

11-15
43000
-0027
51-01

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002751-01

아로니아
의 전립선
비대증
예방 및
개선
효능의
규명 및
기능성
식품
(프로스타
플러스)의
개발

최
종
보
고
서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발

최종보고서

2019 . 06 . 04 .

주관연구기관 / 농업회사법인(주)삼흥
협동연구기관 / 경남과학기술대학교
협동연구기관 / 안전성평가연구소

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발” (개발기간 : 2016. 07. 07. - 2018. 12. 31.)과제의 최종보고서 로 제출합니다.

2019. 2. 8.

주관연구기관명 : 농업회사법인 (주)삼흥

(대표자) 하재규



협동연구기관명 : 경남과학기술대학교 산학협력단 (대표자) 이상원



협동연구기관명 : 안전성평가연구소

(대표자) 송창우



참여기관명 : 농업회사법인 (주)삼흥

(대표자) 하재규



참여기관명 : 농업회사법인 (주)하늘선물애프앤비 (대표자) 여운곤



주관연구책임자 : 권 선 화

협동연구책임자 : 정 은 주

참여기관책임자 : 김 나 현

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

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발” (개발기간 : 2016. 07. 07. - 2018. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 2 . 8 .

주관연구기관명 : 농업회사법인 (주)삼흥 (대표자) 하재규 (인)

협동연구기관명 : 경남과학기술대학교 산학협력단 (대표자) 이상원 (인)

협동연구기관명 : 안전성평가연구소 (대표자) 송창우 (인)

참여기관명 : 농업회사법인 (주)삼흥 (대표자) 하재규 (인)

참여기관명 : 농업회사법인 (주)하늘선물에프앤비 (대표자) 여운곤 (인)

주관연구책임자 : 권 선 화

협동연구책임자 : 정 은 주

참여기관책임자 : 김 나 현

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116016-03-1-CG000	해 당 단 계 연 구 기 간	2016. 07. 07. - 2018. 12. 31.	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	2016년도 고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발			
연구책임자	권선화	해당단계 참여연구원 수	총: 14 명 내부: 14 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:520,000천원 민간:130,000천원 계:650,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 14 명 내부: 14 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:520,000천원 민간:130,000천원 계:650,000천원
연구기관명 및 소속부서명	농업회사법인 (주)삼흥		참여기업명 농업회사법인 (주)삼흥		
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명: 농업회사법인 (주)하늘선물에 프엔비		연구책임자: 여운곤		

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제
-------------------------	------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>주관연구기관 : 농업회사법인 주식회사 삼흥 협동연구기관 : 경남과학기술대학교 정은주교수팀, 안전성평가연구소 위탁연구기관: 농업회사법인 (주)하늘선물 에프엔비</p> <p>안토시아닌이 다량 함유되어 있는 아로니아의 전립선 질환 예방효과와 기전을 검토하고 베타카로틴, 라이코펜의 함량이 우수한 다른 소재를 활용한 복합제품을 개발함.</p> <p><1차년도></p> <p><input type="checkbox"/> 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥 아로니아 추출물의 원료 및 건강기능식품 소재 제조공정 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료표준화 - 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화 - 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(아로니아 추출물) <p><input type="checkbox"/> 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물의 제조 - 가속용매추출장치 추출변수 설정 및 추출물 제조 - 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 평가 ○아로니아 추출물의 cell viability 측정 ○아로니아 추출물의 5-alpha reductase 저해 활성 ○아로니아 추출물의 DHT 전환 억제 활성 검토 ○아로니아 추출물의 항염활성 검토 - 국내산 아로니아와 수입 아로니아 추출물의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 비교평가 <p><input type="checkbox"/> 협동연구기관 - 안전성평가연구소 아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 <i>in vivo</i> 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> 실험결과 토대로 한 시료선정 하기 위한 전립선비대 유도 rat 실험 ○ 실험재료 준비 ○ 실험동물의 조건확립 ○ 전립선비대 <i>in vivo</i> model의 확립 ○ 시료의 투여 ○ 실험동물의 체중변화 ○ 부검 및 시료의 채취 ○ Prostate Index (PI)
------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- 혈액분석
- 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석
- 조직병리학적 평가

<2차년도>

- 주관연구기업 - 농업회사법인 주식회사 삼흥
 - 아로니아 안토시아닌 함량확인 및 지표성분 정량 및 1차 시제품 제작
 - 아로니아 추출액을 이용한 안토시아닌 함량변화 확인
 - HPLC로 안토시아닌의 지표성분 정량
 - 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작
 - 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립
 - 포장디자인 개발
 - 영양성분 분석
 - 시제품 제작

- 협동연구기관 - 경남과학기술대학교
 - 아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴
 - 아로니아로부터 기능성성분의 분리 및 규명
 - 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴
 - 기능성 소재의 cell viability 측정
 - 기능성 소재의 5-alpha reductase 저해 활성
 - 기능성 소재의 DHT 전환 억제 활성 검토
 - 기능성 소재의 항염활성 검토

- 협동연구기관 - 안전성평가연구소
 - 활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 *in vivo* 평가
 - 시료의 선정
 - 실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도
 - 시료의 조제와 투여
 - 실험동물의 체중변화, 장기무게
 - 혈액분석
 - 전립선 및 비뇨생식기계의 histopathological examination

<3차년도>

- 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥
 - 아로니아 추출물의 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 2의 개발
 - 전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2의 제작
 - 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립

	<ul style="list-style-type: none"> - 포장디자인 개발 - 영양성분 분석 - 시제품 2 제작 <p>□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조, 아로니아 추출물의 분석조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활성을 최적화하기 위한 추출조건을 확보 - 추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조 - 추출물 및 복합물 최적화를 위한 반응표면분석 - 아로니아 추출물의 분석조건 확립 ○ 분석용 시료의 제조 ○ 지표성분(표준품) 시료 제조 ○ 아로니아 추출물의 지표성분의 설정 ○ 고정상 및 이동상의 최적화 ○ 검출과장 최적화 - 아로니아 추출물 분석법을 이용한 국내산 아로니아와 수입산 아로니아 내 기능성성분 함량 비교평가 <p>□ 협동연구기관 - 안전성평가연구소 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물의 표적 기전 탐색 <p>□ 위탁연구기관 - 농업회사법인 주식회사 하늘선물애프앤비 시제품의 사업화 전략수립 및 마케팅</p>
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p><연구개발 성과></p> <p>최종 개발성과는 특허출원 4건, 특허등록 2건, 기술실시 2건, 제품화 3건, 매출액 7억, 고용창출 3건, 기술인증1건, SCI논문 4건, 비SCI논문 4건, 학술발표 6건, 인력양성 3건을 목표로 하고 있으며, 과제수행 중에는 특허출원 3건, 기술실시 1건, 제품화 2건, 매출액 2억, 고용창출 3명, 기술인증 1건, SCI논문 2건, 비SCI논문 3건, 학술발표 4건, 인력양성 3건을 목표로 하고 있음.</p> <p>과제수행 중 최종성과는 특허출원 6건, 기술실시 2건, 제품화 3건, 매출액 3억6천9백만원, 고용창출 2명, SCI논문 4건, 학술발표 5건, 인력양성 3건을 홍보활동 2건을 이루었음.</p>
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 건강기능성, 고품질 아로니아 제품의 양산 - 관광 상품용 아로니아 가공 제품으로의 마케팅 추진 - 소비자의 마인드를 읽어낼 수 있는 차별화된 제품과 concept으로 기능성 상품으로 개발

- 거창 지역 특성을 살려 관광단지내 매장판매용 제품으로 판로 확보
- 대형유통업체, OEM, ODM 제품으로의 판로 확보
- 지역 특산물에 새로운 공정을 도입하여 신규 가공 제품을 개발할 수 있음
- 신개념 아로니아 가공 제품을 개발하여 참여기업의 지식재산권 확보와 논문 게재를 통한 제품의 우위성 부여 및 홍보에 활용
- 기능성 제품의 산업적 활용 기술을 참여기업에 이전·상품화하여 전통적인 아로니아 가공 제품 이외에 생산제품의 다양화로 기업의 수익 창출 및 발전에 활용
- 본 연구에 참여하는 학생들에게 산업적 제품개발의 기초지식을 부여하여 취업 시 산업체 현장에 적응력을 강화함
- 모든 연구 자료는 건강기능식품 개별인정형 신청 자료로 활용

○ 기대효과

- 아로니아의 새로운 기능성 확보로 다양한 가공제품의 개발 가능
- 아로니아의 단순 가공 제품의 특허가 아닌 원천기술의 특허 획득을 통한 유사 제품에 대비한 시장 경쟁력 확보 및 수익 창출
- 신개념의 고품질 아로니아 가공 제품 개발을 통한 매출 증대
- 신기술 제품 개발 기술로 인한 주관연구기관의 이미지 향상 및 위상 제고
- 위탁연구기관의 연구 참여 학생들의 산업적 기초지식 함양 및 취업 경쟁력 강화
- 아로니아 발효기술 공정과 안토시아닌 enrichment 공정의 원천 기술 확보
- 아리노아 가공 제품 개발을 위한 생리활성 기능성 및 물성 측정 기술 확보
- 고부가가치의안토시아닌 enrichment 공정을 통한 새로운 제품 개발의 기초 자료 및 기술력 제공
- 신규 가공 공정을 이용한 제품으로 지식재산권 확보를 통한 국내외 시장에서 우위 선점
- 안토시아닌 증강 아로니아 가공 제품 제조 기술을 통한 아로니아 가공 제품의 이미지 향상 및 기능성 규명을 통한 중소기업의 활성화
- 고품질 아로니아 가공 제품의 개발을 통한 참여기업의 매출증대 및 성인병의 예방을 통한 국가 의료비 손실 감소와 국민건강의 활성화
- 아로니아 가공 업계의 활성화 및 새로운 품목의 산업적 활성화 효과 기대
- 연구 종료 후 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청을 위한 제출 자료 획득 기대

국문핵심어 (5개 이내)	아로니아	전립선비대증	표준물질	건강기능식품	프로스타 플러스
영문핵심어 (5개 이내)	Aronia	Benign prostatic hyperplasia	Chemical standard material	Functional food	Prostar plus

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요	1
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	1
제2절 국내외 기술개발 현황	6
제3절 연구개발의 범위	17
제 2장. 연구방법 및 결과	41
제1절 연구방법	41
제2절 1차년도(2016년) 연구개발 수행결과	52
1. 2016년도 연구개발 목표 및 결과	52
2. 연구범위 및 연구수행 방법	54
3. 연구수행 결과	56
제3절 2차년도(2017년) 연구개발 수행결과	88
1. 2017년도 연구개발 목표 및 결과	88
2. 연구범위 및 연구수행 방법	90
3. 연구수행 결과	94
제4절 3차년도(2017년) 연구개발 수행결과	161
1. 2018년도 연구개발 목표 및 결과	161
2. 연구범위 및 연구수행 방법	164
3. 연구수행 결과	167
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	202
제 4장. 연구결과의 활용 계획 등	213
<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서	

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적 및 필요성

연구개발의 개요



아로니아의 전립선 비대증 개선효과

농업회사법인 주식회사 삼흥	경남과학기술대학교	안전성평가연구소	농업회사법인 (주)하늘선물에프앤비
아로니아 추출물의 원료 및 건강기능식품 소재 제조공정 표준화	아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 in vitro 전립선 비대 개선 효능 평가	아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 in vivo 평가	
아로니아 안토시아닌 함량확인 및 지표성분 정량 및 1차 시제품 제작	아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴	활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 in vivo 평가	
아로니아 추출물의 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 2의 개발	추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조, 아로니아 추출물의 분석조건 확립	아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구	시제품의 사업화 전략 수립 및 마케팅

안토시아닌이 다량 함유되어 있는 아로니아의 전립선 질환 예방효과와 기전을 검토하고, 베타카로틴, 라이코펜의 함량이 우수한 다른 소재를 활용한 복합제품을 개발함.

1. 연구개발의 중요성

- 아로니아
 - 아로니아(Aronia melanocarpa)는 장미과 과수로 black chokeberry로도 알려져 있으며 북아메리카에 자생하는 관목(shrub)으로 일반적으로 수고는 90~180cm이고, 과실은 직경 6mm 정도의 진보라~검정색을 띠고 8~14개의 과실이 과방을 이루고 있음.
 - 19세기 러시아로 도입되었으며 현재 스웨덴을 비롯한 폴란드, 체코, 슬로바키아, 우크라이나에서 널리 재배되고 있음. 현재 주로 재배되고 있는 품종으로는 ‘Viking’, ‘Nero’, ‘Aron’ 이 있음.
 - 아로니아는 과실에 신맛과 떫은맛을 가지고 있어 생식보다는 주로 가공용으로 이용되며 다량의

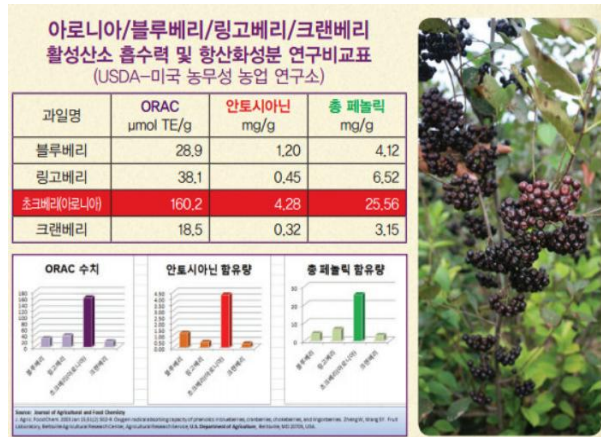


안토시아닌을 함유하고 있어 항산화력을 촉진하는 주스, 차와 같은 음료뿐만 아니라 잼, 와인을 비롯한 식품에 첨가되는 천연 색소로도 널리 이용되고 있으며, 특히 러시아와 동유럽국가에서 고혈압, 동맥경화, 염산결핍증, 비타민결핍증 등에 대한 천연 약제로서 각광받고 있음.

○ 10대 슈퍼푸드의 아로니아

- 아로니아(Aronia berry)는 아로니아 나무의 열매를 말하는데 주로 색소색소의 원료, 약용으로 사용하고 있으며, 관상용으로도 재배하고 있음. 아로니아는 레드쵸크베리, 블랙쵸크베리, 퍼플쵸크베리의 3가지를 합쳐서 아로니아라고 부르며, 킹스베리라고도 불림. 현재 폴란드는 국책사업으로 아로니아를 재배하고 있으며 전 세계 아로니아 생산량의 90%이상이 폴란드산임.
- 아로니아는 미타임즈가 선정한 10대 슈퍼푸드에 선정될 정도로 건강식품으로 알려졌으며, 중세 유럽에서 만병통치약 또는 왕의음식(킹스베리)으로 불리우며 블루베리보다 4배이상 많은 안토시아닌과 폴리페놀 등의 항산화물질이 풍부한 것이 특징임

폴란드 “슈퍼푸드”로의 아로니아



식품 유래 강력한 항산화 물질
뉴트라슈티컬 (Neutraceutical)



아로니아는 다른 베리류보다 **항산화력**이 우수
안토시아닌 함량이 월등히 높음

- 아로니아는 항산화력 뿐만 아니라, 전립선암이나 전립선 질환에도 효과를 나타내는데, 아로니아를 활용한 제품의 개발은 미흡한 실적임.

Anthocyanin Induces Apoptosis of DU-145 Cells *In Vitro* and Inhibits Xenograft Growth of Prostate Cancer

U-Syn Ha,¹ Woong Jin Bae,² Su Jin Kim,¹ Byung Il Yoon,¹ Sung Hoo Hong,¹ Ji You Lee,¹ Tae-Kon Hwang,¹ Sung Yeoun Hwang,² Zhiping Wang,³ and Sae Woong Kim¹

¹Department of Urology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul;
²Catholic Integrative Medicine Research Institute, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul;
³Korea Bio Medical Science Institute, Seoul, Korea;
⁴Department of Urology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, China.

Received: January 2, 2014
Revised: April 11, 2014
Accepted: May 2, 2014
Corresponding author: Dr. Sae Woong Kim,
Department of Urology, College of Medicine,
The Catholic University of Korea,
222 Banpo-daero, Seocho-gu,
Seoul 137-701, Korea.
Tel: 82-2-2258-8226, Fax: 82-2-599-7929
E-mail: ksw1221@catholic.ac.kr

The authors have no financial conflicts of interest.

Purpose: To investigate the effects of anthocyanins extracted from black soybean, which have antioxidant activity, on apoptosis *in vitro* (in hormone refractory prostate cancer cells) and on tumor growth *in vivo* (in adjuvant nude mouse xenograft model). **Materials and Methods:** The growth and viability of DU-145 cells treated with anthocyanins were assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and apoptosis was assessed by DNA laddering. Immunoblotting was conducted to evaluate differences in the expressions of p53, Bax, Bcl-2, androgen receptor (AR), and prostate specific antigen (PSA). To study the inhibitory effects of anthocyanins on tumor growth *in vivo*, DU-145 tumor xenografts were established in adjuvant nude mice. The anthocyanin group was treated with daily oral anthocyanin (8 mg/kg) for 14 weeks. After 2 weeks of treatment, DU-145 cells (2×10^6) were inoculated subcutaneously into the right flank to establish tumor xenografts. Tumor dimensions were measured twice a week using calipers and volumes were calculated. **Result:** Anthocyanin treatment of DU-145 cells resulted in 1) significant increase in apoptosis in a dose-dependent manner, 2) significant decrease in p53 and Bcl-2 expressions (with increased Bax expression), and 3) significant decrease in PSA and AR expressions. In the xenograft model, anthocyanin treatment significantly inhibit tumor growth. **Conclusion:** This study suggests that anthocyanins from black soybean inhibit the progression of prostate cancer *in vitro* and in a xenograft model.

Key Words: Prostatic neoplasms, anthocyanins, apoptosis

Anthocyanin Induces Apoptosis of DU-145 Cells *in vitro* and Inhibits Xenograft Growth of Prostate Cancer / Yonsei Med J 56(1):16-23, 2015

- 우리나라에도 2006년 아로니아를 재배를 시작하였으며, 국내 아로니아 재배면적은 2012년까지 197.5ha를 차지하였으나, 2013년 한 해 동안 증가한 재배면적이 138.7ha에 달하며 2013년 기준으로 국내 아로니아 총 재배면적은 336.2ha에 달함. 따라서 앞으로 몇 년 동안 국내 아로니아 재배면적은 지속적으로 증가할 것으로 생각됨. 가장 넓은 재배면적을 지닌 지역은 충북으로 그 규모는 83.3ha에 달하며, 그 뒤로 전북 74.8ha, 경북 44.7ha를 차지하고 있음.
- 아로니아는- 최근 WTO 체제의 출범과 FTA 발효에 따라 세계 농산물이 무한 경쟁시대에 돌입함으로써 농산물의 개방화와 국제 경쟁상황에서 생존할 수 있는 가장 능동적인 대처방안의 하나가 고부가가치의 농산물을 지역특화 품목으로 육성함과 동시에 농산물의 기능을 이용한 건강 지향적 가공식품의 개발 및 상품화를 과학적으로 확인하여 국내·외 시장에 많이 보급하고, 확산시켜 우리 농산물의 안정적 수급 체계의 구축과 농산물의 고부가가치화를 실현하는 것이 최적의 대안으로 여겨짐.
- 지금까지의 단순 기술 도입 및 적용 수준에서 탈피하여 원천기술 확보를 통한 기술혁신을 통해 새로운 기술 개발을 위해서 여러 각도로 급속히 변화해 가는 국내 및 세계시장의 흐름에 발맞추어 나갈 수 있도록 R&D 중심으로 변화에 대처할 수 있는 연구기반을 구축하기 위함.

○ 전립선은 작은 샘들이 벌집처럼 모인 밤톨 크기의 기관으로 정자에 영양분을 공급하고 병원균의 감염을 막는 정액을 분비함. 위치는 방광 바로 아래 있으며 요도를 도넛 모양으로 감싸고

Contents lists available at ScienceDirect
Cancer Epidemiology
The International Journal of Cancer Epidemiology, Detection, and Prevention
journal homepage: www.cancerepidemiology.net

Plasma carotenoids and tocopherols in relation to prostate-specific antigen (PSA) levels among men with biochemical recurrence of prostate cancer

Samuel O. Antwi,^a Susan E. Steck^{b,c,d}, Hongmei Zhang,^d Lareissa Stumm^e, Jiajia Zhang,^b Thomas G. Hurley^{b,c,e}, James R. Hebert^{b,c}

^aDivision of Epidemiology, Mayo Clinic College of Medicine, 200 First Street SW, Rochester, MN 55905, United States
^bEpidemiology and Biostatistics Arnold School of Public Health, 915 Green St, Columbia, SC 29208, United States
^cCancer Prevention and Control Program, Arnold School of Public Health, 915 Green St, Columbia, SC 29208, United States
^dEpidemiology, Biostatistics, and Environmental Health, University of Memphis, 3825 Drive Avenue, 224 Bellows Hall, Memphis, TN 38152, United States
^eEpidemiology, James Madison University, 800 Mallison Drive, Harrisonburg, VA 22807, United States

ARTICLE INFO
Article history:
Received 9 January 2015
Received in revised form 26 June 2015
Accepted 28 June 2015
Available online 9 July 2015

ABSTRACT
Background: Although men presenting with clinically localized prostate cancer (PCa) often are treated with radical prostatectomy or radiation therapy with curative intent, about 25–40% develop biochemically recurrent PCa within 5 years of treatment, which has no known cure. Studies suggest that carotenoid and tocopherol intake may be associated with PCa risk and progression. We examined plasma carotenoid and tocopherol levels in relation to prostate-specific antigen (PSA) levels among men with PSA-defined biochemical recurrence of PCa.
Methods: Data analyzed were from a 6-month diet, physical activity and stress-reduction intervention trial conducted in South Carolina among biochemically recurrent PCa patients (n=39). Plasma carotenoids and tocopherol levels were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). Linear regression was used to estimate least-square means comparing PSA levels of men with high versus low carotenoid/tocopherol levels, adjusting for covariates.
Results: After adjusting for baseline PSA level, plasma cis-lutein/zeaxanthin level at 3 months was related inversely to PSA level at 3 months (P=0.0089), while α-tocopherol (P=0.01), β-cryptoxanthin (P=0.01), and all-trans-lycopene (P=0.004) levels at 3 months were related inversely to PSA levels at 6-months. Percent increase in α-tocopherol and trans-β-carotene levels from baseline to month 3 were associated with lower PSA levels at 3 and 6 months. Percent increase in β-cryptoxanthin, cis-lutein/zeaxanthin and all-trans-lycopene were associated with lower PSA levels at 6 months only.
Conclusions: Certain plasma carotenoids and tocopherols were related inversely to PSA levels at various timepoints, suggesting that greater intake of foods containing these micronutrients might be beneficial to men with PSA-defined PCa recurrence.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.





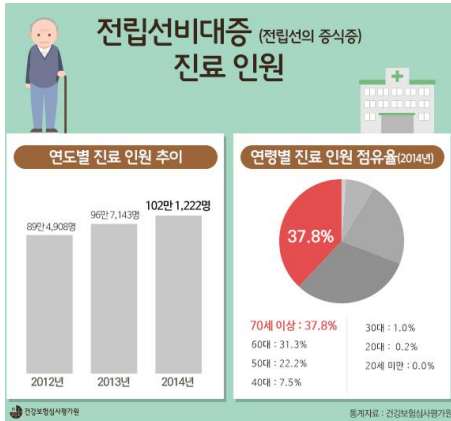
있음. 전립선은 2차 성징부터 성장해 30세 전후면 20g 정도로 됨. 소변과 정액은 이곳을 통해 배출 됨.

○ 전립선 질환의 원인은 비만, 가족력, 대사증후군, 식생활등의 여러 가지 원인이 있으며, 증상으로는 전

립선염, 전립선 비대증, 전립선암 등으로 나타날 수 있음.

○ 전립선 질환 중 전립선염은 성인에서 5%에서 9%의 유병률을 보이며, 비뇨기과 외래환자의 2

5%, 우리나라 개원비뇨기과 방문 환자의 약 15-25%가 전립선염 증후군 환자로 추정될 만큼 매우 흔한 요로질환임. 하지만 전립선염 환자를 비뇨기과 의사들은 매우 자주 접하게 되지만, 그 진단 및 치료효과가 만족스럽지 못하여 치료하는 의사나 환자 모두가 곤혹감을 느끼고 있음.



○ 전립선 질환 중 비대증과 암의 발병율

- 건강보험심사평가원의 통계자료에 따르면 전립선비대

증(전립선의 증식증) 진료 인원은 2012년에 89만 4,908명이었고, 2013년에 96만 7,143명, 2014년에 102만 1,222명으로 최근 3년간 14.1% 증가세를 보임. 전립선비대증은 노화로 인해 발생하는 질환이기 때문에 연령대가 높을수록 환자 발생률이 높고, 특히 50대부터 발병률이 높게 나타남.

- 전립선암은 남성의 경우, 암유병율로 봤을 때, 위암, 대장암에 이어 암유병율 3위임.

○ 전립선에 좋은 원료는 소팔메토가 대표적이고, 아연, 비타민D, 옥타코사놀, 각종 비타민이 있음.

○ 전립선 건강과 관련한 건강기능식품은 다음과 같은 효과를 나타냄.

순위	상품명	남자				여자				
		유병자수	분류	조유병률	연령표준화 유병률*	유병자수	분류	조유병률	연령표준화 유병률*	
	모든 암	603,524	100.0	2387.1	1739.2	모든 암	766,525	100.0	3032.6	2114.9
1	위	148,926	24.7	589.0	413.5	갑상선	251,732	32.8	995.9	779.9
2	대장	113,547	18.8	443.1	318.2	유방	146,416	19.1	573.3	406.0
3	전립선	55,756	9.2	220.5	154.3	대장	76,547	10.0	302.8	175.1
4	갑상선	43,119	7.1	163.3	116.9	위	75,426	9.8	298.4	178.8
5	간	41,203	6.8	163.0	114.7	자궁경부	45,989	6.0	181.9	125.8
6	폐	37,399	6.2	147.9	103.7	폐	21,254	2.8	84.1	43.1
7	방광	22,360	3.7	88.4	62.8	자궁체부	17,053	2.2	67.5	47.0
8	신장	19,621	3.3	77.6	56.9	난소	15,362	2.0	60.8	46.9
9	비호지킨 림프종	15,797	2.6	62.5	45.0	간	13,846	1.8	54.8	33.5
10	임균, 구강 및 인두	12,476	2.1	49.3	36.2	비호지킨 림프종	13,550	1.8	53.6	33.1

* 국가 1차 2004년 주민등록인구조사 자료

전립선 건강과 관련된 건강기능식품은 우리 몸에 어떤 도움을 주까요?

• 전립선 건강의 유지에 도움을 줄 수 있습니다.

나이가 들면서 디하이드로테스토스테론이 증가되면서 호르몬의 변화가 나타나는데, 이러한 신체의 변화들은 전립선비대증이 발생할 수 있게 합니다.

전립선 건강에 도움을 주는 기능성 원료는 남성호르몬인 테스토스테론을 디하이드로테스토스테론으로 전환시키는 효소(5 α -reductase)의 활성을 저해시킴으로서 전립선 비대증 증상 개선 효과를 나타냅니다.



◦ 건강기능식품 전립선인증현황

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
1	쏘팔메토 열매추출물 (고시된 원료로 전환)	제2007-2호	생리활성기능 2등급	Lauric acid	쏘팔메토 열매추출물 로서 320 mg/일	메스꺼움이나 설사 등 소화계통의 불편함을 유발할 수 있으므로 주의
		제2008-40호				① 임신부, 수유부 섭취 주의 ② 메스꺼움이나 설사 등 소화계통의 불편함을 유발할 수 있음
		제2008-8호				
		제2008-15호				① 병원치료 중인 분, 다른 약물을 복용하는 분, 임신부, 수유여성은 섭취에 주의 ② 식품에 알레르기가 있으신 분은 제품표시사항을 확인하시기 바람
		제2008-41호				
		제2008-74호				① 어린이, 임신부, 수유여성은 섭취에 주의 ② 메스꺼움이나 설사 등 소화계통의 불편함을 유발할 수 있음
		제2008-82호				
		제2008-84호				
		제2009-31호				
		제2009-45호				
		제2009-55호				
		제2009-59호				
		제2009-75호				메스꺼움이나 설사 등 소화계통의 불편함을 유발할 수 있으므로 주의
제2009-85호						
제2010-26호						
제2010-44호						
2	쏘팔메토 열매추출물등 복합물	제2008-79호	생리활성기능 2등급	① Lauric acid ② β -sitosterol	쏘팔메토 열매추출물등 복합물로서 320 mg/일	① 메스꺼움이나 설사 등 소화계통의 불편함을 유발 할 수 있음 ② 어린이, 임신부, 수유기 여성 섭취 주의

◦ 기능성 원료

번호	원료	기능성 내용	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
27	헤마토코쿠스추출물	눈의 피로도 개선에 도움을 줄 수 있음	아스타잔틴	아스타잔틴으로서 4~12 mg	① 과다 섭취 시 일시적으로 피부가 황색으로 변할 수 있음 ② β -카로틴의 흡수를 저해할 수 있음
28	쏘팔메토 열매추출물	전립선 건강의 유지에 도움을 줄 수 있음	로르산	로르산으로서 70~115 mg	메스꺼움 등 소화계통의 불편함과 설사를 유발할 수 있음

제2절 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 아로니아에 대한 국내 기술현황으로 아로니아의 국내 학술지 논문으로는 아로니아 분말 첨가가 돈육패티의 항산화활성과 품질특성에 미치는 영향(한국식품조리과학회지, 2015, 31(1), 83-90), 아로니아(Aronia melanocarpa) 착즙액 첨가 젤리의 품질특성(한국식품조리과학회지, 2015, 31(4), 456-464), 반응표면분석법을 이용한 아로니아 식초 제조를 위한 발효조건 최적화(한국식품조리과학회지, 2014, 30(6), 792-799), 아로니아 추출물 및 아로니아 안토시아닌분획의 항산화활성 효과(한국식품조리과학회지, 2014, 30(5), 573-578), 아로니아 분말을 첨가한 청포묵의 품질특성 및 항산화활성(한국식품조리과학회지, 2014, 30(2), 161-169), 아로니아 분말 첨가가 머핀의 품질 및 항산화능에 미치는 영향(한국식품저장유통학회지, 2014, 21(5), 668-675), 추출용매에 따른 아로니아 추출물의 생리 활성(한국식품저장유통학회지, 2014, 21(5), 718-726), 아로니아 분말을 첨가한 식빵의 품질특성(한국식품영양과학회지, 2014, 43(2), 273-280), LPS 자극 RAW 264.7 대식세포에 있어서 아로니아 열매 열수 추출물의 항염증 효과(한국식품영양과학회지, 2015, 44(1), 7-13), 아로니아(Aronia melanocarpa)로부터 유래한 추출물의 항산화 및 항알레르기 효능(2008, 37(9), 1109-1113), 건조방법에 따른 아로니아(Aronia melanocarpa) 열수 추출물의 항산화 성분 함량 및 항산화 활성(한국식품과학회지, 2014, 46(3), 303-308), 아로니아(Aronia melanocarpa) 유래 안토시아닌 색소의 안정성(한국식품과학회지, 2013, 45(4), 416-421), 아로니아를 첨가한 막걸리의 발효특성(한국식품과학회지, 2016, 48(1), 27-35), 짓갈에서 분리된 효모를 이용한 아로니아의 탄닌 성분 저감화 효과에 관한 연구(한국균학회지, 2015, 43(4), 247-252), 발효 공정을 통한 아로니아 추출물의 항염증 효능 증진(한국약용작물학회지, 2014, 22(6), 475-482), 추출방법에 따른 아로니아 추출물의 주름 개선 효능 비교(한국약용작물학회지, 2014, 22(3), 217-222), 항생제 대체 천연물질을 위한 아로니아 주정 추출물 개발에 있어 다양한 *Leuconostoc mesenteroides* 균주를 이용한 발효가 페놀계 화합물 및 항산화활성 변화에 미치는 영향, 한국유기농업학회지, 2014, 22(4), 825-839), 아로니아 분말 첨가량에 따른 설기떡의 품질특성(동아시아식생활학회지, 2014, 24(5), 646-653), 아로니아 베리 열매 및 잎 추출물의 항산화활성(대한화장품학회지, 2013, 39(4), 337-345) 등이 있음.
- 아로니아에 대한 학위논문으로는 아로니아, 몬모렌시, 매실 추출물 섭취가 지구성 운동 후 혈중 피로물질 및 근 손상 효소에 미치는 효과(신판준, 2012), 아로니아(Aronia melanocarpa)로부터 분리한 안토시아닌의 생리활성(박혜미, 2014), 아로니아 첨가에 따른 화이트 초콜릿 가나슈의 산패 억제 효과(박혜란, 2014), 아로니아를 첨가한 터키쉬 딜라이트의 품질특성 및 소비자 기호도 조사(김한희, 2014), 리포솜을 이용한 비타민 C와 아로니아 농축액의 포집 공정 최적화 및 저장 안정성에 관한 연구(김권범, 2014), 전립선 암세포 주에서 블루베리와 아로니아에 의한 전립선 특이 항원(PSA) 발현 연구(이슬지, 2015), 아로니아를 첨가한 막걸리의 발효특성(박미정, 2015), 블랙베리(아로니아)의 국산과 수입산 비교 실험 연구(김예지, 2015), 아로니아(Aronia

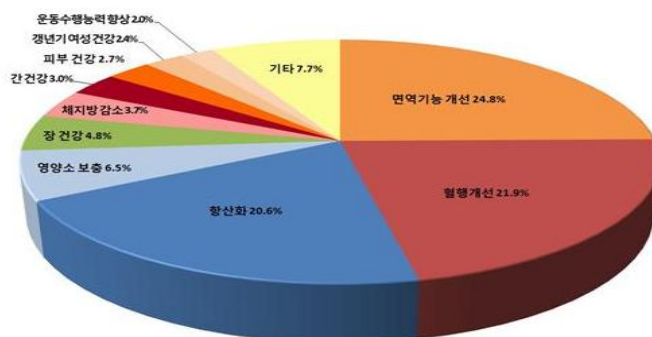
melanocarpa)의 안토시아닌 색소를 이용한 모발의 염색 특성(김주영, 2015), 아로니아 분말 첨가 설기떡의 품질특성 및 항산화 활성(황영란, 2015), 화장품 소재로서 아로니아 추출물의 생리활성 연구(신동화, 2015), 아로니아 섭취가 2000m 로잉머신을 활용한 최대 운동 시 조정선수들의 염증반응과 혈중 피로요인에 미치는 영향(김정희, 2016), The Effect of Temperature, Various Mother of Vinegar and Amount of Sugarin Chokeberry “Aronia melanocarpa“ Vinegar Fermentation, Destiani Supeno, 2016), 아로니아 베리 추출물의 DSS로 유도한 궤양성 대장염 억제효과(강사행, 2016) 등이 있음.

○ 국내 건강기능식품 시장동향

- 국민 소득 수준의 증가와 삶의 질 향상, 고령화 사회로의 진입에 따라 건강의 유지 및 증진이 무엇보다 중요한 사회적 트렌드가 형성됨으로써 고령화와 삶의 질에 대한 욕구 증가로 건강기능식품에 대한 관심이 늘고 있음
- 우리나라 식품산업은 원재료의 80%를 수입 원료에 의존하고 있으나, 건강 기능식품산업은 선진 기술을 바탕으로 국내 자생원료만으로 개발이 가능하므로, 국내 식품산업 구조개선 전략분야로 인식되어 관련제도 및 국가적 지원규모가 크게 확대될 전망이다. 한편, 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장 간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망되고 있음
- 국내에서는 ‘건강기능식품에 관한 법률’에 의해서 ‘건강기능식품’이라는 용어가 사용되고 있으며, 범위는 크게 기준 고시형과 개별인정형으로 구분되고 있음
- 기준 고시형에는 이미 충분히 입증되어진 결과들이 있어 안전성에 신뢰가 많이 가는 품목으로 비타민 및 무기질, 식이섬유 등 약 83여종의 원료가 있고, 개별인정형은 식약청에서 기능을 확실히 검증 받아야지만 사용할 수 있는 원료로 헛개나무추출물 등 140여종이 있음
- 지난해 국내 건강기능식품 시장은 전년보다 5% 증가한 1조8000억 원 규모로 나타났으며, 이중 생산액은 '12년 1조4091억 원에 비해 5% 증가한 1조4820억 원, 수입액은 3854억 원이었으며, 수출액은 754억 원으로 집계됨.
- 식품의약품안전처는 '13년 건강기능식품 생산실적 분석 결과, 총 생산액은 1조4820억 원으로 '12년(1조4091억 원)에 비해 5% 증가한 것으로 집계됨.
- 국내 건강기능식품 시장규모(생산+수입-수출)는 1조7920억 원으로, '09년 이후 지속적인 성장세를 유지함. 수출은 754억 원으로 '12년(584억원) 보다 29% 증가했으며, 수입은 3854억원으로 '12년(3532억원) 보다 9% 증가한 것으로 나타남.
- 식약처는 “국내외 경기침체에도 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영돼 성장세가 지속된 것으로 보인다”고 분석함.
- 홍삼제품 생산액은 5869억 원으로 전체(1조4820억 원)의 40%를 차지하여 여전히 가장 높은 점유율을 보였으나, 그 규모는 '11년 이후 지속적으로 감소하고 있는 것으로 나타남.
- 홍삼 다음으로는 △개별인정형 16%(2324억 원) △비타민·무기질 12%(1747억 원) △프로바이오

틱스 5%(804억 원) △알로에 4%(628억 원) 순으로 생산액이 높았고, 생산액 상위 10개 품목 중 '12년 대비 생산이 급증한 제품은 밀크씨슬추출물 제품으로, 전년 대비 생산액이 128%(135억 원 → 308억 원)나 증가함. 다음으로 프로바이오틱스 제품 55%(518억 원 → 804억 원), 개별인정형 제품 29%(1807억 원 → 2324억 원)의 생산액 증가율이 높았음.

- 밀크씨슬추출물 제품은 지난해 개별인정형 원료의 독점적 사용권(3년)이 소멸돼 생산이 급증한 것으로 분석됐고, 프로바이오틱스 제품은 유산균과 장내면역, 장내미생물의 중요성에 대한 소비자 인식이 높아짐에 따라 생산이 급증한 것으로 분석됨.
- 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈류개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강(5%) 순으로 비중이 높았음.
- 개별인정형 건강기능식품 생산액은 2324억 원으로 '12년 1807억 원에 비해 29% 증가함. 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30%(704억 원)를 차지하여 가장 많았으며, 헛개나무과병추출분말(간 건강) 23%(541억 원), 당귀혼합추출물(면역기능) 14%(314억 원), 마태열수추출물(체지방 감소) 10%(229억 원) 등의 순으로 생산액이 많았음.
- 또한, 2013년 가장 높은 성장세를 보인 제품은 백수오등복합추출물 제품으로 604%(100억 원 → 704억 원)의 성장률을 기록했으며, 마태열수추출물 56%(147억 원 → 229억 원), 초록입홍합추출물 29%(28억 원 → 36억 원) 등의 순으로 증가율이 높았음.
- 업체별 생산실적은 홍삼제품의 지속적인 인기로 한국인삼공사(4288억 원)가 '04년부터 지난해까지 계속 1위를 유지하고 있으며, 한국야쿠르트(786억 원), 서홍캡셀(549억 원), 노바렉스(509억 원), 코스맥스바이오(507억 원) 순으로 생산실적이 높았고, 제조·수입·판매 업체수는 9만6199개소로 '12년 대비 10% 증가했으며, 업종별로는 제조업 3%(449개소), 수입업 7%(3,139개소), 판매업 10%(92,611개소)가 증가함.
- 2013년 건강기능식품 수입액은 3854억 원으로 전년(3532억 원) 대비 9% 증가함. 비타민·무기질 제품 수입액이 1640억 원으로 전체 수입액의 43%를 점유, 가장 큰 비중을 차지했으며, 오메가-3지방산함유유지 제품 15%(586억 원), 개별인정형 제품 6%(213억 원)의 비중을 차지함.



기능성별 건강기능식품 생산실적(점유율)

- 나라별로는 미국이 2624억 원으로 전체의 68%를 점유, 점유율이 가장 높았으며 미국, 캐나다, 호주, 독일, 중국 등 수입 상위 5개국에 전체 수입액의 85%를 차지함.

- 식약처는 “고령화와 소득수준 향상으로 건강기능식품의 꾸준한 성장세가 이어질 것”이라며, “신규 기능성 평가체계 마련 및 기능성 원료 개발 기술 지원 등을 통해 건강기능식품의 안전성과 기능성 관리 강화에 주력해 나갈 방침”이라고 밝힘.

- 건강기능식품 생산 현황('09~ '13)

구분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)*	생산량(톤)
'09년	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
'10년	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
'11년	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
'12년	14,091	34,599	13,507	33,735	584	864
'13년	14,820	31,446	14,066	30,490	754	956
증감률 ('13/'12. %)	5.2	△9.1	4.1	△9.6	29.1	10.6

* 1\$ = 1.095원('13년)

자료) 식 '13년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표', 식품의약품안전청(2012.5)



국내 연도별 건강기능식품 생산실적

자료) '13년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표', 식품의약품안전청(2013. 12. 31)

순위	구분	총생산액					총생산액 2013
		총생산액(억원)	2008	2009	2010	2011	
		8,031	9,598	10,671	13,682	14,091	14,820
1	홍삼	4,184	4,995	5,817	7,191	6,484	5,869
2	개별인정형	416	799	1,129	1,435	1,807	2,324
3	비타민·무기질	531	761	991	1,561	1,646	1,747
4	알로에	639	648	584	692	687	628
5	프로바이오틱스	190	254	317	405	518	804
	누계(5품목)	5,960	7,457	8,838	11,284	11,142	11,372
6	오메가-3지방산함유유지	266	334	348	509	497	490
7	인삼	413	364	341	381	450	466
8	가르시니아라보지아추출물	가르시니아라보지아추출물	가르시니아라보지아추출물	208	207	440	541
9	식이섬유	1	99	117	116	168	밀크시슬 : 308
10	감마리놀렌산	145	108	93	224	152	186
	누계(10품목)	6,785	8,363	9,945	12,719	12,849	13,363
11	기타품목	1,246	1,235	726	963	1,232	1,457

품목별 생산실적 현황 ('13.12.31 기준, 자료 : 식약처)

- 국내 건강기능식품 시장은 국내외 경기 침체에도 불구하고, 건강에 대한 관심이 높아지고 새로

운 가능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되면서 2008년~2013년 연평균 +12.9%의 성장세를 이어가고 있음. 2013년 국내 건강기능식품 총 생산액은 1조 4,829억원으로 전년대비 5.2% 증가하였으며, 총생산액을 출하액과 수출액으로 구분하여 살펴보면, 출하액은 전년대비 4.1% 증가하였고, 수출액은 전년대비 29.1% 대폭 증가함. 2012년 잠시 감소하는 경향을 보였던 수입액은 2013년 3,854억원으로 집계되며, 8.7% 증가한 추세를 나타냄.

- 품목별로는 여전히 홍삼이 전체 시장의 39.6%의 비중을 차지하면서 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, 최근에는 밀크씨슬추출 (간기능 개선), 프로바이오틱스 (유산균), 개별인정형 순으로 생산이 급증한 것으로 분석됨. 개별인정형 내 원료별 생산액은 백수오 등 복합추출물이 전년대비 600% 이상 증가하여 헛개나무과병 추출분말을 제치고 1위로 올라섬. 건강기능식품 기능성 내용별 시장에서는 면역기능개선이 7,483억원으로 전체 시장의 25.3%의 비중을 점유하는 것으로 추산됨.

연도별 국내 건강기능식품 생산 및 수입실적

(단위: 십억원, YoY %)	2008		2009		2010		2011		2012		2013		연평균 성장률 (CAGR %)
	금액	전년대비	금액	전년대비	금액	전년대비	금액	전년대비	금액	전년대비	금액	전년대비	
출하액	751.6	9.1	918.3	22.2	1,021.1	11.2	1,312.6	28.5	1,350.7	2.9	4,106.6	4.1	13.0
수출액	51.4	48.6	41.5	(19.4)	46.0	10.9	55.6	21.0	58.4	5.0	75.4	29.1	15.9
국내총생산액	803.1	11.0	959.8	19.5	1,067.0	11.2	1,368.1	28.2	1,409.1	3.0	1,482.0	5.2	13.0
수입액	288.9	44.2	243.0	(15.9)	258.9	6.6	374.3	44.6	354.7	(5.2)	385.4	8.7	13.8
총계	1,092.0	18.2	1,202.9	10.2	1,326.1	10.2	1,742.5	31.4	1,763.8	1.2	1,867.4	5.9	12.9

자료: 식품의약품안전처, 한국건강기능식품협회, KB투자증권
 주: 환율은 2013년 기준 환율 1\$=1095원 적용

○ 경쟁기관현황

□ 국내 전립선 질환 건강기능식품 시장동향

- 노인인구 증가와 서구식 식습관으로 인해 전립선 질환이 사회적 이슈로 대두되면서 소비자들 관심이 급증하고 있어 향후 더 큰 성장이 예상됨. 5-60대 장년층에서 높은 발병율을 보인 전립선 관련 질환이 최근엔 30-40대까지 확대되며 관련 질환자가 지속적으로 증가하고 있기 때문임.
- 건강보험심사평가원에 따르면 국내 전립선 비대증 진료 인원은 2012년 89만 4908명에서 작년 102만 1222명으로 최근 3년간 14.1%의 증가세를 보이고 있으며, 30대 젊은 층에서도 최근 5년 새 환자가 22% 증가함.

□ 국내 전립선 질환 건강기능식품 경쟁사

	<p>- 지난 2007년 출시한 CJ 제일제당의 전립선 건강기능식품 '전립소' 가 누적 매출 800억원 돌파한 상태.</p>	
		
<p>쏘팔메토 매그넘 17 - (주)한국생활건강</p>	<p>쏘팔메토 에이스 - (주)한미양행</p>	<p>남성활력제 리바이탈 - 바이오센스</p>

□ 국내외 주요시장 경쟁사

경쟁사명	제품명	판매가격(천원)	연 판매액(천원)
① CJ 제일제당	전립소 쏠파메토	25	
② (주)한국생활건강	쏘팔메토 매그넘 17	99	
③ (주)한미양행	쏘팔메토 에이스	59	
④ 바이오센스	남성활력제 리바이탈	90	

○ 지식재산권현황

- 특허기술을 보면 아로니아 추출물이 면역력 증강, 항균효과, 염증성 질환, 혈압 저하, 당뇨병 질환 개선, 심혈관 질환 개선 등의 효과가 있어 의약품 조성물로 활용되고 있는 것으로 나타났음
- 한국특허에서만 나타난 아로니아 활용 예로는 화장품 조성물에 관한 것으로 아로니아를 초음파 추출하여 항산화 및 아토피성 피부에 효과가 있는 화장품에 제조에 관한 기술, 구절초와 아로니아 추출물을 이용하여 항균효과가 있는 화장품조성물 및 미백효과가 있거나 여드름 피부를 개선할 수 있는 화장품 등에 관한 특허기술이 있음.
- 하지만 전립선 질환관련 아로니아 특허는 없으며, 특히, 아로니아에서 추출한 안토시아닌의 전립선암, 전립선염, 전립선비대증에 대한 특허는 없어서, 본 연구과제를 통하여 원천기술을 확보할수 있을 것으로 사료됨.

□ 국내 관련 지식재산권 현황(전립선 비대증관련)

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
① 검정콩으로부터 추출한 안토시아닌을 포함하는 전립선암의 예방 및 치료용 조성물	가톨릭대학교 산학협력단	한국/1020120109461
② 검정콩으로부터 추출한 안토시아닌을 포함하는 비세균성 전립선염의 예방 및 치료용 조성물	가톨릭대학교 산학협력단	한국/1020120107330
③ 검정콩으로부터 추출한 안토시아닌을 포함하는 세균성 전립선염의 예방 및 치료용 조성물	가톨릭대학교 산학협력단	한국/1020120062048
④ 복분자 추출물을 포함하는 전립선비대증 개선용 음료 조성물	재단법인 전라북도생물산업진흥원, 전라북도 고창군	한국/1020120148461

□ 국내 관련 지식재산권 현황(아로니아 관련)

분류	출원번호	발명의 명칭
식품	2013-0001158	식물성유산균을 이용한 카페인이 저감된 발효커피 제조방법
	2012-0129187	유산균 발효발 제조방법 및 그 발효액
	2012-0098588	효소분말과 증발건조미생물을 이용한 효소식품 제조방법 및 조성물
	2012-0095767	차전자피 및 나뭇재를 이용한 변비개선 및 체중조절을 위한 보조식품
	2012-0090280	아로니아를 이용한 반죽 조성물과 이를 이용한 막, 면발의 제조방법
	2012-0072456	안토시아닌효소식품 제조방법 및 조성물
	2012-0022488	아로니아 음료 농축액 및 그 제조방법
	2011-7029625	프로바이오틱 유산균 음료
	2011-0073433	물떡 초크베리 액상 추출물을 함유한 콩과류 가공식품의 제조방법 및 그 제조방법으로 제조된 콩과류 가공식품
	2011-0061438	아로니아 물떡 초크베리 떡볶이 조성물 및 이의 제조방법
	2011-0041314	아로니아 열매를 첨가한 병발효발효주 제조방법
	2011-0030508	아로니아 물떡 초크베리 일사구를 함유한 떡볶이 조성물 및 이의 제조방법
	2010-0079590	아로니아베리 추출물을 이용한 향의 제조방법
2010-0079587	아로니아베리 분말을 이용한 향의 제조방법	
의약	2010-0067959	식물성유산균을 함유하는 면역증강용 조성물
	2010-0053609	초크베리 생균활성분 추출물 C B G 복합체를 유산균체으로 함유하는 증액 영양 및 그을말 예방 및 치료용 약학적 조성물
	2010-0044771	식물성유산균을 함유하는 항균효능을 갖는 조성물
화장료	2012-0157761	초콜릿 추출물을 이용한 향산화, 항염증 및 아토피 피부개선을 위한 화장품 조성물 및 이의 제조 방법
	2011-0144553	구급초 및 아로니아로 구성된 식물 추출물을 함유하는 화장품 조성물
	2009-0114593	향산화 또는 항노화를 위한 화장품 조성물
	2009-0007708	아로니아 추출물을 유산균체으로 포함하는 피부미백용 화장품 조성물
	2007-0070714	아로니아 추출물을 포함하는 화장품 조성물
재배 기술	2012-0103737	조식배양기술을 이용한 아로니아의 줄기마디 배양으로부터 유식물체의 대량 증식방법
	2001-7016156	식물 종의 클라보노이드 및 페놀 물질의 함량을 증가시키는 방법
가공 기술	2012-0098259	아로니아열매농축액의 발효 및 그 제조방법
	2010-0079583	아로니아베리 엑기스의 제조방법
	2009-0120020	아로니아 열매 추출물의 정제 및 분말화 방법

2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 아로니아에 대한 국외 기술현황으로 아로니아의 해외 논문으로는 종양과 비만관련 논문(Effect of anthocyanins of black-fruit aronia upon reaction of cutaneous angiogenesis in mice, *Przegl. Wojsk.-Med*, 2002, 44 (2), 123 -127, ISSN 1507-0603), 방사선에 관한 논문(The Effect of Natural Anthocyanin Dye on Superoxide Radical Generation and Chemiluminescence in Animals after Absorbed 4 Gy Dose of Gamma Radiation, *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 7, No. 6 (1998)), 동맥경화 및 발기부전에 관한 논문(Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI), *Atherosclerosis*. 2007 Oct;194(2):e179-84. Epub 2007 Feb 21), 고지혈증 및 중금속 관련논문(The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hipercholesterolaemia, *Pol. Merk. Lek.*, 2005, XIX, 113, 651~653), 임신성 당뇨에 관한 논문(Influence of 1 anthocyanins derived from chokeberry extract on glycosylated hemoglobin level in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus, *Polish Journal of Gynaecological Investigations*. 2001. 3(3). 123~125)이 있음.
- 또한, 아로니아 G3G추출물의 노폐물의 처리과정에서 발생하는 산화스트레스를 신속하게 제거하여 태아의 미성숙증과 임신성중독증상을 예방할수 있음은 연구결과도 있고(Influence of natural anthocyanins derived from chokeberry extract in the generation of oxidized low density lipoproteins in pregnancies complicated by fetal intrauterine growth retardation of preeclamptic origin-the role of OLAB, *Archives of perinatal Medicine*. 2003. 9(4), 28~30.), 정자감소증에 관한 연구(Application of 1 anthocyanins extracted from chokeberry for treatment of oligospermia in men having increased levels of OLAB. Influence on the fructose level in sperm., *Ginekologia Polska*, 2001, 72, 12, 983-9), 혈전증에 관한 연구(Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis., *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006, Vol 57, No 4, 611-626)도 있음.
- 뿐만 아니라, 당뇨에 대한 연구(Effects of *Aronia* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus., *Folia Med (Plovdiv)*. 2002;44(3):20-3., Influence on *Aronia melanocarpa* on experimental rat's diabetes, *Herba Polonica*, 1999. XLV. 4. 345~353)와 심장질환 및 산화스트레스에 관한 연구(Anthocyanins-An adjunct to cardiovascular therapy?, *Kardiol. Pol.* 2002. 57. 332), 간세포 보호에 관한 연구(Effect of anthocyanins on biochemical parameters in rats exposed to Cadmium, *Acta biochimica polonica*, v.50 no.2, 2003, pp.543-548), 췌장염에 관한 연구(Effects of anthocyanines from *Aronia Melanocarpa* on course of experimental pancreatitis., *Polski Merkurusz Lekarski*, 2000, 8, 48, 395-398), 위궤양에 관한 논문(Antiulcer/activity of anthocyanin from *aronia melanocarpa* Elliot, *Herba Polonica*, Vol. XLIII

1997, Nr 3, 222-227), 즐기세포 방노화 및 손상에 관한 연구(Flavonoid rich chokeberry fruit extract inhibits endothelial progenitor cells senescence induce by oxidized LDL, Journal of Clinical Lipidology. 2007. 1(5). 86), 고혈압 ,만성 심장질환, 관절염 및 산화스트레스에 관한 연구 (Antioxidant activity of anthocyanins from Aronia melanocarpa, Balnologia polska, Vol. XXXVII, 2, 1993, 5~10)가 되어 있으며, 아로니아의 분석 및 항산화력에 관한 연구(Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity, Eur Food Res Technol. 2005. 221. 809~813)가 있음.

○ 시장현황

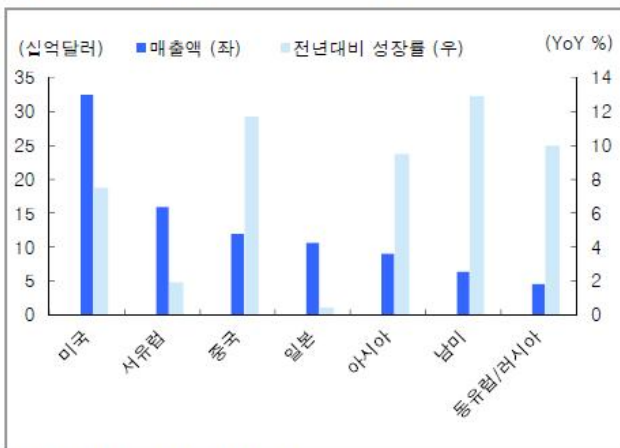
- 2012년 전세계 전체 건강식품 시장 규모는 3,464억달러 (원화기준 350조원)로 추산되며, 2009년부터 2012년까지 연평균 +6% 성장률로 성장해 왔음. 향후 세계 건강식품 시장은 2013년~2020년 연평균 +7.9% 성장률로 성장세가 보다 강화되면서 2020년에는 6,394억 달러의 시장 규모가 형성될 전망이다. 세그먼트 별로는 Supplements (비타민, 미네랄, 허브, 식사대용식품, 스포츠 및 영양강화식품 등), Natural & Organic Foods (유기농 식품), Natural & Organic Personal Care & Household Product (천연 및 유기농 헬스 & 뷰티제품), Functional Food (특정성분을 강화하여 건강을 증진시키는 기능성을 함유한 식품)으로 나누어 볼 수 있으며, 특히 유기농 관련 세그먼트가 상대적으로 더 높은 성장세를 이어갈 전망이다.

□ 연도별 세계 건강식품 품목별 시장규모

(단위: 십억달러, YoY %)	2009	2010	2011	2012	2013E	2014E	2015E	2020E
Supplements								
매출액	80.3	84.6	90.2	96.1	103.4	110.0	117.9	167.7
성장률	4.8	5.4	6.6	6.5	7.6	6.4	7.2	7.3
Natural/Organic Food								
매출액	78.2	83.8	91.5	101.0	111.6	123.1	135.7	225.5
성장률	3.8	7.2	9.2	10.4	10.5	10.3	10.2	9.8
N&OPC & Household Products								
매출액	28.5	31.0	33.9	37.4	41.1	45.2	49.6	76.7
성장률	5.2	8.8	9.4	10.3	9.9	10.0	9.7	8.7
Functional Food								
매출액	96.4	100.9	106.1	111.9	118.0	124.7	131.5	169.6
성장률	2.3	4.7	5.2	5.5	5.5	5.7	5.5	5.2
Total Nutrition Sales								
매출액	283.4	300.4	321.7	346.4	374.1	402.9	434.7	639.4
성장률	3.7	6.0	7.1	7.7	8.0	7.7	7.9	7.8

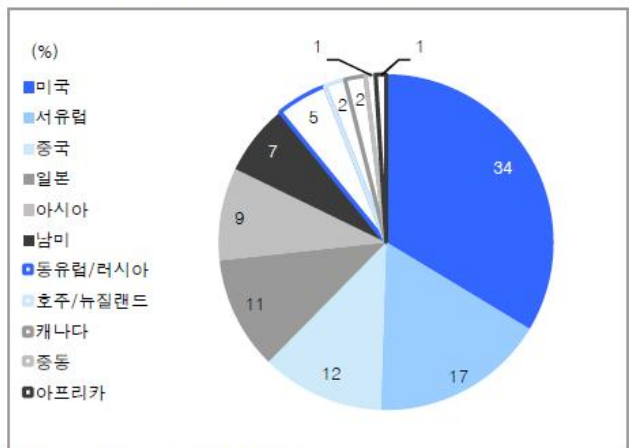
자료: 한국건강기능식품협회, KB투자증권

그림 1. 2012년 국가별 Supplements 시장현황



자료: 한국건강기능식품협회, KB투자증권

그림 2. 2012년 국가별 supplements 시장 점유율



자료: 한국건강기능식품협회, KB투자증권

○ 지식재산권현황

국내외 아로니아 특허 동향

분석범위 : 1993.1.1~검색시점(2014.5.31)

구분	가공기술	재배기술	식품	의약	화장료	계
한국	3	2	14	3	5	27
일본	2	1	4	4	-	11
미국	1	-	9	9	-	19
유럽	-	1	2	4	-	7

구분	번호	내용
발명	식품	2008-193132 알로니아 허브주스 제조 방법
		2007-211569 지방분해 촉진제 및 음식물
		2006-142002 등산화용 이음람 기능성 식품과 그 제조 방법
		2003-062767 아로니아식초 및 그 제조 방법
	의약	2012-509040 알린 및/또는 아연 함유하에서 아로니아중 추출물을 포함하는 연약 자극성물
		2004-066794 시클리프시게나아제 및 유도체 및 산화질소 합성 효소의 저해제 및 식품
		2003-416645 thiol-S-메틸트렌스퍼라제 저해제, 구취 발생 억제제 및 구취 발생 억제 조성물
	의약	1999-355662 만지오렌신 변형 효소 저해제
	재배 기술	2005-217715 식품의 클로로노이드 및 페놀계 성분의 함유량을 증가시키는 방법
	가공 기술	2011-289910 액상 식품 조성물의 효능을 발생 방지 방법
2007-230070 식품 원기스의 제조 방법		

미국	식품	2011-305153	Dietary supplements containing extracts of aronia and method of using same to promote weight loss
		2010-854948	Dietary supplements and methods for treating pain and inflammation
		2009-469456	Dietary supplements containing extracts of aronia and methods of using same to promote weight loss
		2009-390302	Nutritional supplement for the prevention of cardiovascular disease Alzheimer's disease, diabetes and regulation and reduction of blood sugar and insulin resistance
		2008-746039	Healthy drink and a method for improving stability of a drink
		2006-945609	Dietary food supplement containing natural cyclooxygenase inhibitors and methods for inhibiting pain and inflammation
		2006-159524	Chewing gum composition containing chokeberry
		2004-945609	Dietary food supplement containing natural cyclooxygenase inhibitors and methods for inhibiting pain and inflammation
		2002-171258	Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing sub-critical water extraction
	의약	2011-157531	Berry preparations and extracts
		2010-815471	Method and formula for treating celiac disease
		2010-658307	Nutraceutical agent for attenuating the neurodegenerative process associated with Parkinson's disease
		2010-320021	Immune stimulating composition comprising an extract of aronia sp. in combination with selenium and/or zinc
		2009-573012	Nutritional supplement for the prevention of cardiovascular disease Alzheimer's disease, diabetes and regulation and reduction of blood sugar and insulin resistance
		2007-965377	Composition and methods of use of an immunomodulator
		2006-388163	Anthocyanin-rich compositions and methods for inhibiting cancer cell growth
		2004-795967	Anthocyanin-rich compositions and methods for inhibiting cancer cell growth
		2000-522311	Soluble plant derived natural color concentrates and antimicrobial nutraceuticals
	기술	2006-088156	Berry preparations and extracts

유럽	식품	2005-822906	Chewing gum composition containing chokeberry
	식품	2003-009645	Method for modifying the composition of the ingredients of plant products, in particular fruits like sultana, sea buckthorn, chokeberry or cranberry
	의약	2010-720010	Immune stimulating composition comprising an extract of aronia sp. in combination with selenium and/or zinc
		2009-006414	Immune stimulating composition comprising an extract of aronia sp. in combination with selenium and/or zinc
		2002-782232	Feminine care products for the delivery of therapeutic substances
		2000-916123	Soluble plant derived natural color concentrates and antimicrobial nutraceuticals
	재배 기술	2000-936870	Method of increasing the content of flavonoids and phenolic substances in plants

제3절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종목표	<p>주관연구기관 : 농업회사법인 주식회사 삼흥 협동연구기관 : 경남과학기술대학교 정은주교수팀, 안전성평가연구소 위탁연구기관: 농업회사법인 (주)하늘선물 에프앤비</p> <p>안토시아닌이 다량 함유되어 있는 아로니아의 전립선 질환 예방효과와 기전을 검토하고, 기능성 소재의 개별인정을 위한 인허가 자료 확보, 베타카로틴, 라이코펜의 함량이 우수한 다른 소재를 활용한 복합제품을 개발함. (건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 자료 확보)</p>
세부목표	<p><기술개발내용 - 1차년도></p> <p><input type="checkbox"/> 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥 아로니아 추출물의 원료 및 건강기능식품 소재 제조공정 표준화, 표준화 관련 자료 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료표준화 - 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화 - 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(아로니아 추출물) - 원료 표준화를 위한 공정표 개발 및 제시 <p><input type="checkbox"/> 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물의 제조 - 가속용매추출장치의 추출변수 설정 및 추출물 제조 - 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 평가 ○ 아로니아 추출물의 cell viability 측정 ○ 아로니아 추출물의 5-alpha reductase 저해 활성 ○ 아로니아 추출물의 DHT 전환 억제 활성 검토 ○ 아로니아 추출물의 항염활성 검토 - 국내산 아로니아와 수입 아로니아 추출물의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 비교평가 <p><input type="checkbox"/> 협동연구기관 - 안전성평가연구소 아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 <i>in vivo</i> 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> 실험결과 토대로 한 시료선정 하기 위한 전립선비대 유도 rat 실험 ○ 실험재료 준비 ○ 실험동물의 조건확립 ○ 전립선비대 <i>in vivo</i> model의 확립 ○ 시료의 투여 ○ 실험동물의 체중변화 ○ 부검 및 시료의 채취 ○ Prostate Index (PI) ○ 혈액분석 ○ 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석

구분	내용
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 조직병리학적 평가 <건강기능식품 인허가자료 확보 - 1차년도> <기술개발내용 - 2차년도> □ 주관연구기업 - 농업회사법인 주식회사 삼흥 <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 안토시아닌 함량확인 및 지표성분 정량 및 1차 시제품 제작 - 아로니아 추출액을 이용한 안토시아닌 함량변화 확인 - HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량 - 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작 - 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립 - 포장디자인 개발 - 영양성분 분석 - 시제품 제작 □ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴, 지표성분과 <i>in vitro</i> 기능성과 관련한 자료의 확보 - 아로니아로부터 기능성성분의 분리 및 규명 - 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴 ○ 기능성 소재의 cell viability 측정 ○ 기능성 소재의 5-alpha reductase 저해 활성 ○ 기능성 소재의 DHT 전환 억제 활성 검토 ○ 기능성 소재의 항염활성 검토 □ 협동연구기관 - 안전성평가연구소 <ul style="list-style-type: none"> - 활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 <i>in vivo</i> 실험 및 기능성 평가 자료의 확보 ○ 시료의 선정 ○ 실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도 ○ 시료의 조제와 투여 ○ 실험동물의 체중변화, 장기무게 ○ 혈액분석 ○ 전립선 및 비뇨생식기계의 histopathological examination <기술개발내용 - 3차년도> □ 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥 <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물의 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 2의 개발 - 전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2의 제작 - 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립 - 포장디자인 개발 - 영양성분 분석 - 시제품 2 제작

구분	내용
	<p>□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조, 아로니아 추출물의 분석조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활성을 최적화하기 위한 추출조건을 확보 - 추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조 - 추출물 및 복합물 최적화를 위한 반응표면분석 - 아로니아 추출물의 분석조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> ○ 분석용 시료의 제조 ○ 지표성분(표준품) 시료 제조 ○ 아로니아 추출물의 지표성분의 설정 ○ 고정상 및 이동상의 최적화 ○ 검출파장 최적화 - 아로니아 추출물 분석법을 이용한 국내산 아로니아와 수입산 아로니아 내 기능성성분 함량 비교평가 <p>□ 협동연구기관 - 안전성평가연구소 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구 및 기능성 메카니즘 자료 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물의 표적 기전 탐색 <p>□ 위탁연구기관 - 농업회사법인 주식회사 하늘선물애프엔비 시제품의 사업화 전략수립 및 마케팅</p> <p><기능성 소재의 개별인정 신청 시 제출 자료의 획득></p> <ul style="list-style-type: none"> □ 1차년도 : 원료에 관한 자료 제조공정 표준화 자료 □ 2차년도 : 지표성분 구조분석 자료 지표성분 정량분석 자료 <i>in vitro</i> 기능성 자료 <i>in vivo</i> 기능성 자료 □ 3차년도 : 기능성 메카니즘 연구 자료

2. 연차별 개발내용

가. 1차년도

□ 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥

아로니아 추출물의 원료 및 건강기능식품 소재 제조공정 표준화 및 표준화 관련 자료 확보

- 원료표준화

<아로니아 안토시아닌 원료 표준화를 위한 최적 전처리 조건 확립>

전처리	최적조건
원료의 품질 및 세척방법에 따른 안토시아닌의 손실 최소화	수확한 원료표면의 이물질을 제거하고 미생물에 의해 부패된 원료는 선별 원료의 세척시 원료의 손상을 최소화 Ring Blower를 이용한 1k 와류 세척기와 2차 블러쉬 세척기를 이용 이물질 제거
원료의 절단 압력에 따른 안토시아닌의 추출 수율 최적화	원료의 절단후의 추출수율은 추출용매와 원료의 접촉빈도에 따라 변하므로 문제점을 최소화하기 위해 최적조절을 찾을 것임

- 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화

: 아로니아 안토시아닌 지표물질중 기능성분 확인

예) cyanidin-3-glucoside

: 지표물질의 규격 확립

예) 성상 : 진한 적자색의 농축액

고형분 : $60 \pm 3\%$, 세균수 : 1g당 100이하

대장균수 : 음성, 납 : 0.3ppm이하, 카드뮴 0.1ppm이하

: 1일 섭취량과 기능성간의 상관관계 조사

- 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(아로니아 추출물) 및 자료 확보

추출/농축과 건조 공정은 참여기업인 농업회사법인 주식회사 삼흥에서 추출/농축기(동방기계, 2Ton)와 분무건조기(2kg/h)를 이용함. 발효에탄올(이하 주정)은 대한약전 Assay 95.1~95.6 v/v%를 사용할 것이며 물은 먹는물을 사용함.

80kg을 3회 실시 하였으며, 제조공정은 아래와 같이 (가) 원료평량 (나) 추출 (다) 농축 (라) 부재료 혼합과 제형 (사) 포장 및 보관 과정으로 진행함.

- 원료평량 : 추출에 사용할 원료와 용매를 확인하고 칭량하여 추출기에 투입함.
- 추출 : 아로니아 80kg을 건조후 추출기를 이용하여 79 °C에 도달 후 4시간 압력 0.7~0.75 Kg/cm²의 조건에서 추출함.
- 농축 : 농축기를 이용하여 45 °C, 1,000 mmHg 조건에서 농축함.
- 부재료 혼합과 제형
- 포장 및 보관 : 개별포장하여 저온창고에 보관함.
- 개별인정형 신청을 위한 제조공정 표준화 자료 작성

- 원료의 표준화: 생과의 상중하등급으로 자체 선별하여 상등급의 생과를 선별. 당도 14 ~ 16 brix의 생과 선별. 생과의 안토시아닌 함량을 100g 당 0.1 % 함유된 것을 선별하여 원료의 표준화를 하도록 할 것임. 최종적으로 착즙과 농축공정을 통하여 동일한 pH, 당도와 안토시아닌 함량을 지닌 원료로 사용하고자 함.
- 공정의 표준화: 원료 선별 (상중하등급), 원료 세척(회사자체조건) 원료 착즙(회사자체조건), 원료의 농축(회사자체조건), 원료의 추출공정 (회사자체조건)등의 표준화를 통하여 연구수행을 수행하고자 함. 각 공정마다 당도, pH, 안토시아닌, 폴리페놀 함량을 분석 할 것임.

- 원료표준화를 위한 공정표

1. 원료 선별 (상중하 선별)	상: 7개의 열매 이상 / 송이, 평균 열매 크기 1 cm 이상. 색깔: 검정 중: 7개의 열매 이상 / 송이, 평균 열매 크기 0.7 cm 이상. 색깔: 진보라 하: 7개의 열매 미만 / 송이, 평균 열매 크기 0.7 cm 미만. 색깔: 연보라
↓	
2. 원료 세척	버블 세척 3회
↓	
3. 원료 착즙	생과:즙 (6:1), 즉 수율 15% 이상
↓	
4. 원료 농축	65 ℃ 이하, 감압 상태 (※주로, 타사는 80℃에서 함으로써, 영양분손실우려가 있음)
↓	
5. 원료 살균	80℃, 10 분

- 국내산 아로니아 원료의 당도, pH, 항산화력, 안토시아닌 함량의 비교 분석을 통하여 우수한 국내산 원료를 선별하여 사용하고자 함. 이를 위해 국내에서 생산되는 지역별 아로니아 샘플을 수집하여 아래 항목에 대한 기능성 평가를 실시함.
- 국내산 아로니아의 경쟁력 확보를 위한 주요 평가 항목 및 방법

평가항목	방법	비고
당도	당도계를 활용하여 시료당 3번을 측정하여 평균치를 계산할 것임.	당도 10 브릭스 이상
pH	pH 측정기를 활용하여 시료당 3번을 측정하여 평균치를 계산할 것임.	pH 4 ~ 6 사이
항산화력	DPPH assay 방법을 활용하여 시료당 3번을 측정하여 평균치를 계산할 것임.	수입산 대비 항산화력이 동일하거나 높은 아로니아를 활용할 것임.
안토시아닌 함량	안토시아닌 흡광도 방법을 활용하여 시료당 3번을 측정하여 평균치를 계산할 것임.	수입산 대비 안토시아닌 함량이 동일하거나 높은 아로니아를 활용할 것임.
생과 송이당 열매수	육안 측정	생과 1 송이 당 7 개 이상의 열매가 달린 것을 활용할 것임. ※ 참고로, 현재 수입산 아로니아는 폴란드가 주종을 이루고 있으나, 농축액과 분말 형태로 수입되고 있음.

○ 본 연구에서는 개발될 프로스타플러스는 경쟁사들의 제품 (수입산 쏘팔메토)와는 달리 국내 산 아로니아를 활용하여 소재의 제조공정 표준화를 통하여 기술적, 기능적, 차별성을 확보하고자 할 것임.

□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교

아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 in vitro 전립선 비대 개선 효능 평가

- 아로니아 추출물의 제조

○ 아로니아를 다양한 방법의 건조, 추출, 농축 등의 과정을 거쳐 추출함. 이 때 추출용매의 조성, 추출온도, 추출압력 등을 다양하게 적용하여 추출물을 제조하되, 본 연구를 통해 도출된 조건이 lab scale production이 아닌 산업화 대량공정에의 적용이 가능하도록 독립변수를 설정함.

○ 중심합성계획법 (central composite design, CCD) 또는 Box-Behnken design (BBD)를 이용하여 추출용매, 시간, 온도 등 여러 추출인자에 대한 실험점을 설계하고 가속용매추출장치(Accelated Solvent Extractor, ASE)를 이용하여 이 설계에 따라 추출물을 제조함.

○ 독립(조건)변수 설정 예

- 건조방법: Spray Dry, 열풍건조, 동결건조(Freeze Dry)

- 추출용매: 30, 50, 70, 90 % 에탄올(주정), 에탄올 100% 또는 물 100%를 추출용매로 사용하는 경우 추후 제형, 타 재료와의 혼합 등에서 불용화 문제가 있으므로 물과 에탄올을 비율별로 혼합하여 추출하도록 함.

- 추출시간: 2시간, 12시간, 24시간

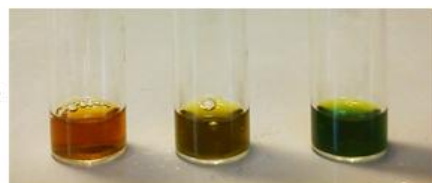
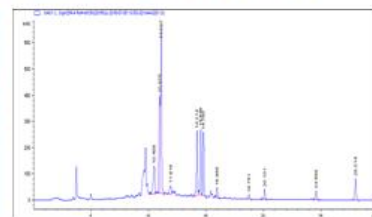
- 추출압력: 최대 1500 psi (100 bar)



가속용매추출장치

추출조건별 크로마토그램 기반 데이터 분석(함량평가)

id	run	EtOH	Temp	Time	Yield	Wageningen	Shimadzu	Chromat	Sum
0	1	100	60	24	49.60%	7748.4	8847.8	2229.5	13825.7
0	2	50	20	2	17.90%	8171.2	2627.6	1456	12254.8
0	3	100	60	2	22.20%	8055.4	4885.8	312.8	7524.7
0	4	100	100	13	47.30%	7544.0	2708.3	8208.4	13060.7
1	5	100	20	13	15.40%	7754.0	5291.3	6129.8	18975.2
13	6	50	60	13	58.50%	8079.2	1384.7	2097.6	12561.5
15	7	50	60	13	50.50%	8720.7	4245.3	2912.4	15878.4
1	8	0	100	13	79.90%	8034.4	2182.5	1374.7	11591.6
10	9	50	100	7	42.30%	8804.8	2522.6	3942.4	15271.8
7	10	0	60	24	42.80%	8700.4	2543.6	687.4	12931.4
1	11	0	20	13	29.20%	8795	1414.8	887.6	5797.4
13	12	50	20	24	47.00%	7916.4	2514.4	1329.5	11759.9
13	13	50	60	13	51.20%	4761.2	2389.8	1071.2	8222.2
12	14	50	100	24	56.50%	10527.8	2770.3	4834.8	18132.9
5	15	0	60	2	24.50%	6434.8	1739.4	499.2	8673.5



추출물 제조

그림. 가속용매추출장치(ASE)를 이용한 아로니아 최적 추출물 제조

- 아로니아의 *in vitro* 전립선 비대 개선 효능 평가

○ 다양한 변수를 적용하여 제조한 추출물을 대상으로 전립선 세포주를 이용하여 5-alpha reductase 저해 활성 및 testosterone에서 DHT로 전환 억제 활성을 평가함으로써 아로니아 추출물의 전립선비대 개선 효능을 평가하고자 함. 또한 국내산 아로니아 추출물과 수입 아로니아 추출물의 *in vitro* 전립선비대개선효능 비교평가함.

- 아로니아 추출물의 cell viability 측정
- 아로니아 추출물의 5-alpha reductase 저해 활성
- 아로니아 추출물의 DHT 전환 억제 활성 검토
- 아로니아 추출물의 항염활성 검토

□ 협동연구기관 - 안전성평가연구소

아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 *in vivo* 평가

- *in vitro* 실험결과 토대로 한 시료선정 하기 위한 전립선비대 유도 rat 실험

- 실험재료 준비
- 실험동물의 조건확립
- 전립선비대 *in vivo* model의 확립
- 시료의 투여

실험시료 구성 예)

	대조군1	대조군2	시료1	시료2	시료3
실험구성1	-	-	아로니아 추출물 농도 1%	아로니아 추출물 농도 3%	아로니아 추출물 농도 5%
실험구성2	-	-	아로니아 추출물 +a	아로니아 추출물 +b	아로니아 추출물 +c
실험구성3	-	-	⋮	⋮	⋮
실험구성4	-	-	⋮	⋮	⋮



- 실험동물의 체중변화
- 부검 및 시료의 채취
- Prostate Index (PI)
- 혈액분석
- 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석
- 조직병리학적 평가

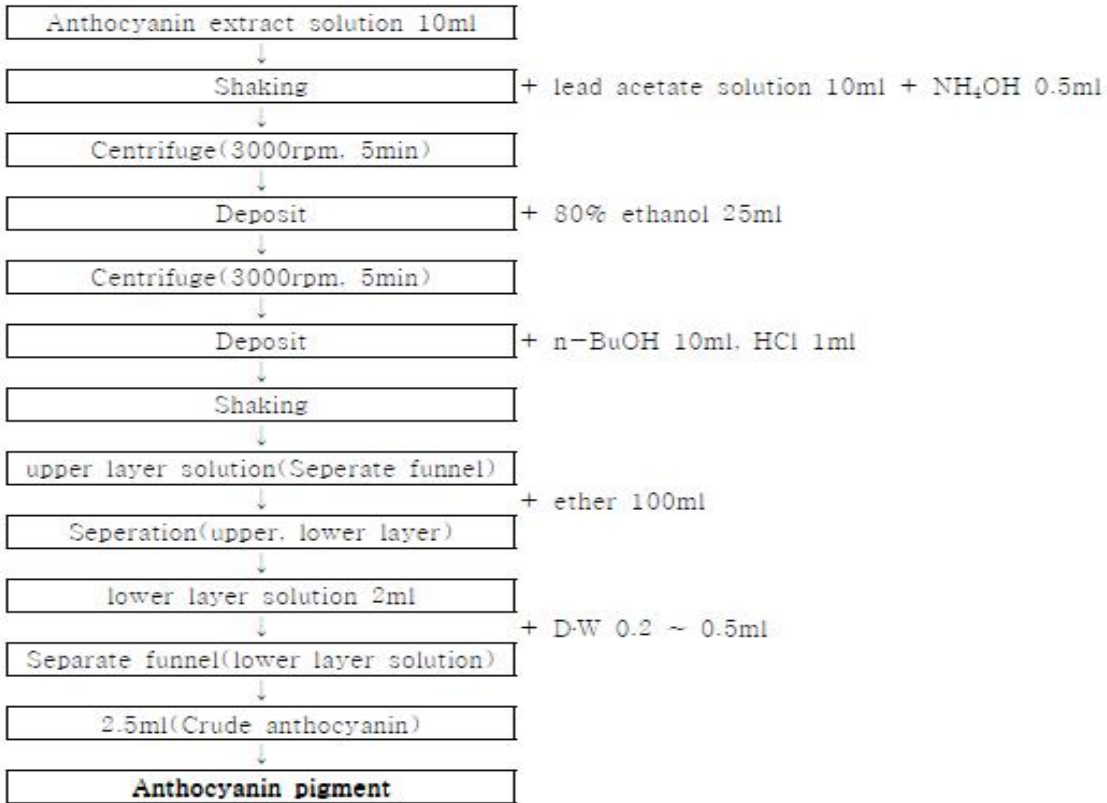
나. 2차년도

□ 주관연구기업 - 농업회사법인 주식회사 삼흥

아로니아 안토시아닌 함량확인 및 지표성분 정량 및 1차 시제품 제작

- 아로니아 추출액을 이용한 안토시아닌 함량변화 확인

- 안토시아닌 추출방법



- Sample 은 농축액으로 실시함

- 시료 0.2ml , 1ml에 0.1%HCl 포함된 메탄올을 10ml을 넣고 2시간 이상 빛을 차단하여 혼합하여, 3000rpm에 30분간 원심분리한 후 상등액을 분석시료로 사용함.

- 0.2M KCl 용액을 0.2M HCl 용액으로 pH 1.0을 맞춘 A 용액을 만듦.

- 0.2M potassium phosphate를 0.1M citric acid를 첨가하여 pH 4.5로 맞춘 B 용액을 만듦.



실험 아로니아 농축액 실험 중간단계2 사진 흡광도 측정 과정의 사진

- 아로니아 분석시료를 100ul를 A와 B 용액 900ul와 섞어준 뒤에 510nm와 700nm에서 흡광도를 측정함. 안토시아닌 함량(mg/100g)은 cyanidin-3-glucoside의 몰흡광계수(26,900)를 이용하여 다음 식에 의해 표시함.

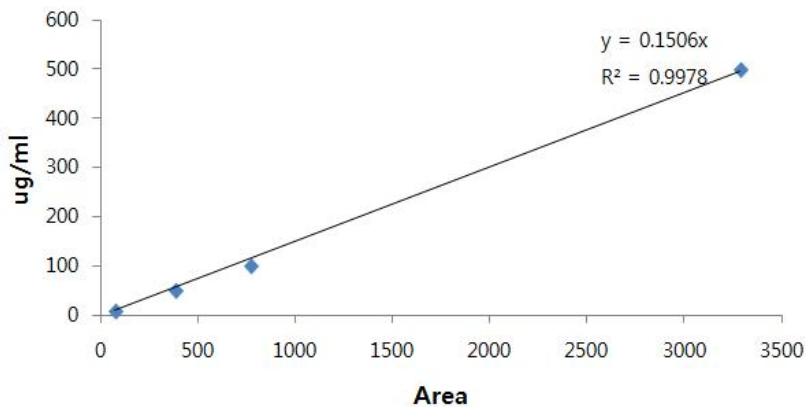
$$\text{Anthocyanin content (mg/100g)} = \frac{A \times mw \times DF \times 10}{\epsilon \times l}$$

- 분석조건
- A : (OD510nm - OD700nm)pH1.0-(OD510nm - OD700nm) pH4.5
- mw: molecular weight for cyanidin-3-glucoside (g) (449.2)
- DF: dilute factor
- 시료를 ml당으로 환산 :1000 ϵ : cyanidin-3-glucoside molar absorbnance(26,900)

- HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량법

안토시아닌을 정량하기 위한 cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside는 Polyphenols Laboratories (Sandnes, Norway)구입 한후, Column은 YMC-Pack ODS AM 250x4.6 mm(USA)이고, column temperature는 30°C 을 유지함. flow rate는 0.8ml/min이였고, solvent A는 a-water/, solvent B는 acetonitrile로 사용함.

HPLC conditions		
1	HPLC	Agilent 1200 series
2	Cloumn	YMC-Pack ODS AM 250x4.6 mm
3	Eluant	a-water
		b: acetonitrile
4	Flow rate	0.8ml/min
5	Temperature	30°C
6	Detection	DAD 280nm



- 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작(단순가공형태로 제작)
 주관연구기관과 연계하여 전립선 질환 예방할수 있는 시제품 레시피를 확립함
 예) 기존 자사 제품의 레시피 예

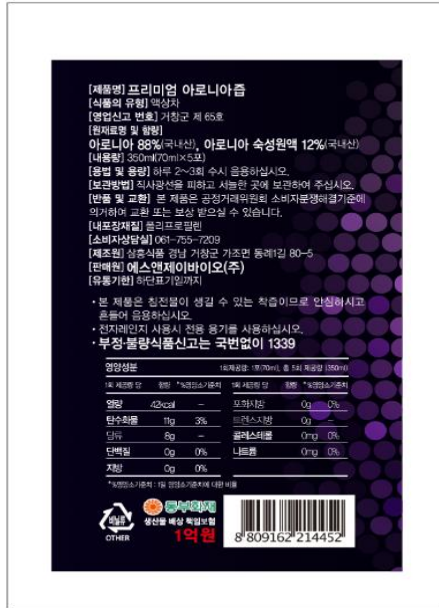
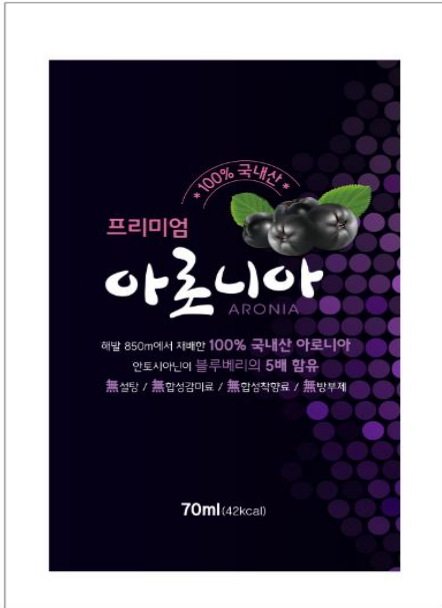
	원료명	I	II	III
1	아로니아 농축액	1.5	2.0	3.0
2	액상과당	9.6	8.6	10.5
3	사과농축액	1.0	1.0	1.0
4	니코틴산아미드	0.2	0.2	0.2
5	폴리텍스트로스	0.8	0.8	0.8
6	무수구연산	0.2	0.2	0.2
7	구연산나트륨	0.01	0.01	0.01
8	스테비텐	0.01	0.01	0.01
9	비타민	0.03	0.03	0.03
10	향료	0.25	0.25	0.25
11	정제수	86.40	86.90	84.00

- 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립
 예)자사 제품 중 아로니아 초산음료



- 포장디자인 개발

- 포장디자인 개발 (포장조건 : 국내 및 국외 관련 포장 용기 선별 및 제작)
- 예) 자사 제품의 포장디자인



- 영양성분 분석

영양성분 표시법에 맞게 제품에 대한 5대 영양성분에 대해 분석한 결과를 토대로 제품 품목신고서를 작성하고 상품화 하고자 함.

- 시제품 제작

□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교

아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴, 지표성분과 *in vitro* 기능성과 관련한 자료의 확보

- 아로니아의 유효성분 규명

- 아로니아에 함유된 기능성성분은 주로 유기산, 비타민, 당류 등 영양성분에 국한되어 있었으나 최근 연구보고를 통해 carotenoid계 (b-carotene, b-cryptoxantin, violaxanthin)성분, phenol성 화합물 및 강력한 항산화 활성을 가진 다양한 phytochemical이 보고된 바 있음.

Constituents	Juice (g/L)*		Berries (different cultivars)
	fresh pressed ^a [8]*	pasteurised ^b [28]	
Rel. density	1.081	1.064	-
Dry matter, in %	19.5 *Brix	15.5	15.6 [24]; 20 [44]; 16.7 – 28.8 [9]
pH	3.6	3.3	3.3– 3.7 [2]
Glucose	41	40	NA
Fructose	38	37	NA
Glucose + Fructose	79	77	66– 100 [24]; 130– 176 g/kg FW [9]
Sucrose	ND	ND	ND
Sorbitol	80	55.6	NA
Dietary fibre	trace [2]	NA	56 g/kg FW [24]
- Pectins	3.7 g/kg [12]	NA	3.4– 5.8 g/kg FW [9]
Fat	NA	NA	0.14% FW [24]
Protein	NA	NA	0.7 % FW [24]
Organic acids			
l-Malic acid	9.0	11.1	13.1 g/kg FW [24]
Tartaric acid	ND	NA	NA
Citric acid	500 mg/L	247 mg/L	2.1 g/kg FW [24]
Isocitric acid	65 mg/L	NA	NA
Shikimic acid	80 mg/L	NA	NA
Succinic acid	1.5	0.160	ND (fresh berries) 800 mg/kg (3 months stored berries) FW [9]
Vitamins			
Vitamin C	200 mg/L	ND	137 mg/kg FW [24] 13– 270 mg/kg FW [9]
Folate, µg/L	NA	35 µg/L	200 µg/kg FW [33]
Vitamin B1	500 µg/L	NA	180 µg/kg FW [24]
Vitamin B2	600 µg/L	NA	200 µg/kg FW [24]
Vitamin B6	550 µg/L	NA	280 µg/kg FW [24]
Niacin	3 400 µg/L	NA	3 000 µg/kg FW [24]
Pantothenic acid	2 200 µg/L	NA	2 790 µg/kg FW [24]
Tocopherols	NA	NA	17.1 mg/kg FW [24]
Vitamin K	NA	NA	242 µg/kg FW [24]
Minerals			
Ash	6.4; 4.6 [9]	3.6; 4.1 [9]	4 400 [24]; 5 800 mg/kg FW [9]
Na, mg/L	5	5.7	26 mg/kg FW [24]
K, mg/L	2 850	1 969	2 180 mg/kg FW [24]
Ca, mg/L	150	185	322 mg/kg FW [24]
Mg, mg/L	140	160	162 mg/kg FW [24]
Fe, mg/L	4 (2– 8)	0.4	9.3 mg/kg FW [24]
Zn, mg/L	1.3 (0.8– 2.5)	0.6	1.47 mg/kg FW [24]
I, µg/L	NA	< 5	NA
Phytochemicals			
Carotenoids	NA	70 µg/L	48.6 mg/kg FW [34]
- β-Carotene	NA	32 µg/L	7.7 FW [24], 16.7 mg/kg FW [34]
- β-Cryptoxanthin	NA	NA	4.63 FW [24], 12.2 mg/kg FW [34]
- Violaxanthin	NA	NA	13.0 mg/kg FW [34]
Phenols (total)	NA	6.3– 6.95	7 849 ^c mg/100 g DW [45] 7 465 ^a mg/100 g DW [44] 3 760 ^d mg/100 g DW [42] 4 210 ^d mg/100 g DW [39] 6 902 ^d mg/100 g FW [49] 2 556 ^d mg/100 g FW, wild [63] 2 010 ^d mg/100 g FW [47]
Amygdalin	57.5 mg/kg [9]	NA	201 mg/kg FW [1]

그림. 아로니아의 영양성분 (Kulling and Rawel, Planta Medica, 2008, 74, 1625–34)

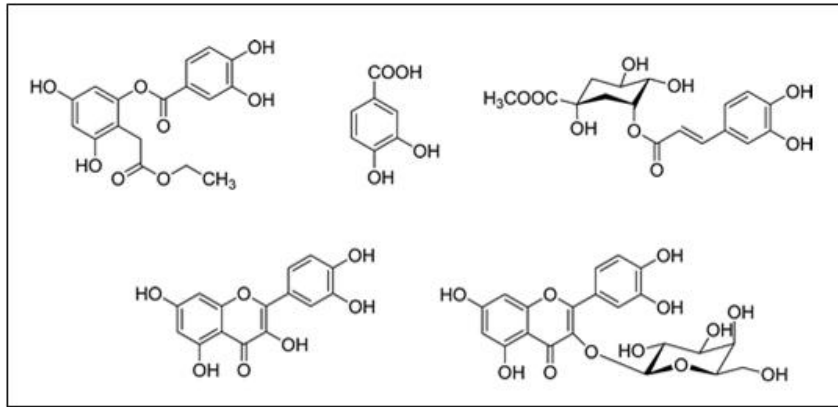


그림. 아로니아의 주요 항산화 활성 유효성분 (Li et al., J Agric Food Chem, 2012, 60, 11551-11559)

- 또한 최근 아로니아 과육 추출물에 함유된 총 phenolic 화합물 및 안토시아닌의 함량평가를 위한 HPLC-DAD-MS 기반 최적 동시분석법이 보고된 바 있음. 이러한 자료를 바탕으로 본 연구에서는 다양한 조건으로 제조한 아로니아 추출물과 전립선 비대 개선 활성간의 상관관계를 분석함으로써 전립선 비대 개선과 가장 높은 correlation을 보이는 ‘유효성분’을 새로이 도출하고자 함.
- 현재까지 다양한 생리활성이 보고된 phenolic compounds를 1차 유효성분group으로 설정하였으며, 추출물의 분석은 최근 McDougall 등이 보고한 phenolic compound targeted analytical method를 적용하여 진행일 계획임.

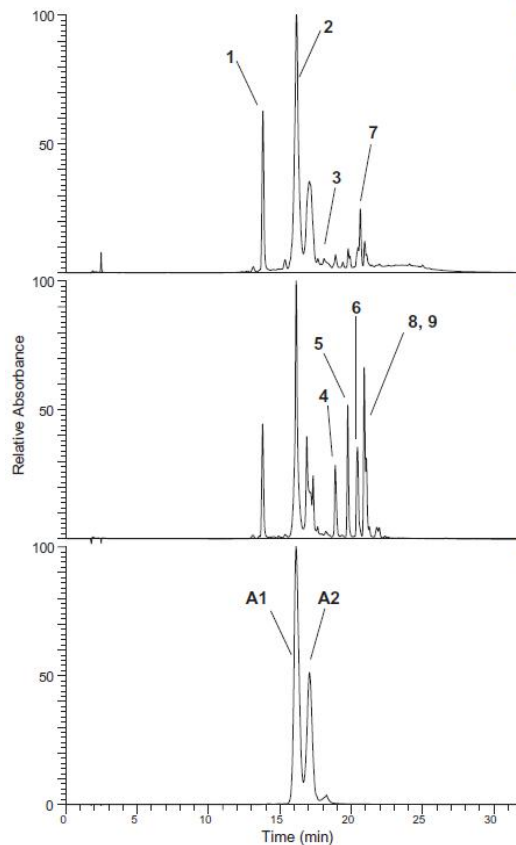


그림. 아로니아 과육 추출물의 HPLC 크로마토그램 (위부터 검출파장 280, 365, 520 nm)

- 아로니아로부터 기능성 성분 분리를 통한 지표 성분 확보

- 추출물과 활성간의 유의적인 상관관계가 도출되지 않는 경우에는 phenolic 계열 외 화합물을 대상으로 한 최적 분석법을 개발한 후 상관관계 분석을 실시할 계획임.
- 아로니아 추출물의 표준화 및 함량평가를 위해 반드시 필요한 지표 성분은 구입가격 및 분리진행시 소요시간 등을 종합적으로 고려하여 구입이 가능한 것은 우선적으로 확보하고(Sigma, Fluka 등), 구입이 불가능하나 중요한 유효성분으로 판단되는 물질에 대해서는 함량분석에 필요한 최소한의 양을 산정하여 분리분석시험을 진행하도록 함.
- 추출물 또는 분획물의 최적 분리조건을 TLC를 통해 결정된 뒤 HSCCC, open column chromatography, MPLC, semi-prep HPLC 등을 이용하여 target compounds를 효율적으로 분리함.
- 지표 성분의 안정성(stability) 확보를 위하여 구입하여 사용하는 물질은 구입 시 제공되는 순도(purity), 보관조건, 안정성에 대한 자료를 준수하고, 분리를 통해 확보한 물질은 함량평가 등 시험에 사용하기 전에 HPLC 분석을 통해 peak spilling, absorbance 측정을 통해 안정성을 확인한 후 사용함.

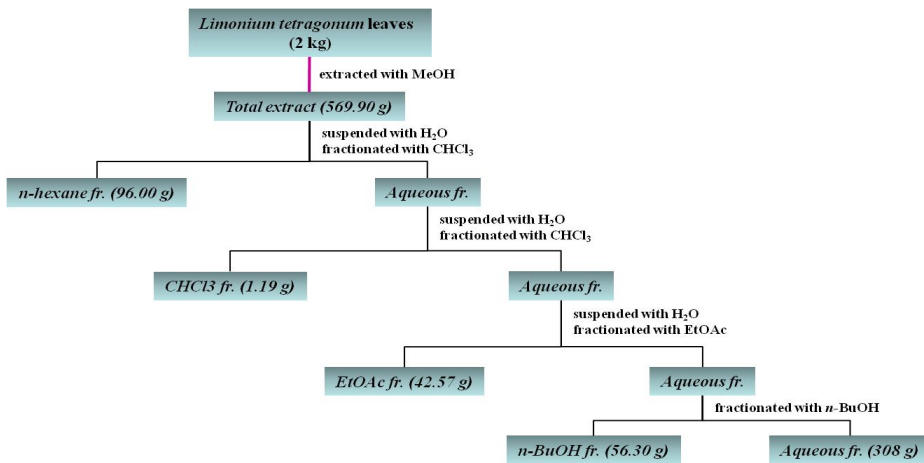


그림. 추출물의 극성별 분획물 제조

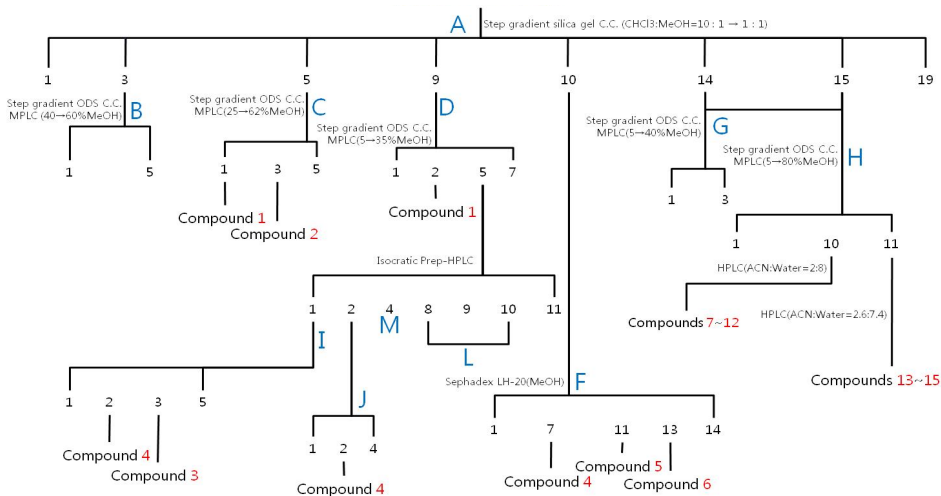


그림. 활성 분획물로부터 화합물의 분리

- 아로니아로부터 분리된 화합물은 IR, MS, NMR 등의 분광학적 분석을 통해 그 구조를 규명.
- 1D, 2D-NMR spectroscopy, MS/MS analysis를 통해 화합물 평면구조를 결정하고, 당의 종류 및 입체구조는 NOESY spectrum 상에서 1H-1H간 correlation을 통해 분석하고 glucose standard를 이용한 GC를 통해 확인.

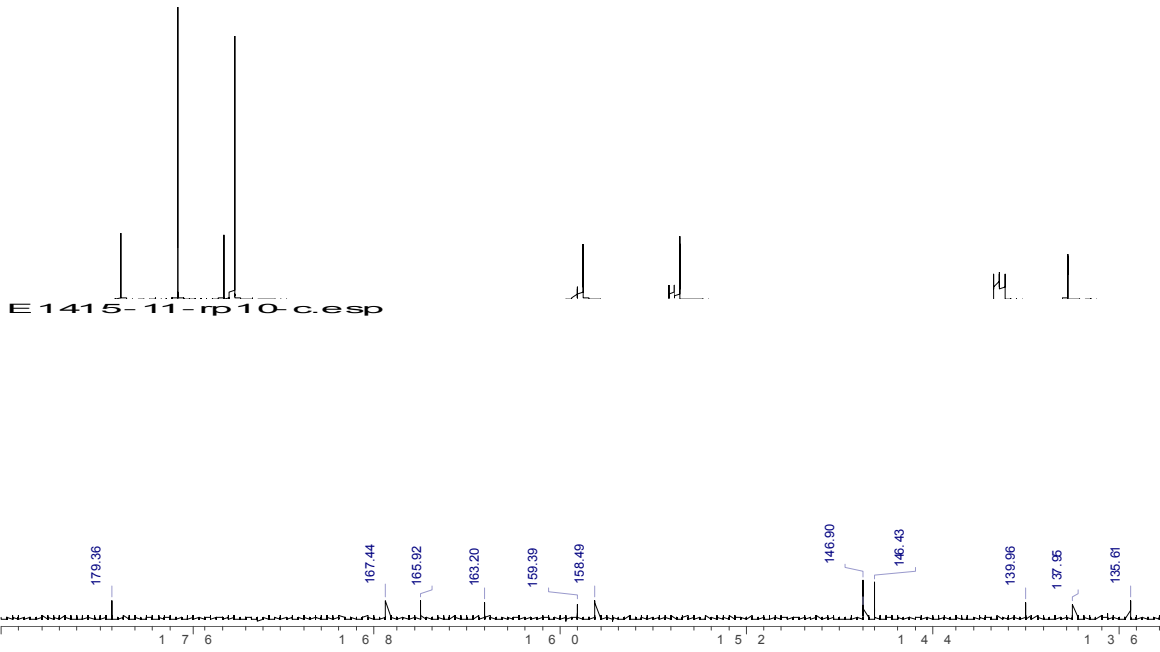


그림. 분리화합물의 1H, 13C-NMR 스펙트럼

- 본 연구진이 보유하고 있는 천연물의 MS data base와 문헌조사를 통해 확보된 자료를 이용하여 HPLC-MS 분석 결과에서 확보된 분자량, 분자식에 해당하는 물질에 대한 identification을 수행.
- 필요할 경우 MS/MS pattern을 확인하여 물질 구조에 대한 정보를 확보함.

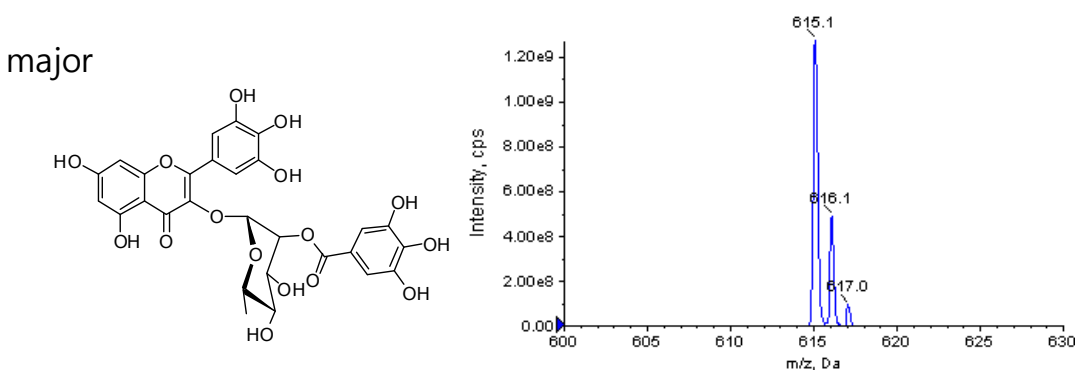


그림. 분리 화합물의 입체구조 및 MS 분석을 통한 분자량 확인

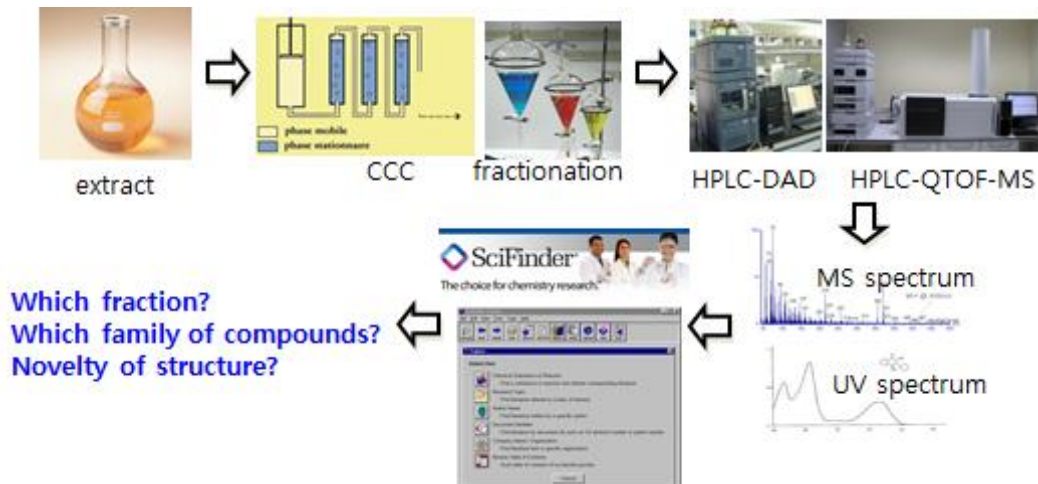


그림. 아로니아로부터 분리한 기능성화합물의 규명

- 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴

○ 아로니아의 전립선비대 개선 효능을 평가하는 동시에, 아로니아 추출물과 복합물로 섭취했을 때 아로니아 추출물을 단독으로 섭취하는 것보다 전립선 비대개선 기능이 강화되거나 또는 아로니아의 기능성을 극대화할 수 있는 기능성 소재를 발굴하고자 함.

○ 문헌조사를 통해 전통의학에서 남성 전립선비대, 전립선염 등의 증상에 사용되어 오고 있는 식의약 소재를 선정하고, 동시에 실험적으로 5-alpha reductase 저해활성을 나타내거나 DHT 전환 저해활성이 있는 것으로 알려진 소재들을 검색하여 활성물질이 규명되지 않았거나 작용기전에 대한 연구가 많이 이루어지지 않은 소재를 택하도록 함. 또한 이들에 대한 화합물, 약리활성 등에 대한 문헌자료를 확보함.

- 전립선비대 개선 소재에 대한 최근 연구보고

- 최근 동물모델을 이용하여 전립선 세포 분화 억제, 전립선조직 비대 저해, apoptosis 관련 기작 및 염증 기작 조절을 통해 전립선비대 개선 효과가 확인된 천연소재가 보고된 바 있음.
- Anthocyanin-riched 서리태콩 추출물은 전립선비대 환자의 하부요로증상(Lower Urinary Tract Symptoms, LUTS)을 개선하는 효과가 우수한 것으로 나타났고 (Evid Based Complement Alternat Med. 2016 in press), 육종용 (Cistanche salsa) 추출물은 전립선비대 동물모델에서 전립선조직세포의 분화를 억제하고 염증성 단백질 발현 조절을 통해 전립선 비대증을 개선하였으며 (Can J Physiol Pharmacol. 2016, 94(1):104-11), 서양자두 (Prunus domestica) 추출물인 Sitoprin (CR002)은 테스토스테론으로 유도한 전립선비대 동물모델에서 전립선 세포 증식 및 비대를 억제하였음 (Toxicol Mech Methods. 2015 25(9):653-64). 또한 phytosterol enriched-유채추출물 (Brassica campestris)의 전립선비대개선효능이 보고된 바 있음 (Phytomedicine. 2015, 22(1):145-52).

- 전통적 남성 비뇨기계 질환 치료 소재

- 한방의학적 관점에서 남성의 비뇨기계 질환은 크게 1) 하복부의 허냉으로 인한 복통과 배뇨장애, 2) 점막조직의 충혈과 발적, 통증을 동반하는 실증, 3) 현대의학적으로 방광염과 요도염에 해당하는 오림(五淋) 증상을 치료하는 처방이 주로 빈용되었음. 오림(五淋)은 소변을 시원하게 누지 못하고 찝끔찝끔 누는 노림(勞淋), 소변에 피가 섞여 나오는 혈림(血淋), 소변이 방울방울 떨어지고 아랫배가 그득한 기림(氣淋), 음경속이 아프고 소변에 모래나 돌이 섞여 나오는 석림(石淋), 그리고 소변을 자주 누지만 잘 나오지 않고 아랫배가 부르고 배뇨시 요도에 작열감이 동반되는 열림(熱淋), 5가지를 총칭함.
- 전통적으로 남성 비뇨기계 질환의 진단 기준이 되었던 상기 증상들은 현대의학적인 관점에서 남성 전립선 비대증에 동반되는 하부요로증상(Lower Urinary Tract Symptoms, LUTS)과 매우 유사하며, 이에 사용된 한약재 및 생약을 1차후보군으로 선정하였음. 1차후보군 생약을 대상으로 연구보고내용 조사, 국내 및 국제 특허 검색을 통한 지식재산권 확보 가능성 타진, 원료수급 문제 등을 종합적으로 고려하고, 최종적으로는 아로니아 추출물과의 배합 시 시너지 효능을 평가하여 기능성 복합물을 제조할 계획임.

<1차 후보군 생약>

창출, 감초, 삼릉, 아출, 백복령, 청피, 사인, 정향피, 빈랑, 현호색, 궁계, 건강, 적작약, 치자, 당귀, 적복령, 조금, 초용담, 시호, 택사, 목통, 차전자, 생지황, 황금, 인삼, 황기, 숙지황, 백출, 진피, 익지인, 승마, 육계.

○ 남성 비뇨기계 질환 빈용 처방

□ 반총산

구성 한약재: 창출, 감초, 삼릉, 아출, 백복령, 청피, 사인, 정향피, 빈랑, 현호색, 궁계, 건강

□ 오림산

구성 한약재: 적작약, 치자, 당귀, 적복령, 조금, 감초

□ 용담사간탕

구성 한약재: 초용담, 시호, 택사, 목통, 차전자, 적복령, 생지황, 당귀, 치자, 황금, 감초

□ 삼기탕

구성 한약재: 인삼, 황기, 백복령, 당귀, 숙지황, 백출, 진피, 익지인, 승마, 육계, 감초

- 아로니아 복합물 제조를 위한 후보생약 선정 계획

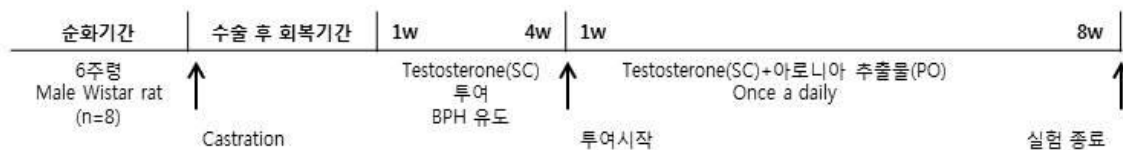
1. 1차 후보군으로 선정된 생약에 대하여 소재의 시장성, 지식재산권 확보 가능성, 원료확보 및 대량생산 가능성 등을 종합적으로 고려하여 아로니아와 배합시 전립선 비대개선효능을 증강시킬수 있는 후보군을 2 차후보로 결정함.
2. 5a-reductase 및 biomarker에 대해 우수한 활성이 보고된 소재 중 추후 지식재산권 확보가 가능한 식의약원료를 추가로 발굴함.
3. 전립선비대 *in vitro* 검색계를 통해 5a-reductase 저해활성 및 항염증활성을 평가하여 multi-targeted agent를 최종후보로 결정할 계획임.

- 연구대상으로 선정된 천연물을 채집 또는 구입하여 감별함.
 - 기능성 소재의 cell viability 측정
 - 기능성 소재의 5-alpha reductase 저해 활성
 - 기능성 소재의 DHT 전환 억제 활성 검토
 - 기능성 소재의 항염활성 검토
- 지표성분의 구조 및 정량 자료, *in vitro* 기능성 자료 준비

□ 협동연구기관 - 안전성평가연구소

활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 *in vivo* 평가 실험 및 기능성 평가 자료의 확보

- 시료의 선정 : 1차 *in vivo* 실험 결과를 검토하여 선별된 아로니아 분획물과 기능성 화합물을 최종시료로 선택함.
- 실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도
- 시료의 조제와 투여



- 실험동물의 체중변화, 장기무게
- 혈액분석
- 전립선 및 비뇨생식기계의 histopathological examination
- *in vivo* 동물실험 기능성 자료 준비

다. 3차년도

□ 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥

아로니아 추출물의 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 2의 개발

- 전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2의 제작

협동연구기관과 연계하여 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 레시피를 확립함

예) 기존 자사 제품의 레시피 예

	원료명	I	II	III
1	아로니아 농축액	76	82	85
2	전립선 비대증에 좋은 소재	6	6	6
3	사과농축액	5	2	2
4	텍스트린	13	10	7
		100	100	100

- 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립

새로운 형태의 제품을 개발하기 위하여 액상을 스프레이 드라이 한후 물에 녹는 제품으로 출시



자사 보유 실험용 SD 기기

- 포장디자인 개발

· 포장디자인 개발 (새로운 형태의 제품)

예) 자사 제품의 포장디자인



- 영양성분 분석

영양성분 표시법에 맞게 제품에 대한 5대 영양성분에 대해 분석한 결과를 토대로 제품 품목 신고서를 작성하고 상품화 하고자 함.

- 시제품 2 제작

□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교

추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조, 아로니아 추출물의 분석조건 확립

- 1,2차년도 연구를 통해 활성성분이 확보된 아로니아와 Biochemical screening 단계에서 활성이 확인된 천연소재에 대하여 활성을 최적화하기 위한 추출조건을 확보하도록 함. 추출조건 최적화의 1차 기준은 *in vitro* assay에서의 활성으로 하고 추가적으로 활성물질의 함량을 같이 검토함.
- 주요 활성물질과 활성 보조물질의 combination treatment를 통해 최적 비율을 확인하여 이러한 비율을 가진 추출물을 만들 수 있는 추출조건을 확보하도록 함.

- 추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조

- 중심합성계획법 (central composite design, CCD) 또는 Box-Behnken design (BBD)를 이용하여 추출용매, 시간, 온도 등 여러 추출인자에 대한 실험점을 설계하고 이 설계에 따라 제조된 추출물에 대해 활성을 평가하고 활성물질의 함량을 분석함.
- 2차년도 연구를 통해 발굴한 기능성 소재의 추출물을 제조한 후, 아로니아 추출물과 다양한 비율로 배합하여 *in vitro* 검색계에서 전립선 비대 활성을 평가함. 배합물과 활성간의 상관관계 분석을 통해 전립선 비대 개선 활성을 증강시키는 최적 배합비를 결정하고 이를 기능성원료로 개발함.
- *in vitro*에서 우수한 활성을 나타낸 아로니아와 기능성소재의 복합물을 제2 협동기관 (경남환경독성본부)에 전달하여 전립선 비대 동물모델에서의 개선 효능을 최종 검증함.
- 추출물의 활성 기반 최적화를 위한 종속 변수 (예)

- 5-alpha reductase 활성 (Y1), DHT 전환 억제활성 (Y2), 안토시아닌 함량 (Y3)

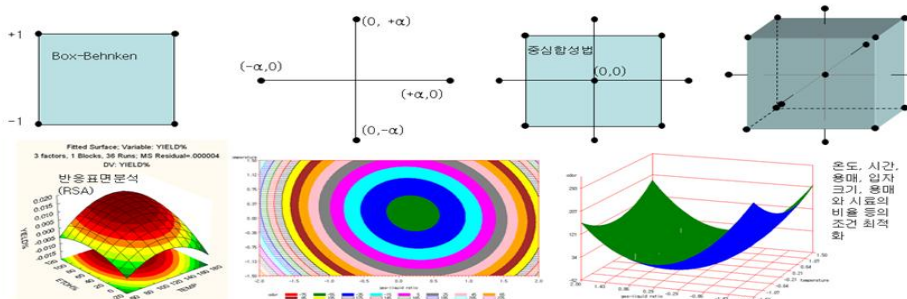


그림. 추출조건 최적화 연구 방법

- 또한 활성평가 및 함량 분석 결과를 가지고 반응표면분석 (response surface analysis)를 수행하

여 최적 추출조건을 도출함. 도출된 최적 추출조건으로 추출물을 제조하여 활성 및 활성물질 함량을 평가하여 최적 추출조건을 검증함.

- 최적 추출조건으로 확보된 추출물에 대해 chemical profile을 확보하고 활성물질의 함량을 평가함.
- 추출물 및 복합물 최적화를 위한 반응표면분석

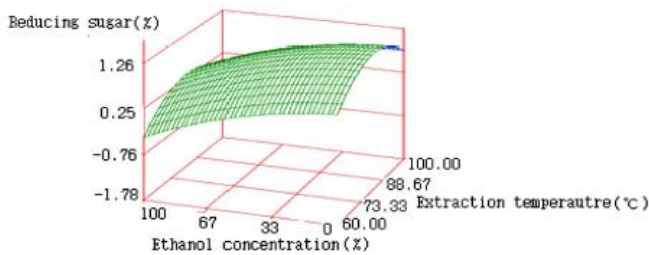
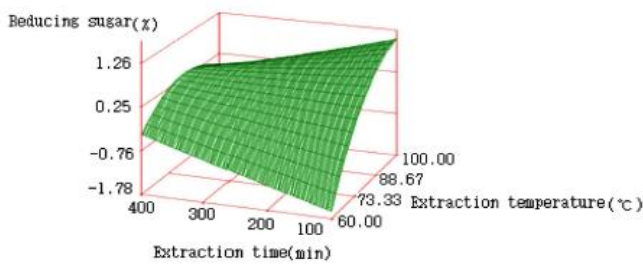
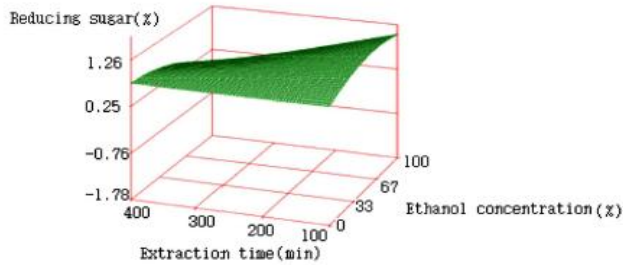


그림. 두릅을 이용한 환류추출공정 최적화 (예)

- 아로니아 추출물의 분석조건 확립

- 아로니아 추출물의 주요성분 함량평가를 위하여 HPLC-DAD를 이용하여 아로니아 추출물의 분석법을 개발함.
- 추출물 분석을 위해 이동상, 고정상 및 검출 조건을 최적화 하고, retention time, peak intensity 등에 대해 재현성을 평가하여 각각의 peak들의 specificity를 확인하고 method validation을 수행함. 개발한 아로니아 분석법을 토대로 국내산 아로니아와 수입한 아로니아의 기능성성분의 함량을 비교평가함.
- 분석용 시료의 제조
- 지표성분(표준품) 시료 제조
- 아로니아 추출물의 지표성분의 설정
- 고정상 및 이동상의 최적화
- 검출과장 최적화

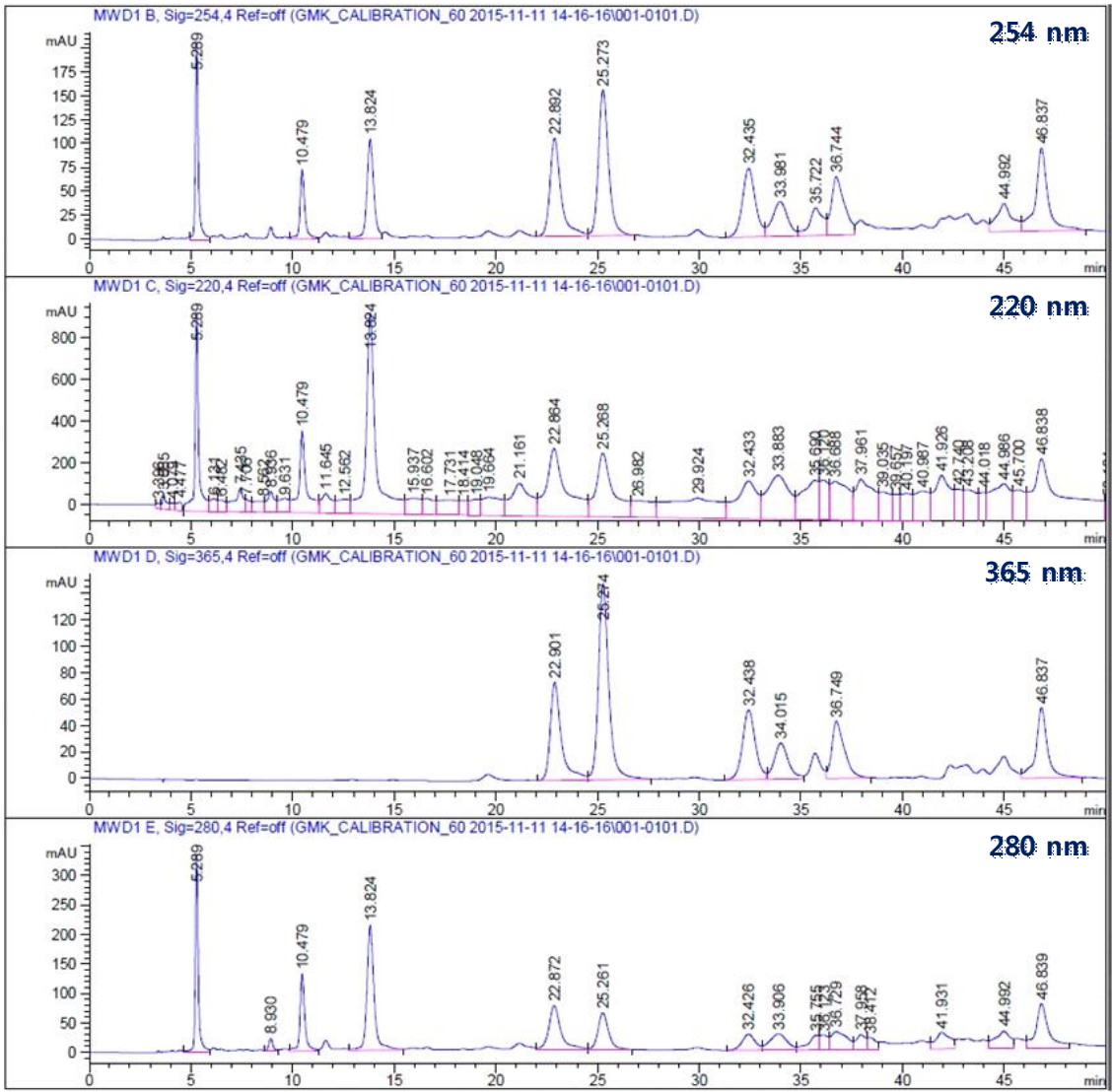


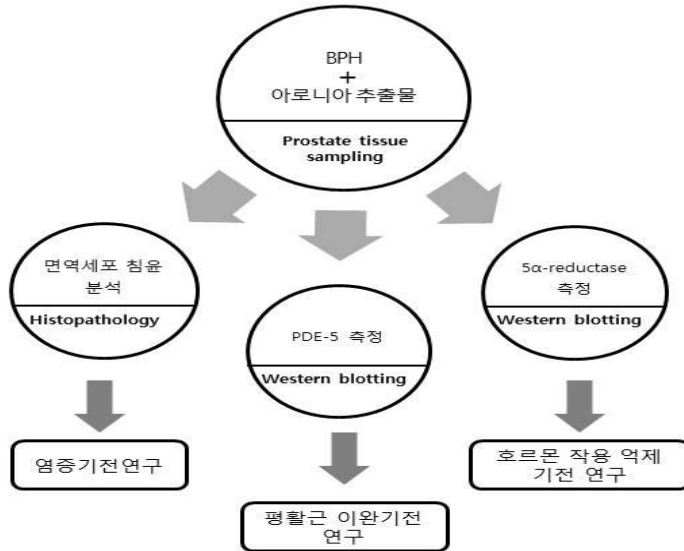
그림. 파장별 추출물의 크로마토그램 비교 (예)

□ 협동연구기관 - 안전성평가연구소

아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구 및 기능성 메카니즘 자료 확보

○아로니아 추출물의 표적 기전 탐색

하기의 세 가지 주요 전립선 비대증 완화 기전 중 면역세포 및 주요 단백질 발현을 분석하여 표적 기전을 확인하고 해당 기전에 대한 상세 연구를 수행함.



○ 예상되는 표적 기전의 종류

A. 염증억제 기전

1. 염증세포 침윤 정도 및 종류 분석
2. Pro & Anti inflammatory cytokines 발현 분석
3. 염증 매개 신호전달 시스템 분석

○ 아로니아 추출물의 기능성 메카니즘 자료 제작

B. 평활근 수축 억제 기전

C. 호르몬 작용 억제 기전

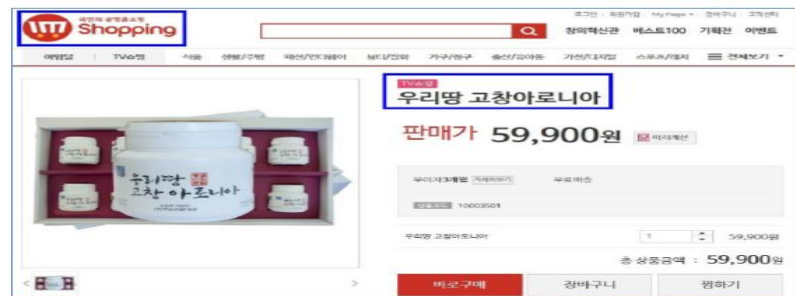
1. 전립선조직에서 dihydrotestosterone 분석
2. 전립선 조직에서 androgen receptor(AR), 5 α -reductase type 1 & 2 (SRD5A1 & SRD5A2) 발현 분석

□ 위탁연구기관 - 농업회사법인 주식회사 하늘선물예프앤비

시제품의 사업화 전략수립 및 마케팅

농업회사법인 주식회사 하늘선물예프앤비는 아로니아를 홈쇼핑에 마케팅하여 작년 8월 이후 매출 약 7억8천만원을 올렸음

2015~2016년 우리담 고창아로니아 아임쇼핑(공영홈쇼핑) 방송 관련 이미지



- 출처 : <http://www.immall.co.kr/goods/selectGoodsDetail.do?prdId=10003501>
 - 생방송 영상자료는 방송국에서 제공해주지 않기 때문에 본사가 보유하고 있지 않습니다.

제 2장. 연구방법 및 결과

제1절 연구개발 수행방법

1. 1차년도 협동연구기관 - 경남과학기술대학교

가. 가속용매추출물장치를 이용한 아로니아 추출물 제조

아로니아의 최적 추출조건을 도출하기 위하여 가속용매추출장치(Accelated Solvent Extractor)를 사용함. 추출조건으로 각 시료의 건물 중량에 대한 추출용매의 비율을 50~100 mL/g의 부피(W/V)로 하고, 추출용매, 추출시간 및 추출압력은 중심합성계획에 의해 따른 조건으로 추출함. 추출물은 whatman filter paper No.2에 거르고 감압 농축 후 동일 용량으로 정용하여 실험에 사용함.

나. 아로니아의 *in vitro* 전립선 비대 개선 효능 평가

(1) 아로니아 추출물의 cell viability 측정

각 시료의 무독성 유효범위의 측정을 위하여 MTT assay 방법을 이용하며 본 실험에 사용된 아로니아 추출물은 모두 0.5% DMSO에 녹여서 assay를 시행함. LNCaP 세포를 2 X 10⁴ cells/well로 96 well plate에 seeding하고 FBS 10 %를 함유한 RPMI 1640에서 18시간동안 incubation 한 후, serum free RPMI 1640으로 교체하고 아로니아 추출물을 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 후 형성된 formazan을 DMSO 100 µl를 넣어 균질하게 녹인 후 microplate reader를 이용하여 450nm에서 측정함.

(2) 아로니아 추출물의 5-alpha reductase 저해 활성

전립선비대에서 과활성화되어 testosterone을 DHT로 전환시키는 효소인 5-alpha reductase에 대한 억제효과를 아로니아 추출물 시료에서 검색하기 위하여 ELISA assay를 시행함. 각 시료는 MTT assay와 같이 0.5% DMSO에 균질하게 녹여 사용하며, 전립선비대와 관련이 있음이고 알려진 5-alpha reductase typeII에 대한 특이적인 저해를 알아보기 위하여, 5-alpha reductase typeII가 주로 발현된다고 알려진 rat의 prostate을 절제하여 균질화시켜 효소원으로 이용함. 시료의 효과를 검토하기 위하여 균질화된 rat의 prostate에 testosterone을 첨가하고 효소단백질의 발현정도를 측정함.

효소원의 공급을 위하여 15주령 Sprague Dawley rat의 prostate를 적출한 후 pH 7.4phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척한 후, 동일한 PBS를 무게의 8배를 첨가한 후 glass homogenizer로 균질화함. 균질액을 4° C에서 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 assay를 실시하였으며, 남은 균질액은 -70° C에 보관함. 실험을 간단히 설명하자면, 시료를 처리한 효소원을 Horseradish Peroxidase(HRP)-conjugated SRD5A2와 SRD5A2-specific antibody와 함께 1시간동안 37 °C에서 incubation을 실시하고, incubation 후 기질용액을 첨가하고 15분 후 황산용액으로 반응을 멈춘 후 450 nm에서 10분 이내에 시료별 차이를 측정함.

(3) 아로니아 추출물의 DHT 전환 억제 활성 검토

in vitro 상에서의 아로니아 추출물을 처리한 SRD5A2-transfected LNCaP cell line에 testosterone 을 처리하여 전환된 DHT를 측정함으로써 시료의 DHT 전환 억제능을 측정하는 방법으로, 인간전립선세포주인 LNCaP 세포에 5-alpha reductase type II의 발현을 위하여 SRD5A2가 삽입되어 있는 pSG5SRD5A2를 Lipofectamine 2000을 이용하여 세포에 transfection 함. Transfection 24시간 경과 후, charcoal-stripped serum 10% RPMI 1640을 48시간동안 처리하여 세포 내 Hormone을 depletion 시킨 후, 48시간 뒤에 아로니아 추출물의 각 시료(실온, 열수, 20%주정, 80%주정)를 처리함. 다시 16시간 후 testosterone을 처리하고, 4시간 후 100 μ l medium을 취하여 DHT로의 변환을 측정함. DHT의 측정은 medium 50 μ l를 대상으로 ELISA assay를 실시하였으며, 450nm에서 측정함. 5-alpha reductase typeII의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay kit(Cusabio, Germany)를 이용하였으며, 460nm에서 측정하고 측정값의 계산은 기준액으로 그린 standard그래프를 이용하여 구하고 BPH군에 대한 백분율(%)로 표기함.

(4) 아로니아 추출물의 항염활성 검토

전립선비대와 연관되어 잘 나타날 수 있는 전립선염에 대한 시료의 효과를 검토하기 위하여 Raw264.7 세포주를 이용하여 LPS로 염증을 유발하여 염증관련 인자의 변화를 RT-PCR을 이용하여 검토함. Raw 264.7을 12 well plate에 seeding 한 후 40% confluence 가 되었을 때 washing 후 배지를 교체하고 선정 시료를 0, 25, 50 μ g/mL의 농도별로 처리하고 18시간동안 배양함.

18시간이 경과한 후 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 2시간 후 세포를 harvest하고 RNA를 추출하고 DNA를 합성한 후 PCR을 시행함. RT-PCR을 위한 primer는

COX-2(F:GAGTGGGAGGCACTTGCATT, R:TGGAGGCGA AGTGGGTTTTTA),

iNOS(F:TCYYGGAGCGAGTTGTGGAT,R:GGGTCGTAATGTCCAGGAAGT),

I6-1 β (F:GTTGACGGACCCCAAAAGAT, R:AAGGTCCACGGAAAGACAC), IL-6

(F:TCCATCCAGTTGCCTTCTTG, R:CCACGATTTCCACA GAACA)로 모두 58°C에서 27 cycle을

증폭하며 GAPDH (F:GTGTTCTACCCCAATGTGT, R:AGGAGACAACCTGGTCCT CAGT)로 internal standard를 실시하며, PCR의 결과물은 1.5% agarose gel에서 전개하여 결과를 확인함.

2. 1차년도 협동연구기관 - 안전성평가연구소

가. 아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 *in vivo* 평가 방법

(1) 실험재료

in vitro 실험 결과를 토대로 최종 건강식품개발에 적합한 시료를 선정하기 위하여 전립선비대를 유도한 rat을 이용하여 전립선비대억제 및 치료효과를 평가하고 관련 기작을 규명하고자 함. 시험 원료인 아로니아는 주관기업인 농업회사법인 주식회사 삼흥에서 일괄 공급받을 예정임.

(2) 실험동물의 조건

실험동물은 6주령의 웅성 Wistar rat를 구입하여 사용함. 실험동물의 사육환경은 온도 23 \pm 2

℃, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 명암교대는 약 12시간으로 하며 사료와 물은 자유로이 섭취하게 함. 실험 동물은 사육상자 당 2마리씩 수용하고 무게측정과 배당교환은 5일에 한 번씩 실시하여 관리함. 실험동물은 일주일의 순화기간을 거쳐서 실험에 사용함.

(3) 전립선비대 *in vivo* model의 확립

일주일의 순화 기간 후 intrinsic testosterone의 영향을 배제하기 위하여 거세(castration)를 시행. 실험동물을 isoflurane 등으로 마취하여 배면이 수술자를 향하게 눕혀 고정하고 음낭 끝 부위의 피부를 절개하여 좌우 고환 및 부고환을 잘라낸 후 절개면을 봉합하여 수술을 실시함. sham group의 경우 피부 절개 및 봉합술만 실시하며 모든 실험동물은 수술 전 항생제(cefazolin) 및 진통제(carprofen)를 투여하여 염증 및 통증을 완화시킴.

거세 후 10일 동안 안정화를 시켜 수술부위의 상처를 아물게 하며, 이후 testosterone propionate(TP)를 투여하여 실험을 개시함. 개시 시점의 동물의 몸무게는 각 그룹 평균 200~250g 이 되도록 하고 1차년도 스크리닝 실험의 경우 6마리를 한 군으로 하여 대상 시료 종류에 맞게 6~7 그룹으로 설정함. 실험중에는 다른 군끼리 한 사육상자에 있지 않도록 배치하고 물과 사료는 자유롭게 급이함. Vehicle control group을 제외한 모든 실험동물은 전립선비대 유도를 위하여 testosterone propionate(TP)을 3 mg/kg body weight/day로 injection 하며, 실험의 오차를 최소화 하기 위하여 3일마다 측정된 실험동물의 무게를 기준으로 총 injection volume은 100 μ l가 되도록 corn oil에 녹여 사용함. Control group은 TP없이 corn oil만을 100 μ l씩 injection 하여 vehicle로 사용하도록 준비함.

(4) 시료의 투여

상기와 같이 거세된 rat을 대상으로 TP를 투여하는 6주간 시험물질을 동시에 경구투여하며 군은 다음과 같이 설정함: (A) Control group; corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 rat, (B) BPH group; TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 생리식염수만 급여한 rat, (C) BPH+aronia extract X; 아로니아추출물 X 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 X추출물을 100mg/kg body weight/day로 경구 투여한 rat, (D) BPH+aronia extract Y; 아로니아 추출물 Y 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 Y추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (E) BPH+aronia EtOH extract Z group; 아로니아 20%주정 추출물 Z 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 20%주정 추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구 투여한 rat, (F) BPH+aronia EtOH extract P group; 아로니아 20%주정 P 추출물 P 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 20%주정 P 추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat.

실험에 있어서 TP은 실험동물의 무게에 따라 조절하여 투여되었으나 총 volume이 100 μ l를 넘지

않도록 하고, injection 부위에 염증이 생기지 않도록 주의하여 투여함. 호르몬과 시료의 투여 오차를 줄이기 위하여 실험동물의 무게는 7일마다 측정하고 각 개체에 맞는 농도를 계산하여 투여함.



(5) 실험동물의 체중변화

실험동물의 무게는 거세술을 시행한 후 10일의 회복기를 거친 후 측정된 몸무게를 최초의 무게로 하며, 이후 7일에 한 번 측정함. 6주의 전립선비대유도 및 6주간의 시료투여 후 모든 실험동물은 최후 시료투여 후 16시간 절식하고 마지막 무게를 측정함. 실험동물의 무게는 실험 개시 시점 마지막의 무게차이를 전체 Weight gain으로 표현함.

$$\text{Weight gain(g)} = \text{Final body weight(g)} - \text{Initial body weight(g)}$$

(6) 부검 및 시료의 채취

모든 실험동물을 isoflurane 등으로 마취 상태에서 복대동맥에서 SST tube를 이용하여 동맥혈 (arterial blood)을 채취하여 실온에 1시간 방치 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 3ml 이상의 혈청을 분리하여 분석에 사용함. 채혈 후 즉시 경추탈골로 안락사하며 전립선 및 방광을 적출하여 조심스럽게 분리하여 PBS에 1회 세척한 후 물기를 가볍게 제거하여 무게를 측정하고 기록함 (dorsal/ventral prostate 모두 분리). 적출된 전립선의 일부는 조직병리학적 검사를 위하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 담가 고정하고 일부는 유전자 및 단백질 분석을 위하여 -80° C에 보관함.

(7) Prostate Index (PI)

측정한 전립선 무게를 PI 지수로 환산하여 각 실험군의 전립선 비대 정도를 분석함.

$$\text{PI} = \frac{\text{채취한 prostate의 무게}}{\text{Final body weight(g)}} \times 100$$

(8) 혈액분석

혈청에서의 AST, ALT, ALP, TG, TP 등 혈청학적 인자에 대한 분석은 혈액분석기를 이용하여 측정함.

(9) 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석

분리된 혈청에서의 testosterone의 측정은 ELASA assay를 통하여 측정되며, 측정값은 testosterone standard로 측정된 그래프를 이용하여 계산함. 혈장에서의 DHT는 측정을 위하여, 혈청 50 μ l을 goat-anti-rabbit antibody가 미리 coated된 96well microplate에 HRP- conjugated DHT와 DHT-specific antibody와 함께 1시간동안 실온에서 shaking incubation을 실시함. incubation 후 기질용액을 첨가하고 15분 후 황산용액으로 반응을 멈춘 후 450 nm에서 10분 이내에 시료별 차이를 측정함. 측정값의 계산은 standard 그래프를 이용하며 단위는 pg/mL로 표기함.

(10) 조직병리학적 평가

상온에서 24시간 이상 고정된 전립선 조직은 tissue processing 과정을 거쳐 4 μ m 두께로 박절하여 dewaxing과 탈수과정 후 일반적인 조직병리학적 검사를 위하여 haematoxylin and eosin (H&E)으로 염색함. 제작된 슬라이드는 광학현미경 하에 검안하여 전립선 상피의 증식 정도, 염증세포의 침윤, 주변 조직의 비후 등의 소견을 관찰함.

3. 2차년도 협동연구기관 - 경남과학기술대학교

가. 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴

(1) 기능성 소재의 cell viability 측정

각 시료의 무독성 유효범위의 측정을 위하여 MTT assay 방법을 이용하며 본 실험에 사용된 아로니아 추출물은 모두 0.5% DMSO에 녹여서 assay를 시행함. LNCaP 세포를 2 X 10⁴ cells/well로 96 well plate에 seeding하고 FBS 10 %를 함유한 RPMI 1640에서 18시간동안 incubation 한 후, serum free RPMI 1640으로 교체하고 아로니아 추출물을 5, 10, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 후 형성된 formazan을 DMSO 100 μ l를 넣어 균질하게 녹인 후 microplate reader를 이용하여 450nm에서 측정함.

(2) 기능성 소재의 5-alpha reductase 저해 활성

전립선비대에서 과활성화되어 testosterone을 DHT로 전환시키는 효소인 5-alpha reductase에 대한 억제효과를 아로니아 추출물 시료에서 검색하기 위하여 ELISA assay를 시행함. 각 시료는 MTT assay와 같이 0.5% DMSO에 균질하게 녹여 사용하며, 전립선비대와 관련이 있음이고 알려진 5-alpha reductase typeII에 대한 특이적인 저해를 알아보기 위하여, 5-alpha reductase typeII가 주로 발현된다고 알려진 rat의 prostate을 절제하여 균질화시켜 효소원으로 이용함. 시료의 효과를 검토하기 위하여 균질화된 rat의 prostate에 testosterone을 첨가하고 효소단백질의 발현정도를 측정함.

효소원의 공급을 위하여 15주령 Sprague Dawley rat의 prostate를 적출한 후 pH 7.4phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척한 후, 동일한 PBS를 무게의 8배를 첨가한 후 glass homogenizer로 균질화함. 균질액을 4 $^{\circ}$ C에서 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 assay를 실시하였으며, 남은 균질액은 -70 $^{\circ}$ C에 보관함. 실험을 간단히 설명하자면, 시료를 처리한 효소원을

Horseradish Peroxidase(HRP)-conjugated SRD5A2와 SRD5A2-specific antibody와 함께 1시간동안 37 °C에서 incubation을 실시하고, incubation 후 기질용액을 첨가하고 15분 후 황산용액으로 반응을 멈춘 후 450 nm에서 10분 이내에 시료별 차이를 측정함.

(3) 기능성 소재의 DHT 전환 억제 활성 검토

in vitro 상에서의 아로니아 추출물을 처리한 SRD5A2-transfected LNCaP cell line에 testosterone을 처리하여 전환된 DHT를 측정함으로써 시료의 DHT 전환 억제능을 측정하는 방법으로, 인간전립선세포주인 LNCaP 세포에 5-alpha reductase type II의 발현을 위하여 SRD5A2가 삽입되어 있는 pSG5SRD5A2를 Lipofectamine 2000을 이용하여 세포에 transfection 함. Transfection 24시간 경과 후, charcoal-stripped serum 10% RPMI 1640을 48시간동안 처리하여 세포 내 Hormone을 depletion 시킨 후, 48시간 뒤에 아로니아 추출물의 각 시료(실온, 열수, 20%주정, 80%주정)를 처리함. 다시 16시간 후 testosterone을 처리하고, 4시간 후 100 µl medium을 취하여 DHT로의 변환을 측정함. DHT의 측정은 medium 50 µl를 대상으로 ELISA assay를 실시하였으며, 450nm에서 측정함. 5-alpha reductase typeII의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay kit(Cusabio, Germany)를 이용하였으며, 460nm에서 측정하고 측정값의 계산은 기준액으로 그린 standard그래프를 이용하여 구하고 BPH군에 대한 백분율(%)로 표기함

(4) 기능성 소재의 항염활성 검토

전립선비대와 연관되어 잘 나타날 수 있는 전립선염에 대한 시료의 효과를 검토하기 위하여 Raw264.7 세포주를 이용하여 LPS로 염증을 유발하여 염증관련 인자의 변화를 RT-PCR을 이용하여 검토함. Raw 264.7을 12 well plate에 seeding 한 후 40% confluence 가 되었을 때 washing 후 배지를 교체하고 선정 시료를 0, 25, 50 µg/mL의 농도별로 처리하고 18시간동안 배양함. 18시간이 경과한 후 1 µg/mL의 LPS를 처리하여 2시간 후 세포를 harvest하고 RNA를 추출하고 DNA를 합성한 후 PCR을 시행함.

RT-PCR을 위한 primer는 COX-2(F:GAGTGGGAGGCACTTGCATT, R:TGGAGGCGA

AGTGGGTTTTTA), iNOS(F:TCYYGGAGCGAGTTGTGGAT,R:GGGTCGTAATGTCCAGGAAGT),

I6-1 β(F:GTTGACGGACCCCAAAAGAT, R:AAGGTCCACGGGAAAGACAC), IL-6

(F:TCCATCCAGTTGCCTTCTTG, R:CCACGATTTCCACA GAACA)로 모두 58°C에서 27 cycle을

증폭하며 GAPDH (F:GTGTTCTACCCCAATGTGT, R:AGGAGACAACCTGGTCCT CAGT)로 internal standard를 실시하며, PCR의 결과물은 1.5% agarose gel에서 전개하여 결과를 확인함.

4. 2차년도 협동연구기관 - 안전성평가연구소

가. 활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 *in vivo* 평가 방법

(1) 시료의 선정

1차 *in vivo* 실험 결과를 검토하여 선별된 아로니아 분획물과 기능성 화합물을 최종시료로 선택

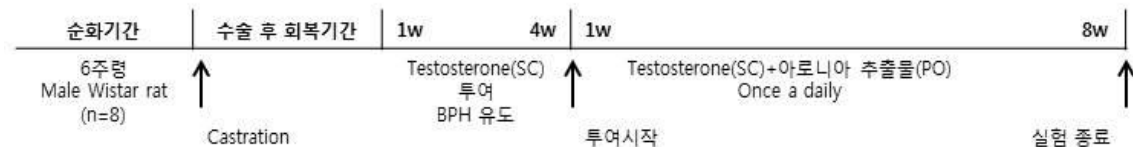
하여 실험을 진행함. 선별된 시료는 50-200 mg/kg·BW 사이의 고농도와 저농도군을 나누어 전립선비대가 유도된 실험동물에게 경구투여함. 본 실험결과를 건강기능식품개발의 기초자료로 활용하기 위하여 건강기능식품인 Saw Palmetto 및 전립선비대의 치료제인 finasteride를 이미 발표된 논문결과에 기초하여 실험동물에 투여하고 결과를 비교함. 원료인 아로니아 추출물은 1차 *in vivo* 실험에서 사용된 추출물과 동일한 것을 이용할 것임.

(2) 실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도

본 실험은 6주령의 웅성 Wistar rat를 구입하여 실험에 사용함. 실험동물의 사육환경은 1차 *in vivo* 실험과 동일하게 유지함. 일주일간의 안정화 기간 후, 실험동물의 거세는 1차 실험과 동일한 방법으로 진행됨. 2차년도 실험동물은 군당 8마리 이상으로 설정함.

(3) 시료의 조제와 투여

상기와 같이 거세된 rat를 대상으로 TP를 투여하고 4주가 경과한 후, 8개의 그룹으로 나누어 다시 8주간 아로니아 추출물 투여실험을 시행함(n=8): (A)Normal control group: castration을 시행하지 않은 정상군으로 corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 rat, (B)control group: corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 rat, (C) BPH group; TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 생리식염수만 급여한 rat, (D) BPH+aronia extract 25; 아로니아 추출물 저농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 추출물을 25 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (E)BPH+aronia extract 50; 아로니아 추출물 중간농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 추출물을 50 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (F) BPH+aronia extract 100; 아로니아 추출물 중간농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (G)Saw Palmetto group; Saw Palmetto 투여그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 Saw Palmetto를 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (H) BPH+Finasteride group;TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 finasteride를 10 mg/kg body weight/day로 경구투여한 그룹으로 나눔.



(4) 실험동물의 체중변화, 장기무게

1차 동물실험과 상동의 방법으로 시행하며 체중 대비 방광무게와 PI 지수를 측정함. 전립선을 포함한 비뇨생식기계 전체에 대한 조직 슬라이드를 제작함. 적출된 조직의 일부는 조직병리학적 검사를 위하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 담아 고정하고 일부는 유전자 및 단백질 분석을 위

하여 -80°C 에 보관함.

(5) 혈액분석

모든 실험동물을 isoflurane 등으로 마취 상태에서 복대동맥에서 SST tube를 이용하여 동맥혈 (arterial blood)을 채취하여 실온에 1시간 방치 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 3ml 이상의 혈청을 분리함. 1차 실험과 동일하게 혈액생화학 분석과 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone을 분석함.

(6) 전립선 및 비뇨생식기계의 histopathological examination

일반적인 tissue processing 과정을 거쳐 제작된 H&E 슬라이드는 1차 실험과 마찬가지로 광학현미경 하에 검안하여 비뇨생식기계의 염증성 및 증식성 소견 유무와 전립선 상피의 증식 정도, 염증세포의 침윤, 주변 조직의 비후 등의 소견을 관찰함.

5. 3차년도 협동연구기관 - 경남과학기술대학교

가. 추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조, 아로니아 추출물의 분석조건 확립

(1) 추출물 및 복합물 최적화를 위한 반응표면분석

각각의 추출 변수에 영향을 받는 종속변수로서 5-alpha reductase 저해활성, DHT 전환 억제활성, 기능성성분(예: 안토시아닌) 함량으로 3회 반복 측정하여 각각 회귀분석을 실시함. SAS(statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하여 회귀분석에 의한 최적조건을 예측함.

회귀분석 결과 임계점이 최대점 혹은 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 통하여 최적점을 구함. 추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 변수의 contour map을 이용하여 분석함.

나. 아로니아 추출물의 분석조건 확립

(1) 분석용 시료의 제조

동결건조한 아로니아를 분말로 만들고 이를 적당량 취하여 50% MeOH를 가한 후 초음파를 이용하여 용해시킨 후 $0.2\ \mu\text{m}$ membrane filter로 여과하여 HPLC용 검액으로 사용함.

(2) 지표성분(표준품) 시료 제조

아로니아로부터 분리한 화합물은 50% MeOH 혼합용매를 이용하여 용해시킨 후 $0.45\ \mu\text{m}$ membrane filter로 여과함.

(3) 아로니아 추출물의 지표성분의 설정

HPLC 및 HPLC/MS를 이용한 아로니아 추출물 chromatogram의 주요 peak의 UV파장을 분석하고 LC-MS를 통해 분자량을 확인하여 지표성분을 설정함. 특히 아로니아 추출물의 chemical profile에

서 전립선비대 개선 활성과 가장 높은 연관성을 보여준 peak를 선정하고, 각 peak별 retention time과 표준품의 UV, MS값을 비교하여 지표성분으로 설정함.

(4) 고정상 및 이동상의 최적화

아로니아 추출물에 대한 최적의 시험법 설정을 위하여 컬럼 및 용매 농도구배, 시료 전처리 등을 다양화함. 0~100 % 아세트나이트릴, 0~100% 메탄올, 증류수를 이용하여 다양한 농도구배로 시험하여 peak resolution이 가장 우수한 최적 배합비율을 도출함. Formic acid 및 acetic acid 첨가에 따른 peak resolution 향상 여부를 확인함. 이 크게 향상되는 것으로 나타났음. 이러한 결과를 바탕으로 아래와 같이 HPLC 분석조건을 확립함.

(5) 검출과장 최적화

PDA detector를 이용한 다양한 파장에서 아로니아 추출물의 chemical profile을 확보하고 가장 우수한 peak resolution이 관찰된 파장을 검출과장으로 설정함.

6. 3차년도 협동연구기관 - 안전성평가연구소

가. 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구

(1) 염증억제 기전

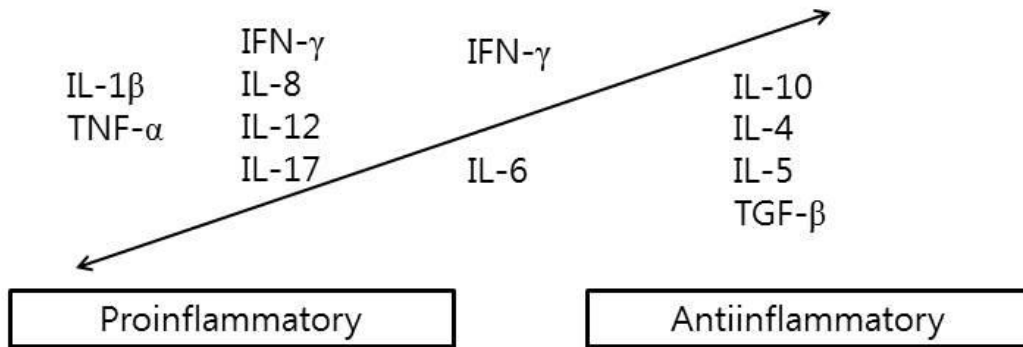
(가) 염증세포 침윤 정도 및 종류 분석

Benign prostate hyperplasia(BPH)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 CD4+ helper T cell 과 만성 염증의 지표인 macrophage의 조직 내 침윤정도를 조직병리학적으로 분석함. 이를 위하여 면역조직화학염색을 실시함. 면역조직화학염색 과정은 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절하여 탈파라핀, 수화 과정을 거쳐 10% 과산화수소수에 담가 내인성 효소반응을 억제함. 그 후 antigen retrieval 과정을 거친 후 cell differentiation을 위한 1차 항체로 monoclonal CD4 antibody 및 monoclonal CD68을 1:200으로 희석하여 사용함. 이 후 biotinylated 2차 항체 및 발색 시스템은 LSAB kit(Dako, Glostrup Denmark)의 매뉴얼을 참조하여 진행함. 대조염색으로는 Mayer's hematoxylin으로 염색 후 봉입하여 광학현미경 하에서 검경함.

(나) Pro & Anti inflammatory cytokines 발현 분석

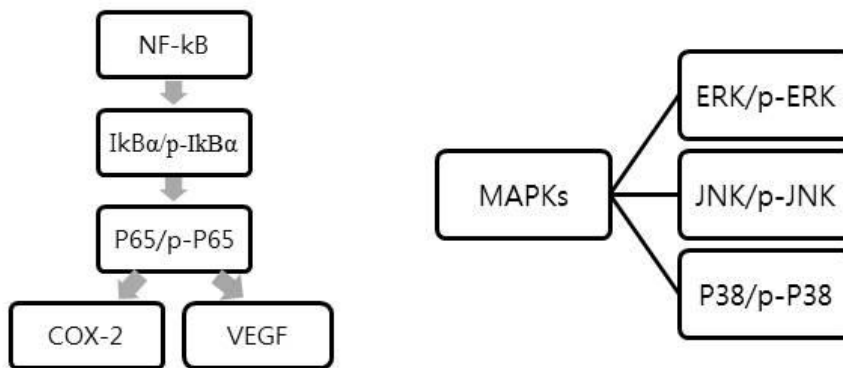
전립선비대질환에 있어 중요한 염증성 cytokine으로 알려진 IL-17 및 IL-15를 비롯하여 Pro-inflammatory cytokine TNF- α , IFN- γ 발현과 anti-inflammatory cytokine IL-10, TGF- β 발현을 western blot을 통해 변화 양상을 분석함. 조직균질액은 3000 rpm에서 6분간 원심분리하여 상등액을 수거하고 Bradford 법으로 단백질을 정량함. 각 군간 50 μ g protein을 기준으로 8, 10, 15% SDS gel에 전기영동하고 I-blot system을 이용하여nitrocellulose membrane에 transfer를 시행함. 5% skim milk로 blocking을 시행하고 각 cytokine의 1차 항체로 4 °C overnight incubation을 진행함. washing 후 2차 항체와 반응시키고 ECL solution을 membrane에 고르게 뿌리고 Chemidoc

에 넣어 develop함. western blotting 기법은 Bio-rad 사(Hercules, CA, USA)의 매뉴얼을 참조하여 진행함.



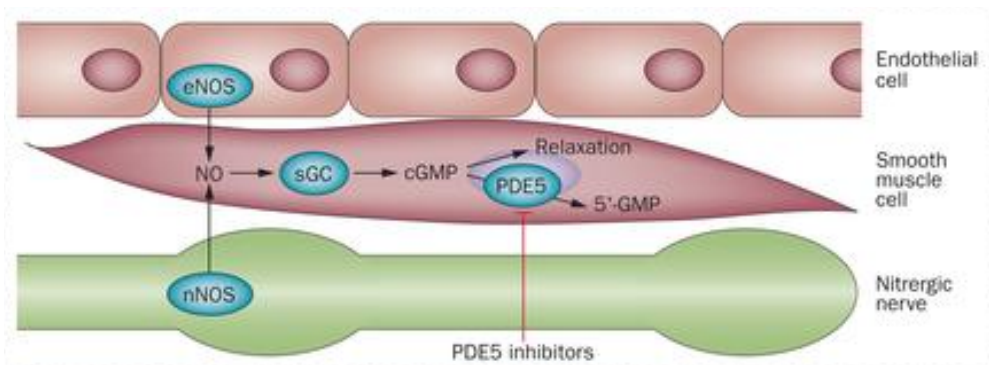
(다) 염증 매개 신호전달 시스템 분석

전립선 조직 내 염증 기전 연구를 위하여 아래 도표로 나타낸 대표적 신호전달 단백질 발현과 그 인산화 정도를 평가하여 어떤 경로가 활성화 되어있는지 분석



(2) 평활근 수축 억제 기전

전립선 비대로 인한 2차적인 hypoxia와 이로 인한 평활근 수축과 관련된 인자로서 nNOS 및 PDE-5 발현량 변화를 real time PCR 과 Western blotting 기법을 이용하여 측정하고 조직에서는 Picro Sirius-Red staining을 통해 콜라겐 섬유조직 증식여부 및 면역조직화학염색을 통해 α-SMA(smooth muscle actin) 발현 양상의 변화를 분석함. 특수염색인 sirius-red 염색법은 Picro Sirius Red Stain Kit (abcam, Cambridge, UK)를 참조함.



<Nature reviews Urology 11, 231-241 (2014)>

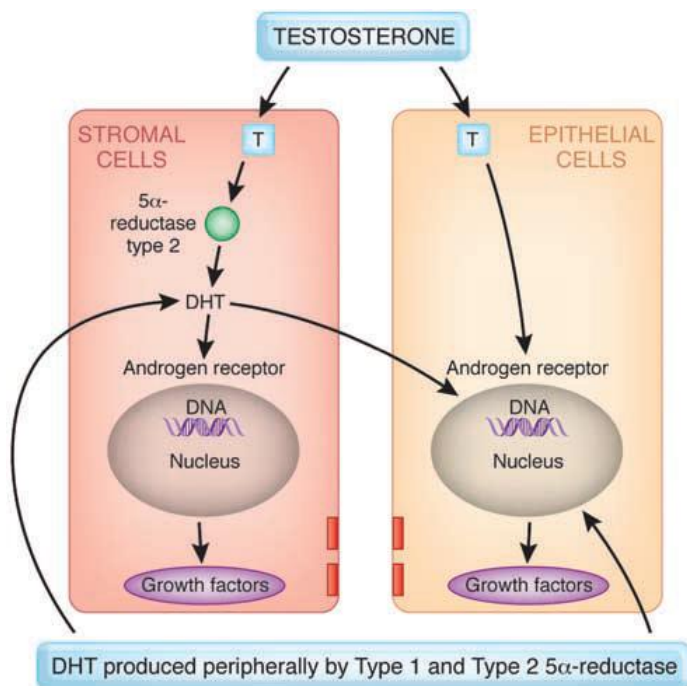
(3) 호르몬 작용 억제 기전

(가) 전립선조직에서 dihydrotestosterone 분석

전립선 조직에서의 DHT 측정은 ELASA assay를 통하여 측정하며 전립선 균질액은 전립선무게의 4배의 pH7.4의 phosphate buffer를 가하여 homogenation 후 5,000rpm으로 10분간 원심분리 후 상등액을 취하여 실험에 사용함.

(나) 전립선 조직에서 androgen receptor(AR), 5 α -reductase type 1 & 2 (SRD5A1 & SRD5A2) 발현 분석

전립선 조직에서 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하고 Reverse transcription(Qiagen RT kit 사용)을 실시함. 만들어진 cDNA를 샘플 당 100ng씩 이용하여 SYBR green real time PCR을 실시하여 정량함. 또한 전립선 균질액에서 추출한 단백질로 western blot을 실시하여 반정량적 분석을 실시하여 mRNA 발현량과 비교함.



<Internatoinal Journal of Impotence Research 20, 11-18 (2008)>

제2절 1차년도(2016년) 연구개발 수행결과

1. 2016년도 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	아로니아 추출물의 원료 및 건 강기능식품 소재 제조 공정 표준 화, 표준화 관련 자료 확보	- 원료표준화	- 원료의 표준화 1. 농가별 아로니아 크기, 색깔, 송이당열매수, 열매모양 표준화 2. 농가별 아로니아 안토시아닌, pH, 당도, 항산화력 검토	농가별 아로니아 분석결과와 진주, 순천지역의 아로니아가 덜익고, 주름이 많음(날씨의 영향이 많음), 거창, 인천, 진천, 옥천 지역의 아로니아가 상태가 좋음.
		- 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화	- 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화 1. 아로니아 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립 2. 아로니아의 안토시아닌 함량 확인 3. 아로니아 안토시아닌 지표물질중 기능성분 확인- 아로니아 추출물/아로니아 액산분말의 항염증 실험결과	아로니아 표준물질의 표준화함. 아로니아 HPLC 분석조건을 확립함 아로니아 안토시아닌 지표물질의 기능성분 확인을 위하여 항염증 실험결과를 도출함
		- 건강기능식품소재 제조공정 표준화(아로니아추출물)	- 제조공정 표준화 1. 세척공정표준화(버블세척 1, 버블세척2, 버블세척 3회) - 색깔 확인 및 당도 확인 2. 착즙공정 표준화(착즙 압력 1, 2),(착즙 횟수 1, 2회) - 착즙수율 및 당도 확인 3. 농축 및 살균 공정 확립	세척공정은 3회로 표준화함 착즙공정은 착즙회수 1회로 한정하며, 착즙수율은 60%로 정함 농축온도는 60℃, 살균공정은 80℃, 10분으로 정함.
		- 원료 표준화를 위한 공정표 개발 및 제시	- 원료 표준화를 위한 공정표 개발 및 제시 1. 전국 6곳의 표준화 공정에 따른 성상변화 2. 공정표 개발 및 제시	원료 표준화를 위한 전국 농가중 6곳의 아로니아의 안토시아닌, 항산화력, 당도를 확인함 공정표를 확립하고, 제시함
	아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립	- 아로니아 추출물의 제조	-아로니아 추출물의 제조 1. 아로니아 건조 2. ASE 추출장치를 이용한 아로니아 추출물 제조 3. 아로니아 추출물의 농축 및	추출변수를 결정하고, Box-Behnken design에 따라 추출조건을 설정한 후 가속용매추출장치(ASE, PSE)를 이용하여

선 비대 개선 효능 평가		건조	아로니아 추출물을 제조하였음.
	- 가속용매추출 장치의 추출변수 설정 및 추출물 제조	ASE 추출장치를 이용한 아로니아 추출물 제조	
	- 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 평가	1. SD rat으로부터 5 alpha reductase 효소원 추출 2. 효소원을 이용한 5-alpha reductase 저해 활성 평가 3. LNCaP cells 배양 4. 아로니아 추출물 및 testosterone의 cytotoxicity 평가 5.Type II 5 alpha reductase (SRD5A2) transformation 6. SRD5A2 transfection 및 DHT 생성량 평가	전립선비대증의 주요 병리학적 마커인 5-alpha reductase 효소에 대한 저해능 평가를 위해 testosterone로부터 생성되는 DHT의 생성량 변화를 측정하였음.
아로니아 추출물의 최종 시료 선정을 위한 1차 <i>in vivo</i> 평가	- <i>in vitro</i> 실험 결과 토대로 한 시료선정 하기 위한 전립선비대 유도 rat 실험	1.실험재료 준비 2.실험동물의 조건확립 3.전립선비대 <i>in vivo</i> model의 확립 4.시료의 투여 5.실험동물의 체중변화 6.부검 및 시료의 채취 7.Prostate Index (PI) 8.혈액분석 9.혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석 10.조직병리학적 평가	동물실험 수행중에 있음. (총 36마리 중 군당 6마리씩 36마리사용. 통계처리를 위한 최소한의 숫자로 6마리씩 설정하였으며 여분동물은 사용하지 않음.)

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>- 원료의 표준화</p> <p>1. 농가별 아로니아 크기, 색깔, 송이당열매수, 열매모양 표준화</p> <p>2. 농가별 아로니아 안토시아닌, pH, 당도, 항산화력 검토</p>	<p>1. 안토시아닌 함량 : 아로니아 분석 시료를 100ul를 A와 B 용액 900ul와 섞어준 뒤에 510nm와 700nm에서 흡광도를 측정함.</p> <p>2. pH : pH 측정기를 사용함.</p> <p>3. 당도 : 당도측정기를 사용함</p> <p>4. 항산화력 검토 : DPPH radical 시료의 a,a-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 측정함하였는데, Blois(Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26: 1199-1200)의 방법을 변형하여 측정함.</p>	<p>농가별 아로니아 크기, 색깔, 송이당열매수, 열매모양 표준화하고, 농가별 아로니아 안토시아닌, pH, 당도, 항산화력 검토함.</p>
<p>- 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화</p> <p>1. 아로니아 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립</p> <p>2. 아로니아의 안토시아닌 함량 확인</p> <p>3. 아로니아 안토시아닌 지표물질중 기능성분 확인- 아로니아 추출물/아로니아 액산분말의 항염증 실험결과</p>	<p>- HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량법 : 안토시아닌을 정량하기 위한 cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside는 Polyphenols Laboratories (Sandnes, Norway)구입 한후, Column은 YMC-Pack ODS AM 250x4.6 mml(USA)이고, column temperature는 30℃을 유지함. flow rate는 0.8ml/min이었고, solvent A는 a-water/, solvent B는 acetonitrile로 사용함.</p>	<p>아로니아 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립하고, 아로니아의 안토시아닌 함량 확인하였음.</p> <p>아로니아 안토시아닌 지표물질중 기능성분 확인- 아로니아 추출물/아로니아 액산분말의 항염증 실험결과를 도출하였음.</p>
<p>- 제조공정 표준화</p> <p>1. 세척공정표준화(버블세척 1, 버블세척 2, 버블세척 3회) - 색깔 확인 및 당도 확인</p> <p>2. 착즙공정 표준화(착즙</p>	<p>1. 안토시아닌 함량 : 아로니아 분석 시료를 100ul를 A와 B 용액 900ul와 섞어준 뒤에 510nm와 700nm에서 흡광도를 측정함.</p> <p>2. pH : pH 측정기를 사용함.</p> <p>3. 당도 : 당도측정기를 사용함</p>	<p>세척공정표준화(버블세척 1, 버블세척 2, 버블세척 3회)하여 색깔 및 당도 확인하고, 착즙공정 표준화(착즙 압력 1, 2),(착즙 횟수 1, 2회)하여, 착즙 수율과 당도를 확인하였음.</p>

<p>압력 1, 2),(착즙 횟수 1, 2회) - 착즙 수율 및 당도 확인</p> <p>3. 농축 및 살균 공정 확립</p>	<p>4. 항산화력 검토 : DPPH radical 시 료 의 a,a-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 측정함하였는데, Blois(Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26: 1199-1200)의 방법을 변형하여 측정함.</p>	<p>농축 및 살균 공정 확립하였음. 원료 표준화를 위한 전국 농가중 6곳의 아로니아의 안토시아닌, 항산화력, 당도를 확인하고 공정표를 확립하고, 제시함</p>
<p>- 원료 표준화를 위한 공정표 개발 및 제시</p> <p>1. 전국 6곳의 표준화 공정에 따른 성장변화</p> <p>2. 공정표 개발 및 제시</p>		
<p>아로니아 추출물 제조</p>	<p>추출변수 설정 및 가속용매추출장치를 이용한 추출물 제조</p>	<p>추출변수를 결정하고, Box-Behnken design에 따라 추출조건을 설정한 후 가속용매추출장치(ASE, PSE)를 이용하여 아로니아 추출물을 제조</p>
<p>아로니아 추출물의 <i>in vitro</i> 전립선 비대증 개선 효능 평가</p>	<p>흰쥐 유래 효소원 및 전립선세포주를 이용한 5-alpha reductase 저해 활성 평가</p>	<p>전립선비대증의 주요 병리학적 마커인 5-alpha reductase 효소에 대한 저해능 평가를 위해 testosterone로부터 생성되는 DHT의 생성량 변화를 측정</p>
<p>아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 <i>in vivo</i> 평가</p>	<p>Wistar rat을 이용한 <i>in vivo</i> 평가</p>	<p>Wistar rat에서 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능평가를 실시중에 있음.</p>

3. 연구수행 결과

□ 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥

가. 아로니아 크기, 모양, 색깔 선별

아로니아 원료는 다음과 같은 지역의 농가에서 수집하여, 1차 선별함.

지역명	농장명	농장주소
부여	최씨농장 (최종성)	(323-852) 충청남도 부여군 남면 회동리91
인천	강화아로니아농장(성재현)	(417-863) 인천광역시 강화군 화도면 홍왕리 1236-2
순창	구림 일품농원 신성기	(595-871) 전북 순창군 구림면 강천로 987
김해	김이군	(621-884) 경상남도 김해시 진례면 시례리 510번지
밀양	송향농장(김송)	(627-883) 경상남도 밀양시 초동면 봉황리 353
안동	서용범	(760-841) 경상북도 안동시 길안면 금곡리 178-1
보은	덕대산농장(이 수현)	(376-881) 충북 보은군 수한면 안내보은로 654-18
영동	손민갈	(370-862) 충청북도 영동군 황간면 회포리69-3
하동	도지은	(667-851) 경상남도 하동군 양보면 장암리
함양	함양아로니아(서진원)	(676-804) 경상남도 함양군 함양읍 월명길 48-8
진안	진안고원아로니아농원	(567-803) 전라북도 진안군 진안읍 구룡리 901
포항	은재산아로니아농원	(790-841) 경상북도 포항시 남구 대송면 장동리 흥계길220번길 11-2
청송	솔보라팜 윤금순	(763-851) 경상북도 청송군 현동면 월매리250번지
옥천	가나농원(진순자)	(373-808) 충청북도 옥천군 옥천읍 마암리 94-2
부여	충남농원 강민숙	(323-804) 충남 부여군 동문로 71-13
청양	베리킹덤(김달식)	(345-871) 충청남도 청양군 온곡면 추광리 475
대전	김중철	(300-290) 대전광역시 동구 소호동 68-1번지
의성	김민석	(769-851) 경상북도 의성군 금성면 청로리6-13번지
무주	무주구천동 아로니아팜	(568-811) 전북 무주군 설천면 삼곡리 969
순천	아로니아팜 후곡농장(최문식)	(540-933) 전라남도 순천시 송광면 후곡리 413번지
옥천	라온플로리아 농장 (박용규)	(373-853) 충청북도 옥천군 군북면 이백2길 1-20
광주	빛고을농원(김제중)	(506-354) 광주광역시 광산구 신통동 397
화성	베리사랑농원(신동엽)	(445-841) 경기도 화성시 비봉면 정학리 566-1
청송	청송아로니아(장시화)	(763-842) 경상북도 청송군 부남면 돌고개길 18
함양	봉수농장(박봉수)	(111-111) 경남 함양군 안의면 귀곡리
청주	청주 아로니아 킹농원	(363-887) 충청북도 청주시 청원구 오창읍 여천리 97
함양	김범석	(111-111) 경남함양군안의귀곡리
임실	박사골영농조합(오홍섭)	(566-913) 전라북도 임실군 삼계면 봉현리
청송	최철현(부부농장)	(763-851) 경상북도 청송군 현동면 월매리 250번지
고령	고령참마음아로니아농장(채경훈)	(717-802) 경상북도 고령군 대가야읍 내곡리 1025
진천	대성 아로니아 농원	(365-802) 충청북도 진천군 진천읍 송두리 272
옥천	이용섭	(373-833) 충청북도 옥천군 동이면 세산리 1263
고령	대가야아로니아 (박은경)	(717-831) 경상북도 고령군 운수면 대평리 1056
괴산	강광복	(367-802) 충청북도 괴산군 괴산읍 수진2길 60번지
거창	달송농장(최말남)	(670-853) 경상남도 거창군 위천면 달산2길 12-7
공주	배 연순	(314-895) 충남공주유곡읍유구리311번지
진주	하릿골 아로니아 농장 (김판호)	(660-841) 경상남도 진주시 문산읍 갈곡리 전801
군산	발산아로니아농장(채창석)	(573-921) 전라북도 군산시 개정면 발산리 443-3
진주	송백작골농장(김철조)	(660-923) 경상남도 진주시 금산면 송백리 564-1번지
진주	청정골 김현 유기농장(안인규)	(660-923) 경상남도 진주시 금산면 송백리 564-1 번지



아로니아 입고 사진

(1) 아로니아 성상

지역명	농가명	크기	색깔	송이당열매수	열매 모양
부여	최씨농장(최종성)	상	진보라	7	상태 좋음
인천	강화아로니아농장	상	검정	8	상태 좋음
순창	구림 일풍농원	중	진보라	7	상태 좋음
김해	김이근님	중	진보라	7	주름짐
밀양	송향농장	하	연보라	6	주름짐
안동	서용범	중	진보라	7	상태 좋음
보은	덕대산농장	상	검정	7	상태 좋음
영동	손인갑	상	검정	7	상태 좋음
하동	도지은	중	검정	6	주름짐
함양	함양아로니아	중	진보라	6	주름짐
진안	진안고원아로니아농원	중	진보라	6	상태 좋음
포항	문제산아로니아농원	중	진보라	7	주름짐
청송	솔보리팍	중	검정	7	상태 좋음
옥천	가나농원	상	검정	9	상태 좋음
부여	충남농원	상	검정	7	상태 좋음
청양	베리킹덤	중	진보라	7	상태 좋음
대전	김중철님	하	진보라	6	주름짐
의성	김민석님	중	진보라	6	상태 좋음
무주	무주구천동 아로니아팍	중	진보라	6	주름짐
순천	아로니아멜라 후곡농장	하	연보라	5	주름짐
옥천	라온뜰아로니아 농장	상	검정	8	주름짐
광주	빛공을농원	하	연보라	5	주름짐
화성	베리사랑농원	중	진보라	6	주름짐
청송	청송아로니아	중	진보라	6	상태 좋음
함양	봉수농장	하	연보라	5	주름짐
청주	청주아로니아 킹농원	중	진보라	6	상태 좋음
함양	김범석님	하	진보라	5	주름짐
임실	박시골영농조합	중	진보라	6	주름짐
청송	부부농장	중	진보라	6	상태 좋음
고령	고령참마음아로니아농장	중	진보라	6	주름짐
진천	대성 아로니아 농원	상	진보라	6	상태 좋음
옥천	이용섭님	상	검정	7	상태 좋음
고령	대가야아로니아	중	진보라	7	주름짐
괴산	강광복님	상	검정	7	상태 좋음
거창	당송농장	상	검정	7	상태 좋음
공주	배영순님	상	검정	7	상태 좋음
진주	하릿골 아로니아 농장	하	연보라	5	주름짐
군산	발산아로니아농장	중	진보라	6	상태 좋음
진주	송백작골농장	하	연보라	5	주름짐
진주	청정골 집현 유기농농장	중	진보라	6	주름짐
거창	한솔농산물	중	검정	6	주름짐
거창	아림교회	상	검정	8	상태 좋음
거창	삼흥식품(하재규)	상	검정	7	상태 좋음

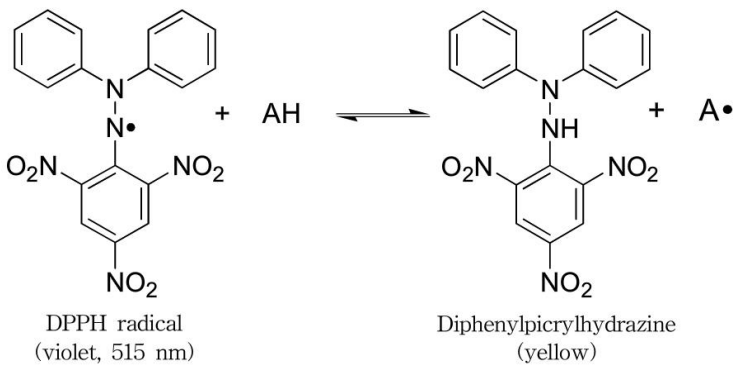
나. 아로니아의 당도, pH, 항산화력, 안토시아닌 함량

항산화력은 DPPH radical을 측정하며, 안토시아닌 함량은 흡광도 측정법으로 측정함.

(1) DPPH radical

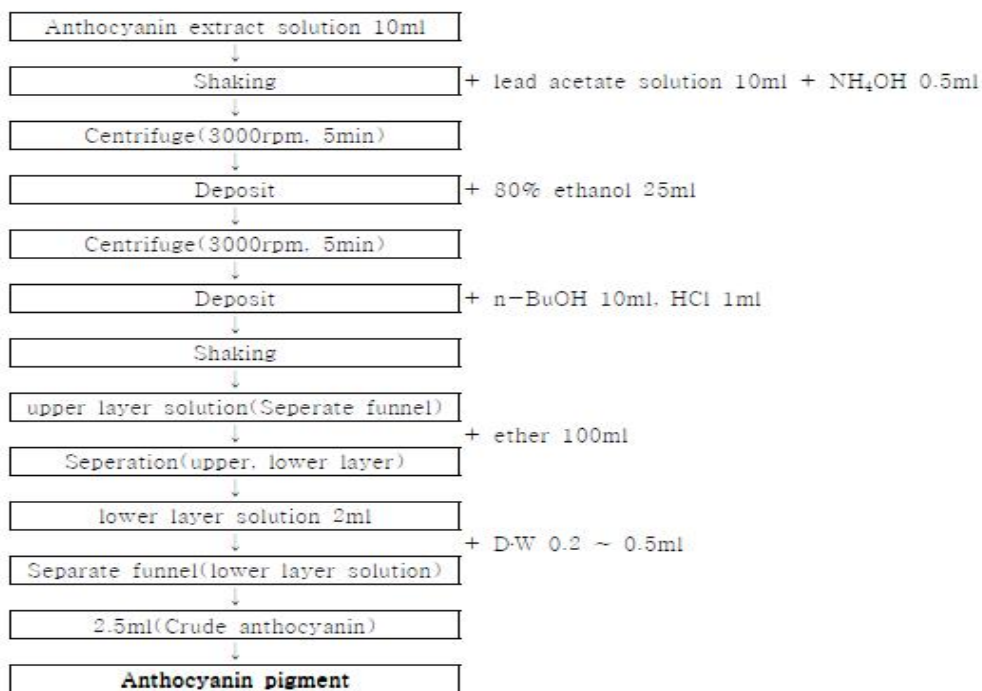
시료의 a,a-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였음. DPPH radical 소거능은 Blois(Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26: 1199-1200)의 방법을 변형하여 측정하였음. 즉, 각 시료용액 30 μl에 0.2 mM DPPH 200 μl를 가하여 혼합하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 다음의 계산식으로부터 산출하였음. 양성대조군으로 Ascorbic acid를 사용하였음.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}}\right) \times 100$$



항산화 방법중 DPPH radical의 원리.

(2) 안토시아닌 추출방법



(가) Sample 은 ①아로니아 배즙, ②아로니아 원액, ③아로니아 농축액, ④자색고구마 농축액으로 실시함

(나) Sample 준비 :

- 시료 0.2ml , 1ml에 0.1%HCl 포함된 메탄올을 10ml을 넣고 2시간 이상 빛을 차단하여 혼합하여, 3000rpm에 30분간 원심분리한 후 상등액을 분석시료로 사용함.
- 0.2M KCl 용액을 0.2M HCl 용액으로 pH 1.0을 맞춘 A 용액을 만듦.
- 0.2M potassium phosphate를 0.1M citric acid를 첨가하여 pH 4.5로 맞춘 B 용액을 만듦.

(다) 실험방법

아로니아 분석시료를 100ul를 A와 B 용액 900ul와 섞어준 뒤에 510nm와 700nm에서 흡광도를 측정하였음. 안토시아닌 함량(mg/100g)은 cyanidin-3-glucoside의 몰흡광계수(26,900)를 이용하여 다음식에 의해 표시하였음.

$$\text{Anthocyanin content (mg/100g)} = \frac{A \times mw \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

(라) 조건 :

- A : (OD510nm - OD700nm)pH1.0-(OD510nm - OD700nm) pH4.5
- mw: molecular weight for cyanidin-3-glucoside (g) (449.2)
- DF: dilute factor
- 시료를 ml당으로 환산 :1000 ϵ : cyanidin-3-glucoside molar absorbance(26,900)

(3) 결과

지역명	농가명	pH	당도	항산화력	안토시아닌 함량 (mg/100g)
부여	최씨농장(최종성)	5.8	11	86.5	145
인천	강화아로니아농장	5.4	12	87.4	150
순창	구림 일풍농원	6.0	12	82.5	152
김해	김이근님	6.2	11	81.6	144
밀양	송향농장	6.4	9	80.6	140
안동	서용범	6.0	12	82.6	152
보은	덕대산농장	5.4	12	82.6	152
영동	손인갑	5.4	12	82.4	155
하동	도지은	6.0	11	81.9	148
함양	함양아로니아	5.8	10	80.9	145
진안	진안고원아로니아농원	6.0	12	82.3	152
포항	문제산아로니아농원	6.0	12	82.1	152
청송	솔보리팜	5.4	12	82.3	154
옥천	가나농원	5.4	13	85.0	158

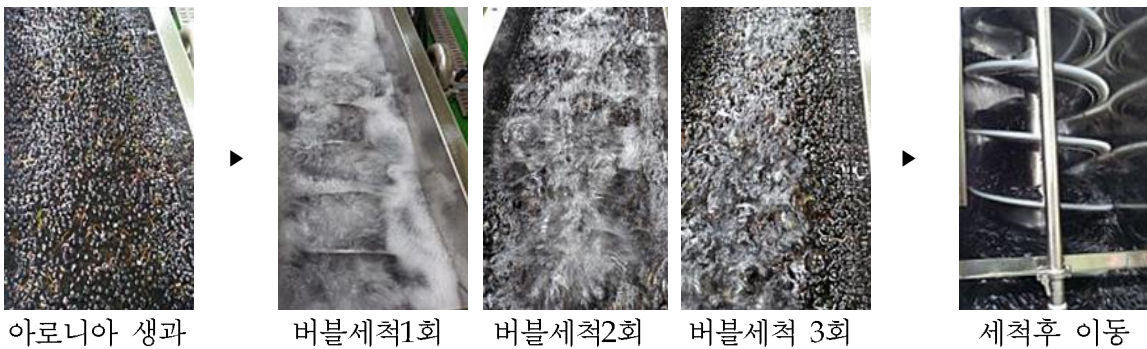
부여	충남농원	5.6	12	82.6	156
청양	베리킹덤	6.0	12	82.4	153
대전	김중철님	6.0	12	82.4	152
의성	김민석님	6.0	12	82.1	155
무주	무주구천동 아로니아팜	6.0	12	83.6	152
순천	아로니아멜라 후곡농장	6.2	10	80.8	142
옥천	라온뜰아로니아 농장	5.4	13	85.2	162
광주	빛공을농원	6.2	10	80.8	144
화성	베리사랑농원	6.0	12	82.4	158
청송	청송아로니아	5.8	12	82.6	157
함양	봉수농장	6.2	11	81.2	156
청주	청주아로니아 킹농원	6.0	11	81.2	156
함양	김범석님	6.2	10	80.9	146
임실	박시골영농조합	6.0	12	82.6	152
청송	부부농장	6.0	11	80.3	148
고령	고령참마음아로니아농장	6.0	12	82.3	152
진천	대성 아로니아 농원	6.0	12	83.6	152
옥천	이용섭님	5.4	13	85.4	157
고령	대가야아로니아	5.8	11	81.3	148
괴산	강광복님	5.4	12	82.6	152
거창	당송농장	5.4	12	82.4	152
공주	배영순님	5.4	12	82.6	160
진주	하릿골 아로니아 농장	6.4	9	79.9	142
군산	발산아로니아농장	6.0	12	82.3	162
진주	송백작골농장	6.4	10	80.9	145
진주	청정골 집현 유기농농장	6.2	9	80.3	140
거창	한솔농산물	5.4	11	87.4	158
거창	아림교회	5.2	12	88.9	162
거창	삼흥식품(하재규)	5.6	14	87.8	160

DPPH radical (%) 경우 대조군 Ascorbic acid는 93.6%

다. 공정 표준화

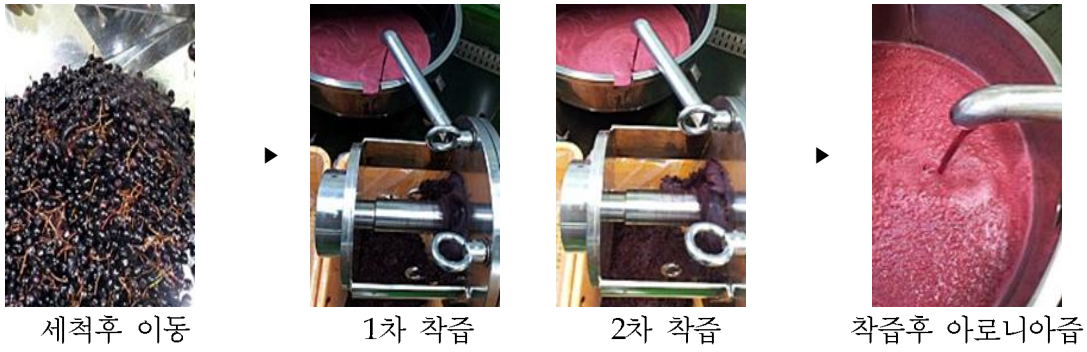
거창의 자사의 아로니아로 공정표준화를 확립하였음.

(1) 세척공정표준화(버블세척 1, 버블세척2, 버블세척 3회) - 색깔 확인 및 당도 확인



	세척전	1차세척후	2차세척후	3차세척후
당도	14	13	13	12
색깔	검정	검정	검정	검정
상태확인	양호	양호	양호	양호

(2) 착즙공정 표준화(착즙 압력 1, 2),(착즙 횟수 1, 2회) - 착즙 수율 및 당도 확인



세척후 이동

1차 착즙

2차 착즙

착즙후 아로니아즙

	착즙압력 1		착즙압력2	
	착즙회수1	착즙횟수2	착즙회수1	착즙횟수2
당도	12	12	12	12
착즙수율	55.5	70.2	60.0	70.5

라. 전국 6곳의 표준화 공정에 따른 성상변화

(1) 세척 표준화에 따른 당도

		세척전	1차세척후	2차세척후	3차세척후
인천	강화아로니아농장	12	11	11	10
거창	삼흥식품	14	13	13	12
순천	아로니아멜라 후곡농장	10	9	9	9
옥천	리온뜰아로니아 농장	13	12	12	11
진주	창장골 집현 유기농농장	9	8	8	8
진천	대성 아로니아 농원	12	11	11	11

(2) 세척 표준화에 따른 색깔

		세척전	1차세척후	2차세척후	3차세척후
인천	강화아로니아농장	검정	검정	검정	검정
거창	삼흥식품	검정	검정	검정	검정
순천	아로니아멜라 후곡농장	연보라	연보라	연보라	연보라
옥천	리온뜰아로니아 농장	검정	검정	검정	검정
진주	창장골 집현 유기농농장	진보라	진보라	진보라	진보라
진천	대성 아로니아 농원	진보라	진보라	진보라	진보라

(3) 3차 세척후 착즙 표준화에 따른 당도

		착즙압력1		착즙압력2	
		착즙회수1	착즙횟수2	착즙회수1	착즙횟수2
인천	강화아로니아농장	10	10	10	10
거창	삼흥식품	12	12	12	12
순천	아로니아멜라 후곡농장	9	9	9	9
옥천	리온뜰아로니아 농장	11	11	11	11

진주	창정골 집현 유기농농장	8	8	8	8
진천	대성 이로나아 농원	11	11	11	11

(4) 3차 세척후 착즙 표준화에 따른 착즙수율

		착즙입력 1		착즙입력 2	
		착즙화수1	착즙화수2	착즙화수1	착즙화수2
인천	강화이로나아농장	554	700	602	704
거창	삼흥식품	555	702	600	705
순천	이로나아멜라 후곡농장	502	655	550	656
옥천	리온뜰이로나아 농장	555	701	586	702
진주	창정골 집현 유기농농장	556	704	603	704
진천	대성 이로나아 농원	555	702	600	705

(5) 3차 세척후 착즙 표준화에 따른 안토시아닌 함량

		착즙입력 1		착즙입력 2	
		착즙화수1	착즙화수2	착즙화수1	착즙화수2
인천	강화이로나아농장	150	150	150	150
거창	삼흥식품	160	160	160	160
순천	이로나아멜라 후곡농장	142	142	142	142
옥천	리온뜰이로나아 농장	162	162	162	162
진주	창정골 집현 유기농농장	140	140	140	140
진천	대성 이로나아 농원	152	152	152	152

(6) 3차 세척후 착즙 표준화에 따른 항산화력

		착즙입력 1		착즙입력 2	
		착즙화수1	착즙화수2	착즙화수1	착즙화수2
인천	강화이로나아농장	874	874	874	874
거창	삼흥식품	878	878	878	878
순천	이로나아멜라 후곡농장	808	808	808	808
옥천	리온뜰이로나아 농장	852	852	852	852
진주	창정골 집현 유기농농장	803	803	803	803
진천	대성 이로나아 농원	836	836	836	836

마. 농축 및 살균 후의 결과

(1) 농축 및 살균에 따른 당도

		농축		살균	
		60℃	70℃	80℃ 10분	80℃ 30분
인천	강화이로나아농장	10	12	12	12
거창	삼흥식품	12	14	14	14
순천	이로나아멜라 후곡농장	9	11	11	11
옥천	리온뜰이로나아 농장	11	13	13	13
진주	창정골 집현 유기농농장	8	10	10	10
진천	대성 이로나아 농원	11	12	12	12

바. 3차 세척후 작즙 표준화에 따른 안토시아닌 함량

		농축		살균	
		60℃	70℃	80℃ 10분	80℃ 30분
인천	강화이로니아농장	148	152	148	130
거창	삼흥식품	158	162	158	139
순천	이로니아멜라 후곡농장	140	144	140	126
옥천	라인뜰이로니아 농장	160	164	160	148
진주	창정골 집현 유기농농장	138	142	138	120
진천	대성 이로니아 농원	150	154	150	134

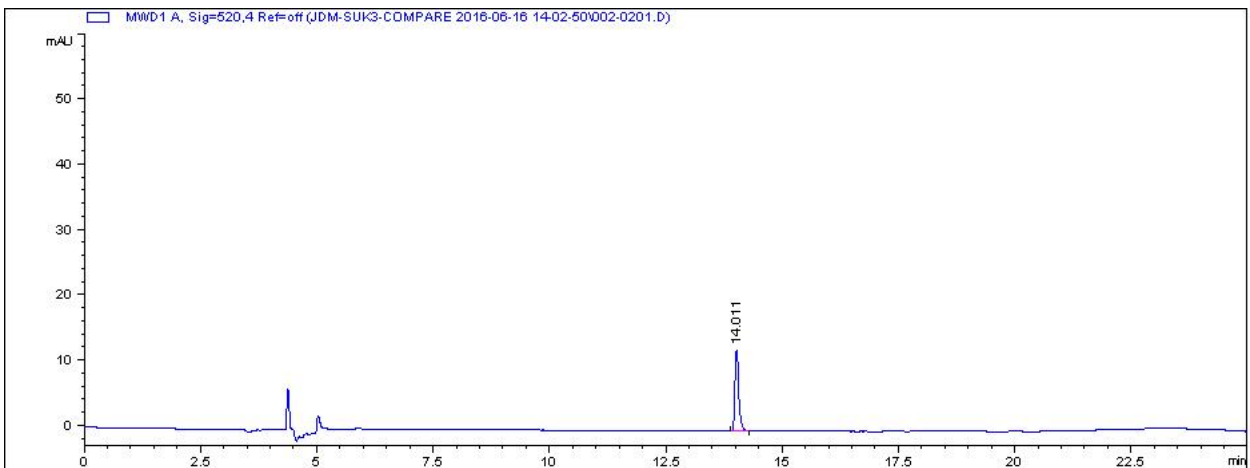
사. 3차 세척후 작즙 표준화에 따른 항산화력

		농축		살균	
		60℃	70℃	80℃ 10분	80℃ 30분
인천	강화이로니아농장	874	852	831	552
거창	삼흥식품	878	856	822	506
순천	이로니아멜라 후곡농장	808	783	741	403
옥천	라인뜰이로니아 농장	852	833	817	532
진주	창정골 집현 유기농농장	803	793	790	466
진천	대성 이로니아 농원	836	816	803	483

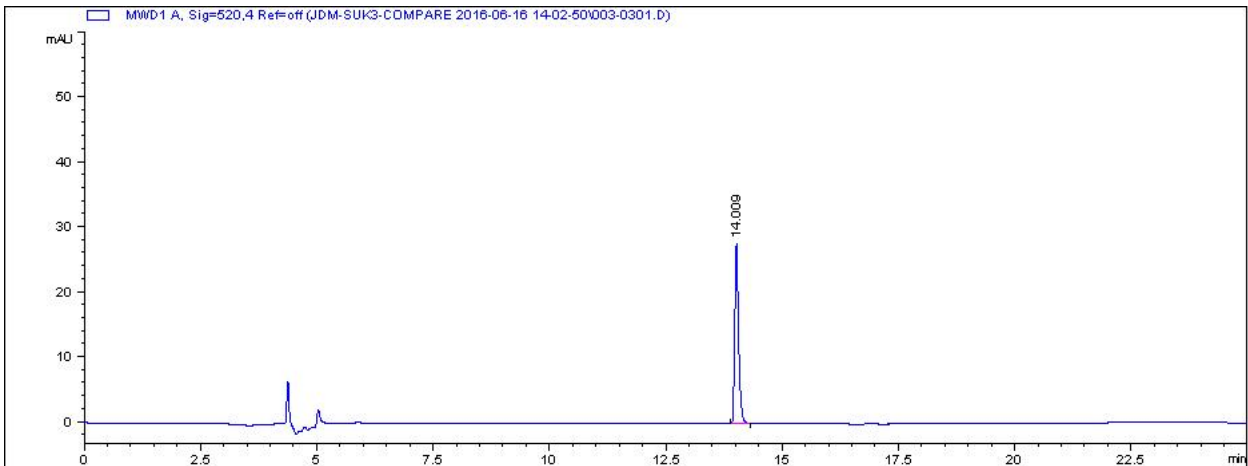
아. 지표 및 확인물질의 분석방법 표준화

(1) 아로니아 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립

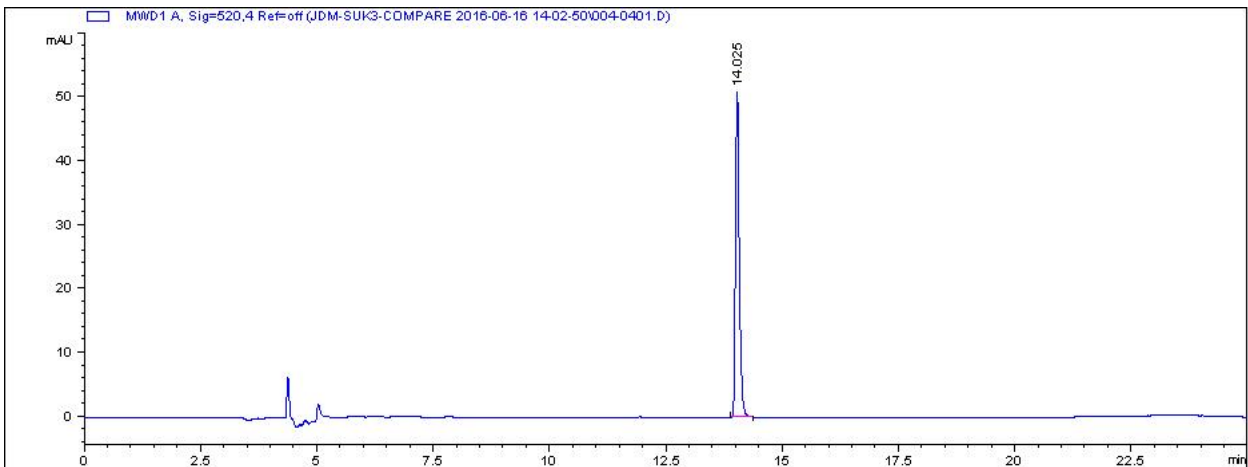
Cyanidin 25 ug/ml



Cyanidin 50 ug/ml



Cyanidin 100 ug/ml



Cyanidin Standard Curve

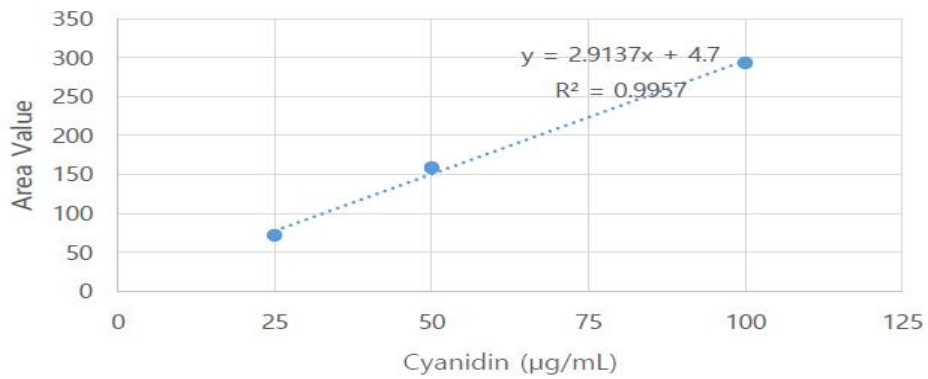


Fig. Cyanidin standard curve.

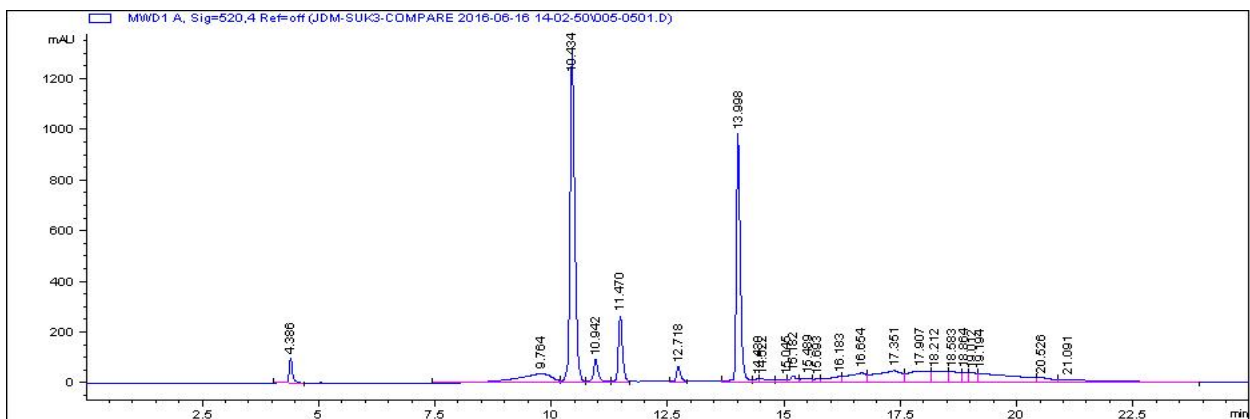
(2) 아로니아의 안토시아닌 함량 확인



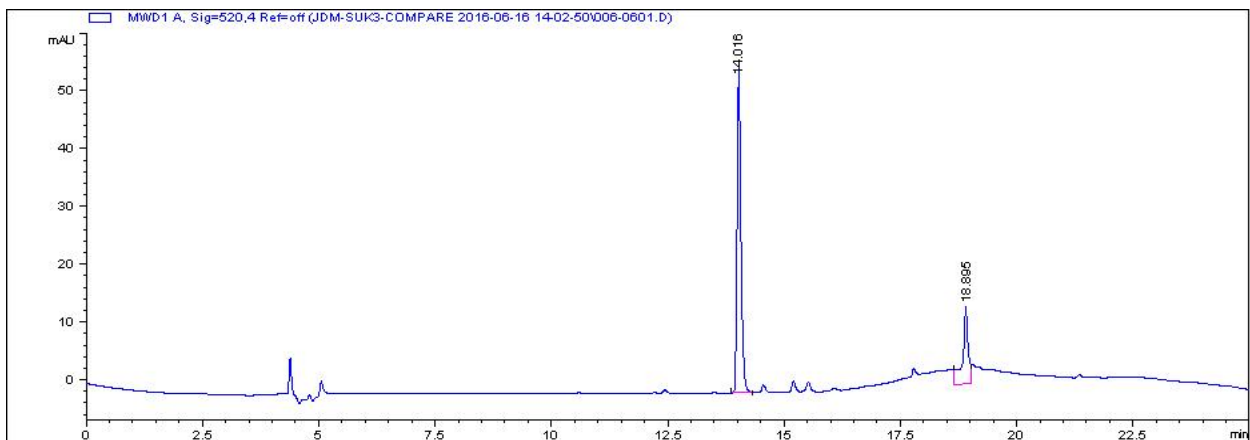
아로니아의 가수분해 작업 및 물질 분리 작업중

아로니아의 안토시아닌 분리 작업

Aronia Hydrolysis(-)



Aronia Hydrolysis (+)

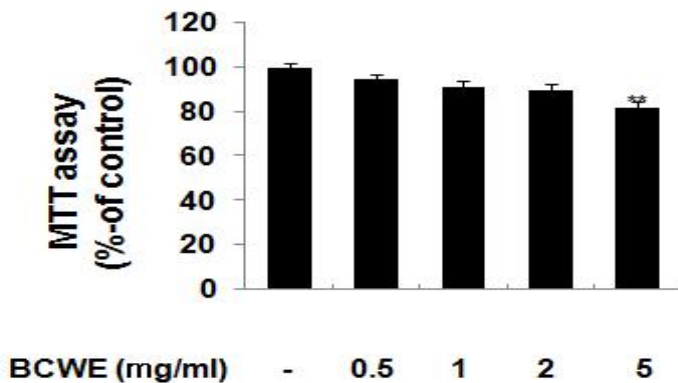


자. 아로니아 안토시아닌 지표물질중 기능성분 확인- 아로니아 추출물의 항염증 실험결과

(1) 세포생존율 측정

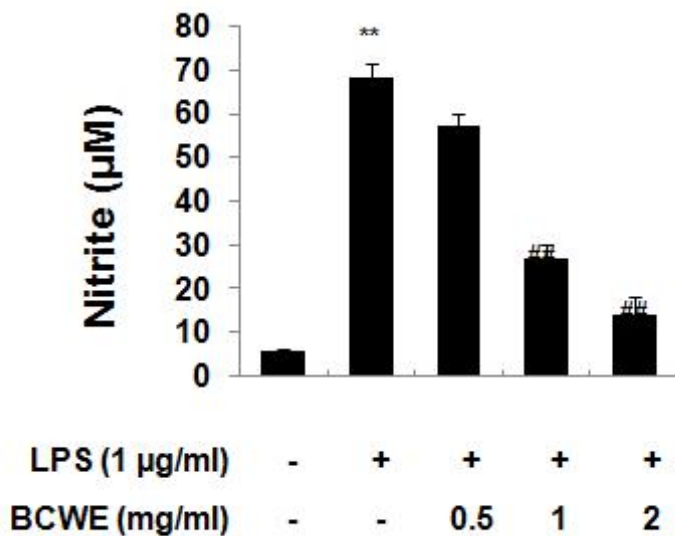
본 실험에 사용한 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korean)로부터 구입하여 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin을 첨가한DMEM 배지로 37°C, 5% CO2 환경에서 배양하였음.

세포 생존율은 MTT assay법을 이용하여 측정하였음. RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 아로니아 시료를 처리하고 24 시간 배양 이후 MTT assay를 수행하였음. 세포 생존율의 측정하기 위해서, 1 ml의 세포배양액(3 x 10⁵ cells/ml in 24-well plates)에 MTT(50 mg/ml) 시약을 첨가하고 4시간 동안 처리한 후 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였음.



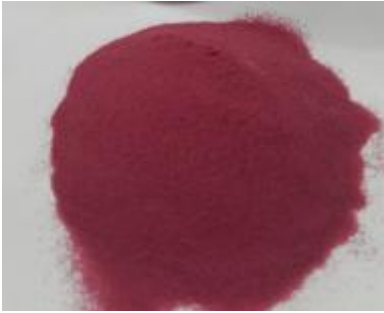
(2) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였음. RAW 264.7 세포는 60 mm cell dish에서 다양한 농도의 아로니아 시료를 1시간 동안 전처리하고 1 ug/ml의 LPS를 처리하여 16시간 배양하였음. 배양액 100 ul와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10 분간 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였음.



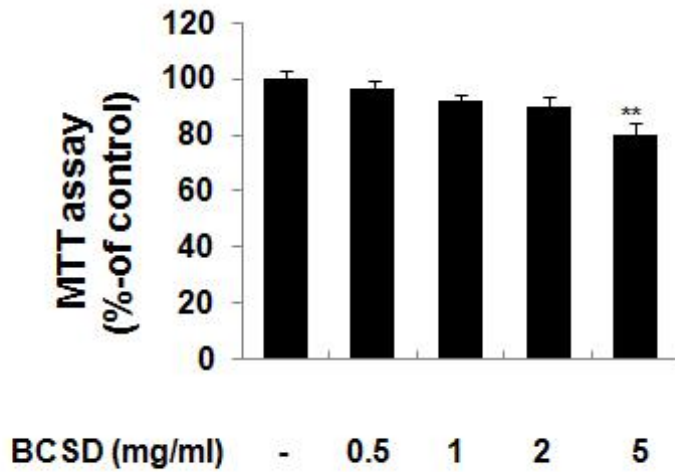
차. 아로니아 안토시아닌 지표물질중 기능성분 확인- 아로니아 액상분말의 항염증 실험결과
 액상분말 시제품은 스프레이 드라이기를 이용하여 제조하였음.

(1) 아로니아 액상 분말 성상

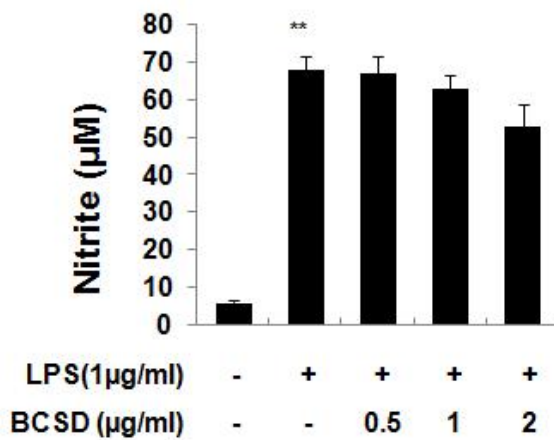


(2) 세포생존율 측정

실험방법은 아로니아 추출물의 방법과 동일

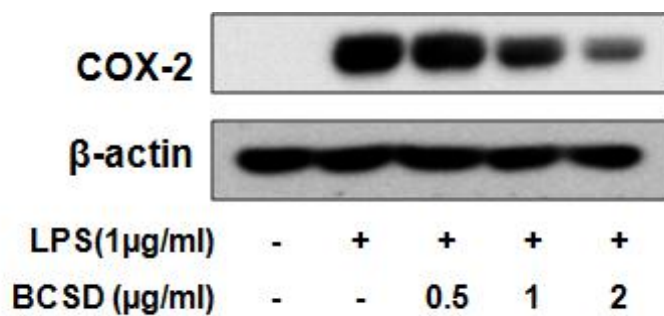


(3) NO 생성량 측정



(4) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 세포를 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 후, RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), protease inhibitors]를 넣어서 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000xg에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 모음. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford assay로 측정하였음. 동일한 양의 단백질은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 poly(vinylidene difluoride) membrane에 transfer하였음. 이 membrane는 blocking buffer (5% skim milk)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰음. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 30분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시킨 다음 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film 상에서 단백질을 확인하였음.



□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 산학협력단

1차년도 목표: 아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 *in vitro* 전립선 비대 개선 효능 평가



1. 아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 *in vitro* 전립선 비대 개선 효능 평가

가. 아로니아 추출물 제조

(1) 아로니아의 건조

- 아로니아의 건조 방법에 따른 활성도 및 주요 성분 변화 분석을 위하여 수확한 생아로니아를 크게 세가지 건조방법인 열풍건조, 냉풍건조, 동결건조방식으로 건조하여 건조물을 제조하였음.
- 열풍건조와 냉풍건조는 현재 시중에서 유통하는 아로니아의 일반적인 건조방법으로 (주)삼흥에서 보유한 설비를 이용하여 건조 후 분말 상태로 공급하였음.
- 동결건조법은 아로니아의 주요 활성성분으로 알려진 안토시아닌 등의 성분 파괴를 최소화할 것으로 기대되는 건조법으로 삼흥으로부터 생아로니아를 공급받은 후 경남과기대에서 보유한 동결건조장치를 이용하여 건조하였음.
- 아로니아 건조시 빛에 의한 기능성성분 파괴를 최소화하기 위하여 모든 과정은 차광 및 저온(< 40°C) 상태에서 진행하였음.

(2) 소형 동결건조기를 이용한 *in vitro* assay용 아로니아 건조물 제조

동결장치 연결 Cell 차광 처리	Freeze Drying 장치 전체 차광을 위한 차광막 설치	
		

(3) 대형 동결건조기를 이용한 *in vivo*용 아로니아 건조물 제조

- 경남과기대 공동실험실습장에 구비된 대형 동결건조장치를 이용하여 냉동보관하던 아로니아 원물을 5일간 동결건조하고 건조가 완료된 건아로니아는 흡습제를 넣어 실험에 사용되기 전까지 냉동보관하였음.



(4) ASE 추출장치를 이용한 아로니아 추출물 제조

- 삼흥으로부터 공급받은 냉풍건조 아로니아를 가속용매추출장치(Accelated Solvent Extractor, ASE)를 이용하여 추출물을 제조하였음.
- ASE추출물은 크게 두가지 장치를 이용하여 진행하였으며, 세포실험용 및 chemical profile 분석을 위한 소량의 추출물 제조를 위해서 thermo ASE를, *in vitro* assay를 통해 활성이 확인된 추출물의 *in vivo* 평가를 위해 안전성평가연구소에 제공할 대량의 시료는 Buchi PSE를 이용하여 진행하였음.
- 추출물의 최적조건 도출을 위하여 아로니아의 추출수율 및 활성도에 영향을 미치는 중요 요인으로서 추출용매, 추출온도, 추출시간을 독립변수를 설정하고, 가속용매추출장치를 이용하여 아로니아 추출물 STD1~13을 제조하였음.

(가) *in vitro* assay용 아로니아 standard 추출물 제조

<Thermo ASE를 이용한 아로니아 추출물 제조>

- 추출장치: Thermo Dionex ASE350
- 독립(조건)변수 설정
 - 건조방법: 냉풍건조
 - 추출용매: 40, 60, 100% 에탄올(주정)
 - 추출온도: 30, 100°C

- 추출시간: 5, 10, 20 min
 - 추출압력: 1700 psi
 - 추출횟수: 1 cycle
- 아로니아 ASE추출조건

Standard #	EtOH (%)	Temperature (° C)	Time (min)
2	100	30	10
4	100	100	10
6	100	50	5
8	100	50	20
9	60	30	5
10	60	100	5
11	60	30	20
12	60	100	20
13	60	50	10
1	40	30	10
3	40	100	10
5	40	30	5
7	40	50	20

(나) *in vivo*용 아로니아 standard 추출물 제조


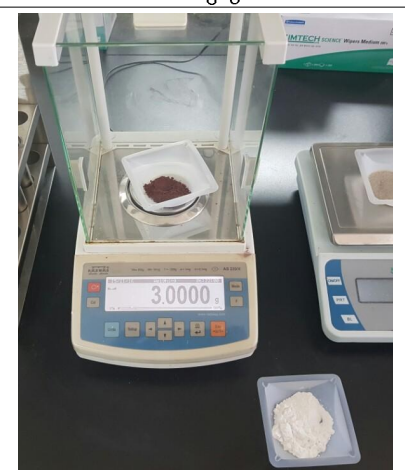


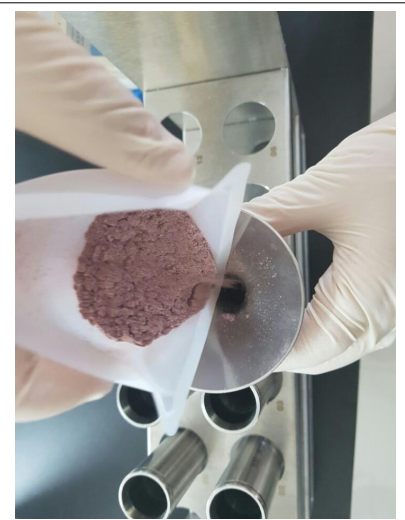
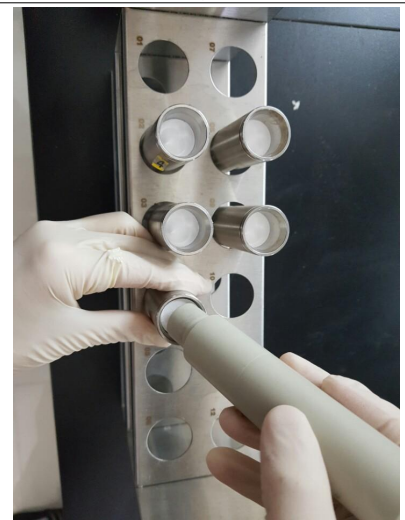
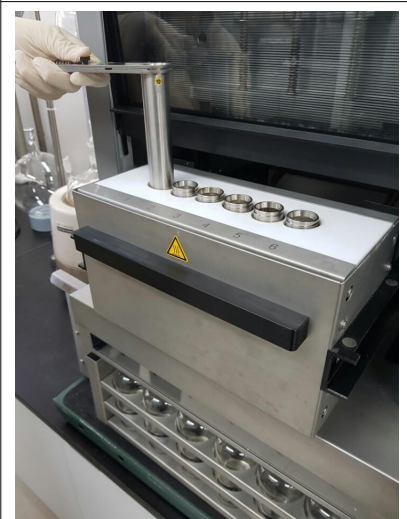


<Buchi Speed Extractor를 이용한 대량 추출물 제조>

○추출장치: Buchi Speed Extractor E-916

○독립(조건)변수 설정

- 건조방법: 냉풍건조
- 추출용매: 40, 60, 100 % 에탄올(주정)
- 추출온도: 30, 100°C
- 추출시간: 5, 10, 20 min
- 추출압력: 100 bar
- 추출횟수: 3 cycle

○아로니아 분말 3 g을 정확히 칭량하여 규조토(Diatomaceous Earth, Celite 545)와 1:3 비율로 혼합한 후 추출용 cell안에 넣어 압축하고 3 cycle로 추출하였음.

<p>1. 냉풍 아로니아</p> 	<p>2. 칭량</p> 	<p>3. 규조토와 혼합</p> 
<p>4. 규조토와 혼합</p> 	<p>5. 추출셀에 혼합물 주입</p> 	<p>6. 시료 압축 및 공기층 제거</p> 
<p>7. 추출셀 삽입</p> 	<p>8. 조건 설정</p> 	<p>9. 차광 및 추출진행</p> 

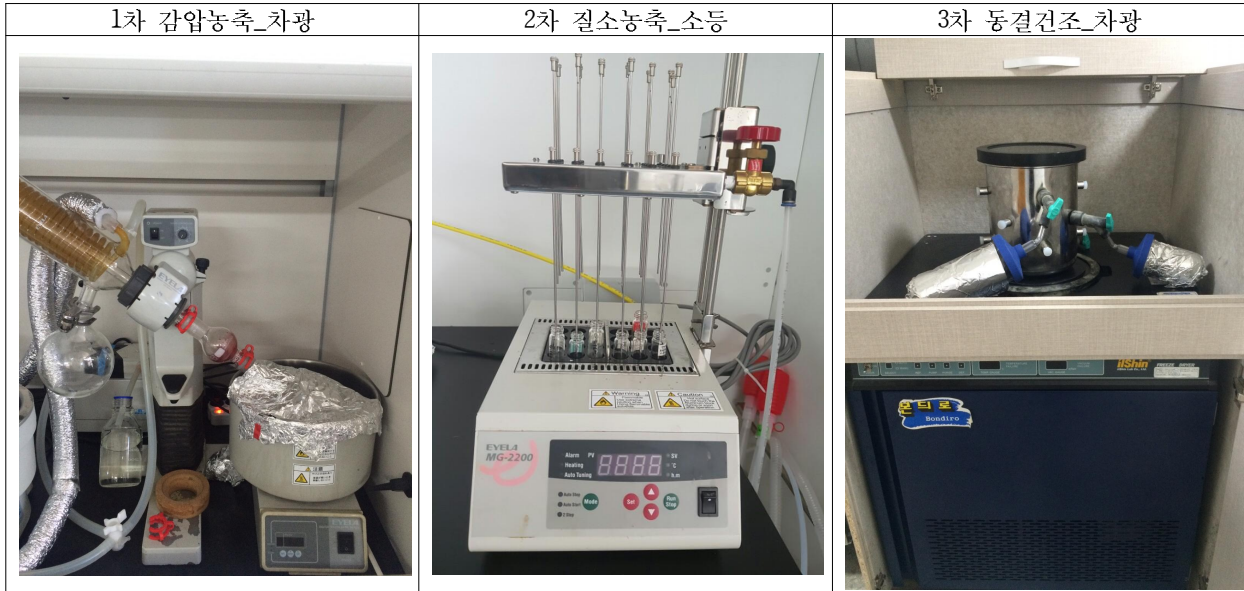
(5) 아로니아 추출물의 농축 및 건조

(가) *in vitro* 및 *in vivo*용 아로니아 추출물의 농축

- ASE 또는 PSE로 추출한 아로니아 추출물은 아로니아 기능성성분의 파괴를 최소화하기 위하여

차광과 저온조건에서 농축을 진행하였음

- 추출물은 1차로 감압농축장치를 이용하여 용매를 제거하고 동일한 추출용매 소량에 녹여 vial로 옮긴 후 질소농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였음. 건조물은 냉동기에 최소 3시간 이상 방치하여 얼리고 동결건조기에서 24시간동안 동결건조하여 수분을 완전히 제거하였음.



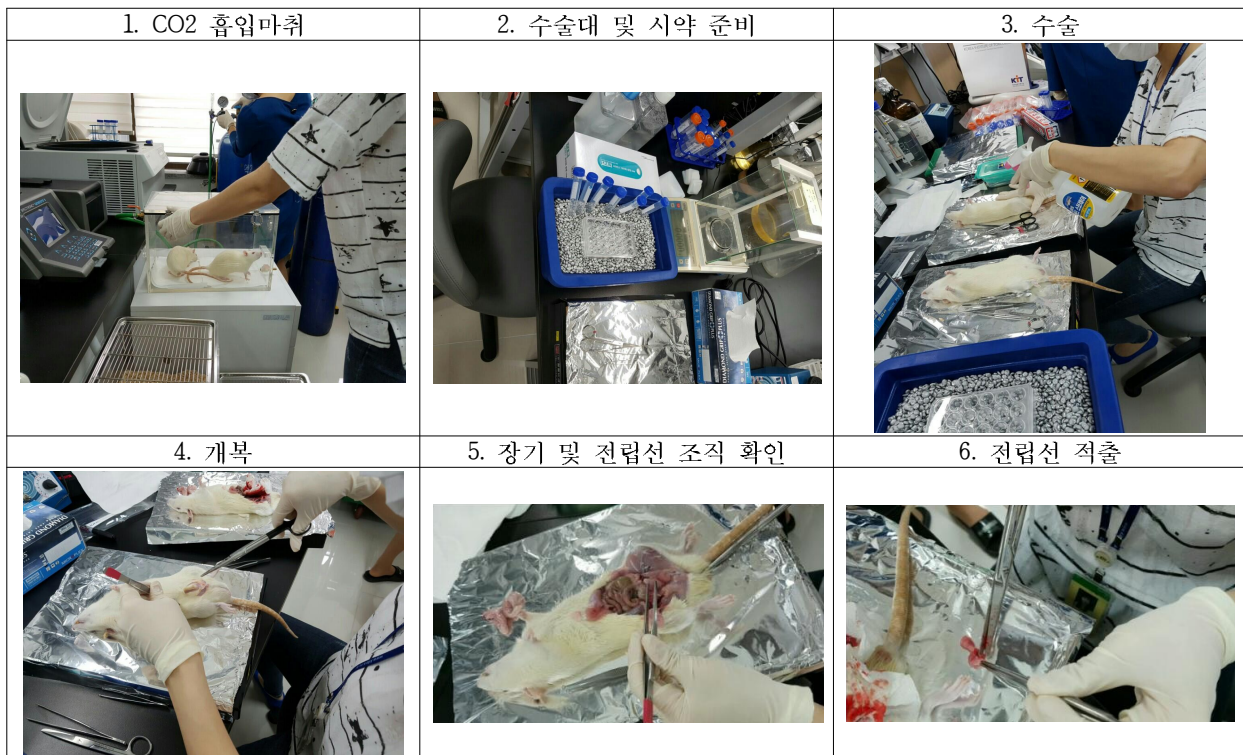
(나) 분석용 아로니아 추출물의 농축

- HPLC 분석용 추출물은 여러 단계의 농축과 용기 이동과정에서 기능성성분의 변화가 일어날 가능성이 있고 이는 미량성분 함량에 큰 영향을 줄 수 있음
- 아로니아 분석용 시료는 가압용매추출장치를 이용한 추출 종료 직후에 추출물 중 일정량을 바로 취하여 membrane filtering (0.45 um)한 뒤, HPLC에 direct injection하여 분석을 실시하였음.

나. 아로니아 *in vitro* 전립선 비대 개선 효능 평가

(1) SD rat으로부터 5-alpha reductase 효소원 추출

- 효소원의 공급을 위하여 15주령 Sprague Dawley rat 11마리를 CO2 흡입마취한 후 prostate를 적출하였음
- 적출한 조직을 pH 7.4 phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척한 후, 전립선 조직 무게의 8배량의 cold PBS를 첨가하고 glass homogenizer로 균질화하였음. 균질액을 4°C, 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 Brand Ford시약을 이용하여 단백질정량을 실시한 후 균질액을 -70° C에 보관하였음.
- 전립선 추출액은 단백질 정량 결과 8.82~10.61 mg/ml 농도로 확인되었으며, 이 효소원을 이용하여 아로니아 추출물의 5-alpha reductase 저해 활성 평가 실험을 진행하였음.



○ 전립선으로부터 추출한 5-alpha reductase 효소원

Rat number	전립선 무게 (mg)	단백질 정량 (ug/ml)
1	610	10.61
2	611	8.82
3	818	9.27
4	595	9.24
5	460	10.20
6	427	9.61
7	620	9.48
8	657	9.82
9	635	9.75
10	530	9.15
11	537	9.80

(2) 효소원을 이용한 아로니아 추출물의 5-alpha reductase 저해활성 평가

- 아로니아 STD1~13의 5-alpha reductase 저해 활성을 평가하기 위하여 균질화된 rat의 prostate, 아로니아 추출물 (50 ug/ml), testosterone 및 β -NADPH를 37°C 에서 반응시킨 후 생성된 dihydrotestosterone (DHT)를 ELISA kit를 이용하여 측정하였음. 총 3회 반복실험하여 평균값을 산정하였음.
- 실험 결과, 아로니아 추출물 STD2, 9, 11번 처리군에서 유의한 DHT 저해 활성이 관찰되었음.
- STD2 추출물의 경우 100% EtOH, 30°C 로 추출한 추출물이고, STD9와 11은 60% EtOH, 30°C 로 추출한 것으로 STD9와 STD11은 추출시간만이 각각 5분과 20분으로 상이함.
- STD9와 STD11은 추출시간에 관계없이 높은 DHT 저해 활성이 관찰되어, 이상의 결과를 통해

추출용매는 100% 또는 60% EtOH, 저온추출조건(추출온도 30℃)에서 추출물의 DHT 저해활성이 높아지는 것으로 관찰되었음.

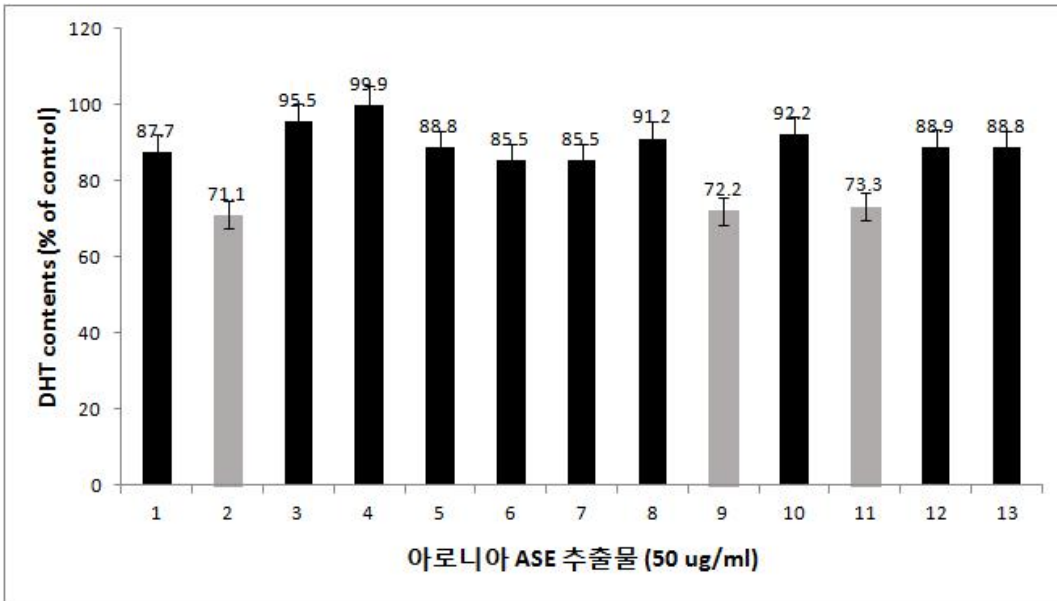


그림. 아로니아 추출물 STD1~13의 LNCaP cell에서 DHT 생성 저해 활성

- 전립선세포주에서 DHT 생성 억제결과를 토대로 전립선비대증을 유도한 실험동물모델에서의 유효성을 검증하기 위하여 STD2와 STD9 아로니아 추출물을 최종 후보로 선정하였음.
- 각 추출용매(60, 100% 에탄올) 조건에서의 추출온도 영향을 비교하기 위하여 STD4(100%-EtOH, 100℃)와 STD10(60%-EtOH, 100℃)을 대조군으로 설정하였음.

→ 동물실험용 아로니아 추출물: STD2, 4, 9, 10번

Standard #	EtOH (%)	Temperature (° C)	Time (min)
2	100	30	10
4	100	100	10
9	60	30	5
10	60	100	5

(3) 전립선세포주를 이용한 아로니아 추출물의 *in vitro* 효능 평가

(가) LNCaP cells 배양

- Human 전립선세포주인 LNCaP cell은 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였음. LNCaP 세포는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37℃, 5% CO2 환경에서 배양하였음.

(나) 아로니아 추출물 및 testosterone 투여에 따른 세포독성 평가

- 아로니아 추출물의 SRD5A2-transfected LNCaP cell에서의 활성 평가 시험에 앞서 아로니아 추

출물과 testosterone의 농도별 세포독성을 확인하였음. LNCaP 세포를 2 X 10⁴ cells/well로 96 well plate에 seeding하고 FBS 10 %를 함유한 RPMI 1640에서 18시간동안 incubation 한 후, 아로니아 추출물 1~13 (25, 50, 100 ug/ml) 및 testosterone (100, 1000 nM)을 투여하고 24시간 배양한 후 MTT assay를 실시하였음. 24시간 후 세포 내에 형성된 formazan을 DMSO 각 100 µl/well를 넣어 균질하게 녹인 후 microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였음.

- 그 결과, 아로니아 처리 농도 25~100 ug/ml와 testosterone 투여 농도 100, 1000 nM에서 모두 유의한 세포독성이 관찰되지 않았음.

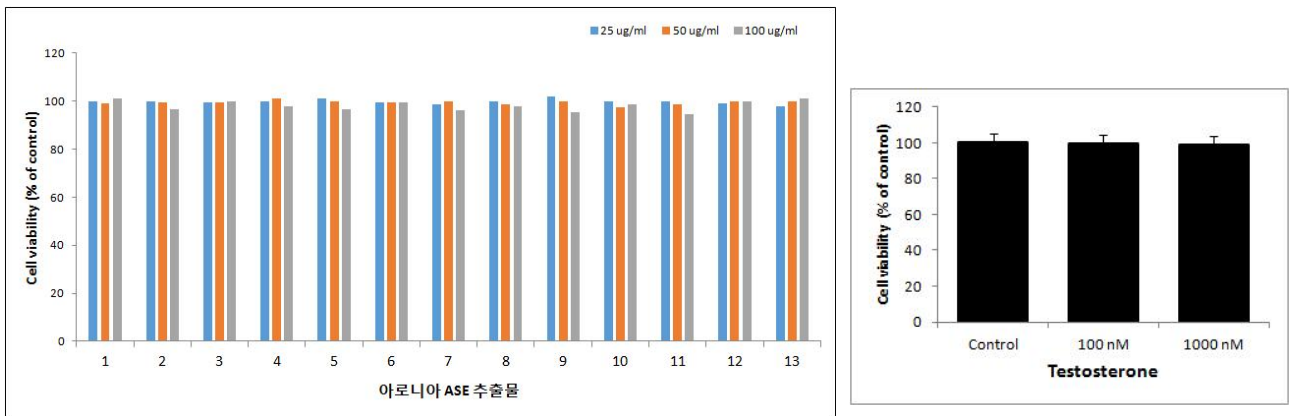


그림. 아로니아 추출물 및 농도별 testosterone의 LNCaP cell에서의 세포독성

(다) Type II 5 alpha reductase (SRD5A2) transformation

- Human 5-alpha-reductase inserted plasmid 2종을 competent cell에 heat shock transformation한 후 항생제 함유 배지에 배양하여 colony를 얻었음. Colony를 항생제 함유 액체배지에 접종 후 24시간 배양하고 plasmid extract kit를 이용하여 각 DNA를 추출하였음.

	Plasmid 1	Plasmid 2
Type	Human ORF	Human ORF
Vector	pCMV6-AC-GFP	pCMV6-entry
Tag	TurboGFP	Myc-DDK
Plasmid Map	<p>RG213025 (7.3 kb)</p>	<p>RC213025 (5.6 kb)</p>

(라) SRD5A2 transfection 및 DHT 생성량 평가

- SRD5A2-transfected LNCaP cell line에 아로니아 추출물을 1시간동안 처리한 후 testosterone (1000 nM)을 투여하여 전환된 DHT를 측정함으로써 시료의 DHT 전환 억제능을 평가하고자 하였습니다. 인간전립선세포주인 LNCaP 세포에 5-alpha reductase type II의 발현을 위하여 SRD5A2가 삽입되어 있는 pSG5SRD5A2를 Lipofectamine 3000을 이용하여 세포에 transfection 하였습니다. Transfection을 실시하기 전, 세포 배양액을 charcoal-stripped serum 10%를 함유한 phenol red free RPMI 1640로 교체하여 24시간동안 처리함으로써 세포 내 hormone을 depletion 시킴. Transfection 실시 24시간 뒤에 아로니아 추출물 (50 ug/ml)을 1시간동안 처리한 후 testosterone(1000 nM)을 처리하고, 18시간 후에 100 µl medium을 취하여 media 내 DHT의 농도를 측정하였습니다. DHT의 측정은 medium 50 µl를 대상으로 ELISA assay를 실시하였으며, 450nm에서 측정함. 5-alpha reductase typeII의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay kit(Cusabio, Germany)를 이용하였으며, 460nm에서 측정하고 측정값의 계산은 기준액으로 그린 standard그래프를 이용하여 구하고 testosterone-only treated group에 대한 백분율(%)로 표기함.

□ 협동연구기관 - 안전성평가연구소

1. 동물실험계획 승인신청서

동물실험계획 승인신청서

※ 관련 사항을 빠짐없이 기재하여 주시기 바랍니다(접수번호는 위원회에서 기재).
 본 신청서의 승인 작업기간은 접수 후 원칙적으로 14일이 소요되며, 승인여부 결과는 추후 개별 통지됩니다. 한글로 본 서식을 작성하여 원본 1부를 서면으로 위원회에 제출해 주시고, 전자파일(이메일)도 별도로 보내주시기 바랍니다. 단, 신청서의 내용이 미비한 경우 위원회는 연구계획서 제출을 요청할 수도 있습니다.

1. 일반사항					
1.1. 연구책임자					
성 명	김나현	소 속	경남생명자원 연구센터	직 위	연구원
연락처(내선)	3851	휴대폰		E-mail	nhkim@kitox .re.kr
교육이수		<input checked="" type="checkbox"/> IACUC자체교육 (일자:2016.03.22, 이수번호: G16-0010) <input type="checkbox"/> 정부주관교육 (일자: , 이수번호:)			
1.2. 동물실험수행자					
성 명	직 위	핸드폰/e-mail	교육이수 (이수번호)	역 할	
탁태길	기술원	/ttkil@kitox.re.kr	<input checked="" type="checkbox"/> 자체교육 (G16-0002) <input type="checkbox"/> 정부주관교육()	실험수행	
이주홍	기술원	/juhonglee@kitox.re.kr	<input checked="" type="checkbox"/> 자체교육 (G16-0009) <input type="checkbox"/> 정부주관교육()	실험수행	
			<input type="checkbox"/> 자체교육 () <input type="checkbox"/> 정부주관교육()		

2. 기 승인 유무 및 승인 요청 사항(해당사항에 V표)	
<input checked="" type="checkbox"/> 신규과제(처음신청)	<input type="checkbox"/> 계속 (기승인번호:) (재신청사유:)

3. 연구 관련 사항	
3.1. 시험명	(시험번호: B16026) Wistar rat에서 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험
3.2. 연구목적 (비전문가도 이해할 수 있도록 평이하게 기술)	
Wistar rat를 이용한 전립선 비대증 모델 동물에서 아로니아 추출물 섭취를 통한 증상 완화 효능을 평가하기 위한 시험이다.	
3.3 시험구분	<input type="checkbox"/> 수탁시험 <input checked="" type="checkbox"/> 내부자체시험 <input type="checkbox"/> 교육/훈련 <input type="checkbox"/> 기타()

3.4 실험기간	2016년 9월 29일 ~ 2016년 12월 31일	3.5. 시험장소	경남환경독성분 부 지하동물실
해당실험기간을 초과하여 실험이 진행될 가능성		<input type="checkbox"/> 있음	<input checked="" type="checkbox"/> 없다
4. 동물실험형태(해당사항 모두 V표)			
<input checked="" type="checkbox"/> 시험물질투여, <input checked="" type="checkbox"/> 재료채취, <input type="checkbox"/> 방사선 조사, <input checked="" type="checkbox"/> 외과적 처치, <input type="checkbox"/> 유전·육종, <input type="checkbox"/> 감염, <input type="checkbox"/> 발열, <input type="checkbox"/> 행동관찰, <input type="checkbox"/> 기타()			
5. 동물실험을 대체할 수 있는 방법의 유무			
<input checked="" type="checkbox"/> 검토하였으나, 동물실험을 대체할 수 있는 방법이 없었다.			
<input type="checkbox"/> 검토하였으나 대체수단으로는 연구목적을 충분히 달성하기가 어려웠다			
검색사이트	<input checked="" type="checkbox"/> PubMed <input type="checkbox"/> Current Contents Connect <input type="checkbox"/> 한국학술정보 <input type="checkbox"/> 기타()		
Key words	(적어도 3개 이상 기입함) benign prostatic hyperplasia , rat model , aronia		
6. 생물학적 위해물질의 사용 여부 및 병원체 (생물학적 위해물질 사용 시 식약청에 사전 보고할 것)			
<input checked="" type="checkbox"/> 사용하지 않음			
<input type="checkbox"/> 사용 합	위험군 분류	<input type="checkbox"/> 제3위험군 (병원체) <input type="checkbox"/> 제4위험군 (병원체) ※ 「생명공학육성법」 제5조 및 같은 법 시행령 제15조에 따라 보건복지부장관이 작성 한 실험지침에 따름	
	병원체 분류	<input type="checkbox"/> 제1군전염병 (병원체) <input type="checkbox"/> 제2군전염병 (병원체) <input type="checkbox"/> 제3군전염병 (병원체) ※ 「전염병예방법」 제2조에 따름	
7. 특별한 주거(Housing) 및 사육조건 필요 유무 (예 Restraining Devices, Radioactive Materials / Other Biohazards, Infectious Disease)			
해당사항 없음.			
8. 실험동물			
8.1. 사용 동물종 ※여러 종의 동물을 이용할 경우 해당 동물 종에 따라 별도 작성			
<input type="checkbox"/> Mouse <input checked="" type="checkbox"/> Rat <input type="checkbox"/> Guinea Pig <input type="checkbox"/> Rabbit <input type="checkbox"/> Hamster <input type="checkbox"/> Dog <input type="checkbox"/> Cat <input type="checkbox"/> Pig <input type="checkbox"/> Gerbil <input type="checkbox"/> 기타()			
8.2 세부내용			
계통명	Wistar rat	사육 희망 장소	<input checked="" type="checkbox"/> barrier구역 <input type="checkbox"/> Semi-barrier구역 <input type="checkbox"/> 일반구역
동물구입처 (Maker)	오라엔트바이오	반입 예정 일	2016년 9월 29일
미생물학적 등급	<input checked="" type="checkbox"/> SPT(Specific Pathogen Free) <input type="checkbox"/> CL(Clean, 준SPT) <input type="checkbox"/> CV(Conventional) <input type="checkbox"/> Germ Free <input type="checkbox"/> 무 확인 <input type="checkbox"/> 기타()		

동물 규격	체중 평균±20%g	주령 10주령	마리수 M 36, F -		
83. 해당 동물(animal)과 종(strain)을 선택한 합리적 이유(연구의 생물학적 연관성 제시)					
수컷 랫드를 이용한 전립선 비대증 유도는 전립선 연구에서 널리 사용되는 방법이며 연구 데이터가 많이 제시되어 있어 제작 및 평가가 용이함					
84. 사용 동물 수에 대한 합리적 근거(가능하면 동물수를 신출한 통계적 근거를 제시)					
군	성별	동물수 (마리)	동물번호	전립선 비대증의 유도	투여물질
Negative control	Male	6	1-6	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	0.5% CMC
Positive control	Male	6	7-12	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	Saw palmetto
T1	Male	6	13-18	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	아로니아 분획물 1
T2	Male	6	19-24	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	아로니아 분획물 2
T3	Male	6	25-30	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	아로니아 분획물 3
T4	Male	6	31-36	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	아로니아 분획물 4
총 36마리 중 군당 6 마리씩 36마리사용. 통계처리를 위한 최소한의 숫자로 6마리씩 설정하였으며 여분동물은 사용하지 않음					
9. 실험동물실 이외의 장소로 동물의 반출 혹은 외부 연구시설에서 동물을 반입할 경우, 그 필요 사유					
해당사항 없음.					
10. 실험방법 (프로토콜) 개요 (필요시 별지를 사용하여 구체적으로 기술할 것)					
※ 외과적 처치를 포함하지 않는 실험인 경우					
- 동물실험에 관한 내용 (시험물질 대조물질 투여경로, 투여량, 투여횟수, 투여기간 등)					
- 샘플 채취에 관한 내용 (혈액, 뇨, 조직 등)					
1. 실험방법					
(1) 수술적 처치 후 1주일간의 회복기간을 두고 상처가 회복되면 체중에 따라 군분리를 실시함					
(2) 시험물질 투여 전립선 비대 유도를 위하여 6주간 3mg/kg의 Testosterone을 매일 피하투여 (SC) 하며 같은기간동안 매 주 1회 체중을 측정하여 체중을 기준으로 각 군에 해당하는 시험물질을 1일 1회 경구 투여함					
순화기간	수술 후 회복기간	1w			
		6w			
Testosterone(SC)+아로니아 추출물(PO)					

동물입수
10주령

castration

투여시작

Once a daily

실험 종료

2 채혈 및 조직 채취

(1) 부검은 시험물질 투여 6주 후 실시하며 인락사 전날 절식을 실시함

(2) 채혈 CO₂ gas로 인락사하고 복대정맥에서 약 6ml 가량 채혈함. 전혈을 serum separating tube에 넣고 30분 상온에 방치한 후 3000RPM으로 원심분리하여 혈청을 분리하여 절반은 혈액생화학 검사를 진행하며 나머지는 호르몬 분석을 위하여 -72°C에 보관함

(3) 조직 채취: 채혈 완료 후 완전히 방혈시킨 후 방광과 전립선을 조심스럽게 적출하여 전체 무게를 측정한다. 후 요도로부터 전립선 외측 및 복측엽(lateral & ventral lobe)을 분리하여 무게를 측정함. 분리된 전립선 조직의 절반은 슬라이드 제작에 필요한 부위만 포르말린에 고정함. 남은 조직은 호르몬 분석을 위하여 -72°C에 보관함.

※ 외과적 처치를 포함하는 실험인 경우, 수술방법

수술 후 관리방법(해당될 경우 해당 사항에 모두 V표)

항생제 투여 진통제 투여 수액처치 기타)

1. 항생제 및 진통제를 경구투여 한 즉시 주사미취를 실시하며 ventro-dorsal position으로 위치한 후 음낭 주위를 포비돈으로 소독함

2. 요도가 다치지 않도록 요도 아래 1cm 피부를 세로방향으로 약 1cm 가량 절개함

3. 피부와 양측 고환집막을 둔성분리하고 복강으로부터 고환 및 부고환을 견인하여 비흡습시로 여러 번 결찰하여 복강이 노출되지 않도록 하고 고환집막과 함께 고환/부고환을 적출함

4. 피하조직과 피부를 봉합하고 수술부위를 소독한 후 따뜻한 물주머니 위에 올려 미취에서 회복되던 케이지에 넣는다

※ 복수의 대규모 수술 실험(Multiple Major Operative Procedures)을 시행하는 경우, 그 필요 사유

- 단 원칙적으로 불허함

11. 동물이 경험하는 통증 및 스트레스의 정도 (해당사항에 V표)

고통등급 A 원생동물 무척추동물을 사용하는 실험

고통등급 B 척추동물을 사용하지만 거의 고통을 주지 않는 실험

- 생산 공급을 목적으로 하는 사육
- 관찰 또는 검사를 목적으로 한 단기간의 보정

고통등급 C 척추동물에게 약간의 스트레스 혹은 단기간의 작은 통증을 주는 실험

- 채혈
- 부작용이 없는 물질의 IV, SC, IM, IP, 구강 투여
- 삼미취 후 혈액채취를 동반한 인락사(항혈청 생산)
- 인락사(삼미취) 실시 후 단시간 내 조직 채취하는 비생존 실험
- 경미한 증상의 전염성 원인체 감염 후 임상증상 등 발현 시 인락사

고통등급 D 척추동물에게 회피 할 수 없는 스트레스 혹은 통증을 주는 실험

(진정제, 진통제, 마취제 등을 사용)

- 삼미취 실시 하에 조직 등 채취한 다음 회복하는 생존실험
- 삼미취 실시 하에 장시간 동안 조작(수술 등)을 실시하는 비 생존 실험
- 장기간의 물리적 억압상태 유지 실험
- 결핵사균이 포함된 FCA(면역증강제) 투여로 염증 과사발생
- 인외채혈 등

고통등급 E 척추동물에게 회피 할 수 없는 스트레스 혹은 통증을 주는 실험 (진정제, 진통제, 마취제 등을 사용할 경우 실험 결과에 부정적인 영향을 주는 실험 등)

- LD50 측정 또는 독성시험 등 죽음을 종료시점으로 설정
- 항암 실험
- 마우스 복강 내 단클론항체(복수) 생산 등

※ 고통등급 E에 해당되는 동물실험은 원칙적으로 불허하나 연구목적상 분명한 사유가 존재하는 경우 위 원회 승인 후 수행

12. 동물이 경험하는 통증 및 스트레스 경감조치

12.1. 진정제, 진통제, 마취제 등의 사용(11.항목의 고통등급 D에 해당되는 경우 기재)
(약물명, 투여량, 경로를 기입)

마취제: Tiletamine+Zolazepam (30mg/kg) + Xylazine (10mg/kg), IP

항생제: Cephazolin (30mg/kg), SC

진통제: Acetaminophen (200mg/kg), PO

12.2. 고통등급 E에 해당되는 동물실험을 수행하는 사유(11.항목의 고통등급 E에
해당되는 경우 기재)

인도적 종료시점은 채택하지만, 연구목적 상 진정·진통제를 투여할 수 없거나,
고통경감을 위한 방법이 없음

예) 통증실험 수행으로 진통제를 사용하면 연구결과에 영향을 미침

연구목적 상 인도적 종료시점을 채택하지 않고 동물의 죽음을 종료시점으로
설정해야 함.

예) LD50 측정을 위한 독성실험

(상세 사유 기재)

13. 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상될 경우, 인도적인
실험종료(Humane endpoints) 또는 안락사를 취하기 위한 기준

- 정상 체중의 20%이상의 체중감소가 관찰되거나 빈사동물이 관찰되는 경우 안락
사를 실시함.

14. 안락사 및 사체처리방법

약제 (사용약물: , 용량:) CO2 가스
경추탈골

기타 ()

※ 사체처리방법 (보관 장소 및 사체 처리업체명)

안전성평가연구소 경남환경독성본부 폐기물 보관고에 보관 후 정기 수거일에 처
리업체(경서산업)에서 방문수거함.

15. 실험자를 위한 작업환경의 안전성 확보 여부

산업보건안전 법규에 따른 안전보호구를 구비함.

실험자에 대한 예방접종(과상풍 2013.09. 09.) 완료.

16. 해당실험이 불필요한 중복실험이 아님을 설명(가능하면, 대체방법 탐색경위 등
을 기술)

남성의 전립선 비대증 완화 효능과 관련 호르몬 변화를 평가하기 위해서는 동물
모델을 이용한 실험이 필요하다.

서 약 서

본 연구수행을 위하여

1. 실험동물의 윤리적 사용과 3R원칙에 따라 동물실험의 수행에 대하여 충분히 검토하였습니다.
2. 「동물보호법」 과 「실험동물에 관한법률」 에 규정된 사항을 준수하며, 안전성평가연구소 경남환경독성본부 동물실험지침을 준수하겠습니다.
3. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 재승인 하겠습니다.
또한 승인된 계획을 변경할 경우 동물실험계획변경신청서를 통해 위원회에 알리고 승인을 받겠습니다.
4. 연구책임자로서 본인을 포함한 등록된 실험수행자들이 실험동물의 윤리적 사용과 승인된 동물실험 방법을 준수하도록 책임·지도하겠습니다.
5. 위 사항의 이행과 함께 위원회 및 동물실험시설장의 결정에 적극 협조하고 따를 것을 서약하며 본 동물실험계획 승인신청서를 제출합니다.

2016 년 09 월 12일

연구책임자: 김 나 현 (서명)

2. IACUC 승인서

Approval of Animal Care and Use Protocol

승인서

1. 동물실험계획 (Original protocol information)

접수번호 Receipt Number	16-1-0025	
시험제목 Protocol Title	(시험번호Protocol Number:) Wistar rat에서 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험	
시험기간 Study Period	2016년 09월 29일 ~ 2016년 12월 31일	
시험책임자 Principal Investigator	소속 Affiliation	경남생명자원연구센터
	성명 Name	김 나 현

2. 승인사항 (Approval)

심의일자 Review Date	2016년 09월 21일
승인일자 Approval Date	2016년 09월 21일
승인번호 Approval Number	1609-0004

□ 특허출원

출원번호통지서 페이지 1 / 3

관인생략
출원번호통지서

출원 일자 2016.11.16
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원 번호 10-2016-0152355 (권수번호 1-1-2016-1116467-18)
출원인 명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4)
발명자 성명 이재규 권선화 정동민
발명의 명칭 항염효과를 갖는 분무건조한 아로니아 분말 및 그 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통행된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 권수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 검색 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안특)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원 기준은 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국특허상표이전, 우선권일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적요청허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통행된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/app/NoOffAct.so> 2016-11-16

(특허출원) 항염효과를 갖는 분무건조한 아로니아 분말 및 그 제조방법(출원번호 : 10-2016-0152355, 출원일자 : 2016. 11. 16)

출원번호통지서 페이지 1 / 3

관인생략
출원번호통지서

출원 일자 2016.11.16
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원 번호 10-2016-0152323 (권수번호 1-1-2016-1116201-92)
출원인 명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4)
발명자 성명 이재규 권선화 정동민 정은주
발명의 명칭 아로니아씨오일과 아로니아추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 피부개선용 화장료 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통행된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 권수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 검색 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안특)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원 기준은 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국특허상표이전, 우선권일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적요청허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통행된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/app/NoOffAct.so> 2016-11-16

(특허출원)아로니아씨오일과 아로니아추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 피부개선용 화장료 조성물(출원번호 : 10-2016-0152323, 출원일자 : 2016. 11. 16)

제3절 2차년도(2017년) 연구개발 수행결과

1. 2017년도 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2017)	아로니아 안토시아닌 함량 확인 및 지표성 분 정량 및 1차 시제품 제작	- 아로니아 추출액을 이 용한 안토시아닌 함량변 화 확인	-아로니아 추출액을 이 용한 안토시아닌 함량변 화 확인	2016년도와 2017년도 재 배된 아로니아(회원사별) 의 추출(착즙)액을 제조 한후 안토시아닌 함량변 화를 확인하였음.
		- HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량	-HPLC 로 안토시아닌 의 지표성분 정량	HPLC로 안토시아닌의 지표성분인 시아니딘의 함량을 정량하였음
		- 전립선 질환 예방용 아 로니아 복합 시제품 제작	-전립선 질환 예방용 아 로니아 복합 시제품 제 작 1.전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아 추출물의 발효	전립선 질환 예방용 아 로니아 복합 시제품을 2 건 제작하였는데, 복합시제품1은 착즙액+ 발효->유산균발효동결건 조제품
		- 전립선 질환 예방용 아 로니아 복합 시제품 제작	2.전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아+ 유산균 발효 동결건조 제품 제작 3.아로니아 복합시제품 1의 제작 4.아로니아 복합 시제품 2 제작	복합시제품2는 착즙액+ 발효(유산균발효, 초산발 효(pH조정))->스프레이 건조제품 으로 제조하였 음. 복합시제품2는 대량생산 공정을 확립하고 제품화 함.
		- 전립선 질환 예방용 아 로니아 복합 시제품 생산 공정 확립	-전립선 질환 예방용 아 로니아 복합 시제품 생 산 공정 확립	아로니아 복합시제품의 제조공정(생산공정)을 확 립하였음
		- 포장디자인 개발	-포장디자인 개발	포장디자인 1건(스티커 디자인, 박스디자인)을 개발하였음
		- 영양성분 분석	-영양성분 분석 -품목제조보고	영양성분 분석하였음
		- 시제품 제작	-시제품 제작 -미생물에 대한 안전성 평가 -시제품의 대량생산 및 제품화	제품화를 위한 시제품의 미생물 안전성평가를 실 시하였고, 제품화를 위 한 대량생산을 실시하였 음

		- 아로니아 동결건조 시제품을 이용한 항염증 분석	-아로니아 동결건조 시제품의 항염증 분석	아로니아 동결건조 제품의 물 추출물(0.5, 1, 2 mg/ml)은 nitro oxide(NO)와 염증반응 관련 단백질인 iNOS, Cox-2, HO-1의 발현을 이용하여 항염증 효과를 검증하였음
아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성 소재의 발굴, 지표성분과 <i>in vitro</i> 기능성과 관련한 자료의 확보		- 아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명	-아로니아로부터 주요 성분 분리 및 확보 -분리한 화합물의 입체 구조 규명	아로니아로부터 안토시아닌 배당체를 포함한 9종의 지표성분을 분리·확보하고 입체구조 규명을 완료하였음.
		- 전립선비대 개선 기능성 소재의 발굴 1.기능성 소재의 cell viability 측정 2.기능성 소재의 5-alpha reductase 저해 활성 3.기능성 소재의 DHT 전환 억제 활성 검토 4.기능성 소재의 항염활성 검토	-전문가 자문을 통한 남성 비뇨기계 질환 전통적 의약 소재 후보군 선정 -5AR 저해활성이 우수한 chemical-based 기능성 소재 추가 선정 -후보 소재에 대한 문헌 자료 조사 -5AR-transfected human 전립선세포주 3종에서 후보소재의 DHT 전환억제능 평가	전립선비대증 개선 복합소재의 발굴을 위하여 전문가 자문, 문헌조사 등을 통해 1차 후보군을 선정하고 전립선 세포주에서 5AR 효소 억제를 통한 DHT 전환 억제효능을 평가하여 최종 후보 5종을 선정하였음. 최종 후보 소재는 동물 실험용 시료 조제를 위하여 대량 추출 후 협동 2기관에 전달하였음.
(1차년도 연계) 아로니아 추출물의 최종 시료 선정을 위한 1차 <i>in vivo</i> 평가		- <i>in vitro</i> 실험결과 토대로 한 시료선정 하기 위한 전립선비대 유도 rat 실험	-실험재료 준비 -실험동물의 조건확립 -전립선비대 <i>in vivo</i> model의 확립 -시료의 투여 -실험동물의 체중변화 -부검 및 시료의 채취 -Prostate Index (PI) -혈액분석 -혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석 -조직병리학적 평가	전립선 비대증 <i>in vivo</i> 모델을 성공적으로 제작한 후 6주간의 투여 결과 서로 다른 아로니아 추출물 중 T1 group에서 감소된 DHT 결과를 나타내었으나 PI 값 및 5 alpha reductase 수치에서는 통계적 유의성을 나타내지 않음.
활성 분획		- 1차년도 실험 결과를	-시료의 선정	전립선 비대증 <i>in vivo</i>

	<p>물 및 기능성 화합물의 2차 <i>in vivo</i> 평가</p>	<p>바탕으로 선정된 시료들의 <i>in vivo</i> 효능 평가 수행</p>	<p>-실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도 -시료의 조제와 투여 -실험동물의 체중변화, 장기무게 -혈액분석 -전립선 및 비뇨생식기관의 histopathological examination</p>	<p>모델을 성공적으로 제작한 후 6주간의 투여 결과 전립선 무게에 대한 PI index 분석과 5 alpha reductase 및 조직병리학적 검사를 실시하였고 DHT 분석은 진행중임.</p>
--	------------------------------------------	----------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>-아로니아 추출액을 이용한 안토시아닌 함량변화 확인</p>	<p>아로니아 추출액(착즙)을 이용한 안토시아닌 함량변화 확인 : 아로니아 분석시료를 510nm와 700nm에서 흡광도를 측정함.</p>	<p>2016년도와 2017년도 재배된 아로니아(회원사별)의 추출(착즙)액을 제조한후 안토시아닌 함량변화를 확인하였음.</p>
<p>-HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량</p>	<p>- HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량법 : HPLC에 의한 안토시아닌의 정량 정성분석 Column은 YMC-Pack ODS AM 250x4.6 mm(USA)이고, column temperature는 30℃을 유지함. flow rate는 0.8ml/min이었고, solvent A는 a-water/, solvent B는 acetonitrile로 사용함.</p>	<p>아로니아 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립하고, 아로니아의 안토시아닌 중 시아니딘 함량을 확인하였음.</p>
<p>-아로니아로부터 주요 성분 분리 및 확보 - 분리한 화합물의 입체구조 규명</p>	<p>- 건조한 아로니아를 메탄올로 추출한 후 감압농축하고 소량의 물에 현탁하여 극성에 따라 n-hexane (1.70 g), methylene chloride (4.52 g), ethyl acetate (20.0 g), n-butanol (22.40 g)로 순차적으로 분획 - Ethyl acetate분획과 n-butanol 분획의 각 소분획으로부터 반복적인 HPLC 실험을 통해 단일 화합물을 분리·정제</p>	<p>아로니아로부터 안토시아닌 배당체를 포함한 9종의 지표성분을 분리·확보하고 입체구조 규명을 완료하였음.</p>
<p>- 전문가 자문을 통한 남성 비뇨기계 질환 전통적 의약 소재 후</p>	<p>- Human 5-alpha-reductase inserted plasmid를 competent cell에 heat shock transformation한 후 항생제</p>	<p>전립선비대증 개선 복합소재의 발굴을 위하여 전문가 자문, 문헌조사 등을 통해 1차 후보군을 선정하고 전</p>

<p>보균 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5AR 저해활성이 우수한 chemical-based 기능성소재 추가 선정 - 5AR-transfected human 전립선세포주 3종에서 후보소재의 DHT 전환억제능 평가 	<p>함유 배지에 배양하여 colony를 얻음. Colony를 항생제 함유 액체배지에 접종 후 24시간 배양하고 plasmid extract kit를 이용하여 DNA를 추출</p> <ul style="list-style-type: none"> - 생약 추출물을 전처리한 전립선세포주에 testosterone을 투여하고 최종 생성된 DHT의 생성량을 측정함으로써 후보 생약의 5 alpha reductase 저해활성을 평가 	<p>립선 세포주에서 5AR 효소 억제를 통한 DHT 전환 억제효능을 평가하여 최종 후보 5종을 선정하였음.</p>
<p>활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 <i>in vivo</i> 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> -시료의 선정 -실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도 -시료의 조제와 투여 -실험동물의 체중변화, 장기무게 -혈액분석 -전립선 및 비뇨생식기계의 histopathological examination 	<p>(1) 시료의 선정</p> <p>1차 <i>in vivo</i> 실험 결과를 검토하여 선별된 아로니아 분획물과 기능성 화합물을 최종시료로 선택하여 실험을 진행함. 선별된 시료는 50-200 mg/kg BW 사이의 고농도와 저농도군을 나누어 전립선비대가 유도된 실험동물에게 경구투여함. 본 실험결과를 건강기능식품개발의 기초자료로 활용하기 위하여 건강기능식품인 Saw Palmetto 및 전립선비대의 치료제인 finasteride를 이미 발표된 논문결과에 기초하여 실험동물에 투여하고 결과를 비교함. 원료인 아로니아 추출물은 1차 <i>in vivo</i> 실험에서 사용된 추출물과 동일한 것을 이용할 것임.</p> <p>(2) 실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도</p> <p>본 실험은 6주령의 웅성 Wistar rat를 구입하여 실험에 사용함. 실험동물의 사육환경은 1차 <i>in vivo</i> 실험과 동일하게 유지함. 일주일간의 안정화 기간 후, 실험동물의 거세는 1차 실험과 동일한 방법으로 진행됨. 2차년도 실험동물은 군당 8마리 이상으로 설정함.</p> <p>(3) 시료의 조제와 투여</p> <p>상기와 같이 거세된 rat를 대상으로</p>

TP를 투여하는 6주간 시험물질을 동시에 경구투여하며 군은 다음과 같이 설정함: (A)Normal control group: castration을 시행하지 않은 정상군으로 corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 rat, (B)control group: corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 rat, (C) BPH group; TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 생리식염수만 급여한 rat, (D) BPH+aronia extract 25; 아로니아 추출물 저농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 추출물을 25 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (E)BPH+aronia extract 50; 아로니아 추출물 중간농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 추출물을 50 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (F) BPH+aronia extract 100; 아로니아 추출물 중간농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 아로니아 추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (G)Saw Palmetto group; Saw Palmetto 투여그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 Saw Palmetto를 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 rat, (H) BPH+Finasteride group;TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 finasteride를 10 mg/kg body weight/day로 경구투여한 그룹으로 나눔.

(4) 실험동물의 체중변화, 장기무게
1차 동물실험과 상동의 방법으로 시행하며 체중 대비 방광무게와 PI 지

	<p>수를 측정함. 전립선을 포함한 비뇨생식기계 전체에 대한 조직 슬라이드를 제작함. 적출된 조직의 일부는 조직병리학적 검사를 위하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 담아 고정하고 일부는 유전자 및 단백질 분석을 위하여 -80°C에 보관함.</p> <p>(5) 혈액분석 모든 실험동물을 isoflurane 등으로 마취 상태에서 복대동맥에서 SST tube를 이용하여 동맥혈(arterial blood)을 채취하여 실온에 1시간 방치 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 3ml 이상의 혈청을 분리함. 1차 실험과 동일하게 혈액생화학 분석과 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone을 분석함.</p> <p>(6) 전립선 및 비뇨생식기계의 histopathological examination 일반적인 tissue processing 과정을 거쳐 제작된 H&E 슬라이드는 1차 실험과 마찬가지로 광학현미경 하에 검안하여 비뇨생식기계의 염증성 및 증식성 소견 유무와 전립선 상피의 증식 정도, 염증세포의 침윤, 주변 조직의 비후 등의 소견을 관찰함.</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3. 연구수행결과

□ 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥

가. 아로니아 농가별 아로니아 추출액 제조 및 이를 이용한 안토시아닌 함량변화 확인

(1) 2016년 회원농가 아로니아의 착즙액 제조 및 안토시아닌 분석

농가별 아로니아 추출액 제조는 1차년도에 확립한 추출액 제조 표준화에 맞추어 진행되었는데, 아로니아 생과를 버블세척 2회를 실시한 후 이동하였으며, 스크류착즙기를 이용하여 2차 착즙을 실시하였음.

지역명	농장명	농장주소
부여	최치농장 (최종성)	(323-882) 충청남도 부여군 남면 회동리81
인천	강화아로니아농장(성재현)	(417-863) 인천광역시 강화군 화도면 홍왕리 1236-2
순창	구림 딸콩농원 신성기	(595-871) 전북 순창군 구림면 강천로 987
김해	김이근	(621-884) 경상남도 김해시 진례면 시례리 510번지
밀양	송향농장(김송)	(627-883) 경상남도 밀양시 초동면 불광리 353
안동	서유범	(760-841) 경상북도 안동시 김안면 금곡리 178-1
보은	덕대산농장(이수현)	(376-881) 충북 보은군 수한면 안내보은로 654-18
영동	손인갑	(370-862) 충청북도 영동군 황간면 회포리69-3
하동	도기은	(667-851) 경상남도 하동군 양보면 장암리
함양	함양아로니아(서진원)	(676-804) 경상남도 함양군 함안읍 월평리 48-8
진안	진안고원아로니아농원	(667-803) 전라북도 진안군 진안읍 구룡리 901
포항	은재산아로니아농원	(780-841) 경상북도 포항시 남구 대송면 강동리 통제길220번길 11-2
청송	솔바리밭 은금순	(763-851) 경상북도 청송군 현동면 월배리250번지
육천	가나농원(진순자)	(373-808) 충청북도 육천군 육천읍 마암리 94-2
부여	충남농원 강민숙	(323-804) 충남 부여군 동문로 71-13
청양	배리정림(김달식)	(345-871) 충청남도 청양군 은곡면 추광리 475
대전	김종철	(300-290) 대전광역시 동구 소호동 68-1번지
의성	김민석	(789-851) 경상북도 의성군 금성면 청포리6-13번지
무주	무주구천동 아로니아팜	(668-811) 전북 무주군 설천면 삼곡리 969
순천	아로니아팜 후곡농장(최문식)	(640-933) 전라남도 순천시 송광면 후곡리 413번지
육천	라운플로리아 농장 (박용규)	(373-853) 충청북도 육천군 군북면 이백2길 1-20
광주	빛고을농원(김제중)	(506-354) 광주광역시 광산구 신흥동 397
화성	배리사랑농원(신동엽)	(445-841) 경기도 화성시 비봉면 광학리 566-1
청송	청송아로니아(김지화)	(763-842) 경상북도 청송군 부남면 돌고개길 18
함양	봉수농장(박봉수)	(111-111) 경남 함양군 안의면 귀곡리
청주	청주 아로니아 킹농원	(363-887) 충청북도 청주시 청원구 오창읍 여천리 97
함양	김범석	(111-111) 경남함양군안의귀곡리
임실	박사골영농조합(오홍섭)	(666-913) 전라북도 임실군 상계면 불현리
청송	최철현(부부농장)	(763-851) 경상북도 청송군 현동면 월배리 250번지
고령	고령침마름아로니아농장(채경준)	(717-802) 경상북도 고령군 대가야읍 내곡리 1025
진천	대성 아로니아 농원	(385-802) 충청북도 진천군 진천읍 송두리 272
육천	이용섭	(373-833) 충청북도 육천군 동이면 세산리 1263
고령	대가야아로니아 (박은정)	(717-831) 경상북도 고령군 운수면 대평리 1056
괴산	강광복	(367-802) 충청북도 괴산군 괴산읍 수진2길 60번지
거창	당송농장(최말남)	(670-853) 경상남도 거창군 위천면 당산2길 12-7
공주	배 영순	(314-895) 충남공주군유구읍유구리311번지
진주	하맛골 아로니아 농장 (김판호)	(660-841) 경상남도 진주시 문산읍 갈곡리 전801
군산	발산아로니아농장(채창석)	(673-921) 전라북도 군산시 개성면 발산리 443-3
진주	송백작물농장(김철조)	(660-923) 경상남도 진주시 금산면 송백리 564-1번지
진주	청정결 집현 유기농농장(안인규)	(660-923) 경상남도 진주시 금산면 송백리 564-1 번지

스크류 착즙기

04월 08일

삼흥식품 귀하
fax. 055-941-1502

사양서

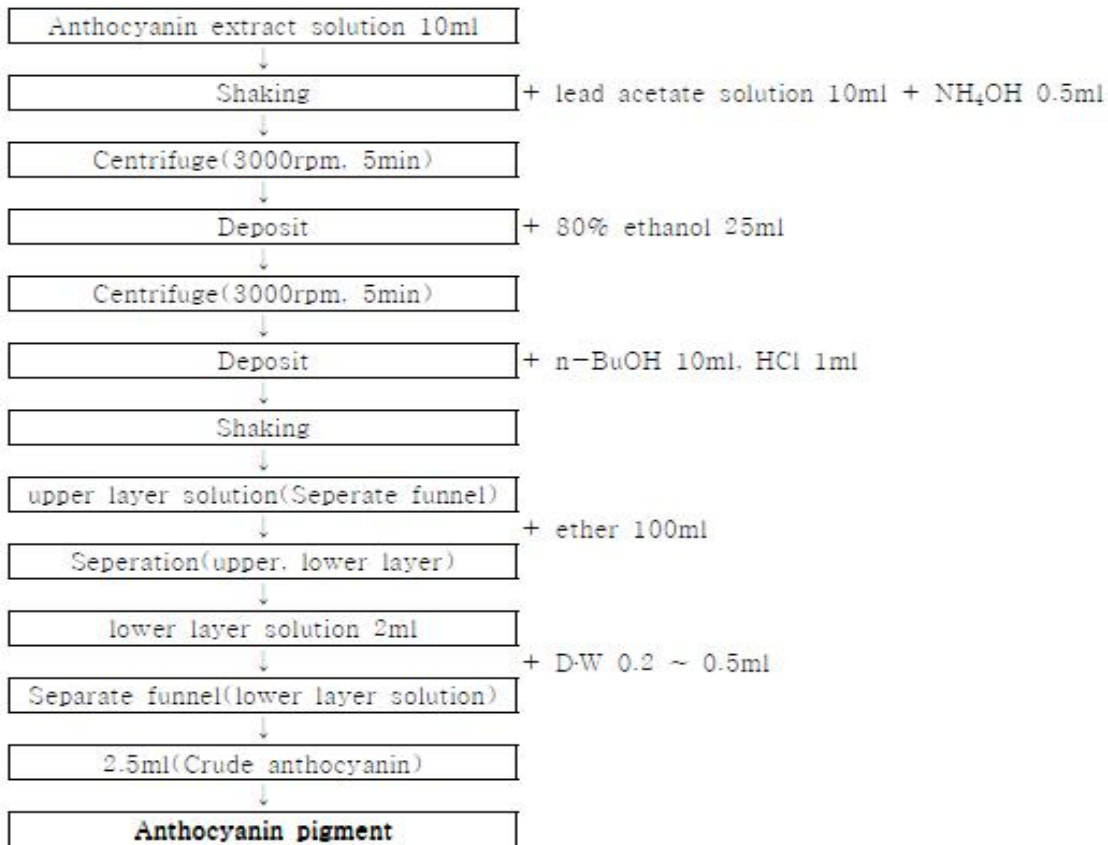
- 기계규격 - 7000 x 1,700 x 1,600(H)
 - 정격전압 - 380V / 삼상
 - 소비전력 - 5Kw (max)이상
 - 생산능력 - 시간당 600kg 전후(내용물(과일,아재)에 따라 다소 차이가 남)
 - 저리입도 - 150mm / 이하
 - 저계중량 - 약 250kg
 - 착즙수율 - 70~80%이상(내용물(과일,아재)에 따라 다소 차이가 남)
- ◆ 제품특징
- 스테인리스로 제작되어 위생적이다.
 - 링소가 간편하여 미생물 번식이 없다.
 - 열발생이 없어 맛과 영양소가 그대로 보존된다.
 - 착즙 수율이 매우 높다.
 - 역상 상태의 원과, 배, 복숭아등도 착즙 수율이 70~80% 가능하다. (생유질이 풍부한 제품류)
 - 인버터 기능(속도조절)- 과일상태(과일,저장과일, or 다양한 종류 착즙가능)
- ◆ 적용분야
- 레몬, 사과즙, 배즙, 오디즙, 기타 과일 및 야채즙

1차년도(2016년) 수집된
삼흥식품(농업회사법인 주식회사 삼흥)의
회원농가 목록

착즙에 사용된 스크류 착즙기 사양서

안토시아닌 함량 분석은 1차적으로 1차년도 삼흥식품(농업회사법인 주식회사 삼흥)의 회원농가를 기초로 수집된 아로니아를 추출하였으며, 이를 이용하여 안토시아닌 함량을 분석하였음.

(가) 안토시아닌 추출방법



(나) Sample 준비 :

- 시료 0.2ml , 1ml에 0.1%HCl 포함된 메탄올을 10ml을 넣고 2시간 이상 빛을 차단하여 혼합하여, 3000rpm에 30분간 원심분리한 후 상등액을 분석시료로 사용함.
- 0.2M KCl 용액을 0.2M HCl 용액으로 pH 1.0을 맞춘 A 용액을 만듦.
- 0.2M potassium phosphate를 0.1M citric acid를 첨가하여 pH 4.5로 맞춘 B 용액을 만듦.

(다) 실험방법

아로니아 분석시료를 100ul를 A와 B 용액 900ul와 섞어준 뒤에 510nm와 700nm에서 흡광도를 측정하였음. 안토시아닌 함량(mg/100g)은 cyanidin-3-glucoside의 몰흡광계수(26,900)를 이용하여 다음식에 의해 표시하였음.

$$\text{Anthocyanin content (mg/100g)} = \frac{A \times \text{mw} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times 1}$$

(라) 조건 :

- A : (OD_{510nm} - OD_{700nm})_{pH1.0} - (OD_{510nm} - OD_{700nm})_{pH4.5}
- mw: molecular weight for cyanidin-3-glucoside (g) (449.2)
- DF: dilute factor

- 시료를 ml당으로 환산 :1000 ϵ : cyanidin-3-glucoside molar absorbance(26,900)

지역명	농가명	착즙수율	안토시아닌함량 (mg/100g)
대조군	자색고구마	70.5	105
부여	최씨농장(최종성)	69.5	145
인천	강화아로니아농장	70.0	150
순창	구림 일풍농원	70.1	152
김해	김이근님	65.6	144
밀양	송향농장	63.5	140
안동	서용범	71.5	152
보은	덕대산농장	73.2	152
영동	손인갑	72.2	155
하동	도지은	68.5	148
함양	함양아로니아	68.5	145
진안	진안고원아로니아농원	70.2	152
포항	문제산아로니아농원	70.1	152
청송	솔보리팜	71.6	154
옥천	가나농원	70.8	158
부여	충남농원	70.8	156
청양	베리킹덤	71.1	153
대전	김중철님	70.1	152
의성	김민석님	70.5	155
무주	무주구천동 아로니아팜	69.9	152
순천	아로니아멜라 후곡농장	65.5	142
옥천	라온뜰아로니아 농장	70.1	162
광주	빛공을농원	62.5	144
화성	베리사랑농원	69.5	158
청송	청송아로니아	70.1	157
함양	봉수농장	68.5	156
청주	청주아로니아 킹농원	76.5	156
함양	김범석님	65.4	146
임실	박시골영농조합	69.5	152
청송	부부농장	65.4	148
고령	고령참마음아로니아농장	70.1	152
진천	대성 아로니아 농원	70.2	152
옥천	이용섭님	72.1	157
고령	대가야아로니아	65.4	148
괴산	강광복님	68.6	152
거창	당송농장	68.5	152
공주	배영순님	70.5	160
진주	하릿골 아로니아 농장	69.8	142
군산	발산아로니아농장	68.8	162
진주	송백작골농장	70.2	145
진주	청정골 집현 유기농농장	70.4	140
거창	한솔농산물	70.1	158
거창	아림교회	71.5	162
거창	삼홍식품(하재규)	70.2	160

나. 2017년 회원농가 아로니아의 착즙액 제조 및 안토시아닌 분석

지역명	농장명(농장주)	농장 주소	지역명	농장명(농장주)	농장 주소
부여	최씨농장 (최종성)	(323-862)충청남도 부여군 남면 최동리91	합천	합천배리농장 전성일	(60249)경상남도 합천군 덕곡면 본죽리 136-2
인천	강화아로니아농장(성재현)	(417-983)인천광역시 강화군 화도면 울릉리 1236-2	여수	가은누리(유성준)	(66949)전라남도 여수시 소림면 하세동길 33-10
순창	구림일품농원 신성기	(696-871)전북 순창군 구림면 고촌리 887	거창	신원 신동훈	(60151)경상남도 거창군 신원면 화지길 73
김해	김이근	(621-884)경상남도 김해시 주례면 시계리 810번지	금산	금산아로니아(김중영)	(312-801)충청남도 금산군 금산읍 상곡리 443
밀양	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	금산	금산아로니아(김중영)	(315-801)충청남도 금산군 금산읍 상곡리443
진주	서용범	(730-841)경상남도 진주시 장안면 금곡리 1139-1	김해	무척산 한우드림(정기태)	(60001)경상남도 김해시 영안면 정림리333번길 10-2
포천	덕대산농장(이수현)	(376-881)충북 포천시 영남면 덕대산리 68-418	김해	김해 무척산한우드림	(60000)김해시 영안면 본리리 368-1번지
영동	손인갑	(370-862)충청북도 영동군 송인면 호곡리89-3	밀양	바름농장(정다운)	(17872)경기도 밀양시 현덕면 현덕리 175-6
하동	도지은	(667-861)경상남도 하동군 하동면 집암리	거창	조인환	(60112)거창군 고제면 고제로 1033
함양	베리킹덤(서진원)	(616-804)경상남도 함양군 함양읍 함양리 48-8	의령	아로니아(홍)	(62112)경상남도 의령군 공북면 공북로 136
서울	김중철	(131-787)서울특별시 용문구 용문동 용문리 101-1	창원	해방농원(최은성)	(61113)경상남도 창원시 의창구 북면 외길리 543
진안	진안고원아로니아농원	(687-803)전라북도 진안군 진안읍 구룡리 901	밀양	바름농장(정다운)	(17872)경기도 밀양시 현덕면 현덕리 175-6
포항	운제산아로니아농원	(790-841)경상북도 포항시 남구 아로니아농원, 출근길220번길 11-2	대진	이정식	(27000)충청북도 대진군 적성면 골문리길 122-4
청송	솔보라팜 윤금순	(793-861)경상북도 청송군 청송읍 용천리286번지	정수	정수밭하늬농장	(66613)전라북도 정수군 정계면 한들로 34
옥천	가나농원(진순자)	(373-808)충청북도 옥천군 옥천읍 구암리 99-2	대전	심중용	(36334)대전광역시 서구 권선동로42-나리하이패스 1305-704
부여	유금순	(323-804)충청남도 부여군 부여읍 용동리 10-13	경주	미간농장(이나연)	(23368)충청북도 영천시 용곡구 서촌로 312-2
부여	유금순	(323-804)충청남도 부여군 부여읍 용동리 10-13	밀양	손은순	(60413)경상남도 밀양시 신내면 신내로 141
의성	김민석	(346-871)경상북도 의성군 의성읍 용동리 478	고성	송돌아로니아(오종효)	(40166)경상북도 고성군 창천면 송림리 41
대전	김중철	(300-290)대전광역시 중구 소동로 68-1번지	고성	최원영(장수하늘농장)	(66222)전라북도 고성군 계남면 장부동 13-25, 1200번지
고성	최원영	(178-861)경상북도 고성군 고성읍 함곡리6-13번지	밀양	최원영	(60464)경상남도 밀양시 창녕읍 남천동길 28-6
무주	무주구천동 아로니아	(668-811)전북 무주군 북이면 송곡리 889	경산	도현수	(38440)경상북도 경산시 진량읍 하양리43길 172-1 (진량읍)
안동	아로니아(이정숙)	(640-833)경상북도 안동시 송미읍 죽곡리 473번지	안성	안성 송가네 아로니아	(17606)경기도 안성시 보개면 남동리1번지
충청	리움아로니아(김성)	(373-863)충청북도 충주군 충주읍 이학2길 1-20	안성	박영구	(17609)경기도 안성시 서문면 하북리길 20-17 (서문면)
충청	홍교농원(김기철)	(636-394)충청남도 홍성군 홍성읍 홍성397	공주	꽃비워농장(이종용)	(32610)충청남도 공주시 탄천면 풍년촌길 71-3 (탄천면) 꽃비워농장
충청	최시원(최시원)	(448-841)충청남도 홍성군 홍성읍 홍성리 869-1	고성	문영희	(24706)경상북도 고성군 거진읍 백두대간로 229-7 (거진읍)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합안	아라농원(홍계규)	(62064)경상남도 합안군 합안면 강령리 889-2
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	남해	장덕발 미소농장	(62043)경남 남해군 삼동면 영지리 2210
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	성주	유준수	(40000)경상북도 성주군 벽진면 불락길 210-6 (벽진면)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합천	지문이 농장 (한지훈)	(60241)경상남도 합천군 대양면 양산길 24-26 (대양면)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합안	민디아로니아농장	(62012)경남합안대신면서촌9211-8
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	산청	박노을	(62209)경상남도 산청군 차장면 무지리 382
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합안	김고영	(62006)경상남도 합안군 차장면 무지리 382
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합안	황복아로니아농장(김성환)	(31700)충청남도 합안시 석남면 괴교리 332-2
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	고성	장익배(장수하늘농장)	(66416)전라북도 고성군 부안면 중앙리 601
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합천	대진(김영희)	(61115)경상남도 합천시 의창구 통울리 31-1번지 산40
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	창원	김태범	(60348)경상남도 창원군 영진면 죽산리 436-2
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	창원	황복농산(이천희)	(66666)전라북도 무주군 무풍면 원촌길 39 (무풍면, 원풍농작영농조합법인소재지)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	무주	원준수	(66666)전라북도 무주군 무풍면 원촌길 39 (무풍면, 원풍농작영농조합법인소재지)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	당진	엘릭아로니아농장	(31700)충청남도 당진시 석남면 괴교리 332-2
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	충주	황정아로니아(김정일)	(27492)충청북도 충주시 길이면 율령길 37 (길이면)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	거창	김연태	(60147)경상남도 거창군 거창읍 정경리 산18
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합천	진동자연농원 황철환	(637-940)경남합천군 합서면 태곡리 산 58
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	문경	지우네 아로니아농장(정태영)	(36311)경상북도 문경시 문경읍 송명면미길 9-19 (문경읍)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	파주	박정훈	(10800)경기도 파주시 진동면 구암로 206 (진동면)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합양	지리산약초농원 강선태	(60002)경남 합양군 유진면 신두길 11-1
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	옥천	옥천아로니아농장(이종우)	(29224)충청북도 옥천군 동이면 세산리 1283
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	경주	아로니아 아로니아농장	(40016)경상북도 경주군 초전면 갈매리 485
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	문경	무강농장(이만희)	(36341)경상북도 문경시 영동면 무림길 21-7 (영동면)
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	합안	김대성	(62000)경상남도 합안군 군북면 합안리 1192-3
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	의성	박민기	(37341)경상북도 의성군 의성읍 도동리 371
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	강화	전기정	(23042)인천 강화군 선원면 지리산리 273-2
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	의성	홍미골(서방농장(백문기))	(37341)경북 의성군 의성읍 도동리 376
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	거창	아름교회	경상남도 거창군 기북면
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	거창	한솔농산	경상남도 거창군 기북면
충청	송향농장(김송)	(627-883)경상남도 밀양시 주례면 송향리 363	거창	하계구(삼홍식품, 지사)	경상남도 거창군 가조면 돌래리

2차년도(2017년) 수집된 삼흥식품(농업회사법인 주식회사 삼흥)의 회원농가 목록

지역명	농장명(농장주)	착즙수율	안토시아닌함량 (mg/100g)
부여	최씨농장 (최종성)	68.5	149
인천	강화아로니아농장(성재현)	71.0	151
순창	구림일품농원 신성기	71.1	152
김해	김이근	62.6	147
밀양	송향농장(김송)	63.5	147
안동	서용범	70.5	150
보은	덕대산농장(이수현)	73.0	154
영동	손인갑	72.1	153
하동	도지은	69.5	145
함양	함양아로니아(서진원)	69.5	146
서울	송준석	70.2	152
진안	진안고원아로니아농원	70.4	152
포항	운제산아로니아농원	70.3	153
청송	솔보라팜 윤금순	72.8	159
옥천	가나농원(진순자)	70.8	156
부여	충남농원 강민숙	71.1	153
청양	베리킹덤(김달식)	70.1	152
대전	김중철	70.5	153
의성	김민석	69.9	150
무주	무주구천동 아로니아팜	65.5	145

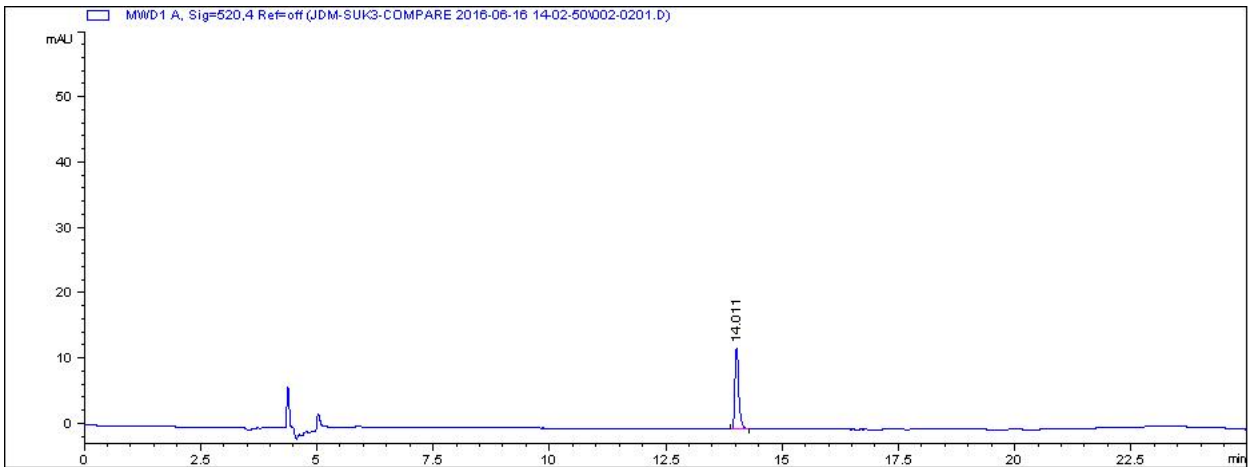
순천	아로니멜라 후곡농장(최문식)	70.1	160
옥천	라운뜰아로니아 농장 (박용규)	62.5	145
광주	빛고을농원(김제중)	69.5	154
화성	베리사랑농원(신동엽)	70.1	157
청송	청송아로니아(장시화)	68.5	156
함양	봉수농장(박봉수)	76.5	156
청주	청주 아로니아 킹농원	65.5	143
함양	김범석	69.5	152
임실	박사골영농조합(오홍섭)	65.4	148
청송	최철현(부부농장)	72.2	151
고령	고령참마음아로니아농장(채경훈)	70.2	152
진천	대성 아로니아 농원	72.1	157
옥천	이용섭	63.4	150
고령	대가야아로니아(박은정)	68.6	152
괴산	강광복	63.2	154
거창	당송농장(최말남)	72.5	162
공주	배 영순	70.5	142
진주	하릿골 아로니아 농장 (김관호)	68.3	163
군산	발산아로니아농장(채창석)	70.6	145
진주	송백작골농장(김철조)	70.1	149
진주	청정골 집현 유기농농장(안인규)	65.5	145
청주	베리굿팜(정상일)	71.0	150
진주	경남진주아로니아(박영근)	68.5	144
공주	유성로컬푸드농장(허명옥)	72.1	156
하동	단비농장 강무중	65.5	149
창원	오대원	70.9	152
진의면	금사리아로니아농원 (이창기)	70.3	152
사천시	녕쿨농원(박억부)	65.3	142
공주	말동골아로니아(이은구)	70.5	164
논산	햇빛촌 아로니아	70.4	166
서산	팔봉산아로니아(김지정)	71.2	168
인천	강화섬농장(이재욱)	72.5	170
강원	정선아리솔농원박성호	71.5	170
하동	서 점구	65.3	147
고성	박인혁	68.5	155
나주	광주아로니아	66.9	156
창녕	조 청 제	70.0	153
거창	청정자연농원 엘림 (박 성 곤)	72.5	170
산청	청산아로니아 농원	70.5	168
합천	합천베리농장 전상일	67.5	150
여수	가온누리(유성훈)	65.1	148
거창	신원 산들농원	70.5	160
금산	금산아로니아(김종승)	71.5	165
금산	금산아로니아(김종승)	70.4	161
김해	무척산 현우드림팜(정기태)	68.5	158
김해	김해 무척산현우드림팜	66.4	155
평택	바른농장(정다순)	68.5	159
거창	조익환	70.4	162
의령	아로니아사랑	65.5	145
창원	해광농원(최은성)	64.5	160

평택	바른농장(정다순)	70.3	155
단양	이정식	61.5	165
장수	장수별하리농장	62.8	160
대전	심종용	69.8	162
청주	미건농장(이나영)	67.5	165
밀양	손은준	65.4	165
고령	소림아로니아(오중표)	70.4	166
장수	최원황(장수하늘농원)	71.8	166
밀양	전진환	65.9	146
경산	도현수	70.5	152
안성	안성 송가네 아로니아	72.1	169
안성	박영구	70.1	160
공주	꽃바위농장(이종웅)	69.8	158
고성	문영희	67.1	150
함안	아라농원(공재규)	65.5	144
남해	장덕봉 미소농장	65.9	154
성주	유관수	66.5	150
합천	지훈이 농장 (한지훈)	67.5	152
함안	만나아로니아농장	65.5	145
산청	박노윤	67.5	150
함안	김고영	65.1	156
당진	왜목아로니아농장(김성환)	70.2	168
고창	꿈의베리(홍용표)	72.1	168
창원	다인(김영희)	65.1	150
창녕	김태백	70.1	159
무주	광음농산(이진희)	72.1	168
당진	왜목아로니아농장	70.6	156
충주	청정아로니아(김창원)	70.1	165
거창	김 영태	68.1	165
함안	진동자연농원 황철환	65.9	149
문경	지우네 아로니아농장(정태영)	64.5	150
과주	박정필	66.7	158
함양	지리산약초농원 강선태	69.5	160
옥천	옥천아로니아농장(이용섭)	70.5	168
성주	아인이네 아로니아농장	71.5	135
문경	부강농장(이만희)	70.6	154
함안	김대성	65.0	145
의성	백문기	70.9	165
강화	전기정	70.6	150
의성	호미골백서방농장(백문기)	70.8	155
거창	아림교회	75.1	169
거창	한솔농산물	71.5	163
거창	하재규(삼홍식품, 자사)	70.2	165

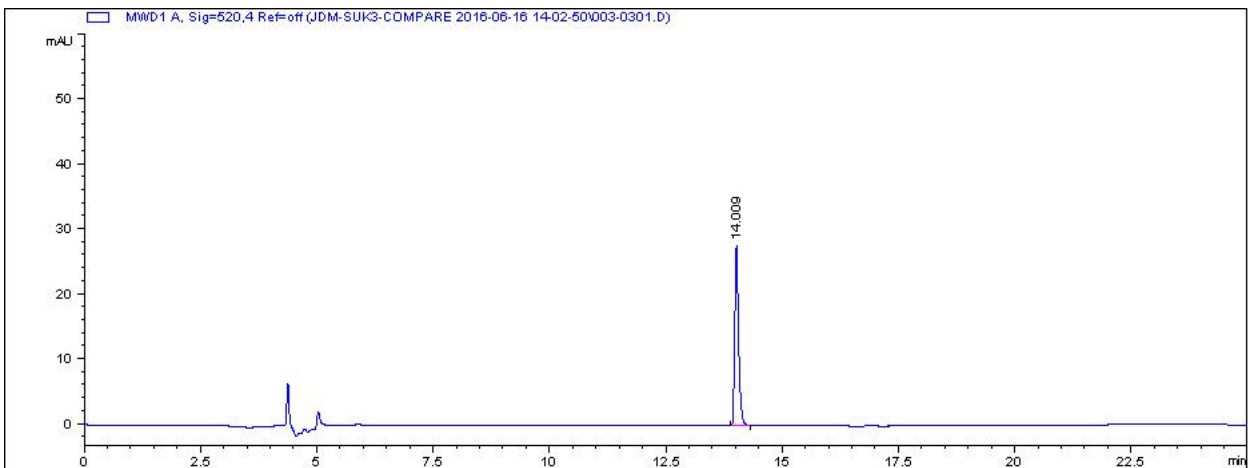
다. HPLC 로 안토시아닌의 지표성분 정량

(1) 아로니아 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립

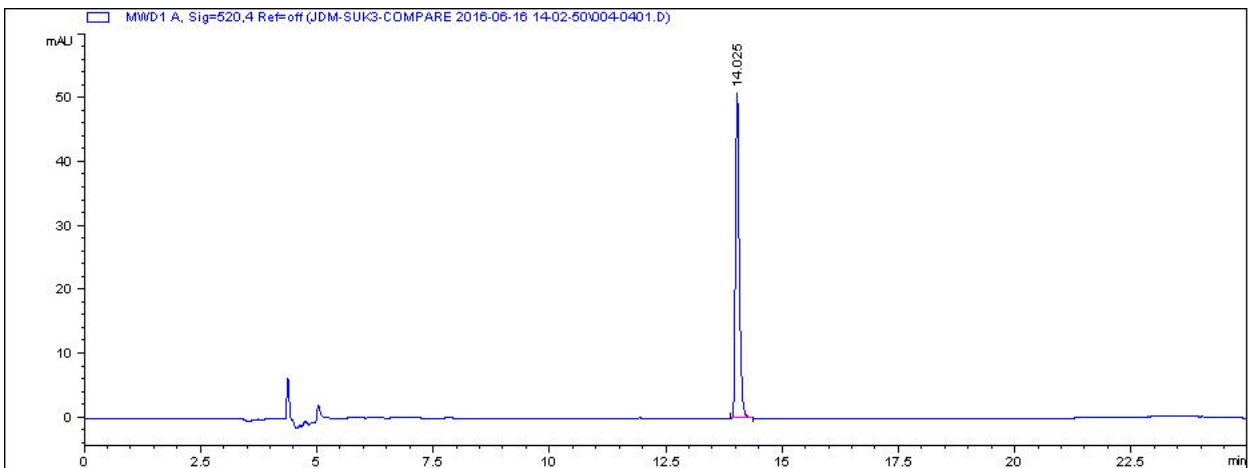
Cyanidin25 ug/ml



Cyanidin50 ug/ml



Cyanidin100 ug/ml



Cyanidin Standard Curve

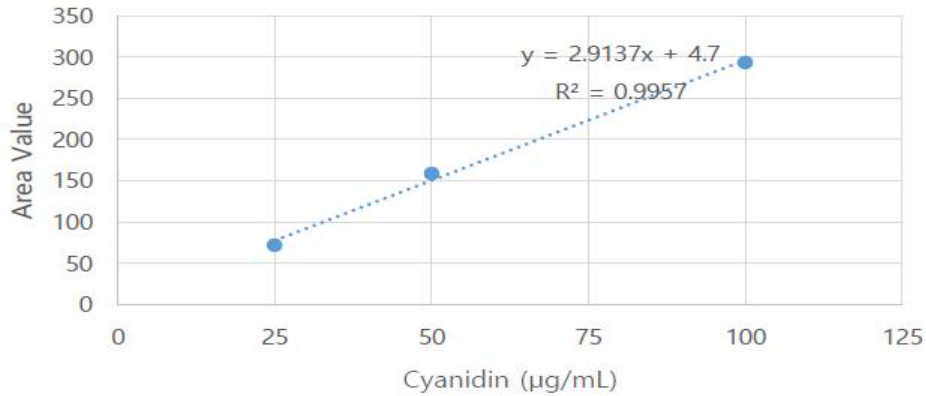


Fig. Cyanidin standard curve.

(2) 아로니아의 안토시아닌 함량 확인

지역명	농장명(농장주)	Cyanidin
부여	최씨농장 (최종성)	9.9
인천	강화아로니아농장(성재현)	9.9
순창	구림일품농원 신성기	10.1
김해	김이근	9.6
밀양	송향농장(김송)	9.7
안동	서용범	9.8
보은	덕대산농장(이 수현)	10.2
영동	손인갑	10.1
하동	도지은	9.3
함양	함양아로니아(서진원)	9.6
서울	송준석	10.0
진안	진안고원아로니아농원	10.2
포항	운제산아로니아농원	10.1
청송	솔보라팜 윤금순	10.2
옥천	가나농원(진순자)	10.3
부여	충남농원 강민숙	10.2
청양	베리킹덤(김달식)	10.1
대전	김중철	10.1
의성	김민석	9.9
무주	무주구천동 아로니아팜	9.6
순천	아로니멜라 후곡농장(최문식)	10.3
옥천	라운뜰아로니아 농장 (박용규)	9.4
광주	빛고을농원(김제중)	10.4
화성	베리사랑농원(신동엽)	10.3
청송	청송아로니아(장시화)	10.2
함양	봉수농장(박봉수)	10.7
청주	청주 아로니아 킹농원	9.4

함양	김범석	10.0
임실	박사골영농조합(오홍섭)	9.7
청송	최철현(부부농장)	9.4
고령	고령참마음아로니아농장(채경훈)	10.0
진천	대성 아로니아 농원	10.3
옥천	이용섭	9.7
고령	대가야아로니아(박은정)	10.0
괴산	강광복	10.1
거창	당송농장(최말남)	10.6
공주	배 영순	9.5
진주	하릿골 아로니아 농장 (김판호)	10.3
군산	발산아로니아농장(채창석)	9.4
진주	송백작골농장(김철조)	9.3
진주	청정골 집현 유기농농장(안인규)	9.4
청주	베리굿팜(정상일)	9.8
진주	경남진주아로니아(박영근)	9.4
공주	유성로컬푸드농장(허명옥)	10.2
하동	단비농장 강무중	9.8
창원	오대원	10.0
진의면	금사리아로니아농원 (이창기)	10.3
사천시	녕쿨농원(박억부)	9.3
공주	말동골아로니아(이은구)	10.7
논산	햇빛촌 아로니아	10.3
서산	팔봉산아로니아(김지정)	10.3
인천	강화섬농장(이재욱)	11.3
강원	정선아리솔농원박성호	11.1
하동	서 점구	9.2
고성	박인혁	10.2
나주	광주아로니아	10.2
창녕	조 청 제	10.0
거창	청정자연농원 엘림 (박 성 곤)	11.3
산청	청산아로니아 농원	11.0
합천	합천베리농장 전상일	9.8
여수	가온누리(유성훈)	9.7
거창	신원 산들농원	10.3
금산	금산아로니아(김종승)	10.6
금산	금산아로니아(김종승)	10.0
김해	무척산 현우드림팜(정기태)	10.2
김해	김해 무척산현우드림팜	10.2
평택	바른농장(정다순)	10.4
거창	조익환	10.6
의령	아로니아사랑	9.4
창원	해광농원(최은성)	10.3
평택	바른농장(정다순)	10.2
단양	이정식	10.6
장수	장수별하리농장	10.3
대전	심종용	10.6
청주	미건농장(이나영)	10.6
밀양	손은준	10.6
고령	소림아로니아(오중표)	10.3

장수	최원황(장수하늘농원)	10.9
밀양	전진환	9.6
경산	도현수	10.0
안성	안성 송가네 아로니아	11.1
안성	박영구	10.5
공주	꽃바위농장(이종웅)	10.4
고성	문영희	9.8
함안	아라농원(공재규)	9.4
남해	장덕봉 미소농장	10.1
성주	유관수	9.8
합천	지훈이 농장 (한지훈)	10.0
함안	만나아로니아농장	9.5
산청	박노윤	9.3
함안	김고영	10.2
당진	왜목아로니아농장(김성환)	11.0
고창	꿈의베리(홍용표)	11.2
창원	다인(김영희)	9.8
창녕	김태백	10.4
무주	광음농산(이진희)	11.2
당진	왜목아로니아농장	10.2
충주	청정아로니아(김창원)	10.3
거창	김 영태	10.5
함안	진동자연농원 황철환	9.8
문경	지우네 아로니아농장(정태영)	9.7
과주	박정필	10.0
함양	지리산약초농원 강선태	10.3
옥천	옥천아로니아농장(이용섭)	11.6
성주	아인이네 아로니아농장	8.1
문경	부강농장(이만희)	10.1
함안	김대성	9.5
의성	백문기	10.8
강화	전기정	9.8
의성	호미골백서방농장(백문기)	10.2
거창	아림교회	10.8
거창	한솔농산물	10.7
거창	하재규(삼흥식품, 자사)	10.9

라. 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작

(1) 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아 추출물의 발효

아로니아 추출액을 유산균 발효를 실시하였는데, 유산균은 Lactobacillus 종류 중 건강기능식품품 목제조신고증을 가지고 있는 유산균 2종(플란타김치유산균, 유산균 9종)을 택하여 발효하였음.

<p style="font-size: small;">2016-09-25 16:19 From: To:8313038834 Page:1/1</p> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> (주) 메디오젠 <small>390-250 충북 제천시 바이오파미1로 120 ☎ (043)644-4216~7 / Fax 644-4215 http://www.mediogen.co.kr</small> </div> <p style="text-align: center; font-weight: bold; margin: 10px 0;">확인서</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">제품명</th> <th colspan="6">원재료(원산지)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>폴립티글리처유산균</td> <td>유산균</td> <td>만포</td> <td>자당</td> <td>유당</td> <td>혼합</td> <td>말긴산</td> </tr> <tr> <td></td> <td>쿠네산</td> <td>말메이시아</td> <td>쿠네산</td> <td>쿠네산</td> <td>내델란드</td> <td>쿠네산</td> </tr> <tr> <td>공급처</td> <td>메디오젠</td> <td>대원제당</td> <td>합광</td> <td>정맥스</td> <td>홍원식품</td> <td>에어리얼</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>건물메이오</td> </tr> </tbody> </table> <p style="font-size: x-small; margin-top: 10px;">귀사에 공급하는 상기 제품 성분의 원산지표기에 대한 내용이 틀림이 없습니다.</p> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">2016년 08월 25일</p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">(주) 메디오젠 대표 백 남 </p>	제품명	원재료(원산지)						폴립티글리처유산균	유산균	만포	자당	유당	혼합	말긴산		쿠네산	말메이시아	쿠네산	쿠네산	내델란드	쿠네산	공급처	메디오젠	대원제당	합광	정맥스	홍원식품	에어리얼							건물메이오	<p style="font-size: small;">2014-09-02 14:06 From: To:8313038834 Page:1/2</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> </div> <p style="text-align: center; font-size: x-small; margin: 10px 0;">제 2004-대전청-0026-0069 호</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; margin: 10px 0;">건강기능식품품목제조신고증</p> <p style="font-size: x-small; margin-top: 10px;"> 영업허가(번호): 제 2004-대전청-0026 호 업 소 명: (주)메디오젠 소 재 지: 충청북도 제천시 왕암동 981번지 영 업 의 종 류: 건강기능식품전용제조업 제 품 명: 9종알파혼합유산균 <small>(프로바이오틱스(원료명))</small> 품목 제조 조건: </p> <p style="font-size: x-small; margin-top: 10px;"> 건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능 식품품목제조신고를 수리합니다. </p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">2010년 12월 17일</p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">대전지방식품의약품안전청 </p>
제품명	원재료(원산지)																																			
폴립티글리처유산균	유산균	만포	자당	유당	혼합	말긴산																														
	쿠네산	말메이시아	쿠네산	쿠네산	내델란드	쿠네산																														
공급처	메디오젠	대원제당	합광	정맥스	홍원식품	에어리얼																														
						건물메이오																														
분무건조 발효용 김치플랜타늄 유산균	액상동결건조 발효용 9종알파혼합유산균																																			

(가) 유산균 발효과정

아로니아 착즙액 제조(25brix)	아로니아 착즙액(10brix)와 아로니아 농축액(65brix)를 혼합하여 30brix로 조절
복합시제품1-유산균 발효 (9종알파혼합유산균)	<ul style="list-style-type: none"> - 종균배양 : 30brix로 조절된 아로니아 착즙액에 9종 알파혼합유산균을 2% 첨가한 후 30℃ 인큐베이터에서 48시간동안 발효 - 본배양 : 종균배양액을 50배의 아로니아 착즙액에 혼합후에 48시간 발효
복합시제품2-유산균 발효 (김치플랜타늄 유산균)	<ul style="list-style-type: none"> - 종균배양 : 30brix로 조절된 아로니아 착즙액에 김치 플랜타늄 유산균을 1% 첨가한 후 30℃ 인큐베이터에서 48시간동안 발효 - 본배양 : 종균배양액을 50배의 아로니아 착즙액에 혼합후에 48시간 발효

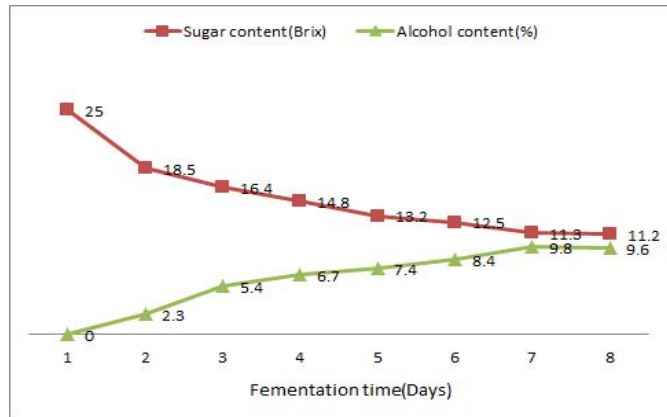
(2) 초산발효과정

복합시제품 2를 분무건조할 때 pH보정이 필요한데, 화학적으로 생산한 acetic acid 나 lactic acid 를 사용하지 않고 아로니아를 알코올발효->초산발효하여 pH 조절하는데 사용하였는데, 아로니아 초산발효액은 다음과 같은 방법으로 제조하였음.

아로니아 착즙액 제조 (25brix)	아로니아 착즙액(10brix)와 아로니아 농축액(65brix)를 혼합하여 25brix로 조절
아로니아 알코올발효	- 주모배양 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 를 접종하여 28℃에서 7일간

배양

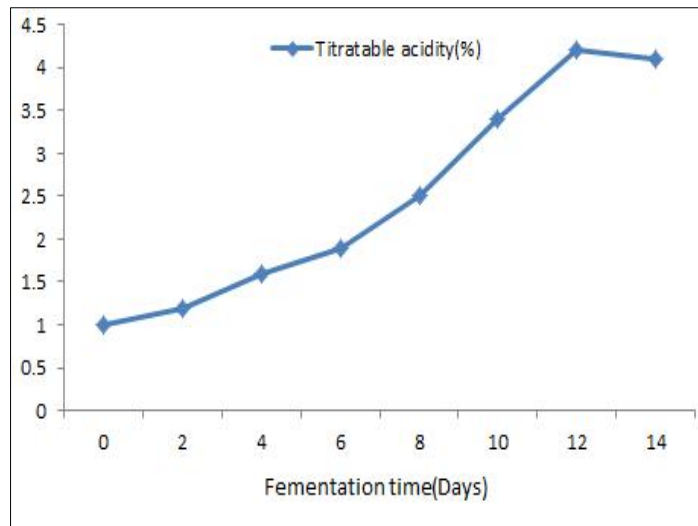
- 주모 10%로 아로니아 착즙액(25brix) 6일동안 발효



아로니아 초산발효

- 종초배양 : 아로니아 착즙액에 Acetobacter sp.를 접종후 30℃에서 200rpm으로 72시간 배양

- 초산발효 : 초기 산도는 1%로 조절한 후 2주간 28℃에서 300rpm에서 아로니아 초산 발효를 진행



나) 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아+유산균 발효 동결건조 제품 (복합 시제품1) 제작

아로니아 복합시제품을 제작하기 위하여 우선 유산균으로 아로니아(액상)발효액을 제조하고, 이를 동결건조하여 아로니아유산균 칩을 제작하였음.

이 제품은 최종 시제품이 분말제품이 될 것이기 때문에 제작한 것으로 영양성분 분석과 대장균, 유산균수를 측정하였음.

검사 성적서

발급번호 : P17-03-014-1호 접수번호 : P-1703014-1

제품명	아로니아유산균칩	제조일자	-	유통기한	-
의뢰일자	2017-03-09	업체명	농림축산검역 주식회사 상흥	대표자	하재규
검사연월일	2017-03-23	의뢰업체주소	경남 거창군 가조면 동대1길 80-5		
제품유형		우편번호	50120		
검사목적	<input checked="" type="checkbox"/> 참고용(영양성분) <input type="checkbox"/> 기타				

시험 항목 및 결과

시험항목	분석결과(100g당 함량)	표시방법에 의한 결과	1일영양성분기준치에 대한비율(%)
열량	445.6 Kcal	450 Kcal	-
나트륨	134.4 mg	130 mg	7%
탄수화물	70.2 g	70 g	21%
당류	49.0 g	49 g	-
지방	13.6 g	14 g	27%
포화지방	0.0 g	9 g	60%
트랜스지방	0.2 g	0.5 g(미만)	-
클레스티롤	0.0 mg	0 mg	0%
단백질	10.6 g	11 g	20%

판정 : 상기사항 없음 검사자 : 강수지, 강명술, 강성훈
 책임자 : 박 준 기

비고 :
 ※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함
 ※ 상기내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 결과이며, 본 성적서는 시험의 정확적 이외의 광고, 선전등 상업적인 용도로 사용될 수 없습니다.

한결분석센터(주) 2017년 3월 23일



문서확인번호 : I2F8-FQBW-J6RH-FXWG

시험 · 검사 성적서

발행번호	R20170321-0028	접수번호	170100329-001
검사연월일	2017.03.21	접수연월일	2017.03.10
제품명	아로니아유산균칩		
(제품)제조번호	통목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타(기준규격)		
제조(수입)일	유통(유통유지)기한		
의뢰자	상명 하재규	업체명	농림축산검역본부시험용
소재지	(50120)경상남도 거창군 가조면 동대1길 80-5	전화번호	검사유형: 제조국:
입재일			
소재지			
시험 · 검사목적	식품 기타(자체품질관리용)		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
유산균수	기준없음	4000 (CFU/g)	상기사항확인 함	
대장균	기준없음	음성	상기사항확인 함	

출발판정 : 상기사항확인함 시험감사자 : 이우희 시험감사책임자 : 박종기

비고 :
 ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 합니다.
 ※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별지로 작성 가능합니다.
 ※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.
 * 식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다. 2017년 03월 21일

한결분석센터(주)

52839 경상남도 진주시 문산읍 월아산로 991, 201호(시험영상동) T:055-763-4048 F:055-763-4049



다) 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아 추출물의 혼합비율 결정
 아로니아 복합 시제품 제작을 위하여 아로니아 착즙액(추출액)과 아로니아 유산균 발효액, 아로니아 초산균발효액의 혼합비율은 다음과 같음.

아로니아 복합시제품1	비율
아로니아 착즙액	50
아로니아 유산균 발효액	50
아로니아 복합시제품2	비율
아로니아 착즙액	70
아로니아 유산균 발효액	20
아로니아 초산균 발효액	10

(4) 아로니아 복합시제품 1 의 제작

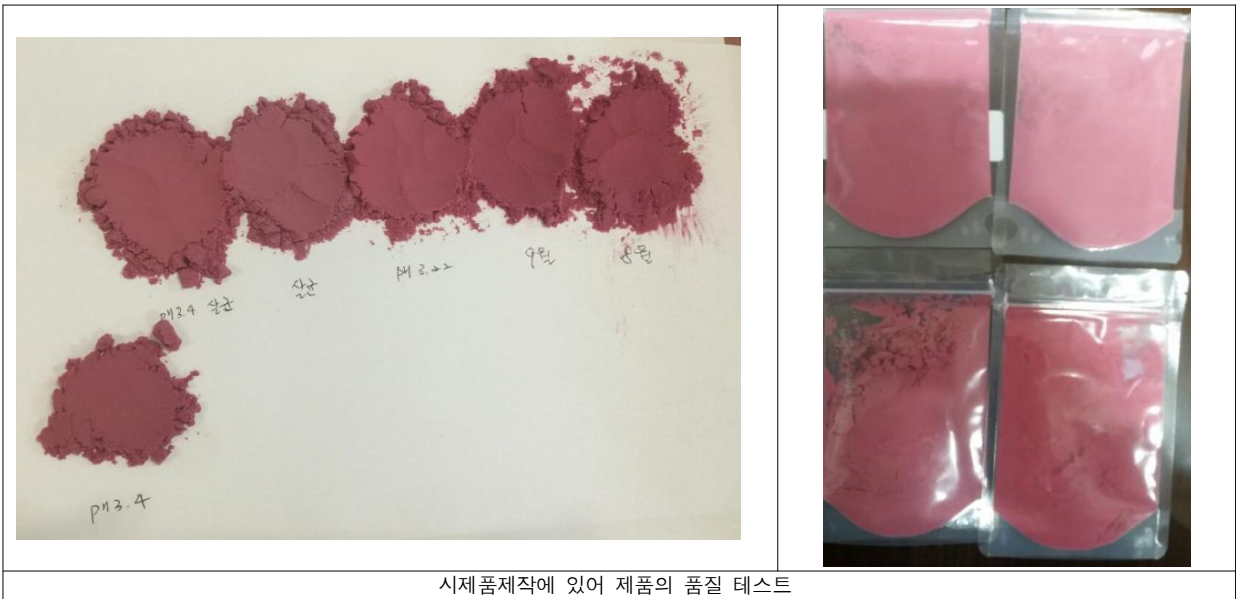


아로니아 복합시제품1
(아로니아유산균칩)

아로니아 복합시제품1은 아로니아 유산균칩으로 아로니아 착즙액과 아로니아 유산균발효액을 혼합하여 동결건조한 제품임. 시제품까지는 제작하였으나, 시장성 검토가 덜되어 제품화는 추후 결정할 예정임.

마. 아로니아 복합 시제품 2 제작

아로니아 복합 시제품 2는 아로니아 착즙액과 아로니아 유산균발효액을 혼합한 액상을 아로니아 초산발효액으로 pH를 조절(보정)하고, 이를 스프레이 건조함으로써, 복합시제품2를 제작하였음.



시제품제작에 있어 제품의 품질 테스트

바. 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품2 생산 공정 확립



사. 포장디자인 개발

물에 녹는 아로니아 제품의 포장디자인은 다음과 같음.

물에 녹는 아로니아
프리미엄 아로니아

아로니아 92% 우리농민이 직접 재배 생산한 아로니아
인토시아닌 폴리페놀 다량 함유 30g (125kcal)

【제품명】 물에 녹는 아로니아 분말 (아로니아 92% 및 첨가물 함유) (원재료명 및 함량) 아로니아 92%(국내산), 분말, 소포화 지방산, 유황 함유 1~2회 8g(2스푼(1스푼당5g))을 따뜻한 물에 녹여 마시거나 요플레, 우유, 미온수 등에 400cc 투입하십시오.
【내용량】 30g
【보관방법】 직사광선을 피하고 서늘한 곳 또는 실온에 보관하십시오. 개봉 후에는 위생 및 밀봉을 꼭 지켜주세요.
【단종 및 교환】 본 제품은 공중개에 의한 고장 소자(수리)에 대한 교환에 대해 교환 또는 보상 받으실 수 없습니다.
【용기세척】 1회용 용기(플라스틱) (055) 941-1500
【제조원】 삼영식품
주소: 경기도 가평군 동계1길 80-6
※ 상용주요사항 : 용기에 부착되어 있는 삽기제에는 유의하십시오.
※ 부정·불량식품 신고는 국민연락처 1399 까지

우리 땅에서 정성껏 재배한 아로니아를 생 추출하여 정제된 아로니아 인토시아닌 폴리페놀을 함유한 아로니아 분말과 물에 잘 녹입니다.

100% 아로니아
100% 아로니아

영양 성분 표기법
100g 기준



100% 아로니아
100% 아로니아



100% 아로니아
100% 아로니아

100% 아로니아
100% 아로니아



100% 아로니아
100% 아로니아

100% 아로니아
100% 아로니아

성분명	단위	함량
에너지	kJ	100
탄수화물	g	100
단백질	g	100
지방	g	100
나트륨	mg	100
칼슘	mg	100
철	mg	100
아연	mg	100
망간	mg	100
구리	mg	100
코발트	mg	100
셀레늄	mg	100
비타민 B1	mg	100
비타민 B2	mg	100
비타민 B6	mg	100
비타민 C	mg	100
비타민 E	mg	100
비타민 K	mg	100
비타민 P	mg	100
비타민 Q	mg	100
비타민 U	mg	100
비타민 V	mg	100
비타민 W	mg	100
비타민 X	mg	100
비타민 Y	mg	100
비타민 Z	mg	100
비타민 AA	mg	100
비타민 BB	mg	100
비타민 CC	mg	100
비타민 DD	mg	100
비타민 EE	mg	100
비타민 FF	mg	100
비타민 GG	mg	100
비타민 HH	mg	100
비타민 II	mg	100
비타민 JJ	mg	100
비타민 KK	mg	100
비타민 LL	mg	100
비타민 MM	mg	100
비타민 NN	mg	100
비타민 OO	mg	100
비타민 PP	mg	100
비타민 QQ	mg	100
비타민 RR	mg	100
비타민 SS	mg	100
비타민 TT	mg	100
비타민 UU	mg	100
비타민 VV	mg	100
비타민 WW	mg	100
비타민 XX	mg	100
비타민 YY	mg	100
비타민 ZZ	mg	100

아. 영양성분 분석

물에 녹는 아로니아 제품의 영양성분표와 품목제조보고서는 다음과 같음.

식품·검사성적서

발행번호	R20170814-0055	접수번호	170101208001
검사원일	2017.08.14	접수일	2017.08.08
제품명	물에 녹는 아로니아 분말	출처	한국농수산식품유통공사
등록/제조번호		등록/제조번호	20060024182106
유형·재질	분말	소재지	경상남도 거창군
제조/수입일		유통(유통일자)기한	2018.01.16
외관	흰색 분말	입차량	상용차량
소재지	경상남도 거창군 가조면 동대1길 80-5	전화번호	055-941-1500
입차량	상용차량	팩스번호	055-941-1502
제조품	아로니아 분말	제조국	대한민국
소재지	경상남도 거창군 가조면 동대1길 80-5	제조업	제조업
시험·검사목적	식품·검사성적서	시험·검사결과	합격
시험·검사항목	중금속, 농약잔류	비고	

시험·검사항목 및 결과

시험·검사항목	시험·검사기준	시험·검사결과	판정	비고
중금속	0.1mg/kg	0.05mg/kg	합격	
농약잔류	0.01mg/kg	0.005mg/kg	합격	

(주)동진생명연구원

식품·식품첨가물품목제조보고서

식품첨가물의 사용용량과 사용처(주소)가 기재되어 있는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다.

보고인

성명: 김재규
주소: 경남 거창군 가조면 동대1길 80-5
영업소: 영남(상동) 상용식품
소재지: 경남 거창군 가조면 동대1길 80-5

식품의 유형: 과채 가공품

제품명: 물에 녹는 아로니아 분말

유통기한: 제조일부 12개월(월,년)
품질유지기한: 제조일부 12개월(월,년)
원재료명 또는 성분명 및 배합비율: 아로니아 분말

용도 용법: 하루 1-2회 6g 정도를 음용하십시오.

제품정보: 보관방법및포장재질: 실온 / HDPE

포장방법 및 포장단위: 밀봉 / 30g, 35g, 40g, 50g

성상: 고유의 붉은 색택과 향미를 지닌 분말로서 이며, 아취가 없어야 한다.

고열탕·저열탕식용 해당여부: [] 예 [] 아니오 [√] 해당 없음

발발연안 식품 해당 여부: [] 예 [√] 아니오

기타:

「식품위생법」 제 37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 보고서를 보고합니다.

보고인: 김재규 (서명)

2017년 8월 14일

식품첨가물 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 보고서를 보고합니다.



보고인: 김재규 (서명)

2017년 8월 14일

영양성분 검사성적서

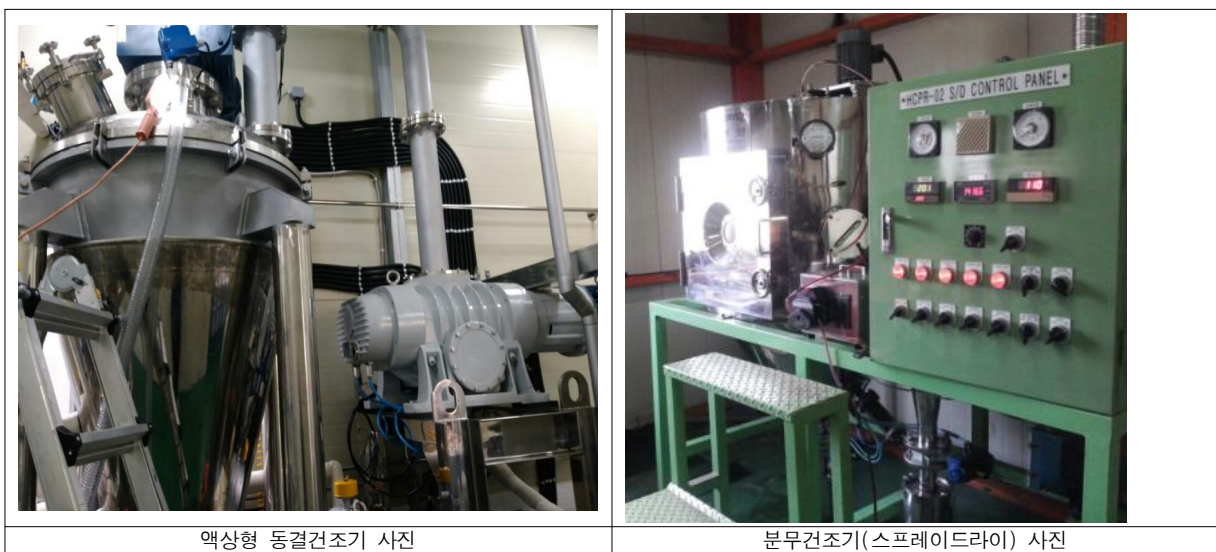
품목제조보고서

자. 지표성분 분석

시험 성적서		(재)남해마늘연구소 경남 남해군 이동면 남해대로 2465-8 Tel : 055-860-8955 Fax : 055-860-8960		접수번호 : 17-27 페이지(2) / (2 총)		 남해마늘연구소																										
1. 의뢰자 ○ 의뢰인 : 농업회사법인 주식회사 삼흥 ○ 주 소 : 경남 거창군 가조면 동례 1길 80-5 ○ 의뢰일자 : 2017. 08. 07.		2. 시험대상품목/물질/시료명 : 아로니아 제품 3종		3. 시험기간 : 2017. 08. 10. ~ 08. 11.		4. 시험방법 : 자체시험방법에 준함.																										
5. 시험환경 온도 : (20.4 ± 1) °C, 습도 : (42 ± 1) % R.H.		6. 시험결과 1) 총 안토시아닌 (mg/L)		2) 총 페놀 (mg/g)		3) DPPH 라디칼 소거활성 (%)																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>시료명</th> <th>총 안토시아닌</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>제품 1</td> <td>5.61±0.05</td> </tr> <tr> <td>제품 2</td> <td>2.54±0.24</td> </tr> <tr> <td>제품 3</td> <td>0.56±0.16</td> </tr> </tbody> </table>		시료명	총 안토시아닌	제품 1	5.61±0.05	제품 2	2.54±0.24	제품 3	0.56±0.16	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시료명</th> <th colspan="3">희석배수</th> </tr> <tr> <th>50배</th> <th>100배</th> <th>200배</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>제품 1</td> <td>90.96±1.64</td> <td>75.18±4.02</td> <td>62.05±1.20</td> </tr> <tr> <td>제품 2</td> <td>91.30±0.20</td> <td>90.16±0.42</td> <td>83.15±1.48</td> </tr> <tr> <td>제품 3</td> <td>64.64±1.56</td> <td>42.01±1.07</td> <td>25.46±0.60</td> </tr> </tbody> </table>		시료명	희석배수			50배	100배	200배	제품 1	90.96±1.64	75.18±4.02	62.05±1.20	제품 2	91.30±0.20	90.16±0.42	83.15±1.48	제품 3	64.64±1.56	42.01±1.07	25.46±0.60	*희석배수에 한함 이 성적서 밖의 내용은 시험의뢰인에 의해 제공된 시료에 한합니다. 시험성적서의 직인이 없거나 사본은 무효이며, 용도이외의 사용을 금합니다.	
시료명	총 안토시아닌																															
제품 1	5.61±0.05																															
제품 2	2.54±0.24																															
제품 3	0.56±0.16																															
시료명	희석배수																															
	50배	100배	200배																													
제품 1	90.96±1.64	75.18±4.02	62.05±1.20																													
제품 2	91.30±0.20	90.16±0.42	83.15±1.48																													
제품 3	64.64±1.56	42.01±1.07	25.46±0.60																													
(재)남해마늘연구소		2017. 08. 11. (재) 남 해 마 늘 연 구 소 장 		(재)남해마늘연구소																												

차. 시제품 제작 및 대량생산, 제품화

시제품은 자사가 보유하고 있는 액상형 동결건조기(시제품1)와 분무건조기(스프레이건조기)를 이용한 시제품(시제품2)을 제작하였으며, 사진은 다음과 같음.



카. 미생물에 대한 안전성 평가

안토시아닌 소재 시제품의 미생물에 대한 안전성 평가를 실시한 결과, 액상제품을 스프레이 드라

이 한 경우 180℃ 이상에서 분무를 하기 때문에 미생물에 대한 안전하였음. 아로니아 스프레이 시제품을 5배의 생리증류수를 첨가하여 10분 동안 손으로 균질한 후 10진 희석법으로 희석하여 검사하였음. 일반세균수의 측정에는 PCA배지(Difco, USA)를 사용하여 35℃, 24시간 배양하였음. 일반세균균수는 표준법(pour-plate technique)으로 하였음. 그 결과, 아로니아 동결건조제품과 아로니아 분무건조시제품은 대장균은 음성으로 나타났음.



타. 시제품의 대량생산 및 제품화



시제품의 대량생산을 위하여 OEM 업체인 (주)대호양행에서 시제품을 대량생산하였으며, 이를 자회사인 (대표자 동일) 삼흥식품에서 물에녹는아로니아 제품으로 출시(제품명 : 물에녹는아로니아) 하여 2017년 7월이후 판매함

<p>대량생산을 위한 시제품의 품질테스트(pH 보정)</p>	<p>(주)대호양행에서 생산한 시제품</p>


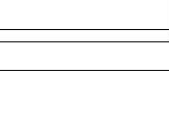


물에 녹는 아로니아 제품사진

- 삼흥식품에서는 이로 인하여 2017년 매출(아로니아 제품, 아로니아 발효액) 약 5500만원을 달성함.

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서							
과제명	아로니아의 전립중 비대중 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 글리콜)의 개발						
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼흥	참여기관	경남과학기술대학교, 안전성평가연구소				
책임자	정동민	연구기간	2016년 07월 - 2016년 12월 (총 30개월)				
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000	총계	650,000		
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	삼흥식품				
기술료	없음	기술실시일	2017.04.01				
구분	기술실시업체 결산에 (연차 배반권) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적				
실적	자산 총계	688	계정연수	1			
	기본 총계	682	기술개발사업 활용 비율액	55			
	부채 총계	5					
	매출액 총계	2392016, 2002017.10					
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	물에 녹는 아로니아		2017. 2.7	125	44%	국내산	없음
2017년 11월 08일 연구책임자 : 정동민 (서명 )							

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

		
		
		
		
		
		
		
2017-10-27, 890000원, 호성농산		총 125,075,400원 총 4,500만원

파. 시제품(우리땅 아로니아 골드분말)의 품목제조보고서
 시제품은 분말형태로써, 자사의 물에 녹는 아로니아 (품목제조보고 번호 : 2004062418275)로 함께 생산하여 판매할 수 있으나, 3차년도 참여기업인 농업회사법인 (주) 하늘선물에프앤비에서 판매가 가능하도록 품목제조보고를 시행함.

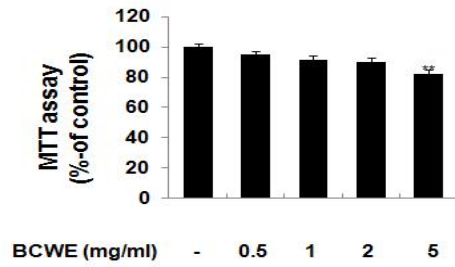


Fig.1 Effect of Black chokeberry water extract (BCWE) on cell viability in Raw 264.7 macrophage cells. Cells were treated with BCWE (0.5, 1, 2, 5 mg/ml) and the cells were further incubated for 24hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results are means \pm S.D of triplicate data. **P<0.01 indicates S.D as compared to control.

(2) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였음. RAW 264.7 세포는 60 mm cell dish에서 다양한 농도의 아로니아 시료를 1시간 동안 전처리하고 1 ug/ml의 LPS를 처리하여 16시간 배양하였음. 배양액 100 ul와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였음.

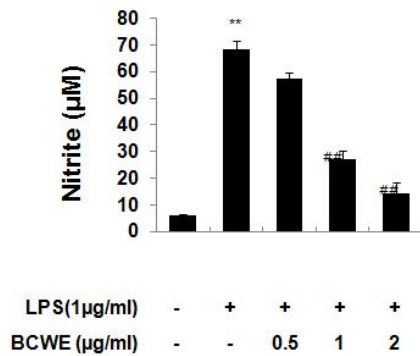


Fig.2. Effect of BCWE on LPS-induced NO production in Raw 264.7 macrophage cells. Cells were pretreated with indicated concentrations of BCWE for 1 h and then stimulated without or with LPS (1 µg/ml) for 16h. The treated culture media were used to measure the amount of nitrite to evaluate NO production. Results are means \pm S.D of triplicate data. **P<0.01 indicates S.D as compared to control. ##P<0.01 indicates S.D as compared to LPS.

LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 NO 생성에 대한 아로니아 물 추출물의 효과를 조사하기 위해서 NO assay에 의해 nitrite 량을 측정하였음 (Fig. 2). NO 생성은 LPS 단독 처리에서 유도되었음. 반면, LPS로 유도된 세포에서 NO 생성의 함량은 아로니아 물 추출물 처리에 의해서 농도별로 감소했음.

(3) Western blot analysis

Western blot 분석의 시료는 차가운 cell lysis buffer을 사용하여 세포를 깨어서 사용되었음. 단백질 농도는 Bradford assay에 의해 측정하였음. 각 시료에 대한 동량의 단백질을 8-12% SDS-PAGE 전기영동으로 분리되어지고 PVDF 멤브레인으로 Blotting하였음. 1차 항체는 4°C에서 16시간동안 처리하고, 2차 항체는 실온에서 1시간처리하였음. 1, 2차 처리된 멤브레인은 ECL 용액을 처리하여 발색하였음.

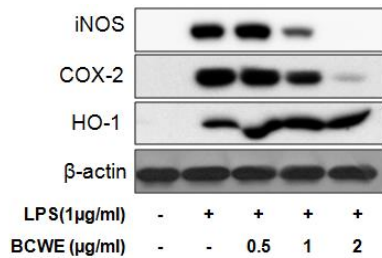


Fig.3. Effect of BCWE on LPS-induced iNOS, COX-2, and HO-1 protein expression in Raw 264.7 macrophage cells. Cells were pretreated with indicated concentrations of BCWE for 1 h and then stimulated without or with LPS (1 µg/ml) for 16h. The expression of iNOS, COX-2, and HO-1 and β -Actin proteins were detected by Western blotting.

LPS로 유도된 RAW 세포주에서 항염증 효과와 항산화력 효과를 조사하기 위해서, iNOS와 COX-2의 단백질 발현량과 HO-1의 단백질 발현량을 Western blot 분석으로 평가하였음 (Fig. 3). 그 결과에 의하면, LPS로 유도된 RAW 세포주에서 iNOS, COX-2, HO-1 단백질이 발현되었음. 아로니아 물 추출물의 처리는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 농도의존적으로 감소하였으나 HO-1은 발현되었음. 이러한 결과는 아로니아 물 추출물의 항염증 반응에서 HO-1 발현이 관련이 있음을 것을 의미함.

□ 협동연구기관 - 경남과학기술대학교 산학협력단

2차년도 목표: 아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴, 지표성분과 *in vitro* 기능성과 관련한 자료의 확보

1. 아로니아의 기능성 성분(지표성분)의 확보

-여러 연구보고를 통해 아로니아에는 유기산, 비타민, 당류 등의 영양성분 외에 carotenoid계 성분인 b-carotene, b-cryptoxanthin, violaxanthin 및 강력한 항산화 활성을 가진 다양한 phenol성 화합물들이 보고된 바 있음.

-현재까지 아로니아의 주요 생리활성 성분으로 보고된 안토시아닌 및 안토시아닌 배당체를 1차 유효성분 그룹으로 설정하고, 아로니아 추출조건과 전립선 비대증 개선 활성간 상관관계 분석을 통해 활성과 가장 관련성이 높은 기능성성분을 도출하고자 하였음.

-아로니아 추출물의 표준화 및 함량평가를 위해 필요한 지표성분을 확보하기 위하여, 다양한 크로마토그래피 (open column chromatography, MPLC, semi-prep HPLC, size exclusion chromatography)법을 적용하여 아로니아 추출물로부터 주요 성분을 분리하고자 하였음.

표. 아로니아의 영양성분 보고

Constituents	Juice (g/L)*		Berries (different cultivars)
	fresh pressed*[8]*	pasteurised*[28]	
Rel. density	1.081	1.064	-
Dry matter, in %	19.5 *Brix	15.5	15.6 [24]; 20 [44]; 16.7 – 28.8 [9]
pH	3.6	3.3	3.3 – 3.7 [2]
Glucose	41	40	NA
Fructose	38	37	NA
Glucose + Fructose	79	77	66 – 100 [24]; 130 – 176 g/kg FW [9]
Sucrose	ND	ND	ND
Sorbitol	80	55.6	NA
Dietary fibre	trace [2]	NA	56 g/kg FW [24]
- Pectins	3.7 g/kg [12]	NA	3.4 – 5.8 g/kg FW [9]
Fat	NA	NA	0.14% FW [24]
Protein	NA	NA	0.7% FW [24]
Organic acids			
l-Malic acid	9.0	11.1	13.1 g/kg FW [24]
Tartaric acid	ND	NA	NA
Citric acid	500 mg/L	247 mg/L	2.1 g/kg FW [24]
Isocitric acid	65 mg/L	NA	NA
Shikimic acid	80 mg/L	NA	NA
Succinic acid	1.5	0.160	ND (fresh berries) 800 mg/kg (3 months stored berries) FW [9]
Vitamins			
Vitamin C	200 mg/L	ND	137 mg/kg FW [24] 13 – 270 mg/kg FW [9]
Folate, µg/L	NA	35 µg/L	200 µg/kg FW [33]
Vitamin B1	500 µg/L	NA	180 µg/kg FW [24]
Vitamin B2	600 µg/L	NA	200 µg/kg FW [24]
Vitamin B6	550 µg/L	NA	280 µg/kg FW [24]
Niacin	3 400 µg/L	NA	3 000 µg/kg FW [24]
Pantothenic acid	2 200 µg/L	NA	2 790 µg/kg FW [24]
Tocopherols	NA	NA	17.1 mg/kg FW [24]
Vitamin K	NA	NA	242 µg/kg FW [24]
Minerals			
Ash	6.4; 4.6 [9]	3.6; 4.1 [9]	4 400 [24]; 5 800 mg/kg FW [9]
Na, mg/L	5	5.7	26 mg/kg FW [24]
K, mg/L	2 850	1 969	2 180 mg/kg FW [24]
Ca, mg/L	150	185	322 mg/kg FW [24]
Mg, mg/L	140	160	162 mg/kg FW [24]
Fe, mg/L	4 (2 – 8)	0.4	9.3 mg/kg FW [24]
Zn, mg/L	1.3 (0.8 – 2.5)	0.6	1.47 mg/kg FW [24]
I, µg/L	NA	< 5	NA
Phytochemicals			
Carotenoids			
- β-Carotene	NA	70 µg/L	48.6 mg/kg FW [34]
- β-Cryptoxanthin	NA	32 µg/L	7.7 FW [24], 16.7 mg/kg FW [34]
- Violaxanthin	NA	NA	4.63 FW [24], 12.2 mg/kg FW [34]
- Anthocyanins	NA	NA	13.0 mg/kg FW [34]
Phenols (total)	NA	6.3 – 6.95	7849 ^c mg/100 g DW [45] 7465 ^a mg/100 g DW [44] 3760 ^d mg/100 g DW [42] 4210 ^d mg/100 g DW [39] 6902 ^d mg/100 g FW [49] 2556 ^d mg/100 g FW, wild [63] 2010 ^d mg/100 g FW [47] 201 mg/kg FW [1]
Amygdalin	57.5 mg/kg [9]	NA	

출처: Kulling and Rawel, *Planta Medica*, 2008, 74, 1625-34

가. 아로니아의 추출 및 분획

- 건조한 아로니아를 메탄올로 추출한 후 감압농축하고 소량의 물에 현탁하여 극성에 따라 n-hexane (1.70 g), methylene chloride (4.52 g), ethyl acetate (20.0 g), n-butanol (22.40 g)로 순차적으로 분획하였음
- 아로니아로부터 주요성분을 확보하기 위하여 ethyl acetate분획과 n-butanol 분획에 대하여 각 reverse-phase flash column chromatography를 실시하여 각 7개의 소분획 (ER1~7, BR1~7)으로 나누었음

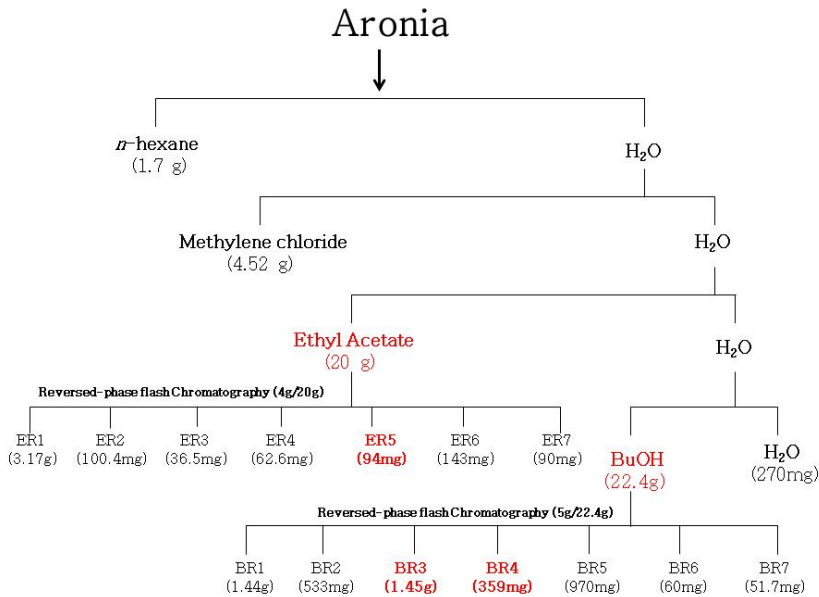
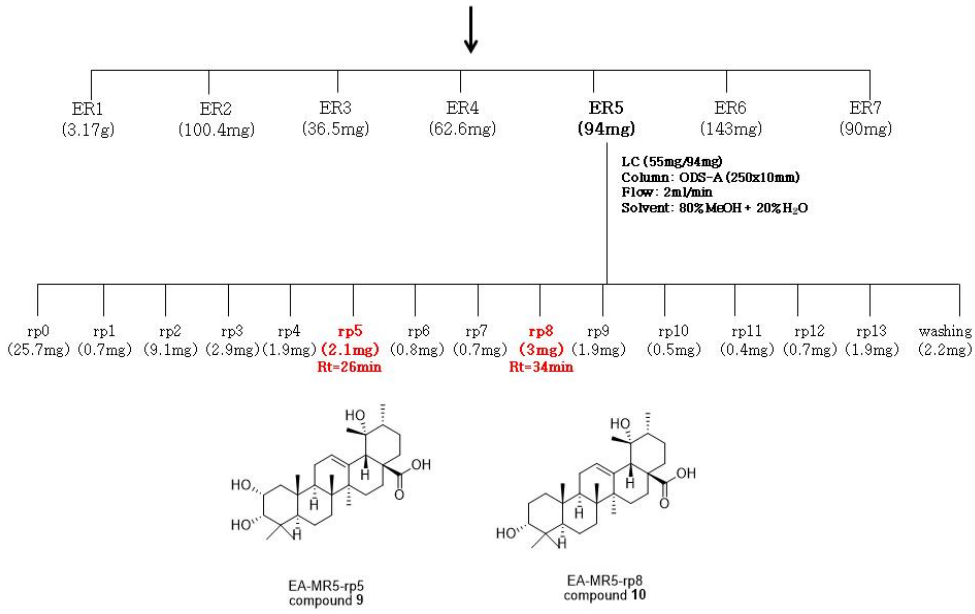


그림. 아로니아 추출물의 극성별 분획물 제조

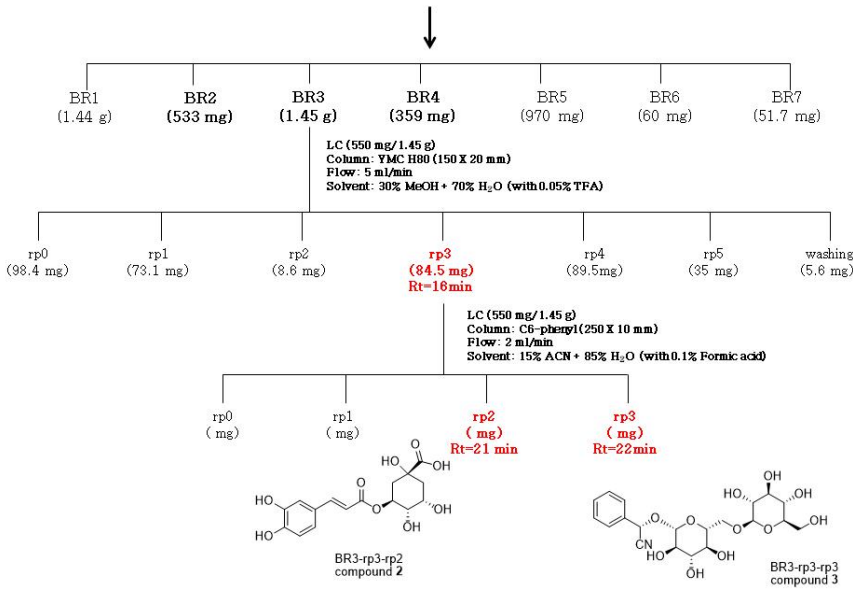
나. 아로니아로부터 주요 지표성분의 분리

- 아로니아 추출물의 ethyl acetate분획과 n-butanol 분획의 각 소분획으로부터 반복적인 HPLC 실험을 통해 단일 화합물을 분리·정제하였음.
- 크로마토그래피 실험 수행 시, 아로니아에 고농도로 함유된 것으로 알려진 안토시아닌 계열 성분의 안정성(stability) 확보를 위하여 0.05% TFA 또는 0.1% formic acid를 함유한 mobile phase를 사용하였음
- n-butanol 분획으로부터 총 7종의 화합물을, ethyl acetate 분획으로부터 2종의 화합물을 지표 성분으로 확보하였음.

Aronia (Ethyl Acetate)



Aronia (BuOH)



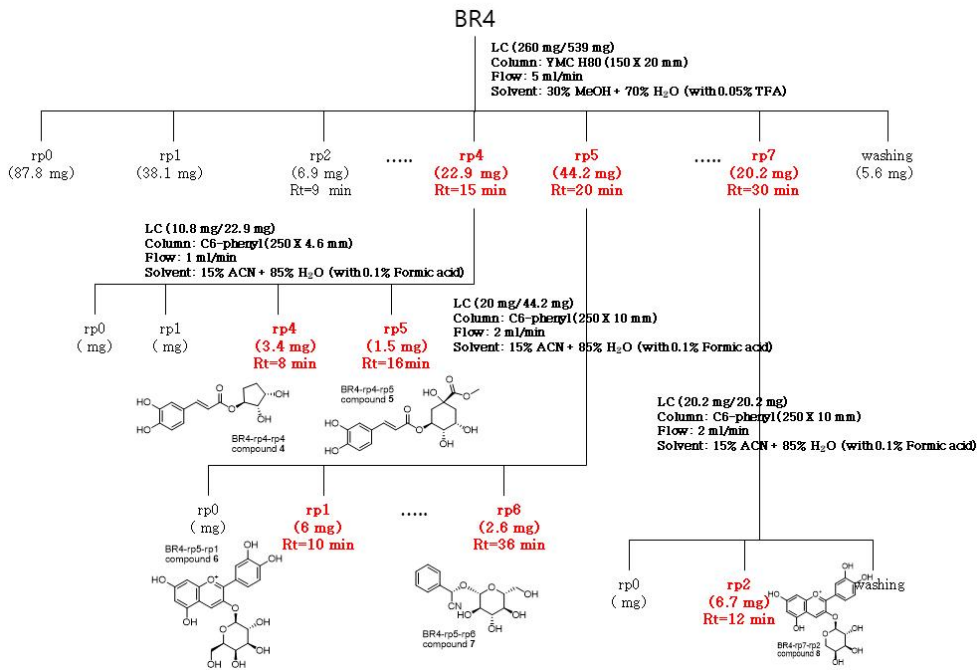


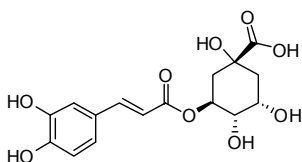
그림. 아로니아의 ethyl acetate 및 n-butanol 분획물로부터 화합물의 분리

-아로니아로부터 분리된 화합물은 IR, MS, NMR 등의 분광학적 분석을 통해 그 구조를 규명하였음. 1D, 2D-NMR spectroscopy, MS/MS analysis를 통해 화합물 평면구조를 결정하고, 당의 종류 및 입체구조는 NOESY spectrum 상에서 1H-1H간 correlation을 통해 분석하고 glucose standard를 이용한 GC를 통해 최종 확인하였음.

-본 연구진이 보유하고 있는 천연물의 MS data base와 문헌조사를 통해 확보된 자료를 이용하여 HPLC-MS 분석 결과에서 확보된 분자량, 분자식에 해당하는 물질에 대한 identification을 수행하였으며 필요한 경우 MS/MS pattern을 확인하여 물질 구조에 대한 정보를 확보하였음.

다. 아로니아로부터 확보한 화합물의 화학구조 규명

화합물 2 [Chlorogenic acid]



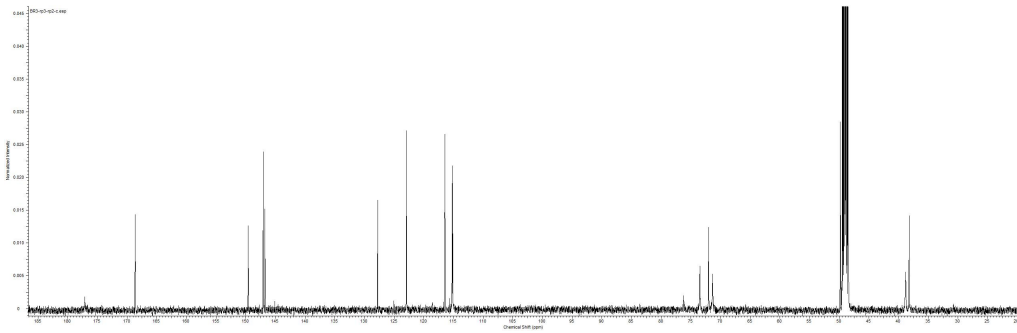
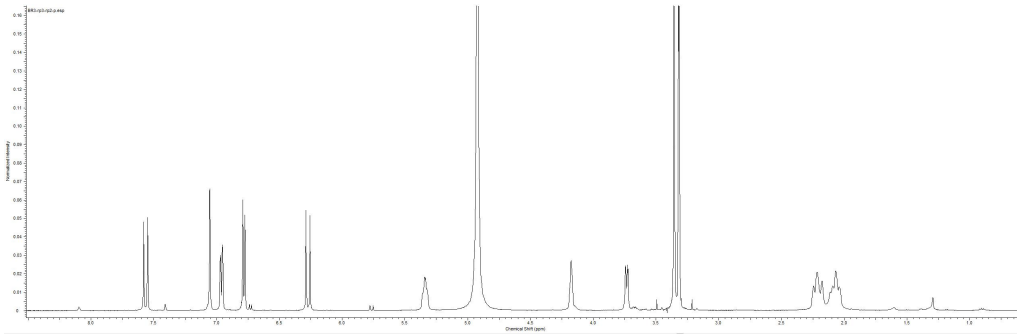


그림. 화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

화합물 3 [Amygdalin]

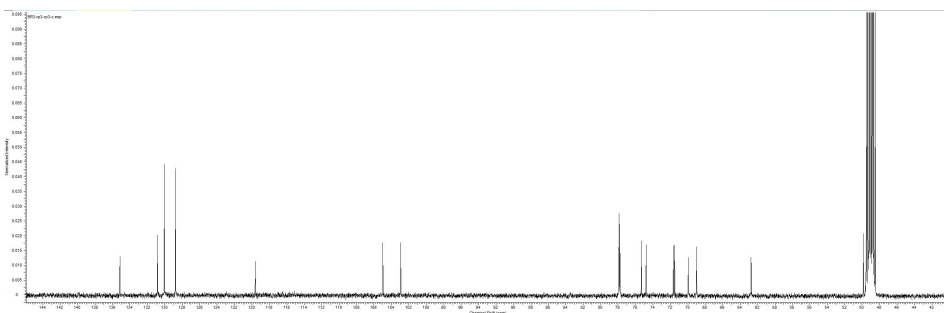
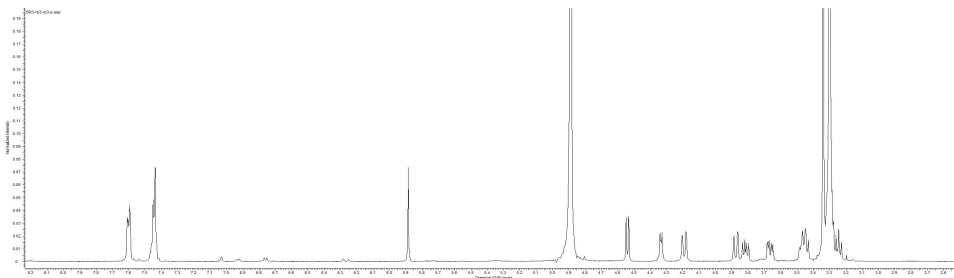
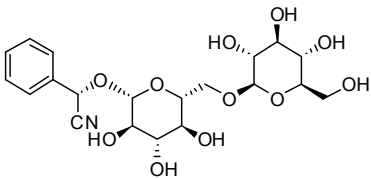


그림. 화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

화합물 4 [1-(3,4-dihydroxycinnamoyl cyclopenta-2,3-diol)]

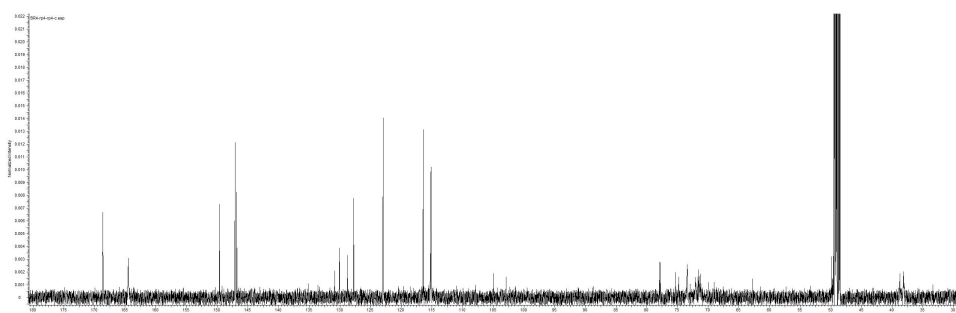
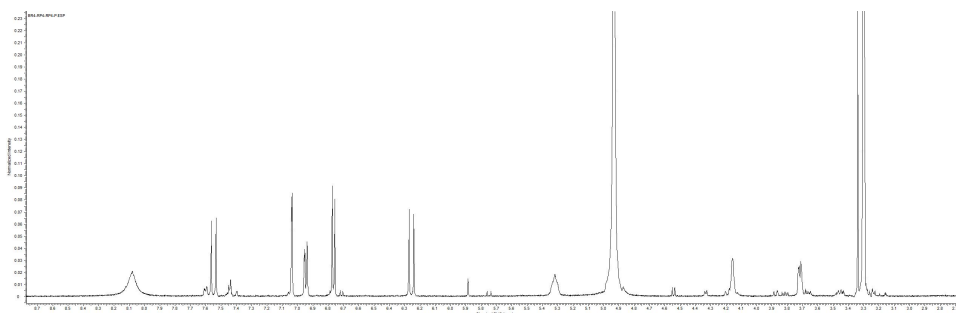
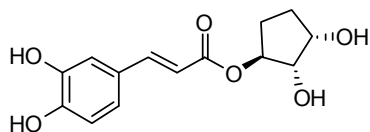
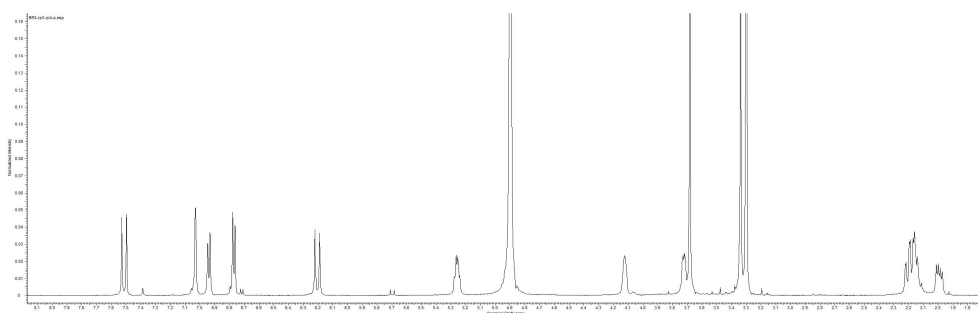
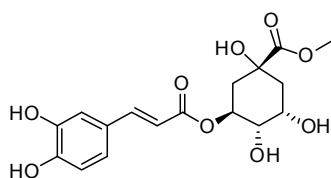


그림. 화합물 4의 1H-NMR, 13C-NMR spectra

화합물 5 [1-(3,4-dihydroxycinnamoyl cyclopenta-2,3-diol)]



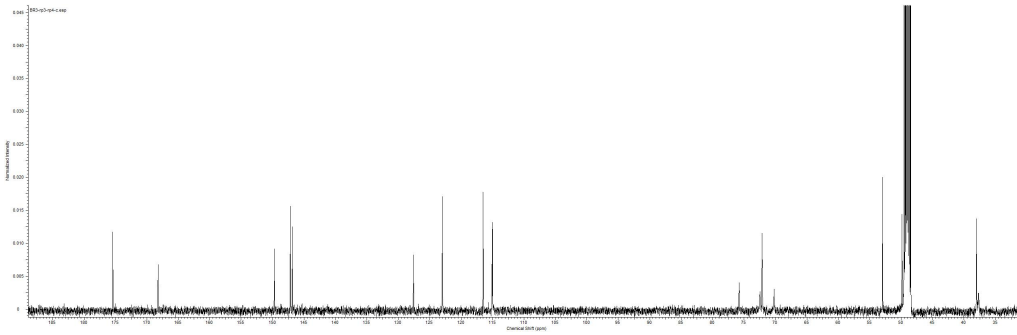


그림. 화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

화합물 6 [Cyanidin-3-glucoside]

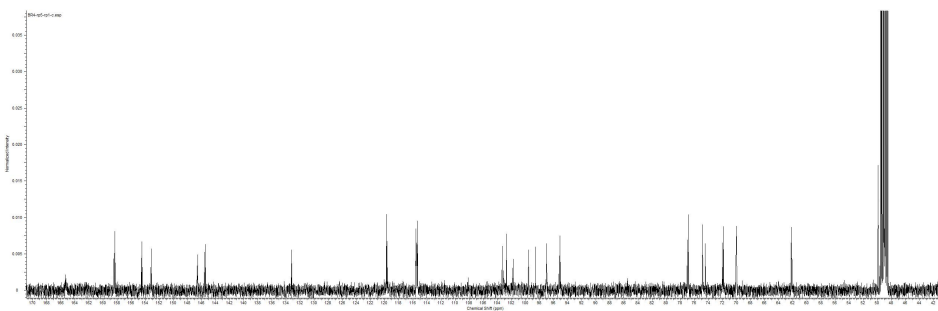
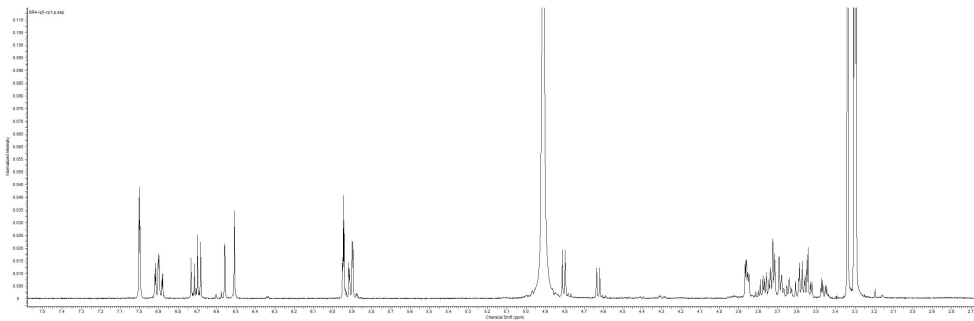
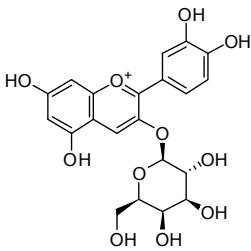
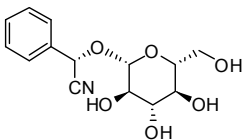


그림. 화합물 6의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

화합물 7



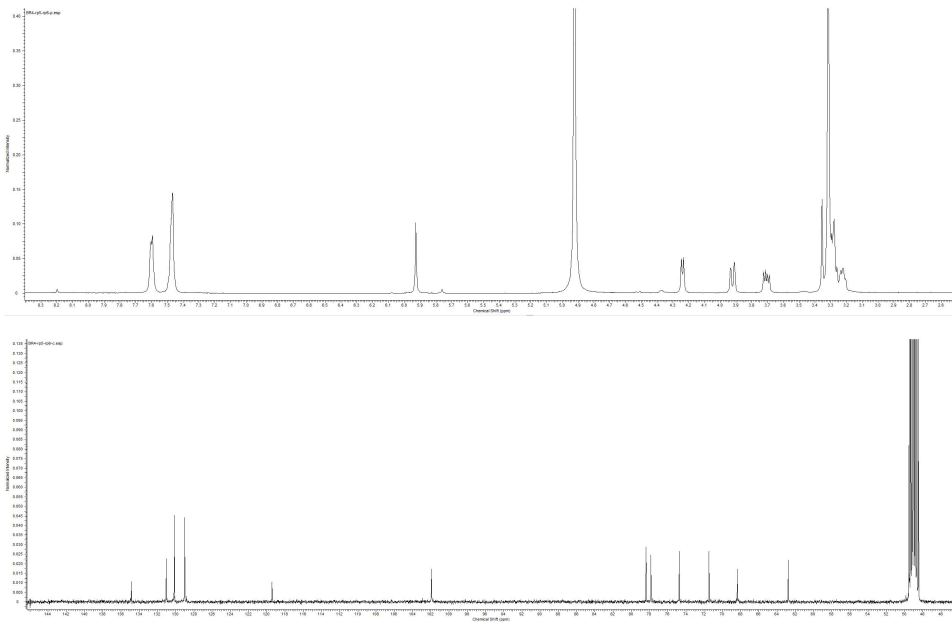


그림. 화합물 7의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

화합물 8 [Cyanidin 3-xyloside]

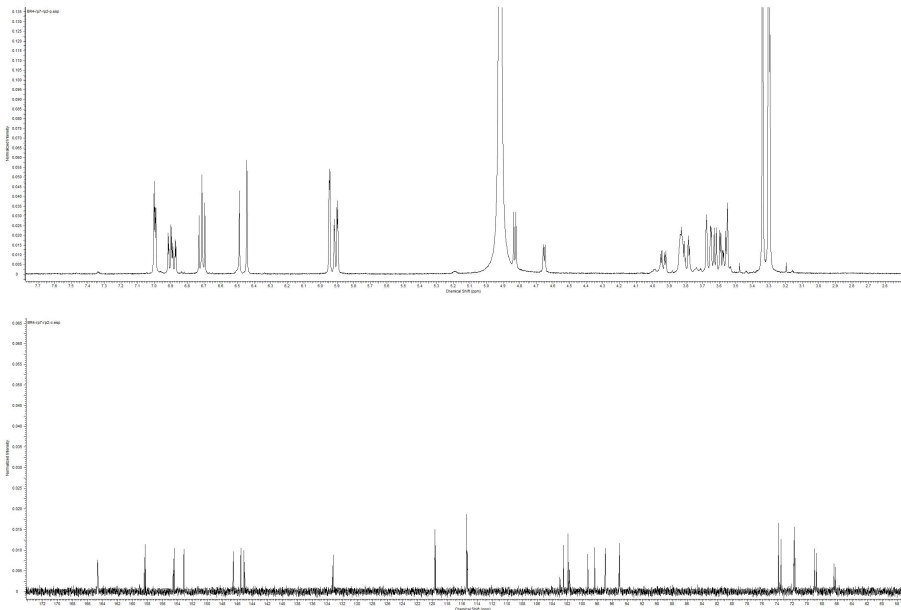
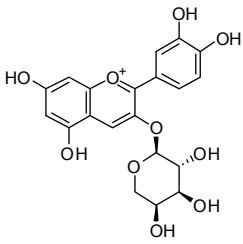


그림. 화합물 8의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

화합물 9 [Acuminatic acid]

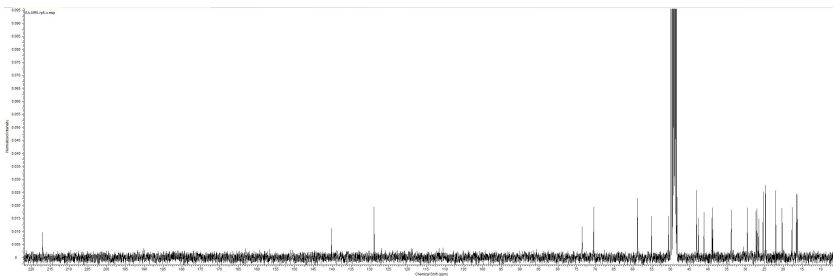
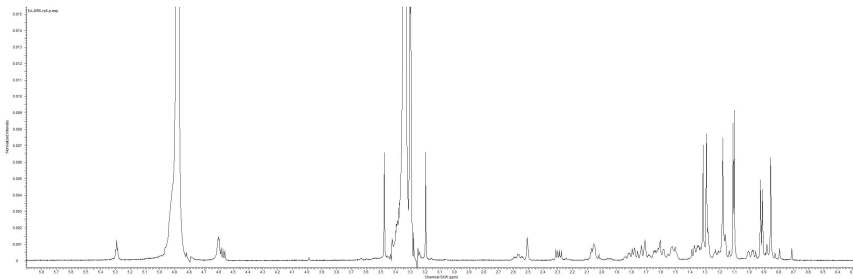
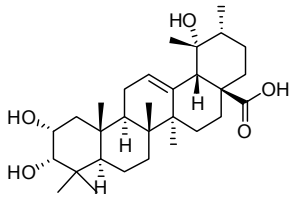
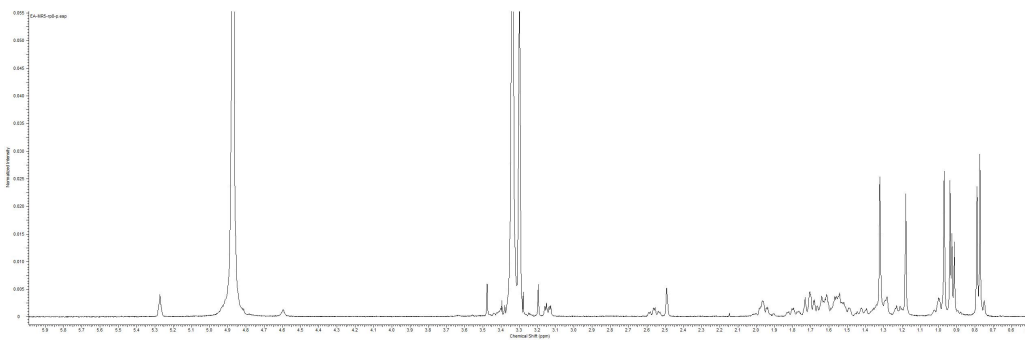
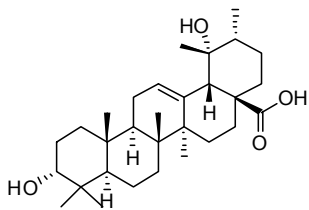


그림. 화합물 9의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectra

화합물 10 [3-Epipomolic acid]



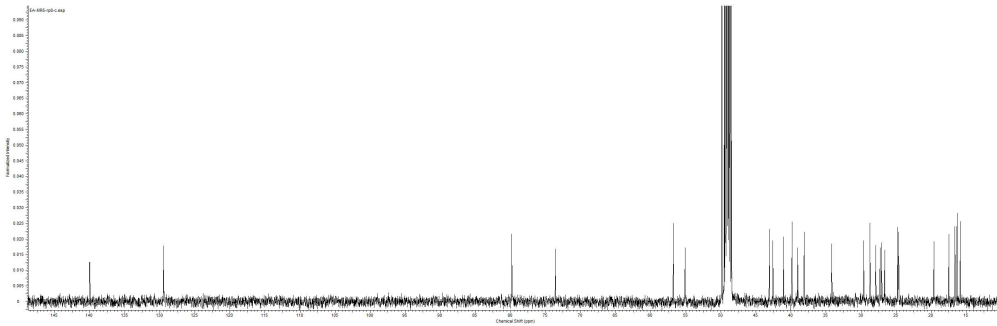


그림. 화합물 10의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

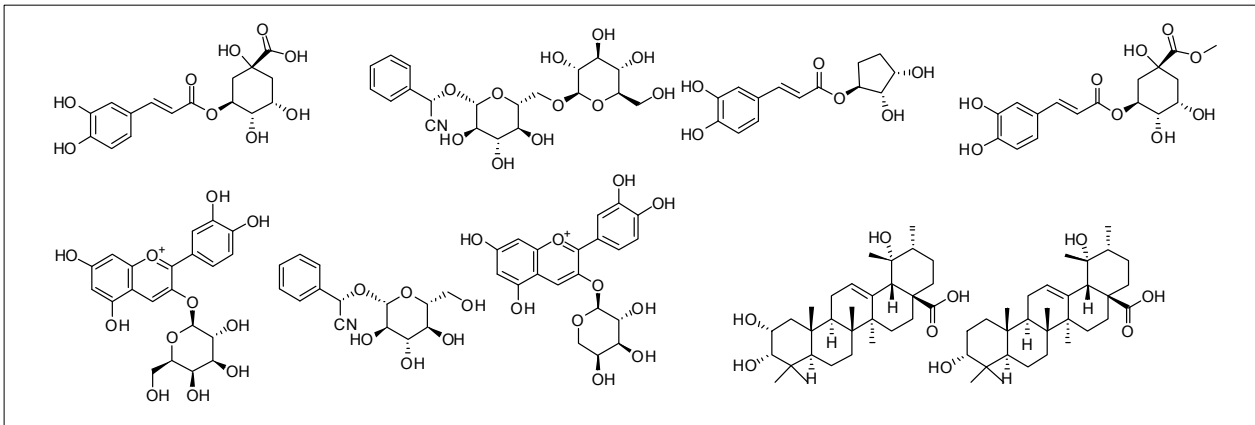


그림. 아로니아로부터 확보한 지표성분 9종의 화학구조

2. 아로니아 추출물의 HPLC 분석법 개발

-아로니아로부터 확보한 9종의 지표성분을 기반으로 하여 HPLC를 이용한 동시분석법을 개발하기 위하여 컬럼의 종류, 용매 조성, 검출과장 등을 최적화하였음.

-아로니아 추출물의 분석 시, 산(acid)을 첨가함으로써 주성분으로 함유된 안토시아닌 및 페놀성 화합물의 안정성을 확보할 수 있는 것으로 보고되고 있음. 일반적으로 분석용 산으로 적용되는 acetic acid, formic acid 및 TFA를 0.05~0.1% 농도로 하여 비교분석한 결과 0.1% TFA를 사용한 경우 가장 우수한 peak resolution을 나타내는 것으로 확인되었음.

-분석용 컬럼은 실험실에 기 구비되어 있는 ODS column과 아로니아 추출물 분석 시 많이 사용되고 있는 컬럼을 확보하여 동일한 용매조건에서 peak resolution을 비교하였음. 비교시험에 사용된 컬럼은 4.6x250 mm 공통규격으로, Thermo Acclaim Polar Advantage II C18, Phenomenex Synergi 4u RP80A, Shisheido Capcell Pak C18, Thermo Phenylhypersil, Hector C18, Phenomenex Gemini 5u C18110A, Varian Pursult XR5 C18, Agilent Eclipse Plus C18, Agilent Eclipse XDB C8, YMC Triart C18

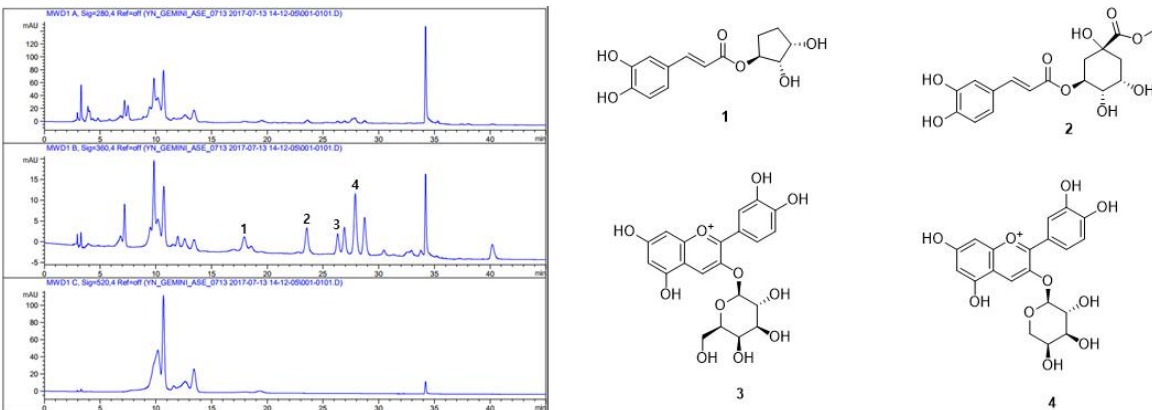
-각 컬럼 적용 시 얻은 크로마토그램을 비교한 결과, Phenomenex Gemini 5u C18 column을 사용했을 때 가장 우수한 peak resolution을 나타내어 이를 분석에 사용하였음.

-아로니아로부터 확보한 9종 지표성분의 정량분석을 위한 최적화 분석조건을 아래와 같이 도출하였음.

Column	Phenomenex Gemini 5u C18110A	
Flow rate	1.0 ml/min	
Injection volume	10 ul (diluted in 50% MeOH)	
Temperature	30° C	
Mobile phase	A: 0.1% TFA-Water B: Acetonitrile	
min	A (%)	B (%)
0	90	10
5	85	15
15	85	15
45	70	30

-위 분석법을 적용하여 아로니아의 표준추출물 (STD 2)를 분석한 결과, 지표성분으로 확보한 9종의 화합물 중, 1-(3,4-dihydroxycinnamoyl cyclopenta-2,3-dilo) (1), chlorogenic acid (2), cyanidin 3-glucoside (3), cyanidin 3-xylose (4)가 주성분으로 검출되었음

-나머지 5종의 화합물은 spiking을 통해 각 retention time을 비교한 결과 UV 검출과장 조건 (220, 280, 365, 520 nm)에서 intensity가 상대적으로 낮은 것으로 관찰되었음.



3. 전립선비대 개선 복합 기능성소재의 발굴

-아로니아의 전립선비대 개선 효능을 평가하는 동시에, 아로니아 추출물과 복합물로 섭취했을 때 아로니아 추출물을 단독으로 섭취하는 것보다 전립선 비대개선 기능이 강화되거나 또는 아로니아의 기능성을 극대화할 수 있는 기능성 소재를 발굴하고자 하였음

-한방의학적 관점에서 볼 때, 남성의 비뇨기계 질환은 크게 1) 하복부의 허냉으로 인한 복통과 배

뇨장애, 2) 점막조직의 충혈과 발적, 통증을 동반하는 실증, 3) 현대의학적으로 방광염과 요도염에 해당하는 오림(五淋) 증상을 치료하는 처방이 주로 빈용되었음

-오림(五淋)은 소변을 시원하게 누지 못하고 찝끔찝끔 누는 노림(勞淋), 소변에 피가 섞여 나오는 혈림(血淋), 소변이 방울방울 떨어지고 아랫배가 그득한 기림(氣淋), 음경속이 아프고 소변에 모래나 돌이 섞여 나오는 석림(石淋), 그리고 소변을 자주 누지만 잘 나오지 않고 아랫배가 부르고 배뇨시 요도에 작열감이 동반되는 열림(熱淋), 5가지를 총칭함

-남성 비뇨기계 질환의 진단 기준이 되었던 상기 증상들은 현대의학적인 관점에서 남성 전립선 비대증에 동반되는 하부요로증상(Lower Urinary Tract Symptoms, LUTS)과 매우 유사한 것으로 사료됨. 한의학 전문가의 자문을 통해 전통적으로 남성 비뇨기계 질환에 사용되어온 한약재 및 생약을 1차후보군으로 선정하고, 이를 대상으로 연구보고내용 조사, 국내 및 국제 특허 검색을 통한 지식재산권 확보 가능성 타진, 원료수급 문제 등을 종합적으로 고려함으로써 최종적으로는 아로니아 추출물과의 배합 시 우수한 시너지 효능을 나타낼 수 있는 소재를 발굴하고자 하였음

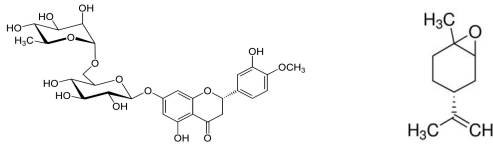
-또한 전통적으로 관련 질환에 사용된 적이 없더라도 5-alpha reductase 저해활성이 우수하다고 알려진 chemical을 주성분으로 함유하고 있는 생약을 추가로 선정하였음. 1차 후보군으로 선정된 모든 생약은 문헌조사를 실시하여 실험적으로 5-alpha reductase 저해활성 및 DHT전환 저해활성이 보고된 바 있는지 확인하고, 그 외에 전립선비대증과 관련성이 높은 biomarker에 대한 활성이 보고되었는지에 대한 검색을 실시하였음. 또한 이들에 대한 주요 기능성 화합물 및 약리활성 등에 대한 문헌자료를 확보하였음.

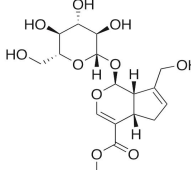
가. 복합 기능성 소재 후보군 (전통적 의약소재)

진피	치자	산수유	강황
			
울금	백복령	적복령	구기자
			
오미자	창출	당귀	용담

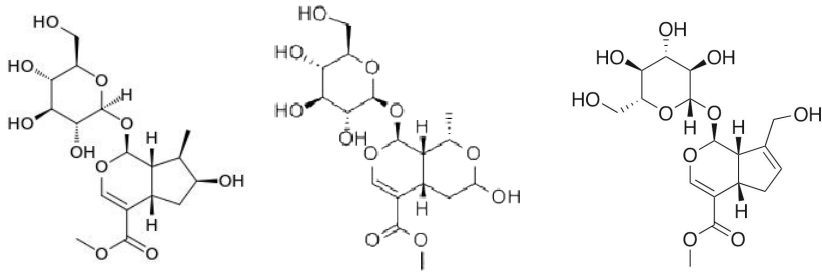


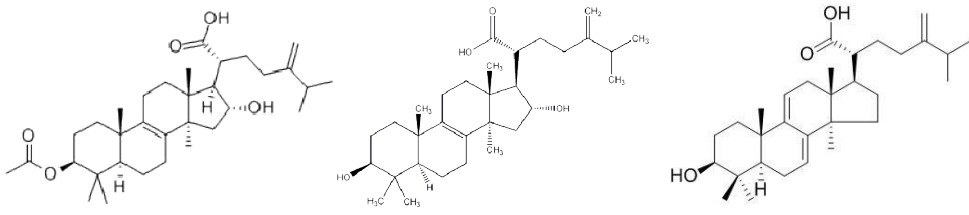
나. 후보 생약의 기능성 성분, 생리활성, 지식재산권 등 조사자료

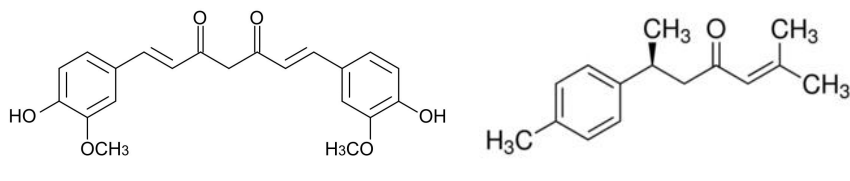
진피	
기원	귤나무(<i>Citrus unshiu</i>)의 잘 익은 열매 껍질
식용 여부	식용 가능
주요 성분	Flavonoid 및 Limonoid류  <hesperidin> <limonene> <nomilic acid>
주요 약리효능	- 소화촉진 및 건위 작용 - 항알러지 작용, 모세혈관 강화, 항염증작용, 혈중지질저하작용
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

치자	
기원	치자나무(<i>Gardenia jasminoides</i>)의 잘 익은 열매
식용 여부	식용 가능
주요 성분	Iridoid 및 황색색소  <geniposide> <crocin>
주요 약리효능	- 담즙분비 촉진 및 간기능강화, 간세포보호작용 - 항산화, 항염증, 항암, 혈압강화작용
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

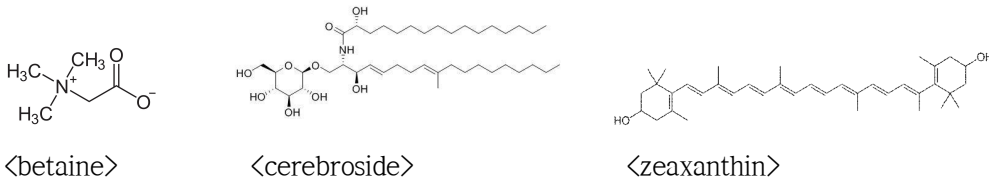
산수유	
기원	산수유나무(<i>Cornus officinalis</i>)의 잘 익은 열매로서 씨를 제거한 것
식용 여부	식용 가능
주요 성분	Iridoid 배당체, secoiridoid 배당체, Bisiridoid 배당체

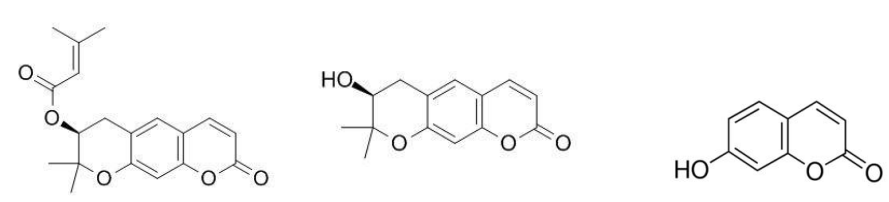
	 <p><loganin> <morroniside> <sweroside></p>
주요 약리효능	- 자양강장, 혈당강화작용 - 항알러지작용, 항미생물작용, 신경세포보호작용
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

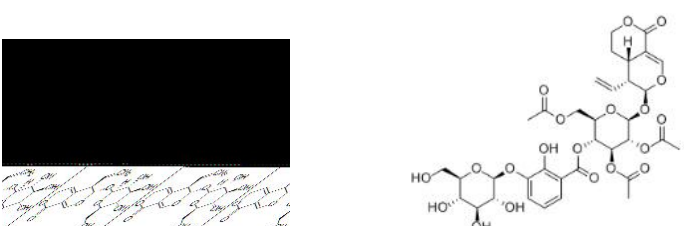
적복령 및 백복령	
기원	복령균(<i>Poria cocos</i>)의 균핵
식용 여부	
주요 성분	<p>다당체, Triterpenoid</p>  <p><pachymic acid> <tumulosic acid> <dehydroeburicoic acid></p>
주요 약리효능	- 이뇨작용, 항염증작용 - 항암작용, 진정작용, 구토억제작용, 적혈구용해억제작용
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

울금	
기원	온울금(<i>Curcuma wenyujin</i>), 강황(<i>C. longa</i>) 등의 덩이뿌리
식용 여부	식용 가능
주요 성분	<p>Diarylhepatonoid, 황색색소, 정유</p>  <p><curcumin> <tumerone></p>
주요 약리효능	- 이뇨작용, 항염증작용 - 항암작용, 진정작용, 구토억제작용, 적혈구용해억제작용
전립선 비대증 관련 보고	울금 및 강황 추출물, 강황에서 유래한 curcumin 성분의 5 alpha reductase 저해 활성 및 전립선 비대증 개선 활성에 대한 연구보고 다수 있음. <아래 표>

<i>Curcuma longa</i>	강황	논문 보고	Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim.	Nutr Rev. 2015 Mar;73(3):155-65. Review.
			강황 추출물의 5-alpha reductase 저해 활성. A new label-free screen for steroid 5α-reductase inhibitors using LC-MS.	Steroids. 2016. 116:67-75.
			강황 추출물의 비뇨기계 질환 치료 효과. Ethnopharmacological survey of medicinal plants practiced by traditional healers and herbalists for treatment of some urological diseases in the West Bank/Palestine.	BMC Complement Altern Med. 17(1):255.
			강황 유래 curcumin의 항암(전립선) 활성. Spices for Prevention and Treatment of Cancers.	Nutrients. 2016. 12;8(8).
			강황 유래 curcumin의 전립선암 치료 기전연구. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment.	Life Sci. 2016 May 1;152:135-44. Review.
			Curcuma mangga 활성분획물의 PC3 cell에서 5-alpha reductase 저해 활성. Molecular effects of bioactive fraction of Curcuma mangga (DLBS4847) as a downregulator of 5α-reductase activity pathways in prostatic epithelial cells.	Cancer Manag Res. 2014 Jun 6;6:267-78.
			Curcumin의 다양한 항암활성 검색. Exploring inhibitory potential of Curcumin against various cancer targets by in silico virtual screening.	Interdiscip Sci. 2014 Mar;6(1):13-24.
			Curcuminoid계 화합물의 항암활성. Analysis of the anticancer activity of curcuminoids, thiotryptophan and 4-phenoxyphenol derivatives.	Oncol Lett. 2014 Jan;7(1):17-22.
			Curcumin의 항암활성. Plant-derived anticancer agents - curcumin in cancer prevention and treatment.	Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2012 Oct-Dec;116(4):1223-9.
		Curcumin의 임상효능연구. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials.	AAPS J. 2013 Jan;15(1):195-218. Review.	
특허(국내)	강황 추출물을 포함하는 억제학적 조성물 (전립선비대증 개선)	등록	등록	
		I L - 6 유도 S T A T 3 활성화 저해 효과를 갖는 강황 또는 울금의 지상부 추출물, 또는 이의 비극성 유기용매 분획물을 포함하는 조성물 (염증성질환 개선)	등록	
<i>Curcuma zanthorrhiza</i>	누른강화	논문 보고	식물 추출물 및 주요성분인 Xanthorrhizol의 항암활성에 대한 다양한 보고. Xanthorrhizol: a review of its pharmacological activities and anticancer properties.	Cancer Cell Int. 2015 Oct 21;15:100. Review.
			Curcuma속 식물 주요 성분 및 효능에 대한 review. Recent advances in the investigation of curcuminoids.	Chin Med. 2008 Sep 17;3:11.

구기자	
기원	구기자나무(Lycium chinensis)의 열매
식용 여부	식용 가능
주요 성분	betaine, cerebroside, Carotenoid계, Pyrrole 유도체  <p><betaine> <cerebroside> <zeaxanthin></p>
주요 약리효능	- 간세포보호작용, 혈압강하작용 - 면역기능조절, 항노화, 항동맥경화, 항암, 여성호르몬유사작용, 조혈기능
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

당귀	
기원	참당귀(<i>Angelica gigas</i>)의 뿌리
식용 여부	
주요 성분	Coumarin, Polyacetylene계  <decursin> <decursinol> <umbeliferone>
주요 약리효능	- 진정작용, 진통작용, 진경작용, 항염증작용, 항균작용 - 뇌세포보호작용, 인지능개선작용, 면역증강작용, 항알러지작용
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

용담	
기원	용담(<i>Gentiana scabra</i>)의 뿌리 및 뿌리줄기
식용 여부	
주요 성분	Iridoid 배당체, Xanthone, Alkaloid류  <gentiopicroside> <trifloroside>
주요 약리효능	- 소화촉진(위액분비촉진) 작용, 건위작용 - 항염증 작용, 항균작용
전립선 비대증 관련 보고	5-alpha reductase 및 benign prostate hyperplasia (BPH)에 대한 연구보고 없음

다. 복합물 후보 생약의 전립선 비대증 개선 활성 평가

(1) LNCaP, DU145 및 PC3 전립선 세포주 배양

3종의 전립선세포주 LNCaP, DU145 및 PC3는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였음. 세가지 세포는 동일하게 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였음.

(2) 생약 추출물의 세포독성 평가

생약 추출물의 SRD5A2-transfected cell에서의 활성 평가 시험에 앞서 추출물의 세포독성을 MTT assay를 통해 확인하였음. LNCaP, DU145 및 PC3 세포를 2 X 10⁴ cells/well로 96 well plate에 seeding하고 FBS 10 %를 함유한 RPMI 1640에서 18시간동안 incubation 한 후, 생약 추출물을 각 10, 50, 100 ug/ml 농도로 투여하고 24시간 배양한 후 MTT assay를 실시하였음. 2시간 후 형성된 for

mazan을 DMSO 100 μ l를 넣어 균질하게 녹인 후 microplate reader를 이용하여 450nm에서 측정하였음. 일부 생약은 고농도 100ug/ml 조건에서 세포독성이 관찰되어 무독성 농도를 10~50 ug/ml로 설정하였음.

(3) 5-alpha reductase (SRD5A1, SRD5A2) transformation

Human 5-alpha-reductase inserted plasmid를 competent cell에 heat shock transformation한 후 항생제 함유 배지에 배양하여 colony를 얻음. Colony를 항생제 함유 액체배지에 접종 후 24시간 배양하고 plasmid extract kit를 이용하여 DNA를 추출하였음.

(4) Plasmid transfection 및 DHT 생성량 평가

SRD5A2-transfected cell에 생약 추출물을 1시간동안 처리한 후 testosterone (1000 nM)을 투여하여 전환된 DHT를 측정함으로써 생약 추출물의 DHT 전환 억제 효능을 평가하고자 하였음. LNCaP, PC3 및 DU145 세포에 각 5-alpha reductase type II의 발현을 위하여 SRD5A2가 삽입되어 있는 pSG5SRD5A2를 Lipofectamine 3000을 이용하여 세포에 transfection 하였음. Transfection을 실시하기 전, 세포 배양액을 charcoal-stripped serum 10%를 함유한 phenol red free RPMI 1640로 교체하여 24시간동안 처리함으로써 세포 내 hormone을 depletion 시켰음. Transfection 실시 24시간 뒤에 생약 추출물 (10, 50 ug/ml)을 1시간동안 처리한 후 testosterone(1000 nM)을 처리하고, 18시간 후에 lysis buffer를 이용하여 cell lysate를 추출하였음. DHT의 측정을 위하여 ELISA assay kit (Cusabio, Germany)를 이용하였으며, 460nm에서 측정하고 측정값의 계산은 기준액으로 그린 standard그래프를 이용하여 구하고 testosterone-only treated group에 대한 백분율(%)로 표기하였음.

(5) 생약 추출물의 제조

후보로 선정된 생약의 추출물 제조를 위하여, 각 생약을 세척하여 50도씨 오븐에서 완전히 건조한 후 50% 주정 에탄올을 추출용매로 하여 초음파 추출하였음. 추출물은 감압농축하여 용매를 제거하고 동결건조기에서 24시간동안 추가 건조과정을 거쳐 제조하였음. 전립선세포주를 이용한 DHT 저해능 평가를 위하여 각 생약 추출물을 DMSO에 녹여 100mg/ml의 농도가 되도록 하고 세포 배양액 또는 멸균증류수를 이용하여 희석한 후 사용하였음. 실험동물모델을 이용한 *in vivo* 효능 평가를 위해서 추출물을 0.5%-CMC에 녹인 후 경구투여하였음.

(6) 생약 추출물의 전립선세포주에서 DHT 전환 억제 활성 결과

○ 생약 추출물을 전처리한 전립선세포주에 testosterone을 투여하고 최종 생성된 DHT의 생성량을 측정함으로써 후보 생약의 5 alpha reductase 저해활성을 평가하였음.

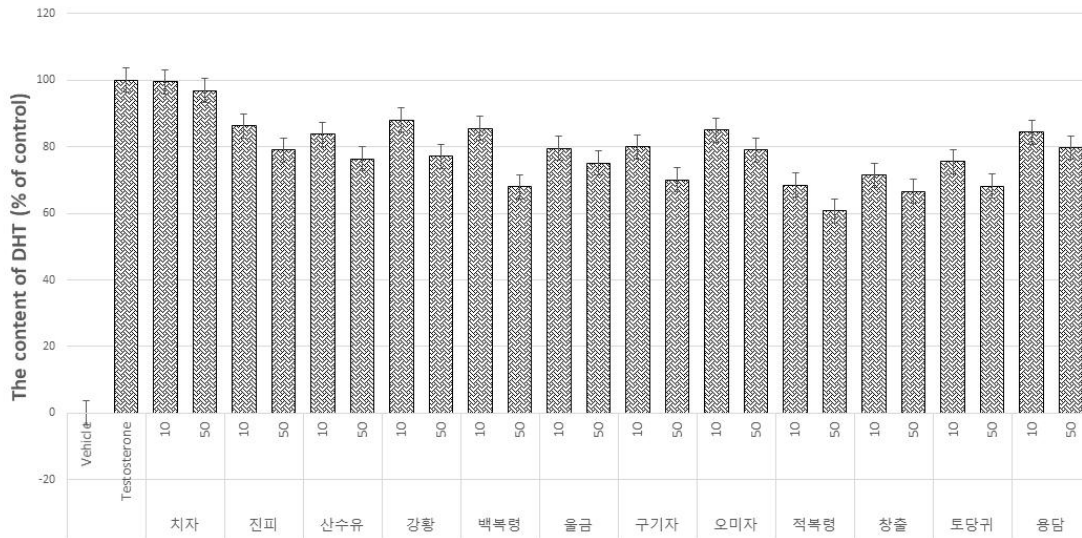


그림. PC3 세포주에서 생약 추출물의 DHT 생성 억제 활성

-PC3 세포주에서는 50µg/ml 투여농도를 기준으로 했을 때, 진피, 산수유, 백복령, 구기자, 적복령, 창출, 토당귀가 20% 이상의 유의적인 억제활성을 나타내었음. 반면 LNCaP 세포와 진피, 울금, 구기자가 우수한 저해 활성을 나타내는 것으로 확인되었음.

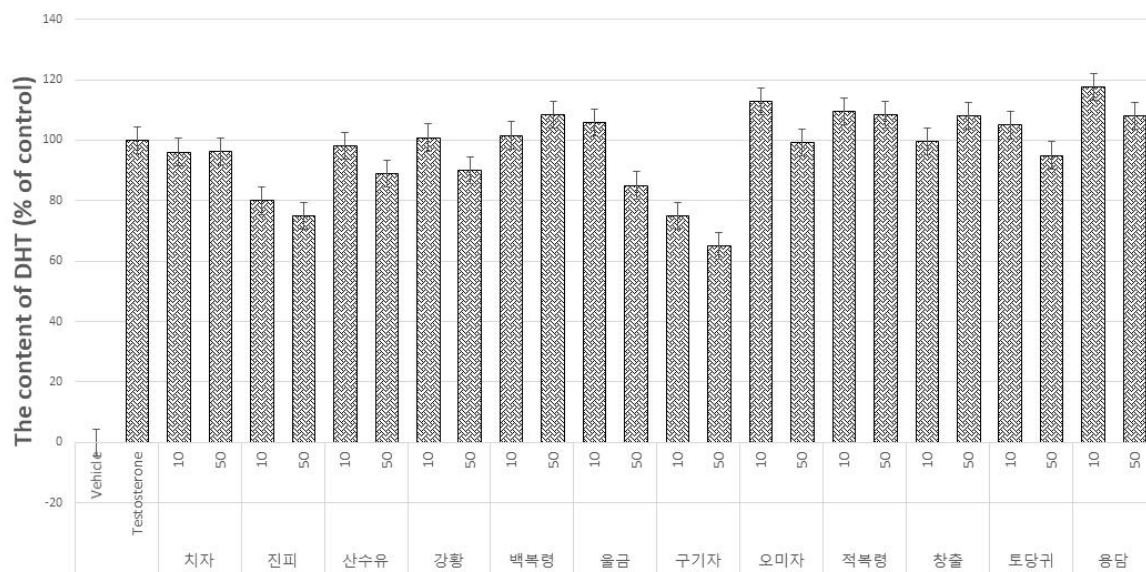


그림. LNCaP 전립선 세포주에서 생약 추출물의 DHT 생성 억제 활성

-DU145 세포에서는 진피, 구기자, 적복령 추출물이 유의한 활성을 나타내었음. 이상의 결과를 토대로 식용이 가능한 동시에, 세가지 세포 모델에서 공통적으로 DHT 저해 활성이 확인된 구기자와 진피를 동물실험을 위한 최종후보로 선정하였음. 울금의 경우 강황 추출물 및 강황에서 유래한 curcumin 성분에 대하여 여러 연구논문을 통해 우수한 5-alpha reductase 저해활성 및 전립선비대증 개선 효능이 보고된 바 있고, 또한 이에 대한 특허가 존재하여 최종 후보에서 제외하

(2) 구지뽕과 오리나무

-식물에서 유래한 다양한 이차대사산물들의 생리활성이 보고되고 있으며 특히 diarylhepanoid계열 성분은 최근 연구보고를 통해 5-alpha reductase 저해활성이 매우 우수한 것으로 보고되고 있음. 이를 바탕으로 diarylhepanonoid계열 성분을 주성분으로 함유하고 있는 생약에 대한 문헌조사를 실시하여 구지뽕(Maclura Tricuspidata)의 뿌리와 오리나무(Alnus japonica)를 후보소재로 추가하였음.

-최종 후보로 선정된 생약 5종(진피, 오리나무, 구지뽕, 구기자, 계육) 및 아로니아는 동물실험을 진행하기 위하여 추출물을 추가제조하여 협동2기관인 안전성평가연구소 경남환경독성분부로 전달하였음.

협동연구기관 - 안전성평가연구소

2차년도 목표: 활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 *in vivo* 평가

1. 동물실험 승인 신청

KIT 경남환경독성본부 IACUC 행정서식 GIACUC-O-003

동물실험계획 승인신청서

접수번호			-		-			
------	--	--	---	--	---	--	--	--

※ 관련 사항을 빠짐없이 기재하여 주시기 바랍니다(접수번호는 위원회에서 기재).

본 신청서의 승인 작업기간은 접수 후 원칙적으로 14일이 소요되며, 승인여부 결과는 추후 개별 통지됨. 한글로 본 서식을 작성하여 원본 1부를 서면으로 위원회에 제출해 주시고, 전자파일(이메일)도 별도로 보내주시기 바랍니다. 단, 신청서의 내용이 미비한 경우 위원회는 연구계획서 제출을 요청할 수도 있습니다.

1. 일반사항					
1.1. 연구책임자					
성명	김나현	소속	경남생명자원연구센터	직위	연구원
연락처(내선)	3851	휴대폰		E-mail	nhkim@kitox.re.kr
교육이수	<input checked="" type="checkbox"/> IACUC자체교육 (일자:2017.03.24., 이수번호: G17-0012) <input type="checkbox"/> 정부주관교육 (일자: , 이수번호:)				
1.2. 동물실험수행자					
성명	직위	핸드폰/e-mail	교육이수 (이수번호)	역할	
김용수	기술원	/nicekws@kitox.re.kr	<input checked="" type="checkbox"/> 자체교육 (G17-0003) <input type="checkbox"/> 정부주관교육()	실험수행	
탁태길	기술원	/ttkil@kitox.re.kr	<input checked="" type="checkbox"/> 자체교육 (G17-0005) <input type="checkbox"/> 정부주관교육()	실험수행	
이주홍	기술원	/juhonglee@kitox.re.kr	<input checked="" type="checkbox"/> 자체교육 (G17-0011) <input type="checkbox"/> 정부주관교육()	실험수행	

2. 기 승인 유무 및 승인 요청 사항(해당사항에 V표)	
<input checked="" type="checkbox"/> 신규과제(처음신청)	<input type="checkbox"/> 계속 (기승인번호:) (재신청사유:)

3. 연구 관련 사항	
3.1. 시험명	Wistar rat에서 생약 및 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험
3.2. 연구목적 (비전문가도 이해할 수 있도록 평이하게 기술)	Wistar rat를 이용한 전립선 비대증 모델 동물에서 <i>in vitro</i> 활성 평가를 통해 최종 선택

된 생약 추출물(강황, 당귀, 진피, 오미자, 각) 과 이전 시험에서 높은 활성을 보인 아로니아 분획물 섭취를 통한 증상 완화 효능을 비교 평가하기 위한 시험이다.

3.3 시험구분	<input type="checkbox"/> 수탁시험 <input checked="" type="checkbox"/> 내부자체시험 <input type="checkbox"/> 교육/훈련 <input type="checkbox"/> 기타()		
3.4 실험기간	2017년 05월 18일 ~ 2017년 09월 29일	3.5. 시험장소	경남환경독성본부 지하동물실
해당실험기간을 초과하여 실험이 진행될 가능성		<input type="checkbox"/> 있음	<input checked="" type="checkbox"/> 없다

4. 동물실험형태(해당사항 모두 V표)			
<input checked="" type="checkbox"/> 시험물질투여, <input checked="" type="checkbox"/> 재료채취, <input type="checkbox"/> 방사선 조사, <input checked="" type="checkbox"/> 외과적 처치, <input type="checkbox"/> 유전·육종, <input type="checkbox"/> 감염, <input type="checkbox"/> 발열, <input type="checkbox"/> 행동관찰, <input type="checkbox"/> 기타()			

5. 동물실험을 대체할 수 있는 방법의 유무	
<input checked="" type="checkbox"/> 검토하였으나, 동물실험을 대체할 수 있는 방법이 없었다.	
<input type="checkbox"/> 검토하였으나, 대체수단으로는 연구목적을 충분히 달성하기가 어려웠다.	
검색사이트	<input checked="" type="checkbox"/> PubMed <input type="checkbox"/> Current Contents Connect <input type="checkbox"/> 한국학술정보
	<input type="checkbox"/> 기타 ()
Key words(적어도 3개 이상 기입함) benign prostatic hyperplasia , rat model , aronia	

6. 생물학적 위해물질의 사용 여부 및 병원체		
(생물학적 위해물질 사용 시 식약청에 사전 보고할 것)		
<input checked="" type="checkbox"/> 사용하지 않음		
<input type="checkbox"/> 사용함	위험 군 분 류	<input type="checkbox"/> 제3위험군 (병원체:) <input type="checkbox"/> 제4위험군 (병원체:) ※ 「생명공학육성법」 제15조 및 같은 법 시행령 제15조에 따라 보건복지부장관이 작성한 실험지침에 따름
	병원 체 분 류	<input type="checkbox"/> 제1군전염병 (병원체:) <input type="checkbox"/> 제2군전염병 (병원체:) <input type="checkbox"/> 제3군전염병 (병원체:) ※ 「전염병예방법」 제2조에 따름

7. 특별한 주거(Housing) 및 사육조건 필요 유무	
(예: Restraining Devices, Radioactive Materials / Other Biohazards, Infectious Disease)	
해당사항 없음.	

8. 실험동물			
8.1. 사용 동물종 ※여러 종의 동물을 이용할 경우 해당 동물 종에 따라 별도 작성			
<input type="checkbox"/> Mouse <input checked="" type="checkbox"/> Rat <input type="checkbox"/> Guinea Pig <input type="checkbox"/> Rabbit <input type="checkbox"/> Hamster <input type="checkbox"/> Dog <input type="checkbox"/> Cat <input type="checkbox"/> Pig <input type="checkbox"/> Gerbil			
<input type="checkbox"/> 기타 ()			
8.2. 세부내용			
계통명	Wistar rat	사육 희망 장소	<input checked="" type="checkbox"/> barrier구역 <input type="checkbox"/> Semi-barrier구역 <input type="checkbox"/> 일반구역
동물구입처(Maker)	오리엔트바이오	반입 예정 일	2017년 5월 18일
미생물학적 등급	<input checked="" type="checkbox"/> SPF(Specific Pathogen Free) <input type="checkbox"/> CL(Clean,준SPF) <input type="checkbox"/> CV(Conventional) <input type="checkbox"/> Germ Free <input type="checkbox"/> 무 확인 <input type="checkbox"/> 기타 ()		

동물 규격	체중: 평균±20%g	주령: 10주령	마리수 M: 108 , F: -
----------	-------------	----------	-------------------

8.3. 해당 동물(animal)과 종(strain)을 선택한 합리적 이유(연구의 생물학적 연관성 제시)
수컷 랫드를 이용한 전립선 비대증 유도는 전립선 연구에서 널리 사용되는 방법이며 연구 데이터가 많이 제시되어 있어 제작 및 평가가 용이함

8.4. 사용 동물 수에 대한 합리적 근거(가능하면 동물수를 산출한 통계적 근거를 제시)

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	전립선 비대증의 유도	투여물질
Sham control	Male	12	1-12	Sham surgery	0.5% CMC
Negative control	Male	12	13-24	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	0.5% CMC
Positive control	Male	12	25-36	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	Saw palmetto
T1	Male	12	37-48	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	아로니아 분획물
T2	Male	12	49-60	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	강황 추출물
T3	Male	12	61-72	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	당귀 추출물
T4	Male	12	73-84	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	진피 추출물
T5	Male	12	85-96	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	오미자 추출물
T6	Male	12	97-108	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	각(gac) 추출물

총 108마리 중 군당 12 마리씩 108마리사용. 통계적 유의성을 위하여 군 당 12마리씩 설정하였으며 여분동물은 사용하지 않음.

9. 실험동물실 이외의 장소로 동물의 반출 혹은 외부 연구시설에서 동물을 반입할 경우, 그 필요 사유
해당사항 없음.

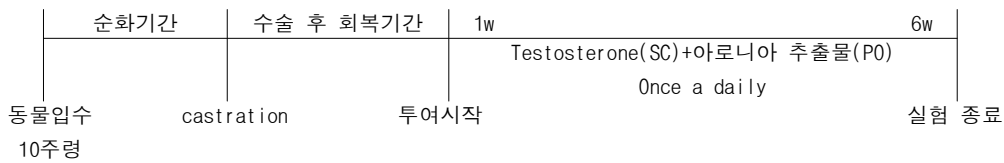
10. 실험방법 (프로토콜) 개요 (필요시 별지를 사용하여 구체적으로 기술할 것)

- ※ 외과적 처치를 포함하지 않는 실험인 경우
- 동물실험에 관한 내용 (시험물질, 대조물질, 투여경로, 투여량, 투여횟수, 투여기간 등)
 - 샘플 채취에 관한 내용 (혈액, 뇨, 조직 등)

1. 실험방법

(1) 수술적 처치 후 1주일간의 회복기간을 두고 상처가 회복되면 체중에 따라 군분리를 실시함.

(2) 시험물질 투여: 전립선 비대 유도를 위하여 6주간 3mg/kg의 Testosterone을 매일 피하투여 (SC) 하며 같은기간동안 매 주 1회 체중을 측정하여 체중을 기준으로 각 군에 해당하는 시험물질을 1일 1회 경구 투여함.



2. 채혈 및 조직 채취

(1) 부검은 시험물질 투여 6주 후 실시하며 안락사 전날 절식을 실시함.

(2) 채혈: Isoflurane gas로 안락사하고 복대정맥에서 약 6ml 가량 채혈함. 전혈을 serum separating tube에 넣고 30분 상온에 방치한 후 3000RPM으로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 절반은 혈액생화학 검사를 진행하며 나머지는 호르몬 분석을 위하여 -72° C에 보관함.

(3) 조직 채취: 채혈 완료 후 완전히 방혈시킨 후 방광과 전립선을 조심스럽게 적출하여 전체 무게를 측정 후 요도로부터 전립선 외측 및 복측 엽(lateral & ventral lobe)을 분리하여 무게를 측정함. 방광의 경우 저류하고 있는 뇨(urine) 측정을 위해 mosquito forcep으로 새는 것을 방지하여 무게를 측정하며 분리된 전립선 조직의 절반은 슬라이드 제작에 필요한 부위만 포르말린에 고정함. 남은 조직은 호르몬 분석을 위하여 -72° C에 보관함.

※ 외과적 처치를 포함하는 실험인 경우, 수술방법

수술 후 관리방법(해당될 경우 해당 사항에 모두 V표)

항생제 투여, 진통제 투여, 수액처치, 기타()

1. 항생제 및 진통제를 등쪽 피하에 주사한 후 바로 주사마취를 실시하며 ventro-dorsal position으로 위치한 후 음낭 주위를 포비돈으로 소독함.

2. 요도가 다치지 않도록 요도 아래 1cm 피부를 세로방향으로 약 1cm 가량 절개함.

3. 피부와 양측 고환집막을 조심스럽게 둔성분리하고 복강으로부터 고환 및 부고환을 견인하여 비흡습사로 여러 번 결찰하여 복강이 노출되지 않도록 하고 고환집막과 함께 고환/부고환을 적출함.

4. 피하조직과 피부를 봉합하고 수술부위를 소독한 후 따뜻한 물주머니 위에 올려 마취에서 회복되면 케이지에 넣는다.

※ 복수의 대규모 수술 실험(Multile Major Operative Procedures)을 시행하는 경우, 그 필요 사유 - 단, 원칙적으로 불허함

11. 동물이 경험하는 통증 및 스트레스의 정도 (해당사항에 V표)
<input type="checkbox"/> 고통등급 A: 원생동물, 무척추동물을 사용하는 실험
<input type="checkbox"/> 고통등급 B: 척추동물을 사용하지만 거의 고통을 주지 않는 실험 -생산, 공급을 목적으로 하는 사육 -관찰 또는 검사를 목적으로 한 단기간의 보정
<input type="checkbox"/> 고통등급 C: 척추동물에게 약간의 스트레스 혹은 단기간의 작은 통증을 주는 실험 - 채혈 - 부작용이 없는 물질의 I.V., S.C., I.M., I.P., 구강 투여 - 심마취 후 혈액채취를 동반한 안락사 (항혈청 생산) - 안락사(심마취) 실시 후 단시간 내 조직 채취하는 비생존 실험 - 경미한 증상의 전염성 원인체 감염 후 임상증상 등 발현 시 안락사
<input checked="" type="checkbox"/> 고통등급 D: 척추동물에게 회피 할 수 없는 스트레스 혹은 통증을 주는 실험 (진정제, 진통제, 마취제 등을 사용) - 심마취 실시 하에 조직 등 채취한 다음 회복하는 생존실험 - 심마취 실시 하에 장시간 동안 조작(수술 등)을 실시하는 비 생존 실험 - 장기간의 물리적 억압상태 유지 실험 - 결핵사균이 포함된 FCA(면역증강제) 투여로 염증, 괴사발생 - 안와채혈 등
<input type="checkbox"/> 고통등급 E: 척추동물에게 회피 할 수 없는 스트레스 혹은 통증을 주는 실험 (진정제, 진통제, 마취제 등을 사용할 경우 실험 결과에 부정적인 영향을 주는 실험 등) - LD50 측정 또는 독성시험 등 죽음을 종료시점으로 설정 - 항암 실험 - 마우스 복강 내 단클론항체(복수) 생산 등 ※ 고통등급 E에 해당되는 동물실험은 원칙적으로 불허하나, 연구목적상 분명한 사유가 존재하는 경우 위원회 승인 후 수행

12. 동물이 경험하는 통증 및 스트레스 경감조치
12.1. 진정제, 진통제, 마취제 등의 사용(11.항목의 고통등급 D에 해당되는 경우 기재) (약물명, 투여량, 경로를 기입) 마취제: Tiletamine+Zolazepam (30mg/kg) + Xylazine (10mg/kg), IM 항생제: Cephazolin (30mg/kg), SC, 1회/1일, 3일간 진통제: Carprofen (100mg/kg), SC, 1회/1일, 3일간
12.2. 고통등급 E에 해당되는 동물실험을 수행하는 사유(11.항목의 고통등급 E에 해당되는 경우 기재) <input type="checkbox"/> 인도적 종료시점은 채택하지만, 연구목적 상 진정·진통제를 투여할 수 없거나, 고통경감을 위한 방법이 없음 예) 통증실험 수행으로 진통제를 사용하면 연구결과에 영향을 미침 <input type="checkbox"/> 연구목적 상 인도적 종료시점을 채택하지 않고 동물의 죽음을 종료시점으로 설정해야 함. 예) LD50 측정을 위한 독성실험 (상세 사유 기재)

13. 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상될 경우, 인도적인 실험종료(Hu mane endpoints) 또는 안락사를 취하기 위한 기준
 - 정상 체중의 20%이상의 체중감소가 관찰되거나 빈사동물이 관찰되는 경우 안락사를 실시함.

14. 안락사 및 사체처리방법
 약제 (사용약물: , 용량:) CO2 가스 경추탈골
 기타 ()
 ※ 사체처리방법 (보관 장소 및 사체 처리업체명)
 안전성평가연구소 경남환경독성본부 폐기물 보관고에 보관 후 정기 수거일에 처리업체(경서 산업)에서 방문수거함.

15. 실험자를 위한 작업환경의 안전성 확보 여부
 산업보건안전 법규에 따른 안전보호구를 구비함.
 실험자에 대한 예방접종(파상풍 2013.09. 09.) 완료.

16. 해당실험이 불필요한 중복실험이 아님을 설명(가능하면, 대체방법 탐색경위 등을 기술)
 남성의 전립선 비대증 완화 효능과 관련 호르몬 변화를 평가하기 위해서는 동물 모델을 이 용한 실험이 필요하다.

서 약 서

본 연구수행을 위하여

1. 실험동물의 윤리적 사용과 3R원칙에 따라 동물실험의 수행에 대하여 충분히 검토하였습니다.
2. 「동물보호법」과 「실험동물에 관한법률」에 규정된 사항을 준수하며, 안전성평가연구소 경남 환경독성본부 동물실험지침을 준수하겠습니다.
3. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 재승인 하겠습니다. 또한 승 인된 계획을 변경할 경우 동물실험계획변경신청서를 통해 위원회에 알리고 승인을 받겠습니다.
4. 연구책임자로서 본인을 포함한 등록된 실험수행자들이 실험동물의 윤리적 사용과 승인된 동물 실험 방법을 준수하도록 책임·지도하겠습니다.
5. 위 사항의 이행과 함께 위원회 및 동물실험시설장의 결정에 적극 협조하고 따를 것을 서약하 며 본 동물실험계획 승인신청서를 제출합니다.

2017 년 05 월 02일

연구책임자: 김 나 현 (서명)

Approval of Animal Care and Use Protocol

승인서

1. 동물실험계획 (Original protocol information)

접수번호 Receipt Number	17-1-0009	
시험제목 Protocol Title	(시험번호Protocol Number:) Wistar rat에서 생약 및 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험	
실험기간 Study Period	2017년 05월 18일 ~ 2017년 09월 29일	
시험책임자 Principal Investigator	소속 Affiliation	경남생명자원연구센터
	성명 Name	김 나 현

2. 승인사항 (Approval)

심의일자 Review Date	2017년 05월 02일
승인일자 Approval Date	2017년 05월 12일
승인번호 Approval Number	1705-0002


KIT 경남환경독성본부 IACUC에서는 상기의 동물실험계획을 승인합니다.

This animal care and protocol was reviewed and approved by the IACUC at Korea Institute of Toxicology Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry.


2017. 05. 12.

IACUC 위원장 김 곤 섭 *Gonsup Kim* (서명)
Chairperson signature

2. IACUC 승인서 발부

<p style="text-align: center;">시험 계획서</p> <p style="text-align: center;">Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험</p> <p>시험번호 B17007-1 시험계획서 승인일 2017년 05월 17일</p> <p>시험의뢰자 해당없음</p> <p>시험기관 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부 경남 진주시 문산읍 제곡길 17 Homepage http://www.kitos.re.kr</p> <p style="text-align: right;">대외비</p> <p style="text-align: right;"> Page 1/3</p>	<p style="text-align: center;">Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험 시험번호: B17007-1</p> <p style="text-align: center;">시험정보</p> <p>시험제목 Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험</p> <p>시험번호 B17007-1 시험의뢰자 해당없음</p> <p>시험기관 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부 경상남도 진주시 문산읍 제곡길 17 Tel: 055-750-3851 Fax: 055-750-3879</p> <p>시험책임자 김나연 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부 경상남도 진주시 문산읍 제곡길 17 Tel: 055-750-3851 E-mail: nhkim@kitos.re.kr</p> <p>부분책임자 시험 주관담당자 이상준 사육관리 박태진 · 이주홍 조직관리 김나연</p> <p>시험일정 실험개시일(동물입수) 2017년 05월 18일 수술일 2017년 05월 23일 투여개시일 2017년 05월 30일 부검개시일(부검일) 2017년 07월 11일 실험종료일 2017년 07월 28일</p> <p style="text-align: right;">Page 1</p>	<p style="text-align: center;">Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험 시험번호: B17007-1</p> <p style="text-align: center;">승인서명</p> <p>_____ 2017. 05. 18 시험책임자 김 나 연 날카 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부</p> <p>_____ 2017. 5. 18. 승인책임자 허 정 두 날카 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부</p> <p>시험의뢰자 _____ 날카</p> <p style="text-align: right;">Page 3/3</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

1차 계획서 및 승인서명

<p style="text-align: center;">시험 계획서</p> <p style="text-align: center;">Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험</p> <p>시험번호 B17007-2 시험계획서 승인일 2017년 06월 27일</p> <p>시험의뢰자 해당없음</p> <p>시험기관 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부 경남 진주시 문산읍 제곡길 17 Homepage http://www.kitos.re.kr</p> <p style="text-align: right;">대외비</p> <p style="text-align: right;"> Page 1/3</p>	<p style="text-align: center;">Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험 시험번호: B17007-1</p> <p style="text-align: center;">시험정보</p> <p>시험제목 Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험</p> <p>시험번호 B17007-2 시험의뢰자 해당없음</p> <p>시험기관 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부 경상남도 진주시 문산읍 제곡길 17 Tel: 055-750-3851 Fax: 055-750-3879</p> <p>시험책임자 김나연 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부 경상남도 진주시 문산읍 제곡길 17 Tel: 055-750-3851 E-mail: nhkim@kitos.re.kr</p> <p>부분책임자 시험 주관담당자 이상준 사육관리 박태진 · 이주홍 조직관리 김나연</p> <p>시험일정 실험개시일(동물입수) 2017년 06월 29일 수술일 2017년 07월 03일 투여개시일 2017년 07월 12일 부검개시일(부검일) 2017년 08월 21일 실험종료일 2017년 08월 31일</p> <p style="text-align: right;">Page 2/3</p>	<p style="text-align: center;">Wistar rat에서 활성 생아, 아로니아 및 락 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 평가 시험 시험번호: B17007-1</p> <p style="text-align: center;">승인서명</p> <p>_____ 2017. 07. 11 시험책임자 김 나 연 날카 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부</p> <p>_____ 2017. 07. 11. 승인책임자 허 정 두 날카 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부</p> <p>시험의뢰자 _____ 날카</p> <p style="text-align: right;">Page 3/3</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2차 계획서 및 승인서명

3. 시험계획서 및 시험스케줄 배부 (2차로 나누어 동물 실험 진행)

○ 시험계획서

1. 개요

1.1. 목적

본 시험은 수컷 Wistar rat에서 중성화 및 호르몬 투여를 통하여 전립선 비대증동물모델을 확보하고 활성 생약, 아로니아 및 팍 추출물 섭취를 통한 증상 완화 효능을 평가하기 위한 실험이다.

1.2. IACUC

안전성평가연구소는 1998년 AAALAC International (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 인증을 획득하였으며, 본 시험계획서는 안전성평가연구소 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) 심의를 통과하였음.

1.3. 동물복지

본 시험은 안전성평가연구소 표준작업지침서에 따라 동물에 대한 일반적인 복지를 실시하고, 실험동물복지법, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (by ILAR publication)에 따라 동물의 고통과 통증을 최대한 예방할 수 있는 의약적 조치를 취함. 특히 사망에 가까운 심각한 독성이 발현되는 경우 시험책임자는 기관수의사와 상의하여 인도적 차원에서 가능한 한 빨리 안락사 시킨다.

2. 시험물질 및 대조물질

2.1. 물질정보

시험물질 및 대조물질의 생산, 조성 및 기타 특성에 관한 자료는 협동연구기관에서 제공하며, 이는 시험기초자료 및 최종보고서에 첨부자료로 포함된다.

2.1.1. 시험물질

명칭	KIT code	비고
아로니아 추출물	T0091	차광 냉장
진피 추출물	T0113	차광 냉장
각(Gac) 추출물	T0115	차광 냉장
오리나무 추출물	T0111	차광 냉장
구기자 추출물	T0112	차광 냉장
구지뽕 추출물	T0114	차광 냉장

2.1.2. 대조물질

명칭	KIT code	비고
CJ 전립소 (Saw palmetto)	-	
Finasteride	-	

2.2. 잔여 시험물질

시험 종료 후 잔여 시험물질은 협동연구기관과 협의하여 폐기, 반환 또는 다른 시험에 사용할 수 있음.

3. 시험계

3.1. 실험동물

종	특정병원체부재 (SPF) 랫드
계통/아계통	Wistar /CrljOri:Wistar
입수동물수	50마리(수컷 50마리)
실험동물수	48마리(수컷 48마리)
주령범위	약 7주령에 입수하며, 투여개시 시 약 9주령 동물을 사용함.
체중범위	투여 시 전체 평균 체중의 $\pm 20\%$ 내외 동물을 사용하며, 실 체중은 최종보고서에 기재함.
공급원	(주)오리엔트바이오
개체식별	경기도 성남시 중원구 갈마치로 322 순화기간 및 회복기간에는 적색 마커를, 투여 및 관찰기간에는 흑색매직에 의한 미부표식법 및 사육상자에 표기하는 케이지카드표시법으로 실시함.

3.2. 시험계 선택이유

현재의 과학적 지식으로 살아있는 동물을 이용한 실험 이외에 본 실험의 목적을 달성하기 위한 다른 대체 실험법이 확립되지 않았다. 랫드에서 전립선 비대증 유도와 관련한 풍부한 자료가 있으므로 본 시험의 실험동물로 선택하였음.

3.3. 질병검사

건강한 동물을 본 시험에 사용하며 동물공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험기초자료로 보관함.

3.4. 순화

모든 동물은 동물실 환경에 적응하기 위해 5일간의 순화기간을 둔다.

3.5. 군 분리

질병이나 상처 등의 임상증상을 보이지 않고, 적절한 체중을 나타내는 동물을 선택하여 시험에 사용함.

4. 동물실 및 사육관리

4.1. 동물실 번호

경남환경독성본부 지하동물실 5

4.2. 사육

순화기간 및 수술 후 2주간 사육상자당 3마리 이하로 폴리케이지 (225W x 465D x 200H mm)에 수용하여 사육하며 이후 와이어 케이지로 교체할 수 있음. 순화도중 비정상 소견이 관찰된 동물 중 상태가 악화된 동물은 격리하여 사육할 수 있음.

4.3. 동물실 환경

항목	범위
온도	23±3° C
습도	30~70%
조명	12 hour light/12 hour dark cycle
조도	150 - 300 Lux
환기횟수	10 - 20 times/hour
청소	동물실과 사육상자 청소는 안전성평가연구소 경남환경독성본부 생명자원연구센터의 표준작업지침서에 따라 실시함.

4.4. 사육상자 및 동물실 식별

모든 사육상자에는 케이지 카드를 부착하고, 동물실의 입구에는 동물실 사용기록지를 부착함.

5. 사료와 물

실험동물용 고품사료를 자유 급여함. 사료는 공급업체에서 검사성적서를 받는다.

물은 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 상수도수를 자유급여 함. 실험동물에 공급되는 물은 6개월마다 환경부에서 지정한 검사기관에 의뢰하여 총 세균수, 대장균수, 납, 염소 및 특정 오염물질 등에 대하여 검사함.

6. 실험 설계

6.1. 군 구성 및 수술적 처치

6.2. 시험 방법

(1) 중성화 수술

1-1. 항생제 및 진통제를 경구투여 한 즉시 주사마취를 실시하며 ventro-dorsal position으로 위치 한 후 음낭 주위를 포비돈으로 소독함.

1-2. 요도가 다치지 않도록 요도 아래 1cm 피부를 세로방향으로 약 1cm 가량 절개함.

1-3. 피부와 양측 고환집막을 둔성분리하고 복강으로부터 고환 및 부고환을 견인하여 비흡습사 로 여러 번 결찰하여 복강이 노출되지 않도록 하고 고환집막과 함께 고환/부고환을 적출함.

1-4. 피하조직과 피부를 봉합하고 수술부위를 소독한 후 따뜻한 물주머니 위에 올려 마취에서 회복되면 케이지에 넣는다.

(2) 수술적 처치 후 봉합부위가 아물 때까지 7일간 회복기간을 두고 상처가 회복되면 체중에 따 라 군분리를 실시함.

(3) 시험물질 투여: 수술 회복기간 이후 전립선 비대 유도를 위하여 6주간 3mg/kg의 Testosterone 을 매일 피하투여 (SC) 하며 같은 기간 동안 매 주 1회 체중을 측정하여 체중을 기준으로 각 군 에 해당하는 시험물질을 1일 1회 경구 투여함.

6.3. 군 설정 및 회복기간

통계적 유의성을 확보하기 위하여 군당 8마리를 설정하였으며 수술 후 7일간 회복기간을 주고 시험을 실시하였음.

1차

Group	Sex	동물수	No	수술적 처치	Treatment
Sham control	M	8	1-8	Sham surgery	0.5% CMC
Negative control	M	8	9-16	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	0.5% CMC
Positive control	M	8	17-24	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	Saw palmetto 200mg/kg
T1	M	8	25-32	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	아로니아 추출물200mg/kg
T2	M	8	33-40	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	진피 추출물 200mg/kg
T3	M	8	41-48	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	곽(gac) 추출물200mg/kg

2차

Group	Sex	동물수	No	수술적 처치	Treatment
Sham control	M	8	1-8	Sham surgery	0.5% CMC
Negative control	M	8	9-16	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	0.5% CMC
Positive control	M	8	17-24	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	finasteride 1mg/kg
T1	M	8	25-32	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	오리나무 추출물200mg/kg
T2	M	8	33-40	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	구기자 추출물 200mg/kg
T3	M	8	41-48	Castration + Testosterone SC (3mg/kg)	구지뽕 추출물200mg/kg

7. 측정 및 관찰

7.1. 일반증상 및 사망률 관찰

사망률, 빈사, 외관 및 행동 변화 등을 포함하는 일반증상을 관찰하고, 날짜와 시간, 지속 정도 등을 기록함. 동물이 비정상이라고 판단될 경우 의사나 경험있는 담당자가 상세히 검사하며, 시험 책임자의 판단에 따라 필요한 경우 관찰의 범위 및 횟수를 증가시킬 수 있음.

심각한 고통이나 사망에 가까운 독성이 발현되는 경우, 시험책임자는 기관수의사와 상의하여 인도적 차원에서 가능한 빨리 CO2로 안락사 시킨다.

기간	빈도
순화기간	1일 1회
회복기간	1일 1회
투여기간	투여 전 후 1회

7.2. 체중

기간	빈도
수술 전	1회
회복기간	주 1회
시험기간	주 1회

7.3. 혈액생화학적 검사

계획 도살되는 생존동물에 대하여 혈액생화학적 검사를 실시함. 후대정맥으로부터 채혈된 혈액 약 8.0 ml을 실온에 약 90분 방치 후 3000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 혈청 약 1 ml을 이용하여 아래의 혈액생화학적 항목에 관하여 측정하고, 나머지 혈청은 호르몬 분석을 위하여 -80° C deep freezer에 냉동 보관함. 빈사동물에 대해서도 같은 방법으로 아래의 가능한 항목에 대해 실시함.

시험항목
· Aspartate aminotransferase, AST
· Alanine aminotransferase, ALT
· Alkaline phosphatase, ALP
· Glucose
· Total protein
· Albumin
· Blood urea nitrogen
· Creatinine
· Triglyceride
· Total cholesterol
· Total bilirubin

7.4. 부검

계획도살일에 계획 도살되는 생존동물에 대하여 isoflurane 마취하에 개복하여 약 6 ml을 채혈 후 후대정맥과 복대동맥을 절단하여 방혈시켜 부검을 실시함. 빈사동물에 대해서는 시험책임자의 판단으로 도살 처분하여 부검하고, 사망동물에 대해서는 가능하면 발견 직후에 바로 부검함.

7.5. 조직고정 및 조직병리검사

4. 동물실 사용 및 관리 기록

Experimental Schedule(Ver. 1_2017. 06. 28.)

Study Title: **Wistar rat에서 활성 생약, 아로니아 및 과추출물의 전립선 비대증 완화 효과 평가 시험**

Study No.: B17007-2		Animal Room No.: 5							Study Director: 김나현 (signature)							Animal Chief Manager: 김응수 (signature)									
Year/Month	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu
2017																									
June/July																									
Date	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Day	A1	A2	A3	A4	A5	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
June/July																									
Date	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Day	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	D31	D32	D33	D34	D35	D36	D37	D38	D39	D40	D41	D42			
August																									
Date	26	27	28	29	30	31																			
Day	D18	D19	D20																						

A: Acclimation Period, AD: Administration, AR: Animal Receipt, Bb: Blood collection for Bb, BC: blood collection for C3a, CalF: Calf measurement, CE: Cage and bedding change, Chem: Serum chemistry, CO: Clinical sign observation, Coag: Coagulation test, Con: Concentration analysis, CR: Cage rack relocation, CRP: Blood collection for CRP, Cyt: Blood collection for Cytokine/Chemokine, D: Dosing Period, DE: Detailed Clinical Sign Observation, DPE: Detailed Physical Examination, ECG: Electrocardiography examination, EX: Excretion, F: Fasting, FC: Food Consumption measurement, FM: Formulation analysis for test article, FQ: Food Quantity measurement, FVII: Sampling for Factor VII, GP: Grouping, HB: Heart rate and Blood pressure measurement, Hem: Hematological test, Hom: Homogeneity test, HR: Heart rate, IM: Immunogenicity, M: Marking, MT: Method validation, N: Necropsy, OP: Ophthalmology, P: Pre-test period, PK: Sampling for PK, R: Recover period, Stab: Stability test, TBW: Terminal body weight, UR: Urine collection for Urinalysis/Urine Chemistry, US: Urine collection setting, UTK: Urine collection for TK (fresh urine), VCO: Veterinarian's clinical sign observation, VE: Veterinary (Physical) Examination, WC: Water Consumption measurement, WQ: Water Quantity measurement

_____: dosing, _____: Clinical sign observation (once daily), _____: Clinical sign observation

Record for Use of Animal Room
(동물실 사용기록지)

Date: 2017. 05. 18.

Recorded by 이 상 준 (signature)

Room No.	5
Study No.	B17007-1
Kind of study	Wistar rat을 이용한 효능 평가 시험
Duration of use (yyyy.mm.dd - yyyy.mm.dd)	2017. 05. 18 ~ 2017. 07. 11
Chief of Animal care	김용수 Tel: 055-750-3868
Study responsible staff	이주홍, 탁태길
Note	해당없음

Korea Institute of Toxicology

(SOP/GANI-S/051-03 Ver.42)

Record for Use of Animal Room
(동물실 사용기록지)

Date: 2017. 06. 29.

Recorded by 이 상 준 (signature)

Room No.	Room 5
Study No.	B17007-2
Kind of study	Wistar/Rat을 이용한 전립선 효능 평가 시험
Duration of use (yyyy.mm.dd - yyyy.mm.dd)	2017. 06. 29 ~ 2017. 08. 23
Chief of Animal care	김용수 Tel: 055-750-3868
Study responsible staff	이주홍, 탁태길
Note	N/A

Korea Institute of Toxicology

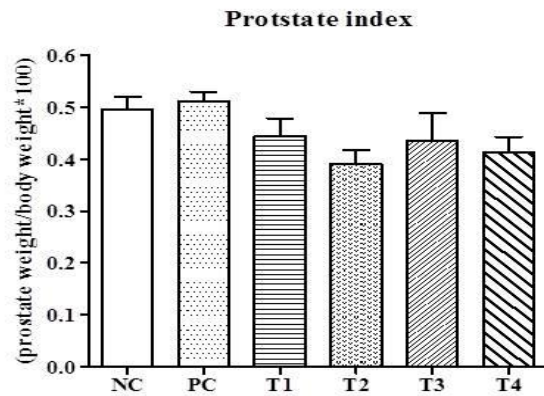
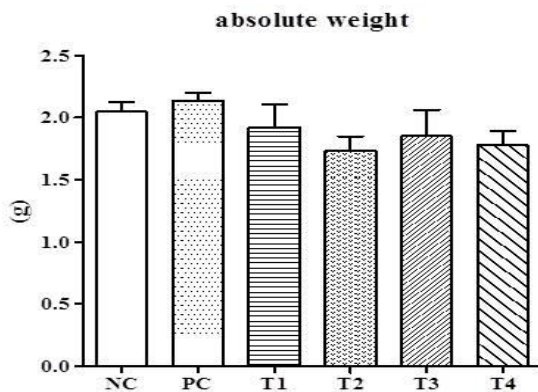
(SOP/GANI-S/051-03 Ver.42)

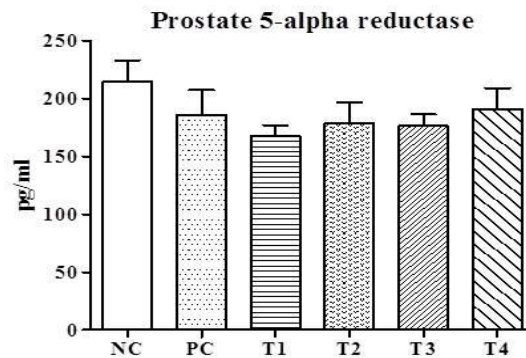
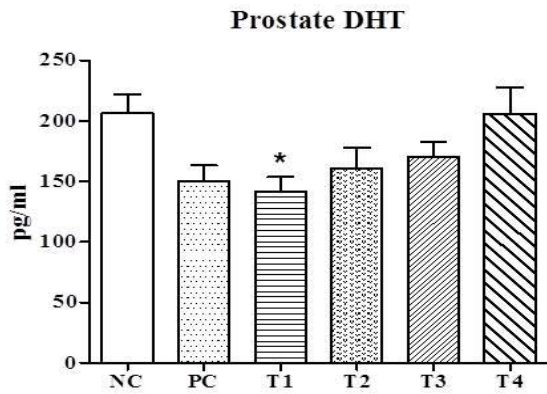
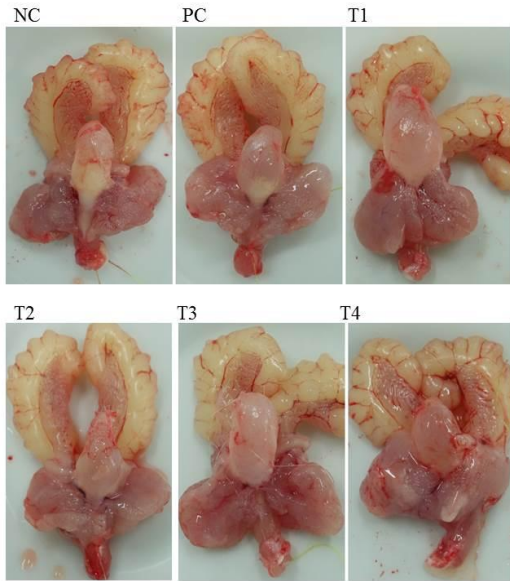
5. 실험 결과

5-1. 1차년도 *in vivo* 실험 결과 요약

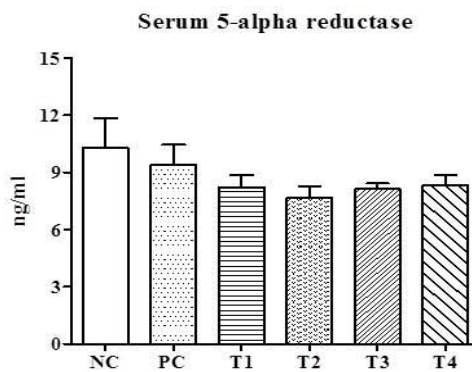
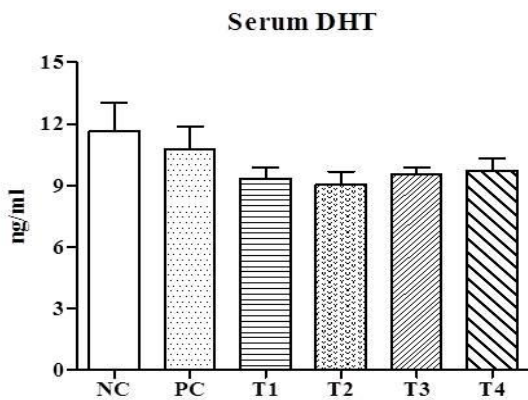
-1차년도 *in vivo* 실험 후 부검 결과 방광저류액은 군에 따른 편차가 심하게 발생하였으며 통계적 유의성을 나타내지 못하여 제외하였음. prostate gross morphology는 ventral lobe 기준으로 모든 Testosterone 투여군에서 비대를 관찰할 수 있었음. 육안적 소견상으로는 T1~T4군 사이의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않음.

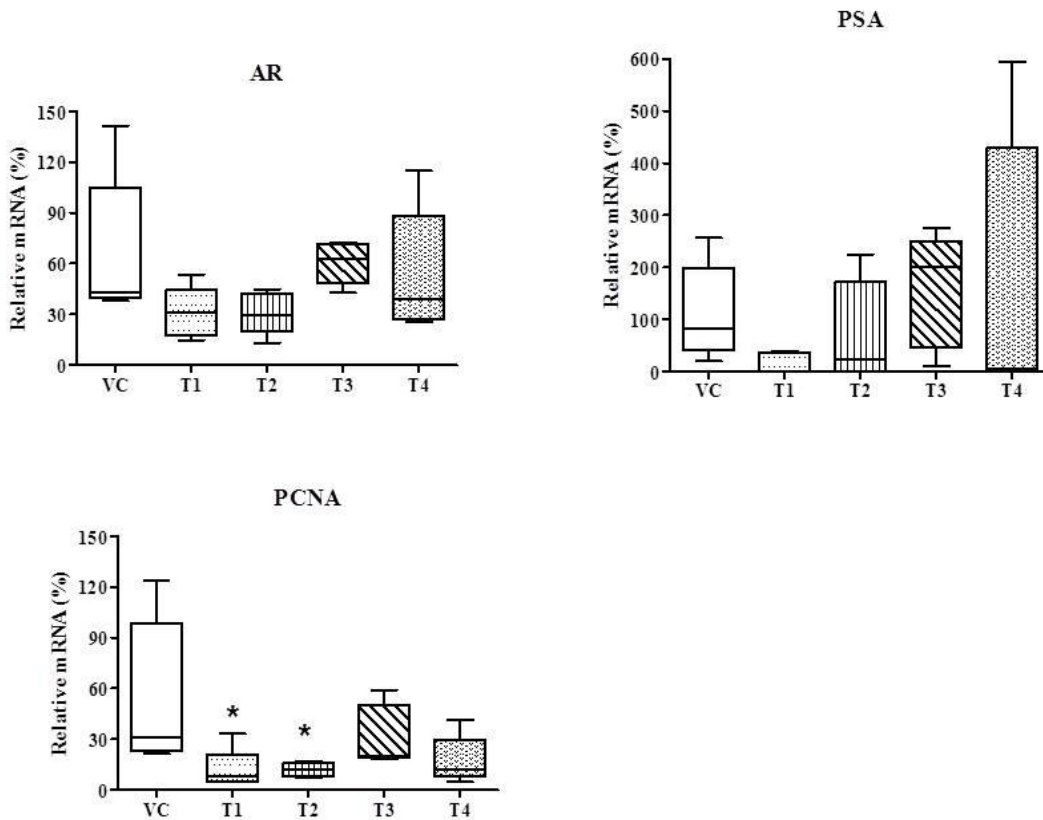
-1차년도 양성대조군(PC)로 사용한 CJ 전립소(Saw palmetto)투여군에서도 눈에 띄는 전립선 비대 완화 효능은 관찰되지 않음.





-실험 종료 후 적출된 전립선 무게를 체중으로 보정하여 전립선지수 (Prostate Index)를 계산하였으며 냉동 전립선 조직 및 혈청에서 DHT 와 5 alpha reductase 분석을 실시함. T1~T4 군은 모두 아로니아 추출물이었으나 T1 추출물에서 조직 내 DHT 감소 소견을 나타내었음.



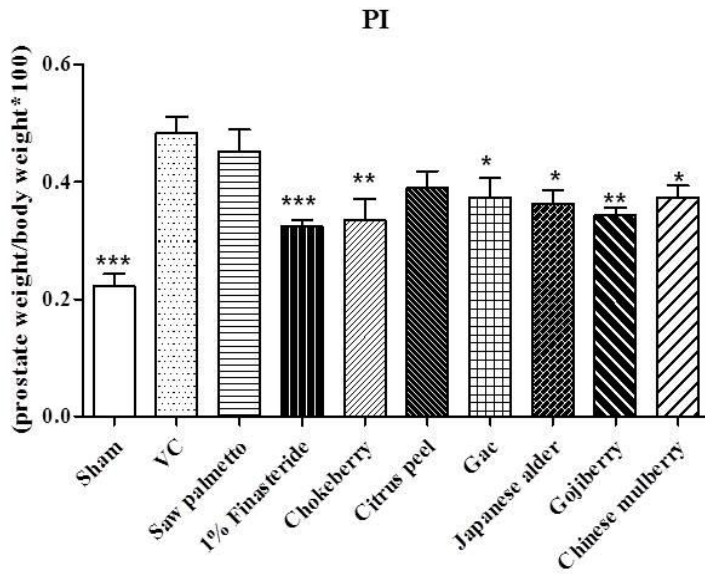


-냉동 전립선 조직에서의 qPCR 수행 결과 Androgen receptor, PSA, PCNA 의 세가지 지표가 모든 아로니아 투여군에서 감소하였으며 그 중 세포증식과 관련이 높은 PCNA의 경우 T1, T2 군에서 유의미한 감소를 나타내었음.

	TP	ALB	BUN	CREA	AST	ALT	ALP	Bil	TG	TCHO
Negative Control	6.29±0.88	4.10±0.49	25.22±4.31	0.56±0.10	134.20±22.54	33.68±7.96	530.86±110.29	0.17±0.03	99.98±33.56	86.60±18.35
Positive Control	6.48±0.61	4.12±0.35	25.02±2.00	0.51±0.05	132.74±11.45	36.54±5.49	595.80±128.42	0.14±0.04	130.70±51.24	87.80±21.84
T1	5.72±0.14	3.79±0.06	23.44±2.62	0.52±0.03	94.06±8.66*	31.90±2.87	517.44±103.33	0.17±0.01	79.04±26.99	78.40±6.58
T2	5.75±0.10	3.75±0.09	21.38±0.79	0.50±0.09	100.60±8.07*	34.00±3.27	435.32±91.84	0.16±0.03	113.32±57.34	83.00±9.35
T3	5.78±0.24	3.81±0.14	22.76±2.24	0.52±0.06	96.26±8.01*	31.62±3.65	469.22±91.94	0.16±0.02	123.94±59.36	74.80±12.76
T4	5.65±0.24	3.75±0.17	20.12±1.27	0.44±0.03	82.48±19.36*	32.58±2.10	358.78±37.14*	0.18±0.02	72.30±19.98	73.80±6.8

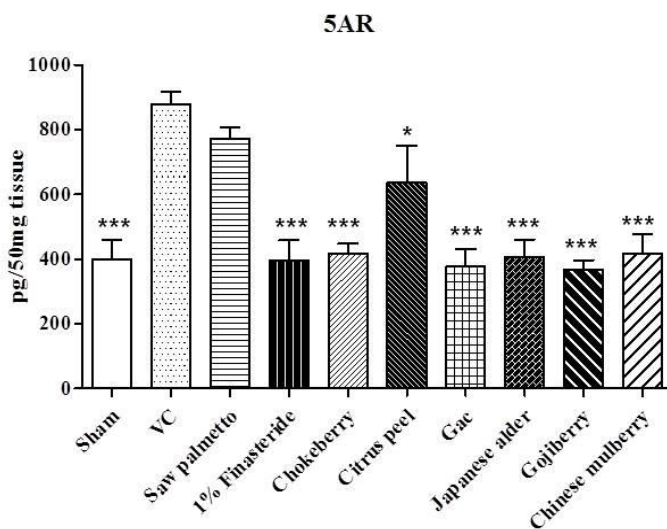
-혈청의 생화학적 분석 결과 AST 및 ALP 수치에서 아로니아 투여군의 감소를 관찰할 수 있었음.

5-2. 2차년도 *in vivo* 실험 종료 후 결과 분석



-Prostate index 분석 결과 Sham control 및 양성대조군인 Finasteride 투여군에서 가장 낮은 P value를 보이며 음성대조군과 명확하게 대조됨.

-아로니아 추출물(Chokeberry), 각 추출물(Gac), 오리나무 추출물(Japanese alder), 구기자 추출물(Gojiberry), 구지뽕 추출물(Chinese mulberry) 에서는 대조군과 통계학적 유의성이 관찰되나 진피 추출물(Citrus peel)에서는 나타나지 않았음.



-또한 1차년도 결과와 유사하게 CJ 전립소(Saw palmetto) 투여군에서는 전립선 비대 감소 효과가 관찰되지 않음.

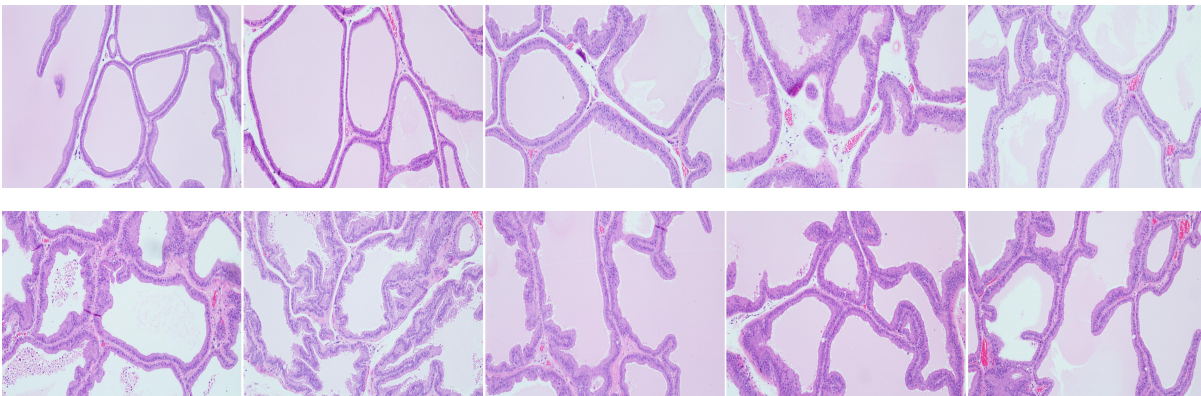
-5-alpha reductase 분석 결과 PI 분석과 유사한 패턴의 결과가 관찰됨.

-양성대조인 Finasteride 투여군 및 모든 시험군에서 통계적으로 유의하게 감소된 5 alpha reductase 수치를 나타내었음. 그러나 진피 추출물 투여군의 경우 다른 시험군에 비해서는 P value 가 큰 값을 나타냄.

	TP	ALB	BUN	CREA	AST	ALT	ALP	TG	TCHO
Sham Control	5.49±0.30	2.28±0.07	17.96±1.15	0.50±0.05	133.75±24.22	35.88±8.61	504.63±58.58	149.13±31.90	78.88±10.01
Vehicle Control	5.05±0.27	2.29±0.16	18.89±1.32	0.46±0.05	157.75±25.19	34.13±4.61	532.63±91.22	156.50±25.42	71.75±8.08
Saw palmetto	5.31±0.15	2.33±0.07	18.65±1.31	0.43±0.05	124.13±12.23	34.38±7.19	475.50±62.09	117.50±34.56	71.38±6.19
1% Finasteride	5.35±0.34	2.21±0.11	17.70±2.32	0.39±0.04	107.63±19.48	30.88±2.64	434.63±113.91	175.88±84.14	73.38±4.96
T1	6.53±1.01	2.76±0.41	21.94±3.66	0.51±0.08	156.63±19.32	41.75±9.24	665.88±209.42	226.38±109.91	85.13±18.18
T2	6.26±1.01	2.60±0.44	21.21±3.19	0.48±0.12	114.00±26.41	35.13±10.32	510.88±118.96	152.75±66.78	75.50±13.63
T3	6.34±1.11	2.68±0.43	22.23±4.19	0.49±0.11	117.63±34.70	32.50±6.65	566.13±147.50	192.50±59.15	81.38±16.90
T4	5.44±0.21	2.33±0.10	18.39±2.40	0.43±0.07	121.38±21.10	35.38±7.37	419.25±53.85	129.13±66.67	71.75±11.76
T5	5.59±0.42	2.34±0.21	19.58±2.56	0.45±0.05	103.00±13.88	30.88±2.64	384.63±80.76	191.13±90.03	65.75±13.14
T6	5.35±0.40	2.21±0.15	16.63±2.00	0.41±0.04	109.75±14.95	32.88±5.79	375.63±64.78	169.63±59.53	64.13±13.22

-혈청의 혈액생화학 분석 결과 2차년도 시험에서는 AST, ALT 및 ALP의 간 수치 영향은 관찰되지 않았음.

T1=아로니아 추출물, T2=진피추출물, T3=각 추출물, T4=오리나무, T5=구기자 추출물, T6=구지뽕 추출물



Sham control 1% Finasteride T1; Chokeberry T2; Citrus Peel T3; Gac
 Vehicle control Saw palmetto T4; Japanese alder T5; Gojiberry T6; Chinese mulberry

-포르말린 고정 후 H&E 염색을 통한 조직병리학적 검사를 수행함. ventral lobe 관찰 결과 양성대조군인 Finasteride 투여군의 경우 전립선 세포 및 주변 기질부의 뚜렷한 감소가 관찰되었으며 모든 투여군에서도 일부 gland 크기 감소 등의 소견이 관찰되었으나 계측가능한 넓이 등으로만 판단하기 어려워 추가적인 분자적 수준의 분석이 동시에 수반되어야 할 필요가 있음.



Screening study of herbal resources (Chokeberry, Citrus peel, Gac, Japanese alder, Gojiberry, Chinese mulberry) for benign prostatic hyperplasia in rats

Na-Hyun Kim¹, Jeong-Doo Heo¹, Kwang-Hyun Hwang¹, Je-Hein Kim¹, Eun-Ju Jeong²

¹Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Korea Institute of Toxicology (KIT), Jinju, Gyeongsangnam-do, Republic of Korea
²Gyeongnam National University of Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Jinju 660-758, Republic of Korea

1. Introduction

The target of the study is ethanol or crude extracts from herbal resources: *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), *Citri Unshiu Pericarpium* (Citrus peel), *Momordica cochinchinensis* (Gac), *Alnus japonica* (Japanese alder), *Lycium chinense* (Gojiberry), *Morus australis* (Chinese mulberry), which were not yet studied for its beneficial effects against benign prostatic hyperplasia (BPH). In this study, those were treated orally in benign prostatic hyperplasia (BPH) rats.

2. Materials & Methods

For in vivo experiments, 8-week old male SPF wistar rats were purchased (n=60). All animals were castrated, then randomly divided into 10 groups (SH, sham control, VC, vehicle control, PC1; Saw palmetto extract, PC2; 1% Finasteride in peanut oil, T1; Chokeberry, T2; Citrus peel, T3; Gac, T4; Japanese alder, T5; Gojiberry, T6; Chinese mulberry). After a week of recovery phase, 200mg/kg of the test materials were orally administered once-a-day for 6 weeks as well as subcutaneous injection of 3mg/kg testosterone. Prostate glands were collected and measured at necropsy for calculating the Prostate Index. Blood serum chemistry and ELISA were also performed.

3. Results

According to the statistical analysis of Prostate Index and tissue 5- α reductase measurement, Finasteride treated group was the most effective among all test groups. Chokeberry, Gac, Japanese alder, Gojiberry and Chinese mulberry were also showed statistically significant results, but Citrus peel was not. Saw palmetto extract treatment could not contribute to any meaningful effects. Blood serum chemistry results were variable, it was performed for screening the clinical abnormality, but all major parameters were in the normal range. Histopathology, VC and saw palmetto treated group were showed thickened connective tissue and increased cellularity than sham control group. Other treatment groups showed decreased epithelial hyperplasia, although minor differences between the groups.

4. Conclusion

In this study, it was somewhat insufficient result since many parameters were statistically unclear. However, this screening study demonstrated that several natural products have a certain possibility of lowering the risk of BPH.

5. Reference

Sin H, Lee SY et al. (2012) Inhibitory effect of *Yakuhwa*(Yak, a traditional herbal medicine against inflammation) against benign prostatic hyperplasia in rats. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 12:84
 Kim HK, Park H et al. (2011) Inhibitory effect of curcumin on testosterone induced benign prostatic hyperplasia in male B6C3F₁ mice. *Journal of Ethnopharmacology* 133:300-306
 Kallig KE, Reed BM. (2005) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*): A review on the diuretic, cardioprotective and potential health effects. *Phytotherapy Research* 19: 625-34.

1. Prostate Index

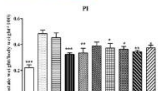


Fig 1. Prostate Index; statistically, sham control showed the best PI value than all other testosterone-induced BPH groups. 1% Finasteride treated group showed the next best results. Chokeberry and Gojiberry extract treatment administered better effects among the test materials. PI of citrus peel extract treated group were not statistically significant.

2. 5- α reductase analysis

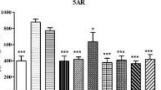


Fig 2. ELISA results from prostate tissue of testosterone-induced BPH Wistar rats. Prostate 5AR level was significantly decrease in all treatment groups. 1% Finasteride, chokeberry, Gac, Japanese alder, Gojiberry and Chinese mulberry showed lower p values than citrus peel which were not showed significance in PI index. 5AR level of Saw palmetto treated group was not different from that of VC group.

3. Serum chemistry

Item	SH	VC	PC1	PC2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
WBC count	148.018	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Neutrophil	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Monocyte	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Platelet	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Albumin	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Bilirubin	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
AST	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
ALT	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
ALP	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Cr	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
BUN	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Ca	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Na	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
K	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
Cl	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012
TP	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012	128.012

4. Histopathology

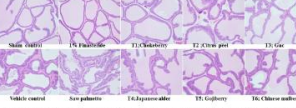


Fig 3. Histopathological examination of prostate tissue of testosterone-induced BPH Wistar rats.

Screening study of herbal resources (Chokeberry, Citrus peel, Gac, Japanese alder, Gojiberry, Chinese mulberry) for benign prostatic hyperplasia in rats

Na-Hyun Kim¹, Jeong-Doo Heo¹, Kwang-Hyun Hwang¹, Je-Hein Kim¹, Eun-Ju Jeong²

¹Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Korea Institute of Toxicology (KIT), Jinju, Gyeongsangnam-do, Republic of Korea; ²Gyeongnam National University of Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Jinju 660-758, Republic of Korea

Introduction: The target of the study is ethanol or crude extracts from herbal resources: *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), *Citri Unshiu Pericarpium* (Citrus peel), *Momordica cochinchinensis* (Gac), *Alnus japonica* (Japanese alder), *Lycium chinense* (Gojiberry), *Morus australis* (Chinese mulberry), which were not yet studied for its beneficial effects against benign prostatic hyperplasia (BPH). In this study, those were treated orally in benign prostatic hyperplasia (BPH) rats.

Materials and Methods: For in vivo experiments, 8-week old male SPF wistar rats were purchased (n=60). All animals were castrated, then randomly divided into 10 groups (SH, sham control, VC, vehicle control, PC1; Saw palmetto extract, PC2; 1% Finasteride in peanut oil, T1; Chokeberry, T2; Citrus peel, T3; Gac, T4; Japanese alder, T5; Gojiberry, T6; Chinese mulberry). After a week of recovery phase, 200mg/kg of the test materials were orally administered once-a-day for 6 weeks as well as subcutaneous injection of 3mg/kg testosterone. Prostate glands were collected and measured at necropsy for calculating the Prostate Index. Blood serum chemistry and ELISA were also performed.

Results: The present study we showed the p53-independent activation of apoptosis by decrease the expression of phosphorylated Akt-mediated suppression of NF- κ B activation that is also substantiated with the downregulation of anti-apoptotic factors Bcl-2 and Bcl-xL in human lung adenocarcinoma cells, resulting in an attenuation of TRAIL resistance in combined treatment. Furthermore, apoptosis was induced in TRAIL-resistant lung cancer cells via a co-treatment of resveratrol and TRAIL, which was assessed by the loss of mitochondrial membrane potential resulting in the translocation of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol due to mitochondrial dysfunction and finally the caspase activation. Furthermore, resveratrol enhances LC3-II processing and lysosomal degradation indicated by p62 downregulation confirmed the autophagy flux activation. Moreover, autophagy flux was not affected by resveratrol-induced TRAIL-mediated apoptosis of lung cancer cells.

Conclusions: Overall, targeting the NF- κ B pathway by resveratrol attenuates TRAIL resistance and induces TRAIL-mediated apoptosis which would be the eminent therapeutic strategy against lung cancer.

References

[1] Zhang L and Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy*. 2005;12(3):228-237.
 [2] Trauzell A, Wermann H, Arlt A, Schutts S, Schafer H, Cestari S, Roder C, Ungerer H, Lampe E, Heinrich M, Walczak Hand Kalthoff H. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C δ 1 and NF- κ B contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2001; 20(11):425-439.
 [3] Matsui MC, Zalcov E, Kimchi A andKroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy andapoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8(9):741-752.

국내학술대회 발표 : 대한수의학회 (2017)

특허출원

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.08.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2017-0110301 (접수번호 1-1-2017-0842392-88)
 출원인명칭 경남과학기술대학교 산학협력단(2-2004-022883-1) 외 1명
 대리인명칭 유지열(9-2007-001663-4)
 발명자명칭 정은주정두 김나현
 발명의명칭 신규추출물 및 그 용도

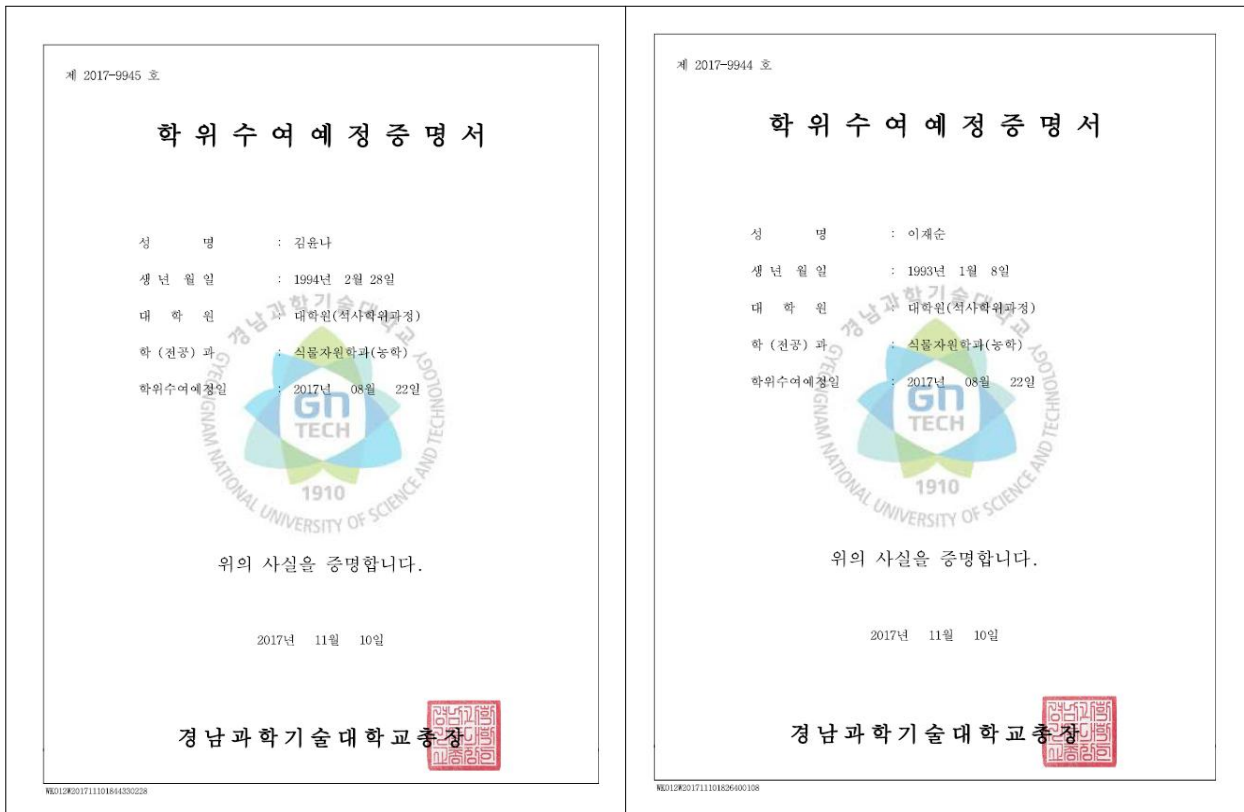
특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동별별 납입명세서에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 우부자번호 : 0131(가곡역) = 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려번호 정보변경(경정)], 정정 신고서를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 우 특허료(patent.go.kr) 접수 > 민원서비스(문답) > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 영세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 단건서 제출기간 이내에 출원서에 최종조 첨부단 영세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 미드린드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 우 국제 안내 : http://www.kipo.go.kr/특허/PCT안내/영문
 우 우선권인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 우 미국특허청의 출원번호를 기준으로 미국 내외에 우선권 주장할 경우, 실용신안 이 경우 상하하여, 우선권일부터 12개월 이내의 미국특허청에 [특허고려번호] 제 2005-29호 제 2호 서식(미국)을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사항을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 우 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무상과정에서 개발한 발명만 사용자(기업)가 명확하게 공개하지 않은 경우, 특허법 제26조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동별별 안내서를 참조하시기 바랍니다.

신규추출물 및 그 용도 (출원번호 : 10-2017-0110301)

□ 인력양성 실적



□ 사업화 실적

농업회사법인 주식회사 삼흥에서는 삼흥식품(대표자동일)에 기술이전하여 제품을 출시하였으며, 2017년 총매출은 2억원(2017년 10월까지)을 달성하였으며, 개발제품(아로니아 제품, 아로니아 발효액)으로는 약 5,500만원을 달성함.



상품화한 제품사진(물에녹는 아로니아 : 액상발효분말제품)


농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 글러스)의 개발			
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼흥	참여기관	경남과학기술대학교, 안전성평가연구소	
책임자	정동민	연구기간	2018년 07월 ~ 2018년 12월 (총 30개월)	
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000	
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	삼흥식품	
기술료	없음	기술실시일	2017.04.01	
구분	기술실시업체 결산액 (년와 배관액) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성			
실적	자산 총계	FRB	제품건수	1
	자본 총계	FR2		
	부채 총계	5	기술개발사업용 매출액	55
	매출액 총계	2392016, 2002017.10		



제품별 실적

구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	물에 녹는 아로니아		2017. 7. 7	125	44%	국내산	없음

2017년 11월 08일

연구책임자 : 정동민 (서명  인)

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

		
2017-07-26, 1000만원, 농업회사법인 (주)삼흥식품에프엔비	2017-07-31, 1480800원, 호성농산	2017-07-31, 3300000원, 거창정림아로니아
		
2017-08-30, 50,144,740원, 호성농산	2017-08-31, 569800원, 농업회사법인 (주)삼흥식품에프엔비	2017-08-31, 11,000,000원, 가나농원
		
2017-08-11, 704000원, 노닐린달	2017-08-19, 780400원, 함양농협가농가농	2017-08-20, 2200000원, (주)세종단영비
		
2017-08-21, 850000원, 가나농원	2017-08-22, 1100000원, 후쿠에프니아농장	2017-08-26, 3300000원, 거창정림아로니아
		
2017-08-28, 1850000원, 호성농산	2017-08-28, 804400원, 무병각수	2017-10-17, 95040000원, 제주관동생협
		
2017-10-27, 990000원, 호성농산	총 128,079,400원 중 48,800만원	

제4절 3차년도(2018년) 연구개발 수행결과

1. 2018년도 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2018)	아로니아 추출물의 전립선 비 대증 효능 을 가지는 시제품 2의 개발	- 전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2의 제작	- 복합시제품 개발을 위한 복합소재 성분확 인 - 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아 추출물의 제작 -전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2-2의 제작	-꾸지뽕의 성분확인과 gac 의 베타카로틴 함량 분석하였음. - 아로니아 복합 시제품 2-2를 제작함 - 전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품을 제작하였는데, 복합시제 품 2-2는 꾸지뽕 5% 함 유한 아로니아 착즙액+ 발효(유산균발효, 초산발 효(pH조정))->스프레이 건조제품
		- 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립	- 전립선 비대증 효능 을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공 정 확립	- 전립선 비대증 효능 을 가지는 아로니아 복 합 시제품 생산 공정 확립하였음.
		- 포장디자인 개발	- 포장디자인 개발	- 2017년도의 복합시제 품2의 포장디자인을 수 정하고, 복합시제품2-2의 스티커디자인을 완성하 여 포장하였음.
		- 영양성분 분석	-품목제보조고	- 복합시제품2-2의 영양 성분분석과 품목제조보 고를 하였음.
		- 시제품 2 제작	- 시제품 2 제작	-제품화를 위한 시제품 의 미생물 안전성평가를 실시하였음.
	- 아로니아 활용제품의 제시	- 아로니아 활용제품의 제시	-아로니아활용제품은 아 로니아쌀, 아로니아연잎 밥을 제시함.	
추출 조건 최적화 및 기능성 복 합물의 제 조, 아로니 아 추출물	활성을 최적화하기 위한 추출조건을 확보	- 전립선비대증 개선 활성 최적화를 위한 추출조건 최적화	- 아로니아 추출조건 최 적화를 위하여 실험설 계법 중 Box-Behnken 방법으 로 에탄올 조성, 추출 온도, 추출시간을 인	

의 분석조건 확립			자로 설정하고 가속용 매추출장치를 이용하여 13개 추출물을 제조
	추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조	<ul style="list-style-type: none"> - 추출조건 최적화를 위한 추출조건별 활성 평가 - 기능성 복합소재 선정 	<ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물 13종에 대한 전립선 세포주에서 DHT 저해활성 평가 수행 - 복합시제품 개발을 위하여 아로니아와의 배합소재후보 12종 선정 - 후보소재 12종에 대하여 3종의 전립선 세포주에서 DHT 생성 저해 활성 평가 - 복합소재의 in vivo 효능검증을 위하여 동물실험용 추출물을 제조하여 협동2기관에 제공
	추출물 및 복합물 최적화를 위한 반응표면분석	<ul style="list-style-type: none"> - 반응표면분석을 이용한 아로니아 추출물의 활성 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - DHT 저해활성에 최적화된 아로니아 추출조건 도출을 위하여 반응표면분석 수행 - 설계 요인 (추출온도, 에탄올농도, 추출시간)에 따른 반응값 분석
	아로니아의 기능성성분 함량 비교평가	<ul style="list-style-type: none"> - 추출조건에 따른 아로니아 추출물의 주요 기능성성분의 함량 비교분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 전립선비대증 실험동물모델에서 우수한 활성을 나타낸 아로니아 추출물에 대하여 HPLC 및 LC/MS를 이용하여 주요 안토시아닌 및 페놀성 화합물에 대한 함량평가 수행
	아로니아 추출물의 분석조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> -HPLC 분석조건 확립 -LC/MS 분석조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 추출물의 주요 기능성성분 함량분석을 위하여 HPLC 분석조건과 LC/MS

				<p>분석조건 최적화</p> <p>- 전립선 및 방광 조직에서 모두 IL-17의 발현은 나타나지 않았으며 COX2 는 미미한 정도로 발현이 확인되었음</p> <p>- 2차년도 <i>in vivo</i> 투여 시료 및 다른 추출 조건의 아로니아 시료 12종에서 NO 억제 정도를 확인한 결과 모든 시료에서 통계상 유의미한 감소를 나타내었으나 구지뽕 추출물이 다른 모든 시료에 비해 좋은 결과를 나타냄.</p>
<p>-아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구</p>	<p>항염기전</p>	<p>- 2차년도 실험에서 6주간 각 시료를 투여한 랫드에서 채취한 전립선 조직에서 대표적 염증 매개 물질인 COX2 발현 및 Th 17 세포 탐색을 위하여 IL-17A 사이토카인 발현을 확인함</p> <p>- 두가지 염증 관련 인자들이 거의 발현되지 않아 동물실험 시료 및 추출물로 ASE 추출물을 요청하여 RAW 264.7 세포에서 NO 억제 반응을 확인함</p>		<p>- PDE5 는 정상 및 테스토스테론 투여한 조직에서 큰 차이 없이 일정 수준의 발현양을 유지하고 있었으나 구지뽕 추출물에서 발현양의 증가가 뚜렷하였음.</p> <p>- nNOS 는 정상 및 테스토스테론 투여 조직에서 모두 매우 낮은 발현 정도를 보이지만 구지뽕 추출물에서 발현양의 증가가 뚜렷하였음.</p>
	<p>평활근 수축 억제 기전</p>	<p>- 6주간 시료를 투여한 랫드에서 채취한 방광 및 주변 평활근 조직에서 PDE5 및 nNOS 발현 정도를 확인함</p>		<p>- 전립선 조직에서 AR 유전자 발현은 아로니아, 진피, 각(Gac) 추출물 투여군에서는 감소 경향을 나타내었지만 통계적으로는 유의하지 않았음. PCNA 는 모든 투여군에서 유의미한 감소를 확인하였으며 PSA 는 통계적으로는 두 양성대조군만 유의미한 차이를 보였음</p>
	<p>호르몬 작용 억제 기전</p>	<p>- 6주간 시료를 투여한 랫드에서 채취한 전립선 조직에서 AR, PCNA, PSA 유전자 발현을 확인함</p> <p>- 해당 기전을 추가적으로 확인하기 위해 사람의 유래의 정상 전립선 상피 세포인 RWPE-1 세포에 testosterone propionate를 노출시켜</p>		

			<p>기존의 랫드 모델에서와 유사한 in viro 모델을 만들어 AR, SRD5A2 및 PCNA 발현 정도를 확인함</p>	<p>나 다른 모든 투여군들도 감소 경향은 확인할 수 있었음.</p> <p>- RWPE-1 세포에서TP와 12종의 아로니아 ASE 추출물에서 AR, SRD5A2 및 PCNA 의 변화를 확인한 결과 2, 3, 5, 9 번 추출물에서 호르몬 및 증식 작용 억제 효능이 확인되었음.</p>
	<p>- 시제품의 사업화 전략 수립 및 마케팅</p>	<p>- 시제품의 사업화 전략 수립 및 마케팅</p>	<p>- 시제품의 흡소핑 방송 결과</p> <p>- 시제품의 공영흡소핑 온라인몰 현황</p>	<p>- 2017년도 개발된 복합 시제품2의 마케팅은 아임소핑의 흡소핑 결과로 표시함.</p>

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>- 복합시제품 개발을 위한 복합소재 성분확인</p>	<p>- HPLC 로 베타카로틴의 지표성분 정량법 : HPLC에 의한 베타카로틴의 정량 정성분석</p> <p>Column은 YMC-Pack ODS AM 250x4.6 mm(USA)이고, column temperature는 30℃을 유지함. flow rate는 0.8ml/min이었고, solvent A는 a-water/, solvent B는 acetonitrile로 사용함.</p>	<p>꾸지뽕의 성분확인과 gac 의 베타카로틴 함량 분석하였음.</p> <p>베타카로틴 표준물질의 분석방법 표준화에 따른 검량곡선 확립 및 분석조건 확립하고, gac의 베타카로틴 함량을 확인하였음.</p>
<p>-전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2의 제작</p>	<p>전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품 제작을 위한 아로니아 추출물의 제작 및 시제품2-2의 제작함</p>	<p>전립선 질환 예방용 아로니아 복합 시제품을 제작하였는데, 복합시제품 2-2는 꾸지뽕 5% 함유한 아로니아 착즙액 + 발효(유산균발효, 초산발효(pH조정))->스프레이건조제품</p>
<p>- 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산</p>	<p>- 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립</p>	<p>- 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립하였음.</p>

공정 확립		
- 포장디자인 개발	- 포장디자인 확정	- 2017년도의 복합시제품2의 포장디자인을 수정하고, 복합시제품2-2의 스티커디자인을 완성하여 포장하였음.
- 품목제조보고	- 품목제조보고 2건	- 복합시제품2-2의 영양성분분석과 품목제조보고를 하였음.
- 시제품 2 제작	- 시제품 2 제작	- 제품화를 위한 시제품의 미생물 안전성평가를 실시하였음.
추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조	<ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 복합물 개발을 위한 후보소재 선정을 위하여 문헌검색, 전통한방소재 자문, 성분화학적 특성 검토, 지식재산권 검색을 실시하여 후보소재를 도출 - 후보소재에 대하여 3종의 전립선 세포주(LNCap, PC3, DU145 cell)에서 DHT 생성 저해 활성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 아로니아 복합시제품 개발을 위하여 전문가 자문을 통해 전통의약소재 12종(진피, 치자, 산수유, 강황, 울금, 백복령, 적복령, 구기자, 오미자, 창출, 당귀, 용담)을 선정 - 최근 해외소재에 대한 소비자들의 높은 관심을 반영하여 베트남 등지에서 배뇨장애 등에 효과적인 것으로 알려진 '계육'을 후보로 선정 및 시료 확보 - 전립선 비대증에 활성 보고된 diarylheptanoid 계열 화합물을 함유한 식용 소재를 대상으로 문헌조사를 실시하여 후보 소재 2종을 추가 선정 - 후보소재에 대하여 in vitro 시험계를 통해 전립선 비대증 개선 활성을 비교평가하고, 동물실험용 추출물을 제조하여 협동2기관에 제공
아로니아 추출물의 분석조건 확립	<p>아로니아 추출물의 정성, 정량분석을 위한 HPLC 분석법 개발 및 최적화</p> <p>LC/MS 분석조건 최적화</p>	<p>아로니아 추출물의 HPLC 분석법을 개발하기 위하여 아로니아로부터 분리·확보한 안토시아닌 및 페놀성 화합물을 지표성분으로 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 이동상 선택 및 gradient 조건 최적화 ○ 컬럼별 resolution 비교를 통한 최적 컬럼 선정 ○ 검출파장 등 최적화 <p>지표성분 외에 아로니아 추출물별 미량성분의 비교분석을 위하여 LC/MS 분석조건 최적화</p>

<p>아로니아 추출물의 기능성분 함량 비교 평가</p>	<p>안토시아닌 2종과 페놀성 화합물 2종을 지표성분으로 한 HPLC 함량 분석</p> <p>7종의 안토시아닌 및 페놀성 화합물에 대한 MRM-mode ESI Mass 분석을 통한 함량 비교분석</p> <p>QToF-MS 분석을 이용한 아로니아 추출물 비교분석</p>	<p>전립선 비대증 동물실험에서 가장 높은 활성도를 나타낸 STD2 아로니아 추출물은 HPLC 함량분석실험에서 타 추출물에 비해 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-arabioside의 함량이 높은 것으로 확인</p> <p>MRM-mode ESI MS분석에서 STD2 아로니아 추출물이 타 추출물에 비해 cyanidin 및 cyanidin 배당체 (hexose, arabinose, pentose)의 함량이 상대적으로 높고, 특히 cyanidin-hexose 계열 화합물의 함량이 월등히 높은 것으로 확인</p> <p>QToF-MS 분석결과 STD2 추출물과 타 추출물 간에 현저한 차이를 나타내는 component로서 palmitic acid(팔미트산)을 도출함</p>
<p>2차년도에서 수행한 동물 실험의 후속 연구로 다양한 아로니아 시료 및 생약 시료에서 전립선 비대증 완화 기전을 탐색</p>	<p>아로니아 추출물 및 복합물 제조를 위한 시료에서 전립선 비대증 완화 기전 탐색 (ex vivo)</p> <p>여러 조건의 아로니아 추출 시료 및 복합물 제조를 위한 시료에서 전립선 비대증 완화 기전 탐색 (in vitro)</p>	<p>2차년도 in vivo 실험 후 냉동 보관된 전립선 조직 및 방광 조직에서 total RNA 추출</p> <p>-cDNA 합성 후 발현 유전자 분석</p> <p>-전립선 조직에서 AR, PCNA, PSA, COX2 발현 정도를 확인하고 방광 조직에서는 근이완 효능 확인을 위해 PDE5, nNOS 및 COX2 의 발현 정도를 확인함</p> <p>항염증 관련 인자의 탐색이 in vivo 상에서 불가능하여 다양한 시료에서 raw 264.7 세포를 이용하여 NO 억제 수준을 스크리닝함</p> <p>-사람 유래의 전립선 상피 세포 (RWPE-1 cell)를 이용하여 동물 모델과 유사하게 TP를 통해 증식을 유도 후 다양한 시료의 증식 억제 기전을 확인</p>
<p>- 시제품의 사업화 전략 수립 및 마케팅</p>	<p>-시제품의 홈쇼핑 방송결과</p> <p>-시제품의 공영홈쇼핑 온라인몰 현황</p>	<p>- 2017년도 개발된 복합 시제품2의 마케팅은 아임쇼핑의 홈쇼핑 결과로 표시함.</p>

3. 연구수행결과

□ 주관연구기관 - 농업회사법인 주식회사 삼흥

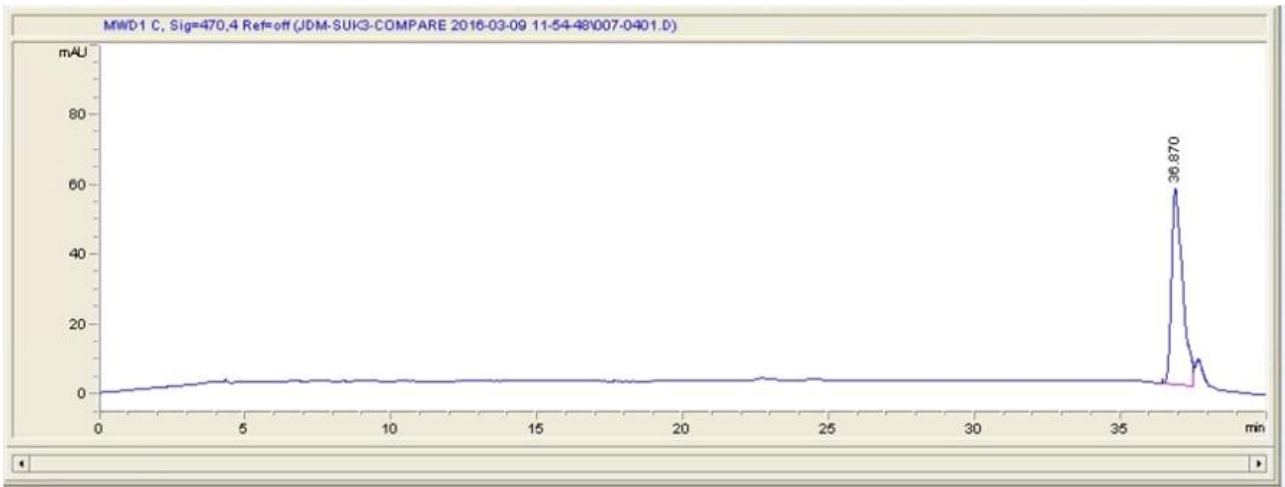
가. 복합소재의 유효성분 분석

3차년도 개발을 위하여 복합소재 중 꾸지뽕 열매 농축액을 5배 희석한 것을 사용하여 성분분석하였음.

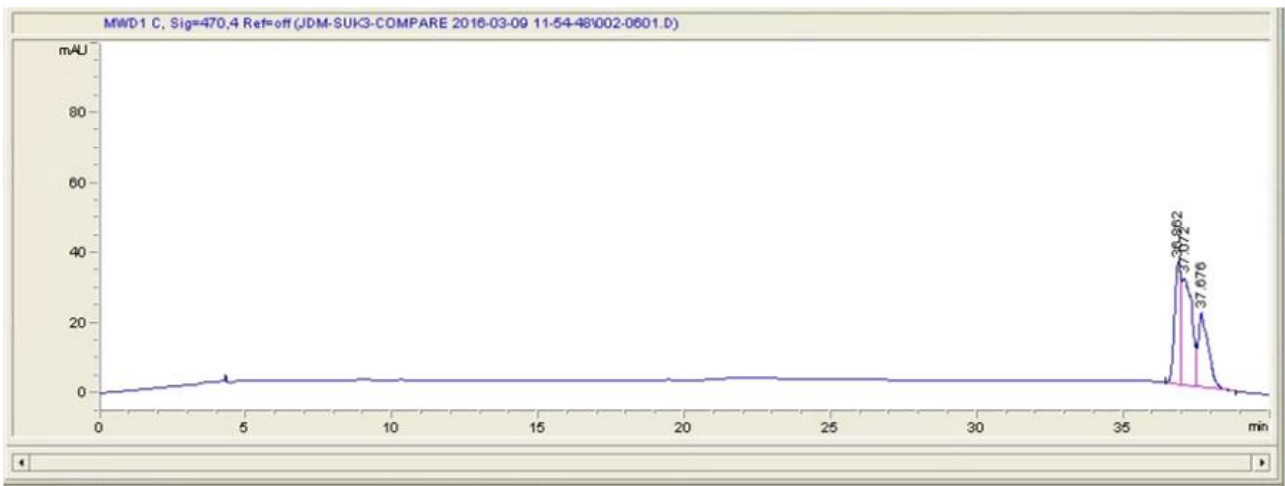
시험항목	결과
열량(Kcal/100g)	367.58Kcal/100g
탄수화물(%)	53.71%
조단백질(%)	30.40%
조지방(%)	3.46%
수분(%)	5.03%
회분(%)	7.40%
나트륨(mg/100g)	15.81mg/100g
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	95.29mg/g
총염록소(mg/g)	5.47mg/g
총페오포르바이드(mg/kg)	23.42mg/kg
비타민A(ug RE/100g)	불검출
비타민B1(mg/100g)	불검출
비타민B2(mg/100g)	0.10mg/100g
비타민B6(mg/100g)	불검출
비타민B12(μ g/100g)	불검출
비타민C(mg/100g)	56.13mg/100g
비타민D(μ g/100g)	불검출
비타민E(mg α -TE/100g)	17.07mg α -TE/100g
비타민K(μ g/100g)	불검출
나이아신(mg/100g)	불검출
엽산(μ g/100g)	불검출
비오틴(μ g/100g)	5772.01 μ g/100g
칼슘(mg/100g)	1135.83mg/100g
판토텐산(mg/100g)	6.84 mg/100g
철(mg/100g)	42.64mg/100g

나) 계육의 베타카로틴 분석

(1) 표준물질 Betacarotene

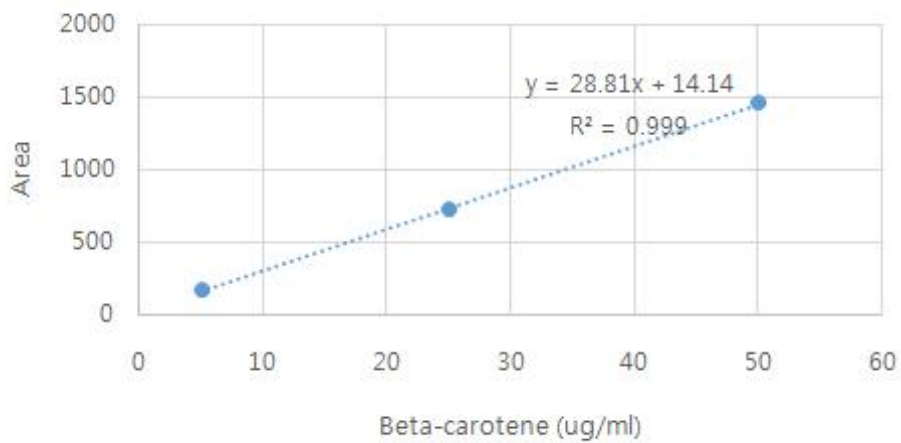


(2) Gac oil



계육의 베타카로틴 함량을 분석한 결과는 2mg/g 으로 나타났음.

Beta-carotene 정량곡선



나. 전립선 질환 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2-2의 제작

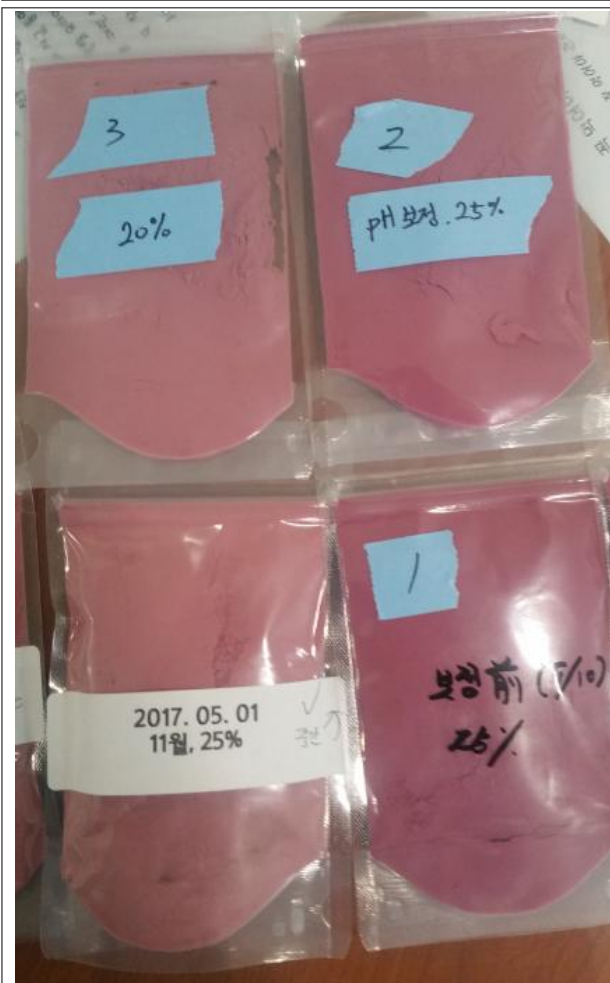
(1) 물에 녹는 우리땅 아로니아 유산균 발효 저온추출 분말

1차년도 결과와 2차년도 결과를 토대로 전립선 질환효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 2-2를 제작하였는데, 이는 과제수행 중 흡쇼핑을 하기 위하여 첫 번째로 흡쇼핑용 물에 녹는 우리땅 아로니아 유산균 발효 저온추출 분말의 시제품을 제작하기 위하여 기존의 시제품과 비교하여 제품 생산하였음.

흡쇼핑 방송을 위하여 대량생산은 제조는 GMP 회사인 대호양행에서 실시하였으며, 소분은 (주)자연그대로(방송시 제조원)에서 하였음.



2018년도 1차 시제품 제작과정



2018년도 2차 시제품 제작과정

(2) (액상분말) 프로스타 아로니아
 자사제품으로 자사에서 제품생산 함.



아로니아추출 및 발효 혼합후 말통작업과정



스프레이드라이 과정

(3) 배합비율설정

3가지 종류의 배합비율중에 배합비율1을 선택하였으며, 이를 품목제조보고서의 배합비율로 최종 결정하였음.

원재료명 및 성분명	배합비율1	배합비율2	배합비율3
아로니아열매	84	84	80
꾸지뽕나무열매	10	6	10
덱스트린	4	8	8
유산균	2	2	2
	최종결정		

다. 전립선 비대증 효능을 가지는 아로니아 복합 시제품 생산 공정 확립



아로니아 입고 및 선별



세척공정



착즙공정



라. 포장디자인 개발

(1) 물에 녹는 우리땅 아로니아 유산균 발효 저온추출 분말

물에 녹는 우리땅 아로니아 유산균 발효 저온추출 분말의 경우 기존의 우리땅 아로니아 분말의 브랜드명을 그대로 살려, 홈쇼핑에 활용할수 있도록 하였고, 아임쇼핑 MD의 요청으로 빨간색박스를 제작하였음.



바. 시제품 2-2 제작

(1) 물에 녹는 우리땅 아로니아 유산균 발효 저온추출 분말의 품목제조보고서와 검사성적서
 흡수평용 물에녹는 우리땅 아로니아 유산균 발효 저온추출 분말을 제작하였으며, 제조원은 (주)자
 연그대로임.

발급번호 : 1179-EJ27-982A-A022-9061

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)		
	주요업	1961년 01월 21일		
영업소	소재지	연호대로 443 6546097		
	충청북도 충주시 충주산단6로 32(용탄동)	휴대전화		
제품정보	식품의 유형	과, 채 가공품류	영업등록번호	20040433073
	제품명	물에 녹는 우리땅 아로니아 유산균발효저온추출분말		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명 및 배합비율	원재료 기재		
	중도 용법	원재료 기재		
	보관방법 및 포장재질	직사광선을 피하고 서늘한 곳 또는 실온에 보관하십시오. 폴리에틸렌		
	포장방법 및 포장단위	일봉, 30g		
	성상	고유의 붉은 색택과 향미를 지닌 분말로서 이미,이취가 없어야 한다.		
	고열량·저열량 식품 해당 여부	[]예 []아니오 []해당 없음		
합할인종 여부	[]예 []아니오			
기타				

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

2017년 04월 10일
 보고인 겸영원

충청북도 충주시장 귀하

품목보고번호	20040433073-476
처리부서	보건소 보건위생과
처리자성명	김영희
처리일자	2017년 04월 11일

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

발급번호 : 1179-EJ27-982A-A022-9061

원재료명 또는 성분명 및 배합비율

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	아로니아추출물분말 [아로니아유산균발효저온추출분말100%]	100%
2	L-아스파르트산 [아로니아유산균발효원액(아로니아98%, 유산균2%)]	78%
3	L-아스파르트산	

중도용법 : 하루 1~2회 6g 정도를 음료로 음용하십시오.

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

(2) 프로스타 아로니아즙의 품목제조보고서 및 배합비율

프로스타 아로니아분말을 제조하기 위하여 전단계의 프로스타 아로니아즙을 품목제조보고하였음.

식품위생법 시행규칙 [별지 제43호서식] <개정 2017. 1. 4.>

식품·식품첨가물 품목제조보고서

※ 위쪽의 유의사항을 읽고 작성하여 주시기 바랍니다. []에는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다. (양쪽)

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인등록번호)		
	주요업	1970.07.12		
영업소	소재지	연호대로 443 055)941-1500		
	충청북도 충주시 충주산단6로 32(용탄동)	휴대전화 010-3852-3301		
제품정보	식품의 유형	음료	영업등록번호	20040624182
	제품명	프로스타 아로니아즙		
	유통기한	제조일로부터	12개월(월, 년)	
	품질유지기한	제조일로부터	일(월, 년)	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	원재료 기재		
	중도 용법	하루 1~2회 수시로 음용하십시오.		
	보관방법 및 포장재질	실온(온도 1℃~35℃) / PET		
	포장방법 및 포장단위	일봉 / TL		
	성상	고유의 연한은 색택과 향미를 지닌 액상으로서 이미,이취가 없어야 한다.		
	특유의 특성	• 고열량·저열량 식품 해당 여부 []예 []아니오 []해당 없음 • 합할인종 식품 해당 여부 []예 []아니오		
기타				

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

2018년 11월 30일
 보고인 겸영원

충청북도 충주시장 귀하

1. 제조방법설명서 1부
 2. 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따라 식품위생안전처장이 지정한 식품안전 시험·검사기관 또는 같은 조 제4항 단서에 따라 총리령으로 정하는 시험·검사기관에 발급한 식품안전 시험·검사기관 지정서 1부
 3. 식품위생안전처장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한에 설정사서 1부
 4. 합할인종 식품 인종서 시(합할인종 식품의 표시·광고를 하는 경우만 해당함)

210mm×297mm(백상지 80g/㎡(재활용품))

(양쪽)

원재료명 또는 성분명 및 배합비율

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)
1	아로니아액즙	96	16		
2	꾸지콩나무액즙	4	17		
3			18		
4			19		
5			20		
6			21		
7			22		
8			23		
9			24		
10			25		
11			26		
12			27		
13			28		
14			29		
15			30		

유의사항

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
 2. 배합비율 표시는 식품안전 및 식품첨가물안전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.
 3. 영인자는 요청하는 품목제조보고번호가 이미 부여된 품목제조보고번호와 중복되는지를 관할 특별자치시장·특별자치도지사·시장·군수·구청장에게 확인하여야 합니다.

(3) 프로스타 아로니아분말 품목제조보고서 및 배합비율

프로스타 아로니아분말의 품목제조보고서는 다음과 같고, 배합비율은 아로니아열매 88%, 꾸지뽕나무 열매 10%, 덱스트린 4%, 유산균2% 순임.

식품·식품첨가물 품목제조보고서

※ 뒤쪽의 유의사항을 읽고 작성하여 주시기 바라며, []에는 해당되는 곳에 √ 표시 합니다. (필수)

성명 허재규 생년월일(법인등록번호) 1970.07.12

보고인 주소 경남 거창군 가조면 동레1길 80-5 전화번호 055)941-1500
유대전화 010-9852-3301

영장(상호) 심흥식품 영입등록번호 20040624182

소재지 경남 거창군 가조면 동레1길 80-5

식품의 유형 과, 제가공품 요청하는 품목제조보고번호 20040624182/46

제품명 프로스타 아로니아분말

유통기한 제조일부터 12개월(월, 년)
유통유지기간 제조일부터 일(월, 년)
원재료명 또는 성분명 및 배합비율 뒤 쪽에 기재

중도 품질 하주 2회, 1회 섭취시 5g-6g 정도를 음료로 섭취하십시오.

제품정보 보관방법 및 포장재질 실온(온도1℃-35℃) / HDPE
포장방법 및 포장단위 밀봉 / 30g, 50g, 100g, 200g, 500g
성상 고유의 연필로 색택과 향미를 지닌 분말으로서 이미, 이취가 없어야 한다.

특유의 특성
고열량·저지방 식품 해당 여부 []에 []아니오 [√] 해당 있음
합탈인종 식품 해당 여부 []에 [√] 아니오

기타

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. (제조·제가공품의 경우, 403호에 기재 하고, 443호를 기재합니다.)
30g 포장: 20개, 11.1g, 2018년 11월 09일
보고인 허재규 (서명-인)
거창군수 귀하

1. 제조방법명세서 1부
2. 「식품·식품첨가물 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따라 식품의약품안전처장이 지정한 시험기관 시험·검사기관 또는 같은 조 제4항 일처에 따라 출력함으로써 유효하는 시험·검사기관에 발급한 시험결과 원사적 기준 및 규격 검토서 1부
3. 식품의약품안전처장이 유효한 고지방 영양에 따라 설정한 유통기한에 실험서우서 1부
4. 합탈인종 식품 시험·합탈인종, 식품의 표시·광고를 하는 경우만 해당합니다.

210axx220ha(백상지 85g/㎡(제출용량))

(필수)

(원재료명 또는 성분명 및 배합비율)

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)
1	아로니아열매	84	16		
2	꾸지뽕나무열매	10	17		
3	덱스트린	4	18		
4	유산균 (Lactobacillus plantarum)	2	19		
5			20		
6			21		
7			22		
8			23		
9			24		
10			25		
11			26		
12			27		
13			28		
14			29		
15			30		

유의 사항

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품관련 및 식품첨가물관련에 사용되어 정하여져 있는 형태로 또는 성분의 경우만 해당합니다.
3. 영인자는 유효하는 품목제조보고번호가 이미 부여된 품목제조보고번호와 중복되는지를 중앙 식품안전처장·특별자치도지사·시장·군수·구청장에게 확인하여야 합니다.

(4) 프로스타 아로니아분말 시제품 제조

프로스타 아로니아분말 시제품을 제조하였는데, 꾸지뽕을 10% 함유한 아로니아발효SD분말임.



사. 아로니아 활용제품의 시제품 제작

(2) 아로니아연잎밥(아로니아건강밥)

아로니아 활용제품으로 아로니아연잎밥(아로니아건강밥)을 제작하였는데, 아로니아를 세척, 세절
 함을 찹쌀, 멥쌀을 불린 것과 혼합하고, 세척하고 세절한 연잎에 싸서 취반함을 탈기, 1차 살균, 2
 차살균, 냉각, 포장을 거쳐 제품을 완성하였음.



(2) 아로니아쌀

아로니아쌀은 농업회사법인 명성제분(주)에서 제조하였음.

발급번호 : 02TC-000T-G2R-F7TF-K050

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)		
	김철진	1965년 03월 30일		
	주소	전화번호	061 332 5071	
전라남도 나주시 동수농공단지길 62-26(102호 은곡동)		휴대전화	010 46027146	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호		
	농업회사법인 명성제분(주)	20110512070		
	소재지	전라남도 나주시 동수농공단지길 62-26(102호 은곡동)		
제품정보	식품의 유형	기타 농산가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2011051207093
	제품명	아로니아쌀		
	유통기한	제조일로부터 12개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 첨가물	햇장에 기재		
	중도 유통법	햇장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	햇장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	포장방법 : 일봉 포장단위 : 100g, 110g, 120g, 130g, 150g, 160g, 170g, 180g, 200g, 250g, 300g, 350g, 380g, 400g, 420g, 500g, 550g, 600g, 700g, 1kg		
	성상	면밀 색깔의 일관여로 쌀과 아로니아의 고유의 향이 난다.		
	품목의 특성	<input checked="" type="checkbox"/> 고열량 - 저지방 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 알칼리성 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을
 보고합니다. 2018년 07월 12일
보고인 김철진

전라남도 나주시장 귀하

품목보고번호	20110512070-93
처리부서	보건소 보건위생과
처리자성명	나광철
처리일자	2018년 07월 12일

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



□ 위탁연구기관- 농업회사법인 (주)하늘선물에프엔비 : 시제품의 사업화 전략수립 및 마케팅
가. 시제품의 홈쇼핑 방송 (2017년 6월부터 2018년 3월까지 방송함)



나. 시제품의 공영홈쇼핑 온라인몰 현황

공영쇼핑

[세척사라](#) | [맞춤상품세븐](#) | [회원가입](#)

[로그인](#) | [회원가입](#) | [My Page](#) | [장바구니](#) | [고객센터](#)

카테고리 TV쇼핑 공영TV 공영마트 국내농수산 e푸른 경상북도관 박수훈의 약한맛 국내생선

TV쇼핑 [소화 흡수가 용이한 발효 분말!] 물에 녹는 우리땅 아로니아 (30gx20통)

원산지 : 아로니아추출분말 [아로니아 발효원액(아로니아(국산))] 외 원산지정보 확인▶

무이자3개월 [자세히보기] 무료배송

판매가 1009303

판매중료 상품입니다.

판매중료

방송일할 상품하고 TV쇼핑 분방 사수하세요! ▶ 방송일할

카테고리 인기상품

[문남성의 표아차를 신하개] 청담표호 표아차(11호) 10주 판매가 69,900원

청담고지배리 구기자분말 (30gx24팩) 판매가 168,000원

올리비아 생약보리 365 판매가 119,000원

국산 아로니아 분말 (30gx20봉) 판매가 69,000원

★인동초 대가림★ 수제당인동유미(10gx255~9팩스) 판매가 80,900원

실 배송 안내

- TV쇼핑상품 : 방송 중 결제 및 입금완료시 방송 중 안내된 기간까지 배송가능
- TV쇼핑상품 외 : 1월 30일 (수)까지 결제 및 입금 완료 전에 한해 배송가능

※ 상품별 배송 마감일이 상이할 수 있기 때문에 자세한 사항은 상품별 상세 페이지를 참고 부탁드립니다.

[상세내용 보기 >](#)

다. 공영홈쇼핑에서 판매된 시제품의 상세페이지






우리땅 아로니아

보랏빛 생명력에 담긴 풍부한 영양소
물에 녹는 우리땅 아로니아는 발효SD건조로 높은 항산화 성분

아로니아는 항산화성분인 안토시아닌을 다른 베리류에 비해 매우 다량으로 함유하고 있습니다.



아로니아
349.79

약 **12.9배**

약 **10.9배**

약 **3.4배**

약 **3.3배**

각종 과일의 안토시아닌 함유량


< 출처 : USDA Database for the Nutrient Content of Selected Foods Release 3.2 (2011) >

색소 NO

방부제 NO


향료 NO


“ 스프레이건조 공법을 아로니아의 풍부한 영양소를 유지하면서도 물에 **완전히 용해**됩니다. ”



영양성분 100g 기준 / 출처 : USDA 미국 농무성 자료 [영양정보]

적박한 토양과 거친 기후에서 자란 유럽산 아로니아가 국내산 아로니아보다 영양성분이 우수하다?






수입 아로니아와 안토시아닌 함량 차이 없어
 육천군농업기술센터(소장 김영석)는 최근 국내 아로니아 시장을 선점하기 위해 서울대 과수과 이수영 연구사를 특별채용 한 뒤, 국내산 아로니아의 성분분석을 의뢰했다. 그 결과 주요 안토시아닌의 함량이 수입산과 큰 차이가 없는 것으로 밝혀졌다. 농촌진흥청에서 직접 제작한 베리를 안토시아닌, 브러리(MS fragment, UV 스펙트럼 분석, 페닌, 화학구조 등)를 바탕으로 아로니아 분리를 실시했다.

출처 : 딸개 농경지 황제 2012년 1월호

우리땅 아로니아

KINGS BERRY ARONIA



【재질명】 물에 녹는 우리땅 아로니아 육산과 발효 저온추출 분말
 【식용의 유형】 과·채 가공품
 【원재료 및 함량】 아로니아추출물분말 (아로니아 유실균양호제추출분말 100% (아로니아 유실균발효분말 (아로니아 (국산), 엑스투린)
 【용법 및 용량】 하루 2~3회 1회 정도를 음료로 음용하십시오.
 【보관방법】 직사광선을 피하고 서늘하고 건조하여, 실온에 보관하십시오.
 【연령 및 교환】 본 제품은 '공정'과 '비대형'에 고사, 소사(농경지황제)에 의거하여 교환 또는 보상을 받으실 수 있습니다.
 【용기재질】 HDPE
 【소비자상담실】 080-754-9013
 【제조원】 (주)시먼그레오 / 충북 충주시 충주산단5로 32 (충민동)
 【판매처】 농업회사법인 (주)하늘선물(에프앤비 / 서울특별시 강남구 선릉로125길 8
 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000



최근 베리류 중 왕이라고 불리며
세계적으로 각광 받고 있는 왕족의 열매
킹스베리를 소개합니다.

01

정성을 다해 키운 **100% 국내산**
우리 농산물 **아로니아**

믿을 수 있는 100% 국내산 아로니아로 만들어서
안심하고 드실 수 있습니다.



02

정부 지원을 받아 **대학교와 기업**이 함께
개발한 **아로니아 신제품**

정부에서 연구개발 자금을 지원 받아 국립대학과의 협력을 통해
유산균 발효 SD분말을 개발 하였습니다.



03

영양소 파괴가 적은 저온추출 유산균발효
스프레이건조(SD)방법으로 제조

기존 오븐건조나 동결건조 보다 총 업그레이드된 발효 스프레이건조(SD) 방법을 적용하여
영양소 파괴가 적고, 연도시마닌 등 항산화 성분이 매우 풍부합니다

Sample	TPC	TP	Total	GC
동결건조분말	27.83 ± 1.26*	1.88 ± 0.11*	4.21 ± 0.07*	
오븐(열)건조분말	15.88 ± 2.12*	1.88 ± 0.11*	4.21 ± 0.07*	
오븐(열)건조분말	22.83 ± 2.20*	1.88 ± 0.11*	4.21 ± 0.07*	
SD건조분말	38.88 ± 1.18*	1.88 ± 0.11*	2.83 ± 0.14*	4.81 ± 0.11*

발효SD건조분말 UP
항산화성분

04

물에 잘 녹는 스프레이건조(SD) 분말로
식감↑~! 흡수율↑~!

정부에서 연구개발 자금을 지원받아 국립대학과의 협력을 통해
유산균 발효 SD분말을 개발 하였습니다.



□ 수행기관: 경남과학기술대학교

1. 아로니아 추출물 최적화를 위한 반응표면분석

가. Box Behnken design을 이용한 실험설계

아로니아 추출물의 추출조건 최적화를 위해 SAS 9.2 소프트웨어를 통해 반응표면분석을 수행하였음. 추출조건에 대한 실험계획은 Box Behnken design을 이용하였으며, 표1에서 보는바와 같이 용매(X1), 추출온도(X2), 추출시간(X3)을 아로니아 추출에서의 중요 변수로 선택하여 각 독립변수를 -1, 0, 1의 3구간으로 부호화하고 15구간의 추출실험을 설정하여 실험계획을 설계하였음.

Table 1. Box Behnken design을 위한 독립변수 및 수준

Independent variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Ethanol conc. (%)	X ₁	40	60	100
Temp. (°C)	X ₂	30	50	100
Time (min)	X ₃	5	10	20

모델식은 Box Behnken design 모델에 실험 데이터를 맞추어 얻은 것이며, 반응(DHT 생성 저해활성) 사이의 경험적 관계를 나타냄. 다항식 모델의 일반적인 유효성 및 정확성을 암시하고 모델의 적합성을 나타내는 결정계수(R²) 값은 0.9655였으며, 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었음 (표 2).

Table 2. 추출조건에 최적화에 대한 반응표면모델

Response	Quadratic polynomial model	R ²
DHT	$Y=110.1622-1.4991X_1+0.9416X_2-0.6313X_3+0.0065X_1X_1+0.0045X_2X_1-0.0075X_2X_2+0.0205X_1X_3-0.0003X_2X_3-0.0341X_3X_3$	0.9655
Source of variation	Sum of squares	
Model	916.8327 ^a	
Linear	500.3553 ^a	
Quadratic	216.5132	
Cross-product	199.9643	
Lack of fit	32.8072	
Pure error	0	
Total error	32.8072	
R ²	0.9655	

모델의 적합성은 자료분석의 구성요소 중 필수적인 부분으로 표 5와 같이 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)을 수행하여 반응모델의 적합성뿐만 아니라 각 항의 계수와 유의성에 대해

확인하였음 (표 3).

Table 3. Box Behnken design의 실험 결과의 변수 분석

Constant coefficient ^a	DHT contents			
	Parameter	estimate	Standard error	P-value
Intercept		110.1622	17.7257	0.0084
X ₁		-1.4991	0.3819	0.0294
X ₂		0.9416	0.3100	0.0560
X ₃		-0.6313	1.1825	0.6305
X ₁ X ₁		0.0065	0.0026	0.0870
X ₁ X ₂		0.0045	0.0014	0.0493
X ₂ X ₂		-0.0075	0.0023	0.0465
X ₁ X ₃		0.0205	0.0071	0.0632
X ₂ X ₃		-0.0003	0.0057	0.9551
X ₃ X ₃		-0.0341	0.0419	0.4754

^aX₁, X₂, and X₃ correspond to ethanol concentration (%), temperature (° C), and time (min), respectively.

나. 반응표면분석법을 이용한 아로니아 추출조건 최적화

박스 벤켄 계획법에 따른 15개 구간에서 아로니아 추출물의 DHT생성 저해활성도를 측정한 결과는 0.1~28.9%로 확인되었으며, SAS 9.2 프로그램을 이용하여 반응모델의 회귀방정식을 계산하였고 이 회귀방정식으로부터 각 변수의 최적화된 값을 얻음. 최적화된 응답을 위해서 각각의 변수의 최적화된 값을 결정하고 변수들 간의 상호작용을 분석하여 3차원 반응표면 그래프로 나타내었음.

그 결과 산출된 아로니아의 최적 추출조건은 추출용매의 에탄올 농도 68.2%, 추출온도 82.8°C, 추출시간 10.84분으로 확인되었음. 그러나 통계분석결과 saddle point가 형성되어 향후 연구에 있어서 통계값을 이용하지 않고 실험을 통한 최적조건을 적용하였음.

Table 4. 반응표면분석법을 이용한 최적화된 아로니아 추출조건

Response	Optimum conditions		
	Ethanol (%)	Temp. (° C)	Time (min)
DHT	68.20	82.80	10.84

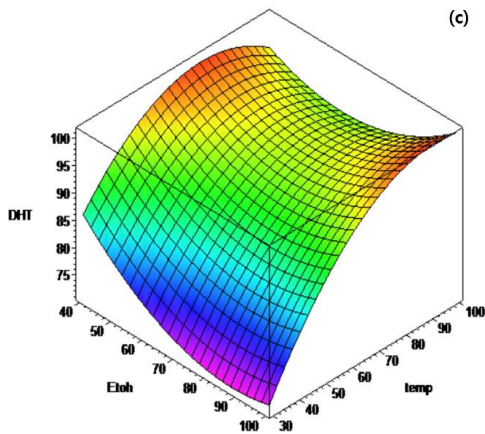
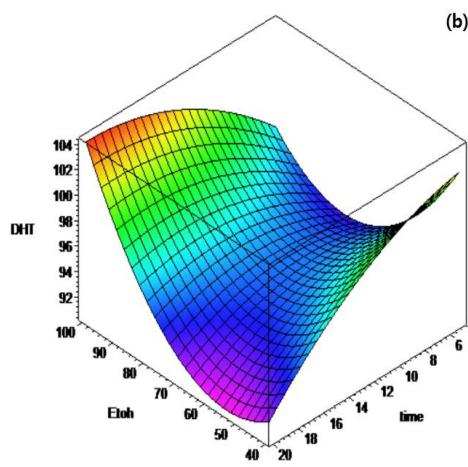
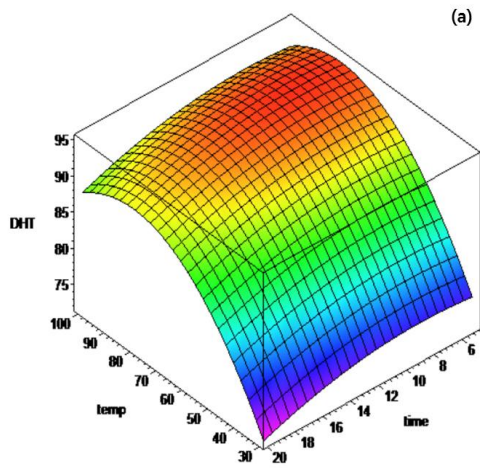


Figure. Response surface plot of the effect of ethanol, temp($^{\circ}$ C), and time (%), on DHT under the fixed optimal conditions of (a) ethanol, 68.20%; (b) temp ($^{\circ}$ C), 82.80; and (c) time, 10.84 min, respectively.

2. 아로니아 추출물과 전립선 비대증 개선활성 간 상관관계 분석

-최근 아로니아 과육 추출물에 함유된 총 phenolic 화합물 및 안토시아닌의 함량평가를 위한 HPLC-DAD-MS 기반 최적 동시분석법이 보고된 바 있음. 이러한 자료를 바탕으로 본 연구에서는 다양한 조건으로 제조한 아로니아 추출물과 전립선 비대 개선 활성간의 상관관계를 분석함으로써 전립선 비대 개선과 가장 높은 correlation을 보이는 ‘유효성분’을 새로이 도출하고자 하였음.

가. 가속용매추출장치를 이용한 아로니아 추출물 제조

-저온, 차광상태에서 건조한 아로니아를 분말화한 후, 가속용매추출장치(Accelated Solvent Extractor, ASE)를 이용하여 추출물을 제조하였음. 추출물 제조 조건은 1차년도에 진행했던 결과를 토대로 동일하게 실시하였으며, 가속용매추출장치를 이용하여 표준 추출물 13종을 제조하였음.

가속용매추출장치 추출조건	
추출 장치	Thermo Dionex ASE350
추출 용매	40, 60, 100 % 에탄올(주정)
추출 시간	5, 10, 20 min
추출 압력	1700 psi
추출 횟수	1 cycle

표. 아로니아 ASE추출물 13종의 추출조건

Standard #	EtOH (%)	Temperature (° C)	Time (min)
2	100	30	10
4	100	100	10
6	100	50	5
8	100	50	20
9	60	30	5
10	60	100	5
11	60	30	20
12	60	100	20
13	60	50	10
1	40	30	10
3	40	100	10
5	40	30	5
7	40	50	20

나. 아로니아 표준추출물 4종 (STD2, STD4, STD9, STD10)의 MS spectrum 분석

-1차년도 연구 수행과정에서 아로니아의 표준추출물 13종에 대해 5-alpha reductase 저해 활성을 평가한 결과, STD2와 STD9가 우수한 활성을 나타냈음. 반면 각 STD2와 STD9와 용매조건은 동일하나 추출온도만 상이한 두가지 추출물 STD4와 STD10은 효소 저해 활성이 낮은 것으로 관찰되었음.

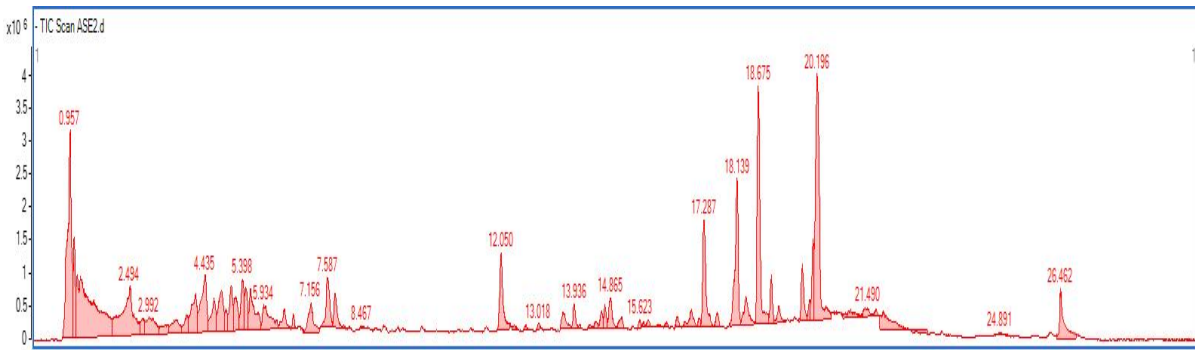
-아로니아 표준 추출물 4종(STD2, 4, 9, 10)의 ASE 추출 조건

Standard #	EtOH (%)	Temperature (° C)	Time (min)
2	100	30	10
4	100	100	10
9	60	30	5
10	60	100	5

-이러한 결과를 토대로 *in vitro*상에서 관찰된 4종 추출물의 활성을 *in vivo* 실험동물모델에 적용하여 비교평가하기 위하여 동물실험에 필요한 추출물을 제조하여 협동2기관인 안전성평가연구소에 전달하였음. 이와 동시에 추출물 4종간 활성 차이를 설명할 수 있는 component를 도출하기 위하여 각 추출물에 대한 MS 스펙트럼을 측정하고 다변량분석을 통해 높은 correlation score를 나타내는 인자(성분)를 도출하고자 하였음. 아로니아 추출물 4종의 MS 측정 조건은 아래와 같음.

Instrument	Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system
Column	Poroshell 120 EC-C18 column (3.0×100 mm, 2.7 μm, Agilent)
Flow rate	0.3 ml/min
mobile phase	acetonitrile (solvent A) and water (solvent B) linear gradient elution: 5-95% A (0-20 min); 10% A (20-30 min)
Mode	Positive mode
Detection	range m/z=100-1500

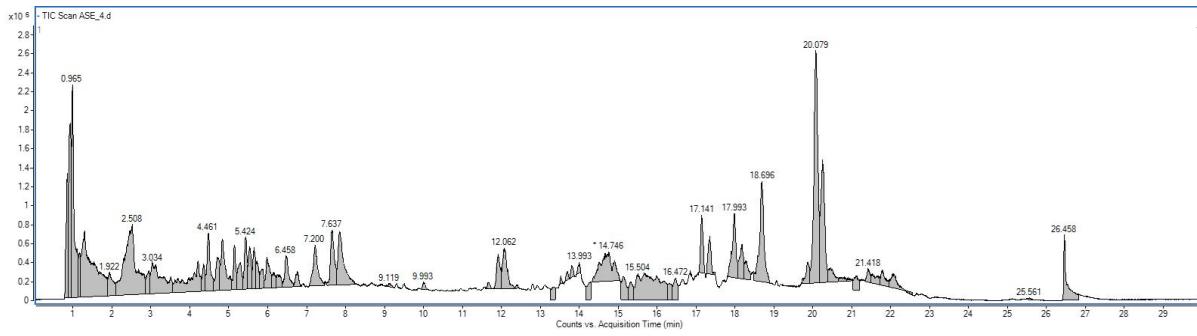
-아로니아 ASE추출물 (STD2, 4, 9, 10)의 MS spectrum 결과



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	0.758	0.957	1.029	3162351.53	22448162.53	74.81
2	1.029	1.056	1.106	1527235.68	5310984.35	17.7
3	1.106	1.134	2.035	969702.48	30005156.5	100
4	11.948	12.05	12.277	1174039.45	6935611.21	23.11
5	17.199	17.287	17.531	1635359.13	9482704.57	31.6
6	17.945	18.139	18.222	2240380.79	12892671.09	42.97
7	18.603	18.675	18.952	3626081.92	19037119.23	63.45
8	19.721	19.809	19.931	887362.85	4138649.33	13.79
9	20.025	20.086	20.113	1247322.52	4264713.76	14.21
10	20.113	20.196	20.567	3744444.49	26937871.94	89.78

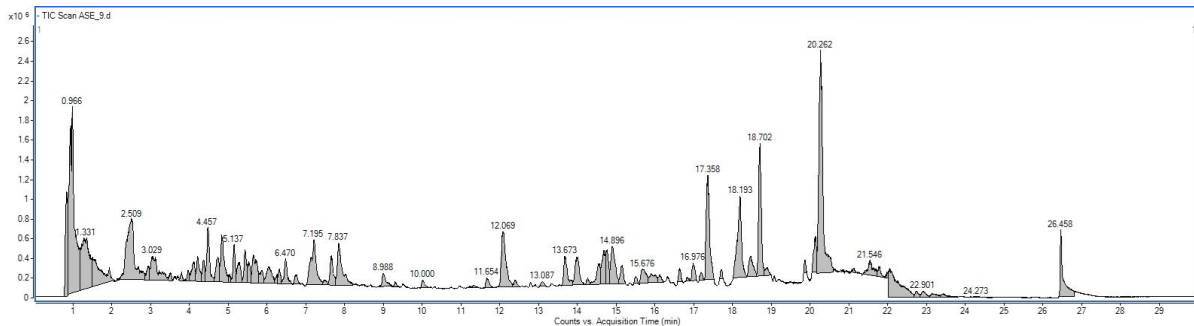
그림. STD2의 QTof-MS spectrum



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	0.761	0.838	0.86	1323040.93	4593723.19	26.79
2	0.86	0.91	0.937	1846719.25	7456573.57	43.48
3	0.937	0.965	1.125	2251107.81	10663043.44	62.18
4	1.175	1.275	1.878	699370.29	14738708.31	85.95
5	2.082	2.508	2.851	744032.06	15552540.65	90.7
6	17.801	17.993	18.071	687326.99	4660112.78	27.18
7	18.491	18.696	18.893	1065505.61	8351178.99	48.7
8	19.924	20.079	20.167	2454910.38	17147628.71	100
9	20.167	20.245	20.389	1306265.86	9708381.57	56.62
10	26.402	26.458	26.834	694685.1	3820822.76	22.28

그림. STD4의 QToF-MS spectrum

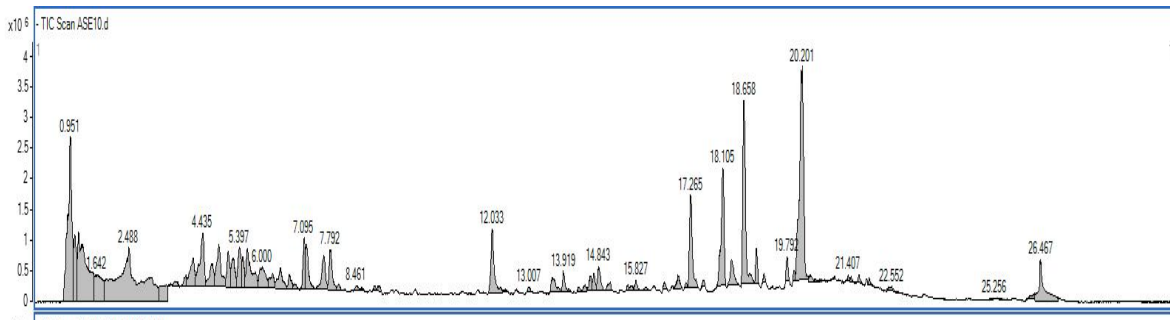


Integration Peak

List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	0.728	0.822	0.855	1072018.65	4377980.58	24.86
2	0.855	0.966	1.165	1899334.2	17610512.91	100
3	2.184	2.509	2.852	611793.41	8901060.74	50.54
4	4.396	4.457	4.623	555192.81	2792349.02	15.86
5	11.936	12.069	12.318	570330.14	4779497.7	27.14
6	17.275	17.358	17.52	1064918.82	6417469.71	36.44
7	18.015	18.193	18.354	831535.31	6150934	34.93
8	18.619	18.702	18.818	1350638.59	6421053.94	36.46
9	20.174	20.262	20.6	2266959.28	15912741.03	90.36
10	26.409	26.458	26.818	683234.58	3711577	21.08

그림. STD9의 QToF-MS spectrum



Integration peak list

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	0.737	0.951	1.034	2688223.71	20359717.1	61.66
2	1.034	1.067	1.122	1103288.03	4947453.71	14.98
3	1.122	1.161	1.587	1144975.83	19054592.18	57.71
4	1.852	2.488	3.279	885172.79	33018864.98	100
5	4.247	4.435	4.518	877409.01	6984104.02	21.15
6	11.939	12.033	12.332	1053017.01	6553750.8	19.85
7	17.187	17.265	17.462	1527043.67	8002258.78	24.24
8	17.956	18.105	18.192	1927725.82	10349240.31	31.34
9	18.595	18.658	18.929	3010188.02	15490839.33	46.92
10	20.013	20.201	20.373	3504012.2	26313249.85	79.69

그림. STD10의 QToF-MS spectrum

-아로니아 추출물 4종의 QToF-MS 스펙트럼을 기반으로 각 추출물의 *in vivo* 효과와 유의적인 상관관계를 나타내는 이온 피크를 MS 분석에 의해 추출하고, 해당 피크에 해당하는 성분이 pamic acid(팔미트산)임을 밝혀내었음.

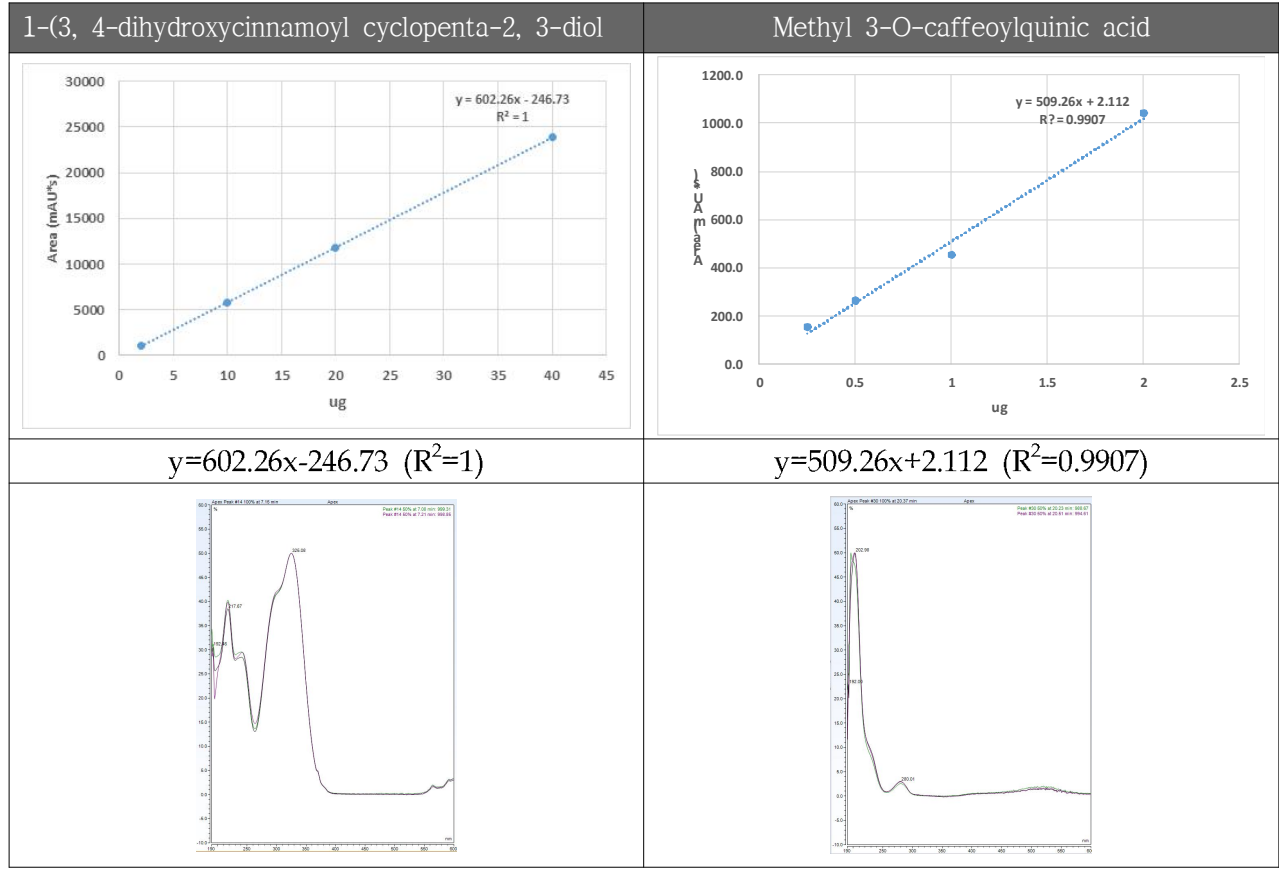
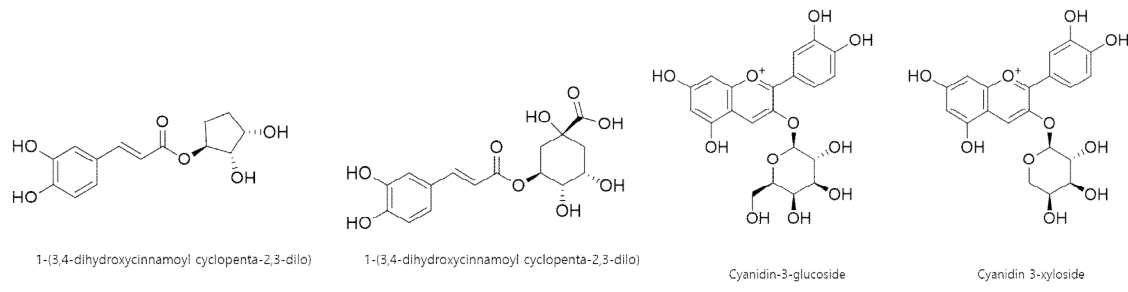
-해당 피크값으로부터 아로니아 추출물 STD2, STD4, STD9, STD10에 함유된 팔미트산의 함량을 계산한 결과, 팔미트산이 추출물 STD2에는 1.441중량%, STD4에는 0.707중량%, STD9에는 0.245중량%, STD10에는 0.548중량% 포함되어 있는 것으로 나타냈음.

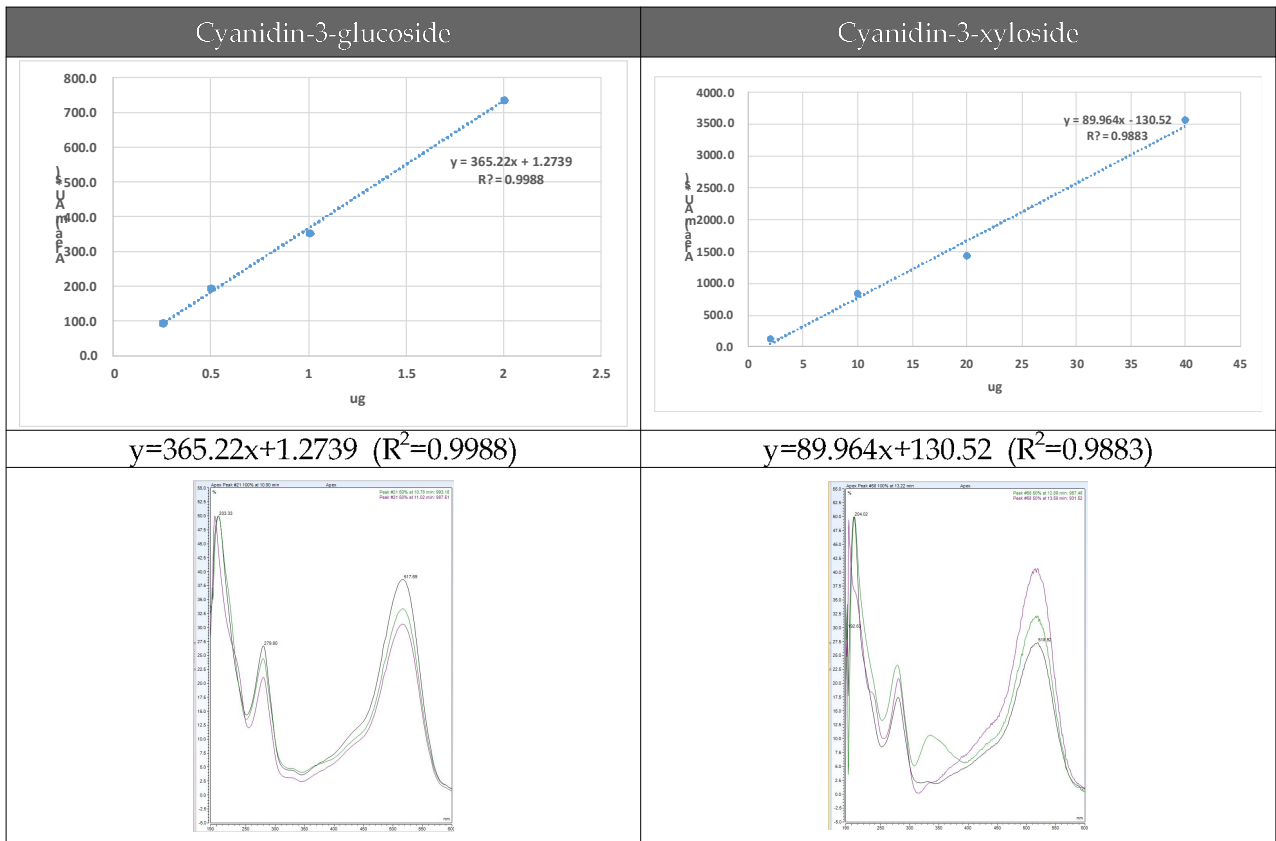
-공동연구기관인 안전성평가연구소에서 수행한 아로니아 추출물 4종에 대한 실험결과, 전립선비대증에 보다 우수한 효과를 나타내는 추출물은 STD2와 STD4번이로, 두 추출물은 모두 팔미트산을 0.7중량% 이상 포함하는 점을 고려할 때, 팔미트산을 0.7중량% 이상 포함하는 아로니아 추출물이 전립선비대증에 보다 효과적임을 유추할 수 있었음.

다. 아로니아 표준추출물 4종(STD2, STD4, STD9, STD10)의 HPLC 함량분석

동물실험에서 유의한 효능 차이를 나타낸 아로니아 표준 추출물 4종에 대하여 전립선 비대증 개선 효능과 연관성이 높은 기능성성분을 도출하기 위하여 아로니아의 주요 안토시아닌 과 페놀성 화합물에 대한 함량분석을 실시하였음.

- 2차년도에 개발한 아로니아 추출물의 HPLC 분석법을 적용하여 4종의 페놀성 화합물 1-(3, 4-dihydroxycinnamoyl cyclopenta-2, 3-diol, methyl 3-O-caffeoylquinic acid, cyanidin glycosides, cyanidin-3-xyloside에 대한 함량분석을 실시하였음.





-추출물 내에 함유된 각 성분의 확인은 아로니아로부터 분리하여 확보한 표준물질을 이용하여 HPLC chromatogram 상의 retention time과 UV spectrum을 비교하였음.

	contents (mg/ml)			
	1-(3, 4-dihydroxycinnamoyl cyclopenta-2, 3-dilo)	Methyl 3-O-caffeoylquinic acid	Cyanidin-3-glucoside	Cyanidin-3-xyloside
STD2	0.5349	ND	0.7642	2.6843
STD4	0.5461	ND	0.5107	2.3228
STD9	0.5015	ND	0.4559	2.1206
STD10	0.5583	ND	0.6002	2.4279

-그 결과, Cyanidin 배당체 2종 (Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-xyloside)의 경우 STD2 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었음. Cyanidin-3-glucoside는 STD2 추출물에 0.7642 mg/ml 함유된 것으로 나타나 다른 3가지 추출물에 비해 1.27~1.69배 높은 함량을 나타내었음.

-공동연구기관인 안전성평가연구소에서 진행한 전립선비대증 동물실험에서 STD9과 STD10 추출물은 유의한 활성이 확인되지 않은 반면, STD2과 STD4 추출물은 테스토스테론으로 유도한 전립선 조직 내 AR(Androgen Receptor), PSA(prostate specific antigen), PCNA(proliferating cell nuclear

antigen)의 발현을 억제하는 효능이 우수한 것으로 나타났음. 또한 전립선 비대증 개선의 주요한 마커가 되는 활성형 DHT의 생성량에 미치는 영향을 비교했을 때, STD2가 가장 우수한 효능을 나타내었음. STD2 추출물에 상대적으로 높은 농도의 cyanidin-3-glucoside가 함유되어 있음은 점을 고려할 때, 아로니아 추출물의 전립선 비대증 개선 효능에 있어 cyanidin-3-glucoside이 주요한 기능성성분으로 작용할 가능성이 있음을 유추할 수 있음.

라. 아로니아 표준추출물 4종(STD2, STD4, STD9, STD10)의 MRM mode MS spectrum 분석

-아로니아 추출물 4종에 함유된 성분 중에서 HPLC에서 검출되지 않는 미량 성분에 함량 비교분석을 위하여 MRM mode (Multiple Reaction Monitoring, SRM)를 이용한 mass spectrum 분석을 실시하였음.

-본 연구진이 확보한 아로니아 표준물질 외에 아로니아의 주요성분으로 알려진 안토시아닌 및 기능성 페놀 화합물에 대한 리스트를 확보하고 해당 물질에 대한 ion-targeted mass spectrum 분석을 진행하였음.

Table. Groups of phenolic compounds identified by LC-PDA-ESI-MS/MS in black chokeberry products.

Compounds ¹	Rt (min)	λ_{max} (nm)	[H - M] ⁻ (m/z) ²	MS/MS Fragments (m/z) ²
Cyanidin-3-hexoside-(epi)catechin	2.54	520	737+	575/423/287
Neochlorogenic acid	2.57	323	353	191
Cyanidin-3-pentoside-(epi)catechin	2.98	520	707+	557/329/287
(+)-Catechin	3.04	280	289	
Cyanidin-3-hexoside-(epi)cat-(epi)cat	3.15	520	1025+	575/409/287
3-O- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	3.30	310	337	191
Cyanidin-3-O-galactoside	3.50	516	449+	287
Chlorogenic acid	3.62	323	353	191
Cryptochlorogenic acid	3.71	323	353	191
Cyanidin-3-O-glucoside	3.79	517	449+	287
Cyanidin-3-O-arabinoside	4.02	515	419+	287+
Procyanidin B2	4.20	280	577	289
Cyanidin-3-O-xyloside	4.65	515	419+	287+
(-)-Epicatechin	4.88	280	289	
Quercetin-dihexoside	5.23	352	625	445/301
Quercetin-dihexoside	5.29	352	625	445/301
Quercetin-3-O-vicianoside	5.50	353	595	432/301
Quercetin-3-robinobioside	5.84	353	609	463/301
Quercetin-3-O-rutinoside	6.02	353	609	463/301
Quercetin-3-O-galactoside	6.09	352	463	301
Quercetin-3-O-glucoside	6.22	352	463	301
Eriodictyol-glucuronide	6.28	280	463	287
Isorhamnetin pentosylhexoside	6.41	352	609	315
Quercetin-O-deoxyhexose-deoxyhexoside	6.76	352	593	433/301
Isorhamnetin rhamnosyl hexoside isomer	6.72	352	623	463/315
Isorhamnetin rhamnosyl hexoside isomer	6.89	352	623	421/315
Di-caffeic quinic acid	6.94	323	515	353/191

¹ Identification confirmed by commercial standards; ² experimental data.

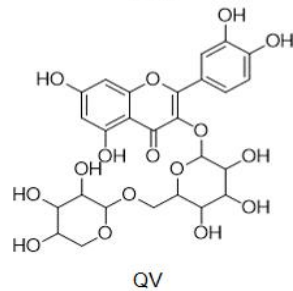
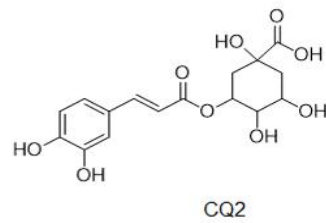
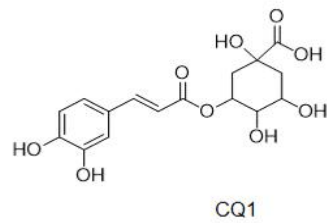
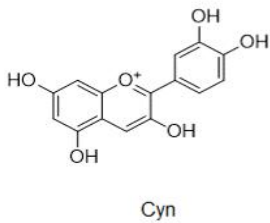
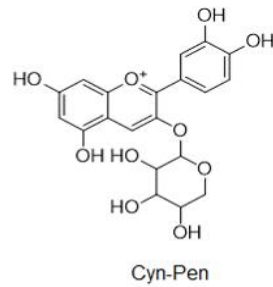
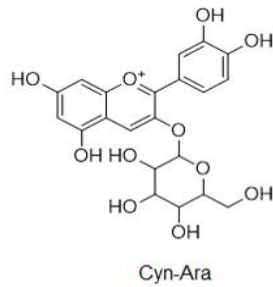
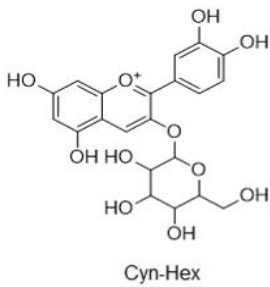
출처: Jan Oszmianski and Sabina Lachowicz, *Molecules*, 2016, 21, 1098

-Mass 분석은 Agilent 1200 HPLC와 ABSCIEX QTRAP 3200 mass spectrometer를 이용하였음. 아로니아 4종 추출물 (STD2, STD4, STD9, STD10)의 크로마토그래피 분리를 위하여 각 추출물 5 ul을 Synergi Fusion column (2.6 um, 2.1 × 50 mm)에 direct injection하고 아래와 같은 분리조건을 통하여 분석하였음.

Flow rate	0.35 ml/min
Injection volume	5 ul (diluted in 50% MeOH)
Temperature	30° C
Mobile phase	A: 0.1% TFA-Water B: 0.1% TFA-MeOH

Positive mode		
min	A (%)	B (%)
0	85	15
5	50	50
6	0	100
7.5	0	100

Negative mode		
min	A (%)	B (%)
0	75	25
3	75	25
6	0	100
7.5	0	100

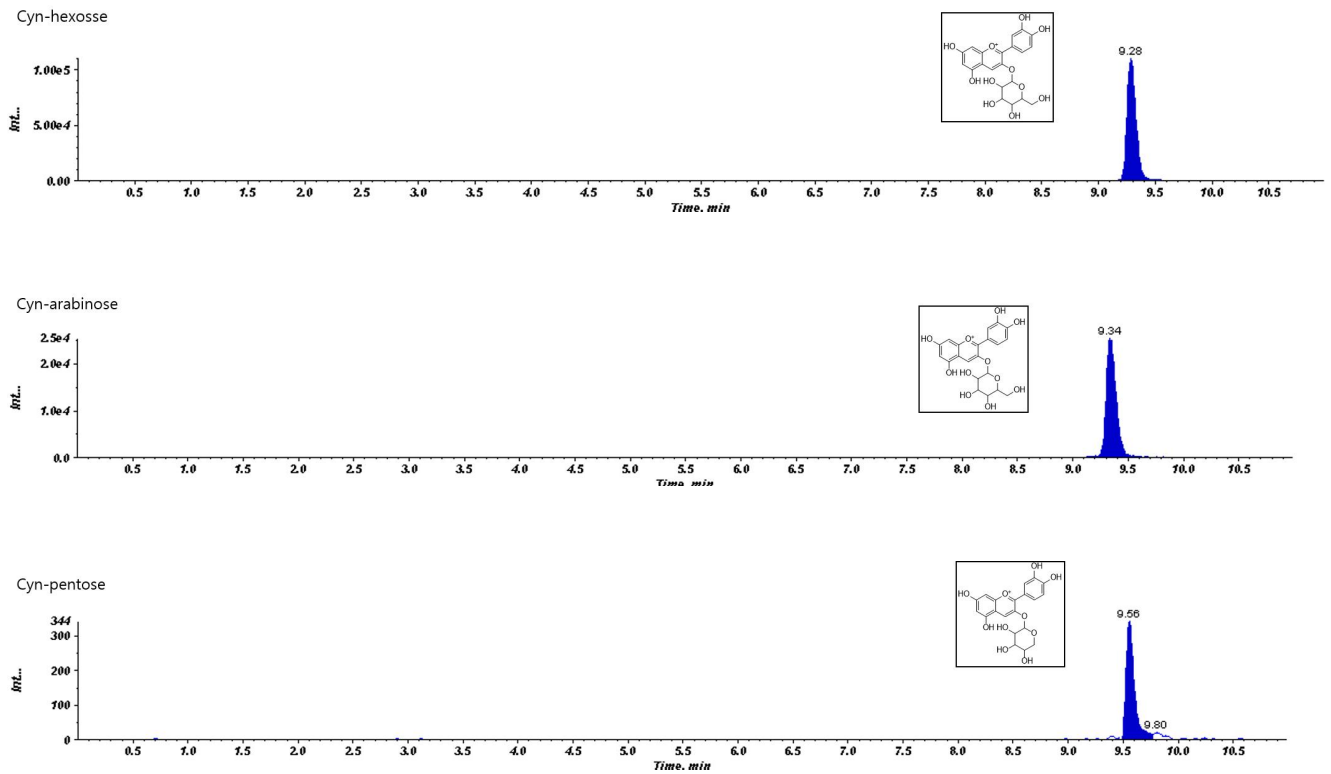


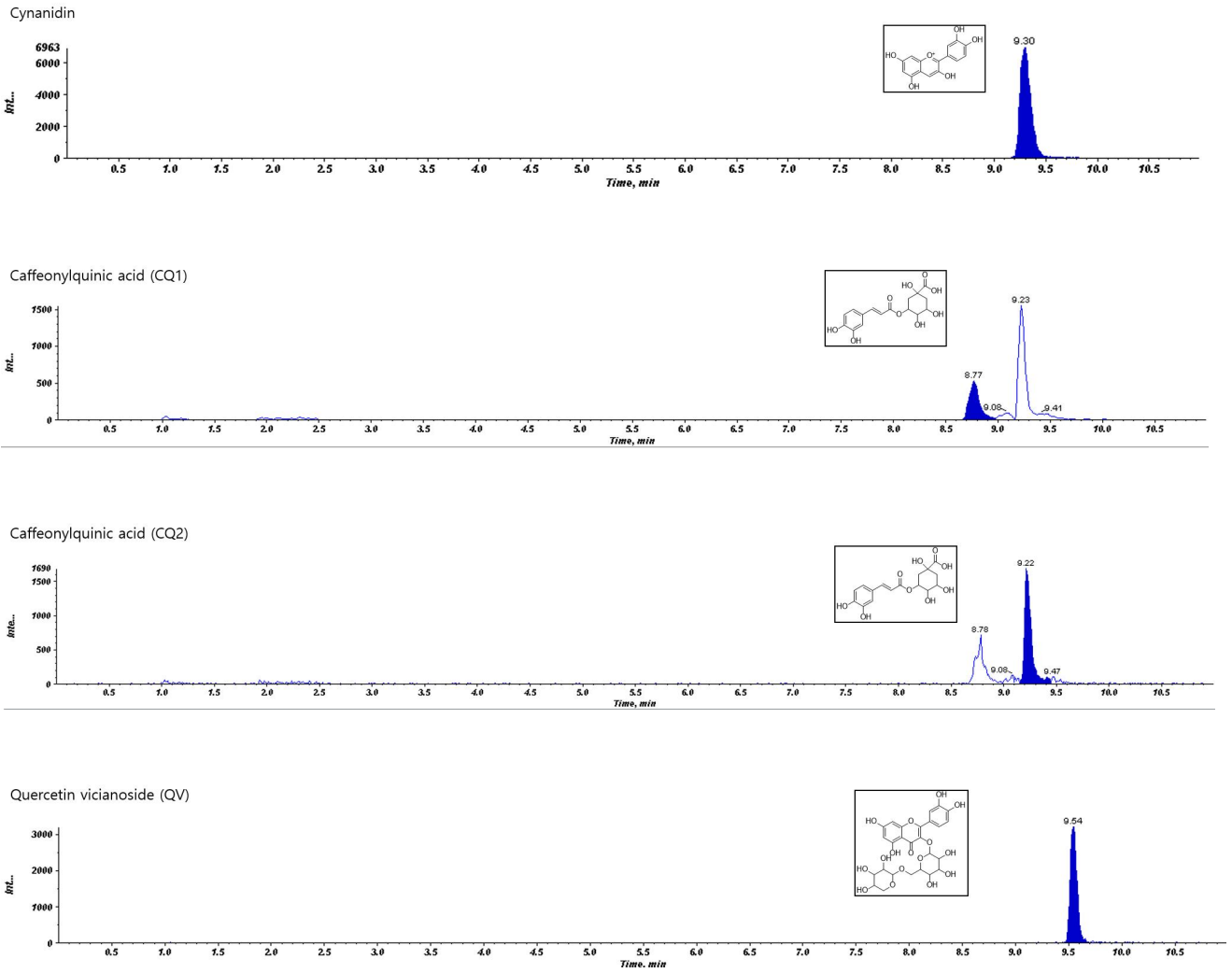
MRM-mode LC/MS 분석을 위한 아로니아 추출물 내 target 물질의 화학구조. 1: Cyn-Hex: cyanidin-3-glucose, cyanidin-3-galactose, 2: Cyn-Ara: cyanidin-3-arabinose, 3: Cyn-Pent: cyanidin-3-pentose, 4: Cyn: cyanidin, 5: CQ1: caffeoylquinic acid, 6: CQ2: caffeoylquinic acid, 7: QV: quercetin vicianoside

-기 보고된 아로니아의 주요 화합물의 분자량 정보를 바탕으로 mass 분석을 실시한 결과, 표준추출물 4종(STD2, STD4, STD9, STD10)에서는 총 6종의 분자량 정보가 검출되었음. 이러한 결과를 바탕으로 4종 추출물 내에 함유된 3종의 안토시아닌과 3종의 페놀 화합물의 함량을 분석하고자 하였음. 안토시아닌(Cyn-Hex, Cyn-Ara, Cyn-Pent)은 positive mode로, 페놀 화합물(CQ1, CQ2, QV)는 negative mode로 검출하였음.

	화합물	MRM mass
Cyn-Hex	cyanidin-3-galactoside or cyanidin-3-glucoside	449/287
Cyn-Ara	cyanidin-3-arabinose	419/287
Cyn-Pent	cyanidin-3-pentose	487/355
Cyn	cyanidin	287
CQ1	caffeoylquinic acid	353/191
CQ2	caffeoylquinic acid	353/191
QV	quercetin vicianoside	595/301

-아로니아 표준 추출물 (STD2, 4, 9, 10)의 MRM mode MS spectrum 결과





-아로니아 추출물에서 검출되는 7종의 안토시아닌 및 페놀 화합물에 대하여 MRM mode를 이용하여 추출물별 해당 이온의 상대적인 intensity를 비교분석한 결과, STD2 추출물에는 모든 화합물의 함량이 다른 추출물에 비해 월등히 높은 것을 확인할 수 있었음. 특히 cyanidin-hexose의 경우 STD2 추출물에 함유된 이온의 intensity가 다른 추출물의 최대 2.5배에 해당하여 STD2 추출물에는 상대적으로 많은 양의 cyanidin-glucose 또는 cyanidin-galactose가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 그 외에 cyanidin-arabinose, cyanidin-pentose, cyanidin의 경우에도 STD2 추출물이 다른 추출물에 비해 최대 2.78배, 3.02배, 2.59배 높은 농도로 함유되어 있는 것을 알 수 있었음.

	Cyn-Hex	Cyn-Ara	Cyn-Pent	Cyn	CQ1	CQ2	QV
	(x 10 ³)						
STD2	586	158	2.09	47.7	3.07	5.73	13.2
STD4	268	68	1.08	20.9	2.21	3.55	10
STD9	310	80.9	1.13	25.7	2.76	4.24	10.9
STD10	230	56.8	0.69	18.4	2.45	3.86	0.88

4종의 아로니아 추출물에 대한 전립선비대증 동물모델을 이용한 활성 결과와 HPLC 및 LC/MS 분

석을 이용한 chemical profile 결과를 토대로, 아로니아 추출물의 전립선비대증 개선 활성에 기여하거나 상호관련성이 높은 기능성성분을 도출하고자 하였음.

-테스토스테론으로 전립선비대를 유도한 동물모델에서 6주간의 추출물 투여 후 prostate index 및 전립선 조직 내에 AR, PSA, PCNA 발현에 미치는 영향을 기준으로 활성도를 평가한 결과 아로니아 추출물 STD2가 가장 우수한 효과를 나타내었음. STD2는 100% 에탄올추정을 추출용매로 하여 30도에서 추출한 추출물임. 지표물질을 이용한 HPLC함량분석실험에서 STD2는 타 추출물에 비해 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-arabinoside의 함량이 높은 것으로 확인되었고, MRM-mode ESI MS분석에서는 STD2 추출물이 타 추출물에 비해 cyanidin 및 cyanidin 배당체 (hexose, arabinose, pentose)의 함량이 상대적으로 높고, QToF-MS 결과를 이용한 다변량 분석에서 STD2 추출물과 타 추출물 간에 현저한 차이를 나타내는 component로서 palmitic acid(팔미트산)이 도출된 바 있음.

-위의 결과를 종합해볼 때 아로니아에 함유된 안토시아닌 계열의 cyanidin 배당체와 팔미트산의 함량이 전립선비대증 개선 효능에 주요한 작용을 하는 성분임을 유추할 수 있었음. 향후 추가연구를 통해 해당성분의 *in vivo*실험을 통한 유효성 검증이 필요할 것으로 보임.

□ 수행기관: 안전성평가연구소

2차년도 실험 후 전립선 조직에서 DHT 정량분석을 추가로 실시하였으며 그 결과 5 alpha reductase 결과와 유사한 경향을 보이는 것을 확인하였음. vehicle control 군과 비교하여 모든 시험군에서 DHT 농도가 유의하게 감소하였음. 2차년도의 in vivo 결과를 바탕으로 3차년도 기전 연구를 수행함.

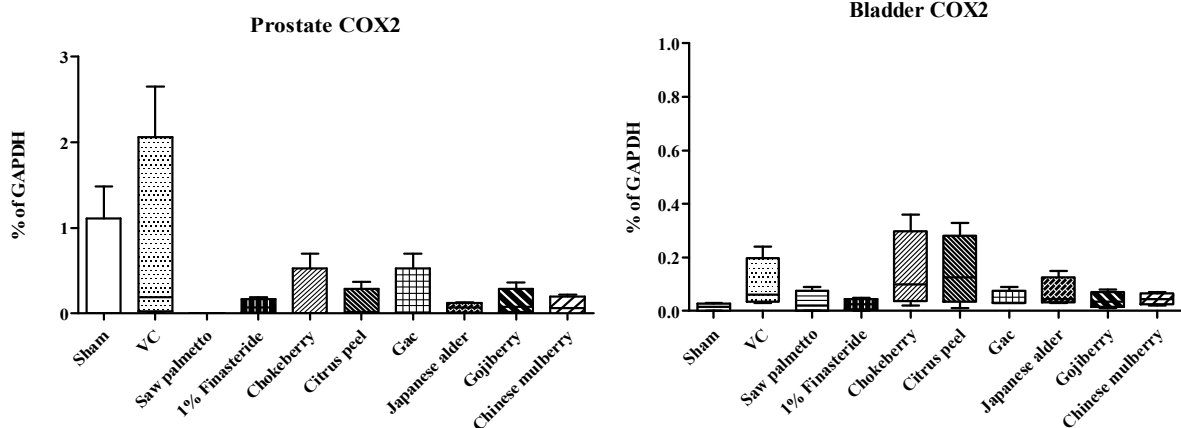
DHT	Sham	VC	Saw palmetto	1% Finasteride	Chokeberry	Citrus peel	Gac	Japanese alder	Gojiberry	Chinese mulberry
Mean	86.02	218.1	155.7	130.6	130.8	147.1	127.6	127.7	128.6	116.7
Std. Deviation	2.751	26.11	14.91	22.95	4.875	14.86	19.34	19.52	16.58	12.16
% of mean reduction rate	60.56	0.00	28.61	40.12	40.03	32.55	41.49	41.45	41.04	46.49

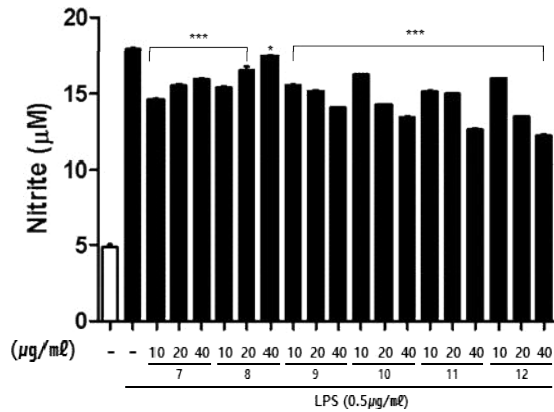
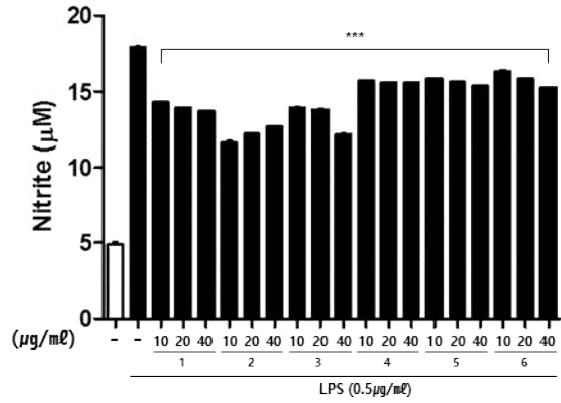
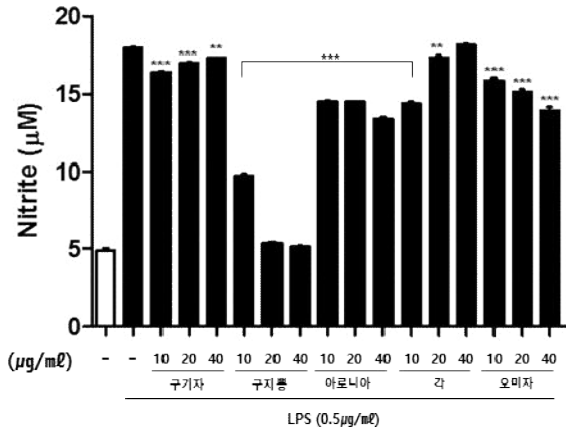
전립선 조직에서 DHT 감소율을 평가한 결과 음성대조군 대비 Saw palmetto 투여군에서 최소로 28.61% 만큼의 감소를 보였으며 아로니아 40.03%, 진피 32.55%, 계육(Gac) 41.49%, 오리나무 41.45%, 구기자 41.04%, 구지뽕 46.49%의 감소를 나타내었음.

가. 아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구

(1) 항염증 효능 평가

2차년도 전립선의 조직병리학적 평가 시 조직 내 염증 유도가 거의 유발되지 않아 전립선 및 방광 조직 homogenate에서 qPCR 방법을 이용하여 대표적인 염증 매개 물질인 COX2 유전자 발현과 Th 17 세포의 유무 확인을 위하여 IL-17A 사이토카인 유전자 발현을 확인하였음. 그러나 이 중 IL-17의 경우 검출 한계 이하로 발현되지 않았으며 COX2 유전자는 동일 group 내에서도 발현이 관찰되는 개체와 그렇지 않은 개체가 존재하며 그 발현 정도가 매우 낮아 통계적인 분석이 불가능하였음. 따라서 TP 로 전립선 비대를 유도하는 해당 in vivo 모델에서는 항염 효능 평가는 어려운 것으로 결론을 내리고 대식세포주인 Raw 264.7 세포에서 실제 실험에 사용한 시료에 대하여 NO 발현 억제능을 확인하였음.





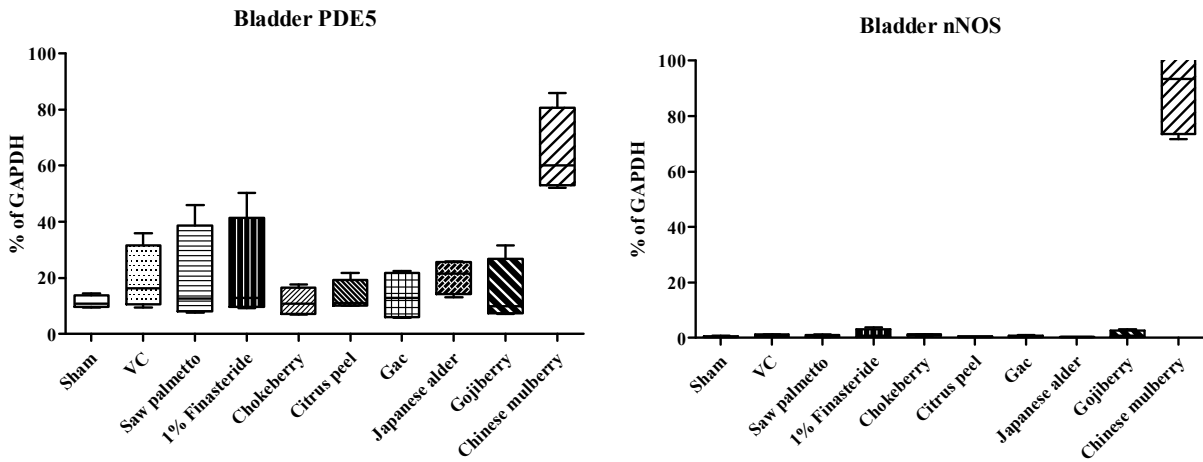
Raw

264.7 세포에서 NO 발현 억제 실험의 방법은 기존의 협동 연구기관의 내용과 동일하게 수행하였으며 LPS 에 의해 유도된 NO활성을 오리나무 추출물을 제외한 동물실험 시료 및 12종류의 서로 다른 아로니아 ASE 추출물에 대하여 각 10, 20, 40 μg/ml 의 농도에 따라 억제 정도를 측정하였음. 그 결과 모든 시료는 NO 억제 능력을 갖지만 그 중 구지뽕 추출물이 다른 시료에 비해 높은 항염 활성을 갖는 것으로 평가되었음. 해당 결과가 1, 2 차년도에 *in vivo* 모델에서 동일하게 평가하기 어려워 차후 전립선 염증을 유발한 모델에서 따로 평가해야 할 것으로 판단됨.

(2) 평활근 수축 억제 기능의 평가

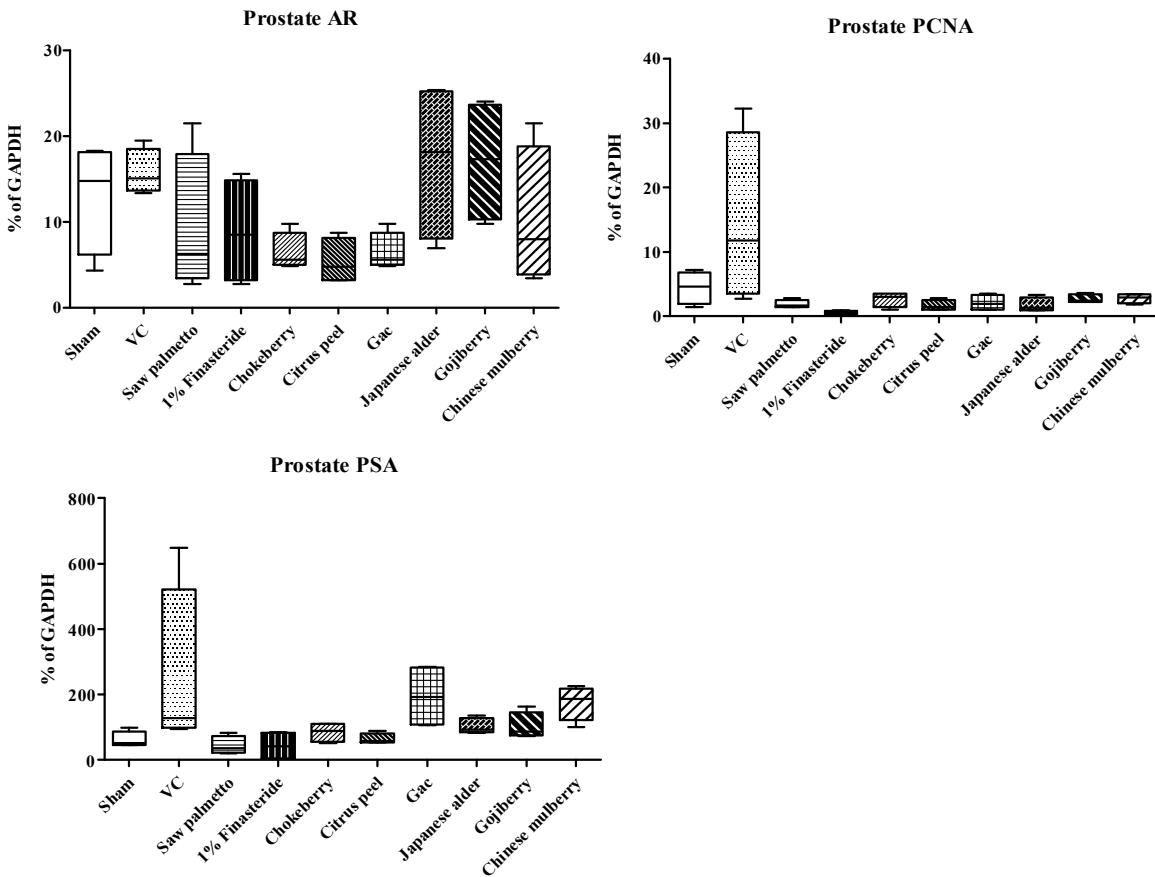
방광 평활근 및 요도 주변의 평활근을 이완시키는 작용을 함으로써 BPH 의 임상 증상 중 잔뇨감, 불편감 등을 완화시키는 sildenafil 등의 약물은 근세포 내의 PDE5 의 기능을 억제하여 NO의 근 이완 작용을 활성화하는 방식으로 작동함. 이와 유사한 작용을 하는 시료가 있는지 평가하기 위해 동물실험 후 채취한 방광 조직에서 PDE5 및 nNOS 발현량을 qPCR로 분석함. 분석 결과 PDE5 의 경우 정상 방광 및 테스토스테론 노출 방광 모두 유사한 정도의 유전자 발현을 보였으며 구지뽕 추출물 투여군의 경우에만 유의한 정도로 PDE5 증가가 관찰되었음. 그러나 PDE5 가 유의하게 감소하는 군은 없는 것으로 판단되어 PDE5 inhibition과 관련한 기전은 연구 대상 시료에서 확인할 수 없는 것으로 판단됨. 또한 PDE5 유전자의 감소가 아닌 유의미한 증가 이러한 변화가 방광 근육에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 3차년도에서 수행하지 못하였음. 신경에 존재하는 NO 생성 단백질인 nNOS 발현의 경우 PDE5 와 마찬가지로 구지뽕 추출물 투여 동물에서 높은

발현을 확인하였음. 추후 구지뽕 추출물에서 평활근에 유효한 성분이 있는지에 대한 연구가 후속 연구로서 가치가 있을것으로 판단됨.



(3) 호르몬 작용 억제 기전

in vivo 모델에서 TP 투여로 인한 전립선 비대증의 완화 효능은 2차년도에서 PI 지수 분석을 통해 모든 시료에서 유의미한 효능이 있음을 확인하였음. 이에 대한 세부 기전 연구를 수행하기 위해 전립선 조직에서 발현하는 Angrogen receptor 및 PCNA, PSA 유전자에 대한 정량 분석을 qPCR을 통해 실시하였음.

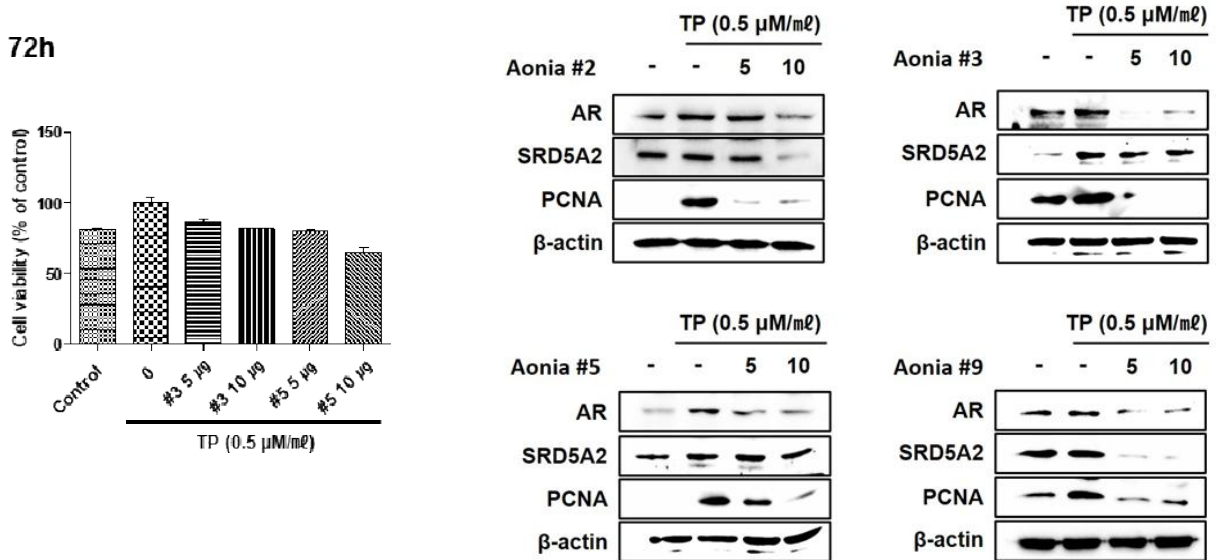


실험의 결과, AR 의 경우 통계적인 유의성은 나타나지 않았으나 아로니아, 진피, Gac 투여군에서 발현이 감소된 것을 확인하였으며 PCNA 및 PSA 발현은 모든 투여군에서 유의하게 감소된 것을 확인하였음. 즉 실험에 사용된 모든 *in vivo* 시료 투여는 전립선 비대증 완화에 효과가 있었으며 호르몬 작용 및 그로인한 증식 억제 기전을 통해 효능을 나타냄을 mRNA 발현으로 확인하였음.

24h



72h



추가적인 *in vitro* 모델에서도 해당 기전을 확인하기 위해 공동연구기관과 다른 실험 방법을 수행하였음. 전립선암 세포주가 아닌 정상 상피세포 RWPE-1 세포에 TP를 투여하여 인위적인 증식을 유도하고 여기에 시료를 첨가한 배지로 배양하여 호르몬 및 증식 억제 정도를 평가하였음. 시료는 복합물 조성을 위하여 아로니아 ASE 추출물 12종과 오미자 및 구기자 추출물을 추가하여 총 14종을 선택하였음. TP 처리 이전에 스크리닝을 위하여 세포에 무해한 농도 검출을 위해 세포 배양액에 각 시료를 농도별로 처리하여 CCK-8 assay를 실시하여 24시간에서의 세포생존율을 확인하고 5 µg/ml, 10 µg/ml 의 두 농도에서 AR 및 SRD5A2 단백질 발현을 western blotting 기법으로 확인한 결과 2, 3, 5, 9 및 오미자 추출물 처리군에서 유의하게 감소하였음. 대조군으로 5 alpha r eductase 억제 물질인 finasteride 및 dutasteride를 처리하였으나 이번 실험 결과에서는 SRD5A2 의 발현양이 대조군과 차이를 보이지 않았음. 이는 추가 실험을 통해 TP와 동시 배양할 경우에

단백질 발현에 차이를 보임을 확인하였음.

스크리닝한 시료에 대하여 TP 로 증식을 유도함과 동시에 72시간동안 배양하여 관련 단백질 발현의 감소 정도를 확인하고자 western blotting을 실시함. 그 결과 2, 3, 5, 9 시료의 처리가 뚜렷하게 TP로 인한 전립선 세포 증식과 관련한 유전자를 효과적으로 감소시킴을 확인하였음.

(4) 3차년도 연구의 결론 및 고찰

in vivo 실험 이후 추가적인 기전 연구를 통하여 본 연구에 적용된 다양한 식품 및 생약 시료가 모두 호르몬 및 증식 기전을 억제하여 전립선 비대증을 완화하는 효능을 갖고 있음을 확인하였음. 최초의 예상과 달리, 해당 동물 모델에서는 사람에서 발생하는 전립선 비대증에서와 같은 염증 및 섬유화 작용은 관찰되지 않아 이에 대한 효능을 평가하기 위해서는 추가적인 *in vivo* 모델이 필요할 것으로 판단됨. 평활근 억제 기전에 대해서는 방광 평활근에 대해 근전도 실험을 하는 등의 추가적인 연구가 뒷받침 된다면 더욱 효능이 뛰어난 시료를 도출할 수 있을 것으로 보임. *in vivo* 와 유사한 *in vitro* 실험 모델에서도 호르몬 작용과 이로 인한 증식이 억제됨을 확인하였으므로 두 가지 연구 기법을 동시에 수행하면 전립선 비대증에 대한 효능 평가 시 더욱 확실한 기초 연구 결과를 도출할 것으로 판단됨.

- 과제 수행중 실적
- SCI 논문 및 비SCI 논문

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 21(1) 2018, 1113-1119
 © Mary Ann Liebert, Inc., and Korean Society of Food Science and Nutrition
 DOI: 10.1089/jmf.2017.0143

Antibesity Effect of Fermented Chokeberry Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice

Na-Hyun Kim^{1,8}, Jonghwan Jegal^{2,8}, Yun Na Kim³, Dong-Min Chung³, Jeong-Doo Heo¹, Jung-Rae Rho³, Min Hye Yang⁴, and Eun Ju Jeong⁵

¹Gyeongsang Department of Environment and Toxicology, Korea Institute of Toxicology, Munam-eup, Korea; ²College of Pharmacy, Pusan National University, Busan, Korea; ³Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju, Korea; ⁴Sunhaeng Agricultural Co., Ltd., Gyeongsang, Korea; ⁵Department of Oceanography, Kunsan National University, Kunsan, Korea;

ABSTRACT Black-fruited chokeberries (*Aronia melanocarpa*), growing mainly in the Central and Eastern European countries, have health benefits due to the high concentrations of polyphenolic compounds. However, a strong bitter taste of chokeberries limits its usage as functional food. We hypothesized that the fermented *A. melanocarpa* with a reduced bitter taste would improve insulin sensitivity and/or ameliorate weight gain induced by high-fat diet (HFD) in male C57BL/6J mice. The mice were administered with HFD together with the 100mg/kg of natural *A. melanocarpa* (T1) or the fermented *A. melanocarpa* (T2) for 8 weeks. The treatment with T2 (100mg/kg body weight, p.o.) markedly attenuated the weight gain and the increase in serum triglyceride level induced by HFD. The T2-treated group had better glucose tolerance and higher insulin sensitivity as measured by oral glucose tolerance test and intraperitoneal insulin tolerance test in comparison to the T1-treated group. Physicochemical analysis revealed that the main constituents of T2 were cyanidin-3-*o*-glucoside and 1-*o*-,4'-dihydroxycyanidin-3-*o*-glucoside, and the content of cyanidin glycosides (3-*o*-glucoside, 3-*o*-xyloside) was significantly reduced during the fermentation process. From the above results, we postulated that antioesity effect of black chokeberry was not closely correlated with the cyanidin content. Fermented chokeberry might be a viable dietary supplement rich in bioactive compounds useful in preventing obesity.

KEYWORDS: *aronia berries* • fermentation • high-fat diet-induced obesity • glucose intolerance • insulin resistance • physicochemical analysis

INTRODUCTION

THE EPIDEMIC OF OBESITY has become a serious public health problem, without an effective therapeutic solution.¹ Obesity is characterized by a pronounced accumulation of body fat and may be associated with enhanced lipid consumption.² Patients with overweight and obesity are much more likely to have an increased prevalence of diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases.^{3,4} Furthermore, obesity is a strong causal factor for sleep breathing disorders such as sleep apnea and sleep disruption, which contributes to the increased cardiovascular mortality.⁵ The potential of natural product-derived compounds for the treatment of obesity have attracted researchers' attentions as sources of safe and effective antiobesity drugs.⁶ Numerous studies have shown that plant-derived extracts, compounds, and phytochemical combinations can improve the symptoms associated with obesity.^{7,8} Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, Rosaceae) is mainly distributed in eastern North America and East Canada.^{9,10} Health benefits of *A. melanocarpa* fruits are well-known since it is rich source of polyphenols such as anthocyanins and cyanidin glycosides.^{10,11} Current knowledge presents black chokeberry as a medicinal plant with diverse biological activities such as anti-inflammatory, gastroprotective, and hepatoprotective properties.¹²⁻¹⁴ *Aronia* plants have been routinely and traditionally used for the treatment of metabolic diseases and *Aronia* fruit juice has recently been of interest for their hypolipidemic effects.^{15,16} Nevertheless, there is little scientific research to discover the beneficial effects of fermented *Aronia* berries in the treatment of obesity.

1113

nutrients

Article
Chokeberry Extract and Its Active Polyphenols Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Modulates Fat Accumulation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice

Na-Hyun Kim^{1,†}, Jonghwan Jegal^{2,†}, Yun Na Kim^{3,†}, Jeong-Doo Heo¹, Jung-Rae Rho³, Min Hye Yang⁴, and Eun Ju Jeong^{5,†}

¹ Gyeongsang Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munam-eup 52834, Korea; rkhkim@kitox.ac.kr (J.-D.H.); jhwook@kitox.ac.kr (J.-D.H.); ² College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, Korea; jhjeong@pusan.ac.kr; ³ Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea; rdkim@kitox.ac.kr (N.-H.K.); jhwook@kitox.ac.kr (J.-D.H.); ⁴ Department of Oceanography, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea; jrho@kunsan.ac.kr; ⁵ Correspondence: minhyang@pusan.ac.kr (M.H.Y.); ejeong@ntech.ac.kr (E.J.J.); Tel.: +82-51-510-5811 (M.H.Y.); +82-55-751-3224 (E.J.J.); Fax: +82-51-513-6754 (M.H.Y.); +82-55-751-3229 (E.J.J.); [†] These authors contributed equally to this work.

Received: 5 October 2018; Accepted: 6 November 2018; Published: 12 November 2018

Abstract: Berries of *Aronia melanocarpa* (chokeberry) are known to be a rich source of biologically active polyphenols. In the present study, the effects of seven anti-adipogenic polyphenolic phytochemicals isolated from *A. melanocarpa* methanol extract on adipogenic transcription factors were investigated. Arnygalin and prunasin were found to inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation by suppressing the expressions of PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α), SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1), FAS (fatty acid synthase), and aP2 (adipocyte fatty-acid-binding protein). *A. melanocarpa* extract-treated (100 or 200 mg/kg/day) on body weighty high-fat diet (HFD)-induced obese mice showed significant decreases in body weight, serum triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels and improved insulin sensitivity as compared with HFD controls. This research shows *A. melanocarpa* extract is potentially beneficial for the suppression of HFD-induced obesity.

Keywords: *Aronia melanocarpa*; polyphenols; anti-adipogenesis; adipogenic transcription factor; diet-induced obesity; insulin resistance

1. Introduction

Obesity is a chronic, relapsing, and multifactorial disorder with wide-ranging causes [1,2], and in Asian men is defined as a body mass index (BMI) of ≥ 30 kg/m² [3]. Obesity is also known to be associated with diverse comorbidities including cardiovascular diseases, dyslipidemia, and type 2 diabetes [4]. Today obesity has reached epidemic proportions, and thus, has become a major global public health problem. The condition is the result of the excessive accumulation of adipocytes, which store and regulate energy in the form of triglycerides or free fatty acids [5]. Adipocyte growth occurs due to hypertrophy (an increase in cell size) and hyperplasia (an increase in cell numbers) [5], and white adipose tissue acts as a major endocrine organ by secreting protein signals and factors called adipokines [7]. Although the precise mechanism has not been delineated, it is generally held that the pathogenesis of complications related to obesity involve abnormal adipokine production by adipocytes [8].

Nutrients 2018, 10, 1734; doi:10.3390/nut10111734

□ 학회활동

The extract of *Aronia melanocarpa* and its active polyphenols suppressed adipogenesis in 3T3-L1 and modulated fat accumulation and insulin resistance in high fat diet-induced obese mice

Na-Hyun Kim^{1,†}, Jonghwan Jegal^{2,†}, Yun Na Kim³, Jeong-Doo Heo¹, Min Hye Yang⁴, and Eun Ju Jeong^{5,†}

¹Gyeongsang Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munam-eup 52834, Korea; ²College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, South Korea; ³Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

The 49th Annual Meeting and Symposium of the Korean Society of Pharmacology / The 10th KSP-3SP-CSP Joint Symposium

Experiment Design

1. Preparation of *Aronia* extract for in vivo experiment
 The juice of fresh *A. melanocarpa* fruits was obtained by green extraction. Mean absolute total (CAF 80%) was 0.281 ± 0.026%. The compound extract was freeze-dried and weighed, followed by dissolved in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC).

2. Animals and Treatment
 Male C57BL/6J mice, 6 weeks old
 Administration of normal diet containing 10% fat (D1) (3.65 kcal/g) or a high-fat diet containing 20% fat (D2) (5.24 kcal/g) for 8 weeks
 Group 1 (D1): Normal diet (10% fat) (D1) (3.65 kcal/g) (n = 10)
 Group 2 (D2): High-fat diet (20% fat) (D2) (5.24 kcal/g) (n = 10)
 Group 3 (D2): High-fat diet (20% fat) (D2) (5.24 kcal/g) + *A. melanocarpa* extract (100 mg/kg) (n = 10)
 Group 4 (D2): High-fat diet (20% fat) (D2) (5.24 kcal/g) + *A. melanocarpa* extract (200 mg/kg) (n = 10)

Key Results

• Effects of *A. melanocarpa* extract on body weights (a) and peritoneal and perigonadal fat masses (b) of mice fed a HFD for 8 weeks

• The average food consumption per animal in each treatment group during 8 weeks. The amount of food consumption was not significantly different between the groups

• Effect of *A. melanocarpa* extract on serum lipid levels in HFD-induced obese mice

• Inhibition of the mRNA expressions of PPAR- γ (A), SREBP1c (B), C/EBP α (C), FAS (D), LPL (E), and aP2 (F) by compounds 1-7 in differentiated 3T3-L1 cells.

• Effects of orally administered *A. melanocarpa* extract (T1-T4) on androgen receptor (AR), prostatic specific antigen (PSA), and proinflammatory cytokine expression (PGE $_{2}$) gene expressions in the prostatic tissue of testosterone propionate-treated Wistar rats

• Relative phenolic compositions of the four *A. melanocarpa* extracts (T1-T4) as determined by LC-MS

• This work was supported by the grants from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (KPFET) through the High Value-added Food Technology Development Program (119918-02) funded by the Korean Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA).

The Comparison of Phytochemicals and Protective Effects of *Aronia melanocarpa* Prepared under Different Extract Conditions in Testosterone Propionate-Induced Prostatic Hyperplasia in Mice

Na-Hyun Kim^{1,†}, Jonghwan Jegal^{2,†}, Yun Na Kim³, Jeong-Doo Heo¹, Min Hye Yang⁴, and Eun Ju Jeong^{5,†}

¹Gyeongsang Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munam-eup 52834, Korea; ²College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, South Korea; ³Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

The 49th Annual Meeting and Symposium of the Korean Society of Pharmacology / The 10th KSP-3SP-CSP Joint Symposium

Introduction

Benign prostatic hyperplasia (BPH)
 • Prostatic gland enlargement is observed in BPH.
 • Common signs and symptoms of BPH
 • Prolapsed or enlarged prostate
 • Decreased frequency of urination at night (nocturia)
 • Difficulty starting urination
 • Weak urine stream or a stream that stops and starts
 • Difficulty at the end of urination
 • Inability to completely empty the bladder

5 α -Reductase enzyme in BPH
 • 5 α -Reductase catalyzes the conversion of testosterone to an active androgen, dihydrotestosterone (DHT).
 • DHT binds to androgen receptors and elicits various hormonal actions.
 • An excessive accumulation of dihydrotestosterone is recognized as leading to male pattern baldness and BPH.

Experiment Design

1. The extraction of *A. melanocarpa* fruits
 Accelerated solvent extraction (ASE) using a BUCHI Speed Extractor E-205
Aronia berries were freeze dried for 5 days and cut into small pieces
 Extraction conditions: extraction temperature (50 or 100°C), solvents (50% or 100% acetone), one extraction cycle, hold time (10 min), and extraction pressure (120 bar)

2. Animals and Treatment
 Male Wistar rats, 8 weeks old
 To exclude the influence of testosterone, rats were castrated by removing testes and epididymis.
 • *A. melanocarpa* extract (T1-T4) dissolved in 0.5% CMC was orally administered (at 100 mg/kg b.w.) once a day
 • Positive control: Saw palmetto (100 mg/kg b.w.) once a day

Key Results

• Effects of orally administered *A. melanocarpa* extract T1 to T4 on prostate weights and prostate of testosterone propionate-treated Wistar rats

• Relative phenolic compositions of the four *A. melanocarpa* extracts (T1-T4) as determined by LC-MS

• This work was supported by the grants from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (KPFET) through the High Value-added Food Technology Development Program (119918-02) funded by the Korean Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA).

□ 특허출원

<p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.12.31 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2018-0173249 (접수번호 1-1-2018-1321162-21) 출원인명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4) 발명자성명 이재규 권선화 발명의명칭 아로니아 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증 예방 및 개선 조성물 및 그 제조방법</p> <p>특허청장</p> <p><< 안내 >></p> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장할 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적공관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p>	<p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.12.29 특기사항 출원번호 40-2018-0183565 (접수번호 1-1-2018-1320844-83) 출원인명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4)</p> <p>특허청장</p> <p><< 안내 >></p> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장할 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적공관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p>
<p>아로니아 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증 예방 및 개선 조성물 및 그 제조방법(10-2018-0173249)</p>	<p>프로스타플러스 상표출원 (40-2018-0183565)</p>

□ 사업화 실적

농업회사법인 주식회사 삼흥에서는 삼흥식품(대표자동일)에 기술이전하여 제품을 출시하였으며, 2018년 총매출은 227,505,800원(2018년 12월까지)을 달성하였으며, 참여기업인 농업회사법인 (주)하늘선물에프엔비에서는 2017년과 2018년 기술개발성과매출액은 87,035,219(원)을 달성하였음.





상품화한 제품사진(물에녹는 아로니아 : 액상발효분말제품)



물에 녹는 우리땅 아로니아발효SD분말(SD분말, 숙성아로니아분말)

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 글리신)의 개발						
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼총	참여기관	경남과학기술대학교, 안전성평가연구소				
책임자	권선화	연구기간	2016년 07월 ~ 2018년 12월 (총 30개월)				
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000	총계	650,000		
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	삼총식품				
기술료	없음	기술실시일	2017.04.01				
구분	기술실시 업체 결산액 (과외 백만원) + 최근연도 결산보고서에 의해 작성						
실적	자산 총계	688	재용건수	2			
	자본 총계	682					
	부채 총계	5					
	매출액 총계	2018				기술개발사업 매출액	227,505,800원
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
2018	플에 늬는 아로니아		2017. 7	73,505,800	44%	국내산	없음
2018	플에늬는 우리당 아로니아발효SD분말(SD분말 숙성아로니아분말)		2017.6 (양산 9월)	154,000,000	100%	국내산	없음

2018년 12월 31일

연구책임자 : 권선화 (서명) (인)

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

		
2018.01.18 거창청정아로니아 7,000,000	2018.01.20 노벨면탈 484,000	2018.01.21 초레볼아로니아발효농축액 영농조합법인 1,100,000
		
2018.03.14 호정농산 499,000	2018.03.20 호국아로니아농장 1,100,000	2018.03.23 거창청정아로니아 8,894,000
		
2018.03.30 보령장소 774,400	2018.04.06 호정농산 499,000	2018.04.18 덕리비인 280,000
		
2018.04.30 초레볼아로니아발효농축액 영농조합법인 1,100,000	2018.06.25 호정농산 815,000	2018.06.14 호정농산 842,000
		
2018.09.28 다자연농업회사법인(주) 770,000	2018.06.29 보령장소 388,200	2018.09.30 호연물류 284,000
		
2018.09.14 주희회사 에이레스물 2,288,800	2018.08.29 증강코스 2,408,700	2018.08.29 농업회사법인(주)하늘밭미래 154,000,000
		

		
2018.09.08 호로연부소 11,000,000	2018.09.14 영진정보통신 835,800	2018.09.14 년말상자 1,280,000
		
2018.09.14 주희회사 진호개발 2,840,000	2018.09.18 청정아로니아 178,000	2018.09.19 호정농산 800,000
		
2018.09.21 (주)태정테크 880,000	2018.09.28 삼미 5,028,000	2018.09.30 보령장소 388,000
		
2018.10.01 호국아로니아농장 890,000	2018.10.16 노벨면탈 435,600	2018.10.28 호정농산 415,600
		
2018.11.08 한울농산물 11,000,000	2018.11.15 호정농산 288,800	2018.11.14 청정아로니아 88,000
		
2018.12.08 풀바외농장 14,800,000	2018.12.28 보령장소 408,100	2018.12.21 보령장소 588,400
		
2018년 매출 총합계 227,505,800		

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품(프로스타 글리츠)의 개발			
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼흥	참여기관	경남과학기술대학교, 안원생명가연구소	
책임자	권선화	연구기간	2016년 07월 ~ 2018년 12월 (총 30개월)	
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000	
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	농업회사법인 (주)하늘선물예프렌비	
기술료	없음	기술실시일	2017.06.01	
구분	기술실시 업체 결산액 (원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성			
실적	자산 총계	275	제품건수	1
	자본 총계	95		
	부채 총계	5		
	매출액 총계	133,380,794(원)		

제품별 실적

구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
2017	블어뉴는 우리당 아로니아 발효SD분말		2017.8 (생산6월)	82,806,424	100%	국내산	없음
2018	블어뉴는 우리당 아로니아 발효SD분말		2017.8 (생산6월)	4,729,798	100%	국내산	없음

2018년 12월 31일

연구책임자 : 권선화 (서명) 인

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

20170701, (주)에프비, 4724125	20170713, (주)에프비, 17029440	20170719, (주)에프비, 2740085
20170808, (주)에프비, 8282300	20170810, (주)에프비, 918445	20170828, (주)에프비, 4128358
20170831, (주)에프비, 8282300	20170904, (주)에프비, 2000000	20171016, (주)에프비, 2799820
20171018, (주)에프비, 8282300	20171027, (주)에프비, 2800000	20171116, (주)에프비, 8144158
2017년 매출 총합계 82,806,424		
20180828, 승서기획, 2984848	20181210, (주)에프비, 1778280	
2018년 매출 총합계 4,729,798		

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절 목표

<연구개발 성과>

최종 개발성과는 특허출원 2건, 특허등록 4건, 기술실시 2건, 제품화 3건, 매출액 7억, 고용창출 3건, 기술인증1건, SCI논문 4건, 비SCI논문 4건, 학술발표 6건, 인력양성 3건을 목표로 하고 있으며, 과제수행 중에는 특허출원 4건, 특허등록2건, 기술실시 1건, 제품화 2건, 매출액 2억, 고용창출 3명, 기술인증 1건, SCI논문 2건, 비SCI논문 3건, 학술발표 4건, 인력양성 3건을 목표로 하고 있음.

<성능향상>

주요 성능지표1)	단위	현재기술수준	최종 개발목표2)	달성도	연구개발 수행내용
1. 기능성 강화아로니아 분획추출물 제조	건	단순열수추출 및 건조	열수추출물 대비 기능성 20% 이상 향상	100	○ 열수추출물 대비 기능성 강화 (DHT 저해 활성 기준 30% 이상) 분획물 제조 1건(특허출원)
2. 아로니아 추출물의 <i>in vitro</i> 전립선비대 개선 효능 평가	건	-	Human 전립선세포주에서 정상군 대비 5a-reductase 30% 이상 억제	100	○ 5a-reductase를 transfection한 Human 전립선세포주 LNCap cell에서 DHT 생성 저해 활성 평가 완료
3. 아로니아 추출물의 <i>in vivo</i> 전립선비대 개선 효능 평가	건	-	정상대조군 대비 DHT로의 전환율 20% 이상 억제	100	○ Vehicle control 대비 모든 시료에서 DHT 발현양을 최소 30% 이상 억제할 수 있는 효능 확인
4. 아로니아 추출물의 안토시아닌 함량평가	건	-		100	○ 국내산 아로니아와 수입산 아로니아의 안토시아닌 함량 분석완료
5. 전립선 질환 예방용 아로니아 시제품(단순제품) 개발	건	-	시제품 개발 2건	100	○ 물에 녹는 아로니아와 물에 녹는 우리땅 아로니아 발효SD분말 등 2건 개발완료
6. 전립선 질환 개선용 아로니아 복합 시제품 개발	건	-	아로니아추출물 대비 기능성 20% 이상 향상된 복합물 개발	100	○ 프로스타 아로니아분말 1건 개발 완료

(단위 : 백만원, 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
												SC I	비 SC I						
총목표	4	2		2		3	200		3		1	4	4	6		3			
1차년도	2								1				1			1			
2차년도	1					1	50		1		1	1	1	2		1			
3차년도	1	2		1		1	150		1			1	1	2		1			
4차년도																			
5차년도																			
소 계	4	2		1		2	200		3		1	2	3	4		3			
종료																			
1차년도	0	0		1		1	100					2	1	2					
2차년도							100												
3차년도							100												
4차년도							100												
5차년도							100												
소 계	0	0		1		1	500					2	1	2					
합 계	4	2		2		3	700	0	3	0	1	4	4	6		3			

제2절 목표 달성여부

<연구성과 목표 대비 실적>

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
최종목표	4	2		2		3	700		3		1	4	4	6		3			
과제수행 중목표	4	2		1		2	200		3		1	2	3	4		3			
2016 목	2								1			1				1			

Anti-diabetic Effect of *Aronia melanocarpa* (Chokeberry) Vinegar in High Fat Diet-fed C57BL/6J Mice

Na-Hyun Kim¹, Tae-Kil Tak¹, Ju-Hong Lee¹, Je-Hein Kim¹, Jeong-Dooh Lee¹, Eun-Ju Jeong²

¹Gyeongnam Department of Environment & Toxicology Department, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munsan-eup, Jinju, Gyeongnam 660-844, Republic of Korea

²Gyeongnam National University of Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Jinju 660-738, Republic of Korea

The target of the study is *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), which originates from the east province of North America and now widely cultivated in Eastern Europe. It contains high level of beneficial phenolic compounds: procyanidins, anthocyanins and phenolic acids. In this study, pressed Aronia juice and Aronia vinegar were treated orally in obese mice for identifying its anti-obesity/diabetic effects. 4-week old C57BL/6J mice were purchased from the Japan SLC (n=36), then randomly divided into 3 groups (VC: vehicle control, T1: pressed Aronia juice, T2: Aronia vinegar. After a week, 60% kcal high fat diet (HFD) were fed for 8 weeks (Research Diets, Inc. USA), and test materials were orally administered once-a-day simultaneously. During the administration period, body weight was measured once a week. At last week of the study, oral glucose tolerance test (OGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) was performed. Epididymal and perineal fat tissues were collected and measured at necropsy. Blood total cholesterol, triglyceride, HDL and LDL level were evaluated by serum chemistry analysis.

Aronia vinegar treatment could lower the mean body weight, fat mass and serum triglyceride level compare to those of vehicle administration, but not statistically significant. Moreover, Aronia vinegar treated group (T2) showed more sensitive results in OGTT and IPITT. Specifically, it revealed lower blood glucose level in both OGTT and IPITT than other groups, while only OGTT result showed statistical significance. Aronia juice treated group (T1), however, showed no differences in all examinations. In this study, oral administration of Aronia vinegar for 8 weeks could lower the risk of hypertriglyceridemia and insulin resistance. In conclusion, Aronia vinegar has anti-diabetic effect in HFD induced obese mice.

Key to Institute's Logo

Anti-diabetic Effect of *Aronia melanocarpa* (Chokeberry) Vinegar in high fat diet-fed C57BL/6J mice

Na-Hyun Kim¹, Tae-Kil Tak¹, Ju-Hong Lee¹, Je-Hein Kim¹, Jeong-Dooh Lee¹, Eun-Ju Jeong²

¹Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Korea Institute of Toxicology (KIT), Jinju, Gyeongnam 660-844, Republic of Korea

²Gyeongnam National University of Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Jinju 660-738, Republic of Korea

1. Introduction

The target of the study is *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), which originates from the east province of North America and now widely cultivated in Eastern Europe. It contains high level of beneficial phenolic compounds: procyanidins, anthocyanins and phenolic acids. In this study, pressed Aronia juice and Aronia vinegar were treated orally in obese mice for identifying its anti-obesity/diabetic effects.

2. Materials & Methods

4-week old C57BL/6J mice were purchased from the Japan SLC (n=36), then randomly divided into 3 groups (VC: vehicle control, T1: pressed Aronia juice, T2: Aronia vinegar. After a week, 60% kcal high fat diet (HFD) were fed for 8 weeks (Research Diets, Inc. USA), and test materials were orally administered once-a-day simultaneously. During the administration period, body weight was measured once a week. At last week of the study, oral glucose tolerance test (OGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) was performed. Epididymal and perineal fat tissues were collected and measured at necropsy. Blood total cholesterol, triglyceride, HDL and LDL level were evaluated by serum chemistry analysis.

3. Results

Aronia vinegar treatment could lower the mean body weight, fat mass and serum triglyceride level compare to those of vehicle administration, but not statistically significant. Moreover, Aronia vinegar treated group (T2) showed more sensitive results in OGTT and IPITT. Specifically, it revealed lower blood glucose level in both OGTT and IPITT than other groups, while only OGTT result showed statistical significance. Aronia juice treated group (T1), however, showed no differences in all examinations.

4. Conclusion

In this study, oral administration of Aronia vinegar for 8 weeks could lower the risk of hypertriglyceridemia and insulin resistance. In conclusion, Aronia vinegar has anti-diabetic effect in HFD induced obese mice.

5. References

Bullay SE, Bandyopadhyay D (2004) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*): A review of its botanical properties and potential health uses. *J Food Biochem* 30:123-134

Prasad JC, Ojha-Choudhury R, Prasad-Srinivas C, Agnihotra S, Mondal, Anandappa GN (2011) A review of medicinal properties, health benefits, uses and nutraceuticals of *Aronia melanocarpa*. *Int J Pharmaceut* 40:212-222

□ 특허출원

출원번호통지서 페이지 1/3

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2016.11.16

특기사항 실시장구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2016-0152355 (권수번호 1-1-2016-1116467-18)

출원인명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4)

발명자성명 이재규 권선화 정동민

발명의명칭 항염효과를 갖는 분무건조한 아로니아 분말 및 그 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행사항은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통행된 납입영수증에 병영, 납부지번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 - * 납부지번호 : 0131(기흥우체국) - 국수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객지원 정보변경(경정), 정정신고서]을 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 - * 특허료(parent go.kr) 검색 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 통특결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 - * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허/마당-PCT/마드리드>
 - * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 - * 미국특허상표청의 선출원을 기점으로 우리나라에 우선권주장할 수 시, 선출원이 미국개상재이던 우선권일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자표고환허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 - * 특허출원 10-2010-0000000, 상표특허출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 공개하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통행된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/isp/kiponet/ir/receipt/online/app/NoOffr.Act.so> 2016-11-16

출원번호통지서 페이지 1/3

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2016.11.16

특기사항 실시장구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2016-0152323 (권수번호 1-1-2016-1116201-92)

출원인명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4)

발명자성명 이재규 권선화 정동민 정은주

발명의명칭 아로니아씨오일과 아로니아추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 피부개선용 화장료 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행사항은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통행된 납입영수증에 병영, 납부지번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 - * 납부지번호 : 0131(기흥우체국) - 국수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객지원 정보변경(경정), 정정신고서]을 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 - * 특허료(parent go.kr) 검색 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 통특결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 - * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허/마당-PCT/마드리드>
 - * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 - * 미국특허상표청의 선출원을 기점으로 우리나라에 우선권주장할 수 시, 선출원이 미국개상재이던 우선권일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자표고환허가서(PTO-SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 - * 특허출원 10-2010-0000000, 상표특허출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 공개하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통행된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/isp/kiponet/ir/receipt/online/app/NoOffr.Act.so> 2016-11-16

(특허출원) 항염효과를 갖는 분무건조한 아로니아 분말 및 그 제조방법(출원번호 : 10-2016-0152355, 출원일자 : 2016. 11. 16)

(특허출원)아로니아씨오일과 아로니아추출물을 유효성분으로 함유하는 여드름 피부개선용 화장료 조성물(출원번호 : 10-2016-0152323, 출원일자 : 2016. 11. 16)

Screening study of herbal resources (Chokeberry, Citrus peel, Gac, Japanese alder, Gobjiberry, Chinese mulberry) for benign prostatic hyperplasia in rats

Na-Hyun Kim¹, Jeong-Doo Heo¹, Kwang-Hyun Hwang¹, Je-Hein Kim¹, Eun-Ju Jeong²

¹Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Korea Institute of Toxicology (KIT), Jinju, Gyeongsangnam-do, Republic of Korea
²Gyeongnam National University of Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Jinju 660-758, Republic of Korea

1. Introduction

The target of the study is ethanol or crude extracts from herbal resources: *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), *Citri Unshiu Pericarpium* (Citrus peel), *Momordica cochinchinensis* (Gac), *Alnus japonica* (Japanese alder), *Lycium chinense* (Gobjiberry), *Morus australis* (Chinese mulberry), which were not yet studied for its beneficial effects against benign prostatic hyperplasia (BPH). In this study, these were treated orally in benign prostatic hyperplasia (BPH) rats.

2. Materials & Methods

For in vivo experiments, 8-week old male SPF wistar rats were purchased (n=60). All animals were castrated, then randomly divided into 10 groups (SH, sham control, VC, vehicle control, PC1; Saw palmetto extract, PC2; 1% Finasteride in peanut oil, T1; Chokeberry, T2; Citrus peel, T3; Gac, T4; Japanese alder, T5; Gobjiberry, T6; Chinese mulberry). After a week of recovery phase, 200mg/kg of the test materials were orally administered once-a-day for 6 weeks as well as subcutaneous injection of 3mg/kg testosterone. Prostate glands were collected and measured at necropsy for calculating the Prostate Index. Blood serum chemistry and ELISA were also performed.

3. Results

According to the statistical analysis of Prostate Index and tissue 5- α reductase measurement, Finasteride treated group was the most effective among all test groups. Chokeberry, Gac, Japanese alder, Gobjiberry and Chinese mulberry were also showed statistically significant results, but Citrus peel was not. Saw palmetto extract treatment could not contribute to any meaningful effects. Blood serum chemistry results were variable, it was performed for screening the clinical abnormality, but all major parameters were in the normal range. Histopathologically, VC and saw palmetto treated group were showed thickened connective tissue and increased cellularity than sham control group. Other treatment groups showed decreased epithelial hyperplasia, although minor differences between the groups.

4. Conclusion

In this study, it was somewhat insufficient result since many parameters were statistically unclear. However, this screening study demonstrated that several natural products have a certain possibility of lowering the risk of BPH.

5. Reference

Sin H, Lee SY et al. (2012) Inhibitory effect of *Andropogon squarrosus*, a traditional herbal medicine against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 12:84
 Kim HK, Park H et al. (2015) Inhibitory effect of curcumin on testosterone induced benign prostatic hyperplasia in rat. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 15:300
 Kallig KE, Reed HM. (2005) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the diuretic, cardioprotective and potential health effects. *Phytotherapy Research* 19: 1025-34.

1. Prostate Index

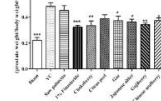


Fig 1. Prostate Index: statistically, sham control showed the best PI value than all other testosterone-induced BPH groups. 1% Finasteride treated group showed the next best results. Chokeberry and Gobjiberry extract treatment administered better effects among the test materials. PI of citrus peel extract treated group were not statistically significant.

2. 5- α reductase analysis

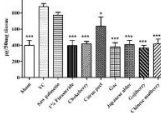


Fig 2. ELISA results from prostate tissue of testosterone-induced BPH Wistar rats. Prostatic SAR level was significantly decrease in all treatment groups. 1% Finasteride, chokeberry, Gac, Japanese alder, Gobjiberry and Chinese mulberry showed lower p values than citrus peel which were not showed significance in PI Index. SAR level of Saw palmetto treated group was not different from that of VC group.

3. Serum chemistry

Group	TC	LDL-C	HDL-C	LDL-C/HDL-C	TC/HDL-C	LDL-C/TC	TC/HDL-C	LDL-C/HDL-C	TC/HDL-C	LDL-C/HDL-C
SH	148.21±12.34	78.56±5.21	25.43±1.12	3.09±0.15	5.83±0.21	0.17±0.01	148.21±12.34	78.56±5.21	25.43±1.12	3.09±0.15
VC	152.34±15.67	82.12±6.34	26.78±1.23	3.07±0.14	5.82±0.20	0.17±0.01	152.34±15.67	82.12±6.34	26.78±1.23	3.07±0.14
PC1	145.67±11.23	75.43±4.56	24.56±1.08	3.07±0.14	5.82±0.20	0.17±0.01	145.67±11.23	75.43±4.56	24.56±1.08	3.07±0.14
PC2	149.87±13.45	79.67±5.67	25.89±1.15	3.08±0.15	5.83±0.21	0.17±0.01	149.87±13.45	79.67±5.67	25.89±1.15	3.08±0.15
T1	142.34±10.56	73.21±4.32	24.12±1.05	3.08±0.15	5.83±0.21	0.17±0.01	142.34±10.56	73.21±4.32	24.12±1.05	3.08±0.15
T2	146.78±12.12	76.54±5.12	25.23±1.10	3.07±0.14	5.82±0.20	0.17±0.01	146.78±12.12	76.54±5.12	25.23±1.10	3.07±0.14
T3	143.56±11.45	74.87±4.78	24.67±1.09	3.08±0.15	5.83±0.21	0.17±0.01	143.56±11.45	74.87±4.78	24.67±1.09	3.08±0.15
T4	147.89±13.12	78.90±5.45	25.67±1.13	3.07±0.14	5.82±0.20	0.17±0.01	147.89±13.12	78.90±5.45	25.67±1.13	3.07±0.14
T5	144.23±11.78	75.12±4.67	24.89±1.10	3.08±0.15	5.83±0.21	0.17±0.01	144.23±11.78	75.12±4.67	24.89±1.10	3.08±0.15
T6	146.12±12.56	77.45±5.23	25.34±1.11	3.07±0.14	5.82±0.20	0.17±0.01	146.12±12.56	77.45±5.23	25.34±1.11	3.07±0.14

4. Histopathology

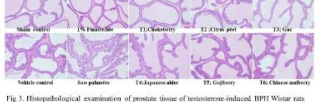


Fig 3. Histopathological examination of prostate tissue of testosterone-induced BPH Wistar rats.

Materials and Methods

A549 cells were seeded at a density of 1.0×10^4 cells onto 12-well plates and incubated at 37°C for 24 h. The A549 cells were pretreated with resveratrol at concentrations of 0, 12.5, 25, 50 μ M following 12 h then recombinant TRAIL protein (100ng/ml) was treated and co-incubated for additional 2 h. Additionally, cells were pretreated with chloroquine (20 μ M) for 1 h, followed by candesartan treatment. Cell morphology was analyzed by taking photographs under an inverted microscope (Nikon, Japan). Cell viability was determined by the crystal violet staining method, MTT and LDH assay. The activity of Autophagy marker LC3, P62 and antiapoptotic, proapoptotic, apoptotic cascade was evaluated by immunoblotting, immunocytochemistry analysis. MTP was measured by the spectrophotometer and nuclear-cytosol fractionation kit used for translocation test.

Results: The present study we showed the p63-independent activation of apoptosis by decrease the expression of phosphorylated Akt-mediated suppression of NF- κ B activation that is also substantiated with the downregulation of anti-apoptotic factors Bcl-2 and Bcl-x1 in human lung adenocarcinoma cells, resulting in an attenuation of TRAIL resistance in combined treatment. Furthermore, apoptosis was induced in TRAIL-resistant lung cancer cells via a co-treatment of resveratrol and TRAIL, which was assessed by the loss of mitochondrial membrane potential, resulting in the translocation of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol due to mitochondrial dysfunction and finally the caspase activation. Furthermore, resveratrol enhances LC3-II processing and lysosomal degradation indicated by p62 downregulation confirmed the autophagy flux activation. Moreover, autophagy flux was not affected by resveratrol-induced TRAIL-mediated apoptosis of lung cancer cells.

Conclusions: Overall, targeting the NF- κ B pathway by resveratrol attenuates TRAIL resistance and induces TRAIL-mediated apoptosis which would be the eminent therapeutic strategy against lung cancer.

[1] Zhang L and Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy*. 2005;12(3):228-237.
 [2] Trautwein A, Wermann H, Aht A, Schutts S, Schafer H, Oestern S, Roder C, Ugeghroen H, Lampe E, Heinrich M, Walczak Hand Kalthoff H. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C δ and NF- κ B contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2001; 20(31):4258-4269.
 [3] Maiuri MC, Zalickar E, Kimchi A and Kroemer G. Self-eating and self-killing: cross-talk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8(8):741-752.

Screening study of herbal resources (Chokeberry, Citrus peel, Gac, Japanese alder, Gobjiberry, Chinese mulberry) for benign prostatic hyperplasia in rats

Na-Hyun Kim¹, Jeong-Doo Heo¹, Kwang-Hyun Hwang¹, Je-Hein Kim¹, Eun-Ju Jeong²

¹Gyeongnam Department of Environmental Toxicology and Chemistry, Korea Institute of Toxicology (KIT), Jinju, Gyeongsangnam-do, Republic of Korea; ²Gyeongnam National University of Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Jinju 660-758, Republic of Korea

Introduction: The target of the study is ethanol or crude extracts from herbal resources: *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), *Citri Unshiu Pericarpium* (Citrus peel), *Momordica cochinchinensis* (Gac), *Alnus japonica* (Japanese alder), *Lycium chinense* (Gobjiberry), *Morus australis* (Chinese mulberry), which were not yet studied for its beneficial effects against benign prostatic hyperplasia (BPH). In this study, these were treated orally in benign prostatic hyperplasia (BPH) rats.

Materials and Methods: For in vivo experiments, 8-week old male SPF wistar rats were purchased (n=60). All animals were castrated, then randomly divided into 10 groups (SH; sham control, VC; vehicle control, PC1; Saw palmetto extract, PC2; 1% Finasteride in peanut oil, T1; Chokeberry, T2; Citrus peel, T3; Gac, T4; Japanese alder, T5; Gobjiberry, T6; Chinese mulberry). After a week of recovery phase, 200mg/kg of the test materials were orally administered once-a-day for 6 weeks as well as subcutaneous injection of 3mg/kg testosterone. Prostate glands were collected and measured at necropsy for calculating the Prostate Index. Blood serum chemistry and ELISA were also performed.

Results: According to the statistical analysis of Prostate Index and tissue 5- α reductase measurement, Finasteride treated group was the most effective among all test groups. Chokeberry, Gac, Japanese alder, Gobjiberry and Chinese mulberry were also showed statistically significant results, but Citrus peel was not. Saw palmetto extract treatment could not contribute to any meaningful effects. Blood serum chemistry results were variable.

Conclusions: In this study, it was somewhat insufficient result since many parameters were statistically unclear. However, this screening study demonstrated that several natural products have a certain possibility of lowering the risk of BPH.

국내학술대회 발표 : 대한수의학회 (2017)

특허출원

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.08.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2017-0110301 (접수번호 1-1-2017-0842392-88)
 출원인명칭 경남과학기술대학교 산학협력단(2-2004-022883-1) 외 1명
 대리인성명 유지영(9-2007-001663-4)
 발명자성명 정은주 허정두 김나현
 발명의명칭 신규추출물 및 그 용도



특허청장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행사항은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원일 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등방된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기라곡드) = 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로 > 특허법 시행규칙 별지 5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 미드린드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으려 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 출원내 http://www.kipo.go.kr/특허/특허/특허-PCT/미드린드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허청의 실용신안 제도(미국 내)에 우선권 주장할 시, 출원인이 인정받아야 하며, 우선권으로부터 일정기간 이내에 미국특허청에 [미국특허청용] [특허고려번호]가시(PTO/SB-359)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사항을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 등방된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

신규추출물 및 그 용도 (출원번호 : 10-2017-0110301)

□ 인력양성 실적

<p>계 2017-9945 호</p> <p style="text-align: center;">학 위 수 여 예 정 증 명 서</p> <p>성 명 : 김윤나 생 년 월 일 : 1994년 2월 28일 대 학 원 : 대학원(석사학위과정) 학 (전공) 과 : 식물자원학과(농학) 학위수여예정일 : 2017년 08월 22일</p> <p style="text-align: center;">위의 사실을 증명합니다.</p> <p style="text-align: center;">2017년 11월 10일</p> <p style="text-align: center;">경남과학기술대학교 총장</p> <p style="text-align: right;"></p> <p style="font-size: small;">WD12R20171110184430228</p>	<p>계 2017-9944 호</p> <p style="text-align: center;">학 위 수 여 예 정 증 명 서</p> <p>성 명 : 이재순 생 년 월 일 : 1993년 1월 8일 대 학 원 : 대학원(석사학위과정) 학 (전공) 과 : 식물자원학과(농학) 학위수여예정일 : 2017년 08월 22일</p> <p style="text-align: center;">위의 사실을 증명합니다.</p> <p style="text-align: center;">2017년 11월 10일</p> <p style="text-align: center;">경남과학기술대학교 총장</p> <p style="text-align: right;"></p> <p style="font-size: small;">WD12R201711101826400188</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

□ 사업화 실적

농업회사법인 주식회사 삼흥에서는 삼흥식품(대표자동일)에 기술이전하여 제품을 출시하였으며, 2017년 총매출은 2억원(2017년 10월까지)을 달성하였으며, 개발제품(아로니아 제품, 아로니아 발효액)으로는 약 5,500만원을 달성함.



상품화한 제품사진(물에녹는 아로니아 : 액상발효분말제품)


농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	아로니아의 전엽전 비대중 혁방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발				
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼흥	참여기관	경남과학기술대학교, 안전성평가연구소		
책임자	정동민	연구기간	2018년 07월 ~ 2018년 12월 (총 30개월)		
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000	총계	650,000
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	삼흥식품		
기술료	없음	기술실시일	2017.04.01		
구분	기술실시업체 결산액 (년와 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적		
실적	자산 총계	688	제품건수	1	
	자본 총계	682			
	부채 총계	5	기술개발성립률 매출액	55	
	매출액 총계	239(2016), 200(2017.10)			




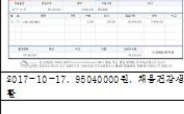
제품별 실적

구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
1	몸에 좋은 아로니아		2017. 7. 7	125	44%	국내산	없음

2017년 11월 08일

연구책임자: 정동민 (서명  인)

* 첨부: 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

		
2017-07-25, 1000만원, 농업회사법인 (주)바논산물애프린트	2017-07-31, 1460800원, 호성농산	2017-07-31, 3300000원, 거창정림아로니아
		
2017-08-01, 30,144,740원, 호성농산	2017-08-01, 569800원, 농업회사법인 (주)바논산물애프린트	2017-08-01, 11,000,000원, 가나농원
		
2017-08-11, 704000원, 노닐린달	2017-08-18, 785400원, 함양농협가우시업소	2017-08-20, 2400000원, (주)비출인연비
		
2017-08-21, 850000원, 가나농원	2017-08-28, 1100000원, 후곡아로니아농장	2017-08-28, 3300000원, 거창정림아로니아
		
2017-08-28, 1650000원, 호성농산	2017-08-28, 804400원, 무명장수	2017-10-17, 95040000원, 새우군단농산물
	총 125,075,400원 중 ~5,500만원	

3. 3차년도

□ SCI 논문 및 비SCI 논문

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 21(1) 2018, 1113-1119
 © Mary Ann Liebert, Inc., and Korean Society of Food Science and Nutrition
 DOI: 10.1089/jmf.2017.0143

Antibesity Effect of Fermented Chokeberry Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice

Na-Hyun Kim^{1,8}, Jonghwan Jegal^{2,8}, Yun Na Kim³, Dong-Min Chung⁴, Jeong-Doo Heo¹, Jung-Rae Rho⁵, Min Hye Yang⁶, and Eun Ju Jeong⁷

¹Gyeongnam Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, Munam-eup, Korea; ²College of Pharmacy, Pusan National University, Busan, Korea; ³Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju, Korea; ⁴Sunhaeng Agricultural Co., Ltd., Gyeongsang, Korea; ⁵Department of Oceanography, Kunsan National University, Kunsan, Korea;

ABSTRACT Black-fruited chokeberries (*Aronia melanocarpa*), growing mainly in the Central and Eastern European countries, have health benefits due to the high concentrations of polyphenolic compounds. However, a strong bitter taste of chokeberries limits its usage as functional food. We hypothesized that the fermented *A. melanocarpa* with a reduced bitter taste would improve insulin sensitivity and/or ameliorate weight gain induced by high-fat diet (HFD) in male C57BL/6J mice. The mice were administered with HFD together with the 100 mg/kg of natural *A. melanocarpa* (T1) or the fermented *A. melanocarpa* (T2) for 8 weeks. The treatment with T2 (100 mg/kg body weight, p.o.) markedly attenuated the weight gain and the increase in serum triglyceride level induced by HFD. The T2-treated group had better glucose tolerance and higher insulin sensitivity as measured by oral glucose tolerance test and intraperitoneal insulin tolerance test in comparison to the T1-treated group. Physicochemical analysis revealed that the main constituents of T2 were cyanidin-3-*o*-glucoside and 1-*o*,4-dihydroxycyanidin-3-*o*-glucoside, and the content of cyanidin glycosides (3-*o*-glucoside, 3-*o*-xyloside) was significantly reduced during the fermentation process. From the above results, we postulated that antioesity effect of black chokeberry was not closely correlated with the cyanidin content. Fermented chokeberry might be a viable dietary supplement rich in bioactive compounds useful in preventing obesity.

KEYWORDS: *aronia berries* • fermentation • high-fat diet-induced obesity • glucose intolerance • insulin resistance • physicochemical analysis

INTRODUCTION
 THE EPIDEMIC OF OBESITY has become a serious public health problem, without an effective therapeutic solution.¹ Obesity is characterized by a pronounced accumulation of body fat and may be associated with enhanced lipid consumption.² Patients with overweight and obesity are much more likely to have an increased prevalence of diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases.^{3,4} Furthermore, obesity is a strong causal factor for sleep breathing disorders such as sleep apnea and sleep disruption, which contributes to the increased cardiovascular mortality.⁵ The potential of natural product-derived compounds for the treatment of obesity have attracted researchers' attentions as sources of safe and effective antiobesity drugs.⁶ Numerous studies have shown that plant-derived extracts, compounds, and phytochemical combinations can improve the symptoms associated with obesity.^{7,8} Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, Rosaceae) is mainly distributed in eastern North America and East Canada.^{9,10} Health benefits of *A. melanocarpa* fruits are well-known since it is rich source of polyphenols such as anthocyanins and cyanidin glycosides.^{10,11} Current knowledge presents black chokeberry as a medicinal plant with diverse biological activities such as anti-inflammatory, gastroprotective, and hepatoprotective properties.¹²⁻¹⁴ *Aronia* plants have been routinely and traditionally used for the treatment of metabolic diseases and *Aronia* fruit juice has recently been of interest for their hypolipidemic effects.^{15,16} Nevertheless, there is little scientific research to discover the beneficial effects of fermented *Aronia* berries in the treatment of obesity.

1113

nutrients

Article
Chokeberry Extract and Its Active Polyphenols Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Modulates Fat Accumulation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice

Na-Hyun Kim^{1,†}, Jonghwan Jegal^{2,†}, Yun Na Kim^{3,†}, Jeong-Doo Heo¹, Jung-Rae Rho⁵, Min Hye Yang⁶, and Eun Ju Jeong^{7,†}

¹ Gyeongnam Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munam-eup 52834, Korea; rkhkim@kitox.ac.kr (J.-D.H.); jhwook@kitox.ac.kr (J.-D.H.); ² College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46244, Korea; jhjeong@pusan.ac.kr; ³ Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea; sldkshk@gnst.ac.kr; ⁴ Department of Oceanography, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea; jrho@kunsan.ac.kr; ⁵ Correspondence: minhyang@pusan.ac.kr (M.H.Y.); ejeong@gnst.ac.kr (E.J.J.); Tel.: +82-51-510-5811 (M.H.Y.); +82-55-751-3224 (E.J.J.); Fax: +82-51-513-6754 (M.H.Y.); +82-55-751-3229 (E.J.J.); ⁶ These authors contributed equally to this work.

Received: 5 October 2018; Accepted: 6 November 2018; Published: 12 November 2018

Abstract: Berries of *Aronia melanocarpa* (chokeberry) are known to be a rich source of biologically active polyphenols. In the present study, the effects of seven anti-adipogenic polyphenolic phytochemicals isolated from *A. melanocarpa* methanol extract on adipogenic transcription factors were investigated. Arnygalin and prunasin were found to inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation by suppressing the expressions of PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α), SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1), FAS (fatty acid synthase), and aP2 (adipocyte fatty-acid-binding protein). *A. melanocarpa* extract-treated (100 or 200 mg/kg/day) on body weighty high-fat diet (HFD)-induced obese mice showed significant decreases in body weight, serum triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels and improved insulin sensitivity as compared with HFD controls. This research shows *A. melanocarpa* extract is potentially beneficial for the suppression of HFD-induced obesity.

Keywords: *Aronia melanocarpa*; polyphenols; anti-adipogenesis; adipogenic transcription factor; diet-induced obesity; insulin resistance

1. Introduction
 Obesity is a chronic, relapsing, and multifactorial disorder with wide-ranging causes [1,2], and in Asian men is defined as a body mass index (BMI) of ≥ 30 kg/m² [3]. Obesity is also known to be associated with diverse comorbidities including cardiovascular diseases, dyslipidemia, and type 2 diabetes [4]. Today obesity has reached epidemic proportions, and thus, has become a major global public health problem. The condition is the result of the excessive accumulation of adipocytes, which store and regulate energy in the form of triglycerides or free fatty acids [5]. Adipocyte growth occurs due to hypertrophy (an increase in cell size) and hyperplasia (an increase in cell numbers) [6], and white adipose tissue acts as a major endocrine organ by secreting protein signals and factors called adipokines [7]. Although the precise mechanism has not been delineated, it is generally held that the pathogenesis of complications related to obesity involve abnormal adipokine production by adipocytes [8].

Nutrients 2018, 10, 1734; doi:10.3390/nut10111734

□ 학회활동

The extract of *Aronia melanocarpa* and its active polyphenols suppressed adipogenesis in 3T3-L1 and modulated fat accumulation and insulin resistance in high fat diet-induced obese mice

Na-Hyun Kim¹, Jonghwan Jegal², Yun Na Kim³, Jeong-Doo Heo¹, Min Hye Yang⁶, and Eun Ju Jeong⁷

¹Gyeongnam Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munam-eup 52834, Korea; ²College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46244, South Korea; ³Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

The 49th Annual Meeting and Symposium of the Korean Society of Pharmacognosy / The 10th KSP-ISP-CSP Joint Symposium

Experiment Design

1. Preparation of Aronia extract for in vivo experiment
 The juice of Aronia (*A. melanocarpa*) fruits were obtained by green extraction. Mean while, the solid (CAF 80%) were in acetone juice was 2.81 ± 1.52%. The compound extract was freeze-dried and weighed, followed by dissolved in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC).

2. Animals and Treatment
 Male C57BL/6J mice, 6 weeks old. Administration of normal diet containing 18% fat (D1) (0.85 kcal/g) or a high-fat diet containing 30% fat (D2) (1.24 kcal/g) for 8 weeks. The compound extract was administered orally (p.o.) at a dose of 100 or 200 mg/kg twice a day. Positive control: 100 mg/kg of Orlistat (Zeneca, Beecham Pharmaceuticals).

3. Inhibition of the mRNA expressions of PPAR- γ (A), SREBP1c (B), C/EBP α (C), FAS (D), LPL (E), and aP2 (F) by compounds 1-7 in differentiated 3T3-L1 cells.

Key Results

Effects of *A. melanocarpa* extract on body weights (a) and peritoneal and perigonadal fat masses (b) of mice fed a HFD for 8 weeks

The average food consumption per animal in each treatment group during 8 weeks. The amount of food consumption was not significantly different between the groups.

Effects of *A. melanocarpa* extract on serum lipid levels in HFD-induced obese mice

Effects of *A. melanocarpa* extract on OMT and the respective AOC (a) and PFTT and the respective AOC (b)

Inhibition of the mRNA expressions of PPAR- γ (A), SREBP1c (B), C/EBP α (C), FAS (D), LPL (E), and aP2 (F) by compounds 1-7 in differentiated 3T3-L1 cells.

Inhibition of the mRNA expressions of PPAR- γ (A), SREBP1c (B), C/EBP α (C), FAS (D), LPL (E), and aP2 (F) by compounds 1-7 in differentiated 3T3-L1 cells.

Relative phenolic compositions of the four *A. melanocarpa* extracts (T1-T4) as determined by LC-MS

1. This work was supported by the grants from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (KPFET) through the High Value-added Food Technology Development Program (119918-02) funded by the Korean Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA).

The Comparison of Phytochemicals and Protective Effects of *Aronia melanocarpa* Prepared under Different Extract Conditions in Testosterone Propionate-Induced Prostatic Hyperplasia in Mice

Na-Hyun Kim¹, Jonghwan Jegal², Yun Na Kim³, Jeong-Doo Heo¹, Min Hye Yang⁶, and Eun Ju Jeong⁷

¹Gyeongnam Department of Environment & Toxicology, Korea Institute of Toxicology, 17 Jegok-gil, Munam-eup 52834, Korea; ²College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46244, South Korea; ³Department of Agronomy and Medicinal Plant Resources, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, South Korea

The 49th Annual Meeting and Symposium of the Korean Society of Pharmacognosy / The 10th KSP-ISP-CSP Joint Symposium

Introduction

Benign prostatic hyperplasia (BPH)
 Prostatic gland enlargement is observed in BPH. Common signs and symptoms of BPH are increased urinary frequency, decreased frequency of urination at night (nocturia), weak urine stream or a stream that stops and starts, dribbling at the end of urination, inability to completely empty the bladder.

5 α -Reductase enzyme in BPH
 5 α -Reductase catalyzes the conversion of testosterone to an active androgen, dihydrotestosterone (DHT). DHT binds to androgen receptors and shows various hormonal actions. An excessive accumulation of dihydrotestosterone is recognized as leading to male pattern baldness and BPH.

Experiment Design

1. The extraction of *A. melanocarpa* fruits
 Accelerated solvent extraction (ASE) using a BUCHI Speed Extractor E-205. *Aronia* berries were freeze dried for 5 days and cut into small pieces. Extraction conditions: extraction temperature (50 or 100°C), solvent (50% or 100% acetone), one extraction cycle, hold time (10 min), and extraction pressure (120 bar).

2. Animals and Treatment
 Male Wistar rats, 8 weeks old. To exclude the influence of testosterone, rats were castrated by removing testes and epididymis. *A. melanocarpa* extract (T1-T4) dissolved in 0.5% CMC was orally administered (p.o.) at a dose of 100 mg/kg twice a day. Positive control: Saw palmetto (100 mg/kg b.w.) once a day.

3. Serum biochemistry data at necropsy for all experimental groups of rats

Effects of orally administered *A. melanocarpa* extracts (T1-T4) on androgen receptor (AR), prostatic specific antigen (PSA), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expressions in the prostatic tissue of testosterone propionate-treated Wistar rats.

Effects of the four *A. melanocarpa* extracts (T1-T4) on androgen receptor (AR), prostatic specific antigen (PSA), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expressions in the prostatic tissue of testosterone propionate-treated Wistar rats.

Relative phenolic compositions of the four *A. melanocarpa* extracts (T1-T4) as determined by LC-MS

1. This work was supported by the grants from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (KPFET) through the High Value-added Food Technology Development Program (119918-02) funded by the Korean Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA).

□ 특허출원

<p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.12.31 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2018-0173249 (접수번호 1-1-2018-1321162-21) 출원인명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4) 발명자성명 이재규 권선화 발명의명칭 아로니아 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증 예방 및 개선 조성물 및 그 제조방법</p> <p>특허청장</p> <p><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식</p> <p>4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</p> <p>5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장할 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적공관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p> <p>6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 과태료에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.</p> </div>	<p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> <p>출원일자 2018.12.29 특기사항 출원번호 40-2018-0183565 (접수번호 1-1-2018-1320844-83) 출원인명칭 농업회사법인 주식회사 삼흥(1-2016-024581-4)</p> <p>특허청장</p> <p><< 안내 >></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.</p> <p>2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호</p> <p>3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식</p> <p>4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.</p> <p>5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. ※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표디자인은 6개월 이내 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장할 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적공관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.</p> <p>6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 과태료에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.</p> </div>
<p>아로니아 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 비대증 예방 및 개선 조성물 및 그 제조방법(10-2018-0173249)</p>	<p>프로스타플러스 상표출원 (40-2018-0183565)</p>

□ 사업화 실적

농업회사법인 주식회사 삼흥에서는 삼흥식품(대표자동일)에 기술이전하여 제품을 출시하였으며, 2018년 총매출은 227,505,800원(2018년 12월까지)을 달성하였으며, 참여기업인 농업회사법인 (주)하늘선물에프엔비에서는 2017년과 2018년 기술개발성과매출액은 87,035,219(원)을 달성하였음.





상품화한 제품사진(물에녹는 아로니아 : 액상발효분말제품)



물에 녹는 우리땅 아로니아발효SD분말(SD분말, 숙성아로니아분말)

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	아로니아의 전엽전 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 글리신)의 개발						
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼총	참여기관	경남과학기술대학교, 안전성평가연구소				
책임자	권선화	연구기간	2016년 07월 ~ 2018년 12월 (총 30개월)				
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000	총계	650,000		
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	삼총식품				
기술료	없음	기술실시일	2017.04.01				
구분	기술실시 업체 결산액 (과외 백만원) + 최근연도 결산보고서에 의해 작성						
실적	자산 총계	688	재용건수	2			
	자본 총계	682	기술개발비	227,505,800원			
	부채 총계	5	기술개발비	227,505,800원			
	매출액 총계	2018	매출액	227,505,800원			
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
2018	플에 늬는 아로니아		2017. 7	73,505,800	44%	국내산	없음
2018	플에늬는 우리당 아로니아발효SD분말(SD분말 숙성아로니아분말)		2017.6 (정산 9월)	154,000,000	100%	국내산	없음

2018년 12월 31일

연구책임자 : 권선화 (서명) (인)

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

		
2018.01.18 거창청정아로니아 7,000,000	2018.01.20 노벨면탈 484,000	2018.01.21 초레볼아로니아발효농축액 영농조합법인 1,100,000
		
2018.03.14 호정농산 499,000	2018.03.20 호국아로니아농장 1,100,000	2018.03.23 거창청정아로니아 8,894,000
		
2018.03.30 보령장소 774,400	2018.04.06 호정농산 499,000	2018.04.18 덕리비인 280,000
		
2018.04.30 초레볼아로니아발효농축액 영농조합법인 1,100,000	2018.06.25 호정농산 815,000	2018.06.14 호정농산 842,000
		
2018.09.28 다자연농업회사법인(주) 770,000	2018.06.29 보령장소 388,200	2018.09.30 호연물류 284,000
		
2018.09.14 주희회사 에이레스물 2,288,800	2018.08.29 증강코스 2,408,700	2018.08.29 농업회사법인(주)하늘밭미래 154,000,000
		

		
2018.09.08 호요면부소 11,000,000	2018.09.14 영진정보통신 835,800	2018.09.14 년말상자 1,280,000
		
2018.09.14 주희회사 진호개발 2,840,000	2018.09.18 청정아로니아 178,000	2018.09.19 호정농산 800,000
		
2018.09.21 (주)태정테크 880,000	2018.09.28 삼미 5,028,000	2018.09.30 보령장소 388,000
		
2018.10.01 호국아로니아농장 890,000	2018.10.16 노벨면탈 435,600	2018.10.28 호정농산 415,600
		
2018.11.08 한울농산물 11,000,000	2018.11.15 호정농산 288,800	2018.11.14 청정아로니아 88,000
		
2018.12.08 풀바위농장 14,800,000	2018.12.28 보령장소 408,100	2018.12.21 보령장소 588,400
		
2018년 매출 총합계 227,505,800		

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 글리츠)의 개발						
주관연구기관	농업회사법인 주식회사 삼흥	참여기관	경남과학기술대학교, 안원생명가연구소				
책임자	권선화	연구기간	2016년 07월 ~ 2018년 12월 (총 30개월)				
정부출연금	520,000	기업부담금	13,000				
기술이전명	아로니아발효기술 및 발효+스프레이드라이 기술	기술실시대상기관	농업회사법인 (주)하늘선물예프렌비				
기술료	없음	기술실시일	2017.06.01				
구분	기술실기 업체 결산액 (단위: 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성						
실적	자산 총계	275	제품건수	1			
	자본 총계	95	기술개발비용	87,005,219(원)			
	부채 총계	5	매출액				
	매출액 총계	133,381,794(원)					
제품별 실적							
구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부
2017	플레이닝은 우리당 아로니아 발효SD분말		2017.8 (생산6월)	82,806,424	100%	국내산	없음
2018	플레이닝은 우리당 아로니아 발효SD분말		2017.8 (생산6월)	4,729,786	100%	국내산	없음

2018년 12월 31일

연구책임자 : 권선화 (서명인)

* 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등)

20170701_고(매)호_4724125	20170713_고(매)호_17029440	20170719_고(매)호_2740085
20170808_고(매)호_8828300	20170810_고(매)호_918445	20170828_고(매)호_4128358
20170831_고(매)호_8299800	20170904_고(매)호_2000000	20171016_고(매)호_4799800
20171018_고(매)호_8288180	20171027_고(매)호_2800000	20171118_고(매)호_8144108
2017년 매출 총합계 82,806,424		
20180828_송서기침_2894548	20181210_고(매)호_1778280	
2018년 매출 총합계 4,729,786		

제3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

제4장 연구결과의 활용 계획 등

- 건강기능성, 고품질 아로니아 제품의 양산
- 관광 상품용 아로니아 가공 제품으로의 마케팅 추진할 예정임.
- 소비자의 마인드를 읽어낼 수 있는 차별화된 제품과 concept으로 기능성 상품으로 개발
- 거창 지역 특성을 살려 관광단지내 매장판매용 제품으로 판로 확보 할 것임
- 대형유통업체, OEM, ODM 제품으로의 판로 확보
- 지역 특산물에 새로운 공정을 도입하여 신규 가공 제품을 개발할 수 있음
- 신개념 아로니아 가공 제품을 개발하여 참여기업의 지식재산권 확보와 논문 게재를 통한 제품의 우위성 부여 및 홍보에 활용
- 기능성 제품의 산업적 활용 기술을 참여기업에 이전·상품화하여 전통적인 아로니아 가공 제품 이외에 생산제품의 다양화로 기업의 수익 창출 및 발전에 활용
- 본 연구에 참여하는 학생들에게 산업적 제품개발의 기초지식을 부여하여 취업 시 산업체 현장에 적응력을 강화함
- 본 연구를 통해 얻은 모든 자료 (문헌조사, 보고서, 논문 등)는 건강기능식품 기능성 원료 신청을 위한 자료로 활용 예정임

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발 (영문)Aronia functional food (PROSTAR PLUS) development for prevention and improvement of benign prostatic hyperplasia				
주관연구기관	농업회사법인 (주)삼흥		주 관 연 구 책 임 자	(소속)농업회사법인 (주)삼흥	
참 여 기 업	농업회사법인 (주)삼흥 농업회사법인(주)하늘선물예프엔비			(성명)권선화	
총연구개발비 (650,000천원)	계	650,000	총 연구 기간	2016. 07. 07. - 2018. 12. 31.(2년6개월)	
	정부출연 연구개발비	520,000	총 참 여 연구 원 수	총 인원	14
	기업부담금	130,000		내부인원	14
	연구기관부담금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>최종 개발성과는 특허출원 4건, 특허등록 2건, 기술실시 2건, 제품화 3건, 매출액 7억, 고용창출 3건, 기술인증1건, SCI논문 4건, 비SCI논문 4건, 학술발표 6건, 인력양성 3건을 목표로 하고 있으며, 과제수행 중에는 특허출원 4건, 특허등록 2건, 기술실시 1건, 제품화 2건, 매출액 2억, 고용창출 1명, 기술인증 1건, SCI논문 2건, 비SCI논문 3건, 학술발표 4건, 인력양성 3건을 목표로 하였고, 최종 성과는 특허출원 6건, 기술실시2건, 제품화3건, 매출액 3억6천만원, 고용창출 2명, SCI 논문 4편, 학술발표 5건, 인력양성 3건, 홍보전시 2건의 성과를 도출하였음.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>아로니아 추출물의 원료 의 표준화 완료, 건강기능식품 소재 제조공정 표준화 완료, 아로니아 안토시아닌 함량확인완료, 안토시아닌 지표성분 정량 완료, 1차 시제품 제작, 전립선 비대증 효능을 가지는 복합소재 시제품개발 완료(꾸지뽕+아로니아 제품)함.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>본과제로 매출실적이 150%이상 이루어졌으며, 추후, 건강기능성, 고품질 아로니아 제품의 양산하고, 관광 상품용 아로니아 가공 제품으로의 마케팅 추진할 예정임.</p> <p>소비자의 마인드를 읽어낼 수 있는 차별화된 제품과 concept으로 대형유통업체, OEM, ODM 제품으로의 판로 확보할 것임.</p> <p>지역 특산물에 새로운 공정을 도입하여 신규 가공 제품을 개발할 수 있음</p>					

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호				
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	2016년도 고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	아로니아의 전립선 비대증 예방 및 개선 효능의 규명 및 기능성 식품 (프로스타 플러스)의 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	농업회사법인 주식회사 삼흥		연구책임자	권선화	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 07. 07 ~ 2016. 12. 31	170,000	42,500	212,500
	2차연도	2017. 01. 01 ~ 2016. 12. 31	170,000	42,500	212,500
	3차연도	2018. 01. 01 ~ 2016. 12. 31	180,000	45,000	225,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		520,000	130,000	650,000
참여기업	농업회사법인 주식회사 삼흥 농업회사법인 주식회사 하늘선물애프엔비				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
농업회사법인 주식회사 삼흥	기획본부장	권선화

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
-----------	--

1. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발결과는 SCI 논문을 4편 제출함으로써, 우수성을 입증함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 아로니아의 새로운 기능성 확보로 다양한 가공제품의 개발 가능함.
- 아로니아의 단순 가공 제품의 특허가 아닌 원천기술의 특허 획득을 통한 유사 제품에 대비한 시장 경쟁력 확보 및 수익 창출하였음.
- 신개념의 고품질 아로니아 가공 제품 개발을 통한 매출 증대하였음.
- 신기술 제품 개발 기술로 인한 주관연구기관의 이미지 향상 및 위상 제고하였으며, 협동연구기관의 연구 참여 학생들의 산업적 기초지식 함양 및 취업 경쟁력 강화
- 아로니아 발효기술 공정과 아로니아의 스프레이 건조 공정의 원천 기술 확보하였음.
- 아리노아 가공 제품 개발을 위한 생리활성 기능성 및 물성 측정 기술 확보
- 신규 가공 공정을 이용한 제품으로 지식재산권 확보를 통한 국내외 시장에서 우위 선점

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 전립선비대증에 효능을 가지는 아로니아복합 제품의 개발로 중소기업의 매출증대 및 아로니아 제품의 활성화할 것임.
- 고품질 아로니아 가공 제품의 개발을 통한 참여기업의 매출증대 및 성인병의 예방을 통한 국가 의료비 손실 감소와 국민건강의 활성화
- 아로니아 가공 업계의 활성화 및 새로운 품목의 산업적 활성화 효과 기대

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구수행을 통하여 특허출원 6건, 기술실시2건, 제품화3건, 매출액 3억6천만원, 고용창출 2명, SCI 논문 4편, 학술발표 5건, 인력양성 3건, 홍보전시 2건의 성과를 도출함으로써 성실수행하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구수행을 통하여 특허출원 6건, 기술실시2건, 제품화3건, 매출액 3억6천만원, 고용창출 2명, SCI 논문 4편, 학술발표 5건, 인력양성 3건, 홍보전시 2건의 성과를 도출함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
아로니아 추출물의 원료 및 건강기능식품 소재 제조공정 표준화	10	100	100여농가 이상의 확보로 아로니아 추출물의 원료확보를 하였으며, 건강기능식품 소재 제조공정 표준화함.
아로니아 추출물 제조 및 아로니아의 <i>in vitro</i> 전립선 비대 개선 효능 평가	10	100	가속용매추출장치를 이용한 추출 조건에 따라 아로니아 추출물의 제조 5a-reductase transfected LNCap cell을 이용한 아로니아 추출물 13종에 대한 DHT 생성 저해 활성 평가 완료
아로니아 추출물의 최종시료 선정을 위한 1차 <i>in vivo</i> 평가	10	100	<i>in vitro</i> 스크리닝으로 선별된 4종의 아로니아 추출물에서 최종 1종의 추출물이 가장 좋은 효능을 보임을 확인하였음.
아로니아 안토시아닌 함량확인 및 지표성분 정량 및 1차 시제품 제작	10	100	아로니아 안토시아닌 함량확인 및 지표성분 정량 및 1차 시제품 제작 하였음(물에 녹는 아로니아분말-삼홍식품).
아로니아로부터 기능성 성분의 분리 및 규명과 전립선비대 개선 기능성소재의 발굴	10	100	아로니아로부터 총 13종의 안토시아닌 및 페놀성 화합물 분리 및 구조규명 완료 분리한 화합물은 아로니아 추출물 분석을 위한 지표성분으로 활용
활성 분획물 및 기능성 화합물의 2차 <i>in vivo</i> 평가	10	100	1차년도에서 선정된 아로니아 추출물 및 공동연구기관에서 추가 선정한 진피, 계육, 오리나무, 구기자, 구지뽕 추출물을 한 실험에서 비교한 결과 구지뽕 추출물에서 가장 좋은 효능이 있음을 확인하였음.
아로니아 추출물의 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 2의 개발	10	100	아로니아 추출물의 전립선 비대증 효능을 가지는 시제품 2의 개발 (물에 녹는 우리땅 아로니아발효 SD분말-하늘선물에프엔비, 프로스타아로니아엑상분말-삼홍식품)
추출조건 최적화 및 기능성 복합물의 제조, 아로니아 추출물의 분석 조건 확립	10	100	실험계획법 중에서 Box-Behnken design을 이용하여 추출조건을 설정하고 가속용매추출장치를 이용하여 추출물 제조

			아로니아 추출물의 정성·정량분석을 위한 HPLC분석법 및 LC/MS 분석법 개발
아로니아 추출물의 전립선 비대증 완화 효능 기전 연구	10	100	전립선의 염증 억제 기전, 방광평활근의 수축 억제 기전 및 호르몬 작용 억제 기전에 대한 지표를 확인한 결과 염증과 관련하여서는 모든 시료에서 항염작용은 관찰되나 동물 모델에서는 염증 자체가 평가하지 어려웠으며 방광평활근 작용에는 구지뽕 추출물에서 효능이 있을 것으로 예상되었고 모든 시료에서 우수한 호르몬 작용 억제 기전을 확인하였음.
시제품의 사업화 전략수립 및 마케팅	10	100	물에 녹는 우리땅 아로니아발효 SD분말의 흡소핑 방송후 매출 발생
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구수행을 통하여 특허출원 6건, 기술실시2건, 제품화3건, 매출액 3억6천만원, 고용창출 2명, SCI 논문 4편, 학술발표 5건, 인력양성 3건, 홍보전시 2건의 성과를 도출함으로써 성실수행하였음이고 여겨짐.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해당없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 건강기능성, 고품질 아로니아 제품의 양산
- 관광 상품용 아로니아 가공 제품으로의 마케팅 추진할 예정임.
- 소비자의 마인드를 읽어낼 수 있는 차별화된 제품과 concept으로 기능성 상품으로 개발
- 거창 지역 특성을 살려 관광단지내 매장판매용 제품으로 판로 확보 할 것임
- 대형유통업체, OEM, ODM 제품으로의 판로 확보
- 지역 특산물에 새로운 공정을 도입하여 신규 가공 제품을 개발할 수 있음
- 신개념 아로니아 가공 제품을 개발하여 참여기업의 지식재산권 확보와 논문 게재를 통한 제품의 우위성 부여 및 홍보에 활용
- 기능성 제품의 산업적 활용 기술을 참여기업에 이전·상품화하여 전통적인 아로니아 가공 제품 이외에 생산제품의 다양화로 기업의 수익 창출 및 발전에 활용
- 본 연구에 참여하는 학생들에게 산업적 제품개발의 기초지식을 부여하여 취업 시 산업체 현장에 적응력을 강화함
- 본 연구를 통해 얻은 모든 자료 (문헌조사, 보고서, 논문 등)는 건강기능식품 기능성 원료 신청을 위한 자료로 활용 예정임

IV. 보안성 검토

해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

연구수행을 통하여 특허출원 6건, 기술실시2건, 제품화3건, 매출액 3억6천만원, 고용창출 2명, SCI 논문 4편, 학술발표 5건, 인력양성 3건, 홍보전시 2건의 성과를 도출함으로써 성실수행하였음.

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구수행을 통하여 특허출원 6건, 기술실시2건, 제품화3건, 매출액 3억6천만원, 고용창출 2명, SCI 논문 4편, 학술발표 5건, 인력양성 3건, 홍보전시 2건의 성과를 도출함으로써 성실수행하였음.

				만 원	만 원	만 원	만 원		만 원										
가중치																			
최종목표	4	2		1		2	200		3		1	2	3		4		3		
연간내 달성실적	6	0		2		3	369		2		0	4	0		5		3		2
달성율(%)	150	0		200		150	185		66.7		0	125	0		125		100		200

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	아로니아 복합발효기술
②	아로니아 발효복합물의 스프레이건조기술
③	
·	
·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①아로니아 복합발효기술							v			
②아로니아 발효복합물의 스프레이건조기술		v				v	v			
·										
·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	주관기관인 농업회사법인 주식회사 삼흥에서는 본 발효기술을 이용하여 뽕은맛을 감소시키는 아로니아제품으로 활용할 예정 아로니아발효기술은 뽕은맛을 감소시키려고 하는 아로니아 음료가공업체에 있어서 기대효과가 있음.
②의 기술	주관기관인 농업회사법인 주식회사 삼흥에서는 본 아로니아 발효복합물의 스프레이건조기술을 이용하여 제품화하였으며, 본 기술은 물에 잘 녹는 효과를 가지고 있기 때문에 아로니아분말 가공업체에 있어서 기대효과가 있음.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명					
가중치																			
최종목표	4	2		1		2	200		3		1	2	3		4		3		
연구기간내 달성실적	6	0		2		3	369		2		0	4	0		5		3		
연구종료 후 성과창출 계획	1						200						1						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	아로니아 복합발효기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2개월	실용화예상시기 ³⁾	2019년 8월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

핵심기술명 ¹⁾	아로니아 발효복합물의 스프레이건조기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2개월	실용화예상시기 ³⁾	2019년 8월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

<뒷면지>

주 의

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