

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

발간등록번호

11-1543000-003671-01

# 강황과 유자 혼합추출물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화

2021.09.10.

주관연구기관 / 농업회사법인(주)에스디씨  
협동연구기관 / 전남대학교 산학협력단  
연세대학교 산학협력단  
울산대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “강황과 유자 혼합추출물 기능성표시식품 소재 개발과 산업화”(개발기간 : 2019. 06. 20 ~ 2021. 06. 19)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021.09.10

주관연구기관명 : 농업회사법인(주)에스디씨 (대표자) 차민석 (인)

협동연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 민경준 (인)

협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단 (대표자) 이충용 (인)

협동연구기관명 : 울산대학교 산학협력단 (대표자) 박규열 (인)



주관연구책임자 : 차 민 석

협동연구책임자 : 전 우 진

협동연구책임자 : 윤 호 근

협동연구책임자 : 최 경 철

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

### 최종보고서

보안등급  
일반[○], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부		사업명	농축산물안전유통 소비기술개발사업							
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)								
공고번호	제 농축2019-179호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)								
			연구개발과제번호	119068-2							
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명 LB1801	100%	2순위 소분류 코드명	0%	3순위 소분류 코드명	0%				
	농림식품과학기술 분류	1순위 소분류 코드명 PA0201	100%	2순위 소분류 코드명	0%	3순위 소분류 코드명	0%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문										
	영문										
연구개발과제명	국문	강황과 유자 혼합추출물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화									
	영문	Functional expression food production base using <i>Curcuma long</i> L. and <i>Citrus junos</i> Siebold ex Tanaka									
주관연구개발기관	기관명	농업회사법인(주)에스디씨		사업자등록번호	409-81-85980						
	주소	(우)57309 전남 담양군 담양읍 예코길 11-9		법인등록번호	200111-0208813						
연구책임자	성명	차민석		직위	대표이사						
	연락처	직장전화	061-381-8912	휴대전화	[REDACTED]						
		전자우편	[REDACTED]	국가연구자번호	[REDACTED]						
연구개발기간	전체	2019.06.20 - 2021.06.19(2년)									
	1차년도	2019. 06. 20 - 2020. 06. 19(12개월)									
	2차년도	2020. 06. 20 - 2021. 06. 19(12개월)									
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )				연구개발 외 지원금			
		현금	현금	현물	현금	현물	현금		현물		
	총계	400,000	400,000	-	-	-	-	800,000	-	800,000	-
	1년차	200,000	200,000	-	-	-	-	400,000	-	400,000	-
2년차	200,000	200,000	-	-	-	-	400,000	-	400,000	-	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
						역할	기관유형				
	공동연구개발기관	전남대학교 산학협력단	전우진	교수	[REDACTED]	[REDACTED]	기능평가	대학			
		연세대학교 산학협력단	윤호근	교수	[REDACTED]	[REDACTED]	기능평가	대학			
울산대학교 산학협력단		최경철	교수	[REDACTED]	[REDACTED]	기능평가	대학				
연구개발담당자 실무담당자	성명	전수화		직위	선임연구원						
	연락처	직장전화	061-381-8912	휴대전화	[REDACTED]						
		전자우편	[REDACTED]	국가연구자번호	[REDACTED]						

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

2021년 07월 30일

연구책임자: 차민석 (인)

주관연구개발기관의 장: 농업회사법인(주)에스디씨 차민석 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 전남대학교 산학협력단 민정준 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 연세대학교 산학협력단 이종용 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 울산대학교 산학협력단 박규열 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		119068-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명 LB1801	100%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 코드명 PA0201	100%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	강황과 유자 추출혼합물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화						
전체 연구개발기간	2019.06.20.~2021.06.19(24개월)						
총 연구개발비	총 800,000천원 (정부지원연구개발비: 400,000천원, 기관부담연구개발비 : 400,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기능성표시식품 생산 기반 구축</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물 표준화 및 기능성 평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물 함유 기능성표시식품 소재 개발</li> <li>• 기능성표시식품 산업화</li> </ul>				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물 제조공정 표준화</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물 제조공정 및 지표성분 표준화</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 활성평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물을 대상으로 세포 및 mice 활성평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 기억력 개선 활성평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물을 대상으로 세포 및 mice 활성평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 면역력 증진 활성평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물을 대상으로 세포 및 mice 활성평가</li> <li>• 기능성표시식품 산업화 3건</li> <li>• 기능성 원료 함유 기능성표시식품 시제품 개발</li> <li>• 그린커피빈주정추출물 함유 기능성표시식품 산업화</li> </ul>				
	1차년도	목표	<p>&lt;주관연구기관(에스디씨)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물 가공기술 표준화</li> <li>• 강황, 유자 효능연구를 위한 시료 제작</li> <li>• 각 효능별 선정원료(추출물) 제조공정 표준화 시작</li> <li>• 에스디씨가 보유한 생산 시설을 이용하여 시제품 생산</li> <li>• 기능성표시식품 품질평가를 위한 기반 구축</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(전남대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 추출물의 HepG2 세포를 이용한 <i>in vitro</i> 독성 확인</li> <li>• 강황, 유자 추출물의 HepG2 세포를 이용한 <i>in vitro</i> 간기능개선 활성 확인</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(연세대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 추출물에 대한 라디칼 소거능 및 세포독성 확인</li> <li>• 강황, 유자 추출물 대상 뇌세포 보호 효능 검색</li> <li>• 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vitro</i> 상에서의 효능 평가 확인</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(울산대학교)&gt;</p>				

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 추출물의 면역세포에서의 독성반응 평가</li> <li>• 강황, 유자 추출물의 면역증진 관련 cytokine 활성 평가</li> <li>• 강황, 유자 추출물에 의한 면역세포에서 산화질소(NO)감소 효과 평가</li> </ul> <hr/> <p>&lt;주관연구기관(에스디씨)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 원료 가공기술 개발 및 제조공정 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농산물 강황, 유자 원료 가공기술 표준화</li> <li>- 강황, 유자 효능 연구를 위한 시료 제작</li> <li>- 각 효능별 선정원료(추출물) 제조공정 표준화 시작</li> </ul> </li> <li>• 기능성표시식품 생산 기반 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 에스디씨가 보유한 생산 시설을 이용하여 시제품 생산</li> <li>- 기능성표시식품 품질평가를 위한 기반 구축</li> </ul> </li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(전남대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 추출물의 HepG2 세포를 이용한 <i>in vitro</i> 독성 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소재의 안전역을 확인하기 위해 XTT-PMS 용액을 이용한 세포 독성 평가</li> </ul> </li> <li>• 강황, 유자 추출물의 HepG2 세포를 이용한 <i>in vitro</i> 간기능 개선 활성 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소재에 대한 세포내 ROS 생성 억제능, 세포내 지방축적 억제능 확인</li> <li>- 소재 처리에 의한 ROS의 변화 확인</li> <li>- 지방산에 의해 유도된 세포 내외 축적된 지질 및 중성지방 함량을 소재 처리에 의한 변화 확인</li> </ul> </li> <li>• 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vitro</i> 상에서의 효능 평가 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 비율의 강황+유자 추출혼합물 소재의 효능 평가를 통하여 선정된 비율의 강황+유자 추출혼합물 소재를 대상으로 농도별 <i>in vitro</i> 상에서의 간기능 개선 확인</li> </ul> </li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(연세대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 추출물에 대한 라디칼 소거능 및 세포독성 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 강황, 유자 추출물을 대상으로 DPPH법을 이용한 라디칼 소거능 측정</li> <li>- 강황, 유자 추출물 대상으로 cell cytotoxicity 측정</li> </ul> </li> <li>• 강황, 유자 추출물 대상 뇌세포 보호 효능 검색 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell cytotoxicity 확인 후 저독성 시료의 농도 범위에서 각 시료의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 Aβ처리에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과 검색</li> <li>- <i>In vitro</i> 상에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 Aβ의 산화적 스트레스에 대한 세포 내 oxidative stress protection system(SOD, catalase)의 활성능 측정</li> </ul> </li> <li>• 강황, 유자 추출물 대상 뇌세포 신호전달물질(acetylcholine)합성 효소(choline acetyltransferase) 활성증진 및 분해효소(acetylcholinesterase) 억제능 검색</li> <li>• 강황, 유자 추출물 대상 뇌세포 생존 및 신장(neurite out growth) 관련 인자의 발현 및 관련 기전에 대한 영향 검토 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 뇌 신경세포의 생존 및 신장과 관련된 인자들의 발현 정도 및 관련 기전에 대한 영향을 mRNA level 및 protein level에서 확인</li> </ul> </li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(울산대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황, 유자 추출물의 면역세포에서의 독성반응 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 강황, 유자 추출물의 안전성 검토와 면역 활성 인자와 <i>in vivo</i> assay계의 적용을 위하여 세포 독성 평가</li> </ul> </li> <li>• 강황, 유자 추출물의 면역증진 관련 cytokine 활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mouse macrophage cell line인 RAW264.7에서 강황 및 유자 추출물의 다양한 농도로 면역세포에 처리하여 면역계와 T세포, Natural killer cell(NK cell)의 activation을 조절하는 cytokine으로 macrophage에서 분비하는 TNF-α, IL-2, IFN-γ, IL-10 등 다양한 cytokine의 발현을 확인할 수 있는 qPCR primer를 구축하여 평가함</li> </ul> </li> </ul>
2차년도	내용	목표	<주관연구기관(에스디씨)>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기능성표시식품 산업화</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(전남대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 마우스를 이용한 <i>in vivo</i> 간기능 개선 기능성 평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 마우스를 이용한 <i>in vivo</i> 간기능 개선 기능성 기작규명</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(연세대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vivo</i>상에서의 기억력 개선 효능 평가</li> <li>• 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vivo</i>상에서의 기억력 개선 효능 기전 연구</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(울산대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 <i>in vivo</i>에서의 독성반응 평가</li> <li>• <i>In vivo/ex vivo</i>에서 강황+유자 추출혼합물의 면역 조절 효능평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물 소재의 선천성 면역력 증강 기능 기작규명</li> </ul> <p>&lt;주관연구기관(에스디씨)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 기능성표시식품 기준규격 설정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건강기능식품의 기준규격을 준용하여 산업화 예정인 기능성 표시식품의 기준규격을 설정</li> <li>- 개발제품의 제조공정 표준화와 품질평가 기준 설정</li> </ul> </li> <li>• 품목제조보고 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품의약품안전처 제2020-129호(2020.12.29.) 고시에 따라 기능성표시식품 개발</li> <li>- 기능성표시식품 생산 및 품목제조보고 3건</li> </ul> </li> <li>• 디자인 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품 산업화를 위한 포장디자인 등 개발 3건</li> </ul> </li> <li>• 제품 산업화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산 제품 출시(한끼어터 사워크림, 한끼어터 콘포타주, 한끼어터 피자) 산업화 3건</li> </ul> </li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(전남대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 마우스를 이용한 <i>in vivo</i> 간기능 개선 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 7주령의 C57BL/6 마우스를 음성대조군(CON), 고지방식이군(HF), 저농도시료군(고지방식이+강황+유자 추출혼합물 저농도), 고농도시료군(고지방식이+강황+유자 추출혼합물 고농도), 양성대조군(고지방식이+기 개발된 간 건강 관련 건강기능식품 원료)으로 나누고 지방간 개선 효과를 확인</li> <li>- 간의 손상정도를 확인하기 위하여 채취한 혈액의 혈청을 이용하여 아미노산 전이효소인 ALT, AST 활성을 assay kit를 이용하여 측정</li> <li>- 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 측정용 kit를 이용하여 측정</li> </ul> </li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 마우스를 이용한 <i>in vivo</i> 간기능 개선 기능성 기작규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Real time PCR을 이용하여 지방합성 및 대사조절에 관여하는 인자 등을 확인하여 분자적 기전을 확인</li> </ul> </li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(연세대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vivo</i> 상에서의 인지력 및 행동능력 증진 효과 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Control, A<math>\beta</math> 또는 TMT(trimetylyin)투여군, 시료 및 A<math>\beta</math> 또는 TMT 복합 투여군, 양성 대조군(기 개발된 기억력 개선 건강기능식품 원료)으로 나누고 행동실험인 Y-maze 및 passive avoidance test를 실시하여 기억력 개선 효능 확인</li> </ul> </li> <li>• 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vivo</i> 상에서의 기억력 개선 효능 기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물 모델 뇌조직에서의 선정된 강황+유자 추출혼합물의 신호전달 시스템 조절 개선 효능 평가</li> </ul> </li> </ul>
--	--	---

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정된 강황+유자 추출혼합물의 효능에 대한 신경세포 신호 전달 시스템(cholinergic system)의 개선 효과 확인</li> <li>• 동물 모델 뇌조직에서의 선정된 강황+유자 추출혼합물의 항산화 시스템 개선 효능 평가</li> <li>- 선정된 강황+유자 추출혼합물의 항산화 효소인 SOD, catalase 및 GSH의 활성 및 함량 개선 효과 확인</li> <li>• 동물 모델 뇌조직에서의 선정된 강황+유자 추출혼합물의 뇌 세포 신장 물질 및 관련 signal에 대한 영향 평가</li> <li>- 선정된 강황+유자 추출혼합물의 BDNF 및 연관 signal인 CREB-pCREB에 대한 영향을 확인</li> </ul> <p>&lt;협동연구기관(울산대학교)&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 <i>in vivo</i>에서의 독성 반응 평가</li> <li>- 강황+유자 추출혼합물의 안전성 검토와 <i>in vitro</i>에서 확인된 농도 적용을 위하여 <i>in vivo</i> 독성평가</li> <li>• <i>In vivo/ex vivo</i>에서 강황+유자 추출혼합물의 면역 조절 효능평가</li> <li>- 시험군에 양성대조군으로 기 개발된 면역력증진 건강기능식품 원료를 포함하여 강황+유자 추출혼합물과 비교</li> <li>- 강황+유자 추출혼합물을 투여한 mouse 혈액의 <i>in vivo</i> NK세포 활성 측정 및 분석</li> <li>- Mitogen에 의한 primary splenocyte에서의 관련 cytokine의 발현 측정</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물 소재의 선천성 면역력 증강 기능 기작 규명</li> <li>- 강황+유자 추출혼합물 처리에 따른 NK 세포활성은 RAW 264.7 cell에 대한 NK세포가 작용하여 분비되는 LDH의 양을 측정함으로써 NK 세포 활성을 평가</li> <li>- RAW264.7 세포의 LPS 또는 강황+유자 추출혼합물 처리를 통해 면역 관련 신호 전달 경로를 평가</li> </ul>
--	--	--	---

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 논문게재 및 학술발표 : SCI(E) 3편, 학술발표 7건</li> <li>• 특허 : 출원 3건</li> <li>• 고용창출 : 4명</li> <li>• 산업화 : 3건</li> </ul>
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내산 소재인 강황, 유자의 간기능 개선, 기억력 개선, 면역력 증진 활성의 학술적 가치를 입증하게 됨</li> <li>• 농산물 고차가공 산업의 선도 모델로 활용이 기대됨</li> <li>• 농촌 개발의 신산업군 표준 모델로 활용이 기대됨</li> <li>• 지역 재배농가와 계약 재배로 안정적인 농가소득, 원료 확보 가능함</li> <li>• 생물자원의 산업화를 통하여 경쟁력이 부족한 국내산 작물의 경쟁력 확보가 가능하며 고부가가치 창출에 따라 농가소득 증대에 기여할 것임</li> </ul>

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문		특허		보고서 원문		연구 시설·장비		기술 요약 정보		소프트웨어		표준		생명자원		화학물질		신제품	
	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호
	농업회사법인(주)에스디씨	지표성분 검출기	GC2010	1	2019.09.18	31,900	-	농업회사법인(주)에스디씨	NFEC-2020-08-264557
	농업회사법인(주)에스디씨	지표성분 분석용 펌프	SCL-40	1	2019.09.18	32,670	-	농업회사법인(주)에스디씨	NFEC-2020-08-264545
농업회사법인(주)에스디씨	지표성분 분석시료 자동주입기	GC2010	1	2019.09.18	31,900	-	농업회사법인(주)에스디씨	NFEC-2020-08-264544	

국문핵심어	강황	유자	간기능 개선	기억력 개선	면역력 증진
-------	----	----	--------	--------	--------

(5개 이내)					
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Citrus junos</i> Siebold ex Tanaka	Liver function improvement	Memory improvement	Immunity enhancement



## 〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요 .....	10
1절. 연구개발의 개요 .....	10
2절. 연구개발의 필요성 .....	10
3절. 연구개발의 범위 .....	12
제2장. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	13
1절. 연구개발의 전략·방법 및 추진체계 .....	13
2절. 연구수행과정 및 수행 내용 .....	18
제3장. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	120
1절. 연구수행 결과 .....	120
2절. 목표달성수준 .....	138
제4장. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 .....	140
제5장. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	141
별첨 자료 (참고 문헌 등) .....	142


# 제1장. 연구개발과제의 개요

## 1절. 연구개발의 개요


- 본 연구의 최종목표는 국내산 강황, 유자를 대상으로 간기능 개선, 기억력 개선, 면역력 증진 활성을 평가하여 건강기능식품 소재를 개발하고 `18년 제정한 “식품 등의 표시·광고에 관한 법률”에 따라 새롭게 시행되는 “기능성표시식품”을 산업화하고자 하는 것임
- 주요 연구내용
  - i) 강황, 유자의 기능성표시식품 소재 개발을 위한 표준화
  - ii) 강황, 유자의 *in vitro*, *in vivo*를 통한 기능성 및 기작 구명
  - iii) 기능성표시식품 생산 및 품질관리 기반 구축
  - iv) 기능성표시식품 산업화

## 2절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구소재 및 필요성

강황	
	<p><b>과명</b> : 생강과(Zingiberaceae)  <b>학명</b> : <i>Curcuma longa</i> L.  <b>주요성분</b> : 뿌리 노란 색소 0.4~0.65%, 정유 6~10%, 커큐민과 유사물질  <b>주요산지</b> : 전남 진도(전국 80%), 해남, 화순, 전북 임실  <b>약리작용</b> : 면역력증진, 항염, 간기능장애 개선, 생리통을 완화, 항암, 항콜레스테롤, 항치매, 소염 작용</p>

- 강황(*Curcuma longa* L.)은 동의보감, 대한약전, PDR for Herbal Medicines, WHO monographs on selected medicinal plants(Vol.1) 등에 질병치료에 사용되었다는 기록이 있으며, 학술발표에 따르면 간 보호, 면역 조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있음
- 진도 강황은 지리적 표시 농산물 제95호로 지정되어 있으며, 난대성 약용자원으로 20여년 전부터 국내재배가 본격화되어, 현재 진도 강황 생산량은 3,100여톤/년임(전국 생산량 86%). 또한 진도군은 강황 산업특구로 지정됨
- 현재, 강황을 이용한 건강기능식품 원료로 하는 ‘발효율금’과 ‘강황 추출물’이 등록되어 있으나, ‘강황 추출물’은 수입 원료임. 이에 본 연구는 전남 진도산 강황을 이용하여 건강기능식품 소재로 개발하고자 함

유자	
	<p><b>학명</b> : <i>Citrus junos</i> Sieb. ex Tanaka  <b>주요성분</b> : citric acid, succinic acid, limonene, terpinene, linalool, camphene, myrcene, phellandrene, limonoid, nomiln, ichangin  <b>주요산지</b> : 전남 고흥, 영암  <b>약리작용</b> : 면역력 증진, 항산화, 항균, 전립선암 전이 억제, 암세포 성장 억제</p>

- 유자는 남해안 및 전남 고흥에서 주로 재배되며, 전남 고흥의 경우 약 65,000톤의 생산량을 보유하고 있음. 이는 전국 유자 생산량의 70%에 해당하는 양으로, 전국 최대 주산지임. 특히, 고흥군은 유자 최대 생산지로 소비자 인지도가 매우 높으며, 이를 바탕으로 2006년 지리적 표시 농산물 제 14호로 등록되었음
- 유자는 면역력 증진, 항산화, 항균, 전립선암 전이 억제의 기능이 있는 것으로 발표되

었으나, 주로 판매되는 것은 유자차, 유자청으로 단순가공식품을 넘지 못하고 있음

- 고흥군은 2017년 농림축산식품부 공모사업으로 ‘고흥유자 6차 산업화 지구조성 사업’(3년간 총 30억원)을 진행 중에 있으며, 이는 생산, 가공, 유통, 관광 융·복합 지역특화산업 클러스터 육성사업임. 본 연구결과는 지자체(고흥군)에서 진행하고 있는 지역특화산업 클러스터 육성사업과 연계하여 농가에 직접적, 장기적, 안정적인 소득을 창출할 수 있을 것임

## 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 우리나라에서는 처음 시도되는 일반식품에 기능성을 표시 가능하도록 하는 기능성표시식품은 식품산업과 사회에 미치는 긍정적 영향이 클 것으로 예측됨. 가정간편식(HMR) 시장의 전체적으로 성장이 둔화되고 있는 우리 식품 산업에 돌파구가 될 수가 있음
- 또한, 기능성표시식품은 상대적으로 고가(高價)인 건강기능식품을 대체해 저렴하게 섭취함으로써 소비자에게도 이익이 됨
- 우리나라의 경우 고시 제정 이후 현재까지(‘21.02.08) 20건의 기능성표시식품이 출시되고 있으며 대부분 액상의 제품으로 유산균, 배변활동 도움 제품들이 먼저 출시되고 있음
- `20년 국내 건강기능식품 시장은 약 4조9000억원으로 추산되고 있으며(출처, 한국건강기능식품협회 `20년 건강기능식품 시장현황) `20년 12월 기능성표시식품 제도를 도입한 우리나라도 향후 5년 내 건강기능식품 시장과 동등한 수준으로 비약적인 발전이 예상됨

### 나. 국외 기능성표시식품의 시장

- 기능성표시식품 제도를 우리나라보다 먼저 시작한 일본의 경우 특정보건용식품은 `20년 전내대비 5.5% 감소한 3,400억엔으로 예측하고 있으며 기능성표시식품은 `19년 2,547억엔에서 `20년 3,007억엔으로 38.6% 증가할 것으로 예측하고 있음(출처, 후지경제)

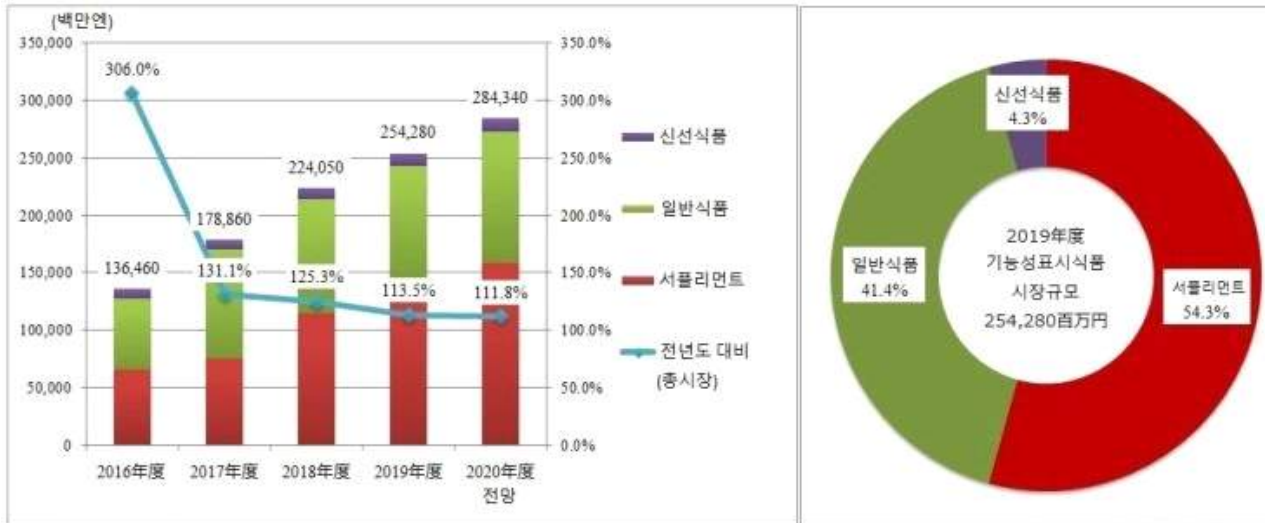
#### ■機能性表示食品の国内市場

	2019年見込	2018年比	2020年予測	2018年比
明らか食品	288億円	77.4%	266億円	71.5%
ドリンク類	1,047億円	134.9%	1,309億円	168.7%
サプリメント	1,211億円	118.7%	1,432億円	140.4%
合計	2,547億円	117.4%	3,007億円	138.6%

※市場データは四捨五入している

- 우리보다 먼저 기능성표시식품을 시작한 일본의 경우 영양제가 49.2%, 기타 가공식품이 42.6%, 신선식품이 8.2%를 차지하며, 과자, 음료 등 일반식품으로까지 그 범위가 점차 확대되는 추세(출처 : 식품음료신문. `21.01.18)
- 야노경제연구소의 자료에 따르면 일본의 기능성표시식품에서 일반식품의 비중은 증가하는 것으로 조사되고 있음

<기능성표시식품의 시장규모 추이와 식품종류별 구성비(2019년도)>



### 3절. 연구개발의 범위

#### 1. 기능성표시식품 생산 기반 구축

- 기능성표시식품 생산을 위하여 HACCP 생산시설과 품질평가 기반 구축

#### 2. 강황+ 유자 추출혼합물 원료 가공기술 개발 및 표준화

- 국내산 강황과 유자 원료의 제조공정 표준화
- 강황+ 유자 추출혼합물의 제조공정 표준화

#### 3. 강황+ 유자 추출혼합물 간기능 개선 기능평가

- 강황, 유자 추출물의 간기능 개선 *in vitro* 생리활성 평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 간기능 개선 *in vitro* 생리활성 평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 간기능 개선 *in vivo* 활성평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 간기능 개선 *in vivo* 기전 규명

#### 4. 강황+ 유자 추출혼합물 기억력 개선 기능평가

- 강황, 유자 추출물의 기억력 개선 *in vitro* 생리활성 평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 기억력 개선 *in vitro* 생리활성 평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 *in vivo/ex vivo* 활성평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 기전 규명

#### 5. 강황+ 유자 추출혼합물 면역력 증진 기능평가

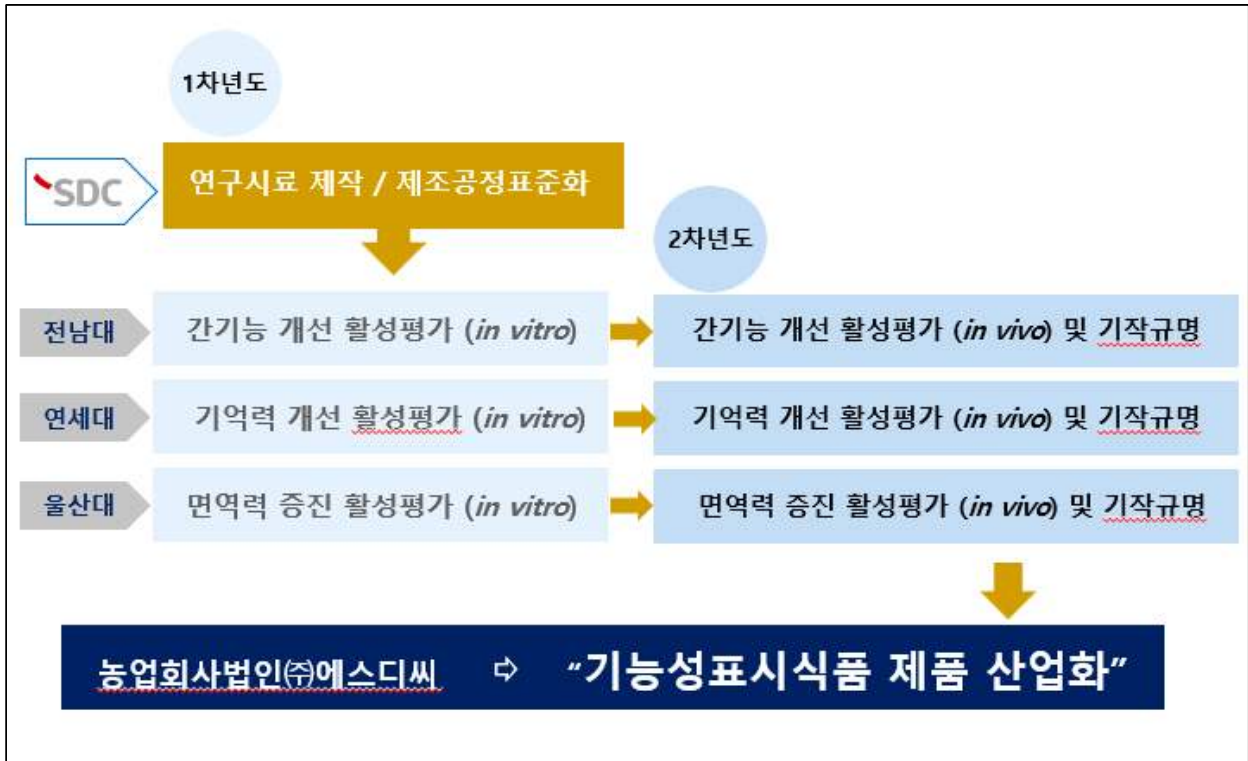
- 강황, 유자 추출물의 면역력 증진 *in vitro* 생리활성 평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 면역력 증진 *in vitro* 생리활성 평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 *in vivo/ex vivo* 활성평가
- 강황+ 유자 추출혼합물의 기전 규명

#### 6. 기능성표시식품 산업화

- 식품의약품안전처 고시 제2020-129호(2020.12.29.) “부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정”에 따라 기능성표시식품 산업화

## 제2장. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1절. 연구개발 전략·방법 및 추진체계



#### 1. 연구개발 추진전략·방법

##### 1) 기능성표시식품 생산기반 구축

- SDC 2공장을 기능성표시식품 전용 생산시설로 활용하기 위하여 HACCP 인증 획득
- 기능성표시식품 품질평가 시설 구축

##### 2) 강황, 유자 표준화된 원재료 확보 및 시료 제작(4종)(수행기관 : 에스디씨)

- 원재료인 강황, 유자의 지표성분 범위를 설정하여 표준화된 원료 확보
- 강황, 유자, 물, 20% 주정추출물 총 4종의 연구시료 제작

##### 3) 강황, 유자 추출물의 간기능 개선 활성 평가(수행기관 : 전남대학교)

- 연구시료 4종(강황, 유자 추출물)을 대상으로 간기능 개선 활성평가
- 1차 *in vitro* 활성평가 결과, 강황+유자 추출물 혼합비율 선정 후 추출혼합물의 *in vitro* 및 *in vivo* 활성평가

##### 4) 강황, 유자 추출물의 기억력 개선 활성 평가(수행기관 : 연세대학교)

- 연구시료 4종(강황, 유자 추출물)을 대상으로 기억력 개선 활성평가
- 1차 *in vitro* 활성평가 결과, 강황+유자 추출물 혼합비율 선정 후 추출혼합물의 *in vitro* 및 *in vivo* 활성평가

##### 5) 강황, 유자 추출물의 면역력 증진 활성 평가(수행기관 : 울산대학교)

- 연구시료 4종(강황, 유자 추출물)을 대상으로 면역력 증진 활성평가
- 1차 *in vitro* 활성평가 결과, 강황+유자 추출물 혼합비율 선정 후 추출혼합물의 *in vitro* 및 *in vivo* 활성평가

##### 6) 강황+유자 추출혼합물 제조공정 표준화(수행기관 : 에스디씨)

- 기능성표시식품 원료로 사용될 강황+유자 추출혼합물의 제조공정 개발 및 표준화
- 기준 및 규격 설정 및 공인기관 성적서 발행

7) 기능성표시식품 산업화 3건(수행기관 : 에스디씨)

- 식품의약품안전처 고시 제2020-129호(2020.12.29.) “부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정”에 따라 기능성표시식품 산업화
- 품목제조신고 3건

2. 기능성표시식품 산업화 추진전략 변경

<변경 사유>

본 사업 수행 기간 중 기능성표시식품 관련 식품의약품안전처 고시가 발표(`20.12.29) 되어 최초 사업(`19.6.20.~`21.6.19.) 시작 시 계획 대비 산업화 전략 변경 요인 발생

2-1. 기능성표시식품 관련 법규 제정

1) 식품 등의 표시·광고에 관한 법률 제정(2018.03.13.)

- 제8조(부당한 표시 또는 광고 행위의 금지) 제2항에 제1항의 각 호의 표시 또는 광고의 구체적인 내용과 그밖에 필요한 사항은 대통령령으로 정한다.
- 기능성표시식품 시장 진출 법률 근거 마련

2) 식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행령 제정(2019.03.14.)

- 제3조(부당한 표시 또는 광고의 내용) 제2항에 부당한 표시 또는 광고의 내용에 관한 세부적인 사항은 식품의약품안전처장이 정하여 고시하도록 하고 있음

3) 식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행 규칙 제정(2019.04.25.)

- 제10조(표시 또는 광고 심의 대상 식품 등) 4호. 기능성표시식품[「식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행령」 별표 1 제3호 나목에 “제품에 함유된 영양성분이나 원재료가 신체조직과 기능의 증진에 도움을 줄 수 있다.” 는 내용으로서 식품의약품안전처장이 정하여 고시하는 내용을 표시·광고하는 식품을 말한다.]

4) 부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정 제정고시안 행정 예고(2019.12.31.)

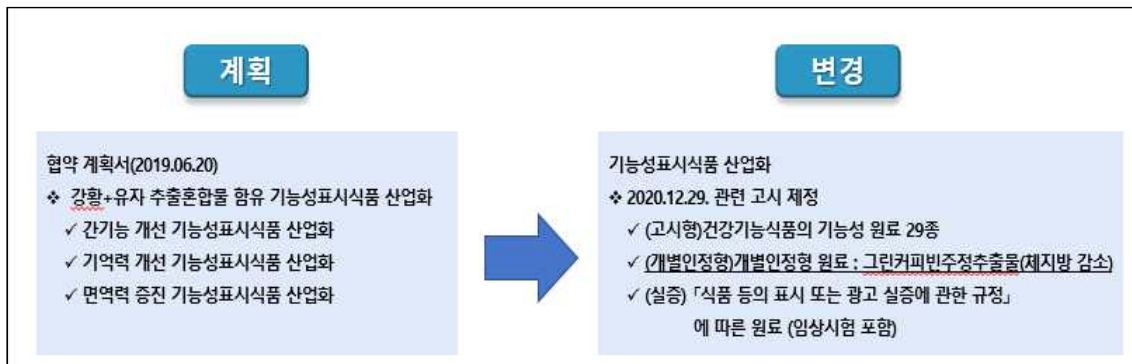
- 식품의약품안전처장 행정 예고 발표, 기능성표시식품의 기본 요건 제시

5) 부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정 고시(식품의약품안전처 고시 제2020-129호, 2020.12.29.)

- 기능성표시식품 산업화를 위한 제도 마련
- 시행령 제 3조 제2항에 따라 “제품에 함유된 영양성분이나 원재료가 신체조직과 기능의 증진에 도움을 줄 수 있다는 내용”을 구체적으로 고시하였음

적용범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>• “신체조직과 기능의 증진에 도움을 줄 수 있다는 내용”(이하 “기능성”이라 한다)을 표시 또는 광고하려는 식품 등에 적용함</li> <li>• 주류, 특수의료용도 등 식품, 영유아·임산부 대상 식품 등은 적용 대상에서 제외함</li> </ul>
기능성의 범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 건강기능식품의 기능성 원료 29종 및 식품의약품안전처장에게 인정받은 새로운 원료의 기능성 등은 표시·광고가 가능함</li> <li>• 어린이, 임신·수유부, 노인 등 건강 민감 계층과 관련된 내용 등은 기능성 범위에서 제외함</li> </ul>
식품 등의 요건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 우수건강기능식품제조기준 적용업소에서 제조·가공된 원재료 또는 성분을 사용하여 식품안전관리인증기준적용업소 등에서 제조·가공되어야 함</li> <li>• 식품 등에 함유된 기능성 원재료 또는 성분의 함량은 1일 섭취기준량의 30% 이상을 충족하고 최대함량기준을 초과하지 않아야 함</li> </ul>
표시 또는 광고의 방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기능성 내용 “본 제품에는 A(기능성)에 도움을 줄 수 있다고 알려진(또는 보고된) B(기능성 원재료 또는 성분)가 들어 있습니다.”</li> <li>• 기능성 광고를 할 경우 “본 제품은 건강기능식품이 아닙니다.”라는 문구를 포함하여야 함</li> </ul>

## 2-2. 기능성표시식품 산업화 전략



### 1) 최초 산업화 계획

- 본 사업은 2019년 6월 20일에 기능성표시식품 관련 제도 마련이 완료되지 않은 상황에서 식품 신시장 진출을 위한 선제적인 사업으로 기능성표시식품 생산기반을 구축하고 주원료로 활용 가능한 소재를 개발하는 것을 목표로 시작되었음
- 기능성표시식품 산업화를 위한 생산기반 구축은 완료하였으나 식품의약품안전처장의 관련 고시가 `20년 12월 말 발표되어 산업화 계획 변경 요인 발생

### 2) 산업화 계획 변경 요인 발생

- 최초 강화+유자추출혼합물을 대상으로 시험관연구와 동물실험 모델에서 간기능개선, 기억력개선, 면역력증진 기능을 확인하고 이를 주원료로 하는 기능성표시식품을 산업화하고자 하였으나 부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정(제2020-129호, `20.12.29) 제4조제1항3호에 따라 인체적용시험을 통해 그 기능을 실증해야 하지만 본 사업에서 수행하지 못하였음, 최초 본 사업 시작 시에는 관련 제도가 마련되지 않아 인체적용시험을 본 사업 내용에 포함하지 않았음

제4조(기능성의 범위) ① 이 고시의 기능성 범위는 다음 각 호와 같다.

1. 「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 기능성 원료로 정해진 것 중 별표 2 제1호에 해당하는 기능성
2. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제10조제1항에 따라 인정 받은 기능성 원료의 제조자 또는 수입자가 별지 서식의 기능성을 나타내는 원재료의 일반식품 사용신청서로 식품의약품안전처장에게 신청하여 별표 2 제2호의 의사결정도에 따라 인정받은 원재료의 기능성
3. 「식품 등의 표시 또는 광고 실증에 관한 규정」 제4조제3호 중 인체적용시험 또는 인체적용시험 결과에 대한 정성적 문헌고찰(체계적 고찰, SR: Systematic Review)을 통해 과학적 자료를 갖춘 다음 각 목에 해당하는 기능성

3) 산업화 계획 변경

구분	한끼어터 사워크림/콘포타주/피자
쌀	69.83%
자일리톨	9.98%
복합조미식품	4.27%
식물성유지	4.27%
귀리식이섬유	3.88%
전분	3.66%
화이트초콜릿	2.55%
그린커피빈주정추출물(기능성원료인정제2018-6호)	0.89%
정제소금	0.67%

- 식약처 고시 제4조 제1항에 따라 기능성표시식품으로 사용 가능한 기능성 원료로 변경
- 제4조 제1항 2호에 따라 산업화시 파급효과가 큰 체지방감소 기능을 가지는 개별인정형 건강기능식품 원료 중 그린커피빈주정추출물(제2018-6호(`18.07.03.))을 기능성 원료로 하는 기능성표시식품 산업화로 계획 변경



### 3. 연구개발 협력 추진 체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	강황과 유자 추출혼합물을 함유한 식품 산업화와 기능성 표시 식품 소재 개발 및 생산기반 구축	주관연구책임자 차민석 외 총 11명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업	-	-
중견기업	-	-
중소기업	1 (농업회사법인)	3
대학	3	9
국공립(연)	-	-
출연(연)	-	-
기타	-	-

주관기관 농업회사법인(주)에스디씨	공동 연구기관 울산대학교	공동 연구기관 연세대학교	공동 연구기관 전남대학교
기능성표시식품 원료 함유 제품 산업화	면역력 증진 활성평가	기억력 개선 활성평가	간기능 개선 활성평가
차민석 외 2명	최경철 외 1명	윤호근 외 2명	전우진 외 3명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 기능성표시식품 생산기반 구축</li> <li>◦ 강황+ 유자 추출혼합물 제조공정 표준화</li> <li>◦ 기능성원료를 함유하는 식품 산업화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 강황+ 유자 추출혼합물의 면역력 증진 활성 평가 및 기작 구명 (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 강황+ 유자 추출혼합물의 기억력 개선 활성 평가 및 기작 구명 (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 강황+ 유자 추출혼합물의 간기능 개선 활성 평가 및 기작 구명 (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>)</li> </ul>

#### 4. 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	생산기반구축	■											150,000	차민석 (에스디씨)	
2	연구시료 및 시제품 제작		■										■	50,000	차민석 (에스디씨)
3	간기능 개선 시험관 연구	■												50,000	전우진 (전남대)
4	기억력 개선 시험관 연구	■												50,000	윤호근 (연세대)
5	면역력 증진 시험관 연구	■												50,000	최경철 (울산대)
2차년도															
1	시제품 생산 및 산업화	■											160,000	차민석 (에스디씨)	
2	간기능 개선 동물연구	■												80,000	전우진 (전남대)
3	기억력 개선 동물연구	■												80,000	윤호근 (연세대)
4	면역력 증진 동물연구	■												80,000	최경철 (울산대)

#### 2절. 연구 수행 과정 및 수행 내용

##### 1. 기능성표시식품 품질평가 기반구축

- 식품의약품안전처 행정예고(‘19.12.31.) 제5조(기능성 표시 또는 광고의 대상 식품 등의 요건)에 따르면 “기능성 표시 또는 광고를 할 수 있는 식품 등의 요건은 다음 각 호와 같다.”라고 규정되어 있으며, 제1호에 “식품 등에 함유된 기능성을 나타내는 원재료 또는 성분의 함량은 별표2 제2호에 따른 1일 섭취기준량의 30%를 충족할 수 있어야 한다.” 라고 규정되어 있음
- 이에 기능성표시식품의 품질평가를 위한 다음의 기자재를 구축 완료하였음

기기명	사진
<초음파추출기> 규격 : 410	

<p>&lt;가열자력교반기&gt; 규격 : HSD150-03P</p>	
<p>&lt;추출용 항온수조&gt; 규격 : DH.WEB-6</p>	
<p>&lt;초순수제조장치(1차)&gt; 규격 : pure ro 130+</p>	
<p>&lt;데시케이터&gt; 규격 : DH.DEBG2</p>	
<p>&lt;pH meter&gt; 규격 : HM-40X</p>	

<p>&lt;지표성분검출기&gt;  PDA 검출기 1 세트  형광 검출기 1 세트</p>	
<p>&lt;지표성분 분석용 펌프&gt;  지표성분 분석용 펌프 2 세트  액세서리</p>	
<p>&lt;분석시료 자동 주입기&gt;  자동 시료 주입 장치 1 세트  액세서리</p>	
<p>&lt;초순수제조장치(3차)&gt;  규격 : PURELAB flex 3</p>	
<p>&lt;감압회전농축기&gt;  규격 : N-1300EW</p>	

<p>&lt;배기형 흡후드&gt; 규격 : GFHP-1800S</p>	
<p>&lt;분석용 정밀저울&gt; 규격 : PX225DKR</p>	
<p>중양실험실</p>	
<p>기기분석실</p>	

2. 강황+ 유자 추출혼합물 가공기술 표준화(강황, 유자 지표성분 분석법 개발)

가. 방법

강황, 유자 원재료의 강황 중 Curcumin, 유자 중 Hesperidin을 정량분석 하였음

(1) Curcumin 정량

① 표준용액의 제조

표준품 Curcumin 10 mg을 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고, Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액을 희석하여 표준용액으로 함

② 시험용액의 제조

검체 원재료(건조물) 1 g을 정밀하게 달아 50 mL 용량플라스크에 취해 Methanol 50 mL로 정용하여 60분간 초음파 추출을 한 후 정용하여 0.45 µm PTFE filter로 여과하고, 여액을 검액으로 함

③ 기기조건

- 검출기 : PDA Detactor (측정파장 425 nm)
- 칼 럼 : ZORBAX Eclipse XDB 길이 250\*4.6mmI.D, 5µm
- 온 도 : 35℃
- 유 속 : 1 mL/min
- 주입량 : 10 µL
- 이동상 : 2% Acetic acid (in 45% ACN)
- 분석시간 : 20min
- 계산식

$$\text{Curcumin 정량(mg/g)} = \frac{\text{검액의 Curcumin농도 } (\mu\text{g/mL}) * \text{검액의 최종부피 (mL)}}{\text{검체 칭량(g)} * 1000 (\mu\text{g/mg})}$$

(2) Hesperidin 정량

① 표준용액의 제조

표준품 Hesperidin 10 mg을 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고, Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액을 희석하여 표준용액으로 함

② 시험용액의 제조

검체 원재료(건조물) 0.5 g을 정밀하게 달아 100 mL 용량플라스크에 취해 Methanol 100 mL로 정용하여 2시간 초음파 추출을 한 후 정용하여 0.45 µm PTFE filter로 여과하고, 여액을 검액으로 함

③ 기기조건

- 검출기 : PDA Detactor (측정파장 280 nm)
- 칼 럼 : Shiseido Capell pak MGII 길이 250\*4.6mmI.D, 5µm
- 유 속 : 1 mL/min
- 주입량 : 10 µL
- 이동상 : A - ACN  
B - DW  
(A : B = 20 : 80)
- 분석시간 : 25min
- 계산식

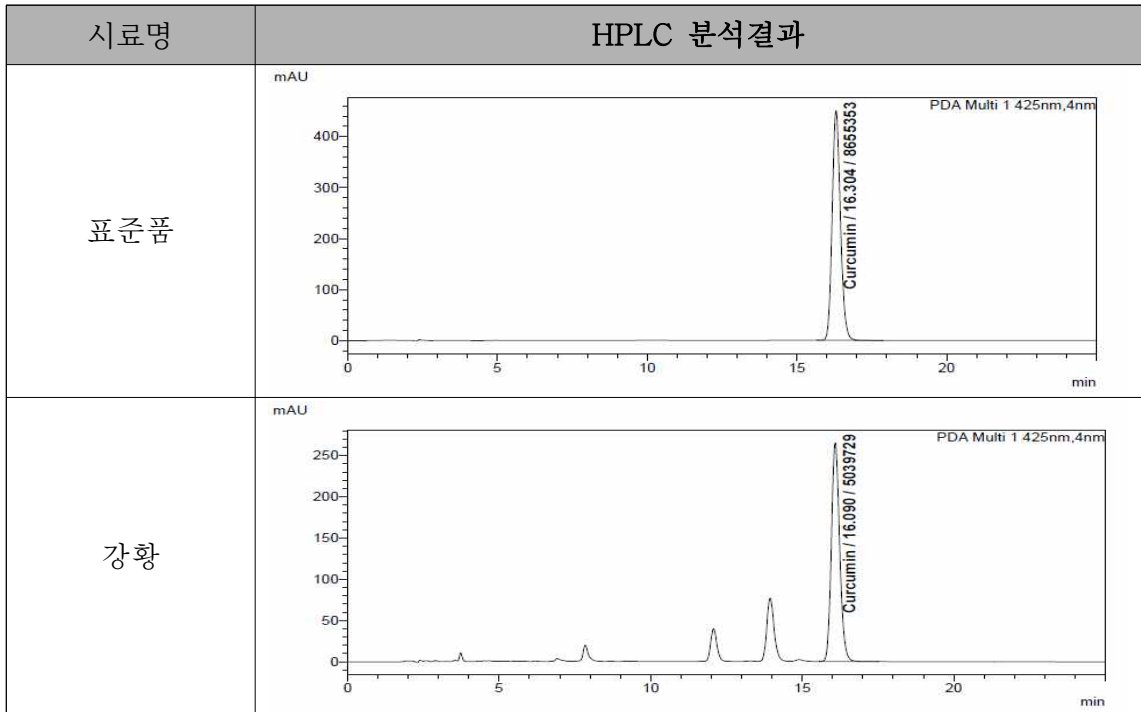
$$\text{Hesperidin 정량(mg/g)} = \frac{\text{검액의 Hesperidin농도 } (\mu\text{g/mL}) * \text{검액의 최종부피 (mL)}}{\text{검체 칭량(g)} * 1000 (\mu\text{g/mg})}$$

나. 결과

(1) 강황 원재료 중 Curcumin 분석 결과

- 강황의 지표성분인 Curcumin을 정량한 결과 2.99 mg/g의 결과를 나타내었음

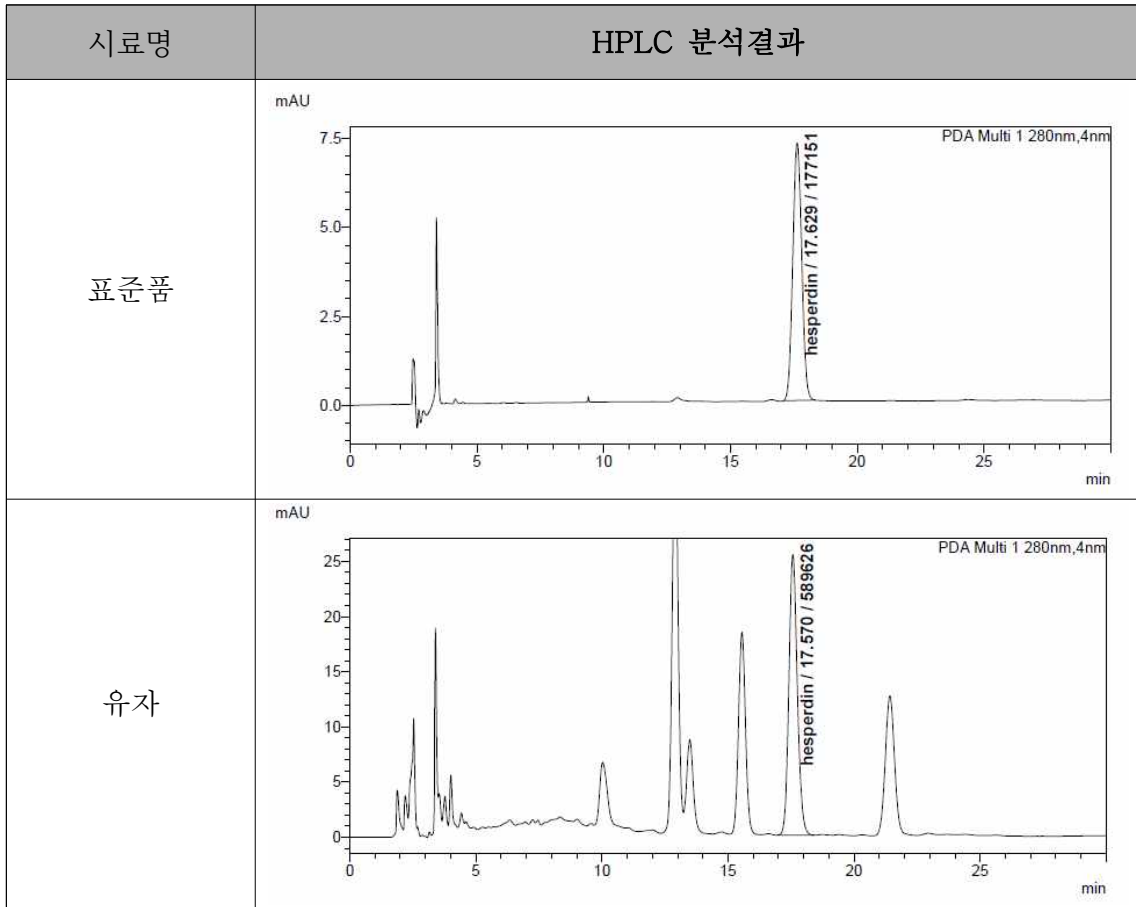
검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
Curcumin 표준품	0.0073	100	8655353	-
강황	1.01209	50	5039729	2.99



(2) 유자 원재료 중 Hesperidin 분석 결과

- 유자의 지표성분인 Hesperidin을 정량한 결과 6.76 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Hesperidin 정량(mg/g)
Hesperidin 표준품	0.01045	100	177151	-
유자	0.50739	100	589626	6.76



### 3. 강황, 유자 연구시료 제작

#### 3-1. 강황, 유자 추출물 연구시료 4종 제작

##### 가. 방법

- 강황은 전남 진도군 소재 진도강황영농조합법인(박시우)에서 유자는 전남 완도군(지정 금)에서 국내산 원료를 구입하여 사용하였음
- 추출, 농축 및 동결건조 공정은 전북 익산소재 (주)프롬바이오에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95v/v%를 사용하였음
- 강황, 유자 각 추출물 제조과정은 아래와 같이 (1)원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 동결 건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

##### (1) 원료평량

추출에 사용할 소재를 칭량하고 비율에 맞게 주정과 정제수를 투입하였음

##### (2) 추출

추출기를 이용하여 원료의 10배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출하였음

용매	추출온도	추출시간
물	100℃	5시간
20%주정	95℃	

##### (3) 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 농축하였음

##### (4) 동결건조

농축액을 동결건조기를 이용하여 동결건조하고 수득물을 측정하였음



(5) 보관

건조가 끝난 추출물은 분쇄한 후 기밀 포장하여 저온보관소에 보관하였음

나. 결과

상기 기술한 방법을 통하여 추출을 실행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었음

코드명		강황		유자	
용매		정제수	20% 주정	정제수	20% 주정
추출	원료량(g)	3,000	3,000	3,000	3,000
	용매량(L)	정제수 30	정제수 24 주정 6	정제수 30	정제수 24 주정 6
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.
농축	온도/감압	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg
	농축량(g)	2,950	2,850	7,200	7,100
	Brix	15.8	14.5	12.8	13.0
건조	건조량(g)	486.1	415.2	975.5	971.9
	수득률(%)	16.2	13.8	32.5	32.4

3-2. 강황, 유자 추출물 연구시료 4종 지표성분 분석

가. 방법

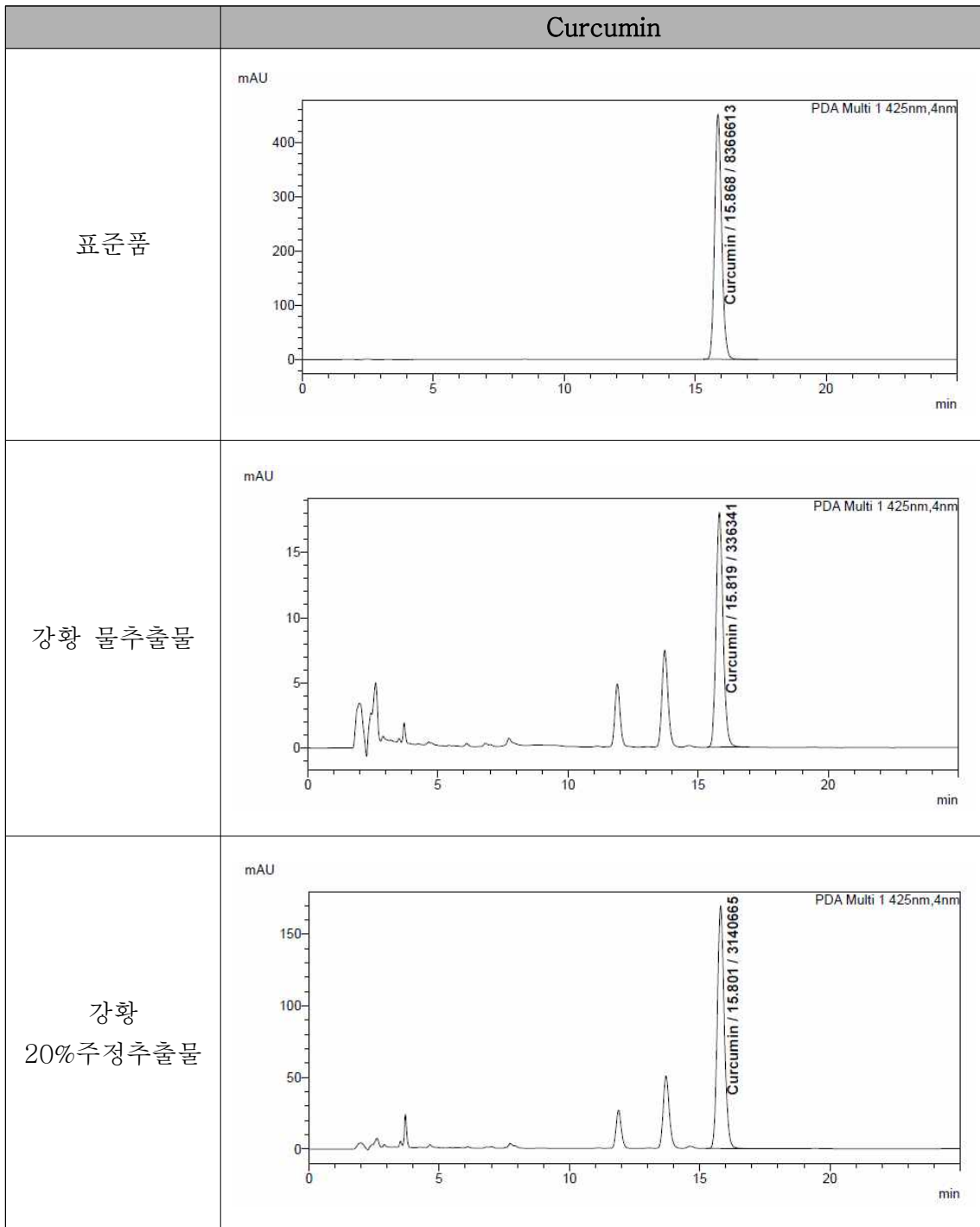
상기의 2. 강황, 유자 가공기술 표준화 시험법에 따라 강황물추출물, 강황20%주정추출물, 유자물추출물, 유자20%추출물의 지표성분을 분석하였음

나. 결과

(1) 강황 추출물 중 Curcumin 분석 결과

- 강황 물추출물과 20%주정추출물 중 강황의 지표성분인 Curcumin을 정량한 결과 각 0.21 mg/g, 1.93 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
Curcumin 표준품	0.0073	100	8366613	-
강황 물추출물	1.00935	50	336341	0.21
강황 20% 주정추출물	1.00850	50	3142990	1.93



(2) 유자 추출물 중 Hesperidin 분석 결과

- 유자 물추출물과 20%주정추출물 중 유자의 지표성분인 Hesperidin을 정량한 결과 각 17.98 mg/g, 21.12 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Hesperidin 정량(mg/g)
Hesperidin 표준품	0.01045	100	173667	-
유자 물추출물	0.50245	100	1569436	17.98
유자 20%주정추출물	0.50587	100	1856887	21.12

Hesperidin	
표준품	
유자 물추출물	
유자 20%주정추출물	

#### 4. 강황 + 유자 추출혼합물 시료 제작

- 공동연구기관의 각 기능별(간기능개선, 기억력개선, 면역력증진) 시험관 연구 결과를 바탕으로 강황추출물과 유자추출물을 1차 선정하였음. 간기능개선(전남대)은 강황20% 주정추출물과 유자물추출물, 기억력개선(연세대)는 강황20%주정추출물과 유자물추출물 그리고 면역력증진(울산대)은 강황물추출물과 유자물추출물을 선정하였음
- 두 추출물의 배합비를 결정하기 위한 시험관 연구에서 간기능개선(전남대)은 강황 : 유자(1:1)추출혼합물, 기억력개선(연세대)는 강황 : 유자(9:1)추출혼합물, 면역력증진(울산대)은 강황 : 유자(7:3)추출혼합물에서 가장 좋은 활성이 확인되어 각 기능별 추출혼합물을 제작하였음

5. 강황 + 유자 추출혼합물 제조공정 표준화

5-1. 강황, 유자 추출물 제조

가. 강황물추출물 제조

- 추출, 농축 및 분무건조 공정은 전북 익산소재 (주)프롬바이오에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95v/v%를 사용하였음
- 강황물추출물 제조과정은 아래와 같이 (1)원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 분무건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

(1) 원료 평량

추출에 사용할 소재를 칭량하고 정제수를 투입

(2) 추출

추출기를 이용하여 원료의 10배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출

용매	추출온도	추출시간
물	100℃	5시간

(3) 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 농축

(4) 분무건조

농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하고 수득물을 측정

(5) 보관

건조가 끝난 추출물은 분쇄한 후 기밀 포장하여 저온보관소에 보관

(6) 지표성분 분석

강황(Curcumin)을 분석법에 따라 정량분석

나. 강황20%주정추출물 제조

- 추출, 농축 및 분무건조 공정은 전북 익산소재 (주)프롬바이오에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95v/v%를 사용하였음
- 강황20%주정추출물 제조과정은 아래와 같이 (1)원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 분무건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

(1) 원료평량

추출에 사용할 소재를 칭량하고 정제수를 투입

(2) 추출

추출기를 이용하여 원료의 10배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출

용매	추출온도	추출시간
20%주정	95℃	5시간

(3) 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 농축

(4) 분무건조

농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하고 수득물을 측정

(5) 보관

건조가 끝난 추출물은 분쇄한 후 기밀 포장하여 저온보관소에 보관

(6) 지표성분 분석

강황(Curcumin)을 분석법에 따라 정량분석

다. 유자물추출물 제조

- 추출, 농축 및 분무건조 공정은 전북 익산소재 (주)프롬바이오에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95v/v%를 사용하였음
- 유자물추출물 제조과정은 아래와 같이 (1)원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 분무건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

(1) 원료평량

추출에 사용할 소재를 칭량하고 정제수를 투입

(2) 추출

추출기를 이용하여 원료의 10배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출

용매	추출온도	추출시간
물	100℃	5시간

(3) 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 농축

(4) 분무건조

농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하고 수득물을 측정

(5) 보관

건조가 끝난 추출물은 분쇄한 후 기밀 포장하여 저온보관소에 보관

(6) 지표성분 분석

유자(Hesperidin)을 분석법에 따라 정량분석

5-2. 강황+ 유자 추출혼합물 제조

가. 강황+ 유자 추출혼합물(1:1) 제조

(1) 원료평량

강황20%주정추출물과 유자물추출물을(1:1) 비율로 평량

(2) 혼합

혼합기를 이용하여 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합

(3) 지표성분 분석

강황(Curcumin)과 유자(Hesperidin)를 분석법에 따라 정량분석

<강황+ 유자 추출혼합물(1:1) 제조공정도>

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
<b>(강황추출물)</b>				
원재료(강황)			Curcumin : 2.99	
↓				
추출 및 여과	20%주정	95℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축				
↓				
분무건조		170℃, SD		
↓				
강황 추출분말			Curcumin : 1.93	
<b>(유자추출물)</b>				
원재료(유자)			Hesperidin : 6.76	
↓				
추출 및 여과	정제수	100℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축				
↓				
분무건조		170℃, SD		
↓				
유자추출분말			Hesperidin : 17.98	
<b>(강황+ 유자 추출혼합물)</b>				
혼합	강황추출분말: 유자추출분말 = 50:50		Curcumin : 0.67 Hesperidin : 9.13	
↓				
원료				

나. 강황+ 유자 추출혼합물(9:1) 제조

(1) 원료평량

강황20%주정추출물과 유자물추출물을(9:1) 비율로 평량

(2) 혼합

혼합기를 이용하여 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합

(3) 지표성분 분석

강황(Curcumin)과 유자(Hesperidin)를 분석법에 따라 정량분석

<강황+ 유자 추출혼합물(9:1) 제조공정도>

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
<b>(강황추출물)</b>				
원재료(강황)			Curcumin : 2.99	
↓				
추출 및 여과	20%주정	95℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축				
↓				
분무건조		170℃, SD		
↓				
강황 추출분말			Curcumin : 1.93	
<b>(유자추출물)</b>				
원재료(유자)			Hesperidin : 6.76	
↓				
추출 및 여과	정제수	100℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축				
↓				
분무건조		170℃, SD		
↓				
유자추출분말			Hesperidin : 17.98	
<b>(강황+ 유자 추출혼합물)</b>				
혼합	강황추출분말: 유자추출분말 = 90:10		Curcumin : 1.23 Hesperidin : 0.59	
↓				
원료				

다. 강황+ 유자 추출혼합물(7:3) 제조

(1) 원료평량

강황물추출물과 유자물추출물을(7:3) 비율로 평량

(2) 혼합

혼합기를 이용하여 강황물추출물과 유자물추출물을 혼합

(3) 지표성분 분석

강황(Curcumin)과 유자(Hesperidin)를 분석법에 따라 정량분석

### <강황+ 유자 추출혼합물(7:3) 제조공정도>

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
<b>(강황추출물)</b>				
원재료(강황)			Curcumin : 2.99	
↓				
추출 및 여과	정제수	100℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축				
↓				
분무건조		170℃, SD		
↓				
강황 추출분말			Curcumin : 0.21	
<b>(유자추출물)</b>				
원재료(유자)			Hesperidin : 6.76	
↓				
추출 및 여과	정제수	100℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축				
↓				
분무건조		170℃, SD		
↓				
유자추출분말			Hesperidin : 17.98	
<b>(강황+ 유자 추출혼합물)</b>				
혼합	강황추출분말: 유자추출분말 = 70:30		Curcumin : 0.18 Hesperidin : 5.19	
↓				
원료				

#### 5-3. 강황+ 유자 추출혼합물 지표성분 분석

##### 가. 방법

상기의 2. 강황, 유자 가공기술 표준화 시험법에 따라 강황(20%주정)+ 유자(물) 추출혼합물(1:1), 강황(20%주정)+ 유자(물) 추출혼합물(9:1), 강황(물)+ 유자(물) 추출혼합물(7:3)의 지표성분 Curcumin, Hesperidin을 분석하였음

##### 나. 결과

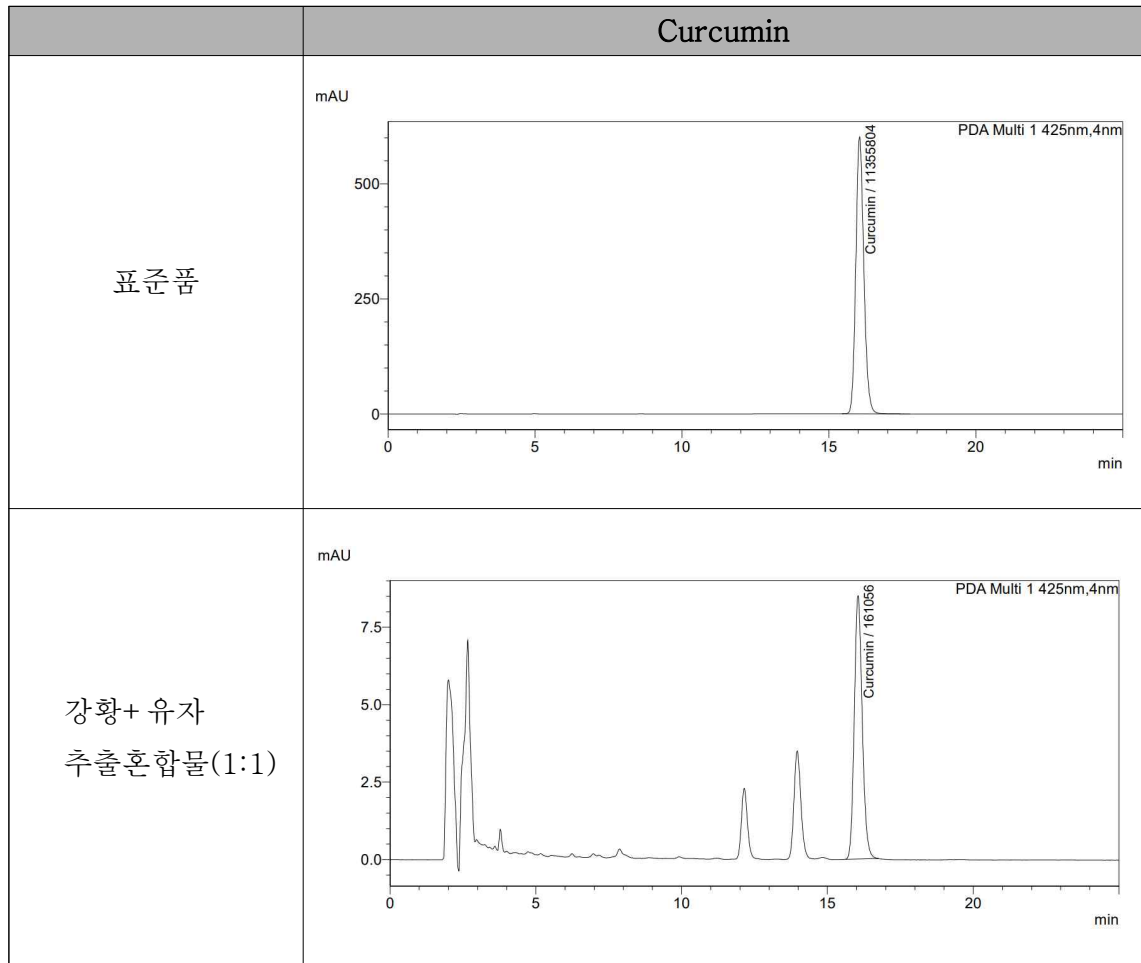
##### (1) 간기능 개선 소재 지표성분 분석

##### (가) 간기능 개선 소재 중 Curcumin 분석 결과

- 간기능 개선 소재 강황+ 유자 추출혼합물(1:1) 중 강황의 지표성분인 Curcumin을 정량한 결과 0.67 mg/g의 결과를 나타내었음



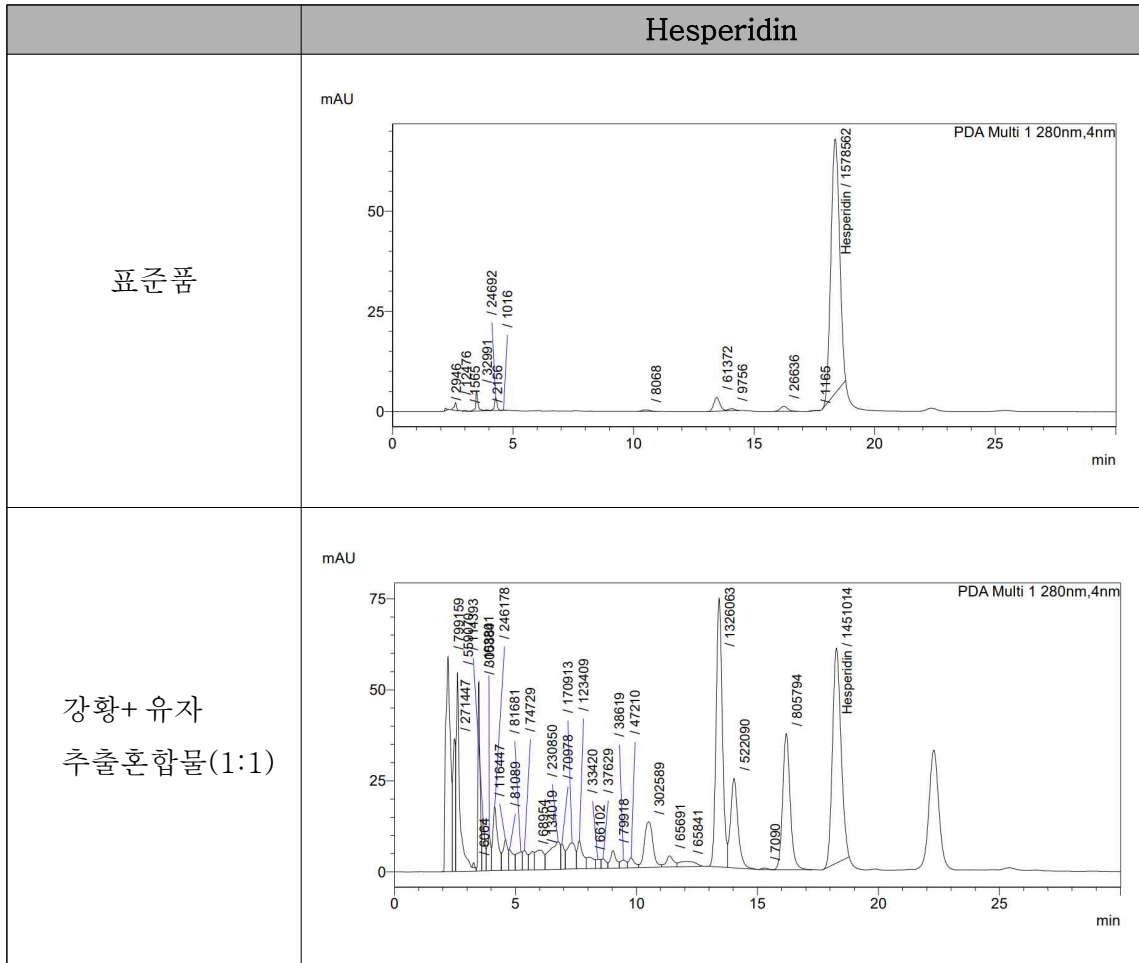
검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
Curcumin 표준품	0.0073	100	11355804	-
강황+ 유자 추출혼합물(1:1)	1.00136	100	724752	0.67



(나) 간기능 개선 소재 중 Hesperidin 분석 결과

- 간기능 개선 소재 강황+ 유자 추출혼합물(1:1) 중 유자의 지표성분인 Hesperidin을 정량한 결과 9.13 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Hesperidin 정량(mg/g)
Hesperidin 표준품	0.01045	100	1578562	-
강황+ 유자 추출혼합물(1:1)	0.50353	100	1451014	9.13

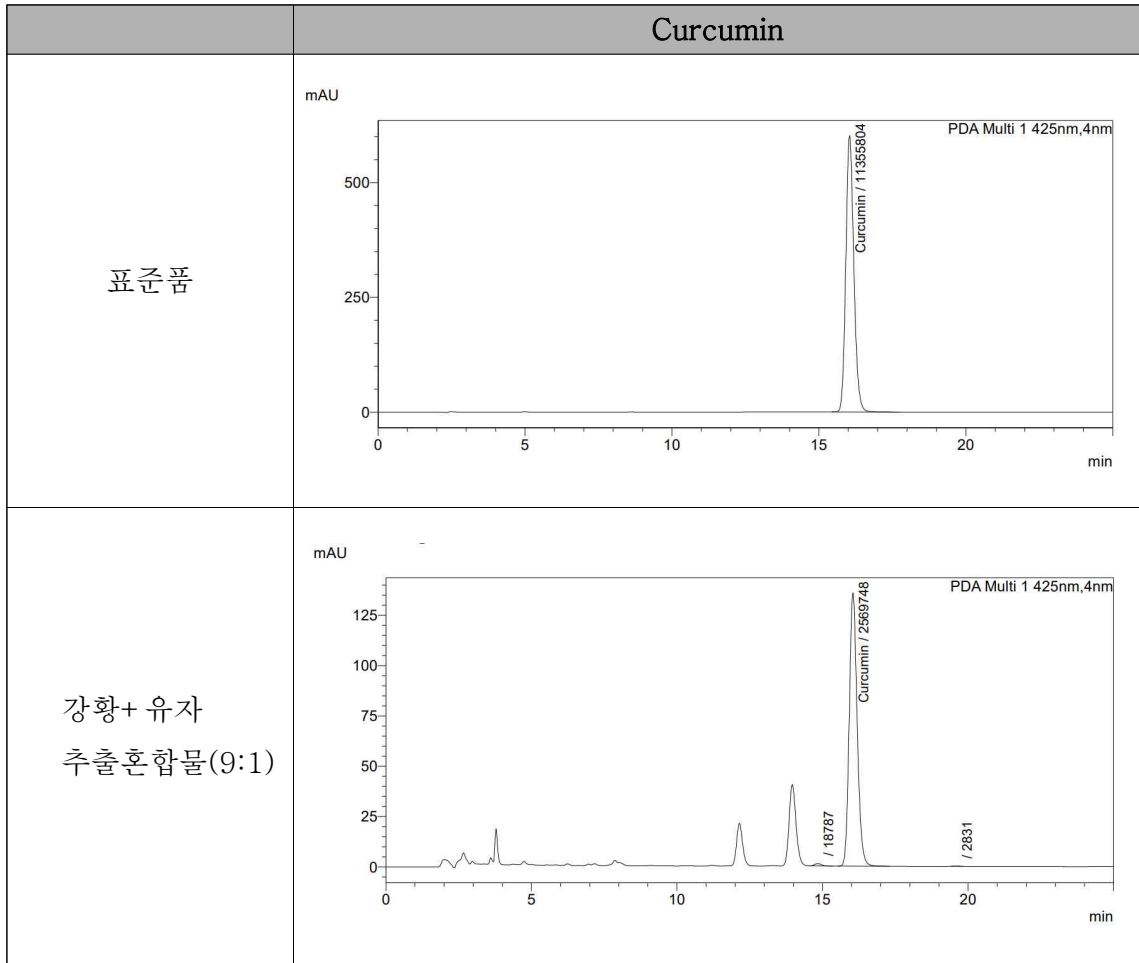


(2) 기억력 개선 소재 지표성분 분석

(가) 기억력 개선 소재 중 Curcumin 분석 결과

- 기억력 개선 소재 강황+ 유자 추출혼합물(9:1) 중 강황의 지표성분인 Curcumin을 정량한 결과 1.23 mg/g의 결과를 나타내었음

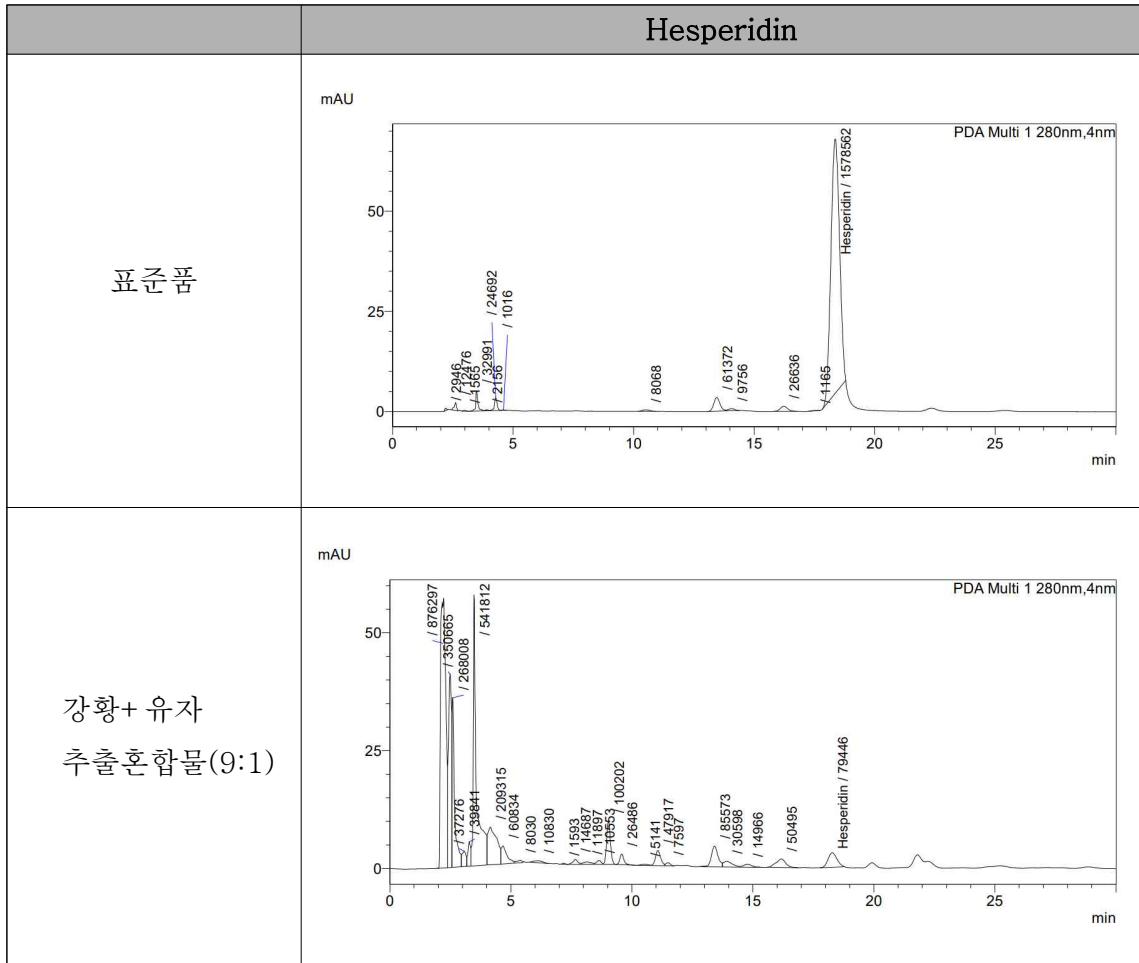
검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
Curcumin 표준품	0.0073	100	11355804	-
강황+ 유자 추출혼합물(9:1)	1.00373	100	2569748	1.23



(나) 기억력 개선 소재 중 Hesperidin 분석 결과

- 기억력 개선 소재 강황+ 유자 추출혼합물(9:1) 중 유자의 지표성분인 Hesperidin을 정량한 결과 0.59 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Hesperidin 정량(mg/g)
Hesperidin 표준품	0.01045	100	1578562	-
강황+ 유자 추출혼합물(9:1)	0.50323	100	79446	0.59

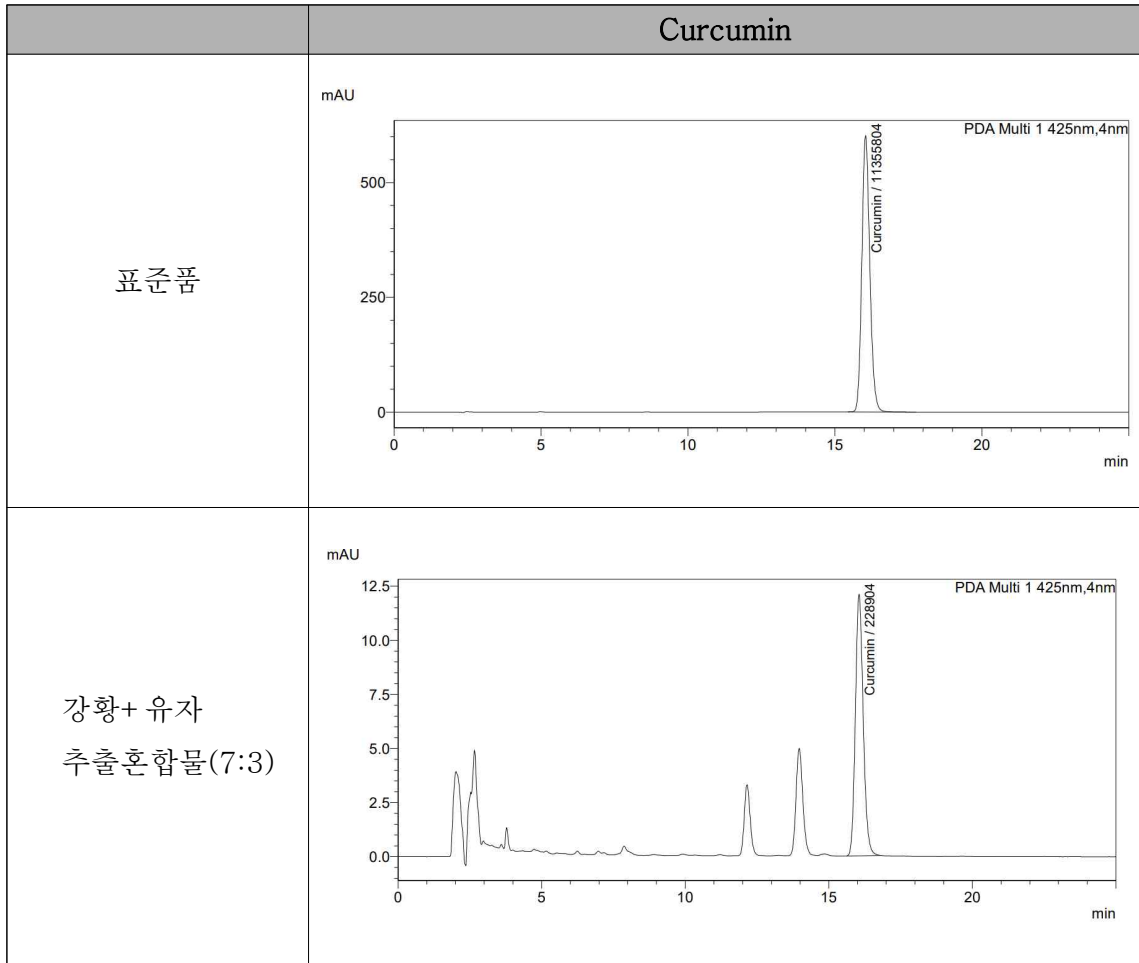


(3) 면역력 증진 소재 지표성분 분석

(가) 면역력 증진 소재 중 Curcumin 분석 결과

- 면역력 증진 소재 강황+ 유자 추출혼합물(7:3) 중 강황의 지표성분인 Curcumin을 정량한 결과 0.18 mg/g의 결과를 나타내었음

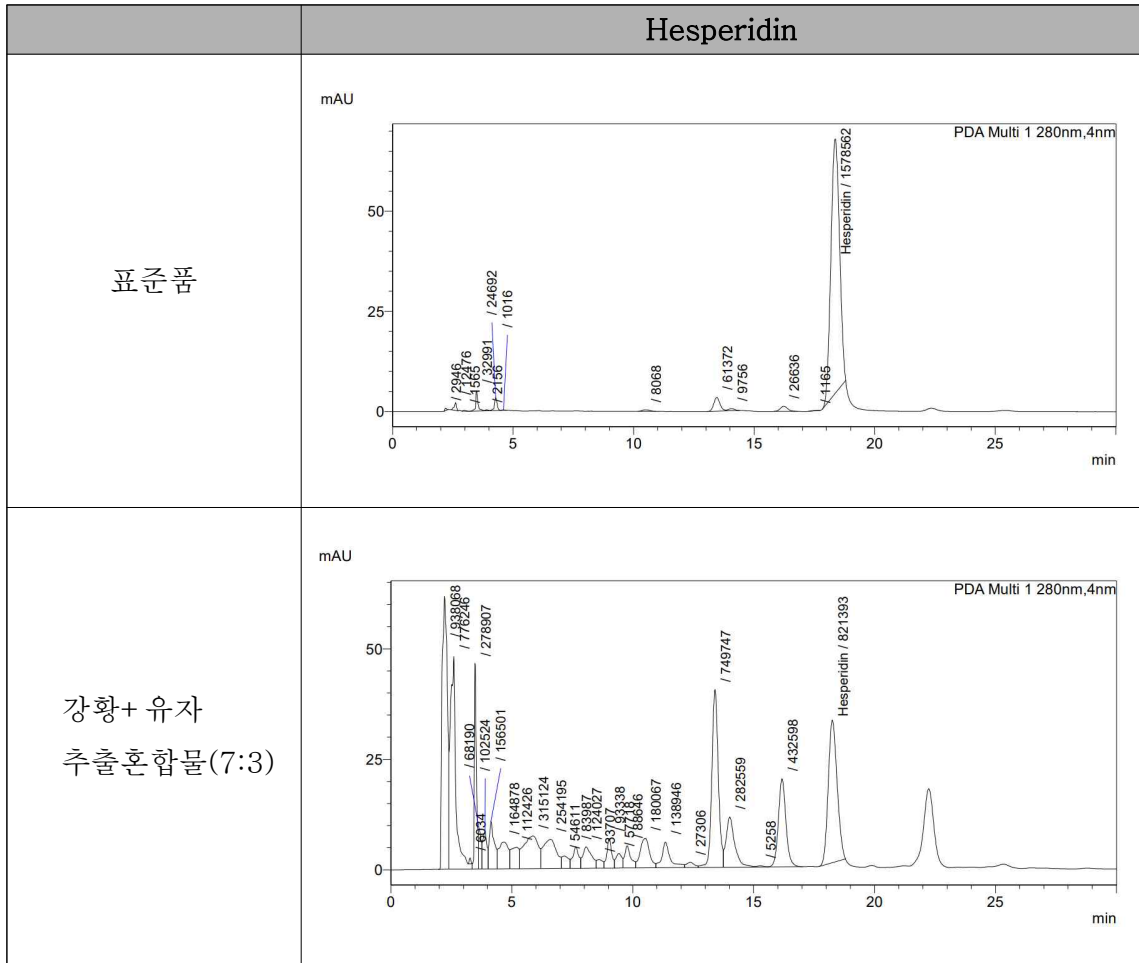
검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
Curcumin 표준품	0.0073	100	11355804	-
강황+ 유자 추출혼합물(7:3)	1.00184	100	228904	0.18



(나) 면역력 증진 소재 중 Hesperidin 분석 결과

- 면역력 증진 소재 강황+ 유자 추출혼합물(7:3) 중 유자의 지표성분인 Hesperidin을 정량한 결과 5.19 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Hesperidin 정량(mg/g)
Hesperidin 표준품	0.01045	100	1578562	-
강황+ 유자 추출혼합물(7:3)	0.50501	100	821393	5.19



5-4. 강황+ 유자 추출혼합물 결과

- 강황 20%주정+ 유자물 추출혼합물(1:1) 표준화 결과, Curcumin 0.67 mg/g, Hesperidin 9.13 mg/g 검출되었으며, 이렇게 표준화된 원료는 협동연구기관 전남대학교에서 간기능 개선 기능평가 결과 그 기능이 확인되었으며, 최종적으로 간기능 개선 소재로 개발되었음
- 강황 20%주정+ 유자물 추출혼합물(9:1) 표준화 결과, Curcumin 1.23 mg/g, Hesperidin 0.59 mg/g 검출되었으며, 이렇게 표준화된 원료는 협동연구기관 연세대학교에서 기억력 개선 기능평가 결과 그 기능이 확인되었으며, 최종적으로 기억력 개선 소재로 개발되었음
- 강황물+ 유자물 추출혼합물(7:3) 표준화 결과, Curcumin 0.18 mg/g, Hesperidin 5.19 mg/g 검출되었으며, 이렇게 표준화된 원료는 협동연구기관 울산대학교에서 면역력 증진 기능평가 결과 그 기능이 확인되었으며, 최종적으로 면역력 증진 소재로 개발되었음

6. 기능성표시식품 시제품 생산

- 식품의약품안전처의 행정 예고 “부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정(식품의약품안전처 공고 제 2019-597호. 2019. 12.31.)”의 기준에 따라 기능성표시식품 시제품을 생산함
- 행정예고 제4조(기능성의 범위) 제1항에 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 기능성 원료로 고시된 것으로서 별표 2 제2호에 해당하는 기능성 원료 또는 성분을 기능성을 함유하는 시제품 생산함
- 식품의약품안전처 행정예고에 제시한 포지티브 리스트 30종 중 프락토올리고당을 주

성분으로 기능성표시식품을 시생산하고 부원료로 가르시니아캄보지아추출물과 귀리식이섬유를 함유하는 시제품을 다음의 배합비로 시생산함

순번	기능성 원료 또는 성분	기능성	1일 섭취기준량
1	인삼	면역력 증진·피로 개선에 도움을 줄 수 있음	• 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합계로서 3~80 mg
2	홍삼	면역력 증진·피로개선·혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름·항산화·갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음	• 면역력 증진·피로개선에 도움을 줄 수 있음: 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 3~80 mg • 혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름·항산화에 도움을 줄 수 있음: 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 2.4~80 mg • 갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음: 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 25~80 mg
3	클로렐라	피부건강·항산화·면역력 증진·혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	• 피부건강·항산화에 도움을 줄 수 있음: 총 엽록소로서 8~150 mg • 면역력 증진·혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음: 총 엽록소로서 125~150 mg
4	스피루리나	피부건강·항산화·혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	• 피부건강·항산화에 도움을 줄 수 있음: 총 엽록소로서 8~150 mg • 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음: 총 엽록소로서 40~150 mg
5	프로폴리스 추출물	항산화·구강에서의 항균 작용에 도움을 줄 수 있음 ※구강 항균작용은 구강에 직접 접촉할 수 있는 형태	• 총 플라보노이드로서 16~17 mg
6	구아마잎 추출물	식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음	• 총 폴리페놀로서 120 mg
7	바나바잎 추출물	식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음	• 코로솔산으로서 0.45~1.3 mg
8	EPA 및 DHA 함유 유지	혈중 중성지질 개선·혈행 개선·혈행 개선·건조한 눈을 개선하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음	• 혈중 중성지질 개선·혈행 개선에 도움을 줄 수 있음: EPA와 DHA의 합으로서 0.5~2 g • 건조한 눈을 개선하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음: EPA와 DHA의 합으로

순 번	기능성 원료 또는 성분	기능성	1일 섭취기준량
			서 0.6~1 g
9	매실추출물	피로 개선에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>구연산으로서 1~1.3 g</li> </ul>
10	NAG(엔에이지, N-아세틸글루코사민)	관절 및 연골 건강·피부 보습에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>관절 및 연골건강에 도움을 줄 수 있음 : N-아세틸글루코사민으로서 0.5~1 g</li> <li>피부보습에 도움을 줄 수 있음 : N-아세틸글루코사민으로서 1 g</li> </ul>
11	구아검/ 구아검가수분해물	혈중 콜레스테롤 개선·식후 혈당상승 억제·장내 유익균 증식·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈중 콜레스테롤 개선·식후 혈당상승 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음: 구아검/구아검가수분해물로서 9.9~27 g</li> <li>장내 유익균 증식에 도움을 줄 수 있음: 구아검/구아검가수분해물로서 4.6~27 g</li> </ul>
12	난소화성말토덱스트린	식후 혈당상승 억제·혈중 중성지방 개선·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>식후혈당 상승 억제에 도움을 줄 수 있음 : 난소화성말토덱스트린 식이섬유로서 11.9~30g(액상원료는 11.6~44 g)</li> <li>혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있음 : 난소화성말토덱스트린 식이섬유로서 12.7~30g(액상원료는 12.7~44 g)</li> <li>배변활동에 원활한 도움을 줄 수 있음 : 난소화성말토덱스트린 식이섬유로서 2.5~30g(액상원료는 2.3~44 g)</li> </ul>
13	대두식이섬유	혈중 콜레스테롤 개선·식후 혈당상승 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈중 콜레스테롤 개선·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음: 대두 식이섬유로서 20~60 g</li> <li>식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음: 대두 식이섬유로서 10~60 g</li> </ul>
14	목이버섯식이섬유	배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>목이버섯식이섬유로서 12 g</li> </ul>
15	밀식이섬유	식후 혈당상승 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> <li>식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음: 밀 식이섬유로서 6~36 g</li> <li>배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음: 밀 식이섬유로서 36 g</li> </ul>



순번	기능성 원료 또는 성분	기능성	1일 섭취기준량
16	보리식이섬유	배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	• 보리 식이섬유로서 20~25 g
17	옥수수겨식이섬유	혈중 콜레스테롤 개선·식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음	• 옥수수겨식이섬유로서 10 g
18	이눌린/치커리추출물	혈중 콜레스테롤 개선, 식후 혈당상승 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	• 혈중 콜레스테롤 개선·식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음 : 이눌린/치커리추출물 식이섬유로서 7.2~20 g • 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음 : 이눌린/치커리추출물식이섬유로서 6.4~20 g
19	차전자피식이섬유	혈중 콜레스테롤 개선·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	• 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음 : 차전자피 식이섬유로서 5.5 g 이상 • 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음: 차전자피 식이섬유로서 3.9 g 이상
20	호로파종자식이섬유	식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음	• 호로파종자 식이섬유로서 12~50 g
21	알로에 겔	피부건강·장건강·면역력 증진에 도움을 줄 수 있음	• 총다당체 함량으로서 100~420 mg
22	프락토올리고당	유익균 증식 및 유해균 억제·칼슘 흡수·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	• 프락토올리고당으로서 3~8 g
23	프로바이오틱스	유산균 증식 및 유해균 억제·배변활동 원활·장건강에 도움을 줄 수 있음	• 100,000,000~10,000,000,000 CFU
24	홍국	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	• 총 모니콜린 K로서 4~8 mg
25	대두단백	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	• 대두단백으로서 15g 이상
26	폴리감마글루탐산	체내 칼슘흡수 촉진에 도움을 줄 수 있음	• 폴리감마글루탐산으로서 60~70 mg
27	마늘	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	• 마늘 분말로서 0.6~1.0 g
28	라피노스	장내 유익균의 증식과 유해균의 억제 도움을 줄 수 있음, 배변활동을 원활히	• 라피노스로서 3~5 g

순번	기능성 원료 또는 성분	기능성	1일 섭취기준량
		하는데 도움을 줄 수 있음	
29	분말한천	배변활동에 도움을 줄 수 있음	• 분말한천으로서 2~5 g (총 식이섬유로서 1.6~4.0 g)
30	유단백가수분해물	스트레스로 인한 긴장 완화에 도움을 줄 수 있음	• 유단백가수분해물로서 150 mg (알파에스1카제인( $\alpha_{S1}$ -casein) <sub>(f91-100)</sub> 으로서 2.7~4.1 mg)


<시제품 1>

배합비	시제품
쌀 15.0% 설탕 3.0% 소금 2.0% 타피오카전분 5.0% 차전자피 48.0% 프락토올리고당 17.0% 가르시니아캄보지아추출물 10.0%	


<시제품 2>

배합비	시제품
쌀 45.0% 설탕 3.0% 소금 2.0% 타피오카전분 5.0% 차전자피 29.0% 프락토올리고당 10.0% 가르시니아캄보지아추출물 6.0%	

<시제품 3>

배합비	시제품
쌀 34.0% 설탕 3.0% 소금 2.0% 타피오카전분 3.0% 차전자피 48.0% 프락토올리고당 0.0% 가르시니아캄보지아추출물 10.0%	

<시제품 4>

배합비	시제품
쌀 47.0% 설탕 3.5% 소금 1.0% 타피오카전분 5.0% 귀리식이섬유 25.0% 프락토올리고당 8.5% 가르시니아캄보지아추출물 10.0%	

7. 강황+ 유자 추출혼합물 간기능 개선 기능평가

7-1. 강황 및 유자 단일추출물의 기능성 활성평가

가. 실험방법

(1) 소재의 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 화합물의 함량을 측정하기 위하여 페놀성 물질인 포스포몰리브덴산 (phosphomolybdic acid)과 반응하여 청색을 나타내는 것을 이용한 폴린 데니스 (Folin Deinis)법 (AOAC., Association of official analytical chemists, Official methods of analysis. 15th ed., Washington DC. Cd 8-35 (1990))을 일부 변형하여 비색정량을 실시하였음. 각 소재는 10 mg/mL로 조제하였으며, 추출물 20  $\mu$ L에 증류수 80  $\mu$ L 첨가하여 혼합하고, 20  $\mu$ L의 폴린-시오칼토 시약 (Folin-Ciocalteu reagent)을 첨가하였다. 혼합액을 5분간 방치 후 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  140  $\mu$ L를 첨가하여 암실에서 1시간동안 실온방치 하였음. 그 후에 반응을 완료하고, 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질로는 갈산 (gallic acid, 시그마社, 미국)을 0  $\mu$ g/mL부터 100  $\mu$ g/mL 농도로 표준검량선을 작성하여 이용하였음. 각 시료의 흡광도는 갈산에 대한 상당량 (gallic acid equivalent ( $\mu$ g/mL))으로 계산하고, 결과로 사용하였음

(2) 소재의 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 모레노 등 (Moreno MI et al., J Ethnopharmacol. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina., 71:109-114(2000))의 방법을 이용하였음. 각 소재의 추출물은 10 mg/mL로 조제하였으며, 본 용액 1 mL에 증류수 4 mL을 넣은 후 5% 아질산 나트륨 (sodium nitrate)용액 0.3 mL을 첨가하여 혼합하였음. 혼합한 후, 실온에서 6분간 반응시킨 후 염화비소알루미늄 (aluminium chloride) 0.3 mL과 1 M 수산화나트륨 (sodium hydroxide), 증류수 2.4 mL을 첨가하여 microplate spectrophotometer (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준물질은 카테킨 (catechin, 시그마社, 미국)을 0 µg/mL부터 100 µg/mL 농도로 표준검량 선을 그리고, 각 시료의 흡광도를 측정하여 그 결과를 카테킨에 대한 상당량 (catechin equivalent (µg/mL))으로 계산하여 구하였음

### (3) 소재의 DPPH 라디칼 소거능 시험

DPPH (α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 블루아 등의 방법 (Billis MS et al., Nature, Antioxidant determination by the use of stable free radicals. 181:1199-1200(1958))에 따라 시험하였음. 각 소재의 추출물은 10 mg/mL로 조제하였으며, 추출물 20 µL에 100 µL DPPH 용액 380 µL를 첨가하여 암실에서 상온으로 30분간 반응시킨 후 microplate spectrophotometer를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였음. 대조구로는 EGCG (Epigallocatechin gallate, 시그마社, 미국)를 사용하였으며, 전자공여능은 다음 식에 의하여 계산하였음

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

### (4) 소재의 ABTS 라디칼 소거능 시험

ABTS (2,2'-azino-bis)(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 라디칼에 대한 소거활성은 Re 등 (Re R et al., Free Radical Biol Med 26: 1231-1237(1999))에 따라 시험하였음. 7 mM ABTS 인산칼륨 (potassium phosphate) 용액에 7 mM ABTS (시그마社, 미국)와 2.45 mM 과황산칼륨 (potassium persulfate)을 70:1로 용해시켜 ABTS+ 라디칼 용액을 제조하였음. 각 소재의 추출물은 10 mg/mL로 조제하였으며, ABTS+ 라디칼 용액 390 µL에 각 소재 추출물 10 µL을 잘 혼합하고 microplate spectrophotometer를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였음. 본 실험은 시료를 녹인 용매인 증류수를 대조군으로 하고, 다음의 식으로 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었음

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

### (5) 통계 처리

본 실험의 결과 분석은 SPSS (Statistical package for social science version 25.0, SPSS Inc., Chicago, USA)통계 프로그램을 사용하였고 실험군의 측정항목의 결과는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였음. 실험그룹 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 확인하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan의 다중검정법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였음 (P<0.05)

## 나. 실험결과

### (1) 총 폴리페놀 함량 측정 결과

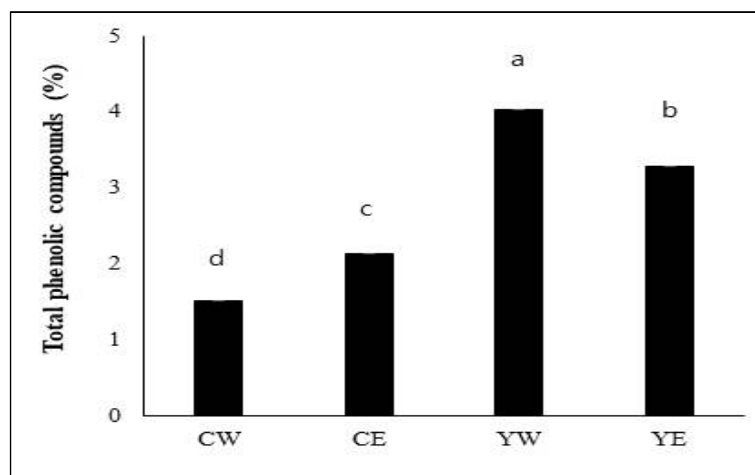


Fig 1. Total phenolic compounds of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* of extracts. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

폴리페놀은 활성 산소를 제거하는 항산화 효과가 있어 노화 방지, DNA 보호, 세포 구성 단백질 보호 등 여러 질병에 대한 위험도를 낮춘다고 알려져 있음. 그래서 폴리페놀 함량이 높을수록 체내에 좋은 역할을 할 것으로 생각됨

Fig 1은 각 시료의 총 폴리페놀함량을 측정한 결과임. 총 폴리페놀함량을 보면 유자물추출물(YW)이 가장 높은 함량을 보였으며 유자 20%주정추출물 (YE)도 강황추출물들 보다 총 폴리페놀함량이 높은 것을 확인 할 수 있음. 강황물추출물(CW)은 강황 20%주정 추출물(CE)보다 더 낮은 것을 확인할 수 있었음

(2) 총 플라보노이드 함량 측정 결과

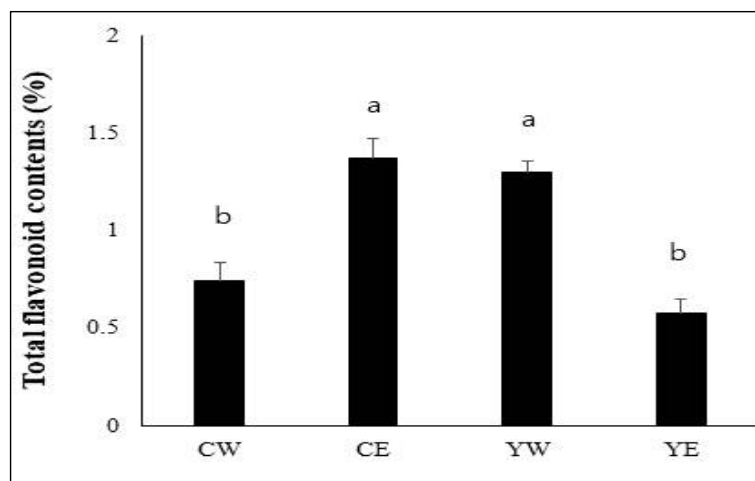


Fig 2. Total flavonoid contents of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* of extracts. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

플라보노이드는 식물이나 균류의 이차대사산물의 일종임. 플라보노이드는 *in vitro* 연구에서 항알러지, 항염증, 항산화, 항균, 항암 등 여러 생물학적 및 약리학적 활성을 갖는 것으로 알려져 있어서 체내에 좋은 역할을 할 것으로 생각됨

Fig 2는 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과임. 유자물추출물(YW)과 강황20%주정추출물(CE)이 가장 높았고 유자물추출물(YW)과 강황20%주정추출물(CE)은 서로 유의적인 차이를 보이지 않았음. 그러나 강황물추출물(CW)과 유자20%주정추출물(YE)의 총 플라보노이드 함량은 서로 유의적인 차이를 보이지 않았음

(3) DPPH 라디칼 소거능 시험 결과

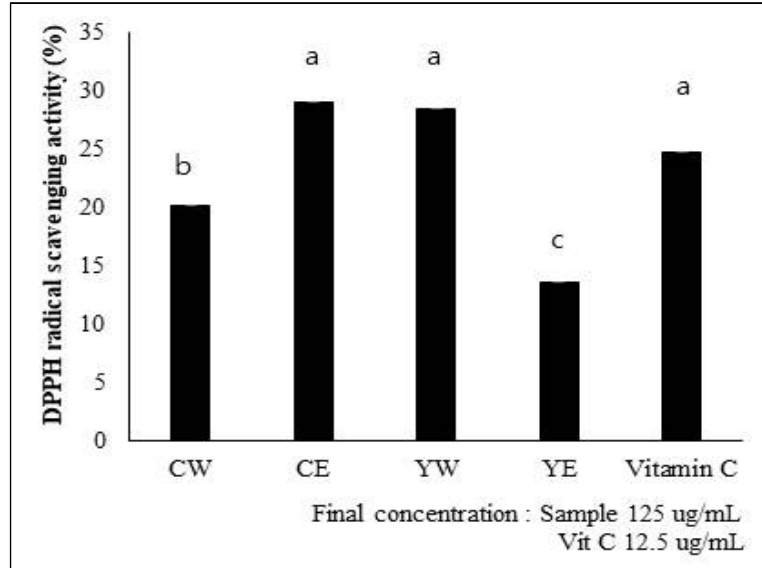


Fig 3. DPPH radical scavenging activities of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* of extracts. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

DPPH 라디칼 소거능은 항산화능을 측정하는데 가장 보편적으로 사용되는 방법임. DPPH 라디칼은 보라색을 띠고 있으나 항산화제와 반응하게 되면 노란색을 띠게 됨. 이러한 색의 변화가 항산화 능의 척도가 됨

Fig 3은 시료의 DPPH 라디칼 소거능을 확인한 결과임. 강황20%주정추출물(CE)과 유자물추출물(YW)은 서로 유의적인 차이를 보이지 않았고 강황물추출물(CW)과 유자 20%주정추출물(YE)은 상대적으로 강황20%주정추출물(CE)과 유자물추출물(YW)보다 DPPH 라디칼 소거능이 떨어지는 것을 확인하였음

(4) ABTS 라디칼 소거능 시험 결과

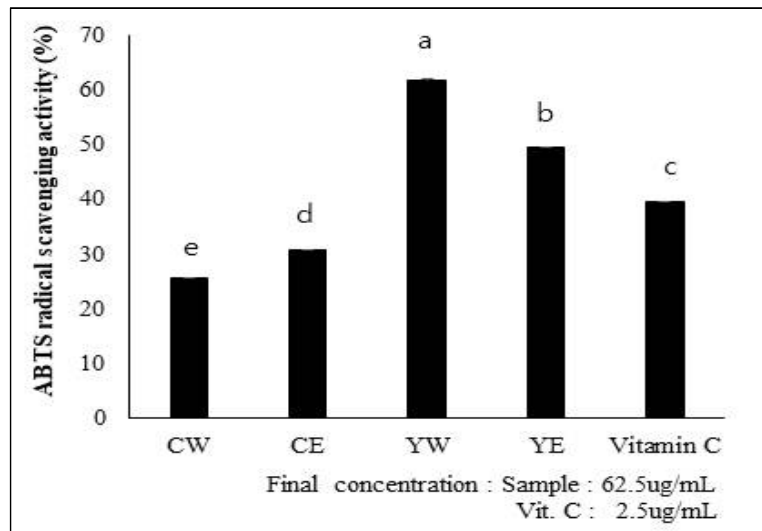


Fig 4. ABTS radical scavenging activities of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* of extracts. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

ABTS 라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거능과 원리는 동일함. ABTS 라디칼은 청녹색을 띠나 항산화 물질과 반응하면 하늘색을 띠게 됨. 그러나 DPPH와 항상 동일한 결과를 보이

지는 않음. 그러나 항산화능을 DPPH와 ABTS를 통해 두 번 체크함으로써 좀 더 명확한 결과를 얻을 수 있음

Fig 4는 시료의 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과임. 유자물추출물(YW)이 가장 높은 수치를 보였으며 그다음 유자20%주정추출물(YE)이 높았음. 강황 추출물들은 유자 추출물들에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 상대적으로 낮았음

위의 4개의 결과를 확인하였을 때, 강황의 경우 총 폴리페놀함량과 플라보노이드 함량이 높고 라디칼 소거능이 더 좋은 강황 20%주정추출물(CE)이 효과가 더 있을 것으로 생각됨. 유자의 경우는 물추출물(YW)이 20%주정추출물(YE)보다 효과가 더 있을 것으로 생각됨

## 7-2. 강황, 유자 단일추출물의 HepG2 세포를 이용한 *in vitro* 간기능 개선 활성 평가 가. 실험방법

### (1) 세포 배양

본 연구에 사용할 간암유래 HepG2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였음. ATCC에서 구매한 HepG2 세포는 10% FBS 및 1% penicillin을 함유한 Minimum Essential Media (MEM)을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며 세포가 80% 정도 밀집되면 계대 배양하여 사용하였음

### (2) 세포 독성

본 연구에 사용한 강황과 유자 추출물이 HepG2 세포에서 독성을 갖는지 확인하기 위해 세포 독성 평가를 진행하였음. HepG2세포는 24 well plate에서 1×10<sup>5</sup> cell/well씩 분주하여 강황과 유자 추출물 (0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL ) 농도로 24시간 처리하였음. 샘플을 제거하고 PBS로 세척한 다음 XTT를 처리하여 2시간 동안 배양시키고 흡광도 450 nm에서 측정하였음

### (3) 지방산 처리

본 연구에서 HepG2 세포에 추출물을 24시간 처리하고 1 mM 지방산 (oleic acid:palmitic acid=2:1)을 24시간 동안 추출물과 함께 처리하여 지방을 축적시켜 실험에 사용하였음. 지방산은 1% bovine serum albumin (BSA)을 포함한 MEM에 녹여 사용하였음

### (4) 세포내 ROS 함량 측정

지방산에 의해 세포내 생성된 ROS가 강황, 유자 단일추출물, 강황 20%주정 추출물과 유자 물 추출물을 혼합한 추출물의 처리에 의해 변화가 있는지 확인하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용해 형광도를 측정하였음. HepG2 세포는 24well plate에서 1×10<sup>5</sup> cell/well씩 분주하여 24시간 뒤 강황, 유자 단일추출물 (50, 100, 150, 200 µg/mL )과 강황 20%주정 추출물과 유자 물 추출물을 혼합한 추출물 (50, 100, 150, 200 µg/mL ) 농도로 24시간 처리하였고, 1 mM 지방산을 24시간 처리하였음. 지방산을 제거하고 PBS로 세척한 다음 DCF-DA를 30분간 처리하여 형광도 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였음

### (5) 세포내 중성지방 함량 측정

지방산에 의해 세포내 생성된 중성지방의 수준이 강황, 유자 단일추출물, 강황 20%주정 추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물의 처리에 의해 변화가 있는지 확인하기 위해 AdipoRed™ Assay Kit (Lonza, Walkersville, MD)를 사용하여 형광도를 확인하였음. HepG2 세포는 24 well plate에서 1×10<sup>5</sup> cell/well씩 분주하여 24시간 뒤 강황, 유자 단일추출물 (50, 100, 150, 200 µg/mL )과 강황 20%주정 추출물과 유자 물 추출물을 혼합한

추출물 (50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도로 24시간 처리하였고, 1 mM 지방산을 24시간 처리하였음. 지방산을 제거하고 PBS로 세척한 다음 Adipored 시약을 처리하여 10분간 염색시키고, PBS로 세척한 다음 형광도 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였음

(6) 세포내 지방함량 측정

지방산에 의해 세포내 생성된 중성지방의 수준이 강황, 유자 단일추출물, 강황 20%주정 추출물과 유자 물 추출물을 혼합한 추출물의 처리에 의해 변화가 있는지 확인하기 위해 Oil red O시약을 사용하여 흡광도를 확인하였음. Oil red O시약은 물과 6:4의 비율로 섞어서 필터 처리하여 사용하였음. HepG2 세포는 24 well plate에서  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주하여 24시간 뒤 강황, 유자 단일추출물(50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과 강황 20%주정 추출물과 유자 물 추출물을 혼합한 추출물(50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도로 24시간 처리하였고, 1 mM 지방산을 24시간 처리하였음. 지방산을 제거하고 PBS로 세척한 다음 실온에서 10% formalin으로 30분간 고정시켰음. 세포가 고정이 된 것을 확인하고, formalin은 제거하여 PBS로 세척하였음. Oil red O 용액은 1시간 동안 실온에서 처리하고 물로 2번 세척하고 현미경(Leica DMI1; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 사진을 찍었음. Isopropanol로 30분 동안 Oil red O 용액을 용출시켜 흡광도 510 nm에서 측정하였음

(7) 통계 처리

본 실험의 결과 분석은 SPSS (Statistical package for social science version 25.0, SPSS Inc., Chicago, USA)통계 프로그램을 사용하였고 실험군의 측정항목의 결과는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였음. 실험그룹 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 확인하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan의 다중검정법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였음 ( $p < 0.05$ )

나. 실험결과

(1) 세포독성결과

(가) 강황 단일추출물의 세포 독성

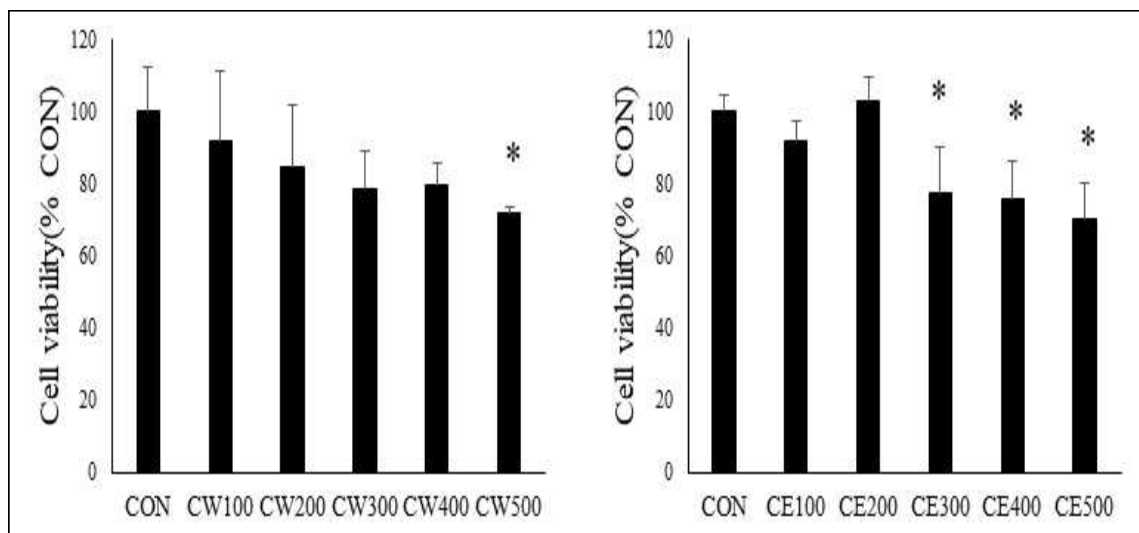


Fig 5. Cytotoxicity of *Curcuma longa* L. water and 20% ethanol extract. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different asterisk in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )



Fig 5는 Hep G2 cell에서 강황 단일추출물에 대한 세포독성의 결과임. 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2에 강황물추출물을 0, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu$ g/mL 의 농도 24시간 배양하여 세포독성을 측정하였음. 강황물추출물에서 0, 100, 200, 300, 400  $\mu$ g/mL 농도에서 유의미한 차이가 없었고, 500  $\mu$ g/mL 농도에서 독성을 보였음. 강황20%주정추출물 0, 100, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 유의미한 차이가 없었고, 300, 400, 500  $\mu$ g/mL 농도에서 유의하게 독성을 보였음. 따라서 강황물추출물은 400  $\mu$ g/mL 이내 농도에서 실험을 진행하였으며, 강황20%주정추출물에 독성을 보이지 않은 200  $\mu$ g/mL 이내를 안전한 농도로 생각하여 실험을 진행하였음

(나) 유자 단일추출물의 세포 독성

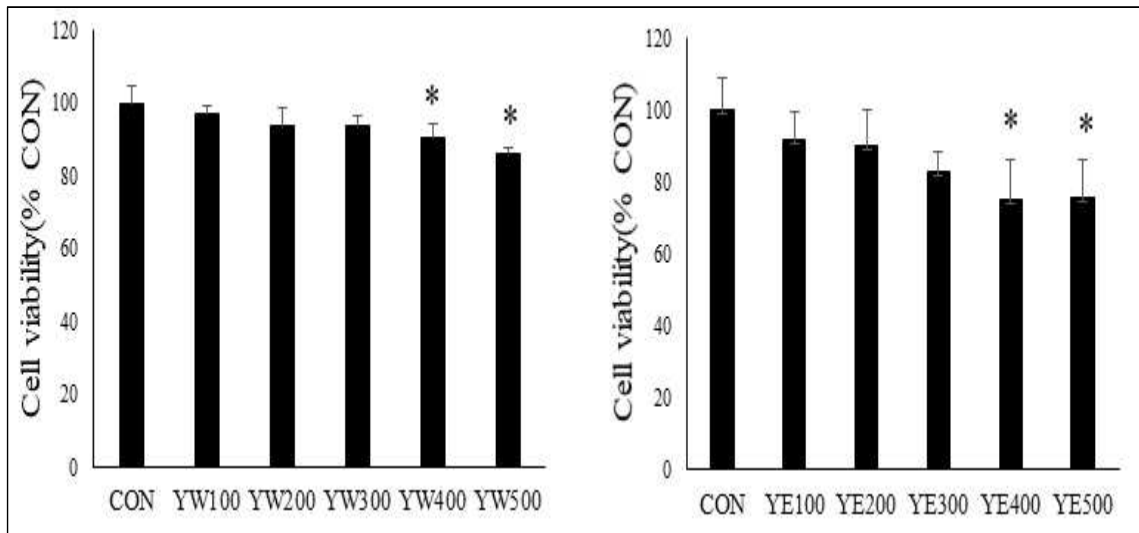


Fig 6. Cytotoxicity of *Citrus junos* water and 20% ethanol extract. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different student' t-test ( $p < 0.05$ )

Fig. 6은 HepG2 cell에서 유자 단일추출물에 대한 세포독성의 결과임. 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2에 유자물추출물을 0, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu$ g/mL 의 농도 24시간 배양하여 세포독성을 측정하였음. 유자물추출물에서 0, 100, 200, 300  $\mu$ g/mL 농도에서 유의미한 차이가 없었고, 400, 500  $\mu$ g/mL 농도에서 독성을 보였음. 유자 20%주정추출물에서 0, 100, 200, 300  $\mu$ g/mL 농도에서 유의미한 차이가 없었고, 400, 500  $\mu$ g/mL 농도에서 독성을 보였음. 유자물추출물과 20%주정추출물이 모두 300  $\mu$ g/mL에서 독성을 보이지 않아 300  $\mu$ g/mL 농도 이내에서 실험을 진행하였음

(2) 세포 내 ROS 형성 측정 결과

(가) 강황 단일추출물의 처리에 따른 세포 내 ROS 형성 측정 결과

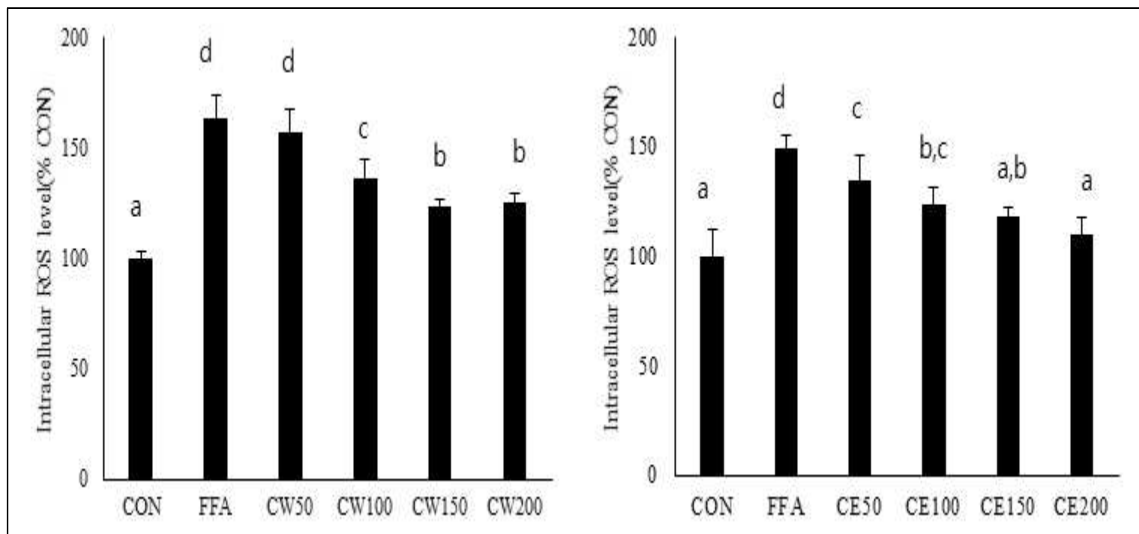


Fig 7. Effect of *Curcuma longa* L. water and 20% ethanol extracts on intracellular ROS level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

지방산을 처리할 경우 세포내에서는 과도한 지방산으로 인해 베타 산화가 일어나게 됨. 베타 산화는 지방을 분해하는 작용으로 지방을 분해하면서 ROS가 형성되게 됨. 이렇게 형성된 ROS가 제대로 제거가 되지 못하면 세포에 좋지 않은 영향을 미치게 되고 그로 인해 유입된 지방이 산화가 되지 못하고 축적이 됨. 즉, 지방산으로 생성되는 ROS를 제거하면 간 세포에 지방이 축적되는 것을 억제할 수 있음

Fig 7은 1 mM의 지방산을 처리하여 ROS 형성을 유도한 HepG2 세포에서 강황 단일추출물의 처리에 따른 ROS형성 수준을 DCF-DA를 사용하여 형광도를 측정된 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 강황 단일추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. ROS발현 수준은 강황 물 추출물을 처리하였을 때 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서부터 효과가 있었고 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서 40% 가량 감소되었음을 확인할 수 있었음. 강황 20%주정 추출물을 처리하였을 때 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서 효과를 보였고, 농도가 짙어질수록 감소하는 경향을 보이다 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서 CON과 비슷한 수준까지 감소하였음을 확인할 수 있었음

(나) 유자 단일추출물의 처리에 따른 세포 내 ROS 형성 측정 결과

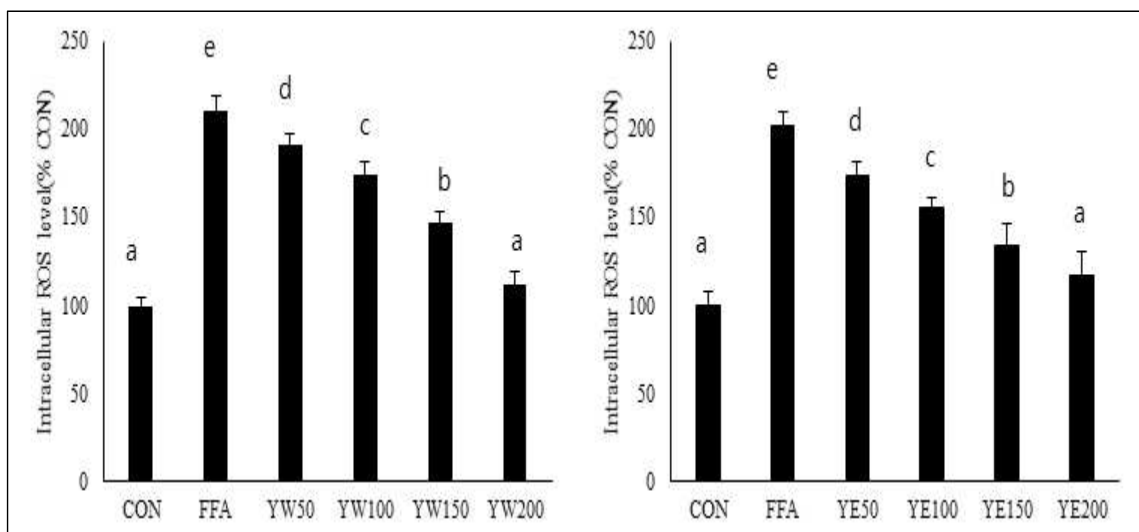


Fig 8. Effect of *Citrus junos* water and 20% ethanol extracts on intracellular ROS

level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 8은 1 mM의 지방산을 처리하여 ROS형성을 유도한 HepG2 세포에서 유자 단일추출물의 처리에 따른 ROS 형성 수준을 DCF-DA를 사용하여 흡광도를 측정된 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 유자 단일추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. ROS발현 수준은 유자물추출물과 유자 20%주정추출물을 처리하였을 때 모두 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 효과적이고 농도 의존적으로 감소하였음. FFA군과 비교하였을 때 유자 물 추출물과 유자 20%주정 추출물은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 90%이상의 ROS감소 효과를 보였음

(3) 세포 내 지질함량 측정 결과

(가) Adipored를 이용한 강황 단일추출물의 처리에 따른 세포 내 지질 함량

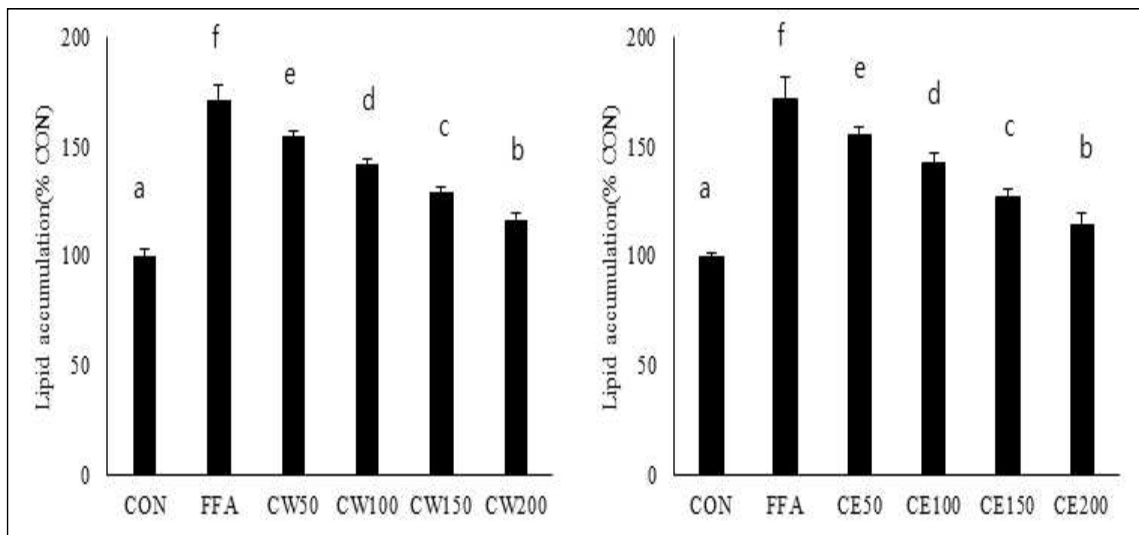


Fig 9. Effect of *Curcuma longa* L. water and 20% ethanol extracts on intracellular TG level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 9는 1 mM의 지방산을 처리하여 지방축적을 유도시킨 HepG2 세포에서 강황 단일 추출물의 처리에 따른 지방축적 억제를 AdipoRed™ Assay Kit를 사용하여 형광도를 측정된 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 강황 단일추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. 강황 물 추출물과 강황 20%주정 추출물을 처리하였을 때 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서부터 효과가 있었고 모든 추출물이 농도가 증가함에 따라 지방축적이 억제되는 것을 확인하였음. FFA군과 비교하였을 때 강황 물 추출물과 강황 20%주정추출물은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 80%이상의 지방 축적 억제효과를 보임. 하지만 강황물추출물과 20%주정추출물간의 유의적 차이를 확인할 수 없었음

(나) Adipored를 이용한 유자 단일추출물의 처리에 따른 세포 내 지질 함량

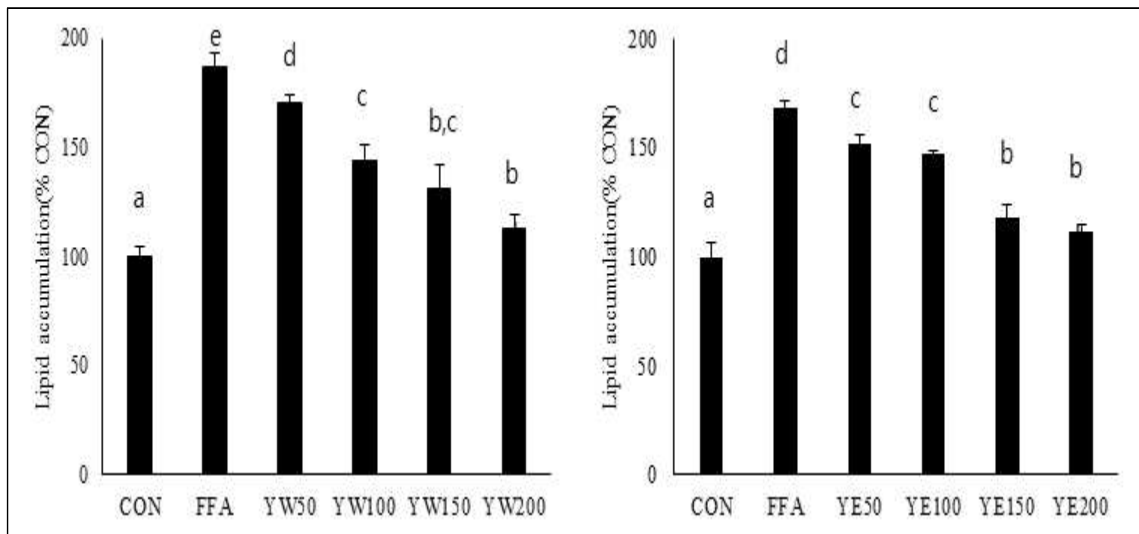


Fig 10. Effect of *Citrus junos* water and 20% ethanol extracts on intracellular TG level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 10은 1 mM의 지방산을 처리하여 지방축적을 유도시킨 HepG2 세포에서 유자 단일 추출물의 처리에 따른 지방축적 억제 효과를 AdipoRed™ Assay Kit를 사용하여 형광도를 측정하여 나타낸 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 유자 단일추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. 유자물추출물은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서 효과를 보였고, FFA군과 비교하였을 때 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 60%의 지방축적 억제효과를 보임. 유자 20%추출물은 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 효과를 보이기 시작하였고, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에서 50%의 지방축적 억제효과를 확인할 수 있었음. 하지만 유자물추출물과 20%추출물 간의 유의적 차이를 확인할 수 없었음

(다) Oil red O를 이용한 강황 단일추출물의 처리에 따른 세포 내 지질함량

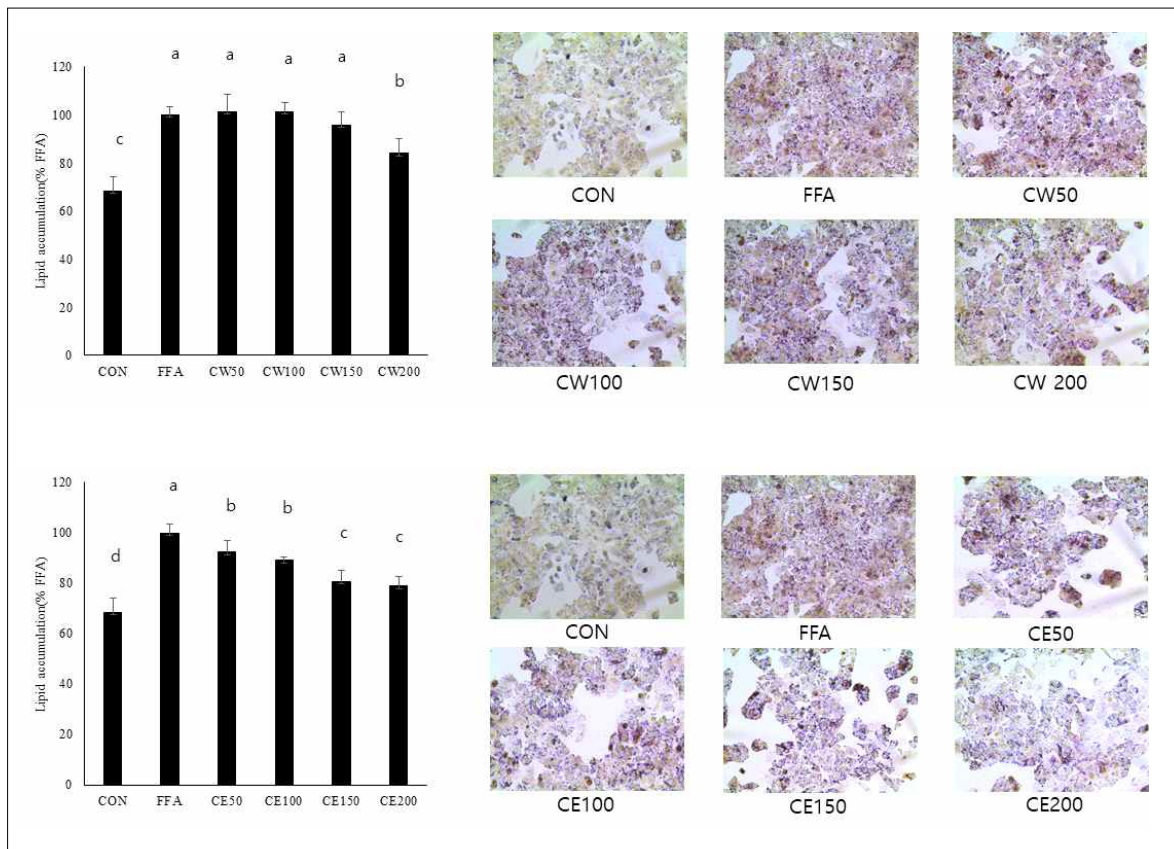


Fig 11. Effect of *Curcuma longa* L. water and 20% ethanol extracts on intracellular lipid accumulation in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 11은 1 mM의 지방산을 처리하여 지방축적을 유도시킨 HepG2 세포에서 강황 단일 추출물의 처리에 따른 지방축적 억제율 Oil red O 시약을 사용하여 흡광도를 측정된 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 강황 단일추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL 농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도 별로 24시간동안 처리하였음. 강황물추출물은 150  $\mu$ g/mL 농도까지 지방축적 억제 효과를 보이지 않다가 200  $\mu$ g/mL 농도에서 효과를 나타내었음. FFA군과 비교해볼 때 강황물 추출물 200  $\mu$ g/mL 농도에서 16% 지방축적 억제효과가 나타났고 옆의 현미경 사진에서도 확인 할 수 있음. 강황 20%주정추출물은 100  $\mu$ g/mL까지 지방 축적 억제효과를 보지 못하다가 150, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 효과가 나타났음. FFA군에 비해 지방축적이 20% 감소하는 것을 확인 할 수 있고 현미경 사진에서도 확인할 수 있음

(라) Oil red O를 이용한 유자 단일추출물의 처리에 따른 세포 내 지질함량

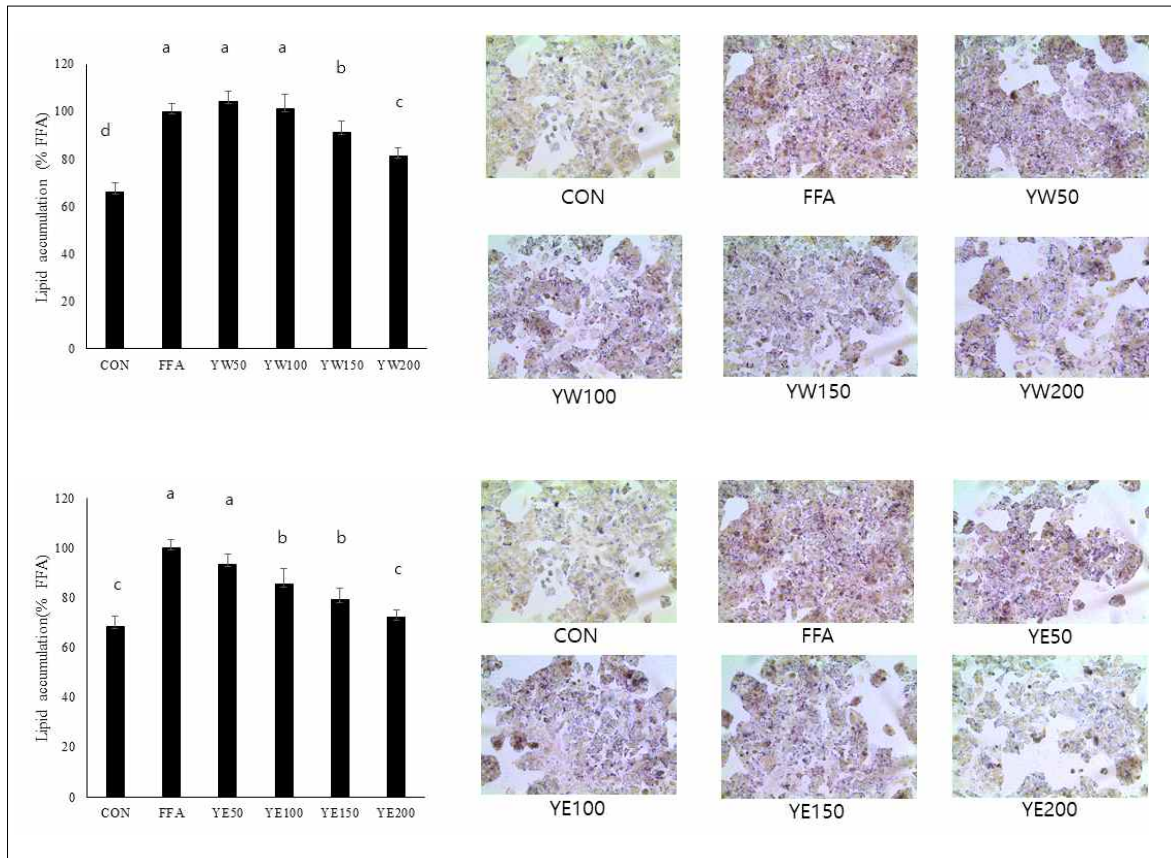


Fig 12. Effect of *Citrus junos* water and 20% ethanol extracts on intracellular lipid accumulation in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 12는 1 mM의 지방산을 처리하여 지방축적을 유도시킨 HepG2 세포에서 유자 단일 추출물의 처리에 따른 지방축적 억제를 Oil red O 시약을 사용하여 흡광도를 측정된 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 유자 단일추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL 농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도 별로 24시간동안 처리하였음. 유자물추출물을 150  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였을 때 FFA군에 비해 지방축적의 양이 감소하였고, 200  $\mu$ g/mL에서 지방축적의 양이 20% 감소하였음. 유자 20%주정 추출물을 100  $\mu$ g/mL처리하였을 때 FFA군에 비해 지방축적의 양이 감소하였고, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 지방축적의 양이 28% 감소하였음. 현미경 사진을 통해서 지방의 양의 변화를 확인 할 수 있음

단일 추출물들의 결과를 종합하면 총 폴리페놀함량은 강황 20%주정추출물과 유자물추출물이 가장 높았으며, 플라보노이드 함량도 강황 20%주정추출물과 유자물추출물이 높았음. 또한 라디칼 소거능을 확인하였을 때 강황 20%주정추출물과 유자물추출물이 가장 높은 것을 확인하였음

단일 추출물들의 세포 내 ROS 농도를 측정하였을 때, 강황 물과 20%주정추출물 모두 세포내 ROS 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 강황 20%주정추출물이 더 효과가 있는 것을 확인할 수 있었음. 유자의 경우도 물 추출물과 20%주정추출물 모두 ROS 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었음. 하지만 유자물추출물과 20%주정추출물을 비교하였을 때 서로 크게 차이가 나지 않았음

단일 추출물들의 Adipored를 측정하였을 때 강황과 유자의 물추출물과 20%주정추출물 모두 지방 축적을 억제하는 것을 확인 할 수 있었음. 모든 추출물들간에 서로 차이를 확인

할 수 없었음

단일 추출물들의 Oil red O staining을 통해 세포내 지방구를 측정된 결과 강황 20%주정추출물이 강황물추출물보다 지방구 축적을 억제하는 것을 확인 할 수 있었으며, 유자의 경우 물추출물과 20%주정추출물 간에 서로 차이는 보이지 않았음

종합하자면 강황의 경우 20%주정추출물이 지방 축적의 억제나 세포내 ROS의 형성을 억제하는 것을 확인 할 수 있었으며, 유자의 경우는 총 페놀함량이나 플라보노이드, 라디칼 소거능은 물 추출물이 높았으며, 또한 유자 물 추출물이 지방 축적의 억제나 세포내 ROS의 형성을 억제하는 것을 확인 할 수 있었음

그래서 두 시료를 섞을 경우 가장 효과가 좋았던 강황 20%주 추출물과 유자물추출물을 섞었을 경우 효과가 가장 좋을 것으로 생각됨

그러나 어느 비율로 섞을 경우 효과가 있는지 확인하기 위해서 강황 20%주정추출물과 유자물추출물의 비율을 1:2, 1:1, 2:1로 섞어서 Adipored를 통해 활성을 측정하였음. Adipored를 사용한 이유는 지방간의 억제효과를 보기위한 실험이기 때문에 세포내 지방 축적을 억제하는지 못하는지 우선으로 확인하였음

### 7-3. 강황+ 유자 추출혼합물의 HepG2 세포를 이용한 *in vitro* 간기능 개선 활성 평가. 실험방법

#### (1) 세포 배양

본 연구에 사용할 간암유래 HepG2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였음. ATCC에서 구매한 HepG2 세포는 10% FBS 및 1% penicillin을 함유한 Minimum Essential Media (MEM)을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며 세포가 80% 정도 밀집되면 계대 배양하여 사용하였음

#### (2) 세포 독성

본 연구에 사용한 강황과 유자 추출물이 HepG2 세포에서 독성을 갖는지 확인하기 위해 세포 독성 평가를 진행하였음. HepG2세포는 24 well plate에서 1×10<sup>5</sup> cell/well씩 분주하여 강황과 유자 추출물 (0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL) 농도로 24시간 처리하였음. 샘플을 제거하고 PBS로 세척한 다음 XTT를 처리하여 2시간 동안 배양시키고 흡광도 450 nm에서 측정하였음

#### (3) 지방산 처리

본 연구에서 HepG2 세포에 추출물을 24시간 처리하고 1 mM 지방산 (oleic acid:palmitic acid=2:1)을 24시간 동안 추출물과 함께 처리하여 지방을 축적시켜 실험에 사용하였음. 지방산은 1% bovine serum albumin (BSA)을 포함한 MEM에 녹여 사용하였음

#### (4) 세포내 ROS 함량 측정

지방산에 의해 세포내 생성된 ROS가 강황, 유자 단일추출물, 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물의 처리에 의해 변화가 있는지 확인하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용해 형광도를 측정하였음. HepG2 세포는 24well plate에서 1×10<sup>5</sup> cell/well씩 분주하여 24시간 뒤 강황, 유자 단일추출물 (50, 100, 150, 200 µg/mL)과 강황20%주정 추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물 (50, 100, 150, 200 µg/mL) 농도로 24시간 처리하였고, 1 mM 지방산을 24시간 처리하였음. 지방산을 제거하고 PBS로 세척한 다음 DCF-DA를 30분간 처리하여 형광도 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였음

#### (5) 세포내 중성지방 함량 측정

지방산에 의해 세포내 생성된 중성지방의 수준이 강황, 유자 단일추출물, 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물의 처리에 의해 변화가 있는지 확인하기 위해 AdipoRed™ Assay Kit (Lonza, Walkersville, MD)를 사용하여 형광도를 확인하였음. HepG2 세포는 24 well plate에서  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주하여 24시간 뒤 강황, 유자 단일추출물 (50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물 (50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도로 24시간 처리하였고, 1 mM 지방산을 24시간 처리하였음. 지방산을 제거하고 PBS로 세척한 다음 Adipored시약을 처리하여 10분간 염색시키고, PBS로 세척한 다음 형광도 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였음

(6) 세포내 지방함량 측정

지방산에 의해 세포내 생성된 중성지방의 수준이 강황, 유자 단일추출물, 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물의 처리에 의해 변화가 있는지 확인하기 위해 Oil red O시약을 사용하여 흡광도를 확인하였음. Oil red O시약은 물과 6:4의 비율로 섞어서 필터 처리하여 사용하였음. HepG2 세포는 24 well plate에서  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주하여 24시간 뒤 강황, 유자 단일추출물(50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )과 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합한 추출물(50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도로 24시간 처리하였고, 1 mM 지방산을 24시간 처리하였음. 지방산을 제거하고 PBS로 세척한 다음 실온에서 10% formalin으로 30분간 고정시켰음. 세포가 고정이 된 것을 확인하고, formalin은 제거하여 PBS로 세척하였음. Oil red O 용액은 1시간 동안 실온에서 처리하고 물로 2번 세척하고 현미경(Leica DMI1; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 사진을 찍었음. Isopropanol로 30분 동안 Oil red O 용액을 용출시켜 흡광도 510 nm에서 측정하였음

(7) 통계 처리

본 실험의 결과 분석은 SPSS (Statistical package for social science version 25.0, SPSS Inc., Chicago, USA)통계 프로그램을 사용하였고 실험군의 측정항목의 결과는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였음. 실험그룹 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 확인하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan의 다중검정법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였음 ( $P < 0.05$ )

나. 실험결과

(1) Adipored를 이용한 강황+ 유자 추출혼합물의 처리에 따른 세포 내 지질함량

(가) 강황20%주정추출물 : 유자물추출물 = 1:1

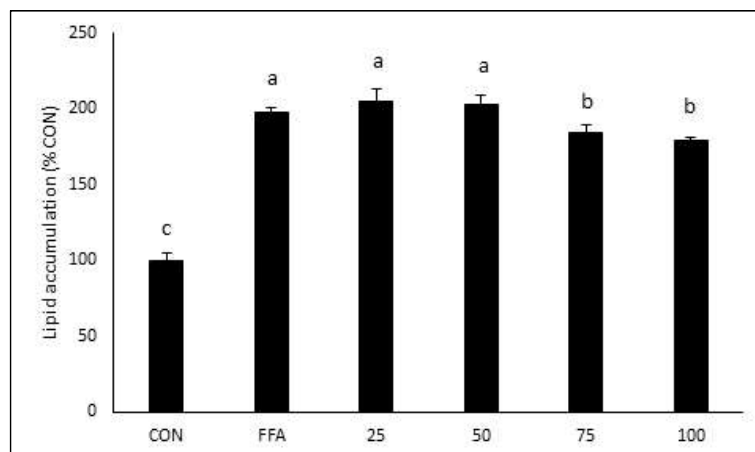


Fig 13. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol and *Citrus junos* water mixed (1:1) extracts on intracellular TG level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express



the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

앞서 실험한 결과를 가지고 강황과 유자 추출물을 비율별로 섞어 효과를 먼저 알아보았음. 지방처리로 인해 ROS가 증가하는 것을 확인하는 것보다는 먼저 간에 지방축적을 억제하는지 확인하였음. 왜냐하면 간에 지방이 축적이 되지 않는 것이 ROS도 억제할 수 있고 시료에 대해 좀 더 명확한 결론을 얻을 수 있기 때문임

Fig 13은 AdipoRed™ Assay Kit를 사용하여 지방 축적을 확인한 결과임. 시료는 강황 20%주정 추출물과 유자 물 추출물을 1:1로 혼합하여 사용한 것임. 시료를 1:1로 혼합하였을 때, 75  $\mu\text{g/mL}$ 에서 효과가 있었으며 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 FFA군 보다 20%더 지방 축적을 억제하는 것을 확인 할 수 있었음

(나) 강황20%주정추출물 : 유자물추출물 = 1:2

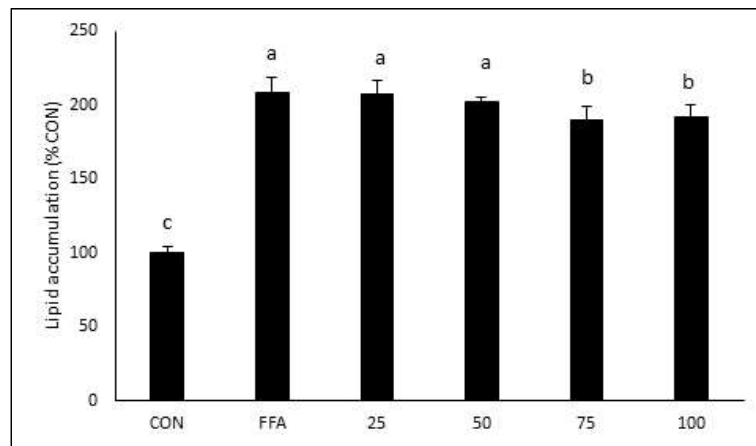


Fig 14. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol and *Citrus junos* water mixed (1:2) extracts on intracellular TG level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 14는 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:2로 혼합하여 세포내 지방 축적능을 AdipoRed™ Assay Kit를 통해 확인한 결과임. 그 결과 1:2로 혼합하여 75  $\mu\text{g/mL}$ 을 처리하였을 때부터 지방 축적 억제를 확인 할 수 있었음. 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 FFA군에 비해 지방 축적을 10% 억제하는 것을 확인 할 수 있었음

(다) 강황20%주정추출물 : 유자물추출물 = 2:1

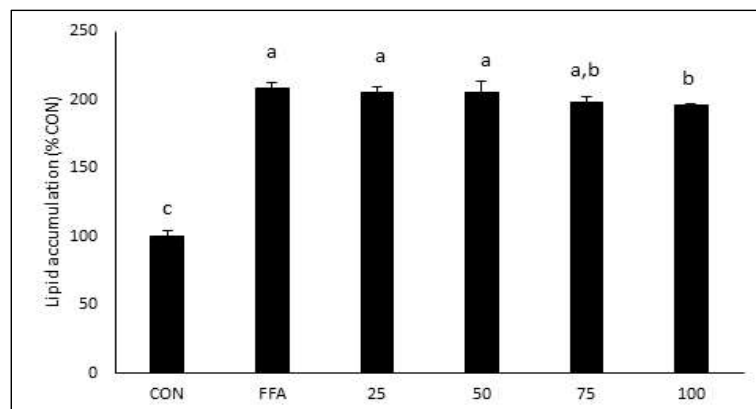


Fig 15. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol and *Citrus junos* water mixed (2:1) extracts on intracellular TG level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express

the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 15는 강황 20%주정추출물과 유자물추출물을 2:1로 혼합하여 세포내 지방 축적능을 AdipoRed™ Assay Kit를 통해 확인한 결과임. 그 결과 2:1로 혼합하여 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때부터 지방 축적 억제력을 확인 할 수 있었음. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 FFA군에 비해 지방 축적을 5% 억제하는 것을 확인 할 수 있었음

위의 결과를 확인하였을 때 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합하였을 때 세포내 지방 축적을 가장 많이 억제하는 것을 확인 할 수 있었음. 그래서 이 후에는 강황 20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합하여 실험을 진행하였음

(2) 세포내 ROS 형성 측정 결과

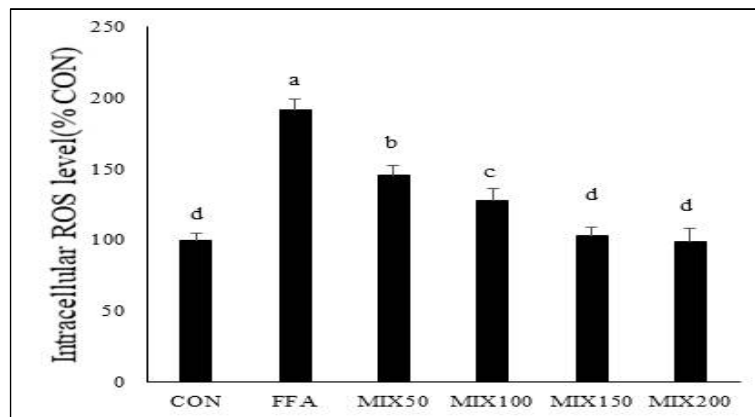


Fig 16. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts on intracellular ROS level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 16은 1 mM의 지방산을 처리하여 ROS형성을 유도한 HepG2 세포에서 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물의 처리에 따른 ROS형성 수준을 DCF-DA를 사용하여 흡광도를 측정한 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 처리하였을 때 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 효과가 있었음. FFA군에 비해 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하였을 때 ROS의 생성 수준이 90%이상 감소하였고, CON수준으로 ROS 생성을 억제하는 것을 확인하였음

(3) 세포 내 지질 함량 측정 결과

(가) Adipored를 이용한 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물의 처리에 따른 세포 내 지질함량

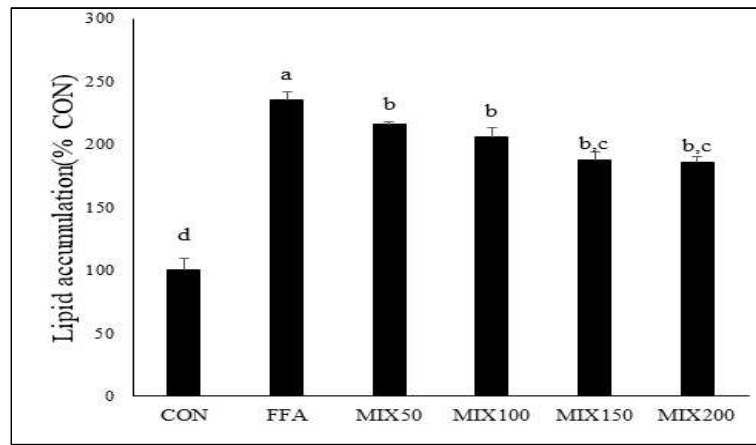


Fig 17. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts on intracellular TG level in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 17은 1 mM의 지방산을 처리하여 지방축적을 유도시킨 HepG2 세포에서 강황20% 주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물의 처리에 따른 지방축적 억제율 AdipoRed™ Assay Kit를 사용하여 형광도를 측정된 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 처리하였을 때 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도부터 효과가 있었고, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리할 때 FFA군에 비해 지방축적의 양이 50% 감소한 것을 확인하였음

(나) Oil red O를 이용한 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물의 처리에 따른 세포 내 지질함량

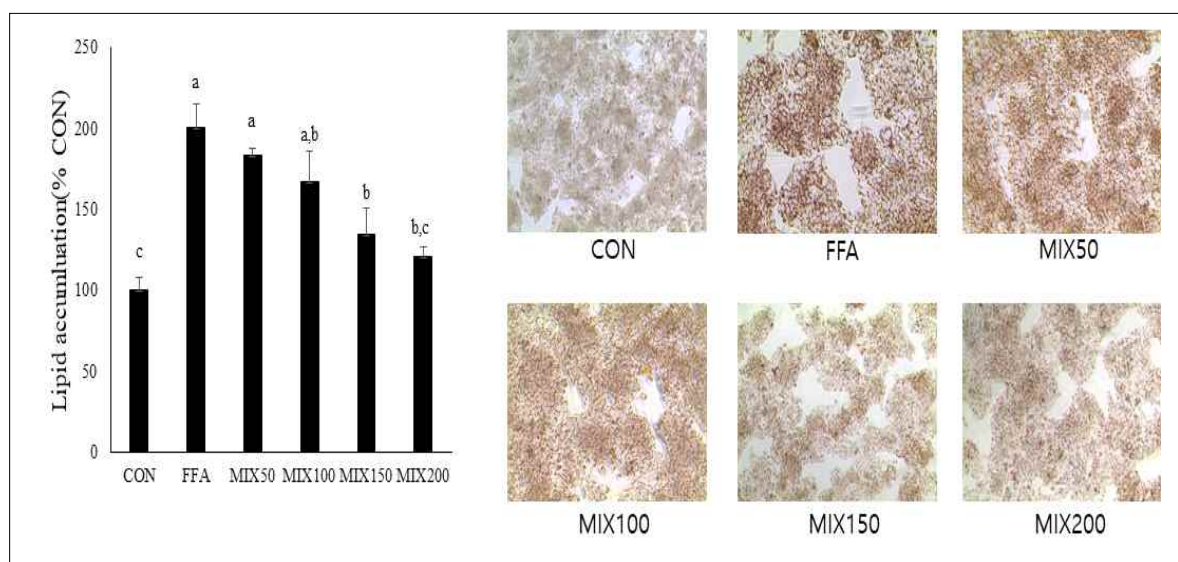


Fig 18. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts on intracellular lipid accumulation in 1 mM FFA treated HepG2 cell. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ )

Fig 18은 1 mM의 지방산을 처리하여 지방축적을 유도시킨 HepG2 세포에서 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물의 처리에 따른 지방축적 억제에 Oil red O 시약을 사용하여 흡광도를 측정한 결과임.  $1 \times 10^5$  cell/well씩 분주한 HepG2 세포에 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL 농도를 24시간 처리하였고 CON군 제외하고 1 mM 지방산을 추출물과 함께 농도별로 24시간동안 처리하였음. 강황 20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합한 추출물을 처리하였을 때 150  $\mu$ g/mL의 농도에서 효과를 보였고, 200  $\mu$ g/mL의 농도를 처리했을 때 FFA군에 비해 지방축적의 양이 19% 감소하였음. 현미경 사진을 통해서도 지방의 양이 감소하였음을 확인할 수 있음

#### 7-4. 강황+ 유자 추출혼합물의 간기능 개선 *in vivo/ex vivo* 활성평가

##### 가. 실험 방법

##### (1) 동물 및 사육환경

본 연구에 사용할 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스는 SLC Inc. (Shizuoku, Japan)에서 구매하여 사용하였음. 마우스는 실험실 환경에 적응시키기 위해 1주간 적응기간을 가지고 실험을 진행하였음. 실험은 22-25  $^{\circ}$ C의 온도로 조절되었고 조명시간은 12시간 간격으로 설정하였음. 처음 1주간 적응기간동안 일반 식이를 급여하였고 실험기간동안 60% 고지방 식이를 급여하였음. 동물은 전남대학교 윤리위원회(CNU IACUC-YB-2020-35)에 따라 관리되어 사육하였음

##### (2) 실험 설계

1주간 적응시킨 마우스는 평균 몸무게가 동일하게 무작위 배정하여 5군으로 나누고 12주간 실험을 진행하였음. 마우스는 음성대조군(CON), 고지방식이군(HFD), 고지방식이군+강황+유자 추출혼합물 저농도(MIX L), 고지방식이군+강황+유자 추출혼합물 고농도(MIX H), 고지방식이군+실리마린 (SILY)으로 나누어 실험을 진행하였음. 매일 식이 섭취량을 기록하였고 음수는 자유 급수하였음. 고지방식이군+강황+유자 추출혼합물 저농도(MIX L)는 300 mg/kg bw/day 고지방식이군+강황+유자 추출혼합물 고농도(MIX H)는 900 mg/kg bw/day, 고지방식이군+실리마린 (SILY) 50 mg/kg bw/day의 농도로 하여 실험을 진행하였음

##### (3) 공복혈당 측정

마우스의 혈당 측정은 12주에 진행하였음. 공복 혈당 측정을 위해 16시간 공복상태를 유지한 마우스 꼬리 정맥혈관에서 미량의 혈액을 추출하여 혈당시험지에 적시고 혈당측정 기기를 사용하여 측정하였음

##### (4) 혈청 중간 손상 인자 측정

마우스의 혈액을 모아 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 실험에 사용하였음. Alanine aminotransferase (AST), aspartate aminotransferase (ALT)는 간에 다량 존재하는 효소이지만 간에서 손상이 일어나면 많은 양의 효소가 혈중으로 나오게 되기 때문에 혈청의 AST, ALT를 간 손상 지표로 사용하였고, assay kit를 사용하여 활성 정도를 측정하였음. 분리한 혈청과 assay kit의 기질액을 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 AST 60분, ALT 30분 동안 방치함. 정색 시액을 각각 처리하여 실온에서 20분 동안 방치하고, 0.4N NaOH 용액을 처리하여 실온에서 10분간 방치하여 505nm의 흡광도에서 측정함

##### (5) 혈중 지방 측정과 유리지방산 측정

마우스 혈청의 중성지방, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤의 양은 assay kit를 사용해 측정하였음. 중성지방과 총콜레스테롤은 혈청과 효소 시약 용해액을 잘 혼합하여 37°C에서 중성지방은 10분, 콜레스테롤은 5분간 방치하였음. 이후 60분 이내에 시약 블랭크를 대조로 하여 중성지방 550 nm, 총콜레스테롤 500 nm 흡광도에서 측정하였음. HDL 콜레스테롤은 혈청을 분리 시액과 잘 혼합하여 원심분리한 다음 효소 시약 용해액에 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 방치하고 60분 이내에 시약 블랭크를 대조로 하여 500 nm 흡광도에서 측정하였음. LDL 콜레스테롤은 아래의 Friedewald formula에 따라 산출하였음. 혈중 유리지방산은 kit를 통해 측정하였음

$$LDL\ Cholesterol = Total\ cholesterol - HDL\ cholesterol - Triglyceride/5$$

(6) SOD 측정

Superoxide dismutase (SOD)는 균질화한 간을 용해하여 조직액의 형태로 만들어 사용함. 3 mM xanthine, 0.2 mM WST-1, xanthine oxidase를 잘 혼합하여 조직액에 처리하고 37°C에서 15분 반응 후 흡광도 450 nm에서 측정함

(7) Catalase 활성 측정

Catalase (CAT) 활성은 균질화한 간을 용해하여 조직액의 형태로 만들어 사용함. 50 mM KPB로 1:1의 비율로 희석한 조직액에 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분주하여 3분간 흡광도 240 nm에서 측정함

(8) GSH 측정

Glutathione (GSH) 균질화한 간을 용해하여 조직액의 형태로 만들어 사용함. 50 mM KPB, Glutathione reductase enzyme, 30 mM DTNB를 잘 혼합하여 조직액에 분주하고 마지막으로 2.5 mM NADPH를 분주하여 5분간 60초 간격으로 흡광도 412 nm에서 측정함

(9) GST 측정

균질화한 간을 용해하여 조직액의 형태로 만들어 사용함. 200 mM glutathione reduced 와 100 mM CDNB, PBS를 잘 혼합하여 조직액에 분주하여 1분간 반응시킨 후 5분간 60초 간격으로 흡광도 340 nm에서 측정함

(10) GR 측정

Glutathione reductase (GR) 균질화한 간을 용해하여 조직액의 형태로 만들어 사용함. 50 mM KPB, 2 mM oxidized glutathione, 3 mM DTNB, 2.5 mM NADPH를 잘 혼합하여 조직액에 분주하고 1분간 반응시키고 10초 간격으로 11회 흡광도 412 nm에서 측정함

(11) GPx 측정

Glutathione peroxidase (GPx) 균질화한 간을 용해하여 조직액의 형태로 만들어 사용함. 3.5 mM glutathione reduced, 0.5 U/mL glutathione reductase, 2.5 mM NADPH를 잘 혼합하여 조직액에 분주한 후 30 mM tert-butyl hydroperoxide를 분주하여 5분간 60초 간격으로 흡광도 340 nm에서 측정함

(12) MDA 측정

균질화한 간을 원심분리하여 상층액을 취해 사용함. 상층액에 1X phosphoric acid와 0.375% TBA를 분주하고 water bath에서 60분간 반응시킴. 반응 후 butanol을 넣고 잘 혼합하여 30분간 상온에서 정치함. 정치가 끝나면 원심분리하여 butanol 층을 취해 흡광도 535 nm에서 측정함

(13) 통계 처리

본 실험의 결과 분석은 SPSS (Statistical package for social science version 25.0, SPSS Inc., Chicago, USA)통계 프로그램을 사용하였고 실험군의 측정항목의 결과는 평

균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였음. 실험그룹 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 확인하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan의 다중검정법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였음 ( $p < 0.05$ )

## 나. 실험 결과

### (1) 실험동물의 체중변화

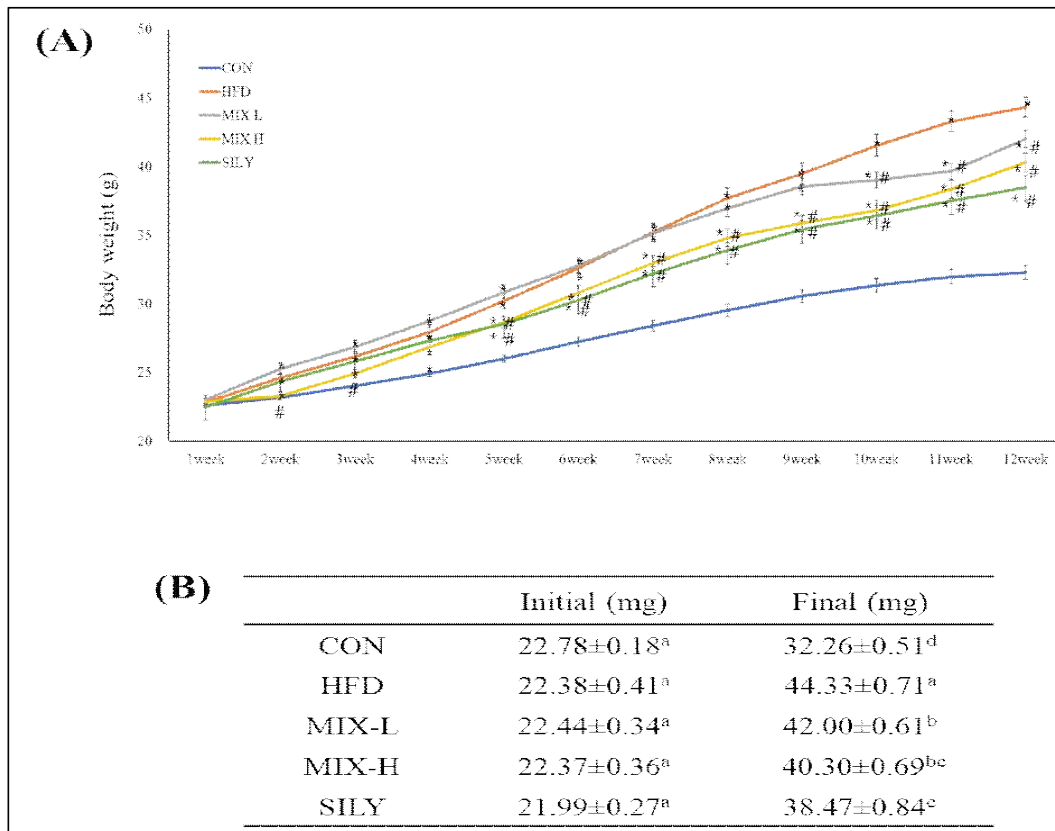


Fig 19. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on (A) body weight and (B) initial and final body weight

Data are expressed as means ± standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

비알콜성지방간 질환과 연관되어 나타나는 질환에는 비만, 이상지질혈증등의 대사 질환이 있음. 이 질환들의 대표적인 증상 중 하나가 체중 증가이기 때문에 고지방식이 섭취를 통해 비만을 유도하고 이를 통해 간에 지방증을 유도하여 실험을 진행하였음. 실험은 매주 체중을 측정하며 관찰하였고 무게의 유의적 차이가 확실하게 보이는 12주까지 실험을 진행하였음. Fig 1.은 7주령의 C57BL/6 마우스를 음성대조군(CON), 고지방식이군(HFD), 고지방식이군+ 강황+ 유자 추출혼합물 저농도(MIX L), 고지방식이군+ 강황+ 유자 추출혼합물 고농도(MIX H), 고지방식이군+ 실리마린(SILY)으로 나누어 12주간 실험을 진행시키고, 체중을 매주 2회씩 측정하여 평균을 낸 결과임

초기 무게는 모든 군에서 22 g으로 동일하였음. 고지방식이 섭취 2주부터 CON군이 23.1 g, HFD군이 24.6 g, MIX L군이 25.3 g, MIX H군이 23.3 g, SILY군이 24.3 g으로 CON 군이 다른 군에 비해서 유의적으로 적은 무게가 측정되었고 이후 12주간의 측정에서도 가

장 적은 무게를 측정하였음. 또한 5주에서 HFD군이 30.2 g, MIX L군이 30.8 g, MIX H군이 28.7 g으로 HFD군이 MIX L군과는 유의미한 차이를 보이지 않았지만, MIX H군에 비해 유의하게 높게 측정되었음. 10주에는 HFD군이 41.5 g, MIX L군이 39.0 g으로 MIX L와 MIX H군에 비해 HFD군에서 높게 측정되었음. 마지막 12주에서 CON군이 32.3 g, HFD군이 44.3 g, MIX L군이 42.0 g, MIX H군이 40.3 g, SILY군이 38.5 g으로 HFD군에 비해 MIX L와 MIX H군에서 체중이 유의하게 감소한 것을 보아 고지방식이 섭취 시 강황+ 유자 추출혼합물을 같이 섭취하였을 때 무게를 효과적으로 감소시켰고, 또한 양성 대조군으로 사용된 SILY군이 MIX H군과 비슷한 체중으로 측정된 것으로 볼 때 더 많은 용량의 추출물에서 체중감소가 효과적으로 감소시켰음을 확인하였음

(2) 간 무게 측정 결과

Table 1. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on organ weight

	(% Relative Weight)				
	Liver	Kidney	Spleen	Epididymal fat	Perirenal fat
CON	4.17±0.04 <sup>b</sup>	0.95±0.04 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>	3.91±0.21 <sup>c</sup>	1.50±0.10 <sup>c</sup>
HFD	4.82±0.30 <sup>a</sup>	0.84±0.03 <sup>b</sup>	0.20±0.01 <sup>ab</sup>	5.83±0.09 <sup>a</sup>	2.76±0.05 <sup>a</sup>
MIX L	4.05±0.15 <sup>b</sup>	0.83±0.02 <sup>b</sup>	0.19±0.00 <sup>b</sup>	4.90±0.17 <sup>b</sup>	2.33±0.06 <sup>b</sup>
MIX H	3.78±0.10 <sup>b</sup>	0.83±0.02 <sup>b</sup>	0.19±0.00 <sup>b</sup>	4.94±0.21 <sup>b</sup>	2.42±0.09 <sup>b</sup>
SILY	3.26±0.09 <sup>c</sup>	0.82±0.03 <sup>b</sup>	0.19±0.02 <sup>b</sup>	4.49±0.39 <sup>bc</sup>	2.39±0.09 <sup>b</sup>

Data are expressed as means ± standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

본 비알콜성지방간은 간에 5% 이상의 지방이 쌓이는 것이 특징이기 때문에 비알콜성지방간이 진행되면서 간에서의 무게가 증가되고 비만이 같이 진행되기 때문에 신장 지방이나 정소 지방과 같은 지방들도 증가하는 경향을 보임. Table 1은 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 해부 후 간과 신장, 비장, 정소 지방, 신장 지방을 측정하고 무게를 측정한 결과임. 각 장기는 체중을 대비 %로 나타내었음. 간의 무게는 HFD군에서 가장 높게 측정되었으며 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의적으로 감소되었음. 신장 지방에서 측정값 역시 HFD군에 비해 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의적으로 감소되었음. 신장과 비장의 무게는 HFD군, MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의차를 확인할 수 없었음. 따라서 강황+ 유자추출물을 섭취시켰을 때 지방증에 효과적인 것을 확인하였고 또한 정소 지방이나 신장 지방의 감소에서도 효과적인 것을 확인할 수 있었음

(3) 공복혈당 측정 결과

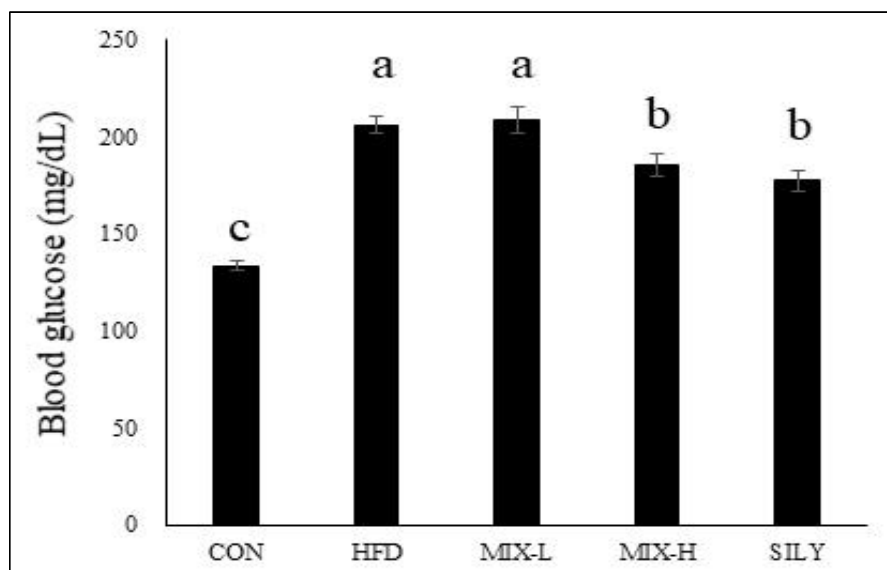


Fig 20. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on serum fasting blood glucose level. Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test.

비알콜성지방간이 진행되면 동반되어 나타나는 질환 중 하나는 당뇨병임. 당뇨병에서도 인슐린 분비 이상으로 일어나는 제 2형 당뇨가 일어나며 공복 혈당이 잘 떨어지지 않는 특징을 갖는 것으로 알려져 있음. Fig. 20은 강황+유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 공복 혈당을 측정된 결과임. 공복 혈당은 16시간 동안 식이를 제거하고 공복 상태를 유지 시킨 마우스의 꼬리 정맥에서 측정하였음. 혈당은 CON군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가된 것을 보아 고지방식이에서 높은 혈당이 유도된 것을 확인할 수 있었음. HFD군과 MIX L군의 혈당에서 유의적인 차이를 보이지 않았지만 MIX H군과 SILY군은 유의적으로 감소되었고 이를 통해 강황+유자 추출혼합물의 섭취가 혈당 감소에 도움을 주는 것을 확인하였으며, 강황+유자 추출혼합물을 더 많이 섭취시킨 MIX H군에서 더 좋은 효과를 보였음.

#### (4) 혈중 지질 측정 결과



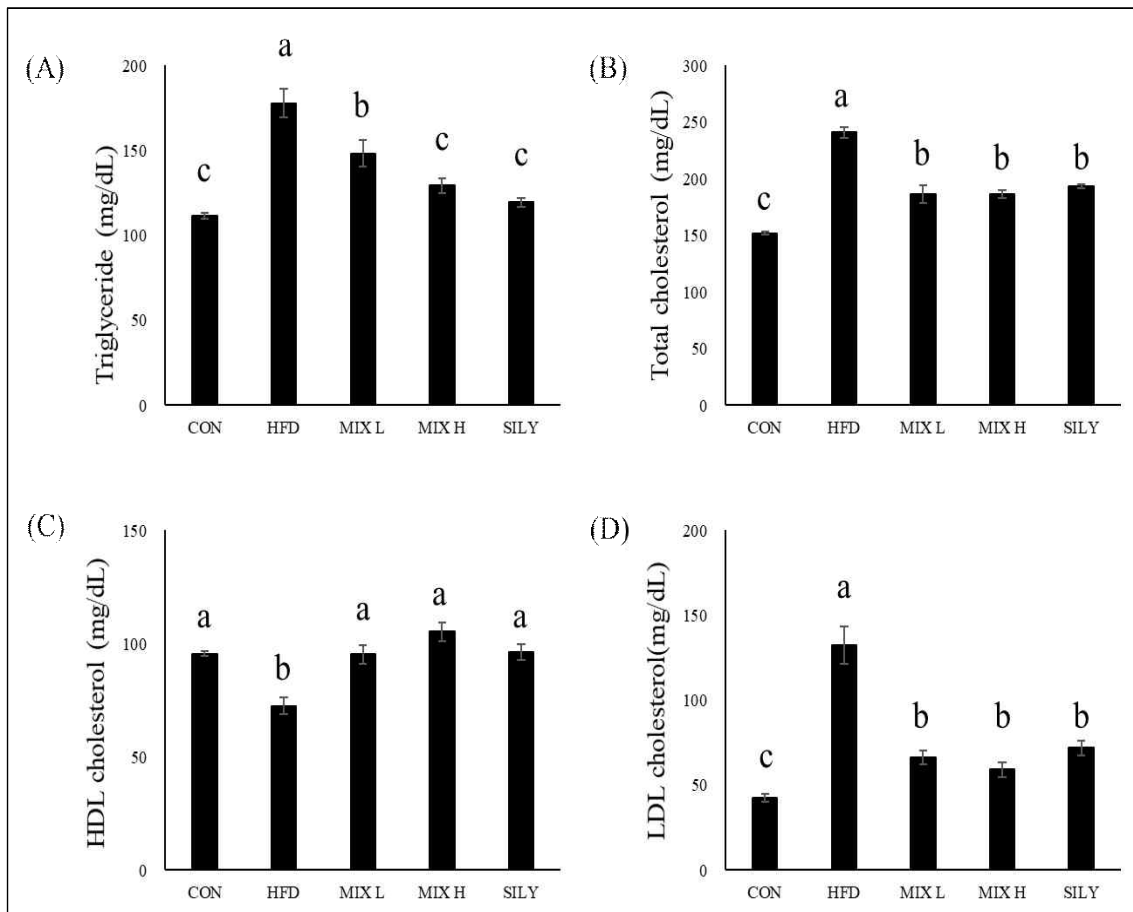


Fig 21. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on serum (A) triglyceride (B) total cholesterol (C) high density lipoprotein cholesterol (D) low density lipoprotein cholesterol

Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

비알콜성지방간 질환의 특징 중 하나는 이상지질혈증이 동반되는 것임. 이상지질혈증이란 지단백 대사 이상으로 혈액의 지방 대사가 비정상적으로 일어나는 질환으로 혈액 중에 지질이나 지방 성분이 많은 상태를 의미함. 지단백은 저밀도지단백 콜레스테롤(LDL-CHO), 고밀도지단백 콜레스테롤(HDL-CHO), 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TC)임. Fig 3은 강황 + 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 혈액 중의 지단백의 함량을 kit를 통해 측정된 결과임. TG는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 감소되었으며 MIX L군 보다 MIX H군에서 더 효과적으로 감소하였음. TC는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 감소하였음. 또한 LDL-CHO에서 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 감소되었음. 반대로 지질이 상대적으로 적은 HDL-CHO는 CON군에 비해 HFD군의 값이 유의하게 감소되었고 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 증가하였음. 따라서 고지방식이 섭취로 인한 이상지질혈증은 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취로 조절됨을 확인할 수 있었음

(5) 혈중 유리 지방산 측정 결과

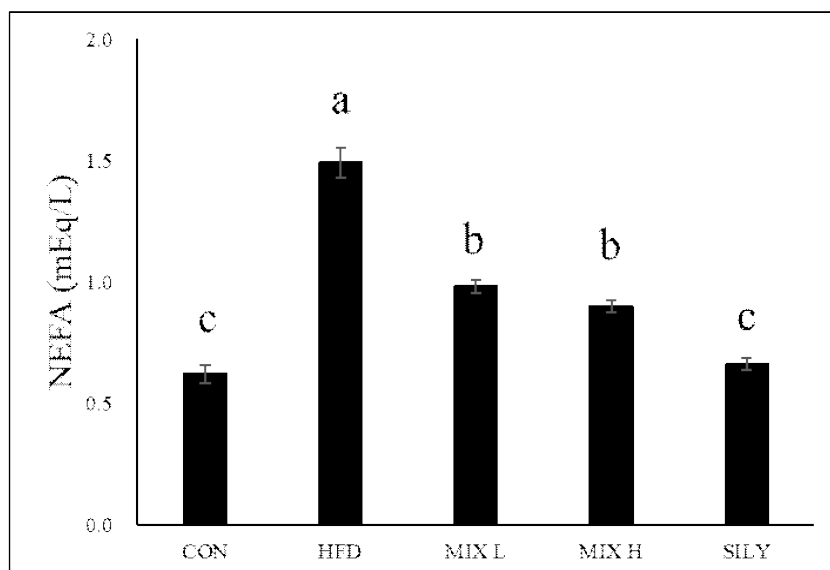


Fig 22. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on serum non-easterified fatty acid Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

지방세포에 저장된 중성지방은 가수 분해되어 유리지방산(non-easterified fatty acid, NEFA)의 형태로 간에 전달되고 이는 간에서 다양한 경로를 통해 중성지방이나 콜레스테롤로 만들어지게 됨. 따라서 혈중의 유리지방산을 줄이는 것은 비알콜성지방간을 완화하는데 중요하다고 볼 수 있음. Fig 22는 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 혈액 중의 유리지방산을 kit를 통해 측정한 결과임. 혈중 유리지방산은 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가하였지만 MIX L군, MIX H군에서 감소하였음. 따라서 고지방식이 섭취로 인한 혈중 유리지방산의 증가는 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취로 인해 효과적으로 감소된 것을 확인하였음

(6) 혈중 간 손상지표 측정 결과

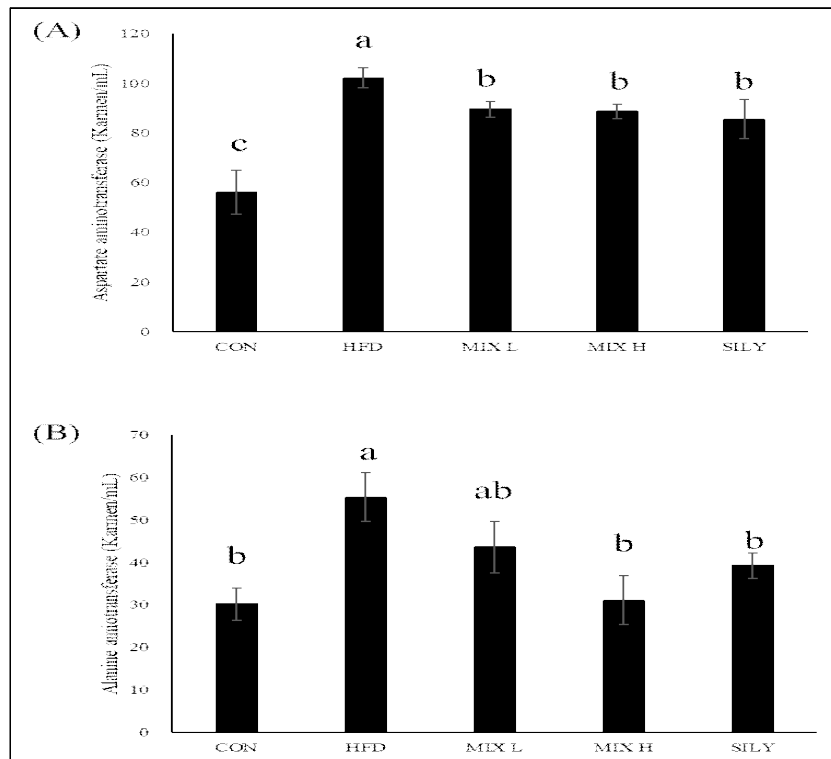


Fig 23. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on serum (A) aspartate aminotransferase (AST) and (B) alanine amiotransferase (ALT) levels

Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine amiotransferase (ALT)는 간에 다량 존재하는 효소로 간이 손상되었을 때 혈액 중으로 나오게 됨. 따라서 혈액 중의 AST, ALT의 증가로 비알콜성지방간이 유도되었음을 짐작할 수 있음

Fig 23은 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 배대동맥에서 채취한 혈청의 AST, ALT를 kit를 통해 측정된 결과임. AST는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가하였고 MIX L군, MIX H군에서 감소하였음. ALT는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX H군에서 감소하였음. 따라서 고지방식이 섭취로 인해 증가된 혈청의 AST, ALT의 수치를 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취가 효과적으로 조절하는 것을 확인하였음

#### (7) 간의 지질 측정 결과

##### 1) 간 H&E Staining 결과

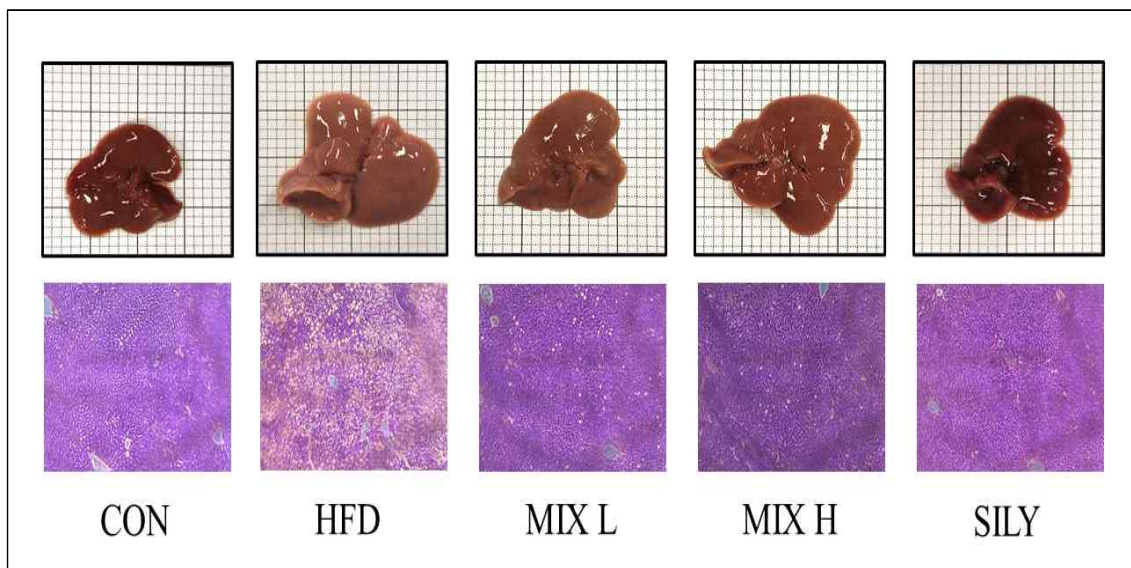


Fig 24. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts lipid accumulation in C57BL/6 mice fed with high fat diet

Fig 24는 간의 지방증 정도를 확인하기 위해 마우스 해부 후 채취한 간을 H&E 염색한 결과임. CON군에서 채취한 간은 말랑하고 매끈하며 검붉은색을 띄고 있고, H&E 염색 결과 지방은 보이지 않았음. 양성대조군으로 사용한 SILY군에서 역시 CON군과 동일하게 매끈하고 검붉은색을 띄고 있지만 크기는 조금 큰 것으로 보임. 반면 HFD군의 간은 지방증이 유도되어 크기도 커지고 조금 단단하고 하얗게 변하였음. H&E 염색 결과에서도 다량의 지방을 확인할 수 있었음. 하지만 MIX L군과 MIX H군의 간에서 HFD군의 간보다 더 짙은 붉은색을 띄고 염색 결과에서도 HFD군에 비해 적은 지방의 양을 보이기 때문에 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취를 통해 간의 지방축적을 완화시키는 것을 추측할 수 있음. 하지만 육안으로 관찰한 것이기 때문에 유의미한 결과 값을 얻기 위해 TG, TC, HDL-CHO, LDL-CHO kit를 통해 간에서의 지방의 양을 측정하였음

2) 간 TG, TC, HDL-CHO, LDL-CHO 측정 결과

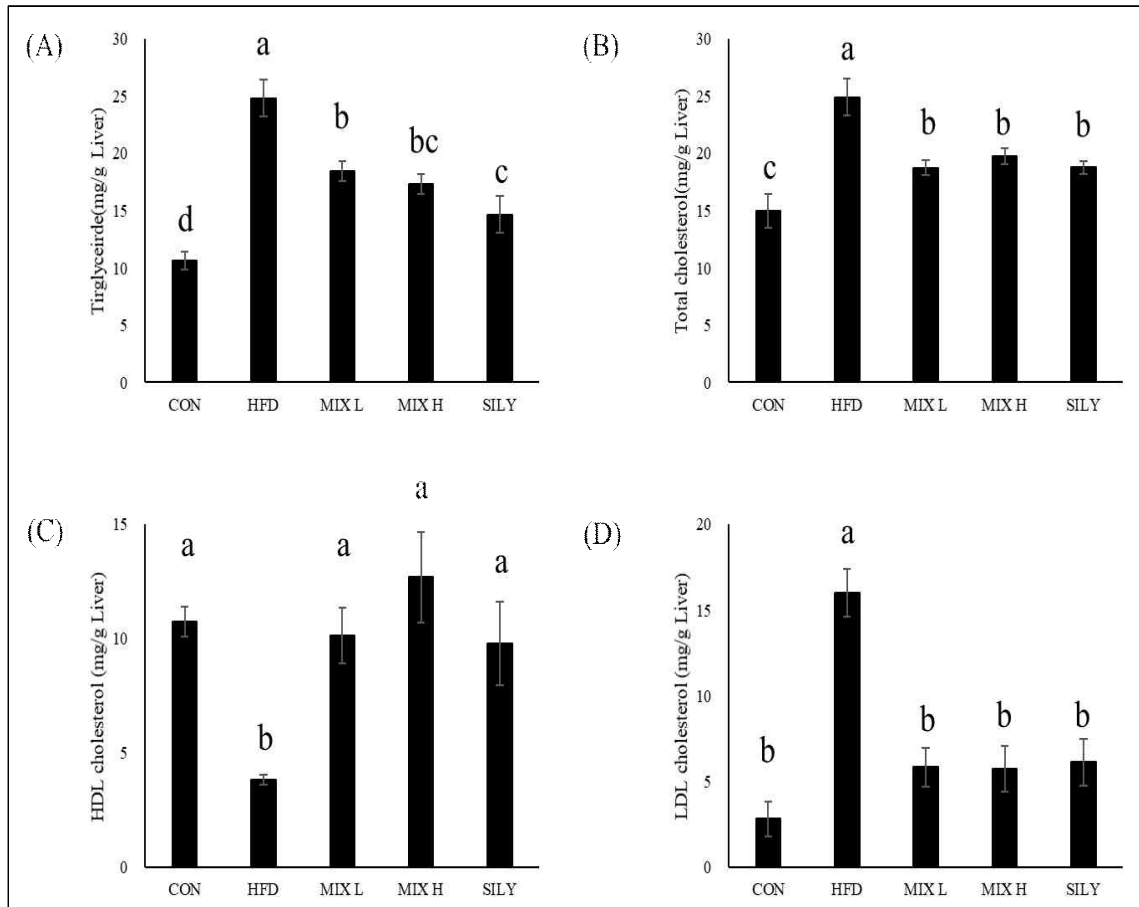


Fig 25. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on liver (A) triglyceride (B) total cholesterol (C) high density lipoprotein cholesterol (D) low density lipoprotein cholesterol

Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

Fig 25는 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간의 지단백을 kit를 통해 측정한 결과임. TG는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 감소되었으며 MIX L군 보다 MIX H군에서 더 효과적으로 감소되었음. TC는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 감소되었음. 또한 LDL-CHO에서 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 유의하게 감소되었음. 반대로 HDL-CHO는 CON군에 비해 HFD군의 값이 유의하게 감소되었고 MIX L군, MIX H군, SILY군에서 효과적으로 증가되었음. 따라서 고지방식이 섭취로 인한 이상지질혈증을 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취로 인해 효과적으로 조절되는 것을 확인하였음

(8) 간의 항산화인자 측정 결과

고지방식이로 인한 지방축적은 체내의 ROS를 증가시키며 이로 인한 산화스트레스는 지방간을 비알콜성지방간염까지 발생시킨다고 알려져 있음. 따라서 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취가 산화 과정에서 발생하는 산화물질들을 항산화효소를 통해 감소시켜 비알콜성

지방간을 완화시키는지 확인하고자 다음의 항산화인자들을 측정하였음

① Superoxide dismutase (SOD)

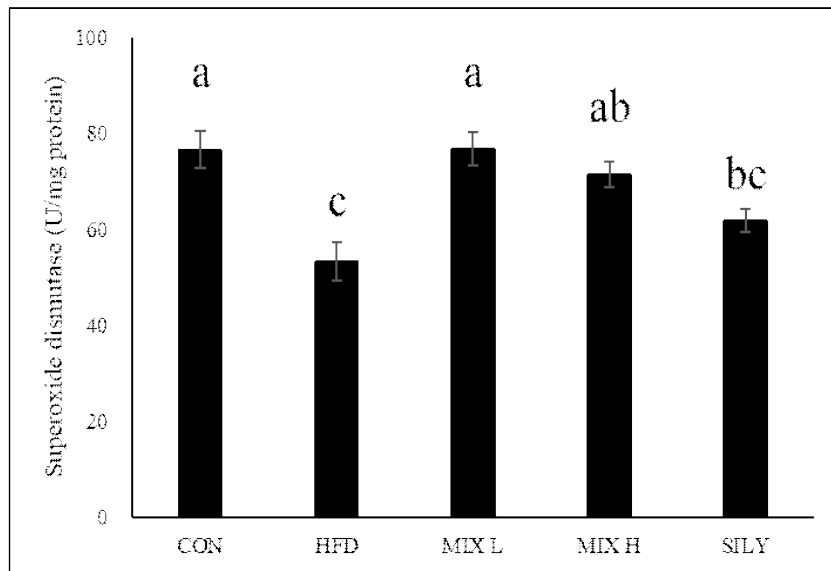


Fig 26. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on liver superoxide dismutase (SOD) Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

Superoxide dismutase(SOD)는 활성산소를 제거하는 강력한 항산화효소임. SOD는  $O_2$ 를 과산화수소( $H_2O_2$ )와 산소( $O_2$ )로 분해하여 활성산소의 독성을 감소시킴. Fig 26은 강황+유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여 SOD를 측정한 결과임. CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 감소되었지만 MIX L군, MIX H군에서 효과적으로 증가하였음. 따라서 고지방식이 섭취로 인해 증가된 산화스트레스를 강황+유자 추출혼합물의 섭취로 인해 SOD의 발현을 증가시킴으로 산화스트레스를 효과적으로 조절하였음

② Catalase(CAT)

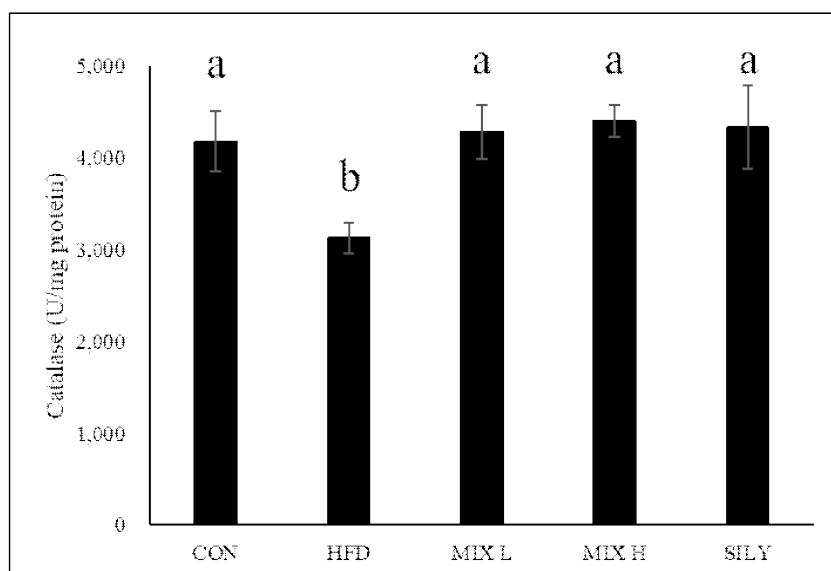


Fig 27. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts

in C57BL/6 mice fed with high fat diet on liver catalase (CAT)

Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b$ ), as determined using Duncan multiple test

Catalase (CAT)는 SOD에 의해 분해된 과산화수소( $H_2O_2$ )를 물( $H_2O$ )과 산소( $O_2$ )로 전환시켜 안정화하는 대표적인 항산화효소임. Fig 27은 강황+유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여 CAT를 측정된 결과임. CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 감소되었지만 MIX L군, MIX H군에서 효과적으로 증가하였음. 따라서 고지방식이 섭취로 인해 증가된 산화스트레스를 강황+유자 추출혼합물의 섭취로 인해 CAT 발현을 증가시킴으로 산화스트레스를 효과적으로 조절하였음

### ③ 글루타티온 효소

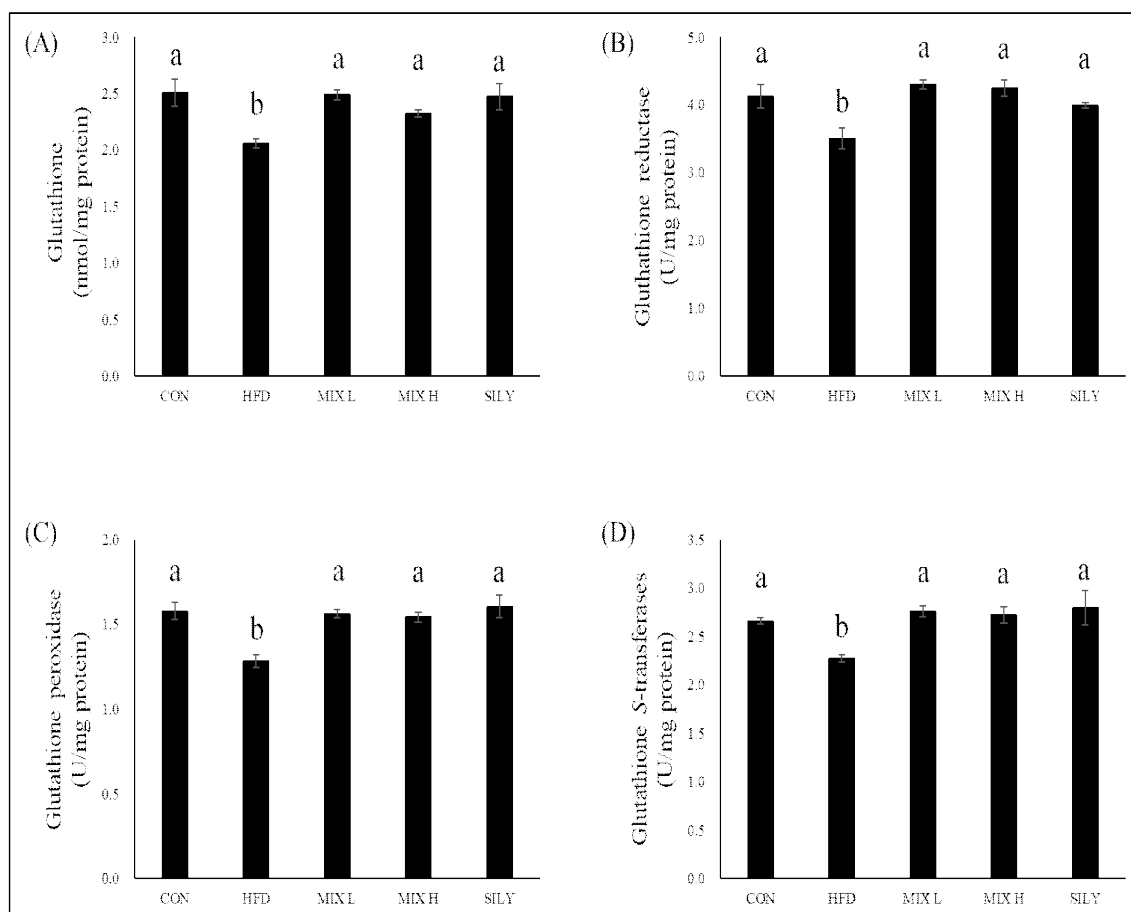


Fig 28. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on liver glutathione (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST). Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b$ ), as determined using Duncan multiple test

글루타티온 효소는 강력한 항산화제로 체내에서 생성됨. Fig 28은 강황+유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여 glutathione (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST)를 측정된 결과임. GST는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 감소되었지만 MIX L군, MIX H군에서 효과적으로 증가되었음. GR은 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 감소되었지만 MIX L군, MIX H군에서 효과적으로 증가되었음. GPx는 CON

군에 비해 HFD군에서 유의하게 감소되었지만 MIX L군, MIX H군에서 효과적으로 증가되었음. GST는 CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 감소되었지만 MIX L군, MIX H군에서 효과적으로 증가되었음. 따라서 고지방식이 섭취로 인해 증가된 산화스트레스를 강황+유자 추출혼합물의 섭취로 인해 글루타티온계효소의 발현을 증가시킴으로 산화스트레스를 효과적으로 조절하였음

(9) 간의 MDA 측정 결과

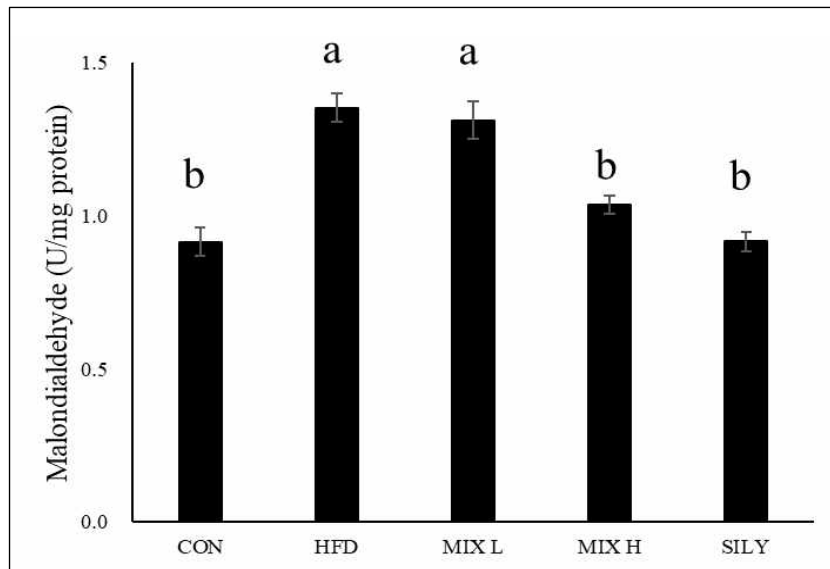


Fig 29. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on liver malondialdehyde (MDA)  
Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b$ ), as determined using Duncan multiple test

Malondialdehyde (MDA)는 지질 과산화 반응에 의해 생산되는 물질로 다량 생성되면 간의 섬유화를 유발하는 물질임. 따라서 MDA를 줄이는 것은 비알콜성지방간질환을 완화하는데 중요한 요소임

Fig 29는 강황+유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여 MDA를 측정된 결과임. CON군에 비해 HFD군에서 유의하게 증가되었지만 MIX H군에서 효과적으로 증가하였음. 따라서 고지방식이 섭취로 인해 증가된 지질 과산화 생성물을 강황+유자 추출혼합물의 섭취로 인해 효과적으로 조절하였음

7-5. 강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 기전 규명

가. 실험 방법

(1) RNA 추출

간에서 RNA를 추출하기 위해 easy-BLUE™ total RNA extraction kit (Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하였음. 간 조직에 easy-BLUE™ 을 30분 처리하여 5분마다 혼합하여 균질화하고, CHCl<sub>3</sub>를 처리하여 상층액을 분리함. Isopropanol을 처리하여 10분간 실온에서 방치하고 원심분리하여 상층액을 제거하였음. 75% ethanol을 처리하여 상층액을 제거하고 말리고 diethyl pyrocarbonate water (DEPC)에 녹여서 cDNA를 합성하였음

(2) cDNA 합성

cDNA 합성은 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,



USA)를 사용하였음. 추출한 RNA는 cDNA로 합성하기 위해서 nano-drop을 이용하여 RNA를 정량하였음. nanodrop으로 정량하고 추출한 RNA는 불안정하기 때문에 iScript cDNA synthesis kit를 이용하여 300 ng의 RNA를 complementary DNA (cDNA)로 합성하였음. 이렇게 합성한 cDNA에 primer와 iQ SYBR Green supermix를 넣어 RT-PCR을 진행하였음

(3) RT-PCR 측정

실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)은 SYBR green Real-time PCR Kit (Bio-Rad)를 사용하였고 사용된 primer sequence는 Table 2와 같음. 합성한 cDNA를 PCR plate에 1  $\mu$ L 넣고, primer 1  $\mu$ L, DEPC 2  $\mu$ L, enzyme mix 5  $\mu$ L을 넣고 PCR을 진행하여 SYBR의 발현정도를 확인하였음

Table 2. RT-PCR sequence

Gene	sequence (5-3)
F-mAMPK	5'-TTCGTGCCGCCCTTT-3'
R-mAMPK	5'-GGTCAGCATGCCCACAAAA-3'
F-mPPARa	5'-TGGCAAAAGGCAAGGAGAAG-3'
R-mPPARa	5'-CCCTCTACATAGAACTGCAA-3'
F-mCPT1	5'-GTGACTGGTGGGAGGAATAC-3'
R-mCPT1	5'-GAGCATCTCCATGGCGTAG-3'
F-mSREBP-1c	5'-CCAGAGGGTGAGCCTGACAA-3'
R-mSREBP-1c	5'-AGCCTCTGCAATTTCCAGATCT-3'
F-mFAS	5'-GAAGTGTCTGGACTGTGTCATTTTAC-3'
R-mFAS	5'-TTAATTGTGGGATCAGGAGAGCAT-3'
F-mACC	5'-TCCCCAAGTTCTTCACGTTCA-3'
R-mACC	5'-CAGGCTCCAAGTGGCGATAA-3'
F-mCD36	5'-TTGAAGGCATTCCCACGTATC-3'
R-mCD36	5'-CGGACCCGTTGGCAAA-3'
F-mFATP2	5'-GGAACCACAGGTCTTCCAAA-3'
R-mFATP2	5'-TAAAGTAGCCCCAACACGA-3'
F-mFATP5	5'-CTACGCTGGCTGCATATAGATG-3'
R-mFATP5	5'-CCACAAAGGTCTCTGGAGGAT-3'

(4) 통계 처리

본 실험의 결과 분석은 SPSS (Statistical package for social science version 25.0, SPSS Inc., Chicago, USA)통계 프로그램을 사용하였고 실험군의 측정항목의 결과는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였음. 실험그룹 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 확인하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan의 다중검정법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였음 ( $p < 0.05$ )

나. 실험 결과

(1) RT-PCR을 통한 지방흡수인자 측정 결과

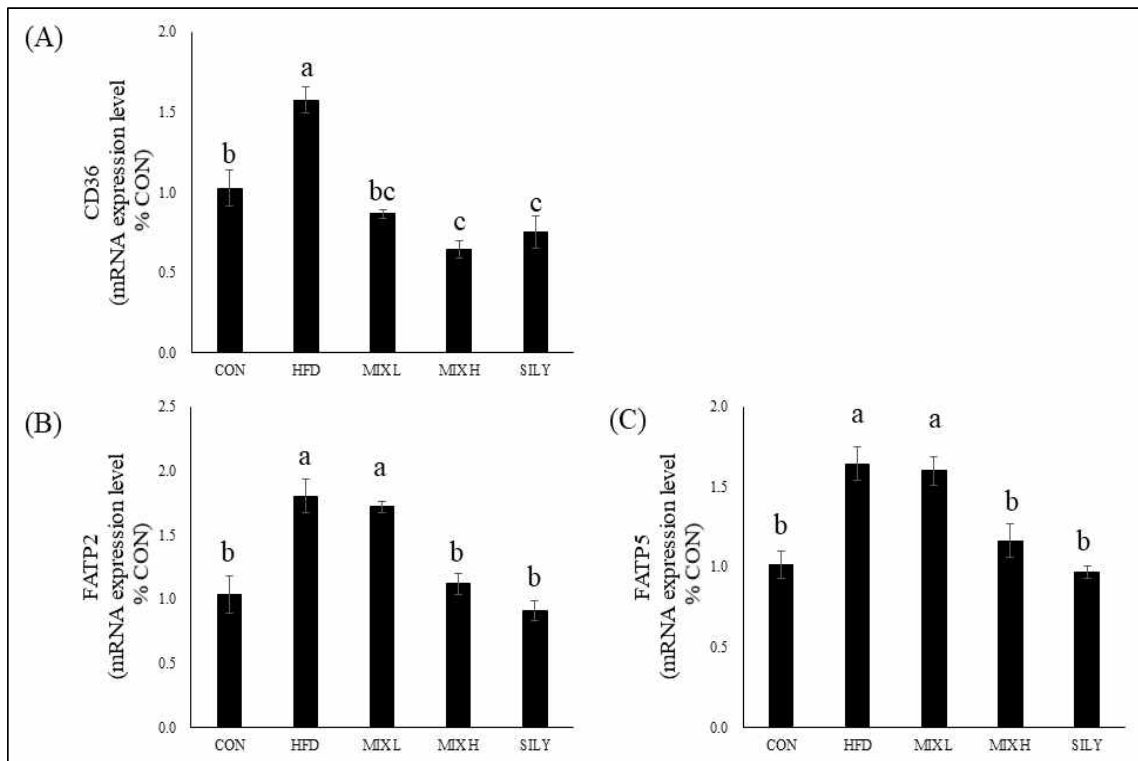


Fig 30. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on liver fatty acid uptake mRNA expression. The mRNA expression level of cluster of differentiation 36 (CD36), fatty acid transport protein 2 (FATP2), fatty acid transport protein 5 (FATP5) in C57BL/6 mice. Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test.

지방간의 분자생물학적 기전을 확인하고자 RT-PCR을 진행하였음. 비알콜성지방간이 진행되면 세포막에 있는 지방흡수인자의 발현이 증가되어 간으로의 지방산유입이 증가됨. Fig 30.은 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여 지방흡수인자(CD36, FATP2, FATP5)의 발현을 측정된 결과임. 고지방식을 섭취한 간에서는 지방흡수인자들의 발현이 증가하였지만 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취군에서는 유의하게 감소하였음. 또한 MIX L군에 비해 MIX H군에서 효과적으로 감소하였음

(2) RT-PCR을 통한  $\beta$ -산화 인자 측정 결과

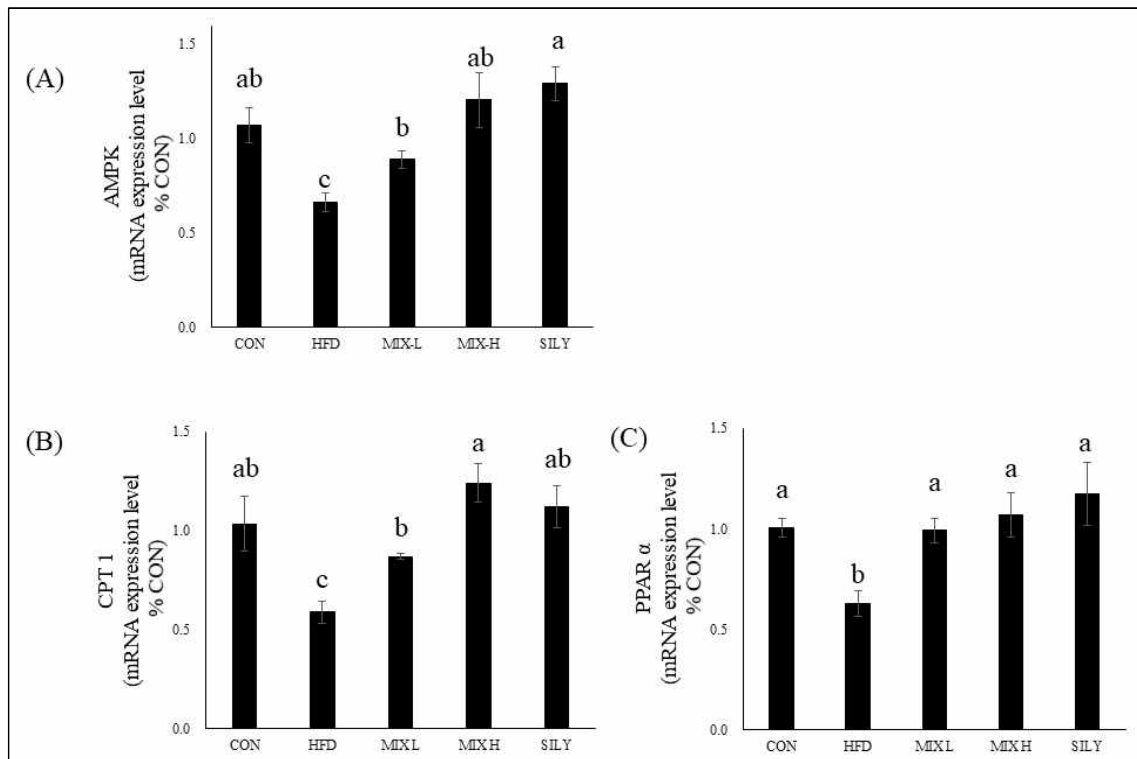


Fig 31. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on  $\beta$ -oxidation mRNA expression

The mRNA expression level of AMP-activated protein kinase (AMPK), peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) in C57BL/6 mice. Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b$ ), as determined using Duncan multiple test

지방간의 분자생물학적 기전을 확인하고자 RT-PCR을 진행하였음. 비알콜성지방간이 진행되면 지방의  $\beta$ -산화인자의 발현이 감소되어 간에서의 지방축적을 유도함. 특히 간에서 지방산의 산화는 AMPK 경로를 통해 일어나기 때문에 AMPK의 발현에 따른  $\beta$ -산화과정이 중요함. Fig 31은 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여  $\beta$ -산화인자인 AMPK, CPT-1, PPAR $\alpha$ 의 발현을 측정 한 결과임. 고지방식이를 섭취한 간에서는 지방흡수인자들의 발현이 감소하였지만 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취군에서는 유의하게 증가하였음

### (3) RT-PCR을 통한 지방합성인자 측정 결과

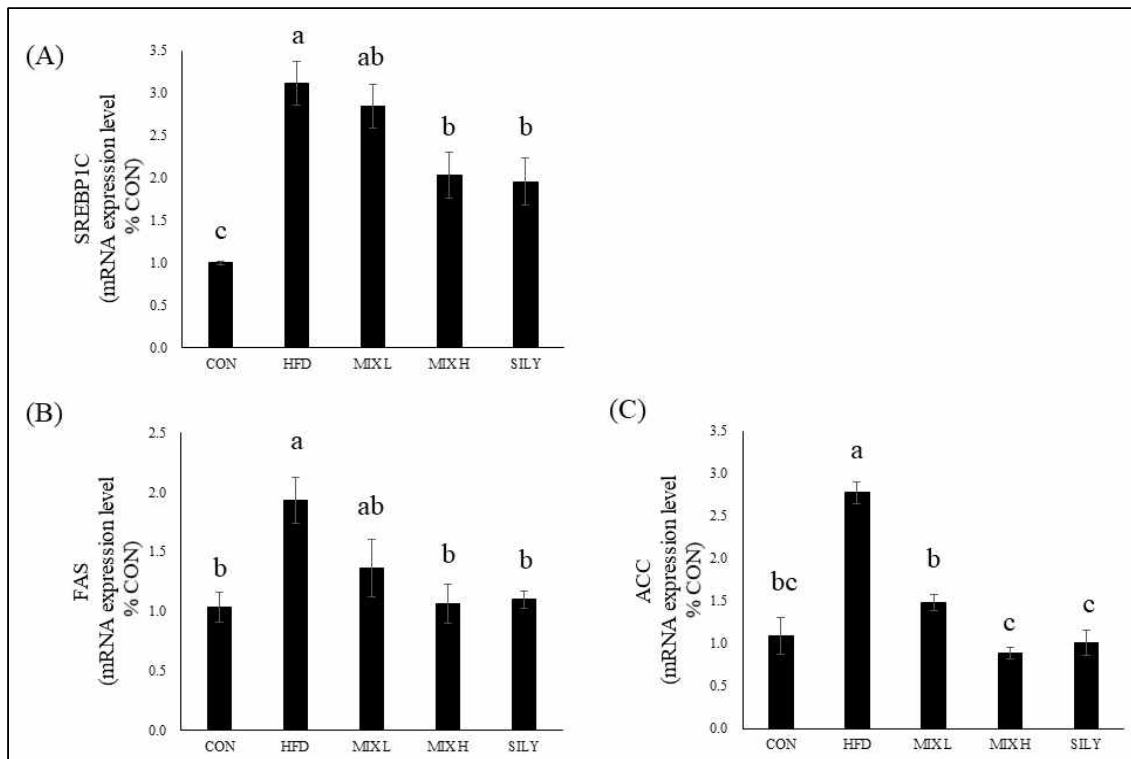


Fig 32. Effect of *Curcuma longa* L. ethanol and *Citrus junos* water mixed extracts in C57BL/6 mice fed with high fat diet on lipogenesis mRNA expression

The mRNA expression level of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC) in C57BL/6 mice. Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ), as determined using Duncan multiple test

지방간의 분자생물학적 기전을 확인하고자 RT-PCR을 진행하였음. 비알콜성지방간이 진행되면 지방합성인자의 발현이 증가되어 지방축적을 유도함. 특히 지방축적은 상위 인자인 AMPK의 감소가 지방합성인자인 SREBP-1c의 발현을 증가시키고 이로 인해 간에 지방이 쌓이게 됨

Fig 32.는 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 비알콜성지방간의 완화 효과를 확인하고자 마우스의 간을 균질화하여 지방합성인자인 SREPB-1c, FAS, ACC의 발현을 측정된 결과임. 고지방식을 섭취한 간에서는 지방합성인자들의 발현이 증가하였지만 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취군에서는 유의하게 감소하였음

## 7-6. 결론

주관기관에서 제공받은 강황물추출물(Curcumin 0.21 mg/g), 강황20%주정추출물(Curcumin 1.93 mg/g), 유자물추출물(Hesperidin 17.98 mg/g), 유자20%주정추출물(21.12 mg/g)들 중 간기능 개선에 가장 좋은 효과를 보이는 시료를 찾기 위해 총 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, 라디칼 소거능, 세포내 ROS 수준, 세포내 지방 함량을 측정하였음. 그 결과 모든 시료에서 세포내 지방 축적 억제, ROS 수준 억제를 하는 것을 확인 할 수 있었음. 그래서 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 높은 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합하여 사용하였음

강황20%주정추출물과 유자물추출물을 혼합하여 사용하였는데 혼합비율을 1:1, 2:1, 1:2

로 설정하여 세포내 지방 함량을 측정하였음. 지방 함량을 측정한 이유는 간 기능 개선을 위해서 ROS를 억제하는 것도 중요하지만 ROS가 생기게 만드는 것이 지방이기 때문에 지방 함량 측정하여 어떤 비율로 혼합하였을 때 가장 효과가 뛰어난지 확인하기 위해 지방 함량을 측정하였음. 측정 한 결과 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합하였을 때 지방 축적을 20% 억제하는 것을 확인할 수 있었음. 1:2나 2:1로 혼합하였을 때는 1:1로 혼합한 것보다 지방 축적을 5-10% 정도 억제하는 것으로 보였음. 그래서 이 결과를 토대로 강황20%주정추출물과 유자물 추출물을 1:1로 혼합하여 실험을 진행하였음

강황20%주정추출물과 유자물추출물을 1:1로 혼합하여 ROS 억제능, 지방 함량을 측정하였을 때 50 µg/mL 부터 ROS 억제능을 보였으며 100 µg/mL 에서부터 지방 함량 억제하는 것을 확인 할 수 있었음

결론적으로 강황20%주정추출물과 유자물추출물을 단일로 사용하였을 경우 100 µg/mL 농도에서 어느 정도 효과가 있었지만 크게 감소하는 것을 확인 할 수 없었음. 그러나 강황 20%주정추출물 50 µg/mL 과 유자물추출물 50 µg/mL을 서로 혼합하여 사용하였을 때 효과가 단일로 처리했을 때보다 더 효과가 있는 것으로 확인되었음. 즉, 강황과 유자를 혼합하였을 때 간에 더 좋은 효과를 볼 수 있었으며, 추후 동물실험을 진행할 때 강황과 유자를 1:1로 혼합한 시료를 사용하는 것이 좋을 것으로 판단됨

전년도 연구에서 강황과 유자를 혼합하여 처리하였을 때 지방축적억제 효과가 있음을 세포 수준에서 확인하였음. 이를 기반으로 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취를 통한 비알콜성지방간 억제 효과를 동물 수준에서 확인하기 위해 12주간 실험을 진행하였음. 동물은 음성대조군(CON), 고지방식이군(HFD), 고지방식이군+ 강황+ 유자 추출혼합물 저농도(MIX-L), 고지방식이군+ 강황+ 유자 추출혼합물 고농도(MIX-H), 고지방식이군+ 실리마린 (SILY)으로 나누어 실험을 진행하였음. 비알콜성지방간은 비만, 이상지질혈증, 당뇨병등의 질환이 동반되어 나타나기 때문에 체중의 유의차를 보일 때까지 실험을 진행하였음. 고지방식이의 섭취로 인한 체중의 증가와 혈액에서 증가된 TG, TC, LDL-CHO의 값은 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취를 통해 유의하게 감소한 것을 확인하였음. 또한 고지방식으로 인해 증가된 간손상인자(AST, ALT)와 유리지방산, 간에서의 지방축적으로 인해 증가된 MDA의 값 역시 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취로 인해 감소되었음. 또한 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취에 따른 비알콜성지방간의 분자생물학적 기전을 확인하기 위한 RT-PCR 결과 고지방식이군에서 지방흡수인자의 증가로 인해 간으로 유입되는 지방산의 양이 증가하였고 간세포에서는 AMPK 발현의 감소로 인해 지방산화인자의 발현은 감소되고 지방합성인자는 증가되어 간에서의 지방축적을 증가하였음. 하지만 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취를 통해 간으로 들어오는 지방산의 유입을 감소시키고, AMPK의 발현을 증가시켜 지방산화인자의 발현을 증가시키고, 지방합성인자는 감소시켜 간에서 지방축적을 억제하는 기작을 보였음

결론적으로 강황+ 유자 추출혼합물의 섭취는 마우스 혈액과 간의 지방축적 양을 감소시키고 산화스트레스를 감소시켜 비알콜성지방간 기능 개선에 효과적임을 확인하였고, 분자적 기작을 통해서도 비알콜성지방간 기능 개선 효과를 확인하였음

## 8. 강황+ 유자 추출혼합물 기억력 개선 기능평가

### 8-1. 강황, 유자추출물에 대한 라디칼 소거능

#### 가. 실험 방법

- (1) 강황, 유자추출물을 대상으로 DPPH (1,1-dephenyl- 2-picrylhydrazyl)법을 이용한 라디칼 소거능 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)시약 자체가 질소 중심의 라디칼 형태이며, 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정화된 상태로 존재 하고 있음. DPPH시약을 100% ethanol에 녹인 후 517nm에서 흡광도가 0.9~1이 되게끔 농도를 조절한 뒤 96-well plate에 농도별로 시료 25  $\mu$ L와 DPPH시약 225  $\mu$ L을 넣고 plate reader기를 이용하여 흡광도 517 nm에서 측정함

#### 나. 실험 결과

- (1) 강황, 유자추출물을 대상으로 DPPH (1,1-dephenyl- 2-picrylhydrazyl)법을 이용한 라디칼 소거능 측정 결과

강황, 유자 단독 추출물 대상으로 하여 radical scavenging 능력을 확인하기 위하여 DPPH assay를 실시함. 각 추출물을 0.1 mg/mL 및 0.5 mg/mL의 농도로 하여 측정함 결과 0.5 mg/mL의 농도에서 라디칼 소거능이 높게 나옴을 확인할 수 있었음. 이는 각각의 소재들이 일정농도 이상에서는 항산화능을 가지고 있다고 유추할 수 있음

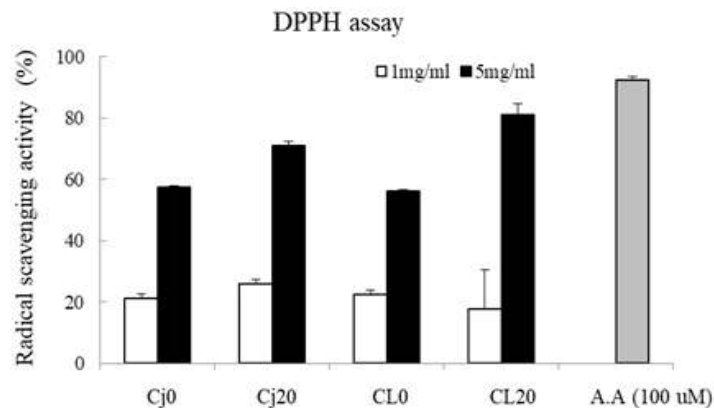


Fig 33. 강황 및 유자 추출물의 라디칼 소거능 검색

Cj0: *Citrus junos* extract (Hot water) /Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) /CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH)

### 8-2. 강황, 유자추출물에 대한 세포독성 확인

#### 가. 실험 방법

- (1) 강황, 유자 단독 추출물 대상 NO 생성 억제 효능 평가

강황, 유자의 단독 추출물을 대상으로 griess assay 방법을 이용하여 NO의 생성 억제 정도를 시료의 농도별로 측정함. 우선 brain 에서 macrophage 역할을 하는 BV2 cell (mouse micro glia cell)을 24well plate에 seeding 후 각 시료를 농도별로 처리하고 처리 후 16시간 지난 뒤 LPS (lipopolysaccharide, 1 mg/mL)를 24시간 처리함. 이후 배지를 수거하여 배지에서의 NO product를 측정함

- (2) 강황, 유자 단독추출물 대상으로 cell cytotoxicity 측정

각 시료의 세포 독성을 보기 위해 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 방법을 이용하여 cell cytotoxicity를 측정함.

Neuro2A cell (mouse neuronal cell line) 을 대상으로 하여 96 well plate에 seeding 후 각 시료를 농도별 처리하여 시료의 독성을 측정함. 상기 독성검사를 기반으로 최대 활성, 유효 효능 및 저독성을 보인 시료를 각 과제별 최종시료로 선정하여 나머지 *in vitro* test를 실시함

(3) 강황, 유자 단독추출물 대상으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 Aβ처리에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과 검색

신경 세포주인 Neuro2A cell을 antimicrobics/antibiotics, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가 2x10<sup>5</sup>cell/mL가 되도록 seeding 한 후 16시간 지난 후에 각각의 시료(10μL/well)를 처리함. 시료 처리 후 16-24시간 뒤에 400 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 6시간 처리하여 oxidative stress를 유도하여 소재의 보호효과를 측정함

(4) 강황, 유자 단독 추출물 대상 뇌세포 신호전달물질 (acetylcholine) 분해효소(acetylcholinesterase) 억제능 검색

뇌신경세포를 1x10<sup>7</sup>/mL로 100 mm dish에 seeding 후 강황, 유자 단독 추출물을 처리하고 24시간 이후에 cell lysis buffer를 이용하여 cell lysate를 얻은 후, 뇌세포 신호전달물질 분해 효소 (Acetylcholinesterase, AChE) 의 활성 억제 효과를 Ellan's method를 이용하여 측정함

(5) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 cytotoxicity 측정

1차적으로 강황 및 유자 단독 추출물의 효능 screening을 통하여 강황 20% 주정 추출물, 유자 물 추출물, 유자 20% 주정 추출물을 선택하였음. 이를 대상으로 다음과 같은 비율로 임의 설정하여 cell cytotoxicity를 각 시료의 세포 독성을 보기 위해 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 방법을 이용하여 cell cytotoxicity를 측정함

- CL20: *Curcuma longa* extract (20% EtOH)
- Cj0: *Citrus junos* extract (Hot Water)
- Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

	Cj0					Cj20			
CL20	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100	75:25	50:50	25:75	0:100

(6) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 뇌세포 신호전달물질 (acetylcholine) 분해효소(acetylcholinesterase) 억제능 검색

뇌신경세포를 1x10<sup>7</sup>/mL로 100 mm dish에 seeding 후 강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 처리하고 24시간 이후에 cell lysis buffer를 이용하여 cell lysate를 얻은 후, 뇌세포 신호전달 물질 분해 효소 (Acetylcholinesterase, AChE) 의 활성 억제 효과를 Ellan's method를 이용하여 측정함

(7) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 SOD (superoxide dismutase) 활성 검색

강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 하여 SOD kit (Dojindo molecular technology, Japan)를 이용하여 SOD 효소의 활성 증진 효과를 측정함

(8) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 Catalase 활성 검색

강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 하여 Catalase kit (Biovision, USA)를 이용하여 catalase 효소의 활성 증진 효과를 측정함

(9) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 AChE 활성 억제 검색

강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 다시 배합하여 AChE 활성을 다시 확인하기로 함. 배

합비를 세분화 하여 효능 평가를 진행하여 효능이 높은 배합비를 최종 선정함. 뇌신경세포를  $1 \times 10^7$ /mL로 100 mm dish에 seeding 후 24시간 뒤에 강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 처리하고 24시간 이후에 cell lysis buffer (0.1 % tritonx100 in PBS)를 이용하여 cell lysate를 얻은 후, 뇌세포 신호전달 물질 분해 효소 (Acetylcholinesterase, AChE)의 활성 억제 효과를 Ellan's method를 이용하여 plate reader (Model 550; Bio-Rad Laboratories, CA, USA)로 측정함

(10) 선정된 강황+ 유자 추출혼합물 대상 세포 독성 및 세포 보호 효과 검색

MTT solution((M5655, Sigma)2.5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였다. 뇌신경 세포인 Neuro2A 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 총 용적을 100  $\mu$ L이 되도록 분주하였으며, 배양액은 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용함. 16-24시간 동안 세포를 배양한 후 추출혼합물을 10, 50, 100, 1000, 10000  $\mu$ g/mL로 처리하여 24시간 동안 배양함. 그 후, MTT solution 10  $\mu$ L를 첨가하여 빛에 의한 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하고 1시간 30분 동안 반응시켰음. 배양액과 MTT reagent를 제거하고 각 well 당 DMSO 200  $\mu$ L를 첨가하여 용해시켰으며, 10분 후 판독기 (Model 550; Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 광학 밀도(optical density)를 측정함. 세포 보호 효과는 위의 실험과 유사한 방법으로 진행하며, 세포 독성이 나타나지 않는 농도 범위로 추출혼합물을 10, 50, 100  $\mu$ g/mL로 처리 후 2시간 뒤에 neuronal cell death를 유발하는  $A\beta_{25-35}$  (25 $\mu$ M)를 24시간 처리하여 oxidative stress를 유도하여 소재의 뇌신경 세포 보호효과를 측정함

(11) 선정된 강황+ 유자 추출혼합물 대상 Catalase 및 SOD활성 증진 *in vitro* 상에서 세포 내의 SOD활성 및 catalase 활성을 측정하기 위하여 SOD 측정 kit (Dojindo molecular technology, Japan) 및 catalase assay kit (biovision, USA)를 이용하여 측정함

(12) 선정된 강황+ 유자 추출혼합물 대상 AChE 억제 효과 확인

뇌신경세포를  $1 \times 10^7$ /mL로 100 mm dish에 seeding 후 24시간 뒤에 강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 처리하고 24시간 이후에 cell lysis buffer (0.1% Triton-X100 in PBS)를 이용하여 cell lysate를 얻은 후, 뇌세포 신호전달 물질 분해 효소 (Acetylcholinesterase, AChE)의 활성 억제 효과를 Ellan's method를 이용하여 plate reader (Model 550; Bio-Rad Laboratories, CA, USA)로 측정함

(13) 선정된 강황+ 유자 추출혼합물 대상 뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 및 관련 기작의 발현 영향 확인

$2 \times 10^5$ /well 의 Neuro2A 세포를 6 well plate에 분주하고 16시간 이후에 50, 100  $\mu$ g/mL 의 강황+ 유자 추출혼합물을 처리한 후 2시간 뒤에  $A\beta_{25-35}$  를 처리한 후 24시간 위에 세포를 수집하여 Ribospin Total RNA Purification Kits (GeneAll biotechnology, Korea)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출하였음. cDNA는 All-in-One 1st Strand cDNA synthesis Master Mix (CellSafe, Korea)를 이용하여 합성함. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 ABI Prism 7700 Sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)을 사용함

Table 3. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA



Gene	Primer sequences		SEQ.ID
GAPDH	Forward	ATGGGACGATGCTGGTACTGA	1
	Reverse	TGCTGACAACCTTGAGTCAAAT	2
BDNF	Forward	CGACATCACTGGCTGACACT	3
	Reverse	ATGTTTTCGGGCATCCAGGTA	4

다음으로는 protein level에서의 BDNF발현 및 관련 인자인 CREB signal 의 발현에 대한 시료의 영향을 western blotting을 이용하여 확인하였음.  $1 \times 10^6$ /well 의 Neuro2A 세포를 60 mm dish에 분주하고 16시간 이후에 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 강황+ 유자 추출혼합물 및 강황 20 % EtOH추출물(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 처리한 후 2시간 뒤에  $\text{A}\beta_{25-35}$  를 처리한 후 24시간 위에 세포를 수집하여 lysis buffer(0.5% triton X-100, 20 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 1 mM PMSF)를 이용하여 lysis를 진행함. 이후 8% 또는 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리 후 nitroceluose membrane에 transfer를 진행하였음. 이후 membrane을 5% (w/v) non-fat Difco™ skim milk blocking buffer로 1시간 처리 후 BDNF(Abchem), CREB(Santacruz Biotechnology), Phosphate-cyclic-adenosine monophosphate response element binding protein(p-CREB, Abchem), 및  $\beta$ -actin(Sigma Aldrich) antibody들을 1:1000, 1:500 또는 1:2000으로 하여 4°C에서 O/N 처리함. 2차 항체를 horseradish peroxidase-conjugated antibody를 1시간 처리한 후 Enhanced Chemiluminescence System(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 발현을 확인함

#### 나. 실험 결과

##### (1) 강황, 유자 단독 추출물 대상 NO 생성 억제 효능 평가

강황, 유자 단독 추출물 대상으로 하여 *in vitro* 에서 세포 대사 중 생성되는 radical 종류 중 하나인 NO (nitric oxide)를 Griess assay를 통하여 측정하였음. 그 결과, 고농도에서는 NO 발생이 증가되는 것으로 확인하였으며, 0.1 mg/mL 처리시 NO production이 억제됨을 확인할 수 있었음. 특히 강황20%주정추출물과 유자물추출물의 NO 생성 억제 효과능이 높은 것으로 확인됨

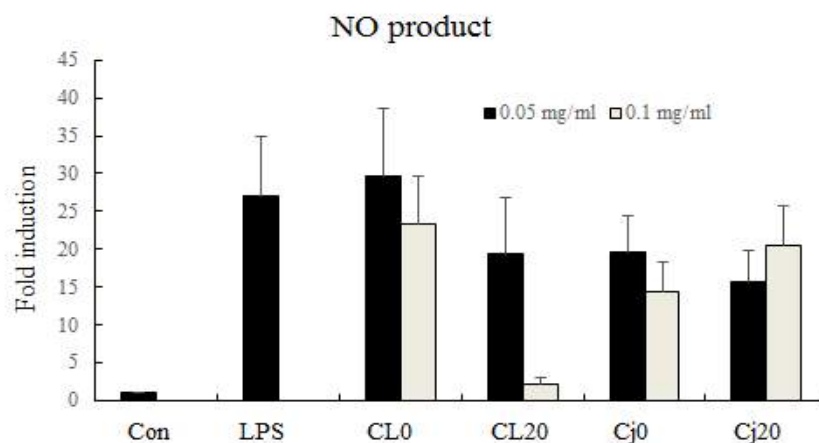


Fig 34. 강황, 유자 추출물의 산화질소 (NO) 생성 억제능

Cj0: *Citrus junos* extract (Hot water) /Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) /CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH)

##### (2) 강황, 유자 단독추출물 대상으로 cell cytotoxicity 측정

강황, 유자 단독 추출물 대상으로 하여 *in vitro* 에서 각 시료들의 세포독성 시험을 농도별로 투여 하여 실시함. 그 결과, 강황의 경우 20%주정추출물의 고농도 (1.0 mg/mL)의 처

리 시 세포독성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었으며, 다른 시료의 경우 유사한 양상을 나타냈음

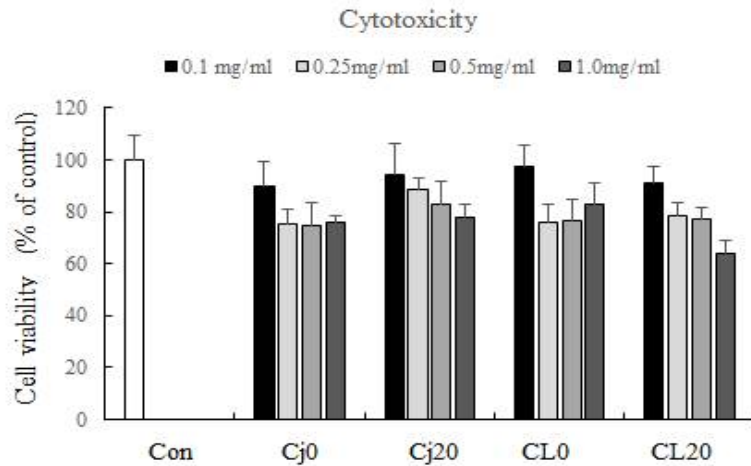


Fig 35. 강황, 유자 추출물의 세포 독성 측정 결과

Cj0: *Citrus junos* extract (Hot water) /Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) /CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH)

(3) 강황, 유자 단독추출물 대상으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 Aβ처리에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과 검색 결과

강황, 유자 단독 추출물 대상으로 하여 *in vitro* 에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 μM)을 처리하여 생성되는 산화적 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 시료의 뇌신경세포 보호효과를 관찰함. 그 결과, 유자물추출물, 유자 20%주정추출물 및 강황20%주정추출물 저농도에서 세포 보호 효과가 있는 것으로 나타남

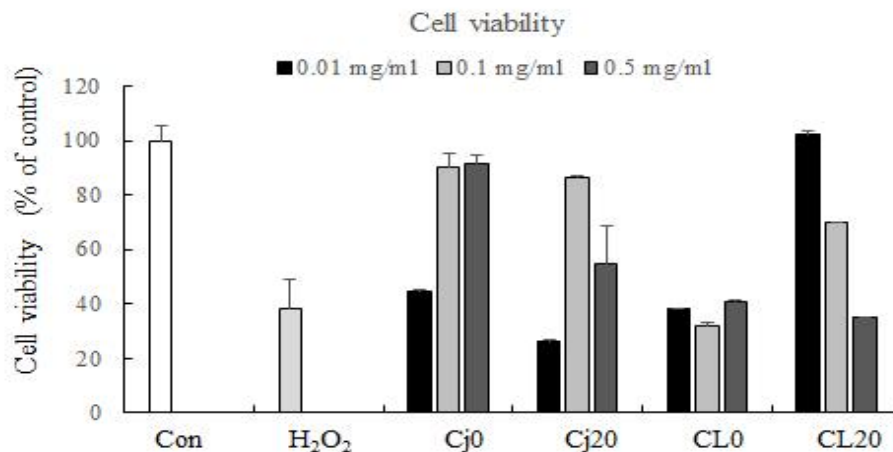


Fig 36. 강황, 유자 추출물의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과

Cj0: *Citrus junos* extract (Hot water) /Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) /CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH)

(4) 강황, 유자 단독 추출물 대상 뇌세포 신호전달물질 분해효소(acetylcholinesterase) 억제능 검색 결과

강황, 유자 단독 추출물 대상으로 하여 *in vitro* 에서 뇌세포 신호전달 물질 (acetylcholine)의 분해 효소인 acetylcholinesterase (AChE)의 활성 억제 효과를 확인하였음. 그 결과 유자20%주정추출물, 강황물추출물 및 20%주정추출물에서 활성 억제 효과가 있음을 확인하였음

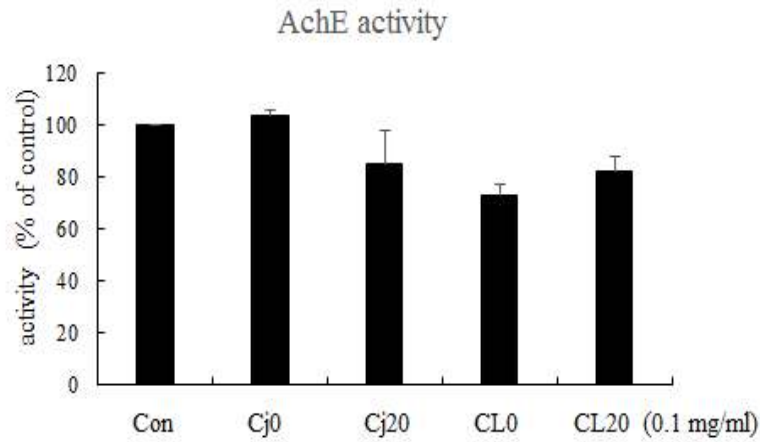


Fig 37. 강황, 유자 추출물의 뇌 신호전달물질 분해 효소(AChE)의 활성 효과  
 Cj0: *Citrus junos* extract (Hot water) /Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)  
 CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) /CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH)

(5) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 cytotoxicity 측정 결과

1차적으로 강황, 유자 단독 추출물의 효능 screening을 통하여 강황20%주정추출물, 유자물추출물, 유자20%주정추출물을 선택하였음. 이를 대상으로 다음과 같은 비율로 임의 설정하여 세포 독성을 보기 위해 cell cytotoxicity를 측정함

- 시료 선정 및 선정 시료의 배합 비율
- CL20: *Curcuma longa* L. extract (20% EtOH)
- Cj0: *Citrus junos* extract (Hot water)
- Cj20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

(%)	Cj0					Cj20				
CL20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100	75:25	50:50	25:75	0:100	

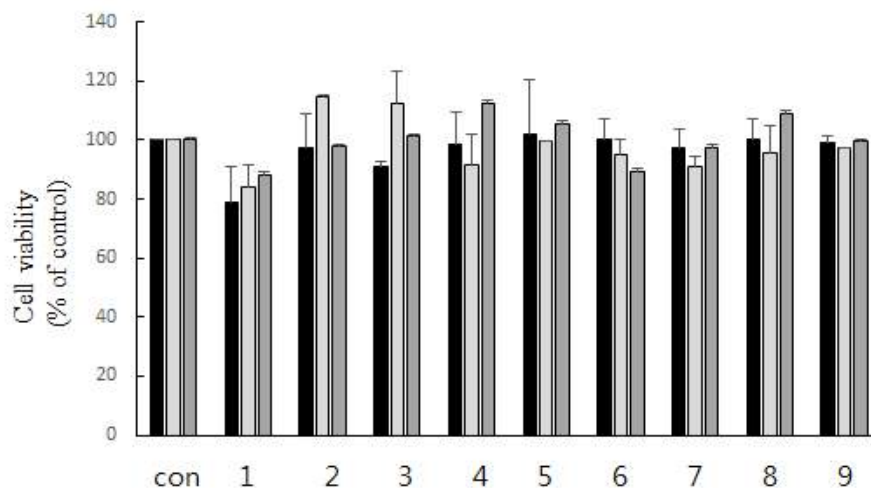


Fig 38. 강황+ 유자 추출혼합물 배합별 세포독성 확인  
 1;CL20:Cj0=100:0/ 2;CL20:Cj0=75:25/ 3;CL20:Cj0=50:50/ 4;CL20:Cj0=25:75/5;  
 CL20:Cj0=0:100/ 6;CL20:Cj20=75:25/ 7;CL20:Cj20=50:50/ 8;CL20:Cj20=25:75/  
 9;CL20:Cj20=0:100

(6) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 뇌세포 신호전달물질 분해효소(acetylcholinesterase) 억제  
능 검색 결과

뇌신경세포를 대상으로 Ellman's method를 이용하여 AChE의 활성 억제 효능을 평가한  
결과, 강황 20%주정추출물 및 강황20%주정추출물 + 유자물추출물의 혼합물 (75:25)  
처리시 그 효능을 확인할 수 있었음

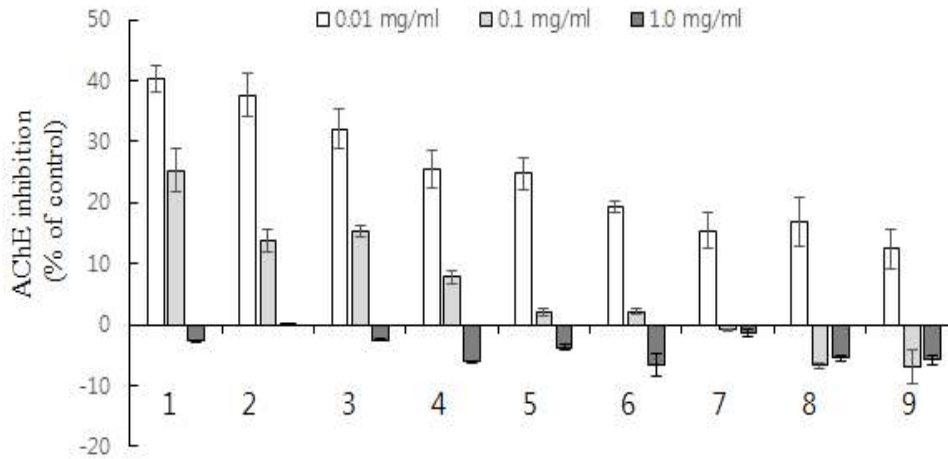


Fig 39. 강황+ 유자 추출혼합물 배합별 AChE 활성 억제 효과

1;CL20:Cj0=100:0/ 2;CL20:Cj0=75:25/ 3;CL20:Cj0=50:50/ 4;CL20:Cj0=25:75/5;  
CL20:Cj0=0:100/ 6;CL20:Cj20=75:25/ 7;CL20:Cj20=50:50/ 8;CL20:Cj20=25:75/  
9;CL20:Cj20=0:100

(7) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 SOD(Superoxide Dismutase)활성 검색

강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 하여 SOD kit (Dojindo molecular technology, Japa  
n)를 이용하여 SOD 효소의 활성 증진 효과를 측정함. 그 결과 각 배합비가 다른 시료 모  
두 고농도에서는 SOD 활성이 증가되는 것을 확인 할 수 있었음. 이 시료들 중 유자 20%  
주정추출물이 농도별로 혼합한 시료에서 미미한 차이로 SOD의 활성을 증진시키는 것으  
로 나타났음. 그러나 유의적 차이라고는 볼 수 없음

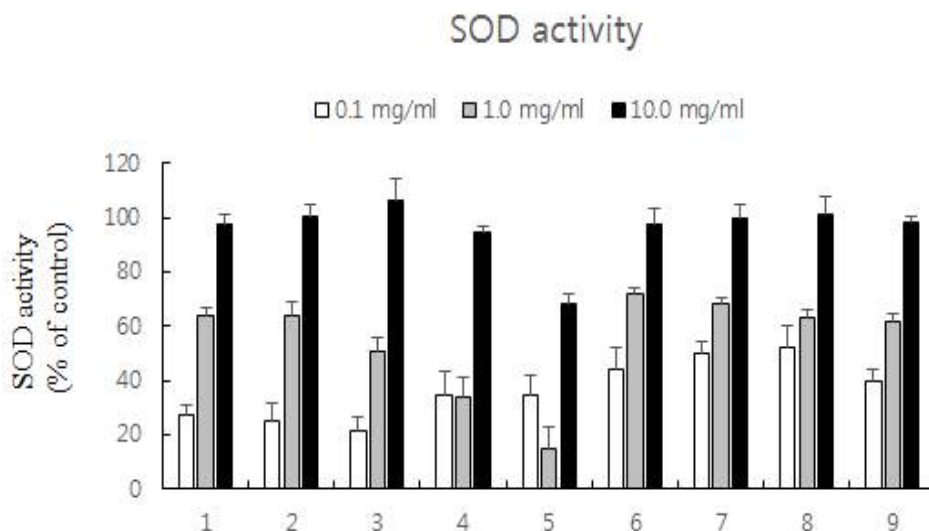


Fig 40. 강황+ 유자 추출혼합물 배합별 SOD 활성 증진 효과 검색

1;CL20:Cj0=100:0/ 2;CL20:Cj0=75:25/ 3;CL20:Cj0=50:50/ 4;CL20:Cj0=25:75/5;

CL20:Cj0=0:100/ 6;CL20:Cj20=75:25/ 7;CL20:Cj20=50:50/ 8;CL20:Cj20=25:75/  
9;CL20:Cj20=0:100

(8) 강황+ 유자 추출혼합물대상 Catalase 활성 검색

강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 하여 Catalase kit (Biovision, USA)를 이용하여 catalase 효소의 활성 증진 효과를 측정함. 그 결과 각 배합비가 다른 시료 모두 고농도에서 SOD 활성이 증가되는 것을 확인 할 수 있었음. 이 시료들 중 유자 20% 주정 추출물이 농도별로 혼합한 시료에서 catalase 활성을 증진시키는 것으로 나타났음

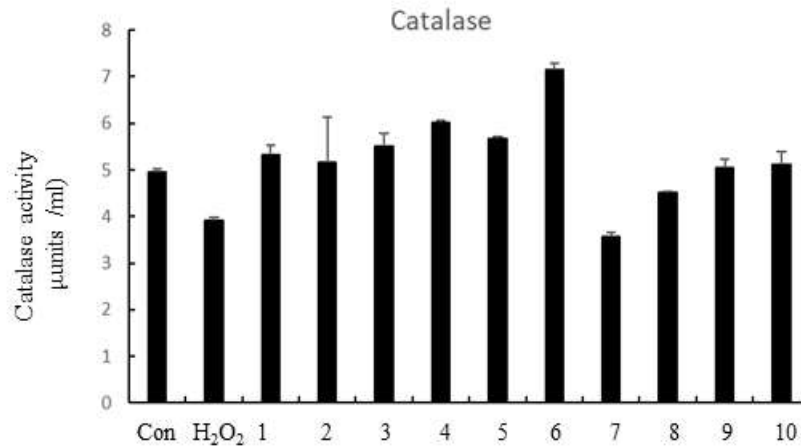


Fig 41. 강황+ 유자 추출혼합물 배합별 catalase 활성 증진 효과 검색

1;CL20:Cj0=100:0/ 2;CL20:Cj0=75:25/ 3;CL20:Cj0=50:50/ 4;CL20:Cj0=25:75/5;  
CL20:Cj0=0:100/ 6;CL20:Cj20=75:25/ 7;CL20:Cj20=50:50/ 8;CL20:Cj20=25:75/  
9;CL20:Cj20=0:100

(9) 강황+ 유자 추출혼합물 대상 AChE 활성 억제 검색

강황+ 유자 추출혼합물을 농도별로 다시 배합하여 AChE 활성을 다시 확인하기로 함. 배합비를 세분화 하여 효능 평가를 진행하여 효능이 높은 배합비를 최종 선정함. 선정 농도로 CL20:Cj0=90:10로 정함

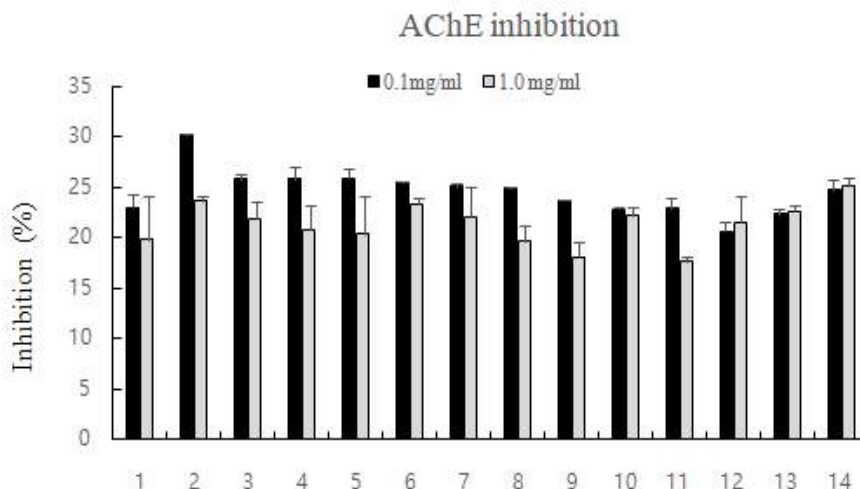


Fig 42. 강황+ 유자 추출혼합물 배합별 AChE 활성 억제 효과 검색

1;CL20:Cj0=100:0/ 2;CL20:Cj0=90:10/ 3;CL20:Cj0=75:25/ 4;CL20:Cj0=50:50 /5;

CL20:Cj0=25:75/ 6;CL20:Cj0=10:90/ 7;CL20:Cj0=0:100/ 8;CL20:Cj20=90:10/  
 9;CL20:Cj20=75:25/ 10;CL20:Cj20=50:50/ 11;CL20:Cj20=25:75/ 12;CL20:Cj20=10:90/  
 13;CL20:Cj20=0:100/ 14;홍삼 추출물 (ginsenoside 10 mg/mL)

(10) 선정된 강황+유자 추출혼합물 대상 세포 독성 및 세포 보호 효과 검색

선정된 강황+유자 추출혼합물 (CL20:Cj0=90:10)을 이용하여 뇌신경 세포인 neuro 2A 세포를 대상으로 세포 독성 및 세포 보호 효과를 검색함. 확인 결과 1000 µg/mL (final cont.) 이상 처리시 독성을 나타내는 것으로 확인함. 이를 바탕으로 하여 amyloid-β에 대한 세포 보호 효과를 확인하였음. 그 결과, 시료 처리 농도 비례하게 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 확인됨

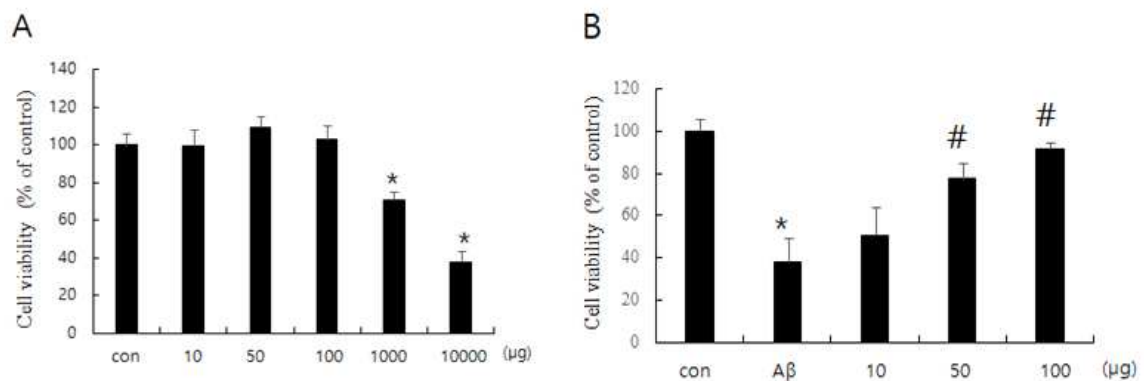


Fig 43. 강황+유자 추출혼합물 세포독성 및 세포 보호 효과 확인

A; 농도별 세포 독성 (cell cytotoxicity)/ B; Aβ에 의해 유도된 세포 독성에 대한 세포 보호 효과 (cell protection)

(11) 선정된 강황+유자 추출혼합물 대상 Catalase 및 SOD활성 증진 효과

선정된 강황+유자 추출혼합물(CL20:Cj0=90:10)을 이용하여 뇌신경 세포인 neuro 2A 세포에서 세포 내 antioxidant system 효소인 catalase 및 SOD 효소의 활성 증진 효과를 확인함. 그 결과 처리 농도에 비례해서 효소의 활성 증진 효과를 나타냄을 확인함

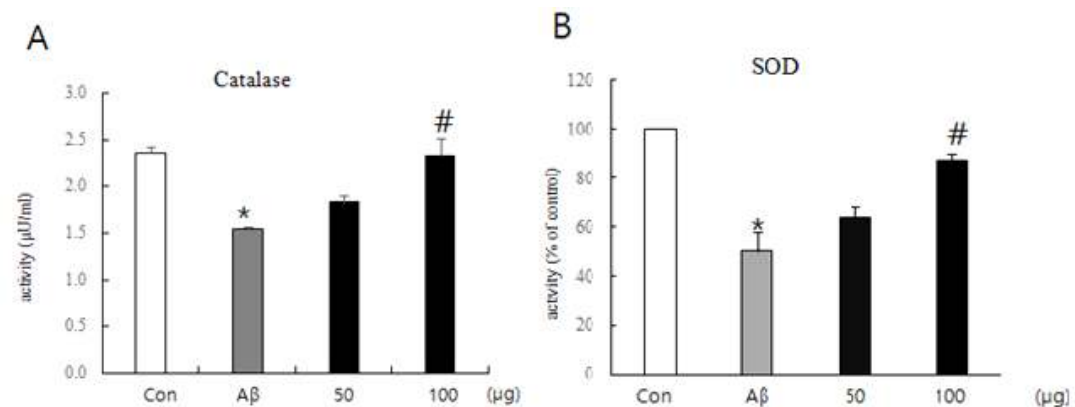


Fig 44. 강황+유자 추출혼합물의 catalase 및 SOD 효소 활성 효과 검색

(12) 선정된 강황+유자 추출혼합물 대상 AChE 억제 효과 확인

선정된 강황+유자 추출혼합물(CL20:Cj0=90:10)을 이용하여 뇌신경 세포인 neuro 2A 세포에서의 AChE 억제 효능 효과를 확인함. 그 결과, 농도에 비례하여 AChE의 활성 억제 효능이 나타남을 확인함

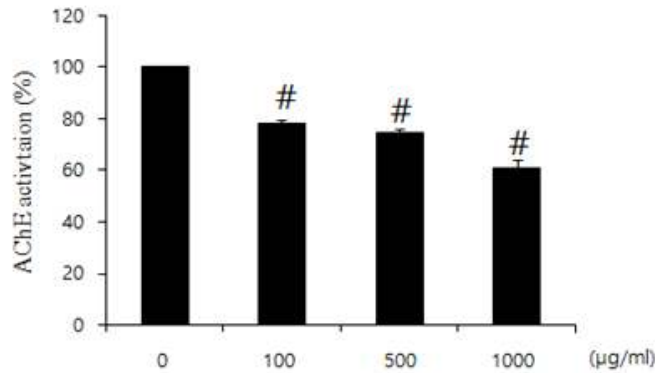


Fig 45. 강황+ 유자 추출혼합물의 AChE 활성 효과 억제 효과 검색

(13) 선정된 강황+ 유자 추출혼합물 대상 뇌 유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 및 관련 기작 의 발현 영향 확인  
 신경세포의 생존 및 신장 인자 (BDNF)의 발현 정도를 mRNA level에서 확인함. 그 결과, A $\beta$ -peptide를 처리한 군에서 BDNF 의 발현이 현격히 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, 혼합시료 의 양성대조군으로 강황 20% EtOH 추출물 처리군 (CL20) 및 추출복합물에서 모두 BDNF 의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었음. 또한 BDNF 관련 인자 (CREB, p-CREB)의 protein level에서의 발현정도를 확인하였음(Fig.45). 그 결과 시료 처리군 모두 BDNF의 발현 및 CREB, p-CREB의 발현 level에 영향을 주는 것으로 확인됨

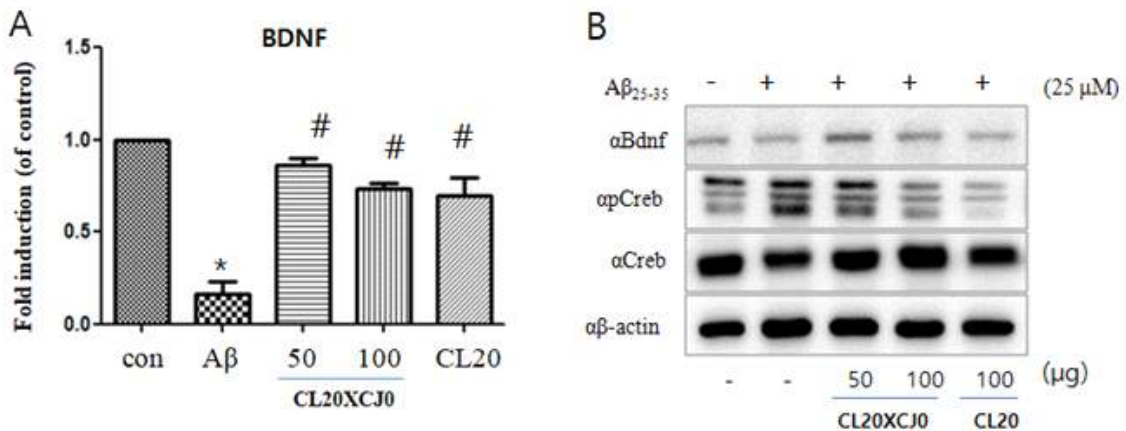


Fig 46. 강황+ 유자 추출혼합물의 BDNF 생성 증진 및 관련 기전 (CREB-pCREB) 조절 효과 확인 A: BDNF 생성 효능 (qPCR)/ B: BDNF 생성 및 관련 기전 조절 효능

### 8-3. 강황+ 유자 혼합 추출물의 기억력 개선 *in vivo/ex vivo* 생리활성 평가 가. 실험 방법

#### (1) 강황+ 유자 추출혼합물의 인지능력 및 기억력 증진 효과 확인

선정된 강황+ 유자 추출혼합물을 대상으로 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 처리한 동물모델을 이용하여 인지력 및 행동능력에 미치는 영향을 확인함

동물실험에 사용한 시료는 복합물에 부형제인 텍스트린을 넣은 시료로써 시료조성은 다음과 같음

- 강황+ 유자 추출혼합물 소재 ; (CL20:Cj0=90:10):텍스트린=50:50
- positive control; CL20(강황20%주정추출물): 텍스트린=50:50

C57/BL6-male mice (6주령)을 이용하여 식이와 물은 자유급식 하고 1주일 적응 후 control (negative control, PBS 투여), A $\beta$ <sub>25-35</sub> 투여군, 강황+ 유자 추출혼합물 시료 및

A $\beta_{25-35}$  복합 투여군 (100 mg/kg BW, 200 mg/kg BW)으로 하고, positive control로 강황20%추출혼합물을 고용량 투여 (200 mg/kg BW)군으로 함

각각의 시료들은 약 28일간 투여하였으며, 시료 투여 후 14일째 되는 날 A $\beta_{25-35}$ 를 Intracerebroventricular(ICV) injection 방법을 통하여 뇌에 투여하여 치매 동물모델을 제작하였으며, 희생 5일 전에 인지능력 실험을 Y-maze 방법을 이용하여 측정하였으며, 기억력 실험은 passive avoidance task를 이용하여 측정함

동물실험은 연세대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받아 관리지침에 따라 수행함 (IACUC-2020-0114).

① Y-maze test (인지능력평가)

: 인지능력 효과를 측정하기 위하여 Y자 미로를 이용하여 시행함. 암실에서 본 실험을 진행하기 1시간 전에 적응 시킨 후, Y자 미로에 실험동물을 넣은 뒤 8분간 동물이 지나간 arm을 측정하여 그 값을 계산하여 수치화함

② Passive avoidance test (기억력 평가)

: 기억력 개선 효과를 측정하기 위하여 passive chamber를 이용하여 측정함. 본 실험 진행 하루 전 암실에서 1시간 전에 적응 시킨 후 passive chamber를 이용하여 적응 훈련 및 전기 자극을 이용한 training을 진행함. 다음 날 비암실에 쥐를 넣고 암실로 들어가는 시간까지를 측정하여 그 값을 수치화함

나. 실험 결과

(1) 강황+ 유자 추출혼합물의 인지능력 및 기억력 증진 효과 확인

< Y-maze test (인지능력평가)>

A $\beta_{25-35}$  투여 후 10일 뒤에 인지능력 검사를 위하여 Y-maze test를 수행함. 그 결과 control, A $\beta_{25-35}$  투여군, 시료 투여군 모두에서 행동 이상에 대한 것은 관찰되지 않았으며, 인지능력에서는 강황+ 유자 추출혼합물 및 A $\beta_{25-35}$  복합 투여군, positive control 모두 A $\beta_{25-35}$  투여 군에 비해 개선되는 양상을 확인 할 수 있었음. 특히 100 mg/kg BW에서 그 효과가 높음을 확인함

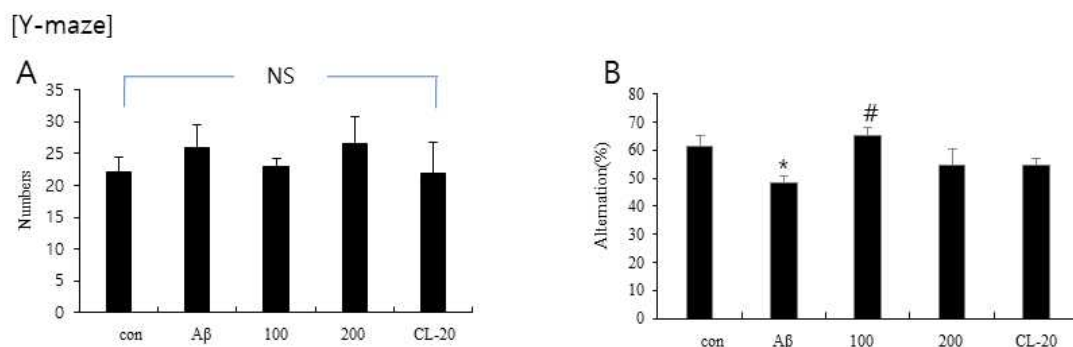


Fig 47. 강황+ 유자 추출혼합물의 인지능력 증진 효과 확인

A: Number of maze entrances / B: alternation (%)

<Passive avoidance test (기억력 평가)>

실험 결과 Y-maze의 결과와 유사한 양상으로 강황+ 유자 추출혼합물 및 A $\beta$  복합 투여군, positive control 모두 A $\beta$  투여 군에 비해 개선되는 양상을 확인할 수 있었으며, 특히 100 mg/kg BW에서 그 효과가 높음을 확인할 수 있었음



[Passive avoidance ]

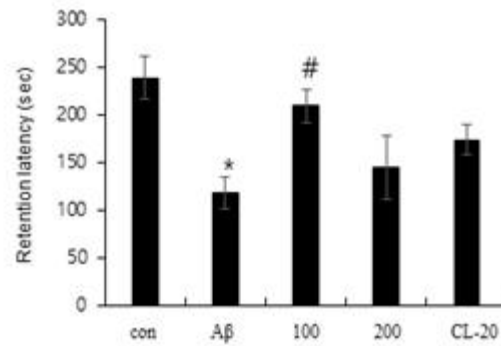


Fig 48. 강황+ 유자 추출혼합물의 기억력 증진 효과 확인

8-4. 강황+ 유자 추출혼합물의 기억력 개선 기전 규명

가. 실험 방법

(1) 강황+ 유자 추출혼합물의 뇌세포 신호전달 분해효소 (acetylcholinesterase, AChE) 억제능 효능 효과 시험

동물모델을 이용한 뇌세포 신호전달 분해효소 (acetylcholinesterase, AChE) 억제능 효능 효과를 확인하기 위하여 기존 문헌에 개시된 방법을 응용하여 동물모델을 이용한 시험을 하기와 같이 Ellman's method 실험을 수행함. 뇌조직 lysate를 이용하여 Ellman's method를 이용하여 acetylcholinesterase 활성 억제를 측정함. 행동실험 완료 후 각 군의 실험동물에서 채취한 brain에서 lysis buffer(10 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100)를 이용하여 균질하고, 이를 centrifugation 하여 상층액을 얻어 이를 대상으로 해당 실험을 진행함. 실험 방법은 *in vitro* assay와 동일하게 Ellman's method를 이용함

(2) 강황+ 유자 추출혼합물의 뇌세포 신장 물질 (BDNF) 및 관련 기전에 대한 영향 평가  
 강황+ 유자 추출혼합물의 뇌신경세포 성장인자(BDNF)의 발현에 대한 영향을 protein level에서 측정함. 행동 실험 후 각 군의 실험동물에서 얻은 brain 을 cortex와 hippocampus로 나누어 실험을 실시함. Protein level에서의 발현을 확인하기 위해서 cortex와 Hippocampus를 lysis buffer(0.5% triton X-100, 20 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 1 mM PMSF를 이용하여 lysate를 만들었으며 이를 이용하여 BDNF의 protein 발현 정도는 western blotting 을 실시하였는데, 실시 방법은 *in vitro* 실험과 동일하게 처리하여 진행함

나. 실험 결과

(1) 강황+ 유자 추출혼합물의 뇌세포 신호전달 분해효소 (acetylcholinesterase, AChE) 억제능 효능 효과 시험

뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 AChE 활성 억제능을 측정한 결과 추출혼합물 처리군 및 positive control 군 모두에서 억제 효능의 양상은 나타났으나, 유의적인 차이는 보이지 않았음. 이는 추출혼합물 및 강황20%주정추출물 모두 AChE 억제에 큰 기대 효과는 나타내지 않는 것으로 사료됨

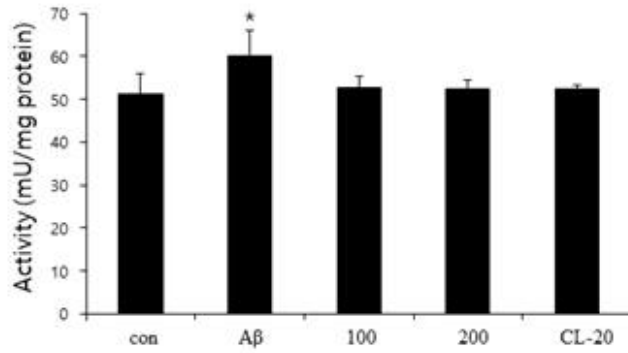


Fig 49. 강황+ 유자 혼합 추출물 시료의 *in vivo*에서의 AChE(acetylcholinesterase) 활성 억제 효능

(2) 강황+ 유자 추출혼합물의 퇴행성 뇌질환 동물모델의 cortex와 hippocampus 에서의 뇌신경세포 성장인자(BDNF) 발현 영향 확인

뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 뇌신경세포 성장인자 (BDNF)의 발현에 대한 시료의 영향을 protein level에서 cortex와 hippocampus에서 측정함. 그 결과 cortex 및 hippocampus 모두에서 추출혼합물 처리군이 positive control인 강황 20% EtOH 처리군에 비해 BDNF의 발현 정도가 증가함을 확인 할 수 있었음. 특히 100 mg/kg BW의 강황+ 유자 추출 복합물 처리 군에서 다른 시료 처리군에 비해 그 효과가 높음을 확인할 수 있었음. 또한 BDNF pathway와 관련있는 CREB-pCREB 관련 인자의 발현에 영향여부를 확인하기 위해 hippocampus에서 관련 인자의 발현을 확인한 결과 100 mg/kg BW에서 개선되는 양상을 보이기는 하였으나 유의적 차이는 없었음

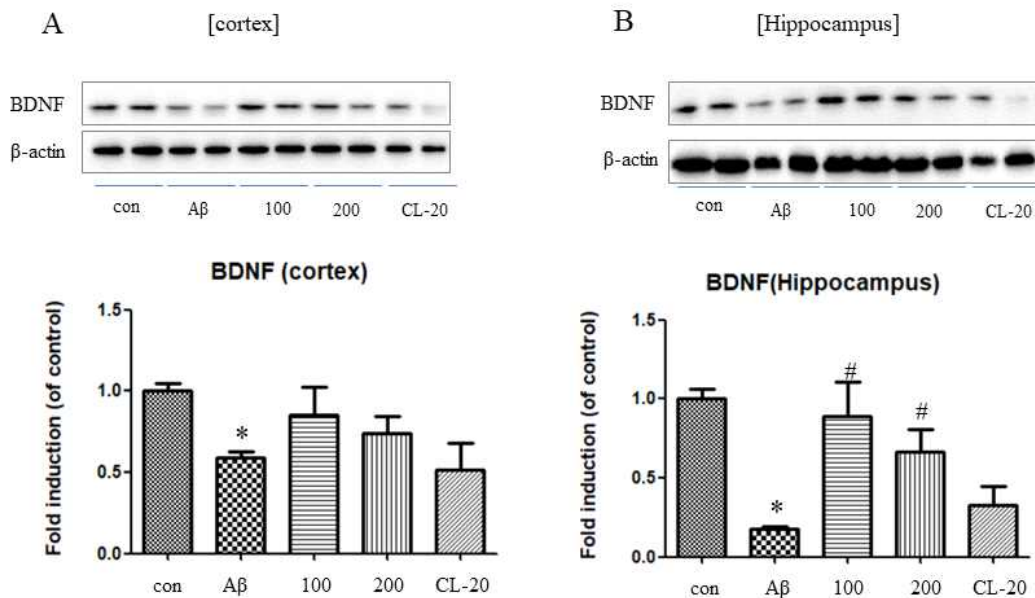


Fig 50. 강황+ 유자 추출혼합물의 *in vivo*에서의 뇌신경세포 성장인자(BDNF) 발현 영향

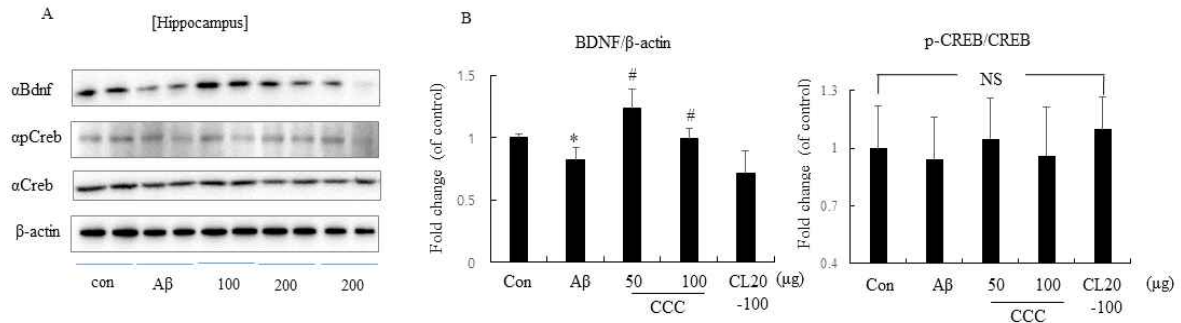


Fig 51. 강황+ 유자 추출혼합물의 hippocampus에서의 뇌신경세포 성장인자(BDNF) 발현 및 관련 인자 변화 영향

A: BDNF 및 CREB-pCREB 발현 확인 / B: BDNF 및 CREB-pCREB 정량

### 8-5. 결론

주관기관에서 제공받은 강황물추출물(Curcumin 0.21 mg/g), 강황20%주정추출물(Curcumin 1.93 mg/g), 유자물추출물(Hesperidin 17.98 mg/g), 유자20%주정추출물(21.12 mg/g)들 중 퇴행성 뇌질환 예방 효능과 관련하여 가장 좋은 효과를 보이는 시료를 찾기 위해 *in vitro*에서의 라디칼 소거능, NO 생성 억제능, 산화적스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과, 뇌세포 신호전달물질 분해효소 억제능을 측정하였음. 각 시료의 효능평가 결과, 강황20%주정추출물, 유자물추출물, 유자20%주정추출물에서 세포 보호 효능과 뇌신경세포 신호전달에서의 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 1차 screening을 통해 효능을 나타낸 강황 20% 주정 추출물, 유자 물 추출물을 선택하고 혼합하여 사용하였음

선정된 소재를 대상으로 임의로 배합비를 정하여 뇌신경 세포 보호효과, AChE 활성 억제 효과 및 세포내 항산화 효소인 SOD 활성효과를 1차 확인하였으며, 이때 강황20% 추출물+ 유자 물 추출물 배합시 효능이 좋게 나타남을 확인하였음. 추후 위의 소재를 이용하여 배합비를 재조정하여 진행한 결과, CL20:CJO=90:10 확인하였으며 추후 위의 소재들을 이용하여 세포 내 항산화 효소 또는 뇌신경 세포 증식 및 활성화 관련 인자들에의 효능 평가를 진행하여 효능이 높은 농도를 설정하여 실험을 진행함. CL20:CJO=90:10 소재를 이용하여 *in vivo*에서 인지 능력과 기억력 개선 효능 및 관련 기전에 대한 연구를 진행한 결과, 고농도에 비해 저농도에서 효능이 높은 것을 확인할 수 있었음. 또한, 강황 20% 추출물 투여와 비교 시 저농도의 시료 투여 또는 처리 군에서 강황 단독 처리군에 비해 효능이 높음을 확인할 수 있었음. 위의 결과, 강황+ 유자 추출혼합물이 강황 추출물에 비해 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선 효과가 높게 나타남을 확인할 수 있었으며, 따라서 위의 소재는 추후 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선 관련 기능성 소재로의 개발 가치가 있을 것으로 사료됨

## 9. 강황+ 유자 추출혼합물 면역력 증진 기능평가

### 9-1. 강황 및 유자 추출물의 면역세포에서의 독성반응 평가

#### 가. 실험 방법

면역세포에서 강황 추출물과 유자 추출물을 처리 했을 때 독성을 평가하기 위해서 WST-1 실험을 진행함. 실험에 사용한 EZ-CYTOX는 WST를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정함으로써 Cell Viability, Proliferation & Cytotoxicity Assay등에 사용함. 면역세포 Raw264.7 cell을 96well plate에 seeding하여 12시간 배양 후 추출물과 control(negative control), LPS-RGE(홍삼추출물)(Positive control)을 처리함. 12, 24 시간 후에 WST-1 assay를 이용하여 각각의 well의 cell viability 변화를 control과 비교

## 하여 독성 평가함

### 나. 실험 결과

#### (1) 12시간

면역세포에서 강황 단일추출물(물추출물, 20%주정추출물, 수용화), 유자 단일추출물(물추출물, 20%주정추출물), 강황+ 유자 추출혼합물 (7:3, 5:5, 3:7)을 사용하여 12시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 강황추출물, 유자추출물, 추출혼합물에서 control에 대비하여 독성이 없는 것으로 나타났음

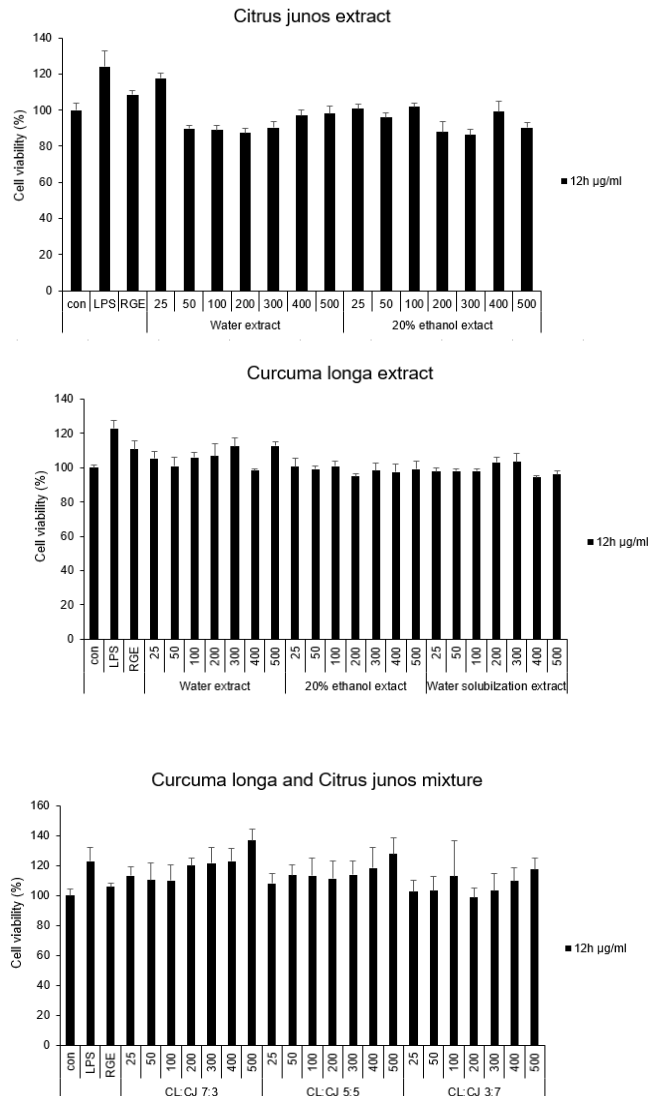


Fig 52. 강황, 유자 추출물의 12시간 세포독성 측정 결과

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) / CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH) / CLW : *Curcuma longa* L. extract (Water solubilization)

CJ0: *Citrus junos* extract (Hot water) /CJ20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)

CL:CJ 7:3: CL0 7:CJ0 3, CL:CJ 5:5: CL0 5:CJ0 5, CL:CJ 3:7: CL0 3:CJ0 7

#### (2) 24시간

면역세포에서 강황 단일추출물(물추출물, 20%주정추출물, 수용화), 유자 단일추출물(물추출물, 20%주정추출물), 강황+ 유자 추출혼합물 (7:3, 5:5, 3:7)을 사용하여 24시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 control에 대비하여 강황물추출물, 20%주정추출물, 유자물추출물과

추출혼합물에서는 독성이 없는 것으로 나타났으며, 유자20%주정추출물에서는 200 µg/mL에서부터 강황 수용화에서는 100 µg/mL에서부터 약간의 독성이 나타났음  
 강황물추출물과 20%주정추출물은 시중에 시판 되고 있는 홍삼(RGE)와 비견할 정도로 세포 생존능이 높았으며, 추출혼합물은 positive control인 LPS만큼 세포 생존능이 증가하는 것으로 보아 강황, 유자 단일 추출물보다 더 좋은 활성이 나타나는 것을 알 수 있었음

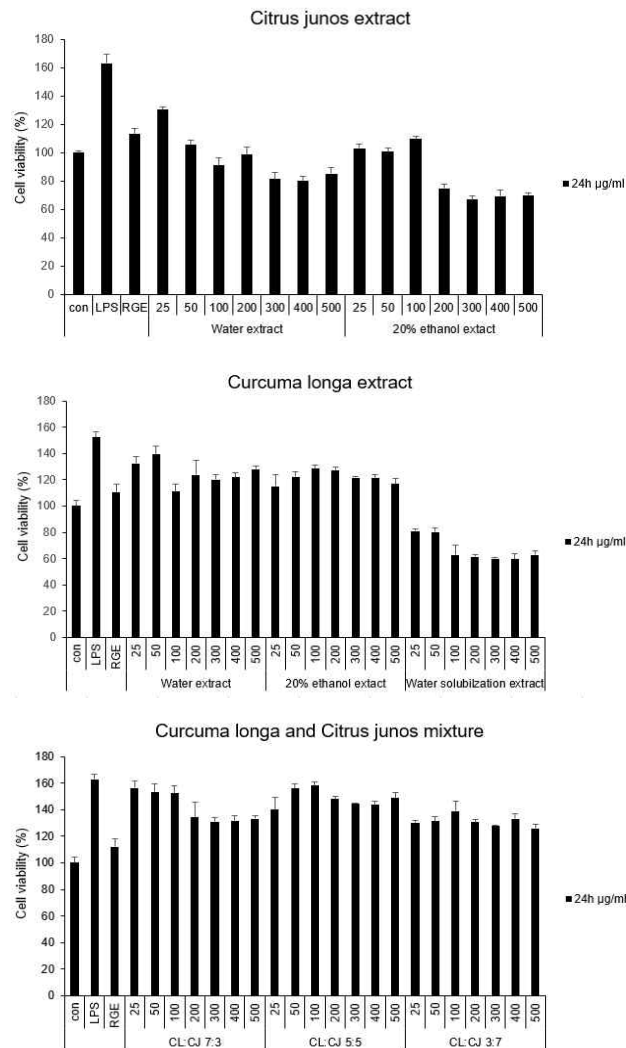


Fig 53. 강황, 유자 추출물의 24시간 세포독성 측정

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) / CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH) / CLW : *Curcuma longa* L. extract (Water solubilization)  
 CJ0: *Citrus junos* extract (Hot water) /CJ20: *Citrus junos* extract (20% EtOH)  
 CL:CJ 7:3: CL0 7:CJ0 3, CL:CJ 5:5: CL0 5:CJ0 5, CL:CJ 3:7: CL0 3:CJ0 7

## 9-2. 강황, 유자 추출물의 면역증진 관련 cytokine 활성 평가 가. 실험 방법

면역세포의 면역과 관련된 cytokine 인자들의 발현 정도를 mRNA level에서 확인함. Raw264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/mL로 seeding 후 12시간이 지난 후 추출물을 처리하여 24시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 RNA prep kit를 이용하여 RNA extraction 후 cDNA 합성함. 합성된 cDNA를 cytokine 관련 인자의 primer를 이용하여 real-time PCR 진행함

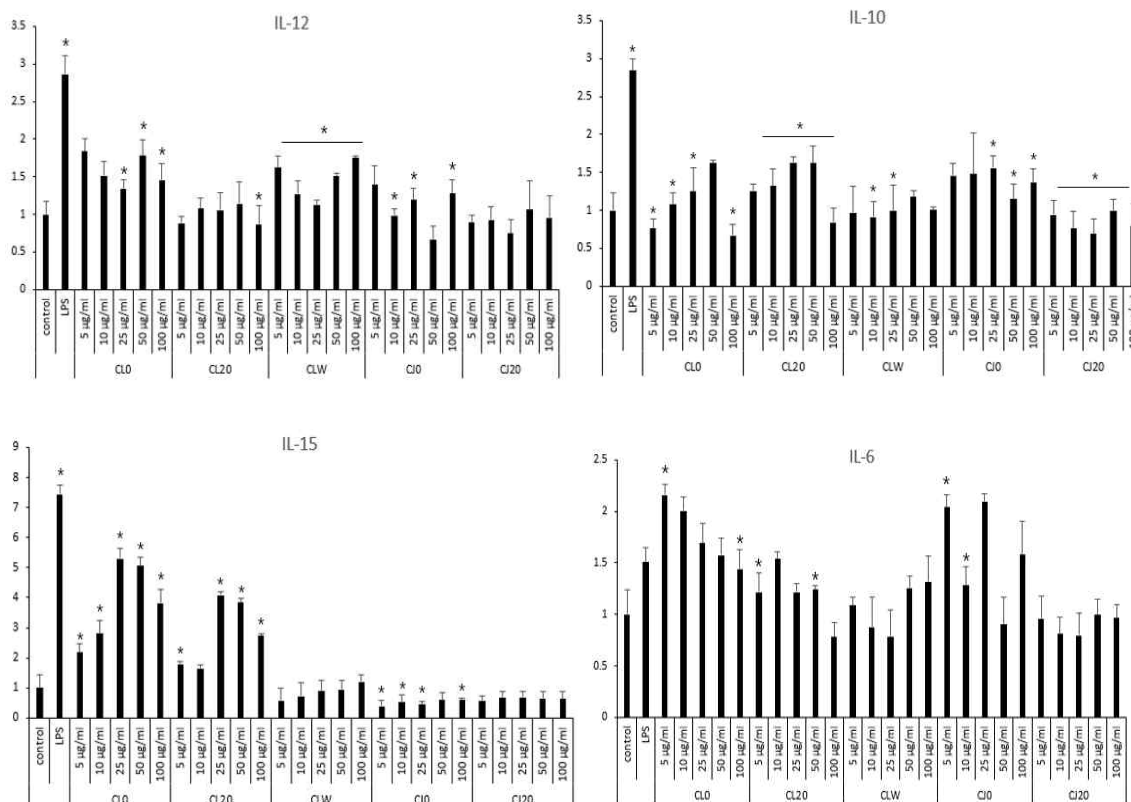
Table4. Real-time PCR primer sequence

Name of genes	Oligonucleotide Sequence (5'-3')	
Interleukin 12 (m)	F	GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA
	R	AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG
Interleukin 10 (m)	F	ACT GGC ATG AGG ATC AGC A
	R	AGA AAT CGA TGA CAG CGC C
Interleukin 15 (m)	F	CAT CCA TCT CGT GCT ACT TGT GTT
	R	CAT CTA TCC AGT TGG CCT CTG TTT
Interleukin 6 (m)	F	CAA GAG ACT TCC ATC CAG TTG C
	R	TTG CCG AGT TCT CAA AGT GAC
Arginase-1 (m)	F	CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA G
	R	AGG AGC TGT CAT TAG GGA CAT C
iNOS (m)	F	CCT GGT ACG GGC ATT GCT
	R	GCT CAT GCG GCC TCC TT
GAPDH (m)	F	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C
	R	GGC CTC TCT CTT GCT CTC AGT ATC

나. 실험 결과

(1) 1차

Mouse Raw264.7 cell에 대한 macrophage를 활성화 시키는 cytokine인 IL-12, IL-10, IL-15, IL-6, Arg-1과 NO생성에 중요한 지표인 iNOS를 mRNA level에서 각각의 cytokine활성을 평가한 결과, 먼저 강황 추출물에서는 CL0(강황물추출물)은 25, 50  $\mu$ g/mL에서, CL20(강황20%주정추출물)은 25, 50  $\mu$ g/mL에서 macrophage 세포의 활성화에 도움을 주는 것으로 보이며, CLW(강황추출물 수용화)에서는 IL-12와 IL-6에서 50  $\mu$ g/mL부터 cytokine활성이 근소하게 증가하는 것을 확인하였음. 유자추출물에서는 CJ0(유자물추출물)이 IL-10, IL-6에서 일반대조군과 대비하여 증가하는 것을, CJ20(유자 20%주정추출물)은 일반 대조군과 대비하여 추출물 농도별로 큰 차이는 나타나지 않는 것을 확인하였음



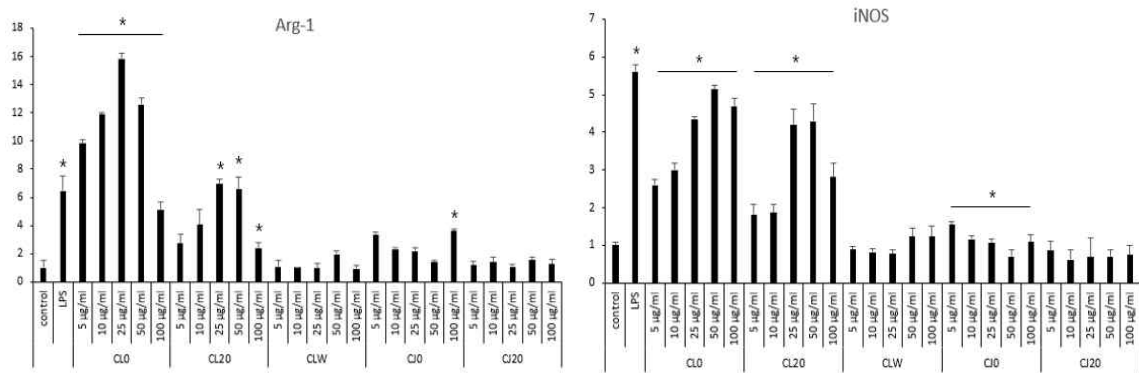


Fig 54. 강황 및 유자 추출물의 면역사이토카인 활성 평가

CL0: *Curcuma longa* L. extract(Hot water) / CL20: *Curcuma longa* L. extract(20% EtOH) / CLW : *Curcuma longa* L. extract (Water solubilization)

Data express the mean ± S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test (\*:  $p < 0.05$ )

(2) 2차

1차 선행연구에서 각각의 추출물 활성 비교를 했을 때에 강황추출물에서는 강황물추출물이, 유자추출물에서는 유자물추출물이 면역 활성이 높은 것으로 사료됨

강황물추출물과 유자물추출물을 각각 7:3, 5:5, 3:7의 비율로 섞어서 추출혼합물을 만들었음. Mouse Raw264.7 cell에 대한 macrophage를 활성화 시키는 cytokine인 IL-12, IL-10, IL-15, IL-6, Arg-1과 NO생성에 중요한 지표인 iNOS를 mRNA level에서 각각의 cytokine활성을 평가한 결과, 강황물추출물과 유자물추출물의 비율이 7:3에서 면역관련 cytokine level이 전체적으로 가장 높게 발현되는 것을 확인하였음. 특히, IL-6와 Arg-1, 그리고 NO를 생성하여 면역반응에 있어 중요한 지표인 iNOS의 발현이 positive control인 LPS를 treat한 level과 비슷하게 향상되는 것을 확인할 수 있었음

따라서, 강황+ 유자 추출혼합물 중 강황물추출물의 비율이 더 높게 들어간 7:3에서 면역활성이 유의적으로 더 향상되는 것을 확인함

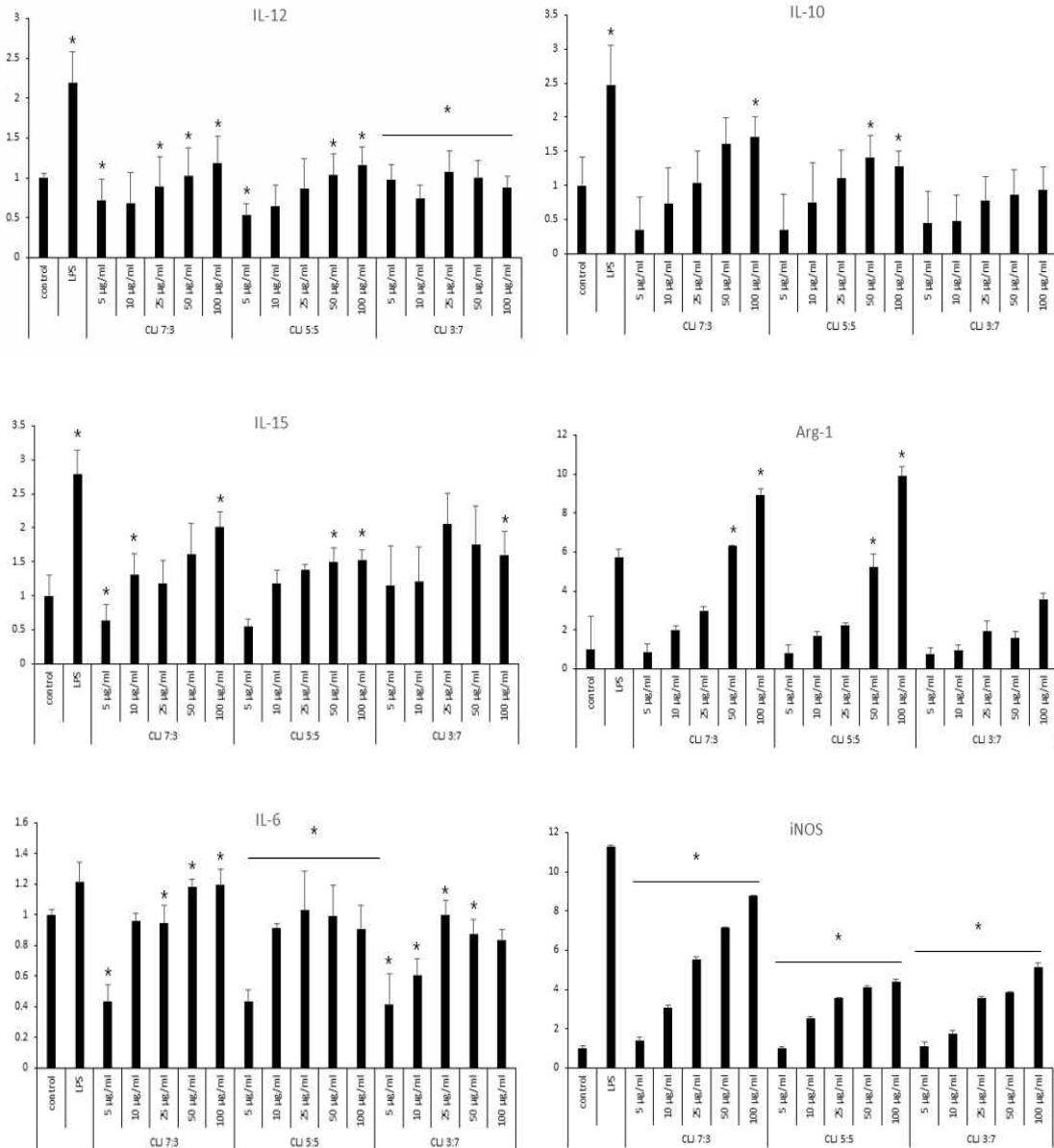


Fig 55. 강황+ 유자 추출혼합물 배합별 면역사이토카인 활성화 평가

CL:CJ 7:3: CL0 7:CJ0 3, CL:CJ 5:5: CL0 5:CJ0 5, CL:CJ 3:7: CL0 3:CJ0 7

Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters in a column are statistically different Duncan multiple range test (\*:  $p < 0.05$ )

### 9-3. 강황+ 유자 추출혼합물에 의한 면역세포에서 산화질소(NO)생성 효과 평가 가. 실험 방법

면역세포에서 강황+ 유자 추출혼합물을 처리한 후 NO 활성화 변화가 생기는지 평가하기 위하여 protein을 가지고 NO assay로 확인함. Raw264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/mL로 seeding 후 12시간이 지난 후 강황, 유자 7:3, 5:5, 3:7 추출혼합물을 농도별로 처리하여 24시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량. 정량한 protein을 가지고 NO assay 진행  
나. 실험 결과

면역에 관여하는 macrophage cell line인 RAW264.7 세포에서 LPS와 강황+ 유자 추출혼합물을 각각 처리한 결과, positive control인 LPS를 처리한 것과 비교했을 때 7:3 비



울의 강황+유자 추출혼합물이 100 µg/mL에서 positive control만큼 NO를 생성하여 면역반응에 효과가 있는 것을 확인하였음. 5:5 비율의 강황+유자 추출혼합물은 positive control에 비교하였을 때는 증가하지 않았지만 control과 비슷한 수준이었고, 3:7 비율의 강황+유자 추출혼합물은 control에 비해 증가하지 않는 것을 확인하였음  
따라서 강황물추출물과 유자물추출물의 혼합 비율이 7:3일 때 NO 생성이 가장 높게 나타난 것으로 보아 7:3의 혼합 비율이 적당하다고 사료됨

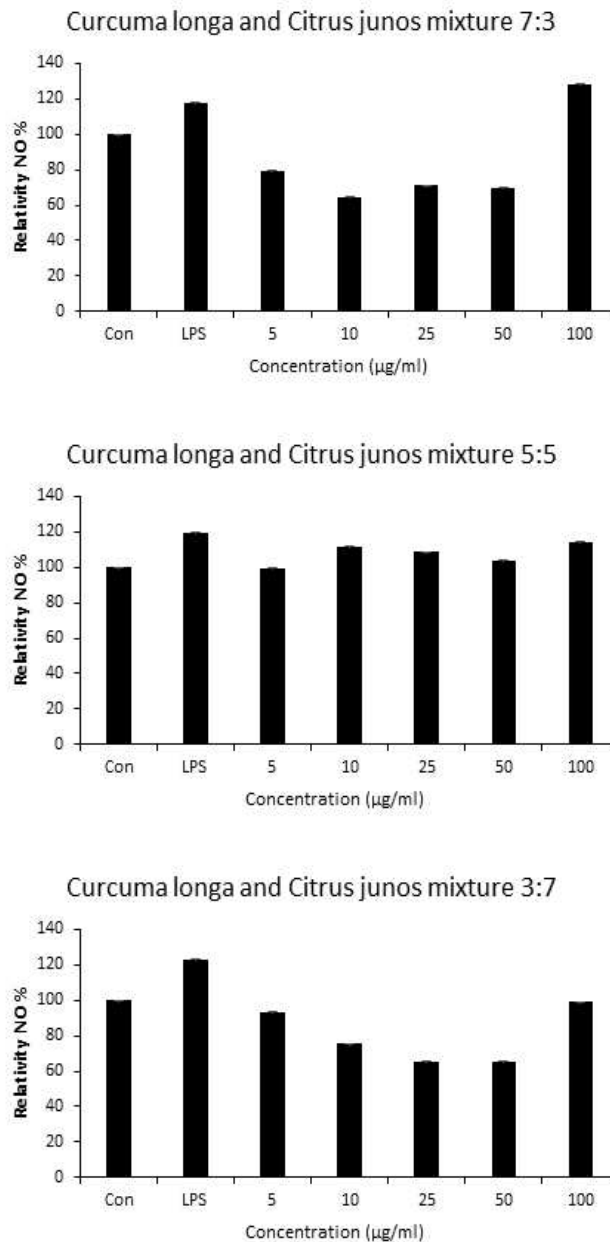


Fig 56. 강황+유자 추출혼합물 배합별 산화질소(NO)활성 평가  
CL:CJ 7:3: CL0 7:CJ0 3, CL:CJ 5:5: CL0 5:CJ0 5, CL:CJ 3:7: CL0 3:CJ0 7

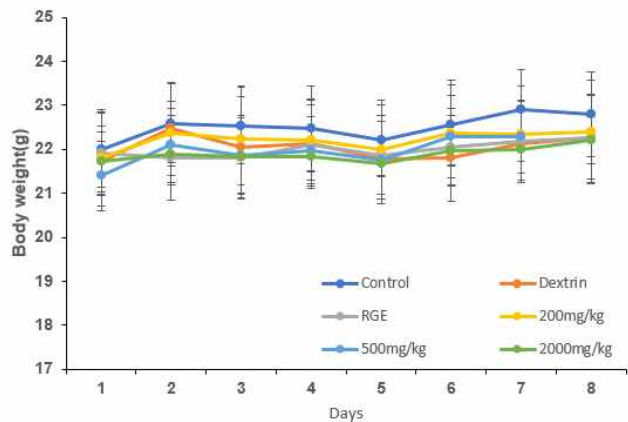
#### 9-4. 강황+유자 추출혼합물의 *in vivo/ex vivo*에서의 독성반응 및 활성평가 가. 실험 방법

*In vivo*에서 강황+유자 추출혼합물을 처리 했을 때 독성을 평가하기 위해서 단기, 장기간으로 강황+유자 추출혼합물을 투여하여 mouse body weight와 condition을 관찰하였음. 단기, 장기기간 투여 후 mouse를 sacrifice시켜 spleen, Lung, Kidney, Liver 각각의 장

기에서 장기 size나 이상 징후가 발견 되지 않았는지 관찰함. 그 후 Liver 조직은 H&E staining을 통하여 Liver 조직에 독성 병변이 있는지 살펴보았음. 또한, spleen을 primary culture하여 WST-1으로 번식능을 확인함. EZ-CYTOX를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정함으로써 cell viability, Proliferation & Cytotoxicity Assay등에 사용하여 평가를 실시함. 비장세포 mouse splenocyte를 96well plate에 seeding하여 12h incubation 후 강황+ 유자 추출혼합물과 control(negative control), Dex(덱스트린)-RGE(홍삼추출물)(positive control)을 처리함. 24시간 후에 WST-1 assay를 이용하여 각각의 well의 cell viability 변화를 control과 비교하여 독성평가를 함

나. 실험 결과

Mouse body weight 변화를 관찰하였을 때 단기(8일), 장기(30일) 모두 별다른 변화가 없고 죽거나 condition이 좋지 않은 mouse가 없었기에 1차적으로 독성이 없는 것으로 사료됨



단기실험 mouse weight

장기실험 mouse weight

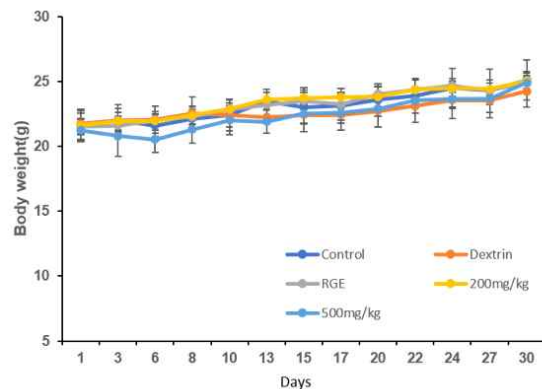
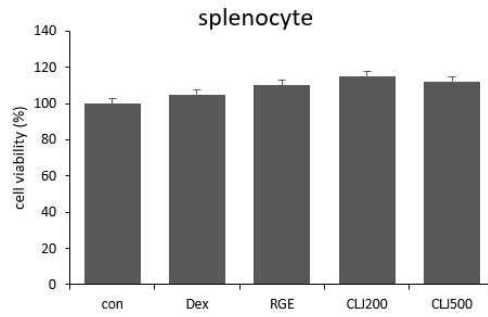


Fig 57. 강황+ 유자 추출혼합물의 단기(8일), 장기(30일)기간 마우스무게 변화관찰 Con;control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린)100 mg/kg, RGE;Red ginseng extract(홍삼추출물)200 mg/kg, CLJ200 mg/kg, 500 mg/kg, 2000 mg/kg(강황+ 유자 추출혼합물)

장기실험(30일)을 통한 비장세포 mouse splenocyte에서 강황+ 유자 추출혼합물을 사용하여 24시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 control에 대비하여 독성이 없는 것으로 나타났음. 따라서, ex vivo상에서도 독성을 띄지 않음을 확인함

Fig 58. 마우스 비장세포에서 강황+ 유자 추출혼합물의 세포독성 관찰



Con:control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린)100 mg/kg, RGE;Red ginseng extract(홍삼추출물)200 mg/kg, CLJ200 mg/kg, 500 mg/kg, 2000 mg/kg(강황+ 유자 추출혼합물)

마우스의 혈장에 강황+ 유자 추출혼합물을 단기, 장기간 동안 경구투입한 후, ALT(Alkaline phosphatase)의 수준을 ALT assay kit(biovision)를 통해 확인하였음. ALT 수치결과 control과 positive control, 강황+ 유자 추출혼합물을 투여한 마우스 모두 정상범위의 수치를 나타내는 것을 확인하였음. 또한 해부를 통하여 간독성을 알아보기 위해 일반적으로 확인하는 Liver tissue를 IHC하여 독성을 확인한 결과 독성이 나타나지 않았음

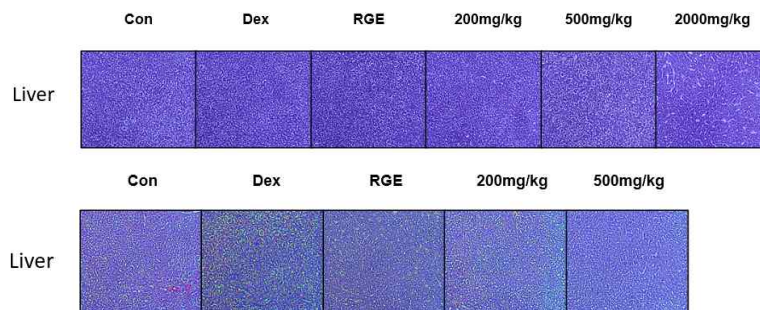
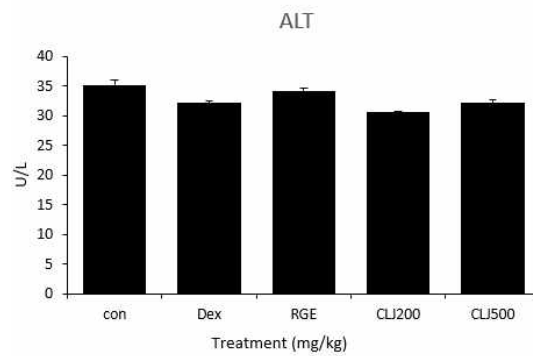
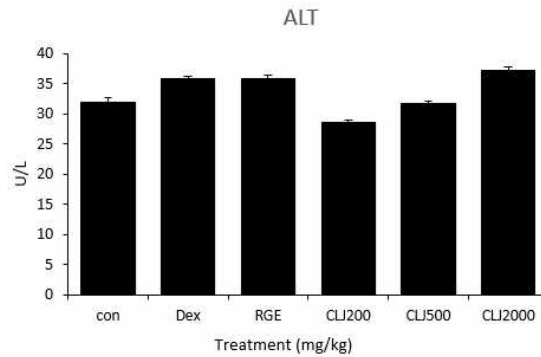


Fig 59. 강황+ 유자 추출혼합물을 통한 간독성 확인

Con;control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린), RGE;Red ginseng extract(홍삼추출물),

CLJ200 mg/kg, 500 mg/kg (강황+ 유자 추출혼합물)

강황+ 유자 추출혼합물을 경구투여 후 해부를 통하여 각각의 전체적인 장기들의 독성을 확인하였으며, 장기 독성을 볼 때 주로 확인 하는 Liver, Kidney, Spleen을 확인하여 병변 확인 및 무게 측정을 통해 독성 확인함

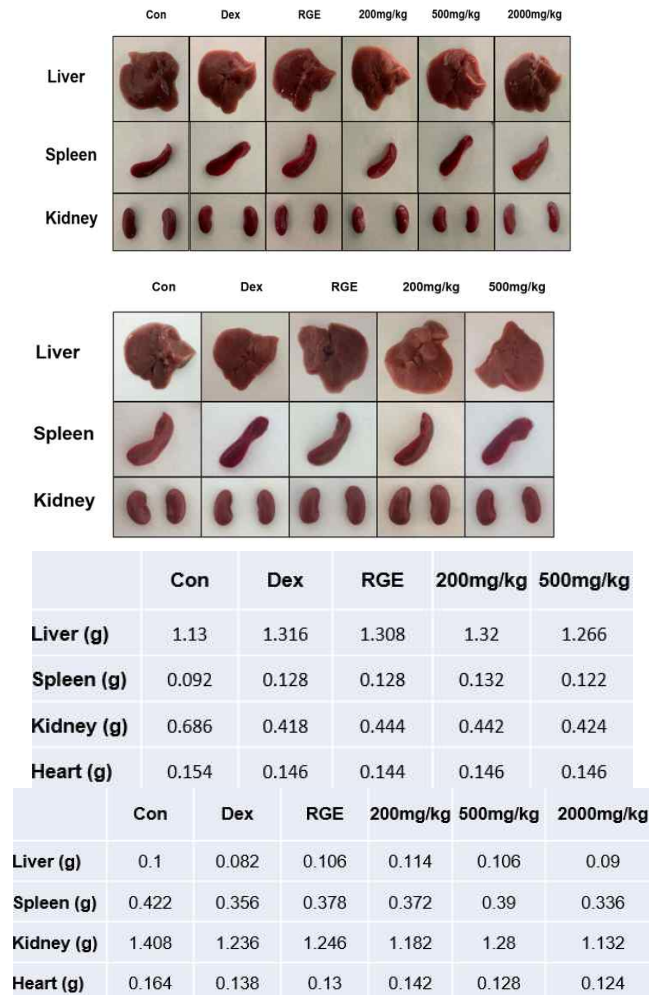


Fig 60. 강황+ 유자 추출혼합물을 통한 장기독성 확인

Con;control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린)100 mg/kg, RGE;Red ginseng extract(홍삼 추출물)200 mg/kg, CLJ200 mg/kg, 500 mg/kg, 2000 mg/kg(강황+ 유자 추출혼합물)

#### 9-5. 강황+ 유자 추출혼합물의 cytokine 활성 평가

##### 가. 실험 방법

Mouse splenocyte에서 강황+ 유자 추출혼합물을 처리 후 비장세포 활성을 측정함. 면역 세포의 면역과 관련된 cytokine 인자들의 발현 정도를 mRNA level에서 확인함. 단기, 장 기간 투여 후 spleen을 적출하여 장기를 lysis하여 RNA 정제 후 qPCR로 cytokine mRNA level 확인하여 *in vivo*에서 효과를 측정함. spleen으로 primary cell culture를 한 mouse splenocyte를 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/mL로 seeding 후 12시간이 지난 후 강황+ 유자 추출혼합물을 처리하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 RNA prep kit로 RNA extraction 후 cDNA 합성을 하고 그것을 이용하여 cytokine 관련 인자의 primer를 이용하여 real-time PCR or Reverse PCR을 진행함으로써 *ex vivo*에서 효

과를 확인함

Table 5. Real-time PCR primer sequence

Name of genes	Oligonucleotide Sequence (5'-3')	
Interleukin 6 (m)	F	CAA GAG ACT TCC ATC CAG TTG C
	R	TTG CCG AGT TCT CAA AGT GAC
iNOS (m)	F	CCT GGT ACG GGC ATT GCT
	R	GCT CAT GCG GCC TCC TT
Interleukin 10 (m)	F	ACT GGC ATG AGG ATC AGC A
	R	AGA AAT CGA TGA CAG CGC C
Interleukin 4 (m)	F	AAC GAG GTC ACA GGA GAA G
	R	GTC TAT CGA TGA ATC CAG GC
GAPDH (m)	F	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C
	R	GGC CTC TCT CTT GCT CTC AGT ATC

나. 실험 결과

마우스를 희생시켜 cytokine활성 평가를 실시한 결과, CLJ2000 mg/kg에서는 활성이 떨어졌으며 CLJ500 mg/kg에서 positive control인 RGE와 비교하였을 때 활성을 띄는 것을 확인하였음. 면역활성 관련 인자인 IL-6, IL-10, IL-4의 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 또한 NO를 생성하여 면역반응에 있어 중요한 지표인 iNOS의 발현이 증가 되는 것을 확인함으로써, *in vivo*상에서도 면역증강을 보이는 것을 알 수 있었음. 또한, primary cell culture를 한 mouse splenocyte에서의 mRNA발현 양상을 확인하였을 때 *in vivo*와 마찬가지로 cytokine활성이 증가하는 것을 확인하였음

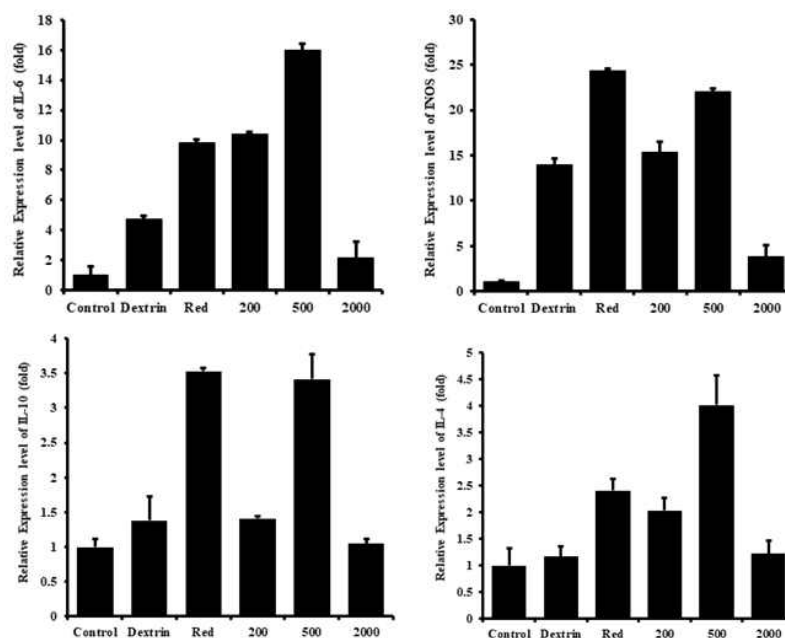


Fig 61. 단기기간(8일) 경구투여한 mouse의 cytokine 활성 평가

Con;control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린) 100 mg/kg, RGE;Red ginseng extract(홍삼 추출물) 200 mg/kg, CLJ 200 mg/kg, 500 mg/kg, 2000 mg/kg(강황+ 유자 추출혼합물)

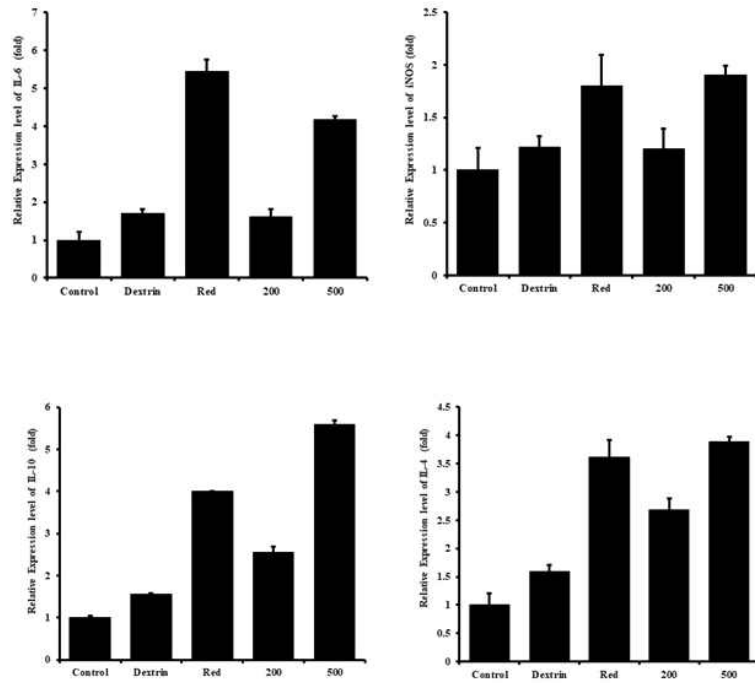


Fig 62. 장기기간(30일) 경구투여한 mouse의 cytokine 활성 평가  
 Con;control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린) 100 mg/kg, RGE;Red ginseng extract(홍삼 추출물) 200 mg/kg, CLJ 200 mg/kg, 500 mg/kg, 2000 mg/kg(강황+ 유자 추출혼합물)

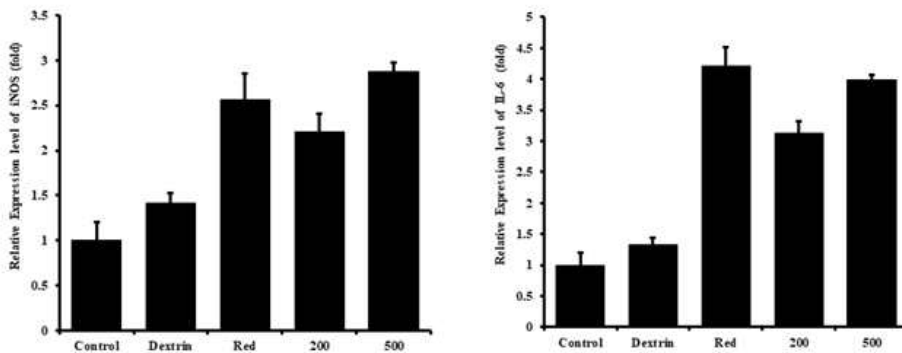


Fig 63. *Ex vivo*에서 cytokine 활성 평가  
 Con;control(대조군), Dex;dextrin(덱스트린), RGE;Red ginseng extract(홍삼추출물), CLJ 200 mg/kg, 500 mg/kg (강황+ 유자 추출혼합물)

9-6. 강황+ 유자 추출혼합물의 면역력 증진 기전 규명  
 가. 실험 방법

면역세포에서 강황+ 유자 추출혼합물을 처리한 후 NK세포 활성 관련 인자를 평가하기 위하여 protein level에서 확인함. Raw264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/ml로 seeding 후 12시간이 지난 후 강황+ 유자 추출혼합물을 처리하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량함. 정량한 protein을 가지고 면역 관련 인자의 antibody를 이용하여 western blot 진행

나. 실험 결과

강황+ 유자 혼합추출물의 매개 면역 증진을 연구하기 위해 우리는 0에서 48시간까지 RAW 264.7 세포의 LPS 또는 강황+ 유자 혼합추출물 처리를 통해 AKT와 I $\kappa$ -Ba의 신호 전달

경로를 조사했음. AKT 및 I $\kappa$ -Ba의 발현을 웨스턴 블롯에 의해 확인하였음. AKT 및 I $\kappa$ -Ba는 세포를 LPS 또는 강황+ 유자 혼합추출물에 노출시킨 후에 인산화되었음. p-AKT 및 p-I $\kappa$ -Ba 발현 수준도 초기에 증가하였음. 이러한 결과는 강황+ 유자 혼합추출물에 의한 AKT 및 I $\kappa$ Ba의 과발현을 입증하였음. DBW 추출물의 투여량이 세포 증식 및 면역 촉진제 생산에 미치는 영향은 세포 증식이 증가한 것이 AKT 경로 활성화의 주요 결과임을 시사함. 강황+ 유자 혼합추출물은 NF- $\kappa$ B 신호 전달에 긍정적인 영향을 미치므로 면역 자극에 영향을 미치고 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로를 조절할 수 있음. 따라서 강황+ 유자 혼합추출물의 면역 증강 효과가 있다는 결과가 나왔음

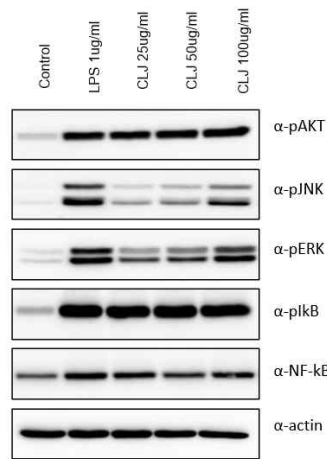


Fig 64. 강황+ 유자 추출혼합물의 AKT와 I $\kappa$ -Ba의 신호 전달 경로 단백질발현 확인  
LPS(Lipopolysaccharide, 지질다당류) CLJ 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL (강황+ 유자 추출혼합물)

### 9-7. 결론

주관기관에서 제공받은 강황물추출물(Curcumin 0.21 mg/g), 강황20%주정추출물(Curcumin 1.93 mg/g), 유자물추출물(Hesperidin 17.98 mg/g), 유자20%주정추출물(21.12 mg/g)들 중 면역활성과 관련하여 가장 좋은 효과를 보이는 시료를 찾기 위해 *in vitro*에서의 각 추출물의 세포 생존능, 면역증진 관련 cytokine 활성화, NO활성 변화를 측정하였음. 강황물추출물, 유자물추출물에서 면역 활성화에 좋은 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 1차 효능평가를 통해 효능을 나타낸 강황물추출물, 유자물추출물을 선택하고 혼합하여 사용하였음

1차년도 연구 결과 강황물추출물과 유자물추출물에서 면역 활성을 보이는 것을 확인하였으며 강황물추출물과 유자물추출물이 7:3의 비율로 혼합되었을 때 가장 높은 활성을 보였음. *In vitro*상에서 mRNA 수준에서 면역 조절 관련 인자가 LPS와 비슷한 수준으로 활성이 높게 나타나는 결과도 있었으며, NO활성 효과를 측정하였을 때도 마찬가지로 활성이 증가하는 것을 확인하였음. *In vivo/ex vivo*상에서도 추출혼합물이 독성을 나타내지 않으면서 면역관련인자 cytokine활성을 나타내는 것을 확인함으로써 효과를 입증함

결론적으로 이 연구에서 강황+ 유자 추출혼합물이 쥐의 비장 세포 및 대식세포에서 사이토카인 분비를 증가 시킨다는 것을 확인하였음. NF- $\kappa$ B 경로를 통해 면역계 활동이 일어나는지를 결정하기 위해 강황+ 유자 추출혼합물을 더 조사했음. 강황+ 유자 추출혼합물은 인산화 된 I $\kappa$ Ba 및 NF- $\kappa$ B를 통해 전염증성 사이토카인 iNOS와 같은 다양한 사이토카인을 활성화시켰음. 따라서 강황+ 유자 추출혼합물이 NF- $\kappa$ B 신호 전달을 통해 면역계를 조절한다는 것을 확인하였음. NF- $\kappa$ B 경로를 통한 면역 효과를 RAW264.7 세포를 사용

하여 평가하였음. 강황+ 유자 추출혼합물은 우수한 면역 자극제이며 시험관 내 및 생체 내에서 마우스의 면역계 증진을 필요로 하는 치료법의 미래 개발에 좋은 가능성을 가지고 있음. 전체적으로, 강황+ 유자 추출혼합물은 마우스 비장 세포 및 대식세포에서 사이토카인 분비를 증가시키는 것으로 확인되어 건강기능식품 소재로 활용 가능성을 확인하였음

## 10. 기능성표시식품 산업화

### 10-1. 기능성표시식품 제도

- 기능성표시식품은 새롭게 제정 고시된 「부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정」 식품의약품안전처고시 제 2020-129호(20.12.29)에 따라 생산 유통 가능하게 되었음, 그 주요 내용은 아래와 같음

#### 1. 제정이유

「식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행령」 제3조제1항 관련 별표 1 제3호 나목에 따라 부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 범위(제품에 함유된 영양성분이나 원재료가 신체조직과 기능의 증진에 도움을 줄 수 있다는 내용)를 구체적으로 정함으로써 과학적 근거를 기반으로 식품에 기능성을 표시하여 소비자의 선택권을 확대하는 한편 부당한 표시 또는 광고로부터 소비자를 보호하고자 함

#### 2. 주요내용

##### 가. 적용 범위(안 제3조)

- (1) “신체조직과 기능의 증진에 도움을 줄 수 있다는 내용”(이하 “기능성”이라 한다)을 표시 또는 광고하려는 식품 등에 적용함
- (2) 주류, 특수의료용도 등 식품, 영유아·임산부 대상 식품 등은 적용 대상에서 제외함

##### 나. 기능성의 범위(안 제4조)

- (1) 건강기능식품의 기능성 원료 29종 및 식품의약품안전처장에게 인정받은 새로운 원료의 기능성 등은 표시·광고가 가능함
- (2) 어린이, 임신·수유부, 노인 등 건강 민감계층과 관련된 내용 등은 기능성 범위에서 제외함

##### 다. 식품 등의 요건(안 제5조)

- (1) 우수건강기능식품제조기준 적용업소에서 제조·가공된 원재료 또는 성분을 사용하여 식품안전관리인증기준적용업소 등에서 제조·가공되어야 함
- (2) 식품 등에 함유된 기능성 원재료 또는 성분의 함량은 1일 섭취기준량의 30% 이상을 충족하고 최대함량기준을 초과하지 않아야 함

##### 라. 표시 또는 광고의 방법(안 제6조)

- (1) 기능성 내용 및 “본 제품은 건강기능식품이 아닙니다.”라는 문구를 주표시면에 표시하여야 함
- (2) 기능성 광고를 할 경우 “본 제품은 건강기능식품이 아닙니다.”라는 문구를 포함하여야 함

##### 마. 자료 공개 등(안 제7조)

- 1) 한국식품산업협회 인터넷 홈페이지에 제품명, 업소명, 기능성 성분명과 그 함량 등의 자료를 공개하여야 함

- 기능성표시식품은 고시 제4조에 따라 기능성의 범위는 고시의 별표 2 제1호에 해당하는



기능성 원료(홍삼 등 29종), 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제10조제1항에 따라 인정받은 기능성 원료(개별인정형 건강기능식품 원료) 중 일반 식품으로 사용 신청하여 식품의약품안전처장에게 인정받은 원료, 「식품 등의 표시 또는 광고 실증에 관한 규정」 제4조제3호 중 인체적용시험 또는 인체적용시험 결과에 대한 정성적 문헌고찰(체계적 고찰, SR: Systematic Review)을 통해 과학적 자료를 갖춘 원료를 사용하여 생산한 제품이어야 함

- 또한, 고시 제4조에 따라 기능성표시식품은 식품안전관리인증기준적용업소로 인증 받은 업소(HACCP)에서 생산되어야 하며 기능성을 나타내는 원재료 또는 성분의 함량은 1일 섭취기준량의 30%이상을 충족하고 최대함량기준을 초과하지 않아야 하며, 기능성을 나타내는 원재료 또는 성분은 우수건강기능식품제조기준 적용업소(FGMP)에서 제조 가공되어야 함
- 이와 같은 규정에 충족하기 위하여 본 사업에서는 아래의 원료를 사용하여 “한끼어터 사워크림”, “한끼어터 콘포타주”, “한끼어터 피자” 3품목을 산업화하였음

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 업체명 : 대한캠택주식회사</li><li>• 기능성 원료 인정번호 : 제2018-6호</li><li>• 기능성 원재료 : 그린커피빈주정추출물</li><li>• 기능성 내용 : 체지방감소에 도움을 줄 수 있음</li><li>• 일일 섭취량 : 그린커피빈주정추출물로서 500 mg/일</li><li>• 지표성분 : 클로로겐산 245 mg/g(표시량의 80~120%)</li></ul> |
|--|



### 식품의약품안전처



수신 대한캠택 주식회사 대표자 귀하 (우01811 서울특별시 노원구 공릉로 232, 707호 (공릉동, 서울테크노파크))

(경유)

제목: 기능성을 나타내는 원재료의 일반식품 사용 가능 여부 판단 결과 알림

1. 「부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정」 제4조제1항제2호와 관련됩니다.
2. 귀 업체에서 제출하신 기능성을 나타내는 원재료의 일반식품 사용 신청서 검토 결과를 아래와 같이 알려드리니 업무에 참고하시기 바랍니다.

가. 신청사항

- 1) 업체명(소재지): 대한캠택 주식회사(서울 노원구 공릉로 232, 707호)
- 2) 기능성 원료 인정번호: 제2018-6호
- 3) 기능성 원재료: **그린커피빈주정추출물**
- 4) 기능성내용: 체지방 감소에 도움을 줄 수 있음

나. 검토결과: 일반식품 사용 가능. 끝.

식품의약품안전처장



주무관	조효정	사무관	조혜영	과장	전길호(2.9)
협조자					박동희
시행	식품표시광고정책과-2119 (2021. 2. 9.)			접수	
우	28159	충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187			/ www.mfds.go.kr
전화번호	043-719-2183	팩스번호	043-719-2180	/ chipchipstar00@korea.kr	/ 비공개(7)

## 10-2. 기능성표시식품 제조공정 표준화

개별인정형 건강기능식품 원료 그린커피빈주정추출물을 함유하는 “한끼어터” 기능성 표시 식품 개발을 위하여 그린커피빈주정추출물의 지표성분인 Chlorogenic acid를 제조공정별로 분석하여 제조공정 중 지표성분의 변화를 확인하고자 함

그린커피빈주정추출물의 일일 섭취량은 500 mg이며 “체지방 감소에 도움을 줄 수 있음”으로 제2018-6호(‘18.07.03.) 개별인정형 건강기능식품 원료로 인정되었고, 지표성분으로는 Chlorogenic acid로서 245 mg/g 임

Chlorogenic acid의 분석은 그린커피빈주정추출물의 지표성분 분석법을 적용하였음  
가. 방법

### (1) 시료 채취

시료는 개별인정형 건강기능식품 원료 공급업체인 대한캠택(주)에서 그린커피빈주정추출물을 공급받았으며 기타 원료는 (주)에스디씨에서 시제품 생산에 사용된 원료에서 채취하였고, 제조공정별 시료는 (주)에스디씨에서 생산된 시료로서 스낵류 제조공정에서 굽기 전, 오븐에 구운 후, 시즈닝 처리 후 각 5곳에서 채취한 시료를 채취하여 분석하였음

### (2) 지표성분 분석

(가) Chlorogenic acid 표준용액의 제조

표준품 Chlorogenic acid(Sigma-aldrich) 10 mg을 취하여 10 mL용량플라스크에 넣고, 30% Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액을 희석하여 표준용액으로 함

(나) 시험용액의 제조

검체 원재료(건조물) 0.5 g을 정밀하게 달아 50 mL 용량플라스크에 취해 30% Methanol 50 mL로 정용하여 2시간 초음파 추출을 함. 이를 식힌 후 정용하여 0.45 μm PTFE filter로 여과하고, 여액을 검액으로 함

(다) 기기조건

- 검출기 : HPLC(shimadzu) PDA Detector (측정과장 330 nm)
- 칼 럼 : Supelco Discovery C18 길이 250\*4.6 mm I.D, 5um
- 유 속 : 1.4 mL/min
- 주입량 : 5 μL
- 이동상 : A- 0.5% Phosphoric acid in water  
B- 0.5% Phosphoric acid in ACN

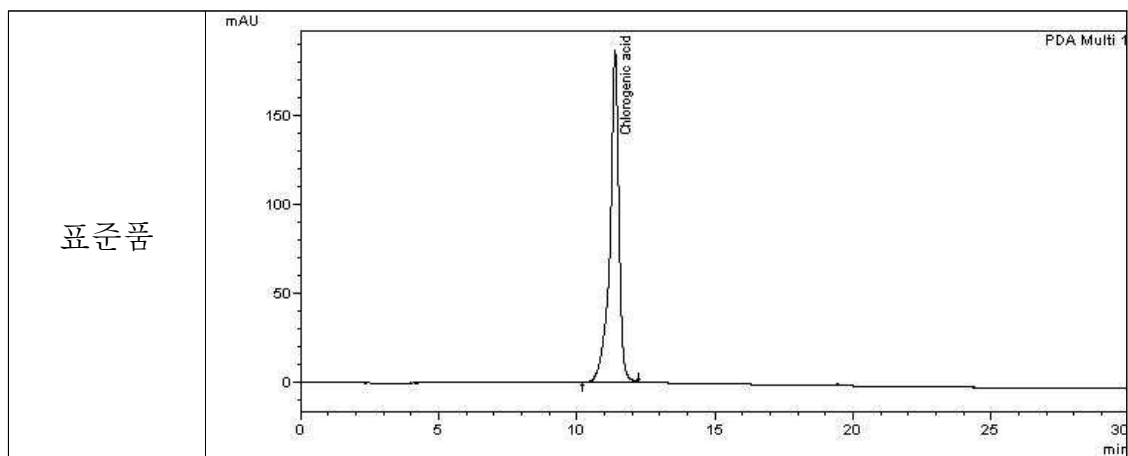
Time(min)	Mobile phase A	Mobile phase B
0	95	5
7	95	5
27	70	30
28	10	90
30	10	90
31	95	5
40	95	5

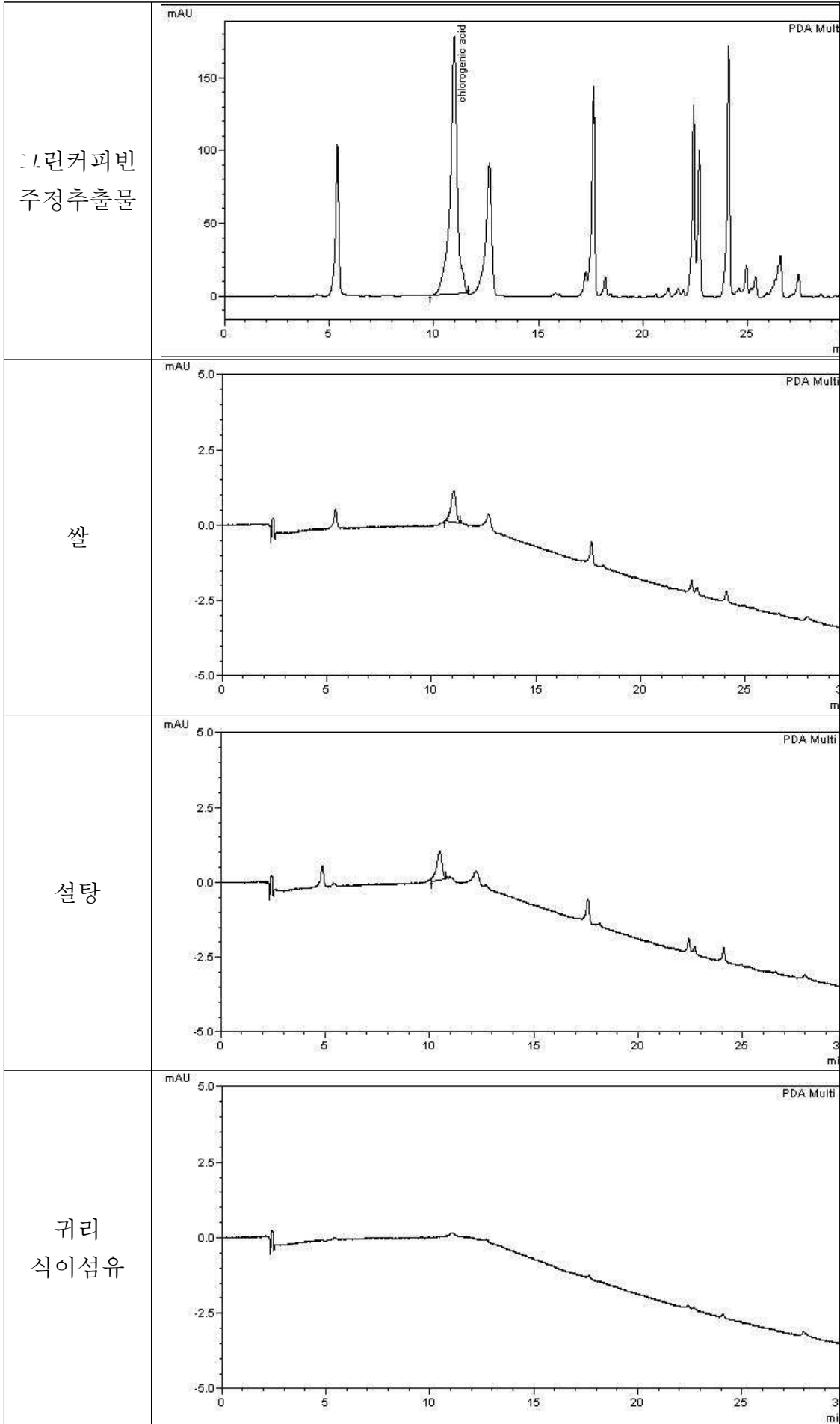
- 계산식

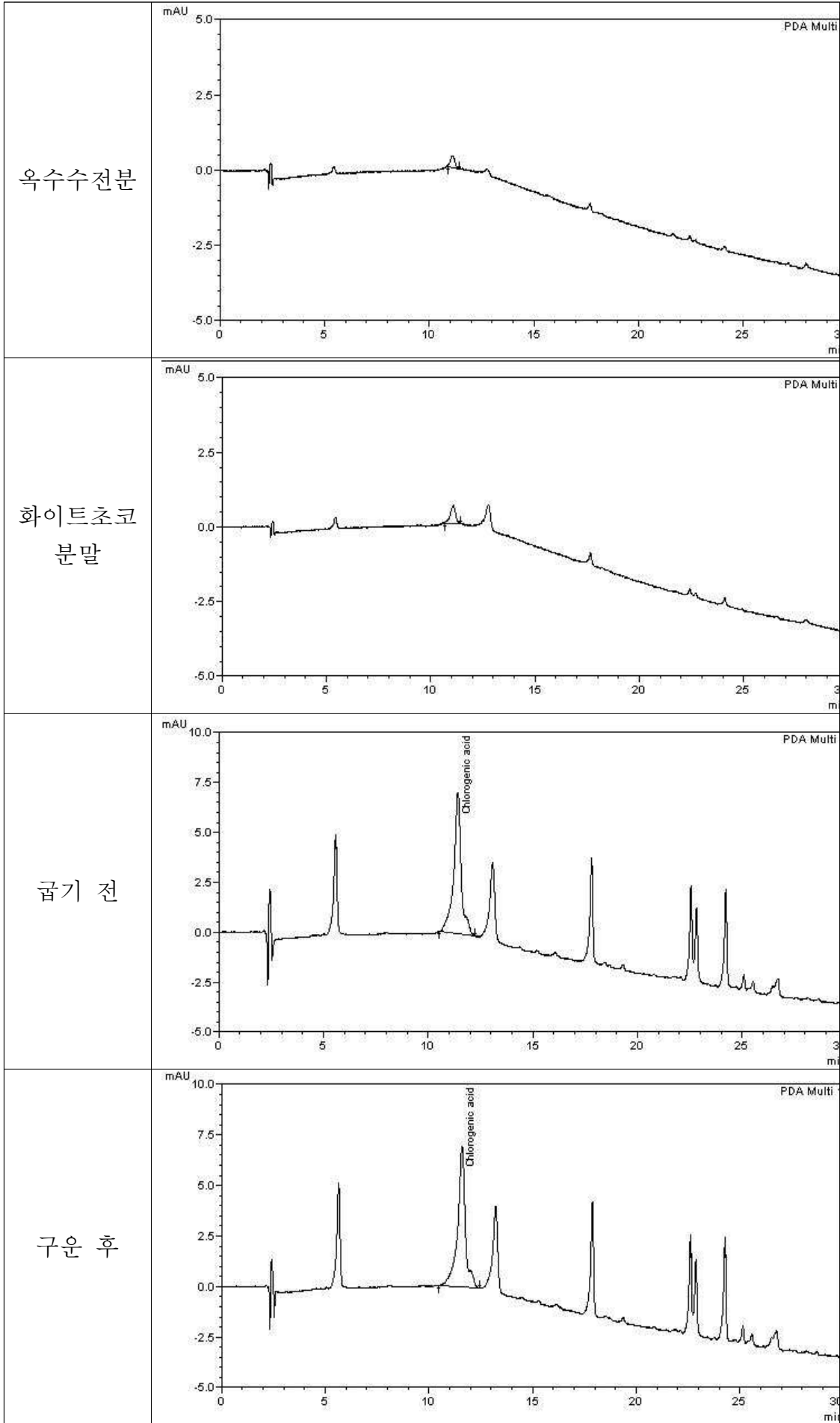
$$\text{Chlorogenic acid 정량(mg/g)} = \frac{\text{검액의 Chlorogenic acid농도 } (\mu\text{g/mL}) * \text{검액의 최종부피 (mL)}}{\text{검체 칭량(g)} * 1000 (\mu\text{g/mg})}$$

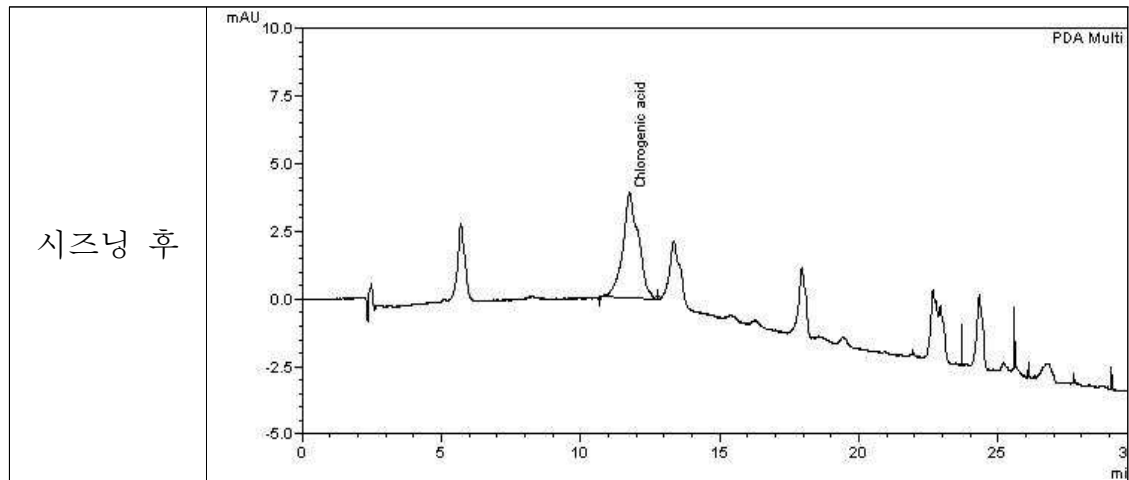
나. 결과

(1) 분석









(2) 결과

시료	Chlorogenic acid (mg/g)
그린커피빈주정추출물	269.9
쌀	-
자일리톨	-
귀리식이섬유	-
옥수수전분	-
화이트초코분말	-
굽기 전-1	3.92
굽기 전-2	3.51
굽기 전-3	3.55
굽기 전-4	3.85
굽기 전-5	3.96
구운 후-1	3.62
구운 후-2	3.51
구운 후-3	3.36
구운 후-4	3.49
구운 후-5	3.65
시즈닝 후-1	2.63
시즈닝 후-2	2.72
시즈닝 후-3	2.77
시즈닝 후-4	2.65
시즈닝 후-5	2.88

(3) 결론

“한끼어터”의 제조공정 중 사용된 원료와 제조공정별 지표성분 분석결과 원재료 중에는 그린커피빈주정추출물에서는 Chlorogenic acid 269.9 mg/g이 검출되었으나 기타원료에서는 검출되지 않았음

제조공정 중에서는 굽기 전에는 3.92 mg/g, 3.51 mg/g, 3.55 mg/g, 3.85 mg/g, 3.96 mg/g, 구운 후 3.62 mg/g, 3.51 mg/g, 3.36 mg/g, 3.49 mg/g, 3.65 mg/g이 검출되었으며, 시즈닝 후에는 2.63 mg/g, 2.72 mg/g, 2.77 mg/g, 2.65 mg/g, 2.88 mg/g이 검출되었음  
지표성분 분석결과로 볼 때 “한끼어터” 제품 생산에 사용된 원료 중에는 그린커피빈주정추

출물 외에는 Chlorogenic acid가 검출되지 않아 “한끼어터”에서 검출되는 Chlorogenic acid는 전량 “한끼어터”에 함유된 그린커피빈주정추출물에서 기인된 것으로 판단됨  
 “한끼어터” 제조과정 중 Chlorogenic acid의 변화 결과를 보면 구운 후 Chlorogenic acid는 약 6 % 감소하였음. 시즈닝 처리 후엔 약 2.73 mg/g으로 구운 후와 비교하였을 때 약 23 % 감소하였음. 이는 시즈닝 첨가로 총량의 증가에서 기인한 것으로 판단됨

### 10-3. 기능성표시식품 산업화

#### 가. 한끼어터 사워크림 산업화

- 제품명 : 한끼어터 사워크림
- 식품의 유형 : 과자
- 유통기한 : 제조일로부터 9개월
- 성상 : 사워크림의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미, 이취가 없어야 한다.
- 원재료 또는 성분명 및 배합비 : 쌀 69.83%, 자일리톨 9.98%, 복합조미식품[사워크림 맛씨즈닝] 4.27%, 식물성유지[정제팜올레인유, 팜올레인유]4.27%, 귀리식이섬유(고시형)3.88%, 전분[옥수수전분]3.66%, 화이트초콜릿2.55%, 그린커피빈주정추출물[기능성원료인정제2018-6호]0.89%, 정제소금0.67%
- 기준규격 :
  - ① 성상 : 사워크림의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미, 이취가 없어야 한다.
  - ② 열량 : 412.37 kcal/100 g
  - ③ 나트륨 : 727.18 mg/100 g
  - ④ 탄수화물 : 82.41 g/100 g
  - ⑤ 당류 : 6.44 g/100 g
  - ⑥ 식이섬유 : 4.93 g/100 g
  - ⑦ 지방 : 7.43 g/100 g
  - ⑧ 트랜스지방 : 0.04 g/100 g
  - ⑨ 포화지방 : 3.46 g/100 g
  - ⑩ 콜레스테롤 : 2.02 mg/100 g
  - ⑪ 단백질 : 6.43 g/100 g
  - ⑫ 대장균군 : 음성
  - ⑬ 납 : 0.0939 mg/kg
  - ⑭ 카드뮴 : 0.0053 mg/kg
  - ⑮ 수은 : 불검출
  - ⑯ 비소 : 0.0269 mg/kg
  - ⑰ 오크라톡신 : 불검출
  - ⑱ 카페인 : 183.32 mg/kg
  - ⑲ 클로로겐산 : 1.89 mg/g

품목제조보고서	제품 사진																								
<p>발급번호 : MAMS-ALBM-PDTM-LVBO-GFVL</p> <p style="text-align: center;"><b>식품·식품첨가물 품목제조보고서</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;"> <b>보고인</b> 성명 : 차민석         </td> <td style="width: 30%;"> <b>생년월일</b> 1970년 05월 09일         </td> <td style="width: 40%;"> <b>신고번호</b> 061 381 8612         </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <b>영양소</b> 소재지 : 전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-37(11-47)         </td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;"> <b>식품의 유형</b> 과자         </td> <td style="width: 30%;"> <b>과자</b> 한끼어터 사워크림         </td> <td style="width: 40%;"> <b>품목제조보고번호</b> 2018051909726         </td> </tr> <tr> <td> <b>유통기한</b> 9개월         </td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td> <b>원재료명 또는 성분명 및 배합비율</b> 쌀도 69.83%, 자일리톨 9.98%, 복합조미식품[콘포타쥬 맛씨즈닝] 4.27%, 식물성유지[정제팜올레인유, 팜올레인유]4.27%, 귀리식이섬유(고시형)3.88%, 전분[옥수수전분]3.66%, 화이트초콜릿2.55%, 그린커피빈주정추출물[기능성원료인정제2018-6호]0.89%, 정제소금0.67%         </td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td> <b>염도</b> 염도 없음         </td> <td colspan="2"> <b>염도에 기재</b> 염도에 기재         </td> </tr> <tr> <td> <b>포장방법 및 포장재질</b> 포장방법 및 포장재질         </td> <td colspan="2"> <b>포장에 기재</b> 포장에 기재         </td> </tr> <tr> <td> <b>첨상</b> 첨상         </td> <td colspan="2"> <b>사워크림의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이취가 없음</b> </td> </tr> </table> <p style="font-size: small;">       ■ 고지방·저지방 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음        ■ 알, 구아를 성분대상으로 표시 관례하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오        ■ 살균·멸균 제품의 해당 여부 [O]는 살균 [ ] 살균 [ ] 멸균     </p> <p style="font-size: x-small;">       기타 : 영양성분내역, 수득량, 농축액시범(조)제조서 / 소재지 : 전남 담양군 담양읍 예곡길 11-9 (061-381-8612) / 위탁제조업체 : 프랑공방     </p> <p style="text-align: right;">2021년 05월 11일 보고인 차민석</p> <p style="text-align: center;"><b>전라남도 담양군수</b> 귀하</p> <p style="font-size: x-small;">       품목제조번호 : 2018051909726        처리부서 : 자치혁신국 녹색관광과    처리자명 : 서효진    처리일자 : 2021년 05월 11일     </p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> </div>	<b>보고인</b> 성명 : 차민석	<b>생년월일</b> 1970년 05월 09일	<b>신고번호</b> 061 381 8612	<b>영양소</b> 소재지 : 전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-37(11-47)			<b>식품의 유형</b> 과자	<b>과자</b> 한끼어터 사워크림	<b>품목제조보고번호</b> 2018051909726	<b>유통기한</b> 9개월			<b>원재료명 또는 성분명 및 배합비율</b> 쌀도 69.83%, 자일리톨 9.98%, 복합조미식품[콘포타쥬 맛씨즈닝] 4.27%, 식물성유지[정제팜올레인유, 팜올레인유]4.27%, 귀리식이섬유(고시형)3.88%, 전분[옥수수전분]3.66%, 화이트초콜릿2.55%, 그린커피빈주정추출물[기능성원료인정제2018-6호]0.89%, 정제소금0.67%			<b>염도</b> 염도 없음	<b>염도에 기재</b> 염도에 기재		<b>포장방법 및 포장재질</b> 포장방법 및 포장재질	<b>포장에 기재</b> 포장에 기재		<b>첨상</b> 첨상	<b>사워크림의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이취가 없음</b>		
<b>보고인</b> 성명 : 차민석	<b>생년월일</b> 1970년 05월 09일	<b>신고번호</b> 061 381 8612																							
<b>영양소</b> 소재지 : 전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-37(11-47)																									
<b>식품의 유형</b> 과자	<b>과자</b> 한끼어터 사워크림	<b>품목제조보고번호</b> 2018051909726																							
<b>유통기한</b> 9개월																									
<b>원재료명 또는 성분명 및 배합비율</b> 쌀도 69.83%, 자일리톨 9.98%, 복합조미식품[콘포타쥬 맛씨즈닝] 4.27%, 식물성유지[정제팜올레인유, 팜올레인유]4.27%, 귀리식이섬유(고시형)3.88%, 전분[옥수수전분]3.66%, 화이트초콜릿2.55%, 그린커피빈주정추출물[기능성원료인정제2018-6호]0.89%, 정제소금0.67%																									
<b>염도</b> 염도 없음	<b>염도에 기재</b> 염도에 기재																								
<b>포장방법 및 포장재질</b> 포장방법 및 포장재질	<b>포장에 기재</b> 포장에 기재																								
<b>첨상</b> 첨상	<b>사워크림의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이취가 없음</b>																								

나. 한끼어터 콘포타쥬 산업화

- 제품명 : 한끼어터 콘포타쥬
- 식품의 유형 : 과자
- 유통기한 : 제조일로부터 9개월
- 성상 : 콘포타쥬의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미, 이취가 없어야 한다.
- 원재료 또는 성분명 및 배합비 : 쌀 69.83%, 자일리톨 9.98%, 복합조미식품[콘포타쥬 맛씨즈닝] 4.27%, 식물성유지[정제팜올레인유, 팜올레인유]4.27%, 귀리식이섬유(고시형)3.88%, 전분[옥수수전분]3.66%, 화이트초콜릿2.55%, 그린커피빈주정추출물[기능성원료인정제2018-6호]0.89%, 정제소금0.67%
- 기준규격 :
  - ① 성상 : 콘포타쥬의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이취가 없어야 한다.
  - ② 열량 : 415.15 kcal/100
  - ③ 나트륨 : 758.79 mg/100 g
  - ④ 탄수화물 : 82.66 g /100 g
  - ⑤ 당류 : 6.83 g/100 g
  - ⑥ 식이섬유 : 4.93 g/100 g
  - ⑦ 지방 : 7.41 g/100 g
  - ⑧ 트랜스지방 : 0.03 g/100 g
  - ⑨ 포화지방 : 3.22 g/100 g
  - ⑩ 콜레스테롤 : 불검출
  - ⑪ 단백질 : 6.92 g/100 g
  - ⑫ 대장균군 : 음성
  - ⑬ 납 : 0.0939 mg/kg



- ⑭ 카드뮴 : 0.0053 mg/kg
- ⑮ 수은 : 불검출
- ⑯ 비소 : 0.0269 mg/kg
- ⑰ 오크라톡신 : 불검출
- ⑱ 카페인 : 183.32 mg/kg
- ⑲ 클로로젠산 : 1.89 mg/g

품목제조보고서	제품 사진																																																																								
<div style="text-align: center;"> <p>발급번호 : MAMB-ALBM-HHJP-YTVX-PCRQ</p> <p><b>식품·식품첨가물 품목제조보고서</b></p> </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: small;"> <tr> <td style="width: 30%;"> <b>보고인</b>            성명 : 차민석            직책 : 차민석         </td> <td style="width: 30%;"> <b>생년월일</b>            1970년 05월 09일  <b>전화번호</b>            061 381 8912  <b>휴대전화</b>            ( )         </td> <td style="width: 30%;"></td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <b>영업소</b>            명칭(상호) : (주)에스디씨푸드            소재지 : 전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-37(11-47)         </td> <td> <b>영업등록번호</b>            20180519097         </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <b>제품정보</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>식품의 유형</td> <td>과자</td> <td>품목제조보고번호</td> <td>2018051909727</td> </tr> <tr> <td>제품명</td> <td colspan="3">한끼어터 분포타주</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td colspan="3">9개월</td> </tr> <tr> <td>품질유지기한</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>원재료 또는 성분명 및 배합비율</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>풍도 확인</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>보관방법 및 포장개공</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>포장방법 및 포장단위</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td colspan="3">분포타주의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이며, 이취가 없음</td> </tr> <tr> <td>품목의 특성</td> <td colspan="3">           ■ 고열량·지방량 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음            ■ 알, 유아를 산취대상으로 표시 면제하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오            ■ 상온 보관 제품의 해당 여부 [ ]비냉장 [ ]냉장         </td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="3">           기타 : 제1차제조업소 : 수취자 - 농림축산검역본부(주)에스디씨 / 소재지 : 전남 담양군 담양읍 예곡길 11-9 (061-381-8912) / 제2차제조업소 : 동원식품         </td> </tr> <tr> <td colspan="3">           「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.         </td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">           2021년 05월 11일            보고인 차민석         </td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;"> <b>전라남도 담양군수</b> 귀하         </td> </tr> <tr> <td colspan="3">           품목제조번호 : 2018051909727         </td> </tr> <tr> <td style="width: 25%;">처리부서</td> <td style="width: 25%;">자치혁신국 녹색관광과</td> <td style="width: 25%;">처리지정명</td> <td style="width: 25%;">처리일자</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>서호진</td> <td>2021년 05월 11일</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> </div>	<b>보고인</b> 성명 : 차민석 직책 : 차민석	<b>생년월일</b> 1970년 05월 09일 <b>전화번호</b> 061 381 8912 <b>휴대전화</b> ( )		<b>영업소</b> 명칭(상호) : (주)에스디씨푸드 소재지 : 전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-37(11-47)		<b>영업등록번호</b> 20180519097	<b>제품정보</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>식품의 유형</td> <td>과자</td> <td>품목제조보고번호</td> <td>2018051909727</td> </tr> <tr> <td>제품명</td> <td colspan="3">한끼어터 분포타주</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td colspan="3">9개월</td> </tr> <tr> <td>품질유지기한</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>원재료 또는 성분명 및 배합비율</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>풍도 확인</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>보관방법 및 포장개공</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>포장방법 및 포장단위</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td colspan="3">분포타주의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이며, 이취가 없음</td> </tr> <tr> <td>품목의 특성</td> <td colspan="3">           ■ 고열량·지방량 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음            ■ 알, 유아를 산취대상으로 표시 면제하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오            ■ 상온 보관 제품의 해당 여부 [ ]비냉장 [ ]냉장         </td> </tr> </table>			식품의 유형	과자	품목제조보고번호	2018051909727	제품명	한끼어터 분포타주			유통기한	9개월			품질유지기한				원재료 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재			풍도 확인	맛장애 기재			보관방법 및 포장개공	맛장애 기재			포장방법 및 포장단위	맛장애 기재			성상	분포타주의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이며, 이취가 없음			품목의 특성	■ 고열량·지방량 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음 ■ 알, 유아를 산취대상으로 표시 면제하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 ■ 상온 보관 제품의 해당 여부 [ ]비냉장 [ ]냉장			기타 : 제1차제조업소 : 수취자 - 농림축산검역본부(주)에스디씨 / 소재지 : 전남 담양군 담양읍 예곡길 11-9 (061-381-8912) / 제2차제조업소 : 동원식품			「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.			2021년 05월 11일 보고인 차민석			<b>전라남도 담양군수</b> 귀하			품목제조번호 : 2018051909727			처리부서	자치혁신국 녹색관광과	처리지정명	처리일자			서호진	2021년 05월 11일	
<b>보고인</b> 성명 : 차민석 직책 : 차민석	<b>생년월일</b> 1970년 05월 09일 <b>전화번호</b> 061 381 8912 <b>휴대전화</b> ( )																																																																								
<b>영업소</b> 명칭(상호) : (주)에스디씨푸드 소재지 : 전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-37(11-47)		<b>영업등록번호</b> 20180519097																																																																							
<b>제품정보</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>식품의 유형</td> <td>과자</td> <td>품목제조보고번호</td> <td>2018051909727</td> </tr> <tr> <td>제품명</td> <td colspan="3">한끼어터 분포타주</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td colspan="3">9개월</td> </tr> <tr> <td>품질유지기한</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>원재료 또는 성분명 및 배합비율</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>풍도 확인</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>보관방법 및 포장개공</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>포장방법 및 포장단위</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td colspan="3">분포타주의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이며, 이취가 없음</td> </tr> <tr> <td>품목의 특성</td> <td colspan="3">           ■ 고열량·지방량 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음            ■ 알, 유아를 산취대상으로 표시 면제하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오            ■ 상온 보관 제품의 해당 여부 [ ]비냉장 [ ]냉장         </td> </tr> </table>			식품의 유형	과자	품목제조보고번호	2018051909727	제품명	한끼어터 분포타주			유통기한	9개월			품질유지기한				원재료 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재			풍도 확인	맛장애 기재			보관방법 및 포장개공	맛장애 기재			포장방법 및 포장단위	맛장애 기재			성상	분포타주의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이며, 이취가 없음			품목의 특성	■ 고열량·지방량 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음 ■ 알, 유아를 산취대상으로 표시 면제하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 ■ 상온 보관 제품의 해당 여부 [ ]비냉장 [ ]냉장																																	
식품의 유형	과자	품목제조보고번호	2018051909727																																																																						
제품명	한끼어터 분포타주																																																																								
유통기한	9개월																																																																								
품질유지기한																																																																									
원재료 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재																																																																								
풍도 확인	맛장애 기재																																																																								
보관방법 및 포장개공	맛장애 기재																																																																								
포장방법 및 포장단위	맛장애 기재																																																																								
성상	분포타주의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이며, 이취가 없음																																																																								
품목의 특성	■ 고열량·지방량 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음 ■ 알, 유아를 산취대상으로 표시 면제하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 ■ 상온 보관 제품의 해당 여부 [ ]비냉장 [ ]냉장																																																																								
기타 : 제1차제조업소 : 수취자 - 농림축산검역본부(주)에스디씨 / 소재지 : 전남 담양군 담양읍 예곡길 11-9 (061-381-8912) / 제2차제조업소 : 동원식품																																																																									
「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.																																																																									
2021년 05월 11일 보고인 차민석																																																																									
<b>전라남도 담양군수</b> 귀하																																																																									
품목제조번호 : 2018051909727																																																																									
처리부서	자치혁신국 녹색관광과	처리지정명	처리일자																																																																						
		서호진	2021년 05월 11일																																																																						

다. 한끼어터 피자 산업화


- 제품명 : 한끼어터 피자
- 식품의 유형 : 과자
- 유통기한 : 제조일로부터 9개월
- 성상 : 피자의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미, 이취가 없어야 한다.
- 원재료 또는 성분명 및 배합비 : 쌀 69.83%, 자일리톨 9.98%, 복합조미식품[토마토& 피자맛씨즈닝] 4.27%, 식물성유지[정제팜올레인유, 팜올레인유]4.27%, 귀리식이섬유(고시형)3.88%, 전분[옥수수전분]3.66%, 화이트초콜릿2.55%, 그린커피빈주정추출물[기능성원료인정제2018-6호]0.89%, 정제소금0.67%
- 기준규격 :
  - ① 성상 : 피자의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미, 이취가 없어야 한다
  - ② 열량 : 415.75 kcal/100 g
  - ③ 나트륨 : 809.82 mg/100 g
  - ④ 탄수화물 : 81.40 g /100 g
  - ⑤ 당류 : 5.27 g/100 g
  - ⑥ 식이섬유 : 4.93 g/100 g
  - ⑦ 지방 : 7.93 g/100 g

- ⑧ 트랜스지방 : 0.04 g/100 g
- ⑨ 포화지방 : 3.50 g/100 g
- ⑩ 콜레스테롤 : 2.17 mg/100 g
- ⑪ 단백질 : 7.16 g/100 g
- ⑫ 대장균군 : 음성
- ⑬ 납 : 0.0939 mg/kg
- ⑭ 카드뮴 : 0.0053 mg/kg
- ⑮ 수은 : 불검출
- ⑯ 비소 : 0.0269 mg/kg
- ⑰ 오크라톡신 : 불검출
- ⑱ 카페인 : 183.32 mg/kg
- ⑲ 클로로겐산 : 1.89 mg/g

품목제조보고서	제품 사진																																																								
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> </div> <p>발급번호: MAMB-ALBM-APND-COYM-SURR</p> <p style="text-align: center;"><b>식품·식품첨가물 품목제조보고서</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-bottom: 10px;"> <tr> <td style="width: 30%;">보고인</td> <td>성명 차민석</td> <td>생년월일 1970년 05월 09일</td> </tr> <tr> <td></td> <td>전화번호 061 381 8912</td> <td>휴대전화</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-bottom: 10px;"> <tr> <td style="width: 30%;">영양소</td> <td>광형(상호) (주)에스디씨2공장</td> <td>영양등록번호 20180519097</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">소재지 전라남도 담양군 담양읍 애곡길 11-37(11-47)</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-bottom: 10px;"> <tr> <td style="width: 30%;">식품의 유형</td> <td>과자</td> <td>분류제조번호</td> <td>2018051909728</td> </tr> <tr> <td>제품명</td> <td colspan="3">한겨레의 피자</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td colspan="3">9개월</td> </tr> <tr> <td>품질유지기한</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>원재료명 또는 성분명 및 배합비율</td> <td colspan="3">맛장예 피자</td> </tr> <tr> <td>용도 용법</td> <td colspan="3">맛장예 피자</td> </tr> <tr> <td>포장방법 및 포장재질</td> <td colspan="3">맛장예 피자</td> </tr> <tr> <td>포장양분 및 포장단위</td> <td colspan="3">맛장예 피자</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td colspan="3">피자의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이후가 없음</td> </tr> </table> <p><b>품목의 특성</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오 [ ] 해당 없음</li> <li>■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 [ ]에 [이]아니오</li> <li>■ 판매하는 식품 해당 여부 [ ]에 [이]아니오</li> <li>■ 알코올·알코올 대체의 해당 여부 [ ]알코올 [ ]알코올</li> </ul> <p>기타 <small>위탁생산(내국·수출) : 농림축산식품(주)에스디씨 / 소재지 : 전남 담양군 담양읍 애곡길 11-9 (061-381-8912) / 위탁제조업체 : 포유식품</small></p> <p>「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2021년 05월 11일 보고인 차민석</p> <p style="text-align: center;"><b>전라남도 담양군수 귀하</b></p> <p>분류제조번호 : 2018051909728</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-bottom: 10px;"> <tr> <td style="width: 25%;">처리부서</td> <td style="width: 25%;">자치혁신국 녹색관광과</td> <td style="width: 25%;">처리자성명</td> <td style="width: 25%;">서효진</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>처리일자</td> <td>2021년 05월 11일</td> </tr> </table> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> </div>	보고인	성명 차민석	생년월일 1970년 05월 09일		전화번호 061 381 8912	휴대전화	영양소	광형(상호) (주)에스디씨2공장	영양등록번호 20180519097		소재지 전라남도 담양군 담양읍 애곡길 11-37(11-47)		식품의 유형	과자	분류제조번호	2018051909728	제품명	한겨레의 피자			유통기한	9개월			품질유지기한				원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장예 피자			용도 용법	맛장예 피자			포장방법 및 포장재질	맛장예 피자			포장양분 및 포장단위	맛장예 피자			성상	피자의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이후가 없음			처리부서	자치혁신국 녹색관광과	처리자성명	서효진			처리일자	2021년 05월 11일	
보고인	성명 차민석	생년월일 1970년 05월 09일																																																							
	전화번호 061 381 8912	휴대전화																																																							
영양소	광형(상호) (주)에스디씨2공장	영양등록번호 20180519097																																																							
	소재지 전라남도 담양군 담양읍 애곡길 11-37(11-47)																																																								
식품의 유형	과자	분류제조번호	2018051909728																																																						
제품명	한겨레의 피자																																																								
유통기한	9개월																																																								
품질유지기한																																																									
원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장예 피자																																																								
용도 용법	맛장예 피자																																																								
포장방법 및 포장재질	맛장예 피자																																																								
포장양분 및 포장단위	맛장예 피자																																																								
성상	피자의 맛과 곡물의 고소한 맛을 갖고 이미,이후가 없음																																																								
처리부서	자치혁신국 녹색관광과	처리자성명	서효진																																																						
		처리일자	2021년 05월 11일																																																						

라. 한끼어터 공인기관 시험 결과

① 성상 및 대장균군

제 D2021052404 호 문서확인 R57V-7280-W156				<b>시험·검사성적서</b>										
제품명	한끼어터		제조일자 (유통기한)											
의뢰인	업체명	농업회사법인주식회사에스디씨	상 명	차면식										
	주 소	전라남도 담양군 담양읍 예고길 11-9												
제조번호			접수년월일	2021-05-25										
검사요목	참고용	접수번호		D2021052404										
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2021-06-02                  시험·검사 책임자 : 이순영, 장경순                  검사관련 총 책임자 : 김현희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성상</td> <td>이미, 이취가 없는 노란 미양, 회황색, 진조록의 고체상</td> <td>송지은</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>음성</td> <td>최정권</td> </tr> </tbody> </table> <p>끝.</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	성상	이미, 이취가 없는 노란 미양, 회황색, 진조록의 고체상	송지은	대장균군	음성	최정권
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원												
성상	이미, 이취가 없는 노란 미양, 회황색, 진조록의 고체상	송지은												
대장균군	음성	최정권												
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.                  ※ 본 성적서는 광고용 성격이 아니며, 시험·검사결과를 시험·검사무적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 세출 용도로 활용할 수 없습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증과 관련이 없습니다.                  ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과원은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2021년 06월 02일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국기능식품연구원</b></p> <div style="text-align: right;">  </div> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 031-311628-0400-1</p>														



KHSI




제 D2021052405 호 문서확인 23M2-W22X-J095		<h2 style="margin: 0;">시험·검사성적서</h2>																
제품명	한끼이티	제조일자 (유통기한)																
의뢰인	업체명	농업회사법인주식회사에스디씨	성명															
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9																
제조번호		접수년월일	2021-05-25															
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2021052405															
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2021-05-28                      시험·검사 책임자 : 이경구                      검사관련 총 책임자 : 김철희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 30%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 30%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.0939 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0053 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>수은(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>노성식</td> </tr> <tr> <td>비소(mg/kg)</td> <td>0.0269 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> </tbody> </table> <p>끝.</p> <p style="margin-top: 20px;">※ 위 판정은 의뢰인 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.                      ※ 본 성적서는 참고용 실적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.                      ※ 본 실적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.                      ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">2021년 05월 28일</p> <p style="text-align: center; margin-top: 5px;"> <span style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">한국기능식품연구원장</span> </p> <p style="font-size: 0.8em; margin-top: 10px;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khfi.re.kr">http://www.khfi.re.kr</a> 전화번호 031-828-0400-1</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	납(mg/kg)	0.0939 mg/kg	정다운	카드뮴(mg/kg)	0.0053 mg/kg	정다운	수은(mg/kg)	불검출	노성식	비소(mg/kg)	0.0269 mg/kg	정다운
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																
납(mg/kg)	0.0939 mg/kg	정다운																
카드뮴(mg/kg)	0.0053 mg/kg	정다운																
수은(mg/kg)	불검출	노성식																
비소(mg/kg)	0.0269 mg/kg	정다운																



**KHSI**



③ 오크라톡신


제 D2021052406 호 문서화인 K16T-V01Y-T8G0		<b>시험·검사성적서</b>							
제품명	한끼어더	제조일자 (유통기한)							
의뢰인	업체명	농업회사법인주식회사에스더씨	상 명						
	주 소	전라남도 담양군 담양읍 애곡길 11-9							
제조번호		접수년월일	2021-05-25						
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2021052406						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2021-06-01                  시험·검사 책임자 : 이정구                  검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>오크라톡신A(ug/kg)</td> <td>불검출</td> <td>연주혜</td> </tr> </tbody> </table> <p>끝.</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	오크라톡신A(ug/kg)	불검출	연주혜
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원							
오크라톡신A(ug/kg)	불검출	연주혜							
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.                  ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며,                  자기품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.                  ※ 치면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관련 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2021년 06월 01일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국기능식품연구원</b></p> <div style="text-align: right;">  </div>									
<p>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khsl.re.kr">http://www.khsl.re.kr</a> 전화번호: 031-3310628-0400-1</p>									



KHSI




④ 카페인

제 D2021052407 호 분석화인 3B2L-L814-GMZO		<b>시험·검사성적서</b>							
제품명	한꺼어터	제조일자 (유통기한)							
의뢰인	업체명	농업회사법인주식회사에스디씨	성명						
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9							
제조번호		접수년월일	2021-06-25						
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2021052407						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2021-06-07                  시험·검사 책임자 : 이순영                  검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>카페인(mg/kg)</td> <td>183.32 mg/kg</td> <td>김명</td> </tr> </tbody> </table> <p>문.</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	카페인(mg/kg)	183.32 mg/kg	김명
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원							
카페인(mg/kg)	183.32 mg/kg	김명							
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.                  ※ 본 성적서는 참고용 성곽서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제3자 용도로 활용할 수 없습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증과 관련이 없습니다.                  ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2021년 06월 07일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국기능식품연구원</b></p> <div style="text-align: right;">  </div> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khfi.re.kr">http://www.khfi.re.kr</a> 전화번호: (051) 31628-0400-1</p>									



⑤ 클로로겐산

페이지(1) / (총 1)

제 D2021061577 호 문서확인 YGUU-BL0A-773I		<b>시험·검사성적서</b>							
제품명	한키어터	제조일자 (유통기한)							
의뢰인	업체명	농업회사법인주식회사에스디씨	성명	자민석					
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9							
제조번호		접수년월일	2021-06-14						
검사의뢰목적	광고용	접수번호	D2021061577						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2021-06-21                  시험·검사 책임자 : 이순영                  검사관련 총 책임자 : 김진희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>클로로겐산(mg/g)</td> <td>1.89 mg/g</td> <td>유재필</td> </tr> </tbody> </table> <p>위표인경서/제2018-6호/대한컴덱주식회사/그린커피빈주정수출물-글.</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	클로로겐산(mg/g)	1.89 mg/g	유재필
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원							
클로로겐산(mg/g)	1.89 mg/g	유재필							
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.                  ※ 본 성적서는 광고용 성격서입니다. 시험·검사결과를 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자거품검검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.                  ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 검사관은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2021년 06월 21일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국기능식품연구원</b></p> <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">  </div> <p style="font-size: small; margin-top: 10px;">(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khfi.re.kr">http://www.khfi.re.kr</a> 전화번호 02-2200-0000 팩스번호 0313628-0400-1</p>									



**KHSI**



### 제3장. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1절. 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

○ 기능성표시식품 생산기반구축 및 산업화

- 주관기관의 2공장에 기능성표시식품 생산시설(HACCP 인증시설)을 구축하였으며, 기능성표시식품의 1일 섭취기준량 정량분석을 위한 고속액체크로마토그래피(HPLC)등 품질평가를 위한 시설을 구축 완료하였음
- 식품의약품안전처고시 제2020-129호(‘20.12. 29) “부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정”에 따라 개별인정형 건강기능식품 원료 “그린커피빈추출물”을 이용하여 기능성표시식품을 산업화하였음

○ 강황과 유자를 이용한 간기능개선, 기억력개선, 면역력증진 활성평가

- 주관기관의 강황물추출물+ 유자물추출물 혼합물(1:1)의 간기능개선 활성평가(*in vitro*, *in vivo*) 완료
- 강황추출물20%추출물+ 유자물추출물 혼합물(9:1)의 기억력개선 활성평가(*in vitro*, *in vivo*) 완료
- 강황물추출물+ 유자물추출물 혼합물(7:3)의 면역력증진 활성평가(*in vitro*, *in vivo*) 완료

##### (2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	연도		계	가중치 (%)	
		1차년도 (2019-2020)	2차년도 (2020-2021)			
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문	목표(단계별)	3	3	-	
		실적(누적)	-	3	3	-
	특허	목표(단계별)	-	3	3	10
		실적(누적)	-	3	3	10
	연구시설·장비	목표(단계별)	3	-	3	-
		실적(누적)	3	-	3	-
	학술발표	목표(단계별)	1	2	3	5
		실적(누적)	2	5	7	5
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술실시(이전)	목표(단계별)	-	3	3	15
		실적(누적)	-	3	3	15
	제품화	목표(단계별)	-	3	3	30
		실적(누적)	-	3	3	30
	매출액	목표(단계별)	-	100	100	10
		실적(누적)	-	-	-	10
	고용창출	목표(단계별)	1	1	2	20
		실적(누적)	1	3	4	20
	인력양성	목표(단계별)	1	2	3	5
		실적(누적)	1	2	3	5
	홍보(전시)	목표(단계별)	-	1	1	5
		실적(누적)	-	1	1	5
계	목표(단계별)	6	118	124	100	
	실적(누적)	7	23	30	100	

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거	
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1차년도 (2019.06 ~2020.06)	2차년도 (2020.06 ~2021.06)		
1	기능성표시식품	건	100	일본/아사히식품	100	50	50	100	식품의약품안전처고시 제2020-129호



(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Beneficial effects of the combination of Curcuma longa L. and Citrus junos against Aβ peptide-induced mice	Journal of Medicinal Food	김미정			Mary Ann Liebert, Inc.	SCI	게재 예정		
2	Combination of Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold ex Tanaka enhance the immune response on RAW264.7 macrophage. The	Biomedicines	김현희			MDPI	SCIE	8월 투고예정		
3	Combination of Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold ex Tanaka Improves Hepatic Steatosis by Preventing Oxidative Stress and Lipid Accumulation in a NAFLD Model	Nutrients	나경은		스위스	MDPI	SCI	게재 예정		

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회	김현희 외	2019.10.25.	제주국제컨벤션센터	대한민국
2	한국식품영양과학회	나경은 외	2019.10.25.	제주국제컨벤션센터	대한민국
3	한국식품과학회	나경은 외	2020.07.02.	광주 김대중컨벤션센터	대한민국
4	한국분자세포생물학회	김현희 외	2020.10.06.	제주국제컨벤션센터 (온라인전환)	대한민국
5	한국식품영양과학회	김현희 외	2020.10.21.	제주국제컨벤션센터	대한민국
6	한국식품영양과학회	김미정 외	2020.10.22	제주국제컨벤션센터	대한민국
7	한국식품영양과학회	나경은 외	2020.10.22	제주국제컨벤션센터	대한민국

# Immune-Stimulating Effects of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex extract via Improving Cytokines in RAW264.7 Macrophages.

Hyunhee Kim<sup>1\*</sup>, Ji-Hye Song<sup>1</sup>, Yongjae Kim<sup>2</sup>, and Kyung-Chul Choi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, Asan Medical Institute of Convergence Science and Technology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

<sup>2</sup>SDC FOOD Co., Ltd. SDC R&D Center, Damyang, Republic of Korea

## Abstract

Curcumin, a component of *Curcuma longa* L, helps prevent dementia due to its anticancer and antioxidant properties. *Curcuma longa* L is the main ingredient in Curry, and in Indians who eat curry, the incidence of senile dementia (Alzheimer's disease) is only one quarter of Americans. It also has the effect of improving obesity and adult diseases (metabolic syndrome), promotes bile secretion. It also prevents chronic diseases such as arteriosclerosis, high blood pressure, and cardiovascular diseases. In the *Citrus junos* Siebold containing rich vitamin C, minerals and citric acid, in addition to these nutrients, flavonoids reduce the incidence of cardiovascular diseases. *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex extract on the immune system have not been known to the public. The immuno-modulatory potential of complex extract was revealed by determining its effect on cell viability and cytokine expression of mouse RAW264.7 cells. Cytokines (IL-10 and IL-6) in RAW264.7 macrophages were slightly higher after treatment with complex extract. Complex extract enhanced the functions of macrophages, such as cytokines production. In addition, cytokine concentrations were significantly increased in cells treated with different doses of complex extracts compared to the control group. Thus, these results showed that complex extracts enhanced cytokine secretion in mouse macrophages, and possess a good natural compounds with immune-stimulatory activity.

## Introduction

The immune defence system is to protect organism from infection and disease and these functions must discover the molecules, as to pathogens, from viruses. Immune stimulation is one of the therapeutic effects that have aim at the stimulation of our nonspecific immune defense. Immune stimulation using plant species comprises another alternative therapy for disease, reinforcing immune response of the host. LPS stimulation of macrophages induces inflammation by activating the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. NF- $\kappa$ B activity is modulated by phosphorylation and regulatory proteins such as p-65 and I $\kappa$ B $\alpha$ , and upon their degradation, NF- $\kappa$ B translocate to the nucleus where it functions as a transcription factor to regulate inflammation. This signaling pathway regulates the expression of various inflammatory mediators, including nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase (COX)-2, and pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , and IL-6, and TNF- $\alpha$ . Curcumin, a component of *Curcuma longa* L, has revealed that it lowers cholesterol levels, prevents cholesterol accumulating in blood vessels, and stops sticking platelets together. *Curcuma longa* L also slows the spread of fat tissue and lowers blood sugar, triglycerides and fatty acid. Curry is the main ingredient in *Curcuma longa* L, and in Indian who eat curry, the incidence of senile dementia (Alzheimer's disease) is only one quarter of Americans. It also has the effect of improving obesity and adult diseases (metabolic syndrome), promotes bile secretion. It also helps with facilitates blood circulation as cholesterol is used when bile is produced, and prevents chronic diseases such as arteriosclerosis, high blood pressure, and cardiovascular diseases. In the *Citrus junos* Siebold containing rich vitamin C, minerals and citric acid, in addition to these nutrients, flavonoids reduce the incidence of cardiovascular diseases. Pulp and rind also contained strong antioxidants that reduced free radical thereby prophylactic activity against disease. *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex extract on the immune system have not been known to the public. Therefore, we identified the immune-stimulating effects of 20% ethanol and water extracts of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex. The immuno-modulatory potential of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex was revealed by determining its effect on cell viability and cytokine expression of mouse RAW264.7 cells. Cytokines (IL-10, IL-6) in RAW264.7 macrophages were slightly higher after treatment with *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex extract. Complex extract enhanced the functions of macrophages, such as cytokines production. In addition, cytokine concentrations were significantly increased in cells treated with different doses of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex extracts compared to the control group. Altogether, the results showed that *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* Siebold complex extracts enhanced cytokine secretion in mouse macrophages, and possess a good natural compounds with immune-stimulatory activity.

## Results

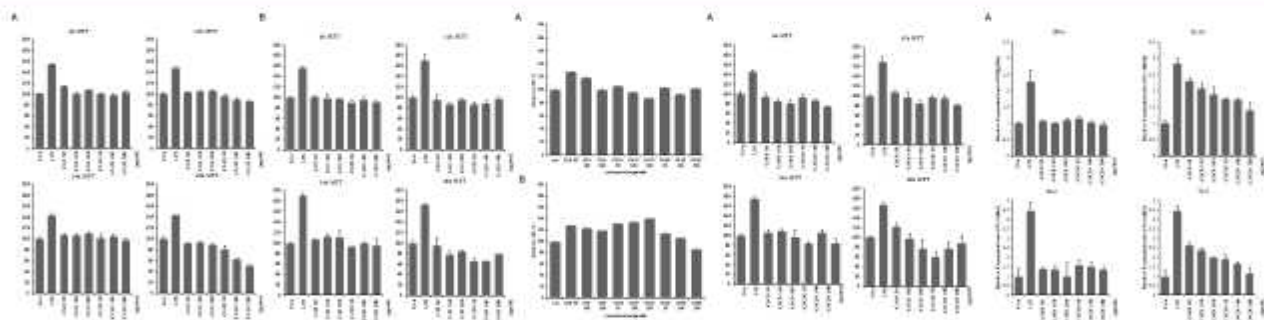


FIG. 1. Cell viability effects of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* extracts during 6h, 12h, 24h, and 48h in RAW264.7 cells. Except for the 48 hour, the remaining showed no toxicity at various concentrations. (A) Cytotoxicity of *Curcuma longa* L. 0% ethanol (CL0 50, CL0 100, CL0 200), 20% ethanol (CL20 50, CL20 100, CL20 200) treatments evaluated with WST-1 assays of RAW264.7 cells for 6h, 12h, 24h, and 48h. (B) Cytotoxicity of *Citrus junos* L. 0% ethanol (CJ0 50, CJ0 100, CJ0 200), 20% ethanol (CJ20 50, CJ20 100, CJ20 200) treatments evaluated with WST-1 assays of RAW264.7 cells for 6h, 12h, 24h, and 48h.

FIG. 2. Effects of Nitric Oxide (NO) production in RAW264.7 cells with *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* treatment. The efficacy of the extracts on NO activity was confirmed. (A) NO activation of *Curcuma longa* L. extracts in RAW264.7 cells. (B) NO activation of *Citrus junos* extracts in RAW264.7 cells.

FIG. 3. Cell viability effects of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* complex extract during 6h, 12h, 24h, and 48h in RAW264.7 cells. (A) Cytotoxicity of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* complex 0% ethanol (CJC0 50, CJC0 100, CJC0 200), 20% ethanol (CJC20 50, CJC20 100, CJC20 200) treatments evaluated with WST-1 assays of RAW264.7 cells for 6h, 12h, 24h, and 48h.

FIG. 4. *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* complex extract enhanced cytokine expression in RAW264.7 cells. The efficacy of the extracts on cytokine expression was confirmed. (A) Cytokine expression level was confirmed about IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2, and IL-6 in *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* complex 0% ethanol (CJC0 50, CJC0 100, CJC0 200), 20% ethanol (CJC20 50, CJC20 100, CJC20 200) in RAW264.7 cells.

## Conclusion

Recently, there has been a growing interest in the medicinal use of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos*. It contains numerous physiologically active compounds and has been known to have therapeutic effects. The main organ of immunity in the human body is the spleen, and increases in cytokine production in splenocytes are a key indicator of immune reactivity. For this reason, we tested the immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* in *in vitro* on RAW264.7 cells. Our study demonstrated that *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* enhance both NO production and the level of inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2, and IL-6) in RAW264.7 macrophages. As a result, these results suggest that *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* has immune-stimulating effects, enhancing NO, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2, and IL-6 secretion, and is nontoxic even at high doses.

This work was supported by "Food Functionality Evaluation program" under the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs and partly Korea Food Research Institute.



# Protective Effects of Yuzu Extracts on Free Fatty Acid-Induced Oxidative Injury in Hepatocytes

Gyeongseon Na<sup>1\*</sup>, Shimne Kim<sup>1</sup>, Jeongjin Park<sup>1,2</sup>, Yongjae Kim<sup>1</sup>, Yoo-Hyun Lee<sup>4</sup>, Woojin Jun<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea, <sup>2</sup>Research Institute for Human Ecology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea, <sup>3</sup>SDC R&D Center, Dalseong 57309, Korea, <sup>4</sup>Department of Food and Nutrition, University of Suwon, Suwon 18323, Korea

## Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease with a broad spectrum of liver injury. Oxidative stress is believed to be the pathogenesis of NAFLD. In this study, we aimed to investigate the *Citrus Junos* (Yuzu) water and ethanol extracts on anti-oxidant and hepatoprotective effects. Radical scavenging of yuzu water and ethanol extracts were measured by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Yuzu ethanol extract was high radical-scavenging activity on ABTS compare with yuzu water extract. Yuzu treatment suppressed lipid accumulation and intracellular triglyceride levels significantly in HepG2 cells. Reactive oxygen species (ROS) was measured using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) by absorbance measurement. Yuzu could decrease cell viability in malignant cells as a concentration dependent manner. These results demonstrated that Yuzu might protect the liver injury by its anti-oxidant effect, which could be a potential therapeutic agent of NAFLD.

## Introduction

Oxidative stress represents an important factor in the pathogenesis of acute and chronic liver diseases. It appears due to an imbalance favoring pro-oxidants that is, reactive oxygen species (ROS), and disfavoring antioxidants, leading to damaging effects on DNA, polyunsaturated lipids, and proteins. Flavonoids, which are widely distributed in fruits and vegetables used in human diet, can prevent injury caused by free radicals in various ways, mainly by direct scavenging of superoxide or peroxynitrite [1].

*Citrus Junos* (Yuzu) is widely cultivated in East Asia and in herbal tea and traditional medicine in South Korea, Japan, and China. Particularly in Korea, it has been commonly used as a raw material for beverages and herbal medicines due to its unique flavor and effectiveness against colds. Yuzu contain vitamin C, flavonoid (naringenin, hesperidin), phenol acids, carotenoids, limonoid, which have been evaluated as anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-ventricular dysfunction, anti-diabetes [2, 3].

This study was determine that hot water and 80% ethanol extract of yuzu have antioxidant effect. Anti-oxidant effect was measured using ABTS and DPPH radical scavenging activity and intracellular ROS level of yuzu extracts.

## Materials & Methods

### Materials

- YW : Hot water extract from yuzu.
- YE : 80% ethanol extract from yuzu.

### Cell Culture and Treatment

- Human hepatocyte HepG2 cell obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were cultured in DMEM medium contain 10% fetal bovine serum.
- 1 mM FFA (Free fatty acid) is mixture of oleic acid/palmitic acid = 2:1

### Total Phenolic Compounds

- The total phenolic contents was determined by employing methods, using Folin-Ciocalteu's reagent at 750 nm.

### Flavonoids Content

- The flavonoids content was measured using a aluminum chloride colorimetric assay developed by Zhishen *et al.*

### DPPH Radical Scavenging Activity Assay

- The DPPH radical scavenging activity was measured from the bleaching of purple colored stable DPPH radical solution at 515 nm.

### ABTS Radical Scavenging Activity Assay

- The ABTS radical scavenging activity was measured from the bleaching of blue colored ABTS anion radical solution at 734 nm.

### Intracellular ROS Level

- Intracellular ROS level was measured using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) by absorbance measurement at excitation 485 nm and emission 528 nm.
- HepG2 cell was treated with 1 mM FFA mixture.

## Results

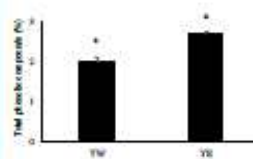


Figure 1. Total Phenolic Compounds of YW and YE. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters above the bar are statistically different by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

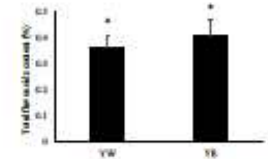


Figure 2. Flavonoid Contents of YW and YE. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters above the bar are statistically different by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

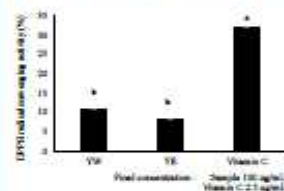


Figure 3. DPPH Radical Scavenging Activity of YW and YE. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters above the bar are statistically different by Dunnett's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

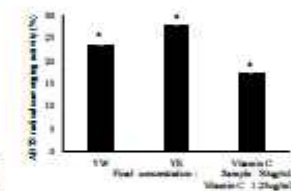


Figure 4. ABTS Radical Scavenging Activity of YW and YE. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters above the bar are statistically different by Dunnett's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

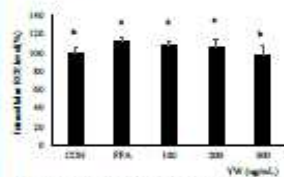


Figure 5. Effect of YW on Intracellular ROS Level. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters above the bar are statistically different by Dunnett's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

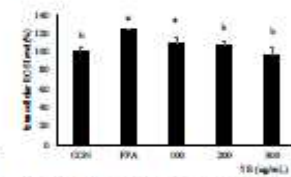


Figure 6. Effect of YE on Intracellular ROS Level. Data express the mean  $\pm$  S.D. Different letters above the bar are statistically different by Dunnett's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## Conclusions

- Total phenolic compounds of YW and YE were 2% and 3%, and flavonoid contents were 0.3% and 0.4%, respectively.
- DPPH radical scavenging of YW and YE were 10% and 8%, ABTS radical scavenging activity were 23% and 27%, respectively.
- YW 200 and 300 µg/mL and YE 300 µg/mL were significantly reduced intracellular ROS level in HepG2 cell.
- Therefore, YW and YE have anti-oxidant effect by reduced intracellular ROS level and radical scavenging activity.

## References

1. Anca H, Aurel A, Miruna S, Nicoleta H, Ciprian-Valentin M, Marieta C, and Anca D. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Naringenin and Its  $\beta$ -Cyclodextrin Formulation in Mice Intoxicated with Carbon Tetrachloride: A Comparative Study. *J Med Food*. 2014, 17(6): 670-677.
2. KM Yoo, KW Lee, JB Park, HJ Lee, and KI Hwang. Variation in Major Antioxidants and Total Antioxidant Activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tomoka) during Maturation and between Cultivars. *J Agric Food Chem*. 2004, 52: 5907-5913.
3. AH Kim, JH Kim, R Ryu, JH Han, YJ Han, MK Lee, MS Choi and YB Park. A Mixture of Ethanol Extracts of Perismon Leaf and *Citrus junos* Sieb Improves Blood Coagulation Parameters and Ameliorates Lipid Metabolism Disturbances Caused by Diet-Induced Obesity in C57BL/6J Mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2016, 26(2): 295-308.

## Acknowledgment

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Reverse Matching Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119068-2).



CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY  
Lab of Functional Food

# Lipid Accumulation Inhibitory Effect of *Citrus Junos* Water Extract in HepG2 Cell

Gysoongeun Na<sup>1</sup>, Shimtae Kim<sup>1</sup>, Subin Bae<sup>1</sup>, Jeongjin Park<sup>1,2</sup>, Yongjae Kim<sup>1</sup>, Minsuk Cha<sup>1</sup>, Woojin Jun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju, Korea, <sup>2</sup>Research Institute for Human Ecology, Chonnam National University, Gwangju, Korea, <sup>3</sup>SDC R&D Center, Danyang, Korea

## Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a disease caused by accumulation of 5% or more of fat in the liver, and is a disease that occurs with type 2 diabetes and obesity. NAFLD progresses due to excessive oxidative stress and fat accumulation. This study showed the antioxidant and the fat accumulation inhibitory effects of *Citrus Junos* water extract (CW) in HepG2 cells induced lipid accumulation. Because oxidative stress exacerbates the disease in NAFLD, the amount of phenolic compounds and flavonoids were measured and the degree of radical scavenging activity were measured through ABTs and DPPH assay. As a result of the ABTs and DPPH assay, it was confirmed that CW has remarkably high antioxidant effect. Lipid accumulation was treated 1 mM fatty acid mixture of oleic acid and palmitic acid 2:1 for 24 h. As a result of AdipoRed, it was confirmed that fat accumulation was suppressed depending on the concentration. In conclusion, CW could inhibit NAFLD through antioxidant effect and fat accumulation inhibition. It was confirmed that fat accumulation was suppressed depending on the concentration. In conclusion, CW could inhibit NAFLD through antioxidant effect and fat accumulation inhibition.

## Introduction

*Citrus Junos* is a pharmacologically effective fruit harvested from Korea, Japan and China. *Citrus Junos* contains vitamin C, flavonoids (naringin, hesperidin), phenolic acid, carotenoids, and limonoids, and is known to be effective in preventing antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, ventricular dysfunction, and diabetes prevention [1].

Reactive oxygen species (ROS) and free radicals are highly reactive oxidizing agents. Therefore, a large amount of ROS and free radicals induce intracellular oxidative stress, and promotes lipid accumulation to promote non-alcoholic fatty liver disease. However, ROS and free radicals can be removed through flavonoids, especially *Citrus Junos* naringin and hesperidin as powerful antioxidants [2].

In this study, the contents of phenolic compounds and flavonoids content were measured to confirm the antioxidant capacity of *Citrus Junos* water extract, and the radical scavenging was confirmed through DPPH and ABTs assay. In addition, adipon was used to confirm whether *Citrus Junos* was effective in inhibiting lipid accumulation.

## Materials & Methods

- ◆ **Material**
  - CW : Hot water extract from *Citrus Junos*
- ◆ **Total Phenolic Compounds**
  - The total phenolic compounds was determined by employing methods, using Folin-Ciocalteu's reagent at 750 nm.
- ◆ **Flavonoids Content**
  - The flavonoids content was measured using a aluminum chloride colorimetric assay developed by Zhishen *et al.*
- ◆ **DPPH Radical Scavenging Activity Assay**
  - The DPPH radical scavenging activity was measured from the bleaching of purple colored stable DPPH radical solution at 515 nm.
- ◆ **ABTs Radical Scavenging Activity Assay**
  - The ABTs radical scavenging activity was measured from the bleaching of blue colored ABTs anion radical solution at 734 nm.
- ◆ **Cell Culture and Treatment**
  - Human hepatocyte HepG2 cell obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were cultured in MEM medium contain 10% fetal bovine serum.
  - 1 mM free fatty acid (FFA) is mixture of oleic acid:palmitic acid = 2:1.
- ◆ **Intracellular Triglycerides Level**
  - Intracellular triglycerides level was measured AdipoRed assay reagent by fluorescence measurement at excitation 485 nm and emission 528 nm.

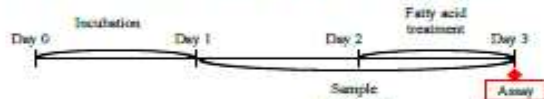


Figure 1. Lipid Accumulation Model in HepG2 Cell

## Results

	Total Phenolic Compounds	Flavonoids Content
CW	4%	1.3%

Table 1. Total Phenolic Compounds and Flavonoids Content of CW. Data express the mean ± S.D. Different letters above the bar are statistically different by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

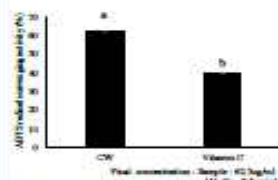


Figure 3. ABTS Radical Scavenging Activity of CW. Data express the mean ± S.D. Different letters above the bar are statistically different by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

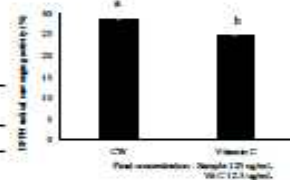


Figure 2. DPPH Radical Scavenging Activity of CW. Data express the mean ± S.D. Different letters above the bar are statistically different by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

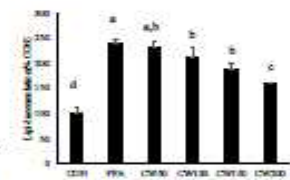


Figure 4. Inhibition of Intracellular Lipid Accumulation by CW. Data express the mean ± S.D. Different letters above the bar are statistically different by Tukey's multiple test ( $p < 0.05$ ).

## Conclusions

- Total phenolic compounds and flavonoids content of CW were 4% and 1.3%, respectively.
- DPPH and ABTS radical scavenging activities of CW were 28% and 62%, respectively.
- CW could suppressed lipid accumulation except CW 100 µg/mL concentration.
- Therefore, CW has anti-oxidant effect by radical scavenging activity and suppressed lipid accumulation.

## References

1. C. Zhao, F. Wang, Y. Lian, H. Xiao and J. Zhong. Biosynthesis of Citrus Flavonoids and Their Health Effects. *Crit. Rev. Food Sci Nutr* 60: 566-583 (2020).
2. Alan MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM and Saiker SD. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. *Adv Nutr* 5: 404-417 (2014).

## Acknowledgment

- This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Reverse Matching Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119068-2).

# Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex extracts induces Immune enhancement effect through regulation of Inflammatory Cytokines

Hyunhee Kim\*, Ji-Hye Song <sup>1</sup>, Sungmin Kwak <sup>1</sup>, Gi-Jun Sung <sup>1</sup>, Seung-Ho Park <sup>1</sup>, Ji-Hoon Jeong <sup>1</sup>, Hyeon park <sup>1</sup>, Jeong Min seok <sup>1</sup>, Min-jeong Kong <sup>1</sup>, Jihyun Son<sup>2</sup>, Yongjae Kim<sup>2</sup>, Kyung-Chul Choi <sup>3</sup>

1. Department of Biomedical Sciences, Asan Medical Institute of Convergence Science and Technology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Republic of Korea  
 2. SDC FOOD Co., Ltd. SDC R&D Center, Danyang, Republic of Korea  
 3. University of Konkuk College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

## Abstract

Curcuma longa L. (CL), a traditional medicinal plant, is well known as a functional food compound. The major component of CL is a curcumin of anthocyanin family that has multi-functions such as antimicrobial, anticancer, and antioxidant activity. In the Citrus junos Siebold (CJ) containing rich vitamin C, minerals and citric acid, in addition to these nutrients, flavonoids reduce the incidence of cardiovascular diseases. The immune-modulatory potential of complex extract was revealed by determining its effect on cell viability, cytokine expression and secretion of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages. Cell viability showed that the extracts did not significantly affect the cell toxicity by using MTT assay. After treatment with complex extract, cytokines (IL-12, IL-10, IL-15, IL-6, Arg-1, and NOS) were higher in RAW264.7 compared to untreated cells. Also, the secretion of nitric oxide (NO) significantly increased relative to the control RAW 264.7 cells. Thus, results from the present study suggested that CL and CJ could be used as a natural immunomodulating agent for inflammatory diseases therapy.

## Introduction

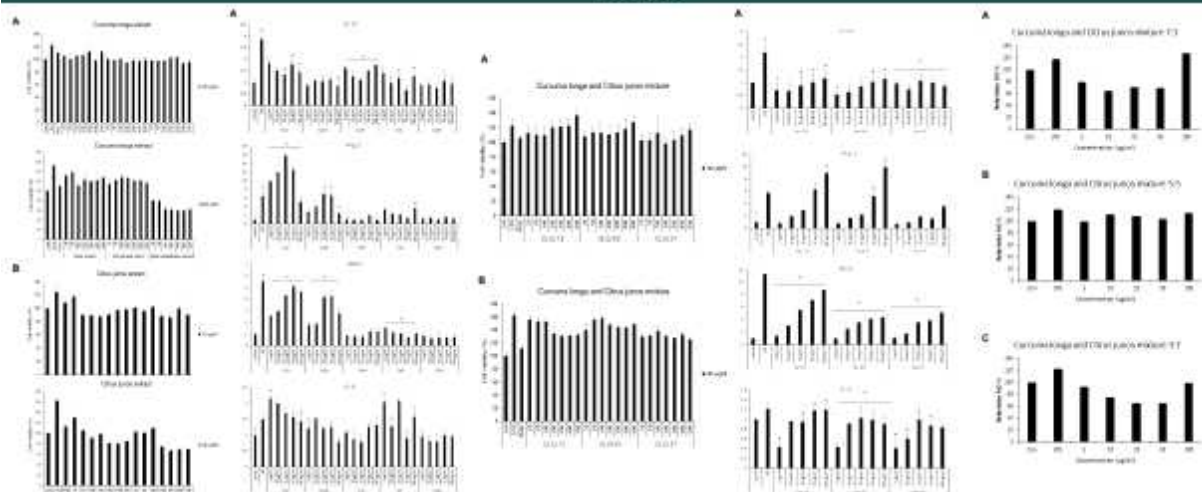
In healthy individuals, transformed or cancerous cells continuously arise as a result of errors during cell division and are continuously removed by innate immune cells, including macrophages and natural killer (NK) cell. If this balance is disrupted due to weakened immune responses, cancer can arise. The immune system can become weakened due to many factors, including environmental toxins, irregular eating habits, stress, and lack of sleep, as well as cardiometabolic syndromes such as hypertension, diabetes, and hyperlipidemia. In healthy individuals, age is an important cause of weakened immune responses and can lead to increased susceptibility to infections and cancer.

Curcumin, a component of Curcuma longa L. helps prevent dementia due to its anticancer and antioxidant properties. The study was conducted by animals at the University of Michigan researchers in the United States has shown that Curcuma longa L. lowers cholesterol levels, prevents cholesterol accumulating in blood vessels, and stops sticking platelets together. Curcuma longa L. also slows the spread of fat tissue and lowers blood sugar, triglycerides and fatty acids. It also has the effect of improving obesity and adult diseases (metabolic syndrome), promotes bile secretion, it also helps with facilitates blood circulation as cholesterol is used when bile is produced, and prevents chronic diseases such as arteriosclerosis, high blood pressure, and cardiovascular diseases.

In the Citrus junos Siebold containing rich vitamin C, minerals and citric acid, in addition to these nutrients, flavonoids reduce the incidence of cardiovascular diseases. Pulp and rind also contained strong antioxidants that reduced free radical thereby prophylactic activity against disease.

Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex extract on the immune system have not been known to the public. Therefore, we identified the immune-stimulating effects of water extracts of Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex. The immune-modulatory potential of Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex was revealed by determining its effect on cell viability and cytokine expression of mouse RAW264.7 cells. Complex extract also has effect of Nitric Oxide (NO) production in Raw 264.7 cells.

## Results



## Conclusion

Recently, the interest in medical approaches using Curcuma longa L. and Citrus junos is increasing. The effectiveness of a single extract has been proven through several papers, and we verified the effect of immune-related treatment using mixed extracts based on existing experimental data. The main organ of immunity in the human body is the spleen, and increases in cytokine production in splenocytes are a key indicator of immune reactivity. For this reason, we tested the immunomodulatory effects of Curcuma longa L. and Citrus junos in vitro on RAW264.7. Our study demonstrated that the single extract of Curcuma longa L. and Citrus junos was not toxic except for Curcuma longa L. water-soluble extract and the high concentration of Citrus junos 20% ethanol extract, and the immune cytokine level was measured through this. It demonstrated that Curcuma longa L. and Citrus junos enhance the level of inflammatory cytokines (IL-12, Arg-1, iNOS, and IL-6) in RAW264.7 macrophages. Later, when the toxicity was evaluated by mixing Curcuma longa L. and Citrus junos at a ratio of 7:3, 5:5, 3:7, it was confirmed that it was not toxic, and then increased when the secretion activity of immune cytokines, IL-12, Arg-1, iNOS, and IL-6, was confirmed. Also, Mixture has immune-stimulating effects.

As a result, when the mixing ratio of Curcuma longa L. and Citrus junos was 7:3, it could be confirmed that the overall efficacy was good in cytokine secretion and NO activity, and the efficacy of the mixed extract could be expected in a later in vivo experiment.



# Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex extracts increase the immunostimulatory activity of RAW264.7 macrophages enhancing NO production and the level of inflammatory cytokines.

Hyunhee Kim\*, Ji-Hye Song, Sungmin Kwak, Gi-Jun Sung, Seung-Ho Park, Ji-Hoon Jeong, Hyeon park, Jeong Min seok,

Min-jeong Kong, Jihyun Son, Yongjae Kim, Kyung-Chul Choi,

1. Department of Biomedical Sciences, Asan Medical Institute of Convergence Science and Technology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Republic of Korea  
 2. SDC FOOD Co., Ltd. SDC R&D Center, Damyang, Republic of Korea  
 3. University of Konkuk College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

## Abstract

Curcuma longa L. (CL), a traditional medicinal plant, is well known as a functional food compound. The major component of CL is a curcumin of anthocyanin family that has multi-functions such as antimicrobial, anticancer, and antioxidant activity. In the Citrus junos Siebold (CJ) containing rich vitamin C, minerals and citric acid, in addition to these nutrients, flavonoids reduce the incidence of cardiovascular diseases. The immuno-modulatory potential of complex extract was revealed by determining its effect on cell viability, cytokine expression and secretion of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages. Cell viability showed that the extracts did not significantly affect the cell toxicity by using MTT assay. After treatment with complex extract, cytokines (IL-12, IL-10, IL-15, IL-6, Arg-1, and INOS) were higher in RAW264.7 compared to untreated cells. Also, the secretion of nitric oxide (NO) significantly increased relative to the control RAW 264.7 cells. Thus, results from the present study suggested that CL and CJ could be used as a natural immunomodulating agent for inflammatory diseases therapy.

## Introduction

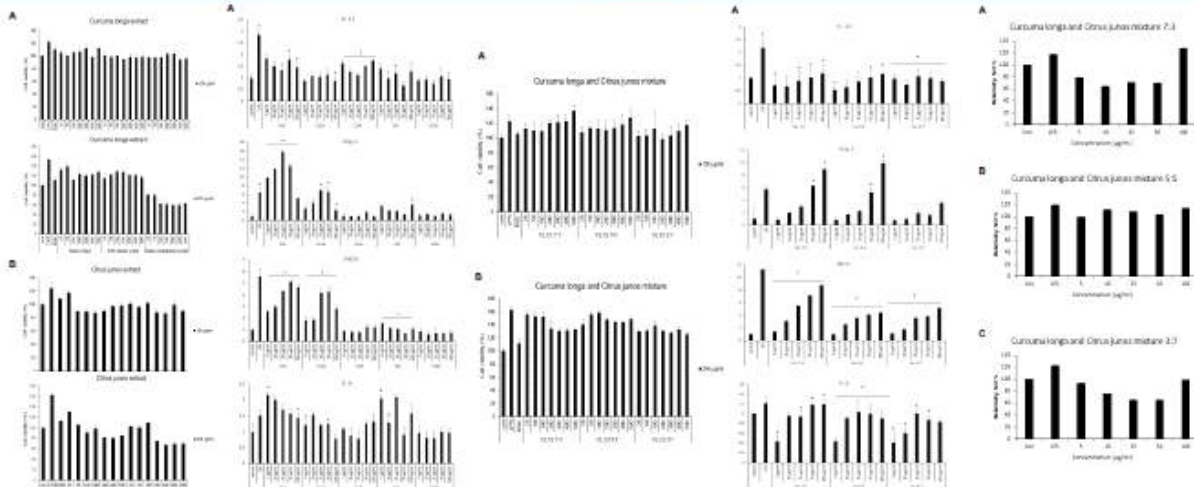
In healthy individuals, transformed or cancerous cells continuously arise as a result of errors during cell division and are continuously removed by innate immune cells, including macrophages and natural killer (NK) cell. If this balance is disrupted due to weakened immune responses, cancer can arise. The immune system can become weakened due to many factors, including environmental toxins, irregular eating habits, stress, and lack of sleep, as well as cardiometabolic syndromes such as hypertension, diabetes, and hyperlipidemia. In healthy individuals, age is an important cause of weakened immune responses and can lead to increased susceptibility to infections and cancer.

Curcumin, a component of Curcuma longa L. helps prevent dementia due to its anticancer and antioxidant properties. The study was conducted by animals at the University of Michigan researchers in the United States has shown that Curcuma longa L. lowers cholesterol levels, prevents cholesterol accumulating in blood vessels, and stops sticking platelets together. Curcuma longa L. also slows the spread of fat tissue and lowers blood sugar, triglycerides and fatty acids. It also has the effect of improving obesity and adult diseases (metabolic syndrome), promotes bile secretion. It also helps with facilitates blood circulation as cholesterol is used when bile is produced, and prevents chronic diseases such as arteriosclerosis, high blood pressure, and cardiovascular diseases.

In the Citrus junos Siebold containing rich vitamin C, minerals and citric acid, in addition to these nutrients, flavonoids reduce the incidence of cardiovascular diseases. Pulp and rind also contained strong antioxidants that reduced free radical thereby prophylactic activity against disease.

Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex extract on the immune system have not been known to the public. Therefore, we identified the immune-stimulating effects of water extracts of Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex. The immuno-modulatory potential of Curcuma longa L. and Citrus junos Siebold complex was revealed by determining its effect on cell viability and cytokine expression of mouse RAW264.7 cells. Complex extract also has effect of Nitric Oxide (NO) production in Raw 264.7 cells.

## Results



## Conclusion

Recently, the interest in medical approaches using Curcuma longa L. and Citrus junos is increasing. The effectiveness of a single extract has been proven through several papers, and we verified the effect of immune-related treatment using mixed extracts based on existing experimental data. The main organ of immunity in the human body is the spleen, and increases in cytokine production in splenocytes are a key indicator of immune reactivity. For this reason, we tested the immunomodulatory effects of Curcuma longa L. and Citrus junos in vitro on RAW264.7. Our study demonstrated that the single extract of Curcuma longa L. and Citrus junos was not toxic except for Curcuma longa L. water-soluble extract and the high concentration of Citrus junos 20% ethanol extract, and the immune cytokine level was measured through this. It demonstrated that Curcuma longa L. and Citrus junos enhance the level of inflammatory cytokines (IL-12, Arg-1, INOS, and IL-6) in RAW264.7 macrophages. Later, when the toxicity was evaluated by mixing Curcuma longa L. and Citrus junos at a ratio of 7:3, 5:5, 3:7, it was confirmed that it was not toxic, and then increased when the secretion activity of immune cytokines, IL-12, Arg-1, INOS, and IL-6, was confirmed. Also, Mixture has immune-stimulating effects.

As a result, when the mixing ratio of Curcuma longa L. and Citrus junos was 7:3, it could be confirmed that the overall efficacy was good in cytokine secretion and NO activity, and the efficacy of the mixed extract could be expected in a later in vivo experiment.



# Neuroprotective Effects of Traditional Medicinal Plants in Oxidative Stress-induced Neuronal Cells via Activation of the CREB and BDNF pathway

Mi Jeong Kim<sup>1\*</sup>, Soo-Yeon Park<sup>1</sup>, Yongjae Kim<sup>2</sup>, Ho-Geun Yoon<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Chronic Metabolic Disease Research, Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Severance Medical Research Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

<sup>2</sup>SDC Research Institute, Danyang-gun, Jeollanam-do, Korea

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and is characterized by progressive impairment of cognitive function and behavior. According to several studies,  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ) aggregation occurs frequently in the brains of patients with AD, and fibrillary A $\beta$  aggregates induce neurotoxicity. Abnormal events due to the accumulated A $\beta$  in cells lead to neuronal cell death and cognitive decline in patients with AD. In this study, we investigated whether the traditional medicinal plant extract (TME) exerts neuroprotective action against A $\beta$  mediated cognitive impairment. A $\beta$  administration caused poor memory retention, and resulted in marked oxidative stress as evidenced by decrease in superoxide dismutase (SOD) and catalase activity in the mouse brain. TME treatment at both the doses reversed A $\beta$  induced behavioral and memory disturbances, significantly decreased the oxidative stress and AChE activity in mouse brain. A $\beta$  administration also brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels were significantly depleted. TME pretreatment led to a significant upregulation of BDNF levels. In conclusion, this study highlights the promising neuroprotective role of TME against A $\beta$  mediated cognitive impairment through reduced oxidative stress, declined AChE activity, and restoration of BDNF levels.

## Introduction

The generation of oxygen free radicals, reactive oxygen species (ROS), and oxidative damage is believed to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Events of increased oxidative stress (ROS, lipid peroxidation, protein modification, and oxidation of mitochondrial DNA) has been shown in the Alzheimer's disease (AD) brain. The pathological features of AD are the accumulation of senile plaques containing  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptide cores and neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau protein. According to several studies, A $\beta$  peptide aggregation occurs frequently in the brains of patients with AD, and fibrillary A $\beta$  aggregates induce neurotoxicity. Oxidative stress participates in the development of AD by promoting A $\beta$  deposition, tau hyperphosphorylation, and the subsequent loss of synapses and neurons. The relationship between oxidative stress and AD suggests that oxidative stress is an essential part of the pathological process, and antioxidants may be useful for AD treatment. *Curcuma longa* (CL), a well-known traditional Chinese herbal medicine, which is widely distributed in northeastern China, and its leaves, root, and bark have been used as folk medicine to treat neurasthenia, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, gastrospasm, and hepatitis several hundred years ago. *Citrus junos* (CJ), a species of the family Rutaceae, is native to the southern coast and Jeju Island in Korea and China. CJ has been used in traditional medicine, cosmetics, and edible foods. It has been reported that CJ contains many bioactive compounds such as vitamins, flavonoids, and limonoid that show anti-inflammatory and/or antioxidant activities. The extract of CJ can inhibit platelet aggregation, prevent ventricular dysfunction, and exert an antidiabetic effect. Phytochemical investigation showed that entire plant has complex water-soluble mixtures of saponins, flavonoids, alkaloids, polysaccharides and protein. In this study, we demonstrate unknown effects of CL and CJ extract complex (CCEC) on oxidative stress in neuronal cell and suggest that the extract of CCEC may be of value as novel amelioration or protection against cognitive deficits on Alzheimer's disease.

## Methods

### Cell viability

Cell viability was measured to determine the cytotoxicity of CORT (corticosterone) on neuro-2A cells. Cell viability was determined with the conventional MTT reduction assay.

### Antioxidant enzyme activity

All groups were treated with corticosterone (CORT, 400  $\mu$ M) except the control group which was untreated. Sample treated groups were pre-incubated with the AE extract for 16h before addition of the CORT. After 24 h to A $\beta$  peptide, antioxidant activity was measured with ELISA kits (Biovision, USA).

### Western blotting

The neuro-2A cells were lysed with RIPA supplemented with the mixture of protease inhibitors 0.1 mM PMSF and phosphatase inhibitors. Protein samples were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane, and immunoblotted. Blots were incubated with primary antibodies washed, and exposed to horseradish peroxidase-linked secondary antibodies at room temperature. Finally, the bands were illuminated using Immobilon ECL.

## Results

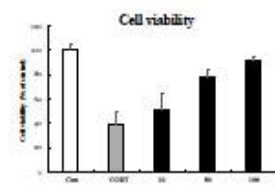
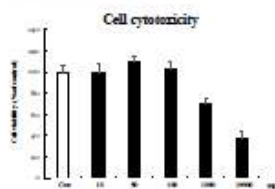


Fig. 1. Cell cytotoxicity and cell viability against oxidative stress.

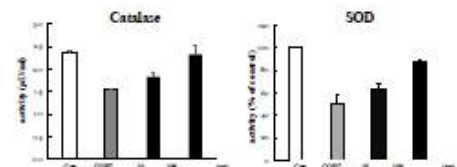


Fig. 2. Activation effects of CCEC on catalase and SOD in oxidative stress-induced neuronal cell.

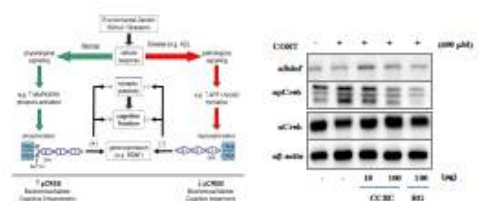


Fig. 3. Activation effects of CCEC on BDNF signal in oxidative stress-induced neuronal cell.



YONSEI UNIVERSITY, College of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology

# Curcuma longa L. and Citrus junos Mixed Extracts Improves Non-acholic Fatty Liver Disease Induced by High Fat Diet through Reducing Oxidative Stress and Lipid Accumulation

Gyeongseun Na<sup>1\*</sup>, Shintae Kim<sup>1</sup>, Subin Bae<sup>1</sup>, Jeongjin Park<sup>1,2</sup>, Yongjoo Kim<sup>1</sup>, Minuk Cha<sup>1</sup>, Woojin Jun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Korea, <sup>2</sup>Research Institute for Human Ecology, Chonnam National University, Korea, <sup>3</sup>SDC R&D Center, Korea

## Abstract

This study was investigated whether the mixed extract of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* (Mix) was effective in the inhibition of fat accumulation and oxidative stress in relation to non-acholic fatty liver disease (NAFLD). The Mix was administered 300 mg/kg body weight/day with high fat diet for 12 weeks in C57BL/6 mice. For the experiments, the mice were randomly divided into 3 groups (n=10 per group) as follows: CON: mice fed a normal diet (AIN-76diet); HFD: mice fed a 60 kcal% fat diet; MIX: mice fed high-fat diet plus Mix. The Mix was mixed in a 1:1 ratio of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos*. After 12 weeks, the body weight of MIX group was significantly decreased compared to HFD group. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels were measured to confirm the antioxidant effect of Mix. As a result, the MIX group was significantly increased CAT and SOD levels and decreased MDA level compared with the HFD group. In addition, the inhibitory effect of Mix on fat accumulation in liver was confirmed by H&E staining. The MIX group reduced the amount of fat droplets compared to the HFD group. The molecular mechanism that inhibited fat accumulation in liver tissue was confirmed using RT-PCR. As a result, the MIX group was increased  $\beta$ -oxidation factors (AMPK, PPAR $\alpha$  and CPT-1) and decreased fat accumulation factors (SREBP-1c, FAS and ACC) compare to the HFD group. In conclusion, Mix decreased NAFLD by acting as inhibiting fat accumulation and oxidative stress.

## Introduction

Excessive intake of fatty acids produces ROS and induces oxidative stress. Oxidative stress negatively affects the body by inducing MDA production and cytotoxicity due to lipid peroxidation. In the liver, antioxidant activity is activated by antioxidant enzymes such as CAT and SOD. But ROS production due to excessive fat intake decreases the activity of antioxidant enzymes and accumulates fat. Fatty liver decreases the  $\beta$ -oxidation factor in the liver, and increases the fat accumulation factor, thereby causing an increase in fatty liver [1].

The bioactive compound of *Curcuma longa* L. is curcumin, which has antioxidant and anticancer effects, and the bioactive compound of *Citrus junos* are naringin and hesperidin, which also greatly affects the antioxidant activity. Previous studies have confirmed that both *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* are effective against fatty liver [2, 3].

In this study, it was conducted to confirm whether the intake of mixed extract of *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* suppresses fatty liver. This was confirmed through antioxidant enzymes, lipid peroxidation factors, lipid  $\beta$ -oxidation factors and lipogenesis factors.

## Materials & Methods



Fig 1. Design of Experiment In Five Model.

- **Materials**
  - Mix : *Curcuma longa* L. and *Citrus junos* extracts
- **Animals**
  - 7-week-old male C57BL/6 mice for 1 week acclimatized, then the mice were randomly divided in 3 group, CON : mice fed a normal, HFD : mice fed 60% kcal fat, MIX : mice fed HFD plus Mix (300 mg/kg b.w./day) (n=10 per group).
  - Mice were sacrificed at 13 week of age. Liver were immediately collected and weighted.
- **Antioxidant Enzyme Activity**
  - The liver tissue was homogenized, and the supernatant was separated to measure CAT and SOD.
- **Malondialdehyde**
  - The liver was reacted with 2-thiobarbituric acid and phosphoric acid, and the reaction was performed by adding butanol, and the absorbance was measured at 535 nm.
- **RT-PCR**
  - Liver RNA was extracted using the easy-BLUE™ total RNA extraction kit, cDNA was synthesized, and real-time PCR was performed.
- **Statistical Analysis**
  - Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE, n = 10), and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , a-b-c), as determined using Duncan multiple test.

## Results

	Initial Body weight (g)	Final Body weight (g)	Liver (g)
CON	22.46 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	31.73 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	2.97 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
HFD	23.01 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	43.33 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	3.51 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
MIX	22.41 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	39.17 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	3.19 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>

Table 1. Effect of MIX on Body Weight and Organ Weight in C57BL/6 Mice

Data are expressed as means  $\pm$  SE, and different letters above the bar are statistically different by Duncan multiple test ( $p < 0.05$ ).

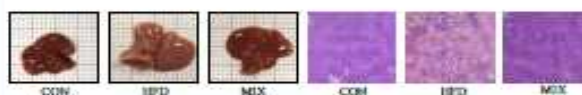


Fig 2. Effect of MIX on Histopathological Changes in HF Diet-fed C57BL/6 Mice.

Table 2. Effect of MIX on Antioxidants Activity in HF Diet-fed C57BL/6 Mice

	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
CON	6675.73 $\pm$ 268.87 <sup>a</sup>	70.89 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
HFD	5750.48 $\pm$ 185.67 <sup>b</sup>	58.12 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>	1.21 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
MIX	6537.09 $\pm$ 185.17 <sup>a</sup>	65.19 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

Data are expressed as means  $\pm$  SE, and different letters above the bar are statistically different by Duncan multiple test ( $p < 0.05$ ).

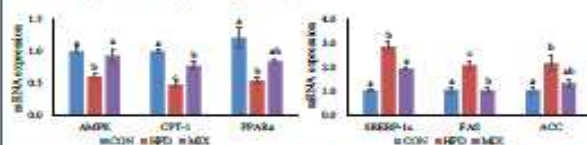


Fig 3. Effect of MIX in C57BL/6 on  $\beta$ -oxidation mRNA Expression.

Data are expressed as means  $\pm$  SE, as determined using Duncan multiple test ( $p < 0.05$ ).

Fig 4. Effect of MIX in C57BL/6 on Lipogenesis mRNA Expression.

Data are expressed as means  $\pm$  SE, as determined using Duncan multiple test ( $p < 0.05$ ).

## Conclusions

- The MIX group effectively reduced body weight and liver weight compared to the HFD group. It was confirmed that fat accumulation was reduced through H&E staining.
- When the antioxidant enzymes CAT and SOD were measured, the MIX group were effectively increased compared to the HFD group.
- When MDA, the lipid peroxide of the liver, was measured, the MIX group was effectively reduced compared to the HFD group.
- In the MIX group, the  $\beta$ -oxidation factors AMPK, CPT-1, and PPAR $\alpha$  were significantly increased compared to the HFD group, and the fat synthesis factors SREBP-1c, FAS, and ACC were significantly decreased compared to the HFD group.

## References

1. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepato! Res* 42:741-749 (2012).
2. Borah A, Faw M, Ogoji R, Loring R, Sarma N, Monda S, Lal M. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and *in-vitro* cytotoxic efficacy of essential oil of *Curcuma caesia* Roxb. leaves: An endangered medicinal plant of North East India. *Ind Crop Prod* 129:448-454 (2019).
3. Sharma K, Mahato N, Lee YR. Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Rev Chem Eng* 35:265-284 (2019).

## Acknowledgment

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Reverse Matching Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119068-2).



CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY  
Lab of Functional Food



□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[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	강황 및 유자로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강 및 면역저하증의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	농업회사법인(주)에스디씨 외 2명	2021.05.27	10-2021-0068509				100	활용	
2	강황 및 유자로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	농업회사법인(주)에스디씨 외 1명	2021.05.31	10-2021-0070226				100	활용	
3	강황 및 유자로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 간보호 및 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	농업회사법인(주)에스디씨 외 1명	2021.06.04	10-2021-0073021				100	활용	

○ 지식재산권 활용 유형

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									
2	√									
3	√									

<특허출원 통지서 3건>

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.06.04  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2021-0073021 (접수번호 1-1-2021-0650703-19)  
(DAS접근코드9074)  
출원인명칭 농업회사법인 주식회사 에스디씨(1-2005-044331-7) 외 1명  
대리인성명 신동인(9-2000-000156-1)  
발명자성명 김용재 전수화 차민석 전우진 박정진  
발명의명칭 강황 및 유자로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 간보호 및 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 조성물

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.05.31  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2021-0070226 (접수번호 1-1-2021-0627285-96)  
(DAS접근코드A174)  
출원인명칭 농업회사법인 주식회사 에스디씨(1-2005-044331-7) 외 1명  
대리인성명 신동인(9-2000-000156-1)  
발명자성명 김용재 전수화 차민석 윤호근 김미정 박수연  
발명의명칭 강황 및 유자로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.05.27  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2021-0068509 (접수번호 1-1-2021-0614048-88)  
(DAS접근코드5983)  
출원인명칭 농업회사법인 주식회사 에스디씨(1-2005-044331-7) 외 2명  
대리인성명 신동인(9-2000-000156-1)  
발명자성명 김용재 최경철 차민석 김현희 전수화  
발명의명칭 강황 및 유자로 구성된 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강 및 면역저하증의 예방 또는 치료용 조성물

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	자기실시	강황 및 유자로 구성된 조합생약추출물을 함유하는 기억력 증진 기능성표시식품 개발	농업회사법인 (주)에스디씨	2021.06.14	40,000,000	농업경영체 전액(100%) 감면
2	자기실시	강황 및 유자로 구성된 조합생약추출물을 함유하는 면역력 증진 기능성표시식품 개발	농업회사법인 (주)에스디씨	2021.06.14	40,000,000	농업경영체 전액(100%) 감면
3	자기실시	강황 및 유자로 구성된 조합생약추출물을 함유하는 간보호 기능성표시식품 개발	농업회사법인 (주)에스디씨	2021.06.14	40,000,000	농업경영체 전액(100%) 감면

<기술실시 계약서>



## 농림식품기술기획평가원



수신자 농업회사법인(주)에스디씨 대표이사

(경유)

제목 농축산물안전유통소비기술개발사업 기술료 감면 승인 알림(주관연구책임자 차민석)

1. 농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제32조(기술료의 납부), 농림축산식품 연구개발사업 관리기준 제36조(기술료의 산정 및 보고서식 등) 및 ㈜에스디씨(2021.6.7.)와 관련됩니다.
2. 귀 기관의 기술료 감면 신청을 아래와 같이 승인하오니 실시기업에서는 2021.06.30. (수)까지 기술실시보고서를 제출해주시기 바랍니다.

사업명 (과제번호)	과제명	주관연구기관	정부출연금*	최종 기술료
	기술이전분류 / 성과활용명	실시기업	당초기술료**	
농축산물안전 유통소비기술 개발  119068-02	강황과 유자 혼합추출물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화	농업회사법인 ㈜에스디씨	400,000,000원	0원 (농업경영체 전액(100%) 감면)
	강황 및 유자로 구성된 조합생약추출물을 함유하는 기능성 증진 기능성표시식품 개발	농업회사법인 ㈜에스디씨	40,000,000원	
	강황 및 유자로 구성된 조합생약추출물을 함유하는 면역력 증진 기능성표시식품 개발	농업회사법인 ㈜에스디씨	40,000,000원	
	강황 및 유자로 구성된 조합생약추출물을 함유하는 간보호 기능성표시식품 개발	농업회사법인 ㈜에스디씨	40,000,000원	

\* 1~2년차 정부출연금에 해당

\*\* 정부출연금의 10~40% 수준에서 정액으로 책정되는 정부납부기술료

붙임 기술실시보고서(양식) 1부. 끝.

농림식품기술기획평가원장



★선임

김성안

원장 취임

신정호

홍조자

시행 연구개발혁신실-2010 (2021.06.14.)

우 (68326) 전라남도 나주시 교목길 46(빛가람동)

전화 061-338-9762

전송 061-338-9799

접수

/ <http://www.ipet.re.kr>

/ [kai8207@ipet.re.kr](mailto:kai8207@ipet.re.kr)

/ 비공개(5,7)

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	한끼어터 사워크림	기능성표 시식품	(주)에스 디씨	-	-	-	5년
2	자기실시	신제품 개발	국내	한끼어터 콘포타주	기능성표 시식품	(주)에스 디씨	-	-	-	5년
3	자기실시	신제품 개발	국내	한끼어터 피자	기능성표 시식품	(주)에스 디씨	-	-	-	5년

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		스넥류 기능성표시식품 3건			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년			
	소요예산(천원)	60,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		0	1,000,000	2,000,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0	5	7
국외		0	5	7	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		면역력증진등 활성을 가지는 스넥류 기능성표시식품 개발에 활용			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		0	200,000	500,000	
	수출	0	500,000	100,000	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	한끼어터 사워크림, 한끼어터 콘포타주, 한끼어터 피자	(주)에스디씨	1	3	4
합계			1	3	4

<신규채용 4명-2019년 1명, 2020년 3명>

출력일시 : 2021.06.28 11:56

**4대 사회보험  
사업장 가입자 명부**

발급번호	20210628448520	발급일시	2021-06-28 11:55	사업장 관리번호	40981859800
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험	
사업장등록번호	409-81-85980	409-81-85980	409-81-85980	409-81-85980	
사업장명칭	농업회사법인 주식회사 예스다비	농업회사법인 주식회사 예스다비	농업회사법인 주식회사 예스다비	농업회사법인 주식회사 예스다비	

■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 2

연번	주민(외국인)등록번호	성명	자격취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9	700320-1*****	김용재	2019.07.15	2019.07.15	2019.07.15	2019.07.15
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						

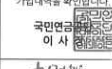
> 위 사업장 가입자 명부는 4대 사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단  
 가입자 정보를 실시간 연계하여 제공하는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일까지 4대 사회보험  
 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 발급사실확인 메뉴에서 확인 가능합니다.  
 ※ 당항 정보연계서비스, 신청 시도보증이 함께 합니다.

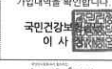
발급번호: 20210628448520 출력일시: 2021.06.28 11:56 2 / 2


연번	주민(외국인)등록번호	성명	자격취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
21	800503-1*****	신동근	2020.07.01	2020.07.01	2020.07.01	2020.07.01
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29	850413-1*****	김준혁	2020.11.09	2020.11.09	2020.11.09	2020.11.09
30						
31						
32	920401-1*****	윤송	2020.09.01	2020.09.01	2020.09.01	2020.09.01
33						
34						

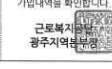
이 하 여 백

> 위 사업장 가입자 명부는 (확인용)으로 신청 발급된 것임을 알려드립니다.  
 [확인용]은 4대 사회보험의 업무목적용 위해서만 제공하는 것이므로 제적증명용, 경력증명용, 대출용 등  
 다른 용도로 사용시에는 발급 기관에 법적 책임이 있다는 점을 알려드립니다.  
 - 타 기관 제출을 위한 용도로 발급을 원하시는 경우에는 각 공단 지사 창구로 신청하시기 바랍니다.  
 > 위 사업장 가입자 명부는 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계  
 받아 제공하는 것입니다. (문의전화: 국민연금 1355, 건강보험 1577-1000, 산재 고용보험 1588-0075)  
 - 사업장 가입자 명부의 내용이 사실과 다를 경우에는 해당 공단으로 문의하시기 바랍니다.  
 - 과거 가입내역은 해당 보험별 각 공단에 문의하여 발급 받으시기 바랍니다.  
 > [산재보험]의 경우, 자격취득일은 근로자 고용일을 뜻하며, 건설업 및 발육업 등 '저전신고 사업장'은  
 근로자 고용정보 신고 대상이 아니므로 '자격취득일(고용일)'은 표기되지 않습니다.  
 > 위 사업장 가입자 명부는 (사업장 관리번호)를 기준으로 작성되었습니다.

위의 같이 국민연금  
가입내역을 확인합니다.  


위의 같이 건강보험  
가입내역을 확인합니다.  


위의 같이 산재보험  
가입내역을 확인합니다.  


위의 같이 고용보험  
가입내역을 확인합니다.  


청정도시: 광주광역시 | 청정도시상 | 다가지 CLEAN

> 위 사업장 가입자 명부는 4대 사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의  
 가입자 정보를 실시간 연계하여 제공하는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일까지 4대 사회보험  
 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 발급사실확인 메뉴에서 확인 가능합니다.  
 ※ 당항 정보연계서비스, 신청 시도보증이 함께 합니다.

□ 고용 효과

		구분	고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	3

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	기능성표시식품 산업화	0	0	0	0	4	
기대 목표	기능성표시식품 산업화	0	0	0	0	4	

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원
1	기능성표시광고 및 법규	'20.11.19. (15:00~17:00)	식품업체 종사자	제주대학교 바이오통합센터	22명

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021	2	1			1	2	1			2	

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	보도자료	뉴스와이어	에스디씨, 쌀로 만든 기능성표시식품 '한끼어터' 출시	2021.06.15



<뉴스와이어 보도자료>

☰ 보도자료 배포 서비스
**NewsWire**   뉴스   서비스   교육   블로그
🔍

---

전체
IT
건강
경제
교육
금융
라이프
레저
문화
미디어
부동산
사회
산업
유통
자동차
환경

---

## 에스디씨, 쌀로 만든 기능성표시식품 '한끼어터' 출시

식품, 건강기능식품에 이어 식품시장 새로운 강자로 떠오르는 기능성표시식품 시장  
다이어트 효과 있는 스낵류 쌀 과자 기능성표시식품, '한끼어터' 출시

출처: 에스디씨  
2021-06-15 16:57

📱
🐦
💬
📌
✉
📄
🔖
🏠



↓

에스디씨의 출시 예정인 한끼어터 시리즈 3종목

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)
㈜에스디씨	지표성분 검출기	GC2010	×	등록	NFEC-2020-08- 264557	2019.09.18	31,900	㈜에스디씨
㈜에스디씨	지표성분 분석용 펌프	SCL-40	×	등록	NFEC-2020-08- 264545	2019.09.18	32,670	㈜에스디씨
㈜에스디씨	지표성분 분석시료 자동주입기	GC2010	×	등록	NFEC-2020-08- 264544	2019.09.18	31,900	㈜에스디씨

## 2절. 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 강황,유자 효능연구를 위한 시료제작 및 효능별 선정원료(추출물)제조공정 표준화 시작	○ 국내산 강황, 유자 시료 채취 ○ 강황+유자 추출물 시료 제작 ○ 효능별 추출혼합물 표준화 완료	100 100 100
○ 기능성표시식품 품질평가를 위한 기반 구축 및 에스디씨가 보유한 생산 시설을 이용하여 시제품 생산	○ 품질평가를 위한 분석 장비 등 구축 ○ 기능성표시식품 시제품 생산	100 100
○ 기능성표시식품 산업화	○ 건강기능식품 원료 그린커피빈주정추출물을 함유한 기능성표시식품 산업화 완료	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 HepG2세포를 이용한 <i>in vitro</i> 독성 확인	○ 연구소재의 안전역을 확인하기 위해 XTT-PMS 용액을 이용한 세포독성 평가	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 HepG2세포를 이용한 <i>in vitro</i> 간기능 개선 활성 확인	○ 지방산을 처리하여 비알코올성 지방증을 유도한 후 세포 내 ROS 생성 억제능, 세포 내 지방축적 억제능을 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 <i>in vivo</i> 활성평가	○ 체중의 증가와 혈액에서 증가된 TG, TC, LDL-CHO, MDA의 값은 강황+유자 추출혼합물의 섭취를 통해 유의하게 감소한 것을 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 기전 규명	○ 강황+유자 추출혼합물의 섭취를 통해 간으로 들어오는 지방산의 유입을 감소시키고, AMPK의 발현을 증가시켜 지방산화인자의 발현을 증가시키고, 지방합성인자는 감소시켜 간에서 지방축적을 억제하는 기작을 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물에 대한 라디칼 소거능 및 세포독성 확인	○ 소재의 라디칼 소거능을 확인하기 위하여 DPPH assay를 이용하여 측정하였으며, 세포독성 평가 위해 MTT assay 진행	100
○ 강황+유자 추출혼합물 대상 뇌세포 보호 효능 검색	○ 소재들의 ROS에 의한 cell damage에 대한 뇌신경 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 처리 후 cell death 확인하였고, 뇌신경 신호전달물질 분해효소(AChE)억제 효능 검토 후 시료를 선정	100
○ 선정된 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vitro</i> 상에서의 효능평가 확인	○ 선정된 시료를 대상으로 하여 일정 비율 배합 후 세포독성, catalase 및 SOD 활성, AChE 억제 효능, BDNF 및 관련 기작의 발현 영향 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 기억력 개선 <i>in vivo/ex vivo</i> 생리활성 평가	○ Y-maze test, Passive avoidance test를 통하여 강황+유자 추출혼합물의 인지능력 및 기억력 증진 효과 확인	100

○ 강황+유자 추출혼합물의 기억력 개선 기전 규명	○ AChE억제능 효능효과 시험, BDNF pathway와 관련 인자 발현을 확인한 결과, 개선되는 양상을 보임	100
○ 강황,유자 단일추출물과 강황+유자 추출혼합물의 면역세포에서의 독성반응 평가	○ 면역세포에 추출물 처리 후 WST-1 assay를 이용하여 세포 독성 평가 진행	100
○ 강황,유자 단일추출물과 강황+유자 추출혼합물의 면역증진 관련 cytokine 활성 평가	○ RNA level에서 면역관련 증진 인자의 변화를 보기 위해 면역증진 관련 cytokine 변화를 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물에 의한 면역세포에서 산화질소(NO)생성 효과 평가	○ 면역세포에 추출물 처리 후 protein을 정제하여 Griess Reagent System으로 NO변화를 통해 효과를 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 <i>in vivo/ex vivo</i> 에서의 독성반응 및 활성 평가	○ 강황+유자 추출혼합물에 대한 <i>in vivo/ex vivo</i> 에서의 독성을 확인한 결과 독성이 없음을 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 <i>in vivo/ex vivo</i> 에서의 cytokine 활성 평가	○ <i>In vivo/ex vivo</i> 에서 강황+유자 추출혼합물의 cytokine 활성 평가를 실시한 결과 cytokine 활성이 증가하는 것을 확인	100
○ 강황+유자 추출혼합물의 면역력 증진 기전 규명	○ 강황+유자 추출혼합물의 면역 자극에 영향을 미치고 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로를 조절할 수 있음을 확인	100

#### 제4장. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 기능성표시식품 제도는 `18년 3월 13일 제정된 식품 등의 표시·광고에 관한 법률에 근거를 두고 있으며, `20년 12월 29일 제정 고시된 「부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정」에 따라 `21년도부터 현재까지 74품목이 개발되었음, 현재까지 개발된 기능성표시식품은 규정에 고시된 기능성 원료 29종을 함유하는 제품들로써 다양한 제품은 생산되지 못한 한계에 있음
  - 본사업을 통해 개발된 한끼어터 시리즈는 최초로 개별인정형 기능성 원료를 사용하여 개발된 기능성표시식품으로서 향후 개별인정형 건강기능식품 원료를 이용한 제품 개발에 선도 모델로 제시될 수 있으며, 규정에 고시된 원료들의 기능 외에 다양한 기능을 가지는 기능성표시식품 개발 선례가 될 것임
-

## 제5장. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		1
	비SCIE		0
	계		1
국내논문	SCIE		0
	비SCIE		2
	계		2
특허출원	국내		0
	국외		0
	계		0
특허등록	국내		3
	국외		0
	계		3
인력양성	학사		0
	석사		0
	박사		0
	계		0
사업화	상품출시		3
	기술이전		0
	공정개발		0
제품개발	시제품개발		3
비임상시험 실시			0
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	0
		2상	0
		3상	0
	의료기기	0	
진료지침개발			0
신의료기술개발			0
성과홍보			0
포상 및 수상실적			0
정성적 성과 주요 내용			기능성표시식품 출시

### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

## 붙임. 참고문헌

1. 식품공전, 식품의약품안전처
2. 기능성표시식품, 특정보건용 식품 등 일본국내 시장조사, 후지경제, 2020
3. 건강식품 시장에 관한 조사결과, 야노경제연구소, 2021
4. 식품 등의 표시·광고에 관한 법률, 법제처, 2020.12.29.
5. 식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행령, 법제처, 2021.01.05.
6. 식품 등의 표시·광고에 관한 법률 시행규칙, 법제처, 2021.05.27.
7. 부당한 표시 또는 광고로 보지 아니하는 식품 등의 기능성 표시 또는 광고에 관한 규정, 식품의약품안전처, 2020.12.29.
8. You, Y., Min, S., Lee, Y.-H., Hwang, K., Jun, W. Hepatoprotective effect of 10% ethanolic extract from *Curdrania tricuspidata* leaves against ethanol-induced oxidative stress through suppression of CYP2E1. *Food Chem. Toxicol.* 2017, 108, 298-304
9. Kim, M.H., Seong, J.B., Huh, J.W., Bae, Y.C., Lee, H.S., Lee, D.S. Peroxiredoxin 5 ameliorates obesity-induced non-alcoholic fatty liver disease through the regulation of oxidative stress and AMP-activated protein kinase signaling. *Redox. Biol.* 2020, 3, 101315
10. Mun, J., Kim S., Yoon H.-G., You, Y., Kim O.-K., Choi K.-C., Lee Y.-H., Lee J., Park J., Jun W. Water extract of *Curcuma longa* L. ameliorates non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* 2019, 11, 2536
11. Mun, J., Park, J., Yoon, H.-G., You Y., Choi, K.-C., Lee, Y.-H., Kim, K., Lee, J., Kim, O.-K., Jun, W. Effects of *Eriobotrya japonica* Water Extract on Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Impairment. *J Med Food.* 2019, 22, 1262-1270
12. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, *et al.*: Beta-amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 1994, 170, 63-66
13. Song JH, Yu JT, Tan L: Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease: risk, mechanisms, and therapy. *Mol Neurobiol* 2015, 52, 1477-1493
14. Li J, Ding X, Zhang R, *et al.*: Harpagoside ameliorates the amyloid- $\beta$ -induced cognitive impairment in rats via up-regulating BDNF expression and MAPK/PI3K pathways. *Neuroscience* 2015, 10, 103-114
15. Alper K, Reith ME, Sershen H: Ibogaine and the inhibition of acetylcholinesterase. *J Ethnopharmacol.* 2012, 15, 139, 879-882
16. Mi-Jeong Kim, Jeongmin Lee, Ah-Reum Seong, Yoo-Hyun Lee, Yung-Jae Kim, Hum-Young Baek, Young Jun Kim, Woo Jin Jun, Ho-Geun Yoon, Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against  $\beta$ -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. *Food Chem Toxicol.* 2011, 49(4), 780-784
17. You M, Pan Y, Liu Y, Chen Y, Wu Y, Si J, Wang K, Hu F. Royal Jelly Alleviates Cognitive Deficits and beta-Amyloid Accumulation in APP/PS1 Mouse Model Via Activation of the cAMP/PKA/CREB/BDNF Pathway and Inhibition of Neuronal Apoptosis. *Front Aging Neurosci.* 2019, 428, 1-10
18. Yamaguchi Y, Kawashima S: Effects of amyloid- $\beta$ -(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur JPharmacol* 2001, 421, 256-272
19. Shen Z, Wangn G, Linn SZ: Two-way shuttle box avoidance conditioning and brain NADH in rats. *Physiol Behav* 1990, 48, 515-517
20. Alper K, Reith ME, Sershen H: Ibogaine and the inhibition of acetylcholinesterase. *J Ethnopharmacol.* 2012, 139, 879-882

21. Comim CM, Reis PA, Frutuoso VS, *et al.*: Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity in the hippocampus of survivor mice. *Neuroscience Lett* 2012, 523, 104-107
22. Abramov AY, Canevari L, Duchen MR: Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci* 2004, 14, 565-575
23. Zheng H, Niu S, Zhao H, *et al.*: Donepezil improves the cognitive impairment in a tree shrew model of Alzheimer's disease induced by amyloid- $\beta$ 1-40 via activating the BDNF/TrkB signal pathway. *Metab Brain Dis* 2018, 33, 1961-1974
24. Yang X, Zhang W, Xu P: NK cell and macrophages confer prognosis and reflect immune status in osteosarcoma. *J Cell Biochem.* 2018, 120, 8792-8797
25. Kottke T, Evgin L, Shim KG, *et al.*: Subversion of NK-cell and TNF $\alpha$  immune surveillance drives tumor recurrence. *Cancer Immunol Res.* 2017, 5, 1029-1045
26. Kim RW, Lee SY, Kim SG, Heo YR, Son MK: Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Dendropanax morbifera* Leveille extract for mouthwash and denture cleaning solution. *J Adv Prosthodont.* 2016, 8, 172-180
27. Sun S, Li T, Jin L, *et al.*: *Dendropanax morbifera* prevents cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting the Sp1/GATA4 pathway. *Am J Chin Med* 2018, 46, 1021-1044
28. Senthil Kumar KJ, Wang SY: Lucidone inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW264.7 murine macrophage cells via NF-kappaB and MAPKs signaling pathways. *Planta Med* 2009, 75, 494-500
29. Song JH, Kang HB, Park SH, *et al.*: Extracts of *Porphyra tenera* (Nori Seaweed) activate the immune response in mouse RAW264.7 macrophages via NF-kappaB Signaling. *J Med Food* 2017, 20, 1152-1159
30. Shewchuk LD, Baracos VE, Field CJ: Reduced splenocyte metabolism and immune function in rats implanted with the Morris Hepatoma 7777. *Metabolism* 1996, 45, 848-855
31. Jabs WJ, Wagner HJ, Schlenke P, Kirchner H: The primary and memory immune response to Epstein-Barr virus infection in vitro is characterized by a divergent production of IL-1 $\beta$ /IL-6 and IL-10. *Scand J Immunol* 2000, 52, 304-308
32. Lacy P, Stow JL: Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 2011, 118, 9-18
33. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D: The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014, 2014, 561459
34. Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, *et al.*: The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I{kappa}B kinase subunit IKK{alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107, 17333-17338

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 강황과 유자 혼합추출물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화				
	(영문) Functional expression food production base using <i>Curcuma longa</i> L. and <i>Citrus junos</i> Siebold ex Tanaka				
주관연구기관	농업회사법인(주)에스디씨		주 관 연 구 책 임 자	(소속)	
참 여 기 업	전남대학교 산학협력단 연세대학교 산학협력단 울산대학교 산학협력단			(성명) 차 민 석	
총연구개발비 (800,000천원)	계	800,000	총 연구 기간	2019.06.20. ~ 2021. 06.19 (2년)	
	정부출연 연구개발비	400,000	총 참 연 구 원 수	총 인원	12명
	기업부담금	400,000		내부인원	12명
	연구기관부담금	0		외부인원	0명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 기능성표시식품 생산 기반 구축</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 간기능 개선 활성 평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 기억력 개선 활성 평가</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 면역력 증진 활성 평가</li> <li>• 기능성원료 함유 기능성표시식품 산업화</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내산 강황과 유자를 추출하여 강황+유자 추출혼합물 생산 완료</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 시험관, 동물모델연구 완료</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 기억력 개선 시험관, 동물모델연구 완료</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 면역력 증진 시험관, 동물모델연구 완료</li> <li>• 기능성 원료 그린커피빈주정추출물 함유 기능성표시식품 생산 완료</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구결과 논문으로 게재하여 마케팅 자료로 활용</li> <li>• 개별인정형 건강기능식품 원료를 함유하는 기능성표시식품 산업화 활용</li> <li>• 제품으로 생산한 한끼어터 사워크림, 한끼어터 콘포타쥬, 한끼어터 피자 제품 쇼핑몰에 상세 정보로 제공하여 기존 제품과의 차별화를 꾀할 예정임</li> <li>• 강황+유자 추출혼합물을 이용하여 주관기관에서 생산하고 있는 식품에 부원료로 활용가능한 건강기능식품 소재 개발</li> <li>• 본 사업으로 수행된 간기능 개선, 기억력 개선, 면역력 증진 관련 시험관, 동물 연구는 관련 연구에 활용 가능함</li> </ul>					



[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	119068-2		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	강황과 유자 혼합추출물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화			과제유형	개발
연구개발기관	농업회사법인(주)에스디씨, 전남대학교 산학협력단, 연세대학교 산학협력단, 울산대학교 산학협력단			연구책임자	차 민 석
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.06.20.~2020.06.19	200,000	200,000	400,000
	2차년도	2020.06.20.~2021.06.19	200,000	200,000	400,000
	계	2019.06.20.~2021.06.19	400,000	400,000	800,000
참여기업	농업회사법인(주)에스디씨				
상대국		상대국연구개발기관			

2. 평가일 : 2021.07.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
농업회사법인(주)에스디씨	대표이사	차 민 석

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

<b>확약</b>	
-----------	--

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

최초 계획했던 기능성표시식품 생산 기반구축이 완료되었으며, 강화과 유자를 함유하는 간기능개선, 기억력개선, 면역력증진 활성평가 연구가 성공적으로 완료되었음

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 사업을 통해 개발된 기능성표시식품 3건은 국내에서 처음으로 개발된 스넥류 기능성표시식품으로서 향후 다양한 유형의 기능성표시식품 개발 가능성을 제시하고 있음

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

강화과 유자를 이용한 간기능개선, 기억력개선, 면역력증진 활성평가 연구 결과를 확보하였으며 향후 건강기능식품 소재개발에 활용 가능함

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

주관기관 SDC를 포함하여 4개 기관이 공동연구로 본 사업을 수행하였으며, 코로나 이후 어려운 사회적 환경 속에서도 참여 연구원의 헌신으로 성공적으로 사업을 수행할 수 있었음

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

■ 등급 : 우수

본 사업의 성과물로서 산업화 3건을 달성하였으며, 특허 출원 3건과 SCI 논문투고 1건을 달성하였고 추가로 논문 2건을 작성 중에 있음

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 3건	10	100	목표달성
기술실시(이전)	15	100	목표달성
제품화 3건	30	100	목표달성
매출	10	0	제품 생산 완료되어 '21년 하반기 판매시작
고용창출	20	200	목표 초과 달성
학술발표	5	233	목표 초과 달성
인력양성	5	100	목표달성
홍보전시	5	100	목표달성
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

‘19년도 6월 사업 시작 시에는 기능성표시식품 제도가 정착되지 못한 시점이어서 선제적으로 예측하여 생산기반 구축과 활성평가 연구를 시작하였음, 그 후 ‘20년 12월 29일 기능성표시식품 제도와 관련된 규정이 고시되어 사업기간이 압박하여 산업화가 어려웠지만, 사전 준비로 사업기간 내 산업화를 달성하였고, 강황과 유자를 이용한 활성평가(시험관, 동물모델) 연구가 완료되어 향후 기능성 원료 소재 개발에 활용가능하게 되었으며, 코로나 팬데믹으로 어려운 환경 속에서도 참여연구원들의 헌신으로 성공적으로 사업을 수행할 수 있었음

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

기능성표시식품 제도 정착이 늦어져 개발된 제품의 매출 실적이 현재는 없음, 그러나 주관기관이 보유하고 있는 이마트 등 대형 거래처와 제품 상정을 협의 중에 있으며 중국 등 해외 수출도 협의 중에 있어 ‘21년 하반기에는 매출이 기대됨

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 사업을 통해 개발된 기능성표시식품은 이마트 등 오프라인 매장과 현대홈쇼핑 등 온라인망에서 판매할 것임
- 강황과 유자를 이용한 간기능개선, 기억력개선, 면역력증진 활성평가 연구 결과는 향후 건강기능식품 원료 소재 개발에 활용 예정임

#### IV. 보안성 검토

o 보안성 필요하지 않음

##### 1. 연구책임자의 의견

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	강황과 유자 혼합추출물 기능성 표시 식품 소재 개발과 산업화			
주관연구개발기관	농업회사법인(주)에스디씨		주관연구책임자	차 민 석
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	400,000	400,000	-	800,000
연구개발기간	2019.06.20.~2021.06.19			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(    ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:    )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 기능성표시식품 생산 기반 구축	기능성표시식품 생산 및 품질평가를 위한 기반 구축 완료하였음
② 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 간기능 개선 활성 평가	강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델연구를 완료하였음
③ 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 기억력 개선 활성 평가	강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델연구를 완료하였음
④ 강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 면역력 증진 활성 평가	강황+유자 추출혼합물의 시험관, 동물모델연구를 완료하였음
⑤ 기능성표시식품 산업화	그린커피빈주정추출물을 함유하는 기능성표시식품을 산업화하였음

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용등)
	특허 출원	특허 등록	품 종 등 록	S M A R T 평 관 등 급	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		S C I	비 S C I	논 문 평 균 I F			학 술 발 표	정 책 활 용	
												건				건	건			건
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	건	
가중치	10	0	0	0	15	0	30	10	0	20	0	0	0	5	0	5	0	5	0	
최종	3	3	0	0	3	0	3	100	0	2	0	0	3	0	3	0	3	0	1	0

목표																						
당해 년도	목표	3	-	-	-	3	-	3	100	-	1	-	-	-	3	-	2	-	2	-	1	-
	실적	3	-	-	-	3	-	3	0	-	3	-	-	3	-	-	5	-	2	-	1	-
달성률 (%)		100	-	-	-	100	-	100	0	-	300	-	-	100	-	-	250	-	100	-	100	-

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	강황+유자 추출혼합물 제조공정 표준화 및 지표성분 정립
②	강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 기능 확인
③	강황+유자 추출혼합물의 기억력 개선 기능 확인
④	강황+유자 추출혼합물의 면역력 증진 기능 확인
⑤	기능성표시식품 개발

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v				
②의 기술		v				v	v				
③의 기술		v				v	v				
④의 기술		v				v	v				
⑤의 기술		v					v				

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	건강기능식품 원료 개발에 활용
②의 기술	건강기능식품 원료 개발에 활용
③의 기술	건강기능식품 원료 개발에 활용
④의 기술	건강기능식품 원료 개발에 활용
⑤의 기술	스넥류 기능성표시식품 개발에 활용

#### 7. 연구종료 후 성과창출 계획

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	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											S C I				비 S C I	논 문 평 균 I F			

단위	건	건	건	평 면 면 적	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	0	0	0	15	0	30	10	0	20	0	0			0	5	0	5	0	5	0
최종목표	3	3	-	-	3	-	3	100	-	2	-	-	-	3	-	3	-	3	-	1	-
연구기간내 달성실적	3	-	-	-	3	0	3	0	-	4	-	-	3	-	-	7	-	3	-	1	-
연구종료후 성과장출 계획	-	3	-	-	-	-	-	1,500	-	3	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	강황+유자 추출혼합물의 간기능 개선 기능 확인		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	없음		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	강황+유자 추출혼합물의 기억력 개선 기능 확인		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	없음		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	강황+유자 추출혼합물의 면역력 증진 기능 확인		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	없음		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	기능성표시식품 개발		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(주관기관에서 개발된 기술로서 자체 활용 )		
이전소요기간	즉시	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2021년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	없음		



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.