

119116
-01

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개()발간등록번호(○)

고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003415-01

국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog
신호를 통한 다이어트 식품 기술개발

2021
농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호를 통한 다이어트 식품 기술개발

2021. 02. 26.

주관연구기관 / 연성대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주)엘파운더
협동연구기관 / 농업회사법인안심촌농원(주)
협동연구기관 / 삼성생약(주)농업회사법인

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호를 통한 다이어트 식품 기술 개발”(개발기간 : 2019. 12. 01. ~ 2020. 12. 02.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 02. 26.

주관연구기관명 : 연성대학교 산학협력단 (대표자) 김진배 (인)
협동연구기관명 : (주)엘파운더 (대표자) 이자복 (인)
협동연구기관명 : 농업회사법인안심촌농원(주) (대표자) 안영미 (인)
협동연구기관명 : 삼성생약(주)농업회사법인 (대표자) 한상중 (인)

주관연구책임자 : 최재영
협동연구책임자 : 이자복
협동연구책임자 : 안영미
협동연구책임자 : 박재중

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	119116-01	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.12.02. ~ 2020.12.01.	단 계 구 분	1차년도/ 1차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호를 통한 다이어트 식품 기술개발			
연구책임자	최 재 영	해당단계 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 1 명 외부: 5 명	해당단계 연구개발비	정부: 120,000천원 민간: 40,000천원 계: 160,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 1 명 외부: 5 명	총 연구개발비	정부: 120,000천원 민간: 40,000천원 계: 160,000천원
연구기관명 및 소속부서명	연성대학교 호텔외식조리과			참여기업명 (주)엘파운더 농업회사법인안심춘농원(주) 삼성생약(주)농업회사법인	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2287- 3406, 2287- 3406	10-2139 443									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 본 연구는 국내에서 생산되는 국화(감국)을 활용하여 지방전구세포 신호인 hedgehog 신호를 기반으로 한 지방 분화를 억제하는 감국 발효물을 개발하여 다이어트에 영향을 주는 식품을 개발하여 사업화 및 상용화를 달성하는 것.
- 본 연구로부터 감국 추출물 및 감국 발효물의 hedgehog 신호를 통한 지방 분화 억제를 확인, 감국 발효물의 공정과정 수립 및 생산의 효율성 확립, 감국 추출물의 독성에 적응하는 유산균 개발, 감국 발효물을 이용한 제품개발을 확보하였음
- 본 과제를 통해서 특허출원 2건, 특허등록 1건, 상표출원 2건, 기술이전 5건 (기술료 4,620천원), 제품화 2건, 매출액 58,190천원, 고용창출 1명, 인력양성 1명, 논문 2건 게재(비 SCI 2건)의 성과를 달성함.

보고서 면수

101

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구목적 <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구는 국내에서 생산되는 국화(감국)을 활용하여 지방전구 세포 신호인 hedgehog 신호를 기반으로 한 지방 분화를 억제하는 감국 발효물을 개발하여 다이어트에 영향을 주는 식품을 개발하여 사업화 및 상용화를 달성하는 것. ○ 연구내용 <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 감국의 추출법 및 배양법(유산균 선별) 규격화 - 감국 추출물 및 감국 발효물의 hedgehog 신호 영향 확인 - Hedgehog 신호를 기반으로 지방억제 확인 및 메커니즘 확립 - 감국 발효물의 제조공정 수립 및 생산 효율성 개발 - 감국 발효물을 활용한 제품화 및 사업화 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 핵심성과 <ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 2건, 특허등록 1건 - 상표출원 2건 - 기술이전 5건, 기술료 4,620천원 - 제품화 2건(이너핏맘, 감국 된장) - 매출액 58,190천원 - 고용창출 1명, 인력양성 1명 - 전문학술지 논문게재 2건 (비SCI 2건) ○ 전략성과 <ul style="list-style-type: none"> - 감국 추출물에 독성에 적응하는 최적의 유산균 선별 - Hedgehog 신호를 통해 지방세포 분화 억제 확인 - 감국 추출물의 유산균 배양법 및 추출법 확립 - 감국 발효물의 공정과정 개선 및 생산의 효율성 확립 - 감국 발효물의 비만억제확인 - 개발된 감국 발효물을 활용한 식품 개발 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> - 감국 발효물을 활용한 시제품 추가개발 - 출시된 제품의 SNS 또는 기사, 잡지를 활용한 홍보 - 제품의 부합제 비율개선 ○ 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 감국 재배 농가의 고부가가치 창출 및 수익 증대 - 선별적 일자리 창출 - 다이어트 식품사업의 새로운 방향성 제시 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>감국</p>	<p>유산균</p>	<p>Hedgehog pathway</p>	<p>다이어트</p>	<p>지방분화억제</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p><i>Chrysanthemum indicum</i> L.</p>	<p>Probiotics (<i>Lactobacillus</i> spp.)</p>	<p>Hedgehog pathway</p>	<p>Diet</p>	<p>Anti- adipogenic</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	22
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	94
4. 연구결과의 활용 계획 등	98
붙임. 참고 문헌	100

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

1) 최종목표

(1) 국내산 국화(감국)를 이용한 hedgehog pathway를 표적으로 하는 다이어트 제재 개발

2) 세부목표

- (1) 국내산 감국의 지방분화 억제 기능성 매커니즘 확립
- (2) 감국의 다이어트 기능성 제조공정 수립 및 생산 효율화
- (3) 감국의 적응공정을 통한 유산균제 개발
- (4) 감국을 이용한 제품류 개발

3) 연차별 개발 목표 및 내용

(1) 1차년도

① 연구개발 목표

- 주관연구기관(연성대학교) : 국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호억제 탐색
- 협동연구기관((주)엘파운더) : 감국독성 저항성 유산균 개발 및 지방세포 분화억제 재 확인
- 협동연구기관(삼성생약주식회사농업회사법인) : 감국 항산화 규명 및 감국 재배방법 연구
- 협동연구기관(농업회사법인안심촌농원(주)) : 감국재배를 통한 원료제공 및 감국 발효 장 연구

1-2. 연구개발의 필요성

1) 연구개발의 개요

(1) 다이어트 식품의 오남용과 습관성으로 인한 부작용

- 혈압 상승과, 변비, 불면증, 불안감, 식은땀 등의 부작용 속출.
- 소화불량, 복부팽만감 유발 및 안일한 인식으로 인해 장기간 복용의 위험이 높음.
- 검증되지 않은 효과로 인해 경제적 손실 및 건강상 부정적 영향.

(2) 다이어트 기능성 규제에 따른 기능성 소재 개발의 어려움

- 비만억제 기능성 원료 추출물의 개별인정 또는 기능성 제품화의 접근필요
- 국내 식물자원으로부터 기능성 물질 추출 및 소재화 요구
- 식물 가공물을 활용한 기능성 소재의 개발에 대한 연구개발 요구

(3) 비만 개선효과 및 장 환경 개선효과의 복합적 영향

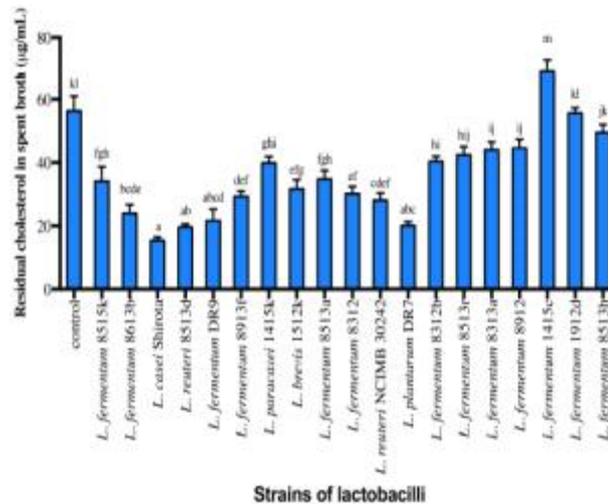
- 기존의 연구에서는 대표적으로 probiotics (유산균) 또는 유산균 함유 식품을 섭취함으로써 장 환경을 개선 및 AMPK 메커니즘에 영향을 주어 체중 조절 및 당뇨병, 고혈압 및 콜레스테롤의 대사성 질환에 대한 효능이 연구되었음.

(4) 고도 비만인구의 지속적인 증가에 따른 정부의 정책 방향

- 최근 20년간 청소년 비만이 급증하고 20~30대 젊은 연령층을 중심으로 고도 비만률이 급속하게 증가하고 있음(그림 1).
- * 정부에서 부처별로 2018년 7월 국가 비만관리 종합대책을 세워 범국민적인 비만증가를 해소대책을 제시하고 있을 정도로 국가적 문제가 심각함.



<그림 1> 국민건강보험공단 빅데이터 분석
*출처 : 국가비만관리종합대책, 2018

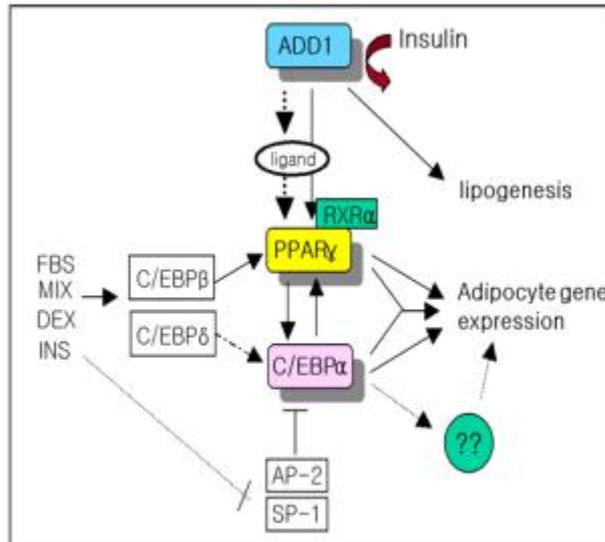


<그림 2> Strains of *Lactobacilli*
*출처 : Lew et al., 2018

(5) 비만이 형성되는 원인을 분자 생물학적으로 접근해 실질적인 효과에 초점

- 비만은 에너지 투입이 에너지 소비를 지속적으로 초과하여 지방세포의 비대 및 증식을 유발할 때 발생하며 체지방의 과도한 축적은 비만으로 연결되어 고지혈증, 고혈압, 심혈관질환, 암, 제 2형 당뇨병과 같은 심각한 질병을 유발하는 요인 중 하나.
- 지방세포로의 분화는 단백질의 발현을 조절하는 전사인자에 의해 제어되는데 순차적으로 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) 계열, C/EBP α , β 와 δ ,

peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)가 주된 전사인자로 (그림 3) 이들은 주로 지방조직에서 발현됨. 또한 이러한 발현 증가가 leptin, adiponectin과 같은 지방세포에만 적용되는 단백질의 활성화로 지방발생을 유도함.



<그림 3> 지방세포 분화에 관여하는 여러 전사인자들의 상호작용

※출처 : 김재범 외. 2002

- Hedgehog pathway 관련 단백질은 세포가 분화 때 동일하게 나타내며, hedgehog pathway를 억제하여 지방세포의 C/EBP, PPAR γ 전사인자에 발현을 억제하는 연구 보고가 있음 (새로운 지방억제 주요타겟 선정).

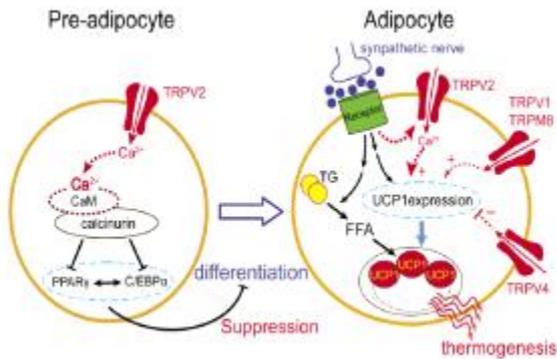
(6) 이학적인 효능을 검증하기 위한 예비연구의 필요성

- Hedgehog pathway는 줄기세포(전구세포 포함) 및 암세포의 형성 또는 분화에 필수적인 요소로, 세포에서 분비되면 세포표면의 수용체 단백질과 결합하여 세포내 신호전달 체계를 작동.
- 유산균과 이를 통해 발효된 특정 약초가 AMPK에 영향을 주어 비만이 개선되었다는 연구보고 있지만, hedgehog pathway 관련 단백질의 변화를 관찰한 연구는 없음.
- 감국 추출물 중 특정 물질이 유산균으로 인해 분자구조의 변화를 겪어 hedgehog 단백질에 직접적으로 영향이 있는지 예비연구가 필요함.
- 본 가정이 증명되면 새로운 천연물이 hedgehog pathway를 타겟으로 지방세포 분화를 억제하여 비만을 예방이 가능할 것으로 사료됨.

(7) 기존 제품과의 차별성 및 독창성, 신규성

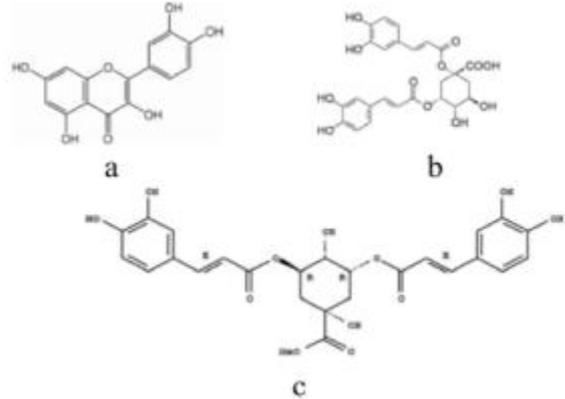
- 시중엔 다양한 유산균 제품이 나와 있으며, 그 기능에 맞는 유산균을 선별하여 제품개발에 적용하고자 함(감국과 기능성 유산균 복합물 제조를 최종목표로 함).

- *Lactobacillus reteri, rhamnosus, casei* 등의 콜레스테롤 감소 효과를 보인 유산균을 이용하여 효과를 극대화 하고자 함(그림 2).
- 감국 추출물 중에서 지방감소효과가 있으며 그 효과를 예상할 특정 물질을 가정하여 유산균을 국화(감국) 추출물에 적응시킨 다음 그 물질의 변화를 확인(그림 4, 그림 5).



<그림 4> 물질이 반응 메커니즘

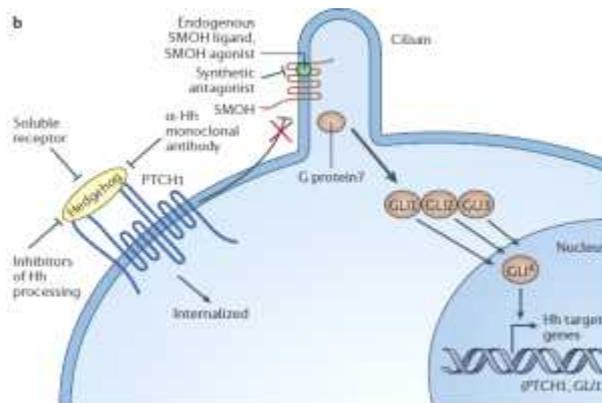
※ 출처 : Uchida *et al.*, 2018



<그림 5> 국화(감국)의 3가지 추출물

※ 출처 : Nepali *et al.*, 2018

- 유산균과 감국 추출물이 hedgehog pathway에 영향을 미치면 지방세포 분화의 전사인자인 C/EBP, PPAR γ 의 발현에 변화가 일어나 지방세포의 분화가 감소 비만의 예방을 예측할 수 있음(그림 6).
- 이런 방식으로 제조된 다이어트 식품은 현재 시중에 나와 있지 않고 국내·외 연구 보고서 및 학술지에 보고되지 않았음.



<그림 6> Hedgehog의 신호전달체계의 도해

※ 출처 : Rubin *et al.*, 2006

(8) 유산균과 감국 추출물을 응용하여 다이어트 식품 개발

- 식품공전에 감국은 향산식물 허브류의 식용 꽃으로 등록되어 있음.
- 유산균 또는 특정 식품의 추출물 및 효소를 이용한 제품은 시중에 판매되어지고 있음.

나, 두 가지 성분의 복합물이 hedgehog pathway를 주 타겟으로 하는 제품은 시중에 판매되지 않음.

- 위와 비슷한 혼합형 타겟형의 국내·외 연구관련 보고서도 보고되어 있지 않음.

* 현 국내시장에서 개발되지 않은 상품 분야

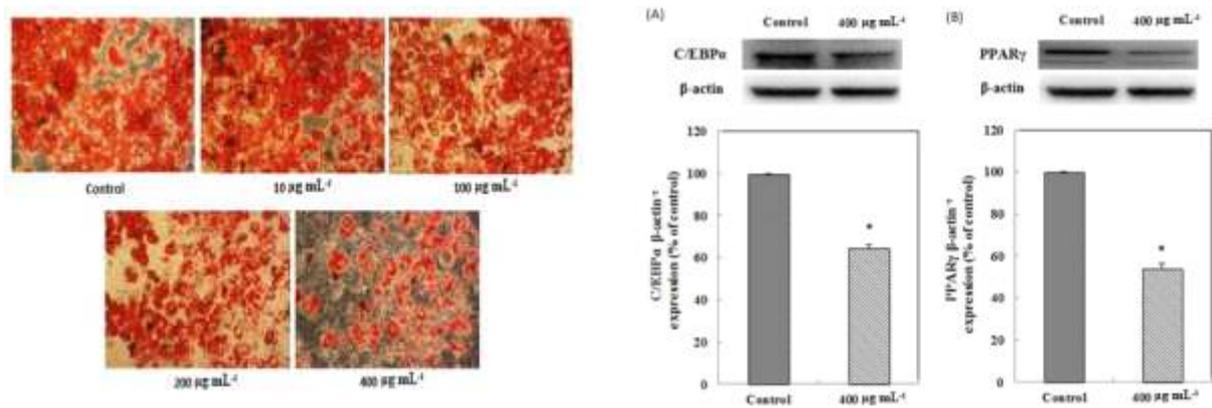
- 감국은 오랜 세월 함께한 약초이며, 유산균은 건강기능식품으로서 상품등록이 되어 있음 (안전성 부분에서 모두 쉽게 이용가능).

2) 예비연구 기술성 검증

(1) 아이디어/기술의 실현가능성 검증

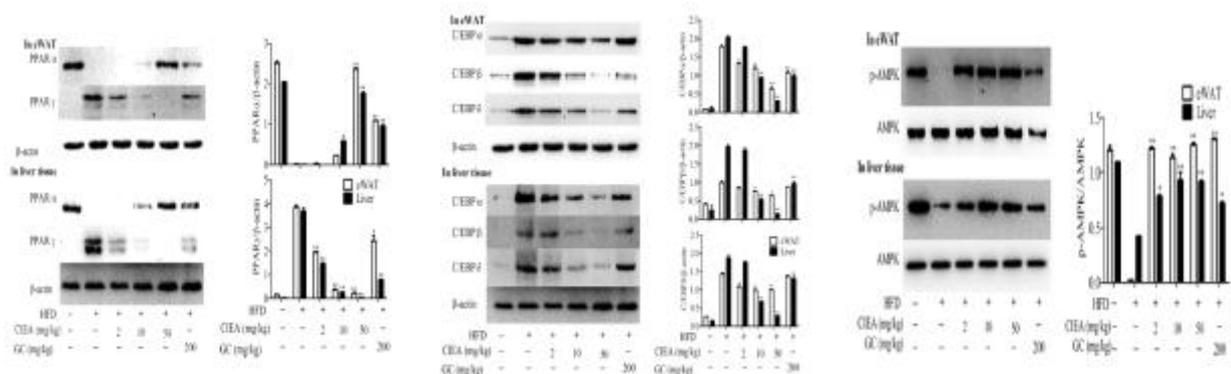
- 유산균에 의한 지방세포 분화과정 중에 C/EBP, PPAR γ 전사인자에 발현의 억제확인(그림 7)

- 감국 추출물이 C/EBP, PPAR γ , AMPK pathway의 억제를 제어하여 지방세포 분화를 억제함(그림 8).



<그림 7> 지방분화 억제 및 C/EBP, PPAR γ 발현 비교

※ 출처 : Park *et al.*, 2018



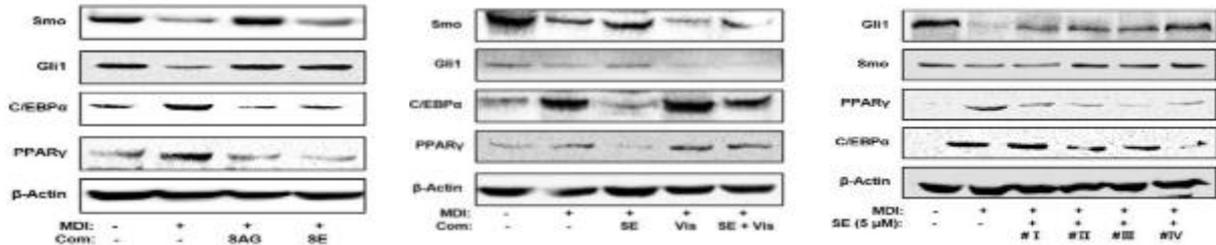
<그림 8> 지방분화 억제 및 C/EBP, PPAR γ , AMPK pathway 억제

※ 출처 : Nepali *et al.*, 2018

- Hedgehog pathway를 주 타겟으로 하는 선행연구에서 실질적으로 C/EBP, PPAR γ 전

사인자의 발현 억제를 확인하였음(그림 9).

- 총 11개 종류의 *Lactobacillus* st.에서 국화(감국) 에탄올 추출물에 키워 그중 잘 적응한 균을 선별, Hedgehog의 반응을 보일 가능성이 큰 균을 키운 추출물의 단일물질 분석을 통해 그 물질을 찾아 상품화하고자 함.



<그림 9> 지방분화 억제 및 C/EBP, PPAR γ 발현 억제

※ 출처 : Chen *et al.*, 2018

Mitochondrial Oxidative Stress Induced by Downregulation of Antioxidant Enzymes Leads to Nuclear Protein Carbonylation by Retrograde Signaling in 3T3-L1 ...

R Fonce, A Axelson, M Hart, A Hauck... - Free Radical Biology and ... 2016 - Elsevier
Obesity-linked insulin resistance is mechanistically connected to local inflammation of adipose tissue, which produces a metabolic state characterized by oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Antioxidants enzymes such as Glutathione S-transferase A4 ...
☆ 09 전체 2개의 버전

Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and mRNA expression in the cocultured C2C12 and 3T3-L1 cells

M Pandurangan, M Veerappan, DH Kim - Applied biochemistry and ... 2015 - Springer
The present study was aimed to investigate the dose-dependent effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on antioxidant enzyme activities and messenger RNA (mRNA) expression in the cocultured C2C12 and 3T3-L1 cells. Coculturing experiments are 3D and more reliable ...
☆ 09 35회 인용 관련 학술자료 전체 11개의 버전

... lipid accumulation and attenuate proinflammatory response of 3T3-L1 adipose cells during oxidative stress through regulation of key adipokines and antioxidant ...

A Septembre-Maiaterre, F Le Sage, S Hatia... - Biofactors. 2016 - Wiley Online Library
Plant polyphenols may exert beneficial action against obesity-related oxidative stress and inflammation which promote insulin resistance. This study evaluated the effect of polyphenols extracted from French Curcuma longa on 3T3-L1 adipose cells exposed to ...
☆ 09 16회 인용 관련 학술자료 전체 3개의 버전

7, 8-Dihydroxyflavone inhibits adipocyte differentiation via antioxidant activity and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocyte cells

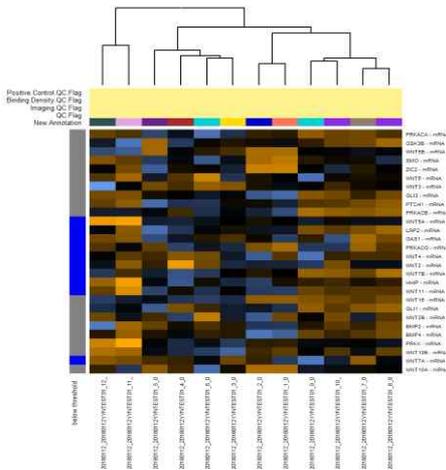
JW Choi, CW Lee, J Lee, DJ Choi, JK Sohng, YI Park - Life sciences. 2016 - Elsevier
Aims Anti-obesity effects of a natural plant flavonoid 7, 8-dihydroxyflavone (7, 8-DHF) were evaluated using 3T3-L1 preadipocyte cells. Main methods The cell viability was determined using MTT assay. Effects of 7, 8-DHF on intracellular lipid droplets and intracellular reactive ...
☆ 09 17회 인용 관련 학술자료 전체 9개의 버전

[HTML] Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants Antirhea borbonica, Doratoxylon apetalum and Gouania mauritiana protect 3T3-L1 ...

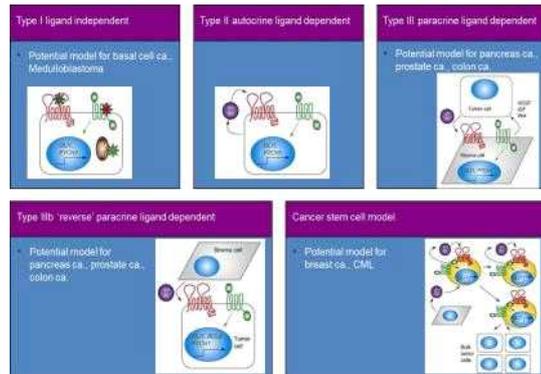
<그림 10> 지방세포의 산화 문제를 해결하고자 하는 논문 목록

- 체내 지방의 증가로 발생하는 산화스트레스 문제를 해결 가능한 기능성을 추가로 입증

하여 항산화제의 기능성을 추가함.



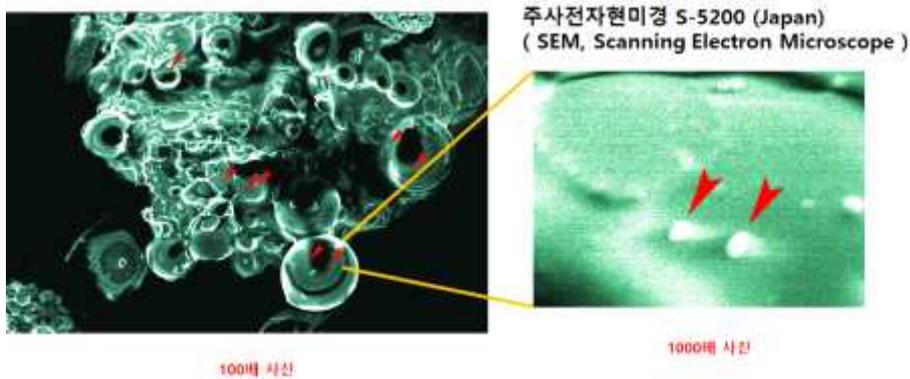
<그림11> 임상환자 조직에서 hedgehog pathway 관련 *Gli1/3* mRNA 변화 확인 (microRNA)



<그림12> Hedgehog pathway 메커니즘 및 lipogenesis의 관련성 분석

※출처 : Scales et al., 2009

- 과우더 제품화 시 유산균의 생존유무 확인 (전자주사현미경)(그림 13).



<그림13> 유산균 생존확인 전자주사현미경

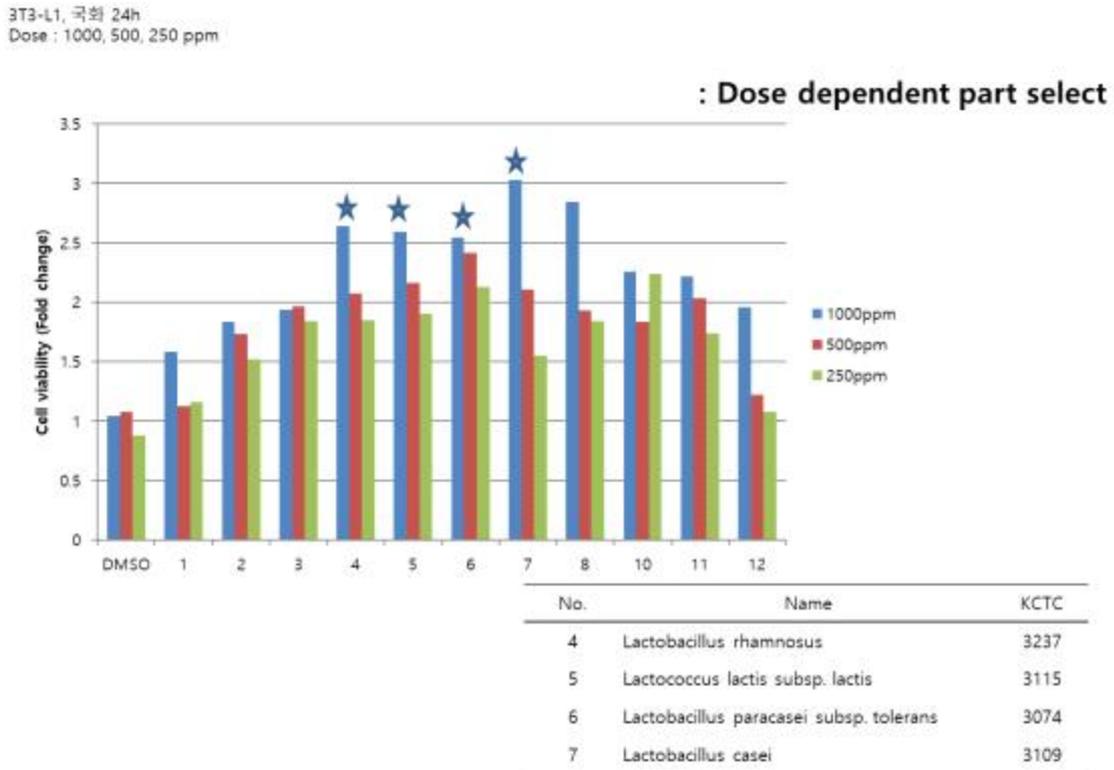
- 감국의 유산균 독성에 따른 유산균 발효가 어려운 점을 개선하는 개선방향 필요
- 유산균 시험균주

<표 1> 시험균주

No.	Name	KCTC
1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	3034
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3140
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	3718
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3237
5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3115
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	3074

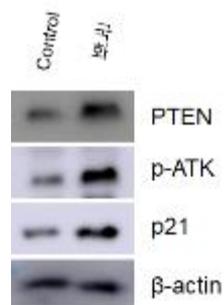
7	<i>Lactobacillus casei</i>	3109
8	<i>Lactobacillus brevis</i>	3498
9	<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	3155
10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	3594
11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3112

- 섭취 가능한 유산균주를 이용한 감국 독성시험 시 세포독성은 확인되지 않고 증식을 보임(그림14).



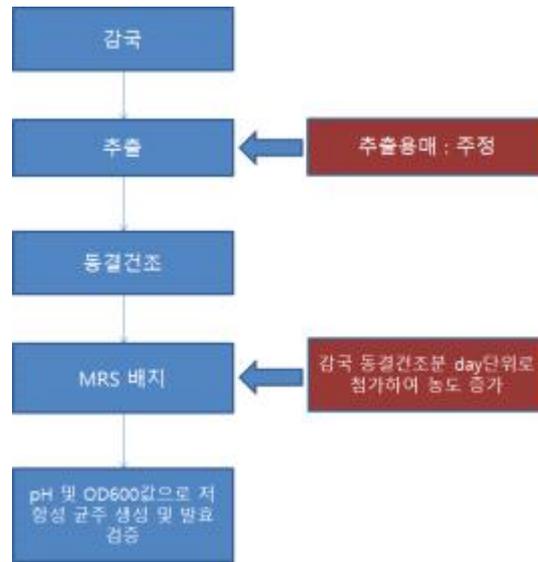
<그림14> 감국을 이용한 세포독성 실험

- 4개의 선별균주(*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus casei*) 선별
- Cell viability factor 확인 1,000ppm 농도 처리 (3T3-L1 - non-differentiation cells)



<그림15> 감국의 PTEN-AKT의 발현확인

- 발효물 제조 흐름도 (저항성 균주 획득)



<그림16> 발효물 제조공법

3) 연구개발 대상의 국내·외 현황

(1) 국내·외 기술현황

- ① Hedgehog pathway는 억제작용을 통해 암세포 저해 용도의 실험 위주로 연구되어 졌음
 - 미국식품의약국(FDA)는 급성 백혈병 치료제로 hedgehog pathway를 차단하는 급성 백혈병 치료제를 처음으로 승인.
 - Hedgehog pathway 관련 단백질 억제를 통해 뇌종양 치료 연구.
 - Hedgehog pathway는 암세포 뿐 아니라 줄기세포 및 전구세포(분화형질을 발현하지 않은 미분화 세포)의 주요 증식 신호전달 체계.
 - 지방줄기세포와 Hedgehog pathway의 관련성에 대한 연구자료 확인 가능(Cousin *et al.*, 2007).
- ② 비만을 형성하는 지방전구세포에 직접적으로 영향을 주어 비만 개선효과를 볼 수 있음
 - 동북아시아에서 대표적으로 사용되어지는 약초의 한 종류인 *Chrysanthemum indicum* (감국) 추출물은 세포에서의 지방분해 효과를 나타낸다고 보고됨 (천연물을 이용한 비만억제 효과).

(2) 시장현황

① 다이어트 식품시장 확장

- 비만은 세계보건기구(WHO)가 21세기 전염병이라고 할 만큼 심각한 질병으로 분류.
- 건강보험공단에 따르면 우리나라 고도·초고도 비만인구는 2002년 2.5%에서 2025년

에 5.9%를 차지할 것으로 전망(그림 15).

- ‘아름다움’, 즉 미(美)의 측면에서 다이어트에 대한 관심 증대.
- 비만치료 건강식품 시장 규모가 클수록 제품 판매량의 증가를 기대.



<그림 17> 국내 다이어트 시장 규모

※ 출처 : 이투데이, 2017

③ 경쟁기관현황(국내)

<표 2> 경쟁 상품 리스트

사진 및 브랜드명	특징
 늦지않았어!	<ul style="list-style-type: none"> - 가르시니아 캄보지아 추출물 - 비타민 B1/B2/B6 함유 - 부원료로 알로에 베라겔 농축분말, 치커리뿌리 추출물분말, 마테추출농축액 분말이용 - 탄수화물 → 지방으로 합성 억제에 도움
 내살을 부탁해	<ul style="list-style-type: none"> - 가르시니아 캄보지아 추출물 - 녹차추출물, 나이아신, 판토텐산, 비타민D 함유 - 탄수화물 → 지방 합성 억제, 항산화 및 체지방감소에 도움
 GRN 검정이	<ul style="list-style-type: none"> - 가르시니아 추출물, 밀크씨슬(실리마린) 추출물 - 옥타코사놀, 비타민 B1/B2, 나이아신, 판토텐산 - 탄수화물 → 지방 합성 억제, 간건강 향상, 체내에너지 생선에 도움

 <p>Nature Craft Forskolin Coleus forskohlii2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 콜리시 포르스콜린 함유 - 식욕억제, 대사 증진, 혈압 감소, 활성 산소제거에 도움
 <p>레몬 클렌즈 다이어트</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 가르시니아 추출물 - 레몬농축액&착즙액, 메이플 시럽, 카옌페퍼, 피쉬콜라겐을 부원료로 이용 - 탄수화물 → 지방 합성억제
 <p>V=B 바이탈뷰티 신형 메타그린</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 녹차추출물 - 비타민 C - 체지방감소, 콜레스테롤 개선, 유기농재배, 체중감소, 복부지방 감소에 도움
 <p>뉴트라티엄</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 그린커피빈 추출물 - 녹차추출물, 고추추출물분말 부원료로 이용 - 체지방감소, 지방량대비 근육량 증가에 도움

- 상기 표에서 제시한 바와 같이, 기존 판매중인 제품은 매커니즘에 대한 부분이 취약하기 때문에 본 연구에서 밝혀지는 hedgehog pathway를 주 표적 매커니즘으로 특허 및 논문과 연계할 수 있는 독창성을 담보할 수 있음.

④ 경제적 효과

- 2가지의 기능성 자원을 복합하여 활용함으로써 유산균의 장환경 개선 및 콜레스테롤 개선 효과, 감국의 항산화 효과와 hedgehog pathway를 주 표적으로 하여 지방세포 분화 억제라는 3가지 효과의 복합적인 상품으로 판매성 강화.
- 천연물 기능성 식품은 고부가가치 제품과 산업재산권을 확보할 수 있기 때문에 수입대체는 물론 기술 및 제품 수출에 기여.

⑤ 사업화 상품화에 미치는 영향

- Hedgehog pathway단백질은 암 치료제로서 의약품에 적용되는 단백질로서 향후 비만 치료제로서의 부가적 기능 창출 기대.

(3) 국내·외 지식재산권현황

① 주요 핵심기술의 특허현황

- 유산균과 기타 추출물을 활용한 특허는 많이 있으나 유산균과 감국추출물을 활용한 특허는 현재 국내·외는 없는 상태임.
- 감국을 활용한 분획물 또는 추출물의 단독성분에 대한 특허는 2009년 2018년까지 꾸준히 증가하고 있으며, 항산화, 항염증, 신경안정, 뇌질환 등 주류를 이루고 있다. 또한 한국: 580여건, 일본: 3건으로 한국이 전 세계에서 감국에 대한 특허 상위 랭크

② 표준화현황

- 주요 핵심기술 및 제품의 표준화 현황
- 국내산 감국의 재배법, 원료 전처리 원료의 성분 분리 동정, 순도평가, 지표성분 확인 후, 식약처에서 제안된 성분 (Chlorogenic acid 0.155%, Luteoloside 0.057%, Luteolin 0.047%-식약처) 함량과 유산균과의 지방분화 억제에 시너지 효과를 극대화 할 수 있도록 제품의 표준화 진행중

1-3. 연구개발 범위

1) 주관연구기관(연성대학교) : 국내산 국화(감국)를 활용한 Hedgehog 신호억제 탐색

(1) 실험방법

- 대표물질 : Camphor를 이용한 실험

① WST-8 assay (Cell viability)

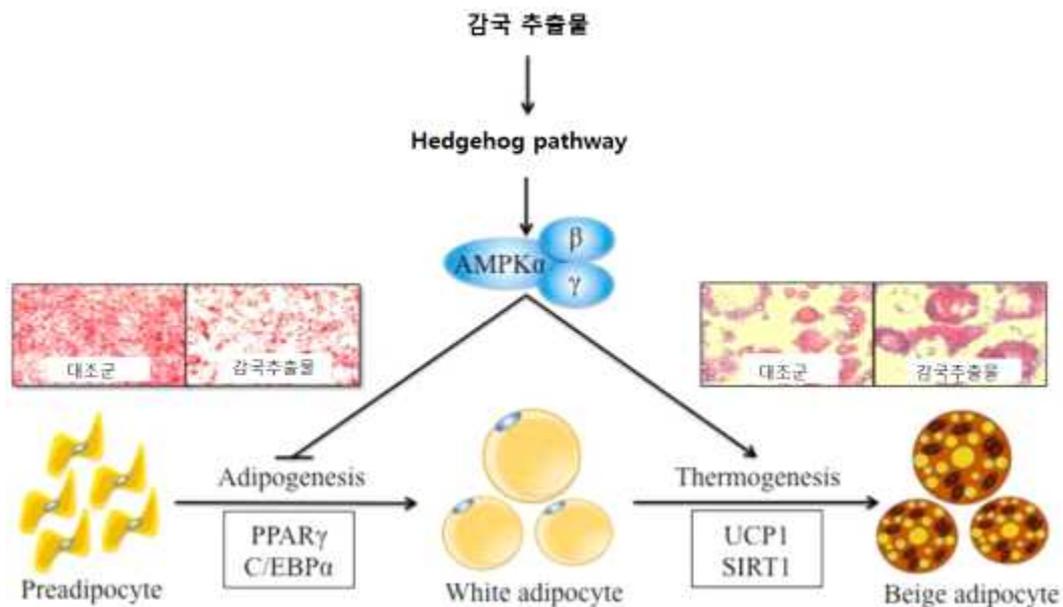
- * 96 well plate에 3T3-L1 세포 7×10^3 cells/well 을 넣고 overnight incubation 한 후 감국 추출물을 농도 의존적으로 단독 처리하여 24 시간이 흐른 뒤 WST-8 시약을 넣고 3시간 incubation 이후 450nm 에서 reading 하여 결과를 분석 한다.

② Oil-Red-O (ORO) staining

- * 6 well plate에 3T3-L1 세포 1×10^5 cells/well 을 넣고 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotics (penicillin and streptomycin, 100 U/mL)를 첨가한 배지에 24 시간 이상 키워 100% density를 유지한다. 동결건조된 감국 추출물을 농도별로 처리한 뒤 MDI solution (adipogenic cocktail)인 IBMX (0.5 mM), DEX (1μ M), insulin (10μ M)을 첨가하여 분화유도를 시작한다. 분화 기간은 총 9일간 지속 하였으며, 분화 초기 3일간은 MDI solution이 함유된 배지를, 분화 중기 3일간은 insulin (10μ M)만을 함유한 배지를, 분화 후기 3일간은 10% FBS 만 함유하는 배

지로 매일 교환한다.

* 분화된 3T3-L1 세포에 PBS 로 2회 세척하였으며, 10% formalin을 분주하여 실온에서 고정한다. 5분 후 10% formalin을 제거한 후 새로운 10% formalin을 분주하여 실온에서 고정한다. 2시간 후 10% formalin을 제거하고 60% isopropanol을 분주하여 곧바로 제거한 후 완전히 건조한 뒤 Oil red O solution 시약을 분주하여 지방구를 염색한다. 1시간 후 증류수로 4번 세척하였고, 붉은색으로 염색된 세포 내 지방구를 현미경으로 관찰하고, 지방의 축적량을 정량하기 위해 100% isopropanol을 분주하여 Oil red O dye를 용출시킨 후 Microplate Reader로 560 nm 파장에서 optical density를 측정한다.



<그림18> 감국추출물을 이용한 비만억제 실험 구조

③ Western blots (단백질 분석)((주)엘파운더와 협동)

* 타겟 물질 처리된 세포 수집 이후 Lysis buffer(20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM β -glicerophosphate, 1 mM sodium vanadate, 1 μ g/ml leupeptin, 그리고 1 mM PMSF)을 이용하여 세포들을 파쇄시키고 10분동안 13,000 RPM으로 원심분리하여 세포 파쇄물을 제거하고 10% SDS-PAGE를 시행한다. SDS-PAGE가 완료된 gel은 PVDF transfer membrane에 transfer하고 5% nonfat skim milk가 포함된 PBS-T (137 mM Sodium Chloride, 2.7 mM Potassium Chloride, 10 mM Phosphate Buffer 0.01% Tween-20) 용액에 담귀 실온에서 1시간동안 blocking 하고 primary 항체로 overnight동안 반응시킨다. 반응이 완료된 membrane은 PBS-T로 5분간 3회 수세한 후 secondary 항체로 약 한 시간 반응시킨 후 역시 PBS-T로 10분간 3회 수세한다. 수세된 membrane은 chemiluminescence 시약으로 필름에 노출시켜 밴드를 확인한다.

④ RT-PCR (RNA 분석)(주)엘파운더와 협동)

* 타겟물질 처리된 세포 수집 이후 Trizol reagent를 이용하여 세포들을 파쇄시키고 1차 total RNA를 추출한 후 추출물을 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany)로 다시 순수 분리하였고, 이 때 DNA 오염을 제거하기 위해서 RNase-Free DNase를 처리과정을 포함토록 하였다. 분리된 total RNA가 파괴 없이 확보되었음을 확인하기 위해서 MOPS-formaldehyde gel 전기영동을 통해 28S rRNA 밴드와 18S rRNA 밴드의 선명도와 진하기를 비교하여 검증하였다. Total RNA 시료의 순도는 Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer, USA)을 이용하여 측정 후 흡광도(260 nm/280 nm 및 260 nm/230 nm)값이 1.85-2.05 범위에 속함을 확인하였다. Total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해서 RNA 주형 3 μg을 대상으로 oligo-d(T) primer (20 mers; Bioneer, Korea)와 random primer (random nonamers; TakaraBio Inc., Japan)이 포함된 역전사(reverse transcription) 반응을 실시하였고, 역전사 반응은 Qiagen-RT kit (Qiagen)을 이용하여 제조사의 권고 방법대로 실시하였다. cDNA 주형으로부터 2 μL를 취하여 PCR 반응에 이용하였다. PCR 증폭은 각 확인할 타겟 primer를 이용하여 열 순환 반응이 95℃ 20초, 58℃ 20초 및 72℃ 25초로 총 40회 수행되도록 하였으며 최초 변성 반응으로서 95℃ 3분을 실시하였다. 각 생성물을 agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

2) 협동연구기관((주)엘파운더) : 감국독성 저항성 유산균 개발 및 지방세포 분화억제 재확인

(1) 실험방법

- ① 감국, 유산균 복합물과 감국 발효물(유산균)을 이용한 지방분화 억제 시너지효과 분석 (감국복합물 및 감국장에서 발효물에 대한 지방분화 시너지효과 확인)
- ② 시너지 분석프로그램 calcsyn을 이용하여 시너지효과 분석
- ③ 감국 및 유산균 복합물 조합 선정 및 유산균 제품화(다이어트 기능성을 강화를 위한 가르시니아 캄보지아와 같은 원료 복합물 첨가)

(2) 비즈니스모델 개발

- ① 시장지향형 사업 도입으로 시장성 확립 (시장에서 거래될 만한 기술 개발).
- ② 오픈이노베이션 추진 (외부R&D협력을 위한 전담부서를 설치).

(3) 기술경영 및 지식재산권 확보전략 수립

- ① Buy R&D 친화적 제도 강화를 통해 수요기반을 증점 확대.
- ② 수요자 → 중개기관 → 공급자가 유기적으로 연계될 수 있는 혁신 생태계를 조성(시장과 밀착 연계)
- ③ 공동연구 지식재산권 수립.
- ④ 우수 기술인력 발굴 (실용화트랙 마련)

(3) 규제 대응 전략 수립

- ① 공동연구기관 통합적인 기술경영 (Technology Management) 도입.
- ② 규제 대응 선도모델을 발굴·도입

(4) 사업화 R&D 연계

- ① 산학을 통한 기 확보된 연구 인력을 통한 지속적인 실험 실시
- ② 천연 활성물질의 효능을 평가하고 대체 소재에 대한 데이터베이스 구축
- ③ 산학이 연계하여 실질적으로 적용 가능한 소재의 개발
- ④ 약재의 지표물질 표준화(Camphor) 및 산지별 지표물질 최적화 연구를 통한 약재 선별로 경쟁력 확보
- ⑤ 생약재의 안전 확보를 위한 생산단계부터 수확 후 포장단계까지 토양·수질 등 농업환경 및 생약재 내 잔류할 수 있는 농약, 중금속 또는 유해생물 등의 위해 요소를 관리하고 그 관리사항을 소비자가 알 수 있게 하는 체계인 GAP(Good Agricultural Practices) 및 유기농 인증확보를 통한 소비자들의 신뢰확보
- ⑥ 토종 식물에 대한 민간요법을 활용하여 각 식물들의 효능과 성분을 데이터화하여 소비자의 환경 친화적 천연 소재 개발에 응용 및 산업화 활성화
- ⑦ 재배 농가의 수익 창출 및 부가가치 향상

(5) 저항성 유산균 선별법

- ① 감국 유산균 colony 선별법
 - 선행연구결과 국화(감국)가 갖는 성분 중 유산균을 사멸시키는 작용 확인됨
 - 감국추출물 1~50 % 각 농도별 처리하여 배양 유산균의 감국추출물 저항성 갖는 균주 선별
 - 선별된 유산균을 감국추출물이 포함된 고체배지에 재배양하여 colony formation을 진행 후 저항성 균주 선별(감국추출물 40% 농도 저항성을 갖는 유산균 선별)

(6) 유산균 배양법(농업회사법인안심촌농원(주) 협동)

- ① 감국 유산균 배양법
 - 감국추출물 1~50 % 각 농도별 처리하여 배양 유산균을 국화(감국)추출물에 접종

- 37°C 회전배양기에 12~48시간 동안 감국 추출 발효물을 이용하여 pH 및 미생물 함량을 측정
- 지방분해 및 총콜레스테롤 저하기능을 갖는 유산균 선별 및 검증
- 유산균을 이용한 감국장 추가 개발

3) 협동연구기관(삼성생약주식회사농업회사법인) : 감국 항산화 규명 및 감국 재배방법 연구

(1) 실험방법

① 총 phenol 함량 측정

- 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가짐
- 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하여 측정(Dewanto *et al.*, 2002).
 - * 산화 환원 반응에 의한 색 변화를 분광기로 총 페놀의 양을 측정하는 방법
 - * 시료에 Folin-Ciocalteu시약을 넣어 5분간 안정화 시킨 뒤 20% Na₂CO₃(w/v)을 첨가하여 다시 15분간 안정화 시킨 뒤 증류수를 첨가하여 725nm 파장에서 흡광도를 측정
 - * Gallic acid를 이용하여 검량선을 작성하여 결과를 나타냄.

② Flavonoid 함량 측정

- 자연에 존재하는 phenol성 물질의 구조는 1,000가지 이상이 밝혀졌으며, 그 중 flavonoid가 대부분을 차지
- 플라보노이드 함량은 Moreno 등이 사용한 방법(2000)을 사용
 - * 농도별로 희석한 시료에 80%의 EtOH를 넣어 희석.
 - * 희석된 시료에 10% aluminum nitmousee(w/v)와 1M potassium acetate(w/v)를 넣어 혼합.
 - * 혼합물에 80% EtOH을 넣고 40분 동안 실온에서 안정화 시킨 후 415 nm에서 흡광도측정.
 - * 표준물질로 quercetin을 이용하여 검량선을 작성한 후 결과를 나타냄.

③ DPPH free radical 소거법

- DPPH는 그 자체가 매우 안정한 자유 라디칼(free radical)로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 자색의 혼합물.
- 항산화 활성을 조사하기 위하여 자유 라디칼인 DPPH를 사용한 항산화활성 측정방법(Xiong *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1993)을 이용.
 - * 유리 시험관에 MeOH을 넣고 시료 화합물을 농도별로 첨가한 후 DPPH용액을 첨가

하여 실온에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 UV/VIS spectrophotometer로 흡광도를 측정.

- * RC50($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 화합물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 화합물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α -tocopherol, BHA, BHT와 비교함.

④ 환원력 측정 (Reducing power)

- Reducing power(환원력) 측정은 Oyaizu가 사용한 방법(1986)을 변형하여 사용.

- * 농도별로 희석한 시료에 0.2M sodium phosphate buffer(w/v)와 1% potassium ferricyanide를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응.
- * 상기 혼합물에 10% trichloroacetic acid(w/v) 넣어 10분간 안정화 시킨 후 반응액의 상층액을 취해 증류수를 첨가 한 후 0.1% ferric chloride를 첨가하는 즉시 흡광도를 측정.

⑤ Linoleic acid 자동산화 저해활성

- Linoleic acid 자동산화 저해활성 측정은 Haraguchi(1992)의 방법을 변형하여 사용

- * 농도별로 희석한 시료를 EtOH에 녹인 2.51% linoleic acid(v/v)와 0.04M potassium phosphate buffer(w/v)를 혼합하여 반응액 조성(55°C, 24h, dark).
- * 24시간 후 반응액에 75% EtOH와 100 μl 의 30% ammonium thiocyanate(w/v)와 3.5% HCl에 녹인 0.02M ferrous chlorade(w/v)를 혼합하여 500 nm에서 흡광도 측정.
- * 측정된 값은 과산화물 생성 억제능 (%)을 계산.

(2) 감국 재배기술

- 감국 재배기술 효율화 및 농장 일부 감국단지 조성 (감국단지 조성 위치는 변경될 수 있음).



<그림 19> 국화(감국)단지 조성위치 (춘천)

① 감국 (동지아묘)를 이용하여 감국 축성재배

- 난지 또는 고랭지 육묘를 위한 20일 이상의 저온처리.
- 동지아를 이용하여 정식 후 13~15℃ 가온을 통해 2~3월 식재 후 개화유도.
- 2줄심기를 통해 2300/a가 되도록 식재.
- 정식 후 관수를 통해 활착과 초기 생육 유도.

② 일장 및 온도관리

- 5월 출하의 경우 정식 2주간 12~13℃ 유지관리 후 주간에 28℃유지 (고온 시 차광막).
- 차광재배(단일처리)를 통해 개화를 앞당기는 재배법 유도.

<표 3> 월별 관리 방안

작형	2	3	4	5	6	7	8	9	비 고
6월출하									심야3시간, 12시간 일장
									28℃이상 넘어가지 않도록 유지
8월출하									12~15℃ 유지 (야간)
9월출하									심야2시간, 12시간 일장
									3월정식, 적심 유지 4개월
									12시간 일장 4월정식, 적심 유지 4개월

③ 수분관리

- 정식 직후 충분히 관수(활착)
- 어린 묘 활착 후 수분을 줄여 토양표면 건조(흰녹병 및 절화수명을 짧게 하여 하엽을 고사).

④ 일장처리

- 5~6월 출하작형에서는 정식과 동시에 전등조명을 시작하며, 5월 출하는 심야 4시간, 6월 출하시 차광필요.
- 일장은 12시간으로 진행.
- 차광막 내의 광도는 꽃잎이 착색될 때까지 지속.

⑤ 네트설치 및 가지고르기

- 감국이 자람에 따라 위로 올려주오 최종높이가 지상에서 50cm로 유지후 균일한 가지만 남기고 나머지 제거(감국의 품질 개선).
- 6줄 심기의 경우 내부의 일조부족이 생겨 줄심기의 수를 줄임.



<그림 20> 감국단지 1차 재배 시험 (춘천)



<그림 21> 감국 2차 채광 시험 (춘천)

4) 협동연구기관(농업회사법인 안심촌농원) : 감국재배를 통한 원료제공 및 감국 발효장 연구

(1) 원료제공 및 제품화 연구

- ① 감국 재배기술 및 건조화 기능성 효율 확인

- 재배를 통한 감국 원료공급.
- 유기농 재배법 개발을 통한 농약 잔류독성 없음 또는 낮음 확인.
- 감국의 건조기술에 따른 원료화 분석.
- 유기농 재배를 통한 원료제공.
- 전문기관을 통한 중금속 및 농약에 대한 분석 의뢰.

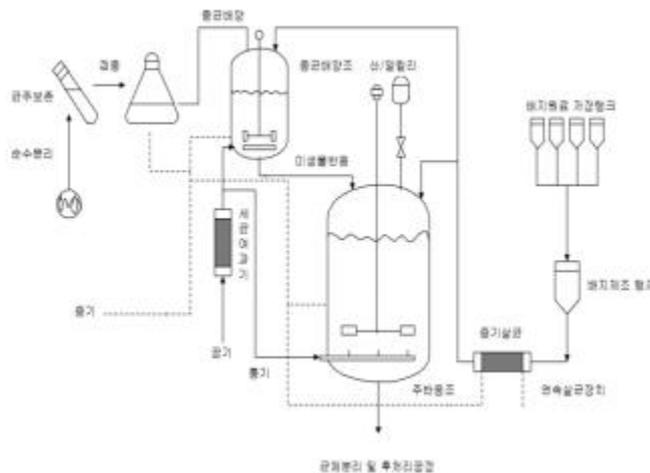
② 제형화 연구를 통한 기능성 효율 확인

- 동결건조를 통한 파우더화 (당 또는 기타 성분으로 인한 문제점 개선).
- 액화 제조에 따른 기호성 분석.



<그림22> 제형화 연구

- 추출형태에 따른 기능성 연계분석(대량 추출 및 제조연구).
- 유산균 발효 (감국장 적용 유산균 선별).
 - * 감국추출물에 미리 선별된 콜레스테롤 및 지질분화를 조절하는 유산균을 이용하여 종균처리 후 발효공법 진행.
 - * 감국 추출물의 세포독성 저항성 균주 선별.



<그림23> 발효공정 도면



<그림24> 추출과정 도면



<그림25> 감국 추출이미지

③ 유산균 배양법 ((주)엘과언더와 협동)

- 감국 유산균 배양법.

- * 감국추출물 1~50 % 각 농도별 처리하여 배양 유산균을 국화(감국)추출물에 접종.
- * 37℃ 회전배양기에 12~48시간 동안 감국 추출발효물을 이용하여 pH 및 미생물 함량을 측정.
- * 지방분화 및 총콜레스테롤 저하기능을 갖는 유산균 선별 및 검증.
- * 유산균을 이용한 감국장 추가 개발.

- 감국장 발효기법 도입.

- * 감국추출물을 이용한 국화(감국)장 발효공법 연구.



<그림26> 감국 장만들기

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진전략 및 체계

1) 연구개발의 추진전략

(1) 국내산 감국(감국)를 활용한 hedgehog 신호억제를 통한 다이어트 식품 기술개발 추진

- ① 연성대학교 산학협력단은 감국추출물과 추출물에 적응한 유산균이 3T3-L1 세포에서 hedgehog pathway에 작용을 주어 3T3-L1세포의 분화 조절 연구와 동물실험 추진
- ② ㈜엘파운더는 협동기관으로서 사전연구로 감국의 활용도의 안전성 검증과 유산균의 선별을 위해 감국의 독성 저항성, 유산균의 선별과 지방세포분화(3T3-L1)의 억제관련 연구를 연성대학교 산학협력단과 협동 진행하며 상업화를 위한 연구
- ③ 삼성생약(주)농업회사법인 지방구세포 분화와 항산화 관련 연관성으로 감국의 항산화 실험으로 데이터를 대학에 제공하며 또한 감국의 재배기술을 연구
- ④ 농업회사법인안심촌농원(주)은 직접 감국을 재배해 원재료를 제고하고 재배한 감국을 활용해 차기년도 연구인 감국장 등 감국을 활용하는 발효식품에 관한 연구를 담당

(2) 과제 성과 관련 및 배출 상품제작

- ① 특허출원을 위해 식품 전문 변리사에게 자문을 구해 특허출원, 상표권 출원 실시
 - 제품의 네이밍 작업 후 상표권 출원
 - 지방세포의 분화를 억제하는 hedgehog pathway에 영향을 미치는 감국 추출물과 감국 추출물에 대해 저항성을 가진 유산균과의 배합으로 비만 억제에 효과적인 배합 기술에 대한 지적재산권 특허 출원
 - 연구된 데이터의 논문화를 위해 관련 자료 수집 및 기술이전 실시
 - 연구된 데이터를 통해 상품을 제작 실질적인 판매를 위해 시장조사 및 수요처 조사, 비즈니스모델 개발
 - 상품개발로 관련 기관 고용창출

(3) 수행기관별 업무분장

수행기관	담당 기술개발 내용			기술개발 비중(%)
	기술성 검증	시장성 검증	사업성 검증	
주관기관	세포생존 및 감국 유효성 단일물질 선별	발굴 해외 수입업체 교신	기술이전을 위한 사업화계획 추진	30
	C/EBP, PPAR γ 등 전사 인자 확인	제조 및 원부자재 공급업체 발굴	비즈니스모델 개발	
	Hedgehog pathway 타겟 지방세포 억제기전 확인	시장점유율 및 마케팅 전략과 유통경로 확보	지식재산권 확보	
협동기관	감국 추출물 세포독성 저항성 균주 선별 (Resistance microbium cell)	다이어트 방향성 분석	기술경영 및 지식재산권 확보전략 수립	70
	감국 발효기법(감국장) 도입	협업 제품개발 기술력 지원	규제 대응 전략 수립	
	지방세포 분화억제 유산균 세포주 선별	R&D 투자목적에 따른 제품 특성 및 시장환경 연구	기술이전 및 상표권	
	감국 다이어트제 제품화	시제품 가능성	시장 사업성 완성	
총 계				100%

(4) 협동기관 사업화

수행기관	기업명	사업화 계획
협동기관	(주)엘파운더	<ul style="list-style-type: none"> - 감국 함유 다이어트 제품 개발 및 판매 (이익창출) - 연구인력 확보 - 감국 연계사업 구축 - 제품 제작 - 기술이전 실시
	삼성생약주식회사 농업회사법인	<ul style="list-style-type: none"> - 감국재배기술 확보 - 기술이전 실시
	농업회사법인 안심촌농원(주)	<ul style="list-style-type: none"> - 감국 재배법을 통한 원료제공 - 감국 화훼단지 개설 - 감국을 이용한 감국장(감국 된장) 개발 - 기술이전 실시

2) 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호억제를 통한 다이어트 식품 기술개발	주관연구책임자 (최○○)외 총 5명

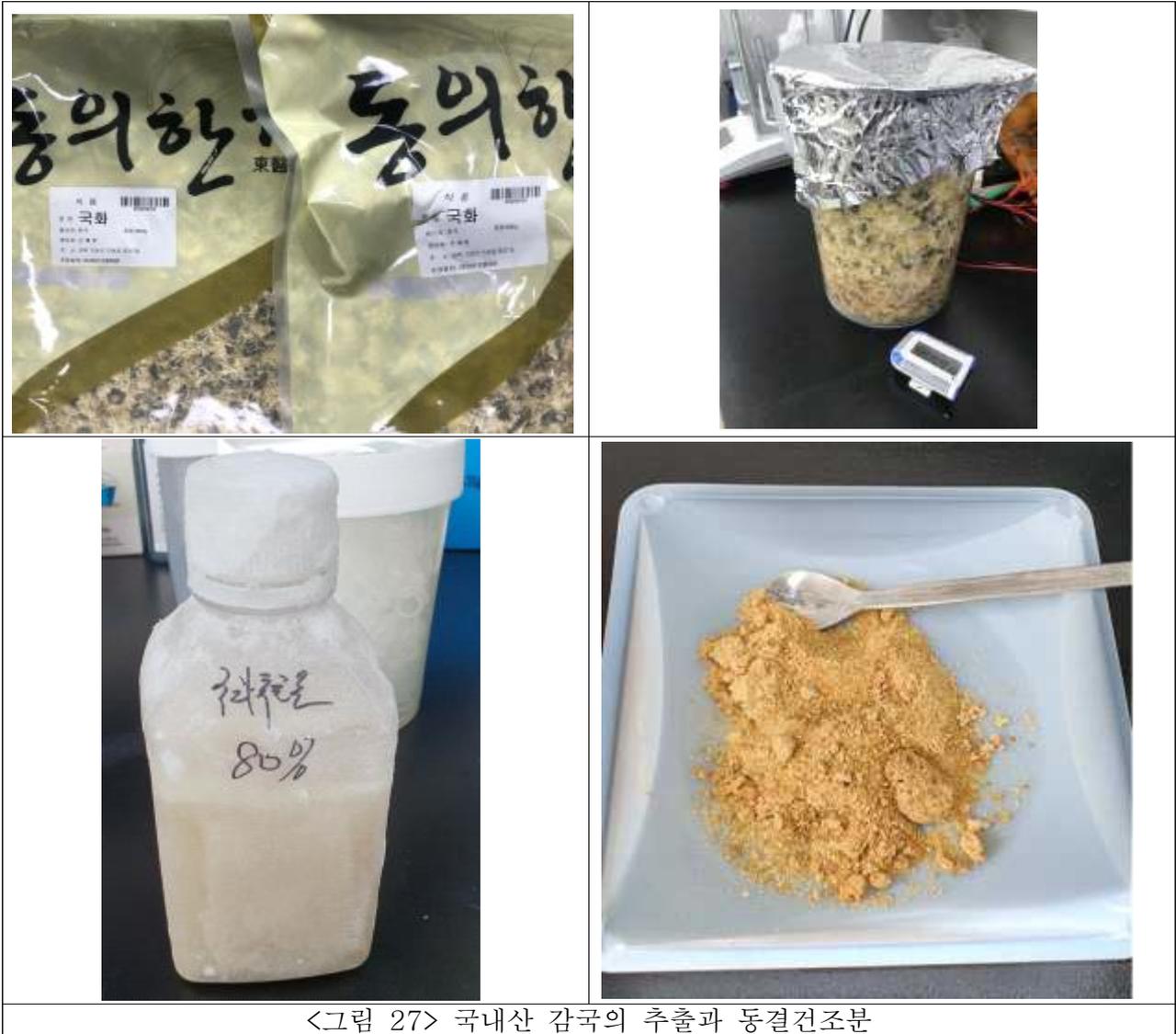
기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	3	5
대 학	1	1
국공립(연)		
출 연 (연)		
기 타		

연성대학교 산학협력단	(주)엘파운더	삼성생약(주) 농업회사법인	농업회사법인 안심촌농원(주)
국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호억제를 통한 다이어트 식품 기술개발	감국 독성 저항성 유산균 개발 및 지방세포분화 억제실험 기술연구	감국 항산화 실험 및 감국의 재배법 연구	감국 재배 및 원료제공 감국 발효 기술연구
연구책임자명 (최○○)외 0명	연구책임자명 (이○○)외 2명	연구책임자명 (박○○)외 0명	연구책임자명 (안○○)외 0명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
감국을 활용한 hedgehog 신호억제 및 다이어트 기술	감국 독성 저항성 유산균 개발 지방세포분화 억제실험(일부)	감국 항산화 실험 및 감국 재배기술 연구	감국 원료제공 및 감국장 연구

2-2. 국화(감국) 추출물의 균주 배양과정의 확립과 균주 선별

1) 감국의 추출법

- 국내산 감국은 지상부의 꽃잎으로만 서울 경동시장에서 구매해 본 연구의 시료로 사용하였으며, 감국 850.2g을 80% 에탄올에서 48시간 상온에서 추출.
- 추출물은 여과지에 여과 후 45℃에서 감압 농축시켜 동결건조 진행.



2) 감국의 유산균 배양과정

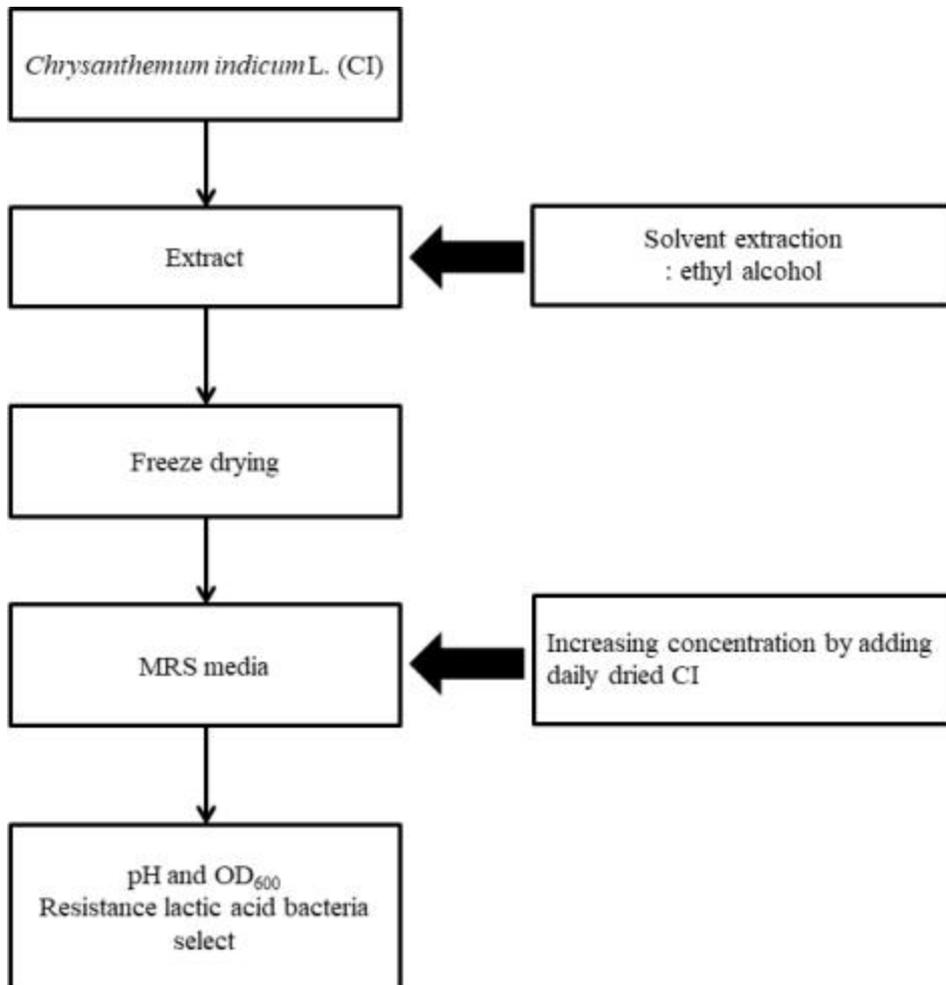
(1) 유산균의 선택

- 상업화용 유산균의 선별을 위해서 공시 균주 11개를 이용하여 예비 실험을 진행하였음.
- 감국 추출물에 유산균을 배양하기 위해 감국 추출물은 MRS배지에 혼합하여 유산균을 각 접종하였음.
- * 이 경우 감국의 독성으로 인해 균주 배양이 잘 안되어 유산균을 정치 배양시킨 MRS배지

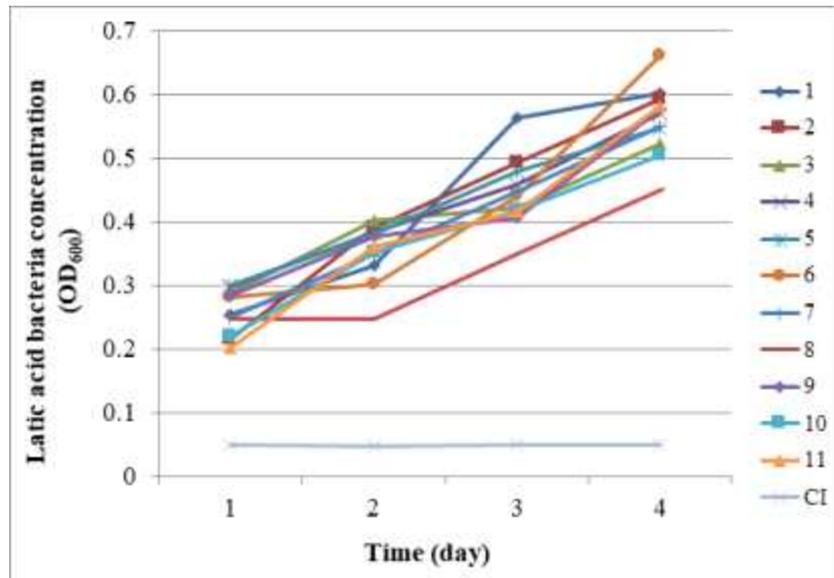
에 감국 건조 동결분을 20%(v/w)의 비율로 조금씩 희석시켜 균을 배양시켜 37℃의 온도에서 96시간 배양진행.

<표 4> 시험균주

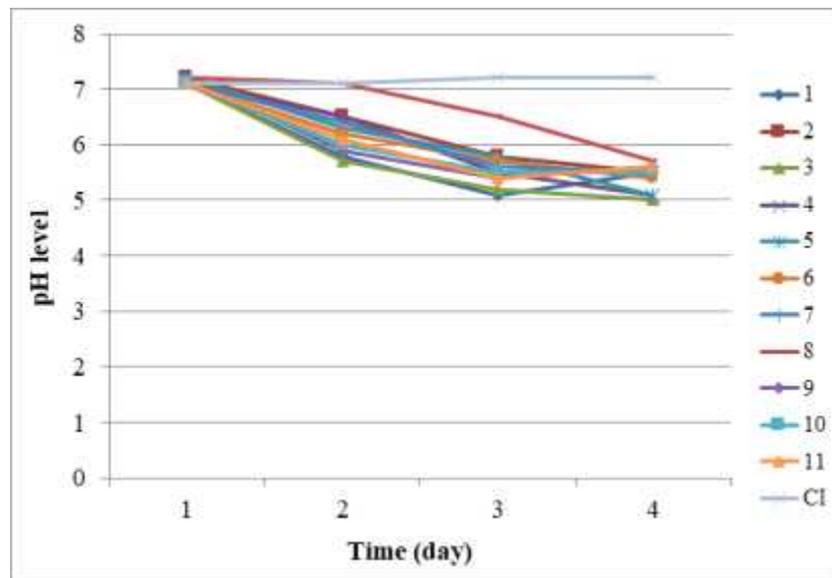
No	Name	KCTC
1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	3034
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3140
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	3718
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3237
5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3115
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	3074
7	<i>Lactobacillus casei</i>	3109
8	<i>Lactobacillus brevis</i>	3498
9	<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	3155
10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	3594
11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3112



<그림 28> 감국의 유산균 배양과정



<그림 29> 배양기간 중의 유산균 증식과정



<그림 30> pH의 변화량

(2) 배양과정 확인

- 배양과정의 공정성을 위해 pH의 측정과 OD₆₀₀기준 유산균의 균수를 확인하였음.
- 전체적인 균주는 4일간 배양에서 무난하게 증식되는 것을 확인하였으며 특히, *Lactobacillus rhamnosus*(4), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*(5), *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*(6), *Lactobacillus casei*(7)가 증식을 완만하게 진행함.
- pH 변화 과정에서도 11개의 균주 초기값 7.0에서 4일 이후의 5.0까지 낮아지는 것을 확인했음.

(3) 배양 후 당함유량 측정

- DNS 환원당 정량, 유기산 정량, pH정량을 실시하였다.

- ① DNS 환원당 정량은 DNS reagent와 glucose 용액을 사용. Standard curve를 만들기 위해 glucose 용액을 다양한 농도로 희석하여 사용하였다. 2 mL의 DNS reagent가 담긴 test tube에 sample 용액이나 glucose 용액을 2 ml을 첨가. 후에 끓는 물에 약 10 min 동안 중탕. 중탕이 끝나면 바로 찬물에 옮겨 냉각. 완전히 식힌 test tube sample 을 cuvette에 넣고 575 nm의 파장에서 absorbance(흡광도) 값을 측정.
- ② 유기산 정량은 0.1N NaOH 용액을 이용. 유산균 배양액의 pH가 중성이 될 때까지 NaOH 용액을 첨가한 뒤 첨가한 용액을 바탕으로 유기산의 양을 계산.
- ③ 유산균은 glucose를 이용하여 대사과정에 필요한 에너지를 얻으며 그 결과물로 유기산을 생성. 즉 유산균의 대사과정 및 유산균의 증식과도 연관성이 있음. 본 연구에서 가장 높은 OD를 나타낸 3074의 경우 glucose의 농도가 가장 낮으며, 유기산의 농도도 높게 나타남. 전체적으로 11개의 균 모두 발효가 잘 되었다는 것을 확인 할 수 있음.

<표 5> 배양 후 당 함유량 측정 및 균체수

	OD ₅₇₅	CFU/mL	Glucose	Organic acid	pH
3034	0.601	1.03×10 ⁹	1.25	7.81	3.69
3104	0.593	1.02×10 ⁹	0.81	7.79	3.63
3718	0.522	8.4×10 ⁸	1.18	6.51	3.81
3237	0.570	9.1×10 ⁸	1.21	6.38	3.84
3115	0.548	9.2×10 ⁸	1.68	7.61	3.79
3074	0.661	1.19×10 ⁹	0.71	8.29	3.58
3109	0.549	9.4×10 ⁸	2.18	6.15	3.89
3498	0.448	7.1×10 ⁸	2.08	5.48	3.99
3108	0.578	9.7×10 ⁸	1.61	6.48	3.81
3155	0.576	9.7×10 ⁸	1.41	6.61	3.87
3594	0.502	8.8×10 ⁸	1.28	5.51	3.97
3112	0.581	1.0×10 ⁹	0.91	7.95	3.64

3) 감국의 독성과 세포의 증식도 확인

(1) 세포배양 및 감국 독성검사

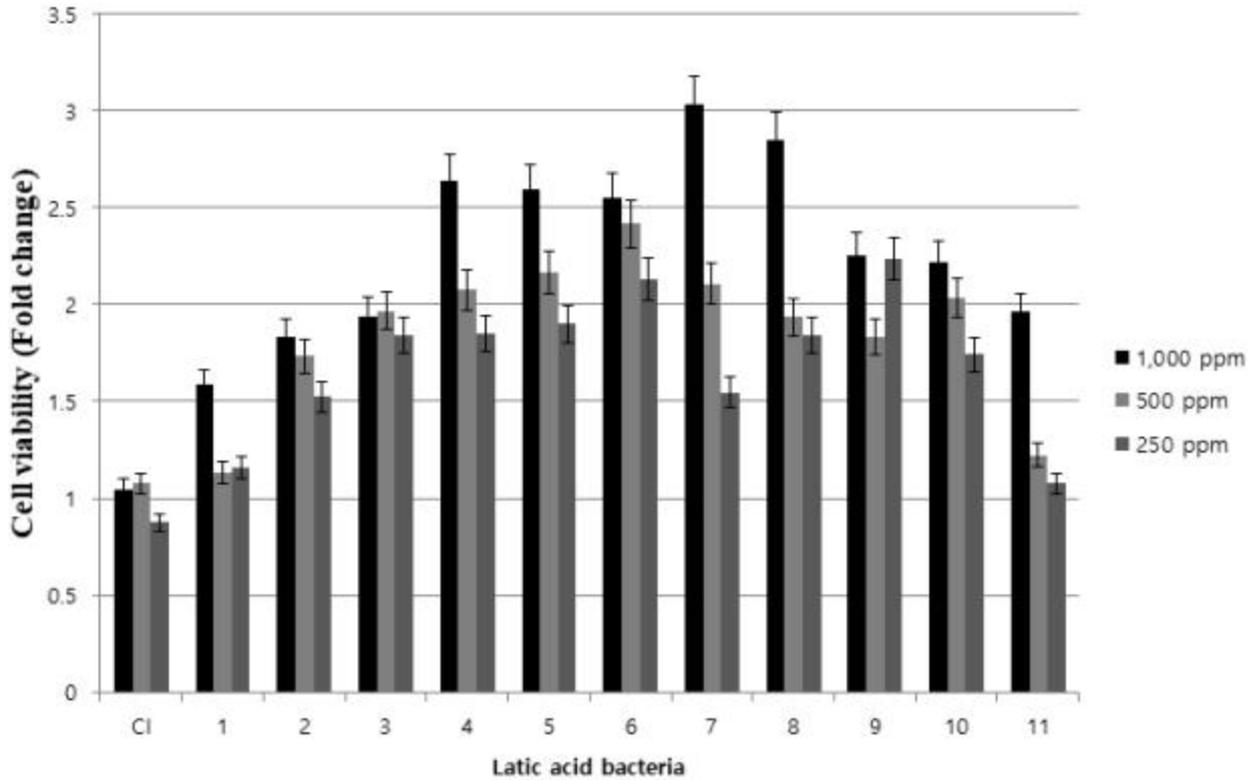
- 3T3-L1 세포주를 96 well plate에 1×10⁴세포수로 10% BCS, 1% penicillin streptomycin이 함유된 DMEM을 이용하여 37℃, 5% CO₂조건에서 12시간 배양.
- 감국 추출물과 감국 발효물 11종을 각 250, 500, 1,000 ppm의 농도로 처리하여 24 시간 배양 후 10% Cyto-X 시약을 첨가, 4시간 배양하여 450 nm에서 감국 독성에 따른 세포의 증식을 확인.

(2) 감국 독성에 따른 세포 증식 확인

- 균주의 배양과정에서와 마찬가지로 *Lactobacillus rhamnosus*(4), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*(5), *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*(6), *Lactobacillus*

casei(7)로 배양한 감국 발효물에서 세포가 감국 발효물 농도별 유의성 있게 증식이 되는 것을 확인.

- 전체적인 감국 독성에 따른 세포사멸은 찾아볼 수 없었음. 오히려 1,000 ppm에서도 증식이 더 활발하게 일어남.
- 지방구세포 분화억제 실험을 위한 11종의 감국 발효물에서 배양과정과 세포독성에 따른 세포의 증식도를 고려해 4종의 감국 발효물을 선별, 농도는 1,000 ppm으로 진행.



<그림 31> 3T3-L1세포주의 증식도

<표 6> 선별된 균주

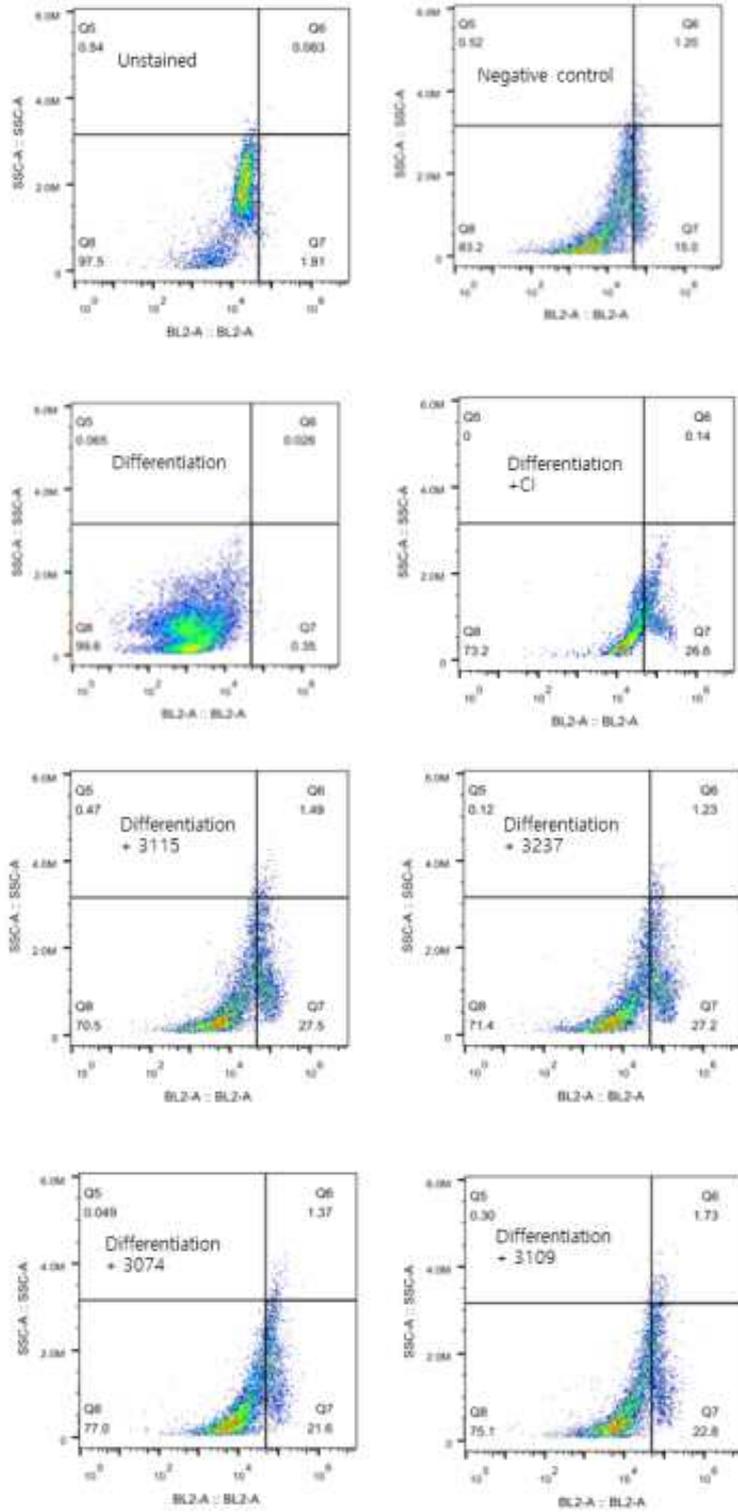
No	Name	KCTC
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3237
5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3115
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	3074
7	<i>Lactobacillus casei</i>	3109

2-3. 감국 발효물의 지방구세포 분화 억제 확인

1) 세포의 분화도 확인

(1) FACS 기기 분석

- 3T3-L1 세포주의 분화도 측정을 위해 635 nm excitation 파장에서 선별된 4개의 감극 발효물과 감극 추출물을 FACS 머신을 활용해 세포의 분화도와 독성을 측정하였음.

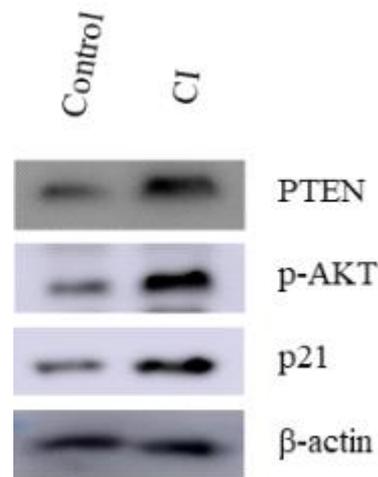


<그림 31> FACS를 활용한 세포의 분화도

- 분화를 유도하지 않은 염색하지 않은 세포(Unstained)의 패턴을 대조로 이후 모든 세포는 형광발현을 유도, 분화를 유도하지 않은 세포(Negative control)로 패턴분석을 하였고, 분화를 유도한 세포(Differentiation)와 side scatte(SSC)가 확연히 다른 것을 확인.
- 지방전구세포는 지방구세포로 분화하면서 세포의 모양이 변화되는데, 이때 지방구세포가 늘어나면서 세포소기관의 변화로 SSC가 작은 사이즈로 증가되면서 Q8(4분면 왼쪽 아래)의 구성이 증가하게 됨. FACS 분석에서 Q8의 분포는 감국추출물을 포함한 4종의 발효물에서 모두 지방구 세포의 감소시키는 것을 확인.
- Q7(4분면의 오른쪽 아래)의 분포에서 세포의 독성을 보이는 패턴이 감국 추출물(CI) 대비 *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*(3074)와 *Lactobacillus casei*(3109)를 이용한 발효물에서 감소되는 것을 확인.

(2) 감국 추출물과 감국 발효물의 지방구세포 분화기전 확인

- ① Western blot을 활용해 감국 추출물이 지방구세포 형성에 중용한 영향을 미치는 protein kinase B (AKT)의 단백질 발현을 확인.
 - AKT는 PPAR γ , C/EBP계열의 상위를 조절하는 전사인자.



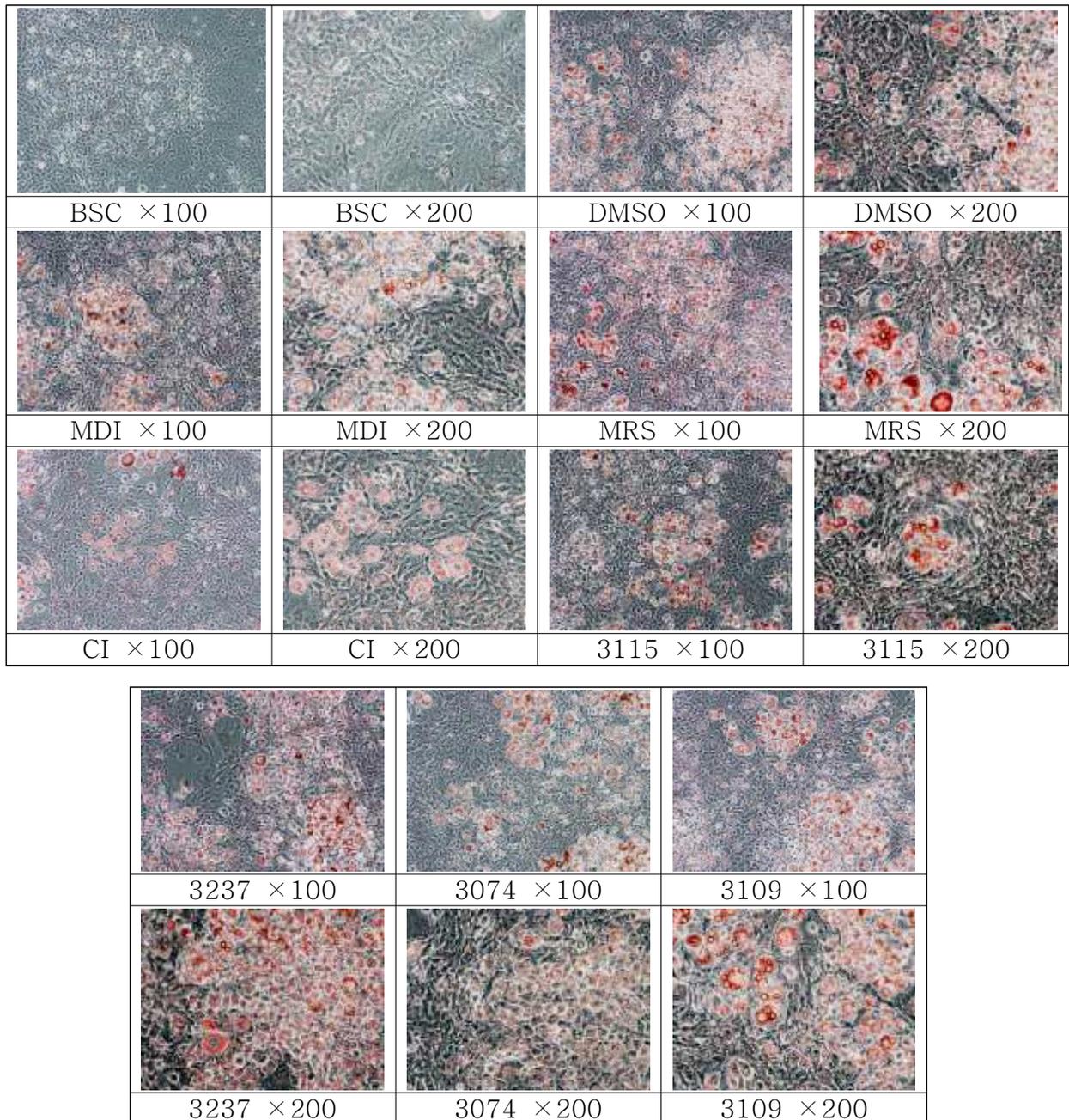
<그림32> 감국 추출물의 PTEN-AKT의 발현확인

- 감국 추출물은 western blot에서 phosphatase and tensin homolog (PTEN)-AKT-p21로 이어지는 AKT 메커니즘을 미분화세포(control)보다 단백질의 발현을 높게 발현시킴. PTEN의 경우 AKT를 조절하는 상위 인자로서 일반적으로 PTEN이 발현을 할 경우 AKT는 발현이 억제되어 짐. 하지만 AKT는 PTEN만이 아닌 JIP1, TBK1, PP2A 등에 의해서도 조절됨 (Hemmings and Restuccia, 2012).
- 위의 데이터를 토대로 AKT 매커니즘에 의해 지방구세포분화가 억제가 되지 않는 것을 확인했으나, ORO염색을 통해 지방구세포의 분화가 억제됨을 확인하였음. 따라서 다른

신호에 의해 지방구세포분화가 억제됨을 확인하고자 hedgehog 신호에 대한 영향을 확인하고자 하였음. 즉, 감국 추출물은 지방전구세포에서 지방구세포로의 분화를 억제시킬.

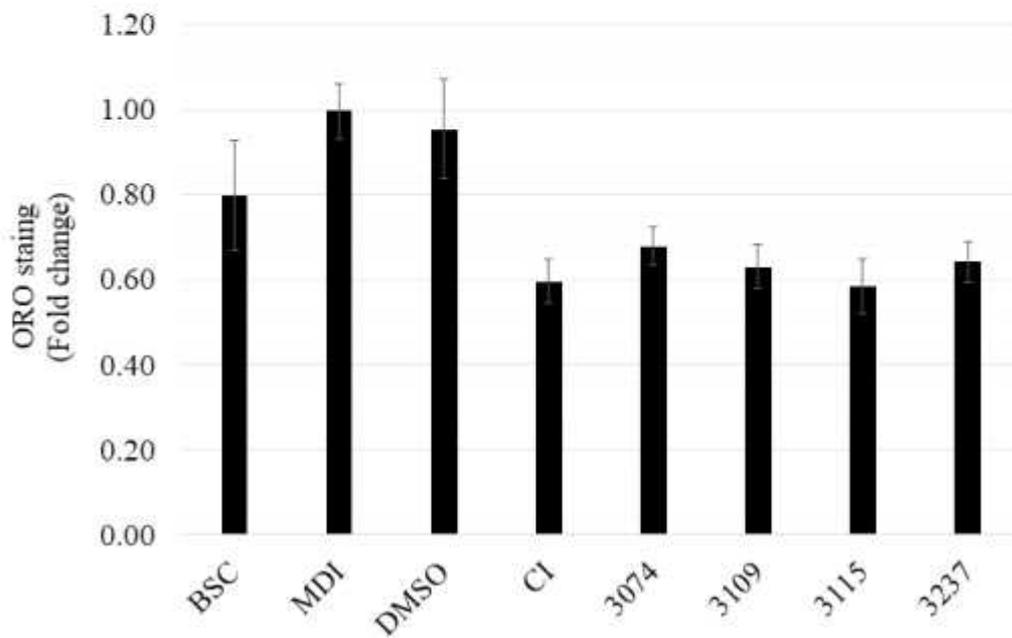
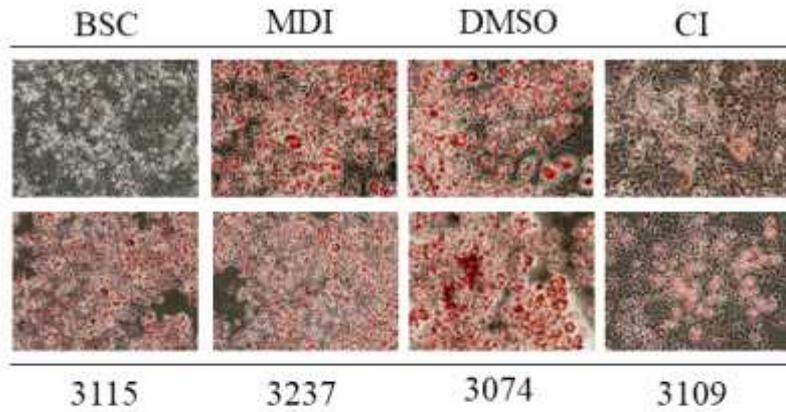
② ORO 염색을 통해서 지방구세포의 분화를 확인

- 미분화 세포는 BSC, 분화 유도된 세포는 MDI, 감국 추출물 처리군은 CI, MRS 배지는 MRS, 각 유산균으로 발효된 감국 발효물은 유산균의 KCTC 번호로 표기.



<그림33> ORO염색을 통해 지방구세포(3T3-L1)의 분화 확인

- Oil-Red-O (ORO) staining
 - * 6 well plate에 3T3-L1 세포 1×10^5 cells/well 을 넣고 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotics (penicillin and streptomycin, 100 U/mL)를 첨가한 배지에 24 시간 이상 키워 100% density를 유지한다. 동결건조된 감국 추출물을 농도별로 처리한 뒤 MDI solution (adipogenic cocktail)인 IBMX (0.5 mM), DEX (1μ M), insulin (10μ M)을 첨가하여 분화유도를 시작. 분화 기간은 총 9일간 지속하였으며, 분화 초기 3일간은 MDI solution이 함유된 배지를, 분화 중기 3일간은 insulin (10μ M)만을 함유한 배지를, 분화 후기 3일간은 10% FBS 만 함유하는 배지로 매일 교환.
 - * 분화된 3T3-L1 세포에 PBS 로 2회 세척하였으며, 10% formalin을 분주하여 실온에서 고정. 5분 후 10% formalin을 제거한 후 새로운 10% formalin을 분주하여 실온에서 고정. 2시간 후 10% formalin을 제거하고 60% isopropanol을 분주하여 곧바로 제거한 후 완전히 건조한 뒤 Oil red O solution 시약을 분주하여 지방구를 염색. 1 시간 후 증류수로 4번 세척하였고, 붉은색으로 염색된 세포 내 지방구를 현미경으로 관찰하고, 지방의 축적량을 정량하기 위해 100% isopropanol을 분주하여 Oil red O dye를 용출시킨 후 Microplate Reader로 560 nm 파장에서 optical density를 측정.
- MDI군과 MRS군과의 세포 모양의 차이점이 거의 없음. 따라서 유산균의 증식과 감국 추출물의 적응을 위해 첨가한 MRS배지가 지방구세포 분화에 영향이 없다는 것을 확인.
- ORO 염색으로 CI, 3074, 3109, 3115, 3237군들 모두 지방구세포를 억제한다는 것을 확인. 특히 4개의 유산균 감국 발효균은 감국 추출물보다 지방구세포 분화 억제를 효과적으로 시킴.
- 또한 감국 추출물과 감국 발효물의 첨가 시 지방전구세포에서 지방구세포로의 분화를 억제했으며, 추가적으로 이미 분화된 지방구세포의 감소를 확인.
- 이는 지방구세포 분화 메커니즘의 하나인 AKT 메커니즘 이외에 추가적인 세포신호가 지방구세포의 분화를 억제시킨 것으로 유추할 수 있으며, 이에 따라 지방전구세포를 조절하는 다양한 세포신호 기전을 확인했다. 대표적으로 Wnt/ β -catein, Notch, hedgehog 신호를 들 수 있음. 이러한 신호는 세포의 유전자 발현과 세포의 성장에 따른 다양한 신호와 함께 작동되며, 지방전구세포에서 이러한 신호의 감소는 주로 분화시기에 발생, 세포의 분화 조절을 제어하는 것으로 알려져 있음.
- ORO 염색으로 감국 추출물과 4종의 감국 발효물이 3T3-L1 세포주의 분화를 조절하는 신호기전에 영향을 주었을 것으로 유추할 수 있으며, 그에 따라 lipogenesis 신호와 hedgehog 신호를 확인.



<그림34> MRS 염색을 제외한 ORO염색된 세포와 수치

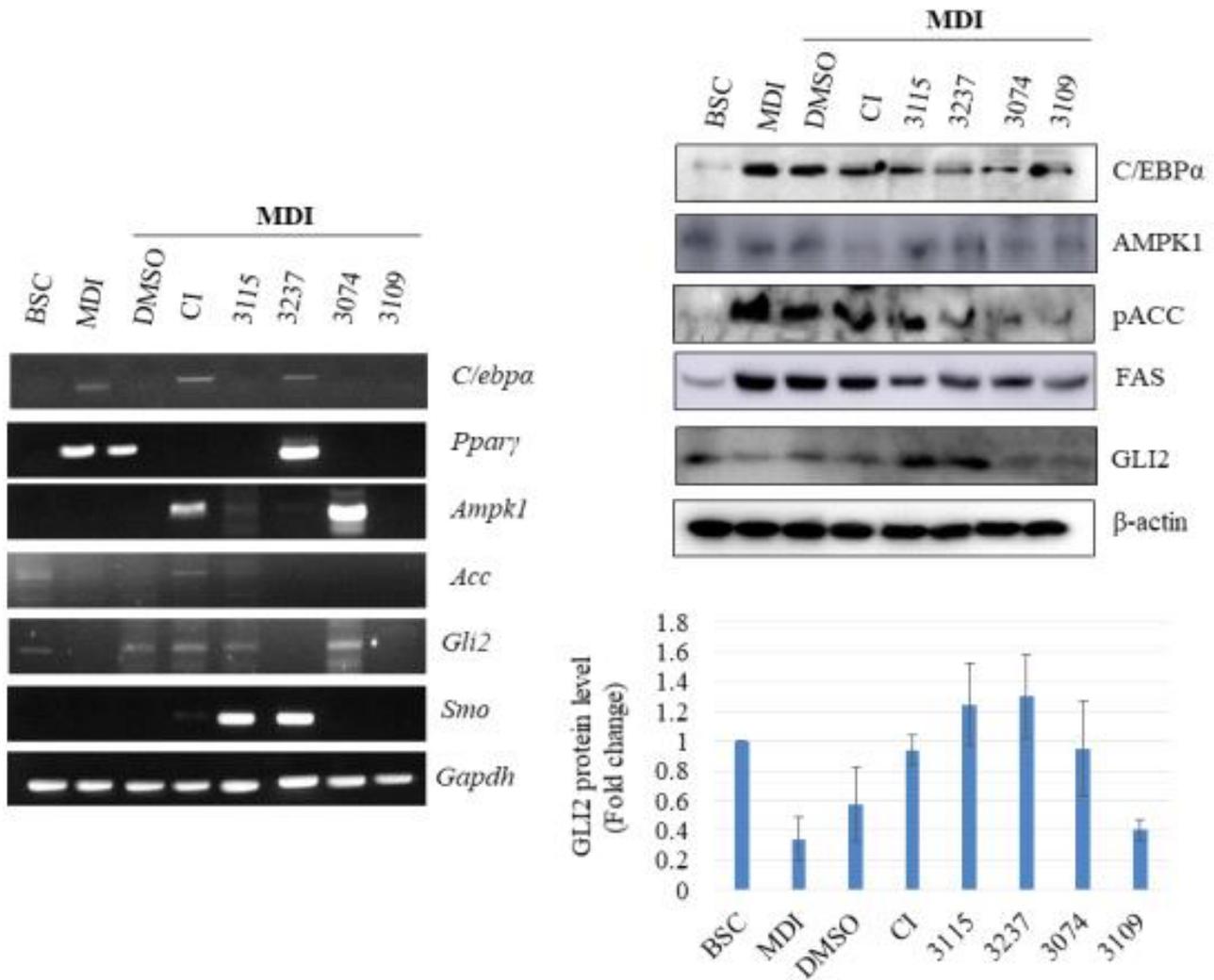
③ RT PCR과 western blot으로 lipogeensis와 hedgehog 신호 발현 확인

- RT-PCR

- * 3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 감국 추출물 및 감국 발효물 1,000 ppm 물질을 24시간 처리하여 세포를 harvest. 1 ml의 TRI reagent에 넣어 세포분해 후 0.2 mL chloroform을 넣고 15초간 vortex를 실시. Vortex 후 실온에서 15분간 방치한 후 4°C에서 12,000 rpm로 10분간 원심 분리한 후 RNA가 포함되어 있는 투명한 상층액을 분리.
- * 분리한 상층액에 0.5 ml isopropanol을 넣고 섞은 후 실온에서 10분간 방치한 후 4°C에서 12,000 rpm 로 10분간 원심 분리하여 RNA를 침전. 상층액을 제거한 후 1 mL 75% ethanol을 넣은 후 vortex하여 4°C에서 7,500 rpm 로 5분간 원심 분리하여 RNA를 washing. RNA pellet을 10분간 공기 건조시킨 후 20 μ L의 DEPC-treated

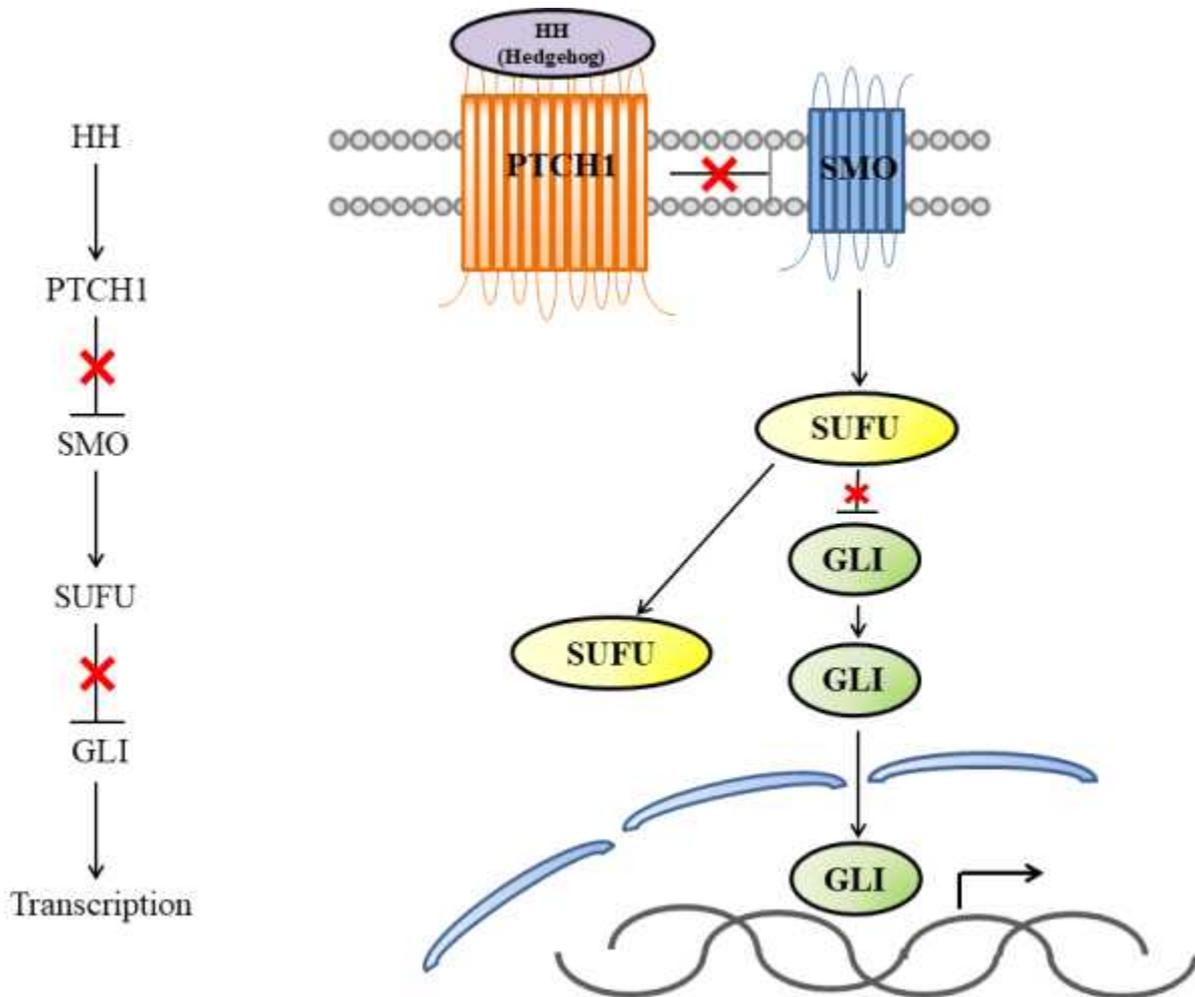
DW로 용해시켜 cDNA synthesis에 사용.

- * cDNA synthesis는 Power cDNA synthesis kit을 사용하여 실시. RNA 1 μ L (1 μ g/ μ L)와 RNase-free water 8.5 μ L를 섞은 후 1 μ L의 random hexamer를 넣어 75°C에서 5분간 반응. RNA mixture를 spin down시킨 후 얼음 위에서 1분간 방치하고 RNase inhibitor 1 μ L, 5x RT buffer 4 μ L, dNTP mixture 2 μ L, DTT 2 μ L 및 AMV RT enzyme 0.5 μ L를 순서대로 넣은 후에 42°C에서 60분 동안 반응시키고 70°C에서 5분간 가열하여 RNA:cDNA hybrid를 denaturation시킴으로써 반응을 정지.
- * PCR은 Prime Master mix를 사용하여 실시. Prime Master mix 10 μ L, forward primer (10 pmole/ μ L) 2 μ L, reward primer (10 pmole/ μ L) 2 μ L, sterilized DW 5 μ L 및 template DNA 1 μ L를 차례대로 넣은 후 PCR machine을 이용하여 PCR을 실시.
- Western blot
 - * 3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 감국 추출물과 감국 발효물 1,000 ppm로 24시간 처리하여 세포를 수집. RIPA lysis buffer에 phosphatase inhibitor cocktail과 protease inhibitor cocktail을 1×로 섞어 얼음에 1시간 동안 lysis 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리기로 원심분리를 실시. 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay를 이용하여 정량 후 10~25 μ g의 단백질을 SDS-PAGE gel method를 이용하여 전기영동.
 - * Gel transfer된 단백질을 1×PBS buffer 1,000 mL과 Tween20 1 mL을 섞어 만든 PBS-T에 희석한 5% skim milk에 1시간 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각각 1:1,000의 농도로 12시간 4°C의 냉장실에 처리. 3회 PBS-T로 세척한 뒤 2차 항체를 각각 1:5,000의 농도로 실온에서 처리 후 다시 3회 PBS-T로 세척. Amersham ECL western blotting detection reagent를 이용하여 발색을 측정. 항체는 anti-p21, anti-akt, anti-PTEN, anti-C/EBP α , anti-AMPK1, anti-pACC, anti- β -actin 및 anti-GLI2를 이용.
- PCR 및western blot을 통한 실험결과에서 감국 추출물 및 각 발효물 분화대조군 (MDI) 대비 3115에서는 hedgehog과 관련된 *Gli2*의 전사를 유지하였고, *Smo*의 전사는 증가. 즉, hedgehog 을 억제하는 2가지 조절 중 신호억제 단백질인 SMO를 조절하는 것이 아닌, ligand에 의한 조절하는 것으로 보여짐. 하지만 단백질 수준에서 지방구 세포로 분화되면서 낮아지는 GLI2를 계속 유지시켜 지방전구세포의 신호를 유지함. 반면, 3074는 *Gli2*의 전사를 증가시켰지만, 단백질 수준에서 GLI2를 3237, 3115만큼 조절하지 못함.



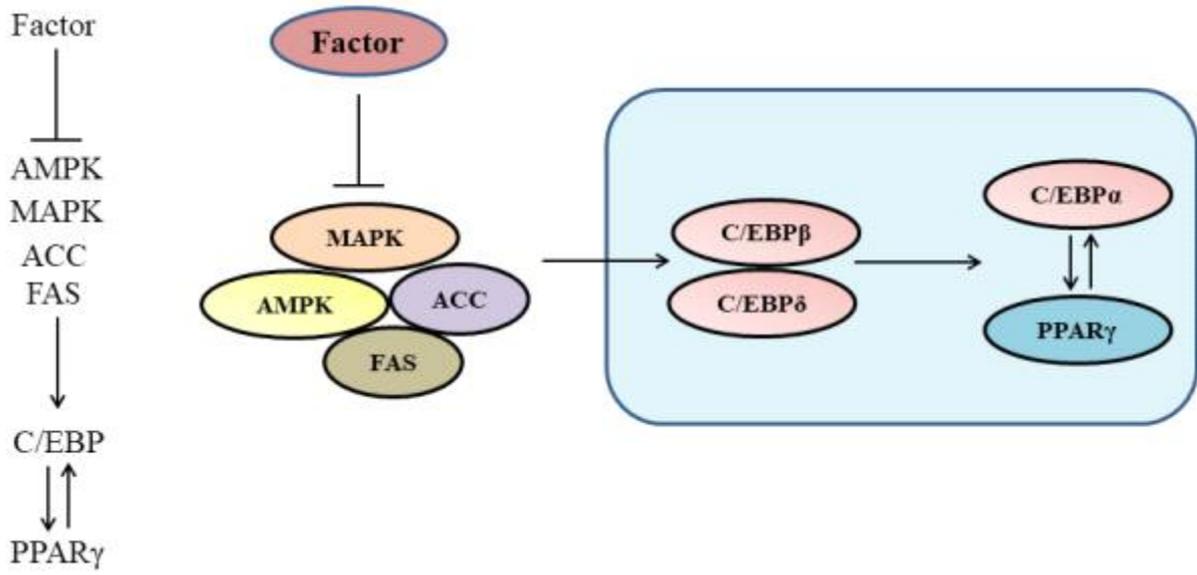
<그림35> Hedgehog와 lipogenesis 신호확인

- Hedgehog 신호는 1980년 초파리에서 발견되어 척추동물에서 3가지 타입의 유전자 상동체가 발견. Shh (Sonic hedgehog), Ihh (Indian hedgehog) 및 Dhh (Desert hedgehog)의 3가지 타입 중 Shh이 리간드 중 가장 광범위하게 발견되며, 특히 배아 발달에 필수적인 역할을 함.
- 리간드와 결합된 12개의 막단백질로 이루어진 patched1 (PTCH1)과 결합하여 억제된 단백질인 smoothened (SMO)를 유동적이게 조절하고, suppressor of fused (SUFU)가 Glioma-associated oncogene (*Gli*) 전사 인자(*Gli1*, *Gli2* 및 *Gli3*)를 핵으로 이동할 수 있게 불활성화시켜 이후 타겟 유전자를 전사시킴.
- 3237의 경우 *Smo* 전사를 활성화 시키고 *Gli2*의 전사를 유지시키는 못하였지만 단백질 수준에서는 GLI2를 조절시킴. 따라서 hedgehog의 유전자와 단백질의 수준을 동시에 보여준 발효물은 3115, 3237로 hedgehog를 조절하는 것을 알 수 있음.

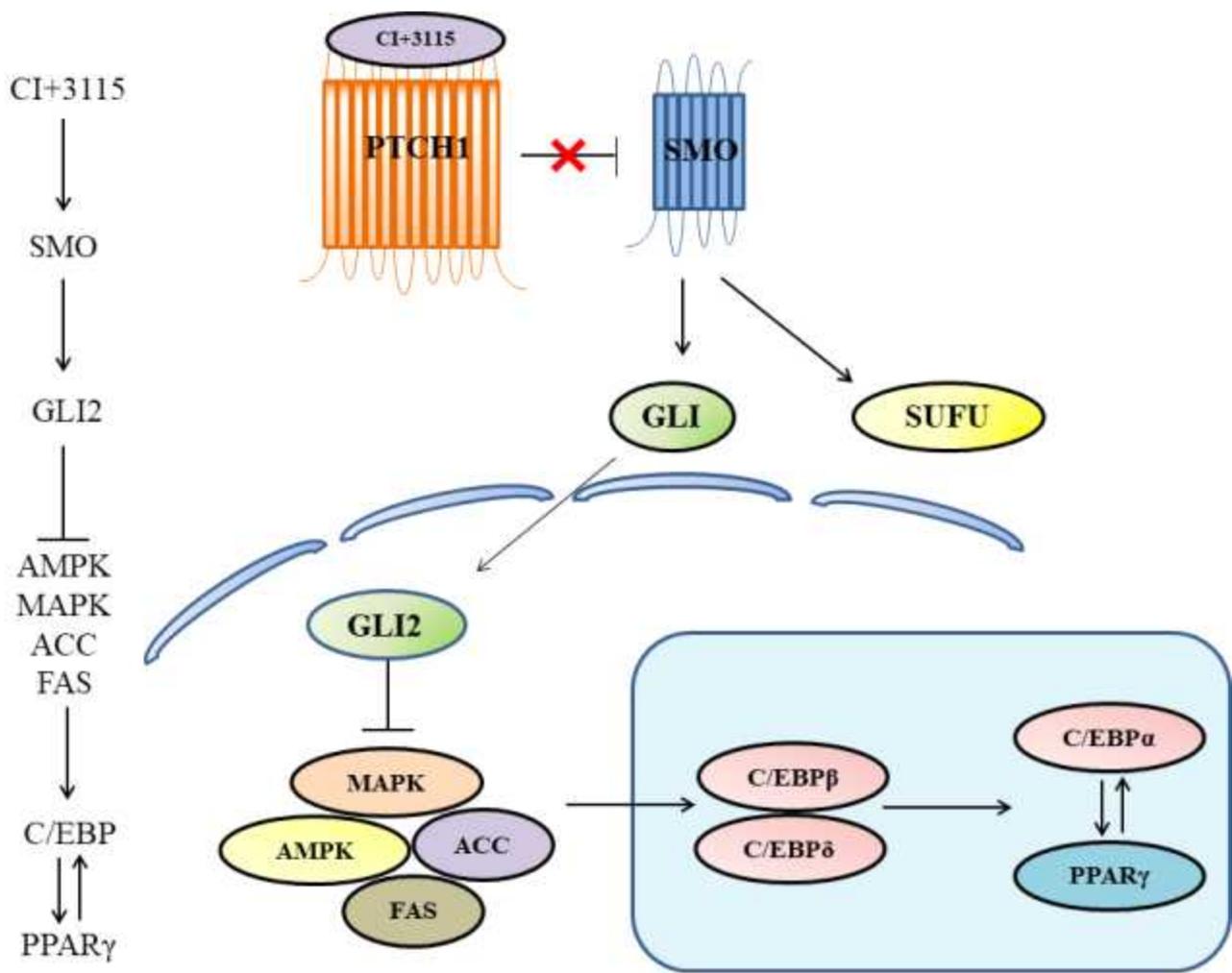


<그림36> Hedgehog 신호전달 체계

- 지방구세포 분화와 관련된 다양한 신호기전은 C/EBP, PPAR, r/RXR, ADD1/SREBP 1C 등이 존재. 특히 C/EBP α 와 PPAR γ 는 서로 발현의 차이를 조절하고 상보적 역할을 함. 지방구세포 분화를 억제하는 신호에서 AMP-activated protein kinase (AMPK), acetyl-CoA carboxylase (ACC), C/EBP α 를 타겟으로 확인하였고, 분화와 관련된 mRNA 수준에서 3115, 3109에서 분화와 관련된 *C/ebp α* , *Ampk1*, *Acc*, *Ppar γ* 의 감소 및 4가지 유산균에서 모두 단백질 수준에서 C/EBP α 및 phosphor acetyl-CoA carboxylase (pACC), FAS를 효과적으로 감소시키는 것을 확인.
- Hedgehog 신호와 lipogenesis 신호를 동시에 조절하는 감국 발효물은 3115로 확인.



<그림37> Lipogenesis 신호전달 체계



<그림38> 감국 발효물(3115)의 지방구세포분화 억제 메커니즘

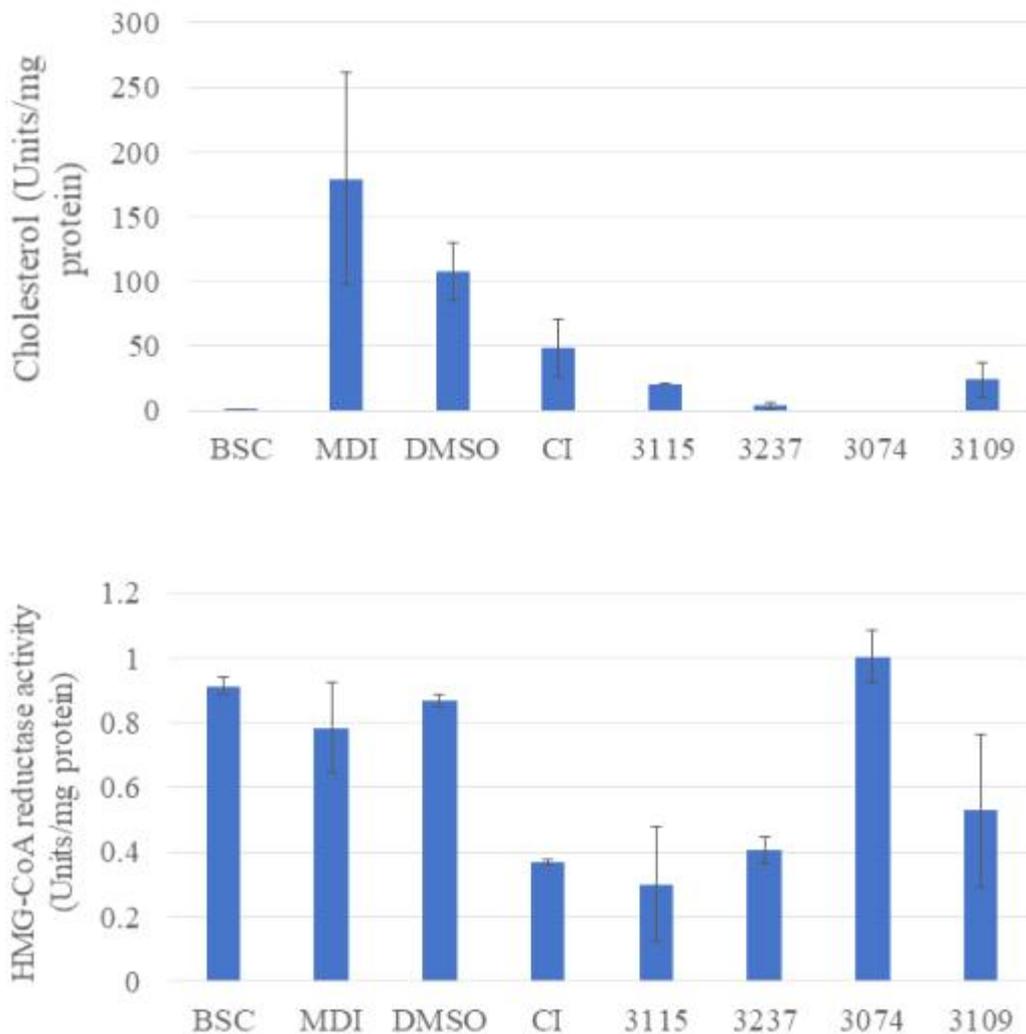
2) 콜레스테롤 관련인자 분석결과

(1) 세포내 콜레스테롤 분석

- 3T3-L1 세포주를 분화 유도하여 세포내 콜레스테롤을 정량적으로 분석 비교. 여러 물질 중 감국 추출물을 포함한 3115, 3237, 3074, 3109의 발효물질에서 콜레스테롤을 모두 억제된 것을 확인.

(2) 콜레스테롤 합성인자 HMG-CoA 효소활성 분석

- 3T3-L1 세포주를 분화 유도하여 단백질을 분리하여 세포내 콜레스테롤 합성의 활성을 측정한 결과 감국추출물을 포함한 3115 및 3237 발효물에서 콜레스테롤 합성인자를 억제.



<그림39> 세포내 콜레스테롤 및 콜레스테롤 합성인자 분석

3) 지방전구세포 지방분화 관련인자 분석 결과

(1) 세포내 중성지방 분석 (Triglyceride)

- 3T3-L1 세포주를 분화 유도하여 세포내 중성지방을 정량적으로 분석 비교. 여러 물질 중 감국 추출물을 포함한 3115, 3237, 3074, 3109의 발효물에서 모두 triglyceride 감소를 보였으며, 감국 추출물을 포함한 3115, 3074, 3109의 발효물에서 높은 억제효과를 확인.

(2) 세포내 GPDH 분석 (Glycerol-3-Phosphate dehydrogerase)

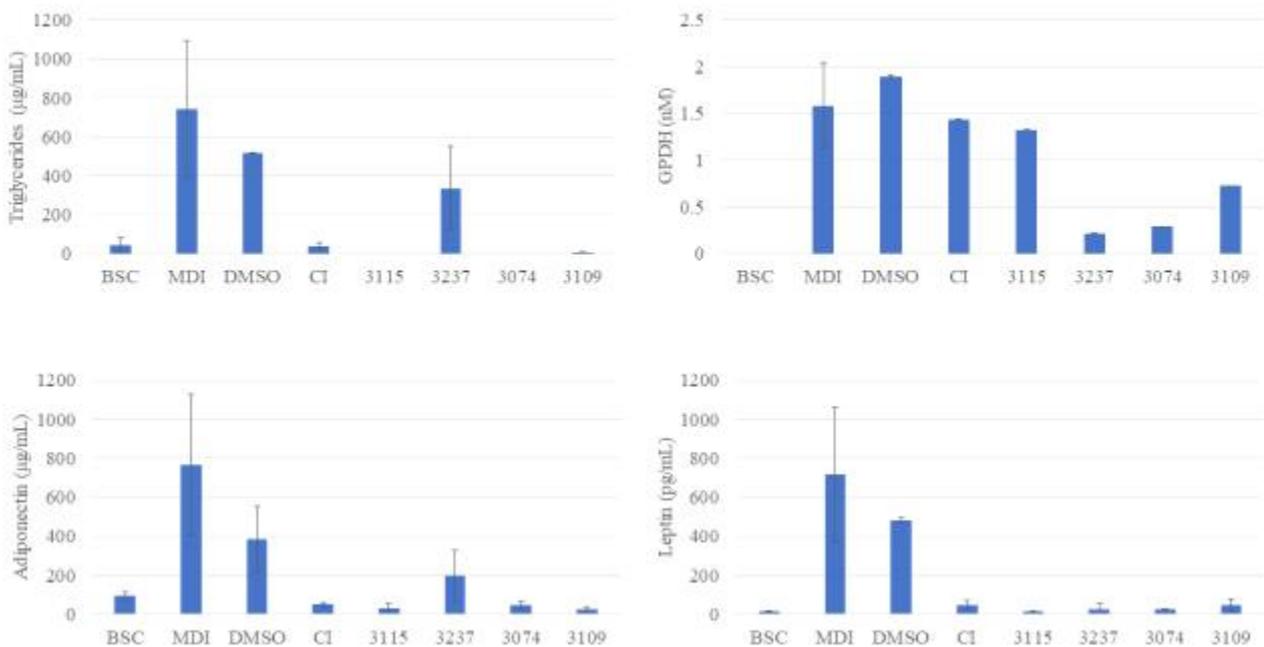
- 3T3-L1 세포주를 분화유도하여 세포내 지방성분인 GPDH를 정량적으로 분석 비교. 여러 물질 중 3237, 3074, 3109의 발효물에서 GPDH를 감소시키는 확인.

(3) 세포내 지방조직 호르몬 (Adiponectin)

- 3T3-L1 세포주를 분화유도하여 세포내 adiponectin을 정량적으로 분석 비교. 여러 물질 중 감국 추출물을 포함한 3115, 3237, 3074, 3109의 발효물에서 adiponectin을 모두 감소시켰고, 감국 추출물을 포함한 3115, 3074, 3109의 발효물에서 높은 억제효과를 확인.

(4) 세포내 지방조직 호르몬 (Leptin)

- 3T3-L1 세포주를 분화유도하여 세포내 leptin을 정량적으로 분석 비교. 여러 물질 중 감국 추출물을 포함한 3115, 3237, 3074, 3109의 발효물에서 모두 leptin을 감소시킴.



<그림40> 세포내 지방분화 관련인자 분석 결과

2-4. 감국 발효물의 항산화

1) Phenolic contents assay

- 추출물 0.2 mL에 Folin-ciocalteau reagent 0.1 mL, 20 % sodium carbonate 0.6 mL를 첨가. 15분 후 증류수 9 mL를 넣어 혼합한 뒤 UV/Visible spectrophotometer로 725 nm에서의 흡광도를 측정. 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 검량선을 작성하여 농도를 나타냄.
- 총 페놀 함량 측정 결과 64% 감국 추출물의 경우 발효 전 농도는 0.697 ± 0.013 mM 였으나, 발효 후 모든 균주에서 감소를 나타냄. 80% 감국 추출물의 경우 발효 전 농도는 0.734 ± 0.015 mM 였으며, 발효 후 3109, 3237에서 증가를 나타냄.

<표 7> 추출농도별 총 phenolic 함량

	64% (mM)	80% (mM)
Extract	0.780 ± 0.015	0.716 ± 0.005
Cont	0.697 ± 0.013	0.734 ± 0.015
<i>L. lactis</i>	0.639 ± 0.021	0.666 ± 0.011
<i>L. casei</i>	0.656 ± 0.011	0.687 ± 0.014
3074	0.696 ± 0.016	0.703 ± 0.010
3109	0.746 ± 0.014	0.744 ± 0.016
3115	0.624 ± 0.012	0.693 ± 0.013
3237	0.769 ± 0.016	0.782 ± 0.011

2) Flavonoid contents assay

- 추출물 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL를 첨가. 40분 후 UV/Visible spectrophotometer로 415 nm에서의 흡광도를 측정. 플라보노이드 함량은 quercetin를 이용하여 검량선을 작성하여 농도를 나타냄.
- 총 플라보노이드 함량 측정 결과 64% 추출물의 경우 발효 전 농도는 0.539 ± 0.020 mM 였으나, 발효 후 모든 균주에서 감소를 나타냄. 80% 추출물의 경우도 발효 전 농도는 0.536 ± 0.019 mM 였으나, 발효 후 모든 균주에서 감소를 확인. 발효과정에서 폴리페놀과 플라보노이드가 유산균이 생성한 효소에 의해 분해된 것으로 확인.

<표 8> 추출농도별 총 flavonoid 함량

	64% (mM)	80% (mM)
Extract	2.405±0.034	2.234±0.042
Cont	0.539±0.020	0.536±0.019
<i>L. lactis</i>	0.233±0.024	0.287±0.022
<i>L. casei</i>	0.254±0.022	0.294±0.020
3074	0.265±0.017	0.334±0.022
3109	0.323±0.018	0.312±0.023
3115	0.221±0.012	0.250±0.021
3237	0.271±0.021	0.278±0.017

3) Reducing power (RP) assay

- 추출물 0.1 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 0.5 mL, 1% potassium ferricyanide 0.5 mL를 첨가. 50℃에서 20분 동안 반응시킨 후 10% TCA 2.5 mL를 가하였다. 반응액을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리를 시킨 뒤, 상층액 0.5 mL와 D.W. 0.5 mL, 1% ferric chloride 0.1 mL를 혼합 반응시킨 뒤, UV/Visible spectrophotometer로 700 nm에서의 흡광도를 측정. Reducing power는 ascorbic acid를 이용하여 검량선을 작성하여 농도를 나타냄.
- Reducing power 측정 결과 64% 추출물의 경우 발효 전 RP는 0.103±0.036 mg/mL였으며, 발효 후 모든 균주에서 증가를 나타내었으며, 그 중 *L. casei*의 증가가 가장 높게 나타남. 80% 추출물의 경우도 발효 전 농도는 0.114±0.040 mg/mL였으며, 발효 후 모든 균주에서 증가를 나타내었으며, 그 중 *L. casei*의 증가가 가장 높게 나타남.

<표 9> 추출농도별 RP함량

	64% (mg/mL)	80% (mg/mL)
Extract	0.239±0.036	0.240±0.035
Cont	0.103±0.036	0.114±0.040
<i>L. lactis</i>	0.159±0.038	0.135±0.037
<i>L. casei</i>	0.176±0.033	0.191±0.034
3074	0.122±0.034	0.122±0.036
3109	0.174±0.035	0.186±0.035
3115	0.121±0.038	0.144±0.038
3237	0.130±0.038	0.148±0.038

4) DPPH assay

- 추출물 0.1 ml에 methanol 1.9 mL를 첨가한 뒤, 517 nm 파장에서 흡광도가 0.8이 되도록 보정한 DPPH용액 1.0 mL를 첨가. 반응액은 vortexing한 뒤 실온에서 30분 동안 반응시킨 뒤, UV/Visible spectrophotometer로 517 nm에서의 흡광도를 측정.
- DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 64% 추출물의 경우 발효 전 DPPH 라디칼 소거능은 $34.04 \pm 0.94\%$ 였으며, 발효 후 *L. lactis*, *L. casei*, 3074, 3109에서 증가를 나타내었으며, 그 중 *L. casei*의 증가가 가장 높게 나타났다. 80% 추출물의 경우 발효 전 DPPH 라디칼 소거능은 $19.67 \pm 0.97\%$ 였으며, 발효 후 모든 균주에서 증가를 나타내었으며, 그 중 3074의 증가가 가장 높게 나타남.

<표 10> 추출농도별 총 DPPH 라디칼 소거능

	64%	80%
Extract	74.00 ± 0.57	64.17 ± 1.21
Cont	34.04 ± 0.94	19.67 ± 0.97
<i>L. lactis</i>	36.38 ± 0.70	22.79 ± 1.00
<i>L. casei</i>	45.46 ± 0.73	28.96 ± 0.14
3074	40.58 ± 0.94	29.67 ± 0.47
3109	43.13 ± 1.56	27.33 ± 1.26
3115	34.00 ± 0.88	27.67 ± 0.51
3237	30.46 ± 1.30	24.75 ± 0.90

5) 지질산화방지능 측정

- 추출물 0.02 mL에 ethanol에 희석한 2.5% linoleic acid 0.2 mL, 증류수 0.78 mL를 첨가. 반응액은 70°C 압조건에서 1일간 반응시킨 뒤 반응액 0.1 mL, 70% ethanol 2.8 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.05 mL, 0.02 M ferrous chloride 0.05 mL를 반응시킴. 3분간 반응 후 UV/Visible spectrophotometer로 500 nm에서의 흡광도를 측정.
- 항지질과산화능 측정 결과 64% 추출물의 경우 발효 전 항지질과산화능은 $56.06 \pm 1.14\%$ 였으며, 발효 후 모든 균주에서 감소를 나타냄. 80% 추출물의 경우 발효 전 항지질과산화능은 $66.18 \pm 1.38\%$ 였으며, 발효 후 모든 균주에서 감소를 나타냄.

<표 11> 추출농도별 지질산화방지능

	64%	80%
Extract	73.05±0.95	81.42±1.10
Cont	56.06±1.14	66.18±1.38
<i>L. lactis</i>	39.66±0.31	46.52±0.99
<i>L. casei</i>	45.42±0.89	54.01±1.87
3074	29.53±1.70	35.80±1.79
3109	32.85±2.00	42.81±0.85
3115	35.46±1.53	41.56±1.00
3237	48.34±1.59	55.40±2.07

6) 감국 발효물의 항산화에 대한 결론

- Flavonoid 함량에서는 감국 추출물이 다른 감국 발효물에 높게 측정되었음. 또한 RP측정에서 감국 추출물에 비해 감국 발효물에서 높게 나타났으며, DPPH 라디칼 소거능에서는 3237을 제외한 나머지 감국 발효물이 감국 추출물보다 높게 측정이 되었음. 또한 지질산화방지능에서는 감국 추출물보다 감국 발효물이 낮게 측정되었음.
- 발효를 통해서 각 항산화능의 차이점을 확인할 수 있었음. 다만 flavonoid 함량의 차이는 발효 후 flavonoid 물질의 감소를 의미함. 이는 물질의 변화를 확인 할 필요가 있음.

2-5. 감국 발효물에서의 단일물질의 연구

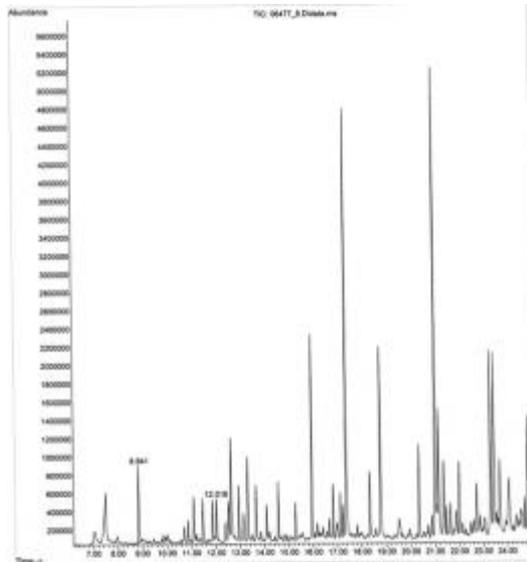
1) GC-MS 분석을 통한 물질 확인

- 각 분석물을 0.5 g에 3차 증류수 5 mL을 넣어 섞어준 후 fiber에 성분을 흡착시키기 위해 70° C에서 20분 동안 방치하여 시료로 사용. 30초 동안 평형을 유지하였고 solid-phase microextraction (SPME) fiber (Pink: PDMS/DVB (StableFlex™))를 사용.
- 컬럼은 gas chromatography (GC) columns (DB-5, DB-5ms, DB-DIOXIN and Cp-Sil 88, 30 m×250 μm×0.25 μm)를 이용하였으며, Agilent 7890 gas chromatography/5977B mass spectrometer를 이용. Data 분석조건은 retention time (RT) 52분, oven온도 50°C 로 측정하였으며, post run 110°C에서 분당 5°C씩 280°C까지 올렸고, 각 hold time은 5분간 주었으며, Mass parameter는 start time 1에서부터 low mass 35/high mass 400까지 측정.
- Column 과 spectrum을 비교하여 동정하였고 측정된 성분은 각각의 피크 면적을 총

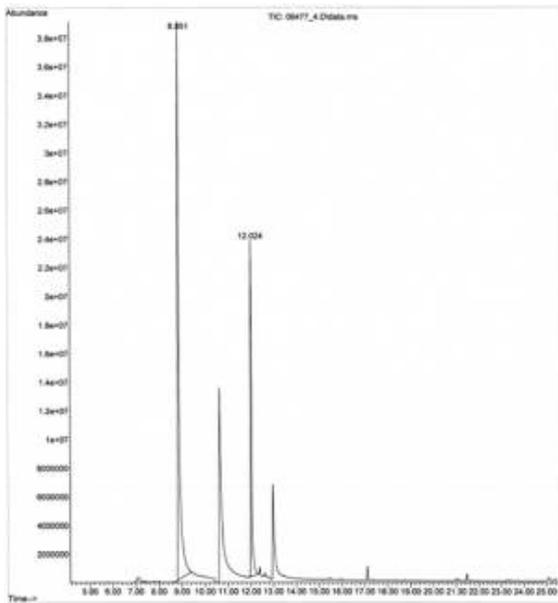
피크 면적으로 나눈 값으로 %로 계산.

(1) 감국 추출무과 감국 발효물의 GC 분석

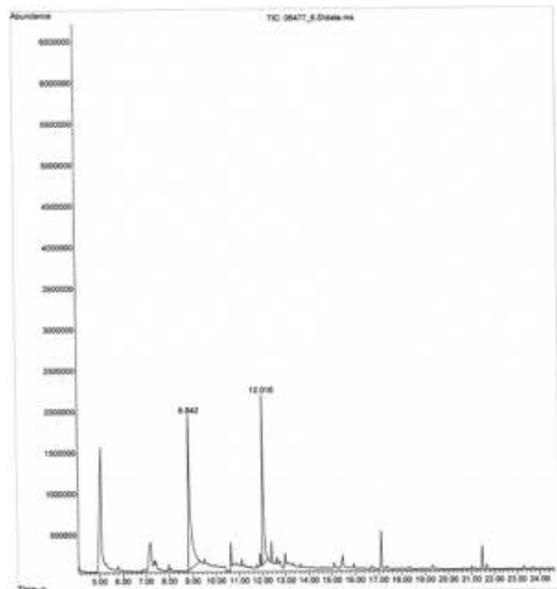
- GC 분석을 통해서 감국 추출물과 4종의 감국 발효물에 대한 물질의 차이를 정성적으로 비교. 여러 물질 중에서 3115, 3237, 3109의 물질에서 특정 물질의 증가를 확인.
- RT 8.8, 12.0에 shift 되는 물질로서 area는 0.68% 인데 반해 3109 발효물은 24.82%로 증가했으며, 3115 발효물은 29.93% 증가, 그리고 3237로 발효물은 15.41% 증가했으나, 3074 발효물은 0.73%로 변화는 거의 없었음. 또한 8.8에 shift 되는 물질도 동일하게 증가된 것을 확인.



CI(감국 추출물)

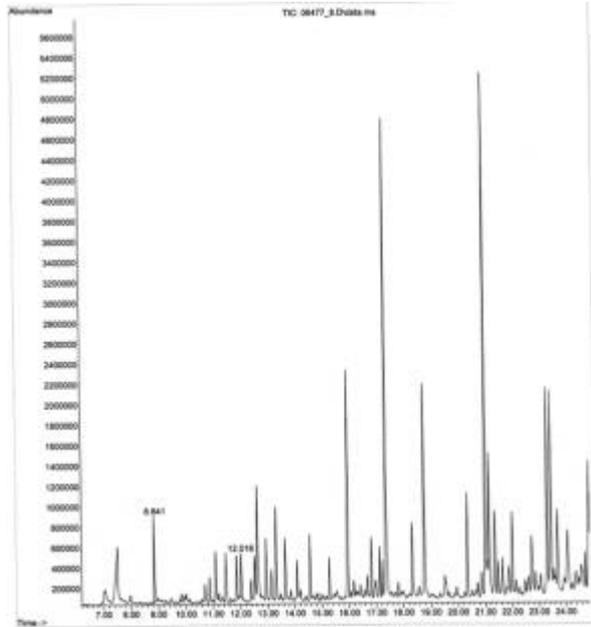


3115

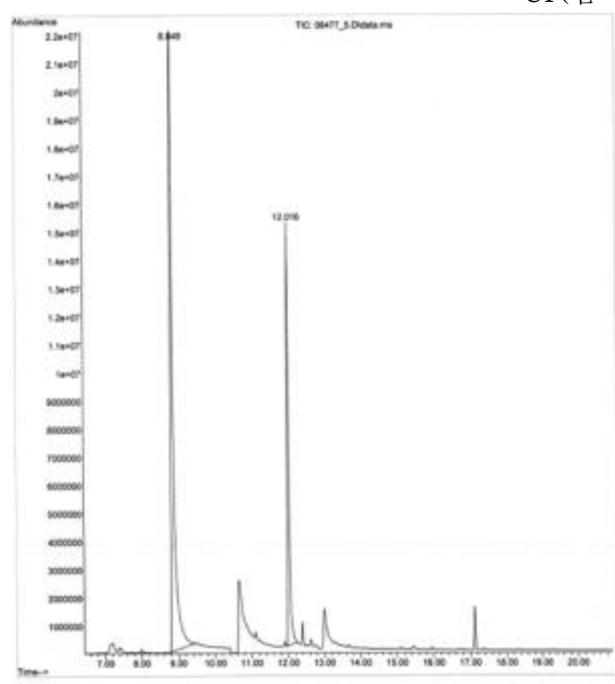


3237

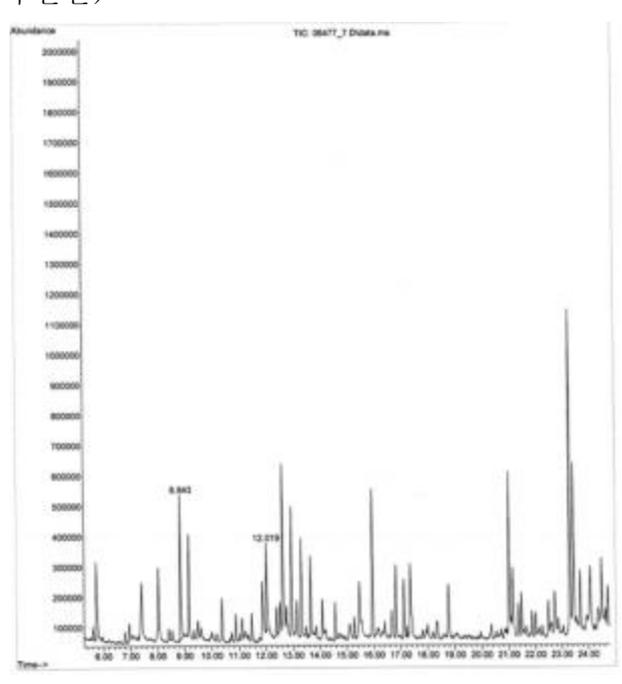
<그림41> 감국 추출물과 감국 발효물(3115, 3237)의 정성 분석



CI(감국 추출물)



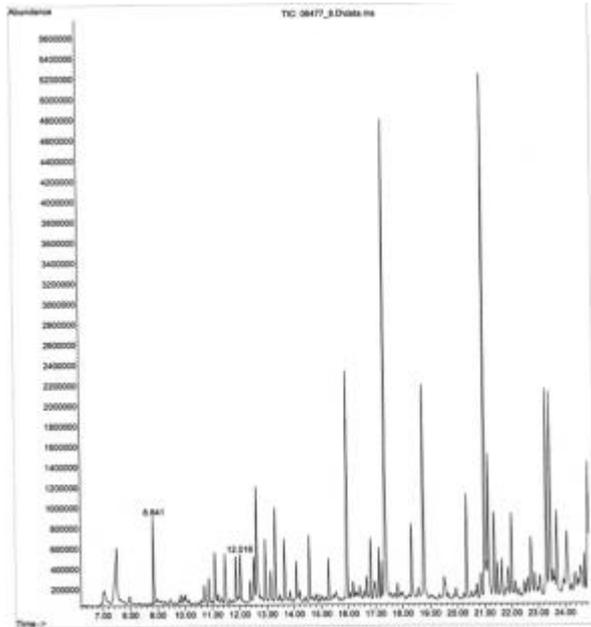
3109



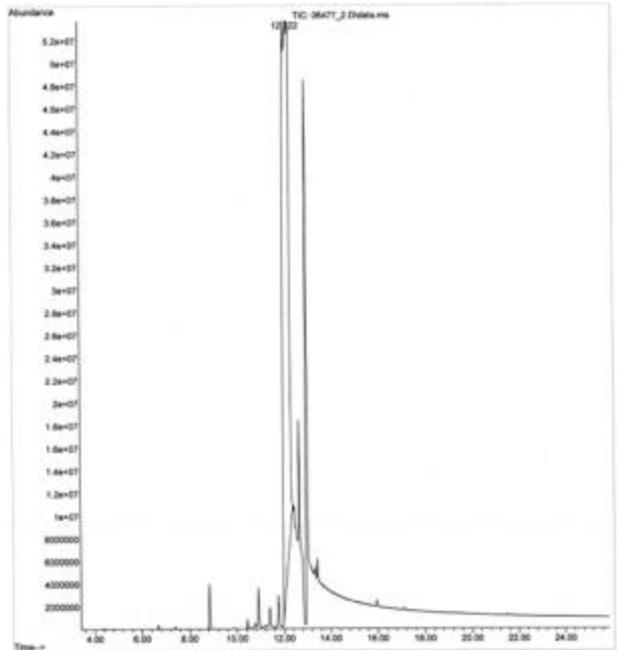
3074

<그림42> 감국 추출물과 감국 발효물(3109, 3074)의 정성 분석

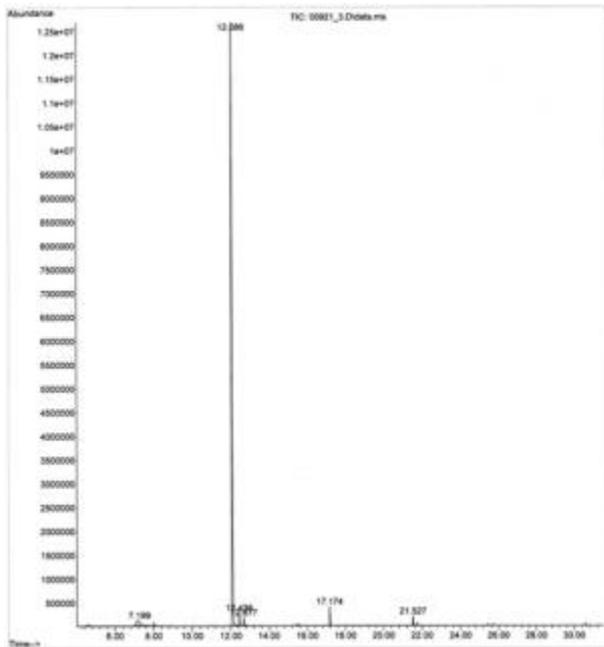
(2) 물질의 GC-MS 분석



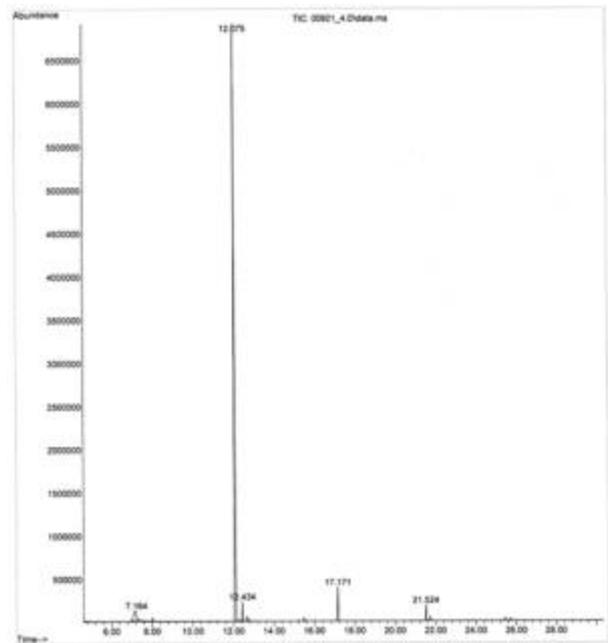
CI(감국 추출물)



Camphor



3115+Camphor

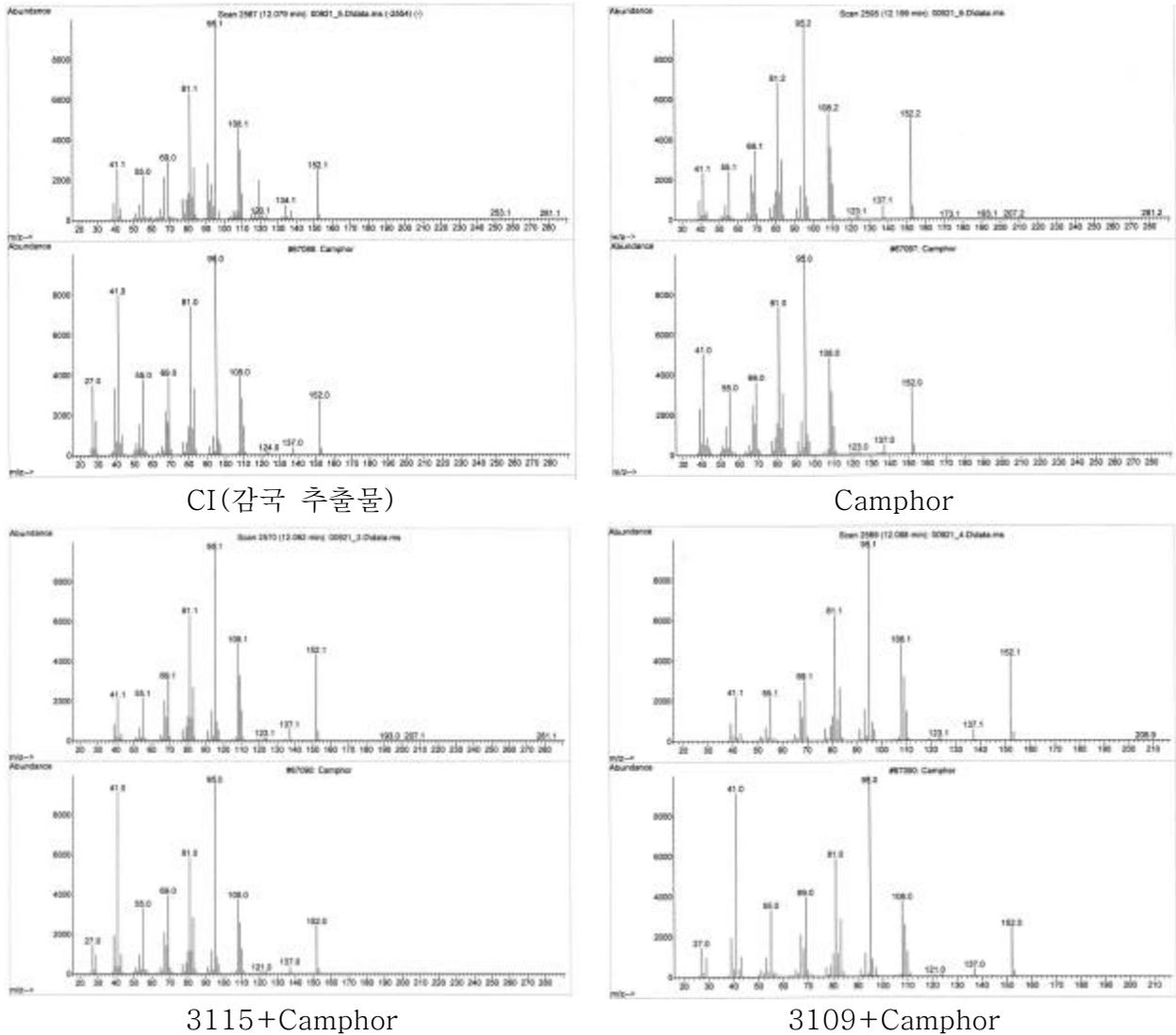


3109+Camphor

<그림43> Camphor와 3109, 3115 GC

- 12.0에 shift 되는 물질은 camphor로서 monoterpene류의 휘발성 정유 성분으로 구조식은 $C_{10}H_{16}O$, 분자량은 152.2. Camphor는 소량으로 예전부터 살균작용, 피임약, 수유억제제등에 이용되어 왔으며, 비만관련 연구로는 lipogenesis 신호의 표적 유전자인 $C/EBP\alpha$, $PPAR\gamma$ 의 발현을 감소시켜 복부지방을 감소시키는 것으로 알려져 있음.
- Camphor의 함량의 증가와 분자의 구조를 확인하기 위해 함량이 높게 측정된 3115,

3109에 camphor를 발효시켰으나, 분자의 구조식은 바뀌지 않았음.



<그림44> Camphor와 3109, 3115 MS 분석

- MS에서 molecular weight 차이를 보이지 않았고, camphor의 구조는 변화되지 않는 것임을 확인.
- PCR과 western blot에서 3115 감국 발효물이 hedgehog 신호인 SMO, GLI2를 활성화시켜 지방구세포의 분화를 억제시켰으면, 따라서 camphor의 증가가 이러한 영향을 준 것으로 사료되어 camphor에 대한 hedgehog 신호 연구를 진행.

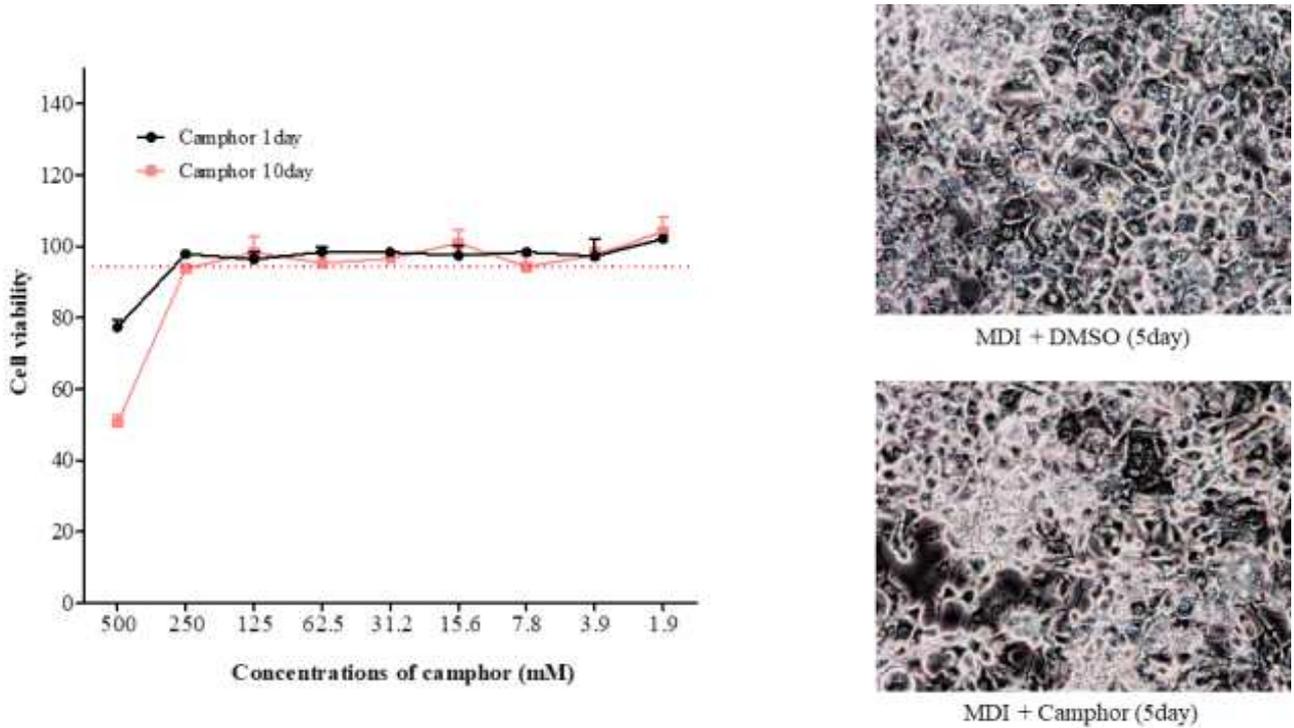
2) Camphor에 대한 hedgehog 신호 확인

(1) Camphor의 세포독성 확인

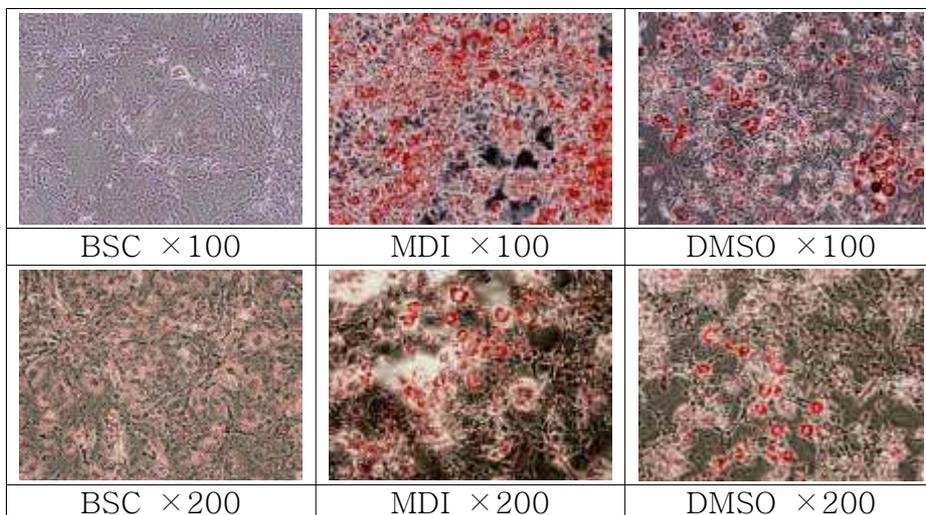
- 3T3-L1 세포주를 32 well plate에 3.5×10^5 세포수로 10% BCS, 1% penicillin

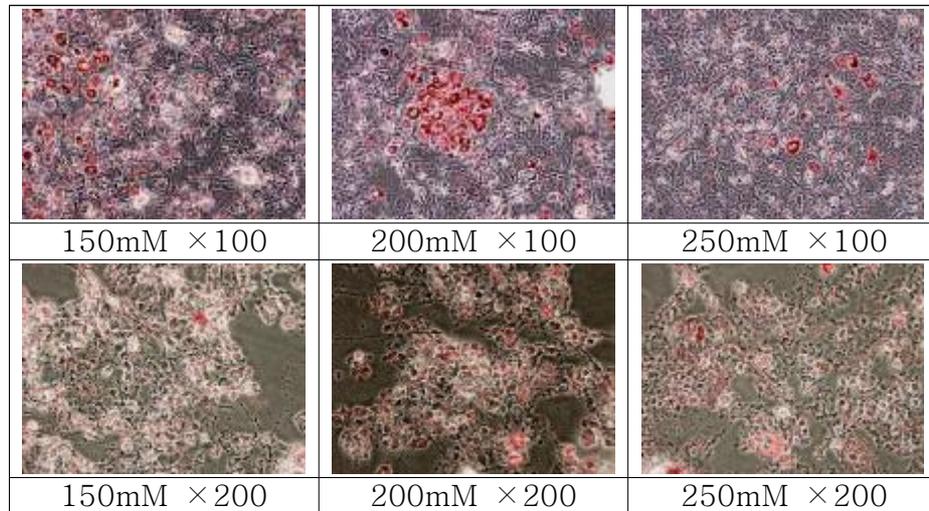
streptomycin가 함유된 DMEM배지에 배양 후 95% 세포배양이 완료된 후 10 μ g/mL insulin, 0.1 mM DEX, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin가 포함된 10% FBS 분화 배지로 교환하여 2일간 배양. 2일마다 10 μ g/mL insulin이 포함된 10% FBS배지로 교환하며 camphor을 150, 200 및 250 mM로 처리.

- 10일간 배양을 유지하며 Oil Red O 염색 후 3T3-L1세포주를 관찰하고 isopropanol 로 용출시켜 SpectraMax i3에서 흡광도 510 nm로 확인한 뒤 실험을 종료.



<그림45> Camphor의 3T3-L1 세포주에서의 독성



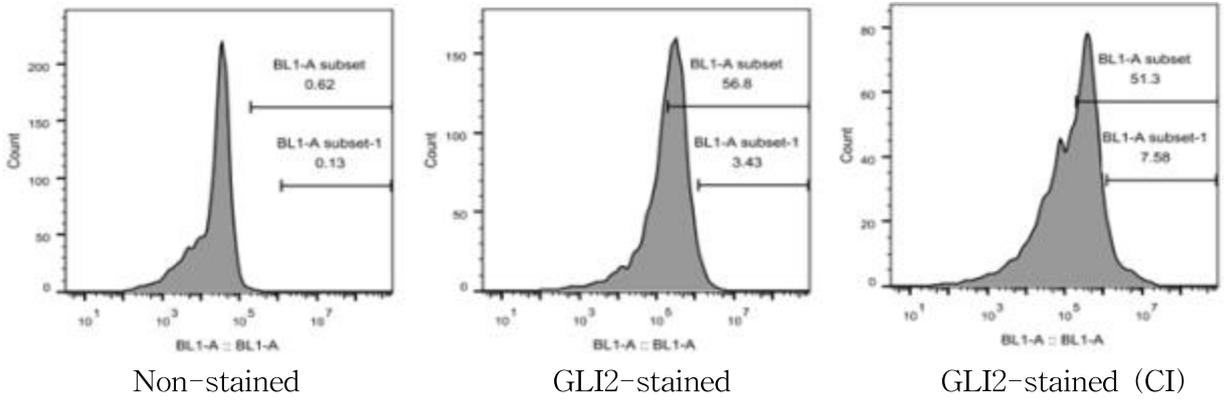


<그림46> Camphor 농도별 ORO 염색(3T3-L1)

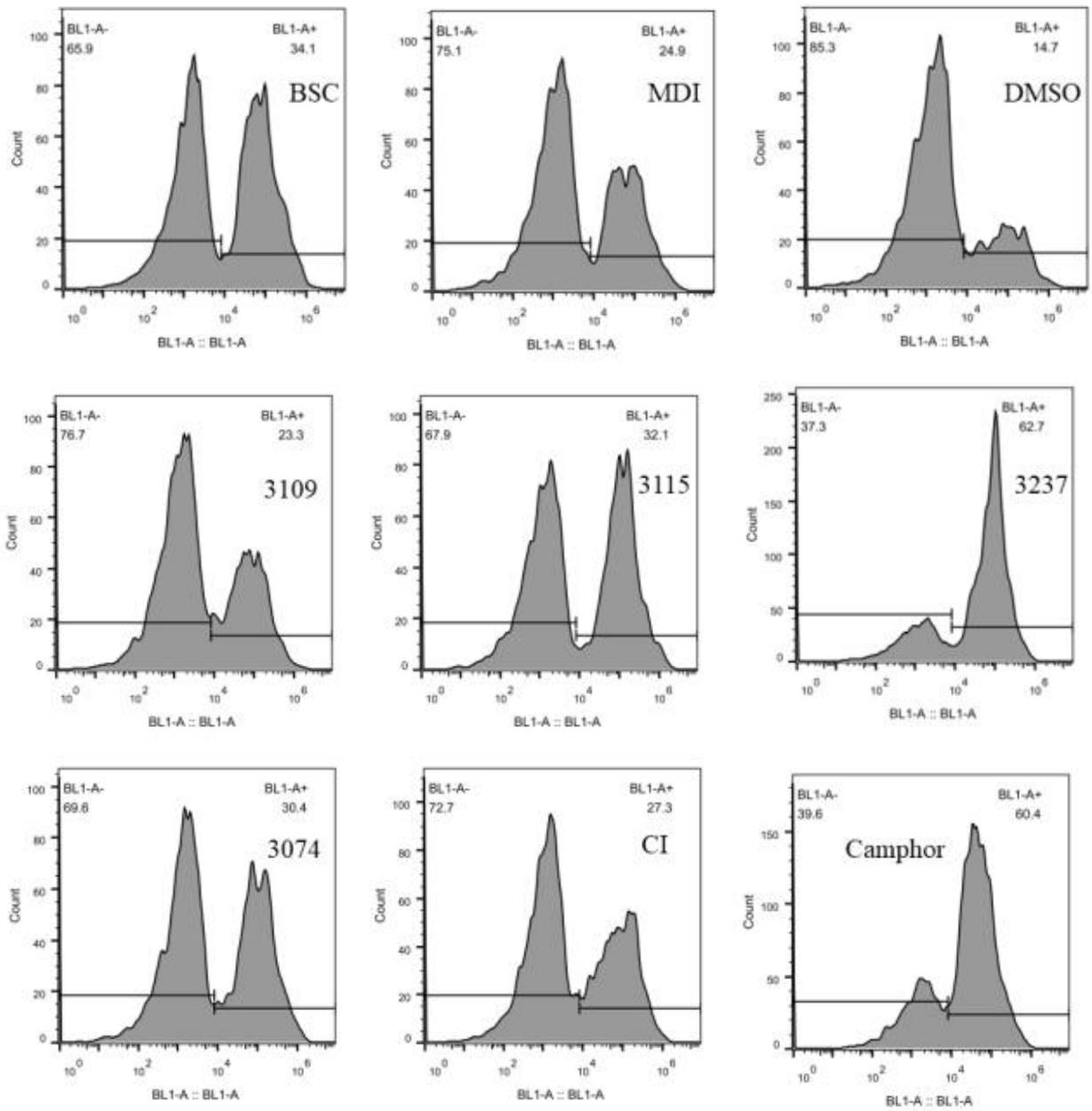
- Camphor의 3T3-L1 세포주에 대한 세포독성은 고농도인 500 mM에서도 보이지 않았음. 또한, 3T3-L1세포주의 분화는 7일 이상 소요되기 때문에 10일까지의 세포독성을 확인한 결과 250 mM 이하의 농도에서 세포독성이 없었음. 분화 5일차 세포모양도 dimethyl sulfoxide (DMSO) 처리된 대조군 대비 세포독성이 없었음.
- 그리고 지방구세포 분화를 ORO염색을 통해 그 모양을 비교했음. 농도별 MDI와 비교해 보았을 때, 100, 200, 250 mM에서 분화억제가 확인.

(2) Camphor와 감국 발효물의 GLI의 비교

- 분화된 3T3-L1 세포주의 GLI 단백질 발현을 분석하기 위해 1.5×10^5 세포수로 준비 후 camphor를 250 mM, 감국 추출물 및 감국 발효물을 1,000 ppm으로 처리. 4일 분화유도 후 pH 7.4 DPBS로 1회 세척 후 DPBS, 0.5% BSA, 0.1% sodium azide로 만든 fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer 500 μ L에 0.1% (v/v) 농도로 Triton X-100을 조제하여 15분간 permeabilization 시킴.
- FACS buffer로 1회 세척 후 GLI1, 2- fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody 로 1시간 염색. FACS buffer로 1회 세척 후 Attune ® FACS machine을 이용하여 490 nm excitation, 520/20 nm emission 파장에서 분석.
- GLI2-FITC를 이용한 시험에서 단백질 발현 수준 FITC 신호가 separation 되지 않는 문제를 발생하여 GLI1 단백질 분석을 추가함.
- 일반적인 3T3-L1세포주의 GLI1 단백질 발현은 $34.1 \pm 5.2\%$ 인 반면 분화된 세포(MDI)는 $24.9 \pm 3.1\%$, 3109는 $23.3 \pm 1.9\%$ 로 단백질 발현이 감소되었고, 3115는 $32.1 \pm 2.8\%$, 3074는 $30.4 \pm 4.2\%$ 로 정상수치만큼 단백질 발현을 보였음. 반면, 3237은 $62.7 \pm 1.5\%$, camphor는 $60.4 \pm 2.2\%$ 로 GLI1의 발현이 높아지는 것을 확인.



<그림47> GLI2 단백질 발현 수준 확인

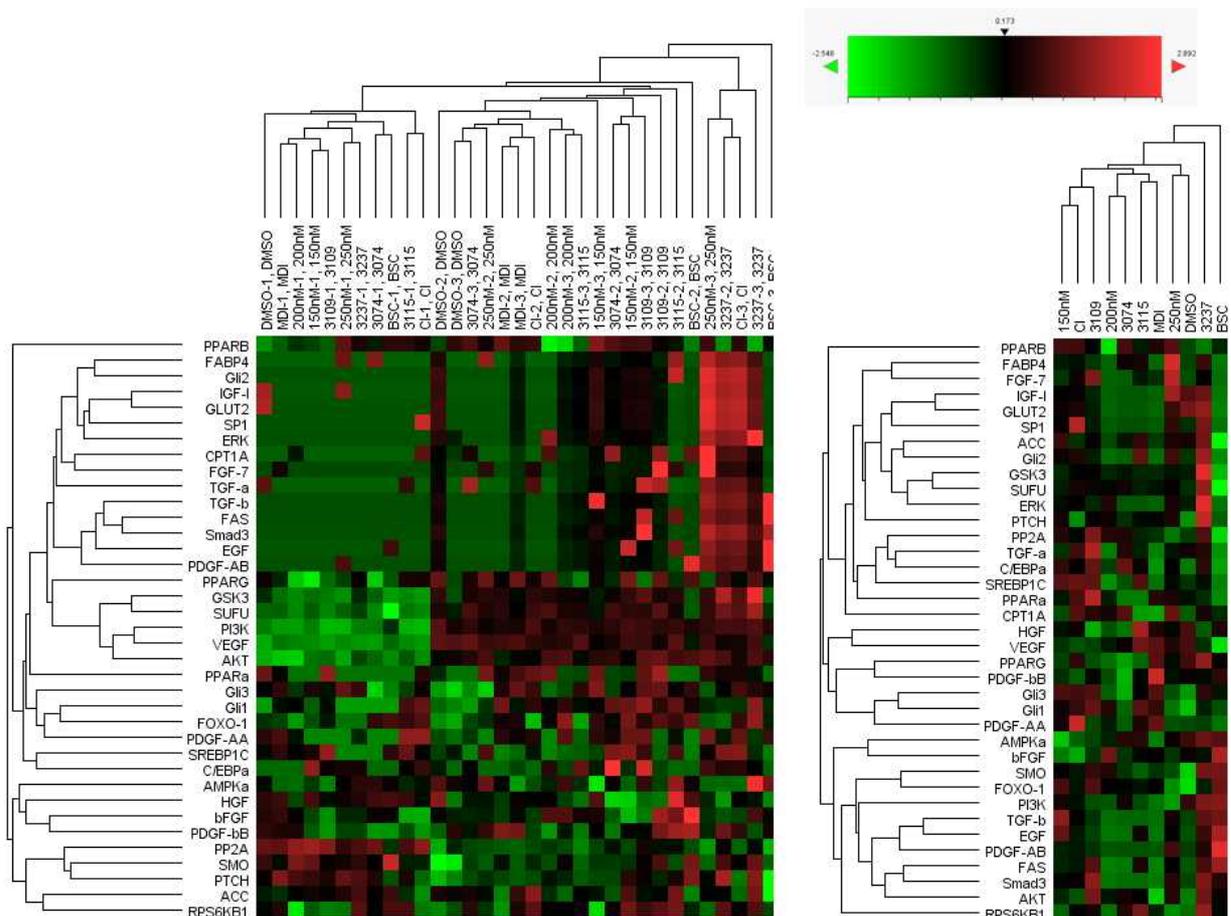


<그림48> GLI1 단백질 발현 수준 확인

(3) nCounter analysis system

① nCounter analysis 분석결과

- 3T3-L1 세포를 분화유도하여 mRNA를 추출 후 target input 양 100 mg을 사용하여 hybridization을 진행하여 분석된 결과는 *Gli3*, *Pdgf-bB*, *Gli1*, *Pdgf-AA*, *Ppar α* 의 타겟이 fold change 1.5 배 이상 분화유도군에서 증가하였으며, *Pdgf-AB*, *Egf*, *Fas*의 타겟이 fold change -1.5 배 이상 분화유도군에서 감소하였음.
- 반면, 감국 발효물을 처리 시 *Gli3*의 타겟이 fold change -1.1~-3.1 배 이상 분화유도군보다 감소하였고, hedgehog pathway의 억제 역할을 하는 *Gli3*의 감소한 것을 확인.
- 감국, 3237 발효물 및 camphor 250 mM 처리군에서 *Gli2*의 발현이 1.5배 이상 증가하였음.



<그림49> nCounter analysis 분석 결과

(4) siRNA 분석과 유전자 발현 분석

① siRNA 분석

- 3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 3.5×10^5 세포수로 24시간 배양한 뒤

serum free DMEM 에 Lipofectamine 2000 reagent 20 μ L 와 15 pmol *Shh* siRNA, 15 pmol *Ptch* siRNA 또는 15 pmol *Smo* siRNA 6 μ L 를 혼합하여 transfection. 대조구는 control siRNA를 사용. 12시간 후 10% FBS 가 포함된 DMEM 배지로 교환한 뒤 48시간 동안 추가 분화 유도.

- *Shh*-siRNA를 이용한 실험에서 *Shh*을 억제시 지방구세포 분화 억제효과가 뚜렷하게 나타나지 않음.
- *Ptch* siRNA 단독 처리 시 *Ptch*가 억제되어 분화가 억제되었고, *Smo* siRNA 단독 처리에서도 *Smo*가 억제되어 분화가 유도됨. camphor 처리에서도 *Ptch* siRNA를 처리한 것과 동일하게 분화가 억제되었으며, 분화 4일차 camphor를 제거하고 *Smo* siRNA를 이용하여 *Smo*를 억제 시 분화가 유도됨.

② SMO와 PTCH inhibitor

- Western blot에서도 *Ptch* siRNA 처리 시 SMO와 GLI1이 강하게 C/EBP α 은 약하게 발현이 되었지만 *Smo* siRNA 처리 시 SMO와 GLI1이 약하게 C/EBP α 은 강하게 발현이 시키며 siRNA의 결과와 동일하게 발현
- PTCH 억제는 SMO를 활성화시키는 기전으로 hedgehog 신호를 활성화 시킴. *Ptch* siRNA와 *Smo* siRNA를 통해 *Smo*를 조절하면 분화기전에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었으며, camphor도 동일한 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있음.

③ Quantitative RT-PCR

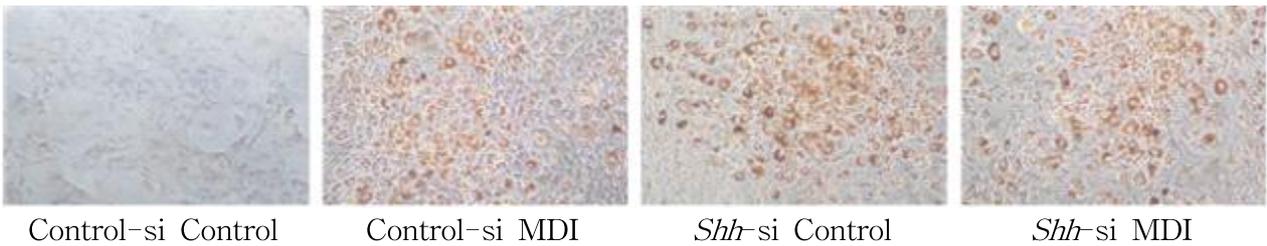
- 3T3-L1 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 4.5×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 camphor를 250 mM로 처리. 세포를 수집하여 3T3-L1 세포주로부터 Easy-Blue reagent을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 M-MLV RTase 와 Random primer 를 이용하여 cDNA를 합성하고 SYBR Green Real time polymerase chain reaction (PCR) Master Mix와 LightCycler system을 사용하여 qPCR을 수행하였다. 모든 유전자 발현 정도는 *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*의 발현값으로 보정
- mRNA에서 camphor 처리시 *Ppar γ* , *C/ebp α* , *Fas*, *Adiponectin*,은 감소하였으며, *Gli1*, *Smo*는 증가 되었음. 이는 camphor가 hedgehog 신호인 *Gli1*과 *Smo*에 영향을 주어 지방구세포의 분화를 억제하는 것을 확인.

④ Western blot

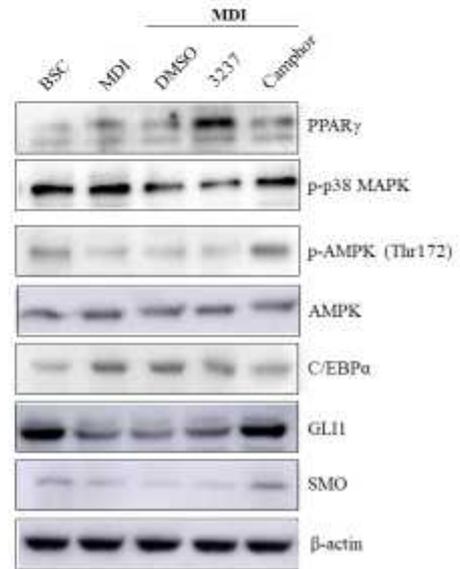
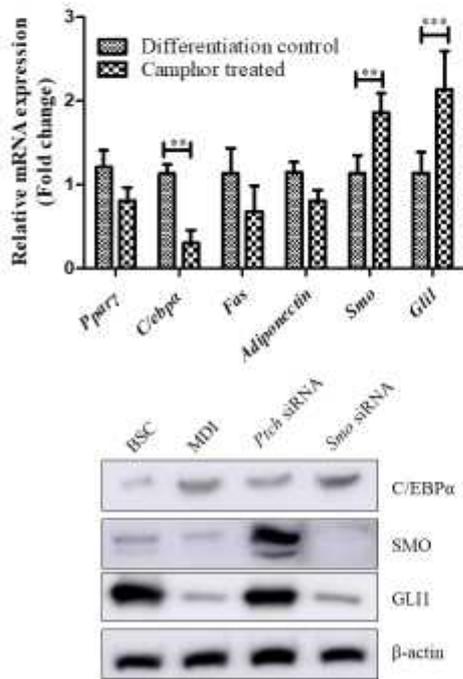
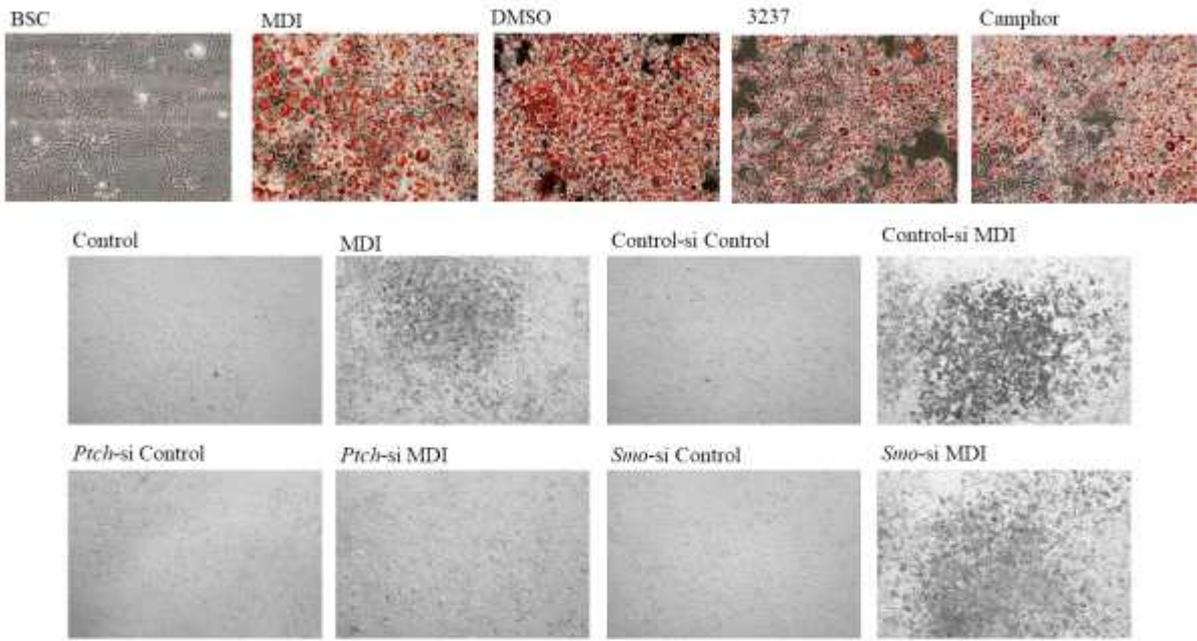
- FACS기기 분석시 camphor와 동일하게 측정된 3237과 비교 분석함. hedgehog, lipogenesis 신호와 연관된 단백질의 발현 수준이 동일한 패턴으로 나타남.

<표 12> Primers sequences

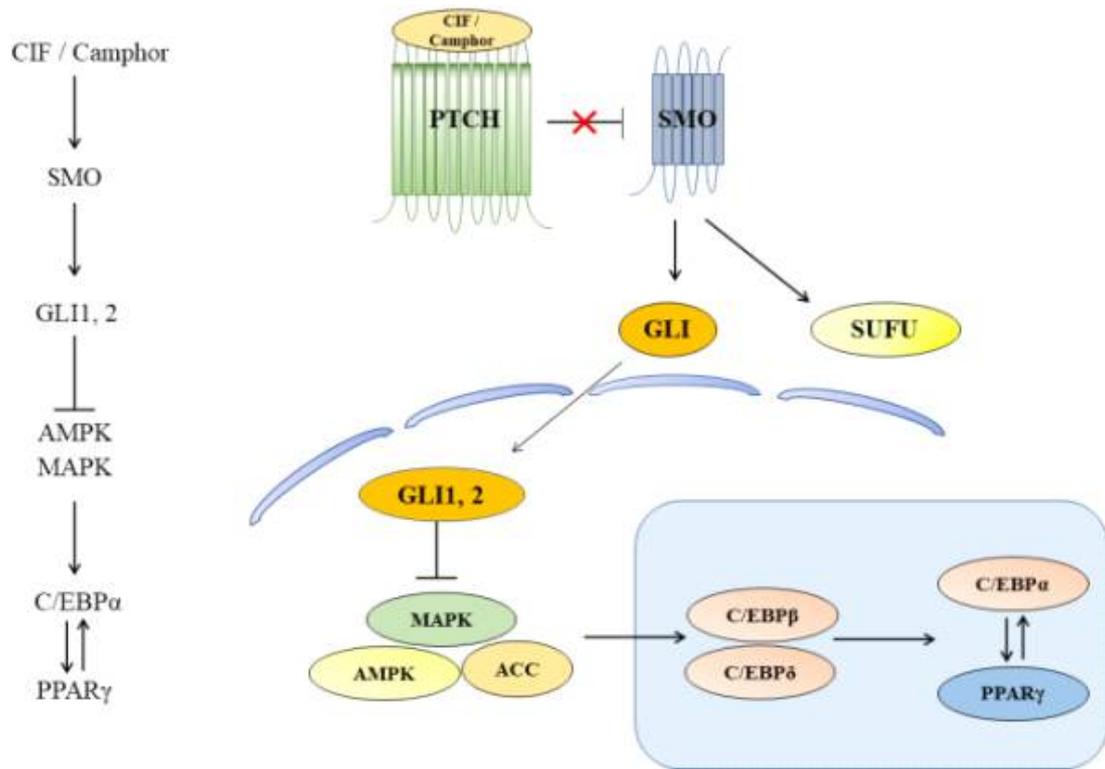
Target gene	Primer	Sequence
<i>Ppar γ</i>	Forward	5' -GGAAGACCACTCGCATTCCTT-3'
	Reverse	5' -GTAATCAGCAACCATTGGGTC-3'
<i>C/ebp α</i>	Forward	5' -GCAGCCACTTGAGTTCTCAGG-3'
	Reverse	5' -GATGTAGGCGGAGAGGTCGAT-3'
<i>Gapdh</i>	Forward	5' -AGCTTCGGCACATATTTTCATCTG-3'
	Reverse	5' -CGTTCACTCCCATGACAAACA-3'
<i>Adiponectin</i>	Forward	5' -GAAGCCGCTTATGTGTATCGC-3'
	Reverse	5' -GAATGGGTACATTGGGAACAGT-3'
<i>Smo</i>	Forward	5' -CAGCAAGATCAACGAGACCA-3'
	Reverse	5' -GCTGAAGGTGATGAGCACAA-3'
<i>Gli1</i>	Forward	5' -ACTGGGGTGAGTTCCTTCT-3'
	Reverse	5' -TGGCAGGGCTCTGACTAACT-3'



<그림 50> *Shh*-siRNA 지방구세포 분화억제 확인

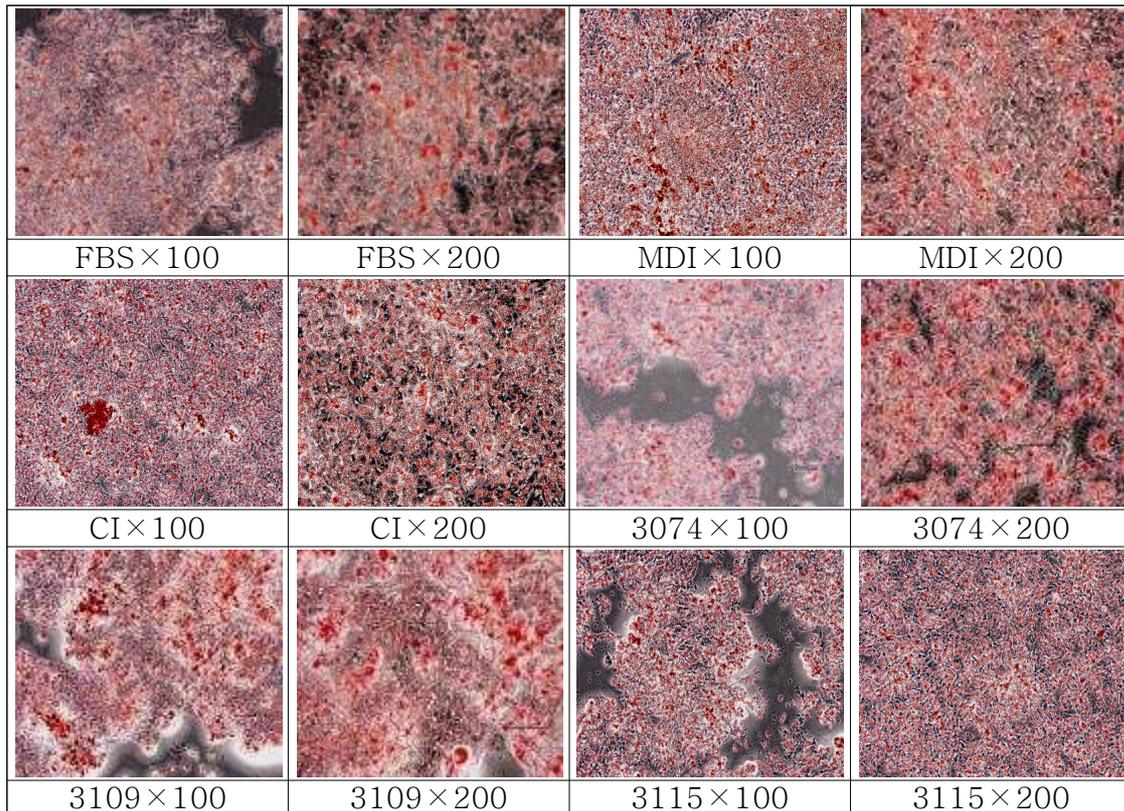


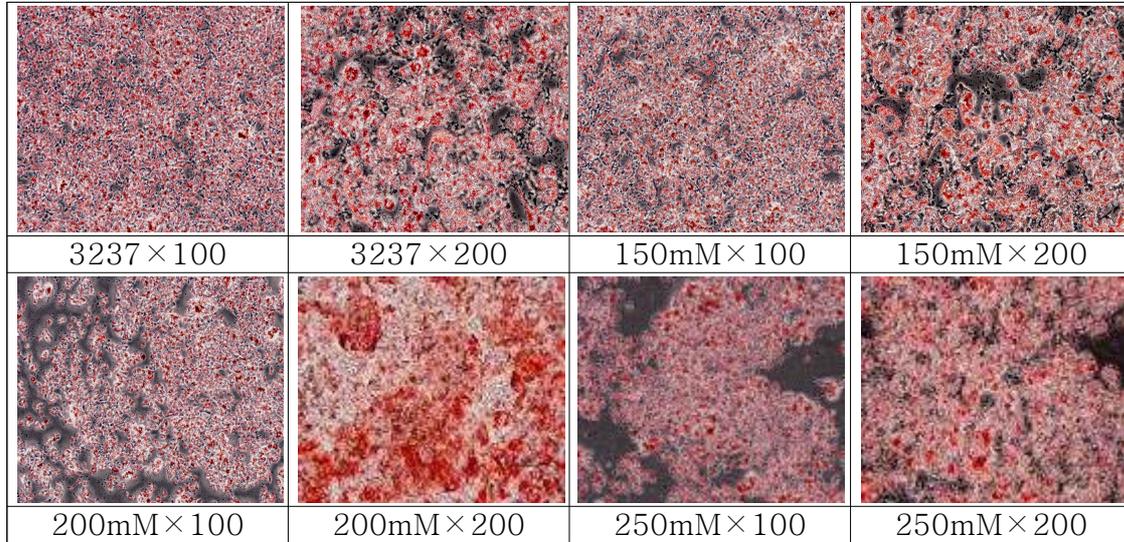
<그림51> Camphor, 3237의 SMO, GLI1의 연관성



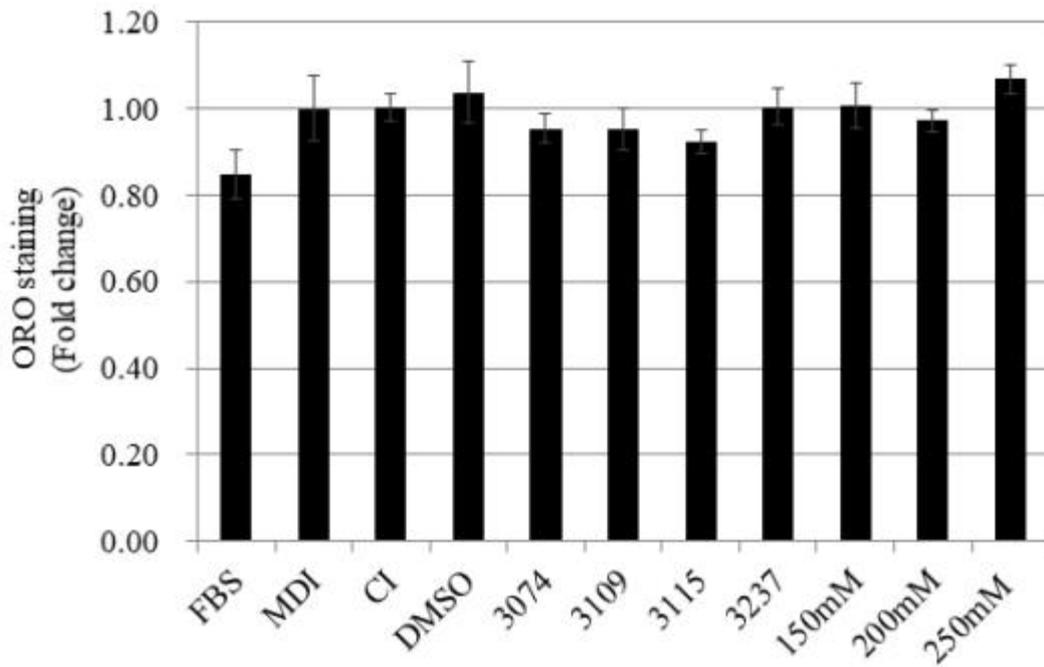
<그림52> 감국 발효물과 camphor의 hedgehog 신호 메커니즘

2-6. HepG2 세포주에서의 분화억제 확인





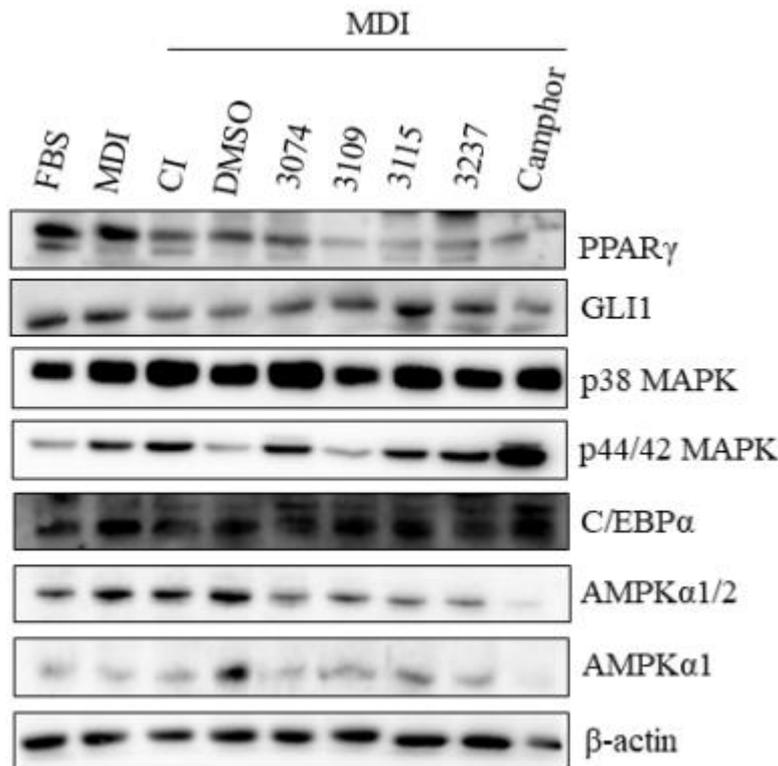
<그림53> ORO 염색을 통해 HepG2 세포주의 지방구 변화 확인



<그림54> ORO 염색된 세포와 수치

- ORO염색으로 HepG2 세포주를 관찰하였음. 감국 추출물과 4종의 감국 발효물에서 세포주의 형태를 살펴보았음. 감국 추출물을 비롯한 4종의 감국 발효물과 camphor 150, 200, 250mM에서 동일한 염색을 보이고 있었음.
- 3115, 3109, 3074 발효물만이 MDI 대비 낮은 수준의 ORO staining을 보여주었으며, 3T3-L1 세포주에서 영향을 주었던 camphor는 농도 대비 크게 영향을 주기 못하는

것으로 나타났음.



<그림55> Hedgehog와 lipogenesis 신호 확인

- 3T3-L1 세포주와 마찬가지로 camphor농도는 250mM으로 설정하여 hedgehog, lipogenesis 신호의 단백질 발현 수준을 확인하였음. HepG2 세포주에서 hedgehog 신호에서는 GLI1에서 MDI 대비 3115, 3237만이 단백질 수준이 높게 나왔으며, 감국 추출물은 그에 미치지 못했음.
- Lipogenesis 신호에서는 PPAR γ 에서 MDI 대비 4종의 감국 추출물과 camphor가 단백질 수준이 낮게 나왔으며, AMPK 신호는 MDI대비 단백질 수준이 높게 나타났음.
- HepG2 세포주에서도 3T3-L1 세포주에서 마찬가지로 hedgehog 신호의 종류인 GLI1에서 3115, 3237 감국 발효물만이 그 효과를 보였으며, 그에 반해 camphor는 효과가 미비하였으나 감국 추출물만큼의 효과를 나타냈음.

2-7. 상업용 유산균 검증

1) 상업용 유산균을 위한 배지 검증

- ① 증류수 1,000 mL당 glucose 10 g, soy peptone 20 g, yeast extract 5g을 첨가한 뒤 감국 추출물 5.585 mL (건조중량 0.8953 g/mL)를 첨가하여 만들었음. 만들어진 배지는 121 $^{\circ}$ C, 15분 간 살균과정을 거쳐 멸균상태로 만들어 사용. 접종은 1,000 mL당

5 g의 비율로 접종하였으며 30℃에서 48시간 배양하여 사용.

- ② 실험 결과 배양 전 흡광도가 0.112, 배양 후 흡광도가 1.522로 충분한 증가를 보였음. 따라서 MRS배지와 포도당 배지에서의 유산균의 증식에는 차이가 없음을 알 수 있었으며, 사용화에서 포도당 배지를 사용하기로 함.

<표 13> 상업용 배지 균주 배양값

	배양 전	배양 후
600nm	0.112	1.522



2) 상업용 유산균 및 추출조건에 따른 분화억제 및 독성시험 분석결과

(1) 상업용 유산균의 세포독성

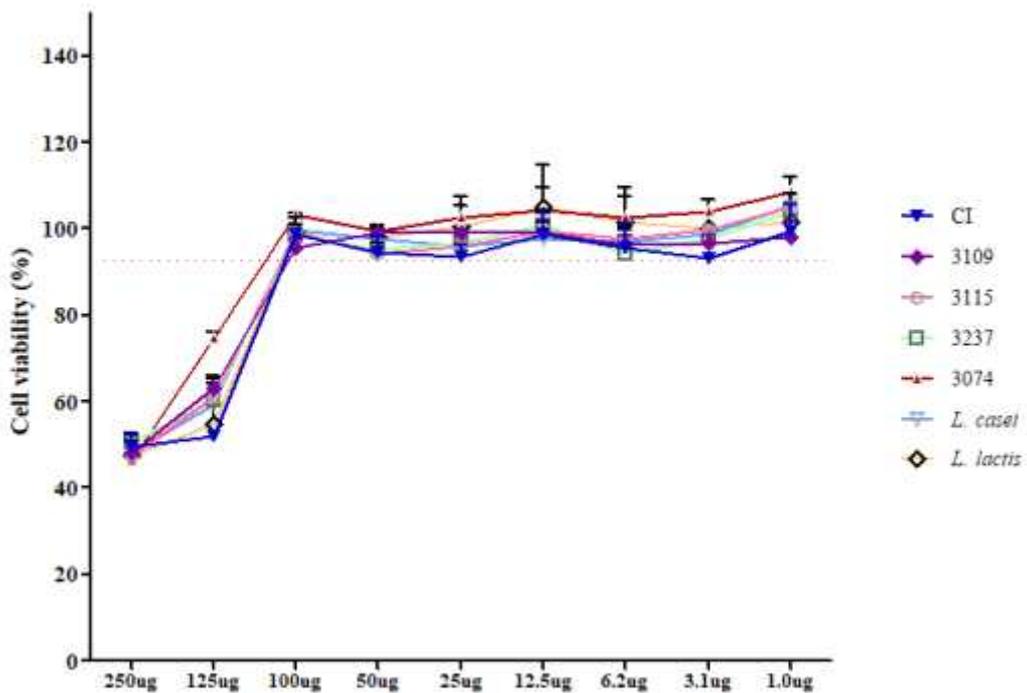
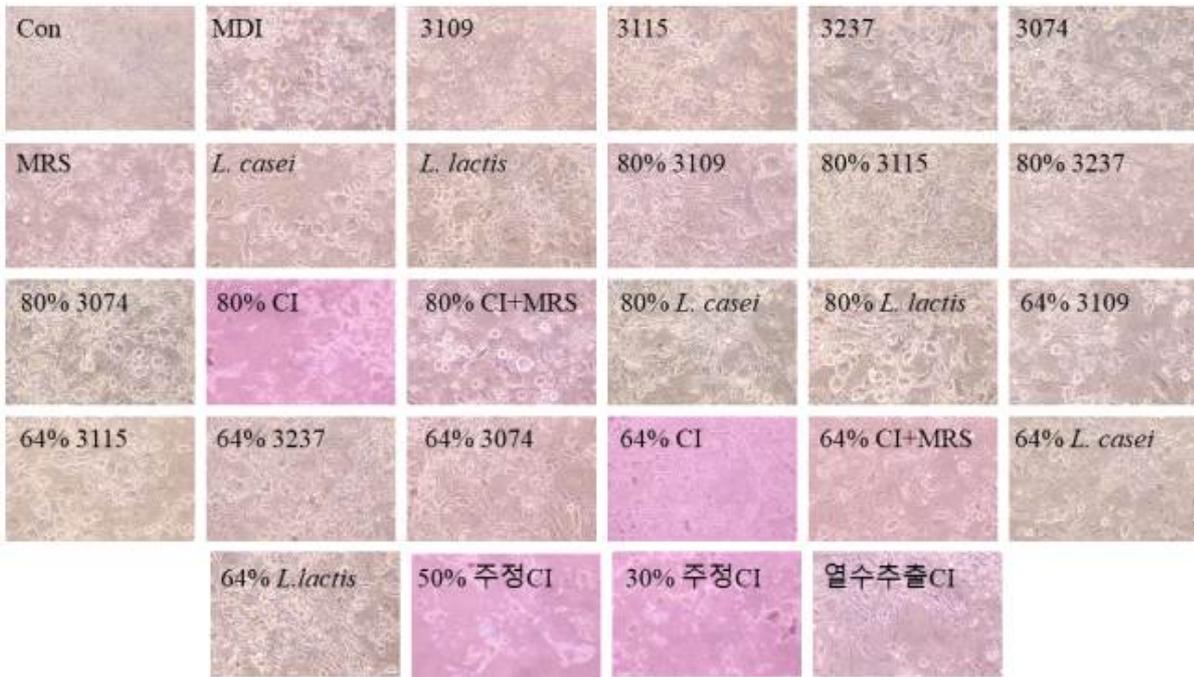
- ① 3T3-L1 세포주를 16일간 분화유도 후 세포독성을 확인한 결과 열수추출을 제외한 모든 감국은 16일 동안 분화 유도 시 세포독성을 보임. 그러나 MRS 배지를 포함 시 세포독성이 현저하게 줄어드는 것을 확인. 이는 감국 추출물 내 MRS 배지의 함량에 따른 감국 추출물의 함유량이 감소하여 나타나는 현상으로 판단됨(감국의 함유량이 높지 않게 조절할 필요성 있음, 동물실험을 통한 간독성 확인이 필요함).
- ② 3T3-L1 세포주를 10일 이하의 분화유도 후 세포독성은 관찰되지 않음. 기존 데이터를 통한 세포독성 실험 완료.

(2) 유산균 발효물의 세포독성

- ① 3T3-L1 세포주를 10일간 추출농도 상업용 유산균 관련 감국추출물 및 발효물 6종을 이용하여 분화를 살펴보았음.
- ② HDF 세포주의 세포독성을 확인한 결과 100 μ g 의 농도 미만에서 세포독성을 5% 미만의 세포독성을 확인.
- ③ 실험오차를 고려했을 때 HDF 세포주에 세포독성이 100 μ g 의 농도 미만에서 세포독성이 없는 것으로 사료됨.

(3) 상업용 유산균 균주 선정과 주정 추출농도 선정

- 본 실험의 결과로 3115와 상업용 균주인 *Lactococcus lactis*와 차이가 거의 없었으며, 80% 에탄올, 64% 에탄올, 64% 주정, 50% 주정 감국 추출시에도 차이가 거의 없어 50% 주정 감국 추출물을 사용화를 위한 동물실험에 사용하기로 함.



<그림56> 상업용 유산균 및 추출조건에 따른 3T3-L1 세포주 분화억제 및 HDF 세포주 독성시험 분석결과

2-8. 상용화를 위한 동물실험

1) 실험의 개요

(1) 실험 목적

- 본 시험은 C57BL/6 mice를 대상으로 고지방식이를 8주간 급이하고 이와 동시에 시험 물질을 8주간 경구 투여하여 경시적 체중 변화와 사료 섭취량, body fat mass를 확인하고 부검 후 간과 부고환 지방의 중량 및 혈청화학적 검사를 통해 시험물질의 항비만 효과를 확인하고자 함.
- 모든 실험은 non-GLP 내에서 실시하였으며, 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제4379호, 일부 개정 2019년 8월 27일 법률 제16544호)에 근거한 (주)케이피씨의 동물실험윤리위원회에 의해 승인 후 시험을 진행(승인번호: P202006).

2) 실험물질 제조

(1) 상업화를 감국 추출물 및 감국 발효물 제조

- 상용화를 위해 MRS배지에서 식용배지인 포도당배지로 교체했으며, 공시균주인 KCTC 3115에서 상업화를 할 수 있는 *Lactococcus lactis*를 구매해 감국 발효물(CILL)을 제작함.
- ① 감국 추출물 제조 시 사용되는 80% 에탄올 대신 50% 식용알코올(주정)로 진행함.
- 시설과 주정 구매의 절차로 인해 구매가 가능하고 대량의 추출이 가능한 곳에 외부의뢰를 진행해 감국 추출물(CI)을 제조



<그림57> 50% 식용알코올 감국 추출물

② 대조물질로 *Garcinia cambogia* (GC)를 구매하여 사용하였으며, 실험의 적절성을 위해 감국 추출물(CI), 감국 발효물(CILL), *Garcinia cambogia* (GC)에 포도당 배지를 희석시킨 후 동결건조 실시.

(2) 실험물질과 대조물질의 조제 및 분석

- 실험물질과 대조물질을 free form으로 계산하여 칭량하고, 칭량한 물질에 부형제를 넣은 후 vortexing을 1분간 진행하고, sonication을 20분씩 실시하여 clear 상태가 된 후 투여.

3) 실험방법

(1) 사료 및 음수

- C57BL/6 mice 수컷 37마리, 7주령하여 60% HFD(고지방식이)사료를 자유섭취 시켰으며, 음수는 상수도수를 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하였고, 폴리카보네이트 재질의 음수병(250 mL)을 이용하여 자유섭취 시킴.

(2) 투여

- 약물 투여는 군 분리한 후 다음날부터 실시하였고 투여 시간은 매일 오전 11시에 실시하였으며, 투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 개체 별 투여액량은 매주 1회의 측정 체중을 기준으로 산출. 매일 오전에 경구 투여용 존데를 부착한 일회용 주사기(1 mL)을 이용하여 8 주간 1일 1회 위 내로 강제 투여.

(3) 군 구성

<표 14> 군 구성

Group	High fat diet	Test article	Dose frequency	Dose (mg/kg)		Vol. (ml/kg)	Head
				0 ~ 8W			
G1	X	Vehicle	QD	-		10	5
G2	O	Vehicle	QD	-		10	8
G3	O	대조물질 (GC)	QD	400 mg/kg		10	8
G4	O	실험물질 1 (CI)	QD	300 mg/kg		10	8
G5	O	실험물질 (CILL)	QD	300 mg/kg		10	8

4) 관찰 및 검사

(1) 검사일정

<표 15> 검사 일정

관찰항목	순화 기간	투여 기간 (8 weeks)								투여 종료
	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	
경구 투여 적응	●									
군 분리	●									
HFD 투여		●	●	●	●	●	●	●	●	
체중 측정	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
사료섭취량 측정		●	●	●	●	●	●	●	●	
Body fat mass									●	
부검										●
혈청화학 검사										●
T 세포 검사										●

(2) 임상증상 관찰 및 체중, 사료섭취량 측정

① 임상증상 관찰

- 모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망 동물의 유무를 확인하였고, 관찰은 투여 개시일부터 투여 종료 시까지 실시.

② 체중 측정과 사료 섭취량 측정

- 군 분리를 위해 시험물질 투여 개시 전일에 체중을 측정하였고, 투여 개시 후 주 1회 체중을 측정하여 이를 기준으로 시험물질 투여액을 결정하였다. 시험물질 투여가 최종 종료되었을 때 16시간 절식 후 체중을 측정한 다음 부검을 실시.
- 군 분리 후 주 1회 cage별 사료 섭취량을 측정하였고, 체중 측정 전일에 사료 급여량을 측정한 후 체중 측정 당일 잔량을 측정하여 사료 섭취량을 계산.

(3) Body fat mass와 혈청학적 검사

- ① 투여 종료일에 body fat mass를 측정하였으며, 측정 시에는 동물을 isoflurane으로 흡입 마취한 후 dual energy X-ray absorptiometry를 이용하여 fat mass와 lean mass를 측정.
- ② 투여를 종료하고 16시간 절식 후 다음날 부검을 실시하였다. 부검 시 동물을 isoflurane으로 흡입 마취한 후 복대정맥을 통해 전 채혈을 실시. 복대정맥에서 채취한 혈액은 0.6 mL SST™ tube에 담고 혈액을 완전히 굳힌 다음 4 °C에서 5,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 1.5 mL tube에 담아 -70°C 이하의 deep freezer에 보관. 보관된 혈청을 이용하여 혈청 생화학 분석기로 다음 항목들을 측정.

<표 16> 혈청검사 항목

구별	항목	단위
간 염증 혈액 마커	AST(Aspartate aminotransferase)	U/L
	ALT(Alanine aminotransferase)	U/L
혈중 지질 profile	트리글리세라이드 (Triglyceride, TG)	mg/dL
	총콜레스테롤(Total cholesterol, T-Chol)	mg/dL
	HDL-cholesterol(HDL)	mg/dL
	LDL-cholesterol(LDL)	mg/dL

(4) 부검과 T 세포 검사

① 부검

- 투여 종료일에 각 그룹별 음수제공 하에 16시간 절식을 시키고 부검은 개체 순서에 따라 진행. 모든 개체는 isoflurane 흡입마취 하에 복대정맥으로 최대한 채혈. 혈액 채취 후 복부 장기에 대해 육안검사를 실시하였고 내부 장기의 이상 유무를 확인하였으며 간과 부고환 지방 조직을 적출. 적출된 간과 부고환 지방은 생리식염수로 세척하고 여과지로 수분을 제거한 후 전자저울로 절대 중량을 측정하였고, 부검 전 절식된 체중에 대한 각각의 상대 중량을 산출.

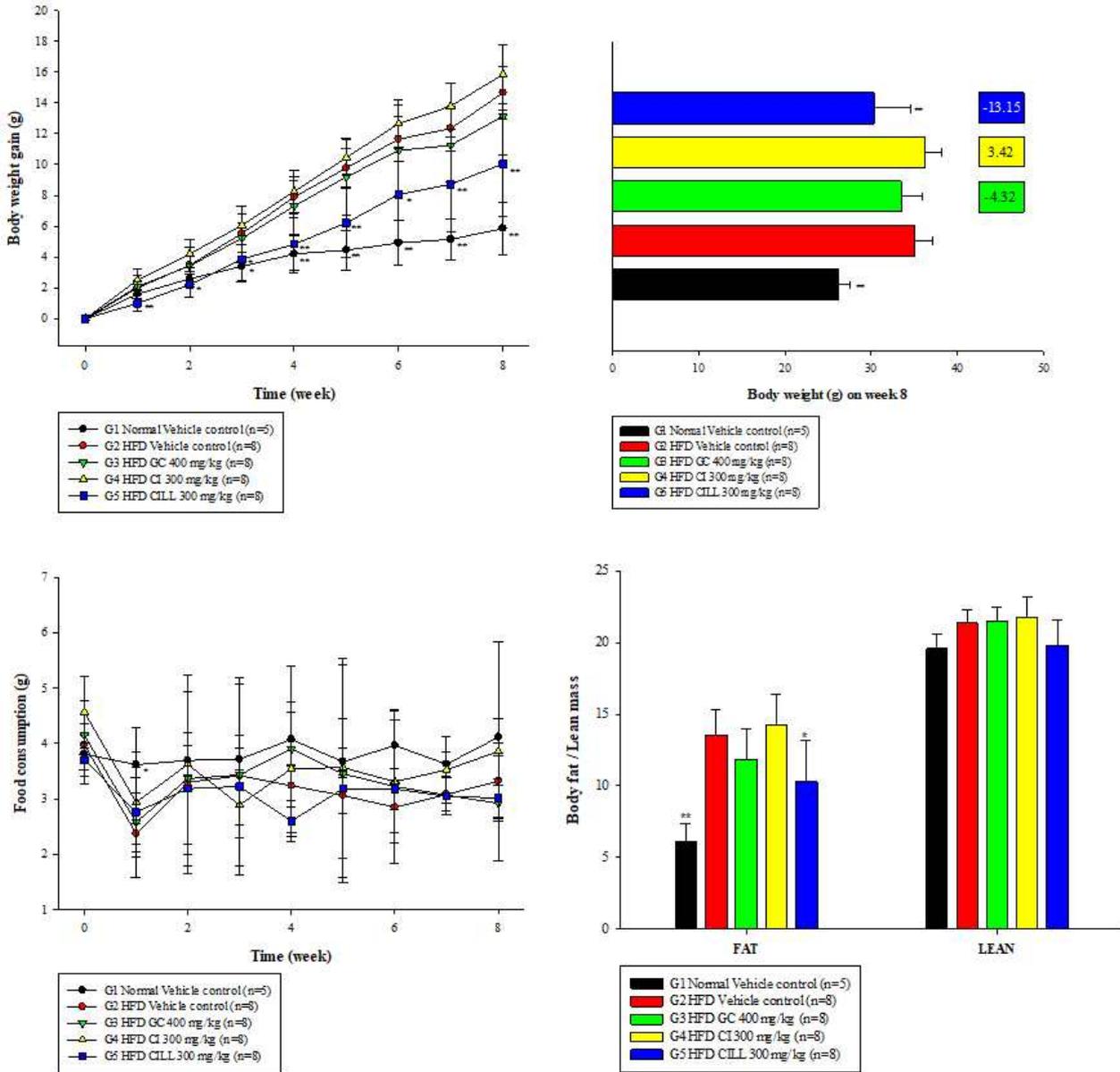
$$\text{산식: 상대 장기 중량} = \text{장기 무게 (g)} / \text{부검 전 절식 체중 (g)}$$

② T 세포 검사

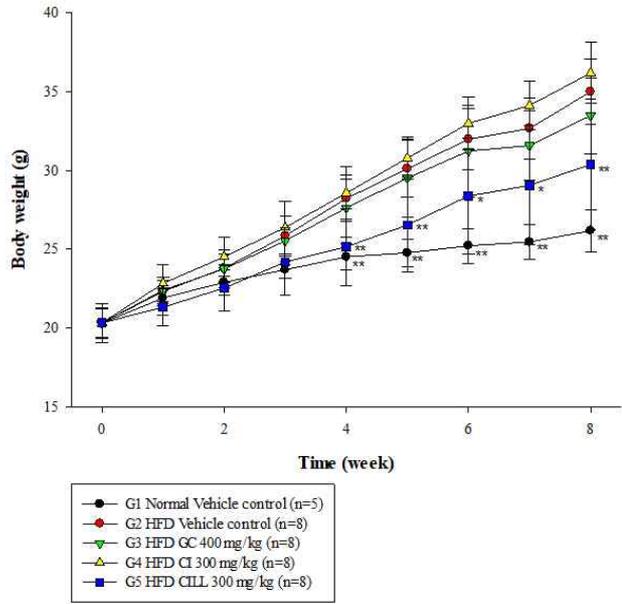
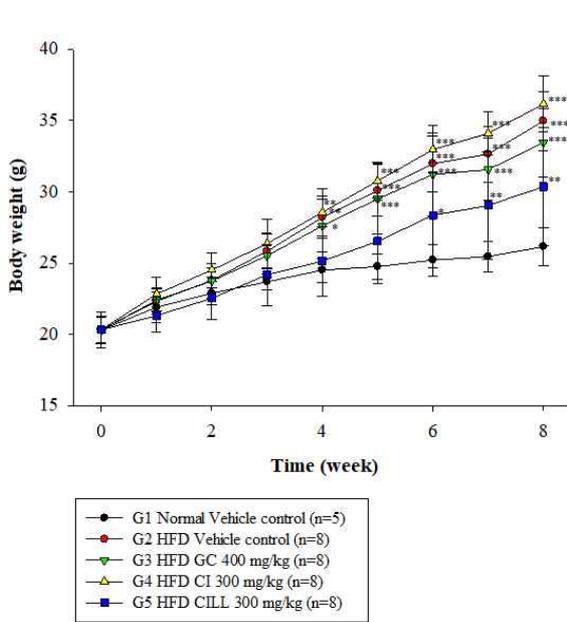
- C57BL/6 mice의 혈액에 동량의 PBS를 처리한 후 Ficoll-Paque Plus를 PBS와 동량으로 처리하여 20° C, 20분간, 2,000 rpm, no breaking 조건으로 원심분리를 진행하였다. 층이 분리되면 red blood cell (RBC) 층을 제외하고 모두 분리해 낸 뒤 PBS를 2배를 넣어 20분간, 2,000 rpm, No breaking 조건으로 원심분리한 뒤 pellet에 RBC lysis buffer를 처리하여 반응시킨 후 PBS를 넣어주고 원심분리하여 상층액을 제거. 상층액 제거 후 PBS를 이용하여 1회 세척하고 단일세포로 실험에 사용하였다. 실험항체는 PE anti-mouse CD45, PE/Cy7 anti-mouse CD3ε, FITC anti-mouse CD4, APC anti-mouse CD8α를 사용.
- 세포분리 실험방법에 따라 분리된 종양의 단일세포는 각각 Fc blocker를 10분간 전 처리하여 blocking을 한 후 FACS buffer에 항체를 희석한 후 4°C에서 차광하여 30분간 반응. 반응이 끝난 세포는 FACS buffer를 이용하여 2회 세척한 후 2% paraformaldehyde를 이용하여 고정하였다. 염색이 끝난 세포는 flow cytometer를 이

용하여 측정. 측정된 데이터는 FlowJo™ V10를 이용하였으며, 각각의 Th subset은 기재된 marker (CD45 & CD3 ϵ)를 기준으로 하여 분석.

5) 임상 및 체중 및 사료의 섭취량, body fat mass



<그림58> 사료의 섭취량 및 Body fat mass



<그림59> 체중의 증가량

<표 17> Body fat mass 증량

Group				Value (g)			
				Total mass	BMC	Fat	Lean
Normal diet	G1 vehicle control	N	Mean	26.4709**	0.7945	6.1012**	19.5751
		5	SD	1.1848	0.1114	1.2540	0.9731
HFD	G2 vehicle control	N	Mean	35.7668	0.8409	13.5717	21.3542
		8	SD	1.9725	0.0797	1.7576	0.9272
	G3 GC 400 mg/kg	N	Mean	34.1802	0.8152	11.8517	21.5133
		8	SD	2.5784	0.0423	2.1687	0.9744
	G4 CI 300 mg/kg	N	Mean	36.8405	0.8447	14.2209	21.7749
		8	SD	2.0066	0.0578	2.1651	1.4344
G5 CILL 300 mg/kg	N	Mean	30.9005**	0.7845	10.3022*	19.8138	
	8	SD	4.1264	0.0915	2.8813	1.8010	

<표 18> Body fat mass 비율

				Percent (%)			
Group				Total mass	BMC	Fat	Lean
Normal diet	G1 vehicle control	N	Mean	100.00	2.9970**	22.9696**	74.0333**
		5	SD	0.00	0.3570	4.2332	4.3360
HFD	G2 vehicle control	N	Mean	100.00	2.3493	37.8282	59.8226
		8	SD	0.00	0.1471	3.2933	3.3701
	G3 GC 400 mg/kg	N	Mean	100.00	2.3954	34.4559	63.1487
		8	SD	0.00	0.2016	4.0489	3.9201
	G4 CI 300 mg/kg	N	Mean	100.00	2.2983	38.4828	59.2189
		8	SD	0.00	0.1915	4.4760	4.5095
	G5 CILL 300 mg/kg	N	Mean	100.00	2.5544	32.8511	64.5944
		8	SD	0.00	0.2556	5.4785	5.4475

<표 19> Body fat mass 크기

				BMD (g/cm ²)	Bone area (cm ²)	Bone volume (cm ²)	Fat in tissue (%)
Normal diet	G1 vehicle control	N	Mean	0.0928	8.5523	0.4806	23.6828**
		5	SD	0.0117	0.4468	0.0674	4.3898
HFD	G2 vehicle control	N	Mean	0.0965	8.7011	0.5086	38.7405
		8	SD	0.0057	0.3761	0.0482	3.4035
	G3 GC 400 mg/kg	N	Mean	0.0935	8.7199	0.4931	35.2968
		8	SD	0.0032	0.4353	0.0256	4.1011
	G4 CI 300 mg/kg	N	Mean	0.1039	8.3252	0.5109	39.3894
		8	SD	0.0182	1.3415	0.0349	4.5960
	G5 CILL 300 mg/kg	N	Mean	0.0936	8.3727	0.4745	33.7106
		8	SD	0.0090	0.4946	0.0554	5.6155

(1) 임상과 체중

- 실험 기간 중에 이상 증상이 관찰되는 동물은 없었으며, 시간이 지나면서 HFD를 섭취

하는 동물은 비만상태가 되었음.

- G1과 G2에서 유의한 차이를 확인할 수 있었으며, G5군(25.15 ± 2.44 g)은 4주부터 G2군(28.22 ± 1.48 g)에 비해 유의한 수준으로 체중이 감소되었음.
- G1군을 비교군으로 했을 경우 G2, 3, 4, 5군에서 유의적 차이를 발견할 수 있었으나, G2군을 비교군으로 했을 경우 G5군에서만 유의성을 확인할 수 있었음. 양성대조군인 G3군이 G2군을 비교군으로 했을 경우 유의적 차이를 가지지 못한 이유로는 감국 발효물의 경우 감국 발효물안에 있는 배지의 성분으로 인해 실험의 공정성으로 인해 G3, 4, 5군 모두 배지를 동일한 양으로 첨가하였음. 따라서 기존의 선행연구에서 투여되었던 양에 비해 약 80%의 양만이 투여가 되어 유의성을 확인할 수 없었을 것으로 판단할 수 있음. 하지만 실험군에서는 모두 유의적 차이를 볼 수 있었음
- 증체량에서는 G5군(1.00 ± 0.53 g)에서 G2군(1.99 ± 0.48 g)과 비교해 1주부터 유의한 차이가 보였으며, 이는 투여 종료까지 낮은 증체량을 유지함.
- G2군(34.98 ± 2.09 g)과 비교해 G3군(33.47 ± 2.41 g), G4군(36.18 ± 1.94 g) 및 G5군(30.38 ± 4.174 g)으로 각 4.32%, -3.42%, 13.15%의 체중 감소를 보였으며, G5군에서만 유의한 차이를 확인.

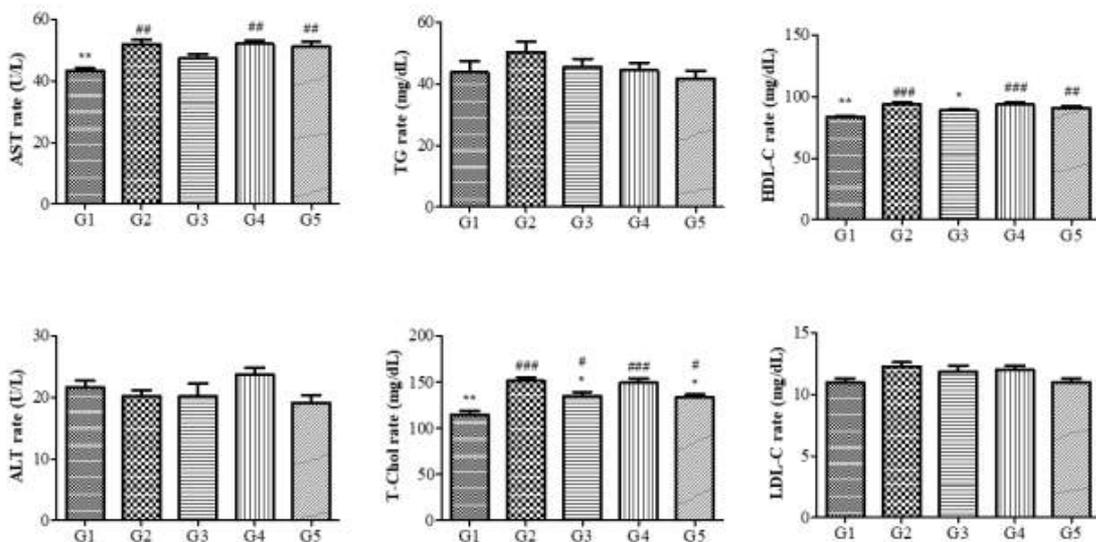
(2) 사료 섭취량

- 유의한 차이를 볼 수 없음.

(3) Body fat mass

- 시험물질 종료일에 body fat mass를 측정한 결과, fat mass 결과에서 G5군(10.3022 ± 2.8813 g)이 G2군(13.5717 ± 1.7576 g)과 비교하여 유의하게 감소하였고, lean mass 결과에서는 유의한 차이가 관찰이 없음.

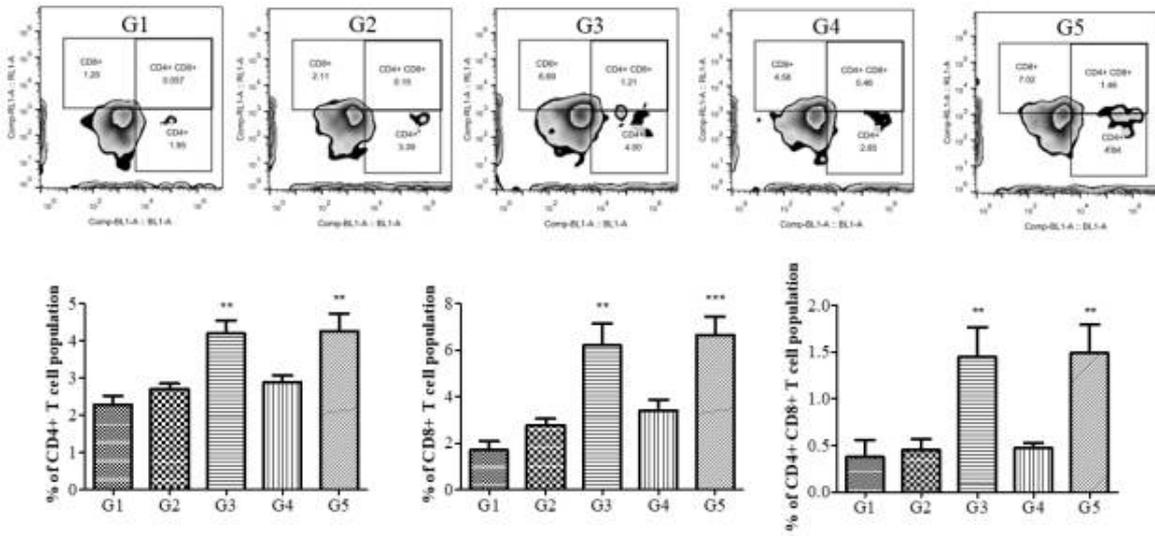
6) 부검, 혈청학적 검사, T 세포 분석



<그림60> 혈청학적 검사

(1) 혈청학적 검사

- G2군을 기준으로 T-Chol에서 G3군(135.13 ± 11.86 mg/dL)과 G5군(133.38 ± 9.26 mg/dL)이 G2군(151.13 ± 11.32 mg/dL)과 비교하여 유의하게 감소하였으며, HDL-C 측정에선 G3군(88.75 ± 3.45 mg/dL)이 G2(94.00 ± 3.63 mg/dL)군에 비해 유의적 감소를 보였음.
- G1군을 기준으로 AST에서 G4, G5군이 유의하게 증가되었으며, T-Chol에서 G3, G4, G5군이 유의적 증가를 보임. 또한 HDL-C에서 G4, G5군이 유의성 있게 증가됨.



<그림61> T 세포 분포

<표 20> Body fat mass 크기

Group	N	Mean	SD	Body weight (g)	Absolute organ weight (g)		Relative organ weight	
					Liver	Epididymal fat	Liver	Epididymal fat
Normal diet	G1	5	23.58**	0.9748*	0.4380**	0.0413**	0.0184**	
	vehicle control	5	1.21	0.0540	0.1323	0.0008	0.0045	
HFD	G2	8	33.04	0.8716	1.9216	0.0264	0.0579	
	vehicle control	8	1.97	0.0342	0.2969	0.0010	0.0062	
	G3	8	31.71	0.8514	1.6998	0.0269	0.0530	
	GC 400 mg/kg	8	2.53	0.0525	0.4519	0.0009	0.0106	
	G4	8	34.32	0.9020	2.2302	0.0263	0.0645	
HFD	G5	8	28.44**	0.7748**	1.3671	0.0274	0.0463	
	CILL 300 mg/kg	8	4.00	0.0849	0.6018	0.0014	0.0155	

(2) T 세포 분포

- G3군과 G5군에서 CD4+CD8+ (double positive) T 세포가 각 $1.21 \pm 0.91\%$, $1.46 \pm 0.81\%$ 로 높게 나왔으며, CD4+ T 세포가 각 $4.00 \pm 1.00\%$, $4.84 \pm 1.33\%$, CD8+ T 세포는 $6.69 \pm 2.68\%$, $7.02 \pm 2.26\%$ 로 G2군에 비해 전부 높게 측정.
- G2군을 비교해서 CD4+ T 세포에서는 G3, G5군에서 유의적 차이를 확인했으며, CD8+ T 세포, CD4+CD8+ T 세포에서도 G3, G5군에서 유의적 차이를 확인.

(3) 부검

- 부검 당시 이상소견은 없었으며, 부검 전 절식 체중 결과에서 G5군(28.44 ± 4.00 g)이 G2군(33.04 ± 1.97 g)과 비교하여 유의하게 체중이 감소하였고, 적출한 간의 절대 중량에서도 G5군(0.7748 ± 0.0849 g)이 G2군(0.8716 ± 0.0342 g)과 비교하여 간 절대 중량이 유의하게 감소되었음. 그 외에 간 조직 상대 중량과 부고환 지방의 중량 및 상대 중량에서는 유의적 차이는 관찰 되지 않았음.

7) 결론

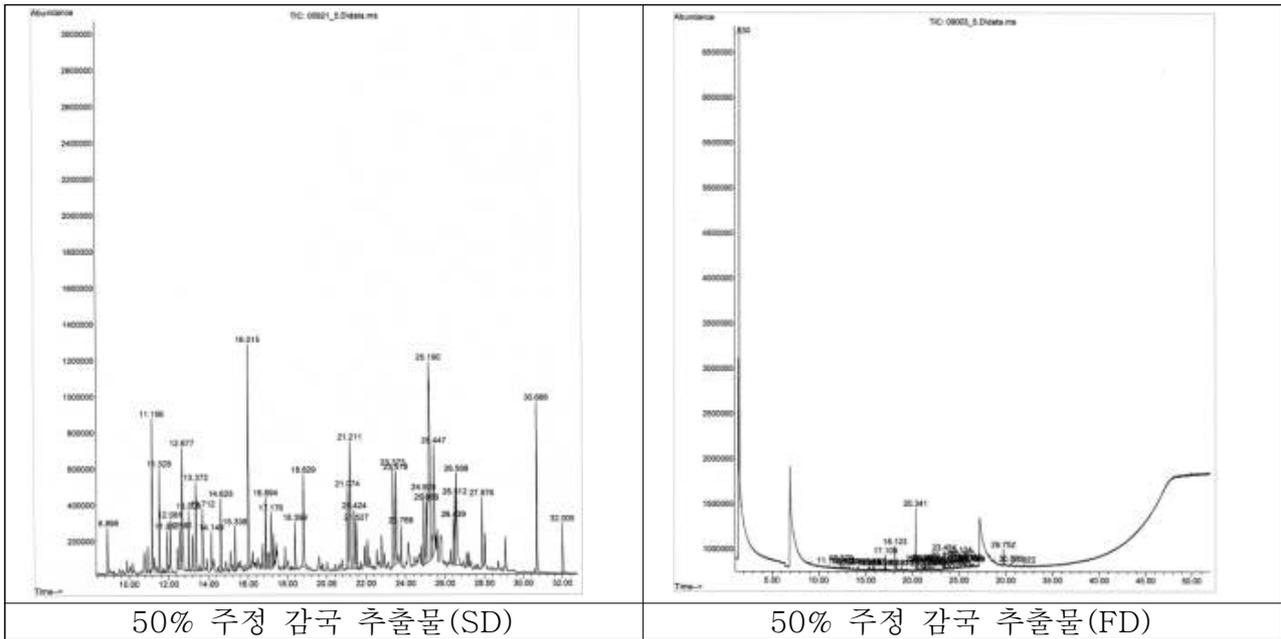
- C57BL/6 mouse에 고지방식이를 8주간 급이하여 유도한 비만 모델에서 시험물질을 8주간 투여하였을 때 체중 변화, fat mass, 간 조직 중량 및 혈액 내 cholesterol 수치 결과에서 시험물질 CILL이 유의한 차이를 보여 우수한 항비만 효과를 지니고 있는 것으로 판단됨.
- 유산균 발효에 의해 감국 추출물의 본래의 영양소 흡수를 돕고, 발효 전에 가지고 있던 특성 변화를 통해서 체중 감소의 효과와 예시로 *L. casei*는 녹차 추출물을 발효시켜 고지방시기 섭취 마우스의 혈청 중성 지방을 억제시킨 연구가 있음(Hong *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).
- *Garcinia cambogia*는 탄수화물이 지방으로 합성되는 억제하여 체지방감소에 영향을 줌으로써 기능성 원료로서 인정이 되었음. 또한 기존의 지방세포로의 지표 단백질인 PPAR γ , C/EBP α 를 유의하게 억제시키는 것을 확인하였음(Kang *et al.*, 2013).
- 본 연구에서 주 타겟인 hedgehog 신호는 미분화된 세포에서 주로 이루어지는 신호로서 최근 연구에선 hedgehog 신호 중 하나인 GLI를 조절하여 지방전구세포가 지방구세포로의 전화를 억제하는 연구가 이루어지고 있음(Ingham *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013). 이는 기존의 지방구세포에서 이루어지는 기전이 타겟이 아니며, 그보다 상위 신호인 지방전구세포에서 이루어지는 신호를 타겟으로 하고 있음. 즉, 탄수화물이 지방으로의 합성을 억제하는 매커니즘이 아닌 지방구세포 그 자체를 억제하는 것이 타겟임.
- 그리고 감국 추출물을 사용한 기존의 연구에서 추출방법의 변화로 인해서도 그 효과가 *Garcinia cambogia*보다 높게 나타난 경우도 있음(Nepali *et al.*, 2018).
- 동물실험에서 실험의 공정성을 위해 공통적으로 배지를 희석시켜 기존의 선행 연구의 투여량보다 약 80% 정도만 투여가 되었음. 그에 따라 그 효과가 반감이 될 수 있음.

*Garcinia cambogia*와 hedgehog 신호에 대한 비만억제 연구는 후속 연구를 통해서 그 효과를 확인이 필요함.

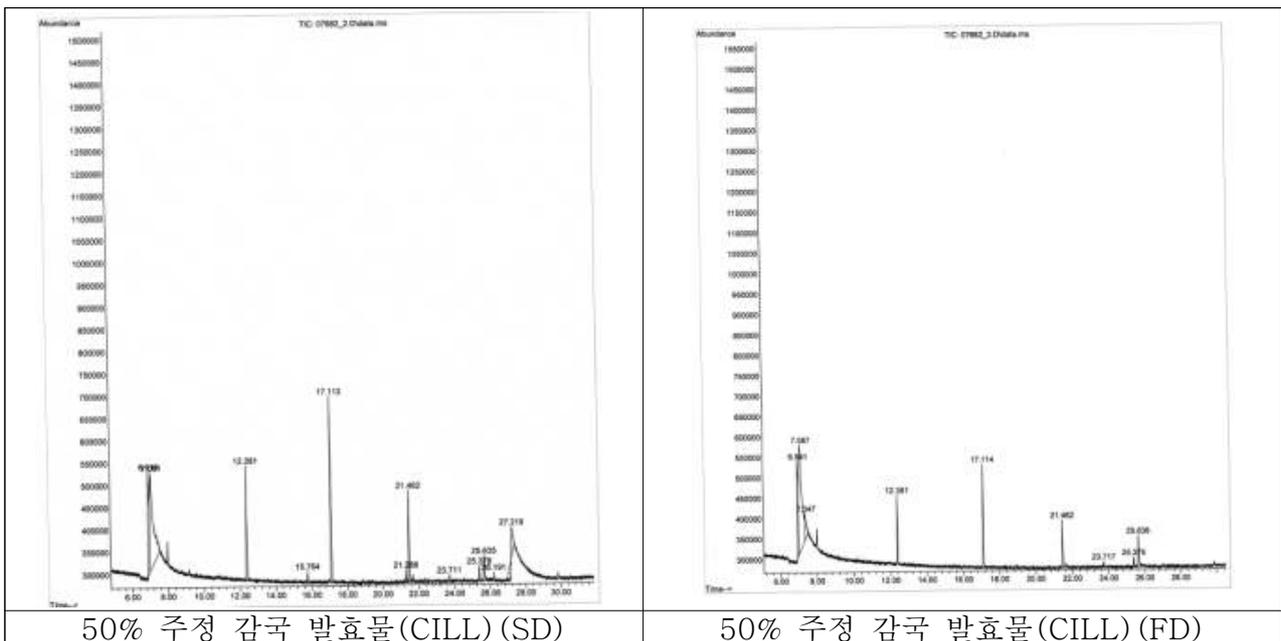
2-9. 시제품 제작을 위한 검증

1) GC 분석

(1) 추출 농도와 건조방법에 따른 차이



<그림62> 건조방법에 따른 차이

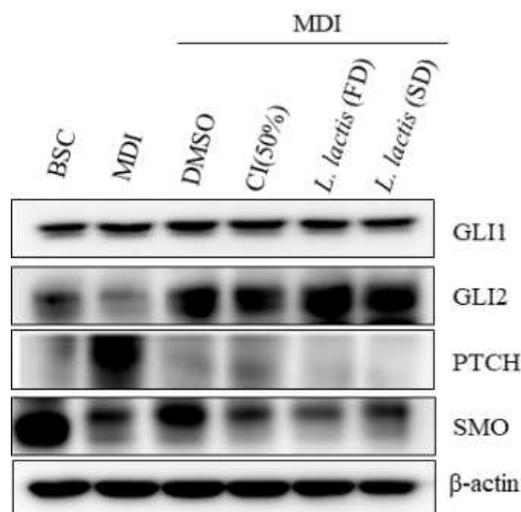


<그림63> 건조방법에 따른 차이

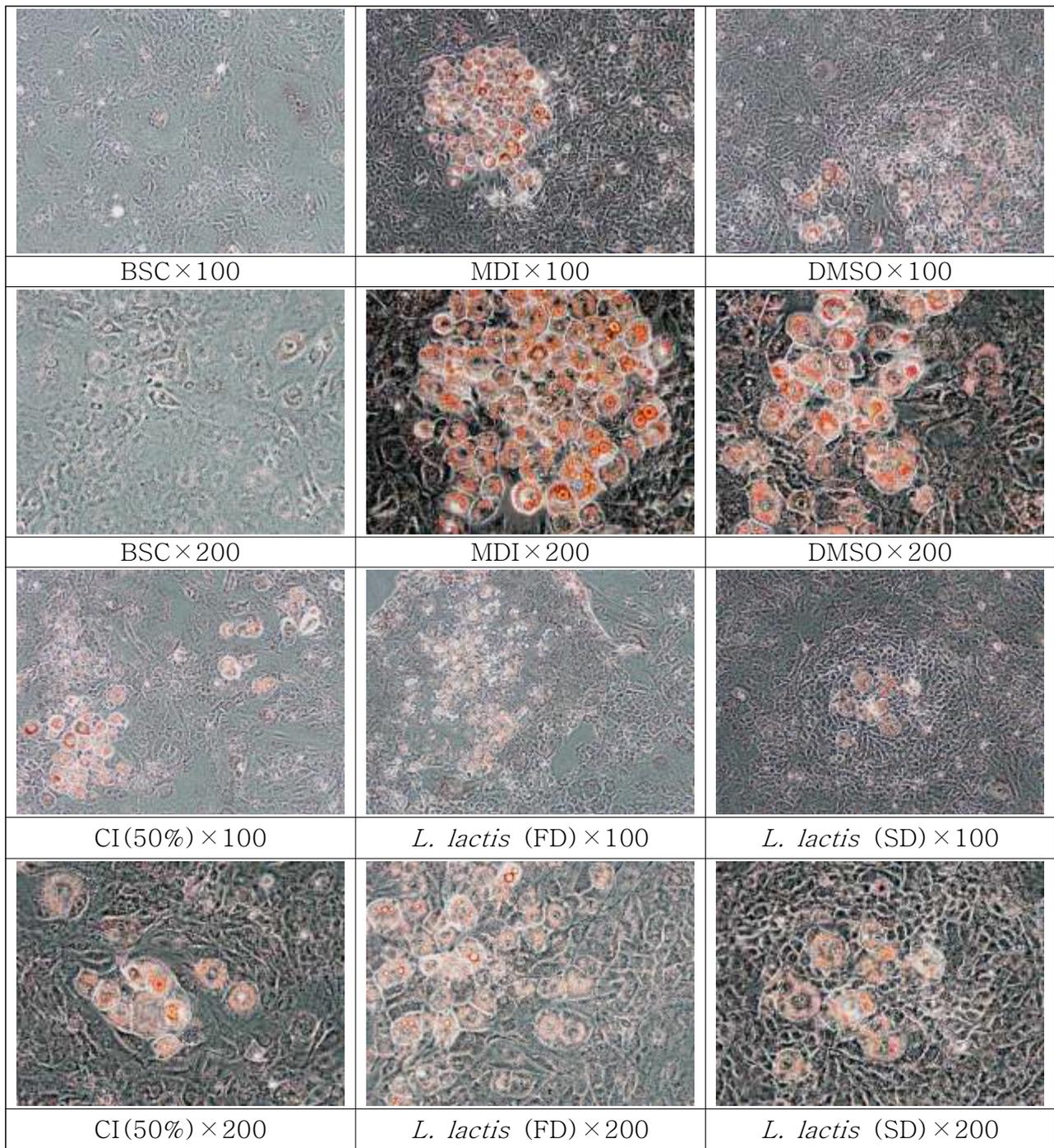
- 기존의 동결건조(FD)와 spray dry(SD)방법에 따른 물질의 함량 차이는 변화가 없는 것으로 나타났음.
- 초기 GC데이터에서 3115 감국 발효물에 비해 camphor와 기타물질들의 함량이 적게 나타났지만, 이것은 식용 알코올과 추출 농도에 따른 차이로 해석해 볼 수 있음. 하지만 동물실험을 통해서 비만억제 효과를 확인 함.
- 상업화를 위한 비용적인 문제로 spray dry(SD)방법이 동결건조보다 비용이 적고 수율이 높다는 장점이 있어, 식품에 많이 이용되고 있으나, 순간 열로 인해 수용성 물질의 소모와 물질의 변화가 있을 수 있다는 단점이 있음.
- 위 결과로 상업화용 CILL에서는 FD와 SD에서의 차이점을 찾을 수 없었음.

2) Hedgehog 신호 확인

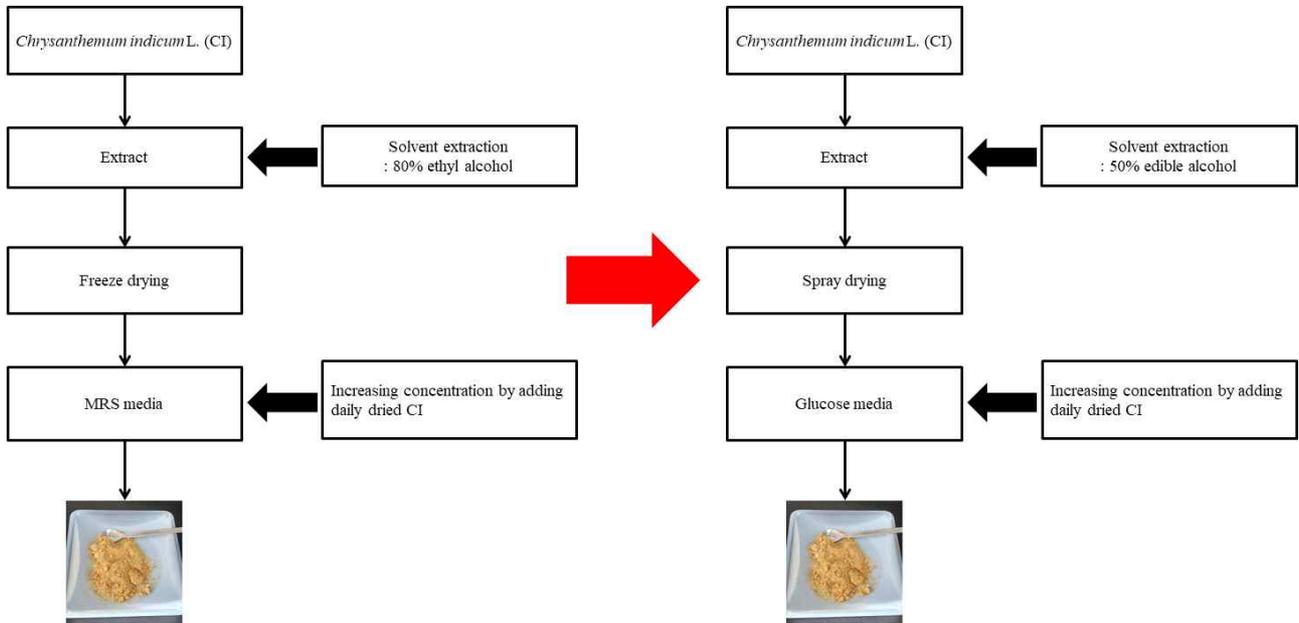
- 3T3-L1 세포주에서 시판용으로 진행할 감국 발효물을 western blot으로 확인을 했음. 동물실험에서 진행되었던 50% 주정 추출한 CI(감국 추출물)와 *L. lactis* 감국 발효물 동결 건조분(FD)과 공정과정의 개선과 경제적 효율을 위한 *L. lactis* 감국 발효물 spray dry (SD)에서의 hedgehog 신호인 GLI1, 2, PTCH, SMO를 호가인해 보았음.
- GLI1의 경우 CI와 FD, SD에서 단백질 발현 수준에서 크게 차이가 나지 않았음. 하지만 GLI2에서는 CI보다 SD, FD의 단백질 발현 수준이 조금 더 높게 나타났으며, SMO의 발현에서는 SD의 발현이 FD, CI보다 더 높게 나타났음. 또한 PTCH는 CI, SD, FD에서 공통적으로 MDI보다 낮게 발현이 되었음.
- 따라서 SD와 FD에서 hedgehog 신호에서는 그 차이를 볼 수 없었으며, 동물실험에서의 지방구세포 분화억제 효과에 따른 비만 억제는 GLI2에 의한 것으로 사료됨.



<그림64> 시판용 감국 발효물의 hedgehog 신호



<그림65> ORO 염색에 따른 3T3-L1 세포의 분화차이



<그림66> 공정과정 변경

- 동결건조에서 SD 건조로 변경하여 경제적인 절감을 이루었으며, 80% 주정 추출에서 50% 주정 추출을 바꿔 원가 절감을 이루었음. MRS 배지에서 glucose 배지로 변경하여 식용이 가능하도록 함. 또한 동일한 효과가 있는 것을 GC 분석 및 western blot, 동물실험을 통해 입증함.
- ORO 염색을 통해서도 세포의 형태에서 80% 에탄올 추출과 3115, 3237과 비교해서 그 차이를 확인하지 못함.

2-10. 감국 재배법 및 재배

1) 감국의 재배방법 연구

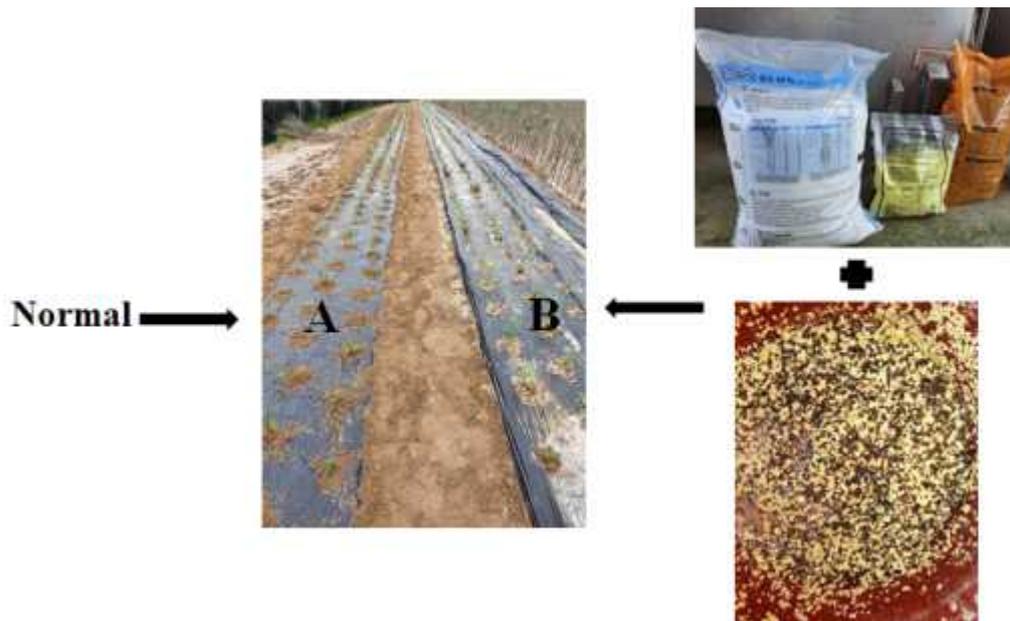
- 동일한 토지에서 토양 분석을 통해서 부족한 부분을 비료를 통해서 그 차이점에 따른 꽃 앞의 수를 파악



<그림 67> 토양 비료사용 처방서

- 감국 1,000 본을 구매하여 토지 임대지에 2종류의 차이점을 두어 재배를 시작

(1) 감국의 재배방법 및 과정



<그림68> 감국 재배법 연구 과정

- 동일한 온도, 일조량, 강수량을 기반으로 출하시기, 정식간격, 비료의 비율차이로 차별을 두어 재배법을 연구하였음
- 중성비료로서 N_2 46%의 요소와 P_4O_{10} 17%, MgO 12%, CaO 40%와 H_4SiO_4 , $CaCO_3$, Fe , Mn , Cu , Mo 등이 함유된 용성인비와 S가 함유되어 있는 입제활화산을 사용하였으며 각 비료별 비율로 사용하여 그 차이를 두었음.
- 마지막으로 꽃잎이 가장 많이 열린 감국의 비교군을 중금속 검사와 잔류농약시험을 실시하였음



<그림69> 감국 재배과정

<표 21> 감국 재배과정

일자	온도(℃)		날씨	업무내용	비고
	08시	14시			
05/14	21	28	맑음	· 감국 모종 입고 · 육모장 밀거름시비 및 멀칭작업	
05/15	16	23	흐림	· 감국 모종 정식	
06/04	19	28	맑음	· 새순 8개(줄기)	
06/10	21	33	맑음	· 잔디물약 살포	
06/12	20	30	흐림	· 잡초제거 · 순치기작업(위순제거)	
06/16	18	31	맑음	· 잡초제거	
06/23	20	33	흐림	· 비타민 살포 · 제초작업	
06/25	20	33	맑음	· 새순 15개(줄기) 나눔	
07/01	18	27	맑음	· 순치기 작업 · 제초작업	
07/10	18	25	흐림	· 제초작업	
07/17	25	32	맑음	· 진딧물발생 방제	
07/24	20	25	비	· 제초작업	
07/31	23	28	비	· 새순이 평균 10개 이상 증가	
08/07	25	28	흐림	· 김메기 작업	
08/14	25	28	비	· 살균제(유황)살포	
08/21	22	24	흐림	· 황변현상 발생 · 미량요소살포(고토, Mg, Ca등)	
08/28	25	30	흐림	· 황변현상 없어짐	
09/04	18	28	흐림	· 김메기 작업	
09/01	18	27	흐림		
09/18	16	24	흐림	· 용성인비, 유황 살포(A구역) · 용성인비(B구역)	
09/25	14	23	맑음		
10/02	16	21	맑음	· 봉우리가 형성	
10/09	10	21	맑음	· 1개의 봉우리 발생	
10/16	6	12	맑음	· 9개의 봉우리 발생	
10/23	2	14	맑음	· 일부 가지에서 개화 시작(약 1%) · 일부가지 약 9~10개의 가지에서 갈색으로 시들편상 발생	
10/30	2	19	맑음	· 약 5% 개화 · 만개하기전 시드는 현상 확장	
11/06	7	17	맑음	· 약 20% 개화	
11/22	5	16	맑음	· 수확 및 잔류농약 시험 검사서 의뢰	

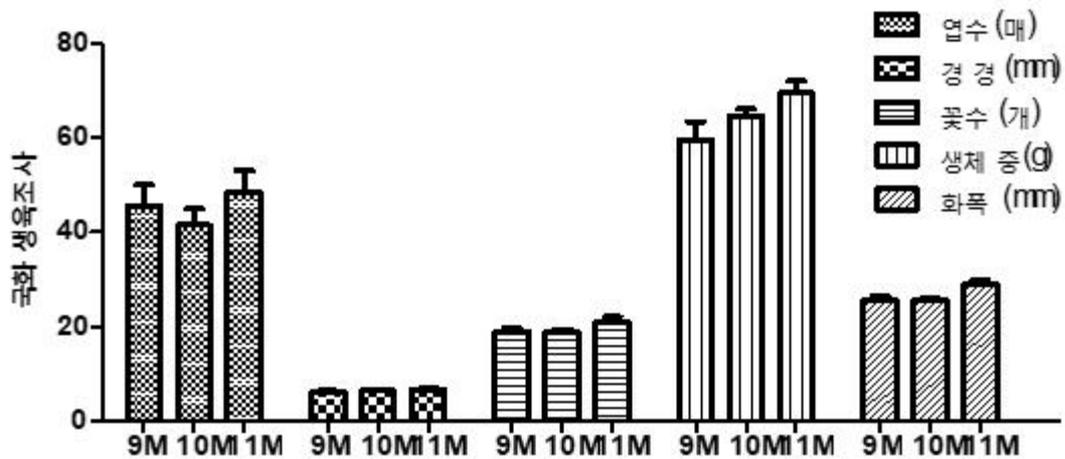
(2) 개화 일수에 따른 재배

① 9월 출하, 10월 출하, 11월 출하에 따른 꽃봉오리 수 분석결과

- 일수에 따른 장대 길이의 변화만 보일뿐 꽃봉오리 수 변화는 유의적 차이를 보이지 않음

꽃대			
조건	9월	10월	11월

<그림70> 개화 조건변화에 따른 꽃대 길이



<그림71> 개화 월에 따른 감국의 생육조사

② 정식 간격에 따른 재배 효율

- 정식간격에 따른 감국의 재배 효율은 20 cm를 제외하고 큰 차이를 보이지 않음
- 단, 정식간격에 따라 자라는 퍼짐 정도가 다름
- 정식간격이 좁을수록 하단부 잎사귀의 갈변이 발생
- 수확을 고려하여 40 cm 이상의 정식간격이 적절한 것으로 보임

감국대				
조건	20cm	30cm	40cm	50cm

<그림72> 정식 간격에 따른 재배 효율 조사

③ 비료사용에 따른 감국 재배 효율

- 3종 비료를 이용한 재배법 변화에 따른 감국의 생육형태 확인
- 3종 비료의 시비 비율에 따른 생육형태의 변화를 보임 (감국의 재배기준이 표기되지 않아 약육장물 및 기타 기준으로 임의로 변경하였으며, 기준 50:5:10을 기준으로 하여 비료를 변화시킴)
- 3종 비료의 시비 비율에서 30:5:20의 비율이 재배 시험된 재배지에 적합한 것으로 판단 됨 (단, 각 적용에 따른 토양조사가 필요됨. 본 연구에서는 춘천시농업기술센터에서 제공된 밭 토양 비료사용 처방서를 기준으로 함)

꽃송이			
비료 조건 (용성인비:활화산:요소)	40:5:10	30:5:10	30:5:20

<그림73> 비료조건에 따른 생육의 차이

2) 감국의 재배



<그림76> 안심촌 감국묘종 구매현황



<그림77> 안심촌 감국 묘종

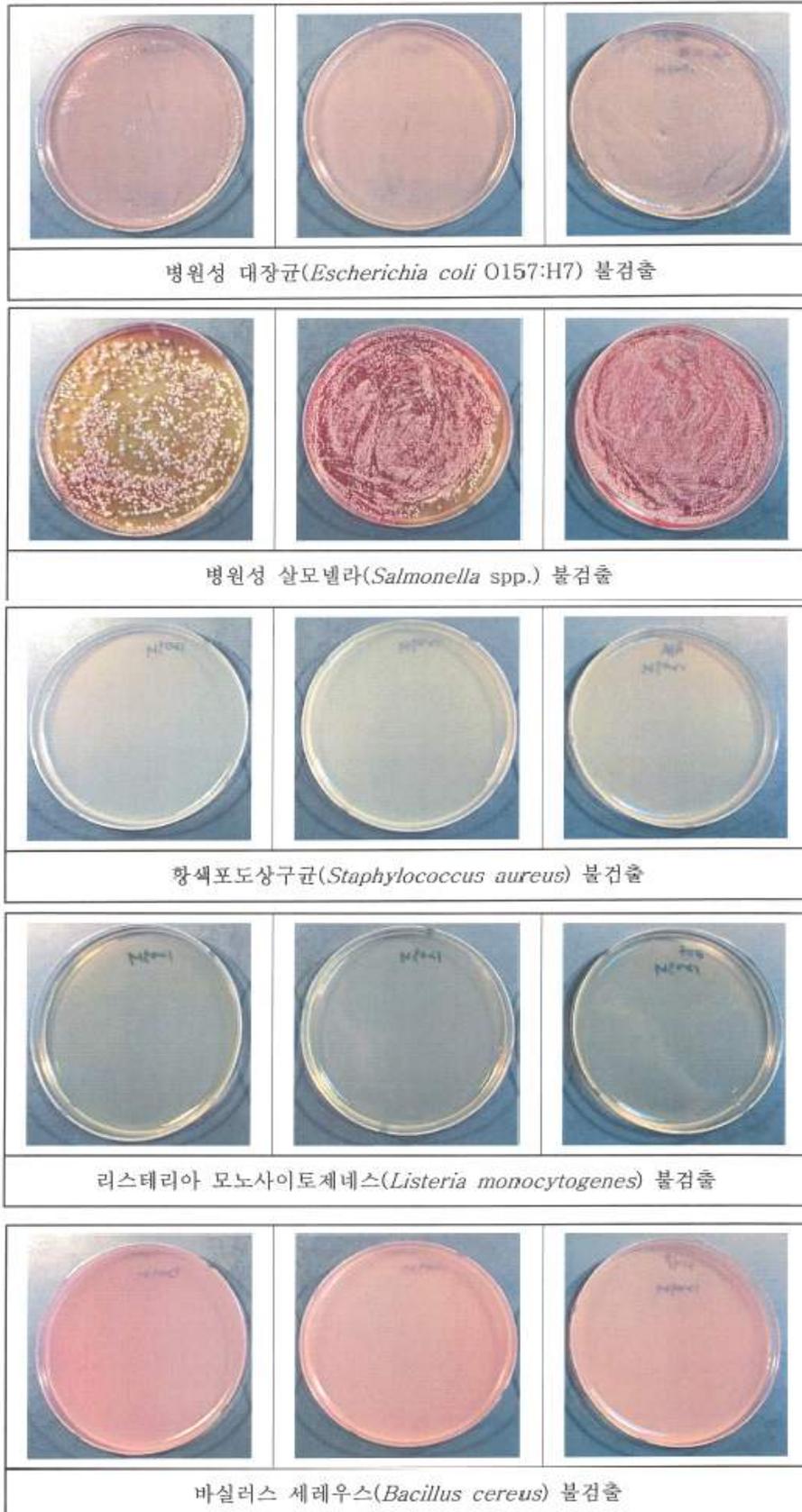


<그림78> 안심촌 감국 수확

- 감국 모종 2,000주를 5월에 구매하여. 경기도 연천군의 농업회사법인안심촌농원(주) 소속의 농지에서 감국을 11월까지 경작해 약 4 kg를 수확하였음.
- 재배 과정 중 특별한 차이를 두지 않고 같은 농토에 재배를 하였음.
- 재배 후 삼성생약과 동일하게 중금속 검사 및 잔류농약검사를 의뢰함.
- 재배 후 꽃잎의 수를 줄기 당 적게는 5송이 많게는 10송이 이하를 주를 이루었음.
- 재배 후 잔류농약은 미검출 되었으며, 총 4종의 중금속(As, Cd, Hg, Pb)를 분석하였으며, 그중 As 0.1 mg/kg, Cd 0.24 mg/kg, Pb 0.44 mg/kg 만 검출되었고, 나머지는 불검출 되었음.
- 또한 병원성 미생물 검사에서 모두 불검출 되었음

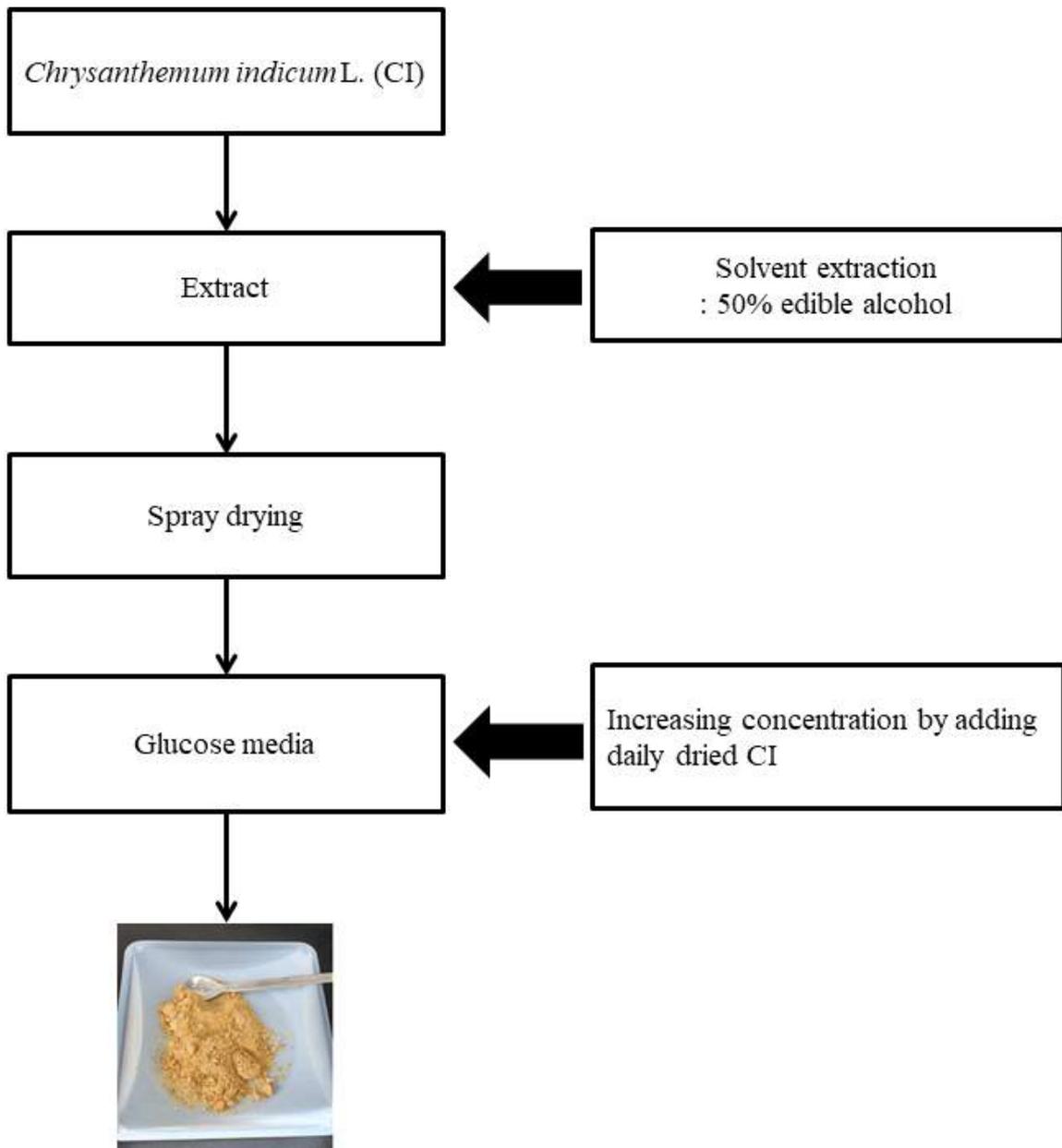


<그림79> 안심촌 감국



<그림82> 병원성 미생물 검사성적서

2-11. 감국 발효물 제조의 표준화와 식품 제조



<그림83> 감국 발효물 제조과정

1) 추출법

- 건조된 감국을 50%의 주정에 20%(w/v)로 넣고 추출기에서 2~3 일간 상온에서 정치 추출시킴.
- 추출된 액은 하우스징필터로 여과를 한 후 진공 농축기에서 30 Brix⁰ 까지 농축을 실시

2) 발효과정

- 농축된 감국 농축액을 *L. lactis* 배양액에 4%(w/w)로 혼합하여 32±2℃에서 36시간 발

효를 시킴

- 감국 발효액을 진공 농축기에서 농축을 실시
- 90~95℃에서 30분간 살균한 후 SD로 분말화 함.

3) 배합 비율

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	덱스트린	36.725%
2	폴리덱스트로스	20%
3	프락토올리고당 [프락토올리고당분말]	20%
4	난소화성말토덱스트린(고시형)	6.5%
5	레몬과즙분말	6%
6	국화발효분말 [감국유산균발효물]	4%
7	자일리톨	4%
8	기타가공품 [락토바실러스람노서스사균체분말]	1%
9	생선콜라겐 [피쉬콜라겐]	1%
10	이산화규소	0.4%
11	프로바이오틱스(고시형) [19종혼합유산균알파-2000]	0.375%
용도용법	물에 용해하여 섭취 또는 직접섭취	
보관방법 및 포장재질	습기와 직사광선을 피하고, 서늘하고 건조한곳에 보관 폴리에틸렌(내부), 종이(외부)	

<그림84> 배합비율

- 제조된 감국유산균 발효물 4% 비율과 덱스트린 36.725%, 폴리덱스트로스 20%, 프락토 올리고당 20%, 난소화성말토덱스트린 6.5%, 레몬과즙분말 6%, 자일리톨 4%, 락토바실 러스, 람노서스 사균 분말 1%, 콜라겐 1%, 이산화규소 0.4 %, 고시형 프로바이오틱스 0.375%로 배합하여 제조되었음

2-12. 감국 된장

1) 감국 된장의 비만억제의 연관성

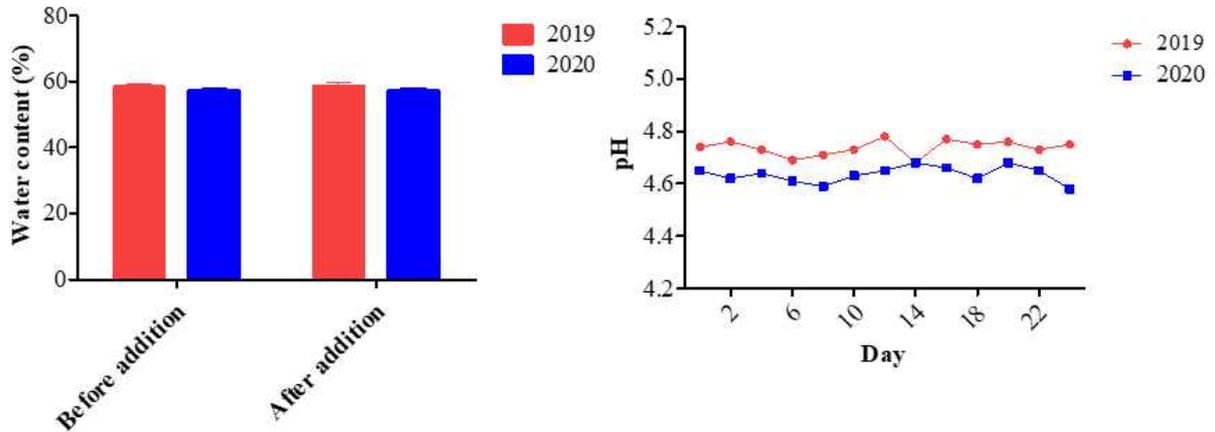
- 국화차를 첨가한 된장과 일반 된장과의 차이점을 본 선행연구(Jee and Sohn, 2007)에선 열수 추출한 국화 추출물을 된장을 제조에 사용함으로써 항혈전 활성, 항산화능 등의 효과를 확인하였음. 혈전 증상은 비만이 원인이 되는 질병으로서 국화(감국) 추출 시 열수보다 주정 추출을 통해 더 많은 국화(감국)의 물질을 추출할 수 있다고 알려져 있음. 이런 선행 연구로 본 과제를 통해 제조된 감국 발효물은 비만과 연관된 질병과 항산화능에 대한 효과를 기대 할 수 있음.

2) 감국 된장 담그기



<그림85> 감국 된장 담그기 과정

- 콩을 구매하여 메주를 만들어 1개월 이상 건조 시킨 후 소금과 물을 이용해 장을 담그고 이때 간장과 된장으로 분리가 됨. 간장은 항아리에 담가 그대로 2개월에서 3년 동안의 숙성 과정을 거치고 된장 역시 동일하게 숙성 과정을 거침.
- 감국장의 경우 된장을 만들고(2020년 생산) 난 후 감국 발효분말을 섞어 약 2개월간의 발효과정을 살펴보았음. 또한 2019년 생산된 된장에도 감국 발효분을 섞어 발효과정을 확인했음.



<그림86> 감국장의 수분활성도와 pH

- 60℃로 조절된 dry oven에 칭량접시를 24시간 건조하여 칭량접시가 포함하고 있을 수분을 제거. 제거된 칭량접시는 무게를 측정하여 그릇 무게로 기록. 그 후 각 된장 시료를 적당량 덜어 칭량접시에 넣은 뒤 무게를 측정하여 건조 전 무게로 함. 그 후 60℃로 조절된 dry oven에 각 시료를 넣은 뒤 72시간 건조하여 다시 무게를 측정하여 건조 후 무게로 측정.

- 수분 함량은 다음과 같은 식으로 계산 되었다.

$$\text{수분} = \left(1 - \frac{\text{건조 후 무게} - \text{그릇 무게}}{\text{건조 전 무게} - \text{그릇 무게}}\right) \times 100$$

- 첨가 전 2019년, 2020년 된장의 수분함량은 각각 58.216 ± 1.124%, 57.186 ± 0.981% 이며 유의미한 차이가 없음. 첨가 후 2019년, 2020년 된장의 수분함량은 각각 58.548 ± 1.034%, 57.072 ± 0.931%이며 유의미한 차이가 없음. 최종적으로 2019년 된장의 첨가 전후를 비교한 경우 p=0.732로 유의미한 차이가 없었으며, 2020년 된장의 첨가 전후를 비교한 경우 p=0.893로 유의미한 차이가 없음.

- 이화학적 검사에서 2019년과 2020년과의 차이를 크지 않음.

2-13. 연구개발성과

1) 기술적 성과

(1) 연구성과

① 연성대학교 산학협력단

- 기술이전 3건 (감국 유산균 발효물 지방세포 분화억제 조성물→(주)엘파운더, 농업회사

법인안심촌농원(주), Camphor와 감국 유산균 발효물 지방세포분화→삼성생약(주)농업회사법인)

- 특허출원 2건, 등록 1건
- KCI급 논문 2건

② ㈜엘파운더

- 기술이전 2건 (이너핏맘 등 2건)
- 상표출원 2건
- 인력양성 1명(박사급)

(2) 정량적 성과

① 국내·외 논문 실적

NO	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	감국의 유산균 발효물이 hedgehog 신호를 통한 지방구세포 분화 억제효과	Journal of Life Science	최○○	6	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2020.06.30.	
2	Camphor의 Hedgehog 신호 SMO 조절을 통한 지방구세포 분화 억제효과	Journal of Life Science	최○○	11	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2020.11.30.	

② 국내·외 지식재산권

NO	지식재산권등명칭	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	이너핏맘	대한민국	(주)엘파운더	2020.05.07.	40-2020-0074929				100
2	innerfitmum	대한민국	(주)엘파운더	2020.05.07.	40-2020-0074930				100
3	감국 발효물을 유효성분으로 함유하는 지방세포 분화 억제용 조성물	대한민국	연성대학교 산학협력단	2020.03.27.	10-2020-0037390	연성대학교 산학협력단	2020.07.23.	10-2139443	100
4	감국 추출물 또는 감국 발효물에	대한민국	연성대학교 산학협력단	2020.10.28.	10-2020-0141129				100

	함유된 camphor를 유효성분으로 하는 지방세포 분화 억제용 조성물								
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

2) 사업적 성과

① 제품화 2건



<그림87> 제품화

- (주)엘파운더 이너핏맘 제품 출시
- 농업회사법인안심촌농원(주) 감국 된장 출시

② 고용창출

- (주)엘파운더 1명 고용창출

③ 사업화 및 매출실적

- (주)엘파운더

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.43억원
			향후 3년간 매출	1.7억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	0억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 2%

		관련제품	개발후 현재까지	국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 0%
				국외 : 0%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위		

* 매출성과

NO	사업화방식	사업화형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액(천원)		매출액 발생년도
							국내	국외	
1	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	다이어트식품 판매	이너핏맘	(주)에드정	7,920		2020
2	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	다이어트식품 판매	이너핏맘	주식회사 유진바이오텍	35,640		2020

* (주)엘파운더 자사 홈페이지에서 현 제품 판매 중 (<https://www.lfounder.co.kr/shop>)

제품소개

이너핏맘_4박스
 포스트바이오틱스,피쉬콜라겐_특허제조기술
100,800원 ~~144,000원~~

제조회사: (주)화인에프티
 원산지: 국산
 브랜드: 락도힐스
 모델: 락도힐스
 포인트: 구매금액(추가옵션 제외)의 1% 적립
 배송비: 주문시 결제

이너핏맘_4박스

총 금액 **100,800원**

<그림88> 홈페이지 판매현황

－ 농업회사법인안심촌농원(주)

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.13억원	
			향후 3년간 매출	0.3억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	0억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 2% 국외 : 0%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0% 국외 : 0%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

* 매출성과

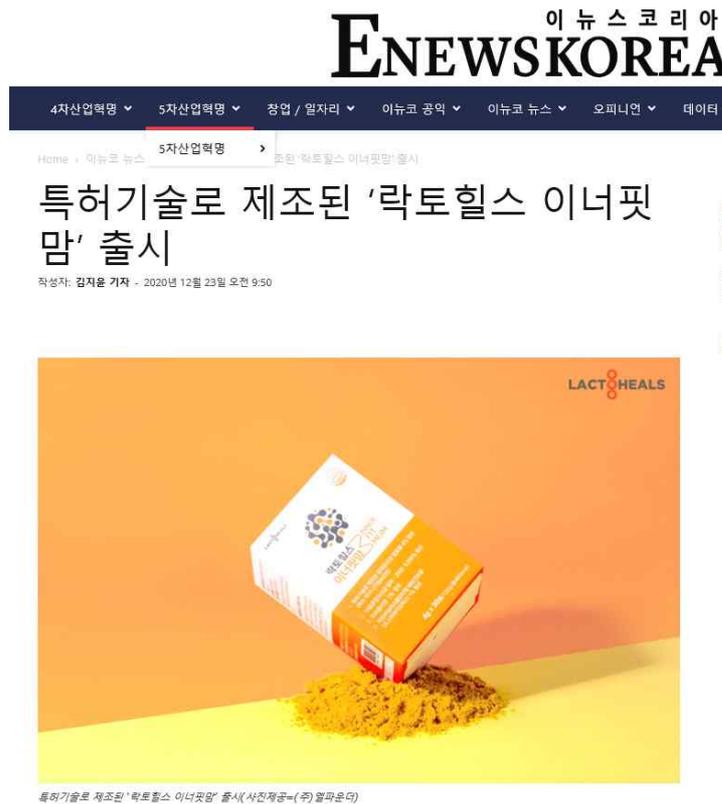
NO	사업화방식	사업화형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액(천원)		매출액 발생년도
							국내	국외	
1	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	장류	감국 된장	(주)라모 스팸	880		2020
2	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	장류	감국 된장셋 트	(주)맑음	1,100		2020
3	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	장류	감국 된장셋 트	삼일약 품교육 (주)	6,600		2020
4	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	장류	감국 된장	(주)삼진 포리머	440		2020
5	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	장류	감국 된장셋 트	(주)세양 이엔지	1,100		2020
6	직접실시	기술이전을 통한 신제품개발	국내	장류	감국 된장	아이티 스정보 통신 (주)	4,510		2020

④ 홍보실적

- (주)엘파운더



<그림89> 이너핏맘 비즈월드홍보



<그림90> 이너핏맘 이뉴스코리아 홍보

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 국내산 국화(감국)를 이용한 hedgehog pathway를 표적으로 하는 다이어트 제제 개발하고 산업화 시행

3-2. 목표 달성여부

1) 세부 연구목표 달성도

연구목표	목표대비 결과	목표달성도(%)
국내산 감국의 지방분화 억제 메커니즘 확립	<ul style="list-style-type: none"> · 감국 추출물 비롯한 감국 발효물에서 지방구세포 분화 억제제가 확인되었음. · 기존의 지방구세포 분화 매커니즘은 AMPK, C/EBP, PPARγ, AKT 등의 매커니즘 이외에 지방전구세포 신호 중 하나인 hedgehog 신호인 PTCH-SMO-GLI의 발현을 통해 지방전구세포에서 지방구세포로의 전화 억제 및 지방구세포의 분화 억제를 확인인. · siRNA를 통해서 <i>Ptch</i>, <i>Smo</i>의 매커니즘으로 지방구세포 분화 억제를 확립. 	100
감국의 다이어트 제조공정 수립 및 생산 효율화	<ul style="list-style-type: none"> · 제조공정의 단순화를 위해 2번의 동결건조를 1번의 동결건조로 줄임 · 동결건조와 가공비용이 비교적 저렴한 SD(spray dry)로 전환해 가공과정의 비용 절감. · 감국 추출시 주정의 농도 80%→50%로 낮춤. 성분의 변화 확인 시 거의 변화가 없 	100

	으며, <i>in vivo</i> 로 그 효능을 확인함.	
감국의 적응공정을 통한 유산균제 개발	감국 발효물을 제조 시 감국 추출물의 독성으로 인해 자체에 균 배양이 안되고 바로 죽는 상황이 발생. · 유산균이 배양되고 있는 배지에 감국 추출물을 소량으로 희석시켜 감국 추출물의 독성에 적응을 시켜 감국 독성 적응 유산균을 개발.	100
감국을 이용한 제품류 개발	· 감국 발효물을 이용하여 (주)엘파운더에서 이너핏맘을 제품화함 · 농업회사법인안심촌농원(주)에서 감국 된장을 출시.	100

2) 기관별 기여도

수행기관	연구개발목표	기여도	수행내용
연성대학교 산학협력단	세포생존 및 감국 유효성 단일물질 선별	100	· 감국 추출물 및 감국 발효물에 대한 세포 독성 확인. · Camphor에 대한 지방구세포 분화억제 확인 및 세포독성 확인. · GC-MS 분석을 통해 선별 물질을 확인.
	C/EBP, PPAR γ 등 전사인자 확인	100	· 감국 추출물 및 감국 발효물에 대한 C/EBP, PPAR γ , AMPK, AKT 매커니즘에 대한 지방구세포 분화 시 발현 확인
	Hedgehog pathway 타겟 지방세포 억제기전 확인	100	· PTCH-SMO-GLI1, 2 유전자 및 단백질 발현 수준에 대한 실험 진행. · Hedgehog 신호가 지방구세포 분화억제를 유도하고 비만을 억제하는 것을 확인.
(주)엘파운더	감국 추출물 세포독성 저항성 균주 선별 (Resistance micro-bium cell)	100	· 감국 세포독성에 적응하는 균주 선별 총 11개의 균주에서 세포독성이 없는 것을 확인.
	지방세포 분화억제 유산균 세포주 선별	100	· 최종 4개의 균주를 선별하고 최종적으로 <i>L. lactis</i> 를 선별.

			· 3T3-L1 세포주를 통해서 지방구세포 분화 억제를 확인.
	감국 다이어트 제품화	100	· 이너핏맘 상품 출시(상표출원 2건)
삼성생약(주) 농업회사법인	감국 재배기술 연구	100	· 토지조사를 통해서 영양분의 보충과 3가지 비료의 비율별로 차이점을 두어 비교. · 최종적으로 꽃잎의 맺힌 수로 확인
	항산화 분석	100	· 감국 추출물, 발효물의 DPPH, 환원력, linoleic, 총 페놀, Flavonoid 분석
농업회사법인 안심촌농원(주)	원료제공(감국 재배)	100	· 감국을 5월부터 재배하여 11월에 최종적으로 재배 후 꽃잎은 건조시킴
	감국 된장 출시	100	· 감국 발효물을 자사 제품 중 하나인 된장에 접목시켜 감국 된장 제품 출시

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

1) 목표 미달성 시 원인(사유)

- ① 2020년도 중국발 코로나 19로 인해 투자 유치가 쉽지 않았음. 전체적인 해외를 비롯한 국내 식품 시장이 원활하지 못했으며, 수출 또한 쉽지 않음 상황으로서 투자 기업들이 본 과제를 통해 출시된 제품에 대한 투자를 매우 꺼려하였음.
- ② 감국 재배법 연구에서 5월에 모종을 받아 진행을 했으나, 올 여름 장기간의 장마로 인해 토지 손실 등의 피해를 입었음. 이에 따라 가능한 재배법 연구로서 부족한 토지의 영양분을 채운거와 채우지 않은 것과 3가지 비율에 따른 비교군을 두고 나머지 부분에서 동일한 조건에서 재배법을 연구하였음.

2) 추후대책

- ① 투자유치 대책
 - 2021년도 코로나 백신이 하반기에 국내에 들어올 예정으로 이에 맞추어 투자액 유치를 진행 중에 있음. 또한 상반기에 가능하다면 코로나로 인해 거리두기가 완화되고 식품시장이 다시 활성화 된다면 투자 유치가 조금 더 앞당겨질 수도 있음.
 - 여러 기관들의 판로 패키지 지원사업 중 공영홈쇼핑 입점 또는 라이브 커머스 방송지원 등을 지속적으로 신청하고, 제품 판매에 전념하여 2022년까지 투자 유치 계획을 목표로 함.

② 후속연구의 필요성

- 감국 발효물 중 camphor이외의 물질에 대한 후속 연구가 필요함. 발효 후 물질의 변화가 일어날 예상 물질로서 chlorogenic acid, luteoloside, lureolin 등이 있으며, 감국 추출물과 감국 발효물과의 물질의 함량과 선별된 물질의 수가 다름. 발효를 통해서 특정 물질이 변해 이 물질이 지방구세포 분화에 영향을 주었을 것으로 사료됨. 물질을 GC 또는 HPLC로 선별하여 실험을 진행하고 *in vitro*와 *in vivo* 데이터로 선별작업이 필요함.
- 감국 된장은 그 효능성을 입증하기 위해 장기적인 관점에서 이화학적 근거를 찾아야 함. 감국 발효물을 첨가 후 2개월 이상부터 시작해서 최대 3년까지의 발효과정 중의 변화를 봐야하며, 샘플의 효능과 관능검사를 통해서 배합과 발효기간을 확인 할 수 있음.
- 지방구세포 분화를 조절하는 상위 신호인 AKT pathway 조절인자에 대한 후속 연구가 필요함. 본 연구에서는 PTEN과 AKT가 동시에 발현이 되었으며 이는 AKT를 조절하는 다른 인자에 의한 것으로 사료됨, 이는 hedgehog 신호와의 관계를 확인 할 필요가 있음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

1) 감국 발효물 적용 제품의 원료 표준화를 통한 사업화

① 인간적용 시험을 통한 특허권 획득

- 원료표준화에 대한 기준규격을 통해 인간적용 효능 용량을 확보하고 특허권 획득 (임상용 시제품 추가 개발).
- 해당 기능성소재를 활용하여 시제품 지원 사업을 추가하고 식약처 미팅을 통한 연구내용의 적절성, 프로토콜에 대한 검증 요청 (개별인정소재 승인 준비 및 개시).
- 감국 발효물을 활용한 시제품 추가개발 (체지방감소의 기능성을 갖는 고시형 원료를 이용하여 당 개발소재의 부원료로 이용하여 기능성을 증대 시킴).

2) 제품의 제제 개발 (제제의 형태적 측면)

① 고형제제

- 고형제제(정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제)의 개발 시 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어서 조제하고, 율활제를 사용하여 제품의 활용도 증대.

② 액상제제

- 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있음.

③ 제품화 제형 변화

- 제형에 따라 부형제를 선택하여 사용하며, 경도, 마손도, 안식각, 수분, 입도, 충전성, 붕해, 코팅, 안정성 등 다양한 물성학적 요인들을 고려하여 가배합비를 확인.

3) 홍보 및 마케팅 개선

① 국내외 전시회를 통한 제품홍보.

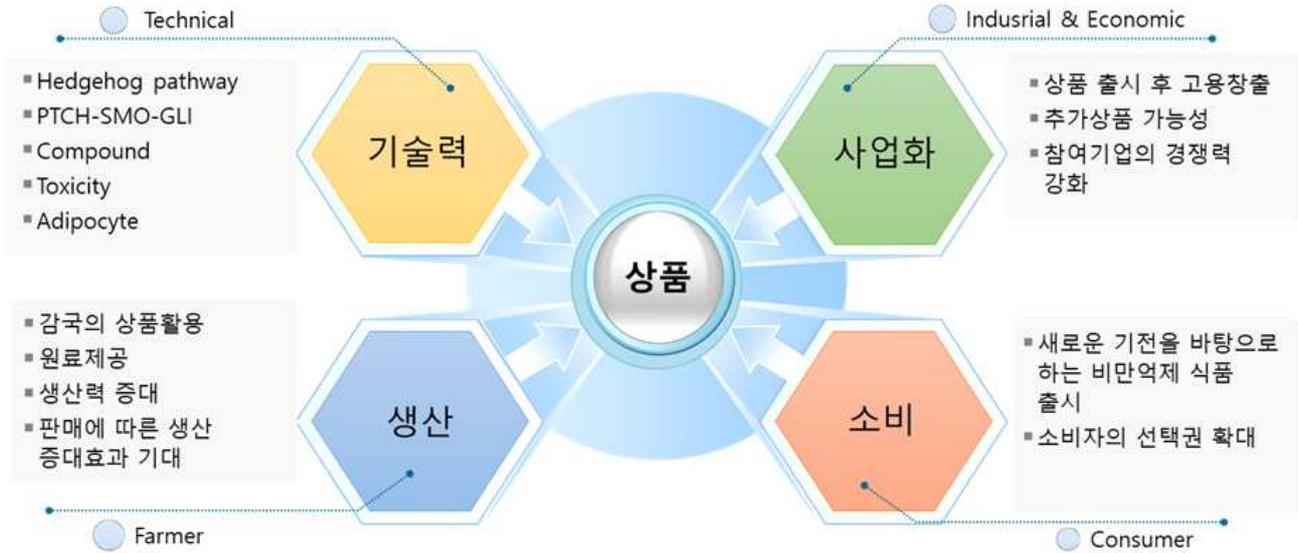
② 건기식 제조업체와의 OEM 계약을 진행하고 제품의 단가 개선을 통한 이익창출.

③ 해외 국가 수출을 위한 유통망 확보.

④ 소셜 네트워크 (쿠팡, 티몬, 지마켓, 위메프 등)을 활용.

⑤ 홈쇼핑 입점을 통한 제품판매 이익 개선.

식품산업 이외의 산업으로의 가능성



<그림91> 파급효과

연구성과



<그림92> 활용계획

붙임. 참고문헌

- Chen J, Bao C, Kim JT, Cho JS, Qiu S, Lee HJ. 2018. Sulforaphene inhibition of adipogenesis via Hedgehog signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem.* 66(45):11926–11934.
- Choi BH. 1993. Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. *Yensei Medical Journal.* 34(1):1–10.
- Cousin W, Fontaine C, Dani C, Peraldi P. 2007. Hedgehog and adipogenesis: fat and fiction. *Biochimie.* 89(12):1447–1453.
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 50(17):4959–4964.
- Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. 1992. Antioxidative substances in leaves of polygonum hydropiper. *J Agric Food Chem.* 40:1349–1351.
- Hemmings BA, Restuccia DF. 2012. PI3K–PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(9):a011189.
- Hong SM, Chung EC, Kim CH. 2015. Anti-obesity effect of fermented whey beverage using lactic acid bacteria in diet-induced obese rats. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 35(5):653–659.
- Ingham PW, Nakano Y, Seger C. 2011. Mechanisms and functions of hedgehog signalling across the metazoa.. *Nat Rev Genet.* 12(6):393–406.
- Ji TJ, Sohn HJ. 2007. Method of preparing *Doenjang*, a Korean soybean paste, containing extract of *Chrysanthemum indicum* Linne and the chrysanthemum *Doenjang* obtained from the method. Korean Patent. 10-0775639.
- Kang ES, Ham SA, Hwang JS, Lee CK, Seo HG. 2013. Effect of *Garcinia cambogia* extract on the adipogenic differentiation and lipotoxicity. *Korean J Food Sci An.* 33(3):411–416.
- Kim JB, Park J. 2002. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *EnM.* 17(1):1–9.
- Lew LC, Choi SB, Khoo BY, Sreenivasan S, Ong KL, Liong MT. 2018. *Lactobacillus plantarum* DR7 reduces cholesterol via phosphorylation of AMPK that down-regulated the mRNA expression of HMG–CoA reductase. *Korean J Food Sci An.* 38(2):350–361.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina.

Journal of Ethnopharmacology. 71(1-2):109-114.

- Nepali S, Cha JY, Ki HH, Lee HY, Kim YH, Kim DK, Song BJ, Lee YM. 2018. *Chrysanthemum indicum* inhibits adipogenesis and activates the AMPK pathway in high-fat-diet-induced obese mice. *Am J Chin Med*. 46(1):119-136.
- Oyaizu M. 1986. Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr*. 44:307-315.
- Park SY, Kim S, Lim SD. 2018. The inhibitory effect of *L. Plantarum* Q180 on adipocyte differentiation in 3T3-L1 and reduction of adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Korean J Food Sci An*. 38(1):99-109.
- Rubin LL, de Sauvage FJ. 2006. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 5(12):1026-1033.
- Scales SJ, de Sauvage FJ. 2009. Mechanisms of hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 30(6):303-312.
- Shi D, Lv X, Zhang Z, Yang X, Zhou Z, Zhang L, Zhao Y. 2013. Smoothed oligomerization/higher order clustering in lipid rafts is essential for high Hedgehog activity transduction. *J Bio Chem*. 288(18):12605-12614.
- Uchida K, Sun W, Yamazaki J, Tominaga M. 2018. Role of thermo-sensitive transient receptor potential channels in brown adipose tissue. *Bio Pharm Bull*. 41(8):1135-1144.
- Wang LC, Pan TM, Tasi TY. 2018. Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26(3):973-984.
- Xiong Q, Kadota S, Tani T, Namba T. 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Bio Pharm Bull*. 19(2):1580-1585.
- 관계부처합동. 2018. 국가 비만관리 종합대책. 보건복지부. 1-39.
- 조남호. 2017. [10조 다이어트 시장] 벌써 10兆 ‘살찌는’ 다이어트 시장. 이투데이. etoday.co.kr/news/view/1486530.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호를 통한 다이어트 식품 기술개발				
	(영문) Diet food technology development project through Hedgehog signal using <i>Chrysanthemum indicum</i> L.				
주관연구기관	연성대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 연성대학교	
참 여 기 업	(주)엘과운더 농업회사법인안심촌농원(주) 삼성생약(주)농업회사법인			(성명) 최 재 영	
총 연구 개발비 (160,000 천원)	계	160,000 천원	총 연구 기간	2019. 12 .02 .~2020. 12 .01. (1 년)	
	정부출연 연구개발비	120,000 천원	총 참 연 구 원 수	총 인 원	6 명
	기업부담금	40,000 천원		내부인원	1 명
	연구기관부담금	-		외부인원	5 명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>목표 : 본 연구는 국내에서 생산되는 국화(감국)을 활용하여 지방진구세포 신호인 hedgehog 신호를 기반으로 한 지방 분화를 억제하는 감국 발효물을 개발하여 다이어트에 영향을 주는 식품을 개발하여 사업화 및 상용화를 달성하는 것.</p> <p>성과 : 특허출원 2건, 특허등록 1건, 상표출원 2건, 기술이전 5건 (기술료 4,620천원), 제품화 2건, 매출액 58,190천원, 고용창출 1명, 인력양성 1명, 논문 2건 게재(비 SCI 2건)</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 감국의 추출법 및 배양법(유산균 선별) 규격화 - 감국 추출물 및 감국 발효물의 hedgehog 신호 영향 확인 - Hedgehog 신호를 기반으로 지방억제 확인 및 메커니즘 확립 - 감국 발효물의 제조공정 수립 및 생산 효율성 개발 - 감국 발효물을 활용한 제품화 및 사업화 - 감국 추출물에 독성에 적응하는 최적의 유산균 선별 - Hedgehog 신호를 통해 지방세포 분화 억제 확인 - 감국 추출물의 유산균 배양법 및 추출법 확립 - 감국 발효물의 공정과정 개선 및 생산의 효율성 확립 - 감국 발효물의 비만억제확인 - 개발된 감국 발효물을 활용한 식품 개발 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 2건, 특허등록 1건, 상표출원 2건, 기술이전 5건 (기술료 4,620천원), 제품화 2건, 매출액 58,190천원, 고용창출 1명, 인력양성 1명, 논문 2건 게재(비 SCI 2건) - 감국 발효물을 활용한 시제품 추가개발, 출시된 제품의 SNS 또는 기사, 잡지를 활용한 홍보, 제품의 부합제 비율개선 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	119116-01		
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	식품			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내산 국화(감국)를 활용한 hedgehog 신호를 통한 다이어트 식품 기술개발			과제유형	(개발)
연구기관	연성대학교 산학협력단			연구책임자	최재영
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.12.02. ~ 2020.12.01.	120,000	40,000	160,000
	계	2019.12.02. ~ 2020.12.01.	120,000	40,000	160,000
참여기업	(주)엘파운더, 농업회사법인안심촌농원(주), 삼성생약(주)농업회사법인				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020.01.11.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
연성대학교 산학협력단	조교수	최재영

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약
|
최재영

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

주관기관 및 협동기관의 노력으로 사업화 지표를 상회하는 결과를 도출함. 본 연구의 결과는 기존에 연구되었던 lipogenesis 신호(AMPK, C/EBP, PPAR 등)에 의한 지방분화 억제가 아닌 지방전구세포의 신호인 hedgehog 신호로 지방분화 억제 효과를 기반으로 한 연구로서 국내 산 농산물인 감국을 활용하였으며, 이에 따른 배양과정 및 추출법 등 사용화가 가능한 매우 우수한 기술을 확보한 것으로 사료됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

본 연구를 통해 개발된 감국 발효물의 hedgehog 신호를 활용한 지방분화 억제기술은 다이어트 식품 시장에 새로운 방향을 제시할 것으로 사료됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구로 개발된 감국의 추출법 및 배양법, hedgehog 신호에 의한 지방분화 억제효과 및 메커니즘, 감국 발효물의 제조공정 수립 및 생산의 효율성 확립은 추가 사업화를 위한 기초 자료가 될 것이며, 특히 다이어트 식품 시장과 감국재배 농가의 새로운 수익 창출의 가능성을 기대할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

주관기관 및 협동기관의 연구진은 코로나로 인한 회의의 어려움에도 8회의 회의를 통해 유기적인 사업 진행을 당설하였으며, 회의를 통해서 성과 공유 및 문제점을 극복하려고 노력하였음. 이와 같이 목표한 연구개발을 성실히 수행한 것으로 사료됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

본 연구를 통해 특허 출원 2건, 특허 등록 1건, 상표 출원 2건, 비SCI 논문게재 2건을 1년 동안의 사업 수행 기간 안에 달성하였으며, 이는 목표대비 우월한 성과라고 할 수 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
감국의 추출법 및 배양법의 규격화 및 감국 발효물의 제조공정 수립 및 사업화	20	100	감국의 추출법 및 감국독성 유산균 선별, 배양법의 규격화, 상용화를 위한 감국 발효물의 제조공정 수립, 효율성 개선
감국 추출물 및 감국 발효물의 hedgehog 신호에 대한 영향 확인	20	100	Hedgehog 신호에 대한 영향 확인
Hedgehog 신호를 기반으로 하는 지방분화억제 메커니즘 확립	20	100	hedgehog 신호에 의한 지방분화억제 확인 후 메커니즘 확립
제품화 1건 및 매출 50,000천원 및 투자유치 1억원, 고용창출 1명	30	80	제품화 2건, 매출액 58,190천원, 고용창출 1명, 인력양성 1명을 달성했으나, 코로나의 장기화로 인해 투자유치 목표를 달성하지 못함
특허 출원 2건, 기술이전 3건	10	100	특허 출원 2건, 등록 1건, 상표출원 2건 달성, 기술이전 5건 달성
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구의 목표 달성을 위해 주관연구기관을 포함한 참여기관의 유기적인 협력으로 연구를 성실하게 수행하였으며, 그 결과 정량지표를 대부분 달성하였음. 또한 본 연구를 통해 개발된 기술은 관련 연구 분야의 발전에 새로운 패러다임을 구축할 것으로 사료됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

연구목표 중 정량지표(투자유치제외) 및 정성지표를 모두 연구기간 중에 모두 달성하였음. 투자유치의 경우 코로나 19의 장기화로 인해 식품산업의 침체화로 시작품에 대한 투자유치가 매우 어려웠음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

시제품의 SNS, 기사, 잡지를 통해 추가 홍보 예정이며, 공영홈쇼핑 입점 및 라이브 커머스 방송지원 등을 활용해 투자유치를 진행 할 계획이며, 이미 출시된 2 제품의 시장 반응을 확인 후 개선에 여지가 있음. 제품의 배합과 조합에 관한 추가 연구가 필요하며, 감국 발효물의 지표물질에 대한 후속 연구가 필요함. 지방구세포 분화 관련 추가 메커니즘 확인과 *in vitro*, *in vivo*의 데이터도 추가로 필요함.

IV. 보안성 검토

○ 본 연구는 해당 없음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

단위													IF						등)
	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	0	0	10	10	30	20	0	10	10	0			0	0	0	0	0	0
최종목표	2	0	0	3	3	3	250	150	2	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0
연기간내 달성실적	4	1	0	5	4.62	2	58.19	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0
달성율(%)	200	200	0	166.7	154	66.6	23	0	50	0	0	0	100	0	0	0	200	0	0

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	감국 발효물을 유효성분으로 함유하는 지방세포 분화 억제용 조성물
②	감국 추출물 또는 감국 발효물에 함유된 camphor를 유효성분으로 하는 지방세포 분화 억제용 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√	√			
②의 기술					√	√				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	감국 발효물의 제품화 및 개선
②의 기술	camphor의 새로운 역할에 따른 과학적 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표						
	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화				기술인 증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용)
	특허출	특허등	품종등	건수	기술료	제품화	매출액	수출액		고용창	투자유	논문 SC I			논문 비 SC	학술발	

	원	록	록						출	치			I	균	표			용	시	등)
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건		건		명			
가중치	10	0	0	10	10	30	20	0	10	10	0			0	0	0	0	0	0	0
최종목표	2	0	0	3	3	3	250	150	2	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
연구기간내 달성실적	4	1	0	5	4.62	2	58.19	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0
연구종료후 성과창출 계획	0	0	0	0	0	1	19.18	150	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	감국 발효물을 유효성분으로 함유하는 지방세포 분화 억제용 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	1,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	24개월	실용화예상시기 ³⁾	2020
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	사업화 기반요건 및 판매가능여부		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

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