법 및 결과 도출 등에 관한 독성시험의 전체적인 브리핑 진행 - 지표물질 선정 후 지표물질 측정에 대한 method 설정 필요 - 11월중 계약 진행 예정
		임상수탁기관(위탁기관)과의 협업 업무 진행	IRB 승인을 위한 자료 및 데이터 확보	- 위탁기관과의 미팅 및 세미나 모임을 통해 협업 - 건기식 개별인정을 받기위한 식약처 제출 서류 목록 검토 - 임상시험전 IRB 승인을 받기 위한 자료작성 및 데이터 확보 : 소재의 유해물질 분석 진행
식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(간 기능 개선 효능 및 작용기전검증) - (재)전주농생명소재연구원	약용곤충 최적 발효복합소재의 <i>in vitro</i> 수준 간 기능 개선 메커니즘 분석	간 섬유화 관련 인자들의 발현 분석을 통한 간 기능 개선 비교 분석	1. 흰점박이꽃무지 유충/고초균 발효 복합소재 ① 간 정상세포(LX-2)에서의 간 섬유화생성인자인 TGF-β1 처리 후 간 손상의 주요 지표인 α-SMA (smooth muscle actin), COL1A1(collagen type 1α 1chain) 발현을 본 결과, 발효 후 복합소재가 발효 전 소재에 비해 농도 의존적으로 α-SMA, COL1A1의 발현율이 감소하는 것을 확인. ② TGF-β1에 의해 유도된 LX-2의 활성화(proliferation)억제 효과를 확인하기 발효 후 시료를 처리한 결과, 효과적으로 LX-2의 증식을 억제하는 결과를 확인. ③ LX-2 세포의 apoptosis 유도 활성을 분석하기 위해 과산화수소(H ₂ O ₂)에 영향을 받는 apoptosis 유발인자 caspase-3/7의 활성을 조사한 결과, 농도 의존적으로 발효 전에 비해 발효 후의 시료에서 활성이 감소되는 것을 확인. ④ 간섬유화에 영향을 미치는 활성산소 ROS, 간 세포 독성이 유발되면 증가하는 아미노기전이효소(ALT/AST)의 함량을 분석한 결과, 발효 후 소재 처리 시 발효 전에 비해 ROS, ALT/AST의 함량이 감소하는 것을 확인. 2. 갈색거저리/효모 발효 복합소재 (3차년 계속)	

			<p>① 간 정상세포(LX-2)에서의 간 섬유유생성인자인 TGF-β1 처리 후 간 손상의 주요 지표인 α-SMA (smooth muscle actin), COL1A1(collagen type 1α 1chain) 발현을 본 결과, 발효 후 복합소재가 발효 전 소재에 비해 농도 의존적으로 α-SMA, COL1A1의 발현율이 감소하는 것을 확인.</p> <p>② TGF-β1에 의해 유도된 LX-2의 활성화(proliferation)억제 효과를 확인하기 발효 후 시료를 처리한 결과, 효과적으로 LX-2의 증식을 억제하는 결과를 확인.</p>
		<p>항염증 관련 인자들의 발현 분석을 통한 간 기능 개선 비교 분석</p>	<p>1. 흰점박이꽃무지 유충/고초균 발효 복합소재</p> <p>① 항염증 효능을 확인하고자 대식세포 RAW 264.7 세포에서 LPS에 활성화된 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6)와 iNOS 및 COX-2의 유전자/단백질 발현 분석. 그 결과, IL-1β, IL-6, COX-2의 경우 발효 전에 비해 발현 차이가 없었으며 대조군 대비 유의차를 확인할 수 없었지만, 염증성 사이토카인 중 TNF-α와 iNOX 발현(유전자/단백질)에서 발효 후가 발효 전과 대조군에 비해 유의차 있는 감소를 보여줌.</p> <p>② 항산화 효능을 확인하기 위해 SOD 분석(xanthine oxidase inhibition)을 진행한 결과, 발효 후 추출물에서 농도 의존적으로 발효 전보다 XO 저해 효능이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. Nitro oxide(NO) 생성 저해 능력을 확인한 결과, 고농도에서만 NO 저해능을 확인.</p> <p>③ 지방 생성 억제 효능 간 세포 괴사, 염증 등을 동반하는 지방간염의 효능을 확인하기 위해, HepG2 세포에 palmitic acid를 처리하여 비알콜성 지방간 세포를 유도한 후 총 콜레스테롤(TC)와 중성지방(TG)의 함량을 측정된 결과, 발효 후 소재</p>

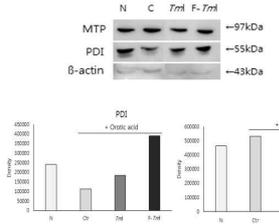
				<p>가 발효 전에 비해 세포 내 축적된 콜레스테롤과 증성지방의 함량을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인.</p> <p>2. 갈색거저리/효모 발효 복합소재 (3차년 계속)</p> <p>① NO 생성 조절은 염증 억제에 있어 중요하므로, 갈색거저리/효모 발효 복합소재 추출물의 NO 생성 억제능을 확인한 결과 농도 의존적으로 발효 후가 발효 전에 비해 NO 함량을 감소시키는 것을 확인.</p>
	Orotic acid에 의해 간 손상이 유도된 동물모델에서 약용곤충 발효복합 소재의 간 기능 개선효능 메커니즘 분석	식·약용곤충 발효복합 소재의 orotic acid에 의한 간 손상 억제 효능 기전 분석	- 흰점박이꽃무지 유충/고초균 발효 복합소재	Orotic acid 비알코올성 간 손상 유도 Rat 동물모델에서 발효 흰점박이꽃무지 열수 추출물 식이에 따른 MTP 및 PDI 발현량을 확인한 결과 MTP 활성에는 큰 영향을 미치지 못 하였지만 PDI 활성에 있어 발효 전과 비교하여 발효 후(10mg/kg) 군에서 증가를 나타내었음.
	발효전후 지표성분별 간 기능성 개선 비교 평가	지표성분을 이용한 간 기능 개선 및 기전 분석(<i>in vitro</i>)	H ₂ O ₂ 로 유발된 간 독성 HepG2 세포에서 최적 발효소재 흰점박이꽃무지/고초균 발효복합 소재의 간 기능 관련 지표 비교 분석을 위해 total glutathione 및 Gamma glutamyltransferase의 함량을 측정 한 결과, 발효 후 소재에서 발효 전 대비 농도 의존적으로 total glutathione이 증가하였고 gamma glutamyltransferase 함량이 감소되어 발효 후 소재가 농도 의존적으로 효과가 있음을 확인.	
	'간 기능 개선에 도움' 효능 증대를 위한 첨가물 탐색	'간 기능 개선에 도움' 효능 증대를 위한 첨가물 탐색	- 약용곤충 발효복합 소재와 더불어 '간 기능 개선에 도움' 효능을 증대시킬 천연 소재 탐색	- 미역귀추출물 및 모과나무추출물에서 항산화 기능을 보이고, 간 세포에 해당 추출물을 처리시 간 기능 관련 인자에서 긍정적인 영향을 나타냄
			- 추후 제품화시 위의 소재를 첨가물로 활용 가능	
식·약용곤충/발효미생물 복합소재를	Orotic acid에 의해 간 손상이 유도된 마우스 모델에서 간 기능	간 손상 관련 체내 지표분석	동물 사육 후, 장기무게, 혈청분석(AST, ALT 등), 지방조직(Oil red 염색) 등의	

<p>활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(전임상 효능검증 및 제품개발) -동아대학교</p>	<p>개선효과 검증 및 최적농도 설정</p>		<p>분석결과 발효곰팡이 식이급여군에서 긍정적인 효과를 보임</p>	
		<p>형태학적 변화 및 간 세포 확인</p>	<p>간 조직을 고정 후 H&E염색을 통하여 형태학적 변화를 관찰한 결과 정상군에 가까운 소견을 보임</p>	
		<p>조직 내 과산화지질억제능 및 항산화 물질 함량 분석</p>	<p>TBARS법 및 GSH 함량 등을 분석한 결과 발효곰팡이 식이급여군에서 과산화지질억제능과 글루타치온 함량이 증가함을 확인함</p>	
	<p>발효복합소재의 간암 증식억제기전 규명</p>	<p>인체 간암 세포주에서 약용곤충 발효복합소재의 세포증식 억제효능 확인</p>	<p>거저리, 곰팡이, 번데기의 발효 전 추출물 및 다양한 균으로 발효 후 추출물의 암세포 증식억제능을 확인하였으며 가장 효능이 뛰어난 균을 선별하였음 (번데기, <i>Aspergillus kawachii</i> 발효균)</p>	
		<p>약용곤충 발효복합 소재가 인체 간암 세포의 apoptosis 유도에 미치는 영향</p>	<p>발효전 번데기 및 발효 후 번데기 추출물의 처리가 간암세포의 apoptosis를 유도한다는 결과를 얻음</p>	
		<p>약용곤충 발효복합 소재가 인체 간암 세포의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향 확인</p>	<p>발효전 번데기 및 발효 후 번데기 추출물의 처리가 caspase 의존형 및 비의존형 경로를 통해 apoptosis를 유도한다는 결과를 얻음</p>	
		<p>약용곤충 발효복합 소재의 투여가 간암이 유도된 흰쥐의 종양성장 억제에 미치는 영향 확인</p>	<p>연구 진행 중 (11월 중 결과도출 예정)</p>	
	<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(마케팅 및 판로개척) -엠에스글로벌 바이오(주)</p>	<p>숙취해소 효력과 간보호 및 간 기능 개선능력을 이용하여 숙취해소 드링크제 개발</p>	<p>약용곤충/발효 복합 소재물과 연계하여 숙취 배합음료 선정하여 개발 : 항산화 실험 (총 플라보노이드 화합물 분석, 총 폴리페놀 화합물 분석) 효소활성 촉진 효과 측정 - 알코올분해효소(Alcohol dehydrogenase, ADH) 및 아세트알데하이드분해효소(Acetaldehyde dehydrogenase, ALDH) : 세포실험 (간 손상 보호효과)- HepG2(간암세포주)를 이용한 세포사멸 실험</p>	<p>숙취에 좋은 소재 탐색하여 부원료 테스트 진행, 식품안전나라를 통해 품목제조보고 등록 가능여부 및 영양성분 분석</p>
			<p>시제품제작 (디자인개발, 라벨제조, 박스제조 외)</p>	<p>식품 품목제조보고서 등록 및 영양성분분석, 자가품질검사 진행</p>
			<p>식품 품목제조보고서 등록완료, 공인기관에 의뢰하여 영양분석 완료</p>	

			<p>디자인 및 라벨 개발</p>	<p>브랜드네이밍 '굼메이트(GUMMATE)'로 하여 BI 진행, 패키지 디자인(병라벨, 외박스) 개발 완료</p>
<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(CRO) -(주)제너럴바이오텍</p>	<p>발효 굼벥이의 경구 섭취가 간건강에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체 적용 시험 프로토콜 synopsis 작성</p>	<p>대상자 선정 기준, 복용량 설정, 대상자수 산정, 유효성·안전성 평가 변수 설정, 선정기준 및 제외기준, 시험방법 설정, 통계방법 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 시험책임자와 협의 후 대상자 선정 기준 확립 - <i>in vivo</i> 시험 결과와 시험 식품의 일상 섭취량을 고려하여 복용량 설정 - 통계 전문가와 협의 후 참고 문헌을 바탕으로 시험 대상자수 산정 - 선행연구자료 및 식약처가 발행한 '건강기능식품 기능성 가이드라인' 중 '간 건강에 도움을 줄 수 있음'편을 참고하고 시험책임자와 협의 후 유효성 평가변수 및 안정성 평가 변수 설정 - 시험책임자와 협의 후 선정기준 및 제외기준 설정 - 시험책임자와 협의 후 시험방법 설정 - 통계 전문가와 협의 후 통계방법 설정 	
		<p>프로토콜 synopsis를 바탕으로 세부내용을 첨부하여 프로토콜 작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 각각의 항목에 대한 세부 내용을 선행 연구와 참고 자료를 바탕으로 프로토콜 작성 - 작성 후 시험책임자와 협의 후 수정사항 수정 	
	<p>IRB 심의 승인</p>	<p>인체적용시험을 개시하기 위해 각 기관의 임상시험심사위원회(IRB) 승인 취득</p>	<p>(임상시험기관: 동아대학교병원, 양산부산대학교병원, 부산대학교병원, 고신대학교병원, 총 4기관)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 심의 신청서, 연구계획서(프로토콜), 증례기록서, 시험대상자 설명문 및 동의서, 인체적용시험자자료집(의뢰자 제공), 시험대상자 보상정보, 대상자 모집 관련 서류 등 관련 서류 작성 및 제출 <p>: 동아대학교병원, 양산부산대학교병원 IRB 승인서 획득, 고신대학교병원, 부산대학교병원 IRB 심의 중</p>	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2019)	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(대량생산 및 제품 안정성평가) -(주)자연과 효소	약용곤충 발효복합 소재를 이용한 간 기능 개선 시제품 대량생산 공정 확립	소재의 대량생산 및 소재 함유 타블렛 제조 및 규격화	<ol style="list-style-type: none"> 1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 대량생산 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 제품화에 쓰일 최종 소재 : 흰점박이꽃무지유충/<i>Bacillus subtilis</i> 발효복합소재 (이하 '흰점박이꽃무지유충발효분말') - 시제품 대량생산 첨가용 2. GMP시설을 갖춘 제조업체와 협의 하에 시제품 제작 테스트 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 임상시험시 대조군과 시험군의 외관상 성상 차이가 없어야 함. 몇 번의 블라인드 테스트를 통해 최종 제형 확립 - 흰점박이꽃무지유충발효분말의 특이취 마스크링 원료 선정 완료 (임상시 대조군과의 성상에서 차이가 없어야 하기 때문에 반드시 마스크링 필요) - 생산 포장 단위 등 전반적인 제조 관리. 3. 타블렛 제조 규격화 <ul style="list-style-type: none"> - 생산된 시제품의 규격확인 : 성상, 영양성분, 열량, 유해물질, 붕해도 등 분석자료 확보 진행 중
		시제품의 식품학적 특성 분석 및 안전성(독성) 시험	개별인정형 건강기능식품의 규격에 맞춘 시제품의 영양학적 및 유해물질 분석, 독성시험 진행	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 품질 규격확인 <ul style="list-style-type: none"> - 영양성분 분석(조단백, 조지방, 당류, 열량 등) - 유해물질 분석(대장균, 대장균군, 이산화황 등) - 지표물질 분석(폴리감마글루탐산) 2. GLP 기관을 통한 독성시험 분석 진행 중 <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여독성, 2주반복투여 DRF시험완료 - 조제물 분석법 검증 완료, 복귀돌연변이, 염색체이상시험, 소핵시험 용량결정시험 완료 - 13주 반복투여 독성시험 진행 중
		임상시험 준비	임상시험 가이드라인에 맞춘 시제품(타블렛형) 제조	<ol style="list-style-type: none"> 1. IRB 심의 승인 유지 <ul style="list-style-type: none"> - CRO업무를 담당하는 위탁 연구개발기관인 (주)랩투메디씨 알오과의 지속적인 업무 수행 2. 임상시험에 필요한 시제품의

			<p>규격확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이전의 연구 데이터를 참조하여 일일 섭취량 등 제품의 규격 설정 <p>3. 임상시험 IRB 승인서 내 계획 변경 및 피험자 모집 중</p>
<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(간 기능 개선 효능 및 작용기전검증) - (재)전주농생명소재연구원</p>	<p>식·약용곤충 최적 발효 복합소재의 간 기능 개선 효능 분석</p>	<p>갈색거저리유충/효모의 간 섬유화 억제 효능 및 기전 분석</p>	<p>1. 갈색거저리유충/효모 발효 복합소재 선별</p> <p>1) 갈색거저리유충에 대한 최적 발효미생물 균주를 선별하기 위해 간 정상세포(LX-2)에서 간 섬유화의 주요지표인 α-SMA (smooth muscle actin), COL1A1 (collagen type 1α 1chain) 유전자 발현 패턴을 RT-qPCR로 확인하여 선별함.</p> <p>2) 갈색거저리유충/효모 발효 추출물의 세포독성 실험 결과로서 세포독성이 관찰되지 않음.</p> <p>3) 갈색거저리유충/효모 발효 추출물은 TGF-β1에 의해 유도된 LX-2 세포의 증식을 효과적으로 억제함.</p> <p>4) 간섬유화에 지대한 영향을 미치는 oxidative stress (H_2O_2)에 의해서 생성된 Reactive oxygen species (ROS)의 생성을 효과적으로 억제함.</p> <p>5) 갈색거저리유충/효모 발효 추출물의 세포수준 간 기능 관련 지표 분석을 통해서, HepG2에서 추출물은 Gamma glutamyltransferase (GGT) 활성을 효과적으로 감소시킴.</p>
	<p>동물모델 조직에서 간 기능 개선 효능 분석 (<i>in vivo</i>)</p>	<p>흰점박이꽃무지유충발효분말의 alcohol에 의한 간 손상 억제 효능 분석 - 기능성 식품원료 개별인정 등록 대상소재로서 alcohol성 동물모델에 적용</p>	<p>1. 흰점박이꽃무지유충발효분말</p> <p>1) Alcohol에 의한 급성 간 손상 동물모델(Rat)에서 간 조직내 축적된 콜라겐 함량을 RT-qPCR과 ELISA로 측정된 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 추출물을 식이로 섭취한 실험군에서 콜라겐 축적량이 감소한 것을 확인.</p> <p>2) Alcohol에 의한 급성 간 손</p>

			<p>상 동물모델(Rat)의 혈청에서 염증반응을 일으키는 사이토카인들 즉, TNF-α, interleukin (IL-1β) 및 IL-6를 ELISA로 분석한 결과, TNF-α 및 IL-6의 발현량 차이는 없었지만 IL-1β의 발현량은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인. 이는 양성대조군인 silymarin과 유사한 경향성을 가지는 것을 확인.</p> <p>1. 갈색거저리유충/효모 발효추출물</p> <ul style="list-style-type: none"> - Orotic acid 비알코올성 간 손상 유도 Rat 동물모델에서 갈색거저리유충발효복합소재의 에탄올추출물은 식이에 따른 MTP (Microsomal triglyceride transfer protein, 중성지방 운반단백질) 및 PDI (Protein disulfide isomerase) 발현량을 확인한 결과, 발효전에 비해 발효후의 MTP 및 PDI 활성이 증가한 것을 확인. 
	<p>대사물질 성분들의 간 기능 개선 및 효능 분석 - 기능성 식품원료 개별인정 등록 대상 소재로서 흰점박이꽃무지유충발효분말 소재를 분석</p>	<p>갈색거저리유충/효모 발효복합소재의 orotic acid에 의한 간 손상 억제 효능 분석</p>	<p>1. HRMAS를 통해 동정된 다양한 대사산물들을 동정하고 대조군과의 비교분석을 위해 O-PLS-DA 실시.</p> <ul style="list-style-type: none"> - O-PLS-DA 분석을 통한 S-polt 결과 발효 전/후의 함량 차이가 두 그룹으로 구분짓는데 큰 영향을 미침. - 화합물 성질에 따라 발효 전 추출물과 비교해서 발효 후 추출물 ES- (음이온 charge)에서는 23개의 대사물질이 up-regulation 된 것을 확인, ES+ (양이온 charge)에서는 51개의 대사물질이 up-regulation 된 것을 확인. - Up-regulation된 대사산물 중 기능적으로 간 기능 개선에 영

				<p>향을 미칠 것으로 판단되는 대사물질로는 항생물질의 일종인 surfactin C, 캡사이신 일종인 homodihydrocapsaicin, 사포닌일종인 notoginsenoside B가 발효전에 비해 발효후에 증가됨.</p>
			<p>최적 발효복합 소재의 증가된 대사물질(들)의 간 기능 개선 효능 및 기전 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 참고문헌을 바탕으로 항섬유화 효능과 연계될 것으로 추측되는 notoginsenoside B 그리고 항염증 효능과 연계될 것으로 추측되는 homodihydrocapsaicin은 합성 외에는 구입에 어려운 문제점이 있음. - 따라서 상업적으로 구입 가능한 항염증 효능이 있을 것으로 추측되는 surfactin C를 구입하여 간 세포의 항섬유화 및 항산화/항염증 효능 분석중. - 선결적인 결과는 surfactin C는 세포적 수준에서 nitric oxide 함량을 줄임.
<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(전임상 효능검증 및 제품개발) -동아대학교</p>	<p>Alcohol성 간 손상 동물 모델에서 약용곤충 발효복합 소재들의 간 기능 개선효능 검증</p>	<p>간 손상 관련 체내 지표 분석</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 혈청분석(AST, ALT 등) 등의 분석결과, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg 투여군 모두 AST, ALT, GGT, ALP에서 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 긍정적인 효과를 보였고, 특히 50 mg/kg 투여군에서 가장 낮은 수치를 보임.
		<p>형태학적 변화 및 간 세포 확인</p>		<ul style="list-style-type: none"> - 간 조직을 고정 후 H&E염색 및 지방조직(Oil red 염색)을 통하여 형태학적 변화를 관찰한 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 100 mg/kg 식이급여군에서 정상 군과 같이 지방구의 수가 줄어들고, 간 소엽구조가 잘 유지되는 등 긍정적인 소견을 보임
		<p>간 조직, 간분획물 및 혈청 내 과산화지질억제능 및 항산화 물질 함량 분석</p>		<ul style="list-style-type: none"> - TBARS법 및 GSH 함량 등을 분석한 결과, 혈청, 간 조직 및 간분획물 모두 흰점박이꽃무지유충발효분말 50, 100 mg/kg 식이급여군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였고, 오히려 200, 400 mg/kg 식이급여군에서는 과산화지질 양이 증가함. - 간 조직 및 혈청 내의

			<p>glutathione 함량 분석결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 100 mg/kg 식이급여군에서 가장 높은 glutathione 함량을 나타냄.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군의 과산화지질억제능과 glutathione 함량이 증가함을 확인함.
		<p>혈중 알코올 및 아세트알데하이드농도, ADH 및 ALDH 활성 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 함량 측정 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 전반적으로 낮은 함량을 나타냄. 특히 100 mg/kg 식이급여군에서 가장 낮은 알코올 수치를 나타냄. 아세트알데하이드 함량 또한 알코올 함량 분석결과와 유사. - 혈중 ADH 및 ALDH 활성 결과, ADH 활성은 25, 50, 100 mg/kg 투여 군에서 유의적으로 증가하였고, 특히 50 mg/kg에서 가장 높은 ADH 활성 수치를 나타냄. 혈중 ALDH 활성은 ADH 활성결과와 유사하고, 100 mg/kg 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 가장 높은 ALDH 활성수치를 보임.
		<p>간 조직의 중성 지질 농도 변화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 간 조직의 중성지질 농도 확인결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 간 조직의 중성지질 농도 회복에 긍정적인 영향을 보이며, 특히 100 mg/kg 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 가장 낮은 중성지질 농도를 보임.
		<p>혈중 내 지질의 변화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 혈중 총 지질 농도 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 100 mg/kg 식이급여군까지 감소하는 경향을 보이며, 200, 400 mg/kg 식이급여군에서는 오히려 높은 수치를 보임. - 혈중 유리지방산 및 중성지질 함량 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 100 mg/kg 식이급여군에서 낮은 농도를 보임.

<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(마케팅 및 판로개척) -엠에스글로벌 바이오(주)</p>	<p>간 기능 개선 효능을 갖는 농축액상 및 타정형 시제품 개발</p>	<p>총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량 변화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 농도 의존적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말식이급여군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보임 - HDL-콜레스테롤 함량 변화 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말식이급여군에서 농도의적으로 증가하는 경향을 보이며, 특히 50, 100 mg/kg 식이급여군에서 가장 높은 함량을 보임 	
		<p>시제품의 특성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 앞선 결과를 토대로 제조한 흰점박이꽃무지유충발효분말을 이용하여 간 기능 효능을 갖는 농축액상 시제품 개발 중 (12월 중 완료예정) 	
	<p>식·약용곤충 함유 간 기능 개선 일반 식품의 개발 추진</p>	<p>식·약용곤충을 이용한 숙취 해소음료 “굼메이트”의 관능적 추가 평가를 통해 제품의 풍미 및 기능성 향상 일반 식품의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 흰점박이꽃무지유충발효물을 이용한 소재의 경우 고유의 특이취로 인해 일반식품으로서 대중들에게 상품화하기 어려운 부분이 있음. : 음료의 배합비율의 개선을 통해 풍미와 기능성을 향상시킨 제품으로 안정성을 가진 제품화 진행 : 숙취해소 음료에 부원료인 아로니아, 블루베리, 적포도 및 향미를 추가하여 항산화 기능이 증진된 제품으로 경쟁력 강화 	
		<p>식·약용곤충 발효소재의 환 시제조 진행</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 흰점박이꽃무지유충발효분말에 각종 한약 재료(구기자, 갈근, 진피, 밀크씨슬, 인진쑥, 헛개, 미나리, 오미자, 산수유 등)을 이용한 환 제조 진행 - 일반식품으로 간 기능개선 식품 기능성 여부 탐색 : ADH 및 ALDH 분석을 통해 간 기능 활성화에 대한 분석 	
		<p>국내외 마케팅 시장 분석 식·약용곤충의 시장동향 파악을 통해 마케팅 진행 전략 수립</p>	<p>전문분석기관과 연계한 식·약용곤충의 고부가가치 기능성 소재에 대한 시장성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ‘발효굼벥이(흰점박이꽃무지유충발효물)를 활용한 간 기능 개선 건강기능식품’에 대하여 경제성 분석을 통해 마케팅/판매/홍보 진행을 위한 시장 동향 파악
			<p>국내외 전시회 참가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 식·약용곤충에 대한 제품의 트렌드 확인 및 국내외 마케팅 방향 분석

	<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화(CRO) -(주)랩투메디 싸알오</p>	<p>다기관 인체적용시험 protocol 및 관련 서류 변경 및 IRB 승인 유지</p>	<p>임상시험기관과 주관기관과의 조율을 통해 관련 서류 작성 및 IRB 승인 유지</p>	<p>1. 프로토콜 변경 (비알코올→알코올성 간) - 식품의 조성비, 연구기관, 연구제목, 유효성 평가변수, 선정기준, 제외기준 등 변경 2. 인체적용시험 관련 서류 변경 - 프로토콜 변경으로 인해 증례기록서, 설명문 및 동의서, 대상자 모집공고, 인체적용시험자자료집 변경 3. IRB 승인 유지 - 각 기관별 IRB에 승인유지를 위해 중간보고서 제출 및 승인 연장</p>
--	---	---	---	--

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
4차 년도 (2020.01 ~ 2021.06)	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화 - 주관연구기관 (주)자연과효소	약용곤충 발효복합 소재를 이용한 간 기능 개선 최종제품 개발	<p>약용곤충 발효복합 소재를 이용한 타정형 제품 생산</p>	 <p>건강기능식품 멀티비타민 (곰뱅이발효분말 함유)</p>  <p>식품 - 기타가공품 (곰뱅이발효분말 함유)</p>
			<p>최종 개발제품의 규격 및 디자인 설정</p>	<p>상표출원 : 케이빙이(K-빙이) 2020.11.02. 출 원 번 호 40-2020-0194945</p>  <p>디자인 시안 제작 - 3종</p> 

				 <p>공백이주용량 0000mg 000mg x 000캡슐(000캡)</p> <p>간 건강에 도움을 줄 수 있음 0000000000에 도움을 줄 수 있음</p>												
		<p>임상시험 종료 후 결과를 바탕으로 개별인정 서류 작성 및 신청</p>	<p>임상시험 연장</p>	<p>코로나19 사태로 임상시험 지연 4다음 년도 연구 기간 연장 기존 : 20.01.01~20.12.31 연장 : 20.01.01~21.06.30</p>												
			<p>임상시험 결과분석</p>	<p>인체적용시험결과보고서 (Clinical Study Report) 흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알코올성 간 손상 완화에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 대조 군 비교 인체적용시험 ver. 1.0 / 2021. 06. 14 * 첨부 참조</p> <table border="1" data-bbox="1077 974 1436 1568"> <tr> <td>시험대 상 품목</td> <td>흰점박이꽃무지유충발효분말</td> </tr> <tr> <td>시험체</td> <td>동아대학교병원 가정의학과</td> </tr> <tr> <td>임자</td> <td>한성호 교수 동아대학교병원 (부산광역시 서구 대신공원로 26)</td> </tr> <tr> <td>실시 기관</td> <td>양산부산대학교병원 (경남 양산시 물금읍 금오로 20) 고신대학교복음병원 (부산광역시 서구 감천로 262) IRB 승인일로부터 ~ 2021년 06월 30일 동아대학교병원 : Version 1.9 (2021.04.15.)</td> </tr> <tr> <td>시험 기간</td> <td></td> </tr> <tr> <td>인체적 용시험 계획서</td> <td>양산부산대학교병원 : Version 1.5 (2020.12.10.) 고신대학교복음병원 : Version 1.2 (2020.12.10.)</td> </tr> </table>	시험대 상 품목	흰점박이꽃무지유충발효분말	시험체	동아대학교병원 가정의학과	임자	한성호 교수 동아대학교병원 (부산광역시 서구 대신공원로 26)	실시 기관	양산부산대학교병원 (경남 양산시 물금읍 금오로 20) 고신대학교복음병원 (부산광역시 서구 감천로 262) IRB 승인일로부터 ~ 2021년 06월 30일 동아대학교병원 : Version 1.9 (2021.04.15.)	시험 기간		인체적 용시험 계획서	양산부산대학교병원 : Version 1.5 (2020.12.10.) 고신대학교복음병원 : Version 1.2 (2020.12.10.)
시험대 상 품목	흰점박이꽃무지유충발효분말															
시험체	동아대학교병원 가정의학과															
임자	한성호 교수 동아대학교병원 (부산광역시 서구 대신공원로 26)															
실시 기관	양산부산대학교병원 (경남 양산시 물금읍 금오로 20) 고신대학교복음병원 (부산광역시 서구 감천로 262) IRB 승인일로부터 ~ 2021년 06월 30일 동아대학교병원 : Version 1.9 (2021.04.15.)															
시험 기간																
인체적 용시험 계획서	양산부산대학교병원 : Version 1.5 (2020.12.10.) 고신대학교복음병원 : Version 1.2 (2020.12.10.)															
			<p>개별인정 서류 작성 및 신청</p>	<p>임상시험 결과를 토대로 개별인 정 서류 작성중</p>												
<p>식·약용곤충/발 효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화 - 협동연구기관1 (재)전주농생명 소재연구원</p>	<p>표준공정에 의해 생산된 최종 제품의 간 기능 개선 효능 분 석</p>	<p>인체 간 정상 세포의 세포증 식 억제능 분석</p>	<p>실험에 사용할 시료의 안전성 평 가를 위하여 인간 간 정상세포 (human hepatic stellate cell line, LX-2)에서 세포 독성 여부를 평 가하였다. 최종제품을 DMSO에 용해하여 MTT assay를 이용하 여 세포독성평가를 실시하였다. LX-2 세포에 각 시료를 농도별 (0, 10, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 안전성을 평가한 결과 그림 1에서와 같이 고농도인 100 µg/mL 까지 세포 독성이 나타나지 않아 시료의 안전성이 높음을 확인</p>	<p>TGF-β1에 의해 간 정상세포 간 섬유화와 밀접한 관련이 있는 인</p>												

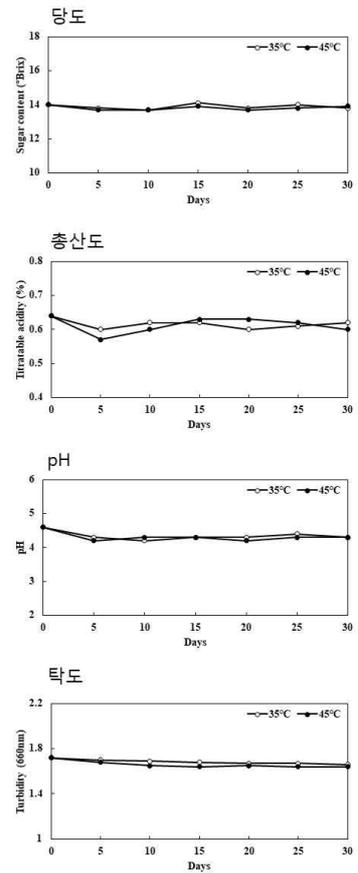
		<p>(LX-2) 활성 억제능 분석</p>	<p>간 간 성상세포(LX-2)에 간 섬유화 촉진 사이토카인인 TGF-β1 처리에 의해 세포 증식을 유도한 후 최종 제품을 농도별로 처리하여 억제하는 효과를 확인하였다. 인간 간 성상세포인 LX-2 cells에 TGF-β1 (HSC를 활성화시키고 간 섬유화를 유발)을 처리하면 대조군(정상군)에 비해 각각 약 1.39배의 간 섬유화가 촉진되었다. 그러나, 흰점박이꽃무지 유충 발효분말이 함유된 타블렛의 모든 농도 처리 군에서 TGF-β1에 유도된 간 섬유화 성장을 억제하는 것을 확인 하였다 (그림 2). 한편, 대조군 타블렛의 50, 100 ug/mL 군에서도 TGF-β1 처리군보다 간 섬유화 성장의 저해능력을 보였지만 같은 농도 발효곰팡이 타블렛보다 저해능력이 떨어지는 것을 확인</p>	
		<p>인체 간 성상 세포의 apoptosis 유도 활성 분석</p>	<p>인체 간 성상 세포의 apoptosis 유도 활성 분석-카스파아제(caspase) 활성 측정 흰점박이꽃무지 유충 발효분말이 함유된 타블렛은 caspase-3/7의 활성 저해가 apoptosis 유발에 직접적인 관련이 있음을 보여주었다.</p>	
		<p>분자수준에서의 간 섬유화 억제 효능 기전 분석</p>	<p>① COL1α1(collagen type I α1 chain) 유전자 발현 확인 ② TGF-β1에 의해 유도되는 Smad 분자 활성</p>	
	<p>최적 발효 대사물질 성분들의 간 기능 개선 및 효능 분석</p>	<p>최적 발효복합 소재의 발효 전/후 대사물질 비교 분석 (OPLS-DA 분석)</p>	<p>발효 전 추출물과 비교해서 발효 후 추출물에서 여러 대사산물이 up-regulation 된 것을 확인하였고 발효 전/후에서 선정된 대사물질은 불포화지방산성분인 Ricinoleic acid임을 확인하였다. Ricinoleic acid는 12-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid라고 불리는 불포화 오메가 9 지방산으로, 항염증효과와 소염작용이 알려졌으며 간 기능개선에도 효과적으로 도움을 줄 것이라고 유추된다.</p>	
	<p>대사물질(들)의 간 기능 개선 효능 및 기전 분석</p>	<p>간 성상에서 흰점박이꽃무지 유충 발효 대사물질 (r-PGA)의 독성 평가</p>	<p>최고농도인 100 ug/mL 까지 95% 이상의 생존율을 보이므로 세포독성이 없는 것을 확인</p>	
		<p>흰점박이꽃무지 유충 발효 대사물질 (r-PGA)의 COL1α1(collagen type I α1 chain) 유전자 발현에 대한 영향</p>	<p>LX-2 세포에서 TGF-β1 처리 군은 약 15배 증가하였으며 r-PGA 모든 처리 군(10~100 ug/mL)이 COL1α1 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소</p>	

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화
- 협동연구기관2 동아대학교 산학협력단

최종제품의 저장 중 품질변화 측정 (음료 시제품 기준)



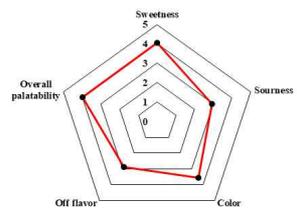
저장성 평가 (0~30일)



미생물 변화

30일간 35°C, 45°C 미생물수 변화 없음

관능평가



구성아미노산

구성아미노산			
Free amino acids	Contents (ppm)	Free amino acids	Contents (ppm)
Aspartic acid	125.64 ± 18.42	Tyrosine	24.33 ± 2.44
Taurine	20.38 ± 2.35	Leucine	101.55 ± 19.57
Serine	17.21 ± 2.33	Ornithine	11.55 ± 1.35
Glutamic acid	103.54 ± 17.22	Phenylalanine	80.98 ± 6.01
Threonine	21.33 ± 3.56	β-alanine	33.55 ± 8.52
Alanine	88.22 ± 10.54	β-amino isobutyric acid	34.13 ± 3.58
Glycine	33.54 ± 5.12	γ-amino-n-butyric acid	70.88 ± 10.55
Citrulline	13.24 ± 2.33	Histidine	20.88 ± 2.37
Valine	114.15 ± 13.55	Proline	550.37 ± 98.86
Methionine	44.28 ± 5.96	Lysine	43.44 ± 3.58
Isoleucine	68.54 ± 8.84	Arginine	80.59 ± 7.75
Total free amino acid		1702.32 ± 255.10	

		유리당	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Organic acids</th> <th>Contents (mg%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sucrose</td> <td>922.58 ± 111.88</td> </tr> <tr> <td>Glucose</td> <td>4087.22 ± 258.33</td> </tr> <tr> <td>Fructose</td> <td>4758.96 ± 180.63</td> </tr> </tbody> </table>	Organic acids	Contents (mg%)	Sucrose	922.58 ± 111.88	Glucose	4087.22 ± 258.33	Fructose	4758.96 ± 180.63		
Organic acids	Contents (mg%)												
Sucrose	922.58 ± 111.88												
Glucose	4087.22 ± 258.33												
Fructose	4758.96 ± 180.63												
<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화 - 참여기업 엠에스글로벌 바이오(주)</p>	<p>발효곤충복합소재를 활용한 시제품 제작 공정 및 개발</p>	<p>곰팡이 고상발효분말 배합 테스트, 환제조 공정</p>	 <p>배합 부원료 스크리닝 및 환제품 시제품 개발</p>										
	<p>시제품의 기능성 실험</p>	<p>항산화 실험 (총 플라보노이드 화합물 분석, 총 폴리페놀 화합물 분석)</p>	 <table border="1"> <caption>Total Polyphenol Contents</caption> <thead> <tr> <th>Sample</th> <th>Content (mg/ml)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A속취환</td> <td>145.29</td> </tr> <tr> <td>B속취환</td> <td>201.00</td> </tr> <tr> <td>곰팡이 환A</td> <td>325.29</td> </tr> <tr> <td>곰팡이 환B</td> <td>386.29</td> </tr> </tbody> </table>	Sample	Content (mg/ml)	A속취환	145.29	B속취환	201.00	곰팡이 환A	325.29	곰팡이 환B	386.29
	Sample	Content (mg/ml)											
A속취환	145.29												
B속취환	201.00												
곰팡이 환A	325.29												
곰팡이 환B	386.29												
<p>시제품 홍보</p>	<p>전시회 참가 엑스포 참가 발효곰팡이 시제품 관련 행사 참여사진</p>												

<p>식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 산업화</p> <p>-</p> <p>위탁기관 (주)랩투메디 씨알오</p>	<p>임상시험</p>	<p>다기관 인체적용시험에 의한 소재의 유효성 입증을 위한 임상시험 모니터링 실시, 통계분석 및 개별인정 제출 자료 작성</p>	<p>· Interim Monitoring, 임상시험 모니터링 방문계획, SAE(중대이상반응)관리, Reporting 및 보고서 작성, 종료방문(Site, IRB)</p> <p>· 통계분석 및 결과보고서 작성: 통계분석 계획 수립, 통계검정 프로그램 적용 여부, 통계 분석 보고서 작성, DM 위탁수행여부 결정, Data 관리 계획 작성, Database 개발, Data validation, 임상시험 결과보고서 작성, 임상 시험 종료보고서 작성</p>										
	<p>임상시험 종료, 개별인증 제출자료 취합 및 개별인정 신청</p>	<p>임상시험 결과 자료 분석</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>내용</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>① 통계검정 계획 수립</td> </tr> <tr> <td>② 통계 검정 및 추정</td> </tr> <tr> <td>① 임상시험 자료작성 및 정리</td> </tr> <tr> <td>② Database 개발</td> </tr> <tr> <td>③ Data Entry</td> </tr> <tr> <td>① 임상시험 결과보고서 작성</td> </tr> <tr> <td>② 임상시험 종료보고서 작성</td> </tr> <tr> <td>① Amendment(프로토콜 등)</td> </tr> <tr> <td>② Safety 관리</td> </tr> </tbody> </table> <p>1차 유효성 평가 변수인 혈중 GGT의 변화량과 2차 유효성 평가변수인 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취한 시험 군에서 알코올성 간 손상 완화의 효과를 확인하였다. 이는 흰점박이꽃무지유충발효분말의 혼합물을 일상적으로 섭취할 시 알코올성 간 손상 완화에 도움을 주는 근거가 될 수 있을 것이다.</p>	내용	① 통계검정 계획 수립	② 통계 검정 및 추정	① 임상시험 자료작성 및 정리	② Database 개발	③ Data Entry	① 임상시험 결과보고서 작성	② 임상시험 종료보고서 작성	① Amendment(프로토콜 등)	② Safety 관리
	내용												
① 통계검정 계획 수립													
② 통계 검정 및 추정													
① 임상시험 자료작성 및 정리													
② Database 개발													
③ Data Entry													
① 임상시험 결과보고서 작성													
② 임상시험 종료보고서 작성													
① Amendment(프로토콜 등)													
② Safety 관리													
<p>개별인증 제출자료 취합 및 개별인정 신청</p>	<p>개별인증 제출자료 취합 및 개별인정 신청</p>	<p>[준비 중 - 절차]</p> <p>· 개별인정 신청자료 초안 작성</p> <p>· 전임상 및 임상시험 결과분석을 통한 건강기능식품 개별인정 신청</p> <p>· 개별인정 제출자료 작성</p> <p>· 개별인정 신청 및 MFDS 대관 업무 수행</p>											

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

■ 본 연구팀은 최종목표인 ‘식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 이용한 고부가가치 기능성 소재개발 및 식품 산업화’의 목표달성을 위하여 크게 핵심성과와 전략성과로 나누어 자체적으로 평가하여 아래의 내용을 중심으로 성과를 첨부함.

※ 첨부 : “핵심 성과 목표”와 “전략 성과 목표”에 대한 결과

<핵심 성과 목표 항목>

평가 항목 (주요성능 Spec)	전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
1 식약용곤충발효분말 제조조건 확립 및 표준화	10	대조군과 비교하여 유효 함량 수치 확인	시료 수 3개 이상	식품공전 참조	한국식품연구소 또는 동급기관을 통하여 공인시험성적서 획득
2 시제품의 안전성 평가 (음료 및 타정형 제품)	10	-	2건	식품공전 참조	한국식품연구소 또는 동급기관을 통하여 영양성분 및 독성시험에 대한 공인시험성적서 획득
3 개발제품의 간 기능개선효능 검증 (혈액 및 간지질 함량측정)	20	대조군과 비교하여 유의적인 수치감소 확인	시험당 시료 수 3개 이상	논문 참조	대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 이상 통계적 유의성이 검증된 감소치
4 개발제품 출시 (음료 및 타정형 제품)	20	3건	3건	제품출시	제품출시
5 개발제품 관련 매출 발생	10	50백만원 이상	50백만원 이상	-	관련 계산서
6 특 허	10	-	출원 3, 등록 1건 이상	-	특허 출원/등록
7 논 문	20	-	10 이상	-	KCI 5편/SCI 5편
합계	100				

- 식·약용곤충 발효복합소재를 활용하여 기능성 제품 개발을 통한 결과적 가치를 전략성과로 평가하고자 함.

<전략 성과 목표 항목>

	평가 항목
1	기능성 소재에 대한 지표성분 3건 이상
2	고용창출, 매출발생 등 상용화 목표성과 제시 (시장 창출 혹은 시장 점유율)
3	건강기능식품소재 개발 전임상 효능평가 2건 이상
4	매출액 50백만원
5	유효성분의 건강기능식품 원료 개별인정형 획득 1건

(2) 정량적 연구개발성과

최종평가정량성과 실적종합표

사업명	과제명	주관연구기관	연구책임자
고부가가치식품기술 개발사업	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간 기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화	(주)자연과 효소	김정욱

(단위 : 건, %, 점)

성과지표	계획(A)	실적(B)	가중치	점수(D)
특허 출원	3	6	0.125	12.50
특허 등록	1	5	0.125	12.50
품종 등록			-	-
기술이전(건)			-	-
기술료(백만원)			-	-
제품화(건)	3	4	0.125	12.50
매출액(백만원)	50	78	0.125	12.50
수출액(백만원)			-	-
고용창출(명)	1	4	0.125	12.50
투자유치(백만원)			-	-
기술인증			-	-
논문(SCI)	5	5	-	-
논문(비SCI)	5	5	-	-
논문평균 IF	10	10	0.125	12.50
학술발표	6	13	0.125	12.50
교육지도			-	-
인력양성	2	5	0.125	12.50
정책 활용			-	-
홍보전시			-	-
기타(수상)			-	-
계	76	125		100.00점

< 핵심 성과 결과 >

평가 항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준- 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
1	식약용곤충발효분말 제조조건 확립 및 표준화 (총 아미노산 및 펩타이드복합물 함량 측정)	10	대조군과 비교하여 유효 함량 수치 확인	시료 수 3개 이상	식품공전 참조	한국식품연구소 또는 동급기관을 통하여 공인시험성적서 획득

[발효곰팡이(고초균/흰점박이꽃무지 유충 발효)] - 관련 첨부

- 지표물질 후보1 : 글루타치온 함량 분석 결과 발효후, 증가한 것을 확인
- 지표물질 후보2 : 유리아미노산 측정 결과 발효 후 생성되는 아미노산 확인(GABA)
- 지표물질 후보3 : 폴리감마글루탐산 함량 분석

[고찰]

지표 후보 물질의 발효전후 함량 비교를 통해 물질 선별 후 식약처 문의 결과 지표물질은 ‘특이성, 대표성, 안정성, 용이성’ 특성을 가져야 하므로 이에 부합되는 지표물질 확인

: 최종적으로 ‘폴리감마글루탐산’을 지표성분으로 설정

[제조공정 확립]

표준생산공정도

식품 품목제조보고서

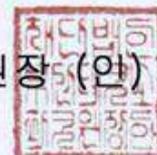
지표물질 후보1 : “글루타치온” 함량 분석 : 발효후, 증가한 것을 확인

시험 성적서

 재단법인 부산테크노파크 부산광역시 강서구 과학산단1로 60번길 31 Tel : 051-974-9091 Fax : 051-974-9099	성적서번호 : BTP-2018-0145 페이지 (1) / (총 1)																
	1. 의뢰자 ○ 기관명 : ㈜자연과효소 ○ 주소 : 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7 기업지원동 308호 (해양생물산업센터) ○ 의뢰일자 : 2017년 12월 21일 2. 시험성적서의 용도 : 과제 시제품의 품질관리용 3. 시험대상품목 또는 물질, 시료명 : 발효추출물 (총 7종) 4. 시험기간 : 2018년 02월 19일~23일 5. 시험방법 : HPLC를 이용한 함량 분석 6. 시험환경: 온도 : (15.4 ± 5.4) °C , 습도 : (30 ± 11) % R.H. 7. 시험결과																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시료명</th> <th>변대기</th> <th>거저리</th> <th>배지</th> <th>발효공병이1</th> <th>발효공병이2</th> <th>공병이</th> <th>균배양</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>검출량 (mg/L)</td> <td>138.14</td> <td>40.00</td> <td>15.48</td> <td>102.11</td> <td>49.19</td> <td>29.87</td> <td>543.77</td> </tr> </tbody> </table>		시료명	변대기	거저리	배지	발효공병이1	발효공병이2	공병이	균배양	검출량 (mg/L)	138.14	40.00	15.48	102.11	49.19	29.87	543.77
시료명	변대기	거저리	배지	발효공병이1	발효공병이2	공병이	균배양										
검출량 (mg/L)	138.14	40.00	15.48	102.11	49.19	29.87	543.77										
* 이 성적서는 의뢰자가 제공한 시료로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. * 본 성적서는 부산테크노파크 KOLAS인정과 관련이 없으며, 시험성적서의 용도 이외의 사용을 금합니다. (성적서 진위확인 문의전화 : 051-974-9091)																	
확인 작성자 성명 : 주혜련	기술책임자(부) 성명 : 이선욱																

2018. 03. 07.

재단법인 부산테크노파크 원장 (인)



지표물질 후보2 : 유리아미노산 측정 결과 발효 후 생성되는 아미노산 확인("GABA")

■ 사료관리법 시행규칙 [별지 제20호서식] <개정 2016.1.5.>

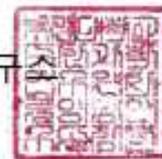
사료검정증명서					
(609-739) 부산광역시 남구 신선로 365					
전화번호(051-629-7061) FAX(051-629-7063)					
문서번호 : 180302-001					
시행일 : 2018.03.15					
수신 : (주)자연과 효소					
접수번호	180302-001	접수연월일	2018.03.02.		
검정번호	180302-001	검정일	2018.03.02.~03.15		
제조업자 · 수입업자	성명	길정욱			
	주소	부산광역시 기장군 일광면 횡계길7 기업지원동 308호			
발효균병이(전) (개봉/ 2018.02.)	의뢰 성분	조지방(%)	조단백질(%)	구성아미노산	황함유아미노산
	검정 결과	14.92	46.92	별지1	별지2
	검정 방법	속실헫추출법	킬달중류법	Ninhydrin법	Ninhydrin법
	의뢰 성분	γ-aminobutyric acid (% in sample)		지방산	
	검정 결과	0.194		별지3	
	검정 방법	Ninhydrin법		GC법	
「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.					
2018년 03월 15일					
사료검정인정기관 부경대학교 사료영양연구소 					
담당부서		사료영양연구소			
책임자		배승철			
담당자		윤정화, 김효선, 박미라, 김동현			
연락처		051)629-7061			
* 사료명칭 : 성분등록증에 명시된 "사료명칭"을 기재 * 시료상태 : 밀봉(관매·공급용)으로 포장된 상태로서 파손하지 않고서는 시료채취를 할 수 없는 경우) 또는 개봉(관매·공급용)으로 포장되지 않은 상태, 벌크를 포함)으로 기재 * 제조 또는 수입 연월일 : 제품 포장지에 표시되어 있는 제조 또는 수입 연월일 기재					

[별지 1] 사료검정증명서

시료명 분석항목	거저리 (% in sample)	글루탐산 (% in sample)	번데기 (% in sample)	발효글루탐산 (% in sample)	배지 (% in sample)
Aspartic Acid	4.79	5.95	4.28	3.40	4.03
Threonine	1.99	3.16	1.82	1.53	1.39
Serine	2.20	1.90	1.92	1.75	1.71
Glutamic Acid	6.18	3.77	5.49	8.57	6.68
Proline	3.50	5.06	3.17	4.30	1.94
Glycine	2.74	2.89	2.25	2.31	1.58
Alanine	3.89	2.21	2.29	2.25	1.58
Valine	3.30	2.60	2.42	2.56	1.80
Isoleucine	2.31	2.04	2.01	1.94	1.76
Leucine	3.71	2.78	2.91	2.71	2.71
Tyrosine	3.19	3.41	2.19	3.06	1.03
Phenylalanine	1.97	1.94	1.95	1.88	1.79
Histidine	3.87	3.39	2.87	3.25	1.26
Lysine	3.03	2.77	2.81	3.02	2.33
Arginine	2.59	2.13	2.17	1.57	2.55
Total	49.06	46.00	40.55	44.10	34.14

「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다. 2018년 03월 08일

사료검정인정기관 부경대학교 사료영양연구소



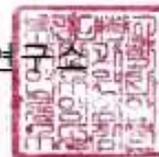
[별지 2] 사료검정증명서

사료명 분석항목	거저리 (% in sample)	공병이 (% in sample)	반대기 (% in sample)	발효공병이 (% in sample)	배지 (% in sample)
Cystine	1.06	1.93	1.68	1.22	1.20
Methionine	1.01	0.93	1.55	1.45	1.38

「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.

2018년 03월 08일

사료검정인정기관 부경대학교 사료영양연구소



[별지 3] 사료검정증명서

분석항목	시료명	거저리 (% Fatty acid)	굴병이 (% Fatty acid)	반대기 (% Fatty acid)
Butyric acid C _{4:0}		0.000	0.000	0.000
Caproic acid C _{6:0}		0.000	0.000	0.000
Caprylic acid C _{8:0}		0.000	0.000	0.000
Capric acid C _{10:0}		0.038	0.000	0.000
Undecanoic acid C _{11:0}		0.000	0.000	0.000
Lauric acid C _{12:0}		0.827	0.075	0.096
Tridecanoic acid C _{13:0}		0.175	0.016	0.000
Myristic acid C _{14:0}		10.905	2.051	0.298
Myristoleic acid C _{14:1}		0.000	0.127	0.000
Pentadecanoic acid C _{15:0}		0.220	0.224	0.052
cis-10-Pentadecenoic acid C _{15:1}		0.000	0.000	0.000
Palmitic acid C _{16:0}		29.888	40.804	43.033
Palmitoleic acid C _{16:1}		1.724	7.308	0.445
decanoic acid C _{17:0}		0.206	0.237	0.151
cis-10-Heptadecenoic acid C _{17:1}		0.075	0.119	0.000
Stearic acid C _{18:0}		4.488	5.485	10.130
Elaidic acid C _{18:1n-7}		0.000	0.000	0.000
Oleic acid C _{18:1n-7}		28.065	36.037	16.952
Linolelaidic acid C _{18:2n-6}		0.000	0.000	0.000
Linoleic acid C _{18:2n-6}		22.315	5.484	3.943
Arachidic acid C _{20:0}		0.181	1.142	0.349
γ-Linolenic acid C _{18:3n-6}		0.000	0.033	0.000
cis-11-Eicosenoic acid C _{20:1}		0.055	0.110	0.000
Linolenic acid C _{18:3n-3}		0.778	0.458	24.422
Heiicosanoic acid C _{21:0}		0.000	0.000	0.000
cis-11,14-Eicosadienoic acid C _{20:2}		0.040	0.000	0.000
Behenic acid C _{22:0}		0.039	0.093	0.047
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid C _{20:3n-6}		0.000	0.000	0.000
Erucic acid C _{22:1n-7}		0.000	0.000	0.000
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid C _{20:3n-3}		0.000	0.000	0.053
Tricosanoic acid C _{23:0}		0.000	0.000	0.000
Methyl cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid C _{20:4n-6}		0.000	0.129	0.000
cis-13,16-Docosadienoic acid C _{22:2}		0.000	0.000	0.000
Lignoceric acid C _{24:0}		0.000	0.041	0.000
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid C _{20:5n-3}		0.000	0.028	0.028
Nervonic acid C _{24:1}		0.000	0.000	0.000
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid C _{22:6n-3}		0.000	0.000	0.000
Total		100	100	100

「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.

2018년 03월 08일

사료검정인정기관 부경대학교 사료영양연구소



[별지 4] 사료검정증명서

분석항목	시료명	발효균병이 (% Fatty acid)	배지 (% Fatty acid)
Butyric acid C _{4:0}		0.000	0.000
Caproic acid C _{6:0}		0.000	0.000
Caprylic acid C _{8:0}		0.000	0.000
Capric acid C _{10:0}		0.000	0.000
Undecanoic acid C _{11:0}		0.000	0.000
Lauric acid C _{12:0}		0.052	0.000
Tridecanoic acid C _{13:0}		0.000	0.000
Myristic acid C _{14:0}		1.525	0.288
Myristoleic acid C _{14:1}		0.110	0.000
Pentadecanoic acid C _{15:0}		0.179	0.039
cis-10-Pentadecenoic acid C _{15:1}		0.000	0.000
Palmitic acid C _{16:0}		40.078	26.095
Palmitoleic acid C _{16:1}		7.559	0.618
decanoic acid C _{17:0}		0.202	0.180
cis-10-Heptadecenoic acid C _{17:1}		0.098	0.044
Stearic acid C _{18:0}		5.270	7.853
Elaidic acid C _{18:1n-7}		0.000	0.000
Oleic acid C _{18:1n-7c}		38.260	18.981
Linolelaidic acid C _{18:2n-6}		0.000	0.000
Linoleic acid C _{18:2n-6c}		4.424	37.089
Arachidic acid C _{20:0}		1.202	0.673
γ-Linolenic acid C _{18:3n-6}		0.000	0.000
cis-11-Eicosenoic acid C _{20:1}		0.112	0.113
Linolenic acid C _{18:3n-3}		0.644	7.037
Heneicosanoic acid C _{21:0}		0.000	0.033
cis-11,14-Eicosadienoic acid C _{20:2}		0.000	0.000
Behenic acid C _{22:0}		0.113	0.635
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid C _{20:3n-6}		0.000	0.000
Erucic acid C _{22:1n-9}		0.000	0.000
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid C _{20:3n-3}		0.000	0.000
Tricosanoic acid C _{23:0}		0.000	0.066
Methyl cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid C _{20:4n-6}		0.124	0.000
cis-13,16-Docosadienoic acid C _{22:2}		0.000	0.000
Lignoceric acid C _{24:0}		0.048	0.245
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid C _{20:5n-3}		0.000	0.000
Nervonic acid C _{24:1}		0.000	0.000
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid C _{22:6n-3}		0.000	0.000
Total		100	100

「사료관리법」 제20조에 따라 검정을 실시한 결과 위와 같이 검정되었음을 증명합니다.

2018년 03월 08일

사료검정인정기관 부경대학교 사료영양연구소



HPLC 를 이용한
흰점박이꽃무지유충발효분말
중 폴리감마글루탐산의
조제물 분석법 검증
(유전독성)

연구번호 : 연19-014

제 출 일 : 2020년 04월 28일

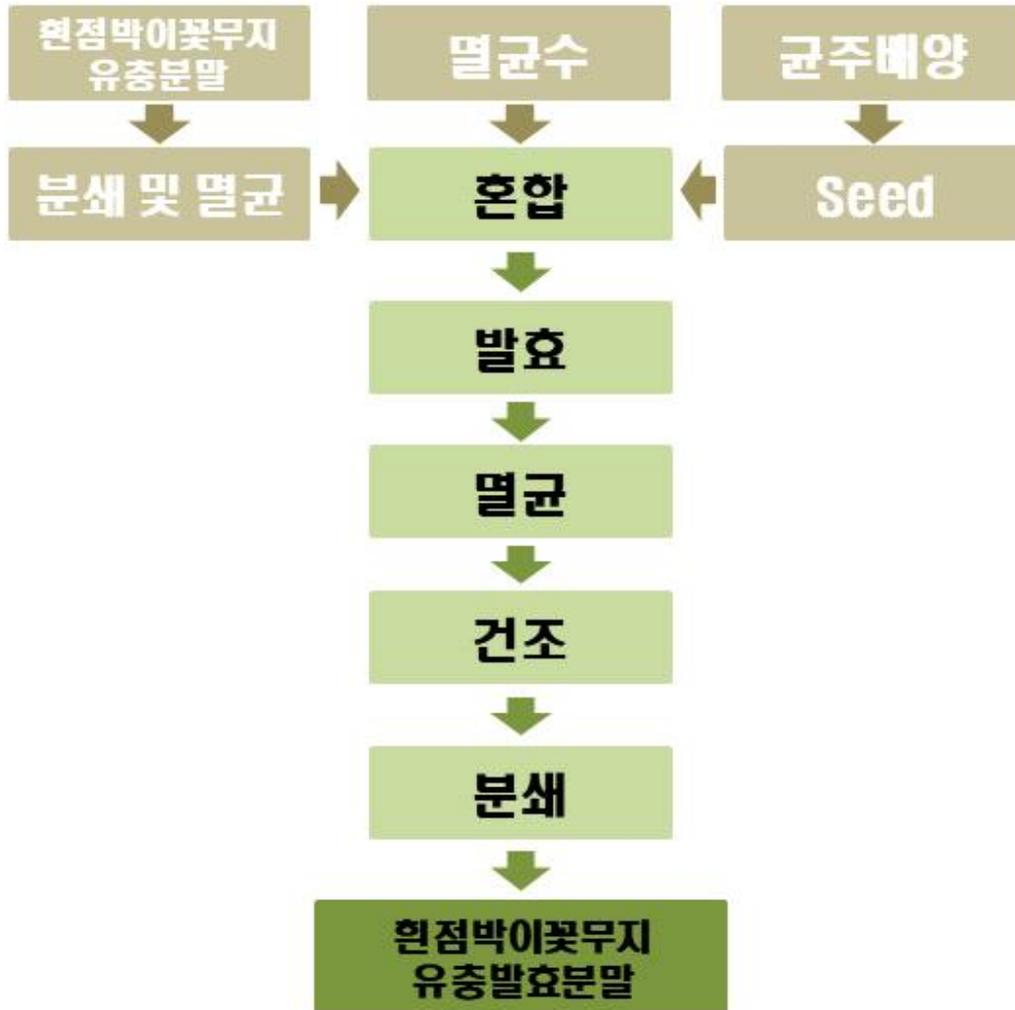


463-400 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 코리아바이오파크 A-101

(Tel.) 031-628-2400/ (Fax) 02-628-0400~1

[표준생산공정도]

흰점박이꽃무지유충 발효분말 (곰팡이발효분말) 표준생산공정도



균주	<i>Bacillus subtilis</i> KACC 91157
Seed 배지	배지 (콩 5%(w/v) 액상배지)
Seed 배양	30℃, 100 rpm, 24시간
발효 조건	접종 seed양 곰팡이 중량의 10%(w/w), 멸균된 곰팡이, 멸균수 혼합 (곰팡이중량의 50%정도), 30℃, 72시간 고상배양
멸균	121℃, 25분
건조	Dry oven 40-50℃, 48-72시간 건조

[품목제조보고서 (궁뎅이발효분말)]
 흰정박이꽃무지유충발효분말

발급번호 : MAMB-AKAH-GOZI-BXOZ-XINN



식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 김정욱	생년월일 [REDACTED]	
	주소 부산광역시 [REDACTED]	전화번호 01023667147	휴대전화 [REDACTED]
영업소	명칭(상호) (주)자연과 효소	영업등록번호 20110156081	
	소재지 부산광역시 기장군 일광면 횡계길 7(해양생물산업육성센터 기업지원동308호)		
제품정보	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호 2011015608144
	제품명	궁뎅이발효분말	
	유통기한	제조일로부터 2년	
	품질유지기한	-	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	뒷장에 기재	
	용도 용법	뒷장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	뒷장에 기재	
	성상	건조분말 성상, 고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없음.	
	품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 []예 []아니오 []해당 없음 ■ 영,유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []예 []아니오 ■ 살균·멸균 제품의 해당 여부 []비살균 []살균 []멸균	
기타	-		

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2019년 12월 05일
 보고인 김정욱

부산광역시 기장군수 귀하

품목보고번호 : 2011015608144

처리부서	참조경제국 환경위생과	처리자성명	박경순	처리일자	2019년 12월 05일
------	-------------	-------	-----	------	---------------



[검사성적서 (곰팡이발효분말)]

흰점박이꽃무지유충발효분말



문서확인번호 : DBFC-T5WO-8ZEF-0KMJ

시험 · 검사성적서

식품의약품안전처 지정번호 : 식품 제035호

발행번호	R20200731-0067		접수번호	200113171-001	
검사완료일	2020-07-31		접수연월일	2020-07-30	
제품명	곰팡이발효분말				
(품목)제조번호			품목제조신고번호	2011015608144	
유형 · 재질 · 품목명	기타가공품				
제조(수입)일	2020-07-25	유통(품질유지)기한			
의뢰자	성명	김정옥, 윤경민, 박진호		업체명 (주)자연과 효소	
	소재지	(46048)부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호(해양생물산업육성센터)			
	전화번호:	팩스번호:	전자우편:		
제조원	업체명	(주)자연과 효소		제조국	
	소재지	부산광역시 기장군 일광면 황계길 7(해양생물산업육성센터 기업지원동308호)			
시험 · 검사목적	식품 자가품질위탁검사				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	단서조항	비고
이물	적합 (단, 금속성이 물은 식품 중 10.0 mg/kg 미만, 크기 2.0 mm 미만)	불검출	적합		

종합판정 : 적합

시험검사원 : 강준순

시험검사책임자 : 박창범

비고 :

- ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- ※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다.

2020년07월31일

(주)한국분석기술연구원



601839 부산시 동구 대영로 267 해공빌딩(초량동)

T:051)466-1231

F:051)466-3298

※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다. <http://lms.mfds.go.kr> Page 1 of 1

[시험성적서 (금병이발효분말)]

흰점박이꽃무지유총발효분말

시험성적서

발급번호 : 참200010624

접수번호	2007-3753	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	금병이발효분말		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유통기한	
업 소 명	(주)자연과 효소	의뢰인	김정옥, 윤경민, 박진호
소재지	부산광역시 기장군 일광면 횡계길 7, 기업지원동 308호(해양생물산업육성센터)		
접수년월일	2020.07.30	검사완료일	2020.08.04

시험결과

시험항목	기준규격	결 과	판 정
대장균	-	음성	-
대장균군	-	음성	-

* 비교 : 생산일자:2020.07.25



2020년 08월 04일

(주) 한국분석기술연구원장



*이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선견, 상면용, 민형사상의 분쟁 등에 사용할 수 없습니다.
 *성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주십시오.
 *이 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 해양빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

평가 항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
2	시제품의 안전성 평가 (음료 및 타정형 제품)	10	-	2건	식품공전 참조	한국식품연구소 또는 동급기관을 통하여 영양성분 및 독성시험에 대한 공인시험성적서 획득

1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 “독성시험” 결과 (공인기관 : 바이오톡스텍)

- 경구투여 독성시험(단회, 2주, 13주) 5,000mg/kg/day로 설정
- 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단
- 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상유발성은 음성으로 판단
- 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성은 음성으로 판단

2. 흰점박이꽃무지유충발효분의 “잔류농약” 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원)

- 3Lot : 잔류농약(Aldrin, BHC, DDT, Dieldrin, Endrin) 불검출

3. “대장균, 중금속” 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원)

- 대장균 : 음성
- 대장균군 : 음성
- 중금속 : 식품공전 기준치 이하

4. 영양성분 분석 결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원)

- 참고용

1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 독성시험 결과 (공인기관 바이오텍스텍 최종보고서)

[최종보고서]



시험번호	시험방법	결론
B18967	흰 점 박 이 꽃 무 지 유 충 발 효 분 말 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험	흰점박이꽃무지유충발효분말을 랫드에 단회경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단
B18968	흰 점 박 이 꽃 무 지 유 충 발 효 분 말 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험	흰점박이꽃무지유충발효분말을 암수랫드에 2주간 반복경구투여한 결과, 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000mg/kg/day로 설정해야 될 것으로 판단
B18969	흰 점 박 이 꽃 무 지 유 충 발 효 분 말 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험	흰점박이꽃무지유충발효분말을 랫드에 13주 반복경구투여한 결과, 무독성량 (NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단
B18970	흰점박이꽃무지유충발효분말의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험	흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단
B18971	흰점박이꽃무지유충발효분말의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험	흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상유발성은 음성으로 판단
B18972	흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스를 이용한 소핵시험	흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성은 음성으로 판단

* 독성시험 공인기관 시험 결과 최종보고서 첨부

2. 흰점박이꽃무지유충발효분의 잔류농약 - (3Lot : 불검출)

[Lot.1] 흰점박이꽃무지유충발효분말1

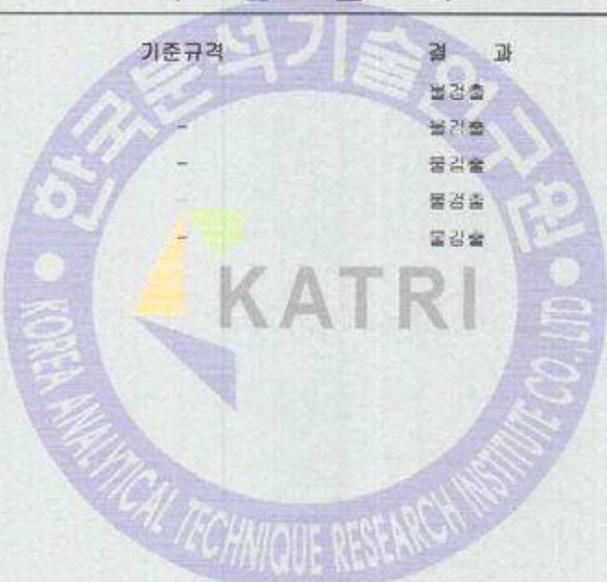
시 험 성 적 서

발급번호 : 참210008866

접수번호	2106-1579	검 사 복 석	일반참고용
제 품 명	흰점박이꽃무지유충발효분말1		
제품유형	-	제 조 일 지	
		유 통 기 한	
업 소 명	(주)자연과 효소	의뢰인	김정옥
소 재 지	부산광역시 기장군 일광면 황계길 7 기업지연동 308호(황계리, 해양생물산업육성센터)		
접수년월일	2021.06.11	검시완료일	2021.06.17

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결 과	판 정
Aldrin(mg/kg)	-	불검출	-
BHC(mg/kg)	-	불검출	-
DDT(mg/kg)	-	불검출	-
Dieldrin(mg/kg)	-	불검출	-
Endrin(mg/kg)	-	불검출	-



2021년 06월 17일

(주) 한국분석기술연구원장



* 본 성적서는 제품인 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품, 견본, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용될 수 없습니다.
 * 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락하십시오.
 * 본 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 내동로 267(주왕동) 해양빌딩, 전화 : 051-468-1231, 팩스 : 051-468-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)
개정번호(1)
개정일자(2019.01.02)

[Lot.2] 흰점박이꽃무지유충발효분말2

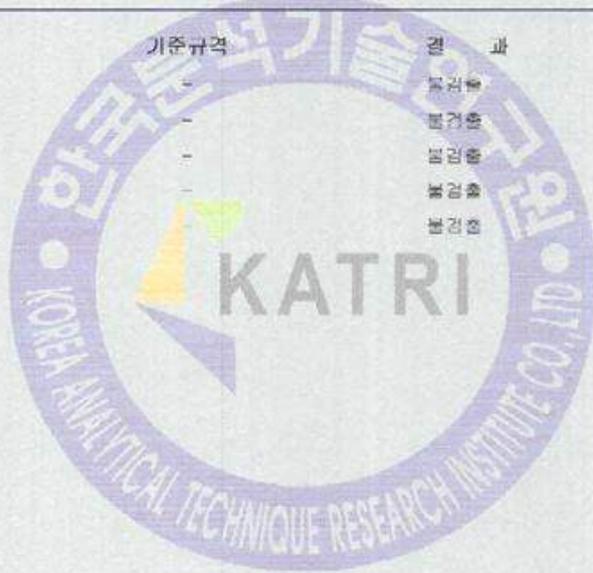
시험 성적서

발급번호 : 참210008865

접수번호	2106-1581	검 사 목 적	일반상고품
제 품 명	흰점박이꽃무지유충발효분말2		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유 통 기 한	
업 소 명	(주)자연과 효소	의 리 인	김정숙
소 재 지	부산광역시 기장군 일광면 황계길 7 기업지연동 308호(황계리, 해양생물산업육성센터)		
접수년월일	2021.06.11	검사완료일	2021.06.17

시험 결과

시험항목	기준규격	결 과	판 정
Aldrin(mg/kg)	-	불검출	-
BHC(mg/kg)	-	불검출	-
DDT(mg/kg)	-	불검출	-
Dieldrin(mg/kg)	-	불검출	-
Endrin(mg/kg)	-	불검출	-



2021년 06월 17일

(주) 한국분석기술연구원장



- 본 성적서는 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 실험 성적, 시험료, 판형시트의 분절 등에 사용된 후 재사용될 수 없습니다.
- 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의의점이 있으시면 연락하십시오.
- 본 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.

주소 : 부산시 동구 대연동 267(초량동) 대연빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3290

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

[Lot.3] 흰점박이꽃무지유충발효분말3

시 험 성 적 서

발급번호 : 착210008864

접수번호	2106-1583	검 사 목 적	일반검교양
제 품 명	흰점박이꽃무지유충발효분말3		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유통 기 한	
업 소 명	(주)자연대 효소	의 위 인	김정욱
소 재 지	부산광역시 기장군 일곡면 황계길 7 기업지원동 308호(황계리, 해양생물산업육성센터)		
접수년월일	2021.06.11	검사완료일	2021.06.17

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결 과	판 정
Aldrin(mg/kg)		불검출	-
BHC(mg/kg)		불검출	-
DDT(mg/kg)		불검출	-
Dieldrin(mg/kg)		불검출	-
Endrin(mg/kg)		불검출	-



2021년 06월 17일

(주) 한국분석기술연구원



- 본 성적서는 제출된 검체에 관하여, 외화분석 이외의 상용 분석, 상인용, 민형사상의 분쟁 등에 사용된 바 없음을 증명합니다.
 - 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시요.
 - 본 성적서는 KOLAS 인증과 관련 없습니다.
- 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 해양빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2019.01.02)

3. 대장균, 중금속 검사결과 - (대장균 : 음성, 중금속 : 기준치 이하)

흰점박이꽃무지유충발효분말 정제(타블렛형)

시 험 성 적 서

발급번호 : 참190014638

검수번호	1910-3416	검 사 목 적	일반항고용
제 품 명	흰점박이꽃무지유충 발효분말 정제(타블렛형)		
제 품 유 형	-	제 조 일 자	
		유통 기 한	
입 소 명	(주)자연과 효소	의 료 인	김정욱
소 재 지	부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호(해양생물산업육성센터)		
접수년월일	2019.10.29	검사완료일	2019.11.01

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결 과	판 정
납(mg/kg)		0.05	-
대장균		음성	-
대장균군		음성	-
비소(mg/kg)		0.04	-
수은(mg/kg)		0.02	-
이산화황(g/kg)		불검출	-
카드뮴(mg/kg)		0.01	-

* 비교 : 생산일자:2019.10.11
이산화황 : 정량한계(10 mg/kg) 미만은 불검출로 한다.

2019년 11월 01일

(주) 한국분석기술연구원장

• 이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 성분, 선전, 상업용, 민행사상의 분쟁 등에 사용할 수 없습니다.
 • 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시십시오.
 • 이 성적서는 KOLAS 인증과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 대영로 207(초량동) 해곡빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)
개정번호(1)
개정일자(2019.01.02)

4. 영양성분

흰점박이꽃무지유충발효분말 정제(타블렛형)

시 험 성 적 서

발급번호 : 참190014658

검수번호	1910-3415	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	흰점박이꽃무지유충 발효분말 정제(타블렛형)		
제품유형	재 조 일 자		
	유 통 기 한		
업 소 명	(주)자연과 효소	의 원 인	김정숙
소 재 지	부산광역시 기장군 일곡면 황계길 7, 기업지원동 308호(해양생물산업육성센터)		
접수년월일	2019.10.29	검사완료일	2019.11.11

시 험 결 과

시험항목	기준규격	결 과	1일영양성분기준치(%)
열량(kcal/100g)	-	405.9	-
나트륨(mg/100g)	-	43.8	2
탄수화물(g/100g)	-	81.5	25
조지방(g/100g)	-	5.9	11
조단백질(g/100g)	-	6.7	12
당류(g/100g)	-	12.9	13
붕해시험	-	30분 이내	-
성상	-	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연미색의 정제	-
수분(%)	-	2.8	-
트랜스지방(g/100g)	-	0.0	-
포화지방(g/100g)	-	1.1	7
회분(%)	-	3.1	-

* 비교 : 생산일자:2019.10.11

위 결과는 작성상 세밀한 검토를 필요로 하며, 분량 당 환산치가 변동되오니 포장 전 보내드린 성적서와 영양표시 관련정보 사이트 (<http://www.foodsafetykorea.go.kr>)를 참고하시어 재확인 후 사용하시기 바랍니다.

2019년 11월 11일

(주) 한국분석기술연구원



*이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의도적 이외의 상품 선전, 상업용, 민원사상의 분쟁 등에 사용할 수 없으며 법적효력이 없음
 *성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주시십시오.
 *이 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 대영로 267(소정동) 해양빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06) 개정번호(1) 개정일자(2019.01.02)

평가 항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
3	개발제품의 간 기능개선효능 검증 (혈액 및 간지질 함량측정)	20	대조군과 비교하여 유의적인 수치감소 확인	시험당 시료 수 3개 이상	논문 참조	대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 이상 통계적 유의성이 검증된 감소치

<논문 참조>

NO	논문명	저자	논문 구분	국내 외 구분	학술지명	학술 지 표 번호	출판 일자	페이지	학술지 임팩트 팩터	SCI 구분
1	유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	심소연, 안희영, 서권일, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	생명과학회지	28(7)	18.07 .30	827 ~ 834	0	BIOSCI (KCI)
2	Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향	심소연, 안희영, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	The Korean Society of Food Preservation	26(7)	19.12 .30	821 ~ 827	0	BIOSCI (KCI)
3	Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protactia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation	In-Sun Park Kang-Yeol Yu Young-Moo Choo Jiyoung Kim	국외 전문 학술 지	국외	Türk biyokimya dergisi = Turkish journal of biochemistry	45(2)	20.04 .24	201903 55 ~ 201903 56	.329	SCI

<동물실험 및 효능 검증>

[1] 알코올성 간 손상 동물 모델에서 약용곤충 발효분말 소재들의 간 기능 개선 효능 검증

1. 간 손상 관련 체내 지표 분석

- 혈청분석(AST, ALT 등) 등의 분석결과, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg 투여군 모두 AST, ALT, GGT, ALP에서 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 긍정적인 효과를 보였고, 특히 50 mg/kg 투여 군에서 가장 낮은 수치를 보임.

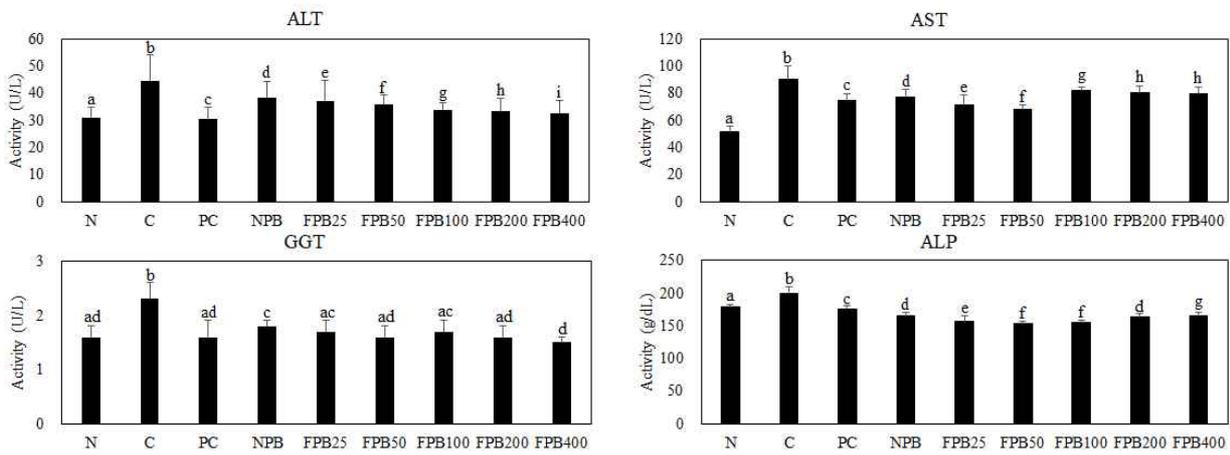


그림. 알코올 유발 간 손상 유발 흰쥐의 혈중 ALT, AST, ALP 및 GGT의 수준

- 간 조직을 고정 후 H&E염색 및 지방조직(Oil red 염색)을 통하여 형태학적 변화를 관찰한 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 100 mg/kg 식이급여군에서 정상군과 같이 지방구의 수가 줄어들고, 간 소엽 구조가 잘 유지되는 등 긍정적인 소견을 보임

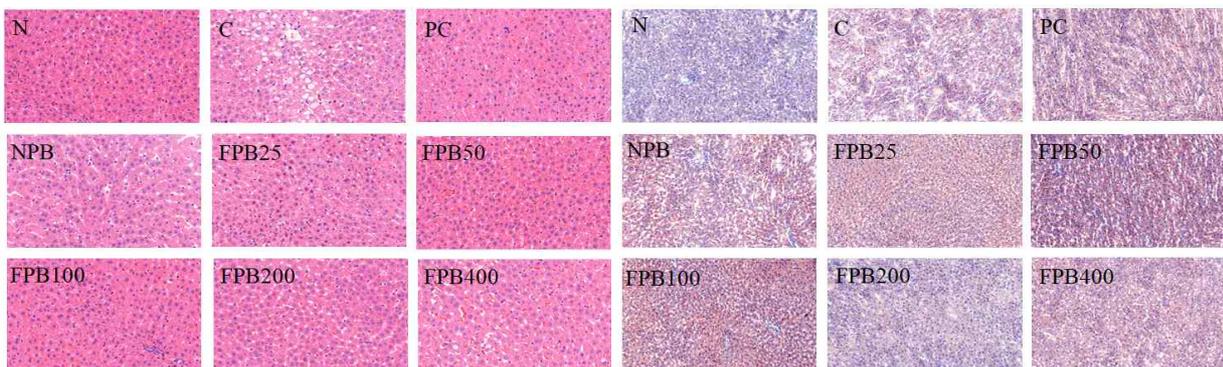


그림. 알코올 유발 간 손상 유발 흰쥐의 간 조직 관찰

- TBARS법 및 GSH 함량 등을 분석한 결과, 혈청, 간 조직 및 간분획물 모두 흰점박이꽃무지유충발효분말 50, 100 mg/kg 식이급여군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였고, 오히려 200, 400 mg/kg 식이급여군에서는 과산화지질 양이 증가함.
- 간 조직 및 혈청 내의 glutathione 함량 분석결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 100 mg/kg 식이급여군에서 가장 높은 glutathione 함량을 나타냄.
- 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군의 과산화지질억제능과 glutathione 함량이 증가함을 확인함.

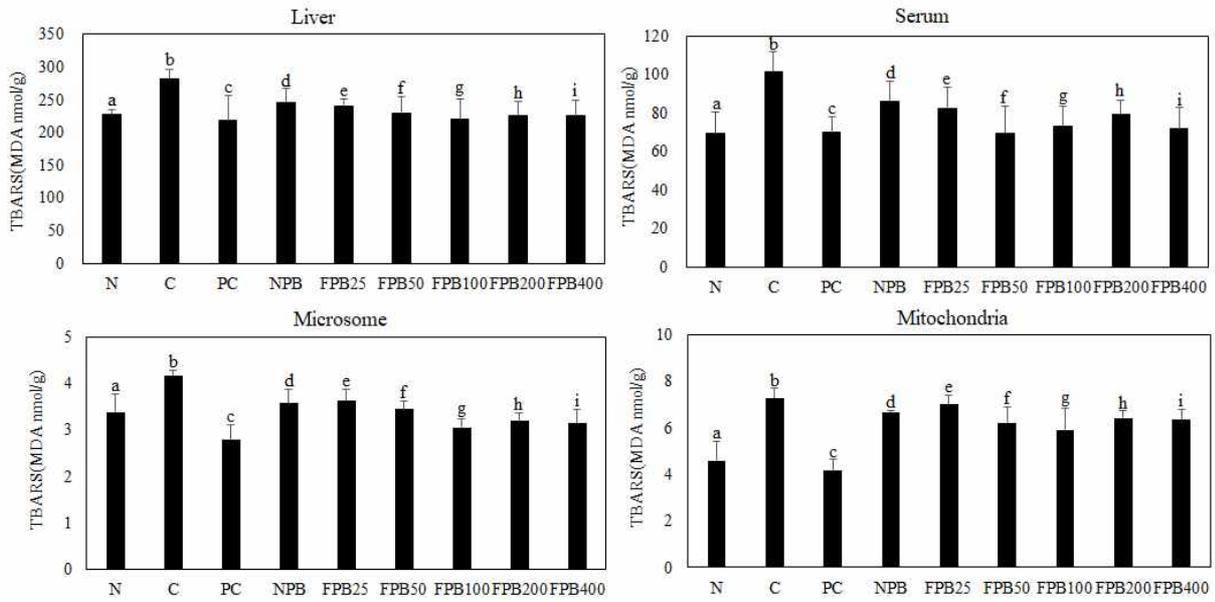


그림. 알코올 유발 간 손상 흰쥐의 간 및 혈중 TBARS 농도

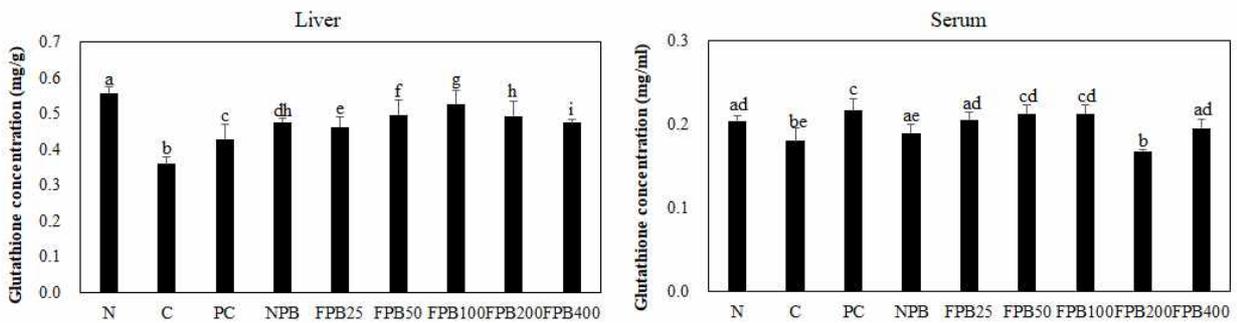


그림. 알코올 유발 간 손상 흰쥐의 글루타치온 농도

- 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 함량 측정 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말식이급여군에서 전반적으로 낮은 함량을 나타냄. 특히 100 mg/kg 식이급여군에서 가장 낮은 알코올 수치를 나타냄. 아세트알데하이드 함량 또한 알코올 함량 분석결과와 유사.
- 혈중 ADH 및 ALDH 활성 결과, ADH 활성은 25, 50, 100 mg/kg 투여 군에서 유의적으로 증가하였고, 특히 50 mg/kg에서 가장 높은 ADH 활성 수치를 나타냄. 혈중 ALDH 활성은 ADH 활성결과와 유사하고, 100 mg/kg 흰점박이꽃무지유충발효분말식이급여군에서 가장 높은 ALDH 활성수치를 보임.

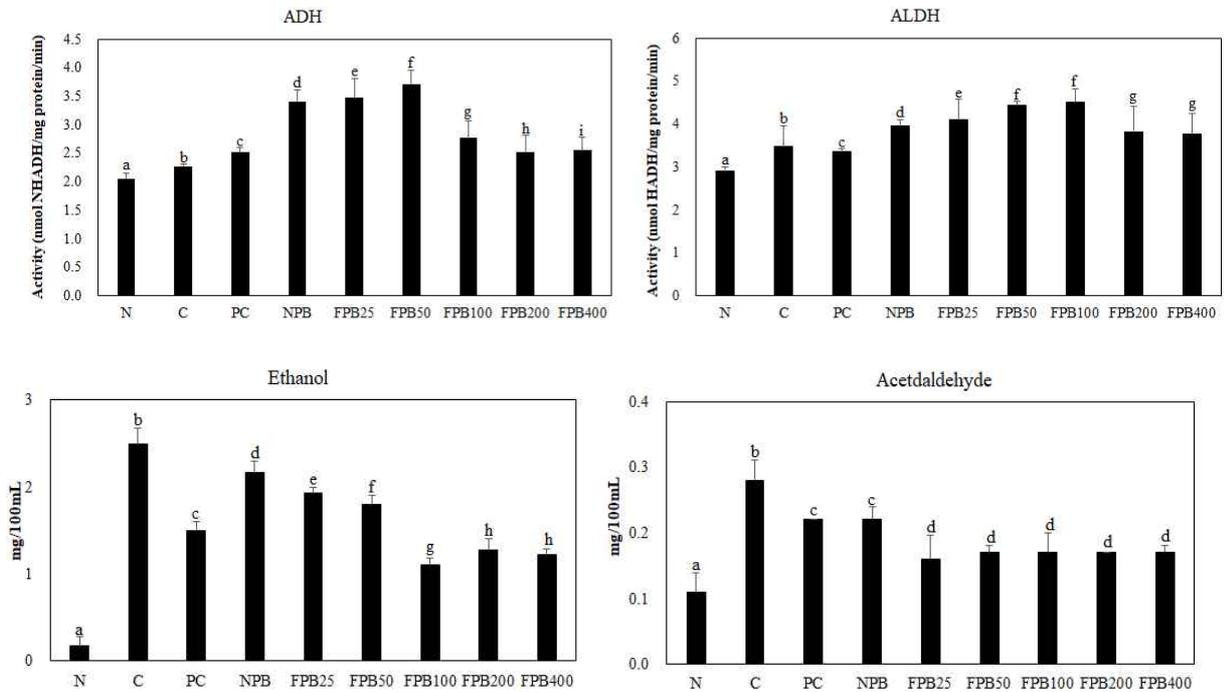


그림. 알코올 유발 간 손상 흰쥐의 혈중 ethanol, acetaldehyde, ADH 및 ALDH 농도

- 간 조직의 중성지질 농도 확인결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 간 조직의 중성지질 농도 회복에 긍정적인 영향을 보이며, 특히 100 mg/kg 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 가장 낮은 중성지질 농도를 보임.

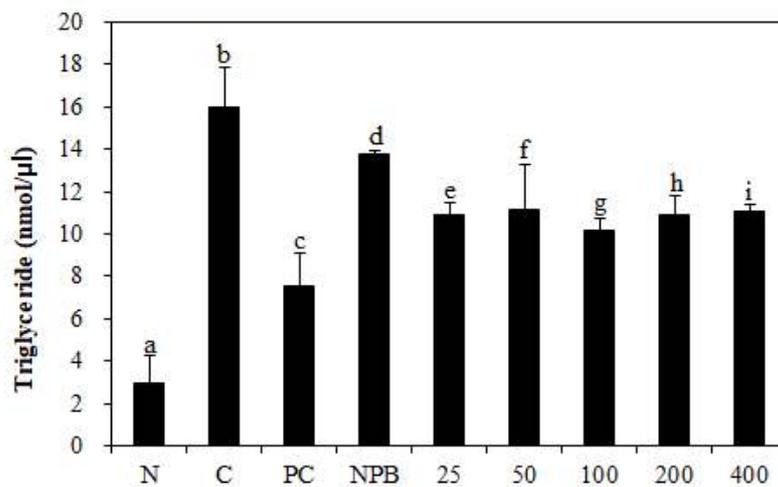


그림. 알코올 유발 간 손상 흰쥐의 간 조직 중성지질 농도

- 혈중 총 지질 농도 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 식이급여군에서 100 mg/kg 식이급여군까지 감소하는 경향을 보이며, 200, 400 mg/kg 식이급여군에서는 오히려 높은 수치를 보임.
- 혈중 유리지방산 및 중성지질 함량 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 100 mg/kg 식이급여군에서 낮은 농도를 보임.

표. 알코올 유발 간 손상 흰쥐의 혈중 콜레스테롤 농도

Group	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)
N	79.64±7.23a	28.04±0.78a	0.26±0.06a
C	87.61±15.12b	25.40±0.58b	0.34±0.07b
PC	72.08±6.12c	33.06±12.71c	0.23±0.07c
NPB	61.89±8.43d	44.87±7.20d	0.22±0.07c
FPB25	60.39±9.52e	48.19±8.15e	0.22±0.05c
FPB50	63.84±7.30f	52.79±10.49f	0.23±0.05c
FPB100	58.15±7.83g	49.16±9.64g	0.20±0.04d
FPB200	62.36±4.90h	49.35±4.63h	0.28±0.07e
FPB400	70.46±6.49i	43.26±7.68i	0.29±0.10e

[2] 동물모델 조직에서 간 기능 개선 효능 분석 (*in vivo*)

1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 alcohol에 의한 간 손상 억제 효능 분석

1) Alcohol에 의한 급성 간 손상 동물모델(Rat)에서 간 조직 내 축적된 콜라겐 함량을 RT-qPCR과 ELISA로 측정된 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말 추출물을 식이로 섭취한 실험군에서 콜라겐 축적량이 감소한 것을 확인.

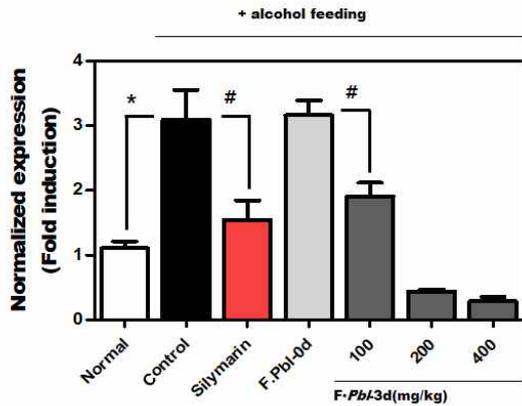


그림. 알코올 간 손상 유도 Rat serum 내에서 흰점박이꽃무지유충/*B. subtilis* 발효 열수 추출물 식이에 따른 1형 콜라겐 유전자의 발현량

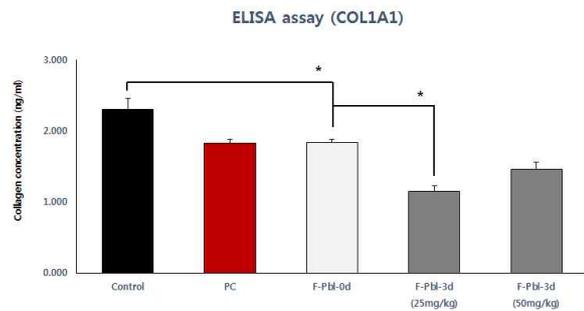


그림. 알코올 간 손상 유도 Rat serum 내에서 흰점박이꽃무지유충/*B. subtilis* 발효 열수 추출물 식이에 따른 1형 콜라겐 단백질 발현량

2) Alcohol에 의한 급성 간 손상 동물모델(Rat)의 혈청에서 염증반응을 일으키는 사이토카인들 즉, TNF- α , interleukin (IL-1 β) 및 IL-6를 ELISA로 분석한 결과, TNF- α 및 IL-6의 발현량 차이는 없었지만 IL-1 β 의 발현량은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인. 이는 양성대조군인 silymarin과 유사한 경향을 가지는 것을 확인.

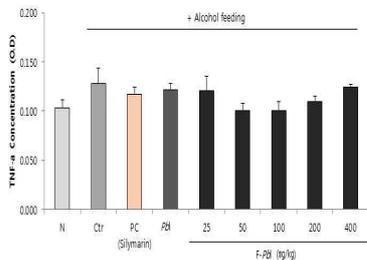


그림. 알코올 간 손상 유도 Rat serum 내에서 흰점박이꽃무지유충/*B. subtilis* 발효 열수 추출물 식이에 따른 TNF- α 의 발현량

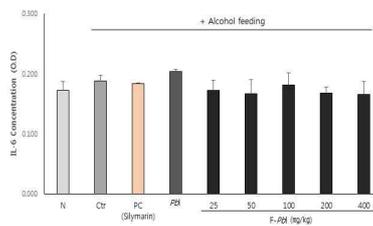


그림. 알코올 간 손상 유도 Rat serum 내에서 흰점박이꽃무지유충/*B. subtilis* 발효 열수 추출물 식이에 따른 IL-6의 발현량

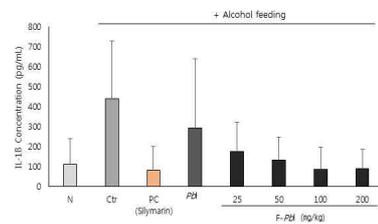


그림. 알코올 간 손상 유도 Rat serum 내에서 흰점박이꽃무지유충/*B. subtilis* 발효 열수 추출물 식이에 따른 IL-1 β 의 발현량

2. 갈색거저리유충/효모 발효복합소재의 orotic acid에 의한 간 손상 억제 효능 분석

- Orotic acid 비알코올성 간 손상 유도 Rat 동물모델에서 갈색거저리유충발효복합소재의 에탄올추출물은 식이에 따른 MTP (Microsomal triglyceride transfer protein, 중성지방 운반단백질) 및 PDI (Protein disulfide isomerase) 발현량을 확인한 결과, 발효전에 비해 발효 후의 MTP 및 PDI 활성이 증가한 것을 확인.

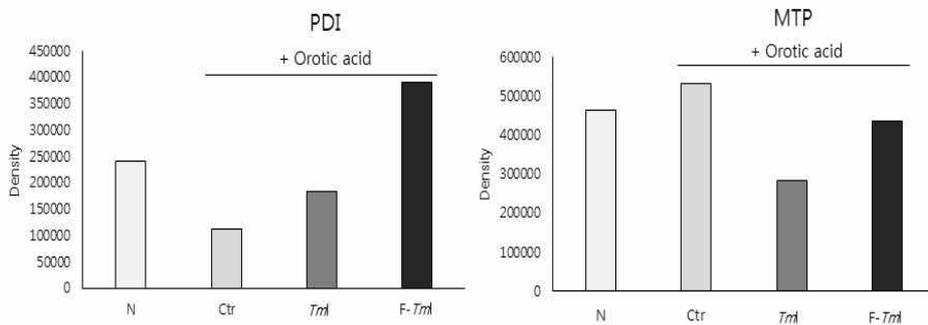
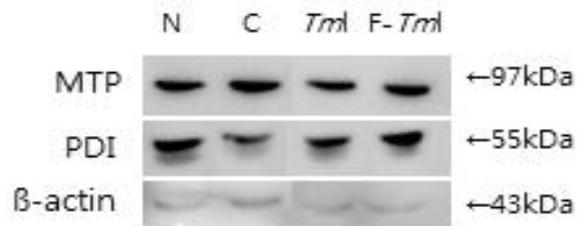


그림. Orotic acid 비알코올성 간 손상 유도 Rat liver tissue에서 갈색거저리유충 *S. cerevisiae* 발효 100% EtOH 추출물 식이에 따른 MTP 및 PDI의 protein 발현율.

[3] 대사물질 성분들의 간 기능 개선 및 효능 분석 - 흰점박이꽃무지유충발효분말 소재를 분석

1. 최적 발효복합 소재의 발효 전/후 대사물질 비교 분석.

(HRMAS를 통해 동정된 다양한 대사산물들을 동정하고 대조군과의 비교분석을 위해 O-PLS-DA 실시)

- O-PLS-DA 분석을 통한 S-polt 결과 발효 전/후의 함량 차이가 두 그룹으로 구분 짓는데 큰 영향을 미침.
- 화합물 성질에 따라 발효 전 추출물과 비교해서 발효 후 추출물 ES- (음이온 charge)에서는 23개의 대사물질이 up-regulation 된 것을 확인, ES+ (양이온 charge)에서는 51개의 대사물질이 up-regulation된 것을 확인.
- Up-regulation된 대사산물 중 기능적으로 간 기능 개선에 영향을 미칠 것으로 판단되는 대사물질로는 항생물질의 일종인 surfactin C, 캡사이신 일종인 homodihydrocapsaicin, 사포닌일종인 notoginsenoside B가 발효전에 비해 발효 후에 증가됨.

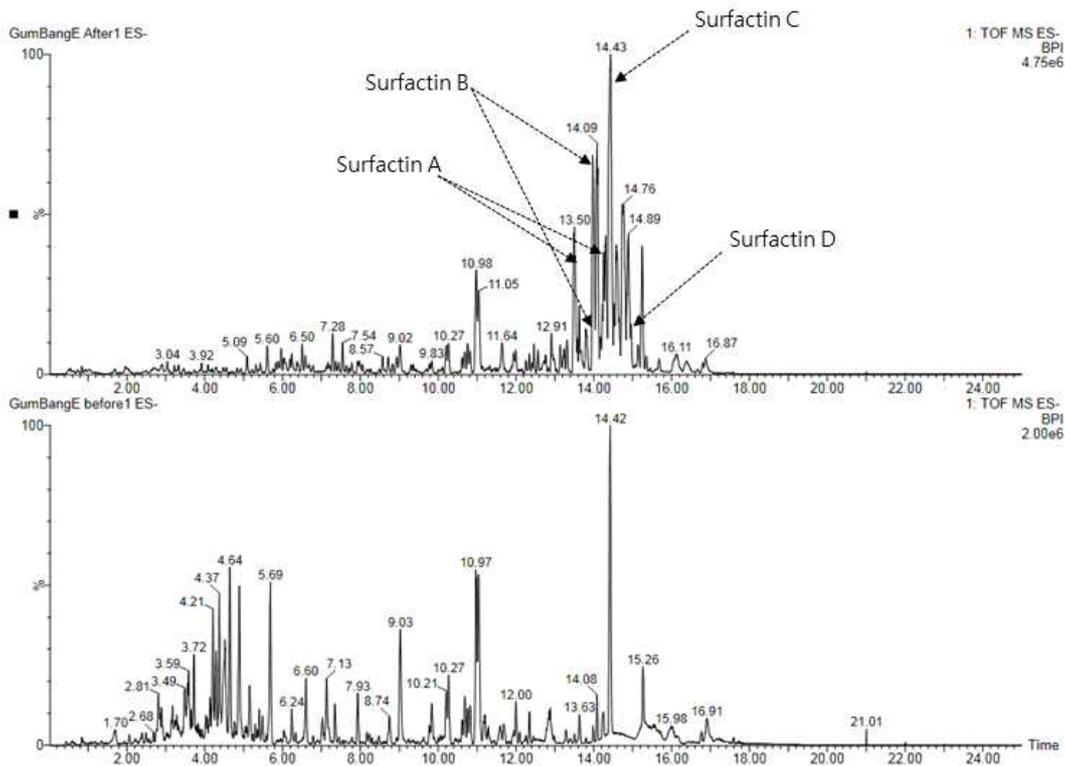


그림. 흰점박이꽃무지유충분말의 발효 전후 ES- (음이온)의 대사물질 변화

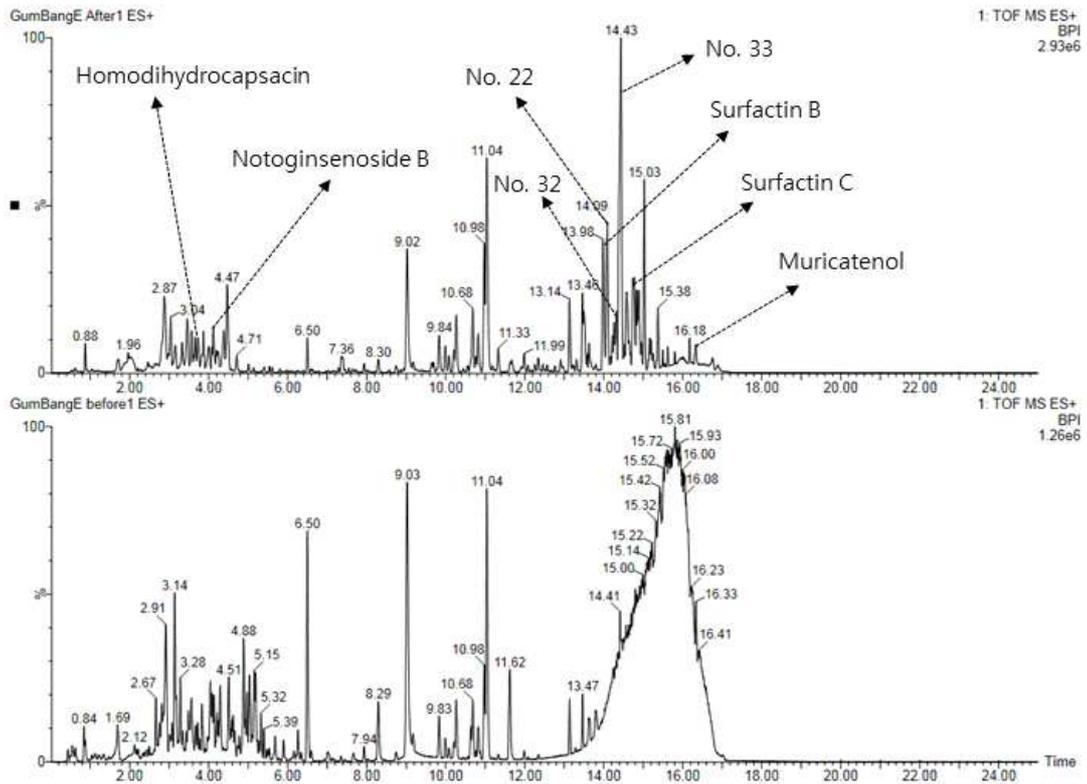


그림. 흰점박이꽃무지유충분말의 발효 전후 ES+ (양이온)의 대사물질 변화

2. 최적 발효복합 소재의 증가된 대사물질(들)의 간 기능 개선 효능 및 기전 분석

- 항성유화 효능과 연계될 것으로 추측되는 notoginsenoside B 그리고 항염증 효능과 연계될 것으로 추측되는 homodihydrocapsacin은 합성 외에는 구입에 어려운 문제점이 있음.
- 따라서 상업적으로 구입 가능한 항염증 효능이 있을 것으로 추측되는 surfactin C를 구입하여 간 세포의 항성유화 및 항산화/항염증 효능 분석중.
- 선결적인 결과는 surfactin C는 세포적 수준에서 nitric oxide 함량을 줄임.

[4] 식·약용근충/발효미생물 복합소재의 간 기능 개선 효능 분석 - 세포실험

1) 표준공정에 의해 생산된 최종제품의 간 기능 개선 효능 분석

가) 인체 간 성상 세포의 세포증식 억제능 분석

① 표준공정에 의해 생산된 최종제품의 독성평가

실험에 사용할 시료의 안전성 평가를 위하여 인간 간 성상세포(human hepatic stellate cell line, LX-2)에서 세포 독성 여부를 평가하였다. 최종제품을 DMSO에 용해하여 MTT assay를 이용하여 세포독성평가를 실시하였다. LX-2 세포에 각 시료를 농도별(0, 10, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 안전성을 평가한 결과 그림 1에서와 같이 고농도인 100 µg/mL 까지 세포 독성이 나타나지 않아 시료의 안전성이 높음을 확인하였다.

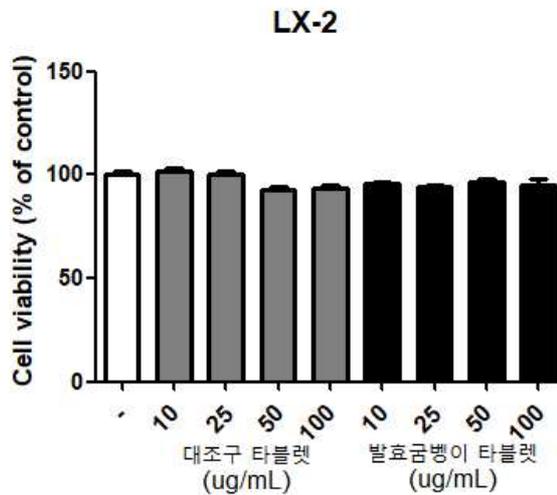


그림 1. 간 성상 LX-2 cell에 대한 최종제품의 독성평가

② TGF-β1에 의해 간 성상 (LX-2) 활성 억제능 분석

간 섬유화와 밀접한 관련이 있는 인간 간 성상세포(LX-2)에 간 섬유화 촉진 사이토카인인TGF-β1 처리에 의해 세포 증식을 유도한 후 최종제품을 농도별로 처리하여 억제하는 효과를 확인하였다. 인간 간 성상세포인 LX-2 cells에 TGF-β1 (HSC를 활성화시키고 간 섬유화를 유발)을 처리하면 대조군(정상군)에 비해 각각 약 1.39배의 간 섬유화가 촉진되었다. 그러나, 흰점박이꽃무지유충발효분말이 함유된 타블렛의 모든 농도 처리 군에서 TGF-β1에 유도된 간 섬유화 성장을 억제하는 것을 확인 하였다 (그림 2). 한편, 대조구 타블렛의 50, 100 ug/mL 군에서도 TGF-β1 처리군 보다 간 섬유화 성장의 저해능력을 보였지만 같은 농도 발효곰팡이 타블렛보다 저해능력이 떨어지는 것을 확인하였다.

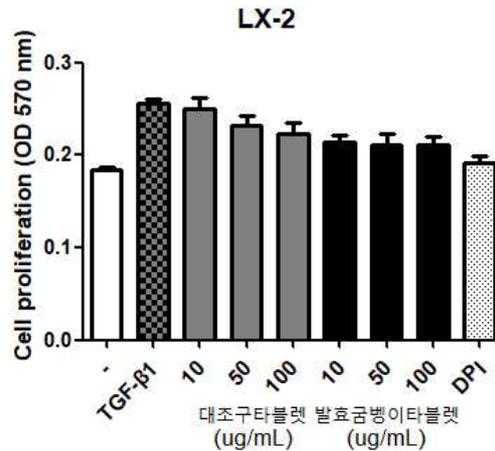


그림 2. 최종제품의 간 성상 (LX-2) 활성 억제능 분석

나) 인체 간 성상 세포의 apoptosis 유도활성 분석

① 인체 간 성상 세포의 apoptosis 유도 활성 분석-카스파아제(caspase) 활성 측정

세포사(apoptosis) 유발의 전반적인 과정에서 중요하다고 알려진 카스파아제-3(caspase-3)과 카스파아제-7(caspase-7)의 활성 조사하기 위하여 H₂O₂ 유도된 LX-2 cell에서 최종제품을 농도별로 처리하여 caspase3/7 활성을 측정하였다. 그 결과 그림에서 보이는 것과 같이 apoptosis 유발의 effector caspase인 caspase-3/7이 H₂O₂에 의해 활성이 증가 되었으며 흰점박이꽃무지유충발효분말이 함유된 타블렛 처리 시 농도별로 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 특히, 고농도 (100 ug/mL) 처리군에서 H₂O₂처리군 대비 48.3% 감소효과를 보였다. 흰점박이꽃무지유충발효분말이 함유된 타블렛은 caspase-3/7의 활성 저해가 apoptosis 유발에 직접적인 관련이 있음을 보여주었다.

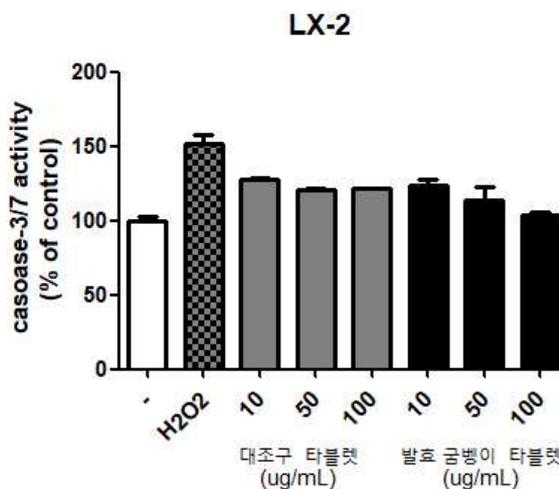


그림 3. H₂O₂ 유도된 간 성상 LX-2 cell에서 카스파아제 (Caspase) 활성 측정

다) 분자수준에서의 간 섬유화 억제효능 기전 분석

① COL I α1(collagen type I α1 chain) 유전자 발현 확인

간 섬유화는 반복적인 간 손상에 대한 상처 회복의 반복으로 인해 간 세포가 손상되어 간경변증으로 이어진다. 급성 간 손상 후 세포자멸사(apoptosis) 또는 세포 괴사(necrosis)에 빠진 간 세포는 새로 재생된 간 세포에 의하여 대체되며 세포외기질의 축적은 미미하다. 반면 만성 간 손상이 반복되면 간 세

포 재생은 실패하며 간 세포는 콜라겐과 같은 세포외기질(ex. COL I α 1, α -SMA 등)로 대체된다. 본 연구에서는 TGF- β 1 에 의해 활성화된 간성상세포의 콜라겐 mRNA의 발현량을 Real-Time PCR 분석으로 확인하였다. 그 결과, LX-2 세포에서 TGF- β 1 처리 군은 6배 증가하였으며 흰점박이꽃무지유충발효분말이 함유된 50 ug/mL 처리 군이 COL I α 1 mRNA 발현을 가장 효과적으로 억제하였다.

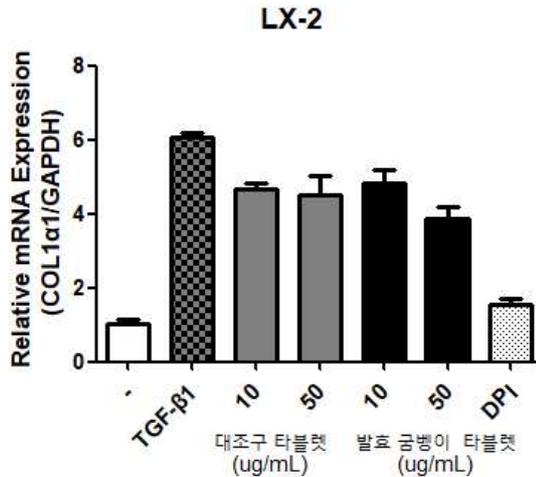


그림 4. TGF- β 1 유도된 LX-2 cell에서 COL I α 1 mRNA 측정

② TGF- β 1에 의해 유도되는 Smad 분자 활성화

TGF- β 1은 세포 표면의 수용체에 결합하여 Smad 전사인자를 포함한 다양한 신호분자를 활성화시키고, 이를 통하여 세포외기질 (extracellular matrix)을 축적한다. 따라서 최종 제품이 활성화된 간 성상에 의해 증가하는 Smad 분자의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 western blot 분석을 통하여 Smad2와 Smad3의 인산화를 단백질 발현량을 비교하여 평가하였다. 그 결과, α -SMA 세포외 기질이 합성되어 유도된 간 섬유화를 발효 곰팡이 타블렛 50 ug/mL농도에서 억제하였다. 또한 TGF- β 1에 의해 유도된 Smad2 와 Smad3 인산화를 발효 곰팡이 타블렛 군에서 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다. 이를 통하여 흰점박이꽃무지유충발효분말이 함유된 시제품은 간 기능 개선 효과가 있다는 것을 확인하였다.

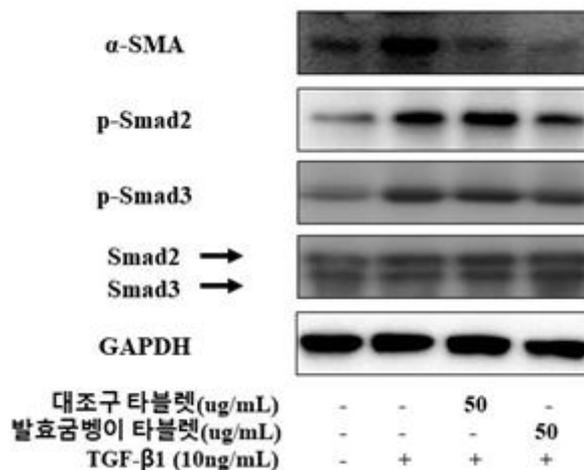


그림 5. TGF- β 1 유도된 LX-2 cell에서 SMAD 기전 단백질 발현 평가

2) 최적 발효 대사물질 성분들의 간 기능 개선 및 효능 분석

가) 최적 발효복합 소재의 발효 전/후 대사물질 비교 분석 (OPLS-DA 분석)

① UPLC/MS 측정 후 직교부분최소자승판별분석(OPLS-DA)으로 대사물질 비교(음이온 ES-, up-regulation)

발효 전/후 군집 패턴을 보이는 변인에서 OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis)를 시행하여 발효 전/후 그룹 간의 명확한 판별을 평가하였다. OPLS-DA는 종속변수로서 각 그룹의 정보를 부여하여 판별에 기여하는 변수의 영향력을 높이는 supervised 분석법이다. 먼저, 발효 전/후 조건별 score space에서 두 그룹 간 명백한 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 각 그룹은 다른 색상으로 표시되며 그룹의 분리는 t [1]에서 쉽게 볼 수 있다. to [1] 점수 값은 각 클래스 내의 변동을 보여준다. 두 그룹 간의 변이는 발효에 의한 생물학적 변이 의해 야기되는 것으로 판단된다. OPLS-DA의 score plot 으로부터 각 그룹 간 가장 확연하게 차이 나는 대상을 추출하고자 cut off 수치를 covariance p[1] \geq |0.05| 이면서 p(corr)[1] \geq |0.5|로 정하였다. OPLS-DA를 통한 S-plot 결과 발효 전/후의 함량 차이가 두 그룹으로 구분 짓는데 큰 영향을 끼친 것으로 확인되었다. 이로부터 확보된 대사체는 보다 신뢰성 있는 검출을 위하여 VIP(Variable Importance on Projection) 값이 1.0 이상임을 확인하였다.

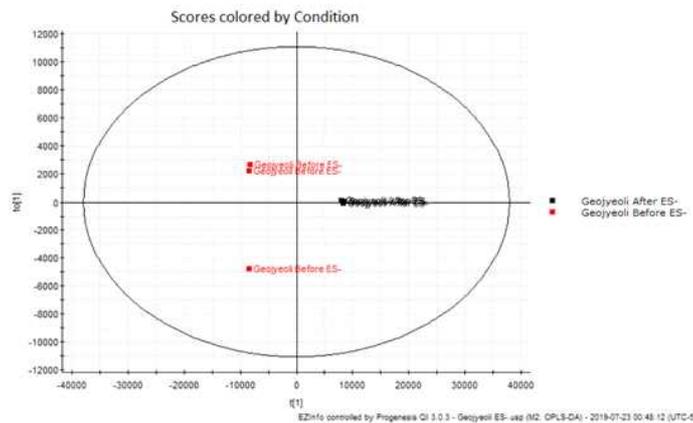


그림 6. A score plot showing group separation in an OPLS-DA score space (ES-)

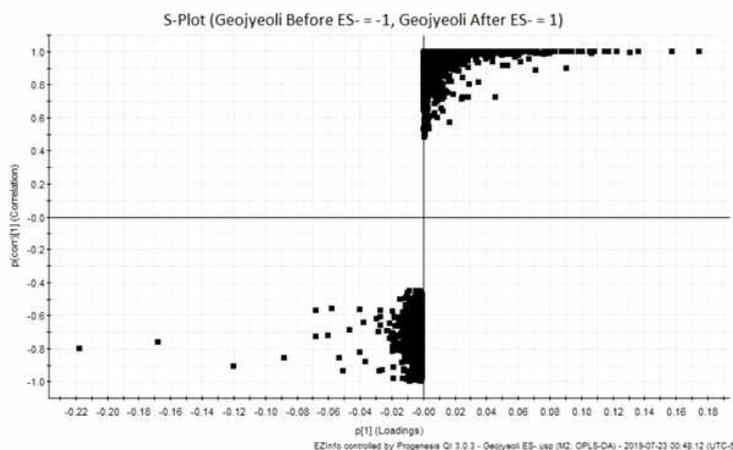


그림 7. S-plot derived from OPLS-DA for before fermentation and after fermentation with value of $p \geq |0.05|$ 이면서 $p(\text{corr}) \geq |0.5|$, which showed the significant different metabolites for each group (ES-)

UPLC-QTOF MS로 측정하여 얻어진 고해상도 분자량, 머무름 시간, MS/MS fragmentation 정보를 바탕으로 발효 전/후 대사체를 동정하였다. 갈색거저리 및 효모균 발효전/후 추출물의 대표적인 UPLC/MS 크로마토그램을 그림8에 나타내었다. 발효 전 추출물과 비교해서 발효 후 추출물에서 여러 대사산물이 up-regulation

된 것을 확인하였고 발효 전/후에서 선정된 대사물은 불포화지방산성분인 Ricinoleic acid임을 확인하였다. Ricinoleic acid 는 12-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid라고 불리는 불포화 오메가 9 지방산으로, 항염증 효과와 소염작용이 알려졌으며 간 기능 효과적으로 도움을 줄 것이라고 유추된다.

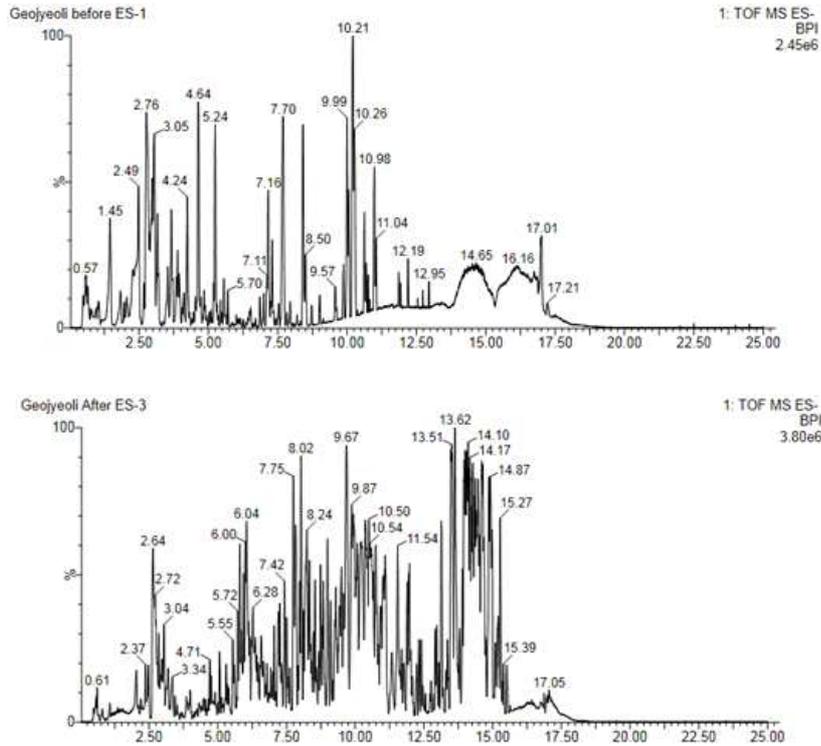
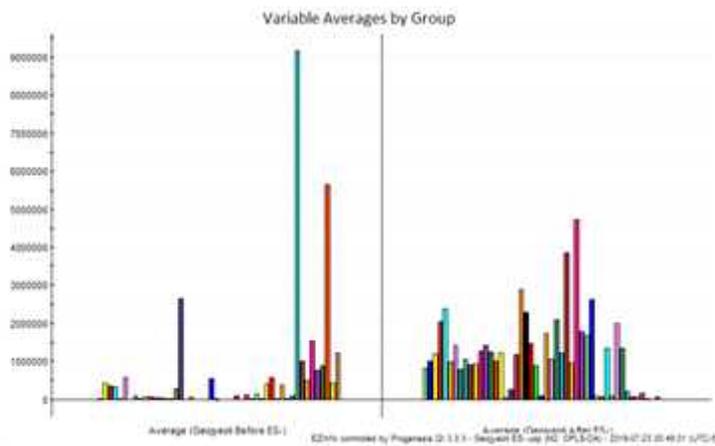


그림 8. Representative BPI chromatograms of after fermentation (up) and before fermentation (down) (ES-)



ES-	Component name	Neutral mass (Da)	Total Fragments Found	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Observed RT (min)	Detector counts	Response
발효 전	Ricinoleic acid	298.2508	2	298.2502	297.243	11.23	7722	6244
발효 후	Ricinoleic acid	298.2508	1	298.2504	297.2432	11.41	16173	13238

그림 9. The significant different metabolites for each group (before vs. after), ES-

3) 후보 대사물질(들)의 간 기능 개선 효능 및 기전 분석

① 간 성상에서 흰점박이꽃무지유충발효 대사물질 (r-PGA)의 독성평가

흰점박이꽃무지유충발효 대사물질인 r-PGA의 간 성상세포(human hepatic stellate cell line, LX-2)에서 세포 독성 여부를 MTT assay를 이용하여 평가하였다. LX-2 세포에 각 시료를 농도별(0, 10, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 세포독성을 평가한 결과 그림 10에서와 같이 최고농도인 100 µg/mL 까지 95% 이상의 생존율을 보이므로 세포독성이 없는 것을 확인하였다.

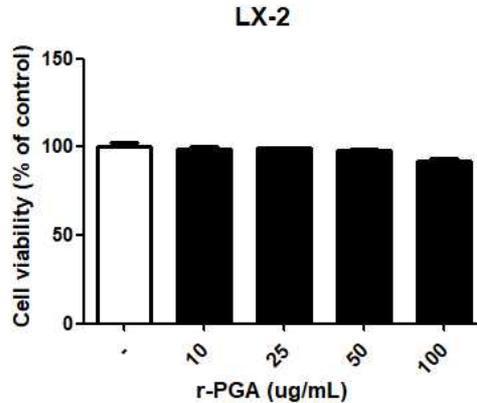


그림 10. 간 성상 LX-2 cell에 대한 흰점박이꽃무지유충발효 대사물질 (r-PGA)의 독성평가

② 흰점박이꽃무지유충발효 대사물질 (r-PGA)의 COL I α1(collagen type I α1 chain) 유전자 발현에 대한 영향

TGF-β1는 간성상세포의 가장 강력한 섬유화 촉진 사이토카인이며 간 성상 자체가 TGF-β1의 주 생산원으로 포함된 세포외기질의 생성을 촉진시킨다. 본 연구에서는 TGF-β1에 의해 활성화된 간성상세포의 콜라겐 mRNA의 발현량을 Real-Time PCR 분석으로 확인하였다. 그 결과, LX-2 세포에서 TGF-β1 처리 군은 약 15배 증가하였으며 r-PGA 모든 처리 군(10~100 µg/mL)이 COL I α1 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.

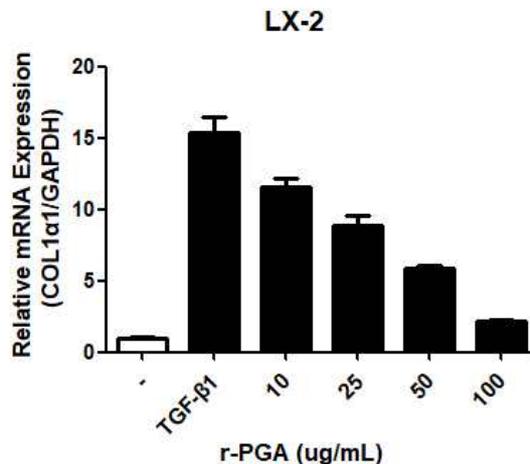


그림 11. r-PGA의 COL I α1(collagen type I α1 chain) 유전자 발현에 대한 영향

③ 흰점박이꽃무지유충발효 대사물질(r-PGA)의 TGF-β1에 의해 유도되는 Smad 신호전달에 대한 영향

TGF-β1는 간성상세포의 강력한 섬유화 촉진 사이토카인으로 간 성상 자체가 TGF-β1의 주 생산원으로 collagen을 포함한 세포외기질의 생성을 촉진한다. TGF-β1는 type II receptor와 결합하여 type I receptor를 인산화시키고 이는 곧 Smad2와 Smad3와 접촉하여 이들의 인산화를 유도한다. 본 연구에서는 활성화된 TGF-β1의 SMAD 신호전달을 통하여 SMAD2/3의 인산화를 유도하였으며 r-PGA 100 µg/mL농도에서 인산화를 억제하는 것을 확인하였

다. 이러한 신호전달을 통해 증가된 collagen과 α -SMA 세포외 기질의 생성을 감소시켰다.

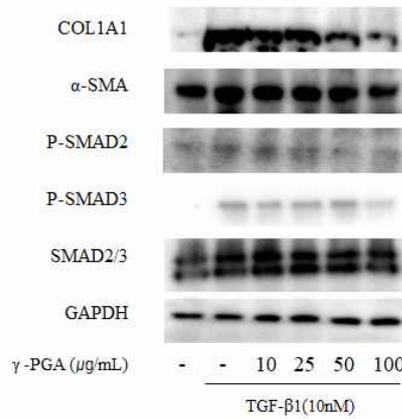
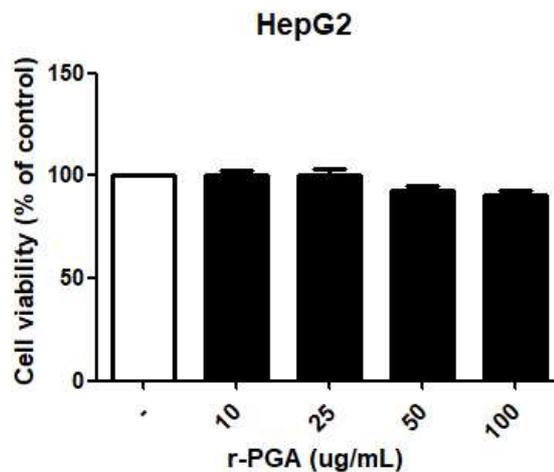


그림 12. r-PGA의 SMAD 기전 단백질 발현 평가

④ H₂O₂ 세포독성에 대한 흰점박이꽃무지유충발효 대사물질 (r-PGA)의 간 세포 보호효과
H₂O₂에 의해 유도된 간 세포 (HepG2)의 세포독성에 대한 r-PGA의 보호효과를 조사하기 위하여 세포생존율을 측정하였다. HepG2세포에서 r-PGA는 10~100 μ g/mL 농도에서 생존율 95% 이상을 나타내어 세포독성이 없음을 확인하였다. H₂O₂유도된 간 세포는 control군 대비 약 36.2%의 생존율이 감소되었으며 r-PGA 100 μ g/mL 처리군에서 H₂O₂ 단독처리군 대비 19.7%를 회복시켜 간 세포 보호효과를 확인하였다.



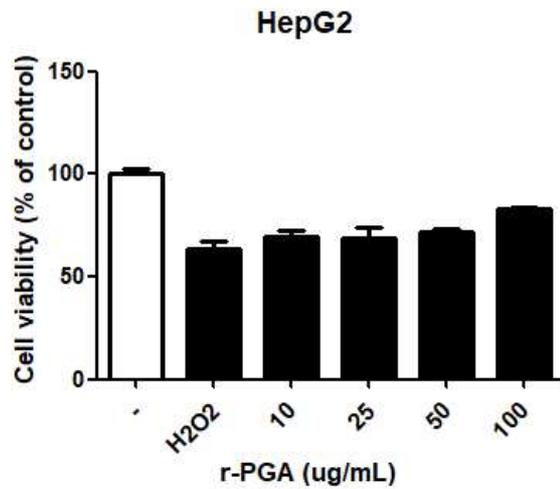


그림 13. H2O2 유도된 HepG2에 대한 r-PGA의 세포보호효과

⑤ ROS 생성에 대한 흰정박이꽃무지유충발효 대사물질 (r-PGA)의 효과

활성산소종(Reactive oxygen species : ROS)은 산소를 이용한 산화과정 중에 발생하며 인체의 생화학적 물질들과 반응하여 세포에 상해를 주고 신호전달체계에 영향을 미쳐 세포사멸을 유도하기도 한다. ROS의 축적은 인체에 산화적 스트레스를 유도하여 암, 노화, 심혈관질환, 간질환, 당뇨병을 일으키기도 한다. 간은 인체 내에서 영양소의 대사, 해독작용 기능을 담당하는 중요한 조직으로 간 손상은 알코올, 바이러스에 의한 감염, 약물의 오남용, 산화적 스트레스에 의한 ROS의 생성 등 여러 가지 원인이 될 수 있다. 본 연구에서는 H2O2에 의해 유도된 활성산소에 대한 r-PGA의 억제 효과를 확인하기 위하여 DCF fluorescencnt의 생성량을 형광분석기를 이용하여 측정하였다. H2O2 단독처리군에서는 ROS 생성이 약 638.4%로 증가하였다. r-PGA 모든 처리군에서 농도 의존적으로 감소시켰고, 100 ug/mL 처리군에서는 ROS 생성을 287.2%로 감소시켰다.

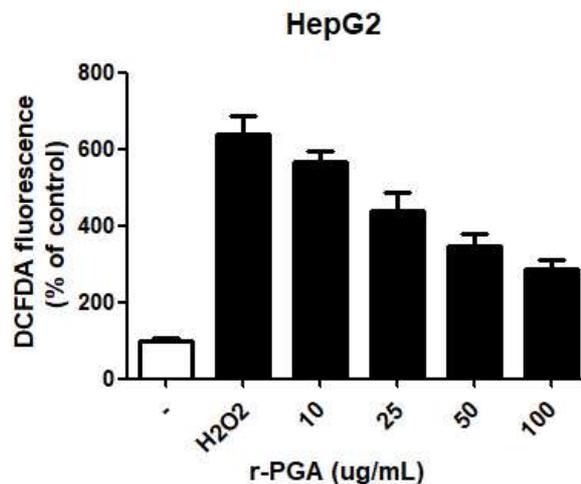


그림 14. r-PGA의 ROS억제 효과

평가 항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
4	개발제품 출시 (음료 및 타정형 제품)	20	3건	3건	제품출시	제품출시

출시건수	개발제품	유형	비고
[제품1]	곰메이트	식품-혼합음료	
[제품2]	곰뱅이환	식품-기타가공품-환제품	
[제품3]	더이엔멀티비타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)	
[제품4]	케이뱅크	식품-기타가공품-타정(정제)	



※ 제품출시확인서 첨부

[제품1] 굼메이트 (식품-혼합음료) 출시

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과 제 명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선물질의 발굴 및 식품 산업화			
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	엠에스글로벌바이오(주)	
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~20년 12월(총 3년 6개월)	
총 정부출연금	1,310,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	()	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	(√)	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
굼메이트		혼합음료	2018.10	80
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

18 년 12 월 21 일

연구책임자 : 김 인덕 (서명 또는 인)



[제품2] 곰뱅이환 (식품-기타가공품-환제품) 출시

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과 제 명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선물질의 발굴 및 식품 산업화			
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	엠에스글로벌바이오(주)	
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~21년 06월(총 4년)	
총 정부출연금	1,310,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	()	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	(√)	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
곰뱅이환		기타가공품	2020.11	85
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

20 년 12 월 22 일

연구책임자 : 김 인덕 (서명 또는 인)

[제품3] 더이엔멀티비타민미네랄 (건강기능식품-비타민-타정(정제)) 출시

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화			
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	-	
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~ 21년 06월(총 4년)	
총 정부출연금	1,268,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	()	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	(✓)	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
더이엔 멀티비타민미네랄		건강기능식품 비타민 금빙이발효분말 함유	20.09.22	75
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 09 월 22 일

연구책임자 : 김정욱 (서명) 푸는인

[제품4] 케이빙이 (식품-기타가공품-타정(정제)) 출시

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화			
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	-	
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~ 21년 06월(총 4년)	
총 정부출연금	1,268,000,000원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(<input checked="" type="checkbox"/>)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
케이빙이		기타가공품	2021.06	80
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2021년 06월 24일

연구책임자 : 김정욱 (서명) (인)

평가 항목 (주요성능 Spec)	전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준- 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
5 개발제품 관련 매출 발생	10	50백만원 이상	50백만원 이상	-	관련 계산서

개발제품 관련 매출

매출연도	개발제품	유형	매출액(원)
2018년	굼메이트	식품-혼합음료	337,844
2019년	굼메이트	식품-기타가공품-환제품	16,107,658
2020년	굼메이트	건강기능식품-비타민-타정(정제)	47,109,522
2020년	더이앤멀티비타민미네랄	식품-기타가공품-타정(정제)	15,400,000
합 계			78,955,024

※ 개발제품별 매출확인서 첨부

2018년 굼메이트 (식품-혼합음료) 매출

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과 제 명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선물질의 발굴 및 식품 산업화			
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	엠에스글로벌바이오(주)	
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~21년 06월(총 4년)	
기업 정보	기업 매출 총액 : 2,149,557,103 원			
관련 실적	특허(), 품종(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(<input checked="" type="checkbox"/>)			
	명칭(번호) : 굼메이트			
	기술실시 명칭 : 굼벵이 함유 식품(혼합음료) 출시 및 매출			
해당제품의 매출 실적				
제품명	제품사진	매출액(원)		해당 과제의 매출액 기여율(%)
굼메이트		국 내	337,844	80
		국 외	0	
* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.				

18 년 12 월 31 일

연구책임자 : 김 인 덕 (서명 또는 인)

2019년 굼메이트 (식품-혼합음료) 매출

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과 제 명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선물질의 발굴 및 식품 산업화		
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	엠에스글로벌바이오(주)
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~21년 06월(총 4년)
기업 정보	기업 매출 총액 : 1,791,781,541 원		
관련 실적	특허(), 품종(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(<input checked="" type="checkbox"/>)		
	명칭(번호) : 굼메이트		
	기술실시 명칭 : 굼메이 함유 식품(혼합음료) 출시 및 매출		
해당제품의 매출 실적			
제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)
굼메이트		국 내	80
		국 외	
<p>* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.</p>			

19 년 12 월 30 일

연구책임자 : 김 인 덕 (서명 또는 인)

2020년 굼메이트 (식품-혼합음료) 매출

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과 제 명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선물질의 발굴 및 식품 산업화		
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	엠에스글로벌바이오(주)
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월~21년 06월(총 4년)
기업 정보	기업 매출 총액 : 1,335,208,456 원		
관련 실적	특허(), 품종(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(√)		
	명칭(번호) : 굼메이트		
	기술실시 명칭 : 굼벵이 함유 식품(혼합음료) 출시 및 매출		
해당제품의 매출 실적			
제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)
굼메이트		국 내	47,109,522
		국 외	0
<p>* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등) 상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.</p>			

20 년 12 월 31 일

연구책임자 : 김 인 덕 (서명 또는 인)

2020년 더이앤멀티비타민미네랄 (건강기능식품-비타민-타정(정제)) 매출

<첨부4>

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화		
주관연구기관	(주)자연과 효소	참여기관	-
연구책임자	김정욱	연구기간	17년 06월 ~ 21년 06월(총 4년)
기업 정보	기업 매출 총액 : 114,364,500원 (2020년 기준)		
관련 실적	특허(<input checked="" type="checkbox"/>), 품종(<input type="checkbox"/>), 소프트웨어(<input type="checkbox"/>), 디자인(<input type="checkbox"/>), 상표(<input type="checkbox"/>), 기타(상세 <input type="checkbox"/>)		
	명칭(번호) : 흰점박이유충(금붕어) 발효물(특허등록 : 제10-2253265호)이 함유된 멀티비타민(건강기능식품)의 출시 및 판매		
	기술실시 명칭 : 멀티비타민(건강기능식품)의 출시		
해당제품의 매출 실적			
제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)
더이앤멀티비타민미네랄		국내	15,400,000
		국외	-
			80%
<p>* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출진표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등)</p> <p>상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.</p>			

2020년 12월 31일

연구책임자 : 김정욱 (서명 또는 인)

평가 항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
6	특 허	10	-	3 이상	-	특허 출원/등록

연구개발성과 - 특허 출원(6건) 및 등록(4건) 목록

출원 NO	특허명	출원인	출원일	출원 번호	등록 NO	등록인	등록일	등록 번호	발명자
1	발효곰팡이 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	동아대학교 산학협력단	18.04.20	10-2018-0045905	1	동아대학교 산학협력단 (주)자연과효소	20.02.25	10-2083275	조영수, 서권일, 안희영, 김정욱, 박규림
2	발효갈색거저리 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	동아대학교 산학협력단	18.05.31	10-2018-0062887	2	동아대학교 산학협력단 (주)자연과효소	19.11.19	10-2048309	조영수, 서권일, 안희영, 김정욱, 박규림
3	발효 흰점박이꽃무지 유충 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물	(재)전주농생명소재연구원	18.08.24	10-2018-0098974	3	(주)자연과효소	20.04.01	10-2098079	추영무, 최영지, 박인선, 손유경, 안희영
4	폴리감마글루탐산 함량이 증진된 흰점박이꽃무지 유충 발효물의 분말의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 폴리감마글루탐산 함량이 증진된 흰점박이꽃무지 유충 발효물의 분말	(주)자연과효소	18.12.28	10-2018-0171975	4	(주)자연과효소	21.05.12	10-2253265	김정욱, 박규림, 조영수, 안희영
5	발효갈색거저리추출물을 유효성분으로함유하는간 기능개선용조성물	(재)전주농생명소재연구원	20.12.02	10-2020-0166789					
6	쌍벌귀뚜라미추출물의발효물을유효성분으로함유하는항염증및주름개선용 조성물	(재)전주농생명소재연구원	20.12.02	10-2020-0166781					

※ 특허등록증 4건 첨부

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2098079 호
Patent Number

출원번호 제 10-2018-0098974 호
Application Number

출원일 2018년 08월 24일
Filing Date

등록일 2020년 04월 01일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
발효 원정박이꽃무지 유충 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물

특허권자 Patentee
(주)자연과 효소(180111-*****)
부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동308호(해양생물산업육성센터)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2020년 09월 14일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김용래

QR코드로 현재 기준 등록사항을 확인하세요

특허청
Korean Intellectual Property Office

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2083275 호
Patent Number

출원번호 제 10-2018-0045905 호
Application Number

출원일 2018년 04월 20일
Filing Date

등록일 2020년 02월 25일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
발효균병이 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

특허권자 Patentee
중앙대학교산학협력단(185071-*****)
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2020년 02월 25일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

박원주

QR코드로 현재 기준 등록사항을 확인하세요

특허청
Korean Intellectual Property Office

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2048309 호
Patent Number

출원번호 제 10-2018-0062887 호
Application Number

출원일 2018년 05월 31일
Filing Date

등록일 2019년 11월 19일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
발효갈색거저리 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

특허권자 Patentee
동아대학교산학협력단(185071-*****)
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2019년 11월 19일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

박원주

QR코드로 현재 기준 등록사항을 확인하세요

특허청
Korean Intellectual Property Office

특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-2253265 호
Patent Number

출원번호 제 10-2018-0171975 호
Application Number

출원일 2018년 12월 28일
Filing Date

등록일 2021년 05월 12일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
폴리갈마글루탐산 함량이 증진된 원정박이꽃무지 유충 발효물의 분말 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 폴리갈마글루탐산 함량이 증진된 원정박이꽃무지 유충 발효물의 분말

특허권자 Patentee
(주)자연과 효소(180111-*****)
부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동308호(해양생물산업육성센터)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2021년 05월 12일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김용래

QR코드로 현재 기준 등록사항을 확인하세요

특허청
Korean Intellectual Property Office

평가 항목 (주요성능 Spec)		전체 항목 에서 차지하는 비중 (%)	최종 개발 목표치	표준 인증 기준 (시료수)	기준 설정 근거	평가 방법
7	논 문	20	-	10 이상	-	KCI 5편/SCI 5편

연구개발성과 - 논문 목록

NO	논문명	저자	논문 구분	국내 외 구분	학술지 명	학술 지 분 류 번호	출판 일자	페 이 지	학술 지 인 펙 트 팩 터	SCI 구분
1	유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	심소연, 안희영, 서권일, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	생명과학회지	28(7)	18.0 7.30	827 ~ 834	0	비SCI (KCI)
2	The Extract of Edible Alga <i>Petalonia binghamiae</i> Suppresses TGF- β 1 or H2O2-Induced Liver Fibrogenesis in LX-2 and HepG2 Cells	Young-Ji Choi, Kang-Yeol Yu, Mi-Hee Kim, Bora Kwon, In-Sun Park, Young-Moo Choo, Seon-Young Kim, Seung-Il Jeong, Jiyoung Kim, Ju Kim	국외 전문 학술 지	국외	Natural product communications	13(6)	18.0 7.31	757 ~ 759	.8	SCI
3	유용 미생물을 이용한 발효갈색거저리 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	장성호, 심소연, 안희영, 서권일, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	생명과학회지	28(8)	18.0 8.01	923 ~ 930	0	비SCI (KCI)
4	The <i>Chaenomeles sinensis</i> Extract has the Potential to Exhibit Antioxidant Activity or Attenuate Liver Damage	Young-Ji Choi, Young-Moo Choo, Seung-Il Jeong, Kang-Yeol Yu, Jiyoung Kim	국외 전문 학술 지	국외	Natural product communications	13	18.0 8.01	1 ~ 2	.8	SCI
5	<i>Bacillus subtilis</i> 를 이용한 발효곰팡이 분말 추출물의 최적배양조건에 따른 경시적 변화	장성호, 심소연, 안희영, 서권일, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	한국식품저장유통학회	26(1)	19.0 2.01	123 ~ 133	0	비SCI (KCI)

6	FERMENTED ORIENTAL MEDICINAL INSECT EXTRACT HAS A SYNERGISTIC EFFECT ON INHIBITING TGF- β 1-OR H2O2-INDUCED HEPATIC FIBROGENESIS IN LX-2 AND HEPG2 CELLS	Y O U N G - J I CHOI IN-SUN PARK YOU-KYUNG SON KANG-YEOL YU JIYOUNG KIM YOUNG-MOO CHOO	국외 전문 학술 지	국외	Acta Polonia e pharma ceutica	76(3)	19.0 6.01	599 ~ 603	.877	SCI
7	Solid state fermentation process with <i>Aspergillus kawachii</i> enhances the cancer-suppressive potential of silkworm larva in hepatocellular carcinoma cells	H y u n - D o n g Cho Hye-Ji Min Yeong-Seon Won Hee-Young Ahn Young-Su Cho Kwon-Il Seo	국외 전문 학술 지	국외	BMC comple mentary and alternati ve medicin e	19	19.0 7.01	241 ~ 256	1.98	SCI
8	Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향	심소연, 안희영, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	The Korean Society of Food Preserv ation	26(7)	19.1 2.30	821 ~ 827	0	BI/SCI (KCI)
9	Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation	In-Sun Park Kang-Yeol Yu Y o u n g - M o o Choo Jiyoung Kim	국외 전문 학술 지	국외	Türk biyokim ya dergisi = Turkish journal of bioche mistry	45(2)	20.0 4.24	201 903 55 ~ 201 903 56	.329	SCI
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M1 (KACC 93023)으로 발효한 갈색 거저리 유충이 비 알코올 성 지방간 유발 흰 쥐에 미치는 영향	심소연, 장성호, 안희영, 조영수	국내 전문 학술 지	국내	생명과학회지	30(5)	20.0 3.06	434 ~ 442	0	BI/SCI (KCI)

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	생명과학회지	심소연	28(7)	한국	한국생명과학회	비SCIE	18.07.30	1225-9918	100%
2	The Extract of Edible Alga <i>Petalonia binghamiae</i> Suppresses TGF-β1-or H2O2-Induced Liver Fibrogenesis in LX-2 and HepG2 Cells	Natural product communications	Young-Ji Choi	13(6)	미국	Natural product Inc.	SCIE	18.07.31	1934-578x	100%
3	유용 미생물을 이용한 발효갈색 거저리 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과	생명과학회지	장성호	28(8)	한국	한국생명과학회	비SCIE	18.08.01	1225-9918	100%
4	The <i>Chaenomeles sinensis</i> Extract has the Potential to Exhibit Antioxidant Activity or Attenuate Liver Damage	Natural product communications	Young-Ji Choi	13	미국	Natural product Inc.	SCIE	18.08.01	1934-578X	100%
5	<i>Bacillus subtilis</i> 를 이용한 발효 곰팡이 분말 추출물의 최적배양 조건에 따른 경시적 변화	한국식품저장유통학회지	장성호	26(1)	한국	한국식품저장유통학회	비SCIE	19.02.01	2287-7428	100%
6	FERMENTED ORIENTAL MEDICINAL INSECT EXTRACT HAS A SYNERGISTIC EFFECT ON INHIBITING TGF-β1-OR H2O2-INDUCED HEPATIC FIBROGENESIS IN LX-2 AND HEPG2 CELLS	Acta Polonicae pharmaceutica	YOUNG-JI CHOI	76(3)	미국	Polish Pharmaceutical Society	SCIE	19.06.01	0001-6837	100%
7	Solid state fermentation process with <i>Aspergillus kawachii</i> enhances the cancer-suppressive potential of silkworm larva in hepatocellular carcinoma cells	BMC complementarity and alternative medicine	Hyun-Dong Cho	19	미국	BMC	SCIE	19.07.01	-	100%
8	<i>Bacillus subtilis</i> 를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 지방간 환자의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향	한국식품저장유통학회지	심소연	26(7)	한국	한국식품저장유통학회	비SCIE	19.12.30	2287-7428	100%
9	Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation	Türk biyokimya dergisi = Turkish journal of biochemistry	In-Sun Park	45(2)	터키	Turk J Biochem	SCIE	20.04.24	1303-829x	100%
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M1 (KACC 93023)으로 발효한 갈색 거저리 유충이 비 알코올성 지방간 유발 흰 쥐에 미치는 영향	생명과학회지	심소연	30(5)	한국	한국생명과학회	비SCIE	20.03.06	1225-9918	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표제목	발표 일시	장소	국명
1	한국식품저장유통학회	로나 카밀레 리자르도, 조현동, 김정호, 조영수, 서권일	Comparision of anti-proliferative activities of fermented Bombyx mori extracts on HepG2 human hepatoma cells	2017.10.26	경북대학교 글로벌프라자 1층	한국
2	한국식품저장유통학회	민혜지, 조현동, 김정호, 조영수, 서권일	Comparision of anti-proliferative activities of fermented Neatus Ventralis extracts on HepG2 human hepatoma cells	2017.10.26	경북대학교 글로벌프라자 1층	한국
3	한국식품저장유통학회	이관우, 조현동, 김정호, 조영수, 서권일	Comparision of anti-proliferative activities of fermented Protaetia Brevitarsis extracts on HepG2 human hepatoma cells	2017.10.26	경북대학교 글로벌프라자 1층	한국
4	국제건강기능식품학술대회	심소연, 안희영, 김태훈, 김영완, 조영수	Antioxidative activity of extracts from fermented Neatus ventralis and Proteaetia brevitarsis seulensis with several kinds of micro-organism	2017.10.24	전북 군산 GSCO	한국
5	한국식품저장유통학회	심소연, 안희영, 김태훈, 김영완, 조영수	Antioxidative Activity, Chemical Characteristics and Bioactive Materials from Larvae of Protaetia brevitarsis seulensis Fermented by Several Kinds of Micro-organisms	2017.10.26	경북대학교 글로벌 프라자 1층	한국
6	2018 한국실험동물학회 동계 심포지움	심소연, 안희영, 장성호, 박우상, 신현승, 조영수	Optimization of the fermentation condition of Protaetia brevitarsis seulensis larvae using Bacillus subtilis KACC 91157	2018.01.24	강원도 원주 한솔오크밸리 빌리시센터	한국
7	2018 한국식품과학회 국제학술대회	심소연, 안희영, 장성호, 박우상, 신현승, 조영수	Physicochemical Properties and Biological Activities of Protaetia brevitarsis seulensis Larvae Fermented by Bacillus subtilis KACC 91157	2018.06.27	BEXCO, Busan, Korea	한국
8	2018 한국생명과학회	심소연, 안희영, 장성호, 박우상, 신현승, 조영수	Depending on the Day of Fermentation in Optimum Conditions of Protaetia brevitarsis seulensis Larvae Fermented by Bacillus subtilis KACC 91157	2018.08.09	경주 더케이호텔	한국
9	The Korean Society for Microbiology&Biotechnology	손유경, 박인선, 최영지, 유강열, 추영무	Antioxidant activity of the water extract of Bacillus subtilis-fermented Protaetia brevitarsis larvae	2018.06.27	여수 엑스포	한국
10	The Korean Society for Microbiology&Biotechnology	최영지, 박인선, 손유경, 김지영, 추영무	The extracts from fermented Protaetia brevitarsis larvae suppresses TGF-β1- or -H2O2-induced liver fibrogenesis in LX-2 and HepG2 cells	2018.06.27	여수 엑스포	한국
11	2019년 제 40차 (사)한국식품저장유통학회 국제학술대회 및 정기총회	심소연	Effect of Protaetia brevitarsis seulensis larvae fermented by Bacillus subtilis on the contents of serum lipid and liver morphology in alcohol-fed rat	2019.08.22	평창 알펜시아리조트 컨벤션센터	한국
12	2019년도 한국생명과학회 제61회 정기총회-유전 의학융합회 제2회 정기총회 및 공동국제 학술대회	심소연	Effect of Protaetia brevitarsis seulensis larvae fermented by Bacillus subtilis on the contents of serum lipid and liver morphology in alcohol-fed rat	2019.08.13	부산 벅스코 제2전시장 3층	한국
13	2019 대한약학회 추계국제 학술대회	임현지	Inhibitory effects of Saccharomyces cerevisiae fermented Tenebrio molitor on TGF-β1 induced hepatic fibrosis in LX-2 cells.	2019.10.14	여수엑스포컨벤션센터	한국

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	[특허] 발효공병이 추출물을 유효성 분으로 함유하는 혈전증의 예 방, 개선 또는 치료용 조성물	한국	동아대학교 산학협력단	18.04.20	10-2018- 0045905	10-20832 75	동아대학교 산학협력단 ㈜자연과학소	20.02.25	10-20832 75	100%	여
2	[특허] 발효갈색거저리 추출물을 유 효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성 물	한국	동아대학교 산학협력단	18.05.31	10-2018- 0062887	10-20483 09	동아대학교 산학협력단 ㈜자연과학소	19.11.19	10-20483 09	100%	부
3	[특허] 발효 흰점박이꽃무지 유충 추 출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물	한국	(재)전주농 생명소재연 구원	18.08.24	10-2018- 0098974	10-20980 79	㈜자연과 효소	20.04.01	10-20980 79	100%	여
4	[특허] 폴리감마글루탐산 함량이 증 진된 흰점박이꽃무지 유충 발 효물의 분말의 제조방법 및 상 기 방법에 의해 제조된 폴리감 마글루탐산 함량이 증진된 흰 점박이꽃무지 유충 발효물의 분말	한국	㈜자연과 효소	18.12.28	10-2018- 0171975	10-22532 65	㈜자연과 효소	21.05.12	10-22532 65	100%	여
5	[특허] 발효갈색거저리추출물을유효성 분으로함유하는간기능개선용조 성물	한국	(재)전주농 생명소재연 구원	20.12.02	10-2020- 0166789					100%	부
6	[특허] 쌍벌귀뚜라미추출물의발효물을 유효성분으로함유하는항염증및 주름개선용조성물	한국	(재)전주농 생명소재연 구원	20.12.02	10-2020- 0166781					100%	부
7	[상표] 케이빙이	한국	㈜자연과 효소	20.11.02	40-2020- 0194945					100%	여

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	곰메이트	2018.10.01	엠에스글로벌바이오(주)	엠에스글로벌바이오(주)	식품(숙취해소음료)	2017.10~2018.09 (1년)		
2	더이엔멀티비타민미네랄	2020.09.22	(주)자연과효소	(주)자연과효소	건강기능식품	2018.10~2020.09 (2년)		
3	곰뱅이환	2020.11.01	엠에스글로벌바이오(주)	엠에스글로벌바이오(주)	식품-기타가공품	2018.11~2020.10 (2년)		
4	케이뱅이	2021.06.24	(주)자연과효소	(주)자연과효소	식품-기타가공품	2019.06~2021.05 (2년)		

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
곰메이트	2018	337		337	매출액(세금계산서,거래명세서)
곰메이트	2019	16,107		16,107	매출액(세금계산서,거래명세서)
곰메이트	2020	47,109		47,109	매출액(세금계산서, 거래명세서)
더이엔멀티비타민미네랄	2020	15,400		15,400	매출액(세금계산서, 거래명세서)
합계		78,953		78,953	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2018년	2019년	2020년	
1	고부가가치식품 기술개발	(주)자연과효소	1			1
2	고부가가치식품 기술개발	엠에스글로벌바이오(주)		1		1
3	고부가가치식품 기술개발	엠에스글로벌바이오(주)			2	2
합계			1	1	2	4

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	1	
		생산인력	2	
	개발 후	연구인력	4	
		생산인력	2	

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	고부가가치식품 기술개발			78,953		4	
기대 목표	고부가가치식품 기술개발			50,000		1	

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2017											
			1	1	2						4		
2		2018	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1								1	
3		2019	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1	1								2	
4		2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
					1							1	

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	전시회 참가 (일산 킨텍스)	2019년 서울식품산업대전	곰메이트(곰뽕이를 활용한 숙취음료 홍보	2019.05.22.~2019.05.24
2	엑스포 참가 (부산 벡스코)	제7회 부산국제안티에이징엑스포	곰메이트(곰뽕이를 활용한 숙취음료 홍보	2019.06.27.~2019.06.29

[그 밖의 성과]

1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 독성시험 결과

(※ 첨부 : 공인기관 - 바이오독스텍 독성시험 결과보고서)

- 경구투여 독성시험(단회, 2주, 13주) 5,000mg/kg/day로 설정
- 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단
- 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상유발성은 음성으로 판단
- 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성은 음성으로 판단

 <p>최종보고서</p> <p>흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험</p> <p>시험번호: B18967</p> <p>㈜바이오독스텍 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53</p> <p>- 1/55 -</p>	 <p>최종보고서</p> <p>흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주 반복 경구투여 용량결정시험</p> <p>시험번호: B18968</p> <p>㈜바이오독스텍 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53</p> <p>- 1/78 -</p>
--	---



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13 주 반복 경구투여 독성시험

시험번호: B18969

㈜바이오텍스텍
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

- 1/237 -



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: B18970

㈜바이오텍스텍
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

- 1/68 -



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호: B18971

㈜바이오텍스텍
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

- 1/65 -



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
마우스를 이용한 소핵시험

시험번호: B18972

㈜바이오텍스텍
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

- 1/64 -

2. 인체적용시험결과보고서 (Clinical Study Report)

(※ 첨부 : 3개 대학병원 인체적용시험 결과보고서)

흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알코올성 간 손상 완화에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험

시험대상 품목	흰점박이꽃무지유충발효분말
시험책임자	동아대학교병원 가정의학과 한성호 교수
실시기관	동아대학교병원 (부산광역시 서구 대신공원로 26) 양산부산대학교병원 (경남 양산시 물금읍 금오로 20) 고신대학교복음병원 (부산광역시 서구 감천로 262)
시험기간	IRB 승인일로부터 ~ 2021년 06월 30일
인체적용시험 계획서	동아대학교병원 : Version 1.9 (2021.04.15.) 양산부산대학교병원 : Version 1.5 (2020.12.10.) 고신대학교복음병원 : Version 1.2 (2020.12.10.)

※ 첨부 : 3개 대학병원 인체적용시험 결과보고서

인체적용시험결과보고서 (Clinical Study Report)

흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알코올성 간
손상 완화에 미치는 영향 분석을 위한 다기관,
무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험

ver. 1.0 / 2021. 06. 14

시험대상 품목	흰점박이꽃무지유충발효분말
시험책임자	동아대학교병원 가정의학과 한성호 교수
실시기관	동아대학교병원 (부산광역시 서구 대신공원로 26) 양산부산대학교병원 (경남 양산시 물금읍 금오로 20) 고신대학교복음병원 (부산광역시 서구 감천로 262)
시험기간	IRB 승인일로부터 ~ 2021년 06월 30일
인체적용시험 계획서	동아대학교병원 : Version 1.9 (2021.04.15.) 양산부산대학교병원 : Version 1.5 (2020.12.10.) 고신대학교복음병원 : Version 1.2 (2020.12.10.)

본 인체적용시험결과보고서에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 의뢰자가 인정하는 경우를 제외하고는 의뢰자의 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

결과보고서 개요

시험제목	흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알코올성 간 손상 완화에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험			
시험목적	건강기능식품 기능성원료로서 흰점박이꽃무지유충발효분말 인체 섭취 시 안전성 및 알코올성 간 손상 완화에 대한 가능성을 검증하고자 함.			
구분	<input type="checkbox"/> Local	<input checked="" type="checkbox"/> Multi (<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외)		
실시기관 및 시험책임자	동아대학교병원 (주관기관) : 가정의학과 한성호 교수 (총괄연구책임자) 양산부산대학교병원 : 가정의학과 이상엽 교수 고신대학교복음병원 : 가정의학과 최종순 교수			
시험디자인	다기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조군 비교, 병행			
시험용 식품	시험식품	흰점박이꽃무지유충발효분말	대조식품	결정셀룰로오스
	제형	500mg tablet		
	복용량	4g/일 (1일 2회, 1회 500mg×4tab, 흰점박이꽃무지유충발효분말로서 500mg/일), 총 8주		
시험대상자	만19세 이상의 성인 남성 또는 여성으로서 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자			
시험대상자 수		시험군	대조군	총 대상자 수
	유효성 평가 레수	32명	32명	64명
	20% 중도 탈락을 포함한 레수	40명	40명	80명
	각 기관별 모집 대상자 수 동아대학교병원 : 20명 양산부산대학교병원 : 29명 고신대학교복음병원 : 31명			
시험기간	1. 동아대학교병원 IRB 승인일(2018년 10월 08일) ~ 2021년 06월 30일 - 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 06. 26. - 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 06. 26. - 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 03. 09. 2. 양산부산대학교병원 IRB 승인일(2018년 09월 20일) ~ 2021년 06월 30일 - 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 01. 07. - 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 01. 13. - 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 01. 25. 3. 고신대학교복음병원 IRB 승인일(2020년 01월 14일) ~ 2021년 06월 30일 - 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 05. 21. - 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 05. 21. - 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 01. 25.			

유효성 평가변수	1차	<ul style="list-style-type: none"> • 혈중 GGT(γ-GTP)의 변화
	2차	<ul style="list-style-type: none"> • 혈중 ALT(GPT)의 변화 • 혈중 AST(GOT)의 변화 • AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ-GTP)가 정상범위로 돌아온 대상자 비율 • 혈중 AST/ALT ratio의 변화 • 혈중 LDH의 변화 • 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화 • 다차원 피로척도(multi-dimensional fatigue inventory)의 변화
안전성 평가변수	<ol style="list-style-type: none"> 1. 이상반응 2. 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화 3. 생체징후 및 문진에 의한 이상소견 여부 	
선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 만19세 이상의 성인 남성 또는 여성 2. 혈액검사에서 γ-GTP(Gamma Glutamyl Transpeptidase)가 정상치를 초과하고 각 기관의 정상 상한치의 4배 이하의 범위에 있는 자 3. 음주 습관 설문에서 지난 1개월 동안 1주일에 평균 남성 소주 2병 이상(맥주 300cc 10잔 이상), 여성은 소주 1병 이상(맥주 300cc 5잔 이상)의 알코올 섭취습관을 가진 자 4. 정상적인 신체활동이 가능하고, 본 시험의 대상자로서 시험동의서에 서면 동의한 자 	
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시험용 식품의 성분에 대한 알레르기가 있는 자 2. 최근 6개월 이내에 중증의 심뇌혈관 질환, 또는 악성 종양이 있는 자 3. 조절되지 않는 고혈압 환자(혈압이 160/100mmHg 이상) 4. 조절되지 않는 갑상샘항진증 또는 갑상샘저하증 환자 5. 바이러스성 간 질환 또는 인체적용시험의 결과에 영향을 줄 수 있는 간질환을 가진 대상자 단, 항바이러스성 약제를 투약 받지 않은 HBV 또는 HCV 보균자는 연구책임자가 시험에 영향을 주지 않는다고 판단할 시 등록할 수 있다. 6. 혈액검사에서 AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 연구기관 정상 상한치의 3배 이상인자 7. Child-Pugh 등급 B 또는 C의 비대상성 간경변 대상자 8. 시험 시작 예정일 기준 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물을 복용한 자 9. 알코올 남용자 10. Creatinine 연구기관 정상 상한치의 2배 이상인 자 11. 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자 12. 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자. 단, 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외한다. 13. 지난 2개월간 한약이나 조약 복용력이 있는 자 14. 인체적용시험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물을 계속 복용해야 하는 자 15. 임신·수유 중이거나 임상시험기간 동안 임신계획이 있는 자 16. 스크리닝일 기준 1개월 이내 다른 약물임상시험에 참여할 자 17. 본 시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 시험을 진행할 수 없다고 연구자가 판단하는 자 	

<p>시험중지 및 탈락기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 선정/제외기준 위반 2. 연구 참여자의 시험중지 요구 3. 이상반응 발생 (중대한 이상반응 포함) 4. 연구 참여자의 불순응(80%미만) 또는 관찰 불가 5. 인체적용시험계획서의 위반 6. 본 인체적용시험에 영향을 미칠 수 있는 의약품 또는 건강기능식품 등을 복용했거나 복용해야 하는 자 7. 시험용 식품을 연속 5일을 초과하여 복용하지 않은 경우 8. 기타 연구자의 판단
<p>시험방법</p>	<p>본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험이다. 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대한 충분하게 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정하였다.</p> <p>무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품과 복용일지 등을 배부받고 매일 2회 고지된 방법대로 복용하도록 하였다.</p> <p>0주(baseline), 4주, 8주째 유효성 및 안전성 평가변수에 대한 측정 및 검사를 실시하였고 그 결과에 대하여 분석하였다.</p>
<p>통계분석방법</p>	<p>통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하였으며 각 주평가변수에 영향을 미칠 수 있는 음주력과 운동량 변수는 군 간 차이가 있을 경우 통제변수로 고려해 공변량분석을 수행하였다.</p> <p>연속형자료, 임상실험실검사치, 활력징후변수들에 대하여는 기초상태(baseline), 각 방문시점, 최종 평가시점, 그리고 기초상태에서 최종평가 시점까지의 변화량에 대하여 기술통계량(연구 대상자 수, 평균, 표준편차, 최소치, 중앙값, 최대값)을 제시하였다.</p> <p>범주형 자료에 대하여는 분할표를 제공하였다. 추가적으로, 필요한 경우 95%신뢰구간이 계산될 것이고, 중간분석은 실시하지 않았다. ITT분석을 위해 최종 유효성 평가 자료가 결측된 경우, LOCF방법에 의하여 분석되도록 하였다.</p>
<p>분석 결과</p>	<p>본 인체적용시험에서 유효성 평가는 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 변화량을 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 1차 유효성 평가 변수로 설정한 GGT의 변화량에 대하여 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과, 시험군의 식품 섭취 후 변화량이 대조군과의 군간 비교에서 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하는 경향을 띄며 개선되었다. 2차 유효성 평가 변수로 설정한 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 ITT population으로 분석한 결과, 시험군에서 식품 섭취 후 대조군에 비해 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하였다. 이러한 결과는 PP population에서도 동일하게 도출되었다.

소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 확인할 수 있었고, BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.

1차 유효성 평가 변수인 혈중 GGT의 변화량과 2차 유효성 평가변수인 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취한 시험군에서 알콜성 간 손상 완화의 효과를 확인하였다. 이는 흰점박이꽃무지유충발효분말의 혼합물을 일상적으로 섭취할 시 알콜성 간 손상 완화에 도움을 주는 근거가 될 수 있을 것이다.

• 안전성 평가

- 시험용 식품을 1회 이상 복용한 시험군 40명, 대조군 40명의 대상자에 대해 시험 기간 중에 생체징후 평가, 임상실험실검사 등으로 안전성을 평가하였다. 시험 기간 중 이상반응이 발생한 사례가 있고 1명 탈락하였지만 대조식품 섭취군으로 시험용 식품과의 연관성은 없는 것으로 판단되며 중대한 이상반응은 발생하지 않았다. 또한 임상실험실 검사치 및 신체검사 등을 통한 안전성 평가결과 임상적으로 위해하다고 판단할 근거는 없었다. 안전성 평가는 시험에 참여한 시험책임자가 시행하였다.

따라서 본 흰점박이꽃무지유충발효분말을 성인 기준 500 mg/일의 용량으로 중·장기간 동안 섭취하여도 안전하다고 판단된다.

요약 및 결론

본 인체적용시험은 만 19세 이상 성인 남성 또는 여성을 대상으로 흰점박이꽃무지유충발효분말 섭취 시 알콜성 간 손상에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 실시되었다. 이를 위해서 선정기준에 해당하고 제외기준에 해당하지 않는 80명을 대상으로 본 인체적용시험용 식품 투여 전/후의 유효성 및 안전성 평가변수를 측정하여 비교하였다. 유효성 평가 변수로 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 변화량을 설정하여 식품을 8주간 섭취한 후 그 효능을 확인하였다. 시험군에서 시험식품을 8주간 섭취 후 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 대조군과의 비교에서 유의성은 확인되지 않았지만 감소하여 개선되는 경향을 보였다. 또한 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점이 시험군에서 대조군 대비 유의성을 띄지는 않았지만 감소하여 개선되는 양상을 보였고 BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.

본 인체적용시험을 진행하며 3명의 이상 반응이 발생하였고 그 중 1명이 중도 탈락 하였지만 시험용 식품과의 인과관계는 없는 사례로 판단되었다. 중대한 이상 반응은 보고되지 않았고, 임상 시험실 검사 결과에서도 안전성 위해 요소는 발견되지 않았다. 시험식품에 사용된 흰점박이꽃무지유충발효분말은 식품의약품 안전처에 식품 원료로 등록된 흰점박이꽃무지유충을 사용하여 제조되었고, 오래전부터 국내·외에 식품으로도 널리 섭취되고 있어 적절한 용량을 섭취 시 안전성은 입증되어 있다고 볼 수 있어 본 시험에서 안전성 위해 요소가 발견되지 않은 것은 당연한 결과로 사료된다.

종합적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취함에 따라 알콜성 간 손상 완화를 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 분석한 결과를 통해 확인하였고, ITT population PP population 및 소그룹 분석 모두에서 동일하게 유효성 평가 변수가 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이상 반응, 임상 시험실 검사, 문진 등을 통해 평가된 안전성 평가에서도 위해 요소가 발견되지 않아 중·장기 섭취에 대해 안전하다는 결과도 확인할 수 있었다.

결론적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 일상적으로 섭취할 경우 알콜성 간 손상 완화에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 다만 본 연구의 결과로는 통계적 유의성을 확인할 수 없어 추후 추가적인 인체적용시험을 진행한다면 유의한 결과를 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 특허출원 3건	○ 특허출원 6건	100
○ 특허등록 1건	○ 특허등록 5건	100
○ 제품화 3건	○ 제품화 4건	100
○ 매출액 (50,000천원)	○ 매출액 (78,000천원)	100
○ 고용창출 (1명)	○ 고용창출 (4명)	100
○ 논문(SCI) (5건)	○ 논문(SCI) (5건)	100
○ 논문(비SCI) (5건)	○ 논문(비SCI) (5건)	100
○ 학술발표 (6건)	○ 학술발표 (13건)	100
○ 인력양성 (2건)	○ 인력양성 (5건)	100

(단위 : 건, %, 점)

성과지표	계획(A)	실적(B)	가중치	점수(D)
특허 출원	3	6	0.125	12.50
특허 등록	1	5	0.125	12.50
품종 등록			-	-
기술이전(건)			-	-
기술료(백만원)			-	-
제품화(건)	3	4	0.125	12.50
매출액(백만원)	50	78	0.125	12.50
수출액(백만원)			-	-
고용창출(명)	1	4	0.125	12.50
투자유치(백만원)			-	-
기술인증			-	-
논문(SCI)	5	5	-	-
논문(비SCI)	5	5	-	-
논문평균 IF	10	10	0.125	12.50
학술발표	6	13	0.125	12.50
교육지도			-	-
인력양성	2	5	0.125	12.50
정책활용			-	-
홍보전시			-	-
기타(수상)			-	-
계	76	125		100.00점

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

임상시험 결과 - 유효성 평가

- 1차 유효성 평가 변수로 설정한 GGT의 변화량에 대하여 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과, 시험군의 식품 섭취 후 변화량이 대조군과의 군간 비교에서 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하는 경향을 띄며 개선되었다.

- 2차 유효성 평가 변수로 설정한 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 ITT population으로 분석한 결과, 시험군에서 식품 섭취 후 대조군에 비해 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하였다. 이러한 결과는 PP population에서도 동일하게 도출되었다.

시험군에서 시험식품을 8주간 섭취 후 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 대조군과의 비교에서 유의성은 확인되지 않았지만 감소하여 개선되는 경향을 보였다. 또한 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점이 시험군에서 대조군 대비 유의성을 띄지는 않았지만 감소하여 개선되는 양상을 보였고 BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.

결론적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 일상적으로 섭취할 경우 알콜성 간 손상 완화에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 다만 본 연구의 결과로는 통계적 유의성을 확인할 수 없어 추후 추가적인 인체적용시험을 진행한다면 유의한 결과를 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

임상시험 결과 간 기능 개선에 대한 분석 내용 중 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)에서 개선 경향은 나타나지만 전체 그룹의 통계적 유의성은 낮게 나타났습니다.

이러한 원인에 대한 자체 분석 내용으로는 “흰꽃무지유충발효분말”의 이화학실험, 동물실험, 세포실험의 간기능 개선 효과가 임상시험에서는 1. 대상자에 따라 효능, 효과가 차별적으로 나타나는 현상, 2. 지연된 임상실험으로 인한 임상 대상자의 피험 오류 예상, 3. 통계적 결과값의 신뢰성을 위해 추가적인 임상시험의 필요성 등으로 확인하였습니다.

2) 자체 보완활동

현재까지 연구 결과물인 이화학실험, 동물실험, 세포실험의 간기능 개선 효과와 임상시험 결과중 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)에서 개선 경향을 토대로 건강기능식품 개별인증을 준비 및 추진하여 식약청의 판단을 구하고자 진행중입니다.

추가적인 연구 테마로는 흰점박이꽃무지유충 외에 거저리를 활용한 발효 소재의 간기능 개선 기작에 대한 연구도 지속적으로 진행하여 곤충자원의 생리활성 기능을 하나씩 체계적으로 규명하고자 연구, 개발에 박차를 가하고 있습니다.

3) 연구개발 과정의 성실성

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 식품산업 발전에 기여하기 위하여 알콜성 간손상 및 비알콜성 간손상에 대한 in vitro, in vivo, 세포실험에서부터 독성시험, 임상시험에 이르기까지 비록 코로나19로 인해 각종 어려움을 극복하고 현재의 결과를 도출하기 위한 공동연구기관인 (재)전주농생명소재연구원과 동아대학교 산학협력관과 참여기업인 엠에스글로벌바이오(주), 위탁기관인 (주)랩투씨알오의 협력을 통해 다양한 연구 성과물과 결과를 성실하게 도출하여 곤충 소재를 활용한 새로운 식품 소재 시장의 개척과 이를 바탕으로 미래 식량자원 중 하나인 곤충산업 발전의 교두보를 마련할 수 있는 좋은 계기를 마련하는 마중물 역할의 연구개발 결과로 사료됩니다.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

식·약용곤충/발효미생물 복합소재의 연구개발 결과 곤충 소재를 활용한 새로운 식품 소재 시장의 개척과 이를 바탕으로 미래 식량자원중 하나인 곤충산업 발전의 교두보를 마련할 수 있는 좋은 계기가 되는 성과로 판단됩니다.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

연구개발성과물인 특허, 논문 등을 활용하여 힌점박이꽃무지유충 외에도 다양한 곤충자원을 활용한 생리활성물질에 대한 연구를 지속할 예정이며, 힌점박이꽃무지유충발효분말 소재 외에도 연구개발 과정 중에 거저리(밀웜) 등을 활용한 식품원료, 가공식품, 건강기능식품 시장에서 곤충자원의 식품 소재화에 앞장설 수 있도록 시장 개척에 노력을 기울일 것입니다.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계		
인력양성	학사	1	
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발	1	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 독성시험결과 최종보고서 2) 인체적용시험 결과보고서 3) 초록
2.	4) 자체평가의견서 5) 연구성과 활용계획서



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 경구투여 독성시험

시험번호: **B18967**

㈜바이오텍스텍

우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

GLP 적합진술서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 경구투여 독성시험

시험번호 : B18967

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호 (2018 년 11 월 21 일)
- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”
Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17
(as revised in 1997)

㈜바이오톡스텍
시험책임자 문설희



2020 년 5 월 29 일

㈜바이오톡스텍
운영책임자 박선희



2020 년 5 월 29 일

신뢰성보증서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 경구투여 독성시험

시험번호 : B18967

(주)바이오톡스텍 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 점검하였다. 점검은 GLP, 시험계획서, (주)바이오톡스텍의 표준작업수순서에 따라서 실시하였으며, 각각의 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

점검수행단계 및 시험책임자와 운영책임자에게 보고한 일자는 아래와 같다.

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
시험계획서	2019년 1월 3일	2019년 1월 3일
시험계획서의 변경	2019년 1월 9일	2019년 1월 9일
동물의 입수*	2018년 12월 11일	2018년 12월 11일
시험물질의 보관	2019년 1월 10일	2019년 1월 10일
시험물질의 조제	2019년 1월 10일	2019년 1월 10일
투여	2019년 1월 10일	2019년 1월 10일
일반증상관찰	2019년 1월 10일	2019년 1월 10일
부검	2019년 1월 24일	2019년 1월 24일
시험기초자료의 기록	2019년 2월 19일	2019년 2월 19일
최종보고서 (안)	2019년 2월 19일	2019년 2월 19일
최종보고서	2020년 5월 29일	2020년 5월 29일

* 수행절차의 점검: 반복적으로 실시되는 정형적인 절차는 시험마다 점검을 실시하지 않고, 특정의 시험을 점검하여 본 시험의 해당단계를 보증한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

(주)바이오톡스텍
신뢰성보증책임자 정우용



2020년 5월 29일

목 차

	페이지
GLP적합진술서	2
신뢰성보증서	3
요약	6
1. 시험실시의 개요	7
1.1 시험목적	7
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	7
1.3 시험기준	7
1.4 동물윤리	7
1.5 수의학적 관리	7
1.6 시험의뢰자	7
1.7 시험기관	8
1.8 시험책임자	8
1.9 시험일정	8
1.10 분담책임자	8
1.11 기록 및 자료의 보관	8
2. 시험재료 및 방법	10
2.1 시험물질	10
2.2 부형제	10
2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석	10
2.4 시험계	11
2.5 사육환경조건	12
2.6 사료	12
2.7 음수	13
2.8 투여	13
2.9 군구성 및 투여용량	13
2.10 관찰 및 검사	14
2.11 자료의 통계처리	14
3. 결과 및 고찰	15
3.1 사망유무	15
3.2 일반증상	15
3.3 체중변화	15
3.4 육안적 부검소견	15
4. 결론	16

FIGURES	17
Figure 1. Body Weights in Male SD Rats	18
Figure 2. Body Weights in Female SD Rats	18
SUMMARY TABLES	19
Table 1. Summary of Mortality	20
Table 2. Summary of Clinical Signs	21
Table 3. Mean Body Weights	22
INDIVIDUAL ANIMAL DATA	23
Table 4. Individual Body Weights during an Acclimation Period	24
Table 5. Individual Clinical Signs	25
Table 6. Individual Body Weights	27
APPENDICES	28
Appendix I. Protocol	29
Appendix II. Protocol Amendments	40
Appendix III. Protocol Deviations	42
Appendix IV. Pathology Report	43
Appendix V. Certificate of Analysis	54
Appendix VI. Results of the Preliminary Study	55

요약

본 시험은 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 Sprague-Dawley 계 암수 6 주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 5,000 mg/kg 단일시험물질 투여군 및 대조군 (주사용수)의 2 군으로 하고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 흰점박이꽃무지유충발효분말을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호 (2018 년 11 월 21 일)
- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”
Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17
(as revised in 1997)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”
식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일)

1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 일부개정 2018 년 3 월 20 일 법률 제 15502 호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 180821).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

명칭 (주)자연과 효소
주소 우 46048 부산광역시 기장군 일광면 횡계길 7, 기업지원동 308 호
TEL + 82-51-723-9446 FAX + 82-51-723-9447

1.7 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍
주소 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.8 시험책임자

성명 문설희
소속 독성 1 팀

1.9 시험일정

시험개시일	2018년 12월 28일
동물입수일	2019년 1월 3일
군분리일	2019년 1월 9일
실험개시일	2019년 1월 10일
투여일	2019년 1월 10일
부검일	2019년 1월 24일
실험종료일	2019년 1월 31일
시험종료일	2020년 5월 29일

1.10 분담책임자

검역	이진희
시험물질보관	김은애
병리	이시준

1.11 기록 및 자료의 보관

1.11.1 보관기간 품목허가일로부터 3년 (식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호)

1.11.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실
주소 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
(시험종료 후 최초 5년간은 (주)바이오톡스텍 자료보관실에서 보관하며,
그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.)

1.11.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료 및 그 외 기록문서,
통신연락문서

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	흰점박이꽃무지유충발효분말
2.1.2	Lot No.	FBP01
2.1.3	성상	분말
2.1.4	성분	<i>Bacillus subtilis</i> , 흰점박이꽃무지유충, 대두콩
2.1.5	유효기간	정보없음
2.1.6	보관조건	실온
2.1.7	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.8	제공자	
	명칭	(주)자연과 효소
	주소	우 46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308 호
2.1.9	잔여시험물질의 처리	반환

2.2 부형제

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	DKN18007
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea

2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석

2.3.1 시험물질의 조제

시험물질을 칭량하여 교반기로 교반하여 현탁시켰다. 조제물은 투여당일 조제하였다.

2.3.2 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

2.4 시험계

2.4.1 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

2.4.2 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Republic of Korea

2.4.3 종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

2.4.4 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 12 마리, 5 주령, 130.4 ~ 138.7 g / 암컷, 12 마리, 5 주령, 105.6 ~ 123.1 g

2.4.5 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 10 마리, 6 주령, 162.1 ~ 175.7 g / 암컷, 10 마리, 6 주령, 122.5 ~ 135.0 g

2.4.6 검역·순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울로 체중을 측정하였다. 7 일간의 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 약 3 일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다.

순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화 (Table 4)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

2.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

2.4.8 군분리

순화기간 종료일에 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10 마리를 선발하여 암수 각 2 군, 군당 암수 각 5 마리로 군분리하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 배치하였다.

2.4.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 본시험에서 제외시켰다.

2.5 사육환경조건

2.5.1	검역실번호	A315
2.5.2	동물실번호	A323
2.5.3	사육상자의 종류, 크기	스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)
2.5.4	사육상자당 수용동물 수	3 마리 (검역·순화기간) / 1 마리 (관찰기간)
2.5.5	온도	실측치: 20.8 ~ 22.5°C, 허용범위: 19.0 ~ 25.0°C
2.5.6	상대습도	실측치: 48.0 ~ 56.0%, 허용범위: 30.0 ~ 70.0%
2.5.7	환기횟수	10 ~ 15 회/시간
2.5.8	명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)
2.5.9	조도	150 ~ 300 Lux

2.5.10 사육기재의 교환 및 세척

사육상자 및 급이기는 1 회/2 주 빈도로 교환하였다.

사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

2.6 사료

2.6.1 종류

실험동물용 고형사료
(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)

2.6.2 Lot No. 2918C-091718MA

2.6.3 제조자 Envigo RMS, Inc., U.S.A.

2.6.4 급이방법

급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취시켰다.

2.6.5 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 입수하여 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.7 음수

2.7.1 종류 및 급수방법

청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취시켰다.

2.7.2 음수의 분석 및 확인

음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1 로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 (환경부령 제 684 호, 2016 년 12 월 30 일, 타법개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여 분석결과를 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.8 투여

2.8.1 투여경로

경구투여

2.8.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

2.8.3 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 15 mL/kg 으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4 시간에 사료를 급여하였다.

2.9 군구성 및 투여용량

2.9.1 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	15	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 시험물질 투여군	5,000	15	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)

2.9.2 투여용량설정

본 시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B18967P1)으로 5,000 mg/15 mL/kg 을 랫드 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 의 단일시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

2.10 관찰 및 검사

2.10.1 일반증상 관찰

투여당일 (0 일)에는 투여 후 30 분, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다.

2.10.2 체중측정

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14 일 (부검일)에 측정하였다.

2.10.3 부검

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 CO₂ 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

2.10.4 조직병리학적 검사

부검 시 육안소견이 관찰되지 않아, 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다.

2.11 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과에 대해서 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 아래의 방법으로 통계분석을 실시하였다.

Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한 결과 (유의수준: 0.05), 등분산이 인정되어 Student t-test 를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

3.1 사망유무

(Table 1)

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.

3.2 일반증상

(Table 2, Table 5)

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

3.3 체중변화

(Figure 1, Figure 2, Table 3, Table 6)

5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 암수 모두 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

3.4 육안적 부검소견

(Appendix IV)

부검 시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

4. 결론

본 시험의 조건 하에서 흰점박이꽃무지유충발효분말을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
Sprague-Dawley 랫드를 이용한
2주 반복 경구투여 용량결정시험

시험번호: **B18968**

(주)바이오텍스텍

우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

최종보고서의 작성

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2 주 반복
경구투여 용량결정시험

시험번호 : B18968

본 시험은 Non-GLP 로 수행하였다.

(주)바이오톡스텍
시험책임자 문설희



2020 년 6 월 2 일

(주)바이오톡스텍
운영책임자 박설희



2020 년 6 월 2 일

목 차

	Page
최종보고서의 작성	2
요약	5
1. 시험실시의 개요	6
1.1 시험목적	6
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	6
1.3 시험기준	6
1.4 동물윤리	6
1.5 수의학적 관리	6
1.6 시험의뢰자.....	6
1.7 시험기관	6
1.8 시험책임자.....	7
1.9 시험일정	7
1.10 시험담당자.....	7
1.11 기록 및 자료의 보관	7
2. 시험재료 및 방법	8
2.1 시험물질	8
2.2 부형제	8
2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석	8
2.4 시험계	9
2.5 사육환경조건	9
2.6 사료	10
2.7 음수	10
2.8 투여	11
2.9 군구성 및 투여용량	11
2.10 관찰 및 검사	11
2.11 자료의 통계처리	14
3. 결과 및 고찰	15
3.1 일반증상	15
3.2 체중변화	15
3.3 사료섭취량.....	15
3.4 혈액학적 검사	15
3.5 혈액생화학적 검사.....	15
3.6 장기중량	16
3.7 부검	16
4. 결론	17

FIGURES	18
Figure 1. Body Weights in Male SD Rats	19
Figure 2. Body Weights in Female SD Rats	19
SUMMARY TABLES	20
Table 1. Summary of Clinical Signs	21
Table 2. Mean Body Weights	23
Table 3. Mean Food Consumption	24
Table 4. Mean Hematological Parameters	25
Table 5. Mean Clinical Chemistry	26
Table 6. Mean Absolute Organ Weights	28
Table 7. Mean Relative Organ Weights	29
INDIVIDUAL ANIMAL DATA	30
Table 8. Individual Body Weights during an Acclimation Period	31
Table 9. Individual Clinical Signs	32
Table 10. Individual Body Weights	34
Table 11. Individual Food Consumption	36
Table 12. Individual Hematological Parameters	37
Table 13. Individual Clinical Chemistry	39
Table 14. Individual Absolute Organ Weights	43
Table 15. Individual Relative Organ Weights	45
APPENDICES	47
Appendix I. Protocol	48
Appendix II. Protocol Amendment	60
Appendix III. Protocol Deviations	62
Appendix IV. Certificate of Analysis	63
Appendix V. Pathology Report	64

요약

본 시험은 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 2 주간 반복 경구 투여하여, 13 주 반복투여 독성시험 시 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 2 주간 경구 투여하였다.

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

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

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

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

이상으로, 흰점박이꽃무지유충발효분말을 암수 랫드에 2 주간 반복 경구 투여한 결과, 13 주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day 로 설정해야 될 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 2 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 13 주 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

Non-GLP

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 참고하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일)

1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 일부개정 2015 년 1 월 20 일 법률 제 13023 호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 180809).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

명칭	(주)자연과 효소		
주소	우 46048 부산광역시 기장군 일광면 횡계길 7, 기업지원동 308 호		
TEL	+ 82-51-723-9446	FAX	+ 82-51-723-9447

1.7 시험기관

명칭	(주)바이오톡스텍		
주소	우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53		
TEL	+ 82-43-210-7777	FAX	+ 82-43-210-7778

1.8 시험책임자

성명	문설희
소속	독성 1 팀

1.9 시험일정

시험개시일	2018 년 12 월 28 일
동물입수일	2019 년 1 월 3 일
군분리일	2019 년 1 월 9 일
실험개시일	2019 년 1 월 10 일
투여기간	2019 년 1 월 10 일 ~ 1 월 23 일
부검일	2019 년 1 월 24 일
실험종료일	2019 년 1 월 31 일
시험종료일	2020 년 6 월 2 일

1.10 분담책임자

검역	이진희
시험물질보관	김은애
병리	이시준

1.11 기록 및 자료의 보관

1.11.1 보관기간 품목허가일로부터 3년 (식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호)

1.11.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실

주소 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 53

(시험종료 후 최초 5년간은 (주)바이오톡스텍 자료보관실에서 보관하며,
그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.)

1.11.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료 및 그 외 기록문서,
검체 (평가 가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관), 통신연락문서

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	흰점박이꽃무지유충발효분말
2.1.2	Lot No.	FBP01
2.1.3	성상	분말
2.1.4	성분	<i>Bacillus subtilis</i> , 흰점박이꽃무지유충, 대두콩
2.1.5	유효기간	정보없음
2.1.6	보관조건	실온
2.1.7	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.8	제공자	
	명칭	(주)자연과 효소
	주소	우 46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308 호
2.1.9	잔여시험물질의 처리	반환

2.2 부형제

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	DKN18004, DKN18007
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea

2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석

2.3.1 시험물질의 조제

시험물질은 칭량하여 교반기를 이용하여 현탁시켰다. 조제물은 2 주간 매일 조제하였다.

2.3.2 조제물의 분석

본시험에서 조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

2.4 시험계

2.4.1 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

2.4.2 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Republic of Korea

2.4.3 종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

2.4.4 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 24 마리, 5 주령, 131.6 ~ 143.0 g / 암컷, 24 마리, 5 주령, 106.5 ~ 120.3 g

2.4.5 투여개시시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 20 마리, 6 주령, 199.2 ~ 221.3 g / 암컷, 20 마리, 6 주령, 137.7 ~ 157.1 g

2.4.6 검역·순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 체중을 측정하였다. 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다.

순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 (Table 8)를 확인하여 동물의 건강상태를 평가하였다.

2.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

2.4.8 군분리

순화기간 종료일에 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 20 마리를 선발하여, 4 군, 군당 암수 각 5 마리로 군분리하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 배치하였다.

2.4.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 본시험에서 제외시켰다.

2.5 사육환경조건

2.5.1 동물실번호 B322

2.5.2 사육상자의 종류, 크기 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)

2.5.3 사육상자당 수용동물 수 3 마리 (검역·순화기간) / 1 마리 (관찰기간)

- 2.5.4 온도 실측치: 21.8 ~ 22.8°C, 허용범위: 19.0 ~ 25.0°C
- 2.5.5 상대습도 실측치: 48.7 ~ 56.7%, 허용범위: 30.0 ~ 70.0%
- 2.5.6 환기횟수 10 ~ 15 회/시간
- 2.5.7 명암주기 (조명시간) 12 시간/일 (오전 7시부터 오후 7시)
- 2.5.8 조도 150 ~ 300 Lux
- 2.5.9 사육기재의 교환 및 세척
사육상자 및 급이기는 1 회/2 주 빈도로 교환하였다.
사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

2.6 사료

- 2.6.1 종류
실험동물용 고품사료
(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)
- 2.6.2 Lot No. 2918C-091718MA, 2918C-102218MA
- 2.6.3 제조자 Envigo RMS, Inc., U.S.A.
- 2.6.4 급이방법
급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취시켰다.
- 2.6.5 사료의 분석 및 확인
사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 입수하여 확인한 결과, 당사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.7 음수

- 2.7.1 종류 및 급수방법
청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취시켰다.
- 2.7.2 음수의 분석 및 확인
음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제 684 호, 2016년 12월 30일, 타법개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여 분석결과를 확인한 결과, 당사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.8 투여

2.8.1 투여경로

경구투여

2.8.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

2.8.3 투여방법 및 투여횟수

개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 2주간 1일 1회 위내에 강제투여하였다.

2.9 군구성 및 투여용량

2.9.1 군구성

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	15	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 저용량군	1,250	15	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)
G3 중용량군	2,500	15	5 (1301 ~ 1305)	5 (2301 ~ 2305)
G4 고용량군	5,000	15	5 (1401 ~ 1405)	5 (2401 ~ 2405)

2.9.2 투여용량설정

단회투여 독성시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B18967P1) 결과, 5,000 mg/kg 용량에서 시험물질 투여에 기인한 영향이 관찰되지 않았다. 따라서, 5,000 mg/kg/day 를 고용량으로 설정하고, 공비 2 를 적용한 2,500 및 1,250 mg/kg/day 를 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

2.10 관찰 및 검사

2.10.1 일반증상 관찰

투여기간 동안 (2 주) 1 일 1 회 일반증상을 관찰하고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다.

2.10.2 체중측정

투여개시일 (투여 1 일, 투여전), 투여 개시 후 주 2 회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다.

2.10.3 사료섭취량 측정

모든 동물에 대하여 투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1 일간의 섭취량을 측정하고, 투여 1 주째는 7 일간의 섭취량을, 투여 2 주째는 6 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다.

2.10.4 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 mL을 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

2.10.5 혈액생화학학적 검사

혈액생화학학적 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

항목	단위	측정방법
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

2.10.6 부검

모든 동물에 대해서 투여 15 일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

2.10.7 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)

2.10.8 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (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)
- 간 (liver)
- 신장 (kidney)
- 위 (stomach)
- 공장 (jejunum)
- 맹장 (cecum)
- 직장 (rectum)
- 고환 (testis)
- 난소 (ovary)
- 흉선 (thymus)
- 부갑상선 (parathyroid gland)
- 비장 (spleen)
- 부신 (adrenal gland)
- 십이지장 (duodenum)
- 회장 (ileum)
- 결장 (colon)
- 췌장 (pancreas)
- 부고환 (epididymis)
- 자궁 (uterus)

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

2.11 자료의 통계처리

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량 결과에 대해서 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 아래의 방법으로 통계분석을 실시하였다.

Bartlett test 를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis test 를 실시하여 유의성을 관찰하였다 (유의수준: 0.05).

3. 결과 및 고찰

3.1 일반증상

(Table 1, Table 9)

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

암수 대조군 및 1,250 mg/kg/day 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

2,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변 (compound-colored stool)이 투여 후 5일부터 투여 후 14일까지 수컷 1~3례 및 암컷 1~3례에서 관찰되었다.

5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변이 투여 후 3일부터 투여 후 14일까지 수컷 1~5례 및 투여 후 4일부터 투여 후 14일까지 암컷 2~5례에서 관찰되었다.

3.2 체중변화

(Figure 1, Figure 2, Table 2, Table 10)

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

3.3 사료섭취량

(Table 3, Table 11)

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

3.4 혈액학적 검사

(Table 4, Table 12)

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

암컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 헤마토크리트치 (HCT)에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성있는 증가가 관찰되었다. 그러나 이는 경미한 변동이고, 연관된 다른 변화를 동반하지 않으므로, 시험물질 투여에 의한 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다.

3.5 혈액생화학적 검사

(Table 5, Table 13)

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

수컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 아스파르테이트아미노전달효소 (AST)에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성있는 감소가 관찰되었다. 이는 경미한 변동이고, 연관된 다른 변화를 동반하지 않으므로, 시험물질 투여에 의한 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다.

3.6 장기중량

(Table 6, Table 7, Table 14, Table 15)

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

암컷 1,250 및 암수 2,500 mg/kg/day 투여군의 비장에서 절대중량이 대조군에 비해 유의성있는 증가가 관찰되었다. 그러나 이는 용량의존성이 없고, 부검결과 이상소견이 관찰되지 않았으므로, 시험물질 투여에 의한 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다.

3.7 부검

(Appendix V)

부검시, 암수 대조군 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

4. 결론

본 시험 조건하에서, 흰점박이꽃무지유충발효분말을 암수 랫드에 2 주간 반복 경구 투여한 결과, 13 주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg/day 로 설정해야 될 것으로 판단된다.



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13 주 반복 경구투여 독성시험

시험번호: **B18969**

㈜바이오텍스텍

우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

GLP 적합진술서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주 반복
경구투여 독성시험

시험번호 : B18969

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호 (2018 년 11 월 21 일)
- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”
Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17
(as revised in 1997)

(주)바이오텍스텍
시험책임자 문설희



2020 년 6 월 2 일

(주)바이오텍스텍
운영책임자 박선희



2020 년 6 월 2 일

신뢰성보증서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주 반복 경구투여 독성시험

시험번호 : B18969

㈜바이오톡스텍 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 점검하였다. 점검은 GLP, 시험계획서, ㈜바이오톡스텍의 표준작업수순서에 따라서 실시하였으며, 각각의 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

점검수행단계 및 시험책임자와 운영책임자에게 보고한 일자는 아래와 같다.

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
시험계획서	2019년 6월 25일	2019년 6월 26일
동물의 입수*	2019년 6월 18일	2019년 6월 18일
시험물질의 보관	2019년 6월 26일	2019년 6월 26일
시험물질의 조제	2019년 6월 26일	2019년 6월 26일
사료섭취량측정*	2019년 6월 11일	2019년 6월 11일
투여	2019년 7월 2일	2019년 7월 2일
일반증상관찰	2019년 7월 2일	2019년 7월 2일
체중측정*	2019년 6월 11일	2019년 6월 11일
긴급부검	2019년 7월 31일	2019년 7월 31일
채뇨	2019년 9월 26일	2019년 9월 26일
노검사*	2019년 8월 7일	2019년 8월 7일
안과학적검사	2019년 9월 27일	2019년 9월 27일
채혈	2019년 10월 1일	2019년 10월 1일
혈액생화학적 검사*	2019년 8월 13일	2019년 8월 13일
혈액학적 검사*	2019년 8월 13일	2019년 8월 13일
부검	2019년 10월 1일	2019년 10월 1일
조직병리검체제작 (삭정)*	2019년 8월 14일	2019년 8월 14일
조직병리검체제작 (포매)*	2019년 8월 20일	2019년 8월 20일
조직병리검체제작 (박절)*	2019년 8월 22일	2019년 8월 22일
조직병리검체제작 (염색)*	2019년 9월 1일	2019년 9월 2일
조직병리학적검사	2019년 10월 23일	2019년 10월 23일
시험기초자료의 기록	2019년 12월 24일 ~ 2019년 12월 27일	2019년 12월 27일
시험기초자료의 기록 (재점검)	2020년 6월 2일	2020년 6월 2일
최종보고서 (안)	2019년 12월 24일 ~ 2019년 12월 27일	2019년 12월 27일

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
최종보고서	2020년 6월 2일	2020년 6월 2일

* 수행절차의 점검: 반복적으로 실시되는 정형적인 절차는 시험마다 점검을 실시하지 않고, 특정의 시험을 점검하여 본 시험의 해당단계를 보증한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

(주)바이오텍스텍
신뢰성보증책임자 정우용



2020년 6월 2일

목 차

	페이지
GLP적합진술서	2
신뢰성보증서	3
요약	7
1 시험실시의 개요	8
1.1 시험목적	8
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	8
1.3 시험기준	8
1.4 동물윤리	8
1.5 수의학적 관리	8
1.6 시험의뢰자	8
1.7 시험기관	9
1.8 시험책임자	9
1.9 시험일정	9
1.10 분담책임자	9
1.11 기록 및 자료의 보관	9
2 시험재료 및 방법	11
2.1 시험물질	11
2.2 부형제	11
2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석	11
2.4 시험계	12
2.5 사육환경조건	13
2.6 사료	13
2.7 음수	14
2.8 투여	14
2.9 군구성 및 투여용량	14
2.10 관찰 및 검사	15
2.11 자료의 통계처리	19
3 결과 및 고찰	20
3.1 일반증상	20
3.2 체중변화	20
3.3 사료섭취량	20
3.4 안과학적 검사	20
3.5 뇨검사	21
3.6 혈액학적 검사	21
3.7 혈액생화학적 검사	21
3.8 장기중량	21
3.9 부검	22
3.10 조직병리학적 검사	22
4 결론	23
5 참고문헌	24

FIGURES	25
Figure 1. Body Weights in Male SD Rats	26
Figure 2. Body Weights in Female SD Rats	26
SUMMARY TABLES	27
Table 1. Summary of Clinical Signs	28
Table 2. Mean Body Weights	36
Table 3. Mean Food Consumption	38
Table 4. Summary of Ophthalmological Examination	40
Table 5. Summary of Urinalysis Results	41
Table 6. Mean Hematological Parameters	43
Table 7. Mean Clinical Chemistry	45
Table 8. Mean Absolute Organ Weights	47
Table 9. Mean Relative Organ Weights	49
INDIVIDUAL ANIMAL DATA	51
Table 10. Individual Body Weights during an Acclimation Period	52
Table 11. Individual Clinical Signs	53
Table 12. Individual Body Weight	67
Table 13. Individual Food Consumption	71
Table 14. Individual Ophthalmological Examination	75
Table 15. Individual Urinalysis Results	77
Table 16. Individual Hematological Parameters	86
Table 17. Individual Clinical Chemistry	90
Table 18-1. Individual Absolute Organ Weights (Scheduled)	94
Table 18-2. Individual Absolute Organ Weights (Unscheduled)	98
Table 19-1. Individual Relative Organ Weights (Scheduled)	99
Table 19-2. Individual Relative Organ Weights (Unscheduled)	103
APPENDICES	104
Appendix I. Protocol	105
Appendix II. Protocol Amendments	119
Appendix III. Protocol Deviations	120
Appendix IV. Certificate of Analysis	121
Appendix V. Analysis of Concentration in the Dosing Formulations (Non-GLP)	122
Appendix VI. Pathology Report	138

요약

본 시험은 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 13 주간 반복 경구투여 시에 대한 안전성을 평가하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 의 3 개 용량과 대조군 (주사용수)을 설정하였고, 암수 각 군당 10 마리에 13 주간 경구 투여하였다.

관찰기간 동안, 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았고, 시험물질색변이 관찰되었다.

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 체중 및 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다.

본 시험 조건하에서 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 랫드에 13 주 반복 경구투여한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day 로 판단된다.

1 시험실시의 개요

1.1 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 13 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호 (2018 년 11 월 21 일)
- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”
Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17
(as revised in 1997)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”
식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일)

1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 일부개정 2018 년 12 월 24 일 법률 제 16075 호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 190341).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

명칭 (주)자연과 효소
주소 우 46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308 호
TEL + 82-51-723-9446 FAX + 82-51-723-9447

1.7 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍
주소 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.8 시험책임자

성명 문설희
소속 독성평가팀

1.9 시험일정

시험개시일	2019년 6월 25일
동물입수일	2019년 6월 25일
군분리일	2019년 7월 1일
실험개시일	2019년 7월 2일
투여기간	2019년 7월 2일 ~ 9월 30일
부검일	2019년 10월 1일
실험종료일	2019년 10월 31일
시험종료일	2020년 6월 2일

1.10 분담책임자

검역	이진희
시험물질보관	김은애
병리	이시준

1.11 기록 및 자료의 보관

1.11.1 보관기간 품목허가일로부터 3년 (식품의약품안전처 고시 제 2018-93 호)

1.11.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실
주소 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

(시험종료 후 최초 5년간은 (주)바이오톡스텍 자료보관실에서 보관하며,
그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.)

1.11.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 최종보고서, 기초자료 및 그 외 기록문서, 검체 (평가 가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관), 통신연락문서, 보관용 시험물질

2 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	흰점박이꽃무지유충발효분말
2.1.2	Lot No.	FBP01
2.1.3	성상	Brown powder
2.1.4	성분 및 함량	<i>Bacillus subtilis</i> , 흰점박이꽃무지유충, 대두콩
2.1.5	제조일자	2018년 11월 28일
2.1.6	유효기간	정보없음
2.1.7	보관조건	실온
2.1.8	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.9	제공자	
	명칭	(주)자연과 효소
	주소	우 46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호
2.1.10	잔여시험물질의 처리	반환

2.2 부형제

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	DKN19003, DKN19006
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea

2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석

2.3.1 시험물질의 조제

시험물질을 칭량하여 교반기를 이용하여 현탁시켰다. 조제물은 냉장 하에서 보관한 후, 안정성이 확보된 8일 이내에 사용하였다.

2.3.2 안정성 및 균질성 (Non-GLP)

안정성 및 균질성은 한국기능식품연구원에서 실시한 “HPLC 를 이용한 흰점박이꽃무지유충발효분말 중 L-glutamic acid 의 조제물 분석법 검증 (Study No.: 연 19-014)”으로 확인하였다. 본시험의 투여농도를 포함하는 83.3 mg/mL 및 333.3 mg/mL 조제물의 균질성과 실온 4 시간 및 냉장 8 일간의 안정성을 확보하였다.

2.3.3 농도분석 (Non-GLP)

조제물의 분석은 HPLC (1260 Infinity LC, Agilent Technologies, Inc., U.S.A.)로 수행하였으며, 투여 전 및 투여 13 주에 각 용량별 조제물의 중층에서 3 회 채취하여 각각 1 회 측정하였다.

분석결과는 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 전에 각각 109.05%, 97.22% 및 95.32%, 투여 13 주에 각각 95.36%, 95.38% 및 94.22%로서 판정기준 (설정농도의 $\pm 20\%$ 이내)에 부합되었다 (Appendix V).

2.4 시험계

2.4.1 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

2.4.2 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Republic of Korea

2.4.3 종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

2.4.4 입수 시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 45 마리, 5 주령, 128.8 ~ 146.5 g / 암컷, 45 마리, 5 주령, 104.6 ~ 123.2 g

2.4.5 투여개시 시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 40 마리, 6 주령, 192.6 ~ 210.8 g / 암컷, 40 마리, 6 주령, 141.3 ~ 165.2 g

2.4.6 검역·순화

입수 시 동물의 외관 검사를 실시하고, 체중을 측정하였다. 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다.

순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 (Table 10)를 확인하여 동물의 이상유무를 확인하였다.

2.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리 시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

2.4.8 군분리

순화기간 종료일에 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 40 마리를 선발하여 암수 각 4 군 (군당 암수 각 10 마리)으로 군분리하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 배치하였다.

2.4.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 본시험에서 제외시켰다.

2.5 사육환경조건

2.5.1	동물실번호	B141
2.5.2	사육상자의 종류, 크기	스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)
2.5.3	사육상자당 수용동물 수	3 마리 (검역·순화기간) / 1 마리 (관찰기간)
2.5.4	온도	실측치: 21.5 ~ 23.5°C / 허용범위: 19.0 ~ 25.0°C
2.5.5	상대습도	실측치: 45.4 ~ 61.6% / 허용범위: 30.0 ~ 70.0%
2.5.6	환기횟수	10 ~ 15 회/시간
2.5.7	명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)
2.5.8	조도	150 ~ 300 Lux
2.5.9	사육기재의 교환 및 세척	사육상자 및 급이기는 1 회/2 주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

2.6 사료

2.6.1	종류	실험동물용 고품사료 (Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)
2.6.2	Lot No.	2918C-010619MA, 2918C-012819MA, 2918C-031819MA 2918C-042819MA
2.6.3	제조사	Envigo RMS, Inc., U.S.A.
2.6.4	급이방법	급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취시켰다.

2.6.5 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.7 음수

2.7.1 종류 및 급수방법

청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취시켰다.

2.7.2 음수의 분석 및 확인

음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1 로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제 684 호, 2016 년 12 월 30 일, 타법개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.8 투여

2.8.1 투여경로

경구투여

2.8.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

2.8.3 투여방법 및 투여횟수

개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 13 주간 1 일 1 회 위내에 강제투여하였다.

2.9 군구성 및 투여용량

2.9.1 군구성

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	15	10 (1101 ~ 1110)	10 (2101 ~ 2110)
G2 저용량군	1,250	15	10 (1201 ~ 1210)	10 (2201 ~ 2210)
G3 중용량군	2,500	15	10 (1301 ~ 1310)	10 (2301 ~ 2310)
G4 고용량군	5,000	15	10 (1401 ~ 1410)	10 (2401 ~ 2410)

2.9.2 투여용량설정

2 주 반복투여 용량결정시험 (Biototech Study No.: B18968) 결과, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 용량에서 시험물질 투여에 기인한 독성 영향이 관찰되지 않았다. 본시험의 투여용량은 시험의뢰자와의 협의에 따라, 5,000 mg/kg/day 를 고용량으로 설정하고, 공비 2 를 적용하여 2,500 및 1,250 mg/kg/day 를 각각 중용량 및 저용량의 투여용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

2.10 관찰 및 검사

2.10.1 일반증상 관찰

관찰기간 (13 주) 동안 모든 동물에 대하여 1 일 1 회 일반증상을 관찰하고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다.

2.10.2 사망동물의 처리

관찰기간 중 사망동물은 발견 시 신속히 부검하고, 즉시 부검을 실시하지 못하는 경우, 냉장 보관한 후 부검을 실시하였다. 부검 후 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였다. 단, 각 측정결과는 평가에서 제외하였다.

2.10.3 체중측정

투여개시일 (투여 전), 투여개시 후 주 1 회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하므로, 체중평가에서 제외하였다. 사망동물은 부검 전에 체중을 측정하였다.

2.10.4 사료섭취량 측정

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1 일간의 섭취량을 측정하였다. 관찰기간에는 7 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13 주에는 6 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다.

2.10.5 안과학적 검사

군당 암수 각 5 마리에 대하여 투여 13 주에 안과학적 검사를 실시하였다. 안과학적 검사는 산동제 (Lot No.: 18G04CA, 이습토 아트로핀 1% 점안제, 한국알콘)를 점안하기 전에 육안으로 동공대광반사 및 전안부 관찰을 실시하고, 산동제 점안 후에 검안경 (ALL PUPIL II, Keeler, U.K.)으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대해서 실시하였다.

2.10.6 뇨검사

군당 암수 각 5 마리에 대하여 투여 13 주에 뇨검사를 실시하였다. 신선뇨 (약 3 시간 채집뇨) 및 축뇨 (약 24 시간 채집뇨)를 수거하여, 아래 항목들을 검사하였다. 신선뇨 채취 중에는 투여 및 사료급여를 실시하지 않고, 음수는 자유섭취시켰다.

종류	항목	단위	측정방법 / 측정기기
신선뇨	pH	-	Combur ¹⁰ Test [®] M stick (Roche, Germany), Reflectance photometry, 뇨화학 분석기 (cobas u 411, Roche, Germany)
	단백 (protein)	mg/dL	
	당 (glucose)	mg/dL	
	케톤체 (ketone body)	mg/dL	
	빌리루빈 (bilirubin)	mg/dL	
	잠혈 (occult blood)	Ery/ μ L	
	색상 및 투명도	-	육안관찰
	침사	-	현미경 검사
축뇨	뇨량	mL	피펫, 피펫에이드
	뇨비중	-	비중계 (Vet360, Reichert, U.S.A.)

2.10.7 혈액학적 검사

모든 생존동물에 대하여 부검 전 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)	$\times 10^6 / \mu$ L	Hydrodynamic focusing DC detection
혈색소량 (hemoglobin, 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	
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	
혈소판수 (platelet count, PLT)	$\times 10^3 / \mu$ L	Hydrodynamic focusing DC detection
백혈구수 (total leukocyte count, WBC)	$\times 10^3 / \mu$ L	Flow cytometry, Fluorescence staining
백혈구백분율 (WBC differential counting)	%	
- 중성호성백혈구 (neutrophils, NEU)		
- 림프구 (lymphocytes, LYM)		
- 단핵구 (monocytes, MONO)		
- 산호성 백혈구 (eosinophils, EOS) - 염기호성 백혈구 (basophils, BASO)		
망상적혈구 (reticulocyte, Reti)	%	Flow cytometry, Fluorescence staining

응고검사는 채취한 혈액 약 2 mL 을 3.2% sodium citrate 함유 tube 에 넣고, 3,000 rpm 으로 10 분간 원심분리한 후 혈장을 채취하였다. 응고시간 분석기 (Coapresta 2000, SEKISUI, Japan)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
프로트롬빈시간 (prothrombin time, PT)	sec	Coagulation time method
부분활성트롬보플라스틴시간 (activated partial thromboplastin time, APTT)	sec	

2.10.8 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) 및 전해질 분석기 (EasyLyte, MEDICA, U.S.A.)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	U/L	JSCC
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	U/L	
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)	U/L	
감마 글루타밀트란스펩티다제 (gamma glutamyl transpeptidase, GGT)	U/L	G5CMP
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
크레아티닌 (creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe
총빌리루빈 (total bilirubin, T-Bili)	mg/dL	Vanadate oxidation
총단백 (total protein, TP)	g/dL	Biuret
알부민 (albumin, Alb)	g/dL	BCG
Albumin/Globulin ratio (A/G ratio)	-	Calculated
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPS
인 (phosphorus, P)	mg/dL	Fiske Subbarow
혈당 (glucose, Glu)	mg/dL	Hexokinase-G6PDH
칼슘 (calcium, Ca)	mg/dL	OCPC
염소* (chloride, Cl)	mmol/L	Ion-selective electrode
나트륨* (sodium, Na)	mmol/L	
칼륨* (potassium, K)	mmol/L	

* 전해질분석기로 측정

2.10.9 부검

모든 생존동물에 대해서 투여 92 일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

2.10.10 장기중량 측정

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

- 뇌 (brain)
- 심장 (heart)
- 간 (liver)
- 신장# (kidney)
- 고환# (testis)
- 난소# (ovary)
- 뇌하수체 (pituitary gland)
- 폐 (lung)
- 비장 (spleen)
- 부신# (adrenal gland)
- 전립선 (prostate)
- 자궁 (uterus)

2.10.11 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환, 안구 및 시신경은 Davidson 고정액에 고정 후, 10% 중성완충 포르말린 용액에 고정하였다.

- 뇌 (brain)
- 갑상선 (thyroid gland)
- 흉선 (thymus)
- 폐 (기관지 포함) (lung including bronchi)
- 기관 (trachea)
- 간 (liver)
- 신장 (kidney)
- 타액선 (악하선, 설하선, 이하선)
(salivary gland: submandibular, sublingual and parotid gland)
- 식도 (esophagus)
- 십이지장 (duodenum)
- 회장 (ileum)
- 결장 (colon)
- 췌장 (pancreas)
- 부고환 (epididymis)
- 정낭 (seminal vesicle)
- 자궁 (uterus)
- 방광 (urinary bladder)
- 장간막 림프절 (mesenteric lymph node)
- 안구 (eye)
- 하더리안선 (Harderian gland)
- 유선 (서혜부) (mammary gland: inguinal)
- 흉골 (골수 포함) (sternum including bone marrow)
- 대퇴골 (골수 포함) (femur including bone marrow)
- 혀 (tongue)
- 그 외 육안소견이 관찰된 장기·조직
- 뇌하수체 (pituitary gland)
- 부갑상선^{a)} (parathyroid gland)
- 심장 (heart)
- 비장 (spleen)
- 부신 (adrenal gland)
- 위 (stomach)
- 공장 (jejunum)
- 맹장 (cecum)
- 직장 (rectum)
- 고환 (testis)
- 전립선 (prostate)
- 난소 (ovary)
- 질 (vagina)
- 악하 림프절 (submandibular lymph node)
- 시신경^{a)} (optic nerve)
- 피부 (서혜부) (skin: inguinal)
- 척수 (흉부) (spinal cord: thoracic)

a) 해당 장기·조직이 슬라이드에 존재할 때만 조직병리학적 검사를 실시하였다.

조직병리학적 검사를 실시하는 장기/조직은 조직병리 검체제작 SOP 에 준하여 검체를 제작하고, 잔여 장기/조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

조직병리학적 검사는 아래의 장기·조직에 대하여 검경하였다.

- 대조군 및 고용량군의 모든 개체
- 중용량 및 저용량군의 육안소견이 관찰된 장기·조직

2.11 자료의 통계처리

체중, 사료섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량 결과에 대해서 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 아래의 방법으로 통계분석을 실시하였다.

Bartlett's test 를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis test 를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel's test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3 결과 및 고찰

3.1 일반증상

(Table 1, Table 11)

투여 30 일에 대조군 암컷 1 레가 사망하였다. 관찰기간 동안, 모든 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

1,250 mg/kg/day 투여군에서는 시험물질색변 (compound-colored stool)이 수컷 1 ~ 2 레에서 투여 2, 9~11 일, 암컷 1~2 레에서 투여 2~12 일에 관찰되었다.

2,500 mg/kg/day 투여군에서는 시험물질색변이 수컷 2 ~ 8 레 및 암컷 1 ~ 6 레에서 투여 2~91 일에 관찰되었다.

5,000 mg/kg/day 투여군에서는 시험물질색변이 수컷 6 ~ 10 레 및 암컷 6 ~ 10 레에서 투여 2~91 일에 관찰되었다.

시험물질색변은 관찰된 기간 및 빈도가 용량의존적으로 증가하고, 체중 및 사료섭취량의 변화 또는 장관계에서 독성학적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았으므로, 시험물질 과량투여에 의한 변화로 판단되며, 독성학적 의미는 미미한 것으로 판단된다.

투여 30 일에 사망한 대조군 암컷 1 레는 사료섭취량의 감소 (decrease in food intake) 및 변량의 감소 (decrease of fecal volume)이 투여 30 일 오전에 관찰된 후, 오후에 사망하였다. 이는 대조군에서 관찰된 변화이고, 부검 및 조직병리학적 검사 결과, 투여와는 연관이 없는 우발적인 사망으로 판단된다.

3.2 체중변화

(Figure 1, Figure 2, Table 2, Table 12)

관찰기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시 유의한 체중의 변화는 관찰되지 않았다.

3.3 사료섭취량

(Table 3, Table 13)

관찰기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시 유의한 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

3.4 안과학적 검사

(Table 4, Table 14)

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

3.5 뇨검사

(Table 5, Table 15)

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 독성변화로 판단되는 결과는 없었다.

검출 및 빈도의 감소/증가경향이 관찰된 항목 모두 경미한 변동으로서 우발적 분포이거나, 연관된 항목의 변화가 관찰되지 않았으므로 모두 독성학적 의미는 없었다.

3.6 혈액학적 검사

(Table 6, Table 16)

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 인정되지 않았다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 용량상관성이 없거나, 정상범위¹⁾ 내의 경미한 변동으로 독성학적 의미는 없었다.

3.7 혈액생화학적 검사

(Table 7, Table 17)

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교 시, 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

3.8 장기중량

(Table 8, Table 9, Table 18-1, Table 18-2, Table 19-1, Table 19-2)

사망동물

비슷한 주령의 정상범위²⁾와 비교 시, 투여 30 일에 사망한 대조군 암컷 1 레 (개체번호: 2107)의 폐, 간, 비장, 신장, 부신, 난소에서 절대 및 상대중량의 증가, 자궁에서 절대 및 상대중량의 감소가 관찰되었다. 이러한 변화는 부검 및 조직병리학적 소견과 일치하나, 대조군에서 관찰된 변화이며, 단일레에서만 관찰된 것으로, 투여와는 연관이 없는 우발적인 것으로 판단된다.

생존동물

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 인정되지 않았다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 정상범위¹⁾ 내의 경미한 변동이고, 형태학적 변화를 동반하지 않아, 독성학적 의미는 없었다.

3.9 부검

(Appendix VI)

사망동물

투여 30 일에 사망한 암컷 1 레 (개체번호: 2107)에서, 복강의 출혈 (hemorrhage), 전위의 황색 병소 (focus), 간 및 비장의 비대 (enlargement)가 관찰되었다.

관찰된 소견은 대조군에서 관찰된 것으로 시험물질과는 무관한 우발적인 것으로 판단된다.

생존동물

부검 시, 암수 대조군, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

그 외, 관찰된 다른 소견은 우발적이고, 시험물질과의 연관성이 없는 것으로 판단된다.

3.10 조직병리학적 검사

(Appendix VI)

사망동물

투여 30 일에 사망한 암컷 1 레 (개체번호: 2107)에서, 골수성 백혈병 (myeloid leukaemia)이 관찰되었다. 대퇴골의 골수에서 미분화된 골수세포가 빠르게 증식하는 것이 관찰되었으며, 전이성 백혈병이 다양한 장기 (간, 비장, 골수를 포함한 흉골, 폐 및 난소)에서 관찰되었다.

그 외, 관찰된 소견은 투여와는 연관이 없는 우발적인 변화로 판단된다.

상기 대조군 사망례에서 관찰된 변화는 단일례에서만 관찰된 것으로, 시험물질 투여와는 연관이 없는 우발적인 것으로 판단된다.

생존동물

조직병리학적 검사 결과, 암수 대조군, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

그 외, 관찰된 다른 소견은 우발적이고, 시험물질과의 연관성이 없는 것으로 판단된다.

4 결론

본 시험 조건하에서 시험물질인 흰점박이꽃무지유충발효분말을 랫드에 13 주 반복 경구투여한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day 로 판단된다.

5 참고문헌

- 1) JM Lee *et al*, Historical control data from 13-week repeated toxicity studies in Crj:CD(SD) rats. Lab. Anim. Res. 2012;28(2):115-121
- 2) JM Lee *et al*, Historical Control Data from 4-week Repeated Toxicity Studies in Crj:CD(SD) Rats. J. Exp. Biomed. Sci. 2012, 18(3):268-275



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: B18970

㈜바이오텍스텍

우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

GLP적합진술서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호 : B18970

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”

Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17
(as revised in 1997)

㈜바이오텍스텍
시험책임자 김승화


2020년 5월 29일

㈜바이오텍스텍
운영책임자 박선희


2020년 5월 29일

신뢰성보증서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호 : B18970

(주)바이오톡스텍 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 짐김하였다. 짐김은 GLP, 시험계획서, (주)바이오톡스텍의 표준작업수순서에 따라서 실시하였으며, 각각의 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

점검수행단계 및 시험책임자와 운영책임자에게 보고한 일자는 아래와 같다.

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
시험계획서	2019년 2월 18일	2019년 2월 18일
시험계획서의 변경 (1)	2019년 9월 26일	2019년 9월 27일
시험계획서의 변경 (2)	2019년 12월 31일	2019년 12월 31일
시험물질의 보관 [용량설정시험]	2019년 2월 20일	2019년 2월 20일
시험물질의 조제	2019년 2월 20일	2019년 2월 20일
시험물질의 처리 [본시험]	2019년 2월 20일	2019년 2월 20일
균주접종*	2019년 8월 12일	2019년 8월 13일
시험물질의 조제	2019년 9월 26일	2019년 9월 27일
시험물질의 처리	2019년 10월 1일	2019년 10월 1일
클로니계수*	2019년 8월 15일	2019년 8월 16일
시험기초자료의 기록	2019년 11월 15일	2019년 11월 15일
최종보고서 (안)	2019년 11월 15일	2019년 11월 15일
최종보고서	2020년 5월 29일	2020년 5월 29일

* 수행절차의 점검: 반복적으로 실시되는 정형적인 절차는 시험마다 점검을 실시하지 않고, 특정의 시험을 점검하여 본 시험의 해당단계를 보증한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

(주)바이오톡스텍
신뢰성보증책임자 정우용



2020년 5월 29일

목 차

	페이지
GLP적합진술서	2
신뢰성보증서	3
요약	6
1. 시험실시의 개요	7
1.1 시험목적	7
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	7
1.3 시험기준	7
1.4 시험의뢰자	7
1.5 시험기관	7
1.6 시험책임자	8
1.7 시험일정	8
1.8 분담책임자	8
1.9 기록 및 자료의 보관	9
2. 시험재료 및 방법	10
2.1 시험물질	10
2.2 음성대조물질	10
2.3 양성대조물질	11
2.4 조제 및 분석	11
2.5 균주	13
2.6 배지	14
2.7 S9 mix의 조제	15
2.8 용량설정시험	15
2.9 본시험	16
2.10 관찰 및 계측	17
2.11 시험의 성립조건	18
2.12 결과의 판정	18
2.13 자료의 통계처리	18
3. 결과 및 고찰	19
3.1 용량설정시험	19
3.2 본시험	19
3.3 시험의 성립	19
4. 결론	20

FIGURES	21
Figure 1. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (Dose Range Finding Study)	22
Figure 2. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation (Dose Range Finding Study)	23
Figure 3. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (1 st Main Study)	24
Figure 4. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation (1 st Main Study)	25
Figure 5. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation (2 nd Main Study)	26
Figure 6. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation (2 nd Main Study)	27
TABLES	28
Table 1. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Absence of Metabolic Activation (Dose Range Finding Study)	29
Table 2. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation (Dose Range Finding Study)	30
Table 3. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Absence of Metabolic Activation	31
Table 4. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation	32
Table 5. Historical Control Data	33
APPENDICES	34
Appendix I. Protocol	35
Appendix II. Protocol Amendments	50
Appendix III. Protocol Deviations	55
Appendix IV. Certificate of Analysis of Test Substance	56
Appendix V. Analysis of Concentration in Dosing Formulations (Non-GLP)	57
Appendix VI. Certificate of Analysis of Standard Substance (Non-GLP)	67
Appendix VII. Certificate of Analysis of Test Substance (Non-GLP)	68

요약

시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균 (WP2*uvrA*(pKM101) 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 각각 검토하였다.

용량설정시험의 결과, 시험물질의 생육저해는 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 19.5 µg/plate 이상에서 관찰되었으나, 복귀변이콜로니수의 계측에는 영향이 없었다.

용량설정시험의 결과에 따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

본시험의 결과, 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 검토하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”

Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17
(as revised in 1997)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2017-71호 (2017년 8월 30일)

- “OECD Guideline for The Testing of Chemicals, 471, Bacterial Reverse Mutation Test”

Organisation for Economic Co-operation and Development (Adopted: Jul. 21, 1997)

1.4 시험의뢰자

명칭 (주)자연과 효소

주소 우46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호

TEL + 82-51-723-9446 FAX + 82-51-723-9447

1.5 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍

주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.6 시험책임자

성명 김승화
소속 첨단독성팀

1.7 시험일정

시험개시일	2019년 2월 14일
실험개시일	2019년 2월 20일
용량설정시험	
- 균주 접종일	2019년 2월 19일
- 시험물질 처리일	2019년 2월 20일
- 균주 배양일	2019년 2월 20일 ~ 2월 22일
- 복귀변이콜로니수 계측일	2019년 2월 22일
본시험	
- 균주 접종일	2019년 9월 30일, 10월 1일
- 시험물질 처리일	2019년 10월 1일, 10월 2일
- 균주 배양일	2019년 10월 1일 ~ 10월 3일, 10월 2일 ~ 10월 4일
- 복귀변이콜로니수 계측일	2019년 10월 3일, 10월 4일
실험종료일	2019년 10월 4일
시험종료일	2020년 5월 29일

1.8 분담책임자

시험물질 보관 김은애

1.9 기록 및 자료의 보관

1.9.1 보관기간 품목허가일로부터 3년 (식품의약품안전처 고시 제2018-93호)

1.9.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실

주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

(시험종료 후 최초 5년간은 (주)바이오톡스텍 자료보관실에서 보관하며,
그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.)

1.9.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료, 기록문서 및
통신연락문서

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	흰점박이꽃무지유충발효분말
2.1.2	Lot No.	FBP01
2.1.3	성상	Brown powder
2.1.4	성분	<i>Bacillus subtilis</i> , 흰점박이꽃무지 유충, 대두콩
2.1.5	제조일	2018년 11월 28일
2.1.6	유효기간	정보없음
2.1.7	보관조건	실온
2.1.8	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.9	제공자	
	명칭	(주)자연과 효소
	주소	우46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호
2.1.10	잔여시험물질의 처리	반환

2.2 음성대조물질

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	18003, 19005
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea
2.2.5	선택이유	본 시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

2.3 양성대조물질

명칭	Lot No. (#: Batch No.)	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	# MKBX7529V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	# S43858V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	# STBD3302V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	BCBR5712V, BCBV9306	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	# WXBC3635V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

2.4 조제 및 분석

2.4.1 시험물질의 조제

2.4.1.1 부형제

2.4.1.1.1 명칭 주사용수

2.4.1.1.2 Lot No. 18003, 19005

2.4.1.1.3 선택이유

용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/plate를 조제하기 위하여, 부형제 검토를 실시한 결과, Dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, tetrahydrofuran에 용해 또는 균일하게 현탁되지 않았고, 주사용수에 균일하게 현탁되었다. 따라서, 주사용수를 부형제로 선택하였다.

2.4.1.2 조제방법

시험물질의 조제는 시험물질 처리일 또는 조제물 분석일에 실시하였다.

필요량의 시험물질을 칭량한 후, 유발에 넣고 소량의 부형제를 넣어 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계 희석하여 조제하였다.

본시험의 조제물은 냉장보관 하에 안정성이 확보된 8일 이내에 사용하였다.

2.4.1.3 조제물의 분석

2.4.1.3.1 균질성 및 안정성 (Non-GLP)

균질성 및 안정성은 한국기능식품연구원에서 실시한 “HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지유충발효분말 중 L-glutamic acid의 조제물 분석법 검증 (Study No.: 연 19-014)”의 결과, 0.53 및 270.22 mg/mL의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정하였다.

2.4.1.3.2 농도 분석 (Non-GLP)

조제물의 농도 분석은 HPLC (1260 Infinity LC , Agilent Technologies, U.S.A.)로 수행하였다.

분석방법은 “HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지유충발효분말 중 L-glutamic acid의 조제물 분석법 검증 (Study No.: 연 19-014)”에 근거하여 처리 전에 3.13 및 50 mg/mL의 조제물 중층에서 3회 채취하여 각각 1회 측정하였다.

조제물의 농도 분석 결과, 흰점박이꽃무지유충발효분말의 조제물의 정밀성 및 정확성은 각각 2.55 ~ 4.72% 및 86.36 ~ 92.76%로 판정기준을 만족하였다 (Appendix V).

2.4.2 양성대조물질의 조제

각 균주에 대한 양성대조물질의 용량은 본 기관의 historical control data에 기초하여 설정하였다. SA는 주사용수 (Lot No.: 17012, 19005, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea)에, 2-NF, 9-AA, 4-NQO 및 2-AA는 DMSO (Lot No.: K49824131, K50270931, Merck, Germany)에 조제하고, 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C, OPR-DFU-657CEV, Operon, Republic of Korea)에 동결 보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

<각 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량>

S9 mix	균주명	명칭	용량 (µg/plate)
-	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA(pKM101)	4-NQO	0.1
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	2.0

2.5 균주

2.5.1 종 및 균주명

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Salmonella typhimurium TA1537

Escherichia coli WP2uvrA(pKM101)

2.5.2 선택이유

변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용하고 있으며, 가이드라인에서 추천하는 균주를 사용하였다.

2.5.3 입수 및 보관

균주는 2015년 10월 22일 (TA98, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101)), 2015년 11월 25일 (TA100 및 TA1537)에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOX™, Inc., U.S.A.)에서 구입하였다. 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130 rpm)한 후, 각 균주의 유전자형 (genotype), 자발복귀변이 콜로니수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인하였다.

각 균주의 특성을 확인한 후, 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결 보관용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하였다.

<각 균주의 유전자형>

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

2.5.4 전배양

동결 보관된 각 균주를 실온에서 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37°C, 130 rpm, BS-31, JEIO TECH. CO., LTD., Republic of Korea)하였다. 전배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10⁹ cells/mL 이상인 것을 확인한 후, 시험에 사용하였다.

2.6 배지

2.6.1 Nutrient broth 배지

Nutrient broth (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 넣고 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 초순수로 최종농도가 0.8%가 되도록 조제한 후, 고압증기 멸균하였다.

2.6.2 최소 glucose 한천평판배지

Bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 넣어 조제하고 고압증기 멸균하였다. 멸균 후, Vogel-Bonner (VB) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 넣고 플레이트에 분주하여 실온에서 굳혔다.

<최소 glucose 한천평판배지의 조성>

성분	각 성분의 함유량
Bacto agar	15 g
VB salts 10배 농축액	100 mL
20% glucose	100 mL
초순수	800 mL
총 액량	1 L

<VB salts 10배 농축액의 조성>

성분	사용량	제조자
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
구연산	1.829 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
K ₂ HPO ₄	10 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	3.58 g	KANTO CHEMICAL CO., INC., Japan
초순수	100 mL	-

2.6.3 Top agar

염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 넣어 각각 0.5 및 0.6%가 되도록 조제한 후, 고압증기 멸균하였다. 멸균 후, 살모넬라균주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin 혼합액 (SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.)을, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

2.7 S9 mix의 조제

2.7.1 입수 및 보관

S9과 Cofactor A를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.

<S9의 특성>

사용동물	Sprague-Dawley rat [CrI:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)
투여용량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째), 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

2.7.2 S9 mix 조성

성분	각 성분의 함유량	
S9	0.1 mL	
Cofactor A	0.4 mol/L MgCl ₂	0.02 mL (8 μmol)
	1.65 mol/L KCl	0.02 mL (33 μmol)
	1.0 mol/L Glucose-6-phosphate	0.005 mL (5 μmol)
	0.1 mol/L NADPH	0.04 mL (4 μmol)
	0.1 mol/L NADH	0.04 mL (4 μmol)
	0.2 mol/L Sodium phosphate buffer, pH 7.4	0.5 mL (100 μmol)
	정제수	0.275 mL
총 액량	1 mL	

2.7.3 S9 mix의 조제방법

S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결 보관된 S9 (Lot No.: 18083106 (용량설정시험), 19051702 (1차 본시험), 19060703 (2차 본시험))과 Cofactor A (Lot No.: A18082806 (용량설정시험), A19051402 (1차 본시험), A19060403 (2차 본시험))를 해동하여 1:9의 비율로 혼합하여 조제하였다.

2.8 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 실시하였다.

2.8.1 용량

가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2.8.2 시험방법

용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 각 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

2.8.3 본시험의 용량설정

용량설정시험의 결과, 시험물질의 생육저해는 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 19.5 µg/plate 이상에서 관찰되었으나, 복귀변이콜로니수의 측정에는 영향이 없었다.

용량설정시험의 결과에 따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

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

2.9 본시험

2.9.1 시험방법

본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다.

본시험은 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하여 2회 실시하였다.

각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군 및 S9 mix 존재 유무를 식별한 번호를 기입하였다.

2.9.2 처리방법

대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질 100 µL를 각 튜브에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 각 균주현탁액 100 µL를 넣은 후, 20분간 진탕배양 (37°C, 90 rpm)하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 2 mL씩 넣어 vortexing 하고, 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 굳혔다.

대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 넣었다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다.

2.9.3 배양법 및 배양시간

Top agar가 굳은 후, 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기 (DK-LI020-P, Daiki scientific Co., LTD., Republic of Korea)에서 48시간 배양하였다.

2.9.4 무균검사

잡균에 의한 오염 유무를 확인하기 위하여, 시험물질 최고용량 100 µL, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 S9 mix 500 µL를 튜브에 각각 넣고, 20분간 진탕배양 (37°C, 90 rpm)하였다. 진탕 종료 후, top agar를 넣어 vortexing하고, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에서 굳혔다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

2.9.5 확인시험

아래의 경우에 해당되지 않았기 때문에 확인시험을 실시하지 않았다.

-
- 유전자돌연변이 유발성에 있어, 본시험의 결과에서 재현성이 확보되지 않은 경우
 - 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4단계 이상 확보되지 않은 경우
-

2.10 관찰 및 계측

2.10.1 시험물질의 침전의 관찰

시험물질 처리시 및 복귀변이콜로니수 계측시에 시험물질의 침전을 육안으로 관찰하고 기록하였다.

2.10.2 복귀변이콜로니수의 계측

배양 종료 후, 복귀변이콜로니수는 자동콜로니 계측기 (ProtoCOL3, SYNBIOISIS, UK)로 자동계측하거나 육안계수를 실시하였다. 자동계측이 정확하지 않다고 판단되는 경우, 육안계수를 실시하였다.

2.10.3 Background lawn의 관찰

생육저해 유무를 확인하기 위하여, 복귀변이콜로니수 계측시, background lawn의 형성 유무를 실체현미경 (45배 배율, SZ61, Olympus, Japan)으로 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 음성대조군과 비교하여 복귀변이콜로니수가 현저히 감소하거나, background lawn이 옅어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

2.11 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

-
- 음성 및 양성대조군에서의 평균 복귀변이콜로니수가 historical control data의 범위 내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것.
 - 오염이 없을 것.
-

2.12 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

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

2.13 자료의 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하며 통계학적 방법은 사용하지 않았다.

3. 결과 및 고찰

3.1 용량설정시험

(Figure 1, Figure 2, Table 1, Table 2)

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 2.8의 시험방법에 따라 용량설정시험을 실시한 결과, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 _{uvrA} (pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

3.2 본시험

(Figure 3, Figure 4, Figure 5, Figure 6, Table 3, Table 4)

3.2.1 복귀변이콜로니수의 계측

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배를 초과하지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

3.2.2 시험물질에 의한 생육저해 및 침전

시험물질의 생육저해는 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되었으나, 복귀변이콜로니수의 계측에는 영향이 없었다.

3.3 시험의 성립

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data (Table 5) 범위 내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다. 또한, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단하였다.



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호: B18971

(주)바이오텍스텍

우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

GLP적합진술서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호 : B18971

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”

Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17
(as revised in 1997)

㈜바이오텍스텍
시험책임자 안효진


2020년 5월 29일

㈜바이오텍스텍
운영책임자 박선희


2020년 5월 29일

신뢰성보증서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호 : B18971

(주)바이오톡스텍 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 점검하였다. 점검은 GLP, 시험계획서, (주)바이오톡스텍의 표준작업수순서에 따라서 실시하였으며, 각각의 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

점검수행단계 및 시험책임자와 운영책임자에게 보고한 일자는 아래와 같다.

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
시험계획서	2019년 2월 19일	2019년 2월 19일
시험계획서의 변경 (1)	2019년 9월 19일	2019년 9월 20일
시험계획서의 변경 (2)	2020년 1월 3일	2020년 1월 3일
시험물질의 보관	2019년 9월 19일	2019년 9월 20일
시험물질의 조제	2019년 9월 19일	2019년 9월 20일
시험물질의 조제	2019년 9월 24일	2019년 9월 24일
시험물질의 처리	2019년 9월 24일	2019년 9월 24일
검체제작 (도말)*	2019년 8월 2일	2019년 8월 2일
검체제작 (염색)*	2019년 8월 5일	2019년 8월 5일
검체판독*	2019년 8월 13일	2019년 8월 13일
시험기초자료의 기록	2019년 12월 18일	2019년 12월 18일
최종보고서 (안)	2019년 12월 18일	2019년 12월 18일
최종보고서	2020년 5월 29일	2020년 5월 29일

* 수행절차의 점검: 반복적으로 실시되는 정형적인 절차는 시험마다 점검을 실시하지 않고, 특정의 시험을 점검하여 본 시험의 해당단계를 보증한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

(주)바이오톡스텍
신뢰성보증책임자 정우용



2020년 5월 29일

목 차

	페이지
GLP적합진술서	2
신뢰성보증서	3
요약	6
1. 시험실시의 개요	7
1.1 시험목적	7
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	7
1.3 시험기준	7
1.4 시험의뢰자	7
1.5 시험기관	7
1.6 시험책임자	8
1.7 시험일정	8
1.8 분담책임자	8
1.9 기록 및 자료의 보관	8
2. 시험재료 및 방법	10
2.1 시험물질	10
2.2 음성대조물질	10
2.3 양성대조물질	11
2.4 조제 및 분석	11
2.5 세포주	13
2.6 배지	14
2.7 S9 mix의 조제	14
2.8 용량설정시험	15
2.9 본시험	17
2.10 관찰	19
2.11 시험의 성립조건	20
2.12 결과의 판정	20
2.13 자료의 통계처리	21
3. 결과 및 고찰	22
3.1 RPD 측정	22
3.2 시험물질의 침전	22
3.3 염색체이상 관찰대상 용량	22
3.4 염색체이상 출현빈도	22
3.5 시험의 성립	23
4. 결론	24

TABLES	25
Table 1. Summary Results of the Dose Range Finding Study	26
Table 2. Summary Results of the Main Study	27
Table 3. Historical Control Data	28
APPENDICES	29
Appendix I. Protocol	30
Appendix II. Protocol Amendments	46
Appendix III. Protocol Deviations	52
Appendix IV. Certificate of Analysis of Test Substance	53
Appendix V. Analysis of Concentration in Dosing Formulations (Non-GLP)	54
Appendix VI. Certificate of Analysis of Standard Substance (Non-GLP)	64
Appendix VII. Certificate of Analysis of Test Substance (Non-GLP)	65

요약

시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/mL를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL로 용량설정시험을 실시한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되었다. 세포증식을 50% 이상 (약 55%) 억제하는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에서는 각각 213 및 311 µg/mL, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 202 µg/mL이었다. 시험물질에 의한 침전은 단시간처리법 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 19.5 µg/mL 이상, 단시간처리법의 대사활성화존재하의 39.1 µg/mL 이상의 용량에서 관찰되었다.

용량설정시험의 결과에 따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	200, 100, 50.0, 25.0
	+	300, 150, 75.0, 37.5
연속처리법	-	200, 100, 50.0, 25.0

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (CHL/IU cell line)를 이용하여 검토하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”

Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17
(as revised in 1997)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2017-71호 (2017년 8월 30일)

- “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 473, *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test”

Organisation for Economic Co-operation and Development (Adopted: Jul. 29, 2016)

1.4 시험의뢰자

명칭 (주)자연과 효소

주소 우46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호

TEL + 82-51-723-9446 FAX + 82-51-723-9447

1.5 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍

주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.6 시험책임자

성명 안효진
소속 첨단독성팀

1.7 시험일정

시험개시일	2019년 2월 14일
실험개시일	2019년 9월 24일
용량설정시험	
- 세포 분주일	2019년 2월 20일
- 시험물질 처리일	2019년 2월 21일
- 세포 배양일	2019년 2월 21일 ~ 2월 22일
- 세포 계수일	2019년 2월 22일
본시험	
- 세포 분주일	2019년 9월 23일
- 시험물질 처리일	2019년 9월 24일
- 세포 배양일	2019년 9월 24일 ~ 9월 25일
- 검체제작 및 염색일	2019년 9월 25일 ~ 9월 26일
- 검체 판독일	2019년 10월 7일 ~ 10월 15일
실험종료일	2019년 10월 15일
시험종료일	2020년 5월 29일

1.8 분담책임자

시험물질 보관 김은애

1.9 기록 및 자료의 보관

1.9.1 보관기간 품목허가일로부터 3년 (식품의약품안전처 고시 제2018-93호)

1.9.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실
주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

(시험종료 후 최초 5년간은 (주)바이오톡스텍 자료보관실에서 보관하며,
그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.)

1.9.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료, 기록문서, 검체
(평가 가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관) 및 통신연락문서

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	흰점박이꽃무지유충발효분말
2.1.2	Lot No.	FBP01
2.1.3	성상	Brown powder
2.1.4	성분	<i>Bacillus subtilis</i> , 흰점박이꽃무지 유충, 대두콩
2.1.5	제조일	2018년 11월 28일
2.1.6	유효기간	정보없음
2.1.7	보관조건	실온
2.1.8	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.9	제공자	
	명칭	㈜자연과 효소
	주소	우46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호
2.1.10	잔여시험물질의 처리	반환

2.2 음성대조물질

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	18003, 19005
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea
2.2.5	선택이유	본 시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

2.3 양성대조물질

명칭	Lot No.	보관조건	제조사
Mitomycin C (MMC)	MKCG5111	냉장	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	SLBV8459	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

2.4 조제 및 분석

2.4.1 시험물질의 조제

2.4.1.1 부형제

2.4.1.1.1 명칭 주사용수

2.4.1.1.2 Lot No. 18003, 19005

2.4.1.1.3 선택이유

용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/mL의 10배 stock (수용액) 또는 100배 stock (유기용매)를 조제하기 위하여, 부형제 검토를 실시한 결과, Dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, tetrahydrofuran에 용해 또는 균일하게 현탁되지 않았고, 주사용수에 균일하게 현탁되었다. 따라서, 주사용수를 부형제로 선택하였다.

2.4.1.2 조제방법

용량설정시험의 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다.

최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후, 유발에 넣고 소량의 부형제를 넣어 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계 희석하여 조제하였다.

본시험의 시험물질의 조제는 시험물질 처리일 또는 조제물 분석일에 실시하였다.

최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후, 유발에 넣고 소량의 부형제를 넣어 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계 희석하여 조제하였다. 단, 0.53 mg/mL 미만의 조제물은 시험물질 처리일에 단계 희석하여 조제하였다.

조제물 분석일에 조제한 본시험의 조제물은 냉장 보관하고, 안정성이 확보된 기간 이내에 사용하였다.

2.4.1.3 조제물의 분석

2.4.1.3.1 균질성 및 안정성 (Non-GLP)

균질성 및 안정성은 한국기능식품연구원에서 실시한 “HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지유충발효분말 중 L-glutamic acid의 조제물 분석법 검증 (Study No.: 연 19-014)”의 결과, 0.53 및 270.22 mg/mL의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정하였다.

2.4.1.3.2 농도 분석 (Non-GLP)

조제물의 농도 분석은 HPLC (1260 Infinity LC , Agilent Technologies, U.S.A.)로 수행하였다.

분석방법은 “HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지유충발효분말 중 L-glutamic acid의 조제물 분석법 검증 (Study No.: 연 19-014)”에 근거하여 처리 전에 각 용량의 조제물 중층에서 3회 채취하여 각각 1회 측정하였다. 단, 0.53 mg/mL 미만의 조제물은 정량한계 이하로, 분석법이 확립되지 않았기 때문에 농도 분석을 실시하지 않았다.

조제물 농도 분석 결과, 조제물의 정밀성 및 정확성은 각각 0.61 ~ 4.11 및 84.02 ~ 94.32%였다. 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 80 ~ 120% 이내로 판정기준을 만족하였다 (Appendix V).

2.4.2 양성대조물질의 조제

MMC는 DMSO (Lot No.: K50270931, Merck, Germany)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시켜 10 µg/mL의 stock solution을 조제하였다.

B[a]P는 필요량을 칭량한 후, DMSO (Lot No.: K50270931)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시켜 2,000 µg/mL의 stock solution을 조제하였다.

조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주하여 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C, OPR-DFU-657CEV, Operon, Republic of Korea)에 동결 보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

계열	S9 mix	명칭	Stock concentration (µg/mL)	최종처리용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	MMC	10	0.1
	+	B[a]P	2,000	20
연속처리법	-	MMC	10	0.1

2.5 세포주

2.5.1 명칭

CHL/IU 세포

2.5.2 선택이유

검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용하고 있으며 가이드라인에서 추천하는 CHL/IU 세포주를 선택하였다.

2.5.3 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 cm² 플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO₂가 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 마이코플라즈마 오염 유무를 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.)을 배양플라스크에 가하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. 1×10⁶ cells/mL가 되도록 FBS를 첨가하고, DMSO의 최종농도가 10%가 되도록 첨가한 후, 동결 보관용 튜브에 분주하였다. 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에서 하루동안 방치한 후, 액체질소탱크로 옮겨 사용시까지 보관하였다.

2.5.4 계대배양

동결보관된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 해동하여, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어있는 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

세포가 배양플라스크 바닥면적에 70 ~ 80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Gibco, U.S.A.)을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

2.5.5 전배양

염색체이상시험에는 세포 계대수가 26 이내인 세포를 사용하였다.

대수증식기의 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Gibco, U.S.A.)을 처리하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10⁴ cells/mL 세포현탁액을 만든 후, 용량설정시험은 6 well 플레이트 (2 mL/well, Nunc, Denmark), 본시험은 60 mm 플레이트 (5 mL/plate, BD, U.S.A.) 및 6 well 플레이트 (2 mL/well)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 각 플레이트에 식별번호를 기입하였다.

2.6 배지

시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Gibco, U.S.A.)을 100:1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2 ~ 8°C) 보관하였다.

2.7 S9 mix의 조제

2.7.1 입수 및 보관

S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기한 내에 사용하였다.

<S9의 특성>

사용동물	Sprague-Dawley rat [CrI:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)
투여용량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째), 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

2.7.2 S9 mix 조성

성분	각 성분의 함유량	
S9	0.3 mL	
Cofactor C	50 mmol/L MgCl ₂	0.1 mL (5 μmol)
	330 mmol/L KCl	0.1 mL (33 μmol)
	50 mmol/L Glucose-6-phosphate	0.1 mL (5 μmol)
	40 mmol/L NADP	0.1 mL (4 μmol)
	20 mmol/L HEPES 완충액 (pH 7.2)	0.2 mL (4 μmol)
	정제수	0.1 mL
총 액량	1 mL	

2.7.3 S9 mix의 조제방법

S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결 보관된 S9 (Lot No.: 18092807 (용량설정시험), 19051702 (본시험))과 Cofactor C (Lot No.: C18092607 (용량설정시험), C19051502 (본시험))를 해동하여 2:4.7의 비율로 혼합하여 조제하였다.

2.8 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 비GLP로 실시하였다.

2.8.1 용량

시험물질이 식품인 것을 고려하여, 5,000 μg/mL을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 μg/mL의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

2.8.2 처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 1 well을 사용하였다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

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	2.2	0.5	0.3	2
		시험물질	2.2		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 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

시험물질 처리 후, 음성대조군 및 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압을 측정하였다. 그 결과, 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압이 음성대조군과 비교하여 각각 1.0 및 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았다. 따라서, 최고용량군 이외의 시험물질군은 pH 및 삼투압을 측정하지 않았다. 또한, pH 변화로 인한 배지의 색 변화는 관찰되지 않았다.

2.8.3 Relative Population Doubling (RPD)의 산출

용량설정시험의 전배양시, Satellite대조군으로 세포독성 확인용 well 플레이트 (1 well)를 제작하였다.

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

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

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

2.8.4 본시험의 용량설정 (Table 1)

2.8.4.1 용량설정시험의 결과

용량설정시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 세포독성이 관찰되었다. 세포증식을 50% 이상 (약 55%) 억제하는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에서는 각각 213 및 311 $\mu\text{g/mL}$, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 202 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 시험물질에 의한 침전은 단시간처리법 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 19.5 $\mu\text{g/mL}$ 이상, 단시간처리법의 대사활성화존재하의 39.1 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 용량에서 관찰되었다.

2.8.4.2 본시험의 용량

본시험의 최고용량은 세포증식을 50% 이상 (약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 본시험의 최고용량으로 하여, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 각각 200 및 300 $\mu\text{g/mL}$, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 200 $\mu\text{g/mL}$ 로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 4단계의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 ($\mu\text{g/mL}$)
단시간처리법	-	200, 100, 50.0, 25.0
	+	300, 150, 75.0, 37.5
연속처리법	-	200, 100, 50.0, 25.0

2.9 본시험

2.9.1 처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질	
단시간 처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.70		0.13	5
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 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속 처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시 (Colcemid 처리전)에 각 용량별로 관찰하였다.

용량설정시험에서 pH 및 삼투압이 음성대조군과 비교하여 각각 1.0 및 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았기 때문에 본시험에서는 pH 및 삼투압을 측정하지 않았다. 또한, pH 변화로 인한 배지의 색 변화는 관찰되지 않았다.

2.9.2 RPD의 산출

용량설정시험과 동일한 방법으로 실시하였으며, 각 용량당 1 well을 사용하였다. Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 RPD를 구하였다.

2.9.3 검체제작

배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Gibco, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 µg/mL 되도록 첨가하여 세포분열을 중기에서 정지시켰다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Gibco, U.S.A.)을 처리하여 플레이트 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Republic of Korea)하였다. 상등액을 제거하고 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액 5 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 냉각고정액 (methanol:acetic acid = 3:1) 1 mL를 첨가한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후

상등액을 제거하였다. 5 mL의 냉각고정액을 첨가한 후, 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 고정하였다. 이러한 고정작업을 1회 반복하였다. 소량의 냉각고정액에 세포를 부유시킨 후, 슬라이드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 검체 슬라이드를 제작하였다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하였다. 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하고, 초순수로 세척 및 건조한 후, 봉입제 (Entellan[®] new, Merck, Germany)로 봉입하였다.

2.10 관찰

검체 슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다.

염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량을 설정하였다.

각 용량당 300개의 분열중기상을 현미경 (600배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

염색체이상은 구조이상, 수적이상 및 기타로 구분하였다.

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 관찰하였다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화로 기록하였다. Gap은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로 정의하였다.

또한, 수적이상에 대해서는 배수체 (polyploidy, pol) 및 핵내배화 (endoreduplication, end)를 관찰하였다.

이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다. Gap에 대해서는 gap이 관찰되는 세포를 포함 또는 미포함하는 이상세포를 구분하여 기록하였다.

기타 (other)는 구조이상 및 수적이상에 포함되지 않는 이상으로 종류와 수를 기록하였다.

2.11 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

-
- 음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것.
 - 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 있을 것.
 - 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열중기상이 300개 이상 관찰될 것.
 - 시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3단계 이상일 것.
-

2.12 결과의 판정

염색체이상을 가진 세포 (gap 미포함)의 출현빈도에 대하여 아래의 조건을 모두 만족하는 경우 양성으로 하였다.

-
- 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 하나 이상의 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것.
 - 증가에 따른 용량의존성이 있을 것.
 - 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 것.
-

2.13 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계해석을 실시하였다.

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도 (gap 미포함)에 대해서 Fisher's exact test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차를 검정하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

3.1 RPD 측정 (Table 2)

RPD 측정 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 0, 25.0, 50.0, 100 및 200 µg/mL의 용량에서 각각 100, 94.2, 82.4, 69.6 및 56.3 %, 존재하의 0, 37.5, 75.0, 150 및 300 µg/mL의 용량에서 100, 95.1, 92.5, 77.3 및 48.9 %, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 0, 25.0, 50.0, 100 및 200 µg/mL의 용량에서 각각 100, 94.3, 85.5, 63.7 및 46.4 %였다.

3.2 시험물질의 침전 (Table 2)

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 대사활성화존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 관찰되었다.

3.3 염색체이상 관찰대상 용량 (Table 2)

염색체이상 관찰대상 용량은 아래와 같이 설정하였다.

계열	S9 mix	염색체이상 관찰대상 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	200, 100, 50.0
	+	300, 150, 75.0
연속처리법	-	200, 100, 50.0

3.4 염색체이상 출현빈도 (Table 2)

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다 ($p < 0.01$).

3.5 시험의 성립

음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data (Table 3)의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있었다. 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다. 또한, 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열중기상이 300개 이상 관찰되었으며, 판독 가능한 용량이 3단계 이상 확보되었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것이 확인되었다.

4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단하였다.



최종보고서

흰점박이꽃무지유충발효분말의
마우스를 이용한 소핵시험

시험번호: B18972

㈜바이오텍스텍

우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

GLP적합진술서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스를 이용한 소핵시험

시험번호 : B18972

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”

Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17
(as revised in 1997)

(주)바이오텍스텍
시험책임자 안효진


2020년 5월 29일

(주)바이오텍스텍
운영책임자 박선희


2020년 5월 29일

신뢰성보증서

시험제목 : 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스를 이용한 소핵시험

시험번호 : B18972

㈜바이오텍스틱 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 점검하였다. 점검은 GLP, 시험계획서, ㈜바이오텍스틱의 표준작업수순서에 따라서 실시하였으며, 각각의 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

점검수행단계 및 시험책임자와 운영책임자에게 보고한 일자는 아래와 같다.

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
시험계획서	2019년 3월 26일	2019년 3월 26일
시험계획서의 변경 (1)	2019년 10월 1일	2019년 10월 1일
시험계획서의 변경 (2)	2019년 12월 31일	2019년 12월 31일
동물의 입수*	2019년 10월 8일	2019년 10월 8일
시험물질의 보관	2019년 10월 8일	2019년 10월 8일
시험물질의 조제	2019년 10월 8일	2019년 10월 8일
투여	2019년 10월 14일	2019년 10월 14일
검체제작 (골수채취)*	2019년 10월 16일	2019년 10월 16일
검체제작 (도말)*	2019년 10월 16일	2019년 10월 16일
검체제작 (염색)*	2019년 10월 17일	2019년 10월 17일
검체판독*	2019년 8월 19일	2019년 8월 19일
시험기초자료의 기록	2020년 1월 3일	2020년 1월 3일
시험기초자료의 기록 (재점검)	2020년 5월 22일	2020년 5월 22일
최종보고서 (안)	2020년 1월 3일	2020년 1월 3일
최종보고서	2020년 5월 29일	2020년 5월 29일

* 수행절차의 점검: 반복적으로 실시되는 정형적인 절차는 시험마다 점검을 실시하지 않고, 특정의 시험을 점검하여 본 시험의 해당단계를 보증한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

㈜바이오텍스틱
신뢰성보증책임자 정우용



2020년 5월 29일

목 차

	페이지
GLP적합진술서	2
신뢰성보증서	3
요약	6
1. 시험실시의 개요	7
1.1 시험목적	7
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	7
1.3 시험기준	7
1.4 동물윤리	7
1.5 수의학적 관리	7
1.6 시험의뢰자	8
1.7 시험기관	8
1.8 시험책임자	8
1.9 시험일정	8
1.10 분담책임자	9
1.11 기록 및 자료의 보관	9
2. 시험재료 및 방법	10
2.1 시험물질	10
2.2 음성대조물질	10
2.3 양성대조물질	11
2.4 조제 및 분석	11
2.5 시험계	12
2.6 사육환경조건	13
2.7 사료	14
2.8 음수	14
2.9 용량설정시험	15
2.10 본시험	16
2.11 관찰	17
2.12 시험의 성립조건	18
2.13 결과의 판정	18
2.14 자료의 통계처리	18
3. 결과 및 고찰	19
3.1 일반증상 관찰	19
3.2 체중변화	19
3.3 소핵 유발 출현빈도	19
3.4 시험의 성립	19
4. 결론	20

TABLES	21
Table 1. Clinical Signs of Dose Range Finding Study in Male ICR Mice	22
Table 2. Clinical Signs of Dose Range Finding Study in Female ICR Mice	23
Table 3. Body Weights of Dose Range Finding Study in Male ICR Mice	24
Table 4. Body Weights of Dose Range Finding Study in Female ICR Mice	25
Table 5. Clinical Signs of Main Study in Male ICR Mice	26
Table 6. Body Weights of Main Study in Male ICR Mice	27
Table 7. Results of Main Study in Male ICR Mice	28
Table 8. Historical Control Data	29
APPENDICES	30
Appendix I. Protocol	31
Appendix II. Protocol Amendments	46
Appendix III. Protocol Deviations	51
Appendix IV. Certificate of Analysis of Test Substance	52
Appendix V. Analysis of Concentration in Dosing Formulations (Non-GLP)	53
Appendix VI. Certificate of Analysis of Standard Substance (Non-GLP)	63
Appendix VII. Certificate of Analysis of Test Substance (Non-GLP)	64

요약

시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 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 공비 2를 적용하여, 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 소핵 유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였다.

본시험의 결과, 시험물질군의 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 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 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

시험물질 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포를 이용하여 소핵유발 유무를 검토하였다.

1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

- “OECD Principles of Good Laboratory Practice”

Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17
(as revised in 1997)

1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2017-71호 (2017년 8월 30일)

- “OECD Guideline for the Testing of Chemicals, 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test”

Organisation for Economic Co-operation and Development (Jul. 29, 2016)

1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정1991년 5월 31일 법률 제4379호, 일부개정 2018년 3월 20일 법률 제15502호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 190157).

1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

1.6 시험의뢰자

명칭 (주)자연과 효소
주소 우46048 부산광역시 기장군 일광면 횡계길 7, 기업지원동 308호
TEL + 82-51-723-9446 FAX + 82-51-723-9447

1.7 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍
주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.8 시험책임자

성명 안효진
소속 첨단독성팀

1.9 시험일정

시험개시일	2019년 3월 21일
실험개시일	2019년 10월 14일
용량설정시험	
- 동물입수일	2019년 3월 26일
- 투여일	2019년 4월 1일, 4월 2일
- 일반증상 관찰일	2019년 4월 1일 ~ 4월 3일
본시험	
- 동물입수일	2019년 10월 8일
- 검역·순화종료일	2019년 10월 14일
- 군분리일	2019년 10월 14일
- 투여일	2019년 10월 14일, 10월 15일
- 검체제작 및 염색일	2019년 10월 16일, 10월 17일
- 검체판독일	2019년 10월 28일 ~ 11월 4일
실험종료일	2019년 11월 4일
시험종료일	2020년 5월 29일

1.10 분담책임자

검역	이진희
시험물질 보관	김은애

1.11 기록 및 자료의 보관

1.11.1 보관기간 품목허가일로부터 3년 (식품의약품안전처 고시 제2018-93호)

1.11.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실

주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

(시험종료 후 최초 5년간은 (주)바이오톡스텍 자료보관실에서 보관하며,
그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.)

1.11.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료, 검체 (평가 가능한
품질이 유지되는 기간 동안 보관), 기록문서 및 통신연락문서

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	흰점박이꽃무지유충발효분말
2.1.2	Lot No.	FBP01
2.1.3	성상	Brown powder
2.1.4	성분	<i>Bacillus subtilis</i> , 흰점박이꽃무지 유충, 대두콩
2.1.5	제조일	2018년 11월 28일
2.1.6	유효기간	정보없음
2.1.7	보관조건	실온
2.1.8	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.9	제공자	
	명칭	(주)자연과 효소
	주소	우46048 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7, 기업지원동 308호
2.1.10	잔여시험물질의 처리	반환

2.2 음성대조물질

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	DKN18007, DKN19006
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea
2.2.5	선택이유	본 시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

2.3 양성대조물질

2.3.1	명칭	Mitomycin C (MMC)
2.3.2	Lot No.	SLBR6518V
2.3.3	보관조건	냉장
2.3.4	제조사	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

2.4 조제 및 분석

2.4.1 시험물질의 조제

2.4.1.1 부형제

2.4.1.1.1 명칭 주사용수

2.4.1.1.2 Lot No. DKN18007, DKN19006

2.4.1.1.3 선택이유

용량설정시험의 최고용량인 250 mg/mL를 조제하기 위하여, 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에 균일하게 현탁되었기 때문에, 주사용수를 부형제로 선택하였다.

2.4.1.2 조제방법

시험물질의 조제는 시험물질 처리일 또는 조제물 분석일에 실시하였다.

필요량의 시험물질을 칭량한 후, 유발에 넣고 소량의 부형제를 넣어 유봉으로 균일하게 현탁시켰다. 현탁된 시험물질을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다.

본시험의 조제물은 냉장보관하고, 안정성이 확보된 8일 이내에 사용하였다.

2.4.1.3 조제물의 분석

2.4.1.3.1 균질성 및 안정성 (Non-GLP)

균질성 및 안정성은 한국기능식품연구원에서 실시한 “HPLC를 이용한 흰점박이꽃무지유충발효분말 중 L-glutamic acid의 조제물 분석법 검증 (Study No.: 연 19-014)”의 결과, 0.53 및 270.22 mg/mL의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정하였다.

2.5.6 검역·순화

반입시 동물의 일반상태 검사를 실시한 후, 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물 입수시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰한 후 동물실로 이동하였다.

검역·순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였다.

2.5.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화 기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

2.5.8 군분리

군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일(군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 체중이 평균체중 $\pm 20\%$ 범위를 벗어난 동물을 제외하고 필요 동물 수 (용량설정시험: 암수 각각 15마리, 본시험: 수컷 25마리)를 선별하였다. 선별한 동물은 각 군의 평균체중이 균등하도록 분리하였다.

2.5.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

2.6 사육환경조건

2.6.1 검역실번호 A314

2.6.2 동물실번호 A320

2.6.3 사육상자의 종류, 크기

2.6.3.1 폴리카보네이트 케이지, 260W×420D×180H (mm)

2.6.3.2 폴리카보네이트 케이지, 200W×260D×130H (mm)

2.6.4 사육상자당 수용동물 수

2.6.4.1 검역 및 순화기간중: 8 ~ 9 마리

2.6.4.2 시험기간중: 3 ~ 5 마리

2.6.5	온도	20.8 ~ 22.6°C (실측치, A314) 21.1 ~ 22.6°C (실측치, A320) 19.0 ~ 25.0°C (허용범위)
2.6.6	상대습도	45.8 ~ 57.9% (실측치, A314) 47.9 ~ 58.3% (실측치, A320) 40.0 ~ 70.0% (허용범위)
2.6.7	환기횟수	10 ~ 15 회/시간
2.6.8	명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (오전 7시부터 오후 7시)
2.6.9	조도	150 ~ 300 Lux

2.6.10 사육기재의 교환 및 세척

사육상자 및 급이기는 1회/2주, 급수병은 2회/주 빈도로 교환하였다.

사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

2.7 사료

2.7.1 종류

실험동물용 고형사료

(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)

2.7.2 Lot No. 2918C-102218MA, 2918C-071619MA

2.7.3 제조자 Envigo RMS, Inc., U.S.A.

2.7.4 급이방법

급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취시켰다.

2.7.5 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공받은 사용 로트의 분석성적서를 확인한 결과, 분석결과가 본사의 허용범위 내에 속하였다.

2.8 음수

2.8.1 종류

청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수

2.8.2 음수의 분석 및 확인

음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제684호, 2016년 12월 30일, 타법개정)의 전 항목에 대해 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1회/년, 미생물 검사는 1회/월 실시하여, 분석결과를 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

2.9 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 비GLP로 실시하였다.

2.9.1 투여용량

시험물질이 식품인 것을 고려하여, 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625 mg/kg의 총 4단계 용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

2.9.2 투여방법

각 용량당 암수 각 3 마리로 하였다.

경구투여용 존데 및 일회용 주사기를 사용하여 약 24 시간 간격으로 2 회 강제경구 투여하였다.

투여액량은 20 mL/kg으로 하고, 군분리시 체중을 기초로하여 산출하였다.

2.9.3 일반증상 관찰

1차 투여직후 및 1차 투여 후 2시간, 2차 투여 전, 2차 투여직후 및 2차 투여 후 2시간, 2차 투여 후 1일에 각 용량의 일반증상을 관찰하였다.

2.9.4 체중측정

체중은 2차 투여 후 1일에 측정하였다.

2.9.5 본시험의 용량설정

2.9.5.1 용량설정시험의 결과

(Table 1, Table 2, Table 3, Table 4)

용량설정시험의 결과, 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

또한, 관찰기간 동안 시험물질군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중 변화는 확인되지 않았다.

따라서, 본시험은 소핵 유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였다. 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.

2.10 본시험

2.10.1 군구성

각 군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정하였다.

군	투여 용량 (mg/kg)	투여 액량 (mL/kg)	투여 횟수	투여 경로	마리수 (수컷) (개체번호)
G1 음성대조	0	20	2	경구	5 (1101-1105)
G2 저용량	1,250	20	2	경구	5 (1201-1205)
G3 중용량	2,500	20	2	경구	5 (1301-1305)
G4 고용량	5,000	20	2	경구	5 (1401-1405)
G5 양성대조	2	10	1	복강내	5 (1501-1505)

2.10.2 투여방법

2.10.2.1 시험물질의 투여

2.10.2.1.1 투여경로

경구투여

2.10.2.1.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

2.10.2.1.3 투여방법 및 투여횟수

시험물질군은 시험물질을 경구투여용 존데 및 일회용 주사기를 사용하여 약 24 시간 간격으로 2회 강제경구 투여하였다.

음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 부형제를 약 24 시간 간격으로 2회 강제경구 투여하였다.

투여액량은 20 mL/kg으로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

2.10.2.2 양성대조물질의 투여

2.10.2.2.1 투여경로

복강투여

2.10.2.2.2 투여경로의 선택이유

양성대조물질 MMC는 일반적인 투여방법인 복강내 투여를 선택하였다.

2.10.2.2.3 투여방법 및 투여횟수

양성대조물질은 일회용 주사침 (26 G)과 주사기 (1 mL)를 사용하여 검체제작 24시간 전에 1회 복강내 투여하였다.

투여액량은 10 mL/kg으로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

2.10.3 일반증상 관찰

1차 투여직후 및 1차 투여 후 2시간, 2차 투여 전, 2차 투여직후 및 2차 투여 후 2시간, 2차 투여 후 1일에 각 용량의 일반증상을 관찰하였다.

2.10.4 체중측정

체중은 검체제작 직전에 측정하였다.

2.10.5 검체제작

시험물질 2차 투여 후 24시간에 동물을 경추탈골하였다.

대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 μ L의 우태아 혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS, Lot No.: 1982135, Gibco, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다.

골수세포부유액은 1,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 (Micro17TR, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Republic of Korea) 하고, 상층액을 제거한 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 검체 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)으로 조제)으로 30분간 염색하였다.

염색된 슬라이드는 0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8) 및 0.004% citric acid 수용액에 세정하고 건조시킨 후, 봉입제 (Entellan[®] new, Merck, Germany)로 봉입하였다.

2.11 관찰

코드화된 검체 슬라이드를 현미경 (600배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

검체 1장당 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE)를 2,000개씩 관찰하고, 1개체당 4,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현율을 구하였다.

골수세포의 증식억제 지표로서, 검체 1장당 총 적혈구 250개를 관찰하여, 1개체당 500개의 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율을 구하였다.

2.12 시험의 성립조건

아래의 조건을 만족하는 경우 성립으로 하였다.

-
- 음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것.
 - 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것.
-

2.13 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

-
- 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의하게 증가할 것.
 - 증가에 따른 용량의존성이 있을 것.
 - 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 것.
-

2.14 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계해석을 실시하였다.

소핵다염성적혈구의 출현빈도에 대하여 Kruskal-Wallis test 및 Mann-Whitney U test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간의 유의차와 음성대조군과 양성대조군간의 유의차를 검정하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중에 대하여 Bartlett test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간의 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산이 인정되어, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준: 0.05). 음성대조군과 양성대조군간의 비교에 대해서는 Folded-F test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산이 인정되어, Student's t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

3.1 일반증상 관찰 (Table 5)

관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

3.2 체중변화 (Table 6)

관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중 변화는 확인되지 않았다.

3.3 소핵 유발 출현빈도 (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 차이는 확인되지 않았다.

3.4 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.

4. 결론

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

인체적용시험결과보고서 (Clinical Study Report)

흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험

ver. 1.0 / 2021. 06. 14

시험대상 품목	흰점박이꽃무지유충발효분말
시험책임자	동아대학교병원 가정의학과 한성호 교수
실시기관	동아대학교병원 (부산광역시 서구 대신공원로 26) 양산부산대학교병원 (경남 양산시 물금읍 금오로 20) 고신대학교복음병원 (부산광역시 서구 감천로 262)
시험기간	IRB 승인일로부터 ~ 2021년 06월 30일
인체적용시험 계획서	동아대학교병원 : Version 1.9 (2021.04.15.) 양산부산대학교병원 : Version 1.5 (2020.12.10.) 고신대학교복음병원 : Version 1.2 (2020.12.10.)

본 인체적용시험결과보고서에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 의뢰자가 인정하는 경우를 제외하고는 의뢰자의 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

결과보고서 개요				
시험제목	흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험			
시험목적	건강기능식품 기능성원료로서 흰점박이꽃무지유충발효분말 인체 섭취 시 안전성 및 알콜성 간 손상 완화에 대한 가능성을 검증하고자 함.			
구분	<input type="checkbox"/> Local <input checked="" type="checkbox"/> Multi (<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외)			
실시기관 및 시험책임자	동아대학교병원 (주관기관) : 가정의학과 한성호 교수 (총괄연구책임자) 양산부산대학교병원 : 가정의학과 이상엽 교수 고신대학교복음병원 : 가정의학과 최종순 교수			
시험디자인	다기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조군 비교, 병행			
시험용 식품	시험식품	흰점박이꽃무지유충발효분말	대조식품	결정셀룰로오스
	제형	500mg tablet		
	복용량	4g/일 (1일 2회, 1회 500mg×4tab, 흰점박이꽃무지유충발효분말로서 500mg/일), 총 8주		
시험대상자	만19세 이상의 성인 남성 또는 여성으로서 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자			
시험대상자 수		시험군	대조군	총 대상자 수
	유효성 평가 레수	32명	32명	64명
	20% 중도 탈락률 포함한 레수	40명	40명	80명
	각 기관별 모집 대상자 수 동아대학교병원 : 20명 양산부산대학교병원 : 29명 고신대학교복음병원 : 31명			
시험기간	1. 동아대학교병원 IRB 승인일(2018년 10월 08일) ~ 2021년 06월 30일 - 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 06. 26. - 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 06. 26. - 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 03. 09. 2. 양산부산대학교병원 IRB 승인일(2018년 09월 20일) ~ 2021년 06월 30일 - 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 01. 07. - 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 01. 13. - 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 01. 25. 3. 고신대학교복음병원 IRB 승인일(2020년 01월 14일) ~ 2021년 06월 30일 - 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 05. 21. - 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 05. 21. - 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 01. 25.			

결과보고서 개요	
유효성 평가변수	<p>1차</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈중 GGT(γ-GTP)의 변화 <p>2차</p> <ul style="list-style-type: none"> • 혈중 ALT(GPT)의 변화 • 혈중 AST(GOT)의 변화 • AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ-GTP)가 정상범위로 돌아온 대상자 비율 • 혈중 AST/ALT ratio의 변화 • 혈중 LDH의 변화 • 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화 • 다차원 피로척도(multi-dimensional fatigue inventory)의 변화
안전성 평가변수	<ol style="list-style-type: none"> 1. 이상반응 2. 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화 3. 생체징후 및 문진에 의한 이상소견 여부
선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 만19세 이상의 성인 남성 또는 여성 2. 혈액검사에서 γ-GTP(Gamma Glutamyl Transpeptidase)가 정상치를 초과하고 각 기관의 정상 상한치의 4배 이하의 범위에 있는 자 3. 음주 습관 설문에서 지난 1개월 동안 1주일에 평균 남성 소주 2병 이상(맥주 300cc 10잔 이상), 여성은 소주 1병 이상(맥주 300cc 5잔 이상)의 알코올 섭취습관을 가진 자 4. 정상적인 신체활동이 가능하고, 본 시험의 대상자로서 시험동의서에 서면 동의한 자
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시험용 식품의 성분에 대한 알레르기가 있는 자 2. 최근 6개월 이내에 중증의 심뇌혈관 질환, 또는 악성 종양이 있는 자 3. 조절되지 않는 고혈압 환자(혈압이 160/100mmHg 이상) 4. 조절되지 않는 갑상샘항진증 또는 갑상샘저하증 환자 5. 바이러스성 간 질환 또는 인체적용시험의 결과에 영향을 줄 수 있는 간 질환을 가진 대상자 단, 항바이러스성 약제를 투약 받지 않은 HBV 또는 HCV 보균자는 연구책임자가 시험에 영향을 주지 않는다고 판단할 시 등록할 수 있다. 6. 혈액검사에서 AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 연구기관 정상 상한치의 3배 이상인 자 7. Child-Pugh 등급 B 또는 C의 비대상성 간경변 대상자 8. 시험 시작 예정일 기준 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물을 복용한 자 9. 알코올 남용자 10. Creatinine 연구기관 정상 상한치의 2배 이상인 자 11. 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자 12. 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자. 단, 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외한다. 13. 지난 2개월간 한약이나 조약 복용력이 있는 자 14. 인체적용시험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물을 계속

결과보고서 개요	
	<p>복용해야 하는 자</p> <p>15. 임신·수유 중이거나 임상시험기간 동안 임신계획이 있는 자</p> <p>16. 스크리닝일 기준 1개월 이내 다른 약물임상시험에 참여할 자</p> <p>17. 본 시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 시험을 진행할 수 없다고 연구자가 판단하는 자</p>
시험중지 및 탈락기준	<p>1. 선정/제외기준 위반</p> <p>2. 연구 참여자의 시험중지 요구</p> <p>3. 이상반응 발생 (중대한 이상반응 포함)</p> <p>4. 연구 참여자의 불순응(80%미만) 또는 관찰 불가</p> <p>5. 인체적용시험계획서의 위반</p> <p>6. 본 인체적용시험에 영향을 미칠 수 있는 의약품 또는 건강기능식품 등을 복용했거나 복용해야 하는 자</p> <p>7. 시험용 식품을 연속 5일을 초과하여 복용하지 않은 경우</p> <p>8. 기타 연구자의 판단</p>
시험방법	<p>본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험이다. 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대한 충분하게 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정 하였다.</p> <p>무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품과 복용일지 등을 배부받고 매일 2회 고지된 방법대로 복용하도록 하였다.</p> <p>0주(baseline), 4주, 8주째 유효성 및 안전성 평가변수에 대한 측정 및 검사를 실시하였고 그 결과에 대하여 분석하였다.</p>
통계분석방법	<p>통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하였으며 각 주평가변수에 영향을 미칠 수 있는 음주력과 운동량 변수는 군 간 차이가 있을 경우 통제변수로 고려해 공변량분석을 수행하였다.</p> <p>연속형자료, 임상실험실검사치, 활력징후변수들에 대하여는 기초상태(baseline), 각 방문시점, 최종 평가시점, 그리고 기초상태에서 최종평가 시점까지의 변화량에 대하여 기술통계량(연구 대상자 수, 평균, 표준편차, 최소치, 중앙값, 최대값)을 제시하였다.</p> <p>범주형 자료에 대하여는 분할표를 제공하였다. 추가적으로, 필요한 경우 95%신뢰구간이 계산될 것이고, 중간분석은 실시하지 않았다. ITT분석을 위해 최종 유효성 평가 자료가 결측된 경우, LOCF방법에 의하여 분석되도록 하였다.</p>
분석 결과	<p>본 인체적용시험에서 유효성 평가는 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 변화량을 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> 유효성 평가

결과보고서 개요

- 1차 유효성 평가 변수로 설정한 GGT의 변화량에 대하여 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과, 시험군의 식품 섭취 후 변화량이 대조군과의 군간 비교에서 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하는 경향을 띄며 개선되었다.
- 2차 유효성 평가 변수로 설정한 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 ITT population으로 분석한 결과, 시험군에서 식품 섭취 후 대조군에 비해 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하였다. 이러한 결과는 PP population에서도 동일하게 도출되었다.
- 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 확인할 수 있었고, BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.
- 1차 유효성 평가 변수인 혈중 GGT의 변화량과 2차 유효성 평가변수인 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취한 시험군에서 알콜성 간 손상 완화의 효과를 확인하였다. 이는 흰점박이꽃무지유충발효분말의 혼합물을 일상적으로 섭취할 시 알콜성 간 손상 완화에 도움을 주는 근거가 될 수 있을 것이다.
- 안전성 평가
 - 시험용 식품을 1회 이상 복용한 시험군 40명, 대조군 40명의 대상자에 대해 시험 기간 중에 생체징후 평가, 임상실험실검사 등으로 안전성을 평가하였다. 시험 기간 중 이상반응이 발생한 사례가 있고 1명 탈락하였지만 대조식품 섭취군으로 시험용 식품과의 연관성은 없는 것으로 판단되며 중대한 이상반응은 발생하지 않았다. 또한 임상실험실 검사치 및 신체검사 등을 통한 안전성 평가결과 임상적으로 위해하다고 판단할 근거는 없었다. 안전성 평가는 시험에 참여한 시험책임자가 시행하였다.
 - 따라서 본 흰점박이꽃무지유충발효분말을 성인 기준 500 mg/일의 용량으로 중·장기간 동안 섭취하여도 안전하다고 판단된다.

요약 및 결론

본 인체적용시험은 만 19세 이상 성인 남성 또는 여성을 대상으로 흰점박이꽃무지유충발효분말 섭취 시 알콜성 간 손상에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 실시되었다. 이를 위해서 선정기준에 해당하고 제외기준에 해당하지 않는 80명을 대상으로 본 인체적용시험용 식품 투여 전/후의 유효성 및 안전성 평가변수를 측정하여 비교하였다.

유효성 평가 변수로 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 변화량을 설정하여 식품을 8주간 섭취한 후 그 효능을

결과보고서 개요

확인하였다. 시험군에서 시험식품을 8주간 섭취 후 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 대조군과의 비교에서 유의성은 확인되지 않았지만 감소하여 개선되는 경향을 보였다. 또한 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점이 시험군에서 대조군 대비 유의성을 띄지는 않았지만 감소하여 개선되는 양상을 보였고 BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.

본 인체적용시험을 진행하며 3명의 이상 반응이 발생하였고 그 중 1명이 중도 탈락 하였지만 시험용 식품과의 인과관계는 없는 사례로 판단되었다. 중대한 이상 반응은 보고되지 않았고, 임상 실험실 검사 결과에서도 안전성 위해 요소는 발견되지 않았다. 시험식품에 사용된 흰점박이꽃무지유충발효분말은 식품의약품 안전처에 식품 원료로 등록된 흰점박이꽃무지유충을 사용하여 제조되었고, 오래전부터 국내·외에 식품으로도 널리 섭취되고 있어 적절한 용량을 섭취 시 안전성은 입증되어 있다고 볼 수 있어 본 시험에서 안전성 위해 요소가 발견되지 않은 것은 당연한 결과로 사료된다.

종합적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취함에 따라 알콜성 간 손상 완화를 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 분석한 결과를 통해 확인하였고, ITT population PP population 및 소그룹 분석 모두에서 동일하게 유효성 평가 변수가 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이상 반응, 임상 실험실 검사, 문진 등을 통해 평가된 안전성 평가에서도 위해 요소가 발견되지 않아 중·장기 섭취에 대해 안전하다는 결과도 확인할 수 있었다.

결론적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 일상적으로 섭취할 경우 알콜성 간 손상 완화에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 다만 본 연구의 결과로는 통계적 유의성을 확인할 수 없어 추후 추가적인 인체적용시험을 진행한다면 유의한 결과를 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

목 차

1. 인체적용시험의 명칭	1
2. 인체적용시험 실시기관, 책임자/담당자 및 관리약사	1
2.1. 인체적용시험 실시기관 및 주소	1
2.2. 시험책임자/담당자	1
2.3. 인체적용시험 관리약사	1
3. 인체적용시험 의뢰자의 성명 및 주소	1
4. 인체적용시험 수탁기관명 및 주소	2
5. 인체적용시험의 목적 및 배경	2
5.1. 목적	2
5.2. 배경	2
6. 윤리적 고려	4
6.1. 기관생명윤리위원회	4
6.2. 시험의 윤리적 수행	6
6.3. 시험대상자 설명문 및 동의서	6
7. 인체적용시험 계획	6
7.1. 인체적용시험용 식품	6
7.2. 이중눈가림의 유지	10
7.3. 시험대상자의 선정/제외 기준	11
7.4. 목표 대상자 수	13
7.5. 인체적용시험기간	14
7.6. 인체적용시험 방법	14
7.7. 유효성 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)	18
7.8. 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법	19
7.9. 자료의 품질 보증	21
8. 시험 대상자	22
8.1. 대상자의 수와 분포	22
8.2. 순응도	23
8.3. 중도 탈락 사유	23
8.4. 시험계획서 위반	24

- 9. 유효성 평가 25**
 - 9.1. 평가 대상군 25
 - 9.2. 통계분석방법 25
 - 9.3. 인구 통계학적 및 기저 특성 26
 - 9.4. 유효성 평가변수 분석 27
 - 9.5. 유효성 평가 결론 38

- 10. 안전성 평가 39**
 - 10.1. 이상반응 39
 - 10.2. 임상실험실 검사 39
 - 10.3. 생체징후, 신체검사 및 기타 안전성에 관한 평가 40
 - 10.4. 안전성 평가 결론 40

- 11. 고찰 및 결론 42**

용어 정의 및 약자

AE	Adverse Event, 이상반응
ALT	Alanine Transaminase
AST	Aspartate Transaminase
BP	Blood Pressure, 혈압
CRF	Case Report Form, 증례기록서
DBP	Diastolic Blood Pressure, 확장기혈압
GCP	Good Clinical Practice, 의약품 임상시험 관리 기준
g-GT	gamma-Glutamyl Transpeptidase
ICH	International Conference on Harmonization
IRB	Institutional Review Board, 임상연구심의위원회
IP	Investigational Product, 시험용식품
ITT	Intention To Treat
PP	Per Protocol
PR	Pulse Rate, 맥박수
PSV	Post Study Visit, 종료 방문
RBC	Red Blood Cell, 적혈구
SBP	Systolic Blood Pressure, 수축기혈압
SAE	Serious Adverse Event, 중대한 이상 반응
SOP	Standard Operating Procedure, 표준작업지침서
TUG	Timed Up and Go test
WBC	White Blood Cell, 백혈구

1. 인체적용시험의 명칭

흰점박이꽃무지유충발효분말의 경구 섭취가 알콜성 간 손상에 미치는 영향 분석을 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험

2. 인체적용시험 실시기관, 책임자/담당자 및 관리약사

2.1 인체적용시험 실시기관 및 주소

기관명 : 동아대학교병원

주 소 : 부산광역시 서구 대신공원로 26

기관명 : 양산부산대학교병원

주 소 : 경남 양산시 물금읍 금오로 20

기관명 : 고신대학교복음병원

주 소 : 부산광역시 서구 감천로 262

2.2 시험책임자/담당자

	소속	직급	성명
총괄연구책임자	동아대학교병원	교수	한성호
각 기관 연구책임자	양산부산대학교병원	교수	이상엽
각 기관 연구책임자	고신대학교복음병원	교수	최종순

2.3 인체적용시험 관리약사

인체적용시험 품목이 의약품이 아니므로 계획서에 준하여 연구자 또는 담당자가 시험용 식품을 배분하였다.

3. 인체적용시험 의뢰자의 성명 및 주소

기관명 : (주)자연과 효소

주 소 : 부산광역시 기장군 일광면 횡계길 7

4. 인체적용시험 수탁기관명 및 주소

기관명 : (주)랩투메디씨알오

주 소 : 서울특별시 강남구 도산대로 8길 12, 4층 441호

5. 인체적용시험의 목적 및 배경

5.1 목적

대한약전외한약규격집에 의하면 흰점박이꽃무지 유충은 어혈을 풀어주고 혈액순환을 개선시키며 간 기능을 강화시킨다고 기록되어 있다.

흰점박이꽃무지 유충은 문헌과 선조들의 경험에 의해 그 효능이 인정되어 민간에서 이용되어 오고 있지만 간질환 회복효능에 대한 원인물질 연구가 미흡한 실정이고 흰점박이꽃무지 유충을 비롯한 궁병이가 약용자원이라기보다는 혐오식품이라는 인식으로 인해 천연자원으로서의 상업화는 이루지지 못하고 있는 실정이다. 이러한 점들을 극복하고 인체 섭취시 안정성 및 알콜성 간 손상 완화에 대한 기능성을 검증하여 흰점박이꽃무지 유충의 효용성을 밝히고자 한다.

5.2 배경

국제연합식량농업기구(FAO)의 보고에 의하면 세계 인구는 2006년 현재 74억명에서 2050년에 92억명으로 증가할 것으로 전망하고 있으나 온난화와 같은 지구의 이상기후로 인해 작물의 수확량이 감소될 것으로 예상하고 있어 식량안보(food security)가 중요한 이슈로 대두되고 있다. 또한, 사료용 곡물의 수요가 늘어 생산비가 오르게 되며 생산면적이 줄어들게 되어 축산물이 식량자원으로는 고가의 먹거리가 될 것으로 예상되어 미래의 식량 확보를 위한 미래 식품 대체기술 개발의 중요성이 부각되고 있다.

곤충의 영양적 가치는 다른 육류(닭, 소, 돼지, 생선 등)에 못지않다. 많은 곤충 종들의 단백질 함유량은 50%이상으로, 주 단백질원인 육류와 유사한 수준일 뿐만 아니라 높은 지방의 공급원이며, 철과 아연 등의 미네랄과 비타민, 식이섬유까지 다량 함유하고 있다. 특히, 리놀레산과 올레산 같은 불포화지방산의 함유량이 높고, 동물성 식이섬유라고 하는 키토산을 다량 함유하고 있어 식용으로 사용 시 몸에

이로울 것으로 판단된다.

또한, 환경적인 측면에서 곤충은 대부분의 가축보다 상당히 적은 온실가스(메탄, 이산화질소, 이산화탄소 등)를 방출한다. 예를 들어 가축이 배출하는 온실가스량은 지구전체 온실가스 발생량의 18% 이상을 차지하는데, 갈색거저리의 경우 1 kg당 돼지의 1/10정도의 온실가스를 생성하여 친환경적이라고 볼 수 있다.

갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 등 식용곤충의 활용도를 높이고 소비를 확산시키기 위해 국립농업과학원에서는 현재 다양한 메뉴 개발 및 특수의료용식품(환자식, 유아식, 노인식) 개발을 위한 연구를 진행중에 있다.

식품첨가물, 사료첨가물, 사료제품 등 이미 유럽, 미국 등의 선진국에서는 국민 위생과 안전을 위한 법이 제정되는 등 산업화가 본격적으로 진행되고 있다. 미래 식품산업으로 각광받고 있는 식·약용곤충 시장에 발맞추어 나가기 위해서는 핵심이 되는 기술과 식품소재 등록을 위한 연구, 식품위생 및 안전을 위한 연구 개발에 대한 효율을 높이는 등 미래 산업에 대한 준비가 필요하다.

따라서 곤충을 식용으로 사용하던 선조들의 전례와 식의약 소재로 활용해왔던 전통지식을 과학화하여 흰점박이꽃무지 유충이 가지는 효능의 기전 연구, 안전성 및 기능성 등의 연구를 통해 효능이 검증되고, 곤충산업에 대한 법령 제정 및 식품위생법 등의 지원이 뒷받침된다면 농가에 새로운 소득자원으로서 기여가 가능하다.

6. 윤리적 고려

6.1 기관생명윤리위원회

본 인체적용시험의 계획서의 최초 승인일은 아래와 같고 각 기관별 시험 실시 전, 실시 중의 계획서 등 변경사항은 IRB에 보고하여 승인을 득하였으며, 그 내역은 Table 1(Table 1-1, Table 1-2, Table 1-3)과 같다.

1) 동아대학교병원

Table 1-1. 계획서 등 IRB 변경 승인 주요 내역

IRB 승인일	주요 변경 사항
2018.10.08.	<ul style="list-style-type: none"> • 최초 승인 - 연구계획서 ver.1.0 - 증례기록서 ver.1.0 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.0
2019.04.03.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경 승인 - 연구계획서 ver.1.1 - 증례기록서 ver.1.1 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.1
2019.09.03.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경 승인 - 연구계획서 ver.1.2 - 증례기록서 ver.1.1 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.2
2019.09.25.	<ul style="list-style-type: none"> • 지속심의 승인 - 연구진행보고서
2019.10.23	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.3 - 증례기록서 ver.1.2 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.3
2019.11.18	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.4 - 증례기록서 ver.1.3 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.4
2020.02.04	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.5 - 증례기록서 ver.1.4
2020.09.16	<ul style="list-style-type: none"> • 지속심의 승인 - 연구진행보고서
2020.09.23	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.6 - 증례기록서 ver.1.5 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.5

2020.12.22	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.7 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.6
2021.01.20	<ul style="list-style-type: none"> • 지속심의 승인 - 연구진행보고서
2021.03.23	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.8
2021.04.21	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.9

2) 양산부산대학교병원

Table 1-2. 계획서 등 IRB 변경 승인 주요 내역

IRB 승인일	주요 변경 사항
2018.09.20.	<ul style="list-style-type: none"> • 최초 승인 - 연구계획서 ver.1.1 - 증례기록서 ver.1.0 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.0
2018.12.20.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경 승인 - 연구비 세부항목 변경
2019.09.18.	<ul style="list-style-type: none"> • 지속심의 승인 - 연구진행보고서
2019.10.07.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.2 - 증례기록서 ver.1.1 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.1
2019.11.11	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.3 - 증례기록서 ver.1.2 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.2
2020.01.20	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.4
2020.09.07	<ul style="list-style-type: none"> • 지속심의 승인 - 연구진행보고서
2020.10.13	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.3
2020.09.23	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.5 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.4
2020.12.22	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.7 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.6
2021.01.20	<ul style="list-style-type: none"> • 지속심의 승인 - 연구진행보고서

2) 고신대학교복음병원

Table 1-3. 계획서 등 IRB 변경 승인 주요 내역

IRB 승인일	주요 변경 사항
2020.01.14.	<ul style="list-style-type: none"> • 최초 승인 - 연구계획서 ver.1.0 - 증례기록서 ver.1.0 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.0
2020.03.10.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.1 - 증례기록서 ver.1.1 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.1
2020.04.23.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.2
2020.05.12.	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.3
2020.12.31	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구계획서 ver.1.2 - 대상자 설명문 및 동의서 ver.1.4
2021.06.01	<ul style="list-style-type: none"> • 변경승인 - 연구비 변경

6.2 시험의 윤리적 수행

본 인체적용시험은 헬싱키 선언을 준수하였고, 의약품 임상시험관리기준(KGCP)을 준용하여 수행되었다.

6.3 시험대상자 설명문 및 동의서

본 인체적용시험 대상자를 선정하기 위한 스크리닝 시행 전에 모든 지원자를 대상으로 본 시험에 대한 설명문을 배포하였고 충분히 설명한 후 지원자 본인의 자발적 의사에 의하여 동의서에 자필 서명하였고, 그 사본을 각 대상자에게 제공하였다.

7. 인체적용시험 계획

7.1 인체적용시험용 식품

7.1.1 인체적용시험용 식품

Table 2. 인체적용시험용 식품의 정보

	시험식품	대조식품
일반명	흰점박이꽃무지유충발효분말	결정셀룰로오스
성분 및 함량	흰점박이꽃무지유충발효분말 12.5% 결정셀룰로오스 68% 설향 6% 생강향 6% 쌍화향 6% 스테아린산마그네슘 1.5%	결정셀룰로오스 77.7% 카라멜색소 2.8 % 설향 6% 생강향 6% 쌍화향 6% 스테아린산마그네슘 1.5%
제형	500 mg tablet	
성상	Tablet	
복용방법	1일, 2회, 각 4tab 아침, 저녁 식후 30분 복용	좌동
포장단위	1병 264tab	
저장방법	상온보관	
사용기간	시험식품 제작일로 부터 2년	

7.1.2 인체적용시험에 사용되는 식품의 포장

인체적용시험에 사용되는 식품은 의뢰자가 제조하여 각 4주 복용 분량 및 약간의 여분인 264tab(1일 섭취량; 2회, 각 500mg 4tab)을 포장하여 공급하였다.

7.1.3 인체적용시험에 사용되는 식품의 라벨링

인체적용시험에 사용되는 식품은 의뢰자가 제조하여 인체적용시험 시험기관의 연구자에게 공급하였다.

시험식품 또는 대조식품으로 생산되는 품목은 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않도록 하였다. 또한 동일한 라벨을 부착함으로써 연구대상자 및 연구자에 대하여 눈가림(blind)이 유지되도록 하였다. 인체적용시험용 식품 라벨의 기재는 시험군별 차이가 노출되지 않도록 주성분 일반명 및 제조번호(Lot No.)는 기입하지 않는다. 눈가림을 위한 샘플의 라벨링 방법은 다음과 같게 하였다.

포장 및 라벨링 : 시험식품과 대조식품은 각각 방문별 섭취분으로 포장하여 라벨링하였다.

1. “인체적용시험용”이라는 표시
2. 제품의 코드명
3. 사용기간
4. 저장방법
5. 제조업자의 상호
6. “인체적용시험외의 목적으로 사용할 수 없음”이라는 표시
7. 연구 대상자코드 (Randomized Number) : 무작위 배정표에 따라 기록

7.1.4 1일 투여량의 산정 근거

Rat에서 기능성원료 흰점박이꽃무지유충발효분말을 50 mg/kg BW/ day [단위 체중(kg)당 1일 섭취량(mg)] 섭취군에서 대조군에 비해 유의적인 간 기능 개선 결과가 나타났다. 따라서 흰점박이꽃무지유충발효분말 50 mg/kg BW/day를 인체에서의 섭취량으로 환산 하였다. Rat에서 인체로의 체표면적대비 환산계수 0.16을 사용하여, 50 mg/kg BW/day는 8 mg/kg BW/day로 환산되고, 성인 체중 60kg 적용 시 480 mg/day로 환산되므로 인체적용시험에 사용되는 1일 복용량을 500 mg/day로 결정 하였다.

* 참고문헌: Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005. U.S. FDA.

7.1.5 시험용식품의 투여량, 투여방법, 투여기간

시험에 참가한 모든 대상자는 인체적용시험에 사용되는 식품을 1일 2회 각 4tab으로 흰점박이꽃무지유충발효분말로서 총 500 mg(아침, 저녁 각 62.5mg×4tab)을 복용하였다. 대상자는 인체적용시험에 사용되는 건강기능식품을 1일 2회 식후 30분에 물과 함께 복용하였다. 각 대상자당 시험/대조식품의 총 투여기간은 8주로 하였다.

7.1.6 인체적용시험에 사용되는 식품 배정방법

인체적용시험에 사용되는 식품은 인체적용시험 계획서에 제시된 과정에 따라 본 인체적용시험에 참여한 대상자에게만 투여되었다.

대상자의 인체적용시험에 사용되는 식품 배정은 방문 2와 방문 3에서 이루어졌다. Screening 방문 시 대상자 선정 제외기준을 확인하여 방문 2에서 인체적용시험 참여여부를 최종 결정하였다. 인체적용시험에 사용되는 식품의 투여가 결정된 대상자는 무작위 배정 후 인체적용시험에 사용되는 식품을 배정받아 방문 2 및 방문 3 이후 각 4주간 섭취하였다.

7.1.7 병용요법 및 병용금지약물

시험 참가 당시 이미 받고 있던 치료나 복용하는 건강기능식품 및 시험기간 중 추가되는 치료는 병용요법으로 간주하였으며, 병용투여 할 필요가 있는 경우에는 투여 내역을 증례기록서와 대상자 진료차트에 기록 (가능하면 일반명 기재)하도록 하였으며 가능한 한 시험기간 중에는 병용요법을 변경하지 않도록 하였다. 시험기간 중 병용약물의 투여는 최소화 하도록 하였으며 대상자의 복지를 위해 필요하고 또 인체적용시험용 식품에 영향을 주지 않는다고 판단될 경우에만 인체적용시험 책임자의 판단에 따라 투여하도록 하였다. 의문 사항이 있을 경우는 인체적용시험 모니터 상의하였다. 시험 중 본 시험의 목적에 위배되지 않는 외과적 수술을 시행하는 경우에도 이를 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하도록 하였다.

7.1.8 인체적용시험에 사용되는 식품의 사용상의 주의사항

○ 금기

- ① 중증의 간장질환자
- ② 중증의 신장질환자
- ③ 중증의 심장질환자

○ 부작용

본 시험식품과 관련한 부작용 정보는 없다.

○ 일반적 주의

병용요법을 실시하는 경우, 각 사용약품의 설명서를 숙지하였다. 투약기간 중 간기능 및 신기능 검사 결과를 정기적으로 관찰하였고 만일 수치가 높아진 경우에는 투여를 중지하도록 하였다.

○ 상호작용

이 식품과 다른 식품과의 상호작용에 대한 정보는 없다.

○ 과량투여 시 처치

인체를 대상으로 한 과량복용시의 증상에 대해서는 알려진바 없으나, 과량투여로 인하여 중독증상이 나타나는 경우에는 일반적인 해독요법을 실시하도록 하였다.

7.1.9 인체적용시험에 사용되는 식품의 관리 및 기록

인체적용시험 연구자는 의뢰자가 제공한 인체적용시험에 사용되는 식품의 수령 사실 및 수량을 서면으로 확인하고 서명하였다. 인체적용시험에 사용되는 식품의 불출은 본 연구에 참여하고 있는 연구자의 서명에 의해 행해졌고, 연구자는 사용하지 않고 남은 식품을 수거하고 수불대장에 그 내용을 기록하였으며, 각 대상자별로 인체적용시험용 식품의 투여일, 수량, 일련번호, 사용기한 또는 유효기간(필요시), 식품식별코드 및 시험대상자식별코드를 기록하였다. 적정 용량을 투여했는지 확인할 수 있는 기록을 작성하였고, 인체적용시험용 식품의 재고가 사용기록과 일치하는지를 확인하였다. 인체적용시험 모니터는 모든 식품의 사용내역을 확인하기 위한 목적으로 정기적으로 연구자가 보관하고 있는 수량을 점검하였다.

7.1.10 복용 순응도

복용 순응도는 시험기간 동안 연구대상자가 실제 복용한 횟수를 섭취해야 하는 횟수로 나눈 백분율로 계산하였다.

반납한 식품복용일지와 회수 된 식품을 참고하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\cdot \text{순응도}(\%) = (\text{실제 복용 횟수} / \text{복용했어야 하는 횟수}) \times 100$$

7.2 이중눈가림의 유지

이중눈가림 유지를 위하여, 본 인체적용시험에서는 외형상으로는 구분이 불가능하도록 동일한 외형의 시험식품과 대조식품을 사용하였고, 연구 대상자 코드의 할당 내역은 연구책임자가 봉인된 상태로 관리하였으며 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않았다.

중대한 이상약물반응 발생으로 부득이하게 해당 코드의 열람이 필요한 경우에도 해당 연구 대상자의 무작위 배정 내역만을 열람할 수 있도록 연구 대상자별 별도의 맹검봉투의 형식으로 관리하였다.

7.3 시험대상자의 선정/제외 기준

본 시험에 지원한 만 19세 이상의 성인 남성 또는 여성을 대상으로 시험에 대한 충분한 설명 후 ‘대상자 동의서’에 자필 서명한 자에 대하여 다음 선정기준에 적합하고 제외 기준에 해당되지 않는 자를 시험대상자로 선정하였다.

7.3.1 선정기준

아래의 기준에 적합한 자를 대상으로 선정하였다:

- 만 19세 이상의 성인 남성 또는 여성
- 혈액검사에서 γ -GTP(Gamma Glutamyl Transpeptidase)가 정상치를 초과하고 각 기관의 정상 상한치의 4배 이하의 범위에 있는 자
- 음주 습관 설문에서 지난 1개월 동안 1주일에 평균 남성 소주 2병 이상(맥주 300cc 10잔 이상), 여성은 소주 1병 이상(맥주 300cc 5잔 이상)의 알코올 섭취습관을 가진 자
- 정상적인 신체활동이 가능하고, 본 시험의 대상자로서 시험동의서에 서면 동의한 자

7.3.2 제외기준

다음 사항에 해당되는 자는 본 시험에서 제외하였다:

- 시험용 식품의 성분에 대한 알레르기가 있는 자
- 최근 6개월 이내에 중증의 심뇌혈관 질환, 또는 악성 종양이 있는 자
- 조절되지 않는 고혈압 환자(혈압이 160/100mmHg 이상)
- 조절되지 않는 갑상샘항진증 또는 갑상샘저하증 환자
- 바이러스성 간 질환 또는 인체적용시험의 결과에 영향을 줄 수 있는 간 질환을 가진 대상자

단, 항바이러스성 약제를 투약 받지 않은 HBV 또는 HCV 보균자는 연구책임자가

시험에 영향을 주지 않는다고 판단할 시 등록할 수 있다.

- 혈액검사에서 AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 연구기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- Child-Pugh 등급 B 또는 C의 비대상성 간경변 대상자
- 시험 시작 예정일 기준 4주 이내에 간 기능에 영향을 미치는 약물, 기타 간독성을 유발할 가능성이 있는 약물을 복용한 자
- 알코올 남용자
- Creatinine 연구기관 정상 상한치의 2배 이상인 자
- 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자
- 정신과 질환으로 약물을 복용하고 있는 자. 단, 수면장애로 인해 간헐적 투약을 하는 경우는 제외한다.
- 지난 2개월간 한약이나 조약 복용력이 있는 자
- 인체적용시험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물을 계속 복용해야 하는 자
- 임신·수유 중이거나 임상시험기간 동안 임신계획이 있는 자
- 스크리닝일 기준 1개월 이내 다른 약물임상시험에 참여할 자
- 본 시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 시험을 진행할 수 없다고 연구자가 판단하는 자

7.4 목표 대상자 수

	시험군	대조군	총 대상자 수
유효성 평가 레수	32명	32명	64명
20% 중도 탈락을 포함한 레수	40명	40명	80명

본 인체적용시험에서는 γ -GTP의 시험군-대조군 간 통계적 차이를 확인 하기 위하여, 시험식품군 40명, 대조 식품군 40명으로 모두 합하여 80명 의 대상자를 모집하는 것을 목표로 하였다. ‘NMED-01과 NMED-02의 간 기능 개선에 대한 인체 효능 평가’ 중 시험식품군이 대조식품군에 비해 12주째에 baseline 대비 γ -GTP의 차이가 18.8, 합동표준 편차가 약 33.3인 것을 감안하여 본 시험에서는 8주째 23.5의 차이를 보일 것으로 예상하였으며, 탈락률은 20%로 하였다.

○ 책정근거

- 귀무가설 : 흰점박이꽃무지유충발효분말을 투여한 시험군과 위제품(placebo)을 투여한 대조군의 혈중 γ -GTP 변화량 평균값이 같다.
- 대립가설 : 흰점박이꽃무지유충발효분말을 투여한 시험군과 위제품(placebo)을 투여한 대조군의 혈중 γ -GTP 변화량 평균값이 다르다.
- 독립변수 : 섭취 식품 (흰점박이꽃무지유충발효분말 VS 대조식품)
- 종속변수 : 혈중 γ -GTP 변화량 평균
- 예상되는 차이 $d = 23.5$
- 표준편차 $\sigma : 33.3$
- α (양측) = 0.05
- β (양측) = 0.20

$$= \frac{2\sigma^2(\alpha/2 + Z_\beta)^2}{d}$$

대상자 수 산출을 위해 G*power 3.1.9.2를 이용하여 계산한 결과 군 당 32명이 필요하였고, 이 결과는 상기 가정을 검정하는데 필요한 최소한의 대상자 수로서

연구도중 탈락률 20%를 고려하여 각 군 당 40명씩 총 80명을 모집하는 것을 목표로 하였다.

7.5 인체적용시험기간

○ 동아대학교병원

IRB 승인일(2018년 10월 08일) ~ 2021년 06월 30일

- 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 06. 26.
- 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 06. 26.
- 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 03. 09.

○ 양산부산대학교병원

IRB 승인일(2018년 09월 20일) ~ 2021년 06월 30일

- 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 01. 07.
- 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 01. 13.
- 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 01. 25.

○ 고신대학교복음병원

IRB 승인일(2020년 01월 14일) ~ 2021년 06월 30일

- 첫 시험대상자 서면동의일 : 2020. 05. 21.
- 첫 시험대상자 등록일 : 2020. 05. 21.
- 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 : 2021. 01. 25.

7.6 인체적용시험 방법

본 시험은 이중눈가림, 무작위배정, 대조식품 비교, 병행설계 인체적용시험이다. 모집공고를 통해 본 시험에 지원한 자가 시험에 대한 충분하게 이해하고 자의에 의해 참여할 것을 서면으로 동의하면, 혈액학적 검사 실시 후 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자에 한하여 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위 배정하였다.

무작위 배정된 연구대상자는 시험용 식품과 복용일지 등을 배부받고 매일 2회 고지된 방법대로 복용하도록 하였다.

0주(baseline), 4주, 8주째 유효성 및 안전성 평가변수에 대한 측정 및 검사를 실시하였고 그 결과에 대하여 분석하였다. 구체적으로 실시한 관찰 및 검사항목의 일정을 Table 3에 요약하였다.

Table 3. 인체적용시험 진행 일정표(Study Flow-Chart)

항 목	방문 1 (screening) (-1일~3주)	방문 2 (기초방문) (0일)	방문 3 (시험 중) (4주± 5일)	방문 4 (시험 종료) (8주± 5일)
대상자 서면동의서 취득	√			
대상자 선정 / 제외기준 평가	√			
대상자 기초 정보 ¹	√	√	√	√
음주력	√		√	√
흡연력	√			
과거병력	√			
신체검사 ²	√	√	√	√
생체징후 ³	√			√
임상실험실 검사(혈액 등) ⁴	√		√	√
시험/대조식품 배분		√	√	
유효성평가변수 측정 ⁵		√	√	√
이상반응 체크			√	√
병용약물 체크		√	√	√
순응도 체크			√	√
설문지 조사		√	√	√

7.6.1 대상자 기초정보

방문 1에서 참여자의 연령, 성별, 생년월일, 음주여부, 흡연여부, 체중, 신장 등 인구 통계적 자료를 기록하였다.

7.6.2 신체검사

매 방문 시 연구자의 문진, 영양상태, 피부/점막, 이비인후계, 심혈관계, 신장/비뇨생식기계, 호흡기계, 대사/내분비계, 소화기계, 근골격계, 신경/정신계 및 사지 등 전신 진찰을 실시하여 정상 여부를 기록하였다.

7.6.3 생체징후

방문 1, 4에서 혈압 및 맥박을 측정하여 기록하였다.

7.6.4 임상실험실 검사

각 방문 시 약 12cc를 채혈하여 방문 1에는 ①,②,③,④검사를 실시하였으며 방문 3에는 ②의 검사를, 방문4에는 ①,②,③의 검사를 실시하였다.

- ①혈액학검사 : WBC, Hemoglobin, Platelet
- ②혈액화학검사 : AST, ALT, g-GT, Bilirubin(total, direct), LDH
- ③혈액화학검사 : Creatinine, Glucose
- ④면역혈청검사 : HbsAg, Anti-HCV

7.6.5 유효성 평가변수 측정

○ 1차 유효성 평가 변수

- 혈중 GGT(γ -GTP)의 변화

○ 2차 유효성 평가 변수

- 혈중 AST(GOT)의 변화
- 혈중 ALT(GPT)의 변화
- AST(GOT) 또는 ALT(GPT) 또는 GGT(γ -GTP)가 정상범위로 돌아온 대상자 비율
- 혈중 AST/ALT ratio의 변화
- 혈중 LDH의 변화
- 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화
- 다차원 피로척도(multi-dimensional fatigue inventory, 19문항)의 변화

7.6.6 시험중지 및 탈락기준

56일 동안 인체적용시험에 사용되는 식품을 섭취하고 유효성 평가변수 측정까지 완료한 대상자는 본 시험을 완료한 것으로 간주하였다.

다음 경우에 해당하는 연구대상자는 중도 탈락시키도록 하였다.

- 선정/제외기준 위반

- 연구 중 연구 대상자의 시험 중지 요구
- 시험용 식품과 직접적인 관계가 있고 시험에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 이상반응 발생 (중대한 이상반응 포함)
- 시험 대상자의 식품 복용 불순응 (순응도 80% 미만) 또는 관찰 불가
- 중대한 인체적용시험계획서 위반이 있는 경우
- 본 인체적용시험에 영향을 미칠 수 있는 의약품 또는 건강기능식품 등을 복용했거나 복용해야 하는 자
- 시험용 식품을 연속 5일을 초과하여 복용하지 않는 경우
- 기타 시험자의 판단

중도탈락한 모든 경우에 있어서 그 원인을 증례기록서에 자세하게 기록하였다.

중도 탈락하여 시험을 완결하지 못한 연구대상자들에게도 가능한 한 안전성 평가를 위하여 임상시험실 검사를 실시하도록 하였다.

7.6.7 무작위 배정 방법

본 인체적용시험을 과학적이고 객관적으로 시행하기 위하여 최종 선정된 대상자들을 블록 무작위 배정(block randomization) 방법을 이용하여 시험군 및 대조군에 1:1로 배정하였다. 이 때 블록의 크기에 따라 무작위 배정에 대한 추측이 가능할 수 있으므로 그 크기는 통계전문가가 임의로 또는 무작위로 설정하였다. 따라서 무작위 배정을 위한 블록의 크기와 수는 알 수 없도록 하였다. 총 무작위 배정 수는 목표 모집인원의 약 120% 규모로 생성하였다.

무작위 배정 내역에 따라 모집된 대상자 순으로 3자리 숫자의 식별코드(고유코드, Randomized Number)를 부여하였고, 해당 코드에 따라 포장된 시험식품 또는 대조식품을 해당 대상자에게 배부하였다.

연구 대상으로 등록되어 무작위 배정번호가 부여되었다면 해당 대상자가 중도 탈락하더라도 사용된 무작위 배정번호는 다시 사용하지 않았다.

무작위배정내역은 통계전문가가 nQuery Advisor 7.0(또는 SAS 9.0 또는 SPSS 21.0)을 이용하여 생성하였고, 이를 의뢰자에게 전달하였으며, 의뢰자는 각

대상자별 무작위 배정내역을 각각의 비투과용 봉투에 담아 밀봉하여 실시기관에 공급하였다.

7.7 유효성 평가기준, 평가방법 및 해석방법(통계분석방법)

7.7.1 효과평가기준 및 평가방법

- 1) 유효성 평가 대상자는 ITT(Intention To Treat) 분석을 위해 다음의 요건을 충족하도록 하였다.
 - 첫 방문 후 최소한 1회 이상의 1차 또는 2차 유효성 평가변수 자료가 확보된 모든 대상자

- 2) 추가적으로 PP(Per-Protocol) 분석을 위해 다음의 요건을 충족하도록 하였다.
 - 선정/제외 기준에 따른 대상자 선택기준에 적합한 대상자.
 - 인체적용시험용 식품을 연속하여 5일분을 초과하여 거르지 않아야 하고, 전체 80% 이상을 복용한 대상자

7.7.2 유효성 평가 기준 및 방법

유효성 평가 기준 시점은 투여 전(방문 2)과 투여 중(방문 3) 및 종료 시(방문 4)에 유효성 평가 변수를 측정하여 Baseline (방문 2)과 비교하여 분석하였다.

7.7.3 통계분석방법

두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t 검정(independent t-test)을, 그렇지 않을 경우 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney's U test)을 수행하였다. 또, 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 대응 t 검정(paired t-test)을, 그렇지 않을 경우 윌콕슨의 부호순위검정(Wilcoxon's signed rank test)을 수행하였다. 연속형 변수의 정규성 검정은 샤피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk's test)을 이용하였다.

통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하며 각 주평가변수에 영향을 미칠 수 있는 음주력과 운동량 변수는 군 간 차이가 있을 경우 통제변수로 고려해 공변량분석을 수행하였다. 연속형자료, 임상실험실검사치, 활력징후변수들에

대하여는 기초상태(baseline), 각 방문시점, 최종 평가시점, 그리고 기초상태에서 최종평가 시점까지의 변화량에 대하여 기술통계량(연구 대상자 수, 평균, 표준편차, 최소치, 중앙값, 최대값)을 제시하였다. 범주형자료에 대하여는 분할표를 제공하였다. 추가적으로, 필요한 경우 95%신뢰구간을 계산 하였고, 중간분석을 실시하지 않았다. ITT분석을 위해 최종 유효성 평가 자료가 결측된 경우, LOCF방법에 의하여 분석하였다. 대상자 기초자료의 경우 방문1 시점에서 측정된 인구통계학적 변수들에 대하여 각 치료군별로 요약하였고, 약물투여군의 비교를 위한 검정을 실시하였다. 이를 위해 연속형 자료에 대하여는 t검정(또는 Wilcoxon's 순위합 검정)을 이용하여 검정하였고, 범주형 자료에 대하여는 카이제곱검정(또는 Fisher's exact test)을 실시하였다.

7.8 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

7.8.1 안전성 평가항목

- 이상반응
- 임상 검사치의 비정상적인 변화
- 생체징후

7.8.2 안전성 평가대상 및 평가방법

인체적용시험에 사용되는 식품을 한번이라도 투여 받고, 이후 적어도 한번 이상 방문하여 이상반응이나 생체징후 값 또는 임상검사치의 변화 등의 안전성 자료를 평가할 수 있는 연구 대상자를 안전성 평가대상으로 하였다.

7.8.3 이상반응의 분류 및 정의

이상반응이란 인체적용시험 관찰기간 중에 발생한 질환 및 사고를 비롯하여 연구 대상자의 복지를 저해하는 모든 사건을 일컫는다. 또한, 임상적으로 유의하다고 여겨지는 임상시험실 검사치나 대상 질환 외의 다른 진단결과도 포함되었다(예를 들어, 계획하지 않은 진단과정이나 치료가 필요하게 되거나 중도탈락을 야기하는 사건).

이상반응(Adverse Event, AE)

인체적용시험에 사용되는 식품을 복용한 후 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후, 증상 또는 질병을 말한다. 반드시 해당 식품과 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

이상약물반응(Adverse Drug Reaction, ADR)

해당 식품과의 인과관계를 완전히 배제할 수 없는 이상반응

중대한 이상반응/이상약물반응(Serious Adverse Event, SAE)

다음에 해당하는 이상반응/이상약물반응을 말한다.

- 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
- 입원 또는 입원기간의 연장이 필요한 경우
- 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능저하를 초래하는 경우
- 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우
- 기타 의학적으로 중요한 경우

7.8.4 평가기준

이상반응은 아래와 같이 3단계로 분류하여 평가하였다.

- 경증(Mild) = 일상적인 활동을 저해 받지 않음
- 중등증(Moderate) = 일상적인 활동을 저해하며, 간단한 처치가 요구됨
- 중증(Severe) = 일상적인 활동을 수행할 수 없으며, 고도의 처치가 요구됨

7.8.5 시험식품과의 인과관계

시험식품과의 인과관계는 아래와 같이 분류하여 평가하였다.

- 명확히 관련이 있음.
- 관련이 있다고 생각됨.
- 관련이 있을 가능성이 있음.
- 관련이 없다고 생각됨.
- 명확히 관련이 없다고 생각됨.

- 불명.

7.8.6 중대한 이상반응 보고방법

인체적용시험책임자와 담당자는 관찰기간 중, 혹은 관찰기간 종료 시에 발생한 모든 중대한 이상반응은 인체적용시험에 사용되는 식품과의 상관유무와 관계없이 발생 후 24시간이내, 인체적용시험의뢰자와 임상연구심의위원회(IRB)에 보고하도록 하였다.

인체적용시험의뢰자와 임상연구심의위원회는 처음의 보고서를 받은 후 그 정보를 검토하고 필요시 인체적용시험 책임자에게 연락하여 더 자세한 정보를 얻도록 하였고, 적절한 사후대책을 마련하도록 하였다.

필요한 경우 중대한 이상반응에 대한 모든 새로운 정보를 포함하는 추적조사 보고서를 인체적용시험 중의 중대한 이상반응 양식에 작성하여 인체적용시험 의뢰자와 임상연구심의위원회에 보고하도록 하였다.

7.9 자료의 품질 보증

본 인체적용시험에 대하여 실시기관은 모니터요원을 지정하여 모니터링을 실시하도록 하였다. 모니터링 방문을 통하여 시험계획서의 준수여부, 시험책임자 등 시험자로부터 인체적용시험 진행현황, 병원기록과 증례기록서(CRF)의 일치여부, 이상반응, 시험용 식품의 관리 등 시험 전반이 계획에 따라 과학적이고 윤리적으로 시행되는지를 확인하였다. 이를 위해 시험자는 모니터요원의 모니터링 방문을 위해 적절한 시간과 장소를 할애하고 증례기록서 및 병원기록의 열람이 가능하도록 하였다.

8. 시험 대상자

8.1 대상자의 수와 분포

본 인체적용시험의 모집공고에 의하여 3개 기관(동아대학교병원, 양산부산대학교병원, 고신대학교복음병원)에서 173명이 지원 및 스크리닝을 실시하였고 이중 목표치인 80명(시험군 : 40명, 대조군: 40명)이 본 인체적용시험에 등록되었다. 시험 중 시험군 3명, 대조군 4명이 중도탈락 하였다. 이에 따라 총 73명이 시험에 순응하여 종료하였다(Table 4, Figure 1). 따라서 탈락을 제외한 73명(시험군 : 37명, 대조군: 36명)이 PP 분석군으로 구성되었고 총 80명(시험군 : 40명, 대조군: 40명)이 ITT 분석군이 되었다.

Table 4. 인체적용시험 대상자의 참여상태

항목	Total
Screening	173
Enrolled	80
Completed	73
Drop-out	7
동의철회	6
이상반응	1
Not Enrolled	93
Inclusion criteria violation	93

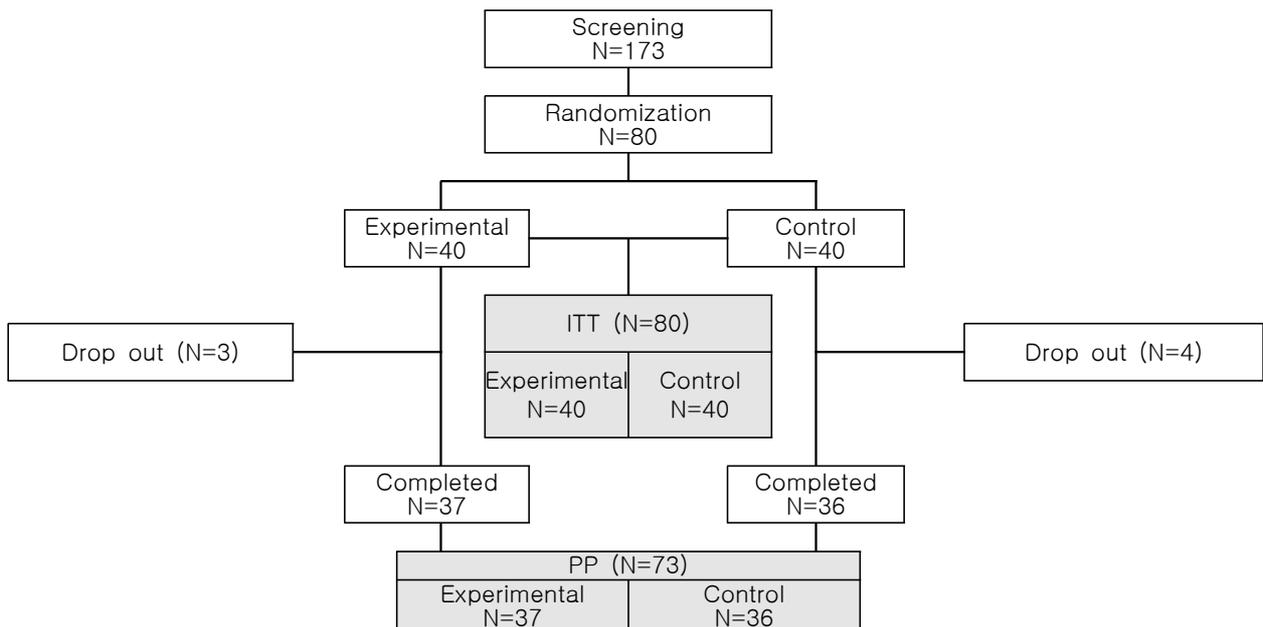


Figure 1. 연구 대상자 분포

8.2 순응도

본 인체적용시험에서는 대상자가 전체 계획된 투여 용량의 80% 이상 복용한 경우 순응한 것으로 간주하였다. ITT군과 PP군에 대한 순응도는 Table 5에 제시하였다. 순응률(시험을 완료한 대상자 비율)은 91.3%였다.

Table 5. 순응도

ITT		PP	
Compliance (순응률)		Compliance (순응률)	
N	%	N	%
73	91.3	73	91.3

8.3 중도 탈락 사유

대상자가 계획서에 따라 선정기준에 적합하고, 제외기준에 해당하지 않으며, 본 시험용 식품의 적절한 섭취 및 모든 방문을 이행한 경우 시험을 완료한 것으로 간주하였다.

본 시험에 등록된 대상자 중 총 7명이 탈락하였는데, 그 내역은 Table 4 및 Table 6에 요약되어 있다.

Table 6. 중도 탈락 사유

Reason for Dropout	N
동의철회	6
사소한 이상반응	1

동의철회는 대상자들의 개인사정에 의한 탈락 6건이었고 사소한 이상반응으로 인한 탈락 1건(복부통증)으로 이들 모두 시험 진행과 유효성 및 안전성 평가와 직접적인 연관성은 없었다.

8.4 시험계획서 위반

본 인체적용시험 진행 중 계획서 등 위반 사례는 2건으로 보고되었다(Table 7). 해당 위반 사례는 IRB에 보고하였고, 대상자의 권리, 안전, 복지나 본 시험에 직접적인 영향을 끼치는 것은 아니라고 판단되었으며, 이에 따라 계획서 변경 등의 조치는 취해지지 않았다.

Table 7. 시험계획서 위반 내역

위반/미준수 구분	내역	조치사항
계획서 미준수	방문일 미준 수 2건	대상자들에게 방문일정에 맞춰 방문할 수 있도록 교육함.

9. 유효성 평가

9.1 평가 대상군

평가 대상군은 무작위 배정 및 유효성 평가변수 결과 확보 여부에 따라 ITT(Intention to Treat) 및 PP(Per Protocol)군으로 분류하였다.

1) 유효성 평가 대상자는 ITT (Intention-To-Treat) 분석을 위해 다음의 요건을 충족시키도록 하였다.

- 첫 방문 후 최소한 1회 이상의 1차 또는 2차 유효성 평가변수 자료가 확보된 모든 대상자

2) 추가적으로 PP(Per-Protocol) 분석을 위해 다음의 요건을 충족시키도록 하였다.

- 선정/제외 기준에 따른 대상자 선택기준에 적합한 대상자
- 인체적용시험용 식품을 연속하여 5일분을 초과하여 거르지 않아야 하고, 전체 80% 이상을 복용한 대상자

이에, ITT 분석군은 전체 대상자인 80명(시험군 : 40명, 대조군: 40명)으로 하였고

PP 분석군은 탈락자 7명을 제외한 73명(시험군 : 37명, 대조군: 36명)으로 하였다.

분석군의 분류는 계획서에 따라 결정되었다. 유효성 평가변수에 대해서는 ITT, PP군 모두에서 분석되었다.

9.2 통계분석방법

두 군간 연속형 변수의 차이를 검정하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 독립 t 검정(independent t-test)을, 그렇지 않을 경우 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney's U test)을 수행하였다. 또, 군 내 시점에 따른 차이 검정을 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 대응 t 검정(paired t-test)을, 그렇지 않을 경우 윌콕슨의 부호순위검정(Wilcoxon's signed rank test)을 수행하였다. 연속형 변수의 정규성 검정은 샤피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk's test)을 이용하였다.

통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 하며 각 주평가변수에 영향을 미칠 수 있는 음주력과 운동량 변수는 군 간 차이가 있을 경우 통제변수로 고려해 공변량분석을 수행하였다. 연속형자료, 임상실험실검사치, 활력징후변수들에

대하여는 기초상태(baseline), 각 방문시점, 최종 평가시점, 그리고 기초상태에서 최종평가 시점까지의 변화량에 대하여 기술통계량(연구 대상자 수, 평균, 표준편차, 최소치, 중앙값, 최대값)을 제시하였다. 범주형자료에 대하여는 분할표를 제공하였다. 추가적으로, 필요한 경우 95%신뢰구간을 계산 하였고, 중간분석을 실시하지 않았다. ITT분석을 위해 최종 유효성 평가 자료가 결측된 경우, LOCF방법에 의하여 분석하였다.

9.3 인구 통계학적 및 기저 특성

본 인체적용시험 대상자에 대해 시험용 식품 투여 전의 기저 특성에 군 간 차이가 있는지 검정하였다(Table 8). 그 결과 ITT군 및 PP군 모두 성별, 나이, 체중, 신장 등에 통계적으로 유의한 차이는 관측되지 않아 두 군의 사전 동질성이 인정된다고 볼 수 있고, 무작위 배정은 통계학적으로 적절하다고 판단된다.

Table 8. Study patients' baseline characteristics

Variable	ITT population			PP population		
	Control (n=40)	Experimental (n=40)	p value	Control (n=36)	Experimental (n=37)	p value
age	50.93±11.51	53.73±8.78	0.225 ¹⁾	51.00±10.63	53.65±8.92	0.252 ¹⁾
weight (kg)	77.16±14.02	78.25±10.55	0.695 ¹⁾	76.41±14.55	78.49±10.94	0.491 ¹⁾
height (cm)	169.83±7.98	170.35±6.84	0.756 ¹⁾	169.84±8.37	170.40±7.05	0.761 ¹⁾
성별	여	7 (17.5%)	0.531 ²⁾	6 (16.7%)	5 (13.5%)	0.707 ²⁾
	남	33 (82.5%)		35 (87.5%)	30 (83.3%)	
흡연	비흡연	20 (50.0%)	20 (50.0%)	18 (50.0%)	19 (51.4%)	0.551
	과거 흡연	8 (20.0%)	4 (10.0%)	7 (19.4%)	4 (10.8%)	
	현재 흡연	12 (30.0%)	16 (40.0%)	11 (30.6%)	14 (37.8%)	
V1_음주	비음주	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	음주	40 (100.0%)	40 (100.0%)	36 (100.0%)	37 (100.0%)	
V3_음주	비음주	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	음주	40 (100.0%)	40 (100.0%)	36 (100.0%)	37 (100.0%)	
V4_음주	비음주	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
	음주	40 (100.0%)	40 (100.0%)	36 (100.0%)	37 (100.0%)	

¹⁾ P values were derived from independent t-test.

²⁾ P values were derived from chi-square test.
(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

9.4 유효성 평가변수 분석

1차 유효성 평가변수인 GGT의 변화량과 2차 유효성 평가변수 항목에 대하여 시험용 식품 섭취 전(방문2, week0)과 섭취 후인 방문3(week4) 및 방문4(week8)에서 측정하였고, 각 측정값과 baseline(방문2) 대비 변화정도를 군 간 및 군내(방문시기별) 비교하였다(Table 9, Table 10).

Table 9. Comparison between and within each groups (ITT)

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=40)	Experimental (n=40)	p value**	Control (n=40)	p value*	Experimental (n=40)	p value*	p value**
GGT								
visit 1	111.50±38.78	92.90±33.58	0.021 ²⁾					
visit 3	103.20±35.33	83.93±29.89	0.010 ²⁾	-8.30±21.19	0.025 ⁴⁾	-8.98±24.50	0.029 ⁴⁾	0.895 ¹⁾
visit 4	102.15±36.31	85.33±37.12	0.037 ²⁾	-9.35±28.61	0.035 ⁴⁾	-7.58±21.50	0.046 ⁴⁾	0.755 ¹⁾
ALT								
visit 1	41.23±24.20	42.23±24.11	0.806 ²⁾					
visit 3	40.70±29.44	38.80±24.43	0.634 ²⁾	-0.53±18.16	0.594 ⁴⁾	-3.43±18.64	0.102 ⁴⁾	0.368 ²⁾
visit 4	43.10±28.42	39.55±26.07	0.560 ²⁾	1.88±18.63	0.309 ⁴⁾	-2.68±25.32	0.208 ⁴⁾	0.128 ²⁾
AST								
visit 1	35.65±13.25	34.58±15.05	0.544 ²⁾					
visit 3	34.43±13.82	30.45±10.92	0.097 ²⁾	-1.23±10.77	0.560 ⁴⁾	-4.13±14.34	0.029 ⁴⁾	0.106 ²⁾
visit 4	39.60±37.17	32.55±19.33	0.122 ²⁾	3.95±36.17	0.851 ⁴⁾	-2.03±20.68	0.045 ⁴⁾	0.118 ²⁾
AST, ALT, GGT 정상 회복 비율 (yes)								
visit 3	9 (23.7%)	14 (36.8%)	0.212 ⁵⁾					
visit 4	10 (26.3%)	16 (42.1%)	0.147 ⁵⁾					
AST/ALT								
visit 1	1.00±0.39	0.92±0.35	0.242 ²⁾					
visit 3	0.99±0.38	0.91±0.29	0.408 ²⁾	-0.01±0.18	0.780 ⁴⁾	-0.01±0.27	0.934 ⁴⁾	0.958 ²⁾
visit 4	1.00±0.42	0.92±0.32	0.453 ²⁾	0.00±0.33	0.239 ⁴⁾	0.00±0.21	0.741 ⁴⁾	0.464 ²⁾
LDH								
visit 1	309.70±100.09	311.88±84.43	0.917 ¹⁾					
visit 3	297.78±103.13	287.68±85.14	0.634 ¹⁾	-11.93±64.95	0.253 ³⁾	-24.20±73.04	0.043 ³⁾	0.279 ²⁾
visit 4	287.18±114.80	283.78±97.15	0.954 ²⁾	-22.53±116.82	0.114 ⁴⁾	-28.10±92.07	0.173 ⁴⁾	0.870 ²⁾
Total bilirubin								
visit 1	0.80±0.27	3.70±18.38	0.832 ²⁾					
visit 3	0.82±0.37	0.76±0.29	0.494 ²⁾	0.03±0.24	0.625 ⁴⁾	-2.94±18.38	0.279 ⁴⁾	0.198 ²⁾
visit 4	0.77±0.37	0.73±0.23	0.900 ²⁾	-0.03±0.29	0.372 ⁴⁾	-2.97±18.37	0.116 ⁴⁾	0.467 ²⁾
Direct bilirubin								
visit 1	0.17±0.06	0.18±0.06	0.320 ²⁾					
visit 3	0.17±0.06	0.17±0.06	0.783 ²⁾	0.01±0.04	0.389 ³⁾	-0.02±0.06	0.067 ⁴⁾	0.160 ²⁾
visit 4	0.16±0.06	0.16±0.05	0.892 ²⁾	-0.01±0.05	0.307 ⁴⁾	-0.02±0.05	0.020 ⁴⁾	0.215 ²⁾
다차원 피로척도								
visit 2	64.98±22.36	68.60±22.80	0.333 ²⁾					

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=40)	Experimental (n=40)	p value**	Control (n=40)	p value*	Experimental (n=40)	p value*	p value**
visit 3	66.23±22.35	66.73±23.73	0.661 ²⁾	1.25±11.90	0.552 ⁴⁾	-1.88±17.98	0.497 ⁴⁾	0.362 ¹⁾
visit 4	64.03±21.25	65.78±22.38	0.773 ²⁾	-0.95±16.51	0.478 ⁴⁾	-2.83±16.60	0.403 ⁴⁾	0.981 ²⁾

* P values were compared within each group.

** P values were compared between groups.

1) P values were derived from independent t-test.

2) P values were derived from Mann-Whitney U test.

3) P values were derived from paired t test.

4) P values were derived from Wilcoxon's signed rank test.

5) P values were derived from Chi-square test.

(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

Table 10. Comparison between and within each groups (PP)

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=36)	Experimental (n=37)	p value**	Control (n=36)	p value*	Experimental (n=37)	p value*	p value**
GGT								
visit 1	114.67±39.42	92.89±34.77	0.010 ²⁾					
visit 3	105.83±35.97	83.22±30.81	0.005 ¹⁾	-8.83±22.27	0.035 ⁴⁾	-9.68±25.36	0.031 ⁴⁾	0.881 ¹⁾
visit 4	104.67±37.12	84.73±38.41	0.020 ²⁾	-10.00±30.10	0.049 ⁴⁾	-8.16±22.27	0.045 ⁴⁾	0.767 ¹⁾
ALT								
visit 1	39.86±21.29	42.78±24.75	0.732 ²⁾					
visit 3	39.22±27.67	39.00±25.11	0.663 ²⁾	-0.64±19.17	0.561 ⁴⁾	-3.78±19.35	0.087 ⁴⁾	0.359 ²⁾
visit 4	41.89±26.60	39.81±26.83	0.608 ²⁾	2.03±19.65	0.347 ⁴⁾	-2.97±26.33	0.187 ⁴⁾	0.120 ²⁾
AST								
visit 1	35.83±13.35	34.78±15.55	0.497 ²⁾					
visit 3	34.42±14.01	30.32±11.23	0.093 ²⁾	-1.42±11.35	0.504 ⁴⁾	-4.46±14.87	0.029 ⁴⁾	0.129 ²⁾
visit 4	40.17±38.98	32.59±20.05	0.112 ²⁾	4.33±38.16	0.900 ⁴⁾	-2.19±21.51	0.045 ⁴⁾	0.146 ²⁾
AST, ALT, GGT 정상 회복 비율 (yes)								
visit 3	9 (25.0%)	14 (37.8%)	0.238 ⁵⁾					
visit 4	10 (27.8%)	16 (43.2%)	0.168 ⁵⁾					
AST/ALT								
visit 1	1.02±0.39	0.92±0.36	0.144 ²⁾					
visit 3	1.00±0.38	0.90±0.29	0.302 ²⁾	-0.01±0.19	0.802 ⁴⁾	-0.01±0.28	0.987 ⁴⁾	0.921 ²⁾
visit 4	1.01±0.42	0.92±0.33	0.323 ²⁾	0.00±0.35	0.252 ⁴⁾	0.00±0.22	0.793 ⁴⁾	0.414 ²⁾
LDH								
visit 1	312.03±101.37	314.00±82.26	0.927 ¹⁾					
visit 3	298.33±104.84	288.27±83.46	0.651 ¹⁾	-13.69±68.27	0.237 ³⁾	-25.73±75.78	0.046 ³⁾	0.351 ²⁾
visit 4	286.56±117.58	284.05±96.64	0.825 ²⁾	-25.47±122.92	0.088 ⁴⁾	-29.95±95.56	0.194 ⁴⁾	0.757 ²⁾
Total bilirubin								
visit 1	0.81±0.28	3.94±19.10	0.842 ²⁾					
visit 3	0.83±0.39	0.77±0.29	0.588 ²⁾	0.03±0.25	0.694 ⁴⁾	-3.17±19.11	0.379 ⁴⁾	0.279 ²⁾
visit 4	0.77±0.38	0.74±0.23	0.778 ²⁾	-0.03±0.30	0.309 ⁴⁾	-3.20±19.11	0.170 ⁴⁾	0.622 ²⁾
Direct bilirubin								
visit 1	0.17±0.06	0.18±0.06	0.299 ¹⁾					
visit 3	0.18±0.06	0.17±0.06	0.837 ²⁾	0.01±0.05	0.350 ³⁾	-0.01±0.06	0.112 ⁴⁾	0.185 ²⁾
visit 4	0.16±0.06	0.16±0.05	0.820 ²⁾	-0.01±0.06	0.368 ⁴⁾	-0.02±0.05	0.034 ⁴⁾	0.268 ²⁾
다차원 피로척도								
visit 2	65.03±22.25	71.08±21.87	0.155 ²⁾					

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=36)	Experimental (n=37)	p value**	Control (n=36)	p value*	Experimental (n=37)	p value*	p value**
visit 3	66.39±21.85	68.51±23.53	0.908 ²⁾	1.36±12.51	0.556 ⁴⁾	-2.57±18.33	0.374 ⁴⁾	0.290 ¹⁾
visit 4	63.94±20.60	67.49±22.14	0.482 ¹⁾	-1.08±17.39	0.711 ³⁾	-3.59±16.83	0.273 ⁴⁾	0.533 ¹⁾

* P values were compared within each group.

** P values were compared between groups.

1) P values were derived from independent t-test.

2) P values were derived from Mann-Whitney U test.

3) P values were derived from paired t test.

4) P values were derived from Wilcoxon's signed rank test.

5) P values were derived from Chi-square test.

(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

9.4.1 1차 유효성 평가변수 분석 결과

1) ITT 분석군

평가변수	구분	결과	유의확률 (p value)	
GGT	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-	
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.	0.035
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.	0.046

- ▶ GGT의 변화량은 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서는 유의성이 나타나지 않았지만 군 내 비교에서는 **시험군, 대조군 모두 유의하게 감소하였다.**

2) PP 분석군

평가변수	구분	결과	유의확률 (p value)	
GGT	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-	
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.	0.049
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.	0.045

- ▶ GGT의 변화량은 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서는 유의성이 나타나지 않았지만 군 내 비교에서는 **시험군, 대조군 모두 유의하게 감소하였다.**

9.4.2 2차 유효성 평가변수 분석 결과

1) ITT 분석군

평가변수	구분	결과	유의확률 (p value)	
AST	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-	
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.	-
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.	0.045
Direct bilirubin	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-	
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.	-
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.	0.020

- ▶ ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서 시험군이 대조군 보다 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하여 개선되는 경향을 보였고, AST와 Direct bilirubin은 군 내 비교에서도 시험군이 유의하게 감소하였다.
- ▶ 따라서 시험식품의 일상적인 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 도움을 줄 것으로 사료된다.

2) PP 분석군

평가변수	구분	결과	유의확률 (p value)
AST	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.
Direct bilirubin	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.

- ▶ ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서 시험군이 대조군 보다 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하여 개선되는 경향을 보였고, AST와 Direct bilirubin은 군 내 비교에서도 시험군이 유의하게 감소하였다.
- ▶ 따라서 시험식품의 일상적인 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 도움을 줄 것으로 사료된다.

9.4.3 소그룹 분석 결과

9.4.3.1 남성

Table 11. Comparison between and within each groups (ITT)

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=33)	Experimental (n=35)	p value**	Control (n=33)	p value*	Experimental (n=35)	p value*	p value**
GGT								
visit 1	110.06±40.03	95.23±34.10	0.125 ²⁾					
visit 3	105.64±36.99	84.49±29.15	0.009 ²⁾	-4.42±18.57	0.172 ⁴⁾	-10.74±23.48	0.020 ⁴⁾	0.351 ²⁾
visit 4	103.88±38.51	85.97±37.78	0.043 ²⁾	-6.18±28.55	0.181 ⁴⁾	-9.26±21.69	0.025 ⁴⁾	0.617 ¹⁾
ALT								
visit 1	42.33±25.26	38.94±20.53	0.598 ²⁾					
visit 3	43.36±31.30	35.23±19.46	0.141 ²⁾	1.03±18.90	0.820 ⁴⁾	-3.71±18.29	0.134 ⁴⁾	0.231 ²⁾
visit 4	45.61±30.12	36.11±18.91	0.183 ²⁾	3.27±19.56	0.144 ⁴⁾	-2.83±17.18	0.274 ⁴⁾	0.083 ²⁾
AST								
visit 1	35.15±13.90	33.86±15.63	0.551 ²⁾					
visit 3	34.91±14.81	29.29±9.26	0.069 ²⁾	-0.24±10.81	1.000 ⁴⁾	-4.57±14.17	0.037 ⁴⁾	0.058 ²⁾
visit 4	41.24±40.68	29.91±9.99	0.083 ²⁾	6.09±39.27	0.311 ⁴⁾	-3.94±13.43	0.067 ⁴⁾	0.051 ²⁾
AST, ALT, GGT 정상 회복 비율 (yes)								
visit 3	7 (21.9%)	12 (36.4%)	0.199 ⁵⁾					
visit 4	7 (21.9%)	13 (39.4%)	0.126 ⁵⁾					
AST/ALT								
visit 1	0.94±0.30	0.95±0.35	0.731 ²⁾					
visit 3	0.92±0.28	0.94±0.28	0.761 ¹⁾	-0.02±0.17	0.490 ³⁾	-0.01±0.28	0.985 ⁴⁾	0.868 ²⁾
visit 4	0.96±0.39	0.94±0.33	0.917 ²⁾	0.02±0.35	0.417 ⁴⁾	-0.01±0.22	0.456 ⁴⁾	0.936 ²⁾
LDH								
visit 1	306.91±83.14	304.57±86.10	0.910 ¹⁾					
visit 3	302.27±99.95	284.83±85.36	0.441 ¹⁾	-4.64±57.08	0.644 ³⁾	-19.74±67.06	0.091 ³⁾	0.390 ²⁾
visit 4	296.36±114.71	275.34±91.14	0.496 ²⁾	-10.55±115.84	0.605 ³⁾	-29.23±86.78	0.284 ⁴⁾	0.936 ²⁾
Total bilirubin								
visit 1	0.86±0.25	4.15±19.64	0.777 ²⁾					
visit 3	0.90±0.37	0.80±0.28	0.282 ²⁾	0.04±0.25	0.435 ⁴⁾	-3.35±19.65	0.374 ⁴⁾	0.233 ²⁾
visit 4	0.82±0.38	0.76±0.22	0.768 ²⁾	-0.03±0.31	0.366 ⁴⁾	-3.39±19.64	0.083 ⁴⁾	0.541 ²⁾
Direct bilirubin								
visit 1	0.18±0.06	0.19±0.06	0.526 ²⁾					
visit 3	0.18±0.05	0.17±0.06	0.457 ¹⁾	0.01±0.04	0.332 ³⁾	-0.01±0.06	0.180 ⁴⁾	0.275 ²⁾
visit 4	0.17±0.06	0.16±0.05	0.921 ²⁾	-0.01±0.05	0.246 ⁴⁾	-0.02±0.06	0.029 ⁴⁾	0.281 ²⁾
다차원 피로척도								
visit 2	65.12±20.94	68.03±22.74	0.429 ²⁾					
visit 3	65.82±20.74	63.17±22.19	0.314 ²⁾	0.70±11.66	0.765 ⁴⁾	-4.86±16.14	0.100 ⁴⁾	0.110 ¹⁾
visit 4	65.15±20.70	63.09±21.97	0.692 ¹⁾	0.03±16.54	0.992 ³⁾	-4.94±15.49	0.184 ⁴⁾	0.495 ²⁾

* P values were compared within each group.

** P values were compared between groups.

1) P values were derived from independent t-test.

2) P values were derived from Mann-Whitney U test.

3) P values were derived from paired t test.

4) P values were derived from Wilcoxon's signed rank test.

5) P values were derived from Chi-square test.

(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

1) ITT 분석군

평가변수	구분	결과	유의확률 (p value)
GGT	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.
Direct bilirubin	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.

- ▶ GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서 시험군이 대조군 보다 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하여 개선되는 경향을 보였고, 1차 유효성 평가변수인 GGT와 2차 유효성 평가변수인 Direct bilirubin은 군 내 비교에서 시험군이 유의하게 감소하였다.
- ▶ 따라서 남성 소그룹 분석 결과 1차 유효성 평가변수 및 2차 유효성 평가변수가 유의성은 없지만 대조군 대비 시험군의 변화량이 감소하여 시험식품의 일상적인 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 도움을 줄 것이라 여겨진다.

9.4.3.2 55세 이상

Table 12. Comparison between and within each groups (ITT)

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=18)	Experimental (n=20)	p value**	Control (n=18)	p value*	Experimental (n=20)	p value*	p value**
GGT								
visit 1	110.39±30.23	85.35±30.39	0.010 ²⁾					
visit 3	99.67±29.59	78.70±20.12	0.014 ¹⁾	-10.72±22.37	0.058 ³⁾	-6.65±17.01	0.133 ⁴⁾	0.529 ¹⁾
visit 4	106.50±31.23	77.45±28.58	0.005 ¹⁾	-3.89±29.54	0.584 ³⁾	-7.90±17.99	0.061 ⁴⁾	0.612 ¹⁾
ALT								
visit 1	35.61±14.96	30.60±12.01	0.380 ²⁾					
visit 3	32.56±10.85	31.05±19.48	0.247 ²⁾	-3.06±10.54	0.236 ³⁾	0.45±15.42	0.586 ⁴⁾	0.953 ²⁾
visit 4	35.67±16.58	31.00±18.41	0.148 ²⁾	0.06±16.13	0.538 ⁴⁾	0.40±14.65	0.717 ⁴⁾	0.492 ²⁾
AST								
visit 1	36.61±13.61	31.05±8.17	0.131 ¹⁾					
visit 3	36.11±15.15	28.65±8.68	0.053 ²⁾	-0.50±7.07	0.842 ⁴⁾	-2.40±6.94	0.112 ⁴⁾	0.172 ²⁾
visit 4	35.28±10.00	30.45±10.83	0.092 ²⁾	-1.33±11.48	0.877 ⁴⁾	-0.60±8.38	0.632 ⁴⁾	0.822 ¹⁾
AST, ALT, GGT 정상 회복 비율 (yes)								
visit 3	2 (11.1%)	5 (26.3%)	0.405 ⁵⁾					
visit 4	4 (22.2%)	6 (31.6%)	0.714 ⁵⁾					
AST/ALT								
visit 1	1.10±0.36	1.10±0.38	0.930 ²⁾					
visit 3	1.15±0.37	1.05±0.28	0.345 ¹⁾	0.05±0.18	0.210 ⁴⁾	-0.05±0.35	0.643 ⁴⁾	0.214 ²⁾
visit 4	1.09±0.36	1.10±0.32	0.915 ¹⁾	-0.01±0.24	0.653 ⁴⁾	0.00±0.27	0.828 ⁴⁾	0.865 ¹⁾
LDH								
visit 1	319.83±122.39	315.35±103.77	0.903 ¹⁾					
visit 3	299.67±111.47	285.95±98.50	0.690 ¹⁾	-20.17±62.11	0.186 ³⁾	-29.40±71.15	0.080 ³⁾	0.474 ²⁾
visit 4	307.28±106.35	284.80±114.38	0.320 ²⁾	-12.56±77.60	0.502 ³⁾	-30.55±92.49	0.444 ⁴⁾	0.650 ²⁾
Total bilirubin								
visit 1	0.75±0.26	6.64±25.98	0.253 ²⁾					
visit 3	0.73±0.29	0.82±0.28	0.219 ²⁾	-0.03±0.15	0.955 ⁴⁾	-5.82±26.01	0.810 ⁴⁾	0.845 ²⁾
visit 4	0.72±0.24	0.80±0.25	0.346 ¹⁾	-0.03±0.24	0.609 ⁴⁾	-5.84±26.00	0.551 ⁴⁾	0.941 ²⁾
Direct bilirubin								
visit 1	0.18±0.05	0.20±0.06	0.233 ¹⁾					
visit 3	0.18±0.06	0.19±0.06	0.582 ¹⁾	0.01±0.03	0.609 ³⁾	0.00±0.06	0.596 ³⁾	0.485 ²⁾
visit 4	0.17±0.05	0.18±0.06	0.452 ¹⁾	0.00±0.07	0.659 ³⁾	-0.02±0.06	0.227 ³⁾	0.211 ²⁾
다차원 피로척도								
visit 2	63.33±22.00	67.50±21.27	0.557 ¹⁾					
visit 3	67.61±24.77	63.05±23.12	0.561 ¹⁾	4.28±10.60	0.105 ³⁾	-4.45±18.99	0.308 ³⁾	0.094 ¹⁾
visit 4	63.61±21.93	63.50±21.03	0.987 ¹⁾	0.28±15.04	0.938 ³⁾	-4.00±16.74	0.299 ³⁾	0.539 ²⁾

* P values were compared within each group.

** P values were compared between groups.

1) P values were derived from independent t-test.

2) P values were derived from Mann-Whitney U test.

3) P values were derived from paired t test.

4) P values were derived from Wilcoxon's signed rank test.

5) P values were derived from Fisher's exact test.

(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

1) ITT 분석군

- ▶ GGT, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서 시험군이 대조군 보다 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하여 개선되는 경향을 보였다.
- ▶ 따라서 55세 이상 소그룹 분석 결과 1차 유효성 평가변수 및 2차 유효성 평가변수가 유의성은 없지만 대조군 대비 시험군의 변화량이 감소하여 시험식품의 일상적인 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 도움을 줄 것이라 여겨진다.

9.4.3.3 BMI 25 미만

Table 13. Comparison between and within each groups (ITT=PP)

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=14)	Experimental (n=11)	p value**	Control (n=14)	p value*	Experimental (n=11)	p value*	p value**
GGT								
visit 1	121.64±52.55	94.00±46.34	0.125 ²⁾					
visit 3	115.93±45.66	82.82±39.37	0.069 ¹⁾	-5.71±21.71	0.469 ⁴⁾	-11.18±28.85	0.114 ⁴⁾	0.593 ¹⁾
visit 4	118.57±43.00	85.36±49.04	0.085 ¹⁾	-3.07±38.12	0.925 ⁴⁾	-8.64±15.40	0.075 ⁴⁾	0.654 ¹⁾
ALT								
visit 1	31.57±15.44	54.64±35.7	0.075 ²⁾					
visit 3	31.36±13.23	48.00±33.65	0.238 ²⁾	-0.21±5.79	0.900 ⁴⁾	-6.64±26.92	0.398 ⁴⁾	0.546
visit 4	38.43±27.82	48.73±37.98	0.262 ²⁾	6.86±18.14	0.107 ⁴⁾	-5.91±43.06	0.386 ⁴⁾	0.099
AST								
visit 1	37.07±15.29	44.55±21.65	0.366 ²⁾					
visit 3	36.43±16.96	35.36±13.13	0.956 ²⁾	-0.64±7.35	0.674 ⁴⁾	-9.18±24.76	0.182 ⁴⁾	0.198
visit 4	50.29±60.78	42.09±32.31	0.913 ²⁾	13.21±58.97	0.925 ⁴⁾	-2.45±39.12	0.286 ⁴⁾	0.273
AST, ALT, GGT 정상 회복 비율 (yes)								
visit 3	3 (21.4%)	6 (54.5%)	0.115 ⁵⁾					
visit 4	4 (28.6%)	6 (54.5%)	0.241 ⁵⁾					
AST/ALT								
visit 1	1.28±0.43	1.01±0.54	0.171 ¹⁾					
visit 3	1.23±0.43	0.89±0.33	0.042 ¹⁾	-0.05±0.12	0.167 ³⁾	-0.11±0.36	0.329 ³⁾	0.661
visit 4	1.27±0.50	0.96±0.39	0.102 ¹⁾	-0.01±0.48	0.961 ³⁾	-0.05±0.21	0.485 ³⁾	0.511
LDH								
visit 1	310.93±103.57	324.64±89.50	0.731 ¹⁾					
visit 3	282.93±121.10	296.64±89.53	0.757 ¹⁾	-28.00±70.40	0.161 ³⁾	-28.00±107.33	0.407 ³⁾	0.827
visit 4	297.86±149.45	289.27±100.54	0.872 ¹⁾	-13.07±160.36	0.765 ³⁾	-35.36±133.00	0.399 ³⁾	0.891
Total bilirubin								
visit 1	0.77±0.28	11.40±35.03	0.310 ²⁾					

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=14)	Experimental (n=11)	p value**	Control (n=14)	p value*	Experimental (n=11)	p value*	p value**
visit 3	0.82±0.50	0.82±0.31	0.565 ²⁾	0.04±0.34	0.969 ⁴⁾	-10.58±35.06	0.477 ⁴⁾	0.655
visit 4	0.71±0.49	0.66±0.18	0.526 ²⁾	-0.07±0.41	0.263 ⁴⁾	-10.75±35.01	0.028 ⁴⁾	0.440
Direct bilirubin								
visit 1	0.16±0.05	0.20±0.04	0.094 ¹⁾					
visit 3	0.16±0.06	0.18±0.06	0.472 ¹⁾	0.00±0.06	0.915 ³⁾	-0.02±0.06	0.441 ³⁾	0.425
visit 4	0.15±0.06	0.16±0.04	0.844 ¹⁾	-0.01±0.06	0.612 ³⁾	-0.05±0.05	0.006 ³⁾	0.122
다차원 피로척도								
visit 2	61.93±25.33	70.09±17.50	0.372 ¹⁾					
visit 3	64.93±23.79	73.00±18.61	0.742 ²⁾	3.00±9.88	0.378 ⁴⁾	2.91±14.79	0.477 ⁴⁾	0.985 ¹⁾
visit 4	60.43±23.80	72.27±15.63	0.565 ²⁾	-1.50±13.03	0.674 ³⁾	2.18±11.88	0.720 ⁴⁾	0.474 ¹⁾

* P values were compared within each group.

** P values were compared between groups.

1) P values were derived from independent t-test.

2) P values were derived from Mann-Whitney U test.

3) P values were derived from paired t test.

4) P values were derived from Wilcoxon's signed rank test.

5) P values were derived from Fisher's exact test.

(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

1) ITT=PP 분석군

평가변수	구분	결과	유의확률 (p value)
Total bilirubin	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.
Direct bilirubin	변화량에 대한 군 간 비교	• 유의한 차이 없음.	-
	측정값에 대한 군 내 비교	대조군	• 유의한 차이 없음.
		시험군	• 방문4에서 기저치 대비 유의한 차이 있음.

- ▶ GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin 변화량이 식품 섭취 8주 후 섭취 전에 비해 군 간 비교에서 시험군이 대조군 보다 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하여 개선되는 경향을 보였고, 2차 유효성 평가변수인 Total bilirubin과 Direct bilirubin은 군 내 비교에서 시험군이 유의하게 감소하였다.
- ▶ 따라서 BMI 25 미만 소그룹 분석 결과 2차 유효성 평가변수가 유의성은 없지만

대조군 대비 시험군의 변화량이 감소하여 시험식품의 일상적인 섭취가 알콜성 간 손상 완화에 도움을 줄 것이라 여겨진다.

9.5 유효성 평가 결론

본 인체적용시험에서 유효성 평가는 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 변화량을 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

1차 유효성 평가 변수로 설정한 GGT의 변화량에 대하여 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과, 시험군의 식품 섭취 후 변화량이 대조군과의 군간 비교에서 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하는 경향을 띄며 개선되었다.

2차 유효성 평가 변수로 설정한 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 ITT population으로 분석한 결과, 시험군에서 식품 섭취 후 대조군에 비해 통계적으로 유의성은 없지만 더 감소하였다. 이러한 결과는 PP population에서도 동일하게 도출되었다.

소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점은 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 확인할 수 있었고, BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.

1차 유효성 평가 변수인 혈중 GGT의 변화량과 2차 유효성 평가변수인 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취한 시험군에서 알콜성 간 손상 완화의 효과를 확인하였다. 이는 흰점박이꽃무지유충발효분말의 혼합물을 일상적으로 섭취할 시 알콜성 간 손상 완화에 도움을 주는 근거가 될 수 있을 것이다.

다만 본 연구의 결과로는 통계적 유의성을 확인할 수 없어 추후 추가적인 인체적용시험을 진행한다면 유의한 결과를 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

10. 안전성 평가

시험기간 동안의 이상반응 및 실험실 검사 등을 변수로 하여 ITT군을 대상으로 안전성을 평가하였다.

10.1 이상반응

본 인체시험에서는 3명(3.8%)의 대상자에서 총 3건의 이상반응이 보고되었으며 그 내역은 Table 14와 같다. 보고된 이상반응은 해소되었으며, 이상반응으로 인해 1명 중도 탈락하였다. 하지만 시험용 식품과의 인과관계는 없는 사례로 판단되었다.

Table 14. 이상반응 보고

이상반응 구분	발생건수			중증도 ¹⁾	시험식품과의 인과관계 ²⁾	군 구분 ³⁾	
	N	%	RN				
Hypoglycemia	1	33.3	003	A	4	Con	
속쓰림	1	33.3	017	A	3	Con	
근막통증증후군	1	33.3	306	B	4	Con	
Total	3	-	-	-	-	-	

1) A-경증(Mild), B-중등증(Moderate), C-중증(Severe)

2) 1-명확히 관련이 있음, 2-관련이 있다고 생각됨, 3-관련이 있을 가능성이 있음,
4-관련이 없다고 생각됨, 5-명확히 관련이 없다고 생각됨, 6-불명

3) Exp-시험군, Con-대조군

10.1.1 중대한 이상반응

본 인체적용시험에서 중대한 이상반응은 보고되지 않았다.

10.2 임상실험실 검사

임상실험실 검사 결과는 기저치(baseline) 대비 변화량에 대한 군 간 비교를 진행하였고, 안전성 평가자료가 결측된 경우에는 LOCF 방법으로 대체하였다.

10.2.1 안전성 검사

안전성 검사에서 변화량에 대한 군 간 유의차는 없었고, 개별 대상자의 결과치에 대해서도 이상소견은 없었다.(Table 15).

Table 15. Comparison between and within each groups (ITT)

Variable	Observed value			Change from baseline				
	Control (n=40)	Experimental (n=40)	p value**	Control (n=40)	p value*	Experimental (n=40)	p value*	p value**
WBC								
visit 1	6.51±1.38	6.48±1.49	0.777 ²⁾					
visit 4	6.75±1.51	6.54±1.35	0.507 ¹⁾	0.25±0.95	0.109 ³⁾	0.06±1.63	0.774 ⁴⁾	0.554 ²⁾
Hb								
visit 1	14.87±1.51	14.91±1.11	0.893 ¹⁾					
visit 4	14.77±1.30	14.68±1.94	0.732 ²⁾	-0.09±0.58	0.310 ³⁾	-0.23±1.91	0.712 ⁴⁾	0.616 ²⁾
Platelet								
visit 1	241.98±52.54	243.43±44.80	0.895 ¹⁾					
visit 4	243.95±49.96	242.40±41.95	0.881 ¹⁾	1.98±23.37	0.596 ³⁾	-1.03±26.25	0.806 ³⁾	0.912 ²⁾
Creatinine								
visit 1	0.84±0.15	0.86±0.16	0.591 ¹⁾					
visit 4	0.83±0.17	0.87±0.16	0.302 ¹⁾	-0.01±0.08	0.336 ³⁾	0.01±0.11	0.723 ³⁾	0.390 ¹⁾
Glucose								
visit 1	111.93±25.67	119.38±41.58	0.551 ²⁾					
visit 4	111.33±24.82	123.58±42.11	0.131 ²⁾	-0.60±23.38	0.980 ⁴⁾	4.20±33.17	0.424 ⁴⁾	0.620 ²⁾

* P values were compared within each group.

** P values were compared between groups.

1) P values were derived from independent t-test.

2) P values were derived from Mann-Whitney U test.

3) P values were derived from paired t test.

4) P values were derived from Wilcoxon's signed rank test.

(Shapiro-Wilk's test was employed for test of normality assumption.)

10.3 생체징후, 신체검사 및 기타 안전성에 관한 평가

생체징후 및 신체검사 등 대상자에 대한 문진 및 진료에서 특이적인 이상반응 또는 비정상 사례는 없었다.

10.4 안전성 평가 결론

시험용 식품을 1회 이상 복용한 시험군 40명, 대조군 40명의 대상자에 대해 시험 기간 중에 생체징후 평가, 임상실험실검사 등으로 안전성을 평가하였다. 시험 기간 중 이상반응이 발생한 사례가 있고 1명 탈락하였지만 대조식품 섭취군으로 시험용

식품과의 연관성은 없는 것으로 판단되며 중대한 이상반응은 발생하지 않았다. 또한 임상실험실 검사치 및 신체검사 등을 통한 안전성 평가결과 임상적으로 위해하다고 판단할 근거는 없었다. 안전성 평가는 시험에 참여한 시험책임자가 시행하였다. 따라서 본 흰점박이꽃무지유충발효분말을 성인 기준 500 mg/일의 용량으로 중·장기간 동안 섭취하여도 안전하다고 판단된다.

11. 고찰 및 결론

본 인체적용시험은 만 19세 이상 성인 남성 또는 여성을 대상으로 흰점박이꽃무지유충발효분말 섭취 시 알콜성 간 손상에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 실시되었다. 이를 위해서 선정기준에 해당하고 제외기준에 해당하지 않는 80명을 대상으로 본 인체적용시험용 식품 투여 전/후의 유효성 및 안전성 평가변수를 측정하여 비교하였다.

유효성 평가 변수로 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 변화량을 설정하여 식품을 8주간 섭취한 후 그 효능을 확인하였다. 시험군에서 시험식품을 8주간 섭취 후 ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점 변화량이 대조군과의 비교에서 유의성은 확인되지 않았지만 감소하여 개선되는 경향을 보였다. 또한 소그룹 분석(남성, 55세 이상, BMI 25 미만)한 결과 남성 및 55세 이상에서 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin, Direct bilirubin 및 다차원 피로척도의 총점이 시험군에서 대조군 대비 유의성을 띄지는 않았지만 감소하여 개선되는 양상을 보였고 BMI 25 미만에서는 GGT, ALT, AST, LDH, Total bilirubin 및 Direct bilirubin이 식품 섭취 후 군간 유의성은 없으나 시험군에서 대조군에 비해 더 감소하여 개선되는 경향을 나타내었다.

본 인체적용시험을 진행하며 3명의 이상 반응이 발생하였고 그 중 1명이 중도 탈락 하였지만 시험용 식품과의 인과관계는 없는 사례로 판단되었다. 중대한 이상 반응은 보고되지 않았고, 임상 시험실 검사 결과에서도 안전성 위해 요소는 발견되지 않았다. 시험식품에 사용된 흰점박이꽃무지유충발효분말은 식품의약품 안전처에 식품 원료로 등록된 흰점박이꽃무지유충을 사용하여 제조되었고, 오래전부터 국내·외에 식품으로도 널리 섭취되고 있어 적절한 용량을 섭취 시 안전성은 입증되어 있다고 볼 수 있어 본 시험에서 안전성 위해 요소가 발견되지 않은 것은 당연한 결과로 사료된다.

종합적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 섭취함에 따라 알콜성 간 손상 완화를 혈중 GGT의 변화량, 혈중 AST의 변화량, 혈중 ALT의 변화량, AST 또는 ALT 또는 GGT가 정상범위로 돌아온 대상자 비율, 혈중 AST/ALT ratio의 변화, 혈중 LDH의 변화, 혈중 빌리루빈(bilirubin)의 변화, 다차원 피로척도 총점의 분석한 결과를 통해 확인하였고,

ITT population PP population 및 소그룹 분석 모두에서 동일하게 유효성 평가 변수가 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이상 반응, 임상 실험실 검사, 문진 등을 통해 평가된 안전성 평가에서도 위해 요소가 발견되지 않아 중장기 섭취에 대해 안전하다는 결과도 확인할 수 있었다.

결론적으로 흰점박이꽃무지유충발효분말을 일상적으로 섭취할 경우 알콜성 간 손상 완화에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 다만 본 연구의 결과로는 통계적 유의성을 확인할 수 없어 추후 추가적인 인체적용시험을 진행한다면 유의한 결과를 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

본 연구는 “식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화” 과제로서 식품산업, 곤충산업의 발전에 기여하기 위하여 여러 가지 곤충자원 중 흰점박이꽃무지유충 발효분말을 활용하여 알콜성 간손상 및 비알콜성 간손상에 대한 *in vitro*, *in vivo*, 세포실험에서부터 독성시험, 임상시험에 이르기까지 공동연구기관인 (재)전주농생명소재연구원과 동아대학교 산학협력관과 참여기업인 엠에스글로벌바이오(주), 위탁기관인 (주)랩투씨알오의 협력을 통해 다양한 연구 성과물과 결과를 성실하게 돌출하여 곤충 소재를 활용한 새로운 식품 소재 시장의 개척과 이를 바탕으로 미래 식량자원 중 하나인 곤충산업 발전의 교두보를 마련할 수 있는 좋은 계기를 마련하는 연구개발 결과로 사료됩니다.

뿐만 아니라 연구개발성과물인 특허, 논문 등을 활용하여 흰점박이꽃무지유충 외에도 다양한 곤충자원을 활용한 생리활성물질에 대한 연구를 지속할 예정이며, 흰점박이꽃무지유충발효분말 소재 외에도 연구개발 과정 중에 거저리(밀웜) 등을 활용한 식품산업 전반의 식품원료, 가공식품, 건강기능식품 시장에서 곤충자원의 식품소재화에 앞장 설 수 있도록 신제품 개발 및 시장 개척에 노력을 기울일 것입니다.

아직 곤충산업 분야가 표준화된 모델이나 상용화가 부족한 현실에서 본 연구 결과물이 미래식량자원으로 예견되는 곤충자원이 보다 활발하게 활성화되어 곤충산업, 식품산업에서 중요한 역할을 할 수 있도록 관계 부처의 많은 관심과 연구개발에 지속적인 투자를 기대합니다.

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	317039-4		
사업구분	고부가가치식품기술사업				
연구분야	식품		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화		과제유형	(개발)	
연구개발기관	(주)자연과효소		연구책임자	김정욱	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2017. 06. 15 - 2017. 12. 31	210,000	70,000	280,000
	2차년도	2018. 01. 01 - 2018. 12. 31	480,000	161,000	641,000
	3차년도	2019. 01. 01 - 2019. 12. 31	345,000	115,000	460,000
	4차년도	2020. 01. 01 - 2021. 06. 30	233,000	92,000	325,000
	계	2017. 06. 15 - 2021. 06. 30	1,268,000	438,000	1,706,000
참여기업	엠에스글로벌바이오(주)				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.07.26

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)자연과효소	대표	김정욱

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (보통)

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 알콜성 간손상 및 비알콜성 간손상에 대한 in vitro, in vivo, 세포실험 등의 결과는 아주 우수한 것으로 판단되지만, 단지 코로나19라는 재난적 상황으로 인한 임상시험 지연과 임상시험 환경의 어려움으로 인해 임상시험 결과가 늦어지고 결과가 일부 그룹에서 간기능 개선 경향은 보이지만 유의성이 낮은 관계로 인해 개별인정 신청이 지연되어 보통으로 평가합니다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

식·약용곤충/발효미생물 복합소재의 연구개발 결과 곤충 소재를 활용한 새로운 식품 소재 시장의 개척과 이를 바탕으로 미래 식량자원중 하나인 곤충산업 발전의 교두보를 마련할 수 있는 좋은 계기가 되는 성과로 판단됩니다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

식·약용곤충/발효미생물 복합소재의 개발은 향후 다양한 곤충자원을 활용한 일반식품 소재의 활용도가 증대될 것으로 판단됩니다.
특히 곤충자원의 식품 소재로 활발하게 이용됨에 따라 곤충자원의 수요도 점진적으로 증가되어 곤충 사육 농가의 증대 및 곤충 사육을 스마트팜과 연계할 경우 대량 사육이 가능한 환경이 조성될 것으로 판단됩니다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 식품산업 발전에 기여하기 위하여 알콜성 간손상 및 비알콜성 간손상에 대한 in vitro, in vivo, 세포실험에서부터 독성시험, 임상시험에 이르기까지 비록 코로나 19로 인해 각종 어려움을 극복하고 현재의 결과를 도출하기 위한 공동연구기관인 (재)전주농생명소재연구원과 동아대학교 산학협력관과 참여기업인 엠에스글로벌바이오(주), 위탁기관인 (주)랩투씨알오의 협력을 통해 다양한 연구 성과물과 결과를 성실하게 도출하였다고 판단됩니다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 연구를 진행하는 과정에서 논문 10편(SCI:5편, 비SCI:5편)을 투고하였으며 지적소유권인 특허출원 6건, 특허등록 5건을 달성하였으며 학술발표 13건 등의 연구개발성과를 달성함으로써 기존 성과 목표 대비 초과하는 우수한 결과를 달성하였다고 판단됩니다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가																								
식약용곤충발효분말 제조조건 확립 및 표준화	10	100	<ul style="list-style-type: none"> - 지표물질 후보1 : 글루타치온 함량 분석 결과 발효후, 증가한 것을 확인 - 지표물질 후보2 : 유리아미노산 측정 결과 발효 후 생성되는 아미노산 확인(GABA) - 지표물질 후보3 : 폴리감마글루탐산 함량 분석 [고찰] 지표 후보 물질의 발효전후 함량 비교를 통해 물질 선별 후 식약처 문의 결과 지표물질은 '특이성, 대표성, 안정성, 용이성' 특성을 가져야 하므로 이에 부합되는 지표물질 확인 : 최종적으로 '폴리감마글루탐산'을 지표성분으로 설정 [제조공정 확립] 표준생산공정도, 식품 품목제조보고서																								
시제품의 안전성 평가 (음료 및 타정형 제품)	10	100	1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 독성시험 결과 (공인기관 : 바이오독스텍) <ul style="list-style-type: none"> • 경구투여 독성시험(단회, 2주, 13주) 5,000mg/kg/day로 설정 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상유발성은 음성으로 판단 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성은 음성으로 판단 2. 흰점박이꽃무지유충발효분의 잔류농약 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원) <ul style="list-style-type: none"> • 3Lot : 잔류농약(Aldrin, BHC, DDT, Dieldrin, Endrin) 불검출 3. 대장균, 중금속 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원) <ul style="list-style-type: none"> • 대장균 : 음성 • 대장균군 : 음성 • 중금속 : 식품공전 기준치 이하 																								
개발제품의 간 기능개선효능 검증 (혈액 및 간지질 함량측정)	20	75	<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th colspan="2">논문명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과</td> <td>Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향</td> </tr> <tr> <td>Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> 1. 알코올성 간손상 동물 모델에서 약용곤충 발효복합 소재들의 간기능 개선 효능 검증 2. 동물모델 조직에서 간 기능 개선 효능 분석 (<i>in vivo</i>) 3. 대사물질 성분들의 간기능 개선 및 효능 분석 (세포) ※임상시험결과 일부그룹에서 간기능개선 경향은 나타나지만 유의성은 높지 않음	논문명		유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향	Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation																			
논문명																											
유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 유발 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향																										
Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation																											
개발제품 출시 (음료 및 타정형 제품)	20	100	<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>출시건수</th> <th>개발제품</th> <th>유형</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>[제품1]</td> <td>곰메이트</td> <td>식품-혼합음료</td> </tr> <tr> <td>[제품2]</td> <td>곰병이환</td> <td>식품-기타가공품-환제품</td> </tr> <tr> <td>[제품3]</td> <td>더이앤멀티비타민미네랄</td> <td>건강기능식품-비타민-타정(정제)</td> </tr> <tr> <td>[제품4]</td> <td>케이베이</td> <td>식품-기타가공품-타정(정제)</td> </tr> </tbody> </table>	출시건수	개발제품	유형	[제품1]	곰메이트	식품-혼합음료	[제품2]	곰병이환	식품-기타가공품-환제품	[제품3]	더이앤멀티비타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)	[제품4]	케이베이	식품-기타가공품-타정(정제)									
출시건수	개발제품	유형																									
[제품1]	곰메이트	식품-혼합음료																									
[제품2]	곰병이환	식품-기타가공품-환제품																									
[제품3]	더이앤멀티비타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)																									
[제품4]	케이베이	식품-기타가공품-타정(정제)																									
개발제품 관련 매출 발생 (50,000천원 이상)	10	100	<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>연도</th> <th>개발제품</th> <th>유형</th> <th>매출액(원)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2018</td> <td>곰메이트</td> <td>식품-혼합음료</td> <td>337,844</td> </tr> <tr> <td>2019</td> <td>곰메이트</td> <td>식품-혼합음료</td> <td>16,107,658</td> </tr> <tr> <td>2020</td> <td>곰메이트</td> <td>식품-혼합음료</td> <td>47,109,522</td> </tr> <tr> <td>2020</td> <td>더이앤멀티비 타민미네랄</td> <td>건강기능식품-비타민-타정(정제)</td> <td>15,400,000</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">합 계 (세금계산서 기준)</td> <td>78,955,024</td> </tr> </tbody> </table>	연도	개발제품	유형	매출액(원)	2018	곰메이트	식품-혼합음료	337,844	2019	곰메이트	식품-혼합음료	16,107,658	2020	곰메이트	식품-혼합음료	47,109,522	2020	더이앤멀티비 타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)	15,400,000	합 계 (세금계산서 기준)			78,955,024
연도	개발제품	유형	매출액(원)																								
2018	곰메이트	식품-혼합음료	337,844																								
2019	곰메이트	식품-혼합음료	16,107,658																								
2020	곰메이트	식품-혼합음료	47,109,522																								
2020	더이앤멀티비 타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)	15,400,000																								
합 계 (세금계산서 기준)			78,955,024																								
특 허	10	100	출원 : 6건, 등록 : 4건																								
논 문	20	100	SCI : 5건, 비SCI : 5건																								
합계	100점		연구 성과 참조																								

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 식품산업 발전에 기여하기 위하여 알콜성 간손상 및 비알콜성 간손상에 대한 in vitro, in vivo, 세포실험에서부터 독성시험, 임상시험에 이르기까지 비록 코로나 19로 인해 각종 어려움을 극복하고 현재의 결과를 도출하기 위한 공동연구기관인 (재)전주농생명소재연구원과 동아대학교 산학협력관과 참여기업인 엠에스글로벌바이오(주), 위탁기관인 (주)랩투씨알오의 협력을 통해 다양한 연구 성과물과 결과를 성실하게 도출하여 곤충 소재를 활용한 새로운 식품 소재 시장의 개척과 이를 바탕으로 미래 식량자원중 하나인 곤충산업 발전의 교두보를 마련할 수 있는 좋은 계기를 마련하는 마중물 역할의 연구개발결과로 사료됩니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

임상시험이 개시되던 2020년 초, 본 과제의 4차년도 과제 수행중 닥친 코로나19라는 대재앙 앞에 임상 대상자 모집에 난항을 겪고 대학병원에 오는 것을 꺼리는 사회 분위기로 인하여 1년 6개월이라는 임상시험 기간동안 지연되어 보다 더 타당성 있는 임상결과가 나오지 못한 부분에 대하여 못내 아쉬움이 많은 과제입니다.

부디 본 연구 성과물이라도 널리 활용되어 미래 식량자원인 곤충산업 발전의 작은 초석이 될 수 있도록 지속적인 지원바랍니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

식·약용곤충/발효미생물 복합소재의 개발은 향후 다양한 곤충자원을 활용한 일반식품 소재의 활용도가 증대될 것으로 판단되므로 본 과제 성과물에 대한 정보를 널리 전파하여 곤충자원의 식품 소재로 활발하게 이용됨에 따라 곤충자원의 수요도 점진적으로 증가되어 곤충 사육 농가의 증대 및 곤충 사육을 스마트팜과 연계할 경우 대량 사육이 가능한 환경이 조성될 것으로 판단됩니다.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품	
연구과제명	식·약용곤충/발효미생물 복합소재를 활용한 고부가가치의 간기능 개선 물질의 발굴 및 식품 산업화			
주관연구개발기관	(주)자연과효소		주관연구책임자	김정욱
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	1,268,000,000	438,000,000	-	1,706,000,000
연구개발기간	2017. 06. 15 - 2021. 06. 30			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체 활용) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가																								
제조조건 확립 및 표준화	10	100	<ul style="list-style-type: none"> - 지표물질 후보1 : 글루타치온 함량 분석 결과 발효후, 증가한 것을 확인 - 지표물질 후보2 : 유리아미노산 측정 결과 발효 후 생성되는 아미노산 확인(GABA) - 지표물질 후보3 : 폴리감마글루탐산 함량 분석 <p>[고찰] 지표 후보 물질의 발효전후 함량 비교를 통해 물질 선별 후 식약처 문의 결과 지표물질은 '특이성, 대표성, 안정성, 용이성' 특성을 가져야 하므로 이에 부합되는 지표물질 확인 : 최종적으로 '폴리감마글루탐산'을 지표성분으로 설정</p> <p>[제조공정 확립] 표준생산공정도, 식품 품목제조보고서</p>																								
시제품의 안전성 평가 (음료 및 타정형 제품)	10	100	<ol style="list-style-type: none"> 1. 흰점박이꽃무지유충발효분말의 독성시험 결과 (공인기관 : 바이오톡스텍) <ul style="list-style-type: none"> • 경구투여 독성시험(단회, 2주, 13주) 5,000mg/kg/day로 설정 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 염색체이상유발성은 음성으로 판단 • 흰점박이꽃무지유충발효분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성은 음성으로 판단 2. 흰점박이꽃무지유충발효분의 잔류농약 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원) <ul style="list-style-type: none"> • 3Lot : 잔류농약(Aldrin, BHC, DDT, Dieldrin, Endrin) 불검출 3. 대장균, 중금속 검사결과 (공인기관 : 한국분석기술연구원) <ul style="list-style-type: none"> • 대장균 : 음성 • 대장균군 : 음성 • 중금속 : 식품공전 기준치 이하 																								
개발제품의 간 기능개선효능 검증 (혈액 및 간지질 함량측정)	20	75	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과</td> </tr> <tr> <td>Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향</td> </tr> <tr> <td>Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation</td> </tr> </table> <ol style="list-style-type: none"> 1. 알코올성 간손상 동물 모델에서 약용곤충 발효복합 소재들의 간기능 개선 효능 검증 2. 동물모델 조직에서 간 기능 개선 효능 분석 (<i>in vivo</i>) 3. 대사물질 성분들의 간기능 개선 및 효능 분석 (세포) <p>※임상시험결과 일부그룹에서 간기능개선 경향은 나타나지만 유의성은 높지 않음</p>	유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과	Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향	Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation																					
유용 미생물을 이용한 발효곰팡이 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성효과																											
Bacillus subtilis를 이용한 발효 곰팡이가 비알코올성 지방간 흰쥐의 혈중 지질 및 간 조직의 morphology에 미치는 영향																											
Metabolomics analysis of medicinal insect <i>Protaetia brevitarsis</i> after <i>Bacillus subtilis</i> fermentation																											
개발제품 출시 (음료 및 타정형 제품)	20	100	<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>출시건수</th> <th></th> <th>유형</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>[제품1]</td> <td></td> <td>식품-혼합음료</td> </tr> <tr> <td>[제품2]</td> <td>곰팡이환</td> <td>식품-기타가공품-환제품</td> </tr> <tr> <td>[제품3]</td> <td>더이앤멀티비타민미네랄</td> <td>건강기능식품-비타민-타정(정제)</td> </tr> <tr> <td>[제품4]</td> <td>케이벵이</td> <td>식품-기타가공품-타정(정제)</td> </tr> </tbody> </table>	출시건수		유형	[제품1]		식품-혼합음료	[제품2]	곰팡이환	식품-기타가공품-환제품	[제품3]	더이앤멀티비타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)	[제품4]	케이벵이	식품-기타가공품-타정(정제)									
출시건수		유형																									
[제품1]		식품-혼합음료																									
[제품2]	곰팡이환	식품-기타가공품-환제품																									
[제품3]	더이앤멀티비타민미네랄	건강기능식품-비타민-타정(정제)																									
[제품4]	케이벵이	식품-기타가공품-타정(정제)																									
개발제품 관련 매출 발생 (50,000천원 이상)	10	100	<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>연도</th> <th>개발제품</th> <th>유형</th> <th>매출액(원)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2018</td> <td>곰메이트</td> <td>식품-혼합음료</td> <td>337,844</td> </tr> <tr> <td>2019</td> <td>곰메이트</td> <td>식품-기타가공품-환제품</td> <td>16,107,658</td> </tr> <tr> <td>2020</td> <td>곰메이트</td> <td>건강기능식품-비타민-타정(정제)</td> <td>47,109,522</td> </tr> <tr> <td>2020</td> <td>더이앤멀티비타민미네랄</td> <td>식품-기타가공품-타정(정제)</td> <td>15,400,000</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">합 계 (세금계산서 기준)</td> <td>78,955,024</td> </tr> </tbody> </table>	연도	개발제품	유형	매출액(원)	2018	곰메이트	식품-혼합음료	337,844	2019	곰메이트	식품-기타가공품-환제품	16,107,658	2020	곰메이트	건강기능식품-비타민-타정(정제)	47,109,522	2020	더이앤멀티비타민미네랄	식품-기타가공품-타정(정제)	15,400,000	합 계 (세금계산서 기준)			78,955,024
연도	개발제품	유형	매출액(원)																								
2018	곰메이트	식품-혼합음료	337,844																								
2019	곰메이트	식품-기타가공품-환제품	16,107,658																								
2020	곰메이트	건강기능식품-비타민-타정(정제)	47,109,522																								
2020	더이앤멀티비타민미네랄	식품-기타가공품-타정(정제)	15,400,000																								
합 계 (세금계산서 기준)			78,955,024																								
특 허	10	100	출원 : 6건, 등록 : 5건																								
논 문	20	100	SCI : 5건, 비SCI : 5건																								
합계	100점		연구 성과 참조																								

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												S C I	비 S C I	논 문 평 관 I F						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	5					20	10		20				10	20					
최종 목표	3	1					3	50		1		5	5	6	2					
연구기간내 달성실적	6	5					4	78		4		5	5	13	5					
달성률 (%)	100	100					100	100		100		100	100	100	100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	흰점박이꽃무지 유충 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선용 조성물
②	폴리감마글루탐산 함량이 증진된 흰점박이꽃무지 유충 발효물의 분말의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 폴리감마글루탐산 함량이 증진된 흰점박이꽃무지 유충 발효물의 분말
③	발효곰팡이 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v	v		v	
②의 기술		v				v				
③의 기술		v				v				

* 각 해당란에 v 표시

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.