

11-1543  
000-002  
161-01

발간등록번호

11-1543000-002161-01

농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)의 기능성 탐색 및 이를 활용한 기능성 소재 개발

최종보고서

2017

농림축산식품부

## 고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

농산부산물(미강, 대두박,  
참깨박)의 기능성 탐색 및  
이를 활용한 기능성 소재 개발

최종보고서

2018. 03. 26.

주관연구기관 / 강원대학교 산학협력단  
협동연구기관 / (주)에스티알바이오텍  
협동연구기관 / 아주대학교 산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)의 기능성 탐색 및 이를 활용한 기능성 소재 개발”(개발기간 : 2014.12.17 ~ 2017.12.16)과제의 최종보고서로 제출합니다

2018. 03. 26.

주관연구기관명 : 강원대학교 산학협력단	산학협력단장
제1협동연구기관명 : (주)에스티알바이오텍	팀장
제2협동연구기관명 : 아주대학교 산학협력단	산학협력단장



주관연구책임자 : 이옥환  
제1협동연구책임자 : 박선주  
제2협동기관책임자 : 남석현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.



### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	314076-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.12.17.~ 2017.12.16.	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	고부가가치식품기술사업			
	사 업 명				
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)의 기능성 탐색 및 이를 활용한 기능성 소재 개발			
연구책임자	해당단계 참 여 연구원 수	총: 21명 내부: 30명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원	
	총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 30명 내부: 30명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	강원대학교 산학협력단 (주)에스티알바이오텍 아주대학교 산학협력단				
위탁연구					
1. 농산부산물의 생물전환 조건 설정 및 소재화를 위한 생산공정 표준화 2. 생산공정 Scale-up 최적화 및 Validation 3. Poilot 규모에서의 시제품 생산 및 제품화 연구 4. 미강 유래 개발소재의 개별인정형 등록 소재로서의 신청을 위한 준비 및 사업화 5. 개발소재의 지표성분 설정 및 공정별 변화 관찰 6. 개발소재의 피부건강 관련 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 효능 평가 7. 개발소재의 면역 관련 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 효능 평가 9. 개발제품에 대한 시장 진입전략 수립				보고서 면수 672쪽	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)의 생물전환 조건 설정 및 소재화를 위한 생산공정 표준화</li> <li>○농산부산물 생물전환소재의 지표성분 설정 및 분석법 개발</li> <li>○<i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 모델을 이용한 전임상시험 단계에서 면역기능 증진, 뼈건강, 아토피 등 피부건강의 효능 평가와 작용기전 연구</li> <li>○지표성분을 기반으로 면역증진용 소재, 뼈건강용 소재, 아토피 등 피부건강용 소재의 유효섭취량 설정</li> <li>○면역증진용 소재의 독성시험[안전성 평가] 및 인체적용시험[유효성평가] 실시</li> <li>○각 개발소재 별 시제품 생산 및 상품화</li> </ul>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산부산물의 생물전환 조건 설정 및 생산공정 표준화</li> <li>○ 생산공정 scale-up 및 validation</li> <li>○ 대량 제품화 공정 확립</li> <li>○ 표준화된 미강 생물전환소재의 단회독성 평가</li> <li>○ 표준화된 미강 생물전환소재의 13주 반복 독성 평가</li> <li>○ 표준화된 미강 생물전환 소재의 인체적용시험 수행</li> <li>○ 미강, 대두박, 참깨박 생물전환 소재의 지표성분 설정 및 분석법 개발</li> <li>○ 미강, 대두박, 참깨박 시제품의 지표성분 변화 조사</li> <li>○ 공정별 미강, 대두박, 참깨박 소재의 지표성분 변화 조사</li> <li>○ 미강, 대두박, 참깨박 소재의 피부건강 관련 <i>in vitro</i> 효능 평가</li> <li>○ 피부세포 모델을 이용한 피부건강 관련 활성 평가</li> <li>○ 동물모델을 이용한 피부건강 관련 활성 평가</li> <li>○ 미강, 대두박, 참깨박 소재의 면역 관련 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 효능 평가</li> </ul>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○상품화 및 사업화 방안                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-기업 유통 여건에 적합한 농산부산물의 생물전환소재 제품의 유통시스템 구축을 통한 상용화</li> <li>-참여기업들을 통한 제품 대량생산공정 수립 및 상품화</li> </ul> </li> <li>○기대효과                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-다양한 농산부산물로부터 관련 업계의 상품성 증진을 위한 기반 마련</li> <li>-농산부산물을 소재로 한 고기능성 고부가가치 기능성소재 개발을 위한 핵심기술 개발</li> <li>-농산물의 관리를 위하여 농가와 직접적인 협력관계 구축 및 농가수익에 기여</li> <li>-농산부산물의 관리를 위하여 탈지유 제조업체와의 협력관계 구축 필요</li> </ul> </li> </ul>					
중심어 (5개 이내)	농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)	기능성 소재	면역기능 개선	미용식품	생물전환(발효)	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Standardization of product process for establishment of bioconversion conditions for agricultural by-product(rice bran, soybean cake, sesame seeds cake)</li> <li>○ Development and validation of analytical method of analytical marker for bioconversion materials of agricultural by-product</li> <li>○ Evaluation of efficacy and mechanism of immune modulation, bone health, atopy in preclinical study using in vitro and in vivo models</li> <li>○ Establishment of effective intake of immunity promotion material, bone health material, skin health material (atopy, etc.) based on the analytical marker</li> <li>○ Toxicity test [Safety evaluation] and human research test [Effectiveness evaluation] of immunopotentiating material</li> <li>○ Manufacturing and commercialization of prototype for each development material</li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Establishment of bioconversion conditions of agricultural by-product and standardization of product process</li> <li>○ Product process scale-up and validation</li> <li>○ Establishment of mass production process</li> <li>○ Single toxicity assessment of standardized rice bran material by bioconversion</li> <li>○ Assessment of 13-week repeated dose toxicity of standardized rice bran material by bioconversion</li> <li>○ Human research of standardized rice bran material by bioconversion</li> <li>○ Development and validation of analytical method of analytical marker for bioconversion materials of agricultural by-product (rice bran, soybean cake, sesame seeds cake)</li> <li>○ Changes of analytical marker for prototype of rice bran, soybean cake, sesame seeds cake</li> <li>○ Changes of analytical marker of rice bran, soybean cake, sesame seeds cake by process</li> <li>○ Evaluation of in vitro efficacy for skin health of rice bran, soybean cake, sesame seeds cake</li> <li>○ Assessment of skin health related activity using skin cell models</li> <li>○ Assessment of skin health activity <i>in vivo</i> models</li> <li>○ Evaluation of in vitro and in vivo efficacy of immune modulation of rice bran, soybean cake, sesame seeds cake</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Commercialization Plan                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Circulation conditions of bioconversion materials of agricultural by-product suitable for corporate circulation conditions</li> <li>-Establishment and commercialization of product mass production process by participating companies</li> </ul> </li> <li>○ Benefit                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Provide the foundation for promoting the marketability of related industries from various agricultural by-products</li> <li>-Development of core technologies for high functional materials based on agricultural by-products</li> <li>-Establish direct partnership with farmers and contribute to farm income for management of agricultural products</li> <li>-Establishment of cooperation with skim milk producers for management of agricultural by-products</li> </ul> </li> </ul>				
Keywords	agricultural by-product	functional food materials	immune modulation	beauty food	bioconversion (fermentation)

## 6. 영문목차

1. Outline of R&D project	8
2. Status of domestic and overseas technology development	31
3. The contents and results of the R&D	43
4. Achievements and contributions of the R&D	661
5. Application plan of the R&D	665
6. Information of abroad scientific technology for conducting project	666
7. Security rating of R&D	667
8. Status of research facilities and equipment registered in NTIS	667
9. Safety guideline of laboratory during performing R&D	668
10. Representative achievements of R&D	670
11. The others	671
12. References	672

<별첨> 자체평가의견서

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	8
2. 국내외 기술개발 현황 .....	31
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	43
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	661
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	665
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	666
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	667
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설장비현황 .....	667
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	678
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	670
11. 기타사항 .....	671
12. 참고문헌 .....	672

<별첨> 자체평가의견서

## 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

### 1절 연구개발 목적

본 기술개발은 생물전환공정에 의한 농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)의 고유 기능성 향상과 함께 신규 기능성(면역활성)의 창출을 통해 면역기능 증진, 뼈건강 및 피부건강의 생리활성을 향상시킨 고기능성 고부가가치 농산부산물(미강, 대두박, 참깨박) 소재화를 위하여 농산부산물의 유용성분 및 지표성분 표준화, 발효 및 효소처리 생물전환공정 최적화, 생산공정 특성화연구 및 validation과 면역기능 증진, 뼈건강 및 피부건강 관련 *in vitro* 및 *in vivo* 효능 평가를 실시하고 이를 기반으로 각 농산부산물(미강, 대두박, 참깨박) 별로 기능성식품 소재(원료) 및 반가공소재 시제품을 개발하고 상품화된 개발제품(소재)를 출시하고자 하며, 그 중 1건의 개발소재[미강 생물전환소재]에 대해서는 독성시험(안전성평가)과 인체적용시험(유효성평가)을 실시하는 등의 기술개발을 이루고자 함.

### 2절 연구개발의 필요성

#### 1. 농산부산물의 현황

##### 가. 농산부산물의 발생 현황

농산물은 기능성물질을 다량 함유하고 있으나 가공방법의 제한성 등으로 인하여 버려지는 부산물이 여전히 다수를 차지하고 있다. 2010년 “우리나라 바이오매스 이용실태에 관한 기초조사” 통계청 자료에 의하면, 벼 부산물의 경우 벧짚이 연간 600만톤, 왕겨가 연간 약 100만톤 내외가 발생되고 있다. 그리고 보리의 경우 연간 16만톤, 고구마 및 대두가 줄기 형태로 각각 연간 26만톤과 22만톤이 발생되고 있으며, 과수 부산물도 전정(剪定)가지 형태로 140만톤이 발생되고 있다.

표. 주요 농산부산물 바이오매스 발생량 추정, 2009

작물별	재배면적 (천ha)	부산물	단위면적당 발생량 (kg/10a)	연간발생량 추정치 (천톤)
벼	924	벧짚	653	6,034
		왕겨	118	1,090
보리	54	보릿짚	298	161
고구마	41	줄기	646	265
대두	82	줄기	269	221
과수	81	전정지	1,742	1,411

자료: 작물별 재배면적은 농작물 생산통계(통계청,2010), 단위면적당 부산물 및 과수(2006 재배면적: 사과 28, 배 21, 포도 19, 복숭아 13 천ha) 전정가지 발생량은 농어부문 바이오매스의 이용활성화를 위한 정책방향과 전략 (한국농촌경제연구원 2007)자료를 참고하여 작성

그러나 위의 자료는 바이오매스를 추산한 자료이며, 식품소재로 가용한 부분은 별도로 집계되어 있지

않다. 또한 이외에도 많은 종류의 농산부산물 발생하고 있는 것으로 판단된다.

농산부산물 중에서 대량으로 발생하면서 동시에 식품소재로 활용이 가능한 것은 사료에 첨가하여 사용되고 있는 것이라고 볼 수 있다. 현재 “농식품 부산물 사료” 프로그램에 소개되고 있는 소재들은 미강, 소맥피(밀기울), 맥주박, 주정박, 대두박, 단백질, 비지, 면실박, 참깨묵(호박), 채종박, 옥수수 등이 있다.

사료에 사용되는 각각의 사용량은 파악하기 어렵지만, 농산부산물을 이용한 고부가가치의 기능성식품 소재 및 미용식품 소재를 개발하기 위해서는 위의 농산부산물 유래 사료원료와 같이 대량으로 소비되어 안정적 공급이 가능한 소재를 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

위의 농산부산물 유래 사료원료 소재 중에서 국내에서 생산된 농산물의 부산물이 주로 생산되는 것은 미강과 참깨묵이며, 이 외에도 채종박은 생산지가 밀집되어 있어 미강 및 참깨묵과 함께 부산물을 구입하기가 용이할 뿐만 아니라 국내 농가와 직접 연계가 가능한 품목이다. 나머지는 국내 생산량이 그리 많지 않은 것으로 보인다. 대두의 경우 국내에서 벼 다음으로 재배면적이 넓으며 생산되는 대두는 거의 전량 식용으로 사용되고 기름을 짜기 위해서는 사용되지 않으며, 외국에서 수입된 대두가 기름을 짜는 데 사용된다. 기름을 짜고 남은 대두박의 일부는 사료에 사용되고 있으나, 나머지는 오히려 다시 수출을 하고 있는 실정이다. 따라서 미강, 참깨묵, 채종박 등을 이용한 기능성식품 소재 및 미용식품 소재의 개발이 농가에 직접적인 파급 효과가 크다고 볼 수 있다.

그러나 대두의 경우 아래의 자료를 살펴보면 가공식품 생산(년 2조원 규모)은 물론 대두박 등 농산부산물의 생산량이 적지 않은 양 발생하고 있으므로 대두박에 대한 검토도 필요한 상황이다. 국내에서 2010년 수출한 대두박이 약 57,665톤에 달하며, 수출단가는 약 1 kg에 0.5\$ 수준이었다.

이들 소재 중 옥수수를 제외한 소재의 발생량은 아래와 같이 추정된다.

종류		생산량
곡물	미강	40만톤 (왕겨는 100만톤)
	맥주박	15만톤 정도 (2000년 자료)
	소맥피	-
	주정박	-
	단백피	-
두류	비지	10만톤
	대두박	57,000톤 수출 (2010년)
종실류	채종박	250,000톤
	참깨묵	9,700톤
	면실박	-

표. 콩 가공식품 생산 현황

구분	두부	장류	콩나물	두유	콩기름	계
생산량(천톤)	294	446	-	194	336	-
생산액(억원)	3,560	4,540	7,000	2,130	4,790	21,980

\* 자료 : 식품의약품안전청(2008)

표. '10년 콩 형태별 수출 물량 및 금액

	계	대두유	대두박	에폭시화한 대두유	대두의 분과 조분	대두유와 그 분획물	대두
물량 (톤)	84,486	18,083	57,665	8,435	277	9	18
금액 (천\$)	58,061	23,277	22,179	12,240	312	30	23

- 주: ① 대두유는 대두유와 그 분획물(정제의 여부를 불문하여 화학적으로 변성가능한 것을 제외)을 가리키며 조유, 정제유와 그것의 식품용, 공업용, 및 기타를 포함함  
 ② 대두박은 대두유의 추출시에 얻어지는 오일-케이크 및 고품의 유박으로서 분쇄한 것인지 또는 펠리트상의 것인지의 여부를 불문함  
 ③ 대두유와 그 분획물을 수소첨가, 에스텔화, 엘라이딘화 등 화학적 변성한 것을 가리킴  
 ④ 대두는 파쇄 한 것인지의 여부를 불문하여 채유용, 박용, 콩나물용, 사료용, 및 기타를 포함함

#### 나. 농산부산물의 활용 현황

이러한 농산부산물을 이용한 기능성소재 개발은 친환경 자원순환 농업기술 개발이라는 국가농업 R&D 15대 agenda에 포함되어 있는 농업현장대응 기술의 하나인 “농축부산물의 자원화”의 하나이다.

농산부산물의 기능성에 대한 연구는 현재까지 주로 여러 가지로 진행되었지만, 농촌진흥청의 자료에 따르면 농산부산물의 기능성소재 개발로 왕겨 및 쌀겨를 활용한 생분해성 바이오필름과 감귤 바이오겔을 활용한 기능성 화장품(베이비파우더, 미백, 노화방지) 소재 및 제품 개발을 대표적 사례로 들 수 있다.

#### 농산부산물 : 부산물을 이용한 기능성소재 개발

- 왕겨, 쌀겨를 활용한 생분해성 바이오필름 개발
  - 분해력 강화, 흑색담공 멸칭필름 개발(중 : 두류, 채소류 등)
  - 용도다양화 : 음식물쓰레기 봉투, 신선유지 박스, 계란용기 등
- 돼지껍질 유래 기능성 콜라겐 상품화 : 키 성장효과(제제, 캔디, 과자 등)
- 감귤 바이오겔을 활용한 식의약소재 개발 및 용도 다양화
  - 제품 실용화 : 화장품 4종(영양크림, 세럼, 클렌징폼, 바디클렌저)
  - 용도다양화 : 창상치료용 인공피부 소재 및 화장품 등 개발
- 작물/부산물을 이용한 친환경 웰빙 소재 실용화
  - 친환경 웰빙 소재 개발 및 실용화 연구
    - 벼 부산물 활용 생분해성 바이오 멸칭 필름 현장실증사업 추진
    - 기능성 화장품(베이비파우더, 미백, 노화방지) 소재 산업화와 제품 개발
  - 유색미 수수 천연색소 함유 인체 친화형 소재 개발과 제품화



이 외에도 버섯배지의 활용이라거나, 부분적으로 여러가지 농산부산물 활용이 보고되었다. 그러나, 농산부산물을 이용한 식의학 기능소재의 개발은 아직 많은 연구가 진행되지는 않았다. IPET에서 관련 과제를 검색한 결과 농산부산물과 관련된 과제는 아래와 같다.

구분	과제명	주관	종료
생산시스템	농업부산물 활용 펠릿 제조 기술 개발	신흥기업 주식회사	2013
융복합	농임업부산물을 이용한 바이오에너지 생산용 당화효소 개발	한국생명공학연구원	2013
수산증양식	막걸리 부산물의 양어사료화를 위한 연구	강릉대학교	2013
융복합	바이오티셀 부산물인 유채박 및 유채대를 이용한 바이오리파이너리 공정 개발	서울대학교	2013
융복합	산업부산물로부터 바이오오일 및 고부가가치 생물소재 양산 기술 개발	한국생명공학연구원	2013
식품가공제조	오리 부산물을 이용한 Jelly Food와 저지방 축산식품의 개발	영농조합법인시.케이.푸드	2013
수산가공유통	젓갈 유래 미생물과 수산가공부산물로부터 다기능성 향산화제 및 기능성 소재 개발	인제대학교	2013
식품가공제조	국제 경쟁력 있는 비숙성 치즈 및 치즈 부산물을 이용한 기능성 유청음료의 산업화	건국대학교(서울)	2012
식품산업	녹차 등의품 또는 부산물을 이용한 기능성 식품 및 코스메슈티컬 소재 개발	(주)비티씨	2012
융복합	농림부산물(반섬유소)활용 젓산제조 핵심기술(C5-SSF) 개발	한국화학연구원	2012
식품가공제조	농산부산물 유래의 당세라마이드 등 생리활성 지질을 함유한 건강 기능식품 소재 개발	(주)두산	2012
식품가공제조	대일 수출용 대봉꽃감의 신속 위생형 일관제조기술 및 감 부산물의 상품화 기술 개발	한국식품연구원	2012
식품산업	수출용 유자 및 가공품 개발과 부산물 활용기술 개발	동국대학교(서울)	2011
식품산업	쌀 가공 부산물을 활용한 쌀 단백질 및 천연보존제 제조기술 개발 및 산업화	(주)비케이바이오	2011
식품산업	저지방-고단백 기능성 콩식품개발과 부산물활용기술개발	고려대학교(서울)	2011
식품산업	갈매나무목 식물의 부산물을 이용한 미백화장료의 개발	한국식품연구원	2010
식물자원/생산	감귤가공부산물을 이용한 고감도 감미료 개발	한국생명공학연구원	2010
식품산업	국내산 레드비트 부산물을 활용한 고순도 베타라인계 천연색소의 생산기술 개발	롯데	2010
식물자원/생산	생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화	(주)한스바이오	2010
식품산업	송이와 부산물을 이용한 고부가가치 가공제품 개발	한국식품연구원	2010
식품산업	주산지 고추종합처리장의 경쟁력 제고를 위한 고추씨 부산물의 고부가가치 가공 제품 개발에 관한 연구	한국식품연구원	2010
수산가공유통	수산부산물로부터 효소 발효기술을 이용한 기능성 수산발효식품 개발	신라대학교	2009
농식품가공·유통	대두 가공부산물을 이용한 기능성 식품소재 개발 연구	연세대학교(원주)	2008

농식품가공·유통	돈육 비선호 부위 및 가축 부산물을 이용한 김치 함유 웰빙 육제품 개발	건국대학교(서울)	2008
농림기자재	새송이버섯 부산물을 이용한 기능성 사료 및 돈육 생산기술 개발	(주)머쉬토피아	2008
농림기자재	척박지 식생 복원을 위한 골재 부산물 용토재 활용 기술 개발	강원대학교	2008
식품산업	고추냉이 부산물로부터 고기능성물질 추출 및 고부가가치화	고려대학교(서울)	2007
동물자원/생산	녹차와 녹차부산물을 이용한 브랜드용 양돈 사료 개발	순천대학교	2007
융복합	화훼부산물과 폐기화훼를 이용한 천연염료, 매염제 개발 및 상품화 연구	원광대학교	2007
가공	닭의 폐기부산물로부터 mucoprotein의 정제 및 활용	한국식품연구원	2006
가공	양잠 부산물을 이용한 실크종이의 제조 및 제조공정에서 발생하는 실크 세리신의 기능성 소재 개발	서울대학교	2006
수산증양식	폐사어와 감귤 가공 부산물의 고온 발효에 의한 양식용 어분 대체원의 개발	제주대학교	2006
축산	우모 digest 및 오징어부산물을 이용한 taurine 강화 축산물 개발	중앙대학교(안성)	2004
가공	유지자원부산물을 이용한 치매예방용 식품소재 및 노인식 개발	한국식품연구원	2004
가공	채소부산물을 이용한 생리활성농축물 및 식이섬유의 제조기술 개발	한국식품연구원	2004
환경	환경오염성 식품가공 부산물인 사과박과 간장박을 이용한 미생물 제제의 대량 생산 및 활용방안	동아대학교	2004
환경	고효율 생물학적 방법에 의한 축산폐수의 고도처리와 처리부산물의 활용 기술개발	선문대학교	2003
가공	곡류도정 부산물로부터 토클스(Tocols)의 분리농축	고려대학교병설보건대학	2003
축산	남은 음식물과 농수산 부산물의 발효용 균주개발 및 사료화 기술개발	순천대학교	2003
축산	녹용의 품질 향상기술 및 녹용과 부산물의 가공 기술개발	밀양산업대학교	2003
축산	식품가공부산물의 사료가치 분석 및 D/B구축	건국대학교(서울)	2003
환경	해조류 가공부산물을 이용한 토양환경개선제 및 액체비료개발 연구	순천대학교	2003
가공	계란 가공부산물인 난각막(egg shell membrane)과 알끈(chalaza)의 유효이용기술 개발	연세대학교(서울)	2002
환경	농업생산 부산물 및 남은 음식물을 이용한 식용달팽이 생산	순천대학교	2002
가공	도계부산물로부터 유용콜라겐의 제조기술 및 기능성음료산업에의 이용연구	한국식품연구원	2002
가공	케일(kale) 가공 부산물 및 양파의 마른 껍질로부터 체중조절용 bioflavonids 소재 개발	한국식품연구원	2002
가공	산지 꽃감 부산물의 생체 기능성 탐색과 활용 기술 개발	경북대학교	2001
환경	부산물비료(퇴비)의 물리성 품질관리 기준 설정	고려대학교(서울)	2000
축산	부화부산물의 식육자원화	전북대학교	2000
원예	산업부산물을 이용한 포트 및 프리그 재배용 상토의 개발 및 시비체계 확립	배재대학교	2000
원예	양액재배 폐암면과 목재 부산물의 원예용 배지 재활용 기술개발	경상대학교	2000

축산	도축부산물을 이용한 전통식 육가공품 제조 연구	한국식품연구원	1998
가공	식품산업 부산물을 이용한 가식성 필름의 제조기술개발 및 산업화에 대한 연구	고려대학교(서울)	1998
가공	율무 및 율무 부산물을 이용한 가공 및 고부가 기능성 제품의 개발연구	덕성여자대학교	1998
환경	전천후 고도 축산폐수처리 방법과 그 부산물의 고부가가치 액비 개발 및 산업화	충남대학교	1998
축산	도축부산물로 생산되는 돼지혈액을 사료로서 재활용하는 방안	전북대학교	1997
가공	미강유정제 부산물로부터 옥타코사놀 및 오리자놀 분리, 정제 기술개발	한국식품연구원	1997
축산	벚꽃위주의 농산부산물을 이용한 축우형 완전배합 발효사료의 개발보급에 관한 연구	서울대학교	1997

## 2. 본 과제에서의 개발 대상 농산부산물 (미강, 대두박, 참깨박 등)

### 가. 미강

쌀(현미)은 전세계적으로 약 연간 5700만톤 생산되며 이중에서 약 90% 정도인 4600만톤 정도가 아시아지역에서 생산되고 있으며, 최대 소비국가인 인도, 중국의 작황에 따라 전체 수급량이 큰 영향을 받는 매우 불안정한 수급구조를 가지고 있는 작물중의 하나이다. 우리나라의 식량자급률은 26%이지만 쌀의 자급률은 90%를 넘어 오히려 공급과잉의 우려가 있다. 특히, 농림축산식품부에 따르면 2014 양곡연도(2013년 11월~2014년 10월)의 쌀 자급률은 92% 내외를 기록할 것으로 예상된다. 우리나라가 쌀시장 개방을 유예하는 대가로 매년 의무적으로 쌀을 수입해야 하기 때문에, 최소시장접근(MMA) 방식에 따라 의무 수입해야 하는 최소수입물량은 올해 40만9,000톤으로 2013년 기준 국내 쌀 소비량 450만톤의 9% 수준이다. 따라서 쌀 자급률이 91%를 넘기면 초과 공급분이 발생하게 된다.

그러나 위에서 언급한 쌀은 현미를 의미하는 것이며, 실제 생활에서는 현미를 도정하여 속껍질을 벗겨낸 백미를 주로 식용하며, 이 과정에서 생기는 쌀눈과 쌀겨로 이루어진 속껍질 가루를 미강이라고 하는데 현미의 약 8%를 차지한다. 특히, 미강은 연간 발생량 40만톤의 약 5%만이 현미유(미강유)의 원료로 사용되고 있어, 쌀 부산물인 미강의 이용가치 향상이 절실히 요구되는 상황이다.

쌀 농가의 소득 증대 및 쌀의 고부가가치화를 위해서는 쌀 자체의 소비를 촉진할 수 있는 연구개발과 더불어 쌀의 도정시에 발생하는 부산물인 미강의 활용방안에 대한 연구를 통해 시장의 확대와 함께 쌀 재배농가의 소득 증대에 기여할 수 있을 것이라 판단된다.

### 나. 대두박

대두박은 두과작물인 대두로부터 착유후 생기는 부산물로, 현재 가장 많이 사용되는 있는 식물성 단백질사료이다. 대두는 세계 총생산량의 약 50%가 미국에서 재배되고 있으며, 약 30%는 중국에서 생

산되고 있다. 대두박은 대두로부터 기름을 짤 때 생기는 부산물로 동물에게 급여하는 가장 경제적이고 고품질의 식물성 단백질사료이다. 국내에서는 1971년부터 추출대두박을 가공 생산하게 되었다. 대두박은 처리, 가공 방법에 따라 영양가가 크게 달라진다. 생대두 및 저온처리 대두는 유해물질인 성장저해인자가 들어있어 영양가가 크게 떨어지나, 고온으로 가압처리를 하면 성장저해인자가 파괴되어 영양가치는 크게 향상된다. 1997년도 전 세계 대두박의 생산량은 약 1억 4천 7백만톤으로 추정되며 그 중 51%가 미국, 18%가 브라질, 10%가 아르헨티나, 9%가 중국, 12%가 나머지 국가들에서 생산되었다고 한다.

국내에서의 대두 생산 자체는 계속 줄고 있는 상황이다.

표. 지역별 재배면적의 변화

(단위:ha)

	'80	'85	'90	'95	'00	'05	'10
계	188,431	155,964	152,265	105,035	86,176	105,421	71,422 (100.0)
경 기	19,724	13,024	9,892	7,330	8,187	9,504	6,062 (8.5)
강 원	14,680	13,179	10,400	6,454	7,521	10,194	7,059 (9.9)
충 북	14,877	12,525	12,577	8,246	8,673	11,882	10,465 (14.7)
충 남	26,554	18,729	14,212	8,213	7,783	9,073	5,811 (8.1)
전 북	14,117	10,338	9,120	5,549	5,021	7,060	4,322 (6.1)
전 남	38,811	38,942	45,540	32,428	20,226	23,769	12,909 (18.1)
경 북	34,076	24,900	25,106	16,747	14,735	19,734	12,888 (18.0)
경 남	17,844	17,979	16,696	12,098	8,433	8,773	5,240 (7.3)
제 주	7,748	6,330	8,722	7,970	5,597	5,432	6,666 (9.3)

주) 특별·광역시는 인근 도에 포함시킴

표. 콩 국내산 및 수입산의 가격비교

단위 : 원/kg

국내산	외국산			
	1985 ~ 2007 평균		2006 ~ 2007 평균	
	수입단가	유통가격	수입단가	유통가격
3,017	279	363	320	416

자료: 농림수산물부. 2008 「양정자료」

표. 중장기 콩 수급 전망

양곡연도	재배면적 (천 ha)	단수 (kg/10a)	생산량 (천 톤)	식용수입량 (천 톤)	1인당 소비량(kg)
2010	70	198	139	326	8.5
2011	71	147	105	355	8.4
전망	2016	107	172	418	8.9
	2021	116	175	204	431

자료: 통계청, KREI-KASMO 2010.

국내산 콩은 아래의 SWOT 분석에서 보듯이 농업 다양화 측면에서 매우 중요한 작물이다. 하지만 수입 단가와 생산단가의 차이가 거의 7~8배의 차이가 있기 때문에 콩 자체만으로는 수익성이 떨어지고 있

는 실정이다.

사료용 제외 콩 자급율은 1990년 64.9%이었으나, 2004년 25.0%까지 하락하였다가 2010년에는 31.7%로 상승하였다. 최근 증가 추세를 고려해 2017년 자급률은 40%까지 증가될 것으로 전망하고 있다.



#### 다. 참깨박 등

참깨박 및 유채박과 같이 기름을 짜고 난 농산부산물물은 농가에서 직접 구매할 수 있는 농산부산물로서의 장점이 있다. 본 과제에서는 참깨박과 유채박 중에서 우수한 고기능성 고부가가치의 결과를 보이는 물질을 최종 선택하여 사용할 계획이다.

##### (1) 참깨박

참깨는 인류가 이용한 유지작물(油脂作物) 가운데 가장 오래된 재배 역사를 가지고 있다. 중국인은 참깨를 불로장생(不老長生)의 묘약(妙藥)이라고 까지 말하며, 한국인의 식탁에서는 조미용으로 없어서는 안 될 중요한 위치에 있다. 그러나 참깨 농사를 하는 농민들에게는 파종부터 수확까지 전과정을 모두 수작업으로 하는 번거로운 작물이다. 따라서 고령화된 농촌에서는 일손이 많이 필요한 참깨 농사를 회피하게 되면서, 국내 참깨 유통시장은 국산 참깨보다 수입산 참깨가 더 많이 유통되고 있는 현실이다.

국내 참깨 재배면적은 지난 1987년 94,000ha였던 것이 현재 2013년 23,000ha로 크게 감소했다. 이와 같은 감소 원인으로 첫째 농촌 노동력의 고령화, 둘째 기계화와 신품종 개발 미흡, 셋째 값싼 수입 참깨의 시장침투를 들 수 있다. 참깨는 벼, 콩, 고추 다음으로 생산면적이 넓으며 약 2천4백억원 이상의 소득을 농가에 부여하는 고소득 작물이다. 특히, 국산 참깨는 시장가격이 비싸, 약 70여만ha에 달하는 밭 면적에 심을 마땅한 작물을 못 찾고 있는 작금의 농촌실정에서 농가들에게 고소득을 안겨줄 유망한 작물임에도, 수확시기인 8월 하순~9월 상중순까지 고추, 고구마 수확 등 다른 경제작물 수확작업 등에 인력이 필요하게 되어, 참깨 수확인력을 구하기가 매우 어려워 부부 인력으로는 참깨 5,000평 농사가 한계인 것이 현 실정이다.

참깨는 무엇보다 종자개량이 빠르게 진행되고 있으며, 내탈립 종으로 개발이 되면서 이제 기계화가 가능한 수준으로 발전하고 있다. 그러므로 참깨는 앞으로 농가 수익에 큰 도움이 될 것으로 예상되는 작물로 참깨박의 발생량도 증가할 것으로 예측된다.

표. 국산참깨의 수급동향

(‘06농림수산식품부)

연도	‘87	‘00	‘01	‘02	‘03	‘04	‘05
재배면적 (천ha)	94.3	44.3	43.5	44.2	35.0	31.8	34.0
수출량 (천톤)	43.3	31.7	31.0	23.8	12.0	20.9	23.5
수입량 (천톤)	0	70.1	77.4	63.1	81.3	79.4	53.0
자급율 (%)	100	26	32	30	23	14	24
전국단수 (kg/ha)	460	720	710	540	340	660	690

표. 국산참깨의 재배면적, 생산량 및 평균단수

(‘11 농림수산식품부)

구분	2005	2006	2007	2008	2009	2010
재배면적 (천ha)	34.0	31.1	31.3	28.8	24.9	27.2
생산량(천톤)	23.5	15.5	17.5	19.5	12.8	12.7
평균단수(kg/10a)	69	50	56	68	37	47

(2) 유채박

유채는 거의 모든 부분 (유채대, 유채씨, 유채박, 유지성분)을 산업에 직,간접적으로 활용할 수 있는 에너지 작물로, 주로 종실로부터 기름을 짜서 이용하는 중요한 유지작물 중 하나이다. 국내에서도 이러한 유채씨로부터 유채유를 생산하고 있으며, 최근 유채씨와 같은 친환경 원료를 활용한 대체에너지 또는 신재생에너지로서 바이오디젤 생산에 관한 연구가 진행되면서 보다 경제적인 활용으로의 관심이 집중되고 있다. 특히, 바이오디젤의 확산과 정착을 위해 제조단가를 낮추는 것이 절실히 필요하며 그 방안으로 안정적인 원료 공급 또는 바이오 리파이너리의 개념으로 부산물들의 적극적인 활용 등이 요구되고 있다.

최근 국내의 유채 생산량은 2007년 719톤에서 2009년 1,604톤으로 증가하고 있으나 국내의 수요량

을 충족시키기 위해 인도, 중국 등에서 많은 양의 유채씨를 수입하고 있는 실정이다. 유채씨의 경우 2010년까지 연평균 약 1억 달러에 달하는 매년 30만톤 이상을 수입하고 있다.

유채박은 유채씨에서 식용유 및 바이오디젤을 생산한 후 발생하는 부산물로 유채씨의 경우 국내 생산량으로는 국내 수요량을 충족시키지 못하여 수입량이 최고조에 달했던 2008년에는 약 50만톤의 유채씨가 인도, 중국, 캐나다로부터 수입되어 식용유 및 바이오디젤의 원료로 사용되었으며, 이 생산과정으로부터 25만톤 정도의 유채박이 발생된 것으로 보고되었다.

이러한 유채박은 현재 낮은 단가의 친환경 바이오매스로서 약 29% 정도의 높은 단백질 함량으로 인하여 주로 농업 비료 및 가축 사료로 사용되고 있으며, 일부 식품용 단백질로 활용하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있다. 그 외 유채박에 약 30~40% 정도 다량 함유되어 있는 섬유질계 화합물을 활용하기 위해서 펙틴을 제조하는 기술이 국내에서 개발되기도 하였다.

### 3. 농산부산물의 고부가가치 소재화 필요성

#### 가. 농산부산물의 부가가치를 높이기 위한 목표

농업부산물은 여러 가지로 사용될 수 있지만 가장 대표적인 것으로, 첫째 사료로 이용하여 가축에 탄수화물이나 단백질을 공급해 줄 수 있으며, 그 다음은 에너지원으로 사용되는 바이오디젤, 바이오에탄올의 생산에 사용될 수 있고, 그 외에 고부가가치 물질을 만들기 위한 노력을 포함할 수 있다.

그러나 이들 부가가치를 최종 제품의 가격으로 비교해 보면 아래와 같다.

종류	가격
사료대체	500원/kg
바이오 디젤	1349원/L
건강기능식품 소재	수십만원/kg

표. 바이오디젤과 일반경유 가격 비교

(단위: 원/리터)

생산 가격/연도	2006	2007	2008	2009 (1/4)
바이오디젤 (A)	968	1,065	1,415	1,349
일반경유 (B)	528	548	862	564
A□B	440	517	553	785
상대 가격비 (A/B)	1.83	1.94	1.64	2.39
세후경유가격 (C)	1,025	1,076	1,390	1,092
A□C	-57	-11	25	257
상대 가격비 (A/C)	0.94	0.99	1.02	1.24

예를 들어 농산부산물을 모두 사료로 사용한다고 해도 역시 사료값 1 kg당 500원의 사료에 포함되는 것에 불과하고, 바이오디젤로 만든다고 해도 결국 건조중량 1 kg당 2000원도 안 되는 제품으로 변화하는 것으로, 이러한 방식의 부산물의 이용은 제조 후의 제품의 가격이 결국 1 kg당 2000원을 넘길

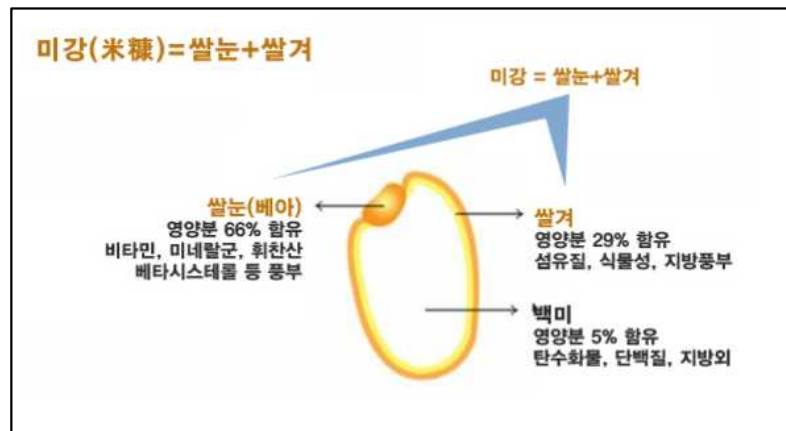


수가 없다. 그러나 건강기능식품으로 개발될 경우에는 부가가치가 훨씬 높아서 1 kg당 수십만원에 판매될 수 있다. 그러므로 농산부산물을 건강기능식품 소재로 개발하는 것이 부가가치 면에서 가장 경제적이고, 타당한 방법이라고 할 수 있다.

#### 4. 건강기능식품 소재로의 개발을 위한 개발 대상 농산부산물의 생리활성 및 기능성 검토

##### 가. 미강의 생리활성 및 연구개발 현황

우리가 쌀이라고 할 때는 주로 벼를 도정한 백미를 뜻한다. 현미를 도정하여 속껍질을 벗겨낸 것을 백미라고 하는데, 미강이란 현미에서 백미로 도정하는 과정에서 생기는 쌀눈과 쌀겨로 이루어진 속껍질 가루를 말하며 현미의 약 8%를 차지한다. 백미를 만들 때 나오는 부산물인 미강에는 백미보다 많은 영양 성분이 들어 있다.



미강에는 전분 34-62%, 기름 15-22% (불포화 지방산 77-88%), 단백질 11-15%, 식이섬유 24-29%, 미네랄 6.6-9.9%, 피틴산 9.3%가 함유되어 있다 (Juliano BO and Hick PA, 1996, Wea-Shng Fur and Been-Huang Chiang, 2001).

미강의 생리활성 성분으로 tocopherol과 tocotrienol 등의 tocol류,  $\gamma$ -oryzanol 등의 지용성 성분과 ferulic acid, p-coumaric acid, benzoic acid 등의 페놀성 화합물이 함유되어 있으며, 체내 콜레스테롤 대사조절에 도움을 주는  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 등과 같은 식물성 스테롤도 함유되어 있다고 알려져 있다. 최근까지 미강은 항산화 효과, 항암 효과, 항염증 효과 및 콜레스테롤 저하 효과 등 여러 방면에 유효한 약리작용이 있는 것으로 보고되고 있다.

현재까지 미강의 유용성분의 효능에 대하여 보고된 연구에 따르면 미강의 지용성 생리활성물질 중 하나인  $\gamma$ -oryzanol은 campesterol,  $\beta$ -sitosterol 등의 sterol과 triterpenoid alcohol이 모핵인 ferulic acid가 ester 결합을 하고 있는 무색, 무취의 혼합물질로 혈중 콜레스테롤 감소시키고 항산화 기능 및 항궤양작용이 있다고 보고되었다. 또한 쌀과 미강의 주요 phenolic acid이며  $\gamma$ -oryzanol의 모핵인 ferulic acid는 LDL(low density lipoprotein) 산화 억제, radical에 의한 세포손상 보호 등, 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라 당뇨 유도 쥐의 혈중 지질 개선 효과 등, 여러 생리활성이 보고되었다. 미강에는 비타민 E의 함량도 풍부한데 비타민 E는 tocopherol과 tocotrienol을 총칭한 말로서 tocopherol의 효능에 대하여 보고된 바에 의하면 항산화 효과와 항암작용 및 관상동맥성 심질환, 알

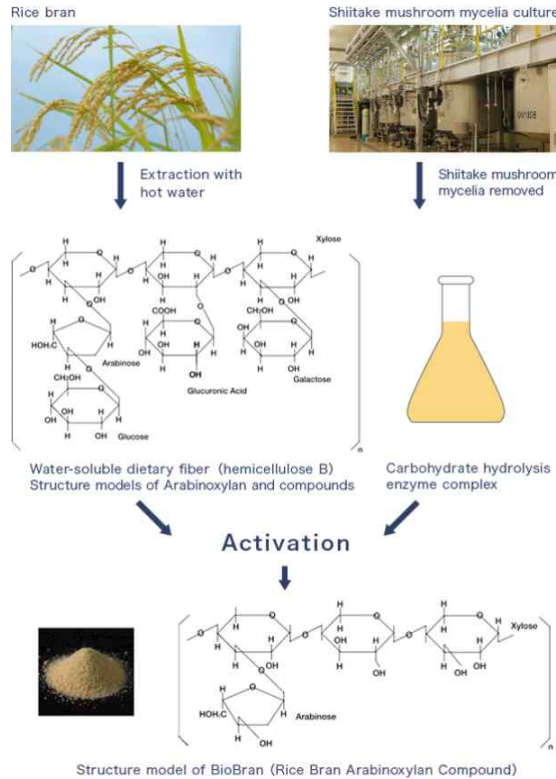


츠하이머질환과 알레르기 예방 효과도 있는 것으로 나타났다. Tocotrienol의 효능은 암세포의 성장 억제, 심혈관계 질병의 개선 효과, 자외선 노출에 의한 피부보호 효과, HMG-CoA의 reductase의 활성 억제에 의한 혈중 콜레스테롤 저하와 함께 혈압강하 효과 및 지질 과산화 방지에 있어서는  $\alpha$ -tocopherol 보다 tocotrienol이 40-60배 효과가 있다고 보고되었다. 한편 근래들어 octacosanol의 효능에 대하여 많이 보고되었는데 octacosanol은 에너지 저장량을 증가시키고 근육의 지방 이용률을 증가시키는 기능을 한다고 보고되었다. 최근 의학보고에 의하면 octacosanol이 혈중 cholesterol에 영향을 주지 않고 cholesterol 대사에서 유도된 부산물 함량을 감소시킨다고 보고되었다.

미강에는 영양뿐만 아니라, 각종 질병과 면역력에 좋은 모든 비타민과 미네랄 성분, 아미노산, 지방산을 함유하고 있다. 미량요소에는 비타민 B1, B15과 이노시톨 (비타민 B군, inositol, 동맥경화, 지방간에 효과), 비타민 E (심장마비감소효과), 노리자놀 (함암 성분, oryzanol), 감마 오리자놀 (gamma-oryzanol, 에너지 대사에 관여) 등 많은 건강에 좋은 성분들이 들어 있다. 또한, 미강을 구성하고 있는 고분자 물질인 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 펙틴, 리그닌 성분 중에서, 미강 1 kg에 3~5 g 함유된 수용성 물질인 헤미셀룰로스B로 불리어지는 성분은 면역조절물질, 즉 BRM (biological response modifier)의 일종으로서 면역강화식품소재로 주목되고 있다.

최근 주목을 받고있는 아라비녹실란(arabinoxylan)은 세포벽 구성성분의 하나로 세포벽 성분인 cellulose나 hemicellulose와 결합되어 있어, 인체의 소화효소로는 cellulose나 hemicellulose를 분해하지 못하기 때문에 미강을 그대로 섭취할 경우 아라비녹실란은 생체에서 기능성 다당체로서 이용되기 어렵다. 따라서 아라비녹실란을 미강 세포벽에서 분리할 수 있는 기술 개발과 함께 불용성의 불활성 아라비녹실란을 수용성의 활성형 아라비녹실란으로 전환시키는 기술 개발이 핵심이라고 할 수 있다. 일본의 다이와社에서는 표고버섯 균사체 배양에 의해 생산된 효소를 활용한 효소처리공정을 통해 수용성의 활성형 아라비녹실란을 개발하고 '바이오브랜 아라비녹실란'이라 명명하였다.

상기 일본의 다이와社에서 개발한 바이오브랜 아라비녹실란은 미강의 고기능성 고부가가치화의 대표적인 성공사례이다. 특히, 바이오브랜이라고 불리는 제품은 미강의 헤미셀룰로스를 표고버섯 균사체 배양을 통해 생산된 효소의 효소처리를 통해 효소처리 아라비녹실란으로 제조한 일종의 생물전환 물질이다.



바이오브랜 아라비녹실란은 1990년대 일본의 다이와社에서 개발된 이후 전세계로 수출되었으며 특히, NK세포의 활성화 기능이 밝혀져 현재 암환자를 중심으로 판매되고 있다.

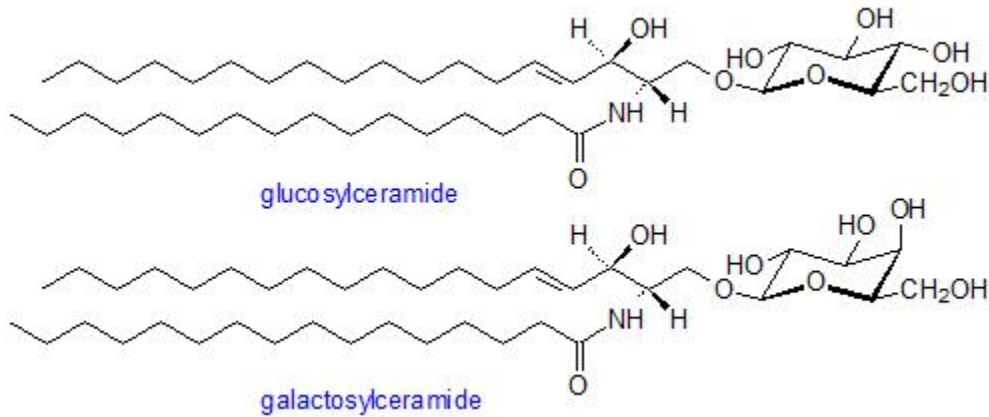
바이오브랜 아라비녹실란은 몸속에 흡수되면 먼저 NK세포에 자극을 주고 자극을 받은 NK세포는 인터페론-감마라는 단백질이 방출된다. 이 인터페론-감마는 다른 NK세포를 활성화시켜 암세포를 살상하는 과립형성을 촉진한다고 알려져 있다. 바이오브랜 아라비녹실란이 왜 이와 같은 활성을 가지고 있는지는 명확하게 밝혀져 있지는 않으나 일부 논문에서는 바이오브랜 아라비녹실란이 선천성 면역세포 자극을 통해 Th1 세포를 활성화 하는 등 PAMP로서의 특징이 나타나기 때문에 PAMP-like properties가 있는 것으로 판단하고 있다.

또한 분비된 인터페론-감마는 매크로파지와 림프구에 대해서도 활성화를 촉진하며, 인터페론-감마가 직접 바이러스의 작용을 억제하는 역할도 하므로 암 뿐만 아니라 여러 가지 세균이나 바이러스에 대한 저항력도 높여준다. 바이오브랜 아라비녹실란의 면역증강제로서의 장점은 부작용이 거의 없다는 점이다. 예를 들어 인공적으로 인터페론이나 IL-2를 투여하면 구토, 불쾌감, 발열 등의 부작용이 심하지만 바이오브랜 아라비녹실란은 이러한 부작용이 없다고 알려져 있다.

국내의 경우 미강을 원재료로 한 기능성소재에 있어서 건강기능식품으로 인정받은 것은 아라비녹실란이 아니라, 고시형으로 등재된 옥타코사놀(지구력 증진에 도움)과, 개별인정형으로 인정받은 쌀겨추출물이 있다.

쌀겨추출물이 피부보습에 도움을 줄 수 있음으로 기능성을 인정받을 수 있었던 것은 쌀겨(미강)에는 피부미용에 좋은 성분이 함유되어 있기 때문이다. 피부 특히, 아토피성 피부 등에서는 피부장벽이 무너져서 염증반응이 일어나고, 가려움증이 심화된다. 그러므로 상당수의 아토피 환자들에서 피부장벽

이 개선되면, 증상이 완화되는 경우가 많다. 이러한 피부장벽 개선제로 여러 가지 제품이 판매가 되고 있지만, 이들 제품은 몇 가지 성분을 혼합한 것으로 피부의 장벽을 완벽히 대체할 수는 없으나, 일부 개선 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 피부장벽의 개선에 필요한 물질을 섭취하는 것도 피부 미용에 매우 중요하다고 할 수 있으며, 이러한 성분 중에서 가장 대표적인 것이 건강기능식품 개별인정형 기능성원료로 인정받은 쌀겨추출물에 함유되어 있는 세라마이드 계열의 물질들이다.



미강에 들어있는 glucosylceramide는 음식으로 섭취하였을 때, 각질세포를 만들 때 tight junction과 관련된 유전자를 발현시켜서 피부장벽을 개선하는 것으로 밝혀져 있다.

국내에서 미강을 원재료로 하여 생산된 건강기능식품 기능성원료로는 아래와 같다.

**[고시형]**

- 옥타코사놀
- 지구력 증진에 도움을 줄 수 있음

**[개별인정형]**

- 쌀겨추출물
- 피부보습에 도움을 줄 수 있음 (기타기능 II)

#### 나. 대두(대두박)의 생리활성 및 연구개발 현황

대두는 단백질 및 지방질 함량이 높은 농산물로서 전 세계적으로 가장 중요한 식용(食用), 유지(乳脂) 자원의 하나이며, 대두는 단백질이 풍부하여 채식위주의 식단에서 부족하기 쉬운 단백질과 지방의 중요한 공급원이다. 만주지역이 원산지이기 때문에 국내에서는 오래 전부터 식용으로 사용되어 왔으며, 현대에도 식품 또는 각종 가공식품 원료의 하나로 매우 다양하게 사용되고 있다.

대두에는 이소플라본(isoflavone), 식이성 섬유(dietary fiber), 올리고당(oligosaccharide), 레시틴(lecithin), 사포닌(saponin), 식물성 sterol과 phenol 화합물 등과 같은 생리활성물질이 다량 함유되어 있다. 대두 이소플라본은 여성호르몬인 estrogen과 유사한 구조와 작용을 가지고 있어 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)이라 부른다(Setchell 등 1999, Lee 등 2003). 과거에는 그 특유의 맛으로 인해 두부, 두유 등 대두식품의 불쾌한 맛 성분에 관한 연구가 많았으나(Song 등 1988, Kim 등 1990), 혈중 콜레스테롤을 낮추고 폐경기 여성의 골다공증을 예방할 뿐만 아니라 항산화 활성에 의한 심혈관질환 억제와 항암 효과 등과 같은 이소플라본의 생리적 활성이 활발하게 보고되고 있다(Sohn 등 2000).

대두에는 총 12 종류의 이소플라본 화합물이 존재하는데, 이는 각각 genistein, daidzein, glycitein의 3종의 aglycone과 각각에 3종류의 배당체(glycosides, malonylglucosides, acetylglucosides)들이다. 대두에는 이소플라본이 건조중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있으며, 이중에서 이소플라본 glycoside인 daidzin과 genistin이 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있으며, glycoside 보다 생리활성이 다양한 aglycone 형태인 daidzein과 genistein 함량은 약 0.01~0.15%에 불과한 것으로 알려져 있다.

##### (1) 대두의 건강기능식품 활용 현황

대두는 건강기능식품의 원재료에 있어서 미강보다 오히려 더 다양하게 사용되고 있다. 현재 식품의약품안전처에서 허가받은 대두 관련 건강기능식품 소재는 아래와 같다.

##### [고시형]

- 대두식이섬유 : ①콜레스테롤 개선 ②식후 혈당상승억제 ③ 배변활동원할
- 대두단백 : ①콜레스테롤 개선
- 피니톨 : 식후 혈당 상승 억제
- 비타민E : 항산화
- 레시틴 : 콜레스테롤 개선

##### [개별인정형]

- 대두이소플라본 추출물 - 뼈, 관절건강
- 대두올리고당 - 배변활동원할 장내 유익균 증식
- 대두 포스파티딜세린 - 기억력/인지능력 향상
- 대두배아열수 추출물 - 체지방 감소
- 콩발효추출물 - 혈당조절

대두에는 특히, 인지질이 풍부한데, 인지질은 세포막 성분의 중요한 구성성분이다. 포스파티딜세린의 경우 기억력/인지능력 향상으로 개별인정을 받았으며, 레시틴은 콜레스테롤 개선 기능으로 고시형 건강기능식품 소재이기도 하다.

대두 이소플라본은 기능성분으로 Daidzin, Genistin, Glycitin이 포함되어 있으며, 이들의 약리효과는 여러 가지가 있지만 현재 건강기능식품으로 허가는 '뼈건강에 도움을 줄 수 있음'으로 개별인정을 받았다.

폐경 후 여성 호르몬인 에스트로겐의 분비 감소에 따른 골다공증의 예방 및 치료를 위한 대체요법으로는 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 경구투여 또는 이를 함유한 식품의 섭취가 있다. 이소플라본은 골대사와 관련하여 활발히 연구가 진행 중인데, daidzein과 genistein이 에스트로겐과 유사구조를 가지고 있어 세포내에서 에스트로겐 수용체(estrogen receptor:ER)와 결합하여 에스트로겐 효과를 나타내며 부작용도 거의 유발하지 않는다. Cho 등은 약콩 추출물의 daidzein과 genistein의 함유량이 대두에 비해 높았고, MG-63 조골세포의 증식과 증식관련 인자인 IGF-I를 선택적으로 발현한다고 보고하였다.

Hutchins 등은 이소플라본의 aglycone인 genistein을 섭취한 경우가 배당체인 genistin을 섭취한 경우보다, 소변 중 genistein의 회수량이 genistin보다 더 높게 나타나 배당체가 aglycone으로 전환되었을 때 이소플라본의 생체이용성이 증가함을 보였다고 보고하였다. Choi 등은  $\beta$ -glucosidase를 이용하여 이소플라본 함량 중 60% 정도를 차지하고 있던 malonyl 배당체 형태의 이소플라본이 3%로 감소하고 aglycone 형태의 이소플라본은 3%에서 56%로 증가하여 기능이 강화된 식품소재를 생산할 수 있는 방안으로 활용될 수 있다고 보고하였다. 발효를 할 경우 대두 중에 함유된 항산화성 물질인 이소플라본, phenol산, tocopherol류 중에서 tocopherol류는 발효가 진행되면서 감소하는 반면, 이소플라본은  $\beta$ -glucosidase의 작용에 의하여 aglycone 형태로 전환되면서 항산화력이 증가되는 것으로 밝혀졌다.

이소플라본의 항산화 효과에 대해서 Lee 등은 in vitro에서 세포내 산화적 스트레스에 대한 방어효과를 보고하였고, Lee 등은 in vivo에서 혈장 nitrite 농도와 적혈구의 catalase 및 glutathione peroxidase 활성 증가를 보고하였다. 이와 같이 이소플라본의 섭취는 혈관질환 관련 요소 및 적혈구와 간의 항산화 효소계에 영향을 미칠 것이라고 하였다.

하지만 이 외에도 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 예를 들어, genistein이 유방암 세포의 estrogen 수용체에  $17\beta$ -estradiol이 결합하는 것을 방해하고 유방암 세포의 estrogen 수용체를 감소시킨다고 보고하였다. Lamartiniere 등은 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)으로 유도된 유방암이 genistein에 의해서 효과적으로 억제됨을 보고하였는데 특히, 사춘기 이전단계에서 genistein 투여가 유방암 예방에 효과적임을 관찰하였다. 전립선암은 dihydrotestosterone(DHT) 농도와 관련이 있는데, Evans 등은 genistein이 testosterone으로부터 DHT로 전환하는 효소인 5- $\alpha$ -reductase의 저해효과가 있다고 보고하였다. 그 외에도 방광암, 위암, 폐암, 간암 등에 대한 항암효과가 있는 것으로 보고되었다.

### 3) 참깨(참깨박)의 생리활성 및 연구개발 현황

참깨, 흑참깨, 들깨는 기원전부터 약용식물로 널리 이용되어져 왔으며, 이들의 항산화작용을 비롯한 여러 생리활성이 밝혀지고 있다. 참깨 중에 함유되어 있는 sesamin, sesamolin, sesamol, sesaminol 등의 lignan 화합물은 간 해독작용과 생체내의 과산화지질 생성 억제, 혈중 콜레스테롤 운반단백질인 저밀도 리포단백질 산화 억제 및 장내 콜레스테롤 흡수 억제 등 체내 생리활성 조절작용이 있어 기능성식품으로 보고되고 있다. 참깨 종자에 함유되어 있는 lignan 화합물들은 유리형 또는 당과 결합되어 있는 배당체의 형태로 존재하며, 배당체의 양은 약 0.1% 정도로 상당량 존재한다. 참깨에는 lignan 화합물 이외에 토코페롤, 플라보노이드 및 페놀산 등의 생리활성물질 들이 유리형 또는 배당체 형태로 존재한다. 흑참깨나 들깨에도 lignan 화합물이나 페놀산, triterpenoid 등의 폴리페놀 화합물의 존재가 보고되고 있어, 이들의 생리활성에 대한 많은 연구보고가 있다.

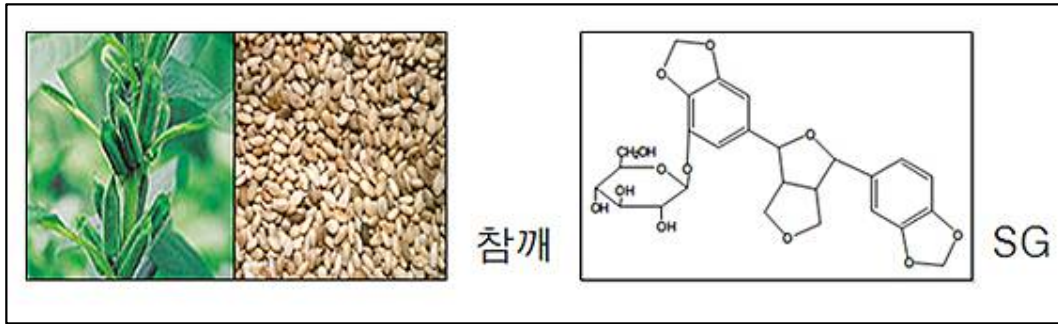
참깨의 경우 2009년부터 현재까지 최종 306건의 연구논문이 출간되었다. 대체적으로 참기름 자체에 대한 성분 분석, 리그난을 중심으로 한 성분의 함량 측정, 참기름 가공방법 연구, 참기름의 약리작용, 리그난 성분 개개 및 성분군들의 약리작용, 참기름 제거 참깨 추출물의 약리작용들이 대부분이었다. 특히, 약리작용을 중심으로 한 기능성 연구로 기억력 증진 효과, 염증 억제 효과, 항동맥경화 및 항고지혈증 효과, 위장 손상에 대한 보호 효과, 항암 효과 그리고 주요 작용인 항산화 효과의 세부기전 연구가 대부분이다. 최근 웰빙시대로 진입함에 따라 미백, 주름 개선 등의 향장품 연구와 질병의 예방을 중심으로 한 연구로 그 추세가 변화하고 있는 것이 특징으로 보여진다.

참깨 관련 국내 특허의 현황은 참깨 연구의 방향과 대체로 일치하여, 화장품, 제형, 식품, 오일 추출 및 성분 추출이 대부분을 차지하고 있다. 용도(기능성) 특허로는 혈관질환 관련 조성물 및 성분, 항암이 대부분이었다. 외국 특허의 경우 1309개의 특허가 검색되었고, 그 중에서 관련 특허 203개를 분석한 결과 마찬가지로 화장품, 연고제, 기능성식품 개발, 성분 추출법 및 성분 고함유 품종 특허들이었다. 기능성의 특허에 있어서는 항산화, 혈관 건강, 항고지혈증, 항노화 및 항암 효과 등이 대부분이었다. 이러한 경향으로 제품화 연구도 진행되고 있는데, 화장품, 연고제, 건기식, 개발 품종, 성분 추출법, 성분 고함유 품종 개발들로 파악되었다. 특허 조사에서 품종과 관련된 특허는 4종이 있으며, 품종보호출원은 검색하지 않았으나 기존 특허 검색에서 검색되는 특허로서 일본 및 미국에서 출원이 되었는데, 미국 회사인 Sesaco Corporation에서 3건 특허 출원한 것으로 조사되었다.

참깨의 sesamol은 배양세포를 이용한 실험에서 자외선에 의한 활성산소의 발생을 억제하고 fibroblast의 손상을 억제한다고 발표되었다. 2014년 발표된 논문 자료를 보면, sesamol은 활성산소를 제거하는 능력이나, 항산화력이 모두 탁월하며, 또한 미백 효과와 관련지을 수 있는 머릿의 tyrosinase를 저해하는 효과가 kojic 산이나 알부틴보다 더 탁월한 것으로 나타났다. Sesamol은 미백 화장품 원료로 사용되고 있지는 않으나, 앞으로는 미백화장품의 원료가 될 가능성이 매우 높다고 판단된다. Sesamol세사몰은 세사몰린의 대사산물로 참깨에 매우 소량만 들어있는 성분이다. 그러므로 생물전환기술을 이용해서 sesamol의 함량을 늘릴 경우, 미백 효과가 탁월한 식품소재가 탄생할 가능성이 높다.

뿐만 아니라 참깨의 리그난의 다른 성분인 sesamin은 rat 실험에서 피부암세포의 성장을 억제하고 자외선에 의한 피부 손상을 보호하는 효과가 있다. 이러한 sesamin의 효과는 참깨의 폴리페놀(리그난)이 항산화 효과가 매우 강력하다는 보고와 일치되는 결과이므로 앞으로 미용소재로의 활용이 주목된다고 할 수 있다.

참깨박의 경우 최근들어 기능성식품으로의 연구 개발이 진행되고 있다. 한국식품연구원 연구팀은 뇌 신경세포 및 동물실험을 통해 볶은 참깨박에 함유돼 있는 세사미놀 배당체(Sesaminol glucoside, SG)가 베타아밀로이드에 의한 뇌신경세포의 사멸 관련 신호전달체계를 조절함으로써 기억력 개선 효과를 나타내는 것을 확인하였다.



세사미놀 배당체가 치매의 원인물질인 아밀로이드베타로 유도된 실험쥐의 기억력 손상을 예방하고, 노화로 인해 기억력이 감소한 쥐에서는 기억력을 증진시키는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

특히, 볶은 참깨박으로부터 추출한 세사미놀 배당체는 부작용이 없으며, 소재의 특성상 열에 안정하고 추출 수율이 높은 장점이 있다. 뿐만 아니라 원료의 수급이 용이하며 단가가 저렴해 경제성이 높고 산업화 가능성이 매우 높은 것으로 전해지고 있다.

또한 참기름, 흑참기름, 들기름을 제조시 부산물로 얻어지는 탈지박 중에도 다양한 폐놀성 화합물이 함유되어 있으며, 이들 화합물들은 포도당과 결합된 수용성 배당체 형태로 존재한다. 이와 같이 참깨박, 흑참깨박 및 들깨박에는 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어, 기능성을 부여한 새로운 식품소재로서의 가능성이 있다. 이러한 생리활성물질은 유리상태로도 존재하나, 대개의 경우 당류와 결합한 배당체의 형태로 존재하고 있으며, 배당체를 형성하고 있는 당류는 효소 등에 의하여 가수분해되며, 배당체의 경우 보다 유리형태가 생리활성이 더 강한 것으로 밝혀져, 이들에 대한 다양한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

##### 5. 개발 대상 농산부산물의 고기능성 고부가가치 소재화 공정 도입시 사전 검토사항

최종적으로 농산부산물을 이용해서 식품이나 건강기능식품을 개발하기 위해서는 식품과 건강기능식품의 조건에 합당해야만 하기 때문에 단순 부산물로 식품을 가공하는 것은 오히려 식중독이나 기타 오염문제로 인하여 식품위생법에 저촉될 수 있다.

따라서 식품원료로 사용하기 위해서는 최소한 아래의 조건에 부합되는 원료를 사용해야 할 것으로 판단된다.

본 과제에서는 이러한 문제를 줄이기 위해서 가능한 조건을 아래와 같이 제시하고 이에 대한 검토를 실시하였다.

- 독성이 없을 것. (독성물질에 오염될 가능성이 없을 것)
- 세균의 감염 수준이 낮을 것.
- 치명적인 균의 감염이 없을 것.
- 항상 일정한 관리가 가능할 것.
- 발효미생물 배양에 필요한 영양소를 가지고 있을 것.
- 쉽게 부패되지 않는 물질일 것.
- 주정을 제외한 유기용매의 사용이 없거나 극히 제한적일 것.

#### 가. 미강의 식품소재로서의 사전 검토사항

미강은 쌀의 재배 및 도정 과정에서 대량 방출되지만 보통의 경우 청결한 상태의 미강 회수가 곤란한 상황에서 식용으로의 활용에 부정적인 경향이 있으며, 식용으로의 활용보다는 비료나 사료로 사용되고 있는 실정이다. 또한 미강은 지질 함량이 높기 때문에 열화의 가능성과 더불어 미세분말화가 불가능하며, 그 결과 미강을 첨가하여 제조되는 제품들의 경우 조직감이 매우 떨어진다. 그러므로 미강은 생리활성물질의 보고임에도 불구하고 식품소재로서의 적용에 어려움이 있어 왔다.

특히, 미강은 알갱이로부터 제거된 지 수시간만에 산패가 시작되어 보통은 비료나 사료로 이용되는데, 사료로 이용되는 경우에도 장기간 유통이 어렵다. 특히, 여름철에는 산패가 심해 설사 등을 유발하여 사료로 사용하기에도 어려운 문제점을 가지고 있다.

미강은 국내에서 생산되는 연간 60만여 톤 중 일부는 미강유 제조에 사용되고 있으나 그 양은 많지 않으며, 일부는 부가가치가 낮은 가축의 대체사료로 소비되거나, 나머지는 비료로 사용되거나 심지어 버려지는 경우도 있는 실정이다. 그러므로 미강을 이용한 고기능성 고부가가치화 기술 개발의 필요성이 높다.

지금까지 시도된 미강을 이용한 고기능성 고부가가치화 기술 개발은 미강으로부터 기능성물질을 탐색한 후 추출 및 분리공정을 개발하고 생산한 기능성물질을 혼합하여 새로운 기능성 제품을 개발하려는 방향이 대부분이나 이 경우 추출공정의 비용이 많이 들고 unknown 성분과의 시너지효과가 간과되어 유효성이 약화될 수 있는 문제점을 갖고 있다.

#### 나. 대두박의 식품소재로서의 사전 검토사항

대두 중에는 생리활성물질 외에도 여러가지 유해성분이 존재하는 것으로 알려져 대두를 식품으로 가공 및 이용하고자 할 경우에는 이들 유해성분의 제거를 위한 전처리 과정이 요구되고 있다. 대두 중에 존재하는 유해성분으로는 trypsin inhibitor, hemagglutinin(적혈구 응집활성), 무기질의 흡수를 억제하는 phytate와 장내에서의 가스발생인자 (flatulence factor)(Rackis 등 1970) 등이 알려져 있다. 이들 중 가스발생인자인 stachyose와 raffinose는 대두에 상당량 함유되어 있다. 인체 내에서는 소화기관 내에  $\alpha$ -galactosidase가 결핍되어 있어 이들 oligosaccharide는 완전히 소화, 흡수되지 않고



장내에 있는 Clostridium sp.와 Bacteroides sp.에 의해 발효가 되어 H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 메탄 등의 가스 형성에 의한 복부 팽만감과 장의 고창(flatulence), 복통(cramping pains), 복명(borborygmus) 등의 원인이 되고 있다(Steggerda 등 1968). 최근 들어 여러 나라에서 대두를 비롯한 두류를 이용한 가공식품의 제조공정에서 가스 발생의 요인으로 알려진 stachyose와 raffinose를 제거하는 방법의 개발에 많은 관심과 노력이 시도되고 있다. 그러므로 대두단백의 경우 항영양인자 (TI, CTI, urease 등)나 항원인자( $\beta$ -conglycinin)를 제거한 정제 대두단백(ISP)이나 농축 대두단백(SPC)이 사용되어야 한다. 최근 CJ에서는 발효공정을 통해서 이러한 문제를 해결한 대두박을 사료의 원료로서 판매하기 시작했다.

대두박을 발효시킴으로서 대두박내의 탄수화물이 발효과정에 필요한 에너지원으로 이용되어 상대적으로 이 과정에서 단백질은 단백질 분해효소에 의하여 크기가 작은 펩타이드 형태로 변화된다. 또한, 이러한 과정에서 대두박에 함유된 트립신 억제인자나 raffinose와 stachyose와 같은 유해 올리고당의 함량이 낮아지게 된다. 일반적으로 이러한 발효대두박은 사료첨가제로 사용되고 전 세계적으로 약 7000억원 규모의 시장으로 알려져 있다.

대두박 발효에 있어서 이러한 대두와 관련된 문제점이 해결되는 것은 좋은 해결방식이기는 하지만, 발효대두박을 사료로만 사용하는 것은 사료 자체가 500원/kg의 가격대가 형성되어, 부가가치가 낮을 수 밖에 없으므로 발효를 이용하되 이보다 더 고기능성 고부가가치를 생산할 수 있는 방법을 개발하는 것이 바람직하다고 보인다.

#### 다. 참깨박 및 채종박의 식품소재로서의 사전 검토사항

참깨박의 경우는 식품소재였으며, 특별한 부작용이 보고되어 있지 않으므로 식품소재로서 특별히 문제점은 없는 것으로 판단된다.

유채박의 경우는 사료로는 사용하였지만, 식품으로 사용하지 않았던 부분이라서 식품소재로 사용하고 자 할 때는 독성과 안전성에 대한 충분한 검토를 실시해야 할 것으로 보인다. 유채씨의 현 장려품종들은 성분개량 육종 성과에 따라 에르크산을 전혀 함유하고 있지 않다. 에르크산 함량이 높으면 소화 흡수가 불량하고, 심장병이나 심장 골격근염을 일으켜 국제허용기준이 5% 이하로 규정되어 있다.

한편, 유채박은 유독성분인 glucosinolate를 포함하고 있어 이것의 함량이 높은 유채박을 가축사료로 투여할 경우 갑상선 장애를 일으켜 증체가 되지 않거나, 가금류에서는 산란율이 격감하게 된다. 따라서 글루코지노레이트 함량은 유채박 1 g당 3 mg 이하라야 이용할 수 있다.

### 6. 고기능성 고부가가치의 기능성식품 소재 및 미용식품 소재 개발을 위한 전략 (생물전환공정 도입)

본 과제에서 추구하고자 하는 농산부산물의 고기능성 고부가가치 소재화를 위하여 발효 및 효소처리의 생물전환공정을 도입하고자 한다. 생물전환공정이란 미생물발효 및 효소처리 등의 생물학적 방법을 통해 천연물이 함유하고 있는 생리활성물질의 구조적 변화를 유도하여 생리활성 고역가의 기능성분의 생성을 유도하는 기술이다. 본 과제에 참여하고 있는 (주)STR바이오텍에서 독자적 원천기술로 보유하고 있는 면역조절(증강) 효능이 밝혀진 약용버섯의 균사를 이용한 '약용버섯균사 발효 및 효소처리의 생물학적 전환(bioconversion) 기술'은 천연물의 효능을 획기적으로 향상시킬 수 있는 platform

기술로서, 본 과제에서는 다양한 농산부산물(미강, 대두박, 참깨박/유채박 등)에 대한 차별적 효능 우위의 생물전환소재의 개발을 추진하고자 한다.

특히, 상기 농산부산물의 생물전환소재의 개발에 있어서 ①약용버섯균사 발효 및 효소처리의 생물전환공정을 통해 상기 농산부산물 유래 생리활성물질의 생체이용률을 증가시키고, 또한 ②생물전환공정 과정 중 진행되는 상기 농산부산물 생리활성 성분의 생물학적 전환을 통해 농산부산물 고유의 생리활성이 향상된 성분의 생성을 유도함으로써 상기 농산부산물이 갖는 고유의 생리활성 및 효능을 극대화함은 물론, ③생물전환공정 과정 중 진행되는 농산부산물 유래 세포벽 성분의 생물학적 전환을 통해 면역활성을 갖는 물질의 생성을 유도시킴과 동시에, ④생물전환 발효공정 과정에서 발효미생물(약용버섯균사)이 증식하면서 생산된 약용버섯 균사체로부터 세포벽 유래 성분의 생물학적 전환을 통해 면역활성을 획기적으로 향상시킨 면역다당체의 생성을 유도함으로써 획기적으로 향상된 면역활성에 따른 체내 면역력 강화를 통해 각종 질병의 예방 및 개선 효과와 함께 피부건강 향상을 도모할 수 있을 것으로 판단된다.

본 과제에서 말하는 생물전환을 요약하면, 기능성이 있는 농산부산물을 약용버섯균사 발효의 배양배지로 활용함으로써 농산부산물에 들어있는 전분 등의 영양성분을 소모시키고, 기능성성분은 강화시키며, 생물전환 발효공정 과정에서 생산되는 약용버섯 균사체의 세포벽 유래 다당체의 면역활성도 함께 향상시키는 공정으로, 최종적으로는 원래의 농산부산물이 가지고 있는 고유한 생리활성 및 효능을 강화시킬 뿐만 아니라, 일부는 농산부산물에는 없던 기능성 물질로 전환시켜 고기능성 고부가가치 식품소재가 개발될 수 있다.

앞서 기술한 바와 같이, 본 과제의 개발 대상 농산부산물인 미강, 대두박, 참깨박에 대한 생리활성 및 연구개발 현황의 선행조사를 통해 미강, 대두박, 참깨 등은 효소처리 생물전환공정을 통해 생리활성이 향상된 성분의 생성 유도과 함께 생리활성물질의 생체이용률을 증가시킨 성분으로서의 전환이 이루어짐을 확인한 바 있다. 즉, 미강은 표고버섯 균사체 배양에 의해 생산된 효소를 이용하여 불활성 아라비녹실란을 면역활성을 갖는 활성형 아라비녹실란으로 전환시킬 수 있음이 밝혀져 있으며, 대두박의 대표적 생리활성물질인 대두이소플라본은  $\beta$ -glucosidase를 이용하여 배당체 form에서 aglycone form으로 전환시킴으로써 생체이용성과 함께 항산화력이 증가되는 것이 밝혀져 있으며, 참깨의 경우에도 주성분인 lignan 화합물은 물론 플라보노이드, 페놀성 화합물 등의 생리활성물질이 배당체 form으로 존재하며  $\beta$ -glucosidase 등의 효소처리에 의해 aglycone form으로 전환되어 생리활성이 더 증가할 가능성이 밝혀져 있다. 따라서 본 과제에서 추구하는 ‘약용버섯균사 발효 및 효소처리의 생물전환공정’을 통해 미강, 대두박, 참깨박 등의 농산부산물이 갖는 고유의 생리활성 및 효능을 보다 극대화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

선행연구 결과, 증거-기반의 효능분석을 통해 본 과제에서 추구하는 생물전환공정에 의해 생산된 미강 생물전환소재는 면역활성을 획기적으로 향상시킨 소재로  $1 \mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서도 비특이적 선천성 면역반응을 활성화시킬 수 있으면서 특히, 선천성 면역반응의 활성화를 통해 특이적 2차 면역반응 중 주로 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화시킬 수 있는 소재로, 동시에 항진된 Th2 면역반응도 억제시킬 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 Th1 면역반응을 향상시킬 필요가 있거나 또는 Th2 면역반응이 항진되어 발생하는 질환에 있어서 효능을 나타낼 수 있을 것으로 기대된다. 여기에 해당되는 경우로 항병력 (항바이러스/항박테리아) 강화, 항암 활성, 알코올성 지방간/간염 억제, 골 대사 관련 뼈건강 증진, 항당뇨/중성지방 저하, 대장염증질환 개선, 알레르기비염/천식 개선, 아토피 피부염 개선 및 피부건강 향상 등에 직,간접적으로 개선 효과가 나타날 수 있을 것으로 예상되며, 본 과제를 통해 확인하고자 한다.

또한 탈지대두 생물전환소재 및 탈지참깨 생물전환소재의 경우에도 대식세포를 이용한 실험결과 1 $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 대식세포를 활성화 시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 활성화시킨 대식세포에서 인터페론- $\beta$ 의 생성이 유도됨을 확인하여 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화 시킬 수 있는 소재로 판단된다. 따라서 앞서 기술한 미강 생물전환소재에서 기대되는 기능성이 나타날 수 있을 것으로 예상되며, 본 과제를 통해 확인하고자 한다.

특히, 본 과제에서 추구하는 생물전환공정을 통해 유도되는 상기의 면역활성 및 면역특성은 농산부산물에 가지고 있는 고유한 생리활성 및 효능과 시너지 효과를 나타내어 농산부산물 고유의 생리활성 및 효능을 극대화 시키는 데 기여할 것으로 판단된다.

### 1-3. 연구개발 범위

년도	강원대(주관기관)	STR바이오텍(제1협동)	아주대(제2협동)
1차년도	<input type="checkbox"/> 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 지표성분 설정 및 분석법 개발 <input type="checkbox"/> 소재별 피부건강 관련 in vitro 활성 평가 - 항산화 활성 : ORAC assay 등 - 미백 활성 : tyrosinase 저해 활성	<input type="checkbox"/> 농부산물의 생물전환 조건 설정 및 소재화를 위한 생산공정 표준화 - 표준화된 생물전환조건으로 소재화 <input type="checkbox"/> 미강:표준화된 미강 생물전환소재 생산 <input type="checkbox"/> 대두박:생물전환공정 확립 및 대두박 생물전환소재 표준화 <input type="checkbox"/> 참깨박:생물전환공정 확립 및 참깨박 생물전환소재 표준화) <input type="checkbox"/> 표준화된 미강 생물전환소재의 단위독성 평가	<input type="checkbox"/> 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 면역 관련 in vitro 및 in vivo 효능 평가 <input type="checkbox"/> 알코올성 간염 <input type="checkbox"/> 항병력 강화 (항살모넬라/항influenza-virus) <input type="checkbox"/> 항당뇨/중성지방
2차년도	<input type="checkbox"/> 공정별 지표성분 변화 관찰 <input type="checkbox"/> 세포모델을 이용한 피부건강 관련 활성 평가 - 항산화 활성 : DCF-DA staining - 항노화 활성 : X-gal staining - 항산화 효소 분석 : RT-PCR, 등	<input type="checkbox"/> Scale-up 및 validation - 생물전환공정, 추출 및 회수공정 scale-up - 생산공정 validation <input type="checkbox"/> 표준화된 미강 생물전환소재의 13주 반복 독성 평가 <input type="checkbox"/> 표준화된 미강 생물전환소재의 인체적용시험 설계 및 개시	<input type="checkbox"/> 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 면역 관련 in vitro 및 in vivo 효능 평가 <input type="checkbox"/> 알레르기비염/천식 <input type="checkbox"/> 아토피 <input type="checkbox"/> 골대사 관련 뼈건강
3차년도	<input type="checkbox"/> 시제품의 지표성분 변화 관찰 <input type="checkbox"/> 동물모델을 이용한 피부건강 관련 활성 평가 - 주름 개선 활성 : hairless 마우스 - 항산화 효소 분석 : RT-PCR 등	<input type="checkbox"/> 대량 제품화 공정 확립 - 5톤 발효조 생산규모에서의 생산 - 제제화 및 제품화 연구 - 시제품 유통 저장성 확인 <input type="checkbox"/> 표준화된 미강 생물전환소재의 인체적용시험 수행 및 결과보고	<input type="checkbox"/> 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 면역 관련 in vitro 및 in vivo 효능 평가 <input type="checkbox"/> LPS 유도 패혈증 억제 <input type="checkbox"/> 항암 <input type="checkbox"/> 대장염증

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 1절 농산부산물(미강, 대두박, 참깨박) 관련 특허 동향

#### 1. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽 등 PCT 특허 및 검색가능 특허)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	전기간
검색범위	미강, 대두박, 참깨박, 생물전환(국문 및 영문)

검색식	문헌
(대두+ 미강+ 참깨)*면역*(생물전환+ 구조변화)*(버섯+ 미생물+ 효소)	10,180건
(대두+ 미강+ 참깨)*면역*(생물전환+ 구조변화)*(버섯+ 담자균+ 효소)	6,630건
<b>(대두+ 미강+ 참깨)*면역*(생물전환+ 구조변화)*(버섯+ 균사체)*효소</b>	<b>867건</b>
(대두+ 미강+ 참깨)*면역*(생물전환+ 구조변화)*(균사체)	422건
(대두+ 미강+ 참깨)*(피부+ 뼈)*(버섯)*효소	1,578건
<b>(대두+ 미강+ 참깨)*(피부+ 뼈)*(생물전환+ 구조변화)*(버섯+ 균사체)*효소</b>	<b>938건</b>

특허 검색 결과 대부분의 경우, 생물전환에는 버섯 균사(체)가 아니라 미생물을 사용하는 것으로 파악되었으며, 또한 농산부산물로 검색할 경우 검색되는 특허가 적어서 우선 미강을 제외하고는 대두박이나, 참깨박이 아닌, 대두와 참깨를 이용하여 검색하였다. 검색의 여러 단계를 최적화된 검색을 실시한 결과, (대두+ 미강+ 참깨)\*면역\*(생물전환+ 구조변화)\*(버섯+ 균사체)\*효소로 검색된 867건과 (대두+ 미강+ 참깨)\*(피부+ 뼈)\*(생물전환+ 구조변화)\*(버섯)\*효소로 검색된 938건으로, 확인 결과 대부분은 본 과제와 관련이 없었으며 대부분의 경우, 단순 추출물이 대부분이며, 버섯 균사체 배양과 효소처리를 한 경우가 없지는 않았으나, 이들이 사용한 생물전환기술이 본 과제에서 수행하고자 하는 방법과는 달랐다.

## 2. 핵심특허 비교

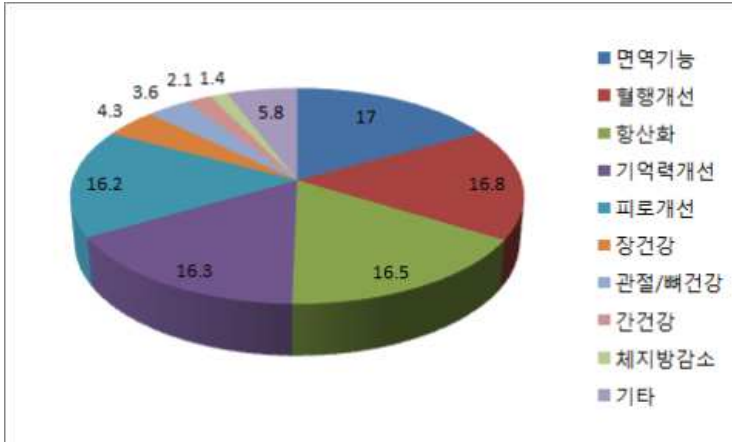
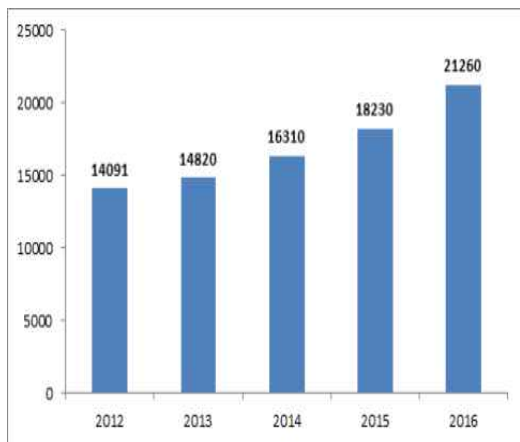
개발기술명		농산부산물의 생물전환기술을 이용한 면역 기능성소재 개발	농산부산물의 생물전환기술을 이용한 뼈건강, 피부건강 기능성소재 개발
Keyword		(대두+ 미강+ 참깨)*면역*(생물전환+ 구조변화)* (버섯+ 미생물+ 효소)	(대두+ 미강+ 참깨)*(생물전환+ 구조변화)*(피부+ 뼈)*(버섯+ 미생물+ 효소)
검색건수		425	424
유효특허건수		4건	4건
핵심특허 및 관련성	특허명	면역활성 증진 복합다당체의 제조방법	미강으로부터 분리한 생리활성물질 및 그 제조방법
	보유국	국내	국내
	등록년도	2005년	2012
	관련성(%)	10%	50%
	유사점	효소처리, 버섯균사체 배양	미강, 버섯, 배양, 효소처리
	차이점	곡물 등 식물조직체를 대상으로 사용하는 것은 유사하지만, 이 특허는 곡류의 헤미셀룰루스가 손상되지 않도록 하는 조건에서 효소처리 및 버섯균사체 배양을 통해 헤미셀룰로스를 생산하는 방법에 관한 것인 반면, 본 과제에서는 헤미셀룰로스를 포함하는 세포벽 성분의 구조변화를 통해 면역활성을 1,000배 이상 획기적으로 향상시켜 선천성면역 향상과 함께 향상된 선천성 면역반응을 통해 2차 면역반응 중 Th1 면역반응을 특이적으로 향상시키는 신규의 면역다당체를 제조하는 것으로 청구항의 주장과도 내용이 전혀 상이함	미강을 버섯 균사체 배양을 통해 미강을 발효시킨다는 점과 효소처리를 한다는 점에서는 유사하지만, 본 과제에서 사용하는 기술과 구체적인 방법이 전혀 상이하고 면역활성에 있어서도 100배 이상 차이가 난다. 또한 본 과제에서는 버섯균사를 이용한 발효 및 효소처리의 생물전환공정에 의해 면역활성을 획기적으로 향상시켜 선천성면역 향상과 함께 향상된 선천성 면역반응을 통해 2차 면역반응 중 Th1 면역반응을 특이적으로 향상시키는 신규의 면역다당체를 제조하는 것으로 청구항에서 주장하는 내용과 전혀 상이함.
핵심특허 및 관련성	특허명	미강 발효물을 유효성분으로 하는 간 보호 발효식품 및 이의 제조방법	미강 발효물을 이용한 아토피성 피부염 개선제 조성물
	보유국	국내	국내
	등록년도	2014년	2014
	관련성(%)	10%	30%
	유사점	미강, 미생물, 발효	미강, 미생물발효, 아토피
	차이점	미강을 미생물로 발효시킨다는 점에서는 유사하지만, 이 특허는 발효미생물로 청국장 분말을 사용하는 반면에, 본 과제에서는 버섯균사를 이용한 발효 및 효소처리의 생물전환공정에 의해 면역활성을 획기적으로 향상시켜 선천성면역 향상과 함께 향상된 선천성 면역반응을 통해 2차 면역반응 중 Th1 면역반응을 특이적으로 향상시키는 신규의 면역다당체를 제조하는 것으로 청구항에서 주장하는 내용과 전혀 상이함.	미강을 미생물로 발효시킨다는 점에서는 유사하지만, 이 특허는 발효미생물로 광합성세균인 로도박터 캡슐라투스를 사용하는 반면에, 본 과제에서는 버섯균사를 이용한 발효 및 효소처리의 생물전환공정에 의해 면역활성을 획기적으로 향상시켜 선천성면역 향상과 함께 향상된 선천성 면역반응을 통해 2차 면역반응 중 Th1 면역반응을 특이적으로 향상시키는 신규의 면역다당체를 제조하는 것으로 청구항에서 주장하는 내용과 전혀 상이함.
핵심특허 및 관련성	특허명	꽃송이 버섯 균사체 배양액을 포함하는 천연항균 제, 이를 포함하는 식품, 화장품 또는 사료 조성물	콩가공부산물을 미생물로 발효함으로써 이소플라 본 비배당체의 함량을 증진시키는 방법
	보유국	한국	한국
	등록년도	2014	2013
	관련성(%)	30%	50%
	유사점	대두부산물, 버섯균사체 배양, 피부건강	대두 생물전환 공정을 사용함.
	차이점	대두부산물을 이용하여 버섯 균사체 배양을 통해 다당체를 함유하는 소재를 생산하는 측면에서는 유사하지만, 이 특허는 천연항균 활성이 주목적인 반면에, 본 과제는 버섯균사를 이용한 발효 및 효소처리의 생물전환공정에 의해 면역활성을 획기적으로 향상시켜 선천성면역 향상과 함께 향상된 선천성 면역반응을 통해 2차 면역반응 중 Th1 면역반응을 특이적으로 향상시키는 신규의 면역다당체를 제조하는 것으로 청구항에서 주장하는 내용과 전혀 상이함.	콩가공부산물을 미생물로 발효하여 이소플라본의 배당체 함량을 증진시킨다는 점에서는 유사하지만, 이 특허는 발효미생물 B. licheniformis LS02로 한정시키고 있는 반면에, 본 과제에서는 버섯균사를 이용한 발효 및 효소처리의 생물전환공정에 의해 면역활성을 획기적으로 향상시켜 선천성면역 향상과 함께 향상된 선천성 면역반응을 통해 2차 면역반응 중 Th1 면역반응을 특이적으로 향상시키는 신규의 면역다당체를 제조하는 것으로 청구항에서 주장하는 내용과 전혀 상이함.

## 2절 국내의 건강기능식품 시장 및 제품 현황

### 1. 국내 건강기능식품 시장 현황

국내 건강기능식품 시장규모는 2016년 기준 2조 1,260억원으로, 세부적으로 고시형 건강기능식품인 홍삼제품이 전체 건강기능식품 시장에서 9천900억원의 가장 큰 비중을 차지하여 한 품목에 편중된 시장구조를 가지고 있다. 기능성 별로는 ‘면역기능 개선’ 관련 제품의 1조984억원으로 가장 높았고, 다음은 혈행개선, 항산화 순 이었다.

#### 【연도별 건강기능식품 판매실적(좌) 및 기능성별 건강기능식품 매출 현황(점유율)】



자료: 2016년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 식품의약품안전청

최근에는 새로운 기능성을 가지는 개별인정형 건강기능식품이 꾸준히 성장하면서 시장이 다변화 되고 있으며, 개별인정형 건강기능식품의 신규시장의 창출 가능성이 커지면서 많은 식품기업들이 새로운 개별인정형 소재를 찾는 데 주력하고 있다. 2016년 개별인정형 건강기능식품의 생산실적은 2,357억원으로 제품 별로는 당귀혼합추출물이 533억원으로 전체의 23%를 차지하여 가장 많았으며, 헛개나무과병추출분말이 249억원으로 11%, 초록입홍합추출오일복합물이 145억원으로 6%를 차지하는 순으로 나타났다.

**【국내 건강기능식품 품목별 생산액 현황】**

순위	구분	총 생산액(억원)					
		'14년		'15년		'16년	
			점유율(%)		점유율(%)		점유율(%)
	계	16,310	100	18,230	100	21,260	100
1	홍삼	6,330	38.8	6,943	38.1	9,900	46.6
2	개별인정형	3,177	19.5	3,195	17.5	2,357	11.1
3	프로바이오틱스	1,388	8.5	1,579	8.7	1,903	9.0
4	비타민 및 무기질	1,415	8.7	2,079	11.4	1,843	8.7
5	밀크씨슬 추출물	676	4.1	705	3.9	1,091	5.1
	누계(5품목)	12,987	79.6	14,501	79.5	17,093	80.4
6	EPA 및 DHA 함유 유지	396	2.4	485	2.7	700	3.3
7	알로에	575	3.5	560	3.1	475	2.2
8	인삼	424	2.6	307	1.7	311	1.5
9	루테인	111	0.7	204	1.1	309	1.5
10	가르시니아 캄보지나 추출물	221	1.4	277	1.5	278	1.3
	누계(10품목)	14,716	90.2	16,333	89.6	19,167	90.2
11	기타 품목	1,314	9.8	1,897	10.4	2,093	9.8

자료: 2016년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 식품의약품안전청, 2016.

가) 미강 생물전환소재(면역기능 개선)와 관련된 시장현황

국내 면역력 증진에 도움을 주는 대표적인 건강기능식품 소재로는 홍삼, 인삼, 알록시글리세롤이 고시되어 있으며, 최근 다양한 면역기능 증진소재에 대한 관심이 높아지면서 연구 및 기술개발의 속도가 증가하고 있다. 국내 면역증강제 시장은 연간 10-20% 상승세를 나타내며 2010년에는 2,500억원 규모의 시장으로 성장하고 있다.

면역기능 개선과 관련하여 인정된 개별인정형 소재는 아래와 같으며, 미강을 유래로 한 면역기능 개선 소재는 없는 상태이다.

미강 유래 개별인정형 기능성원료

현재 식품의약품안전청에 개별인정형 기능성원료로 인정된 원료 중 쌀 유래의 원료로는 CJ의 쌀겨추출물이 유일하다. 따라서 국내에서는 미강 유래 개별인정형 기능성원료를 개발하고자 하는 시도는 미미한 상황이라 생각된다. 특히, 일본에서 개발되어 이미 전세계적으로 판매되는 바이오브랜 아라비녹실란 제품도 아직 국내에서 개별인정을 받지 못한 상태이다.

인정번호	원료명	업체명	기능성내용
제2009-66호	쌀겨추출물	CJ제일제당(주)	피부보습에 도움을 줄 수 있음.

국내 면역기능 개선 관련 건강기능식품 개별인정형 기능성원료 현황

기능성		기능성원료	건수
면역기능 개선	면역기능 증진에 도움	L-글루타민, 게란티바이오게르마늄효모, 금사상황버섯, 다래추출물, 당귀등추출복합물, 당귀혼합추출물, 동충하초주정추출물, 청국장균배양정제물, 표고버섯균사체, 피엘에이지(PLAG), 효모베타글루칸	11
	과민면역반응 완화에 도움	구아바이추출물등복합물, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토청말 등복합물, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말,	5

현재까지 ‘면역기능 증진’과 관련하여 개별인정을 받은 소재는 게르마늄효모, 금사상황버섯, 당귀혼합추출물, 스피루리나, 클로렐라, 표고버섯균사체, L-글루타민, 폴리감마글루탐산, 동충하초주정추출물, 합성PLAG, 효모베타글루칸 등 11건이 개별인정을 받았으며, 이중 폴리감마글루탐산은 고시형으로 전환되었다. 또한 ‘과민면역반응 완화’와 관련하여 개별인정을 받은 소재는 구아바이추출물등복합물, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토청말등복합물, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, 등 5건이 개별인정을 받았다. 그러나 이 중에서 2013년 314억원의 생산실적을 올린 당귀혼합추출물 외에는 각 소재의 매출이 현재까지 미진한 편이다. 최근에 효모 유래 베타글루칸이 시장에 진입했으며, 이 제품은 미국 Wellmune社의 효모 유래 베타글루칸을 수입한 것으로, EU 최초로 건강기능식품으로의 기능성을 인정받기 위한 EU 자체 프로젝트인 Fibebiotics 컨소시엄에서 선택된 5가지 다당체 중 하나이다.

현재까지 개발된 면역기능 증진 개별인정형 소재는 상대적으로 고가의 가격을 유지하고 있기 때문에, 본 연구개발의 미강 생물전환소재는 국내산 농산부산물을 이용함으로써 상대적으로 저렴한 원재료비를 바탕으로 하여 가격경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 추정되기 때문에, 기존의 개별인정형 소재보다 소비자들의 접근을 용이하게 할 수 있을 것으로 판단되어 개별인정형 기능성소재 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

또한, 국내산 농산부산물을 원료로 사용하기 때문에 농산물의 부가가치를 높일 수 있으며, 본 과제를 통해 확보될 자료를 바탕으로 하여 중국을 비롯한 대만, 동남아 등의 보건식품 소재로의 추가 등재를 추진하여 국제적으로 진출할 수 있는 자료를 구축함으로써 차후 시장확대도 가능할 것으로 판단되며, 이를 통해 국내 농산물의 세계시장 판로 확대에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.



#### 부가기능성(간 보호/중성지방) 관련 시장

간 보호 관련 시장은 국내 건강기능식품에서 3%를 차지하지만, 이는 시장에 적절한 제품이 없기 때문이지 간 관련 질환의 유병률이 낮아서가 아니다. 아직 간 보호 관련된 건강기능식품의 인체적용시험(임상시험)은 부족한 상황이지만, 간 보호와 관련되어 많은 연구가 시도되고 있다. 예를 들어 베타글루칸이 주성분이라고 생각되는 아가리쿠스버섯 등이 비알코올성 지방간에 효과가 있음이 마우스 실험으로 확인되었고, 같은 시기에 표고버섯 역시 고지방식에서 간에서 중성지방 축적이 줄어드는 것을 확인하고 있다.

현재 전세계 만성간질환환자 수는 약 6~8억 명에 이르고 우리나라에선 간질환이 40대 사망원인 순위가 1위일 정도로 심각하기 때문에 건강기능식품의 소재로 손상된 간세포의 재생, 간기능 증진, 간쿠퍼세포 활성화 또는 인체의 면역기능을 증진시켜 간질환 예방은 물론 간기능을 개선하여 초기 간질환을 개선하려는 시도가 진행되고 있는 것으로 보인다. 이러한 시장에서 필요한 제품은 항산화의 기능을 위주로 한 제품이 아니라, 간세포의 파괴에 의해서 발생하는 2차 면역반응에 의한 염증을 억제하고 특히, 간 손상을 일으키는 사이토카인의 분비를 억제할 수 있는 제품으로, 초기 간 질환을 개선하려는 연구가 진행되고 있다. 이제 면역관련 물질을 이용하여 간을 치료하려는 것이 새로운 흐름을 이루고 있고, 우선적으로 Th1 사이토카인을 증가시키거나, Th2 사이토카인을 낮추는 방법, 그리고 TGF- $\beta$ 를 억제하는 방법 등이 연구되고 있다.

현재 구체적으로 집계된 자료는 없지만, 간 보호와 관련되어 베타글루칸 혹은 약용버섯 시장은 확대될 것으로 예상된다. 그러므로 농산부산물을 이용한 면역기능 증진의 기능성을 갖는 소재의 제품화가 성공하면 간 보호 관련 시장이 열릴 것으로 생각되며, 가장 큰 시장은 가까운 중국이라고 판단된다.

#### 부가기능성(알레르기비염/천식) 관련 시장

알레르기성 비염은 최근에 환경오염, 공해 등으로 환자수가 증가하여 세계인구의 약 20-30 %를 차지하며, 만성질환 중에서 심장질환보다도 환자가 많은 여섯번째 질환으로 보고되었다. 특히, 천식환자만 전세계적으로 약 3억명으로 추산되며, 매년 25만명의 천식환자가 제대로 치료받지 못해 사망한다고 보고되고 있다.

국내 알레르기성 비염의 의약품시장은 2000억원에 이르며, 치료가 되지 않아서 매년 많은 수의 환자들이 불편함을 겪고 있으며 지금까지 치료제로 나온 대부분의 약들이 질병의 진행을 되돌리는 것이 아니라, 증상만을 억제하기 때문에 병이 개선되지 않고, 오히려 환경 문제 등으로 인하여 알레르기비염/천식 환자가 매년 증가하고 있다.

알레르기성비염과 천식과 같은 경우, 면역과 관련되어 있어 면역기능을 증진시켜 주는 건강기능식품이 도움을 줄 수 있다. 과민면역반응 완화의 개별인정형 제품인 다래추출물은 Th2 면역반응을 억제하는 효과는 있으나, Th1 면역반응을 직접적으로 올리는 것은 아닌 것으로 알려져 있다. 면역과민반응에 의한 피부상태 개선의 개별인정형 제품인 CJ의 CJLP133 유산균 제품은 Th1/Th2 사이토카인을 모두 낮추고, Treg을 증가시키는 것으로 나타났으나, 그 효과가 스테로이드나 면역억제제에 비해서는 크지 않으므로 아직 시장에서의 반응이 크지는 않은 것으로 보인다. 따라서 본 과제에서 추구하는 미강 생물전환소재와 같이 Th1 면역반응을 안전하게 올리고, 반면에 항진된 Th2 면역반응을 낮추어 주는 제품은 아직 시장에 나오지 않은 것으로 보인다.

그러므로 본 과제에서 추구하는 미강 생물전환소재가 출시된다면, 시장을 장악하기에 매우 좋은 상황이라고 판단된다.

나) 대두박 생물전환소재(빠건강)와 관련된 시장현황

대두 유래의 기능성소재는 아래와 같이 다양한 기능성으로 건강기능식품 개별인정을 받았다. 특히 대두 이소플라본은 11건이나 되는 제품들이 “빠건강에 도움”으로 개별인정을 받아 고시형으로 전환되었으므로 이 부분에 효과가 뛰어남을 알 수 있다.

대두 이소플라본은 에스트로젠과 유사구조를 가지고 있는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)으로 세포내에서 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER)와 결합하여 에스트로젠 효과를 나타내며 부작용도 거의 유발하지 않으며, 폐경 후 여성호르몬인 에스트로젠의 분비 감소에 따른 골다공증 예방 및 치료를 위한 대체요법으로 사용되고 있으며, 비슷한 기능성인 갱년기 여성 건강의 기능성으로 개별인정을 받은 백수오복합추출물이 2013년 740억원의 매출을 올린 성공사례도 있어, 본 과제에서 개발하고자 하는 대두박 생물전환소재의 경우 조골세포의 분화에 밀접한 관련이 있는 이소플라본은 구조변화를 통해 기능성이 향상될 것으로 기대되며, 또한 생물전환공정을 통해 새롭게 생성되는 면역활성 다당체는 파골세포의 억제와 관련이 있을 것으로 기대되어, 시너지 효과를 통해 보다 향상된 기능성으로 개별인정형 기능성소재 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

국내 대두 유래 건강기능식품 개별인정형 기능성소재

인정번호	원료명	비고	기능성내용
2010-53	서목태(쥐눈이콩) 펩타이드 복합물		체지방 감소에 도움 식후 혈당 상승억제에 도움 (3등급) 높은 혈압 감소에 도움
2007-10 2007-11 2008-18 2012-31 2012-32	콩발효추출물	고시형전환	혈당조절
2007-11 2008-18	토치대두발효 추출물		혈당조절
2008-20 2008-25 2008-27 2008-28 2008-29 2008-72 2008-73 2008-77 2008-80 2009-11 2009-13 2009-26 2009-27 2009-44	대두이소플라본	고시형전환	빠건강에 도움을 줄 수 있음
고시형	대두단백		혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
고시형	대두식이섬유		혈중 콜레스테롤 개선·식후 혈당상승 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음
2005-20	대두올리고당		장내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움 배변활동 원활에 도움

인정번호	원료명	비고	기능성내용
2008-6	대두배아추출물 등 복합물,		체지방 감소에 도움
고시형	레시틴		혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
2013-6	나토균 배양분말		혈행개선
2006-6 2006-9 2008-71 2009-8	포스파티딜세린	고시형전환	인지력 개선
2013-29 2013-30	포스파티딜세린	고시형	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강을 유지하는데 도움

다) 참깨박 생물전환소재(피부건강)와 관련된 시장현황

이너뷰티 시장은 2009년 아모레퍼시픽의 V=B 제품을 런칭하면서 국내에 소개되었다. 당시 50억원에 불과한 시장은 2011년에 1500억 시장으로 성공했고, 2013년에는 3000억원에 이를 것으로 예상되며 일본은 2012년 2조 3천억원의 시장규모로 국내의 약 15배 규모이다.

일본은 스틱 젤리 등 새로운 제형의 개발과 태반(placenta) 등의 신성분의 발견에 있는 것으로 분석됐다. 또한 피부미용, 노화방지, 미백, 차가운 체질 개선 등 4가지 분야로 나뉘어 고른 성장을 보이고 있다.

한국의 이너뷰티 시장은 대부분의 매출이 콜라겐과 히알루론산 등 피부미용에 집중되어 있는 편이지만 최근에는 미백 등 새로운 분야로 확대되고 있다. 또한 아모레퍼시픽과 LG생활건강, CJ 등 대기업 그리고 화장품회사 및 제약회사까지 합세해 다양한 신제품이 출시되고 있는 추세이다.

이너뷰티 제품은 화장품으로 분류되지 않고 건강기능식품으로 분류되며, 일반적인 영양보조제나 비타민제가 전체적인 영양 균형에 초점을 맞추는 것과 다르게 이너뷰티 제품들은 인체에 필요한 영양소 중 피부에 유효한 성분들로 집중 구성되어 있다.

결론적으로 제품 및 시장분석 결과, 본 과제를 통해서 무엇보다 ①경제적인 생산과정의 확립 및 ②고기능성에 대한 검증을 목표로 두고 과제를 진행할 계획이다.

## 2. 국외 제품생산 및 시장 현황

### 가) 국외 시장 현황

세계적인 고령화 추세와 더불어 웰빙 및 로하스 등 건강지향적 라이프 스타일의 확산으로 세계 건강기능성식품 시장은 지속적으로 성장해 왔으며, 2015년 기준 세계 건강기능성식품 시장은 1,179억불 (130조원) 규모이며, 그 동안 미국, 유럽, 일본 등 선진국들이 세계 건강기능성식품 시장을 주도하였지만, 향후 중국, 인도, 라틴아메리카 등 신흥공업국들이 견인해 나갈 것으로 전망되고 있다.



- ※ 세계 시장 규모 : 3,500억달러, 한화 약 400조원) (NBJ, '12)
- ※ 국내 시장 : 연평균 성장률 27.4% 수준(5개년 기준, 식약청, 12 보도자료)

최근 건강기능성식품 산업의 글로벌 키워드로는 실버세대, 면역, 피부미용, 만성질환, 건강장수, 정신건강, 자기관리, 천연성, 파마푸드(pharma foods), 천연성분, 아동/청소년, 스포츠/에너지 등을 들 수 있으며, 건강유지를 위해서 치료보다는 예방을 중시하는 소비자의 요구와 사회적 필요성으로 향후 세계 건강기능성식품에 대한 수요는 지속적으로 증가할 것으로 전망된다.

### 【세계 건강기능성식품 매출액】

[단위: 억 달러]

구분	2011	2012	2013e	2014e	2015e
Supplements	902	961	1,034	1,100	1,179
Natural/Organic Food	915	1,010	1,116	1,231	1,357
N&OPC&HH Products	339	374	441	452	486
Functional Food	1,061	1,119	1,180	1,247	1,315
Total	3,217	3,464	3,741	4,029	4,347

#### 면역소재로서의 약용버섯 해외시장 분석

일본, 유럽, 미국 등 해외 약용버섯 시장은 지속적으로 증가하고 있다. 1994년 약용버섯, 버섯 추출물 및 이것으로부터 유래된 제품의 시장규모가 38억불 이었으나, 1999년에는 60억불로 증가했다. 시장을 분석하면 북미는 1994년 3500만불에 불과해 아시아와 유럽이 거의 99%의 시장을 차지하고 있으며 북미는 1%에 불과하였다. 하지만 미국도 그 이후로 매년 20~40%씩 시장이 성장하고 있다. 이는 천연물(한약재)에 오랜 경험을 가진 나라에서 우선적으로 약용버섯과 면역소재에 관심을 보이고 있음을 나타낸다. 2002년 약용버섯 시장은 110억불에 이르는 것으로 추정하였으며, 이 중 가장 큰 시장이 건강기능식품용이었다. 최근의 정확한 추산은 어렵지만 2012년 전세계 약용버섯의 시장은 250억불에 이르는 것으로 추정하고 있으며, 이 중 영지버섯만 약 50억불에 이르는 것으로 추산된다. 이러한 추산으로 볼 때 전세계적으로는 이미 약용버섯 시장이 오메가-3의 시장을 압도한 것으로 생각된다.

하지만 약용버섯을 섭취하는 이유가 면역력의 증강에 있음에도 불구하고 약용버섯은 아직까지 버섯을 단순 분말화하거나, 단순추출물로 이루어진 저가의 제품이 시장을 형성하고 있으며 특히, 효과가 객관적으로 검증되지 못하고 임상결과도 효과가 뚜렷하지 않은 상태이다. 이에 효과가 뛰어나고, 농산 부산물을 이용하여 경제적인 가격의 면역소재를 출시할 경우에는 거대시장에서 우월적인 위치를 차지할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 나) EU 면역소재 개발 현황

EU의 경우 면역기능의 health claim을 요구하고 있는 다당체에 대해서 아직까지 건강기능식품으로 효능을 인정하고 있지 않으나, 최근 들어 여러 가지 후보물질들을 추천 받아서 EU 최초로 건강기능식품으로의 가능성을 인정하기 위한 EU의 자체 프로젝트를 FP7(The Seventh Framework Programme)안에 Fibebiotics 라는 프로젝트로 포함시켰다. 이는 유럽에서의 향후 면역소재(다당체)의 시장 향방을 예측할 수 있는 매우 중요한 프로젝트라고 할 수 있다.

이 프로젝트가 수행하고자 하는 내용은 이미 효능이 거의 확인된 후보물질을 대상으로 QC와 관련된 실험을 한 후에 바로 인체적용시험(임상시험)을 진행해서 효능을 객관적으로 검증하는 것이다. 이 과정은 건강기능식품의 기능성 주장을 위해서 산업계가 컨소시움을 이루어서 과제를 하는 첫 번째 사례가 된다는 점에서도 중요하지만, 무엇보다 EU로 청원이 들어온 다른 30개의 'bioactive compounds 및 functional products에 대한 프로젝트'와 경쟁해서 상기 'health claim을 목적으로 한 다당체 프로젝트'가 선정되었다는 점이다. 그러므로 이 프로젝트는 건강기능식품으로 등재 가능성이 가장 높은 물질을 선발했다고 볼 수 있다.

이 프로젝트는 미국 웰문社의 효모 베타글루칸을 비롯한 5개 제품을 대상으로 일차 비교실험을 진행한 후에, 최종 인체적용시험을 진행할 계획으로 알려져 있다.

FP7의 Fibebiotics 프로젝트를 간단히 소개하면 다음과 같다.

과제명	장관(Gut) 및 면역 기능을 향상시키는 다당체 부제목: 다당체의 기능성 확인(From polysaccharide compound to health claim)
기간	2012년 1월 1일 ~ 2016년 6월 1일
연구비	6백만 유로
목적	다당체에 대한 생물학적 활성이 있는 기능을 연구하고 건강관련 주장(claim)을 지지할 수 있는 지식을 창출함.
가설	다당체는 장관 및 면역 기능, 선천성면역과 적응면역을 support 한다. 서로 다른 다당체와 formulation은 서로 다른 생물학적 효과를 나타낼 수 있다. Tools & models 은 건강에 대한 효과를 유지하고 표준화하는데, 필요한 건강기능 식품의 설계에 도움이 된다.
주요목표	물질, 가공방법에 의한 효과, 및 구조와 기능간의 관계를 파악하기 위해서 생화학적 분석을 수행한다. 다당체를 분류하고 제품 디자인을 위해서 in vitro 스크린 방법을 표준화한다. 작용기전을 연구하고, 생물표지자를 유효성을 검증하기 위하여 in vivo 및 ex vivo 분석을 이용한다. 노인을 대상으로 임상시험을 수행하여, 지식의 유효성을 평가한다.
조사대상 물질	①웰문사(社)의 효모 베타글루칸, ②오트웰사(社)의 귀리(oat) 베타글루칸, ③NAXUS사의 아라비녹실란, ④표고버섯의 베타글루칸, ⑤Lactobacillus mucosae균이 분비하는 베타글루칸

이들 후보물질들은 이미 시장에서 널리 판매되고 있는 제품들이라서, 제조회사가 자체적으로 오랜 임상자료와 경험을 축적하고 있는 제품들이다. 특히, 아라비녹실란은 국내에 소개된 지 오래되었고, 미국 웰문사의 효모 베타글루칸은 앞서 언급했듯이 2013년 국내에서도 건강기능식품으로 등재되어 판매가 이루어지고 있는 물질이다.

Fibebiotics 컨소시엄에서 시험하는 5개 제품의 시장성은 다음과 같다.

#### 효모 베타글루칸

효모 베타글루칸은 매우 다양한 회사들이 베타글루칸이라는 이름으로 다양한 제품을 내놓고 있으며, 베타글루칸 제품의 기능을 비교한 Vetvickova의 논문을 보면 미국내의 다양한 회사가 효모 베타글루칸을 제조하고 있으며, 면역활성도 제품에 따라 큰 차이를 보이고 있다. 효모 베타글루칸의 대표회사로 미국의 Wellmune社와 유럽의 노르웨이 Biotec Pharmacon ASA社가 있다.

#### 오트밀 베타글루칸

오트밀의 베타글루칸은 면역소재로 인정되기는 하지만, 일반적으로는 식이섬유로 더 가치를 부여받고 있으며 면역소재로서의 기능은 약한 편이다. 오트밀의 베타글루칸은 전세계의 많은 회사에서 다양한 제품이 출시되고 있다.

### 밀/쌀 아라비녹실란

아라비녹실란은 밀 또는 미강 유래의 다당체로부터 개발되어진 기능성소재로서, 일본 대화약품(Daiwa pharmaceutical Co., Ltd.)에서 개발된 바이오브랜 MGN-3를 대표적인 소재로 꼽을 수 있으며, 미강 유래 수용성 다당체를 효소분해하여 제조된 원료로서, 1992년 일본 대화약품의 Hiroaki Maeda에 의해 개발되어 현재 일본을 비롯한 대만, 태국, 베트남, 싱가포르, 필리핀, 말레이시아, 아랍에미리트, 호주, 인도네시아, 미국, 인도, 그리스, 폴란드 등 18개국 이상의 국가에서 판매되고 있으며, 매출액은 연간 약 4500억원 이상으로 추정될 정도로 높은 매출액을 보이고 있다.

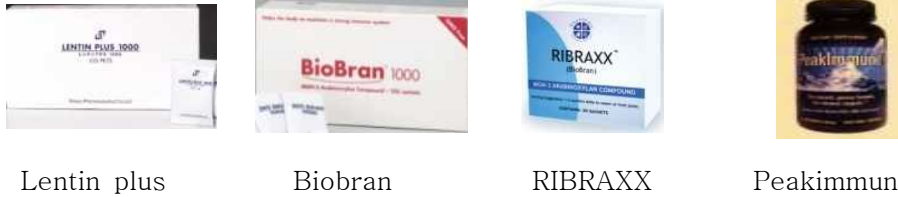


그림. 일본의 미강 유래 기능성소재(MGN-3)를 이용한 제품 현황

### 일본 일부지역의 방사능 오염에 의한 시장의 변화

특히, 일본은 미강 유래 기능성 다당체 연구 개발의 선두주자로 바이오브랜이라는 대표소재를 통해서 시장을 선점하고 있는 상태이다. 이 제품의 주요성분인 아라비녹실란은 이번 EU에서 수행하는 FP-7의 프로젝트 Fibebiotics 에서 5가지 대표소재 중의 하나로 선발되었다. 하지만 일본은 현재 방사성 오염물질의 재오염으로 인하여 일본산 농산물의 수입을 모두 꺼리는 상황이기 때문에 미강 유래 기능성 다당체 시장에 큰 변화가 있으리라고 생각된다. 이러한 변화를 주도하기 위해서는 외국에서 요구하는 수준의 자료를 준비해야 한다. 특히, 유럽은 아주 높은 수준의 자료를 요구하지만, 이번 FP-7의 프로젝트를 통해서 어떠한 자료를 제공해야 하는 것인가가 드러날 것으로 보인다. 또한 이 프로젝트가 600만 유로의 비용으로 진행된다는 것을 고려한다면, 미리부터 준비하지 않는다면, 새로운 기회를 놓칠 수 있다고 생각된다.

### 표고버섯 베타글루칸

표고버섯 유래 베타글루칸 제품은 일본에서 시작했으므로, 주로 일본에서 제조 및 판매되고 있다. 초기에는 의약품으로 개발되었으나, 이후 건강기능성식품으로 개발되고 있다. 효모 베타글루칸 뿐만 아니라 버섯 유래 베타글루칸도 미국에서 다양한 제품이 판매되고 있다. EU의 경우 대표적인 회사가 노르웨이의 Glycanova社로 이 회사는 표고버섯 베타글루칸으로 이루어진 Lentinex 라는 제품이 GRAS 인정을 받아, 전세계에서 판매되고 있다.

### 미생물이 분비하는 베타글루칸

미생물 역시 베타글루칸을 분비하는 것으로 알려져 있다. 그러나 베타글루칸의 구조가 버섯이나, 효모의 베타글루칸과는 약간 다른 것으로 알려져 있다. 특히, 흑효모의 베타글루칸은 국내와 일본에서도 약간의 시장을 가지고 있으나, 시장규모는 파악하기 어려우나 크지 않은 것으로 보인다. 이번 EU에서 수행하는 FP-7의 프로젝트 Fibebiotics에 Lactobacillus mucosae균이 분비하는 베타글루칸이 5가지 대표소재 중 하나로 선발되었다.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

## < 목차 >

#### 1절. 생산공정 및 Bioassay 실험법 설명

##### 1. 농산부산물화 탈지공정 설명

##### 2. 생물전환공정 설명

가. 발효미생물 증균배양공정

나. 농산부산물(생물전환)산물 생산공정

(1) 전처리공정

(가) 이물 및 곰팡이 세척공정

(나) 농산물 및 농산부산물 자원의 배양배지화를 위한 가수분해효소에 의한 효소처리공정

(2) 발효 및 효소처리 생물전환공정

(3) 후처리공정

##### 3. Bioassay 실험법 설명

가. 대식세포(마크로파지)의 배양

나. 대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 측정

다. 대식세포(마크로파지)의 Cytokine 분비능 측정

#### 2절. 미강의 고기능성/고부가가치 소재 개발

##### 1. 생산공정 표준화를 위한 면역활성 평가

가. 품종별 미강 및 미강(생물전환)산물의 면역활성 비교

나. 품종별 미강(생물전환)산물의 면역활성 재현성 평가

다. 미강(생물전환)산물의 3반복 생산에서 면역활성 평가 : 효능 및 독성시험용 소재생산

라. 탈지공정에 따른 미강 및 미강(생물전환)산물의 면역활성 평가

마. 탈지공정에 따른 미강(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 평가

##### 2. 미강(생물전환)산물의 지표성분 설정 및 분석법 개발

가. 미강 원물 및 (생물전환)산물의 추출 및 농축

(1) 100% ethanol을 이용한 추출 및 농축

(2) 70% ethanol을 이용한 추출 및 농축

(3) 100% methanol을 이용한 sonication 추출

나. 개발소재의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건 확립

(1) 20배수 3회연속 추출

(2) 추출배수 설정을 위한 실험

(3) 100배수 3회연속 추출

(4) 최적 시료추출조건 설정

다.  $\gamma$ -Oryzanol의 분석법 확립을 위한 예비실험

(1) 이동상 및 Flow rate에 따른 분석법 조사

(가) 이동상 1번 조건

(나) 이동상 2번 조건

(다) 이동상 3번 조건



- (라) 이동상 1번 조건에서 유속 변경
- (마) 이동상 5번 조건
- (바) 이동상 5번 조건에서 컬럼 온도 변경
- (사) 이동상 6번 조건
- 라. 품종별 미강 21종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\gamma$ -Oryzanol 함량 분석
- 마. 미강 원물 및 (생물전환)산물의  $\gamma$ -Oryzanol method validation
- 바. 미강 시제품의  $\gamma$ -oryzanol 함량 분석
- 3. 미강 원물 및 (생물전환)산물의 지표성분 분석 최적조건 확립**
- 4. 50L 규모에서의 생산공정 표준화**
  - 가. 생산단계별 시료의 지표성분인  $\gamma$ -Oryzanol 분석
    - (1) 주관기관 결과
    - (2) 제1협동기관 결과
  - 나. 생산단계별 시료의 Bioassay
- 5. 50L 규모에서의 생산공정 validation**
  - 가. 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증
- 6. 2ton 규모에서의 생산공정 scale-up 확립**
- 7. Pilot 규모에서의 시제품 생산 : 표준화된 개발소재의 시제품 생산**

### 3절. 대두의 고기능성/고부가가치 소재 개발

- 1. 생산공정 표준화를 위한 면역활성 평가**
  - 가. 콩 종류별 면역활성 조사
  - 나. 콩 종류별 (생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가
  - 다. 생산지별 대두 면역활성 조사
  - 라. 생산지별 대두(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가
  - 마. 경남 거창 대두(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가
  - 바. 생산지별 대두(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가
  - 사. 품종별 대두의 면역활성 평가
  - 아. 품종별 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가
  - 자. 3반복 생산에서 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가 : 효능 및 독성시험용 소재 생산
    - (1) 3반복 생산에서 생산지별 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가
    - (2) 3반복 생산에서 품종별 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가
    - (3) 3반복 생산에서 진품 품종의 대두(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가
- 2. 대두(생물전환)산물의 지표성분 설정 및 분석법 개발**
  - 가. 개발소재의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건 확립
    - (1) 20배수 3회연속 추출
    - (2) 추출배수 설정을 위한 실험
    - (3) 100배수 3회연속 추출
    - (4) 최적 시료추출조건 설정
  - 나. 대두 원물 및 (생물전환)산물의 추출
    - (1) 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 대두 원물
    - (2) 제1협동으로부터 제공받은 품종별 대두(생물전환)산물의 sonication 추출
    - (3) 제1협동으로부터 제공받은 탈지대두의 sonication 추출

- 다. 탈지대두의 Isoflavone 함량 분석
- 라. 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량 분석
- 마. 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone method validation
- 바. 대두 시제품의 isoflavone 함량 분석

**3. 대두 원물 및 (생물전환)산물의 지표성분 분석 최적조건 확립**

**4. 50L 규모에서의 생산공정 표준화**

- 가. 생산단계별 시료의 지표성분인 Isoflavone 분석
  - (1) 주관기관 결과
  - (2) 제1협동기관 결과
- 나. 생산단계별 시료의 Bioassay

**5. 50L 규모에서의 생산공정 validation**

- 가. 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

**6. 500L 규모에서의 생산공정 scale-up 확립**

**4절. 참깨의 고기능성/고부가가치 소재 개발**

**1. 생산공정 표준화를 위한 면역활성 평가**

- 가. 깨 종류별 면역활성 조사
- 나. 깨 종류별 (생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가
- 다. 생산지별 참깨 면역활성 조사
- 라. 생산지별 생참깨(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가
- 마. 경남 거창 참깨(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가
- 바. 생산지별 참깨(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가
- 사. 품종별 참깨 면역활성 조사
- 아. 품종별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가
- 자. 3반복 생산에서 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가 : 효능 및 독성시험용 소재 생산
  - (1) 3반복 생산에서 생산지별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가
  - (2) 3반복 생산에서 품종별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가
  - (3) 3반복 생산에서 진을 품종의 참깨(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가

**2. 참깨(생물전환)산물의 지표성분 설정 및 분석법 개발**

- 가. 개발소재의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건 확립
  - (1) 20배수 3회연속 추출
  - (2) 추출배수 설정을 위한 실험
  - (3) 100배수 3회연속 추출
  - (4) 최적 시료추출조건 설정
- 나. 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 추출
  - (1) 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 참깨 원물
  - (2) 제1협동으로부터 제공받은 품종별 참깨(생물전환)산물의 sonication 추출
  - (3) 제1협동으로부터 제공받은 탈지참깨의 sonication 추출
- 다. 탈지참깨의 Lignan 함량 분석
- 라. 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 Lignan 함량 분석
- 마. 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Lignan method validation
- 바. 참깨 시제품의 lignan 함량 분석

- 3. **참깨 원물 및 (생물전환)산물의 지표성분 분석 최적조건 확립**
- 4. **50L 규모에서의 생산공정 표준화**
  - 가. 생산단계별 시료의 지표성분인 Lignan 분석
    - (1) 주관기관 결과
    - (2) 제1협동기관 결과
  - 나. 생산단계별 시료의 Bioassay
- 5. **50L 규모에서의 생산공정 validation**
  - 가. 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증
- 6. **500L 규모에서의 생산공정 scale-up 확립**

**5절. 국내 발생 탈지농산부산물에 대한 식품원료 적합성 검토 및 생물전환공정 재설계**

- 1. **국내 발생 탈지농산부산물에 대한 식품원료 적합성 기준 설정**
- 2. **국내 발생 탈지농산부산물로부터 생산된 (생물전환)산물에 대한 평가**
  - 가. 탈지대두박
  - 나. 탈지참깨박
- 3. **국내 발생 탈지농산부산물에 적용 가능한 생물전환공정 재설계**
  - 가. 탈지대두박
  - 나. 탈지참깨박
- 4. **50L 규모에서 생산된 국내 발생 생참깨박의 (생물전환)산물의 면역활성 조사**

**6절. 개발소재의 면역활성 특성 조사**

- 1. **미강 원물 및 (생물전환)산물의 cytokine 분비능 평가**
- 2. **대두 원물 및 (생물전환)산물의 cytokine 분비능 평가**
  - 가. 대두 및 대두(생물전환)산물
  - 나. E탈지대두 및 E탈지대두(생물전환)산물
  - 다. H탈지대두 및 H탈지대두(생물전환)산물
- 3. **참깨 원물 및 (생물전환)산물의 cytokine 분비능 평가**
  - 가. 참깨 및 참깨(생물전환)산물
  - 나. E탈지참깨 및 E탈지참깨(생물전환)산물
  - 다. H탈지참깨 및 H탈지참깨(생물전환)산물

**7절. 개발소재로부터 정제된 면역활성 다당체(유효성분)의 특성 조사**

- 1. **미강(생물전환)산물의 면역활성 다당체(유효성분)**
  - 가. 면역활성 다당체(유효성분) 분리·정제
    - (1) 분리·정제공정
    - (2) HPLC 분석
    - (3) 대식세포 NO 생성 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가
  - 나. 면역활성 다당체(유효성분) 작용기전 연구
    - (1) 대식세포에서의 cytokines 분비패턴 조사 및 Receptor 유추 해석
      - (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가

- (나) IL-1 $\beta$  분비능 평가
- (다) IL-4 분비능 평가
- (라) IL-5 분비능 평가
- (마) IL-6 분비능 평가
- (바) IL-10 분비능 평가
- (사) IL-12p70 분비능 평가
- (아) IFN- $\beta$  분비능 평가
- (자) 결과 분석
- (2) Receptor 확인 : TLR4 agonist 입증
  - (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
  - (나) IL-6 분비능 평가
  - (다) IL-10 분비능 평가
  - (라) IFN- $\beta$  분비능 평가
  - (마) 결과 분석
- (3) TLR4 agonist, MPLA와의 비교 평가
  - (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
  - (나) IL-6 분비능 평가
  - (다) IFN- $\beta$  분비능 평가
  - (라) 결과 분석

## 2. 대두(생물전환)산물의 면역활성 다당체(유효성분)

### 가. 면역활성 다당체(유효성분) 분리·정제

- (1) 분리·정제공정
- (2) HPLC 분석
- (3) 대식세포 NO 생성 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

### 나. 면역활성 다당체(유효성분) 작용기전 연구

- (1) 대식세포에서의 cytokines 분비패턴 조사 및 Receptor 유추 해석
  - (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
  - (나) IL-1 $\beta$  분비능 평가
  - (다) IL-4 분비능 평가
  - (라) IL-5 분비능 평가
  - (마) IL-6 분비능 평가
  - (바) IL-10 분비능 평가
  - (사) IL-12p70 분비능 평가
  - (아) IFN- $\beta$  분비능 평가
  - (자) 결과 분석
- (2) Receptor 확인 : TLR4 agonist 입증
  - (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
  - (나) IL-6 분비능 평가
  - (다) IL-10 분비능 평가
  - (라) IFN- $\beta$  분비능 평가
  - (마) 결과 분석
- (3) TLR4 agonist, MPLA와의 비교 평가
  - (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가

- (나) IL-6 분비능 평가
- (다) IFN- $\beta$  분비능 평가
- (라) 결과 분석

### 3. 참깨(생물전환)산물의 면역활성 다당체(유효성분)

#### 가. 면역활성 다당체(유효성분) 분리·정제

- (1) 분리·정제공정
- (2) HPLC 분석
- (3) 대식세포 NO 생성 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

#### 나. 면역활성 다당체(유효성분) 작용기전 연구

##### (1) 대식세포에서의 cytokines 분비패턴 조사 및 Receptor 유추 해석

- (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
- (나) IL-1 $\beta$  분비능 평가
- (다) IL-4 분비능 평가
- (라) IL-5 분비능 평가
- (마) IL-6 분비능 평가
- (바) IL-10 분비능 평가
- (사) IL-12p70 분비능 평가
- (아) IFN- $\beta$  분비능 평가
- (자) 결과 분석

##### (2) Receptor 확인 : TLR4 agonist 입증

- (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
- (나) IL-6 분비능 평가
- (다) IL-10 분비능 평가
- (라) IFN- $\beta$  분비능 평가
- (마) 결과 분석

##### (3) TLR4 agonist, MPLA와의 비교 평가

- (가) TNF- $\alpha$  분비능 평가
- (나) IL-6 분비능 평가
- (다) IFN- $\beta$  분비능 평가
- (라) 결과 분석

### 8절. 3개 개발소재의 LPS antagonist 입증을 위한 *in vivo* 효능 평가

1. 호중구 유도능 측정을 위한 실험 조건 확립
2. 3개 개발소재의 호중구 유도능 측정 및 LPS antagonist 확인
3. 3개 개발소재의 LPS antagonist 입증을 위한 *in vivo* 효능 평가에 대한 실험적 의의

### 9절. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 생체안전성 평가

#### 1. 정상 마우스에서 장기 무게 측정 및 cytokine profiling을 통한 생체안전성 평가

- 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 생체안전성 평가-1
- 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 생체안전성 평가
- 다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 생체안전성 평가

- 라. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 생체안전성 평가
- 마. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 생체안전성 평가
- 바. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 생체안전성 평가-2

**2. 아치사량의 LPS와 galactosamine으로 유도된 패혈증 마우스모델에서 염증성 cytokine 생성 억제 및 간/신장 독성 억제능 평가**

가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과-1

- (1) 염증성 cytokine 억제 효과
- (2) 간 독성 억제 효과
- (3) 신장 독성 억제 효과

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과

- (1) 염증성 cytokine 억제 효과
- (2) 간 독성 억제 효과
- (3) 신장 독성 억제 효과

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과

- (1) 염증성 cytokine 억제 효과
- (2) 간 독성 억제 효과
- (3) 신장 독성 억제 효과

라. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과

- (1) 염증성 cytokine 억제 효과
- (2) 간 독성 억제 효과
- (3) 신장 독성 억제 효과

마. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과

- (1) 염증성 cytokine 억제 효과
- (2) 간 독성 억제 효과
- (3) 신장 독성 억제 효과

바. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과-2

- (1) 염증성 cytokine 억제 효과
- (2) 간 독성 억제 효과
- (3) 신장 독성 억제 효과

**3. 치사량의 LPS와 galactosamine으로 유도된 패혈증 마우스모델에서 개발소재의 치사율 억제 효과**

가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 치사율 억제 효과-1

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

라. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

마. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

바. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 치사율 억제 효과-2

**4. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 생체안전성 평가에 대한 실험적 의의**

**10절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항병력 강화 효능 평가**

**1. in vitro 살모넬라 감염 억제능 평가**

가. 항살모넬라 항균활성

- (1) 미강(생물전환)산물의 항균활성 평가

- (2) 대두(생물전환)산물의 항균활성 평가
- (3) 참깨(생물전환)산물의 항균활성 평가
- 나. 대식세포 섭식능 활성화 효과
  - (1) 미강(생물전환)산물의 섭식능 평가
  - (2) 대두(생물전환)산물의 섭식능 평가
  - (3) 참깨(생물전환)산물의 섭식능 평가
- 다. 대식세포 내 살모넬라 증식 억제능 효과
  - (1) 미강(생물전환)산물의 살모넬라 증식 억제능 평가
  - (2) 대두(생물전환)산물의 살모넬라 증식 억제능 평가
  - (3) 참깨(생물전환)산물의 살모넬라 증식 억제능 평가
- 라. 장관세포 점착 및 침입 억제 효능 평가
  - (1) 미강(생물전환)산물의 점착 및 침입 억제 효능 평가
  - (2) 대두(생물전환)산물의 점착 및 침입 억제 효능 평가
  - (3) 참깨(생물전환)산물의 점착 및 침입 억제 효능 평가
- 2. 살모넬라 복강 감염 마우스모델에서 내재면역계 세포 및 Th1세포 활성화를 통한 감염 억제 효능 평가**
  - 가. 살모넬라 복강 감염 마우스모델에서의 복강 내 미생물 생존 억제 효과
  - 나. 림프구 증식 유도 및 INF- $\gamma$  발현에 미치는 효과
  - 다. Th1 cytokine 발현에 미치는 효과
  - 라. Th2 cytokine 발현에 미치는 효과
  - 마. 마우스 치사율 조절 효과
  - 바. 식중독 마우스 모델에서의 살모넬라 침투 억제능 평가
- 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항병력 강화 효능 평가에 대한 실험적 의의**

**11절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항당뇨 효능 평가**

- 1. 제1형 당뇨 모델에서 항당뇨 효능 평가**
  - 가. *in vitro* 당뇨 억제능 평가
    - (1) (제1형 당뇨) Ins-1 세포주에서 세포독성 및 활성산소 생성에 미치는 효과
    - (2) (제1형 당뇨) Ins-1 세포주에서 NO 생성 및 인슐린 분비에 미치는 효과
  - 나. Alloxan 처리로 유도된 제1형 당뇨 마우스모델에서의 당뇨 억제능 평가
    - (1) 혈당, 혈청 내 인슐린, 간 내 글리코겐 양 평가
    - (2) 당 대사 관련 효소 조절능 평가
    - (3) 간 조직 및 췌장 조직 보호 효과
- 2. 제2형 당뇨 모델에서 항당뇨 효능 평가**
  - 가. 고지방식이로 유도된 제2형 당뇨 마우스모델에서 항당뇨 저하 효능 평가
    - (1) 체중, 간 무게, 백색지방 무게 변화에 미치는 효과
    - (2) 혈당 및 혈청 내 인슐린에 미치는 효과
    - (3) Glucose tolerance에 미치는 효과
    - (4) 지질 분석
    - (5) 당 대사 관련 효소 조절능 평가
    - (6) 염증성 cytokine 분석

(7) 간 조직 및 췌장 조직 보호 효과

**3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항당뇨 효능 평가에 대한 실험적 의의**

**12절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 비알코올성 지방간 억제 효능 평가 : 고지방식이로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서 지방간 생성 억제능 평가**

1. 고지방식이로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서의 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 지방간 생성 억제능 평가
2. 고지방식이로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서의 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 지방간 생성 억제능 평가
3. 고지방식이로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서의 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 지방간 생성 억제능 평가
4. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 비알코올성 지방간 억제 효능 평가에 대한 실험적 의의

**13절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 알코올성 지방간/간염 억제 효능 평가**

**1. *in vitro* 간 보호 기능 평가**

가. HepG2 세포주를 이용한 간 보호 기능 평가

- (1) 미강(생물전환)산물의 세포독성 및 ROS 저감 효과
- (2) 대두(생물전환)산물의 세포독성 및 ROS 저감 효과
- (3) 참깨(생물전환)산물의 세포독성 및 ROS 저감 효과

**2. 알코올의 투여로 인해 유발된 알코올성 지방간 마우스모델에서 간 보호 효능 평가**

- 가. 알코올의 투여로 유도된 지방간 마우스 모델에서 간 무게 변화
- 나. 혈청 내 생화학적 지표 측정
- 다. 간 조직 내 항산화물질의 변화
- 라. 간 조직 보호 효과

**3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 알코올성 지방간/간염 억제 효능 평가에 대한 실험적 의의**

**14절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 골대사 관련 뼈건강 효능 평가**

**1. *in vitro* 효능 평가**

가. 조골전구세포주를 이용한 분화 유도능 평가

- (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 조골전구세포 분화유도능 평가
- (2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 조골전구세포 분화유도능 평가
- (3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 골전구세포 분화유도능 평가

나. 대식세포주를 이용한 파골세포 분화 억제능 평가

- (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 파골세포 분화억제능 평가
- (2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 파골세포 분화억제능 평가



(3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 파골세포 분화억제능 평가

## 2. 골다공증 마우스모델에서 골대사 관련 뼈건강 효능 평가

가. 골다공증 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 골다공증 억제 효과

- (1) 대퇴골과 경골의 무게 변화 측정
- (2) 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과
- (3) 골 밀도와 골 강도에 미치는 효과
- (4) 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

나. 골다공증 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 골다공증 억제 효과

- (1) 대퇴골과 경골의 무게 변화 측정
- (2) 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과
- (3) 골 밀도와 골 강도에 미치는 효과
- (4) 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

다. 골다공증 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 골다공증 억제 효과

- (1) 대퇴골과 경골의 무게 변화 측정
- (2) 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과
- (3) 골 밀도와 골 강도에 미치는 효과
- (4) 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

라. 농산부산물 소재의 골다공증 억제 효과에 대한 평가

## 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 골대사 관련 뼈건강 효능 평가에 대한 실험적 의의

## 15절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 알레르기비염/천식 관련 효능 평가

### 1. *in vitro* 효능 평가

가. B세포주에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능 평가

나. B세포주에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능 평가

다. B세포주에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능 평가

### 2. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 효능 평가

가. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 억제 효능 평가

- (1) 기관지폐포세척액(BALF) 내 IgE 생성 억제 효과
- (2) BALF 내 총 세포 수 및 세포 population에 미치는 효과
- (3) Th1/Th2 cytokine 발현에 미치는 효과
- (4) 폐 조직 보화 효과

나. 알레르기 염/천식 유도 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 억제 효능 평가

- (1) 기관지폐포세척액(BALF) 내 IgE 생성 억제 효과
- (2) BALF 내 총 세포 수 및 세포 population에 미치는 효과
- (3) Th1/Th2 cytokine 발현에 미치는 효과
- (4) 폐 조직 보화 효과

다. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 억제 효능 평가

- (1) 기관지폐포세척액(BALF) 내 IgE 생성 억제 효과
- (2) BALF 내 총 세포 수 및 세포 population에 미치는 효과
- (3) Th1/Th2 cytokine 발현에 미치는 효과
- (4) 폐 조직 보화 효과

**3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항알레르기비염/천식 효능 평가에 대한 실험적 의의**

**16절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 아토피피부염 관련 효능 평가**

**1. *in vitro* 효능 평가**

가. Mast cell 기반 효능 평가

- (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 평가
- (2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 평가
- (3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 평가
- (4) 3개 소재(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 비교 평가

**2. DNCB 유도 아토피성 피부염 마우스모델에서의 효능 평가**

가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 아토피성 피부염 억제 효능 평가

- (1) 미강(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과
- (2) 미강(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효과
- (3) 미강(생물전환)산물의 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 아토피성 피부염 억제 효능 평가

- (1) 대두(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과
- (2) 대두(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효과
- (3) 대두(생물전환)산물의 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 아토피성 피부염 억제 효능 평가

- (1) 참깨(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과
- (2) 참깨(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효과
- (3) 참깨(생물전환)산물의 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

**3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항아토피피부염 효능 평가에 대한 실험적 의의**

**17절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 부종 관련 효능 평가**

**: Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) 유도 부종 마우스모델에서의 효능 평가**

**1. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 부종 억제 효능 평가**

가. 미강(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과

나. Myeloperoxidase 억제 효과

다. 염증 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량 측정

**2. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 부종 억제 효능 평가**

가. 대두(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과

나. Myeloperoxidase 억제 효과

다. 염증 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량 측정

**3. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 부종 억제 효능 평가**

가. 참깨(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과

나. Myeloperoxidase 억제 효과

다. 염증 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량 측정

**4. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항부종 효능 평가에 대한 실험적**

## 의의

### 18절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 대장염증 완화 효능 평가

#### 1. DSS로 유도된 대장염증 마우스모델에서 개발소재의 투여로 인한 체중 변화 및 대장 염증 완화 효과 확인

- 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 염증 완화 효과 확인
- 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 염증 완화 효과 확인
- 다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 염증 완화 효과 확인

#### 2. 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

- 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능 확인
- 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능 확인
- 다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

#### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 대장염증 완화 효능 평가에 대한 실험적 의의

### 19절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 항암 효능 평가

#### 1. 개발소재의 *in vitro* 종양 억제 활성 확인

- 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 *in vitro* 종양 억제 활성 확인
- 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 *in vitro* 종양 억제 활성 확인
- 다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 *in vitro* 종양 억제 활성 확인

#### 2. 마우스모델에서 피하 이식된 종양의 성장 억제 및 염증관련 단백질 발현 억제 확인

- 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피하 이식 종양 억제 효과 확인
  - (1) 종양 무게 측정 및 조직 염색
  - (2) 종양조직 내 eicosanoids 측정
- 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피하 이식 종양 억제 효과 확인
  - (1) 종양 무게 측정 및 조직 염색
  - (2) 종양조직 내 eicosanoids 측정
- 다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 피하 이식 종양 억제 효과 확인
  - (1) 종양 무게 측정 및 조직 염색
  - (2) 종양조직 내 eicosanoids 측정

#### 3. 마우스모델에서 폐 전이 종양의 전이 억제 확인

- 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 폐 전이 종양의 전이 억제 확인
- 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 폐 전이 종양의 전이 억제 확인
- 다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 폐 전이 종양의 전이 억제 확인

#### 4. 마우스모델에서 종양 관련 면역반응 활성화 확인

- 가. 대식세포 활성화 확인
  - (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대식세포 활성화 확인
  - (2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대식세포 활성화 확인
  - (3) 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대식세포 활성화 확인
- 나. NK세포 활성화 확인
  - (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포 활성화 확인
  - (2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포 활성화 확인

(3) 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포 활성화 확인

## 5. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 항암 효능 평가에 대한 실험적 의의

### 20절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 피부건강 관련 효능 평가

#### 1. 피부세포모델 기반의 *in vitro* 효능평가

가. 3개 개발소재에 대한 PBS 추출물의 피부건강 관련 효능 평가

- (1) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가
- (2) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과
- (3) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가
- (4) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과
- (5) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가
- (6) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과
- (7) 미강 (생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가
- (8) 미강 (생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 평가
- (9) 대두박 (생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가
- (10) 대두박 (생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 평가
- (11) 참깨박 (생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가
- (12) 참깨박 (생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 평가
- (13) X-gal staining을 통한 노화 억제 활성 평가
- (14) Collagen assay를 통한 노화 억제 활성 평가
- (15) DCF-DA를 통한 ROS 저감 효과 평가

나. 농산부산물 소재 메탄올 추출물의 피부건강 관련 효능 평가

- (1) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포독성 평가
- (2) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포 보호 효과
- (3) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포독성 평가
- (4) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포 보호 효과
- (5) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포독성 평가
- (6) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포 보호 효과
- (7) X-gal staining을 통한 노화 억제 활성 평가

다. 미강(생물전환)산물과 유백피 복합추출물의 피부건강 관련 효능 평가

- (1) 농산부산물(생물전환)산물과 유백피 추출물의 피부세포 보호 효과
- (2) 미강 복합소재의 세포 보호 효과

라. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  유도 피부표피세포의 아토피성 관련 효능 평가

- (1) 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 피부표피세포에 대한 세포독성 평가
- (2) 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 염증성 cytokine 및 chemokine mRNA level 평가
- (3) 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 염증성 cytokine 및 chemokine 생성량 평가
- (4) 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 아토피 관련 주요 작용기전 구명

#### 2. UV-B로 유도된 피부노화 동물모델을 이용한 피부건강 관련 효능 평가

- (1) 체중 변화
- (2) 식이섭취 및 식이 효율
- (3) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 HR-1의 등피부 변화 평가

- (가) 등피부 주름 측정 (Dermobella) 분석
- (나) 등피부 주름 형상 변화
- (4) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 HR-1의 피부보습 변화 평가
  - (가) 표피 수분함량 측정 (transepidermal water loss, TEWL)
  - (나) 피부보습 관련 세라마이드 대사 관련 효소 측정
- (5) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 HR-1의 상피조직 두께 및 콜라겐 섬유 평가
- (6) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 작용기전 구명
  - (가) 피부 염증 관련 유전자 발현 평가
  - (나) 피부 matrix metallo proteinases (MMPs) 발현 평가

**21절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 *in vitro* 피부건강 및 피부미용 관련 항산화 효능 평가**

**1. 품종별 미강 21종의 원물 및 (생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 평가 및 상관관계 조사**

가.  $\beta$ -glucan 함량 측정

- (1)  $\beta$ -glucan 함량 분석방법
- (2) 품종별 미강 21종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

나. 항산화활성 측정

- (1) 총 페놀 함량 측정
- (2) DPPH radical 소거능 측정
- (3) ORAC value 측정

다. 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

**2. 생산공정별 미강(생물전환)산물의 *in vitro* 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성 평가**

가. 총페놀함량

나. DPPH 라디칼 소거능 측정

다. ORAC value 측정

라. Tyrosinase 저해활성 평가

**3. 품종별 대두 5종, 진풍 탈지대두의 원물 및 (생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 평가 및 상관관계 조사**

가.  $\beta$ -glucan 함량 측정

- (1) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석
- (2) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

나. 항산화활성 측정

- (1) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정
- (2) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정
- (3) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정
- (4) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정
- (5) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정
- (6) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정

다. 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

- (1) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석
- (2) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

**4. 생산공정별 대두(생물전환)산물의 *in vitro* 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성 평가**

- 가. 총페놀함량
- 나. DPPH 라디칼 소거능 측정
- 다. ORAC value 측정
- 라. Tyrosinase 저해활성 평가

**5. 품종별 참깨 5종, 진을 탈지참깨의 원물 및 (생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 평가 및 상관관계 조사**

가.  $\beta$ -glucan 함량 측정

- (1) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석
- (2) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

나. 항산화활성 측정

- (1) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정
- (2) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정
- (3) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정
- (4) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 미백활성(Tyrosinase 저해 활성) 측정
- (5) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정
- (6) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정
- (7) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정
- (8) Lignan 지표물질의 미백활성(Tyrosinase 저해 활성) 측정
- (9) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 미백활성(Tyrosinase 저해 활성) 측정

다. 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

- (1) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석
- (2) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

**6. 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 및 tyrosinase 저해활성 평가**

- 가. 총페놀함량
- 나. DPPH 라디칼 소거능 측정
- 다. ORAC value 측정
- 라. Tyrosinase 저해활성 평가

**22절. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청을 위한 미강(생물전환)산물의 안전성 검증 실시 (외부시험의뢰, GLP)**

1. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
2. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험
3. Beagle dog을 이용한 단회용량증가 (single dose-escalation) 경구투여 독성시험
4. 미생물복귀돌연변이시험
5. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험
6. ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

**23절. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청을 위한 미강(생물전환)산물의 시제품 생산**

**1. 미강(생물전환)산물의 인체적용시험용 시제품 생산**

- 가. 2ton 규모의 생물반응기에서 원료 생산
- 나. 인체적용시험용 원료 QC 및 제공
- 다. 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 생산
- 라. 인체적용시험용 제품 QC

## 2. 미강(생물전환)산물의 품질유지기한설정 실험

### 가. 미강(생물전환)산물의 품질유지기한설정 실험

- (1) 품질유지기한 설정을 위한 유통기한 설정 시험 및 유통기한 예측  
(가) 유통기한 설정 가속 시험 계획
- (2) 품질지표에 대한 실험방법 : 지표성분
- (3) 품질지표에 대한 실험결과 : 지표성분
- (4) 품질지표에 대한 실험방법 : NO 생성능 측정
- (5) 품질지표에 대한 실험결과 : NO 생성능 측정
- (6) 품질유지기한 설정 결과

## 24절. 미강(생물전환)산물의 유효성 평가를 위한 인체적용시험 설계, IRB 심의 의뢰 및 연구종료통지서 (외부시험의뢰, CRO)

1. 인체적용시험 설계 및 외부시험의뢰 (CRO)
2. 기관생명윤리위원회 (IRB) 심의 의뢰
3. 인체적용시험 연구종료통지서

## 25절. 개발소재의 상품화 및 제품화 연구

1. 개발소재의 상품화 연구
2. 개발소재를 적용한 시제품 개발
3. 제품의 미생물학적, 이화학적, 물리적 품질기준 설정
4. 2종 이상 제품 출시

## 26절. 개발제품에 대한 시장진입전략 수립 : 상업화 추진 계획

1. 제품 양산계획  
가. 원료수급 계획  
나. 소재(원료)생산 계획  
다. 제품(완제품)생산 계획
2. 판로 확보 및 마케팅 계획  
가. 개별인정 전 판매전략  
나. 자사유통 전략  
다. 개별인정 과정의 판매전략  
라. 개별인정 후 판매전략  
마. 수출전략

# 1절. 생산공정 및 Bioassay 실험법 설명

## 1. 농산부산물화 탈지공정 설명

본 과제에서 원료 탐색의 용도로 구입한 시료는 아래의 표와 같다. 생산지별로 구입한 농산물 시료의 농산부산물화를 위해 탈지공정을 시행하였다. 탈지공정에는 미강유, 콩기름, 참기름 제조에 사용되는 발효주정 및 hexane을 사용하였다. 분쇄한 농산물분말을 유리플라스크에 적당량 담고 발효주정 및 hexane을 각각 분말량의 5배수씩 넣어주었다. 3시간동안 상온에서 150 rpm으로 교반추출 한 후 여과하여 농산물로부터 추출된 기름(상등액)을 제거하고 침전물을 분리하였다. 분리된 침전물을 특정 온도에서 건조하여 농산부산물을 얻었다.

발효주정을 사용한 탈지공정을 E탈지공정, hexane을 사용한 탈지공정을 H탈지공정으로 명명하고 농산물을 탈지하여 농산부산물화시키고 연구에 사용하였다.

표 2. 생산지별 시료의 구입 목록

소재	원산지	구매처
미강	경남 거창군	SS농부
	충북 괴산	GM생활
	충북 괴산	GS장터
대두	경남 거창군	SS농부
	경북 예천	SH농장
	경남 합천	WR식품
	강원 인제	HJ농원
참깨	충북 괴산	GM생활
	충북 괴산	GS장터
	경남 거창군	SS농부
	경북 예천	SH농장

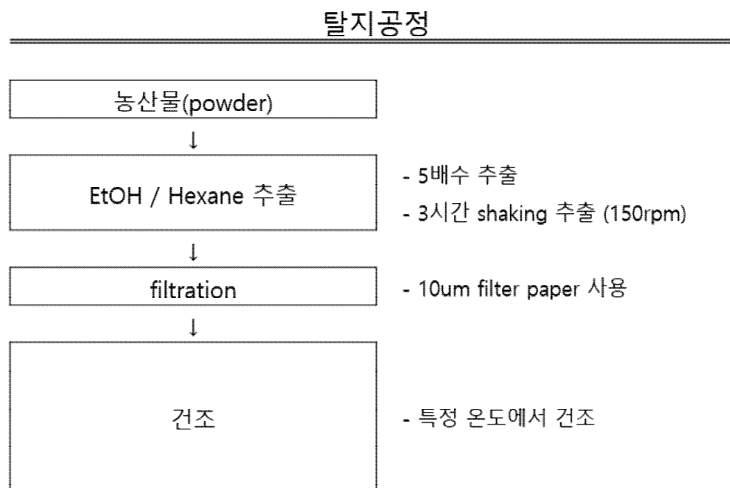


그림 2. 농산부산물화 탈지공정도



## 2. 생물전환공정 설명

### 가. 발효미생물 종균배양공정

발효미생물(표고버섯균사, 이하 표고균사)의 종균배양공정은 제1협동기관에서 기 확립한 버섯균사 종균 배양공정 체계를 기반으로 수행하였다. 제1협동기관에서는 표고버섯 균사체 배양물을 기 확립된 배양공정을 통해 생산하고 있으며, 본 과제의 발효미생물(표고균사)의 종균배양공정은 기 확립된 생산공정에 준하여 수행하였다. 표고균사 seed 배양공정은 5L, 50L 발효조에서 컴퓨터 모니터링 on-line system을 통해 발효조의 다양한 배양변수가 자동으로 컴퓨터 모니터를 통해 실시간 모니터링 되며, 또한 생산공정은 데이터 자동 저장을 통한 발효공정 확립을 통해 제어가 가능하도록 기 구축된 5L, 50L, 500L, 5000L 발효조 시스템에서 수행하고 있다. 발효조에서의 표고균사 seed 배양조건은 온도 28℃, 교반속도 120~180 rpm, 공기유입량 1 vvm 조건에서 96시간 배양하여 종균으로 사용하였다.

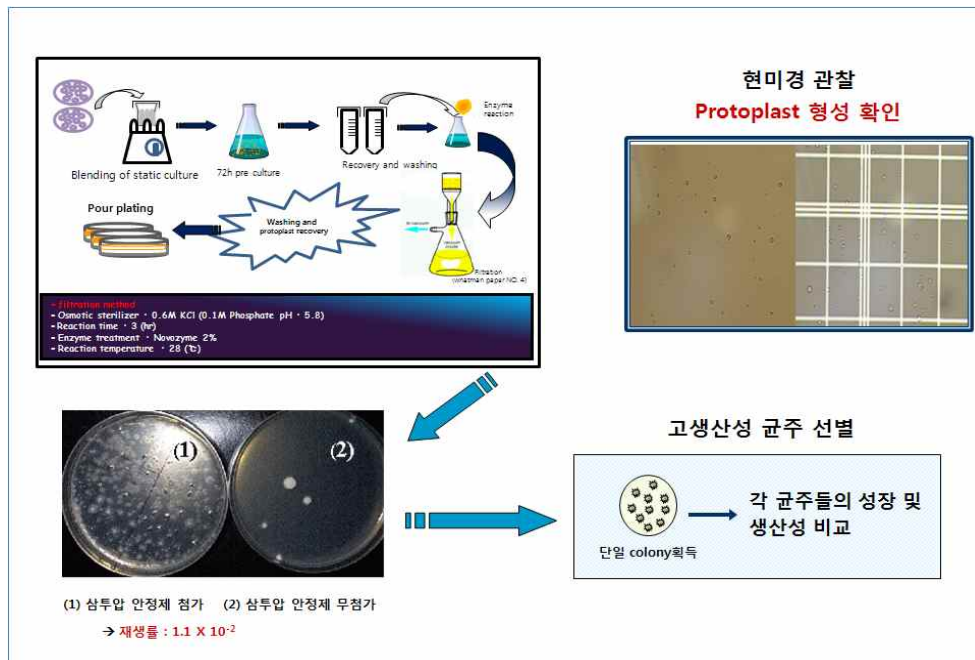


그림 3. 버섯균사로부터 원형질체 분리 및 재생을 통한 단일콜로니 획득 체계

제1협동기관에서는 버섯균사배양 최적화를 위해 버섯균사의 단일콜로니 획득 및 고생산성 균주 선별을 위한 스크리닝 시스템이 기 구축되어 있으며, 선정된 버섯균사체의 세포 생산성 향상을 위하여 통계학적 프로그램을 기반으로 한 배양배지 최적화 및 배양변수 최적화를 통해 표고균사 배양을 위한 배양공정 최적화 체계도 기 확립되어 있다. 또한 lab-scale의 flask 배양공정의 scale-up 생산공정 최적화를 위하여 5L 발효기를 기반으로 자동화모니터링 시스템을 구축하고 있으며, 가스분석시스템의 구축을 통한 배양변수의 실시간 분석 및 자동화배양공정 시스템을 통해 500L 및 5톤의 scale-up 생산공정에서도 안정화된 버섯균사 배양공정을 확립하고 있다.

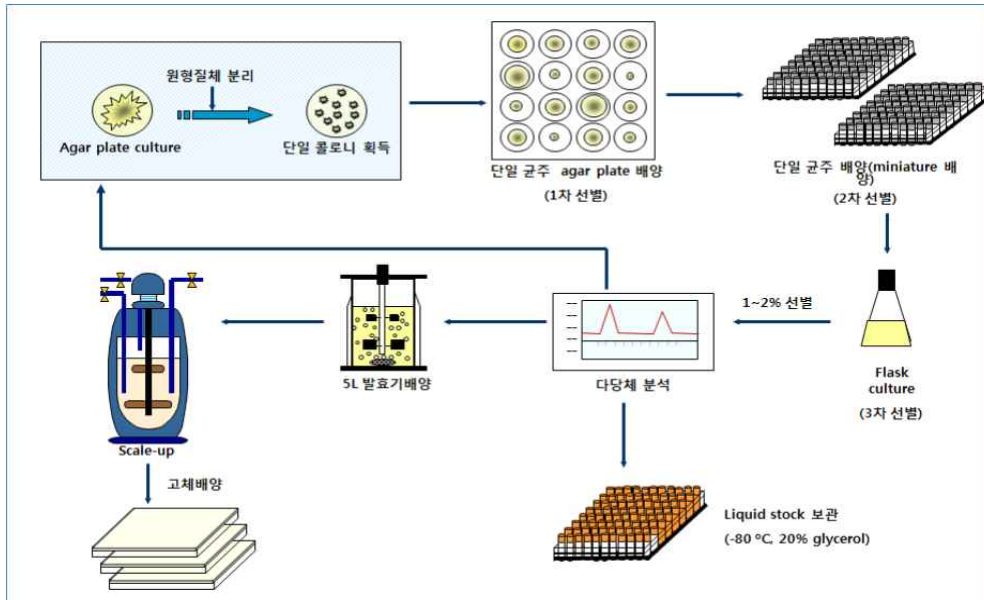


그림 4. 버섯균사로부터 단일콜로니 획득을 통한 균주개발 및 Scale-up system 체계

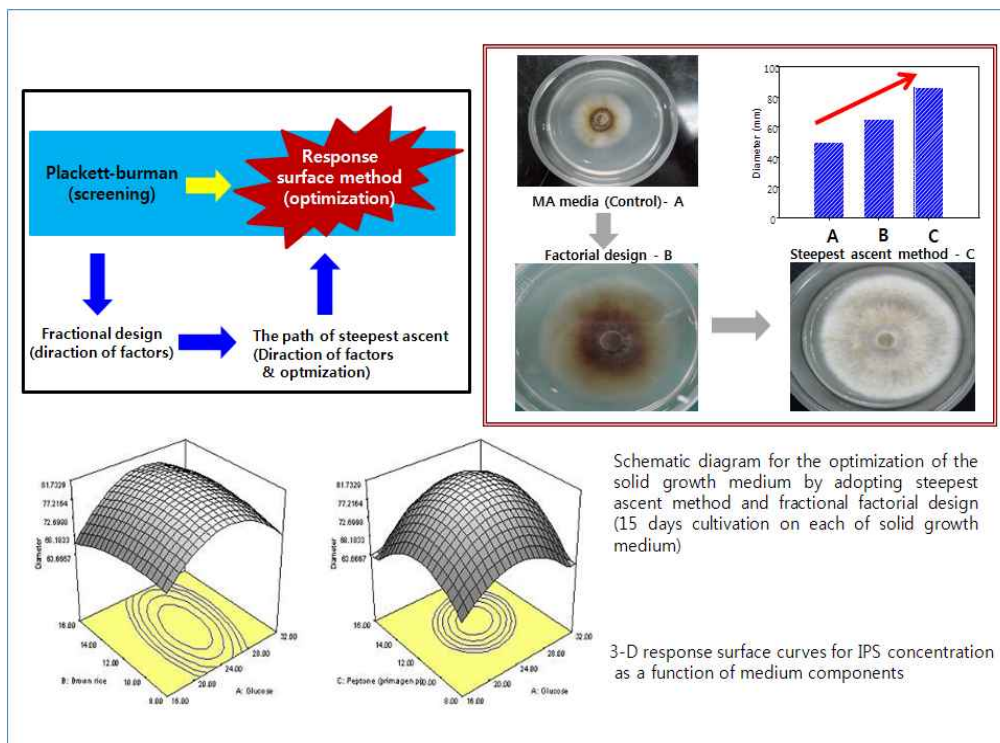


그림 5. 고생산성 균주의 신속선별을 위한 고체성장배지 최적화 체계



그림 6. 컴퓨터 모니터링 및 자동제어 시스템

## 나. 농산부산물(생물전환)산물 생산공정

농산부산물(생물전환)산물 제조에 있어서 발효 및 효소처리 생물전환공정에 의한 제조는 아래 그림의 공정도에 따라 제조하였다.

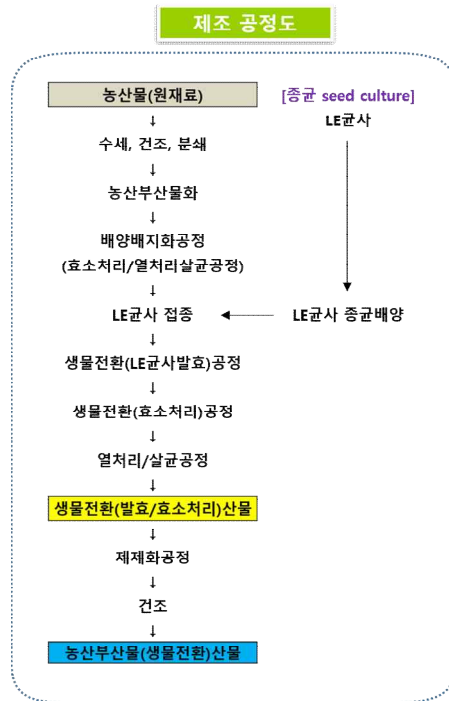


그림 7. 농산부산물(생물전환)산물의 제조공정도

### (1) 전처리공정

#### (가) 이물 및 곰팡이 세척공정

면역조절소재를 생산하기 위한 농산물자원인 현미, 대두, 참깨는 이물 및 곰팡이 등의 오염물질을 제거하기 위하여 세척공정을 수행하였다.

이물 및 곰팡이 제거 작업은 각각의 농산물자원을 ① 1차로 고압의 air gun으로 겉면에 붙어 있을 이물 및 먼지 등을 제거하였다. ② 2차로 체를 쳐서 그 외 존재할 수 있는 이물을 제거하였다. ③ 3차로 물 또는 필요시 에탄올을 처리하여 곰팡이 포자 등의 오염물질을 제거하는 공정을 거쳤다. 세척공정을 거친 농산물자원을 자체규격의 미생물검사를 통해 미생물오염 검사를 수행하여 원재료로 사용하였다.

#### (나) 농산물 및 농산부산물 자원의 배양배지화를 위한 가수분해효소에 의한 효소처리공정

이물 및 곰팡이 오염을 제거한 농산물 및 농산부산물 자원은 다양한 가수분해효소를 사용하여 효소처리공정을 수행하였다. 가수분해효소는 각 농산물 및 농산부산물 자원에 최적화한 조합의 complex 효소를 사용하였으며, 농산물 및 농산부산물 자원의 전분 및 셀룰로오스 등을 분해할 수 있는 amylase 계열의 효소와 cellulase 계열의 효소를 사용하여 실험을 수행하였다. 각각의 효소는 0.1~0.5%(w/v)으로 처리하고, 최적 활성을 나타내는 온도에서 1시간 동안 반응시키고 멸균과정을 거쳐 농산물 및 농산부산물의 배양배지를 제조하였다.

(2) 발효 및 효소처리 생물전환공정

농산물 및 농산부산물 자원을 배양배지화한 액상배지에 표고균사를 접종하여 28℃~30℃에서 배양하였다. 잔류 탄소원의 농도가 일정농도 이하로 고갈되는 시점에서 농축된 액상배지를 첨가하는 유가식 공정으로 7~10일간 배양하였다. 발효배양공정에 의해 생산된 표고균사발효 농산물발효물 및 농산부산물발효물에 대하여 2차 생물전환공정의 효소처리공정을 수행하였다. 원재료 즉, 배양기질인 농산물 및 농산부산물과 발효 배양산물인 배양균사체로부터 세포벽 유래의 면역활성 기능성물질을 효과적으로 생산하기 위해서는 세포벽을 구성하고 있는 성분 중 특정성분의 구조 변화를 통해 면역활성 기능성물질로 전환시킴과 함께 효율적으로 추출할 수 있는 효과적인 추출방법을 고려하여야 한다. 이러한 방법으로써 cellulase, hemi-cellulase, pectinase, β-glucanase, β-glucosidase, lysozyme 등 다양한 세포벽 분해효소를 이용한 연구가 보고되어 있다. 본 과제에서는 제1협동기관에서 기 보유하고 있는 cell wall lytic enzyme complex(세포벽을 분해할 수 있는 세포벽 가수분해효소인 cellulase, hemi-cellulase 및 pectinase 등의 효소 외에 베타글루칸 분해효소인 β-glucanase의 효소복합제)를 사용하여 50~60℃ 조건에서 시간별로 shaking(250 rpm)하여 효소/기질반응을 최적화 하였다. 2차 생물전환공정에 있어서 표고균사 배양을 통해 생산된 효소와 함께 섬유소분해효소 즉, 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase), 펙티나아제(pectinase), 글루카나제(glucanase) 등의 다양한 효소제를 각각의 농산물 및 농산부산물 마다 최적화된 최적량을 첨가하여 실시하였다. 효소로는 상업적으로 판매되고 있는 효소제 즉, 섬유소분해효소인 비스코자임(Viscozyme: *Aspergillus* 유래 복합물), 셀룰라아제(Cellulase: *Aspergillus niger* 유래), 펙틴분해효소인 필트라제(Filtrase: *Trichoderma reesei* 유래 복합물), 라피다제(Rapidase: *Aspergillus niger* 유래 복합물) 및 스미자임(Sumizyme: *Aspergillus niger* 유래 펙티나아제를 함유한 복합물)을 사용하였다.

(3) 후처리공정

생물전환공정에 의해 생산된 농산물 및 농산부산물 자원의 생물전환(발효/효소처리)산물은 90℃, 1시간 효소 불활성화 과정 및 살균과정을 거친 후 동결건조하여 분말화 하였다.



그림 8. (생물전환)산물의 후처리 및 회수작업 공정도



### 3. Bioassay 실험법 설명

#### 가. 대식세포(마크로파지)의 배양

미강, 대두 찹개의 원물 및 (생물전환)산물의 면역활성을 평가하기 위하여 5% DMEM media를 사용하여 마크로파지(대식세포)의 배양 및 assay를 수행하였다. 면역활성 측정에 사용한 마크로파지(대식세포)는 RAW 264.7 세포주로, 계대배양은 24well plate의 각 well에  $1 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 0.5 ml 씩 세포를 계대배양하였다. 24시간 배양 후 현미경으로 cell growth 상태를 확인한 뒤, 배지를 완전히 제거한 다음 혈청이 첨가되지 않은 배지로 2~3회 washing 하여준다. 각 well에 시료가 첨가된 5% FBS DMEM 배지를 0.5 ml 씩 채워준다. 시료의 농도는  $16 \mu\text{g/ml}$  농도를 시작으로 1/2 serial dilution하여 희석하였다. 또한, positive(+) control로 최종 농도  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하였다( $200 \mu\text{g/ml}$  stock). 시료가 처리된 24well을 8~24시간 배양 후 각 well의 배양액을  $400 \mu\text{l}$ 씩 취하고,  $400 \mu\text{l}$ 씩 취한 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 assay에 사용하였다.

#### 나. 대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 측정

96well plate에 각각의 시료와 serial dilution 된 standard를  $100 \mu\text{l}$  분주하고, Griess reagent (① N-(1-naphtyl) ethylene diamine dihydrochloride : 0.5 g/500 ml ② Sulfanilamide : 5g / 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 29.5 ml/470.5 ml)를  $100 \mu\text{l}$  분주한 후 1분간 반응시킨다. ELISA leader를 이용하여 540 nm(또는 550nm)에서 흡광값을 측정하여 다양한 시료의 면역활성 역가를 측정하였다.

#### 다. 대식세포(마크로파지)의 Cytokine 분비능 측정

미강, 대두 찹개의 선천성 면역반응 활성화 효능을 확인하기 위하여 관련된 cytokine 발현능을 조사하였다. 대조군 물질로는 LPS(Lipopolysaccharide)를 각각  $0.001 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.01 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.1 \mu\text{g/mL}$  처리하였으며, 미강, 대두 찹개의 원물 및 (생물전환)산물을 1, 10,  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 실험을 수행하였다. 시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 각각의 cytokine 분석을 위한 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay 시료로 사용하여 분석을 수행하였다.

○ TNF- $\gamma$  (R&D system, MIF00) assay kit

① Standard concentration : 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4 pg/mL

② Material & reagent : mouse TNF- $\gamma$  microplate , mouse TNF- $\gamma$  standard, mouse TNF- $\gamma$  conjugate, assay diluents RD1-21, calibrator diluent RD5Y, kit control, wash buffer concentrate, color reagent A, color reagent B, stop solution, plate sealers.

③ Reagents, sample, standard를 준비하였으며 pouch 안의 mouse TNF- $\gamma$  microplate 를 sample, standard (8 well)를 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.

④ 50  $\mu\text{L}$  의 Assay diluents RD1-21을 각 well에 넣었다.

⑤ 50  $\mu\text{L}$ 의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.

⑥ plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.

⑦ 100  $\mu\text{L}$ 의 mouse TNF- $\gamma$  conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.

- ⑧ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑨ Substrate solution (color reagent A, color reagent B를 1:1 mix)을 100  $\mu$ L 넣고 30분 빛이 없는 상태에서 반응하였다.
- ⑩ 100  $\mu$ L stop solution을 넣고 혼합하였다.
- ⑪ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑫ Standard 값을 기준으로 (log-log) 다항식그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-1 $\beta$  (R&D system, MLB00C) assay kit

- ① Standard :400 pg/mL, 200 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12.5 pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-1 $\beta$  microplate, Mouse IL-1 $\beta$  standard, Mouse IL-1 $\beta$  conjugate, Assay diluents RD1N, Calibrator Diluent RD5-16, kit control, Wash buffer, concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-1 $\beta$  microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50 ul의 Assay diluents RD1N 을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50 ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100 ul의 Mouse IL-1 $\beta$  conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100 ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100 ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하여, 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑫ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 선형그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-4 (R&D system, M4000B) assay kit

- ① Standard :250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL, 15.6 pg/mL, 7.8 pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-4 microplate, Mouse IL-4 standard, Mouse IL-4 conjugate, Assay diluents RD1-18, Calibrator Diluent RD5Y, kit control, Wash buffer, concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-4 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.

- ⑤ 50 ul의 Assay diluents RD1-18을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50 ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100 ul의 Mouse IL-4 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100 ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100 ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.
- ⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL)그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-5 (R&D system, M5000)

- ① Standard : 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL, 15.6 pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-5 microplate, Mouse IL-5 standard, Mouse IL-5 conjugate, Assay diluents RD1-38, Calibrator Diluent RD6-12, kit control, wash buffer, concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-5 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50 ul의 Assay diluents RD1-38 을 각 well에 넣었다
- ⑥ 50 ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100 ul의 Mouse IL-5 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100 ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100 ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하여, 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 직선그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-6 (R&D system, M6000B) assay kit

- ① Standard : 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 pg/mL



- ② Material & reagent : mouse IL-6 microplate , mouse IL-6 standard, mouse IL-6 conjugate, assay diluents RD1-14, calibrator diluent RD5T, kit control wash buffer concentrate, color reagent A, color reagent B, stop solution, plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 mouse IL-6 microplate를 sample, standard (8 well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50  $\mu$ L의 assay diluents RD1-14 을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50  $\mu$ L의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑧ 100  $\mu$ L의 mouse IL-6 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑩ Substrate solution (color reagent A, color reagent B를 1:1 mix)을 100  $\mu$ L 넣고 30분 빛이 없는 상태에서 반응하였다.
- ⑪ 100  $\mu$ L stop solution을 넣고 혼합 하였다.
- ⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 선형그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-10 (R&D system, M1000) assay kit

- ① Standard : 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 pg/mL
- ② Material & reagent : mouse IL-10 microplate, mouse IL-10 standard, mouse IL-10 conjugate, assay diluents RD1-14, calibrator diluent RD5T, kit control, wash buffer, concentrate, color reagent A, color reagent B, stop solution, plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 mouse IL-10 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50  $\mu$ L의 assay diluents RD1-14 을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50  $\mu$ L의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑧ 100  $\mu$ L의 mouse IL-10 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑩ Substrate solution (color reagent A, color reagent B를 1:1 mix)을 100  $\mu$ L 넣고 30분 빛이 없는 상태에서 반응하였다.
- ⑪ 100  $\mu$ L stop solution을 넣고 가볍게 혼합 하였다.
- ⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.

⑬ Standard 값을 기준으로 (log-log) 다항식그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-12p70 (R&D system, M1270) assay kit

① Standard :250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5pg/mL, 31.2 pg/mL, 15.6 pg/mL, 7.8 pg/mL

② Material & Reagent : Mouse IL-12p70 microplate, Mouse IL-12p70 standard, Mouse IL-12p70 conjugate, Assay diluents RD1-14, Calibrator Diluent RD5Y, kit control Wash buffer concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.

③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.

④ Pouch 안의 Mouse IL-12p70 microplate를 sample, standard(8well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers 로 동봉하였다.

⑤ 50 ul의 Assay diluents RD1-14을 각 well에 넣었다.

⑥ 50 ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.

⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.

⑧ 100 ul의 Mouse IL-12p70 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.

⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400 uL이나, 넘치므로, 300 ul)를 넣고 5번 wash하였다.

⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100 ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.

⑪ 100 ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.

⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.

⑬ Standard 값을 기준으로 (log-log) 다항식그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IFN- $\beta$  (PBL Assay Science, 42400) assay kit

① Standard :1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL, 15.6 pg/mL

② Material & Reagent : Pre-coated micro-titer plate(s), Plate sealers, wash solution Concentrate, Mouse Interferon-Beta Standard, Dilution buffer, Antibody Concentrate, HRP Conjugate Concentrate, Concentrate Diluent, TMB substrate, Stop Solution

③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.

④ Pouch안의 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.

⑤ 100 ul의 sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 1시간 상온에서 반응하였다.

⑥ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300 ul를 넣고 3번 wash하였다.

⑦ 100 ul의 Mouse IFN- $\beta$  antibody를 넣고 1시간 상온에서 반응하였다.

Antibody concetrate를 필요한 양만큼 Concentrate diluent에 희석하여 사용한다.

(예 40 ul antibody concentrate : 2.0 mL concentrate diluent)

⑧ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300 ul를 넣고 3번 wash하였다.

⑨ 100 ul의 HRP solution을 넣고 1시간 상온에서 반응하였다.

HRP concentrate를 필요한 양만큼 Concentrate diluent에 희석하여 사용한다.

(예 20 ul HRP concentrate : 2.0 mL concentrate diluent)

⑩ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300 ul를 넣고 3번 wash하였다.

⑪ TMB substrate를 100 ul 넣고 15분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.

⑫ 100 ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.

⑬ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.

⑭ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IFN- $\alpha$  (PBL Assay Science, 42120) assay kit

① Standard :400 pg/mL, 200 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12.5 pg/mL, 6.25 pg/mL

② Material & Reagent : Pre-coated micro-titer plate(s), Plate sealers, wash solution Concentrate, Mouse Interferon-alpha Standard, Sample buffer, Antibody Concentrate, HRP Conjugate Concentrate, Concentrate Diluent, Assay diluent, TMB substrate, Stop Solution

③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.

④ Pouch안의 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.

⑤ 100 ul의 sample, standard를 넣고, 50 ul의 Diluent antibody solution을 넣고 1시간 상온에서 450 rpm으로 교반하여 반응하였다. antibody concentrate를 필요한 양만큼 Concentrate diluent에 희석하여 사용한다. (예 40 ul antibody concentrate : 4.0 mL concentrate diluent)

⑥ 20-24시간동안 4도씨에서 반응하였다. Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300 ul를 넣고 3번 wash하였다.

⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300 ul를 넣고 4번 wash하였다.

⑧ 100 ul의 HRP solution을 넣고 2시간 상온에서 반응하였다. HRP concentrate를 필요한 양만큼 Assay diluent에 희석하여 사용한다. (예 24 ul HRP concentrate : 3.0 mL concentrate diluent)

⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300 ul를 넣고 4번 wash하였다.

⑩ TMB substrate를 100 ul 넣고 15분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.

⑪ 100 ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.

⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.

⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 그래프를 그려 농도를 계산하였다.

## 2절. 미강의 고기능성/고부가가치 소재 개발

### 1. 생산공정 표준화를 위한 면역활성 평가

#### 가. 품종별 미강 및 미강(생물전환)산물의 면역활성 비교

면역활성은 미강 및 미강(생물전환)산물에 대한 대식세포 활성화 실험을 통해 평가하였다. 농진청으로부터 제공받은 품종별 미강 21종에 대한 미강(생물전환)산물을 생산하였다. 미강(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8 µg/ml로, 미강 원물에 비해 256배 이상 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

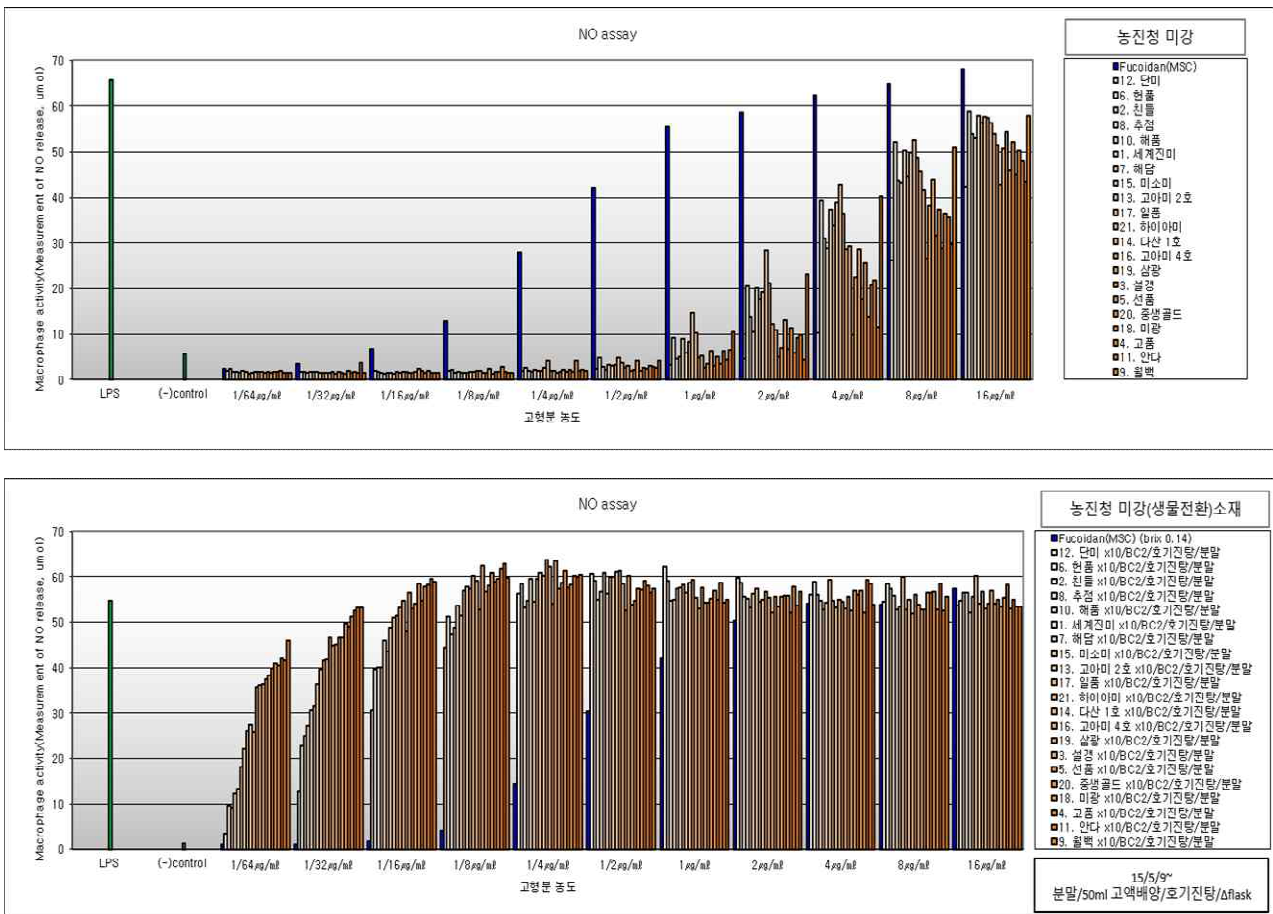


그림 9. 품종별 미강 및 미강(생물전환)소재의 면역활성 역가 평가

나. 품종별 미강(생물전환)산물의 면역활성 재현성 평가

미강(생물전환)산물에 대한 대식세포 활성화 실험을 재수행한 결과 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8 µg/ml로 나타나 재현성을 확인할 수 있었다.

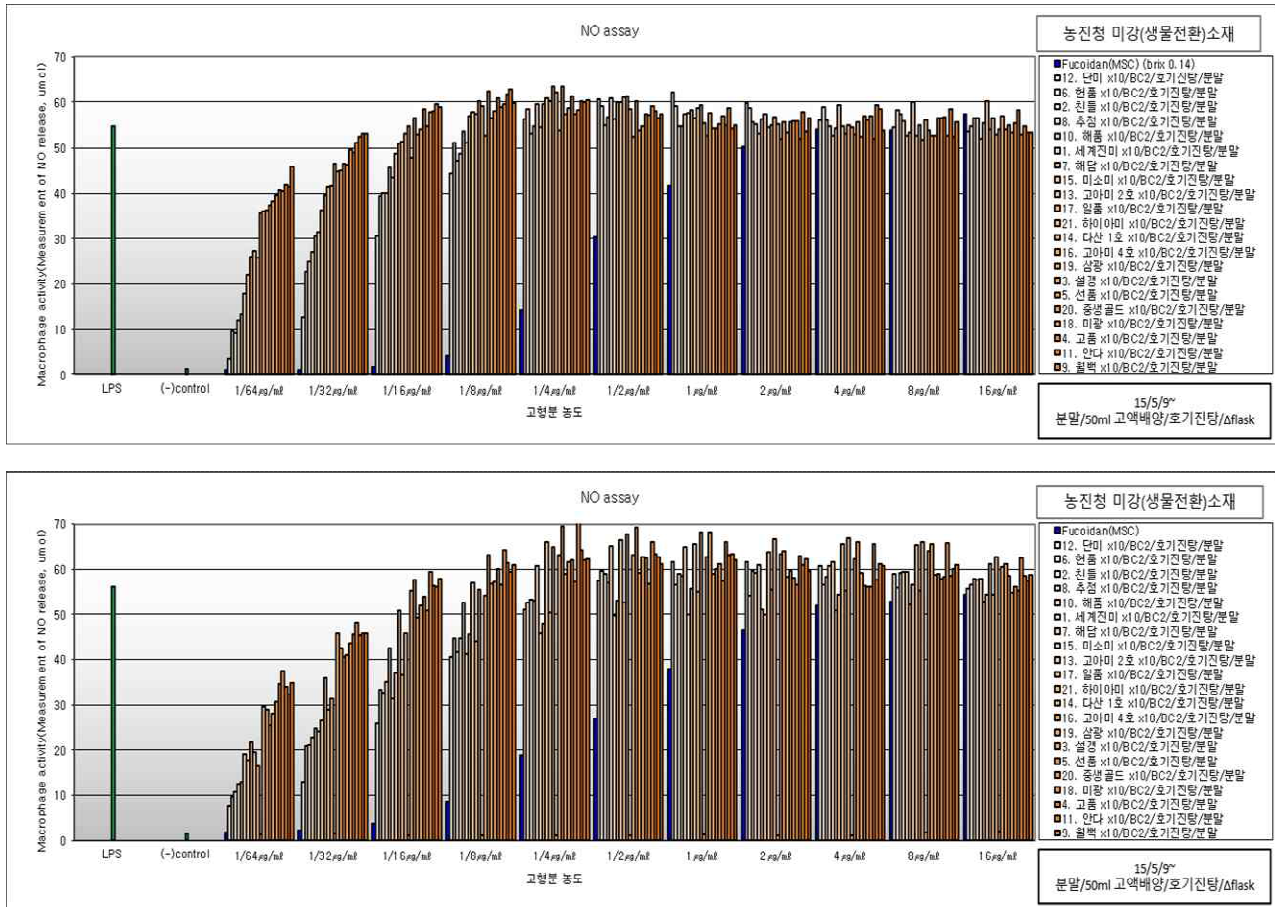


그림 10. 품종별 미강(생물전환)소재의 면역활성 역가 재현성 평가

다. 미강(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 평가 : 효능 및 독성시험용 소재 생산

미강(생물전환)산물의 생산 안정성을 평가하기 위하여 3반복 생산하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 면역활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

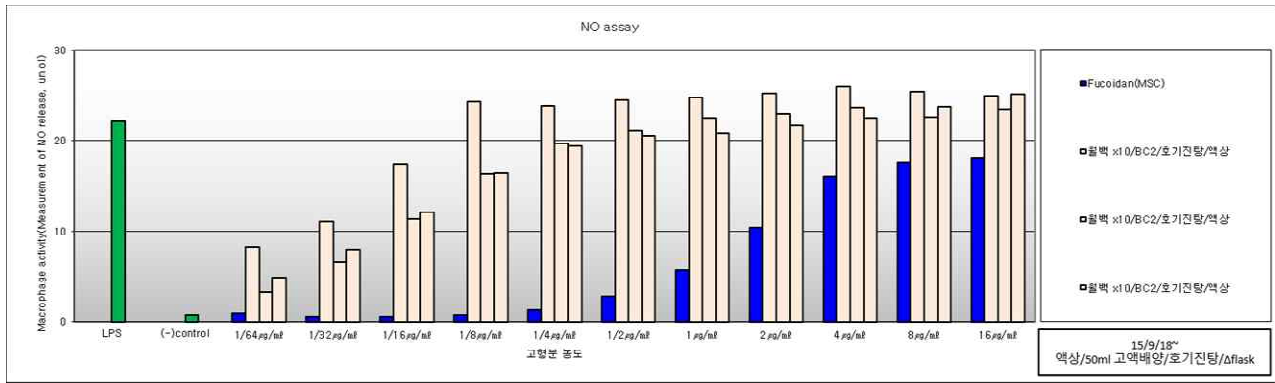


그림 11. 미강(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

라. 탈지공정에 따른 미강 및 미강(생물전환)산물의 면역활성 평가

A건조공정을 거쳐 생산된 미강(생물전환)산물, H탈지미강(생물전환)산물 및 E탈지미강(생물전환)산물의 면역활성 평가 결과 A건조공정의 경우 탈지공정 조건에 따른 면역활성의 역가가 미강(생물전환)산물에서와 같이 탈지미강의 (생물전환)산물에서도 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 원물에 비해 256배 이상 높은 면역활성 역가를 나타냈다. 탈지공정에 따른 미강 및 미강(생물전환)산물과의 면역활성의 차이가 없는 것으로 나타나 탈지 후에도 면역활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

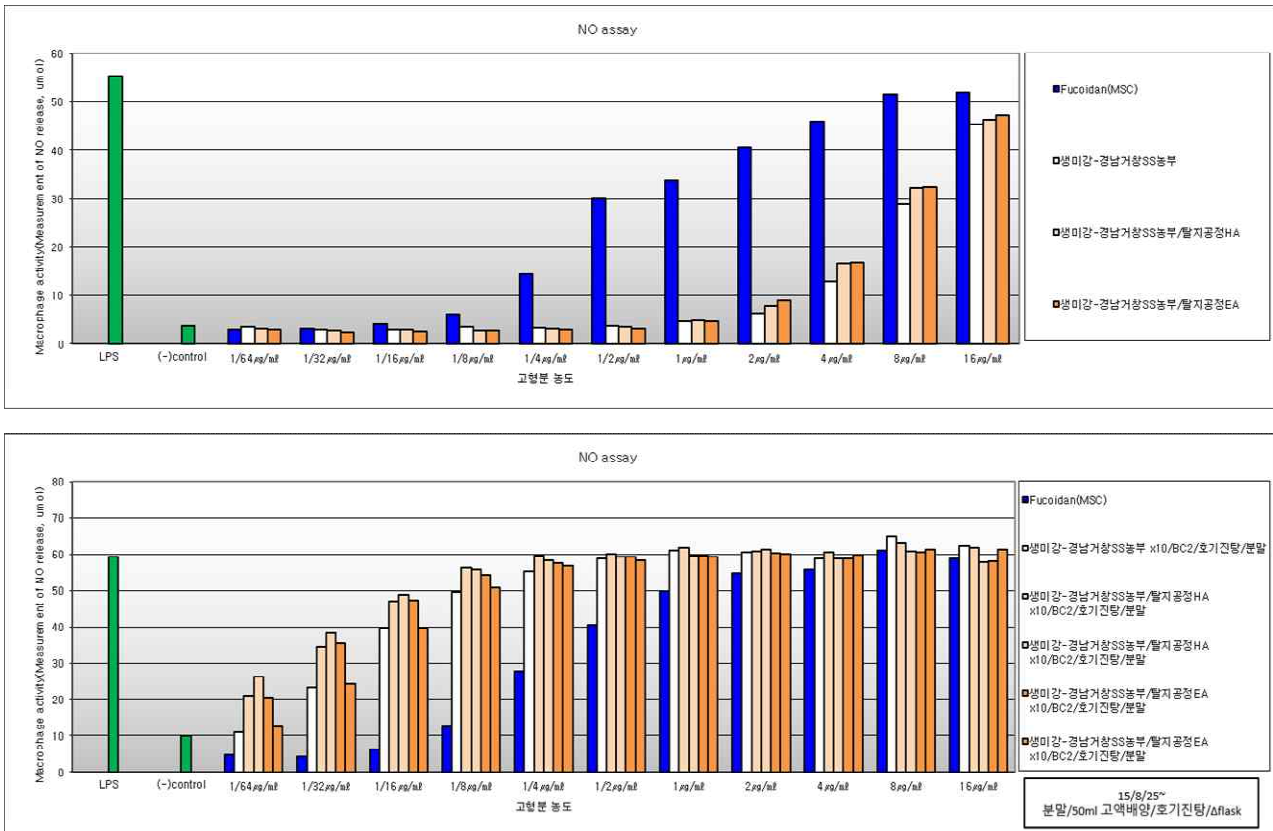


그림 12. 미강 및 미강(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가

마. 탈지공정에 따른 미강(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 평가

B건조공정을 거쳐 생산된 미강(생물전환)산물, H탈지 미강(생물전환)산물 및 E탈지 미강(생물전환)산물을 3반복 생산하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 미강(생물전환)산물, H탈지공정을 거친 미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/2 µg/ml로 H탈지 원물에 비해 256배 이상의 높은 면역활성 역가를 나타냈고, B건조공정을 거쳐 생산된 E탈지 미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 16 µg/ml로 미강(생물전환)산물 및 H탈지공정을 거친 미강(생물전환)산물에 비해 매우 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

탈지공정 조건에 따른 면역활성 차이는 있으나 3반복 생산에 의한 면역활성에서는 재현성을 확인할 수 있었다.

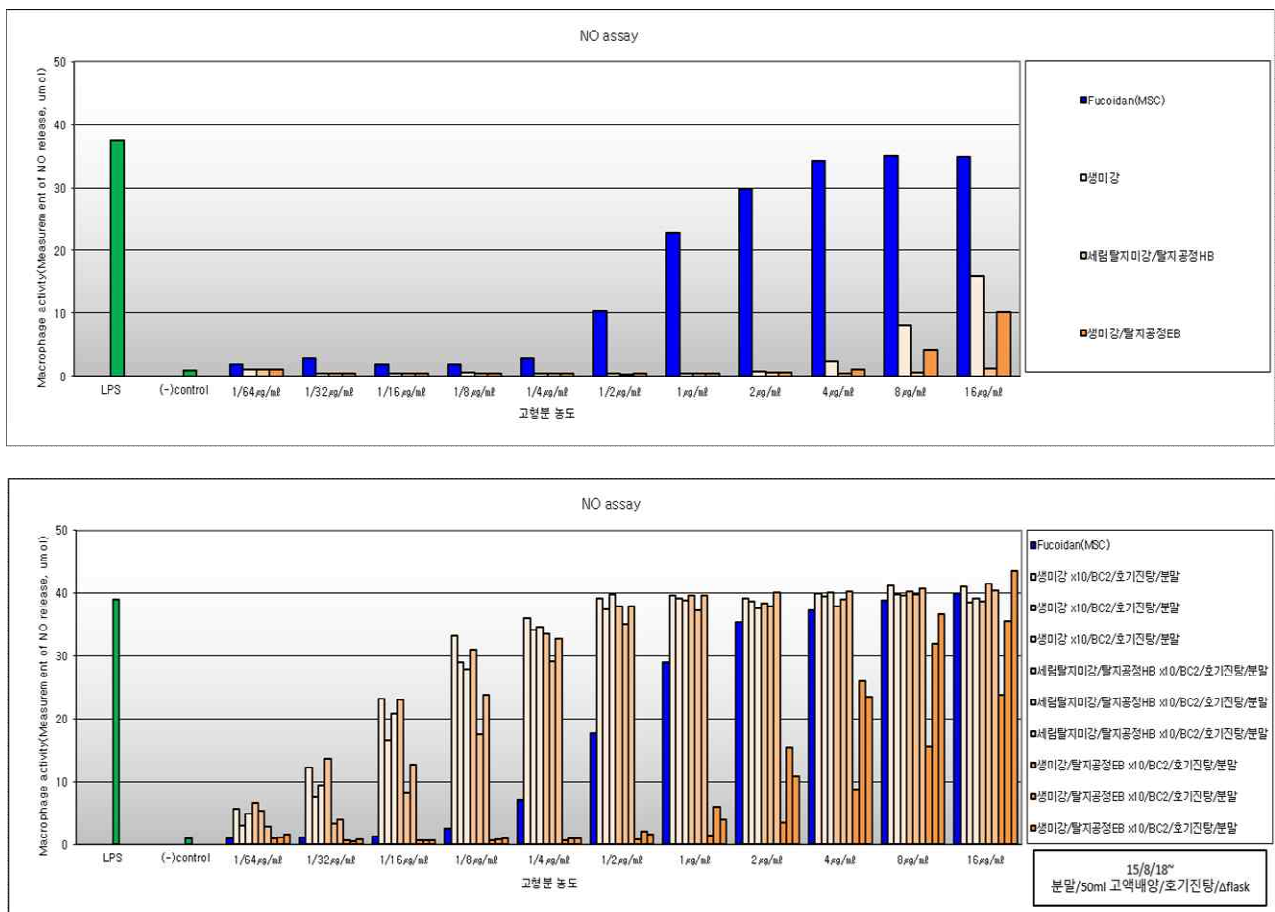


그림 13. 미강 및 미강(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가



## 2. 미강(생물전환)산물의 지표성분 설정 및 분석법 개발

### 가. 미강 원물 및 (생물전환)산물의 추출 및 농축

#### (1) 100% ethanol을 이용한 추출 및 농축

제1협동에서 제공된 미강 원물 및 (생물전환)산물의 추출조건 확립을 위하여 100% ethanol을 이용한 예비추출을 진행하였다. 시료에 대한 추출용매는 10배수로 하여, 70℃에서 3시간 동안 추출하였다. 1차 여과 후 4℃에서 24시간 동안 정치시킨 후 2차 여과하였다. 40℃에서 감압농축 후 약 4일간 동결건조 하였다. 그 결과 미강 원물의 경우 11.5%, 미강 (생물전환)산물의 경우 4.5% 수율의 분말을 얻었다.







#### (2) 70% ethanol을 이용한 추출 및 농축

제1협동에서 제공된 미강 원물 및 (생물전환)산물을 70% ethanol을 이용한 예비추출을 진행하였다. 시료에 대한 추출용매는 10배수로 하여, 70℃에서 3시간 동안 추출하였다. 1차 여과 후 4℃에서 24시간 동안 정치시킨 후 2차 여과하였다. 40℃에서 감압농축 후 약 4일간 동결건조 하였다. 그 결과 미강 원물의 경우 17%, 미강 (생물전환)산물의 경우 19% 수율로서, 100% ethanol을 이용한 추출보다 높은 수율을 얻었다.

#### (3) 100% methanol을 이용한 sonication 추출

농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 미강 21종을 이용하여 제1협동기관에서 생물전환공정을 통하여 최종적으로 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물 총 42종을 이용하여 추출물을 제조하였다. 2.5 g의 시료를 100% methanol을 이용하여 volumetric flask에 정용한 뒤, 1시간동안 sonication 추출 하였다. 충분히 방냉 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 필터 하여 분석에 사용하였다.

표 1. 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 미강 21종

No.	학명	품종	구분	수확시기	사진
1		세계진미	멥쌀 (가공용)	2014년 10월	
2		친들	멥쌀	2014년 10월	
3		설갱	멥쌀 (양조용)	2014년 10월	
	<i>Oryza sativa</i>				
4		고품	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
5		선품	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
6		현품	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	

7	해담	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
8	추점	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
9	월백	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
10	해품	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
11	안다	멥쌀 (가공, 초다수)	2014년 10월	
12	단미	멥쌀 (가공용)	2014년 10월	
13	고아미 2호	고아밀로스쌀 (가공용)	2014년 10월	
14	다산 1호	멥쌀 (가공, 초다수)	2014년 10월	
15	미소미	멥쌀	2014년 10월	
16	고아미 4호	고아밀로스쌀 (가공용)	2014년 10월	
17	일품	멥쌀	2014년 10월	
18	미광	멥쌀	2014년 10월	
19	삼광	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	
20	중생골드	멥쌀	2014년 10월	
21	하이아미	멥쌀 (최고품질)	2014년 10월	

## 나. 개발소재의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건 확립

### (1) 20배수 3회연속 추출

미강이 함유하고 있는 지표성분을 최대로 추출할 수 있는 조건을 확인하기 위해 추출배수를 20배수로 고정하고 3회연속추출을 실시하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol 및 hexane을 각각 사용하였다. 각각의 시료를 1 g씩 유리병에서 정밀히 측정하고 HPLC grade methanol 및 hexane을 20 ml씩 각각 넣어주었다. 유리병을 1시간동안 상온에서 sonication하여 지표성분을 추출하였다. Sonication후 4000 rpm, 3분간 원심분리하여 잔사와 분리된 상등액을 조심히 따라 보관하고, 잔사에 새 용매를 같은 양 넣어 동일한 방법으로 추출하였다. 총 3회 연속추출하였다. 분리된 상등액은 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

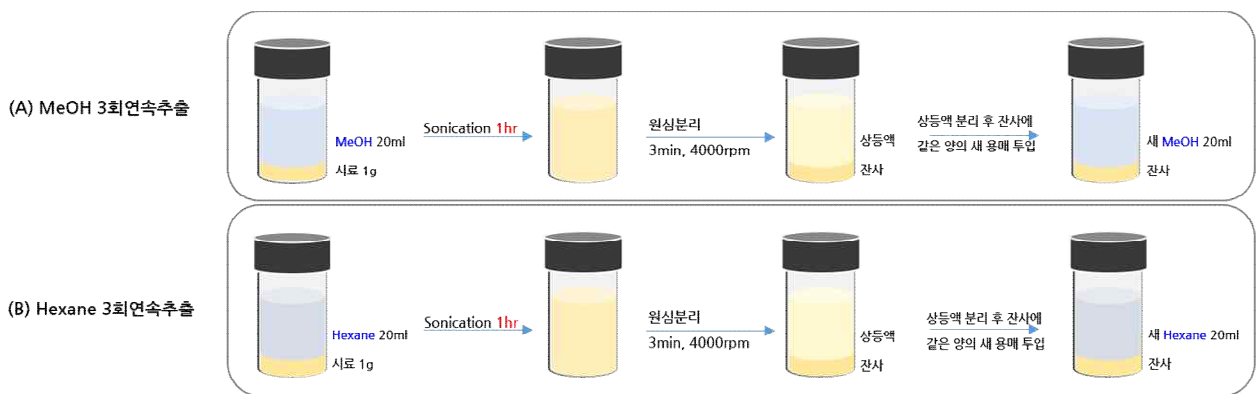


그림 14. 20배수 3회연속추출 공정도

미강의 지표성분 분석에 있어서 실험조건은 주관기관인 강원대학교(이옥환 교수님 Lab)에서 확립한 조건을 그대로 사용하였다. 미강을 methanol 및 hexane으로 각각 20배수 3회연속추출 시 확연히 다른 지표성분 패턴양상을 보였다.

미강의 표준물질인  $\gamma$ -oryzanol 은 4종류(cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate)의 물질이 깔끔하게 분석됨을 확인하였다.

그림 14의 (A)는 미강 methanol추출 상등액을 HPLC로 분석한 크로마토그램의 결과이다. Methanol 추출액의 경우  $\gamma$ -oryzanol 4종류(cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate) 성분이 잘 추출되었고, 분석 시 peak의 분리도도 좋음을 확인하였다. Methanol 3회연속추출에 있어서 1회 추출 시 88.3%, 2회 추출 시 11.1%, 3회 추출 시 0.7%의 비율로 추출횟수가 증가할수록 추출되는 정도가 확연히 줄어드는 것을 확인하였다.

그림 14의 (B)는 미강 hexane추출 상등액을 HPLC로 분석한 결과이다. Hexane 추출액의 경우 4종류의 성분 이외에 여러 성분들이 같이 추출되어 표준물질 4종류와 peak가 겹쳐 분리도가 좋지 않았다. Hexane 3회연속추출에 있어서 각 peak의 분리도가 매우 좋지 않아  $\gamma$ -oryzanol 4종류 성분의 비율을 계산할 수 없었다.

결론적으로 미강의 20배수 3회연속추출실험 결과로 부터 추출용매로 hexane보다 methanol이 적합하고, 20배수 추출에 있어서 2회 추출 시 99.4%의 추출율을 확인할 수 있었다.

표 2. 미강 20배수 3회연속추출 결과

미강 20배수 3회연속추출				
지표성분		r-oryzanol		
추출용매	추출횟수	Area값	Area값 합계	추출 %
Methanol 20배수	1회	3213175		88.3
	2회	402652	3640230	11.1
	3회	24403		0.7
Hexane 20배수	1회	?		?
	2회	?	?	0
	3회	?		0

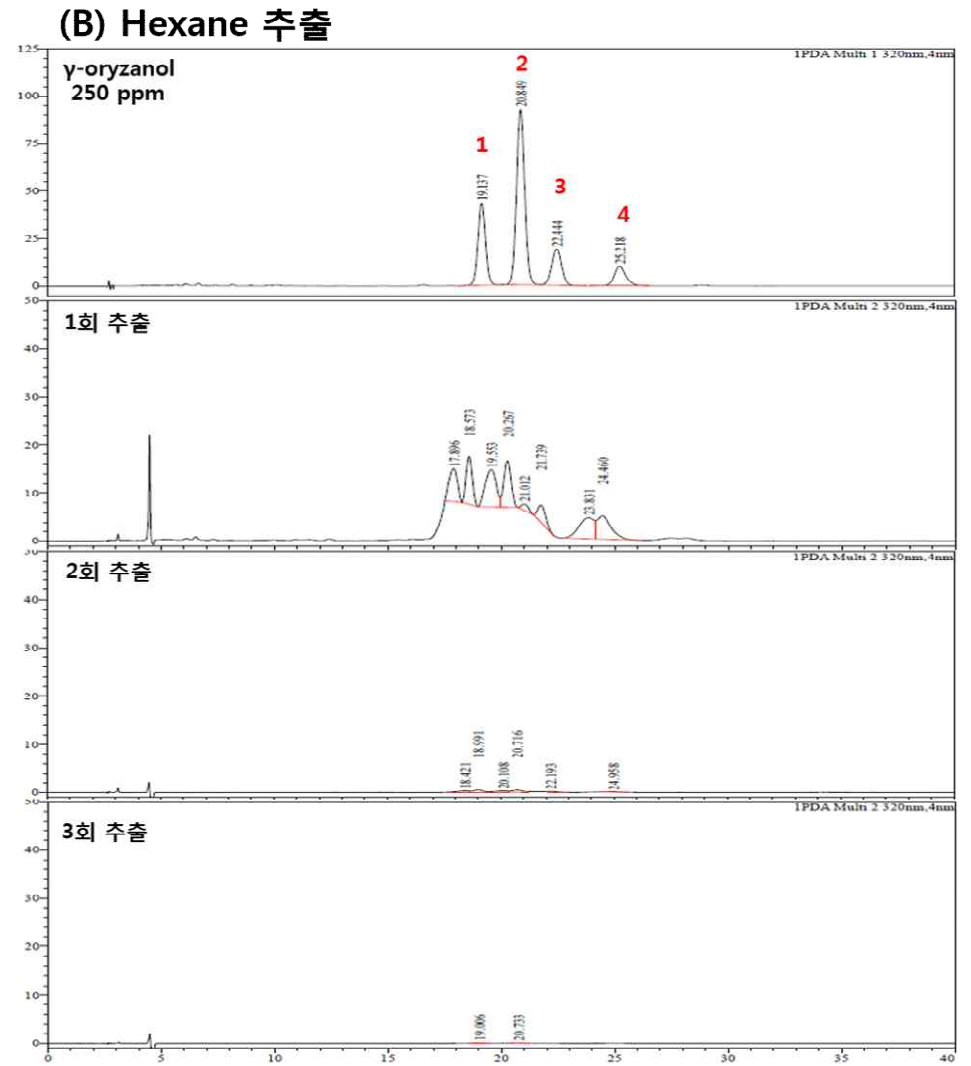
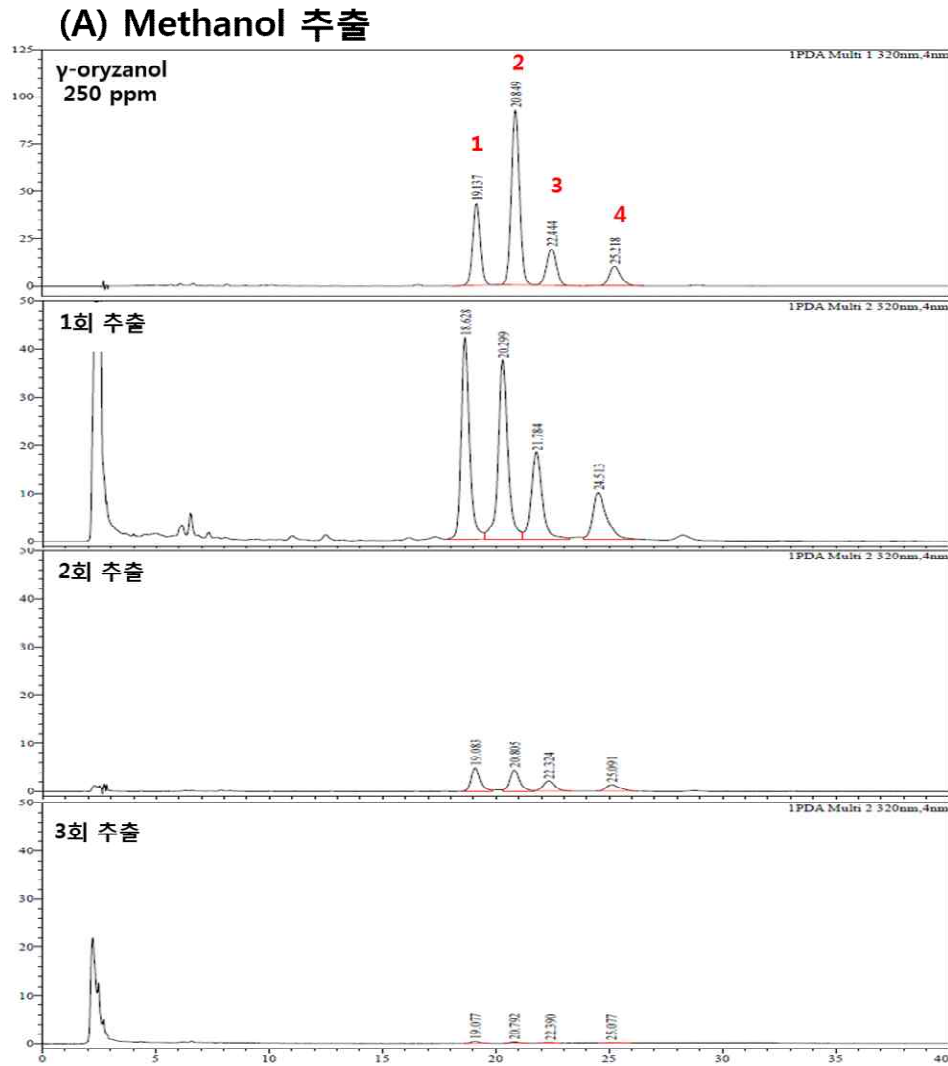


그림 15. 미강 20배수 3회연속추출 실험 HPLC 크로마토그램

1.cycloartenol ferulate(20.6min), 2.cyclobranol ferulate(22.5min), 3.campesterol ferulate(24.3min), 4.beta-sitosterol ferulate(27.3min)

(2) 추출배수 설정을 위한 실험

미강의 지표성분 패턴분석을 위한 최적 추출배수 설정을 위해 추출배수에 따른 1회 추출량 조사 실험을 실시하였다. 추출배수는 20배, 50배, 100배로 설정하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol 및 hexane을 각각 사용하였다. 20배수 추출 시 시료 2.5 g, 50배수 추출 시 시료 1 g, 100배수 추출 시 시료 0.5 g을 각각 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 추출용매로 정용하였다. 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication하여 추출하였다. Sonication후 상온에서 10분간 식힌 후 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.



그림 16. 추출배수 설정 실험 공정도

미강을 methanol 및 hexane으로 각각 추출 시 확연히 다른 지표성분 패턴양상을 보였다.

그림 16의 (A)는 미강의 20배수, 50배수, 100배수 methanol추출액을 HPLC로 분석한 크로마토그램의 결과이다. methanol추출액의 경우  $\gamma$ -oryzanol 4종류 성분이 잘 추출되었고, 분석 시 peak의 분리도도 좋음을 확인하였다. Methanol 20배, 50배, 100배 추출배수에 따른 1회 추출량 조사 결과, 희석배수를 환산한 area값을 비교했을 때 100배수, 50배수, 20배수의 순으로 즉, 추출배수가 클수록 추출비율이 높게 나타났다.

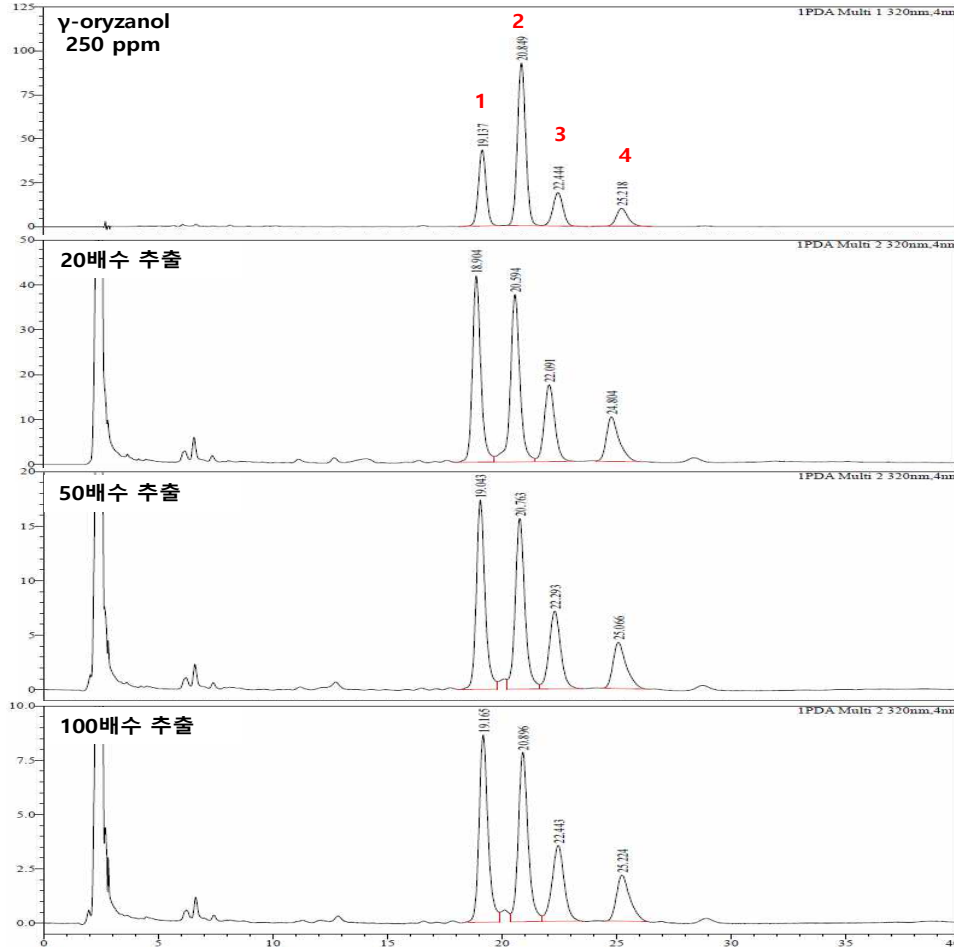
그림 16의 (B)는 미강의 20배수, 50배수, 100배수 hexane추출액을 HPLC로 분석한 결과이다. 미강의 표준물질인  $\gamma$ -oryzanol은 4종류(cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate)의 성분이 깔끔하게 분석됨을 확인하였으나 hexane 추출액의 경우 4종류의 성분 이외에 여러 물질들이 함께 추출되어 표준물질 4종류와 peak가 겹쳐 분리도가 좋지 않았다. Hexane 20배수, 50배수, 100배수 추출물의 경우 peaks의 분리도가 매우 좋지 않아  $\gamma$ -oryzanol 4종류 성분의 비율을 계산을 할 수 없었다.

결론적으로 미강의 추출배수 설정 실험은 추출용매로 hexane보다 methanol이 적합하고, 추출 횟수를 1회로 설정 시 100배수가 가장 추출비율이 높음을 확인할 수 있었다.

표 3. 미강 추출용매 및 추출배수 설정 결과

미강 추출용매 및 추출배수 설정					
지표성분		r-oryzanol			
추출용매	추출배수	Area값	단위 환산	희석배수로 환산한 Area값	
Methanol	20배	3065747	0.5mg/10ul		6131494
	50배	1339046	0.2mg/10ul	1mg/10ul	6695230
	100배	683074	0.1mg/10ul		6830740
Hexane	20배	?			?
	50배	?			?
	100배	?			?

**(A) Methanol 추출**



**(B) Hexane 추출**

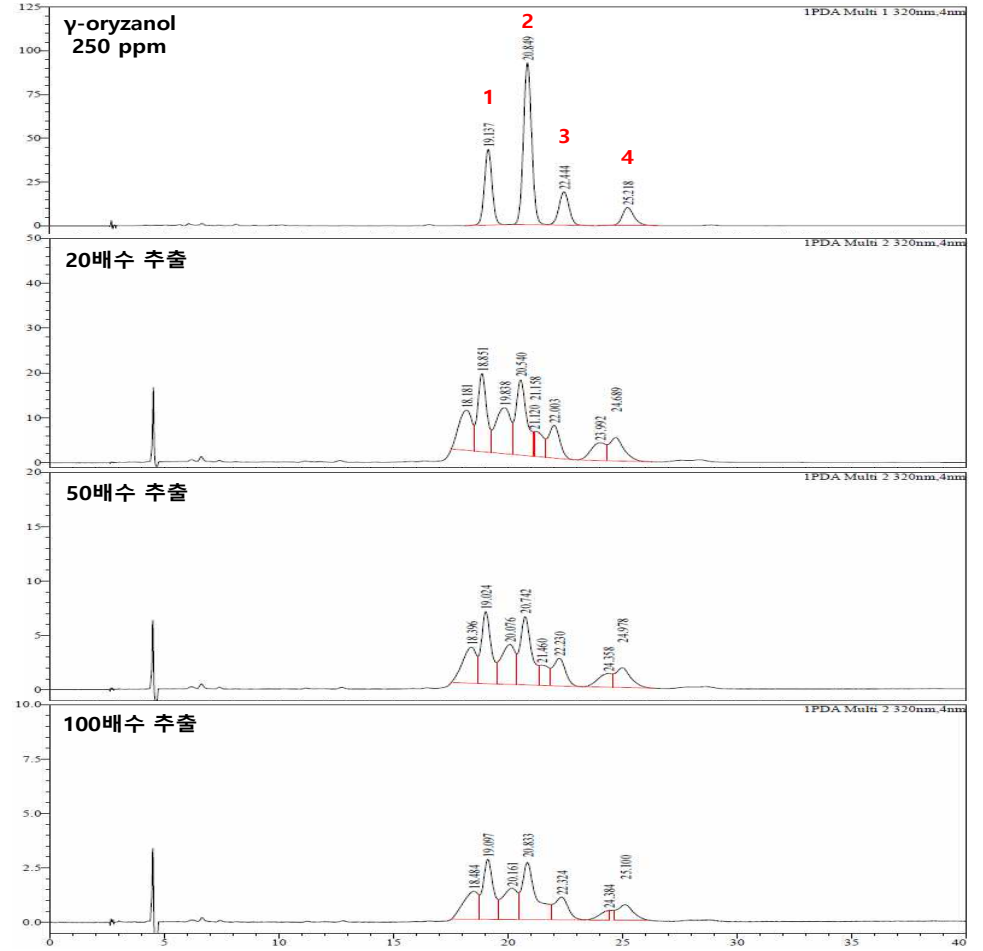


그림 17. 미강의 추출용매 및 추출배수 설정 실험 HPLC 크로마토그램

1.cycloartenol ferulate(20.6min), 2.cyclobranol ferulate(22.5min), 3.campesterol ferulate(24.3min), 4.beta-sitosterol ferulate(27.3min)

\* 추출배수에 맞추어 Y축 스케일을 추출배수만큼 확대하여 표시하였음



(3) 100배수 3회연속 추출

앞선 20배수 3회연속추출 실험과 추출배수 설정 실험의 결과를 바탕으로 추출배수를 100배수로 고정하고 3회연속추출을 실시하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol을 사용하였다. 시료 0.2g을 유리병에서 정밀히 측정하고 HPLC grade methanol 20 ml을 넣어주었다. 유리병을 1시간동안 상온에서 sonication하여 추출하였다. Sonication후 4000 rpm, 3분간 원심분리하여 잔사와 분리된 상등액을 조심히 따라 보관하고, 잔사에 새 용매를 같은 양 넣어 동일한 방법으로 추출하였다. 총 3회연속추출하였다. 분리된 상등액은 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

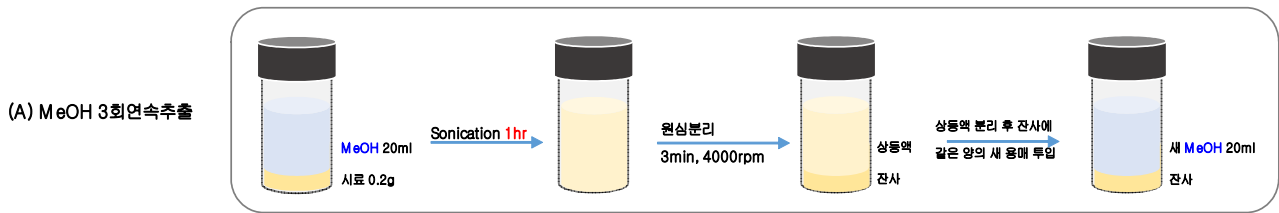


그림 18. 100배수 3회연속추출 공정도

앞선 실험에서 20배수 3회연속추출 실험과 20배수, 50배수, 100배수 추출배수 설정 실험의 결과를 비교해 볼 때 20배수보다 100배수 추출이 더 적합함을 확인하였다. 100배수로 추출 시 추출횟수를 설정하기 위한 추가실험이 필요하였기에 확인실험을 진행하였다.

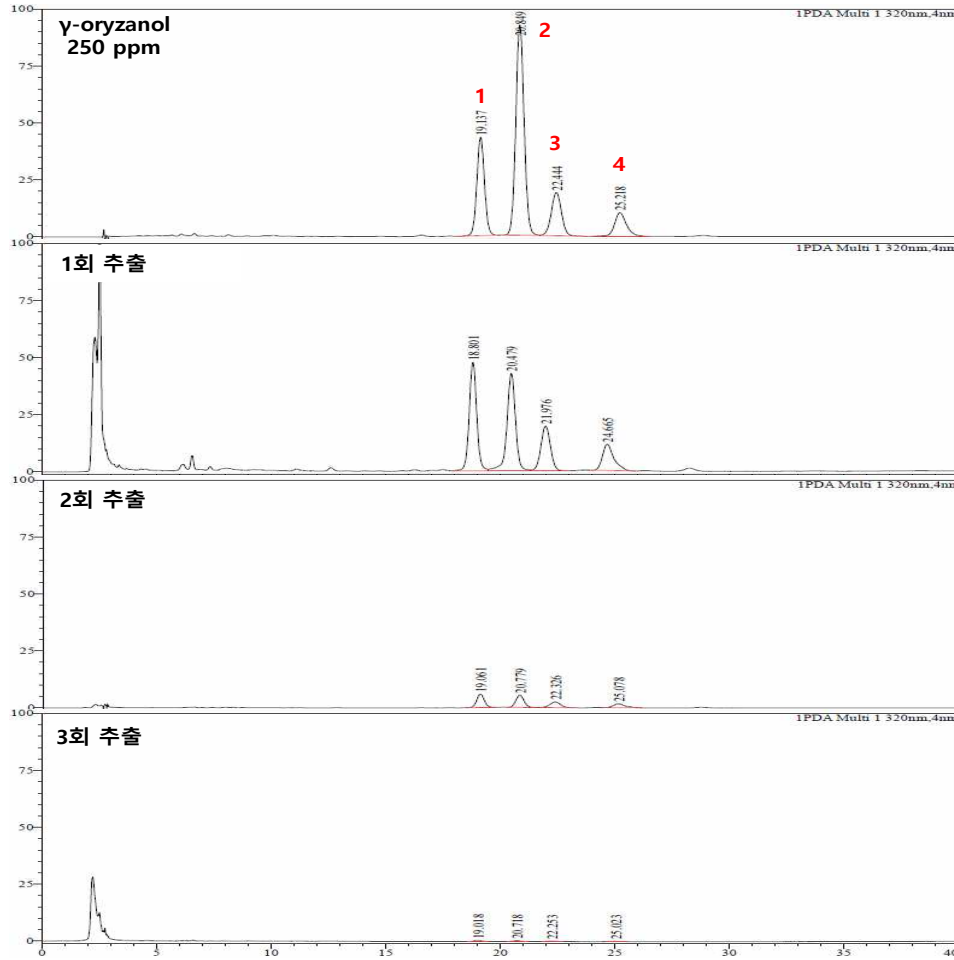
그 결과 미강 20배수 3회연속추출의 총량보다 100배수 3회연속추출 총량이 1.04배 더 많아, 총 추출량에서는 서로 비슷하였다. 또한 20배수 3회연속추출 시 1회 추출에서 88.3%, 2회 추출에서 11.1% 3회 추출에서 0.7%의 비율로 총 3회 추출해야 100% 추출되는 반면, 100배수 3회연속추출의 경우 1회 추출에서 97.2%의 추출 정도를 보였고 2회 추출에서 2.8%로 총 2회만 추출해도 100% 추출됨을 확인하였다.

결론적으로 20배수로 추출배수를 설정할 경우 최소 2회 정도 연속추출을 하여야 97% 이상의 추출이 가능하지만 100배수로 추출 시 1회 추출만으로도 97% 이상의 추출이 가능함을 확인하였다.

표 4. 미강 Methanol 20배수 3회연속추출, 100배수 3회연속추출 결과 비교

미강 추출배수 설정						
지표성분		r-oryzanol				
추출용매	추출횟수	추출 %	Area값	단위 환산	회석배수로 환산한 Area값	
Methanol 20배수	1회	88.3	3213175	0.5mg/10ul		6131494
	2회	11.1	402652	0.5mg/10ul	1mg/10ul	6695230
	3회	0.7	24403	0.5mg/10ul		6830740
	합					7280460
Methanol 100배수	1회	97.2	737975	0.1mg/10ul		7379750
	2회	2.8	20971	0.1mg/10ul	1mg/10ul	209710
	3회	0	0	0.1mg/10ul		0
	합					7589460

(A) Methanol 20배수 3회연속추출



(B) Methanol 100배수 3회연속추출

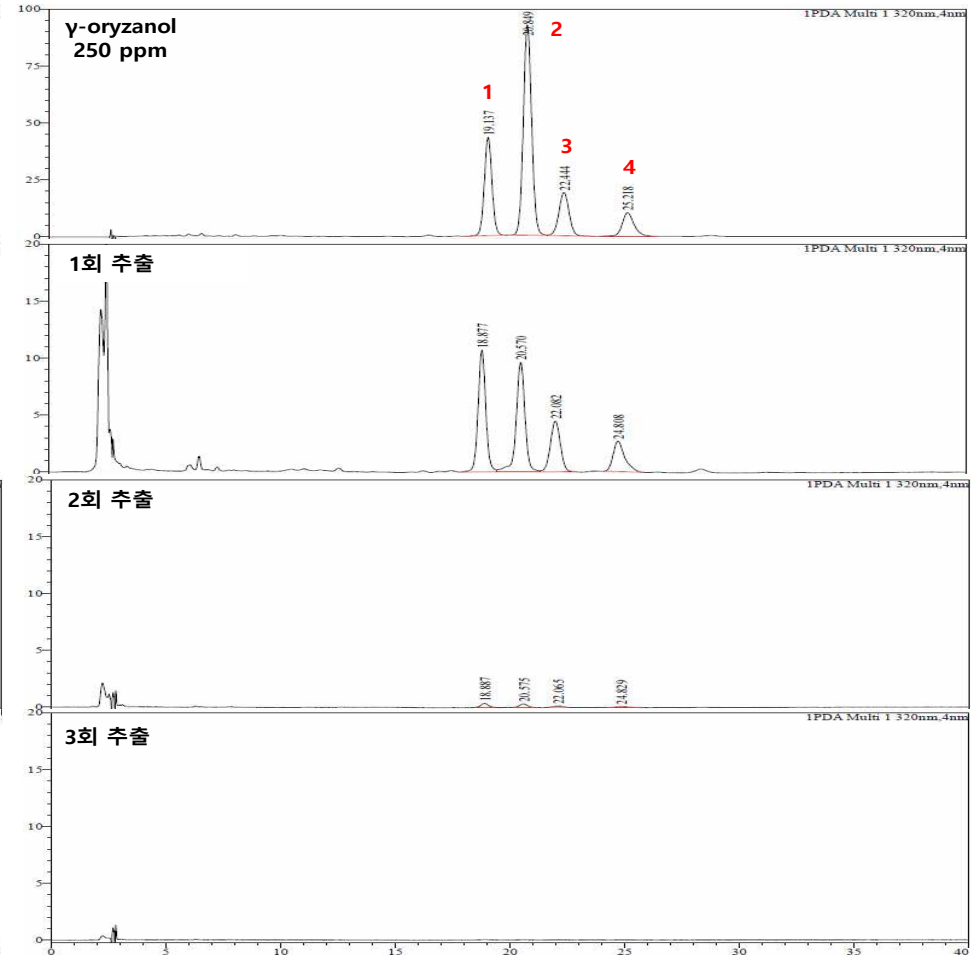


그림 19. 미강 Methanol 20배수 3회연속추출, 100배수 3회연속추출 실험 HPLC 크로마토그램

1.cycloartenol ferulate(20.6min), 2.cyclobranol ferulate(22.5min), 3.campesterol ferulate(24.3min), 4.beta-sitosterol ferulate(27.3min)

\* 추출배수에 맞추어 Y축 스케일을 추출배수만큼 확대하여 표시하였음

#### (4) 최적 시료추출조건 설정

미강의 20배수 3회연속추출실험 결과에서 추출용매로 hexane보다 methanol이 적합하고, 20배수로 추출 시 2회 이상을 추출해야 99.4%의 추출율을 확인할 수 있었다. 또한 미강의 추출배수 설정 실험 결과에서는 추출용매로 hexane보다 methanol이 적합하고, 추출횟수를 1회로 설정 시 100배수가 가장 추출량이 높음을 확인할 수 있었다. 미강의 20배수, 100배수 3회연속추출 비교실험 결과에서 20배수로 추출배수를 설정할 경우 최소 2회 정도 연속추출을 하여야 97% 이상의 추출이 가능하지만 100배수로 추출 시 1회 추출만으로도 97% 이상의 추출이 가능함을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 미강의 최적 시료추출 조건은 추출용매는 methanol, 추출배수는 100배수, 추출횟수는 1회로 설정하였다.

## 다. $\gamma$ -Oryzanol의 분석법 확립을 위한 예비실험

(1) 이동상 및 Flow rate에 따른 분석법 조사

(가) 이동상 1번 조건

Xu & Godber(1999)의 방법을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. Waters 2695 separation module HPLC system을 이용하여 분석을 진행하였으며, 그 결과는 아래 그림과 같다.  $\gamma$ -Oryzanol 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며, 10여 종의 ferulic acid의 혼합물인  $\gamma$ -Oryzanol에서 주요 4개 물질인 cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate 및  $\beta$ -sitosterol ferulate의 피크가 확인되었다. 각각의 피크면적은 23.9%, 55.0%, 13.9% 및 7.2%로 나타내었다. 하지만 각 피크의 경우 모두 25분 이후에서 45분 이전으로, 후반에 몰려있어 이동상 조정이 필요할 것으로 보인다.

표 5.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건①

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 $\mu\text{m}$ )
Column temp.	20 °C
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:dichloromethane:acetic acid=55:44:3:3
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(315 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Run time	50 min

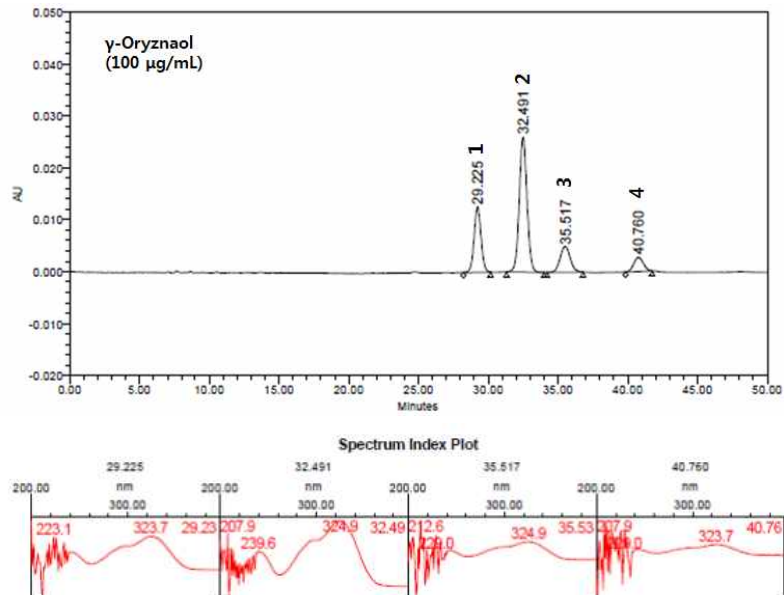


그림 20.  $\gamma$ -Oryzanol의 이동상조건 1에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

(나) 이동상 2번 조건

이전의 방법을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. 비극성도가 높은 methanol의 비율을 더 크게 한 이동상을 이용하여 분석한 결과, 이동상조건 1번과 retention time이 비슷한 것으로 나타났다.

표 6.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건②

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 $\mu$ m)
Column temp.	20°C
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:dichloromethane:acetic acid=60:34:3:3
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(315 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 $\mu$ L
Run time	50 min

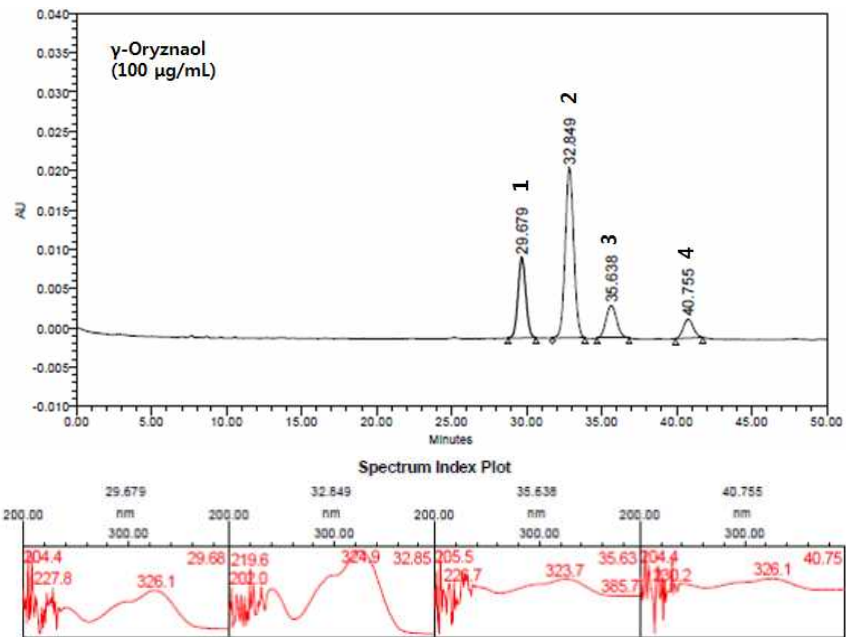


그림 21.  $\gamma$ -Oryzanol의 이동상조건 2에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

(다) 이동상 3번 조건

이전의 방법을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. 이동상조건 1번, 2번과 비교하였을 때 retention time이 빨라졌지만, 피크 2번과 3번의 분리능이 떨어지는 것으로 나타났다.

표 7.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건③

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 $\mu$ m)
Column temp.	20°C
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:dichloromethane:acetic acid=70:24:3:3
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(315 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 $\mu$ L
Run time	50 min

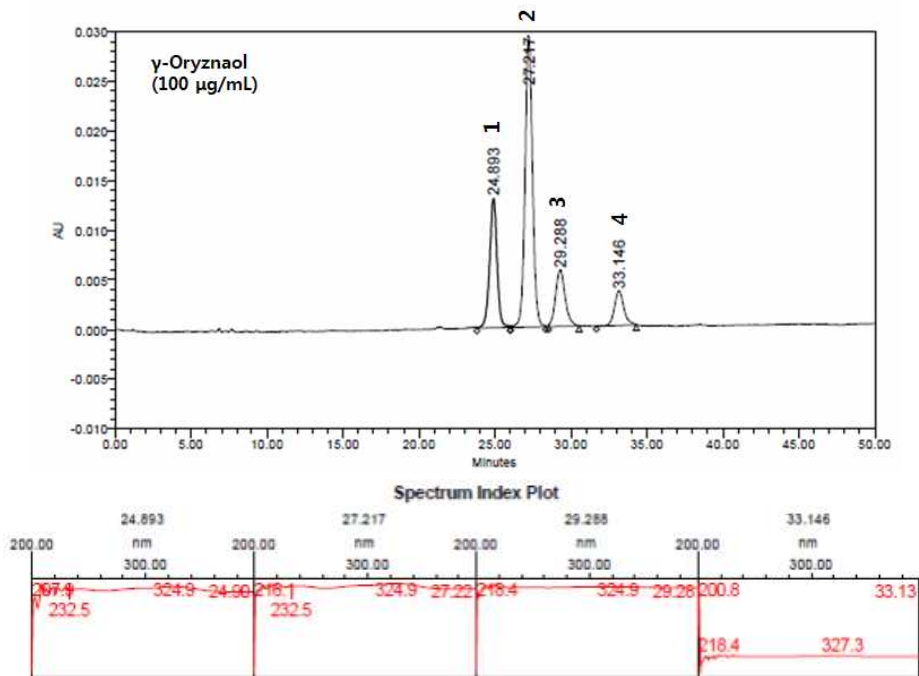


그림 22.  $\gamma$ -Oryzanol의 이동상조건 3에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

(라) 이동상 1번 조건 및 유속 변경

이전의 방법을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. 이동상조건 1번 방법과 동일하게 하며, flow rate를 1.0 mL/min에서 1.4 mL/min으로 높였다. 또한 Xu & Godber(1999)논문에 따라 분석 파장을 325 nm로 조정하였다. 지표물질인  $\gamma$ -Oryzanol과 함께 100% ethanol로 추출한 미강 원물 및 (생물전환)산물질을 함께 분석하였다. 시료는 5 mg/mL의 농도로 이동상에 녹여 분석하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 유속이 빨라짐에 따라 각 피크의 retention time이 빨라졌다. 하지만 시료의 4번 피크에서 피크 갈라짐 현상이 보였으며, 이를 분리하기 위한 다음 실험을 진행하였다.

표 8.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건④

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 $\mu$ m)
Column temp.	20°C
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:dichloromethane:acetic acid=50:44:3:3
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(325 nm)
Flow rate	1.4 mL/min
Injection volume	10 $\mu$ L
Run time	40 min

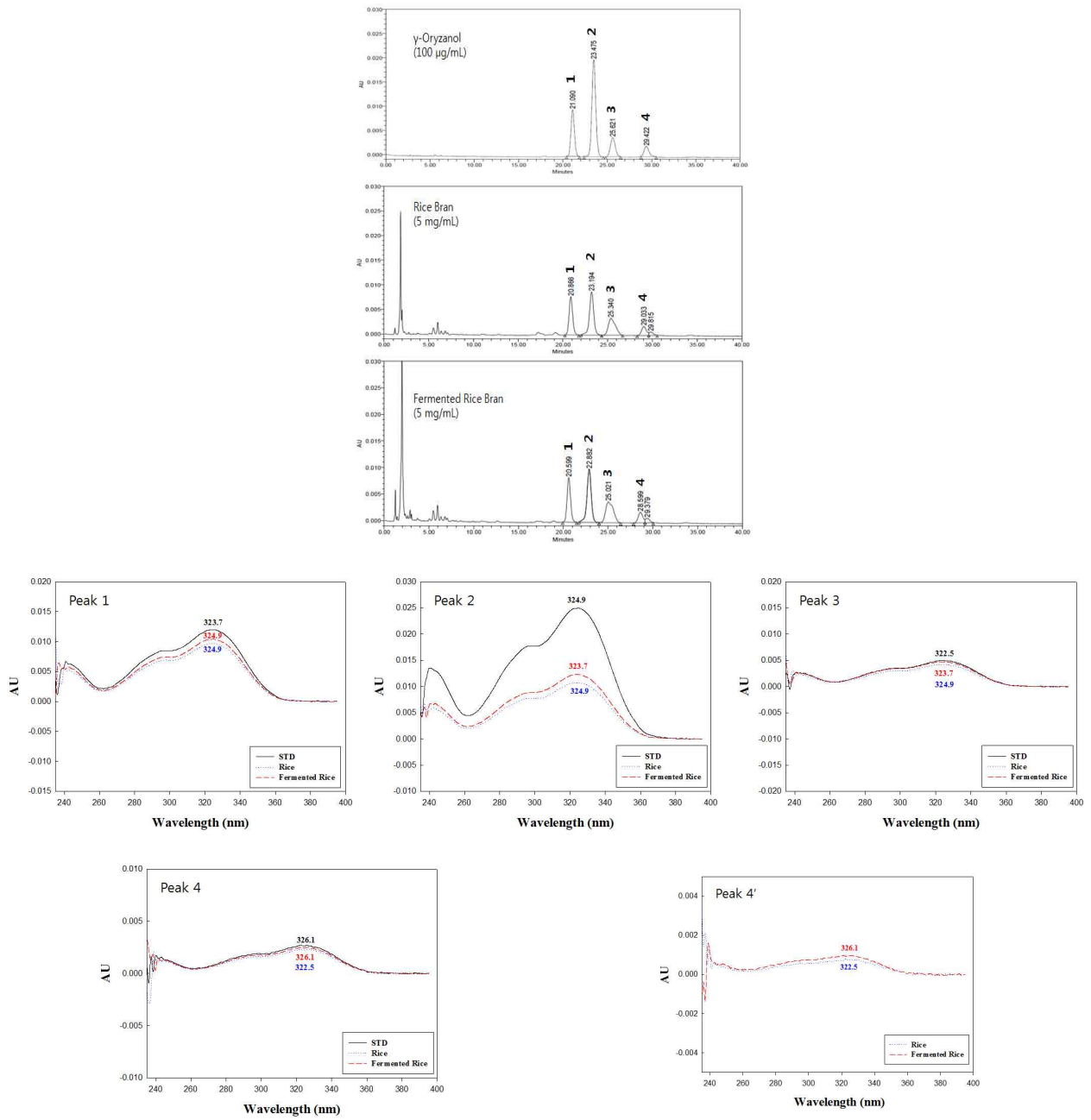


그림 23.  $\gamma$ -Oryzanol, 미강 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼



(마) 이동상 5번 조건

이전의 방법을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. 이전의 이동상조건에서 methanol의 함량을 없애고 acetonitrile의 함량을 94%까지 높인 이동상을 이용하였다. 시료는 250 µg/mL의  $\gamma$ -Oryzanol과 미강 원물 및 (생물전환)산물의 70% ethanol 추출물을 10 mg/mL의 농도로 이동상에 녹여 분석하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 나왔으며, Flow rate가 1.4 mL/min임에도 불구하고, 첫 피크의 retention time이 27분으로 늦춰졌다. 또한 지표물질 및 시료에서 4번 피크가 갈라지는 현상을 보였다.

표 9.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건⑤

Instrument	Conditions
Column	SunfireTM C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 µm)
Column temp.	20°C
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:dichloromethane:acetic acid=0:94:3:3
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(325 nm)
Flow rate	1.4 mL/min
Injection volume	10 µL
Run time	50 min

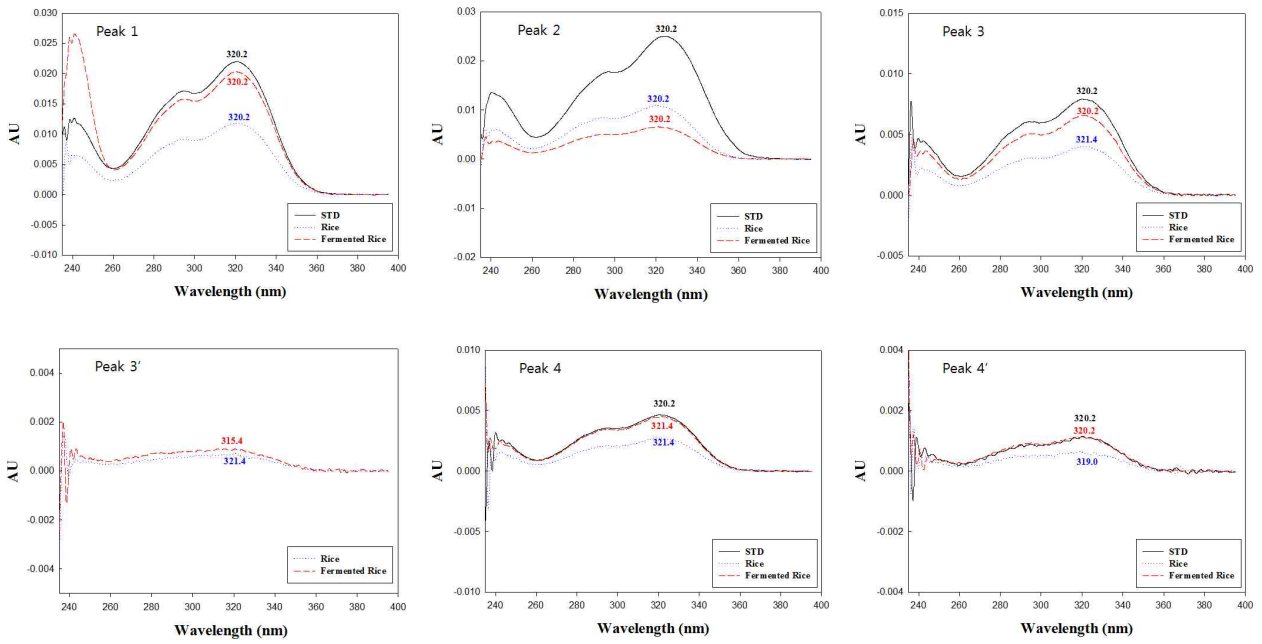
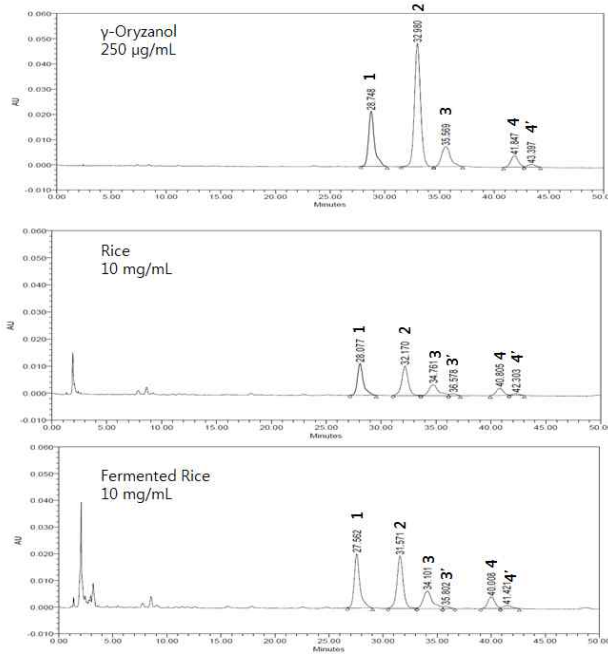


그림 24.  $\gamma$ -Oryzanol, 미강 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건5에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

(바) 이동상 5번 조건 및 컬럼 온도 변경

이동상 5번 조건을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. 이동상을 동일하게 하고, 컬럼 온도를 20℃에서 40℃로 높여 진행하였다.  $\gamma$ -Oryzanol은 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 진행하였으며, 시료는 농촌진흥청에서 제공받은 미강 중 No. 12와 No. 7의 (생물전환)산물을 이용하여 분석하였다. 미강 시료는 100% methanol을 이용하여 1시간동안 sonication 추출하여 상층액 필터 후 바로 HPLC에 injection 하였다. 그 결과, retention time이 16분으로, 총 run time을 30분으로 줄일 수 있었다. 하지만 여전히 4번 피크는 갈라짐 현상이 보였다.

표 10.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건⑤

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 $\mu\text{m}$ )
Column temp.	40℃
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:dichloromethane:acetic acid=0:94:3:3
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(325 nm)
Flow rate	1.4 mL/min
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Run time	30 min

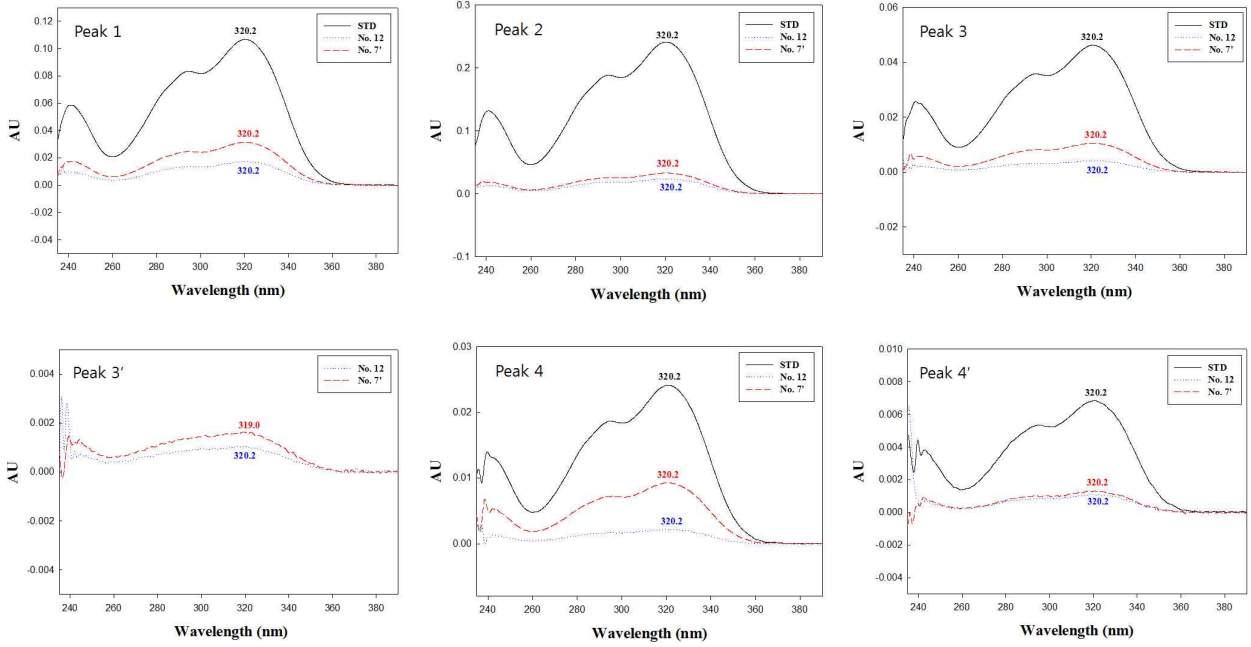
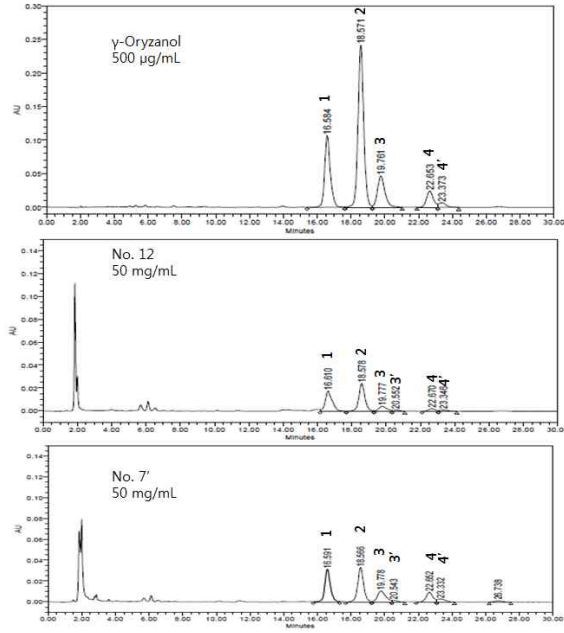


그림 25.  $\gamma$ -Oryzanol, 미강 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건5-컬럼 온도변경에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

(사) 이동상 6번 조건

이동상 조건을 변형하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. E. J. Rogers et al.(1993)의 문헌을 바탕으로 methanol:acetonitrile:isopropanol(45:50:5, v/v)의 이동상을 이용하였으며, flow rate 1.0 mL/min으로 분석하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 시료는  $\gamma$ -Oryzanol 500  $\mu\text{g/mL}$ , No. 12와 No. 7의 원물 및 (생물전환)산물(50 mg/mL)을 이용하여 분석하였다. 각 피크에서 피크 갈라짐 현상은 나타나지 않았으며, retention time 또한 첫 피크가 18분, 총 run time이 30분을 나타내었다. 현재까지의 예비실험을 통해 이동상 6번 조건이 미강시료에서  $\gamma$ -Oryzanol을 분석하는 가장 최적화된 방법임을 확인하였다. 이후 동일한 조건을 이용하여 농촌진흥청에서 제공 받은 품종별 원물 21종과 생물전환공정을 마친 (생물전환)산물 21종의 분석을 진행하였다.

표 11.  $\gamma$ -Oryzanol의 HPLC 분석조건⑥

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 $\mu\text{m}$ )
Column temp.	40 °C
Mobile phase	Methanol:acetonitrile:isopropanol=45:50:5
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(325 nm)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Run time	30 min

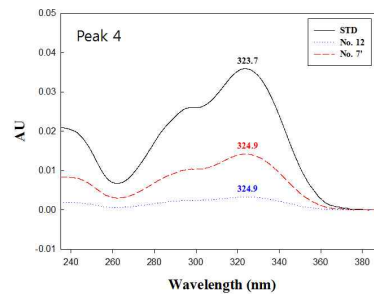
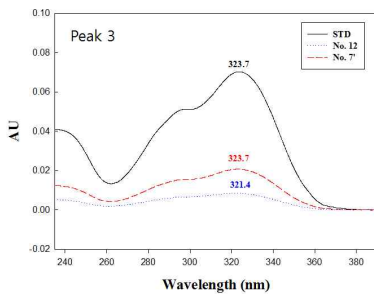
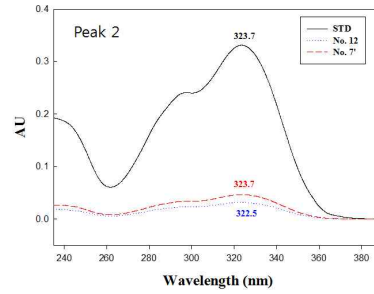
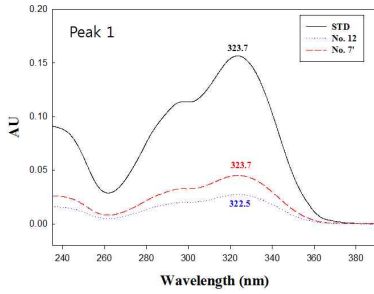
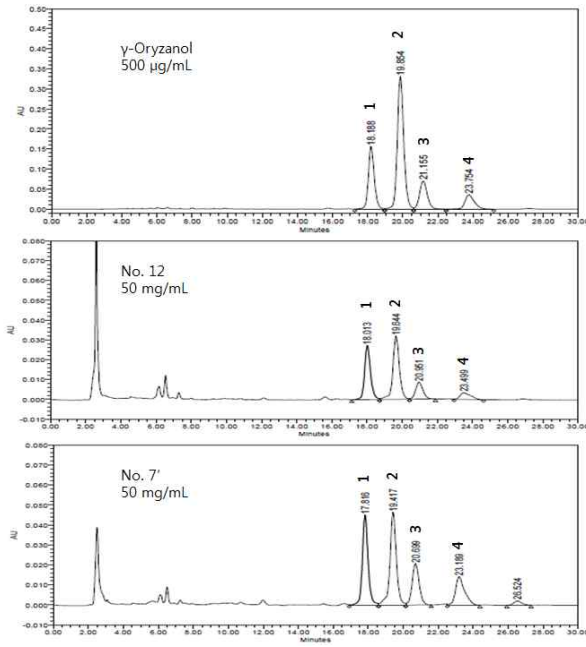


그림 26.  $\gamma$ -Oryzanol, 미강 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건6에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

라. 품종별 미강 21종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\gamma$ -Oryzanol 함량 분석

이동상 6번 조건과 같은 조건을 이용하여 총 42종의 미강을 분석하였다.  $\gamma$ -Oryzanol standard의 경우 7.8125~250  $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 6 지점을 이용하여 표준검량선( $y=24316x+12835$ )을 작성하였으며, 0.9999의 높은 결정계수( $R^2$ )를 나타내었다. 그 결과, 21번 하이아미 원물에서  $304.9 \pm 0.79 \text{ mg/100 g}$ 으로 가장 높은  $\gamma$ -Oryzanol 함량을 나타내었으며, 각 피크인 cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate 및  $\beta$ -sitosterol ferulate는 각각 25.3, 41.9, 19.0 및 13.8%의 함량을 나타내었다. 또한 18번 미광의 (생물전환)산물과 18번 미광 원물에서 각각 298.0 및 286.6  $\text{mg/100 g}$ 의 높은  $\gamma$ -Oryzanol 함량을 나타내며 생물전환시  $\gamma$ -Oryzanol의 함량이 증가되었다. 하지만 19번 삼광 원물의 경우 198.8  $\text{mg/100 g}$ 에서 생물전환시 139.3  $\text{mg/100 g}$ 으로  $\gamma$ -Oryzanol 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 미강 21종의 분석 결과 생물전환시  $\gamma$ -Oryzanol 함량이 감소되거나 증가하였다.

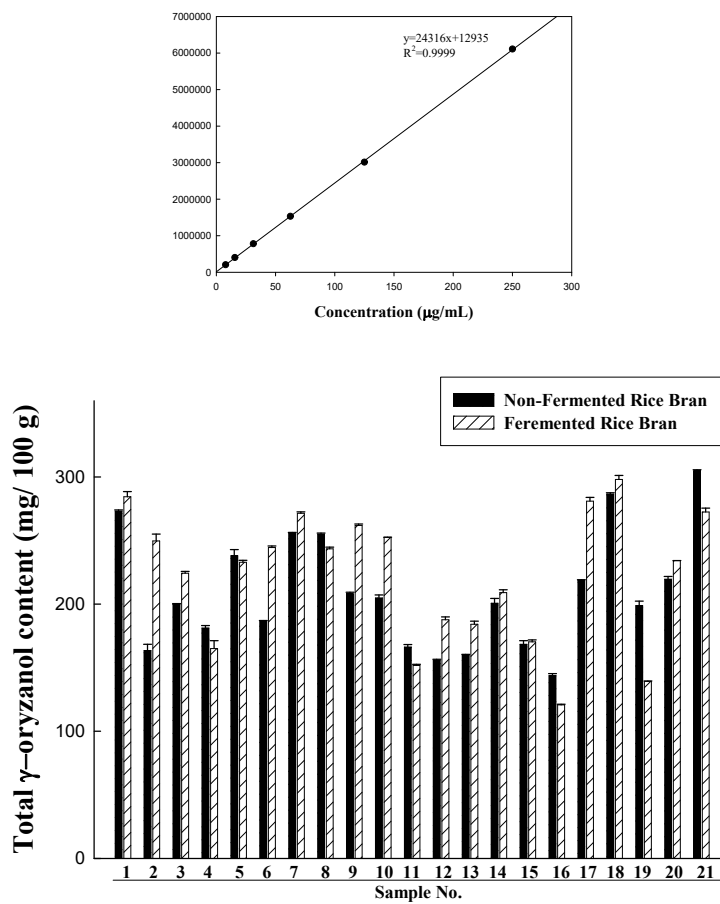


그림 27. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의  $\gamma$ -Oryzanol 함량

표 12. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 총  $\gamma$ -Oryzanol 함량

No.		평균 (mg/100 g)	표준편차	RSD (%)
1	NRB <sup>1)</sup>	273.13	0.97	0.35
	FRB <sup>2)</sup>	284.41	4.12	1.45
2	NRB	163.41	5.06	3.10
	FRB	249.66	5.45	2.18
3	NRB	199.94	0.53	0.26
	FRB	224.32	1.44	0.64
4	NRB	181.22	1.97	1.09
	FRB	165.03	6.24	3.78
5	NRB	238.00	4.88	2.05
	FRB	232.95	1.49	0.64
6	NRB	187.02	0.08	0.04
	FRB	244.52	1.19	0.49
7	NRB	255.89	0.56	0.22
	FRB	271.42	1.10	0.40
8	NRB	255.14	0.75	0.29
	FRB	243.53	1.29	0.53
9	NRB	208.10	1.22	0.59
	FRB	261.85	1.21	0.46
10	NRB	204.85	2.43	1.19
	FRB	252.50	0.18	0.07
11	NRB	166.29	1.94	1.17
	FRB	151.78	0.92	0.61
12	NRB	155.69	0.96	0.61
	FRB	187.69	2.32	1.24
13	NRB	159.94	0.55	0.34
	FRB	184.22	2.34	1.27
14	NRB	200.76	3.73	1.86
	FRB	209.09	2.19	1.05
15	NRB	168.39	2.92	1.73
	FRB	170.31	1.53	0.90
16	NRB	143.69	1.62	1.13
	FRB	120.72	0.52	0.43
17	NRB	218.66	0.53	0.24
	FRB	280.97	3.02	1.07
18	NRB	286.60	1.05	0.37
	FRB	298.06	3.20	1.07
19	NRB	198.82	3.50	1.76
	FRB	139.29	0.29	0.21
20	NRB	219.63	2.09	0.95
	FRB	234.23	0.03	0.01
21	NRB	304.90	0.79	0.26
	FRB	272.50	2.99	1.10

<sup>1)</sup>Non-fermented rice bran

<sup>2)</sup>Fermented rice bran

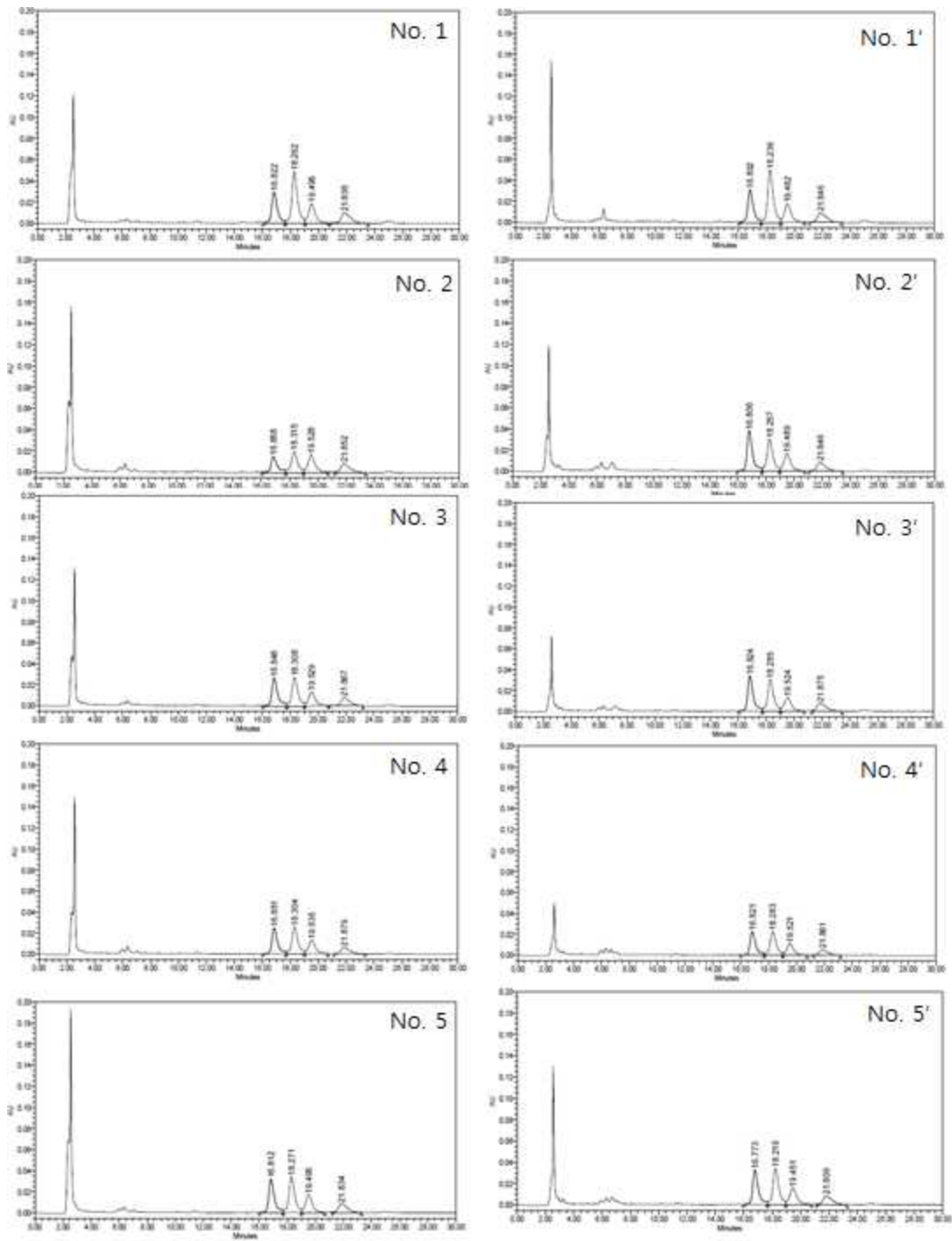


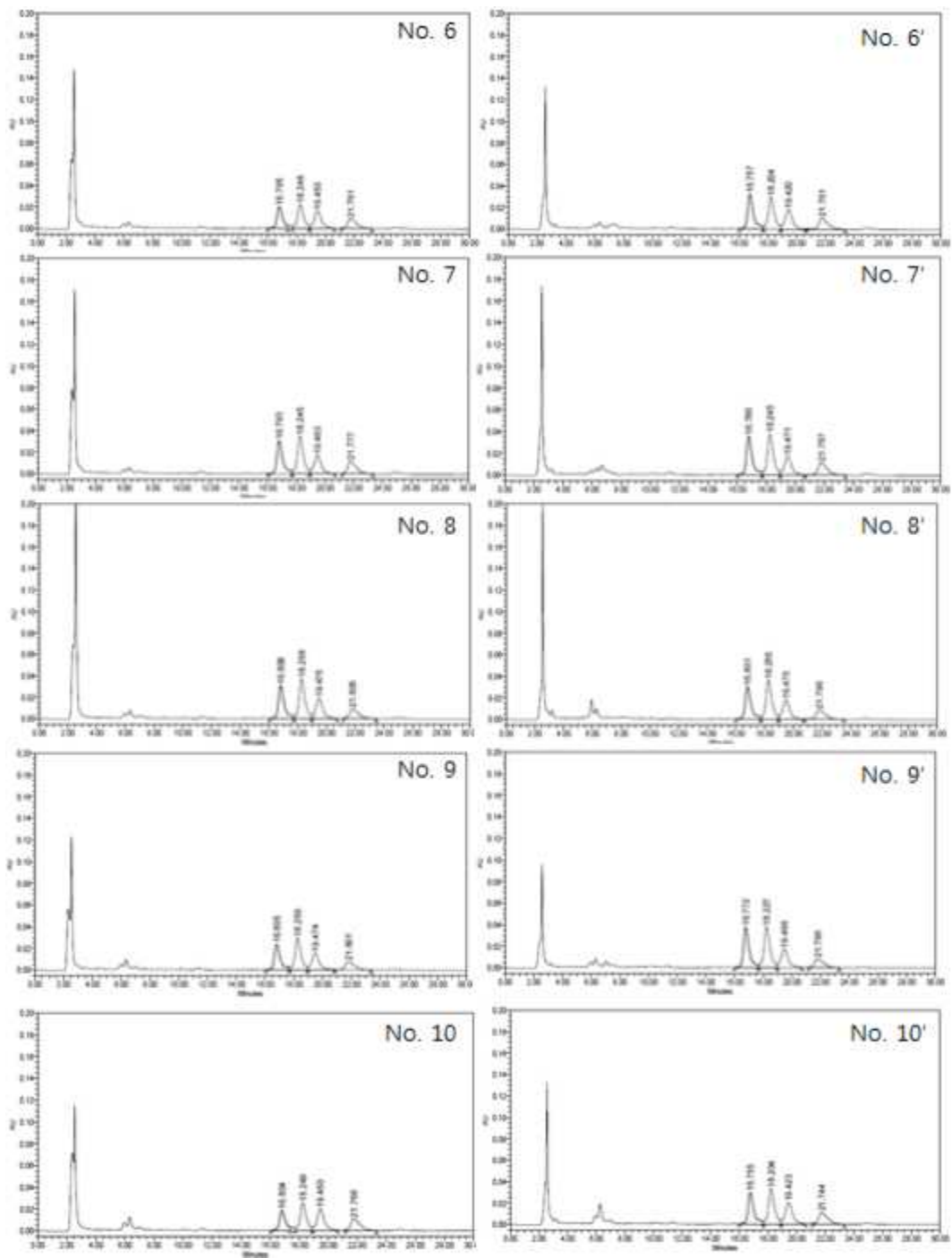
표 13. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 ferulic acid 비율(%)

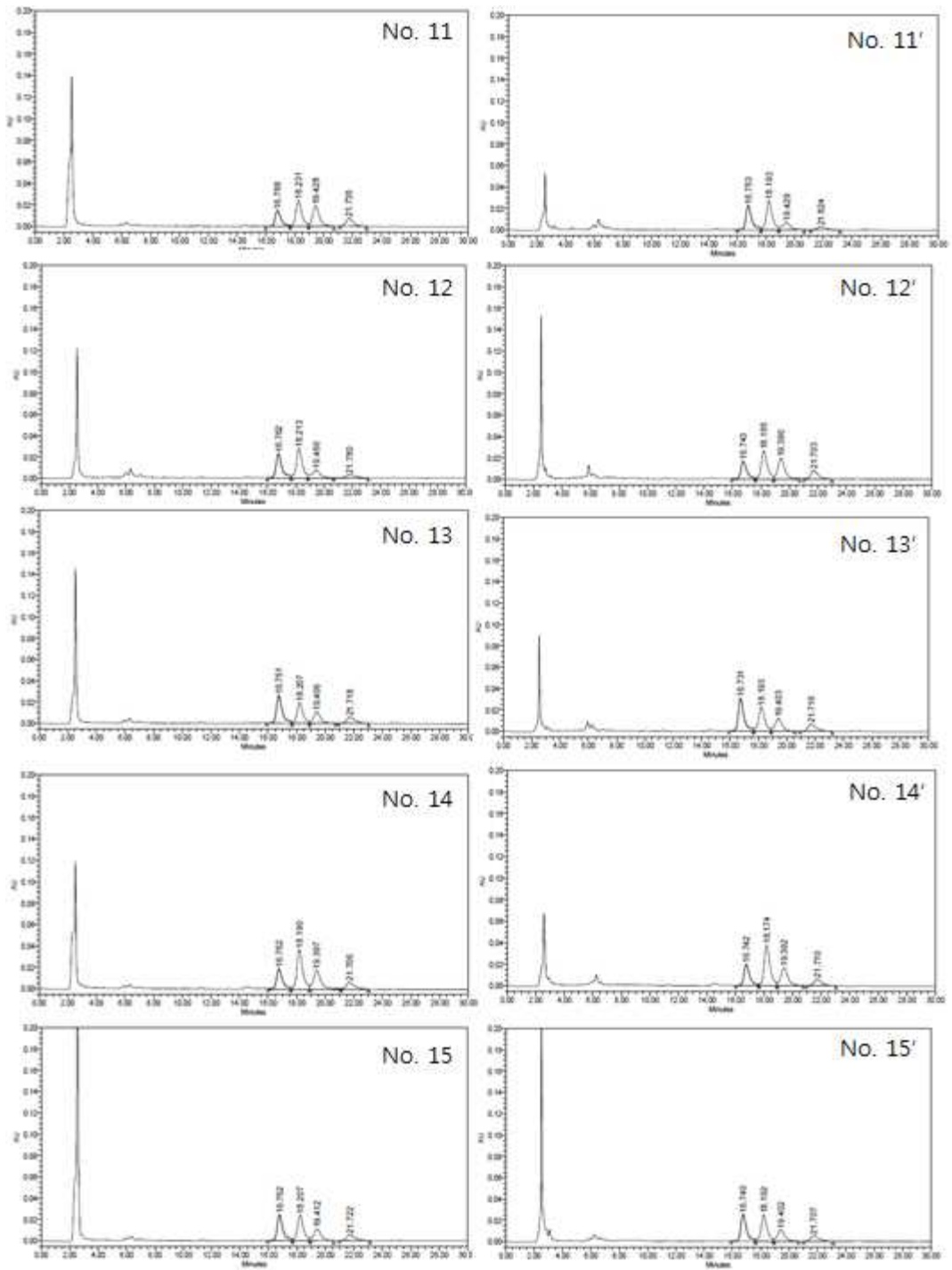
No.	$\gamma$ -Oryzanol species composition (%)				
	cycloartenol	cyclobranol	campesterol	$\beta$ -sitosterol	
	ferulate	ferulate	ferulate	ferulate	
1	NRB <sup>1)</sup>	25.34	41.87	19.01	13.77
	FRB <sup>2)</sup>	25.66	42.03	18.77	13.54
2	NRB	22.57	30.19	29.14	18.10
	FRB	34.43	31.50	19.95	14.12
3	NRB	31.54	34.57	19.39	14.50
	FRB	34.06	35.16	17.64	13.13
4	NRB	31.13	35.77	20.83	12.27
	FRB	34.24	35.45	19.02	11.29
5	NRB	30.91	35.26	20.32	13.51
	FRB	31.75	35.62	20.04	12.59
6	NRB	25.43	30.19	26.26	18.12
	FRB	32.43	29.78	22.04	15.74
7	NRB	28.70	33.78	20.52	17.00
	FRB	30.92	35.07	18.35	15.66
8	NRB	28.98	35.27	22.08	13.67
	FRB	29.26	35.55	21.60	13.59
9	NRB	27.96	35.17	22.82	14.05
	FRB	34.67	34.49	19.21	11.63
10	NRB	21.05	30.90	28.78	19.27
	FRB	27.99	32.51	23.72	15.78
11	NRB	21.25	34.82	30.89	13.04
	FRB	35.42	42.83	14.99	6.76
12	NRB	34.66	42.31	15.65	7.39
	FRB	21.80	35.12	29.92	13.16
13	NRB	38.21	30.03	19.01	12.76
	FRB	38.39	30.41	18.54	12.66
14	NRB	22.21	42.98	24.94	9.87
	FRB	23.30	43.76	23.53	9.41
15	NRB	34.13	35.31	19.15	11.41
	FRB	35.12	35.66	18.30	10.92
16	NRB	33.45	35.08	18.87	12.60
	FRB	33.37	35.49	18.68	12.47
17	NRB	29.26	34.40	21.34	15.00
	FRB	31.67	34.54	19.56	14.22
18	NRB	29.02	35.69	20.58	14.70
	FRB	29.97	36.51	19.47	14.06
19	NRB	27.45	34.19	24.40	13.97
	FRB	27.68	34.94	24.07	13.31
20	NRB	32.01	35.92	20.50	11.56
	FRB	32.40	36.53	19.53	11.53
21	NRB	30.95	38.51	17.03	13.52
	FRB	31.82	39.28	16.33	12.57

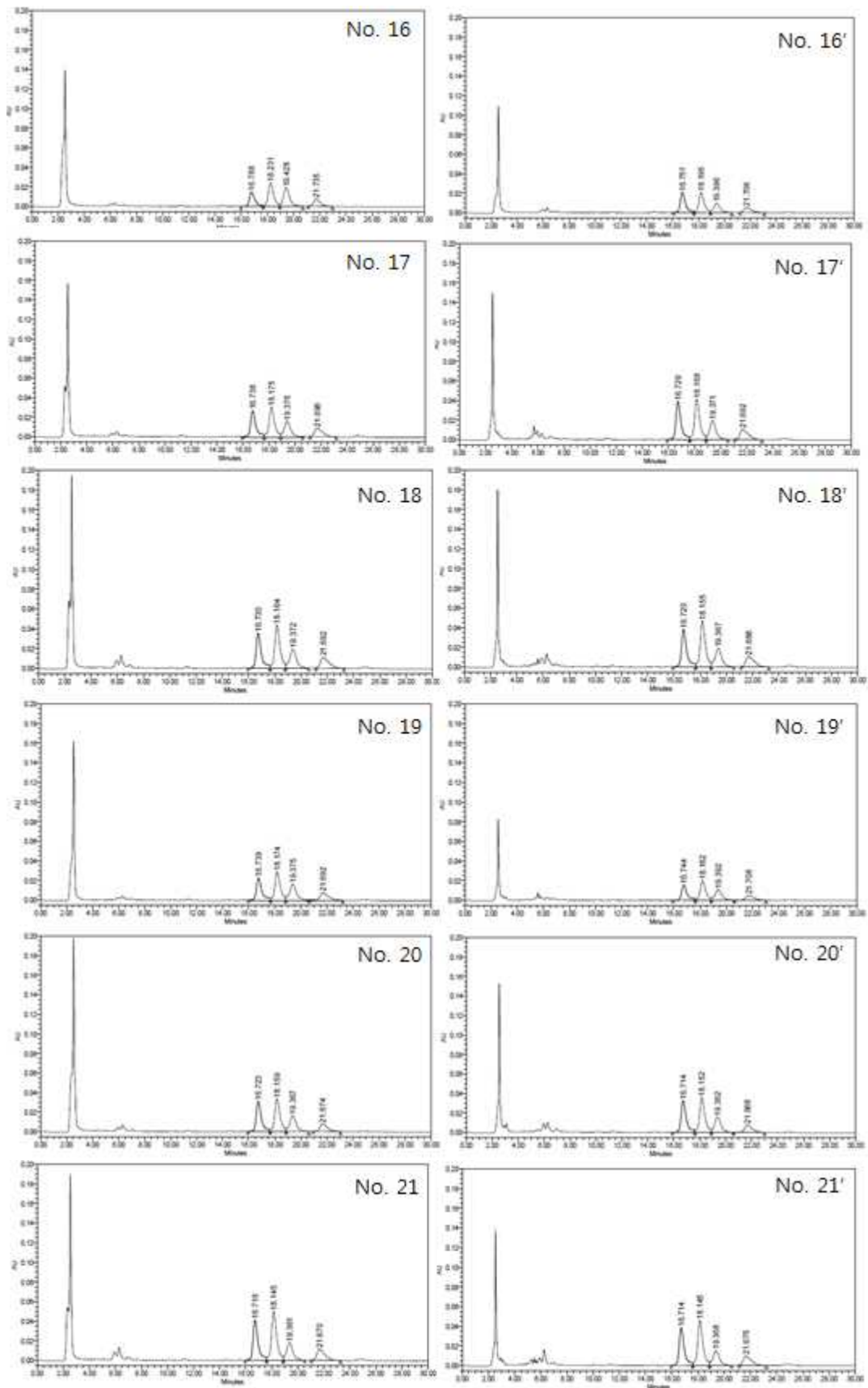
<sup>1)</sup>Non-fermented rice bran

<sup>2)</sup>Fermented rice bran









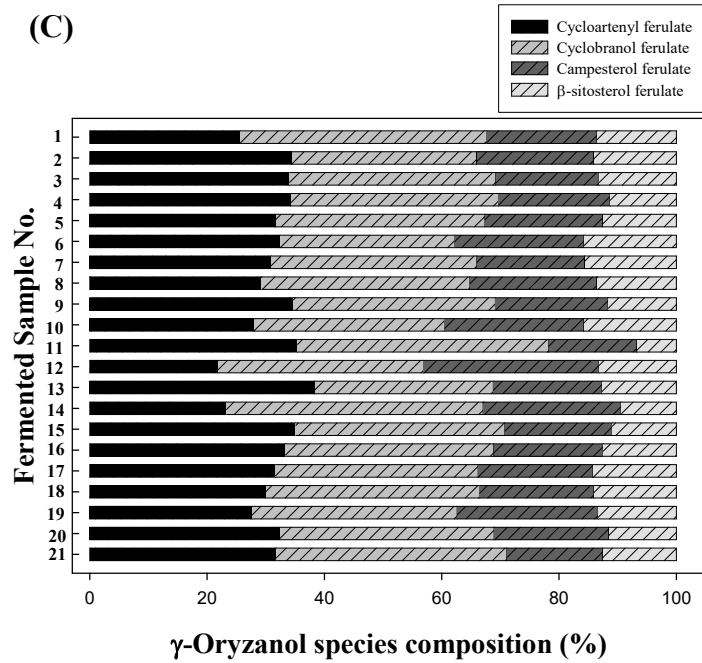
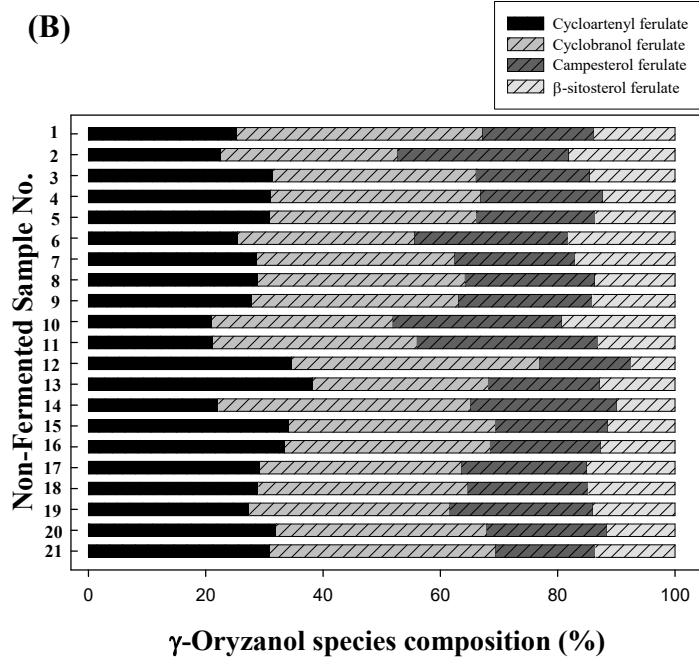


그림 28. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 chromatogram (A) 및 ferulic acid 비율 (B,C)

#### 마. 미강 원물 및 (생물전환)산물의 $\gamma$ -Oryzanol method validation

현재까지 미강에 존재하는  $\gamma$ -Oryzanol의 분석을 위하여 HPLC 분석조건을 확립하였으며, 이때 이용된 분석법을 검증하기 위하여, 이동상 6번 조건과 같은 조건을 이용하여 method validation을 실시하였다. 분석법의 유효성을 검증하기 위한 방법으로는 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantization, LOQ)를 사용하였다.

Waters 996 Photodiode Array Detector(Waters co., Milford, MA, USA)를 사용하여 190 nm부터 400 nm까지 흡광도를 측정하여 각 피크의 최대흡수파장을 확인하였다(그림 28). 표준물질  $\gamma$ -Oryzanol에서는 각 피크인 cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate 및  $\beta$ -sitosterol ferulate의 retention time이 각각 16.36 min, 17.76 min, 18.95 min 및 21.20 min으로 확인되었고, 각 시료에서도 동일한 retention time에서 피크를 확인할 수 있었다. Ferulic acid의 혼합물인  $\gamma$ -Oryzanol을 0, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250  $\mu\text{g/mL}$ 로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다. 그 결과 (그림 29), 결정계수( $R^2$ ) 값은 0.9999로 우수한 직선성을 보였다. 정밀성은 표 14와 같이 일간(intra-day) 정밀도에서 0.77~1.88%를 나타내었고, 일내(inter-day) 정밀도에서 1.74~2.14%로 모두 5% 이하의 정밀도를 나타내었다. 정확성은 회수율을 측정하여 그 결과로 나타내었다. 각 시료에 함유되어 있는  $\gamma$ -Oryzanol 함량의 약 80~120%가 되는 농도인 50, 60 및 75  $\mu\text{g/mL}$ 의 표준용액을 첨가하여 HPLC로 검출되는 농도를 측정하였다. (표 15) 그 결과 하이아미 미강 원물 및 (생물전환)산물에서 일간 및 일내 측정 결과 각각 107.77~110.99% 및 107.83~111.85%의 회수율을 나타내었다. 검출한계와 정량한계는 검량선의 기울기와 반응의 표준편차에 근거하는 방법으로 검출한계는  $3.3 \times$ 표준편차/기울기로, 정량한계는  $10 \times$ 표준편차/기울기 값으로 확인하였다. 이때의 기울기는 표준검량선에서 저농도 3구간의 기울기를 사용하였으며, 표준편차는 중간농도를 7회 분석하여 이용하였다. 그 결과(표 16), 검출한계는 1.5816  $\mu\text{g/mL}$ , 정량한계는 4.7927  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

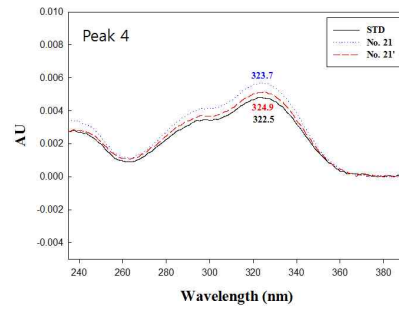
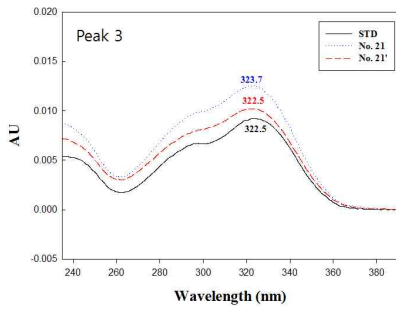
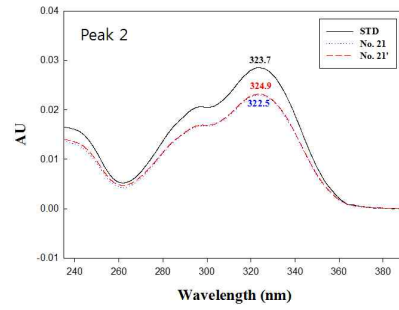
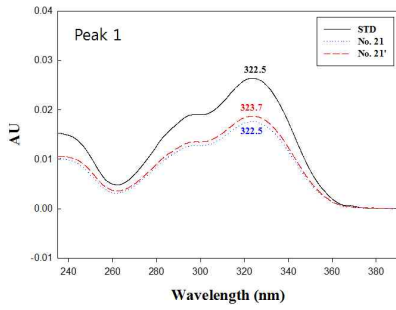
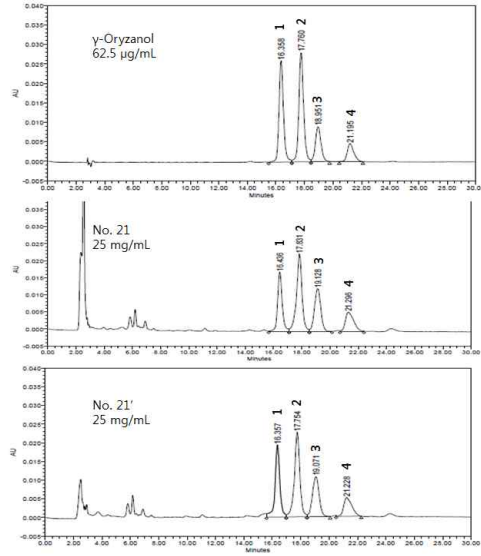


그림 29.  $\gamma$ -Oryzanol, 하이아미 미강 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건6에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼



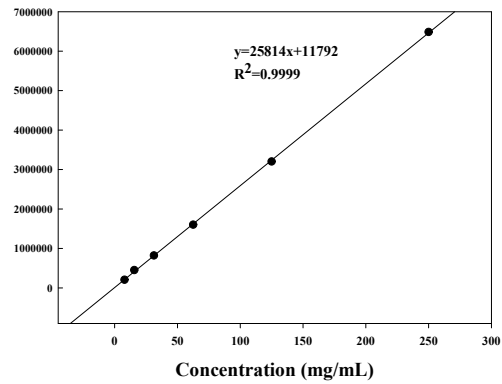


그림 30.  $\gamma$ -Oryzanol standard의 직선성 확인

표 14. 하이아미 원물 및 (생물전환)산물의 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 정밀성

Sample	Intra-day		Inter-day	
	Mean±SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)	Mean±SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)
Non-Fermented Haiami	257.28±1.97	0.77	256.80±4.48	1.74
Fermented Haiami	243.10±4.58	1.88	242.58±5.20	2.14

표 15. 하이아미 원물 및 (생물전환)산물의 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 회수율

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day			Inter-day		
		Mean±SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	RSD (%)	Mean±SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	RSD (%)
Non-Fermented Haiami	50	53.56±1.20	107.11	2.25	54.19±0.33	108.37	0.60
	60	65.80±0.29	109.67	0.44	64.96±1.78	108.26	2.74
	75	81.61±1.41	108.81	1.73	81.61±1.27	108.81	1.55
Fermented Haiami	50	53.61±0.81	107.21	1.51	53.92±1.20	107.83	2.23
	60	65.84±0.98	109.73	1.49	66.70±0.08	111.16	0.12
	75	83.24±1.32	110.99	1.58	83.89±1.67	111.85	1.99

표 16.  $\gamma$ -Oryzanol 분석의 검량한계 및 검출한계

Sample	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope	Intercept	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
$\gamma$ -Oryzanol	7.8125-31.25	26080.32	17705.10	0.9966	1.5816	4.7927

**바. 미강 시제품의  $\gamma$ -oryzanol 함량 분석**

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공 받은 미강(생물전환)산물 기반 시제품의  $\gamma$ -oryzanol 분석을 위하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 제조는 시료 500 mg을 취하여 100% methanol로 50 mL volumetric flask에 정용하여 1시간동안 sonication 추출 후, 고형분의 제거를 위하여 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리 후 상층액을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하였다.  $\gamma$ -Oryzanol 표준물질은 7.8125~250  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 표준검량선을 작성하였다( $y=20765x-6734.9$ ,  $R^2=1.000$ ). 미강 시제품의 ferulate 비율 및  $\gamma$ -oryzanol 함량을 표 18에 나타내었다.

표 17. 미강 시제품의 ferulate 비율 및  $\gamma$ -oryzanol 함량

	Cycloatenyl ferulate (%)	Cyclobranol ferulate (%)	Campesterol ferulate (%)	$\beta$ -Sitosterol ferulate (%)	$\gamma$ -Oryzanol (mg/g)
미강 시제품	37.05	33.09	16.49	13.37	3.84±0.06

### 3. 미강 원물 및 (생물전환)산물의 지표성분 분석 최적조건 확립

#### 시료추출 방법

시료(분말) 0.5 g을 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 HPLC grade methanol로 정용하였다 (100배수 추출). 50 ml 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication 추출하였다. Sonication 후 상온에서 10분간 식힌 다음 0.45 um 실린지 필터를 이용해 여과 후 분석에 사용하였다.

#### 표준물질 제조

미강의 지표성분 패턴분석을 위한 표준물질로  $\gamma$ -oryzanol을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된  $\gamma$ -oryzanol은 Wako chemical社의 제품으로 cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate의 4종류의 물질로 구성된 혼합물이다.

$\gamma$ -oryzanol 표준물질 50 mg을 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 HPLC grade ethanol로 정용하였고, 이를 표준원액으로 사용하였다. 표준원액을 HPLC grade ethanol로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

#### HPLC 분석조건

HPLC 분석조건은 아래 표와 같다. Shimadzu Model LC-20A Prominence Series HPLC system과 Shimadzu Model SPD-M20A Prominence Photodiode Array Detector(Shimadzu Co., JAPAN)을 사용하여 분석하였다.

표 18.  $\gamma$ -oryzanol의 HPLC 분석조건

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6 ×250 mm, 5.0 μm)
Detector	Shimadzu Model SPD-M20A Prominence photodiode Array Detector 320nm
Mobile phase	Methanol : Acetonitrile : Isopropanol = 45 : 50 : 5 Isocratic
Column temp.	40 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μL
Run time	40 min

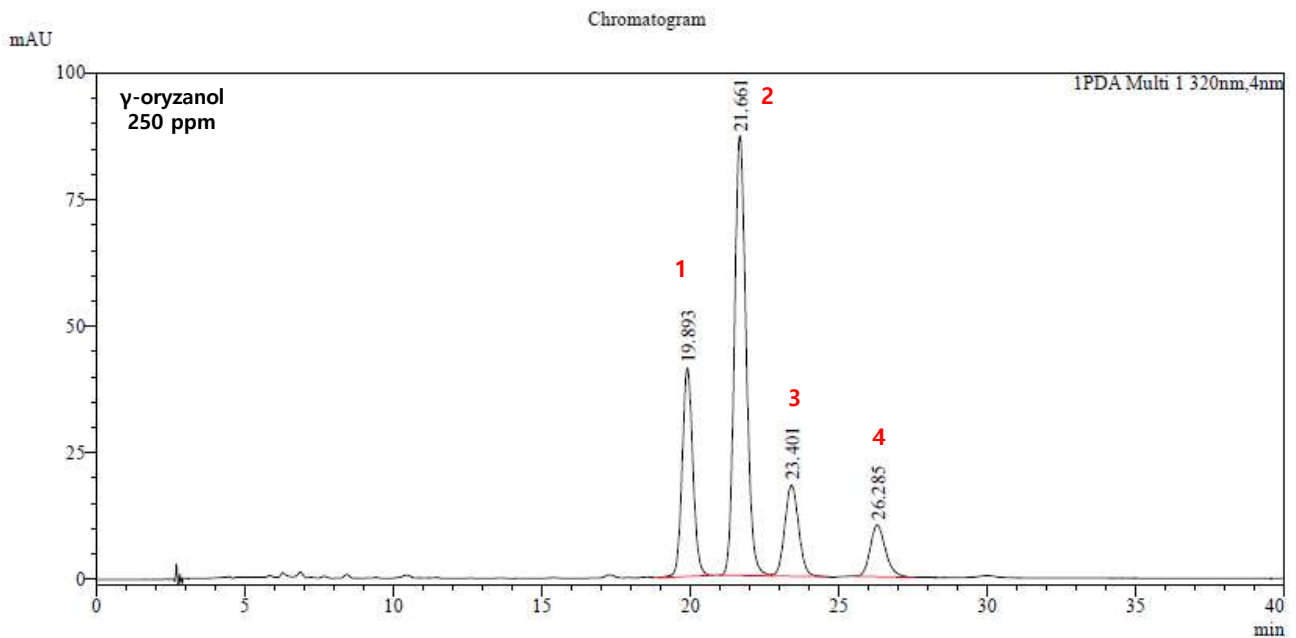


그림 31.  $\gamma$ -oryzanol 표준물질의 HPLC 크로마토그램

1.cycloartenol ferulate(19.8min), 2.cyclobranol ferulate(21.6min), 3.campesterol ferulate(23.4min), 4.beta-sitosterol ferulate(26.2min)

#### 4. 50L 규모에서의 생산공정 표준화

##### 가. 생산단계별 시료의 지표성분인 $\gamma$ -Oryzanol 분석

###### (1) 주관기관 수행결과

미강(생물전환)산물의 지표성분인  $\gamma$ -oryzanol의 분석은 이전에 method validation을 통해 특이성 (specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)의 검증으로 확립한 분석 조건을 이용하였다.

제1협동기관(주)에스티알바이오텍에서 제공받은 미강(생물전환)산물의  $\gamma$ -oryzanol의 분석을 위하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 제조는 각 시료 500 mg을 취하여 100% methanol로 50 mL volumetric flask에 정용하여 1시간동안 sonication 추출 후, 고형분의 제거를 위하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하였다.

$\gamma$ -Oryzanol 표준물질은 7.8125~250  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 표준검량선을 작성하였다.

$\gamma$ -Oryzanol은 Campesterol, beta-sitosterol 등의 sterol과 ferulic acid가 ester 결합을 하고 있는 혼합물질로, 혈중 콜레스테롤 감소, 항산화, 항궤양 작용 등의 생리활성이 알려져 있다.

미강(생물전환)산물의 HPLC 분석 결과,  $\gamma$ -oryzanol의 표준검량선( $y=19836x-22917$ ,  $R^2=1.0000$ )으로 나타났으며, 모든 생산공정 단계에서 원물에 비해  $\gamma$ -oryzanol 함량의 감소는 일어나지 않는 것으로 확인되었다. 마찬가지로  $\gamma$ -oryzanol의 주요 구성성분인 cycloartenyl ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate의 비율도 크게 변하지 않는 것으로 나타났다. 아래 그림은 미강(생물전환)산물의  $\gamma$ -oryzanol분석 크로마토그램을 나타낸 것으로, cycloartenyl ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate 순으로 분리가 되었다.

~~

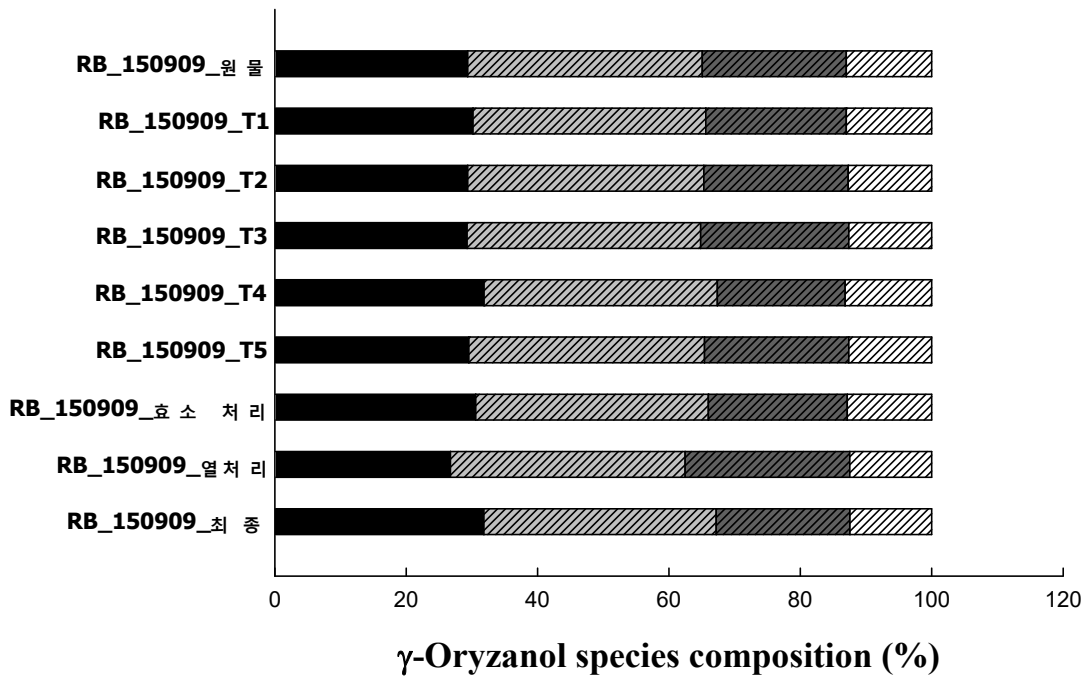
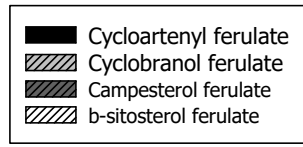
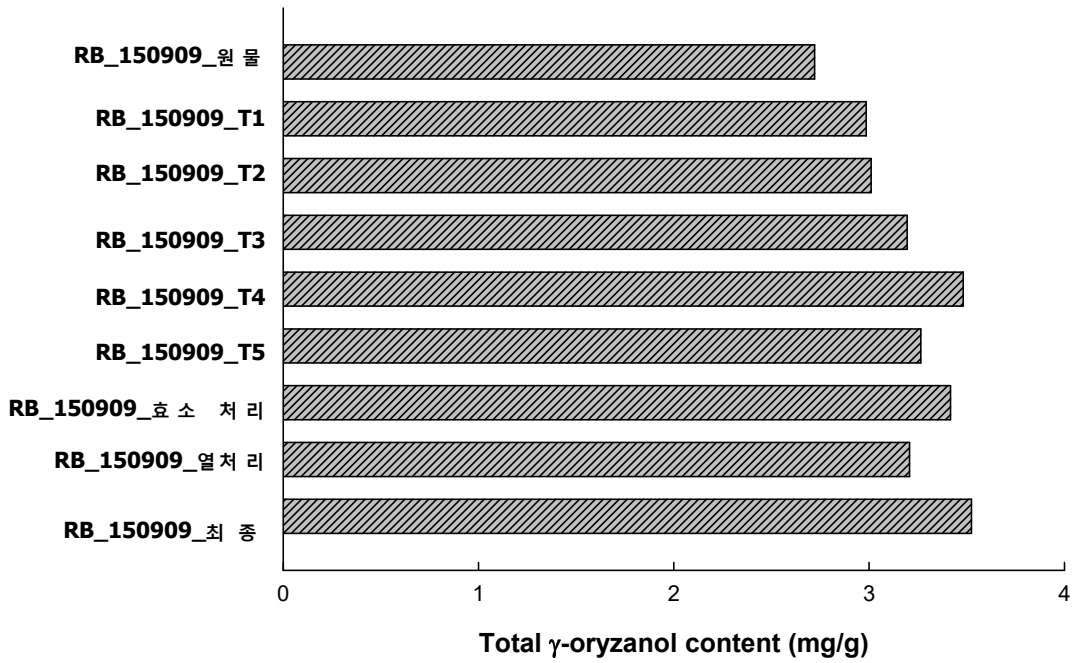


그림 32. 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분의 함량 변화 및 Ferulate 비율

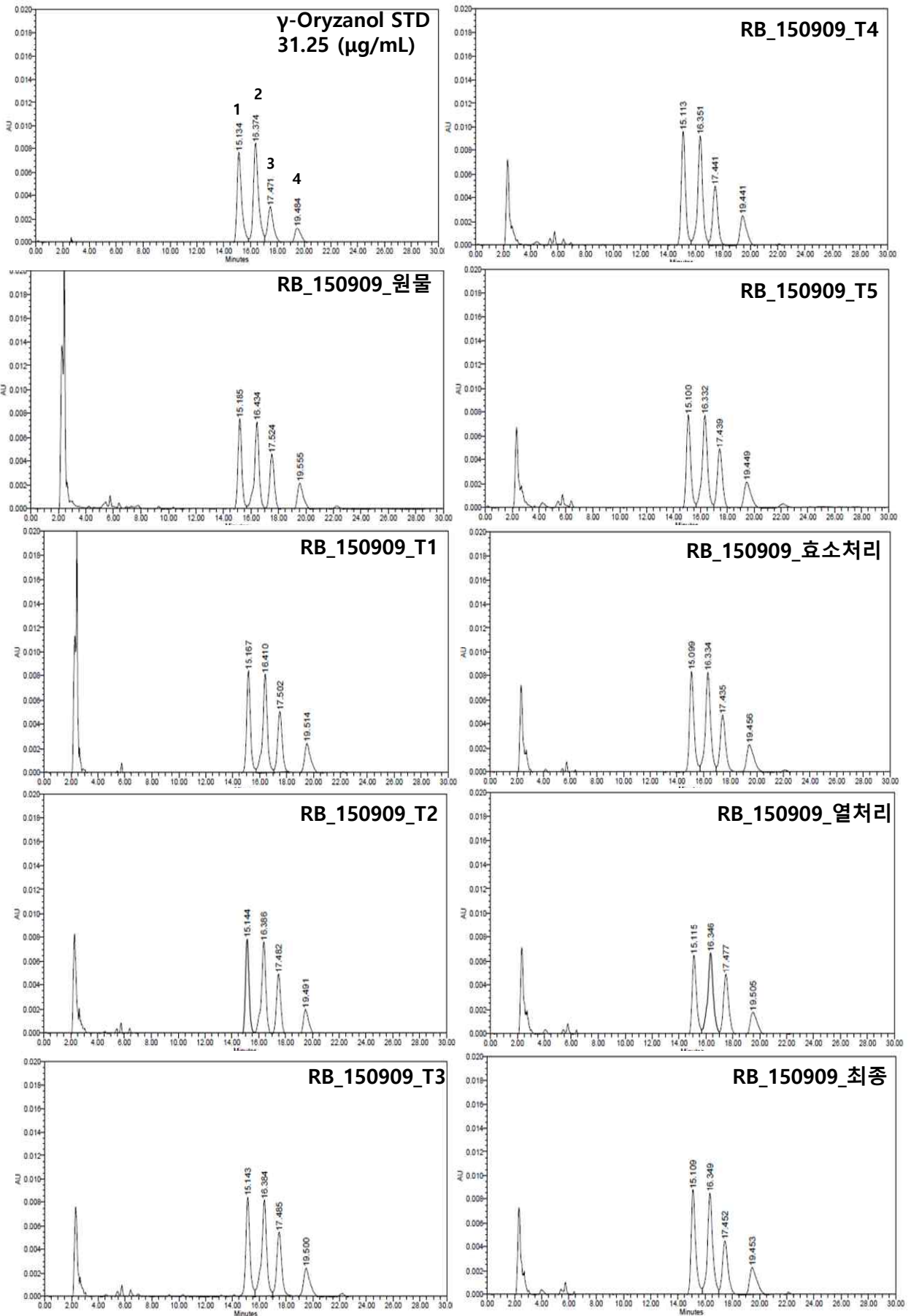
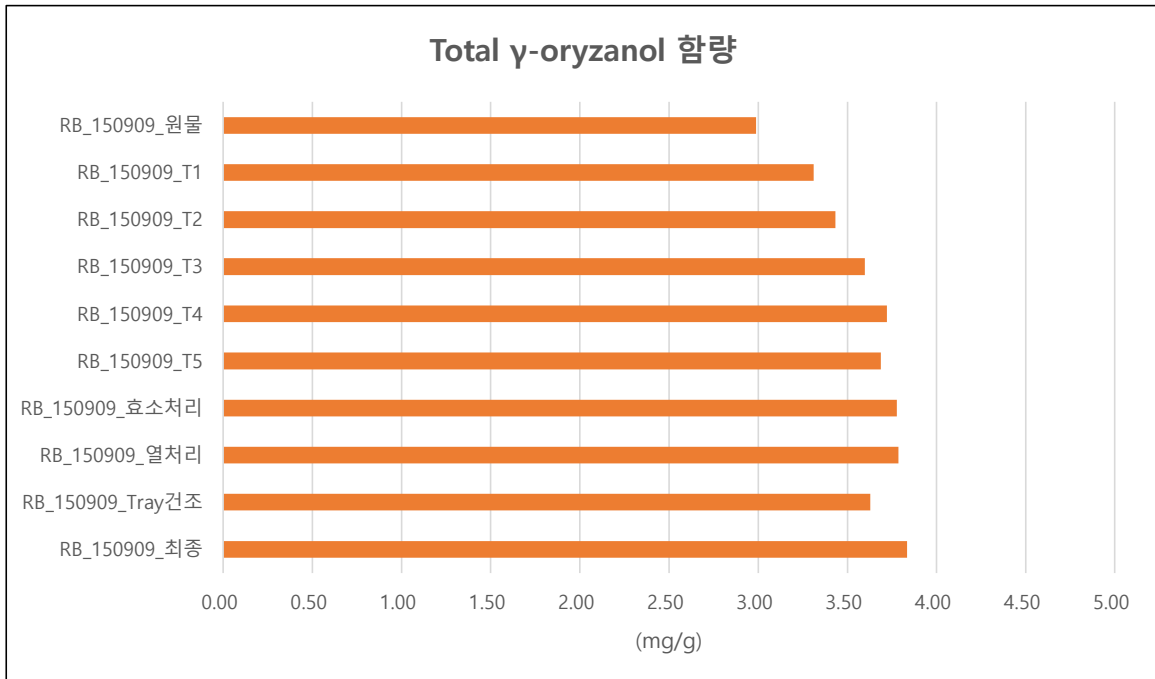


그림 33. 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분 분석 크로마토그램

(2) 제1협동기관 수행결과

50L 규모의 발효조에서 미강(생물전환)산물의 생산공정 표준화를 위하여 생산공정 단계에 따라 시료를 채취하여 1차년도에 확립된 미강(생물전환)산물의 지표성분 분석법을 활용해 지표성분의 변화를 조사하고, 이를 생산공정 표준화에 활용하였다.

분석 결과, 미강(생물전환)산물의 지표성분으로 설정한  $\gamma$ -oryzanol의 함량은 생산공정 단계별로 함량의 큰 변화 없이 14.873~18.927 mg/g의 수준에서 유지됨을 확인하였다. 또한  $\gamma$ -oryzanol의 4가지 성분인 Cycloartenol ferulate은 평균 32.74% , Cyclobranol ferulate은 평균 35.49%, Campesterol ferulate은 평균 18.23%, beta-Sitosterol ferulate은 평균 13.54%의 비율로 함유돼있음을 확인하였다. 또한  $\gamma$ -oryzanol의 retention time은 Cycloartenol ferulate 18.085분, Cyclobranol ferulate 19.692분, Campesterol ferulate 21.142분, beta-Sitosterol ferulate 23.730분으로 확인되었다.



각 물질 별 함량 비율 (%)	Cycloartenol ferulate	Cyclobranol ferulate	Campesterol ferulate	Beta-Sitosterol ferulate
RB_150909_원물	32.41	35.37	18.79	13.43
RB_150909_T1	32.66	35.15	18.83	13.36
RB_150909_T2	33.42	35.46	18.21	12.92
RB_150909_T3	32.82	35.03	17.86	14.28
RB_150909_T4	32.91	35.61	17.97	13.52
RB_150909_T5	33.29	35.64	18.01	13.06
RB_150909_효소처리	33.14	35.16	18.05	13.65
RB_150909_열처리	32.88	35.34	18.11	13.68
RB_150909_Tray건조	30.67	36.6	18.64	14.09
RB_150909_최종	33.16	35.56	17.86	13.42

그림 34. 50L 규모의 발효조에서 생산된 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분의 함량 변화 조사



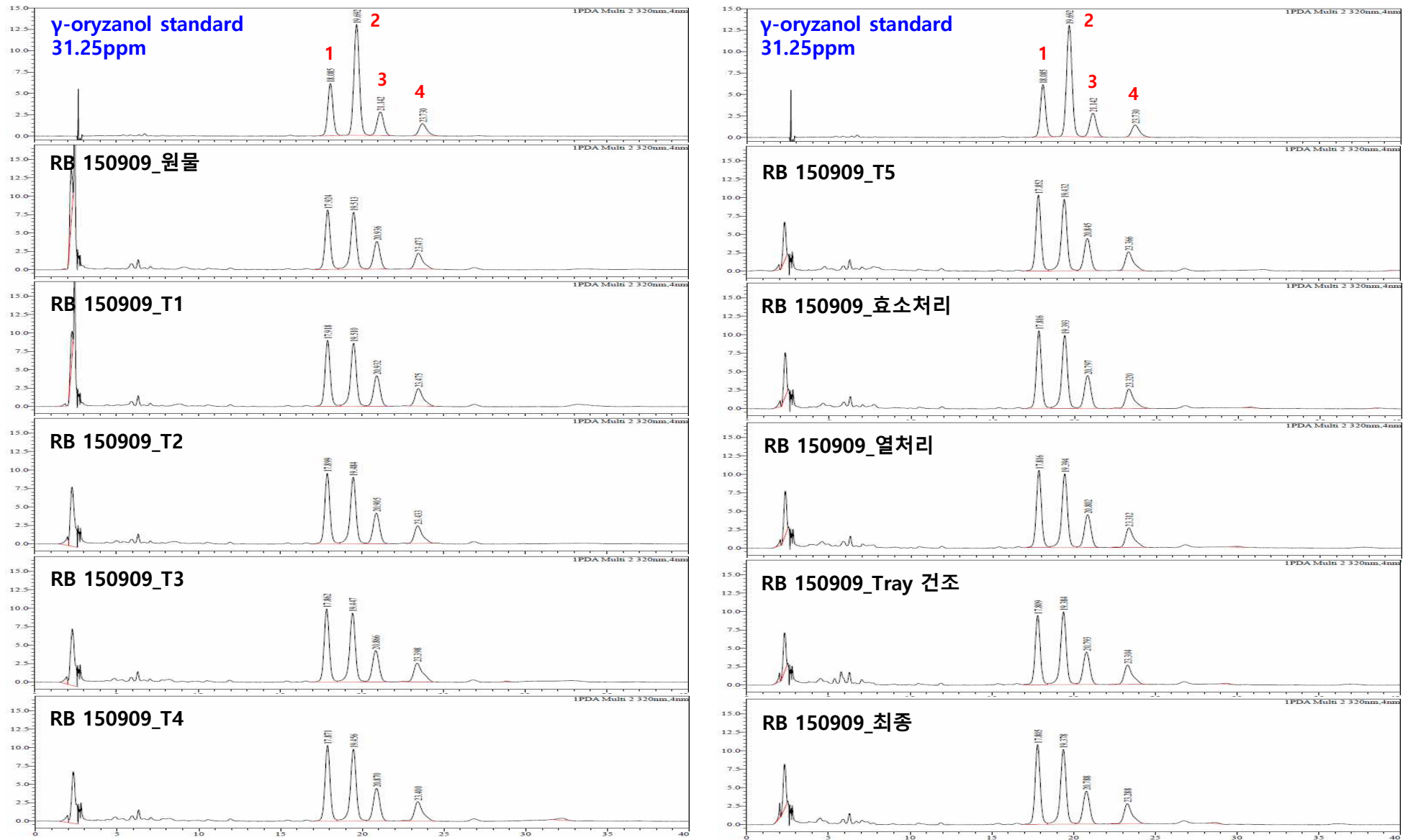


그림 35. 50L 규모의 발효조에서 생산된 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분 분석 크로마토그램

### 나. 생산단계별 시료의 Bioassay

대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 특성에 있어서 대식세포의 배양상태를 보다 안정적으로 유지된 상태에서 NO 생성을 측정하는 Bioassay 방법이 1차년도에 확립됨에 따라 이를 활용하여 면역활성 역가를 측정하고, 이를 50L 규모의 발효조에서 미강(생물전환)산물의 생산공정 표준화에 활용하였다.

미강(생물전환)산물의 생산공정 단계에 따른 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과, 미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>(Minimum effective concentration)은 1/2 µg/ml 농도 이하로 생산공정 단계가 진행될수록 면역활성이 안정적으로 증가하는 결과를 확인함으로써 50L 규모에서의 미강(생물전환)산물의 생산공정이 안정적으로 표준화 되었음을 확인하였다.

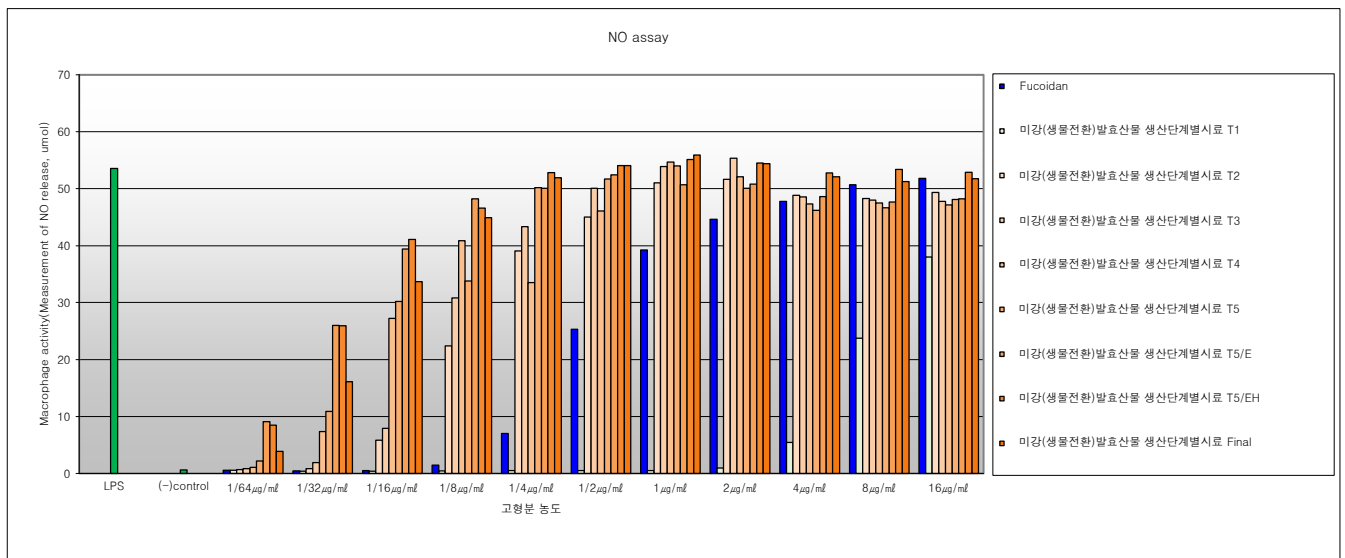


그림 36. 50L 규모의 발효조에서 생산된 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 대식세포 활성화능 측정

## 5. 50L 규모에서의 생산공정 validation

### 가. 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

표준화된 생산공정의 반복 재현성을 확인하기 위하여 50L 규모의 발효조에서 미강(생물전환)산물의 3반복 시험생산을 실시하여 생산하였으며, 미강(생물전환)산물의 생산 균일성을 검증하기 위하여 면역활성 역가를 측정하였다.

3반복 시험생산을 통해 생산배치에 따른 면역활성 역가가 큰 차이 없이 일정한 수준을 유지함을 확인함으로써 50L 규모 발효조에서의 미강(생물전환)발효산물의 생산공정의 균일성 검증을 완료하였다.

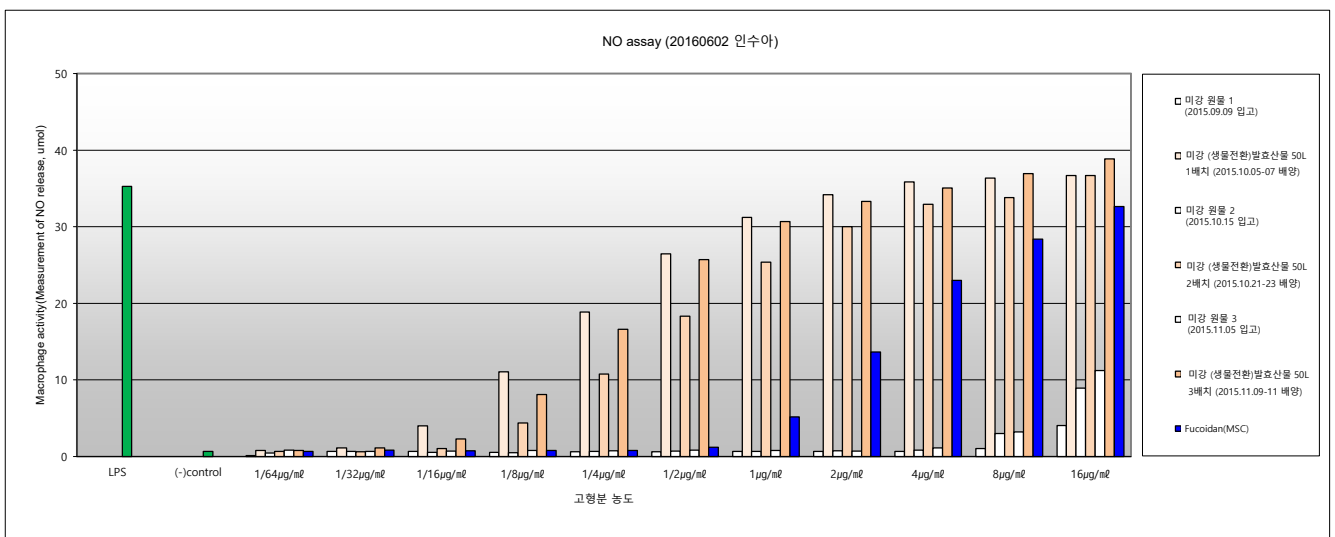


그림 37. 50L 발효조에서 3반복 시험생산된 미강(생물전환)산물의 대식세포 활성화능 평가

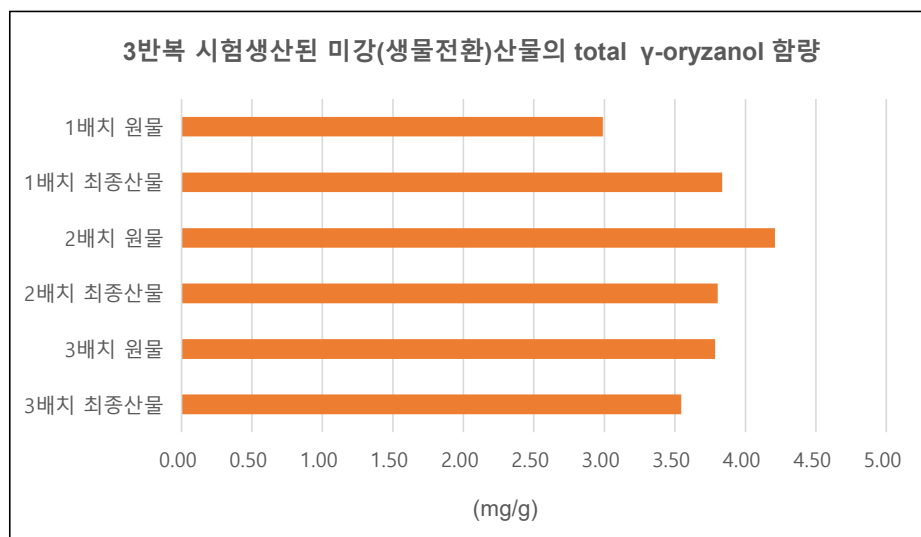


그림 38. 50L 발효조에서 3반복 시험생산된 미강(생물전환)산물의 지표성분 함량 조사

## 6. 2ton 규모에서의 생산공정 scale-up 확립

본 과제 의 2차년도 연구목표에서 500L규모의 발효조에서 생산공정 scale-up 확립이 목표였지만 발효조의 크기를 더 증가시켜 2ton 규모 발효조에서의 생산공정 scale-up을 진행하였다. 생산공정이 안정적으로 확립되었는지 확인하기 위하여 미강(생물전환)산물을 2차례 시험생산하였고, 생산공정에 따른 시료를 채취하여 면역활성 역가를 측정하였다.

미강(생물전환)산물의 생산공정 단계에 따른 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과,

미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>은 1/2 µg/ml 농도 이하로 확인되었다.

Scale-up된 2ton 규모의 발효조에서 생산공정 단계가 진행될수록 면역활성이 안정적으로 증가하는 결과를 확인함으로써 2ton 규모에서의 미강(생물전환)발효산물 생산공정 scale-up이 안정적으로 확립되었음을 확인하였다.

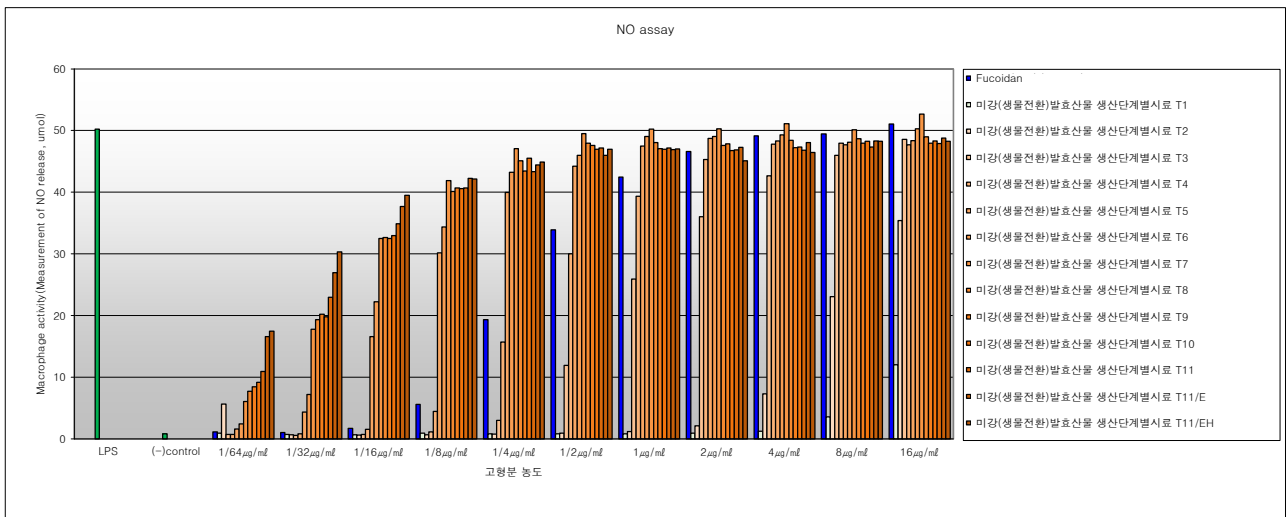


그림 39. 2ton 규모에서 생산된 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 시료의 대식세포 활성화능 평가

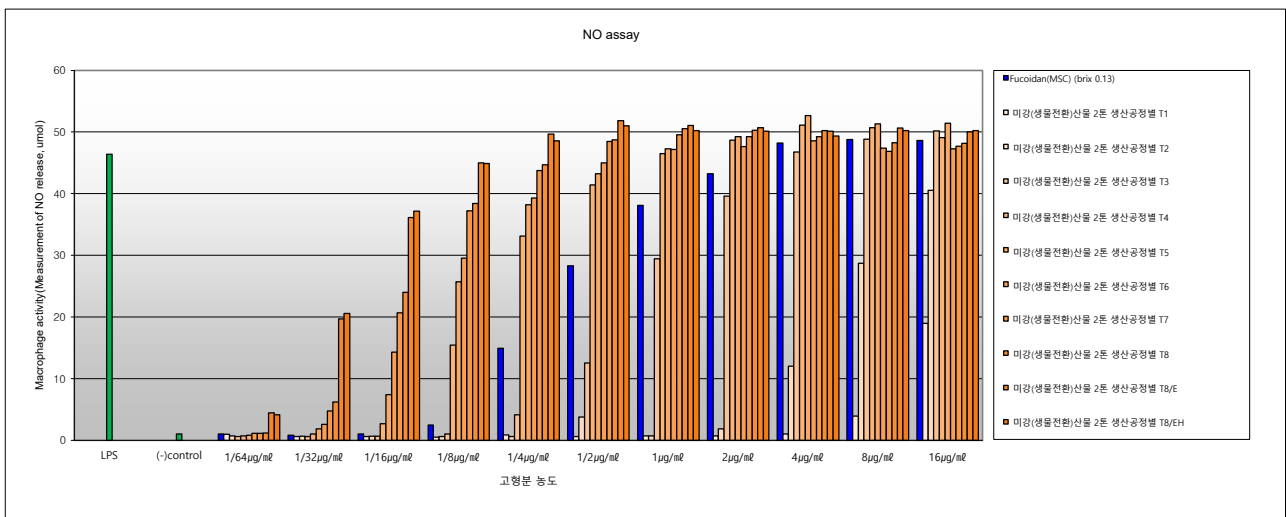


그림 40. 2ton 규모에서 생산된 미강(생물전환)산물의 생산공정 단계별 시료의 대식세포 활성화능 평가

## 7. Pilot 규모에서의 시제품 생산 : 표준화된 개발소재의 시제품 생산

5,000L 규모에서의 미강(생물전환)산물 생산 [인체적용시험 用]

미강(생물전환)산물의 인체적용시험용 시제품 제작에 필요한 원료는 5ton 규모 발효조에서 생산된 원료를 사용하였다.

동결건조 후 분말화한 미강(생물전환)산물의 최종 원료에 대한 면역활성 역가를 측정 한 결과 면역활성 역가인, MEC<sub>100</sub>은 1/2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이하로 확인되어, 생물전환공정 이후 나머지 생산단계에서 문제점 없이 생산이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

5ton 규모의 발효조에서 생산된 미강(생물전환)산물 최종 원료의 면역활성에 이상이 없음을 확인하여 이를 인체적용시험용 시제품 제작에 사용하였다.

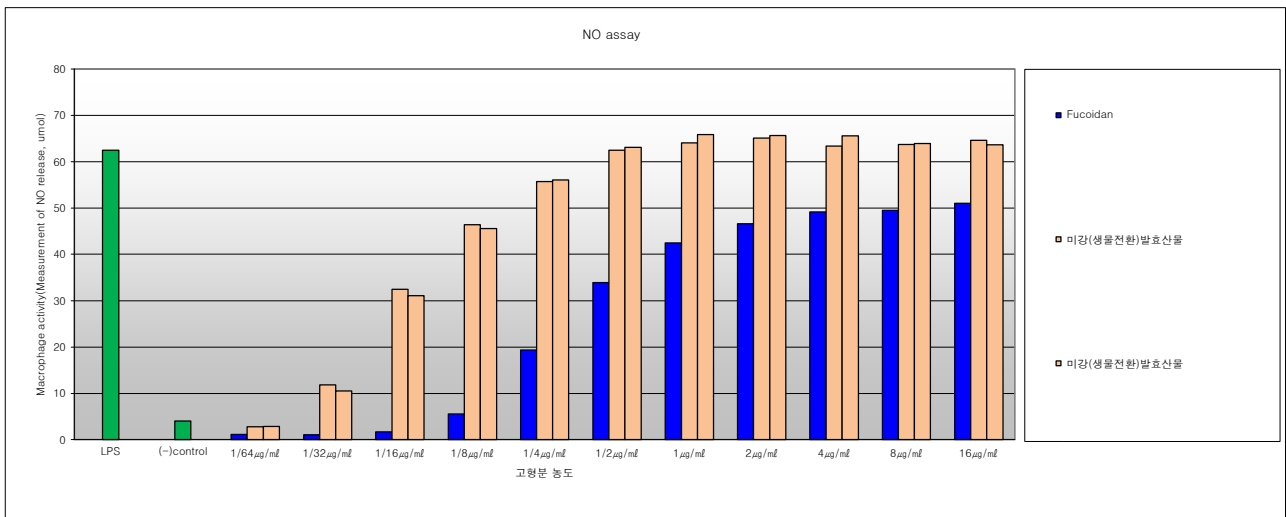


그림 41. 5ton 규모의 발효조에서 생산된 인체적용시험용 원료의 대식세포 활성화능 평가

### 3절. 대두의 고기능성/고부가가치 소재 개발

#### 1. 생산공정 표준화를 위한 면역활성 평가

##### 가. 콩 종류별 면역활성 조사

경남 거창에서 생산된 4종(강낭콩, 검정콩, 쥐눈이콩, 흰콩)의 콩을 구입하여 대식세포 활성화 실험을 진행한 결과, 콩 종류에 상관없이 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

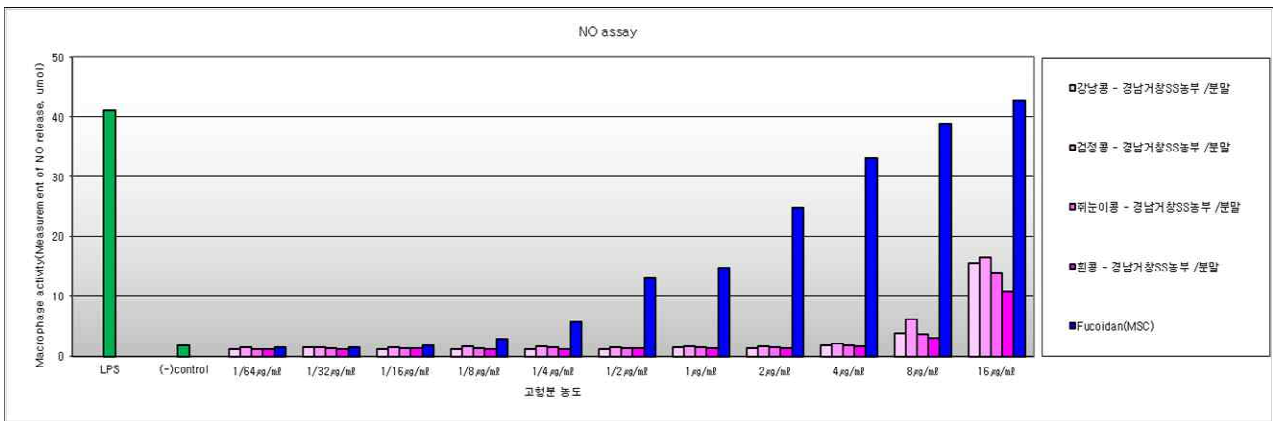


그림 42. 콩 종류별 면역활성 역가 조사

##### 나. 콩 종류별 (생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가

경남 거창에서 생산된 4종(강낭콩, 검정콩, 쥐눈이콩, 흰콩)의 콩 원물에 대한 콩(생물전환)산물을 생산하였다. 콩(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/2~1 µg/ml로 원물에 비해 매우 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

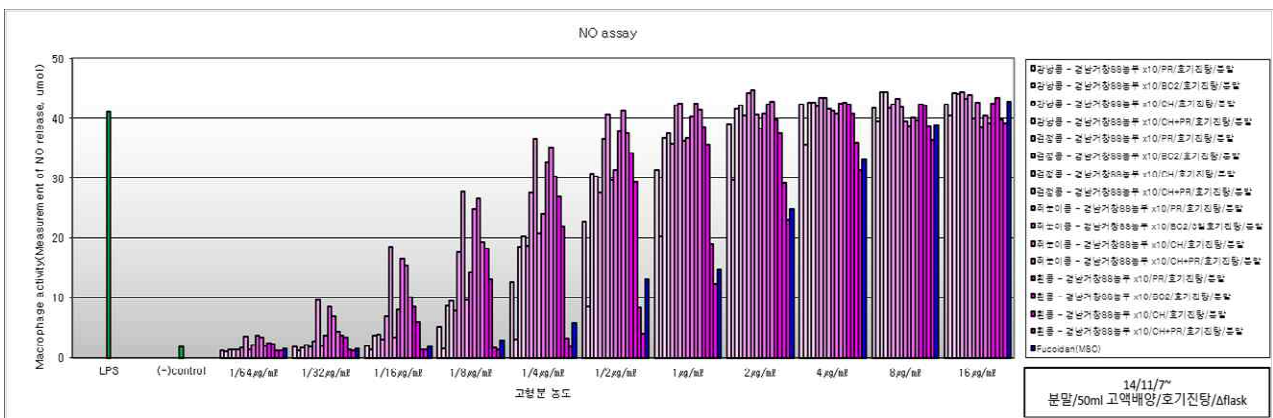


그림 43. 콩 종류별 (생물전환)산물의 면역활성 평가

#### 다. 생산지별 대두 면역활성 조사

충북 괴산, 경남 거창, 경북 예천, 경남 합천, 강원 인제에서 생산된 대두 5종을 구입하여 대식세포 활성화 실험을 진행한 결과, 생산지에 상관없이 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

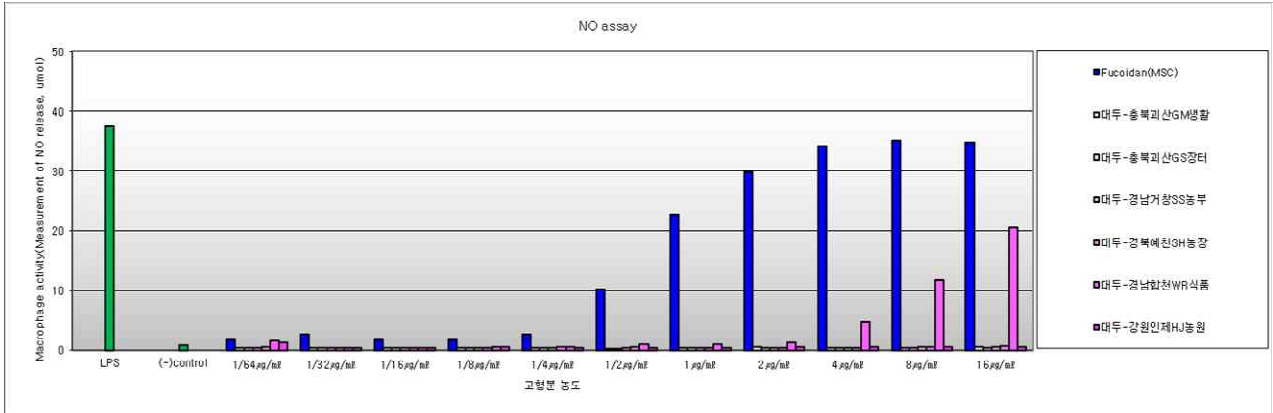


그림 44. 생산지별 대두에 대한 면역활성 역가 조사

#### 라. 생산지별 대두(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가

충남 괴산 2곳, 경북 예천, 경남 합천, 강원 인제에서 생산된 5종의 대두 원물에 대해 생물전환 조건에 따른 대두(생물전환)산물을 생산하였다. 생산지 및 생물전환 조건에 따라 대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 약간의 차이는 있으나 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/2 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

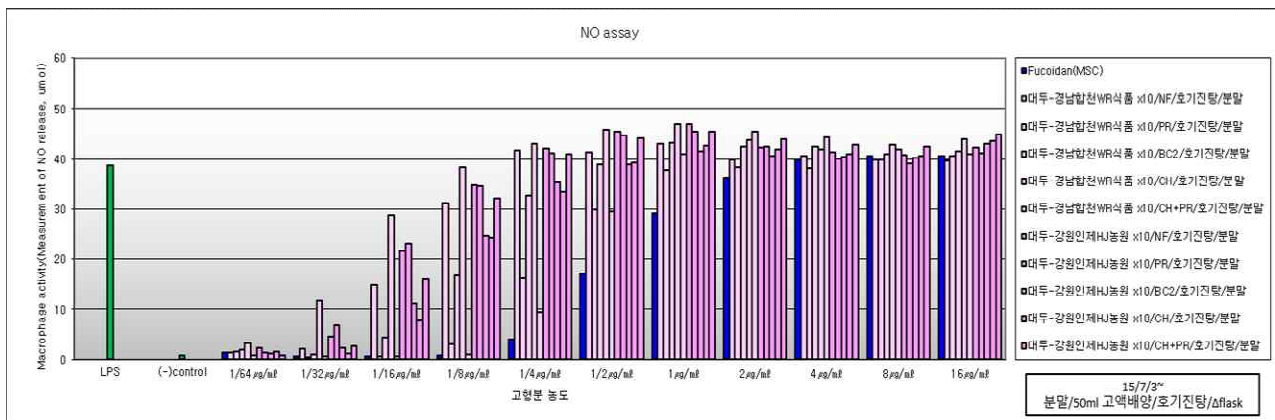
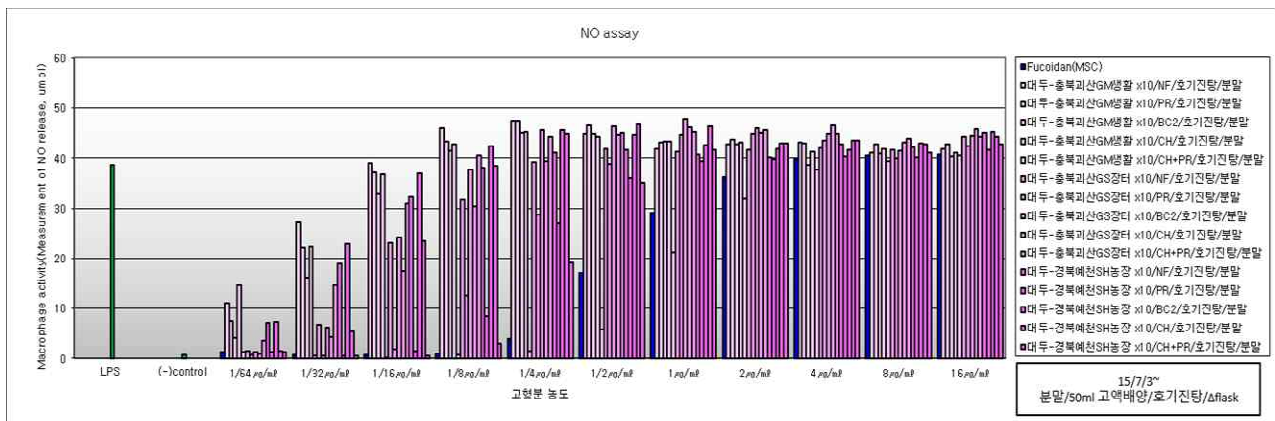


그림 45. 생산지별 대두(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 역가 평가

**다. 경남 거창 대두(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가**

기 실험에서 사용된 대두(흰콩)에 대해 생물전환조건에 따른 대두(생물전환)산물을 생산하였고 그 중 BC2 생물전환 조건에 대해 추가 실험을 수행하였다. 대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/4~1/2 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

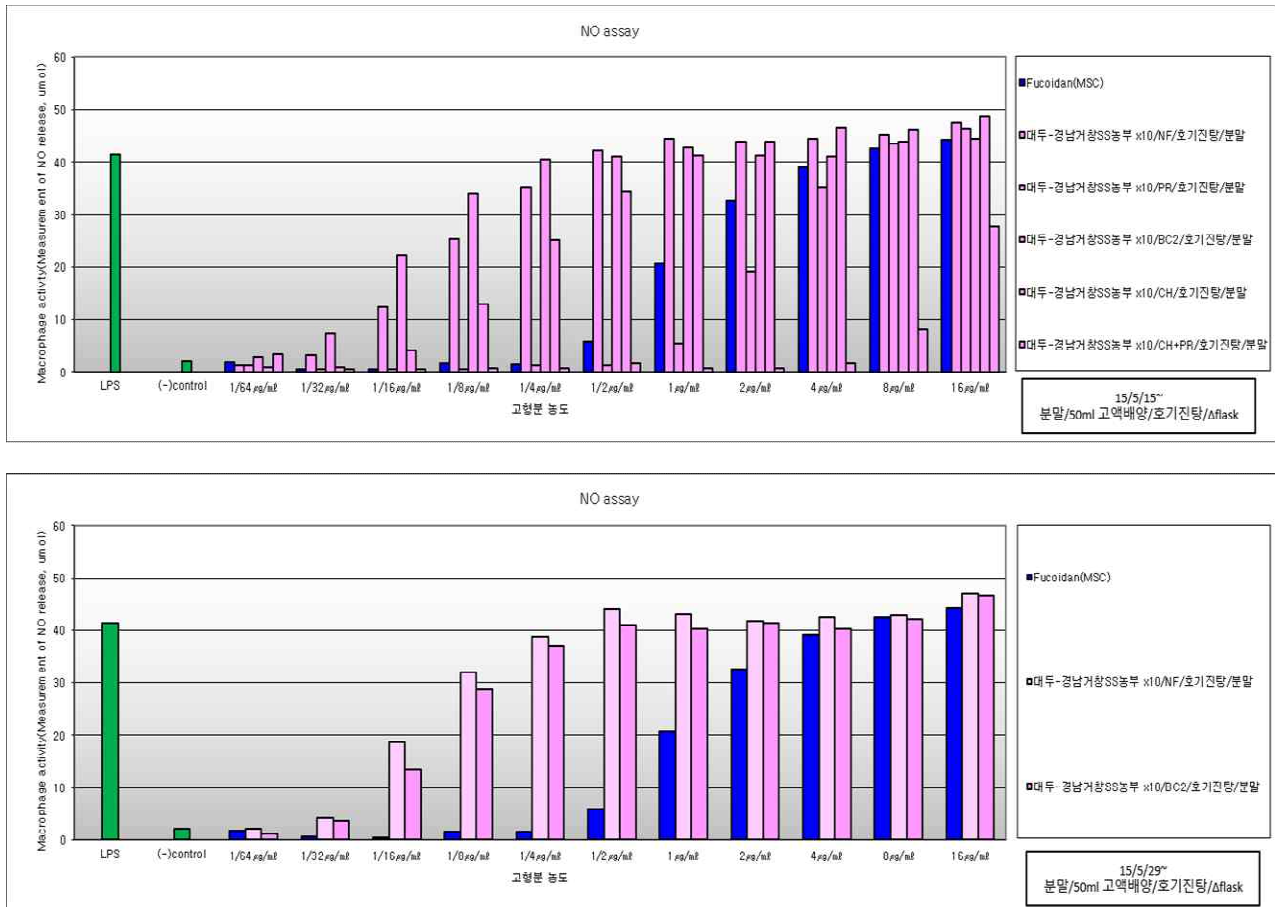


그림 46. 대두(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 역가 평가

**바. 생산지별 대두(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가**

대두 원물, H탈지공정을 거친 대두 원물, E탈지공정을 거친 대두 원물, 각 6종(충남 괴산 2곳, 경북 예천, 경남 함천, 강원 인제)에 대하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 모든 조건에서 면역활성 역가를 확인할 수 없었다.

대두(생물전환)산물, H탈지공정을 거친 H탈지대두(생물전환)산물, E탈지공정을 거친 E탈지대두(생물전환)산물, 각 6종(충남 괴산 2곳, 경북 예천, 경남 함천, 강원 인제)을 2반복 생산하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 H탈지공정을 거친 H탈지대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/2 µg/ml로, 탈지공정을 거치지 않은 대두(생물전환)산물과 비슷한 면역활성 역가를 나타냈으며, E탈지공정을 거친 E탈지대두(생물전환)산물은 경남거창SS농부, 강원인제HJ농원에서 구입한 대두를 제외한 4종의 E탈지대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 16 µg/ml 이상으로 많이 낮아진 것을 확인할 수 있었다.



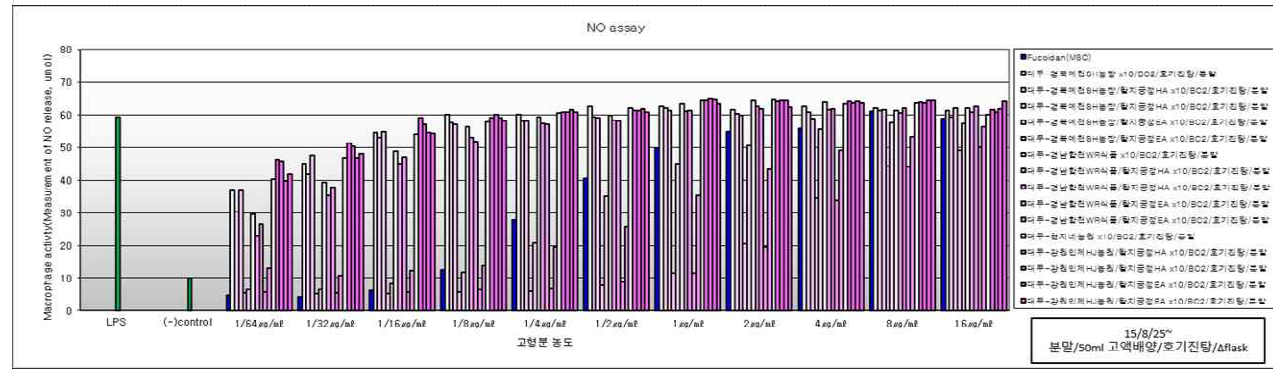
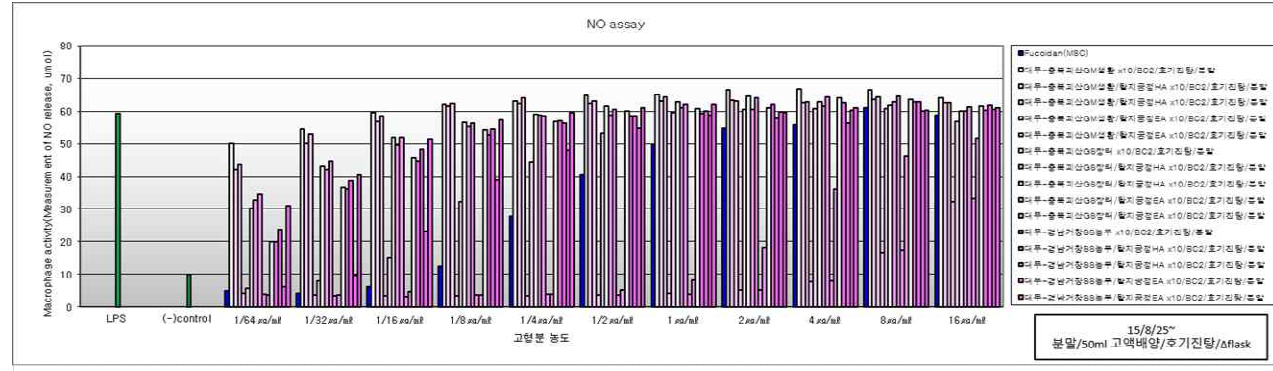
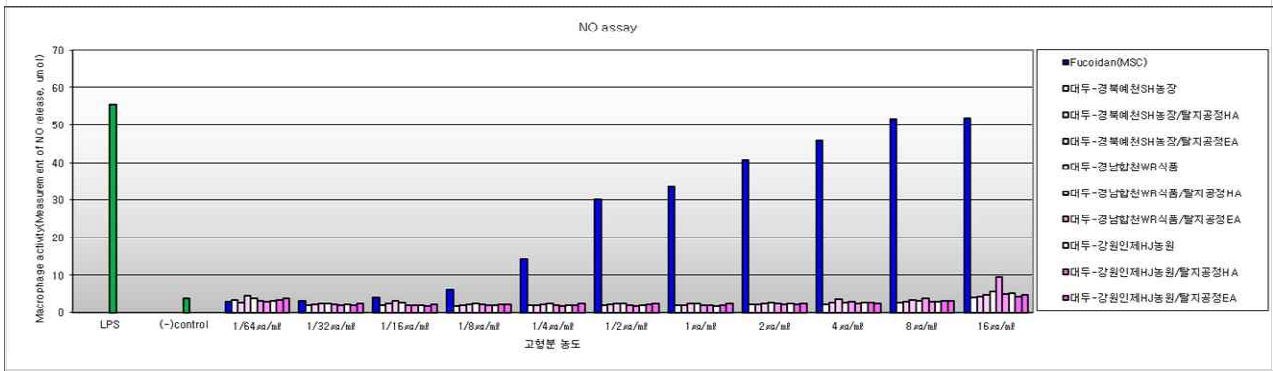
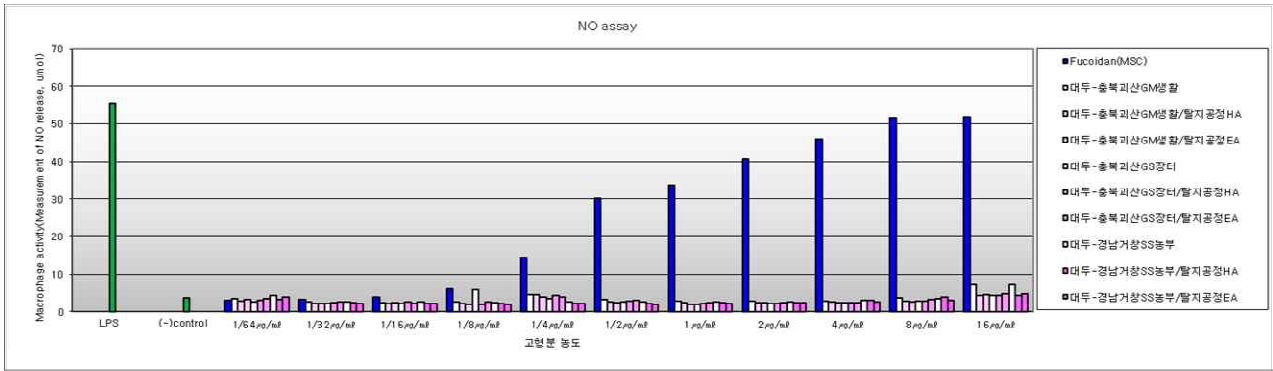


그림 47. 생산지별 대두(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 역가 평가

### 사. 품종별 대두의 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 품종별 대두 5종(대풍2호, 새단백, 우람, 진풍, 대원)품종에 대한 대식세포 활성화 실험을 진행한 결과, 품종에 상관없이 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

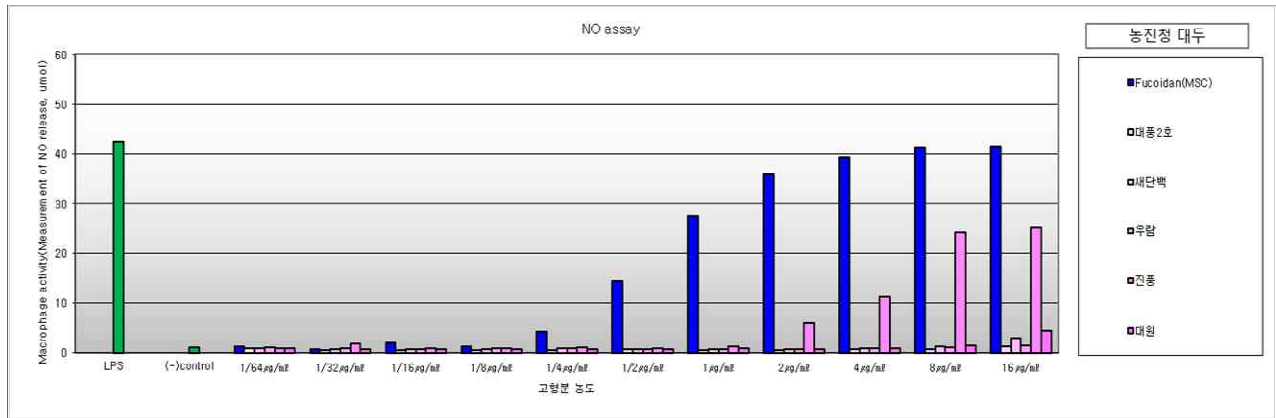


그림 48. 품종별 대두에 대한 면역활성 역가 조사

### 아. 품종별 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 품종별 5종(대풍2호, 새단백, 우람, 진풍, 대원)의 대두 원물에 대해 (생물전환) 산물을 생산하였다. 품종별 대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/4~1/2 µg/ml로 원 물에 비해 512배 이상 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

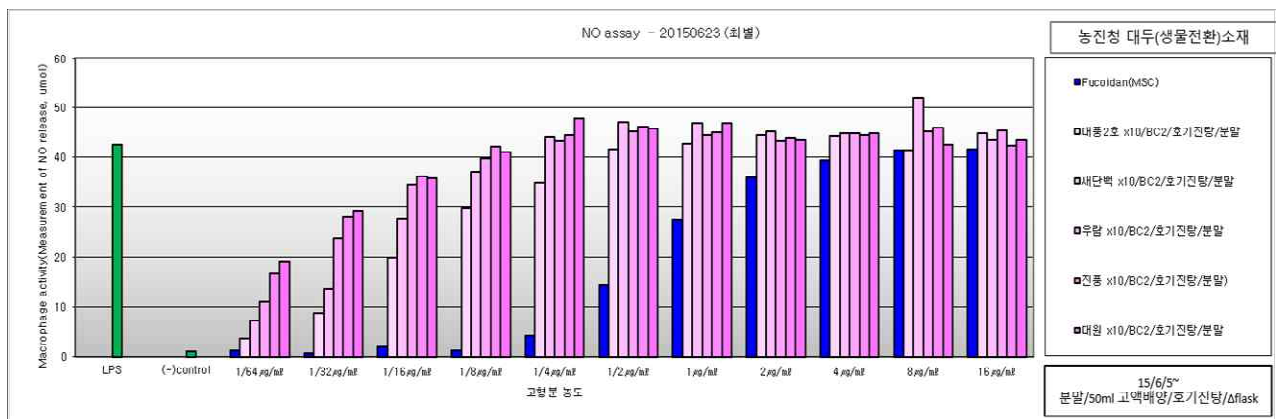


그림 49. 품종별 대두(생물전환)산물의 면역활성 역가 평가

자. 3반복 생산에서 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가 : 효능 및 독성시험용 소재 생산

(1) 3반복 생산에서 생산지별 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가

생산지별(충북 괴산 2곳, 경북 예천, 경남 합천, 강원 인제) 대두 5종에 대해 BC2 생물전환 조건으로 대두(생물전환)산물을 3반복 생산하였다. 대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/16~1/8 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

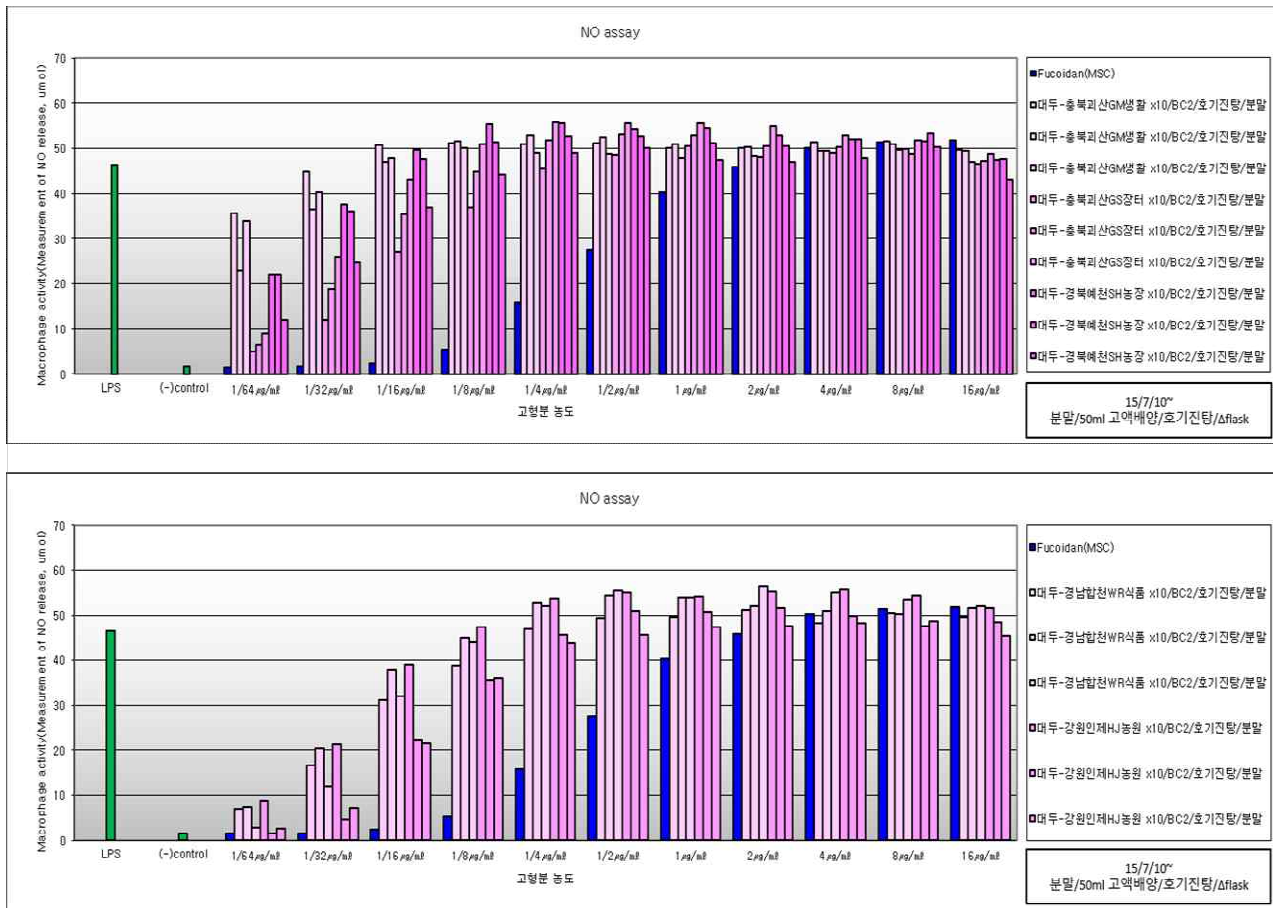


그림 50. 생산지별 대두(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

(2) 3반복 생산에서 생산지별 대두(생물전환)산물의 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 품종별 대두 5종(대풍2호, 새단백, 우람, 진풍, 대원)에 대해 BC2 생물전환 조건으로 대두(생물전환)산물을 3반복 생산하였다. 대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/4~1/2 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

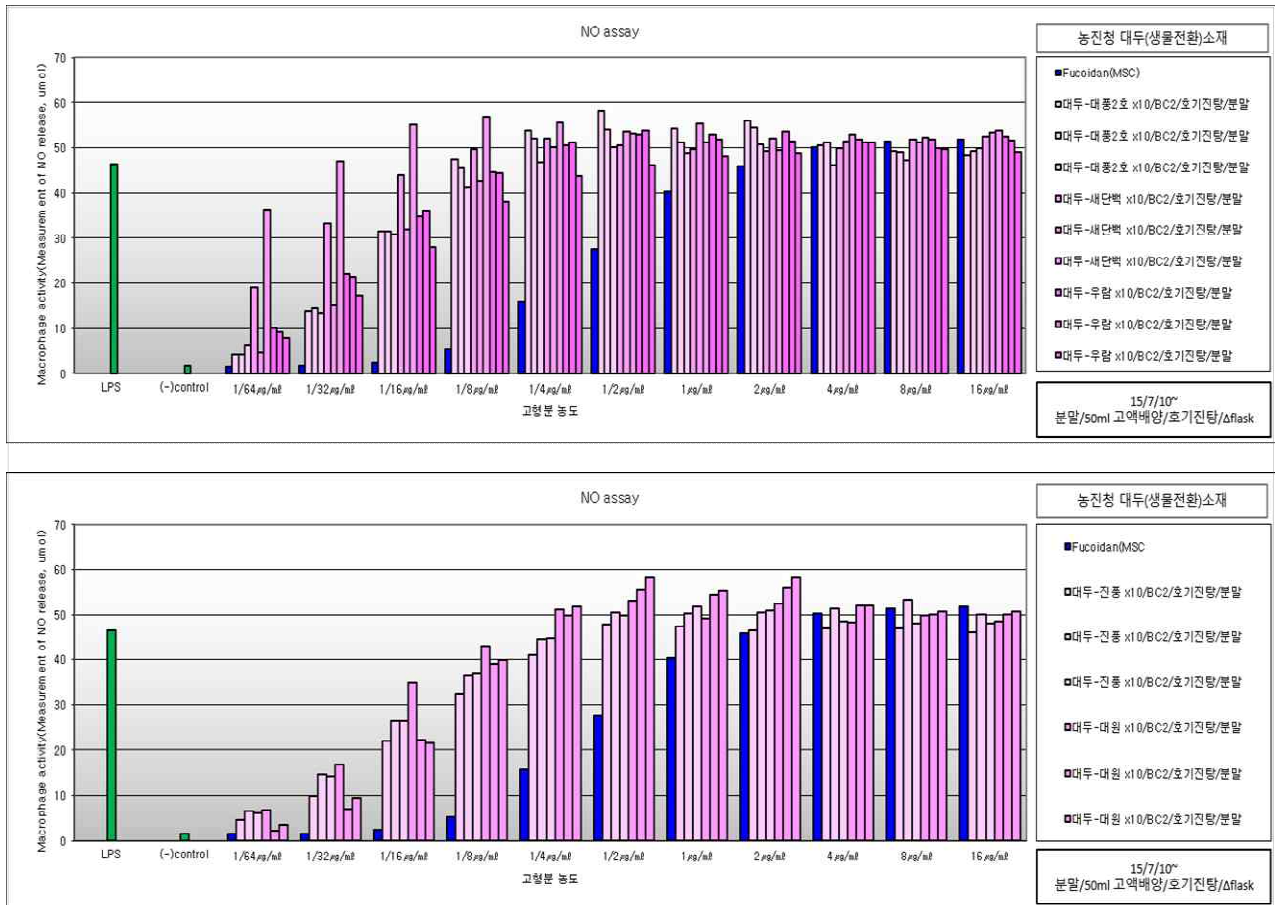


그림 51. 품종별 대두(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

(3) 3반복 생산에서 진풍 품종의 대두(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 진풍 품종의 대두 원물과 H탈지공정 및 E탈지공정을 통해 생산된 진풍 품종의 탈지대두 원물에 대해 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 모든 조건에서 면역활성 역가를 확인할 수 없었다.

반면, 진풍 품종에 있어서 H탈지공정을 거친 H탈지대두(생물전환)산물 및 E탈지공정을 거친 E탈지대두(생물전환)산물을 4반복 생산하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 H탈지공정 및 E탈지공정을 거친 탈지대두(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/4 μg/ml로, 탈지공정을 거치지 않은 대두(생물전환)산물보다 2배 정도 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

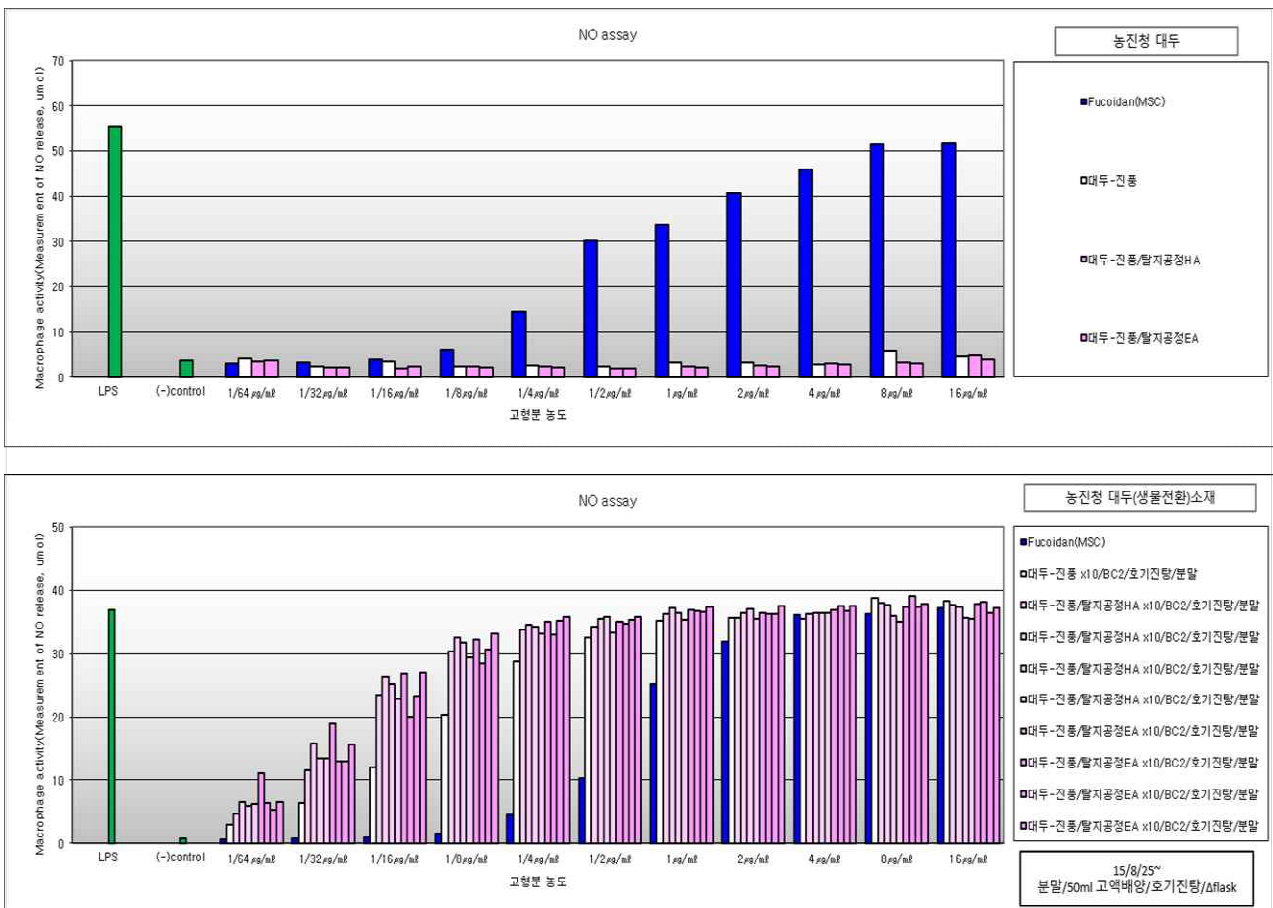


그림 52. 진풍 품종의 대두(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

## 2. 대두(생물전환)산물의 지표성분 설정 및 분석법 개발

### 가. 개발소재의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건 확립

#### (1) 20배수 3회연속 추출

대두가 함유하고 있는 지표성분이 최대로 추출되는 조건을 확인하기 위해 추출배수를 20배수로 고정하고 3회연속추출을 실시하였다.

추출용매는 HPLC grade methanol 및 hexane을 각각 사용하였다. 각각의 시료를 1 g씩 유리병에서 정밀히 측정하고 HPLC grade methanol 및 hexane을 20 ml씩 각각 넣어주었다. 유리병을 1시간동안 상온에서 sonication하여 추출하였다. Sonication후 4000 rpm, 3분간 원심분리하여 잔사와 분리된 상등액을 조심히 따라 보관하고, 잔사에 새 용매를 같은 양 넣어 동일한 방법으로 추출하였다. 총 3회연속추출 하였다. 분리된 상등액은 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

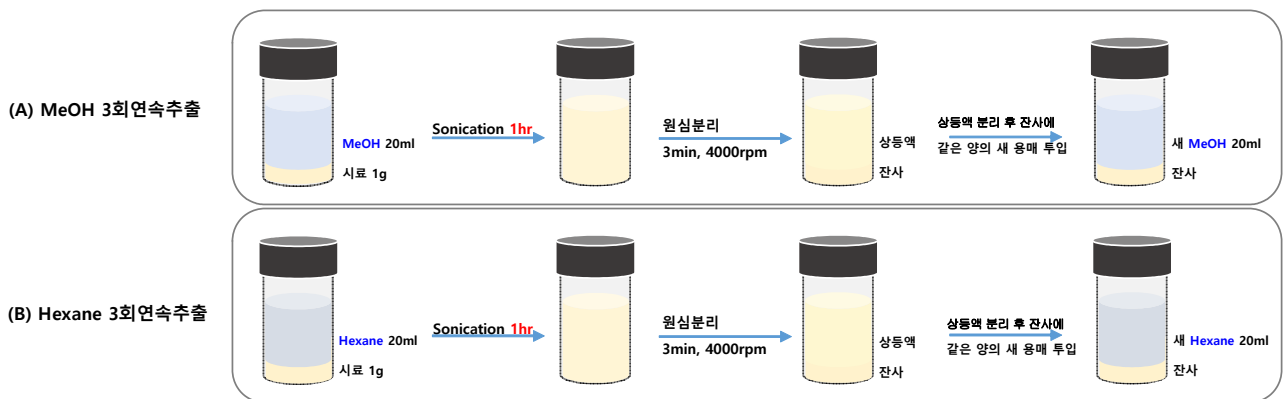


그림 53. 20배수 3회연속추출 공정도

대두의 지표성분 분석에 있어서 실험조건은 주관기관인 강원대학교(이옥환 교수님 Lab)에서 확립한 조건을 그대로 사용하였다. 대두를 methanol 및 hexane으로 추출 시 확연히 다른 지표성분 패턴양상을 보였다.

먼저 대두의 표준물질인 Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein(이하 이소플라본 6종)은 높은 분리도를 보이며 분석됨을 확인하였다.

그림 53의 (A)는 대두 methanol추출 상등액을 HPLC로 분석한 크로마토그램 결과이다. Methanol 추출액의 경우 이소플라본 6종 모두 잘 추출되었고, 분석 시 peak의 분리도도 좋음을 확인하였다. Methanol 3회연속추출 시 1회 추출에서 65.4%, 2회 추출에서 23.7%, 3회 추출에서 10.9%의 비율로 추출횟수가 증가할수록 추출되는 정도가 확연히 줄어드는 것을 확인하였다.

그림 53의 (B)는 대두 hexane추출 상등액을 HPLC로 분석한 크로마토그램 결과이다. 대두 hexane 추출액의 경우 4번 Daidzein과 6번 Genistein만이 매우 소량 추출되었을 뿐 다른 이소플라본은 추출이 되지 않음이 확인되었다.

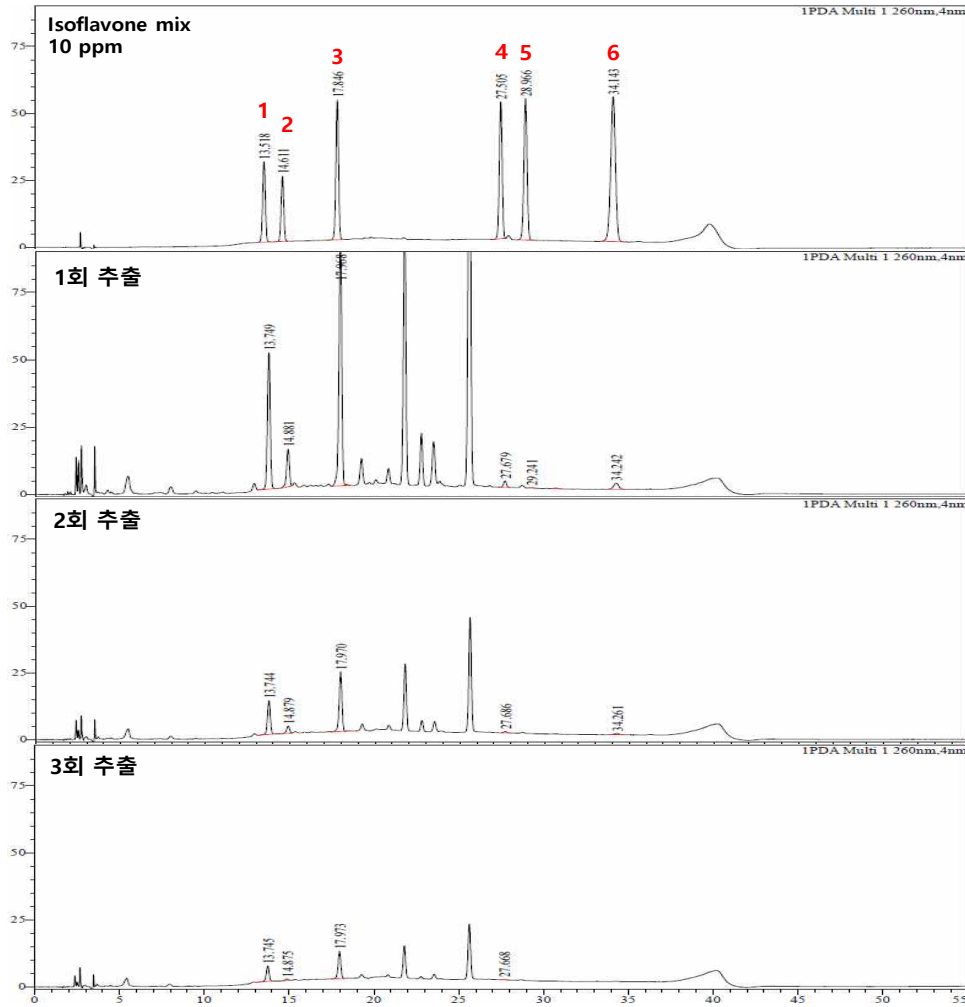
결론적으로 대두의 20배수 3회연속추출 실험은 추출용매로 methanol이 적합하고, 20배수 추출에 있어서 2회 추출 시 89.1%의 추출율을 확인할 수 있었지만 추출율이 90%를 넘지 않아 개선할 필요성이 있음을 알 수 있었다.

표 19. 대두 20배수 3회연속추출 결과

대두 20배수 3회연속추출				
지표성분		Isoflavone 6종		
추출용매	추출횟수	Area값	Area값 합계	추출 %
Methanol 20배수	1회	1501734		65.4
	2회	514450	4500422	23.7
	3회	234027		10.9
Hexane 20배수	1회	0		0
	2회	0	0	0
	3회	0		0



### (A) Methanol 추출



### (B) Hexane 추출

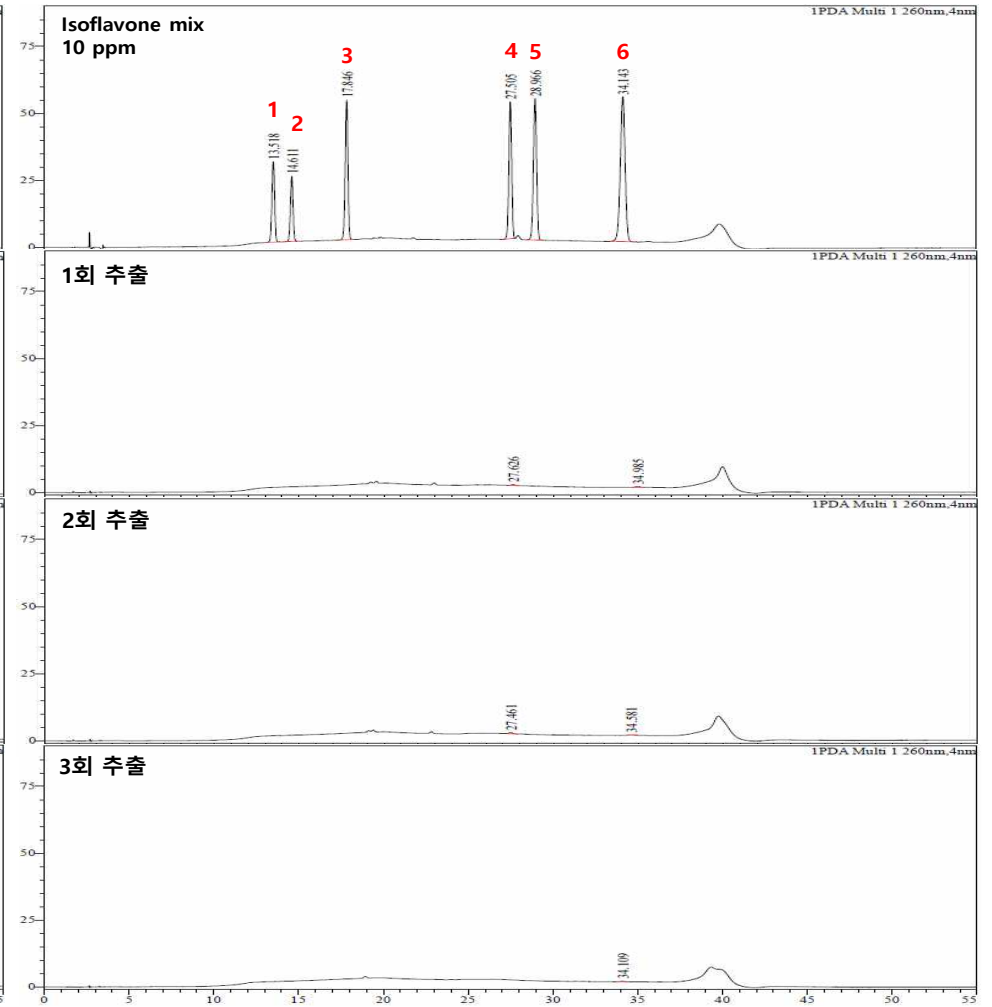


그림 54. 대두 20배수 3회연속추출 실험 HPLC 크로마토그램

1.Daidzin(14.2min), 2.Glycitin(15.3min), 3.Genistin(18.5min), 4.Daidzein(28.2min), 5.Glycitein(29.7min), 6.Genistein(35.2min)



(2) 추출배수 설정을 위한 실험

대두의 지표성분 패턴분석을 위한 최적 추출배수 설정을 위해 추출배수에 따른 1회 추출량 조사 실험을 실시하였다. 추출배수는 20배, 50배, 100배로 설정하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol 및 hexane을 각각 사용하였다. 20배수 추출 시 시료 2.5 g, 50배수 추출 시 시료 1 g, 100배수 추출 시 시료 0.5 g을 각각 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 추출용매로 정용하였다. 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication하여 추출하였다. sonication후 상온에서 10분간 식힌 후 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

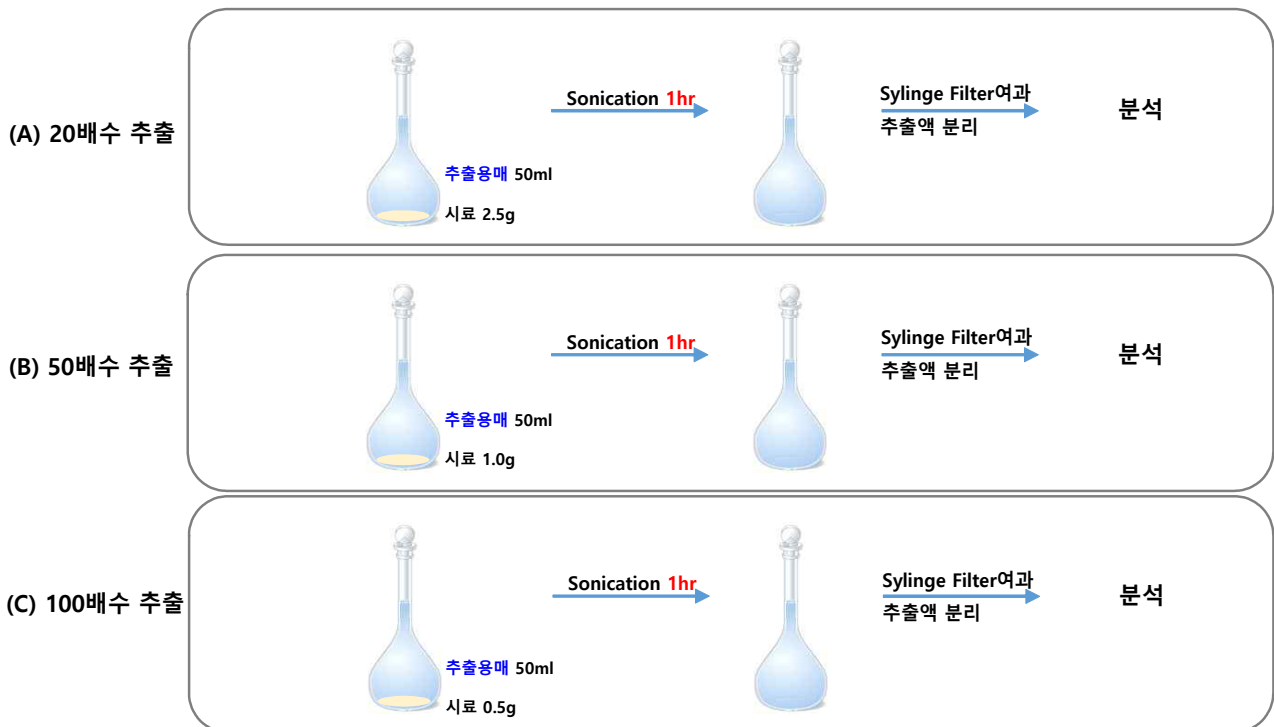


그림 55. 추출배수 설정 실험 공정도

대두를 methanol 및 hexane으로 각각 추출 시 확연히 다른 지표성분 패턴양상을 보였다.

대두의 표준물질인 Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein(이하 이소플라본 6종)은 높은 분리도를 보이며 분석됨을 확인하였다.

그림 55의 (A)는 대두 20배수, 50배수, 100배수 methanol추출액을 HPLC로 분석한 크로마토그램 결과이다. Methanol추출액의 경우 이소플라본 6종 모두 잘 추출되었고, 분석 시 peak의 분리도도 좋음을 확인하였다. Methanol 20배, 50배, 100배 추출배수에 따른 1회 추출량 조사 결과 희석배수로 환산한 area값을 비교했을 때 100배수, 50배수, 20배수의 순으로 추출배수가 클수록 추출비율이 높게 나타났다.

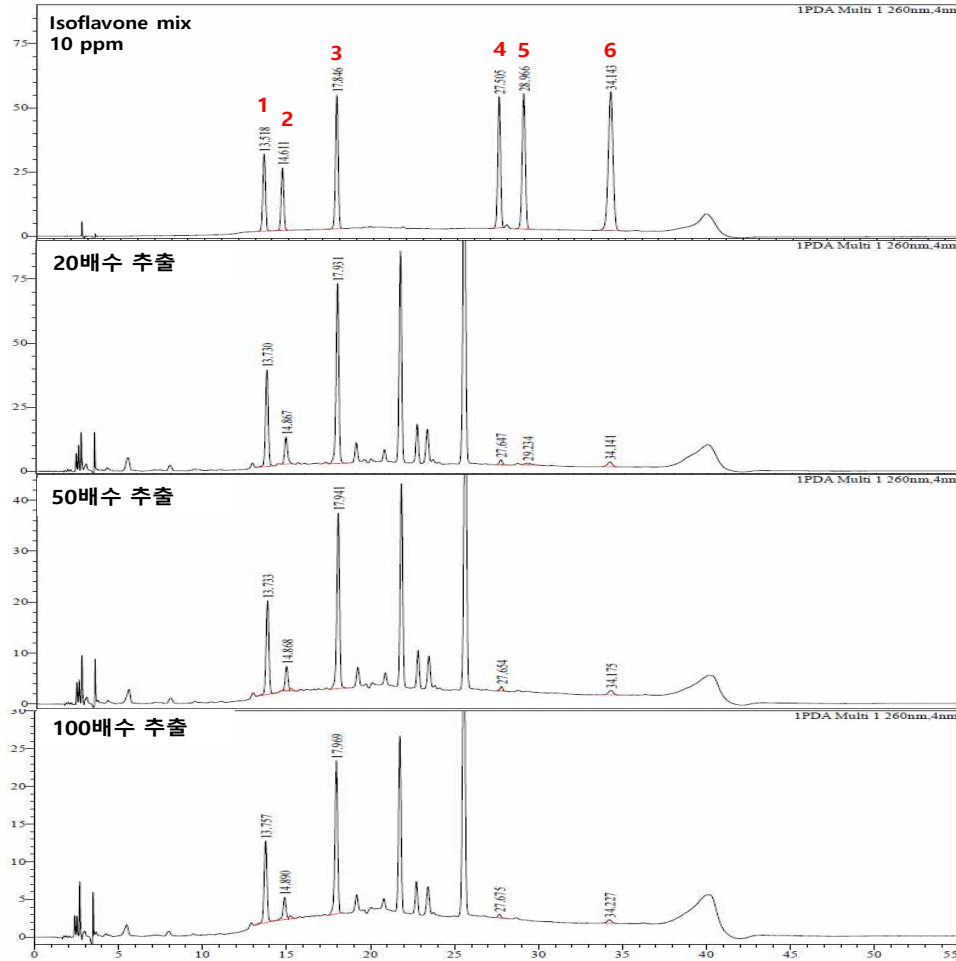
그림 55의 (B)는 대두 20배수, 50배수, 100배수 hexane추출액을 HPLC로 분석한 결과이다. 대두 hexane추출액의 경우 이소플라본은 추출이 되지 않음을 확인하였다.

결론적으로 대두의 추출배수 설정실험은 추출용매로 hexane보다 methanol이 적합하고, 추출 횟수를 1회로 설정 시 100배수가 가장 추출량이 높음을 확인할 수 있었다.

표 20. 대두 추출용매 및 추출배수 설정 결과

대두 추출용매 및 추출배수 설정					
지표성분		Isoflavone 6종			
추출용매	추출배수	Area값	단위 환산	희석배수로 환산한 Area값	
Methanol	20배	1454693	0.5mg/10ul		2909386
	50배	701525	0.2mg/10ul	1mg/10ul	3507625
	100배	416445	0.1mg/10ul		4164450
Hexane	20배	0			0
	50배	0	0		0
	100배	0			0

**(A) Methanol 추출**



**(B) Hexane 추출**

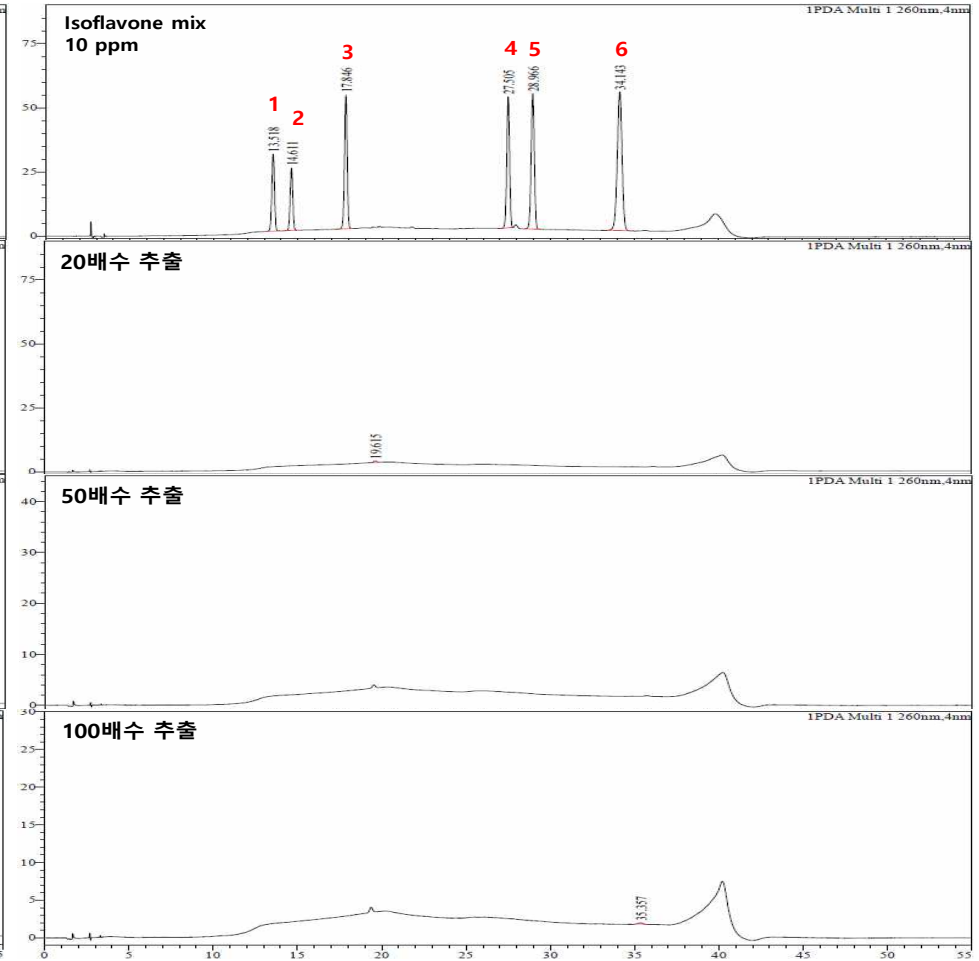


그림 56. 대두의 추출용매 및 추출배수 설정 실험 HPLC 크로마토그램

1.Daidzin(14.2min), 2.Glycitin(15.3min), 3.Genistin(18.5min), 4.Daidzein(28.2min), 5.Glycitein(29.7min), 6.Genistein(35.2min)

\* 추출배수에 맞추어 Y축 스케일을 추출배수만큼 확대하여 표시하였음

(3) 100배수 3회 연속 추출

앞선 20배수 3회연속추출 실험과 추출배수 설정 실험의 결과를 바탕으로 추출배수를 100배수, 200배수로 고정하고 3회연속추출을 실시하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol을 사용하였다. 100배수 추출에는 시료 0.2 g을, 200배수 추출에는 시료 0.1 g을 유리병에서 정밀히 측정하고 HPLC grade methanol 20 ml을 넣어주었다. 유리병을 1시간동안 상온에서 sonication하여 추출하였다. Sonication후 4000 rpm, 3분간 원심분리하여 잔사와 분리된 상등액을 조심히 따라 보관하고, 잔사에 새 용매를 같은 양 넣어 동일한 방법으로 추출하였다. 총 3회 연속추출하였다. 분리된 상등액은 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

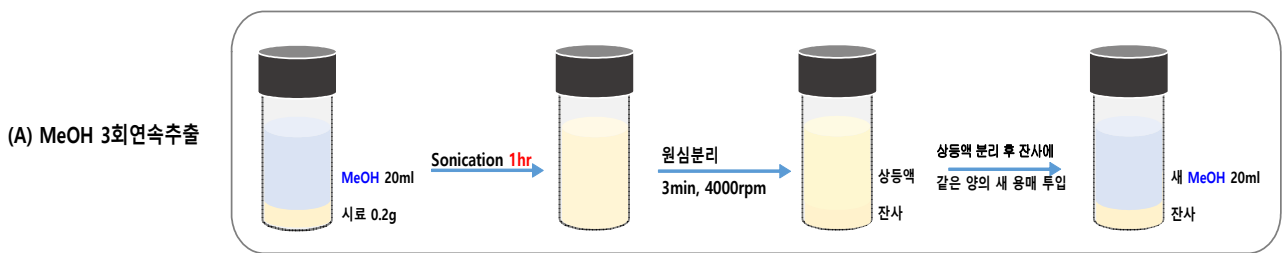


그림 57. 100배수 3회연속추출 공정도

앞선 실험에서 20배수 3회연속추출 실험과 20배수, 50배수, 100배수 추출배수 설정실험의 결과를 비교해 볼 때 20배수보다 100배수 추출이 더 적합함을 확인하였다. 100배수, 200배수로 추출 시 추출횟수를 설정하기 위한 추가실험이 필요하였기에 확인실험을 진행하였다.

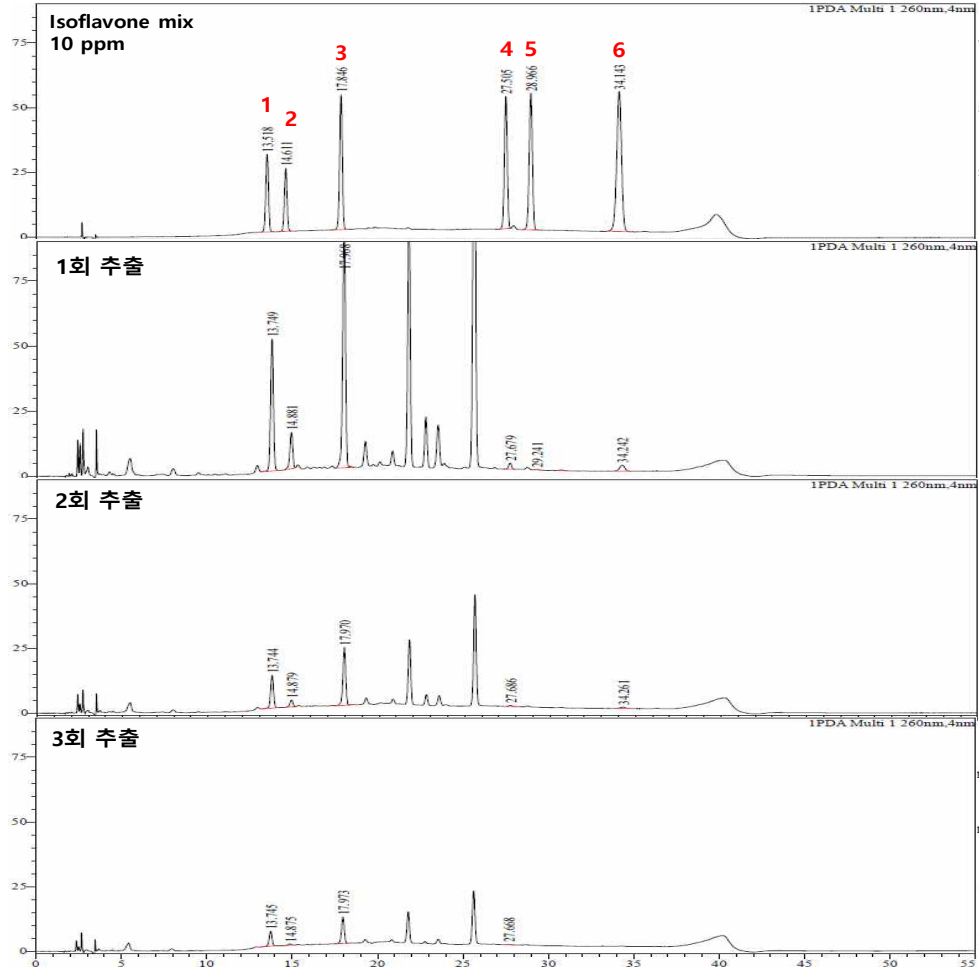
대두 20배수, 100배수, 200배수로 추출했을 때, 추출배수에 따른 회석배수로 환산한 Area값의 합은 200배수, 20배수, 100배수의 순으로 나타났지만, 차이는 크지 않음을 확인하였다. 그러나 추출율에서 차이를 보였다. 20배수로 추출 시 1회에서 65.4%, 100배수에서 77.5%, 200배수에서는 79.6%로 추출배수가 커질 수록 1회에서 추출되는 비율이 증가됨을 확인하였다.

결론적으로 100배수로 대두 추출 시 2회 이상을 추출하여야 95% 이상의 추출율을 확인할 수 있었고, 200배수로 추출할 경우에도, 2회 이상 추출하여야 96% 이상의 추출율을 확보할 수 있음을 확인하였다.

표 21. 대두 Methanol 20배수 3회연속추출, 100배수, 200배수 3회연속추출 결과 비교

대두 추출배수 설정						
지표성분		Isoflavone 6종				
추출용매	추출횟수	추출 %	Area값	단위 환산	희석배수로 환산한 Area값	
Methanol 20배수	1회	65.4	1501734	0.5mg/10ul		3003468
	2회	23.7	514450	0.5mg/10ul	1mg/10ul	1028900
	3회	10.9	234027	0.5mg/10ul		468054
	합					<b>4500422</b>
Methanol 100배수	1회	77.5	331273	0.1mg/10ul		3312730
	2회	17.8	76064	0.1mg/10ul	1mg/10ul	760640
	3회	4.6	18949	0.1mg/10ul		189490
	합					<b>4262860</b>
Methanol 200배수	1회	79.6	180147	0.05mg/10ul		3602940
	2회	16.5	37409	0.05mg/10ul	1mg/10ul	748180
	3회	3.9	9077	0.05mg/10ul		181540
	합					<b>4532660</b>

**(A) Methanol 20배수 3회연속추출**



**(B) Methanol 100배수 3회연속추출**

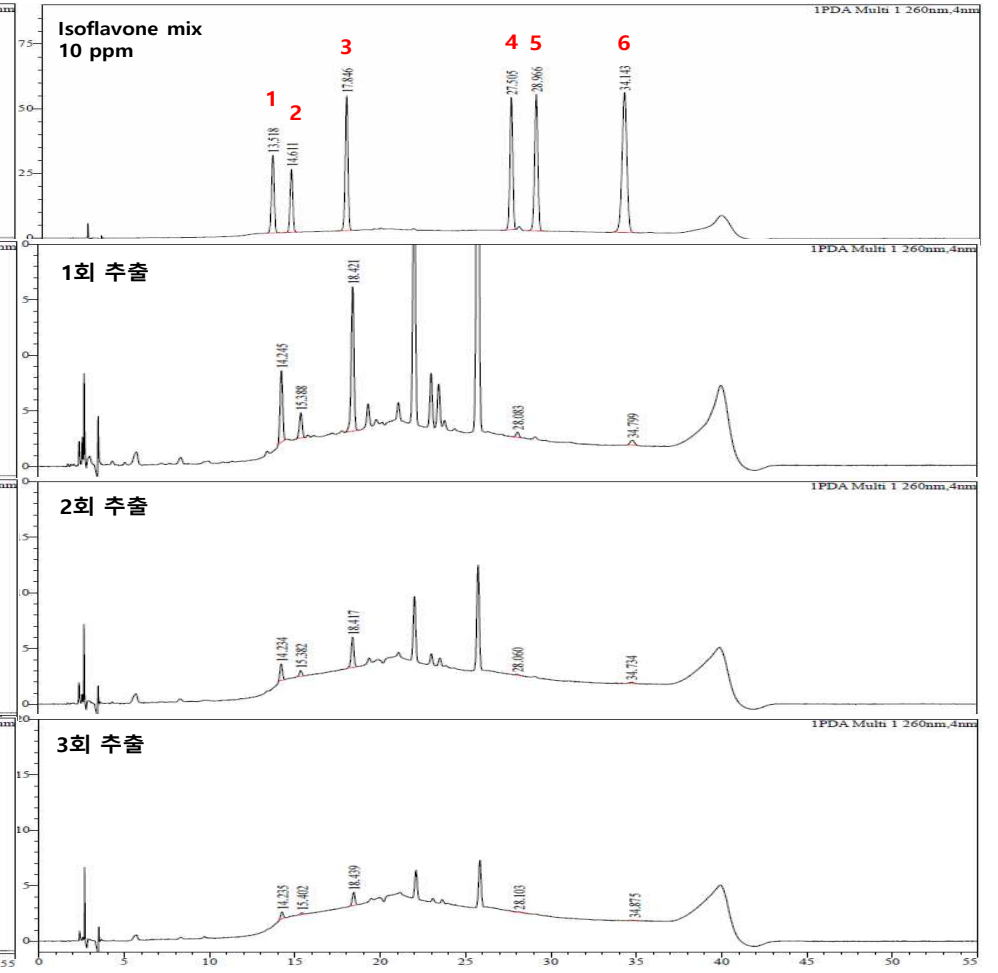


그림 58. 대두 Methanol 20배수 3회연속추출, 100배수 3회연속추출 실험 HPLC 크로마토그램

1.Daidzin(14.2min), 2.Glycitin(15.3min), 3.Genistin(18.5min), 4.Daidzein(28.2min), 5.Glycitein(29.7min), 6.Genistein(35.2min)

\* 추출배수에 맞추어 Y축 스케일을 추출배수 만큼 확대하여 표시하였음

#### (4) 최적 시료추출조건 설정

대두의 20배수 3회연속추출 실험결과에서 추출용매로 methanol이 적합하고, 20배수로 추출 시 2회 이상을 추출해야 89.1%의 추출율을 확보할 수 있음을 확인하였다.

또한 대두의 추출배수 설정 실험결과에서도 추출용매로 methanol이 적합하고, 추출 횟수를 1회로 설정하고 20배, 50배, 100배수로 추출 시 100배수가 가장 추출량이 높음을 확인할 수 있었다.

대두 20배수, 100배수, 200배수로 3회연속추출 했을 때, 추출배수에 따른 회석배수로 환산한 Area값의 합은 200배수, 20배수, 100배수의 순으로 나타났지만, 차이는 크지 않음을 확인하였다. 그러나 추출율에서 차이를 보였다. 20배수로 추출 시 1회에서 65.4%, 100배수에서 77.5%, 200배수에서는 79.6%로 추출배수가 커질수록 1회에서 추출되는 비율이 증가됨을 확인하였다. 결론적으로 100배수로 대두 추출 시 2회 이상을 추출하여야 95% 이상의 추출율을 확인 할 수 있었고, 200배수로 추출할 경우에도, 2회 이상 추출하여야 96% 이상의 추출율을 확보할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 대두의 지표성분 추출조건은 100배수 2회 추출로 설정하였다.

보고서를 작성 할 시점에는 재현성의 문제로 대두의 추출 조건이 확립되지 않아 1차년도 대두의 지표성분 분석을 위한 추출조건으로 추출용매 methanol, 추출횟수 1회, 추출배수 100배로 설정하여 실험을 진행하였다. 그러나 현 시점에서 대두의 지표성분 추출조건이 100배수 2회 추출로 확정하였다. 차후 실험부터는 확정된 추출조건으로 실험을 진행할 예정이다.

## 나. 대두 원물 및 (생물전환)산물의 추출

### (1) 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 대두 원물

농촌진흥청에서 2014년 10월에 수확된 품종별 대두 5종을 제공받았다. 모두 흰콩이었으며, 각각의 품종은 대원, 대풍2호, 우람, 진풍, 새단백 등 5종이었다. 대두 시료는 아래 표와 같으며, 이후 대두 및 대두박 실험에 사용되었다.

표 22. 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 대두 5종

No.	학명	품종	수확시기	사진
1		대원	2014년 10월	
2		대풍2호	2014년 10월	
3	<i>Glycine max(L.) Merr</i>	우람	2014년 10월	
4		진풍	2014년 10월	
5		새단백	2014년 10월	

### (2) 제1협동으로부터 제공받은 품종별 대두(생물전환)산물의 sonication 추출

농촌진흥청에서 제공받은 품종별 대두 5종을 이용하여 제1협동에서 생물전환공정을 진행하였다. 제1협동에서 제공받은 대두 원물 및 (생물전환)산물을 그림 54의 (C)와 동일한 조건으로 30분간 sonication 추출을 진행하였다. 원심분리(3,000 rpm, 10 min) 후 상층액을 필터 하여 실험에 사용하였다.

### (3) 제1협동으로부터 제공받은 탈지대두의 sonication 추출

농촌진흥청에서 제공받은 품종별 대두 5종 중 4번 진풍을 이용하여 제1협동에서 탈지 공정을 진행하였다. 탈지는 hexane 또는 ethanol을 이용하여 진행하였으며, 각각의 탈지물을 이용하여 생물전환공정을 진행하였다. 4번 진풍 원물 및 hexane, ethanol 탈지물 및 이들의 (생물전환)산물 등 총 5종의 대두시료를 이용하여 미강과 동일한 조건으로 추출하였다. 대두 시료 2.5g을 칭량하고 100% methanol을 적절한 용량으로 정용한 뒤 30분 동안 sonication 추출하였다. 충분히 방냉 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 필터 하여 분석에 사용하였다.



#### 다. 탈지대두의 Isoflavone 함량 분석

탈지 대두의 Isoflavone 함량은 건강기능식품의 시험법(2014)의 3-54. 대두이소플라본(제1)법의 방법을 이용하여 아래 표와 같은 조건으로 분석하였다. Waters 2695 separation module HPLC system을 이용하여 분석을 진행하였다. Isoflavone의 경우 다이드진(Daidzin), 글리시틴(Glycitin), 제니스틴(Genistin)의 배당체와 다이드제인(Daidzein), 글리시테인(Glycitein), 제니스테인(Genistein)의 비배당체로 구성되어있다. 배당체는 100% methanol로, 비배당체는 100% DMSO를 이용하여 제조하였고, 각 농도의 희석은 모두 methanol을 이용하였다. 6가지의 Isoflavone을 모두 혼합하여 각각의 Isoflavone이 50 µg/mL에서 1.5625 µg/mL 사이가 되도록 희석하여 표준검량선을 작성하였다. 각 표준물질의 검량선에 따라 4번 진풍 원물 및 hexane, ethanol 탈지물 및 이들의 (생물전환)산물 등 총 5종의 시료를 이용하여 Isoflavone 함량을 분석 한 결과는 표 24와 같으며, 진풍 원물과 hexane, ethanol 탈지물에서는 배당체인 다이드진, 글리시틴 및 제니스테인이 주로 함유되어있었으며, 원물과 탈지물의 (생물전환)산물은 비배당체인 다이드제인, 글리시테인 및 제니스테인이 주로 함유되어 있음을 알 수 있었다. Total Isoflavone은 진풍 원물 및 탈지물에서 각각 474.98±15.77, 522.79±16.30 및 428.27±25.46 µg/mL인 반면, (생물전환)산물은 비배당체의 함량이 높아, hexane 탈지 (생물전환)산물이 2577.96±2.40 µg/mL, ethanol 탈지 (생물전환)산물이 2453.02±5.00 µg/mL의 함량을 나타내었다.

표 23. Isoflavone 분석조건

Instrument	Conditions		
Column	C <sub>18</sub> 4.6 x 250 mm, 5.0 µm		
Column temp.	40°C		
	Time (min)	A <sup>a)</sup>	B <sup>b)</sup>
	0	90	10
Mobile phase (Gradient)	21	60	40
	32	60	40
	35	40	60
	36	90	10
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector 260 nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 µL		
Run time	50 min		

<sup>a)</sup>water/MeOH/acetic acid(88:10:2)

<sup>b)</sup>MeOH/acetic acid(98:2)

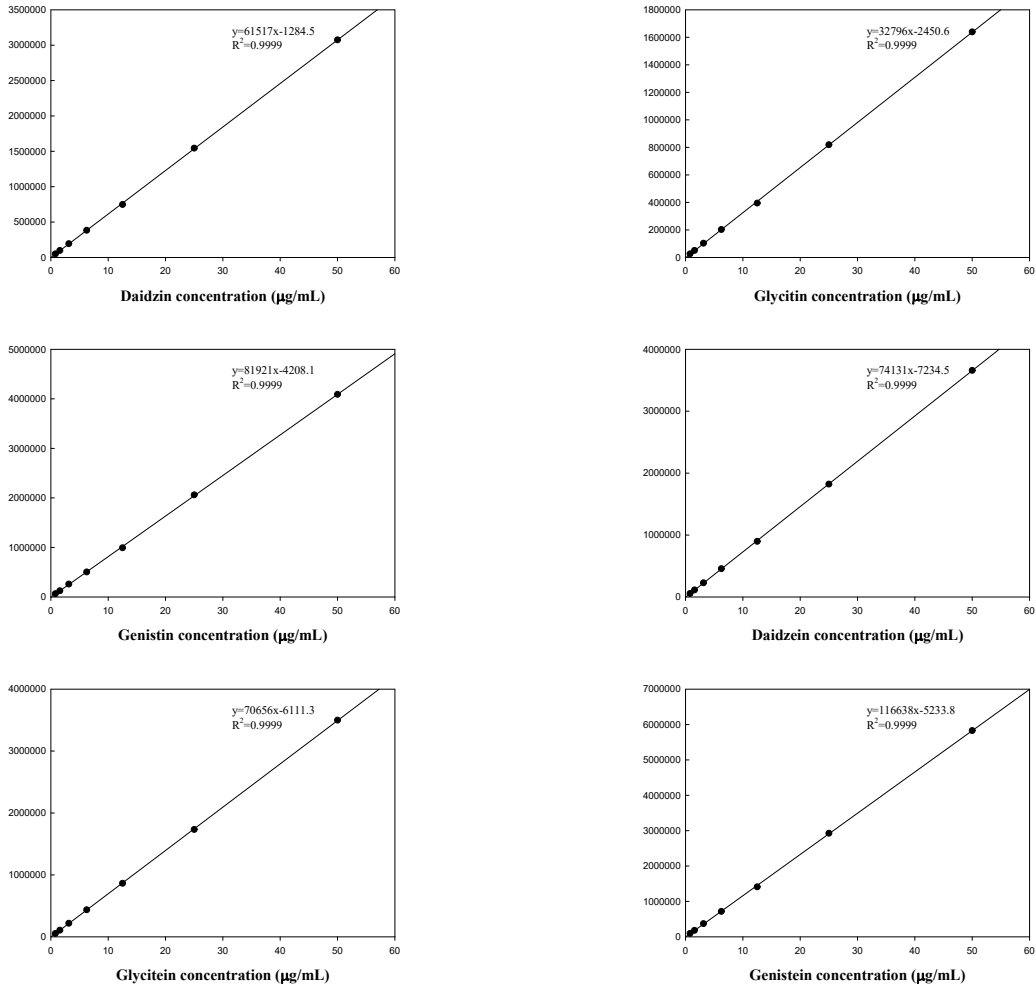


그림 59. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량 분석을 위한 standard curve

표 24. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량

Sample	Glycoside			Aglycone			Total Isoflavone (µg/mL)
	Daidzin (µg/mL)	Glycitin (µg/mL)	Genistin (µg/mL)	Daidzein (µg/mL)	Glycitein (µg/mL)	Genistein (µg/mL)	
UDS <sup>1)</sup>	147.10±8.17	90.56±1.96	237.31±6.66	ND	ND	ND	474.98±15.77
HDS <sup>2)</sup>	159.64±6.57	100.80±3.26	262.35±10.14	ND	ND	ND	522.79±16.30
HDFS <sup>3)</sup>	ND	ND	44.82±0.27	875.05±0.85	165.32±0.26	1492.77±1.62	2577.96±2.40
EDS <sup>4)</sup>	135.75±8.88	69.43±1.98	223.09±14.66	ND	ND	ND	428.27±25.46
EDFS <sup>5)</sup>	ND	ND	ND	833.95±4.74	141.46±2.41	1477.61±6.76	2453.02±5.00

<sup>1)</sup>UDS, Un-defatted soybean

<sup>2)</sup>HDS, Hexane-defatted soybean

<sup>3)</sup>HDFS, Hexane-defatted fermented soybean

<sup>4)</sup>EDS, Ethanol-defatted soybean

<sup>5)</sup>EDFS, Ethanol-defatted fermented soybean

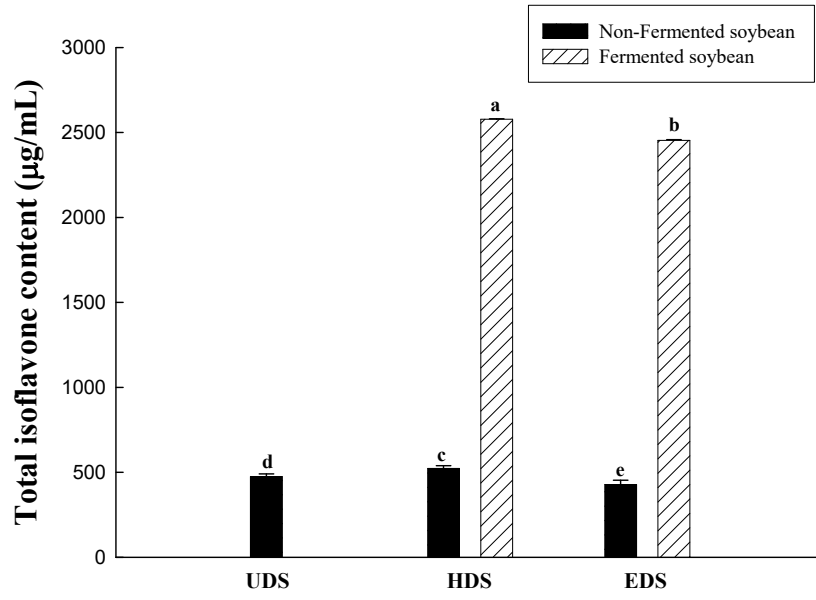


그림 60. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Total Isoflavone 함량

라. 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량 분석

농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 대두 및 제1협동에서 제공받은 품종별 대두의 (생물전환)산물 등 총 10종의 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량은 표 23과 같은 조건으로 분석하였다. 6가지의 Isoflavone을 모두 혼합하여 각각의 Isoflavone이 100 µg/mL에서 1.5625 µg/mL 사이가 되도록 희석하여 표준검량선을 작성하였다. 각 표준물질의 검량선에 따라 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물 등 총 10종의 시료를 이용하여 Isoflavone 함량을 분석한 결과 아래 표와 같다. 분석 결과, Isoflavone 배당체인 다이드진, 글리시틴, 제니스틴은 대두의 (생물전환)산물에서 비배당체인 다이드제인, 글리시테인, 제니스테인으로 전환됨을 확인하였다. 배당체가 비배당체로 전환되었을 때, 생체 이용성이 증가하여 항암, 항산화, 항염증 등의 다양한 생물학적 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. Total isoflavone은 품종별 대두 원물에서 119.78~640.33 µg/mL, (생물전환)산물에서 567.34~1967.25 µg/mL로 나타났으며, 특히 4번 진풍 (생물전환)산물에서 원물(640.33 µg/mL)보다 높은 1967.23 µg/mL을 나타내었다. 대두 생물전환시 배당체에서 비배당체의 전환과 total Isoflavone 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

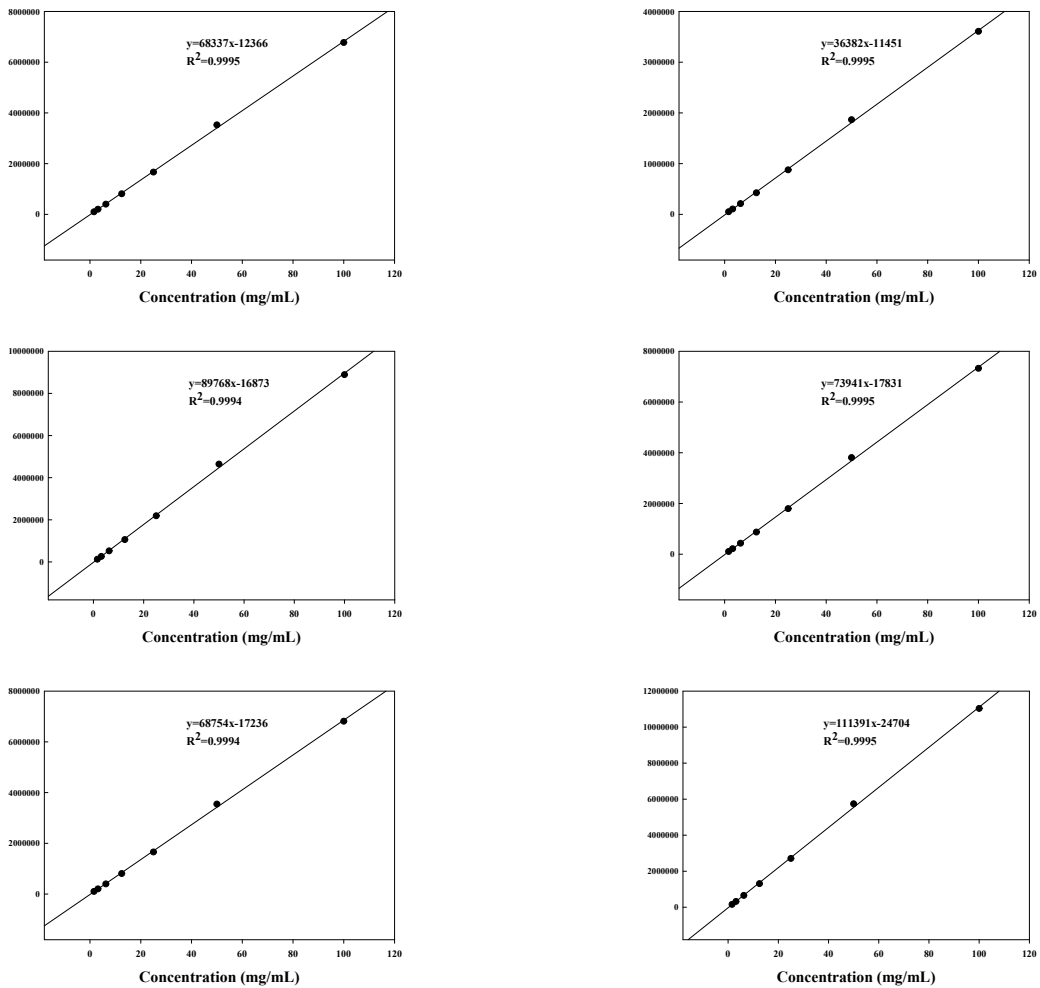


그림 61. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량 분석을 위한 standard curve

표 25. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone 함량

sample		Glycoside			Aglycone			Total
		Daidzin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Glycitin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Genistin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Daidzein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Glycitein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Genistein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Isoflavone ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	NS	144.59 $\pm$ 2.66	63.99 $\pm$ 1.25	186.17 $\pm$ 1.32	ND	ND	ND	394.76 $\pm$ 5.03
	FS	ND	ND	ND	746.53 $\pm$ 13.18	102.40 $\pm$ 1.11	826.40 $\pm$ 16.05	1675.33 $\pm$ 30.27
2	NS	138.81 $\pm$ 1.23	150.49 $\pm$ 2.17	236.41 $\pm$ 1.10	ND	ND	ND	525.70 $\pm$ 2.34
	FS	ND	ND	ND	616.00 $\pm$ 15.83	222.20 $\pm$ 5.75	866.06 $\pm$ 22.44	1704.26 $\pm$ 43.95
3	NS	161.19 $\pm$ 0.18	55.50 $\pm$ 1.06	240.85 $\pm$ 1.01	ND	ND	ND	457.53 $\pm$ 1.55
	FS	ND	ND	ND	828.66 $\pm$ 3.82	91.79 $\pm$ 1.03	1046.80 $\pm$ 3.43	1967.25 $\pm$ 6.46
4	NS	162.62 $\pm$ 1.11	108.20 $\pm$ 2.13	369.51 $\pm$ 1.32	ND	ND	ND	640.33 $\pm$ 1.40
	FS	ND	ND	ND	634.57 $\pm$ 4.75	128.64 $\pm$ 1.34	1200.67 $\pm$ 8.60	1963.88 $\pm$ 14.68
5	NS	38.85 $\pm$ 0.37	44.44 $\pm$ 0.47	36.99 $\pm$ 0.21	ND	ND	ND	119.78 $\pm$ 0.57
	FS	ND	ND	ND	227.11 $\pm$ 5.37	76.96 $\pm$ 1.84	263.27 $\pm$ 6.26	567.34 $\pm$ 13.45

<sup>1</sup>NS, Non-fermented soybean

<sup>2</sup>FS, Fermented soybean

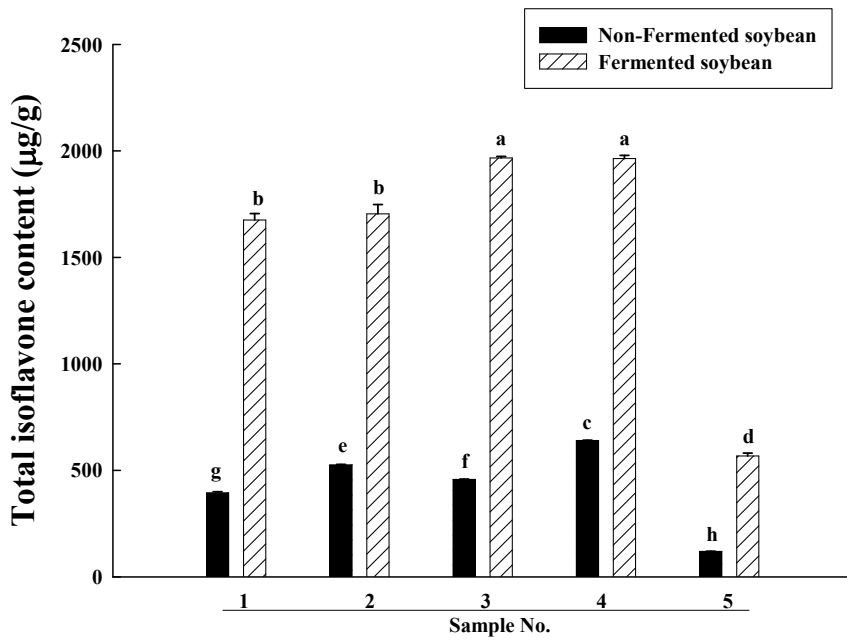


그림 62. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 Total Isoflavone 함량

#### 마. 원물 및 (생물전환)산물의 Isoflavone method validation

대두 및 대두박에 존재하는 Isoflavone의 분석을 위하여 HPLC 조건을 확인하였으며, 이때 이용된 분석법을 검증하기 위하여, method validation을 실시하였다. 표 23과 동일한 조건으로 3번 우람 대두 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여 진행하였다. 분석법의 유효성을 검증하기 위한 방법으로는 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantization, LOQ)를 사용하였다. Waters 996 Photodiode Array Detector(Waters co., Milford, MA, USA)를 사용하여 190 nm부터 400 nm까지 흡광도를 측정하여 각 피크의 최대흡수파장을 확인하였다 (그림 62). Isoflavone의 배당체인 daidzin, glycitin, genistin 및 비배당체 daidzein, glycitein, genistein의 retention time이 각각 12.08 min, 13.07 min, 15.82 min 및 24.45 min, 25.93 min, 29.84 min으로 확인되었고, 각 시료에서도 동일한 retention time에서 피크를 확인할 수 있었다. Isoflavone 표준물질은 0, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다. 그 결과, 결정계수( $R^2$ ) 값은 0.9998~1로 우수한 직선성을 보였다 (그림 63). 정밀성은 표 27과 같이 일내(intra-day) 정밀도에서 0.22~0.88%를 나타내었고, 일간(inter-day) 정밀도에서 0.34~1.00%로 모두 5% 이하의 정밀도를 나타내었다. 정확성은 회수율을 측정하여 그 결과로 나타내었다. 각 시료에 3.125, 25, 50 µg/mL의 표준용액을 첨가하여 HPLC로 검출되는 농도를 측정하였다(표 26). 그 결과(표 27), 우람 대두 원물 및 (생물전환)산물에서 일간 및 일내 측정 결과 각각 98.56~114.23% 및 97.67~115.18%의 회수율을 나타내었다. 검출한계와 정량한계는 검량선의 기울기와 반응의 표준편차에 근거하는 방법으로 검출한계는  $3.3 \times$ 표준편차/기울기로, 정량한계는  $10 \times$ 표준편차/기울기 값으로 확인하였다. 이때의 기울기는 표준검량선에서 저농도 3구간(1.5624~6.25 µg/mL)의 기울기를 사용하였으며, 표준편차는 중간농도를 7회 분석하여 이용하였다. 그 결과는 표 28과 같으며, daidzin의 LOD값이 0.1439 µg/mL, LOQ값이 0.4361 µg/mL로 가장 낮은 값을 나타내었다.

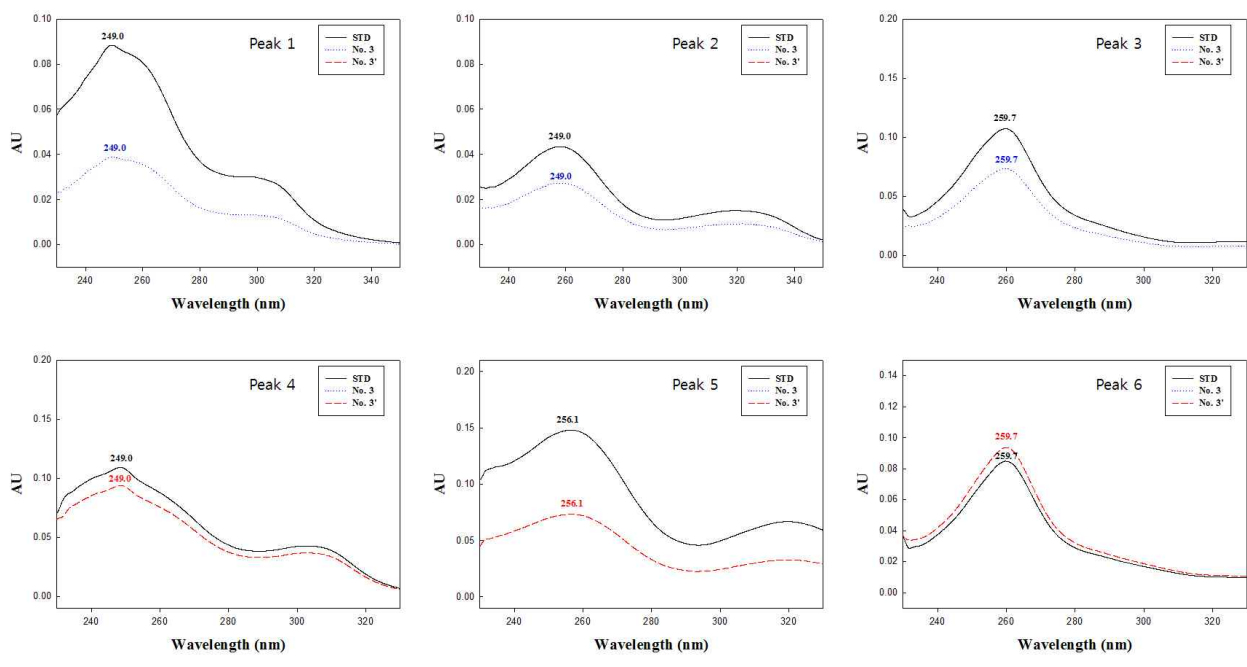
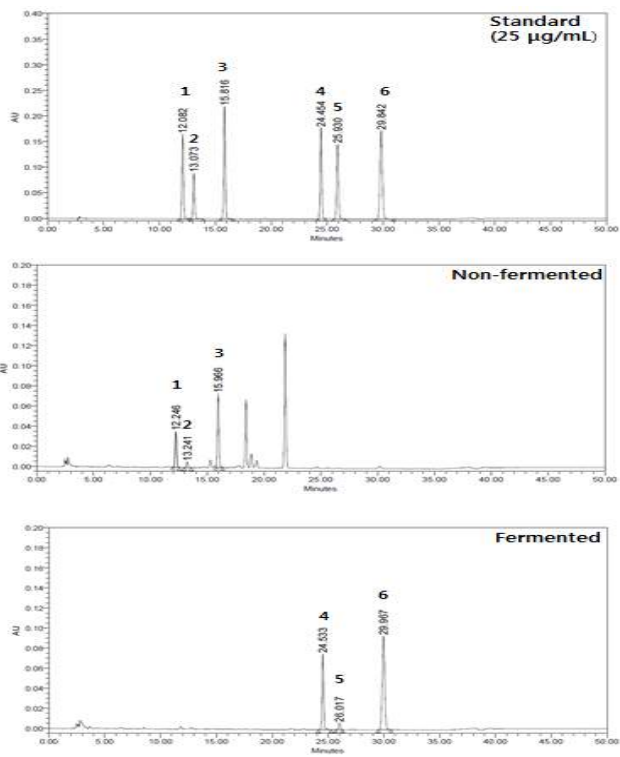


그림 63. Isoflavone, 우람 대두 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

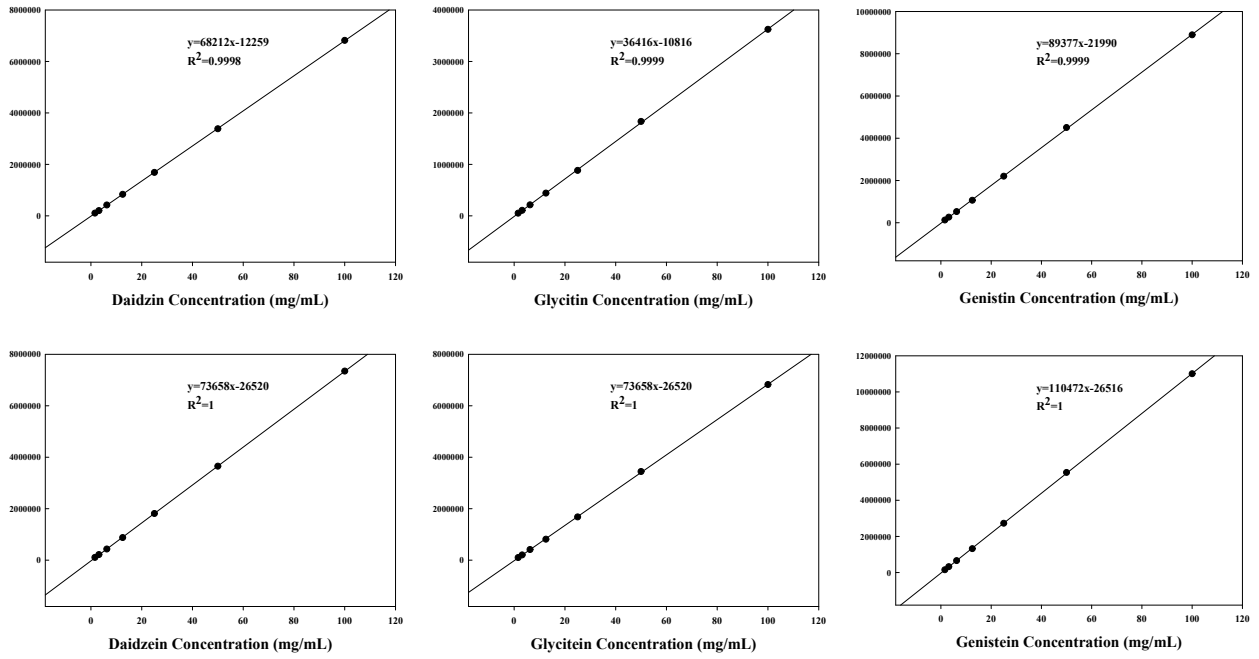


그림 64. Isoflavone standard의 직선성 확인

표 26. 우람 대두 원물 및 (생물 전환)산물의 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 정밀성

Sample	Intra-day		Inter-day	
	Mean±SD (µg/mL)	RSD (%)	Mean±SD (µg/mL)	RSD (%)
Non-Fermented Uram	637.73±5.62	0.88	642.25±6.40	1.00
Fermented Uram	2074.58±4.55	0.22	2088.73±7.03	0.34



표 27. 우람 대두 원물 및 (생물전환)산물의 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 회수율

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day			Inter-day			
		Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	RSD (%)	Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	RSD (%)	
Daidzin	Non-Fermented Uram	3.125	3.43 $\pm$ 0.08	109.62	2.22	3.29 $\pm$ 0.05	105.15	1.46
		25	27.55 $\pm$ 0.43	110.21	1.56	26.79 $\pm$ 0.69	107.15	2.59
		50	51.30 $\pm$ 1.24	102.60	2.41	50.71 $\pm$ 1.23	101.43	2.43
	Fermented Uram	3.125	3.27 $\pm$ 0.03	104.63	0.78	3.30 $\pm$ 0.03	105.49	0.78
		25	25.96 $\pm$ 0.48	103.84	1.84	26.07 $\pm$ 0.49	104.28	1.87
		50	50.27 $\pm$ 0.67	100.55	1.32	50.57 $\pm$ 0.73	101.13	1.44
Glycitin	Non-Fermented Uram	3.125	3.51 $\pm$ 0.02	112.35	0.60	3.50 $\pm$ 0.05	111.96	1.43
		25	26.61 $\pm$ 0.42	106.42	1.58	26.14 $\pm$ 0.38	104.57	1.44
		50	51.12 $\pm$ 1.49	102.23	2.92	50.55 $\pm$ 1.59	101.10	3.15
	Fermented Uram	3.125	3.46 $\pm$ 0.08	110.57	2.19	3.37 $\pm$ 0.06	107.86	1.71
		25	25.67 $\pm$ 0.34	102.69	1.33	25.70 $\pm$ 0.29	102.80	1.12
		50	50.13 $\pm$ 0.47	100.26	0.94	50.49 $\pm$ 0.59	100.97	1.16
Genistin	Non-Fermented Uram	3.125	3.05 $\pm$ 0.11	97.67	3.56	3.20 $\pm$ 0.07	102.34	2.13
		25	28.80 $\pm$ 0.28	115.18	0.98	27.97 $\pm$ 0.99	111.89	3.54
		50	52.55 $\pm$ 0.73	105.09	1.39	52.03 $\pm$ 0.95	104.05	1.83
	Fermented Uram	3.125	3.38 $\pm$ 0.02	108.09	0.65	3.35 $\pm$ 0.03	107.10	0.77
		25	26.12 $\pm$ 0.48	104.50	1.85	26.14 $\pm$ 0.43	104.54	1.65
		50	50.88 $\pm$ 0.98	101.75	1.92	50.84 $\pm$ 0.88	101.69	1.73
Daidzein	Non-Fermented Uram	3.125	3.32 $\pm$ 0.04	106.22	1.25	3.34 $\pm$ 0.03	106.99	0.93
		25	26.40 $\pm$ 0.57	105.61	2.17	25.97 $\pm$ 0.17	103.89	0.64
		50	50.56 $\pm$ 0.87	101.11	1.71	50.48 $\pm$ 0.80	100.95	1.59
	Fermented Uram	3.125	3.45 $\pm$ 0.10	110.43	3.03	3.57 $\pm$ 0.09	114.23	2.56
		25	26.92 $\pm$ 0.84	107.68	3.14	27.03 $\pm$ 0.86	108.13	3.18
		50	51.36 $\pm$ 1.08	102.73	2.10	51.62 $\pm$ 1.13	103.23	2.19
Glycitein	Non-Fermented Uram	3.125	3.17 $\pm$ 0.02	101.35	0.52	3.08 $\pm$ 0.06	98.56	1.79
		25	26.14 $\pm$ 0.48	104.58	1.84	25.75 $\pm$ 0.13	103.02	0.52
		50	50.25 $\pm$ 0.74	100.49	1.47	50.11 $\pm$ 0.69	100.22	1.37
	Fermented Uram	3.125	3.23 $\pm$ 0.12	105.33	3.58	3.31 $\pm$ 0.14	106.02	4.37
		25	25.88 $\pm$ 0.52	103.54	2.01	26.09 $\pm$ 0.73	104.38	2.79
		50	50.78 $\pm$ 0.80	101.57	1.58	51.06 $\pm$ 0.86	102.12	1.69
Genistein	Non-Fermented Uram	3.125	3.26 $\pm$ 0.05	104.27	1.60	3.20 $\pm$ 0.08	102.43	2.60
		25	26.42 $\pm$ 0.53	105.68	2.01	26.08 $\pm$ 0.06	104.31	0.24
		50	50.74 $\pm$ 0.80	101.48	1.57	50.65 $\pm$ 0.73	101.29	1.44
	Fermented Uram	3.125	3.45 $\pm$ 0.11	110.25	3.06	3.43 $\pm$ 0.10	109.66	2.83
		25	26.85 $\pm$ 0.70	107.39	2.59	27.01 $\pm$ 0.83	108.05	3.06
		50	51.68 $\pm$ 1.11	103.36	2.14	51.86 $\pm$ 1.14	103.72	2.20

표 28. Isoflavone 분석의 검량한계 및 검출한계

Sample	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope	Intercept	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Daidzin	1.5625-6.25	66415.03	0.07	1.0000	0.1439	0.4361
Glycitin	1.5625-6.25	34813.73	0.07	1.0000	0.1579	0.4784
Genistin	1.5625-6.25	85952.42	0.06	1.0000	0.1991	0.6033
Daidzein	1.5625-6.25	70303.12	0.05	1.0000	0.2474	0.7497
Glycitein	1.5625-6.25	66310.49	0.03	0.9999	0.2928	0.8871
Genistein	1.5625-6.25	108655.75	0.13	1.0000	0.1997	0.6051

**바. 대두 시제품의 isoflavone 함량 분석**

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공 받은 대두(생물전환)산물 기반 시제품의 isoflavone 분석을 위하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 제조는 시료 500 mg을 취하여 100% methanol로 50 mL volumetric flask에 정용하여 30분 동안 sonication 추출 후, 고형분의 제거를 위하여 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리 후 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과하였다. Isoflavone 표준물질은 각각 3.125~100 µg/mL의 농도로 희석하여 표준검량선을 작성하였다. 그 결과(표 30), 배당체인 Daidzin, Glycitin 및 Genistin은 모두 검출되지 않았으며, 비배당체인 Daidzein, Glycitein 및 Genistein만 검출되는 것으로 확인되었다.

표 29. 대두 시제품의 Isoflavone 함량

	Glycoside			Aglycone			Total Isoflavone (mg/g)
	Daidzin (mg/g)	Glycitin (mg/g)	Genistin (mg/g)	Daidzein (mg/g)	Glycitein (mg/g)	Genistein (mg/g)	
시제품	ND	ND	ND	0.80±0.00	0.21±0.00	0.42±0.00	1.43±0.00

### 3. 대두 원물 및 (생물전환)산물의 지표성분 분석 최적조건 확립

#### 시료추출 방법

시료(분말) 0.5 g을 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 HPLC grade methanol로 정용하였다(100배수 추출). 50 ml 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication 추출하였다. Sonication 후 상온에서 10분간 식힌 다음 0.45 um 실린지 필터를 이용해 여과 후 분석에 사용하였다.

#### 표준물질 제조

대두의 원물 및 부산물(대두박)의 지표성분 패턴분석에 있어서 실험조건은 식품의약품안전처의 건강기능식품 기준 및 규격에 기재된 대두이소플라본 제 1법을 약간 변형하여 적용한 것으로 주관기관인 강원대학교(이옥환 교수님 Lab)에서 확립한 조건을 그대로 사용하였다. 대두의 원물 및 부산물(대두박)의 지표성분 패턴분석을 위한 표준물질로 Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein(이하 이소플라본 6종)을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 표준물질 이소플라본 6종은 모두 Sigma社 제품이다.

각각의 이소플라본(Daidzin, Genistin, Glycitin, Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준물질 50 mg을 정밀히 측정하였다. 정밀히 측정한 표준물질을 50 mL 부피플라스크에 넣는다. 배당체(Daidzin, Genistin, Glycitin) 표준품은 HPLC grade methanol을 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 하였다. 비배당체(Daidzein, Genistein, Glycitein) 표준품은 dimethylsulfoxide(DMSO)를 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 하였다. 위의 용액을 HPLC grade methanol로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

#### HPLC 분석조건

HPLC 분석조건은 아래 표와 같다. Shimadzu Model LC-20A Prominence Series HPLC system과 Shimadzu Model SPD-M20A Prominence Photodiode Array Detector(Shimadzu Co., JAPAN)을 사용하여 분석하였다.

표 30. 이소플라본 6종의 HPLC 분석조건

Instrument	Conditions		
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6 ×250 mm, 5.0 μm)		
Detector	Shimadzu Model SPD-M20A Prominence photodiode Array Detector <b>260nm</b>		
	A용액 - H <sub>2</sub> O : Methanol : acetic acid = 88 : 10 : 2		
	B용액 - Methanol : acetic acid = 98 : 2		
	시간(분)	A용액 (%)	B용액 (%)
	0	90	10
Mobile phase	21	60	40
	32	60	40
	35	40	60
	36	90	10
	55	90	10
Column temp.	40 °C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	55 min		

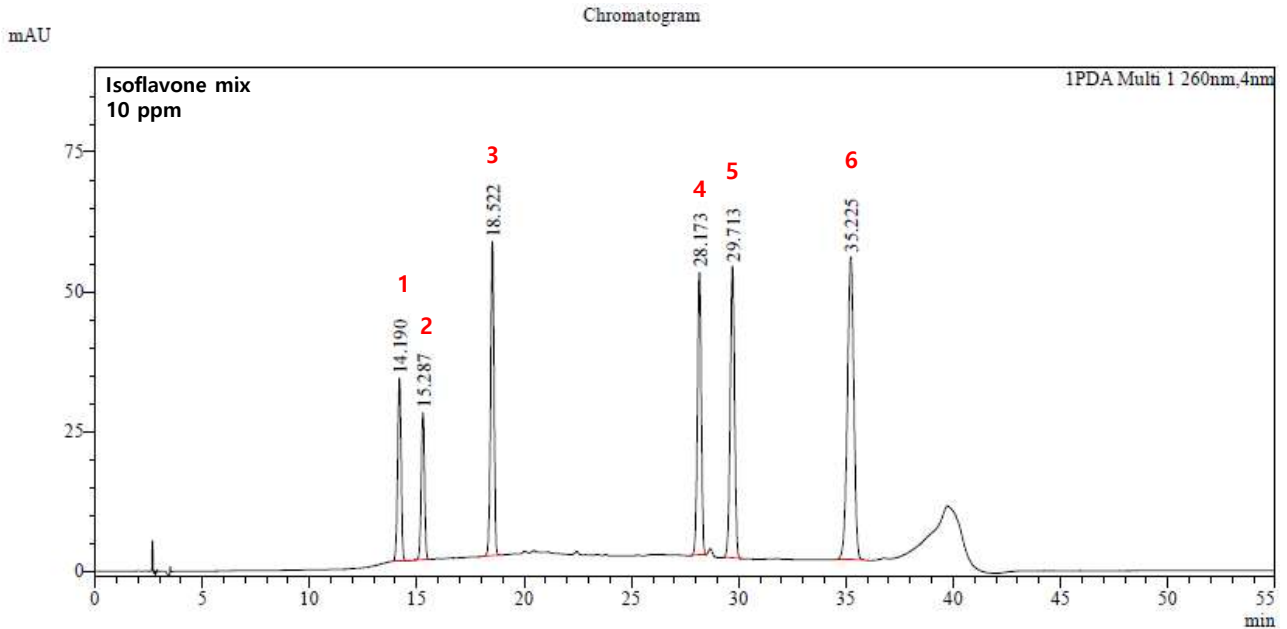


그림 65. 이소플라본 6종 표준물질의 HPLC 크로마토그램

배당체; 1.Daidzin(14.2min), 2.Glycitin(15.2min), 3.Genistin(18.5min)

비배당체; 4.Daidzein(28.1min), 5.Glycitein(29.7min), 6.Genistein(35.2min)

## 4. 50L 규모에서의 생산공정 표준화

### 가. 생산단계별 시료의 지표성분인 Isoflavone 분석

#### (1) 주관기관 결과

대두(생물전환)산물의 지표성분 isoflavone은 배당체인 Daidzin, Glycitin, Genistin과 그 비배당체인 Daidzein, Glycitein, Genistein로 구성되어있다. 6가지의 isoflavone을 분석하기 위한 분석법은 이전에 method validation을 통해 확립한 분석 조건을 이용하여 분석하였다.

제1협동기관(주)에스티알바이오텍에서 제공받은 대두(생물전환)산물의 Isoflavone의 분석을 위하여 각 시료 500 mg을 취하여 100% methanol로 50 mL volumetric flask에 정용하여 30분 동안 sonication 추출 후, 고형분의 제거를 위하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. 6가지의 isoflavone 표준물질은 0.78125 µg/mL, 1.5625 µg/mL, 3.125 µg/mL, 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL의 농도로 희석하여 표준검량선을 작성하였다.

isoflavone 표준용액의 표준검량선은 Daidzin( $y=37074x+16406$ ,  $R^2=0.9996$ ), Glycitin( $y=36430x+19098$ ,  $R^2=0.9996$ ), Genistin( $y=52546x+20631$ ,  $R^2=0.9996$ ), Daidzein( $y=54758x+17871$ ,  $R^2=0.9998$ ), Glycitein( $y=52025x+24643$ ,  $R^2=0.9998$ ), Genistein( $y=136368x+45272$ ,  $R^2=0.9997$ )으로 나타났으며, 각 표준검량선에 대입하여 대두(생물전환)산물의 isoflavone 함량을 계산하였다. 그 결과, 대두(생물전환)산물에서는 비배당체인 Daidzein, Glycitein, Genistein만 검출되었으며, 생산공정이 진행됨에 따라 배당체가 각 비배당체로 전환되며 total isoflavone 함량이 증가되는 경향이 나타났다. 이러한 경향은 대두 isoflavone에는 본 연구에 사용한 3종류의 배당체(Daidzin, Glycitin, Genistin)와 그 비배당체(Daidzein, Glycitein, Genistein) 외에도 각각의 6"-O-acetyl-glucosides, 6"-O-malonyl-glucosides를 포함하여 총 12종류의 대두 isoflavone이 존재하여 이러한 acetyl, malonyl화 배당체가 비배당체로 전환되어 높은 total isoflavone 함량을 나타내는 것으로 생각된다. 이러한 isoflavone 비배당체의 생리활성은 항산화, 항염증, 혈청 지질대사 개선 등, 많은 연구 결과에서 배당체보다 우수한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있기 때문에, 대두(생물전환)산물은 대두 원물보다 더욱 높은 생리활성을 기대할 수 있을 것이다.

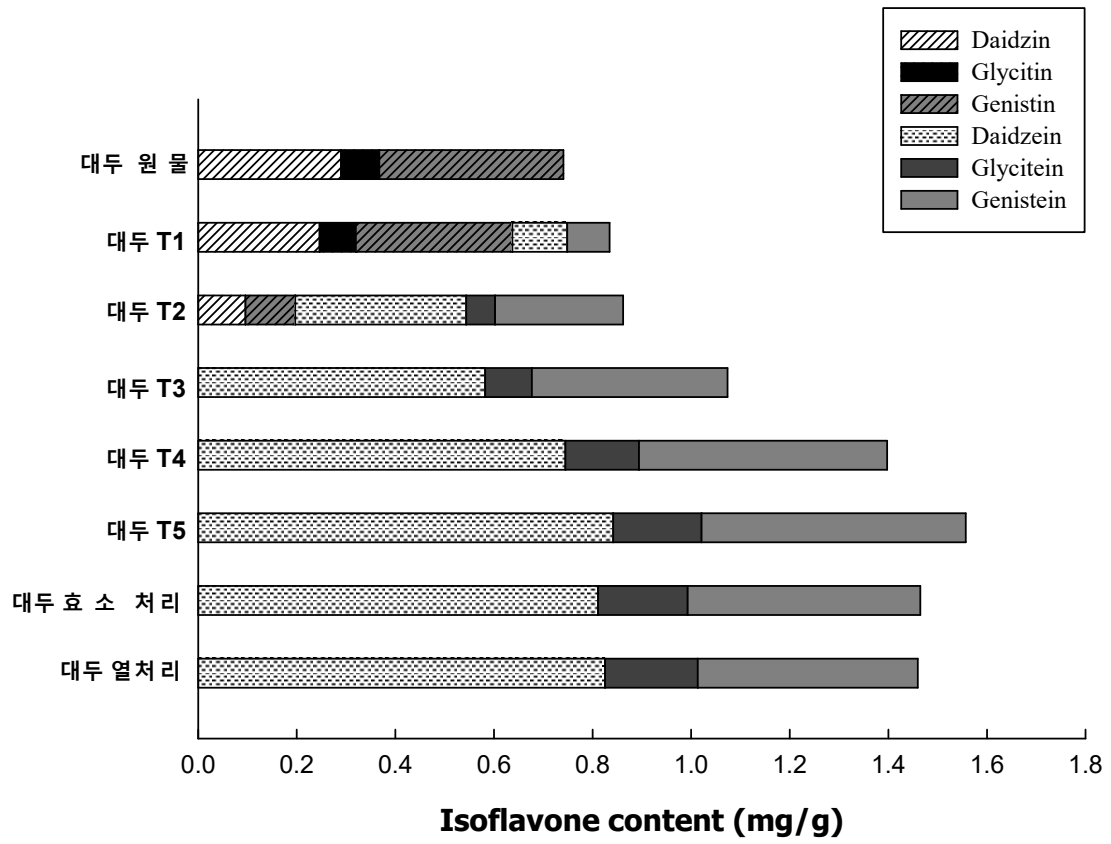


그림 66. 대두(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분의 함량 변화

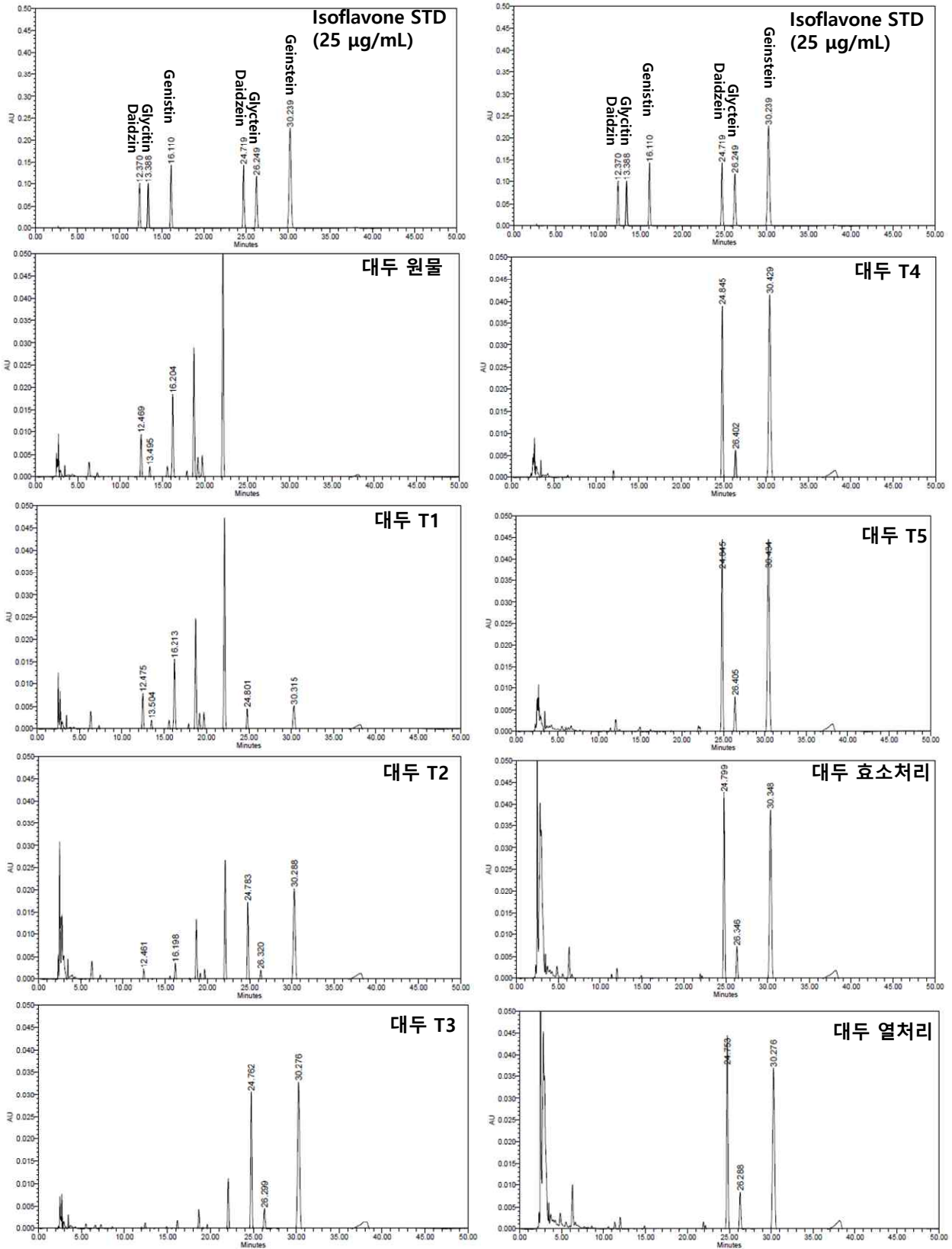


그림 67. 대두(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분 분석 크로마토그램



(2) 제 1협동기관 결과

50L 규모의 발효조에서 대두(생물전환)산물의 생산공정 표준화를 위하여 생산공정 단계에 따라 시료를 채취하여 1차년도에 확립된 대두(생물전환)산물의 지표성분 분석법을 활용해 지표성분의 변화를 조사하고, 이를 생산공정 표준화에 활용하였다.

대두에는 12종류의 isoflavone 화합물이 존재하는데, 이는 Genistein, Daidzein, Glycitein의 3종의 aglycone과 각 aglycone에 3종류의 배당체(glycosides, malonylglycosides, acetylglycosides) 들이 있다. 분석 결과, 대두(생물전환)산물의 isoflavone의 HPLC 분석 결과, 원물에서는 4종의 isoflavone 배당체가 주요 peaks로 존재하며, 이외에도 5종의 isoflavone 배당체가 작은 peak들로 존재하고 있음을 확인하였다. 생물전환 발효공정이 진행되면서 배당체에서 비배당체로 전환이 이루어지며 T4단계에서 전환이 모두 완료되었음을 확인하였다. 생물전환이 완료된 후 검출되는 isoflavone 비배당체 성분은 Daidzein, Glycitein, Genistein 3성분으로, 이들 3성분을 대두(생물전환)산물의 지표성분으로 설정한 바 있다. 원물에 대한 isoflavone 배당체 성분 분석에 있어서는 4개의 주요 peak 중 2개는 Daidzin과 Genistin으로 확인되었으며, 작은 peak 중 1개는 Glycitin으로 확인되었다. 확인된 성분들만을 비교하였을 때 생산공정 종료 후 총 이소플라본 함량은 원물대비 최종산물에서 3배 이상 증가한 것으로 나타났다. 또한 12종의 isoflavone 중 성분이 확인된 6종의 isoflavone의 retention time은 Daidzin 14.624분, Glycitin 15.802분, Genistin 18.794분, Daidzein 28.416분, Glycitein 30.177분, Genistein 35.324분으로 확인되었다.

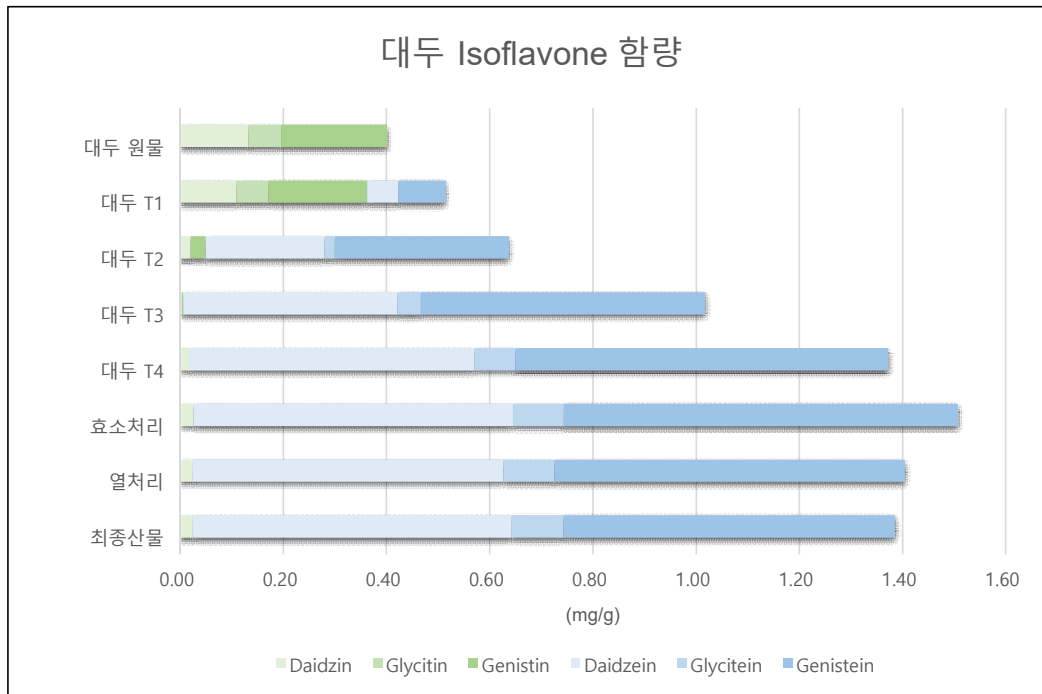


그림 68. 50L 규모의 발효조에서 생산된 대두(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분의 함량 변화 조사

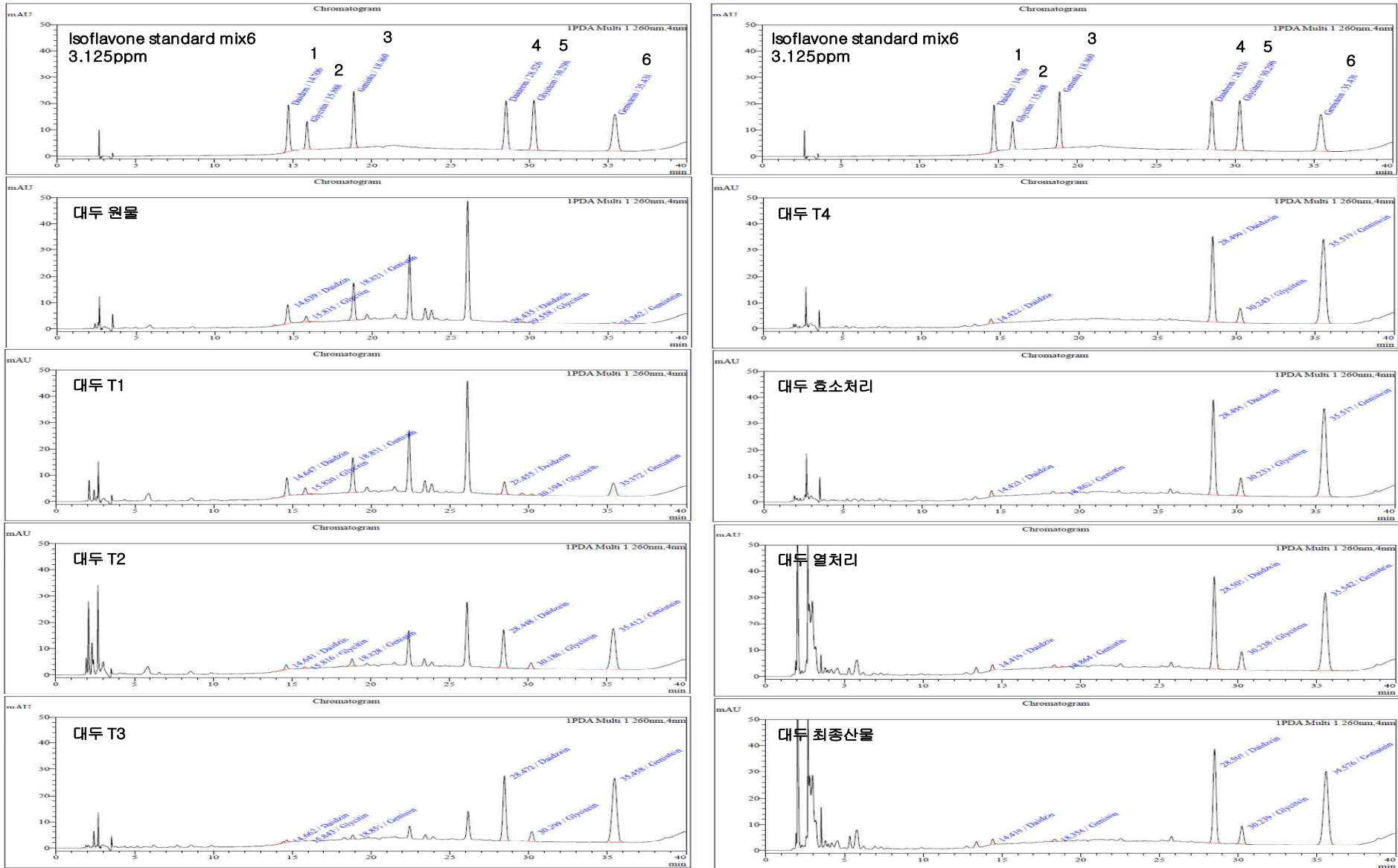


그림 69. 50L 규모의 발효조에서 생산된 대두(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분 분석 크로마토그램

## 나. 생산단계별 시료의 Bioassay

대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 특성에 있어서 대식세포의 배양상태를 보다 안정적으로 유지된 상태에서 NO 생성을 측정하는 Bioassay 방법이 1차년도에 확립됨에 따라 이를 활용하여 면역활성 역가를 측정하고, 이를 50L 규모의 발효조에서 대두(생물전환)산물의 생산공정 표준화에 활용하였다.

대두(생물전환)산물의 생산공정 단계에 따른 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과, 대두(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>은 1/2 µg/ml 농도 이하로 생산공정 단계가 진행될 수록 면역활성이 안정적으로 증가하는 결과를 확인함으로써 50L 규모에서의 대두(생물전환)산물의 생산공정이 안정적으로 표준화 되었음을 확인하였다.

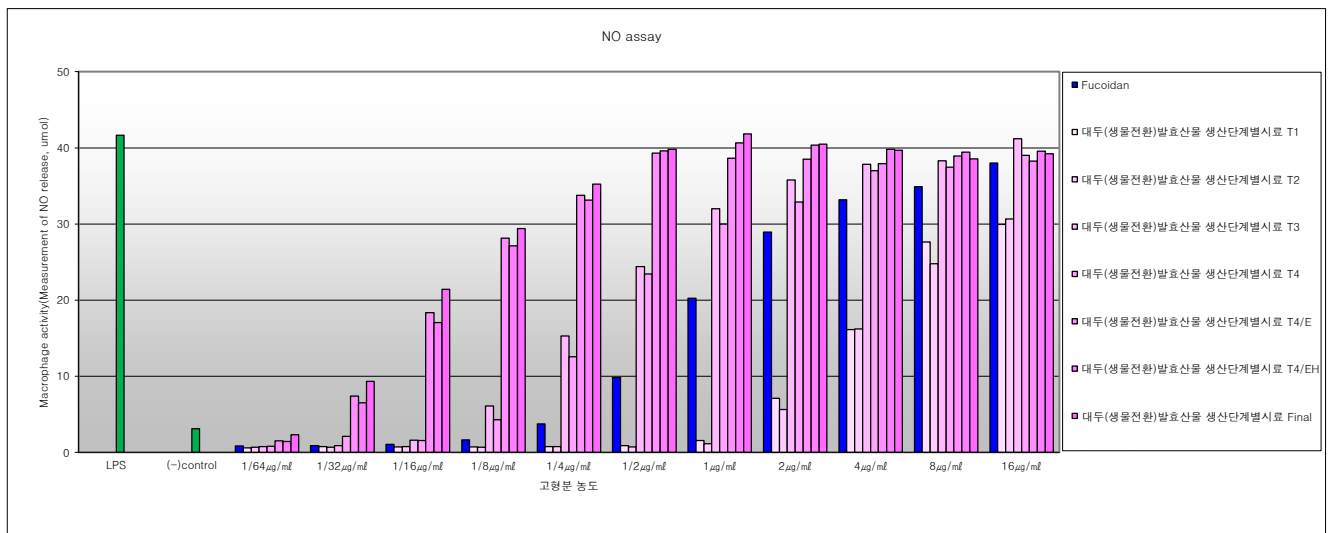


그림 70. 50L 규모의 발효조에서 생산된 대두(생물전환)산물의 생산공정 단계별 대식세포 활성화능 측정

## 5. 50L 규모에서의 생산공정 validation

### 가. 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

표준화된 생산공정의 반복 재현성을 확인하기 위하여 50L 규모의 발효조에서 대두(생물전환)산물의 3반복 시험생산을 실시하여 생산하였으며, 대두(생물전환)산물의 생산 균일성을 검증하기 위하여 면역활성 역가를 측정하였다.

대두(생물전환)산물의 3반복 시험생산 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과, 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>은 2 µg/ml로 확인되었다.

3반복 시험생산을 통해 생산배치에 따른 지표성분 조사에 있어서는 원물의 원산지에 따른 차이는 물론 생물전환공정에 따른 차이가 나타나 면역활성 역가 조사에 있어서 배치별로 약간의 차이는 있었지만 일정한 범위 내에서 면역활성 수준을 유지함을 확인함으로써 50L 규모 발효조에서의 대두(생물전환)산물의 생산공정의 균일성 검증을 완료하였다.

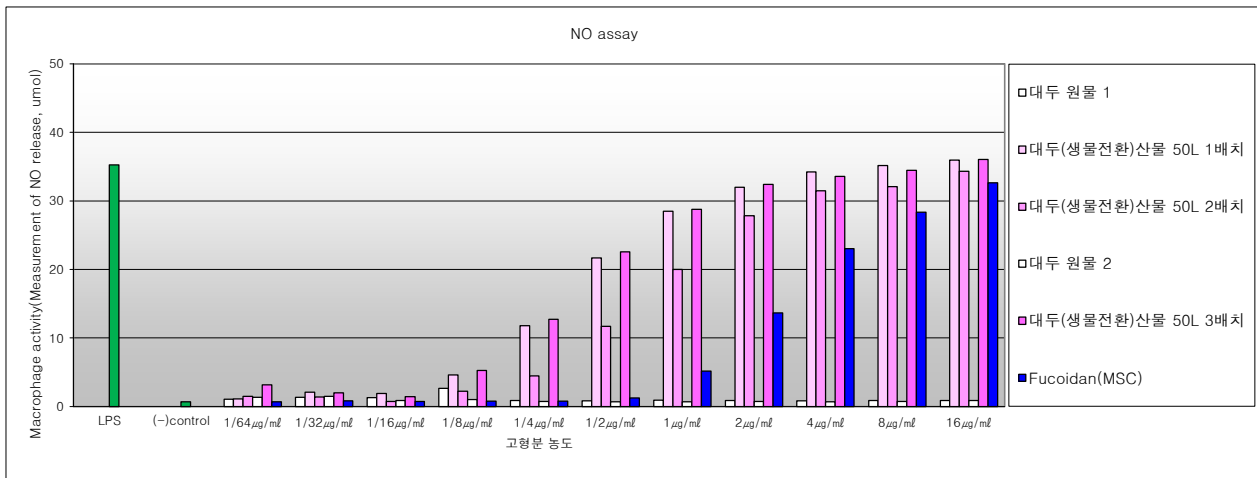


그림 71. 50L 발효조에서 3반복 시험생산된 대두(생물전환)산물의 대식세포 활성화능 평가

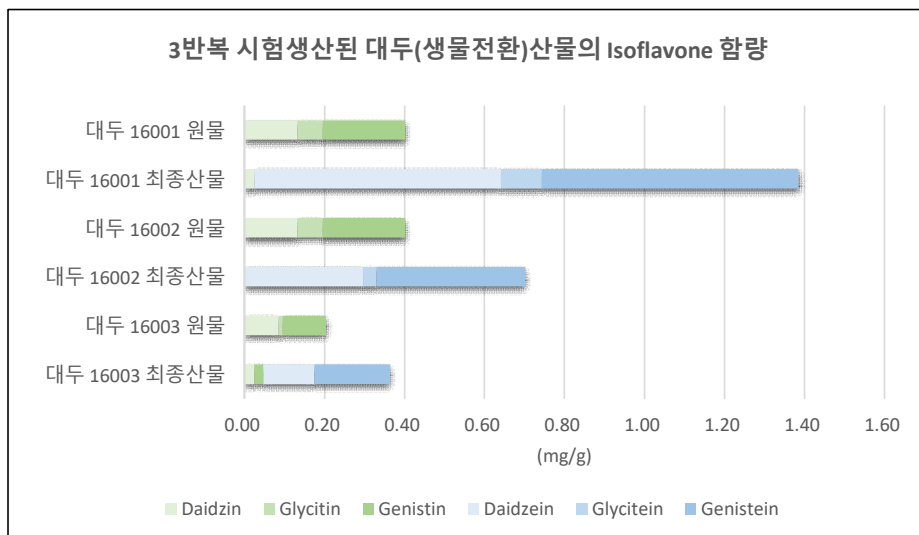


그림 72. 50L 발효조에서 3반복 시험생산된 대두(생물전환)산물의 지표성분 함량 조사

## 6. 500L 규모에서의 생산공정 scale-up 확립

앞선 연구에서 진행되었던 50L 발효조에서 3반복 시험생산을 통해 생산 균일성이 검증된 생산공정을 바탕으로, 본 과제 3차년도 연구목표에 해당하는 500L 규모의 발효조에서 생산공정 scale-up을 진행하였다. 500L 규모의 발효조에서 대두박으로부터 대두박(생물전환)산물을 생산하는 생산공정이 안정적으로 확립되었는지 확인하기 위하여 대두박(생물전환)산물을 시험생산 하였으며, 생산공정에 따른 시료를 채취하여 면역활성 역가를 측정하였다.

대두박(생물전환)산물의 생산공정 단계에 따른 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과,

대두박(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>은 1/4 µg/ml 농도 이하로 확인되었다.

Scale-up된 500L 규모의 발효조에서 생산공정 단계가 진행될수록 면역활성이 안정적으로 증가하는 결과를 확인함으로써 500L 규모에서의 대두박(생물전환)산물 생산공정 scale-up이 안정적으로 확립되었음을 확인하였다.

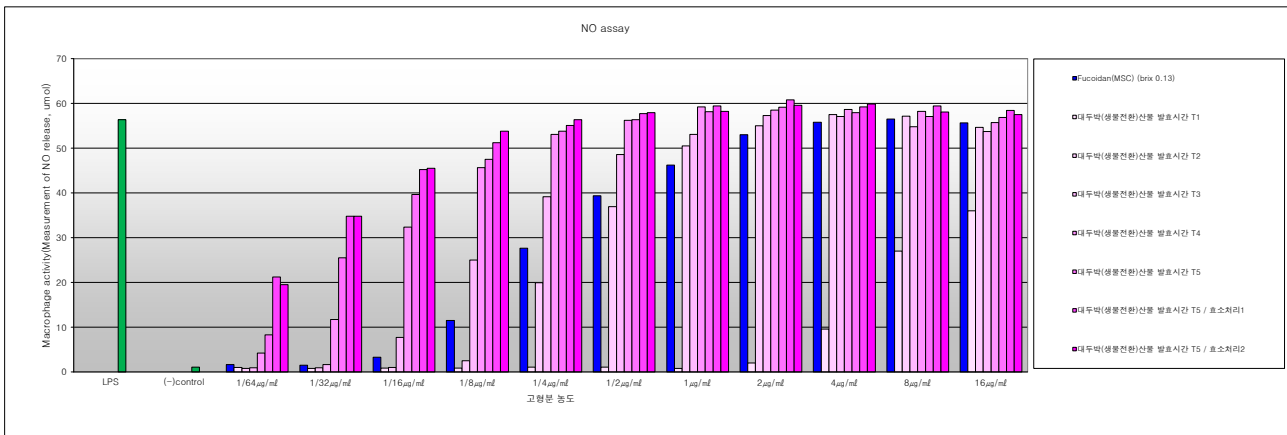


그림 73 500L 규모에서 생산된 대두박(생물전환)산물의 생산공정 단계별 시료의 대식세포 활성화능 평가

## 4절. 참깨의 고기능성/고부가가치 소재 개발

### 1. 생산공정 표준화를 위한 면역활성 평가

#### 가. 깨 종류별 면역활성 조사

경남 거창에서 생산된 3종(검정깨, 들깨, 참깨)의 깨를 구입하여 대식세포 활성화 실험을 진행한 결과 깨 종류에 상관없이 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

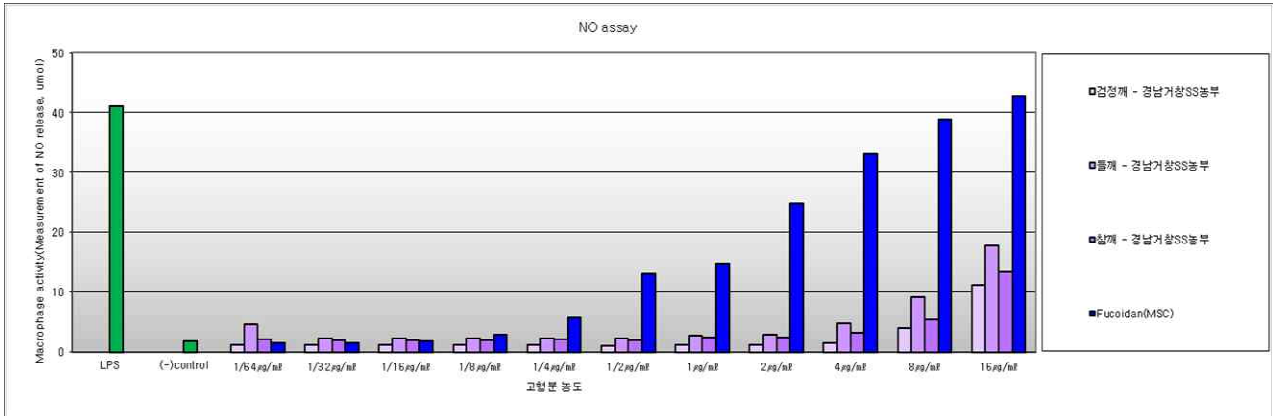


그림 74. 깨 종류별 면역활성 역가 조사

#### 나. 깨 종류별 (생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가

경남 거창에서 생산된 3종(검정깨, 들깨, 참깨)의 깨 원물에 대한 깨(생물전환)산물을 생산하였다. 깨(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1~2 μg/ml로 원물에 비해 매우 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

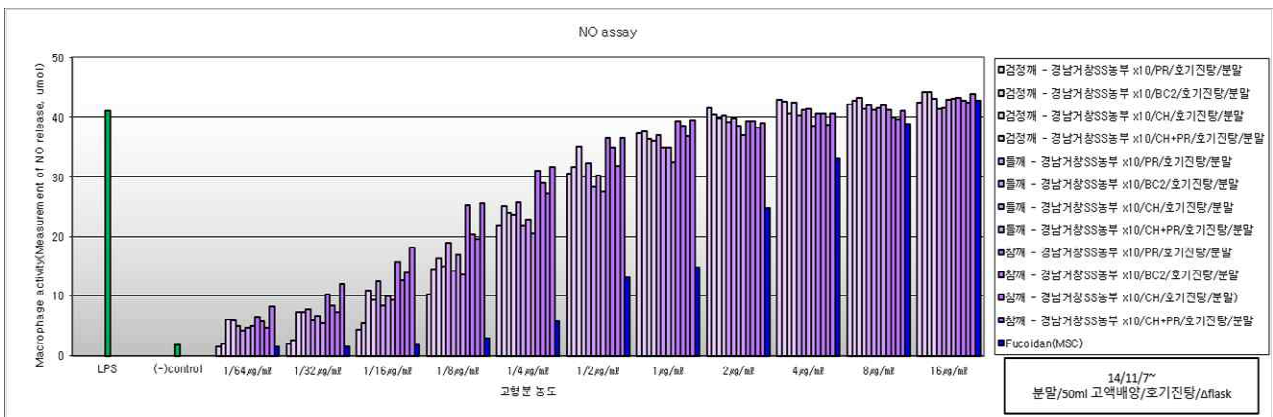


그림 75. 깨 종류별 (생물전환)산물의 면역활성 역가 평가

다. 생산지별 참깨 면역활성 조사

충북 괴산 2곳, 경북 예천, 경남 거창에서 생산된 참깨 4종을 구입하여 대식세포 활성화 실험을 진행한 결과, 생산지에 상관없이 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

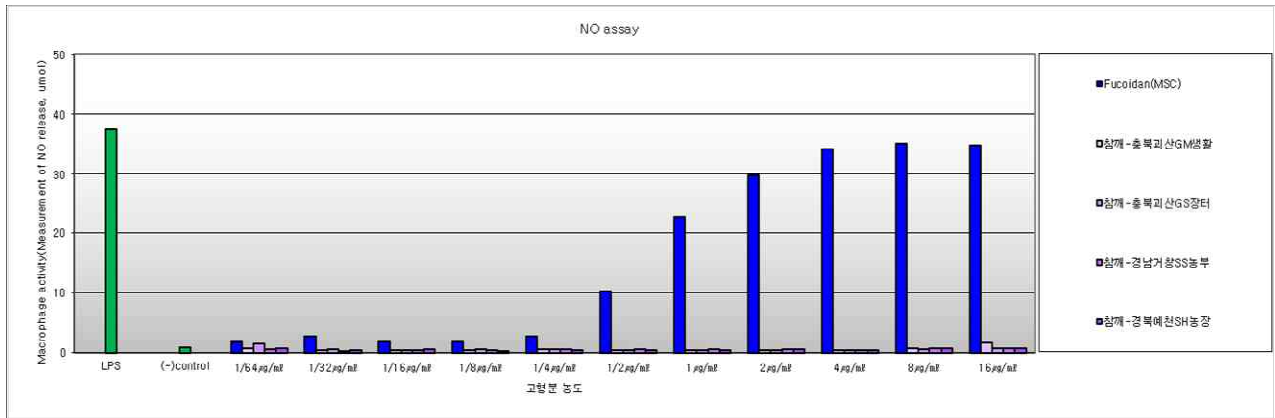


그림 76. 생산지별 참깨에 대한 면역활성 역가 조사

라. 생산지별 참깨(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가

충북 괴산 2곳, 경북 예천에서 생산된 참깨 3종을 구입하여 생물전환조건에 따른 참깨(생물전환)산물을 생산하였다. 참깨(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/4 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

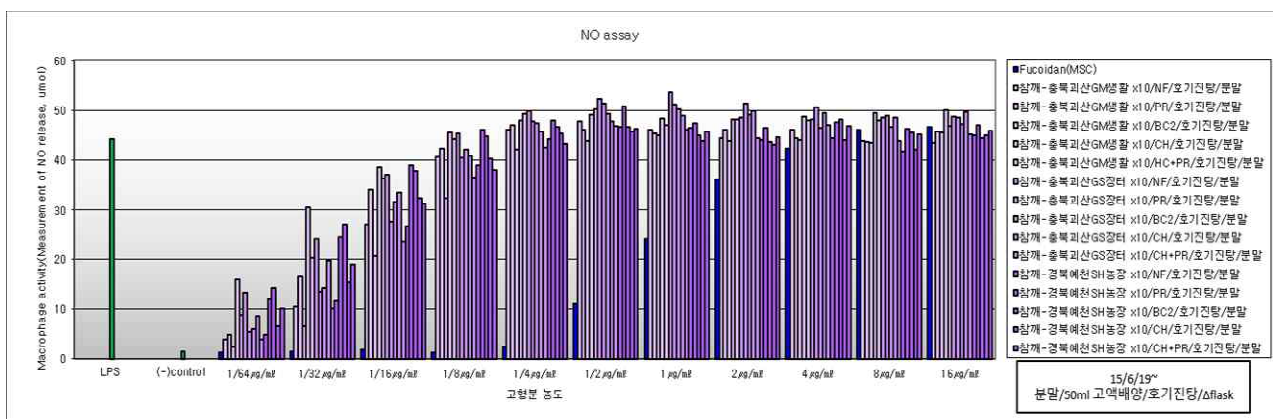


그림 77. 생산지별 참깨(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 역가 평가

마. 경남 거창 참깨(생물전환)산물의 생물전환 조건에 따른 면역활성 평가

경남 거창에서 생산된 3종(검정깨, 들깨, 참깨)의 깨 원물에 대한 깨(생물전환)산물을 생산하였다. 깨(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1~2 µg/ml로 원물에 비해 매우 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

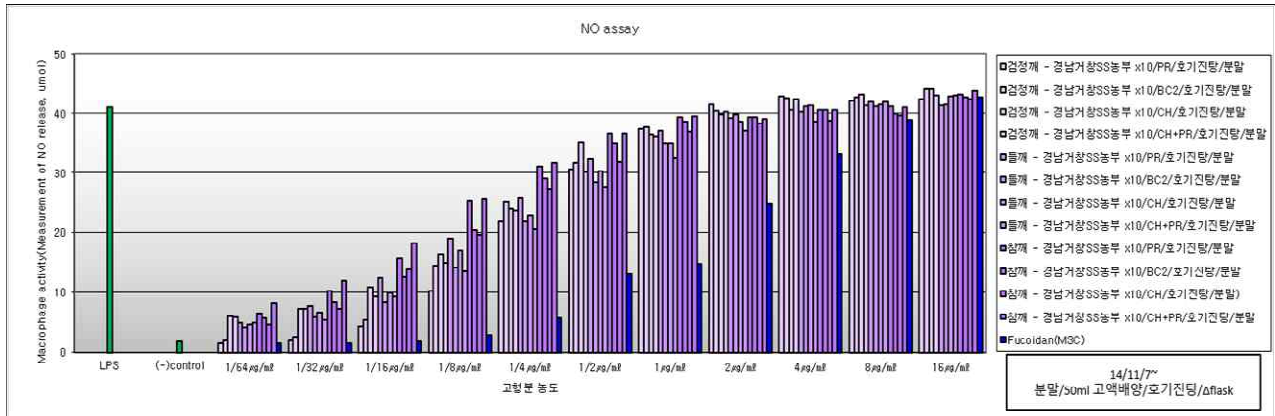


그림 78, 깨 종류별 (생물전환)산물의 면역활성 역가 평가



바. 생산지별 참깨(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가

참깨 원물, H탈지공정을 거친 H탈지참깨 원물, E탈지공정을 거친 E탈지참깨 원물의 각 4중(충북 괴산 2곳, 경남 거창, 경북 예천)에 대하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 모든 조건에서 면역활성 역가를 확인할 수 없었다.

참깨(생물전환)산물, H탈지공정을 거친 H탈지참깨(생물전환)산물, E탈지공정을 거친 E탈지참깨(생물전환)산물의 각 4중(충북 괴산 2곳, 경남 거창, 경북 예천)을 2반복 생산하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과, H탈지공정을 거친 H탈지참깨(생물전환)산물, E탈지공정을 거친 E탈지참깨(생물전환)산물 모두 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/4 μg/ml로 탈지공정을 거치지 않은 참깨(생물전환)산물과 비슷한 면역활성 역가를 나타냈다.

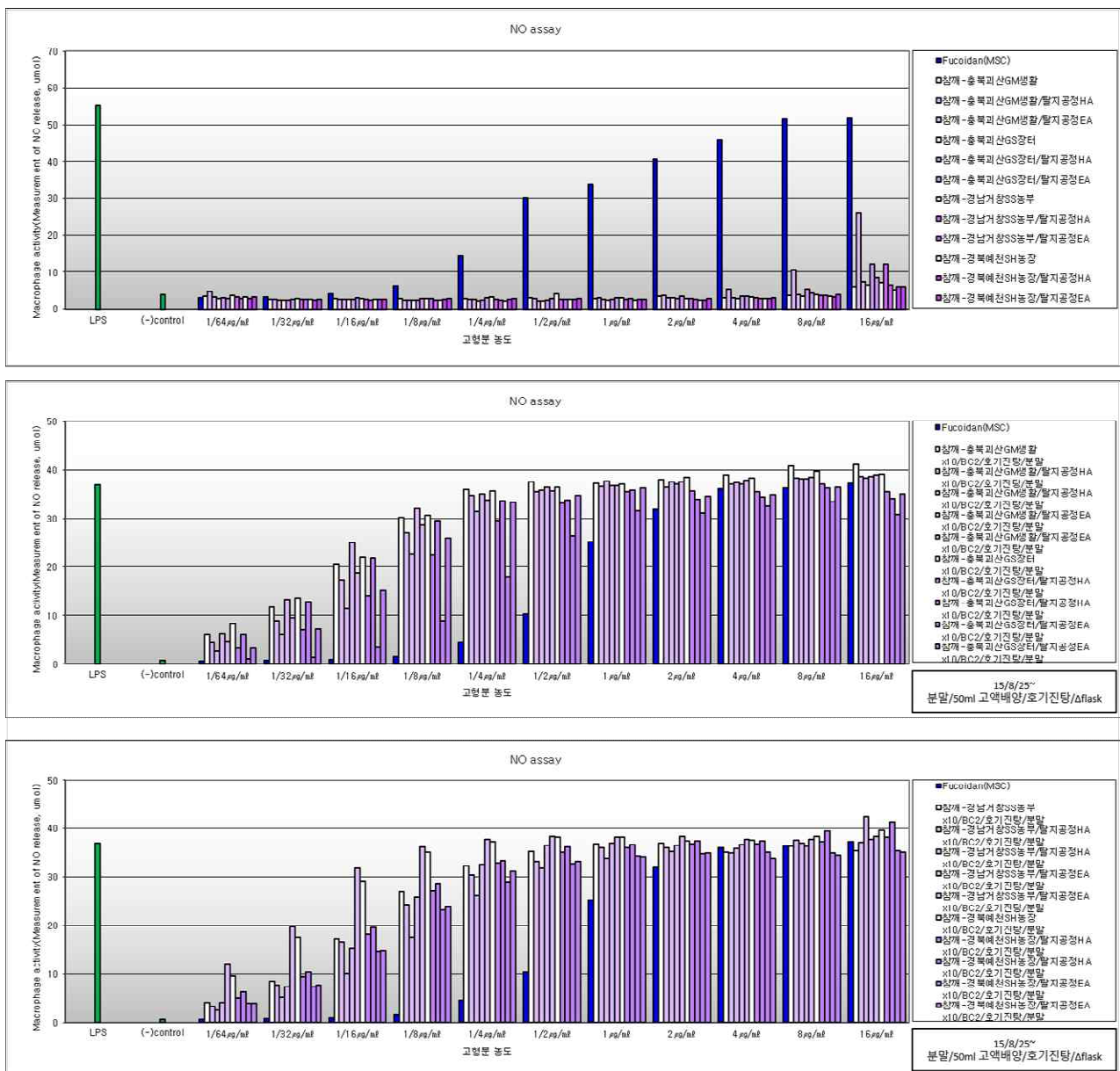


그림 79, 생산지별 참깨(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 역가 평가

### 사. 품종별 참깨 면역활성 조사

농진청으로부터 제공받은 구입한 품종별 생참깨 5종(강안, 강흑, 평안, 진백, 진율)에 대한 대식세포 활성화 실험을 진행한 결과, 품종에 상관없이 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

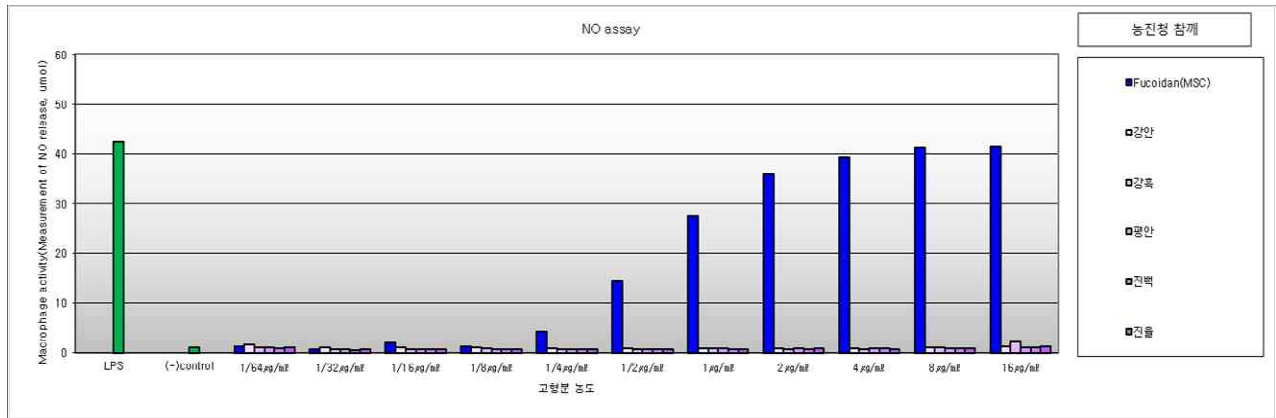


그림 80, 품종별 참깨에 대한 면역활성 역가 조사

### 아. 품종별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 품종별 5종(강안, 강흑, 평안, 진백, 진율)의 생참깨 원물에 대해 (생물전환)산물을 생산하였다. 생참깨(생물전환)산물은 품종에 따라 면역활성 역가에 차이를 보였고 그 중 진율, 진백 품종의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/4 µg/ml로 매우 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

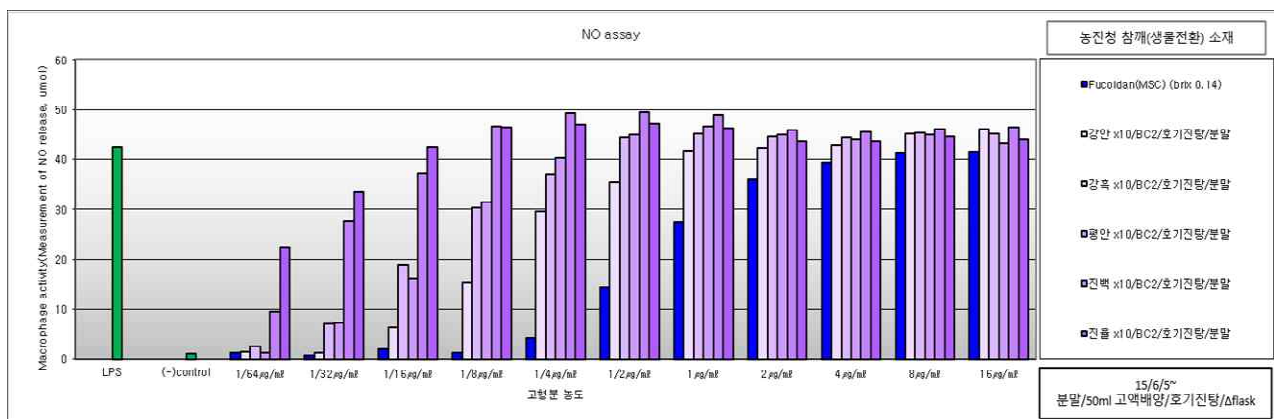


그림 81, 품종별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 역가 평가

자. 3반복 생산에서 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가 : 효능 및 독성시험용 소재 생산

(1) 3반복 생산에서 생산지별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가

생산지별 참깨 4종(충북 괴산 2곳, 경남 거창, 경북 예천)에 대해 BC2/CP 생물전환조건으로 참깨(생물 전환)산물을 3반복 생산하였다. 참깨(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/8~1/4 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

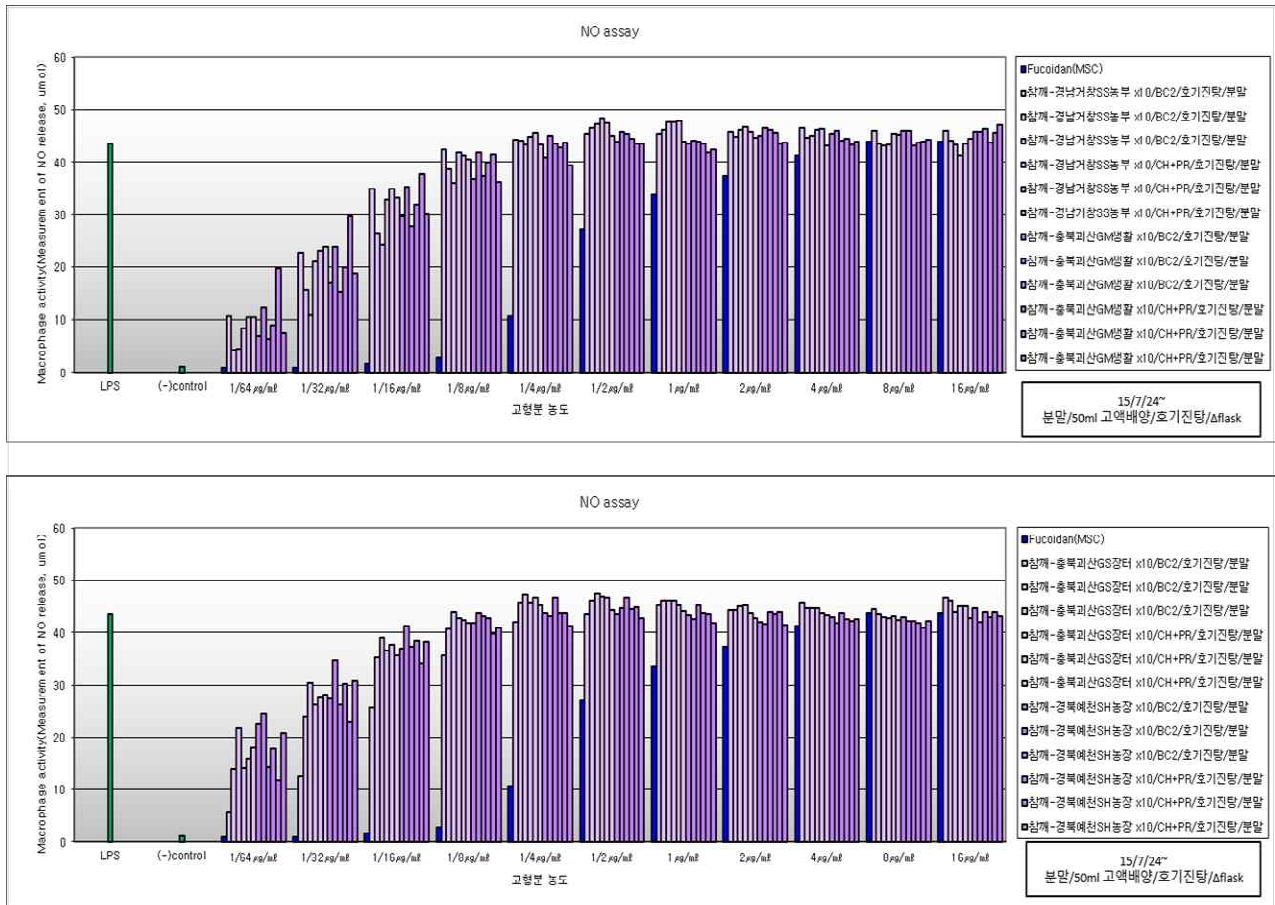


그림 82, 생산지별 참깨(생물 전환)소재의 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

(2) 3반복 생산에서 품종별 참깨(생물전환)산물의 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 품종별 참깨 5종(강안, 강흑, 평안, 진백, 진율)에 대해 BC2 생물전환조건으로 참깨(생물전환)산물을 3반복 생산하였다. 참깨(생물전환)산물의 면역활성 역가는 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/4~1/2 µg/ml로 높은 면역활성 역가를 나타냈다.

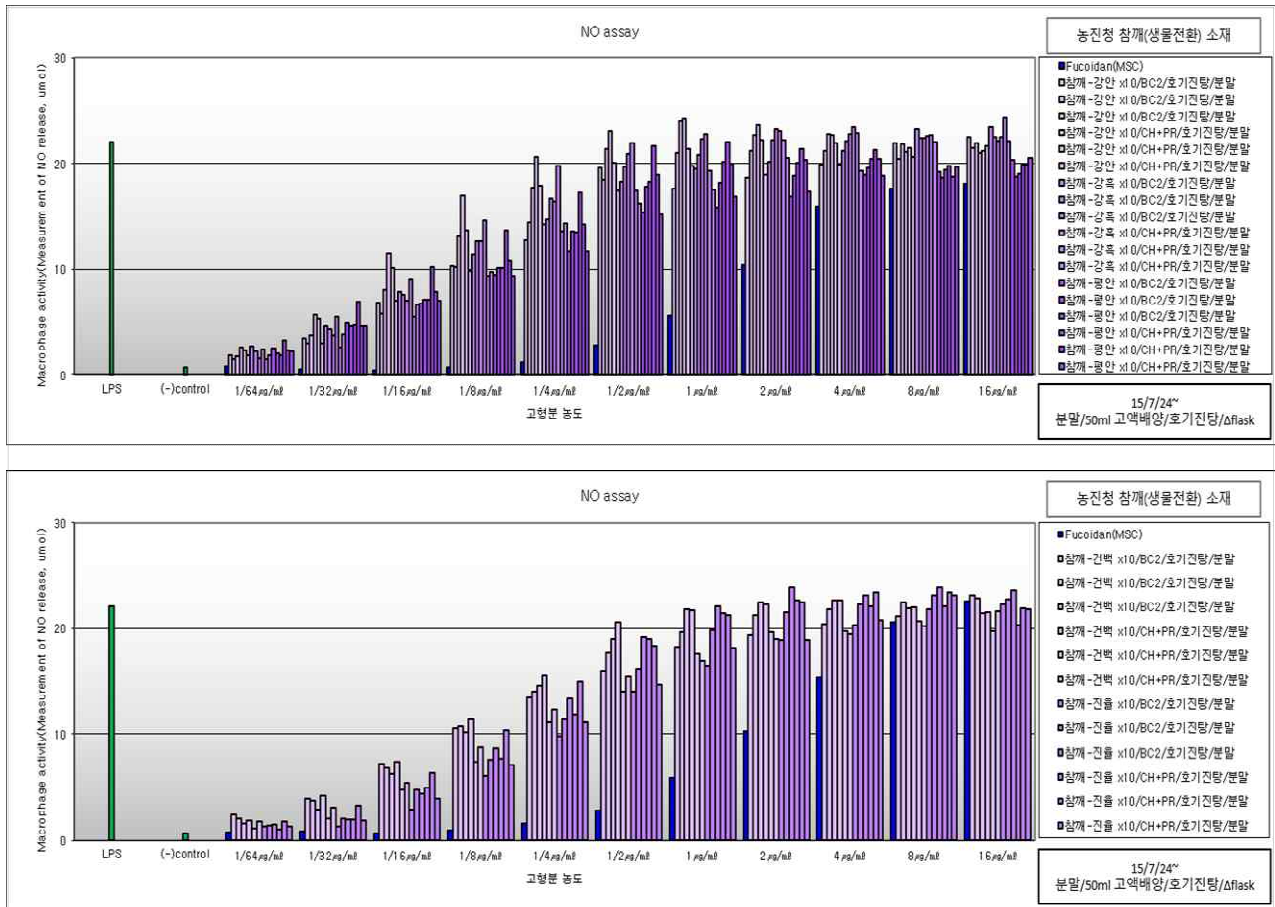


그림 83, 품종별 참깨(생물전환)산물의 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

(3) 3반복 생산에서 진을 품종의 참깨(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 면역활성 평가

농진청으로부터 제공받은 진을 품종의 참깨 원물과 H탈지공정 및 E탈지공정을 통해 생산된 진을 품종의 탈지참깨 원물에 대해 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 모든 조건에서 면역활성 역가를 확인할 수 없었다.

반면, 진을 품종에 있어서 H탈지공정을 거친 H탈지참깨(생물전환)산물, E탈지공정을 거친 E탈지참깨(생물전환)산물을 4반복 생산하여 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 참깨(생물전환)산물, E탈지공정을 거친 E탈지참깨(생물전환)산물은 면역활성 역가가 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/4~1/2 µg/ml로 비슷하였고 H탈지공정을 거친 H탈지참깨(생물전환)산물은 역가가 MEC<sub>100</sub>으로 대략 1/2~1 µg/ml로 2배 정도 낮은 면역활성 역가를 나타냈다.

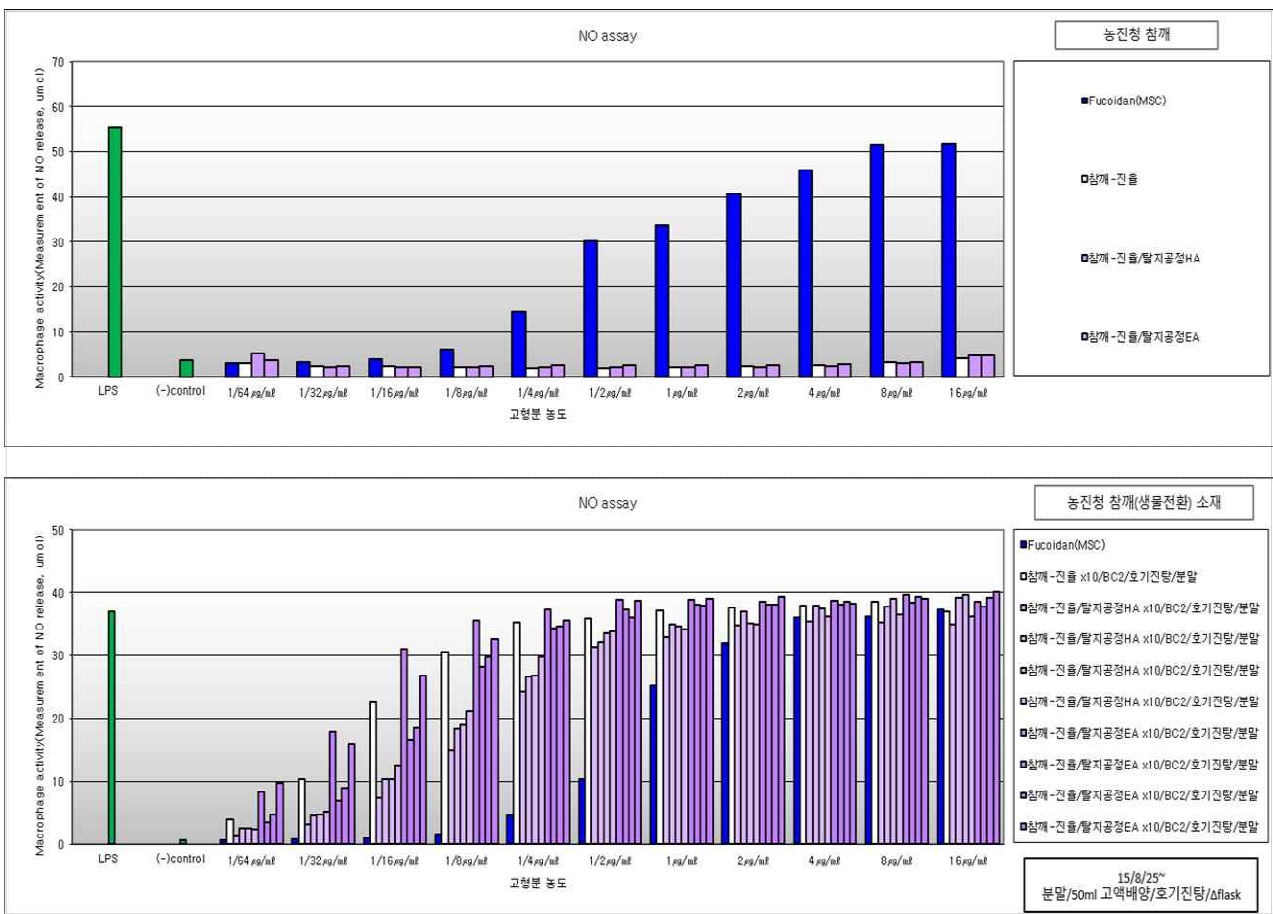


그림 84, 진을 품종의 참깨(생물전환)산물의 탈지공정에 따른 3반복 생산에서의 면역활성 역가 평가

## 2. 참깨(생물전환)산물의 지표성분 설정 및 분석법 개발

### 가. 개발소재의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건 확립

#### (1) 20배수 3회연속 추출

참깨가 함유하고 있는 지표성분을 최대로 추출할 수 있는 조건을 확인하기 위해 추출배수를 20배수로 고정하고 3회연속추출을 실시하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol 및 hexane을 각각 사용하였다. 각각의 시료를 1 g씩 유리병에서 정밀히 측정하고 HPLC grade methanol 및 hexane을 20 ml씩 각각 넣어주었다. 유리병을 1시간동안 상온에서 sonication하여 지표성분을 추출하였다. Sonication후 4000 rpm, 3분간 원심분리하여, 잔사와 분리된 상등액을 조심히 따라 보관하고, 잔사에 새 용매를 같은 양 넣어 동일한 방법으로 추출하였다. 총 3회 연속추출하였다. 분리된 상등액은 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

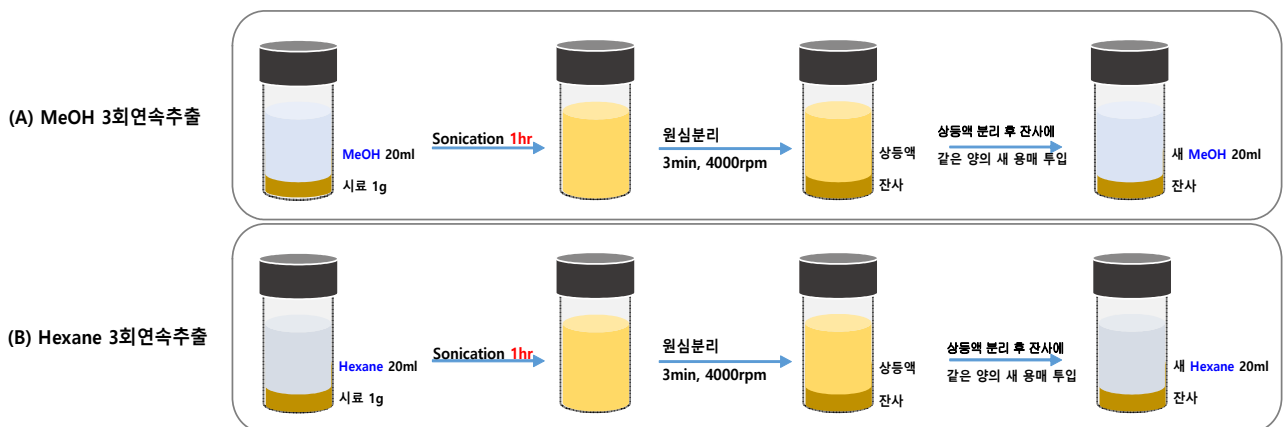


그림 85, 20배수 3회연속추출 공정도



참깨의 지표성분 분석에 있어서 실험조건은 주관기관인 강원대학교(이옥환 교수님 Lab)에서 확립한 조건을 그대로 사용하였다. 참깨를 methanol 및 hexane으로 각각 추출 시 유사한 지표성분 패턴양상을 보였다.

먼저 참깨의 표준물질인 sesamol, sesamin, sesamolin(이하 리그난 3종)은 높은 분리도를 보이며 분석됨을 확인하였다.

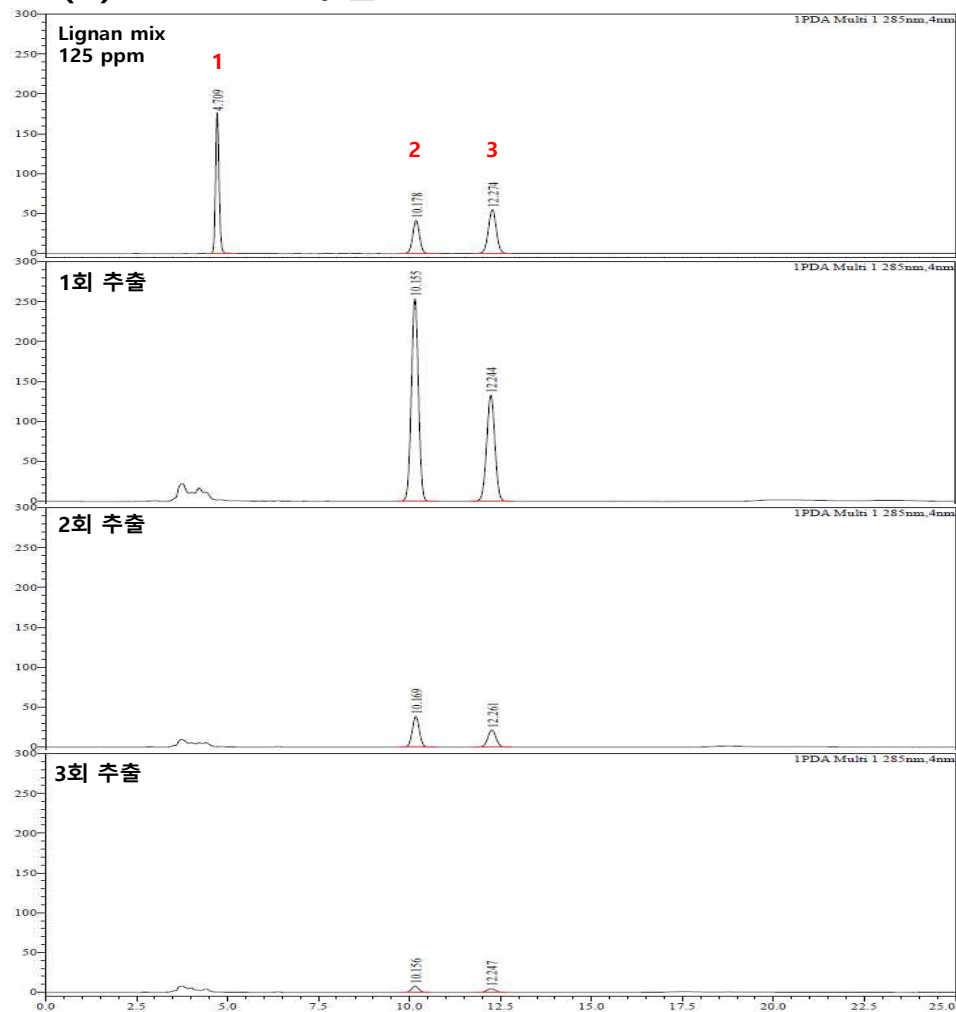
그림 84는 참깨 methanol추출 상등액과 참깨 hexane추출 상등액을 HPLC로 분석한 크로마토그램 결과이다. 참깨 methanol추출액과 hexane추출액 모두에서 sesamol은 검출되지 않았고 sesamin, sesamolin 두 물질은 좋은 분리도를 보이며 분석됨을 확인하였다. Methanol 3회연속추출에 있어서 1회 추출 시 84.2%, 2회 추출 시 13.1% 3회 추출 시 2.6%의 비율로 추출횟수가 증가할수록 추출되는 정도가 확연히 줄어드는 것을 확인하였고, hexane 3회연속추출에 있어서 1회 추출 시 95.6%, 2회 추출 시 3.1% 3회 추출 시 1.3%의 비율로 추출횟수가 증가할수록 추출되는 정도가 확연히 줄어드는 것을 확인하였다. 참깨 추출의 경우 1회 추출에 있어서는 hexane추출이 methanol추출보다 더 높은 비율로 추출됨을 확인하였으나, 3회 연속추출 완료 후 총 추출량을 비교하였을 때 methanol 총추출량이 hexane 총추출량보다 1.12배 더 많았다.

결론적으로 참깨 20배수 3회연속추출 실험은 추출용매로 hexane보다 methanol이 더 적합하고, 20배수로 추출 시 2회 이상을 추출해야 97.3%의 추출율을 확보할 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 31. 참깨 20배수 3회연속추출 결과

참깨 20배수 3회연속추출				
지표성분	Lignan 3종			
추출용매	추출횟수	Area값	Area값 합계	추출 %
Methanol 20배수	1회	5555585		84.2
	2회	864686	6594557	13.1
	3회	174286		2.6
Hexane 20배수	1회	5618448		95.6
	2회	181251	5875340	3.1
	3회	75641		1.3

### (A) Methanol 추출



### (B) Hexane 추출

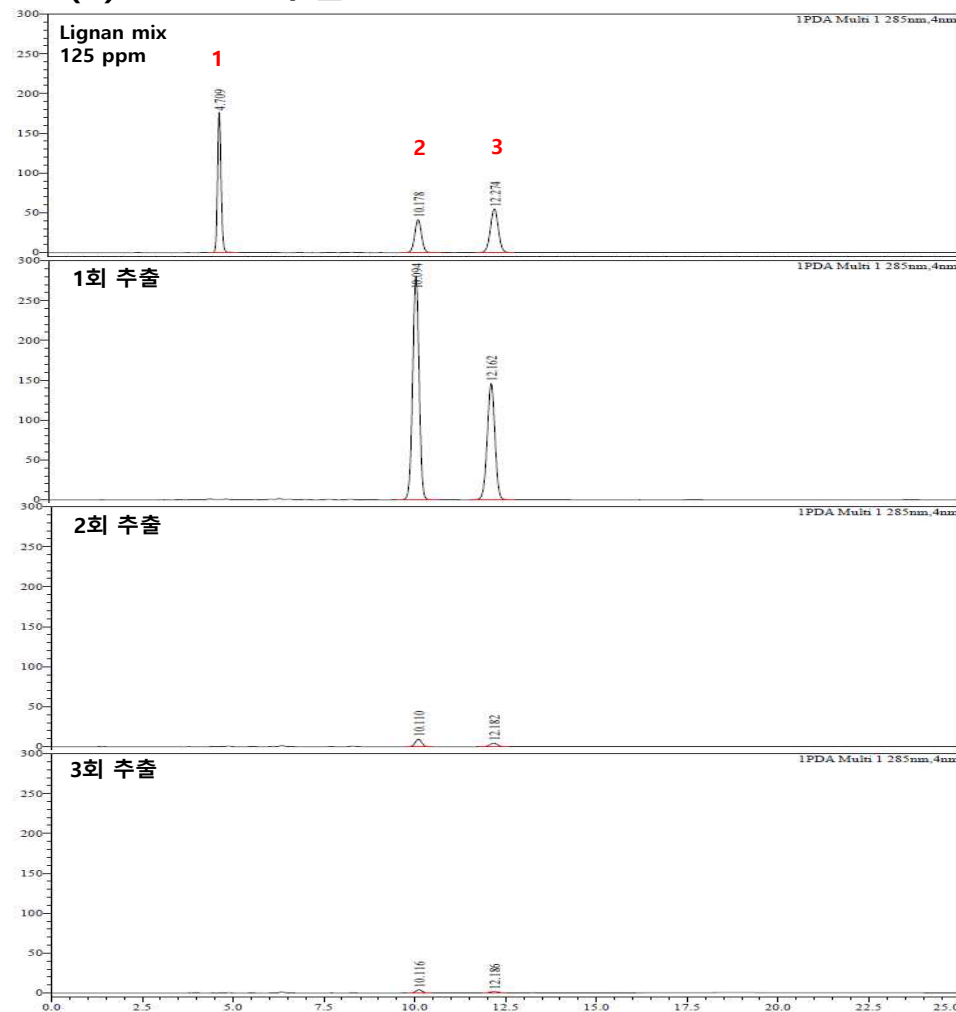


그림 86, 참깨 20배수 3회연속추출 실험 HPLC 크로마토그램  
1.sesamol(4.7min), 2.sesamin(10.0min), 3.sesamol(12.1min)



(2) 추출배수 설정을 위한 실험

참깨의 지표성분 패턴분석을 위한 최적 추출배수 설정을 위해 추출배수에 따른 1회 추출량 조사 실험을 실시하였다. 추출배수는 20배, 50배, 100배로 설정하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol 및 hexane을 각각 사용하였다. 20배수 추출 시 시료 2.5 g, 50배수 추출 시 시료 1 g, 100배수 추출 시 시료 0.5 g을 각각 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 추출용매로 정용하였다. 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication하여 지표성분을 추출하였다. Sonication 후 상온에서 10분간 식힌 후 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

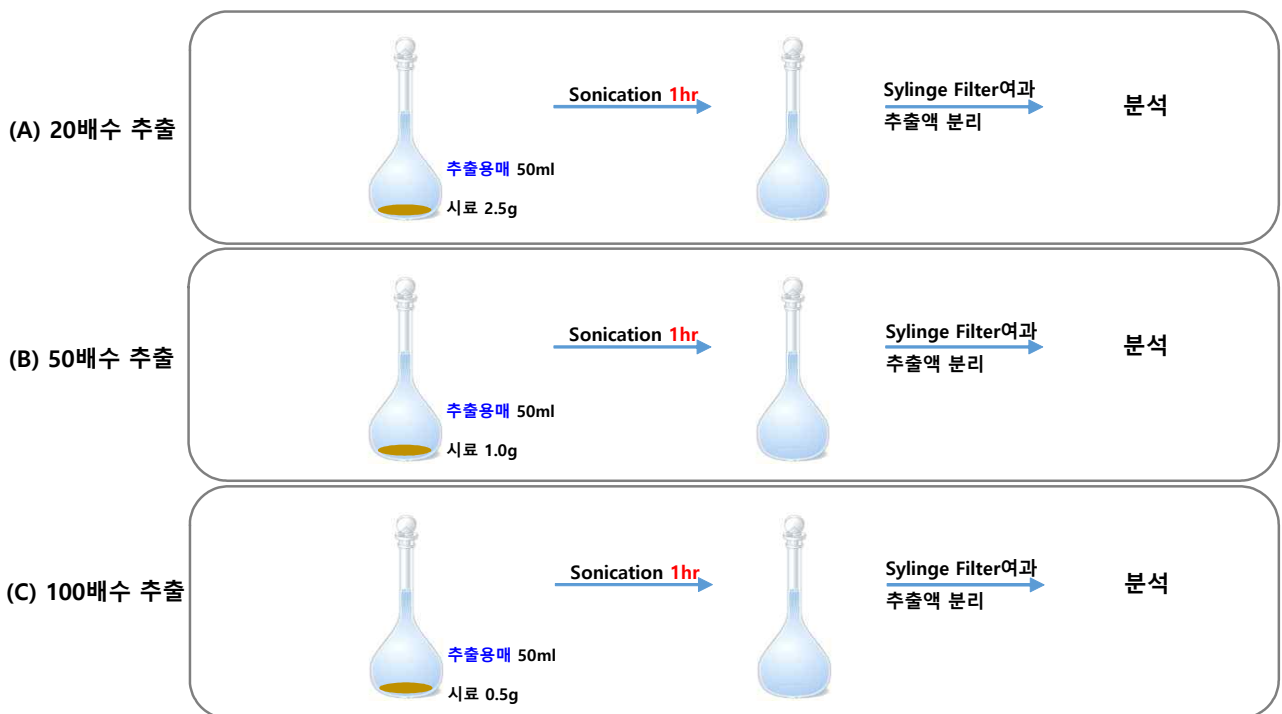


그림 87, 추출배수 설정 실험 공정도

참깨를 methanol 및 hexane으로 각각 추출 시 유사한 지표성분 패턴양상을 보였다.

먼저 참깨의 표준물질인 sesamol, sesamin, sesamolin(이하 리그난 3종) 은 높은 분리도를 보이며 분석됨을 확인하였다.

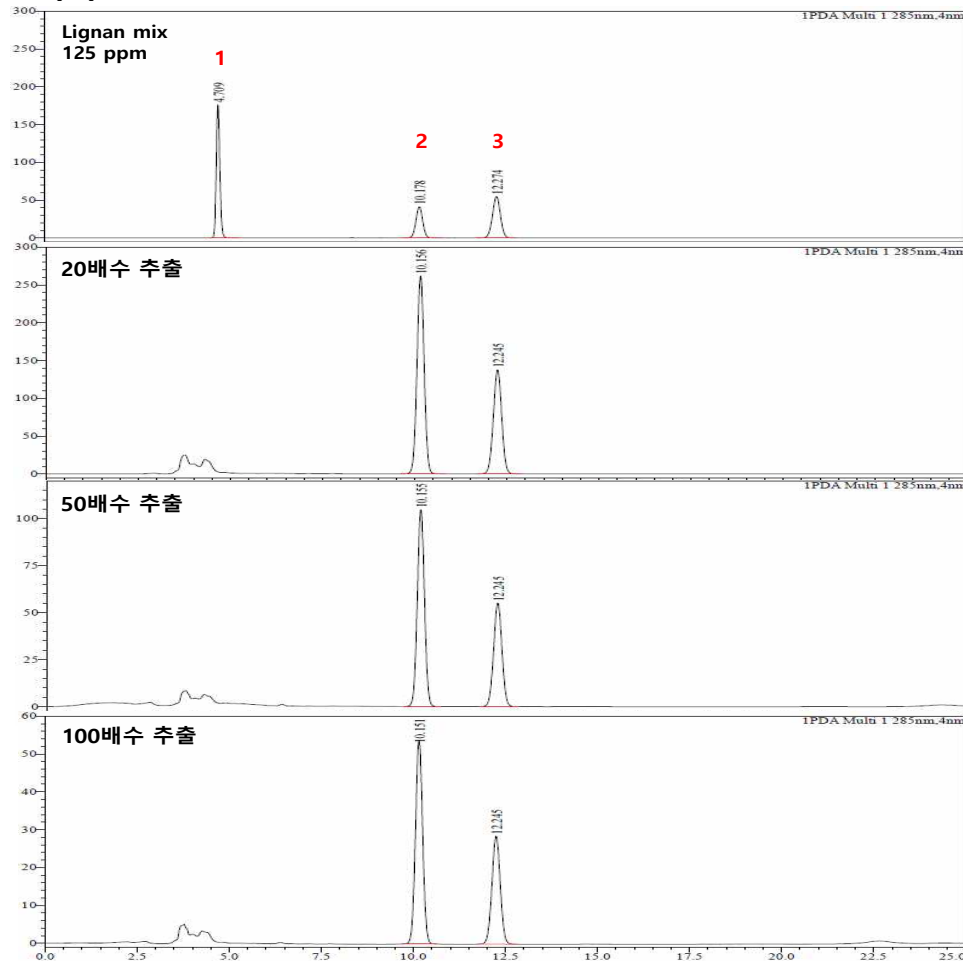
그림 86의 (A)는 참깨 20배수, 50배수, 100배수 methanol추출액을 HPLC로 분석한 크로마토그램 결과이다. 참깨 methanol추출액 및 hexane추출액 모두에서 sesamol은 검출되지 않았고 sesamin, sesamolin 두 물질은 좋은 분리도를 보이며 분석됨을 확인하였다. Methanol 20배, 50배, 100배 추출배수에 따른 1회 추출량 조사 결과 희석배수로 환산한 area값을 비교했을 때 100배수가 가장 높은 추출비율을 보였고, 20배수가 50배수보다 약간 높은 추출량을 보였으나 큰 차이는 없었다. Methanol추출의 결과와는 반대로 Hexane 20배, 50배, 100배 추출배수에 따른 1회 추출비율 조사 결과 희석배수로 환산한 area값을 비교했을 때 20배, 50배, 100배의 순으로 추출배수가 클수록 추출비율이 적게 나타났다. 가장 높은 추출비율을 보인 methanol 100배수와 hexane 20배수의 추출량을 비교 하였을 때 methanol 추출비율이 hexane 추출비율보다 1.07배 더 많았다.

결론적으로 참깨의 추출배수 설정 실험은 추출용매로 hexane보다 methanol이 적합하고, 추출횟수를 1회로 설정 시 100배수 추출에서 가장 추출비율이 높음을 확인할 수 있었다.

표 32. 참깨 추출용매 및 추출배수 설정 결과

참깨 추출용매 및 추출배수 설정					
지표성분		Lignan 3종			
추출용매	추출배수	Area값	단위 환산	같은단위로 환산한	Area값
Methanol	20배	5744443	0.5mg/10ul		11488886
	50배	2296617	0.2mg/10ul	1mg/10ul	11483085
	100배	1186679	0.1mg/10ul		11866790
Hexane	20배	5565722	0.5mg/10ul		11131444
	50배	2204327	0.2mg/10ul	1mg/10ul	11021635
	100배	1068383	0.1mg/10ul		10683830

### (A) Methanol 추출



### (B) Hexane 추출

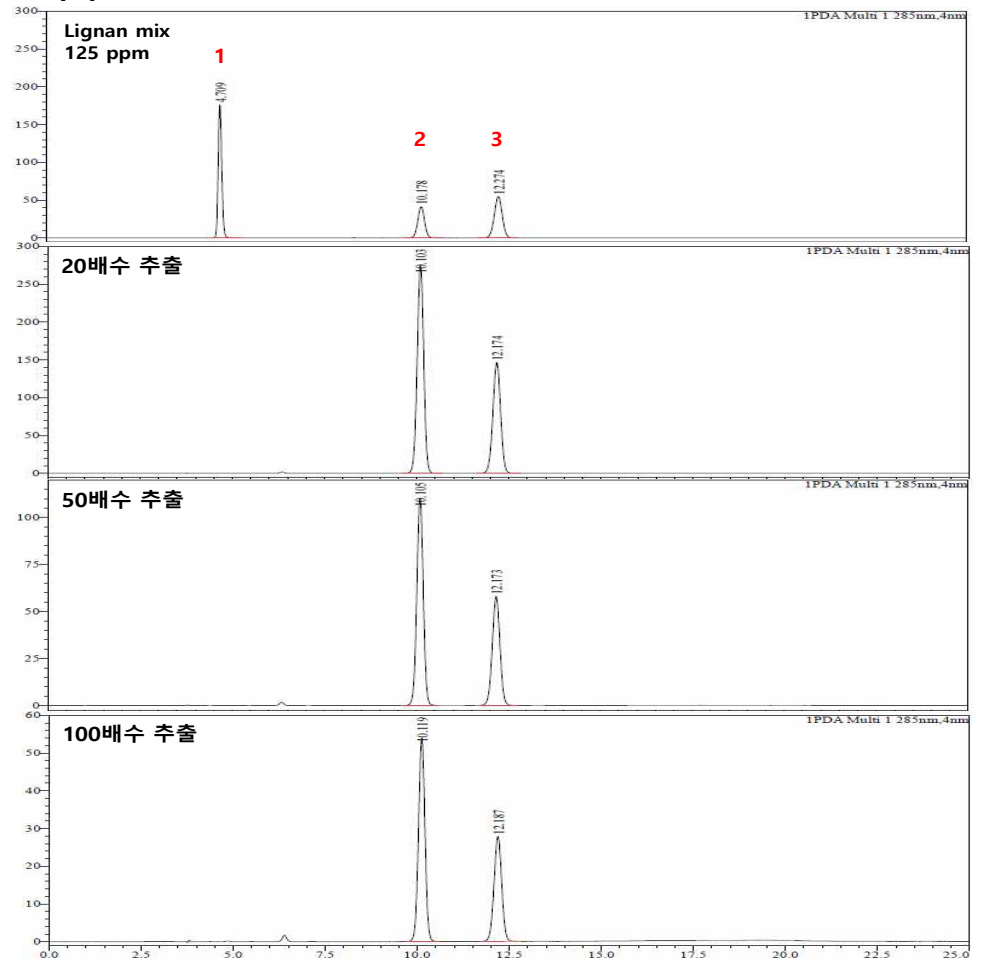


그림 88. 참깨 추출용매 및 추출배수 설정실험 HPLC 크로마토그램

1.sesamol(4.7min), 2.sesamin(10.0min), 3.sesamolol(12.1min)

\* 추출배수에 맞추어 Y축 스케일을 추출배수만큼 확대하여 표시하였음

(3) 100배수 3회연속 추출

앞선 20배수 3회연속추출 실험과 추출배수 설정 실험의 결과를 바탕으로 추출배수를 100배수로 고정하고 3회연속추출을 실시하였다.

추출용매로 HPLC grade methanol을 사용하였다. 시료 0.2 g을 유리병에서 정밀히 측정하고 HPLC grade methanol 20 ml을 넣어주었다. 유리병을 1시간동안 상온에서 sonication하여 추출하였다. Sonication후 4000 rpm, 3분간 원심분리하여 잔사와 분리된 상등액을 조심히 따라 보관하고, 잔사에 새 용매를 같은 양 넣어 동일한 방법으로 추출하였다. 총 3회연속추출하였다. 분리된 상등액은 0.45 um 실린지 필터로 여과 후 분석에 사용하였다.

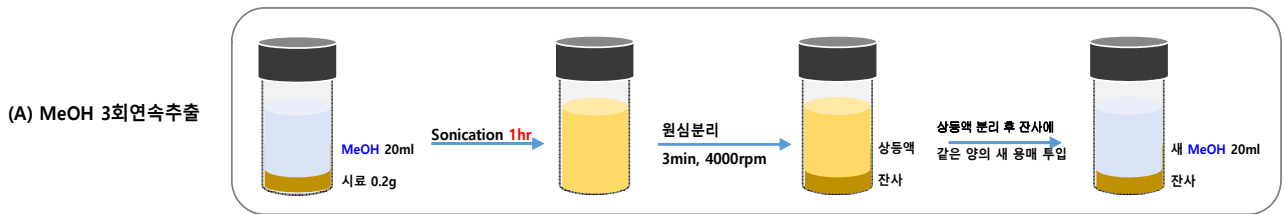


그림 89, 100배수 3회연속추출 공정도

앞선 실험에서 20배수 3회연속추출 실험과 20배수, 50배수, 100배수 추출배수 설정실험의 결과를 비교해 볼 때 20배수보다 100배수 추출이 더 적합함을 확인하였다. 100배수로 추출 시 추출횟수를 설정하기 위한 추가실험이 필요하였기에 확인실험을 진행하였다.

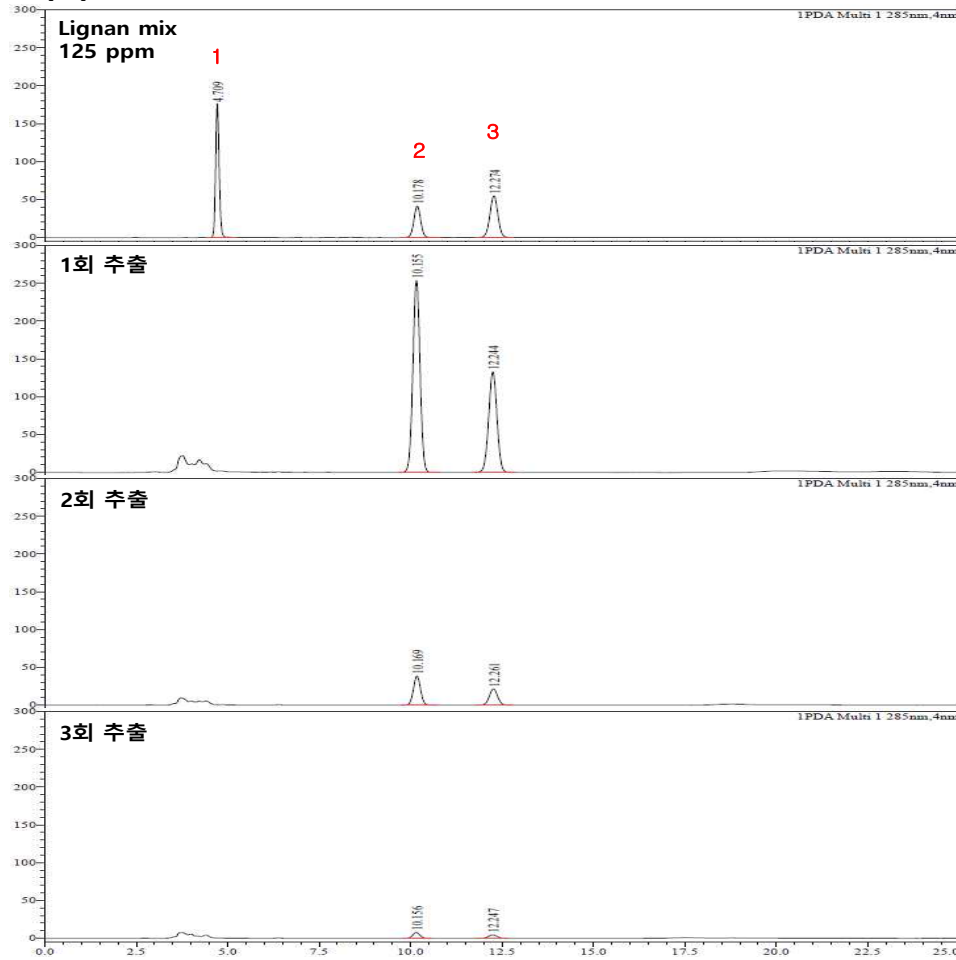
그 결과 참깨 20배수 3회연속추출의 총량보다 100배수 3회연속추출 총량이 1.01배 많아, 총추출량에서는 서로 비슷하였다. 또한 20배수 3회연속추출 시 1회 추출에서 84.2%, 2회 추출에서 13.1%, 3회 추출에서 2.6%의 비율로 추출 정도가 줄어드는 반면, 100배수 3회연속추출의 경우 1회 추출에서만 91.2%의 추출 정도를 보였고 2회 추출에서 7.0%로 연속 2회 추출만으로도 98.2%가 추출되어 거의 100%에 가깝게 추출됨을 확인하였다.

결론적으로 20배수로 추출배수를 설정할 경우 최소 2회 정도 연속추출을 하여야 91% 이상의 추출이 가능하지만 100배수로 추출 시 1회 추출만으로도 91% 이상의 추출이 가능함을 확인하였다.

표 33. 참깨 Methanol 20배수 3회연속추출, 100배수 3회연속추출 결과 비교

참깨 추출배수 설정						
Lignan 3종						
지표성분	추출용매	추출횟수	추출 %	Area값	단위 환산	희석배수로 환산한 Area값
Methanol 20배수		1회	84.2	555585	0.5mg/10ul	11111170
		2회	13.1	864686	0.5mg/10ul	1729372
		3회	2.6	174286	0.5mg/10ul	348572
		합				13189114
Methanol 100배수		1회	91.2	1213015	0.1mg/10ul	1213015
		2회	7.0	92233	0.1mg/10ul	92233
		3회	1.8	24403	0.1mg/10ul	24403
		합				13296510

**(A) Methanol 20배수 3회연속추출**



**(B) Methanol 100배수 3회연속추출**

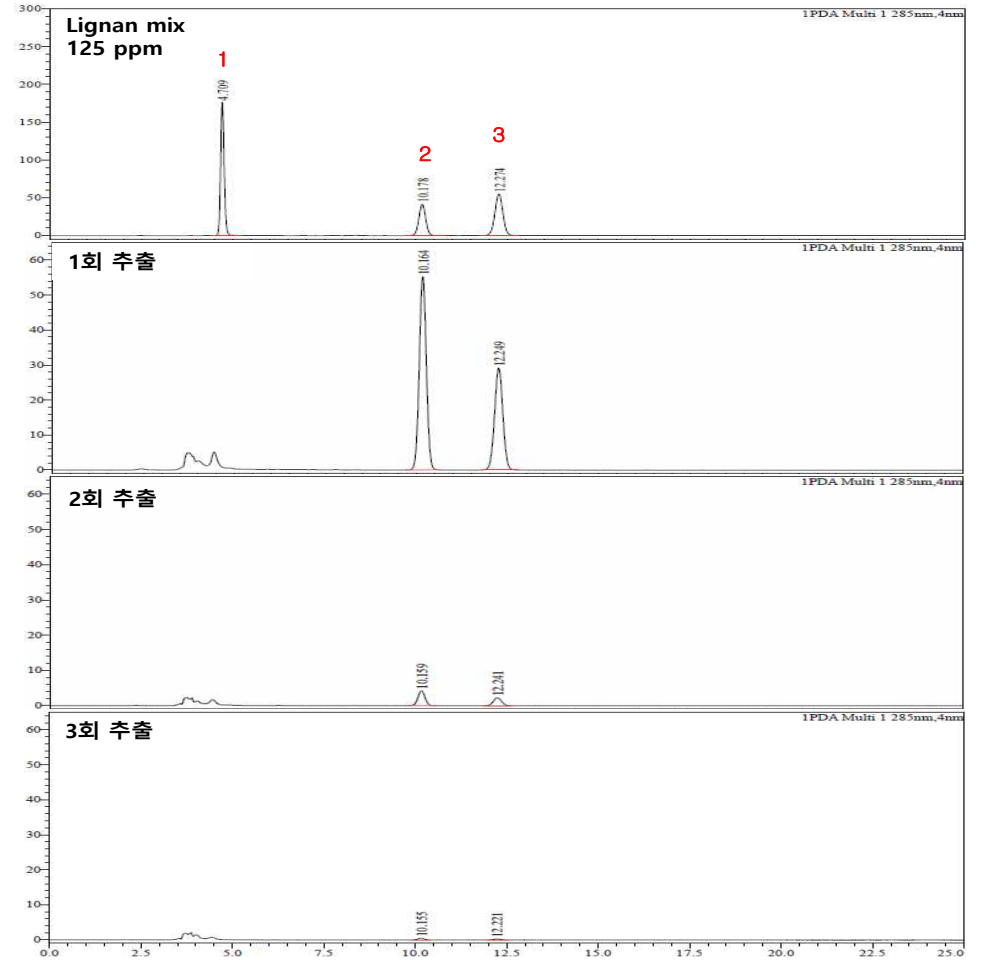


그림 90. 참깨 Methanol 20배수 3회연속추출, 100배수 3회연속추출 실험 HPLC 크로마토그램

1.sesamol(4.7min), 2.sesamin(10.0min), 3.sesamolin(12.1min)

\* 추출배수에 맞추어 Y축 스케일을 추출배수만큼 확대하여 표시하였음

#### (4) 최적 시료추출조건 설정

참깨의 20배수 3회연속추출 실험결과에서 추출용매로 methanol이 hexane보다 더 적합하고, 20배수로 추출 시 2회 이상을 추출해야 97.3%의 추출율을 확보할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 참깨의 추출배수 설정실험 결과에서도 추출용매로 methanol이 hexane보다 적합하고, 추출횟수를 1회로 설정 시 100배수가 가장 추출비율이 높음을 확인할 수 있었다. 참깨의 20배수, 100배수 3회연속추출 비교실험 결과에서 20배수로 추출배수를 설정할 경우 최소 2회 정도 연속추출을 하여야 91% 이상의 추출이 가능하지만 100배수로 추출 시 1회 추출만으로도 91% 이상의 추출이 가능함을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 참깨의 최적 시료추출조건은 추출용매는 methanol, 추출배수는 100배수, 추출횟수는 1회로 설정하였다.

나. 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 추출

(1) 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 참깨 원물

농촌진흥청에서 2014년 8월에 수확된 품종별 참깨 5종을 제공받았다. 백색, 갈색, 흑색 3가지의 종피색이었으며, 각각의 품종은 평안, 건백, 진율, 강흑, 강안 등 5종이었다. 참깨시료는 아래 표와 같으며 추후 참깨 및 참깨박 실험에 사용되었다.

표 34. 농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 참깨 5종

No.	학명	품종	종피색	수확시기	사진
1		평안	백색	2014년 8월	
2		건백	백색	2014년 8월	
3	<i>Sesame indicum</i> L.	진율	갈색	2014년 8월	
4		강흑	흑색	2014년 8월	
5		강안	백색	2014년 8월	

(2) 제 1협동으로부터 제공받은 품종별 참깨(생물전환)산물의 sonication 추출

농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 참깨 5종을 이용하여 제1협동기관에서 생물전환공정을 진행하였다. 제1협동에서 제공받은 참깨 원물 및 (생물전환)산물을 그림 85의 (C)와 동일한 조건으로 1시간 동안 sonication 추출을 진행하였다. 방냉 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 필터 하여 실험에 사용하였다.

(3) 제 1협동으로부터 제공받은 탈지참깨의 sonication 추출

농촌진흥청으로부터 제공받은 품종별 참깨 5종 중 3번 진율 품종을 이용하여 제1협동기관에서 탈지 공정을 진행하였다. Hexane 및 ethanol을 이용하여 탈지를 진행하였으며 각각의 탈지물을 이용하여 생물전환공정을 진행하였다. 3번 진율 원물 및 hexane, ethanol 탈지물 및 이들의 (생물전환)산물 등 총 5종의 참깨 시료를 이용하여 미강과 동일한 조건으로 추출하였다. 2.5 g의 참깨시료를 100% methanol을 이용하여 volumetric flask에 정용한 뒤, 1시간 동안 sonication 추출 하였다. 충분히 방냉 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 필터 하여 분석에 사용하였다.

### 다. 탈지참깨의 Lignan 함량 분석

식품첨가물의 기준 및 규격(2014)의 ‘2-3\_나. 천연첨가물 165. 참깨유불검화물’의 방법을 이용하여 아래 표와 같은 조건을 이용하여 총 5종의 참깨를 분석하였다. Lignan 화합물인 sesamol, sesamin, sesamolin은 각각 7.8125~250 µg/mL의 범위에서 6 지점을 이용하여 표준검량선  $y=18265x-15730$ ,  $y=29685x-26777$ ,  $y=17598x-20833$ 을 작성하였으며, 0.9997, 0.9998, 0.9998의 높은 결정계수( $R^2$ )를 확인하였다. 그 결과, 탈지하지 않은 원물에서  $2.17\pm 0.00$  mg/g으로 가장 높은 Total Lignan 함량을 나타내었으며, hexane과 ethanol 탈지 (생물전환)산물의 Total Lignan 함량은  $1.44\pm 0.00$  및  $1.37\pm 0.00$  mg/g으로 원물인  $1.01\pm 0.00$  및  $1.15\pm 0.00$  mg/g 보다 증가된 함량을 나타내었다. Lignan 화합물은 항산화, 항염증, 피부 미백과 보호 효과, 신경 세포 보호 효과, 패혈증 억제효과 등의 효능을 나타낸다고 알려져 있다. 참깨의 생물전환시 lignan 함량이 증가하여 더 높은 생리활성을 기대할 수 있을 것이다.

표 35. Lignan의 HPLC 분석 조건

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5.0 µm)
Mobile phase	Methanol:Water=80:20
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector(285 nm)
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	10 µL
Run time	20 min



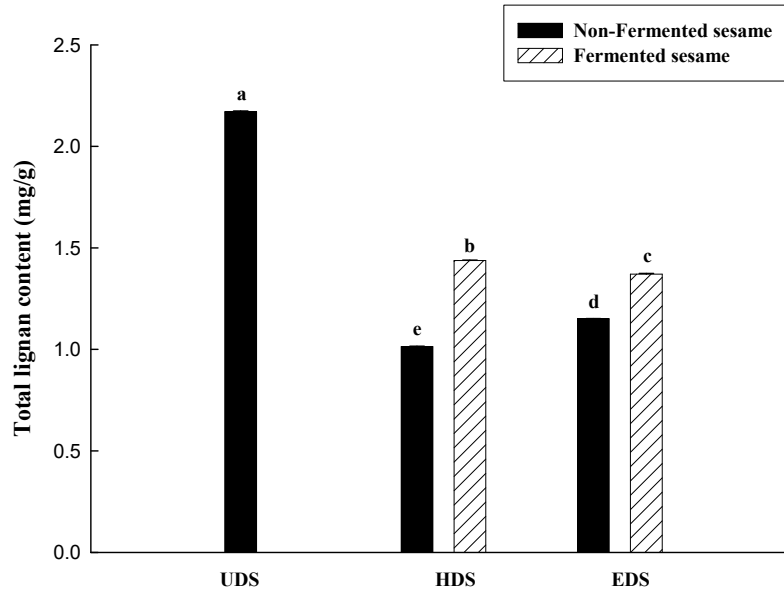
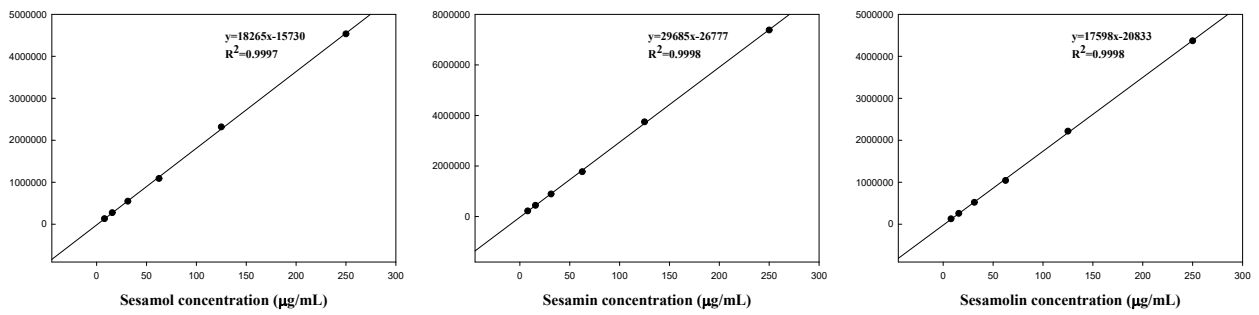


그림 91. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Total Lignan 함량

표 36. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Lignan 함량

No.	Sesamol (mg/g)	Sesamin (mg/g)	Sesamolin (mg/g)	Lignan (mg/g)
UDS <sup>1)</sup>	N/D	0.68±0.00 <sup>a)</sup>	1.49±0.01 <sup>a)</sup>	2.17±0.00 <sup>a)</sup>
HDS <sup>2)</sup>	N/D	0.36±0.00 <sup>d)</sup>	0.66±0.00 <sup>e)</sup>	1.01±0.00 <sup>e)</sup>
HDFS <sup>3)</sup>	N/D	0.46±0.00 <sup>b)</sup>	0.98±0.00 <sup>b)</sup>	1.44±0.00 <sup>b)</sup>
EDS <sup>4)</sup>	N/D	0.35±0.00 <sup>e)</sup>	0.80±0.00 <sup>d)</sup>	1.15±0.00 <sup>d)</sup>
EDFS <sup>5)</sup>	N/D	0.42±0.00 <sup>c)</sup>	0.95±0.00 <sup>c)</sup>	1.37±0.00 <sup>c)</sup>

<sup>1)</sup>UDS, Un-defatted sesame

<sup>2)</sup>HDS, Hexane-defatted sesame

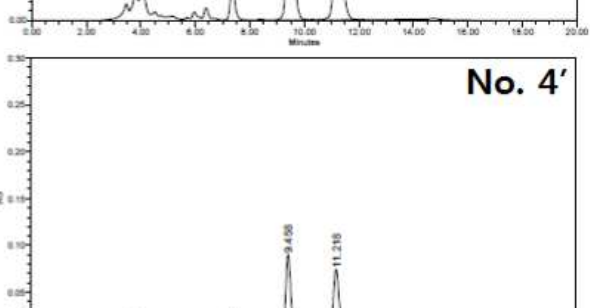
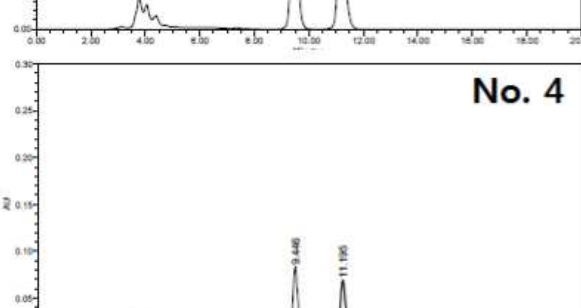
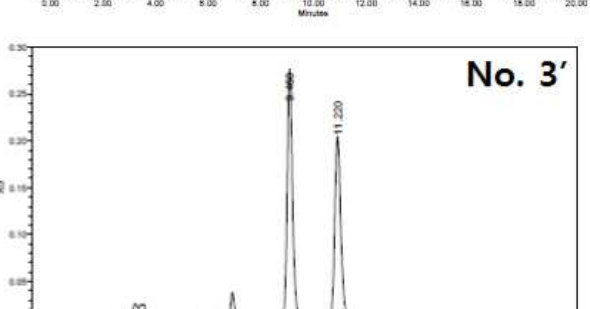
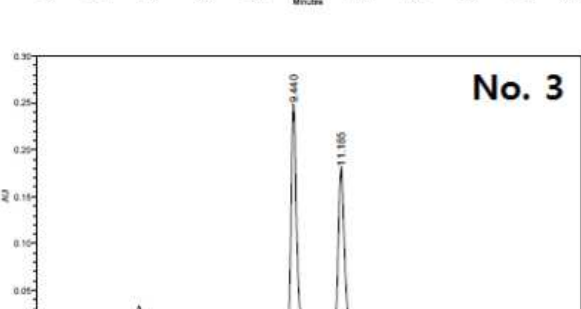
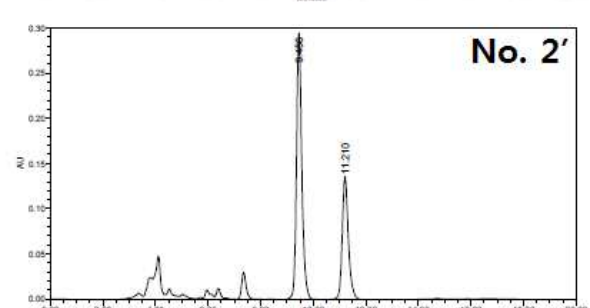
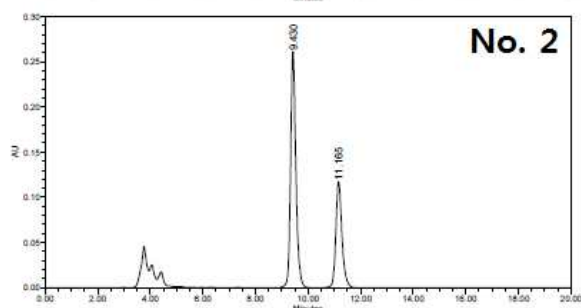
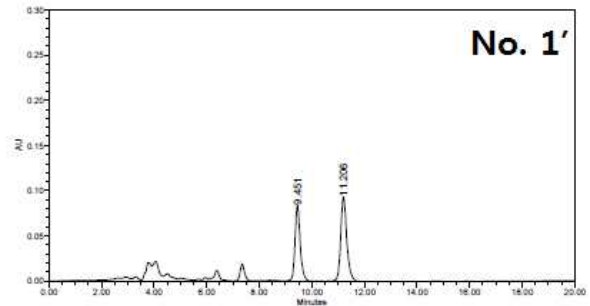
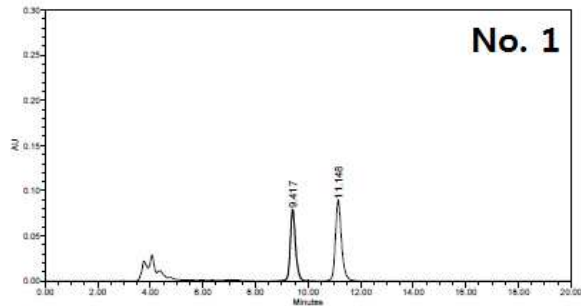
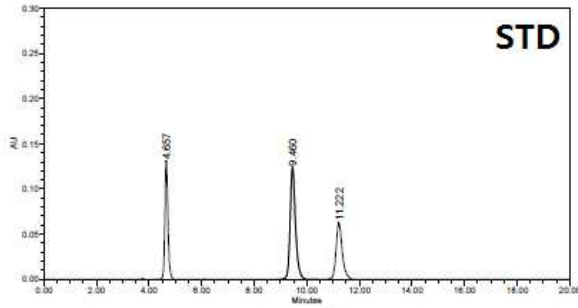
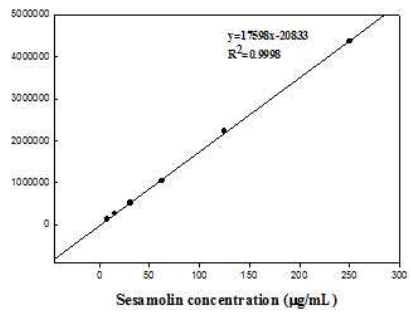
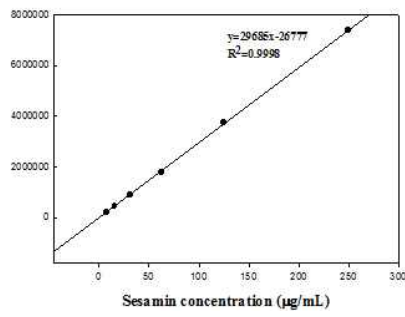
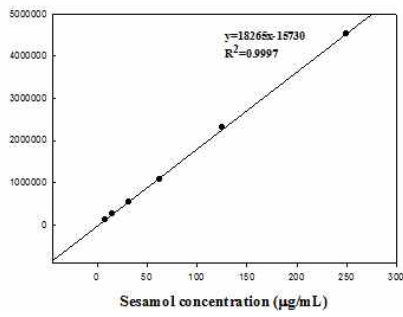
<sup>3)</sup>HDFS, Hexane-defatted fermented sesame

<sup>4)</sup>EDS, Ethanol-defatted sesame

<sup>5)</sup>EDFS, Ethanol-defatted fermented sesame

## 라. 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 Lignan 함량 분석

농촌진흥청에서 제공받은 품종별 참깨 5종을 이용하여 제1협동기관에서 생물공정전환을 진행하여 총 10 종의 참깨 시료를 제공받았다. Lignan 함량 분석은 참깨박 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건인 표 34과 동일한 조건으로 분석하였다. Lignan 화합물인 sesamol, sesamin, sesamolin은 각각 7.8125~250 µg/mL의 범위에서 6 지점을 이용하여 표준검량선  $y=18265x-15730$ ,  $y=29685x-26777$ ,  $y=17598x-20833$ 을 작성하였으며, 0.9997, 0.9998, 0.9998의 높은 결정계수( $R^2$ )를 나타내었다. 그 결과(표 36), 3번 진을 원물과 (생물전환)산물에서  $5.76\pm 0.01$ ,  $6.58\pm 0.07$  mg/g으로 가장 높은 Total Lignan 함량을 나타내었으며, 2번 건백 원물과 (생물전환)산물에서  $4.68\pm 0.01$ ,  $5.40\pm 0.01$  mg/g의 높은 Total Lignan 함량을 나타내었다. 품종별 참깨의 생물전환시 품종 5종 모두 sesamin, sesamolin의 함량이 증가하였으며, sesamol의 경우 참깨박 원물 및 (생물전환)산물과 마찬가지로 검출되지 않았다. 이는 참깨의 착유 과정에서 참깨를 고온에서 roasting시 sesamin과 sesamolin이 분해되어 sesamol로 전환된다고 알려져 있는데, 본 실험에 사용한 참깨는 roasting 과정을 거치지 않았기 때문에 sesamol이 검출되지 않았다.



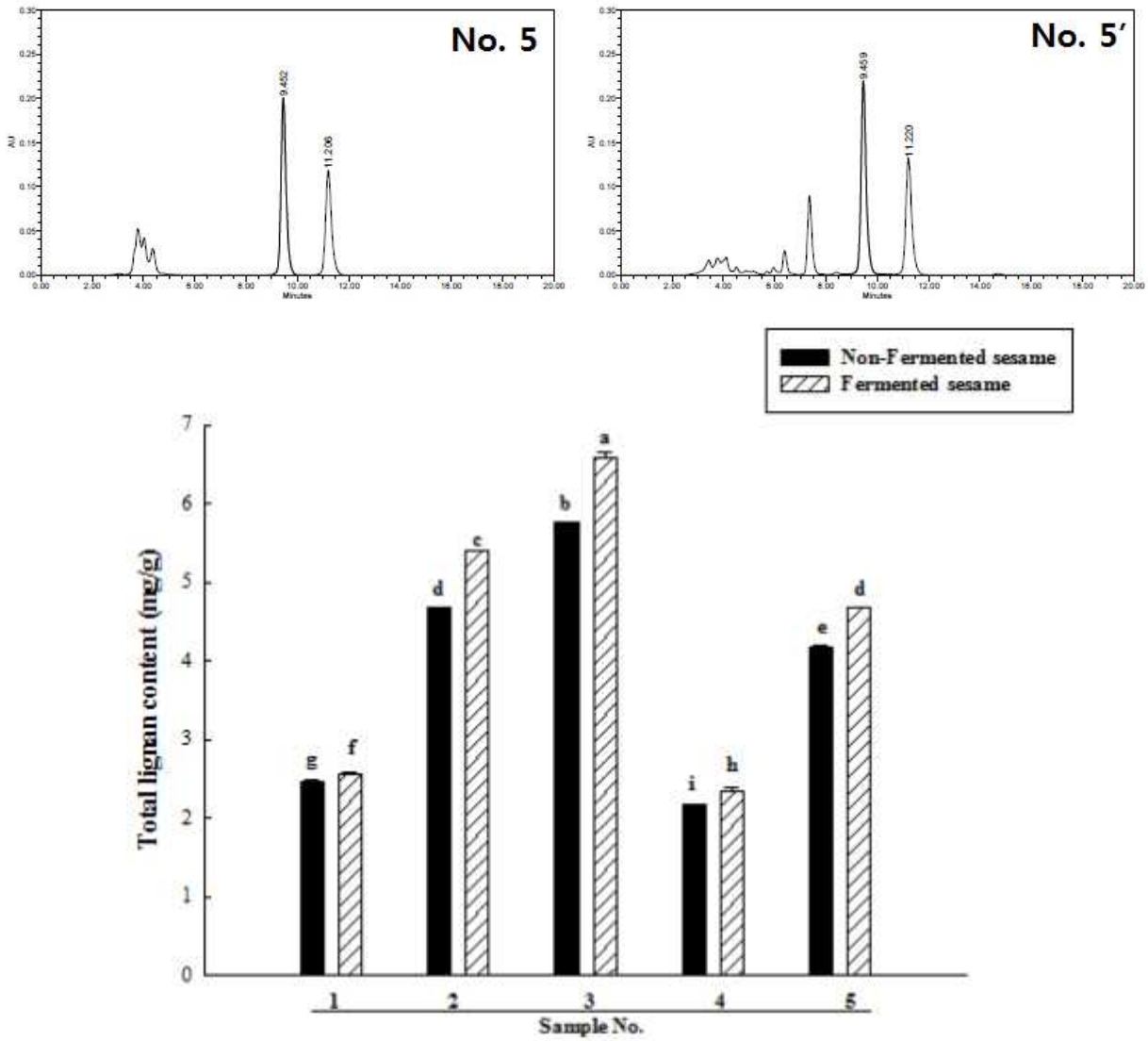


그림 92. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 chromatogram 및 Total Lignan 함량

표 37. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Total Lignan 함량

No.		Sesamol (mg/g)	Sesamin (mg/g)	Sesamolin (mg/g)	Lignan (mg/g)
1	NS <sup>1)</sup>	ND	0.78±0.01 <sup>j)</sup>	1.68±0.01 <sup>h)</sup>	2.46±0.02 <sup>g)</sup>
	FS <sup>2)</sup>	ND	0.81±0.01 <sup>i)</sup>	1.76±0.01 <sup>g)</sup>	2.57±0.02 <sup>f)</sup>
2	NS	ND	2.48±0.00 <sup>c)</sup>	2.20±0.00 <sup>f)</sup>	4.68±0.01 <sup>d)</sup>
	FS	ND	2.83±0.00 <sup>a)</sup>	2.56±0.01 <sup>c)</sup>	5.40±0.01 <sup>e)</sup>
3	NS	ND	2.37±0.00 <sup>d)</sup>	3.39±0.01 <sup>b)</sup>	5.76±0.01 <sup>b)</sup>
	FS	ND	2.67±0.02 <sup>b)</sup>	3.91±0.05 <sup>a)</sup>	6.58±0.07 <sup>a)</sup>
4	NS	ND	0.84±0.01 <sup>h)</sup>	1.33±0.01 <sup>j)</sup>	2.17±0.01 <sup>i)</sup>
	FS	ND	0.89±0.01 <sup>g)</sup>	1.46±0.04 <sup>i)</sup>	2.35±0.05 <sup>h)</sup>
5	NS	ND	1.94±0.00 <sup>f)</sup>	2.25±0.01 <sup>e)</sup>	4.18±0.01 <sup>e)</sup>
	FS	ND	2.17±0.00 <sup>e)</sup>	2.51±0.00 <sup>d)</sup>	4.68±0.01 <sup>d)</sup>

<sup>1)</sup>Non-fermented sesame

<sup>2)</sup>Fermented sesame

#### 마. 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Lignan method validation

참깨 및 참깨박에 존재하는 Lignan을 위하여 HPLC 분석조건을 확인하였으며, 이 분석법을 검증하기 위하여 표 34과 같은 조건을 이용하여 method validation을 실시하였다. 분석법의 유효성은 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantization, LOQ)를 이용하여 검증하였다.

Waters 996 Photodiode Array Detector(Waters co., Milford, MA, USA)를 사용하여 190 nm부터 400 nm까지 흡광도를 측정하여 각 피크의 최대흡수파장을 확인하였다. 표준물질 sesamol, sesamin, sesamolin의 혼합물에서 각 피크의 retention time이 각각 4.66 min, 9.50 min 및 11.26 min으로 확인되었고, 각 시료에서도 동일한 retention time에서 피크를 확인할 수 있었다(그림 91). Lignan 혼합물을 각 물질의 농도가 0, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL이 되도록 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 값으로 각 물질의 검량선을 작성하였다. 그 결과  $y=18309x-17636$ ,  $y=29746x-33563$ ,  $y=17667x-25926$ 의 표준검량선과 0.9999, 0.9999, 0.9999의 결정계수( $R^2$ )를 나타내어 우수한 직선성을 확인하였다(그림 92). 정밀성을 확인하기 위하여 표 38과 같이 일내(intra-day) 정밀도에서 각각 0.29%~1.94%를 나타내었고, 일간(inter-day) 정밀도에서 각각 0.35~0.47%로 모두 5% 이하의 정밀도를 나타내었다. 정확성은 회수율을 측정하여 그 결과로 나타내었다. 각 시료에 원물에 포함되어 있는 각 물질의 약 80, 100, 120%의 피크면적에 해당하는 농도를 첨가하였다. 즉, sesamol은 15, 20, 25 µg/mL, sesamin은 10, 15, 20 µg/mL, sesamolin은 15, 20, 25 µg/mL의 표준용액을 첨가하여 HPLC로 검출되는 농도를 측정하였다(표 39). 그 결과 진을 원물 및 (생물전환)산물에서 일간 및 일내 측정 결과 각각 93.90~110.27% 및 98.43~114.90%의 회수율을 나타내었다. 검출한계와 정량한계는 검량선의 기울기와 반응의 표준편차에 근거하는 방법으로 검출한계는  $3.3 \times$ 표준편차/기울기로, 정량한계는  $10 \times$ 표준편차/기울기 값으로 확인하였다. 이때의 기울기는 표준검량선에서 저농도 3구간의 기울기를 사용하였으며, 표준편차는 중간농도를 7회 분석하여 이용하였다. 그 결과(표 40), sesamol의 검출한계는 0.3400 µg/mL, 정량한계는 1.030 µg/mL으로 나타났고 sesamin은 0.2581 및 0.7821 µg/mL, sesamolin은 0.2305 및 0.6985 µg/mL으로 확인되었다.

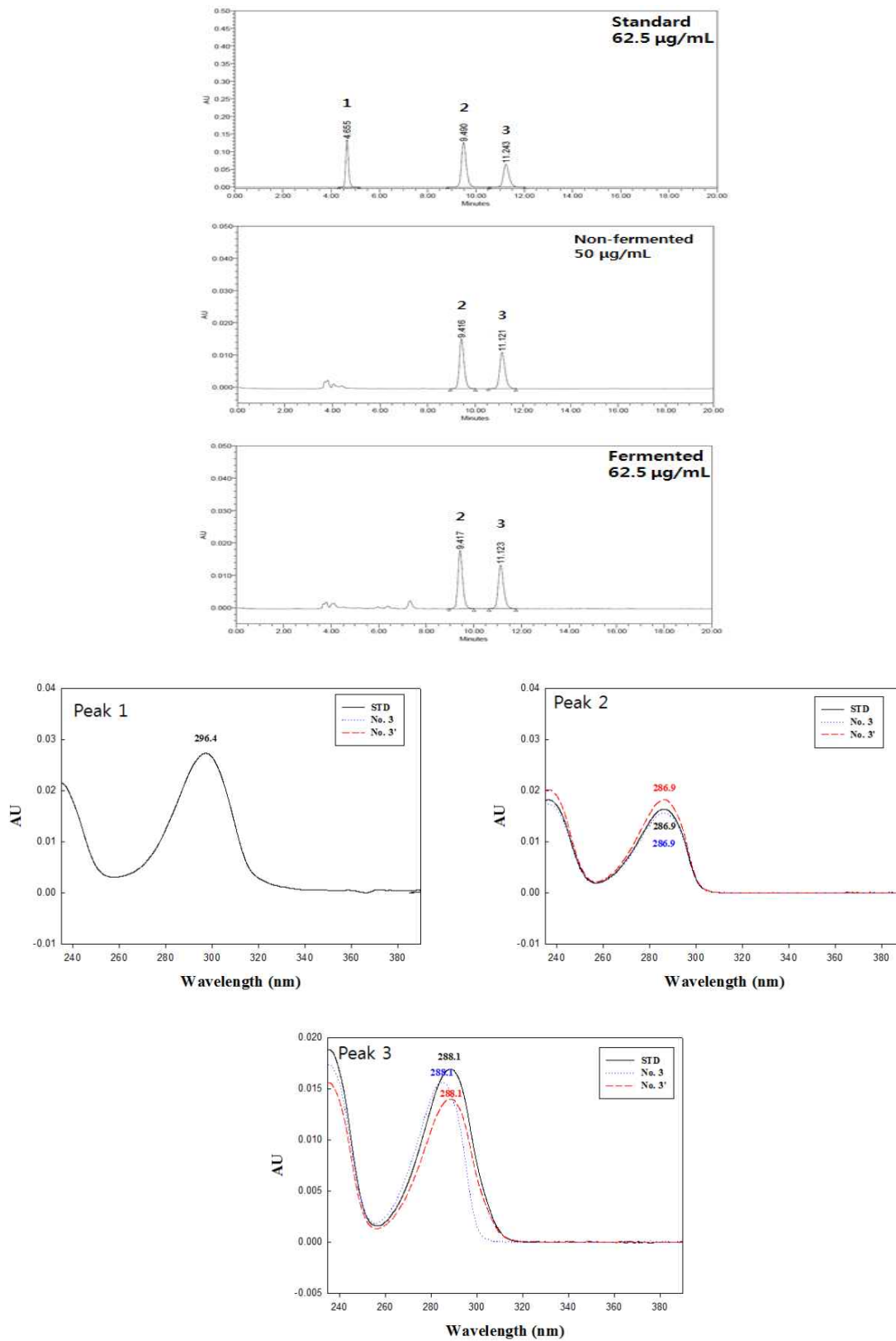


그림 93. Lignan, 진을 원물 및 (생물전환)산물의 분석조건에 따른 크로마토그램 및 스펙트럼

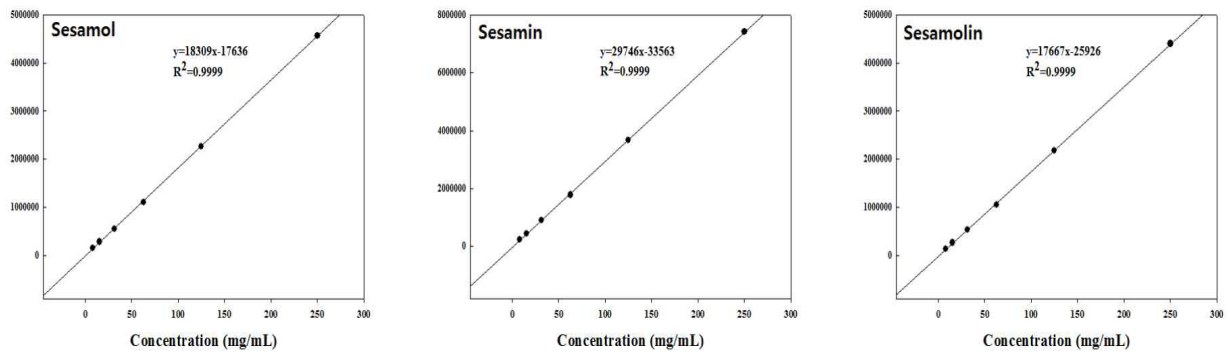


그림 94. Lignan standard의 직선성 확인

표 38. 진을 원물 및 (생물전환)산물의 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 정밀성

Sample	Intra-day		Inter-day	
	Mean±SD (µg/mL)	RSD (%)	Mean±SD (µg/mL)	RSD (%)
Non-Fermented Jinyul	5.79±0.02	0.29	6.44±0.22	0.35
Fermented Jinyul	7.85±0.15	1.94	8.46±0.04	0.47

표 39. 진을 원물 및 (생물전환)산물의 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 회수율

Sample	Concentration (µg/mL)	Intra-day			Inter-day			
		Mean±SD (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Mean±SD (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	
Sesamol	Non-Fermented Jinyul	15	15.04±0.11	100.27	0.73	14.24±0.22	94.94	1.75
		20	20.26±0.04	101.29	0.21	19.12±0.20	95.58	1.21
		25	27.16±0.25	108.65	0.93	26.63±0.39	106.54	1.70
	Fermented Jinyul	15	15.37±0.01	102.47	0.06	14.57±0.11	97.12	0.85
		20	19.69±0.11	98.43	0.55	18.87±0.30	94.35	1.86
		25	27.68±0.29	110.72	1.06	27.04±0.44	108.17	1.88
Sesamin	Non-Fermented Jinyul	10	11.15±0.02	115.10	0.16	9.65±0.04	96.46	0.46
		15	16.28±0.05	108.55	0.33	14.55±0.04	96.97	0.28
		20	21.29±0.07	106.45	0.33	19.67±0.05	98.35	0.23
	Fermented Jinyul	10	11.49±0.16	114.90	1.43	9.77±0.06	97.69	0.57
		15	17.14±0.07	114.28	0.44	14.53±0.08	96.89	0.56
		20	21.52±0.22	107.60	1.01	19.03±0.13	95.14	0.71
Sesamolins	Non-Fermented Jinyul	15	15.29±0.12	101.90	0.78	14.49±0.03	96.62	0.27
		20	20.46±0.13	102.28	0.63	19.60±0.07	98.02	0.43
		25	27.73±0.23	110.91	0.83	27.22±0.49	108.89	2.09
	Fermented Jinyul	15	15.36±0.10	102.37	0.66	14.36±0.14	95.71	1.10
		20	19.84±0.16	99.18	0.82	18.78±0.11	93.90	0.70
		25	28.01±0.32	112.05	1.14	27.57±0.91	110.27	3.82



표 40. Lignan 분석의 검량한계 및 검출한계

Sample	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope	Intercept	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Sesamol	7.8125-31.25	17162	12816.07	0.9999	0.3400	1.0303
Sesamin	7.8125-31.25	28514.6	1131.543	0.9999	0.2581	0.7821
Sesamolin	7.8125-31.25	16713.14	-203.343	0.9999	0.2305	0.6985

#### 바. 참깨 시제품의 lignan 함량 분석

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공 받은 참깨(생물전환)산물 기반 시제품의 lignan 분석을 위하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 제조는 시료 500 mg을 취하여 100% methanol로 50 mL volumetric flask에 정용하여 1시간 동안 sonication 추출 후, 고형분의 제거를 위하여 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리 후 상층액을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하였다. Lignan 표준물질은 각각 7.8125~250  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 표준검량선을 작성하였다. 그 결과(표 42), sesamin의 경우 3.84 $\pm$ 0.01, sesamol은 2.41 $\pm$ 0.00 mg/g의 함량을 나타내었다. Sesamol의 경우 검출이 되지 않았으며 total lignan 함량은 6.25 $\pm$ 0.00 mg/g으로 나타났다.

표 41. 참깨 시제품의 lignan 함량

	Sesamol (mg/g)	Sesamin (mg/g)	Sesamol (mg/g)	Lignan (mg/g)
시제품	ND	3.84 $\pm$ 0.01	2.41 $\pm$ 0.00	6.25 $\pm$ 0.00

### 3. 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 지표성분 분석 최적조건 확립

#### 시료추출 방법

시료(분말) 0.5 g을 50 ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 HPLC grade methanol로 정용하였다(100배수 추출). 50 ml 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication 추출하였다. Sonication 후 상온에서 10분간 식힌 다음 0.45 um 실린지 필터를 이용해 여과 후 분석에 사용하였다.

#### 표준물질 제조

참깨의 원물 및 부산물(참깨박)의 지표성분 패턴분석에 있어서 실험조건은 식품의약품안전처의 식품첨가물 공전 해설서에 게재된 참깨유불검화물 분석을 약간 변형하여 적용한 것으로 주관기관인 강원대학교(이옥환 교수님 Lab)에서 확립한 조건을 그대로 사용하였다. 참깨의 원물 및 부산물(참깨박)의 지표성분 패턴 분석을 위한 표준물질로는 sesamol, sesamin, sesamolin (이하 리그난 3종)을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 표준물질 리그난 3종은 모두 Biopurify Phytochemicals社 제품이다.

각각의 리그난(sesamol, sesamin, sesamolin) 표준물질 50 mg을 정밀히 측정하였다. 정밀히 측정한 표준물질을 50 mL 부피플라스크에 넣는다. HPLC grade methanol로 정용하였고, 이를 표준원액으로 사용하였다. 표준원액을 HPLC grade methanol로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

#### HPLC 분석조건

HPLC 분석조건은 아래 표와 같다. Shimadzu Model LC-20A Prominence Series HPLC system과 Shimadzu Model SPD-M20A Prominence Photodiode Array Detector(Shimadzu Co., JAPAN)을 사용하여 분석하였다.

표 42. 리그난 3종의 HPLC 분석조건

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5.0 μm)
Detector	Shimadzu Model SPD-M20A Prominence photodiode Array Detector <b>285nm</b>
Mobile phase	Methanol : H <sub>2</sub> O = 80 : 20
	Isocratic
Column temp.	25 °C
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	10 μL
Run time	25 min

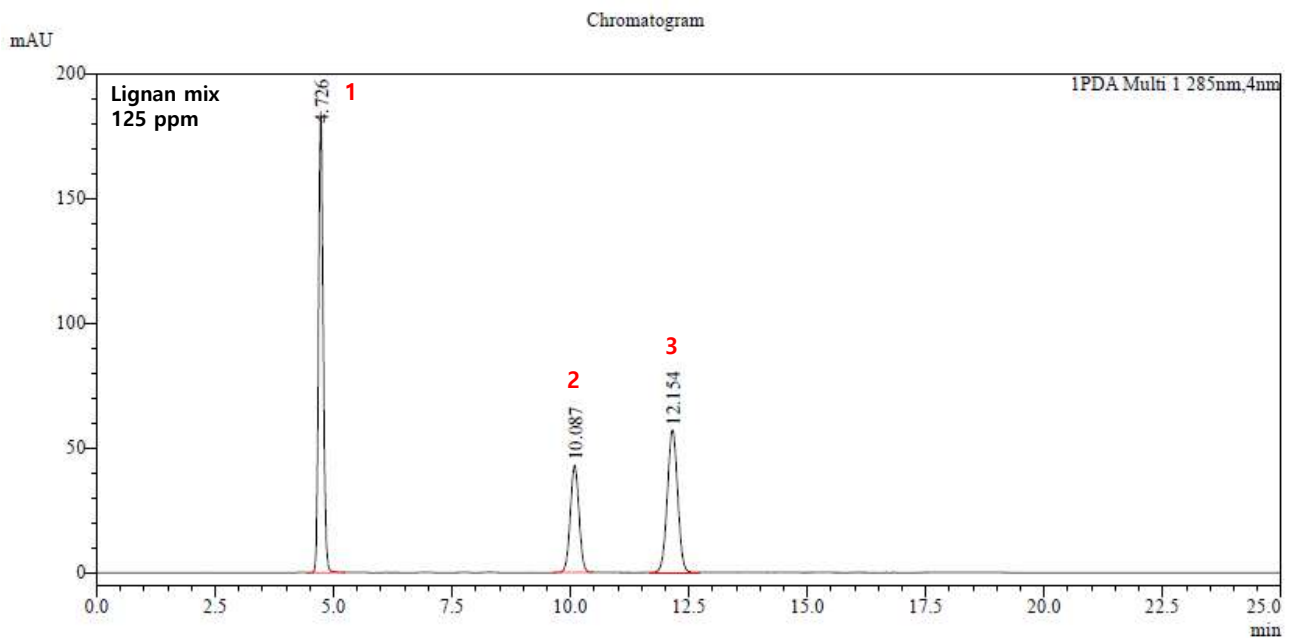


그림 95. 리그난 3종 표준물질의 HPLC 크로마토그램  
 1.sesamol(4.7min), 2.sesamin(10.1min), 3.sesamolin(12.1min)

#### 4. 50L 규모에서의 생산공정 표준화

##### 가. 생산단계별 시료의 지표성분인 Lignan 분석

###### (1) 주관기관 결과

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공받은 참깨(생물전환)산물의 lignan 분석을 위하여 각 시료 500 mg을 취하여 100% methanol로 50 mL volumetric flask에 정용하여 1시간 동안 sonication 추출 후, 고형분의 제거를 위하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. Sesamol, Sesamin, Seamolin의 표준물질은 3.90625~125 µg/mL의 농도로 희석하여 표준검량선을 작성하였다.

HPLC 분석 결과, 표준물질 Sesamol( $y=16730x+10761$ ,  $R^2=0.9999$ ), Sesamin( $y=19035x+21154$ ,  $R^2=0.9999$ ), Sesamolin( $y=18241x+18074$ ,  $R^2=0.9999$ )의 표준검량선을 작성하였으며, 나타낸 표준검량선 식에 대입하여 참깨(생물전환)산물의 lignan 함량을 계산하였다. 그 결과, 생산공정 최종산물의 Lignan 함량은 6.22 mg/g으로 원물의 lignan 함량 2.85 mg/g 보다 약 2배 정도 증가하는 것을 확인하였다. 이는 원물의 수분 함량이 높는데 기인한 것으로 사료되며 생산공정 중 lignan 함량의 감소는 없는 것으로 나타났다. Sesamol의 경우 모든 생산공정 단계에서의 참깨(생물전환)산물에서 검출되지 않았다. 참깨의 가공공정 중 고온 가열시 Sesamolin이 분해되어 Sesamol로 전환되는데, 본 연구에서 사용한 참깨(생물전환)산물의 경우 가열 처리가 이루어지지 않았기 때문에 검출이 되지 않은 것으로 보인다. 생물전환시 함량이 증가된 Sesamin과 Sesamolin 경우 *in vitro*계에서는 활성이 다소 약하지만, *in vivo*계에서는 알코올 분해 촉진, 콜레스테롤 흡수 억제, 간 보호 효과 등의 많은 생리활성이 보고되고 있다. 따라서 참깨의 생물전환시 보다 더 높은 생리활성을 기대할 수 있을 것이다.

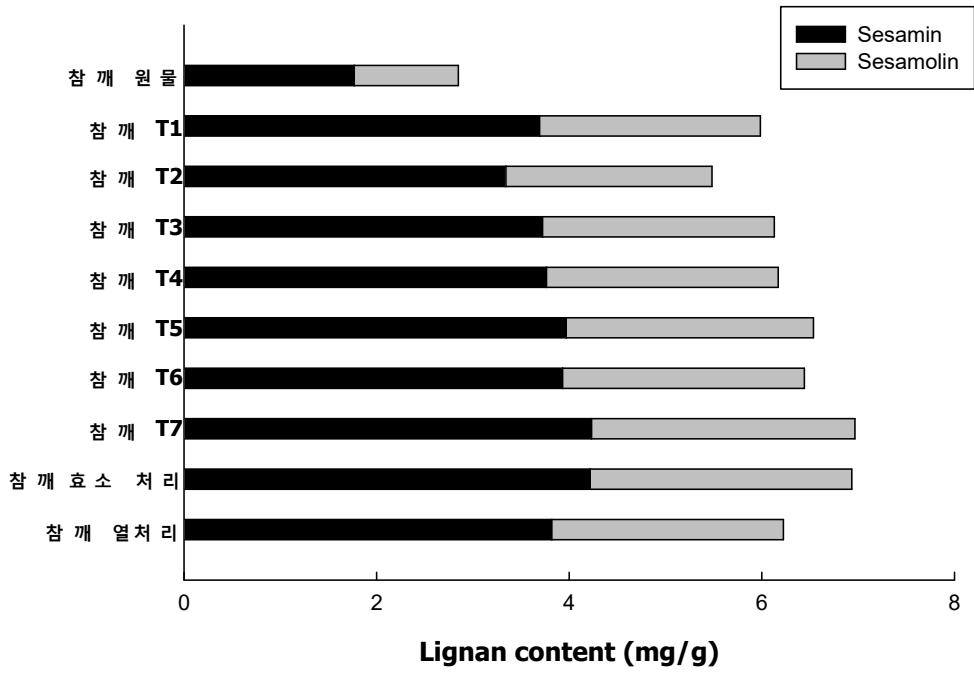


그림 96. 참깨(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분의 함량 변화

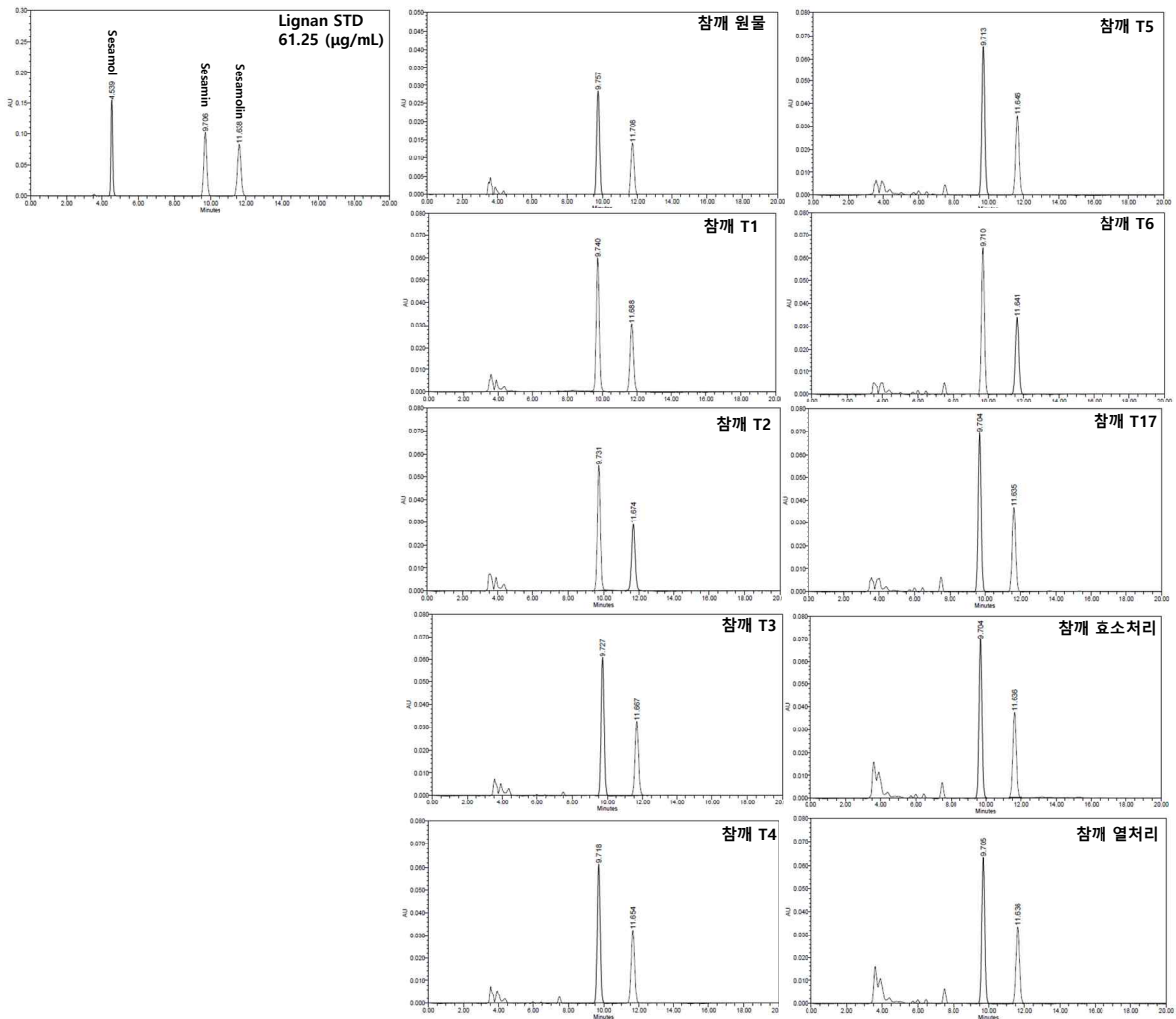


그림 97. 참깨(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분 분석 크로마토그램

(2) 제1협동기관 수행결과

50L 규모의 발효조에서 참깨(생물전환)산물의 생산공정 표준화를 위하여 생산공정 단계에 따라 시료를 채취하여 1차년도에 확립된 참깨(생물전환)산물의 지표성분 분석법을 활용해 지표성분의 변화를 조사하고, 이를 생산공정 표준화에 활용하였다.

분석 결과, 참깨(생물전환)산물의 지표성분으로 설정한 Lignan의 함량은 원물에서는 lignan 3종인 Sesamol, Sesamin, Sesamolin 중 Sesamol은 검출되지 않았고 Sesamin과 Sesamolin만 존재하고 있음을 확인하였다. 생산공정을 진행하여도 시료에서 sesamol은 검출되지 않았다. 원물대비 최종산물에서 lignan의 함량이 약 3.3배 증가됨을 확인하였다. 생산공정을 진행함에 따라 lignan의 함량은 큰 변화 없이 6.53~7.73 mg/g의 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 lignan 3종의 retention time은 Sesamol 4.737분, Sesamin 9.912분, Sesamolin 11.863분으로 확인되었다.

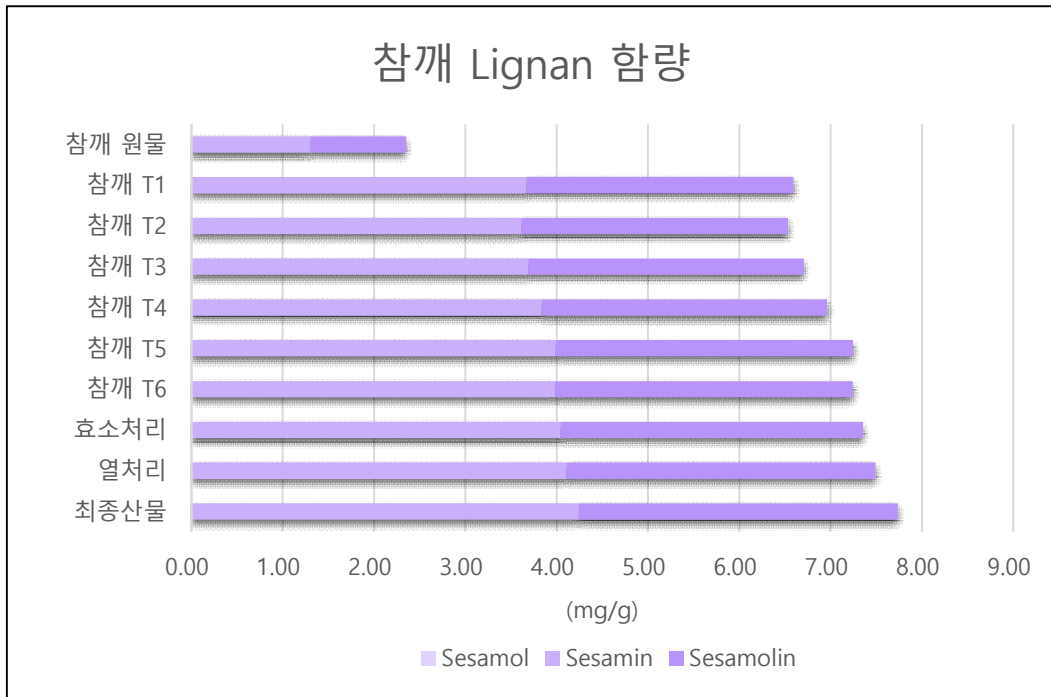


그림 98. 50L 규모의 발효조에서 생산된 참깨(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분의 함량 변화 조사

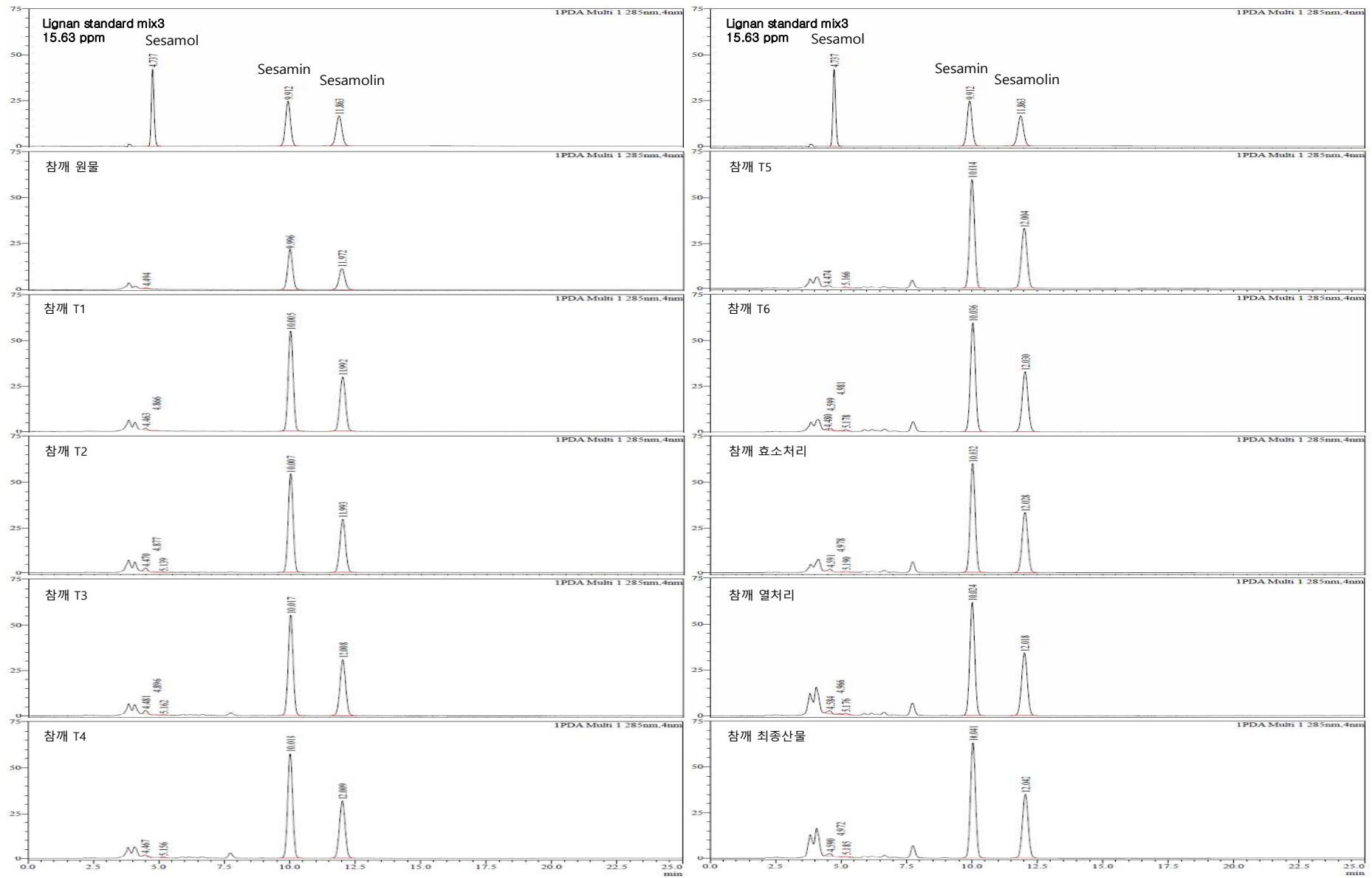


그림 99. 50L 규모의 발효조에서 생산된 참깨(생물전환)산물의 생산공정 단계별 지표성분 분석 크로마토그램



## 나. 생산단계별 시료의 Bioassay

대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 특성에 있어서 대식세포의 배양상태를 보다 안정적으로 유지된 상태에서 NO 생성을 측정하는 Bioassay 방법이 1차년도에 확립됨에 따라 이를 활용하여 면역활성 역가를 측정하고, 이를 50L 규모의 발효조에서 참깨(생물전환)산물의 생산공정 표준화에 활용하였다.

참깨(생물전환)산물의 생산공정 단계에 따른 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과, 참깨(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인, MEC<sub>100</sub>은 1 µg/ml로 생산공정 단계가 진행될수록 면역활성이 안정적으로 증가하는 결과를 확인함으로써 50L 규모에서의 참깨(생물전환)산물의 생산공정이 안정적으로 표준화 되었음을 확인하였다.

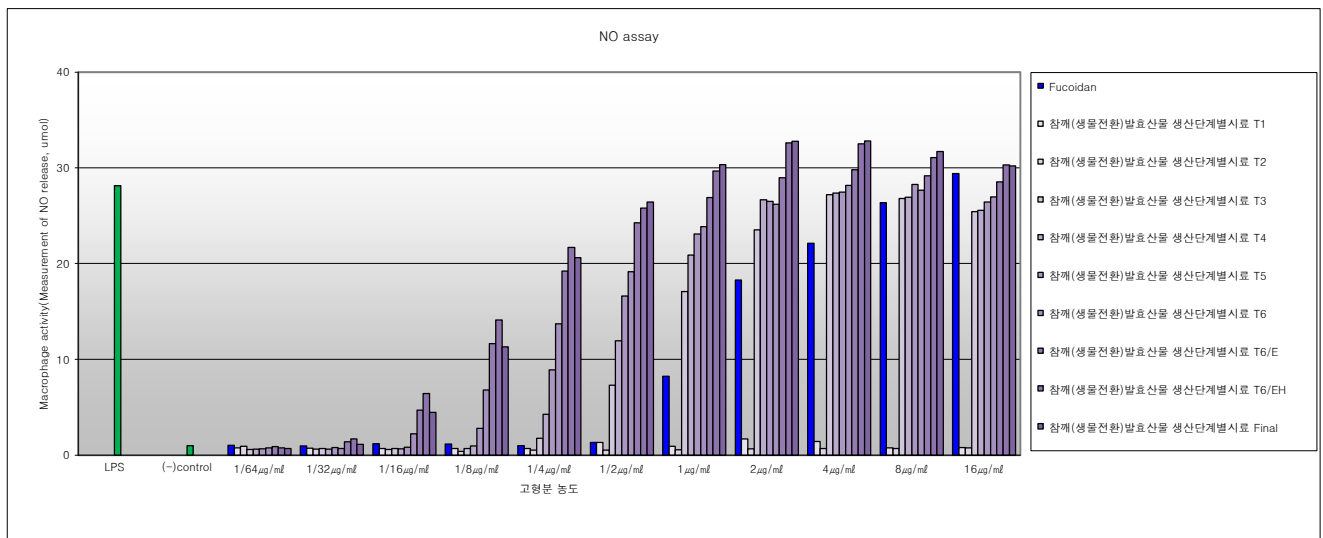


그림 100. 50L 규모의 발효조에서 생산된 참깨(생물전환)산물의 생산공정 단계별 대식세포 활성화능 측정

## 5. 50L 규모에서의 생산공정 validation

### 가. 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

표준화된 생산공정의 반복 재현성을 확인하기 위하여 50L 규모의 발효조에서 참깨(생물전환)산물의 3반복 시험생산을 실시하여 생산하였으며, 참깨(생물전환)산물의 생산 균일성을 검증하기 위하여 면역활성 역가를 측정하였다.

참깨(생물전환)산물의 3반복 시험생산 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과, 면역활성역가 MEC<sub>100</sub>은 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다.

3반복 시험생산을 통해 생산배치에 따른 면역활성 역가가 배치별로 약간의 차이는 있었지만 일정한 범위 내에서 면역활성 수준을 유지함을 확인함으로써 50L 규모 발효조에서의 참깨(생물전환)산물의 생산공정의 균일성을 검증을 완료하였다.

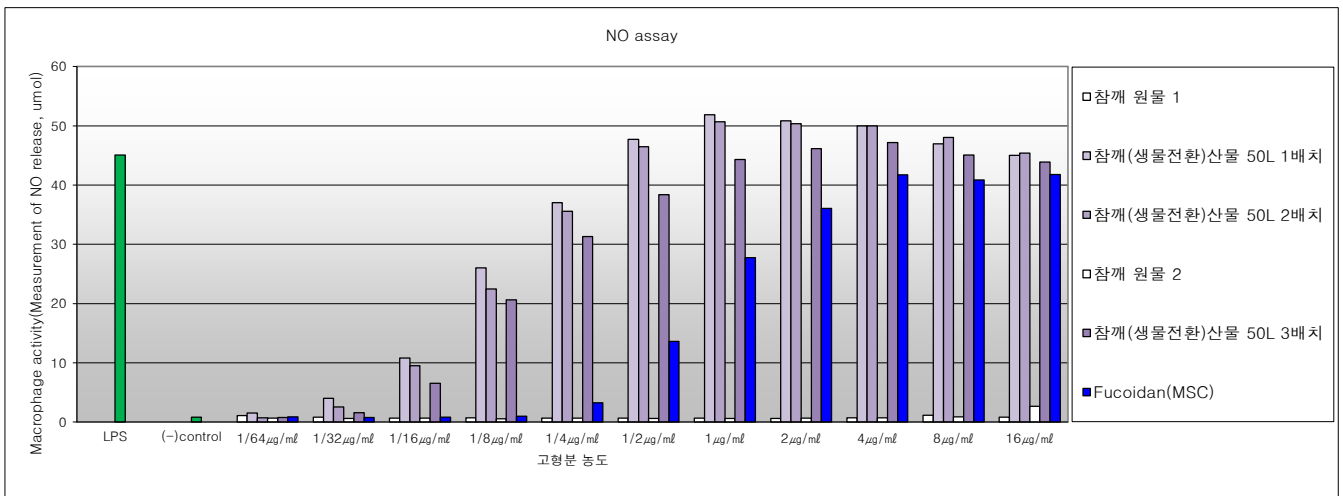


그림 101. 50L 발효조에서 3반복 시험생산된 참깨(생물전환)산물의 대식세포 활성화능 평가

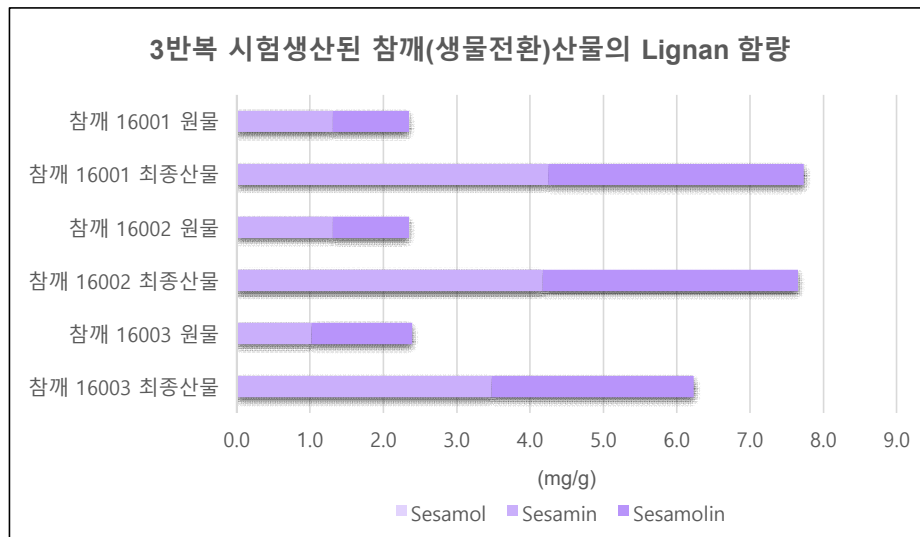


그림 102. 50L 발효조에서 3반복 시험생산된 참깨(생물전환)산물의 지표성분 함량 조사

## 6. 500L 규모에서의 생산공정 scale-up 확립

앞선 연구에서 진행되었던 50L 발효조에서 3반복 시험생산을 통해 생산 균일성이 검증된 생산공정을 바탕으로, 본 과제의 3차년도 연구목표에 해당하는 500L 규모의 발효조에서 생산공정 scale-up을 진행하였다. 500L 규모의 발효조에서 참깨박으로부터 참깨박(생물전환)산물을 생산하는 생산공정이 안정적으로 확립되었는지 확인하기 위하여 참깨박(생물전환)산물을 시험생산 하였으며, 생산공정에 따른 시료를 채취하여 면역활성 역가를 측정하였다.

참깨박(생물전환)산물의 생산공정 단계에 따른 시료의 면역활성 역가를 측정한 결과,

참깨박(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>은 1/2 µg/ml 농도 이하로 확인되었다.

Scale-up된 500L 규모의 발효조에서 생산공정 단계가 진행될수록 면역활성이 안정적으로 증가하는 결과를 확인함으로써 500L 규모에서의 참깨박(생물전환)산물 생산공정 scale-up이 안정적으로 확립되었음을 확인하였다.

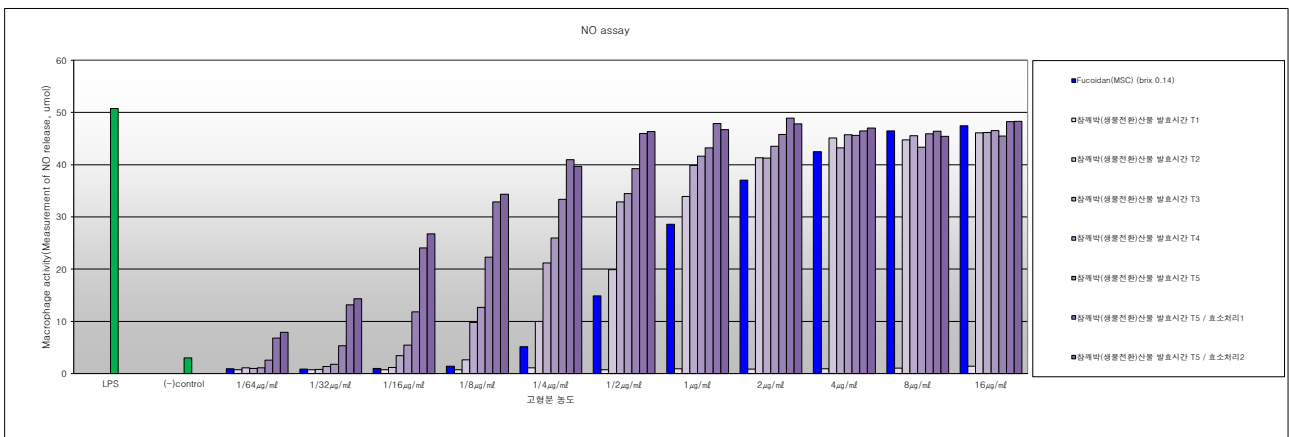


그림 103 500L 규모에서 생산된 참깨박(생물전환)산물의 생산공정 단계별 시료의 대식세포 활성화능 평가

## 5절. 국내 발생 탈지농산부산물에 대한 식품원료 적합성 검토 및 생물전환공정 재설계

### 1. 국내 발생 탈지농산부산물에 대한 식품원료 적합성 기준 설정

본 과제에서 진행하고자 하는 농산부산물(미강, 대두박, 참깨박)의 식품원료로써의 사용은 식품의약품안전처의 ‘식품의 기준 및 규격 전부개정고시’(제2016-154호)의 ‘제2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격’ 중 ‘1.식품원료 기준’에서 ‘1)원료 등의 구비요건’에 명시된 “(23) 식품의 제조·가공 중에 발생하는 식용 가능한 부산물을 다른 식품의 원료로 이용하고자 할 경우 식품의 취급기준에 맞게 위생적으로 채취, 취급, 관리된 것이어야 한다.”의 기준에 따라 적합하다면 미강, 대두박, 참깨박은 식품원료로서 사용이 가능하다.

미강은 현미에서 백미로 도정하는 과정에서 생기는 쌀눈과 쌀겨로 이루어진 속껍질 가루로, 식품의 취급기준에 맞게 위생적으로 채취, 취급, 관리하였다면 식품원료로서 사용이 가능하다.

대두박은 대두에서 hexane으로 기름을 추출하고 남은 부산물로써, 탈지대두 라고도 부른다. 대두박에 남아있는 hexane을 확인하여 그 규격이 기준에 적합하도록 식품의약품안전처 고시 제2016-414호 ‘건강기능식품 기능성원료 및 기준 규격 인정에 관한 규정’의 제3조의 6.유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료, 및 제15조의 4.유해물질에 대한 규격 설정에 명시된 [별표 2]에 따라 용매를 사용한 원료의 경우 유해물질 규격을 설정해야 한다. 헥산의 규격은  $< 5 \text{ mg/kg}$  이다. ‘건강기능식품의 기준 및 규격’에서 대두를 원재료로 헥산을 사용하여 생산된 대두 레시틴은 물론 ‘건강기능식품의 기준 및 규격’에 나타난 헥산을 용매로 사용한 원료의 규격은 모두 잔류용매(mg/kg) : 5.0 이하(헥산을 사용하는 경우)로 기재되어 있는 바, 대두박을 식품의 취급기준에 맞게 위생적으로 채취, 취급, 관리하였다면 식품원료로서 사용이 가능하다.

참깨박은 참깨에서 기름을 추출하고 남은 부산물로써, 참깨의 경우, 생참깨 또는 볶은참깨에서 압착법으로 채유하거나, 용제를 사용하여 추출한다. 압착법에 의해 채유되고 남은 참깨박이라면 식품의 취급기준에 맞게 위생적으로 채취, 취급, 관리하였다면 식품원료로서 사용이 가능하고, 용제를 사용하여 추출 후 남은 참깨박이라면 남아있는 용제를 확인하여 그 규격이 기준에 적합하고(주정의 경우 1% 이하로 잔존해야함. 주세법에 따라 1% 이상은 주류로 판단), 참깨박을 식품의 취급기준에 맞게 위생적으로 채취, 취급, 관리하였다면 식품원료로서 사용이 가능하다.

## 2. 국내 발생 탈지농산부산물로부터 생산된 (생물전환)산물에 대한 평가

### 가. 탈지대두박

1차년도 결과에서 자체적으로 대두에 탈지공정(혁신, HA 또는 주정, EA)을 적용하여 생산된 탈지대두박을 대상으로 생물전환(발효)공정을 적용하여 생산된 (생물전환)산물과 면역활성을 비교하였다.

대두(진풍) 탈지공정HA (생물전환)산물 1공정-3의 면역활성 역가  $MEC_{100}$ 은  $1/4 \mu\text{g}/\text{ml}$

대두(진풍) 탈지공정EA (생물전환)산물 1공정-3의 면역활성 역가  $MEC_{100}$ 은  $1/4 \mu\text{g}/\text{ml}$  로 확인되었다.

국내 발생 탈지대두박을 대상으로 생물전환(발효)공정을 적용하여 (생물전환)산물을 생산하였고, 면역활성 역가를 측정하였다.

국내 발생 탈지대두박의 (생물전환)산물에 대해 대식세포 NO 생성능의 면역활성을 조사한 결과 국내 발생 탈지대두박 원물의 경우 면역활성을 나타내지 않거나 매우 높은 농도에서만 낮은 면역활성을 일부 나타내고 있다. 국내 발생 탈지대두박에 대해 5가지의 생물전환(발효)공정에 의해 (생물전환)산물을 생산하였다. 5가지의 효소처리 전처리공정에서의 조건에 따라 1공정-1, 1공정-2, 1공정-3, 1공정-4, 1공정-5의 (생물전환)산물로 명명하였다.

면역활성이 우수한 (생물전환)산물은 국내 발생 탈지대두박의 입고처에 따라 달랐다. 탈지대두박(SP)의 (생물전환)산물의 경우 3곳의 입고처 중에서 가장 면역활성이 낮았으며, 1공정-1에서 면역활성이 가장 높았다. 탈지대두박(SJ)의 (생물전환)산물의 경우 공정에 따라 면역활성의 폭이 컸고, 1공정-1에서 면역활성이 가장 높았다. 탈지대두박(ID)의 (생물전환)산물의 경우 1공정-4에서 면역활성이 가장 높음을 확인하였다.

탈지대두박(SP)의 (생물전환)산물 : 1공정-1의 면역활성 역가  $MEC_{100}$ 은  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$

탈지대두박(SJ)의 (생물전환)산물 : 1공정-1의 면역활성 역가  $MEC_{100}$ 은  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$

탈지대두박(ID)의 (생물전환)산물 : 1공정-4의 면역활성 역가  $MEC_{100}$ 은  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  로 확인되었다.

국내 발생 탈지대두박의 (생물전환)산물과 자체 탈지공정이 적용된 탈지대두박의 (생물전환)산물의 면역활성 역가를 비교한 결과 자체 탈지공정이 적용된 탈지대두박의 (생물전환)산물이  $2^3 \sim 2^5(8 \sim 32)$ 배 면역활성이 더 높음을 확인하였다.

이러한 결과를 통해 국내 발생 탈지대두박의 (생물전환)산물이 자체 탈지공정에 의해 생산된 탈지대두박의 (생물전환)산물에 버금가는 우수한 면역활성을 내기 위해선 생물전환(발효)공정의 재설계가 필요할 것으로 판단되었다.

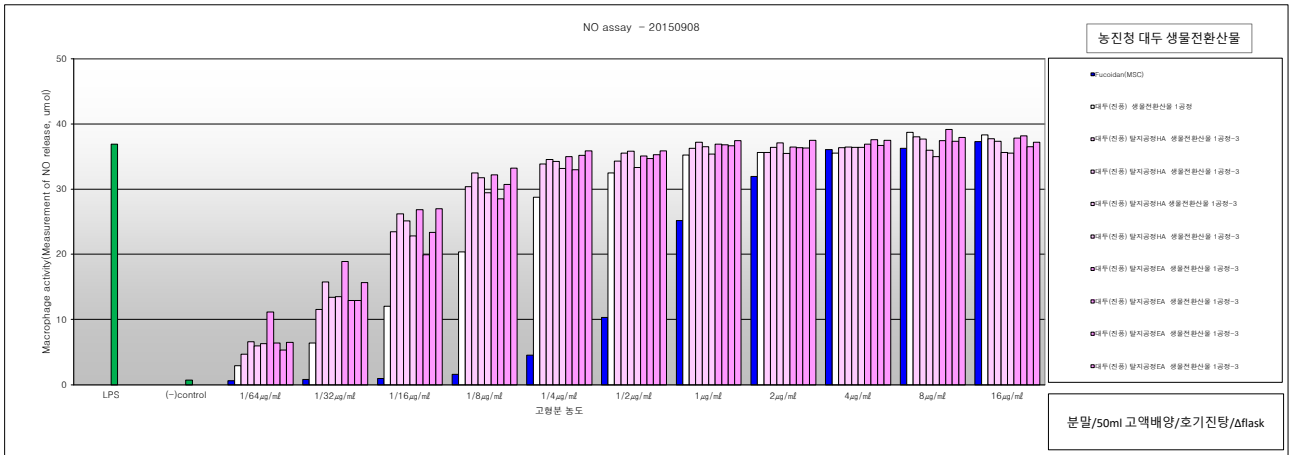


그림 104 자체 탈지공정에 의해 생산된 탈지대두박에 있어서 생물 전환(발효)공정 1공정-3에 의해 생산된 (생물 전환)산물의 면역활성 조사

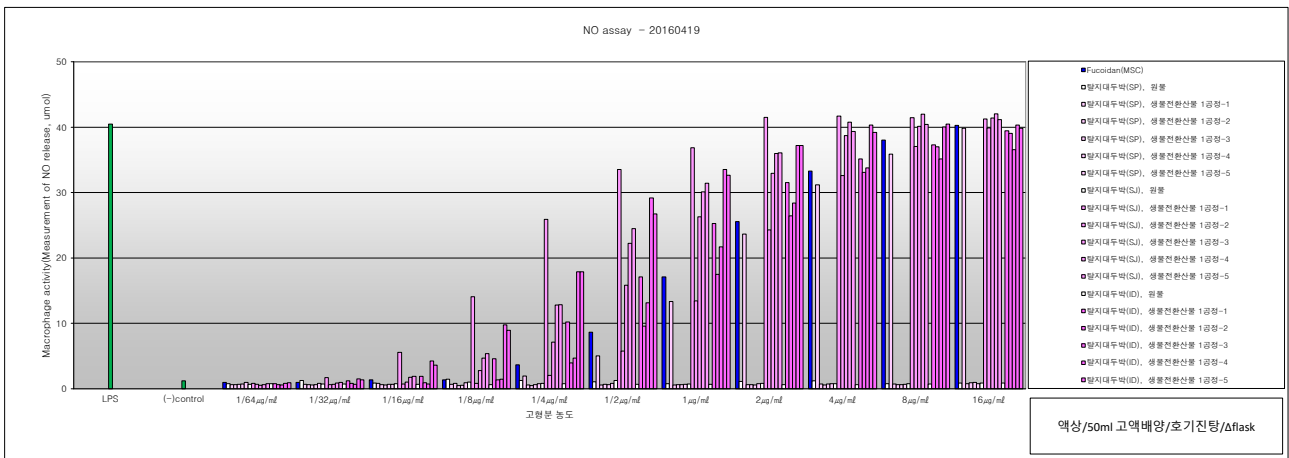


그림 105 국내 발생 탈지대두박의 원물 및 5가지의 효소처리 전처리공정에서의 조건에 따른 생물 전환(발효)공정에 의해 생산된 (생물 전환)산물의 면역활성 조사

## 나. 탈지참깨박 (깻묵/볶은참깨박, 생참깨박)

지난 1차년도 결과에서 참깨에 자체적으로 탈지공정(헥산, HA 또는 주정, EA)를 적용하여 생산된 탈지참깨박을 대상으로 생물전환공정을 적용하여 생산된 (생물전환)산물과 면역활성을 비교하였다.

참깨(진유) 탈지공정HA (생물전환)산물 1공정-3의 면역활성역가 MEC100은  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$

참깨(진유) 탈지공정EA (생물전환)산물 1공정-3의 면역활성역가 MEC100은  $1/2 \mu\text{g}/\text{ml}$  로 확인되었다.

국내 발생 볶은참깨박 및 생참깨박을 대상으로 생물전환(발효)공정을 적용하여 (생물전환)산물을 생산하였고, 면역활성 역가를 측정하였다.

국내 발생 볶은참깨박 및 생참깨박의 (생물전환)산물에 대해 대식세포 NO 생성능의 면역활성을 조사한 결과 국내 발생 볶은참깨박 원물의 경우 면역활성을 나타내지 않거나 매우 높은 농도에서만 면역활성을 일부 나타내고 있다.

볶은참깨박에 대해 5가지의 효소처리 전처리공정에서의 조건에 따른 생물전환(발효)공정에 의해 (생물전환)산물을 생산하였다. 5가지의 생물전환(발효)공정에 따라 1공정-1, 1공정-2, 1공정-3, 1공정-4, 1공정-5의 (생물전환)산물로 명명하였다.

볶은참깨박 (생물전환)산물 : 1공정-3의 면역활성 역가 MEC100은  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$

생참깨박 (생물전환)산물 : 1공정-3의 면역활성 역가 MEC100은  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  로 확인되었다.

국내 발생 볶은참깨박 및 생참깨박과 자체 탈지공정이 적용된 탈지참깨박의 (생물전환)산물의 면역활성 역가를 비교한 결과 자체 탈지공정이 적용된 탈지참깨박의 (생물전환)산물이  $2^2 \sim 2^4(4 \sim 16)$ 배 면역활성이 더 높음을 확인하였다.

이러한 결과를 통해 국내 발생 탈지참깨박을 이용할 경우 볶은참깨박 보다 생참깨박이 더 활용도가 높을 것으로 생각되며, 국내 발생 탈지참깨박의 (생물전환)산물이 자체 탈지공정의 탈지참깨박 (생물전환)산물에 버금가는 우수한 면역활성을 내기 위해선 생물전환(발효)공정의 재설계가 필요할 것으로 판단이 되었다.

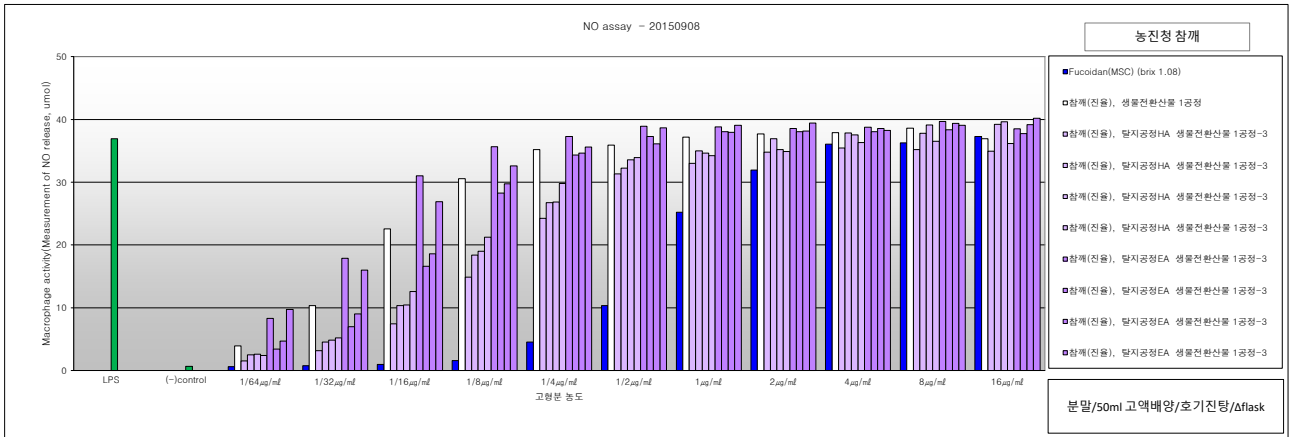


그림 106 자체 탈지공정에 의해 생산된 탈지참깨박의 생물전환(발효)공정 1공정-3에 의해 생산된 (생물 전환)산물의 면역활성 조사

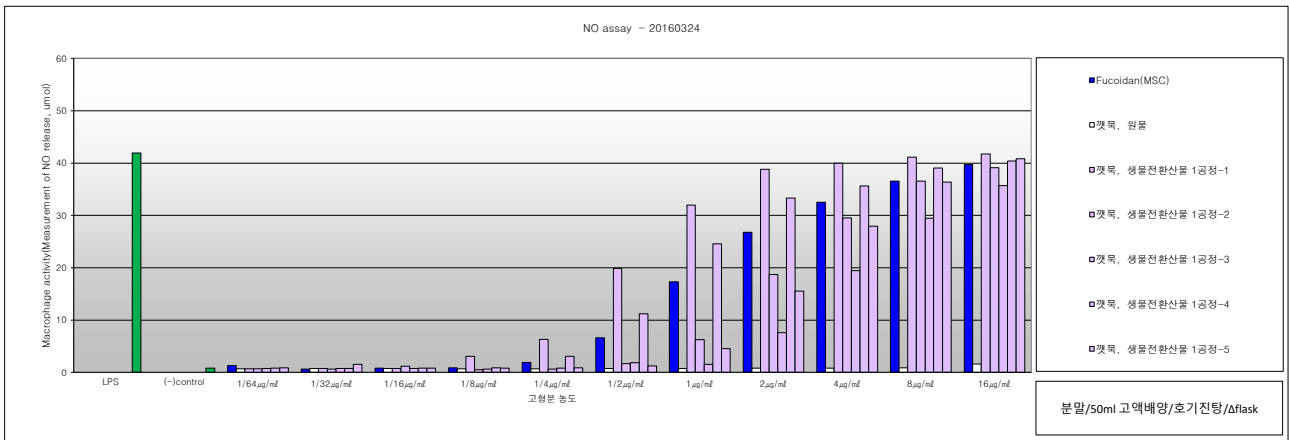


그림 107 국내 발생 볏은참깨박의 원물 및 5가지 효소처리 전처리공정에서의 조건에 따른 생물전환(발효)공정에 의해 생산된 (생물 전환)산물의 면역활성 조사

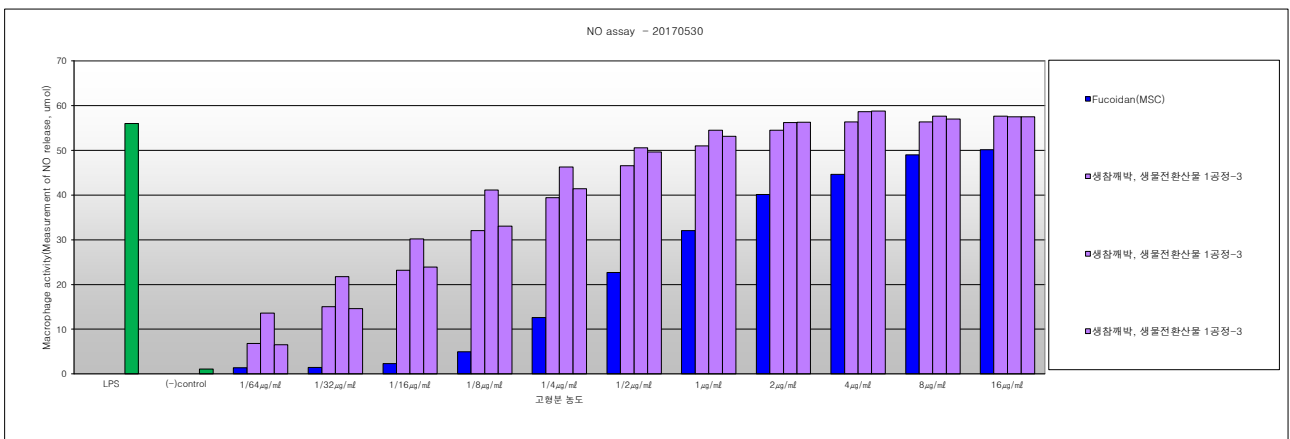


그림 108 국내 발생 생참깨박의 생물전환(발효)공정 1공정-3에 의해 생산된 (생물 전환)산물의 면역활성 조사



### 3. 국내 발생 탈지농산부산물에 적용 가능한 생물전환공정 재설계

#### 가. 탈지대두박

국내 발생 탈지대두박 만을 배양배지의 성분으로 함유하고 있는 배양배지의 경우, 탈지과정에서 함께 추출되는 성분들이 많을수록 소실되는 성분(영양원)도 많아져 결국 필수 영양원인 탄소원, 질소원, 인, 무기염류, 비타민 등의 불균형을 초래하여 발효미생물이 성장 및 활동하기에 한계가 있을 것으로 판단되어, 이에 따라 부족한 필수 영양원을 추가하는 배양배지 최적화 과정을 거쳐 발효미생물이 잘 활동할 수 있도록 최적화 시킨 생물전환(발효)공정 신공정Ⅲ-1으로의 최적화가 이루어졌다.

앞서 생물전환(발효)공정 1공정에 의해 생산된 국내 발생 탈지대두박(3곳의 입고처)의 생물전환산물에서 면역활성이 낮았던 상기 국내 발생 탈지대두박에 대해 생물전환(발효)공정 최적화에 따른 생물전환산물의 면역활성을 조사하였다. 생물전환(발효)공정 1공정에 의해 생산된 생물전환산물에서 면역활성이 낮았던 반면에, 국내 발생 탈지대두박 배양배지에 필수 영양원을 추가하여 최적화 시킨 생물전환(발효)공정 신공정Ⅲ-1을 적용하여 생산된 생물전환산물에서 획기적으로 향상된 면역활성을 나타냈다.

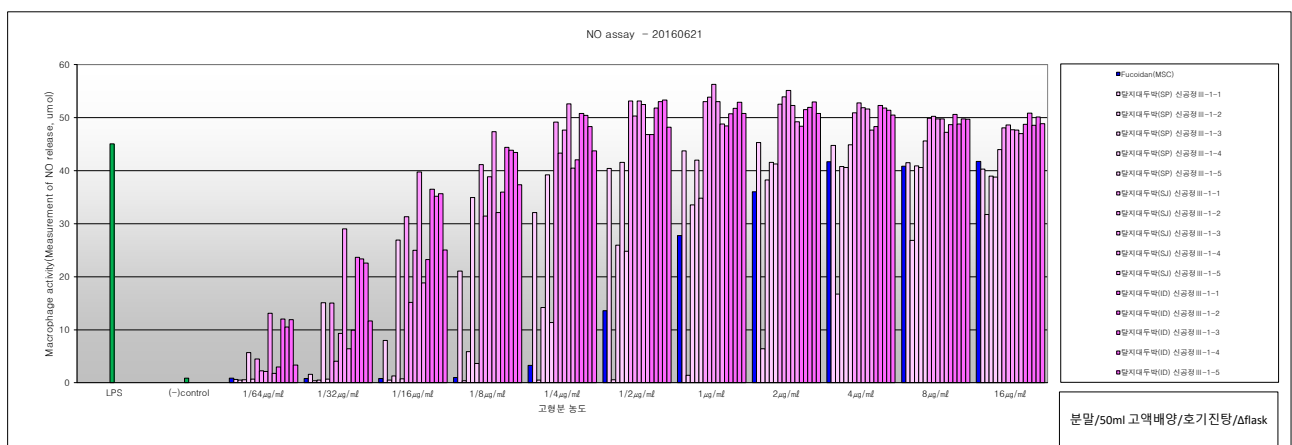
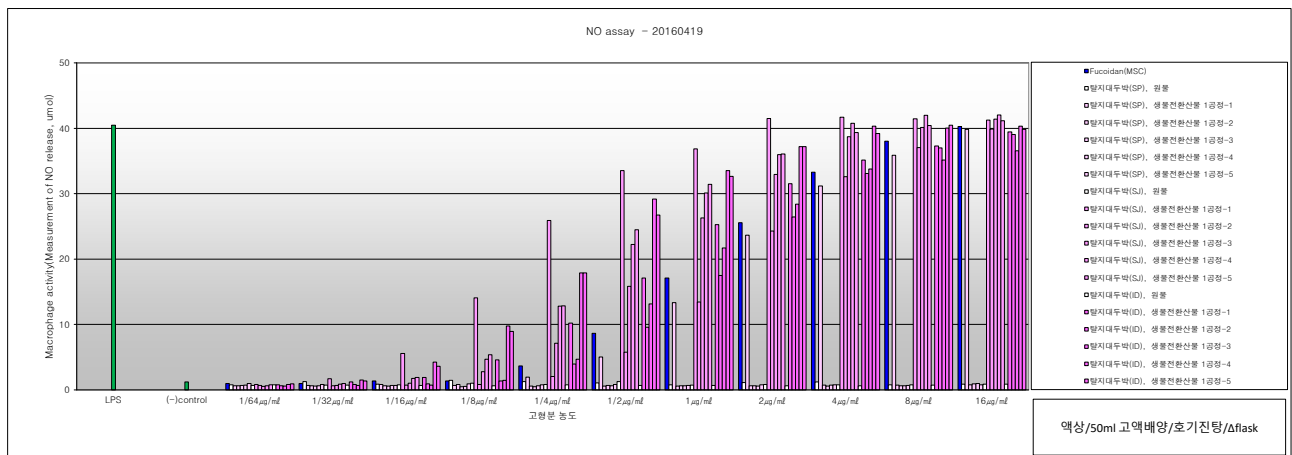


그림 109 국내 발생 탈지대두박의 생물전환(발효)공정 1공정 및 신공정Ⅲ-1에 의해 생산된 생물전환산물의 면역활성 평가

나. 탈지참깨박 (깻묵/볶은참깨박, 생참깨박)

국내 발생 깻묵(볶은참깨박) 만을 배양배지의 성분으로 함유하고 있는 배양배지의 경우, 볶은참깨의 탈지과정에서 함께 추출되는 성분들이 많을수록 소실되는 성분(영양원)도 많아져 결국 필수 영양원인 탄소원, 질소원, 인, 무기염류, 비타민 등의 불균형을 초래하여 발효미생물이 성장 및 활동하기에 한계가 있을 것으로 판단되어, 이에 따라 부족한 필수 영양원을 추가하는 배양배지 최적화 과정을 거쳐 발효미생물이 잘 활동할 수 있도록 최적화 시킨 생물전환(발효)공정 신공정Ⅲ-1으로의 최적화가 이루어졌다.

앞서 생물전환(발효)공정 1공정에 의해 생산된 국내 발생 깻묵(볶은참깨박)의 생물전환산물에서는 면역활성이 낮은 반면에, 국내 발생 깻묵(볶은참깨박) 배양배지에 필수 영양원을 추가하여 최적화 시킨 생물전환(발효)공정 신공정Ⅲ-1을 적용하여 생산된 생물전환산물에서 획기적으로 향상된 면역활성을 나타냈다.

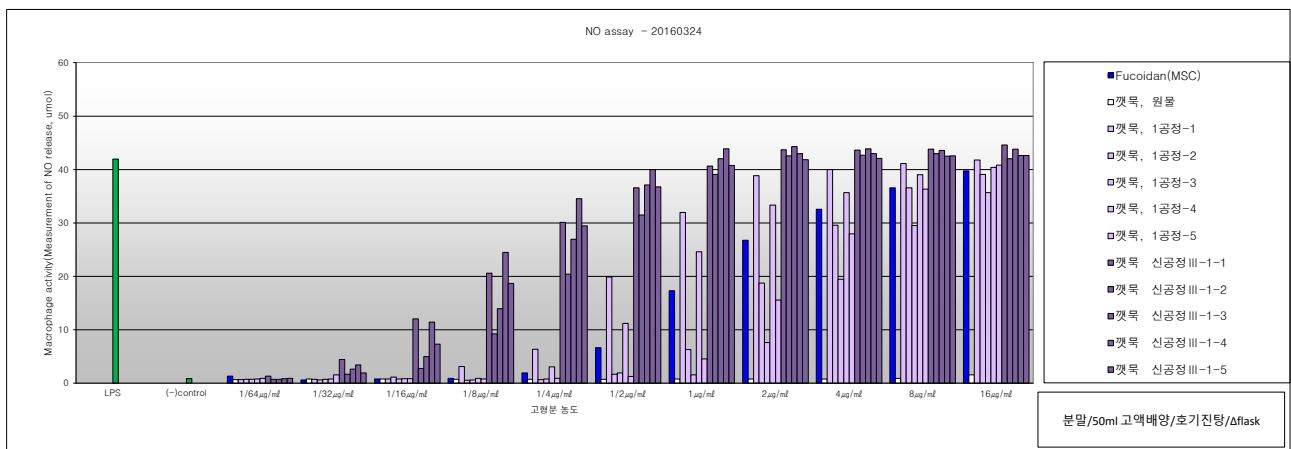


그림 110 국내 발생 깻묵(볶은참깨박)의 생물전환(발효)공정 1공정 및 신공정Ⅲ-1에 의해 생산된 생물전환산물의 면역활성 평가

국내 발생 생참깨박 만을 배양배지의 성분으로 함유하고 있는 배양배지의 경우, 발효미생물에 의한 생물전환(발효)공정을 통해 생산된 생물전환산물에 있어서, 앞서에서도 나타난 바와 같이 탈지공정이 이루어지지 않은 참깨를 배양배지로 사용한 경우와 거의 동일한 수준의 면역활성이 나타났다. 그러나 제공받은 국내 발생의 생참깨박의 경우 미생물 오염이 심하여 통상의 살균처리공정으로는 충분한 살균이 이루어지지 않아, 미생물 오염이 심한 국내 발생의 생참깨박에 감마선 조사를 한 후 살균처리공정을 거쳐 생물전환(발효)공정을 통해 생물전환산물을 생산하였으나 면역활성이 1/2~1/4 정도 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다.

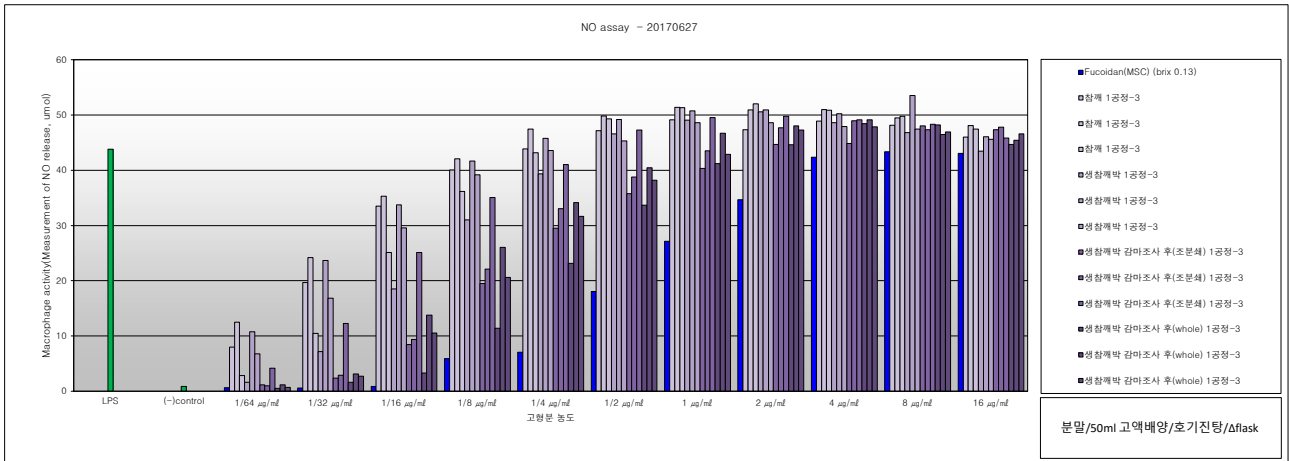


그림 111 국내 발생 생참깨박의 감마선 조사 유무에 따른 생물전환(발효)공정 1공정-3에 의해 생산된 생물전환산물의 면역활성 평가

앞서 구입한 국내 발생 생참깨박의 경우 미생물 오염이 심하여 통상의 살균처리공정으로는 충분한 살균이 이루어지지 않아, 이에 대한 해결책으로 생참깨박의 생산에 있어서 농산물자원인 참깨에 대한 이물 및 곰팡이 세척을 위한 전처리공정을 본 보고서에서 제시한 농산부산물(생물전환)산물 생산공정에 있어서 이물 및 곰팡이 세척공정에 의거하여 수행하고, 자체규격의 미생물검사를 통해 미생물오염 검사를 통과한 원재료(참깨)를 제공하여 생참깨박 생산을 의뢰하여 생산된 생참깨박을 사용하였다.

앞서 생참깨박 만을 배양배지의 성분으로 함유하고 있는 배양배지에서 생산된 생참깨박(생물전환)산물의 면역활성 역가가 탈지공정이 이루어지지 않은 참깨를 배양배지로 사용한 경우와 거의 동등한 수준으로 나타남에 따라, 보다 안정적이고 보다 향상된 면역활성 역가를 나타낼 수 있도록 효소처리 전처리공정에서의 조건 및 추가 필수 영양원이 생물전환(발효)공정에 미치는 영향을 조사하여 생산 안정성이 보다 향상된 신공정 개발을 위하여 신공정 I-1, I-2, II-1, II-2, III-1, III-2에 의해 생산된 생참깨박(생물전환)산물의 면역활성을 평가하여 신공정III을 생참깨박(생물전환)산물의 생산을 위한 생물전환(발효)공정으로 선정하였다.

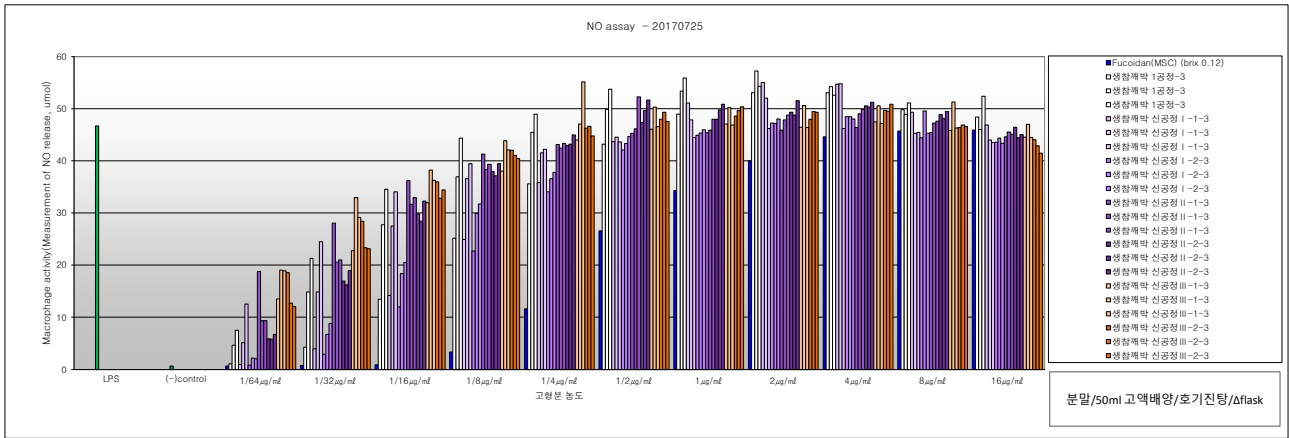


그림 112 생산 안정성이 보다 향상된 생참깨박의 생물전환(발효)공정 개발을 위한 신공정 평가

#### 4. 50L 규모에서의 생산된 국내 발생 생참깨박의 (생물전환)산물의 면역활성 조사

국내 발생 생참깨박에 대한 보다 안정적이고 보다 향상된 면역활성 역가를 나타낼 수 있는 생물전환(발효)공정이 확립됨에 따라 50L 규모의 발효조에서 생물전환(발효)공정의 신공정Ⅲ-2에 의해 생참깨박(생물전환)산물이 안정적으로 생산될 수 있는지 확인한 결과, 앞서 수행한 3반복의 flask 배양에서와 같이 생참깨박(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가인 MEC<sub>100</sub>이 1/2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이하로 확인함으로써 scale-up 이 안정적으로 확립되었음을 확인하였다.

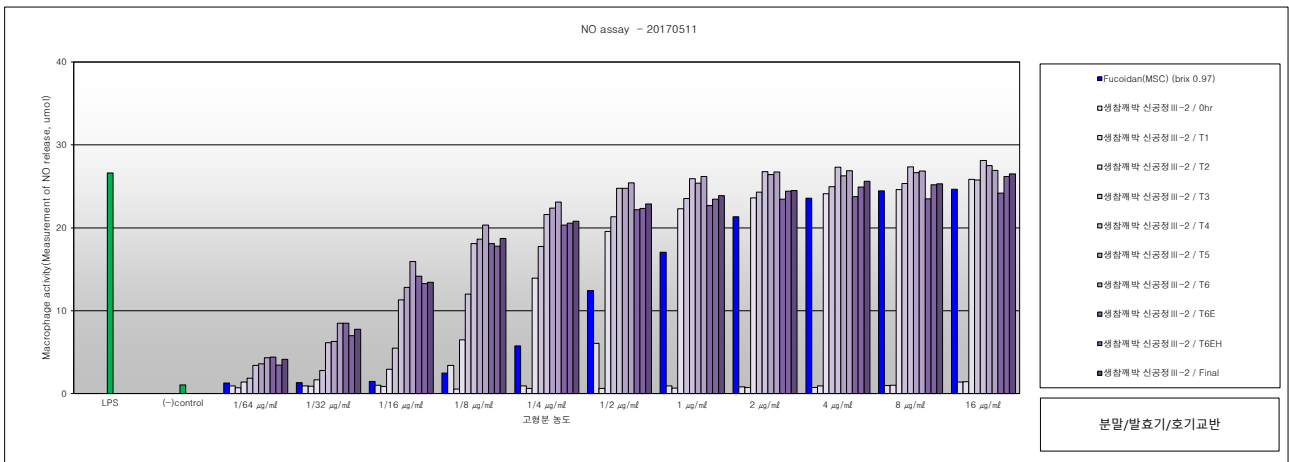


그림 113 50L 규모의 발효조에서 생산된 국내 발생 생참깨박의 (생물전환)산물의 생물전환(발효)공정 발효시간 단계별 면역활성 평가

## 6절. 개발소재의 면역활성 특성 조사

### 1. 미강 원물 및 (생물전환)산물의 cytokine 분비능 평가

미강 및 미강(생물전환)산물의 선천성 면역반응 활성화 효능을 확인하기 위하여 대식세포(macrophage), RAW264.7 세포주에서의 Cytokine 분비능을 조사하였다. 미강 및 미강(생물전환)산물을 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 실험을 수행하였다. 시료 처리 16시간 후 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ ), IL-4(Interlukine-4), IL-5(Interlukine-5), IL-6(Interlukine-6), IL-10(Interlukine-10), IL-12p70(Interlukine-12p70), IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ ), IFN- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) 실험법으로 분석하였다.

현재 시료처리 시간대 별로(6시간, 12시간, 18시간 후) 배양상등액을 취하여 cytokine 분비능을 조사하는 실험을 진행 중에 있으며, 이 결과를 바탕으로 3반복을 실험을 진행할 예정이며, 아래의 결과는 상기의 예비실험 조건에서 수행한 결과를 바탕으로 작성하였다.

#### 가. TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물의 경우 10 $\mu$ g/mL의 처리농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고, 100 $\mu$ g/mL의 고농도에서는 분비량이 증가하는 것이 관찰되었다. 반면, 미강(생물전환)산물의 경우, 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고 10 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 높은 분비량을 나타내었다. 또한, 전체적인 분비량을 비교하였을 시 미강(생물전환)산물이 미강 원물에 비하여 높은 TNF- $\alpha$  분비능을 갖는 것으로 분석되었다.

#### 나. IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### 다. IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### 라. IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### 마. IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물의 경우 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서만 IL-6가 분비되었다. 반면, 미강(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 IL-6가 분비되기 시작하였고, 10 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다. 또한 전체적인 분비량을 비교하였을 시 미강(생물전환)산물이 미강 원물에 비하여 현저히 높은 IL-6 분비능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

#### 바. IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10 이 분비되지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 미강(생물전환)산물의 경우 10 $\mu$ g/mL과 100 $\mu$ g/mL에서 IL-10 이 분비되는 것을 확인할 수 있었다.

#### 사. IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### 아. IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물의 경우 IFN- $\beta$ 를 분비하지만, 전체적으로 매우 낮은 분비량을 나타내었다. 반면, 미강(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작하였고, 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하는 양상을 나타내었다. 전체적인 분비량을 비교하였을 시 미강(생물전환)산물이 미강 원물에 비하여 현저히 높은 IFN- $\beta$  분비능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

#### 자. IFN- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

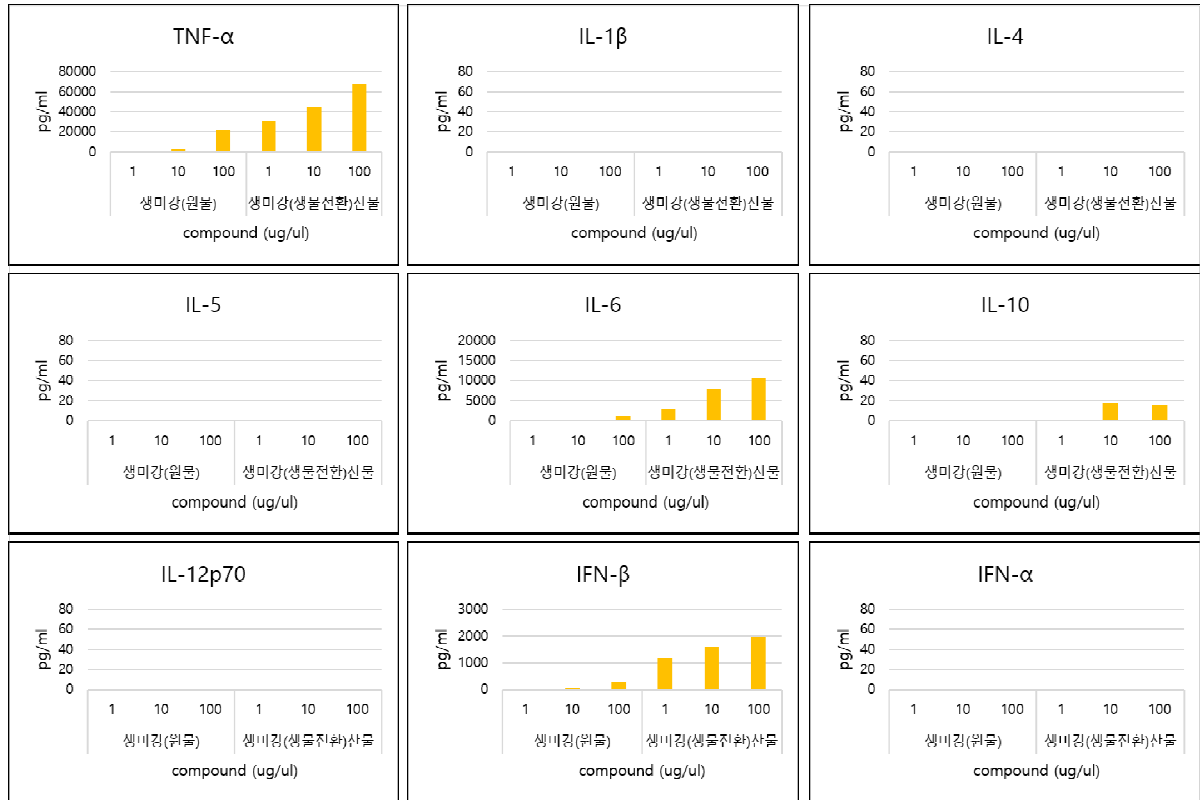


그림 114. 미강 및 미강(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

미강 및 미강(생물전환)산물의 면역활성 관련 cytokine을 분석한 결과, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IFN- $\beta$ 와 함께 IL-10 이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 이 중 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IFN- $\beta$ 의 발현이 매우 높게 유도 되는 것을 확인할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 포식작용 시 대식세포와 단핵세포 등에서 분비되며 inducible nitric oxide(NO)와 함께 독감바이러스 등의 다양한 바이러스에 대하여 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 항원 특이 면역반응, 염증반응, 급성반응에서의 주요 mediator이며 또한 생체내 방어체계에서 핵심역할을 담당하는 대표적 cytokine이다.

IFN- $\beta$ 는 IFN- $\alpha$ 와 함께 type I interferon으로 항균, 항바이러스 효과가 있으며 Th1 세포의 분화에 기여하여 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokine으로 Th1 면역반응을 유도하는 반면, Th2 및 Th17 면역반응을 억제하는 면역조절 기능이 있는 cytokine이다.

따라서, 본 과제를 통해 개발된 미강(생물전환)산물은 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화시킬 수 있는 소재로, 동시에 항진된 Th2 면역반응도 억제시킬 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 Th1 면역반응을 향상시킬 필요가 있거나 또는 Th2 면역반응이 항진되어 발생하는 질환에 있어서 효능을 나타낼 수 있을 것으로 예상된다. 여기에 해당되는 경우로 항병력(항바이러스/항박테리아) 강화, 항암 활성화, 알코올성 지방간/간염 억제, 골 대사 관련 뼈건강 증진, 항당뇨/중성지방 저하, 대장염증질환 개선, 알레르기비염/천식 개선, 아토피 피부염 개선 및 피부건강 향상 등에 직,간접적으로 개선 효과가 나타날 수 있을 것으로 예상된다.



## 2. 대두 원물 및 (생물전환)산물의 cytokine 분비능 평가

대두 및 대두(생물전환)산물의 선천성 면역반응 활성화 효능을 확인하기 위하여 대식세포(macrophage), RAW264.7 세포주에서의 Cytokine 분비능을 조사하였다. 대두 및 대두(생물전환)산물을 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 실험을 수행하였다. 시료 처리 16시간 후 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ ), IL-4(Interlukine-4), IL-5(Interlukine-5), IL-6(Interlukine-6), IL-10(Interlukine-10), IL-12p70(Interlukine-12p70), IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ ), IFN- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) 실험법으로 분석하였다.

현재 시료 처리 시간대 별로(6시간, 12시간, 18시간 후) 배양상등액을 취하여 cytokine분비능을 조사하는 실험을 진행 중에 있으며, 이 결과를 바탕으로 3반복을 실험을 진행할 예정이며, 아래의 결과는 상기의 예비실험 조건에서 수행한 결과를 바탕으로 작성하였다.

### 가. 대두 및 대두(생물전환)산물

#### (1) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물에서는 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 대두(생물전환)산물에서는 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 분비되기 시작하였고 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하는 양상을 나타내었다.

#### (2) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물과 대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### (3) IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물과 대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### (4) IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물과 대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(5) IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-6의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 대두(생물전환)산물의 경우 10 $\mu$ g/mL 농도에서부터 IL-6가 분비되기 시작하여, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 분비량이 상대적으로 크게 증가하였다.

(6) IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 대두(생물전환)산물의 경우 100 $\mu$ g/mL에서만 IL-10 이 소량 분비되는 것을 확인할 수 있었다.

(7) IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물과 대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(8) IFN- $\beta$  분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IFN- $\beta$ 의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 대두(생물전환)산물의 경우, 1 $\mu$ g/mL에서부터 IFN- $\beta$  가 분비되기 시작하였고, 10 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다.

(9) IFN- $\alpha$  분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 대두 원물과 대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

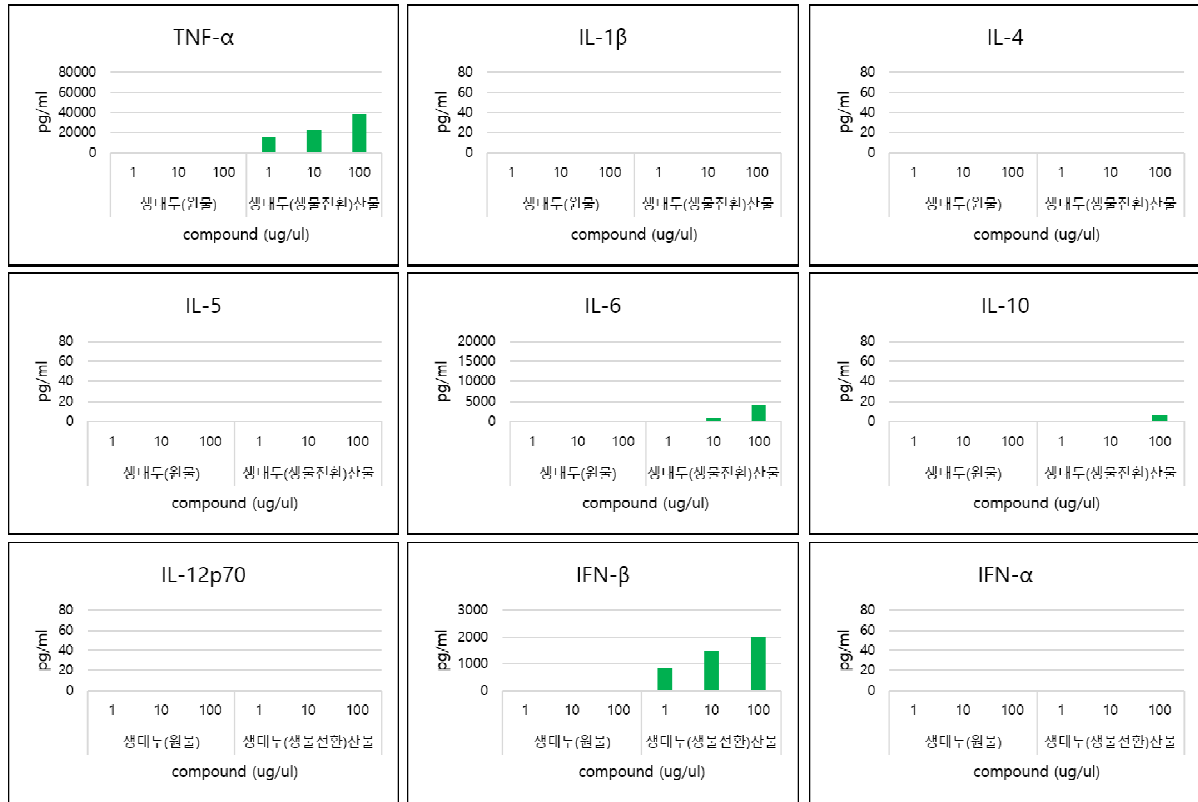


그림 115. 대두 및 대두(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

## 나. E탈지대두 및 E탈지대두(생물전환)산물

### (1) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물에서는 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지대두(생물전환)산물에서는 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 높은 분비량을 나타내었다.

### (2) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물과 E탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (3) IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물과 E탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (4) IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물과 E탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (5) IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-6의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지대두(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 IL-6가 분비되기 시작하였고 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다.

### (6) IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10 이 분비되지 않은 것으로 확인되었다. 반면에 E탈지대두(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 IL-10의 분비가 관찰되지 않았으나 10 $\mu$ g/mL과 100 $\mu$ g/mL에서는 농도 의존적으로 분비량이 증가하였다.

(7) IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물과 E탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(8) IFN-β 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-β(Interferon-β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물의 경우 1, 10, 100μg/mL의 처리농도 모두에서 IFN-β의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지대두(생물전환)산물의 경우 1μg/mL에서부터 IFN-β가 분비되기 시작하였고 10, 100 μg/mL의 처리농도에서 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하는 양상을 나타내었다.

(9) IFN-α 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-α(Interferon-α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지대두 원물과 E탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

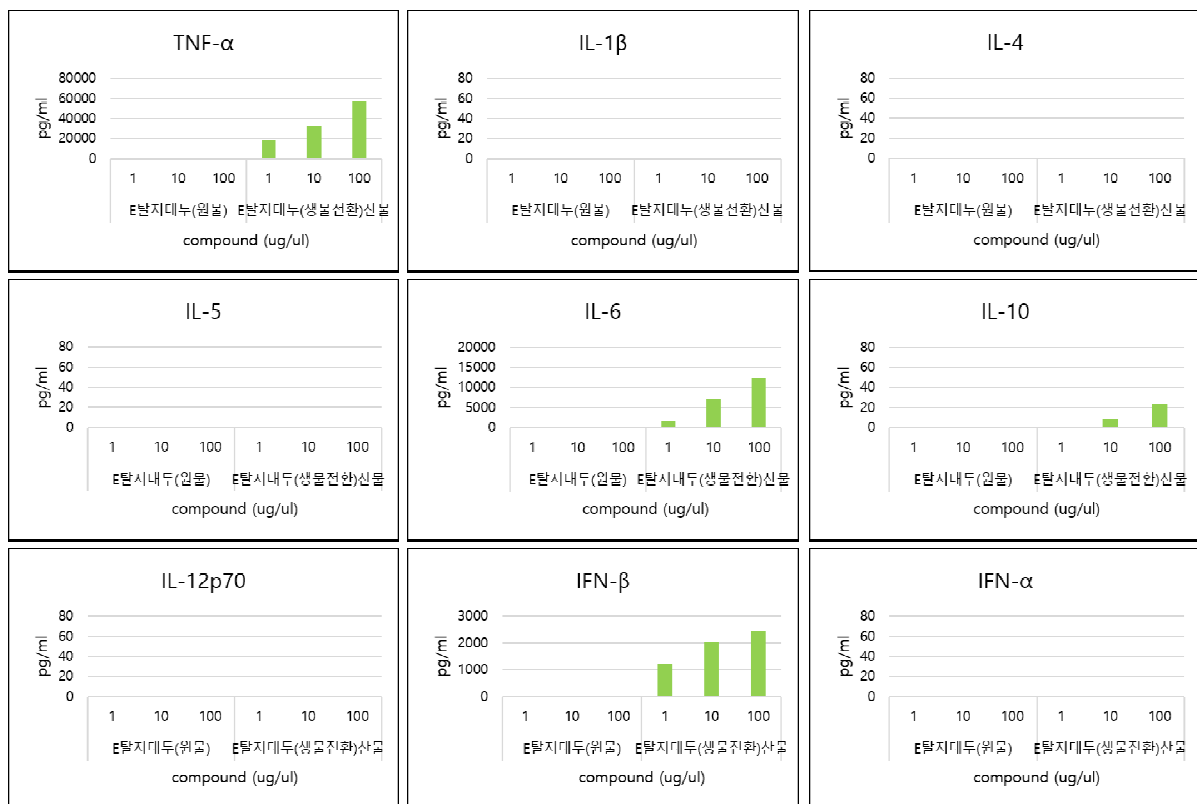


그림 116. E탈지대두 및 E탈지대두(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

## 다. H탈지대두 및 H탈지대두(생물전환)산물

### (1) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물의 경우 100 $\mu$ g/mL에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 관찰되었다. H탈지대두(생물전환)산물에서는 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 분비되기 시작하였고 10 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다.

### (2) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물과 H탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (3) IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물과 H탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (4) IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물과 H탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (5) IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-6의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, H탈지대두(생물전환)산물의 경우 10 $\mu$ g/mL부터 IL-6가 분비되기 시작하였고, 농도가 증가함에 따라 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

### (6) IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, H탈지대두(생물전환)산물의 경우 100 $\mu$ g/mL에서 IL-10 이 분비되는 것을 확인할 수 있었다.

(7) IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물과 H탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(8) IFN-β 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-β(Interferon-β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물의 경우 100μg/mL의 처리농도에서만 IFN-β의 분비가 소량 관찰되었다. 반면에 H탈지대두(생물전환)산물의 경우 10μg/mL, 100μg/mL의 처리농도에서 IFN-β의 분비량이 크게 증가하였다.

(9) IFN-α 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-α(Interferon-α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지대두 원물과 H탈지대두(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

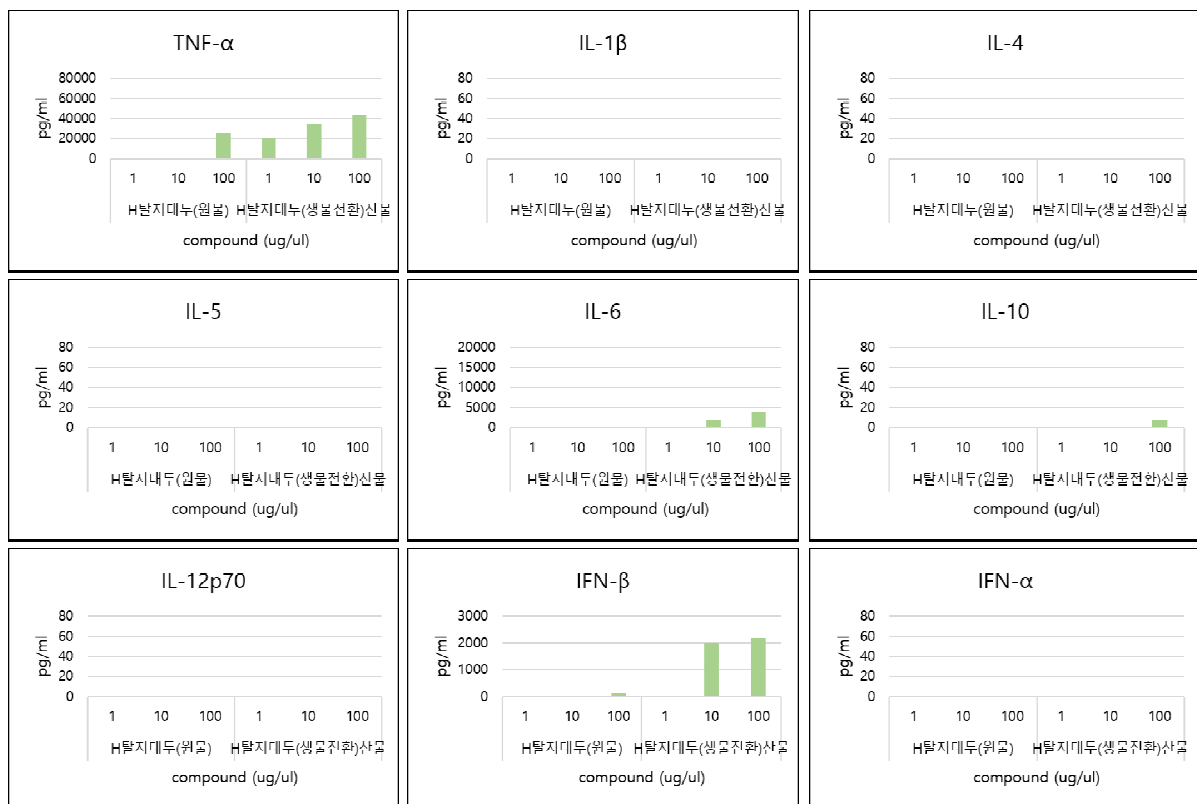


그림 117. H탈지대두 및 H탈지대두(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

대두, E탈지대두 및 H탈지대두의 면역활성 관련 cytokine의 분비패턴이 서로 매우 유사하며 또한 대두(생물전환)산물, E탈지대두(생물전환)산물 및 H탈지대두(생물전환)산물에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IFN- $\beta$ 와 함께 IL-10 이 발현되는 등 cytokine 분비패턴이 서로 매우 유사하게 나타났다. 특히, 상기 3가지의 대두(생물전환)산물에 있어서의 IFN- $\beta$  분비능이 미강(생물전환)산물과 유사하여 앞서 언급한 유사한 효과가 기대된다.



### 3. 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 cytokine 분비능 평가

생참깨 및 생참깨(생물전환)산물의 선천성 면역반응 활성화 효능을 확인하기 위하여 대식세포(마크로파지), RAW264.7 세포주에서의 Cytokine 분비능을 조사하였다. 생참깨 및 생참깨(생물전환)산물은 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 농도를 처리하여 실험을 수행하였다. 시료 처리 16시간 후 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ ), IL-4(Interlukine-4), IL-5(Interlukine-5), IL-6(Interlukine-6), IL-10(Interlukine-10), IL-12p70(Interlukine-12p70), IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ ), IFN- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) 실험법으로 분석하였다.

현재 시료 처리 시간대 별로(6시간, 12시간, 18시간 후) 배양상등액을 취하여 cytokine분비능을 조사하는 실험을 진행 중에 있으며, 이 결과를 바탕으로 3반복을 실험을 진행할 예정이며, 아래의 결과는 상기의 예비실험 조건에서 수행한 결과를 바탕으로 작성하였다.

#### 가. 참깨 및 참깨(생물전환)산물

##### (1) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 생참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고, 10  $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서 분비량이 크게 증가하는 양상을 나타냈다.

##### (2) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물과 생참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

##### (3) IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물과 생참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

##### (4) IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물과 생참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(5) IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-6의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 대두(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 IL-6가 분비되기 시작하였고, 10 $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다.

(6) IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 생참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL부터 IL-10가 분비되기 시작하였고 10,100 $\mu$ g/mL에서 농도 의존적으로 증가하며 특히, 100 $\mu$ g/mL의 고농도에서 IL-10의 분비가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(7) IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물과 생참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(8) IFN- $\beta$  분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IFN- $\beta$ 의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, 생참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL 의 저농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고, 10 $\mu$ g /mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서 분비량이 증가하였다.

(9) IFN- $\alpha$  분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 생참깨 원물과 생참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

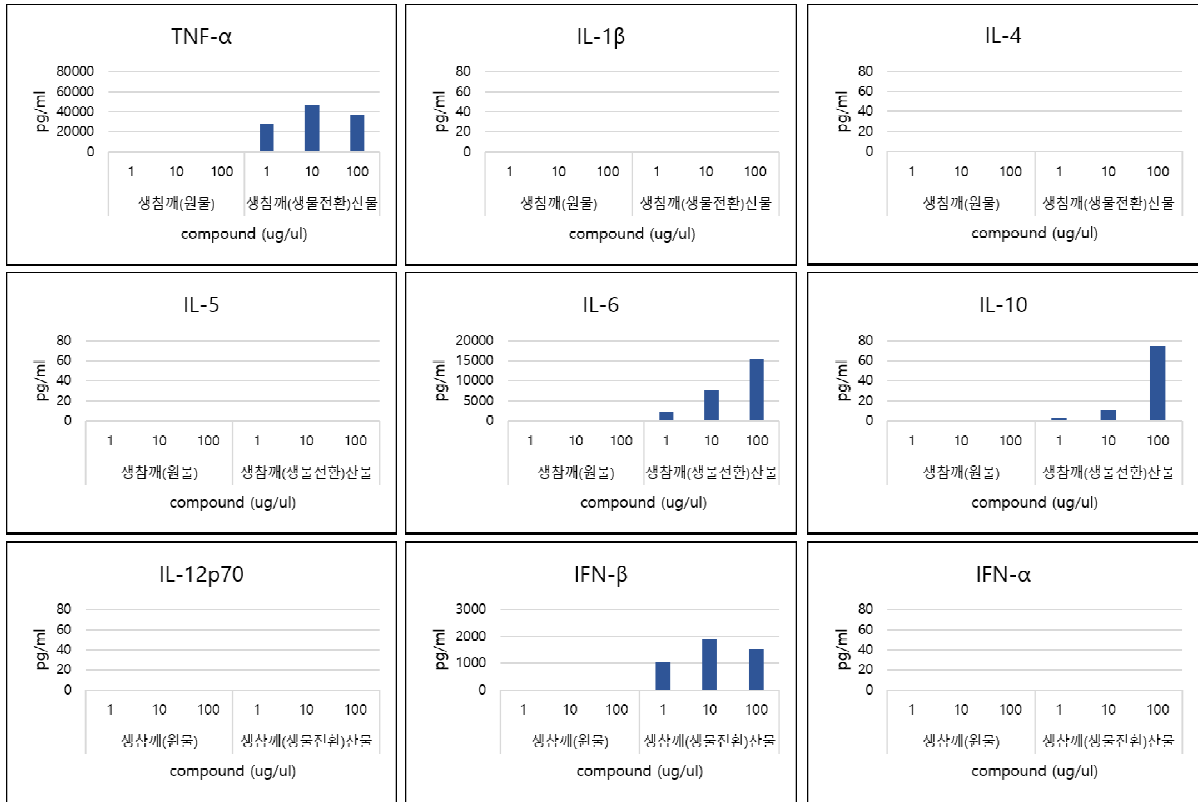


그림 118. 생참깨 및 생참깨(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

## 나. E탈지참깨 및 E탈지참깨(생물전환)산물

### (1) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고, 10 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 증가하였다.

### (2) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물과 E탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (3) IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물과 E탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (4) IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물과 E탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (5) IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-6의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL부터 IL-6가 분비되기 시작하였고 10 $\mu$ g/mL에서 미세하게 증가하다가 100 $\mu$ g/mL에서 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

### (6) IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 IL-10 이 분비되지 않았으나 100 $\mu$ g/mL에서 IL-10 이 분비되는 것을 확인할 수 있었다.

(7) IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물과 E탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(8) IFN-β 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-β(Interferon-β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100μg/mL의 처리농도 모두에서 IFN-β의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, E탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1μg/mL에서부터 IFN-β가 분비되기 시작하였고, 10μg/mL, 100μg/mL의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다.

(9) IFN-α 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-α(Interferon-α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 E탈지참깨 원물과 E탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

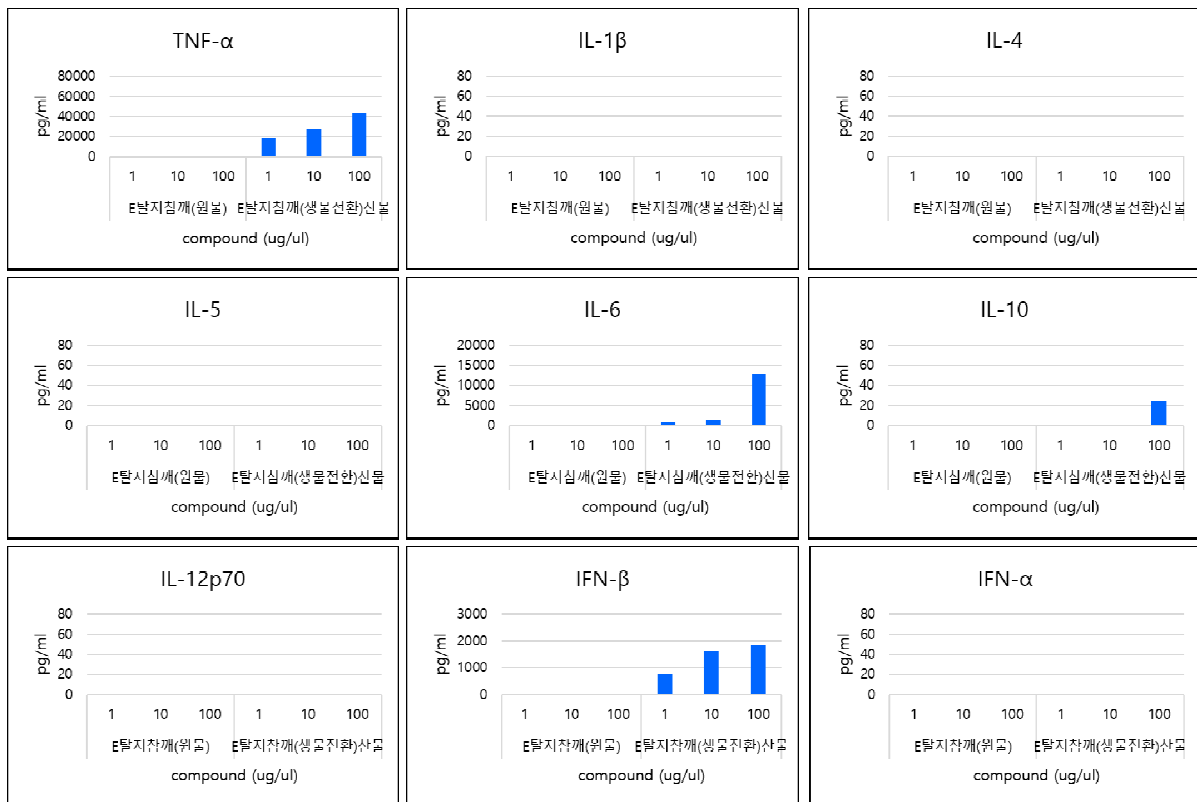


그림 119. E탈지참깨 및 E탈지참깨(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

## 다. H탈지참깨 및 H탈지참깨(생물전환)산물

### (1) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물의 경우 1 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL의 처리농도에서는 TNF- $\alpha$ 의 분비가 관찰되지 않았으나 100 $\mu$ g/mL의 고농도 처리에서는 TNF- $\alpha$ 의 분비가 소량 관찰되었다. H탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하였고, 10 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도에서 분비량이 증가하였다.

### (2) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물과 H탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (3) IL-4 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물과 H탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (4) IL-5 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물과 H탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

### (5) IL-6 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-6의 분비가 관찰되지 않았다. 반면에 H탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1 $\mu$ g/mL의 저농도에서 IL-6의 분비가 소량 관찰되었으며 10, 100 $\mu$ g/mL에서는 IL-6의 분비량이 증가하는 것이 확인되었다.

### (6) IL-10 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100 $\mu$ g/mL의 처리농도 모두에서 IL-10의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, H탈지참깨(생물전환)산물의 경우 처리농도 10 $\mu$ g/mL부터 IL-10 이 분비되기 시작하였고, 100 $\mu$ g/mL로 농도가 증가함에 따라 분비량도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(7) IL-12p70 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물과 H탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(8) IFN-β 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-β(Interferon-β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물의 경우 1, 10, 100μg/mL의 처리농도 모두에서 IFN-β의 분비가 관찰되지 않았으며 반면, H탈지참깨(생물전환)산물의 경우 1μg/mL 의 저농도에서부터 IFN-β가 분비되기 시작하였고, 10μg/mL, 100μg/mL의 처리농도에서 분비량이 크게 증가하였다.

(9) IFN-α 분비능 평가

시료처리 후 16시간에 배양상등액을 취하여 IFN-α(Interferon-α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 H탈지참깨 원물과 H탈지참깨(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

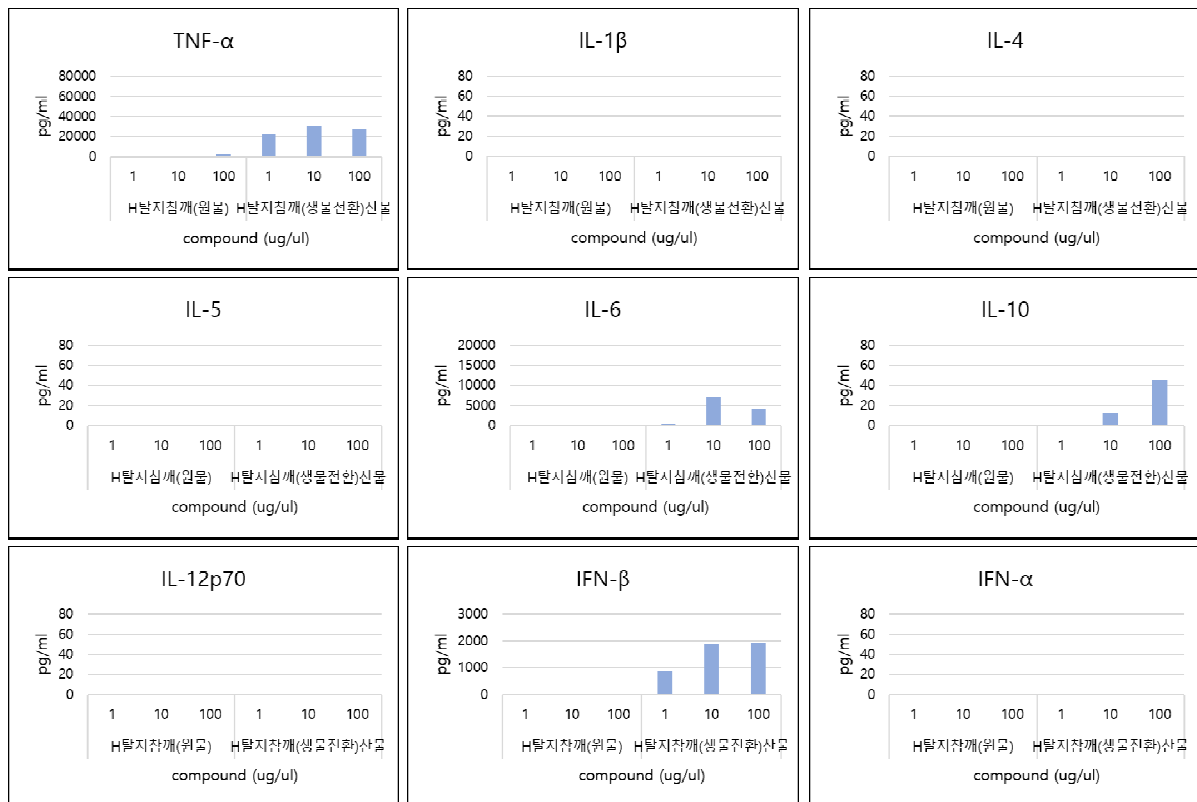


그림 120. H탈지참깨 및 H탈지참깨(생물전환)산물의 cytokine 발현능 평가

참깨의 경우 미강과 달리 대두에서와 유사하게 생참깨, E탈지참깨, H탈지참깨 원물 모두에서 조사한 9가지의 cytokine 모두 거의 분비가 관찰되지 않았다. 반면에 생참깨(생물전환)산물, E탈지참깨(생물전환)산물, H탈지참깨(생물전환)산물은 미강(생물전환)산물 및 3가지의 대두(생물전환)산물과 유사하게 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IFN- $\beta$ 의 발현이 매우 높게 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, IFN- $\beta$ 의 분비능이 미강(생물전환)산물과 유사하여 앞서 언급한 유사한 효과가 기대된다.



## 7절. 개발소재로부터 정제된 면역활성 다당체(유효성분)의 특성 조사

### 1. 미강(생물전환)산물의 면역활성 다당체(유효성분)

#### 가. 면역활성 다당체(유효성분) 분리·정제

##### (1) 분리·정제공정

다당체분획물의 제조공정도는 아래의 그림과 같다. 분말화된 미강(생물전환)소재에 약 20배수의 3차증류수를 첨가하여 수용성물질을 추출한다. 수용성물질 추출 후 원심분리를 통해 잔사를 제거하고 추출상등액을 분리한다. 추출상등액에 상등액의 4배수에 해당하는 양의 EtOH을 첨가하여 잘 섞어준 후, 4℃에서 밤새 보관한다. 생성된 침전물을 원심분리를 통해 분리하고, 상등액을 제거한 침전물에 3차증류수를 첨가해 용해시킨 후, 원심분리 또는 여과를 통해 용해되지 않은 물질을 제거한다. 여과된 침전물용해액에 대해 투석용 튜브를 사용하여 투석을 진행한다. 2시간에 한 번씩 3차증류수를 교체하고, 이를 10회 이상 반복한다. 투석완료 후 동결건조를 통해 분말화한다.



그림 121. 다당체분획물 제조공정도 및 제조과정

(2) HPLC 분석

다당체분획물의 분석에 사용한 기기는 Shimadzu LC 010Avp (Shimadzu Co., Japan)로 분석조건은 아래 표와 같다.

표 43. 다당체분획물 분석조건

Instrument	Conditions
Instrument	SHIMADZU_HPLC, SEDEX 75_ELSA
Column	Ultrahydrogel™ 1000 (7.8x300mm) Waters, WAT011535
Column oven	45 °C
Flow rate	0.6 ml/min
Solvent	HPLC grade water
Elution	Isocratic, HPLC water 100%
Run time	40 min
Injection	20 µl
Sample extraction	시료 100mg을 HPLC water 10ml로 250rpm 1시간 shaking 추출 후, 원심분리 후 분석

50L 발효조에서 생산된 2배치, 2톤 발효조에서 생산된 1배치의 미강(생물전환)산물을 사용하여 분리정제 한 다당체분획물의 균일성을 확인하기 위해 반복실험을 진행하였다. 각 배치당 2번씩 반복하여 다당체분획물을 제조하였다. 각 배치의 미강(생물전환)산물의 다당체분획물의 HPLC분석 결과 모두 저분자물질이 잘 제거되고 면역활성 다당체의 분획이 잘 이루어졌음을 크로마토그램의 피크를 통해 확인하였다. 다당체분획물 정제에 있어서 50L 제1배치와 50L 제2배치의 다당체분획물 회수율은 각각 약 10.74%, 3.31%이었으며, 2톤 제1배치의 회수율은 10.92%로 배치 간에 서로 차이를 보였지만, 이는 정제순도와 함께 정제규모에 따른 손실의 과다여부에 의한 것으로 각 배치의 2반복 다당체분획물의 분리정제에 있어서 각각 2.52, 0.86, 0.00으로 편차가 거의 없음을 확인하였다. 이를 통해 배치에 따른 다당체분획 제조공정 적용의 차이가 없음을 확인하였고, 재현성이 우수한 다당체분획물 제조공정임을 확인하였다.

표 44. 미강(생물전환)산물의 생산배치에 따른 2반복 다당체분획물의 회수율 비교

	다당체분획물 회수율(%)	편차
미강(생물전환)산물 50L 제1배치	10.74	2.52
미강(생물전환)산물 50L 제2배치	3.31	0.86
미강(생물전환)산물 2톤 제1배치	10.92	0.00

n=2

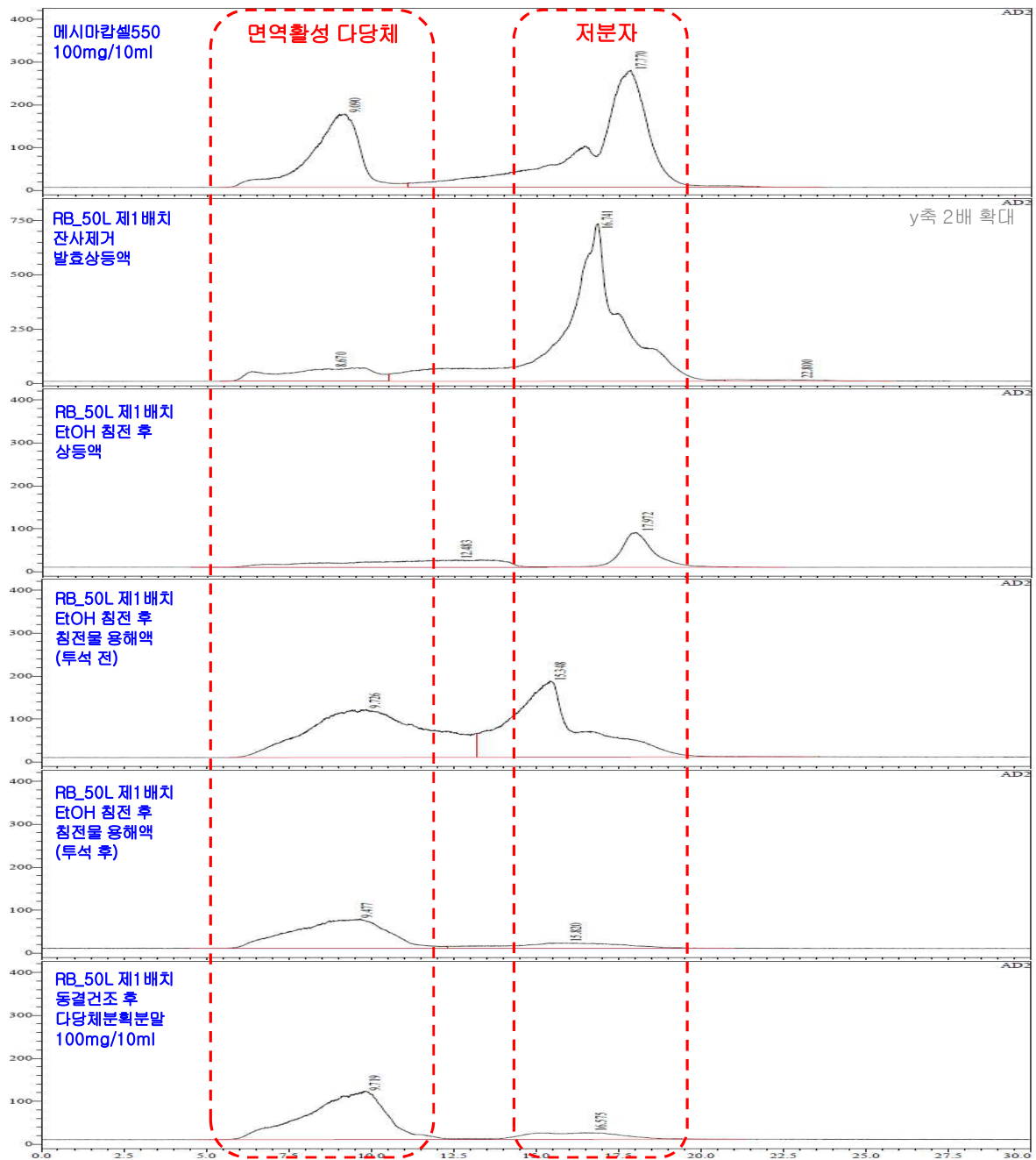


그림 122. 미강(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별 HPLC분석 크로마토그램

미강(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별로 샘플을 채취하여, 공정에 따른 크로마토그램 패턴 변화를 분석하였다. 비교물질로 상황버섯 균사체 유래의 면역활성 다당체로 항암치료에 사용되고 있는 전문의약품인 메시마캡셀550을 사용하였다. 분석결과 미강(생물전환)산물의 불용성물질을 제거한 상등액을 gel filtration HPLC를 통해 분석한 결과 16.7분대에서 저분자물질의 피크가 나타났으며, 8.6~9.7분대에서 고분자의 다당체분획 피크가 검출되었다. EtOH침전공정과 투석공정을 진행 후, 저분자물질이 제거되어 분석 시 저분자물질의 피크가 감소함을 확인하였고 동결건조 후에도 큰 변화가 없음을 확인하였다.

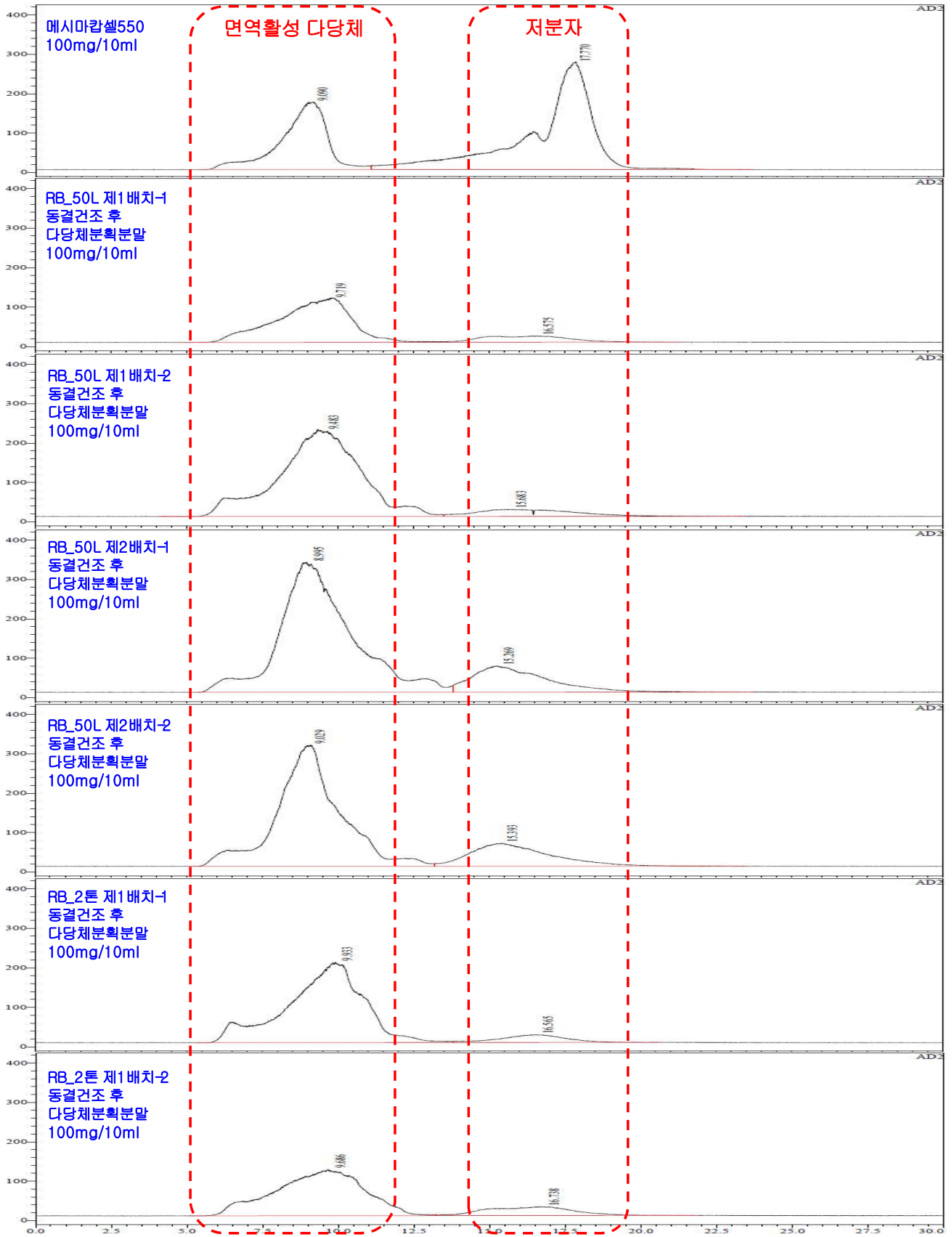


그림 123. 미강(생물 전환)산물의 다당체분획물들의 HPLC분석 크로마토그램

(3) 대식세포 NO 생성 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

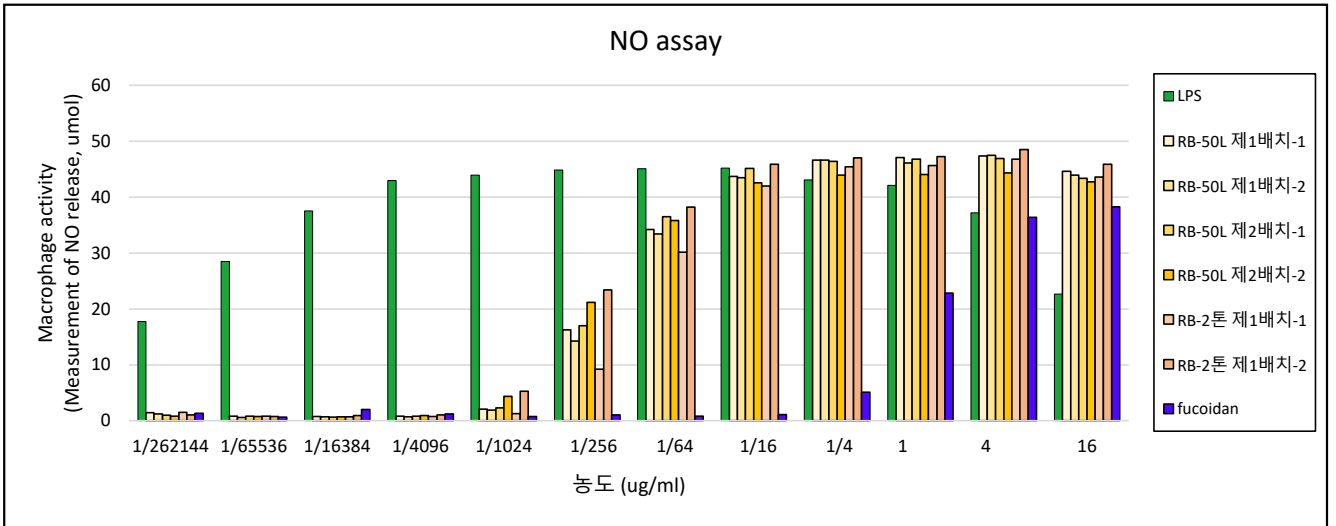


그림 124. 미강(생물전환)산물의 다당체분획물들의 대식세포 활성화능 평가

50L 발효조와 2톤 발효조에서 각각 생산된 총 3배치의 미강(생물전환)산물을 사용하여, 다당체분획물 분리정제의 균일성을 확인하기 위해 반복실험을 진행하였다. 각 배치당 2번씩 다당체분획물을 제조하였고, 이들의 대식세포 NO 생성능을 측정하여 대식세포 활성화능을 평가하였다.

측정 결과, 50L 제1배치의 미강(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들(RB\_50L 제1배치-1, 2)와 제2배치의 미강(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들(RB\_50L 제2배치-1, 2), 2톤 제1배치 미강(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들(RB\_2톤 제1배치-1, 2)간의 NO 생성능에서 큰 차이를 보이지 않았다. 각각의 배치에서 생산된 미강(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들의 면역활성 역가 MEC100은 대략 1/4 µg/mL 임을 확인할 수 있었다.

앞선 결과에서 50L 제2배치의 미강(생물전환)산물의 다당체분획물 회수율이 3.1%로, 50L 제1배치의 미강(생물전환)산물의 다당체분획물 회수율이 10.74%, 2톤 제1배치의 미강(생물전환)산물의 다당체분획물 회수율이 10.92%인 것에 비해 더 낮은 회수율을 보였지만, NO 생성능을 비교하였을 때 큰 차이가 없음을 확인하였다.

## 나. 면역활성 다당체(유효성분) 작용기전 연구

### (1) 대식세포에서의 cytokines 분비패턴 조사 및 Receptor 유추 해석

최근 면역활성을 나타내는 다당체에 의한 macrophage 활성화, NK세포 자극활성 및 cytokine 생산 자극 등과 같은 여러 생리활성에 대한 연구결과들이 속속 발표되고 있다.

또한 면역활성을 나타내는 다당체의 특이적 구조가 대식세포 등 면역세포들이 세포표면에 발현하고 있는 특이수용체인 패턴인식수용체(pattern recognition receptor, PRR)에 인식되면서 신호전달을 매개한다고 밝혀지고 있다.

이러한 연구결과들에 근거하여, 앞에서 확립된 분리정제공정을 통해 제조된 미강(생물전환)산물의 다당체분획물 또한 면역세포의 특이수용체인 패턴인식수용체에 인식되어 신호전달이 매개되는지를 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴 비교를 통해 특이수용체(specific receptor)를 유추하였고, 이를 확인하기 위하여 유추된 특이수용체에 대한 inhibitor를 처리하여 신호전달이 차단되는지 확인하는 실험도 함께 진행하였다. Inhibitor 처리 실험을 통해 미강(생물전환)산물에 대한 특이수용체가 패턴인식수용체의 하나인 TLR4(Toll-like receptor4)임을 확인할 수 있었으며, TLR4의 ligand로 잘 알려진 LPS와 함께 TLR4 agonist로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 비교를 통해 미강(생물전환)산물의 면역활성 특성을 조사하였다.

미강(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성을 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴을 조사하였다. 대조군 물질로는 LPS(Lipopolysaccharide)를 각각 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 처리하였으며, 미강(생물전환)산물은 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 반면 미강(생물전환)산물의 다당체분획물은 LPS와 동일한 농도인 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 수행하였다. 미강(생물전환)산물의 처리농도 설정은 미강(생물전환)산물로부터 다당체분획물의 회수율이 반복실험을 통해 약 12 %로 나왔기 때문에 이를 근거로 하여 농도를 설정하였다.

#### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 미강(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되는 것을 확인할 수 있었으며 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작해서 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 미강(생물전환)산물의 TNF- $\alpha$  분비량과 비슷한 수치를 나타내었다. 또한 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물 다당체분획물 모두에서 농도가 증가할수록 TNF- $\alpha$  분비량이 유사하게 증가함을 보임을 확인하였다. 이를 통해 미강(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

미강(생물전환)산물 다당체분획물과 LPS의 TNF- $\alpha$  분비량을 비교하였을 때, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 LPS가 더 높은 분비량을 나타냈으나, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 서로 비슷한 정도의 TNF- $\alpha$  분비량을 보였다.

#### (나) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를

ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 미강(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 IL-6가 분비되기 시작하여 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-6의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 IL-6가 소량 분비되기 시작하여 처리농도가 증가함에 따라 IL-6의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 농도가 증가할수록 IL-6 분비량이 유사한 분비량을 보임을 확인하였다. 이를 통해 미강(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-6를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

미강(생물전환)산물 다당체 분획물과 LPS의 IL-6 분비량을 비교하였을 때, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 LPS에 의한 IL-6의 분비량이 낮게 나타났으나, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 서로 비슷한 정도의 IL-6 분비량을 보였다.

(바) IL-10 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 미강(생물전환)산물의 경우 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-10의 분비량이 측정되는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-10의 분비량이 측정되었다.

미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 IL-10 분비량이 고농도에서 유사하게 측정된 것을 확인하였다. 이를 통해 미강(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-10을 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IL-10 분비량을 비교하였을 때 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서만 IL-10의 분비량이 측정되었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 미강(생물전환)산물 다당체분획물에서 IL-10의 분비량이 더 높게 나타났다.

#### (사) IL-12p70 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### (아) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 미강(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되는 것을 확인할 수 있었고 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작해서 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 미강(생물전환)산물의 IFN- $\beta$  분비량과 비슷한 수치를 나타내었다. 또한 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 IFN- $\beta$  분비량이 농도가 증가할수록 유사하게 증가함을 확인하였다. 이를 통해 미강(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IFN- $\beta$ 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IFN- $\beta$  분비량을 비교하였을 때 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 모든 농도에서 LPS가 상대적으로 약간 높게 나타났다.

#### (자) 결과 분석

미강(생물전환)산물의 면역활성 관련 cytokine을 분석한 결과, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 및 IFN- $\beta$ 가 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 미강(생물전환)산물의 상기 면역활성은 다당체분획물에 기인한 것임을 확인할 수 있었다. 비교물질인 LPS와 비교평가 시, LPS에서도 TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$ 의 cytokine 분비패턴 양상이 미강(생물전환)산물 다당체분획물과 유사함은 물론 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-12p70도 함께 분비되지 않음을 확인할 수 있었다. LPS는 TLR4(Toll-loke receptor4)에 인식되는 물질로 잘 알려져 있는 바, 이를 통해 미강(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 인식되어 신호를 매개할 것이라 유추해석할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 탐식작용 시 대식세포와 단핵세포 등에서 분비되며 inducible nitric oxide(NO)와 함께 독감바이러스 등의 다양한 바이러스에 대하여 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 항원 특이 면역반응, 염증반응, 급성반응에서의 주요 mediator이며 또한 생체내 방어체계에서 핵심역할을 담당하는 대표적 cytokine이다.

IFN- $\beta$ 는 IFN- $\alpha$ 와 함께 type I interferon으로 항균, 항바이러스 효과가 있으며 특히, Th1 세포의 분화에 기여하여 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokine으로 Th1 면역반응을 유도하는 반면, Th2 및 Th17 면역반응을 억제하는 면역조절 기능이 있는 cytokine이다.

결론적으로 활성화시킨 대식세포에서 Interferon- $\beta$ 의 생성이 유도됨을 확인하여 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화시킬 수 있는 소재로 판단되며, 이들의 면역활성은 모두 고분자 다당체분획물에 의해 나타남을 확인할 수 있었다.



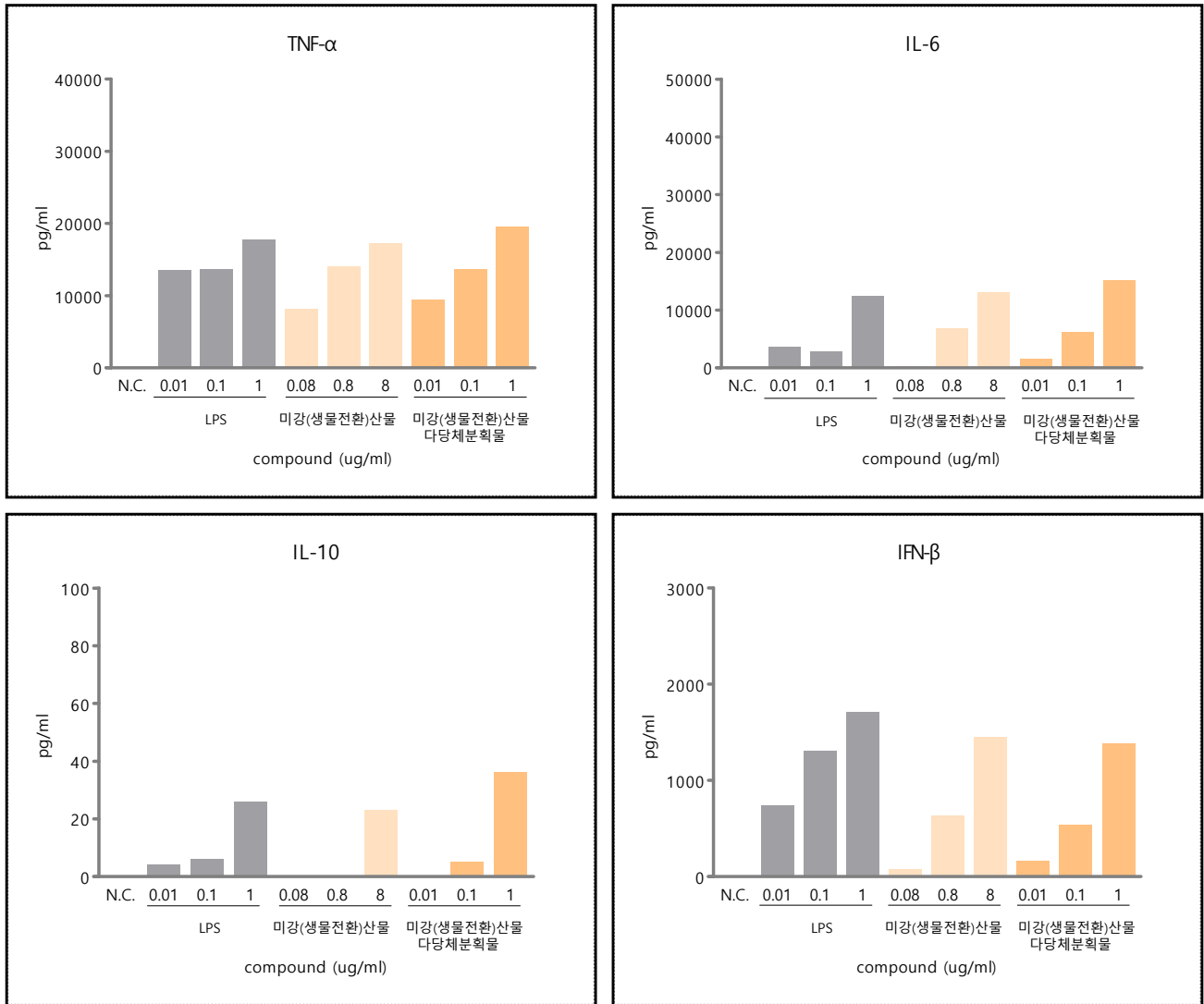


그림 125. 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비패턴 조사

## (2) Receptor 확인 : TLR4 agonist 입증

현재까지 개발된 많은 면역소재의 경우 대부분 receptor가 확인되고 있지 않으며 일부 베타글루칸 제품만이 주로 dectin-1 이라는 수용체에 결합한다고 알려져 있으나, 베타글루칸 제품조차도 불용성소재의 경우 dectin에 결합하는 반면 수용성소재는 dectin-1에 결합하지 않는 것으로 알려져 있다. 수용체가 알려져 있으면 biomarker가 확정될 수 있으며 이를 바탕으로 의약품 및 동물용의약품 개발의 임상시험에 있어서도 biomarker의 설정에 활용이 가능하다는 장점이 있다.

앞선 실험결과들을 바탕으로 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 Receptor가 TLR4임을 유추한 바, 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 특이적으로 인식되어 신호를 매개하는 것인지 확인하기 위하여 TLR4에 대한 specific한 Inhibitor인 TAK-242를 사용하여 최종 확인하고자 하였다.

### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 1 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물의 경우에서도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 8 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 1 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 TNF- $\alpha$ 의 분비가 완전히 차단되거나 매우 크게 대폭 감소되는 결과에 근거하여 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 TNF- $\alpha$  분비 신호가 매개됨을 확인할 수 있었다.

### (나) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물의 경우에도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-6 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

### (다) IL-10 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-10의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물의 경우에도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-10의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-10의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-10의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-10 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

(라) IFN- $\beta$  분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 미강(생물전환)산물의 경우에도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IFN- $\beta$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 미강(생물전환)산물과 미강(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IFN- $\beta$  분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

(마) 결과 분석

미강(생물전환)산물의 대식세포 면역활성은 다당체분획물에 의해 나타남을 확인하였으며, 대식세포 활성화에 의해 나타나는 반응들은 TLR4 specific inhibitor인 TAK242에 의해 모두 억제되어 TLR4가 미강(생물전환)산물의 수용체임을 확인함으로써, 본 과제에서 추구하는 생물전환공정에 의해 생산된 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물은 TLR4 agonist의 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

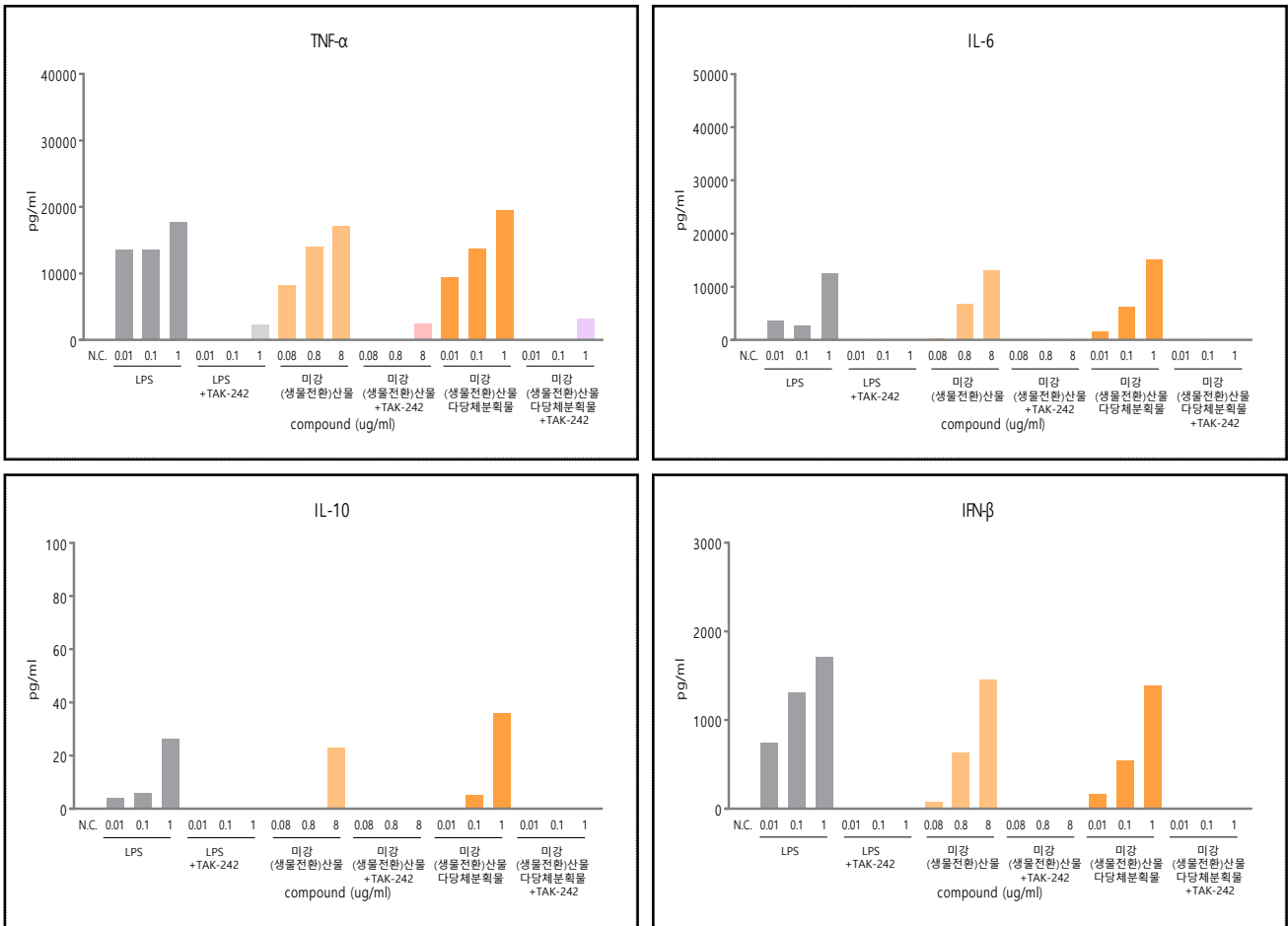


그림 126. TLR4 inhibitor 처리시, 미강(생물전환)산물 및 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비량 억제 평가

### (3) TLR4 agonist, MPLA와의 비교 평가

패턴인식수용체의 하나인 TLR4에 대한 대표적 리간드로 그람음성균 유래의 내독소인 LPS (lipopolysaccharide)가 이에 해당한다. 또한 논문 및 임상에서의 적용을 통해 TLR4 agonist, Th1 adjuvant로 입증된 유일한 면역조절소재로 GSK社에서 출시하고 있는 MPLA가 있다. MPLA는 대표적인 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)를 화학적 변환을 통해 독성을 약화시킨 탈독성(detoxified) 유도체이다. LPS에서 lipid A는 면역세포 표면에 있는 TLR4(toll-like receptor 4)에 의해 인식되는 영역으로 면역활성과 함께 독성을 나타내는 부분이다. MPLA는 lipid A에서 화학적 변환을 통해 phosphate group 하나를 제거하여 lipid A를 화학적으로 변환시킨 물질로, TLR4와의 결합 구조에 변화를 일으켜 탈독성화 시키고 동시에 TLR4와의 결합은 유지시킴으로써 면역활성이 유지되도록 개발된 물질이다.

앞선 실험을 통해 미강(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 의해 인식되어 신호전달을 매개하는 것으로 확인되어, TLR4의 대표적 ligand인 LPS와 TLR4 agonist이자 Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 면역활성 특성을 비교하고자 실험을 수행하였다.

#### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001 $\mu$ g/mL의 농도까지 TNF- $\alpha$ 의 높은 분비량을 유지하다가 0.0001 $\mu$ g/mL의 농도에서는 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 급속히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에는 0.001 $\mu$ g/mL의 농도에서 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 급속히 감소되고, 0.0001 $\mu$ g/mL의 농도에서는 TNF- $\alpha$ 가 분비되지 않음을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 분비량이 증가함을 확인할 수 있었으나, 1 $\mu$ g/mL 농도에서의 TNF- $\alpha$  분비량이 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 0.01 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량과 비슷한 수준이며, LPS의 0.001 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준임을 확인할 수 있었다.

처리농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하여 농도가 증가함에 따라 분비량도 증가하는 양상을 나타내었다.

#### (나) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

#### (다) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 미강(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) 결과 분석

대표적인 면역활성물질인 LPS 및 MPLA와 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 특성을 비교한 결과 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$ 의 분비패턴과 수치가 매우 유사함을 확인한 바, 미강(생물전환)산물 다당체분획물은 매우 강력한 TLR4 agonist의 면역조절소제임을 입증할 수 있었다. 또한 현재 유일하게 TLR4 agonist이자, Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소제인 MPLA에 비해 미강(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 능력이 10배 이상 낮은 농도에서도 MPLA에 비해 더 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

MPLA는 FDA에서 두 번째로 허가한 백신 adjuvant물질이며, 인간 백신에 유일하게 허가된 TLR ligand이기도 하다. GSK社에서는 지속적으로 MPLA를 adjuvant로 사용한 백신을 출시하고 있다. MPLA를 사용한 B형간염백신의 항체생성률은 기존 백신이 60%인데 반해 100%에 가깝게 향상되었으며, 최근 개발한 대상포진 단백질백신에서는 기존 생백신의 방어율이 50% 정도인데 비해 97%의 방어율을 보여주고 있는 대표적 TLR4 agonist 이다.

미강(생물전환)산물 다당체분획물은 LPS 및 MPLA와 같이 10가지의 TLR중 TLR4에 특이적으로 결합하며 또한 TLR4에 LPS가 결합하는 것을 방해함으로써, TLR4 agonist로서의 기능과 함께 LPS에 의해 나타나는 염증 부작용을 억제함을 보여주고 있어 LPS antagonist로서의 기능을 동시에 가지고 있는 특성이 있다.

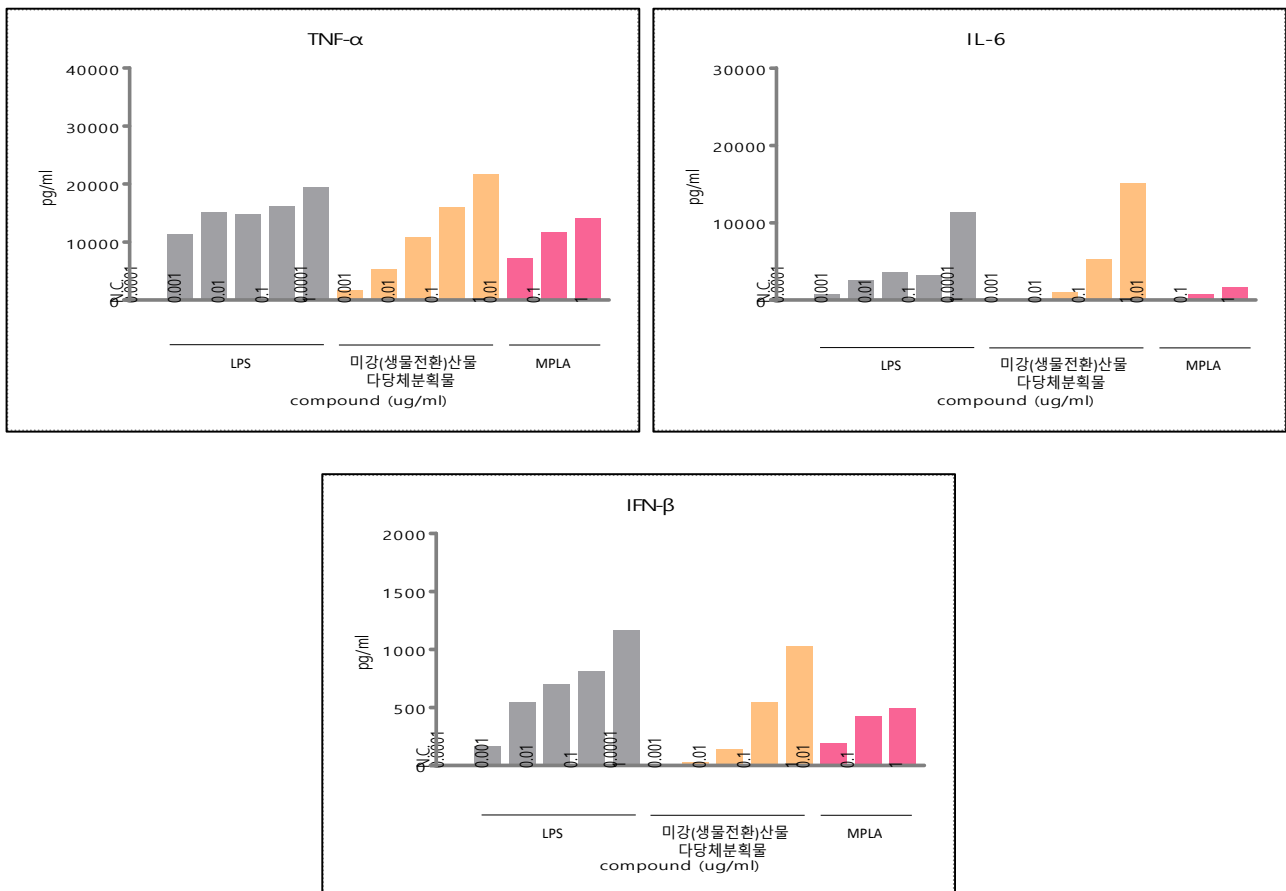
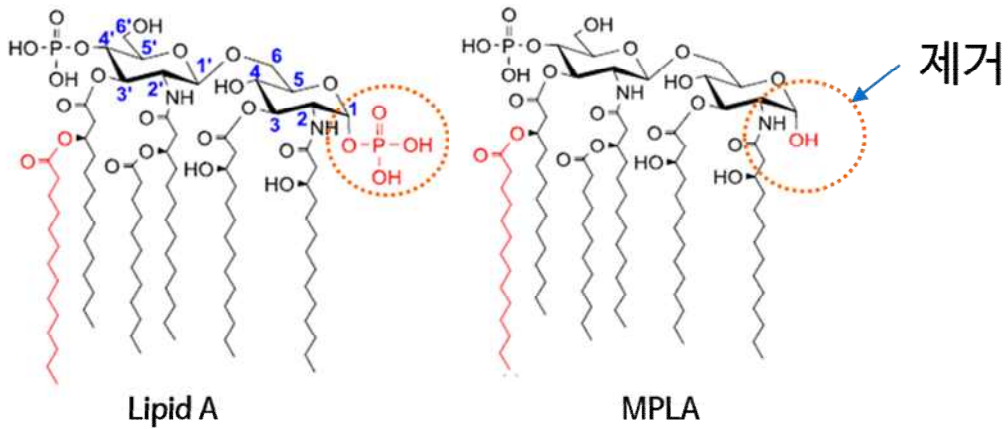


그림 127. LPS, 미강(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA의 cytokine 분비량 비교



백신은 생백신과 사백신으로 나눌 수 있다. 사백신의 경우, 생백신과는 달리 바이러스나 박테리아 유래의 단백질이나 DNA 혹은 RNA 등의 강력한 면역유발물질이 거의 없기 때문에 자체의 항원만으로는 충분한 항체나 CTL 반응을 충분히 유발하지 못하게 된다. 이를 극복하기 위해서 사용하는 물질이 adjuvant 이다. 이러한 물질은 특히, 선천성 면역을 자극하여 적응면역이 더 쉽게 활성화 되도록 한다. 일반적으로 이와 같이 선천성 면역력을 올려주는 물질을 어쥬번트라고 부른다.

현재까지 다양한 어쥬번트들이 연구되고 있으며, 이들의 상당수가 TLR의 ligand들이다. 이들은 현재 동물용 백신에서 다양하게 연구되고 있고 또한 많은 임상연구가 진행되고 있으나, 현재 가장 안전하다고 알려진 것은 앞서 설명한 인간백신에 처음으로 허가된 유일한 TLR ligand인 MPLA라는 물질로 TLR4 agonist 이다. 아직 이유는 정확하지 않지만 TLR4 agonist, MPLA가 특히 안전한 이유는 MyD88 신호 대신에 TRIF 신호를 주로 이용하여 더 안전하게 면역력을 올릴 수 있기 때문이라고 해석되고 있다. 그러므로 면역조절소재를 개발하기 위해서는 TLR4 agonist를 개발하는 것이 현재로서는 가장 안전한 방법이라고 생각된다.

## 2. 대두(생물전환)산물의 면역활성 다당체(유효성분)

### 가. 면역활성 다당체(유효성분) 분리·정제

#### (1) 분리·정제과정

다당체분획물의 제조공정도는 아래의 그림과 같다. 분말화된 대두(생물전환)산물에 약 20배수의 3차증류수를 첨가하여 수용성물질을 추출한다. 수용성물질 추출 후 원심분리를 통해 잔사를 제거하고 추출상등액을 분리한다. 추출상등액에 상등액의 4배수에 해당하는 양의 EtOH을 첨가하여 잘 섞어준 후, 4℃에서 밤새 보관한다. 생성된 침전물을 원심분리를 통해 분리하고, 상등액을 제거한 침전물에 3차증류수를 첨가해 용해시킨 후, 원심분리 또는 여과를 통해 용해되지 않은 물질을 제거한다. 여과된 침전물용해액에 대해 투석용 튜브를 사용하여 투석을 진행한다. 2시간에 한 번씩 3차증류수를 교체하고, 이를 10회 이상 반복한다. 투석완료 후 동결건조를 통해 분말화한다.



그림 128. 다당체분획물 제조공정도 및 제조과정



(2) HPLC 분석

다당체분획물의 분석에 사용한 기기는 Shimadzu LC 010Avp (Shimadzu Co., Japan)로 분석조건은 아래 표와 같다.

표 45. 다당체분획물 분석조건

Instrument	Conditions
Instrument	SHIMADZU_HPLC, SEDEX 75_ELSD
Column	Ultrahydrogel™ 1000 (7.8x300mm) Waters, WAT011535
Column oven	45 °C
Flow rate	0.6 ml/min
Solvent	HPLC grade water
Elution	Isocratic, HPLC water 100%
Run time	40 min
Injection	20 µl
Sample extraction	시료 100mg을 HPLC water 10ml로 250rpm 1시간 shaking 추출 후, 원심분리 후 분석

50L 발효조에서 생산된 제1배치의 대두(생물전환)산물을 사용하여 분리정제한 다당체분획의 균일성을 확인하기 위해 반복실험을 진행하였다. 배치당 2번씩 반복하여 다당체분획물을 제조하였다. 각 배치의 대두(생물전환)산물의 다당체분획물을 HPLC로 분석한 결과 모두 저분자물질이 잘 제거되고 면역활성 다당체의 분획이 잘 이루어졌음을 크로마토그램의 피크를 통해 확인하였다.

다당체분획물 정제에 있어서 50L 제1배치의 다당체분획물 회수율은 각각 약 10.36%, 9.96%로 평균 10.16%, 편차 0.28로 편차가 거의 없음을 확인하였다.

이를 통해 배치에 따른 다당체분획 제조공정 적용의 차이가 없음을 확인하였고, 재현성이 우수한 다당체분획물 제조공정임을 확인하였다.

표 46. 대두(생물전환)산물의 2반복 다당체분획물의 회수율

	평균 다당체분획물 회수율(%)	편차
대두(생물전환)산물 50L 제1 배치	10.16	0.28

n=2

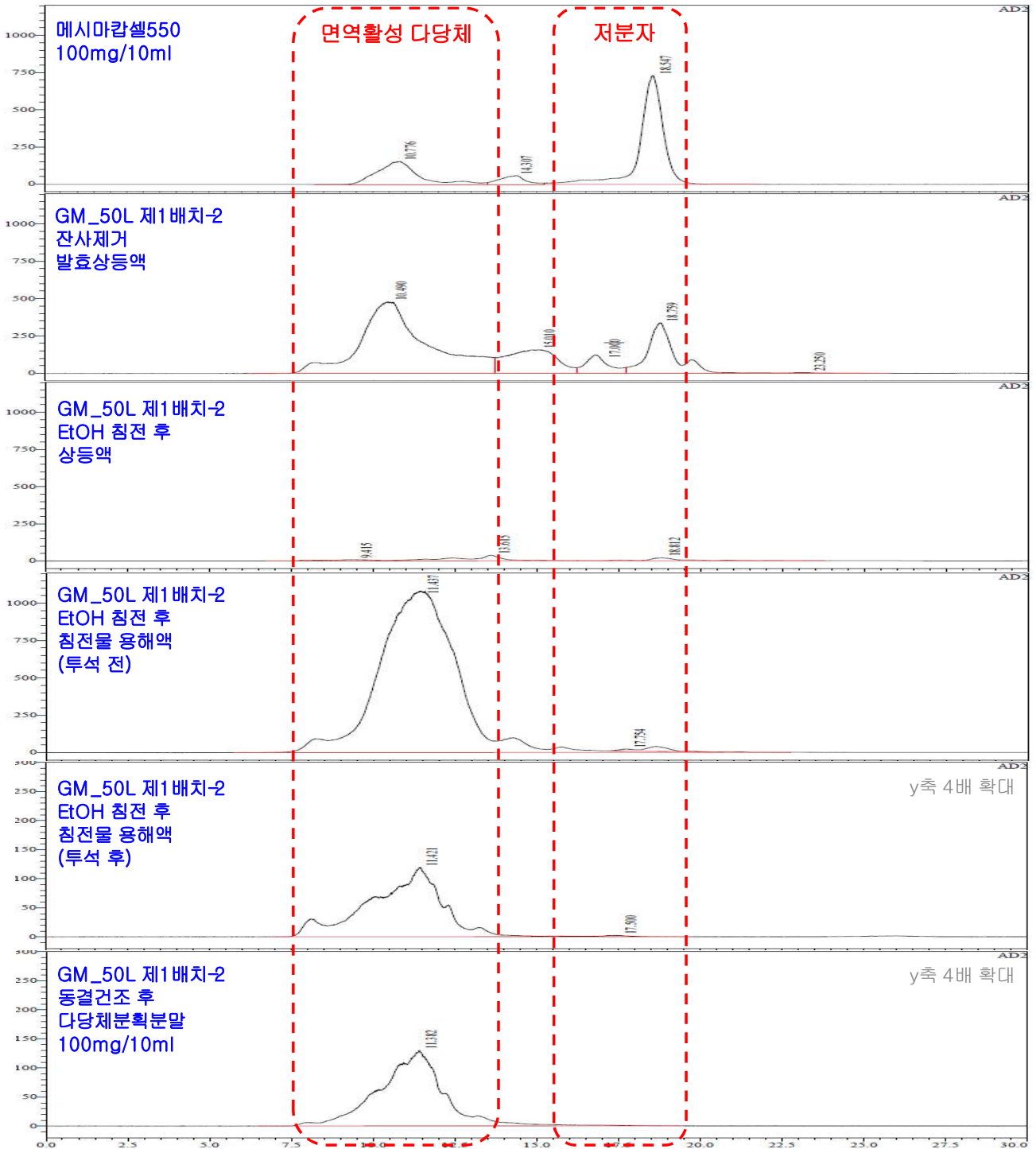


그림 129. 대두(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별 HPLC분석 크로마토그램

대두(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별로 샘플을 채취하여, 공정에 따른 크로마토그램 패턴변화를 분석하였다. 비교물질로 상황버섯 균사체 유래의 면역활성 다당체로 항암치료에 사용되고 있는 전문의약품인 메시마캡셀550을 사용하였다. 분석결과 대두(생물전환)산물의 불용성물질을 제거한 상등액을 gel filtration HPLC를 통해 분석한 결과 18.7분대에서 저분자물질의 피크가 나타났으며, 10.5분대에서 고분자의 다당체분획 피크가 검출되었다. 저분자물질의 피크의 용출액과 고분자의 다당체분획 피크의 용출액에 대한 대식세포 NO생성능을 측정된 결과, 고분자의 다당체분획 peak에서는 대식세포 NO생성능이 관찰되었다. EtOH침전공정과 투석공정을 진행 후, 저분자물질이 제거되어 분석 시 저분자물질의

피크가 감소함을 확인하였고 동결건조 후에도 큰 변화가 없음을 확인하였다.

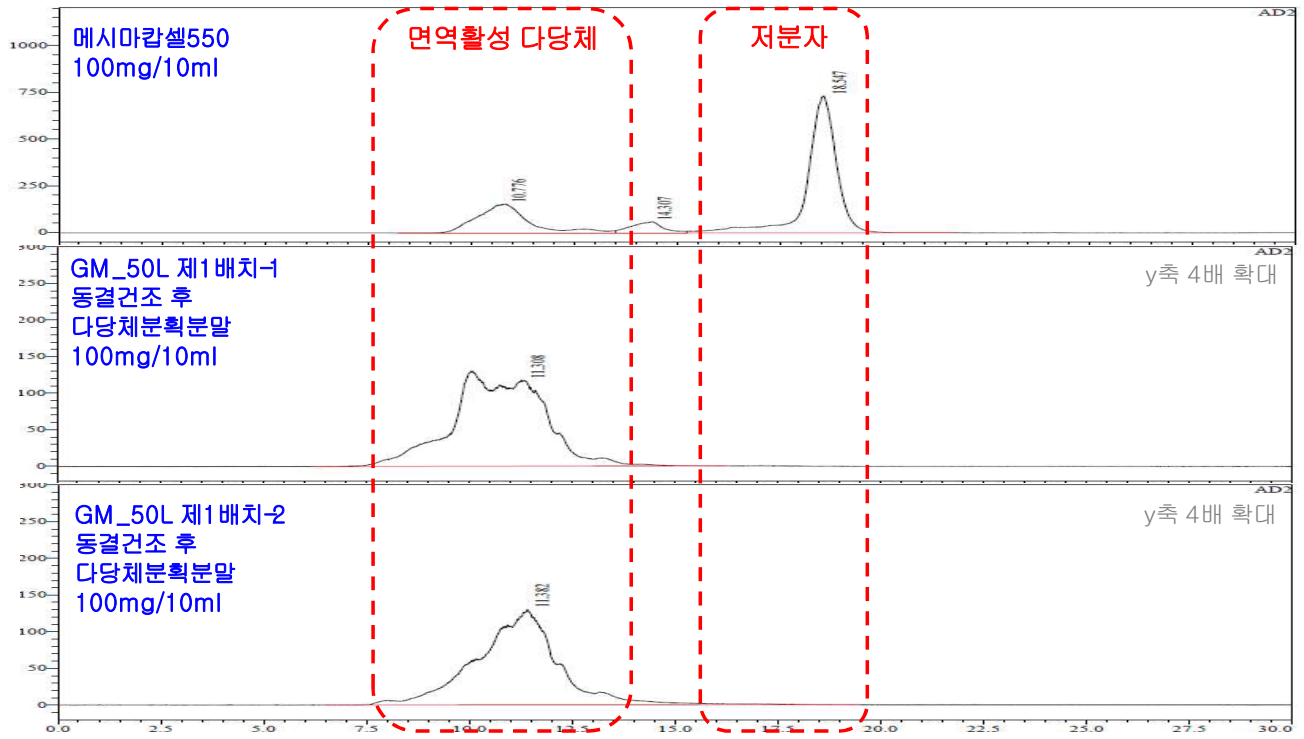


그림 130. 대두(생물 전환)산물의 다당체분획물들의 HPLC분석 크로마토그램

(3) 대식세포 NO 생성 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

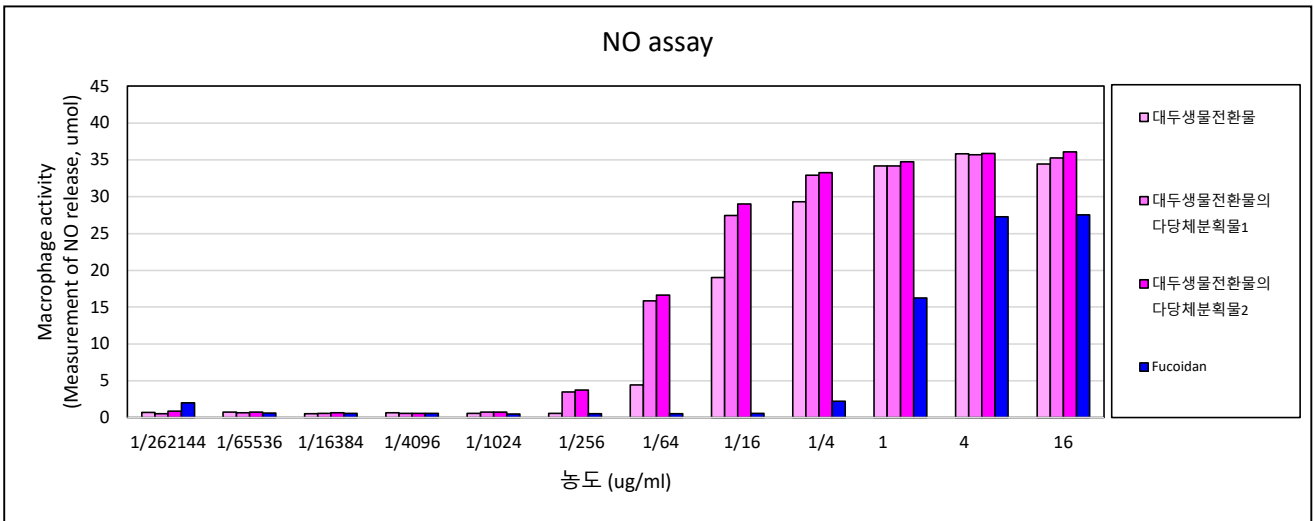


그림 131. 대두(생물전환)산물의 다당체분획물들의 대식세포 활성화능 평가

50L 발효조에서 생산된 제1배치의 대두(생물전환)산물을 사용하여, 다당체분획물 분리정제의 균일성을 확인하기 위해 반복실험을 진행하였다. 배치당 2번씩 다당체분획물을 제조하였고, 이들의 대식세포 NO 생성능을 측정하여 대식세포 활성화능을 평가하였다.

측정 결과, 50L 제1배치의 대두(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물1과 다당체분획물2간의 NO 생성능에서 큰 차이를 보이지 않았다. 제1배치에서 생산된 대두(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물 1과 2의 면역활성역가 MEC<sub>100</sub>은 대략 1/4 µg/mL 임을 확인할 수 있었다.

## 나. 면역활성 다당체(유효성분) 작용기전 연구

### (1) 대식세포에서의 cytokines 분비패턴 조사 및 Receptor 유추 해석

최근 면역활성을 나타내는 다당체에 의한 macrophage 활성화, NK세포 자극활성 및 cytokine 생산 자극 등과 같은 여러 생리활성에 대한 연구결과들이 속속 발표되고 있다.

또한 면역활성을 나타내는 다당체의 특이적 구조가 대식세포 등 면역세포들이 세포표면에 발현하고 있는 특이수용체인 패턴인식수용체(pattern recognition receptor, PRR)에 인식되면서 신호전달을 매개한다고 밝혀지고 있다.

이러한 연구결과들에 근거하여, 앞에서 확립된 분리정제공정을 통해 제조된 대두(생물전환)산물의 다당체분획물도 면역세포의 특이수용체인 패턴인식수용체에 인식되어 신호전달이 매개되는지를 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴 비교를 통해 특이수용체(specific receptor)를 유추하였고, 이를 확인하기 위하여 유추된 특이수용체에 대한 inhibitor를 처리하여 신호전달이 차단되는지 확인하는 실험도 함께 진행하였다. Inhibitor 처리 실험을 통해 대두(생물전환)산물에 대한 특이수용체가 패턴인식수용체의 하나인 TLR4(Toll-like receptor4)임을 확인할 수 있었으며, TLR4의 ligand로 잘 알려진 LPS와 함께 TLR4 agonist로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 비교를 통해 대두(생물전환)산물의 면역활성 특성을 조사하였다.

대두(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성을 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴을 조사하였다. 대조군 물질로는 LPS(Lipopolysaccharide)를 각각 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 처리하였으며, 대두(생물전환)산물은 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 반면 대두(생물전환)산물의 다당체분획물은 LPS와 동일한 농도인 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 수행하였다. 대두(생물전환)산물의 처리농도 설정은 대두(생물전환)산물로부터 다당체분획물의 회수율이 반복실험을 통해 약 12 %로 나왔기 때문에 이를 근거로 하여 농도를 설정하였다.

#### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 대두(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되는 것을 확인할 수 있었으며 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작해서 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 대두(생물전환)산물의 TNF- $\alpha$  분비량과 비슷한 수치를 나타내었다. 또한 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물 다당체분획물 모두에서 농도가 증가할수록 TNF- $\alpha$  분비량이 유사하게 증가함을 보임을 확인하였다. 이를 통해 대두(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

대두(생물전환)산물 다당체분획물과 LPS의 TNF- $\alpha$  분비량을 비교하였을 때, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 LPS가 더 높은 분비량을 나타냈으나, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 서로 비슷한 정도의 TNF- $\alpha$  분비량을 보였다.

#### (나) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를

ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 대두(생물전환)산물의 경우 처리농도 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 IL-6가 분비되기 시작하여 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-6의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 IL-6가 소량 분비되기 시작하여 처리농도가 증가함에 따라 IL-6의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 농도가 증가할수록 IL-6 분비량이 유사한 분비량을 보임을 확인하였다. 이를 통해 대두(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-6를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

대두(생물전환)산물 다당체 분획물과 LPS의 IL-6 분비량을 비교하였을 때, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 LPS에 의한 IL-6의 분비량이 낮게 나타났으나, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 서로 비슷한 정도의 IL-6 분비량을 보였다.

(바) IL-10 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 대두(생물전환)산물의 경우 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-10의 분비량이 측정되는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-10의 분비량이 측정되었다.

대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 IL-10 분비량이 고농도에서 유사하게 측정된 것을 확인하였다. 이를 통해 대두(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-10을 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IL-10 분비량을 비교하였을 때 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서만 IL-10의 분비량이 측정되었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대두(생물전환)산물 다당체분획물에서 IL-10의 분비량이 더 높게 나타났다.

#### (사) IL-12p70 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### (아) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 대두(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되는 것을 확인할 수 있었고 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작해서 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 대두(생물전환)산물의 IFN- $\beta$  분비량과 비슷한 수치를 나타내었다. 또한 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 IFN- $\beta$  분비량이 농도가 증가할수록 유사하게 증가함을 확인하였다. 이를 통해 대두(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IFN- $\beta$ 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IFN- $\beta$  분비량을 비교하였을 때 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 모든 농도에서 LPS가 상대적으로 약간 높게 나타났다.

#### (자) 결과 분석

대두(생물전환)산물의 면역활성 관련 cytokine을 분석한 결과, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 및 IFN- $\beta$ 가 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 대두(생물전환)산물의 상기 면역활성은 다당체분획물에 기인한 것임을 확인할 수 있었다. 비교물질인 LPS와 비교평가 시, LPS에서도 TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$ 의 cytokine 분비패턴 양상이 대두(생물전환)산물 다당체분획물과 유사함은 물론 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-12p70도 함께 분비되지 않음을 확인할 수 있었다. LPS는 TLR4(Toll-loke receptor4)에 인식되는 물질로 잘 알려져 있는 바, 이를 통해 대두(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 인식되어 신호를 매개할 것이라 유추해석할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 탐식작용 시 대식세포와 단핵세포 등에서 분비되며 inducible nitric oxide(NO)와 함께 독감바이러스 등의 다양한 바이러스에 대하여 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 항원 특이 면역반응, 염증반응, 급성반응에서의 주요 mediator이며 또한 생체내 방어체계에서 핵심역할을 담당하는 대표적 cytokine이다.

IFN- $\beta$ 는 IFN- $\alpha$ 와 함께 type I interferon으로 항균, 항바이러스 효과가 있으며 특히, Th1 세포의 분화에 기여하여 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokine으로 Th1 면역반응을 유도하는 반면, Th2 및 Th17 면역반응을 억제하는 면역조절 기능이 있는 cytokine이다.

결론적으로 활성화시킨 대식세포에서 Interferon- $\beta$ 의 생성이 유도됨을 확인하여 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화시킬 수 있는 소재로 판단되며, 이들의 면역활성은 모두 고분자 다당체분획물에 의해 나타남을 확인할 수 있었다.

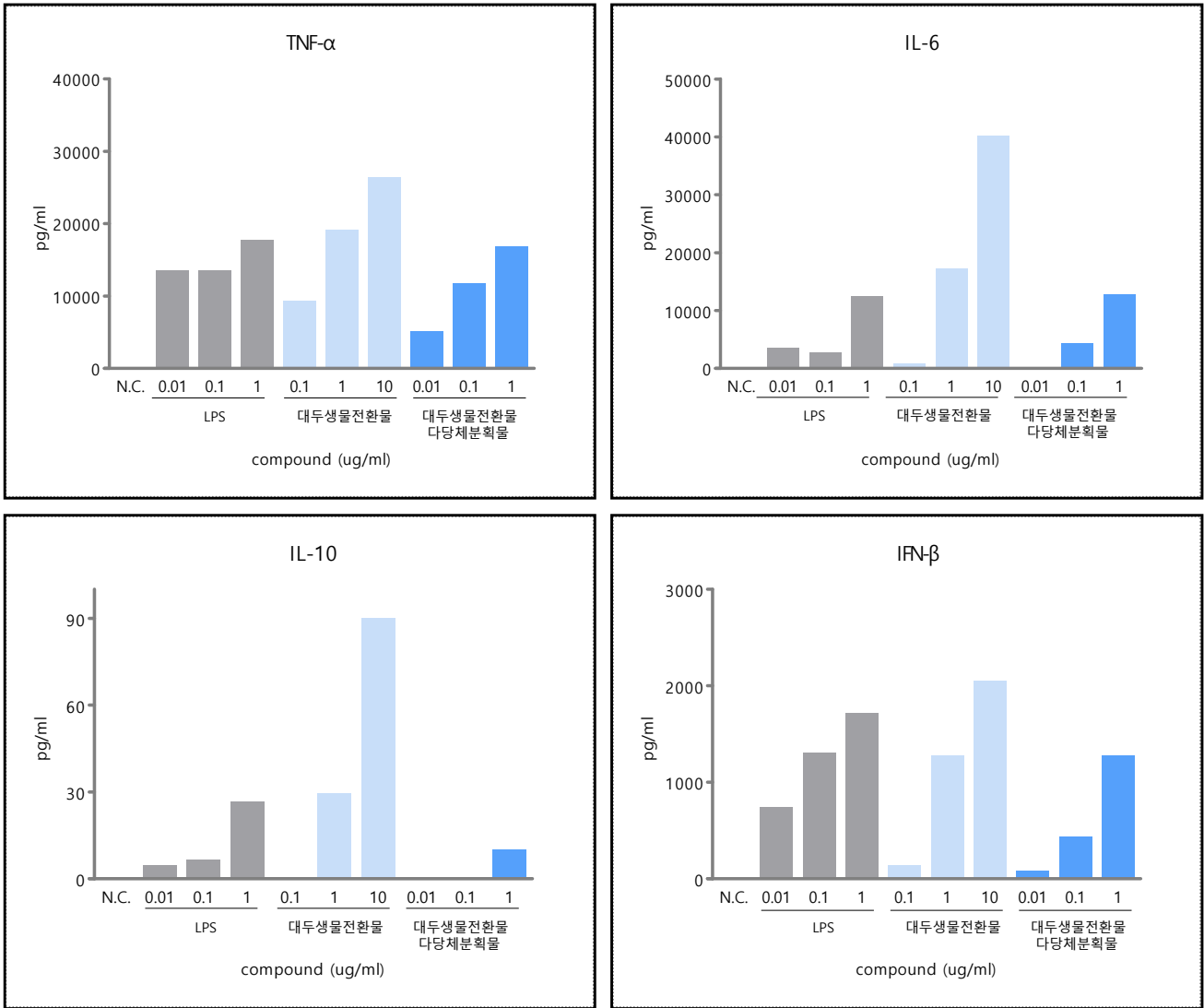


그림 132. 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비패턴 조사



## (2) Receptor 확인 : TLR4 agonist 입증

현재까지 개발된 많은 면역소재의 경우 대부분 receptor가 확인되고 있지 않으며 일부 베타글루칸 제품만이 주로 dectin-1 이라는 수용체에 결합한다고 알려져 있으나, 베타글루칸 제품조차도 불용성소재의 경우 dectin에 결합하는 반면 수용성소재는 dectin-1에 결합하지 않는 것으로 알려져 있다. 수용체가 알려져 있으면 biomarker가 확정될 수 있으며 이를 바탕으로 의약품 및 동물용의약품 개발의 임상시험에 있어서도 biomarker의 설정에 활용이 가능하다는 장점이 있다.

앞선 실험결과들을 바탕으로 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 Receptor가 TLR4임을 유추한 바, 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 특이적으로 인식되어 신호를 매개하는 것인지 확인하기 위하여 TLR4에 대한 specific한 Inhibitor인 TAK-242를 사용하여 최종 확인하고자 하였다.

### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.01 $\mu$ g/mL 및 0.1 $\mu$ g/mL의 농도에 있어서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 1 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물의 경우에서도 0.1 $\mu$ g/mL 및 1 $\mu$ g/mL의 농도에 있어서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 10  $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 0.01 $\mu$ g/mL 및 0.1 $\mu$ g/mL의 농도에 있어서 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 1 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 TNF- $\alpha$ 의 분비가 완전히 차단되거나 매우 크게 대폭 감소되는 결과에 근거하여 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 TNF- $\alpha$  분비 신호가 매개됨을 확인할 수 있었다.

### (나) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물의 경우에도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 3가지 농도 모두에서 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-6 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

### (다) IL-10 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-10의

분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물의 경우에도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-10의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-10의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-10의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-10 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

#### (라) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 대두(생물전환)산물의 경우에도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IFN- $\beta$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 대두(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IFN- $\beta$  분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

(마) 결과 분석

대두(생물전환)산물의 대식세포 면역활성은 다당체분획물에 의해 나타남을 확인하였으며, 대식세포 활성화에 의해 나타나는 반응들은 TLR4 specific inhibitor인 TAK242에 의해 모두 억제되어 TLR4가 대두(생물전환)산물의 수용체임을 확인함으로써, 본 과제에서 추구하는 생물전환공정에 의해 생산된 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물은 TLR4 agonist의 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

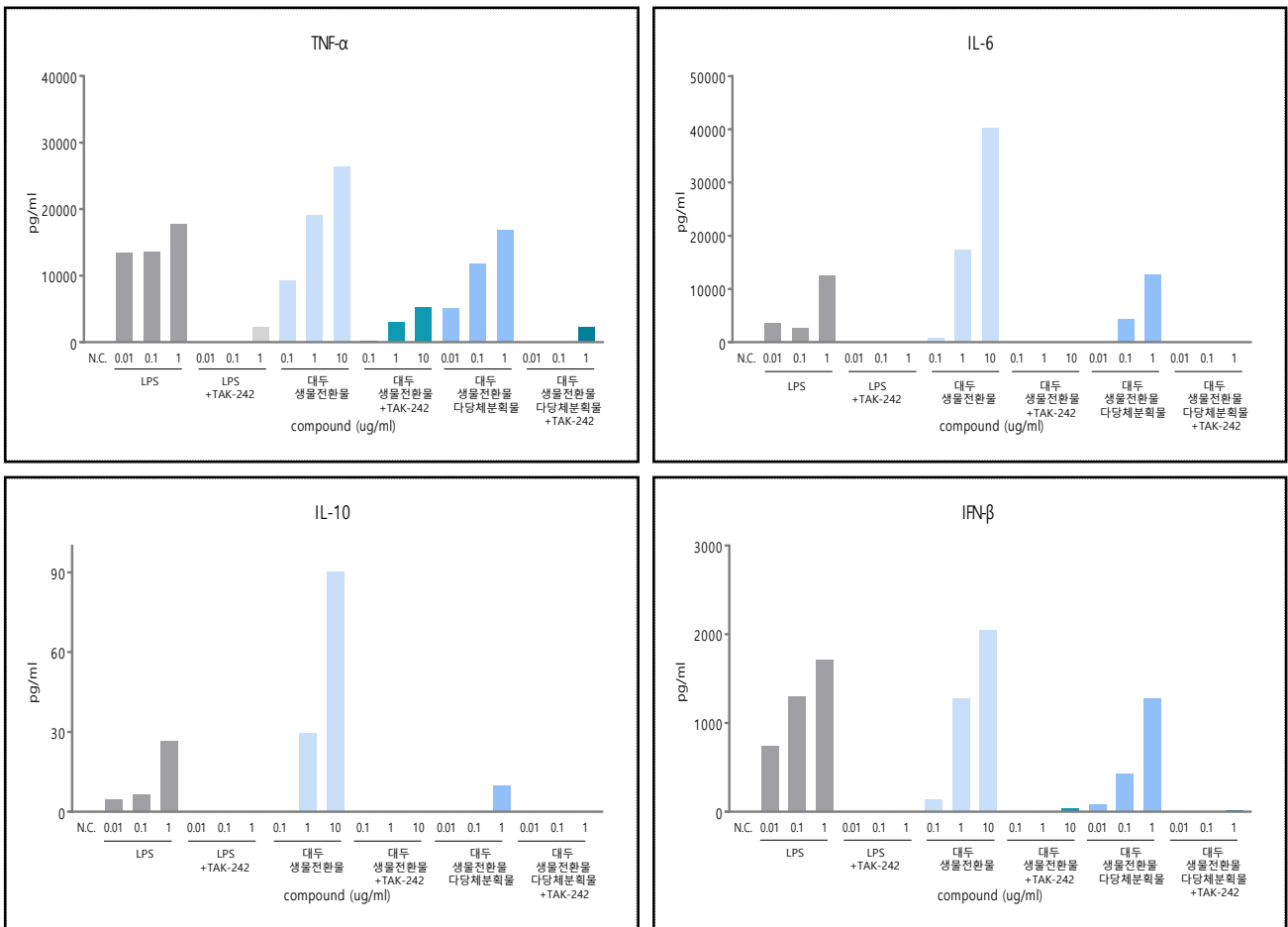


그림 133. TLR4 inhibitor 처리시, 대두(생물전환)산물 및 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비량 억제 평가

### (3) TLR4 agonist, MPLA와의 비교 평가

패턴인식수용체의 하나인 TLR4에 대한 대표적 리간드로 그람음성균 유래의 내독소인 LPS (lipopolysaccharide)가 이에 해당한다. 또한 논문 및 임상에서의 적용을 통해 TLR4 agonist, Th1 adjuvant로 입증된 유일한 면역조절소제로 GSK社에서 출시하고 있는 MPLA가 있다. MPLA는 대표적인 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)를 화학적 변환을 통해 독성을 약화시킨 탈독성(detoxified) 유도체이다. LPS에서 lipid A는 면역세포 표면에 있는 TLR4(toll-like receptor 4)에 의해 인식되는 영역으로 면역활성과 함께 독성을 나타내는 부분이다. MPLA는 lipid A에서 화학적 변환을 통해 phosphate group 하나를 제거하여 lipid A를 화학적으로 변환시킨 물질로, TLR4와의 결합 구조에 변화를 일으켜 탈독성화 시키고 동시에 TLR4와의 결합은 유지시킴으로써 면역활성이 유지되도록 개발된 물질이다.

앞선 실험을 통해 대두(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 의해 인식되어 신호전달을 매개하는 것으로 확인되어, TLR4의 대표적 ligand인 LPS와 TLR4 agonist이자 Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 면역활성 특성을 비교하고자 실험을 수행하였다.

#### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001 $\mu$ g/mL의 농도까지 TNF- $\alpha$ 의 높은 분비량을 유지하다가 0.0001 $\mu$ g/mL의 농도에서는 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 급속히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에는 0.001 $\mu$ g/mL의 농도에서 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 급속히 감소되는 것을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 분비량이 증가함을 확인할 수 있었으나, 1 $\mu$ g/mL 농도에서의 TNF- $\alpha$  분비량이 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 0.01 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량과 비슷한 수준이며, LPS의 0.001 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준임을 확인할 수 있었다.

#### (나) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.1 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 IL-6가 분비되기 시작하여 1 $\mu$ g/mL에서 IL-6의 분비량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 분비량이 증가함을 확인할 수 있었으나, 1 $\mu$ g/mL 농도에서의 IL-6분비량이 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 0.1 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준이며, LPS의 0.001 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준임을 확인할 수 있었다.

#### (다) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.0001 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작하여 농도 의존적으로 IFN- $\beta$ 의 분비량이 크게 증가함을 확인한 반면, 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.001 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작하여 농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작하여 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량이 조금 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(라) 결과 분석

대표적인 면역활성물질인 LPS 및 MPLA와 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 특성을 비교한 결과 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$ 의 분비패턴과 수치가 매우 유사함을 확인한 바, 대두(생물전환)산물 다당체분획물은 매우 강력한 TLR4 agonist의 면역조절소제임을 입증할 수 있었다. 또한 현재 유일하게 TLR4 agonist이자, Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소제인 MPLA에 비해 대두(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 능력이 10배 이상 낮은 농도에서도 MPLA에 비해 더 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

MPLA는 FDA에서 두 번째로 허가한 백신 adjuvant물질이며, 인간 백신에 유일하게 허가된 TLR ligand이기도 하다. GSK社에서는 지속적으로 MPLA를 adjuvant로 사용한 백신을 출시하고 있다. MPLA를 사용한 B형간염백신의 항체생성률은 기존 백신이 60%인데 반해 100%에 가깝게 향상되었으며, 최근 개발한 대상포진 단백질백신에서는 기존 생백신의 방어율이 50% 정도인데 비해 97%의 방어율을 보여주고 있는 대표적 TLR4 agonist 이다.

대두(생물전환)산물 다당체분획물은 LPS 및 MPLA와 같이 10가지의 TLR중 TLR4에 특이적으로 결합하며 또한 TLR4에 LPS가 결합하는 것을 방해함으로써, TLR4 agonist로서의 기능과 함께 LPS에 의해 나타나는 염증 부작용을 억제함을 보여주고 있어 LPS antagonist로서의 기능을 동시에 가지고 있는 특성이 있다.

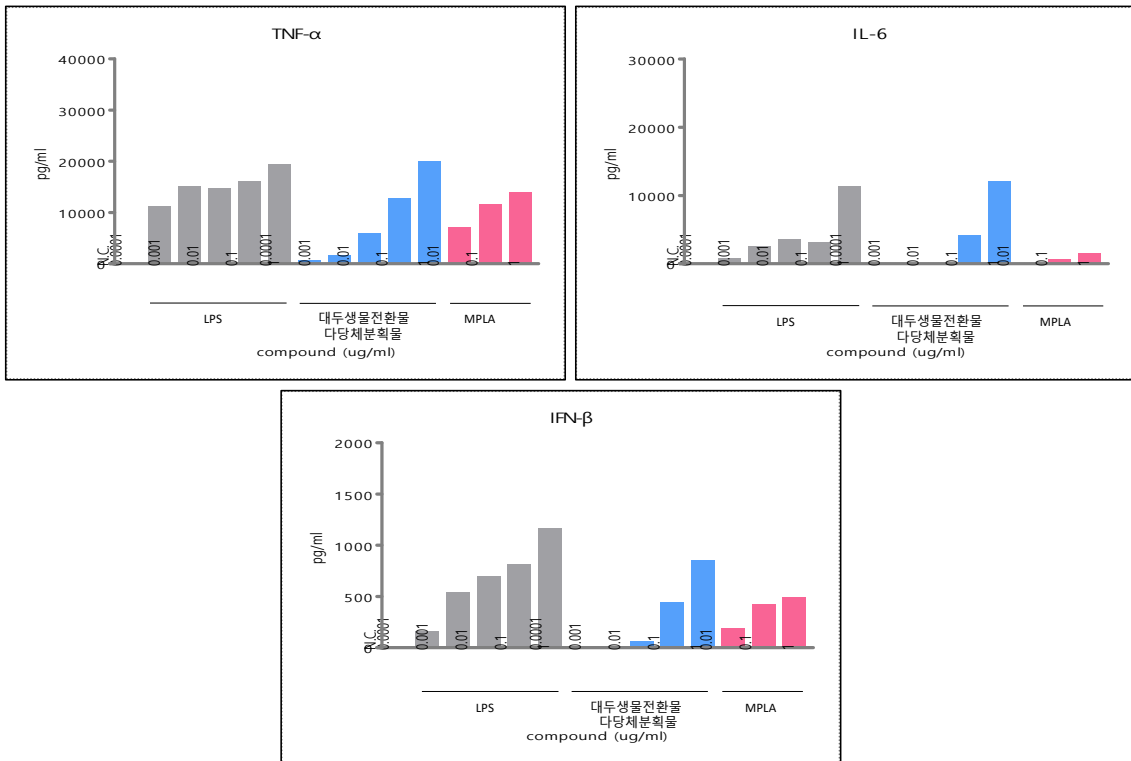
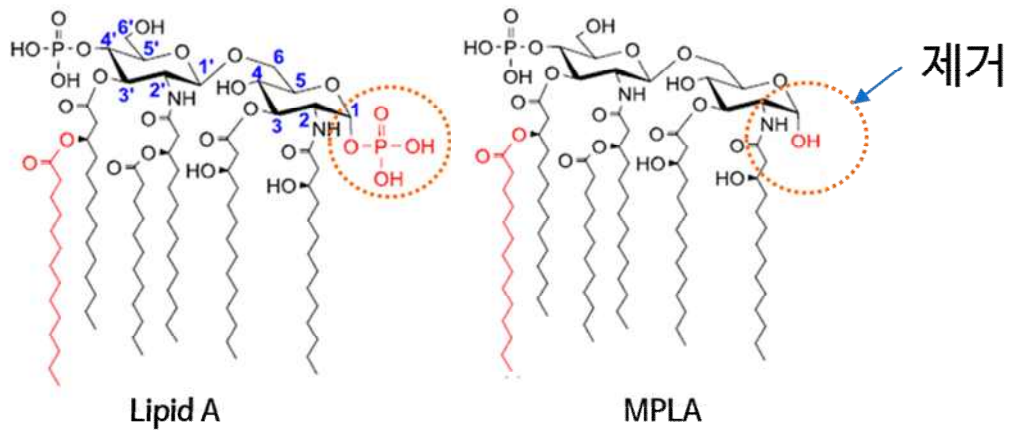


그림 134. LPS, 대두(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA의 cytokine 분비량 비교



백신은 생백신과 사백신으로 나눌 수 있다. 사백신의 경우, 생백신과는 달리 바이러스나 박테리아 유래의 단백질이나 DNA 혹은 RNA 등의 강력한 면역유발물질이 거의 없기 때문에 자체의 항원만으로는 충분한 항체나 CTL 반응을 충분히 유발하지 못하게 된다. 이를 극복하기 위해서 사용하는 물질이 adjuvant 이다. 이러한 물질은 특히, 선천성 면역을 자극하여 적응면역이 더 쉽게 활성화 되도록 한다. 일반적으로 이와 같이 선천성 면역력을 올려주는 물질을 어쥬번트라고 부른다.

현재까지 다양한 어쥬번트들이 연구되고 있으며, 이들의 상당수가 TLR의 ligand들이다. 이들은 현재 동물용 백신에서 다양하게 연구되고 있고 또한 많은 임상연구가 진행되고 있으나, 현재 가장 안전하다고 알려진 것은 앞서 설명한 인간백신에 처음으로 허가된 유일한 TLR ligand인 MPLA라는 물질로 TLR4 agonist 이다. 아직 이유는 정확하지 않지만 TLR4 agonist, MPLA가 특히 안전한 이유는 MyD88 신호 대신에 TRIF 신호를 주로 이용하여 더 안전하게 면역력을 올릴 수 있기 때문이라고 해석되고 있다. 그러므로 면역조절소재를 개발하기 위해서는 TLR4 agonist를 개발하는 것이 현재로서는 가장 안전한 방법이라고 생각된다.

### 3. 참깨(생물전환)산물의 면역활성 다당체(유효성분)

#### 가. 면역활성 다당체(유효성분) 분리·정제

##### (1) 분리·정제과정

다당체분획물의 제조과정도는 아래의 그림과 같다. 분말화된 참깨(생물전환)산물에 약 20배수의 3차증류수를 첨가하여 수용성물질을 추출한다. 수용성물질 추출 후 원심분리를 통해 잔사를 제거하고 추출상등액을 분리한다. 추출상등액에 상등액의 4배수에 해당하는 양의 EtOH을 첨가하여 잘 섞어준 후, 4°C에서 밤새 보관한다. 생성된 침전물을 원심분리를 통해 분리하고, 상등액을 제거한 침전물에 3차증류수를 첨가해 용해시킨 후, 원심분리 또는 여과를 통해 용해되지 않은 물질을 제거한다. 여과된 침전물용해액에 대해 투석용 튜브를 사용하여 투석을 진행한다. 2시간에 한 번씩 3차증류수를 교체하고, 이를 10회 이상 반복한다. 투석완료 후 동결건조를 통해 분말화한다.



그림 135. 다당체분획물 제조과정도 및 제조과정

(2) HPLC 분석

다당체분획물의 분석에 사용한 기기는 Shimadzu LC 010Avp (Shimadzu Co., Japan)로 분석조건은 아래 표와 같다.

표 47. 다당체분획물 분석조건

Instrument	Conditions
Instrument	SHIMADZU_HPLC, SEDEX 75_ELSA
Column	Ultrahydrogel™ 1000 (7.8x300mm) Waters, WAT011535
Column oven	45 °C
Flow rate	0.6 ml/min
Solvent	HPLC grade water
Elution	Isocratic, HPLC water 100%
Run time	40 min
Injection	20 µl
Sample extraction	시료 100mg을 HPLC water 10ml로 250rpm 1시간 shaking 추출 후, 원심분리 후 분석

50L 발효조에서 생산된 제1배치의 참깨(생물전환)산물을 사용하여 분리정제를 통해 다당체분획물을 제조하였다. 참깨(생물전환)산물의 다당체분획물을 HPLC로 분석한 결과 모두 저분자물질이 잘 제거되고 면역활성 다당체의 분획이 잘 이루어졌음을 크로마토그램의 피크를 통해 확인하였다.

표 48. 참깨(생물전환)산물의 2반복 다당체분획물의 회수율

	다당체분획물 회수율(%)
참깨(생물전환)산물 50L 제1배치	12.16



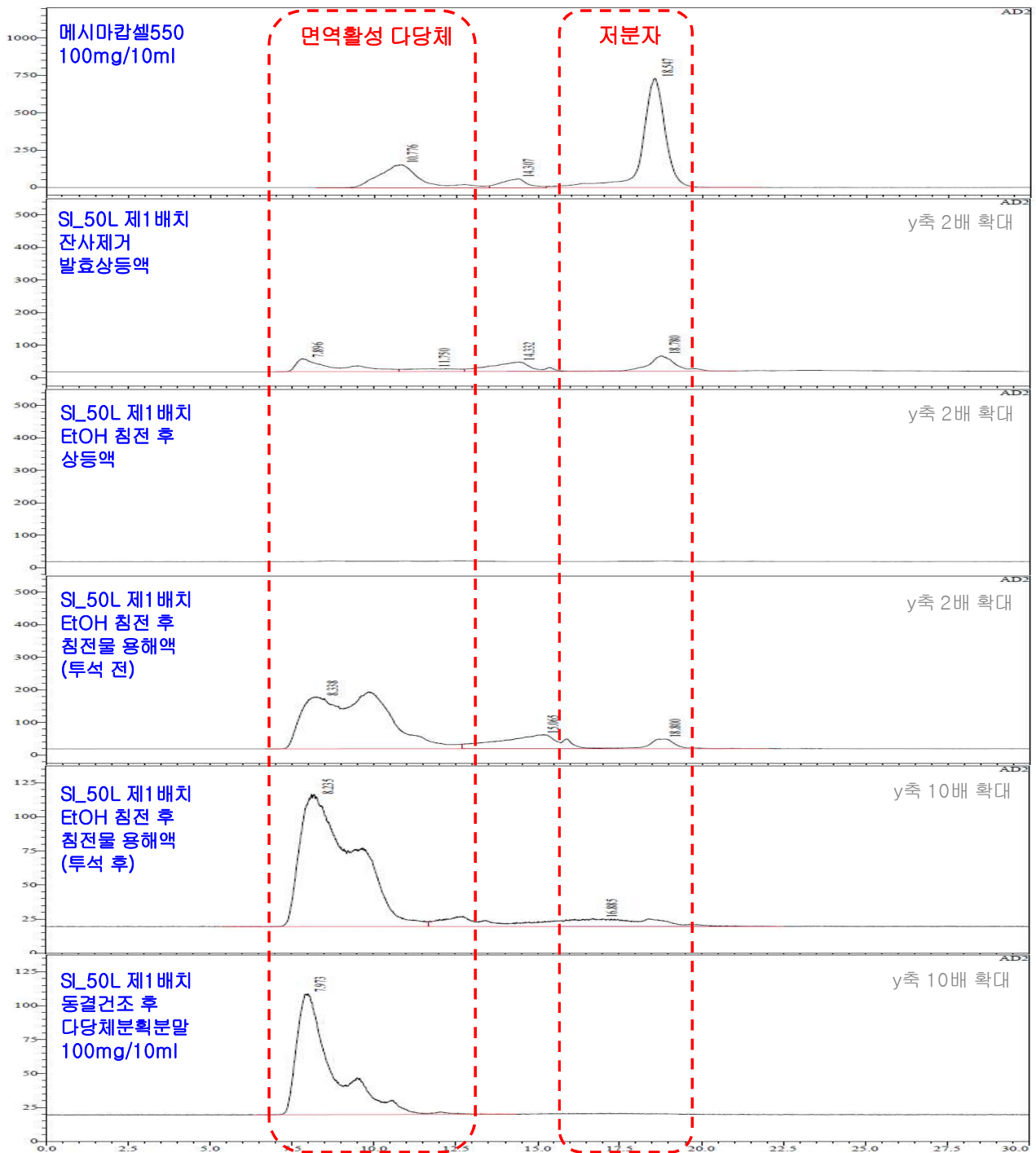


그림 136. 참깨(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별 HPLC분석 크로마토그램

참깨(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별로 샘플을 채취하여, 공정에 따른 크로마토그램 패턴변화를 분석하였다. 비교물질로 상황버섯 균사체 유래의 면역활성 다당체로 항암치료에 사용되고 있는 전문의약품인 메시마캡셀550을 사용하였다. 분석결과 참깨(생물전환)산물의 불용성물질을 제거한 상등액을 gel filtration HPLC를 통해 분석한 결과 18.7분대에서 저분자물질의 피크가 나타났으며, 8.3분대에서 고분자의 다당체분획 피크가 검출되었다. 저분자물질의 피크의 용출액과 고분자의 다당체분획 피크의 용출액에 대한 대식세포 NO생성능을 측정된 결과, 고분자의 다당체분획 peak에서는 대식세포 NO생성능이 관찰되었다. EtOH침전공정과 투석공정을 진행 후, 저분자물질이 제거되어 분석 시 저분자물질의 피크가 감소함을 확인하였고 동결건조 후에도 큰 변화가 없음을 확인하였다.

(3) 대식세포 NO 생성 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

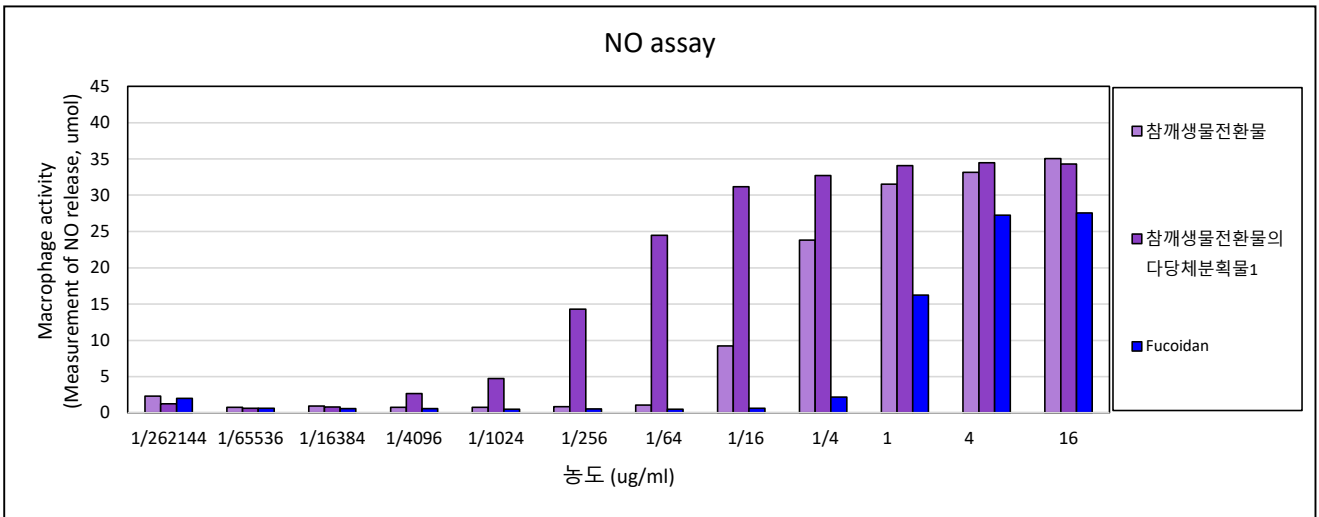


그림 137. 참깨(생물전환)산물의 다당체분획물들의 대식세포 활성화능 평가

50L 발효조에서 생산된 제1배치의 참깨(생물전환)산물을 사용하여, 다당체분획물을 제조하였고, 대식세포 NO 생성능을 측정하여 대식세포 활성화능을 평가하였다.

측정 결과, 50L 제1배치의 참깨(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물의 NO 생성능에서 큰 차이를 보이지 않았다. 제1배치에서 생산된 참깨(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물의 면역활성역가 MEC<sub>100</sub>은 대략 1/4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  임을 확인할 수 있었다.

## 나. 면역활성 다당체(유효성분) 작용기전 연구

### (1) 대식세포에서의 cytokines 분비패턴 조사 및 Receptor 유추 해석

최근 면역활성을 나타내는 다당체에 의한 macrophage 활성화, NK세포 자극활성 및 cytokine 생산 자극 등과 같은 여러 생리활성에 대한 연구결과들이 속속 발표되고 있다.

또한 면역활성을 나타내는 다당체의 특이적 구조가 대식세포 등 면역세포들이 세포표면에 발현하고 있는 특이수용체인 패턴인식수용체(pattern recognition receptor, PRR)에 인식되면서 신호전달을 매개한다고 밝혀지고 있다.

이러한 연구결과들에 근거하여, 앞에서 확립된 분리정제공정을 통해 제조된 참깨(생물전환)산물의 다당체분획물도 면역세포의 특이수용체인 패턴인식수용체에 인식되어 신호전달이 매개되는지를 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴 비교를 통해 특이수용체(specific receptor)를 유추하였고, 이를 확인하기 위하여 유추된 특이수용체에 대한 inhibitor를 처리하여 신호전달이 차단되는지 확인하는 실험도 함께 진행하였다. Inhibitor 처리 실험을 통해 참깨(생물전환)산물에 대한 특이수용체가 패턴인식수용체의 하나인 TLR4(Toll-like receptor4)임을 확인할 수 있었으며, TLR4의 ligand로 잘 알려진 LPS와 함께 TLR4 agonist로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 비교를 통해 참깨(생물전환)산물의 면역활성 특성을 조사하였다.

참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성을 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴을 조사하였다. 대조군 물질로는 LPS(Lipopolysaccharide)를 각각 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 처리하였으며, 참깨(생물전환)산물은 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 반면 참깨(생물전환)산물의 다당체분획물은 LPS와 동일한 농도인 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 수행하였다. 참깨(생물전환)산물의 처리농도 설정은 참깨(생물전환)산물로부터 다당체분획물의 회수율이 반복실험을 통해 약 12 %로 나왔기 때문에 이를 근거로 하여 농도를 설정하였다.

#### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 참깨(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되는 것을 확인할 수 있었으며 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작해서 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 참깨(생물전환)산물의 TNF- $\alpha$  분비량과 비슷한 수치를 나타내었다. 또한 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 모두에서 농도가 증가할수록 TNF- $\alpha$  분비량이 유사하게 증가함을 보임을 확인하였다. 이를 통해 참깨(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

참깨(생물전환)산물 다당체분획물과 LPS의 TNF- $\alpha$  분비량을 비교하였을 때, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 LPS가 더 높은 분비량을 나타냈으나, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 서로 비슷한 정도의 TNF- $\alpha$  분비량을 보였다.

#### (나) IL-1 $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 $\beta$ (Interlukine-1 $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를

ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 참깨(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 IL-6가 분비되기 시작하여 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-6의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 IL-6가 소량 분비되기 시작하여 처리농도가 증가함에 따라 IL-6의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 농도가 증가할수록 IL-6 분비량이 유사한 분비량을 보임을 확인하였다. 이를 통해 참깨(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-6를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

참깨(생물전환)산물 다당체 분획물과 LPS의 IL-6 분비량을 비교하였을 때, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 LPS에 의한 IL-6의 분비량이 낮게 나타났으나, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 서로 비슷한 정도의 IL-6 분비량을 보였다.

(바) IL-10 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 참깨(생물전환)산물의 경우 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-10의 분비량이 측정되는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-10의 분비량이 측정되었다.

참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 IL-10 분비량이 고농도에서 유사하게 측정된 것을 확인하였다. 이를 통해 참깨(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-10을 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IL-10 분비량을 비교하였을 때 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서만 IL-10의 분비량이 측정되었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 참깨(생물전환)산물 다당체분획물에서 IL-10의 분비량이 더 높게 나타났다.

#### (사) IL-12p70 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

#### (아) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 참깨(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되는 것을 확인할 수 있었고 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리농도에서부터 IFN- $\beta$ 가 분비되기 시작해서 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리농도가 증가함에 따라 IFN- $\beta$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 참깨(생물전환)산물의 IFN- $\beta$  분비량과 비슷한 수치를 나타내었다. 또한 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 IFN- $\beta$  분비량이 농도가 증가할수록 유사하게 증가함을 확인하였다. 이를 통해 참깨(생물전환)산물에 함유된 여러 물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IFN- $\beta$ 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IFN- $\beta$  분비량을 비교하였을 때 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 모든 농도에서 LPS가 상대적으로 약간 높게 나타났다.

#### (자) 결과 분석

참깨(생물전환)산물의 면역활성 관련 cytokine을 분석한 결과, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 및 IFN- $\beta$ 가 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 참깨(생물전환)산물의 상기 면역활성은 다당체분획물에 기인한 것임을 확인할 수 있었다. 비교물질인 LPS와 비교평가 시, LPS에서도 TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$ 의 cytokine 분비패턴 양상이 참깨(생물전환)산물 다당체분획물과 유사함은 물론 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-12p70도 함께 분비되지 않음을 확인할 수 있었다. LPS는 TLR4(Toll-loke receptor4)에 인식되는 물질로 잘 알려져 있는 바, 이를 통해 참깨(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 인식되어 신호를 매개할 것이라 유추해석할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 탐식작용 시 대식세포와 단핵세포 등에서 분비되며 inducible nitric oxide(NO)와 함께 독감바이러스 등의 다양한 바이러스에 대하여 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 항원 특이 면역반응, 염증반응, 급성반응에서의 주요 mediator이며 또한 생체내 방어체계에서 핵심역할을 담당하는 대표적 cytokine이다.

IFN- $\beta$ 는 IFN- $\alpha$ 와 함께 type I interferon으로 항균, 항바이러스 효과가 있으며 특히, Th1 세포의 분화에 기여하여 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokine으로 Th1 면역반응을 유도하는 반면, Th2 및 Th17 면역반응을 억제하는 면역조절 기능이 있는 cytokine이다.

결론적으로 활성화시킨 대식세포에서 Interferon- $\beta$ 의 생성이 유도됨을 확인하여 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화시킬 수 있는 소재로 판단되며, 이들의 면역활성은 모두 고분자 다당체분획물에 의해 나타남을 확인할 수 있었다.

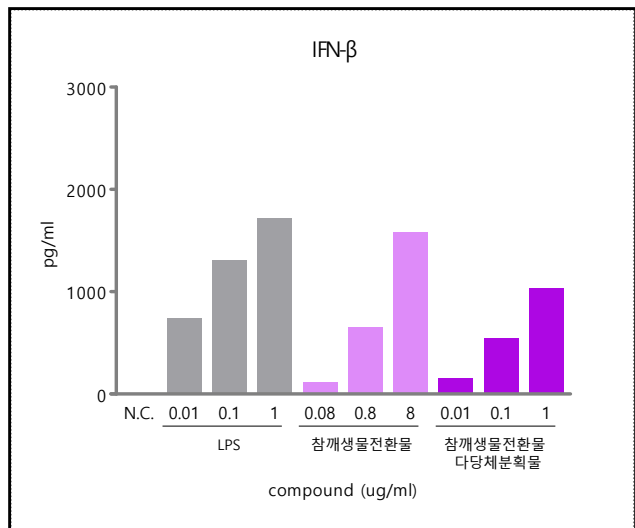
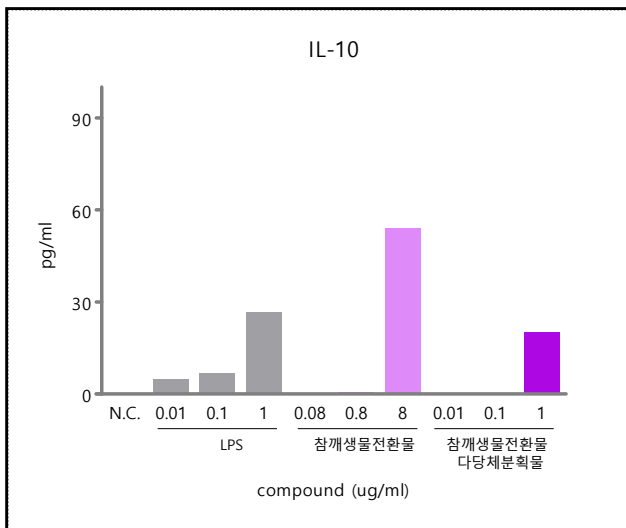
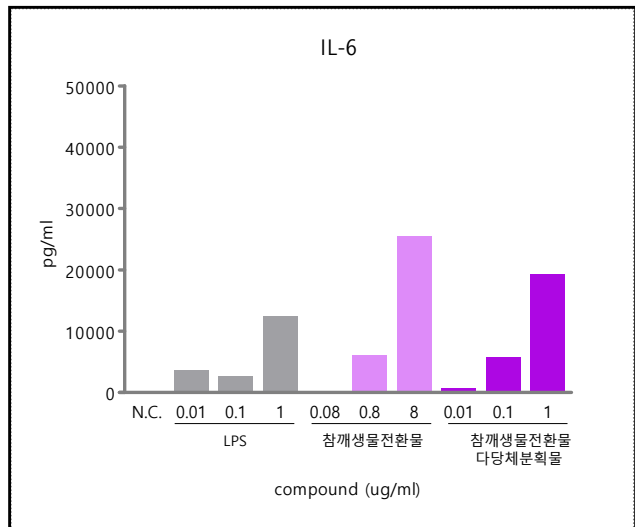
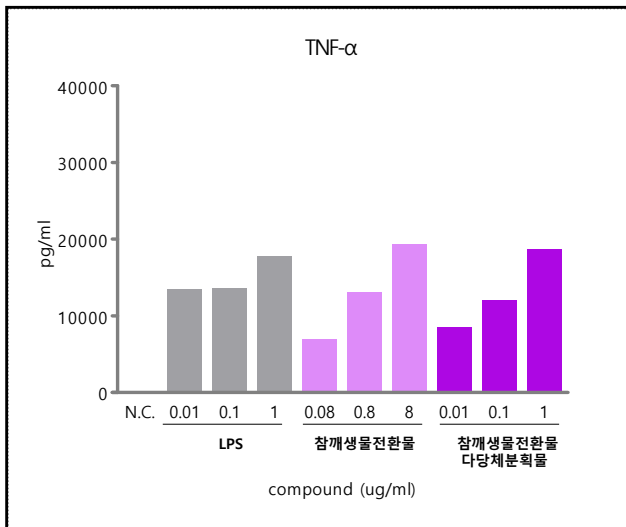


그림 138. 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비패턴 조사

## (2) Receptor 확인 : TLR4 agonist 입증

현재까지 개발된 많은 면역소재의 경우 대부분 receptor가 확인되고 있지 않으며 일부 베타글루칸 제품만이 주로 dectin-1 이라는 수용체에 결합한다고 알려져 있으나, 베타글루칸 제품조차도 불용성소재의 경우 dectin에 결합하는 반면 수용성소재는 dectin-1에 결합하지 않는 것으로 알려져 있다. 수용체가 알려져 있으면 biomarker가 확정될 수 있으며 이를 바탕으로 의약품 및 동물용의약품 개발의 임상시험에 있어서도 biomarker의 설정에 활용이 가능하다는 장점이 있다.

앞선 실험결과들을 바탕으로 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 Receptor가 TLR4임을 유추한 바, 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 특이적으로 인식되어 신호를 매개하는 것인지 확인하기 위하여 TLR4에 대한 specific한 Inhibitor인 TAK-242를 사용하여 최종 확인하고자 하였다.

### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.01 $\mu$ g/mL 및 0.1 $\mu$ g/mL의 농도에 있어서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 1 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물의 경우에서도 0.08 $\mu$ g/mL 및 0.8 $\mu$ g/mL의 농도에 있어서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 8 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 0.01 $\mu$ g/mL 및 0.1 $\mu$ g/mL의 농도에 있어서 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 1 $\mu$ g/mL의 고농도에 있어서는 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 TNF- $\alpha$ 의 분비가 완전히 차단되거나 매우 크게 대폭 감소되는 결과에 근거하여 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 TNF- $\alpha$  분비 신호가 매개됨을 확인할 수 있었다.

### (나) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물의 경우에도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 3가지 농도 모두에서 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-6 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

### (다) IL-10 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-10의 분

비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물의 경우에도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-10의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-10의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-10의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-10 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

#### (라) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- $\beta$ (Interferon- $\beta$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 참깨(생물전환)산물의 경우에도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 3가지 농도 모두에서 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IFN- $\beta$ 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IFN- $\beta$ 의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 참깨(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IFN- $\beta$  분비 신호가 매개됨을 확인하였다.



(마) 결과 분석

참깨(생물전환)산물의 대식세포 면역활성은 다당체분획물에 의해 나타남을 확인하였으며, 대식세포 활성화에 의해 나타나는 반응들은 TLR4 specific inhibitor인 TAK242에 의해 모두 억제되어 TLR4가 참깨(생물전환)산물의 수용체임을 확인함으로써, 본 과제에서 추구하는 생물전환공정에 의해 생산된 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물은 TLR4 agonist의 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

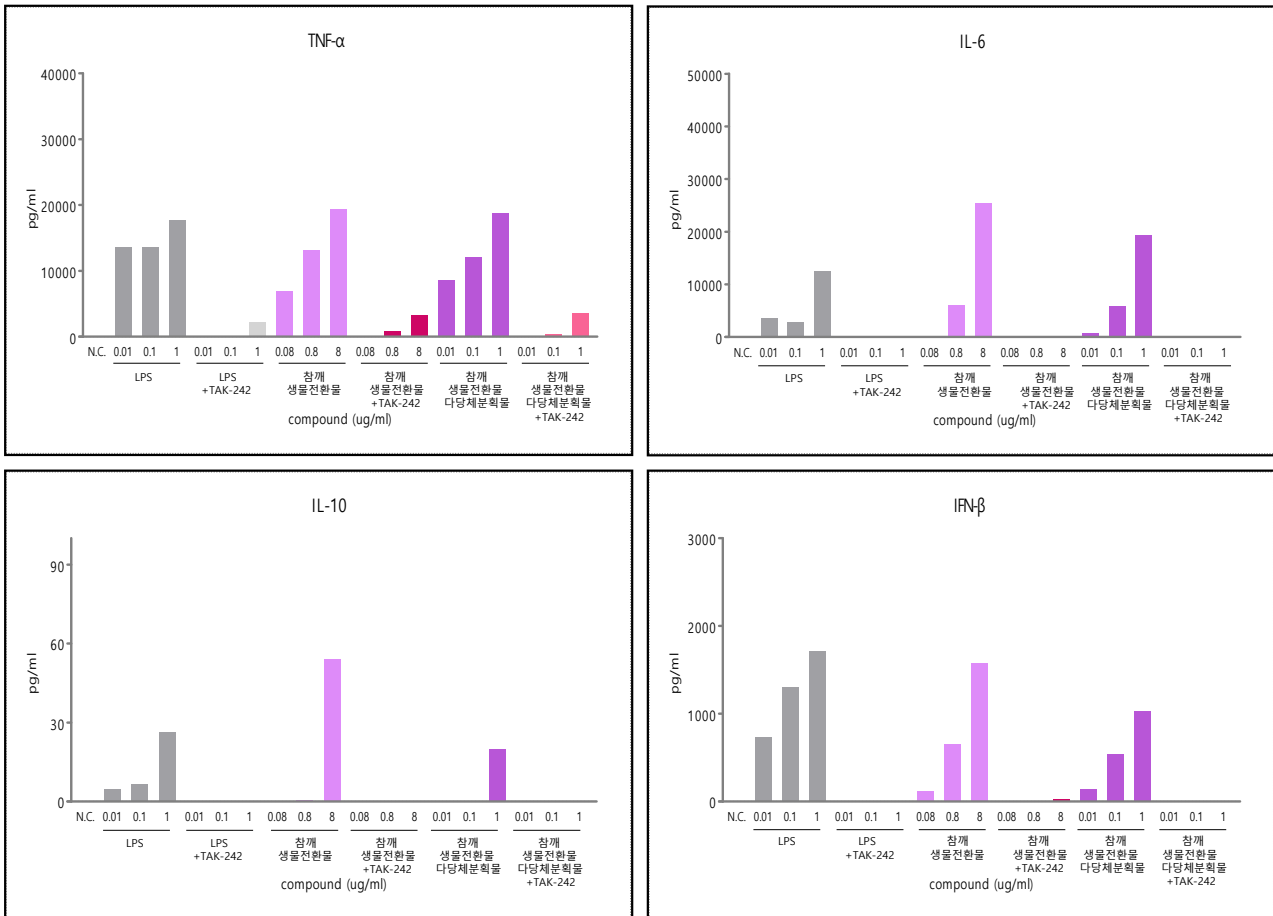


그림 139. TLR4 inhibitor 처리시, 참깨(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비량 억제 평가

### (3) TLR4 agonist, MPLA와의 비교 평가

패턴인식수용체의 하나인 TLR4에 대한 대표적 리간드로 그람음성균 유래의 내독소인 LPS (lipopolysaccharide)가 이에 해당한다. 또한 논문 및 임상에서의 적용을 통해 TLR4 agonist, Th1 adjuvant로 입증된 유일한 면역조절소제로 GSK社에서 출시하고 있는 MPLA가 있다. MPLA는 대표적인 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)를 화학적 변환을 통해 독성을 약화시킨 탈독성(detoxified) 유도체이다. LPS에서 lipid A는 면역세포 표면에 있는 TLR4(toll-like receptor 4)에 의해 인식되는 영역으로 면역활성과 함께 독성을 나타내는 부분이다. MPLA는 lipid A에서 화학적 변환을 통해 phosphate group 하나를 제거하여 lipid A를 화학적으로 변환시킨 물질로, TLR4와의 결합 구조에 변화를 일으켜 탈독성화 시키고 동시에 TLR4와의 결합은 유지시킴으로써 면역활성이 유지되도록 개발된 물질이다.

앞선 실험을 통해 참깨(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 의해 인식되어 신호전달을 매개하는 것으로 확인되어, TLR4의 대표적 ligand인 LPS와 TLR4 agonist이자 Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소제인 MPLA와의 면역활성 특성을 비교하고자 실험을 수행하였다.

#### (가) TNF- $\alpha$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001 $\mu$ g/mL의 농도까지 TNF- $\alpha$ 의 높은 분비량을 유지하다가 0.0001 $\mu$ g/mL의 농도에서는 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 급속히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에는 0.0001 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 TNF- $\alpha$ 가 분비되기 시작하여 처리농도가 증가함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 분비량이 증가함을 확인할 수 있었으나, 1 $\mu$ g/mL 농도에서의 TNF- $\alpha$  분비량이 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 0.01 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량과 비슷한 수준이며, LPS의 0.001 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준임을 확인할 수 있었다.

#### (나) IL-6 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 IL-6가 분비되기 시작하여 1 $\mu$ g/mL에서 IL-6의 분비량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 $\mu$ g/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 분비량이 증가함을 확인할 수 있었으나, 1 $\mu$ g/mL 농도에서의 IL-6분비량이 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 0.01 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량과 비슷한 수준이며, LPS의 0.001 $\mu$ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준임을 확인할 수 있었다.

#### (다) IFN- $\beta$ 분비능 평가

시료 처리 후 16시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) 결과 분석

대표적인 면역활성물질인 LPS 및 MPLA와 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 특성을 비교한 결과 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$ 의 분비패턴과 수치가 매우 유사함을 확인한 바, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물은 매우 강력한 TLR4 agonist의 면역조절소제임을 입증할 수 있었다. 또한 현재 유일하게 TLR4 agonist이자, Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소제인 MPLA에 비해 참깨(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 능력이 10배 이상 낮은 농도에서도 MPLA에 비해 더 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

MPLA는 FDA에서 두 번째로 허가한 백신 adjuvant물질이며, 인간 백신에 유일하게 허가된 TLR ligand이기도 하다. GSK社에서는 지속적으로 MPLA를 adjuvant로 사용한 백신을 출시하고 있다. MPLA를 사용한 B형간염백신의 항체생성률은 기존 백신이 60%인데 반해 100%에 가깝게 향상되었으며, 최근 개발한 대상포진 단백질백신에서는 기존 생백신의 방어율이 50% 정도인데 비해 97%의 방어율을 보여주고 있는 대표적 TLR4 agonist 이다.

참깨(생물전환)산물 다당체분획물은 LPS 및 MPLA와 같이 10가지의 TLR중 TLR4에 특이적으로 결합하며 또한 TLR4에 LPS가 결합하는 것을 방해함으로써, TLR4 agonist로서의 기능과 함께 LPS에 의해 나타나는 염증 부작용을 억제함을 보여주고 있어 LPS antagonist로서의 기능을 동시에 가지고 있는 특성이 있다.

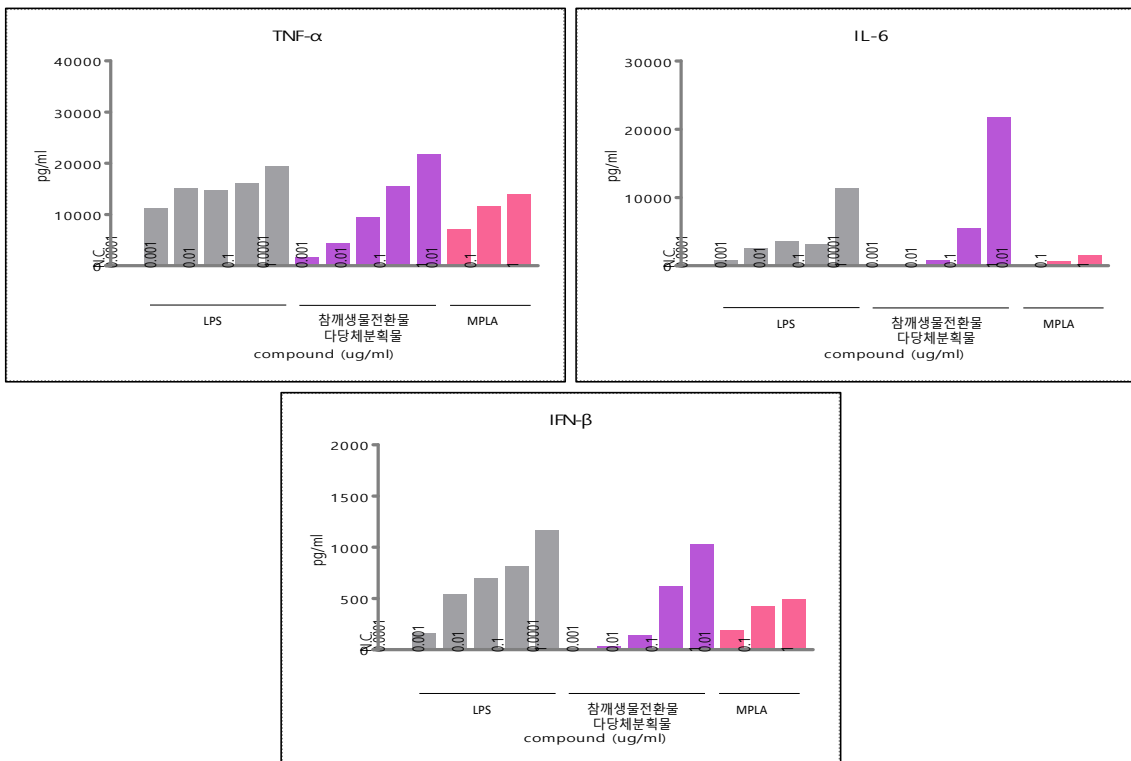
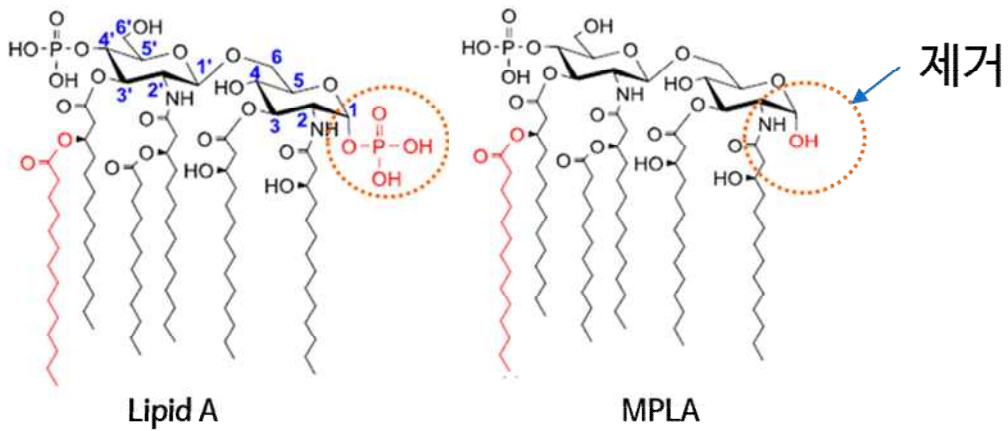


그림 140. LPS, 참깨(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA의 cytokine 분비량 비교



백신은 생백신과 사백신으로 나눌 수 있다. 사백신의 경우, 생백신과는 달리 바이러스나 박테리아 유래의 단백질이나 DNA 혹은 RNA 등의 강력한 면역유발물질이 거의 없기 때문에 자체의 항원만으로는 충분한 항체나 CTL 반응을 충분히 유발하지 못하게 된다. 이를 극복하기 위해서 사용하는 물질이 adjuvant 이다. 이러한 물질은 특히, 선천성 면역을 자극하여 적응면역이 더 쉽게 활성화 되도록 한다. 일반적으로 이와 같이 선천성 면역력을 올려주는 물질을 어쥬번트라고 부른다.

현재까지 다양한 어쥬번트들이 연구되고 있으며, 이들의 상당수가 TLR의 ligand들이다. 이들은 현재 동물용 백신에서 다양하게 연구되고 있고 또한 많은 임상연구가 진행되고 있으나, 현재 가장 안전하다고 알려진 것은 앞서 설명한 인간백신에 처음으로 허가된 유일한 TLR ligand인 MPLA라는 물질로 TLR4 agonist 이다. 아직 이유는 정확하지 않지만 TLR4 agonist, MPLA가 특히 안전한 이유는 MyD88 신호 대신에 TRIF 신호를 주로 이용하여 더 안전하게 면역력을 올릴 수 있기 때문이라고 해석되고 있다. 그러므로 면역조절소재를 개발하기 위해서는 TLR4 agonist를 개발하는 것이 현재로서는 가장 안전한 방법이라고 생각된다.

## 8절. 3개 개발소재의 LPS antagonist 입증을 위한 *in vivo* 효능 평가

### 1. 호중구 유도능 측정을 위한 실험 조건 확립

미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물이 LPS에 대한 antagonist로 작용할 수 있는지 확인하기 위하여 마우스 복강에서 LPS에 의한 호중구 유도 시 3개 개발소재의 호중구 유도 억제 효과를 평가하였다. 실험군당 10마리의 8주령의 수컷 BALB/c 마우스를 1주일간 적응시킨 후 복강에 LPS를 농도별로(0, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/mouse) 주사하고 8시간 후 호중구의 유도 효과를 확인하였다. 그 결과, 마우스 당 200 ng의 LPS를 주사하였을 때 호중구 유도능이 포화되는 것을 확인하였으며, 이후의 실험에서는 200 ng의 LPS를 이용하였다.

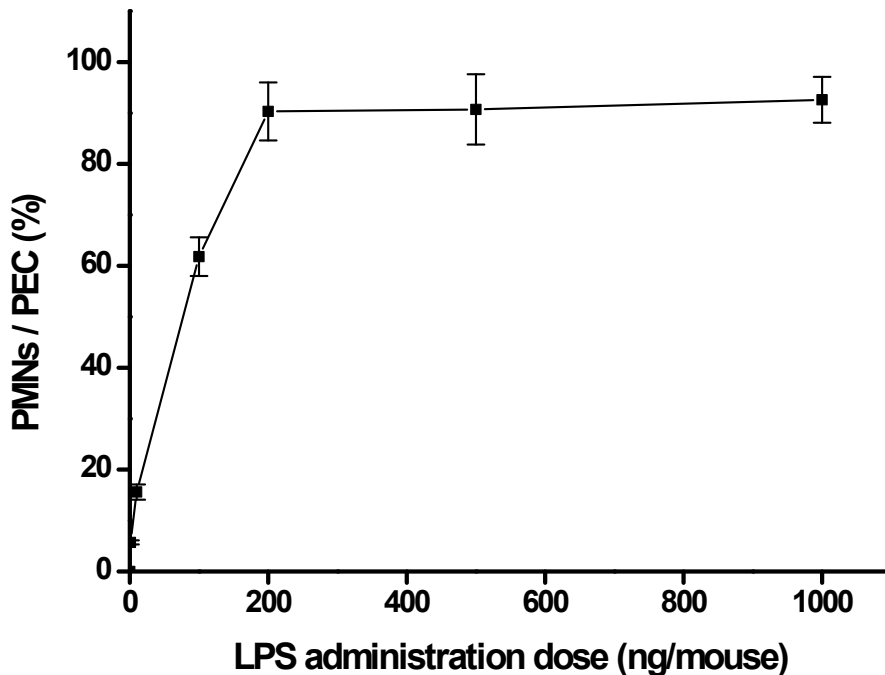


그림 141. LPS의 주사 농도에 따른 호중구 유도능 평가

## 2. 3개 개발소재의 호중구 유도능 측정 및 LPS antagonist 확인

미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 LPS와 동일한 투여량인 200 ng으로 마우스에 복강주사하고 8시간 후 호중구의 유도능을 확인하였다. 앞선 LPS 단독 주사 실험과 동일한 조건인 8주령의 수컷 BALB/c 마우스를 1주일간 적응시킨 후 사용하였으며, 실험군당 10마리의 마우스를 사용하였다. 그 결과, 양성대조군으로 사용한 LPS의 경우 약  $6 \times 10^5$  cell의 호중구를 유도하는 것으로 확인되었으며 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물은 염증반응에 의한 호중구의 유도를 활성화시키지 않는 것으로 확인되었다. 또한 LPS와 함께 동일 투여량의 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 동시 투여한 결과, LPS에 의한 호중구 유도를 억제할 수 있는 것으로 확인되어 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물이 LPS에 대한 antagonist로 작용할 수 있는 것으로 평가되었다.

표 49. 농산부산물 3개 개발소재의 호중구 유도능 및 LPS antagonist 활성 평가

Sample	Dose (ng/mouse)	PMNs/PEC (%)	Total PEC ( $1 \times 10^4$ cells/mL)
LPS	200	90.3 ± 5.7	72
(from <i>E.coli</i> )	1000	92.6 ± 4.5	63
미강(생물전환)산물	200	14.1 ± 1.3	1.4
다당체분획	1000	14.3 ± 1.1	1.6
LPS + 미강(생물전환)산물	200 + 200	44.7 ± 1.7	35
다당체분획	1000 + 1000	50.3 ± 4.2	31
대두(생물전환)산물	200	15.6 ± 1.1	1.7
다당체분획	1000	13.8 ± 1.9	2.5
LPS + 대두(생물전환)산물	200 + 200	47.6 ± 3.5	31
다당체분획	1000 + 1000	52.4 ± 2.9	26
참깨(생물전환)산물	200	13.9 ± 1.2	1.3
다당체분획	1000	12.8 ± 0.9	1.6
LPS + 참깨(생물전환)산물	200 + 200	50.1 ± 4.2	41
다당체분획	1000 + 1000	56.3 ± 5.3	39

### 3. 3개 개발소재의 LPS antagonist 입증을 위한 *in vivo* 효능 평가에 대한 실험적 의의

본 연구에서 사용한 농산부산물 3개 개발소재는 대식세포의 활성화 및 Th1 면역반응의 활성화를 강하게 유도하기 때문에, 체내에서 endotoxin으로 작용 시 과도한 염증반응에 의한 부작용을 유발할 가능성이 있다. 따라서, 개발소재의 과도한 염증반응 유발 가능성을 평가하기 위하여 마우스 호중구 유도 모델을 확립하였으며, 개발소재의 호중구 유도능을 확인하였다. 그 결과, 개발소재는 단독 복강주사 시 복강으로의 세포 침윤을 유도하지 않으며, 호중구의 유도 및 활성화 역시 일으키지 않는 것으로 확인되었다. 또한, LPS와 동일한 양을 함께 주사하여 LPS에 의해 유도되는 호중구의 침윤을 억제할 수 있는지 확인한 결과, 개발소재를 함께 투여한 마우스의 경우 LPS에 의해 유도되는 복강 내 세포 침윤 및 호중구의 이동이 억제되는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는, 개발소재가 TLR4의 agonist로 작용하지만 LPS와 같은 과도한 염증반응을 유발하지 않으며, LPS와 경쟁적으로 TLR4에 결합함으로써 LPS에 대한 antagonist로 작용할 수 있는 가능성을 시사한다.

## 9절. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 생체 안전성 평가

개발소재의 생체안전성 및 한계투여량 조사를 위하여, 개발소재를 2주간 농도별로 마우스에 식이 및 복강투여 한 뒤 마우스에 미치는 생체안전성을 평가하였다. 또한, 살모넬라 유래 LPS와 galactosamine에 의해 유도된 패혈증 마우스모델에서 개발소재가 갖는 전신성 염증반응 억제 효과를 평가하였다.

### 1. 정상 마우스에서 장기 무게 측정 및 cytokine profiling을 통한 생체안정성 평가

실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 1주일간 적응시킨 뒤, 2주간 개발소재를 농도별로 식이 또는 복강투여 하였다. 이후 마우스를 희생하여 장기무게와 nitrite의 양, cytokine의 발현량을 조사하여 개발소재가 갖는 생체안전성을 평가하였다.

#### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 생체안전성 평가-1

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 1, 10, 100 mg/kg의 1일 섭취량으로 식이투여 한 경우, 모든 투여 농도에서 생체독성을 보이지 않았으며, 정상적인 생체 상태에서 과도한 면역반응을 유도하지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 복강주사 한 경우 역시 특이적인 생체독성이나 면역반응의 활성화는 유도하지 않는 것으로 확인되었다.

표 50. 정상 마우스에 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 투여 시 체중 및 장기무게의 변화-1

Sample	body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)					
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen	
Vehicle	30.6 ± 1.5	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.01 ± 0.09	0.15 ± 0.01	
미강 원물 식이투여	1 mg/kg	30.2 ± 2.3	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	1.04 ± 0.10	0.14 ± 0.01
	10 mg/kg	30.8 ± 1.9	0.16 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1.03 ± 0.08	0.16 ± 0.02
	100 mg/kg	31.0 ± 2.5	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	1.02 ± 0.11	0.14 ± 0.02
미강 원물 복강투여	100 mg/kg	30.5 ± 2.7	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.02	1.03 ± 0.10	0.17 ± 0.02
미강 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	30.9 ± 1.4	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.02	1.02 ± 0.08	0.15 ± 0.02
	10 mg/kg	30.4 ± 2.3	0.17 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1.00 ± 0.09	0.13 ± 0.02
	100 mg/kg	30.6 ± 1.7	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.03	1.03 ± 0.10	0.14 ± 0.01
미강 (생물전환)산물 복강투여	100 mg/kg	30.2 ± 2.8	0.17 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1.02 ± 0.11	0.15 ± 0.01



표 51. 정상 마우스에 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 투여 시 nitrite 및 cytokine 발현량 변화-1

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	
Vehicle	0.80 $\pm$ 0.05	33.4 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.3	
미강 원물 식이투여	1 mg/kg	0.77 $\pm$ 0.04	32.6 $\pm$ 1.4	8.4 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.4
	10 mg/kg	0.78 $\pm$ 0.06	33.5 $\pm$ 2.6	8.9 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.2
	100 mg/kg	0.75 $\pm$ 0.03	30.9 $\pm$ 3.0	8.1 $\pm$ 0.7	7.5 $\pm$ 0.6
미강 원물 복강투여	100 mg/kg	0.83 $\pm$ 0.06	31.7 $\pm$ 2.8	8.8 $\pm$ 0.6	7.5 $\pm$ 0.3
미강 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	0.79 $\pm$ 0.02	35.1 $\pm$ 1.7	8.5 $\pm$ 0.7	7.2 $\pm$ 0.4
	10 mg/kg	0.85 $\pm$ 0.06	34.9 $\pm$ 1.6	8.9 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.6
	100 mg/kg	0.83 $\pm$ 0.04	34.2 $\pm$ 2.5	8.6 $\pm$ 0.7	7.7 $\pm$ 0.3
미강 (생물전환)산물 복강투여	100 mg/kg	0.88 $\pm$ 0.07	36.8 $\pm$ 3.2	9.0 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 0.6

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 생체안전성 평가

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 1, 10, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 한 경우 체중의 변화나 장기무게의 변화, 염증반응의 활성화를 보이지 않았으며, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 복강투여 한 경우 역시 특이한 독성반응은 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

표 52. 정상 마우스에 대두 원물 및 대두(생물전환)산물 투여 시 체중 및 장기무게의 변화

Sample	body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)					
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen	
Vehicle	30.6 ± 1.5	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.01 ± 0.09	0.15 ± 0.01	
대두 원물 식이투여	1 mg/kg	31.2 ± 2.3	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.02	1.03 ± 0.08	0.17 ± 0.01
	10 mg/kg	31.8 ± 2.9	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	1.00 ± 0.06	0.16 ± 0.02
	100 mg/kg	30.7 ± 1.8	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	1.03 ± 0.10	0.18 ± 0.02
대두 원물 복강투여	100 mg/kg	31.5 ± 2.4	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	1.00 ± 0.07	0.14 ± 0.01
대두 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	30.9 ± 2.5	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.02	1.01 ± 0.08	0.15 ± 0.02
	10 mg/kg	31.3 ± 2.7	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	1.11 ± 0.08	0.16 ± 0.01
	100 mg/kg	31.6 ± 3.0	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.98 ± 0.09	0.18 ± 0.02
대두 (생물전환)산물 복강투여	100 mg/kg	31.1 ± 2.2	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.99 ± 0.10	0.18 ± 0.01

표 53. 정상 마우스에 대두 원물 및 대두(생물전환)산물 투여 시 nitrite 및 염증성 cytokine 발현량

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	
Vehicle	0.80 $\pm$ 0.05	33.4 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.3	
대두 원물 식이투여	1 mg/kg	0.83 $\pm$ 0.05	35.2 $\pm$ 1.7	8.4 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.4
	10 mg/kg	0.82 $\pm$ 0.03	33.9 $\pm$ 2.4	8.8 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 0.3
	100 mg/kg	0.86 $\pm$ 0.06	35.8 $\pm$ 2.0	8.3 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.2
대두 원물 복강투여	100 mg/kg	0.87 $\pm$ 0.07	34.9 $\pm$ 2.6	8.1 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.3
대두 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	0.82 $\pm$ 0.03	35.6 $\pm$ 1.4	8.4 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.7
	10 mg/kg	0.84 $\pm$ 0.05	33.9 $\pm$ 1.9	8.5 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.6
	100 mg/kg	0.85 $\pm$ 0.06	36.8 $\pm$ 2.3	8.8 $\pm$ 0.7	7.3 $\pm$ 0.2
대두 (생물전환)산물 복강투여	100 mg/kg	0.89 $\pm$ 0.07	35.7 $\pm$ 1.8	8.8 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.4

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 생체안전성 평가

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물을 1, 10, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 한 경우와, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 복강투여 한 경우 모두 체중 및 장기무게의 변화, 염증반응의 활성화를 보이지 않는 것으로 확인되었다.

표 54. 정상 마우스에 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물 투여 시 체중 및 장기무게의 변화

Sample	body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)					
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen	
Vehicle	30.6 ± 1.5	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.01 ± 0.09	0.15 ± 0.01	
참깨 원물 식이투여	1 mg/kg	30.9 ± 1.4	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.99 ± 0.08	0.17 ± 0.02
	10 mg/kg	31.0 ± 2.8	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.01	1.00 ± 0.07	0.16 ± 0.01
	100 mg/kg	31.4 ± 1.7	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.98 ± 0.08	0.15 ± 0.01
참깨 원물 복강투여	100 mg/kg	31.3 ± 2.0	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01	1.03 ± 0.10	0.18 ± 0.02
	1 mg/kg	30.7 ± 2.4	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.02	1.02 ± 0.08	0.16 ± 0.01
	(생물전환)산물 식이투여	10 mg/kg	31.5 ± 1.9	0.17 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.99 ± 0.10
	100 mg/kg	31.9 ± 2.8	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.03 ± 0.11	0.15 ± 0.02
참깨 (생물전환)산물 복강투여	100 mg/kg	31.6 ± 3.0	0.16 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.02	1.00 ± 0.09	0.14 ± 0.02

표 55. 정상 마우스에 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물 투여 시 nitrite 및 염증성 cytokine 발현량

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	
Vehicle	0.80 $\pm$ 0.05	33.4 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.3	
참깨 원물 식이투여	1 mg/kg	0.80 $\pm$ 0.04	32.5 $\pm$ 1.9	8.6 $\pm$ 0.7	7.1 $\pm$ 0.5
	10 mg/kg	0.85 $\pm$ 0.06	33.0 $\pm$ 1.2	8.4 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.4
	100 mg/kg	0.87 $\pm$ 0.08	35.4 $\pm$ 3.1	8.3 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.6
참깨 원물 복강투여	100 mg/kg	0.84 $\pm$ 0.06	34.9 $\pm$ 3.3	8.7 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.4
참깨 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	0.82 $\pm$ 0.03	31.9 $\pm$ 3.0	8.3 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.6
	10 mg/kg	0.80 $\pm$ 0.02	34.2 $\pm$ 2.8	8.4 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.5
	100 mg/kg	0.86 $\pm$ 0.07	33.9 $\pm$ 1.5	8.8 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.5
참깨 (생물전환)산물 복강투여	100 mg/kg	0.88 $\pm$ 0.07	35.1 $\pm$ 3.4	8.7 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.6

라. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 생체안전성 평가

대두의 가공 후 부산물인 대두박 및 대두박(생물전환)산물의 생체안전성을 평가하였다. 40 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 한 뒤 체중 및 장기무게의 변화, 혈청 내 nitrite의 양, 염증성 cytokine의 발현량을 확인하였으며, 대두박 원물과 대두박(생물전환)산물 모두 생체 내에서 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

표 56. 정상 마우스에 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물 투여 시 체중 및 장기무게의 변화

Sample	body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)					
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen	
Vehicle	31.8 ± 2.4	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.02	1.03 ± 0.05	0.17 ± 0.02	
대두박 원물 식이투여	40 mg/kg	33.1 ± 3.1	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.01	1.05 ± 0.09	0.19 ± 0.02
대두박 (생물전환)산물 식이투여	40 mg/kg	32.5 ± 2.7	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.02	1.06 ± 0.06	0.18 ± 0.01

표 57. 정상 마우스에 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물 투여 시 nitrite 및 염증성 cytokine 발현량

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF-α	IL-1β	IL-6	
Vehicle	0.84 ± 0.07	35.8 ± 3.0	8.9 ± 0.7	6.4 ± 0.5	
대두박 원물 식이투여	40 mg/kg	0.88 ± 0.05	36.1 ± 2.7	9.1 ± 0.8	6.1 ± 0.4
대두박 (생물전환)산물 식이투여	40 mg/kg	0.83 ± 0.06	36.3 ± 3.5	9.2 ± 0.5	6.7 ± 0.5

마. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 생체안전성 평가

참깨의 가공 후 부산물인 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 생체안전성을 평가하였다. 대두박 소재와 마찬가지로 40 mg/kg의 1일 투여량에서 평가를 진행하였으며, 2주간 식이투여 한 뒤 안전성을 확인하였다. 그 결과, 참깨박 원물과 참깨박(생물전환)산물 모두 생체 내 독성을 보이지 않는 것으로 확인되었다.

표 58. 정상 마우스에 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물 투여 시 체중 및 장기무게의 변화

Sample	body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)					
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen	
Vehicle	31.8 ± 2.4	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.02	1.03 ± 0.05	0.17 ± 0.02	
참깨박 원물 식이투여	40 mg/kg	33.1 ± 3.1	0.20 ± 0.2	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02	1.05 ± 0.04	0.18 ± 0.02
참깨박 (생물전환)산물 식이투여	40 mg/kg	32.9 ± 2.7	0.17 ± 0.2	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1.01 ± 0.09	0.19 ± 0.02

표 59. 정상 마우스에 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물 투여 시 nitrite 및 염증성 cytokine 발현량

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF-α	IL-1β	IL-6	
Vehicle	0.84 ± 0.07	35.8 ± 3.0	8.9 ± 0.7	6.4 ± 0.5	
참깨박 원물 식이투여	40 mg/kg	0.83 ± 0.06	34.9 ± 2.7	9.2 ± 0.5	5.9 ± 0.4
참깨박 (생물전환)산물 식이투여	40 mg/kg	0.88 ± 0.05	36.1 ± 3.4	9.5 ± 0.7	6.8 ± 0.6

바. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 생체안정성 평가-2

투여 방법과 상관없이, 최대 100 mg/kg의 1일 투여량까지 미강 원물과 미강(생물전환)산물의 독성이 나타나지 않아, 최대 투여량을 360 mg/kg으로 설정하여 추가적인 생체안전성 평가를 수행하였다. 40, 120, 360 mg/kg의 1일 투여량으로 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 2주간 식이투여 한 뒤, 체중 및 장기의 무게, 혈청 내 염증지표를 확인한 결과, 360 mg/kg의 1일 투여량 까지도 특이적인 생체독성은 보이지 않는 것으로 확인되었다.

표 60. 정상 마우스에 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 투여 시 체중 및 장기무게의 변화-2

Sample	body weight (g)	Organ weight (g/20g body weight)					
		Heart	Lung	Stomach	Liver	Spleen	
Vehicle	31.8 ± 2.4	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.02	1.03 ± 0.05	0.17 ± 0.02	
미강 원물 식이투여	40 mg/kg	32.2 ± 2.5	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.03	1.02 ± 0.10	0.18 ± 0.02
	120 mg/kg	31.9 ± 3.0	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.03	1.05 ± 0.09	0.16 ± 0.01
	360 mg/kg	32.3 ± 3.1	0.17 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	1.05 ± 0.08	0.17 ± 0.02
미강 (생물전환)산물 식이투여	40 mg/kg	31.9 ± 2.7	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.03	1.03 ± 0.06	0.18 ± 0.01
	120 mg/kg	32.0 ± 3.0	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.02	1.06 ± 0.09	0.18 ± 0.02
	360 mg/kg	31.7 ± 2.8	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.29 ± 0.03	1.04 ± 0.08	0.19 ± 0.02



표 61. 정상 마우스에 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 투여 시 nitrite 및 cytokine 발현량 변화-2

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	
Vehicle	0.84 $\pm$ 0.07	35.8 $\pm$ 3.0	8.9 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 0.5	
미강 원물 식이투여	40 mg/kg	0.85 $\pm$ 0.06	34.1 $\pm$ 3.2	8.1 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.6
	120 mg/kg	0.88 $\pm$ 0.08	34.8 $\pm$ 3.3	8.5 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.5
	360 mg/kg	0.83 $\pm$ 0.07	35.0 $\pm$ 2.7	8.2 $\pm$ 0.6	6.6 $\pm$ 0.4
미강 (생물전환)산물 식이투여	40 mg/kg	0.86 $\pm$ 0.08	36.3 $\pm$ 2.5	9.1 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 0.4
	120 mg/kg	0.85 $\pm$ 0.07	35.9 $\pm$ 1.6	8.7 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 0.6
	360 mg/kg	0.90 $\pm$ 0.08	36.0 $\pm$ 2.4	9.3 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.4

## 2. 아치사량의 LPS와 galactosamine으로 유도된 패혈증 마우스모델에서 염증성 cytokine 생성 억제 및 간/신장 독성 억제능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 패혈증 억제 효과를 확인하기 위하여, 살모넬라 유래 LPS와 galactosamine의 주사를 통해 유발된 전신성 염증 마우스모델에서 개발소재의 투여로 인한 염증 완화 효과를 확인하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 이용하였으며, 1주일 적응 식이 후 개발소재를 2주간 식이투여 한 뒤 아치사량의 LPS(5 ug/kg, SIGMA, L6143)와 galactosamine(700 mg/kg, TCI, G0007)의 복강주사를 통해 패혈증을 유도하고 4시간 뒤 마우스를 희생하여 개발소재의 염증 완화 효과를 확인하였다.

### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과-1

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 1, 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 2주간 식이투여 한 뒤, 아치사량의 5 ug/kg LPS와 700 mg/kg galactosamine을 복강주사 하여 전신성 염증반응을 유도하였다. 4시간 뒤 마우스를 희생하여 혈청 내 염증반응 지표와 간 손상 및 신장 손상 여부를 확인하였다.

#### (1) 염증성 cytokine 억제 효과

혈청 내 nitrite 양과 염증성 cytokine의 양을 확인한 결과, 미강 원물을 투여한 마우스에서는 약간의 염증성 cytokine 감소가 확인되었지만 효과가 크지 않은 것으로 관찰되었다. 반면, 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 혈청 내 nitrite의 양과 cytokine의 양 모두 억제되는 효과를 보였으며, 1일 투여량이 높을수록 효과가 증가하는 것으로 확인되었다.

표 62. 전신염증반응 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 의한 nitrite 및 염증성 cytokine 억제 효과-1

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)		
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Vehicle	0.80 $\pm$ 0.05	33.4 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.3
LPS/GalN (5 ug/kg and 700 mg/kg)	18.3 $\pm$ 1.2	327.4 $\pm$ 21.5	46.8 $\pm$ 3.9	36.1 $\pm$ 2.7
미강 원물 식이투여				
1 mg/kg	18.2 $\pm$ 1.0	319.5 $\pm$ 20.6	45.1 $\pm$ 3.1	35.9 $\pm$ 3.3
40 mg/kg	18.6 $\pm$ 1.5	311.2 $\pm$ 17.5	44.8 $\pm$ 2.6	35.1 $\pm$ 3.1
미강 (생물전환)산물 식이투여				
1 mg/kg	8.6 $\pm$ 0.4	158.1 $\pm$ 7.8	35.2 $\pm$ 2.4	30.9 $\pm$ 1.2
40 mg/kg	5.0 $\pm$ 0.3	120.4 $\pm$ 10.5	26.9 $\pm$ 2.1	23.0 $\pm$ 1.3

(2) 간독성 억제 효과

미강 원물을 투여한 경우, 간 손상에 의해 나타나는 간 무게의 증가 및 혈청 내 GOT/GPT 수치의 회복이 나타나지 않았다. 반면, 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스의 경우 간 손상이 유의미하게 억제되는 것으로 확인되었다.

표 63. 전신염증반응 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 의한 간 보호 효과-1

Sample		Liver Weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle		1.01 ± 0.09	66.2 ± 3.7	36.1 ± 2.4
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)		1.28 ± 0.11	267.1 ± 15.4	186.9 ± 10.5
미강 원물 식이투여	1 mg/kg	1.28 ± 0.10	271.6 ± 20.5	185.4 ± 11.4
	40 mg/kg	1.26 ± 0.09	268.3 ± 11.7	180.3 ± 12.0
미강 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	1.22 ± 0.10	186.9 ± 12.3	86.8 ± 5.4
	40 mg/kg	1.12 ± 0.09	155.2 ± 13.0	70.9 ± 5.6

(3) 신장독성 억제 효과

신장 손상의 지표인 신장조직 내 myeloperoxidase activity 및 혈청 내 creatine, BUN의 양을 확인한 결과, 미강 원물 투여 시 전신성 염증반응에 의한 신장독성을 억제하지 못하는 것으로 확인되었으며 미강(생물전환)산물 투여 시 전신성 염증반응에 의한 신장독성을 억제하는 것으로 확인되었다.

표 64. 전신염증반응 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 의한 신장독성 억제 효과-1

Sample		Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Vehicle		1.71 ± 0.11	0.24 ± 0.01	9.4 ± 0.4
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)		5.76 ± 0.41	0.55 ± 0.03	51.9 ± 3.2
미강 원물 경구투여	1 mg/kg	5.78 ± 0.29	0.56 ± 0.04	50.8 ± 4.7
	40 mg/kg	5.71 ± 0.37	0.53 ± 0.04	50.1 ± 3.6
미강 (생물전환)산물 경구투여	1 mg/kg	5.47 ± 0.28	0.47 ± 0.02	41.8 ± 2.6
	40 mg/kg	5.11 ± 0.34	0.42 ± 0.03	31.9 ± 1.4

## 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 전신성 염증반응 억제 효과를 확인하기 위해, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 1, 40 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 한 뒤 아치사량의 5  $\mu$ g/kg LPS와 700 mg/kg galactosamine을 복강주사 하여 전신성 염증반응을 유도하였다. 염증반응 유도 4시간 후 마우스를 희생하여 혈청 내 염증지표와 간 손상, 신장 손상을 확인하였다.

### (1) 염증성 cytokine 억제 효과

혈청 내 염증반응의 지표를 확인한 결과, 대두 원물 투여 시에는 혈청 내 nitrite의 양과 염증성 cytokine 모두 크게 감소하지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 대두(생물전환)산물을 투여한 경우 nitrite의 양과 염증성 cytokine의 양 모두 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

표 65. 전신염증반응 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여에 의한 nitrite 및 염증성 cytokine 억제 효과

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	
Vehicle	0.80 $\pm$ 0.05	33.4 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.3	
LPS/GalN (5 $\mu$ g/kg and 700 mg/kg)	18.3 $\pm$ 1.2	327.4 $\pm$ 21.5	46.8 $\pm$ 3.9	36.1 $\pm$ 2.7	
대두 원물 식이투여	1 mg/kg	18.8 $\pm$ 1.6	330.6 $\pm$ 20.9	45.9 $\pm$ 3.5	35.2 $\pm$ 3.0
	40 mg/kg	18.5 $\pm$ 1.4	321.8 $\pm$ 11.4	44.1 $\pm$ 1.7	35.8 $\pm$ 3.3
대두 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	10.7 $\pm$ 0.9	178.5 $\pm$ 12.3	38.2 $\pm$ 2.1	32.3 $\pm$ 1.9
	40 mg/kg	5.5 $\pm$ 0.2	131.9 $\pm$ 5.8	30.6 $\pm$ 2.4	28.9 $\pm$ 1.4

(2) 간독성 억제 효과

전신성 염증반응에 의해 유발되는 간독성 역시 대두 원물 투여 시에는 큰 효과를 나타내지 않는 것으로 확인되었지만, 대두(생물전환)산물 투여 시에는 농도 의존적인 간독성 억제 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

표 66. 전신염증반응 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여에 의한 간 보호 효과

Sample		Liver Weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle		1.01 ± 0.09	66.2 ± 3.7	36.1 ± 2.4
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)		1.28 ± 0.11	267.1 ± 15.4	186.9 ± 10.5
대두 원물 식이투여	1 mg/kg	1.29 ± 0.12	272.5 ± 20.6	185.4 ± 12.7
	40 mg/kg	1.25 ± 0.11	263.4 ± 14.6	180.9 ± 7.6
대두 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	1.22 ± 0.10	196.9 ± 11.6	92.4 ± 4.7
	40 mg/kg	1.18 ± 0.09	165.4 ± 15.2	74.6 ± 2.5

(3) 신장독성 억제 효과

간독성 억제 효과와 마찬가지로, 대두 원물 투여 시 신장독성에 대한 억제 효과도 높지 않은 것으로 확인되었다. 반면, 대두(생물전환)산물 투여 시에는 농도 의존적인 신장독성 억제 효과가 나타나는 것으로 확인되었다.

표 67. 전신염증반응 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여에 의한 신장독성 억제 효과

Sample		Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Vehicle		1.71 ± 0.11	0.24 ± 0.01	9.4 ± 0.4
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)		5.76 ± 0.41	0.55 ± 0.03	51.9 ± 3.2
대두 원물 식이투여	1 mg/kg	5.74 ± 0.39	0.56 ± 0.04	50.4 ± 4.9
	40 mg/kg	5.71 ± 0.40	0.53 ± 0.02	50.2 ± 3.6
대두 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	5.62 ± 0.35	0.49 ± 0.02	46.3 ± 2.7
	40 mg/kg	5.23 ± 0.29	0.45 ± 0.03	35.6 ± 1.8

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 전신성 염증반응 억제 효과를 확인하였다. 1, 40 mg/kg의 1일 투여량으로 각 소재를 식이투여 한 뒤 아치사량의 5 µg/kg LPS와 700 mg/kg galactosamine을 복강주사 하여 전신성 염증반응을 유도하였다. 이후, 혈청 내 염증반응 지표와 간 및 신장 손상 여부를 확인하였다.

(1) 염증성 cytokine 억제 효과

참깨 원물을 식이투여 한 경우, 1, 40 mg/kg의 1일 투여량에서 모두 유의미한 전신성 염증반응 억제 효과를 보이지 않았다. 반면, 참깨(생물전환)산물을 투여한 경우에는 농도 의존적으로 혈청 내 nitrite의 양과 염증성 cytokine의 양이 감소되는 효과를 보였다.

표 68. 전신염증반응 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 의한 nitrite 및 염증성 cytokine 억제 효과

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF-α	IL-1β	IL-6	
Vehicle	0.80 ± 0.05	33.4 ± 2.1	8.5 ± 0.6	7.1 ± 0.3	
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	18.3 ± 1.2	327.4 ± 21.5	46.8 ± 3.9	36.1 ± 2.7	
참깨 원물 식이투여	1 mg/kg	18.5 ± 1.6	331.2 ± 20.3	47.2 ± 2.0	35.9 ± 1.4
	40 mg/kg	18.4 ± 1.7	323.6 ± 14.1	46.6 ± 3.3	36.2 ± 2.9
참깨 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	12.8 ± 1.1	195.6 ± 10.5	41.2 ± 2.0	33.8 ± 1.7
	40 mg/kg	6.3 ± 0.3	151.2 ± 10.4	32.8 ± 1.2	30.2 ± 1.9



(2) 간독성 억제 효과

참깨 원물을 1, 40 mg/kg의 1일 투여량으로 투여한 경우, 전신성 염증반응에 의한 간독성을 억제하지 못하는 것으로 확인되었다. 반면, 참깨(생물전환)산물을 1, 40 mg/kg의 1일 투여량으로 식이한 경우에는 간 손상이 효과적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

표 69. 전신염증반응 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 의한 간 보호 효과

Sample	Liver Weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle	1.01 ± 0.09	66.2 ± 3.7	36.1 ± 2.4
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	1.28 ± 0.11	267.1 ± 15.4	186.9 ± 10.5
참깨 원물 식이투여	1 mg/kg	1.30 ± 0.12	265.6 ± 21.1
	40 mg/kg	1.27 ± 0.11	264.8 ± 16.0
참깨 (생물전환)산물 식이투여	1 mg/kg	1.25 ± 0.06	207.8 ± 11.3
	40 mg/kg	1.22 ± 0.05	185.9 ± 14.7

(3) 신장독성 억제 효과

간 손상 억제 효과와 마찬가지로, 참깨 원물의 투여는 신장독성을 억제하지 못하는 것으로 확인되었으며, 참깨(생물전환)산물의 투여는 농도 의존적인 신장독성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

표 70. 전신염증반응 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 의한 신장독성 억제 효과

Sample	Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Vehicle	1.71 ± 0.11	0.24 ± 0.01	9.4 ± 0.4
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	5.76 ± 0.41	0.55 ± 0.03	51.9 ± 3.2
참깨 원물 식이투여			
1 mg/kg	5.75 ± 0.32	0.57 ± 0.05	52.8 ± 2.9
40 mg/kg	5.70 ± 0.49	0.54 ± 0.03	51.1 ± 4.3
참깨 (생물전환)산물 식이투여			
1 mg/kg	5.65 ± 0.41	0.51 ± 0.03	47.2 ± 3.2
40 mg/kg	5.38 ± 0.32	0.46 ± 0.02	38.1 ± 2.7

**라. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과**

대두의 가공 후 부산물인 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 전신성 염증반응 억제 효과를 확인하였다. 두 소재 모두 40 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 하였으며 아치사량의 5 µg/kg LPS와 700 mg/kg galactosamine을 복강주사 하여 전신성 염증반응을 유도하고 두 소재의 염증반응 억제 효과를 확인하였다.

(1) 염증성 cytokine 억제 효과

대두박 원물을 식이투여 한 경우 40 mg/kg의 1일 투여량에서는 혈청 내 염증반응 지표의 감소가 보이지 않았다. 반면, 대두박(생물전환)산물의 경우 40 mg/kg의 1일 투여량에서 혈청 내 염증반응 지표를 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었으며 대두(생물전환)산물과 큰 차이를 보이지 않았다.

표 71. 전신염증반응 마우스모델에서 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 투여에 의한 nitrite 및 염증성 cytokine 억제 효과

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)		
		TNF-α	IL-1β	IL-6
Vehicle	0.84 ± 0.07	35.8 ± 3.0	8.9 ± 0.7	6.4 ± 0.5
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	22.6 ± 2.0	382.4 ± 15.7	45.9 ± 2.4	40.5 ± 3.2
대두박 원물 식이투여 40 mg/kg	23.5 ± 2.1	379.5 ± 21.4	48.1 ± 3.7	40.9 ± 2.5
대두박 (생물전환)산물 식이투여 40 mg/kg	6.3 ± 0.5	156.7 ± 10.5	35.8 ± 2.3	36.9 ± 1.7

(2) 간독성 억제 효과

대두박 원물 투여 시 전신성 염증반응에 의한 간 손상을 억제하지 못하는 것으로 확인되었으며, 대두박(생물전환)산물 투여 시에는 염증반응의 억제로 인해 간 손상이 완화되는 것으로 확인되었다. 혈청에서의 염증반응 지표와 유사하게, 대두(생물전환)산물이 갖는 억제 효과와 대두박(생물전환)산물이 갖는 억제 효과는 비슷한 수준으로 평가된다.

표 72. 전신염증반응 마우스모델에서 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 투여에 의한 간 보호 효과

Sample	Liver Weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle	1.03 ± 0.05	61.9 ± 2.4	38.3 ± 1.7
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	1.33 ± 0.12	285.9 ± 11.4	181.3 ± 12.4
대두박 원물 40 mg/kg 식이투여	1.34 ± 0.10	280.4 ± 22.6	184.2 ± 10.9
대두박 (생물전환)산물 40 mg/kg 식이투여	1.23 ± 0.11	172.6 ± 15.0	81.9 ± 5.4

(3) 신장독성 억제 효과

간독성 억제 효과와 마찬가지로, 대두박 원물 투여 시에는 신장독성에 대한 억제 효과를 보이지 않았으나, 대두박(생물전환)산물 투여 시에는 신장독성이 억제되는 것으로 확인되었으며 대두(생물전환)산물이 갖는 억제 효과와 유사한 수준인 것으로 평가된다.

표 73. 전신염증반응 마우스모델에서 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 투여에 의한 신장독성 억제 효과

Sample	Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Vehicle	1.62 ± 0.08	0.21 ± 0.02	8.6 ± 0.5
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	5.83 ± 0.52	0.52 ± 0.04	50.3 ± 3.8
대두박 원물 식이투여 40 mg/kg	5.81 ± 0.55	0.54 ± 0.03	50.1 ± 4.2
대두박 (생물전환)산물 식이투여 40 mg/kg	5.38 ± 0.41	0.48 ± 0.03	38.9 ± 1.5

**마. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과**

참깨의 가공 후 부산물인 참깨박 원물과 참깨박(생물전환)산물의 전신성 염증반응 억제 효과를 확인하였다. 두 소재 모두 40 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 한 뒤, 아치사량의 5 µg/kg LPS와 700 mg/kg galactosamine을 복강주사 하여 전신성 염증반응을 유도하였다. 4시간 후 혈청과 간, 신장에서 전신성 염증반응 억제 효과를 확인하였다.

**(1) 염증성 cytokine 억제 효과**

혈청 내 염증반응의 지표를 확인한 결과, 참깨박 원물을 투여한 마우스에서는 염증반응이 억제되지 않는 것으로 나타났으며, 참깨박(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 염증반응이 효과적으로 제어되는 것으로 확인되었다. 또한, 참깨(생물전환)산물 투여 시와 비교했을 때, 참깨박(생물전환)산물 투여 시 조금 더 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

표 74. 전신염증반응 마우스모델에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 투여에 의한 nitrite 및 염증성 cytokine 억제 효과

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)		
		TNF-α	IL-1β	IL-6
Vehicle	0.84 ± 0.07	35.8 ± 3.0	8.9 ± 0.7	6.4 ± 0.5
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	22.6 ± 2.0	382.4 ± 15.7	45.9 ± 2.4	40.5 ± 3.2
참깨박 원물 40 mg/kg 식이투여	22.8 ± 1.4	371.6 ± 22.5	46.8 ± 3.4	41.6 ± 2.4
참깨박 (생물전환)산물 40 mg/kg 식이투여	6.1 ± 0.5	148.1 ± 11.6	33.7 ± 2.4	28.9 ± 2.1

(2) 간독성 억제 효과

참깨박 원물을 식이한 경우, 염증반응에 의한 간독성 역시 억제하지 못하는 것으로 확인되었다. 참깨박(생물전환)산물을 식이투여 한 경우 효과적인 간독성의 억제가 나타나는 것으로 확인되었고, 참깨(생물전환)산물과 비교했을 때, 참깨박(생물전환)산물이 약간 높은 활성을 갖는 것으로 평가된다.

표 75. 전신염증반응 마우스모델에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 투여에 의한 간 보호 효과

Sample	Liver Weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle	1.03 ± 0.05	61.9 ± 2.4	38.3 ± 1.7
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	1.33 ± 0.12	285.9 ± 11.4	181.3 ± 12.4
참깨박 원물 식이투여 40 mg/kg	1.34 ± 0.12	289.4 ± 20.5	180.9 ± 15.3
참깨박 (생물전환)산물 식이투여 40 mg/kg	1.20 ± 0.09	181.4 ± 10.7	88.3 ± 5.4

(3) 신장독성 억제 효과

간독성 억제 효과와 마찬가지로, 참깨박 원물의 경우 신장독성에 대한 억제 효과를 보이지 않았다. 참깨박(생물전환)산물 투여 시에는 염증반응의 억제로 인한 신장 손상 완화 효과를 보였으며, 참깨(생물전환)산물보다 약간 높은 활성을 갖는 것으로 평가된다.

표 76. 전신염증반응 마우스모델에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 투여에 의한 신장 독성 억제 효과

Sample	Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Vehicle	1.62 ± 0.08	0.21 ± 0.02	8.6 ± 0.5
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	5.83 ± 0.52	0.52 ± 0.04	50.3 ± 3.8
참깨박 원물 40 mg/kg 식이투여	5.85 ± 0.41	0.52 ± 0.05	49.8 ± 3.1
참깨박 (생물전환)산물 40 mg/kg 식이투여	5.30 ± 0.42	0.45 ± 0.03	37.6 ± 2.4



바. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 패혈증 억제 효과-2

최대 40 mg/kg의 1일 투여량에서 미강(생물전환)산물이 전신성 염증반응을 억제하는 효과를 보임에 따라, 더 높은 투여량에서의 염증 억제 효과를 확인하였다. 40, 120, 360 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 식이투여 하였고, 아치사량의 5 µg/kg LPS와 700 mg/kg galactosamine을 복강주사 하여 전신성 염증반응을 유도한 후, 혈청 내 염증지표와 간 손상, 신장 손상 여부를 확인하였다.

(1) 염증성 cytokine 억제 효과

혈청 내 nitrite의 양과 염증성 cytokine의 양을 확인한 결과, 미강 원물은 투여량이 많을수록 약간의 염증반응 억제 효과를 갖는 것으로 나타났으나, 효과가 크지 않은 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물의 경우 120 mg/kg의 1일 투여량까지는 농도 의존적인 효과의 증가가 보였으나, 360 mg/kg의 1일 투여량에서는 120 mg/kg의 1일 투여량과 큰 효과 차이를 보이지 않는 것으로 보아 120 mg/kg 정도의 1일 투여량에서 전신성 염증반응 억제 효과가 포화되는 것으로 생각된다.

표 77. 전신염증반응 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 의한 nitrite 및 염증성 cytokine 억제 효과-2

Sample	Nitrite (uM)	Cytokines (pg/mL)			
		TNF-α	IL-1β	IL-6	
Vehicle	0.84 ± 0.07	35.8 ± 3.0	8.9 ± 0.7	6.4 ± 0.5	
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	22.6 ± 2.0	382.4 ± 15.7	45.9 ± 2.4	40.5 ± 3.2	
40 mg/kg	22.0 ± 1.7	372.5 ± 16.3	44.8 ± 1.9	40.1 ± 2.5	
미강 원물 식이투여	120 mg/kg	21.2 ± 2.0	369.5 ± 21.4	42.2 ± 3.1	38.1 ± 2.9
360 mg/kg	21.5 ± 1.9	361.3 ± 15.3	40.3 ± 2.8	35.7 ± 1.5	
40 mg/kg	5.5 ± 0.4	138.1 ± 11.7	25.3 ± 1.5	21.9 ± 1.5	
미강 (생물전환)산물 식이투여	120 mg/kg	4.9 ± 0.3	115.6 ± 10.5	21.1 ± 2.0	18.1 ± 1.2
360 mg/kg	4.7 ± 0.2	109.8 ± 7.5	18.9 ± 1.4	17.6 ± 0.9	

(2) 간독성 억제 효과

혈청 내 염증지표와 마찬가지로, 미강 원물 투여 시에는 농도 의존적으로 효과가 증가하지만 염증 억제 활성이 크지 않은 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물 투여 시에는 120 mg/kg에서 활성이 포화되는 것으로 보이며 그 이후의 투여량에서는 효과의 증가가 크지 않은 것으로 확인되었다.

표 78. 전신염증반응 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 의한 간 보호 효과-2

Sample	Liver Weight (g)	GOT (Karmen unit/mL)	GPT (Karmen unit/mL)
Vehicle	1.03 ± 0.05	61.9 ± 2.4	38.3 ± 1.7
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	1.33 ± 0.12	285.9 ± 11.4	181.3 ± 12.4
40 mg/kg	1.31 ± 0.11	282.3 ± 20.5	180.5 ± 8.9
미강 원물 식이투여	120 mg/kg	1.28 ± 0.10	263.9 ± 17.4
360 mg/kg	1.25 ± 0.12	248.1 ± 10.9	144.3 ± 10.5
40 mg/kg	1.15 ± 0.10	161.9 ± 11.2	68.3 ± 4.2
미강 (생물전환)산물 식이투여	120 mg/kg	1.11 ± 0.08	148.3 ± 12.7
360 mg/kg	1.10 ± 0.09	142.6 ± 13.9	60.7 ± 2.9

(3) 신장독성 억제 효과

전신성 염증반응에 의한 신장독성 역시 미강 원물의 경우 낮은 염증 억제 활성을 보이는 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물의 경우 간독성의 결과와 마찬가지로 120 mg/kg 까지는 높은 염증 억제 활성을 보이지만 360 mg/kg 투여량에서는 120 mg/kg 투여 시와 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다.

표 79. 전신염증반응 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 개발소재의 투여에 의한 신장독성 억제 효과-2

Sample	Myeloperoxidase activity (U/g protein)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	
Vehicle	1.62 ± 0.08	0.21 ± 0.02	8.6 ± 0.5	
LPS/GalN (5 µg/kg and 700 mg/kg)	5.83 ± 0.52	0.52 ± 0.04	50.3 ± 3.8	
40 mg/kg	5.85 ± 0.40	0.50 ± 0.03	49.8 ± 2.7	
미강 원물 식이투여	120 mg/kg	5.66 ± 0.37	0.47 ± 0.02	45.6 ± 3.1
360 mg/kg	5.49 ± 0.28	0.45 ± 0.04	42.9 ± 3.4	
40 mg/kg	5.08 ± 0.27	0.45 ± 0.03	35.1 ± 2.8	
미강 (생물전환)산물 식이투여	120 mg/kg	4.89 ± 0.34	0.40 ± 0.02	27.6 ± 2.1
360 mg/kg	4.82 ± 0.25	0.38 ± 0.03	25.3 ± 1.8	

### 3. 치사량의 LPS와 galactosamine으로 유도된 패혈증 마우스모델에서 개발소재의 치사율 억제 효과

개발소재의 투여가 전신성 염증반응에 의한 마우스의 사망률을 개선할 수 있는지 확인하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 1주일 적응 후 사용하였으며, 개발소재를 각 투여량 별로 2주간 식이투여 및 복강투여 하였다. 이후 20 µg/kg의 살모넬라 유래 LPS(Sigma, L6143)와 700 mg/kg의 galactosamine(TCI, G0007)을 복강주사하여 패혈증을 유도하였다. 이후 60시간까지 관찰하여 마우스의 사망률을 확인하였다.

#### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 치사율 억제 효과-1

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서의 전신성 염증반응으로 인한 치사율을 확인하였다. 그 결과, 미강 원물을 투여한 마우스의 경우 투여량 및 투여방법과 상관없이 50시간 이내에 모든 마우스가 사망하는 것으로 확인되었으며, 대조군과 비교했을 때 치사율의 억제 효과를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스의 경우 10 mg/kg의 1일 투여량으로 식이 시 3마리, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 식이 시 4마리, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 복강주사 시 5마리의 마우스가 생존하는 것으로 확인되었다.

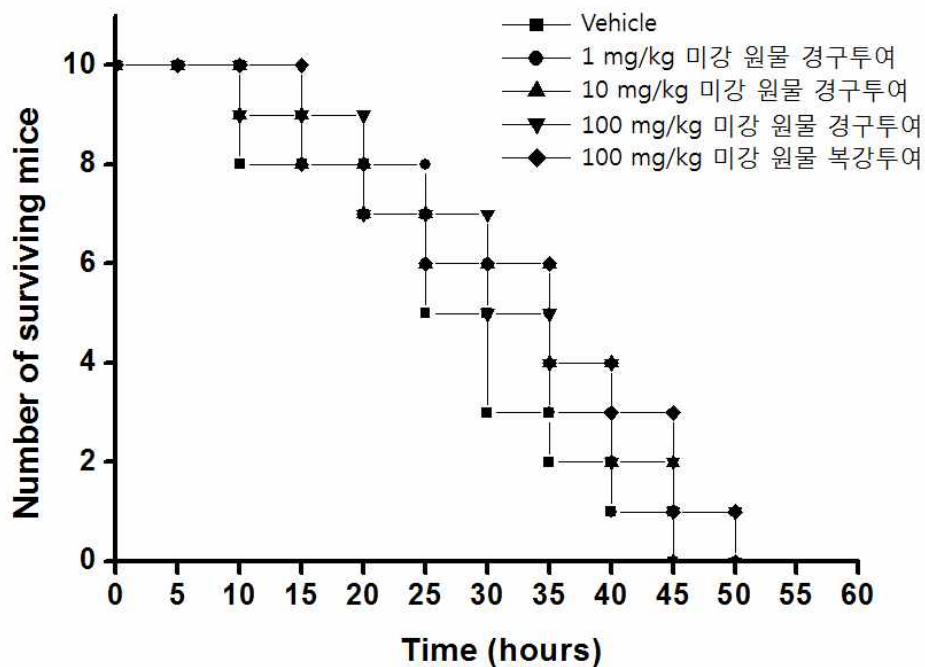


그림 142. 미강 원물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율-1

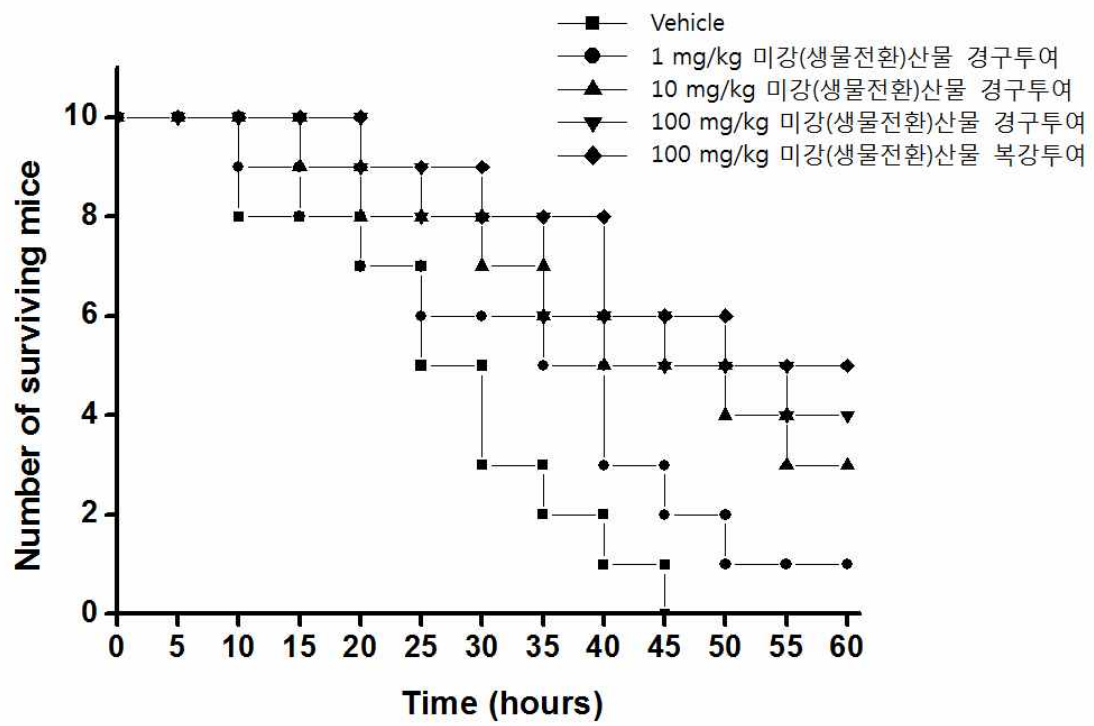


그림 143. 미강(생물전환)산물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율-1

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 마우스에서의 전신성 염증반응으로 인한 치사율을 확인하였다. 그 결과, 대두 원물을 투여한 마우스의 경우 1일 투여량과 투여방법에 관계없이 모든 마우스가 50시간 이내에 사망하는 것으로 확인되었다. 반면, 대두(생물전환)산물을 투여한 경우 10 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 한 마우스에서 2마리, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 한 마우스에서 3마리, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 복강주사 한 마우스에서 4마리의 마우스가 생존하는 것으로 확인되었다.

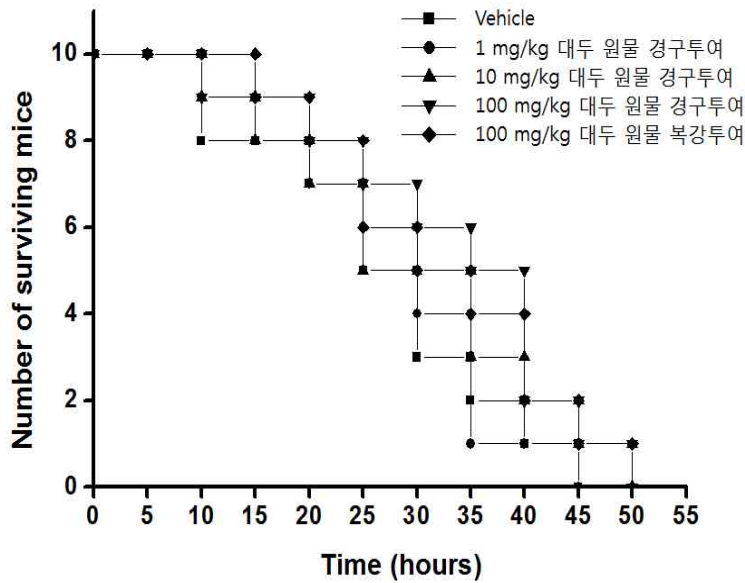


그림 144. 대두 원물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율

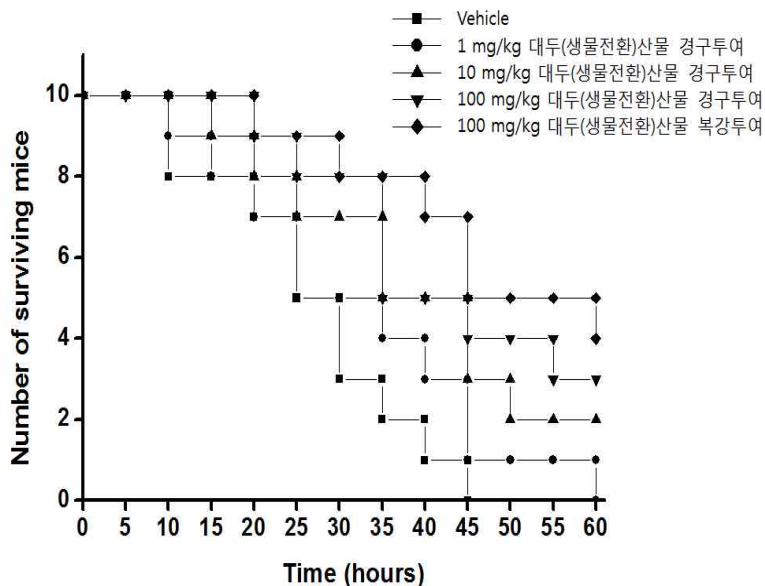


그림 145. 대두(생물전환)산물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 마우스에서의 생존률을 확인하였다. 참깨 원물을 투여한 마우스의 경우, 1일 투여량 및 투여방법과 상관없이 50시간 내에 모든 마우스가 사망하여 대조군과 차이를 보이지 않았다. 반면, 참깨(생물전환)산물을 투여한 마우스의 경우 10 mg/kg의 1일 투여량으로 식이 투여 시 1마리, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 시 2마리, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 복강주사 시 3마리의 마우스가 생존하는 것으로 확인되었다.

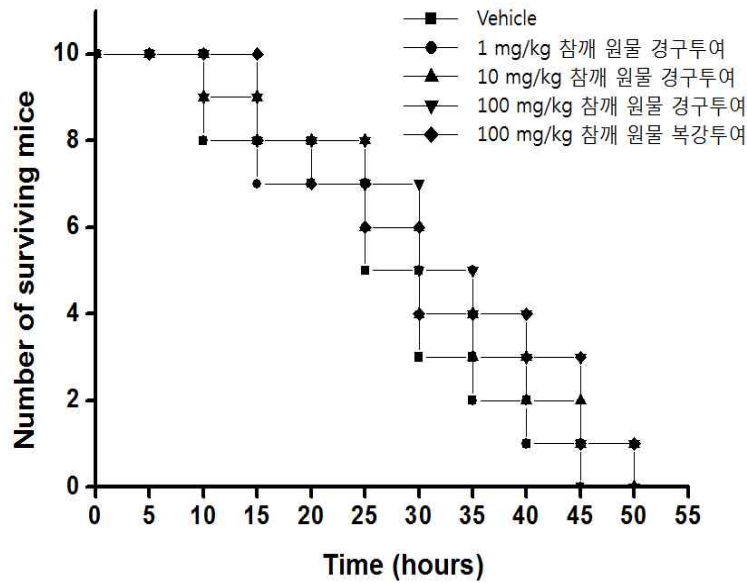


그림 146. 참깨 원물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율

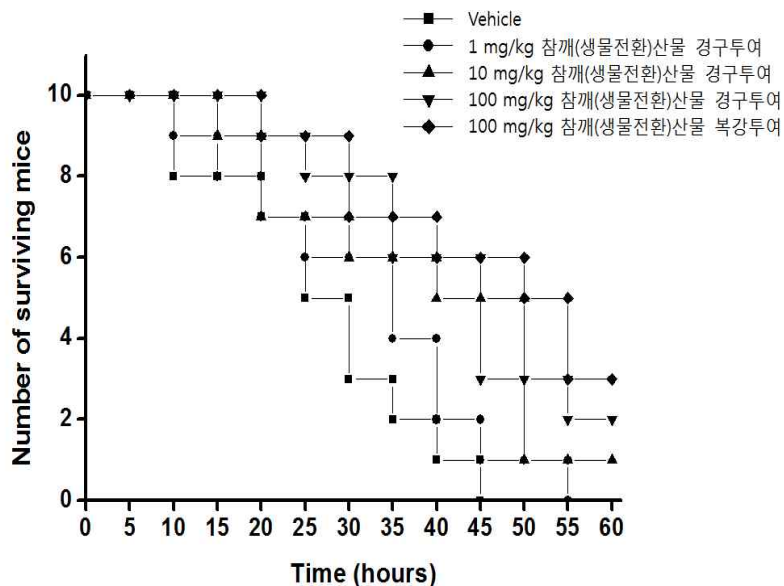


그림 147. 참깨(생물전환)산물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율

라. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

대두의 가공 부산물인 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물의 진신성 염증반응에 의한 마우스 치사율을 확인하였다. 대두박 원물을 40 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 한 마우스의 경우, 50시간 이내에 모든 마우스가 사망하여, 대조군과 차이를 보이지 않았다. 반면, 대두박(생물전환)산물을 40 mg/kg의 1일 투여량으로 투여한 마우스의 경우, 3마리의 마우스가 생존하는 효과를 보였다.

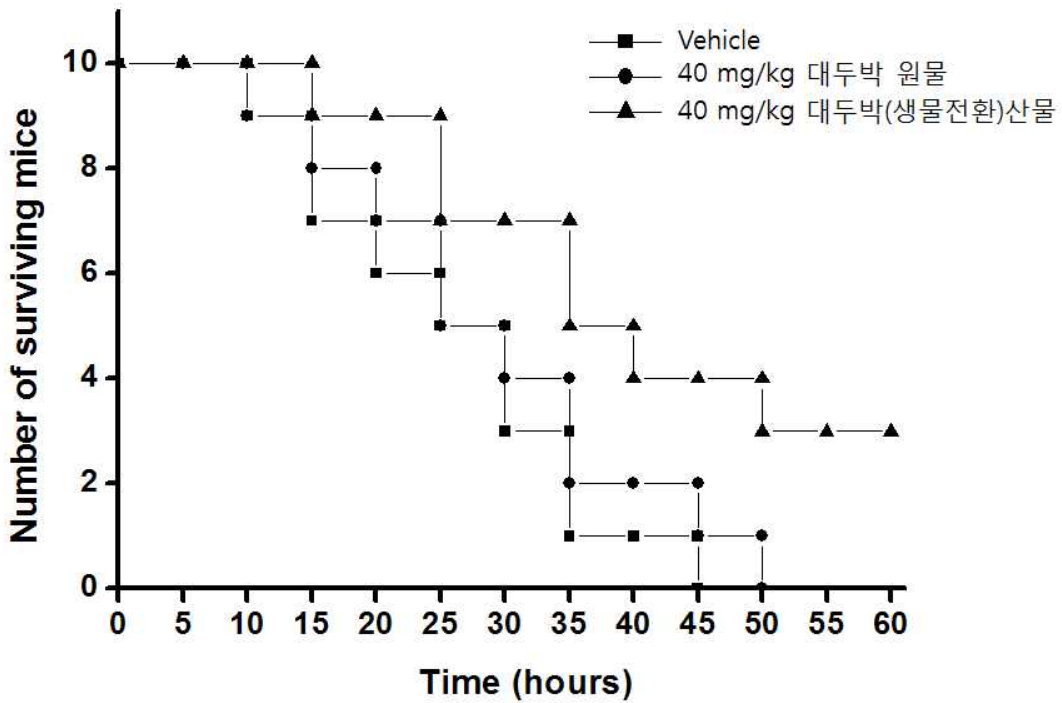


그림 148. 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율



마. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 치사율 억제 효과

참깨의 가공 부산물인 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 진신성 염증반응에 의한 마우스 치사율을 확인하였다. 참깨박 원물을 40 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 한 마우스의 경우 50시간 내 모든 마우스가 사망하였으며, 대조군과 차이를 보이지 않았다. 반면, 참깨박(생물전환)산물을 40 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 한 마우스의 경우 60시간 이후에도 3마리의 마우스가 생존하는 것을 확인하였다.

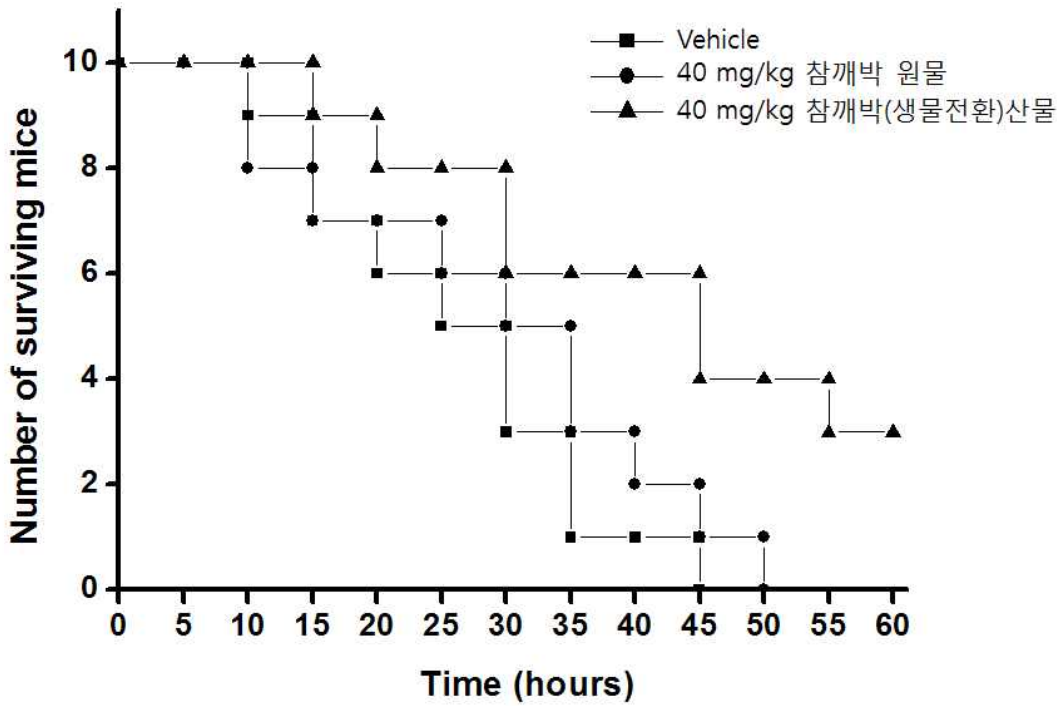


그림 149. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율

바. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 치사율 억제 효과-2

미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 최대 투여량을 360 mg/kg으로 설정하여 전신성 염증반응 마우스의 치사율을 확인하였다. 미강 원물은 40, 120, 360 mg/kg의 1일 투여량에서도 전신성 염증반응에 의한 마우스의 사망률을 개선시키지 못하는 것으로 확인되었으나, 미강(생물전환)산물은 40 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 했을 경우 4마리, 120, 360 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여했을 경우 5마리의 마우스가 생존하는 것으로 확인되었다. 앞선 결과에서, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 시 4마리가 생존하는 결과와 비교할 때, 미강(생물전환)산물이 갖는 생리효과는 100 mg/kg 정도의 1일 투여량에서 포화되는 것으로 보이며, 그 이상 투여 시 효과는 일정하게 유지되는 것으로 생각된다.

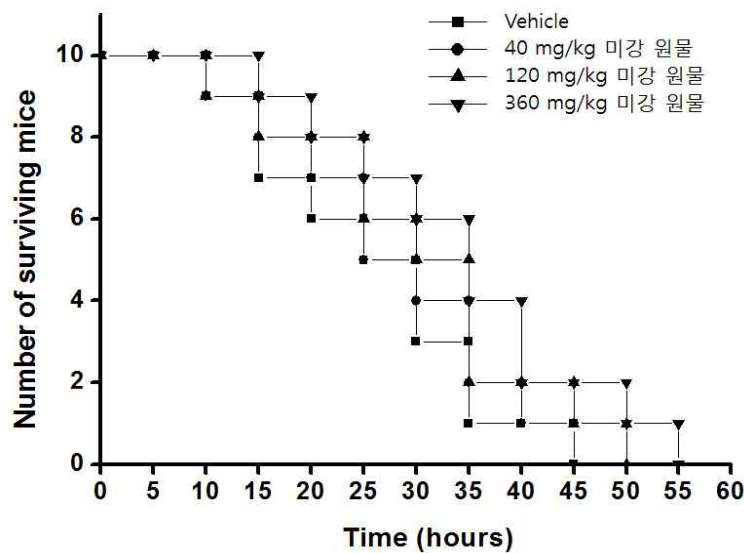


그림 150. 미강 원물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율-2

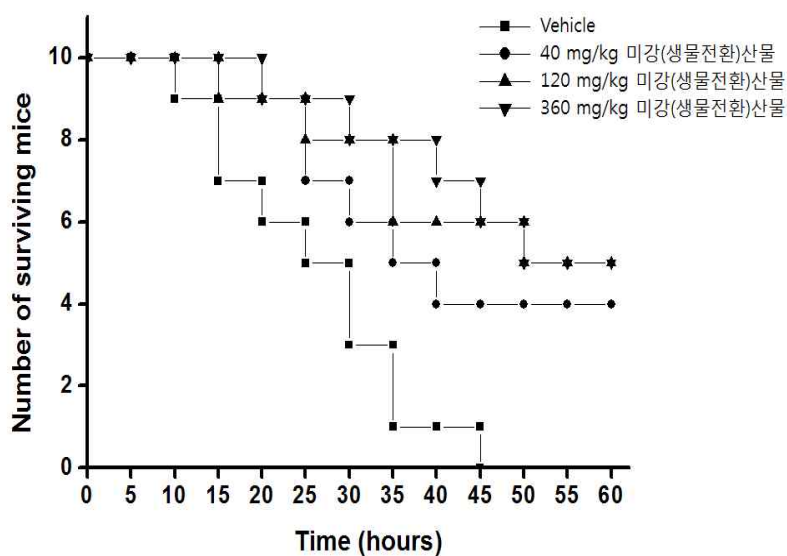


그림 151. 미강(생물전환)산물을 투여한 패혈증 마우스모델에서의 치사율-2

#### 4. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 생체안전성 평가에 대한 실험적 의의

농산부산물 3개 개발소재의 투여에 의해 일어나는 마우스 생체 내 변화를 확인하기 위해, 다양한 1일 투여량의 개발소재를 정상 마우스에 2주간 투여한 후, 마우스의 체중 및 장기무게, 혈청 내 nitrite 생성량 및 염증성 cytokine 생성량을 확인하였다. 그 결과, 개발소재는 본 연구에서 사용한 최대 1일 투여량 (미강 원물 및 미강(생물전환)산물 360 mg/kg, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물, 참깨 원물, 참깨(생물전환)산물 100 mg/kg, 대두박 원물 및 대두박(생물전환)산물, 참깨박 원물, 참깨박(생물전환)산물 40 mg/kg) 까지도 특이할만한 체내 지표의 변화를 보이지 않으므로, 정상 상태에서의 섭취 시 과민반응의 유발이나 과도한 면역세포의 활성화 등의 문제를 일으키지 않는 것으로 판단된다.

LPS와 galactosamine의 주사로 인해 유도된 전신성 염증반응 마우스모델에서는 개발소재의 식이에 의해 과도한 염증반응이 억제되며, 간 손상과 신장 손상 역시 억제되는 것으로 확인되었다. 다양한 1일 투여량에서의 효과를 확인한 미강(생물전환)산물의 경우, 40 mg/kg의 1일 투여량에서도 뛰어난 활성을 보이는 것으로 확인되었고, 120 mg/kg의 1일 투여량 이상에서는 효과의 포화가 일어나는 것으로 확인되었다. 하지만, 정상 마우스에 360 mg/kg의 1일 투여량으로 식이한 경우에 독성이 나타나지 않았고, 360 mg/kg의 1일 투여량으로 식이한 패혈증 마우스모델에서도 효과가 감소되지 않고 유지되는 것으로 확인되었기 때문에, 필요에 따라 섭취량을 조절해도 무방하다는 실험적 근거로 삼을 수 있다. 또한, 개발소재의 투여로 인한 전신성 염증반응의 억제는 8절에서 확인된 개발소재의 LPS antagonist 기능과 부합하며, 개발소재가 TLR4의 agonist 임을 감안할 때, 체내에서 endotoxin tolerance를 유도하여 과도한 면역반응을 조절할 수 있는 물질일 가능성이 있다. 따라서, 본 연구를 통해 개발된 소재의 처리로 인해 유도되는 면역세포의 신호전달을 면밀히 조사하여 개발소재의 생리활성을 보다 명확히 구명할 필요가 있다.

## 10절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항병력 강화 효능 평가

### 1. *in vitro* 살모넬라 감염 억제능 평가

#### 가. 항살모넬라 항균활성

미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항병력 강화 효능 평가를 위하여 살모넬라 감염동물모델을 이용하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 Balb/c 마우스를 1주간 적응후 사용하였으며, *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주를 이용한 복강 내 살모넬라 감염 모델, *Salmonella typhimurium* SL1344 균주를 이용한 장관 내 살모넬라 감염 식중독 모델을 이용하였고 세 가지 모두 10 mg/kg 의 농도로 식이하여 미생물 감염을 억제할 수 있는지 확인하였다.

미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 살모넬라 감염 억제능을 평가하기 위하여, 상기 3개 개발소재가 직접적인 항균활성을 갖는지 확인하였다. 지시균주로는 *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주를 사용하였고, 일반적인 살모넬라 배양배지인 nutrient broth에 지시약인 phenol red와 발효를 위한 glucose가 포함된 nutrient broth (NBGP)를 사용하여 살모넬라의 성장 및 당 발효로 인한 색 변화를 측정하였다. 배양 시 각각 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 살모넬라의 생존 억제를 유도하는지 확인하였으며, 배양 후 0, 2, 4, 8 시간에 흡광도를 측정하여 생존율을 계산하였다.

(1) 미강(생물전환)산물의 항균활성 평가

미강(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 살모넬라의 생존율을 측정하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 미강(생물전환)산물은 직접적인 항균활성은 보이지 않는 것으로 확인되었다.

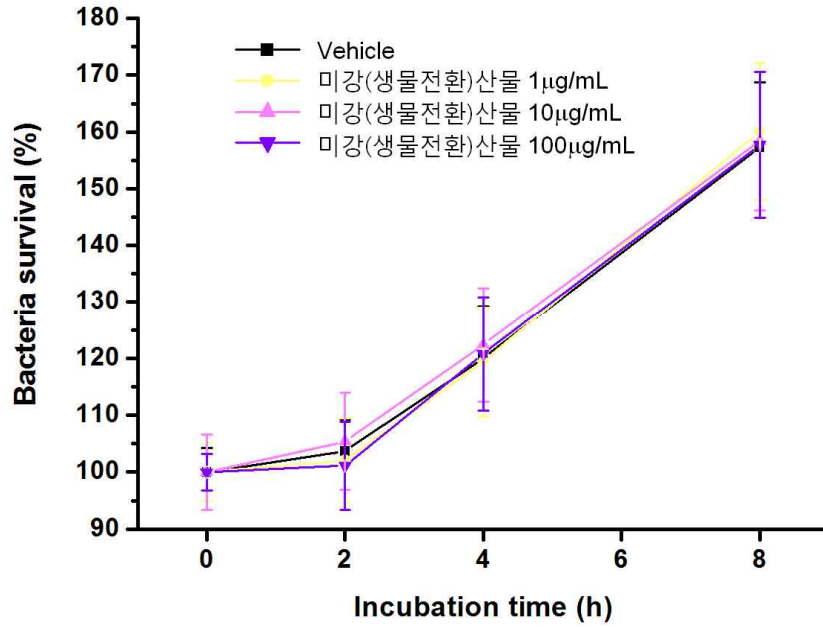


그림 152. 미강(생물전환)산물의 항살모넬라 항균활성

(2) 대두(생물전환)산물의 항균활성 평가

대두(생물전환)산물의 직접적인 항균활성을 확인한 결과, 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 직접적인 항균활성은 보이지 않는 것으로 확인되었다.

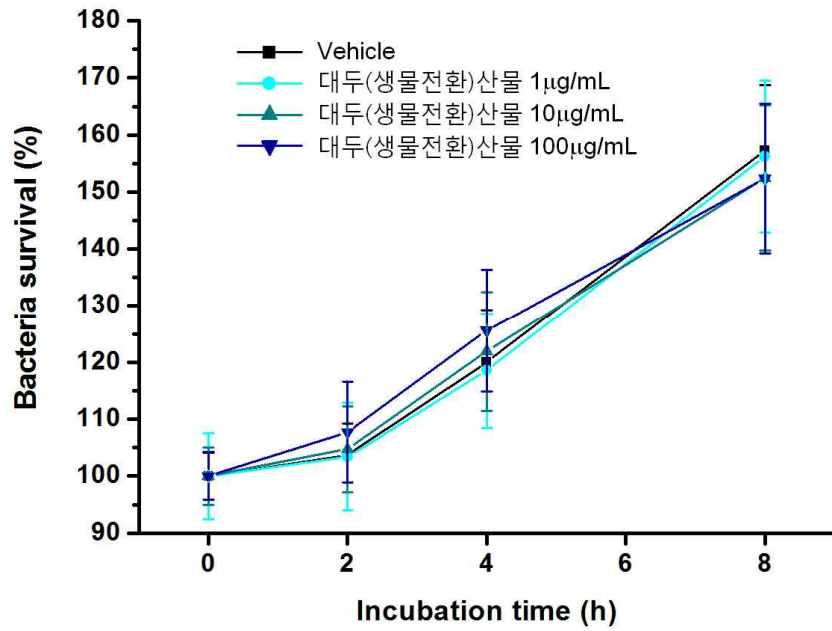


그림 153. 대두(생물전환)산물의 항살모넬라 항균활성

(3) 참깨(생물전환)산물의 항균활성 평가

동일한 방법을 이용하여 참깨(생물전환)산물의 직접적인 항균활성을 측정하였으며, 다른 두 소재와 마찬가지로 직접적인 항균활성은 보이지 않는 것으로 확인되었다.

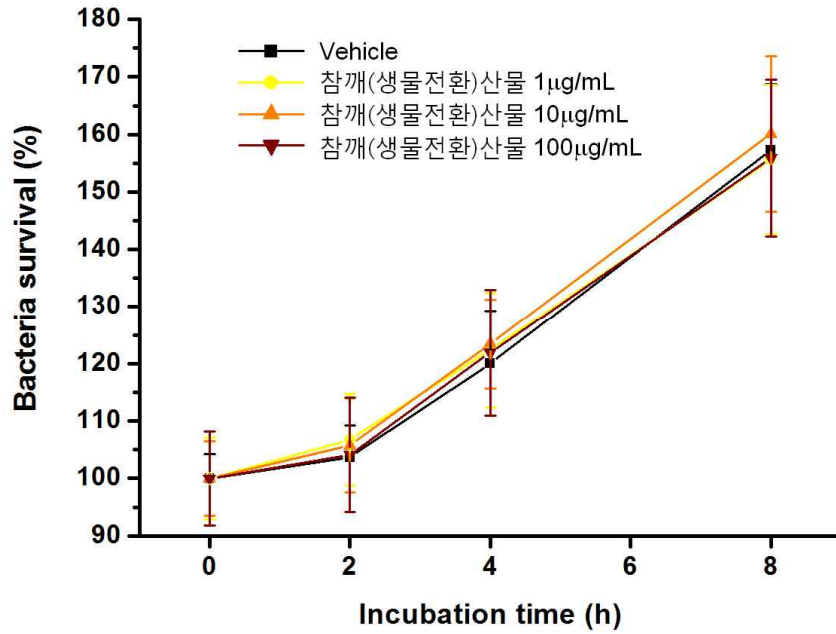


그림 154. 참깨(생물전환)산물의 항살모넬라 항균활성

## 나. 대식세포 탐식능 활성화 효과

미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물 모두 직접적인 항균활성을 나타내지 않음에 따라, 대식세포의 활성화를 통하여 미생물의 감염을 억제할 수 있는지 확인하였다. 24 well plate에서  $1 \times 10^4$  cells의 마우스 유래 대식세포에(RAW264.7)에 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 후 *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주를 1 MOI의 농도로 30분, 60분간 감염시킨 뒤 섭취된 살모넬라의 수를 측정하여 상기 농산부산물 3개 개발소재가 갖는 탐식능의 활성화를 확인하였다.

### (1) 미강(생물전환)산물의 대식세포 탐식능 향상 평가

대식세포에 미강(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 살모넬라를 30분, 60분간 감염시킨 결과, 살모넬라 30분 감염시에 미강(생물전환)소재의 처리로 인한 탐식능의 증가가 최대 3.65배 까지 증가함을 확인하였고 살모넬라 60분 감염시에는 최대 10.06배 까지 증가함을 확인하였다.

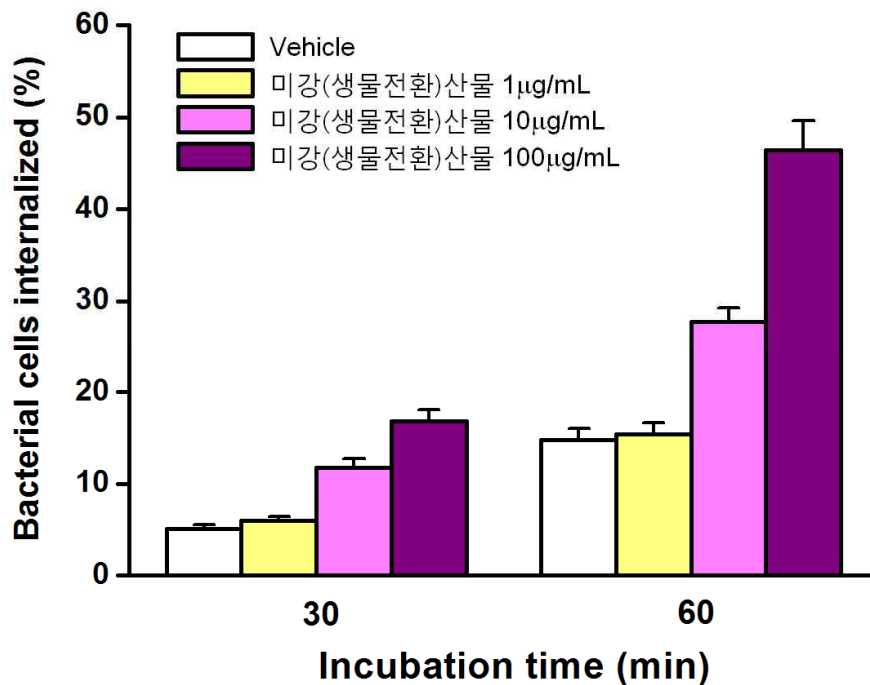


그림 155. 농도별 미강(생물전환)산물이 대식세포 탐식능에 미치는 효과



(2) 대두(생물전환)산물의 대식세포 탐식능 향상 평가

대식세포에 대두(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 살모넬라를 30분, 60분간 감염시킨 결과, 살모넬라 30분 감염시에 대두(생물전환)산물의 처리로 인한 탐식능의 증가가 최대 3.49배 까지 증가함을 확인하였고 살모넬라 60분 감염시에는 최대 9.05배 까지 증가함을 확인하였다.

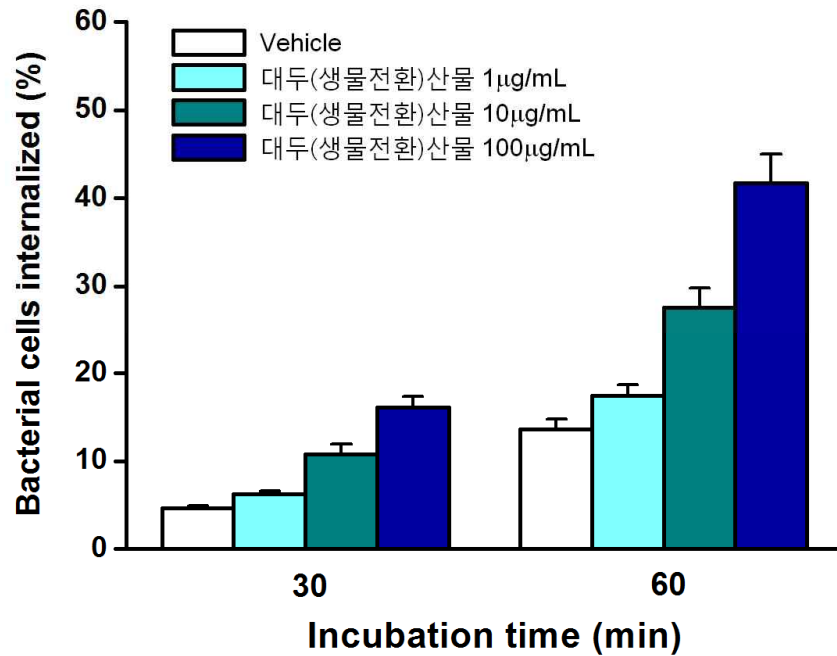


그림 156. 농도별 대두(생물전환)산물이 대식세포 탐식능에 미치는 효과

(3) 참깨(생물전환)산물의 대식세포 탐식능 향상 평가

대식세포에 참깨(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 살모넬라를 30분, 60분간 감염시킨 결과, 살모넬라 30분 감염시에 참깨(생물전환)산물의 처리로 인한 탐식능의 증가가 최대 4.24배 까지 증가함을 확인하였고 살모넬라 60분 감염시에는 최대 9.7배 까지 증가함을 확인하였다.

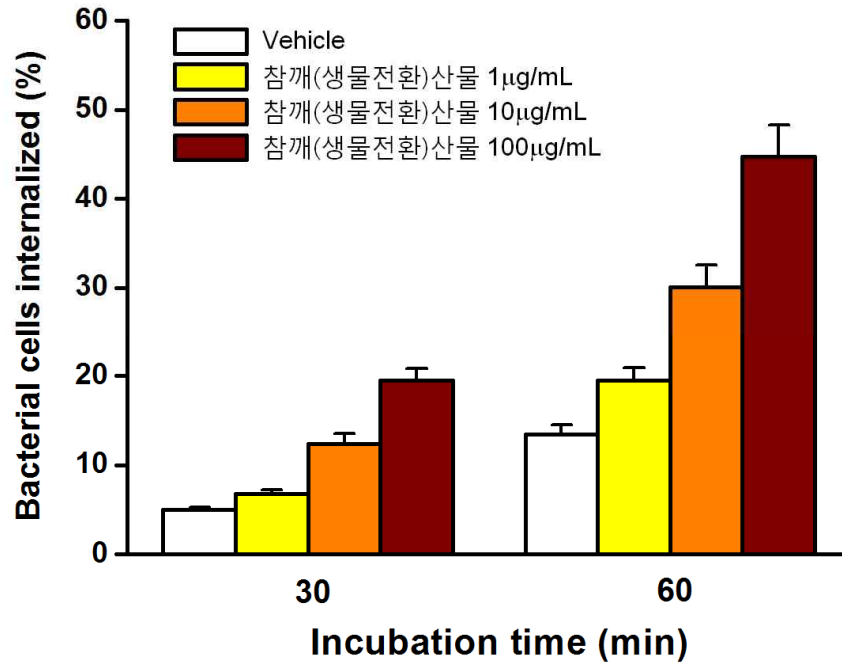


그림 157. 농도별 참깨(생물전환)산물이 대식세포 탐식능에 미치는 효과

### 다. 대식세포 내 살모넬라 증식의 억제 효과

대식세포의 탐식작용에 의해 세포 내로 들어간 살모넬라는 세포 내 증식이 가능하기 때문에, 미강(생물 전환)산물, 대두(생물 전환)산물, 참깨(생물 전환)산물의 처리가 autophagy의 활성화를 통해 대식세포 내에 존재하는 살모넬라의 증식을 억제할 수 있는지 확인하였다. 농산부산물 3개 개발소재를 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 24 well plate에서  $1 \times 10^4$  cell의 대식세포에 4시간 동안 처리하여 활성화 시킨 후, *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주를 1 MOI의 농도로 2시간, 4시간, 8시간 동안 감염시켜 탐식 및 세포 내 증식이 일어나게 하였다. 이후 세포 내에 생존하는 살모넬라의 수를 측정하여 개발소재의 대식세포 내 살모넬라 증식의 억제 효과를 평가하였다.

#### (1) 미강(생물 전환)산물의 대식세포 내 살모넬라 증식 억제능 평가

대식세포에 미강(생물 전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 살모넬라를 2시간, 4시간, 8시간 동안 감염시킨 결과, 2시간 배양시에는 탐식된 살모넬라의 양이 많아짐에 따라 대조군에 비해 세포 내 살모넬라가 증가하는 경향을 보였으며, 시간이 지날수록 세포 내 존재하는 미생물의 수가 감소하는 것으로 확인되었다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 미강(생물 전환)산물을 처리하고 살모넬라 감염 후 최대 8시간 경과 시 대식세포 내에 존재하는 살모넬라는 대조군에 비하여 52.4%로 감소하는 것으로 확인되었다.

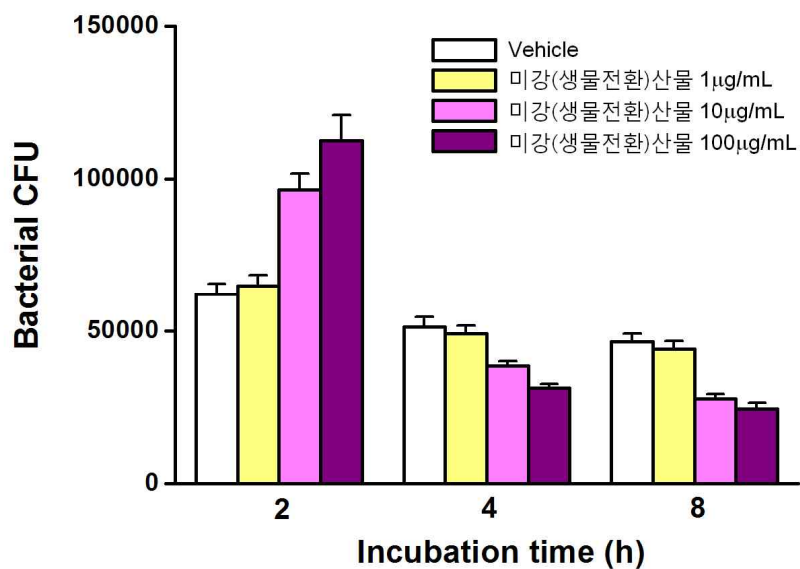


그림 158. 농도별 미강(생물 전환)산물이 대식세포 내 살모넬라 증식의 억제에 미치는 효과

(2) 대두(생물전환)산물의 대식세포 내 살모넬라 증식 억제능 평가

대식세포에 대두(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 살모넬라를 2시간, 4시간, 8시간 동안 감염시킨 결과, 미강(생물전환)산물 처리와 마찬가지로 2시간 배양시에는 탐식작용의 활성화로 인해 세포 내 살모넬라가 증가하는 경향을 보였으며 시간이 지날수록 세포 내 존재하는 미생물의 수가 감소하는 것으로 확인되었다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 대두(생물전환)산물을 처리하고 살모넬라 감염 후 최대 8시간 경과 시 대식세포 내에 존재하는 살모넬라는 대조군에 비하여 55.5%로 감소하는 것으로 확인되었다.

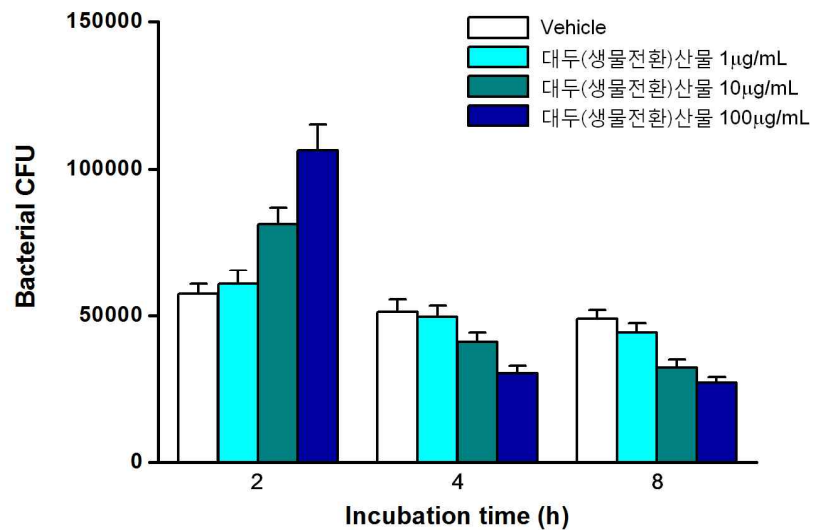


그림 159. 농도별 대두(생물전환)산물이 대식세포 내 살모넬라 증식의 억제에 미치는 효과

(3) 참깨(생물전환)산물의 대식세포 내 살모넬라 증식 억제능 평가

대식세포에 참깨(생물전환)산물을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 살모넬라를 2시간, 4시간, 8시간 동안 감염시킨 결과, 다른 두 가지 소재와 마찬가지로 2시간 배양 시에는 세포 내 살모넬라의 증가가 일어났으며 그 이후로는 감소하는 경향을 보였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 참깨(생물전환)산물을 처리하고 살모넬라 감염 후 최대 8시간 경과 시 대식세포 내에 존재하는 살모넬라는 대조군에 비하여 52.1%로 감소하는 것으로 확인되었다. 세 가지 소재는 대식세포를 대상으로 한 미생물 감염 억제능에서 큰 차이를 보이지는 않았으나, 미강(생물전환)산물이 다른 두 소재에 비하여 약간 더 높은 대식세포 활성화 유도 효과를 갖는 것으로 평가되었다.

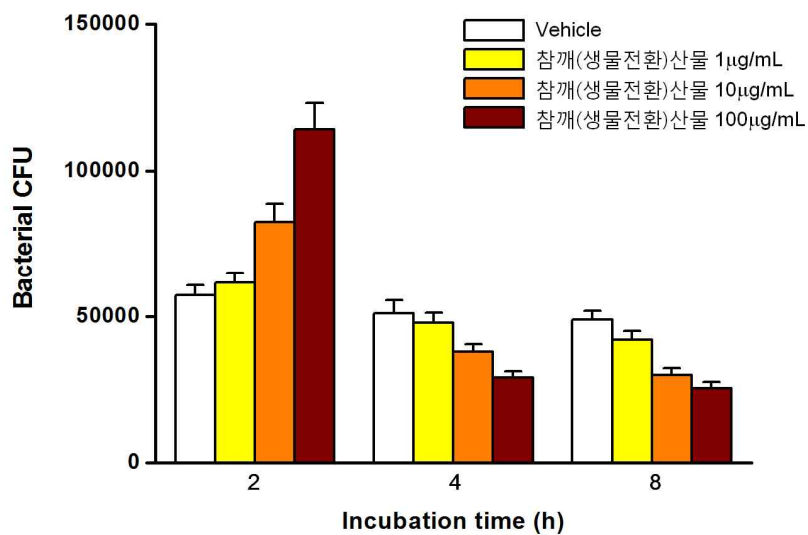


그림 160. 농도별 참깨(생물전환)산물이 대식세포 내 살모넬라 증식의 억제에 미치는 효과

## 라. 장관세포 점착 및 침입 억제 효능 평가

: Caco-2 세포주를 이용한 장관 세포 점착 및 침입 억제 효능 평가

살모넬라 감염의 대부분은 장관 내 감염을 통해 일어나기 때문에, 농산부산물 3개 개발소재가 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입을 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 사람 유래 대장암 세포주인 Caco-2 세포주와 *Salmonella typhimurium* SL1344 균주를 이용한 *in vitro* 실험계에서 평가하였다. 개발소재를 Caco-2 세포주에 처리하고, SL1344 균주를 감염시킨 후 Caco-2 세포내로 침투된 살모넬라의 양을 측정하여 점착 및 침입 억제 효능을 평가하였다.

### (1) 미강(생물전환)산물의 장관세포 점착 및 침입 억제 효능 평가

100 µg/mL 농도의 미강(생물전환)산물을 24 well plate에서  $5 \times 10^5$  cell의 Caco-2 세포주에 4시간 전처리 또는 100 MOI의 살모넬라와 동시 처리한 후 세포 내로 침투한 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 4시간 전처리의 경우에 10.7%의 살모넬라 침투 억제능을 보였으며 동시처리의 경우 58.4%의 살모넬라 침투 억제능을 보였다. 미강(생물전환)산물의 경우 직접적인 항균활성이 없으므로 이러한 살모넬라 침투 억제 효과는 미강(생물전환)산물이 Caco-2 대장세포에 직접 작용하여 살모넬라의 침투를 억제하는 것으로 보인다.

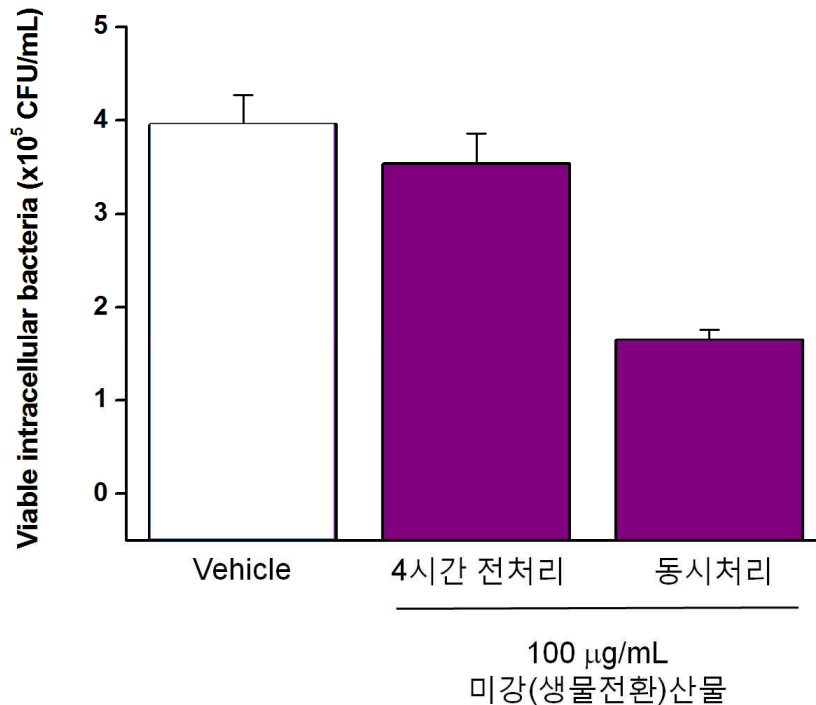


그림 161. Caco-2 세포주를 이용한 미강(생물전환)산물의 장관세포 내 침투 억제 활성

(2) 대두(생물전환)산물의 장관세포 점착 및 침투 억제 효능 평가

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 대두(생물전환)산물을 24 well plate에서  $5 \times 10^5$  cell의 Caco-2 세포주에 4시간 전처리 또는 100 MOI의 살모넬라와 동시처리 한 후 세포 내로 침투한 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 4시간 전처리의 경우에 7.1%의 살모넬라 침투 억제능을 보였으며 동시처리의 경우 52.4%의 살모넬라 침투 억제능을 보였다. 대두(생물전환)산물 역시 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 항균활성을 가지지 않으므로 대두(생물전환)산물이 Caco-2 대장세포에 직접 작용하여 미생물의 침투를 억제한 것으로 보인다.

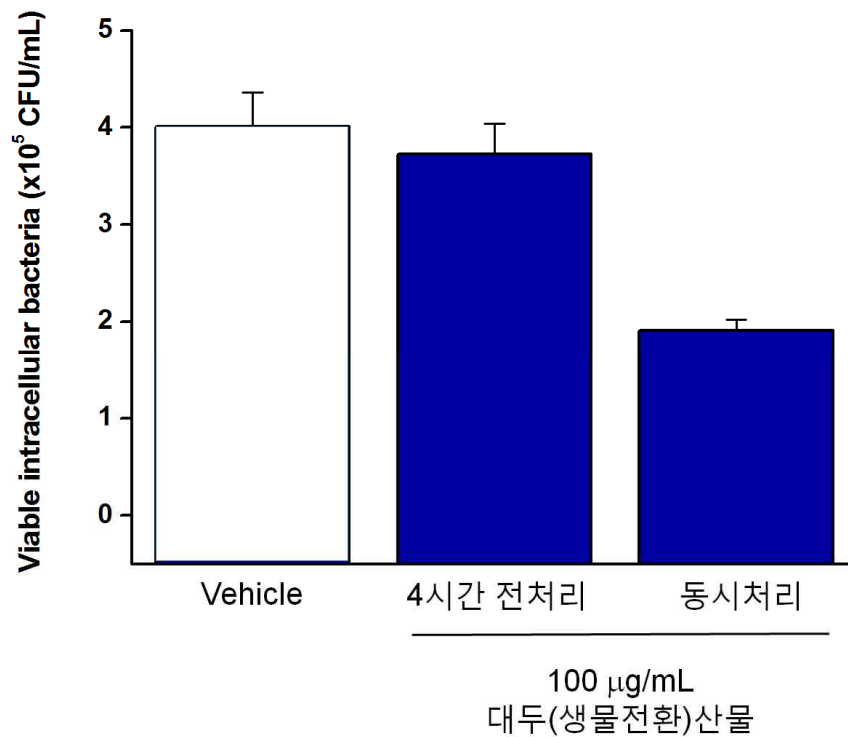


그림 162. Caco-2 세포주를 이용한 대두(생물전환)산물의 장관세포 내 침투 억제 활성

(3) 참깨(생물전환)산물의 장관세포 점착 및 침입 억제 효능 평가

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 참깨(생물전환)산물을 24 well plate에서  $5 \times 10^5$  cell의 Caco-2 세포주에 4시간 전처리 또는 100 MOI의 살모넬라와 동시처리 한 후 세포 내로 침투한 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 4시간 전처리의 경우에 11.4%의 살모넬라 침투 억제능을 보였으며 동시처리의 경우 54.5%의 살모넬라 침투 억제능을 보였다. 참깨(생물전환)산물 역시 다른 두 소재와 마찬가지로 항균활성을 가지지 않기 때문에 참깨(생물전환)산물이 Caco-2 대장세포에 직접 작용하여 미생물의 침투를 억제한 것으로 보인다.

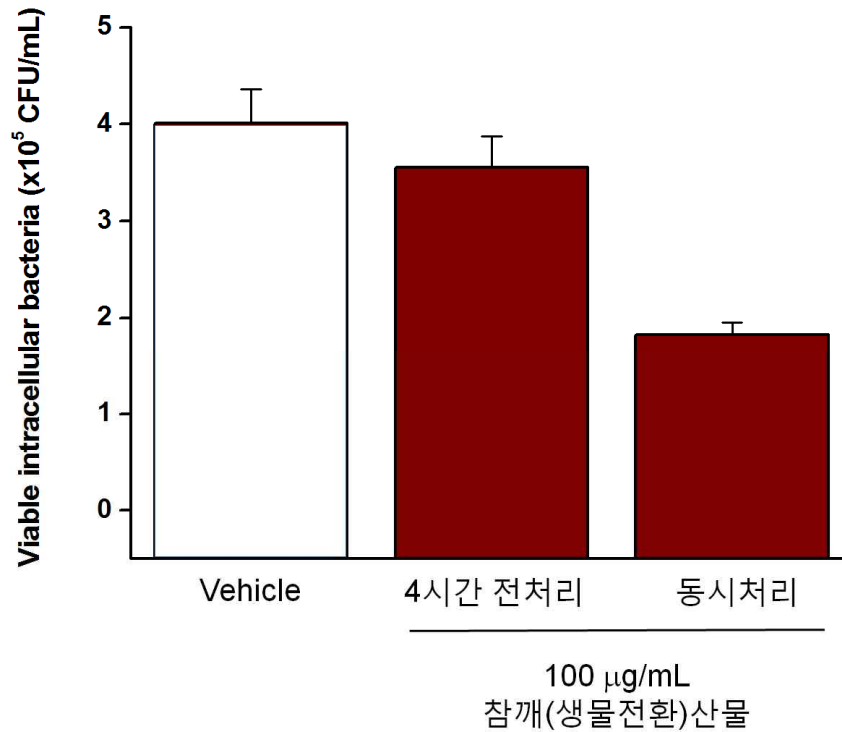


그림 163. Caco-2 세포주를 이용한 참깨(생물전환)산물의 장관세포 내 침투 억제 활성



## 2. 살모넬라 복강 감염 마우스모델에서 내재면역계 세포 및 Th1세포 활성화를 통한 감염 억제 효능 평가

### 가. 살모넬라 복강 감염 마우스모델에서의 복강 내 미생물 생존 억제 효과

농산부산물 3개 개발소재가 대식세포를 이용한 *in vitro* 실험계에서 대식세포의 활성화를 유도하여 탐식 작용 및 세포 내 살모넬라 생존을 억제하는 것을 확인함에 따라, *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주를 이용한 미생물 감염 마우스모델을 제작하여 농산부산물 소재의 *in vivo* 항미생물 활성을 검정하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 BALB/c 마우스를 이용하였으며, 1주일 적응 후 농산부산물 소재를 각각 10 mg/kg 의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 하였다. 이후, *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주를  $1 \times 10^4$  CFU 농도로 복강주사하여 복강 내 살모넬라 감염을 유도하였다. 감염 2일 후 마우스를 희생하여 복강 내 살모넬라를 PBS를 이용해 회수한 뒤, LB plate 에 spreading 하여 복강 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 측정 결과, 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 처리한 그룹에서 모두 대조군에 비하여 생존하는 살모넬라가 월등히 감소함을 확인하였고, 상기 3개 개발소재는 살모넬라 억제 효과에서 큰 차이를 보이지는 않았다.

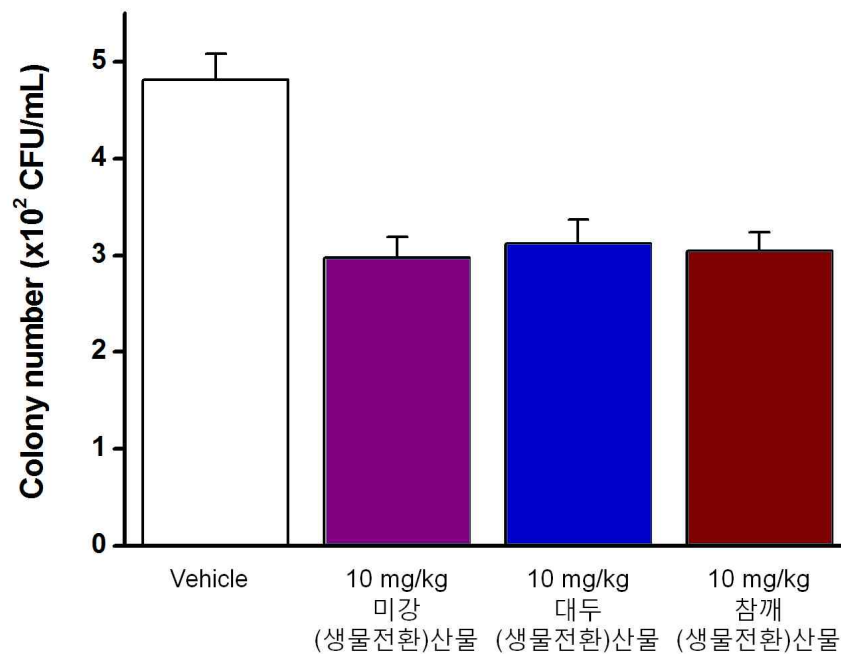


그림 164. 농산부산물 3개 개발소재의 복강 내 살모넬라 억제 효과

나. 림프구 증식 유도 및 INF- $\gamma$  생산 활성화 효과

희생한 마우스의 비장을 적출한 후 비장 내 림프구를 분리하였다. 분리한 림프구를 T세포 증식 유도물질인 concanavalin A 와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 세포의 증식이 얼마나 유도되는지 확인하였다. 그 결과, 대조군인 살모넬라 감염 비장 림프구는 세포의 증식이 약 1.4배 증가한 것에 비하여, 미강(생물전환)산물 투여 마우스의 경우 약 1.9배, 대두(생물전환)산물 및 참깨(생물전환)산물 투여 마우스의 경우 약 1.8배 증가하는 것으로 확인되었다.

표 80. 농산부산물 3개 개발소재의 림프구 증식 및 interferon- $\gamma$  생산 유도 효과

sample	lymphocyte proliferation (fold-increase)	INF- $\gamma$ (pg/mL)
vehicle	1.38 $\pm$ 0.12	287.204 $\pm$ 13.586
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	1.89 $\pm$ 0.13	359.725 $\pm$ 22.614
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	1.77 $\pm$ 0.12	337.596 $\pm$ 30.048
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	1.79 $\pm$ 0.13	341.094 $\pm$ 24.265

### 다. Th1 cytokine 발현에 미치는 효과

농산부산물 3개 개발소재의 투여가 Th1 면역반응을 증강시키는지 확인하기 위하여, Th1 cytokine의 발현량을 측정하여 Th1 활성화 효과를 평가하고자 하였다. Th1 cytokine 중 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12의 네 가지 cytokine을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였으며, 살모넬라를 감염시키지 않은 마우스와 살모넬라를 감염시킨 마우스에 농산부산물 소재를 각각 투여하여 활성화 효과를 비교하였다. 그 결과, 정상 마우스에 개발소재를 투여한 경우에는 IL-1 $\beta$ 의 발현량이 약간 증가한 것을 제외하면 cytokine의 발현량에 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, 살모넬라에 감염된 경우에는 살모넬라 감염에 의해 유도된 Th1 cytokine의 발현량 보다 더 많은 cytokine의 생산이 상기 3개 개발소재에 의해 유도되는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 개발소재의 투여가 정상 생체 내에서는 불필요한 면역반응의 활성화를 유도하지 않는 반면에, 미생물 감염시에는 Th1 면역반응을 증강시켜 생체 내 감염된 미생물을 효과적으로 제어할 수 있음을 보여주었다.

표 81. 농산부산물 3개 개발소재의 Th1 cytokine 증강 효과

sample	cytokines (pg/mL)			
	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	IL-12
salmonella (-)				
vehicle	171 $\pm$ 12	41.7 $\pm$ 3.7	57.3 $\pm$ 3.2	240 $\pm$ 13
10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	186 $\pm$ 14	43.3 $\pm$ 2.8	58.0 $\pm$ 3.9	253 $\pm$ 17
10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	183 $\pm$ 15	42.1 $\pm$ 3.0	57.7 $\pm$ 4.0	250 $\pm$ 16
10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	184 $\pm$ 11	41.9 $\pm$ 2.9	58.3 $\pm$ 4.7	247 $\pm$ 13
salmonella (+)				
vehicle	239 $\pm$ 13	55.7 $\pm$ 3.8	73.4 $\pm$ 5.4	284 $\pm$ 13
10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	256 $\pm$ 11	63.9 $\pm$ 4.3	77.3 $\pm$ 4.8	325 $\pm$ 29
10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	251 $\pm$ 17	60.3 $\pm$ 2.7	76.9 $\pm$ 5.3	320 $\pm$ 27
10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	254 $\pm$ 20	61.5 $\pm$ 4.5	76.8 $\pm$ 6.0	324 $\pm$ 31

**라. Th2 cytokine 발현에 미치는 효과**

위의 결과에서, 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 Th1 cytokine의 발현을 강화 시킴에 따라, Th1 면역 반응의 길항적 반응인 Th2 면역반응의 강화 여부를 확인하기 위하여 Th2 cytokine 발현량을 확인하였다. Th2 cytokine으로 IL-4, IL-5, IL-10의 세 가지 cytokine의 발현량을 확인하였으며 Th1 cytokine 과 마찬가지로 살모넬라에 감염되지 않은 정상 마우스와 살모넬라에 감염된 마우스 모두에서 확인하였다. 그 결과, 개발소재의 투여는 살모넬라에 감염되지 않은 마우스와 감염된 마우스 모두 Th2 cytokine의 생성을 증가시키지 않는 것으로 확인되었다.

표 82. 농산부산물 3개 개발소재가 Th2 cytokine 발현에 미치는 효과

sample	cytokines (pg/mL)		
	IL-4	IL-5	IL-10
salmonella (-)			
vehicle	52.1 ± 3.4	294 ± 17	44.7 ± 2.3
10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	50.9 ± 3.6	290 ± 22	45.1 ± 3.1
10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	51.4 ± 2.7	289 ± 19	44.5 ± 2.7
10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	51.0 ± 3.9	292 ± 20	44.1 ± 3.2
salmonella (+)			
vehicle	56.8 ± 4.3	289 ± 17	48.7 ± 3.3
10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	57.2 ± 3.8	296 ± 15	49.2 ± 3.8
10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	56.9 ± 4.1	292 ± 13	49.6 ± 4.3
10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	57.3 ± 3.5	290 ± 21	48.9 ± 3.5

마. 마우스 치사율 조절 효과

농산부산물 3개 개발소재의 투여가 살모넬라 감염으로 인한 마우스의 치사율을 감소시킬 수 있는지 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 Balb/c 마우스를 사용하였다. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 10 mg/kg의 투여량으로 2주간 식이한 후, *Salmonella typhimurium* ATCC14028 균주의 치사 농도인  $1 \times 10^5$  CFU를 복강내로 주사하여 감염시켜 마우스의 사망을 유도하였다. 그 결과, 대조군의 마우스는 감염 후 7일째 모든 마우스가 사망한데 비해 미강(생물전환)산물을 투여한 경우 최대 21일, 대두(생물전환)산물을 투여한 경우 최대 18일, 참깨(생물전환)산물을 투여한 경우 최대 19일까지 마우스가 생존하여 개발소재의 투여로 인해 마우스의 사망이 지연되는 효과가 있음을 확인하였다.

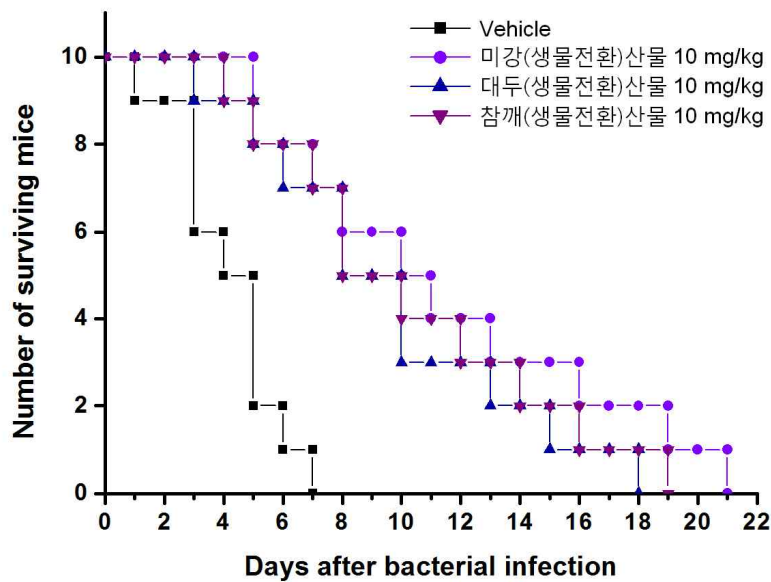


그림 165. 농산부산물 3개 개발소재의 마우스 치사율 지연 효과

바. 식중독 마우스모델에서의 몸 안으로의 살모넬라 침투 억제능 평가

(1) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

세포주를 이용한 실험에서 농산부산물 3개 개발소재가 살모넬라의 장관 세포 내 침투를 억제하는 효과가 있음을 확인함에 따라, 식중독 마우스모델에서의 살모넬라 침투 억제 효과를 평가하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 C57BL/6 마우스를 1주일 적응 후 사용하였으며, 농산부산물 소재를 각각 10 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 하였다. 이후, 4시간 동안 금식, 금수 시킨 후 20 mg의 streptomycin을 경구 투여 하여 장관 내의 미생물을 사멸시켰다. 20시간 뒤에 다시 4시간 동안 금식, 금수 시킨 후  $10^8$  CFU의 *Salmonella typhimurium* SL1344 균주를 경구투여 하여 살모넬라의 감염을 유도 하였다. 감염 후 24시간, 48시간 후 각각 분변을 채취하여 분변 내 살모넬라의 생균 수를 측정된 결과, 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 투여한 경우 모두 대조군에 비하여 많은 양의 살모넬라가 장관 내로 침투되지 못하고 분변으로 빠져나온 것으로 확인되었다. 24시간 후에 측정된 결과와 48시간 후에 측정된 결과 모두 미강(생물전환)산물이 가장 뛰어난 효과가 있는 것으로 나타났으며, 대두(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물은 효과가 비슷한 것으로 확인되었다.

표 83. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

Sample	Salmonella in feces ( $\times 10^4$ CFU/g)	
	1 day	2 day
normal mice	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
SL1344 infection only	338 $\pm$ 18	420 $\pm$ 31
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	662 $\pm$ 48	729 $\pm$ 53
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	613 $\pm$ 42	665 $\pm$ 36
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	609 $\pm$ 37	667 $\pm$ 58

(2) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

표 81의 결과에서, 농산부산물물의 투여 시 생체 내로 들어간 살모넬라가 조직 내로 침투하지 못하고 체외로 배출되는 것을 확인함에 따라, 마우스를 희생한 뒤 맹장과 장관막림프절, 비장, 간을 적출하여 조직 내로 침투한 살모넬라의 수를 측정하였다.

① 맹장 및 장관막림프절

살모넬라의 감염 후 1차 침투 조직인 맹장과 그에 연결된 림프조직인 장관막림프절 내의 살모넬라를 측정하여 농산부산물 소재의 조직 침투 억제 효과를 확인하였다. 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물은 모두 살모넬라의 맹장 내 침투를 억제하였으며 미강(생물전환)산물은 58.9%, 대두(생물전환)산물은 47.4%, 참깨(생물전환)산물은 49.1%의 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 또한 미강(생물전환)산물은 75.4%, 대두(생물전환)산물은 62.5%, 참깨(생물전환)산물은 65.4%의 장관막림프절 내 살모넬라를 억제하는 것으로 확인되었고, 3개 개발소재 모두 맹장보다 장관막림프절에서의 억제율이 더 큰 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 장관막림프절에 존재하는 면역세포가 농산부산물 소재에 의하여 활성화됨으로써 살모넬라가 침투되었더라도 효과적으로 제거할 수 있었던 것으로 보인다.

표 84. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

Sample	Salmonella in tissue	
	Cecum ( $\times 10^5$ CFU/g)	Mesenteric lymph node ( $\times 10^3$ CFU/organ)
normal mice	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
SL1344 infection only	489 $\pm$ 32	109 $\pm$ 8
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	201 $\pm$ 12	26.8 $\pm$ 1.9
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	257 $\pm$ 16	40.8 $\pm$ 3.2
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	249 $\pm$ 21	37.7 $\pm$ 2.3

② 비장 및 간

조직 내로의 침투 및 체액을 통한 이동이 가능한 비장과 간에서의 살모넬라의 양을 측정하였다. 비장 내 존재하는 살모넬라에 대해 미강(생물전환)산물을 투여한 경우 83.8%, 대두(생물전환)산물을 투여한 경우 77.2%, 참깨(생물전환)산물을 투여한 경우 79.2%의 억제율을 보였다. 또한 간에 존재하는 살모넬라에 대해 미강(생물전환)산물은 75.6%, 대두(생물전환)산물은 68.6%, 참깨(생물전환)산물은 69.4%의 억제율을 보였다. 비장과 간 모두 맹장에 비해 높은 억제율을 보였는데, 이러한 결과 또한 다양한 면역세포의 활성화로 인한 것으로 추측된다.

표 85. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

Sample	Salmonella in tissue	
	Spleen (x10 <sup>2</sup> CFU/organ)	Liver (x10 <sup>2</sup> CFU/organ)
normal mice	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
SL1344 infection only	129 ± 11	77.4 ± 5.6
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	21.0 ± 1.7	18.9 ± 1.3
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	29.4 ± 1.9	24.3 ± 1.5
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	26.8 ± 2.3	23.7 ± 2.0



### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항병력 강화 효능 평가에 대한 실험적 의의

미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항병력 강화 효과를 살모넬라를 대상으로 한 항균활성 및 살모넬라 감염 마우스모델에서 평가하였다. 연구에 사용한 3개 개발소재는 모두 직접적인 항균활성을 가지지 않는 것으로 확인되었으나, 대식세포에 개발소재 처리 시 살모넬라에 대한 대식세포의 탐식능을 증가시키며, 세포 내 살모넬라의 생존 역시 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 또한, 대장암 세포주인 Caco-2 세포주를 이용한 살모넬라의 장관세포 침투 실험에서, 개발소재의 처리로 인해 살모넬라의 침투가 억제되는 것을 확인하였다. 앞선 연구 결과에서 확인된 미강, 대두, 참깨의 생물전환산물이 갖는 TLR4 agonist 기능이 대식세포를 효과적으로 활성화 시켜 살모넬라에 대한 탐식 및 살해 효과를 보이는 것으로 생각되며, TLR4 agonist로 작용하는 다당체 이외의 다양한 다당체 혹은 비배당체 성분들이 장관 세포에 대한 보호 효과를 갖는 것으로 생각된다.

살모넬라의 복강주사로 인해 유발된 salmonellosis 마우스모델에서, 개발소재의 투여로 인해 복강 내 감염된 살모넬라의 수가 감소되며, 마우스의 치사율 역시 지연되는 결과를 확인하였다. 개발소재가 갖는 살모넬라 감염 억제 효과는 Th1 면역반응의 활성화에 의한 것으로 확인되었으며, Th2 면역반응에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한, 이러한 Th1 면역반응 활성화 반응은 정상 마우스의 경우에는 유도되지 않으므로, 개발소재가 갖는 생체안전성을 다시 한번 확인한 결과라고 평가할 수 있다.

살모넬라를 경구로 투여하여 식중독 마우스모델을 제작하고, 개발소재의 살모넬라 감염 억제 효과를 확인한 결과, 개발소재의 투여 시 살모넬라의 분변 내 배출이 증가하며 조직 내 생존하는 살모넬라의 수가 감소하는 결과를 확인하였다. 특히, 조직 내 존재하는 살모넬라의 경우 맹장에 비해 장관막립프절, 비장, 간에서의 감소율이 높은 것으로 보아 개발소재가 갖는 Th1 면역반응 활성화에 의해 조직 내 살모넬라가 효과적으로 제거된 것으로 생각된다.

3개 개발소재의 살모넬라 감염 억제 효과를 비교하면, 미강(생물전환)산물이 가장 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었고, 참깨(생물전환)산물이 대두(생물전환)산물에 비해 약간 높은 활성을 가지나 큰 차이는 나지 않는 것으로 확인되었다. 하지만, 3개 개발소재 모두 체내에서 과도한 염증반응이나 과민반응을 일으키지 않으며, 감염에 대응하기 위한 효과적인 면역반응을 활성화시켜 살모넬라의 감염을 억제하는 것으로 볼 때, 개발소재의 지속적인 투여는 감염에 대한 효과적인 예방 방법으로 사용될 수 있을 것이라 평가된다.

# 11절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항당뇨 효능 평가

## 1. 제1형 당뇨 모델에서 항당뇨 효능 평가

### 가. *in vitro* 당뇨 억제능 평가

(1) (제1형 당뇨) Ins-1 세포주에서 세포 독성 및 활성산소 생성에 미치는 효과  
 농산부산물 3개 개발소재가 제1형 당뇨에 대한 억제 활성을 갖는지 확인하기 위하여, 랫 유래 췌장 β세포주인 INS-1 세포주를 이용한 *in vitro* 실험계에서 각 소재의 활성을 평가하였다. INS-1 세포주에 Glucose transporter 2 (GLUT2)를 통해 β세포 특이적으로 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)를 생산, 독성을 유발하는 alloxan을 처리하여 세포의 사멸을 유도하고, 개발소재를 처리하여 세포 사멸을 억제할 수 있는지 확인하였다.

#### ① 미강(생물전환)산물

INS-1 세포주를  $5 \times 10^5$  cells/well 의 농도로 96 well plate에 분주한 후, 10 mM의 alloxan과 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 미강(생물전환)산물을 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 통해 세포의 생존률을 측정된 결과, alloxan을 처리한 경우 약 62.5%의 세포가 사멸한 것으로 확인되었고 미강(생물전환)산물을 함께 처리한 경우 사멸율이 최대 약 38.6%까지 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 alloxan에 의해 생성되는 세포 내 ROS의 양을 DCF-DA로 표지하여 측정된 결과, 미강(생물전환)산물을 처리한 경우 대조군에 비해 최대 34.9% 까지 ROS의 생성량이 감소하는 것으로 나타났으며, 이러한 효과는 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다.

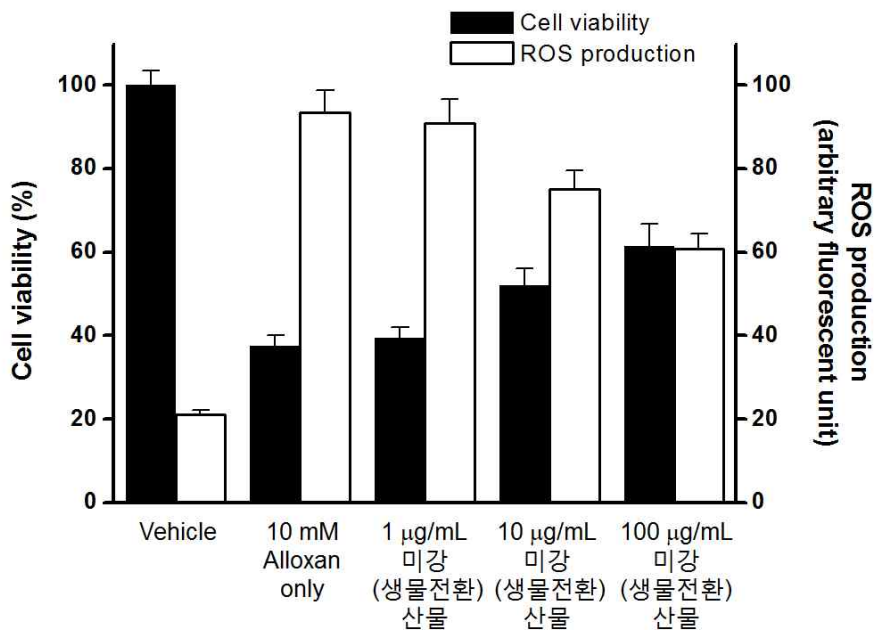


그림 166. 미강(생물전환)산물의 처리가 alloxan에 의해 유도되는 INS-1 세포주의 사멸과 ROS 생성에 미치는 효과

② 대두(생물전환)산물

동일한 실험계에서 대두(생물전환)산물의 세포 사멸 억제능과 ROS 생성 억제능을 측정하였다. 그 결과, alloxan에 의한 세포 사멸율을 최대 약 30.4% 까지 억제하였으며 ROS 생성은 최대 약 46.2% 까지 억제되는 것으로 확인되었다. 또한 이러한 효과는 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다.

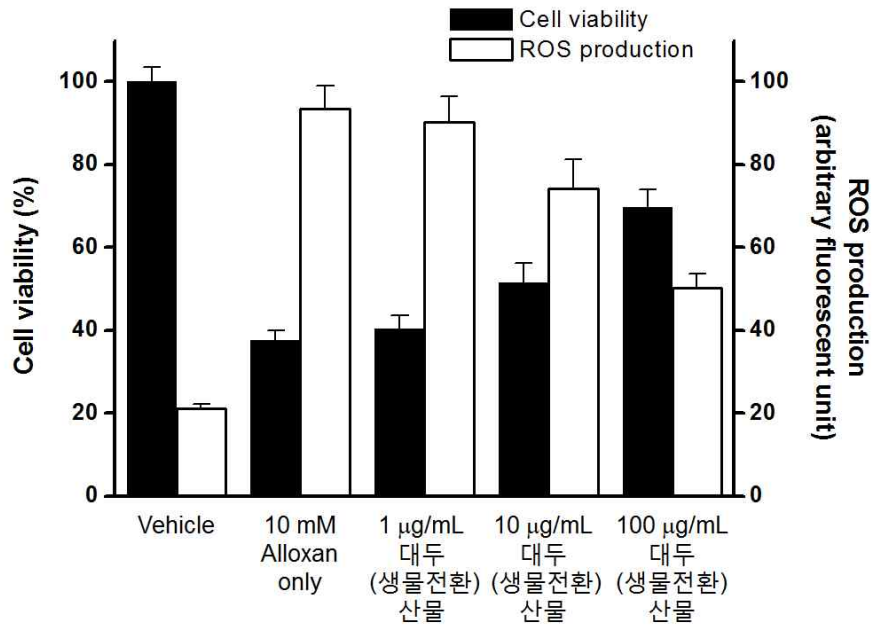


그림 167. 대두(생물전환)산물의 처리가 alloxan에 의해 유도되는 INS-1 세포주의 사멸과 ROS 생성에 미치는 효과

③ 참깨(생물전환)산물

참깨(생물전환)산물의 INS-1 세포 사멸 억제능과 ROS 생성 억제능을 확인한 결과, 다른 두 소재와 마찬가지로 농도 의존적으로 alloxan에 의한 세포 사멸과 ROS 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 최대 농도인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각 39.7%의 세포 사멸 억제와 60.3%의 ROS 생성 억제 효율을 보이는 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물과 비교하여 볼 때, 다른 두 소재보다 참깨(생물전환)산물이 더 뛰어난 활성을 보였는데, 이러한 결과는 다른 소재와는 달리 특이적으로 참깨(생물전환)산물이 갖는 항산화활성 때문인 것으로 보인다.

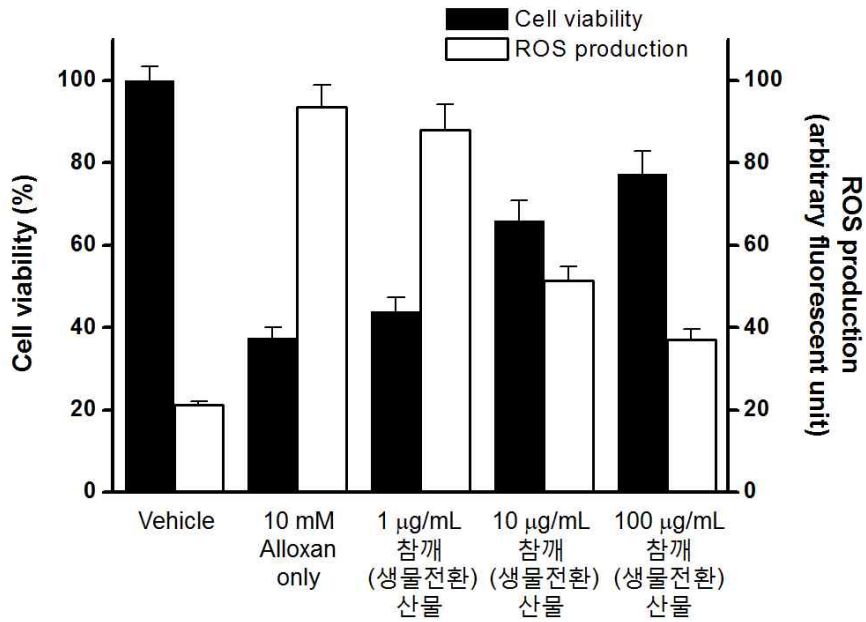


그림 168. 참깨(생물전환)산물의 처리가 alloxan에 의해 유도되는 INS-1 세포주의 사멸과 ROS 생성에 미치는 효과

(2) (제1형 당뇨) Ins-1 세포주에서 NO 생성 및 인슐린 분비에 미치는 효과

Alloxan의 처리에 의해 INS-1 세포 내 ROS 증가와 세포의 사멸이 일어나게 되면, 세포가 생성, 분비하는 nitric oxide의 양이 증가하며 인슐린의 분비는 감소하게 된다. 앞선 결과에서 농산부산물 3개 개발소재의 처리에 의해 세포 내 ROS의 양과 세포 사멸율이 감소하였으므로, INS-1 세포가 분비하는 nitric oxide의 양과 인슐린의 양을 측정하였다. 그 결과, 농산부산물 3개 개발소재 모두 농도 의존적으로 NO의 분비를 억제하고 인슐린의 분비량을 회복시키는 효과를 확인하였으며, NO의 경우 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최대 농도에서 미강(생물전환)산물은 38.8%, 대두(생물전환)산물은 54.2%, 참깨(생물전환)산물은 69.2%의 NO 생성 및 분비를 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 인슐린의 경우는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최대 농도에서 각각 31.4%, 45.7%, 64.6% 까지 분비량이 회복되는 것으로 확인되었으며, 세포 사멸 억제 및 ROS 생성 억제와 마찬가지로 참깨(생물전환)산물이 가장 뛰어난 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

표 86. 농산부산물 3개 개발소재의 처리가 INS-1 세포주의 NO 생성 및 분비, 인슐린 생성에 미치는 효과

Sample	Nitric oxide (arbitrary fluorescent unit)	Insulin release (ng/mL)
Vehicle	19.784 ± 1.253	1.809 ± 0.057
10 mM Alloxan only	82.479 ± 5.261	0.821 ± 0.034
미강(생물전환)산물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.830 ± 0.077
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.921 ± 0.059
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.079 ± 0.086
대두(생물전환)산물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.859 ± 0.042
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.956 ± 0.063
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.196 ± 0.073
참깨(생물전환)산물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.911 ± 0.078
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.154 ± 0.105
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.351 ± 0.107

나. Alloxan 처리로 유도된 제 1형 당뇨 마우스모델에서의 당뇨 억제능 평가

(1) 혈당, 혈청 내 인슐린, 간 내 글리코겐 양 평가

*in vitro* 실험계에서 농산부산물 3개 개발소재의 처리가 제1형 당뇨에 대한 항당뇨 효과가 있음이 확인됨에 따라, 제1형 당뇨의 마우스모델에서 개발소재의 항당뇨 효과를 검증하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 ICR 마우스를 1주일간 적응 후 사용하였으며, 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 각각 10 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이투여 한 후, 100 mg/kg의 alloxan을 복강주사로 투여하여 제1형 당뇨를 유도하였다. 1주일간 당뇨를 유도한 뒤, 마우스를 희생하여 당뇨의 지표로써 혈당량, 혈중 인슐린 농도, 간 내 글리코겐의 농도를 측정하였다. 그 결과, 당뇨가 유도된 대조군은 혈당이 308.4 mg/dL로 증가하였으나 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 혈당량의 증가가 각각 14.7%, 19.8%, 31.7% 억제되는 것으로 확인되었다. 또한 혈중 인슐린 농도는 당뇨 유발 시 정상 마우스에 비하여 15.9% 수준으로 감소하는데 비해, 미강(생물전환)산물 투여 시 40.9%, 대두(생물전환)산물 투여 시 51.9%, 참깨(생물전환)산물 투여 시 67.3% 까지 회복되는 것으로 확인되었다. 혈중 인슐린의 감소로 인하여 감소하는 간 내 글리코겐 농도 역시 당뇨 유발 대조군이 정상 대비 79.8% 수준으로 감소됨에 비하여 미강(생물전환)산물 투여 시 85.9%, 대두(생물전환)산물 투여 시 89.6%, 참깨(생물전환)산물 투여 시 94.8% 까지 회복되는 것으로 확인되었다.

표 87. 농산부산물 3개 개발소재의 처리가 제1형 당뇨 마우스모델의 혈당, 혈중 인슐린 농도, 및 간 내 글리코겐의 양에 미치는 효과

Sample	Blood glucose (mg/dL)	Serum insulin (ng/mg protein)	Glycogen (mg/g liver wt.)
Vehicle	127.0 ± 8.1	59.204 ± 4.283	3.041 ± 0.213
Alloxan only (100 mg/kg)	308.4 ± 15.7	9.407 ± 0.821	2.427 ± 0.154
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	263.0 ± 17.8	24.221 ± 1.556	2.613 ± 0.179
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	247.3 ± 12.0	30.749 ± 2.109	2.724 ± 0.231
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	210.5 ± 10.6	39.845 ± 2.450	2.883 ± 0.207

(2) 당 대사 관련 효소 조절능 평가

당 대사 관련 효소 중 인슐린에 의해 조절되는 Glucose-6-phosphatase (G6pase), Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), Glucokinase (GCK)의 활성에 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 미치는 효과를 측정하였다. 당뇨에 의해 혈중 인슐린의 농도가 감소하면, G6pase와 PEPCK가 활성화되어 포도당 신생합성이 촉진되며 GCK의 억제로 인하여 glycogen 합성이 억제됨이 알려져 있다. 따라서 농산부산물 소재의 투여 시 인슐린 분비가 회복됨에 따라서 이 세 효소의 활성을 제어할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, G6pase 활성은 당뇨 유발 시 정상 마우스 대비 2.4배로 활성이 증가하지만 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물 투여 시 각각 1.8배, 1.6배, 1.3배로 활성이 억제됨을 확인하였다. 또한 PEPCK의 경우 당뇨 유발 마우스에서 1.9배 활성이 증가하였으나 3개 개발소재 투여 시 각각 1.5배, 1.5배, 1.3배로 억제되는 것으로 확인되었다. GCK의 경우 당뇨 유발 시 정상 마우스 대비 48.2% 수준으로 활성이 감소하였으나 3개 개발소재 투여 시 각각 73.7%, 78.3%, 85.6% 수준으로 활성이 증가됨을 확인하였다.

표 88. 농산부산물 3개 개발소재의 제1형 당뇨 유발 마우스에서의 당 대사 관련 효소 조절 효과

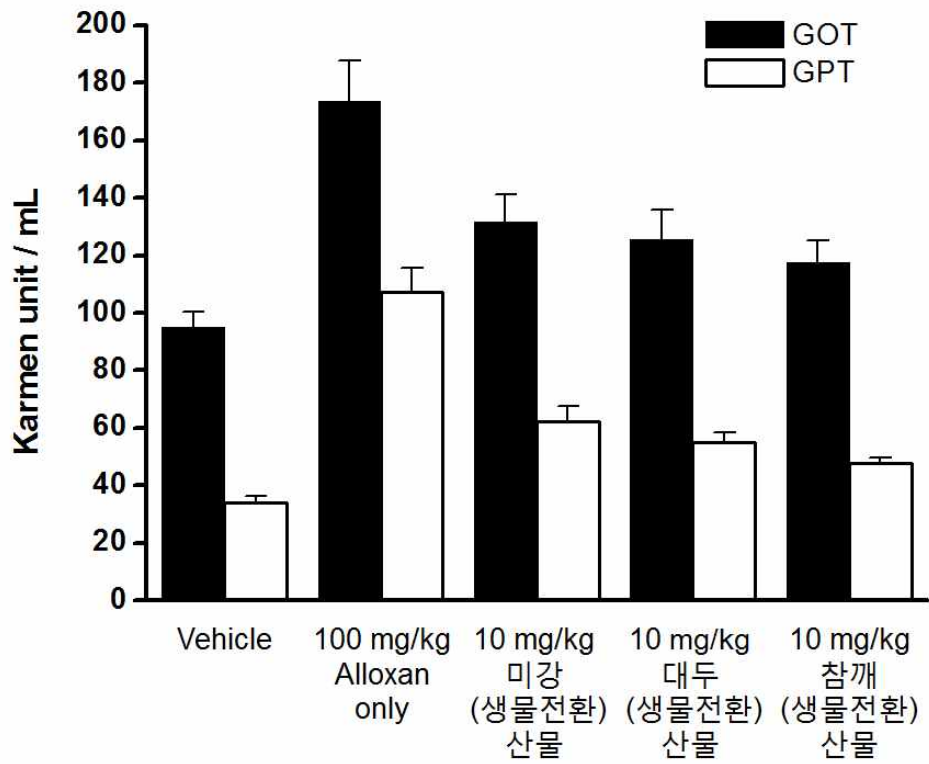
Sample	enzyme activity (nmol/min/mg protein)		
	G6pase	PEPCK	GCK
Vehicle	71.422 ± 4.231	17.540 ± 1.161	10.840 ± 0.893
Alloxan only (100 mg/kg)	172.559 ± 12.549	33.426 ± 2.076	5.224 ± 0.335
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	128.304 ± 7.203	26.736 ± 1.948	7.990 ± 0.507
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	115.696 ± 7.501	25.528 ± 2.007	8.493 ± 0.710
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	93.043 ± 5.637	23.471 ± 1.052	9.274 ± 0.569

### (3) 간 조직 및 췌장 조직 보호 효과

제1형 당뇨병으로 인해 유발되는 간 손상을 농산부산물 3개 개발소재의 투여로 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 혈중 GOT/GPT 농도의 측정 및 조직 염색을 수행하였다. 당뇨병 유발 시 GOT는 정상 대비 1.8배 증가하며 GPT는 3.1배 증가하였으나 미강(생물전환)산물 투여 시 각각 1.4배, 1.8배로 증가폭이 감소하는 것으로 확인되었다. 대두(생물전환)산물 투여 시에는 GOT와 GPT가 각각 1.4배, 1.7배로 감소하였으며 참깨(생물전환)산물 투여 시에는 각각 1.3배와 1.5배로 감소하는 것으로 확인되어 당뇨병에 의해 유발되는 간 손상을 효과적으로 억제할 수 있음이 확인되었다(그림, A). 또한 간 조직을 적출하여 파라핀 블록 제작 후, hematoxyline과 eosin Y로 염색하여 조직의 손상 정도를 확인한 결과, alloxan에 의한 당뇨병 유발 시 간 조직의 손상이 강하게 유도된 데 비해 농산부산물 소재의 투여 시 간 손상의 정도가 완화된 것으로 확인되었다(그림, B). 동일한 방법으로 췌장 조직을 염색하여 확인한 결과, 그림과 같이 당뇨병이 유발된 마우스의 췌장 조직 내 랑게르한스섬은  $\beta$ -세포의 파괴로 인하여 크기가 작으며 조직이 치밀하지 못한 결과를 보이는데 비해, 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 투여한 마우스의 경우 췌장 랑게르한스섬의 조직 손상이 완화되는 것으로 확인되었다.



(A)



(B)

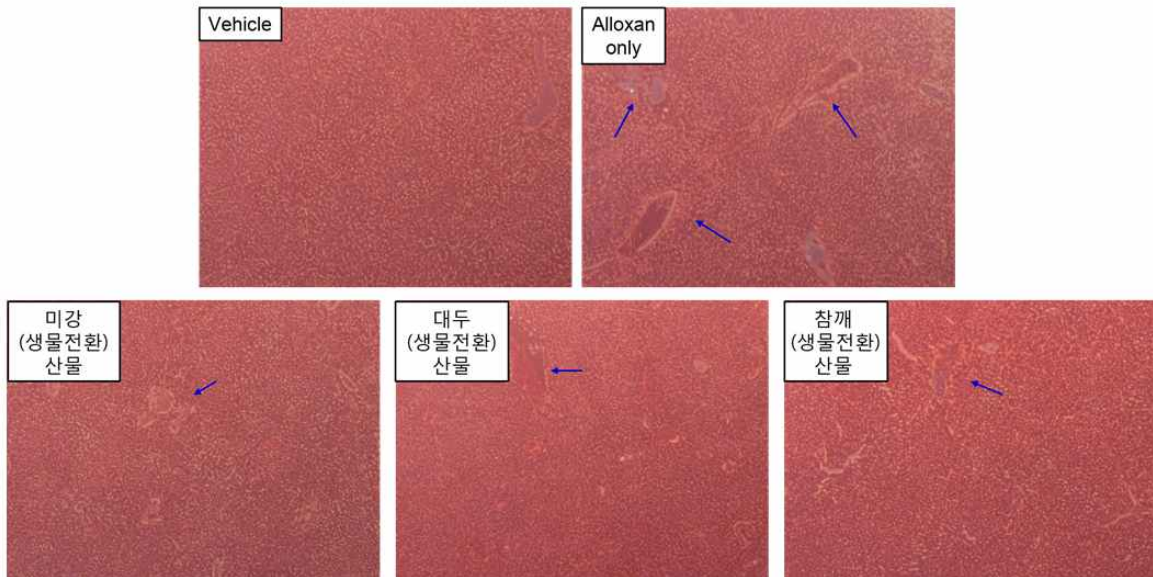


그림 169. 농산부산물 3개 개발소재의 간 손상 보호 효과

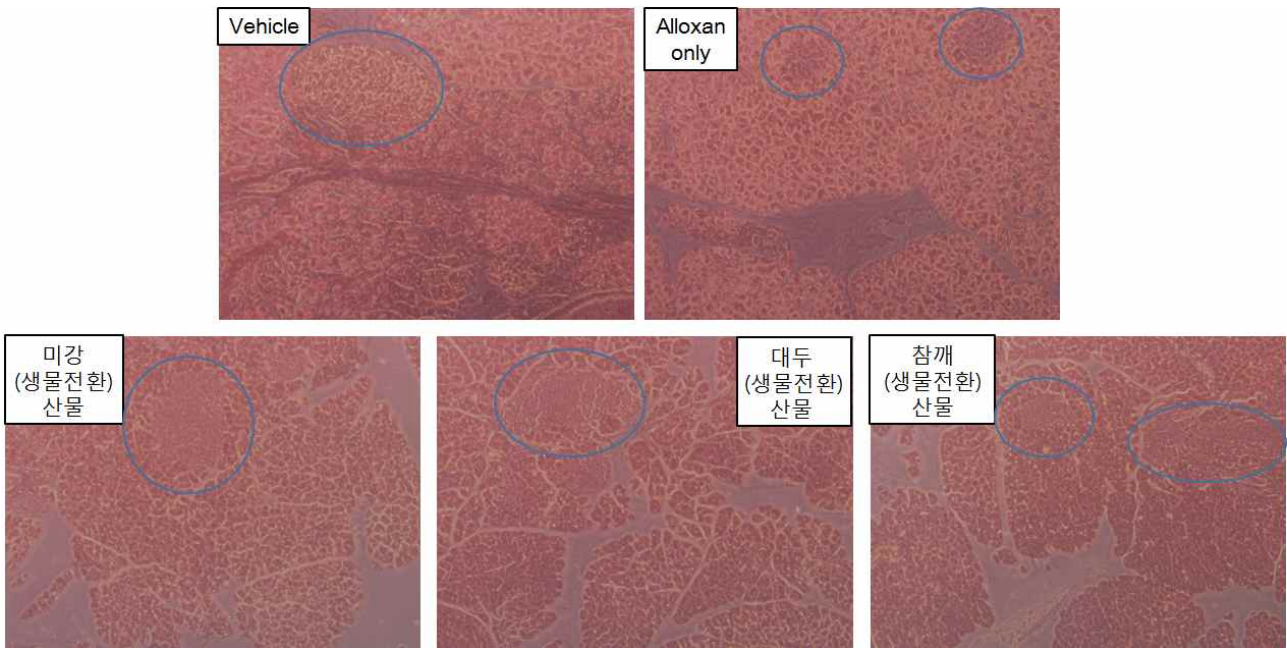


그림 170. 농산부산물 3개 개발소재의 췌장 손상 보호 효과

## 2. 제 2형 당뇨병 모델에서 항당뇨 효능 평가

### 가. 고지방식이로 유도된 제2형 당뇨병 마우스모델에서 항당뇨 효능 평가

#### (1) 체중, 간 무게, 백색지방 무게 변화에 미치는 효과

고지방식이로 인한 비만에 의해 유도되는 제2형 당뇨병 마우스모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 항당뇨 효과를 평가하였다. 당뇨병 유발용 고지방식은 Dyet 사의 제품을 사용하였으며 식이의 조성은 아래 표와 같다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 ICR 마우스를 1주일 적응 후 사용하였으며, 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 10 mg/kg의 1일 투여량으로 고지방식에 섞어 식이투여하였고, 7주간 식이하여 제2형 당뇨병을 유발하였다. 7주 후 마우스를 희생하여 체중, 간 무게, 백색지방 무게를 측정된 결과 정상 마우스의 경우 7주간의 체중 증가가 8.01g 인데 비하여 제2형 당뇨병 유발 마우스는 12.04g 의 체중 증가가 일어났으며, 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 투여한 경우 각각 10.91g, 10.41g, 9.09g 의 체중 증가를 보여 대조군 대비 체중 증가율이 감소함을 보였다. 간 무게 와 백색지방 무게 또한 당뇨병 유발 대조군에 비하여 억제됨을 확인하였고, 평균 먹이 섭취량의 차이는 보이지 않으므로 이러한 효과는 먹이의 미섭취 때문은 아닌 것으로 확인되었다.

표 89. 일반 식이 조성 및 제2형 당뇨병 유발용 고지방식이의 조성

component	normal diets (g/kg diet)	high-fat diets (g/kg diet)
casein	200.0	200.0
DL-methionine	3.0	3.0
corn starch	150.0	150.0
sucrose	500.0	150.0
cellulose	50.0	50.0
corn orl	50.0	
salt mix #200000 <sup>a</sup>	35.0	35.0
vitamin mix #310025 <sup>b</sup>	10.0	10.0
choline bitartrate	2.0	2.0
beef tallow		400.0

<sup>a</sup>Dyets cat. no. 200000, <sup>b</sup>Dyets cat. no. 310025

표 90. 제2형 당뇨 마우스모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 체중, 간 무게, 백색지방 무게에 미치는 효과

Sample	initial weights (g)	final weights (g)	liver weights (g)	white adipose tissue weights (g)	feed intakes (g/day)
normal control	23.15 ± 1.75	31.16 ± 2.24	1.79 ± 0.12	0.41 ± 0.03	3.44 ± 0.22
HFD-control	23.54 ± 1.43	35.58 ± 2.18	2.63 ± 0.16	1.77 ± 0.12	3.01 ± 0.19
HFD- 10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	23.48 ± 1.52	34.39 ± 2.56	2.20 ± 0.09	1.28 ± 0.09	3.03 ± 0.28
HFD- 10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	23.61 ± 1.86	34.02 ± 2.73	2.11 ± 0.17	1.18 ± 0.10	3.01 ± 0.21
HFD- 10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	24.03 ± 2.02	33.12 ± 2.10	2.02 ± 0.08	0.89 ± 0.07	3.06 ± 0.23

(2) 혈당 및 혈청 내 인슐린에 미치는 효과

제2형 당뇨 마우스모델에서 혈당량 및 혈중 인슐린 농도에 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 미치는 효과를 확인하였다. 혈당 측정 결과, 고지방식이 마우스의 경우 혈당량이 1.9배 증가하였으나 미강(생물 전환)산물 투여 마우스에서는 1.5배, 대두(생물 전환)산물 투여 마우스에서는 1.4배, 참깨(생물 전환)산물 투여 마우스에서는 1.3배로 혈당량의 증가가 억제되었다. 혈중 인슐린 농도의 경우 고지방식이 마우스에서 정상 대비 51.1% 수준으로 감소하여 제2형 당뇨가 유발되는 것으로 확인되었고, 미강(생물 전환)산물 투여 시 60.7%, 대두(생물 전환)산물 투여 시 64.2%, 참깨(생물 전환)산물 투여 시 69.1% 로 회복되는 것으로 확인되었다.

표 91. 제2형 당뇨 마우스모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 혈당에 미치는 효과

Sample	Blood glucose (mg/dL)	Serum insulin (ng/mL)
normal control	113.5 ± 9.7	0.805 ± 0.053
HFD-control	216.7 ± 10.8	0.412 ± 0.027
HFD-10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	168.0 ± 8.9	0.489 ± 0.038
HFD-10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	161.7 ± 11.6	0.517 ± 0.033
HFD-10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	143.8 ± 10.5	0.556 ± 0.041

(3) Glucose tolerance 에 미치는 효과

제2형 당뇨병에 의한 혈당 조절 장애 측정을 위한 경구 당부하 검사를 실시하였다. 7주간 고지방식이를 섭취한 마우스를 16시간동안 절식시킨 후, 포도당을 경구투여 하고 30분 간격으로 마우스 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당량을 측정하였다. 아래 그림과 같이 정상 마우스의 경우 포도당 투여 시 30분까지 혈당이 증가하며 그 이후로 감소하기 시작하여 120분 후에는 정상 수치에 가깝게 감소하나, 제2형 당뇨병이 유발된 마우스의 경우 이러한 혈당 강하 효과가 크게 감소되어 있음이 확인되었다. 농산부산물 3개 개발소재의 투여 시 전체적인 혈당 증가폭이 감소하는 것으로 확인되었으며 특히, 참깨(생물전환)산물의 경우 다른 두 소재보다 혈당 증가 억제 및 조절 능력이 뛰어난 것으로 확인되었다.

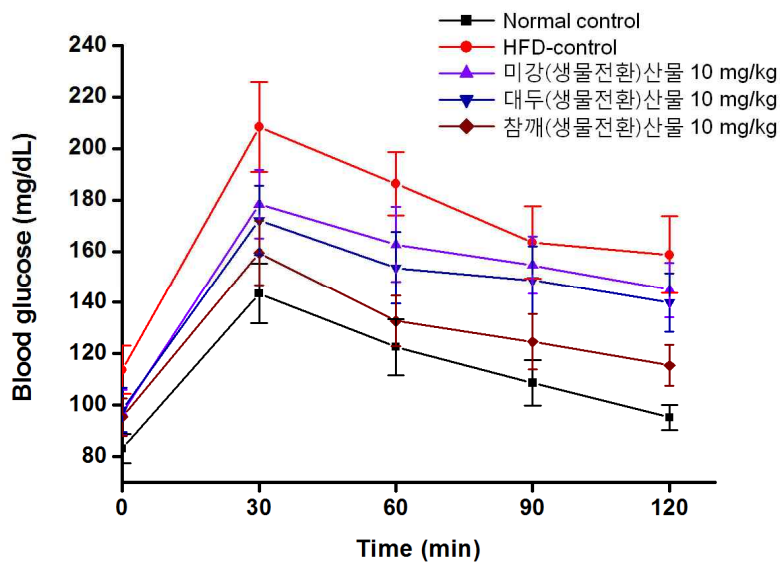


그림 171. 농산부산물 3개 개발소재의 혈당 조절 능력 회복 효과

(4) 지질 분석

고지방식이로 인하여 증가하는 혈청 내 지질을 분석한 결과, 제2형 당뇨 마우스의 경우 HDL의 양이 감소하며 중성지방과 콜레스테롤, LDL의 양은 증가하는 것으로 확인되었다. 농산부산물 3개 개발소재의 투여 시 감소한 HDL의 양을 회복시키며, 증가된 중성지방과 콜레스테롤, LDL의 양은 억제하는 효과가 있음이 나타났으며, 혈당 억제 및 인슐린 분비 결과와는 달리 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물 사이에 큰 효과 차이는 보이지 않는 것으로 확인되었다.

표 92. 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 제2형 당뇨 유발 마우스의 혈중 지질에 미치는 효과

Sample	triglyceride (mg/dL)	total cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
normal control	112 ± 9	141 ± 8	84.2 ± 5.6	28.3 ± 1.7
HFD-control	163 ± 12	169 ± 12	61.9 ± 6.0	35.7 ± 2.3
HFD-10 mg/kg 미강(생물전환)산물	135 ± 8	154 ± 10	69.2 ± 5.3	31.0 ± 1.8
HFD-10 mg/kg 대두(생물전환)산물	133 ± 10	155 ± 9	68.3 ± 5.1	31.2 ± 1.9
HFD-10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	129 ± 9	151 ± 10	72.6 ± 6.8	30.7 ± 2.2

(5) 당 대사 관련 효소 조절능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 투여가 제2형 당뇨병으로 인해 감소한 인슐린의 분비량을 회복시킴에 따라, G6pase, PEPCK, GCK의 활성을 측정하였다. 그 결과, 제1형 당뇨병과 마찬가지로 3개 개발소재 모두 G6pase와 PEPCK의 활성을 억제하며 GCK의 활성을 회복시키는 효과가 있는 것으로 확인되었고 인슐린 회복 효과가 가장 높았던 참깨(생물전환)산물이 효소 활성 조절 효과도 가장 큰 것으로 확인되었다.

표 93. 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 제2형 당뇨병 유발 마우스의 당 대사 관련 효소 활성에 미치는 효과

Sample	enzyme activity (nmol/min/mg protein)		
	G6pase	PEPCK	GCK
Vehicle	62.419 ± 5.056	22.908 ± 1.087	11.524 ± 0.993
HFD only	183.442 ± 10.115	41.438 ± 3.240	5.113 ± 0.427
HFD-10 mg/kg 미강(생물전환)산물	125.019 ± 8.436	37.109 ± 2.053	7.426 ± 0.632
HFD-10 mg/kg 대두(생물전환)산물	113.176 ± 9.591	34.241 ± 2.754	8.508 ± 0.624
HFD-10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	85.037 ± 4.426	28.834 ± 2.090	9.306 ± 0.718



(6) 염증성 cytokine 분석

비만으로 인한 제2형 당뇨의 유발 기전은 아직 확실히 알려져 있지 않으나, 지방조직에서 분비하는 염증성 cytokine이 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되어 있다. 따라서 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 지방 조직 내 cytokine의 발현과 혈액 내로 분비된 cytokine에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 그 결과, 제2형 당뇨 유발 시 지방조직과 혈청 내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 모두 증가하는 것으로 확인되었고, 농산부산물 소재의 투여 시 cytokine의 발현이 억제되는 것으로 확인되었다.  $\beta$  세포의 인슐린저항성에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 IL-1 $\beta$ 의 경우 미강(생물전환)산물을 투여하면 당뇨 유발 마우스 대비 지방조직에서 18.2%, 혈청에서 27.6% 감소하였고, 대두(생물전환)산물 투여 시에는 각각 22.9%와 35.5% 감소하였다. 참깨(생물전환)산물 투여 시에는 각각 35.4%와 58.4%가 감소하여 가장 높은 억제 효과를 보였다.

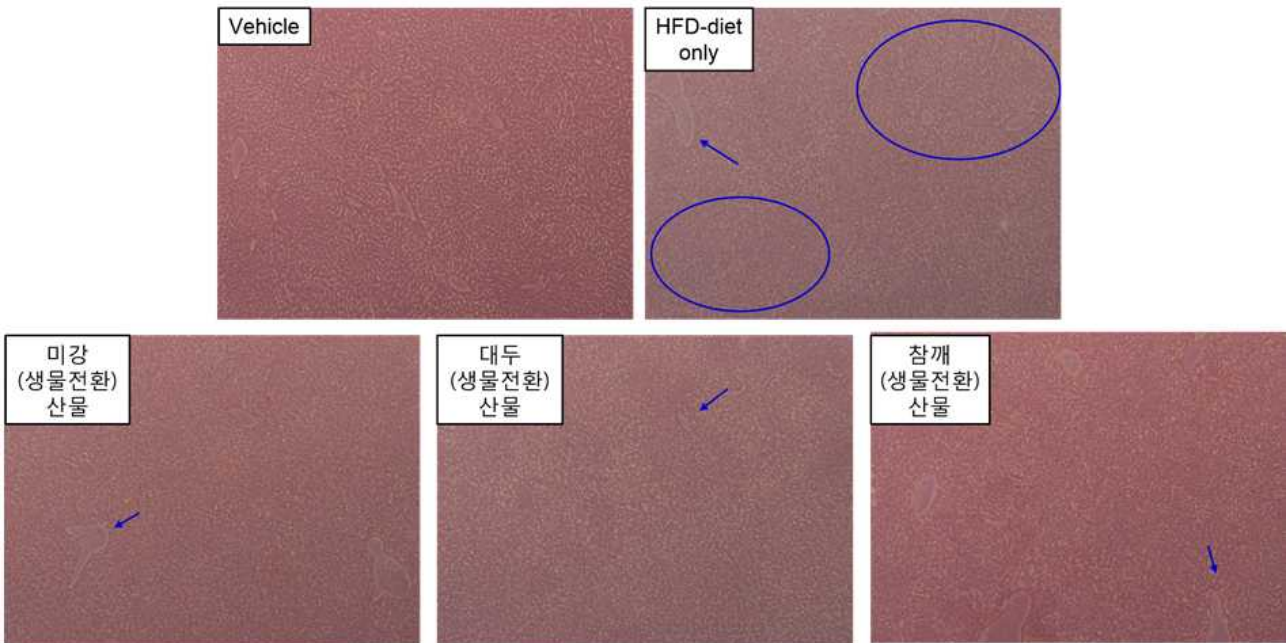
표 94. 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 제2형 당뇨 유발 마우스의 염증성 cytokine 발현에 미치는 효과

Sample	serum (pg/mL)			adipose tissue (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
normal control	2.87 $\pm$ 0.13	13.2 $\pm$ 1.1	16.9 $\pm$ 1.3	23.0 $\pm$ 1.1	58.3 $\pm$ 4.2	77.3 $\pm$ 5.8
HFD-control	15.2 $\pm$ 1.2	109 $\pm$ 8	58.9 $\pm$ 4.0	74.9 $\pm$ 5.6	175 $\pm$ 9	212 $\pm$ 16
HFD-10 mg/kg 미강(생물전환)산물	10.2 $\pm$ 0.8	78.9 $\pm$ 5.2	47.1 $\pm$ 2.5	56.0 $\pm$ 4.1	143 $\pm$ 11	155 $\pm$ 9
HFD-10 mg/kg 대두(생물전환)산물	9.23 $\pm$ 0.56	70.3 $\pm$ 4.1	42.4 $\pm$ 3.9	50.8 $\pm$ 3.6	135 $\pm$ 8	153 $\pm$ 12
HFD-10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	7.83 $\pm$ 0.47	45.3 $\pm$ 3.5	36.1 $\pm$ 2.6	38.1 $\pm$ 2.5	113 $\pm$ 6	132 $\pm$ 10

(7) 간 조직 및 췌장 조직 보호 효과

제2형 당뇨병을 유발한 마우스에서 간 조직과 췌장 조직을 적출하여 염색한 결과, 당뇨 유발 시 간에서는 조직 손상 및 지방 축적이 관찰되었고 췌장에서는 랑게르한스섬의 파괴가 관찰되었다. 반면 농산부산물 3개 개발소재의 투여시에는 이러한 간 조직의 손상 및 지방 축적이 완화되는 효과를 보였으며, 췌장의 랑게르한스섬 역시 보호되는 효과를 확인하였다.

(A)



(B)

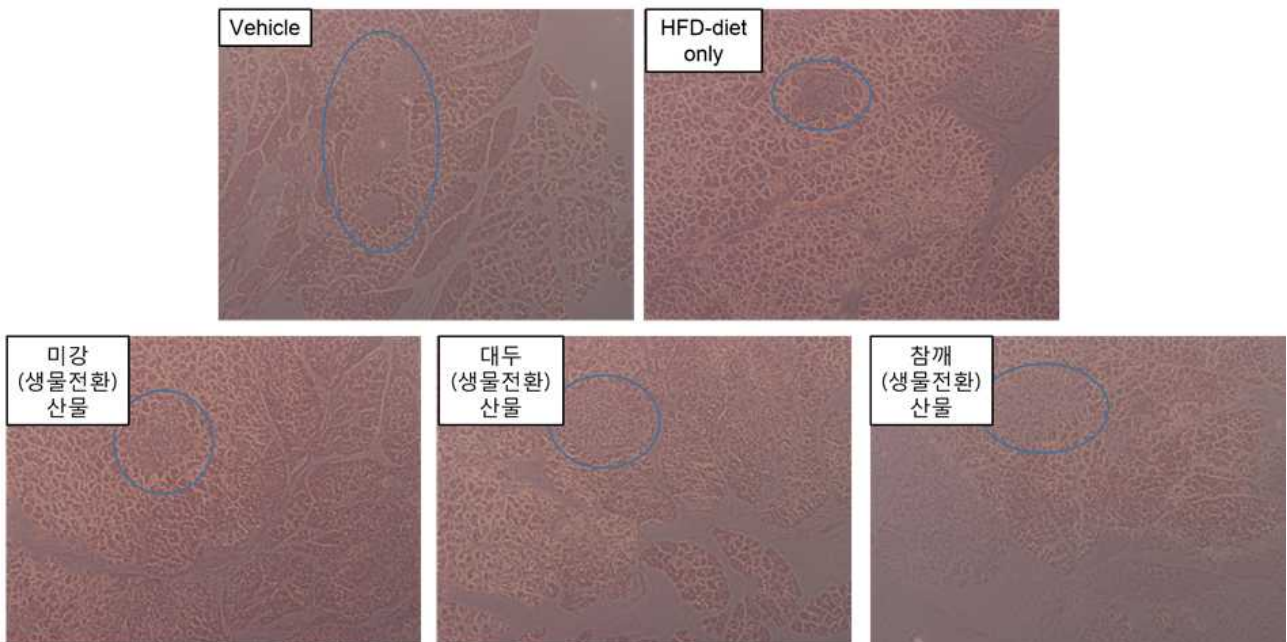


그림 172. 농산부산물 3개 개발소재의 간 조직 및 췌장 조직의 보호 효과

### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항당뇨 효능 평가에 대한 실험적 의의

미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항당뇨 효과를 alloxan을 이용한 1형 당뇨병 모델과 고지방식이로 통해 유도한 2형 당뇨병 모델에서 확인하였다. Rat의  $\beta$ 세포주인 INS-1 세포주에 alloxan을 처리하여 세포의 사멸을 유도하고, 개발소재를 농도별로 처리하여  $\beta$ 세포에 대한 보호 효과를 확인한 결과, 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물은 모두 농도 의존적으로 세포의 사멸을 억제하며, alloxan에 의한 세포 내 ROS 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한, 세포의 생존률 증가에 따른 NO 분비 억제 및 insulin 분비 회복 역시 농도 의존적으로 일어나는 것으로 확인되었고, INS-1 세포주에 대한 보호 효과는 참깨(생물전환)산물이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 참깨 원물에 포함되어 있는 토코페롤, 플라보노이드, 폴리페놀 등의 항산화 성분이 참깨(생물전환)산물에도 유지되어 있거나, 혹은 활성을 갖는 비배당체의 형태로 존재하기 때문인 것으로 보인다.

마우스에 alloxan을 주사하여  $\beta$ 세포를 파괴하고 당뇨를 유발시킨 1형 당뇨병 마우스모델에서, 개발소재의 식이투여는 혈당의 증가를 억제하며, 인슐린의 분비를 회복시키고, 간과 췌장의 조직을 보호하는 효과가 있는 것으로 확인되었다. INS-1 세포주를 이용한 실험 결과와 마찬가지로, 참깨(생물전환)산물의 억제 효과가 가장 뛰어난 것으로 확인되었으며, alloxan에 의한 췌장 내  $\beta$ 세포의 사멸을 효과적으로 억제하기 때문에, 이후 발생하는 다양한 당뇨 지표들이 함께 억제되는 것으로 생각된다.

마우스에 고지방식사와 비타민을 지속적으로 식이하여 고지질혈증에 의한 당뇨를 유발시킨 2형 당뇨병 마우스모델에서, 개발소재의 식이투여는 체중 증가 억제 및 혈당 강하 효과, 당 조절 능력의 회복 등 다양한 당뇨 지표의 개선을 일으키는 것으로 확인되었다. 특히, 2형 당뇨병의 원인 중 하나로 생각되는 지방조직에서의 염증반응 역시 개발소재의 투여로 인해 억제되는 것으로 확인되어, 2형 당뇨병 예방에 효과적인 소재로 사용될 수 있을 것이라 판단된다.

3개 개발소재의 항당뇨 효과를 종합할 때, 참깨(생물전환)산물이 가장 뛰어난 항당뇨 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 특히, 1형 당뇨병 마우스모델과 2형 당뇨병 마우스모델 모두에서 효과적인 당뇨 증상의 억제 효과를 보임에 따라, 당뇨 예방 혹은 당뇨 질환으로 인한 증상 개선에 도움을 줄 수 있는 소재로 사용될 가능성이 있다고 평가된다.

## 12절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 비알코올성 지방간 억제 효능 평가

: 고지방식으로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서 지방간 생성 억제능 평가

### 1. 고지방식으로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서의 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 지방간 생성 억제능 평가

1차년도 연구 결과 중 알코올성 간염 모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 간 보호 효과가 뛰어난에 따라, 비알코올성 지방간에서 개발소재의 간 보호 효과를 확인하고자 하였다. 실험군당 10마리의 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 1주일간 적응 후 사용하였으며, 60%의 지방이 포함된 고지방식을 11주간 식이하여 지방간을 유도하였다. 비만/지방간 유도 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 10 mg/kg의 농도로 함께 식이하여 개발소재의 지방간 생성 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 미강 원물 투여 마우스에 비해 미강(생물전환)산물 투여 마우스에서 체중 증가 및 백색지방 증가가 감소하는 결과를 보였으며, 간에서의 중성지방 및 콜레스테롤의 양도 효과적으로 감소시키는 것으로 확인되었다. 특히, 혈중 중성지방과 콜레스테롤에 대한 강력한 억제 효과를 보이는 것으로 평가되었다.

표 95. 고지방식이로 유도된 지방간 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여가 체중 및 백색지방, 간무게에 미치는 효과

	Body weight (g)	WAT weight (mg/g body weight)	Liver weight (mg/g body weight)
normal	30.5 ± 2.4	25.1 ± 1.6	33.7 ± 2.5
High fat diet only	48.9 ± 3.7	108.5 ± 8.7	28.9 ± 1.4
10 mg/kg 미강 원물	47.2 ± 1.9	104.7 ± 5.4	29.3 ± 1.0
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	45.3 ± 3.5	99.6 ± 6.3	32.1 ± 2.7

표 96. 고지방식이로 유도된 지방간 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여가 간조직 내 지질 함량에 미치는 효과

	Hepatic TG (mg/g liver weight)	Hepatic TC (mg/g liver weight)
normal	17.5 ± 1.6	6.2 ± 4.9
High fat diet only	33.8 ± 2.4	9.8 ± 3.8
10 mg/kg 미강 원물	32.7 ± 1.1	9.6 ± 6.7
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	26.3 ± 2.3	7.3 ± 5.2

표 97. 고지방식이로 유도된 지방간 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여가 혈중 지질 및 혈당에 미치는 효과

	Plasma TG (mg/dL)	Plasma TC (mg/dL)	Plasma glucose (mg/dL)
normal	82.4 ± 5.4	138.6 ± 11.7	75.4 ± 5.4
High fat diet only	121.6 ± 7.6	203.7 ± 13.8	95.3 ± 5.2
10 mg/kg 미강 원물	118.9 ± 8.3	200.9 ± 9.4	94.7 ± 6.8
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	93.4 ± 5.4	163.7 ± 5.6	89.3 ± 4.7

## 2. 고지방식으로 유도된 비만/지방간 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 지방간 생성 억제능 평가

고지방식으로 유도된 비만/지방간 마우스에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여로 인한 지방간 생성 억제 효과를 확인하였다. 대두 원물을 투여한 마우스에서는 지방간 생성 억제 효과 및 지질 대사 조절 효과를 보이지 않았으나 대두(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 지방간 생성이 억제되는 효과를 보였으며 혈중 지질과 혈중 콜레스테롤의 양 역시 감소하는 효과가 나타남을 확인하였다. 다만, 미강(생물전환)산물에 비해 그 활성이 낮은 것으로 평가되었다.

표 98. 고지방식으로 유도된 지방간 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여가 체중 및 백색지방, 간무게에 미치는 효과

	Body weight (g)	WAT weight (mg/g body weight)	Liver weight (mg/g body weight)
normal	30.5 ± 2.4	25.1 ± 1.6	33.7 ± 2.5
High fat diet only	48.9 ± 3.7	108.5 ± 8.7	28.9 ± 1.4
10 mg/kg 대두 원물	48.1 ± 3.9	106.3 ± 9.2	29.0 ± 1.5
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	46.7 ± 3.7	102.2 ± 8.7	30.7 ± 1.8

표 99. 고지방식으로 유도된 지방간 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여가 간조직 내 지질 함량에 미치는 효과

	Hepatic TG (mg/g liver weight)	Hepatic TC (mg/g liver weight)
normal	17.5 ± 1.6	6.2 ± 0.49
High fat diet only	33.8 ± 2.4	9.8 ± 0.38
10 mg/kg 대두 원물	33.5 ± 2.4	9.7 ± 0.58
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	30.7 ± 1.7	8.2 ± 0.47

표 100. 고지방식으로 유도된 지방간 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여가 혈중 지질 및 혈당에 미치는 효과

	Plasma TG (mg/dL)	Plasma TC (mg/dL)	Plasma glucose (mg/dL)
normal	82.4 ± 5.4	138.6 ± 11.7	75.4 ± 5.4
High fat diet only	121.6 ± 7.6	203.7 ± 13.8	95.3 ± 5.2
10 mg/kg 대두 원물	120.3 ± 10.5	202.6 ± 15.4	95.1 ± 5.6
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	111.7 ± 9.4	189.1 ± 10.3	91.7 ± 6.7

### 3. 고지방식이 유도된 비만/지방간 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 지방간 생성 억제능 평가

고지방식이 유도 비만/지방간 마우스모델에 참깨(생물전환)산물을 함께 투여하여 지방간 생성 억제 효과를 확인하였다. 참깨 원물을 투여한 마우스에서는 유의미한 효과가 확인되지 않았으나 참깨(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 지방간 생성 억제 효과가 나타나는 것을 확인하였고, 간 조직 및 혈청에서의 지질 수준 역시 감소하는 것으로 확인되었다. 대두(생물전환)산물에 비해서는 높은 활성을 보였으나 미강(생물전환)산물에 비해 낮은 활성을 갖는 것으로 평가된다.



표 101. 고지방식이로 유도된 지방간 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여가 체중 및 백색지방, 간무게에 미치는 효과

	Body weight (g)	WAT weight (mg/g body weight)	Liver weight (mg/g body weight)
normal	30.5 ± 2.4	25.1 ± 1.6	33.7 ± 2.5
High fat diet only	48.9 ± 3.7	108.5 ± 8.7	28.9 ± 1.4
10 mg/kg 참깨 원물	48.0 ± 2.5	105.7 ± 10.1	29.2 ± 2.3
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	46.0 ± 3.1	101.6 ± 9.5	31.3 ± 1.9

표 102. 고지방식이로 유도된 지방간 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여가 간조직 내 지질 함량에 미치는 효과

	Hepatic TG (mg/g liver weight)	Hepatic TC (mg/g liver weight)
normal	17.5 ± 1.6	6.2 ± 0.49
High fat diet only	33.8 ± 2.4	9.8 ± 0.38
10 mg/kg 참깨 원물	33.1 ± 2.9	9.7 ± 0.83
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	28.9 ± 2.5	7.9 ± 0.61

표 103. 고지방식이로 유도된 지방간 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여가 혈중 지질 및 혈당에 미치는 효과

	Plasma TG (mg/dL)	Plasma TC (mg/dL)	Plasma glucose (mg/dL)
normal	82.4 ± 5.4	138.6 ± 11.7	75.4 ± 5.4
High fat diet only	121.6 ± 7.6	203.7 ± 13.8	95.3 ± 5.2
10 mg/kg 참깨 원물	119.6 ± 9.8	201.8 ± 17.6	94.0 ± 6.2
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	105.6 ± 8.3	175.8 ± 9.6	88.9 ± 7.2

#### 4. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 비알코올성 지방간 억제 효능 평가에 대한 실험적 의의

고지방식이로 유도한 비만/지방간 마우스모델에서 농산부산물 3개 개발소재의 지방간 생성 억제 효과를 확인하였다. 60%의 지방이 포함된 고지방식을 11주간 식이하여 비만/지방간을 유도하고 개발소재를 함께 식이투여 한 경우, 3개 개발소재 모두 비만과 지방간의 생성을 일부 억제하는 것으로 확인되었다. 특히, 미강(생물전환)산물의 경우, 대두(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물에 비해 전체적인 억제 활성이 높은 것으로 확인되었으며, 혈중 중성지방과 콜레스테롤에 대한 억제활성은 특히 뛰어난 것으로 확인되었다. 따라서, 비만/지방간의 지표 중 혈중 지질에 대한 개선용의 소재로 개발할 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

# 13절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 알코올성 지방간/간염 억제 효능 평가

## 1. *in vitro* 간 보호 기능 평가

### 가. HepG2 세포주를 이용한 간 보호 기능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 알코올에 의한 간독성 억제 효과를 확인하기 위해 사람 유래 간암 세포주인 HepG2 세포주를 이용하였다.  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 96 well plate에 세포를 분주한 후, 개발소재와 200 mM의 에탄올을 함께 처리하여 간세포의 사멸을 유도하였다. 24시간 배양 후, MTT assay를 통해 세포의 생존률을 측정하였다.

간 세포에 에탄올 처리 시 세포의 사멸이 유도되는 기전 중 하나인 ROS의 발생을 개발소재의 투여로 억제할 수 있는지 확인하였다. 개발소재를 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 30분간 처리한 후, 200 mM의 에탄올을 30분간 처리하여 ROS의 발생을 유도하였다. 이 후 ROS의 형광 표지자인 DCFH-DA를 처리하여 표지하였고, ROS에 의해 발생한 형광을 측정하였다.

#### (1) 미강(생물전환)산물의 세포독성 및 ROS 저감 효과

HepG2 세포주에 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 미강(생물전환)산물과 에탄올을 처리한 후 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과, 에탄올 처리 시 간세포의 생존률은 52.8% 였으나 미강(생물전환)산물의 처리 시 농도 의존적으로 생존률이 증가하였으며 최대 농도인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 61.6%의 생존률을 보이는 것으로 확인되었다.

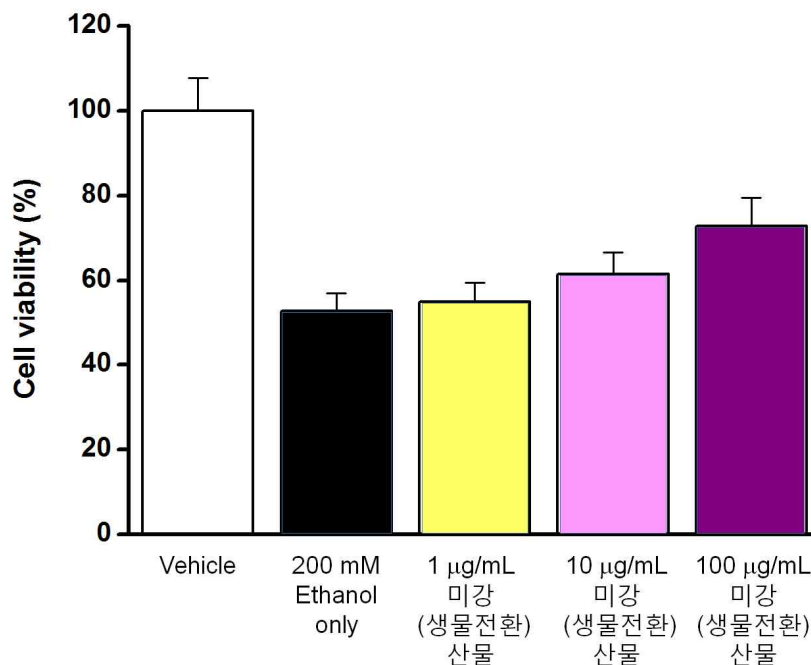


그림 173. 미강(생물전환)산물의 간 세포 사멸 억제 효과

HepG2 세포주에 에탄올 처리 시 ROS가 발생되며, 형광으로 측정된 결과 대조군 대비 1.8배의 ROS가 생성되는 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물의 처리는 농도 의존적으로 에탄올에 의해 발생하는 ROS를 감소시킬 수 있었으며, 최대농도인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 30.6% ROS를 감소시키는 것으로 확인되었다.

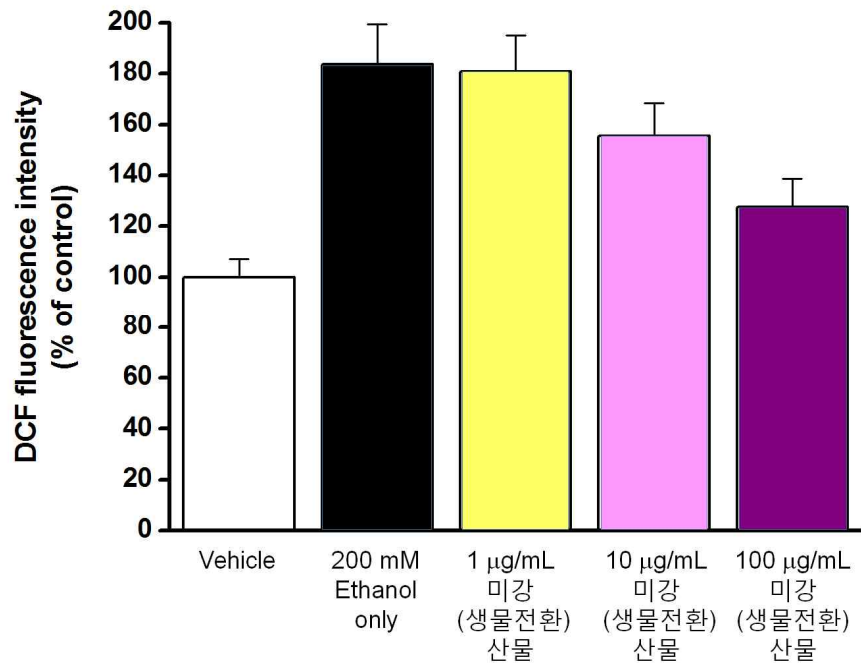


그림 174. 미강(생물전환)산물의 ROS 발생 억제 효과

(2) 대두(생물전환)산물의 세포독성 및 ROS 저감 효과

HepG2 세포주에 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 대두(생물전환)산물과 에탄올을 처리한 후 세포의 생존률을 측정하였다. 대두(생물전환)산물의 처리 시 농도 의존적으로 생존률이 증가하였으며 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 74.4%의 생존률을 보이는 것으로 확인되었다.

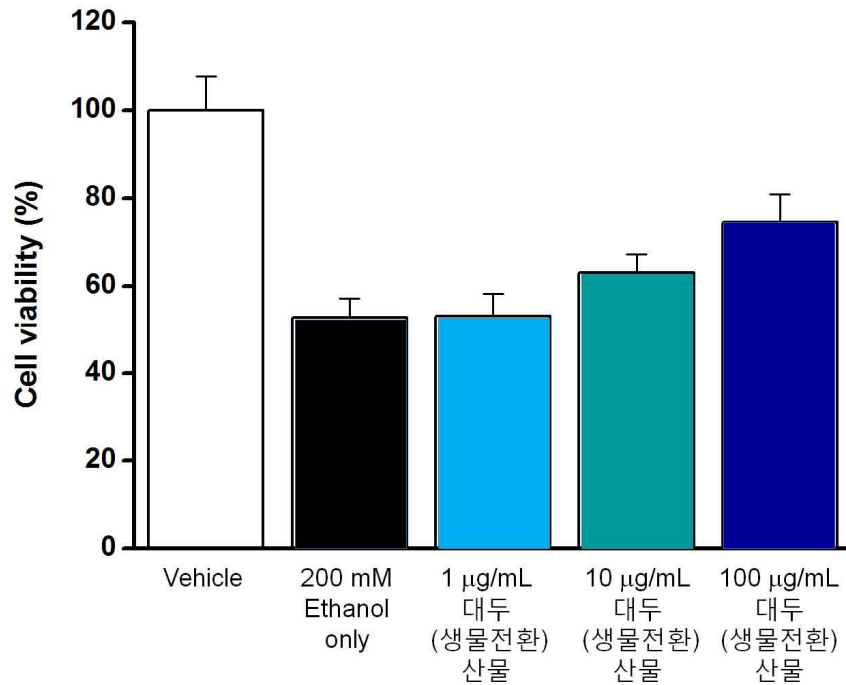


그림 175. 대두(생물전환)산물의 간 세포 사멸 억제 효과

대두(생물전환)산물의 처리 역시 농도 의존적으로 ROS의 발생을 억제하였으며, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 30.1%의 ROS 발생 억제 능력을 보여주었다.

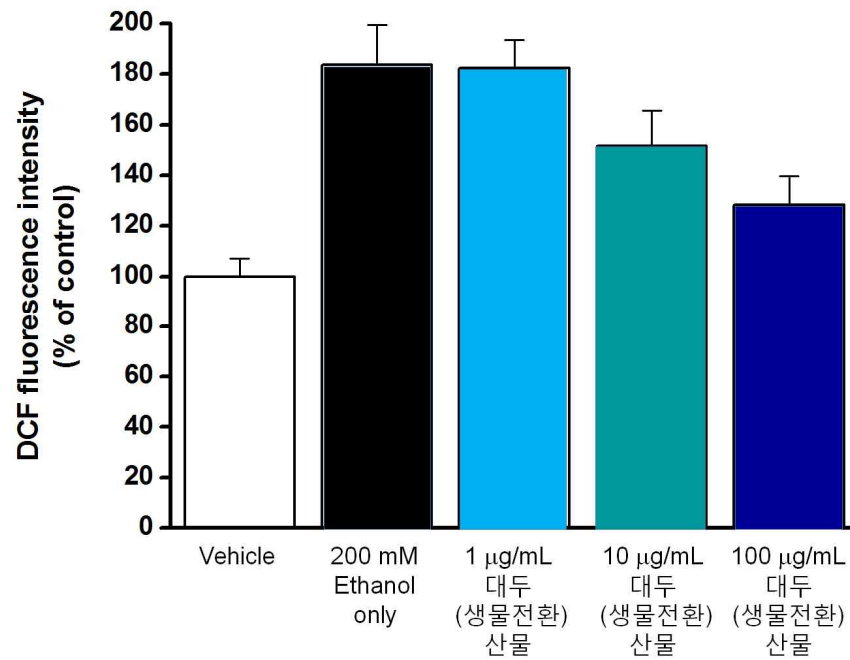


그림 176. 대두(생물전환)산물의 ROS 발생 억제 효과

(3) 참깨(생물전환)산물의 세포독성 및 ROS 저감 효과

HepG2 세포주에 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 참깨(생물전환)산물과 에탄올을 처리한 후 세포의 생존률을 측정하였다. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물과 마찬가지로 참깨(생물전환)산물의 처리 시 농도 의존적으로 생존률이 증가하였으며 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 생존률은 80.1%로 확인되었다.

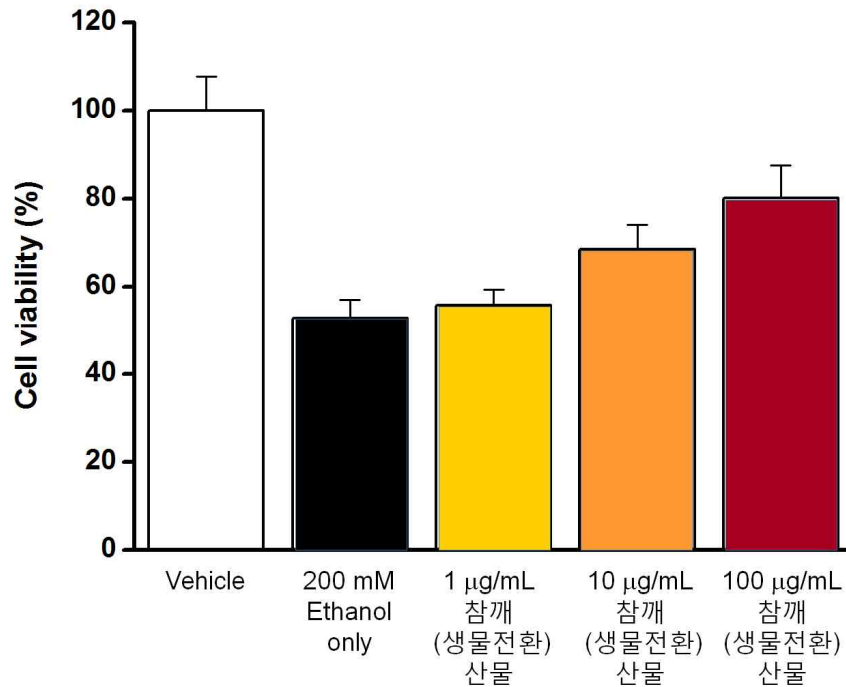


그림 177. 참깨(생물전환)산물의 간 세포 사멸 억제 효과

참깨(생물전환)산물 역시 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물과 마찬가지로 농도 의존적인 ROS 생성 억제 능력을 나타내었으며, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 37.3%의 ROS 억제 능력이 있음이 확인되었다. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물 보다 참깨(생물전환)산물의 ROS 억제 활성이 더 강한 것으로 확인되었는데, 위 그림의 결과와 마찬가지로 참깨(생물전환)산물이 갖는 항산화활성 때문인 것으로 추측된다.

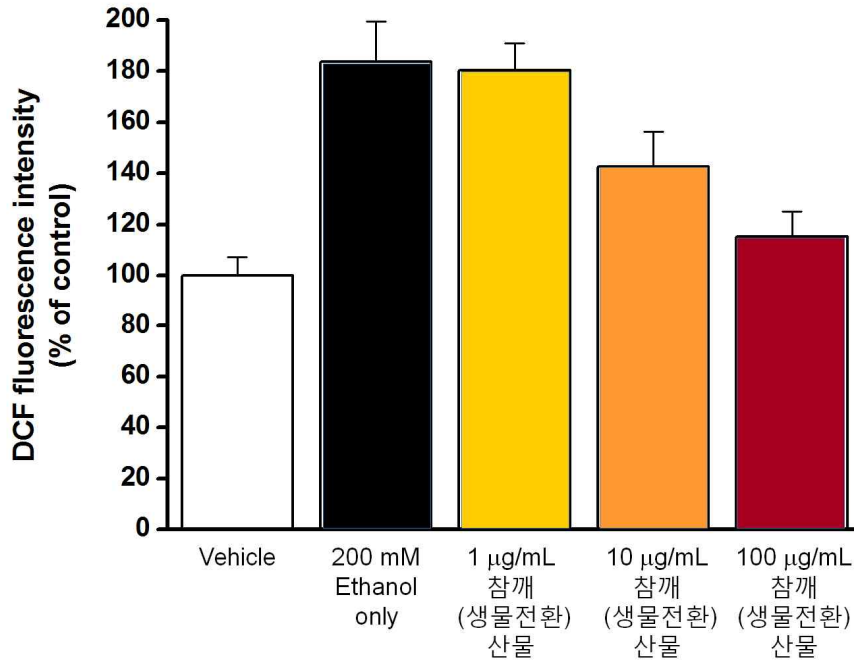


그림 178. 참깨(생물전환)산물의 ROS 발생 억제 효과



## 2. 알코올 투여로 인해 유발된 알코올성 지방간 마우스모델에서 간 보호 효능 평가

### 가. 알코올의 투여로 유도된 지방간 마우스모델에서 간 무게 변화

*in vivo* 실험계에서 농산부산물 3개 개발소재의 알코올성 지방간 억제 효능을 확인하기 위해 Liber-Decarli 액체기본식이를 이용한 에탄올 유도 지방간 마우스모델을 이용하였다. Liber-Decarli 액체 기본식이의 조성은 아래 표와 같으며 일반식이를 공급받는 일반식이군 (normal diets, AIN-93G)과 에탄올식이에 포함된 에탄올과 동일한 열량을 말토덱스트린으로 대체한 대조군 (control diet)을 포함하여 실험하였다. 실험군당 10마리의 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 1주일 적응 후 사용하였으며, 농산부산물 소재는 10 mg/kg 농도로 에탄올식이에 첨가하여 총 8주간 식이하어 에탄올에 의한 지방간 및 간염을 유도하였다. 8주 후 마우스를 희생하여 체중과 간 무게를 측정된 결과, 에탄올식이군의 경우 간의 염증 및 지방간의 발생으로 인하여 간 무게/체중 비율이 정상 마우스 대비 13.0% 증가하는 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물을 투여한 경우 정상 마우스 대비 3.8%, 대두(생물전환)산물을 투여한 경우 2.9%, 참깨(생물전환)산물을 투여한 경우 1.1% 증가하는 것으로 확인되어 세 소재가 모두 간 조직 내 염증 반응 및 지방간 형성을 억제하는 것으로 판단된다.

표 104. Liber-Decarli 액체기본식이의 조성

component	normal diets (g/kg diet)	ethanol diets (g/kg diet)
casein (100 mesh)	41.4	41.4
L-cystein	0.5	0.5
DL-methionine	0.3	0.3
corn oil	8.5	8.5
olive oil	28.4	28.4
safflower oil	2.7	2.7
dextrin maltose	115.2	25.6
cellulose	10.0	10
choline bitartrate	0.53	0.53
xanthan gum	3.0	3.0
salt mix <sup>a</sup>	8.75	8.75
vitamin mix <sup>b</sup>	2.5	2.5
ethanol	0	48

<sup>a</sup>salt mix (g/kg mix): calcium phosphate, dibasic, 500; sodium chloride, 74; potassium citrate, monohydrate, 220; potassium sulfate, 52; magnesium oxide, 24; manganous sulfate H<sub>2</sub>O, 4.6; ferrous sulfate 7H<sub>2</sub>O, 4.95; zinc carbonate, 1.6; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenite, 0.01; chromium potassium sulfate, 0.55; sodium fluoride, 0.06; sucrose, finely powdered, 117.92.

<sup>b</sup>vitamin mix (g/kg mix): thiamin HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; niacin, 3.0; calcium pantothenate, 1.6; folic acid, 0.2; biotin, 0.02; vitamin B12 (0.1%), 10; vitamin A acetate (500,000 IU/g), 4.8; vitamin D3 (400,000 IU/g), 24; menadione sodium bisulfite, 0.08; p-aminobenzoin acid, 5; inositol, 10; dextrose, 939.

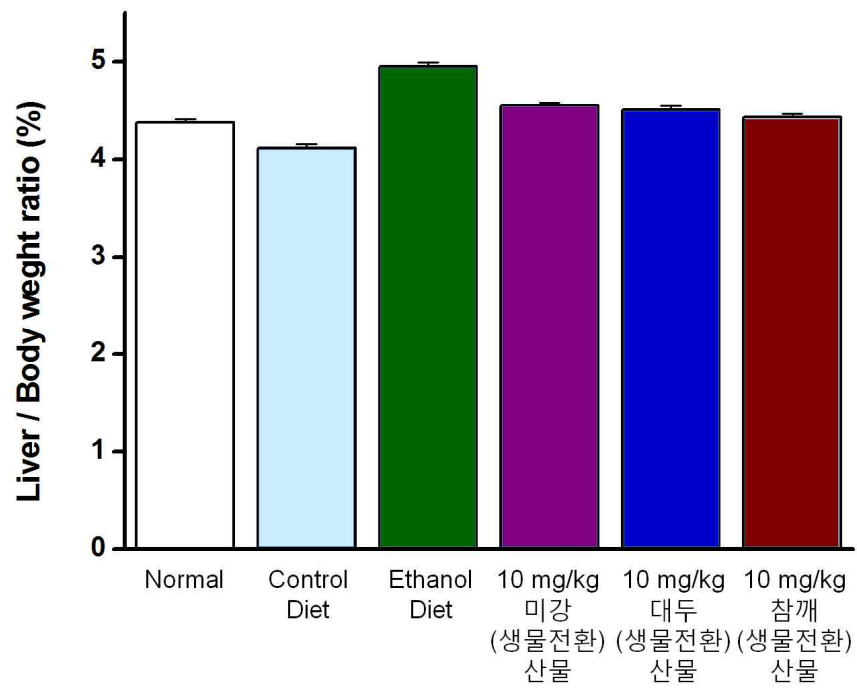


그림 179. 농산부산물 3개의 개발소재의 투여로 인한 간 무게 증가 억제 효과

나. 혈청 내 생화학적 지표 측정

마우스를 희생하여 혈청을 분리한 후, 혈청 내 존재하는 생화학적 지표들을 측정하여 간손상 여부를 확인하였다. GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP, bilirubin을 측정된 결과 에탄올에 의해 간손상이 유도된 마우스는 네 가지 생화학적 지표가 모두 증가하였으나 농산부산물 3개의 개발소재를 각각 에탄올과 함께 투여한 경우에는 정상수치에 가깝게 감소하는 것으로 확인되었다.

표 105. 농산부산물 3개 개발소재가 에탄올에 의해 유도된 간손상 지표에 미치는 효과

Sample	Serum index (U/L)			
	GOT	GPT	$\gamma$ -GTP	billirubin
normal control	63.7 ± 5.2	22.1 ± 1.7	5.56 ± 0.47	0.49 ± 0.03
control diet	58.9 ± 4.9	26.7 ± 1.5	5.53 ± 0.39	0.51 ± 0.04
Ethanol diet-control	75.5 ± 5.9	45.1 ± 3.6	6.38 ± 0.42	0.81 ± 0.05
Ethanol diet-10 mg/kg 미강(생물 전환)산물	62.9 ± 5.1	31.2 ± 2.9	5.80 ± 0.37	0.66 ± 0.04
Ethanol diet-10 mg/kg 대두(생물 전환)산물	63.2 ± 4.4	30.8 ± 3.0	5.77 ± 0.49	0.69 ± 0.03
Ethanol diet-10 mg/kg 참깨(생물 전환)산물	60.3 ± 4.2	28.1 ± 1.4	5.71 ± 0.43	0.60 ± 0.04

#### 다. 간 조직 내 항산화물질의 변화

간 조직 내 대표적 항산화물질인 glutathione (GSH)의 양과 형태를 측정하였다. 환원형 GSH는 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과를 보이지만, 알코올에 의해 간 독성이 유발되면 glutathione이 산화되어 GSSG로 전환되고, 간 독성을 제어하지 못함이 알려져 있다. 알코올을 식이한 마우스의 경우, 총 GSH의 양과 환원형 GSH의 양이 모두 감소되어 있으며 GSSG/GSH 비율 역시 정상 대비 1.38배 증가한 결과를 보였다. 반면 농산부산물 3개 개발소재를 처리한 경우 총 GSH 양의 증가, 환원형 GSH 양의 증가가 일어났으며, 특히 GSSG/GSH 비율은 정상수치에 근접하게 감소하는 것으로 확인되었다.

표 106. 농산부산물 3개 개발소재의 투여가 glutathione의 양과 형태에 미치는 효과

Sample	Total GSH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)	Reduced GSH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)	GSSG/GSH ratio ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)
normal control	4.27 $\pm$ 0.28	3.75 $\pm$ 0.27	0.16 $\pm$ 0.01
control diet	4.95 $\pm$ 0.45	4.30 $\pm$ 0.38	0.17 $\pm$ 0.01
Ethanol diet-control	3.82 $\pm$ 0.29	3.01 $\pm$ 0.21	0.22 $\pm$ 0.02
Ethanol diet-10 mg/kg 미강(생물전환)산물	4.22 $\pm$ 0.30	3.71 $\pm$ 0.39	0.18 $\pm$ 0.01
Ethanol diet-10 mg/kg 대두(생물전환)산물	4.25 $\pm$ 0.41	3.70 $\pm$ 0.26	0.18 $\pm$ 0.01
Ethanol diet-10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	4.41 $\pm$ 0.25	4.08 $\pm$ 0.33	0.17 $\pm$ 0.01

## 라. 간 조직 보호 효과

마우스를 희생한 뒤 간을 적출하여 hematoxyline과 eosin Y로 염색, 조직의 손상 및 지방 축적 정도를 확인하였다. 그 결과, 아래 그림과 같이 정상 마우스와 대조군 식이 마우스는 간 손상 및 지방 축적이 없는데 비해 에탄올 식이 마우스에서는 간 조직의 손상과 출혈, 지방의 축적이 다량으로 일어난 것을 확인하였다. 반면 농산부산물 3개 개발소재를 투여한 경우에는 에탄올에 의한 간 손상이 강하게 억제되는 것으로 나타났으며, 지방 축적 또한 매우 적게 일어나는 것으로 확인되어 세 소재가 모두 간 보호 효과가 뛰어난 것으로 평가되었다.

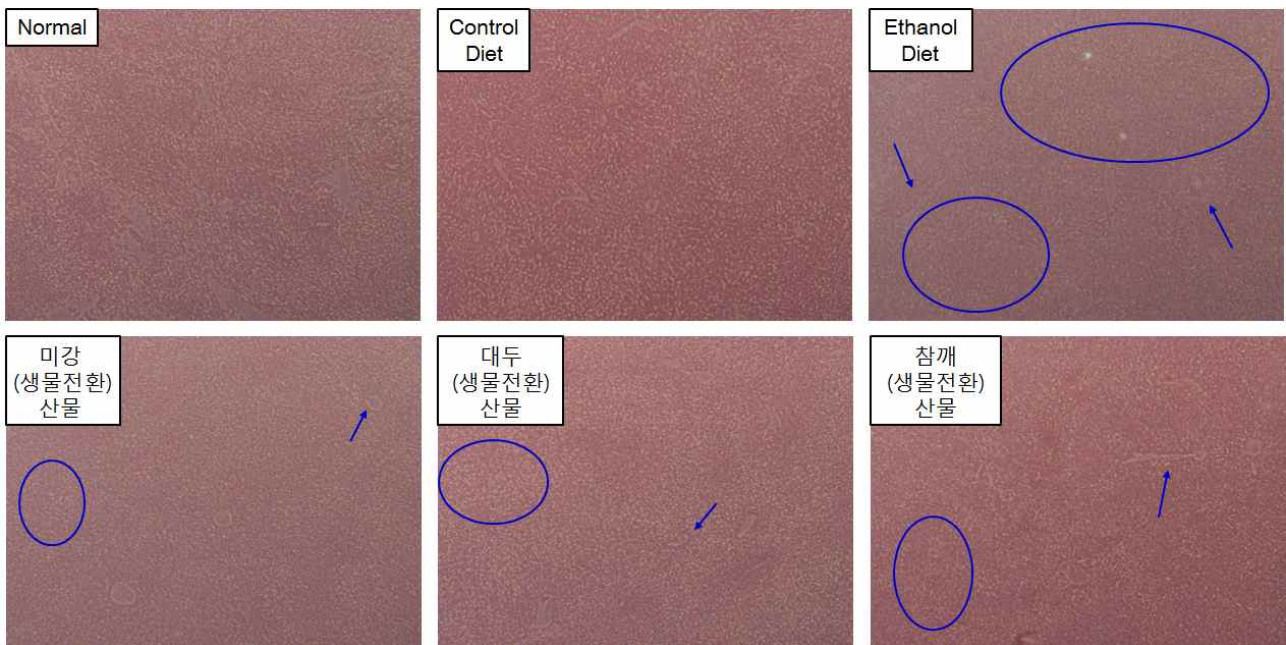


그림 180. 농산부산물 3개 개발소재의 투여로 인한 간 손상 보호 효과

### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 알코올성 지방간/간염 억제 효능 평가에 대한 실험적 의의

농산부산물 3개 개발소재가 갖는 알코올성 지방간에 대한 억제 효과를 확인하였다. 사람의 간암 세포주인 HepG2 세포주에 에탄올을 처리하여 세포의 사멸을 유도하며, 개발소재를 함께 처리하여 세포에 대한 보호 효과를 확인하였다. 그 결과, 참깨(생물전환)산물이 가장 높은 세포 보호 효과를 보이는 것으로 확인되었으며, 에탄올의 처리에 의한 ROS의 생성 역시 가장 많이 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 INS-1 세포주를 이용한 항당뇨 효과의 결과와 마찬가지로, 참깨(생물전환)산물에 존재하는 다양한 항산화 성분들의 생리 활성에 의한 것이라 생각된다.

마우스에 에탄올이 포함된 Liber-Decarli 식이를 투여하여 알코올성 지방간을 유도하고, 개발소재를 함께 식이하여 개발소재의 생체 내 간 보호 효과를 확인하였다. 마우스모델을 이용한 알코올성 지방간 모델에서도 참깨(생물전환)산물이 가장 뛰어난 보호 효과를 갖는 것으로 확인되었으나, 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물과 큰 차이를 나타내지는 않았다. 특히, 3개 개발소재를 투여한 마우스의 경우 모두 간조직 내 대표적 항산화물질인 glutathione의 양과 형태가 조절되어 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 3개 개발소재가 생체 내 산화-항산화 반응을 집적적으로 조절할 수 있는 가능성을 시사한 것으로, 알코올성 지방간 및 간염에 대한 예방, 개선을 위한 건강기능성 식품 소재로서의 높은 가능성을 갖는 것으로 보인다.

# 14절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 골대사 관련 뼈건강 효능 평가

## 1. *in vitro* 효능 평가

### 가. 조골전구세포주를 이용한 분화유도능 평가

농산부산물 3개 개발소재가 골대사 관련 뼈건강에 미치는 효과를 평가하기 위하여, MC3T3-E1 조골전구세포주를 이용한 조골세포 분화유도능을 측정하였다. 조골전구세포의 분화조건 확립을 위하여, 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cell을 접종한 뒤 다양한 조골세포 분화배지를 처리하여 분화를 유도하였으며, 분화유도능이 가장 뛰어난 분화배지를 선택하여 실험에 사용하였다 (Dif\_III).

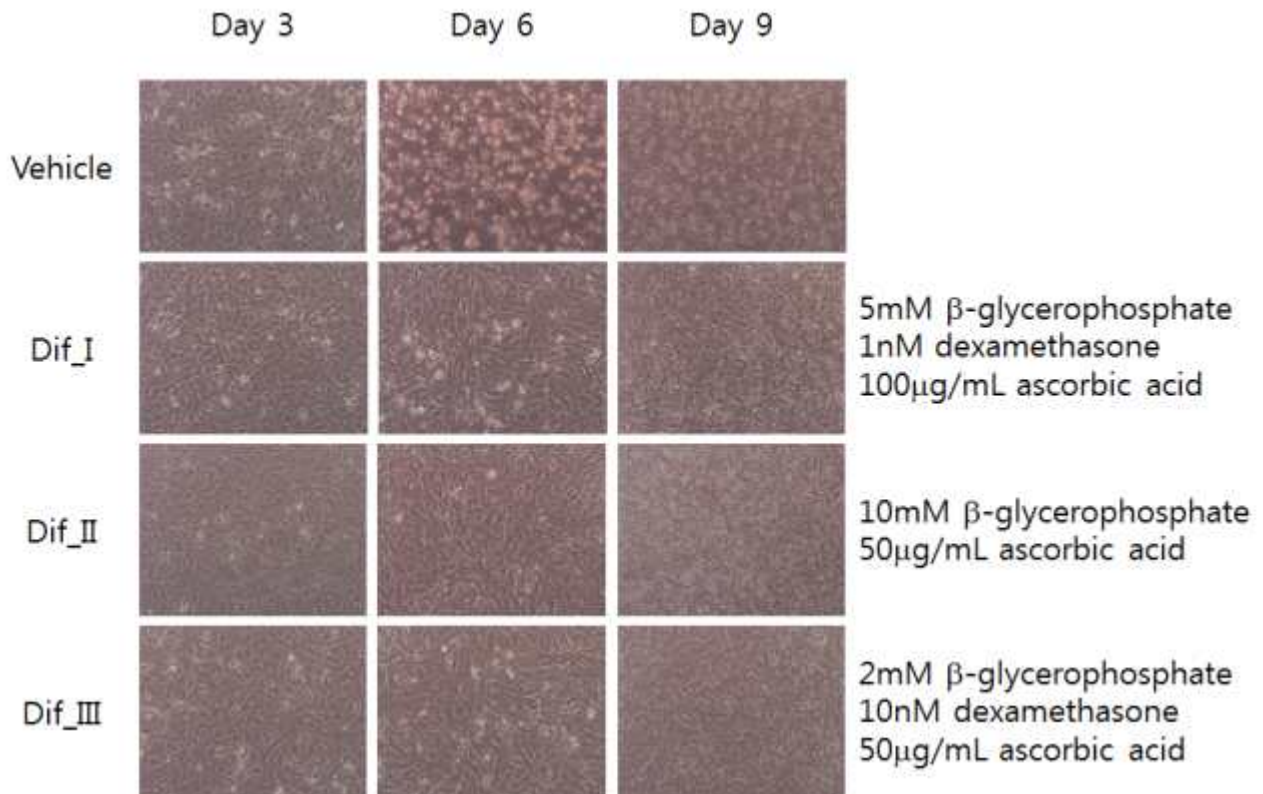


그림 181. 조골세포 분화조건 확립

(1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 조골전구세포 분화유도능 평가

조골전구세포 분화 유도 시 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 농도별로 함께 처리하여 분화 유도에 개 발소제가 미치는 효과를 확인하였다. 조골전구세포에서 조골세포로의 분화 시 특이적으로 나타나는 효 소인 alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 측정하여 분화 정도를 평가하였으며, 그 결과 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 조골세포의 분화를 촉진시키지는 못하는 것으로 확인되었다.

		ALP activity (fold-increase)
	Vehicle	1.00 ± 0.08
	Positive	1.72 ± 0.12
미강 원물	1 µg/mL	1.69 ± 0.15
	10 µg/mL	1.71 ± 0.13
	100 µg/mL	1.74 ± 0.11
미강(생물전환)산물	1 µg/mL	1.70 ± 0.12
	10 µg/mL	1.74 ± 0.15
	100 µg/mL	1.76 ± 0.14

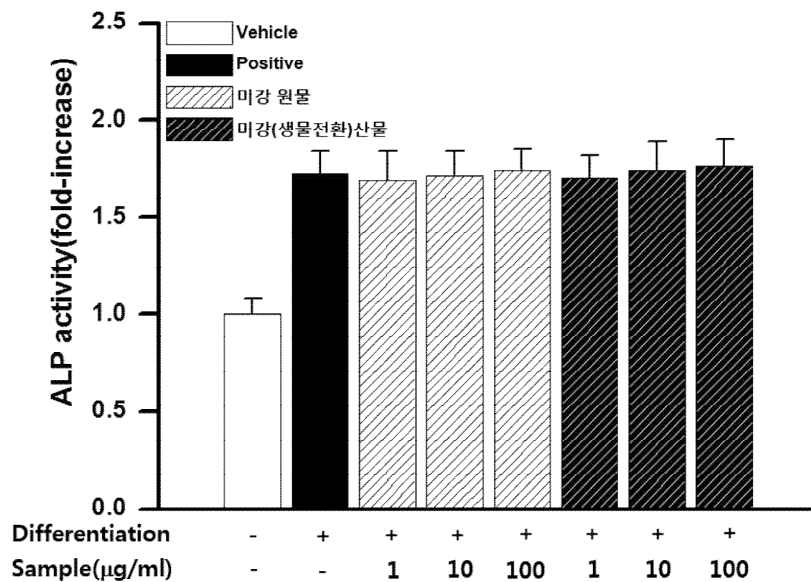


그림 182. 조골세포 분화 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 분화 촉진 효과



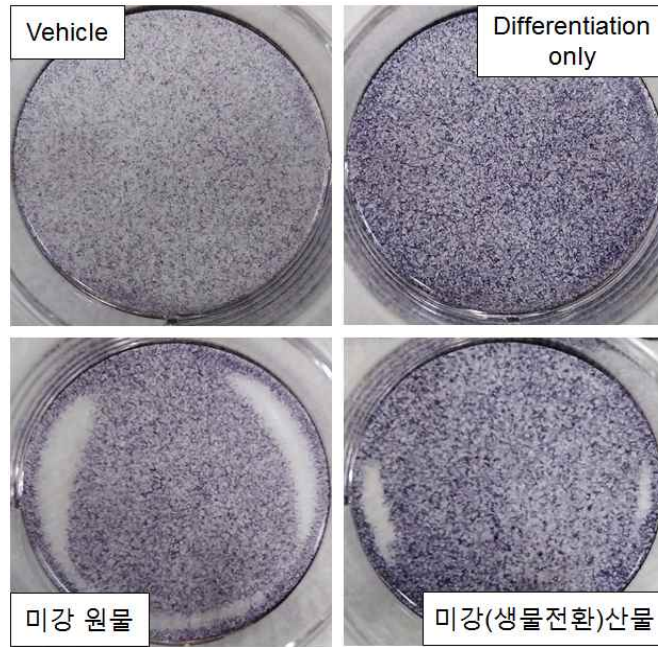


그림 183. 조골세포 분화 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 분화 촉진 효과 (ALP 염색)

(2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 조골세포 분화유도능 평가

대두 원물과 대두(생물전환)산물을 조골세포 분화 시 함께 처리하여 분화유도능을 확인하였다. 원물과 생물전환산물 모두 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 분화를 촉진시키지 못하였으나 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각 10%와 13%, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 각각 22%와 23%의 분화 촉진 효과가 있는 것으로 확인되었다. 원물과 생물전환산물에서 큰 효과 차이를 보이지는 않는 것으로 보아, 대두 원물에 존재하는 생리활성 성분이 생물전환과정 중 유지되어 활성을 나타내는 것으로 보인다.

		ALP activity (fold-increase)
	Vehicle	1.00 $\pm$ 0.08
	Positive	1.72 $\pm$ 0.12
대두 원물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.71 $\pm$ 0.14
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.82 $\pm$ 0.13
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.94 $\pm$ 0.16
대두(생물전환)산물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.72 $\pm$ 0.16
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.85 $\pm$ 0.15
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.95 $\pm$ 0.14

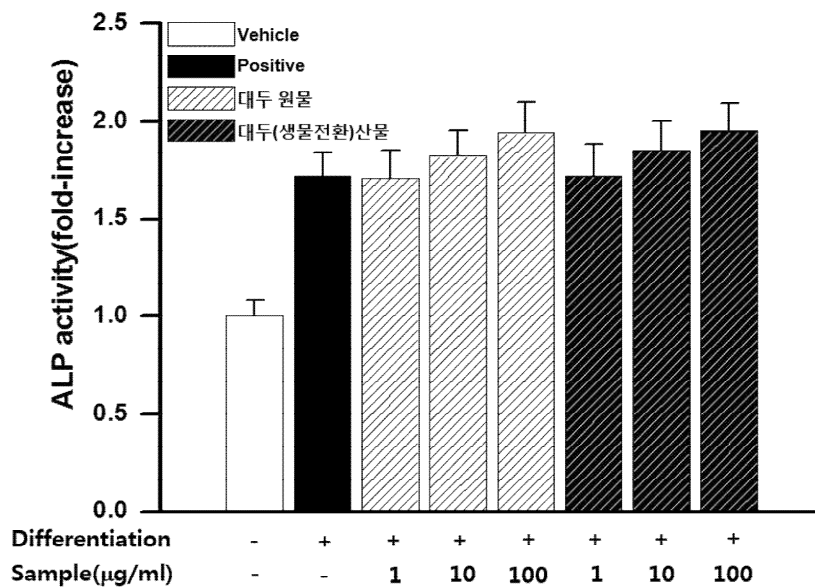


그림 184. 조골세포 분화 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 분화 촉진 효과

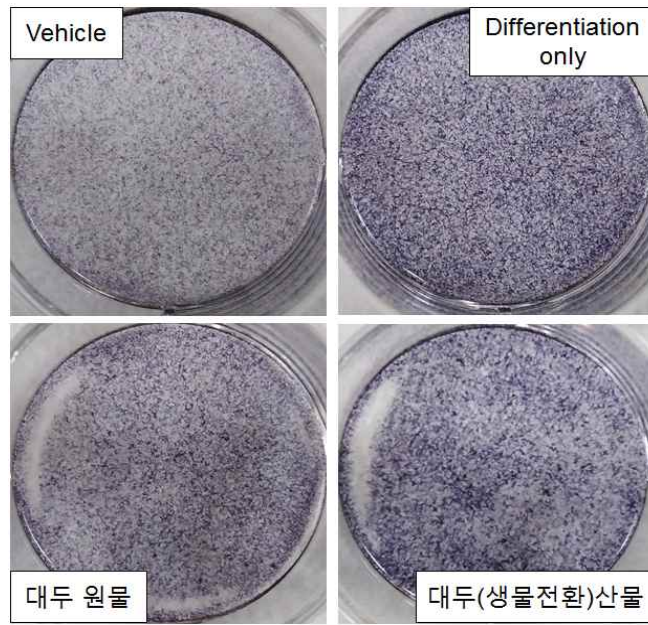


그림 185. 조골세포 분화 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 분화 촉진 효과 (ALP 염색)

(3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 조골전구세포 분화유도능 평가

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물을 조골세포 분화 시 함께 처리하여 분화유도능을 확인한 결과, 원물과 생물전환산물 모두 조골세포로의 분화를 촉진시키지 못하는 것으로 확인되었다.

		ALP activity (fold-increase)
Vehicle		1.00 ± 0.08
Positive		1.72 ± 0.12
참깨 원물	1 µg/mL	1.70 ± 0.11
	10 µg/mL	1.73 ± 0.15
	100 µg/mL	1.74 ± 0.16
참깨(생물전환)산물	1 µg/mL	1.71 ± 0.13
	10 µg/mL	1.72 ± 0.17
	100 µg/mL	1.73 ± 0.13

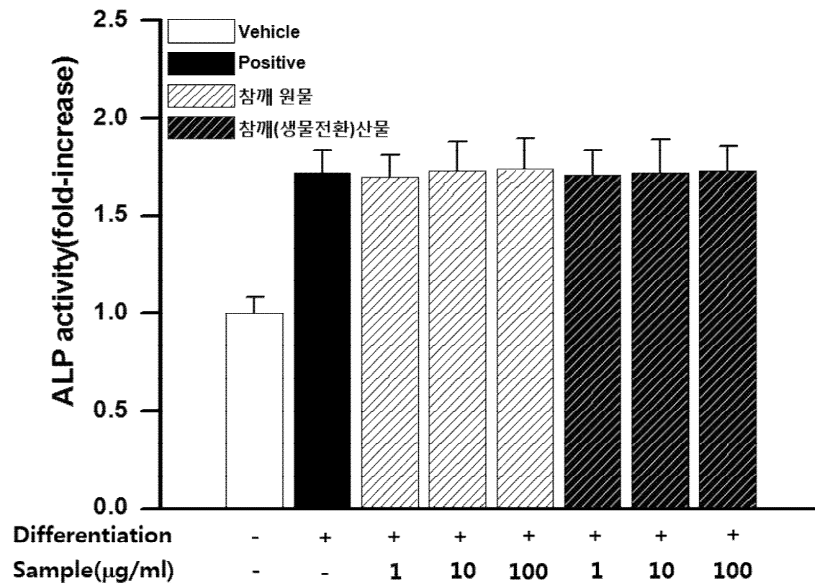


그림 186. 조골세포 분화 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 분화 촉진 효과

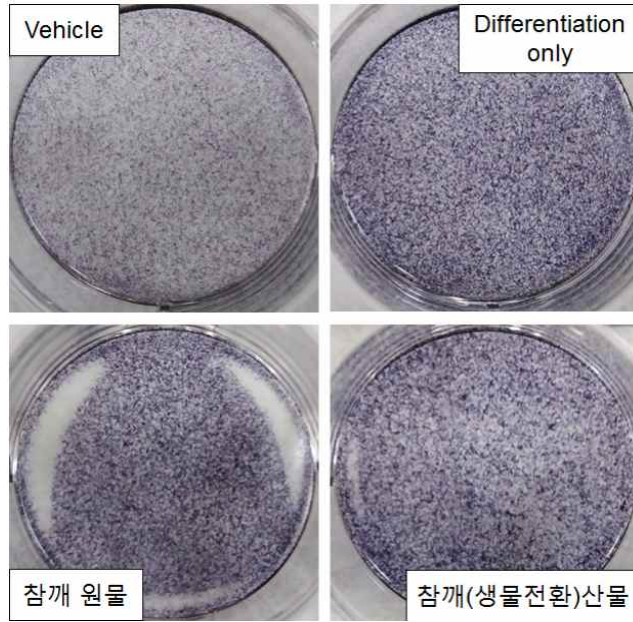


그림 187. 조골세포 분화 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 분화 촉진 효과 (ALP 염색)

#### 나. 대식세포주를 이용한 파골세포 분화억제능 평가

농산부산물 3개 개발소재가 골대사를 조절하는 또 하나의 세포인자인 파골세포에 미치는 효과를 확인하기 위하여, RAW264.7 마우스 대식세포주를 이용한 파골세포 분화억제능을 측정하였다. 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cells/well의 농도로 세포 접종 후 24시간 배양하였다. 이후, 100 ng/mL의 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)를 배지에 희석하여 처리하였으며, 2일마다 배지를 교환하며 5일간 파골세포의 분화를 유도하였다. 분화 종료 후 tartrate-resistance acidic phosphatase (TRAP) 염색법을 이용하여 파골세포의 분화 정도를 확인하였다.

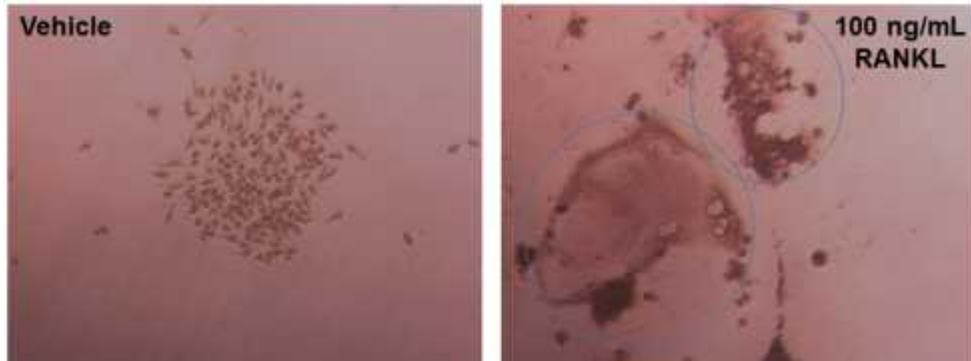


그림 188. 파골세포 분화조건 확립

(1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 파골세포 분화억제능 평가

RANKL를 처리하여 대식세포의 파골세포 분화 시, 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 함께 처리하여 파골세포 분화에 미치는 효과를 확인하였다. 그 결과, 미강 원물은 파골세포로의 분화를 억제하는 효과를 보이지 않았으나, 미강(생물전환)산물 처리 시 파골세포로의 분화가 거의 일어나지 않아 미강(생물전환)산물은 파골세포로의 분화를 억제하는 것으로 확인되었으며, 대식세포의 활성화 형태를 가지는 것으로 확인되었다.

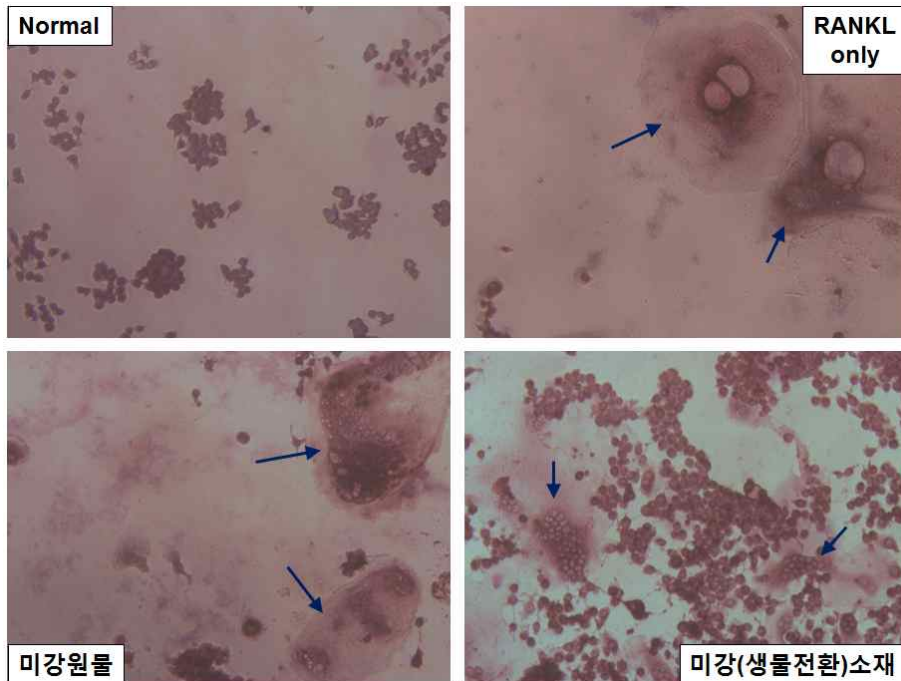


그림 189. 파골세포 분화시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 처리에 따른 파골세포 분화 억제 효과

(2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 파골세포 분화억제능 평가

파골세포 분화 시, 대두 원물과 대두(생물전환)산물을 함께 처리하여 파골세포 분화억제능을 확인하였다. 대두 원물은 파골세포로의 분화를 억제하는 효과를 보이지 않았으나, 대두(생물전환)산물은 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 파골세포로의 분화를 억제하는 것으로 확인되었으며, 이는 대식세포를 강하게 활성화 시킴으로 인하여 파골세포로의 분화를 강하게 억제하는 것으로 판단된다.

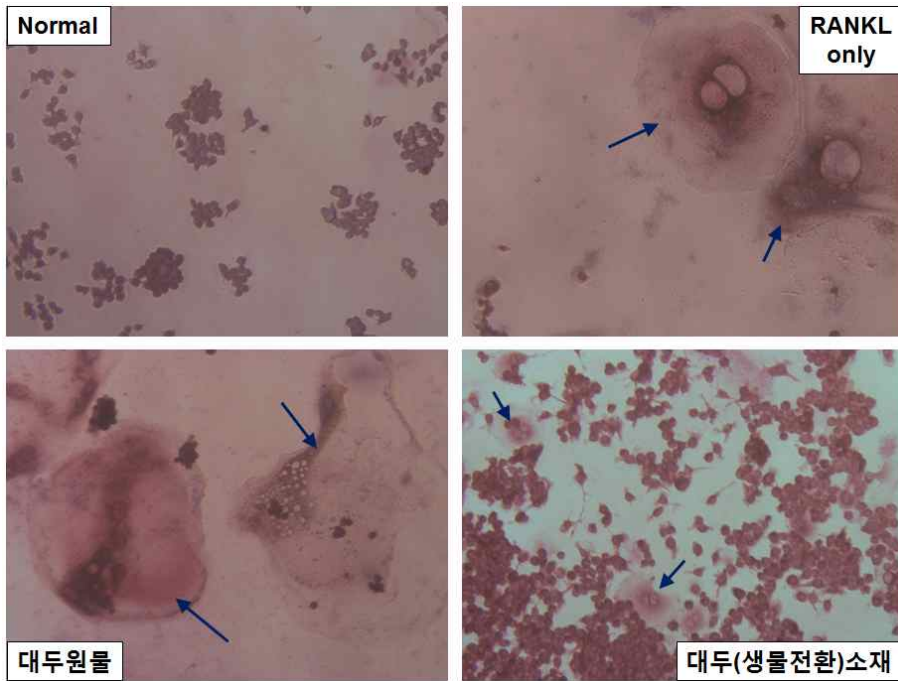


그림 190. 파골세포 분화시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 처리에 따른 파골세포 분화 억제 효과



(3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 파골세포 분화억제능 평가

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물의 파골세포 분화 억제 효과를 확인한 결과, 참깨 원물은 파골세포 분화를 억제하지 못하는 것으로 확인되었고, 참깨(생물전환)산물은 파골세포로의 분화를 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, 다른 두 개발소재와 마찬가지로 대식세포를 강하게 활성화를 시킴으로 인하여 파골세포로의 분화를 강하게 억제하는 것으로 판단된다.

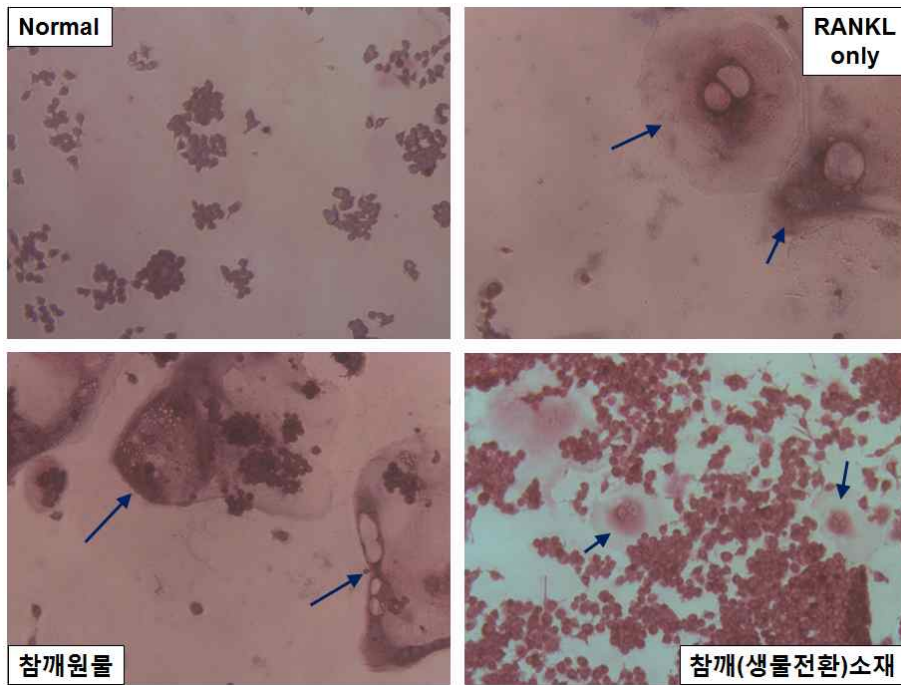


그림 191. 파골세포 분화시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 처리에 따른 파골세포 분화 억제 효과

## 2. 골다공증 마우스모델에서 골대사 관련 효능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 뼈건강 증진 효과를 생체 수준에서 평가하기 위하여 난소적출 골다공증 마우스모델을 제작하였다. 실험군당 10마리의 8주령 암컷 ddY 마우스를 사용하였으며, 1주일 적응 후 마우스에서 난소를 적출하였다. 난소 적출 1주일 후부터 10 mg/kg의 투여량으로 개발소재를 식이투여 하였다. 총 4주간 식이투여 후 마우스를 희생하고 대퇴골과 경골을 채취하여 무게, 길이, 골밀도와 골강도를 측정하였으며, 혈청 내 osteocalcin의 양과 칼슘, 인의 양을 확인하여 골대사에 미치는 효과를 평가하였다.

### 가. 골다공증 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 골다공증 억제 효과

#### (1) 대퇴골과 경골의 무게 변화 측정

난소적출을 통해 골다공증을 유도하고 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 4주간 식이한 마우스에서 대퇴골과 경골의 무게를 측정하여 골다공증 억제 효과를 확인하였다. Sham 마우스에 비해 난소적출 마우스의 경우 대퇴골과 경골 모두에서 체중 대비 골질량의 비율이 큰폭으로 감소한 것으로 보아 난소적출로 인한 골다공증이 효과적으로 유도된 것으로 확인된다. 그러나 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서 골질량의 회복은 보이지 않았다.

표 107. 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 골질량의 변화

Sample	Absolute bone weight (g)		Relative bone weight (% vs body weight)	
	대퇴골	경골	대퇴골	경골
Sham	0.071 ± 0.005	0.052 ± 0.004	0.272 ± 0.013	0.202 ± 0.016
Positive control	0.062 ± 0.005	0.041 ± 0.004	0.208 ± 0.011	0.153 ± 0.011
10 mg/kg 미강 원물	0.064 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.206 ± 0.012	0.155 ± 0.013
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	0.063 ± 0.003	0.042 ± 0.002	0.208 ± 0.015	0.157 ± 0.016

(2) 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과

골다공증 유발로 인해 대퇴골과 경골의 두께와 길이에 미치는 효과를 확인하였다. 대퇴골과 경골 모두 골 두께의 감소가 유발되는 것을 확인하였으나, 골다공증이 유발되더라도 골 길이는 큰 변화가 보이지 않는 것으로 확인되었다. 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 투여한 경우에도 골 두께의 회복은 보이지 않았다.

표 108. 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 골 두께와 골 길이의 변화

Sample	Bone thickness (mm)		Bone length (mm)	
	대퇴골	경골	대퇴골	경골
Sham	1.81 ± 0.11	1.95 ± 0.16	16.12 ± 1.12	19.10 ± 1.67
Positive control	1.41 ± 0.12	1.72 ± 0.15	16.05 ± 1.38	18.99 ± 1.54
10 mg/kg 미강 원물	1.45 ± 0.10	1.74 ± 0.11	16.10 ± 1.52	19.02 ± 1.44
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	1.44 ± 0.08	1.70 ± 0.13	16.03 ± 0.89	18.96 ± 1.09

(3) 골 밀도와 골 강도에 미치는 효과

골다공증으로 유발되는 대퇴골의 골밀도 감소와 경골의 골강도 감소에 미강 원물 및 미강(생물전환)산물이 미치는 효과를 확인하였다. 대퇴골의 골밀도는 골다공증이 진행됨에 따라 약 45% 감소하였으며 경골의 골강도는 약 48.5% 감소하였다. 하지만, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 투여 시 골밀도와 골강도의 변화는 보이지 않았다.

표 109. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 대퇴골 골밀도와 경골 골강도의 변화

Sample	대퇴골 골밀도 (mg/cm <sup>2</sup> )	경골 골강도 (N)
Sham	0.71 ± 0.05	1.73 ± 0.15
Positive control	0.39 ± 0.02	0.89 ± 0.06
10 mg/kg 미강 원물	0.41 ± 0.03	0.92 ± 0.04
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	0.38 ± 0.02	0.94 ± 0.05

(4) 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

혈청 내 골대사 관련 지표인 osteocalcin의 양과 칼슘, 인의 양을 확인하여 골다공증 억제 효과를 확인하였다. 골소실의 지표인 osteocalcin의 양은 골다공증 유발 시 약 1.6배 증가하였으며 칼슘과 인의 양은 각각 40%와 44% 감소하는 것으로 확인되었다. 이전 결과와 마찬가지로 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 투여한 경우 골다공증 억제 효과를 확인할 수 없었다.

표 110. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

Sample	Osteocalcin level (ng/mL)	Ca level (mg/dL)	P level (mg/dL)
Sham	22.31 ± 1.58	13.10 ± 1.15	13.03 ± 1.26
Positive control	36.18 ± 2.51	7.89 ± 0.63	7.26 ± 0.55
10 mg/kg 미강 원물	35.72 ± 1.50	7.93 ± 0.56	7.38 ± 0.63
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	35.06 ± 2.63	8.01 ± 0.73	7.29 ± 0.58

나. 골다공증 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 골다공증 억제 효과

(1) 대퇴골과 경골의 무게 변화 측정

대두 원물과 대두(생물전환)산물을 투여한 골다공증 유도 마우스에서 대두 원물과 대두(생물전환)산물의 골질량 감소 억제 효과를 확인하였다. 골다공증 유도 시 체중 대비 대퇴골의 무게는 23.5% 감소하였고 체중 대비 경골의 무게는 24.2% 감소하였으나 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 감소율이 각각 12.9%와 10.9%로 회복되는 것으로 확인되어 대두 원물과 대두(생물전환)산물의 투여로 인해 골다공증의 유도가 억제된 것으로 평가된다.

표 111. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 골질량의 변화

Sample	Absolute bone weight (g)		Relative bone weight (% vs body weight)	
	대퇴골	경골	대퇴골	경골
Sham	0.071 ± 0.005	0.052 ± 0.004	0.272 ± 0.013	0.202 ± 0.016
Positive control	0.062 ± 0.005	0.041 ± 0.004	0.208 ± 0.011	0.153 ± 0.011
10 mg/kg 대두 원물	0.068 ± 0.005	0.046 ± 0.001	0.253 ± 0.017	0.176 ± 0.011
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	0.067 ± 0.006	0.046 ± 0.004	0.251 ± 0.022	0.180 ± 0.015

(2) 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물 투여 시 대퇴골과 경골의 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과를 확인하였다. 미강 원물과 미강(생물전환)산물 투여시의 결과와 마찬가지로 골다공증 유도 시에도 골 길이에 는 차이를 보이지 않았으나, 골다공증으로 인해 유발된 골 두께의 감소에 대해 대두 원물과 대두(생물전환)산물 투여시 효과적으로 회복되는 것이 확인되었다.

표 112. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 골 두께와 골 길이의 변화

Sample	Bone thickness (mm)		Bone length (mm)	
	대퇴골	경골	대퇴골	경골
Sham	1.81 ± 0.11	1.95 ± 0.16	16.12 ± 1.12	19.10 ± 1.67
Positive control	1.41 ± 0.12	1.72 ± 0.15	16.05 ± 1.38	18.99 ± 1.54
10 mg/kg 대두 원물	1.69 ± 0.15	1.82 ± 0.08	16.11 ± 1.10	19.05 ± 0.89
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	1.70 ± 0.09	1.85 ± 0.14	16.09 ± 0.96	19.01 ± 1.06

(3) 골 밀도와 골 강도에 미치는 효과

대두 원물과 대두(생물전환)산물 투여 시 대퇴골의 골밀도와 경골의 골강도를 측정하였다. 골다공증 유도 시 45% 감소한 골밀도가 대두 원물 투여 시 15.5% 감소로 회복되었으며 대두(생물전환)산물 투여 시에는 12.7% 감소로 회복되는 것으로 확인되었다. 또한 경골의 골강도 역시 골다공증 유발로 인해 48.5% 감소하였으나 원물과 생물전환산물 투여 시 각각 22%와 18.5% 감소로 회복되는 것으로 확인되었다.

표 113. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 대퇴골 골밀도와 경골 골강도의 변화

Sample	대퇴골 골밀도 (mg/cm <sup>2</sup> )	경골 골강도 (N)
Sham	0.71 ± 0.05	1.73 ± 0.15
Positive control	0.39 ± 0.02	0.89 ± 0.06
10 mg/kg 대두 원물	0.60 ± 0.04	1.35 ± 0.11
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	0.62 ± 0.03	1.41 ± 0.09

(4) 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

대두 원물과 대두(생물전환)산물을 투여한 골다공증 마우스에서 혈청 내 골대사 관련 지표들을 확인하였다. 혈청 내 osteocalcin의 경우, 골다공증 대조군에서 1.6배 증가하였으나 대두 원물과 대두(생물전환)산물 투여 시에는 1.4배와 1.3배로 회복되는 것으로 확인되었으며, 칼슘과 인 역시 정상수준에 근접하게 회복되는 것으로 확인되었다.

표 114. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

Sample	Osteocalcin level (ng/mL)	Ca level (mg/dL)	P level (mg/dL)
Sham	22.31 ± 1.58	13.10 ± 1.15	13.03 ± 1.26
Positive control	36.18 ± 2.51	7.89 ± 0.63	7.26 ± 0.55
10 mg/kg 대두 원물	30.72 ± 2.79	11.25 ± 1.05	10.87 ± 0.89
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	28.68 ± 1.51	11.58 ± 0.96	11.01 ± 0.91

다. 골다공증 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 골다공증 억제 효과

(1) 대퇴골과 경골의 무게 변화 측정

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 투여 시 골다공증으로 인한 골질량의 변화를 측정하였으며, 원물과 생물전환산물 모두 골질량의 감소를 억제하는 효과는 없는 것으로 확인되었다.

표 115. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 골질량의 변화

Sample	Absolute bone weight (g)		Relative bone weight (% vs body weight)	
	대퇴골	경골	대퇴골	경골
Sham	0.071 ± 0.005	0.052 ± 0.004	0.272 ± 0.013	0.202 ± 0.016
Positive control	0.062 ± 0.005	0.041 ± 0.004	0.208 ± 0.011	0.153 ± 0.011
10 mg/kg 참깨 원물	0.061 ± 0.005	0.042 ± 0.003	0.206 ± 0.021	0.154 ± 0.016
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	0.060 ± 0.003	0.043 ± 0.003	0.209 ± 0.020	0.157 ± 0.014

(2) 골 두께 및 골 길이에 미치는 효과

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 투여 시 대퇴골과 경골의 골 두께, 골 길이의 변화를 측정하였다. 골다공증의 유발로 인해 감소한 대퇴골과 경골의 골 두께에서, 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물의 투여로 인한 회복 효과는 나타나지 않았다.

표 116. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 골 두께와 골 길이의 변화

Sample	Bone thickness (mm)		Bone length (mm)	
	대퇴골	경골	대퇴골	경골
Sham	1.81 ± 0.11	1.95 ± 0.16	16.12 ± 1.12	19.10 ± 1.67
Positive control	1.41 ± 0.12	1.72 ± 0.15	16.05 ± 1.38	18.99 ± 1.54
10 mg/kg 참깨 원물	1.46 ± 0.07	1.75 ± 0.09	16.06 ± 1.02	18.97 ± 0.94
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	1.43 ± 0.10	1.73 ± 0.06	16.08 ± 1.31	19.03 ± 1.05

(3) 골 밀도와 골 강도에 미치는 효과

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 투여 시 대퇴골의 골밀도와 경골의 골강도에 미치는 효과를 확인하였다. 골다공증의 유발로 인해 대퇴골의 골밀도와 경골의 골강도가 감소하였으며, 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 투여로 인한 회복 효과는 나타나지 않았다.

표 117. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 대퇴골 골밀도와 경골 골강도의 변화

Sample	대퇴골 골밀도 (mg/cm <sup>2</sup> )	경골 골강도 (N)
Sham	0.71 ± 0.05	1.73 ± 0.15
Positive control	0.39 ± 0.02	0.89 ± 0.06
10 mg/kg 참깨 원물	0.40 ± 0.03	0.88 ± 0.05
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	0.42 ± 0.02	0.95 ± 0.04

(4) 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 투여 시 골다공증 유발로 인한 혈청 내 골대사 관련 지표를 확인하였다. osteocalcin의 양과 칼슘, 인의 양을 측정된 결과 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물의 투여가 골대사의 회복을 유도하지는 못하는 것으로 확인되었다.

표 118. 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물을 투여한 난소적출 골다공증 마우스에서 혈청 내 골대사 관련 지표의 확인

Sample	Osteocalcin level (ng/mL)	Ca level (mg/dL)	P level (mg/dL)
Sham	22.31 ± 1.58	13.10 ± 1.15	13.03 ± 1.26
Positive control	36.18 ± 2.51	7.89 ± 0.63	7.26 ± 0.55
10 mg/kg 참깨 원물	34.98 ± 2.56	8.23 ± 0.72	7.59 ± 0.61
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	35.83 ± 2.41	8.09 ± 0.77	7.76 ± 0.62



### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 골다사 관련 뼈건강 효능 평가에 대한 실험적 의의

미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물에 대한 골다공증 억제 효과를 평가하였다. 조골전구세포주인 MC3T3-E1에 대한 분화 유도 촉진 능력을 확인한 결과, 상기 3개 개발소재 모두 조골세포로의 분화를 촉진시키지는 못하는 것으로 확인되었다. 반면에, 대식세포주를 이용한 파골세포의 분화 시, 3개 개발소재를 함께 처리할 경우 대식세포의 활성화로 인한 파골세포로의 분화가 억제되는 결과를 확인하였다.

난소적출로 유도되는 골다공증 마우스모델에서 각 소재의 *in vivo* 골다공증 억제 효과를 측정된 결과, 대두 원물과 대두(생물전환)산물에서 골다공증의 유도가 저해되는 효과를 확인하였고 나머지 두 소재의 원물 및 생물전환산물의 경우 골다공증의 유도를 억제하지 못하는 것으로 평가되었다. 대두 원물과 대두(생물전환)산물에서 효과 차이가 보이지 않는 것으로 볼 때, 대두 원물 내 존재하는 isoflavone의 골다공증 억제 효능이 생물전환공정을 통해서도 변화하거나 파괴되지 않고 유지되는 것으로 보이며 새로이 만들어지는 비배당체의 활성이 추가되지는 않는 것으로 평가된다.

다만, 본 연구에 사용한 골다공증 유도 모델이 난소적출로 인해 발생하는 에스트로겐 부족에 의한 조골세포/파골세포 조절 실패로 유도되는 것이기 때문에, 파골세포의 분화를 억제할 수 있는 생물전환산물의 활성을 온전히 반영하는 결과라고 볼 수 없다. 따라서 대두 isoflavone의 활성과 더불어 대두(생물전환)산물이 갖는 파골세포 분화 억제 효능에 따른 시너지 효과에 대한 평가가 필요하다. 현재 이용되는 골다공증 유도 동물모델의 경우 난소적출 또는 고령의 설치류에 저칼슘 식이를 통해 유도하는 방법이며, 두 모델 모두 파골세포 분화 억제에 따른 골다공증 완화 효과를 보기 어렵다는 한계가 있다. 따라서 대두(생물전환)산물의 경우 실제 골다공증 질환에 사용하였을 경우 본 연구에서 확인한 효과보다 더 큰 효과를 나타낼 가능성이 높을 것으로 평가된다.

## 15절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 알레르기비염/천식 관련 효능 평가

### 1. *in vitro* 효능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 알레르기비염/천식 관련 효능 평가를 위하여, 사람의 B 세포주인 U266.B1 세포주를 이용하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 농도로 접종한 U266.B1 세포주에  $10 \mu\text{g/mL}$ 의 LPS와  $5 \text{ ng/mL}$ 의 IL-4를 72시간 동안 처리하여 IgE의 생성을 유도하였으며, 자극시 개발소재를 함께 처리하여 IgE 생성 억제에 미치는 개발소재의 효과를 평가하고자 하였다.

#### 가. B세포주에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능 평가

B 세포주의 자극에 따른 IgE 발현 시, 미강(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능을 확인하였다. 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 자극원과 함께 처리한 결과, 미강 원물에서는 최대  $100 \mu\text{g/mL}$  농도에서 15.7%의 IgE 생성 억제 효과를 갖는 것으로 나타났으며, 미강(생물전환)산물에서는 동일 농도에서 60.4%의 억제 효과를 갖는 것으로 확인되었다.

		IgE production (ng/ml)
	Vehicle	$13.273 \pm 1.208$
	Positive	$516.902 \pm 37.652$
미강 원물	$1 \mu\text{g/mL}$	$509.722 \pm 43.758$
	$10 \mu\text{g/mL}$	$476.249 \pm 35.113$
	$100 \mu\text{g/mL}$	$437.891 \pm 31.925$
미강(생물전환)산물	$1 \mu\text{g/mL}$	$431.105 \pm 32.284$
	$10 \mu\text{g/mL}$	$265.630 \pm 12.279$
	$100 \mu\text{g/mL}$	$212.508 \pm 14.317$

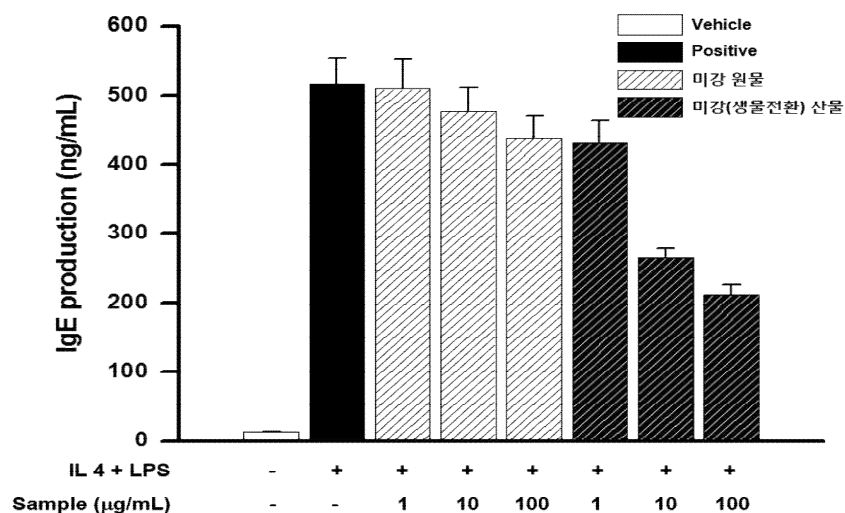


그림 192. U266.B1 B 세포주에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물이 IgE 생성에 미치는 효과

나. B세포주에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능 평가

대두(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능을 평가한 결과, 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 원물에 비하여 생물전환산물의 억제 효율이 월등히 높은 것으로 확인되었다.

		IgE production (ng/ml)
	Vehicle	12.016 ± 1.114
	Positive	523.943 ± 40.281
대두 원물	1 µg/mL	506.912 ± 34.206
	10 µg/mL	467.265 ± 28.910
	100 µg/mL	443.994 ± 24.656
대두(생물전환)산물	1 µg/mL	438.031 ± 31.307
	10 µg/mL	273.915 ± 15.634
	100 µg/mL	230.014 ± 11.030

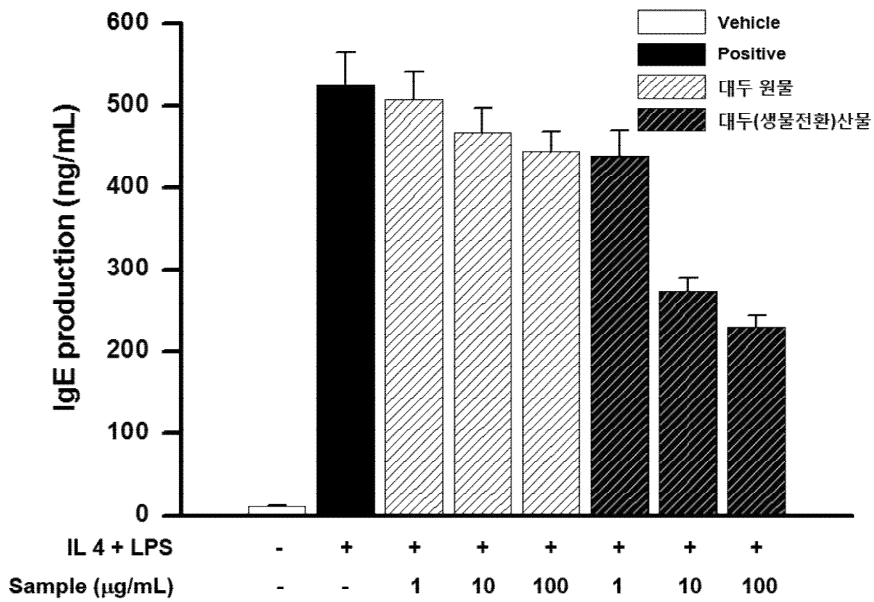


그림 193. U266.B1 B 세포주에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물이 IgE 생성에 미치는 효과

다. B세포주에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능 평가

참깨(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효능을 평가한 결과, 다른 두 개발소재와 같이 원물에 비하여 생물 전환시 B 세포의 IgE 생성을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 평가되었다.

		IgE production (ng/ml)
Vehicle		12.016 ± 1.114
Positive		523.943 ± 40.281
참깨 원물	1 µg/mL	509.253 ± 28.024
	10 µg/mL	458.039 ± 31.627
	100 µg/mL	431.251 ± 28.669
참깨(생물전환)산물	1 µg/mL	428.330 ± 31.053
	10 µg/mL	261.328 ± 17.421
	100 µg/mL	221.030 ± 11.058

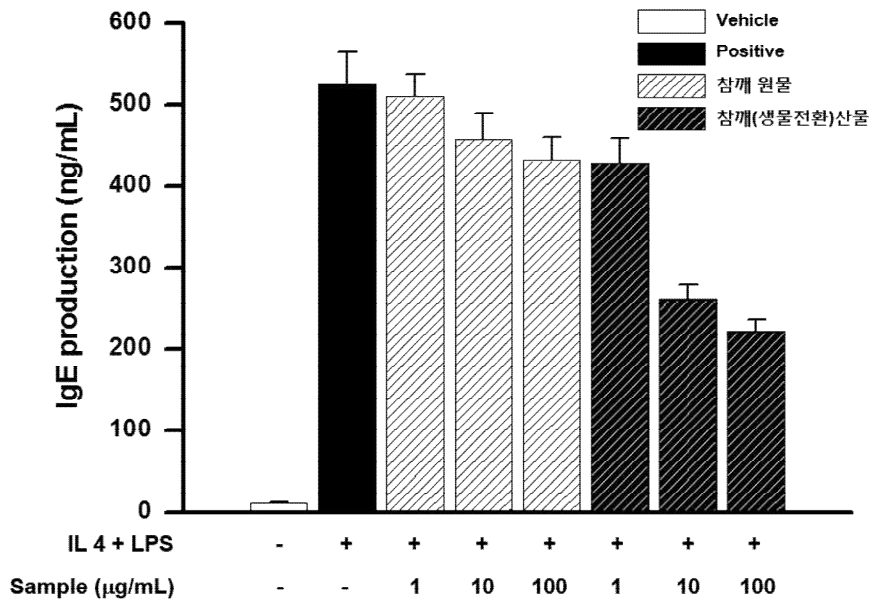


그림 194. U266.B1 B 세포주에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 IgE 생성에 미치는 효과

3개 개발소재 모두 원물에 비해 생물전환시 IgE 생성 억제 효율이 급격하게 증가하는 것으로 확인되었으며, 이는 생물전환산물이 갖는 Th1 면역반응 활성화에 의한 것으로 판단된다.

## 2. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 효능 평가

개발소재의 알레르기비염/천식 억제 효과를 생체 내에서 평가하기 위하여, 알레르기비염/천식 유발 마우스 모델을 제작하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 1주일 적응 후 사용하였으며, 0.2 ml의 1% aluminium hydroxide에 현탁한 20 ug의 OVA를 1주일 간격으로 총 3회 복강주사하여 OVA에 대한 감작을 유도하였다. 이후 2주간 개발소재를 10 mg/kg의 1일 투여량으로 식이투여 하였으며, 2주간의 투여기간이 끝나기 5일간 매일 30분씩 1%의 OVA를 흡입하게 하여 알레르기비염/천식을 유도하였다. 이후 마우스를 희생하여 염증 및 알러지 반응의 지표를 확인하였다.

### 가. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 억제 효능 평가

#### (1) 기관지폐포세척액(BALF) 내 IgE 생성 억제 효과

미강(생물전환)산물 식이 후 알레르기비염/천식이 유도된 마우스에서 기관지폐포세척액(BALF)을 분리하여 BALF 내 존재하는 IgE의 양을 측정하였다. 그 결과, 미강(생물전환)산물 투여 시 IgE의 생성이 68.8% 억제되는 것으로 확인되었고, 대조군으로 사용한 미강 원물에 비해 미강(생물전환)산물에서 뛰어난 IgE 생성 억제 효능을 보이는 것으로 확인되었다.

		IgE production (ng/ml)
Normal		4.229 ± 0.261
OVA only		172.594 ± 12.504
10 mg/kg	미강 원물	120.915 ± 10.994
10 mg/kg	미강(생물전환)산물	56.779 ± 4.283

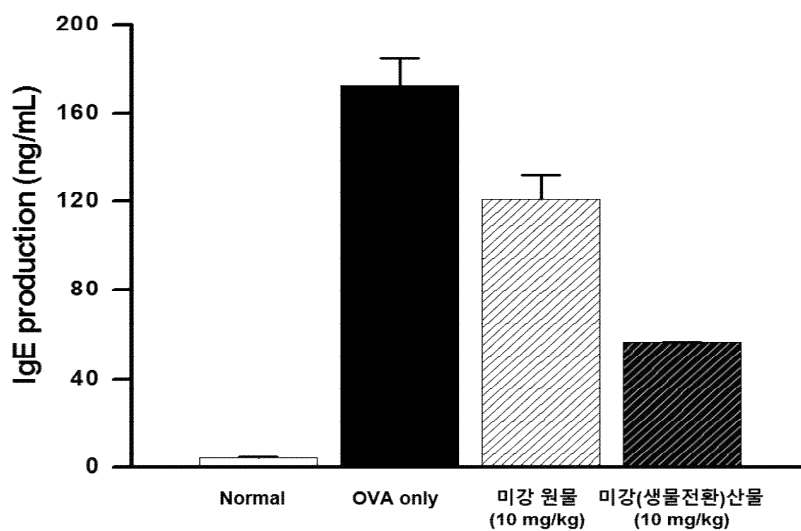


그림 195. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여로 인한 BALF 내 IgE 생성 억제 효과

(2) BALF 내 총 세포수 및 세포 population에 미치는 효과

염증반응의 결과로 유도되는 BALF 내 세포 유입과 증식에 미강(생물전환)산물이 미치는 효과를 확인하였다. BALF 내 총 세포수를 측정된 결과, 알레르기비염/천식의 유도으로 인해 유입 및 증식하는 세포의 수가 미강(생물전환)산물의 투여로 인해 감소하는 효과를 확인하였다. 또한, giemsa 염색을 통하여 BALF내 존재하는 세포의 종류를 확인한 결과, 림프구와 호중구, 호산구의 유입 및 증식은 억제하였으나 대식세포의 유입과 증식은 억제하지 않는 것으로 확인되었다.

		Total cell counting (x10 <sup>6</sup> )
Normal		0.4 ± 0.1
OVA only		1.6 ± 0.2
10 mg/kg	미강 원물	1.4 ± 0.1
10 mg/kg	미강(생물전환)산물	1.1 ± 0.1

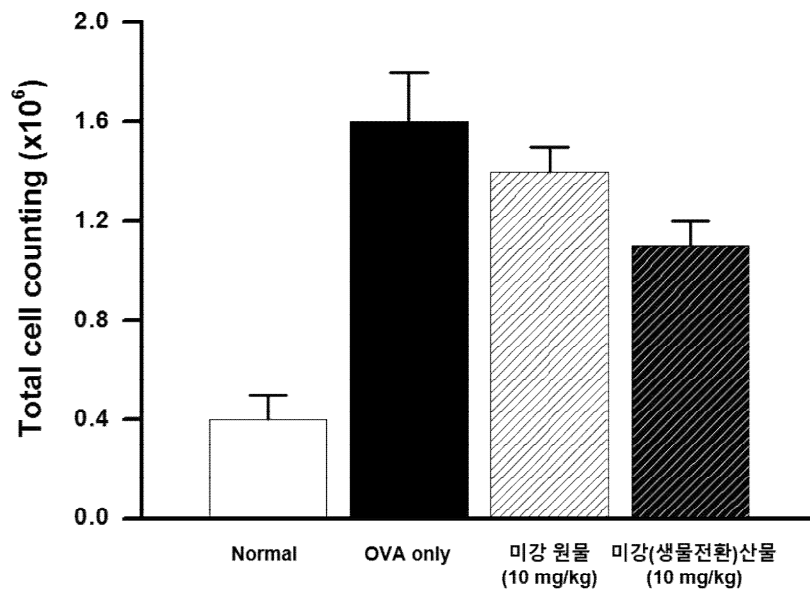


그림 196. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여로 인한 BALF 내 세포 유입 및 증식 억제 효과

		Lymphocyte ( $\times 10^4$ )	Neutrophil ( $\times 10^4$ )	Macrophage ( $\times 10^4$ )	Eosinophil ( $\times 10^4$ )
Normal		1.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	11.2 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.0
OVA only		11.8 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.5	61.8 $\pm$ 4.9	60.2 $\pm$ 5.2
10 mg/kg	미강 원물	8.8 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.4	58.3 $\pm$ 4.2	42.9 $\pm$ 3.7
10 mg/kg	미강 (생물전환)산물	6.1 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 0.5	57.7 $\pm$ 3.8	31.2 $\pm$ 2.8

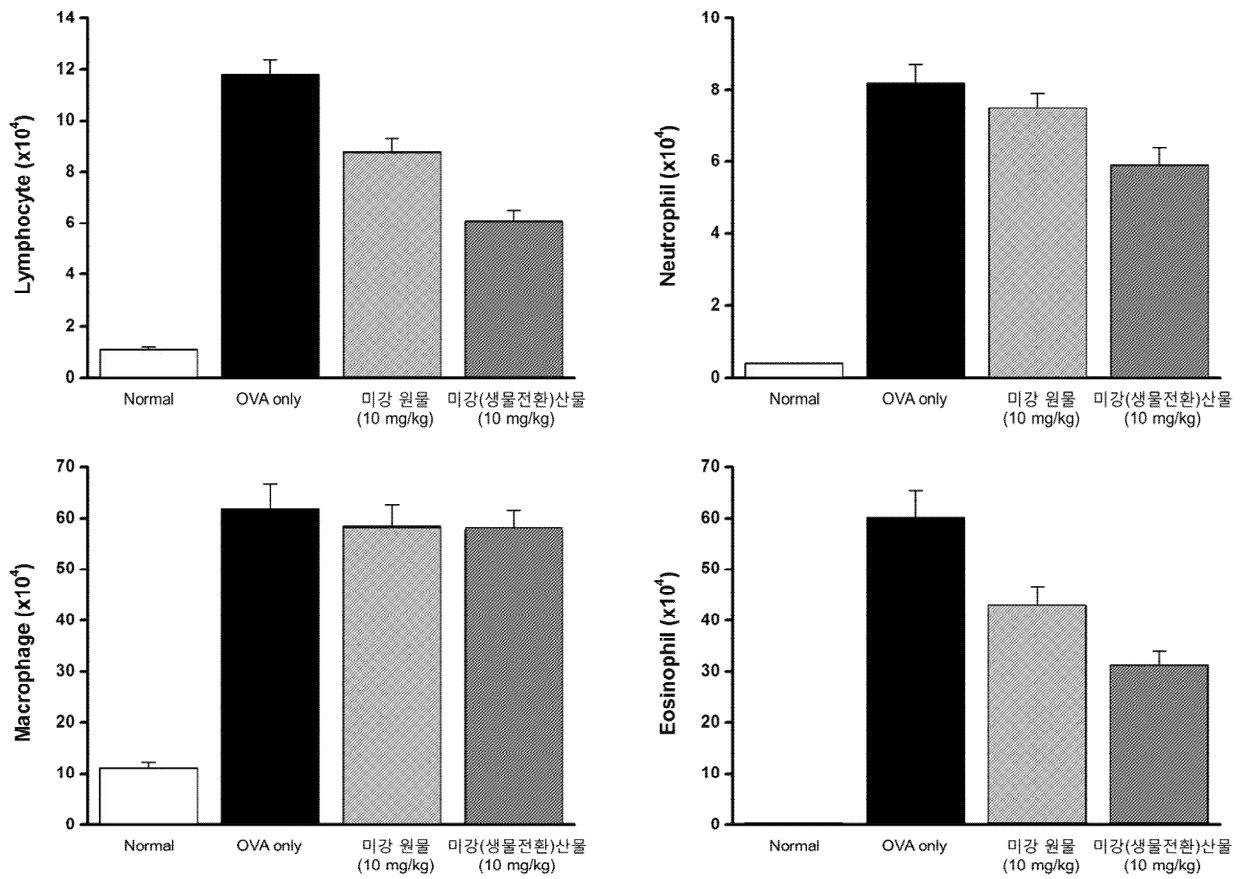


그림 197. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여가 BALF 내 세포 population에 미치는 효과

(3) Th1/Th2 cytokine 발현에 미치는 효과

알레르기 염증반응 조절에 중요한 요인인 Th1 cytokine과 Th2 cytokine을 측정하여 Th1/Th2 반응이 미강(생물전환)산물의 투여로 인해 어떻게 조절되는지 확인하였다. BALF 내 존재하는 Th2 cytokine과 혈청 내 존재하는 Th1 cytokone을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였으며, Th2 cytokine으로 IL-4, -5, -13의 양을 측정하였고 Th1 cytokine으로 IL-2, -10, -12의 양을 각각 측정하였다. 그 결과, 알레르기비염/천식 유도 시 BALF 내 Th2 cytokine은 증가하고 혈청 내 Th1 cytokine은 감소하였으며, 미강(생물전환)산물 투여 시 BALF 내 증가된 Th2 cytokine의 발현은 억제되고, 혈청 내 감소된 Th1 cytokine의 발현은 회복되는 결과를 확인하였다.

표 119. 알레르기비염/천식 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물이 BALF 내 Th2 cytokine에 미치는 효과

	Th2 cytokines in BALF		
	IL-4	IL-5	IL-13
normal	11.8 ± 0.9	14.2 ± 1.3	15.9 ± 1.4
OVA only	90.6 ± 7.2	129.4 ± 1.2	151.7 ± 11.2
10 mg/kg 미강 원물	75.9 ± 5.6	102.7 ± 8.9	107.2 ± 8.5
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	45.7 ± 3.7	51.9 ± 4.2	56.2 ± 4.2

표 120. 알레르기비염/천식 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물이 혈청 내 Th1 cytokine에 미치는 효과

	Th1 cytokines in serum		
	IL-2	IL-10	IL-12
normal	21.7 ± 1.5	98.5 ± 5.6	272.8 ± 18.9
OVA only	13.8 ± 1.2	61.3 ± 4.8	198.2 ± 11.2
10 mg/kg 미강 원물	14.5 ± 1.1	65.8 ± 4.7	205.3 ± 14.7
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	17.2 ± 1.5	81.5 ± 5.2	231.6 ± 11.2



(4) 폐 조직 보호 효과

희생한 마우스에서 폐 조직을 분리하여 고정, 탈수 후 파라핀에 embedding 하여 파라핀 블록을 제조하였다. 파라핀 블록은 4 $\mu$ m 두께로 박편하여 슬라이드 글라스 위에 부착하고, hematoxyline과 eosin Y 로 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 알레르기비염/천식 유도 시 폐포의 염증이 발생하는 것이 관찰되었으며, 미강(생물전환)산물 투여 시 알레르기비염/천식에 의한 염증 발생이 완화되어 폐 조직이 보호되는 것으로 확인되었다.

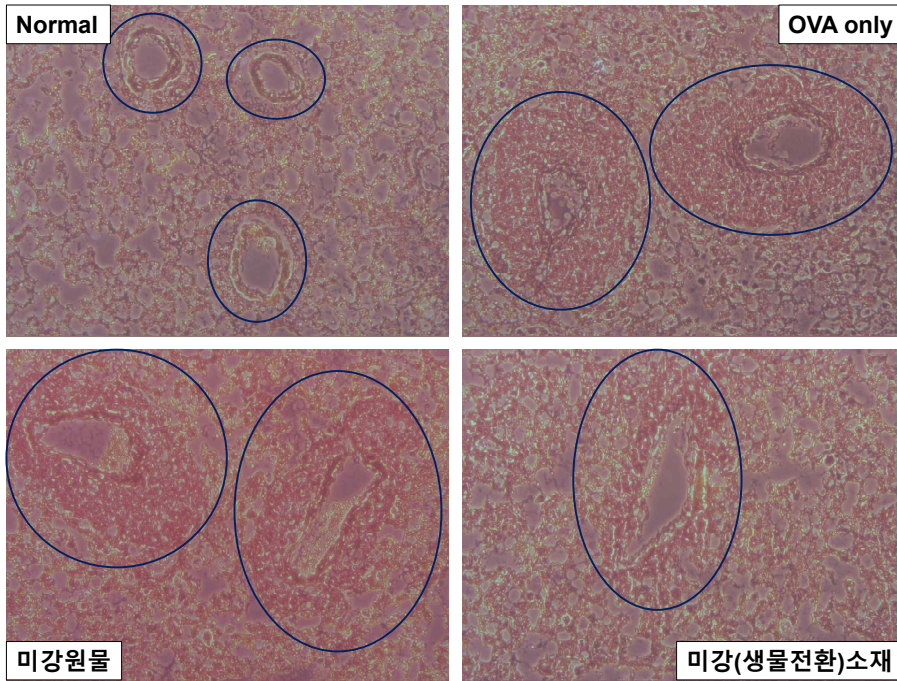


그림 198. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 알레르기비염/천식 유도 마우스에서의 폐 조직 내 염증 완화 효과

나. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 억제 효능 평가

(1) 기관지폐포세척액(BALF) 내 IgE 생성 억제 효과

대두(생물전환)산물을 2주간 식이투여 후 BALF를 회수하여 BALF 내 존재하는 IgE의 양을 측정하였다. 대두 원물에 비해 대두(생물전환)산물에서 더 뛰어난 IgE 생성 억제 효과를 보여 알레르기비염/천식을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

		IgE production (ng/ml)
Normal		4.229 ± 0.261
OVA only		172.594 ± 12.504
10 mg/kg	대두 원물	138.642 ± 11.206
10 mg/kg	대두(생물전환)산물	71.529 ± 5.924

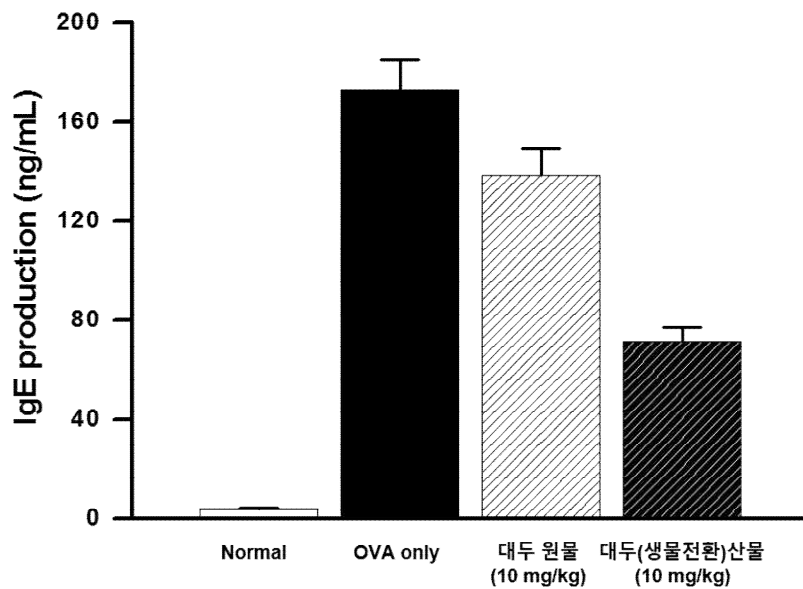


그림 199. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여로 인한 BALF 내 IgE 생성 억제 효과

(2) BALF 내 총 세포수 및 세포 population에 미치는 효과

BALF 내 총 세포수 및 세포의 종류를 확인한 결과, 대두 원물과 대두(생물전환)산물에서 각각 8.3%와 33.3%의 세포 유입 및 증식 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 또한 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 대식세포의 유입이나 증식은 억제하지 않으며, 림프구와 호중구, 호산구의 유입과 증식만 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

		Total cell counting (x10 <sup>6</sup> )
Normal		0.4 ± 0.1
OVA only		1.6 ± 0.2
10 mg/kg	대두 원물	1.5 ± 0.2
10 mg/kg	대두(생물전환)산물	1.2 ± 0.1

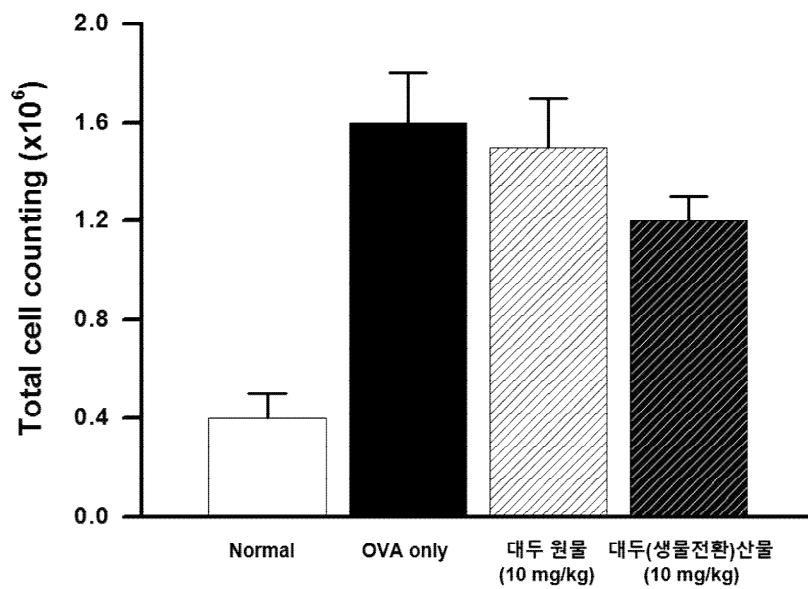


그림 200. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여로 인한 BALF 내 세포 유입 및 증식 억제 효과

		Lymphocyte ( $\times 10^4$ )	Neutrophil ( $\times 10^4$ )	Macrophage ( $\times 10^4$ )	Eosinophil ( $\times 10^4$ )
Nomal		1.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	11.2 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.0
OVA only		11.8 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.5	61.8 $\pm$ 4.9	60.2 $\pm$ 5.2
10 mg/kg	대두 원물	9.1 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.5	59.2 $\pm$ 4.7	46.7 $\pm$ 3.2
10 mg/kg	대두(생물전환)산물	6.5 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.6	58.6 $\pm$ 5.5	35.0 $\pm$ 3.1

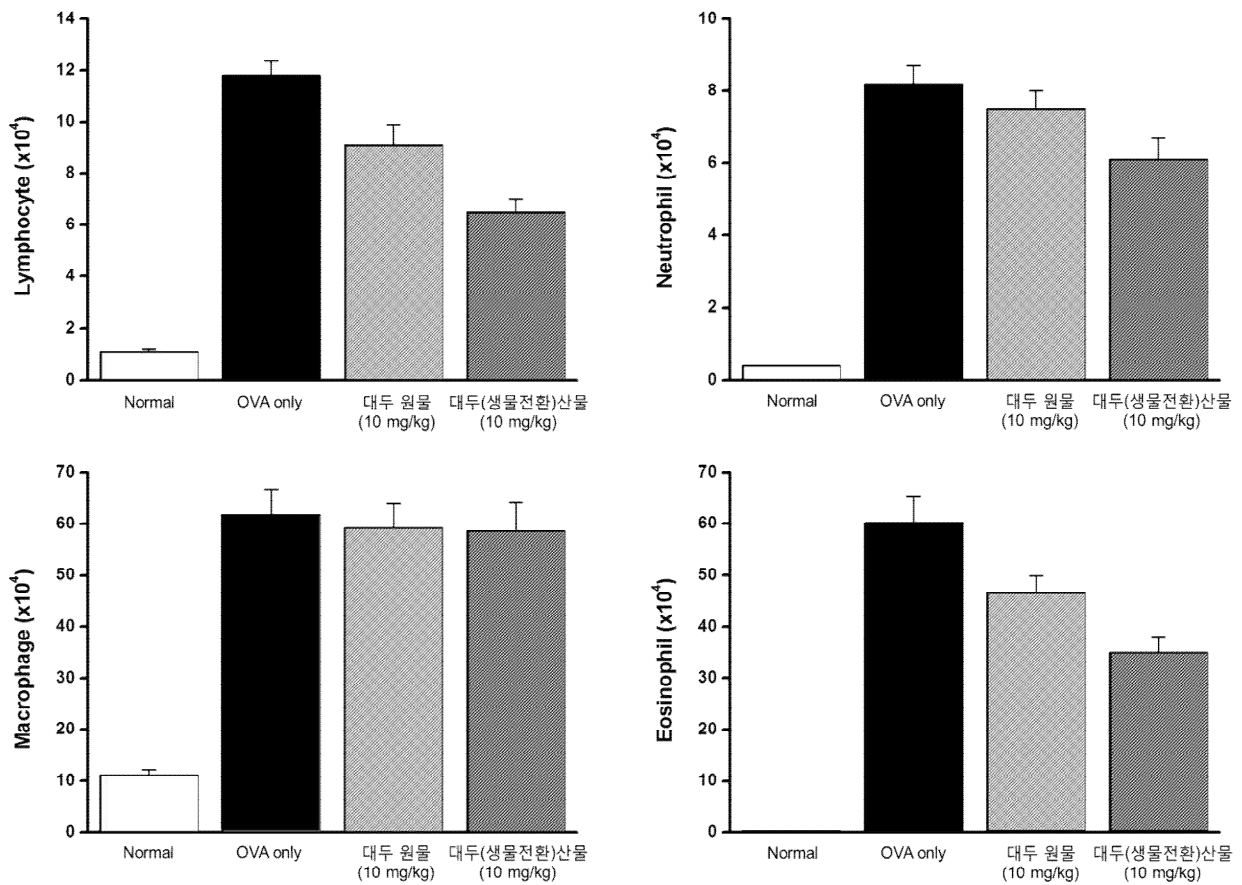


그림 201. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여가 BALF 내 세포 population 에 미치는 효과

(3) Th1/Th2 cytokine 발현에 미치는 효과

BALF 내 Th2 cytokine과 혈청 내 Th1 cytokine을 측정 한 결과, 대두(생물전환)산물의 식이투여 시 BALF 내 유도된 Th2 cytokine의 억제 및 혈청 내 감소한 Th1 cytokine의 회복 효과가 있는 것으로 확인되었다.

표 121. 알레르기비염/천식 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물이 BALF 내 Th2 cytokine에 미치는 효과

	Th2 cytokines in BALF		
	IL-4	IL-5	IL-13
normal	11.8 ± 0.9	14.2 ± 1.3	15.9 ± 1.4
OVA only	90.6 ± 7.2	129.4 ± 1.2	151.7 ± 11.2
10 mg/kg 대두 원물	79.3 ± 2.9	112.8 ± 5.6	115.9 ± 7.6
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	48.3 ± 3.5	60.8 ± 2.7	67.1 ± 5.1

표 122. 알레르기비염/천식 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물이 혈청 내 Th1 cytokine에 미치는 효과

	Th1 cytokines in serum		
	IL-2	IL-10	IL-12
normal	21.7 ± 1.5	98.5 ± 5.6	272.8 ± 18.9
OVA only	13.8 ± 1.2	61.3 ± 4.8	198.2 ± 11.2
10 mg/kg 대두 원물	14.0 ± 1.3	63.2 ± 5.9	201.7 ± 15.3
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	16.3 ± 0.8	76.3 ± 6.1	224.1 ± 10.9

(4) 폐 조직 보호 효과

조직 염색 후 관찰 결과, 대두(생물전환)산물 투여 시 알레르기 반응에 의해 유도된 폐포 염증이 완화되는 것을 확인하였다.

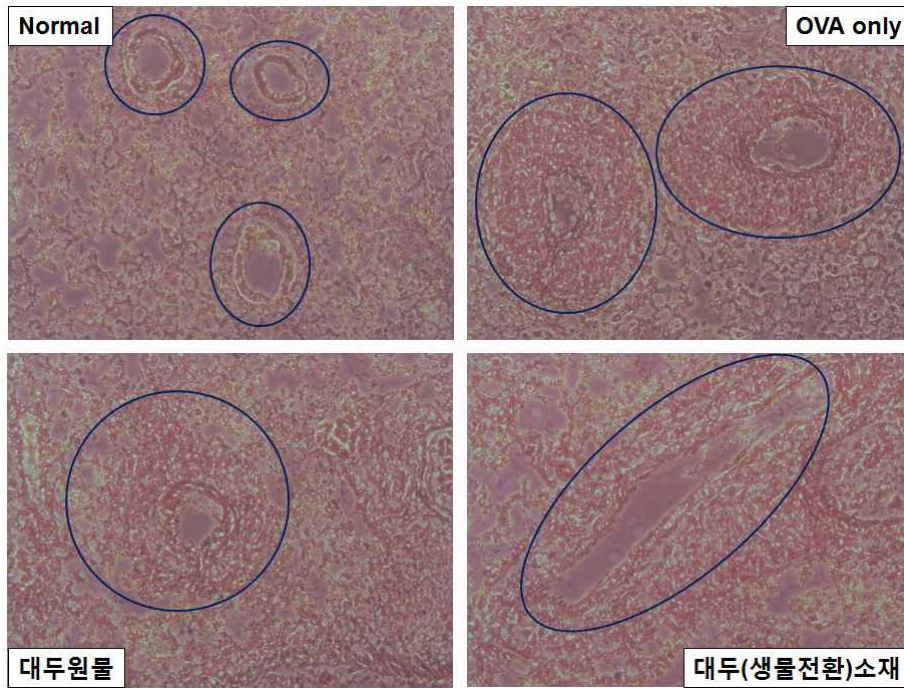


그림 202. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 알레르기비염/천식 유도 마우스에서의 폐 조직 내 염증 완화 효과

다. 알레르기비염/천식 유도 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 억제 효능 평가

(1) 기관지폐포세척액(BALF) 내 IgE 생성 억제 효과

참깨(생물전환)산물 투여 시 BALF 내 생성되는 IgE의 양을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었으며, 참깨 원물에서는 그 효과가 미비한 것으로 확인되었다.

		IgE production (ng/ml)
Normal		4.229 ± 0.261
OVA only		172.594 ± 12.504
10 mg/kg	참깨 원물	142.824 ± 10.327
10 mg/kg	참깨(생물전환)산물	74.608 ± 5.422

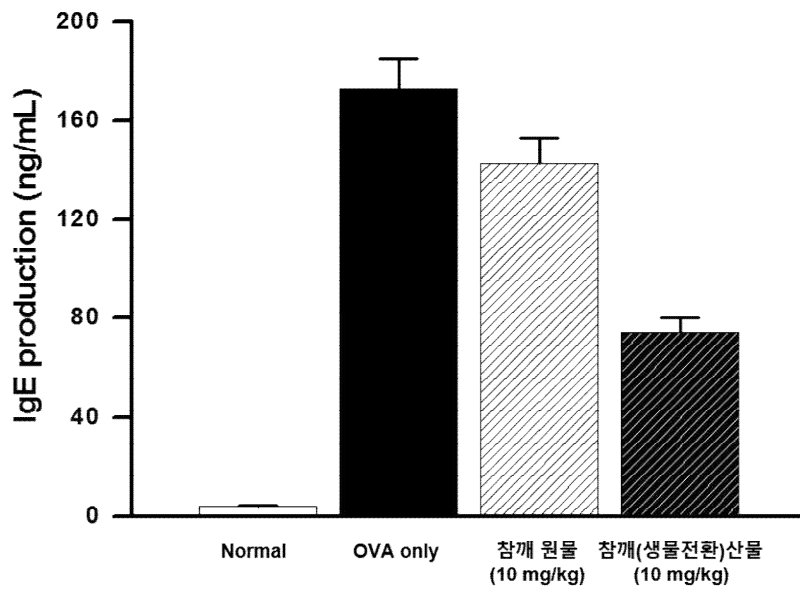


그림 203. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여로 인한 BALF 내 IgE 생성 억제 효과

(2) BALF 내 총 세포수 및 세포 population에 미치는 효과

참깨(생물전환)산물의 투여 시 BALF 내 세포의 유입과 증식을 억제할 수 있는 것으로 나타났으며, 다른 두 소재와 마찬가지로 대식세포의 유입과 증식은 억제하지 않으며 림프구와 호중구, 호산구의 유입과 증식만 억제하는 것으로 확인되었다.

		Total cell counting (x10 <sup>6</sup> )
Nomal		0.4 ± 0.1
OVA only		1.6 ± 0.2
10 mg/kg	참깨 원물	1.5 ± 0.1
10 mg/kg	참깨(생물전환)산물	1.2 ± 0.1

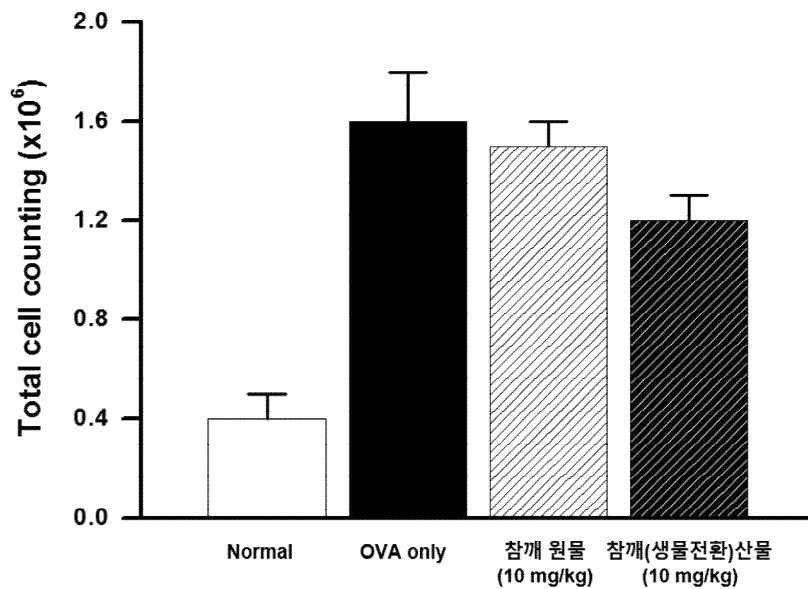


그림 204. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여로 인한 BALF 내 세포 유입 및 증식 억제 효과



		Lymphocyte (x10 <sup>4</sup> )	Neutrophil (x10 <sup>4</sup> )	Macrophage (x10 <sup>4</sup> )	Eosinophil (x10 <sup>4</sup> )
Normal		1.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	11.2 ± 1.0	0.3 ± 0.0
OVA only		11.8 ± 0.6	8.2 ± 0.5	61.8 ± 4.9	60.2 ± 5.2
10 mg/kg	참깨 원물	9.3 ± 0.6	7.8 ± 0.4	58.5 ± 4.3	49.2 ± 4.8
10 mg/kg	참깨(생물전환)산물	6.7 ± 0.3	6.5 ± 0.5	58.1 ± 3.8	39.4 ± 2.7

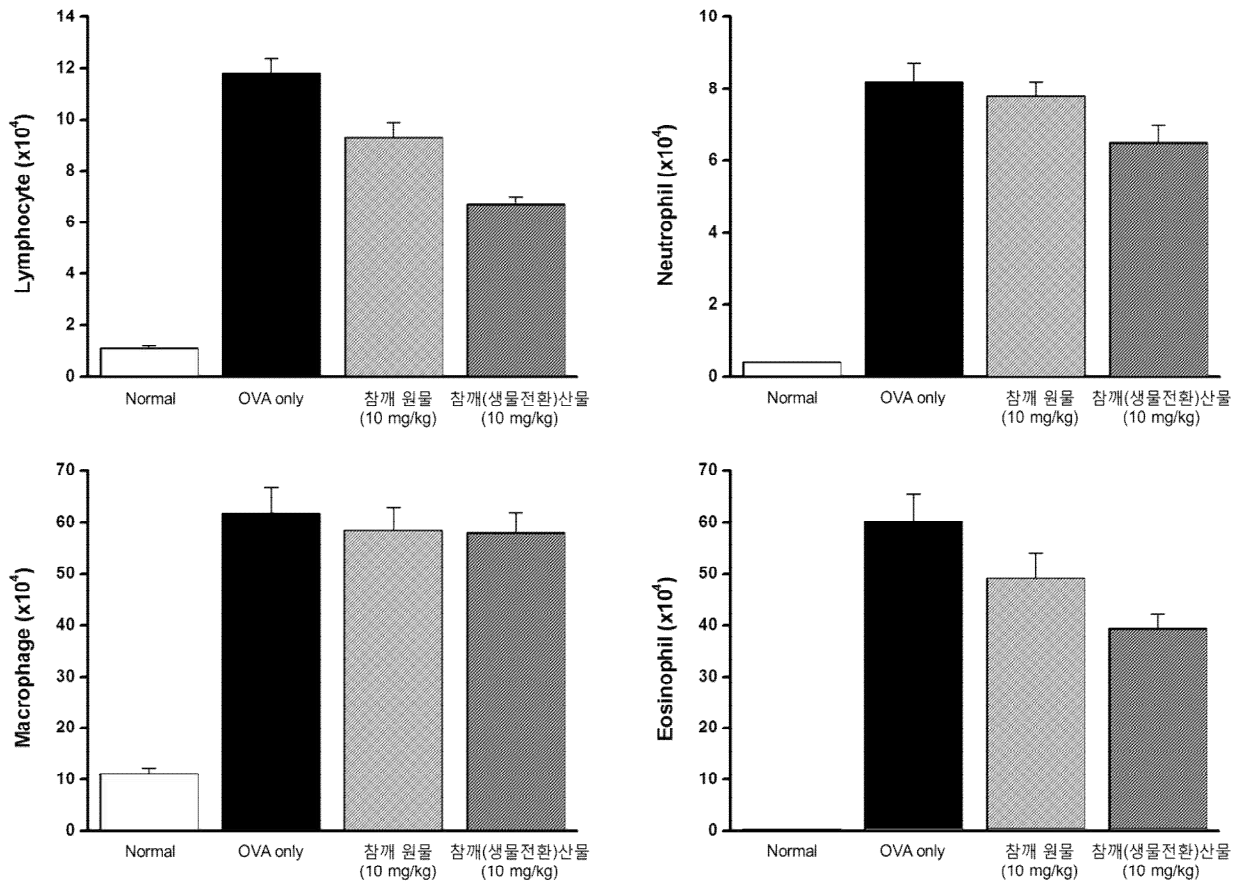


그림 205. OVA-유도 알레르기비염/천식 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여가 BALF 내 세포 population에 미치는 효과

(3) Th1/Th2 cytokine 발현에 미치는 효과

참깨(생물전환)산물 투여로 인해 Th1 cytokine의 생성량이 회복되었으며, Th2 cytokine의 생성이 억제되는 것으로 확인되었다.

표 123. 알레르기비염/천식 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 BALF 내 Th2 cytokine에 미치는 효과

	Th2 cytokines in BALF		
	IL-4	IL-5	IL-13
normal	11.8 ± 0.9	14.2 ± 1.3	15.9 ± 1.4
OVA only	90.6 ± 7.2	129.4 ± 1.2	151.7 ± 11.2
10 mg/kg 참깨 원물	77.2 ± 5.4	110.9 ± 8.3	116.8 ± 8.9
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	46.1 ± 2.6	58.2 ± 2.9	62.4 ± 5.5

표 124. 알레르기비염/천식 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 혈청 내 Th1 cytokine에 미치는 효과

	Th1 cytokines in serum		
	IL-2	IL-10	IL-12
normal	21.7 ± 1.5	98.5 ± 5.6	272.8 ± 18.9
OVA only	13.8 ± 1.2	61.3 ± 4.8	198.2 ± 11.2
10 mg/kg 참깨 원물	13.9 ± 1.2	62.3 ± 5.0	202.8 ± 16.2
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	16.5 ± 0.9	78.2 ± 6.3	229.8 ± 12.7

(4) 폐 조직 보호 효과

알레르기비염/천식의 유도로 인해 일어난 조직의 염증이 참깨(생물전환)산물의 투여로 인해 완화되는 결과를 확인하였다.

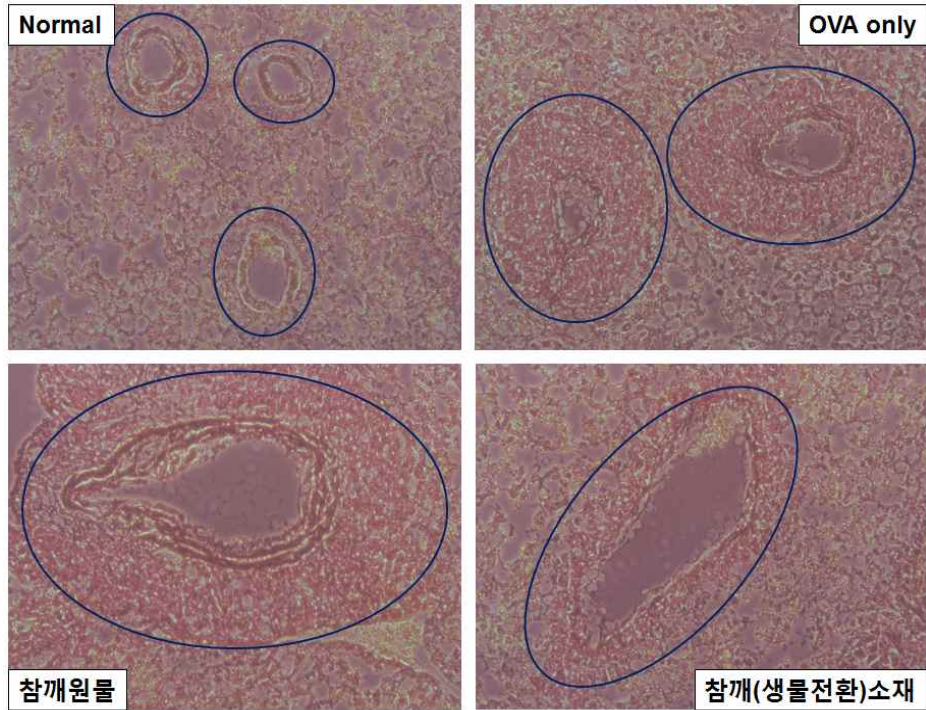


그림 206. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 알레르기비염/천식 유도 마우스에서의 폐 조직 내 염증 완화 효과

### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항알레르기비염/천식 효능 평가에 대한 실험적 의의

농산부산물 3개 개발소재의 알레르기비염/천식 억제 효과를 B 세포주를 이용한 *in vitro* 실험계와 OVA를 이용하여 유도한 알레르기비염/천식 마우스모델에서 확인하였다. 사람 유래 B 세포주인 U266.B1 세포주를 LPS와 IL-4로 자극하여 IgE의 생산을 유도하고 개발소재를 함께 처리한 경우, 개발소재가 농도 의존적으로 IgE 생성 억제 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. Th1 면역반응을 조절하는 물질의 경우, B 세포의 IgE switching을 억제할 수 있다는 보고 (Hwang J. S. *et al. BMC Complement Altern. Med.* 2012)를 참고할 때, Th1 면역반응을 활성화시킬 수 있는 개발소재의 생리활성이 B 세포주에서의 IgE 생성을 억제하는 것으로 보인다.

OVA와 alumina를 이용해 감작시키고, OVA를 흡입하게 하여 알레르기비염/천식을 유도한 마우스에 개발소재를 2주간 식이투여 한 경우, IgE 생성 감소, BALF 내 세포 침윤 억제, 폐 조직 보호 등 알레르기비염/천식에 의해 유도되는 다양한 지표들이 회복되는 것으로 확인되었다. 특히, Th1/Th2 cytokine을 확인하여 개발소재의 면역조절 능력을 확인한 결과, 알레르기반응에 의해 감소되어 있는 Th1 cytokine의 발현을 유도하여 Th2 면역반응을 억제, 결과적으로 알레르기반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물은 모두 각 소재의 원물과 비교하여 더 뛰어나게 알레르기비염/천식을 억제하는 효과를 갖는다고 평가할 수 있다. 3개 개발소재 사이에는 큰 차이를 보이지는 않았으나, 미강(생물전환)산물이 대두(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물 보다 약간 더 높은 억제 활성을 보이는 것으로 평가된다. 3개 개발소재가 이러한 효과를 보이는 것은, 각 소재의 원물이 갖는 염증 억제 생리물질의 효과에 더하여 생물전환 과정을 통해 획득되는 Th1 면역반응 활성화 효능에 기인한 것으로 판단된다.

## 16절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 아토피피부염 관련 효능 평가

### 1. *in vitro* 효능 평가

#### 가. Mast cell 기반 효능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 아토피 억제 효능 평가를 위하여, RBL-2H3 비만세포주를 이용한 개발소재의 탈과립 억제 효능을 평가하였다. 비만세포주에 3개 개발소재를 처리한 후 자극원으로 자극하여 탈과립의 정도를 확인하였으며, 자극원으로는 calcium ionophore 인 A23187과 IgE/DNP-BSA 두가지를 이용하였다. 탈과립의 정도는 과립 내 존재하는 효소인  $\beta$ -hexosaminidase의 활성도와 알레르기반응의 주요인인 histamine의 양을 측정하여 평가하였다.

#### (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 평가

미강(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능을 평가하였다. A23187을 자극원으로 사용할 경우, 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 접종하여 24시간 배양한 RBL-2H3 세포주에 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 각각 15분간 전처리 한 뒤, 배지에 10  $\mu$ M로 희석한 A23187로 20분간 자극하여 탈과립을 유도하였다. 이후 상층액 50  $\mu$ l를 회수하여 상층액 내 존재하는  $\beta$ -hexosaminidase와 histamine의 양을 측정하였다. DNP-BSA를 자극원으로 사용할 경우, 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 접종 시 DNP-BSA 특이적인 IgE를 1  $\mu$ g/mL의 농도로 함께 처리하여 하루밤 감각하였다. 이후 배지를 이용하여 100  $\mu$ g/mL 농도로 희석한 DNP-BSA를 처리하여 자극하였으며, 미강 원물과 미강(생물전환)산물은 감각과 동시 처리와 자극 전 15분간 처리의 두가지로 사용하였다. A23187 자극 시, 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 최대 100  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 약 46%, 43%의  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과를 보였고, histamine은 각각 약 42%와 44%의 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었으며, 모든 농도에서 세포독성은 보이지 않는 것으로 확인되었다. DNP-BSA를 자극원으로 처리하며 개발소재를 자극 전 처리할 경우에는, 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 최대 35~39% 정도의  $\beta$ -hexosaminidase와 histamine 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었고, 감각과 함께 개발소재를 처리할 경우에는 억제 효과가 18% 정도로 감소하는 것으로 확인되었다.

		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 5.139
Positive		98.483 ± 6.609
미강 원물	1 µg/mL	100.882 ± 5.136
	10 µg/mL	98.406 ± 7.712
	100 µg/mL	99.526 ± 5.221
미강(생물전환)산물	1 µg/mL	101.207 ± 9.942
	10 µg/mL	99.031 ± 5.276
	100 µg/mL	100.310 ± 7.274

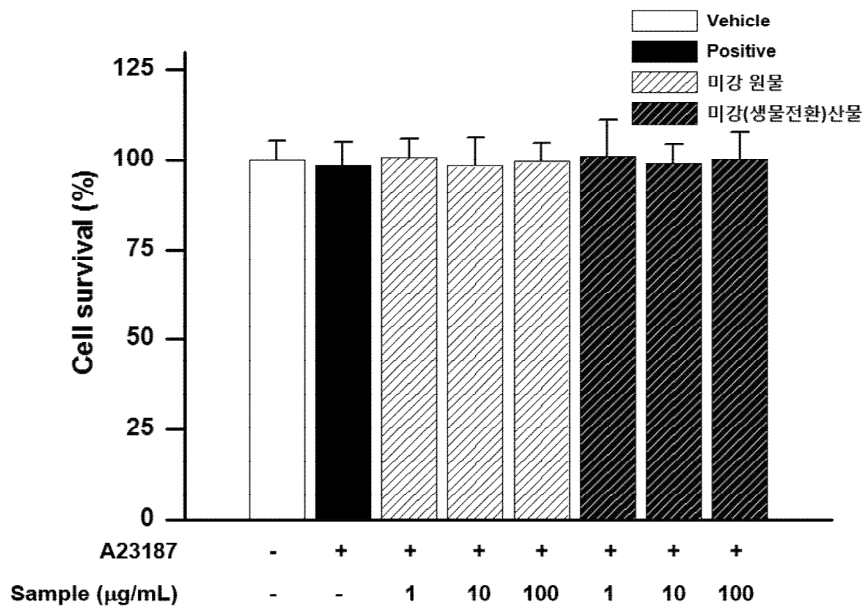


그림 207. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 세포독성 측정

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 5.826
Positive		100.000 $\pm$ 6.914
미강 원물	1 $\mu$ g/mL	90.824 $\pm$ 5.466
	10 $\mu$ g/mL	76.218 $\pm$ 4.281
	100 $\mu$ g/mL	53.582 $\pm$ 4.223
미강(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	88.946 $\pm$ 6.820
	10 $\mu$ g/mL	77.402 $\pm$ 5.302
	100 $\mu$ g/mL	56.609 $\pm$ 4.240

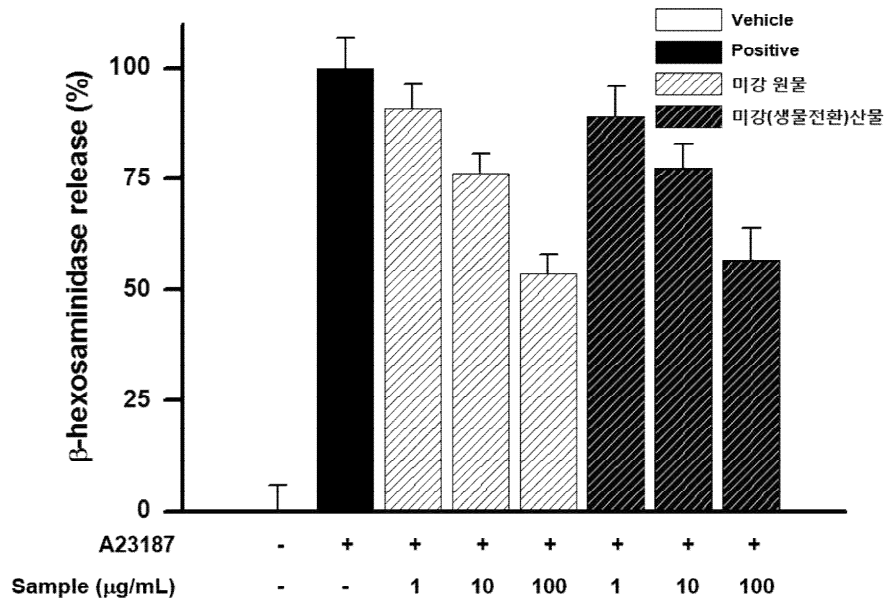


그림 208. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		Histamine release (%)
Vehicle		0.000 ± 2.624
Positive		100.000 ± 6.428
미강 원물	1 µg/mL	96.241 ± 3.208
	10 µg/mL	75.032 ± 5.094
	100 µg/mL	58.221 ± 3.207
미강(생물전환)산물	1 µg/mL	95.327 ± 5.274
	10 µg/mL	73.895 ± 3.513
	100 µg/mL	56.182 ± 3.229

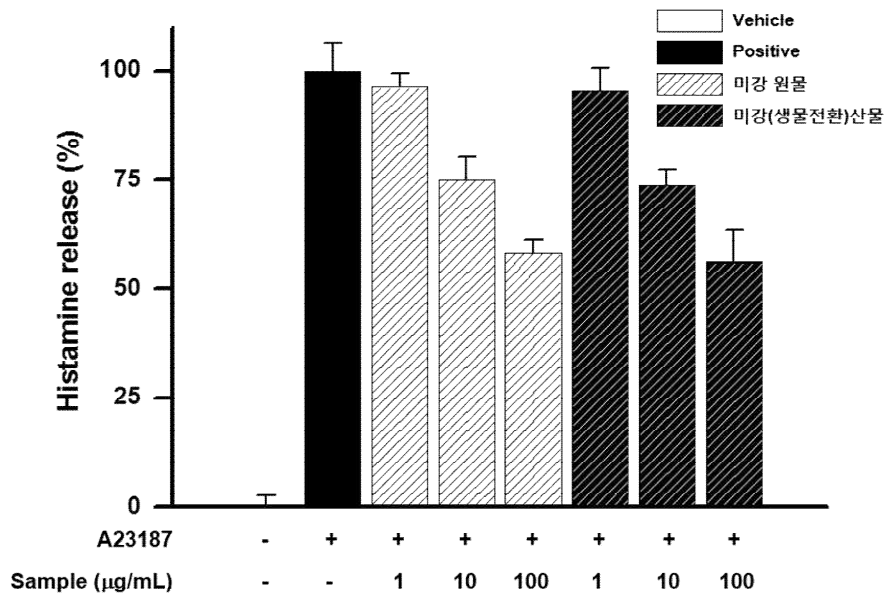


그림 209. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 histamine 억제 효과



		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 5.628
Positive		99.603 ± 6.275
미강 원물	1 µg/mL	100.214 ± 4.203
	10 µg/mL	99.320 ± 5.327
	100 µg/mL	101.629 ± 5.339
미강(생물전환)산물	1 µg/mL	98.030 ± 7.521
	10 µg/mL	98.936 ± 5.328
	100 µg/mL	100.084 ± 4.203

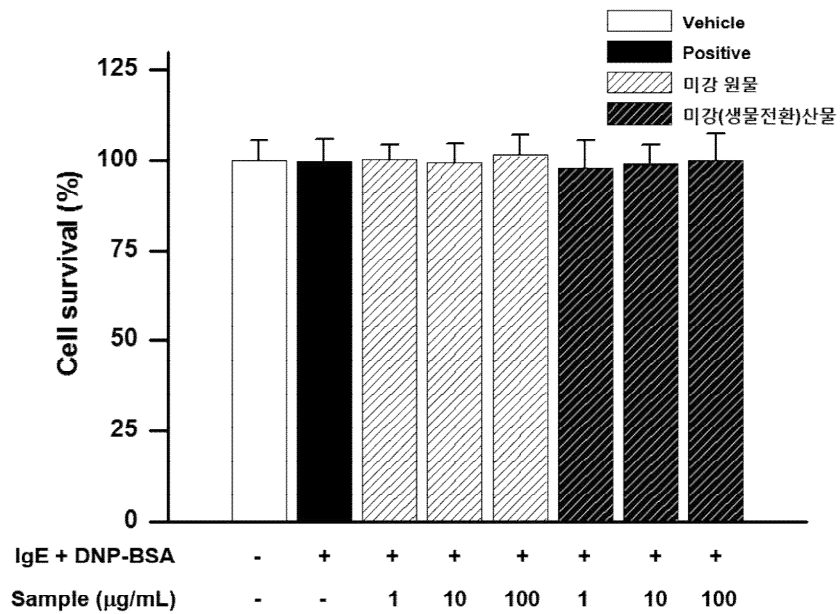


그림 210. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른 세포 독성 측정

		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 2.758
Positive		99.271 ± 3.549
미강 원물	1 µg/mL	98.924 ± 5.067
	10 µg/mL	97.925 ± 5.678
	100 µg/mL	99.284 ± 5.041
미강(생물전환)산물	1 µg/mL	98.586 ± 5.291
	10 µg/mL	99.092 ± 4.287
	100 µg/mL	100.208 ± 7.254

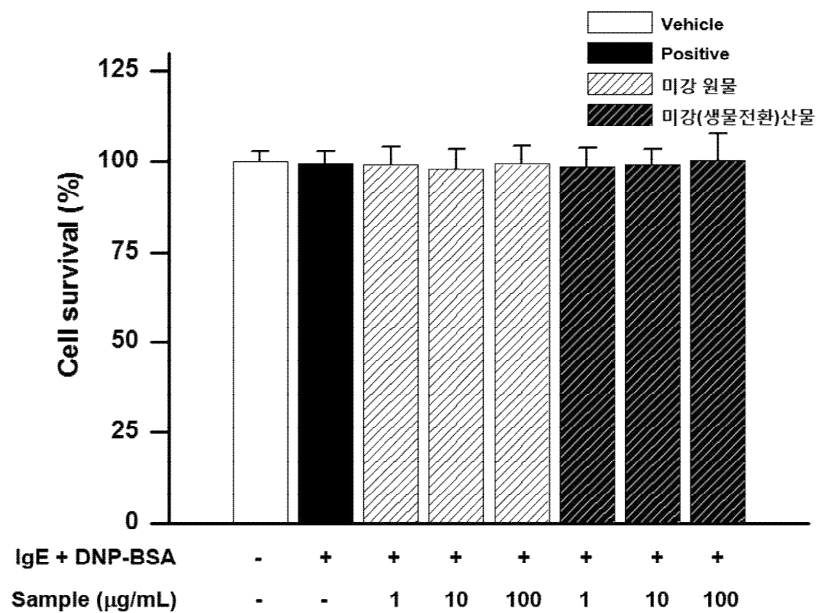


그림 211. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 감작과 동시 처리에 따른 세포독성 측정

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 4.753
Positive		100.000 $\pm$ 6.309
미강 원물	1 $\mu$ g/mL	95.132 $\pm$ 5.217
	10 $\mu$ g/mL	78.218 $\pm$ 5.395
	100 $\mu$ g/mL	63.390 $\pm$ 2.177
미강(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	97.006 $\pm$ 5.506
	10 $\mu$ g/mL	79.641 $\pm$ 5.775
	100 $\mu$ g/mL	64.072 $\pm$ 4.521

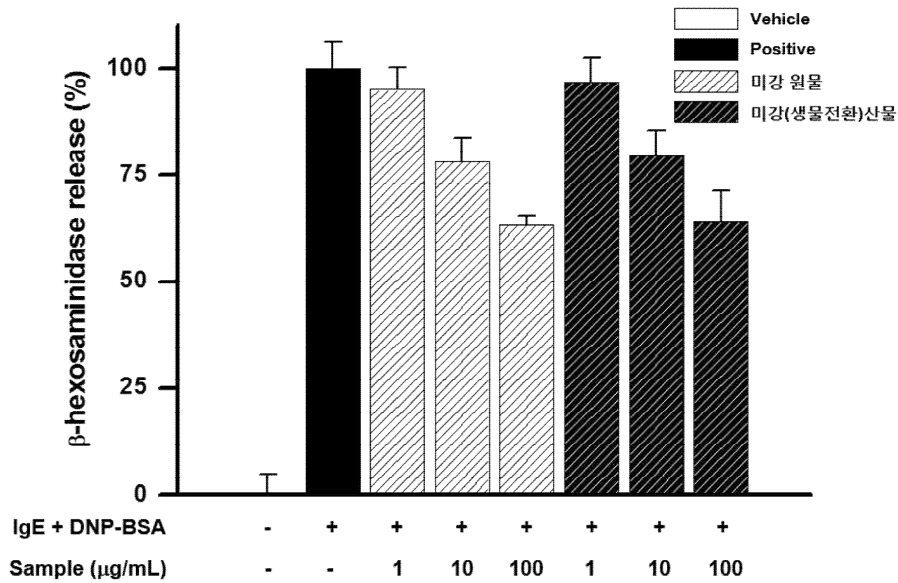


그림 212. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 3.081
Positive		100.000 $\pm$ 9.210
미강 원물	1 $\mu$ g/mL	95.847 $\pm$ 7.747
	10 $\mu$ g/mL	83.706 $\pm$ 8.264
	100 $\mu$ g/mL	82.109 $\pm$ 6.285
미강(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	96.280 $\pm$ 5.146
	10 $\mu$ g/mL	85.038 $\pm$ 7.224
	100 $\mu$ g/mL	82.092 $\pm$ 6.210

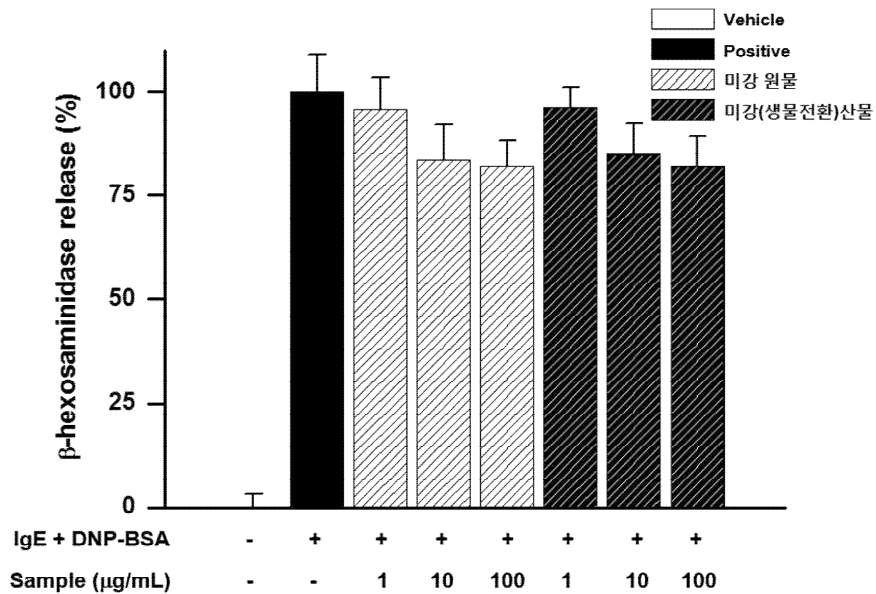


그림 213. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 감작과 동시 처리에 따른  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		Histamine release (%)
	Vehicle	0.000 ± 4.063
	Positive	100.000 ± 2.889
미강 원물	1 µg/mL	90.084 ± 5.143
	10 µg/mL	78.035 ± 5.219
	100 µg/mL	60.713 ± 4.914
미강(생물전환)산물	1 µg/mL	89.228 ± 6.206
	10 µg/mL	75.289 ± 5.601
	100 µg/mL	62.283 ± 5.553

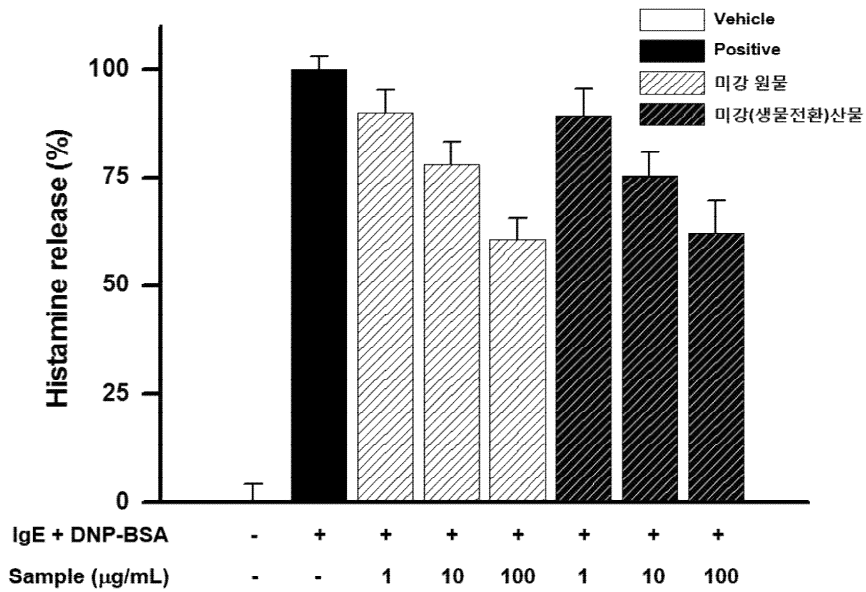


그림 214. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른 histamine 억제 효과

(2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 평가

대두 원물과 대두(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제 효과를 확인하였다. A23187을 자극원으로 사용 시, 최대 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대두 원물은 약 48%, 대두(생물전환)산물은 약 47%의  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과를 보였다. histamine의 경우, 각각 약 47%와 약 48%로  $\beta$ -hexosaminidase와 큰 차이를 보이지 않았다. DNP-BSA로 자극할 경우 자극 전 개발소재 처리시 최대 40~45% 정도의 탈과립 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었으며, 감각과 동시에 처리할 경우에는 원물과 생물전환산물 모두 억제 효과가 15% 정도로 감소하는 것으로 확인되었다.

		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 $\pm$ 7.584
Positive		98.603 $\pm$ 5.981
대두 원물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99.904 $\pm$ 5.116
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100.062 $\pm$ 7.726
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	98.492 $\pm$ 6.572
대두(생물전환)산물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	101.342 $\pm$ 5.506
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99.256 $\pm$ 5.416
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	98.725 $\pm$ 6.068

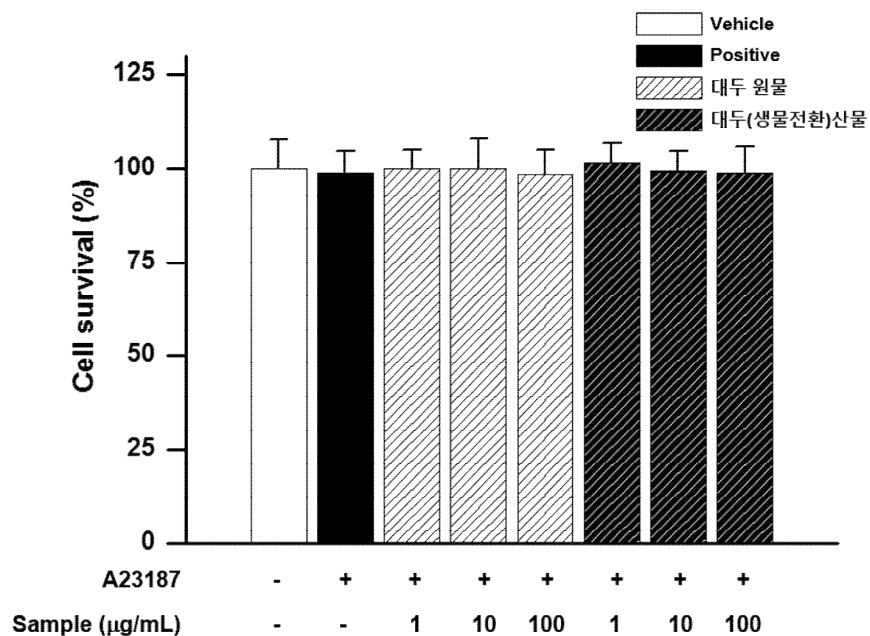


그림 215. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 세포독성 측정

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 6.442
Positive		100.000 $\pm$ 2.686
대두 원물	1 $\mu$ g/mL	92.820 $\pm$ 5.043
	10 $\mu$ g/mL	75.439 $\pm$ 5.224
	100 $\mu$ g/mL	52.416 $\pm$ 3.558
대두(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	91.583 $\pm$ 7.225
	10 $\mu$ g/mL	73.903 $\pm$ 6.030
	100 $\mu$ g/mL	53.491 $\pm$ 4.228

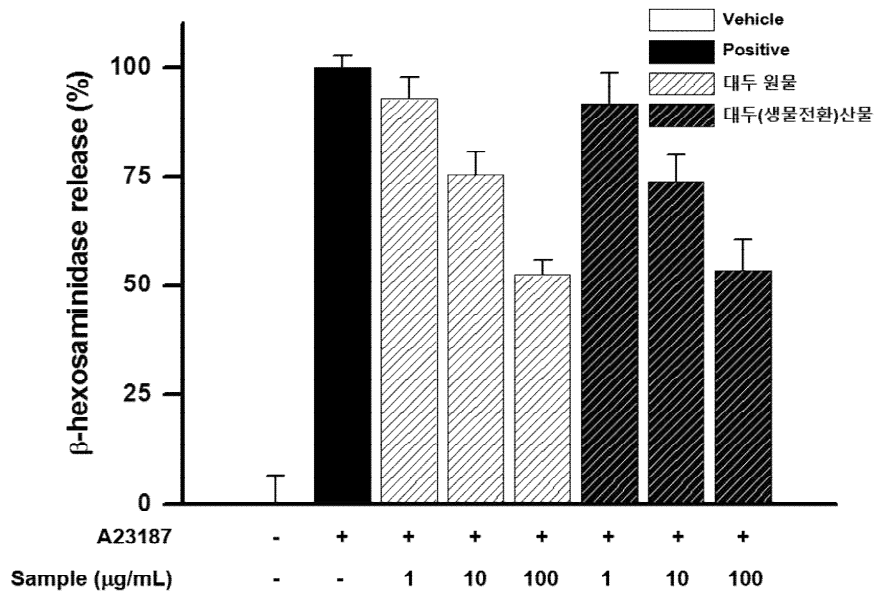


그림 216. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		Histamine release (%)
Vehicle		0.000 ± 2.624
Positive		100.000 ± 6.428
대두 원물	1 µg/mL	95.039 ± 7.228
	10 µg/mL	78.029 ± 6.372
	100 µg/mL	52.752 ± 5.031
대두(생물전환)산물	1 µg/mL	97.265 ± 5.317
	10 µg/mL	75.039 ± 6.278
	100 µg/mL	51.582 ± 4.206

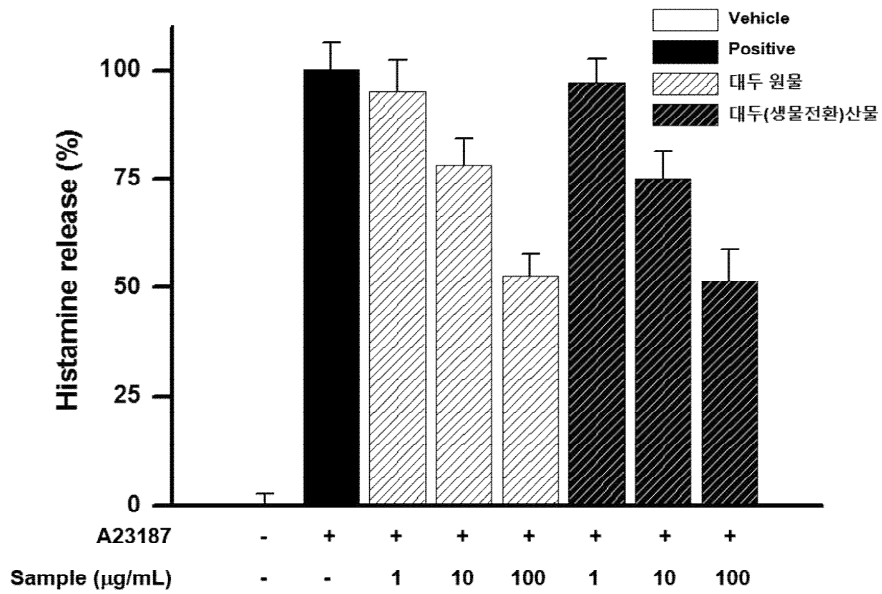


그림 217. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 histamine 억제 효과



		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 5.628
Positive		99.603 ± 6.275
대두 원물	1 µg/mL	100.028 ± 5.142
	10 µg/mL	99.306 ± 7.218
	100 µg/mL	101.121 ± 5.206
대두(생물전환)산물	1 µg/mL	100.898 ± 4.351
	10 µg/mL	99.356 ± 5.038
	100 µg/mL	100.825 ± 7.246

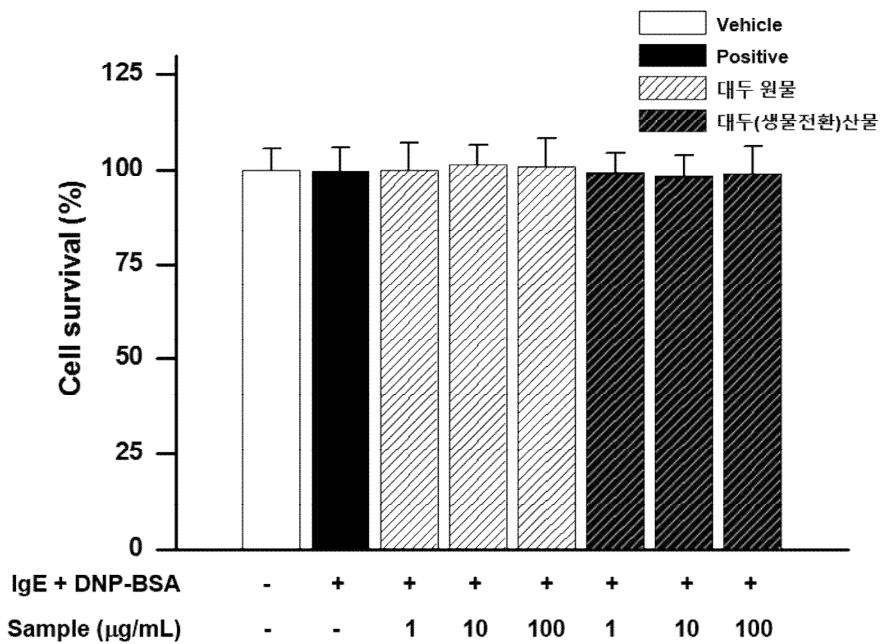


그림 218. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른 세포독성 측정

		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 2.758
Positive		99.271 ± 3.549
대두 원물	1 µg/mL	98.316 ± 7.225
	10 µg/mL	99.052 ± 4.293
	100 µg/mL	101.220 ± 5.463
대두(생물전환)산물	1 µg/mL	98.983 ± 7.201
	10 µg/mL	99.126 ± 5.034
	100 µg/mL	100.084 ± 4.153

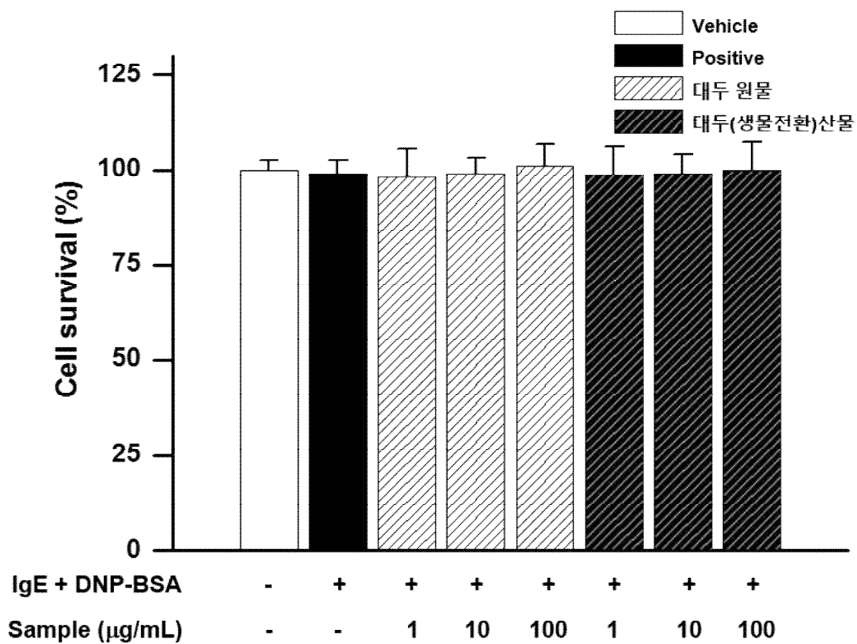


그림 219. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 감작과 동시 처리에 따른 세포독성 측정

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 4.753
Positive		100.000 $\pm$ 6.309
대두 원물	1 $\mu$ g/mL	96.551 $\pm$ 7.720
	10 $\mu$ g/mL	73.289 $\pm$ 5.132
	100 $\mu$ g/mL	60.284 $\pm$ 4.269
대두(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	94.205 $\pm$ 5.527
	10 $\mu$ g/mL	74.633 $\pm$ 6.802
	100 $\mu$ g/mL	61.309 $\pm$ 4.205

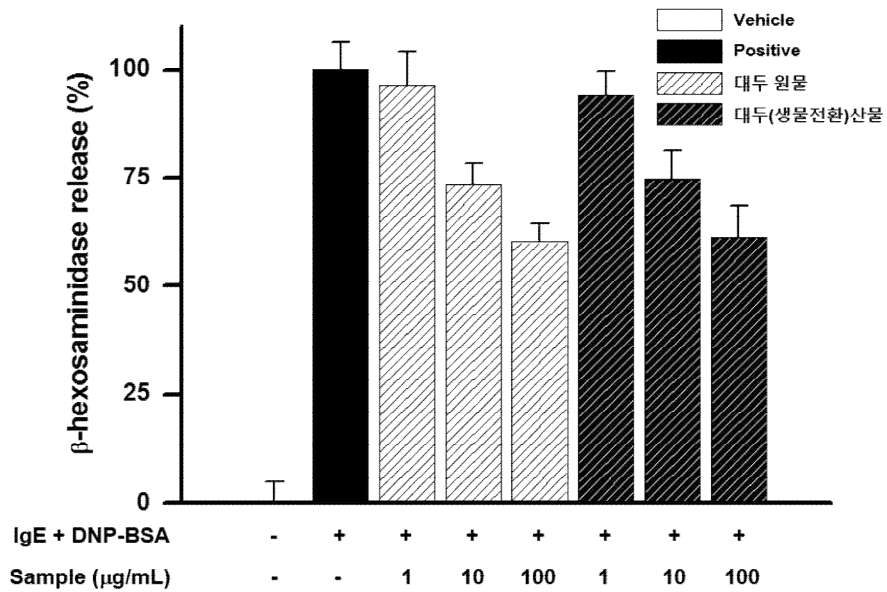


그림 220. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 3.081
Positive		100.000 $\pm$ 9.210
대두 원물	1 $\mu$ g/mL	93.610 $\pm$ 0.958
	10 $\mu$ g/mL	88.498 $\pm$ 6.732
	100 $\mu$ g/mL	86.262 $\pm$ 5.279
대두(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	92.281 $\pm$ 4.226
	10 $\mu$ g/mL	89.230 $\pm$ 7.218
	100 $\mu$ g/mL	85.529 $\pm$ 6.231

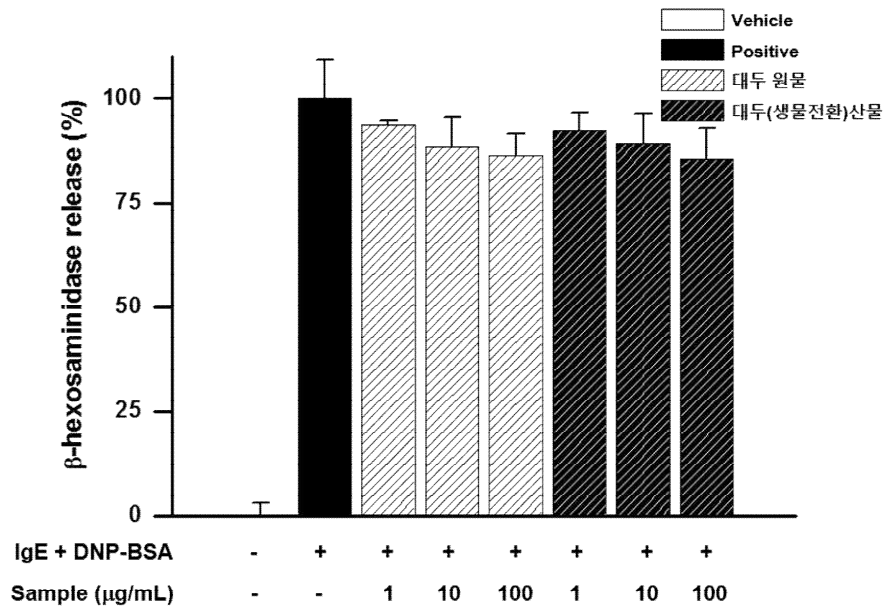


그림 221. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 감작과 동시 처리에 따른  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		Histamine release (%)
Vehicle		0.000 ± 4.063
Positive		100.000 ± 2.889
대두 원물	1 μg/mL	91.522 ± 6.263
	10 μg/mL	74.217 ± 3.890
	100 μg/mL	56.203 ± 4.172
대두(생물전환)산물	1 μg/mL	90.215 ± 7.589
	10 μg/mL	75.504 ± 5.214
	100 μg/mL	55.098 ± 3.262

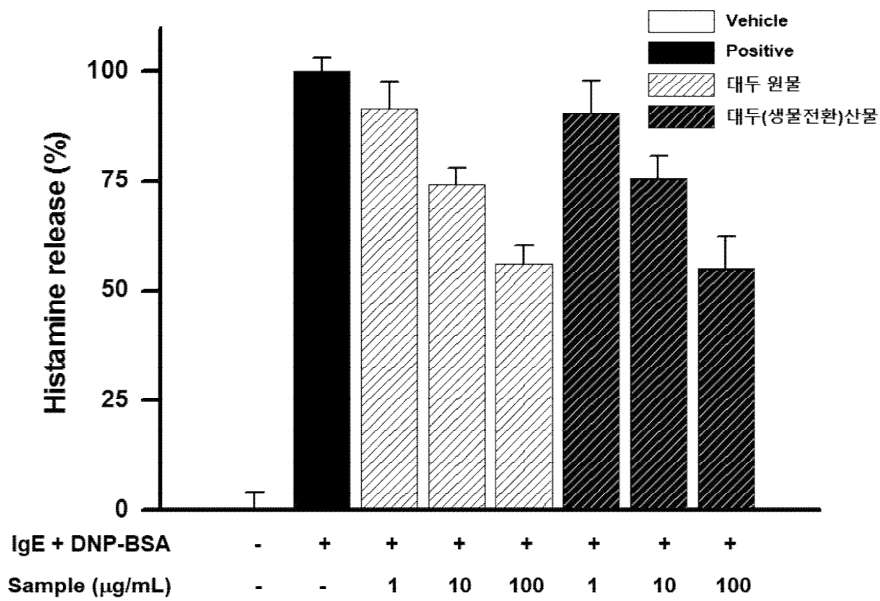


그림 222. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른 histamine 억제 효과

(3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제능 평가

참깨 원물과 참깨(생물전환)산물의 비만세포 활성화 억제 효과를 확인하였다. 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물을 비만세포에 처리한 뒤 A23187로 자극할 경우, 최대 30~33%의  $\beta$ -hexosaminidase와 histamine 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 자극 전 처리 후 DNP-BSA로 자극시에는 최대 농도에서 20~29%의 탈과립 억제 효과를 보였으며, 감각과 동시 처리 후 자극시에는 최대 농도에서의 탈과립 억제 효과가 12~13% 정도로 감소하는 것으로 확인되었다.

		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 7.584
Positive		98.603 ± 5.981
참깨 원물	1 $\mu$ g/mL	99.667 ± 5.220
	10 $\mu$ g/mL	102.037 ± 8.120
	100 $\mu$ g/mL	98.418 ± 7.243
참깨(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	99.063 ± 7.715
	10 $\mu$ g/mL	100.085 ± 7.280
	100 $\mu$ g/mL	99.629 ± 6.349

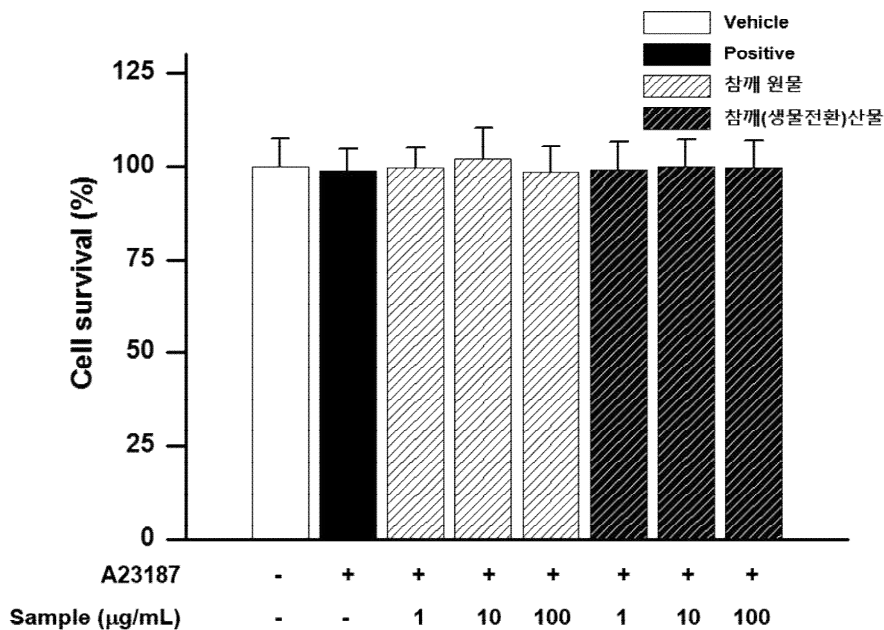


그림 223. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 세포독성 측정

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 6.442
Positive		100.000 $\pm$ 2.686
참깨 원물	1 $\mu$ g/mL	92.283 $\pm$ 5.442
	10 $\mu$ g/mL	80.063 $\pm$ 5.417
	100 $\mu$ g/mL	67.229 $\pm$ 5.823
참깨(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	95.014 $\pm$ 7.725
	10 $\mu$ g/mL	83.609 $\pm$ 5.219
	100 $\mu$ g/mL	70.092 $\pm$ 5.284

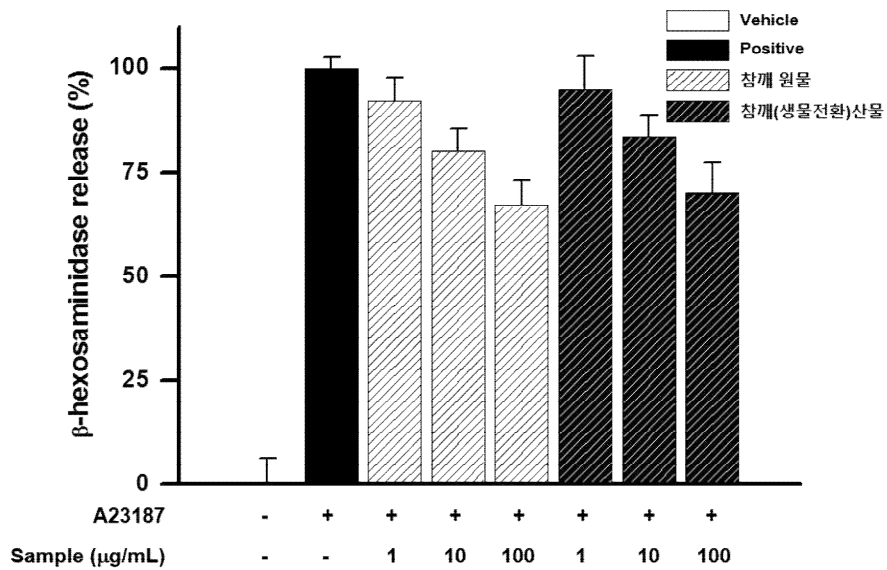


그림 224. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		Histamine release (%)
Vehicle		0.000 ± 2.624
Positive		100.000 ± 6.428
참깨 원물	1 µg/mL	96.996 ± 6.617
	10 µg/mL	85.603 ± 5.032
	100 µg/mL	76.250 ± 5.812
참깨(생물전환)산물	1 µg/mL	95.038 ± 8.854
	10 µg/mL	82.625 ± 7.218
	100 µg/mL	77.209 ± 4.281

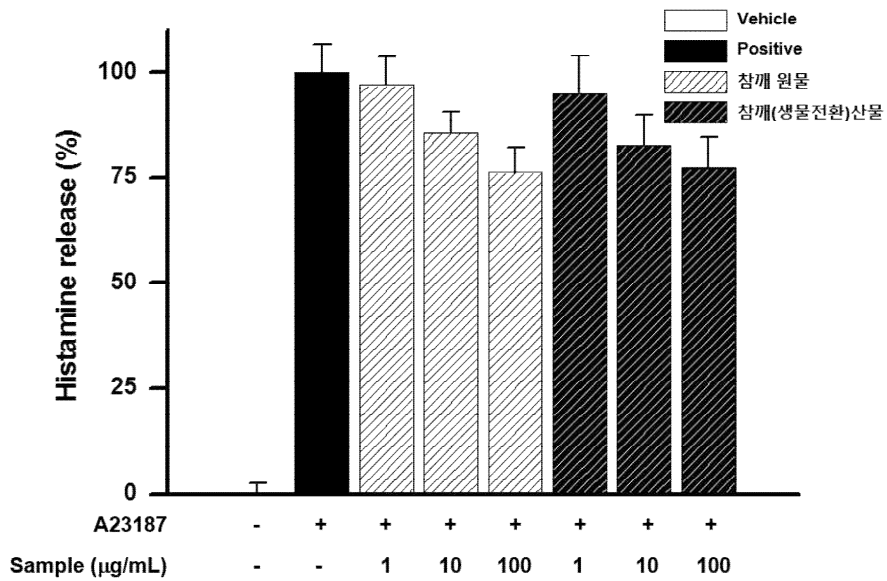


그림 225. RBL-2H3 세포주에 A23187 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 histamine 억제 효과



		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 5.628
Positive		99.603 ± 6.275
참깨 원물	1 µg/mL	100.028 ± 5.142
	10 µg/mL	99.306 ± 7.218
	100 µg/mL	101.121 ± 5.206
참깨(생물전환)산물	1 µg/mL	100.898 ± 4.351
	10 µg/mL	99.356 ± 5.038
	100 µg/mL	100.825 ± 7.246

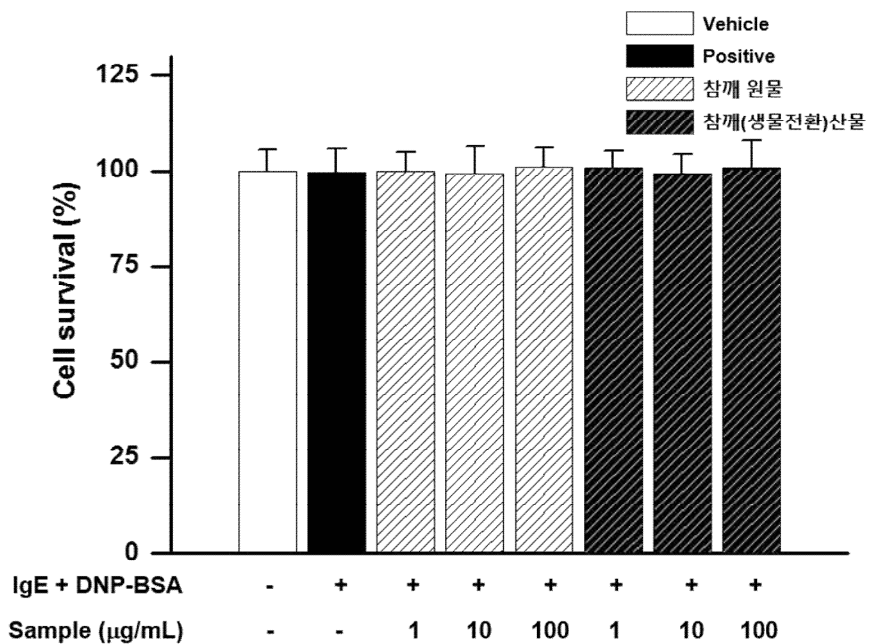


그림 226. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른 세포독성 측정

		Cell survival (%)
Vehicle		100.000 ± 2.758
Positive		99.271 ± 3.549
참깨 원물	1 µg/mL	99.309 ± 4.825
	10 µg/mL	98.196 ± 2.428
	100 µg/mL	99.282 ± 5.901
참깨(생물전환)산물	1 µg/mL	98.904 ± 4.462
	10 µg/mL	100.389 ± 7.524
	100 µg/mL	98.601 ± 5.964

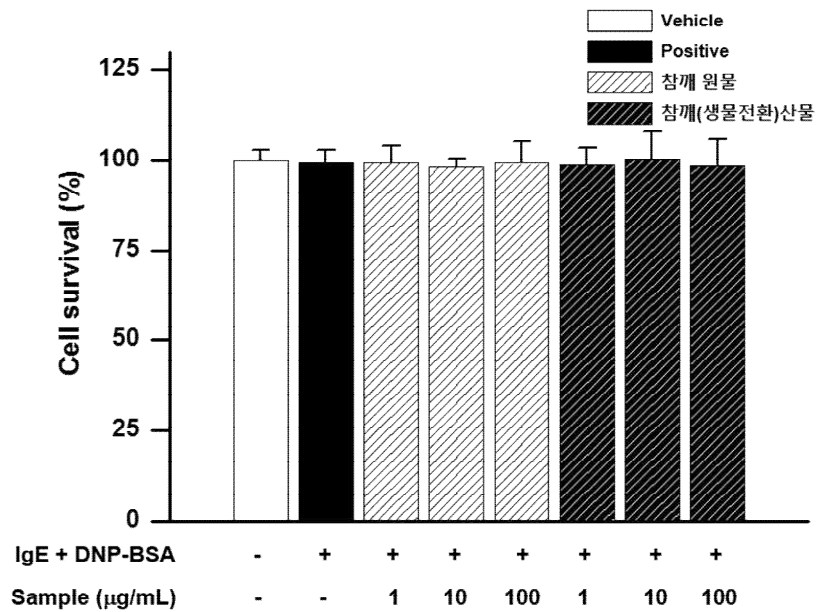


그림 227. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 감작과 동시 처리에 따른 세포독성 측정

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 4.753
Positive		100.000 $\pm$ 6.309
참깨 원물	1 $\mu$ g/mL	98.007 $\pm$ 7.851
	10 $\mu$ g/mL	81.254 $\pm$ 5.628
	100 $\mu$ g/mL	71.094 $\pm$ 6.221
참깨(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	95.609 $\pm$ 8.013
	10 $\mu$ g/mL	80.716 $\pm$ 4.527
	100 $\mu$ g/mL	70.834 $\pm$ 6.201

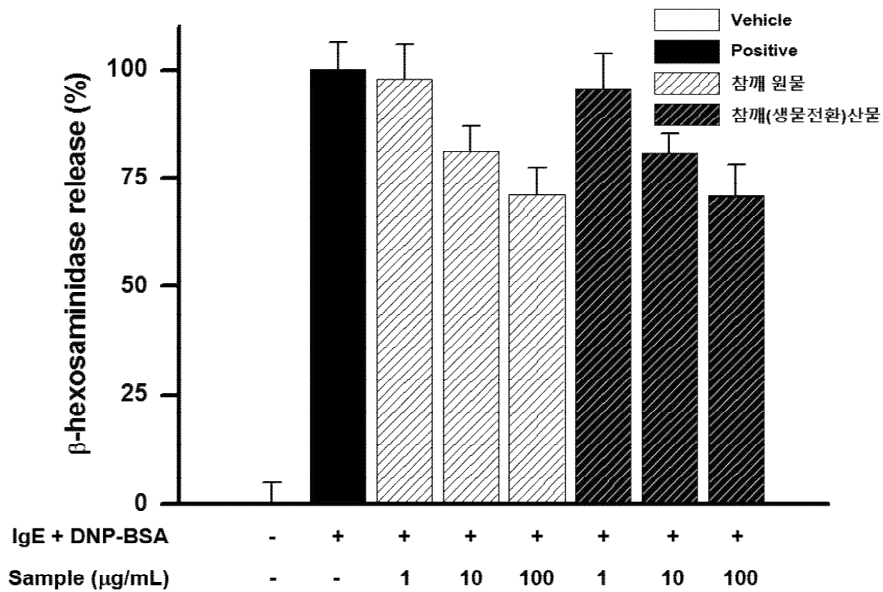


그림 228. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		$\beta$ -hexosaminidase release (%)
Vehicle		0.000 $\pm$ 3.081
Positive		100.000 $\pm$ 9.210
참깨 원물	1 $\mu$ g/mL	95.527 $\pm$ 2.536
	10 $\mu$ g/mL	90.735 $\pm$ 4.392
	100 $\mu$ g/mL	88.179 $\pm$ 1.464
참깨(생물전환)산물	1 $\mu$ g/mL	96.389 $\pm$ 6.201
	10 $\mu$ g/mL	90.825 $\pm$ 6.294
	100 $\mu$ g/mL	87.309 $\pm$ 7.271

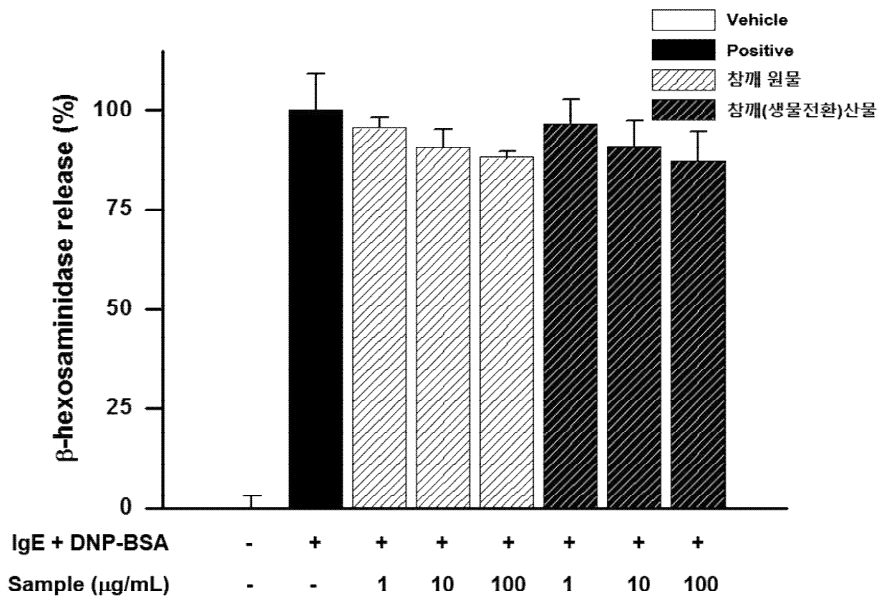


그림 229. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 감작과 동시 처리에 따른  $\beta$ -hexosaminidase 억제 효과

		Histamine release (%)
Vehicle		0.000 ± 4.063
Positive		100.000 ± 2.889
참깨 원물	1 µg/mL	95.627 ± 6.661
	10 µg/mL	86.312 ± 5.463
	100 µg/mL	79.283 ± 5.214
참깨(생물전환)산물	1 µg/mL	97.203 ± 7.243
	10 µg/mL	85.093 ± 6.443
	100 µg/mL	80.029 ± 4.821

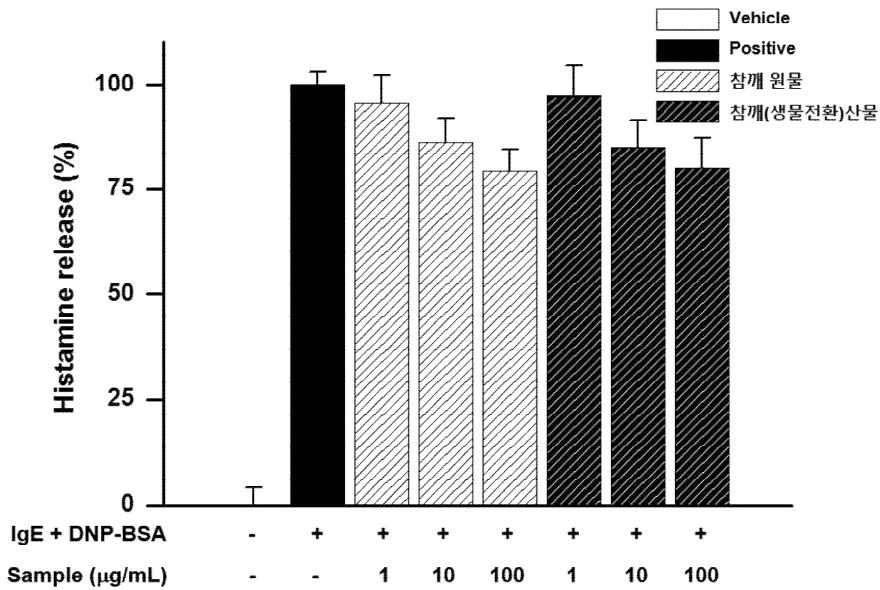


그림 230. RBL-2H3 세포주에 IgE/DNP-BSA 자극 시 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 자극 전 처리에 따른 histamine 억제 효과

## 2. DNCB 유도 아토피성 피부염 마우스모델에서의 효능 평가

### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 아토피성 피부염 억제 효능 평가

알레르기비염/천식 마우스모델에서 확인된 농산부산물 3개 개발소재의 IgE 생성 억제 활성과 부종 마우스모델에서 확인된 항염증 활성을 기반으로 하여, IgE 생성 관련 피부 염증 모델인 DNCB-유도 아토피 피부염 모델을 제작하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 1주일간 적응 후 사용하였다. 세가지 소재의 원물과 생물전환산물을 10 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이한 뒤 DNCB(Sigma, 237329)를 귀에 처리하여 감각하였으며, mite extract(BioStir, 307-34151)를 도포하여 자극하였다. 이후 1주일에 1회씩 총 4주간 DNCB와 mite extract를 도포하여 아토피 피부염을 유발하고 개발소재의 활성을 측정하였다.

#### (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과

DNCB 와 mite extract의 처리로 인해 유도된 아토피성 피부염 모델에서 귀 두께를 측정하여 미강(생물전환)산물이 갖는 종창 억제 효과를 확인하였다. 아토피성 피부염이 유발된 마우스에서는 귀 두께가 약 1.53배 증가하는 것이 관찰되었고, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 증가된 귀 두께가 각각 9.9%와 17% 감소하는 것으로 확인되었다.

표 125. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 귀 종창 억제 효과

Sample	Ear Thickness ( $\mu\text{m}$ )
Vehicle	238.0 $\pm$ 17.9
Positive control	364.0 $\pm$ 25.1
10 mg/kg 미강 원물	328.0 $\pm$ 8.4
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	302.0 $\pm$ 16.4

(2) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효과

아토피성 피부염이 유발됨에 따라 생성되는 IgE의 양을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 혈청 내 존재하는 IgE의 양을 측정한 결과, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서 각각 14%와 39%의 IgE 생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

표 126. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 IgE 생성 억제 효과

Sample	Total IgE in serum (ng/mL)
Vehicle	151.2 ± 10.3
Positive control	763.4 ± 56.9
10 mg/kg 미강 원물	657.2 ± 43.8
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	462.9 ± 22.5

(3) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

천식 유도 마우스모델에서 개발소재의 투여가 Th1/Th2 면역반응을 조절하여 염증반응을 완화시키는 결과를 얻음에 따라, 아토피성 피부염 마우스모델에서도 Th1/Th2 면역반응을 조절할 수 있는지 확인하였다. 비장세포 내의 IL-2의 mRNA양과 귀 조직 내의 IL-5 mRNA 양을 real time-PCR로 확인한 결과, 아토피성 피부염이 유발됨에 따라 감소하는 IL-2의 mRNA양은 회복되는 것으로 나타났으며 IL-5의 양은 감소하는 것으로 확인되었다. 이러한 효과는 미강 원물에 비해 미강(생물전환)산물에서 크게 증가하는 것으로 확인되었다.

표 127. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

Sample	IL-2 mRNA in splenocyte (relative fold change)	IL-5 mRNA in ear (relative fold change)
Vehicle	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Positive control	0.63 ± 0.04	9.3 ± 0.7
10 mg/kg 미강 원물	0.65 ± 0.03	8.6 ± 0.5
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	0.80 ± 0.04	7.2 ± 0.4

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 아토피성 피부염 억제 효능 평가

(1) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물 식이 후, 아토피성 피부염을 유발하고 귀 두께를 측정하였다. 그 결과, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 귀 종창이 각각 10.4%와 14.8% 감소하는 것으로 확인되었다.

표 128. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 귀 종창 억제 효과

Sample	Ear Thickness ( $\mu\text{m}$ )
Vehicle	238.0 $\pm$ 17.9
Positive control	364.0 $\pm$ 25.1
10 mg/kg 대두 원물	326.0 $\pm$ 15.2
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	310.0 $\pm$ 15.8

(2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효과

혈청 내 존재하는 IgE의 양을 확인한 결과, 대두 원물 투여 시 13%, 대두(생물전환)산물 투여 시 33%의 IgE 생성 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

표 129. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 IgE 생성 억제 효과

Sample	Total IgE in serum (ng/mL)
Vehicle	151.2 $\pm$ 10.3
Positive control	763.4 $\pm$ 56.9
10 mg/kg 대두 원물	662.9 $\pm$ 41.8
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	512.0 $\pm$ 31.2



(3) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

비장세포에서의 IL-2 mRNA 생성과 귀 조직 내 IL-5 mRNA 생성을 확인한 결과, IL-2 생성량의 회복 및 IL-5 생성량의 억제 효과를 보이는 것으로 관찰되었다. 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 대두 원물에 비해 대두(생물전환)산물의 효과가 큰 것으로 평가되었다.

표 130. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

Sample	IL-2 mRNA in splenocyte (relative fold change)	IL-5 mRNA in ear (relative fold change)
Vehicle	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Positive control	0.63 ± 0.04	9.3 ± 0.7
10 mg/kg 대두 원물	0.67 ± 0.05	8.8 ± 0.6
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	0.75 ± 0.05	7.6 ± 0.3

다. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 아토피성 피부염 억제 효능 평가

(1) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 귀 종창 억제 효과

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물 식이 후, 아토피성 피부염을 유발하고 귀 두께를 측정하였다. 그 결과, 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 귀 종창이 각각 6.6%와 10.4% 감소하는 것으로 확인되었다.

표 131. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 귀 종창 억제 효과

Sample	Ear Thickness ( $\mu\text{m}$ )
Vehicle	238.0 $\pm$ 17.9
Positive control	364.0 $\pm$ 25.1
10 mg/kg 참깨 원물	340.0 $\pm$ 31.6
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	326.0 $\pm$ 27.9

(2) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 IgE 생성 억제 효과

혈청 내 IgE 생성량을 확인한 결과 참깨 원물 투여 시 10%의 억제 효과를 보였으며 참깨(생물전환)산물 투여 시 28%의 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

표 132. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 IgE 생성 억제 효과

Sample	Total IgE in serum (ng/mL)
Vehicle	151.2 $\pm$ 10.3
Positive control	763.4 $\pm$ 56.9
10 mg/kg 참깨 원물	685.9 $\pm$ 44.6
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	548.7 $\pm$ 23.1

(3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

비장세포에서의 IL-2 mRNA, 귀 조직에서의 IL-5 mRNA 생성량을 확인하였다. 앞선 두 결과와 마찬가지로 IL-2 mRNA 생성량의 회복을 보였으며 IL-5 mRNA 생성량의 억제를 보였고, 참깨 원물에 비해 참깨(생물전환)산물에서 뛰어난 활성이 있는 것으로 확인되었다.

표 133. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 아토피성 피부염 마우스에서 Th1 cytokine 및 Th2 cytokine 조절 효과

Sample	IL-2 mRNA in splenocyte (relative fold change)	IL-5 mRNA in ear (relative fold change)
Vehicle	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Positive control	0.63 ± 0.04	9.3 ± 0.7
10 mg/kg 참깨 원물	0.64 ± 0.05	9.1 ± 0.7
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	0.69 ± 0.03	8.5 ± 0.3

### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항아토피피부염 효능 평가에 대한 실험적 의의

농산부산물 3개 개발소재의 항아토피 피부염 효능에 대한 평가를 RBL-2H3 비만세포주와 mite extract를 이용하여 유도한 아토피 피부염 마우스모델에서 확인하였다. RBL-2H3 세포주를 calcium ionophore인 A23187 또는 IgE/DNP-BSA로 자극하고 개발소재를 함께 처리한 경우, 농도 의존적인 비만세포 탈과립의 억제가 유도되는 것으로 확인되었다. 하지만, 실험에 사용한 개발소재의 원물과 생물전환산물은 효과의 차이가 나타나지 않았고, 비만세포에 직접 작용하는 생리활성물질은 대부분 원물에 존재하는 생리활성물질인 것으로 생각된다.

DNCB와 mite extract를 이용하여 아토피 피부염을 유발하고, 개발소재를 식이투여 한 마우스의 경우, 아토피 피부염으로 인한 귀의 종창이 억제되는 것으로 확인되었다. 특히, RBL-2H3를 이용한 *in vitro* 결과와는 달리, 생물전환산물이 원물에 비해 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 아토피 피부염은 알레르기비염/천식 모델과 마찬가지로 Th2 면역반응의 활성화가 주된 기전으로 작용하는데, 귀 조직 내 IL-2 mRNA와 IL-5 mRNA level을 확인한 결과처럼, 생물전환산물이 갖는 Th1 면역반응 활성화에 의해 Th2 면역반응이 억제되어 나타나는 효과인 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 3개 개발소재 모두 비만세포에 직접 작용하는 항염증 활성을 어느 정도 가지고 있는 것으로 평가되나, 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물에 비해 참깨(생물전환)산물의 경우 그러한 활성이 낮은 것으로 확인되었다. 또한, 생물전환공정을 통해 만들어지는 생물전환산물의 경우, Th1 면역반응을 활성화 시키는 생리활성에 의해 Th2 면역반응 관련 알레르기반응을 효과적으로 제어할 수 있는 소재로 사용될 수 있는 가능성이 크다고 평가된다.

## 17절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 부종 관련 효능 평가

: Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) 유도 부종 마우스모델에서의 효능 평가

### 1. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 부종 억제 효능 평가

앞선 결과에서 개발소재의 원물이 직접적으로 비만세포의 탈과립을 억제하는 활성을 가짐에 따라서, 비만세포를 직접 자극하여 염증반응을 유도하는 TPA-유도 부종 마우스모델을 제작하여 개발소재의 항염증 활성을 평가하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였고, 개발소재를 10 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이한 후, 160 uM의 TPA(Simga. P8139)를 마우스의 귀에 도포하여 염증을 유발하였다. 24시간 뒤 마우스를 희생하여 염증 유발 정도를 확인하였다.

#### 가. 귀 종창 억제 효과

TPA의 처리에 의해 유발된 귀 종창에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 종창 억제 효과를 확인하였다. 미강(생물전환)산물을 2주간 식이한 경우, 귀 두께의 증가가 38.1% 억제되는 것으로 확인되었으며, 미강 원물을 2주간 식이한 경우 역시 46%의 억제율을 보여, 미강 원물과 미강(생물전환)산물에서 큰 차이를 보이지 않았다.

		Ear thickness (μm)
Nomal		268 ± 13
TPA only		394 ± 16
10 mg/kg	미강 원물	336 ± 22
10 mg/kg	미강(생물전환)산물	356 ± 17

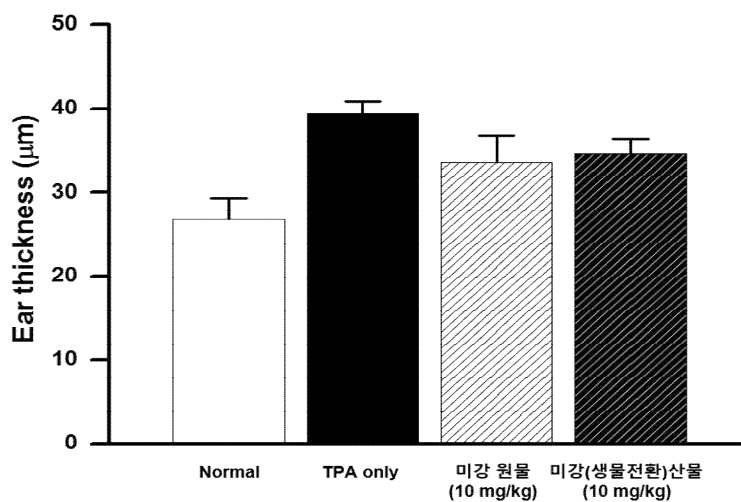


그림 231. TPA-유도 부종 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 따른 귀 종창 억제 효과

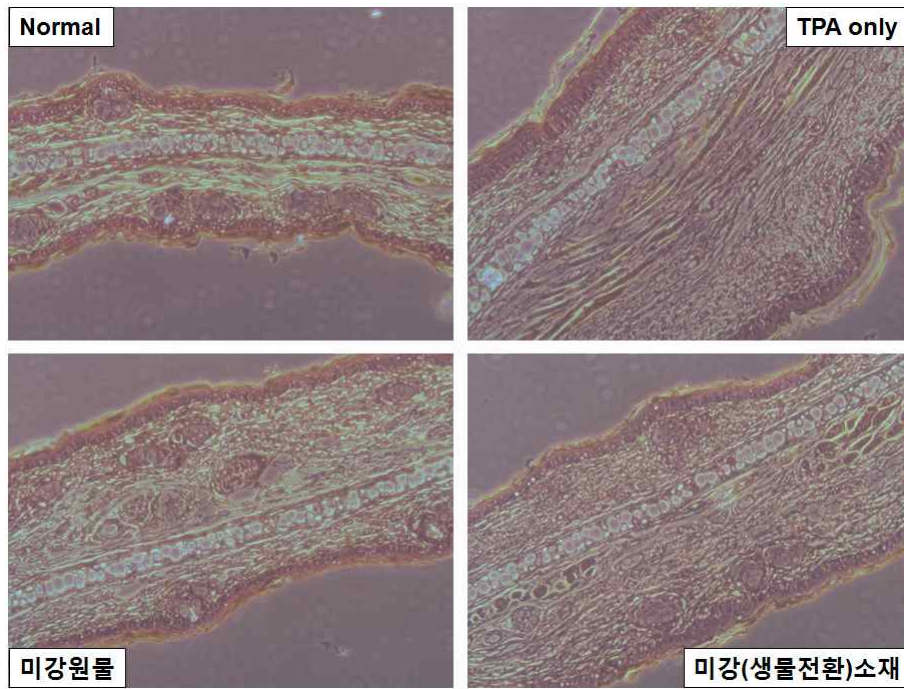


그림 232. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 투여한 TPA-유도 부종 마우스모델의 귀 조직 내 염증 완화 효과

### 나. Myeloperoxidase 억제 효과

비만세포의 활성화 지표 중 하나인 myeloperoxidase의 효소 활성화를 측정하여 미강(생물전환)산물의 항염증 활성을 평가하였다. 부종이 유도된 마우스 귀 조직 내 myeloperoxidase의 활성을 측정한 결과, 미강(생물전환)산물에서 33.3%의 효소 활성 억제율을 보였고 미강 원물 역시 31.5%의 억제율을 보여 미강 원물과 미강(생물전환)산물에서 큰 활성 차이를 보이지 않았다.

		Myeloperoxidase activity (units)
Normal		3.2 ± 0.2
TPA only		256.9 ± 17.5
10 mg/kg	미강 원물	176.9 ± 11.6
10 mg/kg	미강(생물전환)산물	172.4 ± 15.4

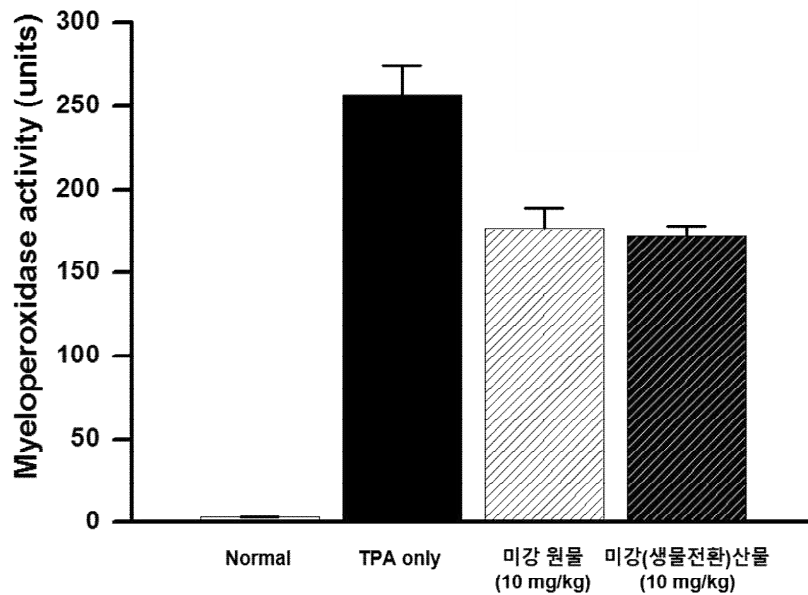


그림 233. TPA-유도 부종 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 따른 myeloperoxidase 억제 효과

다. 염증 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량 측정

염증이 유발된 귀 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량을 측정하였다. 대표적인 염증성 cytokine 인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ , IL-6의 양을 측정하였으며, 염증매개물질로는 prostaglandin E2와 leukotriene B4의 양을 측정하였다. 그 결과, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 모두 염증성 cytokine과 염증매개물질의 발현을 억제하여 염증반응을 제어할 수 있는 것으로 확인되었으며, 미강 원물과 미강(생물전환)산물 사이의 효과 차이는 보이지 않았다.

표 134. TPA-유도 부종 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 따른 염증성 cytokine 억제 효과

	Inflammatory cytokine (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
normal	7.9 $\pm$ 0.5	183.7 $\pm$ 11.8	203.4 $\pm$ 15.6
TPA only	86.8 $\pm$ 5.6	1098.5 $\pm$ 56.9	925.7 $\pm$ 56.9
10 mg/kg 미강 원물	58.4 $\pm$ 4.7	811.2 $\pm$ 44.2	715.4 $\pm$ 63.1
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	59.6 $\pm$ 1.8	826.7 $\pm$ 49.7	723.9 $\pm$ 52.8

표 135. TPA-유도 부종 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여에 따른 염증성 신호전달물질 억제 효과

	Eicosanoids (pg/mL)	
	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
normal	105.6 $\pm$ 8.4	52.3 $\pm$ 3.1
TPA only	926.7 $\pm$ 51.9	307.5 $\pm$ 15.6
10 mg/kg 미강 원물	808.2 $\pm$ 23.8	256.8 $\pm$ 11.7
10 mg/kg 미강(생물전환)산물	805.4 $\pm$ 44.9	251.2 $\pm$ 20.8



## 2. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 부종 억제 효능 평가

### 가. 귀 종창 억제 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 2주간 10 mg/kg의 농도로 식이한 후, TPA를 처리하여 귀의 부종을 유도하였다. 24시간 뒤 귀 두께를 측정된 결과, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물에서 각각 27% 와 33.3%의 귀 종창 억제 효과를 보여, 대두 원물과 대두(생물전환)산물에서 큰 차이를 보이지 않았다.

		Ear thickness ( $\mu\text{m}$ )
Normal		268 $\pm$ 13
TPA only		394 $\pm$ 16
10 mg/kg	대두 원물	360 $\pm$ 18
10 mg/kg	대두(생물전환)산물	352 $\pm$ 15

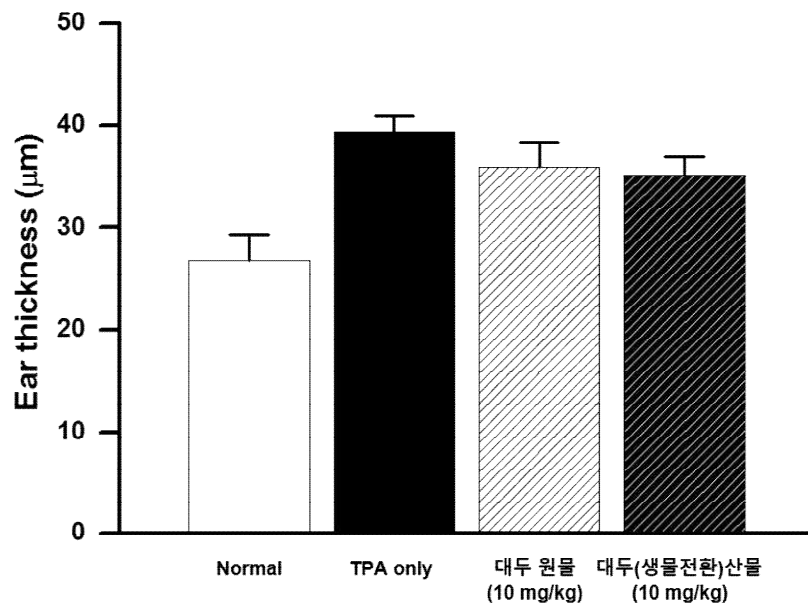


그림 234. TPA-유도 부종 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여에 따른 귀 종창 억제 효과

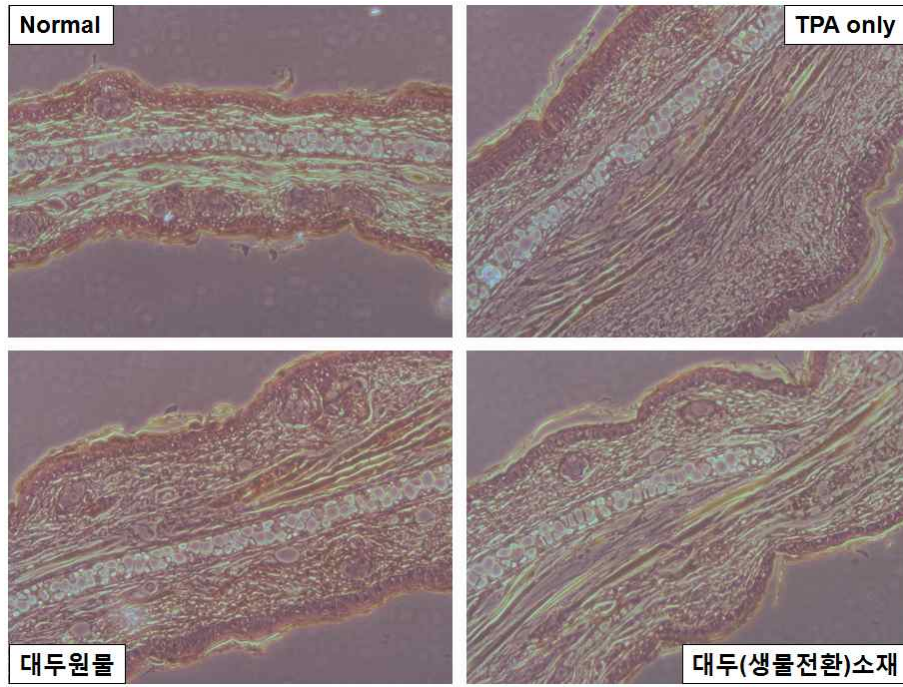


그림 235. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 투여한 TPA-유도 부종 마우스모델의 귀 조직 내 염증 완화 효과

#### 나. Myeloperoxidase 억제 효과

귀 조직 내 myeloperoxidase 활성을 측정한 결과, 대두 원물을 식이한 마우스에서 29.2%의 억제 효과를 보였고, 대두(생물 전환)산물을 식이한 마우스에서 28.9%의 억제 효과를 보이는 것으로 확인되어 대두 원물과 대두(생물 전환)산물 사이에 큰 차이를 보이지 않았다.

		Myeloperoxidase activity (units)
Normal		3.2 ± 0.2
TPA only		256.9 ± 17.5
10 mg/kg	대두 원물	182.7 ± 10.9
10 mg/kg	대두(생물 전환)산물	183.5 ± 13.4

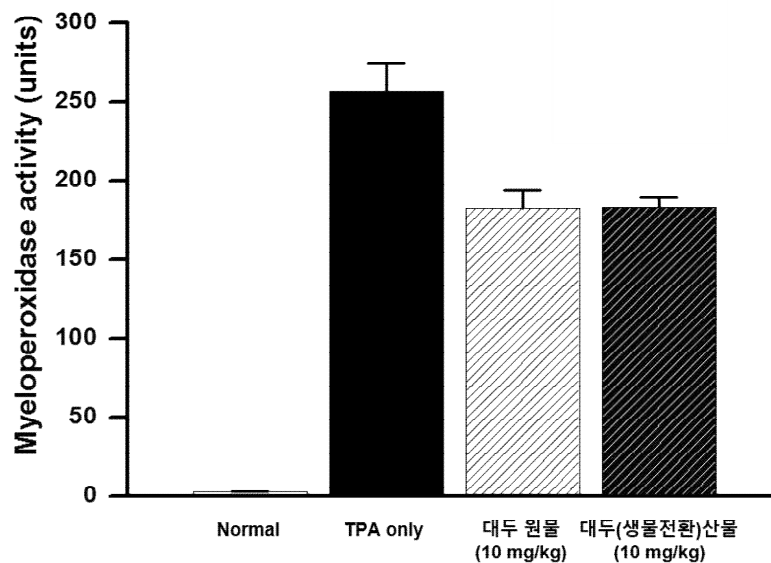


그림 236. TPA-유도 부종 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물 전환)산물의 투여에 따른 myeloperoxidase 억제 효과

**다. 염증 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량 측정**

귀 조직 내 염증성 cytokine과 염증매개물질의 발현량을 측정하였다. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물 모두 염증성 cytokine과 염증매개물질의 발현을 억제하는 효과를 보였으며, 대두 원물과 대두(생물전환)산물 사이의 효과 차이는 없는 것으로 확인되었다.

표 136. TPA-유도 부종 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여에 따른 염증성 cytokine 억제 효과

	Inflammatory cytokine (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
normal	7.9 $\pm$ 0.5	183.7 $\pm$ 11.8	203.4 $\pm$ 15.6
TPA only	86.8 $\pm$ 5.6	1098.5 $\pm$ 56.9	925.7 $\pm$ 56.9
10 mg/kg 대두 원물	63.7 $\pm$ 5.6	841.8 $\pm$ 52.5	759.2 $\pm$ 56.3
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	62.8 $\pm$ 3.7	839.7 $\pm$ 38.6	752.4 $\pm$ 55.7

표 137. TPA-유도 부종 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여에 따른 염증성 신호전달물질 억제 효과

	Eicosanoids (pg/mL)	
	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
normal	105.6 $\pm$ 8.4	52.3 $\pm$ 3.1
TPA only	926.7 $\pm$ 51.9	307.5 $\pm$ 15.6
10 mg/kg 대두 원물	823.6 $\pm$ 61.5	259.7 $\pm$ 16.9
10 mg/kg 대두(생물전환)산물	830.7 $\pm$ 29.7	253.6 $\pm$ 12.2

### 3. 참깨(생물전환)산물의 부종 억제 효능 평가

#### 가. 귀 종창 억제 효과

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 10 mg/kg의 농도로 2주간 식이한 후, TPA를 처리하여 귀의 부종을 유도하고 귀의 두께를 측정하여 염증 유발 정도를 확인하였다. 참깨 원물 투여 시 11.1%, 참깨(생물전환)산물 투여 시 17.5%의 염증 억제 효과를 보여, 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물에서 큰 차이를 보이지 않았다.

		Ear thickness ( $\mu\text{m}$ )
Normal		268 $\pm$ 13
TPA only		394 $\pm$ 16
10 mg/kg	참깨 원물	380 $\pm$ 17
10 mg/kg	참깨(생물전환)산물	350 $\pm$ 16

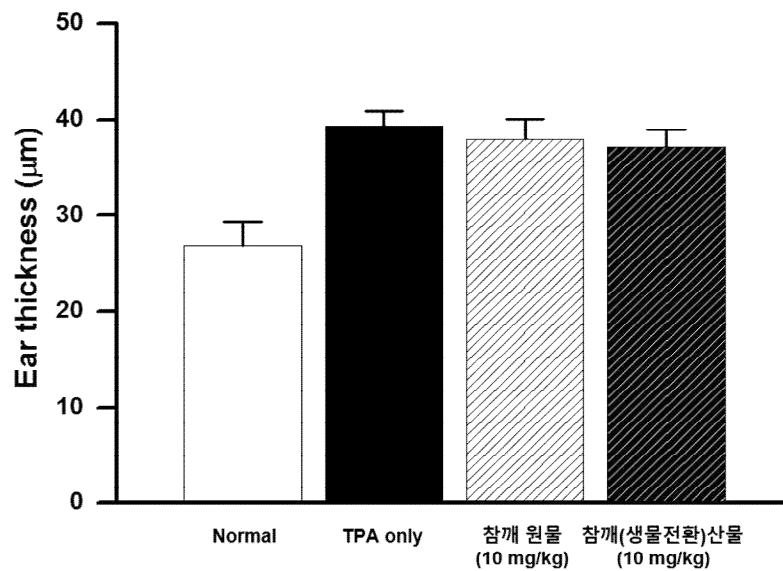


그림 237. TPA-유도 부종 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 따른 귀 종창 억제 효과

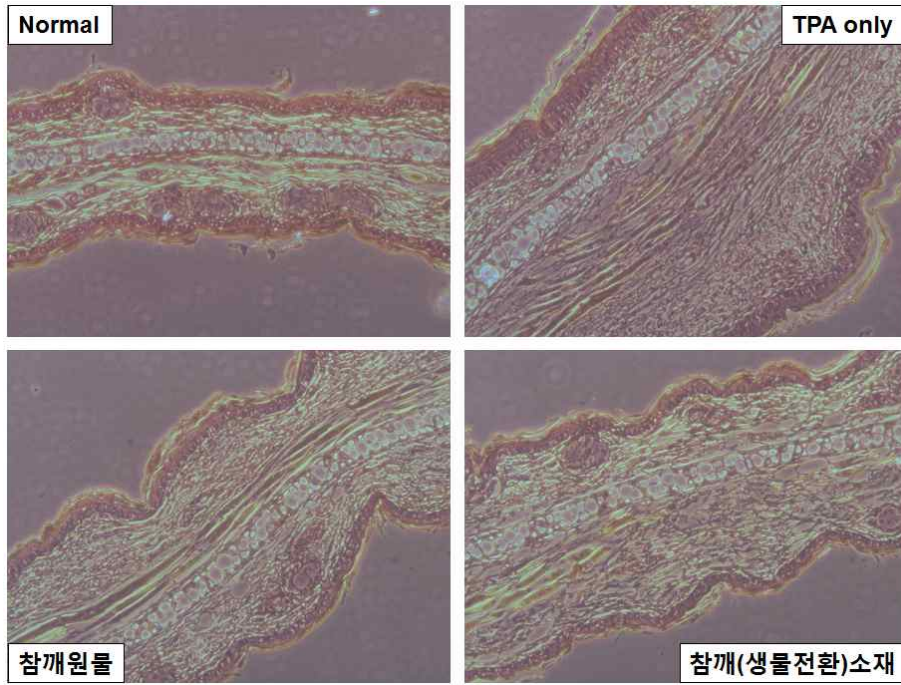


그림 238. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 TPA-유도 부종 마우스모델의 귀 조직 내 염증 완화 효과

## 나. Myeloperoxidase 억제 효과

귀 조직 내 myeloperoxidase의 활성 정도를 측정한 결과, 참깨 원물 투여 마우스에서는 23%의 myeloperoxidase 활성 억제를 보였고, 참깨(생물전환)산물 투여 마우스에서는 21.1%의 myeloperoxidase 활성 억제를 보이는 것으로 확인되어 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 사이에 큰 차이를 보이지 않았다.

		Myeloperoxidase activity (units)
Normal		3.2 ± 0.2
TPA only		256.9 ± 17.5
10 mg/kg	참깨 원물	198.6 ± 12.5
10 mg/kg	참깨(생물전환)산물	203.4 ± 17.9

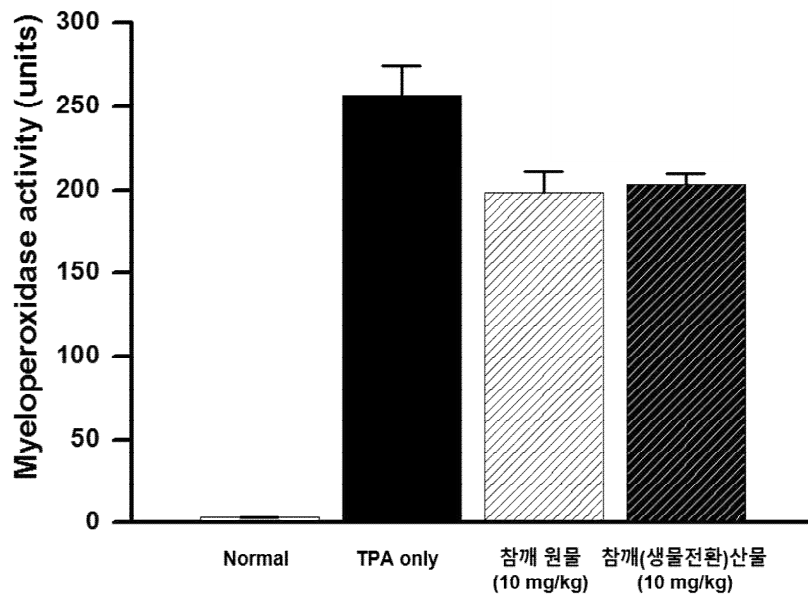


그림 239. TPA-유도 부종 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 따른 myeloperoxidase 억제 효과

**다. 염증 조직 내 cytokine 및 염증매개물질의 발현량 측정**

귀 조직 내 염증성 cytokine 및 염증매개물질의 발현량을 측정한 결과, 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 투여한 마우스에서 모두 염증성 cytokine과 염증매개물질의 발현을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물과 마찬가지로 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물 간의 차이는 보이지 않았다.

표 138. TPA-유도 부종 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 따른 염증성 cytokine 억제 효과

	Inflammatory cytokine (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
normal	7.9 $\pm$ 0.5	183.7 $\pm$ 11.8	203.4 $\pm$ 15.6
TPA only	86.8 $\pm$ 5.6	1098.5 $\pm$ 56.9	925.7 $\pm$ 56.9
10 mg/kg 참깨 원물	68.9 $\pm$ 5.9	883.4 $\pm$ 61.1	793.6 $\pm$ 63.7
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	70.1 $\pm$ 6.0	872.0 $\pm$ 72.8	782.8 $\pm$ 60.6

표 139. TPA-유도 부종 마우스모델에서 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 투여에 따른 염증성 신호전달물질 억제 효과

	Eicosanoids (pg/mL)	
	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
normal	105.6 $\pm$ 8.4	52.3 $\pm$ 3.1
TPA only	926.7 $\pm$ 51.9	307.5 $\pm$ 15.6
10 mg/kg 참깨 원물	854.9 $\pm$ 53.2	281.5 $\pm$ 9.8
10 mg/kg 참깨(생물전환)산물	842.7 $\pm$ 57.6	289.3 $\pm$ 22.6



#### 4. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 항부종 효능 평가에 대한 실험적 의의

농산부산물 3개 개발소재의 피부 부종 억제 효능에 대한 평가를 TPA를 이용하여 유도한 피부 부종 마우스모델에서 확인하였다. 앞선 아토피 피부염 결과에서, 3개 개발소재 모두 RBL-2H3 세포주에 대한 직접적인 항염증 활성을 일부 가지고 있었기 때문에, 비만세포를 직접 자극하여 염증을 유발하는 TPA 유도 부종 모델에서 개발소재의 활성을 평가하고자 하였다.

마우스에 개발소재를 2주간 식이투여 하고 귀의 피부에 TPA를 도포하여 24시간 동안 염증반응을 유도한 결과, 3개 개발소재 모두 어느 정도의 종창 억제 및 염증성 cytokine 억제, eicosanoids의 생성 억제 효과가 있는 것으로 평가되었으며, 참깨(생물전환)산물에 비하여 미강(생물전환)산물과 대두(생물전환)산물의 항염증 활성이 높은 것으로 확인되었다. 다만, RBL-2H3 세포주를 이용한 실험과 마찬가지로 원물과 생물전환산물의 차이는 없는 것으로 확인되었으며, TPA는 비만세포 내 PKC 단백질의 활성화를 직접적으로 유도하여 빠르고 강한 염증반응을 일으키는 물질이기 때문에, 생물전환산물이 갖는 Th1 면역반응 활성화 효과에 의해서는 추가적인 억제 효과를 나타내지 못하는 것으로 보인다. 하지만, 원물에 존재하는 항염증물질이 생물전환공정을 거치더라도 활성을 잃지 않고 유지되어 생물전환산물에서도 동일한 수준의 활성을 나타내는 것으로 확인되었기 때문에, 항염증활성이 뛰어난 원물을 이용하여 생물전환산물을 제조했을 경우 면역반응의 조절 효과와 함께 높은 항염증활성을 갖는 소재를 개발할 가능성이 있을 것이라 생각된다.

## 18절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물 의 대장염증 완화 효능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 대장염증 완화 효과를 확인하기 위하여, dextran sulfate sodium (DSS, MW 36,000-50,000)을 이용한 대장염증 마우스모델을 제작하고, 개발소재의 염증 완화 효과를 확인하였다. 실험군당 10마리의 6주령 수컷 C57BL/6 마우스를 1주일간 적응시킨 뒤 사용하였으며, 개발소재를 40 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 식이하였다. 이후 물에 녹인 3%의 DSS를 5일간 음수하게 하여 대장염증을 유도하였고, 10일 뒤 마우스를 희생하여 대장염증의 완화 여부를 확인하였다.

### 1. DSS로 유도된 대장염증 마우스모델에서 체중 변화 및 대장 염증 완화 효과 확인

DSS로 유도된 대장염증 마우스모델에서 개발소재의 투여로 인한 체중 변화 및 대장 염증을 완화 효과를 확인하였다. 개발소재를 2주간 식이한 뒤 DSS의 투여로 대장염증을 유도하고, 체중과 대장 길이, 대장 조직 염색, 대장 조직 내 myeloperoxidase 활성화를 확인하여 염증 완화 효과를 평가하였다.

### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 염증 완화 효과 확인

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대장염증 완화 효과를 확인하였다. 대장염증의 유발로 인해 감소한 체중과 대장의 길이는 미강 원물의 식이를 통해 약간 회복되는 결과를 확인하였으나, 미강(생물전환)산물 식이 시에는 미강 원물과 비해 더 높은 효과를 보이지는 않는 것으로 확인되었다. 대장 조직 내 염증지표로 확인한 myeloperoxidase activity 역시 미강 원물의 식이에 의해 약간 감소하며, 미강(생물전환)산물에도 비슷한 수준의 활성이 유지되는 것으로 확인되었다. 따라서, 미강 원물에 포함되어 있는 항염증 성분이 대장염증에 대한 억제 효과를 보이며, 미강(생물전환)산물에서도 동일한 생리활성 성분이 유지되어 효과를 갖는 것으로 생각된다.

표 140. DSS로 유도된 대장염증 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 식이가 마우스 체중과 대장 길이에 미치는 효과

Treatment	Body Weight (g)	Colon Length (cm)
Normal mice	24.1 ± 1.1	8.9 ± 1.1
DSS only	21.3 ± 2.3	6.3 ± 0.8
40 mg/kg 미강 원물	21.8 ± 2.1	6.6 ± 0.7
40 mg/kg 미강(생물전환)산물	21.9 ± 2.2	6.9 ± 0.8

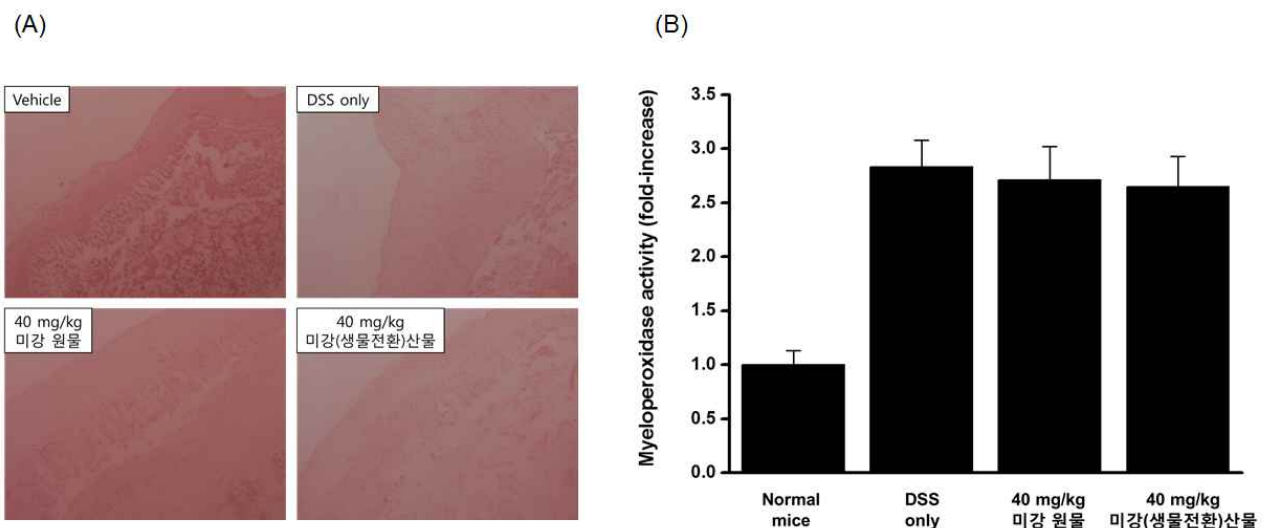


그림 240. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물이 대장 조직 내 염증 완화에 미치는 효과

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 염증 완화 효과 확인

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 대장염증 완화 효과를 확인한 결과, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물은 모두 대장염증에 대한 완화 효과를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 미강 원물과 달리 대두 원물에는 항염증 활성을 갖는 생리활성 성분이 없는 것으로 생각되며, 따라서 대두(생물전환)산물 역시 대장염증에 대한 항염증 활성은 갖지 못하는 것으로 보인다.

표 141. DSS로 유도된 대장염증 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 식이가 마우스 체중과 대장 길이에 미치는 효과

Treatment	Body Weight (g)	Colon Length (cm)
Normal mice	24.1 ± 1.1	8.9 ± 1.1
DSS only	21.3 ± 2.3	6.3 ± 0.8
40 mg/kg 대두 원물	21.1 ± 2.3	6.2 ± 0.8
40 mg/kg 대두(생물전환)산물	21.0 ± 2.2	6.3 ± 0.7

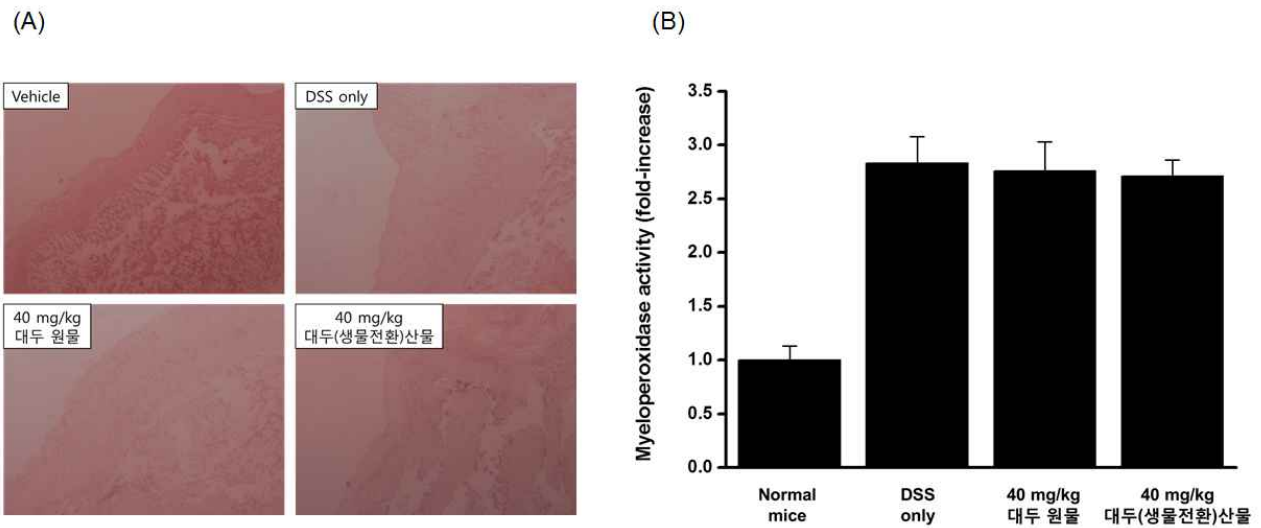


그림 241. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물이 대장 조직 내 염증 완화에 미치는 효과

다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 염증 완화 효과 확인

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 대장염증 완화 효과를 확인한 결과, 두 소재 모두 대장염증에 대한 완화 효과는 없는 것으로 확인되었다. 대두 개발소재와 마찬가지로, 대장염증에 대한 생리활성 성분이 원물과 생물전환산물 모두에 포함되어 있지 않는 것으로 생각된다.

표 142. DSS로 유도된 대장염증 마우스모델에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 식이가 마우스 체중과 대장 길이에 미치는 효과

Treatment	Body Weight (g)	Colon Length (cm)
Normal mice	24.1 ± 1.1	8.9 ± 1.1
DSS only	21.3 ± 2.3	6.3 ± 0.8
40 mg/kg 참깨박 원물	21.2 ± 2.5	6.4 ± 0.7
40 mg/kg 참깨박(생물전환)원물	21.5 ± 2.4	6.4 ± 0.8

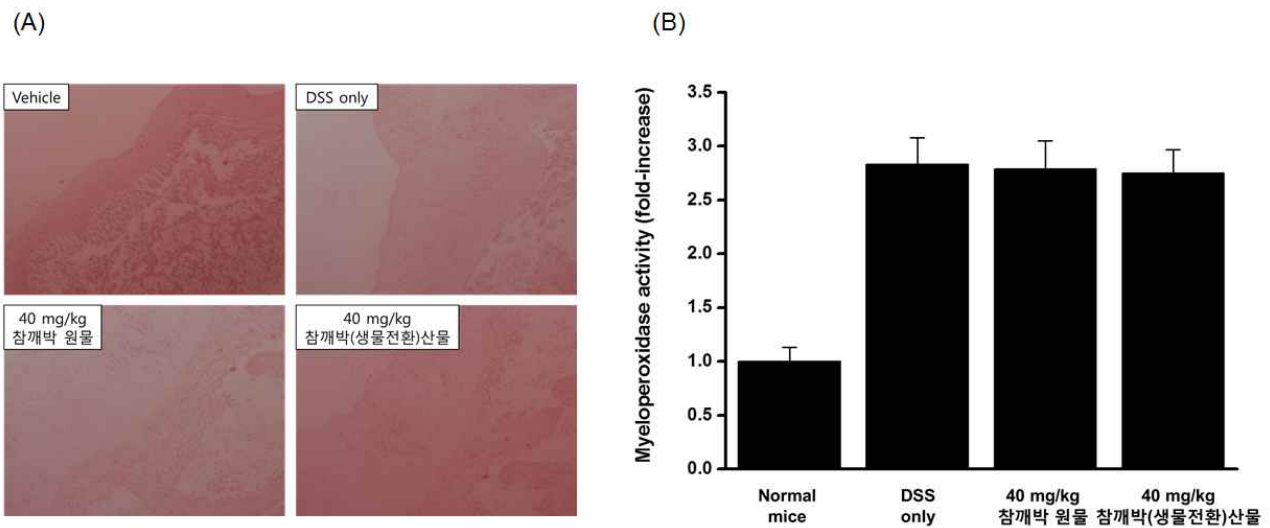


그림 242. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물이 대장 조직 내 염증 완화에 미치는 효과

## 2. 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

대장염증의 유발로 인해 발생하는 염증성 cytokine의 양을 확인하였다. 대장염증이 유발된 마우스를 희생한 뒤, 심장에서 채혈 후 혈청을 분리하였으며, 분리한 혈청 내 염증성 cytokine의 양을 ELISA 방법을 통해 확인하였다.

### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능을 확인한 결과, 미강 원물과 미강(생물전환)산물 모두 약간의 염증성 cytokine 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 특히, 염증조직의 완화 효과와는 다르게, 미강(생물전환)산물의 경우 미강 원물보다 더 높은 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는, 미강(생물전환)산물이 염증조직에 대한 직접적인 항염증 효과는 미강 원물과 동일하지만, 체내의 전체적인 염증반응 및 면역반응을 조절할 수 있는 능력이 있음을 시사한다.

표 143. 대장염증 마우스모델에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제 효과

Sample		Cytokine (pg/mL)		
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Vehicle		215 $\pm$ 17	1184 $\pm$ 56	2893 $\pm$ 162
DSS only		307 $\pm$ 25	1632 $\pm$ 98	3085 $\pm$ 275
미강 원물	40 mg/kg 식이투여	282 $\pm$ 13	1511 $\pm$ 130	3016 $\pm$ 154
미강 (생물전환)산물	40 mg/kg 식이투여	270 $\pm$ 22	1502 $\pm$ 117	3004 $\pm$ 205

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 염증성 cytokine의 양을 확인하였다. 대두 원물의 경우 염증성 cytokine의 생성량을 거의 억제하지 못하는 것으로 확인되었으나, 대두(생물전환)산물의 경우는 약간의 cytokine 생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 미강(생물전환)산물과 마찬가지로, 생물전환공정을 통해 개발된 소재가 체내의 전체적인 면역반응을 조절하여 나타난 효과인 것으로 생각된다.

표 144. 대장염증 마우스모델에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제 효과

Sample		Cytokine (pg/mL)		
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Vehicle		215 $\pm$ 17	1184 $\pm$ 56	2893 $\pm$ 162
DSS only		307 $\pm$ 25	1632 $\pm$ 98	3085 $\pm$ 275
대두 원물	40 mg/kg	301 $\pm$ 24	1603 $\pm$ 137	3058 $\pm$ 209
대두 (생물전환)산물	40 mg/kg	285 $\pm$ 20	1556 $\pm$ 78	3025 $\pm$ 177

다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 염증성 cytokine 억제 효과를 확인하였다. 참깨박 원물을 식이한 경우, 염증성 cytokine의 생성을 거의 억제하지 못하였으나, 참깨박(생물전환)산물을 식이한 경우 염증성 cytokine이 약간 억제되는 것으로 확인되었다. 미강, 대두 개발소재와 마찬가지로 생물전환산물의 경우 체내 면역반응의 조절을 통한 효과인 것으로 판단된다.

표 145. 대장염증 마우스모델에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 염증성 cytokine 생성 억제 효과

Sample		Cytokine (pg/mL)		
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Vehicle		215 $\pm$ 17	1184 $\pm$ 56	2893 $\pm$ 162
DSS only		307 $\pm$ 25	1632 $\pm$ 98	3085 $\pm$ 275
참깨박 원물	40 mg/kg	303 $\pm$ 16	1617 $\pm$ 126	3055 $\pm$ 214
참깨박 (생물전환)산물	40 mg/kg	291 $\pm$ 21	1583 $\pm$ 109	3020 $\pm$ 185



### 3. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 대장염증 완화 효능 평가에 대한 실험적 의의

DSS의 섭취로 인해 유발된 마우스 대장 염증에 대한 농산부산물 3개 개발소재의 억제 효능을 확인하였다. DSS에 의해 유도되는 대장염증은 inflammasome 활성화에 의한 과도한 염증반응의 결과이며, 본 연구에서 사용한 개발소재의 면역조절 생리활성에 의해 일부 억제되는 것으로 확인되었다. 본 연구의 결과, 미강 원물에서 약간의 염증억제활성이 나타났으며 미강(생물전환)산물의 경우 미강 원물이 갖는 염증억제활성이 유지되는 것으로 확인되었다. 또한, 미강 원물에 비해 미강(생물전환)산물의 경우 염증성 cytokine을 더 감소시키는 결과로 보아, 미강(생물전환)산물이 갖는 면역조절 활성이 DSS에 의해 유발된 염증반응을 조절한 것이라 생각된다. 대두 및 참깨박 개발소재의 경우 원물이 갖는 염증억제활성은 없었으나, 각 소재의 생물전환산물은 염증성 cytokine을 일부 감소시킬 수 있는 것으로 확인되었다. 다만, 대장 조직에 대한 직접적인 염증억제활성은 낮은 것으로 평가된다.

최근의 연구 결과에 따르면, DSS에 의한 급성대장염증모델에서 inflammasome의 활성화는 대장 상피조직의 보호 기능을 하지만, 만성대장염증모델에서는 오히려 염증반응을 더 유도한다고 보고되어 있다 (Zaki, M. H. *et al. Immunity*. 2010., Allen, I. C. *et al. J. Exp. Med.* 2010.). 따라서, 개발소재가 갖는 inflammasome 조절 효과를 확인할 필요가 있으며, 급성대장염증모델과 만성대장염증모델에서 개발소재의 생리효과를 비교, 평가할 필요가 있다.

## 19절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 항암 효능 평가

농산부산물 3개 개발소재의 항암 효능을 평가하기 위하여, 마우스 유래 대장암 세포주인 CT-26 세포주를 사용하여 *in vitro* 항암활성 및 *in vivo* 항암활성을 확인하였다. 배양중인 CT-26 세포주에 개발소재를 농도별로 처리하여 직접적인 암세포 살해활성을 측정하였으며, CT-26 피하 이식 및 폐 전이 마우스 모델을 제작하여 개발소재의 *in vivo* 항암활성을 측정하였다.

### 1. 개발소재의 *in vitro* 종양억제활성 확인

개발소재가 갖는 직접적인 암세포 살해활성을 확인하기 위해, 96 well plate에서 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 개발소재를  $1 \times 10^4$  cells/well의 CT-26 세포주에 48시간 동안 처리한 뒤, MTT assay를 통해 세포의 생존률을 확인하였다.

#### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 *in vitro* 종양억제활성 확인

농도별 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 *in vitro* 종양억제활성을 측정한 결과, 모든 농도에서 암세포에 대한 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

표 146. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 CT-26 대장암 세포주에 대한 세포독성 평가

Sample	Cell Survival (%)	
Vehicle	100.0 $\pm$ 7.3	
미강 원물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99.4 $\pm$ 8.2
	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	101.6 $\pm$ 5.3
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100.7 $\pm$ 7.2
	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	98.9 $\pm$ 5.4
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99.7 $\pm$ 4.2
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	101.5 $\pm$ 1.4
	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100.8 $\pm$ 0.9
미강(생물전환)산물	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	98.4 $\pm$ 5.3
	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	102.6 $\pm$ 7.0
	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99.7 $\pm$ 4.2
	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100.2 $\pm$ 2.6
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	101.3 $\pm$ 4.7
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100.8 $\pm$ 5.1
	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	98.2 $\pm$ 3.3

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 *in vitro* 종양억제활성 확인

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 농도별로 CT-26 암세포주에 처리한 결과, 모든 농도에서 암세포에 대한 직접적인 살해활성은 나타나지 않았다.

표 147. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 CT-26 대장암 세포주에 대한 세포독성 평가

Sample	Cell Survival (%)	
Vehicle	100.0 ± 7.3	
대두 원물	1 µg/mL	99.4 ± 2.5
	5 µg/mL	101.6 ± 1.4
	10 µg/mL	98.7 ± 5.2
	50 µg/mL	102.4 ± 2.8
	100 µg/mL	99.3 ± 5.8
	500 µg/mL	102.6 ± 7.4
	1000 µg/mL	100.5 ± 5.9
대두(생물전환)산물	1 µg/mL	100.2 ± 3.7
	5 µg/mL	99.6 ± 4.5
	10 µg/mL	101.3 ± 4.2
	50 µg/mL	99.5 ± 2.6
	100 µg/mL	101.7 ± 3.9
	500 µg/mL	98.4 ± 4.4
	1000 µg/mL	101.8 ± 6.7

다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 *in vitro* 종양억제활성 확인

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 농도별로 CT-26 세포주에 처리한 결과, 모든 농도에서 암세포에 대한 살해활성은 갖지 않는 것으로 확인되었다.

표 148. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 CT-26 대장암 세포주에 대한 세포독성 평가

Sample	Cell Survival (%)	
Vehicle	100.0 ± 7.3	
참깨 원물	1 µg/mL	98.6 ± 2.7
	5 µg/mL	100.5 ± 3.6
	10 µg/mL	101.2 ± 2.4
	50 µg/mL	99.6 ± 5.2
	100 µg/mL	100.4 ± 3.2
	500 µg/mL	100.2 ± 5.7
	1000 µg/mL	99.4 ± 2.6
참깨박(생물전환)산물	1 µg/mL	99.8 ± 0.8
	5 µg/mL	100.4 ± 6.2
	10 µg/mL	101.3 ± 5.4
	50 µg/mL	98.6 ± 7.2
	100 µg/mL	100.3 ± 2.8
	500 µg/mL	101.3 ± 2.6
	1000 µg/mL	98.9 ± 4.5

## 2. 마우스모델에서 피하 이식된 종양의 성장 억제 및 염증관련 단백질 발현 억제 확인

농산부산물 3개 개발소재가 모두 암세포주에 대한 직접적인 살해활성을 갖지 않음에 따라, 종양 이식 마우스에서 종양미세환경의 변화에 따른 개발소재의 항암활성을 평가하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 1주일 적응 후 개발소재를 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 2주간 식이투여 하였다. 이 후, 마우스의 왼쪽 옆구리에  $1 \times 10^6$  cells의 CT-26을 주사하였고, 개발소재의 식이투여를 유지하며 3주간 종양의 발달을 유도하였다. 이 후 마우스를 희생하여 종양 및 비장의 적출, 복강 대식세포 및 혈청을 회수하였고, 종양면역반응의 변화 및 종양조직 내 변화를 확인하였다.

미강 원물 및 미강(생물전환)산물, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물, 그리고 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 소재를 각각 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 2주간 식이한 마우스에 CT-26 종양을 이식하였다. 3주 후 적출한 종양의 무게 및 종양조직 내 eicosanoids를 측정하여 3개 개발소재의 투여에 의한 종양조직 내 변화를 확인하였다.

## 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피하 이식 종양 억제 효과 확인

### (1) 종양 무게 측정 및 조직 염색

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 종양 이식 마우스의 종양 무게를 측정한 결과, 미강 원물 식이투여 시 약 14.3%, 미강(생물전환)산물 투여 시 약 32.1%의 종양 무게가 감소한 것으로 확인되었다. 또한, 종양조직을 염색하여 확인한 결과, 종양조직 특이적인 신생혈관의 생성이 감소하였으며, 조직의 치밀도 역시 감소되어 있는 것으로 확인되었다. 이러한 효과는, 미강에 존재하는  $\gamma$ -oryzanol, ricetrienol, ferulic acid 등의 생리활성 성분과 더불어, 미강(생물전환)산물에 의한 면역세포의 활성화에 의한 것으로 추측되며, 미강 원물과 미강(생물전환)산물의 성분분석을 통해 비교할 필요가 있다.

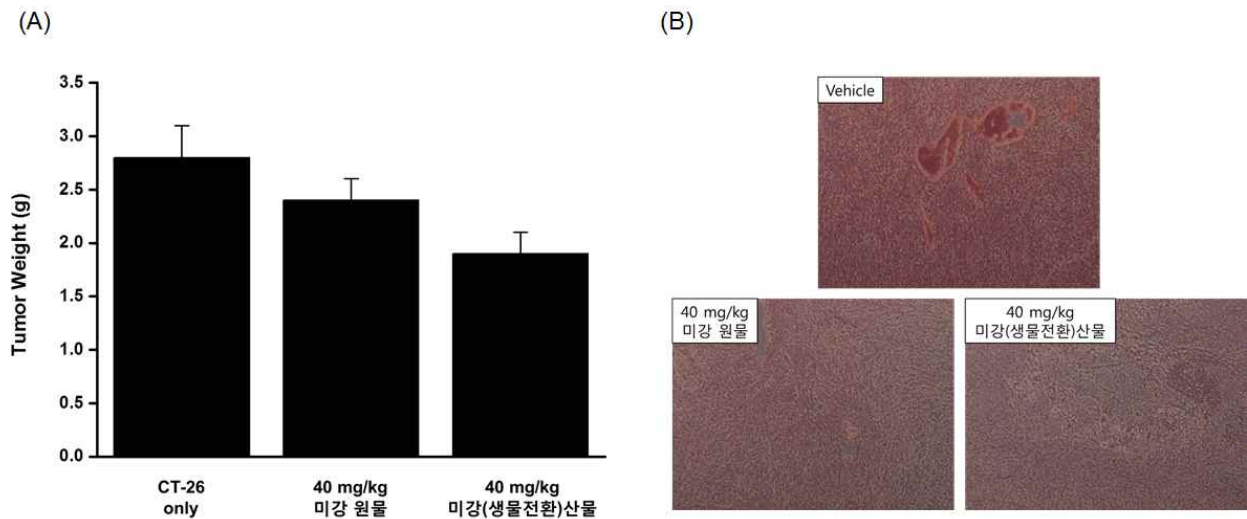


그림 243. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 마우스 이식 종양 성장 억제 효과

### (2) 종양조직 내 eicosanoids 측정

종양의 발달에 관여하는 eicosanoids인  $PGE_2$ 와  $LTB_4$ 의 종양조직 내 발현량을 확인하였다. 그 결과, 미강 원물을 식이한 마우스에서는  $PGE_2$ 와  $LTB_4$ 가 각각 21%, 23% 억제되는 것으로 확인되었고, 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 두가지 모두 38% 억제되는 것으로 확인되었다.

표 149. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 종양 이식 마우스에서 종양조직 내 eicosanoids의 측정

Treatment	Eicosanoids (pg/mL)	
	$PGE_2$	$LTB_4$
CT-26 only	826 ± 53	1837 ± 82
40 mg/kg 미강 원물	652 ± 27	1420 ± 63
40 mg/kg 미강(생물전환)산물	510 ± 36	1132 ± 57

## 나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피하 이식 종양 억제 효과 확인

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 식이한 마우스에서 종양조직의 변화를 관찰하였다. 종양의 무게 측정 및 조직 염색, 종양조직 내 eicosanoids의 양을 측정하여 대두 개발소재가 갖는 종양 억제 효과를 평가하였다.

### (1) 종양 무게 측정 및 조직 염색

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과, 대두 원물을 식이한 마우스에서는 종양의 무게 및 조직의 변화를 보이지 않았다. 반면, 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 종양의 무게가 약 14.3% 감소하는 것으로 확인되었으며, 조직 내 혈관 생성 억제 및 조직의 괴사가 진행되는 것으로 확인되었다.

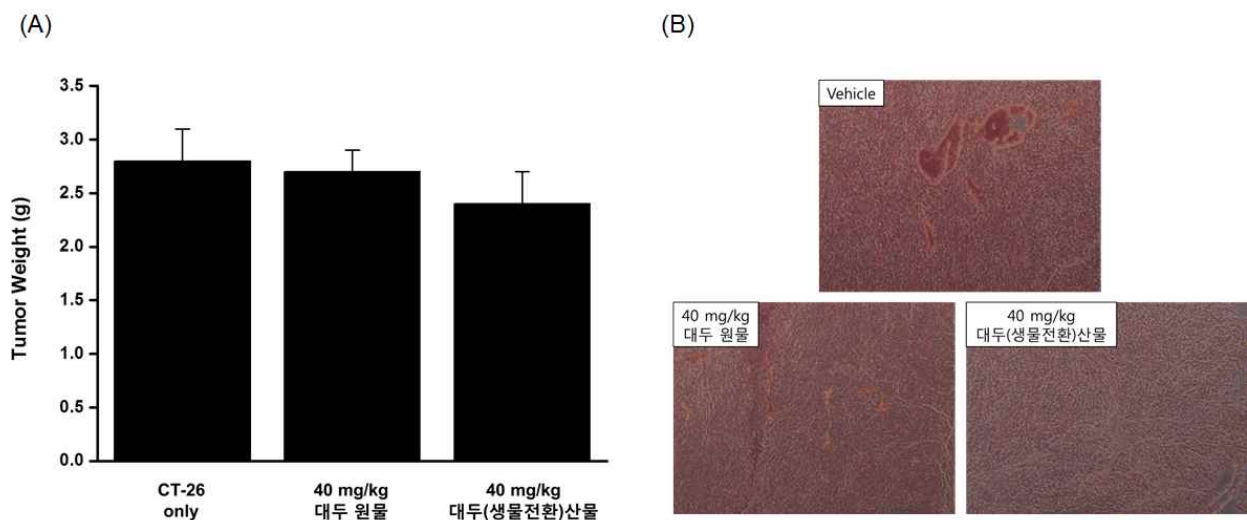


그림 244 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 마우스 이식 종양 성장 억제 효과

### (2) 종양조직 내 eicosanoids 측정

대두 원물을 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 식이한 마우스에서는 PGE<sub>2</sub>와 LTB<sub>4</sub> 모두 큰 변화를 보이지 않았다. 반면, 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 PGE<sub>2</sub>가 25%, LTB<sub>4</sub>가 28% 억제되는 것으로 확인되었다.

표 150. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 종양 이식 마우스에서 종양조직 내 eicosanoids의 측정

Treatment	Eicosanoids (pg/mL)	
	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
CT-26 only	826 ± 53	1837 ± 82
40 mg/kg 대두 원물	811 ± 49	1811 ± 99
40 mg/kg 대두(생물전환)산물	619 ± 26	1326 ± 101

**다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 피하 이식 종양 억제 효과 확인**

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 종양조직의 변화를 관찰하였다. 종양의 무게 변화 및 조직의 변화, 종양 내 eicosanoids의 양을 확인하여 참깨박 개발소재가 갖는 종양 억제 효과를 평가하였다.

(1) 종양 무게 측정 및 조직 염색

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 마우스 이식 종양 억제 효과를 확인한 결과, 참깨박 원물을 식이한 마우스는 종양 무게의 변화 및 종양조직 내 변화가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스는 종양의 무게가 약 10.7% 감소하였으며, 조직 내 혈관 생성의 억제 및 조직의 괴사가 진행됨이 확인되었다.

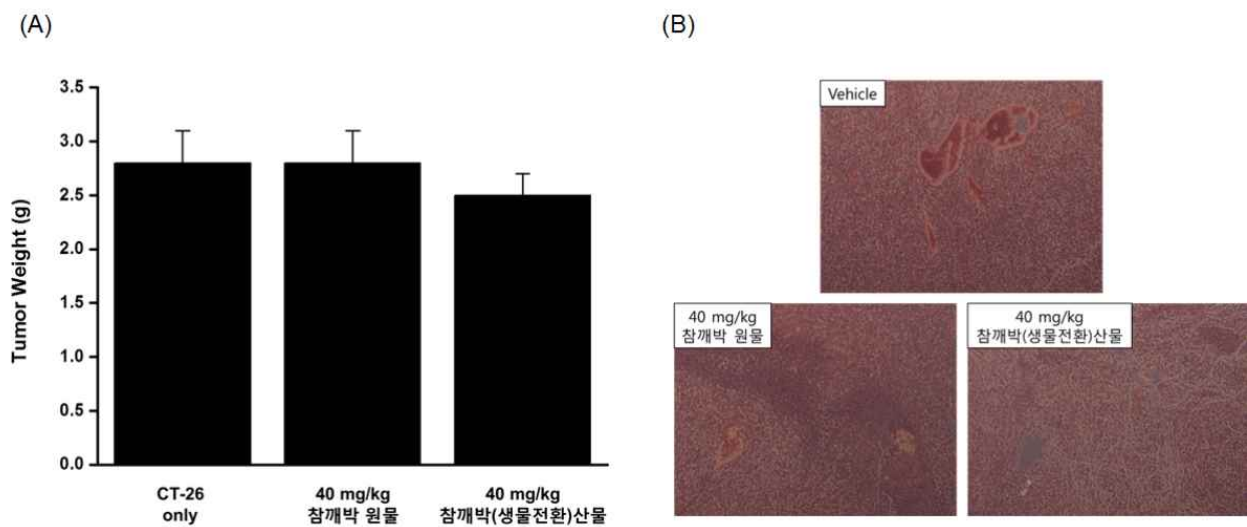


그림 245 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 마우스 이식 종양 성장 억제 효과

(2) 종양조직 내 eicosanoids 측정

종양조직 내 PGE<sub>2</sub>와 LTB<sub>4</sub>의 양을 측정한 결과, 참깨박 원물을 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 식이한 마우스에서는 두 eicosanoid 모두 감소하지 않는 결과를 보였다. 반면, 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 PGE<sub>2</sub>가 21%, LTB<sub>4</sub>가 21% 억제되는 것을 확인하였다.

표 151. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 식이한 종양 이식 마우스에서 종양조직 내 eicosanoids의 측정

Treatment	Eicosanoids (pg/mL)	
	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
CT-26 only	826 ± 53	1837 ± 82
40 mg/kg 참깨박 원물	839 ± 55	1856 ± 118
40 mg/kg 참깨박(생물전환)산물	663 ± 48	1451 ± 106



### 3. 마우스모델에서 폐 전이 종양의 전이 억제 확인

농산부산물 3개 개발소재를 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 식이한 마우스에서 종양의 전이 억제 효과를 확인하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 2주간 개발소재 식이 후  $1 \times 10^5$  cells의 CT-26 세포주를 정맥주사하여 폐전이를 유도하였다. 2주 후 마우스를 희생하여 폐 조직을 적출하고 조직 박편 제작 후 H&E 염색하여 전이된 nodule의 수를 확인하였다.

#### 가. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 폐 전이 종양의 전이 억제 확인

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스의 폐 전이 억제 효과를 확인하였다. 마우스를 희생한 후 폐 조직을 염색하여 확인한 결과, 미강 원물을 식이한 마우스에서는 종양의 전이가 약 21.9% 억제되었으며, 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 약 58.6%가 억제되는 것을 확인하였다. 피하 이식 마우스모델에서의 종양 성장 억제와 마찬가지로, 미강 원물에 존재하는 다양한 생리활성 성분의 효과와 더불어 미강(생물전환)산물이 갖는 면역세포 활성화 효과에 기인한 것이라 생각된다.

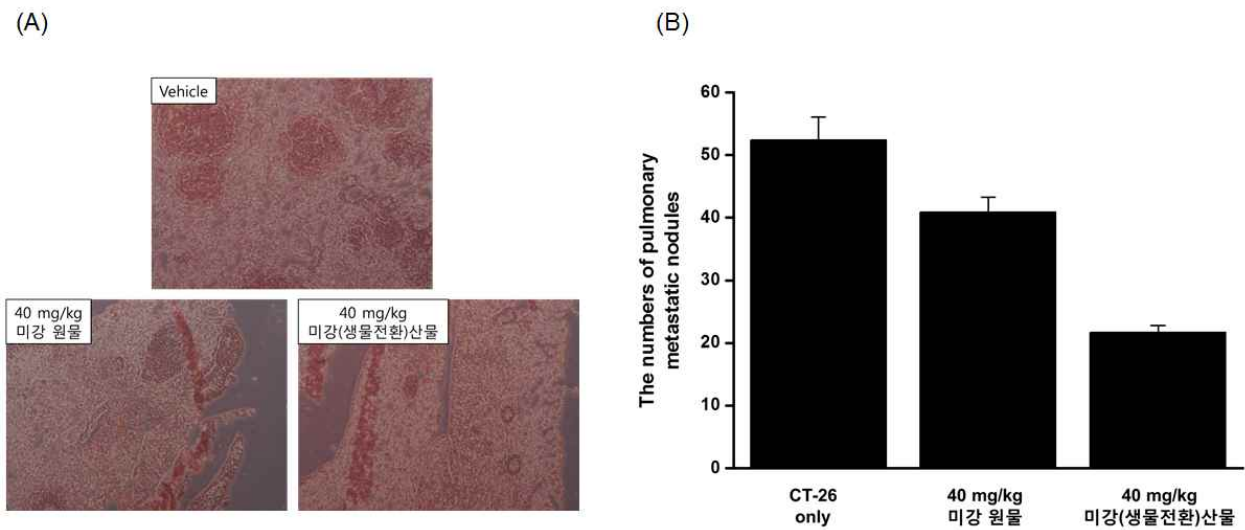


그림 246. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 폐 전이 억제 효과

나. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 폐 전이 종양의 전이 억제 확인

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 폐 전이 억제 효과를 확인하였다. 종양의 전이를 유도한 폐 조직을 염색하여 확인한 결과, 대두 원물을 식이한 마우스에서는 폐 전이가 억제되지 못하는 것으로 확인되었다. 반면, 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 폐 전이가 약 37.4% 억제되는 것으로 확인되었다.

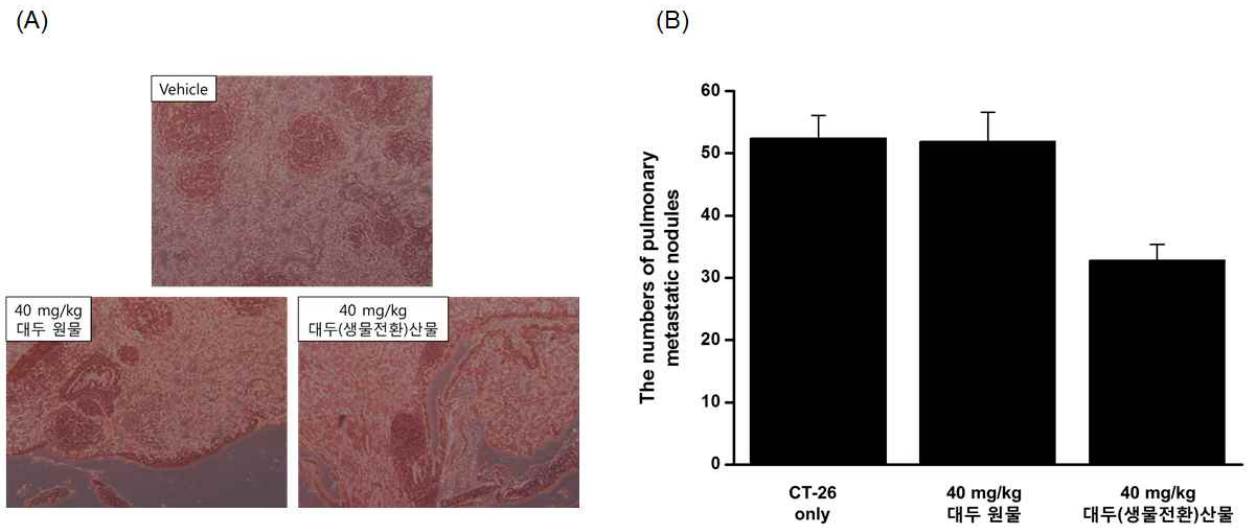


그림 247. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 폐 전이 억제 효과

### 다. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 폐 전이 종양의 전이 억제 확인

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 폐 전이 억제 효과를 확인하였다. 참깨박 원물을 식이투여 한 뒤, 종양의 폐 전이를 유도한 마우스에서는 폐 전이의 억제 효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 참깨박(생물전환)산물을 식이투여 한 마우스의 경우, 약 31.9%의 폐 전이 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

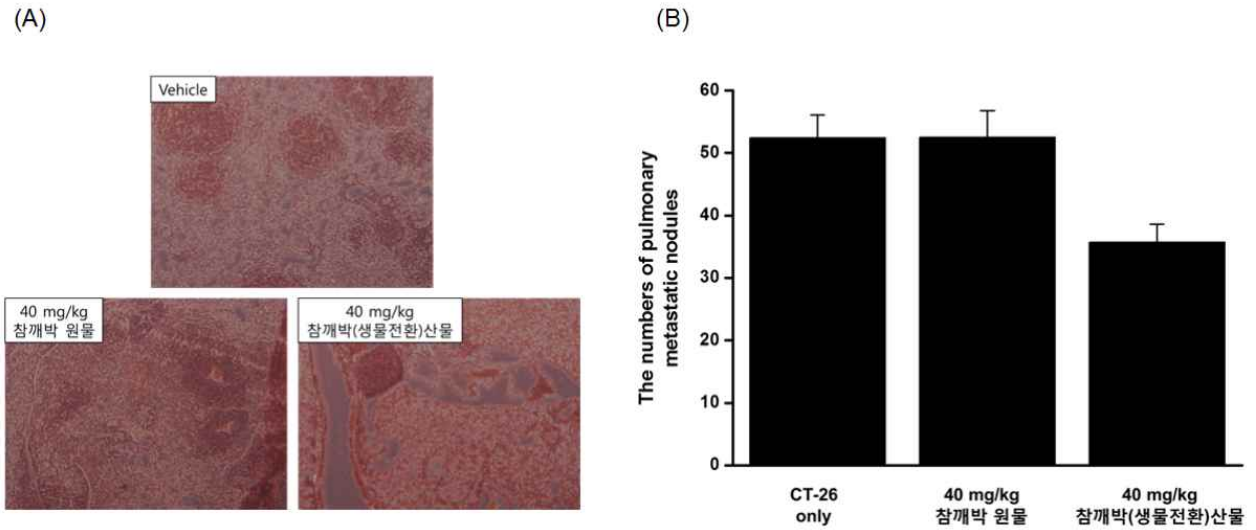


그림 248. 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 폐 전이 억제 효과

#### 4. 마우스모델에서 종양 관련 면역반응 활성화 확인

연구에 사용한 농산부산물 3개 개발소재들은 암세포에 대한 직접적인 살해활성은 없으나, 마우스모델에서 종양조직에 대한 성장 억제 및 전이 억제 효과를 보임에 따라 개발소재가 갖는 종양 관련 면역반응 활성화 효과를 확인하였다. 실험군당 10마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 1주일 적응 후 개발소재를 40 mg/kg의 1일 섭취량으로 2주간 식이투여 하였다. 이 후, 마우스의 왼쪽 옆구리에  $1 \times 10^6$  cells의 CT-26을 주사하였고, 개발소재의 식이투여를 유지하며 3주간 종양의 발달을 유도하였다. CT-26를 이식한 마우스 복강에서 분리한 대식세포와 비장 내 NK세포의 활성화를 측정하였으며, 두 세포의 활성화 및 암세포 살해능을 비교하여 개발소재가 갖는 종양 관련 면역반응 활성화 효과를 평가하였다.

### 가. 대식세포 활성화 확인

대식세포 활성화의 경우, 희생한 종양 이식 마우스의 복강에 10 mL의 PBS를 넣고 회수한 뒤 PBS 내 존재하는 대식세포의 수를 계수하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 접종한 대식세포를 24시간 배양한 뒤, 100 ng/mL의 LPS와 10 units/mL의 interferon- $\gamma$ 를 처리하여 48시간 배양하였다. 이후 상층액을 회수하여 분비되는 nitrite의 양과 포식작용 활성화, cytokine의 양을 확인하였고, 종양을 이식하지 않은 정상 마우스의 활성화 정도를 함께 비교하였다.

#### (1) 미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대식세포 활성화 확인

미강 원물 및 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서의 대식세포 활성화를 확인한 결과, 종양 이식 마우스에서 억제되어 있는 대식세포의 활성화가 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 식이로 인해 회복되는 결과를 확인하였다. 종양 무게 및 전이 억제 효과와 마찬가지로 미강 원물에 비해 미강(생물전환)산물의 경우 더 높은 대식세포 활성화 효과를 보였으며, 활성성분의 비교를 통한 분석이 필요할 것이라 생각된다.

표 152. 종양 이식 마우스에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여가 대식세포의 활성화에 미치는 효과

Treatment	Macrophage Activation	
	Nitrite ( $\mu$ M)	Phagocytosis (%)
Normal mice	40.17 $\pm$ 3.75	82.7 $\pm$ 5.1
CT-26 only	8.78 $\pm$ 0.76	52.6 $\pm$ 4.2
40 mg/kg 미강 원물	14.37 $\pm$ 1.28	59.3 $\pm$ 3.9
40 mg/kg 미강(생물전환)산물	33.24 $\pm$ 1.15	75.6 $\pm$ 3.3

표 153. 종양 이식 마우스에서 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 투여가 대식세포의 cytokine 분비에 미치는 효과

Treatment	Cytokines (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Normal mice	4513 $\pm$ 183	249 $\pm$ 11	351 $\pm$ 27
CT-26 only	1512 $\pm$ 86	106 $\pm$ 5	127 $\pm$ 11
40 mg/kg 미강 원물	2330 $\pm$ 108	142 $\pm$ 11	218 $\pm$ 15
40 mg/kg 미강(생물전환)산물	3429 $\pm$ 221	207 $\pm$ 9	313 $\pm$ 27

(2) 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대식세포 활성화 확인

대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 분리한 대식세포의 활성화 정도를 확인한 결과, 대두 원물을 식이한 마우스에서는 대식세포의 활성화 회복 효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서는 대식세포의 활성화가 유도되는 것으로 확인되었다.

표 154. 중앙 이식 마우스에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 대식세포 활성화 효과

Treatment	Macrophage Activation	
	Nitrite ( $\mu$ M)	Phagocytosis (%)
Normal mice	40.17 $\pm$ 3.75	82.7 $\pm$ 5.1
CT-26 only	8.78 $\pm$ 0.76	52.6 $\pm$ 4.2
40 mg/kg 대두 원물	8.81 $\pm$ 0.34	50.2 $\pm$ 4.5
40 mg/kg 대두(생물전환)산물	25.76 $\pm$ 1.83	70.3 $\pm$ 6.7

표 155. 중앙 이식 마우스에서 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 투여가 대식세포의 cytokine 분비에 미치는 효과

Treatment	Cytokines (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Normal mice	4513 $\pm$ 183	249 $\pm$ 11	351 $\pm$ 27
CT-26 only	1512 $\pm$ 86	106 $\pm$ 5	127 $\pm$ 11
40 mg/kg 대두 원물	1554 $\pm$ 96	110 $\pm$ 7	134 $\pm$ 10
40 mg/kg 대두(생물전환)산물	2831 $\pm$ 164	163 $\pm$ 15	243 $\pm$ 19

(3) 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 대식세포 활성화 확인

참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 복강대식세포의 활성화를 확인한 결과, 참깨박 원물을 식이한 마우스에서는 대식세포의 활성화 회복 효과가 나타나지 않았으나 참깨박(생물전환)산물을 식이한 경우 대식세포의 활성화가 회복되는 것으로 확인되었다.

표 156. 중앙 이식 마우스에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 대식세포 활성화 효과

Treatment	Macrophage Activation	
	Nitrite ( $\mu\text{M}$ )	Phagocytosis (%)
Normal mice	40.17 $\pm$ 3.75	82.7 $\pm$ 5.1
CT-26 only	8.78 $\pm$ 0.76	52.6 $\pm$ 4.2
40 mg/kg 참깨박 원물	8.54 $\pm$ 0.64	51.1 $\pm$ 2.8
40 mg/kg 참깨박(생물전환)산물	22.39 $\pm$ 1.57	71.2 $\pm$ 3.4

표 157. 중앙 이식 마우스에서 참깨박 원물 및 참깨박(생물전환)산물의 투여가 대식세포의 cytokine 분비에 미치는 효과

Treatment	Cytokines (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Normal mice	4513 $\pm$ 183	249 $\pm$ 11	351 $\pm$ 27
CT-26 only	1512 $\pm$ 86	106 $\pm$ 5	127 $\pm$ 11
40 mg/kg 참깨박 원물	1446 $\pm$ 58	108 $\pm$ 8	121 $\pm$ 11
40 mg/kg 참깨박(생물전환)산물	2594 $\pm$ 99	157 $\pm$ 13	219 $\pm$ 16

## 나. NK세포 활성화 확인

NK세포 활성화의 경우, 비장을 파쇄한 후 RBC lysis buffer를 이용하여 적혈구를 제거하였으며, Histopaque-1077을 이용하여 gradient로 NK세포를 분리하였다. 분리한 NK세포는 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 접종하였으며, 25 uM의 calcein-AM으로 표지한 YAC-1 세포를  $5 \times 10^3$  cells/well의 농도로 함께 접종하였다. 이후 3시간 배양하여 NK세포의 YAC-1 세포 살해를 유도한 후 상층액을 회수하였다. 상층액 내 존재하는 calcein의 형광 강도를 측정하여 NK세포의 암세포 살해활성을 측정하였으며, 정상 마우스의 NK세포 활성화를 대조군으로 하여 함께 비교하였다.

### (1) 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포 활성화 확인

미강 원물과 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포의 암세포 살해활성을 확인하였다. 대조군으로 사용한 정상 마우스의 NK세포에 비해, 종양 이식 마우스에서 분리한 NK세포의 경우 약간의 활성화가 유도되는 것으로 확인되었으며, 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스의 경우 NK세포의 활성화가 크게 유도되는 것으로 확인되었다. 특히, 미강(생물전환)산물을 식이한 마우스의 경우 종양 이식 마우스의 NK세포에 비해 암세포 살해활성이 약 4.3배 증가하는 것으로 확인되었다.

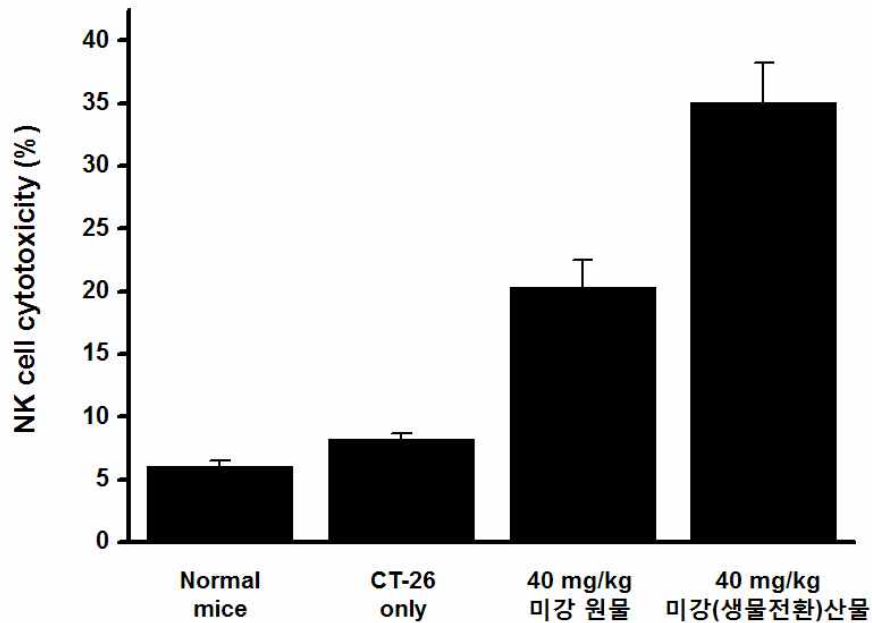


그림 249. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 NK세포 활성화 효과



(2) 대두 원물과 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포 활성화 확인

대두 원물과 대두(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포의 암세포 살해활성을 측정하였다. 대두 원물을 식이한 마우스의 경우 NK세포의 활성화가 유도되지 않았으나, 대두(생물전환)산물을 식이한 경우 종양 이식 마우스에 비해 약 2.8배의 암세포 살해활성 증가 효과가 있는 것으로 확인되었다.

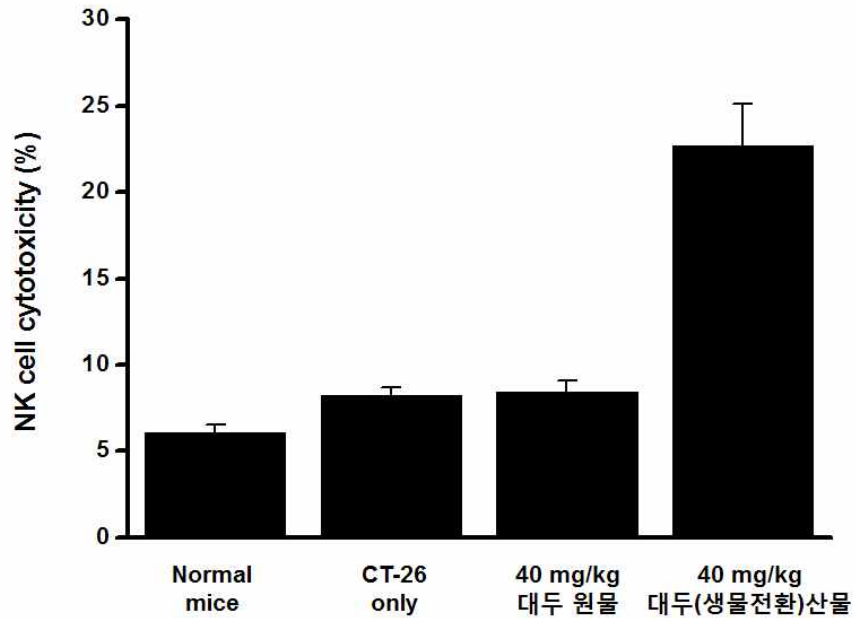


그림 250. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 NK세포 활성화 효과

(3) 참깨 원물과 참깨(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포 활성화 확인

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 NK세포의 활성화 효과를 확인한 결과, 참깨 원물을 식이한 마우스의 경우 NK세포의 활성화 유도 효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 참깨(생물전환)산물을 식이한 마우스의 경우, 종양 이식 마우스 대비 약 2.5배의 NK세포 활성화가 유도되는 것으로 확인되었다.

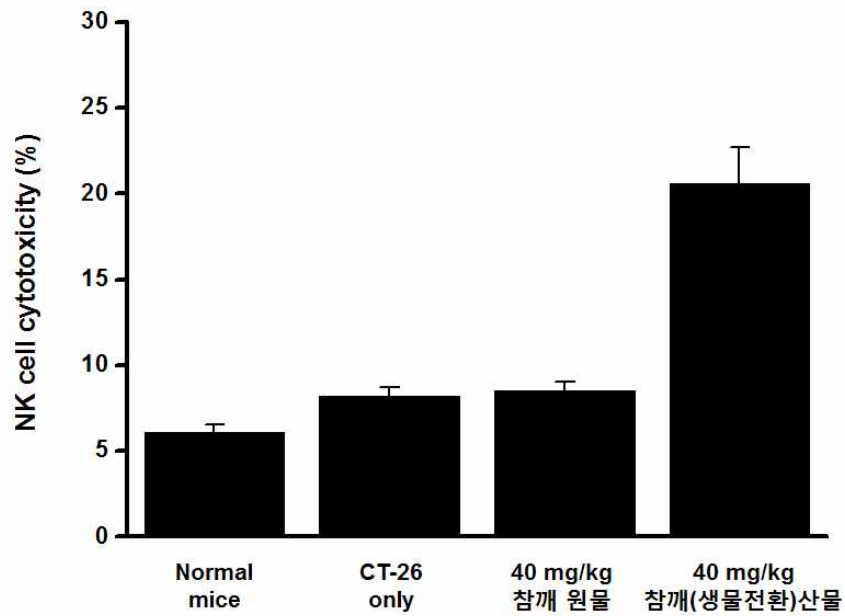


그림 251. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 NK세포 활성화 효과

## 5. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 항암 효능 평가에 대한 실험적 의의

농산부산물 3개 개발소재가 갖는 항암효과를 *in vitro* 실험계와 *in vivo* 마우스모델에서 평가하였다. 3개 개발소재는 모두 CT-26 대장암 세포주에 대해 직접적인 살해활성은 없는 것으로 확인되었다. 하지만, CT-26 피하이식 모델 및 정맥주사를 통한 폐 전이 모델에서는 미강 원물과 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물이 암의 성장과 전이를 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

각 소재가 갖는 항암활성을 비교하면, 미강(생물전환)산물이 가장 뛰어나며, 대두(생물전환)산물과 미강 원물이 비슷한 활성을 갖고, 참깨박(생물전환)산물이 가장 낮은 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 미강에 포함되어 있는  $\gamma$ -oryzanol이 CT-26 대장암 이식 마우스모델에서 암 성장을 억제한다는 보고 (Kim S. P. *et al. Mol. Nutr. Food Res.* 2012.)를 참고할 때, 미강 원물에 포함되어 있는  $\gamma$ -oryzanol 등의 성분이 이식된 대장암에 대한 항암활성을 나타낸 것으로 보인다. 또한, 미강(생물전환)산물의 경우 미강 원물이 갖는 항암활성과 함께 면역세포 활성화를 통한 항암활성을 나타내는 것으로 보이며, 원물의 자체적인 항암활성이 나타나지 않는 대두(생물전환)산물과 참깨박(생물전환)산물이 항암활성을 갖는 것 역시 생물전환에 의해 부가된 면역조절 활성 때문인 것으로 보인다. 본 연구에서 확인한 생물전환산물이 갖는 면역조절활성은 종양에 의해 억제된 대식세포 활성화 능력의 회복과 NK세포의 활성화이며, 세포독성 T세포의 활성화와 NKT세포의 활성화 여부는 추가적인 연구를 통해 확인할 필요가 있다. 또한, 피하로 이식한 암에 대한 항암활성보다 폐 전이의 경우 더 뛰어난 항암활성을 갖는 것으로 확인되었으며, 피하 이식 종양의 성장에 대한 억제율에 비해 높은 수준의 대식세포 활성화 및 NK세포 활성화를 유도하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는, 피하 이식 종양의 경우 면역세포의 이동 및 침윤이 어려운 경우가 많아 면역세포의 활성화 정도와는 달리 낮은 수준의 종양 성장 억제를 보이는 것으로 생각된다. 따라서, 피하 이식이 아닌 종양 이식 마우스모델에서 개발소재의 항암활성을 더 평가해 볼 필요가 있다.

## 20절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 피부건강 관련 효능 평가

### 1. 피부세포모델 기반의 *in vitro* 효능평가

사람의 피부는 여러 가지 자극에 의하여 노화가 촉진되는데, 이 중 가장 문제가 되는 것은 산화적 스트레스에 의한 피부손상으로 피부의 탄력성을 감소시키며, 콜라겐 합성 감소, 주름 형성 등의 피부노화 작용을 유발한다. 또한 다양한 콜라겐 분비 세포는 피부의 수분공급, 외부자극 완화 또는 보호, 상처 치유, 지혈작용 등의 역할을 한다. 즉, 섬유아세포에서 콜라겐 세포를 원활하게 증식하지 못하면 수분 공급이 줄어들고, 상처 치유가 늦어지는 등의 현상이 일어나며 지속될 경우 주름이 생성되는 노화현상이 시작된다.

피부세포모델을 이용한 농산부산물 미강, 대두, 참깨(생물전환)산물의 피부건강 관련 효능 평가는 식품의약품안전처에서 발행한 건강기능식품 기능성 평가 가이드 ‘피부건강에 도움을 줄 수 있음’ 편에 의거하여 Human dermal fibroblast(피부섬유아세포) 및 epidermal keratinocyte(피부표피세포)를 시험계로 사용하였다.

HDF(피부섬유아세포)의 배양은 10% FBS 및 1% P/S를 함유한 저농도 glucose DMEM에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였으며, HaCaT(피부표피세포)의 경우 10% FBS 및 1% P/S를 함유한 고농도 glucose DMEM에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하며 실험에 사용하였다.

### 가. 3개 개발소재에 대한 PBS 추출물의 피부건강 관련 효능 평가

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공받은 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물과 각각의 원물의 피부건강 관련 효능 평가를 위한 추출물의 제조는 PBS를 사용하였다. 즉, 각 시료 500 mg에 PBS를 이용하여 25 mL volumetric flask에 정용한 뒤(200 mg/mL), shaker를 이용하여 100 rpm에서 1시간 동안 추출하였다. 그 후 고형분의 제거를 위하여 원심분리 후 상층액을 filter하여 실험에 사용하였다.

(1) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가

미강(생물전환)산물의 세포독성 평가는 XTT{2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay kit를 이용하여 평가하였다. 실험의 원리는 살아있는 세포에 XTT reagent를 처리하면 세포 내 mitochondria내의 효소와 반응하여 tetrazolium ring이 분해되어 formazan crystal을 형성하게 되며 색을 띄게 된다. 이 색의 흡광도를 측정하여 세포독성 평가를 실시하였다.

미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 독성 및 생존율의 평가를 위하여 50, 100, 200  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 이후 XTT reagent를 4시간 동안 처리하여 세포독성을 평가하였다. 그 결과, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 모두 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서는 50~200  $\mu$ g/mL의 농도를 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

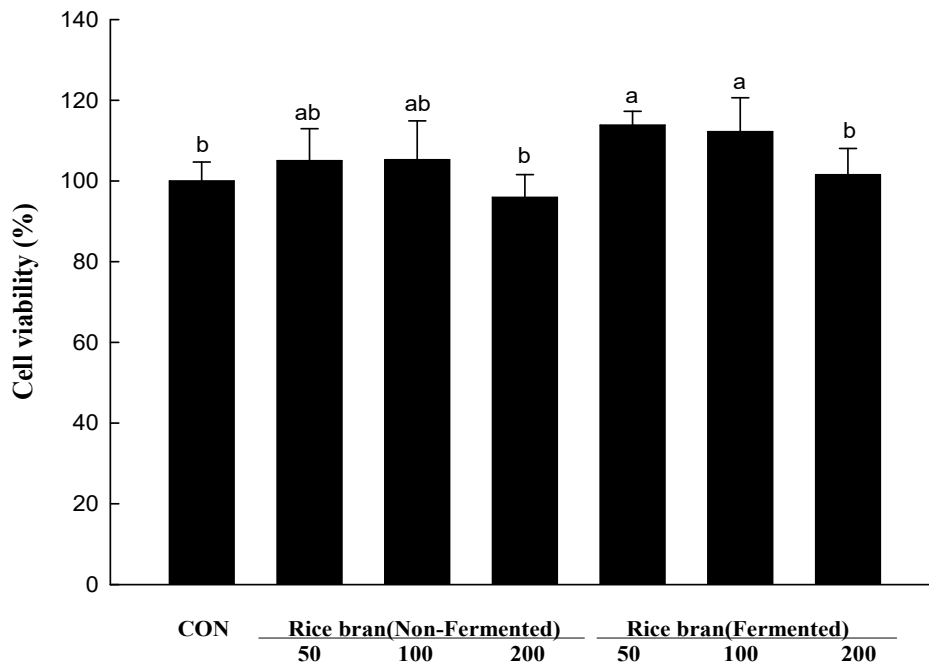


그림 252. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

(2) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과

피부섬유아세포에 대한 소재의 세포 보호 효과를 측정하기 위하여 hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유발한 상태에서 피부섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 XTT assay를 이용하여 측정하였다. 양성대조군으로는 항산화제로 널리 알려진 ascorbic acid를 이용하였다.

세포 보호 효과 측정 결과 hydrogen peroxide를 처리한 군에서 CON군에 비해 55% 정도의 생존율을 나타내었으며, 양성대조군 ascorbic acid 100  $\mu$ M 농도에서 약 67% 정도의 생존율을 나타내어, 양성대조군은 피부섬유아세포의 산화적 스트레스에 대한 유의적인 보호 효과를 나타내었다.

하지만 미강 원물 및 미강(생물전환)산물은 모두 모든 농도에서 hydrogen peroxide를 처리한 군의 생존율과 통계 유의적인 차이를 보이지 않아, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 PBS 추출물은 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과가 매우 미비한 것으로 확인되었다.

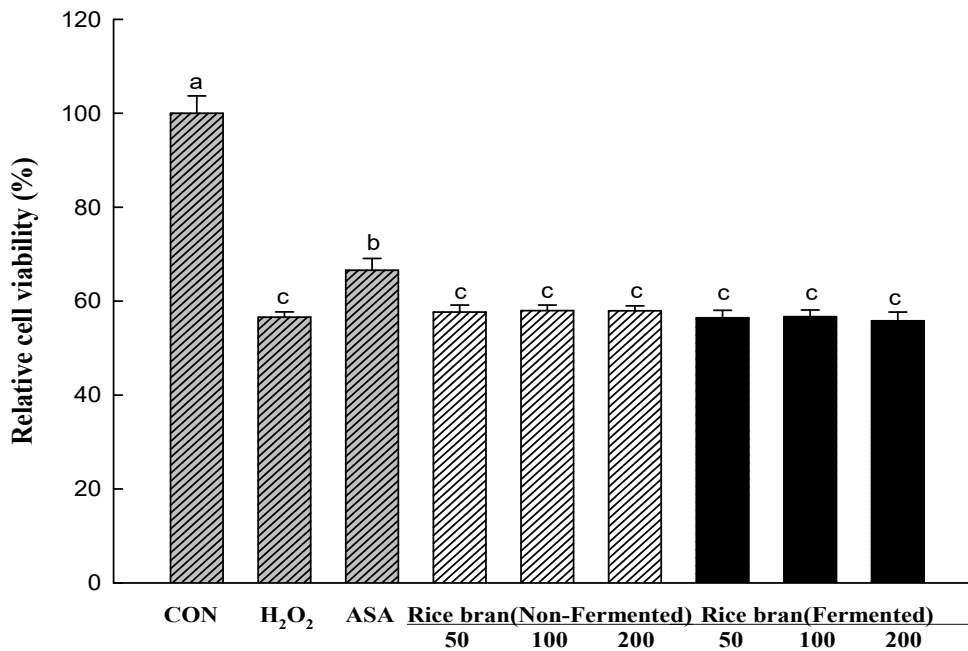


그림 253. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

(3) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 및 생존율의 평가는 미강(생물전환)산물의 세포독성 평가 방법과 동일하게 진행하였다. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물을 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 XTT assay를 이용하여 피부섬유아세포의 독성을 평가한 결과, 모든 농도의 대두 원물 및 대두(생물전환)산물에서 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 50~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였다.

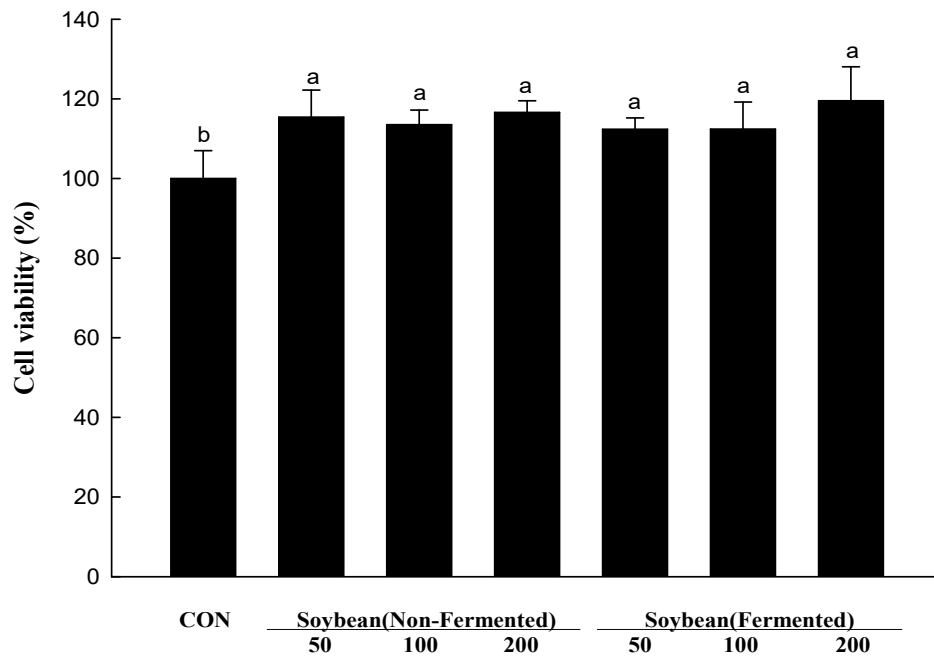


그림 254. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

(4) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 세포 보호 효과 측정 결과, 양성대조군 ascorbic acid에서는 57%의 생존율을 보였지만, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 모든 농도에서 hydrogen peroxide군의 47% 생존율과 큰 차이를 나타내지 않아, 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 PBS 추출물 역시 피부섬유아세포의 세포 보호 효과는 매우 미비한 것으로 확인되었다.

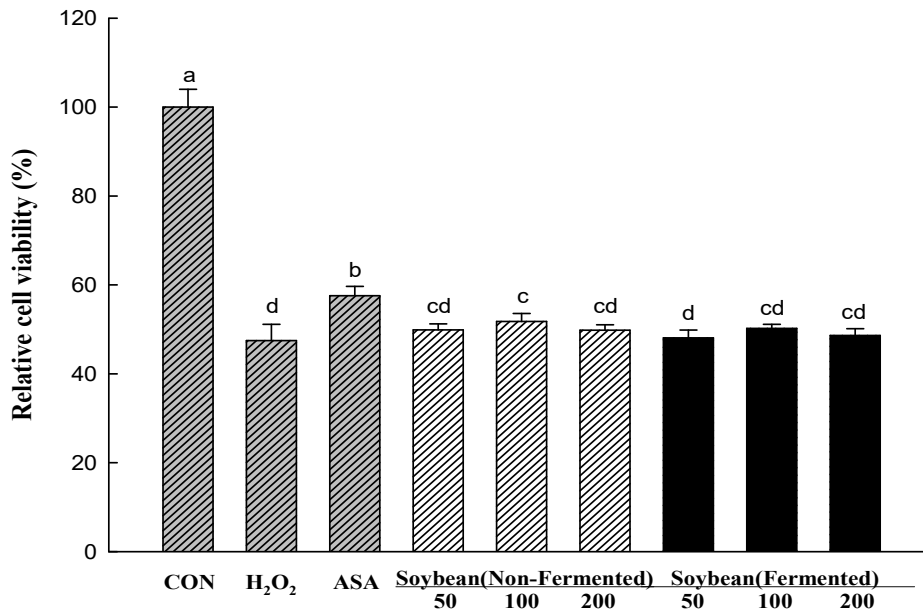


그림 255. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과



(5) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 및 생존율의 평가는 미강(생물전환)산물의 세포독성 평가 방법과 동일하게 진행하였다. CON군을 100%의 생존율로 보았을 때, 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물 50~200 µg/mL 농도에서 모두 유의적으로 생존율이 증가하여 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 세포독성은 없는 것으로 확인되었다. 참깨(생물전환)산물 100 µg/mL 농도에서 가장 높은 135.11%의 생존율을 나타냈다.

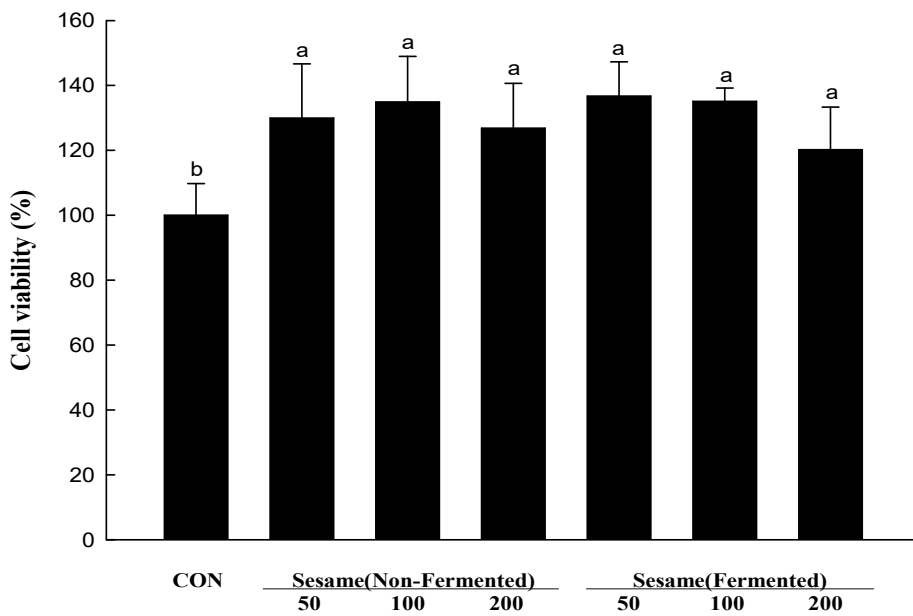


그림 256. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

(6) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 효과

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 세포 보호 효과 측정 결과, hydrogen peroxide군에서 49% 정도의 생존율을 나타냈으며, 양성대조군 ascorbic acid에서 66% 정도의 생존율을 나타냈다. 하지만 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 경우 모든 농도에서 hydrogen peroxide군과의 통계유의적인 차이는 나타났지만, 51~54% 범위의 생존율을 나타내 앞선 미강(생물전환)산물과 유사하게 PBS 추출물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과는 극히 미비한 것으로 나타났다.

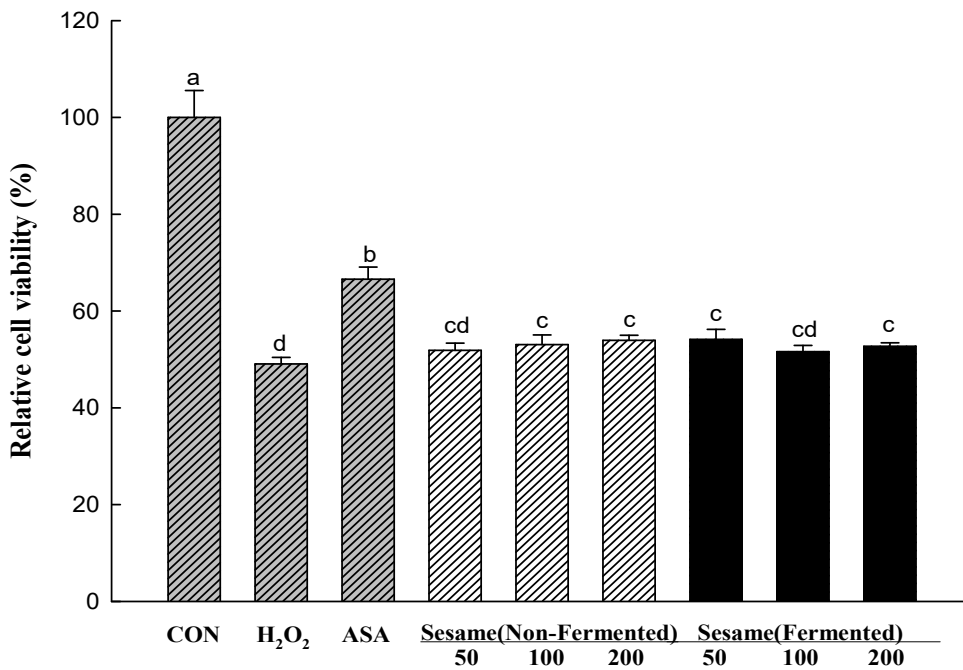


그림 257. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

(7) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공받은 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물의 피부건강 관련 효능 평가를 위하여 각 시료 500 mg에 PBS를 이용하여 50 mL volumetric flask에 정용한 뒤(100 mg/mL), shaker를 이용하여 100 rpm에서 1시간 동안 추출하였다. 그 후 고형분의 제거를 위하여 원심분리 후 상층액을 filter하여 실험에 사용하였다.

미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 독성을 평가하기 위하여 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 이후 XTT reagent를 4시간 동안 처리하여 세포독성을 평가하였다. 그 결과, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 모두 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서는 1~100 µg/mL의 농도를 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

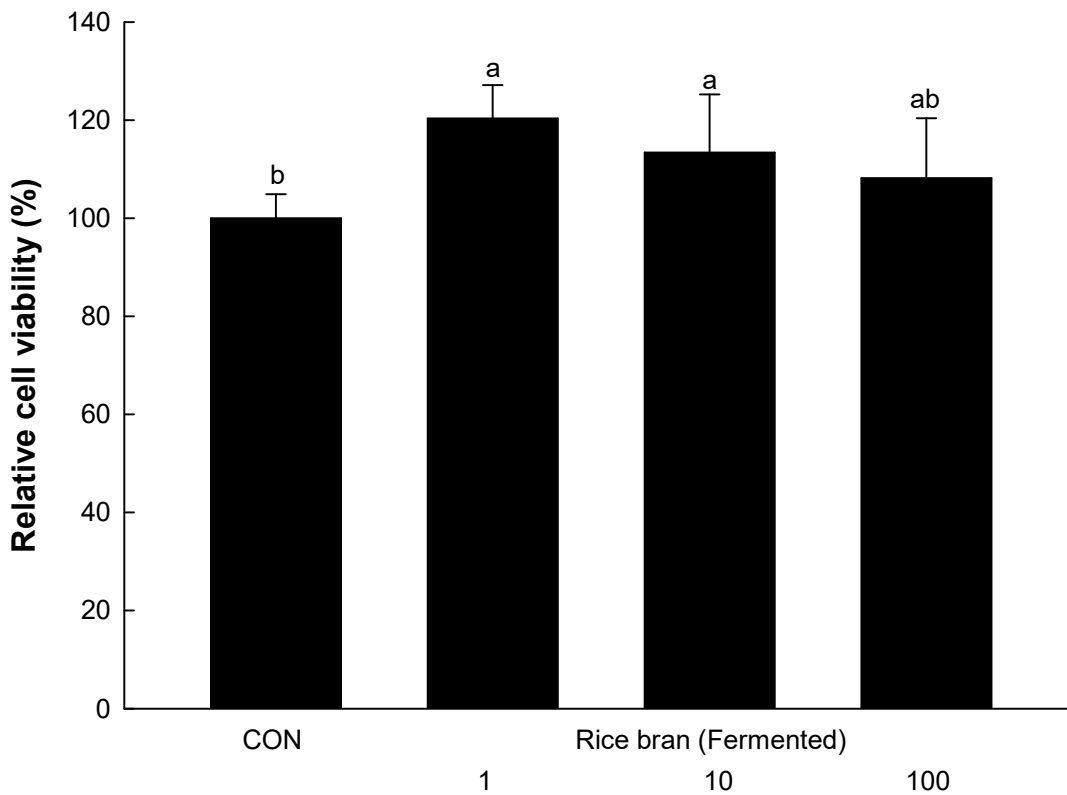


그림 258. 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

(8) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 평가

미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 보호 효과를 알아보기 위하여 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 진행하였다. 피부세포 보호 평가 결과, 양성대조군인 ascorbic acid에서 약 65%의 생존율을 나타냈으며  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리군에서 약 49%의 생존율을 나타내었다. 미강(생물전환)산물의 경우 최저 농도 1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 최고 농도 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 55%의 생존율을 나타내어 통계 유의적인 차이는 나타났지만 미비한 세포 보호 효과를 나타내었다.

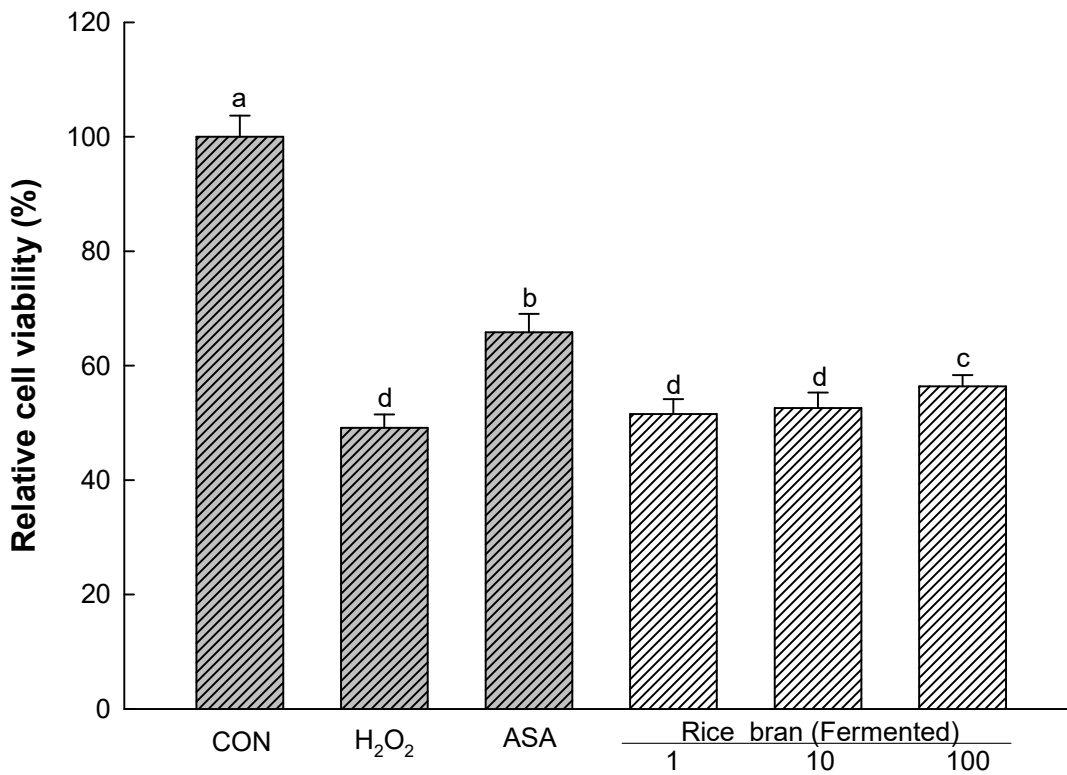


그림 259. 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

(9) 대두박(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가

대두박(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 독성을 평가하기 위하여 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포독성 평가 결과, 최저 농도 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 110%의 세포 생존율을 나타냈으며, 최고 농도 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 120%의 세포 생존율을 보여, 모든 농도에서 독성이 없는 것으로 나타났다.

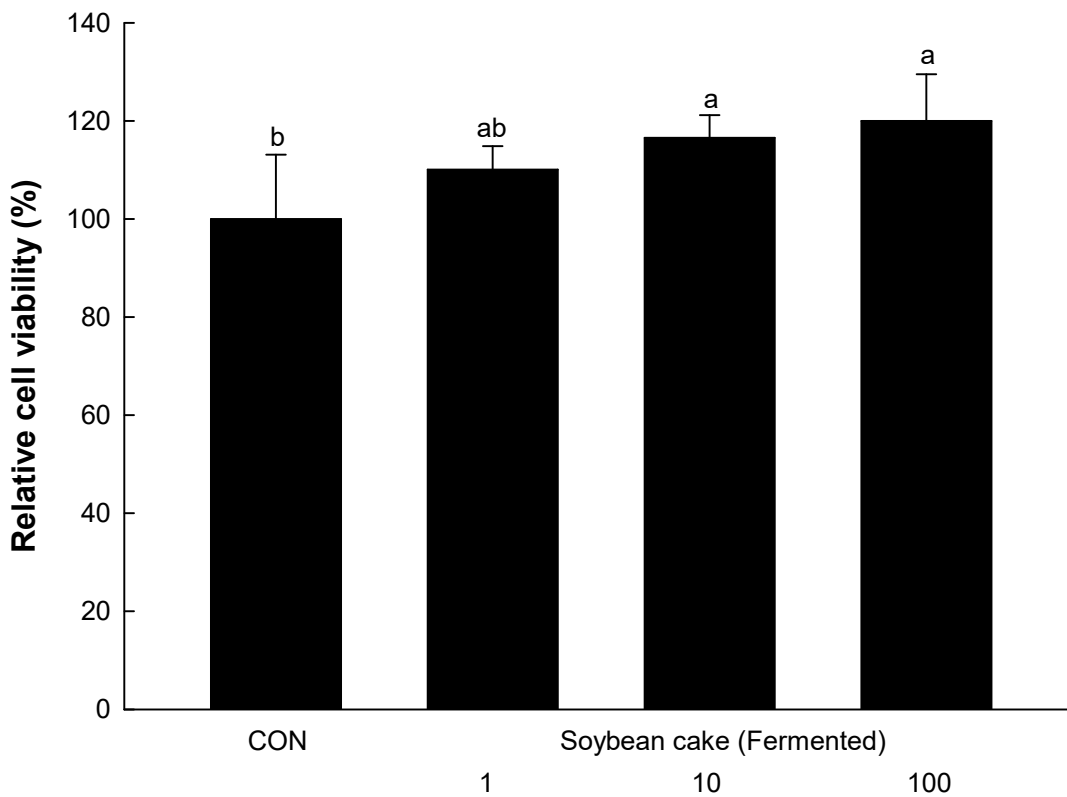


그림 260. 대두박(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

(10) 대두박(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 평가

대두박(생물전환)산물의 피부섬유아세포 보호 효과를 알아보기 위하여 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 진행하였다. 평가 결과,  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리군에서 약 47%의 세포 생존율을 나타내었으며, 대두박(생물전환)산물 모든 농도에서  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 대두박(생물전환)산물의 경우 피부섬유아세포의 세포 보호 효과는 나타나지 않는 것으로 판단된다.

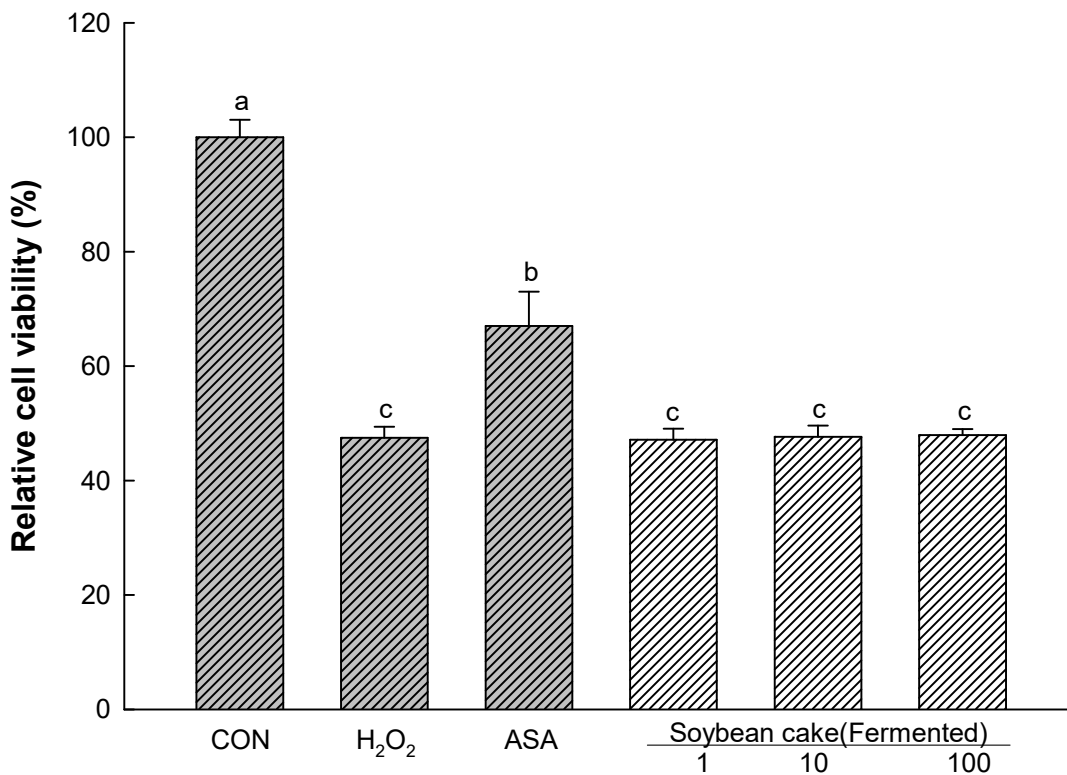


그림 261. 대두박(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

(11) 참깨박(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포독성 평가

참깨박(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 독성을 평가하기 위하여 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 독성 평가 결과, 참깨박(생물전환)산물 모든 농도에서 CON 대비 약 130% 이상의 세포 생존율을 나타내어, 독성은 없는 것으로 나타났다. 따라서 참깨박(생물전환)산물 1~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

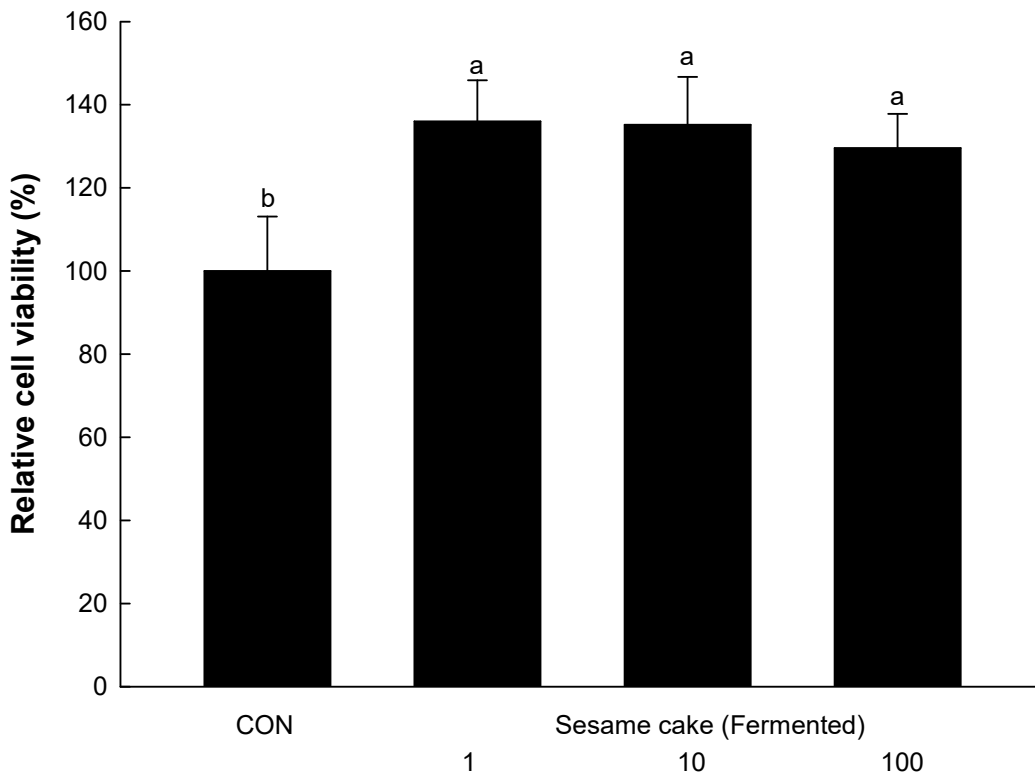


그림 262. 참깨박(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

(12) 참깨박(생물전환)산물의 피부섬유아세포에 대한 세포 보호 평가

참깨박(생물전환)산물의 세포 보호 효과를 평가하기 위하여, 참깨박(생물전환)산물 1~100 µg/mL의 농도를 처리하여 24시간 배양한 뒤, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 30분 처리 후, 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 양성대조군 ascorbic acid에서 약 67%의 세포 생존율을 나타냈으며, 참깨박(생물전환)산물은 모든 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 참깨박(생물전환)산물은 대두박(생물전환)산물과 유사하게 피부섬유아세포에서의 세포 보호 효과는 미비한 것으로 생각된다.

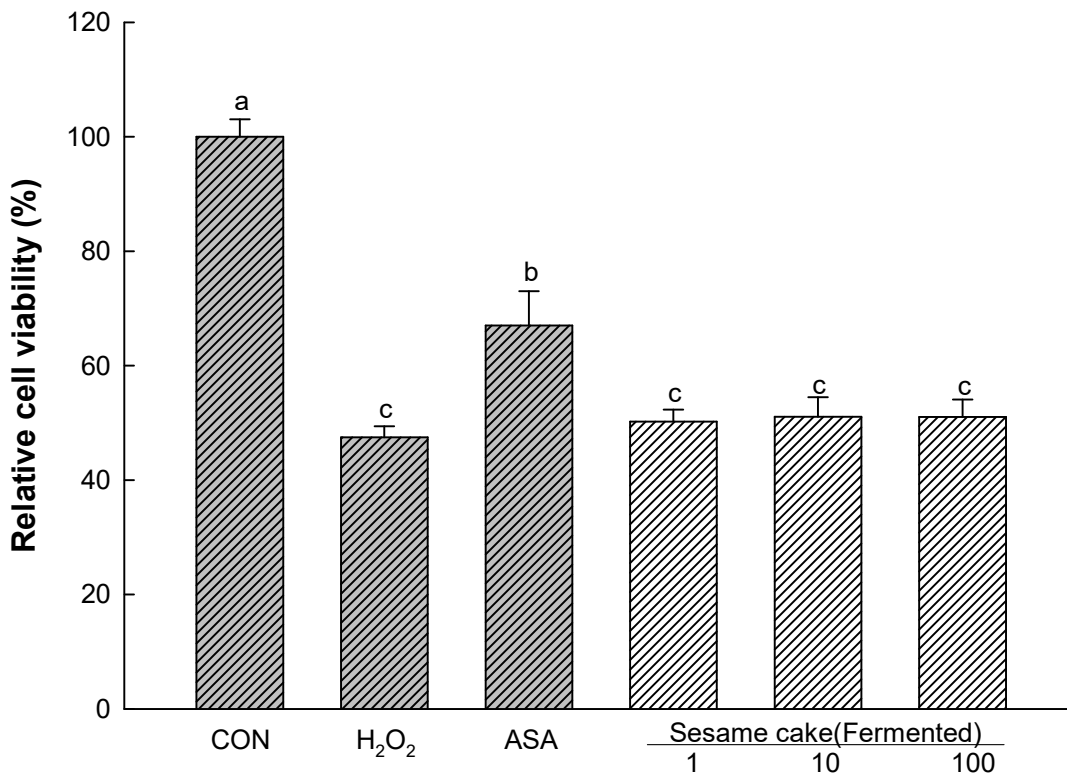


그림 263. 참깨박(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과



(13) X-gal staining을 통한 노화 억제 활성 평가

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물의 노화 억제 활성을 평가하기 위하여 X-gal staining을 통해, 피부섬유아세포의 노화 정도를 평가하였다. 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물의 농도를 100 µg/mL으로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 30분동안 처리한 후 배지를 교체하였다. 그 후 2일 간격으로 배지를 교체하며 배양한 후, 배양 7일째 X-gal staining을 실시하였다. 그 결과, X-gal staining positive cell은 CON에서 약 5%를 나타냈으며, 양성대조군인 ascorbic acid의 경우 약 23%를 나타내었다. 반면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서는 약 65%를 나타내어 노화가 확연히 진행되었음을 확인할 수 있었다. 또한 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 모두 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 X-gal staining을 통해 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물의 노화 억제 활성을 평가한 결과, 노화 억제 효능은 매우 미비한 것으로 나타났다.

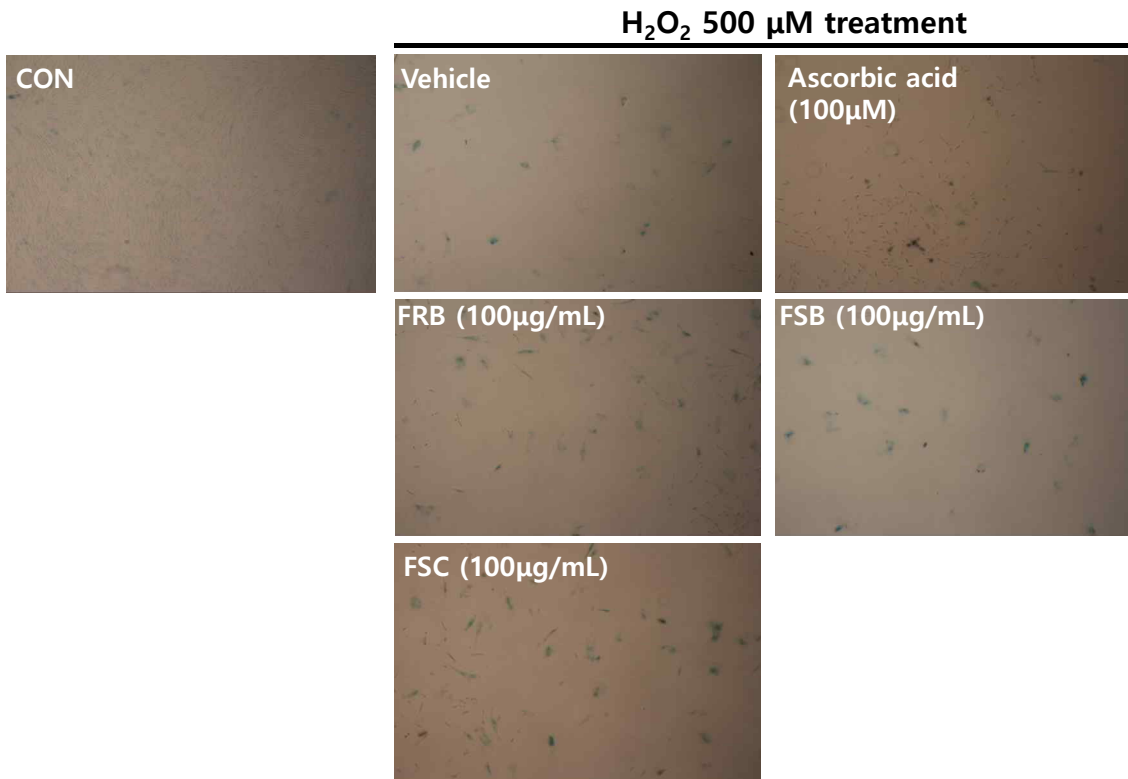


그림 264. X-gal staining을 통한 피부섬유아세포의 morphology

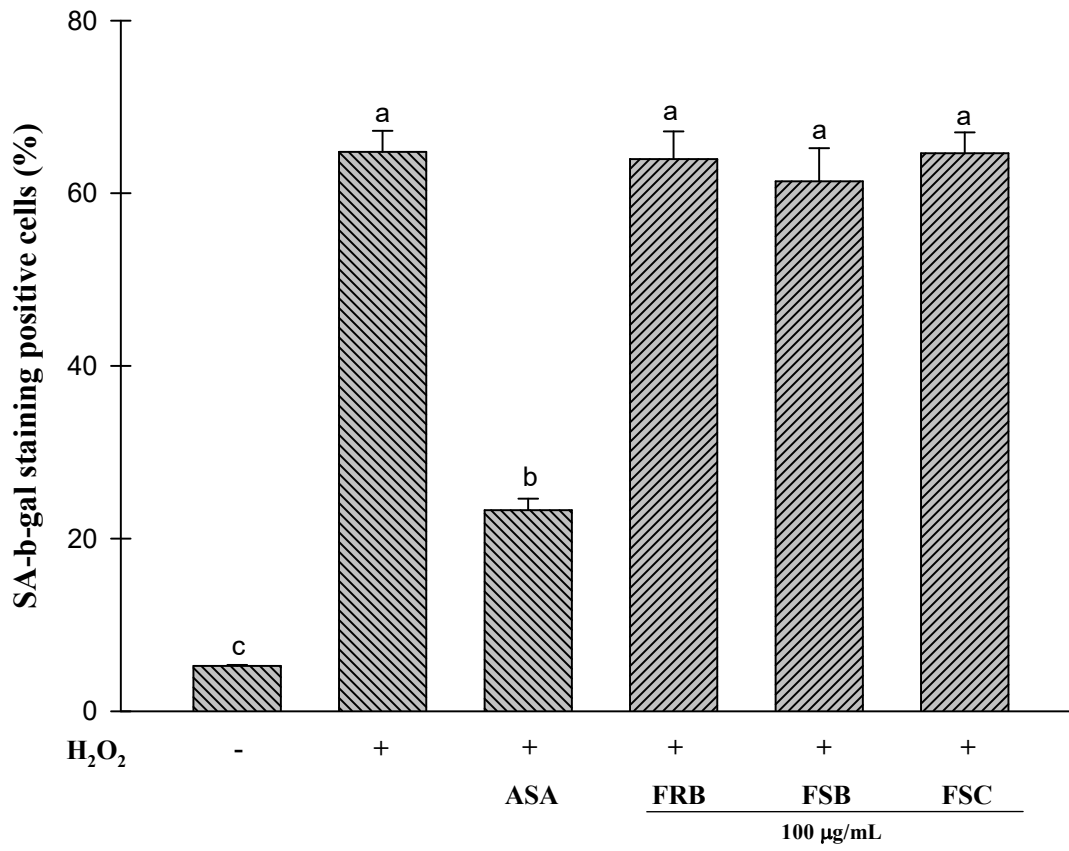


그림 265. X-gal staining을 통한 피부섬유아세포의 항노화 활성

(14) Collagen assay를 통한 노화 억제 활성 평가

Collagen assay는 Sircol collagen assay kit를 이용하여 진행하였다. 시료를 처리하여 24 시간 동안 배양한 후, 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 30분동안 처리하였다. 그 후 free DMEM media로 교체한 후 3일간 배양하였다. 다음 free DMEM media를 수거하여 원심분리 후, 상층액을 이용하여 실험에 사용하였다. 각 시료를 처리한 media를 동량 1.5 mL tube에 첨가한 후, 1 mL의 sircol dye reagent를 첨가한 후 30분간 교반시켰다. 그 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 1 mL의 alkali reagent (0.5M sodium hydroxide)를 첨가하여 pellet을 녹여준 뒤, 10분간 반응하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagen은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 자극에 의하여 감소된다고 알려져있다.

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물의 처리로 인한 collagen 함량의 평가 결과, CON군에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서 collagen이 약 0.6 µg/100 µL 감소하는 것으로 나타났다. 양성대조군인 ascorbic acid의 경우 약 2.89 µg/100 µL의 함량을 나타내어 CON군에 비하여 높은 collagen 함량을 나타내었다. 반면 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물의 경우 앞선 X-gal staining 결과와 유사하게 collagen assay에서도 매우 미비한 노화 억제 효능을 나타내었다.

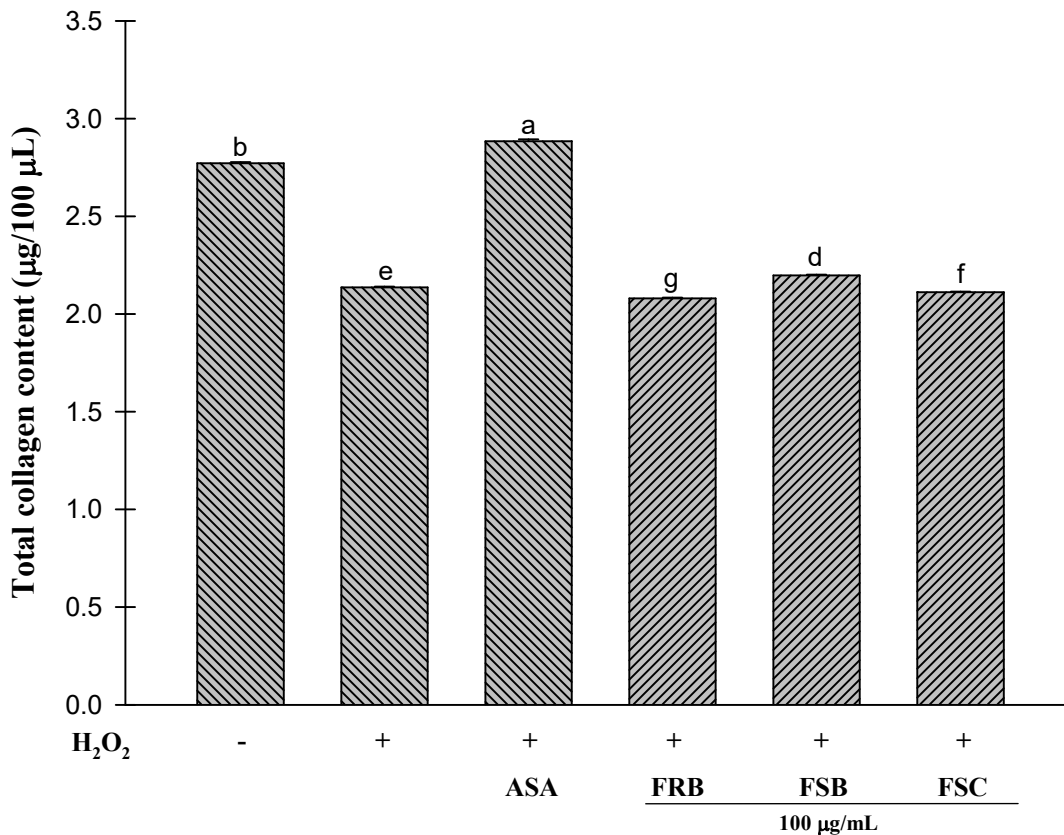


그림 266. Collagen assay를 통한 피부섬유아세포의 항노화 활성

(15) DCF-DA를 통한 ROS 저감 효과 평가

DCFDA는 세포 밖에서는 형광을 나타내지 않지만 친유성이 매우 높아 세포 내로 쉽게 침투가 가능하며, 산화적 스트레스에 의하여 DCFH를 형성하여 세포 내에 축적되게 된다. 이때, DCFH는 세포 내 생성된 과산화물과 반응하여 형광물질인 DCF를 형성하여 형광측정기로 측정이 가능한 원리를 이용하여 피부섬유아세포에서 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성능을 평가하였다.

시료를 처리하여 24 시간 동안 배양한 후, 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1시간 30분동안 처리하였다. 그 후, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후, 4% paraformaldehyde 용액 1 mL를 첨가하여 15분간 실온에서 반응시켜 세포를 고정시켰다. 그 후, 10 μM H<sub>2</sub>-DCFDA를 처리한 후 빛이 들어가지 않도록 주의하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, Gel/Mount를 이용하여 마운팅 하였다. 그 후, 역상현미경 (Leica DM 3000B, Wetzlar, Germany)로 cell morphology를 관찰하였으며, 형광측정기를 이용하여 형광을 수치화 하였다.

형광현미경 측정 결과, CON군에 비하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서 많은 수의 세포가 형광을 띄고 있는 것을 확인할 수 있으며, 양성대조군 ascorbic acid에서 그 수가 현저히 줄어드는 것으로 나타났다. 반면 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 처리군에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군과 유사한 형광을 나타내는 것으로 확인되었다. 형광 정량 결과, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 처리 시 뚜렷한 ROS 저감 효과는 없는 것으로 나타났다.

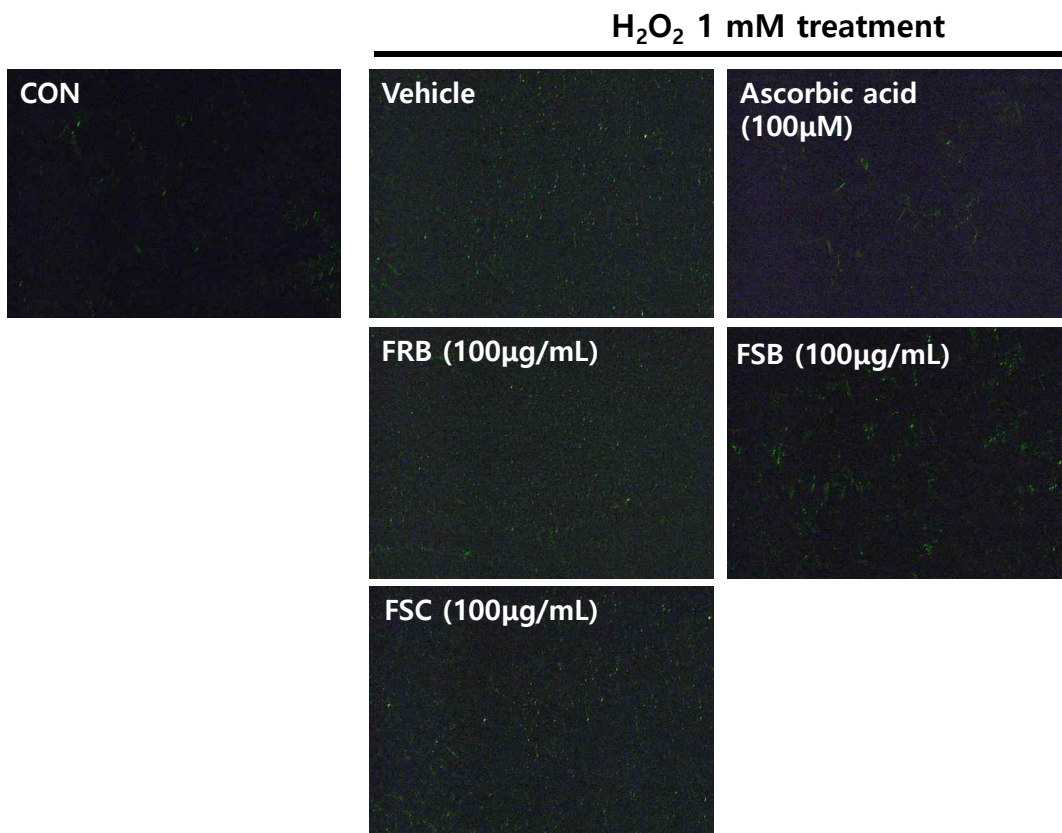


그림 267. DCF-DA를 통한 피부섬유아세포의 ROS 저감 효과

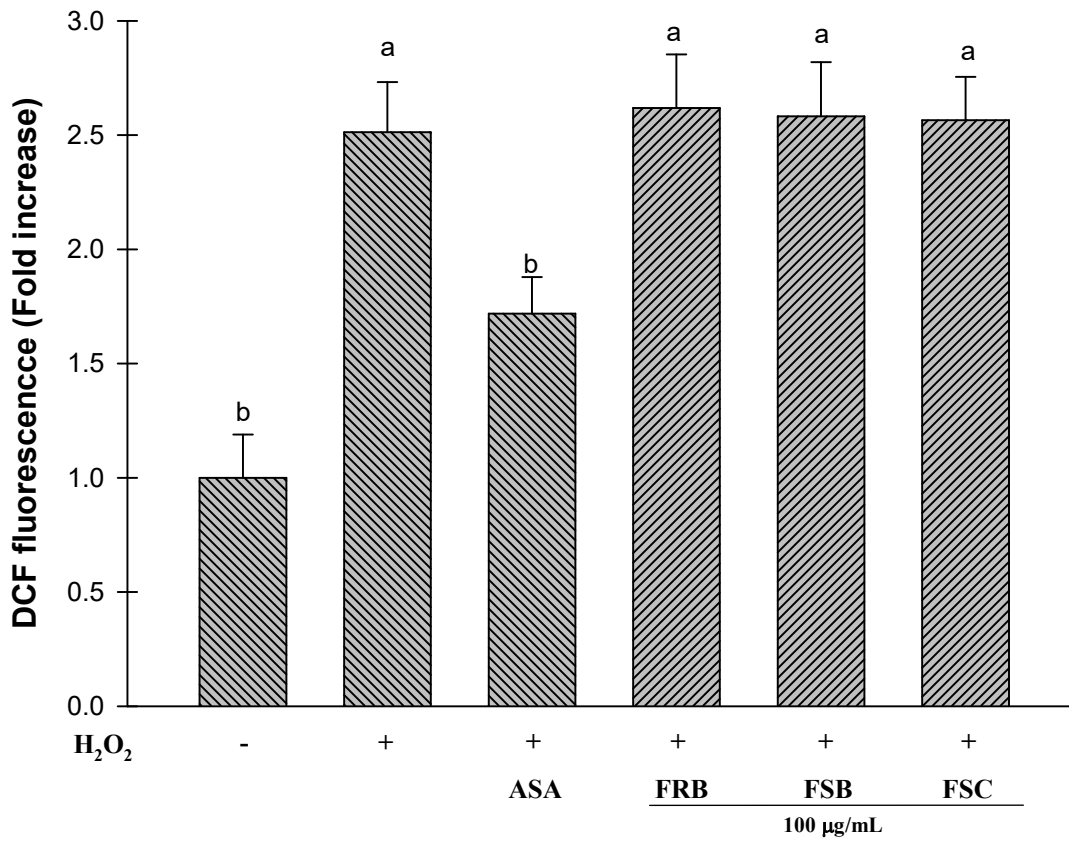


그림 268. DCF-DA를 통한 피부섬유아세포의 ROS 저감 활성

## 나. 농산부산물 소재 메탄올 추출물의 피부건강 관련 효능 평가

앞선 3개 개발소재의 PBS 추출물의 피부건강 관련 효능은 극히 미비한 것으로 나타났다. 따라서 추출 용매의 변경과 농축 및 동결건조를 통해 추출 효율성을 높이고자 추출조건을 변경하였다.

각 소재 30 g을 칭량하여 600 mL의 100% methanol로 60°C 항온수조에서 3시간 동안 추출하였다. 충분히 냉각한 후 여과하여 회전진공농축기를 이용하여 감압농축, 동결건조를 실시하여 메탄올 추출물을 수득하였으며 각 소재의 수율은 미강 원물 12.66%, 미강(생물전환)산물 17.66%, 대두 원물 10.66%, 대두(생물전환)산물 24.32%, 참깨 원물 1.00%, 참깨(생물전환)산물 15.65%로 나타났다.

또한, 피부세포모델 피부섬유아세포(HDF)에 추가적으로 피부표피세포(HaCaT)의 두 가지 피부세포모델을 이용하여 3개 개발소재의 피부건강 관련 효능을 평가하였다.

### (1) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포독성 평가

피부섬유아세포의 세포독성 평가 결과, 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 100, 200, 400 µg/mL의 농도 모두에서 독성이 나타나지 않았으나, 피부표피세포의 세포독성 측정 결과, 미강 원물 100 µg/mL과 미강(생물전환)산물에서는 독성을 나타내지 않았으나, 미강 원물 200, 400 µg/mL의 농도에서는 각각 90.65, 84.92%의 생존율을 나타내었다.

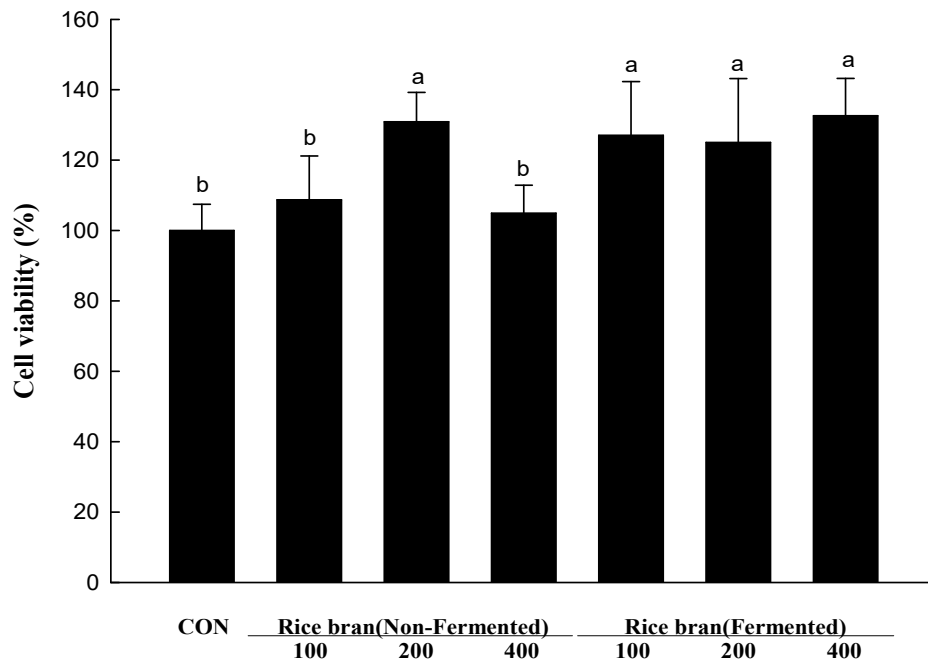


그림 269. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

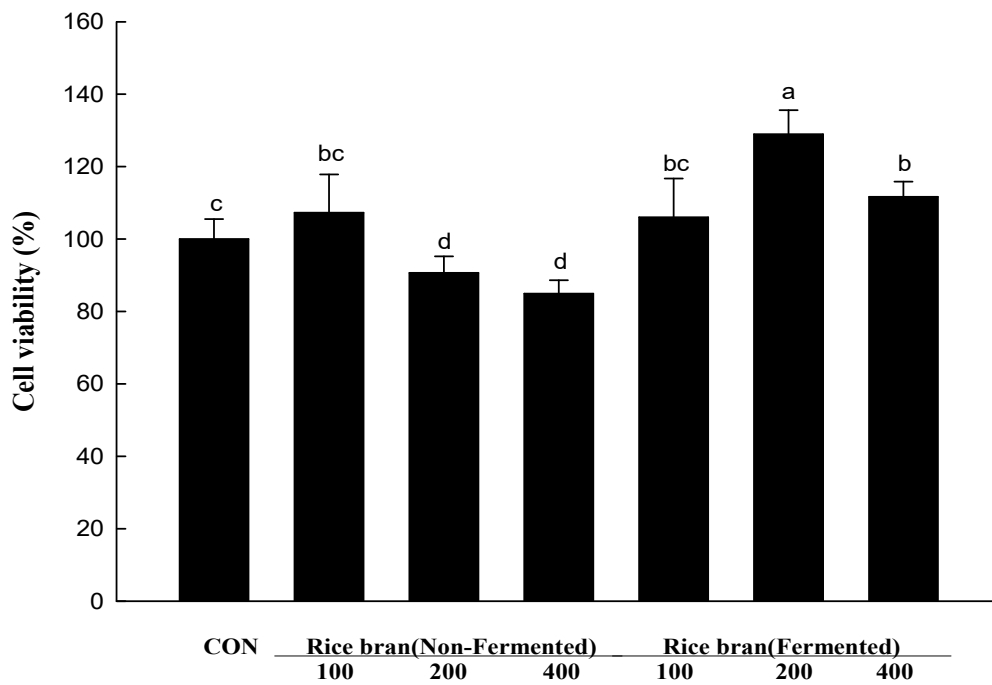


그림 270. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포독성 평가

(2) 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포 보호 효과

미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포 보호 효과를 알아보기 위하여 100, 200, 400 µg/mL의 농도에서 실험을 진행하였다. 측정 결과, 미강 원물의 경우 hydrogen peroxide군의 생존율과 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 미강(생물전환)산물에서 농도 의존적으로 미비하지만 세포 생존율이 증가하는 것으로 나타났다. 최고농도인 400 µg/mL에서 55.91%의 생존율을 나타내어 hydrogen peroxide보다 약 9% 정도의 생존율을 증가시키는 것을 확인하였다.

미강(생물전환)산물의 피부표피세포 보호 효과 측정 결과, 피부섬유아세포의 보호 효과의 경향과 유사하게 미강 원물에서는 세포 보호 효과가 나타나지 않았지만, 미강(생물전환)산물에서는 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하여 최고농도인 400 µg/mL에서 hydrogen peroxide 대비 약 14% 정도의 생존율을 증가시키는 것을 확인하였다.

미강 원물에서는 보호 효과가 나타나지 않았지만 생물전환시 두 가지 피부세포모델의 피부보호 효과를 확인할 수 있었다.



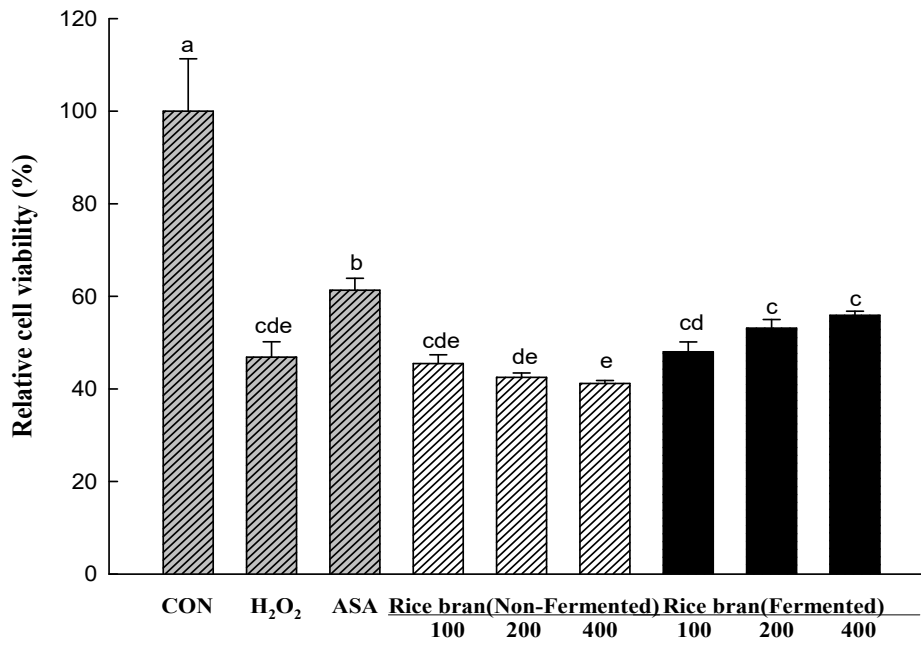


그림 271. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

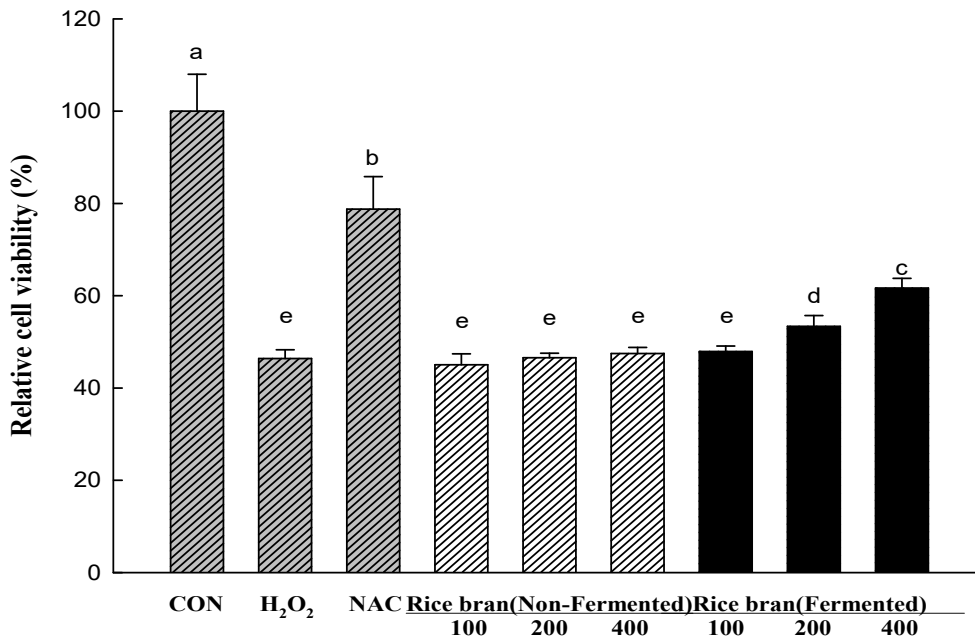


그림 272. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포 보호 효과

(3) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포독성 평가

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부세포모델 세포독성 평가 결과, 피부섬유아세포에서는 모두 독성을 나타내지 않았으나, 피부표피세포에서는 대두(생물전환)산물 최고농도인 400 µg/mL에서 92.95%의 생존율을 나타내었다.

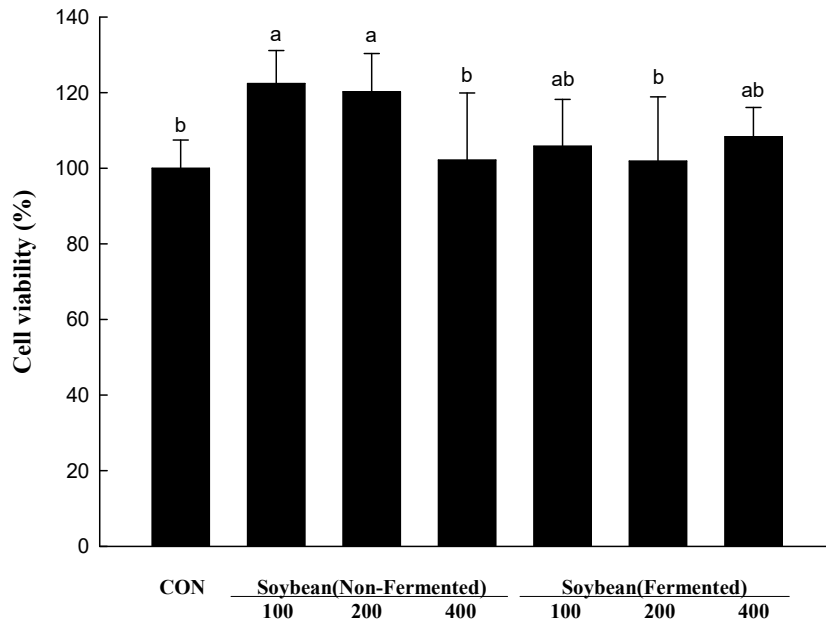


그림 273. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

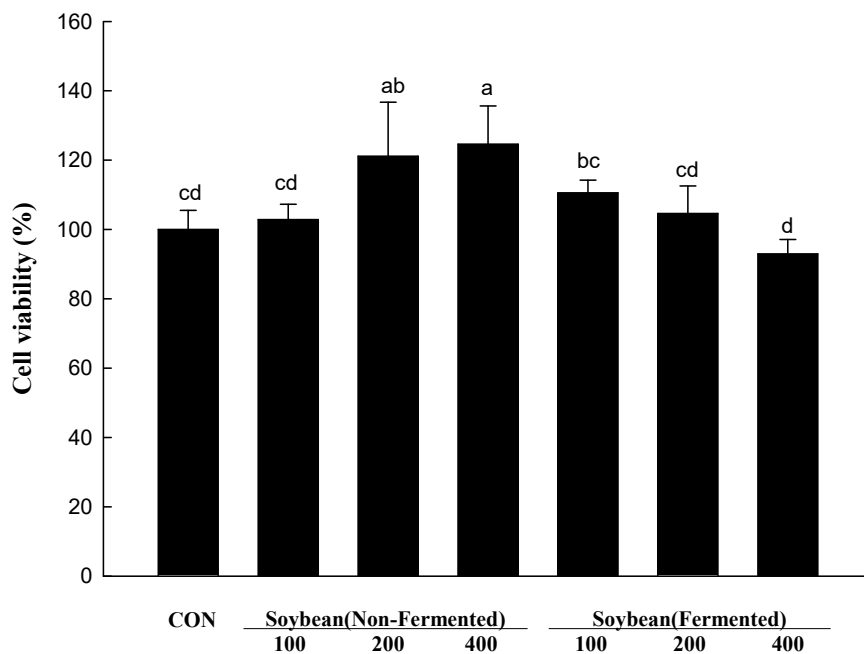


그림 274. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포독성 평가

(4) 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포 보호 효과

대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포 보호 효과 측정 결과, 대두 원물 및 대두(생물전환)산물 모두 모든 농도에서 유의적인 세포 보호 효과를 나타내지 않았다.

표피세포 세포 보호 효과 측정 결과, 피부섬유아세포와 유사하게 모든 농도에서 세포 보호 효과가 나타나지 않았다. 이는 앞선 대두(생물전환)산물의 PBS 추출물에서도 세포 보호 효과가 나타나지 않은 것과 동일한 결과이며 따라서, 대두(생물전환)산물의 피부건강 효능은 매우 미비한 것으로 생각된다.

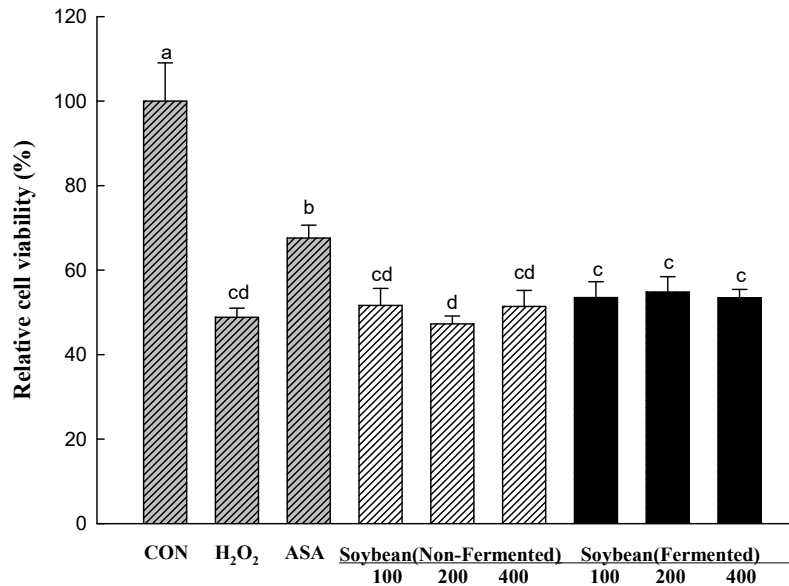


그림 275. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

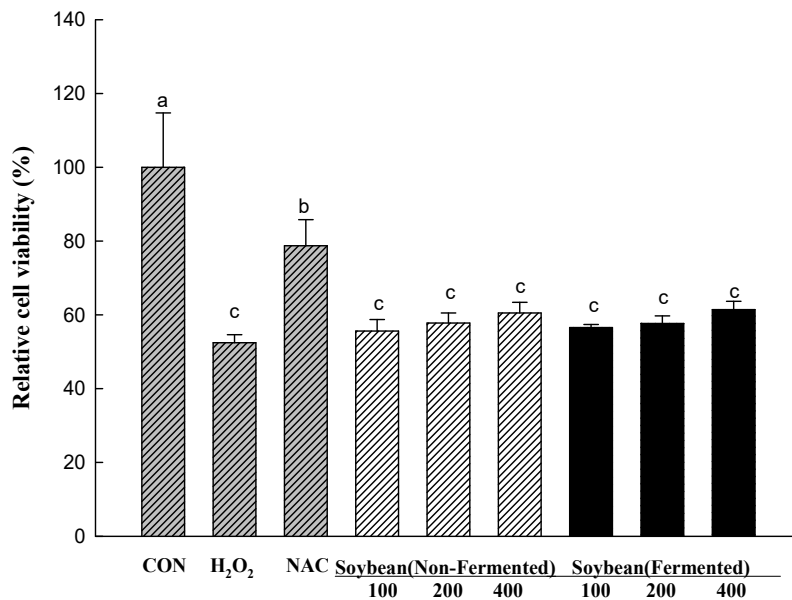


그림 276. 대두 원물 및 대두(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포 보호 효과

(5) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포독성 평가

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포 세포독성 평가 결과, 참깨 원물 농도 400 µg/mL에서 88.57%의 생존율이 나타났으며, 나머지 소재에서는 독성이 나타나지 않았다. 피부표피세포 세포독성 평가 결과, 참깨(생물전환)산물 400 µg/mL에서 88.16%의 생존율을 나타냈으며 나머지 농도에서는 독성이 나타나지 않았다.

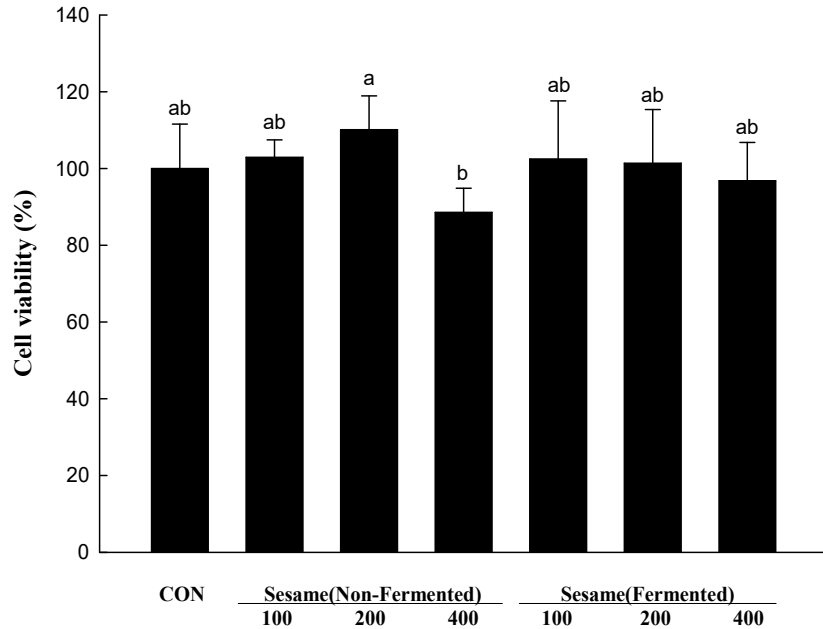


그림 277. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포독성 평가

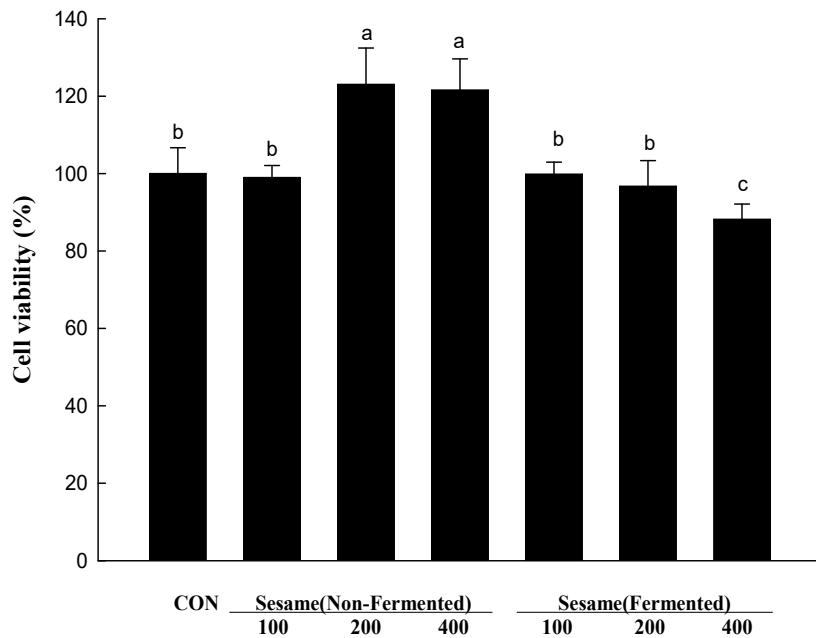


그림 278. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포독성 평가

(6) 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포 및 피부표피세포에 대한 세포 보호 효과

피부섬유아세포의 세포 보호 효과 측정 결과, 참깨 원물에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것으로 나타났으며 최고농도인 400 µg/mL에서 77.19%의 생존율로, 양성대조군인 ascorbic acid와 유사한 세포 보호 효과를 확인할 수 있었다. 하지만 참깨(생물전환)산물의 경우 모든 농도에서 유의적인 생존율의 증가가 나타나지 않았다. 피부표피세포 측정 결과, 피부섬유아세포의 결과와 유사하게 참깨 원물에서만 농도 의존적으로 생존율을 증가시켰으며, 피부섬유아세포의 결과와 마찬가지로 참깨의 생물전환 시 원물의 세포 보호 효과가 유지되지 않는 것으로 나타났다.

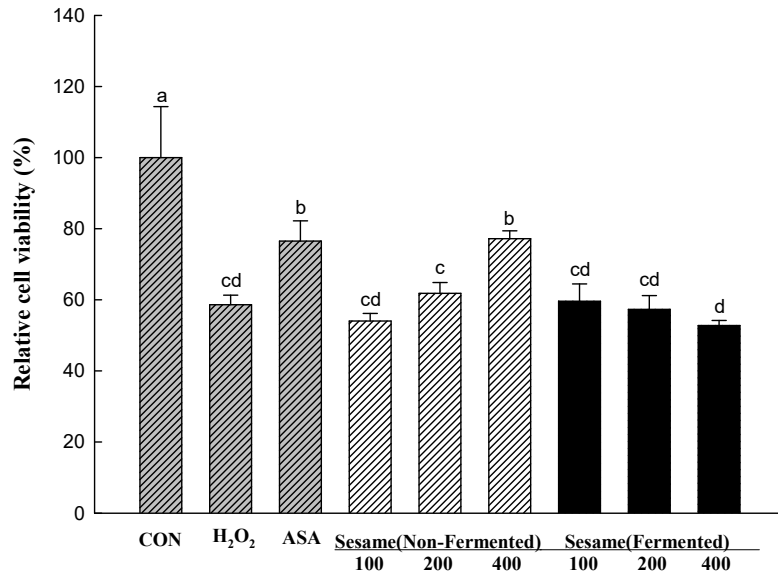


그림 279. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

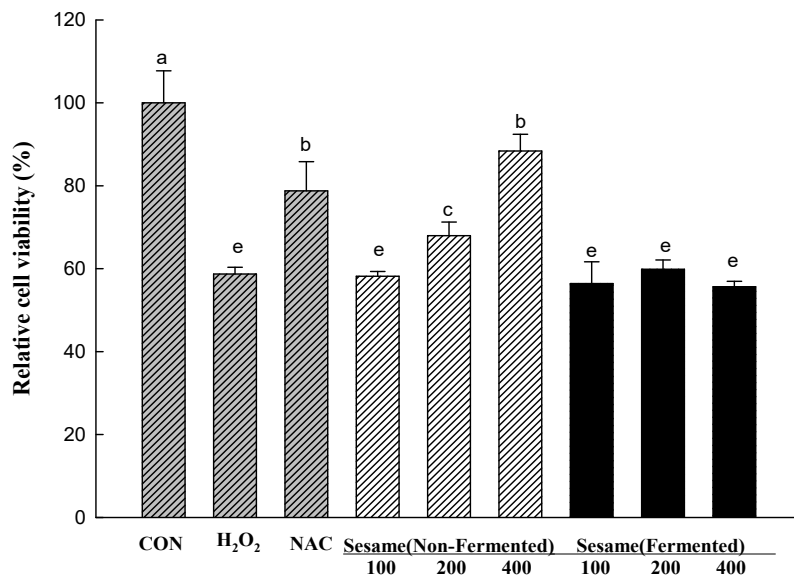


그림 280. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포 보호 효과

(7) X-gal staining을 통한 노화 억제 활성 평가

X-gal은 lactose의 유사체로서  $\beta$ -galactosidase에 의해서 galactose와 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole로 분해된다. X-gal로부터 분해된 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole은 파란색을 띄게 되는데, 이때  $\beta$ -galactosidase는 노화가 발생한 세포에서 많은 발현이 나타난다. 이러한 X-gal의 원리를 이용하여 농산부산물 소재의 노화 억제 활성을 측정하였다.

측정 결과 hydrogen peroxide의 처리로 인한 피부 노화 유도시, 양성대조군 ascorbic acid (100  $\mu$ M)에서 30.98%의 노화도를 보였으며, 미강(생물전환)산물에서 60.04%, 참깨 원물에서 49.20%의 노화도를 나타냈다. 이외의 소재들은 앞선 세포 보호 효과의 결과와 마찬가지로 노화를 막지 못하는 것으로 나타났다.

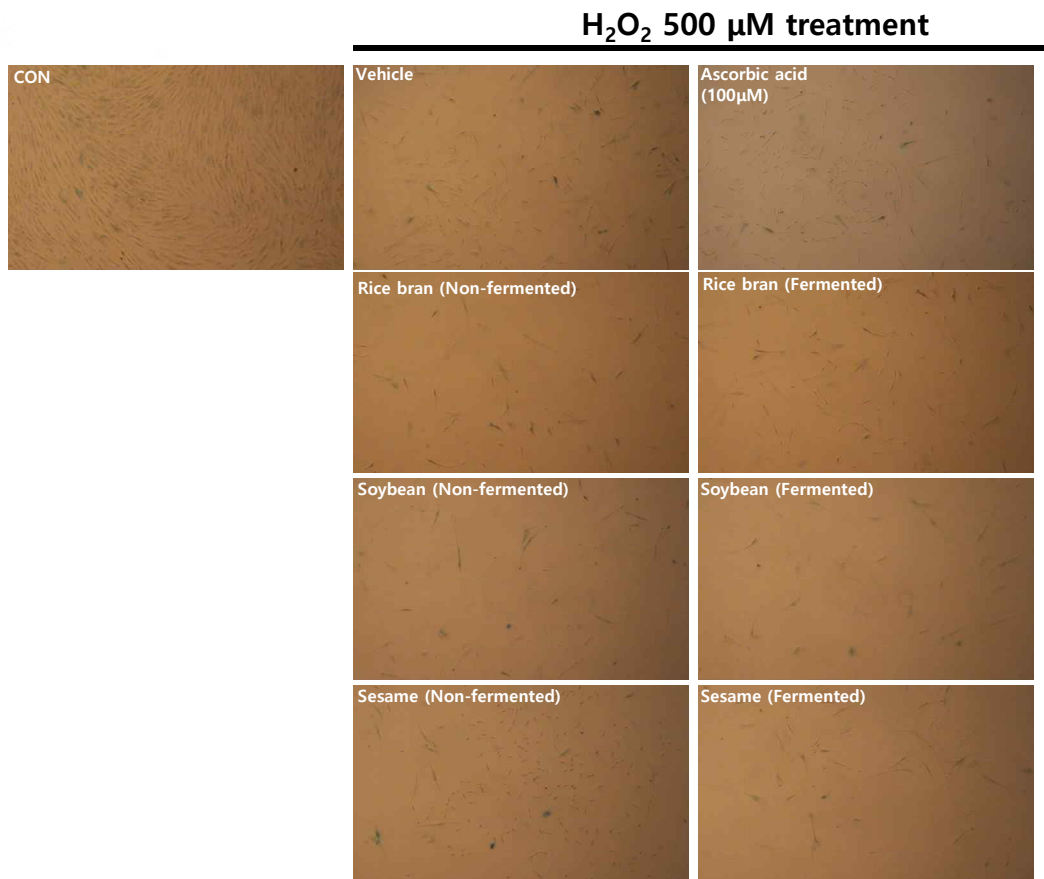


그림 281. X-gal staining을 통한 농산부산물 소재의 피부섬유아세포의 morphology

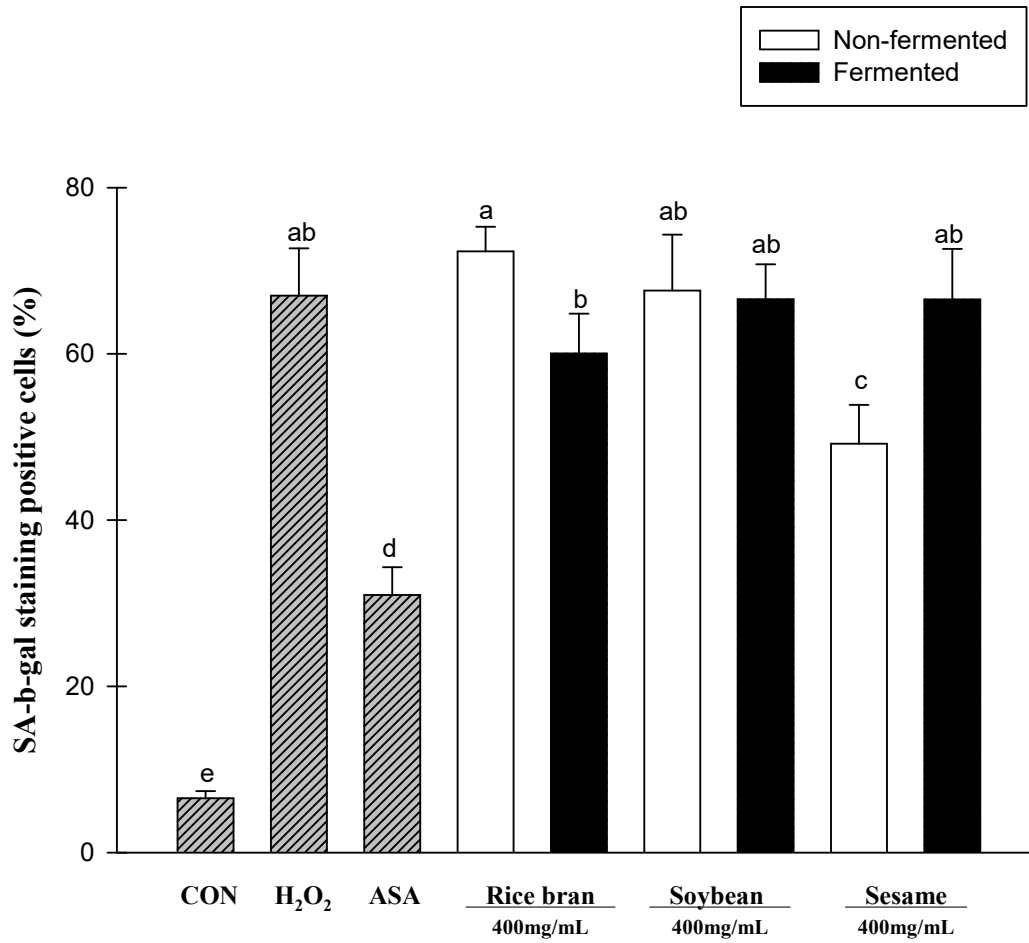


그림 282. X-gal staining을 통한 농산부산물 소재의 피부섬유아세포의 항노화 활성

다. 미강(생물전환)산물과 유백피 복합추출물의 피부건강 관련 효능 평가

앞선, 3개 개발소재의 원물 및 (생물전환)산물의 피부건강 관련 효능 평가 결과, PBS 추출물의 경우 모든 농산부산물 소재에서 피부 건강 효능은 없는 것으로 나타났다. 메탄올 추출물의 경우 참깨 원물에서 피부섬유아세포, 피부표피세포에서 뛰어난 효과를 나타냈지만, 참깨의 생물전환시 효능이 유지되지 않고 사라지는 것으로 보인다. 결과를 종합하여 볼 때, 농산부산물 소재의 생물전환시 미강(생물전환)산물의 경우만 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물에 비해 약간의 효능이 나타나는 것으로 확인되었다.

유백피는 느릅나무과의 왕느릅나무의 코르크층을 벗긴 수피를 말하며 항산화, 항염작용, 항균작용, 멜라닌 합성 조절 등의 피부 미백 및 피부 건강에 관한 효능이 알려져 있다.

(1) 농산부산물(생물전환)산물과 유백피 추출물의 피부세포 보호 효과

본 연구의 미강, 대두, 참깨의 (생물전환)산물과 유백피의 피부섬유아세포에서의 세포 보호 효과를 비교한 결과, 유백피 200 µg/mL에서 81.20%의 생존율을 보여 양성대조군인 ascorbic acid보다 10% 이상의 우수한 생존율을 나타냈다. 대두(생물전환)산물과 참깨(생물전환)산물의 경우 hydrogen peroxide군과 유의적인 생존율 차이를 나타내지 못하였다. 피부표피세포의 경우도 유사한 경향을 나타내었다.

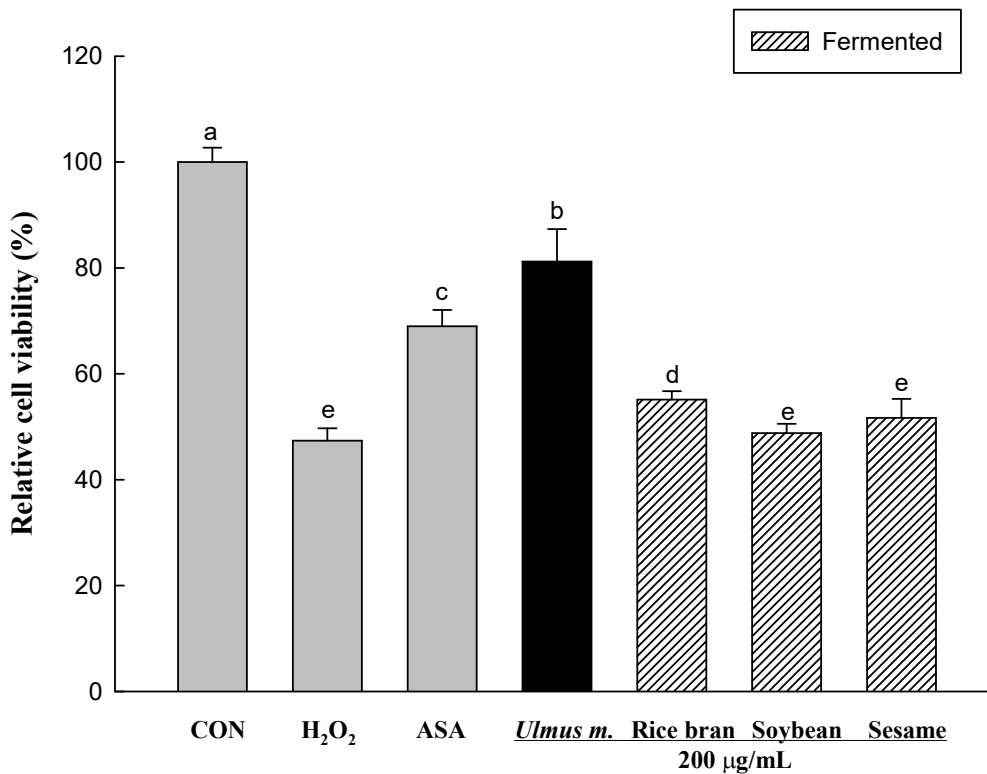


그림 283. 유백피 추출물과 농산부산물(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과



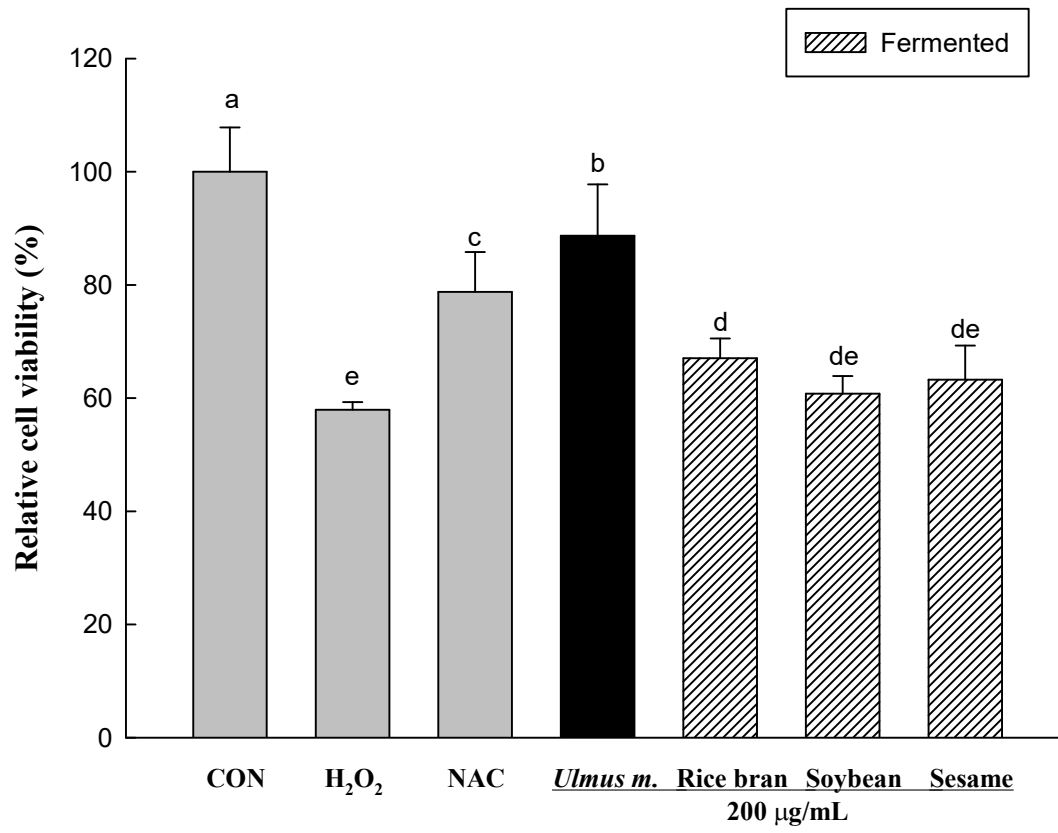


그림 284. 유백피 추출물과 농산부산물(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포 보호 효과

(2) 미강복합소재의 세포 보호 효과

미강(생물전환)산물과 유백피를 혼합하여 각 5:5, 7:3, 9:1의 비율의 복합추출물을 제조하여 세포 보호 효과를 측정한 결과, 5:5의 비율로 혼합한 복합추출물에서 가장 높은 세포 보호 효과를 나타내었다. 선행연구를 통해 유백피의 피부건강 개선 효능을 확인하였으며, 농산부산물을 이용하는 측면에서 미강(생물전환)산물과의 복합추출물을 제조하여 미강(생물전환)산물의 면역 등 기존의 기능성은 유지하며 추가적으로 피부건강 효능이 기대된다. 추후 피부세포모델과 차년도 피부 노화동물모델을 이용한 피부건강 관련 효능 평가는 미강(생물전환)산물과 유백피의 복합추출물 형태의 소재로 진행할 예정이다.

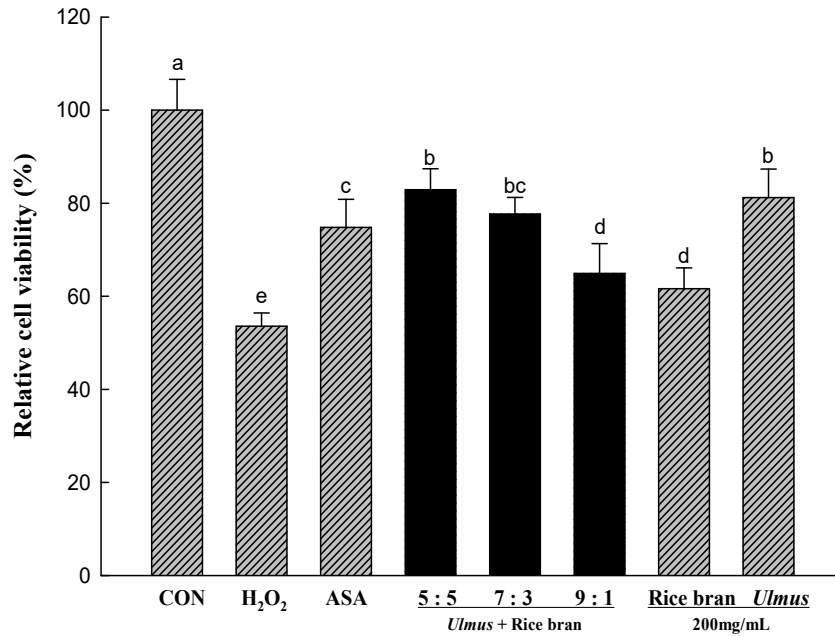


그림 285. 미강복합소재의 피부섬유아세포의 세포 보호 효과

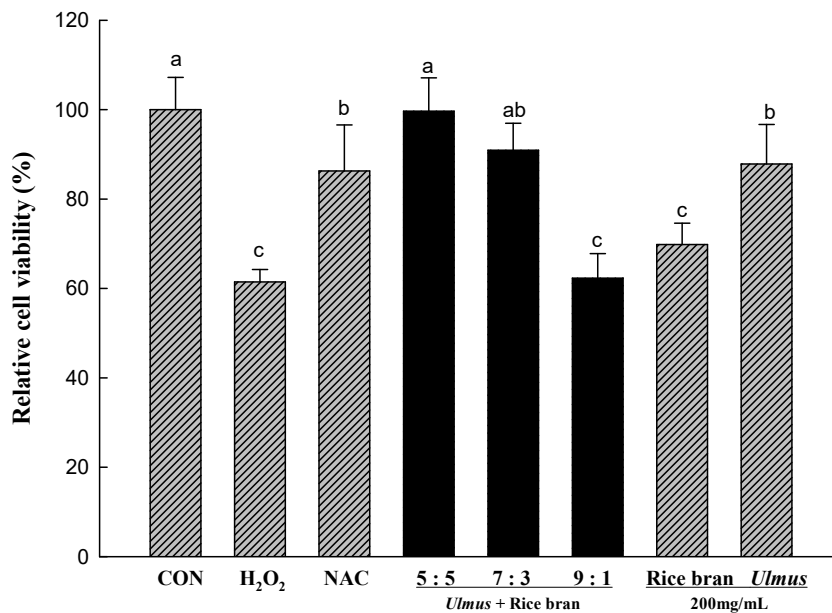


그림 286. 미강복합소재의 피부표피세포의 세포 보호 효과

## 라. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 유도 피부표피세포의 아토피성 관련 효능 평가

아토피성 피부염은 만성염증성피부질환으로 고혈청 IgE 농도 및 호산구 증가증 등과 관련되어 있으며, 호산구의 침윤과 활성화를 포함하는 IgE 매개 염증반응이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 아토피 피부염의 발병기전에서 다양한 면역 작동 세포들과의 관련된 연구가 이루어지고 있다. 피부표피세포는 각질층을 생성하며 여러 cytokine 및 chemokine을 생산하여 면역 및 염증반응에 관여함으로써, 아토피 피부염 및 건선 등 다양한 피부질환과 관련되어 있다. TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 에 의해 자극된 피부표피세포는 염증부위의 단핵구 등의 침윤을 증가시키는 것으로 알려져 있는 TARC 및 MDC 등의 chemokine의 비정상적인 발현을 유도하게 된다고 알려져 있다.

따라서 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 아토피성 관련 효능을 평가하고자, 피부표피세포 (HaCaT)를 이용하여 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  처리 시 증가되는 cytokine과 chemokine 및 관련 작용기전을 구명하고자 하였다.

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공받은 진을 품종 참깨 원물 및 (생물전환)산물 이용하여 각 시료 500 mg에 PBS를 이용하여 25 mL volumetric flask에 정용한 뒤(200 mg/mL), shaker를 이용하여 100 rpm에서 1시간 동안 추출하였다. 그 후 고형분의 제거를 위하여 원심분리 후 상층액을 filter하여 실험에 사용하였다.

(1) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부표피세포에 대한 세포독성 평가

진을 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부섬유아세포의 독성 및 생존율의 평가를 위하여 시료를 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 처리 또는 TNF-α 및 IFN-γ (10 ng/mL)와 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 이후 XTT reagent를 4시간 동안 처리하여 세포독성을 평가하였다. 그 결과, 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물 모두 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, TNF-α 및 IFN-γ를 동시 처리하였을때도 독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서는 최고 농도인 200 µg/mL의 농도를 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

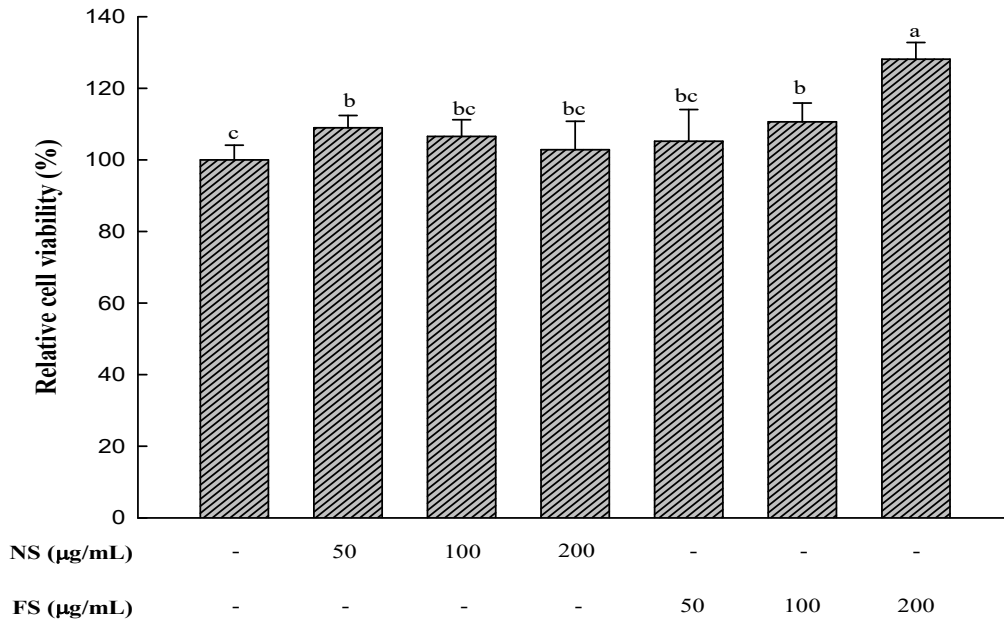


그림 287. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 피부표피세포의 세포독성 평가

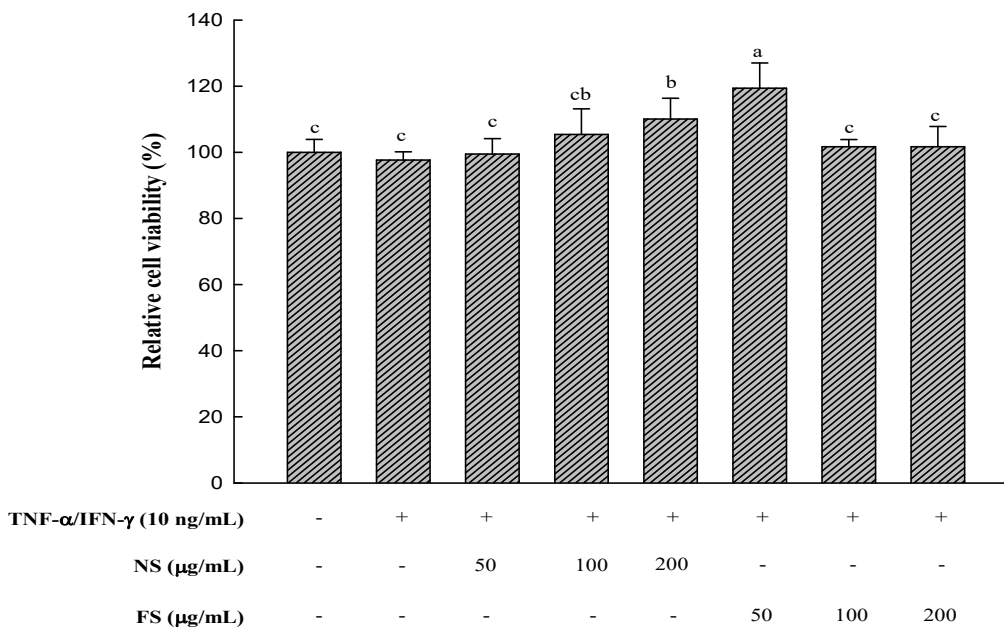


그림 288. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 TNF-α/IFN-γ 동시처리 피부표피세포의 세포독성 평가

(2) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 염증성 cytokine 및 chemokine mRNA level에 미치는 영향 평가

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 염증성 cytokine 및 chemokine mRNA 유전자 발현은 RT-PCR을 이용하여 평가하였다. Interleukine-1beta(IL-1 $\beta$ ) 및 IL-6는 TNF- $\alpha$ 에 의하여 분비가 촉진되는 급성 조절 단백질이며 주요한 염증성 사이토카인으로 작용한다. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 에 의하여 증가된 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA 발현량은 참깨 원물(NS) 처리 시에 유의적인 발현량 감소를 나타내지 않았다. 반면 참깨(생물전환)산물(FS) 처리 시에 mRNA 발현량이 감소하는 것으로 나타났다. Intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)은 각종 염증세포의 이동 및 침윤을 유발시키는 인자로서 염증반응을 조절하는데 매우 중요하다. ICAM-1의 경우도 앞선 결과와 유사하게 참깨(생물전환)산물에서만 발현량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) 및 macrophage-derived chemokine (MDC)는 Th2세포를 염증부위로 이동시키는 대표적인 chemokine으로써 아토피 피부염 환자의 혈청에서 그 수준이 현저하게 증가되어 있다고 알려져 있다. 발현량 평가 결과, 참깨 원물 처리 시 유의적인 발현 감소는 나타나지 않았으나, 참깨(생물전환)산물 처리 시 그 발현량이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다.

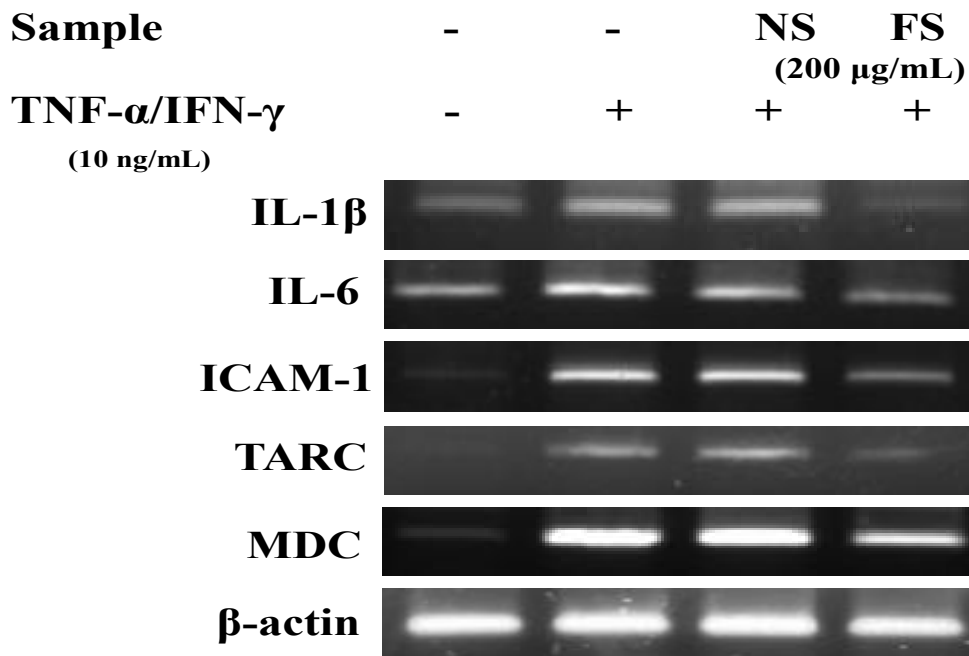


그림 289. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 cytokine 및 chemokine mRNA level에 미치는 영향

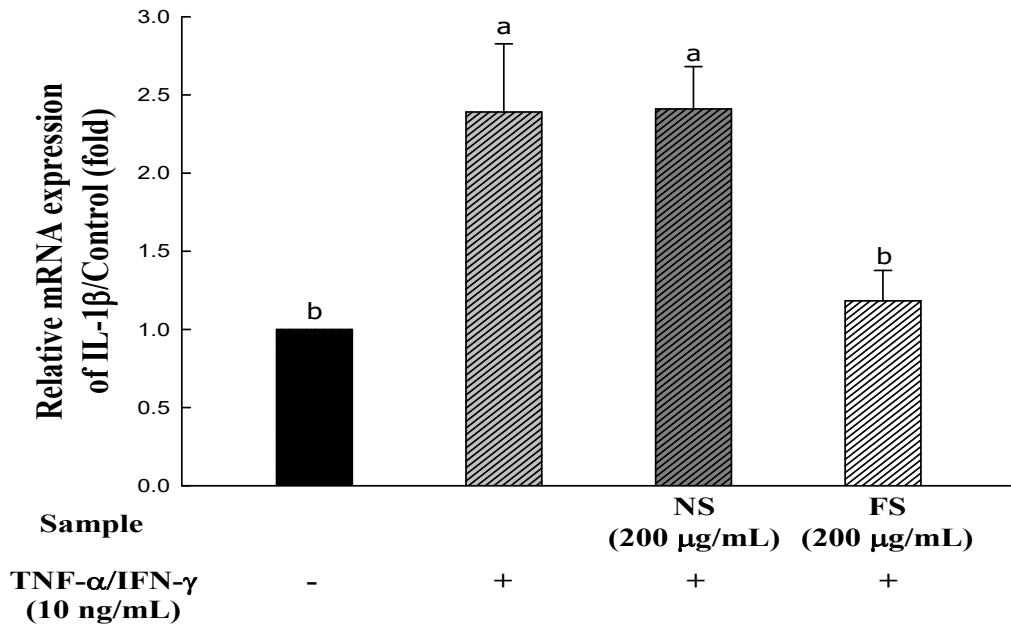


그림 290. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 IL-1 $\beta$  mRNA level에 미치는 영향

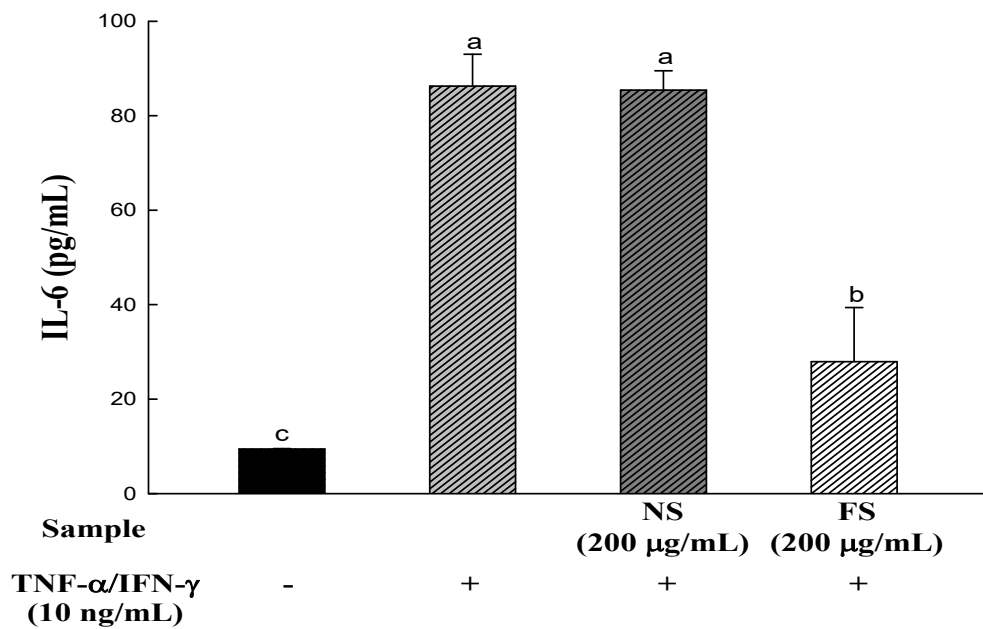


그림 291. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 IL-6 mRNA level에 미치는 영향

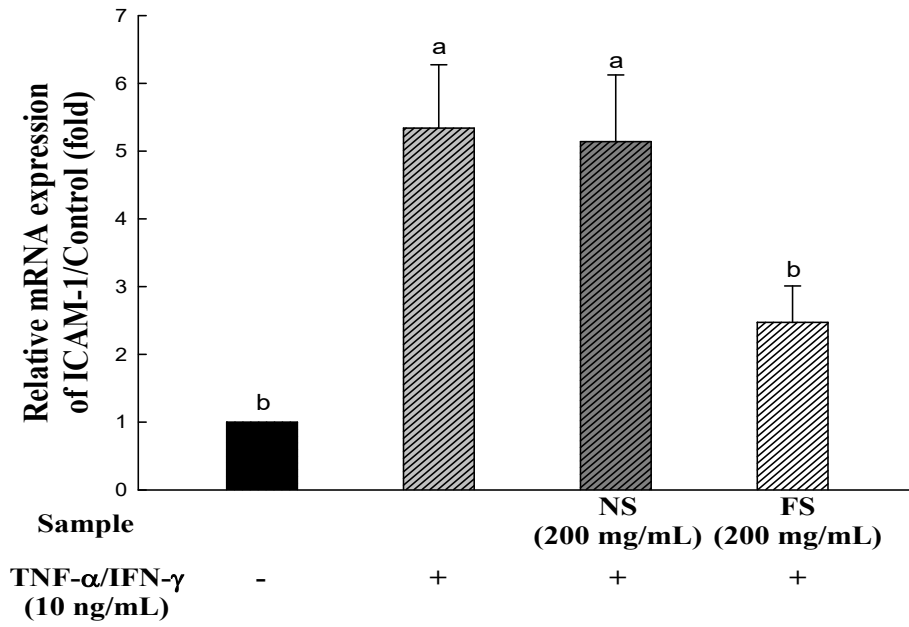


그림 292. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 ICAM-1 mRNA level에 미치는 영향

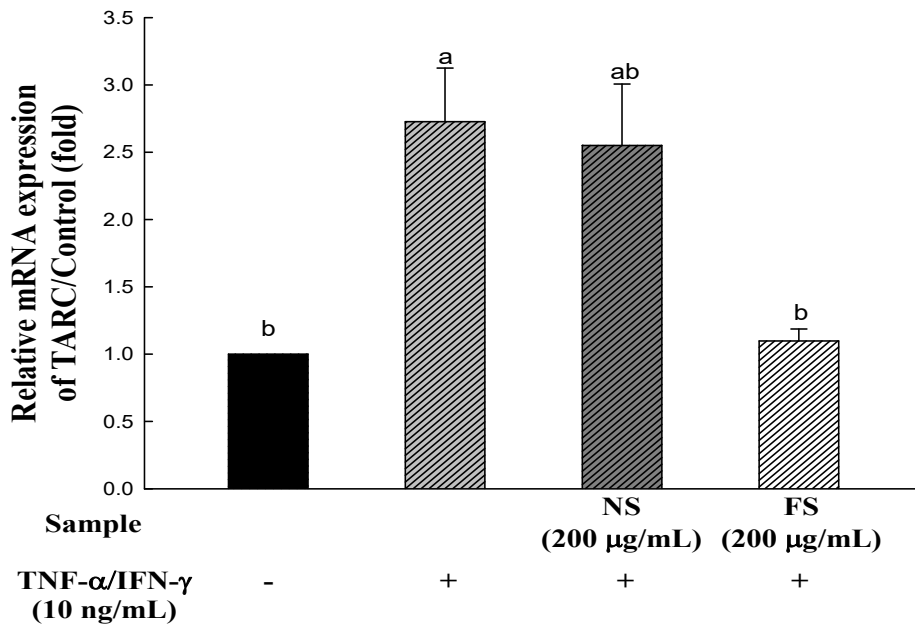


그림 293. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 TARC mRNA level에 미치는 영향

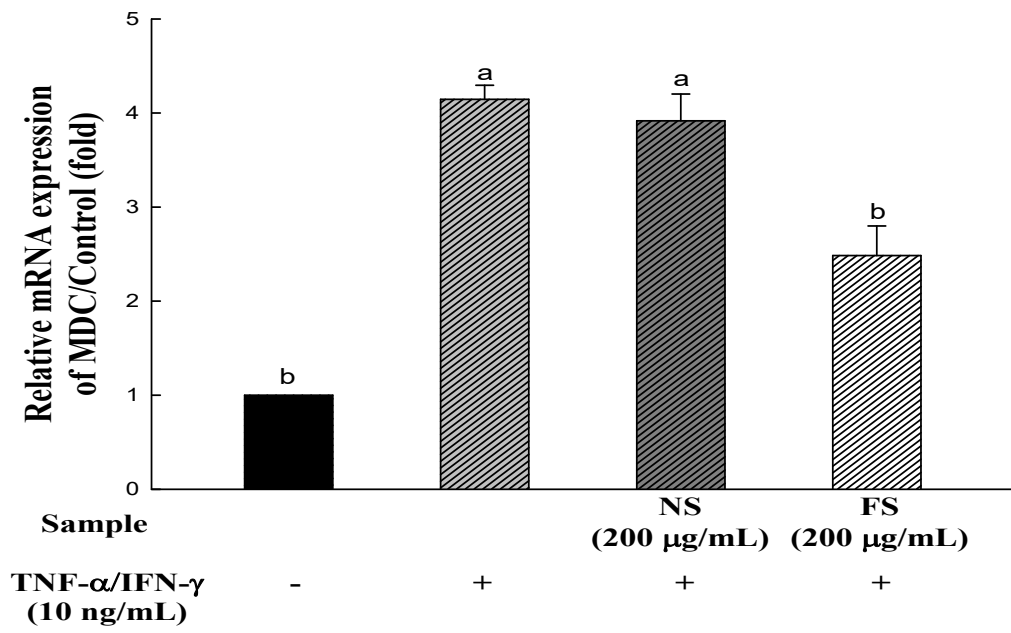


그림 294. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 MDC mRNA level에 미치는 영향



(3) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 염증성 cytokine 및 chemokine 생성량에 미치는 영향 평가

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 염증성 cytokine 및 chemokine 생성량에 미치는 영향을 평가하기 위하여 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물과 TNF- $\alpha$ /IFN $\gamma$ 를 동시처리 하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양배지의 상층액을 수득하여 ELISA kit (R&D system)을 이용하여 생성량을 측정하였다.

그 결과, 앞선 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현량과 유사하게 참깨 원물 처리 시 TNF- $\alpha$ /IFN $\gamma$  처리군과 유사한 cytokine 및 chemokine의 생성량을 나타내었다. 반면 참깨(생물전환)산물의 경우 약 2배에서 3배까지 cytokine 및 chemokine의 생성량을 감소시키는 것으로 나타났다.

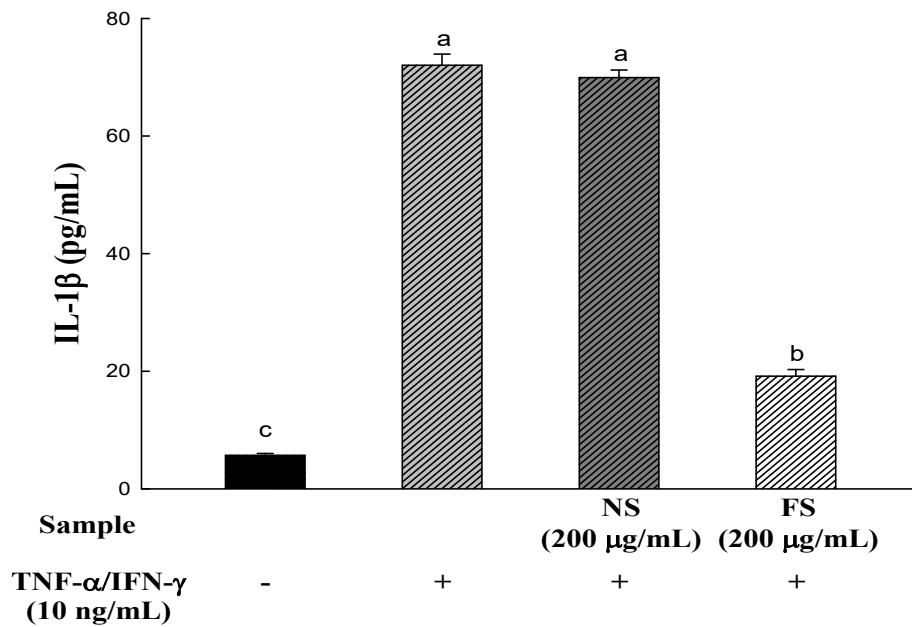


그림 295. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 IL-1 $\beta$  생성량에 미치는 영향

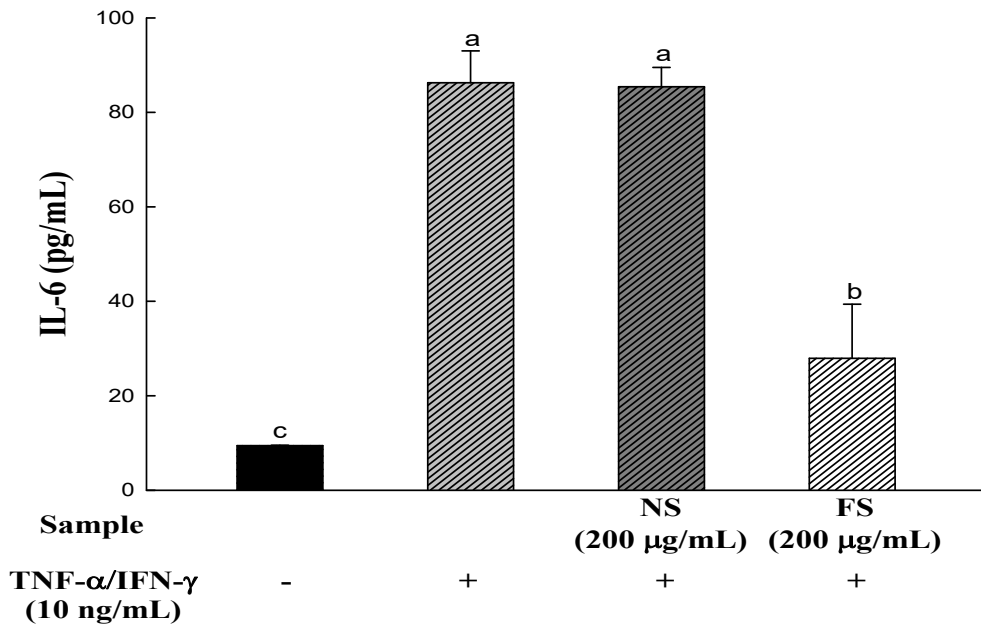


그림 296. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 IL-6 생성량에 미치는 영향

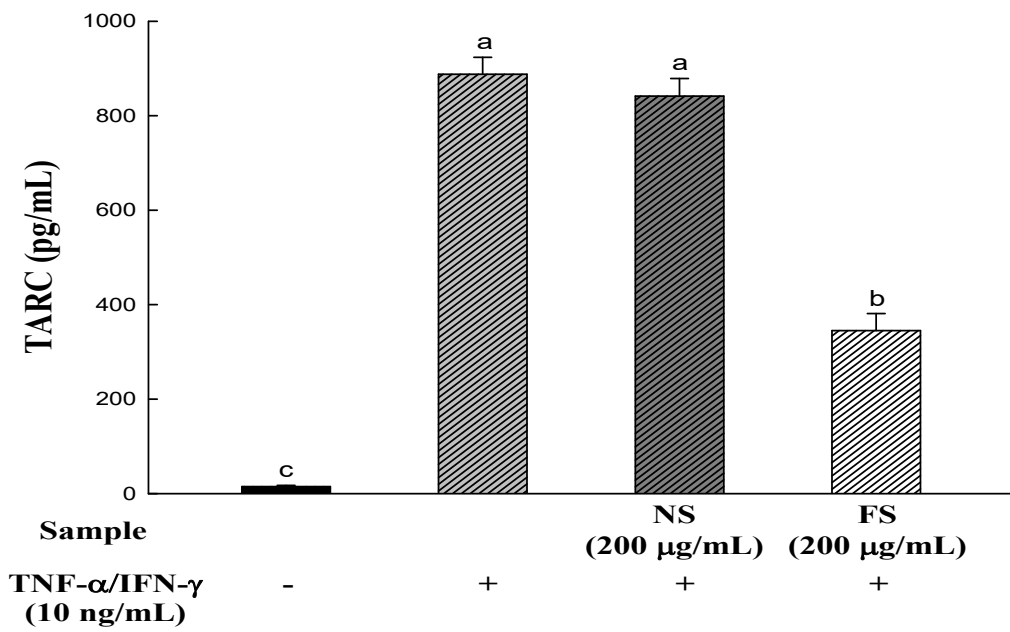


그림 297. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 TARC 생성량에 미치는 영향

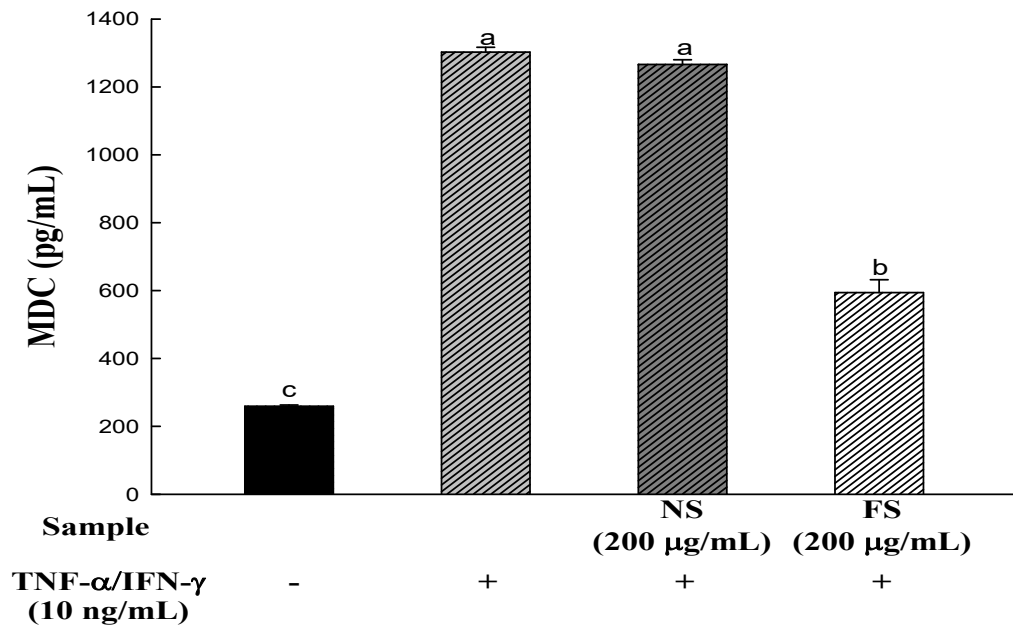


그림 298. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 MDC 생성량에 미치는 영향

(4) 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 아토피 관련 주요 작용기전 구명

참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물의 아토피 관련 작용기전을 구명하기 위하여 western blot을 실시하였다. NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)는 TNF- $\alpha$  및 LPS (lipopolysaccharide) 등 각종 자극에 의해 활성화 된다. 주된 활성화 기작은 IKK (I $\kappa$ B kinase)에 의하여 I $\kappa$ B를 인산화시키고, 인산화된 I $\kappa$ B는 ubiquitination에 의해 분해되어 I $\kappa$ B와 복합물을 이루고 있던 NF- $\kappa$ B가 유리되어 세포질로부터 핵으로 이동하여 최종적으로 핵 안에서 각종 염증반응에 관여하는 cytokine 및 chemokine을 조절하는 전사인자로 작용하게 된다. 따라서 피부표피세포에서의 I $\kappa$ B의 인산화 및 NF- $\kappa$ B의 인산화를 억제하는 것은 아토피 피부염 발병에 있어 주요한 작용기전으로 알려져 있다.

STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1)은 IFN- $\gamma$ 에 의해 유도된 JAK (janus kinase)의 인산화에 의해 활성화된다. STAT family proteins 중, STAT1은 각종 염증반응 조절에 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있다.

관련 단백질 평가 결과, TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 에 의하여 NF- $\kappa$ B 및 STAT1의 인산화가 유도된 것을 확인하였으며, I $\kappa$ B의 경우 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리 시 분해되어 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 참깨 원물 처리 시 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리군에 비하여 p-STAT1의 인산화를 미비하게나마 억제하는 것으로 나타났다. 참깨(생물전환)산물의 경우 p-STAT1의 인산화를 현저하게 억제하는 것으로 나타났다. p-NF- $\kappa$ B의 경우 참깨(생물전환)산물에서만 발현을 억제시켰으며, I $\kappa$ B의 경우 참깨(생물전환)산물 처리 시 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리에 의해 분해가 억제되어 발현량이 회복되는 것으로 나타났다.

위와 같은 결과를 종합하여 보았을 때, 참깨(생물전환)산물에 의한 염증성 cytokine 및 chemokine의 발현 억제는 NF- $\kappa$ B 및 STAT1 신호전달체계의 인산화를 억제함으로써 항아토피 효과를 갖는 것으로 나타났다.

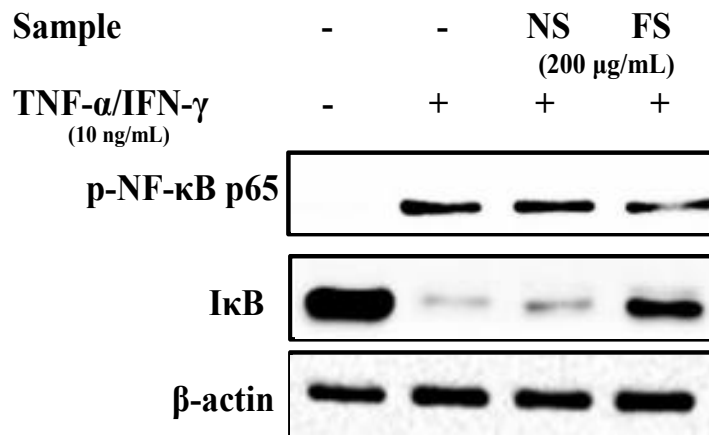


그림 299. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 NF- $\kappa$ B 관련 단백질 발현에 미치는 영향

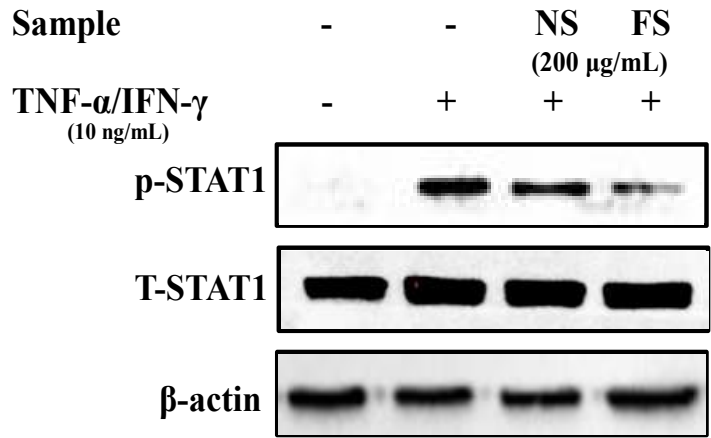


그림 300. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 STAT1 관련 단백질 발현에 미치는 영향

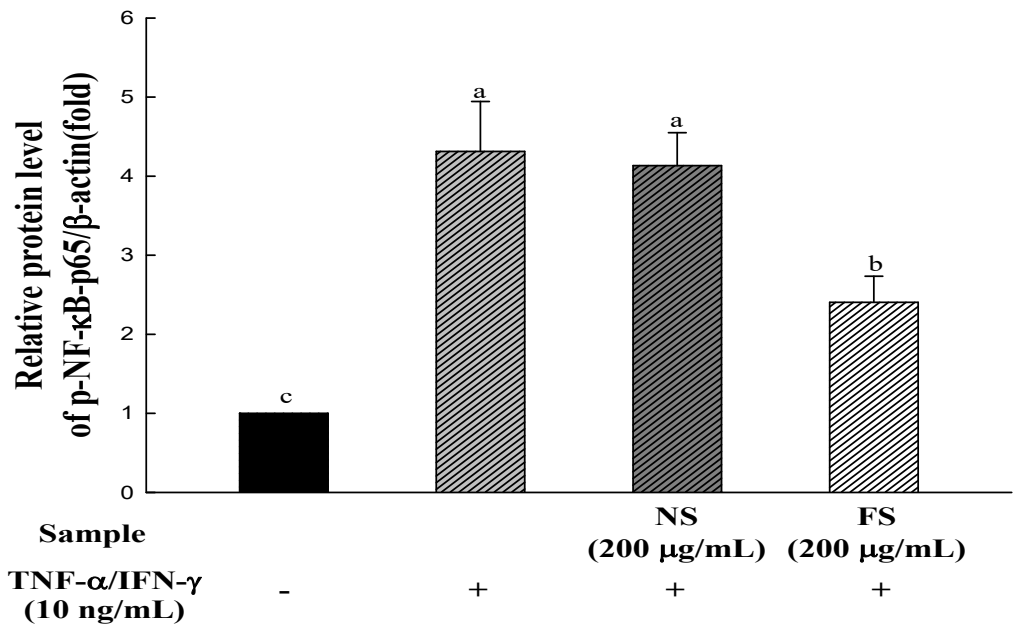


그림 301. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 p-NF- $\kappa$ B-p65 발현량에 미치는 영향

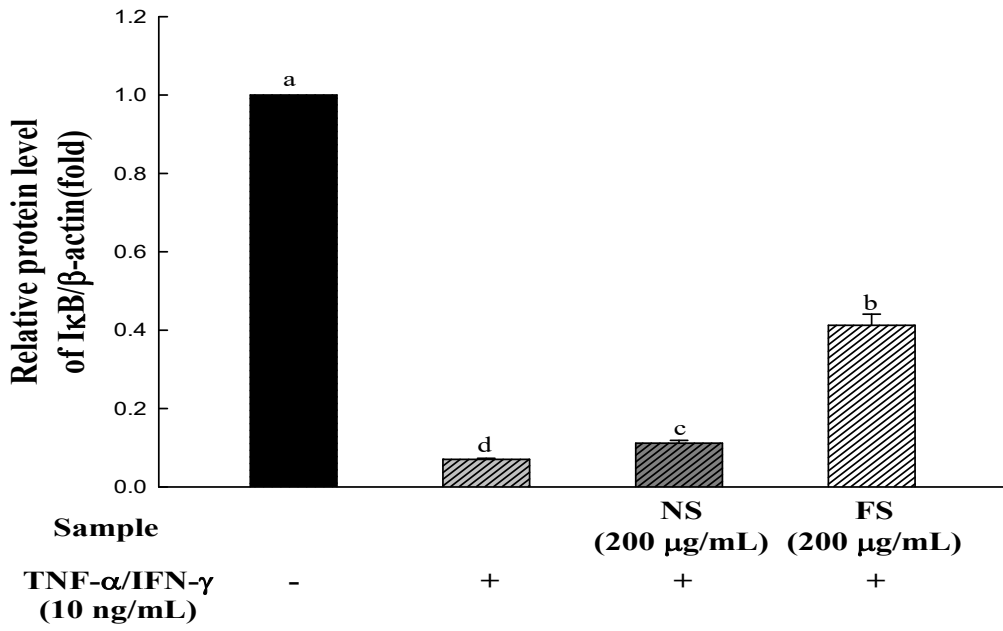


그림 302. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 I $\kappa$ B 발현량에 미치는 영향

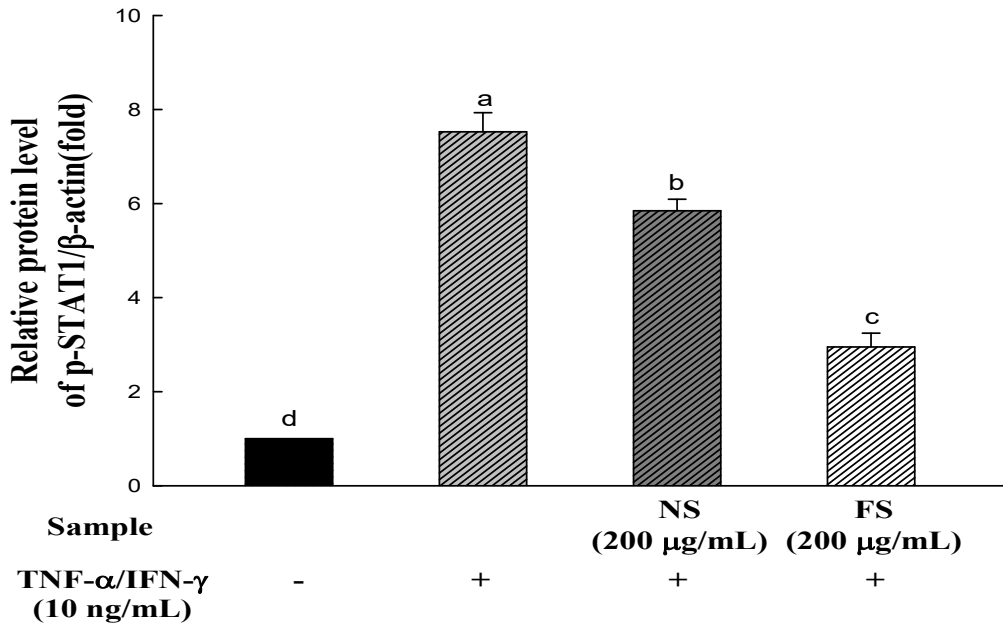


그림 303. 참깨 원물 및 참깨(생물전환)산물이 p-STAT1 발현량에 미치는 영향

## 2. UV-B로 유도된 피부노화 동물모델을 이용한 피부건강 관련 효능 평가

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물의 항주름 및 보습증진 등의 피부건강 관련 효능을 평가하기 위하여 *in vivo*에서 UV-B로 유도된 HoS:HR-1 주름생쥐동물 모델에서 효능 평가를 수행하였다.

UV-B 조사 및 피부주름 유발을 위하여 7주령의 HR-1 생쥐에 UVB 램프(15 W type, UV maximum wave length 312 nm; UV intensity 100  $\mu\text{W cm}^{-2}$ , Ieda Boeki Co., Tokyo, Japan)로 등피부에 조사하였다. 즉, HR-1 생쥐를 첫 번째 1 주일은 매일 100  $\text{mJ/cm}^2$  UVB radiation (1 minimal erythematal dose=100  $\text{mJ/cm}^2$ )을 조사하였고, 그런 다음 2주째부터 10주째까지는 200  $\text{mJ/cm}^2$ 로 UVB radiation을 주에 3번(월, 수, 금) 조사하였다.

군 분리는 다음 표와 같이 정상대조군, UV-B 조사군, UV-B조사와 retinoic acid 0.01% 도포 양성대조군 및 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물을 각각 40 mg/kg로 투여한 시험군으로 구성하였다.

표 158. 시험군 구성

Groups	Treatment
HR-1 normal control	HR-1 without any treatment
UV-B vehicle control	HUVB irradiation vehicle
UV-B 0.01% retinoic acid	UVB irradiation + retinoic acid 0.01% (topical ointment)
UV-B FRB	UVB irradiation + FRB 40 mg/kg / oral administration
UV-B FSB	UVB irradiation + FSB 40 mg/kg / oral administration
UV-B FSC	UVB irradiation + FSC 40 mg/kg / oral administration

(1) 체중 변화

체중은 다음과 같이 체중변화, 총 체중 증가량, 1일 평균 체중 증가량을 측정하였다.

체중변화 : 매주 목요일 오전 10 시에 측정/기록

총 체중 증가량 = [Final body weight - initial body weight]

1 일 평균 체중 증가량 = [Total body weight gain/days]

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여에 대한 체중 변화를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UV-B를 조사하여 주름을 유도한 다음 매주 체중 변화를 측정한 결과, 다음 그림과 같이 각 추출물에 대한 체중변화는 HR-1 생쥐에 UV-B를 조사와 관계없이 그룹간 변화가 나타나지 않았다.

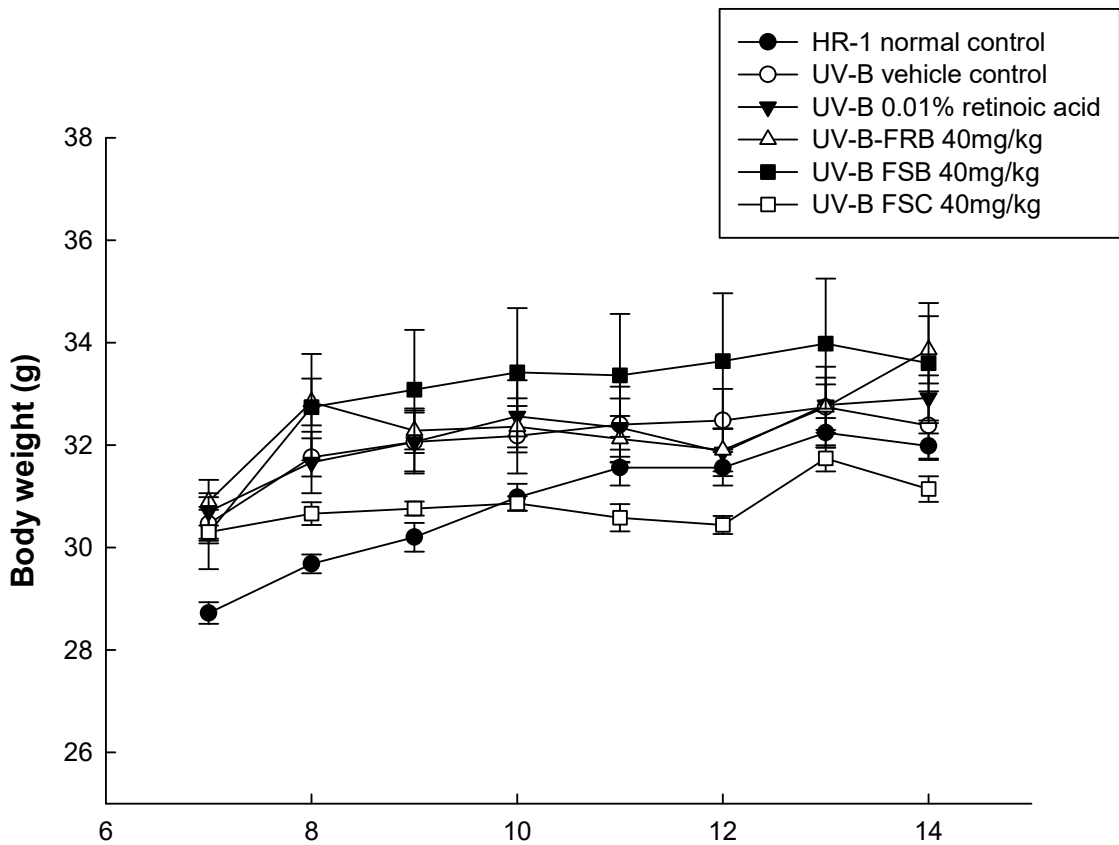


그림 304. HR-1 생쥐의 체중 변화량



(2) 식이섭취 및 식이 효율

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 식이섭취 및 식이효율 변화를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 8주 동안 측정된 결과, 정상군 (normal control)과 UVB-대조군 (vehicle control)의 식이섭취량은 비슷한 수준이었고, 식이효율은 UVB-대조군에서 감소하는 것으로 나타났다. 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군의 식이섭취량은 UVB-대조군과 같거나 약간의 감소를 보였으며, 식이효율은 모든 군에서 감소하는 것으로 나타났다.

HR-1 생쥐의 식이섭취량 및 식이효율은 다음과 같은 식을 이용하여 나타내었다.

- 식이섭취량 (food intake)
- 1일 평균 식이 섭취량 - Total food intake / days
- 식이효율 (food efficiency ratio, FER)
- FER = [Total weight gain / Total food intake ] x 100

표 159. 식이섭취량, 체중 증가 및 식이효율

Group	Food intakes (g/day)	Body weight gain (g/day)	Food efficiency ratio (FER, %)
HR-1 normal control	2.75	0.065±0.03	2.37±1.19
UV-B vehicle control	2.81	0.042±0.01	1.03±0.42
UV-B 0.01% retinoic acid	3.19	0.048±0.01	1.29±0.62
UV-B FRB	2.48	0.064±0.02	0.72±0.36
UV-B FSB	2.48	0.018±0.02	0.40±0.74
UV-B FSC	2.58	0.050±0.01	0.82±0.74

(3) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 HR-1의 등피부 변화 평가

(가) 등피부 주름 측정 (Dermobella) 분석

UV-B가 조사되어 광노화가 유발된 HR-1마우스 피부의 주름개선을 관찰하기 위하여 잠시 ethyl ether 로 마취한 후 생쥐의 등피부를 주름분석기(Dermobella, chowis, Seongnam-si, Korea)로 UVB조사 4주, 6주, 8주, 10주후에 각각 주름측정기를 이용하여 주름을 측정하였다.

주름도 모공처럼 영상에서 주변 대비 상대적으로 어둡게 나오며, 이 어두운 영역을 먼저 검출한 후 털을 제거하는 것까지 비슷하게 진행된다. 주름에서 중요한 요소는 길이와 깊이이므로, 길이가 일정 수치 이하이거나 깊이가 평균보다 얇은 영역은 잔주름으로 간주하여 이를 제거한다. 깊이는 HLS color 의 S channel 이 실제 깊이와 유사한 값을 가지므로 이를 이용하고, 최종적으로 주름으로 판별된 각 영역에서 길이와 평균 깊이 값을 곱하고, 이를 영상 크기 값으로 나눠줌으로써 index가 자동계산 된다. 측정 수치가 작아질수록 피부 주름의 깊이가 낮아짐을 의미한다.

$$Wrinkle\ index = \frac{\sum(L_i \times D_i)}{Image\ size}$$

$L_i \propto$  length of  $i$ -th wrinkle,  $D_i \propto$  average depth of  $i$ -th wrinkle

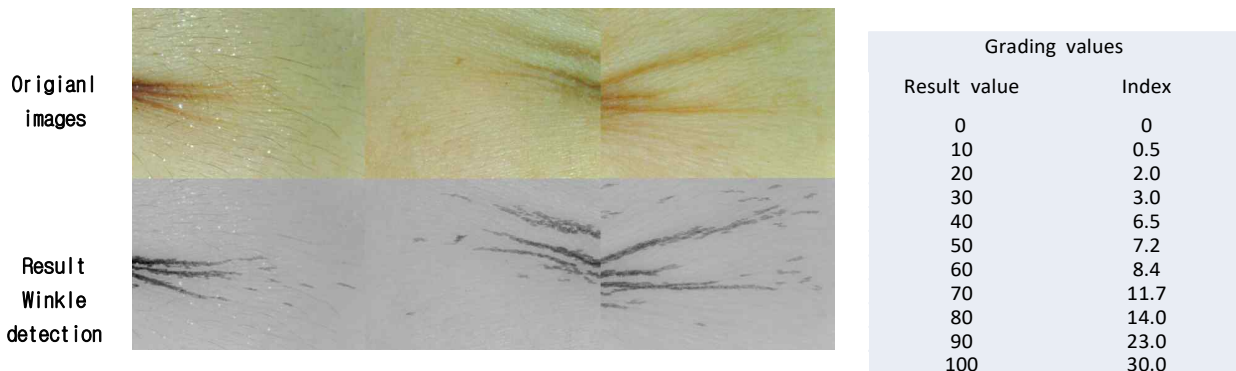


그림 305. 분석 index 값 산출 자료

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 등피부 주름깊이 (wrinkle depth) 개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UV-B를 조사하여 광노화를 유도한 다음 등피부 주름깊이를 skin dermobella 3D 분석기로 UVB조사 2주, 4주, 6주, 8주에 측정 하였다. 그 결과, 2주, 4주, 6주, 8주에서 정상군에 비해 UVB-대조군에서 UVB 광노화로 주름형성 및 깊이가 유의적으로 증가되었다. 반면 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서는 주름형성 및 깊이가 UVB-대조군에 비해 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다.

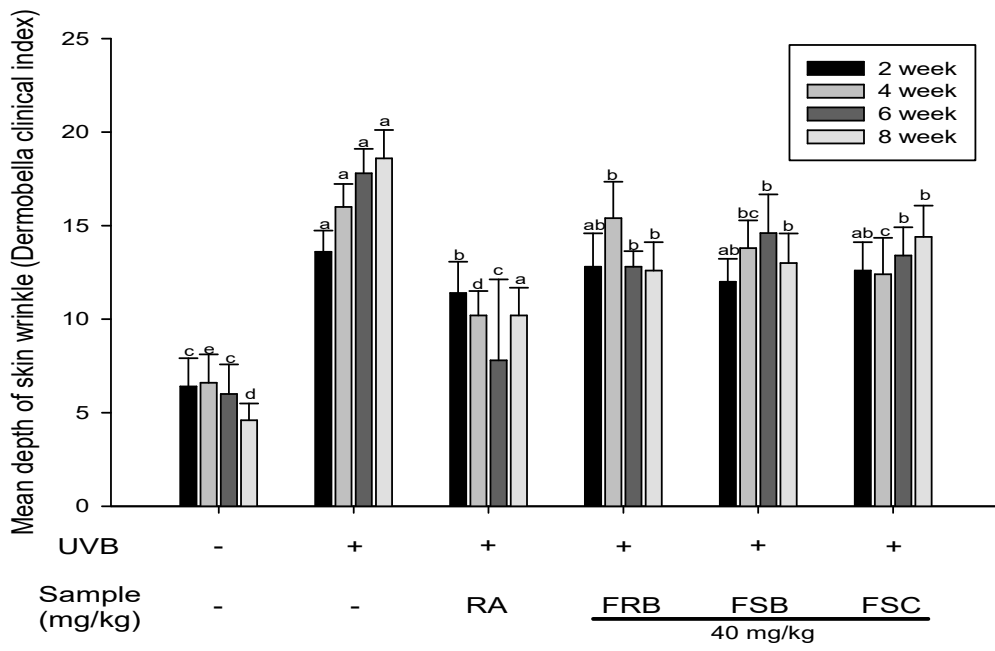
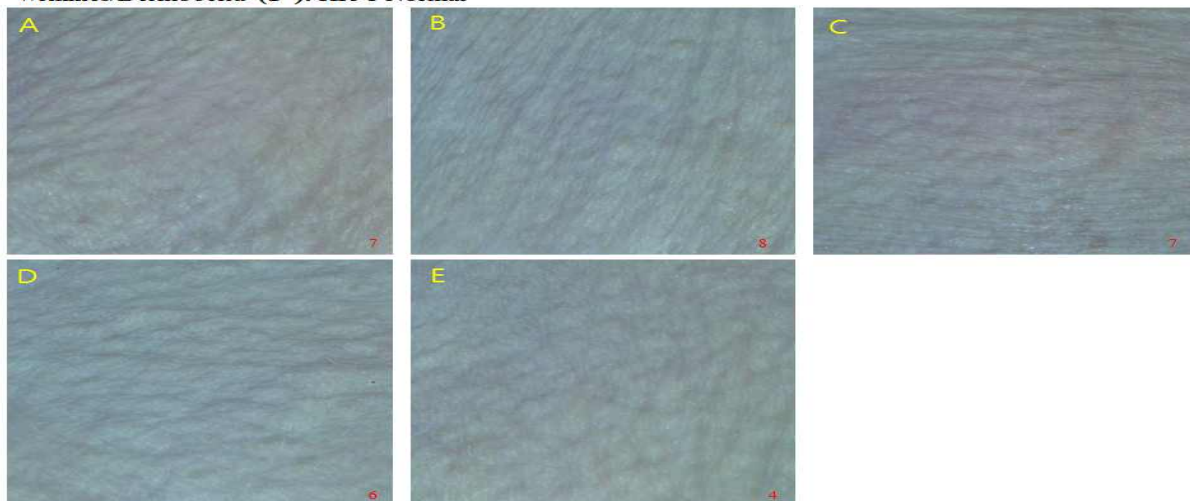
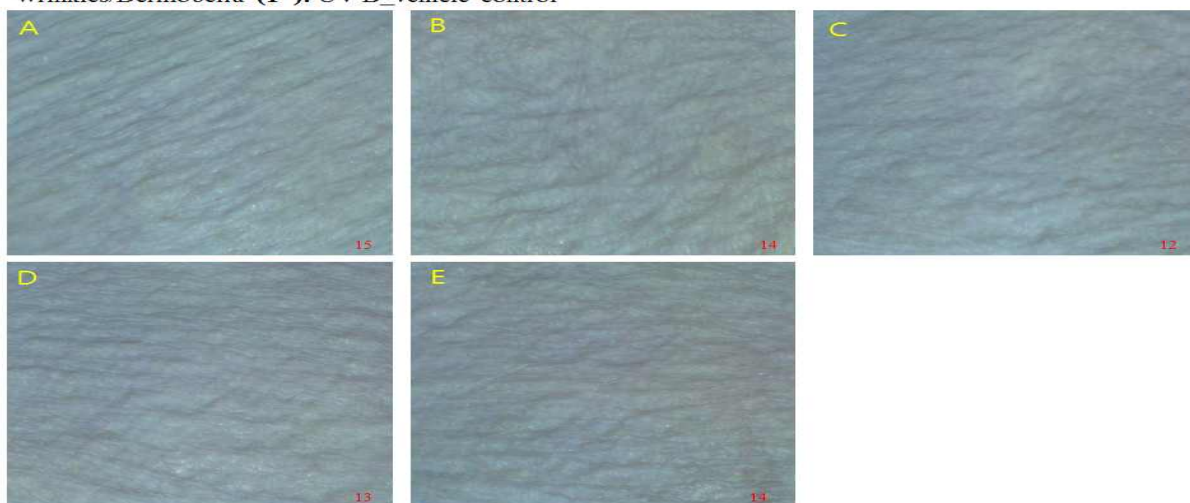


그림 306. Dermobellar를 이용한 HR-1 생쥐의 등피부 주름 분석

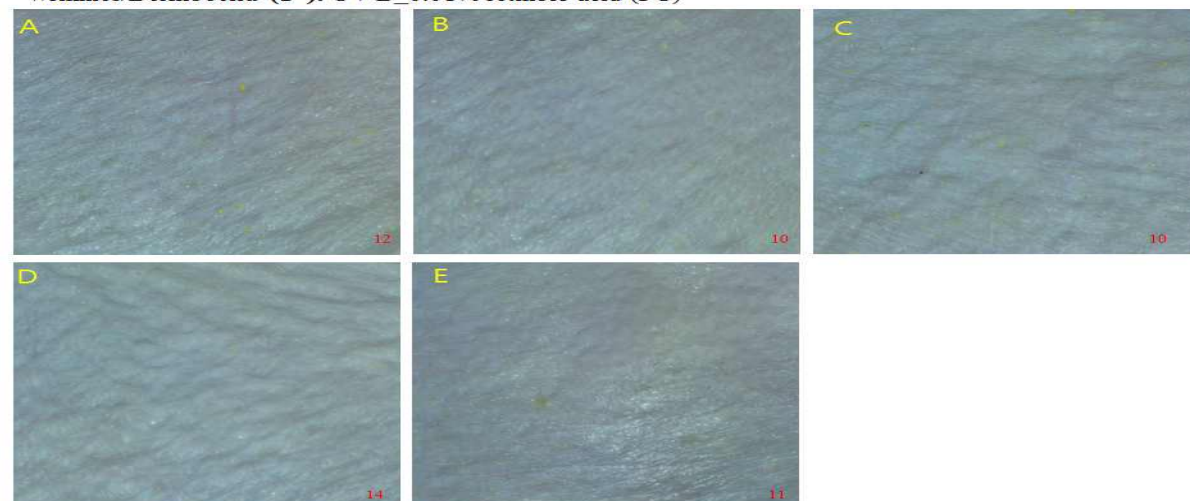
Wrinkles/Dermobella (1<sup>st</sup>): HR-1 Normal



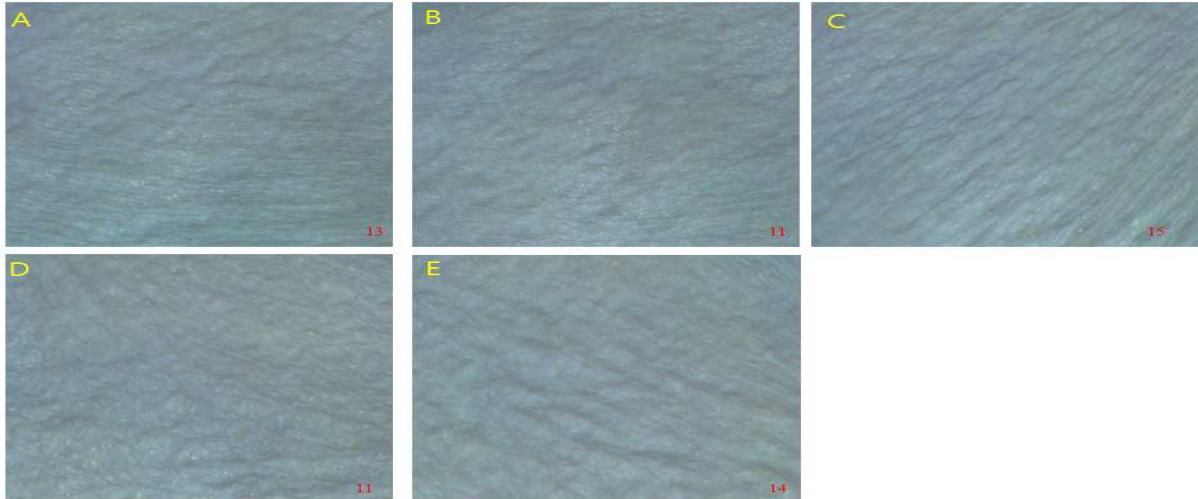
Wrinkles/Dermobella (1<sup>st</sup>): UV-B\_vehicle control



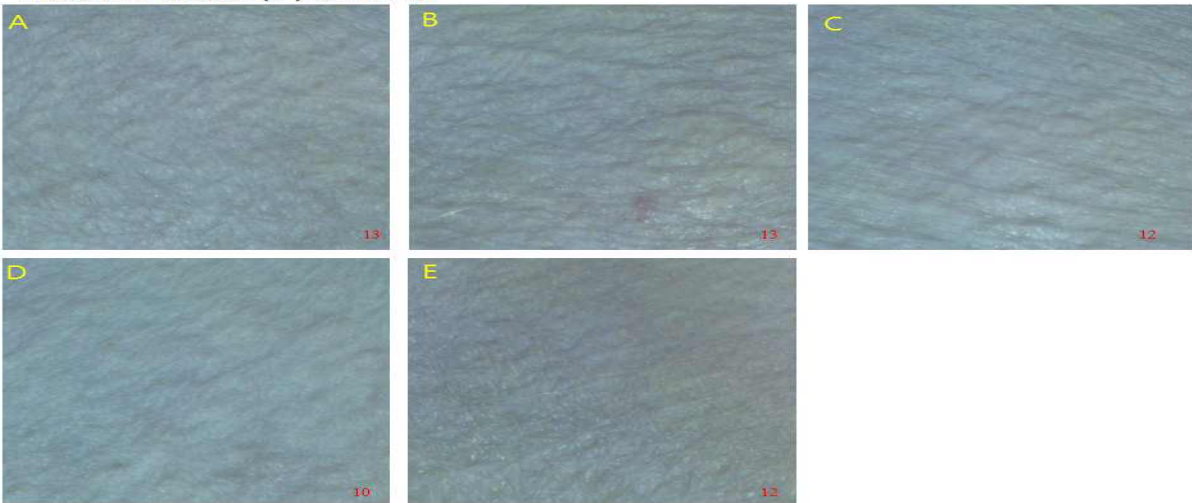
Wrinkles/Dermobella (1<sup>st</sup>): UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)



Wrinkles/Dermobella (1<sup>st</sup>): UV-B-FRB



Wrinkles/Dermobella (1<sup>st</sup>): UV-B-FSB



Wrinkles/Dermobella (1<sup>st</sup>): UV-B-FSC

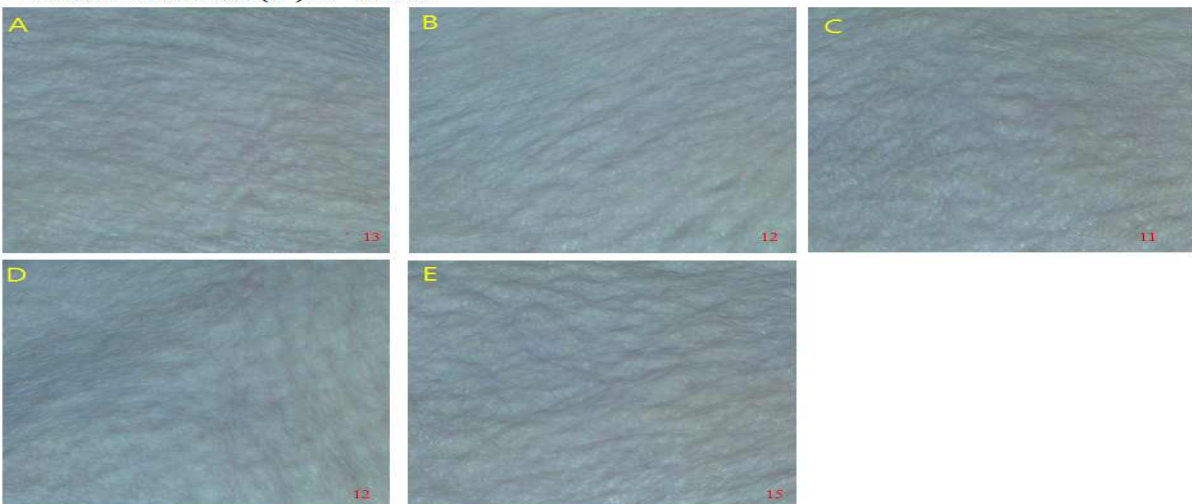
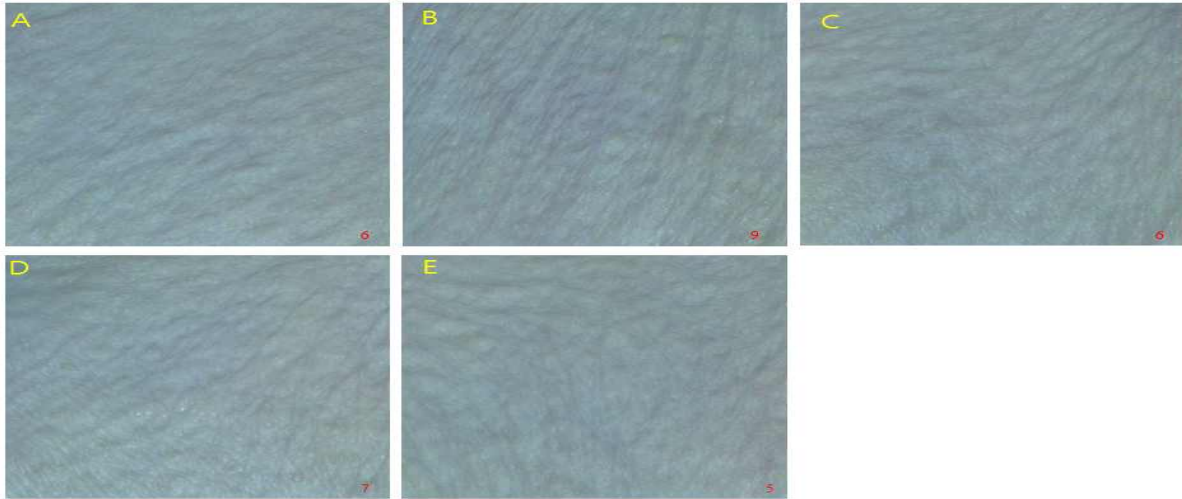


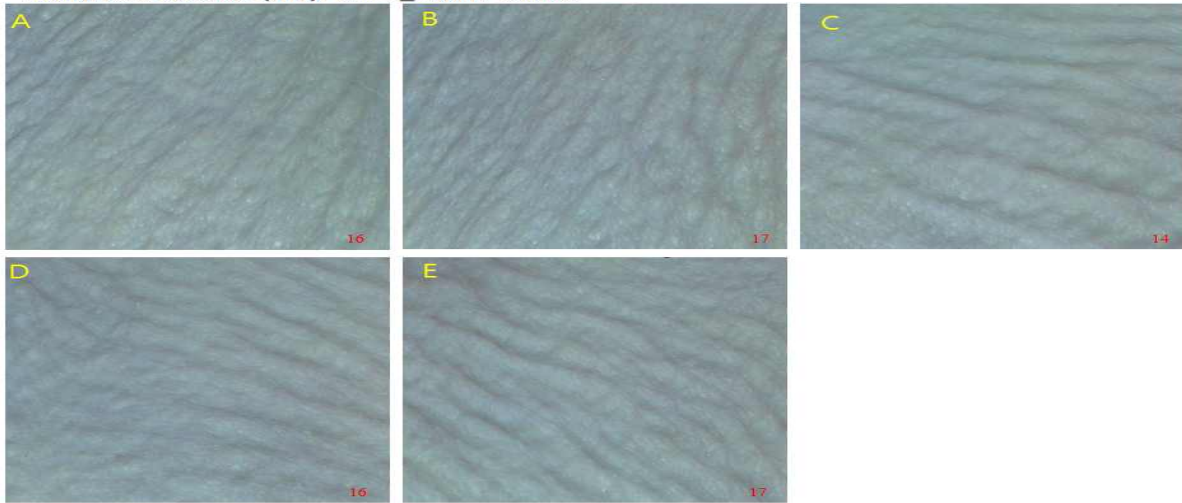
그림 307. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 주름 사진 (2 week)



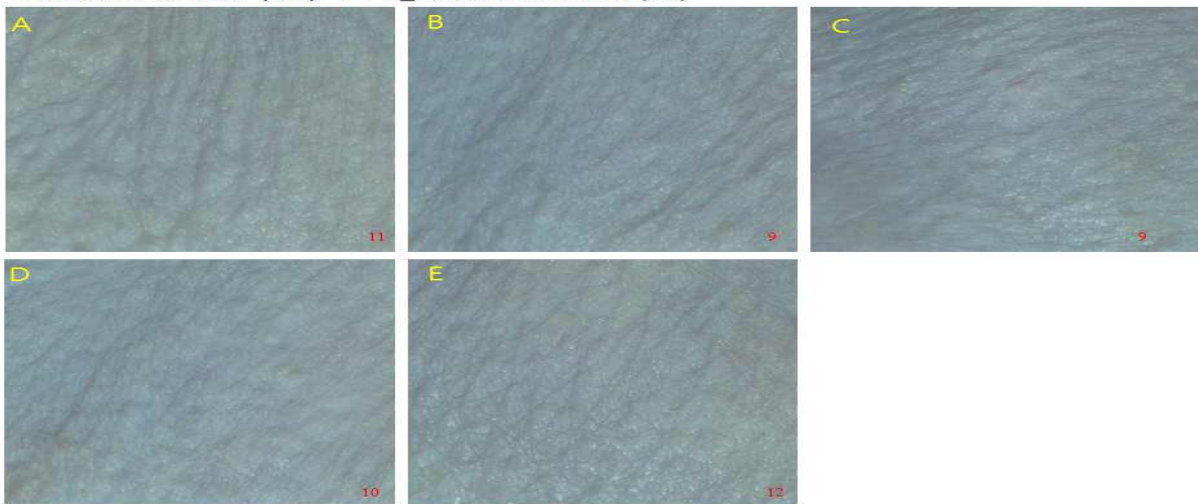
Wrinkles/Dermobella (2nd): HR-1 Normal



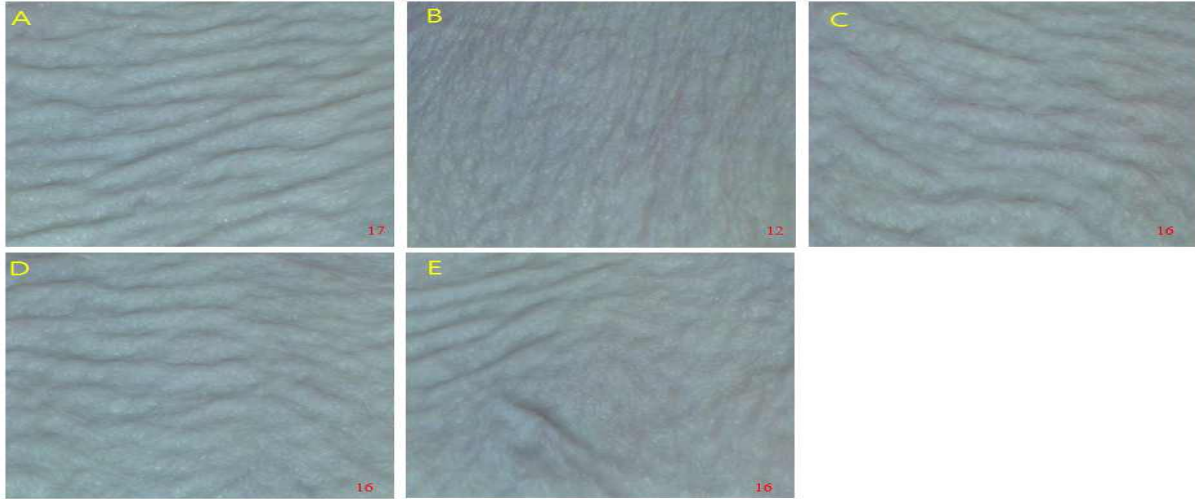
Wrinkles/Dermobella (2nd): UV-B\_vehicle control



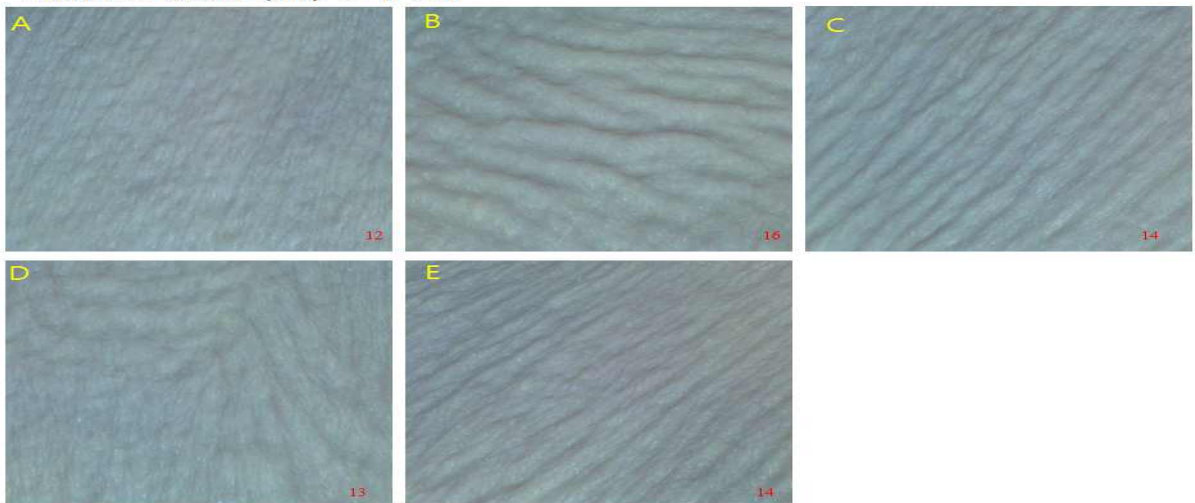
Wrinkles/Dermobella (2nd): UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)



Wrinkles/Dermobella (2nd): UV-B-FRB



Wrinkles/Dermobella (2nd): UV-B-FSB



Wrinkles/Dermobella (2nd): UV-B-FSC

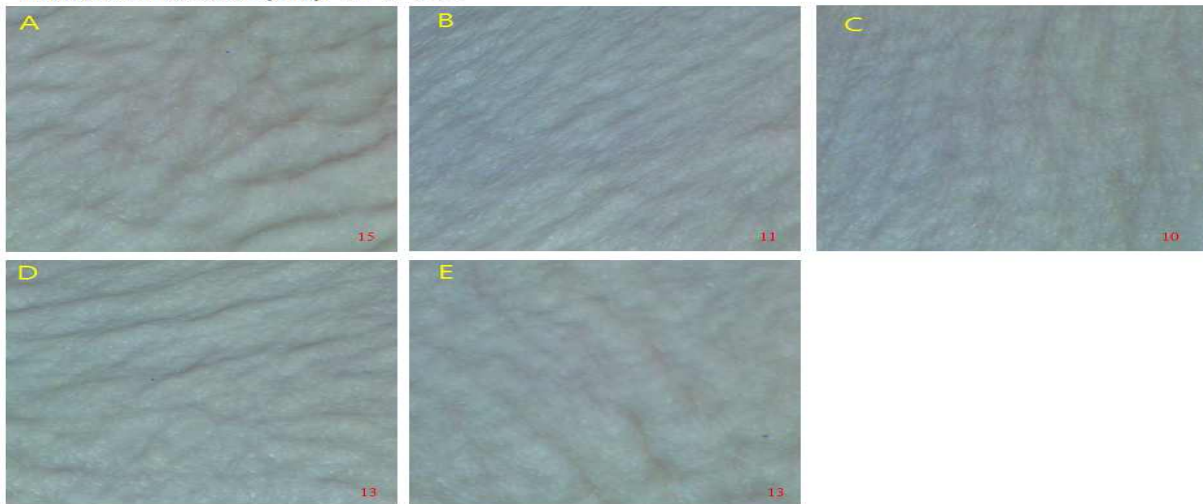
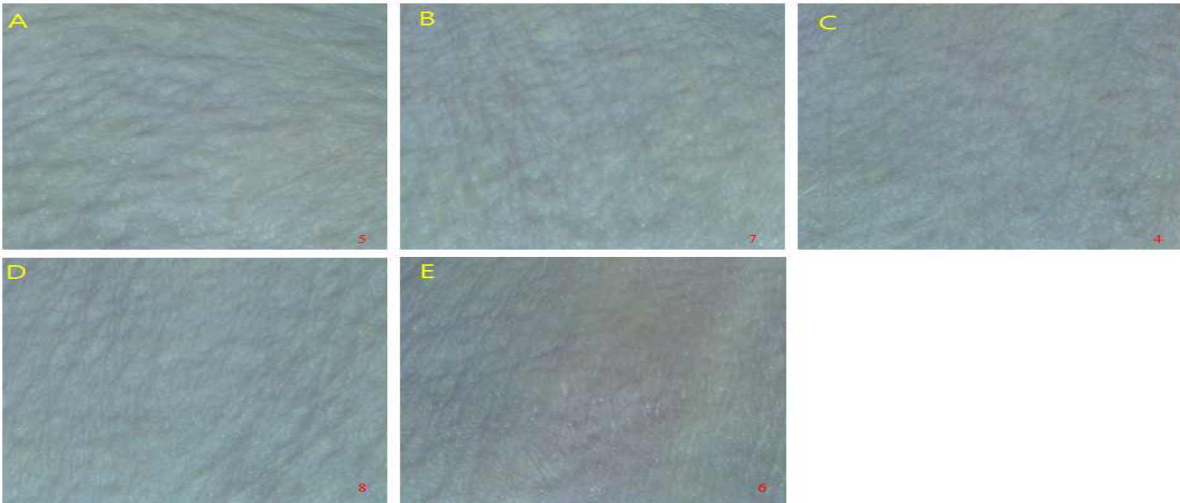
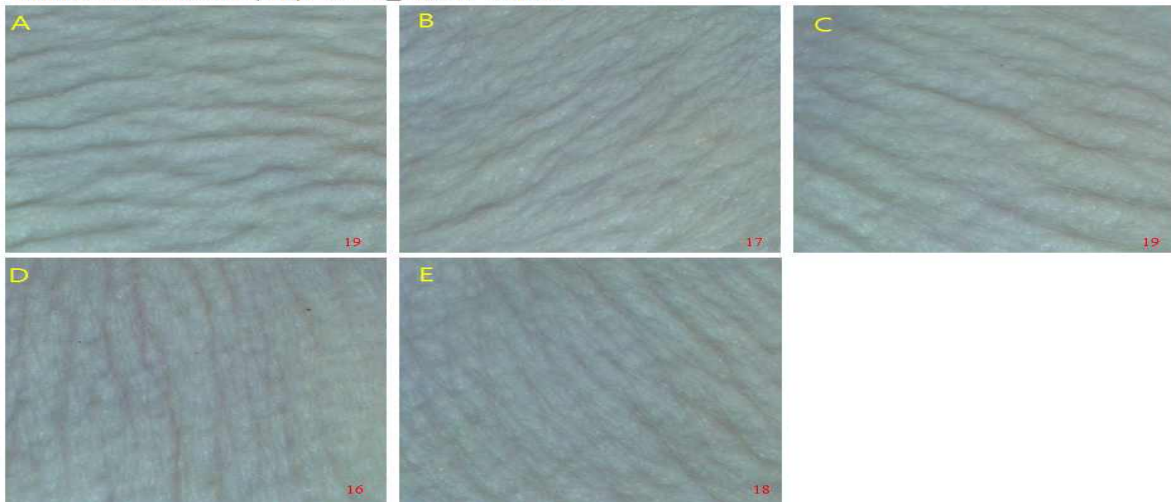


그림 308. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 주름 사진 (4 week)

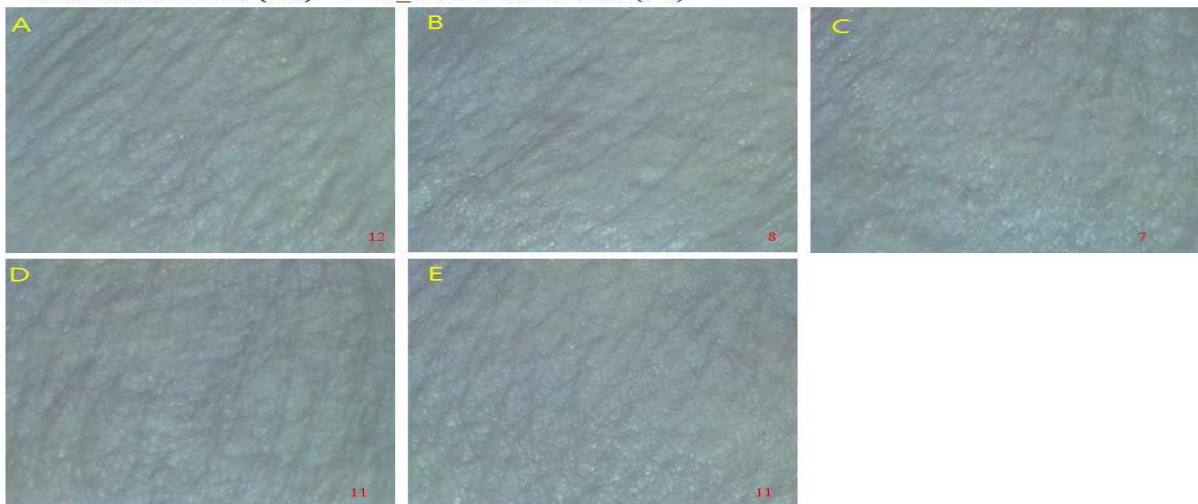
Wrinkles/Dermobella (3rd): HR-1 Normal



Wrinkles/Dermobella (3rd): UV-B\_vehicle control

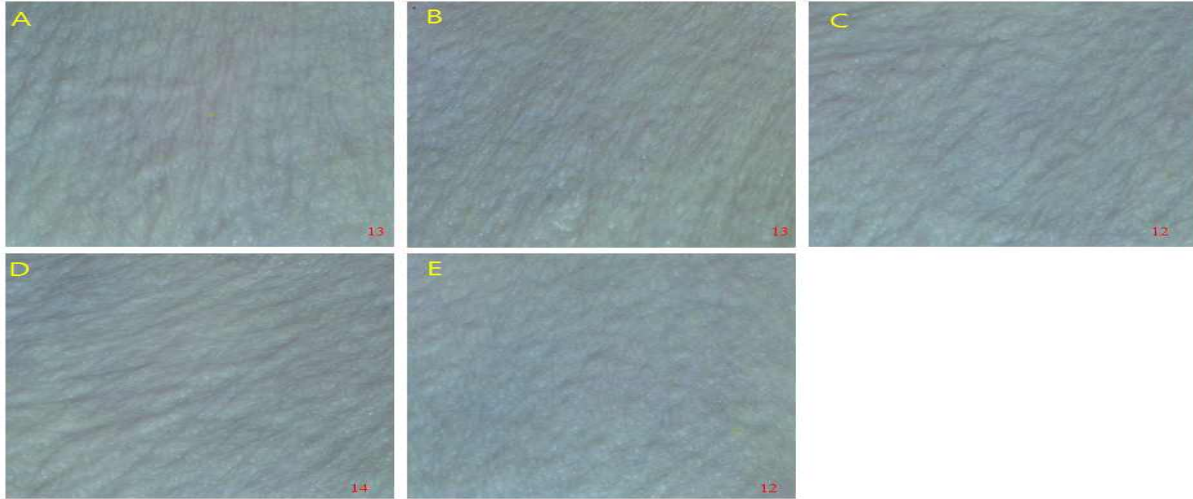


Wrinkles/Dermobella (3rd): UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)

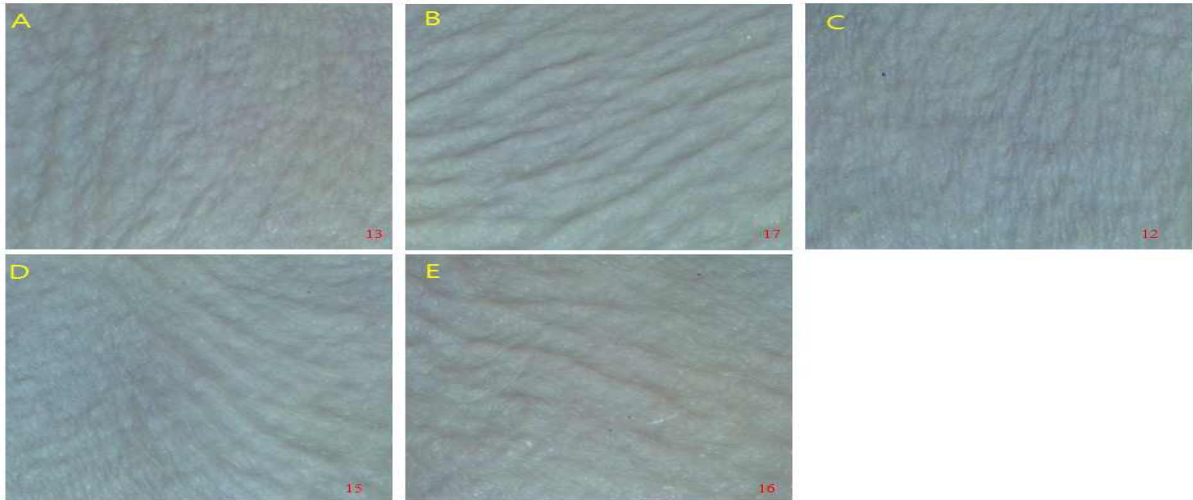




Wrinkles/Dermobella (3rd): UV-B-FRB



Wrinkles/Dermobella (3rd): UV-B-FSB



Wrinkles/Dermobella (3rd): UV-B-FSC

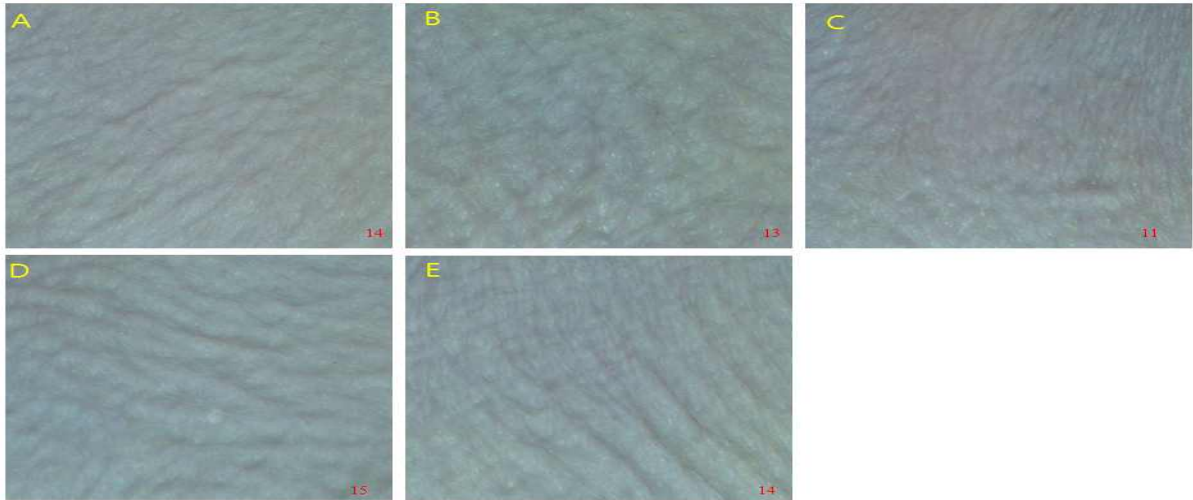
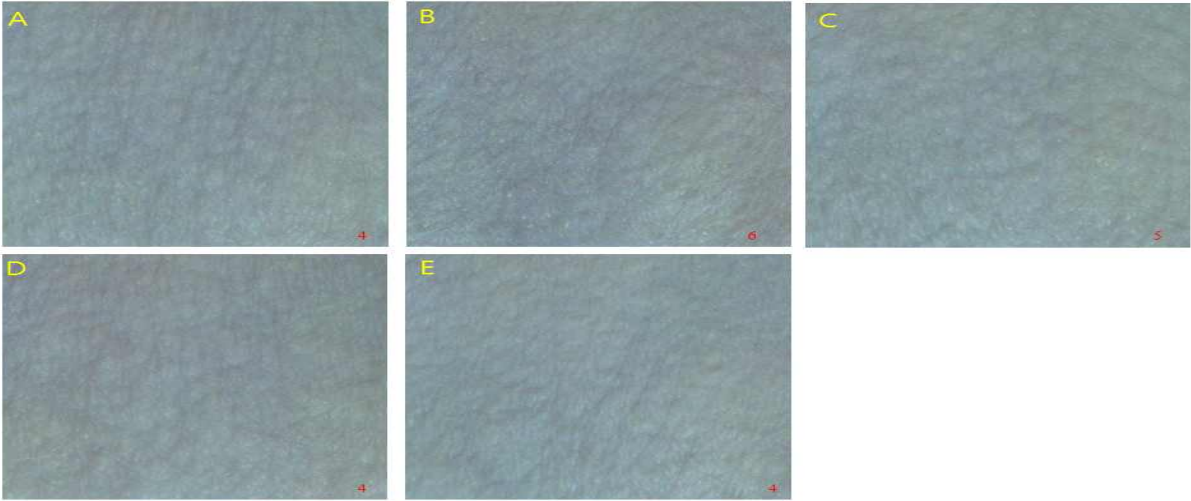
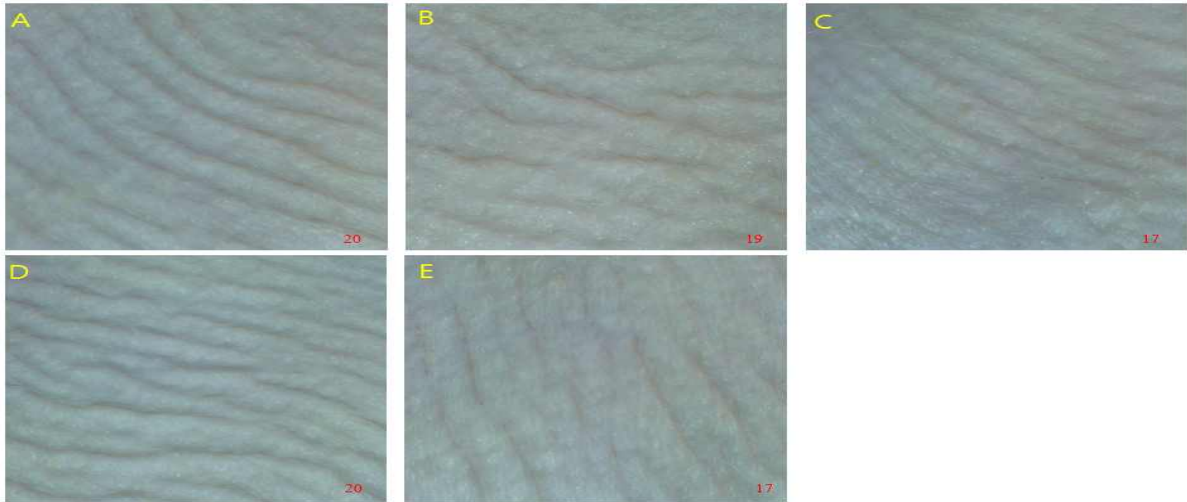


그림 309. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 주름 사진 (6 week)

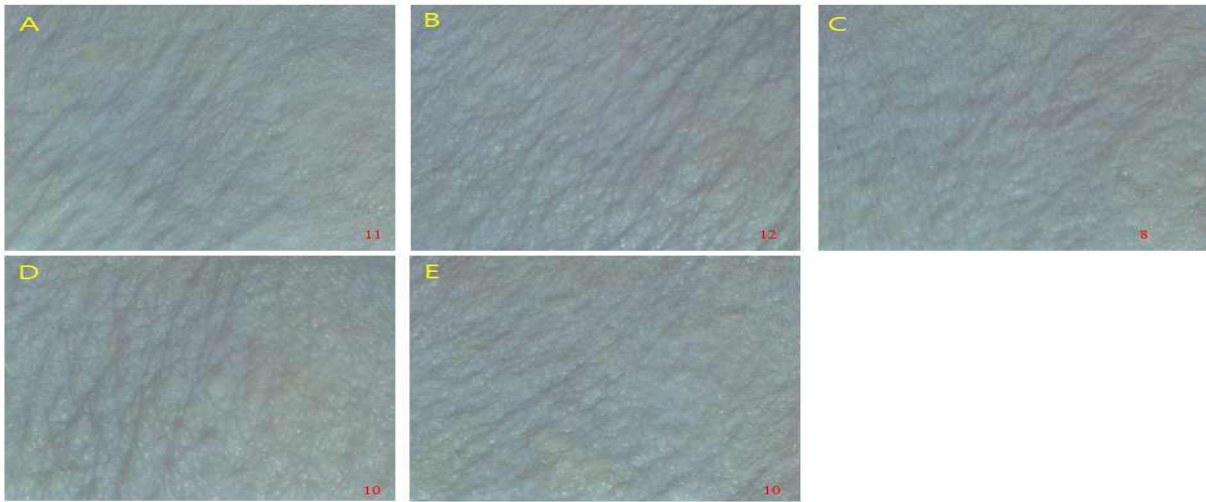
Wrinkles/Dermobella (4th): HR-1 Normal



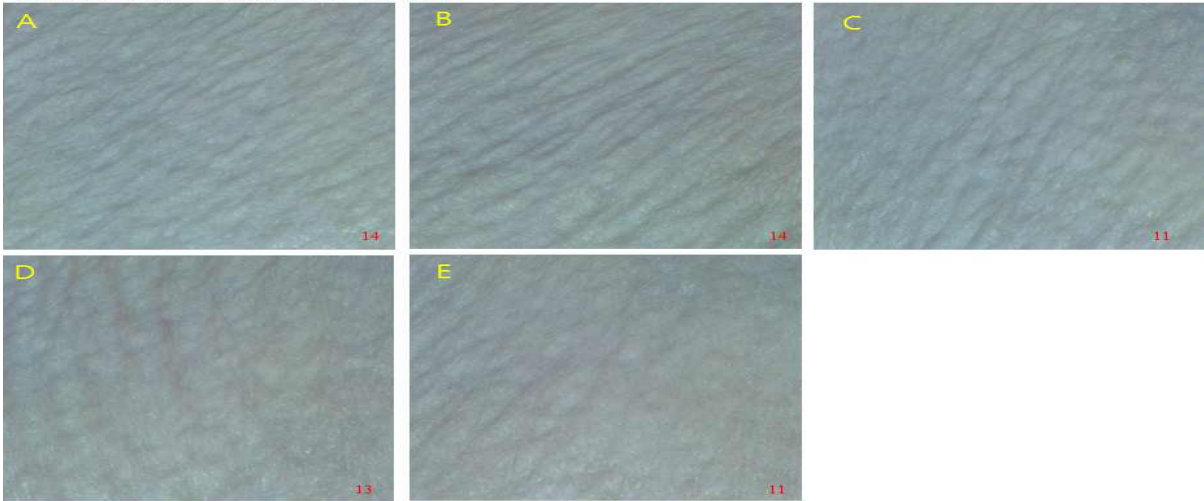
Wrinkles/Dermobella (4th): UV-B\_vehicle control



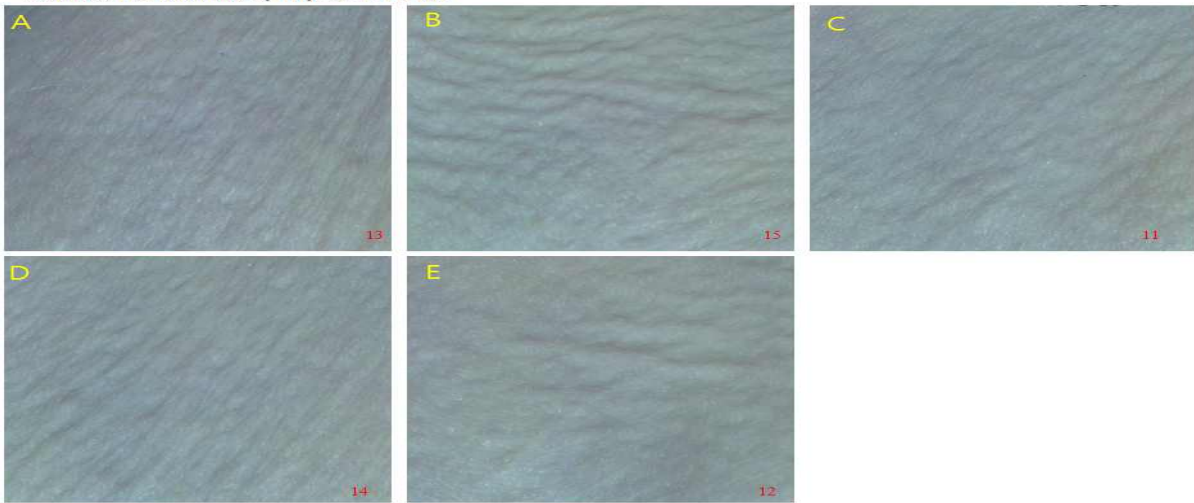
Wrinkles/Dermobella (4th): UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)



Wrinkles/Dermobella (4th): UV-B-FRB



Wrinkles/Dermobella (4th): UV-B-FSB



Wrinkles/Dermobella (4th): UV-B-FSC

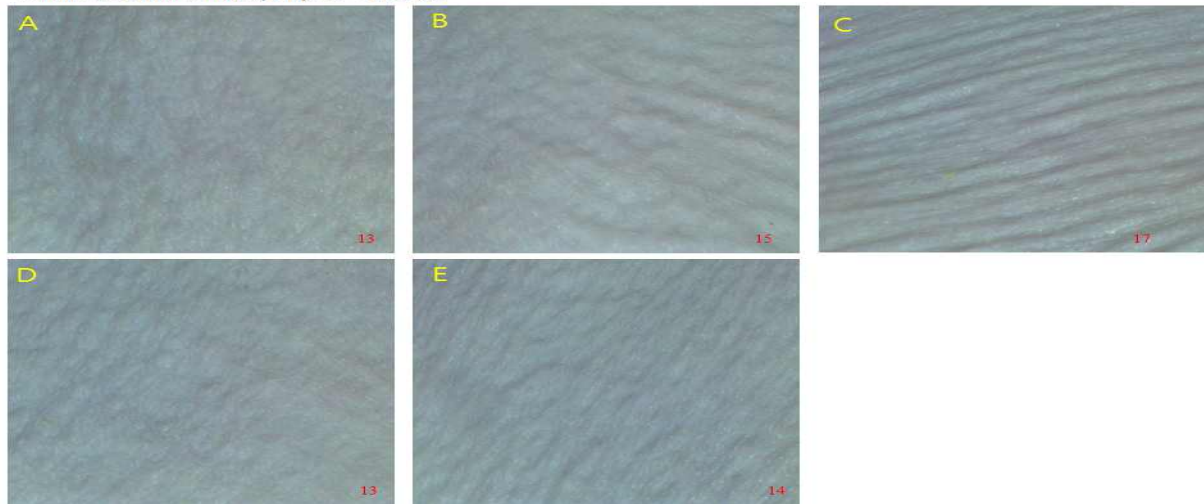


그림 310. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 주름 사진 (8 week)

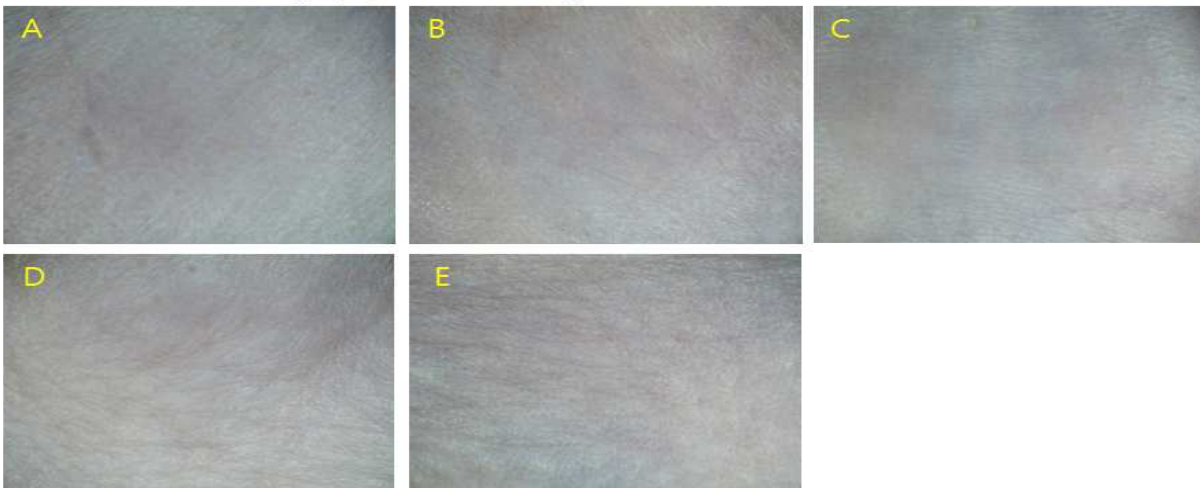
(나) 등피부 주름 형상 변화

UV-B가 조사되어 색소 침착이 유발된 마우스 피부의 주름 개선을 관찰하기 위하여 잠시 ethyl ether 로 마취한 후 생쥐의 등피부를 USB Digital Microscope(x400, CE FOROHS, china)로 피부조직을 400배 촬영하여 주름의 변화를 검경하였다. 전체 등부위 중 주름 침착을 비교하기 위하여 왼쪽 등과 오른쪽 등을 구분하였으며 왼쪽 등의 색소 침착이 나타난 부위를 주름 형성 및 개선 정도를 관찰하였다.

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물, 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 등피부 주름 형성 (wrinkle formation) 개선 효과를 관찰하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 광노화를 유도한 다음 1주, 3주, 5주, 7주에 HR-1 생쥐의 등피부 주름을 digital microscope (400x)로 등 주름 형태를 관찰한 결과, 정상군에 비하여 UVB 대조군이 UVB 광노화로 인한 주름 형성이 현저하게 증가되었고, 미강(생물전환)산물 투여군, 대두박(생물전환)산물 투여군 및 참깨박(생물전환)산물 투여군에서 등피부 주름 형성이 UVB 대조군에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었다.



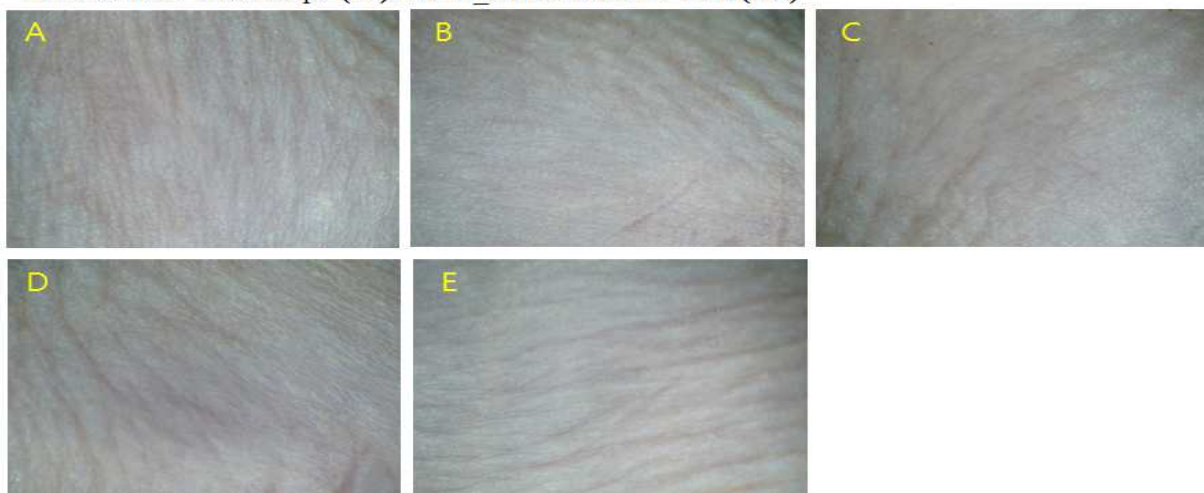
Wrinkles/400x microscope (1<sup>st</sup>): **HR-1 normal\_control**



Wrinkles/400x microscope (1<sup>st</sup>): **UV-B\_vehicle control**



Wrinkles/400x microscope (1<sup>st</sup>): **UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)**



Wrinkles/400x microscope (1<sup>st</sup>): UV-B-FRB



Wrinkles/400x microscope (1<sup>st</sup>): UV-B-FSB



Wrinkles/400x microscope (1<sup>st</sup>): UV-B-FSC

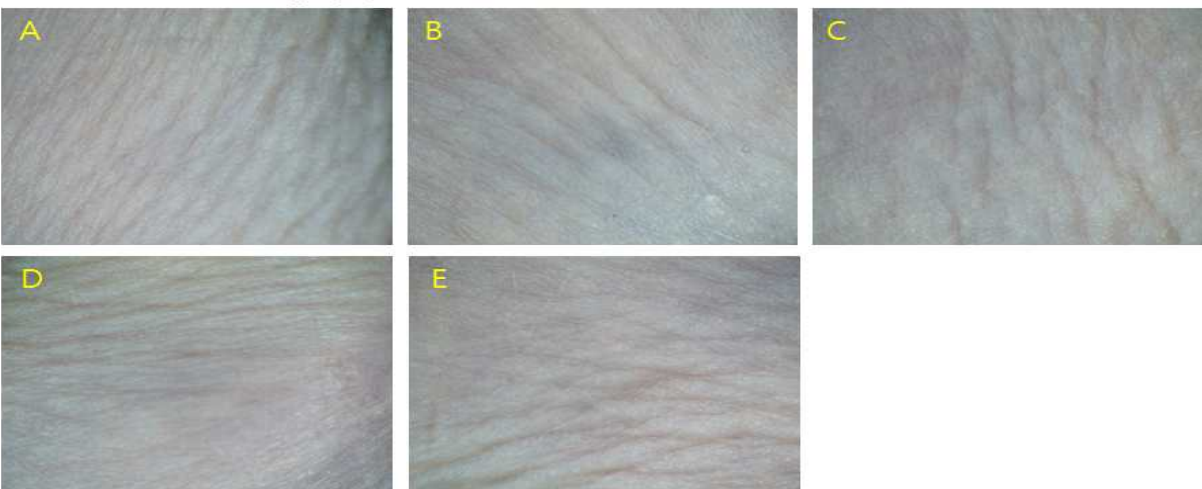
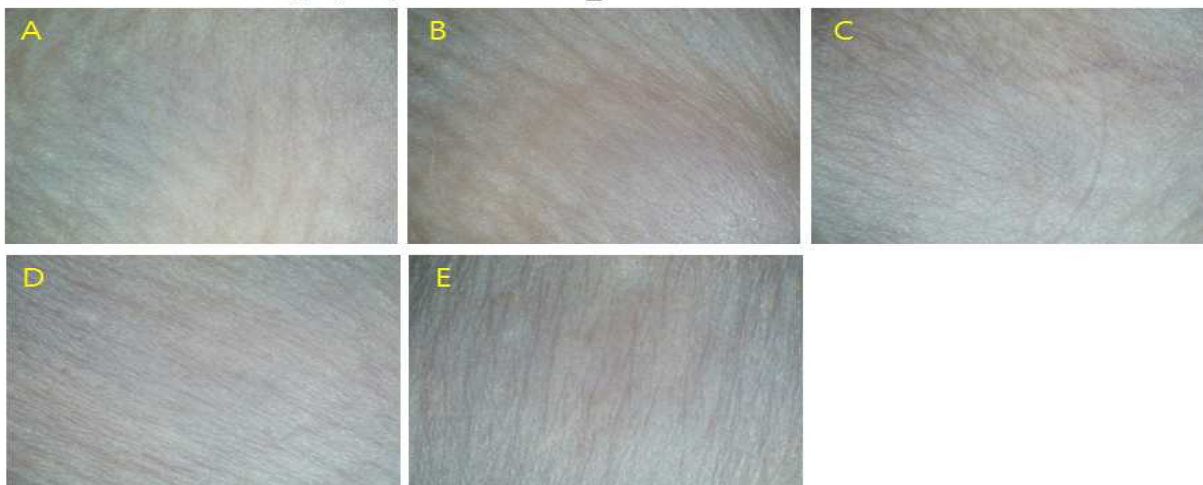


그림 311. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 미세주름 사진 (2 week)

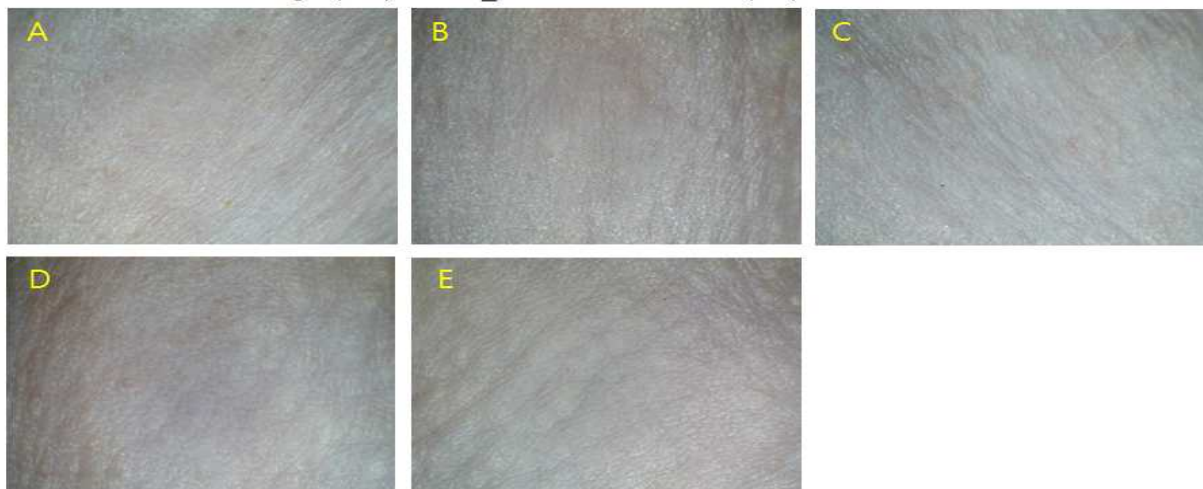
Wrinkles/400x microscope (2nd) : HR-1 normal\_control



Wrinkles/400x microscope (2nd): UV-B\_vehicle control



Wrinkles/400x microscope (2nd): UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)

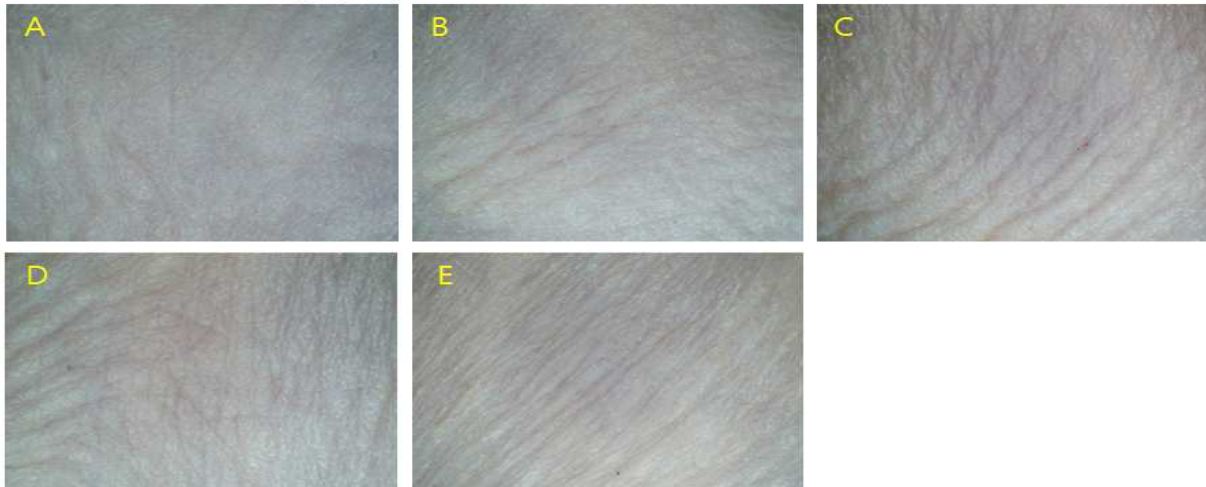




Wrinkles/400x microscope (2nd): UV-B-FRB



Wrinkles/400x microscope (2nd): UV-B-FSB



Wrinkles/400x microscope (2nd): UV-B-FSC

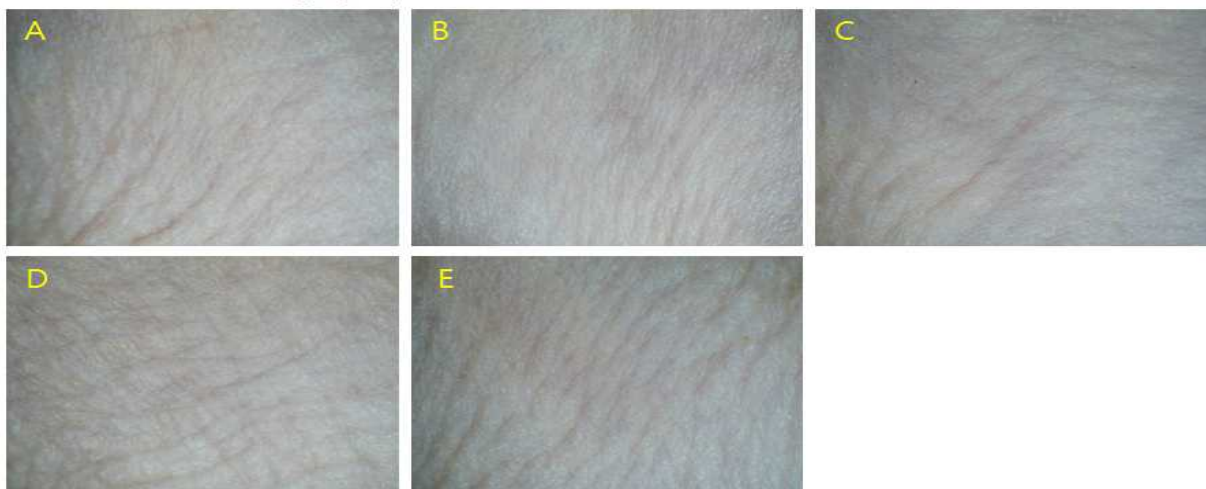
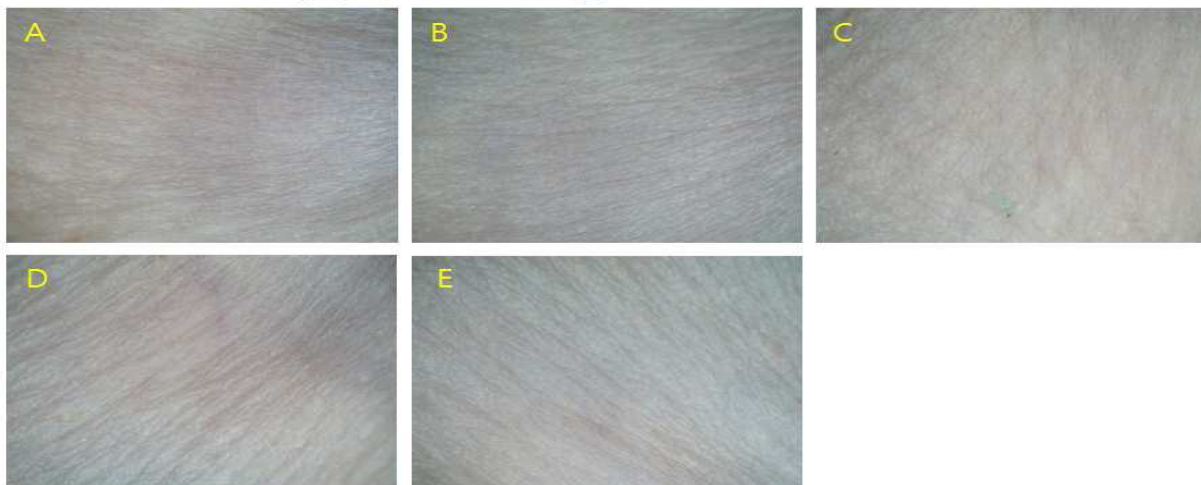


그림 312. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 미세주름 사진 (4 week)



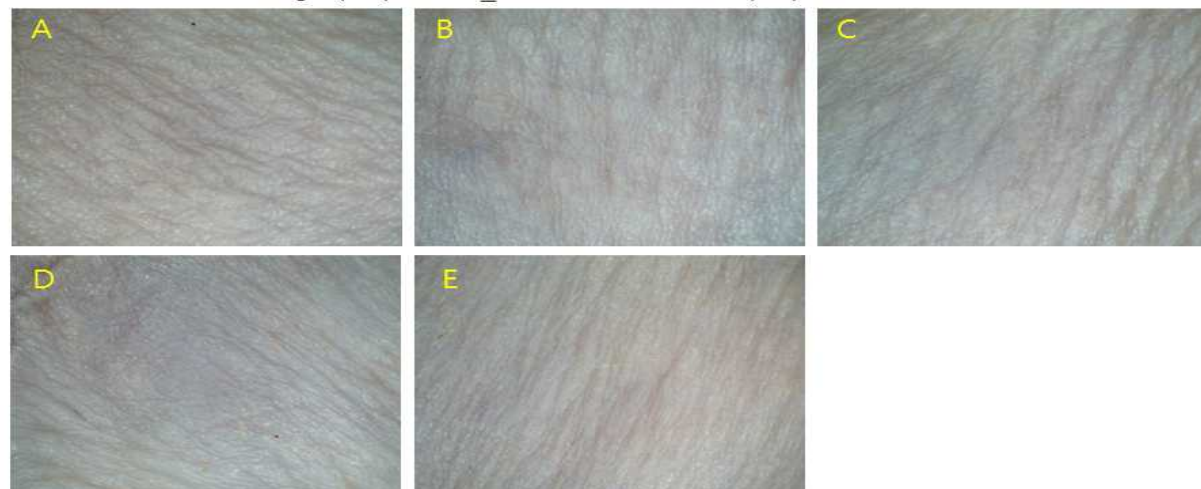
Wrinkles/400x microscope (3rd) : **HR-1 normal\_control**



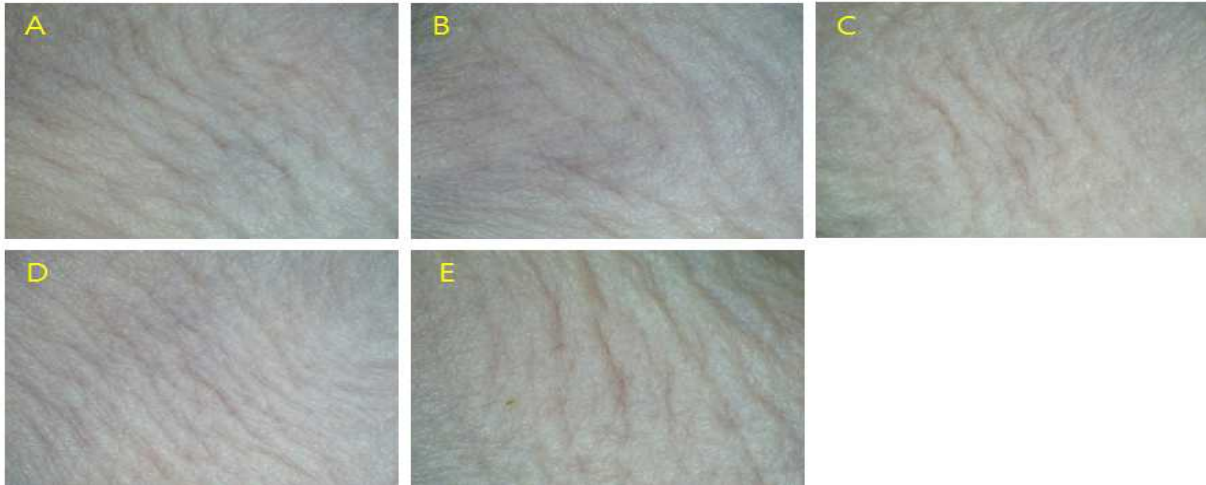
Wrinkles/400x microscope (3rd): **UV-B\_vehicle control**



Wrinkles/400x microscope (3rd): **UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)**



Wrinkles/400x microscope (3rd): UV-B-FRB



Wrinkles/400x microscope (3rd): UV-B-FSB



Wrinkles/400x microscope (3rd): UV-B-FSC



그림 313. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 미세주름 사진 (6 week)

Wrinkles/400x microscope (4th) : HR-1 normal\_control



Wrinkles/400x microscope (4th): UV-B\_vehicle control



Wrinkles/400x microscope (4th): UV-B\_0.01% retinoic acid (PC)





Wrinkles/400x microscope (4th): UV-B-FRB



Wrinkles/400x microscope (4th): UV-B-FSB



Wrinkles/400x microscope (4th): UV-B-FSC



그림 314. UV-B로 유도된 HR-1 생쥐의 등피부 미세주름 사진 (8 week)

(4) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 HR-1의 피부보습 변화 평가

(가) 표피 수분함량 측정 (transepidermal water loss, TEWL)

TEWL은 피부장벽기능을 말해주는 지표로서, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 피부보습 증진 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 8주 후 표피 수분함량을 측정하였다. 그 결과, 정상군 (normal control)에 비해 UVB-대조군 (vehicle control)에서 유의성 있게 증가하였고, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 대조군 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

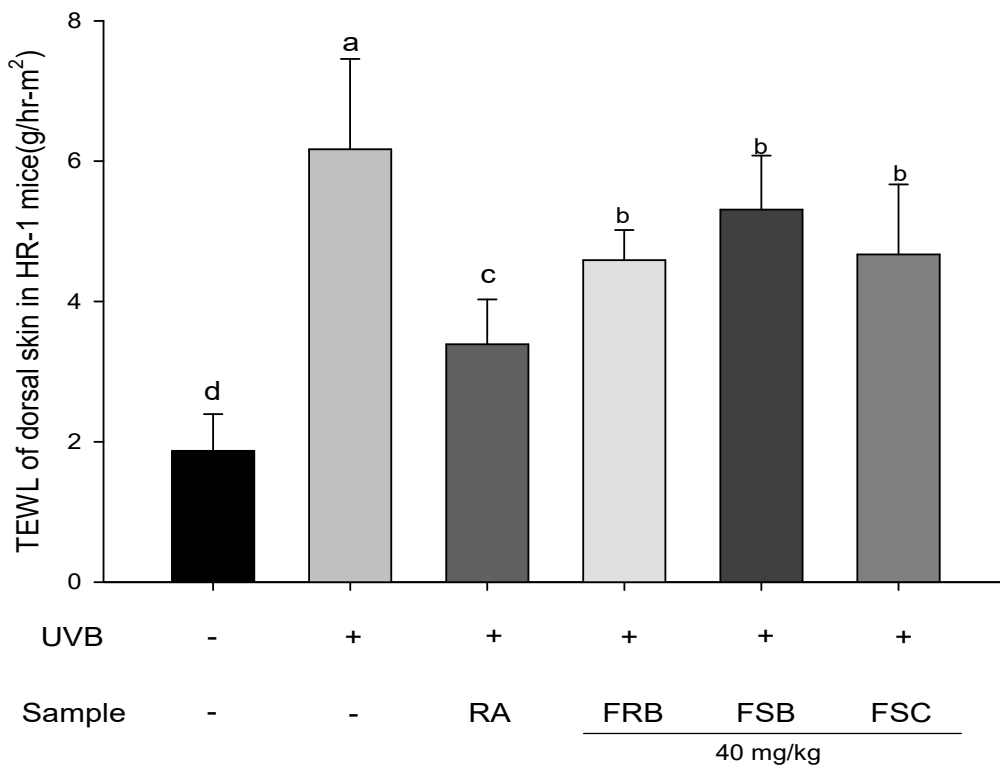


그림 315. HR-1 생쥐의 표피 수분함량 손실량 변화

(나) 피부보습 관련 세라마이드 대사 관련 효소 측정

Glycosmceramide 및 acylglycosylceramide로 부터 Ceramide 6의 재생성에 관여하는 glucocerebrosidase (GCase) 효소의 활성을 측정하기 위하여, 분리된 표피에 0.1m PMSF가 첨가된 PBS와 함께 분쇄하고, 10000x g로 4℃에서 5분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액 50 µl에 0.5 mM 4-methylumbellifery-β-D-glucoopyranoside (4-MUG)가 함유된 citrate-phosphate buffer (pH 5.6, 5mM sodium taurocholate) 50 µl를 첨가한 후 37℃에서 60분간 반응시켰다. 1250 µl의 200 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.5)를 가하여 반응을 종결시키고 4-MUG에서 전환된 4-MU (4-methylumbelliferone)의 형광 발색정도를 spectrofluorimeter 측정기(excitation = 360nm, emission = 450nm)(Hitachi 300, Tokyp, Japan)에서 측정하였다. 0-300 nM 농도 범위의 4-MU를 형광 측정을 위한 standard로 사용하였다.

세라마이드 대사 관련 효소인 glucocerebrosidase 활성 측정 결과, 정상군에 비해 UVB-대조군에서 유의성 있게 감소하였고, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군은 대조군 비해 증가하는 것으로 나타났다.

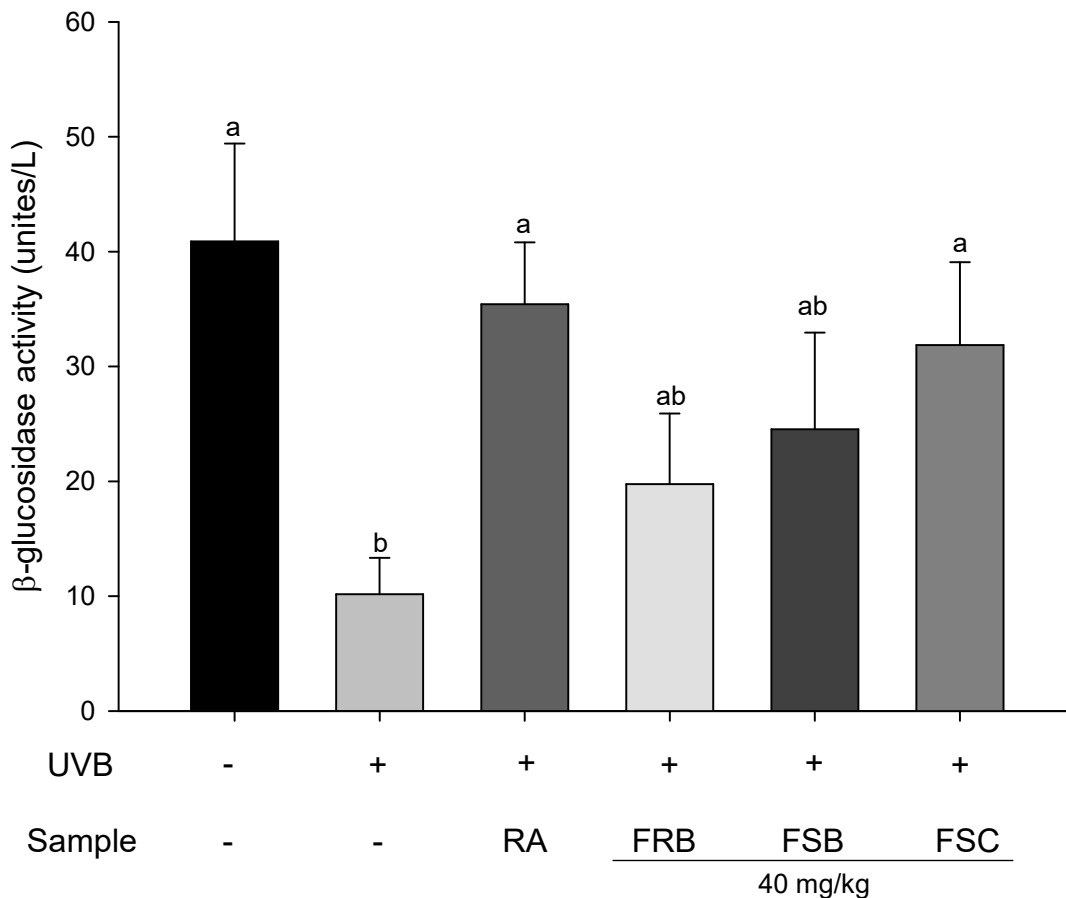


그림 316. HR-1 생쥐에서의 β-glucosidase activity 측정

(5) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 HR-1의 상피조직 두께 및 콜라겐 섬유 평가

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도하고 실험 종료 후 등피부조직을 H&E 염색을 하여 현미경 상에서 상피조직 두께를 측정된 결과, 정상군에 비하여 UVB-대조군에서 상피조직 두께가 두꺼워져 있고, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 상피조직 두께가 UVB-대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 또한, 등피부조직을 Masson's trichrome 염색을 하여 현미경 상에서 콜라겐 섬유 (collagen fiber) 변화를 측정된 결과, 정상군에 비해 UVB-대조군에서 M-T 염색의 강도가 감소된 것 보아 콜라겐 섬유(collagen fiber)의 분해가 진행되어 주름 형성이 가속된 것으로 생각되는 결과이다. 반면에 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에서는 콜라겐 섬유 (collagen fiber)의 양이 UVB-대조군에 비해 증가되었고, 이러한 결과는 RB, SBM, SOM, BRB (BC 40 mg/kg)에 의해 주름 개선이 되었다고 생각된다.

비만세포 (mast cells) 침윤정도를 알 수 있는 toluidine blue 염색 결과, 정상군에 비해 UVB-대조군 dermis 주변에 비만세포가 많이 침윤되었으나, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에서는 UVB-대조군에 비하여 비만세포가 감소된 것을 확인하였다.

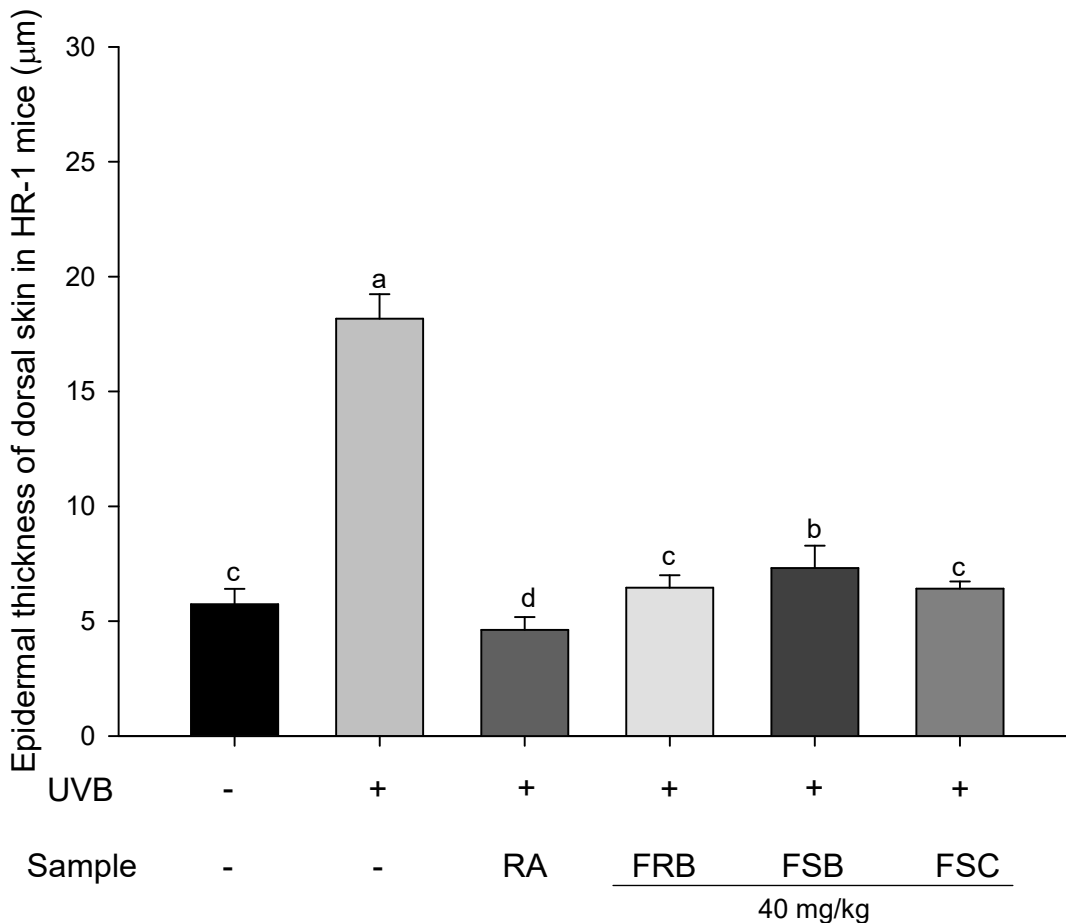


그림 317. UV-B에 의해 유도된 상피조직 두께



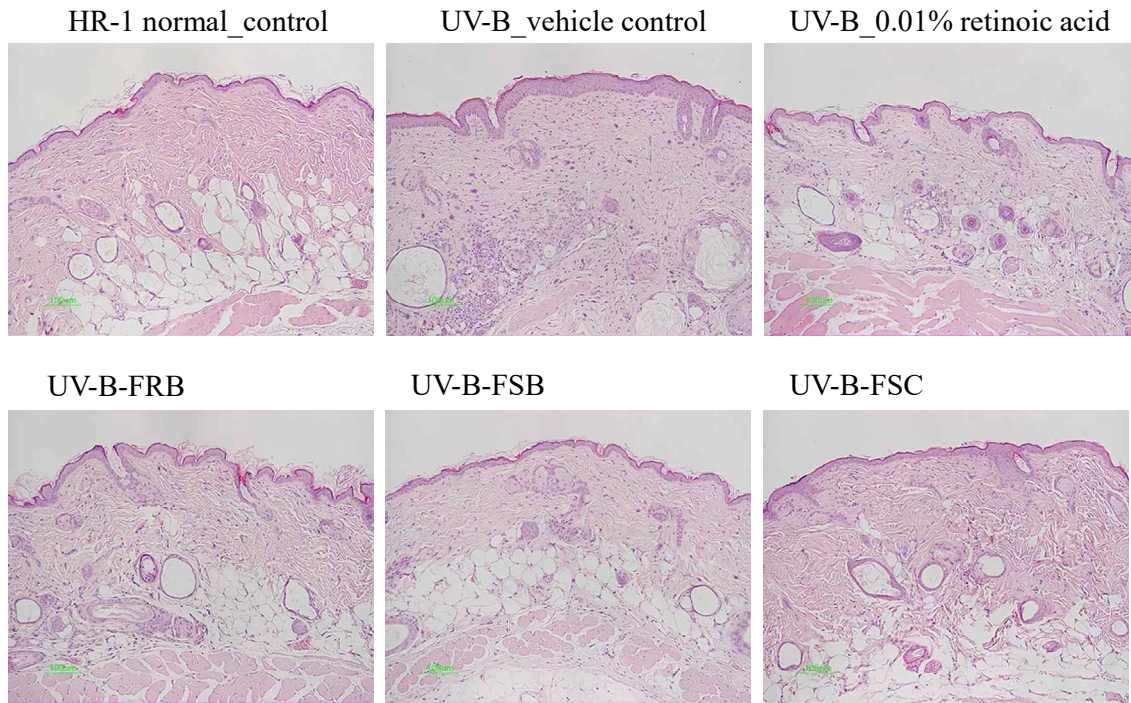


그림 318. UV-B에 의해 유도된 등피부의 조직학적 관찰 (H&E staining)

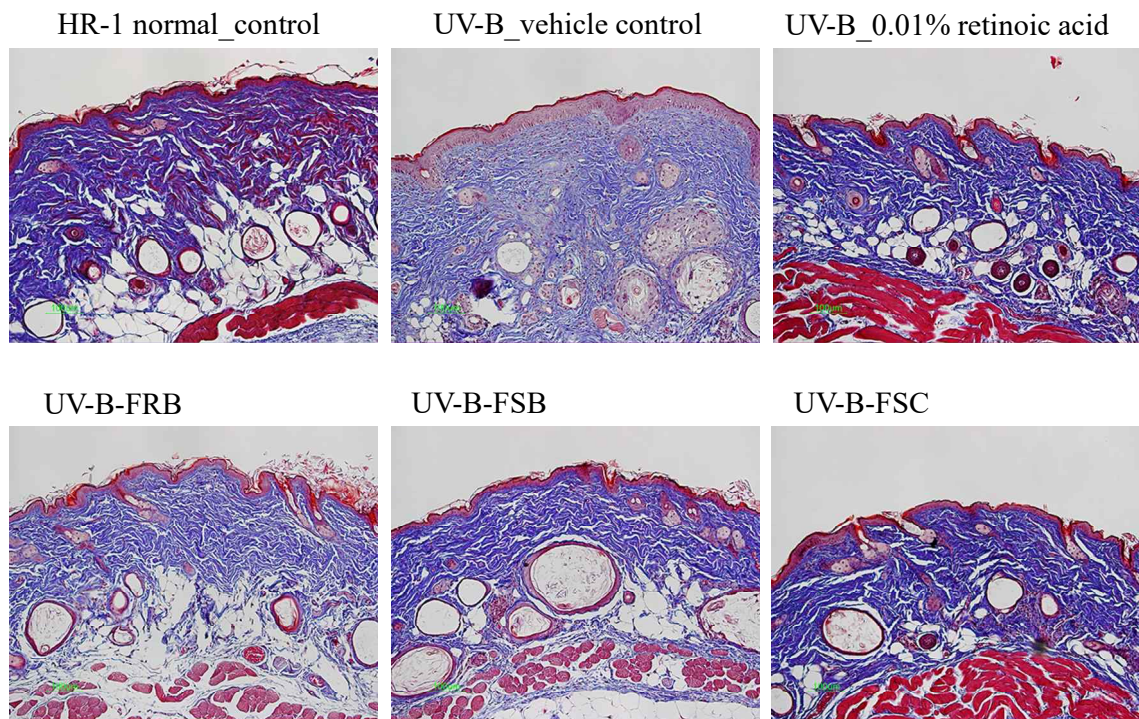


그림 319. UV-B에 의해 유도된 등피부의 조직학적 관찰 (M-T staining)



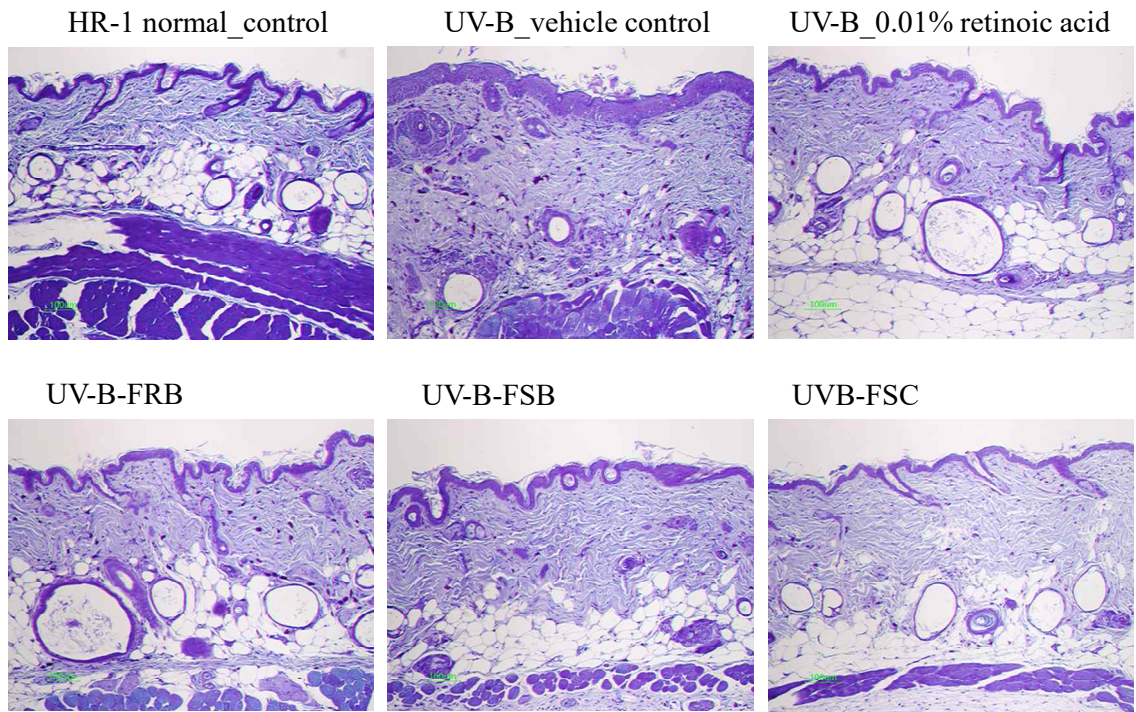


그림 320. UV-B에 의해 유도된 등피부의 조직학적 관찰 (Toluidine blue staining)

(6) UV-B 조사에 의한 농산부산물 추출물의 작용기전 구명

(가) 피부 염증 관련 유전자 발현 평가

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 피부 주름 개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도하고 실험 종료 후, 등피부조직을 분리하여 염증관련 유전자 발현을 측정하였다. UVB-대조군의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NOS-II 및 COX-2 mRNA 유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군의 상대정량 값을 분석하였다.

그 결과, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현은 정상군에 비해 UVB-대조군에서 유의성 있게 증가하였다. IL-1 $\beta$  mRNA 유전자 발현은 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 UVB-대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고, IL-6 mRNA 유전자 발현 역시 유의성 있게 감소하였다. TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현의 경우도 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 감소하였음을 나타냈다. NOS-II 및 COX-2 mRNA 유전자 발현 역시 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 양성대조군인 retinoic acid 도포군과 유사한 수준으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

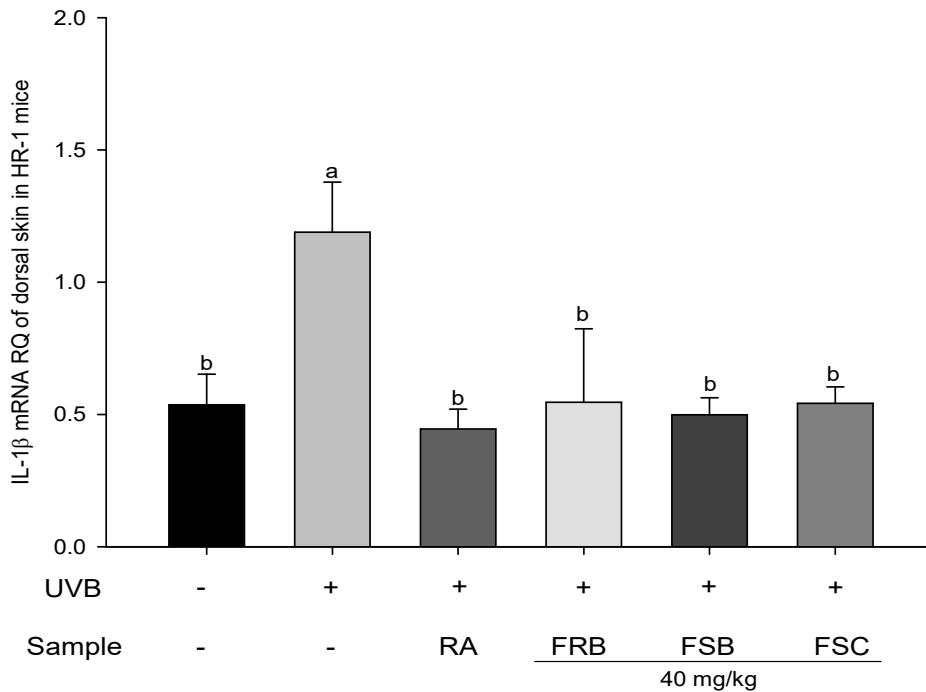


그림 321. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 IL-1 $\beta$  mRNA level에 미치는 영향

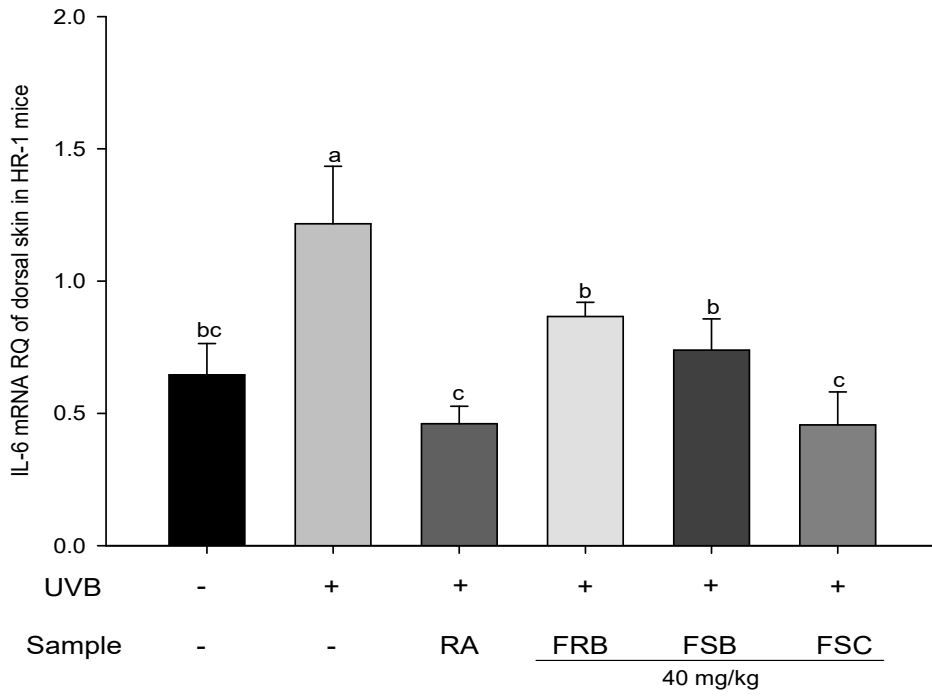


그림 322. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 IL-6 mRNA level에 미치는 영향

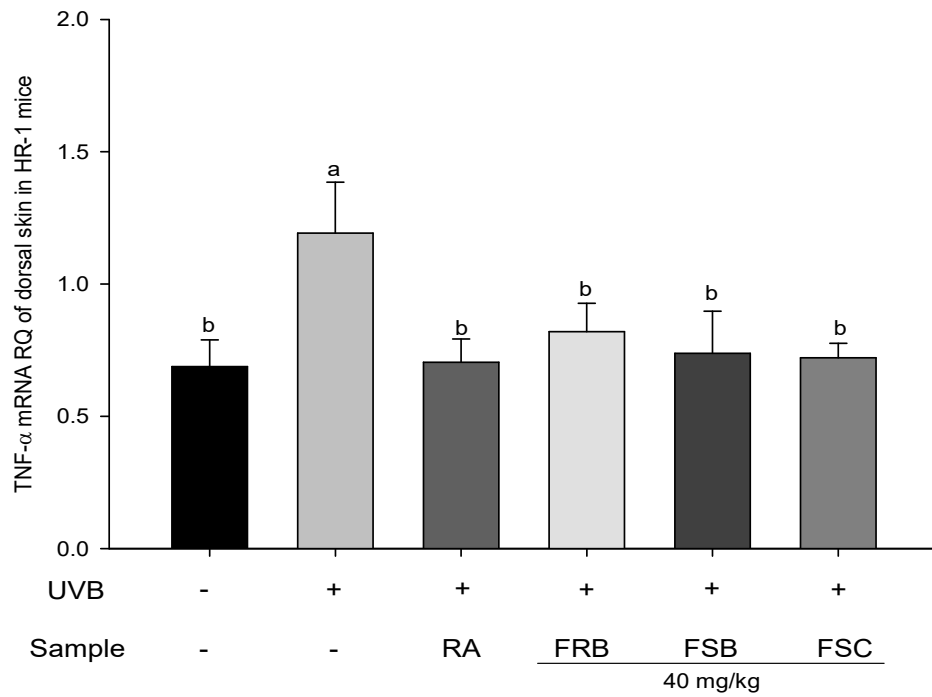


그림 323. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 TNF-α mRNA level에 미치는 영향

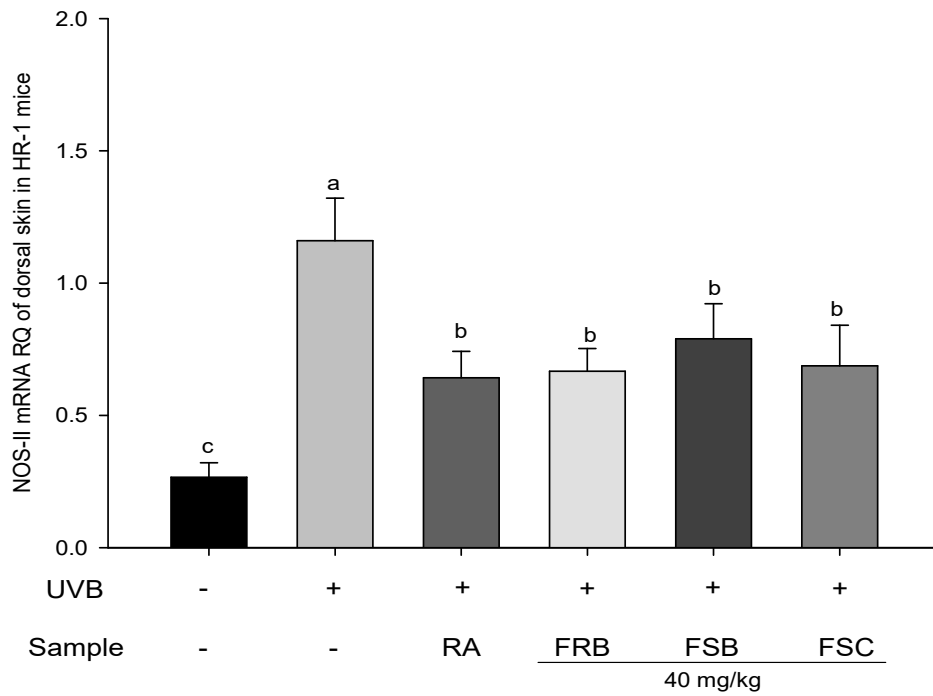


그림 324. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 NOS-II mRNA level에 미치는 영향

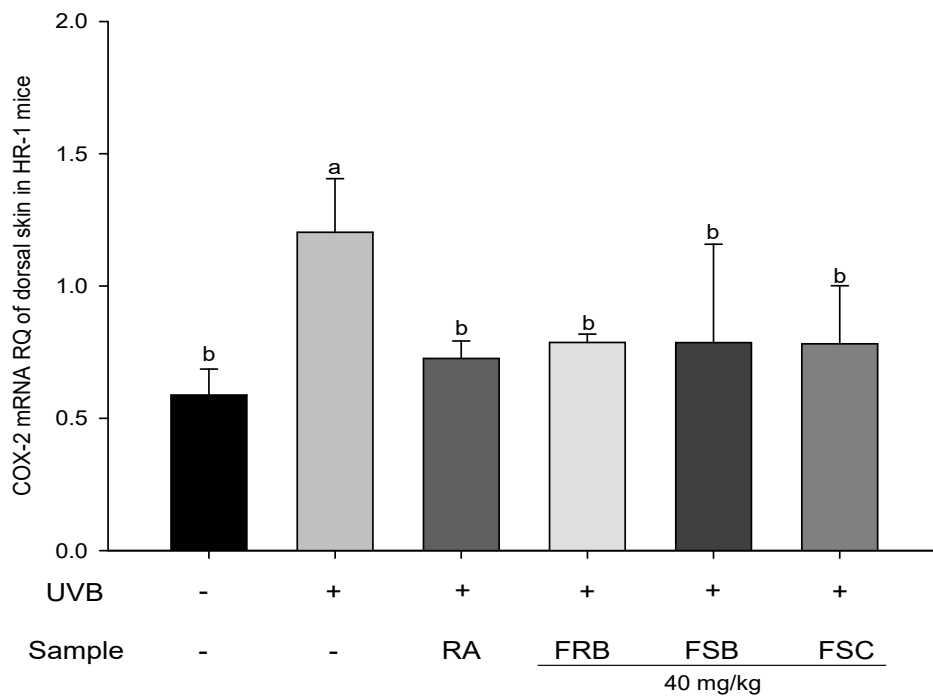


그림 325. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 COX-2 mRNA level에 미치는 영향

(나) 피부 matrix metallo proteinases (MMPs) 발현 평가

미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물에 대한 피부 주름 개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도하고 실험 종료 후 등피부조직을 분리하여 UVB 광노화에 의한 피부 콜라겐 분해로 형성되는 주름 생성 변화를 관찰하기 위하여 MMP-2 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과, MMP-2 단백질 발현은 정상군에 비해 UVB-대조군에서 유의성 있게 증가하였다. 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 MMP-2 단백질 발현은 UVB-대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

또한 MMP-2 및 MMP-9 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 미강(생물전환)산물, 대두박(생물전환)산물 및 참깨박(생물전환)산물 추출물 투여군에서 UVB 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다.

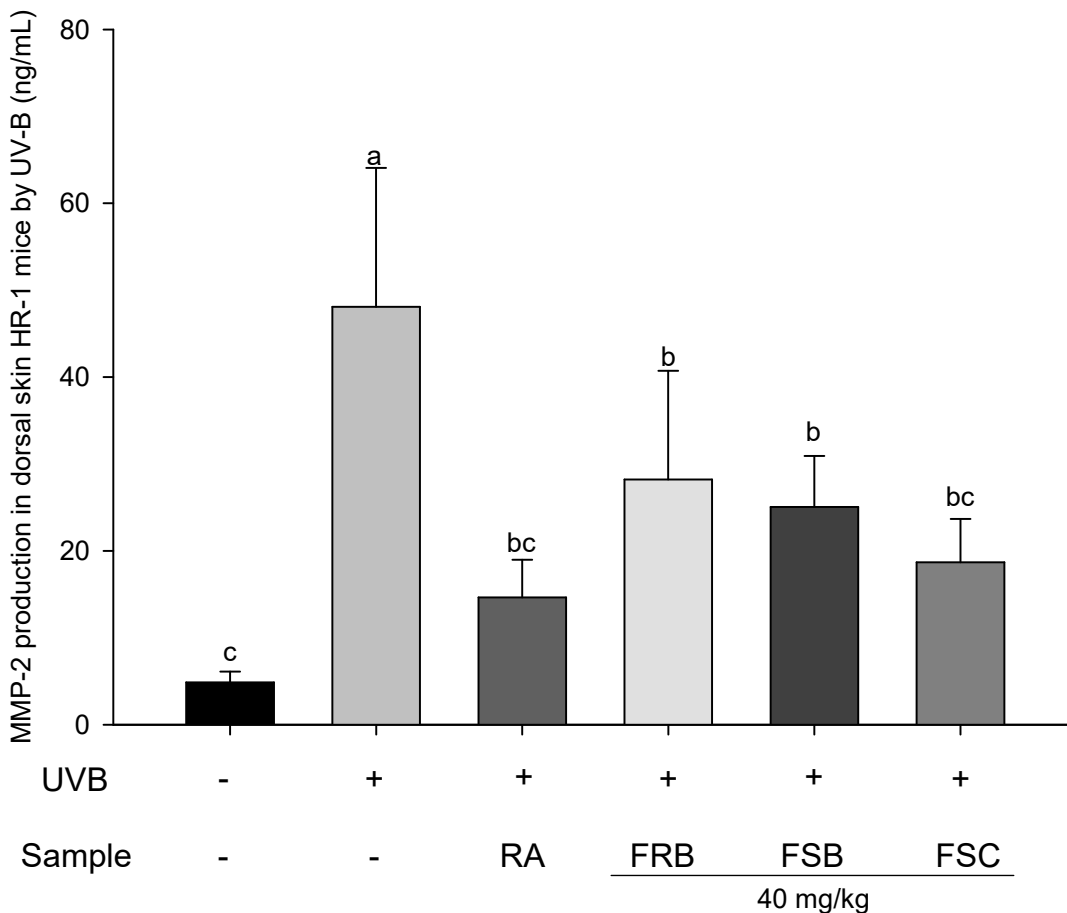


그림 326. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 MMP-2 생성량에 미치는 영향

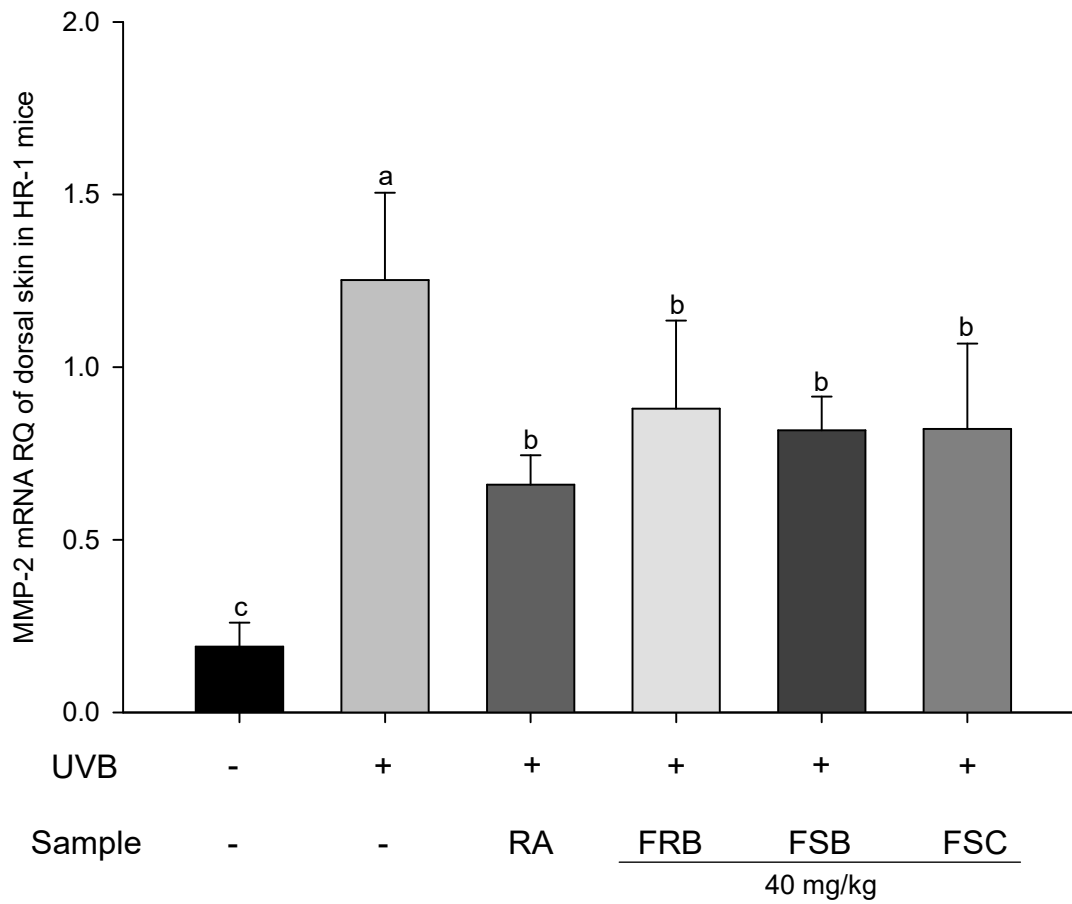


그림 327. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 MMP-2 mRNA level에 미치는 영향

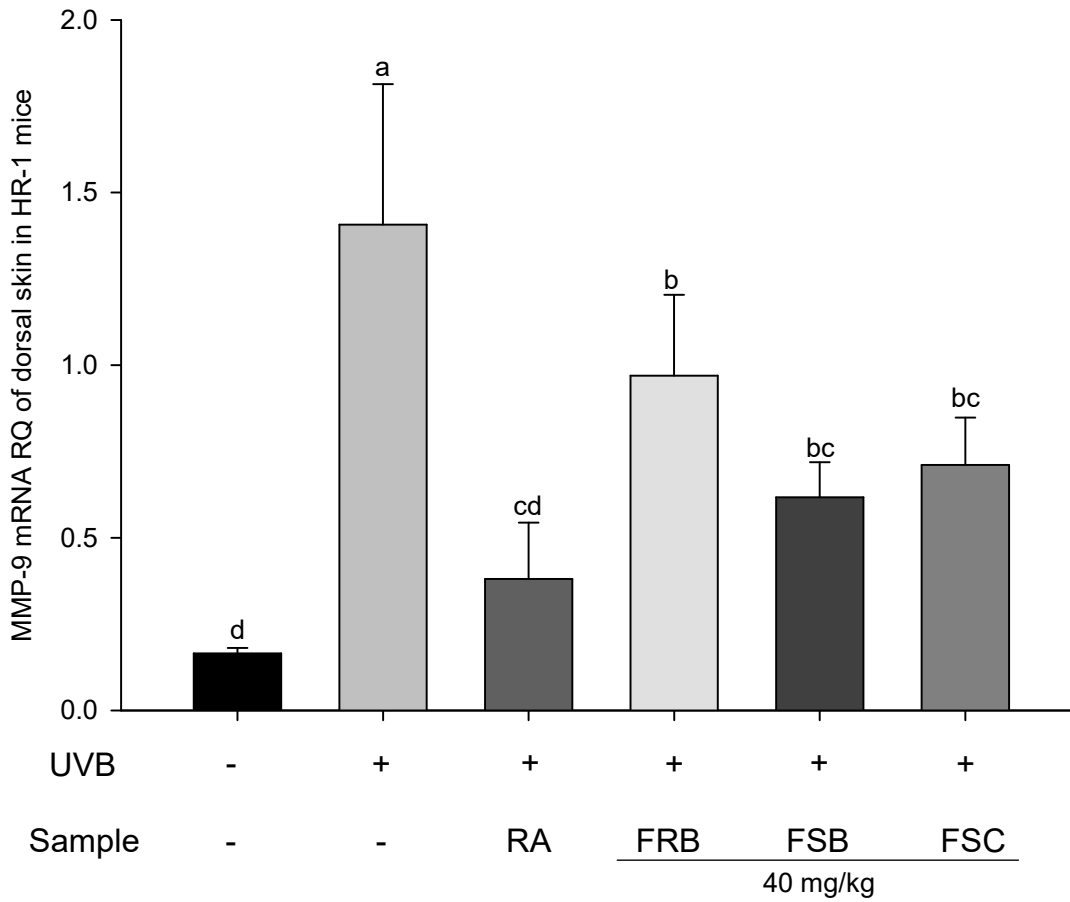


그림 328. 미강, 대두박, 참깨박(생물전환)산물 추출물이 MMP-9 mRNA level에 미치는 영향

## 21절. 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 *in vitro* 피부건강 및 피부미용 관련 항산화 효능 평가

### 1. 품종별 미강 21종의 원물 및 (생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 평가 및 상관관계 조사

#### 가. $\beta$ -glucan 함량 측정

##### (1) $\beta$ -glucan 함량 분석방법

농촌진흥청에서 제공받은 21종의 미강 및 제1협동에서 제공받은 품종별 21종의 (생물전환)산물, 총 42종의 미강을 이용하여 미강의 유효성분 중  $\beta$ -glucan 분석을 진행하였다.  $\beta$ -Glucan의 정량은 Megazyme(The Bray Co.)의 'Mixed-linkage beta-glucan kit'를 이용하여 측정하였다. Total glucan 함량은 0.5 mm 크기의 체를 통과시킨 시료 50 mg에 100  $\mu$ L의 50% ethanol과 2 mL의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 첨가하고 100°C에서 3분간 교반하였다. 그 후 50°C에서 5분간 식힌 후 100  $\mu$ L의 lichenase(5 U)을 첨가하고 1시간 동안 50°C에서 교반하여 반응시켰다. 2.5 mL의 sodium acetate buffer(pH 4.0)를 추가하고 원심분리(1,000 g, 10 min) 하여 분리된 상등액 50  $\mu$ L와 동량의  $\beta$ -glucosidase(0.1 U)를 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시킨 뒤, GOPOD(glucose oxidase/peroxidase) reagent 1.5 mL을 첨가하고 50°C에서 20분 반응 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $\beta$ -Glucan의 함량은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\beta\text{-glucan} = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.05} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \times D$$

$\Delta A$  : 시료의 흡광도-공시료(Blank)의 흡광도

$F$  : 흡광도를 D-glucose의  $\mu$ g으로 환산하기 위한 계수

$W$  : 시료의 무게(mg)

162/180 : 유리상태 glucose 분자량으로부터  $\beta$ -glucan 분자와 같이 무수상태의 glucose 분자량으로 전환하기 위한 계수



(2) 품종별 미강 21종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

제1협동에서 제공된 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여  $\beta$ -glucan 분석을 진행하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 미강 원물에서 0.18~0.57%, (생물전환)산물에서 0.14~0.20% 범위의 함량을 나타내었다. 특히 12번 원물에서 0.57%로 가장 높은  $\beta$ -glucan 함량을 나타내었으며, 13번 원물에서 0.44%, 15번 원물에서 0.40% 순으로 높은 함량을 나타내었다.  $\beta$ -glucan은 다당류의 일종으로 인체의 면역시스템에 작용하여 면역력을 증강시켜주는 생물학적 반응 조절 물질로 알려져 있다. 면역계 내의 대식세포의 기능을 활성화시켜 림프구나 백혈구의 cytokine을 분비를 촉진시킴으로써 면역계의 전반적인 기능을 강화시킨다.

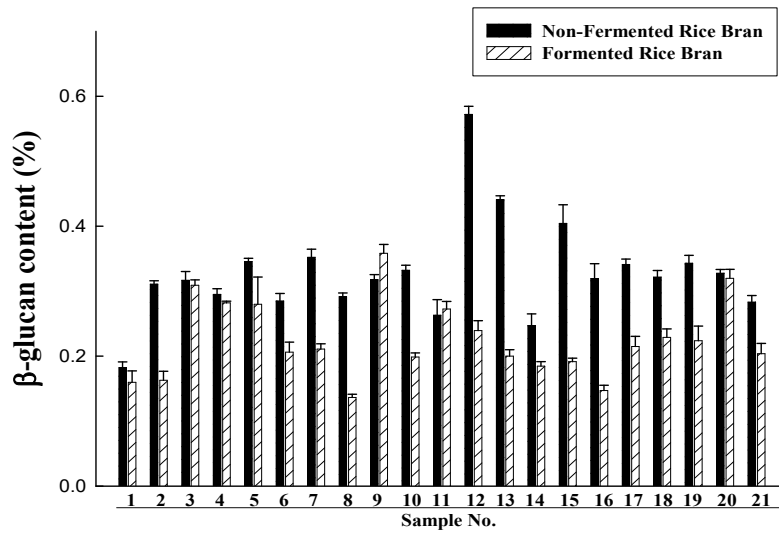


그림 329. 품종별 미강 원물 및 발효물의  $\beta$ -glucan 함량

## 나. 항산화활성 측정

### (1) 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 측정하였다. 농촌진흥청에서 제공받은 21종의 미강 및 제1협동에서 제공받은 품종별 21종의 (생물전환)산물, 총 42종의 미강을 100% methanol로 1시간동안 sonication 추출한 시액 1 mL에 10% Folin-Ciocalteu's reagent 1 mL과 2% sodium carbonate 용액 1 mL을 혼합하여 암실에서 1시간동안 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용하여 표준검량선을 작성하였고, 이로부터 시료의 총 페놀 함량(mg gallic acid equivalent/g)을 산출하였다. 그 결과, 품종별 미강 42종의 총 페놀 함량은 31.32~156.08 mg GAE/g의 범위에서 나타났고, 대체로 원물보다 (생물전환)산물에서 더 높은 총 페놀 함량을 나타내는 것을 알 수 있었다. 특히 7번 해당 (생물전환)산물에서 156.08±5.12 mg GAE/g으로 원물(89.62±1.61 mg GAE/g) 대비 약 174%의 총 페놀 함량을 나타내었다.

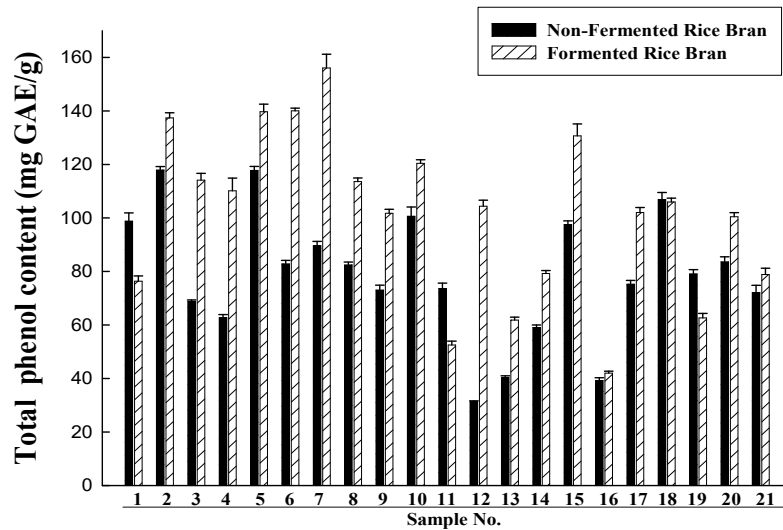


그림 330. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량

(2) DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 전자 전달에 의한 항산화활성을 측정하는 방법으로, 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 전자나 수소를 받아 환원되어 안정한 분자를 형성하게 될 때, 보라색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다. 비교적 짧은 시간 내에 간단하게 항산화능을 측정할 수 있어 널리 사용되고 있는 방법이다. 농촌진흥청 및 제1협동에서 제공받은 품종별 21종의 (생물전환)산물, 총 42종의 미강 sonication 추출물 200  $\mu$ L와 0.4 mM DPPH 시약 800  $\mu$ L를 혼합하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$DPPH\ radical\ scavenging(\%) = [1 - (\frac{A_{Experiment} - A_{Blank}}{A_{Control}})] \times 100$$

그 결과, 대부분의 시료에서 원물보다 (생물전환)산물에서 DPPH radical 소거능이 뛰어난 것으로 나타났으며, 특히 7번 해당과 10번 해품, 15번 미소미 (생물전환)산물에서 71.30 $\pm$ 0.78%, 70.43 $\pm$ 1.05% 및 66.53 $\pm$ 0.72% 순으로 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다.

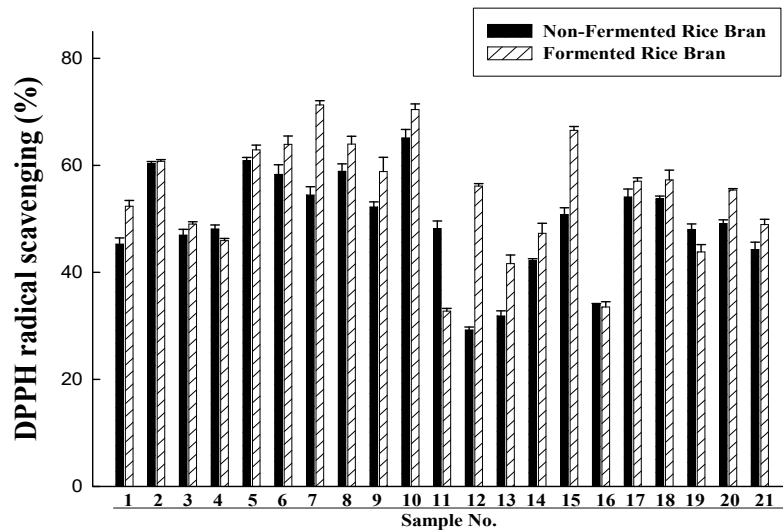


그림 331. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능

(3) ORAC value 측정

ORAC value는 형광표준용액 40 nM fluorescent를 제조하여 측정 직전에 150 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)를 첨가한 다음 fluorescence microplate reader(Spectramax GEMINI EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정 조건은 485 nm에서 전자여기 후 535 nm에서 방출되는 조건으로 37°C에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소율을 측정하였다. 결과 값은 Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroma-2- carbonyl acid) 1 μM에 의해 보호된 curve area와 비교하여, 그 값은 μM Trolox equivalents(TE)/g으로 표현하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 품종별 미강 21종에서 모두 원물보다 (생물전환)산물의 ORAC value가 높게 측정되었으며, 특히 7번 해당 (생물 전환)산물에서 1101.31±41.11 μM TE/g으로 원물(641.02±23.39 μM TE/g) 대비 약 171.8%의 높은 ORAC value를 나타내었다.

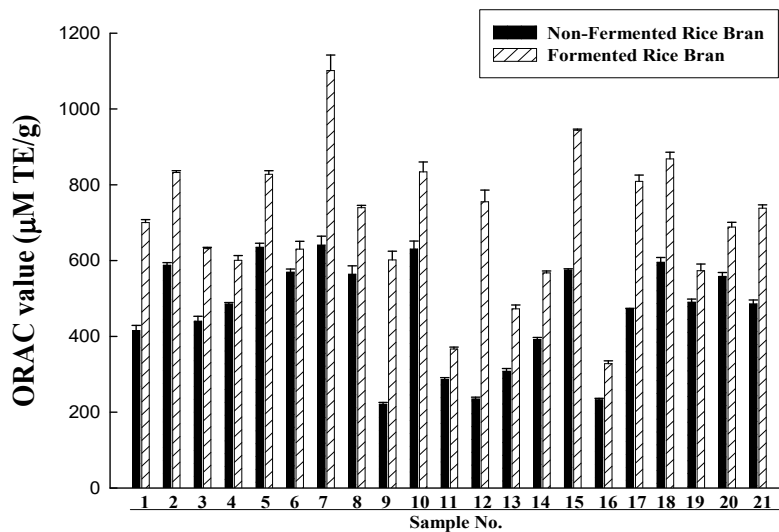


그림 332. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value

**다. 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석**

미강 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분 및 항산화활성간의 상관관계를 알아보기 위하여 상관계수(correlation coefficient, R)의 제곱 값인 결정계수(determination coefficient, R<sup>2</sup>)값을 확인하였다. 그 중 총 페놀 함량과 DPPH radical 소거능 사이의 결정계수가 0.7586으로 가장 높은 값을 나타내었다. 또한 총 페놀 함량과 ORAC value 및 ORAC value와 DPPH radical 소거능 사이의 결정계수가 0.6770 및 0.6306으로 높은 상관관계를 나타내었으나 지표성분인  $\gamma$ -Oryzanol과 항산화활성 사이의 결정계수는 0.2396~0.2784으로 낮은 상관계수를 나타내었다.

표 160. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 결정계수(R<sup>2</sup>)

	TPC <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging	ORAC value	$\beta$ -Glucan	$\gamma$ -Oryzanol
TPC	1				
DPPH radical scavenging	0.7586	1			
ORAC value	0.6770	0.6306	1		
$\beta$ -Glucan	0.1136	0.1044	0.1968	1	
$\gamma$ -Oryzanol	0.2396	0.2658	0.2784	0.0657	1

<sup>1)</sup>Total phenol contents

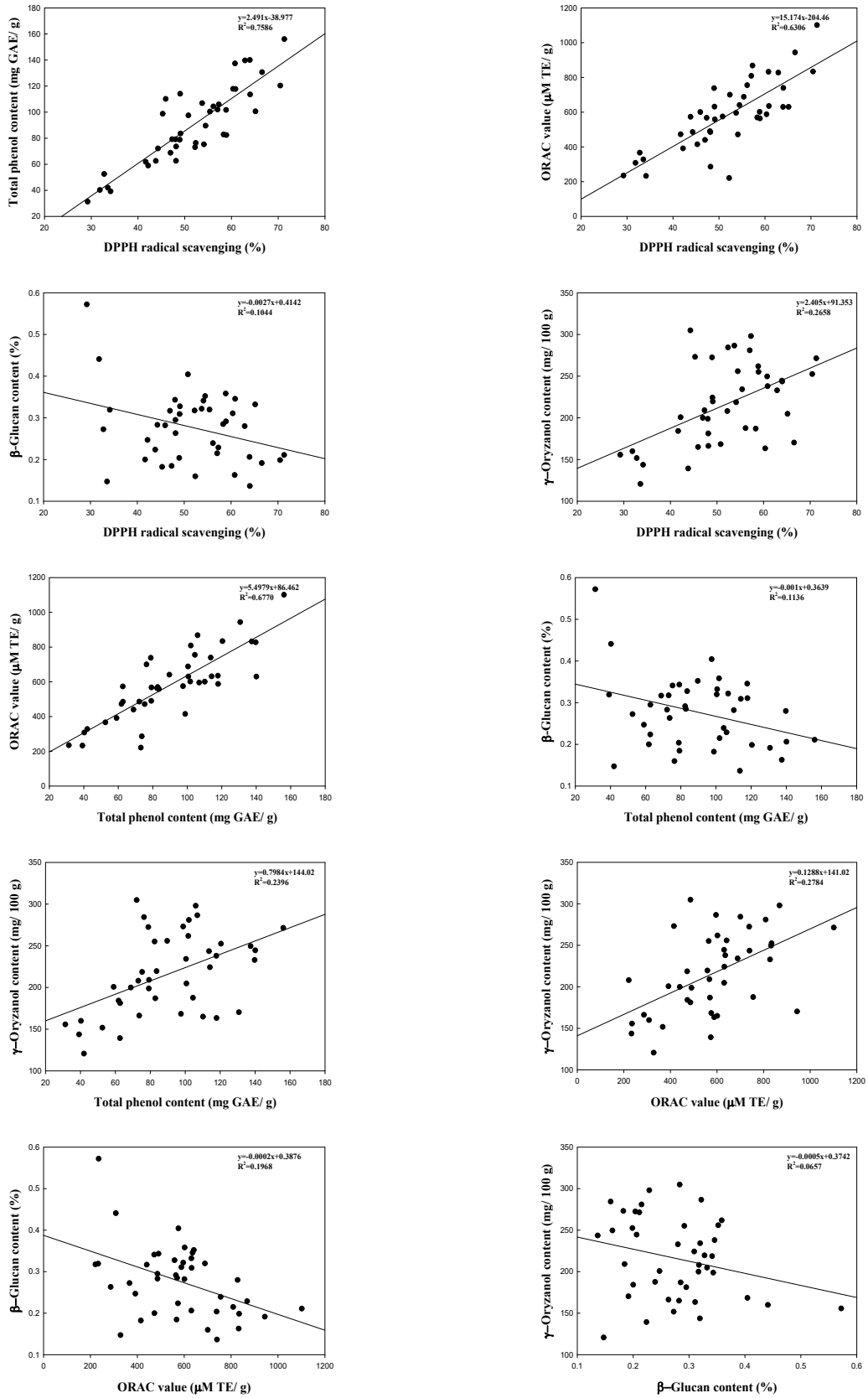


그림 333. 품종별 미강 원물 및 (생물전환)산물의 상관관계

## 2. 생산공정별 미강(생물전환)산물의 *in vitro* 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성 평가

### 가. 총페놀함량

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공받은 생산공정별 미강(생물전환)산물의 *in vitro* 활성 평가를 위한 추출은 각 2.5 g의 시료에 100% methanol을 이용하여 50 mL volumetric flask에 정용하여 1시간 sonicator를 이용하여 추출하였다. 그 후 고형분을 제거하기 위하여 원심분리 후 상층액을 filter 하여 실험에 사용하였다.

페놀성 화합물은 식물에 널리 분포되어 있는 방향족 화합물로서 페놀성 화합물이 가지는 hydroxyl기가 free radical에 수소 원자를 환원하여 항산화, 항염증 등의 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고되고 있다. 미강(생물전환)소재의 총페놀함량은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 측정하였다. 미강(생물전환)산물의 추출물 1 mL에 10% Folin-Ciocalteu reagent 1 mL과 2% sodium carbonate 용액 1 mL을 첨가하여 혼합한 후 암소에서 1시간 반응 후 microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 이용하였으며, 작성된 표준검량선으로부터 미강(생물전환)산물의 총페놀함량을 계산하였다. 총페놀함량 측정 결과, 제1배치 생산공정별 미강16001 T1을 제외한 모든 미강(생물전환)산물에서 원물에 대비하여 총페놀함량이 통계 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 가장 높은 함량을 나타낸 미강(생물전환)산물은 미강16001T4, 미강16001 열처리 소재로 각각 116.45, 116.03 mg GAE/g의 함량을 나타내었다. 제2배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 경우 원물 대비 총페놀함량이 감소되는 경향을 나타냈다. 마찬가지로 제3배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 경우도 미강16003 T1을 제외한 모든 소재에서 원물 대비 총페놀함량이 감소되는 경향을 나타내었으며, 미강16003 열처리 소재의 경우 원물 69.20 mg GAE/g 대비 39.97 mg GAE/g로 약 1.7배 이상 감소하였다.

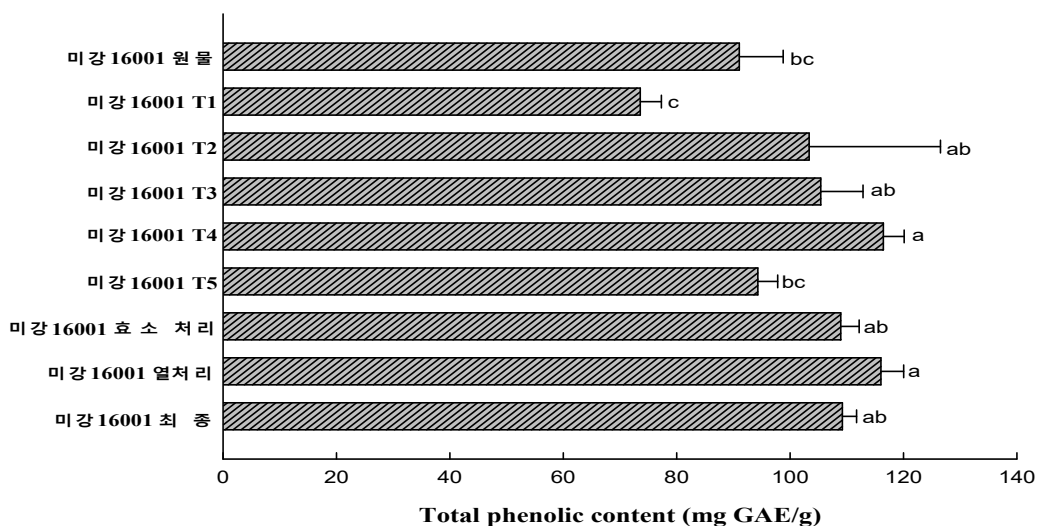


그림 334. 제1배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 총페놀함량

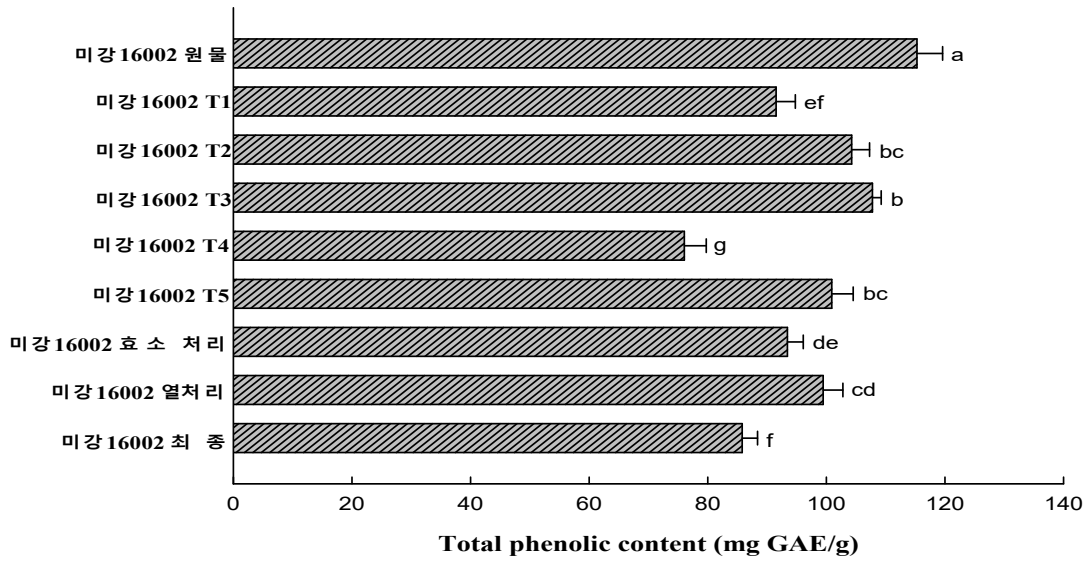


그림 335. 제2배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 총페놀함량

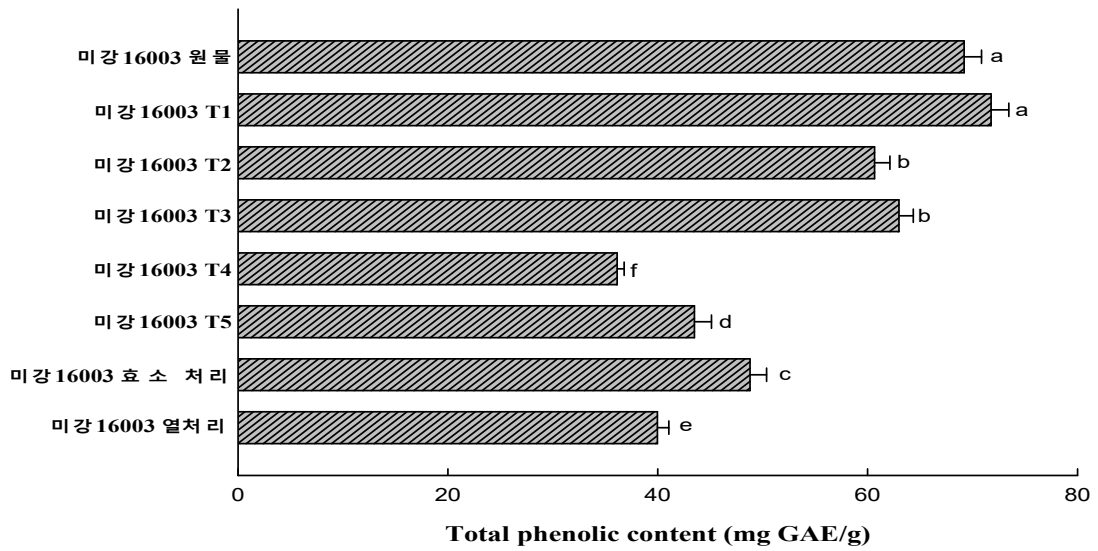


그림 336. 제3배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 총페놀함량



## 나. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 전자전달에 의한 항산화능을 비교하기 위한 방법 중 하나로, 비교적 안정한 free radical DPPH 시약을 이용하여 페놀성, 방향족 화합물 등의 항산화 성분과 반응 시 노란색으로 탈색되는 원리를 이용한 측정 방법으로 주스, 와인 등 식품의 항산화 활성 측정에 널리 사용되고 있다. 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 방법은 시료 200  $\mu$ L에 0.4 mM DPPH 시약 800  $\mu$ L을 첨가하여 암소에서 10분간 반응 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left\{ 1 - \left[ \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{control}}} \right] \right\} \times 100$$

생산공정별 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능의 결과는 다음 그림과 같다. 총페놀함량의 결과와 유사하게 제1배치 생산공정의 경우 미강16001 원물에 대비하여 미강(생물전환)산물에서 증가된 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 그 중 미강16001 T4가 75.86%의 소거능을 나타내 제1배치 생산공정별 미강(생물전환)산물 중 가장 높게 나타났으며 이는 앞선 총페놀함량 측정 결과와도 매우 유사하였다. 제2배치 생산공정별 미강(생물전환)산물은 미강16002 원물에 대비하여 모든 미강(생물전환)산물에서 DPPH 라디칼 소거능이 감소되는 경향을 나타냈다. 제3배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 경우도 미강16003 원물에 대비하여 (생물전환)산물에서 라디칼 소거능의 감소를 보였다. 제1, 2, 3배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능은 총페놀함량 측정 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

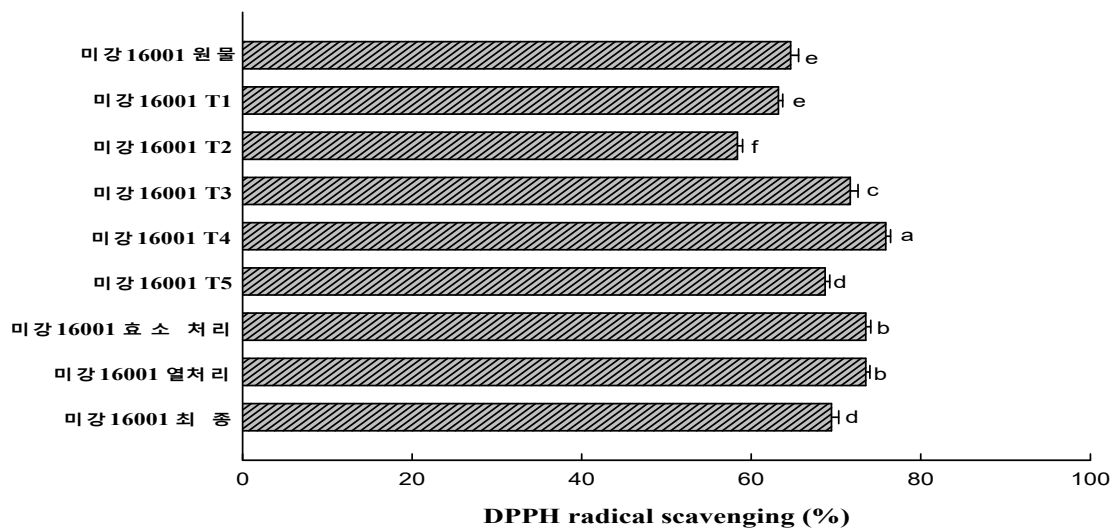


그림 337. 제1배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

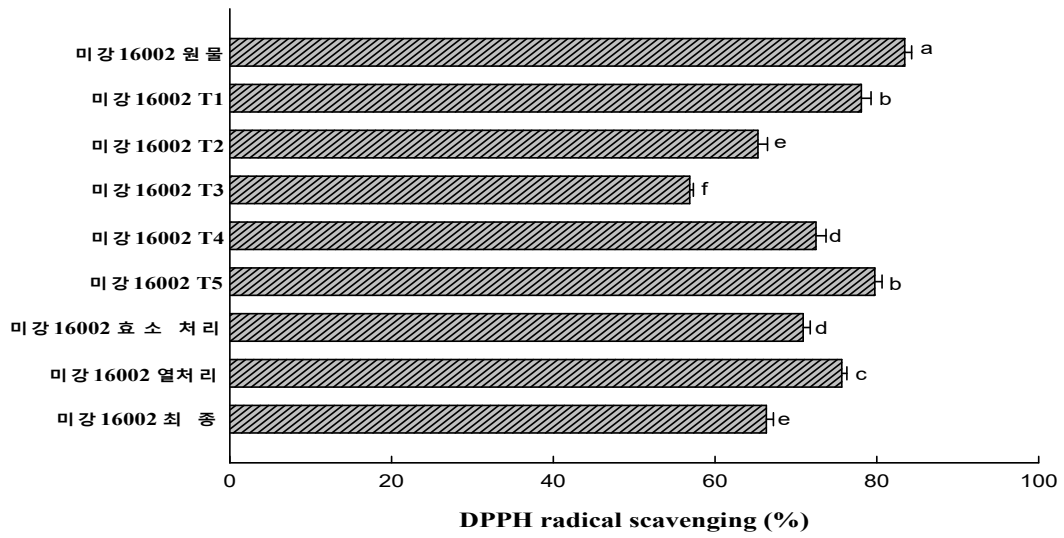


그림 338. 제2배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

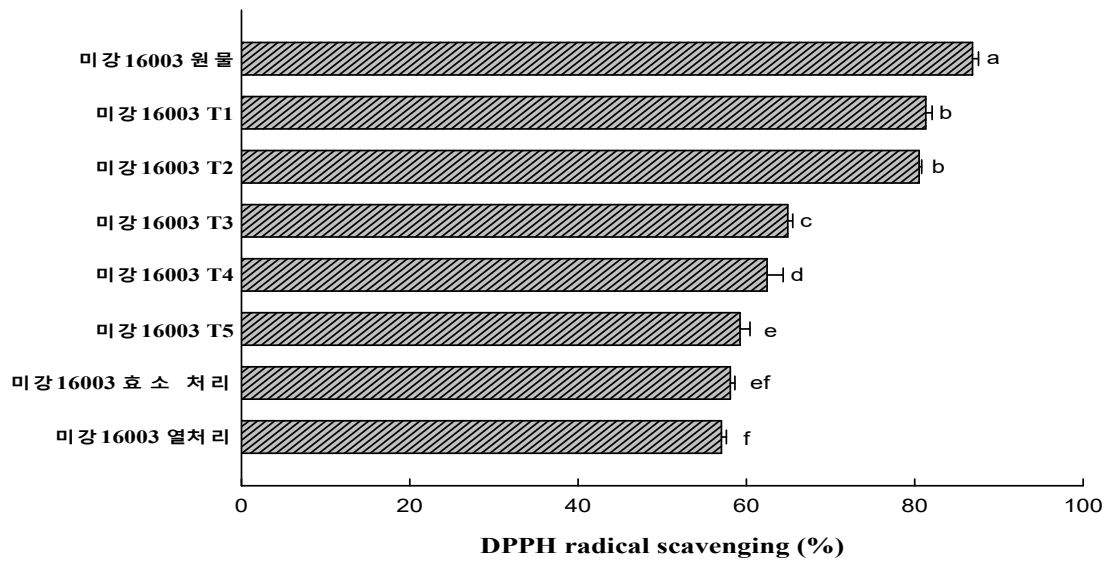


그림 339. 제3배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

#### 다. ORAC value 측정

ORAC(Oxygen radical absorbance capacity) value란 수소전자전달 이론을 근거로 하는 항산화능 측정 방법 중 하나로, radical generator인 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical의 소거 능력을 측정하는 원리를 이용한다. 시료 내 소수성, 친수성 성분과 모두 반응하여 감도가 높은 장점이 있다. 생산공정별 미강(생물전환)산물의 ORAC value 측정은 미강(생물전환)산물 추출물 25  $\mu$ L에 형광물질 40 nM fluorescein 150  $\mu$ L을 96 well black plate에 첨가 한 후 radical generator인 144 mM AAPH 25  $\mu$ L를 첨가하여 fluorescence microplate reader를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 전자여기 485 nm, 전자방출 535 nm 조건에서 3분 간격으로 90분 동안 형광의 감소율을 측정하였으며, 표준물질인 trolox를 이용하여 표준검량선에 대입하여 ORAC value를 계산하였다.

생산공정별 미강(생물전환)산물의 ORAC value 측정 결과, 제1배치 생산공정 미강(생물전환)산물의 미강 16001 원물은 685.08  $\mu$ M TE/g으로 나타났으며 효소처리, 열처리, 최종산물에서 원물보다 높은 ORAC value를 나타내었다. 가장 높은 ORAC value는 미강16001 최종산물로, 714.79  $\mu$ M TE/g의 값을 보였다. 제2배치 생산공정 미강(생물전환)산물의 경우 미강16002 T3에서 432.68  $\mu$ M TE/g으로 가장 낮은 ORAC value를 보였으며 미강16002 열처리 산물만이 원물 대비 ORAC value가 증가하였다.

제3배치 생산공정 미강(생물전환)산물의 경우는 모든 미강(생물전환)산물에서 원물 대비 ORAC value가 감소하는 것으로 나타났다. ORAC value는 앞선 총페놀함량, DPPH 라디칼 소거능의 결과와 대체적으로 유사한 결과를 나타내었다. 일반적으로 총페놀함량과 DPPH 라디칼 소거능 및 ORAC value간의 상관관계가 비교적 높은 편으로 알려져 있다.

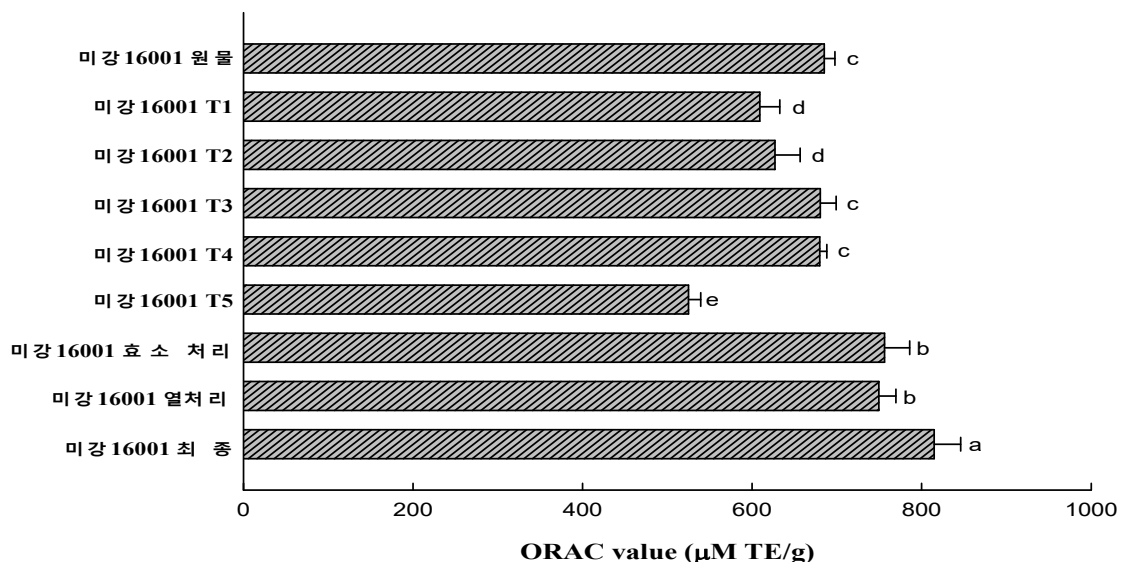


그림 340. 제1배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 ORAC value

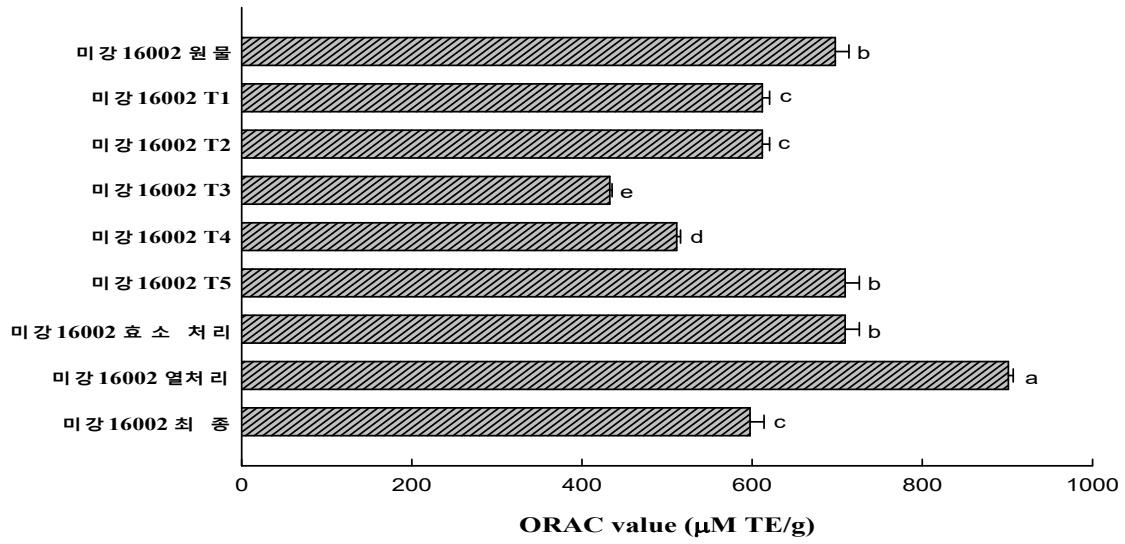


그림 341. 제2배치 생산공정별 미강(생물 전환)산물의 ORAC value

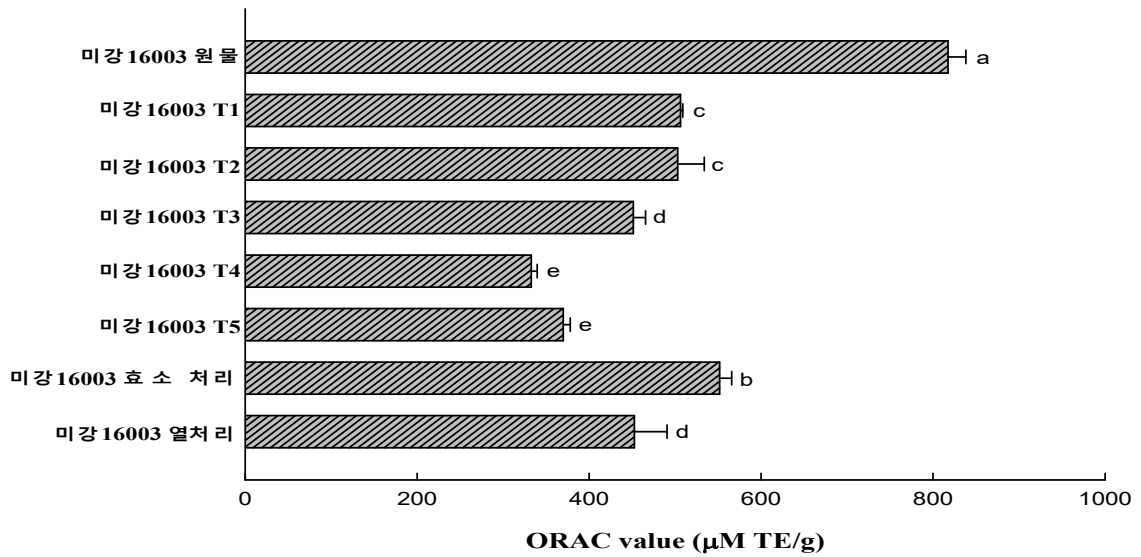


그림 342. 제3배치 생산공정별 미강(생물 전환)산물의 ORAC value

**라. Tyrosinase 저해활성 평가**

멜라닌은 동물, 식물에 존재하는 고분자 페놀류로써 피부, 머리카락, 눈동자 등에 분포되어 자외선, 건조, 온도 등에 대한 보호효과를 제공하나, 과도한 멜라닌의 생성은 인체 내 기미, 주근깨, 검버섯 등을 형성하여 피부노화를 촉진시킨다고 알려져 있다. 이러한 멜라닌은 표피에 존재하는 melanocyte의 세포내에서 tyrosinase 효소의 산화반응으로 합성된다. L-tyrosine은 tyrosinase에 의해 L-DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine)으로 합성되고 다시 L-DOPA는 dopaquinone으로 산화되며, 중간 대사산물을 거쳐 멜라닌으로 합성된다.

생산공정별 미강(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성 평가는 미강(생물전환)산물 추출물 40 μL과 phosphate buffer 100 μL, mushroom tyrosinase (2000unit/mL) 20 μL를 96 well plate에 첨가 후 기질인 1.5 mM L-tyrosine 40 μL를 넣어 37°C에서 15분간 반응 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 tyrosinase 저해제로 널리 알려져 있는 ascorbic acid를 사용하였다. Tyrosinase 저해 활성능의 계산식은 다음과 같다.

$$Tyrosinase\ inhibitory\ activity\ (\%) = (1 - A_{sample}/A_{control}) \times 100$$

미강(생물전환)산물의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과, 제1배치 생산공정 미강(생물전환)산물의 경우 미강16001 원물에서 33.25%의 저해 활성을 나타냈으며 원물에 대비하여 모든 (생물전환)산물에서 저해 활성이 낮아지는 경향을 나타냈다. 제2배치 생산공정 미강(생물전환)산물의 경우 미강16002 T4를 제외한 모든 (생물전환)산물에서 원물 대비 저해 활성이 낮아지는 경향을 나타냈으며, 제3배치 생산공정 미강(생물전환)산물의 경우 제1배치 생산공정과 유사하게 모든 (생물전환)산물에서 원물에 대비하여 저해 활성이 낮아지는 것으로 나타났다. 양성대조군인 ascorbic acid 1 mg/mL의 저해 활성은 약 90% 이상으로 나타난 것에 반해, 미강(생물전환)산물의 tyrosinase 저해 활성은 비교적 낮은 저해 활성을 보였다.

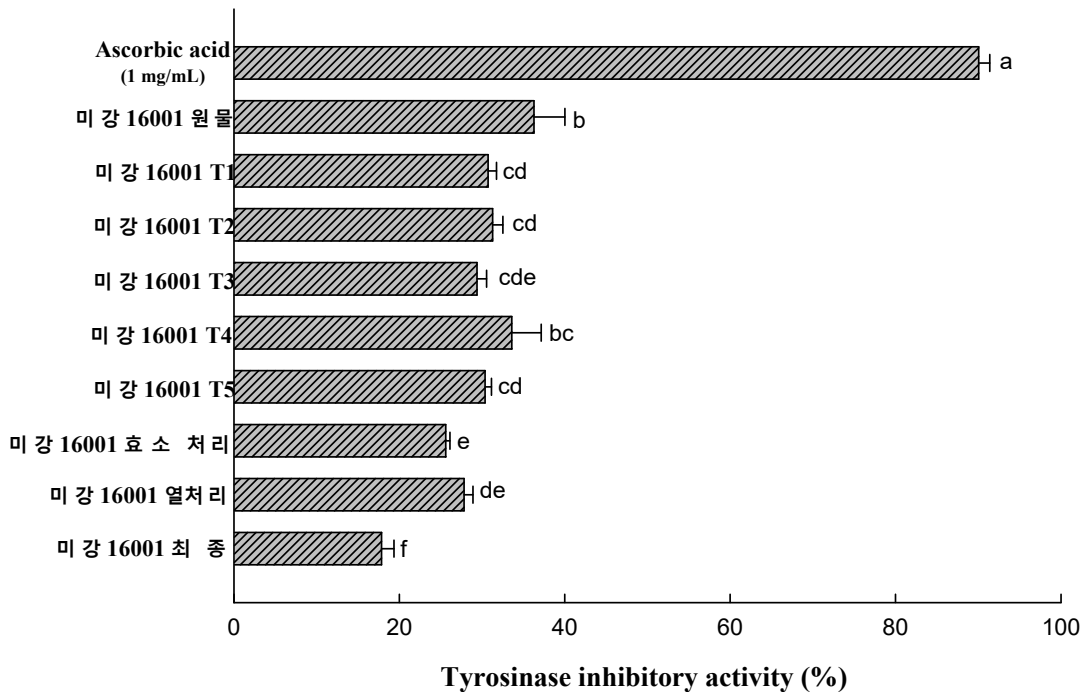


그림 343. 제1배치 생산공정별 미강(생물전환)산물의 Tyrosinase 저해 활성

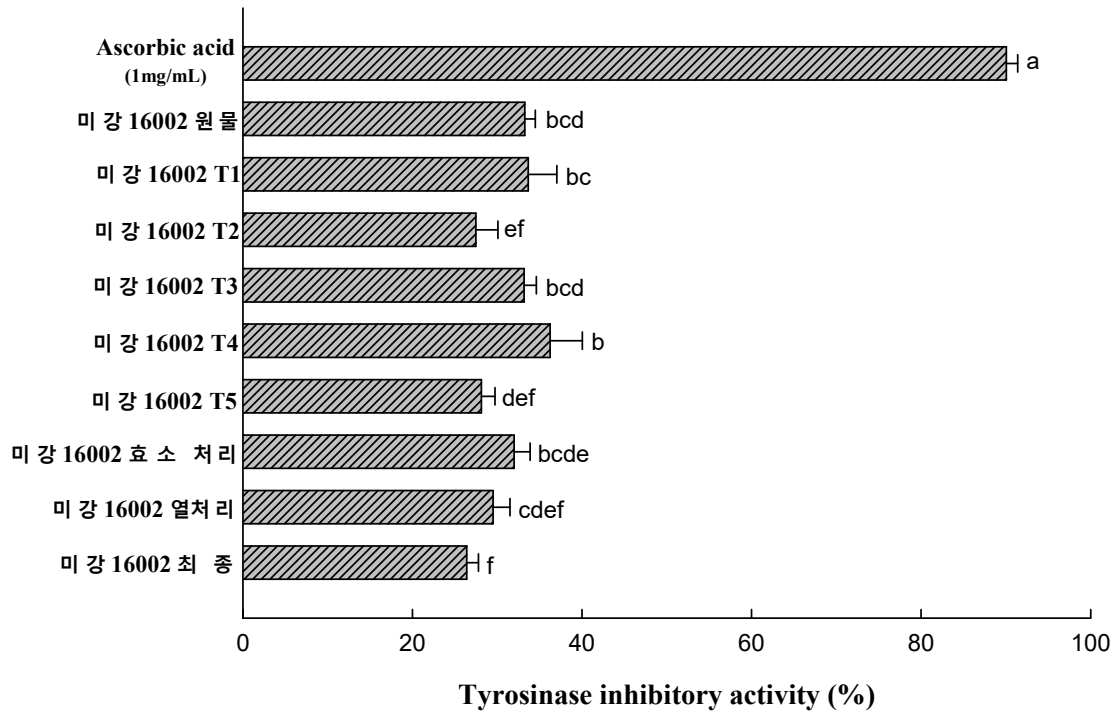


그림 344. 제2배치 생산공정별 미강(생물 전환)산물의 Tyrosinase 저해 활성

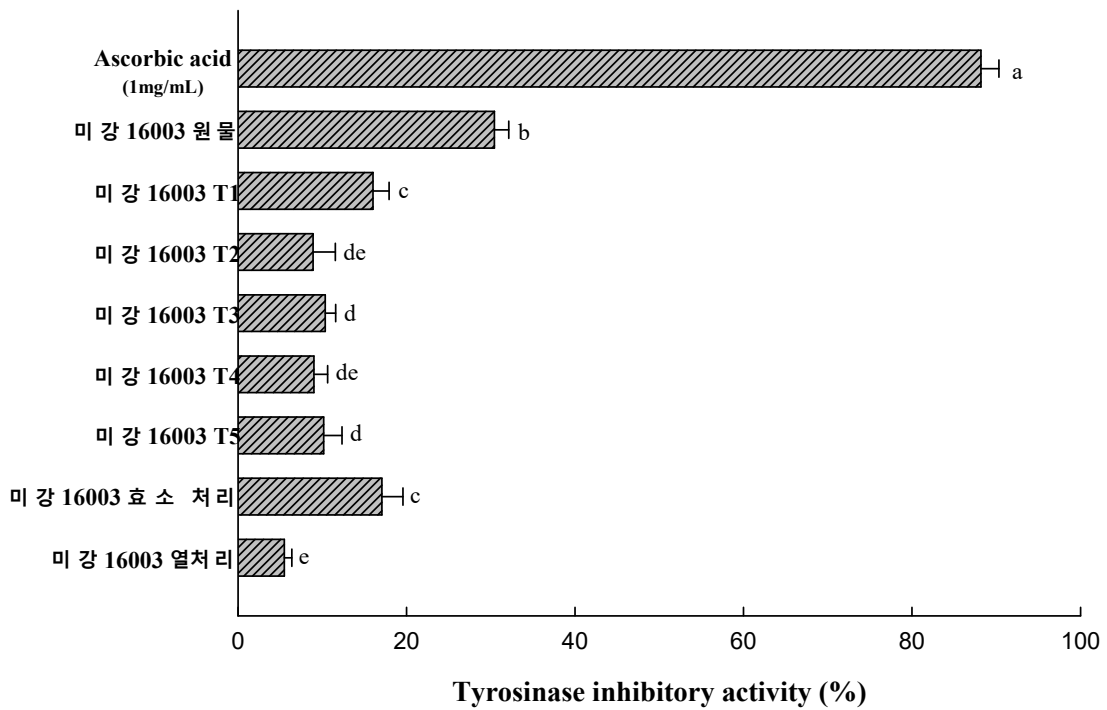


그림 345. 제3배치 생산공정별 미강(생물 전환)산물의 Tyrosinase 저해 활성

### 3. 품종별 대두 5종, 진풍 탈지대두의 원물 및 (생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 평가 및 상관관계 조사

#### 가. $\beta$ -glucan 함량 측정

##### (1) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 $\beta$ -glucan 함량 분석

농촌진흥청 및 제1협동에서 제공된 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여  $\beta$ -glucan 분석을 진행하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 품종별 대두의  $\beta$ -glucan 함량 범위는 0.0344%~0.1046%으로 나타났으며, 2번 품종 대두 2호 (생물전환)산물에서 0.1046%로 가장 높게 나타났으며, 1번 품종 대두에서 원물 0.0557%, (생물전환)산물 0.0784%로 생물전환시  $\beta$ -glucan 함량이 증가되는 경향을 보였다. 나머지 품종별 대두는 생물전환시  $\beta$ -glucan 함량이 다소 감소하는 경향을 보였다.

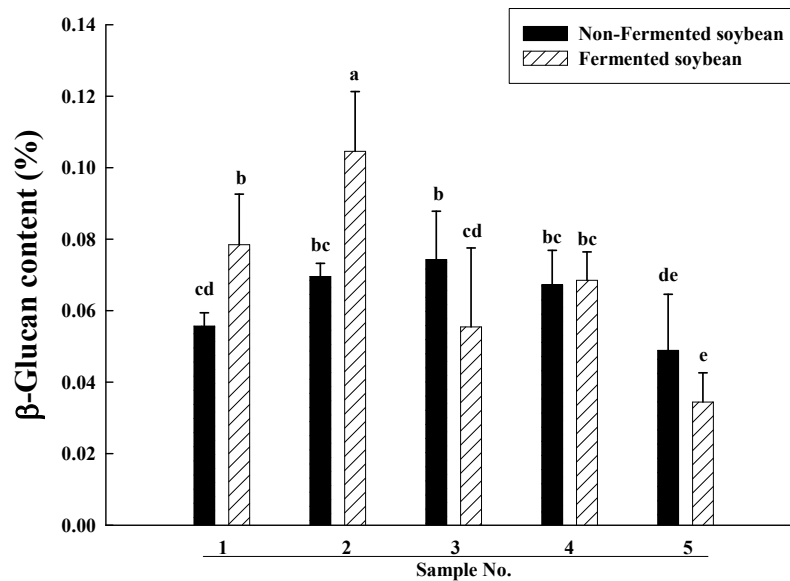


그림 346. 품종별 대두 원물 및 발효물의  $\beta$ -glucan 함량

(2) 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

농촌진흥청에서 제공받은 5종 중 진풍의 hexane, ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물 총 5종을 이용하여  $\beta$ -glucan 함량 분석을 진행하였다.  $\beta$ -Glucan의 함량은 0.088~0.111% 범위에서 나타났으며, 진풍 원물에서 0.1105%로 가장 높은  $\beta$ -glucan 함량을 나타내었다. Hexane 탈지 원물 및 (생물전환)산물에서는 유의적 차이가 나타나지 않았지만, ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물 사이에서는 0.940 및 0.1093%로 유의적으로 (생물전환)산물에서 다소 높은  $\beta$ -glucan 함량을 나타내었다.

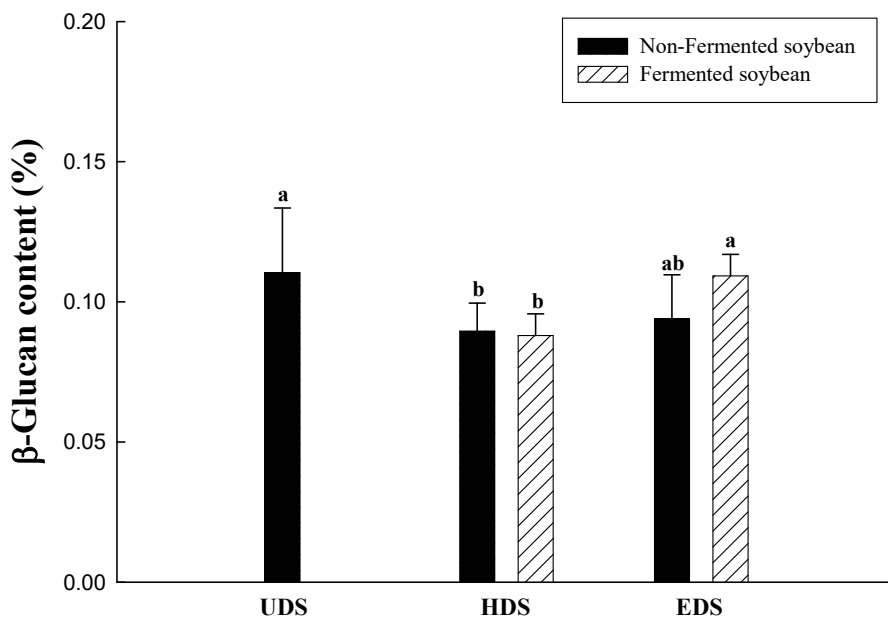


그림 347. 진풍 탈지 대두 원물 및 발효물의  $\beta$ -glucan 함량



## 나. 항산화활성 측정

### (1) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정

농촌진흥청에서 제공받은 품종별 대두 5종을 이용하여 제1협동에서 생물전환공정을 거쳐 총 10종의 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물을 제공받았다. 100% methanol로 정용하여 1시간동안 sonication 추출한 추출물의 상등액을 이용하여 항산화활성 측정에 사용하였다. 총 페놀 함량을 측정한 결과, 품종별 대두 원물은 33.28~44.96 mg GAE/g으로, (생물전환)산물은 36.58~40.44 mg GAE/g으로 대부분 원물 보다 (생물전환)산물에서 더 높은 총 페놀 함량을 나타내었으나, 4번 진풍 대두 원물에서 44.96 mg GAE/g으로 가장 높은 총 페놀 함량을 나타내었다.

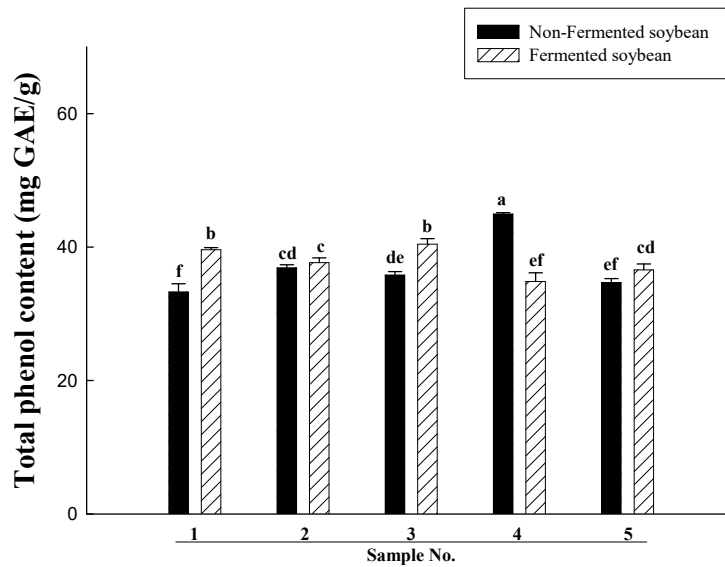


그림 348. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량

(2) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정

농촌진흥청 및 제1협동에서 제공받은 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 그 결과, 원물에서 35.61~49.80%의 소거능을, (생물전환)산물에서 26.09~45.23%의 소거능을 나타내어, (생물전환)산물보다 원물에서 다소 높은 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 이전의 실험인 진풍 탈지 원물 및 (생물전환)산물에서 hexane으로 탈지한 원물과 (생물전환)산물을 비교하였을 때 원물보다 생물전환공정 후 DPPH radical 소거능이 감소한 것과 비슷한 경향을 나타내었다.

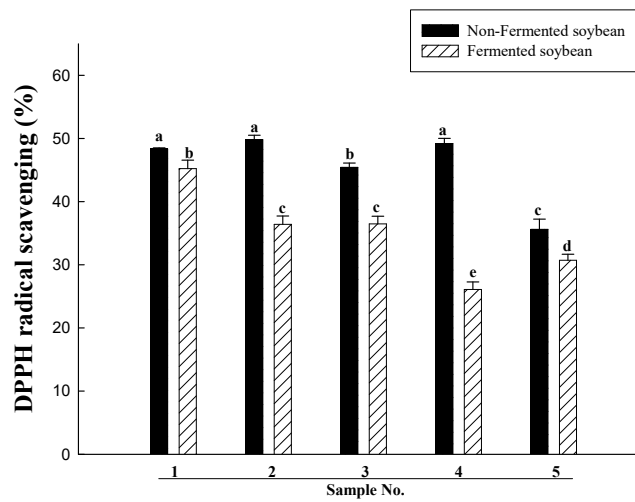


그림 349. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능

(3) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정

품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value를 측정한 결과, 대두 원물에서  $195.25 \pm 3.08 \sim 378.74 \pm 6.18 \mu\text{M TE/g}$ 의 함량을 나타내었고, 대두 (생물전환)산물은 원물보다 높은  $290.89 \pm 1.08 \sim 753.79 \pm 6.95 \mu\text{M TE/g}$ 의 범위를 나타내었다. 특히 2번 대풍2호의 경우 생물전환공정을 거친 후  $753.79 \pm 6.95 \mu\text{M TE/g}$ 의 높은 ORAC 지수를 확인할 수 있었다.

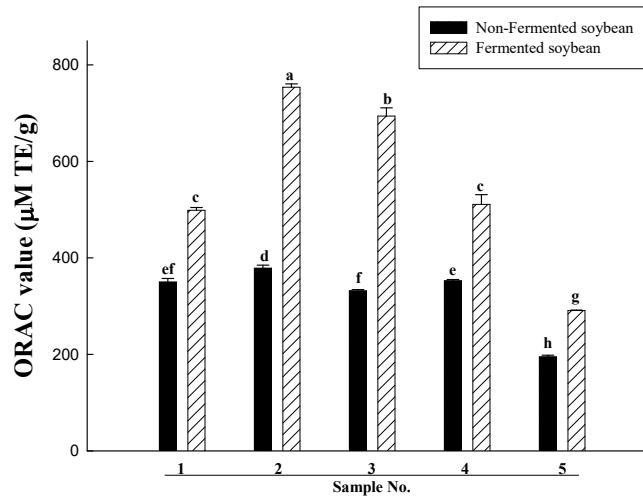


그림 350. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value

(4) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 농촌진흥청에서 제공받은 진풍의 hexane, ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물 총 5종을 이용하여 100% methanol로 1시간동안 sonication 추출한 추출액으로 실험을 진행하였다. Gallic acid를 이용하여 표준검량선을 작성하였고, 이로부터 시료의 총 페놀 함량(mg gallic acid equivalent/g)을 산출하였다. 그 결과, 진풍 원물 및 hexane, ethanol 탈지 원물은 27.07~39.44 mg GAE/g 인데 반하여 탈지 (생물전환)산물은 41.61 및 42.34 mg GAE/g 으로 총 페놀 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

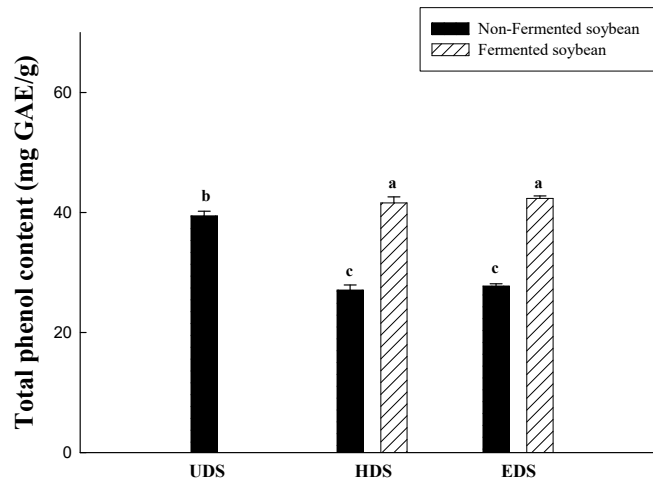


그림 351. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량

(5) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정

농촌진흥청 및 제1협동에서 제공받은 진풍 원물 및 탈지 (생물전환)산물, 총 5종의 sonication 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 그 결과, 진풍 및 탈지 진풍 원물에서 43.30~51.09%의 DPPH radical 소거능을 나타내었고, hexane 탈지 (생물전환)산물의 경우 31.30%, ethanol 탈지 생물전환산산물은 59.92%의 소거능을 나타내어 hexane 탈지물의 경우 생물전환공정을 거친 후 오히려 DPPH radical 소거능이 감소하는 것으로 확인되었다.

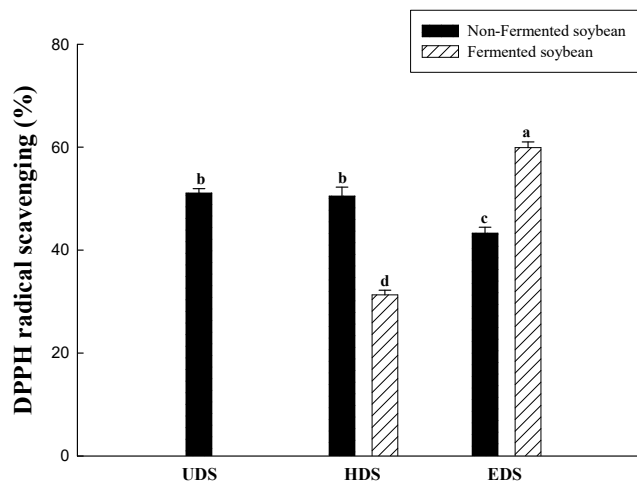


그림 352. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능

(6) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정

진풍 원물 및 hexane, ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value를 측정하여 아래 그림에 나타내었다. 그 결과 진풍 원물 및 탈지 원물의 경우 247.48~384.47  $\mu\text{M TE/g}$ 의 범위로 확인되었으며, (생물전환)산물의 경우 hexane 탈지에서 786.34  $\mu\text{M TE/g}$ , ethanol 탈지에서 721.96  $\mu\text{M TE/g}$ 으로 높은 ORAC 지수를 나타내었다.

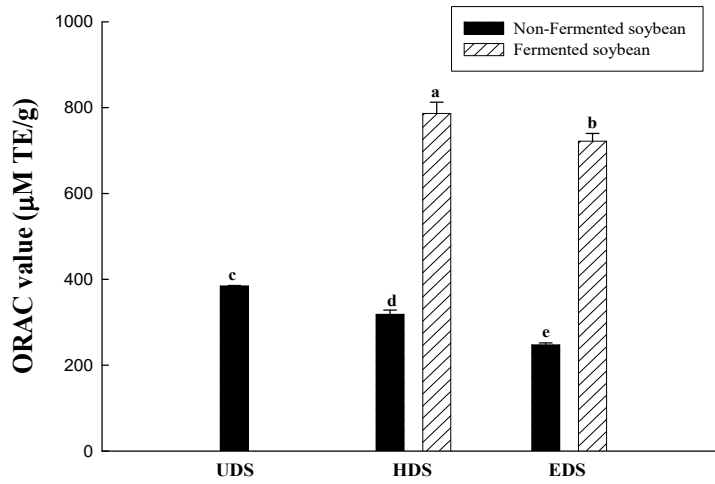


그림 353. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value

**다. 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석**

(1) 품종별 대두 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물 5종의 유효성분 및 항산화활성간의 상관관계를 알아보기 위하여 결정계수 (determination coefficient,  $R^2$ ) 값을 확인하였다. 결정계수는 0.0348~0.7749까지 나타났으며, 특히 ORAC value와 Isoflavone 함량 사이에서 0.7749의 높은 상관관계를 확인하였다. 그 다음으로는 ORAC value와  $\beta$ -glucan 함량 사이에서 0.3888의 결정계수를 확인하였다.

표 161. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 결정계수( $R^2$ )

	TPC <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging	ORAC value	Isoflavone	$\beta$ -Glucan
TPC	1				
DPPH radical scavenging	0.0873	1			
ORAC value	0.0758	0.0492	1		
Isoflavone	0.0657	0.1891	0.7749	1	
$\beta$ -Glucan	0.0348	0.0450	0.3888	0.2029	1

<sup>1)</sup>Total phenol contents

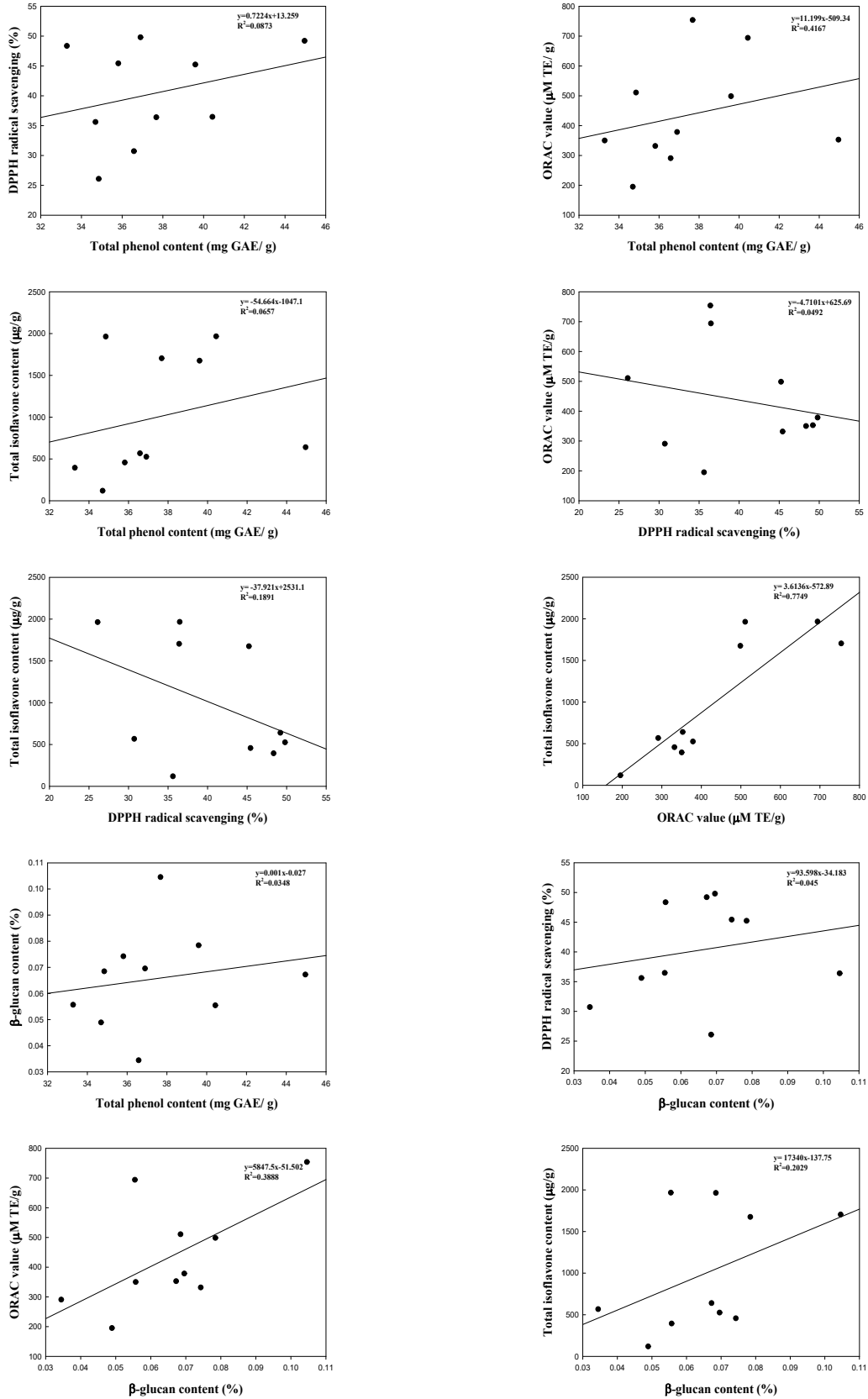


그림 354. 품종별 대두 원물 및 (생물전환)산물의 상관관계



(2) 진풍 탈지대두 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

진풍 원물 및 hexane, ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물 등 5종의 유효성분 및 항산화활성간의 상관관계를 알아보기 위하여 결정계수(determination coefficient,  $R^2$ ) 값을 확인하였다. 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분 및 항산화 활성 사이의 결정계수는 0.0006~0.9997까지 나타났으며, 그중 ORAC value와 총 Isoflavone 함량 사이에서 0.9997의 높은 상관관계를 나타내는 것으로 확인되었다. 총 페놀 함량과 ORAC value 사이에서 0.7149, 총 페놀함량과 총 Isoflavone 함량에서 0.6989 순으로 높은 값을 나타내었다.  $\beta$ -Glucan 함량의 경우 DPPH radical 소거능과 0.5368의 결정계수를 나타내어 다소 높은 상관관계를 나타내었다.

표 162. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 결정계수( $R^2$ )

	TPC <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging	ORAC value	Isoflavone	$\beta$ -Glucan
TPC	1				
DPPH radical scavenging	0.0006	1			
ORAC value	0.7149	0.0293	1		
Isoflavone	0.6989	0.0326	0.9997	1	
$\beta$ -Glucan	0.2578	0.5368	0.0049	0.0028	1

<sup>1)</sup>Total phenol contents

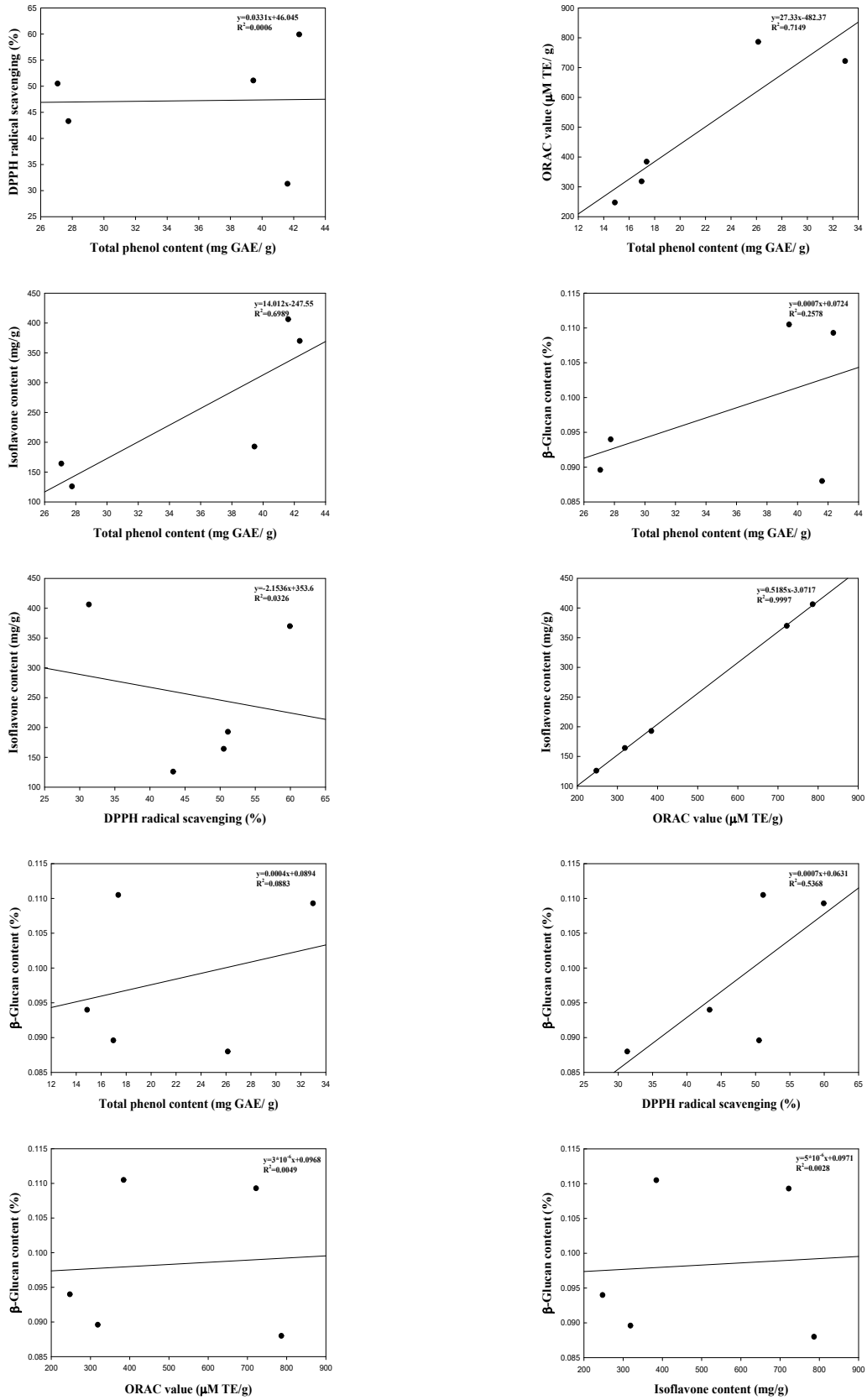


그림 355. 진풍 탈지 대두 원물 및 (생물전환)산물의 상관관계

#### 4. 생산공정별 대두(생물전환)산물의 *in vitro* 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성 평가

##### 가. 총페놀함량

제1협동기관(주)에스티알바이오텍)에서 제공받은 생산공정별 대두(생물전환)산물의 *in vitro* 활성 평가를 위한 추출은 각 2.5 g의 시료에 100% methanol을 이용하여 50 mL volumetric flask에 정용하여 30분동안 sonicator를 이용하여 추출하였다. 그 후 고형분을 제거하기 위하여 원심분리 후 상층액을 filter 하여 실험에 사용하였다

대두(생물전환)산물의 총페놀함량은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 미강(생물전환)산물의 총페놀함량 측정 방법과 동일하게 측정하였다. 대두(생물전환)산물의 추출물 1 mL에 10% Folin-Ciocalteu reagent 1 mL과 2% sodium carbonate 용액 1 mL을 첨가하여 혼합한 후 암소에서 1시간 반응 후 microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 이용하였으며, 작성된 표준검량선으로부터 총페놀함량을 계산하였다.

측정 결과, 제1배치 생산공정 대두(생물전환)산물의 경우 대두16001 T2를 제외한 모든 대두(생물전환)산물에서 원물 대비 총페놀함량이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 대두16001 효소처리 소재에서 50.52 mg GAE/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다.

제2배치 생산공정도 이와 유사하게 대두16002 T2를 제외한 모든 (생물전환)산물에서 원물에 대비하여 총페놀함량이 증가하거나 유지되는 경향을 나타내었다.

제3배치 생산공정 대두(생물전환)산물의 경우 대두16003 T3, T5, T6을 제외한 (생물전환)산물에서 원물 대비 총페놀함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

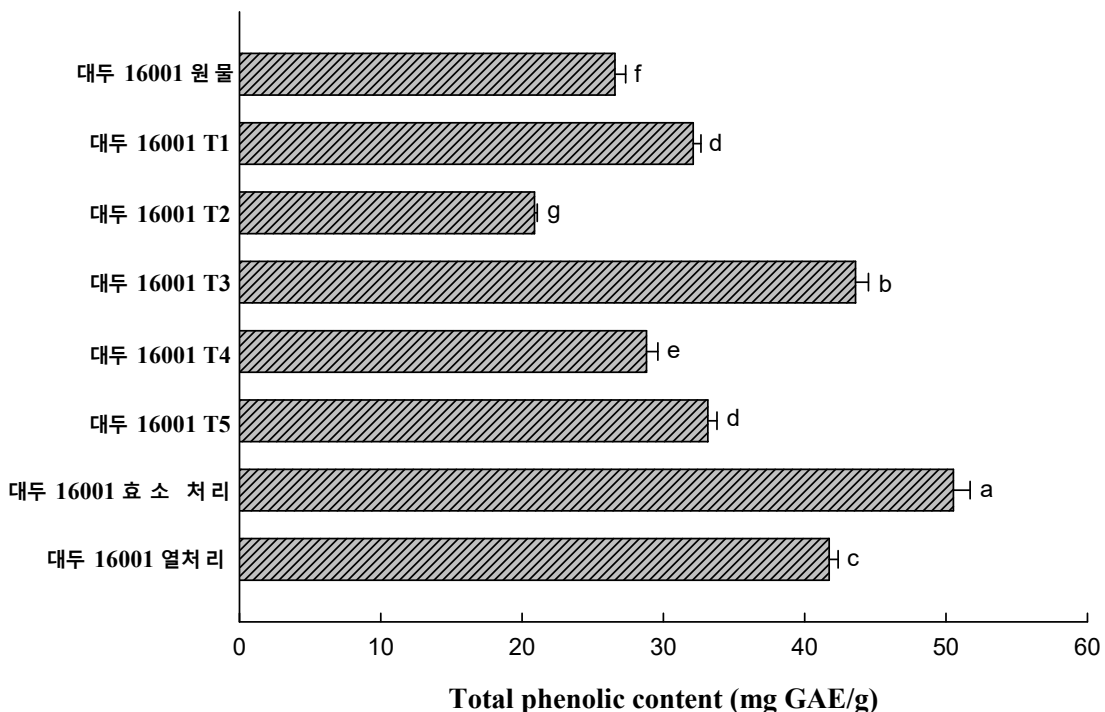


그림 356. 제1배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 총페놀함량

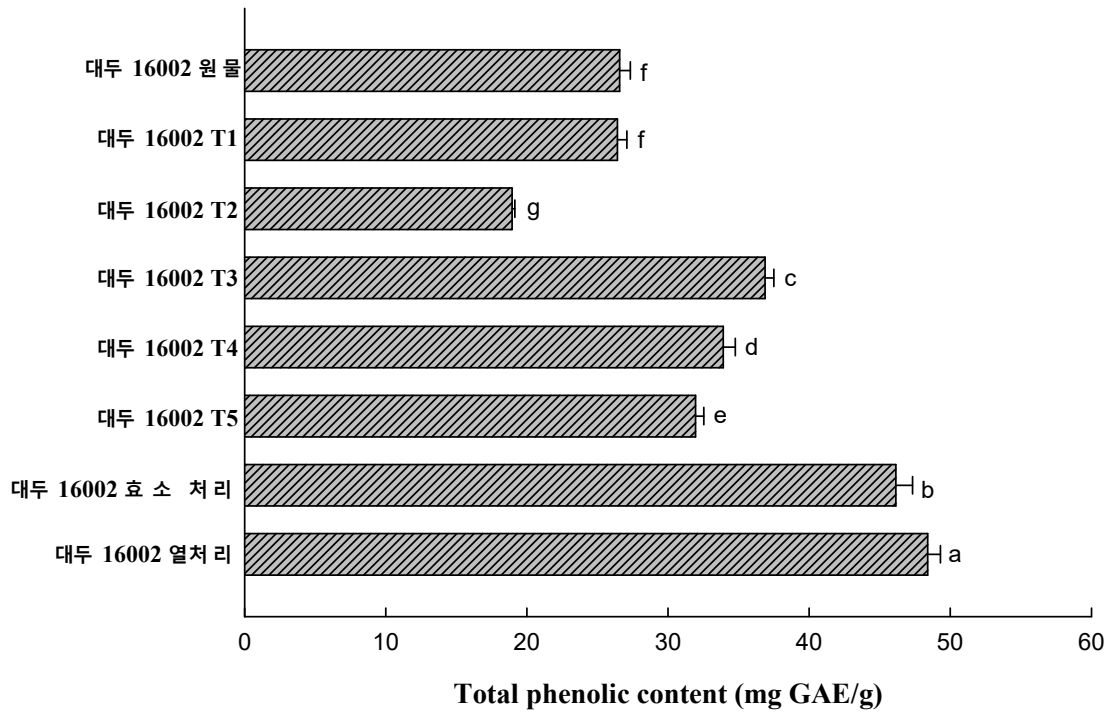


그림 357. 제2배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 총페놀함량

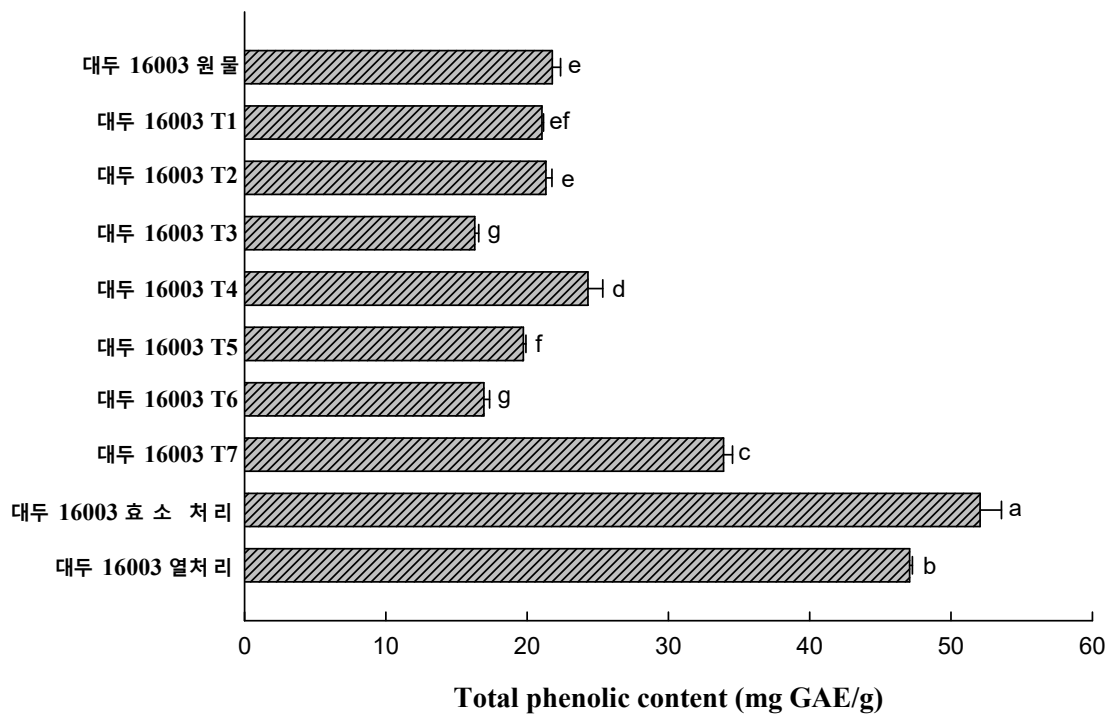


그림 358. 제3배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 총페놀함량

## 나. DPPH 라디칼 소거능 측정

대두(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 방법은 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 방법과 동일하게 측정하였다. 즉, 시료 200  $\mu$ L에 0.4 mM DPPH 시약 800  $\mu$ L을 첨가하여 암소에서 10분간 반응 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 제1배치 생산공정 대두(생물전환)산물은 대두16001 원물에서 53.67%의 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며, (생물전환)산물은 원물 대비 모두 라디칼 소거능이 낮아지는 경향을 보였다.

제2배치 생산공정 대두(생물전환)산물의 경우도 제1배치와 유사하게 대두16002 원물에서 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내었으며 (생물전환)산물은 모두 원물 대비 소거능이 낮아지는 걸로 나타났다. 제3배치 생산공정 대두(생물전환)산물의 경우는 대두16003 원물에서 23.74%의 라디칼 소거능을 나타내었으며 대두16003 T7에서 25.53%로 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내었다.

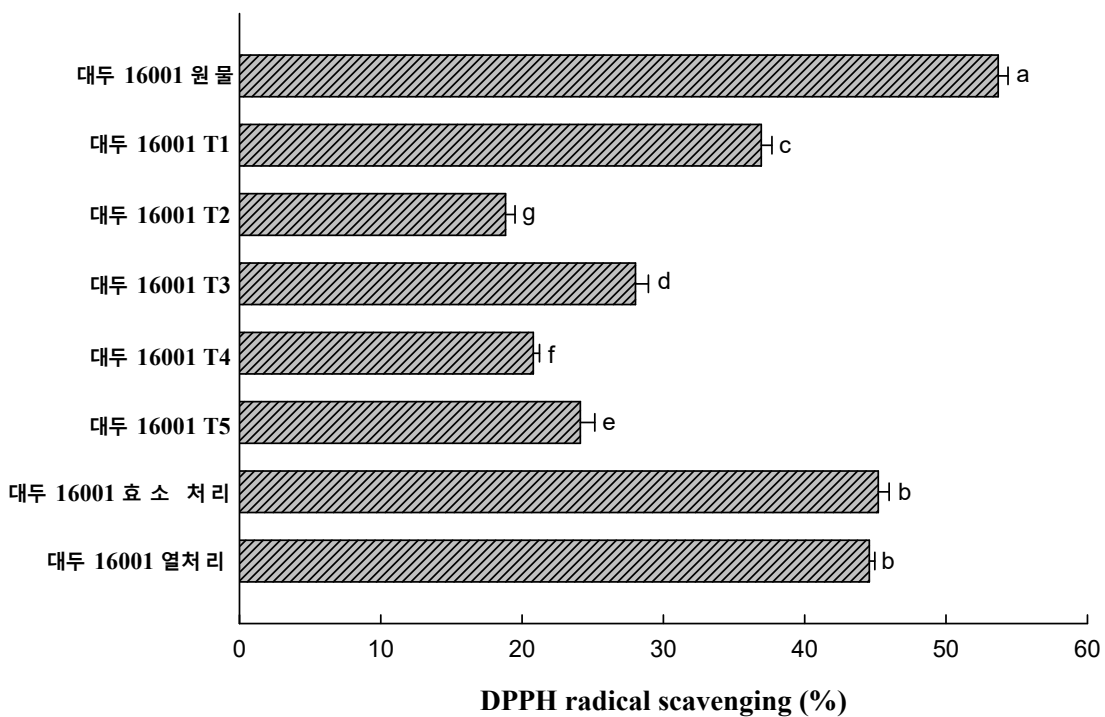


그림 359. 제1배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

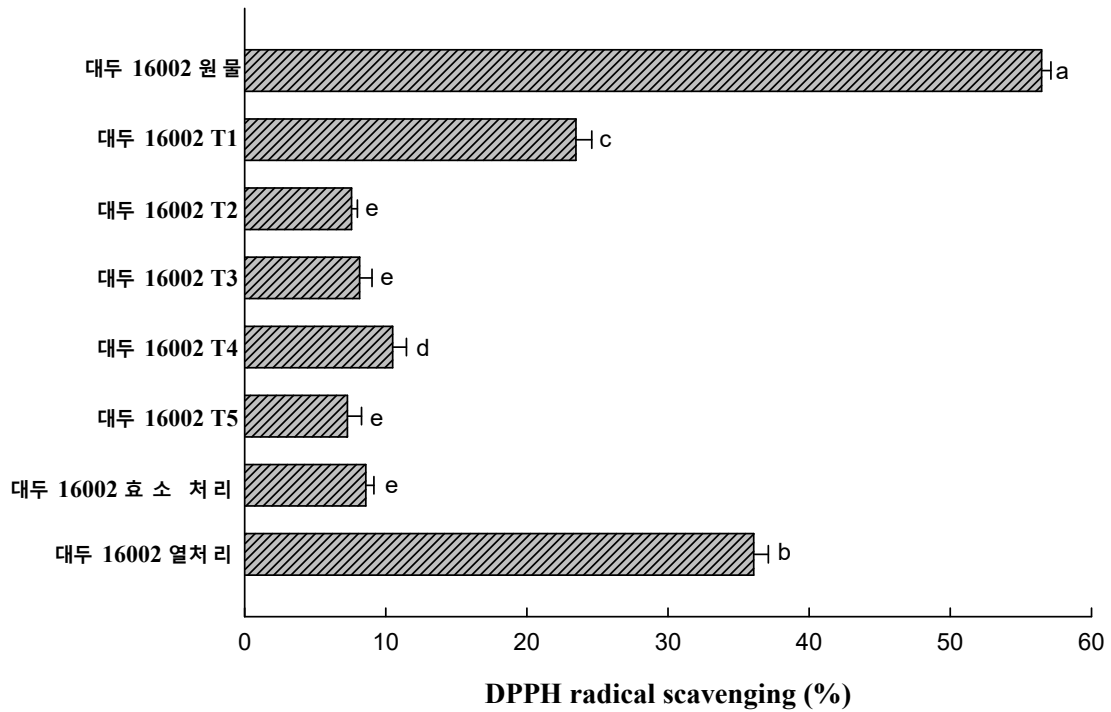


그림 360. 제2배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

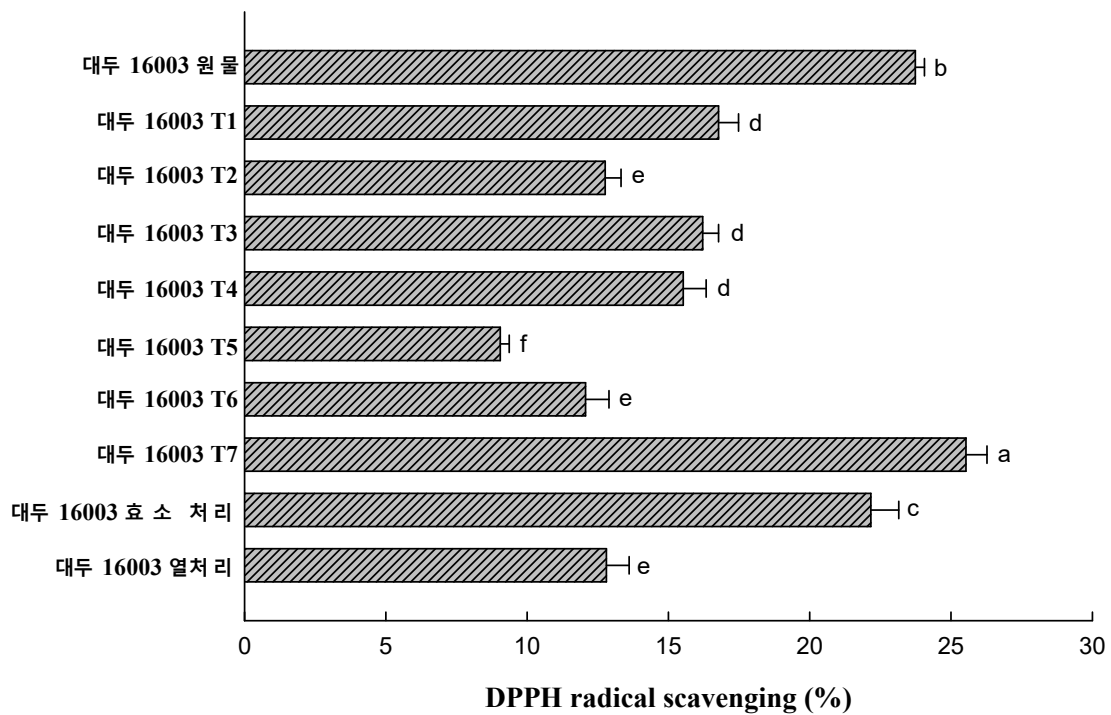


그림 361. 제3배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

#### 다. ORAC value 측정

생산공정별 대두(생물전환)산물의 ORAC value 측정은 미강(생물전환)산물의 ORAC value 측정 방법과 동일하게 측정하였다. 대두(생물전환)산물 추출물 25  $\mu$ L에 형광물질 40 nM fluorescein 150  $\mu$ L을 96 well black plate에 첨가 한 후 radical generator인 144 mM AAPH 25  $\mu$ L를 첨가하여 fluorescence microplate reader를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 전자여기 485 nm, 전자방출 535 nm 조건에서 3분 간격으로 90분 동안 형광의 감소율을 측정하였다.

측정 결과, 제1배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 경우, 대두16001 원물과 비교하였을 때, 대두 16001 T1을 제외한 모든 (생물전환)산물에서 ORAC value가 증가하는 것으로 나타났다. 가장 높은 ORAC value는 대두16001 열처리 소재로 873.28  $\mu$ M TE/g으로 원물 436.49  $\mu$ M TE/g에 비해 약 1.8배 이상 증가된 값을 나타내었다.

제2배치 생산공정별 대두(생물전환)산물은 대두16002 효소처리 소재에서 821.01  $\mu$ M TE/g으로 가장 높은 값을 나타내었으며 대체적으로 (생물전환)산물에서 원물 대비 ORAC value가 증가하는 것으로 나타났다.

제3배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 경우, 대두16003 열처리 소재에서 가장 높은 525.26  $\mu$ M TE/g 값을 나타내었다.

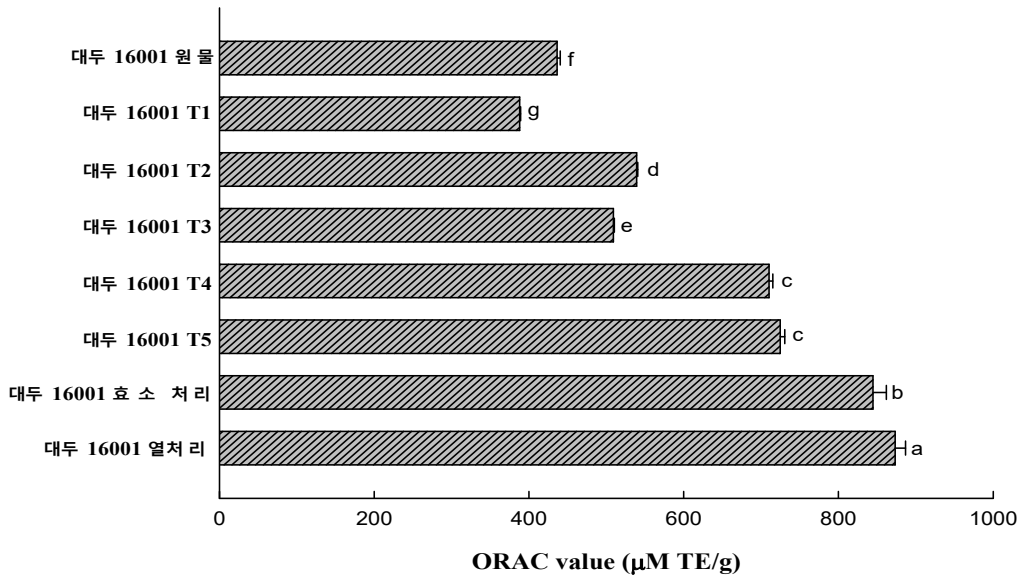


그림 362. 제1배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 ORAC value

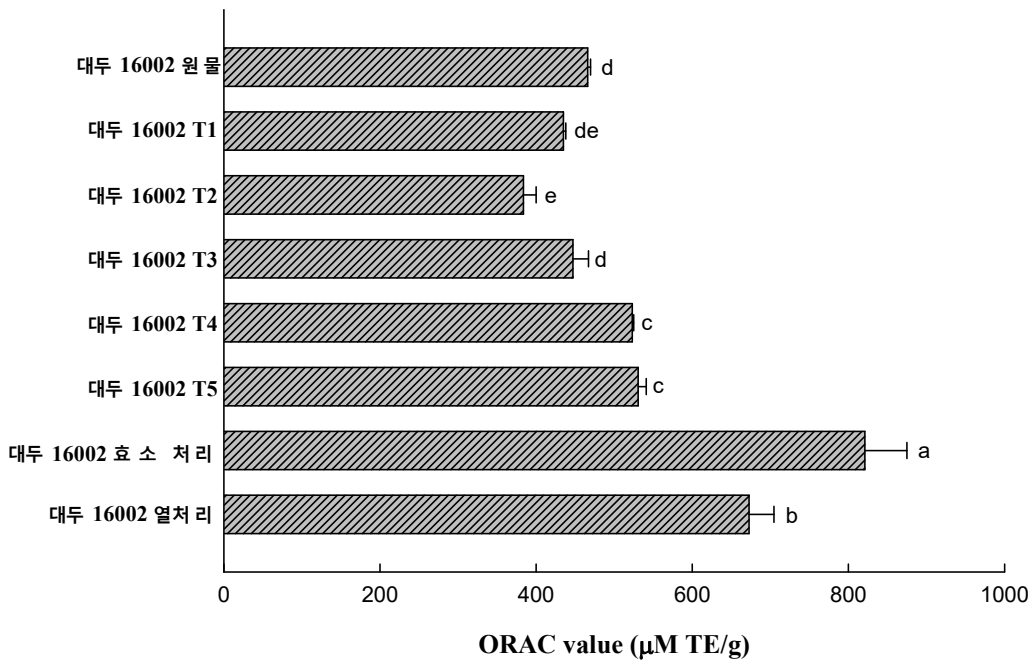


그림 363. 제2배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 ORAC value

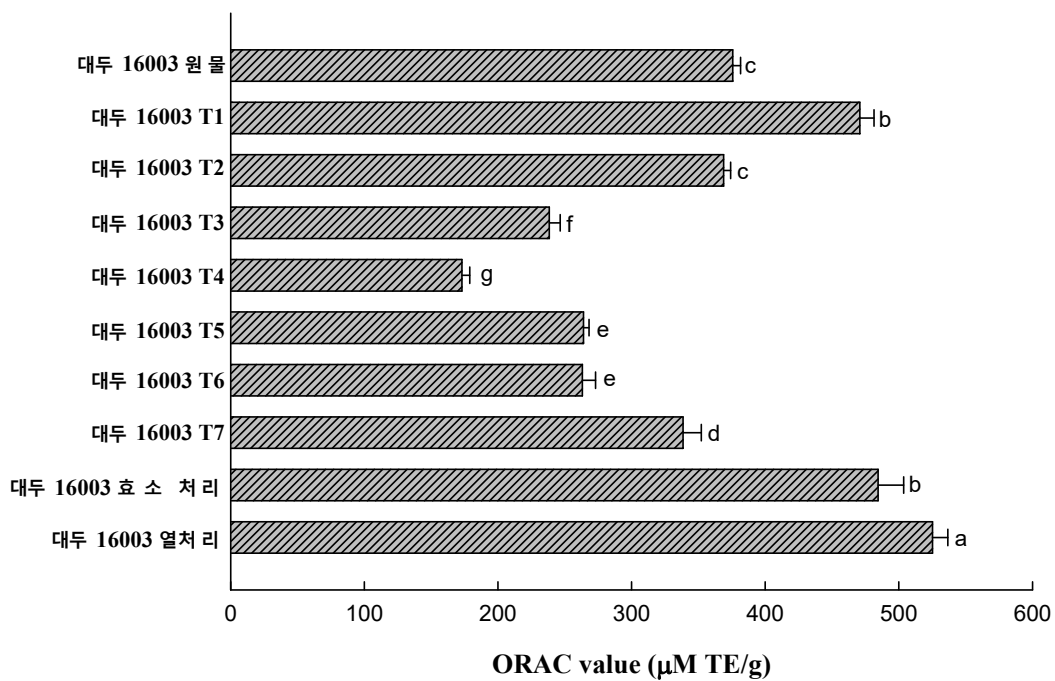


그림 364. 제3배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 ORAC value



## 라. Tyrosinase 저해활성 평가

생산공정별 대두(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성 평가는 미강(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성 평가 방법과 동일하게 진행하였다. 즉, 대두(생물전환)산물 추출물 40  $\mu$ L과 phosphate buffer 100  $\mu$ L, mushroom tyrosinase (2000unit/mL) 20  $\mu$ L를 96 well plate에 첨가 후 기질인 1.5 mM L-tyrosine 40  $\mu$ L를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

측정 결과, 제1배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 경우 모든 소재에서 통계 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 저해활성 범위는 26.27~29.05%로 나타났다.

제2배치 생산공정별 대두(생물전환)산물은 대두16002 원물에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, 대두16002 열처리 소재에서 4.11%로 가장 미비한 저해활성을 나타냈으며 제1배치와는 달리, 모든 (생물전환)산물에서 저해활성이 감소되는 것으로 나타났다.

제3배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 경우 대두16003 원물, T7, 열처리 소재가 가장 높은 저해 활성을 나타내었고 대두16003 T5 소재에서 2.85%의 가장 미비한 저해활성을 나타내었다.

대두(생물전환)산물의 경우 대체적으로 원물에 비해 tyrosinase 저해활성이 감소되는 경향을 나타내었다.

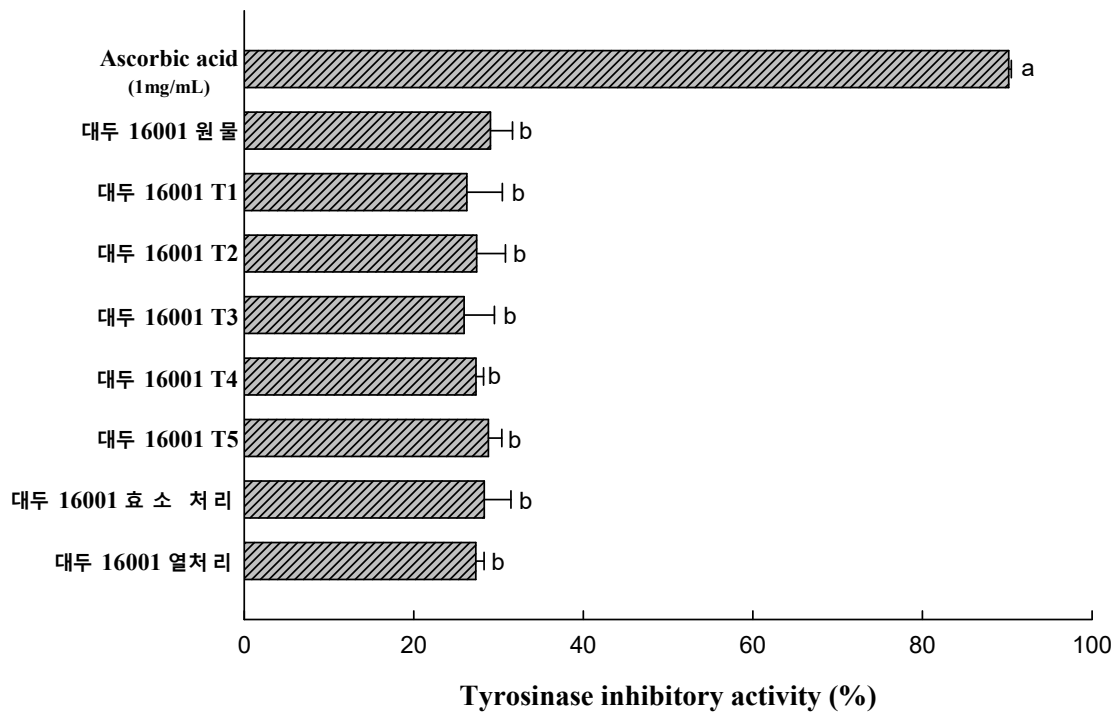


그림 365. 제1배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성

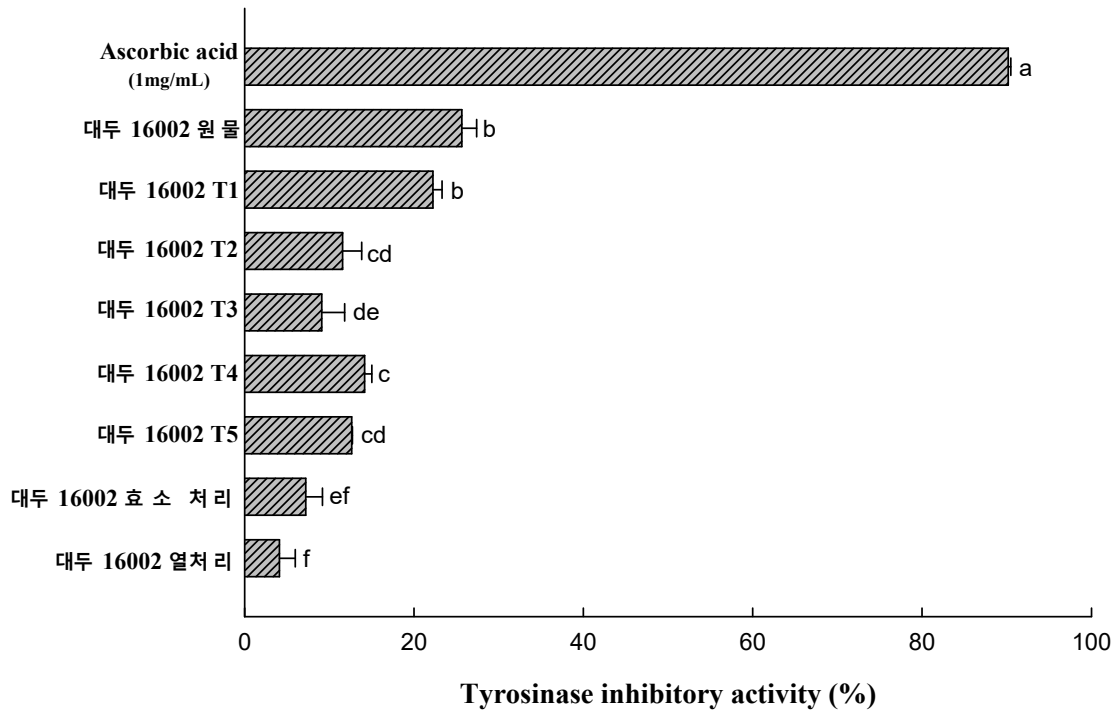


그림 366. 제2배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성

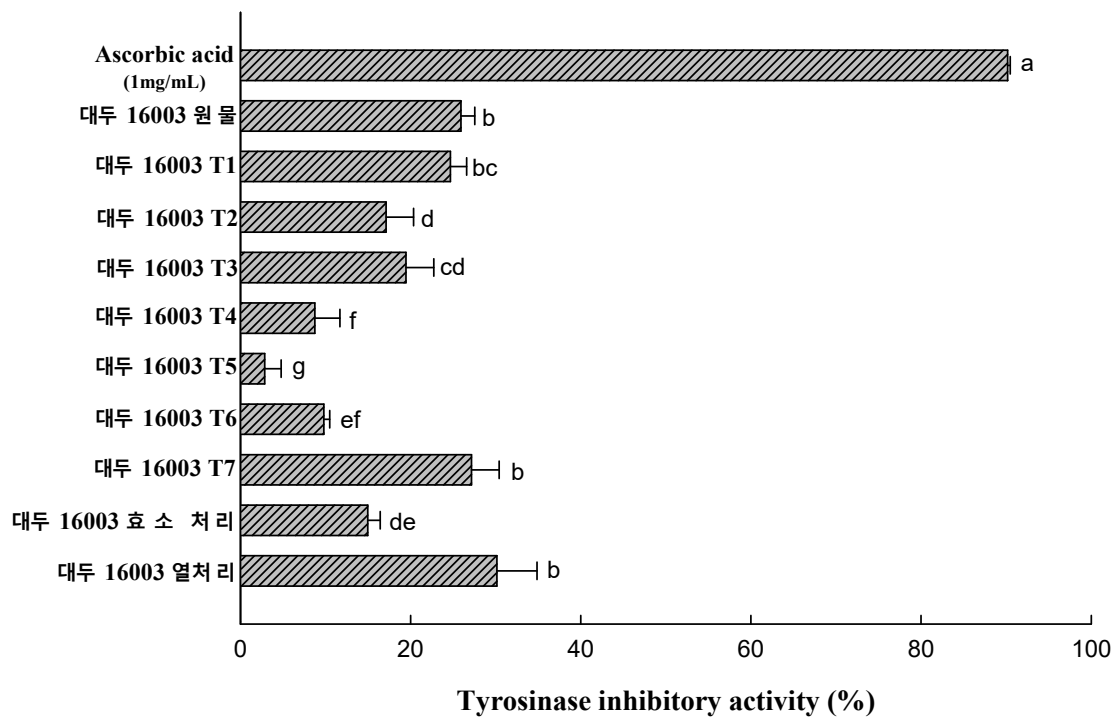


그림 367. 제3배치 생산공정별 대두(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성

5. 품종별 참깨 5종, 진을 탈지참깨의 원물 및 (생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 평가 및 상관관계 조사

가.  $\beta$ -glucan 함량 측정

(1) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

농촌진흥청에서 제공 받은 품종별 참깨 5종과 제1협동기관에서 제공받은 품종별 참깨 5종의 (생물전환)산물, 총 10종의  $\beta$ -glucan 함량을 분석한 결과는 아래 그림과 같으며, 5번 강안 원물에서  $0.19 \pm 0.01\%$ 로 가장 높은  $\beta$ -glucan 함량을 나타냈으며, 다음으로 1번 평안 (생물전환)산물에서  $0.16 \pm 0.01\%$ 로 높게 나타났다. 원물과 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 차이는 유의적으로 나타나지 않았다.

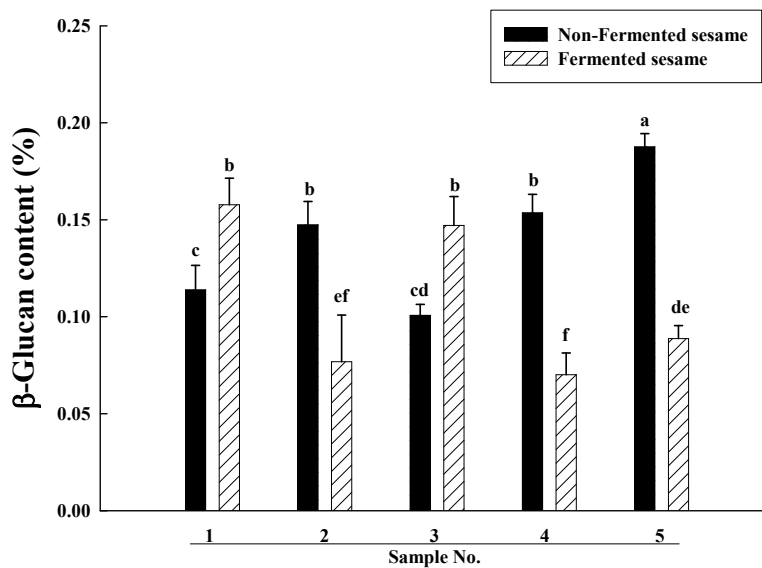


그림 368. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량

(2) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량 분석

농촌진흥청에서 제공 받은 참깨 3번 진을 품종을 제1협동기관에서 hexane과 ethanol을 이용하여 탈지한 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여  $\beta$ -glucan 함량을 분석하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 0.0545~0.1645% 사이의 함량을 나타내었다. Hexane과 ethanol 탈지 원물에서 0.1645 및 0.0961% 인데 반하여 (생물전환)산물의 경우 0.0800, 0.0545%로 원물보다 다소 낮은 함량을 나타내었다.

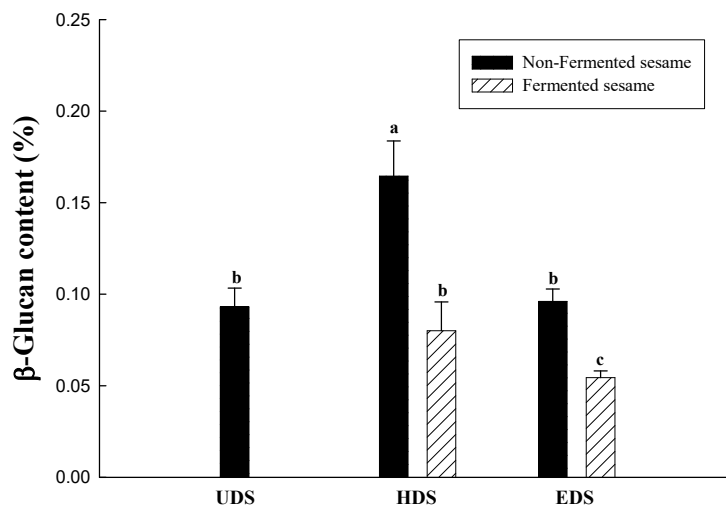


그림 369. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의  $\beta$ -glucan 함량

## 나. 항산화활성 측정

### (1) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정

농촌진흥청에서 제공받은 품종별 참깨 5종과 제1협동기관에서 제공받은 (생물전환)산물 총 10종의 참깨를 이용하여 총 페놀 함량을 분석한 결과, 2번 건백, 3번 진을 (생물전환)산물에서  $51.90 \pm 0.68$  및  $51.65 \pm 0.52$  mg GAE/g으로 가장 높은 총 페놀 함량을 나타내었다. 참깨박 원물 및 (생물전환)산물과 마찬가지로 생물전환시 총 페놀 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

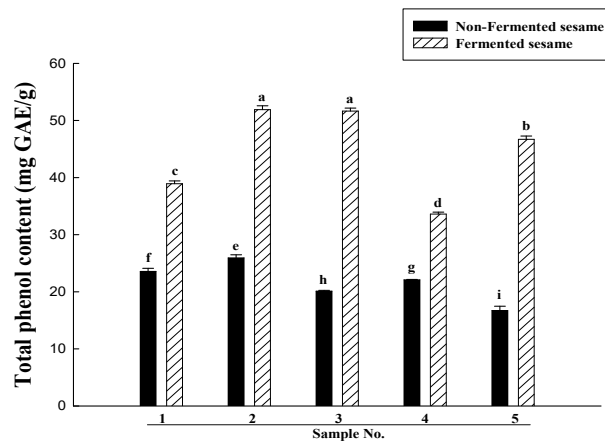


그림 370. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량

(2) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정

품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능은 미강과 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과, 3번 진을 품종 (생물전환)산물에서  $82.57 \pm 1.15\%$ 를 나타내었고 5번 강안 원물에서  $37.95 \pm 0.37\%$ 로 가장 낮은 소거능을 나타내었다. 이는 총 페놀 함량 측정과 유사한 결과로 생물전환시 DPPH radical 소거능이 증가하는 것으로 확인되었다.

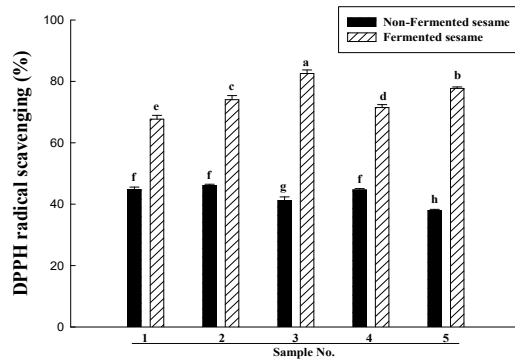


그림 371. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능

(3) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정

ORAC value는 미강과 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, 2번 건백 (생물전환)산물에서  $1,067.80 \pm 41.85 \mu\text{M TE/g}$ 으로 가장 높은 활성을 나타냈다. 4번 강흑 원물은  $172.34 \pm 6.31 \mu\text{M TE/g}$ 으로 가장 낮은 ORAC 지수를 보였다. 총 페놀 함량, DPPH radical 소거능의 결과와 마찬가지로 생물전환시 원물보다 높은 활성을 나타내었다.

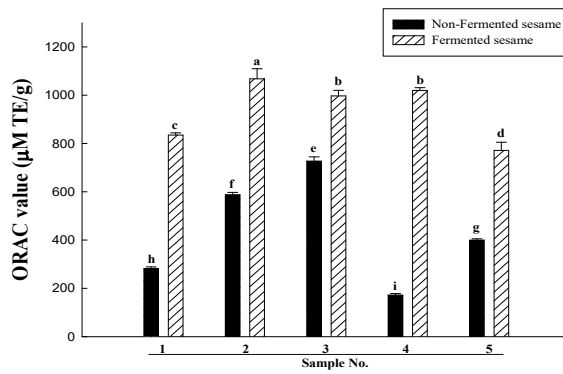


그림 372. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value

(4) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 미백활성(Tyrosinase 저해 활성) 측정

품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과는 아래 그림과 같다. 원물 참깨는 14.31~32.64%, 참깨 (생물전환)산물은 11.74~26.31%의 저해능을 나타내었으며, 특히 5번 강안 원물에서 32.64%로 유의적으로 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 그 다음으로 4번 강흑 원물과 2번 건백 (생물전환)산물에서 각각 27.07% 및 26.31%의 순으로 저해활성을 확인하였다.

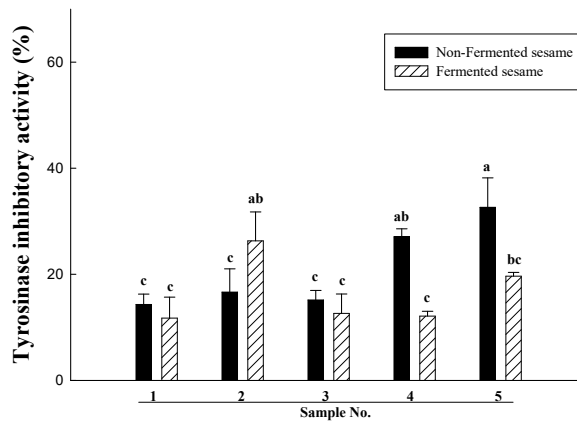


그림 373. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Tyrosinase 저해 활성



(5) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량 측정

농촌진흥청에서 제공 받은 참깨 3번 진을 품종을 제1협동기관에서 hexane과 ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여 미강과 동일한 방법으로 총 페놀 함량을 측정하였다. 그 결과, hexane 탈지 참깨 (생물전환)산물에서  $52.09 \pm 0.69$  mg GAE/g으로 가장 높게 나타났으며 탈지 참깨 모두 원물 보다 (생물전환)산물에서 높은 페놀 함량을 나타내었다.

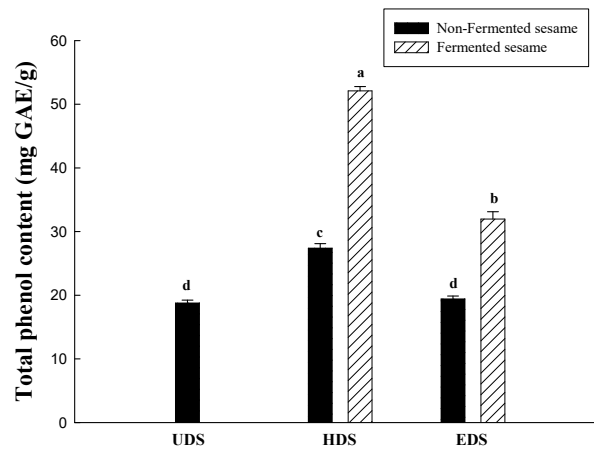


그림 374. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 총 페놀 함량

(6) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 미강과 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과, hexane, ethanol 탈지 참깨 (생물전환)산물에서  $68.12 \pm 0.72\%$ ,  $66.32\% \pm 1.09\%$ 로 가장 높게 나타났으며 총 페놀 함량 결과와 마찬가지로 원물보다 (생물전환)산물에서 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다.

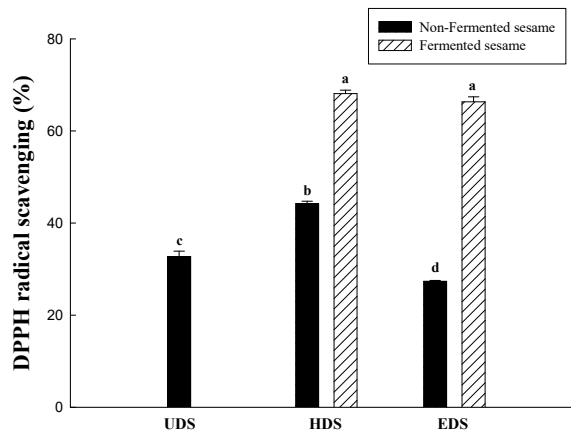


그림 375. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 DPPH radical 소거능

(7) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value 측정

ORAC value는 미강과 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과는 아래 그림과 같으며, ethanol 탈지 (생물전환) 산물에서  $705.45 \pm 30.25 \mu\text{M TE/g}$ 으로 가장 높게 나왔으며 hexane 탈지 (생물전환)산물에서  $601.11 \pm 17.57 \mu\text{M TE/g}$ 으로 두 번째로 높게 나타났다. 총 페놀 함량과 DPPH radical 소거능의 결과와 마찬가지로 (생물전환)산물이 원물보다 높은 함량을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

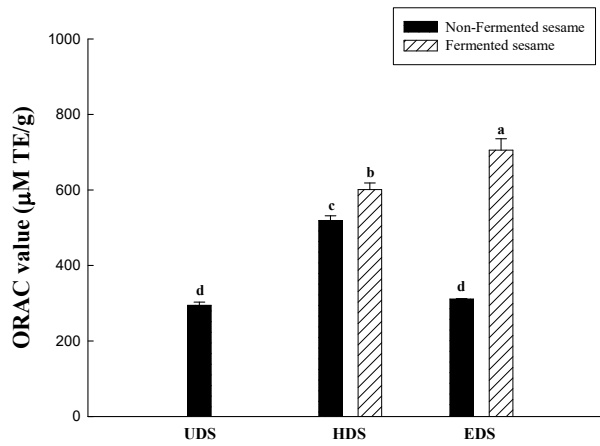


그림 376. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 ORAC value

(8) Lignan 지표물질의 미백활성(Tyrosinase 저해 활성) 측정

피부에 존재하는 melanin은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인으로 알려져 있으며, 표피세포의 melanocyte에서 tyrosinase를 enzyme으로 하여 tyrosine으로 생합성 되어 피부의 국소에 melanin이 과다하게 침착되어 주근깨, 검버섯 등의 원인이 된다. melanin 생합성 과정에 관여하는 tyrosinase는 페놀 화합물을 기질로 이용하는 효소이고 생체 내에서의 melanin 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)을 생성시키고 이를 다시 dopaquinone으로 산화되며 중간 대사산물을 거쳐 최종 멜라닌으로 합성된다. 농촌진흥청 및 제1 협동에서 제공받은 참깨박 원물 및 (생물전환)산물 총 5종의 sonication 추출물 40  $\mu$ L와 0.1 M phosphate buffer 100  $\mu$ L와 기질인 1.5 mM L-tyrosine 40  $\mu$ L를 96 well plate에 넣고 mushroom tyrosinase 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$Tyrosinase\ inhibitory(\%) = (1 - A_{sample}/A_{control}) \times 100$$

본 실험에 앞서, 참깨(박)의 지표물질인 sesamol, sesamin, sesamol인을 이용하여 tyrosinase 저해활성을 확인하였다. 그 결과, 양성대조군으로 쓰인 ascorbic acid 1 mg/mL과 sesamol 1 mg/mL에서 각각 90.87 $\pm$ 1.05%, 92.59 $\pm$ 1.11%로 높은 저해 활성이 나타났으며, sesamin은 8.47 $\pm$ 3.98%, sesamol인은 16.24 $\pm$ 3.15%로 비교적 낮은 저해 활성을 보였다.

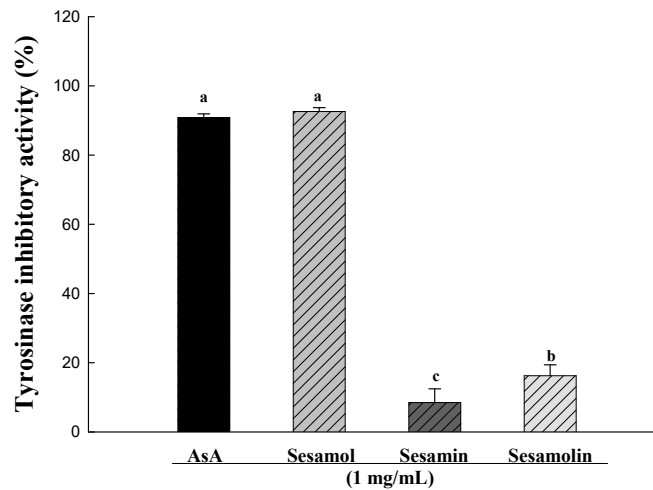


그림 377. Lignan standard Tyrosinase 저해 활성

(9) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 미백활성(Tyrosinase 저해 활성) 측정

제1협동기관에서 제공 받은 진을 품종 원물 및 hexane, ethanol 탈지 원물 및 (생물전환)산물을 이용하여 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, 진을 원물에서 8.19±3.01%로 매우 낮은 활성을 나타내었으며, ethanol 탈지 원물에서는 -2.00±4.18%로 나타났다. Lignan standard Tyrosinase 저해활성의 결과로 보았을 때 원물 및 탈지 참깨 중 sesamol이 검출되지 않았기 때문에 참깨 원물 및 탈지물에서의 tyrosinase 저해 활성이 미비한 것으로 판단된다.

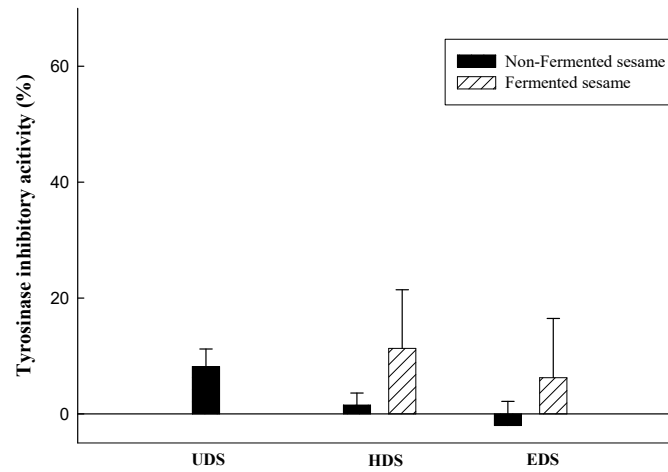


그림 378. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 Tyrosinase 저해 활성

**다. 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석**

(1) 품종별 참깨 5종의 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분 및 항산화활성간의 상관관계를 알아보기 위하여 상관계수 (correlation coefficient, R)의 제곱 값인 결정계수(determination coefficient R<sup>2</sup>) 값을 확인하였다(그림 152, 표 36). 총 페놀 함량과 DPPH radical 소거능 사이의 결정계수가 0.9108로 가장 높은 값을 나타냈다. DPPH radical 소거능과 ORAC value 사이의 결정계수는 0.6496으로 높은 상관관계를 나타내었고, Lignan과 β-glucan 사이의 결정계수는 0.0053으로 낮은 상관관계를 보였다.

표 163. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 결정계수(R<sup>2</sup>)

	TPC <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging	ORAC value	Lignan	β-Glucan
TPC	1				
DPPH radical scavenging	0.9108	1			
ORAC value	0.5958	0.6496	1		
Lignan	0.1638	0.0693	0.2204	1	
β-Glucan	0.1592	0.1924	0.2762	0.053	1

<sup>1)</sup>Total phenol contents

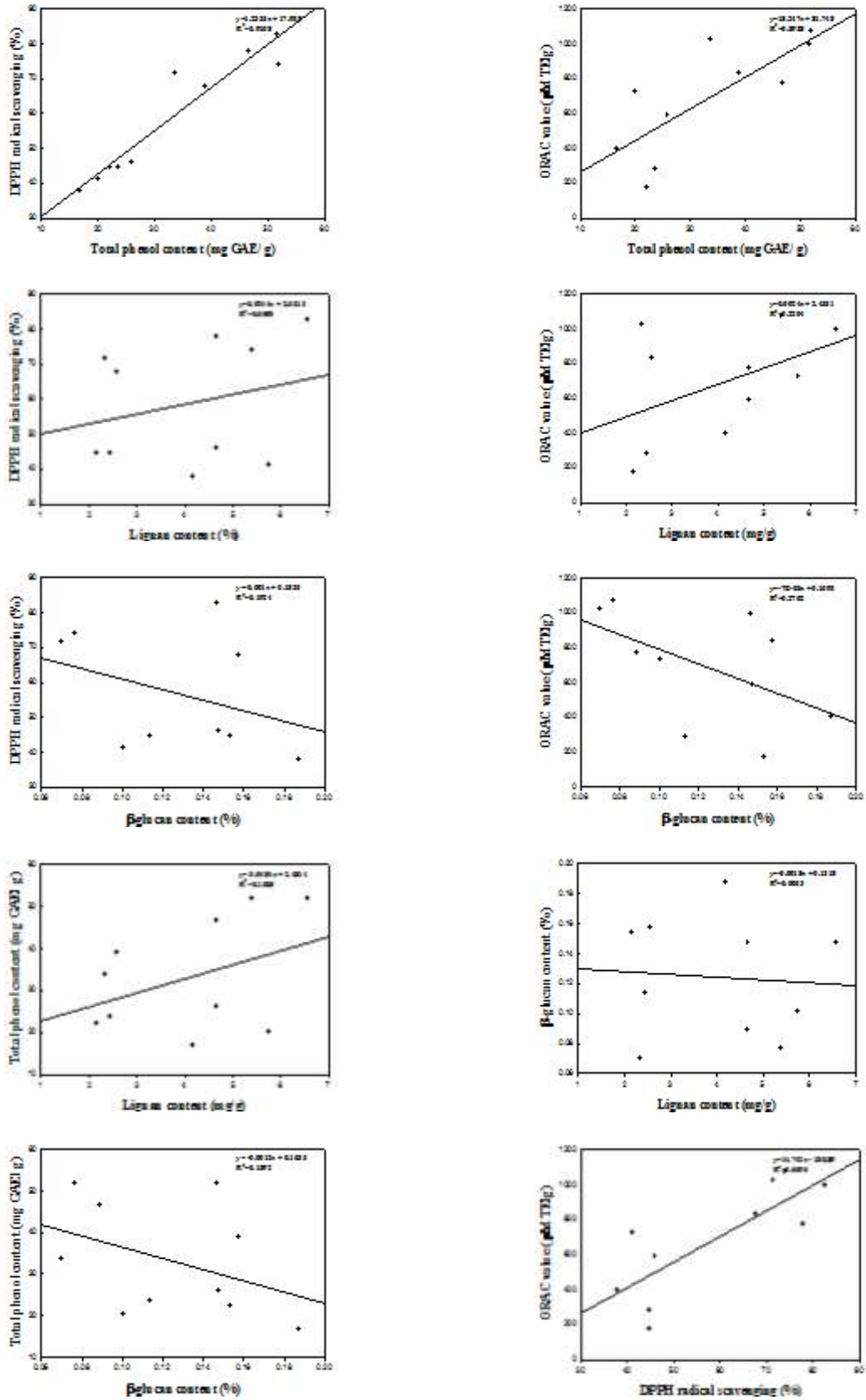


그림 379. 품종별 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 상관관계

(2) 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분과 항산화활성의 상관관계 분석

진을의 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 유효성분 및 항산화활성간의 상관관계를 알아보기 위하여 결정계수 (determination coefficient  $R^2$ ) 값을 확인하였다(그림 153, 표 37). 그 값은 0.0300~0.8859의 범위를 나타내었으며, 특히 DPPH radical 소거능과 ORAC value 사이에서 0.8859의 높은 상관관계를 나타내었다. 그 뒤로 총 페놀 함량과 DPPH radical 소거능에서 0.7438의 높은 결정계수 값을 확인하였다.

표 164. 진을 탈지참깨 원물 및 (생물전환)산물의 결정계수( $R^2$ )

	TPC <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging	ORAC value	Lignan	$\beta$ -Glucan
TPC	1				
DPPH radical scavenging	0.7438	1			
ORAC value	0.4963	0.8859	1		
Lignan	0.0300	0.0213	0.1354	1	
$\beta$ -Glucan	0.0687	0.1778	0.0764	0.1508	1

<sup>1)</sup>Total phenol contents



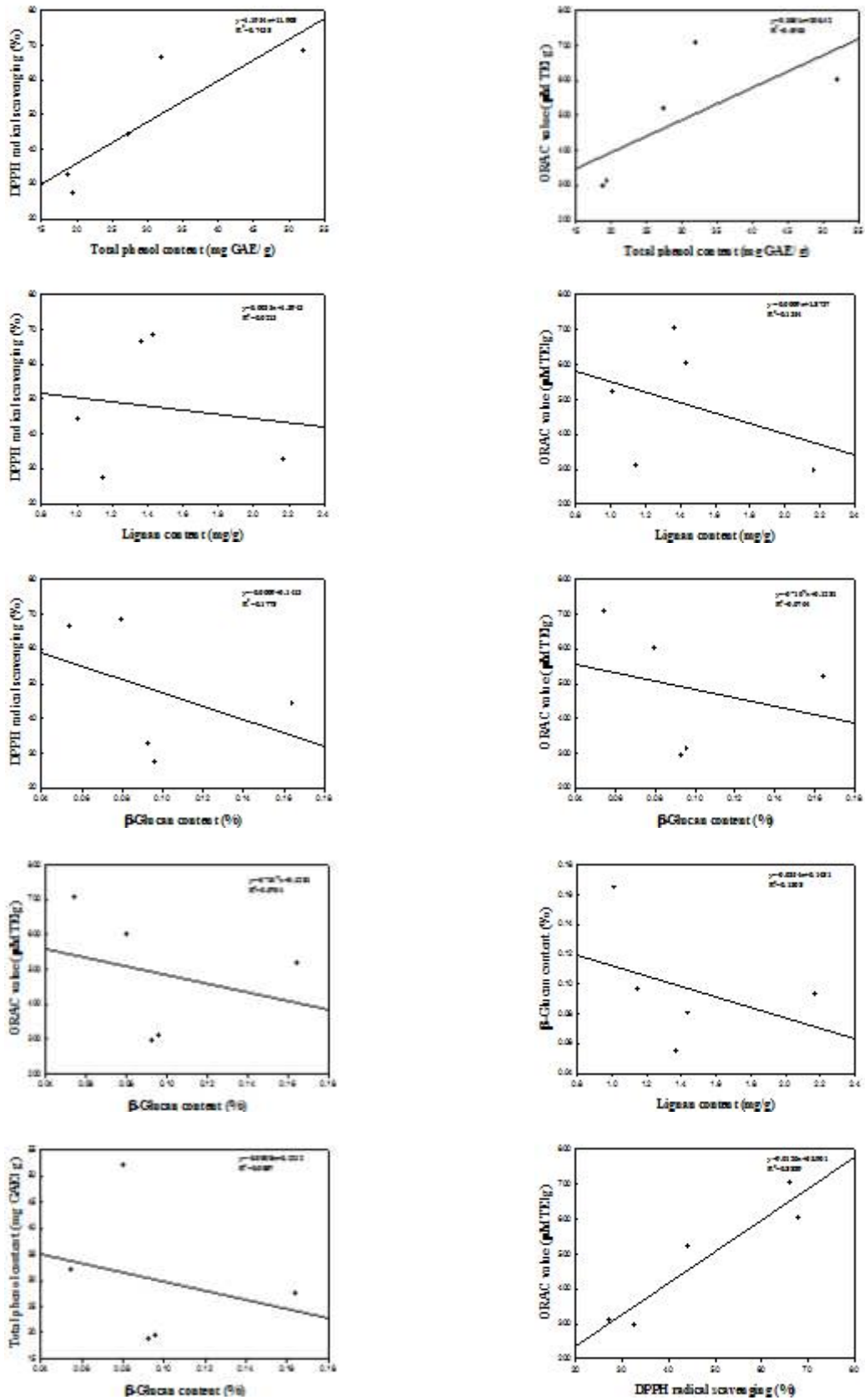


그림 380. 진을 탈지 참깨 원물 및 (생물전환)산물의 상관관계

## 6. 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 *in vitro* 항산화활성 및 tyrosinase 저해활성 평가

제1협동기관(주에스티알바이오텍)에서 제공받은 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 *in vitro* 활성 평가를 위한 추출은 각 2.5 g의 시료에 100% methanol을 이용하여 50 mL volumetric flask에 정용하여 1시간 sonicator를 이용하여 추출한 뒤, 원심분리 후 상층액을 filter 하여 실험에 사용하였다.

### 가. 총페놀함량

참깨(생물전환)산물의 총페놀함량은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 미강(생물전환)산물의 총페놀함량 측정 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

생산공정별 참깨(생물전환)산물의 총페놀함량 측정 결과, 제1배치 생산공정의 경우 참깨16001 원물에서 20.08 mg GAE/g의 함량을 나타내었고 T1 소재를 제외한 모든 참깨(생물전환)산물에서 총페놀함량이 증가하였다. 그 중 참깨16001 열처리 소재의 경우 54.34 mg GAE/g으로 원물 대비 약 2배 이상의 총페놀함량이 증가하는 것으로 나타났다.

제2배치 생산공정은 참깨16002 원물과 열처리 소재로 제1배치 생산공정과 유사하게 원물 대비 약 1.8배 이상의 총페놀함량이 증가하였다.

제3배치 생산공정의 경우 참깨16003 원물은 24.86 mg GAE/g으로 나타났으며 참깨16003 T3 소재까지 함량이 감소하다가 T5 소재부터 증가하기 시작하여 가장 높은 총페놀함량을 나타낸 효소처리 소재에서 148.53 mg GAE/g으로 원물 대비 약 6배 가량 총페놀함량이 증가하는 것으로 나타났다.

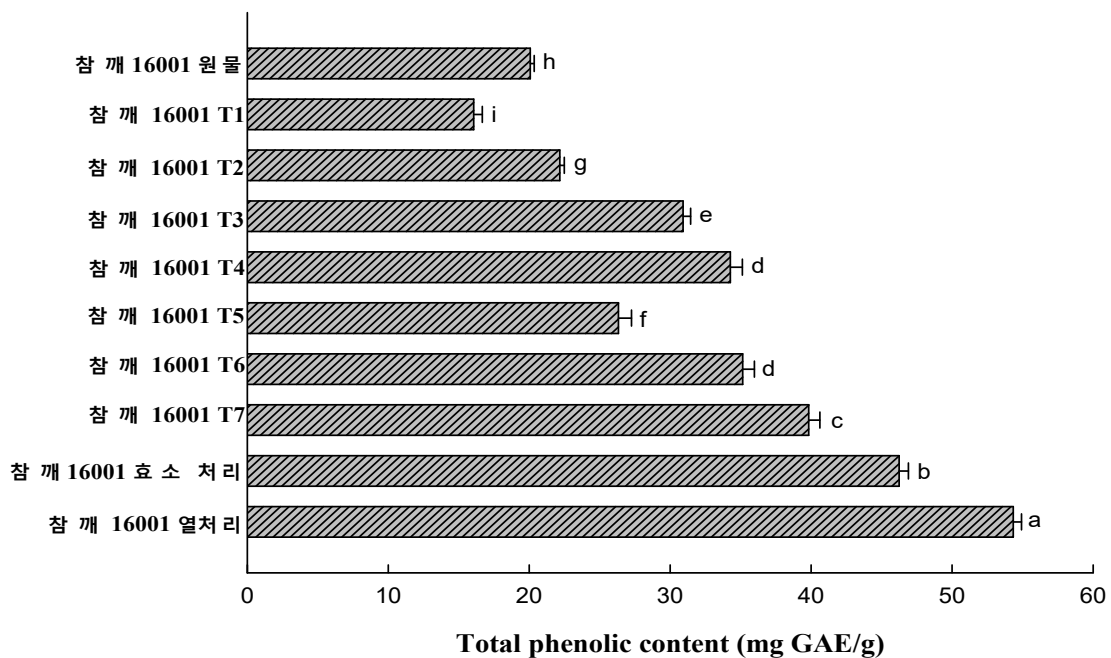


그림 381. 제1배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 총페놀함량

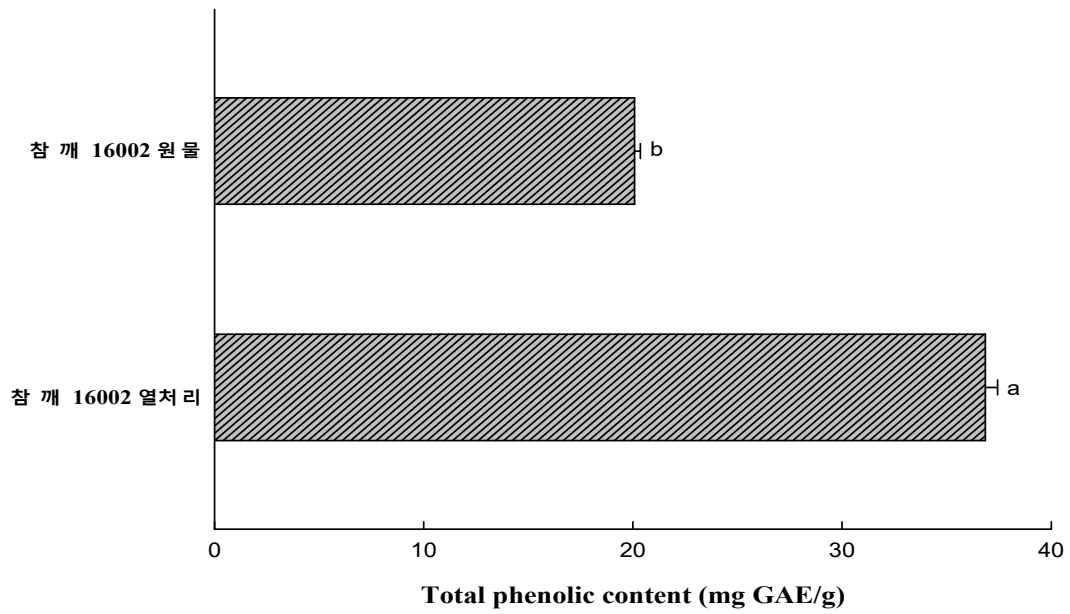


그림 382. 제2배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 총페놀함량

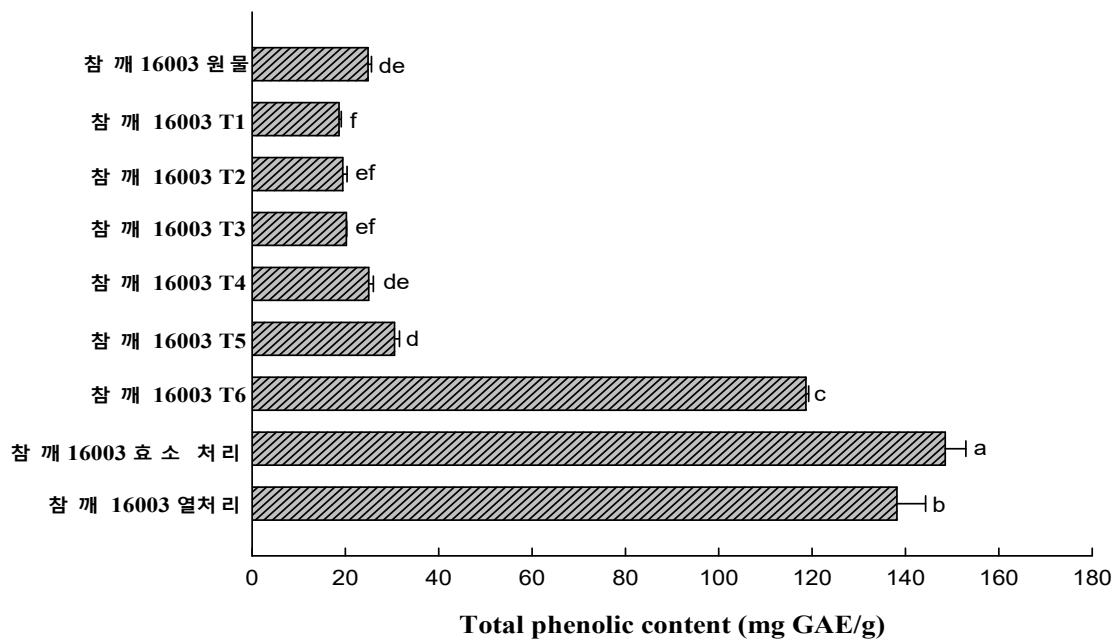


그림 383. 제3배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 총페놀함량

## 나. DPPH 라디칼 소거능 측정

참깨(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 방법은 미강(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 방법과 동일하게 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 제1배치 생산공정 참깨(생물전환)산물 소재의 참깨16001 원물에서 27.93%의 라디칼 소거능을 나타냈으며, 생물전환이 진행되며 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것으로 나타났으며, 가장 높은 소거능을 나타낸 참깨16001 열처리 소재에서 62.90%으로 원물 대비 2배 이상의 소거능이 증가하는 것으로 나타났다.

제2배치 생산공정의 경우 참깨16002 열처리 소재에서 51.33%로 원물 대비 약 2배 가량 증가하는 것으로 나타났다.

제3배치 생산공정도 총페놀함량 측정의 결과와 유사한 경향으로 참깨16003 T4 소재부터 소거능이 증가하여 T6, 효소처리, 열처리 소재에서 87.58~89.37%로 원물 대비 약 2배 이상의 소거능이 증가하는 것으로 나타났다.

제1, 2, 3배치 생산공정 참깨(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 앞선 총페놀함량의 결과와 유사하게 증가되거나 감소되는 경향을 나타냈다.

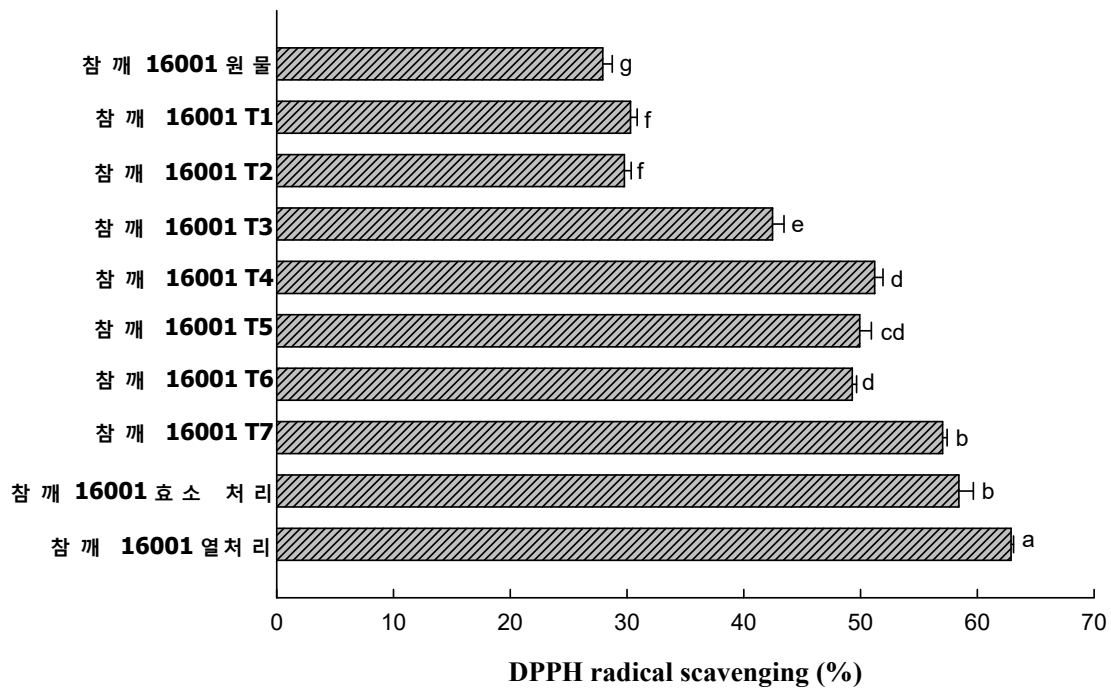


그림 384. 제1배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

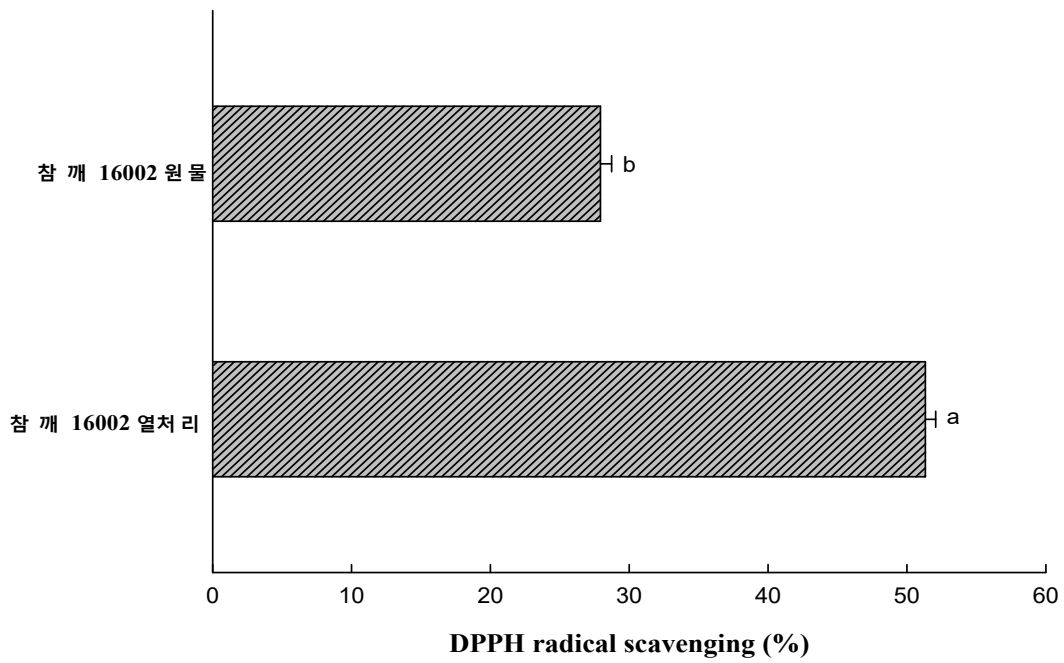


그림 385. 제2배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

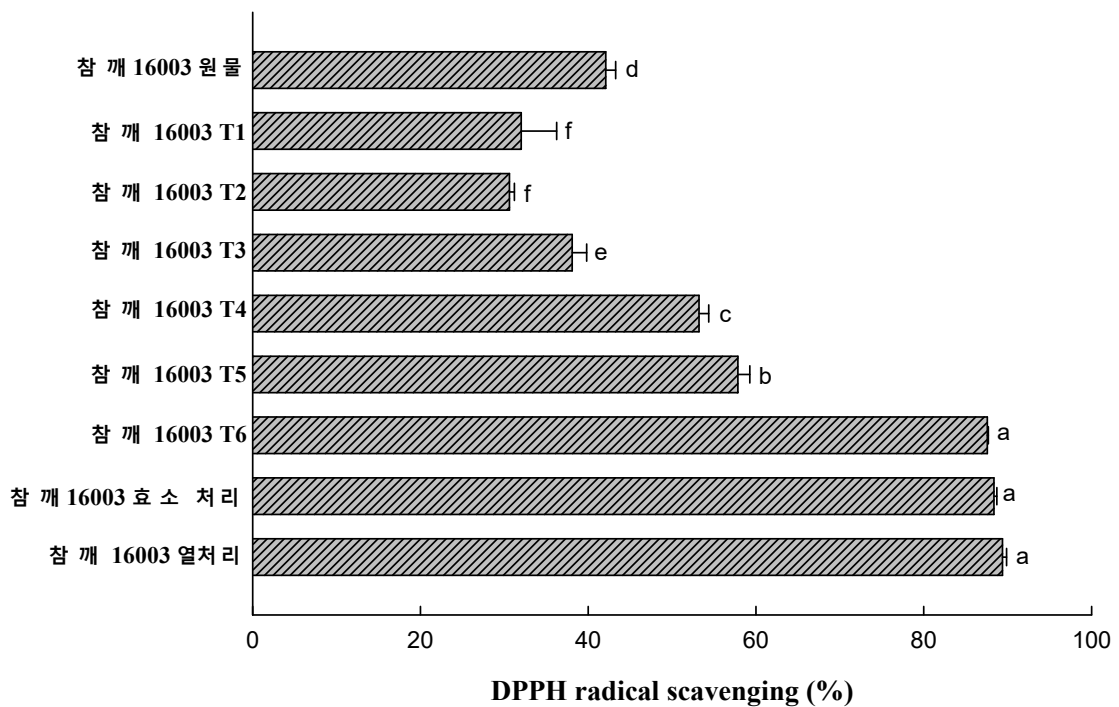


그림 386. 제3배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 DPPH 라디칼 소거능

### 다. ORAC value 측정

생산공정별 참깨(생물전환)산물의 ORAC value 측정은 미강(생물전환)산물의 ORAC value 측정 방법과 동일하게 측정하였다.

ORAC value 측정 결과, 제1배치 생산공정의 참깨16001 원물에서 254.17  $\mu\text{M TE/g}$ 으로 측정 되었으며 앞선 총페놀함량, DPPH 라디칼 소거능의 결과와 유사하게 생물전환이 진행되며 원물에 대비하여 ORAC value가 증가하는 경향을 나타내었다. 가장 높은 ORAC value를 보인 참깨16001 열처리 소재는 543.63  $\mu\text{M TE/g}$ 으로 나타나 원물 대비 2배 이상 증가되는 것을 확인하였다.

제2배치 생산공정의 경우 열처리 소재에서 403.46  $\mu\text{M TE/g}$ 으로 원물 대비 ORAC value의 증가가 확인 되었다.

제3배치 생산공정의 경우 참깨16003 원물에서 345.39  $\mu\text{M TE/g}$ 의 ORAC value를 나타냈으며, T4 소재 부터 ORAC value의 값이 증가하며 효소처리, 열처리 소재에서 각각 1134.01, 1113.90  $\mu\text{M TE/g}$ 의 값을 나타내었다.

생산공정별 참깨(생물전환)산물은 앞선 총페놀함량, DPPH 라디칼 소거능, ORAC value의 결과 값이 서로 유사하게 나타났으며, 미강, 대두(생물전환)산물에 비해 비교적 높은 항산화 활성을 나타냄을 확인하였다.

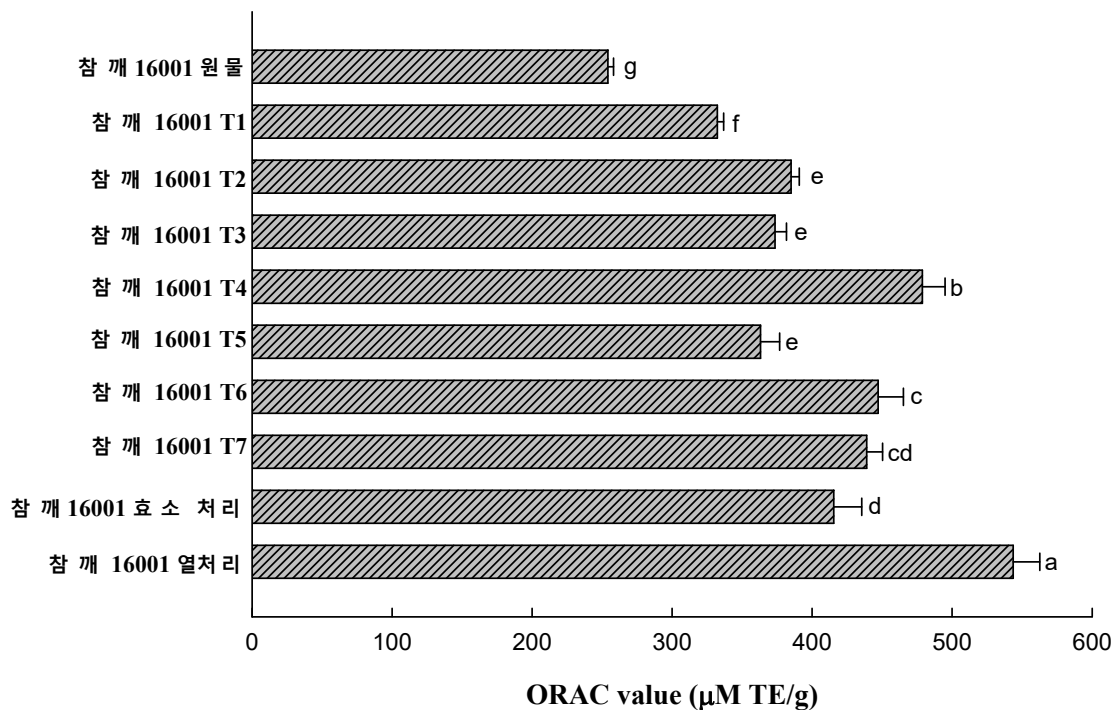


그림 387. 제1배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 ORAC value

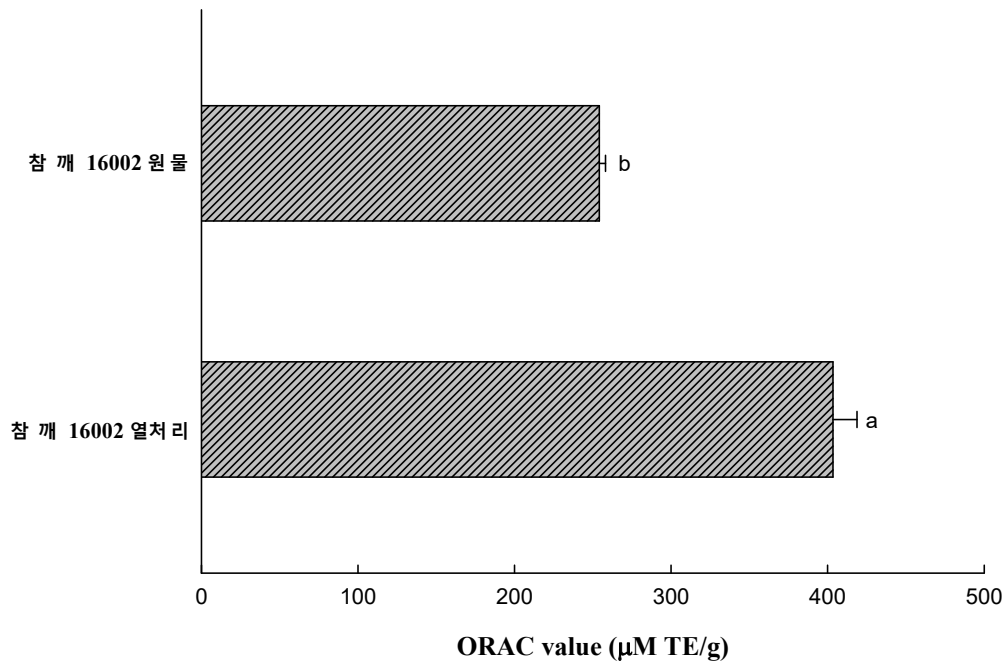


그림 388. 제2배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 ORAC value

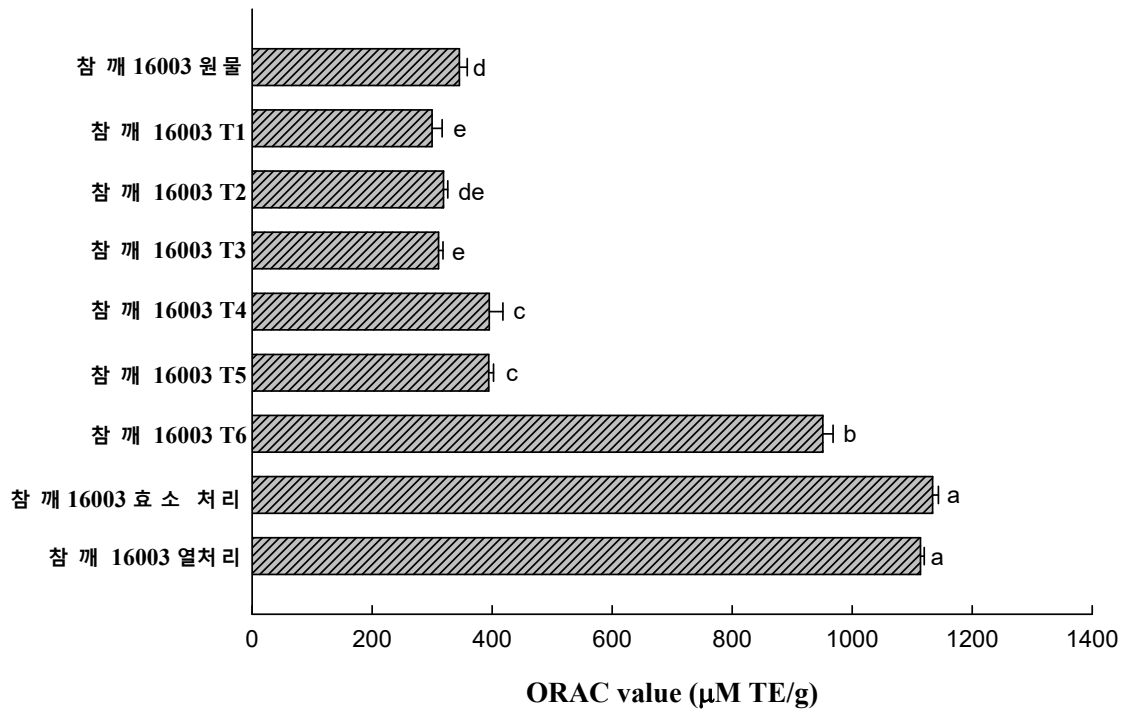


그림 389. 제3배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 ORAC value

## 라. Tyrosinase 저해활성 평가

생산공정별 참깨(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성 평가는 미강(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성 평가 방법과 동일하게 진행하였다.

Tyrosinase 저해활성 평가 결과, 양성대조군 ascorbic acid에서 90% 이상의 우수한 저해활성을 나타냈다. 하지만 제1, 2, 3배치 모든 생산공정 참깨(생물전환)산물에서 높은 저해활성은 나타나지 않았다. 피부 미백 효과는 참깨의 lignan 화합물 중 sesamol에 의해 큰 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 참깨는 고온에서 roasting시 sesamol이 분해되어 sesamol로 전환된다고 알려져 있다. 따라서 본 연구의 roasting 과정을 하지 않은 참깨에는 sesamol이 포함되어 있지 않아, 높은 tyrosinase 저해활성을 확인할 수 없었다.

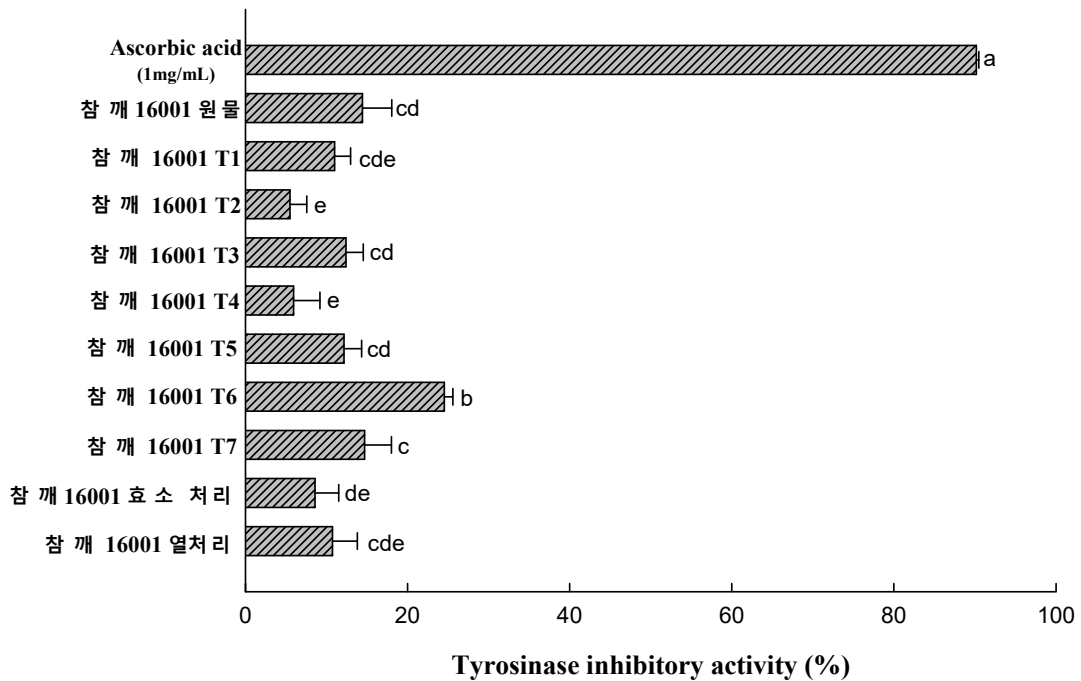


그림 390. 제1배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성



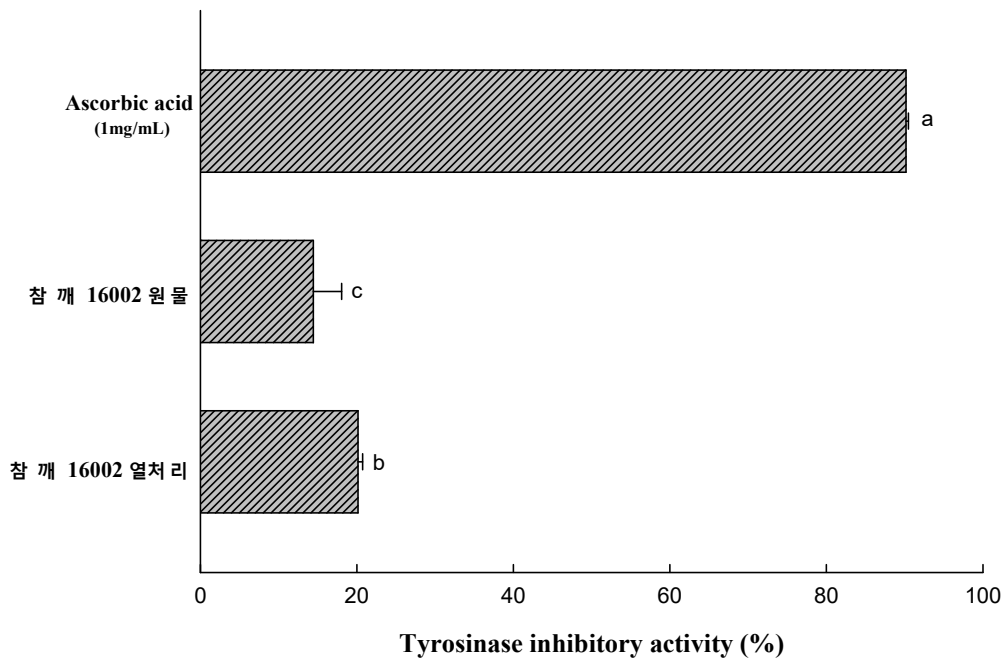


그림 391. 제2배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성

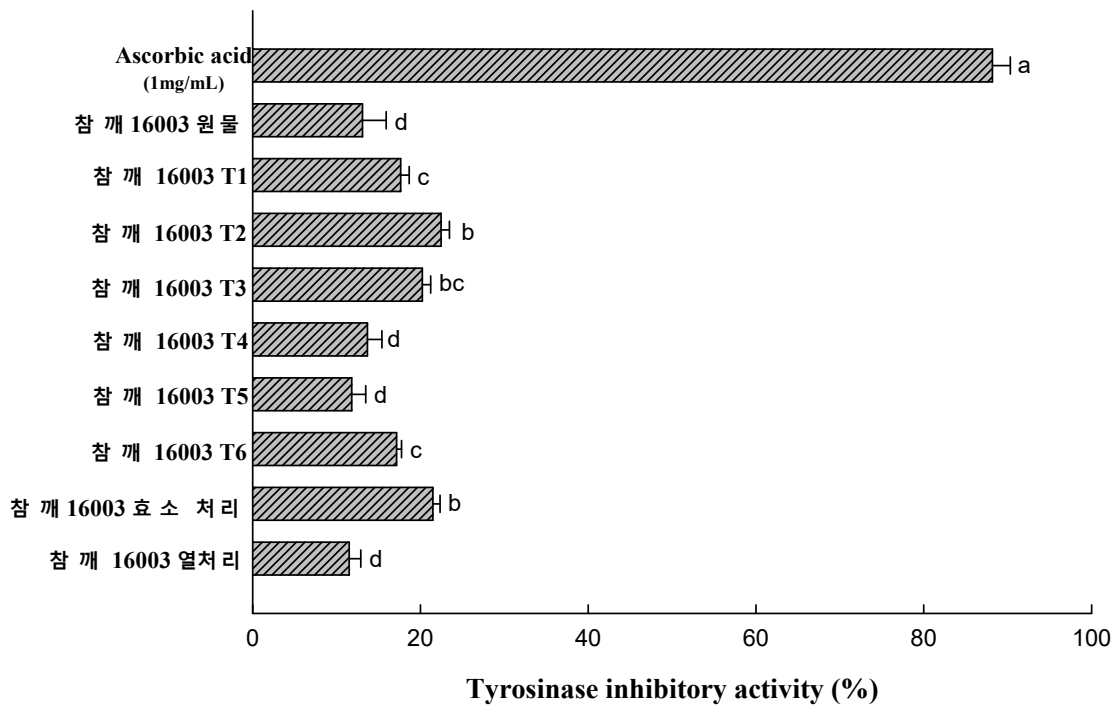



그림 392. 제3배치 생산공정별 참깨(생물전환)산물의 tyrosinase 저해활성

## 22절. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청을 위한 미강(생물전환)산물의 안전성 검증 실시 (외부시험의뢰, GLP)

### 1. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

- 시험동물 : Sprague-Dawley 랫드
- 투여량 : 4,000 mg/kg 경구 투여
- 결과 : ① 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.  
② 체중측정결과, 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.  
③ 실험종료 시 부검결과, 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다.


이상의 결과로 보아, 본 시험조건에서 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose,ALD)은 4,000 mg/kg 이상으로 판단된다.

<p><b>최종보고서</b></p> <p>Sprague-Dawley 랫드를 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 단회 경구투여 독성시험</p> <p>(시험번호 : GT15-00337)</p>  <p>2016 년 05 월</p> <p>the way to trust <b>KGL</b> 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> <p>바이오통합연구소</p>	<p style="text-align: center;"><u>Sprague-Dawley 랫드를 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 단회 경구투여 독성시험</u></p> <p>1. 요약</p> <p>본 시험은 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]를 Sprague-Dawley(SD) 계통 암수 랫드에 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 독성증상과 개략적인 치사량을 조사하기 위하여 실시하였다. 부형제 대조군과 4,000 mg/kg 용량의 단일 시험물질 투여군으로 설정하여 부형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.</p> <p>1) 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 2) 체중측정결과, 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다. 3) 실험종료 시 부검결과, 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다.</p> <p>이상의 결과로 보아, 설치류인 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]를 단회 경구투여한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았고, 시험물질 투여와 관련된 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건에서 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 4,000 mg/kg 이상으로 판단된다.</p> <p style="text-align: center;">the way to trust <b>KGL</b> 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> <p style="text-align: center;">GT15-00337 <span style="float: right;">- 1/25 -</span></p>
---	--

## 2. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험

- 시험동물 : Sprague-Dawley 랫드
- 투여경로 : 임상예정 경로인 경구로 존데를 이용하여 강제 경구투여
- 투여횟수 및 시각 : 1 회/일, 7 일/주, 13 주간, 오전 중에 투여
- 투여량 : 1,000(저용량군), 2,000(중용량군), 4,000(고용량군) mg/kg 경구투여
- 결과 : ① 실험기간 동안 사망동물 및 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.  
 ② 체중 및 사료섭취량 측정결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.  
 ③ 안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 실험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.  
 ④ 요검사, 요침사 및 요량 검사결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.  
 ⑤ 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사 및 혈액생화학적 검사결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.  
 ⑥ 절대 및 상대장기중량 측정결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.  
 ⑦ 부검 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질과 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.




이상의 결과로 보아, 본 시험 조건에서 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 설치류 SD 랫드에 13 주간 반복 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 무독성량은 4,000 mg/kg으로 판단되며 표적장기는 관찰되지 않았다.

<p><b>최종보고서</b></p> <p>Sprague-Dawley 랫드를 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 13 주 반복 경구투여 독성시험</p> <p>(시험번호 : GT15-00338)</p>  <p>2016년 12월</p> <p><i>the way to trust</i> <b>KCL</b> 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>	<p style="text-align: center;"><u>Sprague-Dawley 랫드를 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 13 주 반복 경구투여 독성시험</u></p> <p>1. 요약</p> <p>본 시험은 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 13 주 반복 경구투여에 의한 독성증상과 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) 및 표적장기(target organ)를 조사하기 위하여 실시되었다. Sprague-Dawley(SD) 개종 암-수 랫드를 이용하여 1,000(저용량군), 2,000(중용량군) 및 4,000(고용량군) mg/kg의 용량으로 시험군을 설정하고 부형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검 시 육안소견 및 병리조직학적 소견을 관찰하였다.</p> <p>1) 실험기간 동안 사망동물 및 시험물질과 관련된 독성학적 일반증상은 관찰되지 않았다.</p> <p>2) 체중 및 사료섭취량 측정결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>3) 안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.</p> <p>4) 요검사, 요침사 및 요량 검사결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>5) 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사 및 혈액생화학적 검사결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>6) 절대 및 상대장기중량 측정결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>7) 부검 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질과 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.</p> <p>이상의 결과로 보아, 본 시험 조건에서 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 설치류인 SD 랫드에 13 주간 반복 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 무독성량은 4,000 mg/kg으로 판단되며 표적장기는 관찰되지 않았다.</p> <p style="text-align: center;"><i>the way to trust</i> <b>KCL</b> 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> <p style="text-align: center;">GT15-00338 - 1/138 -</p>
--	--

### 3. Beagle dog을 이용한 단회용량증가 (single dose-escalation) 경구투여 독성시험

- 시험동물 : Beagle dog
- 투여량 : 1차 투여 250, 500 mg/kg, 2차 투여 1,000, 2,000 mg/kg 경구 투여
- 결과 : ① 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.  
 ② 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.  
 ③ 체중변화 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다.  
 ④ 부검소견 관찰결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건하에서 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 Beagle dog에 단회 경구투여 하였을 때, 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았고, 또한 사망동물은 관찰되지 않았으므로 본 시험 조건하에서 개략의 치사량(ALD, Approximate lethal dose)은 암수 모두 2,000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단된다.

<p><b>최종보고서</b></p> <p>Beagle dog을 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 단회용량증가(single dose-escalation) 경구투여 독성시험 (시험번호 : GT15-00339)</p>  <p>2016년 12월</p> <p>the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이오융합연구소</p>	<p style="text-align: center;"><u>Beagle dog을 이용한 단회용량증가(표고균사)발효분말의 단회 경구투여 독성시험</u></p> <p><b>1. 요약</b></p> <p>본 시험은 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 비실적용인 Beagle dog에 단회용량증가(single dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 수행하였다. 시험물질인 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 250 및 500 mg/kg으로 투여하는 시험물질 투여군을 설정하여 군당 암수 각 1 마리에 단회 경구투여(1 차)한 후, 4 일간의 회복기간을 둔 후, 1,000 및 2,000 mg/kg으로 재투여(2 차)하였다. 2 차 투여 후 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견은 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.</li> <li>2. 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.</li> <li>3. 체중변화 관찰결과, 시험물질 투여와 관련된 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다.</li> <li>4. 부검소견 관찰결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.</li> </ol> <p>이상의 결과로 보아, 본 시험 조건하에서 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 Beagle dog에 단회 경구투여하였을 때, 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았고, 또한 사망동물은 관찰되지 않았으므로 본 시험 조건하에서 개략의 치사량(ALD, Approximate lethal dose)은 암수 모두 2,000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단된다.</p> <hr/> <p style="text-align: center;">the way to trust  한국건설생활환경시험연구원 GT15-00339 Korea Conformity Laboratories - 1/20 -</p>
---	--

#### 4. 미생물복귀돌연변이시험

- 시험균주 : *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 (히스티딘 요구성 균주)  
*Escherichia coli* WP2uvrA (트립토판 요구성 균주)
- 시험농도 : S9 mix (-)의 경우 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate  
S9 mix (+)의 경우 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate
- 결 과 : 대사활성계의 적용에 관계없이 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가가 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 통해 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]는 본 시험조건 하에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

<p>최 종 보 고 서</p> <p>RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 미생물복귀돌연변이시험 (시험번호 : GT15-00340)</p>  <p>2016 년 05 월</p> <p>the way to trust <b>KCL</b> 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories 바이 오 융 합 연 구 소</p>	<p style="text-align: right; font-size: small;">RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 미생물복귀돌연변이시험</p> <p>1. 요약</p> <p>시험물질 (명칭 : RB-F[미강(표고균사)발효분말])의 미생물에 대한 돌연변이 유발성 여부를 확인하기 위해 히스티딘 요구성 균주인 <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성 균주인 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA를 사용하여 직접법과 대사활성법으로 복귀돌연변이시험을 실시하였다.</p> <p>시험은 preincubation 방법을 이용하였다. 시험물질을 멸균증류수에 균일하게 분산 하여 최고농도의 시험물질을 조제한 후 단계 희석하여 처리하였으며, 농도결정시험을 바탕으로 직접법 및 대사활성법에서 다음의 농도를 적용하였다.</p> <p style="margin-left: 40px;">S9 mix (-)의 경우 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate</p> <p style="margin-left: 40px;">S9 mix (+)의 경우 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate</p> <p>본시험에서 시험물질을 각 농도별로 처리한 결과, 대사활성계의 적용에 관계없이 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가가 관찰되지 않았다.</p> <p>이상의 결과를 통해 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]은 본 시험조건 하에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.</p> <hr/> <p style="font-size: x-small;">GT15-00340      the way to trust <b>KCL</b> 한국건설생활환경시험연구원      Korea Conformity Laboratories      1/24</p>
--	--

## 5. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

- 시험균주 : Chinese hamster Ovary fibroblast 유래의 난소유아세포 (CHO-k1 cell)
- 시험농도 : 직접 법 (-S9 mix, 24시간 연속처리군) : 185.19, 555.56, 1666.67  $\mu\text{g/ml}$   
 직접 법 (-S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복군) : 185.19, 555.56, 1666.67  $\mu\text{g/ml}$   
 대사활성법 (+S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복군) : 185.19, 555.56, 1666.67  $\mu\text{g/ml}$
- 결과 : ① 본시험 결과 대사활성화를 적용시키지 않은 직접법의 24 시간 연속처리군 및 6 시간 처리 18 시간 회복군의 경우 이상중기상의 빈도가 음성대조군과 비교하여 모든처리농도에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.  
 ② 대사활성법 (6 시간 처리 18 시간 회복군)의 경우, 모든 처리군에 있어서 이상중기상의 빈도는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.  
 ③ 직접법 및 대사활성법에 있어서 배수성과 핵내 배화의 빈도 또한 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.  
 ④ 이상의 결과를 종합할 때, RB-F[미강(표고균사)발효분말]은 본 시험 조건하에서 CHO-k1 세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

### 최종보고서

포유류 배양세포를 이용한  
RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 염색체이상시험

(시험번호 : GT15-00341)



the way to trust **KCL** 한국건설생활환경시험연구원  
Korea Conformity Laboratories  
바이오융합연구소

포유류 배양세포를 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 염색체이상시험

#### 1. 요약문

RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 유전독성을 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 난소유아세포 (CHO-k1 cell)를 이용하여 대사활성효소계 (S9)를 적용한 대사활성화법 (+S9 mix) 및 적용하지 않은 직접법 (-S9 mix)에서 염색체이상시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 분산시킨 후 희석하여 조제하였다.

본시험의 시험물질 처리농도를 결정하기 위해 세포증식억제시험을 수행한 다음 본 시험을 위한 시험물질 최고처리농도를 결정하여 공비 3의 3 단계 농도군으로 다음과 같이 정하였다.

직접법 (-S9 mix, 24 시간 연속처리군) : 185.19, 555.56, 1666.67  $\mu\text{g/ml}$   
 직접법 (-S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 185.19, 555.56, 1666.67  $\mu\text{g/ml}$   
 대사활성법 (+S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 185.19, 555.56, 1666.67  $\mu\text{g/ml}$

본시험 결과 대사활성화를 적용시키지 않은 직접법의 24 시간 연속처리군 및 6 시간 처리 18 시간 회복군의 경우 이상중기상의 빈도가 음성대조군과 비교하여 모든 처리농도에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.

대사활성법 (6 시간 처리 18 시간 회복군)의 경우, 모든 처리군에 있어서 이상중기상의 빈도는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.

직접법 및 대사활성법에 있어서 배수성과 핵내 배화의 빈도 또한 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합할 때, RB-F[미강(표고균사)발효분말]은 본 시험 조건하에서 CHO-k1 세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

## 6. ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

- 시험동물 : ICR 마우스 골수세포
- 투여농도 : 4000 mg/kg bw/day, 2000 mg/kg bw/day, 1000 mg/kg bw/day의 용량으로 2일 동안 2회 경구투여
- 결과 : □ 개체 당 약 4000 개의 PCE를 대상으로 MNPCE의 수를 계수한 결과 모든 시험물질 투여군 (4000 mg/kg bw/day, 2000 mg/kg bw/day, 1000 mg/kg bw/day)에서 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편, 양성대조군의 소핵유발빈도는 용매대조군과 비교 시 현저한 증가가 관찰되었다 ( $p < 0.01$ ).
- 세포독성의 지표인 500 개의 적혈구 중 PCE/(PCE+NCE) 비율은 모든 시험물질 투여군에서 용매대조군과 비교 시 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다.
- RB-F[미강(표고균사)발효분말]는 마우스 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

### 최종보고서(안)

ICR 마우스 골수세포를 이용한  
RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 소핵시험

(시험번호 : GT15-00342)



the way to trust **KCL** 한국건설생활환경시험연구원  
Korea Conformity Laboratories  
바이오 융합 연구소

ICR 마우스 골수세포를 이용한 RB-F[미강(표고균사)발효분말]의 소핵시험

#### 1. 요약

시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]에 대한 발암성 유발 유·무 판단의 기초 자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

약 8주령의 수컷 마우스에 시험물질 RB-F[미강(표고균사)발효분말]을 4000 mg/kg bw/day, 2000 mg/kg bw/day, 1000 mg/kg bw/day의 용량으로 2 일 동안 2 회 경구 투여하였고, 투여 후 18~24 시간에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도와 세포독성을 평가하였다. 본 시험에서 적용된 용량범위 내에서 개체 당 약 4000 개의 PCE를 대상으로 MNPCE의 수를 계수한 결과 모든 시험물질 투여군 (4000 mg/kg bw/day, 2000 mg/kg bw/day, 1000 mg/kg bw/day)에서 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편, 양성대조군의 소핵유발빈도는 용매대조군과 비교 시 현저한 증가가 관찰되었다 ( $p < 0.01$ ).

세포독성의 지표인 500 개의 적혈구 중 PCE/(PCE+NCE) 비율은 모든 시험물질 투여군에서 용매대조군과 비교 시 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다.

이상의 결과로 본 시험 조건하에서 RB-F[미강(표고균사)발효분말]는 마우스 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

GT15-00342

the way to trust **KCL** 한국건설생활환경시험연구원  
Korea Conformity Laboratories

-1/27-

## 23절. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청을 위한 미강(생물전환)산물의 시제품 생산

### 1. 미강(생물전환)산물의 인체적용시험용 시제품 생산

#### 가. 2ton 규모의 생물반응기에서 원료 생산

미강(생물전환)산물의 인체적용시험용 시제품 제작에 필요한 원료는 앞서 확립된 2ton 규모 발효조에서 생산된 원료를 사용하였다.

동결건조 후 분말화한 미강(생물전환)산물의 최종 원료에 대한 면역활성 역가를 측정된 결과 면역활성 역가인, MEC<sub>100</sub>은 1/2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이하로 확인되어, 생물전환공정 이후 나머지 생산단계에서 문제점 없이 생산이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

2ton 규모의 발효조에서 생산된 미강(생물전환)산물 최종 원료의 면역활성에 이상이 없음을 확인하여 이를 인체적용시험용 시제품 제작에 사용하였다.

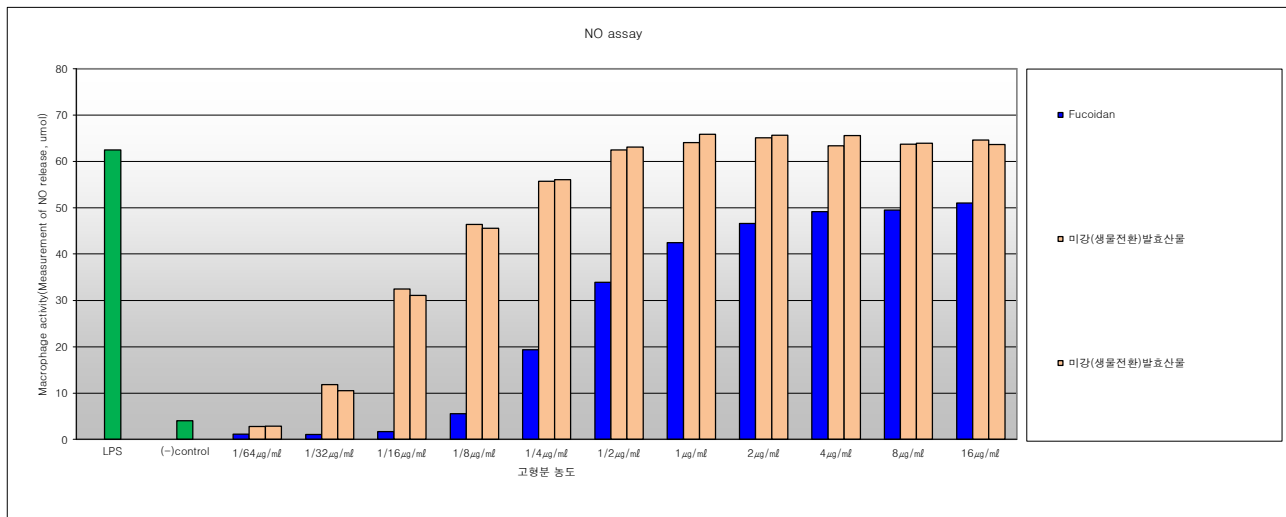


그림 393. 2ton 규모의 발효조에서 생산된 인체적용시험용 원료의 대식세포 활성화능 평가



나. 인체적용시험용 원료 QC 및 제공



강원도 춘천시 소양강로 56  
 바이오벤처프라자 3-8호  
 Tel. 033-258-6325 Fax. 033-258-6333

시험 성적서

결 재	담 당	경 토	승 인
	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

제품유형 : 기타가공식품 (국유가공품) / 인체적용시험용 원료

품 명	제 조 일 자	Batch No.
미강(생물전환)산물	2016.06.23	RB-16001

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고
1	성 상	미색의 분말로 고유의 색택 및 향미를 가져야 하며, 이취가 없어야 함.	적 합	
2	이 물	검출되지 않아야 함.	불검출	
3	수 분 함 량	5% 이하	적 합	
4	입 도	No.40(425 $\mu$ m) 98% 통과	적 합	
5	대 장 균 균	유당 배지법	음 성	
		대장균군 건조발효배지법	음 성	
6	일 반 미 생 물 수	규격 외 참고항목	적 합	
7	알 코 홀 함 량	0.8g 이상	적 합	
8	용 해 도	물에 대한 용해도 22% 이상	적 합	
9	대식세포 활성화능	LPS 대비 80% 이상	적 합	NO Release법 또는 Lysosomal Enzyme assay 법
10	지 표 성 분	감마오리자놀( $\gamma$ -Oryzanol)	확 인	
판 정		* 상기 성적서는 계약 제8조 (품질보증 및 관리)에 의거한 "첨부 2.원료검사표준서"에 근거함.		
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합				

(주)에스티알바이오텍



**다. 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 생산**

한국CNS팜에서 미강(생물전환)산물의 시험식품 및 대조식품의 생산을 진행 하였다.

(1) 시험식품

① 주성분명 : 미강(표고균사)발효분말 (RB-F)

② 성상 및 제형

: 연한갈색의 분말로 고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없다.  
하드캡슐(0호)

③ 함량

: 400mg/하드캡슐 (미강(표고균사)발효물로서 300mg/하드캡슐)  
미강(표고균사)발효물 75.0%

④ 보관방법

: 개봉 후에 습기가 적고 직사광선을 받지 않는 서늘한 곳에 보관하십시오.

⑤ 보관용기

: 폴리에틸렌

⑥ 유통기한

: 제조일로부터 2년

⑦ 용법 및 용량

: 1일 2회, 1회 3캡슐을 물과 함께 섭취, 미강(표고균사)발효물로서 1,800mg/day 아침, 저녁으로 하루 중 동일한 시간대에 섭취, 또는 하루 중 동일한 시간대에 섭취

⑧ 주의사항 : 임산부, 수유부는 섭취 전 전문가와 상담이 필요합니다.

⑨ 원재료

: 미강으로 만들어진 발효배지에 표고버섯 균주를 배양하여 발효된 발효산물을 처리

⑩ 원재료 및 배합비율 : 1캡슐 중 배합비율

원료명	배합비율(%)	함량(mg)	사용목적
미강(표고균사)발효물	75.0%	300.0mg	-
유당	3.0%	12.0mg	
텍스트린	20.0%	80.0mg	
스테아린산마그네슘	1.0%	4.0mg	윤활제
이산화규소	1.0%	4.0mg	완활제
		400mg	

(2) 대조식품

① 주성분명 : 결정셀룰로오스

② 성상 및 제형

: 연한갈색의 분말로 고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없다.

하드캡슐(0호)

③ 함량

: 400mg/하드캡슐

④ 보관방법

: 개봉 후에 습기가 적고 직사광선을 받지 않는 서늘한 곳에 보관하십시오.

⑤ 보관용기

: 폴리에틸렌

⑥ 유통기한

: 제조일로부터 2년

⑦ 용법 및 용량

: 1일 2회, 1회 3캡슐을 물과 함께 섭취

아침, 저녁으로 하루 중 동일한 시간대에 섭취

또는 하루 중 동일한 시간대에 섭취

⑧ 주의사항 : 임산부, 수유부는 섭취 전 전문가와 상담이 필요합니다.

⑨ 원재료

:

⑩ 원재료 및 배합비율 : 1캡슐 중 배합비율

원료명	배합비율(%)	함량(mg)	사용목적	내용표기
결정셀룰로오스	95.8%	383.2mg	-	
카카오색소	0.3%	1.2mg	색소	
카라멜색소	0.5%	2.0mg	색소	
치자황색소(NK 300P)	0.6%	2.4mg	색소	
스테아린산마그네슘	1.8%	7.2mg	유효제	
이산화규소	1.0%	4.0mg	유효제	
		400mg		

라. 인체적용시험용 제품 QC



강원도 춘천시 소양강로 56  
 바이오벤처프라자 3-8호  
 Tel. 033-258-6325 Fax. 033-258-6333

시험성적서

결 재	담 당	검 토	승 인
	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

제품유형 : 기타가공식품 (곡류가공품) / 인체적용시험용 시험식품

품 명	제 조 일 자	Batch No.
STR_RB-F	2017.1.17	STR_RB-F_17001

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고
1	성 상	미색의 분말로 고유의 색택 및 향미를 가져야 하며, 이취가 없어야 함.	적 합	
2	이 물	검출되지 않아야 함.	불검출	
3	수 분 함 량	5% 이하	적 합	
4	입 도	No.40(425 $\mu$ m) 98% 통과	적 합	
5	대 장 균 균	유당 배지법	음 성	
		대장균균 건조필름배지법	음 성	
6	일 반 미 생 물 수	규격 외 참고항목	적 합	
7	알 코 올 함 전 물	0.8g 이상	적 합	
8	용 해 도	물에 대한 용해도 22% 이상	적 합	
9	대식세포 활성화능	LPS 대비 80% 이상	적 합	NO Release법 또는 Lysosomal Enzyme assay 법
10	지 표 성 분	감마오리자놀( $\gamma$ -Oryzanol)	확 언	
판 정		* 상기 성적서는 계약 제8조 (품질보증 및 관리)에 의거한 "첨부 2.원료검사표준서"에 근거함.		
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합				

(주)에스티알바이오텍



그림 394 인체적용시험용 시험식품의 시험성적서

## 2. 미강(생물전환)산물의 품질유지기한설정 실험

: 2차년도에 시작하여, 3차년도에 완료되는 연구

### 가. 미강(생물전환)산물의 품질유지기한설정 실험

상기 개발된 미강(생물전환)산물 소재(원료)의 품질유지기한 설정을 위하여 아래 표의 조건에서 6개월 간 보관하면서 가속시험을 실시하였다. 4주 간격으로 샘플링을 하여 분석을 통해 품질유지기한을 예측하고자 하였다. 품질유지기한 산출을 위한 품질지표 및 시험방법은 아래 표와 같이 수행하였다. 품질유지기한 설정을 위한 각 품질지표의 품질한계는 아래 표와 같이 설정하였다.

표 166. 품질유지기한 조사를 위한 가속시험 조건 설정

구분	실험조건	구분	실험조건
저장온도	30℃, 35℃, 45℃	저장기간	6개월
대조구온도	35℃	실험횟수	7회(1개월마다)
유통온도	실온(1~35℃)	실험반복수	3반복/1회

표 167. 품질유지기한 조사를 위한 품질지표의 설정

품질지표		실험방법
지표성분	γ-oryzanol	게제된 논문(Method validation)의 실험방법
NO 생성능 측정	NO 생성능 측정	아래 방법 기재

표 168. 품질유지기한 조사를 위한 품질한계의 설정

품질지표	품질한계	근거
γ-oryzanol	대조구 대비 80~120%	-
NO 생성능 측정	대조구 대비 80~120%	-

(1) 품질유지기한 설정을 위한 유통기한 설정 시험 및 유통기한 예측

표 169. 제품의 특성

구분	설명
식품유형	미강(생물전환)산물 분말
성상	연갈색의 고운 분말
사용원료	미강
제조 및 가공공정	생물전환(발효/효소처리)공정 → 효소 불활성화 → 살균 → 동결건조 → 포장
포장재질	불투과성 비닐
포장방법	밀봉
포장단위	단일 포장
보존 및 유통온도	실온 (1~35℃)
보존조건	각 온도별로 향온이 가능한 배양기에 직사광선을 피하여 밀봉하여 보관

(가) 유통기한 설정 가속시험 계획

미강(생물전환)산물 분말을 은색의 폴리에틸렌 비닐로 각 밀봉하여 온도와 시간 경과에 따른 변화를 관찰하기 위한 품질유지기한 설정 실험을 진행하였으며, 본 시험은 식품의약품안전평가원에서 발행한 「식품, 식품첨가물, 축산물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준」(식품의약품안전처 공고 제2017-368호)의 가이드라인 기준에 준하여 작성하였다. 실온유통제품임으로 35℃을 포함하여 온도 설정을 하였다. 품질유지기한 설정을 하기 위해서 저장 온도 및 습도를 설정하여 수행하였으며, 실험주기는 1개월 간격으로 6개월의 저장기간으로 0개월차를 포함하여 총 7회 시험을 수행하였으며, 각 개월마다 3반복씩 수행하였다.

표 170. 저장온도별 보관 사진



습도 : 포장재질이 수분 불투과성 재질로 포장된 제품으로 설정하지 않았음.

(2) 품질지표에 대한 실험방법 : 지표성분

(가) 시료추출 방법

저장온도별 시료(분말) 0.5g을 50ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 HPLC grade methanol로 정용하였다 (100배수 추출). 50ml 부피플라스크를 1시간동안 상온에서 sonication 추출하였다. Sonication 후 상온에서 10분간 식힌 다음 0.45um 실린지 필터를 이용해 여과 후 분석에 사용하였다.

(나) 표준물질 제조

제품(기능성원료)의 지표성분 패턴분석을 위한 표준물질로 미강의 대표적 성분 중 하나인  $\gamma$ -oryzanol을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된  $\gamma$ -oryzanol은 Wako chemical社의 제품으로 cycloartenol ferulate, cyclobranol ferulate, campesterol ferulate, beta-sitosterol ferulate의 4종류의 물질로 구성된 혼합물이다.

$\gamma$ -oryzanol 표준물질 50mg을 50ml 부피플라스크에 정밀히 취하여 HPLC grade ethanol로 정용하였고, 이를 표준원액으로 사용하였다. 표준원액을 HPLC grade ethanol로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

(다) HPLC 분석조건

HPLC 분석조건은 아래 표와 같다. Shimadzu Model LC-20A Prominence Series HPLC system과 Shimadzu Model SPD-M20A Prominence Photodiode Array Detector(Shimadzu Co., JAPAN)을 사용하여 분석하였다.

(라) 표준물질 함량(mg/g) 계산

$$\text{함량 (mg/g)} = C \times (V \times D) / W$$

- C : 시험용액 중의 표준물질 농도 (mg/mL)
- V : 시험용액 전량 (mL)
- D : 희석배수
- W : 시료채취량 (g)

(마) 표준물질 0개월차 대비 백분율(%) 계산

$$\text{백분율 (\%)} = M \text{ 개월차 함량 (mg/g)} / 0\text{개월차 함량 (mg/g)} \times 100$$

위 계산식으로 계산하여 저온도별 저장기간에 따른 미강 품질지표의 변화 백분율 계산을 시행하였다.

표 171.  $\gamma$ -oryzanol의 HPLC 분석조건

Instrument	Conditions
Column	Sunfire™ C <sub>18</sub> (4.6 ×250 mm, 5.0 μm)
Detector	Shimadzu Model SPD-M20A Prominence photodiode Array Detector 320nm
Mobile phase	Methanol : Acetonitrile : Isopropanol = 45 : 50 : 5 Isocratic
Column temp.	40 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μL
Run time	40 min

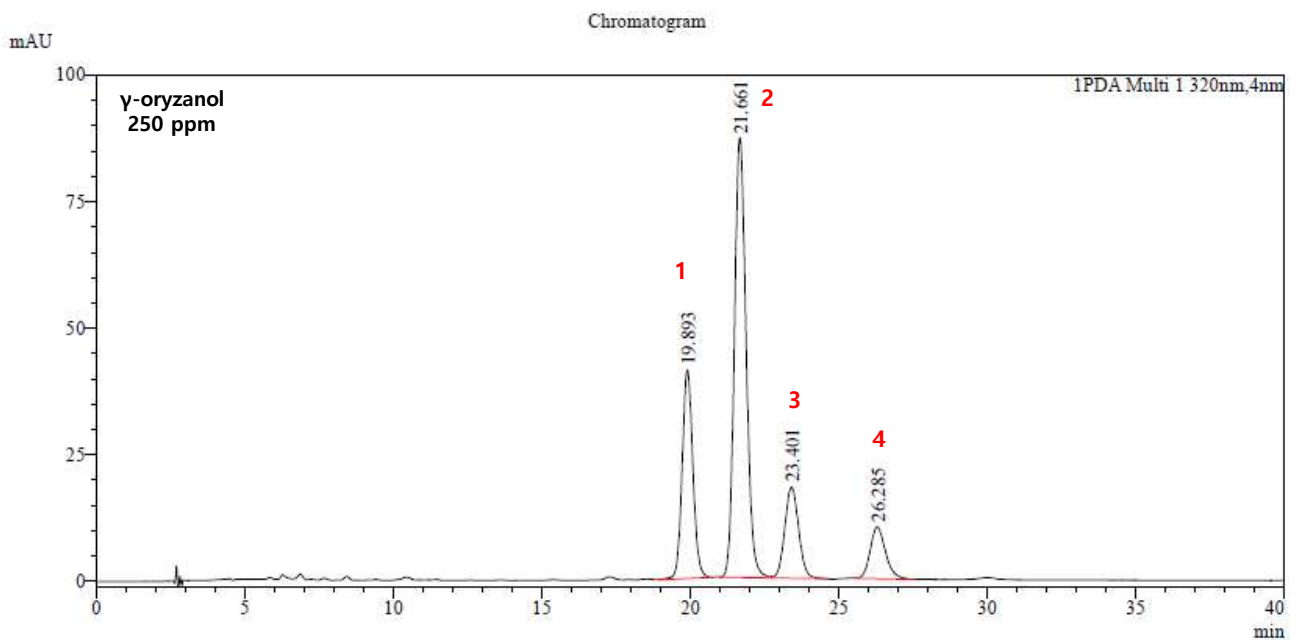


그림 395.  $\gamma$ -oryzanol 표준물질의 HPLC 크로마토그램

1.cycloartenol ferulate(19.8min), 2.cyclobranol ferulate(21.6min), 3.campesterol ferulate(23.4min), 4.beta-sitosterol ferulate(26.2min)



(3) 품질지표에 대한 실험결과 : 지표성분

안정성시험은 식품의약품안전청의 가이드라인에 의거하여 실시하였다. 품질유지기한 설정의 품질지표 중 지표성분은  $\gamma$ -oryzanol 함량 값으로 확인하였다. 실험 조건은 30℃, 35℃, 45℃의 가속시험 조건으로 수행하였다. 0개월에서부터 6개월의 저장온도별 저장기간에 따른 지표성분을 1개월에 1번씩 총 7회로 각 개월마다 3반복씩 측정하여 평균 함량값으로 변화를 확인하였다. 제품(기능성원료)의  $\gamma$ -oryzanol 함량 값 변화를 비교하였을 때, 0개월차 대비 지표성분의 함량 변화는 없었으며, 지표성분이 일정 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 이를 통해 품질지표로 설정한  $\gamma$ -oryzanol이 저장온도별 저장기간 동안 안정적임을 확인하였다.

표 172. 저장온도별 저장기간에 따른 제품(기능성원료)의 지표성분의 변화

구분	30℃	35℃	45℃
Initial		3.654 mg/g (100%)	
1개월	3.684 mg/g (100.821%)	3.623 mg/g (99.152%)	3.593 mg/g (98.331%)
2개월	3.683 mg/g (101.794%)	3.625 mg/g (99.206%)	3.617 mg/g (98.987%)
3개월	3.721 mg/g (101.834%)	3.691 mg/g (101.026%)	3.636 mg/g (99.507%)
4개월	3.752 mg/g (102.682%)	3.720 mg/g (101.806%)	3.654 mg/g (100.027%)
5개월	3.769 mg/g (103.147%)	3.809 mg/g (104.242%)	3.737 mg/g (102.271%)
6개월	3.862 mg/g (105.692%)	3.798 mg/g (103.941%)	3.725 mg/g (101.943%)

#### (4) 품질지표에 대한 실험방법 : NO 생성능 측정

##### (가) 대식세포(마크로파지)의 배양

제품(기능성원료)의 품질유지기한 설정을 위해 미강(생물전환)산물의 면역활성을 평가하기 위하여 5% DMEM media를 사용하여 마크로파지(대식세포)의 배양 및 assay를 수행하였다. 면역활성 측정에 사용한 마크로파지(대식세포)는 RAW 264.7 세포주로, 계대배양은 24well plate의 각 well에  $1 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 0.5 ml 씩 세포를 계대배양하였다. 24시간 배양 후 현미경으로 cell growth 상태를 확인한 뒤, 배지를 완전히 제거한 다음 혈청이 첨가되지 않은 배지로 2~3회 washing 하여준다. 각 well에 시료가 첨가된 5% FBS DMEM 배지를 0.5 ml 씩 채워준다. 시료의 농도는  $16 \mu\text{g/ml}$  농도를 시작으로 1/2 serial dilution하여 희석하였다. 또한, positive(+) control로 최종 농도  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하였다( $200 \mu\text{g/ml}$  stock). 시료가 처리된 24well을 8~24시간 배양 후 각 well의 배양액을  $400 \mu\text{l}$ 씩 취하고,  $400 \mu\text{l}$ 씩 취한 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 assay에 사용하였다.

##### (나) 대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 측정

96well plate에 각각의 시료와 serial dilution 된 standard를  $100 \mu\text{l}$  분주하고, Griess reagent (① N-(1-naphtyl) ethlene diamine dihydrochloride :  $0.5 \text{ g}/500 \text{ ml}$  ② Sulfanilamide :  $5 \text{ g}/85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$   $29.5 \text{ ml}/470.5 \text{ ml}$ )를  $100 \mu\text{l}$  분주한 후 1분간 반응시킨다. ELISA leader를 이용하여 540 nm(또는 550 nm)에서 흡광값을 측정하여 다양한 시료의 면역활성 역가를 측정하였다.

#### (5) 품질지표에 대한 실험결과 : NO 생성능 측정

제품(기능성원료)의 품질유지기한 설정을 위해 미강(생물전환)산물에 대한 대식세포 활성화 실험을 수행한 결과 면역활성 역가는  $\text{MEC}_{100}$ 으로 대략  $1/4 \sim 1 \mu\text{g/ml}$  농도로 나타났으며, 각 개월수마다 3반복 실험을 한 결과, 재현성을 확인할 수 있었다. 또한 저장온도별 저장기간 동안에 따른 NO 생성능 변화값 변화를 비교하였을 때, 0개월차 대비 변화는 없었으며, 일정 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 이는 품질지표인 NO 생성능 값이 저장온도별 저장기간 동안 안정적인 것을 확인하였다. 자세한 결과는 아래 그림과 같다.

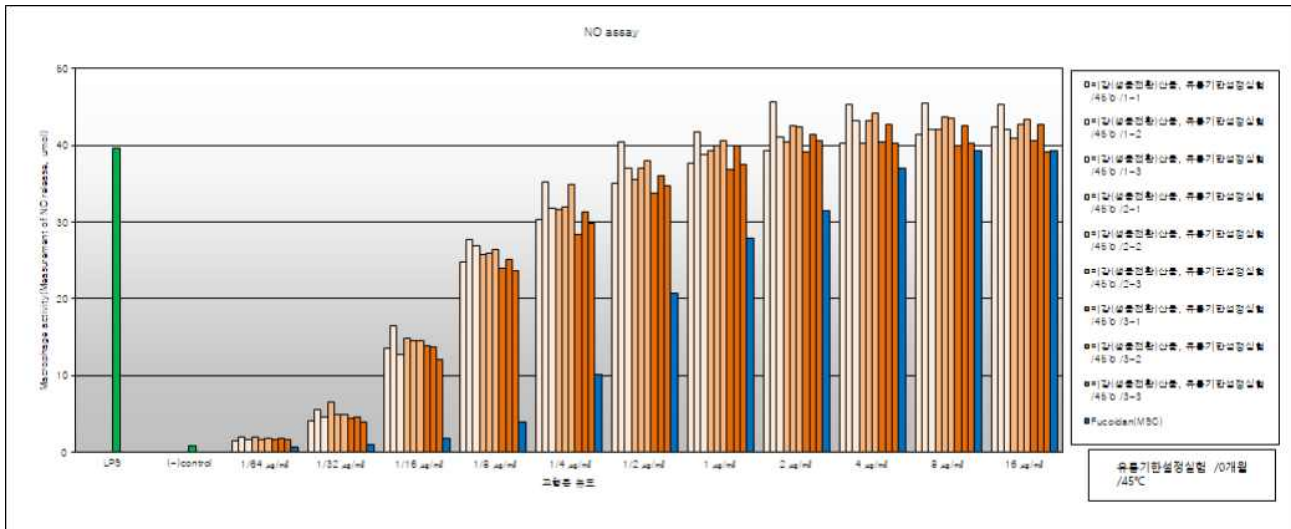
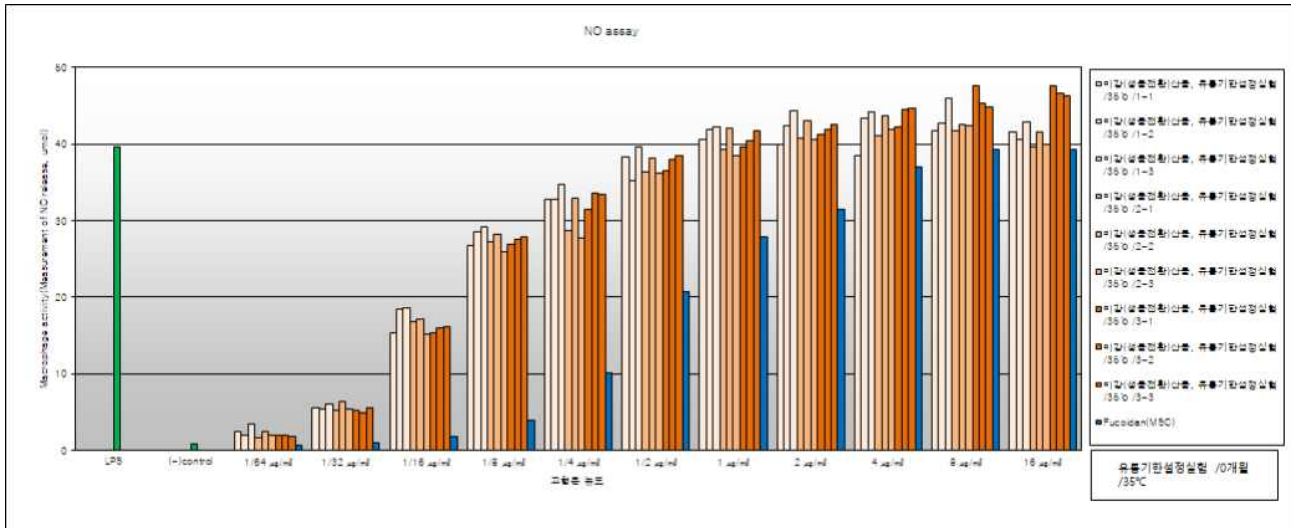
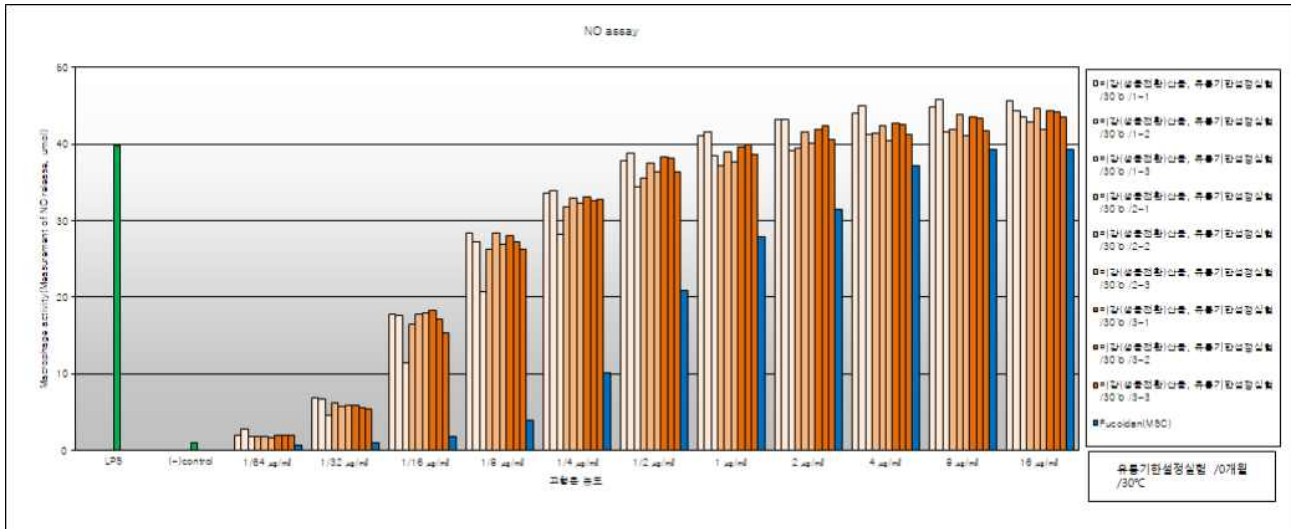


그림 396. 저장온도별 저장기간에 따른 미갈 역가의 변화 : 0개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)

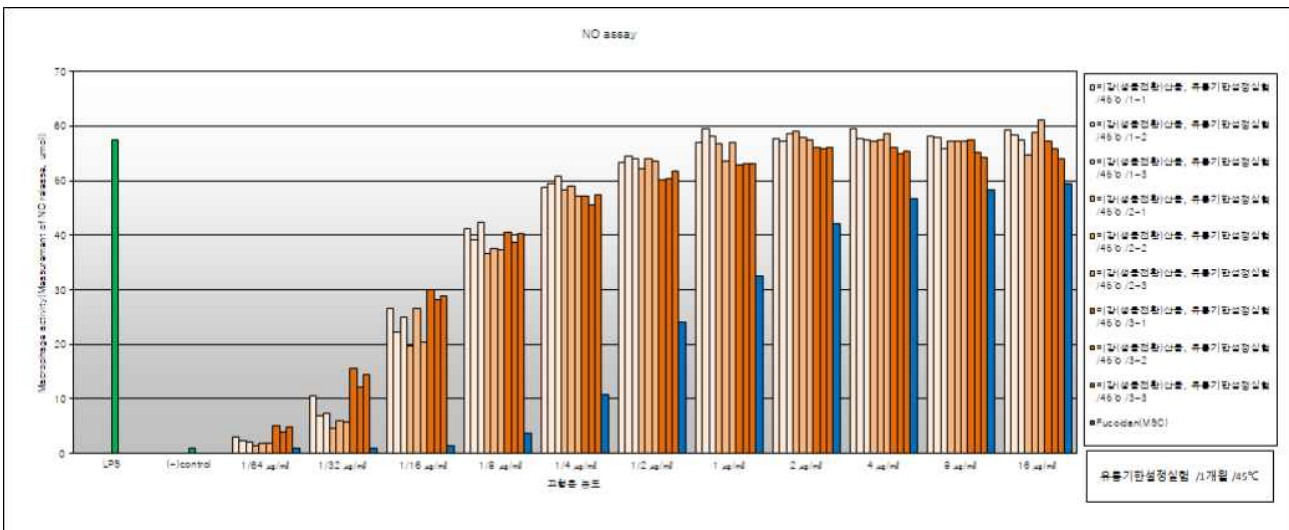
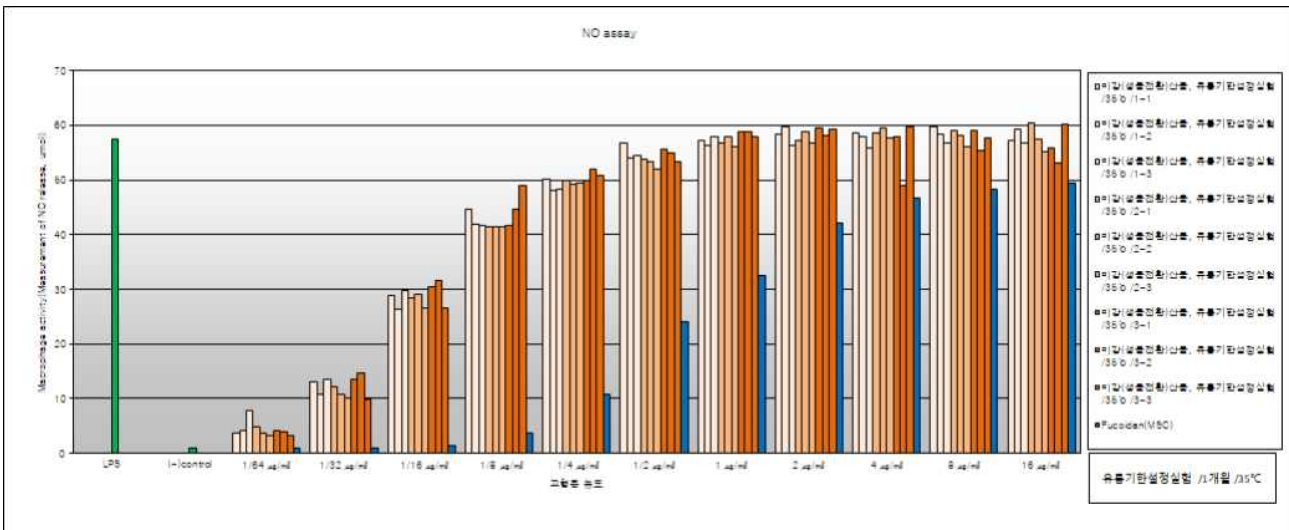
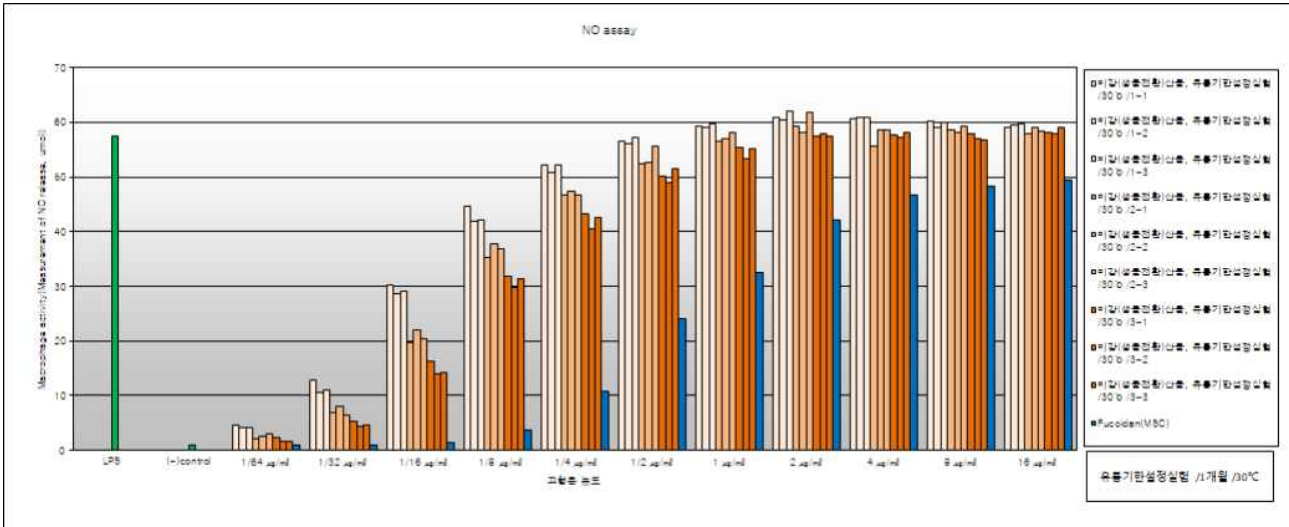


그림 397. 저장온도별 저장기간에 따른 미갈 역가의 변화 : 1개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)

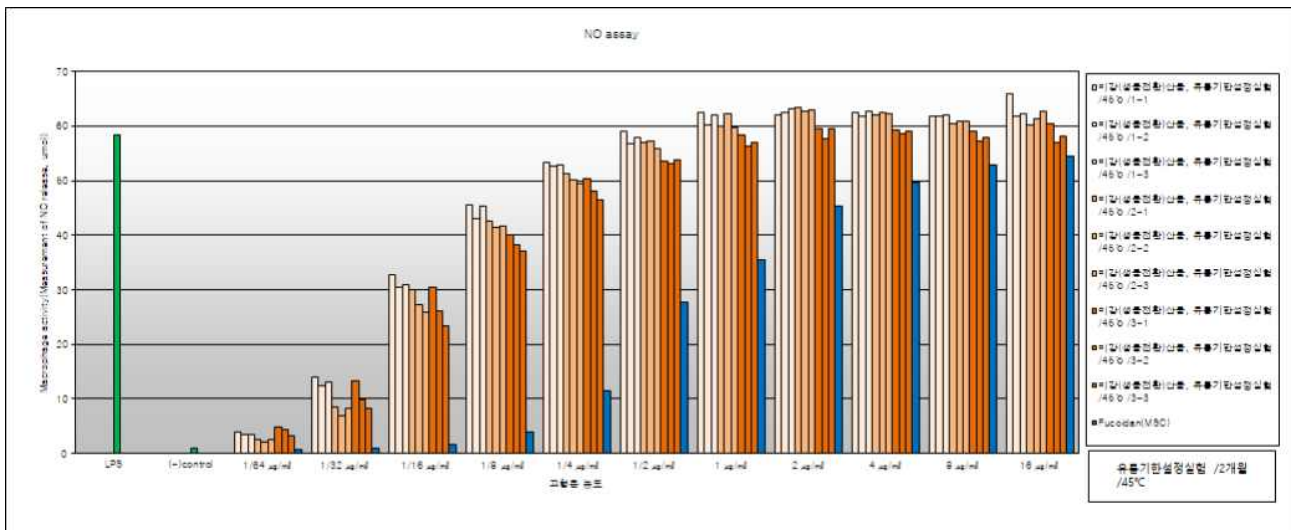
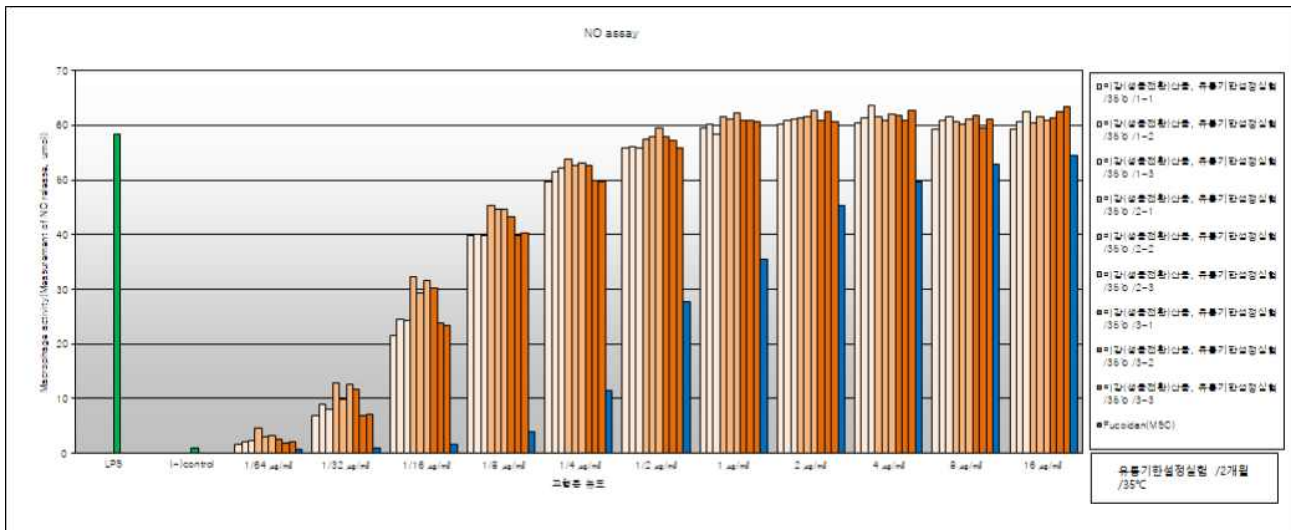
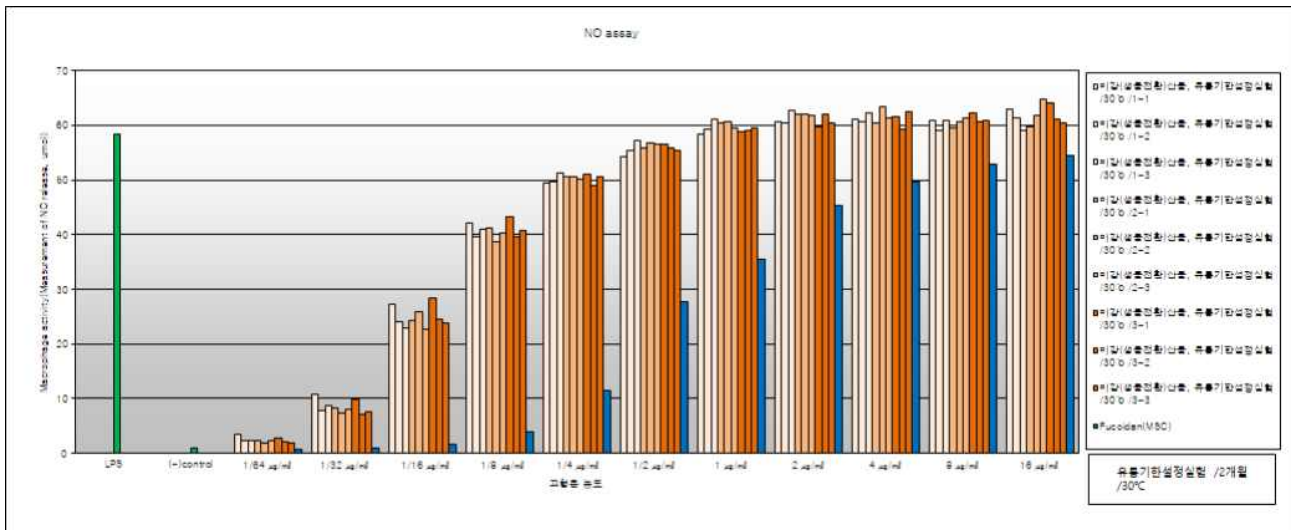


그림 398. 저장온도별 저장기간에 따른 미강 역가의 변화 : 2개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)

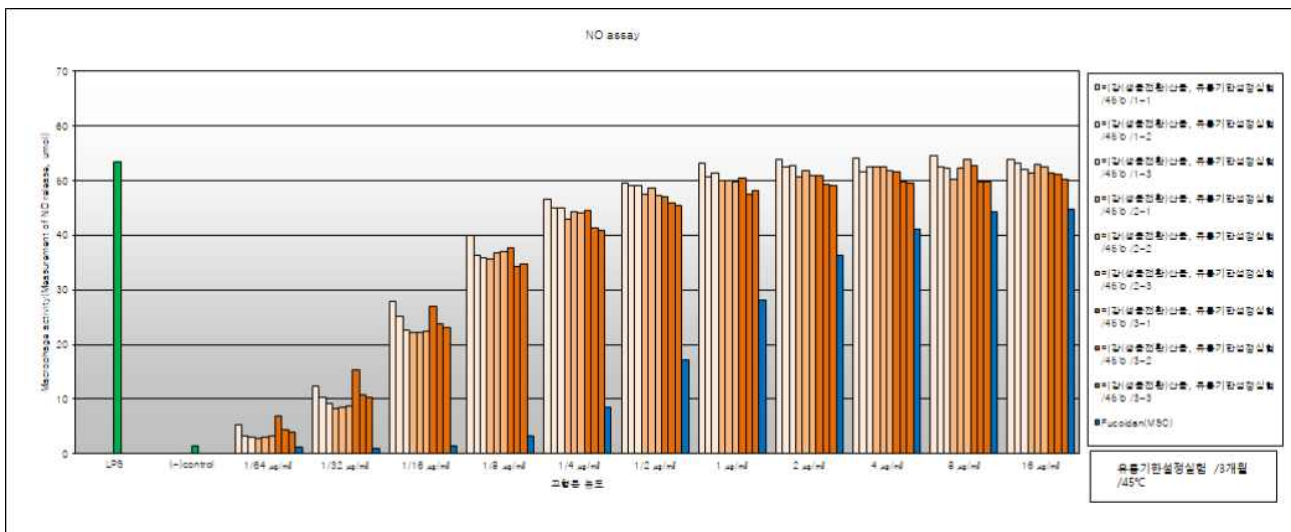
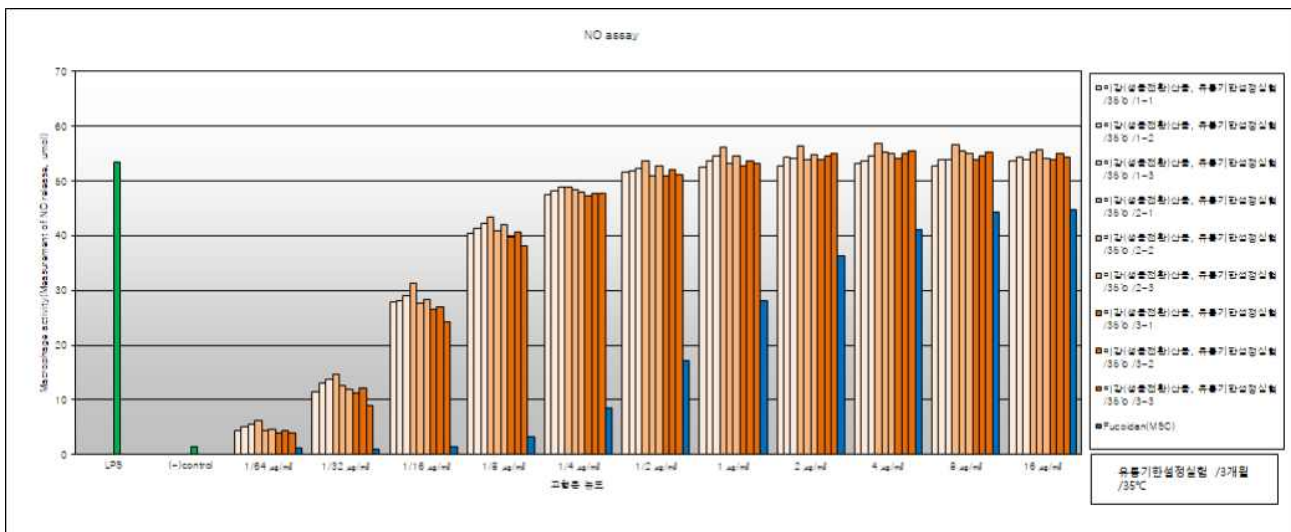
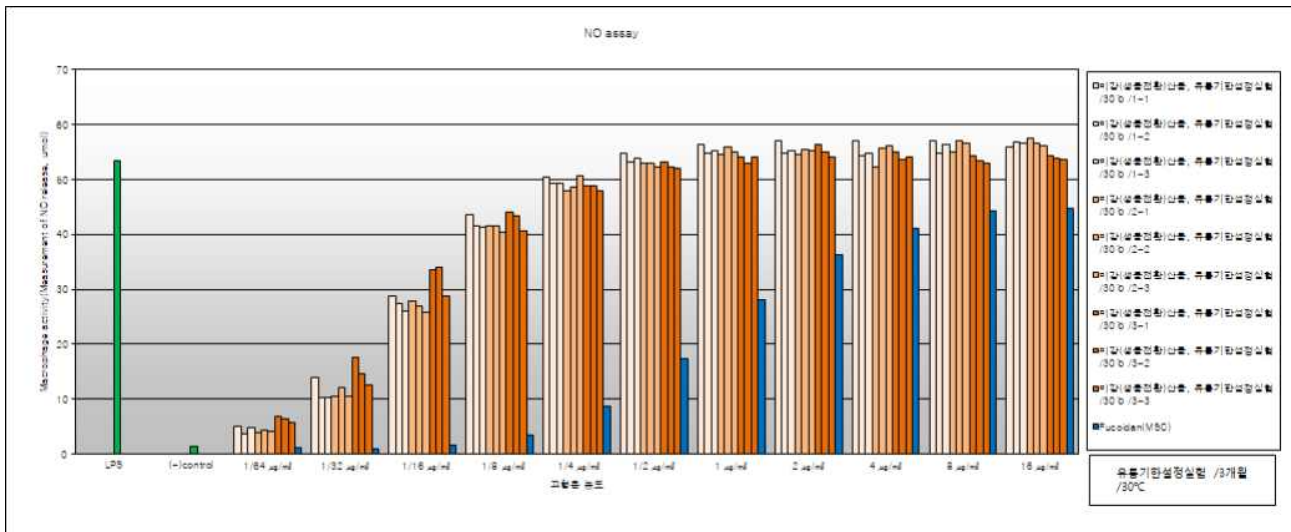


그림 399. 저장온도별 저장기간에 따른 미강 역가의 변화 : 3개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)



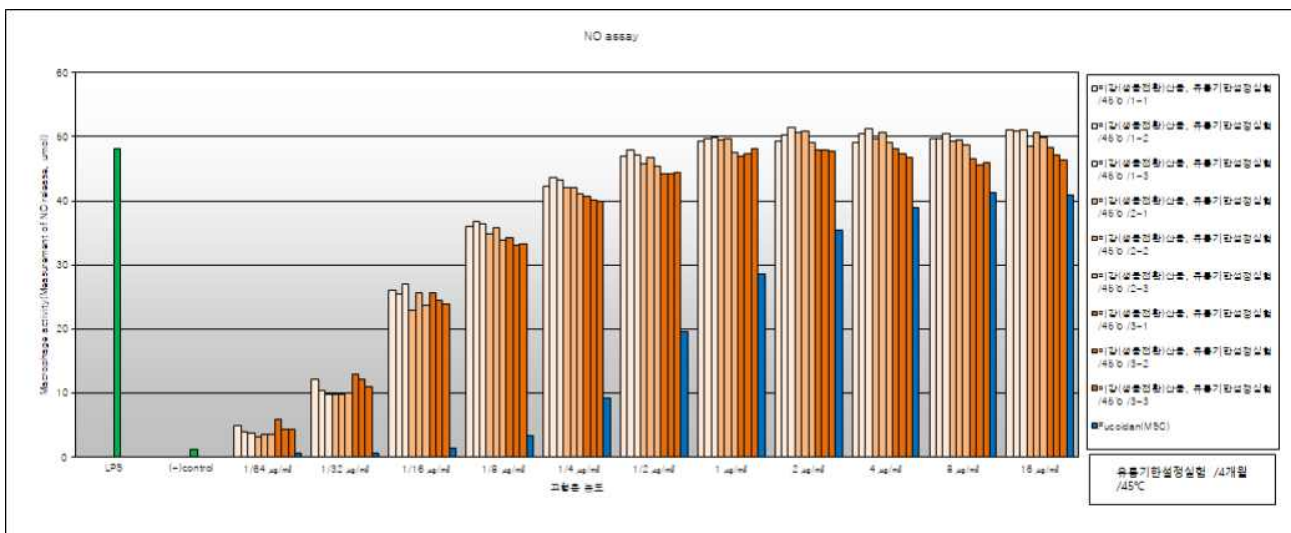
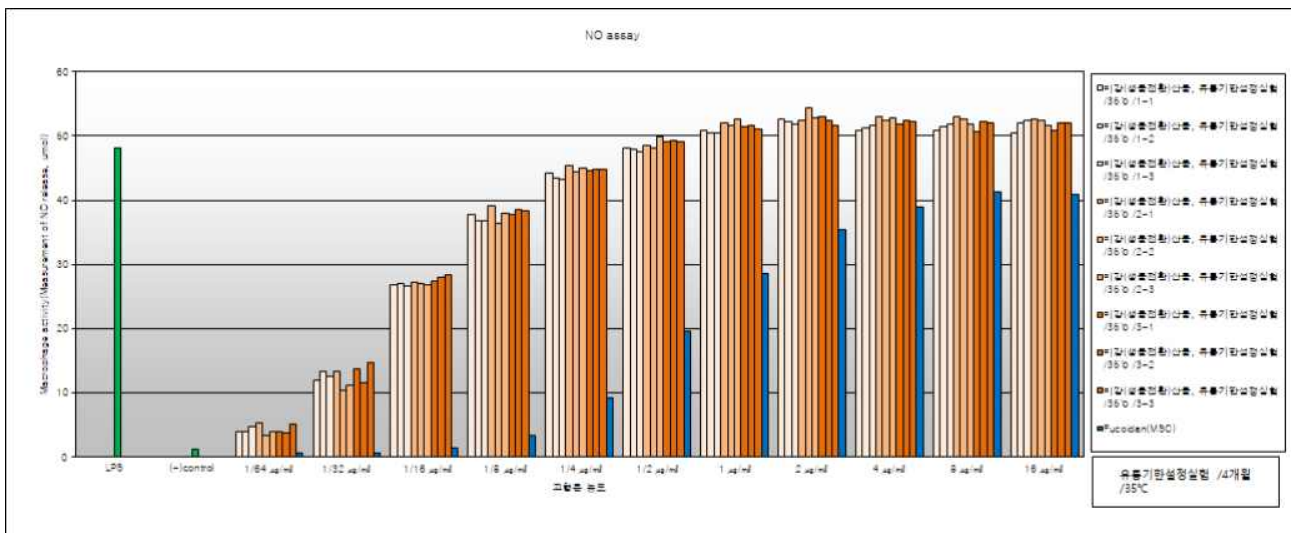
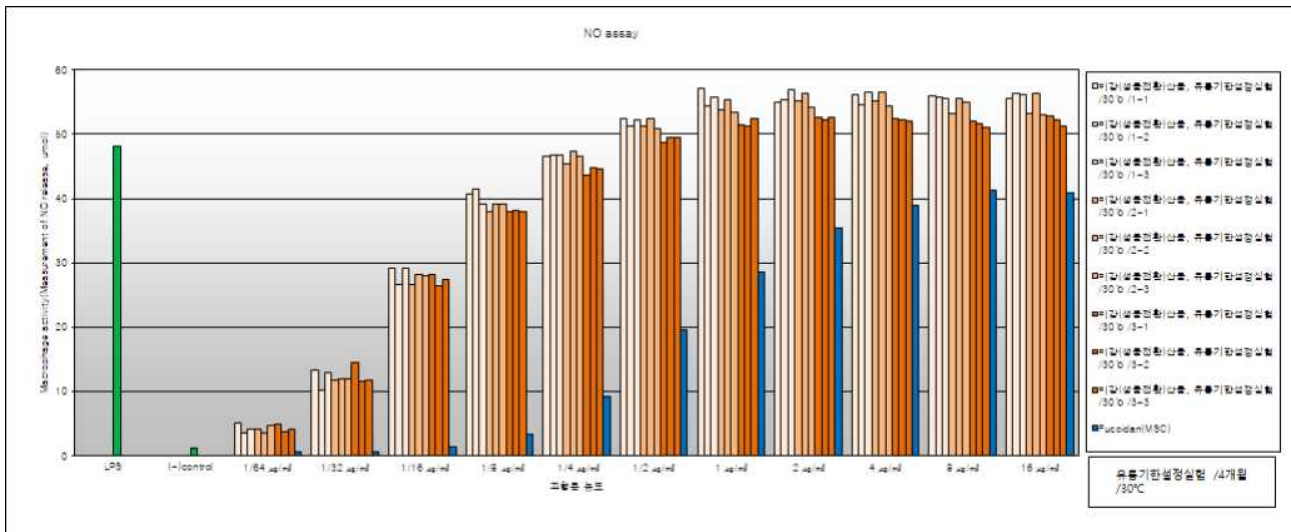


그림 400. 저장온도별 저장기간에 따른 미강 역가의 변화 : 4개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)

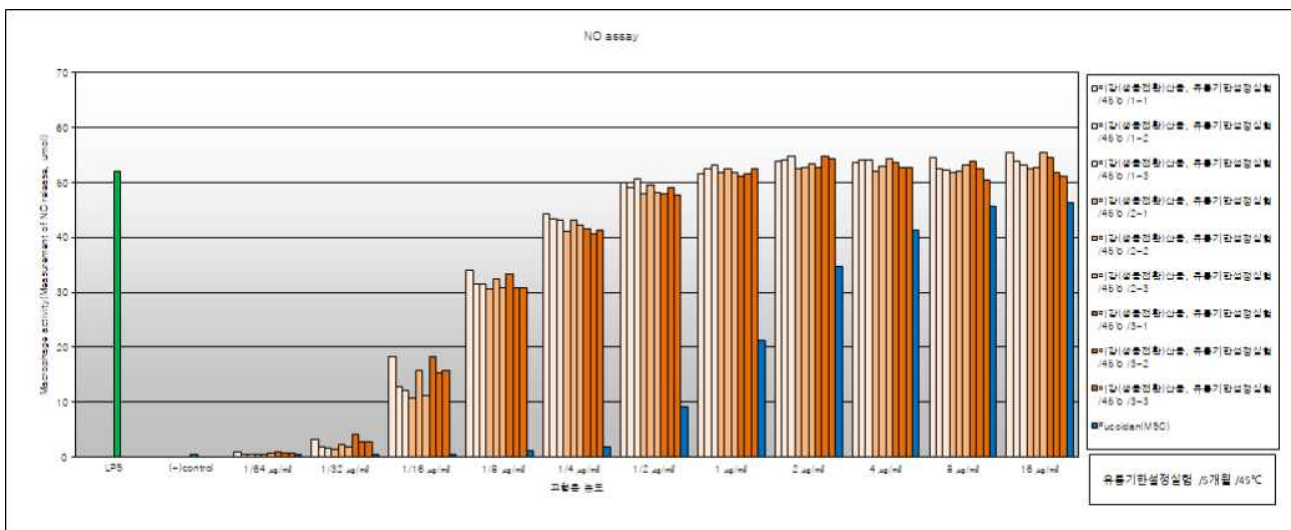
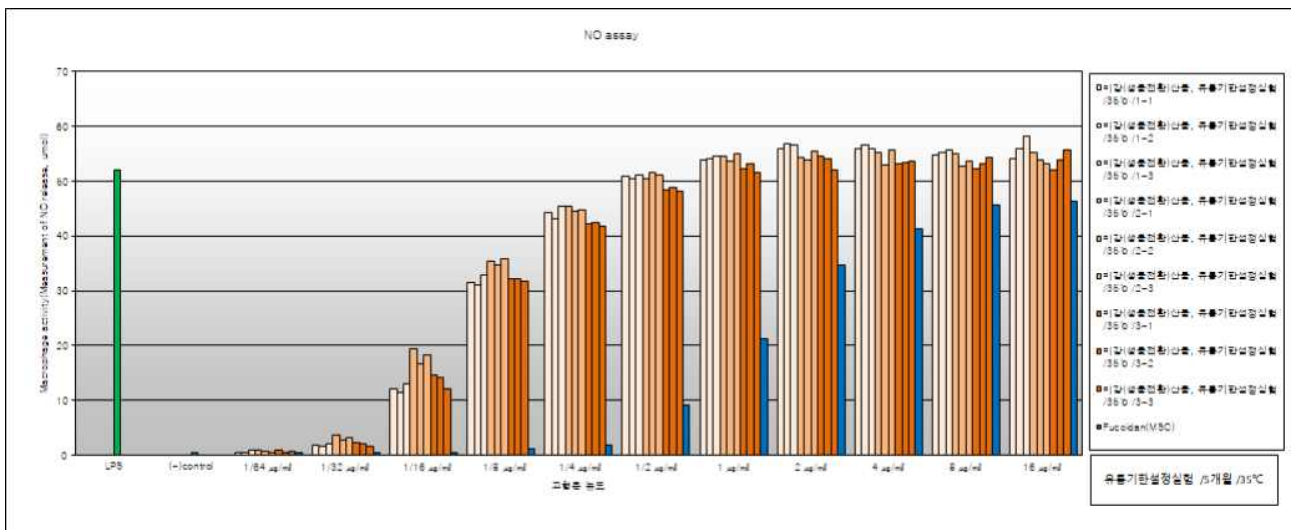
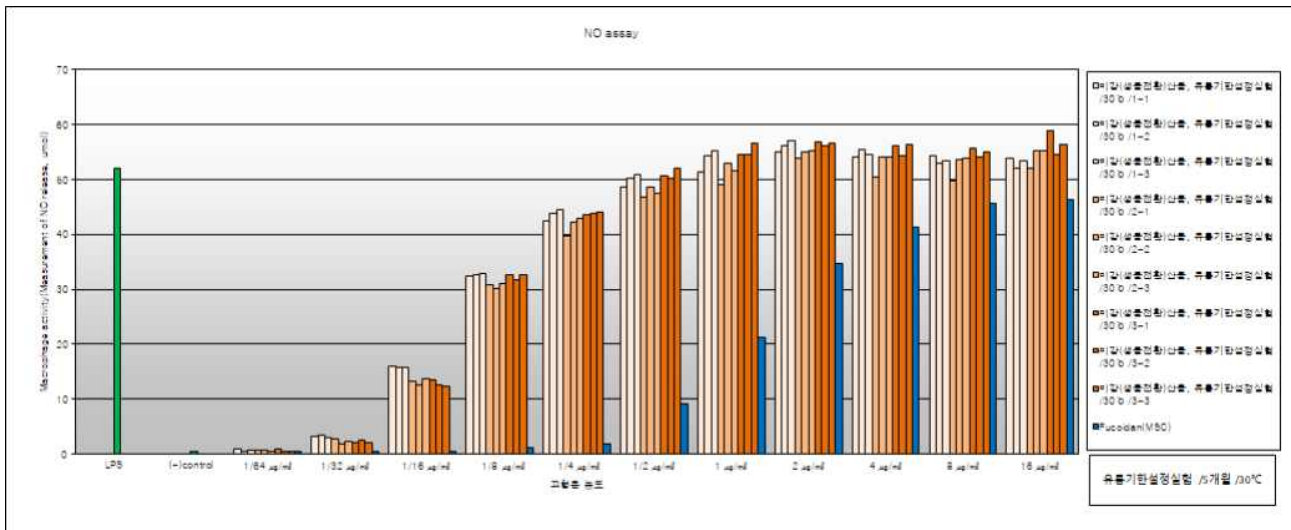


그림 401. 저장온도별 저장기간에 따른 미강 역가의 변화 : 5개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)



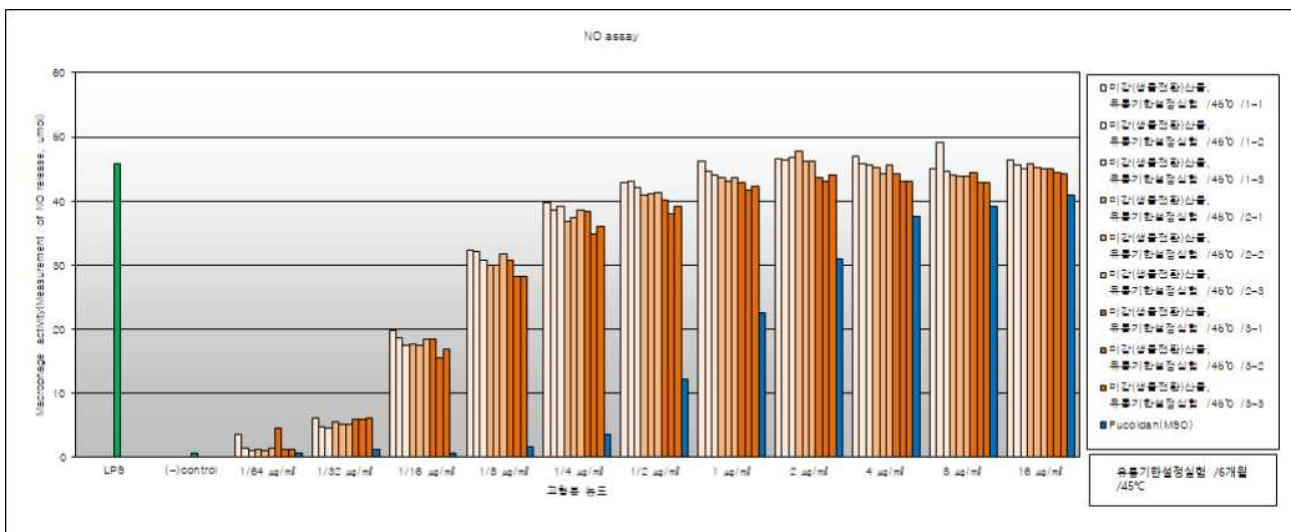
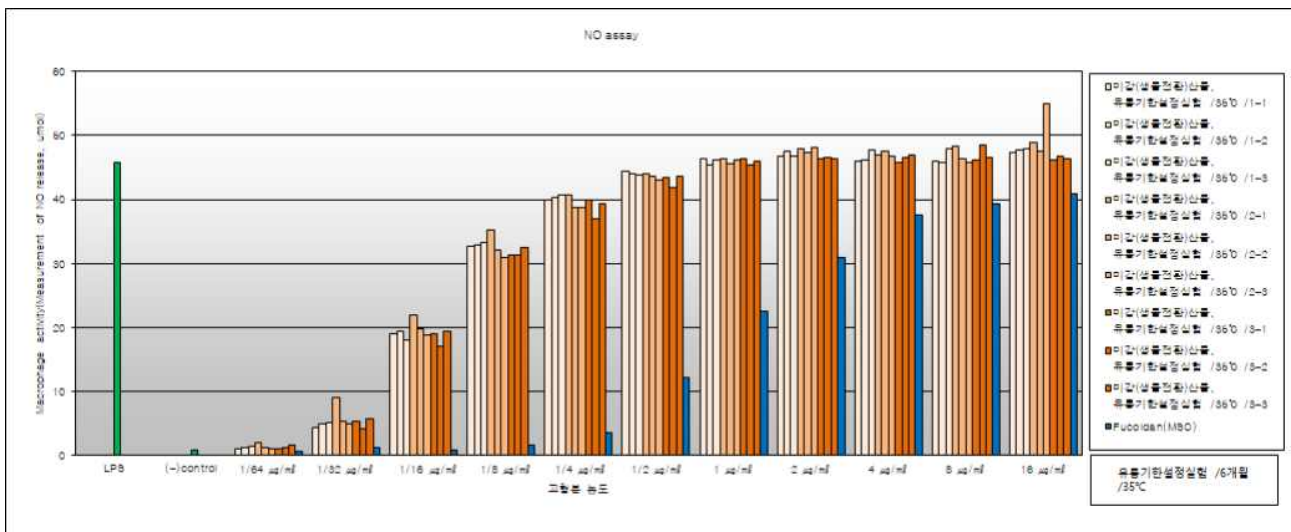
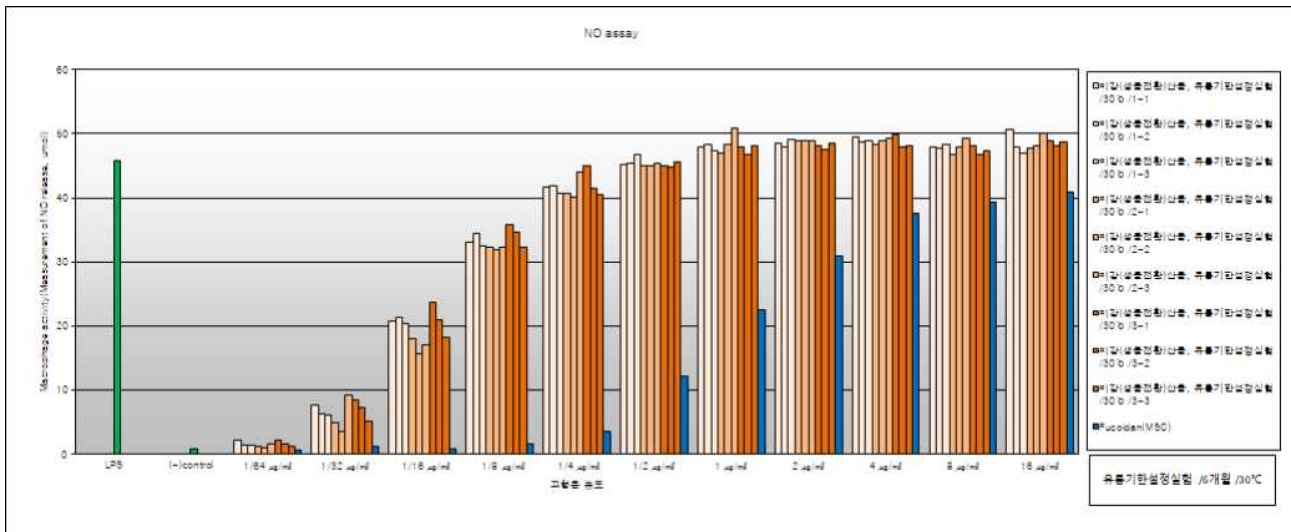


그림 402. 저장온도별 저장기간에 따른 미강 역가의 변화 : 6개월차 30°C, 35°C, 45°C (3반복 실험)

(6) 품질유지기한 설정 결과


저장온도별 저장기간에 따른 제품(기능성원료)의 품질지표의 변화를 평가하기 위해 지표성분인  $\gamma$ -oryzanol과 대식세포(마크로파지)의 NO 생성능 측정하여 관찰하였다. 품질지표 모두 0개월차와 비교하여 안정적으로 유지되었으며, 설정된 기준에 적합한 결과가 나왔다. 30°C, 35°C, 45°C의 조건에서 6개월간 가속시험 결과를 바탕으로, 제품의 유통기한을 예측한 결과,  $\gamma$ -oryzanol과 대식세포(마크로파지)의 NO 생성능이 가속조건에서 안정적으로 유지됨을 확인하였고, 이러한 결과를 바탕으로 최종 품질유지기한을 24개월로 설정하였다. 또한 위 기간 동안 본 제품을 유통할 경우 제품 안정성을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

## 24절. 미강(생물전환)산물의 유효성 평가를 위한 인체적용시험 설계, IRB 심의 의뢰 및 연구종료통지서 (외부시험의뢰, CRO)

### 1. 인체적용시험 설계 및 외부시험의뢰 (CRO)

미강(생물전환)산물의 유효성 평가를 위한 인체적용시험 PROTOCOL을 설계하였다.

*The Best Solution for the Approval and Clinical Trial of Health Functional Food*



# (주)네오뉴트라

---

110-460 서울시 중로구 연건동 273 국도빌딩 1층 <http://www.NeoNutra.com>  
Tel: 02-2277-3935 Fax: 02-2277-3940 [help@NeoNutra.com](mailto:help@NeoNutra.com)

---

문서번호 : 기획 16-106

발송일자 : 2016년 9월 8일

수 신 : ㈜STR바이오텍

제 목 : 인체적용시험 CRO 견적서 제출건

---

1. 귀사의 실적 변항하심을 기뻐합니다.
2. 당사를 귀사의 사업파트너로서 협력할 수 있는 기회를 주신 것에 대해 깊은 감사를 드립니다.
3. 귀사의 연구/개발 소재/제품의 인체적용시험 CRO 견적서를 발송과 같이 송부하오니 업무에 참고하시기 바랍니다.
4. 검토하시고 문의 또는 추가 요청 시에 상가 연락처로 연락주시면 영의껏 도와드리겠습니다. 감사합니다.

붙임1. 인체적용시험 CRO 과정의 개요 1부,  
붙임2. 인체적용시험 CRO 견적서 1부.

## ㈜네오뉴트라 대표이사

(직인생략)

별첨1. 인체적용시험 CRO 과제의 개요

**1.1 기본 정보**

**1.1.1 기능성 내용 및 연구 목적**

- 기능성 내용 : 면역증진
- 목적 및 CRO 범위 : 안전성, 유효성 검사 인체적용시험으로써 프로토콜 개발, 모니터링, 통계, 보고서 등 CRO 업무 수행

**1.1.2 개략적인 과제 정보**

인체적용시험 명칭		안전성, 기능성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험
대상 피험자	인원 수	100명 (2개군-시험군, 대조군)
	선정 기준	말초혈액 백혈구 수치가 $3 \times 10^3$ 이상 ~ $8 \times 10^3$ cells/ul 미만 인 건강한 성인, 스트레스, 피로, 나이 등
	제외 기준	질환자 등
시험기관 및 수		대학 또는 대학 부속병원 1처
기간	과제기간	15개월
	시험기간	8개월
	섭취기간	8주 또는 12주
인체적용시험 디자인		단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조시험
위약 및 시험식품의 공급		동일포장, 인체적용시험용 제품이라는 라벨, 무작위 배정에 의한 라벨 등

- 상기 원료/성분의 특성 범위 및 인체적용시험 규모는 귀사에서 제공한 자료를 바탕으로 디자인한 것으로 확정된 사항은 아닙니다.

**1.1.3 CRO 업무의 범위**

당사의 CRO 업무의 범위를 별첨2. 인체적용시험 CRO 견적서에 설정하였습니다.

### 1.2 예상 일정 계획

귀사에서 제공해주신 정보 및 당사와 인체적용시험기관의 일정을 기준으로 인체적용시험 진행에 대한 각 업무단계별 예상 소요일정 입니다.

번호	항목	예상 기간(m)	예상 일련	내용
1	Contract for CRO			인체적용시험 CRO 계약 체결
2	Project Setup	1	-	제공된 자료 검토 전략 수립 시험 디자인 연구자/연구기관 선정 프로토콜/CRF 등 개발
3	IRB Submission/Approval (Protocol)	2	-	다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도기간 소요
4	Initiation Activities	1	-	피험자 모집 방안 등 제반 준비 인체적용시험식품 제조 인체적용시험기관 계약 인체적용시험 study material 제작 등 인체적용시험 개시 모임
5	Study Stage	8		등록기간 : 6 개월 섭취기간 : 8주 또는 12주 모니터링
6	Data Management	1	-	DB 구축, 코딩 등
7	Statistical Analysis	1	-	통계분석 및 표/그림 제작
8	Clinical Study Report	1	-	결과보고서 작성 및 연구자 고찰 상 임
9	IRB Submission (CSR)	1		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도기간 소요

- 상기 예상소요기간은 평균적으로 소요되는 예상기간을 나타낸 것이며, 상황에 따라 변동될 수 있습니다.
- 행정 관련 소요기간은 보완여부나 보완내용에 따라 소요일정이 상당히 가변적임을 알려드립니다.

### 1.3 견적서 내용

#### 1.3.1 규정

- 견적서 내용은 귀사에서 제시한 자료를 근거로 작성한 것이며, 충분히 가변적임을 알려드립니다. 즉, 인체적용시험 연구비 및 CRO 견적은 인체적용시험기관 및 피험자 수, 프로토콜(연구계획서), 검사 항목 변경 등에 따라 가변적일 수 있습니다.
- 당사는 관련 분야 전문가 협력체계를 구축하여 양질의 자료 및 결과를 제공하고 있습니다.

#### 1.3.2 CRO 견적 및 결제조건

<b>CRO 비용</b>	<b>70,000</b> 천원 (부가세 별도)
세부내역	인체적용시험 CRO 세부견적
견적 변동 사항	인체적용시험 기간(피험자 모집/등록, 섭취 등), 피험자 수, 인체적용시험기관 수 등에 의해 견적은 변동될 수 있습니다.
결제조건	계약금 : 계약 시 30,000 천원
	중도금 1 : 첫 피험자 등록 후 15,000 천원
	중도금 2 : 마지막 피험자 마지막 방문 후 15,000 천원
	잔금 : 결과보고서 IRB 제출 후 10,000 천원

#### 1.3.3 견적서 제외 항목

제외 항목	부가가치세
	인체적용시험 연구비(피험자 보상비 및 외부 의뢰 검사비용)
	피험자 모집 관련 비용(전단지 제작/광고 등)
	IRB 심의료(초심의, 지속심의, 연차심의 등)
	e-CRF 구축비용(option)

#### 1.3.4 인체적용시험기관 및 예상 연구비

인체적용시험기관	대학 또는 대학 부속병원 1처
----------	------------------

예상 연구비	1.5 -1.8억원 (기관별 검사비, 간접비 등에 따른 변동 가능)
견적 포함 항목	인체적용시험 연구비(피험자보상비 등)
예상 검사 항목	유효성 평가(NK cell activity, WBC, IFN-gamma 등), 안전성 평가 항목(이상반응, 혈액검사 등)



별첨2. 인체적용시험 CRO 견적서

인체적용시험 CRO 세부 견적 내용

[단가:천원]

내 용	인원	개월 / 횟수	기관수	단가	수량	금액	합계	비고
<b>I. Project Management</b>								
1.1 Project Management							13,900	
1.1.1 인체적용시험 전반 진도 및 수행 관리		(15개월)		500	15	7,500		
1.1.2 시험기관 & CRC 관리		(6개월)		800	8	6,400		
1.2 Regular Meeting							300	
1.2.1 계획서 수립 협의		(1회)	(1차)	200	1	200		
1.2.2 계획서 발표 회의(연구자 전체 회의)		(1회)		500	0	0		
1.2.3 수시 회의		(2회)	(1차)	100	0	0		
1.2.4 종료 회의		(1회)	(1차)	100	1	100		
<b>II. Project Setup</b>								
2.1 Strategy for Design							1,200	
2.1.1.자료검색/조사/정리				500	1	500		
2.1.2 전략 수립/인체적용시험계획 디자인				700	1	700		
2.2 Search for site & investigator							1,700	
2.2.1 연구자 및 연구기관 조사 / 과제 협의			(1차)	700	1	700		
2.2.2 연구비 계산/협의			(1차)	500	1	500		
2.2.3 연구기관 계약업무 대행			(1차)	500	1	500		
2.3 Protocol & CRF Development							15,100	
2.3.1 연구계획서				6,000	1	6,000		
2.3.2 샘플 사이즈 산정 및 분석 모델 디자인				1,000	1	1,000		
2.3.3 IB/시험식품/맹검봉투/무작위배정 지도				100	1	100		
2.3.4 증례기록서(CRF) 디자인				3,000	1	3,000		
2.3.5 e-CRF 구축				25,000	0	0		
2.3.6 동의서 등 각종 양식				1,000	1	1,000		
2.3.7 각종 study material 제작				40	100	4,000		
<b>III. Regulatory Affairs</b>								
3.1 IRB submission							2,250	
3.1.1 초심의를 서류 제작/제출			(1차)	800	1	800		
3.1.2 수정 서류 제작/제출			(1회) (1차)	500	1	500		
3.1.3 변경 서류 제작/제출			(1회) (1차)	500	1	500		
3.1.4 시험종료 보고			(1차)	250	1	250		
3.1.5 지속심의/연차심의/중간보고 심의			(1회) (1차)	200	1	200		
<b>IV. Initiation Activities</b>								
4.1 시험기관/CRC 교육			(1차)	200	1	200		
4.2 인체적용시험 개시 회의/보고서		(2명)	(1차)	220	2	440		
4.3 개시 방문/보고서		(1명)	(1차)	320	1	320		
<b>V. Study Stage</b>								
5.1 모니터링 방문		(1명) (25회)		400	25	10,000		
5.2 유선 모니터링	뉴스레터			20	30	600		
	monthly report		(1차)	20	15	300		
5.3 환자증례기록 내용 검증(Source Documents Verification)				50	100	5,000		



5.4 모니터링 방문 보고서		30	25	750
5.5 CRF 배포/관리/회수	(1회) (1처)	300	1	300
5.6 종료 방문(연구문서 점검)	(1회) (1처)	400	1	400
5.7 시험물질 관리/수불 (약국) 모니터링	(4회) (1처)	50	4	200
<b>VI. Data Management</b>				<b>8,500</b>
6.1 DB 디자인 및 구축		2,000	1	2,000
6.2 데이터 입력		20	100	2,000
6.3 데이터 검증 및 확정		30	100	3,000
6.4 데이터 인코딩		1,000	1	1,000
6.5 이상반응 코딩		500	1	500
<b>VII. Statistical Analysis</b>				<b>6,000</b>
7.1 최종 통계 분석		5,000	1	5,000
7.2 통계분석 결과표 작성		1,000	1	1,000
<b>VIII. Clinical Study Report</b>				<b>6,000</b>
8.1 Table & Figure 제작		2,000	1	2,000
8.2 결과 보고서 작성		3,000	1	3,000
8.3 제작 자료 검증		1,000	1	1,000
<b>IX. IRB submission of CSR</b>				<b>800</b>
9.1 시험결과보고서 제작/IRB 제출	(1처)	800	1	800
<b>X. Others</b>				
총액 (부가세 별도)				74,260
견적가 (부가세 별도)				70,000

Remarks	
1. 적용 기준	
· 피험자수	100명
· 인체적용시험기관수	1처
· 과제기간	15개월 (계약 후 결과보고서 IRB 심의신청까지) (시험기간으로 8개월)
2. 유의사항	연구자 회의비(회의비 또는 식사비)는 의뢰사가 직접 지급하거나 실비로 청구됩니다. 중대한 이상반응 발현 시 관련업무 대응은 별도의 금액이 부가 됩니다.
3. 견적서 제외 항목	"1.3 견적서 내용 1.3.3 견적 포함/제외 항목" 참조
4. 견적서의 유효기한	· 본 견적서의 유효기한은 제출일로부터 1개월입니다. · 견적서의 유효기한이 지날 경우 기준단가의 변동이 있을 수 있습니다.
Q160908	

## 2. 기관생명윤리위원회(IRB) 심의 의뢰

기관생명윤리위원회(IRB) 심의 및 승인을 위하여 임상시험자자료집(Investigator's Brochure)의 작성이 완료되었다. 작성된 미강(표고균사)발효분말[RB-F]의 임상시험자자료집의 내용은 별첨으로 첨부하였음.



3. 인체적용시험 연구종료통지서

CUH201602038002-HE002

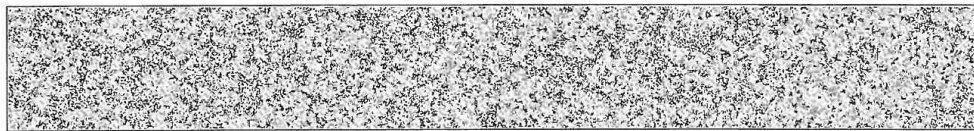
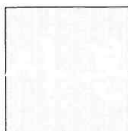
2013.12.23 개정본

## 통지서

※ 본 과제 의 문서보존기간은 3년 입니다.

수 신	의뢰(지원)기관	에스티알바이오텍				
	연구책임자	임상시험센터 채수완				
IRB File No.		CUH 2016-02-038-002	심사내용	종료보고서	통지일자	2017.10.25
연구과제명	국문	면역기능 증진에 대한 RB-F의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험				
	영문	A 8 week, randomized, double-blind, Placebo-controlled clinical trial of RB-F for the evaluation of efficacy and safety on immune function				
임상시험코드			Study Nick Name	STR_RB-F		

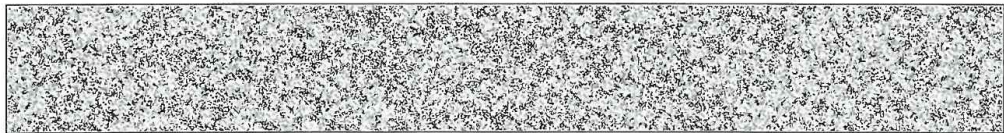
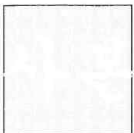
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료기술 <input type="checkbox"/> 의료기기 ( <input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급 ) <input type="checkbox"/> 해당사항 없음					
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input checked="" type="checkbox"/> 인체유래물(검체)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구 <input type="checkbox"/> 기타 ( )					
연구분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구					
연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 ( <input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구 ) <input type="checkbox"/> 기타 ( )					
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)					
일반명	미강(표고균사)발효분말			상품명	RB-F	
전체시험자증례수	전체	100 명	국내	100 명	본원	100 명
연구승인기간	2017.01.18 ~ 2018.01.17					
지원의뢰기관	기관명	에스티알바이오텍		대표(직위)		성명
제출서류목록	(첨부) 연구과제점검리스트					
관련근거	평가일자	2017.10.24				
중간보고시기		비고				



심사결과	● 승인    ○ 시정승인
	연구 종료보고를 승인합니다.

- ⊗ 본 위원회는 국제 임상시험 통일안(ICH) 및 임상시험관리기준(GCP), 생명윤리 및 안전에 관한 법률을 준수합니다.
- ⊗ 연구의 승인유효기간은 최대 1년입니다. 본 통지서에 기재된 승인유효기간을 초과하여 연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 위원회에서 지정한 중간보고 시기에 중간보고서를 제출하여 승인유효기간을 연장하시기 바랍니다.
- ⊗ 승인된 연구도 필요한 경우에는 정규심의에서 재평가하여 변경이나 보안을 요청할 수 있습니다.
- ⊗ 본 위원회에서 승인한 연구계획서에 따라 연구를 수행해야 하며, 위원회의 승인을 받은 연구대상자 설명문 및 동의서, 연구대상자 모집 공고문을 사용해야 합니다.
- ⊗ 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고, 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행해야 합니다. 또한 연구대상자의 보호를 위해 사전 승인 없이 취해진 변경도 위원회에 즉각 보고해야 합니다.
- ⊗ 연구 중에 중대하고 예상하지 못한 이상 약물/의료기기 반응이나, 연구대상자에게 위험을 줄 수 있는 예상하지 못한 문제가 발생할 경우, 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- ⊗ 연구 종료 시 종료/결과보고서를 제출해 주시기 바랍니다.
- ⊗ 연구 결과와 관련하여 본 기관의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시 기관명을 사용할 수 없습니다.
- ⊗ 본 통지서는 임상시험 관리기준 제6호가목2)에 따른 심사결과 통보서로 사용할 수 있습니다.

전북대학교병원 생명의학연구윤리심의위원회위원





## 25절. 개발소재의 상품화 및 제품화 연구

### 1. 개발소재의 상품화 연구

본 과제를 통해 개발된 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물을 활용하여 반가공(과립)소재를 만들어 개발소재의 상품화 가능성을 확인하였다.

제품의 제조공정을 적용하여 진행한 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물의 반가공(과립)소재는 제조공정상에서 원료의 변질 없이 과립이 균일하게 생산됨을 확인하여, 개발소재의 과립제제로서의 상품화 가능성을 확인하였다.

표 173. 개발소재의 제제화 과정



## 2. 개발소재를 적용한 시제품 개발

본 과제를 통해 개발된 기능성식품 소재(원료)는 최적화된 생물전환공정을 통해 생산된 미강(생물전환)산물, 대두(생물전환)산물, 참깨(생물전환)산물로, 생물전환공정 완료 후 별도의 부형제 첨가 없이 동결건조하여 분말화하였다. 최종적으로 미강(생물전환)산물 분말, 대두(생물전환)산물 분말, 참깨(생물전환)산물 분말로 명명하였고, 총 3건의 기능성식품 소재(원료)를 개발 완료하였다.

개발된 미강(생물전환)산물 분말, 대두(생물전환)산물 분말, 참깨(생물전환)산물 분말을 원료로 하여 제조된 최종 시제품을 각각 BioRB-β (미강(표고균사)발효분말), BioSB-β (대두(표고균사)발효분말), BioSI-β (참깨(표고균사)발효분말)로 명명하였고, 총 3건의 시제품을 제작하였다.

개발된 시제품의 표기사항은 아래와 같다.

- (1) 제품명 : BioRB-β (바이오알비-베타), BioSB-β (바이오에스비-베타), BioSI-β (바이오에스아이-베타)
- (2) 식품의 유형 : 기타가공품
- (3) 내용량 : 60g
- (4) 포장재질 : 폴리에틸렌
- (5) 원료명 및 함량 : 미강(표고균사)발효분말, 대두(표고균사)발효분말, 참깨(표고균사)발효분말
- (6) 제조원 및 제조일자
- (7) 소비자 상담실
- (8) 반품 및 교환장소
- (9) 유통기한 : 제품 용기 하단 표시일까지
- (10) 권장섭취량 및 섭취 방법
  - 1회 섭취량은 약 1g(티스푼으로 하나)입니다.
  - 하루 2회 섭취하는 것이 좋습니다.
  - 아침, 저녁 식사 후 섭취하는 것을 권장합니다.
  - 섭취량/섭취횟수를 늘려도 됩니다.
- (11) 섭취시 주의사항
  - 부작용이 의심되면 섭취를 중단하시기를 권장합니다.
  - 알레르기에 민감하거나, 알레르기 체질인 분은 성분을 확인 후 섭취하시기 바랍니다.
- (12) 보관방법
  - 직사광선을 피해 서늘하고 건조한 곳에 보관하시길 바랍니다.
  - 본 제품은 습기에 민감하므로 항상 밀봉하여 보관하시길 바랍니다.
  - 80℃ 이상의 고온에 노출하지 마시길 바랍니다.

표 174. 개발된 시제품의 원재료 및 배합비율

원재료	함량(g)	비율(%)
(생물전환)산물 분말	30	50
부형제	30	50
합계	60	100

본 시제품은 상품화 연구와 품질유지기한 설정 실험을 근거하여 개발을 진행하였으며, 미강(생물전환) 산물 분말, 대두(생물전환)산물 분말, 참깨(생물전환)산물 분말을 활용한 완제품 포장은 아래 표와 같다.

표 175. 개발된 시제품 사진

<b>BioRB-β</b> 미강(표고균사)발효분말	<b>BioSB-β</b> 대두(표고균사)발효분말	<b>BioSI-β</b> 참깨(표고균사)발효분말
		
		
		

3. 제품의 미생물학적, 이화학적, 물리적 품질기준 설정 : 시험 성적서



강원도 춘천시 소양강로 56  
 바이오벤처프라자 3-8호  
 Tel. 033-258-6325 Fax. 033-258-6333

시험 성적서

결 재	담 당	검 토	승 인

제품유형 : 기타가공식품 (곡류가공품) / 시제품

품 명	제 조 일 자	Batch No.
BioRB-β 미강(표고균사)발효분말	2016.8.23	RB-Test-16001

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고
1	성 상	미색의 분말로 고유의 색택 및 향미를 가져야 하며, 이취가 없어야 함.	적 합	
2	이 물	검출되지 않아야 함.	불검출	
3	수 분 함 량	5% 이하	적 합	
4	입 도	No.40(425μm) 98% 통과	적 합	
5	대 장 균 균	유당 배지법	음 성	
		대장균균 건조필름배지법	음 성	
6	일 반 미 생 물 수	규격 외 참고항목	적 합	
7	알 코 올 침 전 물	0.8g 이상	적 합	
8	용 해 도	물에 대한 용해도 22% 이상	적 합	
9	대식세포 활성화능	LPS 대비 80% 이상	적 합	NO Release법 또는 Lysosomal Enzyme assay 법
10	지 표 성 분	감마오리자놀(γ-Oryzanol)	확 인	
판 정				
■ 적합 □ 부적합				

(주)에스티알바이오텍



그림 405 BioRB-β (미강(표고균사)발효분말)의 시험성적서



## 시험성적서

결 재	담 당	검 토	승 인

제품유형 : 기타가공식품 (곡류가공품) / 시제품

품 명	제 조 일 자	Batch No.
BioSB-β 대두(표고균사)발효분말	2016.8.25	SB-Test-16001

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고
1	성 상	미색의 분말로 고유의 색택 및 향미를 가져야 하며, 이취가 없어야 함.	적 합	
2	이 물	검출되지 않아야 함.	불검출	
3	수 분 함 량	5% 이하	적 합	
4	입 도	No.40(425μm) 98% 통과	적 합	
5	대 장 균 균	유당 배지법	음 성	
		대장균균 건조발효배지법	음 성	
6	일 반 미 생 물 수	규격 외 참고항목	적 합	
7	알 코 올 침 전 물	0.8g 이상	적 합	
8	용 해 도	물에 대한 용해도 22% 이상	적 합	
9	대식세포 활성화능	LPS 대비 80% 이상	적 합	NO Release법 또는 Lysosomal Enzyme assay 법
10	지 표 성 분	이소플라본(Isoflavone)	확 인	
판 정				
■ 적합 □ 부적합				

(주)에스티알바이오텍



그림 406 BioSB-β (대두(표고균사)발효분말)의 시험성적서

## 시험성적서

결 재	담 당	검 토	승 인

제품유형 : 기타가공식품 (곡류가공품) / 시제품

품 명	제 조 일 자	Batch No.
BioSI-β 참깨(표고균사)발효분말	2017.10.25	SI-Test-17001

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고
1	성 상	미색의 분말로 고유의 색택 및 향미를 가져야 하며, 이취가 없어야 함.	적 합	
2	이 물	검출되지 않아야 함.	불검출	
3	수 분 함 량	5% 이하	적 합	
4	입 도	No.40(425μm) 98% 통과	적 합	
5	대 장 균 균	유당 배지법	음 성	
		대장균균 건조필름배지법	음 성	
6	일 반 미 생 물 수	규격 외 참고항목	적 합	
7	알 코 올 침 전 물	0.8g 이상	적 합	
8	용 해 도	물에 대한 용해도 22% 이상	적 합	
9	대식세포 활성화능	LPS 대비 80% 이상	적 합	NO Release법 또는 Lysosomal Enzyme assay 법
10	지 표 성 분	리그난(sesamol, sesamin, sesamolol)	확 인	
판 정				
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합				

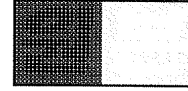
(주)에스티알바이오텍



그림 407 BioSI-β (참깨(표고균사)발효분말)의 시험성적서

4. 2종 이상 제품 출시 : 품목제조신고서

발급번호 : 110M-10JR-F30D-EHLX-W7DH



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)		
	이상종	1955년 10월 15일		
	주소	전화번호		
	강원도 춘천시 소양강로 56(후평동, 바이오벤처타운3-8호)	휴대전화	011 6620107	
영업소	명칭(상호)			
	(주)에스티알바이오텍			
	소재지			
	강원도 춘천시 소양강로 56(후평동, 바이오벤처타운3-8호)			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업등록번호	20020380539
	제품명	미강(표고균사)발효/효소처리분말		
	유통기한	제조일부터 24개월 까지		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	직사광선을 피하고 서늘하고 건조한 곳에 보관 내부 - PE봉투, 외부 - 화이버드럼 또는 종이박스		
	포장방법 및 포장단위	분말 포장 1, 5, 10, 20 kg 단위의 포장		
	성상	미강(표고균사)발효/효소처리분말로 고유의 색깔과 향미를 가지며 이미 ?이취가 없어 야 한다		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음		
기타				

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

2016년 07월 19일

보고인 이상종

강원도 춘천시장 귀하

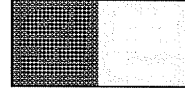
품목보고번호	20020380539-39				
처리부서	보건소 식품의약과	처리자성명	박희정	처리일자	2016년 07월 19일



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

그림 408 미강(생물전환)산물의 품목제조보고서

발급번호 : 11K7-WU9S-73V7-F5N6-H1RD



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 이상종	생년월일(법인번호) 1955년 10월 15일		
	주소 강원도 춘천시 소양강로 56(4동 3-8호 후평동, 바이오벤처프라자)	전화번호		
		휴대전화	011 6620107	
영업소	명칭(상호) (주)에스티알바이오텍	영업등록번호 20020380539		
	소재지 강원도 춘천시 소양강로 56(4동 3-8호 후평동, 바이오벤처프라자)			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2002038053942
	제품명	대두(표고균사)발효/효소처리분말		
	유통기한	제조일로부터 24개월 까지		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	분말 포장 1, 5, 10, 20 kg 단위의 포장		
	성상	대두(표고균사)발효/효소처리분말로 고유의 색택과 향미를 가지며 이미?이취가 없어야 한다.		
	품목의 특성	<input checked="" type="checkbox"/> 고열량·저영양 식품 해당 여부    [ ]에 [ ]아니오 [O]해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 할랄인증 식품 해당 여부    [ ]에 [O]아니오		
기타				

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

2017년 12월 20일

보고인 이상종

강원도 춘천시장 귀하

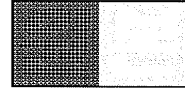
품목보고번호	20020380539-42				
처리부서	보건소 식품의약과	처리자성명	박희정	처리일자	2017년 12월 21일



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

그림 409 대두(생물전환)산물의 품목제조보고서

발급번호 : 11J7-AU1S-U3P7-1506-4094



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	이상종	1955년 10월 15일	
	주소	전화번호	
	강원도 춘천시 소양강로 56(4동 3-8호 후평동, 바이오벤처프라자)	휴대전화	011 6620107
영업소	영칭(상호)	영업등록번호	
	(주)에스티알바이오텍	20020380539	
	소재지	강원도 춘천시 소양강로 56(4동 3-8호 후평동, 바이오벤처프라자)	
제품정보	식품의 유형	기타가공품	요청하는 품목제조 보고번호
			2002038053943
	제품명	참깨(표고균사)발효/효소처리분말	
	유통기한	제조일부 24개월 까지	
	품질유지기한		
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재	
	용도 용법	뒷장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	분말 포장 1, 5, 10, 20 kg 단위의 포장	
	성상	참깨(표고균사)발효/효소처리분말로 고유의 색택과 향미를 가지며 이미?이취가 없어야 한다.	
품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부    [ ]에 [ ]아니오 [O]해당 없음 ■ 할랄인증 식품 해당 여부        [ ]에 [O]아니오		
기타			

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

2018년 01월 25일

보고인 이상종

강원도 춘천시장 귀하

품목보고번호	20020380539-43	처리자성명	박희정	처리일자	2018년 01월 25일
처리부서	보건소 식품의약과				



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

그림 410 참깨(생물전환)산물의 품목제조보고서

## 26절. 개발제품에 대한 시장진입전략 수립 : 상업화 추진 계획

### 1. 제품 양산계획

#### 가. 원료수급 계획

- 주력 원재료인 미강은 농산물원료를 유통하는 업체인 쌀농부를 통해 미강을 안정적으로 공급 받는 것이 가능한 것을 확인하였다.
- 또한 당사의 효능물질은 미강을 구성하는 물질 중 쌀눈은 필요가 없는 것으로 생각되며 쌀눈이 제외된 미강을 쌀눈만을 주력으로 유통하고 있는 업체인 (주)에이원이쌀눈을 통해 대량으로도 공급이 가능한 것을 확인하였다.
- 대두박 및 참깨박의 경우는 식용유 및 참기름제조회사를 통해 공급이 가능한지 여러경로를 통해 알아보고 있는 중에 있다.

#### 나. 소재(원료)생산 계획

- (주)에스티알바이오텍은 건강기능식품인 홍국의 소재(원료) 생산시설을 보유하고 있어 본 과제를 통해 개발된 농산부산물 생물전환소재를 즉시 생산할 수 있는 생산 인프라를 이미 구축하고 있어 즉각적인 소재(원료)생산이 가능하다.
- 소재(원료)의 판매량이 대폭 증가하더라도 당사가 입주하고 있는 (재)춘천바이오산업진흥원이 소재(원료)생산시설을 구축하고 있어 즉각적인 대응이 가능하다.
- 또한 현재 소재(원료)생산시설의 공장 건립을 추진하고 있어 소재(원료) 생산에 대해서는 문제없이 진행될 수 있을 것으로 판단된다.

#### 다. 제품(완제품)생산 계획

- 제품(완제품) 생산과 관련해서는 제품(완제품) GMP생산시설을 보유하고 있는 전문위탁생산업체에서 생산하는 방안과 당사가 입주하고 있는 (재)춘천바이오산업진흥원의 제품(완제품)GMP생산시설을 활용하는 방법 중 당사에 적합한 방법으로 진행이 가능하다.
- 따라서 제품(완제품)의 생산에 대해서는 차질 없이 진행될 수 있을 것으로 판단된다.

## 2. 판로 확보 및 마케팅 계획

### 가. 개별인정 전 판매전략

- 개별인정을 획득하기 전이라도 당사가 합자로 설립한 건강식품 유통전문기업인 (주)ATR이문텍을 통해, 이미 인정된 건강기능식품의 기능성원료를 사용한 제품에 효능을 증가시키는 차별화원료로 사용하여 제품을 우선적으로 생산한다.
- 본 과제를 통해 개발된 소재는 식약처 개별인정을 받지 않아 기능성 표현에 현재 상황에서 한계가 있기에 시판(온라인판매, 대리점판매 등 시중판매)업체에서의 판매는 어려움이 클 것으로 예상되지만 방문판매업체나 다단계업체의 경우에는 차별화된 소재의 우월성을 개별접촉을 통해 제품 유통을 하는 것이 가능하기 때문에 본 과제를 통한 효능자료와 생산된 제품의 체험을 통해 개별인정을 받기 전에도 판매될 수 있도록 적극적인 영업을 추진한다.
- 방문판매업체, 다단계업체의 발굴 또한 무분별한 확장이 아닌 당사의 영업망이 확보하고 있는 OEM업체인 (주)한국씨엔에스팜, 성신식품(주), (주)에프엔디 등을 통해 건설하고 신뢰할 수 있는 업체를 추천받은 후 추천받은 업체를 선별적으로 접촉함으로써 개발소재와 유통업체가 같이 성장할 수 있는 방향으로 영업한다.

### 나. 자사유통 전략

- 당사에서도 소재(원료) 판매를 원활하게 진행하기 위해 필요한 레프런스제품을 우선적으로 제조하여 온라인쇼핑몰을 통해 제품을 직접 판매하고 쌍방향 커뮤니케이션을 통해 소재 및 제품 홍보를 지속적으로 진행하여 향후 당사 유통망을 구축할 수 있는 토대를 마련한다.
- 생산된 레프런스제품의 제품판매 및 유통회사 및 전시회 샘플로 활용하고 지속적인 커뮤니케이션을 통해 기존 기능성소재와의 시너지 효과의 확인하고 고개 및 수요업체의 needs를 파악하는 등 시장경쟁력을 확인하여 당사의 소재 및 제품의 나아갈 방향을 제시하는데 활용한다.
- 당사에서 레프런스제품에 대한 온라인쇼핑몰을 준비하고 있으며 이를 통해 제품을 직접 판매와 함께 쌍방향 커뮤니케이션을 통해 소재 및 제품 홍보를 지속적으로 진행하여 향후 당사 유통망을 구축할 수 있는 토대를 마련한다.
- 생산된 제품은 효능을 확실히 볼 수 있는 대상을 선정하기 위해 효과가 나타날 것으로 기대되는 해당 질환의 환우회, 온라인카페 등에 접촉하여 무상 또는 유상으로 공급하여 효능을 체험하게 함으로써 충성고객을 확보하여 향후 입소문 마케팅의 근간을 확보한다.
- 또한 전문 인터넷마케팅 업체와 제휴하여 지속적이고 체계적인 홍보를 통해 시장을 확대해 나간다.
- 지속적인 직접판매를 통해 효능을 체험한 고객과의 유대강화를 통해 확보된 충성고객층이 형성되면 충성고객이 당사의 주요판매원이 될 수 있는 전국적 유통망을 만들어 제품 유통시장에 진출한다.

#### 다. 개별인정 과정의 판매전략

- 당사와 밀접한 유대관계를 가지고 있으면서 건강식품시장에서 지명도가 있는 (주)이룸, (주)천호식품, (주)우리레인보우 등에 개별인정 전 단계에서 제품화에 필요한 정보를 제공하여 건강기능식품 개별인정 후 제품화되는 일정을 최소화 하여 개발소재에 대한 관심을 고취시킨다.
- 먼저 유통라인을 선점하고 현격한 실적을 이룩한 업체에 대해서는 해당 유통라인과 제형에 대해 독점권을 부여하는 것을 상기시켜 개별인정과 동시에 제품을 출시하고 마케팅 할 수 있도록 유도한다.
- 국내 주요 건강기능식품 메이저 업체인 (주)한국인삼공사, (주)삼웨이, (주)태평양, (주)한국야쿠르트 등에는 개별방문을 통해 당사 개발소재의 개별인정 진행상황을 공유하여 당사 소재에 대한 관심을 유지시킨다.
- 국내 건강기능식품 개발담당자를 대상으로 한 설명회를 자체적으로 개최하여 개발소재에 대한 정확한 정보를 제공하여 제품화의 토대를 잡도록 하고 소재에 대한 관심을 증폭시킨다.
- 국내 전문 저널에 정보 광고를 통해 개발소재에 대한 정보 제공 및 관심을 유도한다.

#### 라. 개별인정 후 판매전략

- 개별인정 전, 개별인정 과정을 통해 확보한 효능 자료 및 제품 컨셉, 고객 needs 등을 시장을 주도할 수 있는 주요 기업에 전달하여, 개발될 소재가 기존 주력제품에 적용되거나 또는 신제품으로 출시될 경우 주력제품으로 진행될 수 있도록 지원하여 국내 소재 판매를 극대화 시킨다.
- 제품 확대에 의한 유통업체간 무분별한 경쟁에 따른 소재(원료)가격 압박을 받지 않도록 다른 추가 신제품도 지속적으로 개발하여 제품가격이 문란해지지 않도록 하여 대한민국 대표소재로 발 도움 한다.

#### 마. 수출전략

- 바이오소재의 경우 해외유명 전시회를 장기간 지속적으로 참가하면서 해외유명바이어와 신뢰관계를 형성하고 해외에서도 통용되는 자료를 축적해야 한다고 알려져 있다. 이에 당사의 역량을 집중할 수 있는 전시회만 선별적이고 지속적으로 참여하는 것이 좋다고 판단하여 2016년 하반기 부터 저명한 바이오소재전시회 브랜드 중 VitaFood-Europe, Supplside-west, Fi-Korea 만 선별적이고 참여하기 시작했으며 향후에도 5년 이상 유지할 예정이다.
- 건강식품 선진국시장인 미국, 서부유럽, 일본 등을 우선적으로 거점으로 진출한 후 선진국에서의 성공성과를 바탕으로 개발도상국에서는 소재(원료)의 효능에 대한 평판에 당사를 찾아올 수 있도록 하여 소재의 가격을 유지시켜 이익을 극대화 시켜나간다.



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	미강(생물전환)산물	개발후 현재까지	1.58 억원	
			향후 3년간 매출	10 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			1 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			1 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세 부 항 목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3년		
	소요예산(백만원)		10,000 (백만원)		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1.58	5	50
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
가. 1차년도			
연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용	
[제1세부 : 강원대학교 이우환] 벼 미강, 대두박, 참깨박 소재의 지표성분 설정	100	① 지표성분 설정 및 분석법 확립 -개발소재별 유효성분 및 지표성분 조사 -개발소재별 유효성분 농도 조사	
개발소재의 피부건강 관련 in vitro 활성 평가 및 상관관계 조사	100	① 벼 미강, 대두박, 참깨박 소재의 in vitro 활성 평가 -in vitro 항산화 활성 평가 -in vitro tyrosinase 저해활성 평가 -생물전환소재 지표성분 및 유효성분 함량과 생리활성간의 상관관계 구명	
[제1협동 : STR바이오텍 박선옥] 농산부산물 원료 탐색	100	① 수급 가능한 농산부산물의 원료 탐색을 위하여 -벼(현미)의 원물 및 부산물(미강) 원료에 대한 확정 -두류(대두)의 원물 및 부산물(콩류박) 원료에 대한 원산지별 탐색 -종실류(참깨/유채씨)의 원물 및 부산물(종실박) 원료에 대한 원산지별 탐색	
농산부산물 유래 생물전환소재의 in vitro 효능 평가 및 QC를 위한 bioassay 분석법 확립	100	① in vitro 효능 평가 및 QC를 위한 bioassay 분석법 확립 -면역활성 평가를 위한 대식세포 활성화능 평가 및 분석법 확립 -면역활성 평가를 위한 대식세포의 cytokines 분비능 평가 및 분석법 확립 -면역활성 평가를 위한 대식세포의 포식능 및 살해능 평가	
농산부산물의 생물전환공정 조건 설정 및 소재화를 위한 생산공정 표준화	100	① 선정된 농산부산물의 생물전환공정 최적화 -농산부산물의 생물전환을 위한 배양배지화 전처리공정 개발 -bioassay 기반의 발효 및 효소처리 생물전환공정 최적화 -추출 및 회수공정 최적화 ② 소재화를 위한 생산공정 표준화 -생산공정별 지표성분 분석을 통한 공정 표준화	
농산부산물 유래 생물전환소재 생산	100	①벼 미강 유래 표준화된 발효미강 생산(효능 평가 및 독성시험 용) ②두류(대두)박 유래 생물전환소재 생산(효능 평가 용) ③종실(참깨/유채)박 유래 생물전환소재 생산(효능 평가 용)	
Scale-up을 위한 최적화	100	① 생산성 향상을 위한 생물전환공정 자동화 연구 ② Scale-up을 위한 생산공정 factor 조사	
미강 유래 개발소재의 안전성 검증 (외부시험의뢰 GLP)	100	① 개발 시제품의 안전성시험 실시 -발효미강을 적용한 시제품의 안전성시험 실시 :설치류 및 비설치류 단회 투여 독성시험 :유전독성시험(복귀 돌연변이, 염색체 이상 시험, 소핵시험)	
[제2협동 : 아주대학교 남석현] 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 면역 관련 in vitro 및 in vivo 효능 평가	100	① 마우스모델에서의 항병력(항살모넬라/항influenza-virus) 강화 평가 -내재면역계 세포 및 Th1 세포의 활성화 평가	
	100	② 마우스모델에서의 항당뇨/중성지방 저하 효능 평가 -1형 당뇨 마우스모델에서 β-세포 보호 효과 확인 및 당대사 관련 효소 조절능 평가 -2형 당뇨 마우스모델에서 당대사 관련 효소 조절능 및 지방 저하 효과 평가	
	100	③ 알코올성 지방간/간염 마우스모델에서의 효능 평가 -간세포 산화 억제 효능 및 간 조직 손상 억제 효과 확인	

나. 2차년도

연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
[제1세부 : 강원대학교 이옥환] 공정별 지표성분 변화 조사	100	① 공정별 미강, 대두박, 참깨박 소재의 지표성분 변화 조사 -소재별 유효성분 변화 조사 -단계별 유효성분 변화 조사
개발소재의 피부건강 관련 in vitro 활성 평가	100	① 공정별 미강, 대두박, 참깨박 소재의 in vitro 활성 평가 -in vitro 항산화 활성 평가 -in vitro tyrosinase 저해활성 평가
피부세포모형을 이용한 피부건강 관련 활성 평가	100	① 항산화 활성 평가 및 작용기전 구명 -세포독성평가 -HDF 세포 항산화 활성 평가(XTT assay 및 DCF-DA staining) -Antioxidant enzyme response에 대한 mRNA 및 protein level분석  ② 항노화 활성 평가 및 작용기전 구명 -HDF 항노화 활성 평가(X-gal staining 및 collagen assay) -주요작용기전연구(RT-PCR 및 western blot)
[제1협동 : STR바이오텍 박선주] 대량생산 체제에서의 농산부산물의 생물전환공정 scale-up 확립	100	① 선정된 농산부산물의 생산공정 scale-up -농산부산물의 배양배지화 전처리공정 scale-up -생물전환공정 scale-up -회수공정 scale-up -50L, 500L 규모의 scale-up을 위한 생물전환공정 최적화
생산공정 validation 및 생산공정 표준화	100	① 생산공정 validation 및 생산공정 표준화 -50L 발효조 규모에서의 반복시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증 ② 공정 표준화 -생산공정별 지표성분 분석을 통한 공정 표준화
Pilot 생산규모에서의 시제품 생산	100	① Pilot 규모에서의 시제품 생산 -50L 및 500L 규모에서의 소재 시제품 생산 :벼 미강 유래 표준화된 발효미강 생산(효능 평가 및 독성시험 용) :두류(대두)박 유래 생물전환소재의 시제품 생산(효능 평가 용) :총질(참깨/유채)박 유래 생물전환소재의 시제품 생산(효능 평가 용)
미강 유래 개발소재의 안전성 검증 (외부시험의뢰 GLP)	100	① 개발 시제품의 안전성시험 실시 -발효미강을 적용한 시제품의 안전성시험 실시 :설치류 13주 반복 투여 독성시험
미강 유래 개발소재의 유효성 평가를 위한 인체적용시험 실시 (외부시험의뢰 CRO)	100	① 표준화된 발효미강의 인체적용시험 설계 -인체적용시험 설계 -기관생명윤리위원회(IRB) 심의 및 개시
개발소재의 안정성 및 제제화 연구	100	① 기능식품 소재 3건 이상 및 반가공 소재 상품화 시제품 3건 이상 ② 개발소재의 안정성 및 저장성 조사 :온도, 습도, 포장재의 종류, 포장 용기의 종류, 저장기한 등 ③ 기초 제제화를 위한 소재의 물성 테스트 ④ 개발소재의 품질 유지 기한 설정
[제2협동 : 아주대학교 남석현] 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 면역 관련 in vitro 및 in vivo 효능 평가	100	① 알레르기비염/천식 마우스모델에서의 효능 평가 -Th2 활성화 억제 효능 확인 및 폐 보호 효과 확인
	100	② 아토피 마우스모델에서의 효능 평가 -IgE/염증성 cytokine 생성 억제능 및 세포 침윤 억제능 확인
	100	③ 마우스모델에서 골대사 관련 뼈건강 효능 평가 -파골세포 분화 및 활성화 억제 효과 확인 -골다공증 억제 효과 확인

다. 3차년도

연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
[제1세부 : 강원대학교 이옥환] 시제품의 지표성분 변화관찰	100	① 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 지표성분 변화 관찰 -시제품의 지표성분 변화 조사
벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 피부미용 관련 in vivo 효능 평가	100	① 피부노화 동물모델을 이용한 피부미용 관련 활성 평가 -피부노화동물모델을 이용한 주름개선 효능 평가 -피부노화동물모델을 이용한 주요작용기전 연구
[제1협동 : STR바이오텍 박선주] 대량생산 체제에서의 농산부산물의 생물전환공정 scale-up	100	① 선정된 농산부산물의 생산공정 scale-up -500L, 5000L 규모의 scale-up을 위한 생물전환공정 최적화 -5,000L급 발효조에서의 최적 생물전환공정의 산업화 적용
Pilot 생산규모에서의 시제품 생산	100	① Pilot 규모에서의 시제품 생산 -500L 및 5,000L 규모에서의 소재 시제품 생산 :벼 미강 유래 표준화된 발효미강 생산(효능 평가 및 인체적용시험 용) :두류(대두)박 유래 생물전환소재의 시제품 생산(효능 평가 및 제품화 용) :중실(참깨/유채)박 유래 생물전환소재의 시제품 생산(효능 평가 및 제품화 용)
개발소재의 안정성 및 제제화 연구 (계속)	100	① 기능식품 소재 3건 이상 및 반가공 소재 상품화 시제품 3건 이상 ② 개발소재의 안정성 및 저장성 조사 ③ 기초 제제화를 위한 소재의 물성 테스트 ④ 개발소재의 품질 유지 기한 설정
개발소재의 상품화 및 제품화 연구	100	① 개발소재의 상품화 연구 -개발 또는 복합소재의 상품화 연구 ② 개발소재를 적용한 시제품 개발 ③ 제품의 미생물학적, 이화학적, 물리적 품질기준 설정 ④ 완제품 포장 개발 연구 ⑤ 제품 출시 2종 이상
미강 유래 개발소재의 유효성 평가를 위한 인체적용시험 실시 (외부시험의뢰 CRO)	100	① 표준화된 발효미강의 인체적용시험 실시 -인체적용시험 실시 -결과보고서 작성
개발 제품에 대한 시장 진입 전략 수립	100	① 개발 제품에 대한 시장 진입 전략 수립 - 제품 출시 및 제품 출시에 따른 판매 홍보 전략 수립
[제2협동 : 아주대학교 남석현] 벼 미강, 대두박, 참깨박 생물전환소재의 면역 관련 in vitro 및 in vivo 효능 평가	100	① LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 생체 안전성 평가 -장기무게 측정 및 cytokine profiling을 통한 생체 안전성 평가 -TNF- $\alpha$ 생성 억제 및 간/신장독성 억제능 평가
	100	② 마우스모델에서 항암 효능 평가 -피하 이식된 종양의 성장 억제 및 염증관련 단백질 발현 억제 효과 확인 -폐 전이 종양의 전이 억제 효과 확인 -종양 관련 면역반응 활성화 효과 확인
	100	③ 대장염증 마우스모델에서의 효능 평가 -염증발병조직 내 염증성 cytokine 생성 억제능 확인

#### 4-2. 관련분야 기여도

##### 가. 기술적 측면

- 농산부산물로부터 기능성소재 생산기술을 위한 원료 탐색 및 생산공정 표준화
- 농산부산물 관련 업계의 상품화 증진을 위한 기반 기술 마련
- 농산부산물 기능성소재의 제품화를 위한 핵심기술 개발
- 농산부산물 기능성소재의 면역, 항산화, 피부건강 등의 *in vitro* 및 *in vivo* 효능 평가를 통한 농산부산물의 고기능성 고부가가치 소재화
- 농산부산물 기능성소재의 효능을 국내 및 국제 저널에 게재하여 기능성 소재로의 가능성 입증

##### 나. 경제적·산업적 측면

- 농산부산물 기능성소재의 식품화로 인한 생산업체의 경쟁력 제고
- 기술 축적을 통한 다양한 농산부산물 관련 제품 시장 진출의 기반 확보
- 농산부산물 기능성소재에 대한 brand화 및 사업화로 인한 고부가가치 창출

## 5. 연구결과의 활용계획

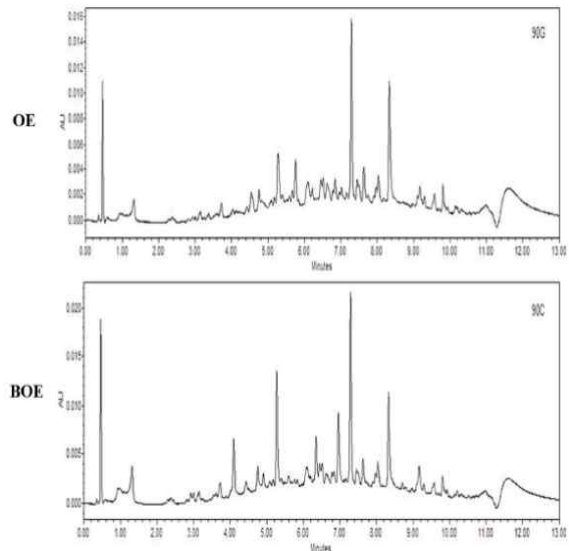
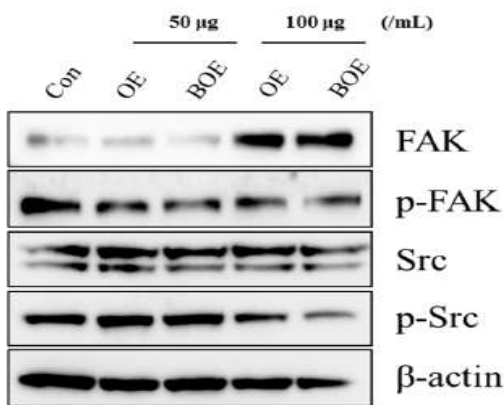
코드번호	D-07
<p>1. 농산부산물의 기능성소재 개발 기술 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종별 농산부산물의 원물 및 부산물의 탐색을 통해 원료 관리 및 원재료 확보 방안 수립</li> <li>- 미강, 대두박, 참깨박 유래 생물전환 소재의 개발 및 생산을 위하여 조건 설정 및 소재화를 위한 생산 공정 표준화 확립</li> <li>- 선정된 농산부산물에 대한 대량생산을 위하여 50L, 500L 및 5000L 규모의 생물전환공정 scale-up 및 validation을 통한 표준생산공정 구축</li> </ul> <p>2. 개발된 농산부산물 기능성소재의 가공적성 연구 및 소재를 적용한 시제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각 개발소재의 기초 제제화를 위한 물성 테스트를 기반으로 제제화 연구를 통한 제품의 품질유지 기한 설정을 통해 안정성 확보</li> <li>- 미생물학적, 이화학적 및 물리적 품질기준의 설정을 위한 제품 표준화 작업 수행</li> </ul> <p>3. 개발된 농산부산물 기능성소재의 직접 상품화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 완제품의 포장 개발 연구와 개발제품에 대한 시장 진입 전략 수립을 통해 향후 개발소재를 적용한 제품의 출시를 위한 준비 및 판매 홍보 전략 수립</li> </ul> <p>4. 생산체계 구축과 brand화를 통한 소비자 유통채널에 직접공급</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- (주)에스티알바이오텍은 건강기능식품 생산시설을 보유하고 있어 즉각적인 소재 생산이 가능하며, 생산이 대폭 증가하더라도 (주)에스티알바이오텍이 입주하고 있는 (재)춘천바이오산업진흥원 소재 GMP 생산시설을 활용하여 즉각적인 대응 가능</li> </ul> <p>5. 최근 소비자 니즈에 부합하고 농산 부산물의 활용도를 제고</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효능 자료 및 제품 컨셉, 고객 needs 등, 소재가 기존 주력 제품에 적용 되거나 또는 신제품으로 출시될 경우 주력제품으로 진행될 수 있도록 지원하여 국내 소재 판매 극대화</li> </ul> <p>6. 다양한 농산 부산물로부터 추가 연구사업 추진과 이를 통한 사업화, 관련 투자 계획 수립에 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각 개발소재의 유효성분 및 지표성분의 표준화, 생물전환공정 최적화 및 bioconversion에 의한 시너지 효과를 기반으로 하는 다양한 기능성(면역기능 증진, 뼈건강, 피부건강, 항산화, 면역조절 효과 등) 관련 효능 및 기전 연구를 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 평가를 통해 농산부산물 제품화 및 부산물 활용 기반연구의 자료로서 활용</li> </ul>	

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호 D-08

### 1. 생물전환(Bioconversion) 기술 연구동향

- 바위솔은 위궤양이나 위암 질환을 치료하기 위하여 민간요법으로 사용되어온 식물로써 *Aspergillus kawachii*로부터 분리된 효소를 사용하여 생물전환을 실시하여, Ms-1 endothelial cell의 혈관형성 억제능을 평가한 결과, 바위솔 비 생물전환 추출물에서는 큰 효과가 나타나지 않았으나, 바위솔 생물전환 추출물에서 endothelial cell의 migration, adhesion 및 tube formation 형성을 확연히 억제하는 것으로 나타났다. 또한 UPLC 분석을 통해 비 생물전환 추출물과 생물전환 추출물의 크로마토그램을 비교한 결과, 생물전환에 의하여 유의한 화합물의 변화를 나타내는 것을 확인하였다. (Lee et al, 2017)



- *Latobacillus plantarum*을 이용하여 생물전환된 홍삼의 경우, 총 페놀 함량 및 DPPH radical 소거능, 지질과산화 억제능이 비 생물전환 홍삼 추출물과 비교하여 보았을 때, 생물전환 홍삼추출물에서 유의적으로 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 또한, HPLC를 이용하여 진세노사이드를 분석한 결과, 비 생물전환 홍삼 추출물에서는 Rb2와 Rb3 등과 같은 장내 생체 이용률이 매우 낮은 진세노사이드가 대다수 검출 되었지만 생물전환시 생체 흡수율이 높은 진세노사이드 Rd로 전환되는 것으로 나타났다. (Jung et al, 2017)

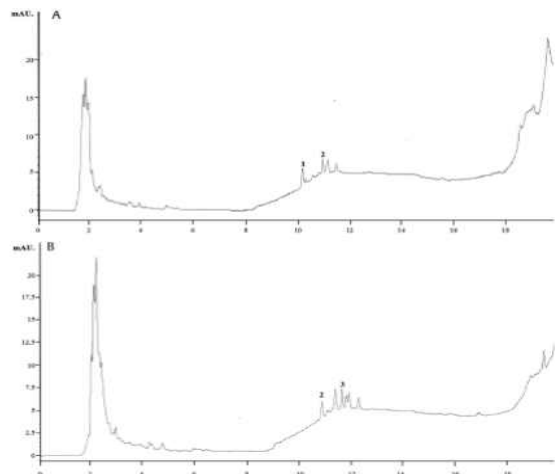
Table 2  
Antioxidant effects of red ginseng extract and fermented red ginseng extract by *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P

Sample	Concentration (mg/ml)	DPPH radical scavenging activity (%)	Inhibition of $\beta$ -carotene and linoleic acid oxidation (%)	Inhibition of lipid peroxidation (%)
Red ginseng extract	0.25	4.33 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	30.38 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	40.30 $\pm$ 1.16 <sup>c</sup>
	0.5	8.01 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	33.42 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	59.54 $\pm$ 0.70 <sup>d</sup>
	1	14.31 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	35.43 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	71.19 $\pm$ 2.49 <sup>e</sup>
	2	23.40 $\pm$ 0.48 <sup>d</sup>	43.19 $\pm$ 0.62 <sup>d</sup>	82.69 $\pm$ 2.06 <sup>f</sup>
	4	35.54 $\pm$ 1.20 <sup>e</sup>	47.27 $\pm$ 0.06 <sup>e</sup>	87.61 $\pm$ 0.65 <sup>f</sup>
Fermented red ginseng extract	0.25	3.94 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	44.05 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	53.08 $\pm$ 1.54 <sup>c</sup>
	0.5	7.17 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	47.92 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>	71.83 $\pm$ 0.62 <sup>d</sup>
	1	12.81 $\pm$ 0.61 <sup>c</sup>	55.98 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>	78.17 $\pm$ 0.42 <sup>e</sup>
	2	17.78 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>	57.71 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	87.77 $\pm$ 1.53 <sup>f</sup>
	4	22.94 $\pm$ 0.71 <sup>e</sup>	61.95 $\pm$ 0.34 <sup>e</sup>	93.99 $\pm$ 0.27 <sup>f</sup>
Ascorbic acid	0.1	96.30 $\pm$ 0.18		
BHT	0.1		80.91 $\pm$ 2.43	76.90 $\pm$ 0.70

Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation

<sup>a-f</sup> Means in the same column followed by different letters represent significant differences by concentration ( $p < 0.05$ )

BHT, 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; SD, standard deviation



## 2. 건강기능식품 국외 시장 현황

- 세계 건강기능식품 시장 규모는 2015년 기준, 1,179억 달러 규모로 추산되며 연평균 7.3% 정도의 성장세를 나타내고 있다. 앞으로 2020년 기준, 1,677억 달러의 규모로 성장할 것으로 전망된다.
- 세계 건강기능식품 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 미국은 약 400억 달러 규모이며 그 다음으로 중국이 약 163억 달러, 일본이 약 109억 달러의 규모를 형성하고 있다. 한국은 21억 달러 규모의 시장을 형성하며 세계 시장에서 점유율은 1.78%를 차지하고 있다. 그 중 미국은 천연/유기농 제품이 769억 달러로 가장 큰 비중을 차지하고 있으며 보충제 시장은 408억 달러로 나타났다. 중국의 경우 비타민, 무기질 관련 제품이 50% 이상의 점유율을 보이며 다음으로 면역증강 관련 제품이 약 10% 정도의 점유율을 가지고 있다.

## 7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음	

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.



## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11		
<p>○ (1) 연구실 안전점검(연안법 제8조)</p> <p>1) 연구실 안전점검</p> <p>① 개요 : 연구실 내 잠재되어 있는 위험요소의 발견과 개선대책의 수립</p> <p>② 점검대상 : 이공계대학 소속 연구·실험실</p> <p>③ 실시방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구실 안전점검 전문기관에 용역 의뢰</li> <li>- 산업위생, 화공, 기계, 전기, 소방 각 분야별 전문가 투입, 점검 실시</li> </ul> <p>④ 점검내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연안법 제7조에서 정한 사항의 점검과 연구실 실내 공기질(VOC, CO, CO<sub>2</sub>, DUST 등) 측정</li> </ul> <p>2) 일상점검</p> <p>① 개요 : 연구활동종사자가 매일 연구개발활동 시작 전 연구실 안전상태를 점검</p> <p>② 점검대상 : 이공계대학 소속 연구·실험실</p> <p>③ 실시방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구활동종사자가 연구실의 상태에 대하여 육안점검하고 점검결과를 안전점검 일지에 기록 보관(2년간)</li> </ul> <p>④ 점검내용 : 연구에 활용되는 실험기자재 및 실험재료의 이상유무, 보호구 점검</p> <p>(2). 교육·훈련(연안법 제18조)</p> <p>1) 개요 : 연구실 안전관리에 관한 정보를 연구활동종사자에게 제공</p> <p>2) 교육방법</p> <p>① 자체 안전교육 실시요청</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 교육구분 : 신규 채용에 따른 교육·훈련</li> <li>- 교육방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 시설관리과에서 제작·배부하는 교재 배부/ 책임교수 주도하 안전교육 실시</li> <li>· 자체교육결과를 안전교육대장에 기록하여 보관</li> </ul> </li> <li>- 교육대상 : 신규채용 등에 따른 교육·훈련 대상자</li> </ul> <p>② 온라인 안전교육 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 교육구분 : 정기 교육·훈련</li> <li>- 교육방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 강원대학교 연구실 안전정보시스템에 안전교육 콘텐츠 탑재하여 학기별 6시간의 교육과정 제공</li> <li>· 연구활동종사자는 연간 12시간의 온라인 교육 이수하여야 함</li> </ul> </li> <li>- 교육대상 : 연구실에 소속된 상시 연구활동종사자 (대학생, 대학원생, 연구원)</li> </ul> <p>③ 집합식 안적교육</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 교육구분 : 정기 교육·훈련</li> <li>- 교육방법 : 연구실 안전교육 전문기관에 용역 의뢰하여 전문 안전교육 실시</li> <li>- 교육대상 : 신규 채용 등에 따른 교육·훈련, 정기 교육·훈련 미이수자/ 대학원생, 연구원 등 고위험 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 고난이도의 연구를 수행하는 연구활동종사자</li> </ul> </li> </ul> <p>참고) 법정 교육이수 시간</p>				

구 분	교육대상	교육시간
신규 채용 등에 따른 교육·훈련	신규채용된 연구활동종사자 (계약직 포함)	8시간 이상
	신규 연구개발활동에 참가하는 연구활동종사자(대학생·대학원생 등)	2시간 이상
정기 교육·훈련	연구활동종사자	반기별 6시간 이상
특별안전 교육·훈련	중대 사고 발생 및 연구내용 변경 등 필요성이 인정되는 연구활동종사자	2시간 이상

**(3) 건강검진(연안법 제18조)**

- 1) 개요 : 연구활동종사자의 건강상태 확인 및 건강증진에 기여
- 2) 대상 : 화학약품을 취급하거나 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자
- 3) 검진내용 : 일반건강검진

일반검진 항목(기본검사)		
1. 검진상담료	5. 식전혈당	9. AST(SGOT)
2. 흉부방사선검사	6. 총콜레스테롤	10. ALT(SGPT)
3. 요단백	7. HDL콜레스테롤	11. 감마지피티
4. 혈액소	8. 트리글리세라이드	12. 혈청크레아티닌

**(4) 연구활동종사자 보험(연안법 제14조)**

- 1) 개요 : 연구활동종사자가 연구개발활동(교과과정 포함)중에 발생한 사고로 인한 부상·질병·신체장해·사망 등 생명 및 신체상의 손해를 보상하는 보험
- 2) 보험명 : 연구활동종사자 보험
- 3) 보장기간 : 1년 단위 재계약
- 4) 가입대상
  - 연구활동종사자
- 5) 보상범위

구 분	지 급 사 유	보 장 한 도
사 망	사망·질병 사망·치료 중 사망	1억원
후유장해	교육과학기술부장관이 최근 고시한 「연구실사고에 대한 보상기준」이상 지급	1억원
부 상	교육과학기술부장관이 최근 고시한 「연구실사고에 대한 보상기준」이상 지급	1천만원

※ 1인당 보상금액이며, 사고인원수 또는 사고발생수에 제한을 두지 않음

**(5) 기타 연구실에서 실행 가능한 안전조치 사항**

- 안전보건표지 부착(산업안전보건법 참조)/ 연구수행에 필요한 안전보호구 확보
- 연구실 실정에 맞는 안전수칙 마련/ 연구실 안전확보를 위한 정기회의 개최 및 결과 기록 보관
- 물질안전보건자료(MSDS) 비치 및 관련 교육 실시
- 고압가스 및 화학약품, 실험폐기물 안전 취급·보관 대책 마련 등

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Comparative Analysis of $\gamma$ -Oryzanol, $\beta$ -Glucan, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Fermented Rice Bran of Different Varieties	강원대학교	1저자, 교신저 자	nutrients	3.550	2017.06.03	단독사사	SCI / 2
2	논문	<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance Extracts Attenuated H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and UVB-Induced Skin Photo-Aging by Activating Antioxidant Enzymes and Inhibiting MAPK Pathways	강원대학교	1저자, 교신저 자	International Journal of Molecular Sciences	3.226	2017.06.05	중복사사	SCI
3	논문	Anti-Photoaging Effect of Jeju Putgyul (Unripe Citrus) Extracts on Human Dermal Fibroblasts and Ultraviolet B-induced Hairless Mouse Skin	강원대학교	1저자, 교신저 자	International Journal of Molecular Sciences	3.226	2017.09.25	중복사사	SCI
4	특허	미강생물전환물을 함유하는 면역증강용, 당뇨개선용, 고지혈증 개선용 또는 간 보호용 조성물	(주)에스티알바이오텍	-	대한민국	-	2017.08.18	단독	-
5	기타	농산부산물의 지표성분 분석법 연구 관련 기술 및 노하우	강원대학교	-	대한민국	-	2017.04.18	단독	기술이전

## 11. 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당 사항 없음.	

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 통계청, 2010, 농작물 생산통계</li> <li>○ 한국농촌경제연구원, 2007, 농어부문 바이오매스의 이용활성화를 위한 정책방향과 전략</li> <li>○ 식품의약품안전청, 2008, 콩가공식품산업(장류)의 현황과 발전과제</li> <li>○ 농림수산식품부, 2008, 양정자료</li> <li>○ 통계청, 2010, 농업부문 전망모형 KREI-KASMO</li> <li>○ 농림수산식품부, 2006, 농작물생산통계</li> <li>○ 농림수산식품부, 2010, 농작물생산통계</li> <li>○ 한국식품안전관리인증원, 2017, 2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석</li> <li>○ 식품의약품안전처, 2016, 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황</li> <li>○ 연구성과실용화진흥원, 2016, 건강기능식품 시장 동향</li> <li>○ Lee, S. G., Kim, J. S., Lee, H. S., Lim, Y. M., So, J. H., Hahn, D. &amp; Nam, J. O. 2017, Bioconverted <i>Orostachys japonicas</i> Extracts Suppress Angiogenic Activity of Ms-1 Endothelial Cells. <i>International journal of molecular sciences</i>, 18(12), 2615.</li> <li>○ Jung, J., Jang, H. J., Eom, S. J., Choi, N. S., Lee, N. K. &amp; Paik, H. D, 2017, Fermentation of red ginseng extract by the probiotic <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11613P: ginsenoside conversion and antioxidant effects. <i>Journal of Ginseng Research</i>.</li> <li>○ Xu, Z., &amp; Godber, J. S. 1999, Purification and identification of components of <math>\gamma</math>-oryzanol in rice bran oil. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>, 47(7), 2724-2728.</li> <li>○ 식품의약품안전처, 2014, 식품첨가물의 기준 및 규격</li> <li>○ 식품의약품안전처, 2014, 건강기능식품의 시험법</li> <li>○ 식품의약품안전처, 2016, 건강기능식품 기능성 평가 가이드 '면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음' 편</li> <li>○ 식품의약품안전처, 2014, 건강기능식품 기능성 평가 가이드 '피부건강에 도움을 줄 수 있음' 편</li> <li>○ Lim, H., Kim, T. H. &amp; Lee, H. H. 2016, A study on perception and usage status on health functional foods in women according to menopause status. <i>Journal of menopausal medicine</i>, 22(1), 20-30.</li> <li>○ Yoon, S. W., Lee, J., Pyo, Y. G., Oh, S. K., Lee, J. S. &amp; Kim, I. H. 2014,. Nutraceutical lipid substances in Korean rice cultivars. <i>Journal of Food and Nutrition Research</i>, 2(1), 40-46.</li> <li>○ Goli, A. H., Barzegar, M. &amp; Sahari, M. A. 2005, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (<i>Pistachia vera</i>) hull extracts. <i>Food Chemistry</i>, 92(3), 521-525.</li> <li>○ Othman, S. B., Katsuno, N., Kanamaru, Y. &amp; Yabe, T. 2015, Water-soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity in vitro. <i>Food chemistry</i>, 175, 306-314.</li> <li>○ Zheng, J., Jin, Y. &amp; Row, K. H. 2005, Analysis of isoflavones from Korean and Chinese soybean and processed products by HPLC. <i>Journal of the Korean Chemical Society</i>, 49(4), 349-354.</li> </ul>	

주 의

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