11-1543
000-001
398-01

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

잣송이 기능성원료 연구개발 및 제품화

잣송이 추출물을 이용한 체지방조절 최종보고서

2016

농림축산식품부

발 간 등 록 번 호
11-1543000-001398-01

잣송이 추출물을 이용한 체지방조절 기능성원료 연구개발 및 제품화 최종보고서

2016 . 07 . .

주관연구기관 / (주)키토라이프
협동연구기관 / 한국건강기능식품협회
부설 한국기능식품연구원
경희대학교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "잣송이 추출물을 이용한 체지방조절 기능성원료 연구개발 및 제품화"(개발기간 : 2013. 07. ~ 2016. 07.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016 . 07 . .

주관연구기관명 : (주)키토라이프 (대표자) 정 득 래 (인)
협동연구기관명 : 한국건강기능식품협회 (대표자) 양 주 홍 (인)
부산 한국기능식품연구원
: 경희대학교 (대표자) 홍 충 선 (인)
참여기관명 : (주)키토라이프 (대표자) 정 득 래 (인)

주관연구책임자 : 정 득 래
협동연구책임자 : 허 석 현
: 이 정 민
참여기관책임자 : 정 득 래

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 연람에 동의합니다.

- 1 -

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>113019-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2015.07.16~
2016.07.15</td><td>단 계 구 분</td><td>3차년/
3차년</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>세부 사업명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">잣송이 추출물을 이용한 체지방조절 기능성원료 연구개발 및 제품화</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">정특래</td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 4 명
내부: 4 명
외부: 0 명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부:150,000
천원
민간:51,000
천원
계:201,000
천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 35 명
내부: 12 명
외부: 23 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:450,000
천원
민간:153,000
천원
계:603,000
천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">(주)키토라이프 및 기술연구소</td><td colspan="2">참여기업명
(주)키토라이프</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
<tr><td colspan="4">1) 잣송이 추출조건 확립 및 표준화
◦ 원활한 원재료 수급을 위한 지역별 원재료 수급계획 수립
◦ 유효성분 추출/농축공정 개발
◦ 대용량 추출방법의 확립 및 원료 표준화
2) 기능/지표성분 선정 및 분석조건의 최적화
◦ 초임계 잣송이 추출물 내 많이 함유되어 있는 성분 PK-E1 성분으로 기능/지표성분 확인 및 분석 조건 검토
3) 기능/지표성분 분석법 확립 및 Method validation</td><td colspan="2">보고서 면수

190면</td></tr>
</table>

◦ PK-E1의 분석방법 확립 및 시험법 검증(Method Validation) 4) 초임계 잣송이 추출물 내 성분확인 ◦ 초임계 잣송이 추출물 내 유효성분 검토 및 확인 5) 초임계 잣송이 추출물의 기준규격 설정 ◦ 제조공정별 기능/지표성분 함량 변화 확인 ◦ 기능/지표성분, 유해물질 기준규격 설정 ◦ 잔류농약, 영양성분 확인 6) 초임계 잣송이 추출물의 안정성 확인 ◦ 유통기한을 확인하기 위한 초임계 잣송이 추출물 기능성 원료의 안정성 확인 7) In vitro 실험을 통한 잣송이 추출물 기능성 효과 평가 ◦ 여러 조건의 초임계 추출물에서 in vitro 실험을 통해 가장 효과가 뛰어난 조건의 추출물 선발 ◦ 선택한 추출물의 in vitro 실험을 통한 기능성 확인 8) 선택한 추출물을 이용한 In vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가 ◦ 선택한 추출물의 동물 독성 시험을 통해 안전 농도 확인 ◦ 선택한 추출물의 고지방식이로 유도한 비만 동물모델에서 체지방감소 효과 확인 9) 시제품을 이용한 in vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가 ◦ 고지방식이로 유도한 비만 동물모델에서 시제품의 체지방감소 효과 확인 10) GLP 기관에서의 동물독성 시험 ◦ (주)바이오톡스텍에서 단회투여독성시험, 4주반복 용량결정시험, 13주반복투여독성시험+4주회복시험, 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험등 11) 인체적용시험을 위한 제재화(capsule) ◦ 초임계 잣송이 추출물을 활용한 캅셀, 정제 등 다양한 제형검토 12) 인체적용시험 ◦ 인체적용시험은 경희대학교병원 내분비내과 이상열교수, 경희대학교 동서의학대학원 임상영영연구소 소장인 임현정 교수님과 공동으로 경희대학교병원에서 진행중임. 13) 기능성원료 개별인정 신청 14) 건강기능식품 제형 개발통한 시제품 생산 ◦ 3차년 과제 종료기한인 2016년7월15일까지는 인체적용시험결과가 도출되기에는 시간적으로 어려운 상황입니다. 따라서 개별인정 신청과 제품화는 본 과제의 최종보고서가 제출된 이후에 진행될 예정입니다. ◦ 가평군의 지원으로 설립된 (주)KOREA PINE과 특허출원명 “초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물”의 내	

초임계 잣송이 생산기술 허여 계약을 체결하여 매출액 중 3%를 로얄티로 받기로 계약함.	

코드번호	D-01

연구의 목적 및 내용	1. 연구개발 목적 - 우리나라 고유 약용식물인 잣송이(Korean Pine Cone)를 이용하여 비만감소 (체지방감소) 기능성 효과를 동물실험, 인체적용시험 등의 과학적, 객관적 증명을 통하여 비만 예방 및 비만 보조식품제 연구개발 - 식품의약품안전처의 건강기능식품 체중조절용 개별인정제품으로 신청 2. 연구개발의 내용 - 건강기능식품 개별인정형 기능성원료로 인정받기 위해서는 초임계 잣송이 추출물의 원료표준화, 안전성, 기능성 등에 대한 여러 가지 과학적 평가가 수반되므로 식품의약품안전처의 평가기준을 바탕으로 연구개발 ① 초임계 잣송이 추출물 기능성원료 생산의 표준화를 위한 기능/지표성분 설정, ② 기능성 원료생산 추출방법 확립 및 수율 향상을 위한 최적화 추출조건 설정 ③ 기능성원료의 기능/지표성분, 위해물질 등의 규격을 설정하여 원료 생산의 표준화 ④ in vitro, in vivo 등을 통한 잣송이 추출물의 체지방감소에 미치는 유효성 검증 및 작용 Mechanism 확인 ⑤ 무작위배정, 이중맹검 위약대조 임상시험을 통한 잣송이 추출물의 체지방감소에 미치는 유효성과 안전성 확인 및 건강기능식품 기능성원료로써 개별인정 - 초임계 잣송이 추출물 건강기능식품 제품화를 위한 원료표준화, 시제품생산, 제형화 ① 대용량 추출방법의 확립 및 원료 표준화 : Pilot과 최신 기술공정인 Scale-up ② 기능성원료 시제품 생산 및 인체적용시험 적용제품 생산 ③ 건강기능식품 제형화 및 품질관리, 제품개발 - 국내 초임계 잣송이 추출물 건강기능식품 제품화 사업추진
연구개발성과	- (사)가평잣협회등과 업무협약(MOU)을 통해 원료 확보 - CO_2의 임계점인 71기압, 31℃ 이상의 조건에서 150, 200, 250, 300, 400bar의 압력과 40, 50, 60, 70℃의 온도 범위에서 추출 수행. - 순환식 초임계 추출장비(용량 : 50L, CO_2 유량 : 60L/hr)를 이용하여 잣송이를 추출한 결과, 평균 3.7%의 추출 수율 확립. - 미세결정셀룰로오스를 부형재로 하여 초임계 잣송이 추출물을 분말화를 수행하였고, 초임계 잣송이 추출물 분말 1Kg당 150,000원 이내로 제조가능 하기에 기존 체지방감소 기능성 원료와 가격경쟁 우위에 있을 수 있다고 판단됨.

연구개발성과	- 초임계 잣송이 추출물 중 유효성분 분석 ① Terpene류 확인 ② 가스크로마토그래피 질량분석기(GC/MS)을 통한 초임계 잣송이 추출물 성분 확인 ③ Oleamide 확인 시험 및 지방산 분석 ④ 초임계 잣송이 추출물 중 Phenol 류 확인 ⑤ 초임계 잣송이 추출물 중 함량이 많은 유효성분 분리정제 - 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 분석조건 확인 :고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용한 PK-E1 확인 - 특이성 (Specificity) : HPLC 분석시 검출시간(Retention time으로 검토) - 직선성 (Linearity) : 6개 농도로 3반복 직선성 확인 - 시료 직선성 (Sample Linearity) : 6개 농도로 3반복 직선성 확인 -정확도(Accuracy),회수율(Recovery) : 3개 농도로 원료를 첨가하여 회수율 검토 - 정밀도(Precision) : 4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가 - 범위(Range) : 직선성, 정확성, 정밀성 검토 후 범위 설정 - 가평지역,홍천지역 잣송이분말 중 PK-E1 확인 - Oil red O staining - Glycerol release assay - 지방 대사 관여 효소의 발현을 확인을 위한 real time PCR - 부검을 통한 장기 이상 확인 - 혈액을 이용한 생화학 분석 - 혈중 lipid profiles 분석 - 지방 조직에서의 지방대사 관련 인자들의 RNA 발현 확인을 위한 real time PCR - SPCE의 조제물 중 Dehydroabietic acid의 농도분석을 위한 본 분석법은 적합한 것으로 확인. 또한 부형제(Corn oil)내에서 12.5 및 400mg/ml 농도의 조제물은 균질하였으며 실온 4시간 및 냉장 7일간은 안정한 것으로 확인 - SPCE을 랫드에 단회 경구투여한 결과 개략의 치사량은 암수 모두 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단 - 본시험 조건하에서 시험물질 SPCE의 마우스 골수세포의 소핵유발성은 음성으로 판단 - SPCE의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단 - 본 시험조건에서 시험물질 SPCE의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단

연구개발성과	-SPCE을 Sprague-Dawley계 암수 랫드에 4주간 반복 경구투여한 결과, 암수 2,000mg/kg/day 용량에서 체중증가 억제(수컷), BUN(수컷) 및 ALP의 증가가 관찰되었고, 암수 500, 1,000 및 2,000mg/kg/day 용량에서는 Crea, T-Chol, 간장 및 신장의 무게의 증가 또는 증가 경향이 관찰되었다. 따라서 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 2,000mg/kg/day를 고용량으로 설정하고 공비 3으로 하여 667 및 222mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단 - 본 시험조건하에서 SPCE의 무독성량(NOAEL)은 수컷 222mg/kg/day 및 암컷 667mg/kg/day로 판단된다. - 초임계 잣송이 추출물 9Lot에 대한 기능/지표성분 함량 확인 - 기능/지표성분(Dehydroabietic acid), 유해물질(납, 총비소, 카드뮴, 총수은, 대장균군, 세균수) 기준규격 설정 - 수입 잔류농약 59종, 영양성분(열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 나트륨) 확인 - 초임계 잣송이 추출물의 유통기한을 2년으로 예상 ① 25, 35, 40℃ 세 온도에 저장 ② 5개월 이상 저장하면서 일정 기간마다 꺼내어 기능/지표성분등의 변화 확인 ③ 저장기간 동안의 변화량을 아레니우스식을 이용하여 유통기한 산출 - 혈중 lipid profiles 분석 - 지방 조직에서의 지방대사 관련 인자들의 RNA 발현 확인을 위한 real time PCR - 인체적용시험은 경희대학교병원 내분비내과 이상열교수, 경희대학교 동서의학대학원 임상영영연구소 소장인 임현정 교수님과 공동으로 경희대학교병원에서 진행중에 있으나, 3차년 과제 종료기한인 2016년7월15일까지는 인체적용시험결과가 도출되기에는 시간적으로 어려운 상황입니다. 따라서 개별인정 신청과 제품화는 본 과제의 최종보고서가 제출된 이후에 진행될 예정입니다. - 또한 가평군의 (주)KOREA PINE과 특허출원명 " 초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물"의 내 초임계 잣송이 생산기술 허여계약을 체결하여 매출액 중 3%를 로얄티로 받기로 계약함.
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 우리 고유 약용식물인 초임계 잣송이 추출물의 과학적 임상시험을 통해 고부가가치 기능성식품, 건강기능식품 제품화와 국제적 경쟁력 있는 제품개발로 세계화 추진 - 식품의약품안전처의 개별인정형 건강기능식품 인정되면 건강기능식품 및 기능성소재 시장의 확대 등의 파급효과와 세계 건강기능식품 시장 진출 ○ 초임계 잣송이 추출물 건강기능식품 제품화는 융복합기술산업인 제6차 고부가가치사업으로 국가경제와 지역경제 활성화, 농가소득 증대 등에

기여

- 원천기술 확보로 인한 국내 기능성원료 수입대체 및 수출 증대효과와 국내 기능성원료의 안정된 공급으로 지역농민의 안정적 생산관리 및 농가소득 확대

○ 초임계 잣송이 추출물의 건강기능식품 제품화 성공시 기능성원료로서 50억 정도의 매출이 가능하며, 관련산업 파급효과 시 약 500억 이상의 경제적 가치를 기대

- 초임계 잣송이 추출물의 경우 현재 사용되지 않는 부산물을 활용하므로 추출물원료 15만원/kg 단가를 예상하므로, 관련 경쟁 원료(15-18만원/kg)와 비교해 원료 경쟁력이 있음

- 잣송이 원료 : 1000원/kg (추출수율 : 10%, 원료단가 : 10,000원/kg)
- 제조가공 및 기타 비용 (용매 포함) : 140,000원/kg 추출물
- 예상 공급가격 : 150,000원/kg

○ 기능/지표성분 함량의 효율적인 추출방법 (초임계추출법)에 따른 최적화와 추출 조건 설정

- 세계적으로 처음 잣송이 원료를 초임계추출법으로 생리활성성분 추출하여 기능성분 및 지표성분 설정과 과학적 건강기능식품 기능성 평가 및 과학적 기전 규명 향상을 위한 최적 조건 설정

○ 기능성원료 *in vitro* 및 *in vivo* 등의 실험 실시하여 효능평가 및 인체적용시험을 통한 체지방감소 기능성 및 안전성 확보(식약처 한시적 원료인정)와 안정적 최종 제품 제형화

○ Pilot과 최신 기술공정인 Scale-up을 통한 기능성원료의 대량생산공정의 최적화를 통한 제품원료생산의 표준화 및 품질관리, 생리활성성분의 최대 수율증대

○ 건강기능식품의 과학적 연구개발 과정과 선진국 대비 기술수준 향상 정도

성능지표	현재기술수준 비교		기술개발 최종목표		
	국내	선진국	1차년도	2차년도	3차년도
① 특성성분(지표성분)/성공율(%)	90%	100% (미국 NIH)	분석법 및 분리 정제기술 확립(100%)	-	-
② 유효성분 규명/분리효율(%)	80%	100% (미국 NIH)	표준공정 validation test 80%	표준공정 validatio test 확립(100%)	-
③ 표준분석법 정립/분석한계(ppb)	80%	100% (미국 NIH)	분석방법 벨리데이션	기준규격설정 (100%)	-
④ Scale up/원료대량생산 시스템구축	70%	100% (미국 NIH)	-	대량생산 양산체계 70%	대량생산 양산체계구축
⑤ 전임상 및 안전성(독성평가) 시험 평가	-	-	전임상평가	GLP 안전성 평가	한시적 원료인정
⑥ 인체적용시험	-	-	-	-	임상시험 완료
⑦ 대량 소재화 및 제형/제품화 기술	-	-	-	-	시제품 완료
⑧ 식약청 건기식 원료 개별인정 추진	-	-	-	-	식약청 개별인정 신청

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)

중심어 (5개 이내)	잣송이	체지방조절	기능성원료	건강기능식품	제품개발

< SUMMARY >

코드번호	D-02

Purpose& Contents	1. Research and Development purposes. - Using the Korean Pine Cone, in the Korea unique medicinal plant, Functional effect verification in the obesity decreasement(body fat decreasement) by scientific, objective certification through animal experiment, body Application test etc. and Research and Development in the nutritional supplements that prevent obesity. - Ministry of Food and Drug Safety application : As an individual approval for weight regulation of the health functional food application. 2. Contents of Research and Development. - To be recognized as health functional food individual approval that have functional raw material, several scientific evaluations are accompanied standardization, safety and functionality in the supercritical-Korean Pine Cone. Research and Development is implemented based on the evaluation standard of Ministry of Food and Drug Safety. ① Set up the function/indicator ingredient of the Korean Pine Cone for the functional raw material production's standardization. ② Set up the optimized extraction condition for extraction method establishment as well as yield improvement of the functional raw material production. ③ The Standardization of the raw material production by setting up the standard with the function/indicator ingredient, hazardous substances for the functional raw material. ④ Korean pine cone extracts validity and mechanism of action on body fat reduction is confirmed through in-vitro experiments and in-vivo testing. ⑤ Availability, safety confirmation influencing on the reduction of the body fat of the Korean Pine Cone are tested through clinical trial about randomization, double-blind, controlled experiments, placebo contrast. and Individual Approval is requested functional raw material of the health functional food.

	- Raw material standardization, trial manufactured goods production and formulation for commercialization of supercritical-Korean Pine Cone health-functional food. ① Establishment of Large capacity extraction method and standardization of raw material. : Pilot and Scale-up; the latest process of technique. ② Trial manufactured goods production of the functional raw material and production of health-applied trial products and quality management, product development. ③ Health functional food formulation, Quality Management and product development. - Business project for the domestic Korean Pine Cone extract health functional food's commercialization.
Results	- Raw material secure in GAPYEONG PINE NUTS ASSOCIATES through Business agreement(MOU) - Extract operation : Under the condition 71 atm, more than 31℃(CO_2 's critical point), the pressure;150, 200, 250, 300, 400bar and temperature range;40, 50, 60, 70℃ - result of extracting Korean Pine Cone using Circulation supercritical extraction (capacity : 50L, CO_2 flow rate : 60L/hr), average 3.7% extraction yield Establishment. - carried out for the powdering of supercritical-Korean Pine Cone's extract. using as excipient :Microcrystalline cellulose(MCC), supercritical-Korean Pine Cone's extract could be produced within 150,000 won per 1kg. So Korean Pine Cone could be judged that it has a price competitive advantage than existing functional raw material of decrease in the body fat. - Effective ingredient analysis in the supercritical-Korean Pine Cone's extract. ① Terpene type confirmation ② Ingredient confirmation of the supercritical-Korean Pine Cone's extract through Gas Chromatography/Mass Spectrometer(GC/MS) ③ Oleamide confirmation trial and the fatty acid analysis. ④ Phenol type confirmation in the supercritical-Korean Pine Cone's extract ⑤ separate purification : having high content effective ingredient in the supercritical-Korean Pine Cone's extract.

Results	- PK-E1 analysis condition confirmation in the supercritical-Korean Pine Cone's extract. :PK-E1 confirmation using the high pressure liquid chromatograph(HPLC) - Specificity : Reviewing Retention time in the HPLC Analyzing. - Linearity : verification in the 3 repeat linearity as 6 unit concentration. - Sample Linearity : verification in the 3 repeat linearity as 6 unit concentration. - Accuracy, Recovery : Recovery rate review; adding as 3 unit concentration of raw material. - Precision : implement repeat-reproducibility and exactitude-evaluation among daily, equipment, experiment, tester to 2 experimenters with 2 types equipment in the 4 days. - Confirming of the PK-E1 in Korean Pine Cone powder at Gapyeong, Hong chion area. - Oil red O staining. - Glycerol release assay. - Real time PCR : confirm the enzyme's expression concerning the fat metabolism. - Confirmation the organ's abnormality through autopsy. - The Biochemistry is analyzed by using blood. - Analysis of the lipid profiles in blood. - Real time PCR : Confirmation of the RNA expression related to fat metabolism in lipid tissue. - In addition, Preparation of 12.5 and 400mg / ml concentration in the excipient (Corn oil) is homogeneous at room temperature was 4 hours and 7 days cold storage stable as confirmed. - We progressed single oral administration for rat. Consequently, An outline lethal dose is exceed 2,000mg/kg both sexes. - Under the final test condition, In the mouse's merrow cell, micronucleus formation that is due to SPCE-test material is concluded negative results. - SPCE's chromosomal abnormality is concluded negative result. - Under the final test condition, SPCE's gene mutation formation is negative results. - After the oral administration of the male and female rats based the SPEC to the repeated for 4 weeks, at the dose of the male and female

Results	2,000mg / kg / day, body weight increase inhibition in capacity (male), BUN (male) and the ALP increase were observed. and In the Crea and the T-Chol, increase or increasing tendency of the weight of both liver and kidney were observed at the dose of male and female 500, 1000 and 2,000mg / kg / day. Thus, the 13 weeks repeated dose oral toxicity study was considered to set a 2,000mg / kg / day in capacity. It is reasonable to be set up by a 3 azeotropic 667 and 222mg / kg / day in the low-dose and medium capacity. - Under the final test condition, SPCE's Non-toxic amount(NOAEL) is 222mg/kg/day for male-rat and 667mg/kg/day for female-rat. - Function/indicator ingredient content verification : total 9Lot of the super critical-Korean Pine Cone. - Standard set-up : function/indicator ingredient(Dehydroabietic acid),Hazardous Substances.(lead, total arsenic, cadmium, total mercury, coliforms, standard plate count) - Confirmed 92 kinds of the Imported pesticides, nutritive components.(calorie, carbohydrate, crude protein, Crude fat, moisture, ash, sodium) - The shelf life of the supercritical-Korean Pine Cone is expected as 2 years. ① storage under the three temperature.(25℃,35℃,40℃) ② On storaging supercritical-Korean Pine Cone over the 5 months, taked out and checked the change to the function/indicator ingredient each period of time. ③ During the storage periods, Variation is calculated the shelf life by using the Arrhenius equation. - Lipid profiles Analysis in blood. - Confirmation about the RNA expression related on the fat metabolism in the fat tissue : implement real time PCR. - The Clinical Trial is in progress in association with following agency. : professor. Lee sang yeol(endocrinology)Kyung Hee University Medical Center professor. Kyung Hee University Graduate School of East-West Medical Science.

Results	Until 16.07.15 ,3rd year project deadline, It is uncertain that clinical trial test's result is deducted significantly. So, individual approval apply and production will take place later submission the final report of this project. - In addition, we entered into an agreement that contains inner-supercritical Korean Pine Cone production technique with KOREA PINE corporation of Gapyeong-gun and 3% of the sales account should be received as royalties. Adopted Patent Name is as follows. "Supercritical-Korean Pine Cone composition for body fat reduction which contains the extract".
Expected Contribution	○ We will achieve a high value-added functional food, health food commercialized through scientific clinical trials of an unique medicinal plant ,supercritical-Korean Pine Cone extract. This is also due to product development looks forward to pushing globalization in an international competition. - If Ministry of Food and Drug Safety will recognize Pine Cone as an individual approval health functional food, the markets of health functional food and functional material is enlarged and advanced global health functional food market. ○ High value-added business; Convergence Industry will be expected by super critical-Korean Pine Cone health functional food production. So national and local economy will have activation, Household Income increase. - Result from original technology secure, We expect following contents. : can prepare import substitution of the domestic functional raw material and expect export enlarging effect. Local farmer can manage stable production and Farm income enlargement will be expected. ○ If the Extract of the supercritical-Korean Pine Cone health functional food commercialization is successful, it is possible to sales of approximately 50 billion as a functional ingredient. And the ripple effect of the related industry is expecting an economic value of about 50 billion or more.

Expected Contribution	- In supercritical-Korean Pine Cone case, by-product that are not currently in use will be utilize. The unit price of the extract raw material is expected ₩ 150,000 / kg Price. So Compared with the related competition material (₩150,000-180,000/ kg), there is a material Competitiveness. • Korean Pine Cone raw material : 1,000 won/kg (extraction yield : 10%, raw material unit price : 10,000 won/kg) • manufacture-processing and other costs (contain solvent) : 140,000 won/kg extract • expected supply price : 150,000 won/kg ○ Optimization and set-up the extraction condition : following effective extract method of the function/indicator ingredient content.(supercritical extraction) - Bioactive Ingredients contained in Korean Fine Cone are extracted by supercritical extraction for the first time in the world. : Set up the function material and indicator ingredient, scientific function evaluation and optimal conditions setting to improve scientific mechanism investigation. ○ Efficacy assessments of the functional raw material by carrying out the in vitro, in vivo tests. Secure to function, safety about body fat reduction through clinical trial(Ministry of Food and Drug Safety Limited-recognized materials) and stable final product formulation. ○ On applying Pilot and Scale-up; that is the latest process technology, Standardization and quality control of the product raw material production through in mass production optimization. At the same time, it can be expected to increase the maximum yield of the bioactive components of the product material. ○ Scientific research and development process of functional food and the degree of technical standard improvement compared to advanced country.

Expected Contribution	performance indicator	current technology level comparison		technology-development final objective		
		Domestic	Developed countries	1st year	2nd year	3rd year
	① specific ingredient (indicator ingredient)/Success rate(%)	90%	100% (America NIH)	Analysis method and separation refining technology establishment (100%)	-	-
	② effective ingredient investigation/ separation efficiency(%)	80%	100% (America NIH)	standard performance validation test 80%	standard performance validation test establishment(100%)	-
	③ Standard Analysis Methods establishment/analysis limit(ppb)	80%	100% (America NIH)	Analysis method validation	standard set up (100%)	-
	④ Scale up/ Building material mass-production system	70%	100% (America NIH)	-	mass production system 70%	mass production system build
	⑤ Preclinical and Safety(Toxicity evaluation) Test evaluation	-	-	Preclinical test	GLP safety evaluation	temporary raw material approval
	⑥ clinical trial	-	-	-	-	clinical trial completion
	⑦ massive material and formulation/ 제품화 technology	-	-	-	-	prototype completion
	⑧ individual-approval propel of health functional food raw material in KFDA	-	-	-	-	KFDA individual approval application
Keywords	Korean pine cone	body fat control	functional ingredient	health functional food	products development	

〈 CONTENTS 〉

Chapter 1 An overview of R&D projects ·····	20
Chapter 2 The current status of R&D in korea and abroad ·····	27
Chapter 3 Details and results of research ·····	41
3. 1. Details of research ·····	41
3. 1. 1. Extraction conditions establishment and standardization of korea pine cone ·····	41
3. 1. 2. Study of active component & setting of functional/marker component in supercritical korea pine cone extracts ·····	41
3. 1. 3. Method of set functional/marker component(PK-E1) in supercritical korea pine cone extracts ·····	41
3. 1. 4. Method validation of PK-E1 in supercritical korea pine cone extracts ·····	42
3. 1. 5. Indentfy of content of functional/marker component in korea pine cone from various regions ·····	42
3. 1. 6. Standards and Specifications of supercritical korea pine cone extracts ·····	42
3. 1. 7. Identification of stability of supercritical korea pine cone extracts ·····	42
3. 1. 8. In vitro, evaluation of functional effect in korea pine cone extracts ·····	42
3. 1. 9. In vivo, evaluation of functional effect through animal experiment ·····	43
3. 1. 10. Safety test in GLP institution·····	43
3. 1. 11. Formulation for clinical trial ·····	43
3. 1. 12. A 12 weeks, double-blinded, randomized, placebo-controlled clinical trial of korea pine cone extracts for a evaluating efficacy in of overweight adults ·····	43
3. 1. 13. Application for individual registrations as functional health foods and production ·····	45
3. 2. Results of research ·····	47
3. 2. 1. Extraction conditions establishment and standardization of korea pine cone ·····	47
3. 2. 2. Study of active component & setting of functional/marker component in supercritical korea pine cone extracts ·····	56
3. 2. 3. Method of set functional/marker component(PK-E1) in supercritical korea pine cone extracts ·····	68

3. 2. 4. Method validation of PK-E1 in supercritical korea pine cone extracts ·····	73
3. 2. 5. Indentfy of content of functional/marker component in korea pine cone from various regions ·····	81
3. 2. 6. Standards and Specifications of supercritical korea pine cone extracts ·····	81
3. 2. 7. Identification of stability of supercritical korea pine cone extracts ·····	96
3. 2. 8. In vitro, evaluation of functional effect in korea pine cone extracts ·····	105
3. 2. 9. In vivo, evaluation of functional effect through animal experiment ·····	128
3. 2. 10. Safety test in GLP institution ·····	150
3. 2. 11. Formulation for clinical trial ·····	156
3. 2. 12. A 12 weeks, double-blinded, randomized, placebo-controlled clinical trial of korea pine cone extracts for a evaluating efficacy in of overweight adults ·····	160
3. 2. 13. Application for individual registrations as functional health foods and production ·····	161
Chapter 4 Ratios of accomplishment and contribution to related fields ·····	177
Chapter 5 Application plan etc. of final research ·····	184
Chapter 6 Typical research performance in R&D projects ·····	188
Chapter 7 References ·····	189

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요 ·····	20
제 2 장 국내외 기술개발 현황 ·····	27
제 3 장 연구수행 내용 및 결과 ·····	41
3. 1. 연구내용 ·····	41
3. 1. 1. 잣송이 추출조건 확립 및 표준화 ·····	41
3. 1. 2. 초임계 잣송이 추출물 유효성분 검토 및 기능/지표성분 설정 ·····	41
3. 1. 3. 초임계 잣송이 추출물 중 설정된 기능/지표성분(PK-E1) 시험법 검토 ·····	41
3. 1. 4. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 시험법 검증(Method Validation) ·····	42
3. 1. 5. 지역별 원재료 중 기능/지표성분 함량 확인·····	42
3. 1. 6. 초임계 잣송이 추출물의 기준규격 설정 ·····	42
3. 1. 7. 초임계 잣송이 추출물의 안정성 확인 ·····	42
3. 1. 8. In vitro 실험을 통한 잣송이 추출물 기능성 효과 평가 ·····	42
3. 1. 9. In vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가 ·····	43
3. 1. 10. GLP 기관에서의 안전성 시험 ·····	43
3. 1. 11. 인체적용시험을 위한 제형화 ·····	43
3. 1. 12. 과체중 성인에서 잣송이 추출물 섭취가 체지방 조성에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험 ·····	43
3. 1. 13. 건강기능식품 개별인정 원료신청 및 제품화 ·····	45
3. 2. 연구결과 ·····	47
3. 2. 1. 잣송이 추출조건 확립 및 표준화 ·····	47
3. 2. 2. 초임계 잣송이 추출물 유효성분 검토 및 기능/지표성분 설정 ·····	56
3. 2. 3. 초임계 잣송이 추출물 중 설정된 기능/지표성분(PK-E1) 시험법 검토 ·····	68
3. 2. 4. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 시험법 검증(Method Validation) ·····	73
3. 2. 5. 지역별 원재료 중 기능/지표성분 함량 확인·····	81
3. 2. 6. 초임계 잣송이 추출물의 기준규격 설정 ·····	81
3. 2. 7. 초임계 잣송이 추출물의 안정성 확인 ·····	96
3. 2. 8. In vitro 실험을 통한 잣송이 추출물 기능성 효과 평가 ·····	105
3. 2. 9. In vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가 ·····	128

3. 2. 10. GLP 기관에서의 안전성 시험	150
3. 2. 11. 인체적용시험을 위한 제형화	156
3. 2. 12. 과체중 성인에서 잣송이 추출물 섭취가 체지방 조성에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험	160
3. 2. 13. 건강기능식품 개별인정 원료신청 및 제품화	161
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	177
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	184
제 6 장 연구개발과제의 대표적 연구실적	188
제 7 장 참고문헌	189

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03

제 1 절 연구개발 목적

○ 우리나라 고유 약용식물인 잣송이(Korean Pine Cone)를 이용하여 비만감소 (체지방감소) 기능성 효과를 동물실험, 인체적용시험 등의 과학적, 객관적 증명을 통하여 비만 예방 및 비만 보조식품제 연구개발

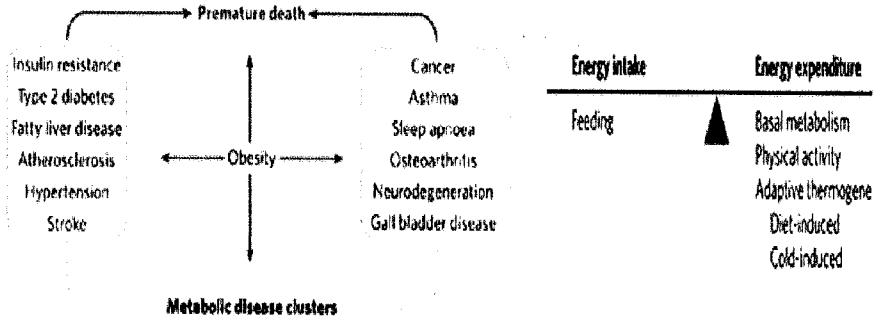
○ 식품의약품안전처의 건강기능식품 체중조절용 개별인정제품으로 신청

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구배경

가. 보건건강 측면

○ **비만이란 유전적 원인 또는 생활 습관상의 원인에 의하여 체내에 과도한 지방이 축적되는 상태**로 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 심장병, 뇌졸중, 암 등의 주요 **건강위험인자.**

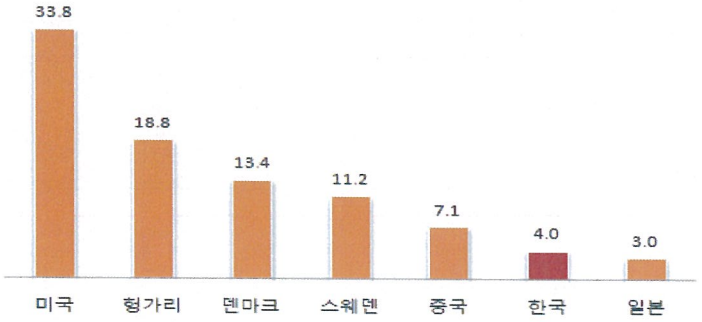


※자료 : Nutrition business journal 2006

<비만의 건강 위험성과 원인>

○ **세계보건기구(WHO)는 비만을 단순히 건강을 해치는 위험인자가 아닌 반드시 치료해야 할 질병으로 분류할 만큼 위험한 질환으로 지목**하고 있음

- **전 세계적**으로 2005년도 기준 15세 이상 성인중 **16억 명이 과체중이고 최소한 4억 명은 비만인 것으로 보고**하고 있으며 5세 이하 어린이 중 적어도 200만 명이 과체중인 것으로 보고하고 있음
- **비만 인구는 향후 10년간 50% 증가할 것이며 2015년에는 전 세계 인구의 4분의 1에 가까운 15억명 (23.4%)이 비만**이 될 것이라고 전망하여, 성인 중 약 23억 명은 과체중이고 비만은 7억 명 이상일 것으로 예상하고 있음



2009~2011년 세계 주요국 비만율 현황(단위%)<출처: OECD 등>

○ 미국(NHANES 2005-2008, 만20세 이상)의 경우 체질량지수 25kg/㎡이상 과체중 및 비만 유병률은 남자 72.8%, 여자 63.0%였으며, 체질량지수 30kg/㎡이상 비만 유병률은 남자 32.9%, 여자 35.6%였음<CDC, NCHS. Health, United States, 2010>.

○ 국**내 비만 유병률**(만19세 이상, 표준화)은 남자의 경우 1998년 25.1%에서 2007년 36.2%로 증가하여 최근 **3년간 36%정도**를 유지하고 있으며, 여자의 경우 1998년부터 2010년까지 26%수준으로 유지되고 있음(그림1).

○ **보건복지부**가 발표한 2010년 결과 **비만 유병률(만19세 이상)은 전체 31.4%, 남자 36.5%, 여자 26.4%**로 남자가 여자보다 10% 정도 높았으나, 60대 이후 여자의 비만 유병률이 남자보다 높아져 70대 이상에서는 여자의 유병률이 남자보다 10% 높았음(그림2).

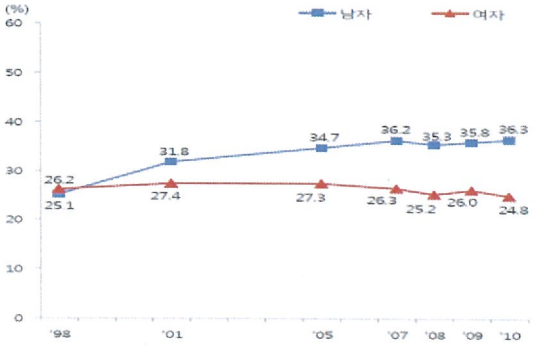


그림 1. 비만 유병률 추이(체질량지수 기준)

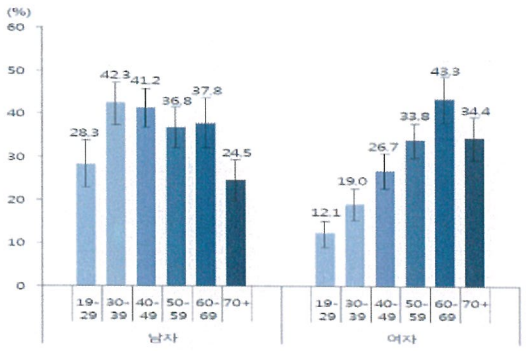


그림 2. 연령별 비만 유병률(체질량지수 기준)

※ 비만유병률: 체질량지수(kg/m^2) 25 이상인분율, 만19세 이상
<출처 : 보건복지부, 2010년 국민건강통계>

○ 최근 보건복지부가 발표한 '2011년 지역건강통계'에 따르면 체질량지수가 25이상인 비만 인구의 비율이 23.3%로 작년 22.5%보다 상승한 수치로 한국인 비만율의 최고치를 기록하였음.

○ 이처럼 비만은 단순 체형과 외형변화의 문제가 아니라 당뇨병, 고혈압, 심혈관질환(연간 1,700만명 사망)등 복합적인 합병증을 가속화 시킬 수 있는 생명을 위협하는 치명적인 질병이며 비단 성인뿐만 아니라 소아 비만도 날로 증가하는 추세로 막대한 직·간접적인 사회적 비용이 발생하는 심각한 고위험 질병임[1, 2].

○ 따라서 **비만의 적절한 예방 및 치료는 보건의학적인 면에서 뿐만 아니라 경제적, 사회적으로도 그 파급효과가 매우 크며, 비만예방 및 비만보조제인 건강기능식품 에 관한 연구의 중요성 및 필요성이 매우 크다고 할 수 있음**

나. 산업적 측면 (건강기능식품의 체지방감소)

○ **우리 몸의 체내**에 존재하는 지방, 즉 체지방은 식품을 통해 섭취되거나 간 등에서 합성된 것으로, **체지방이 필요 이상으로 축적되면 비만이 되고 이로 인해 당뇨병, 심혈관계질환 등의 질병발생 위험이 높아진다고 알려져 있음.**

- 과도하게 축적된 체지방을 감소시키면 혈압이 낮아지고 인슐린 저항성이 감소되며 혈중 지질이 개선되며, 또한 혈전 생성이 감소되고 각종 염증지표들이 낮아지는 등 건강에 도움을 주며 결국 사망률을 낮추는 효과가 있음.

○ 의약품의 비만치료제에는 식욕억제제와 지방분해효소억제제 등이 있는데, 식욕억제제(리덕틸등)는 식욕을 느끼는 뇌에 작용하여 배고픔을 덜 느끼게 하거나 포만감을 증가시키는 것이며,

- 지방분해효소억제제(제니칼등)는 음식물로 섭취한 지방을 분해하는 효소를 차단하여 섭취된 지방이 흡수되는 것을 줄이고 밖으로 배설되게 하는 것을 말함.

○ 식욕억제제 펜터민, 펜디메트라진, 디에칠프로피온, 마진돌은 의존성이나 내성이 발생할수 있어 마약류(향정신성의약품)으로 지정 관리되고 있음.

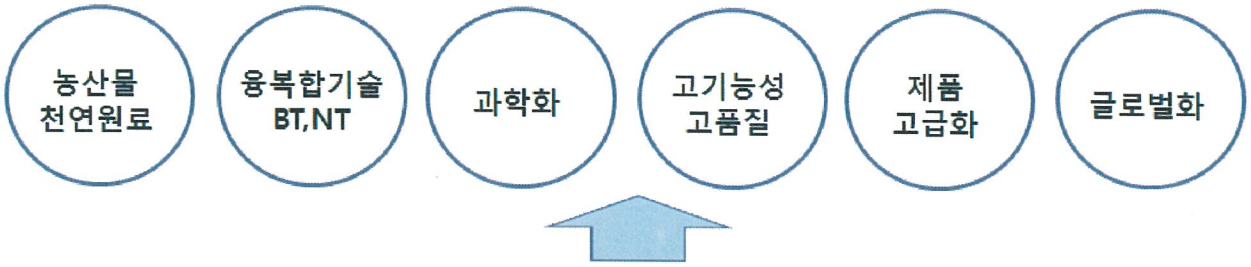
- 적절한 운동과 건강한 식사습관 없이 식욕억제제로 살이 빠진 상태를 유지하려고 하면 비만보다 무서운 부작용(치명적인 폐동맥, 고혈압, 심각한 심장병의 존성, 불안,초조, 불면, 흥분상태 등)을 얻을 수 있음.

- 비만 치료 약제가 부작용이나 건강 위해 가능성으로 인해 시장에서 퇴출되거나 사용에 대한 우려가 급증.

○ 운동부족과 식생활 변화로 비만에 의한 만성질환 증가로 대체의학에 대한 관심 증대하여 보건산업의 패러다임이 질병치료에서 질병예방으로 바뀌어 가고 있음.

2. 연구개발 필요성

우리나라 건강기능식품의 산업 분석 및 연구개발 필요성
○ 노령화 사회의 진입, 만성질환 증가로 국가 보건의료비 증가, 건강에 대한 소비자의 관심 등이 건강기능식품산업 지속적 발전 전망 ○ 농림수산물 원료를 활용 건강기능식품 기능성소재로 개발하는 것은 농림산물의 식품원료를 고부가가치 융복합 제품화하는 것 ○ 식품의 기능성을 활용하는 지식기반 산업으로 유사 산업 (제약, 한방, 화장품) 과의 접목 가능성이 높아 미래 신성장동력으로 발전할 가능성이 높음 ○ 국내 농림수산물 건강기능식품 개별인정을 위해 필요한 동물시험, 인체적용시험, 원료 표준화 등 과학화 및 글로벌화를 위한 정부의 적극적 지원



구 분	발 전 요 인	장 애 요 인
수 요	• **건강관심 증가와 식생활을 통한 질병예방의 중요성 증대로 급격한 수요증가 예상 산업분야** • **천연 유래 원료, 국내산 농산물 선호** • 고령화 가속화, 영양불균형 증가, 환경오염 및 스트레스 증가로 건강기능식품 수요 증가	• **국내 연구개발 부족, 해외 제품 높은 선호도** • 내수 위주의 생산 및 판매체계 • 건강기능식품의 라이프 사이클 짧음 • 개별인정 원료 획득 소요 기간 길고, 비용 큼 • 초기 투자에 대한 경제성 확보가 어려움
환 경	• 건강기능식품법 정착에 따른 신뢰도 증가 • **정부 차원에서의 건강기능식품 산업 활성화를 위한 기술지원 확대 추진** • 지자체별로 지역 특산물 등 천연물 이용한 동물시험 수준의 기능성 평가 연구 활발	• **한미, 한중 FTA로 인한 값싼 원료 수입증가** • **국내 원료의 안정적, 지속적 확보 어려움과 해외 소재 의존도 높음(원료가 상승 요인)** • 유사 건강식품 등의 범람과 기능성에 불신으로 소비자의 부정적 인식 만연
기 술	• **동의보감 등 전통 한방원료 사용경험 풍부** • 개별인정 획득 업체의 증가로 개별인정 획득 프로세스 정착 (추출 등 제조공정, 원료의 표준화, 기능성 평가 등)	• 개별인정 획득 소재의 인체적용 시험 투자 부족 • 기능성 평가의 다양한 바이오 마커 개발 부족 • **연구 초기 단계에 제품화를 고려하지 않은 개발로 전임상 단계에 머무르거나 제품화 실적이 저조함**

○ **대외적으로는 WTO 출범에 따른 FTA(한-칠레, 한-EU) 체결과 향후 한-미, 한-중, 한-일 FTA 예정 등으로 농수산물의 가격 경쟁력 저하**가 불가피하고, 농가의 수익 감소 예상되어, **농림수산물의 고부가가치화를 통한 전략적 식품산업육성 필요함**

- **우리 식품산업**의 영세성과 낮은 기술 경쟁력 문제를 해결하고 식품산업의 고부가 가치화와 농업의 안정적인 수요처 확보를 목적으로 식품산업의 한계(영세성, 낮은 기술력)를 극복하고 농업과 **융·복합 및 글로벌 식품산업을 선택 필요**

○ **세계 각국은 천연물 약용식물 개발에 있어 생물다양성협약, 나고야 의정서 등의 국제협약을 통해 자국 생물자원 보호를 강화**하고 있으며, 세계시장 진출을 위해서는 천연물 약용식물의 과학화, 표준화, 규격화 등에 대한 신뢰성 확보가 필요함

○ 각종 **잣나무** 관련 연구자료를 보면 우리나라 지역의 유리한 지리적, 환경적 조건을 최대한 활용함으로서 **국내외 경쟁을 극복하면서 산업화** 할 수 있는 **미래 지향적인 녹색성장 대체작목**으로 가능성이 높음

- 잣은 예부터 귀해서 우리의 일상생활에 그렇게 밀접하게 이용되지 못해 생산된 잣은 그대로 먹기도 하고 수정과 각종 음식의 부원료로 사용되어 실제로 소비되는 양에는 한계가 있어 잣의 용도를 더욱 다양하게 개발할 필요가 있음
- 1·3차 산업 위주의 산업간 불균형 심화와 기존 원물형태의 단순 생산·판매형식에서 벗어나 잣송이의 뛰어난 기능성을 이용한 기능성 제품화를 통한 제6 산업화로 새로운 고소득원 창출과 지역산업 경제 활성화 가능

○ 다이어트 용품, 비만클리닉, 약품 등을 포함해 국**내 다이어트 관련 시장 규모는 1조원 이상으로 추정되고 있으며 이중 다이어트 식품은 약 2천억원대 시장을 형성국내 외 건강기능식품 시장 규모는 점점 더 커지고 있음**

- 하지만 국내소재를 개발하여 수출한 사례는 극히 드물어, 수출 가능한 국내 소재의 개발이 이루어진다면 현재 해외원료를 이용한 개별인정원료의 수입대체효과가 기대될 뿐 아니라 국내소재의 수출이익도 창출될 수 있을 것으로 예상

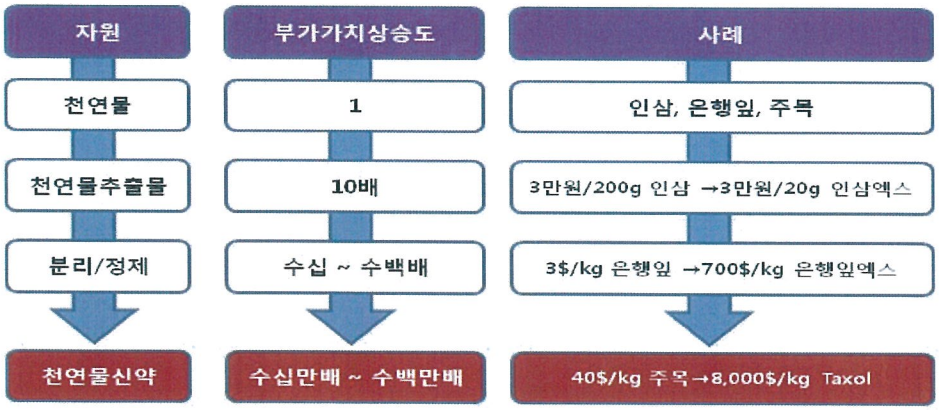
○ **체지방감소와 관련하여 개별인정 받은 소재로는** 히비스커스 등 복합추출물, 공액리놀레산(CLA), 가르시니아 추출분말(HCA), Green Mate Extract, 대두배아열수추출물, 콜레우스 포스콜리 추출물 등이 있으며 **대부분 해외 원료에 의존하고 있어 국내 소재를 이용한 체지방감소 개별인정소재는 전무한 실정**

○ 우리나라 대표적인 건강기능식품중의 하나인 인삼홍삼 건강기능식품은 부가가치율이 높고, 농업과의 연관성이 큰 산업으로 타 식품제조업에 비해 높음

- 이는 인삼홍삼가공업이 부가가치를 제고하고 후방산업인 농업은 물론, 전방산업인 타제조업이나 서비스업에 대한 연관성도 높음을 의미함

기능성 제품화의 경제적 부가가치 사업성

- **인삼제품 : 스위스 파마톤사는 고려인삼에서 추출한 사포닌으로 자양강장제인 진사나(파마톤)제품으로 매년 약 30억 달러 매출**
- **은행잎제품 : 독일 제약사는 우리나라 은행잎으로부터 혈행순환 치료제로 개발하여 매년 약 20억 달러 매출(2조4천억원)**



○ **산업계는 농림수산물 원재료를 가공하거나, 유효성분을 추출 및 농축하여 기능성 원료를 제조, 제형화를 통한 제품화 유통 및 판매 등으로 유통망**을 구성하고 있으며, 국내 중소기업은 주로 기능성식품의 완제품생산에 많이 참여하고 있음

후 방 산 업	기능성 소재 산업	전 방 산 업
• **한방 천연원료** -홍삼, 헛개나무, 백수오, 당귀, 가시오가피 등 • **농산물 원료** -알로에, 버섯류, 대나무, 복분자, 석류, 녹차 등 • **수산물 원료** -초록잎홍합, 정어리 게껍질, 조류 등	• **건강기능식품 기능성 인정 소재** -항산화 소재, 관정건강 소재, 면역증진 소재, 갱년기개선 소재, 피부건강 소재, 간건강 소재, 항비만 소재 등	• **천연물 원료** -천연물의 추출, 농축, 분리, 정제 • **기능성평가** -*in vitro, in vivo*, 인체적용시험 등 • **기준규격 표준화** -원료 지표성분 또는 기능성 성분 • **완제품 생산 공정** -천연물 소재의 대량 생산공정 및 정제, 연질캡슐, 경질캡슐, 음료, 분말 제조 등

제 3 절 연구개발 범위

1. 건강기능식품 개별인정형 기능성원료로 인정받기 위해서는 초임계 잣송이 추출물의 원료표준화, 안전성, 기능성 등에 대한 여러 가지 과학적 평가가 수반되므로 식품의약품안전처의 평가기준을 바탕으로 연구개발

 가. 초임계 잣송이 추출물 기능성원료 생산의 표준화를 위한 기능/지표 성분 설정,

 나. 기능성 원료생산 추출방법 확립 및 수율 향상을 위한 최적화 추출조건 설정

 다. 기능성원료의 기능/지표성분, 위해물질 등의 규격을 설정하여 원료 생산의 표준화

 라. in vitro, in vivo 등을 통한 잣송이 추출물의 체지방감소에 미치는 유효성 검증 및 작용 Mechanism 확인

 마. 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험을 통한 잣송이 추출물의 체지방감소에 미치는 유효성과 안전성 확인 및 건강기능식품 기능성원료로써 개별인정

2. 초임계 잣송이 추출물 건강기능식품 제품화를 위한 원료표준화, 시제품생산, 제형화

 가. 대용량 추출방법의 확립 및 원료 표준화 : Pilot과 최신 기술공정인 Scale-up

 나. 기능성원료 시제품 생산 및 인체적용시험 적용제품 생산

 다. 건강기능식품 제형화 및 품질관리, 제품개발

3. 국내 초임계 잣송이 추출물 건강기능식품 제품화 사업추진

제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

제 1 절 국내외 현황

1. 잣나무의 일반적 특성

○ **잣나무는 지구상에 분포하는 100여개의 소나무속 수종 가운데 유일하게 한국산(Korean Pine-koraiensis)이란 종명을 가진 수종**으로써 우리나라에서 주요 경제적 조림수종으로 선정되어 전역에 식재되고 있음. 또한 **식용이나 약용으로 이용되는 잣을 생산할 수 있어 타 수종에 비하여 조림 선호도가 높은 수종**

- **잣나무**는 식물지리학적으로 한반도와 만주, 시베리아 등에 분포하는데, 만주와 시베리아[3, 4] 남쪽은 수천 년 동안 우리 겨레의 영토였으므로 **우리 토종 천연특산식물**
- **잣나무**는 1960년도부터 지금까지 꾸준히 많은 면적에 조림되어 왔으며 현재 **전체 조림면적의 30%정도를 차지**하며, 1960년도부터 2001년까지 잣나무 조림면적은 약 45만 ha로 **남한 전체 산림면적의 약 7%를 차지하는 중요한 경제수종**

○ **잣나무는 한국이 원산지라 영어로 "Korean Pine(한국소나무)"이라 하며, 학명도 "Pinus Koraiensis Siebold et Zucc."**로서 속명인 Pinus는 라틴어의 피치(pitch), 역청(탄화수소의고중합체)이라는 의미의 pix에서 온 것이고, 종명인 Koraiensis는 원산지인 한국을 말함

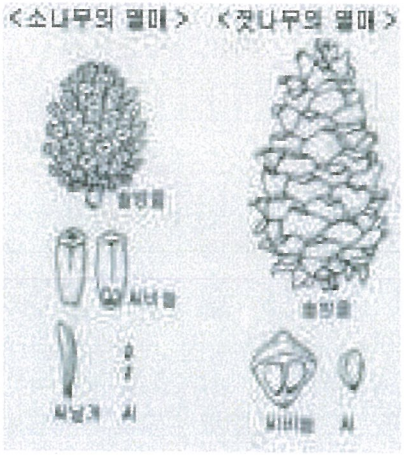
원재료	학 명	이 명	생 약 명
잣나무	*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.	Korean pine, 잣 (pine nut), 백자(柏子),송자(松子)실 백(實柏),	해송자(海松子) -열 매

출처 : 식품의약품안전청 식품원재료 DB 자료

○ **잣나무가 학술적으로 소개** 된 것은 1842년에 **폴란드의 식물학자**인 Siebold씨와 Zuccarini씨에 의해 처음으로 세상에 알려져서 **외국인에 의해 한국소나무**(Korean Pine, 신라송, 조선송, 한송 등)라 불리워짐

- **소나무의 경우** 원산지가 한국임에도 불구하고, 일제시대 일본인에 의해 소나무의 영어명을 **'Japanese Red Pine (일본소나무)'**이라고 명칭함

○ **잣나무**는 **소나무과에 속하는 상록수 침엽교목**으로 **소나무**는 잎이 2개씩 달려있는 **2엽송**인데 반하여, **잣나무**는 잎이 5개씩 달려 있어 **'오엽송'**이라고도 함



- 우리나라에서 자라는 잣나무는 잣나무, 눈잣나무, 섬잣나무, 스트로브잣나무의 4종이 있음

- **잣은 잣나무의 씨앗**으로 큰 솔방울처럼 생긴 잣송이에서 떨어낸 것을 말함

○ **잣나무는** 우리나라의 기후 풍토에 적합한 대표적인 고유 수종으로 키 30m, 직경 1.5m쯤까지 자라는 바늘잎 큰 나무로 5백년 넘게까지 사는데, **잣나무 열매를 맺기까지 적어도 12년이 걸리고**, 꽃이 피어 **잣 열매가 결실**하는 데도 **2년이 걸림**

- 5월에 꽃이 피어 솔방울 같은 모양으로 달려 있다가 다음 해 결실기인 9~10월경, 갈색 또는 푸른색을 띠고 가을이 되면 손바닥만한 길이에 타원꼴 잣송이가 달리며,

- **잣송이는 하나에 100-120개의 씨앗을 품으며, 이 씨앗 상태의 것을 피잣**(껍데기가 있는 잣)이라 하고 껍데기 안에 있는 배젖이 곧 잣이라 함

암꽃 **유구과** **구과** **피잣** **백잣**

2. 잣의 역사적 유래 및 전통 약효

가. 역사적 전통 약효

○ **잣은 명나라 때 '신라송자(신라잣)'라고 해서 가장 약효가 높은 것으로 『본초강목』이라는 책에 기록**돼 있음.

- 옛문헌에 신라시대에는 사신들이 중국으로 건너갈 때 잣을 많이 가지고 가서 팔았다고 하여 '신라송자'라고 말함. '신라송자'는 잣나무씨의 한자명으로 신라에서 나는 소나무 종

류의 씨 즉 신라의 잣나무 씨를 특별히 구별하여 부른 별칭

○ **'해동송자**(동쪽 나라의 잣, 즉 우리나라의 잣)'라고 해서 **고려 인삼과 함께 우리나라의 특산품으로 중국을 비롯해서 서역 나라에 까지 수출됐음**

○ **잣나무 열매인 잣**은 예로부터 **'신선이 먹는 음식'**으로 알려질 만큼 그 영양가와 약효가 높아, **중국인들도 우리나라 잣을 제일**로 쳐서 **이시진도 『본초강목』**에서 **"신라송자 약효가 으뜸"**이라 했음.

○ 송나라 태조 때에 나온 **『개보본초』**(開寶本草)에도 **"신라 잣은 신선도(神仙道)를 닦는 사람들이 먹으며 신라에서 온다."**고 기록

동의보감	**잣을 장복하면 몸이 산뜻해지고 불로장수하며 조금만 먹어도 영양이 되므로 죽을 만들어 상복하라고 되어 있음**
본초강목	**해송자는 골절풍과 풍비(風痺:관절질환)를 다스리고, 오장육부를 도와 허손을 보함**
본초비요	잣은 폐를 윤활하게 하고 위를 데워주며 풍을 없애고 기침을 그치게 하며 장이 허하여 생기는 변비를 치료함
다산방	태아를 튼튼히 자라는 데 잣죽을 먹이며, 태루(胎漏: 유산징후)에도 역시 좋음
본초경	성미는 달며 따뜻하고, 기와 혈을 다 보한다고 했고 폐기를 도와 기침을 멈추고 내장을 부드럽게 해주며 속을 덥게 한다고 했음
일화자본초	허한 것을 보하고 여윈 것을 살지게 하며 오장의 기능을 돕고 피부를 윤택하게 하며, 풍비 한비를 낫게 한다고 되어있음
개보본초	**골절풍, 현기증을 낫게 하며 오장을 윤택하게 하고 배고프지 않게 한다고 전해지고 있음**

나. 전통유래 식용사례

○ **잣나무의 송이와 소나무 솔방울은 식품으로써 용도가 유사**하여, 일반가정에서는 신경통에 유효하다 하여 **예부터 술을 담그어 향기와 약효를 기대하여 식용**으로 섭취함

열선전(列仙傳)에 보면 "**고대에 장수한 사람들과 수 백 살까지 장수한 선인들은 대부분 해송자**를 **상식**한 사람들이다. 이들은 **해송자를 타작한 후 품질이 우수한 크고 좋은 알맹이 만 골라서 술 속에 침주하여 만든 약주를 마셨다.**" 고 기록
200g의 **해송자**를 **소주 1리터 속에** 집어넣어 약 2개월 동안 밀봉하여 저장해 둔 후부터 마시기 시작한다. **하루에 2-4잔을 3등분**하여 아침, 점심, 저녁에 마신다. **해송자의 보정효과는 유명**하다.

○ **잣송이 이용 발효식품 제조 특허 사례**

특허 1 : 잣송이를 이용한 발효식품 제조 방법
본 발명에 따르면, 기존에 대부분이 버려지던 **잣송이로**부터 유효 생약 및 향, 정유 성분을 추출하여 유용하게 이용할 수 있고, **발효를 이용함으로써 유효 성분의 추출효율을 높일** 수 있다. 특히, 맥아와 같은 효소제를 인위적으로 첨가하여 발효효율을 높이면 단기간에 발효가 이루어지므로 시간에 따라 공기 중에 휘발되기 쉬운 잣송이 특유의 향과 정유 성분을 자연 발효에 비해 더 많이 보존할 수 있다.

특허 2 : 솔방울을 이용한 발효엑기스의 제조방법
본 발명은 **솔방울을 이용한 발효엑기스의 제조방법**에 관한 것으로, **솔방울(잣송이** 포함)을 황설탕 및 벌꿀에 침지하여 6개월 이상동안의 숙성기간을 거쳐 충분한 발효가 이루어진 후 착즙을 하여 제조된 솔방울을 이용한 **발효엑기스의 제조방법**에 관한 것이다.

3. 잣송이 생리활성물질 및 약리작용

가. 생리활성물질

○ 소나무, 잣나무 등 침엽수류 정유 Essential Oil 성분은 식물의 2차대사물질로서 송진과 같은 물질을 분비하는데 일반적으로

○ 이 물질에는 α-oinion, β-pinene, campane, terpenoid와 같은 essential oil 류나 ercetin, kaempferol 등의 flavonoid류 등 다양한 생리활성 성분을 함유

- 이들 essential oil류는 현재 많은 식물로부터 추출하여 이용하고자 하고 있으며, 그중에는 이미 피톤치드 등 생활용품, 기능성식품 등의 제품화가 되어 있는 것도 있음

* 피톤치드 : 식물이 병원균·해충·곰팡이에 저항하려고 내뿜거나 분비하는 물질임
산림욕을 통해 피톤치드를 마시면 스트레스가 해소되고 장과 심폐 기능이 강화되며 살균작용도 이뤄지는 것으로 알려져 있음

○ 잣송이 부산물은 여러 가지 유용 물질 이외에 단백질 함량은 3.1%로 낮지만 지방 함량은 13.1%로 높으며, 에너지 함량도 6,104kcal/kg으로 높은 것으로 분석되었음

- 특히 지방산 함량에 있어서는 포화지방산이 1.5%인 반면에 단일불포화 지방산이 24%로 높았으며 그중에서도 ω-6지방산이 51%이고 ω-3지방산이 24%로 매우 높음,
- 잣송이 부산물을 기능성원료로 이용할 수 있는 기술개발은 그 효과를 검토할 필요성이 있음

나. 약리작용

○ 지금까지 알려진 **잣송이에 대한 가치는 영양물질 이외에 terpenoid계 성분, phenol계 성분, 탄닌 및 알칼로이드 성분에 의한 항균, 살충 및 타감 작용을 하는 약리작용**에 관한 것이 있음[5, 6].

- 특히 **terpenoids는 휘발성 향기 물질**이면서 불포화탄화수소로서 **항균 및 살충효과**를 가지고 있는 것으로 알려져 있음.

○ **terpenoids**는 이소프렌으로 구성되어 있는 성분으로 **항생[7], 항암[8], 혈압강하 진정효과** 및 호르몬 분비를 촉진하고, terpinolene과 borneol은 담즙분비를 촉진하여 콜레스테롤을 분해함으로서 체내의 **콜레스테롤 수치를 낮추는 작용**을 가지고 있어 뇌졸중 고혈압 및 동맥경화증에 효과적인 것으로 보고[9, 10].

- 그리고 **α-pinene**은 식물계에서 가장 많은 terpenoids로서 생장이 가장 활발할 때 분비되는 생체활성물질인데 이것은 **방충 및 항균의 작용**[11, 12]을 한다.

- 이밖에도 **β-pinene**은 솔잎류에 가장 특징적인 성분으로 **미생물 억제작용**을 지니고 있는 것으로 보고

○ **잣나무에서 생산되는 잎과 송이는 약리적 가치가 높고, 일본에서는 항산화제로서의 기능**이 있는 것으로 알려지고 있음

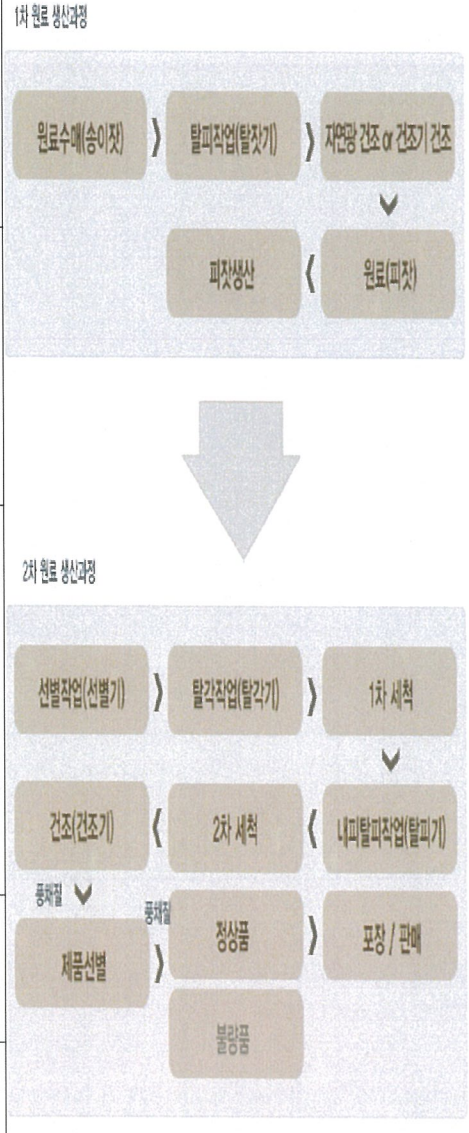
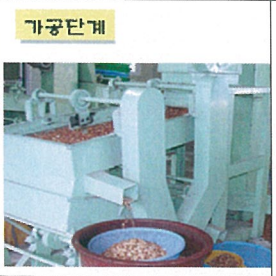
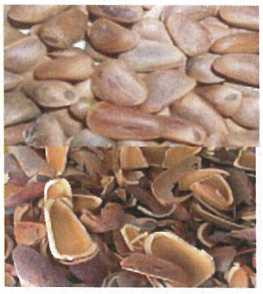
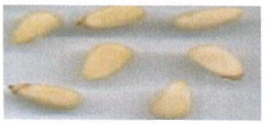
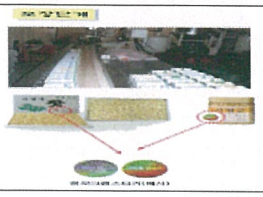
- **잣나무**는 terpenoid계 성분, phenol계 성분 타닌 및 알칼로이드성분이 들어 있기 때문에 **피부자극제, 소염제, 소독제 완화제 및 보향제로 이용**되고 있다.

생리활성 성분	약 리 작 용
terpenoid	이소프렌으로 구성되어 있는 성분으로 항생, 항암, 혈압강하, 진정효과 및 호르몬 분비를 촉진
terpinolene, borneol	담즙 분비를 촉진하여 콜레스테롤을 분해함으로서 체내 콜레스테롤 수치를 낮추는 작용과 뇌졸중, 고혈압에 효과적인 것으로 보고
α-pinene	식물계에서 가장 많은 terpenoids로서 생장이 가장 활발할 때 분비되는 생체활성물질로 방충 및 항균 작용
β-pinene	솔잎류에 가장 특징적인 성분으로 미생물 억제작용이 있어 잣송이 부산물의 사료적 가치는 매우 높을 것으로 판단

4. 잣가공 제품의 제조공정

○ 채취한 잣송이는 모아서 7일 정도 쌓아놓고, 표면의 송진이 삭으면 잣 탈곡기를 이용하여 잣송이 안의 잣을 털어내고,

○ 탈곡한 피잣은 선별하여 외피를 분리하고 가열한 후 내피를 분리하여 다시 선별한 후에 포장함.

잣가공 과정	주요 제조공정 설명	제조공정도
	1. 잣송이 채취 ○ 채취 잣송이를 7일 이상 쌓아 놓으면 구과 표면에 송진이 삭아 종자 꺼내기 수월 ○ 탈곡기이용 종자만 모아 햇볕이나 건조기에 말려 수분이 20%이하 상태 보관	
	2. 잣송이 탈각 ○ 잣의 탈각은 먼저 선별기를 이용해 굵기별로 나누어, ○ 탈각기 재질은 연마석으로 폭크기 조절하여 굵기별로 나눠 종자를 모아서 작업	
	3. 피잣 건조 ○ 탈각이 끝나면 풍력을 이용하는 껍질 분리기를 이용해 배젖 만을 따로 선별 ○ 배젖을 싸고 있는 얇은 속껍질(내피)은 가열후에 내피분리기로 제거하고. ○ 건조기를 이용해 수분이 7~9% 정도로 건조	
	4. 선 별 과 정 ○ 건조된 상품을 색채선별기를 이용하여 수작업으로 선별함	
	5. 포 장 과 정 ○ 선별된 잣을 수작업으로 중량을 달아 플라스틱 용기에 포장함	

5. 국내외 잣과 잣송이 제품화 사례

가. 국내 잣과 잣잎, 잣송이 가공제품

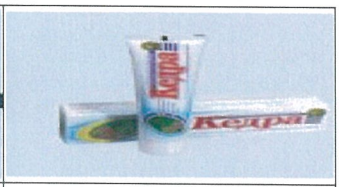
○ 현재 **잣을 이용한 잣 막걸리, 잣기름** 등이 판매되고 있으며, 잣송이를 이용한 식품은 없으나 **피톤치드 잣나무 정유오일**, 향균 스프레이, 방향제 등이 시중에 유통되고 있음.

나. 외국 잣과 잣송이 가공제품

○ **미국 리피드 뉴트리션사**는 **우리나라의 잣(가평잣)을 이용하여 잣지방산 중 피놀렌산**(pinoleic acid)이 동물실험, 인체시험 등 **연구결과 식욕억제효과**가 있음을 밝히고 **"PinnoThin" 이란 제품을 세계 유통하고 있음.**

잣 초콜릿	쥬스	건강기능식품
잣 스낵	**잣 다이어트바**	**건강기능식품**

○ **제외국의 경우** 시베리아 잣송이의 송진과 잣껍질을 추출 가공한 제품이 **잣 껌, 잣 치약, 잣 정유 등으로 개발되어 판매**되고 있음.

		
잣송이 추출 정유	잣송이 정유 천연소재 껌	잣송이정유 천연소재 치약

6. 유사 기능성 소재 건강기능식품 개별인정형 제품 성공사례

가. 현재 유사기술 연구개발 및 제품화 현황

○ **헛개나무가** 2008년 10월 **식약청으로부터 건강기능식품 개별인정형(기능: 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는 데 도움을 줄 수 있음)원료로 인정**을 받음으로서 헛개나무의 알콜분해 효과와 간기능에 작용하는 효과와 효능에 대하여 재조명

○ **종전에 헛개나무 상품화**는 즙(파우치) 형태의 **단순 기타가공 식품이 주류**였고, 웰빙 식품 시장에서 큰 주목을 받지 못했으나, **2008년 10월 식약청으로부터 건강기능식품 개별인정형 원료로 인정**을 받은 후 **CJ뉴트라 , 일진제약 ,한국야쿠르트 등 대기업이** 다투어 **헛개나무 건강기능식품**을 출시하여 **약 1,000억원 매출 시장 형성**

○ **헛개나무 건강기능식품 및 일반식품 상품 현황**

- 헛개나무 건강기능식품 개별인정제품 -

헤파칸(일진제약)	헬프칸(CJ뉴트라)	쿠퍼스(한국야쿠르트)

- 헛개나무 일반식품 제품현황 -

헛개나무일반식품	장흥헛개-환	정남진장흥헛개진액	디펜스	장흥헛개진액
타사제품	에이치디원프리미엄	HD-1프리미엄	크린헤파	헛개열매-D

나. 잣송이 추출물 관련 유사 건강기능식품 개별인정 제품화 현황

○ 솔잎증류농축액은 "적송원" 이라는 제품으로 일진제약 등에서 제조유통

○ 소나무껍질추출물 "피크노제놀"제품으로 엘지(LG) 등에서 유통

< "솔잎증류농축액" 개별인정형 >

○ **"솔잎증류농축액"은 적송(Pinus densiflora)의 솔잎을 수증기로 증류**하여 만들어집니다. 지표성분은 3-carene, limonen과 terpinolene로 정하였으며, 각각의 함량은 12%, 8%, 17.5% 이상이 되도록 표준화

○ 솔잎증류농축액은 인슐린 수준에는 영향을 미치지 않고 공복혈당을 개선하는 것으로 동물시험에서 관찰

○ 실제로 혈당이 약간 높은 사람을 대상으로 솔잎증류농축액의 보충효과를 비교한 **인체적용연구에서도, 솔잎 증류농축액은 공복혈당 개선에 도움이 확인**되었음

#	R.T	compound	송침유(%)	
3	8.11	α-phellandrene	1.49	±0.00
4	8.27	**α-pinene**	**10.13**	±0.01
5	8.59	camphene	2.29	±0.00
6	9.10	sabinene	4.22	±0.03
7	9.18	β-pinene	3.02	±0.00
8	9.42	β-myrcene	1.32	±0.00
9	9.84	**δ-3-carene**	**22.28**	±0.07
10	9.95	α-terpinene	2.04	±0.00
11	10.10	1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene	4.65	±0.00
12	10.19	limonen		
13	10.20	**β-phellandrene**	**13.90**	±0.01
14	10.73	γ-terpinene	3.77	±0.00
15	11.28	**α-terpinolene**	**23.24**	±0.05
20	12.79	4-terpineol	4.24	±0.05
21	12.89	p-cymen-8-ol	1.09	±0.00

< "소나무껍질추출물 등 복합물" 개별인정형 >

○ **엘지(LG) "소나무껍질추출물 등 복합물"은 프랑스 해안송껍질주정추출물**, 비타민 C, 비타민 E 및 달맞이꽃종자유를 혼합하여 만듬.

○ 자외선에 의해 발생된 활성산소는 피부의 콜라겐을 분해하는 효소(MMP, Matrix Metalloproteinase)를 활성화하고, TGF-β2 발현을 억제하여 교원질의 합성을 저하하므로 피부주름을 발생시키는데

- "엘지 소나무껍질 추출물 등 복합물"은 자외선 조사로 인한 콜라겐 분해와 교원질 합성 저하를 억제할 수 있음이 동물 시험에서 확인되었슴.

○ **"햇볕 또는 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강을 유지하는데 도움을 줄 수 있습니다."의 기능성을 인정함.**

제 2 절 발전전망과 기술동향

1. 건강기능식품산업의 시장 및 기술 동향

가. 건강기능식품산업의 발전전망

○ **건강기능식품산업**은 소비자에게는 건강증진 및 기능개선 등의 효과를 주고, 기업에게는 일정기간 독점적 수익창출이 가능하며, 국가에게는 의료비 등 국가비용 절감 등의 효과를 주는 등 **소비자, 기업 및 국가가 모두 win-win 할 수 있는 산업**이라 할 수 있음.

○ 최근 **건강기능식품산업의 특징**은 **①고성장 산업 ②기능성원료의 다양화 ③주 소비계층의 다양화 ④맞춤형 복합형 제품**으로의 진화 4가지로 정리할 수 있음.

○ 건강지향적 소비 경향의 증가, 신제품 개발 가속화로 **건강기능식품 시장규모**는 확대 추세이며, 타 산업과 비교해서도 큰 성장률을 보이고 있다. **향후 5년간 연 10% 수준의 성장을 전망**하고 있음.

나. 국내 건강기능식품 관련 기술 동향

○ 국내 기능성식품 기술개발은 1990년대 중반까지 해외에서 기능성이 입증된 식품 소재의 추출 및 가공 분야가 주를 이루었으나, 이후 식품 소재의 기능성 규명에서 최종 제품화까지 전주기적인 연구가 활발하게 이루어지면서 국내기술 수준이 크게 향상되었음

○ 2008년 생명공학기본계획 총괄추진위원회의 보고에 의하면 국내 식품 관련기술은 다음과 같은 단계에 있음

기술격차	5년	기술수준	70%
강 점	식품 제조 가공 공정기, 제형화 기술, 소재탐색기술, 전통발효식품 가공기술		
약 점	**기능성평가모델개발기술**, 안전성평가기술, 영양유전체기술, **인체효능평가기술**		
주요 연구분야	**건강기능식품개발**, 전통발효식품의 고기능화, 식품안전성 관련 기술		
신기술 유망분야	**신규 기능성식품소재 개발연구**, 영양유전체 활용 및 개인맞춤형 식품개발연구, 식품나노기술개발		

※ 출처 : 한국생명공학원

다. 세계 건강기능식품 시장 및 기술 동향

○ **세계 건강기능식품 시장**은 선진국에서 보다 소비가 활성화된 모습을 보이고, 이에따라 **선진국에서 높은 성장률을 지속**하는 일종의 **'선진국형' 시장**으로 파악됨

- **미국과 일본을 중심**으로 지난 10년간 막대한 국가예산을 투입하여 연구개발 지원하여, 이에 따른 정책에 힘입어 **건강기능식품의 세계시장은 놀라운 성장을 지속함**

- 소득 수준의 향상과 더불어 최근에는 **중국과 인도, 브라질 등 신흥개발국에서도 건강기능식품에 대한 수요가 크게 높아지는 추세**이기 때문에, 글로벌 차원에서 주목할 만한 잠재력을 지닌 시장으로 평가되고 있음

○ 글로벌 **의약품 시장의 경우 5% 수준, 화장품 시장의 경우 4% 수준**의 성장률을 보이는 것과 비교하여 **건강기능식품 시장의 성장세(10% 이상)는 상당히 높은** 것으로 판단됨

- 지난 5~10년간 건강에 대한 관심은 지속적으로 증가했고, 특히 과거와 달리 **만성질환으로 인한 사망자가 늘면서 치료보다는 예방이 중요하다는 인식**이 널리 퍼짐

- **중장년 인구**는 빠르게 늘어남 (현재 20% 이상의 유럽인구가 65세 이상이고, 2030년에는 30%를 넘을 것으로 예상) ⇨ **건강기능식품의 주 소비자 증가**

- 로하스 및 웰빙 추구 등을 통해 자신의 삶의 질을 높이려는 욕구가 건강기능식품의 구매로 이어지면서 새로운 시장을 형성함

○ 미국, 유럽, 일본 등에서 식품산업 관련기술은 단순한 식량 확보 차원이 아닌 노화억제, 장수안전, 건강수명연장 관련식품을 발전 가능성이 높은 분야로 보고 이들 식품개발을 위한 식품생명공학기술 개발에 연구 역량을 집중하고 있음

- **유럽 각국의 식품연구기관**에서 수행하고 있는 기능성식품 관련 연구에는 주로 **비만, 심혈관 질환 예방, 면역 조절, 장건강 등에 연구가 집중**되고 있음

○ **대체의학 요법**과 함께 허브들의 생리·약리 활성에 관한 연구개발이 **국가연구사업**으로 자리 잡고 있음

- **미국인의 약 50%가 기능성식품이 의약품을 대체**할 수 있다고 믿고 있으며 이들은 천연 식용원료를 사용함으로써 부작용 및 위험을 완화시킬 수 있고 친숙한 식품 형태를 취하고 있는 점에서 선호

○ 기존에 있는 특정 성분을 더욱 보강, 새로운 성분을 첨가한 식품을 개발하는 것이 최근

추세이며, 특정 영양분이 미리 함유된 새로운 작물을 개발하고 이를 활용하여 기능성식품을 개발되고 있음

2. 국가별 농림수산물 소재 건강기능식품 시장 동향

○ **세계 농림수산물 소재 건강기능식품시장은 herbal & botanical extracts 47.4%, fish oils 35.3%, non-herbal extracts 16.1%로 구성되어 있음**

- Herbal & botanical extracts 시장은 주로 면역, 심혈관건강, 에너지증진, 정신건강 관련 기능성소재가 관심영역임

- **면역소재로 echinacea, 콜레스테롤과 혈압조절용 소재로 garlic**, 정신건강과 혈행개선 소재로 **ginkgo biloba,** 에너지증진 소재로 **inseng,** 전립선 건강소재로 **saw palmetto**, 우울·불면소재로 **St John's Wort** 등이 있으며, 기타 **중국전통의약품**, ayurvedic compounds 등의 소재가 있음

- Fish oils 시장은 주로 fish oils과 미세조류에서 추출한 PUFAs가 있으며, 성인과 소아를 대상으로 한 식품, 음료, 식이보충제에 활용되고 있음

- Non-herbal extracts의 경우, 글루코사민과 콘드로이친이 주요 성분임

○ **미국의 경우, 은행잎 소재가 미국내 판매1위로 인기**가 있으며, 글루코사민, 코엔자임Q10, 어유, 소팔메토, 인삼, 녹차, 블랙호쉬, 바위돌꽃뿌리추출물(rhodiola rosea root), 전통중국약재, ayurvedic therapies 소재가 유망하고, 주로 음료나 보충제형태로 개발되어 판매됨

○ **중국의 경우**, DHA, 마늘유, 오메가3 어유, 키토산, 포도추출물, 아마씨오일, 복합리놀렌산, 홍화오일, 글루코사민, 스피루리나, 버섯추출물, 은행잎, echinacea, phytosterols, 아세로라추출물, DHA, 코엔자임Q10, StJohn's wort 등의 소재가 차, 캔디, 음료, 보충제형태로 판매중임

○ **일본의 경우**, 녹색채소 대용섭취로 녹즙이 인기가 있으며, 강황, 글루코사민, 마늘, 효소, 자라엑기스, 식이섬유의 인기가 높음

○ **천연, 안전한 먹거리를 선호하는 소비자 기호트렌드는 국내산 농림수산물을 활용한 건강기능식품의 발전에 긍정적인 영향으로 작용함**

3. 건강기능식품의 사업화 분석

가. 산업 분석

○ **인간 수명연장 및 고령화, 현대인의 바쁜 생활로 인한 불균형적인 식사, 각종 공해로 인한 환경오염 증가, 스트레스 증가 등으로 건강의 중요성은 더욱 커져 향후 건강기능식품산업은 지속적으로 성장할 것으로 전망함**

○ **21세기는 경제발전과 웰빙 트랜드**에 따른 소비자의 니즈 증가 및 식생활 변화에 따라 식품의 1차적 기능인 영양과 2차적 기능인 맛과 같은 단순한 기능을 넘어서 **3차적 기능인 생체조절기능(건강기능식품의 기능성 해당)에 대한 관심이 고조**

- **농림수산물 원료**의 기능성을 활용하는 지식기반산업이자 첨단기술 및 타산업인 **제약,한방, 화장품과의 접목 가능성이 높은 미래성장동력**으로 발전할 가능성이 높음
- **스위스 파마톤사**는 **인삼에서 추출**한 사포닌으로 만든 자양강장캡슐인 '진사나(GINSANA)'로 **연 약 30억달러(3조6천억원) 매출실적**을 기록하고 있음

나. 환경 분석

○ **농림수산물 원료는 단일소재 또는 복합소재의 동물시험, 인체적용시험 등 과학적인효능평가를 통해 건강기능식품 개별인정 원료로 허가받아 기능성을 표현 할수 있어야 시장성장 가능함**

- 대부분 농림수산물이 기능성을 지니고 있으나 과학적으로 그 효능을 입증하지 못해 기능성원료로 인정을 받지 못해 시장 확대는 물론 농가소득증대에 장애 요인
- 따라서 기능성이 있는 것으로 알려진 농림수산물 원료의 기능성평가를 위한 동물실험, 인체적용시험 및 인프라를 구축하고, 과학적 우수성을 입증하는 노력 필요
- 식약청은 2010년에 영지·운지·표고버섯과 자라, 화분, 로얄제리 등의 농산물이 건강기능식품 재평가 시 기능성 인정을 할 만한 과학적 증빙자료를 제출하지 못해 건강기능식품시장에서 퇴출된바 있음

○ **건강기능식품산업은 국산소재 연구개발이 부진해 수입산 소재 의존도가 88%로 매우 높아 선진국 유행 제품의 복사 제품생산이 많고, 내수 위주로 산업구조가 형성됨**

- 농산물, 약용식물 등 연구는 지속적으로 수행되었으나 산업계와 연계 미흡으로 산업화가 저조한 상황이며 자체 연구개발보다는 수입 의존도가 높아 원천 기술력이 취약
- 산업 경쟁력을 결정하는 중요한 요소는 과학적인 데이터 확보 및 이에 대한 소비자인지, 부작용 통제 및 원료의 안정적 확보임

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05

제 1 절 연구내용

3.1.1. 잣송이 추출조건 확립 및 표준화

○원활한 원재료 수급을 위한 계획 수립
가평군의 잣나무 재배현황을 파악하고 수급방안을 세운다.

○최적의 초임계 잣송이 추출조건 확립
압력 및 온도 변수를 변화시켜 초임계 CO_2의 밀도를 조절하여 특정 생리활성이 가장 많이 추출되는 초임계 추출 조건 탐색

○대용량 추출 방법 확립
가장 높은 생리활성을 보이는 150기압, 40℃의 초임계 추출 조건에서 10L 추출기를 이용하여 예비 추출을 수행한 후, 50L 추출 장비를 이용하여 CO_2 유속에 따른 최적 생산성 조건 확립

3.1.2. 초임계 잣송이 추출물 유효성분 검토 및 기능/지표성분 설정

○초임계 잣송이 추출물 중 유효성분을 확인하기 위하여 가스크로마토그래피(GC) 와 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 기능성원료의 표준화를 할 수 있는 기능/지표성분을 찾아 설정하고자 다음과 같은 확인시험을 행하였다.
- Terpene류 확인
- 가스크로마토그래피 질량분석기(GC/MS)을 통한 초임계 잣송이 추출물 성분 확인
- Oleamide 확인 시험 및 지방산 분석
- 초임계 잣송이 추출물 중 Phenol 류 확인
- 초임계 잣송이 추출물 중 함량이 많은 유효성분 분리정제

3.1.3. 초임계 잣송이 추출물 중 설정된 기능/지표성분(PK-1) 시험법 검토

○초임계 잣송이 추출물 함유된 PK-E1 함량을 측정하기 위한 시험방법을 찾고 적절한 시험법인가 확인

○초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 분석조건 확인
-고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용한 PK-E1 확인

3.1.4. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 시험법 검증(Method Validation)

○PK-E1을 주어진 분석 조건하에 전처리 하여 HPLC를 이용하여 분리, 정량하는 시험법의 유효성을 검증하는데 그 목적이 있다. 시험법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토

- 특이성 (Specificity) : HPLC 분석시 검출시간(Retention time으로 검토)
- 직선성 (Linearity) : 6개 농도로 3반복 직선성 확인
- 시료 직선성 (Sample Linearity) : 6개 농도로 3반복 직선성 확인
- 정확도(Accuracy),회수율(Recovery) : 3개 농도로 원료를 첨가하여 회수율 검토
- 정밀도(Precision) : 4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가
- 범위(Range) : 직선성, 정확성, 정밀성 검토 후 범위 설정

3.1.5. 지역별 원재료 중 기능/지표성분 함량 확인

○원료 표준화 확인을 위해 지역별 원재료(잣송이분말) 중 PK-E1을 설정된 시험방법으로 확인

- 가평지역,홍천지역 잣송이분말 중 PK-E1 확인

3.1.6. 초임계 잣송이 추출물의 기준규격 설정

○제조공정별 기능/지표성분 함량 변화 확인

- 초임계 잣송이 추출물 9Lot에 대한 기능/지표성분 함량 확인

○기능/지표성분, 유해물질 기준규격 설정

- 기능/지표성분(Dehydroabietic acid), 유해물질(납, 총비소, 카드뮴, 총수은, 대장균군, 세균수) 기준규격 설정

○잔류농약, 영양성분 확인

- 수입 잔류농약 59종, 영양성분(열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 나트륨) 확인

3.1.7. 초임계 잣송이 추출물의 안정성 확인

○유통기한을 확인하기 위한 초임계 잣송이 추출물 기능성 원료의 안정성 확인

- 25, 35, 40℃ 세 온도에 저장
- 5개월 이상 저장하면서 일정 기간마다 꺼내어 기능/지표성분등의 변화 확인
- 저장기간 동안의 변화량을 아레니우스식을 이용하여 유통기한 산출

3.1.8. In vitro 실험을 통한 잣송이 추출물 기능성 효과 평가

○여러 조건의 초임계 추출물에서 in vitro 실험을 통해 가장 효과가 뛰어난 조건의 추출물 선발

○선택한 추출물의 in vitro 실험을 통한 기능성 확인

3.1.9. In vivo 동물실험을 통한 기능성 효능 평가

○선택한 추출물의 동물 독성 시험을 통해 안전 농도 확인
○선택한 추출물의 고지방식이로 유도한 비만 동물모델에서 체지방감소 효과 확인
○시제품을 이용한 in vivo 동물시험을 통한 기능성 효과 평가

3.1.10. GLP 기관에서의 안전성 시험

충북 청원군 오창읍 연구단지로 53 오창과학산업단지 내 (주)바이오톡스텍과 초임계 잣송이 추출물(SPCE)에 대한 안전성시험 용역 계약을 하고 다음과 같은 항목의 안전성시험을 행하였다.

○조제물 중 Dehydroabietic acid의 농도분석법 및 validation 및 안정성 확인시험
○단회투여독성(랫드-경구)
○4주반복 용량결정(DRF)시험(랫드-경구)
○13주반복투여독성시험 + 4주 회복시험(랫드-경구)
○복귀돌연변이시험
○염색체이상시험
○소핵시험(마우스-경구/복강)

3.1.11. 인체적용시험을 위한 제형화

○추출물 성상은 녹갈색의 고점액성이므로 제형의 다양화를 위해 분말화하는 방법과 연질캅셀 제형화 검토하였다.

3.1.12. 과체중 성인에서 잣송이 추출물 섭취가 체지방 조성에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

○인체시험기관과 먼저 연구용역계약서를 작성한다.
○인체적용시험 계획서 작성하여 IRB 신청을 한다.
○IRB 승인완료 후 피검자 모집 후 인체적용시험 실시한다.
○인체적용시험 완료 후 인체적용시험 최종보고서를 작성한다.

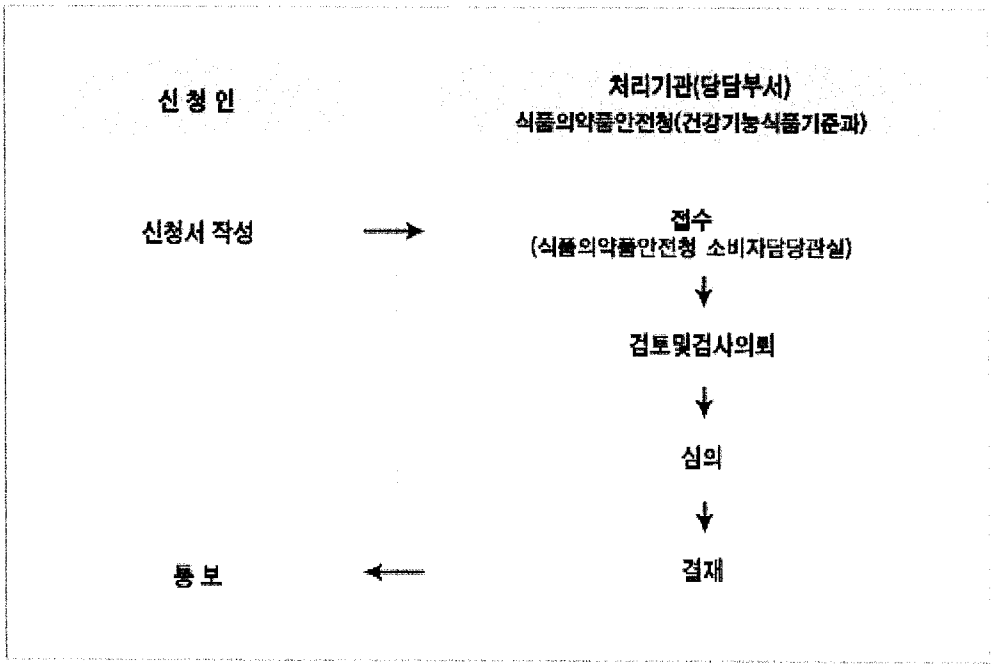
<인체적용시험 계획서 요약>

시험 제목	과체중 성인 (25kg/m^2≤BMI<30kg/m^2)에서 잣송이 추출물 섭취와 의학 영양치료가 체지방 조성에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12 주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
시험 책임자	이 상열 (경희대학교병원 내분비내과 교수)
시험 공동연구자	임 현정 (경희대학교 동서의학대학원 교수, 임상영양연구소 소장)
시험 실시기관	경희대학교 병원 (서울특별시 동대문구 경희대로 23) 경희대학교 임상영양연구소 (서울특별시 동대문구 경희대로 26)
분석항목	1. 1차 유효성 평가 DEXA 측정을 통한 체내 지방량 2. 2차 유효성 평가 (1) 체중, 허리둘레 (2) Impedance법을 통한 체조성 (3) 혈당, 인슐린 농도 (4) 혈중 지질 농도 (총콜레스테롤, Triglycerides, LDL콜레스테롤, HDL콜레스테롤) (5) 혈중 유리지방산과 글리세롤 측정 (6) Adipokine 농도 (leptin, adiponectin, visfatin)
Confidential	본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 정보는 시험책임자 및 시험담당자, 임상시험심사위원회, 식품의약품안전처를 위해 제공된 것으로 경희대학교 부설 임상영양연구소의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

3.1.13. 건강기능식품 개별인정 원료신청 및 제품화

최종적으로 GLP기관의 안전성시험 결과와 인체적용시험 최종보고서를 토대로 건강기능식품 기능성원료 인정을 신청한다. 식약청 홈페이지에서 건강기능식품 기능성원료 인정신청 절차는 아래와 같다.

▪건강기능식품 기능성원료 인정신청 처리절차



▪구비서류

▶ 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서(전자문서로 된 신청서 포함)
- 제출자료 2부 (원본 1부 포함)
- 제출자료를 수록 CD 1개
- 제품 또는 시제품 및 기능성분(또는 지표성분) 표준품
- 국내 건강기능식품검사기관이 발행한 시험성적서

※ 제출자료
- 제출자료 전체의 총괄 요약본
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- 제조방법 및 그에 관한 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
- 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 안전성에 관한 자료
- 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

※ 주의사항

- 제출자료를 생략하는 경우에는 그 사유를 구체적으로 기재하여야 함
- 모든 제출자료는 원문과 요약본을 함께 제출하여야 하며, 영어 이외의 외국어 자료는 한글 번역문을 제출하여야 함

▪신청기관 : 전자접수 또는 식품의약품안전처 고객지원담당관실

※ 처리부서 : 건강기능식품기준과

▪수수료 : 전자결재 또는 수입인지 : 신규 1,9000,000원, (추가변경) 800,000원

▪처리기간

- 신규원료 : 120일
- 기능성추가 : 60일

제 2 절 연구결과

3.2.1. 잣송이 추출조건 확립 및 표준화

가. 원활한 원재료 수급을 위한 계획 수립

(1) 가평 지역 잣나무 및 잣송이 원료 현황

○ 가평군의 토양과 기후가 잣나무의 생산의 최적지이며 잣 생산량 또한 홍천, 포천에 비해 전국에서 가장 많은 양을 생산하고 있음

- 가평잣 생산량 26.5% : 2009년 생산기준

○ 가평군은 21개의 잣가공업체가 있으며 전국 최대 규모의 잣과 잣송이 부산물이 생산 되고 있음

(2) 잣송이 원료확보 방안

○ 잣송이 원료를 이용한 건강기능식품 기능성 원료 추출 및 가공제조를 위해 국내 잣송이 원료 최대 생산지인 가평지역의 군청, 가평잣협회(생산자단체), 가평잣향토사업단(농식품부 향토사업)과 업무협약(MOU)을 통해 원료 확보

- (사)가평잣협회(대표:이수근,총137회원)은 가평군 잣생산자단체로, 2007년10월에 설립한 가평군 지역내에서 가평잣을 생산하는 농가들이 모여 설립한 비영리법인

○ 초임계 잣송이 추출물 원료의 사전확보 및 품질관리 등을 위해 가평 지역(가평군 상면 행현리 잣탈각지)내에서 잣송이 껍질 수확후(8-9월) 자연건조해서 세분가공후 저장창고에서 저장후 잣송이 추출시 1차 가공 (가평잣향토사업단 사업주체 (주)코리안파인과 계약)

○ 초임계 잣송이 추출물 1차 가공원료를 초임계추출전문업체인 (주)그린텍21 에 위탁가공하여 비임상 및 임상시험 수행과 건강기능식품 기능성원료 시제품 및 완제품 제작

< 가평 지역 잣나무 및 잣송이 원료 현황 >

○ 가평군 전체 산림면적은 69,290ha로 사유림과 도유림의 비율이 각각 53.9%와 32.4%로 비중이 큰 편이며, 전체 산림면적 69,290ha 중 29.8%에 해당하는 20,651ha가 잣나무 산림면적으로 가평지역 대표 수종

<가평군 산림면적 현황(2008)> (단위: ha)

구 분		합 계	국유림	도유림	군유림	사유림
가평	전체산림	69,290	8,716	22,419	834	37,321
	잣나무	20,651	-	-	174	20,477

○ 가평군은 수령별 잣나무 식재면적 중 경제성이 높은 21~40년생 잣나무가 대부분을 차지하고 있음

<수령별 잣나무 식재면적 현황(2008)> (단위: ha)

합 계	10년생이하	11~20년생	21~30년생	31~40년생	41~50년생	51~60년생	61~70년생	70년생이상
20,651	752	4,244	9,577	4,389	1,273	60	67	289

자료 : 가평군 산림공원과(2009년)

○ 가평군 생산현황을 살펴보면, 매년 국내 잣 생산량의 약 23% 이상을 차지하고 있는 잣 최대 주산지임. 2007년도의 가평 군 잣 생산량은 1,452톤으로 전년도에 비해 많은 양이 증가하였으나, 2008년에는 800여톤으로 생산량

<2004~2007년 국내 잣 주산지의 생산량 비교> (단위: 피잣기준)

2004년				2005년			2006년			2007년		
구분	전국 합계	생산량 (톤)	비율 (%)	전국 합계	생산량 (톤)	비율 (%)	전국 합계	생산량 (톤)	비율 (%)	전국 합계	생산량 (톤)	비율 (%)
		3,06	100.		2,680	100.0		1,518	100.0		3,781	100.0

<상위 3위 생산지역>

2004년				2005년			2006년			2007년		
1	홍천	952	31.1	홍천	1010	37.8	인제	415	27.4	가평	1452	38.4
2	가평	704	23.0	가평	547	20.4	홍천	288	18.9	홍천	982	25.9
3	인제	368	12.0	인제	368	13.7	양평	210	13.8	인제	450	11.9
4	양평	3120	10.2	양평	312	11.6	가평	144	9.5	춘천	254	6.7

나. 최적의 초임계 잣송이 추출조건 확립

(1) 초임계 이산화탄소 추출의 개요

모든 물질은 압력과 온도에 따라 고체, 액체, 기체의 3가지 상태중 하나의 형태로 존재하지만, 특정 온도와 압력에서는 이들 3가지 상이 동시에 존재하는데 이를 삼중점 (Tp)라 한다. 이 삼중점으로부터 증기압 곡선이 고온 쪽으로 연장되면, 기체와 액체가 공존하는 한계점인 임계점(critical point)에 도달한다. 이 점에서는 기체와 액체의 밀도가 같아지며, 기-액 공존상태의 계면이 소실된다. 이 기-액 공존의 임계점은 모든 물질에 존재한다(그림 3).

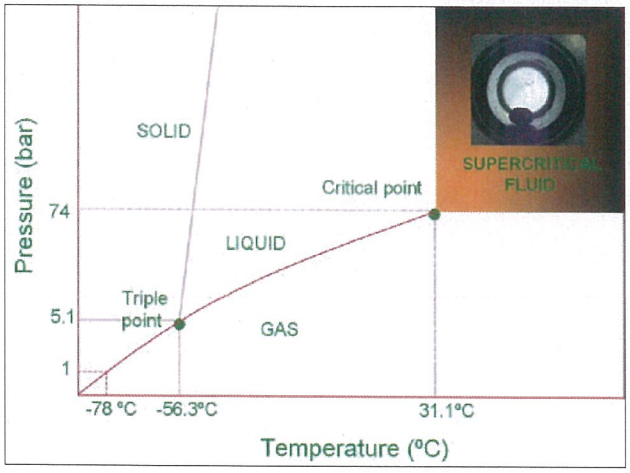


그림 3. 고체, 액체, 기체 상태와 초임계 유체상을 보여주는 이산화탄소의 phase diagram.

이 임계온도 이상에서 고밀도로 압축되어, 기체와 액체의 구별이 없는 유체를 초임계 유체라 부른다. 용매분자의 확산력이 지배적인 점에서는 기체와 유사하지만, 분자의 응집력의 영향이 무시할 수 없는 점에서는 액체와 유사하기 때문에 여러 가지 물질을 용해하는 성질을 가지고 있다. 더구나 온도와 압력에 의해 밀도를 연속적으로 변화시킬 수 있기 때문에, 이상기체의 상태로부터 액체에 필적하는 크기까지 밀도를 임의로 조정할 수 있다.

초임계 영역에서 사용되는 용매로 천연에 풍부하게 존재하는 물질인 물 (임계온도 : 374.1℃, 임계압력 : 22.12MPa)과 이산화탄소 (임계온도 : 31.1℃, 임계압력 : 7.38MPa)를 주로 사용한다. 물은 여러 가지 용도, 물질에 대한 용매로의 잠재적인 능력을 가지지만, 약극성 또는 무극성 용매로 사용하기 위해서는 고온으로 해야 할 필요가 있으며, 열적으로 불안정한 물질을 취급하는 데는 부적절하다. 이에 대하여 이산화탄소는 무극성 또는 약극성 물질에 대하여 양호한 용매이므로 물을 보완할 수 있는 물질이다. 이산화탄소는 물과 마찬가지로 인류가 생존하는데 있어서 불가결한 물질이며, 환경에 전혀 악영향을 미치지 않는다.

초임계 유체 기술이 여러 추출 및 정제 분야에 활용범위를 넓혀가는 이유는 다음과 같다. 먼저, 기존의 추출공정에서 사용되는 유기 용매의 인체 유해성이 최근 들어 심각하게 부각되고 있으며, 의약품 및 식품 가공 물질을 대상으로 하는 경우 유기 용매 잔류문제는 이들 공정이 지니는 근본적인 애로사항으로 지적되어 왔다. 특히, 의약품과 같은 인체투여 물질들의 추출 및 정제 분야에 있어서는 미량의 잔류 용매를 완전히 제거하기 위하여 완벽한 유기 용매 분리 공정을 사용하거나, 다른 방안으로 처음부터 유기 용매를 배제한 새로운 추출 기술을 모색할 필요성이 제기되고 있다. 초임계 유체 추출에 주로 사용되는 이산화탄소는 무독성이고 상온 상압에서 거의 잔존하지 않는 특성을 가지고 있어 상기와 같은 일반 용매의 인체 유해성 문제에서 완전히 자유로울 수 있다.

식품, 의약품, 향료 등의 산업분야에서 원하는 물질을 얻어내기 위하여서는 유기용매를 사용하여 추출을 하고, 증류를 하여 용매와 원하는 물질을 분리시킨다. 일반적으로 증류공정의 경우는 계속적인 상전이에 필요한 막대한 양의 잠열수요로 인하여 분리조작 중 가장 에너지를 많이 사용하는 공정상의 문제점을 지니고 있다. 또한, 액-액 용매추출의 경우는 추출 조작 후 추출물과 용매 혼합물의 분리를 위하여 에너지 과소비형의 증류나 증발 등의 후속 분리조작이 필요한 근본 문제를 지니고 있다. 그러나 초임계 유체를 사용하는 경우에는 상의 전이를 수반하지 않으면서 단순히 압력을 가압-감압하는 반복조작이 수반되며, 이로 인하여 가압장치 조작에 필요한 전기 에너지만을 필요로 하는 특징을 지니고 있다. 따라서 의도

하는 제품의 생산에 있어서 증류나 추출과 같은 분리조작과 비교하여 에너지 절약 효과가 크다. 또한 추출 후 발생하는 폐기물에 대해서도 유해 용매가 잔존하지 않아, 여타의 다른 추출법에 비해 폐기물에 별도의 처리를 할 필요가 없는 장점을 가지고 있다.

초임계 추출에 사용되는 장비는 고압을 유지할 수 있는 용기와 이 용기 내로 유체를 공급하며 압력을 올려줄 수 있는 가압장치가 주요 장비이다. 용기 내에 처리하고자 하는 물질이나 부품을 넣고 밀봉한 후, 가압장치를 이용하여 유체-일반적으로 이산화탄소-를 용기 내로 공급하여 압력과 온도를 올려 초임계 상태를 만든다. 초임계 상태에서 일정시간 유지하여 원하는 추출이나 반응과 같은 공정을 진행시킨다. 이후 한쪽으로 유체를 방출하여 용기의 압력을 낮추어 공정을 마치거나, 방출된 유체를 다시 가압장치로 보내어 용기 내부로 공급하는 순환방식의 공정으로 진행된다. (그림 4).

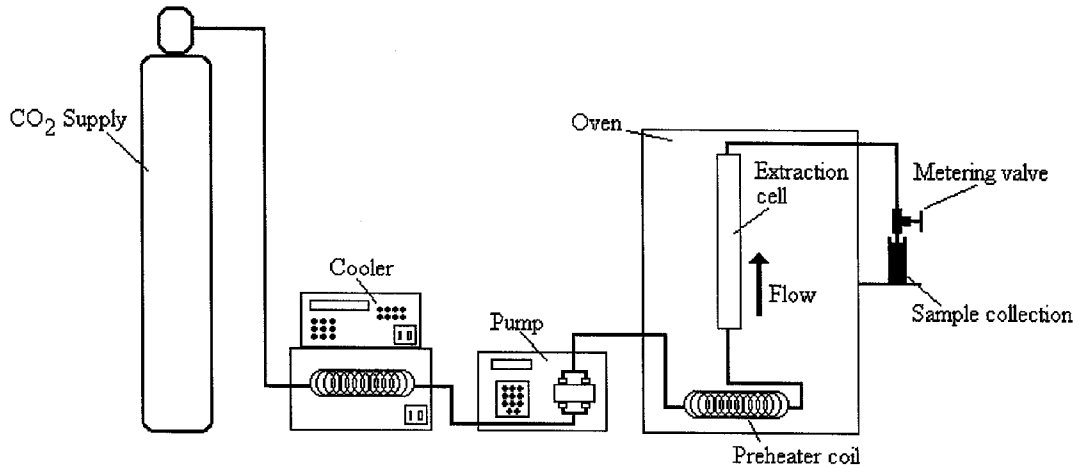


그림 4. 초임계 추출 과정의 모식도.

본 연구는 초임계 이산화탄소 유체의 추출 압력과 온도를 조절하여 용해력에 변화를 줌으로써 잣송이 중의 생리활성을 가진 유효성분의 선택적 추출이 가능하게 하여, 추후의 생리활성 검증을 통해 높은 유효성분 함량을 가지는 추출물을 얻기 위한 최적의 추출 조건을 확립하는 것에 있다.

(2) 최적의 초임계 잣송이 추출 조건 확립

(가) 잣송이 원료의 전처리

잣송이 원료를 경기도 가평의 가평잣영농조합으로부터 공급받아, 건조하지 않고, 경동시장의 제분소에서 "추말" 분쇄과정을 거쳐 추출의 원료로 사용하였다. 일반 용매 추출과는 달리 초임계 추출과정은 추출기에 원료가 추출조에 정치된 상태에서 초임계 상태의 이산화탄소를 계속 흘려주면서 추출이 진행되므로, 원료의 입자 크기가 추출 수율에 많은 영향을 미친다. 즉, 입자사이즈가 크면, 입자의 표면적이 넓어짐으로써 용매와 접촉할 수 있는 면적이 작아지고, 추출 수율이 낮아지는 단점이 있고, 입자가 너무 고우면 용매가 원활하게 원료를 통과하지 못하여 추출 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 본 연구에서는 가장 높은 생리활성을 보이는 최적의 압력과 온도의 초임계 추출 조건을 탐색하는 것이 목적이므로, 향후에 최적의 생산성을 확보하기 위해서는 입자크기에 따른 생산 시간과 수율의 차이를 확인하는 생산 최적화

연구가 필요하다.

(나) 1L 초임계 추출기를 이용한 항비만 효능을 나타내는 최적의 추출압력과 온도의 탐색

본 실험은 알려진 물질을 최대로 얻기 위한 최적 추출 압력과 온도 탐색 시험과는 달리, 초임계 추출 압력과 온도의 변화에 의한 밀도(용해력)에 따라 가장 높은 생리활성을 보이는 추출물의 획득에 목적이 있다. 따라서 추출물 수율과는 상관없이 최적의 온도와 압력이 정해지면, 추후에 입자크기와 추출시간 등의 변수를 통해 최대의 생산성을 갖는 운전 조건을 확립하여야 한다.

잣송이의 경우 3-carene, limonene, α-pinene과 같은 휘발성 정유들이 검출되는 바, 이 등[13]의 이들의 추출에 적합한 150기압을 최저로 하고, 현재 일반적 상용공정의 최대 압력인 400기압의 범위에서 추출을 수행하였고, 온도는 임계온도인 31℃이상으로 진행하되, 추출물의 열변성을 우려하여 70℃ 이하의 범위에서 추출을 진행하였다.

잣송이의 최적 초임계 추출 압력과 온도 탐색에 사용된 추출기의 개략도는 아래 그림 5과 같다.

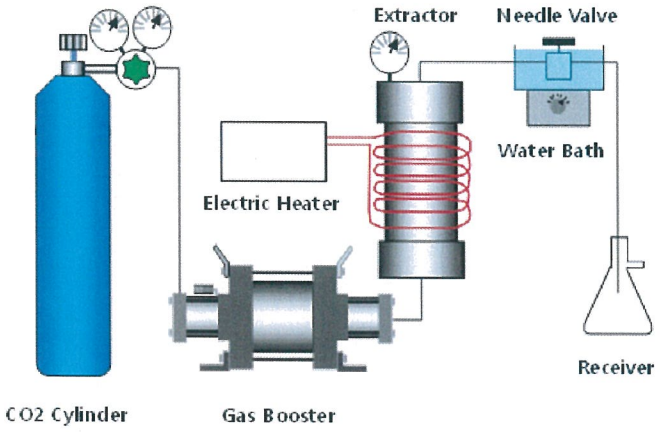


그림 5. Flow diagram of supercritical extraction system

내용량 1L의 초임계 추출장비에 분쇄된 원료 310g을 투입한 후, energized seal로 밀봉하고 추출기의 head 부분과 본체는 clamp 체결 방식을 사용하였다. 초임계 유체로 사용된 CO_2는 cylinder에서 가스 상태로 나와서 원하는 압력에 도달할 때까지 Haskel gas booster (모델 No. 30/75)를 이용하여 압력을 높이고 원하는 압력에 도달한 후, 추출기 내부가 일정한 압력을 유지하도록 needle valve를 조작하면서 추출물을 500ml 가지 달린 플라스크에 포집하였다. 추출기의 온도는 자동 온도 조절이 가능한 전기 히터를 사용하여 일정하게 유지하였다. 추출 종료 시점은 추출물의 무게가 더 이상 증가 될 때까지 최대한 진행하였다.

잣송이의 유효성분의 추출을 위하여 초임계 유체의 압력과 온도를 달리한 20개 처리구에 대한 추출 결과는 표 1과 같다.

표 1) Yield of korean pine cone extracts by supercritical CO_2 extraction (1L extractor)

Extraction condition		Yield (%)	Extraction condition		Yield (%)
Extraction pressure (bar)	Extraction temperature (℃)		Extraction pressure (bar)	Extraction temperature (℃)	
150	40	4.19	250	60	7.00
150	50	4.52	250	70	3.71
150	60	5.52	300	40	4.24
150	70	4.19	300	50	4.50
200	40	1.77	300	60	4.46
200	50	3.17	300	70	6.03
200	60	6.77	400	40	4.36
200	70	8.06	400	50	4.94
250	40	2.33	400	60	5.49
250	50	3.87	400	70	5.39

추출결과, 전 조건에 걸쳐 4~6%의 추출 결과를 보였는데, 이는 Woo 등[14]의 솔 추출물의 초임계 추출에 의한 수율과 유사하였다.

일반적으로 초임계 이산화탄소에 대한 특정 물질에 대한 용해도는 초임계 이산화탄소의 밀도와 그 물질의 증기압에 영향을 받는다. 만약 초임계 이산화탄소의 밀도가 높고, 특정 물질에 대한 증기압이 높은 조건이라면 용해도는 증가하게 된다. Triglyceride계 오일 추출의 초임계 추출의 경우[15], 특정한 압력을 기존으로 낮은 경우는 추출 수율이 밀도에 영향을 받아 온도가 낮을수록 추출 수율이 증가되지만, 높을 경우는 초임계 유체의 밀도보다는 용질의 증기압에 영향을 받아 온도가 높은 조건일수록 추출 수율이 높아지는데 이는 카놀라유[16]와 해바라기씨[17]의 초임계 추출에서도 공통적으로 나타나는 경향이다. 하지만 잣송이의 경우, 모든 압력 조건에서 온도가 높을수록 추출수율이 높아지는 경향만 있을 뿐, 압력의 변화에 대해서는 특별한 경향을 보이지 않았다. 그 이유는 잣송이의 초임계 추출물에는 휘발성 정유이외에 다양한 계열의 물질이 이로 인해 추출 특성이 일관되게 나타나지 않은 것으로 추론할 수 있다. 잣송이에는 terpenoid계 성분, phenol계 성분, 탄닌 및 알칼로이드 성분이 함유된 것으로 알려져 있으며, 이외에 새로운 diterpenoid acid들이 함유된 것으로 최근에 보고되었다[18].

(다) 10L 초임계 추출기를 이용한 초임계 잣송이 추출물의 시험 생산

내용량 10L의 초임계 추출기에 분쇄된 잣송이 원료 3Kg을 넣은 후, 1L와 동일한 CO_2 gas booster를 장착하여 추출한 결과를 아래 표2에 나타내었다.

추출기의 부피가 10배 늘어났음에도 동일한 CO_2 gas booster를 사용하였으므로 전반적으로 1L 추출기 사용시보다 수율이 낮게 나타났다.

CO_2의 유속은 추출하고자 하는 물질의 초임계 CO_2에 대한 용해도, 입자 사이즈, 추출용기의 Length/Diameter ratio와 함께 중요한 초임계 추출의 공정 변수이다. 유속이 충분히 클 경우에는 용매와 원료 표면 사이에 농도 구배(gradient)를 형성하게 되고, 원료안에서의 용질의 확산 속도가 추출 속도를 지배하게 된다. 유속이 충분히 낮을 경우, 원료의 표면으로부터 용질의 제거가 낮아지게 되고, 원료내의 용질의 확산은 용질의 제거 속도에 맞춰지게 된다.

표 2) Yield of korean pine cone extracts by supercritical CO_2 extraction (10L extractor)

No.	Extraction condition			Yield (%)
	Extraction pressure (bar)	Extraction temperature (℃)	Extraction Time (min.)	
1	150	40	420	1.26
2	150	40	420	1.46
1	300	70	540	3.46
2	300	70	540	3.87

(라) 50L 초임계 추출기를 이용한 초임계 잣송이 추출물의 시험 생산

50L 추출 장비는 1L와 10L와는 달리 아래 그림 6과 같은 CO_2 순환식 추출장비로 추출조에서 빠져나온 타겟추출물과 CO_2의 혼합물이 분리조에서 분리되어 CO_2는 다시 저장조를 거쳐 압축펌프를 통해 다시 추출조로 공급되는 방식으로 추출이 진행된다.

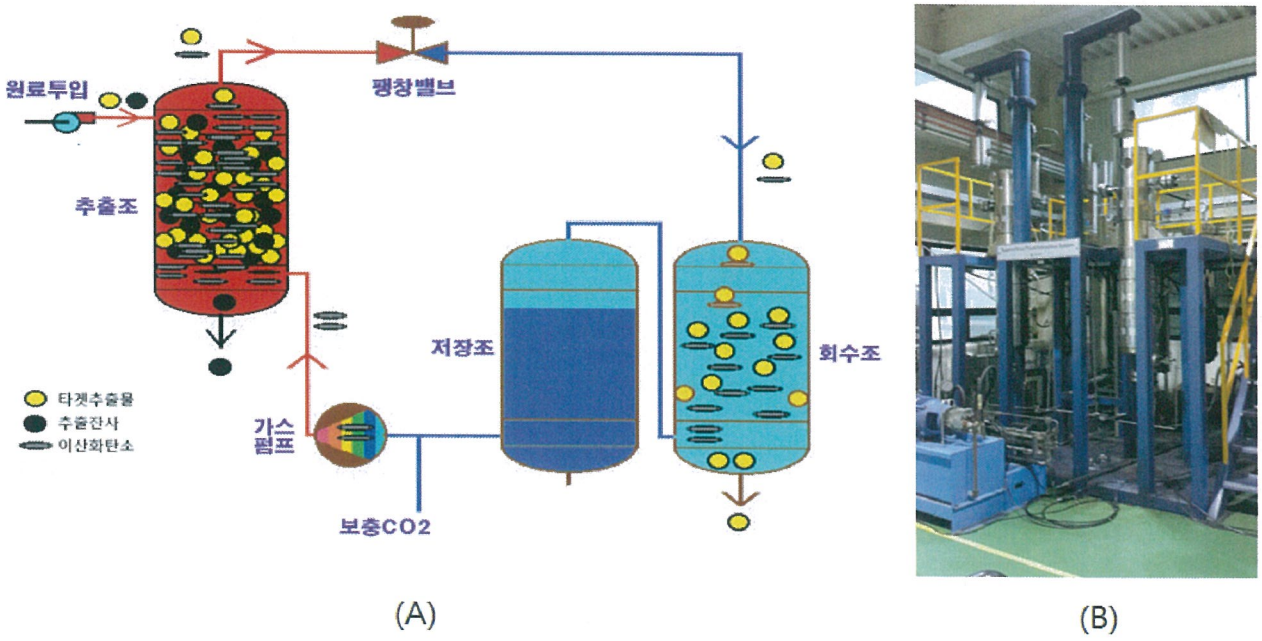


그림 6. (A) Circulatory supercritical extraction system, (B) Commercial system of supercritical CO_2 extraction (50L *2)

내용량 50L 추출 장비에 원료 13.2Kg을 가득 채우고 지방세포 분화 억제 활성이 가장 좋은 150bar, 40℃의 추출 조건에서 CO_2 펌프의 유량을 최대인 60L/hr의 속도로 420분 추출을 수행한 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3. Yield of pine cone extracts by supercritical CO_2 extraction (50L extractor)

Lot No.	Extraction condition at			Yield (%)
	Extraction pressure (bar)	Extraction temperature (℃)	Extraction Time (min.)	
20140414	150	40	420	3.81
20140416	150	40	420	3.60
20140417	150	40	420	3.71

평균 추출 수율 3.71%이고 조추출물의 성상은 녹갈색의 고점액성 추출물을 수득하였다.

초임계 추출로 얻어진 crude 추출물을 5배수의 95% 에탄올에 용해시키면, 거의 용해되며 이를 여과하여 용매를 증발시켜 농축하면 좀 더 투명한 추출물이 얻어지며 이때의 수율은 95% 이상이다 (그림 7)

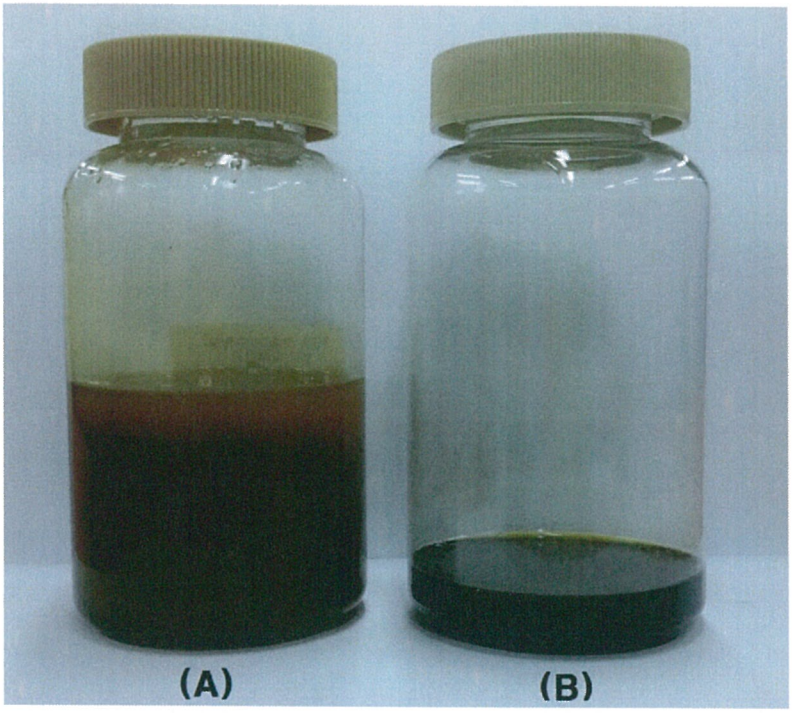


그림 7. 초임계 잣송이 추출물. (A) 정제전, (B) 정제후.

(마) 최적추출조건으로 pilot 생산 및 scale up 모색방안 검토

잣송이 초임계 추출물의 pilot 생산은 다음과 같이 진행하였다. 내용량 50L의 초임계추출장비에 원료 잣송이 마쇄물 13kg을 가득 채우고 지방세포의 분화 억제 활성이 가장 좋은 추출조건(추출압력;150bar, 추출온도;40℃, 추출시간;420min, CO_2 펌프유량; 60L/hr)에서 총 9회 2번 추출한 결과를 표 4와 표 5에 나타내었다.

표 4. 50L의 초임계추출장치에서 추출한 잣송이 추출물의 수율

추출번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9
시료량	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg
추출시간	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr
잔사무게	12.41kg	12.41kg	12.42kg	12.47kg	12.43kg	12.47kg	12.43kg	12.44kg	12.47kg
잔사수율	4.53%	4.53%	4.46%	4.07%	4.38%	4.07%	4.38%	4.30%	4.07%
총 추출물량 4,100.4g(3.50%)									

* 추출물량은 수분을 제거한 후의 무게를 측정하여 얻은 값임

표 5. 50L의 초임계추출장치에서 추출한 잣송이 추출물의 수율

추출번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9
시료량	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg	13kg
추출시간	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr	7hr
잔사무게	12.36kg	12.37kg	12.35kg	12.34kg	12.37kg	12.38kg	12.34kg	12.38kg	12.36kg
잔사수율	4.92%	4.85%	5.00%	5.08%	4.85%	4.77%	5.08%	4.77%	4.92%
추출물량	520g	510g	510g	540g	530g	500g	530g	510g	530g
추출물 수율	4.00%	3.92%	3.92%	4.15%	4.08%	3.85%	4.08%	3.92%	4.08%
총 추출물량 4,680g(4.0%)									

* 추출물량은 수분을 제거한 후의 무게를 측정하여 얻은 값임

표 4와 표 5의 잣송이 추출물의 수율이 차이는 표 4의 추출시 사용한 원료는 장시간 노지에서 보관한 후 추출하였으며, 표 5의 추출시 사용한 잣송이는 작년 10월달 잣송이 수확시기에 바로 추출한 것이다. 전체적으로 수율은 3.5~4.0%의 수율을 나타내었다.

Scale up 방안은 초임계 추출장치는 상업적으로는 50L 초임계추출장치를 많이 사용하고 있는 실정이므로 대량생산에서는 50L 반응기를 기본 4개로 설비하여 생산할 계획이며, 그리하면 한 달 150kg 생산가능하고, 초기 소재원료 생산량으로는 적절하다고 판단되고, 향후 시장상황을 고려하여 반응기 추가 증설도 고려하고 있습니다.

- 초임계 잣송이 추출물의 경우 현재 사용되지 않는 부산물을 활용하므로 추출물원료 15만원/kg 단가를 예상하므로, 관련 경쟁 원료(15-18만원/kg)와 비교해 원료 경쟁력이 있음

- **잣송이 원료 : 500원/kg (추출수율 : 5%, 원료단가 : 10,000원/kg)**
- **제조가공 및 기타 비용 (용매 포함) : 140,000원/kg 추출물**
- **예상 공급가격 : 150,000원/kg**

초임계 추출 압력과 온도의 변화에 의한 밀도(용해력)에 따라 가장 높은 생리활성을 보이는 추출물을 획득하기 위해 수율과 상관없이 최적의 온도와 압력을 확인하기 위해 여러 압력(150, 200, 250, 300, 400bar)과 온도(40, 50, 60, 70℃)에서 추출을 하였다.
그 결과 지방세포 분화 억제 활성이 가장 좋은 150bar, 40℃의 추출조건에서 CO_2 펌프의 유량을 최대인 60L/hr의 속도로 420분 추출을 수행한 결과 평균 추출 수율은 3.71%이고, 조추출물의 성상은 녹갈색의 고점액성이었다.

지금까지 체지방 감소 기능성 소재는 총 21가지가 식약청에 등록되어 있으며 가격은 가르시니아 캄보지아 추출물(33,000원/kg), 클레우스 포스콜리 추출물(380,000원/kg) 등 가격대가 30,000~380,0000원 정도를 형성하고 있으며, 대부분 개별인정 원료이므로 독점으로 인해 가격대가 공개되어 있지 않고 있다. 저희 잣송이 추출물은 현재 제조가격을 kg당 100,000~150,000원으로 예상하고 있으므로 충분히 기존 체지방 감

소 소재와 가격경쟁면에서도 우위에 있다고 판단된다.

3.2.2. 기능/지표성분 선정 및 분석조건의 최적화

가. 초임계 잣송이 추출물의 성분 분석

초임계 잣송이 추출물 중 유효성분을 확인하고 이 중 기능성원료의 표준화를 할 수 있는 기능/지표성분을 찾아 설정하였다.

분석시료	Lot. No.
초임계 잣송이 추출물	20130708

(1) Terpene류 확인

솔잎, 잣잎 등에는 Terpene류 성분들이 다량 함유되어 있는 것을 알려져 있어 초임계 잣송이 추출물 중 Terpene류의 함량을 확인하기 위하여 총 9종(α-pinene, β-pinene, 3-carene, Limonene, α-Thujoue, Bornyl acetate, Sabinene hydrate, Terpinolene, γ-Terpinene)을 가스크로마토그래피(GC)로 측정하였다.

① 가스크로마토그래피(GC) 분석 조건

각각의 표준품 10~30mg을 정밀하게 달아 10mL 정용플라스크에 넣은 뒤 Methylene Chloride로 녹인 용액을 표준용액으로 하였고, 초임계 잣송이 추출물 약 500mg을 정밀히 달아 50mL 정용플라스크에 넣은 후 Methylene Chloride에 녹인 용액을 시험용액으로 하였다.

기기분석조건

Instrument	Agilent 7890
Column	HP-FFAP (30m×0.25mm,0.25um)
Injector temp	200℃
Detector temp	230℃
Oven temp.	50℃(2min), 8℃/min→253℃(1.75min)
Carrier gas	N_2
Gas flow	1.0mL/min
Injection volumn	1.0ul
Inlets	Split (10:1)

계산식

$$\text{함량 (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도(ug/ml) x 용액량(ml) x 표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

② 분석결과

초임계 잣송이 추출물에는 Terpene류 9종 중 5종의 성분이 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간대에 Peak가 검출되었다. α-pinene은 약 8.06분, β-pinene은 약 8.91분, 3-carene은 약 9.55분, Limonene은 약 9.9분, α-Thujoue는 약 11.55분, Bornyl acetate는 약 14.59분에 나타났으며, Sabinene hydrate,Terpinolene, γ-Terpinene는 시험용액에서 검출이 되지 않았다<그림 8>.

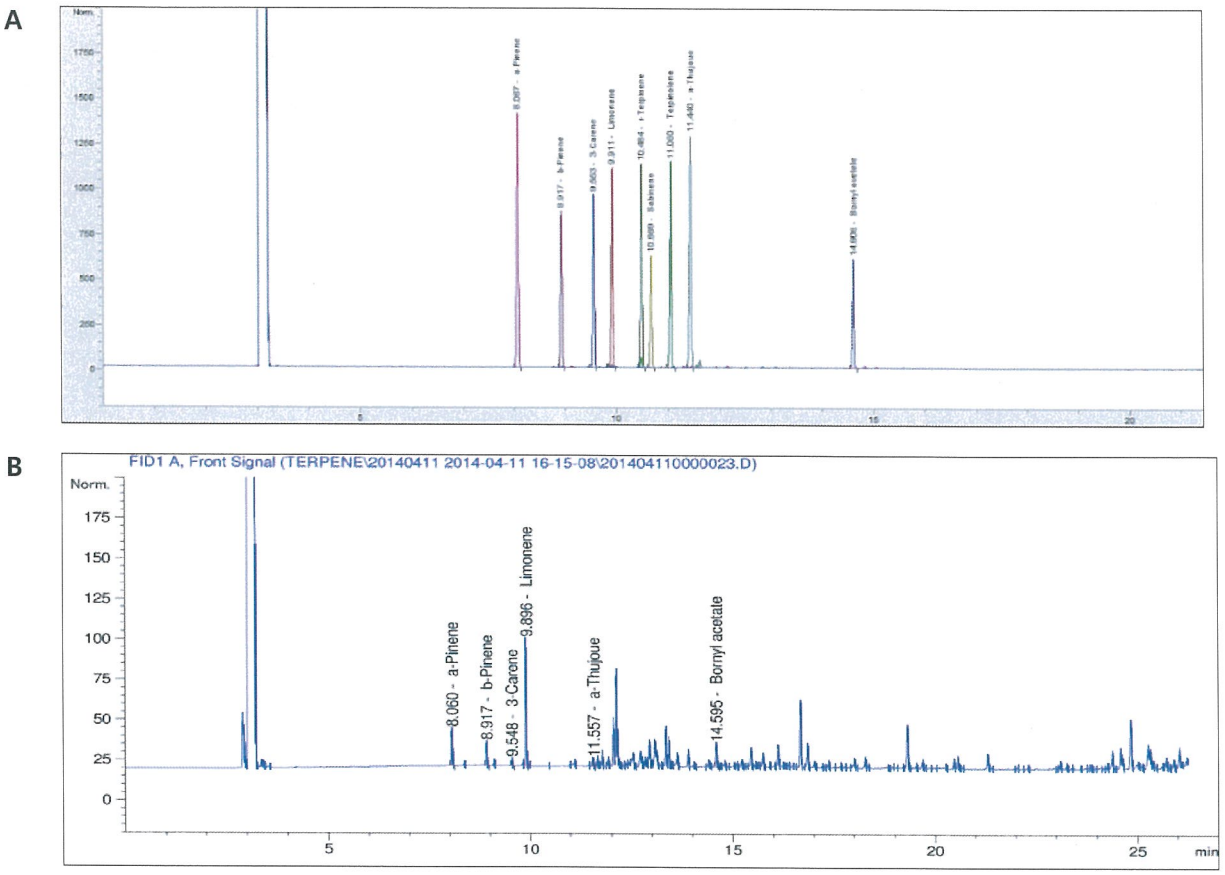


그림 8. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램 (A: 표준용액, B: 시험용액)

분석결과, 초임계 잣송이 추출물의 Terpene류 총 함량은 18.53 mg/g이었으며, 이 중 Limonene의 함량이 10.05mg/g으로 그 함량이 가장 많음을 확인할 수 있었다<표 6>.

표 6. 초임계 잣송이 추출물 중 Terpene류 함량

성분	시험용액농도(μg/ml)	시료량(g)	용액량(ml)	표준품 순도	함량 (mg/g)
3-Carene	3.80209	0.4255	50	0.917	0.41
Limonene	88.87021	0.4255	50	0.962	10.05
Terpinolene	-	0.4255	50	0.960	-
a-Pinene	28.33435	0.4255	50	0.992	3.30
Sabinene	-	0.4255	50	0.984	-
b-Pinene	16.65997	0.4255	50	0.992	1.94
r-Terpinene	-	0.4255	50	0.986	-
a-Thujoue	4.73429	0.4255	50	0.984	0.55
Bornyl acetate	19.37643	0.4255	50	1.000	2.28
합 계					18.53

(2) 가스크로마토그래피 질량분석기(GC/MS)을 통한 초임계 잣송이 추출물 성분 확인

초임계 잣송이 추출물에 들어있는 성분들을 확인하기 위하여 GC/MS Library를 비교함으로서 유효성분들을 확인하였다.

① 가스크로마토그래피 질량분석기(GC/MS) 분석조건

시료 약 300mg을 정밀히 달아 50mL 정용플라스크에 넣은 후 Methylene Chloride에 녹인 용액을시험용액으로 하였다.

기기분석조건

Instrument	Agilent 5973N
Injection volumn	1.0ul
Inlets	Splitless Heater : 270℃
Column	HP5-MS(60m × 250um × 0.25um)
Column flow	1.0mL/min
Oven Temp.	50℃(4min) → 2℃/min → 280℃(10min)
Detector	Ion source : EI Source temp : 280℃ Source voltage : 70 eV Qurd temp : 150℃ Detection mode : scan mode

② 분석결과

초임계 잣송이 추출물에서 106.872분에 9-Octadecenamide, (Z)- Peak가 검출 되었으며, 위 성분과 유사도가 92.7%인 것으로 나타났다<그림 9, 10>.

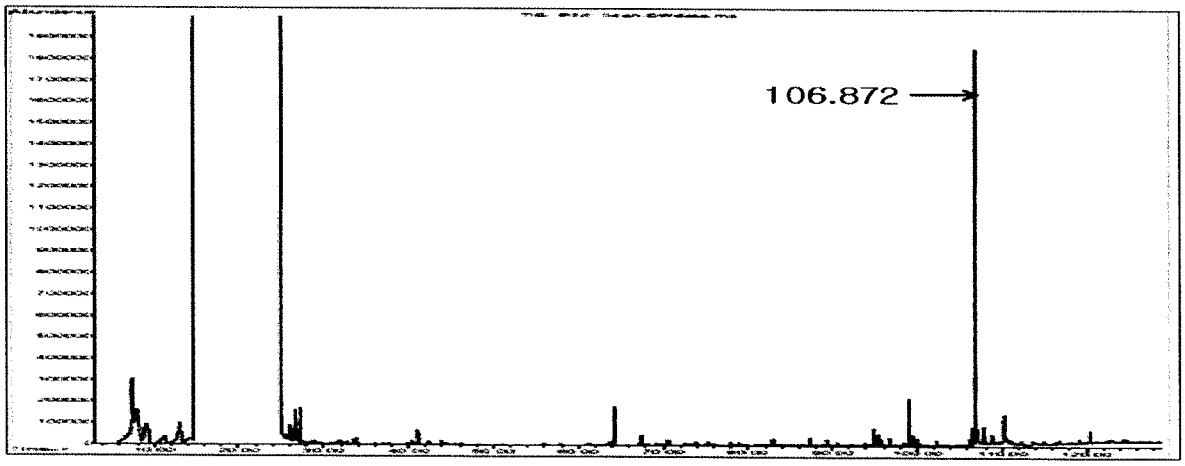


그림 9. GC/MS로 분석한 초임계 잣송이 추출물 이온 크로마토그램

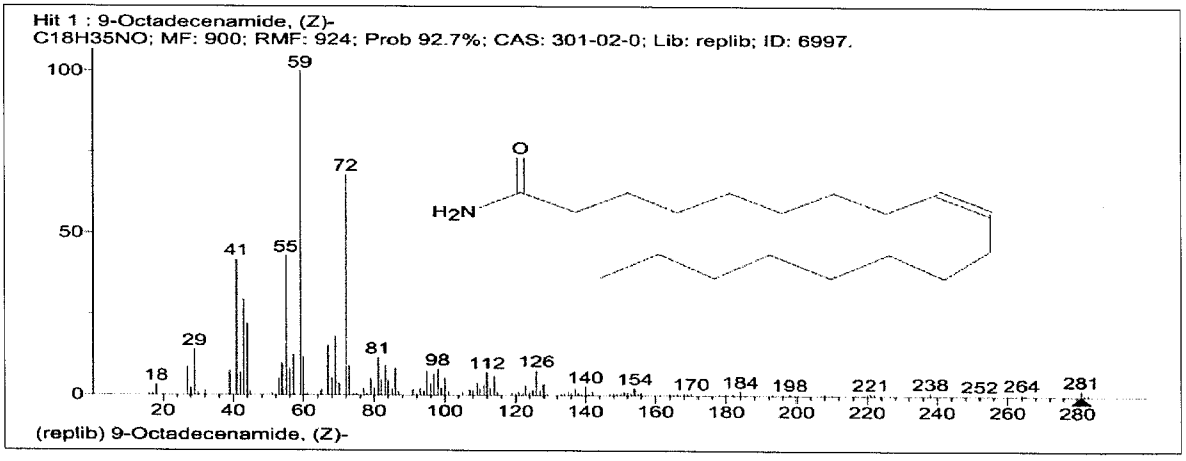


그림 10. 106.872 min Library 자료

추후실험에서는 상용화 된 표준품(이명: Oleamide)과 동일한 성분인지 확인하기 위해 추가 실험을 진행하기로 하였다.

(3) Oleamide 확인 시험 및 지방산 분석

GC/MS를 통해서 유효성분으로 확인된 Oleamide가 초임계 잣송이 추출물 중 들어 있는 함량을 측정하기 위하여 상용화된 표준품을 구입하여 Oleamide 의 함량과 지방산의 함량을 확인하기 위하여 GC로 측정하였다

① 가스크로마토그래피(GC) 분석 조건

초임계 잣송이 추출물 중 Oleamide의 함량을 측정하기 위하여 추출물 약 25mg을 정밀히 달아 0.5N 메탄올성 NaOH 1.5mL을 넣은 후 질소 충진 후 100℃에서 5분간 반응시킨다. 이것을 30~40℃로 냉각 후 BF3-methanol 시약 2mL을 첨가 하여 100℃에서 30분간 반응시킨 다음 iso-octane 2mL을 첨가하여 Shaking 후 포화 NaCl를 첨가한다. 이것을 잘 섞어준 후 상층액을 무수황산나트륨을 이용하여 탈수시킨 것을 시험용액으로 한다. 표준품으로는 Sigma-Aldrich에서 판매되는 Oleamide (Cat.# O2136, CAS # 301-02-0)를 구매하여 시험용액과 동일한 방법으로 전처리하여 분석하였다.

기기분석조건

Instrument	Agilent 7890 GC System
Detector	FID
Column	SPTM-2560(100m × 250um × 0.20um)
Injection temp.	225℃
Detector temp.	285℃
Oven Temp.	100℃(4min) → 3℃/min → 240℃(15min)
Carrier gas	He
Column flow	0.75ml/min
split ratio	200:1
Injection volume	1.0ul

② 분석결과

본 실험방법은 지방산 37종을 분석하는 방법과 동일한 방법으로, 표준용액 Oleamide와 지방산 37종 함께 분석하였다. Oleamide 피크가 48.413분에 나타나고, 초임계 잣송이 추출물에서도 48.396분에 피크가 검출되는 것을 확인 할 수 있었으며, 지방산 37종 중 Oleic acid의 피크가 48.359분에 검출되었다<그림 11, 12>.

Oleamide 와 Oleic acid 피크가 동일한 시간대에 검출되어 두 성분 중 시험용액에서 검출되는 피크가 어느 물질인지 확인할 수 없었고 Oleamide 함량으로 정량한다면 약 15.24mg/g 정도 되나 기능/지표물질로서 함량이 많지 않고 Oleic acid와 분리된다면 그 함량이 더 작아질 것으로 사료되어 기능/지표성분으로 적절치 않음을 확인 할 수 있었다. 또한 초임계 잣송이 추출물 내 지방산을 확인한 결과 함량이 높은 상위 3품목의 지방산은 스테아르산, 올레산, 리놀렌산으로 각각 1.62mg/g, 13.37mg/g, 17.11mg/g으로 검출<표 7>되었으나 함량이 올레산, 리놀렌산의 경우 식물추출물 내 많이 들어있는 지방산임으로 초임계 잣송이 추출물의 기능/지표성분으로

적절치 않음을 확인하였다.

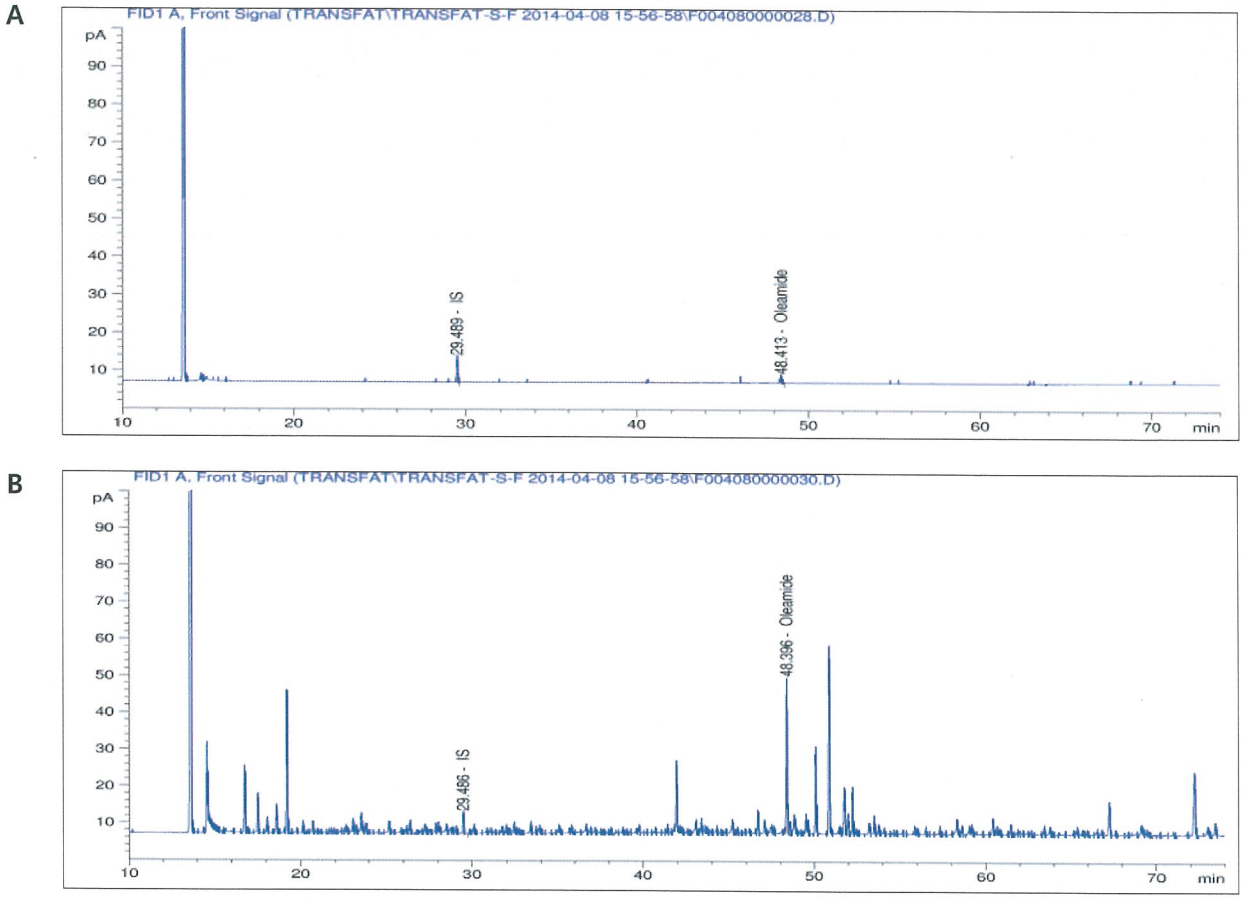


그림 11. 표준용액과 시험용액 중 Oleamide의 크로마토그램 (A: 표준용액, B: 시험용액)

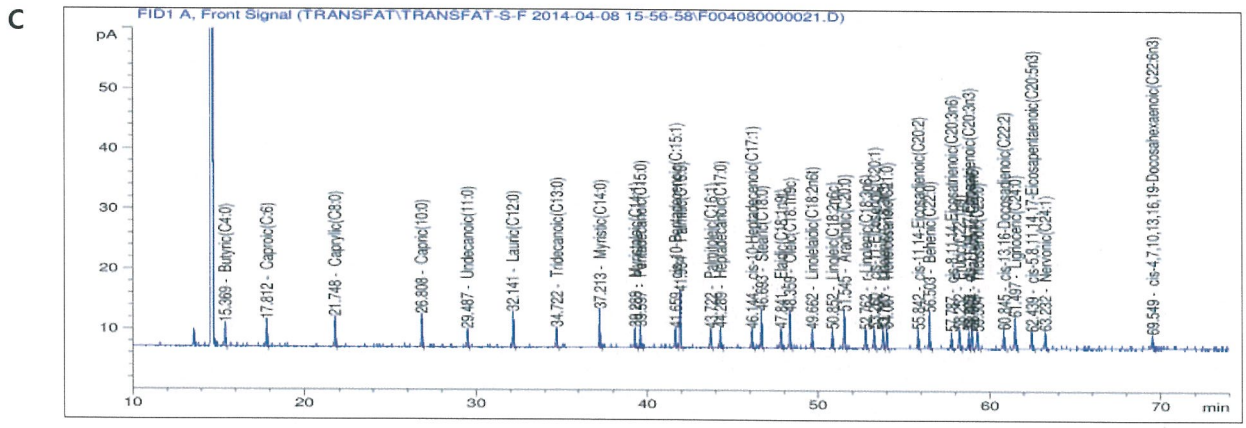


그림 12. 지방산 37종 표준용액 크로마토그램

표 7. 초임계 잣송이 추출물 중 검출된 지방산의 함량

항목	단위	결과
스테아르산	mg/g	1.62
올레산	mg/g	13.37
리놀레산	mg/g	17.11

(4) 초임계 잣송이 추출물 중 Phenol 류 확인

초임계 잣송이 추출물에 함유된 Phenol 화합물의 함유 여부를 확인하기 위하여 Phenol 화

합물 10종을 액체크로마토그래프(HPLC) 및 C18 컬럼을 통하여 분리하는 방법으로 254nm, 280nm, 329nm에서 Phenol 화합물을 확인하고, 초임계 잣송이 추출물 중 Phenol 화합물의 함량을 정량하였다.

① 액체크로마토그래피(HPLC) 분석조건

Table 3. Phenol 화합물 표준물질정보

Name of STD	Co.	Cat #	Lot #	Purity
Protocatechuic acid ethyl ester	Sigma	E24859	STBC9544V	99.2%
p-hydroxybenzoic acid	Sigma	H20806	MKBG4937V	99.9%
Salicylic acid	Junsei	31420-1201	2012J1063	-
Syringic acid	Sigma	S6881	BCBB6446V	99%
p-Coumaric acid	Sigma	C9008	SLBD5279V	99.9%
Cinnamic acid	Aldrich	C80857	00402EE	99.9%
Gallic acid Monohydrate	Kanto chemical Co.	17003-11	805X1827	-
Chlorogenic acid	Sigma	C3878	096K1722	98%
Caffeic acid	Sigma	C0625	SLBF2524V	99.7%
Trans-Ferulic acid	Sigma	128708	STBC5005V	99.8%

각각의 표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 메탄올 25mL에 녹여 표준용액으로 하여 분석하였다. 초임계 잣송이 추출물의 경우 500mg을 10ml 정용플라스크에 취한 후 추출용액(MeOH : 10% Acetic acid = 85:15) 7ml을 넣은 후 30분간 초음파추출, 상온으로 식힌 후 DW로 정용 후 0.45um PTFE syringe filtering 하여 시험용액으로 사용하였다.

기기분석조건

Instrument	HPLC system
Detector	UV detector(254, 280, 329nm)
Column	Cadenza CD-C18 3um, 4.6 × 150mm
Mobile Phase	A : 50mM H_3PO_4 at pH 2.5 B : Acetonitrile

Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)
0	95	5	0.7
5	95	5	0.7
17	85	15	0.7
40	80	20	0.7
60	50	50	0.7
70	50	50	0.7
75	0	100	0.7
80	0	100	0.7
85	95	5	0.7
90	95	5	0.7

Injection Vol.	10㎕
Run Time	90 min
Temperature	35℃

* 파장별 분석항목

254nm - Protocatechuic acid ethyl ester, p-hydroxybenzoic acid, Salicylic acid

280nm - Syringic acid, p-Coumaric acid, Cinnamic acid, Gallic acid Monohydrate

329nm - Chlorogenic acid, Caffeic acid, Trans-Ferulic acid

계산식

$$\text{함량 (mg/g)} = \frac{\text{시험용액농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준품순도}}{\text{시료량(g)} \times 1000}$$

④분석결과

10종의 Phenol 화합물에 대해 254, 280, 329nm에서 실험을 진행한 결과, 254, 329nm에서는 검출되는 피크가 없었으며, 280nm에서는 Syringic acid, p-Coumaric acid, Cinnamic acid가 검출되었으나 표준용액과 시험용액 Spectrum 불일치로 나타났다<그림 13>.

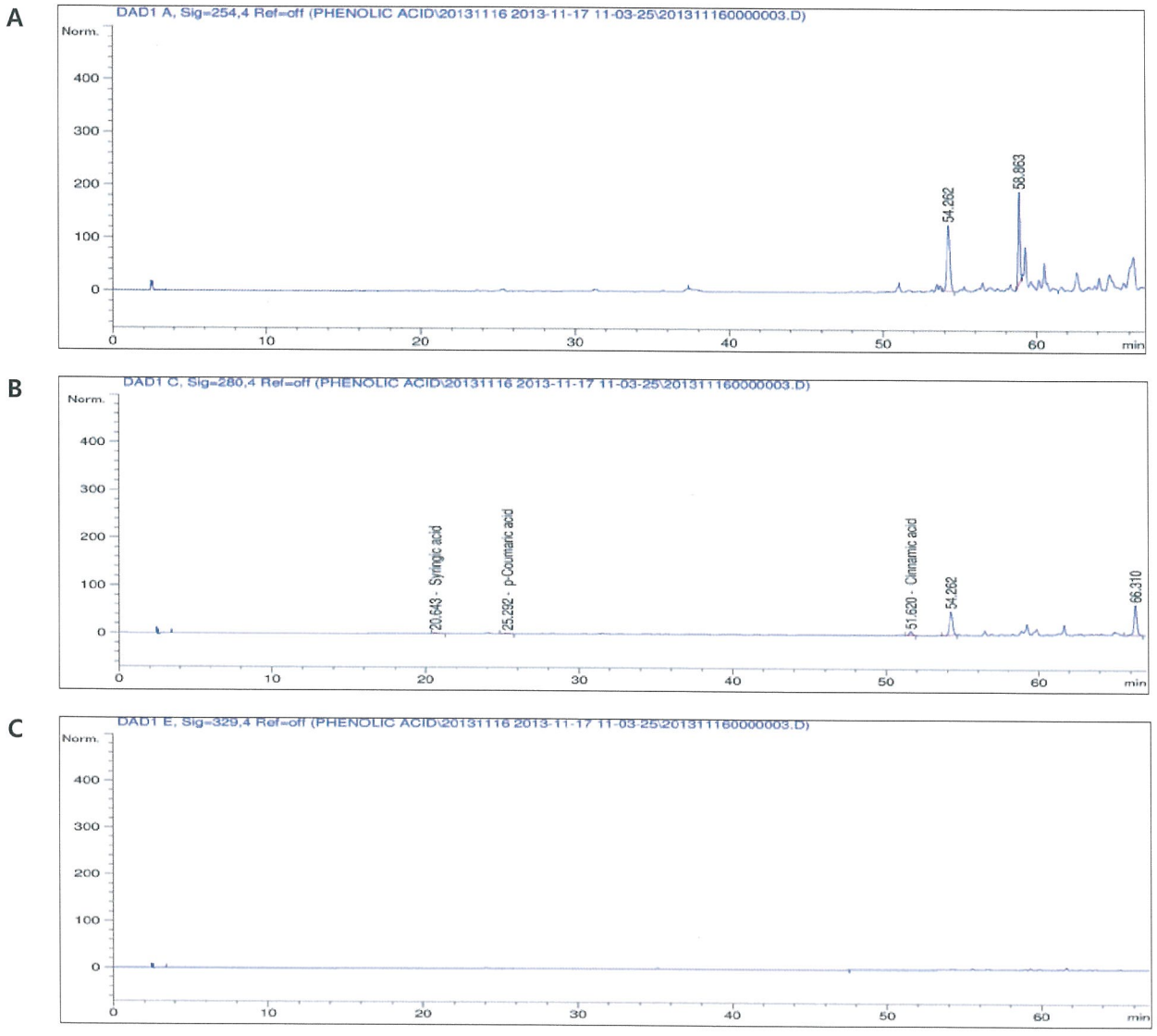


그림 13. 초임계 잣송이 추출물 크로마토그램(A : 254nm, B : 280nm, C : 329nm)

(5) 초임계 잣송이 추출물 중 유효성분 분리정제

초임계 잣송이 추출물 내 들어 있는 함량이 높은 유효성분을 확인하기 위하여 초임계 잣송이 추출물을 분리정제하여 진행하였다.

① 초임계 잣송이 추출물에서 중성물질과 산성물질의 분획

초임계 잣송이 추출물 83g을 메탄올 100mL에 녹여 얼음물에서 냉각한 것에 NaOH 44g을 증

류수 500mL에 녹인 용액을 얼음물에서 충분히 냉각한 것을 넣고 잘 혼합하였다. 이 혼합용액을 Dichlormethane 700mL 씩 3회 추출하여 NaOH층과 분리하였다. Dichlormethane 추출액을 5% NaOH 수용액으로 세척하고 농축하여 중성분획 77.8g을 얻었다. NaOH층은 Dichlormethane 300mL씩 2회 추출하고 NaOH층을 -20℃에서 냉각하고 묽은 염산으로 중화하였다(pH 5). Ethyl acetate 500mL 씩 2회 추출하여 Ethyl acetate 층을 농축하여 산성분획 4.4g을 얻었다.

초임계 잣송이 추출물, 중성분획, 산성분획을 솔잎정유, 리모넨과 Thin layer Chromatography(TLC)로 비교하여 그림 14에 표시하였다. 전개용매 ; Chlorform : Ethyl acetate 3 : 2, 발색 ; 10% 황산 분무 후 가열하여 확인하였다.

그림 14. 잣송이 추출분획의 비교

② 중성분획의 칼럼크로마토그래피에 의한 분리

중성분획 76g을 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 11개 분획으로 분리하였다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 분획 fr.1; 3.65g, fr.1-2; 1.8g, fr.2; 10g, fr.3; 11.36g, fr.4; 3.5g, fr.5; 2g, fr.6; 2.48g, fr.7; 1.72g, fr.8; 0.42g, fr.9; 1.57g, fr.10; 0.7g, fr.11; 20.8g 을 얻었다.

- 컬럼 크기 ; 6.6 x 42cm,
- 용출 용매 ; Dichlormethane : Ethyl acetate 10 : 1(4L) → 9 : 1(2L) →7 : 1(2.4L) → 5 : 1(1.8L) → 3 : 1(2L) → 2 : 1(1.5L) → 1 : 1(1.5L) → Dichlormethane ; Methanol 4 : 1(2L)

각 분획의 TLC는 그림 15에 나타내었으며 물질은 극성이 증가하는 순서로 PK-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -H로 명명하였다

③ PK-D, PK-E 분획의 제조

위 실험에서 얻은 fr.2, fr.3, fr.4, fr.5, fr,6, fr.7을 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 반복하여 PK-D, PK-E 분획을 각각 5.9g, 8.6g을 얻었다.

- 용출 용매 : Dichlormethane : Ethyl acetate(7:1 → 5:1 → 3:1→ 2:1),
- Dichlormethane : Ethyl acetate : Isopropanol(7:1:0.05 → 5:1:0.05 → 2:1:0.05),
- Dichlormethane : Isopropanol(50:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1)

④ PK-E 분획물의 HPLC 분석조건

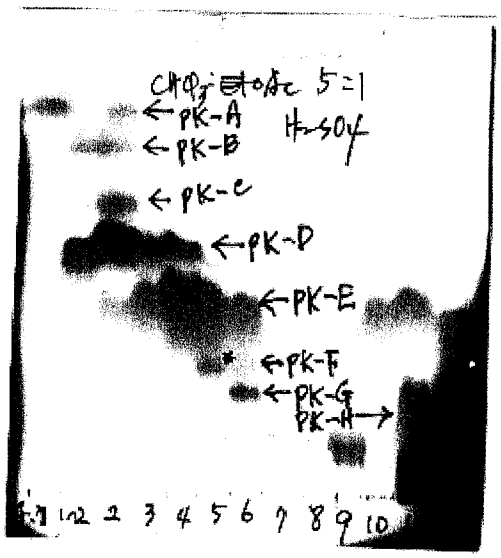


그림 15. 컬럼크로마토그래피 후 각 분획의 TLC

PK-E분획과 초임계 잣송이 추출물에 대하여 HPLC로 분석할 수 있는 조건을 찾고 검출기 파장을 변화시켜 서로를 비교 분석하였다. PK-E 분획물 2.4mg을 5mL 정용플라스크에 넣고 DMSO 1mL을 넣고 녹인 후 메탄올로 정용하였다. 초임계 잣송이 추출물 690.6mg을 50mL 정용플라스크에 넣고 디메틸설폭사이드 10mL을 넣고 녹인 후 메탄올로 정용, 10배 희석하여 기기분석 하였다. HPLC 크로마토그램은 각각 그림 16, 그림 17에 나타내었다.

기기조건

Column	Cadenza CD-C18 (4.6×150mm, 3㎛)
Oven temperature	25℃
Detector	ELSD Drift tube temp : 80℃ Nebulizer gas flow rate : 1.5ml/min DAD (210nm, 250nm 280nm)
Injection volume	20ul
Mobile phase	A : DW (10%) B : Methanol (90%)
Run Time	30 min
Flow rate	0.6ml/min

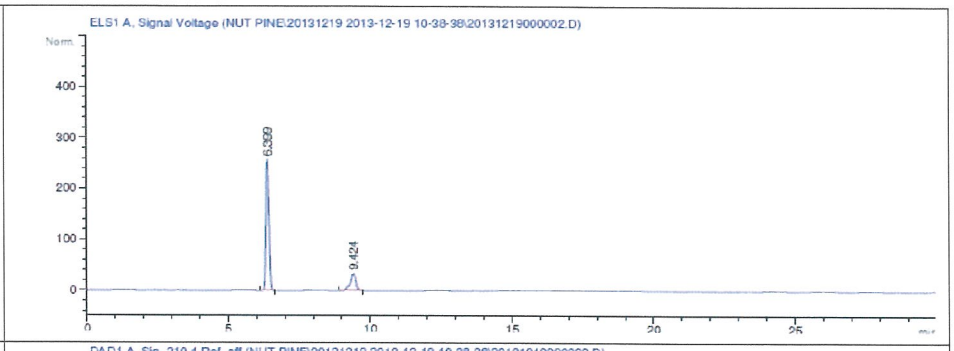
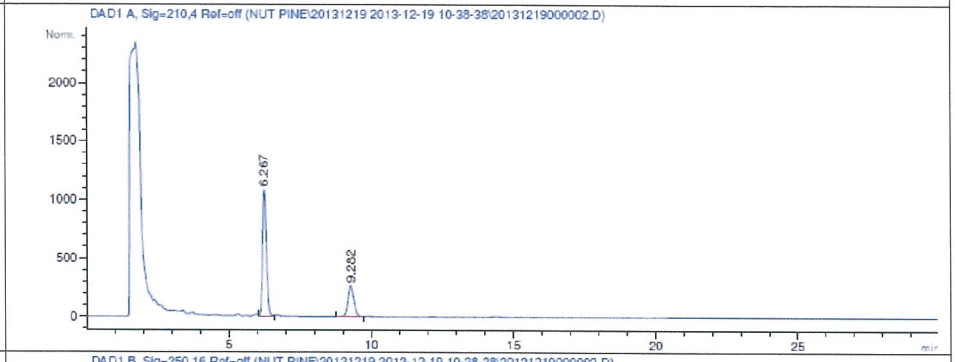
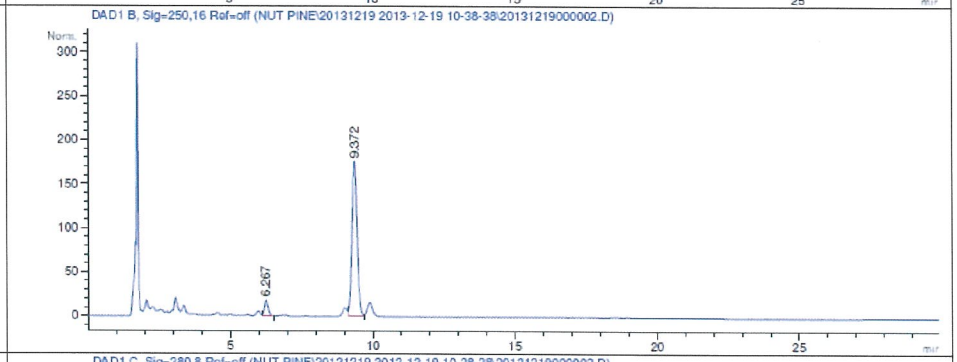
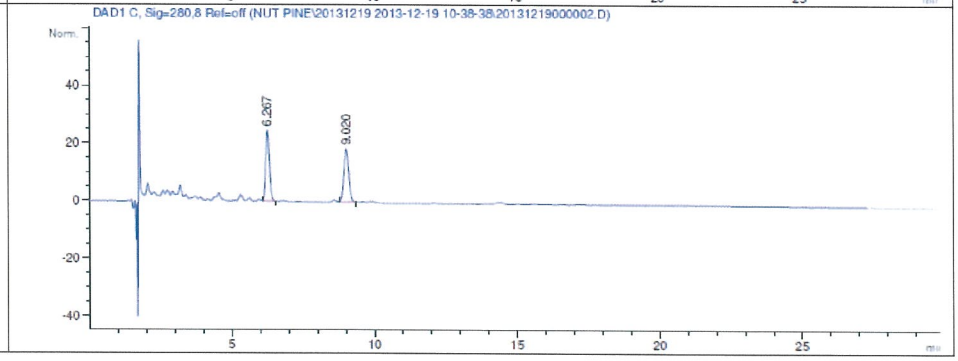
ELSD	
210nm	
250nm	
280nm	

그림 16. PK-E 의 HPLC 크로마토그램

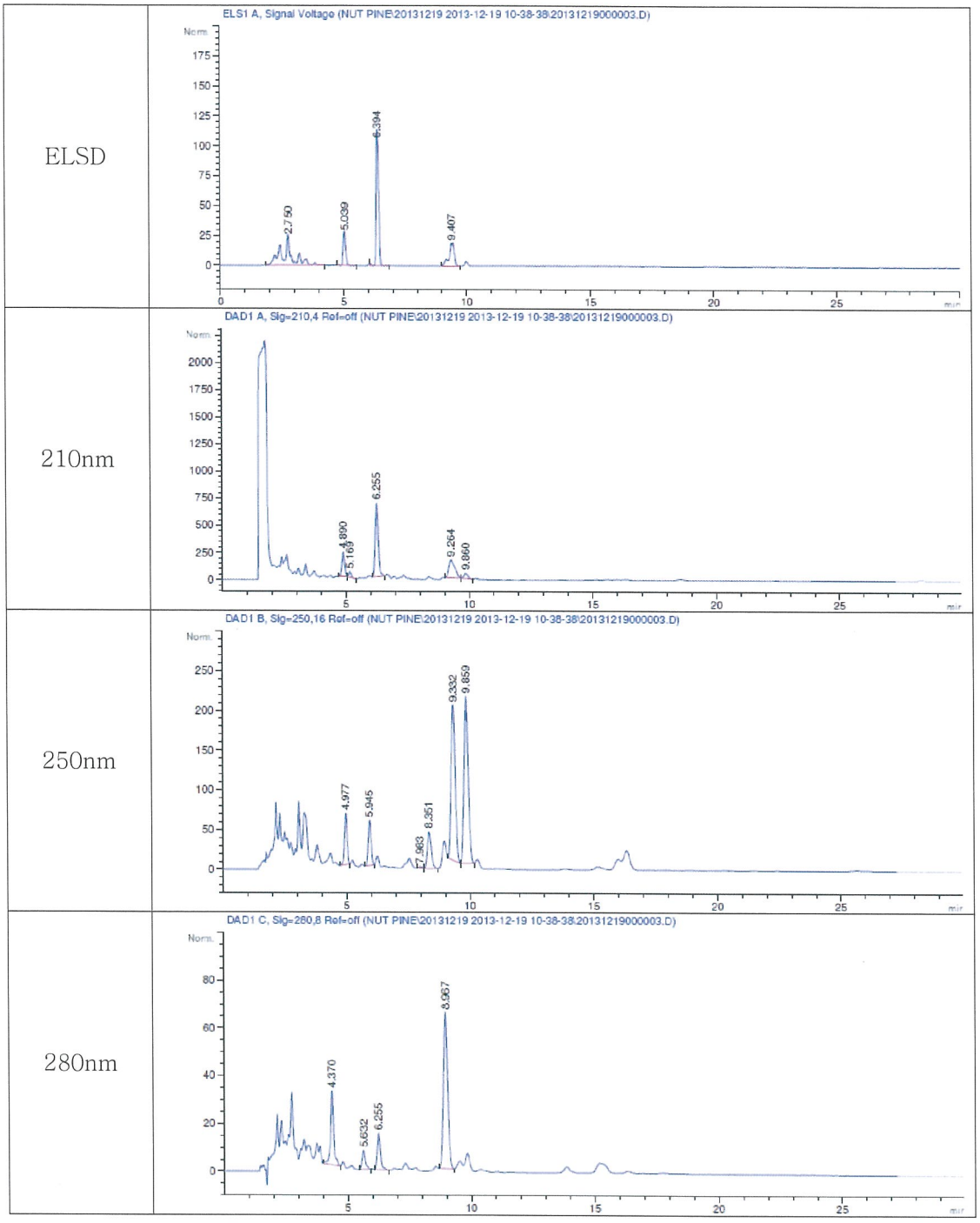


그림 17. 초임계 잣송이 추출물의 HPLC 크로마토그램

⑤ PK-E 분획의 Preparative HPLC에 의한 PK-E1, PK-E2의 분리

PK-E를 메탄올에 녹이고, Waters사 DeltaprepLC300를 이용하여 Preparative HPLC(검출 파장; 210nm)를 수행하여 PK-E1, PK-E2를 각각 분취하였다.

분석결과

Prep-LC를 이용하여 1차 정제물을 그림 18과 같이 분리시킨 후 위 물질로 HPLC를 이용하여 단일물질인지 확인하였다. 그 결과, 그림 19와 같이 단일 물질임을 알 수 있었으며 NMR을 분석을 통해 물질 구조를 확인하는 작업을 진행하기로 하였다. 물질 구조를 확인하기 전까지

"PK-E1"이라고 명명하였다.

Preparative HPLC 조건

Instrument	Prep-LC
Column	Phenomenex, Gemini-NX C18 10u, 250 × 21.20mm
Detector	UV 225nm
Mobile phase	A : DW B : Methanol

min	A	B
0.00	15	85
45.00	15	85
46.00	0	100
70.00	0	100

Injection Vol.	200㎕

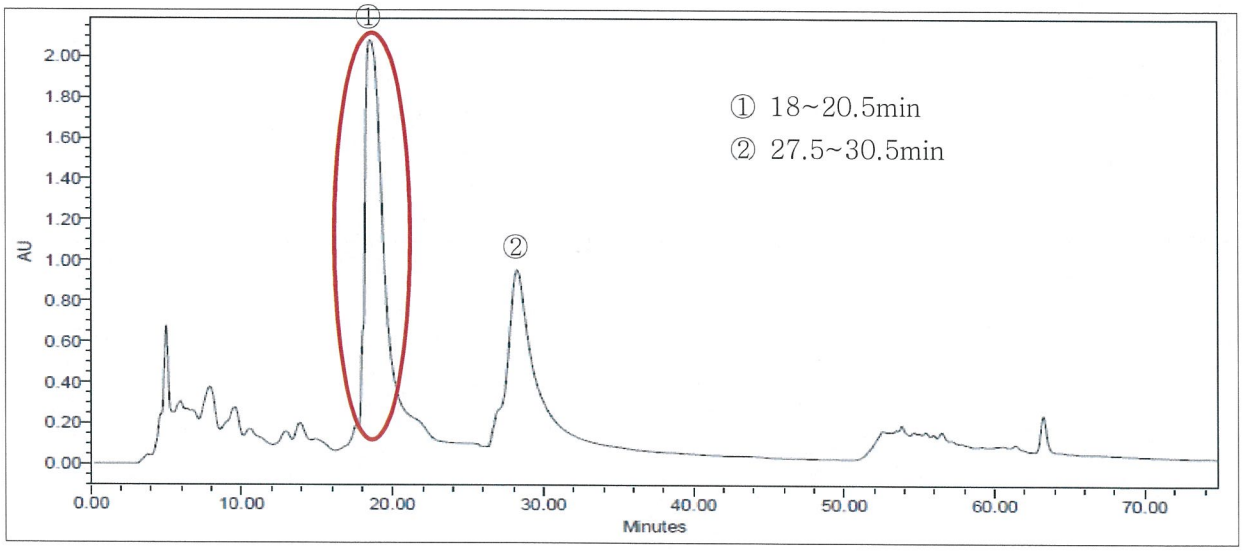


그림 18. PK-E의 Preparative HPLVC 크로마토그램, ①= PK-E1, ②= PK-E2

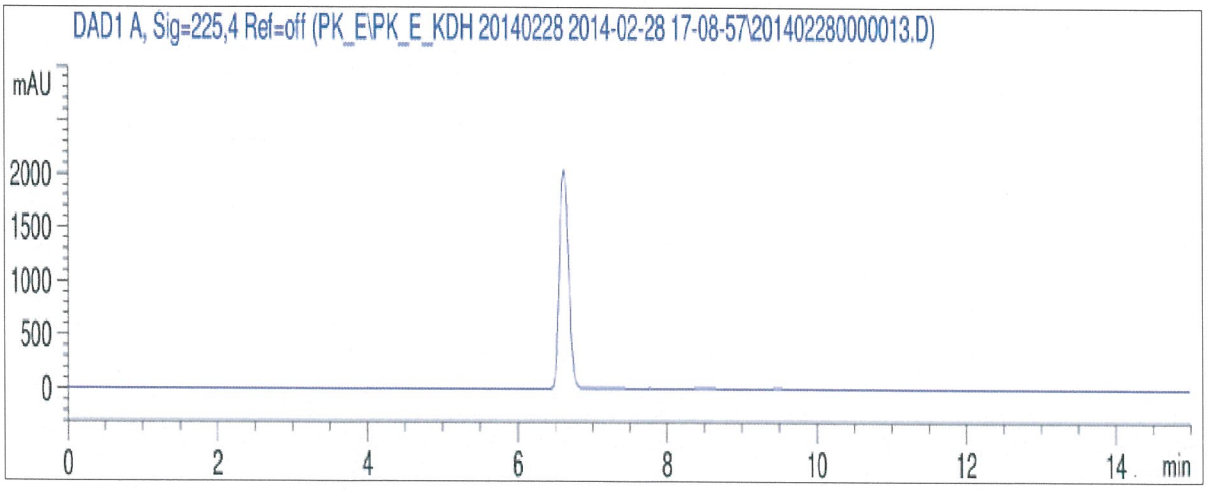


그림 19. 분취한 PK-E1(①)의 HPLC 크로마토그램(이동상 용매; 90% Acetonitrile)

3.2.3. 초임계 잣송이 추출물 중 설정된 기능/지표성분(PK-1) 시험법 검토

초임계 잣송이 추출물에 함유된 PK-E1 함량을 측정하기 위한 시험법을 찾고 적절한 시험법인가 확인하는 것을 목적으로 한다.

가. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 분석조건 1차 확인

PK-E1의 분석조건을 설정하기 위하여1차 정제된 초임계 잣송이 추출 분획물(PK-E)의 분획물을 이용하여 분석조건을 검토하였다.

(1) 고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용한 PK-E1 확인

1차 정제된 초임계 잣송이 추출 분획물(PK-E)을 5mL 정용플라스크에 넣고, DMSO 1mL에 녹인 후 메탄올로 정용한 것을 시험용액으로 한다. 기존 추출물과 비교하기 위하여 정제되지 않은 초임계 잣송이 추출물도 같은 방법으로 제조한다.

기기분석조건

Instrument	HPLC system
Column	Cadenza CD-C18 3um, 4.6 × 150mm
Detector	ELSD Drift tube temp : 80℃ Nebulizer gas flow rate : 1.5ml/min
Mobile phase	A : DW B : Methanol
Injection Vol.	20㎕
Temperature	25℃

min	A	B
0.00	50	50
5.00	50	50
10.00	0	100
25.00	0	100
26.00	50	50
30.00	50	50

분석결과

1차 정제된 초임계 잣송이 추출 분획물(PK-E)을 ELSD로 분석한 결과, 분획물에는 16.244분, 16.766분, 17.341분에 피크가 검출되었으며, 추출물에서는 15.533분, 16.253분, 16.777분, 17.365분, 17.700분에 피크가 검출되었다. 분획물과 추출물에서 동일한 시간대인 약 16분에 고농도 피크가 검출되는 것을 확인 할 수 있었다<그림 20>. 약 16분대 검출된 Peak를 PK-E1으로 간주되며, PK-E1으로 분리정제된 물질로 다시 확인할 필요가 있다고 사료된다.

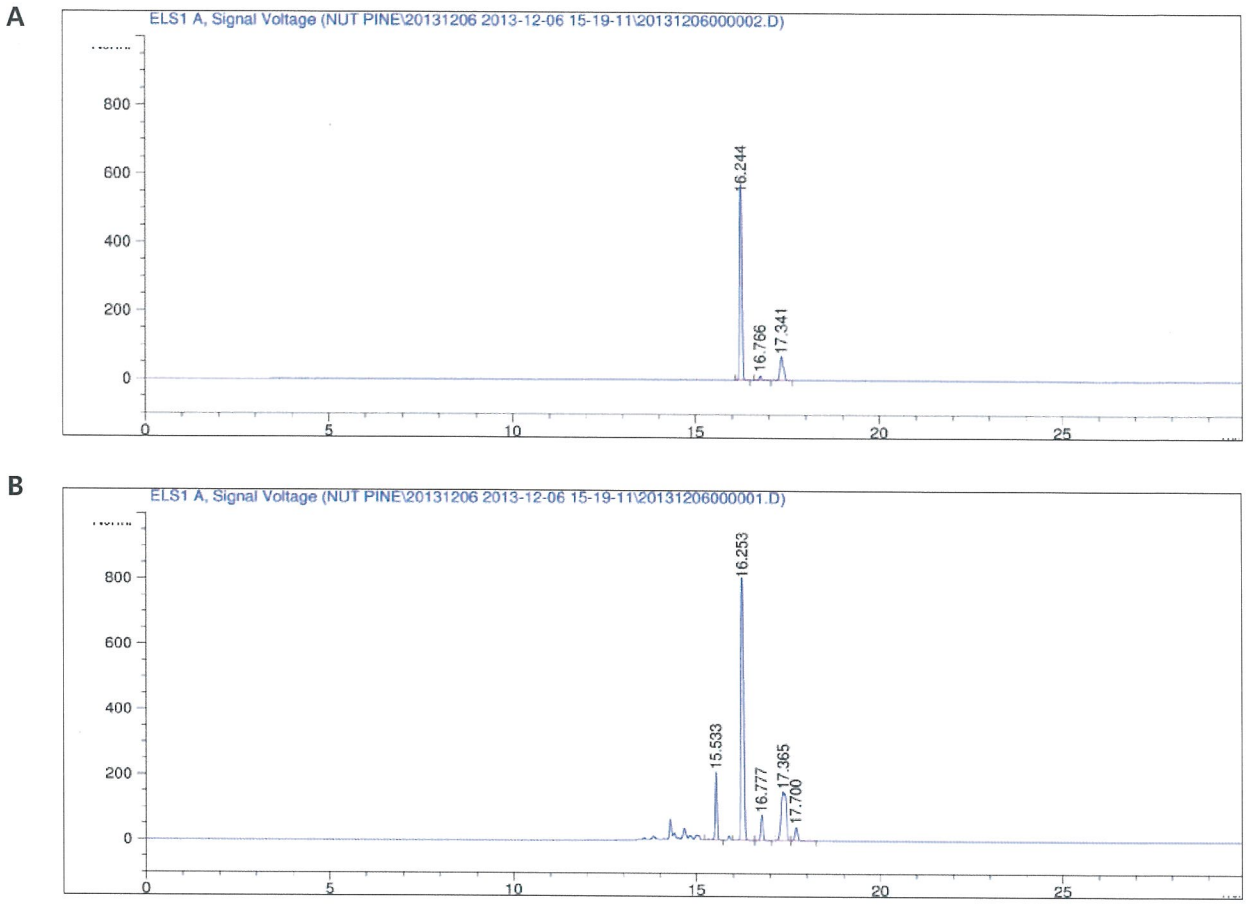


그림 20. 정제물과 추출물의 크로마토그램(A: 정제물, B: 추출물)

나. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 분석조건 2차 확인

2차 실험에서는 분리 정제된 PK-E1 표준품을 사용하여 분석조건을 검토해 보았다. 1차조건에서는 ELSD를 사용한 시험방법이었으나 분석방법이 더 용이한 UVD를 이용하여 검토하였으며, 분리도를 좀 더 개선하기위하여 이동상의 조건을 변경하여 진행하였다.

(1) 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 PK-E1 확인

PK-E1을 정밀히 단 후 메탄올에 녹인 것을 표준용액으로 하였으며, 초임계 잣송이 추출물은 50mg을 50mL 정용플라스크에 정밀히 단 후, 메탄올에 녹인 것을 시험용액으로 사용하였다.

기기분석조건

Instrument	HPLC system
Detector	UV detector(225nm)
Column	Cadenza CD-C18 3um, 4.6 × 150mm
Mobile Phase	A : DW(10%), B : Acetonitrile(90%)
Injection Vol.	5㎕
Run Time	30 min
Temperature	25℃

계산식

$$\text{PK-E1 함량 (mg/g)} = \frac{\text{검량선농도(ug/ml)} \times \text{시험용액전량(ml)} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

분석결과

o 1차실험

시험용액 분석 결과 PK-E1 peak이 약 6분대에 나타났으며<그림 21>, 검출된 peak의 정점인 6.855분과 그 뒤 7.062분의 spectrum 확인 결과 <그림 22> 와 같이 패턴이 다른 것을 확인할 수 있었으며, 피크분리도에 문제가 있음을 확인 할 수 있었다. 시험용액의 크로마토그램과 spectrum은 아래와 같다.

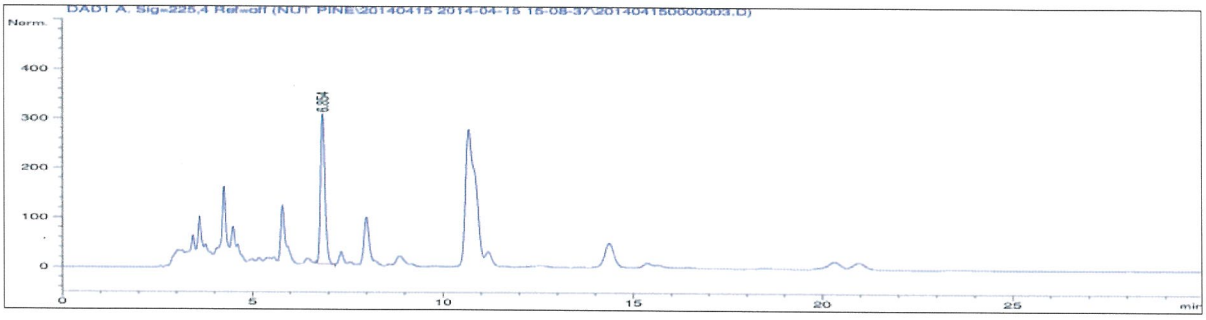


그림 21. 시험용액의 PK-E1 크로마토그램

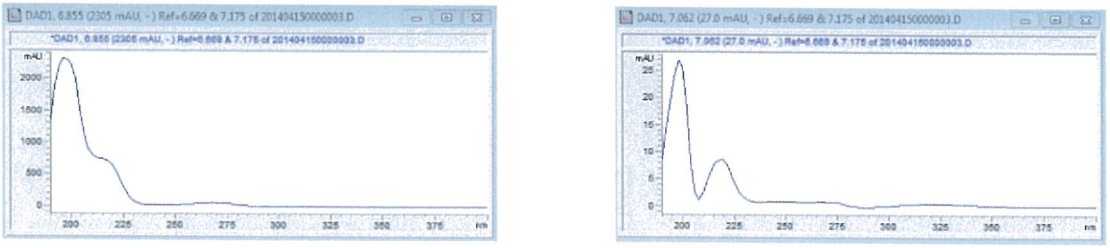


그림 22. 시험용액의 Spectrum

o 2차 실험

1차 실험에서의 Peak의 분리도를 개선하기 위하여 2차 실험에서는 기기 조건을 변경하여 피크분리도를 개선하기로 했다. 기존 DW : ACN = 10% : 90% 의 분석조건을 DW : ACN = 15% : 85% 로 변경하여 추가 진행하였다. PK-E1 피크는 약 8분대 나타났으나, 피크 뒷 부분이 완전히 분리되지 않은 것을 확인할 수 있었다<그림 23>. 이에 3차 실험을 진행하였다.

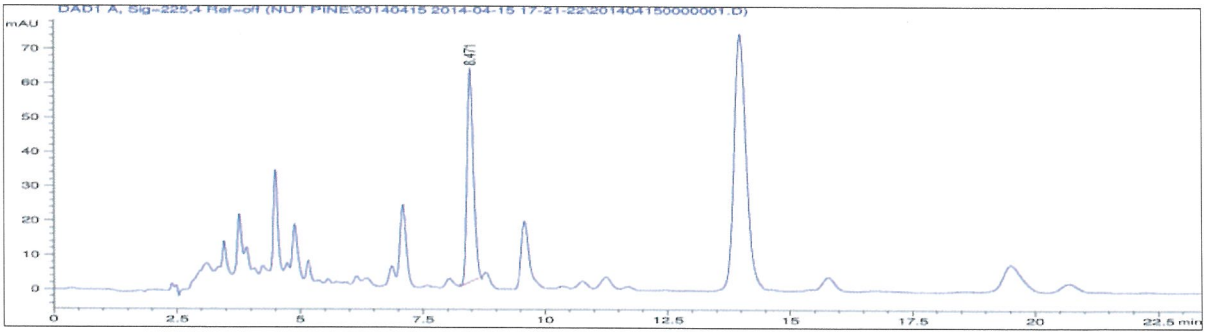


그림 23. 시험용액의 PK-E1 크로마토그램

o 3차 실험

3차 실험에서는 분석기기 조건을 DW : ACN = 20% : 80% 로 변경하여 추가 진행하였다. 그 결과 <그림 24>처럼 피크가 완전히 분리되는 것을 확인하였다. 또한 시험용액의 PK-E1 peak의 purity를 확인하기 위해서 peak의 5 points spectrum을 확인하였다. 5 points의 spectrum이 모두 일치하여 PK-E1 피크가 완전히 분리되었음을 확인하였다<그림 25>. 또한 검량선을 작성하지 않았지만 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1의 함량이 약 130~140mg/g 함유되어 있는 것으로 사료되어 기능/지표성분으로 PK-E1으로 결정하기로 하였다. 그러나 PK-E1의 구조식 및 분자량을 확인하여 물질을 명명해야 하야 하는 추가적인 실험이 필요함으로 추후 진행할 계획이다.

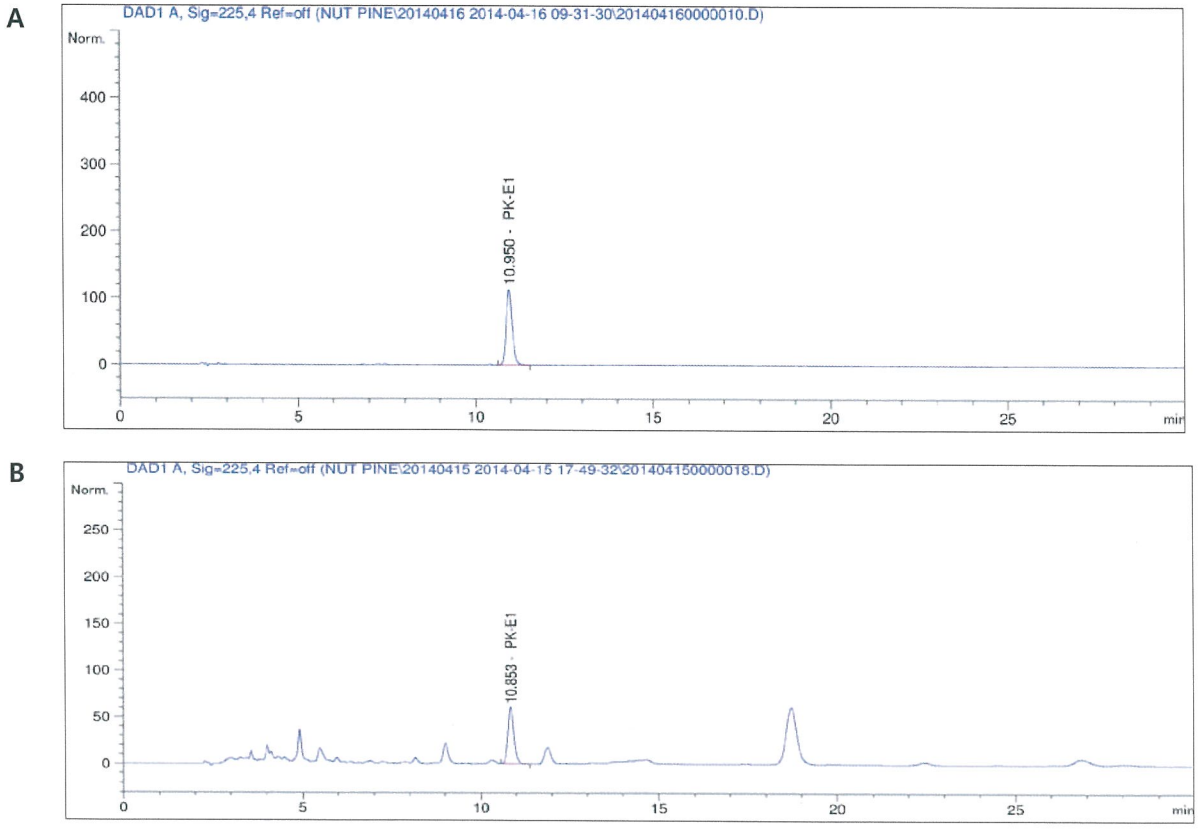


그림 24. PK-E1 크로마토그램(A : 표준용액, B : 시험용액)

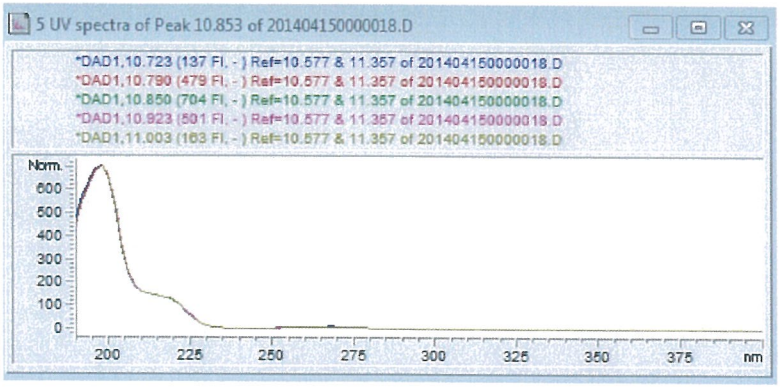


그림 25. Peak purity test : 시험용액 중 PK-E1 peak 각5점의 spectrum분석

최종 설정된 시험법

○ 실험방법

(1) 장비

HPLC System Shiseido Nanospace SI2 series, Shiseido, Japan
Pump 3101 SI-2(Dual), Column oven 3004
Autosampler-Z 3133, PDA detector 3017 SI-2
Degagger 3010

Agilent 1260 Infinity, USA
G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
G1316A 1260 TCC, G1315D 1260 DADVL

(2) 시약 및 시액

1) 표준품 : PK-E1(분리정제)
2) Methanol : Duksan, HPLC grade
3) Acetonitrile : Duksan, HPLC grade
4) 3차 증류수

(3) 표준용액의 제조

PK-E1 표준품을 정밀히 단 후 메탄올에 녹인 것을 표준용액으로 하고, 이를 적절히 희석하여 사용한다.

(4) 시험용액의 제조

초임계 잣송이 추출물 50mg을 50mL 정용플라스크에 정밀히 단 후, 메탄올에 녹인 것을 시험용액으로 사용한다.

(5) 기기분석조건

Instrument	HPLC system
Detector	UV detector(225nm)
Column	Cadenza CD-C18 3um, 4.6 × 150mm
Mobile Phase	A : DW(20%), B : Acetonitrile(80%)
Injection Vol.	5㎕
Run Time	30 min
Temperature	25℃

(6) 계산식

$$\text{PK-E1 함량 (mg/g)} = \frac{\text{검량선농도(ug/ml) x 시험용액전량(ml) x 표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

3.2.4. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 시험법 검증(Method Validation)

본 시험법 검증(Method Validation)은 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1의 함량을 측정하는데 있어 정해진 방법으로 처리하여 분리, 정량하였을 때 유효성을 검증하는데 목적이 있다. 분석법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 시료의 직선성(Sample Linearity), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다. 요약하여 아래 표 8에 나타내었다.

표 8. 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 시험법 검증 요약

항목		평가방법	설정값
특이성 (Specificity)		HPLC 분석시 검출시간(Retention time으로 검토)	o 검출시간: 약 10분대에 peak 검출
직선성 (Linearity)	표준용액	6개 농도로 3반복 직선성 확인	o 약 15~470ug/mL, R^2=0.999
	시료	6개 농도로 3반복 직선성 확인	o 70~280ug/mL o R^2=0.999
정확성 (Accuracy)		3개 농도로 원료를 첨가하여 회수율 검토	o 20.71 ~ 62.13ug/mL 범위에서 회수율 : 101.087~103.941% RSD : 0.64~1.08%
정밀도 (Precision)		4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	o 함량 평균 140.0175mg/g, SD 1.58, RSD 1.13%
범위 (Range)		직선성, 정확성, 정밀성 검토	o 15~470ug/mL

가. 개요

본 보고서는 PK-E1을 주어진 분석 조건하에 전처리 하여 HPLC를 이용하여 분리, 정량하는

시험법의 유효성을 검증하는데 그 목적이 있다. 시험법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

(1) 분석물질

시　　료 : 초임계 잣송이 추출물

분석물질 : PK-E1

(2) 분석방법

1) 고속액체크로마토그래피법

가. 장비

HPLC System	Agilent 1260 Infinity, USA G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS G1316A 1260 TCC, G1315D 1260 DADVL Shiseido Nanospace SI2 series, Shiseido, Japan Pump 3101 SI-2(Dual), Autosampler 3023 SI-2, Column oven 3014 SI-2 PDA detector 3017 SI-2
Analytical Column	Cadenza column C18 (3um, 4.6 × 150mm)

나. 시약

① PK-E1 표준품

② 3차 증류수

③ Methanol : Duksan, HPLC Grade

④ Acetonitrile : Burdick&Jackson, HPLC Grade

다. 표준용액 조제

표준품 약 40mg을 100ml 정용 플라스크에 취한 후 메탄올로 녹여 100mL로 정용(400ppm)한 후 이를 12.5~400ppm으로 농도별로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

라. 시험용액 조제

(1) 검체 약 50mg을 50mL 용량플라스크에 넣고, 메탄올로 녹인다.

(2) PTFE syringe filter (0.45um)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용한다.

마. 분석조건

Instrument	HPLC system
Detector	PDA detector(225nm)
Column	Cadenza column C18 (3um, 4.6 × 150mm)
Mobile Phase	A : DW (20%) B : ACN (80%)
Injection Vol.	5㎕
Flow rate	0.6mL/min
Run Time	30 min
Temperature	25℃

바. 계산

$$\text{PK-E1 함량 (mg/g)} = \frac{\text{시험용액농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준품순도}}{\text{시료량(mg)}}$$

나. 시험법 유효성 검증 결과

(1) 특이성 (Specificity)

(가) 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1의 크로마토그램

PK-E1의 표준물질과 원료를 같은 분석법으로 분석하여 검출된 Peak를 확인하여 동일 물질임을 확인하였다. 표준용액은 약 10.863분에 검출되었고, 시험용액은 10.853분에 검출되었다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램은 다음과 같다<그림 26>.

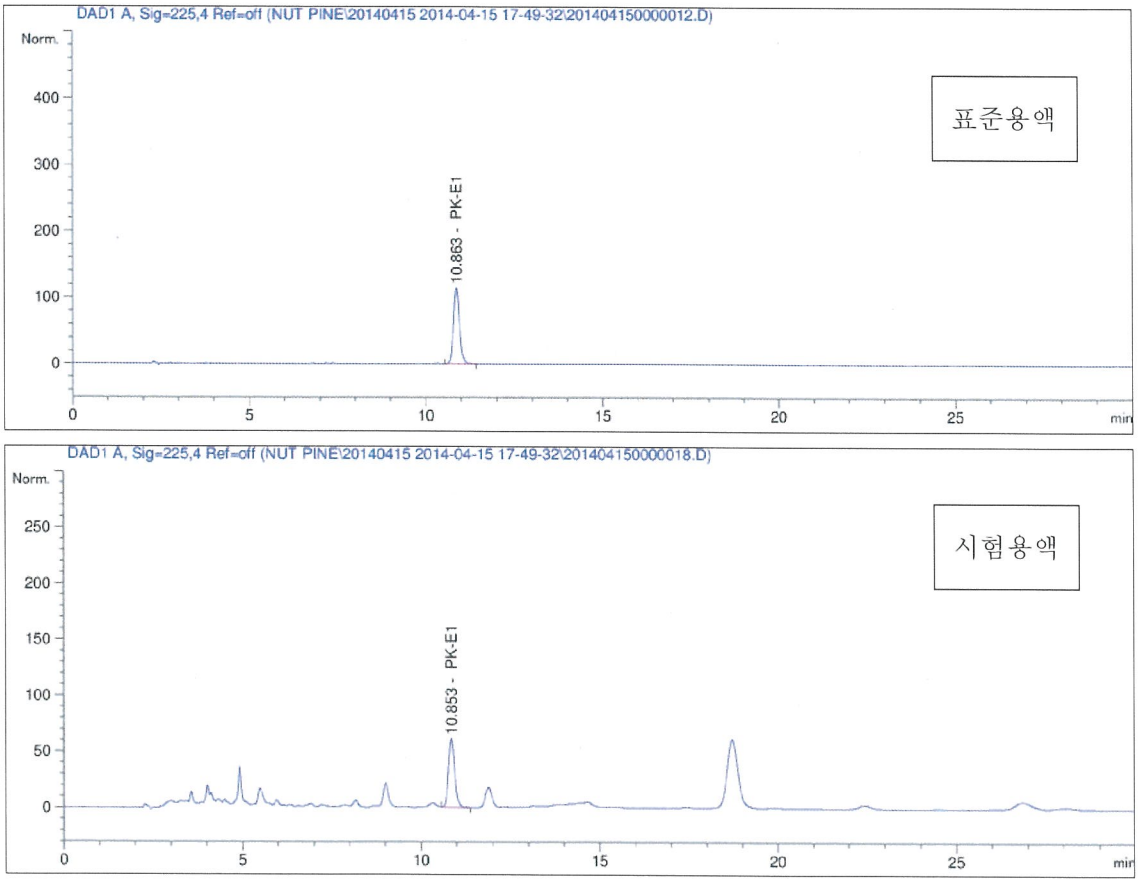
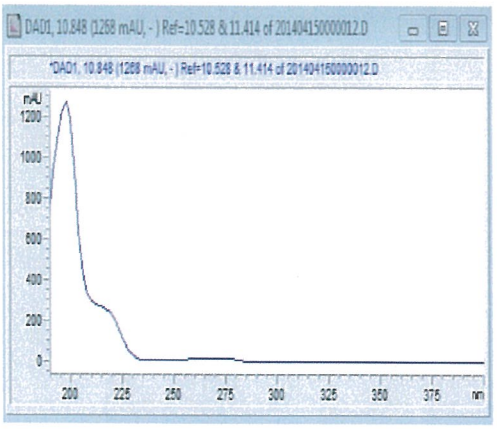


그림 26. 표준용액과 시험용액 중 PK-E1의 크로마토그램

(나) 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1의 spectrum과 peak purity 확인

시험용액 중 검출된 크로마토그램이 표준용액인 PK-E1와 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인하였다. 약 10분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 225 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인할 수 있었다<그림 27>. 또한 시험용액의 PK-E1 peak의 purity를 확인하기 위해서 peak의 5 points spectrum을 확인하였다. 5 points의 spectrum이 모두 일치하여 PK-E1 단일물질임을 확인하였다<그림 28>.

A



B

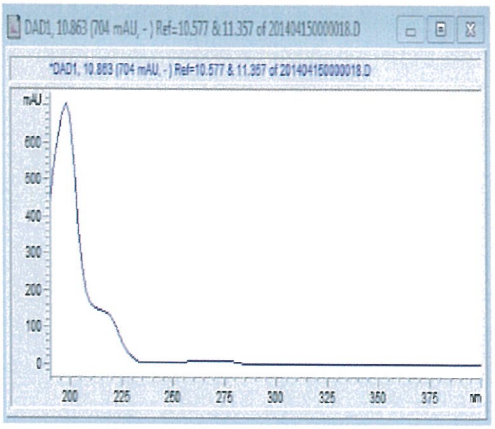


그림 27. PK-E1 spectrum A: 표준용액 B : 시험용액

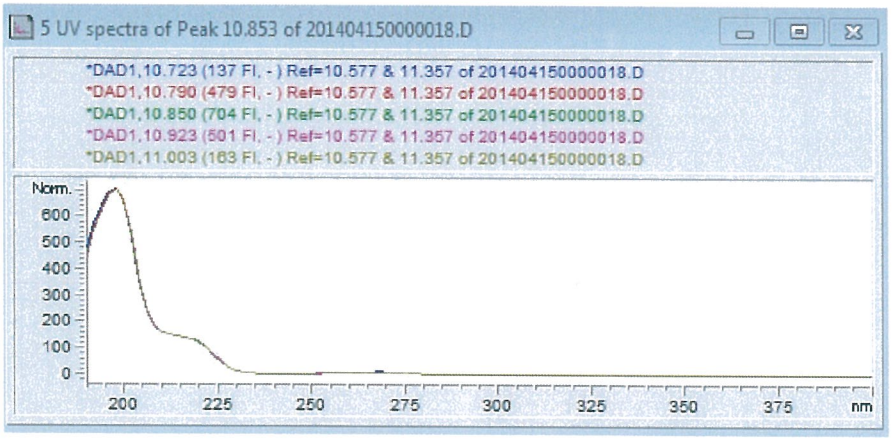


그림 28. Peak purity test : 시험용액 중 PK-E1 peak 각5점의 spectrum분석

(2) 직선성 (Linearity)

표준용액은 표준물질 약 400mg을 100 mL의 정용플라스크에 메탄올로 녹인 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 PK-E1는 약 15~470ug/mL에서 직선성이 확인되었고, 이때 직선의 상관계수는 해당농도범위에서 평균 R_2=0.9999로 나타났다<표 9~11>.

표 9. PK-E1 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회실험)

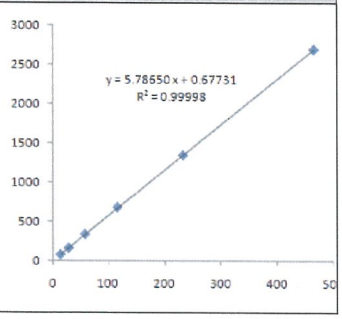
STD level	농도(ppm)	면적(Area)	검량선
1	14.5625	81.92608	
2	29.125	166.2955	
3	58.25	339.43073	
4	116.5	682.11182	
5	233	1346.32202	
6	466	2696.729	
기울기	5.78650		
y절편	0.67731		
R^2	0.99998		

표 10. PK-E1 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회실험)

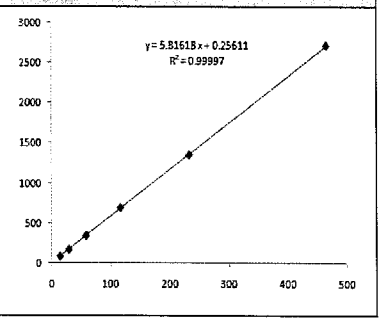
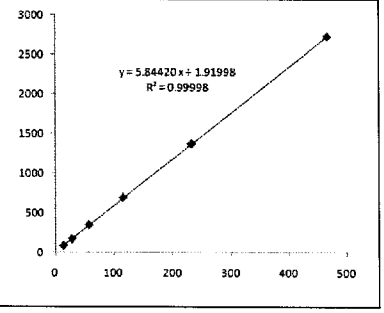
STD level	농도(ppm)	면적(Area)	검량선
1	14.5625	81.58374	
2	29.125	166.77881	
3	58.25	341.43857	
4	116.5	687.36017	
5	233	1348.88147	
6	466	2711.4729	
기울기	5.81618		
y절편	0.25611		
R^2	0.99997		

표 11. PK-E1 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회실험)

STD level	농도(ppm)	면적(Area)	검량선
1	14.5625	82.85487	
2	29.125	166.83904	
3	58.25	344.43225	
4	116.5	690.16602	
5	233	1366.8772	
6	466	2722.03931	
기울기	5.84420		
y절편	1.91998		
R^2	0.99998		

(3) 시료 직선성 (Sample Linearity)

시료를 농도별로 제조하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. 시험용액 농도 약 140ug/mL의 농도를 목적농도 100%로 설정하여 50% ~ 200% 범위에서 평가한 결과 PK-E1의 시료는 약 25mg ~ 100mg(시험용액 농도 약 70~280ppm) 에서 시료의 직선성이 확인되었고, 이때 직선의 상관계수는 해당농도범위에서 평균 R_2=0.999로 나타났다<표 12~14>.

표 12. 시료 PK-E1에 대한 검량선 작성 (1회실험)

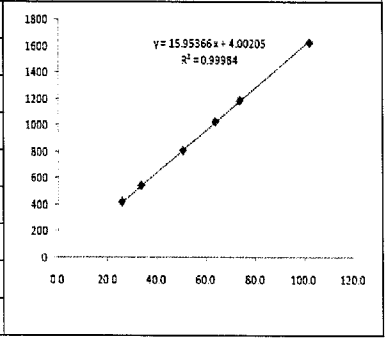
농도(%)	시료량(mg)	면적(Area)	검량선
50	26.0	418.03699	
75	33.8	541.03375	
100	50.7	808.55103	
125	63.8	1026.8677	
150	73.7	1188.1113	
200	102.2	1628.3839	
기울기	15.95366		
y절편	4.00205		
R^2	0.99984		

표 13. 시료 PK-E1에 대한 검량선 작성 (2회실험)

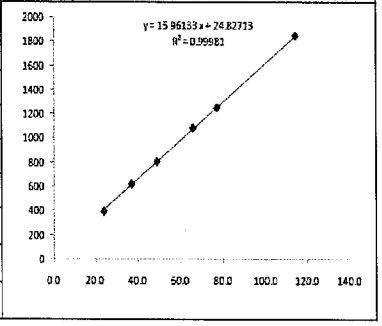
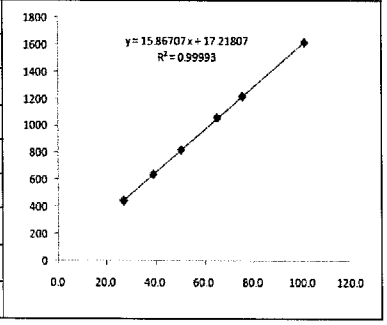
농도(%)	시료량(mg)	면적(Area)	검량선
50	23.6	390.56375	
75	36.7	618.24658	
100	48.8	805.74396	
125	65.8	1082.5531	
150	77.0	1251.35486	
200	114.3	1845.54077	
기울기	15.96133		
y절편	24.82713		
R^2	0.99981		

표 14. 시료 PK-E1에 대한 검량선 작성 (3회실험)

농도(%)	시료량(mg)	면적(Area)	검량선
50	27.0	442.65228	
75	39.2	637.83936	
100	50.5	820.14166	
125	65.2	1057.7211	
150	75.5	1215.4987	
200	101.1	1617.8001	
기울기	15.86707		
y절편	17.21807		
R^2	0.99993		

(4) 정확도(Accuracy), 회수율(Recovery)

실험의 정확성을 측정하기 위하여 PK-E1 원료에 표준용액이 약 20, 40, 60ug/mL 농도를 가하여 전처리를 한 후 측정하여 그 회수율을 측정하였다. PK-E1는 50~70mg/L 범위에서 회수율이 101.087~103.941%이며, RSD는 0.64~1.08%로 나타났다<표 15>.

표 15. PK-E1의 농도별 정확도, 회수율 확인

sample (mg/L)	원료(mg) + 추가표준용액 농도(ug/mL)	이론함량 (mg/L)	검출된 Area	PK-E1 검출함량 (ug/mL)	회수율 (%)	평균 (%)	RSD (%)
초임계 잣송이 추출물	49.8(mg)		818.59467	139.78576	-		-
	49.7(mg)		807.07294	137.81478	-		
	52.6(mg)		859.49683	146.78274	-		
20.711	56.5(mg) + 20.711	178.35502	1055.38672	180.29289	101.087	101.86922	1.01
	49.0(mg) + 20.711	157.42882	935.35431	159.75939	101.480		
	49.7(mg) + 20.711	159.38193	961.47833	164.22833	103.041		
41.422	48.7(mg) + 41.422	177.30277	1059.61975	181.01702	102.095	102.29909	1.08
	54.9(mg) + 41.422	194.60176	1178.78040	201.40139	103.494		
	54.2(mg) + 41.422	192.64865	1142.34814	195.16906	101.308		
62.133	57.7(mg) + 62.133	223.12521	1342.24756	229.36510	102.797	103.17335	0.64
	51.6(mg) + 62.133	206.10524	1253.75513	214.22703	103.941		
	57.2(mg) + 62.133	221.73013	1333.68652	227.90060	102.783		

(5) 정밀도(Precision)

함량 분석 재현성 시험을 위해 분석장비 및 분석자, 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였다. 결과는 140ug/mL의 농도를 6회 반복 실험하여 측정치를 비교하였고, 사용한 실험 장비는 Agilent HPLC 1260 series와 Shiseido HPLC nanospace 두 장비, Cadenza C18 (3um, 4.6 × 150mm), 4일간, 두 명의 시험자가 분석하였다. 실험 간의 분석 결과 평균 140.02mg/g 으로 분석되었고, 이때 RSD 1.13 이었다. 검출시간은 Shiseido HPLC와 Agilent HPLC에서 분석하였을 때 동일하게 약 10분대에서 검출되었다<표 16~20>.

표 16. 일자를 달리하여 분석재현성 확인

	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD (%)
1차(2014-04-15)	138.002	140.0175	1.58	1.13
2차(2014-04-16)	140.760			
3차(2014-04-16)	139.633			
4차(2014-04-18)	141.675			

표 17. 분석일 4월 15일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260, Cadenza C18

	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD (%)
1	679.55023	117.33811	137.7208	138.002	0.57	0.41
2	623.61804	107.67301	137.3380			
3	838.99469	144.89018	137.4670			
4	719.11719	124.17530	138.2798			
5	897.33356	154.97116	138.6146			
6	733.57422	126.67348	138.5924			

표 18. 분석일 4월 16일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260, Cadenza C18

	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD (%)
1	798.13141	137.18817	138.5739	140.760	1.32	0.94
2	899.63733	154.63991	140.5817			
3	784.23590	134.79913	140.4158			
4	821.28168	141.16835	140.8866			
5	842.31812	144.78511	142.5050			
6	797.43158	137.06785	141.5990			

표 19. 분석일 4월 16일, 분석자 B, Agilent HPLC 1260, Cadenza C18

	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD (%)
1	850.41711	146.17756	140.2856	139.633	0.53	0.38
2	904.27698	155.43760	139.7820			
3	849.88593	146.08624	138.8652			
4	833.76746	143.31501	139.1408			
5	783.69781	134.70662	139.7372			
6	822.57050	141.38994	139.9900			

표 20. 분석일 4월 18일, 분석자 A, Shiseido nanospace, Cadenza C18

	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD (%)
1	3847846	146.938	141.0154	141.675	1.44	1.02
2	3779641	144.284	141.7328			
3	4486043	171.777	142.4353			
4	3806916	145.345	140.8382			
5	3682998	140.522	139.9622			
6	3833358	146.374	144.0689			

(6) 범위(Range)

초임계 잣송이 추출물에서에서 PK-E1 분석법의 정량 범위는 직선성, 정확성, 정밀성를 고려할 때, PK-E1의 분석농도를 15~470ug/mL의 범위로 설정하였다.

3.2.5. 지역별 원재료 중 기능/지표성분 함량 확인

원료 표준화 확인을 위하여 각각 다른 지역(가평, 홍천)에서 채취한 원재료(건조된 잣송이) 중 PK-E1의 함량을 확인하기 위하여 위 검증된 시험방법으로 분석하였다. 각 시료당 3반복씩 전처리하여 분석한 결과, 가평에서 채취한 잣송이의 경우 PK-E1의 함량이 11.18±0.63mg/g, 홍천지역에서 채취한 잣송이의 경우 PK-E1의 함량이 9.90±0.52 mg/g임을 확인하였다. 원료 표준화를 위하여 추가적으로 지역별, 생산년도별 원재료를 확인할 필요가 있다.

3.2.6. 초임계 잣송이 추출물의 기준규격 설정

가. 초임계추출물의 영양성분, 기능/지표성분 분석결과

초임계 잣송이추출물 분석결과

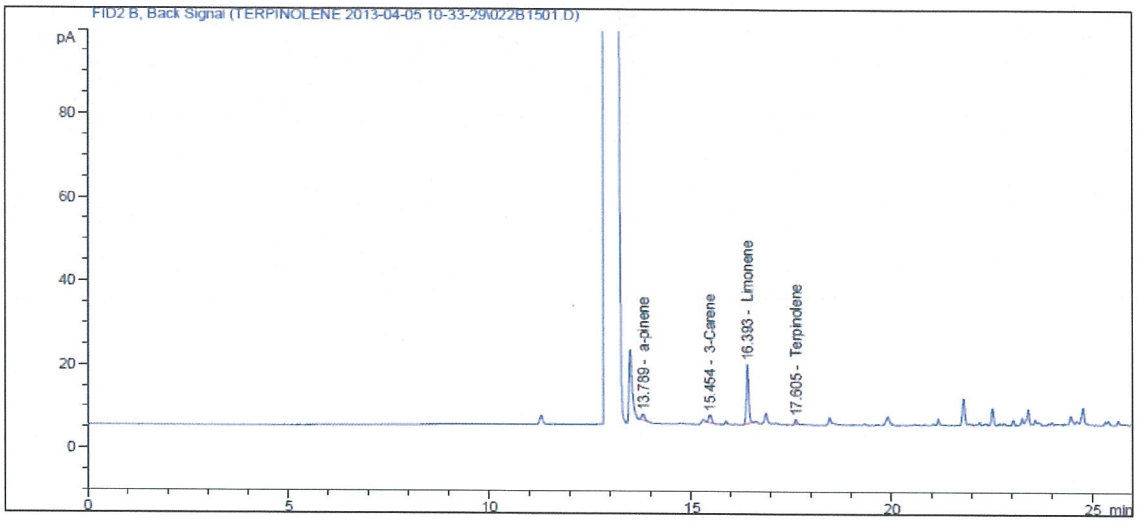
(1) 잣송이의 특성을 확인하기 위하여 영양성분 분석결과

항목	단위	결과
열량	kcal/100g	684.07kcal/100g
탄수화물	%	1.78%
조단백질	%	0.69%
조지방	%	**74.91%**
수분	%	22.62%
회분	%	불검출
나트륨	mg/100g	0.27mg/100g
당류(Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Sucrose)	mg/g	불검출

(2) 기능/지표성분 분석결과

○ **Terpenoid 계 성분**

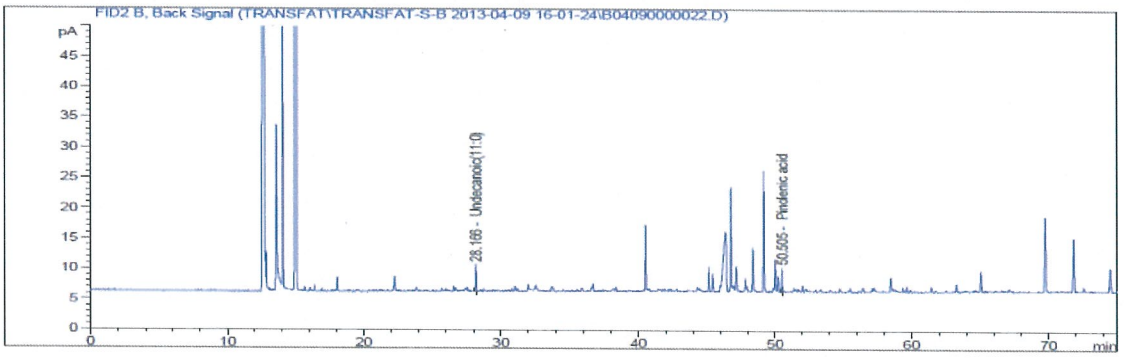
항목	단위	결과
a-pinene	mg/g	2.74
3-carene	mg/g	3.51
Limonene	mg/g	12.92
Terpinolene	mg/g	1.74



(3) 지방산

○ **Pinolenic acid**

항목	단위	결과
Pinolenic acid	mg/g	5.56



○ 부티르산 등

항목	단위	결과
부티르산	g/100g	불검출
카프로산	g/100g	불검출
카프릴산	g/100g	불검출
카프르산	g/100g	불검출
언데카노산	g/100g	불검출
로르산	g/100g	0.03
트리데카노산	g/100g	불검출
미리스트산	g/100g	0.08
미리스트올레산	g/100g	불검출
펜타데카노산	g/100g	불검출
cis-10-펜타데카노산	g/100g	0.02
팔미트산	g/100g	0.74
팔밋올레산	g/100g	0.03
헵타데카노산	g/100g	0.03
cis-10-헵타데카노산	g/100g	불검출
스테아르산	g/100g	0.28
올레산	g/100g	1.25
엘라이드산	g/100g	2.92
리놀레산	g/100g	1.50
리놀레라이드산	g/100g	0.73
감마리놀렌산	g/100g	불검출
리놀레산	g/100g	0.07
아라키드산	g/100g	0.05
cis-11-에이코세노산	g/100g	0.03
에이코사디에노산	g/100g	0.02
cis-8,11,14-에이코사트리에노산	g/100g	불검출
cis-11,14,17-에이코사트리에노산	g/100g	불검출
아라키돈산	g/100g	0.06
에이코사펜타에노산	g/100g	불검출
헤니코사노산	g/100g	0.04
베헨산	g/100g	0.04
에루스산	g/100g	0.08
도코사디에노산	g/100g	불검출
도코사헥사에노산	g/100g	불검출
트리코사노산	g/100g	불검출
리그노세르산	g/100g	0.05
네르본산	g/100g	0.06

(4) 잣송이 잔류농약 59종 분석결과 - "친환경 자연원료"

○ 잣송이에 대한 농약의 잔류허용기준은 없으나, 잣의 경우「식품의 기준 및 규격」원재료에 대한 농약의 잔류허용기준에 클로르플루아주론 1종이 포함되어 있음.

- 이에 따라,「수입식품등검사지침」(제 2012-132호) 별표 31 동시다분석 검사대상 59종과 클로르플루아주론에 대하여 잔류농약을 분석하였음

○ **동시 다분석 검사 59종 - 불검출**

시험항목	시험방법	실험결과
Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicofol, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazlil, Iprodione, Iprovalicarb, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분-제2법	59종 불검출
Acetamipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Hexaflmuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법	

○ **잣 잔류농약 허용기준 List - 불검출**

항목	단위	결과	기준
클로르플루아주론	mg/kg	불검출	0.01mg/kg

나. 제조공정별 기능/지표성분 함량 확인

초임계 잣송이 추출물은 제조공정이 원재료를 초임계 추출하여 바로 추출물이 나오므로 중간 단계의 공정별 함량을 측정하는 것이 불가능하였다. 그러므로 원재료인 건조된 잣송이 함량과 추출물의 함량만을 확인하였는데 9 Lot별 추출물 모두 가평지역에서 수급한 원재료로 1차년도 결과보고서에 제시한 바와 같이 원재료의 함량은 11.18±0.63mg/g이었으며, 9Lot 결과를 확인한 결과 50.0389 ± 2.59mg/g 임을 확인할 수 있었다.

다. 기능/지표성분, 유해물질 기준규격 설정

본 연구결과 초임계 잣송이 추출물의 기준·규격은 다음과 같다.

(1) 제조기준

(가) 원재료 : 잣송이

(2) 기준·규격

(가) 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 밝은 노란 연두의 페이스트

(나) Dehydroabietic acid 함량 (mg/g) : 50 mg/g 의 80% ~ 120 %

(다) 납 (mg/kg) : 1.0 mg/kg

(리) 총비소 (mg/kg) : 1.0 mg/kg

(마) 카드뮴 (mg/kg) : 1.0 mg/kg

(비) 총수은 (mg/kg) : 1.0 mg/kg

(사) 대장균군 : 음성

(아) 세균수 : 1 mL당 100이하

(3) 시험법

(가) 성상

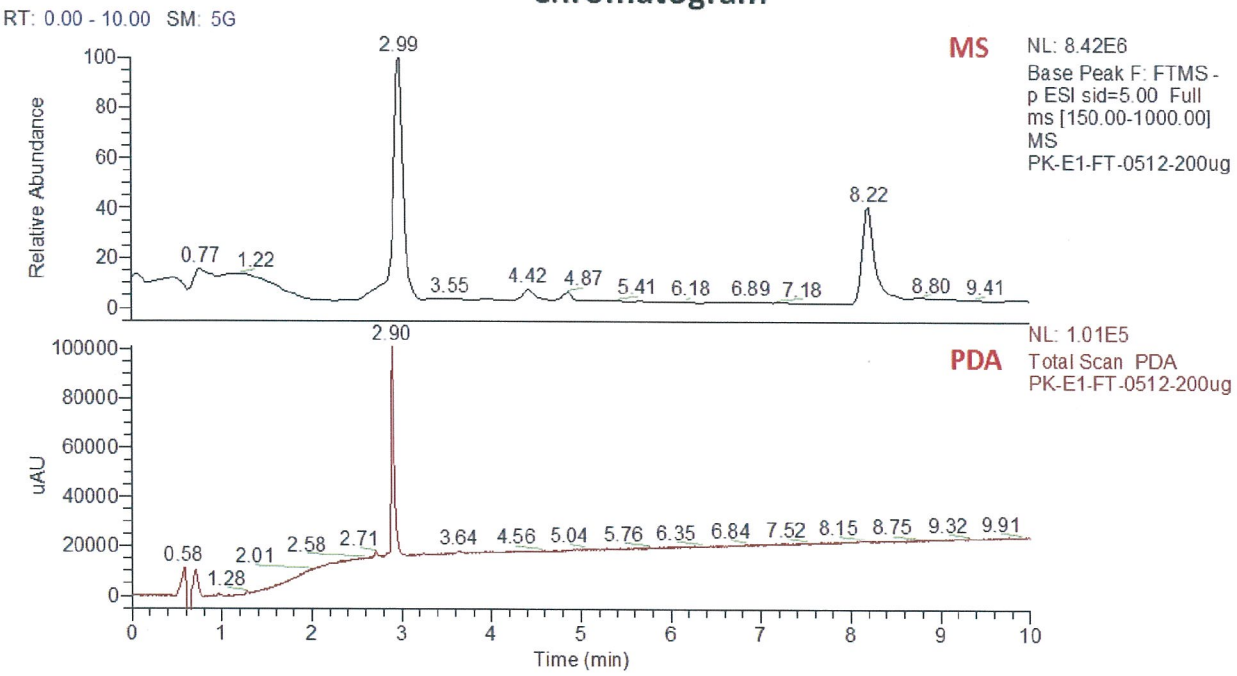
식품공전 제 10. 일반시험법 19. 성상시험법(관능시험법)

한국표준색이름(산업자원부 기술표준원) 참조

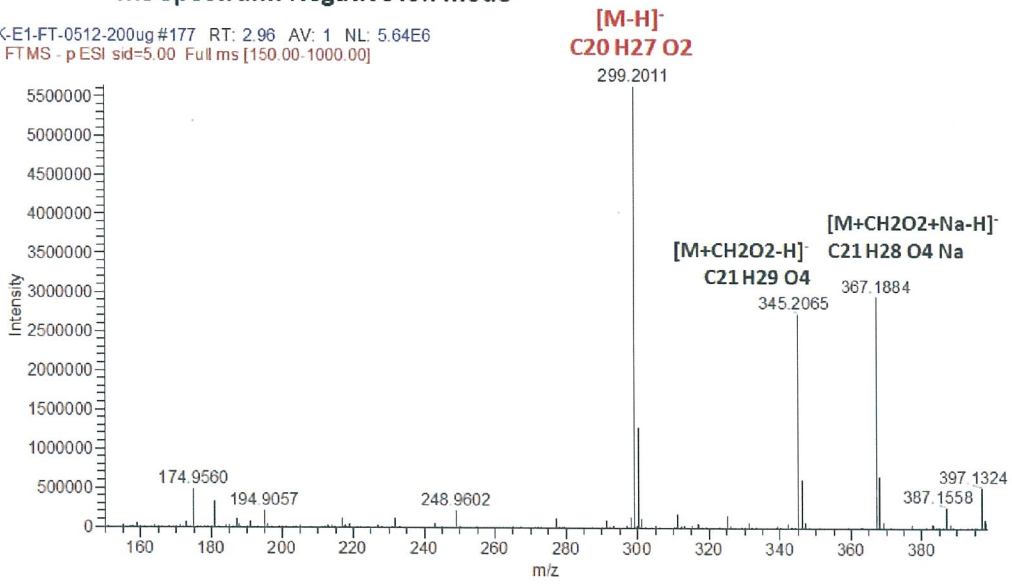
(나) Dehydroabietic acid

1차년도 초임계 잣송이추출물의 기능/지표성분인 PK-E1의 구조식 및 분자량을 확인한 결과 아래 표와 같이 Dehydroabietic acid($C_{20}H_{28}O_2$) 임을 확인할 수 있었다.

Chromatogram



MS Spectrum: Negative ion mode

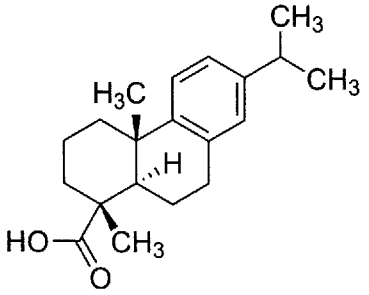


* CH2O2: Formic acid

Elemental composition search on mass 299.20

m/z= 294.20-304.20

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
299.2011	299.2006	1.75	7.5	$C_{20}H_{27}O_2$
	299.2024	-4.42	0.0	$C_7H_{25}O_4N_9$
	299.1992	6.24	8.0	$C_{18}H_{25}ON_3$
	299.2037	-8.91	-0.5	$C_9H_{27}O_5N_6$

분석물질	Dehydroabietic acid
구조	
CAS Number	1740-19-8
구조식	$C_{20}H_{28}O_2$
Molecular weight	300.44

고속액체크로마토그래피법

① 장비

HPLC System　Agilent 1260 Infinity, USA
G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
G1316A 1260 TCC,
G1315D 1260 DADVL

Analytical Column　Cadenza column C18 (3um, 4.6 × 150mm)

② 시약

가. Dehydroabietic acid 표준품 : Ambo, P1001 (LOT : 140509) 97.13%
나. Methanol : Duksan, HPLC grade
다. Acetonitrile : Burdick&Jackson, HPLC grade
라. 3차증류수

③ 표준용액 조제

표준물질 Dehydroabietic acid 약 5mg을 정밀하게 달아 메탄올 10mL에 녹여 표준용액으로 한다. 이를 희석해서 working Solution으로 사용한다.

④ 시험용액 조제

(1) 검체 약 100~200mg을 50mL 용량플라스크에 넣고, 메탄올로 녹인다.
(2) PTFE syringe filter (0.45um)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용한다.

⑤ 분석조건

Instrument	HPLC system
Detector	PDA detector(225nm)
Column	Cadenza column C18 (3um, 4.6 × 150mm)
Mobile Phase	A : DW (20%) B : ACN (80%)
Injection Vol.	5㎕
Flow rate	0.6mL/min
Run Time	30 min
Temperature	25℃

⑥ 계산

$$\text{Dehydroabietic acid 함량 (mg/g)} = \frac{\text{시험용액농도(ug/mL)} \times \text{희석용량(mL)} \times \text{표준품순도}}{\text{시료량(mg)}}$$

(다) 납, 총비소, 카드뮴

식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납(Pb) 1)시험용액의 조제 가)습식분해법 (2)마이크로웨이브법

(라) 총수은

식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1 중금속 시험 7.1.2.4 수은(Hg)

(마) 대장균군

식품공전 제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.1 정성시험 가. 유당배지법

(바) 세균수

식품공전 제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.5 세균수 3.5.1 일반세균수 가. 표준평판법

(4) 기준·규격 설정근거

(가) 기능/지표성분 규격 설정에 관한 자료

기능/지표성분의 규격은 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 백분율로 설정한다. 일반적으로 추출물의 경우는 표시량의 80% ~ 120%를 원칙으로 하나 천연물의 경우 원료 Lot 별 기능/지표물질의 함량 편차가 커서 여러 Lot의 분석 데이터를 근거로 규격 함량을 달리 설정할 수 있다. 초임계잣송이추출물 중 Dehydroabietic acid 함량은 설정한 시험방법으로 분석하여 측정하였으며, 분석 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 15.0) One-way ANOVA을 이용하여 각 Lot 간의 평균값(mean), 표준편차(SD, standard deviation), 표준오차(SE, standard Error), 최소값, 최대값, 95% 신뢰구간에서의 상한치(Upper Bound)와 하한치(Lower Bound)를 구하여 모두 포함할 수 있는 규격을 설정하였다.

초임계 잣송이 추출물의 기준·규격을 설정하기 위하여 9Lot를 각각 3반복 분석한 결과<표

21>를 토대로 Dehydroabietic acid의 함량 범위<표 22, 23>를 구하였다. 전체 평균±SD, 평균의 80% ~ 120%, 각 Lot별 하한치 ~ 상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치~상한치를 분석하여 분석오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할 수 있는 기준규격으로 50 mg/g의 80% ~ 120%인 **40 ~ 60 mg/g**으로 설정하였다. 9Lot의 원료 간 Dehydroabietic acid 함량은 편차가 거의 나타나지 않았다.

표 21. Lot 별 Dehydroabietic acid의 함량 분석결과

(단위 : mg/g)

분석횟수 / Lot No.	1	2	3	평 균
Batch NO 1	50.8681	51.7826	51.5248	51.3918
Batch NO 2	52.4063	51.7454	51.0148	51.7222
Batch NO 3	51.7512	53.0249	48.7930	51.1897
Batch NO 4	51.6842	52.4614	49.6997	51.2818
Batch NO 5	46.1742	45.8258	46.2468	46.0823
Batch NO 6	49.1692	51.9397	50.8707	50.6598
Batch NO 7	50.6344	49.8852	50.6577	50.3924
Batch NO 8	52.0250	51.9198	53.0646	52.3365
Batch NO 9	45.4406	45.1905	45.2483	45.2931
평 균	50.0389 ± 2.59			

표 22. Lot 별 Dehydroabietic acid의 함량 범위 결과

(단위 : mg/g)

분석횟수 / Lot No.	표준편차 (SD)	표준오차 (SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Batch NO 1	0.471527	0.272236	50.8681	51.7826	50.2205	52.5632
Batch NO 2	0.696041	0.401859	51.0148	52.4063	49.9931	53.4512
Batch NO 3	2.171107	1.253489	48.793	53.0249	45.7964	56.5832
Batch NO 4	1.424153	0.822235	49.6997	52.4614	47.7440	54.8196
Batch NO 5	0.225053	0.129935	45.8258	46.2468	45.5232	46.6413
Batch NO 6	1.397231	0.806692	49.1692	51.9397	47.1890	54.1308
Batch NO 7	0.439431	0.253706	49.8852	50.6577	49.3008	51.4840
Batch NO 8	0.632772	0.365331	51.9198	53.0646	50.7646	53.9084
Batch NO 9	0.130939	0.075598	45.1905	45.4406	44.9679	45.6184
전체	2.591577	0.498749	45.1905	53.0646	44.9679	56.5832

표 23. Dehydroabietic acid의 함량 범위(요약)

	Dehydroabietic acid(mg/g) 함량 범위
전체 평균±SD	50.0389 ± 2.59
평균의 80~120%	40.03112 ~ 60.04668
각 Lot 별 최소값~최대값	45.1905 ~ 53.0646

(나) 유해물질 규격 설정에 관한 자료

초임계 잣송이 추출물의 유해물질 규격은 원재료 또는 제조과정 중 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목(제13조제7호 가목 관련) [별표 2]에 준하여 설정하였다<표 24>. 초임계 잣송이 추출물의 경우 잣송이를 초임계로 추출하였으므로 중금속 4종(납, 총비소, 카드뮴, 총수은)과 미생물 중 대장균군, 세균수만 유해물질규격으로 설정하였다.

표 24. 유해물질규격설정항목(식품의약품안전처 고시 제2013-217호 제14조 제6호 가목 관련)

원료	항목		규격	비고
모든 원료	중금속	납	< 10.8㎍/일	
		총비소	< 150㎍/일	
		카드뮴	< 3.0㎍/일	
		총수은	< 2.1㎍/일	
	미생물	대장균군	음성	
		세균수	≤ 100/g	액상제품에 한함
용매를 사용한 원료	잔류용매	헥산	< 0.005g/kg	
		이소프로필알콜	≤ 0.05g/kg	
		초산에틸		
		메틸알콜		
		아세톤	≤ 0.03g/kg	
해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료	동물용의약품		「식품의 기준 및 규격」에 따름	
	곰팡이 독소	총아플라톡신 (B_1, B_2, G_1 및 G_2의 합)		
		파툴린		
		오크라톡신		
		기타곰팡이독소		
	방사능 오염	^{131}I		
		^{134}Cs+^{137}Cs		

① 중금속

초임계 잣송이 추출물의 중금속 실험을 진행한 결과, 납 최대 0.0817mg/kg, 총비소 최대 0.0071mg/kg, 카드뮴 최대 0.0007 mg/kg으로 검출되었고 총수은은 최대 0.006 mg/kg으로 검출되었다<표 25>. 원료에서 발생할 수 있는 오차, 원료의 1일 최대섭취량, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에서 제안하고 있는 중금속 기준(상한값)<표 26>을 고려하여 안전성에 문제가 없도록 설정하고자 하였다. 납, 총비소, 카드뮴, 총수은의 규격을 각각 1.0mg/kg으로

설정하였다<표 27>.

표 25. 초임계 잣송이 추출물 중금속 분석결과

시 험 항 목		Batch No 1	Batch No 5	Batch No 9
중금속	납(mg/kg)	**0.0817**	0.0255	0.0045
	총비소(mg/kg)	**0.0071**	0.0066	0.0016
	카드뮴(mg/kg)	0.0006	**0.0007**	0.0001
	총수은(mg/kg)	**0.006**	0.001	0.004

표 26. 초임계 잣송이 추출물 중금속 규격 상한값

시 험 항 목		규격	상한값(이하)*
중금속	납(mg/kg)	< 10.8㎍/일	10.8㎍/g
	총비소(mg/kg)	< 150㎍/일	150㎍/g
	카드뮴(mg/kg)	< 3.0㎍/일	3.0㎍/g
	총수은(mg/kg)	< 2.1㎍/일	2.1㎍/g

* 초임계잣송이추출물의 최대섭취량을 1g/일로 계산
단, 섭취량 변경 시 검토 필요.

표 27. 초임계 잣송이 추출물 중금속 제안규격

시 험 항 목		제안규격(mg/kg)
중금속	납(mg/kg)	1.0[a)]
	총비소(mg/kg)	1.0[c)]
	카드뮴(mg/kg)	1.0[b)]
	총수은(mg/kg)	1.0[d)]

a) 납 : 초임계잣송이추출물의 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 납을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 10.8㎍/일 보다 낮은 섭취 기준임.

b) 총비소 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 총비소를 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 150㎍/일 보다 낮은 섭취 기준임.

c) 카드뮴 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 카드뮴을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 3.0㎍/일 보다 낮은 섭취 기준임.

d) 총수은 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 총수은을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 2.1㎍/일 보다 낮은 섭취 기준임.

② 대장균군

대장균군은 실험결과 모든 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였다<표 28, 29>.

표 28. 대장균군 분석결과

시 험 항 목		Batch No 1	Batch No 5	Batch No 9
미생물	대장균군	음성	음성	음성

표 29. 대장균군 제안규격

시 험 항 목		제안규격
미생물	대장균군	음성

③ 세균수

세균수는 실험결과 모든 원료에서 불검출로 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 세균수의 규격을 1 mL당 100이하로 설정하였다<표 30, 31>.

표 30. 세균수 분석결과

시 험 항 목		Batch No 1	Batch No 5	Batch No 9
미생물	세균수	불검출	불검출	불검출

표 31. 세균수 제안규격

시 험 항 목		제안규격
미생물	세균수	1 mL당 100이하

④ 잔류농약, 영양성분 확인

㉮ 잔류농약(유해물질 규격 미설정에 관한 자료)

잔류농약은 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 의거하여 규격으로 설정하지는 않지만 시험결과를 제출하여야 하는 항목으로「식품의 기준 및 규격」에 원재료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등검사지침」(제 2014-23호) 별표 3.1. 동시다분석 검사대상: 59종에 대하여 분석하여야 한다. 또한 식품으로 섭취 이력이 있거나 잔류농약이 오염될 수 있다고 판단되면 원재료에 대한 잔류허용기준이 없다 하여도 정밀검사항목 59종을 분석하여야 한다. 잣송이의 경우 원재료에 대한 기준은 없지만 잣이 식용으로 사용되고 있어 정밀검사 항목 59종에 대하여 분석하였다<표 32>. 분석결과 정밀검사항목(59종)이 모두 불검출로 확인되었다<표 33>.

표 32. 잔류농약 시험항목 및 시험방법

시 험 항 목	시 험 방 법
Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicofol, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazlil, Iprodione, Iprovalicarb, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분-제2법
Acetamipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Hexaflmuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법

표 33. 초임계 잣송이 추출물 잔류농약 분석 결과

연번	농약명	분석결과
1	다이아지논(Diazinon)	불검출
2	디디티(DDT)	불검출
3	디코폴(Dicofol)	불검출
4	디크로보스(Dichlorvos)	불검출
5	말라치온(Malathion)	불검출
6	메소밀(Methomyl)	불검출
7	메톡시페노자이드(Methoxyfenozide)	불검출
8	메티다치온(Methidathion)	불검출
9	보스칼리드(Boscalid)	불검출
10	비에치씨(BHC)	불검출
11	비펜스린(Bifenthrin)	불검출
12	싸이퍼메쓰린(Cypermethrin)	불검출
13	싸이프로디닐(Cyprodinil)	불검출
14	싸이할로쓰린(Cyhalothrin)	불검출
15	아세타미프리드(Acetamiprid)	불검출
16	아족시스트로빈(Azoxystrobin)	불검출
17	아트라진(Atrazine)	불검출
18	에치온(Ethion)	불검출
19	엔도설판(Endosulfan)	불검출
20	이마자릴(Imazalil)	불검출

연번	농약명	분석결과
21	이소프로치오란(Isoprothiolane)	불검출
22	이프로디온(Iprodione)	불검출
23	이프로발리카브(Iprovalicarb)	불검출
24	카바릴(Carbaryl)	불검출
25	카보후란(Carbofuran)	불검출
26	캡탄(Captan)	불검출
27	퀸토젠(Quintozene)	불검출
28	클로로타로닐(Chlorothalonil)	불검출
29	클로르피리포스(Chlorpyrifos)	불검출
30	클로르피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl)	불검출
31	클로르훼나피르(Chlorfenapyr)	불검출
32	톨클로포스-메칠(Tolclofos-methyl)	불검출
33	트리아디메폰(Triadimefon)	불검출
34	트리아조포스(Triazophos)	불검출
35	트리프루미졸(Triflumizole)	불검출
36	트리플루무론(Triflumuron)	불검출
37	티아메톡삼(Thiamethoxam)	불검출
38	파라치온(Parathion)	불검출
39	파라티온-메틸(Parathion-Methyl)	불검출
40	파클로부트라졸(Paclobutrazol)	불검출
41	퍼메쓰린(Permethrin)	불검출
42	페나리몰(Fenarimol)	불검출
43	페니트로치온(Fenitrothion)	불검출
44	펜발러레이트(Fenvalerate)	불검출
45	펜토에이트(Phenthoate)	불검출
46	펜프로파스린(Fenpropathrin)	불검출
47	펜헥사미드(Fenhexamid)	불검출
48	포스메트(Phosmet)	불검출
49	프로시미돈(Procymidone)	불검출
50	프로클로라즈(Prochloraz)	불검출
51	프로페노포스(Profenofos)	불검출
52	플루벤디아마이드(Flubendiamide)	불검출
53	플루페녹수론(Flufenoxuron)	불검출
54	피라크로스트로빈(Pyraclostrobin)	불검출
55	피리메타닐(Pyrimethanil)	불검출
56	피리미카브(Pirimicarb)	불검출
57	피리미포스-메틸(Pirimiphos-methyl)	불검출
58	헥사프루무론(Hexaflumuron)	불검출
59	후루디옥소닐(Fludioxonil)	불검출

㈏ 영양성분분석

초임계 잣송이 추출물에 대한 영양성분분석은 표 34와 같다.

표 34. 영양성분 시험방법 및 결과

시험항목	시 험 방 법	결 과
열량 (Kcal/100g)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 6)열량의 계산	684.07
탄수화물(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 5)탄수화물	1.78
조단백질(%)	AOAC OFFICIAL METHOD 991.20	0.69
조지방(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 4)지질 (1)조지방	74.91
수분(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 1)수분	22.62
회분(%)	식품공전 제10.일반시험법 1.일반성분시험법 2)회분	불검출
나트륨 (mg/100g)	식품공전 제10.일반시험법 11.미량영양성분시험법 1)무기성분	0.27

3.2.7. 초임계 잣송이 추출물의 안정성 확인

초임계 잣송이 추출물의 유통기한을 2년으로 설정하는데 무리가 없는지 확인하기 위하여 25, 35, 40℃에서 5개월 이상 저장하면서 안정성을 확인하고자 하였다.

가. 실험방법

(1) 연구재료

본 실험에 사용된 시료는 초임계 잣송이 추출물이며 시료는 불투명한 PP 재질에 포장된 상태로 저장되었다. 저장된 시료는 측정 시기마다 항온기에서 수거한 후 즉시 실험에 이용하였다 (그림 31~33).

그림 31. 25℃ 항온기에 저장된 초임계 잣송이 추출물.

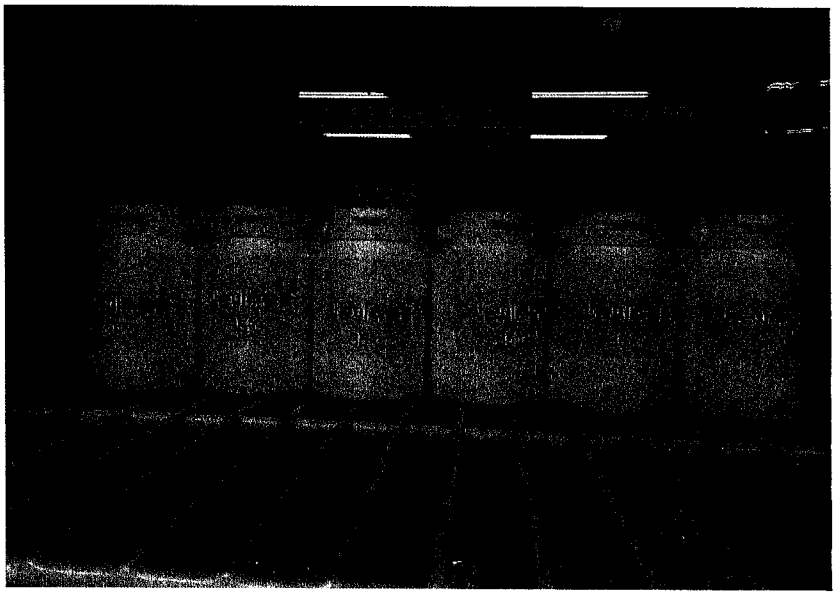


그림 32. 35℃ 항온기에 저장된 초임계 잣송이 추출물.

그림 33. 40℃ 항온기에 저장된 초임계 잣송이 추출물.

(2) 연구방법

(가) 분석 항목 설정

시료의 분석항목은 제형과 건강기능식품의 유통기한 설정기준을 참고하여 선정한 것으로 표 35에 나타나있다. 분석항목 중 성상은 각 포인트별로 1회 진행하였고, Dehydroabietic acid 함량 및 세균수는 포인트별로 3반복 진행하였다. 대장균군은 각 포인트 중 25℃ 저장 시료만 1회씩 진행하였고 중금속은 생산처음에만 확인차 진행하였다.

표 35. 초임계 잣송이 추출물의 분석항목

분류	실험항목
관능	성상
이화학	Dehydroabietic acid, 납, 비소, 카드뮴, 수은
미생물	세균수, 대장균군

(나) 실험 방법

성상, 납, 비소, 카드뮴, 수은, 세균수, 대장균군은 식품공전, Dehydroabietic acid는 본 연구사업을 통하여 설정한 분석법을 근거로 하여 분석하였다<표 36>.

표 36. 분석항목별 실험방법

검사항목	실험방법
성상	식품공전 제 10. 일반시험법 19. 성상시험법(관능시험법)
Dehydroabietic acid	연구사업을 통하여 설정한 분석법
납, 비소, 카드뮴	식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납(Pb) 1)시험용액의 조제 가)습식분해법 (2)마이크로웨이브법
수은	식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1 중금속 시험 7.1.2.4 수은(Hg)
세균수	식품공전 제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.5 세균수 3.5.1 일반세균수 가. 표준평판법
대장균군	식품공전 제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.1 정성시험 가. 유당배지법

(다) 온도 조건 설정 및 저장 중 측정시기

초임계 잣송이 추출물의 유통기한 설정을 위한 저장 온도조건 및 저장 중 측정 시기는 표 37과 같다. 시료는 25℃, 35℃, 40℃로 설정된 항온기에 저장하여 약 30~60일 간격으로 모두 5회에 걸쳐 실험을 진행하였다.

표 37. 저장 중 온도조건 및 측정횟수

저장조건	측정시기(일)
25℃ ± 2℃	0, 72, 94, 130, 154일(5회)
35℃ ± 2℃	0, 72, 94, 130, 154일(5회)
40℃ ± 2℃	0, 72, 94, 130, 154일(5회)

(라) 품질한계

본 연구에서는 저장에 사용된 초임계 잣송이 추출물의 초기 함량을 100%로 하여 Dehydroabietic acid 함량은 그 값의 80%를 품질한계로 설정하였고, 세균수는 100/g, 대장균군은 양성을 품질한계로 설정하였다.

(마) 통계처리방법 및 유통기간 예측방법

온도에 의한 가속시험에서 가장 널리 사용하는 수명-스트레스 관계 해석기법은 아레니우스모델(Arrhenius Model)이다. 이 모델은 액체, 기체, 고체의 화학반응시 발생되는 활성화 에너지와 온도의 반응률로 나타낸 것으로 아래와 같은 여러 가지 수식으로 로그 변환하여 수명 예측에 적용된다.

i) 품질지표의 반응차수 결정

각 저장 온도별 품질지표의 반응속도 및 반응속도상수를 산출하여 품질지표의 반응차수를 결정한다.

㉮, ㉯ 식을 이용하여 각 항목의 0차, 1차 반응식을 산출한다.

㉮ $A = A_0 + kt$	㉯ $LnA = LnA_0 + kt$
A : t시간 후의 측정값	A : t시간 후의 측정값
A_0 : t_0시간에서 측정값	A_0 : t_0시간에서 측정값
k : 반응속도상수	k : 반응속도상수
t : 반응시간(유통기간)	t : 반응시간(유통기간)

ii) 온도 영향에 따른 활성화 에너지 산출

품질지표의 온도의존성 분석을 위하여 ㉰식(Arrhenius식)을 변형한 식에 따라 1차 선형 회귀분석법으로 LnK(y축), 1/T(x축)으로 얻은 직선의 기울기로부터 ㉱식을 이용하여 활성화 에너지를 구한다.

㉰ $K = Ae^{Ea/RT}$ ↔ $LnK = -(Ea/R)(1/T) + LnA$	㉱ $Ea = -Slope \times R$
A : 아레니우스 상수 Ea : 활성화 에너지(cal/mol) R : 기체상수(1.986cal/mol) T : 절대온도 K : 반응속도상수	A : 아레니우스 상수 Ea : 활성화 에너지(cal/mol) R : 기체상수(1.986cal/mol)

iii) 반응속도상수 산출

㉲식(변형 아레니우스식)에 따라 시험하지 않은 온도구간의 회귀방정식 추정을 통해 반응속도상수를 산출한다.

㉲ $LnK = -(Ea/R)(1/T) + LnA$
A : 아레니우스 상수 Ea : 활성화 에너지(cal/mol) R : 기체상수(1.986cal/mol) T : 절대온도 K : 반응속도상수

iv) 유통기간의 산출

국내유통온도를 적용하여 각 온도에 노출되는 기간을 산정한 후 해당제품의 유통기간을 산출한다.

실온유통제품을 위한 실제 국내 유통온도 및 시간을 파악하기 위하여 2013년도 기상청 자료를 참조한다.

2013년 국내 주요 지역 월별 기온												(단위 : ℃)
	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
서울	-3.4	-1.2	5.1	10.0	18.2	24.4	25.5	27.7	21.8	15.8	6.2	-0.2
인천	-2.9	-1.4	4.1	8.9	16.0	22.2	24.1	26.9	21.5	15.9	6.8	0.4
대전	-2.6	0.0	6.6	10.6	18.8	23.9	26.8	27.8	21.4	15.5	6.7	1.3
대구	-0.1	2.6	9.8	12.3	20.3	24.3	28.7	29.0	23.0	17.2	8.9	3.5
광주	0.0	2.0	7.6	11.4	19.1	23.9	27.1	28.4	22.6	16.8	8.6	2.9
울산	0.9	3.4	9.4	12.1	18.4	22.0	27.8	29.0	22.8	17.7	9.8	4.3
부산	2.5	4.7	10.2	12.6	18.2	21.9	26.1	28.0	23.7	18.9	10.9	5.4
강릉	-0.5	1.8	7.4	10.8	18.1	21.5	27.0	28.5	20.8	15.8	8.8	3.1
제주	5.6	6.2	10.0	13.5	18.6	21.7	28.7	29.1	24.0	19.2	12.9	8.1
평균	-0.1	2.0	7.8	11.4	18.4	22.9	26.9	28.3	22.4	17.0	8.8	3.2

1, 2, 3, 11, 12월(5개월:152일)의 평균기온은 10℃이하였으며, 4월(1개월:30일) 11℃, 5, 10월(2개월:61일) 17~18℃, 6, 9월(2개월:60일) 22~23℃, 7, 8월(2개월:62일) 27~28℃인 것으로 나타났다.

따라서 연간 온도별 유통시간을 아래와 같이 정리할 수 있다.

연간 온도별 유통시간					
온도	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃
시간	152일	30일	61일	60일	62일

나. 실험결과

(1) 제품저장에 따른 품질변화

(가) 성상

저장 초기의 초임계 잣송이 추출물의 성상은 '이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 밝은 노란 연두의 페이스트'로 측정되었다. 5개월 동안 가속실험을 진행한 결과, 저장기간 및 저장온도

에 따른 성상 변화는 관찰되지 않아 초임계 잣송이 추출물의 성상이 일정한 수준으로 유지되는 것이 확인되었다<표 38>.

표 38. 초임계 잣송이 추출물 저장 중 성상 결과

항목	저장기간(일)	저장온도		
		25℃	35℃	40℃
성상	0차	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 밝은 노란 연두의 페이스트		
	1차(72)	unchanged	unchanged	unchanged
	2차(94)	unchanged	unchanged	unchanged
	3차(130)	unchanged	unchanged	unchanged
	4차(154)	unchanged	unchanged	unchanged

(나) Dehydroabietic acid

Dehydroabietic acid의 저장기간 및 저장온도에 따른 분석은 모든 차수와 온도에서 3반복 진행하였으며 그 결과는 평균±표준편차로 표 39에 나타나있다. 저장 중 Dehydroabietic acid의 함량은 모든 저장 온도에서 저장 기간에 따라 조금씩 감소하는 경향이 나타났다.

표 39. 초임계 잣송이 추출물 중 Dehydroabietic acid 함량 측정 결과

(단위 : mg/g)

항목	저장기간(일)	저장온도		
		25℃	35℃	40℃
Dehydroabietic acid	0차		53.20±0.6999	
	1차(72)	52.82±0.6347	51.68±2.7941	51.40±1.3022
	2차(94)	49.70±0.6473	48.48±1.2482	47.09±0.3080
	3차(130)	48.83±0.7935	47.85±0.5712	44.76±2.1385
	4차(154)	48.95±0.3919	46.78±0.7377	45.25±0.9821

(다) 세균수

초임계 잣송이 추출물의 세균수 실험은 모든 차수와 온도에서 3반복 진행하였으며, 모두 불검출로 확인되었다(표 40).

표 40. 초임계 잣송이 추출물 중 세균수 측정 결과

항목	저장기간(일)	저장온도		
		25℃	35℃	40℃
세균수	0차		불검출	
	1차(72)	불검출	불검출	불검출
	2차(94)	불검출	불검출	불검출
	3차(130)	불검출	불검출	불검출
	4차(154)	불검출	불검출	불검출

(라) 대장균군

대장균군은 모든 온도/모든 차수에서 진행하지 않고 처음과 저장차수별로 25℃에서만 진행하

였다. 이렇게 측정한 결과 대장균군은 모두 음성으로 확인되었다(표 41).

표 41. 초임계 잣송이 추출물 중 대장균군 측정 결과

항목	저장기간(일)	저장온도(25℃)
대장균군	0차	음성
	1차(72)	음성
	2차(94)	음성
	3차(130)	음성
	4차(154)	음성

(마) 중금속

중금속은 저장기간에 따라 함량이 변하는 물질이 아니므로 확인을 위하여 저장을 시작하기 전인 0차에서만 진행하였다(표 42).

표 42. 초임계 잣송이 추출물의 중금속 측정 결과

항목	분석결과(mg/kg)
납	0.0058
총비소	0.0162
카드뮴	0.0002
총수은	0.004

(2) 유통기한 예측

(가) 품질지표의 선정

품질지표의 선정은 저장기간 동안 각 항목을 측정한 결과를 바탕으로 그린 회귀방정식의 상관계수를 통해 진행하게 된다.

초임계 잣송이 추출물 유통통기한 설정 시험의 분석항목 중 품질지표로 가능한 항목은 Dehydroabietic acid와 세균수였으나 세균수는 모든 차수와 저장온도에서 불검출이었으므로 Dehydroabietic acid에 대하여 반응차수별, 온도별 회귀방정식과 상관계수를 산출하였다<표 43>. 그 결과 Dehydroabietic acid 함량이 시간과 온도에 따라 유의적인 추세가 나타났으며 그 중 0차 반응식 40℃의 상관계수가 0.8008로 가장 높아 품질지표로 선정하였고 해당 지표가 0차 반응을 따른다고 보았다. Dehydroabietic acid의 회귀방정식과 상관계수를 산출하기 위한 회귀직선은 그림 34와 같다.

표 43. Dehydroabietic acid의 반응차수, 온도에 따른 회귀방정식 산출

반응차수	온도(℃)	회귀방정식	상관계수
0차	25	y = -0.0321x + 53.5927	0.7400
	35	y = -0.0436x + 53.5256	0.7323
	40	**y = -0.0594x + 53.6802**	**0.8008**
1차	25	y = -0.00006x + 3.9819	0.7393
	35	y = -0.0009x + 3.9809	0.7343
	40	y = -0.0012x + 3.9850	0.7888

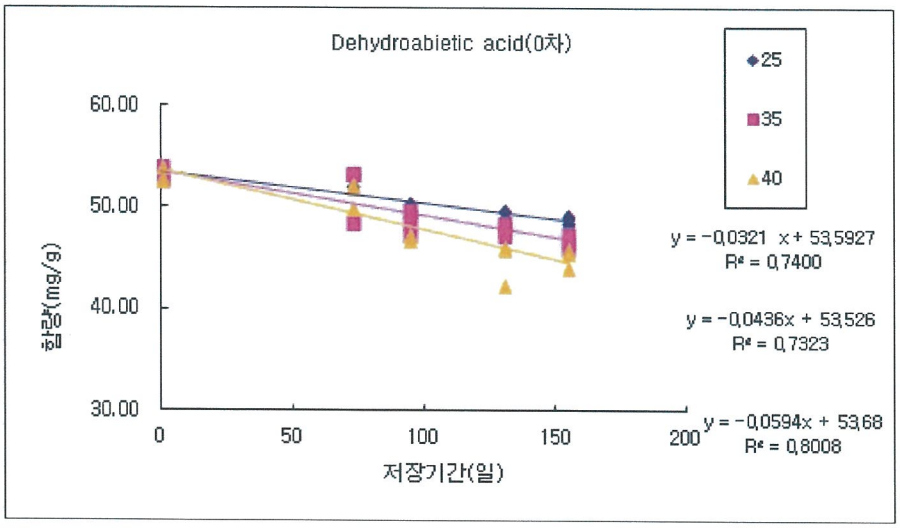


그림 34. Dehydroabietic acid의 0차 반응 회귀직선.

(나) 온도 영향에 따른 활성화 에너지 산출

Dehydroabietic acid의 0차 반응식을 기준으로 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출하였다. 그 결과 Dehydroabietic acid의 활성화 에너지는 -7275.2504kcal/mol임을 확인하였으며, 온도와 반응속도간 방정식은 LnK = -3661.4245x + 8.82603427 임을 알 수 있었다(표 44).

표 44. 온도와 반응속도간 방정식 산출

온도	절대온도(T)	1/T(x축)	K	LnK(y축)	LnK = -(Ea/R)(1/T) + LnA
25℃	298	0.0034	0.0321	-3.4380	y = -3661.4245x + 8.82603427 (Ea=-7275.2504)
35℃	308	0.0032	0.0436	-3.1320	
40℃	313	0.0032	0.0594	-2.8242	

(다) 실험하지 않은 온도구간의 반응속도상수(K) 산출

전 단계에서 구한 온도와 반응속도간 방정식(LnK = -3661.4245x + 8.82603427)을 이용하여 실험하지 않은 온도 구간의 반응속도상수를 산출한다.

유통 예상온도(10, 15, 20, 25, 30℃)의 반응속도상수는 표 45과 같다.

표 45. 온도별 반응속도상수(K) 산출

온도	절대온도(T)	1/T(x축)	LnK(y축)	K
10℃	283	0.003534	-4.111861	0.016377
15℃	288	0.003472	-3.887245	0.020502
20℃	293	0.003413	-3.670295	0.025469
25℃	298	0.003356	-3.437954	0.032130
30℃	303	0.003300	-3.132003	0.043630

(라) 유통기간 예측

온도별 반응속도상수와 국내 온도별 유통기간을 토대로 Dehydroabietic acid의 연간 변화량을

산출한 결과 Dehydroabietic acid 함량은 연간 약 0.304847 감소하는 것으로 나타났다(표 46).

초임계 잣송이 추출물의 Dehydroabietic acid 초기함량은 0차 3반복 평균값을 토대로 연간변화량을 적용하였으며, 이때 초임계 잣송이 추출물의 Dehydroabietic acid 함량이 품질한계(초기값의 80%)에 도달하는데 걸리는 시간은 약 34.90년으로 계산되었다(표 47).

표 46. Dehydroabietic acid 함량의 연간변화량 산출

저장온도	국내온도별 유통기간	반응속도상수(-K)	연간변화량
	A	B	A × B
10℃	5개월(152일)	-0.016377	-0.081886
15℃	1개월(30일)	-0.020502	-0.020502
20℃	2개월(61일)	-0.025469	-0.050938
25℃	2개월(60일)	-0.032130	-0.064261
30℃	2개월(62일)	-0.043630	-0.087261
누계	12개월(365일)		-0.304847

표 47. 유통기간 산출

초기함량	품질한계	연간변화량	유통기간 산출
A	B	C	(A-B)/C
53.2025	42.5620	0.305	34.90

다. 결론

본 유통기한 설정 실험은 초임계 잣송이 추출물의 유통기한을 설정하기 위한 것으로 제품을 5개월간 3개 온도구간에서 저장하며 품질지표의 변화를 측정하였으며, 측정 결과는 아레니우스식을 토대로 통계처리하였다.

초임계 잣송이 추출물의 품질지표를 Dehydroabietic acid 함량으로 선정하여 유통기간을 예측한 결과 해당 제품의 유통기간은 약 34.90년으로 산출되었다. 이는 온도변화에 의한 품질변화만을 고려하여 진행된 것으로 실제 유통 환경에서는 이와 다른 결과가 나타날 수 있다. 따라서 본 원료가 제품화 되었을 경우 제품의 유통기간 설정 시에는 온도 외에 유통기간에 영향을 미칠 수 있는 다른 환경적인 요인들과 판매 이후 소비자가 제품을 섭취하는 기간을 고려하여 1.0 미만의 안전계수를 적용하여 유통기간을 설정하는 것이 타당하다고 판단된다. 따라서 초임계 잣송이 추출물에 일반적인 건강기능식품 원료의 유통기한인 2년으로 설정하는 것에 문제가 없다고 사료되나 포장형태의 변화, 습도, 빛 등의 요인에 노출될 가능성과 완제품 생산시 부원료의 영향, 제품판매 후 소비기간을 고려해야 할 것으로 판단된다.

3.2.8. In vitro 실험을 통한 잣송이 추출물 기능성 효과 평가

가. 여러 조건의 초임계 추출물에서 가장 효과가 뛰어난 추출물 선정

■ **DPPH 라디칼 소거능**

보라색의 DPPH 라디칼은 항산화제와의 반응에 의해 라디칼이 소거되어 노란색으로 변하는 점을 이용하여 항산화 활성을 검정하는 방법이다. 초임계 잣송이 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 그림 35와 같다. 2500 μg/mL과 5000 μg/mL에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 잣송이 추출물 (Pine cone extract; PC) 1, PC 2과 PC 3이 2500 μg/mL과 5000 μg/mL에서 각각 71.2%, 77.%(PC 1), 36.1%, 52.7%(PC 2), 21.8%, 28.0%(PC 3)로 다른 샘플들에 비해 유의적으로 높았다($p<0.05$). 따라서, PC 1과 PC2가 다른 샘플들에 비해 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

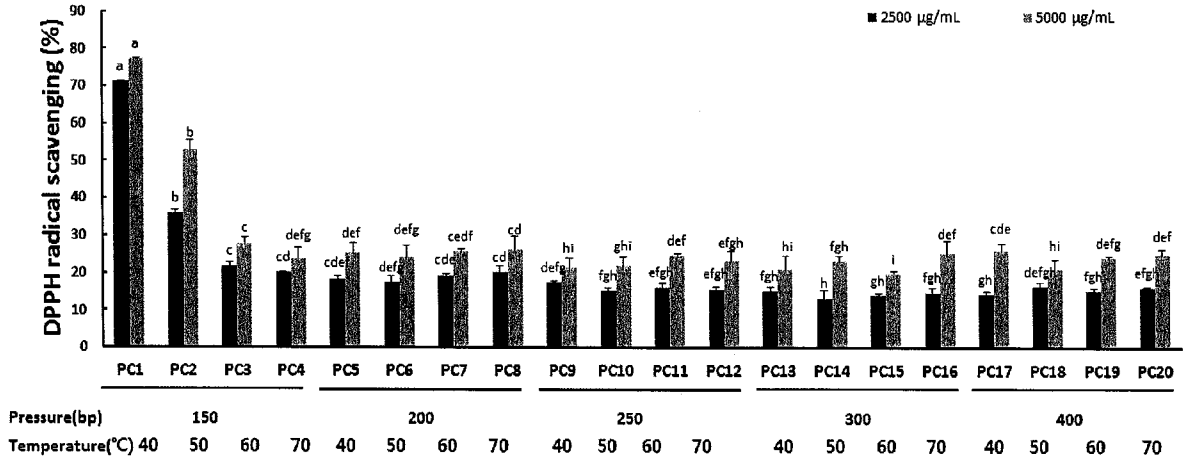


그림 35. DPPH radical scavenging activity of supercritical pine cone extracts.

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

■ **ABTS 라디칼(ABTS+) 소거능**

ABTS는 양이온 라디칼(cation radical)로 유리기(hydroxyl, peroxyl, alkoxyl)들과 반응하여 상대적으로 안정한 ABTS·+를 형성한다. 항산화 물질과 반응하여 청록색이 탈색되어 흡광도 값을 변화시켜 항산화능을 측정할 수 있다. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 측정은 인위적으로 라디칼을 제거하는 작용기작으로 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있는데 DPPH가 친수성 항산화제에 제한적으로 반응하는 반면 ABTS는 친수성 항산화제와 소수성 항산화제 모두에서 반응을 하기 때문에 ABTS의 소거능이 높게 측정된다.

초임계 잣송이 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 그림 36과 같다. 초임계 잣송이 추출물 500 μg/mL와 1000 μg/mL에서 ABTS 라디칼 소거능은 34.3%, 46.6%으로 PC 1이 가장 높았고, PC 19가 29.7%, 36.9%, PC 7은 27.6%, 34.4%로 다른 샘플들에 비해 유의적으로 높았

다($p<0.05$). 따라서, PC 1과 PC19가 다른 샘플들에 비해 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

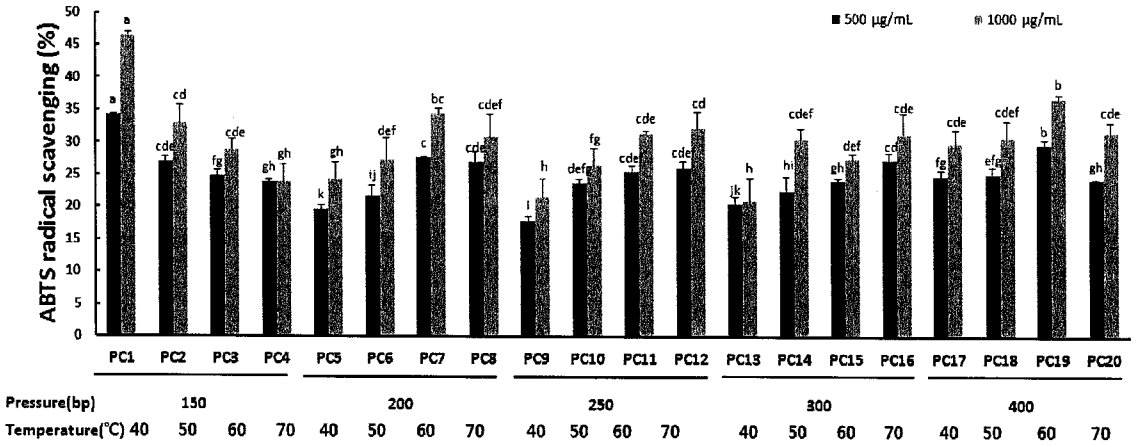


그림 36. ABTS radical scavenging activity of supercritical pine cone extracts.
All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

■ 세포독성실험

초임계 잣송이 추출물을 3T3-L1 세포에 처리 가능한 최적 농도를 알아보기 위해 MTT 실험을 실시하였다[19, 20]. 초기 실험에서 초임계 잣송이 추출물을 20, 40, 60, 80, 100 ug/mL을 실시한 결과, 3T3-L1 세포에 24시간 처리 시 세포생존율이 90% 미만임을 확인하였다 (data not shown). 이에 농도를 낮춰 추출물 20가지를 3T3-L1 세포에 24시간 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과는 그림 37과 같다. 초임계 잣송이 추출물을 5, 10 μg/mL을 처리한 결과, 10 μg/mL에서 세포 독성이 나타났다. 따라서, 본 실험에서는 세포독성이 나타나지 않는 농도인 5 μg/mL를 사용하여 지방세포 분화 억제 및 분해 효과를 검정하였다.

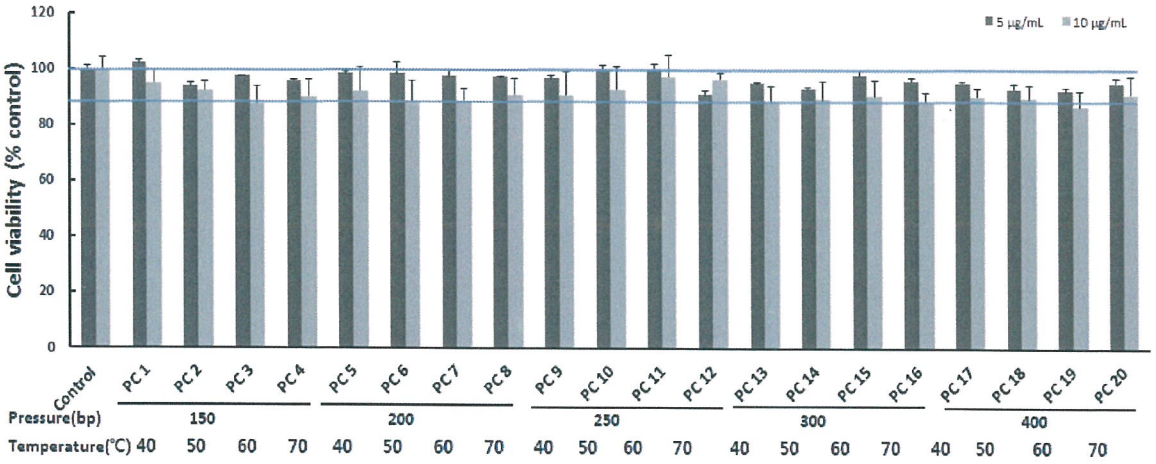


그림 37. **Effect of supercritical pine cone extracts on cell viability in 3T3-L1 preadipocytes.** Cells were incubated with supercritical pine cone extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assya. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(NC) cells, taken as 100%. All data are presented as mean±standard deviation. Significantly different at $p<0.05$ compared with control by t-test.

(1) 초임계 잣송이 추출물이 지방 세포 분화에 미치는 영향

(가) Oil Red O staining

초임계 잣송이 추출물이 지방세포가 분화하는 과정에서, 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 측정하기 위해 지방세포가 분화하는 동안 초임계 잣송이 추출물 처리한 후, 후기(9일째)에 Oil red O staining[21 24]을 수행한 결과는 그림38, 39와 같다. 5 μg/mL의 농도로 초임계 잣송이 추출물(Pine cone extract; PC)를 처리하였을 때, PC 1, PC 10, PC 16 그리고 PC 17에서 control에 비해 지방의 축적 정도가 유의적으로 감소하여 지방세포의 분화 억제 활성이 있음을 확인할 수 있었다($p<0.05$).

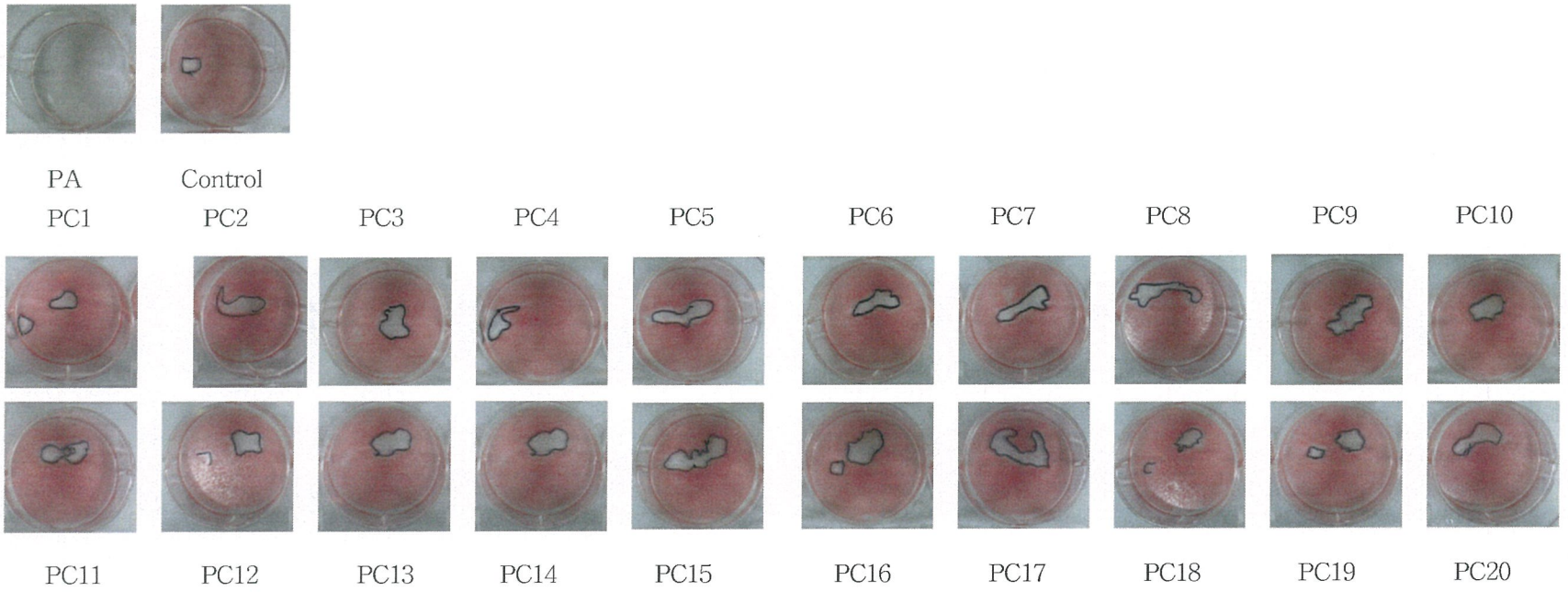


그림 38. Oil red O staining of neutral lipids in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. Oil red O staining was performed at 9 day.

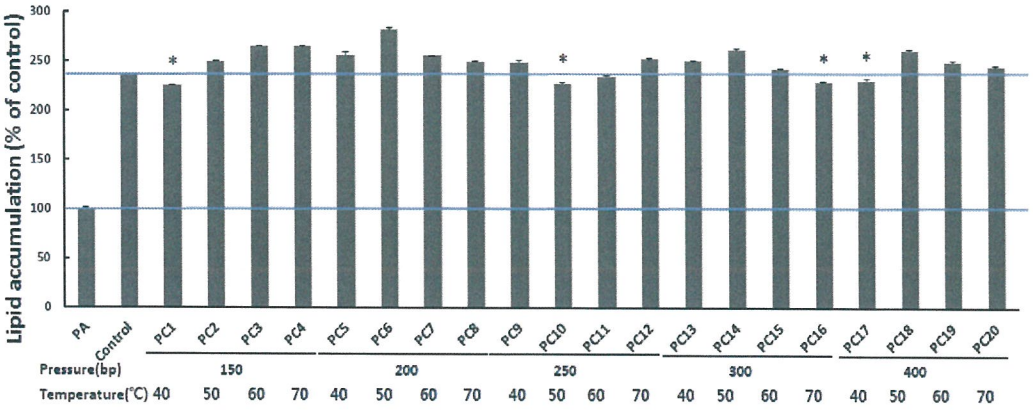


그림 39. Lipid accumulation in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1.

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. The lipid accumulation was evaluated by Oil red O staining at 9 day. All data are presented as mean±standard deviation. Significantly different at $p<0.05$ compared with control by t-test.

(나) Glycerol release assay

초임계 잣송이 추출물이 지방세포의 분화과정에서 글리세롤 방출량에 미치는 영향[25]을 알아보기 위해 분화와 동시에 각 추출물을 처리한 후, 분화 초기(3일째), 분화 중기(6일째), 분화 후기(9일째)에 배양액 내 free glycerol 함량을 측정한 결과는 그림 40과 같다.

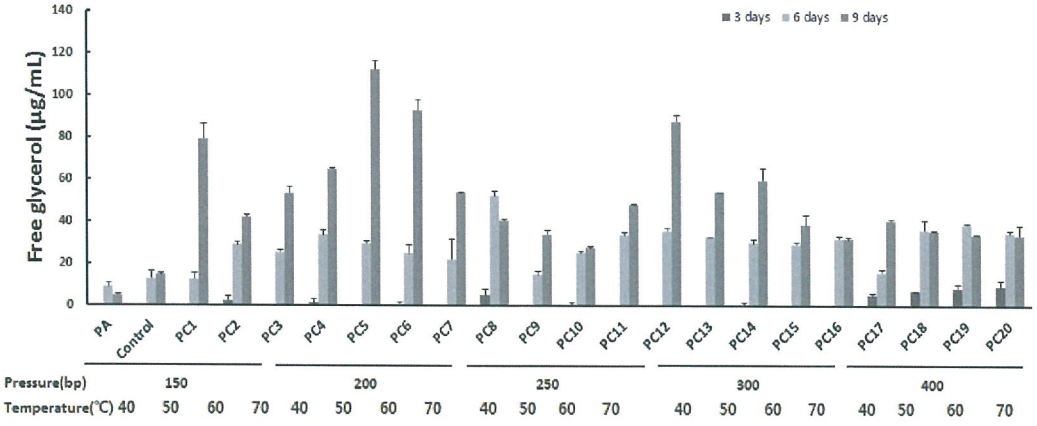


그림 40. Glycerol release in supercritical pine cone extracted 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. Increase of lipolytic effect was evaluated by the release of glycerol to the cultured medium at day 3, 6 and 9.

(2) 초임계 잣송이 추출물이 지방 분해에 미치는 영향

(가) Oil Red O staining

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해 과정에서, 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 측정하기 위해 분화되어 있는 지방세포에 잣송이 추출물을 처리한 후 분화 후기(11일째)에 Oild red O staining을 수행한 결과는 그림 41, 42와 같다. 5 μg/mL의 농도로 잣송이 추출물(Pine cone extract; PC)를 처리하였을 때, PC 1, PC 10 그리고 PC 16에서 control에 비해 지방의 축적 정도가 유의적으로 감소하여 지방세포의 분해를 활성화 시키는 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$).

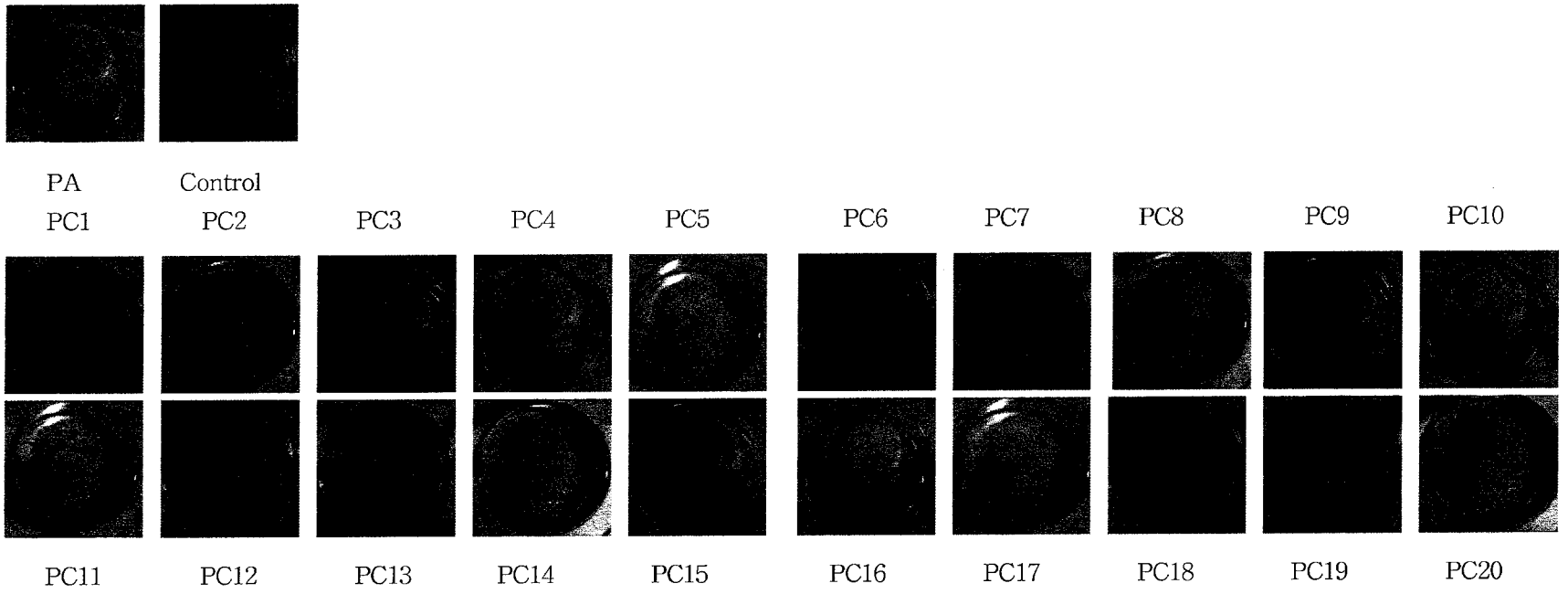


그림 41. Oil red O staining of neutral lipids in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. Oil red O staining was performed at 11 day.

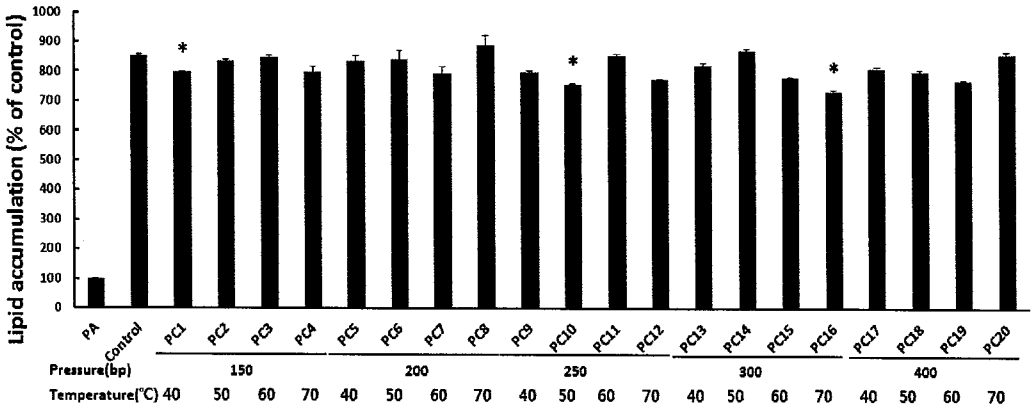


그림 42. Lipid accumulation in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1.

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. The lipid accumulation was evaluated by Oil red O staining at 9 day. All data are presented as mean±standard deviation. Significantly different at $p<0.05$ compared with control by t-test.

(나) Glycerol release assay

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해 과정에서, 글리세롤 방출량에 미치는 영향을 측정하기 위해 분화되어 있는 지방세포에 초임계 잣송이 추출물을 처리한 후 분화 후기(11일째)에 배양액 내 free glycerol 함량을 측정한 결과는 그림 43과 같다.

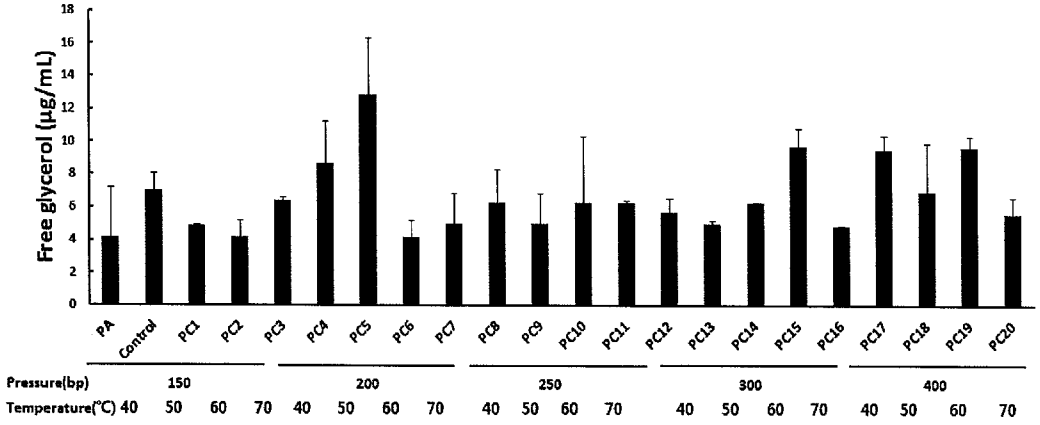


그림 43. Glycerol release in supercritical pine cone extracted 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine cone extract treated 3T3-L1 for 2 days. Increase of lipolytic effect was evaluated by the release of glycerol to the cultured medium at 11 day.

나. in vitro 실험을 통한 초임계 잣송이 추출물 기능성 효과 평가

(1) 초임계 잣송이 추출물이 지방 분화에 미치는 영향

(가) Oil Red O staining

초임계 잣송이 추출물이 지방세포가 분화하는 과정에서, 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 측정하기 위해 지방세포가 분화하는 동안 초임계 잣송이 추출물 처리한 후, 분화초기(3일째), 분화중기(6일째), 후기(9일째)에 각각 Oil red O staining을 수행한 결과는 그림 44, 45와 같다.

분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 7.4% 유의적으로 증가하였고, 초임계 잣송이 추출물(pine cone 300bp, 70℃; PC 16) 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 7.7% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 15.6% 유의적으로 증가하였고, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 0.8%, 0.5% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 341.6% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL은 지방 분화 유도군에 비해 각각 28.6%, 26.1% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 4.2%, 15.6% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 502.9% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL은 지방 분화 유도군에 비해 각각 10.3%, 7.1% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 10.3%, 15.3% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서, 초임계 잣송이 추출물 5 μg/mL 처리군은 지방 분화를 억제하지만, 1 μg/mL 처리군은 지방 분화를 촉진하는 것을 확인하였다.

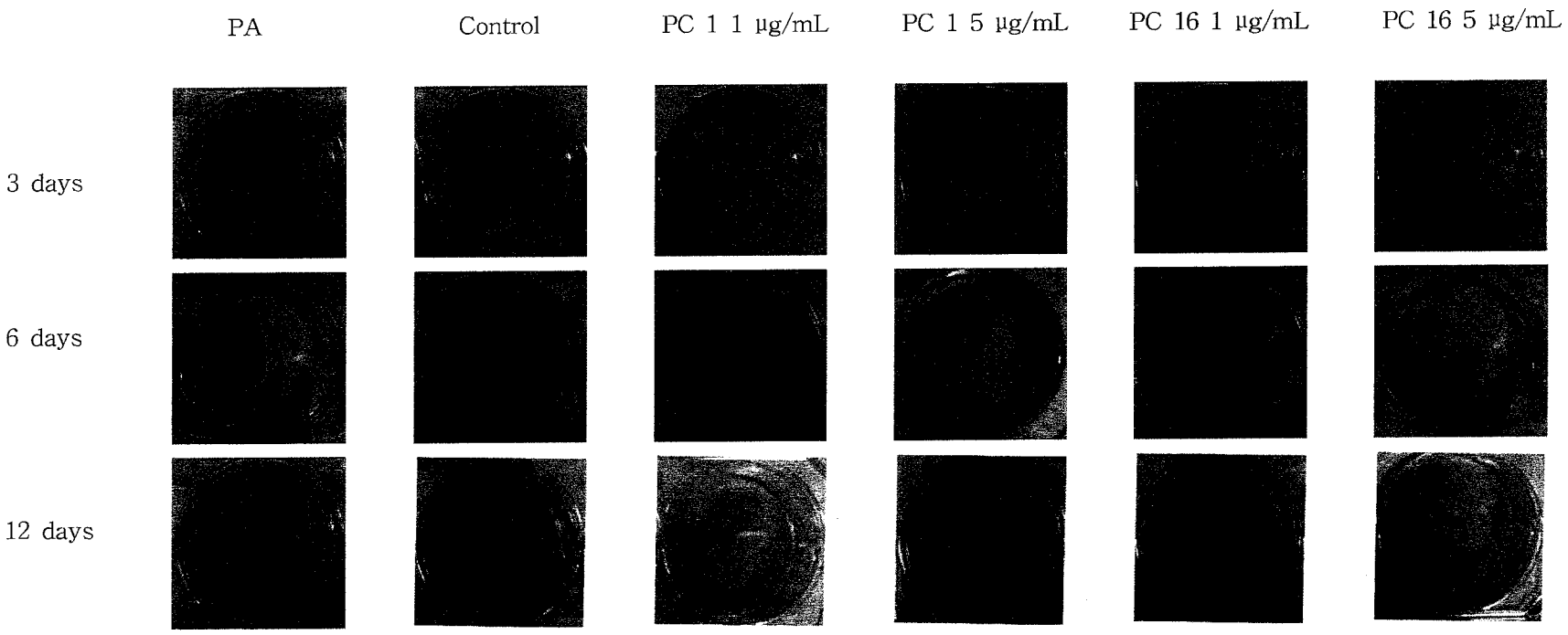


그림 44. Oil red O staining of neutral lipids in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. Oil red O staining was performed at day 3, 6 and 9. PA; Preadipocyte, PC 1;Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; 300 bp, 70 ℃

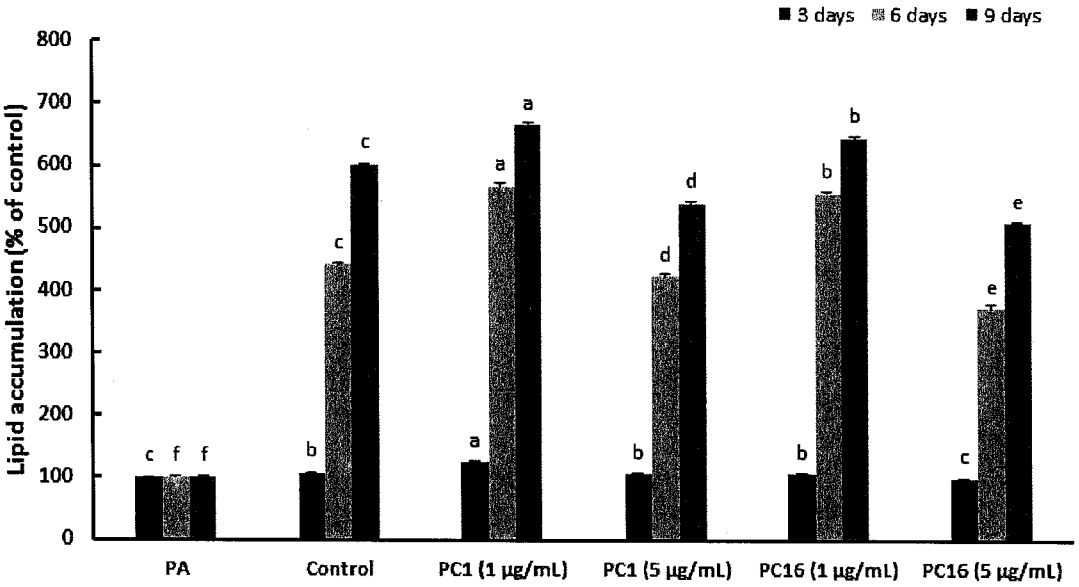


그림 45. Lipid accumulation in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1.

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. The lipid accumulation was evaluated by Oil red O staining at 3 day, 6 day, 9 day. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1;Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; 300 bp, 70 ℃

(나) Glycerol release assay

초임계 잣송이 추출물이 지방세포의 분화과정에서 글리세롤 방출량에 미치는 영향을 알아보기 위해 분화와 동시에 각 추출물을 처리한 후, 분화 초기(3일째), 분화 중기(6일째), 분화 후기(9일째)에 배양액 내 free glycerol 함량을 측정한 결과는 그림 46과 같다.

분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 100% 유의적으로 증가하였고, 초임계 잣송이 추출물(pine cone 300bp, 70℃; PC 16) 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 100% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 20.0% 증가하였고, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 60.0%, 60.0% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 79.4% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 24.1% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해각각 31.7%, 47.6% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 15.9% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 92.5% 유의적으로 증가하였고, PC 1 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 5.8% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 20.6%, 35.4%, 14.8% 유의적으로 증가였다($p<0.05$).

따라서, 분화 초기와 중기에 있어서 초임계 잣송이 추출물 5 μg/mL 처리군은 지방 분화를 억제하지만, 1 μg/mL 처리군은 지방 분화를 촉진하는 것을 확인하였다.

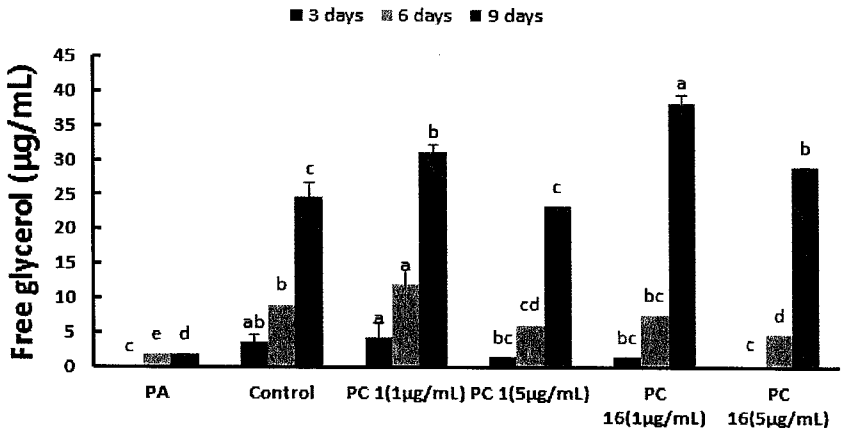


그림 46. Glycerol release in supercritical pine cone extracted 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. Increase of lipolytic effect was evaluated by the release of glycerol to the cultured medium at day 3, 6 and 9. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(다) Real time PCR에 의한 adipogenic transcription factor (PPAR-γ, C/EBP) 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포분화에서 분화초기에 발현되는 유전자인 peroxisome proliferation activated receptors-γ(PPAR-γ), CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 47과 같다.

PPAR-γ의 발현 정도는 분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 52.1% 유의적으로 증가하였고, PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 9.7% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 20.2%, 31.8%, 25.7% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 14.9% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았고, PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 50.3% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 10.7%, 4.6%, 0.1% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 81.0% 유의적으로 증가하였고, PC1 1 μg/mL 처리군, PC 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL처리군은 지방 분화 유도

군에 비해 각각 34.7%, 58.8%, 51.8% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PPC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 20.3% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

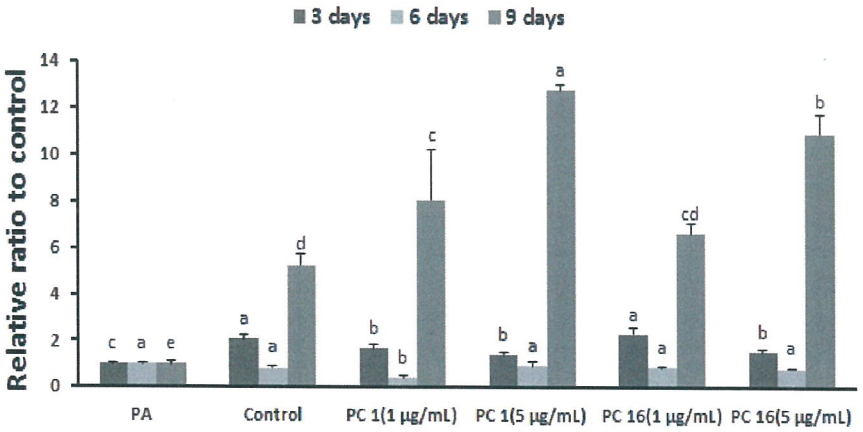
C/EBP의 발현 정도는 분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 72.6% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군, PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 34.5%, 58.6%, 67.0%, 37.1% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 56.1% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았고, PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 71.4% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 56.8%, 45.3%, 46.2% 증가하거나 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 66.1% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았고, PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 78.4% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 68.1%, 14.1%, 17.0% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

따라서, 초임계 잣송이 추출물이 adipogenic transcription factor의 분화를 조절하여 지방 생성을 억제 할 수 있을 것으로 사료된다.

(a)



(b)

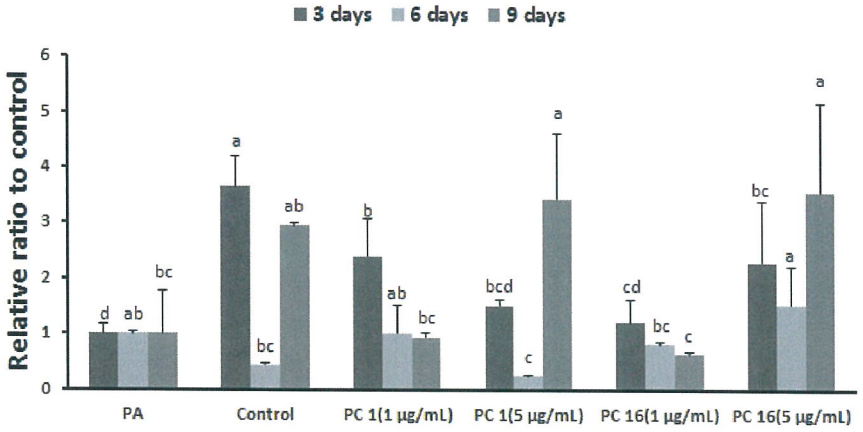


그림 47. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of adipogenic transcription factor (PPAR-ɣ, C/EBP) in 3T3-L1.

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

(a); PPAR-ɣ , (b); C/EBP, PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC 16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(라) Real time PCR에 의한 adiponectin 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포분화에서 adiponectin 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 48과 같다.

분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 88.5% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군이 지방 분화 유도군에 비해 6.6% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 55.9%, 41.0%, 38.7% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 79.7% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μ

g/mL 처리군, PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 54.1%, 59.4%, 58.2%, 28.2% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 65.5% 유의적으로 증가하였고, PC 16 1 μg/mL 처리군이 지방 분화 유도군에 비해 59.4% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 29.4%, 9.1%, 16.6% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

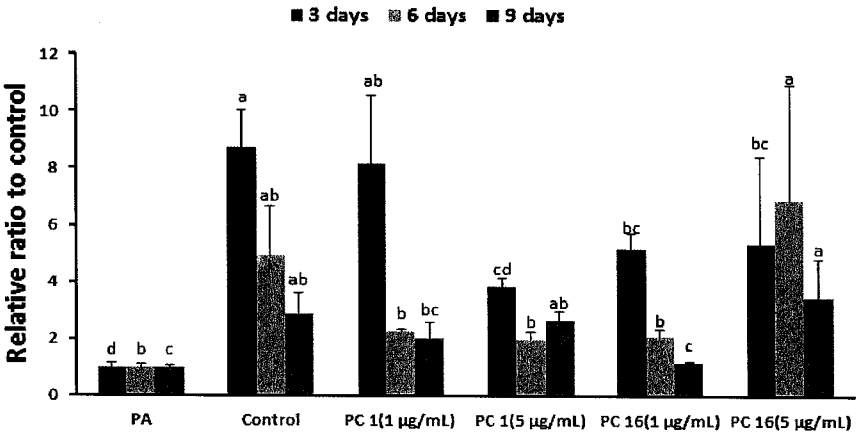


그림 48. **Effect of supercritical pine cone extracts on expression of adiponectin in 3T3-L1.** Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.
PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(마) Real time PCR에 의한 FAS 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포분화에서 지방합성 관련 유전자인 fatty acid synthase(FAS)의 발현에 미치는 영향[26]을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 49와 같다.

FAS의 발현 정도는 분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 87.3% 유의적으로 증가하였고, PC 1 5 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과, PC 16 5 μg/mL 처리군이 지방 분화 유도군에 비해 각각 56.2%, 43.5%, 68.3% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 34.8% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 24.2% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았고, PC 1 1 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 62.8%, 41.1% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 35.5%, 27.1% 감소하였으나 유의성은

나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 65.5% 유의적으로 증가하였고, PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 59.4% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 29.4%, 9.1%, 16.6% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

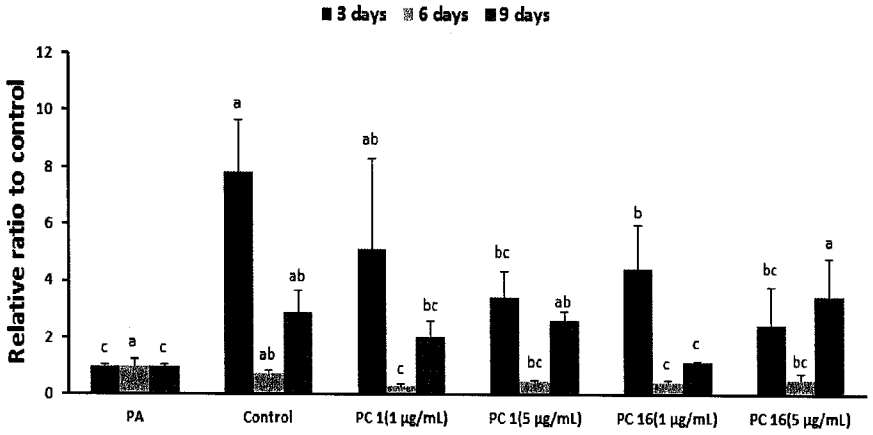


그림 49. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of FAS in 3T3-L1.
Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.
PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(바) Real time PCR에 의한 LPL 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포분화에서 지방분해 관련 유전자인 lipoprotein lipase(LPL)발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 50과 같다.

LPL 발현 정도는 분화 초기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군에서 40.6% 유의적으로 증가하였고, PC 1 5 μg/mL 처리군이 지방 분화 유도군에 비해 27.1% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 2.4%, 19.9%, 17.6% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

분화 중기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 51.2% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군, PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군이 비해 각각 40.6%, 20.5%, 33.3%, 3.8% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$)

분화 후기의 경우, 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 81.0% 유의적으로 증가하였

고, PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 20.3% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 34.6%, 58.8%, 51.8% 유의적으로 증가하였다.

따라서, 초임계 잣송이 추출물이 LPL 유전자의 발현을 증가시켜 지방 생성 및 축적을 억제 할 수 있을 것으로 보여 진다.

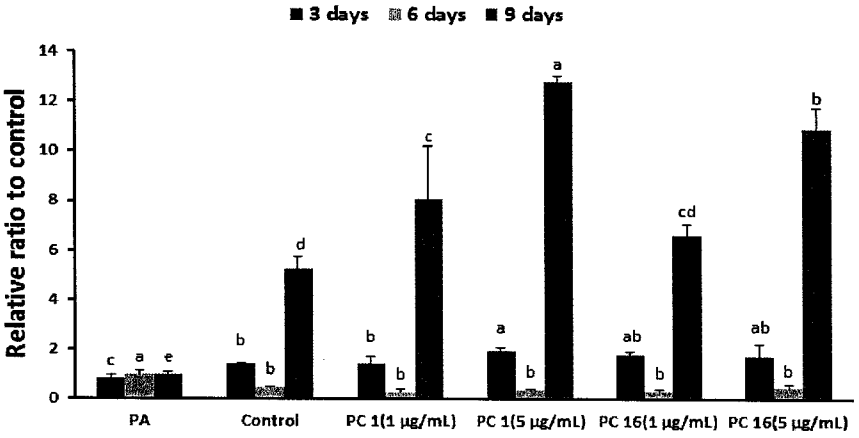


그림 50. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of LPL in 3T3-L1.

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail and supercritical pine cone extracts for 9 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(2) 초임계 잣송이 추출물이 지방 분해에 미치는 영향

(가) Oil Red O staining

초임계 잣송이 추출물이 지방세포를 분해하는 과정에서, 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 측정하기 위해 지방세포가 분화한 후 초임계 잣송이 추출물 처리하고, 분화 후기(11일째)에 Oil red O staining을 수행한 결과는 그림 51, 52와 같다.

전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 570.2% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 2.8% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 그리고 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 10.7%, 6.6%, 5.6% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서 초임계 잣송이 추출물이 지방세포를 분해할 수 있을 것으로 확인되었다.

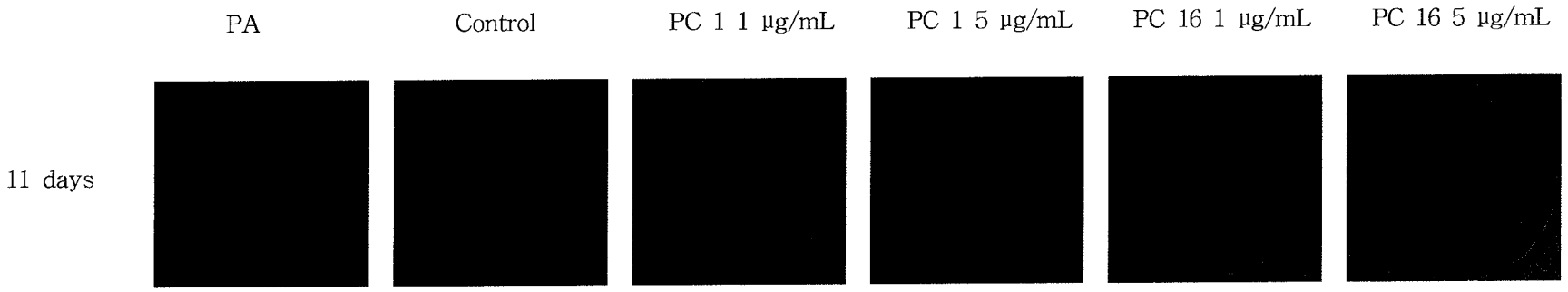


그림 51. Oil red O staining of neutral lipids in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. Oil red O staining was performed at 11 day.

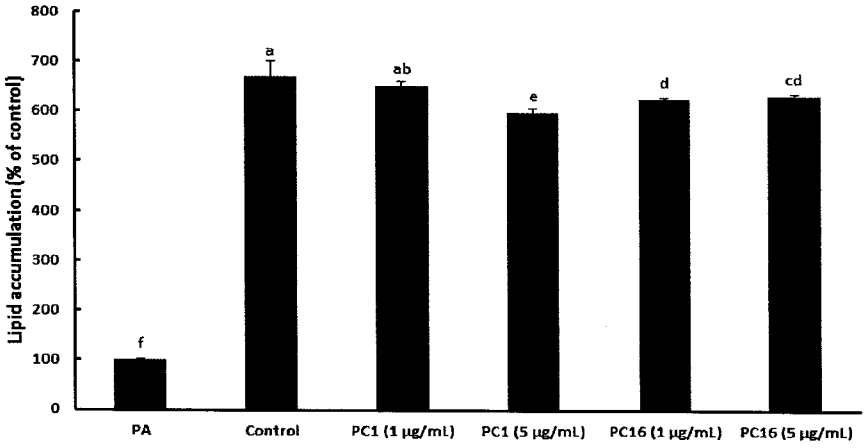


그림 52. **Lipid accumulation in supercritical pine cone extracts treated 3T3-L1.**

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. The lipid accumulation was evaluated by Oil red O staining at 11 day. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(나) Glycerol release assay

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해 과정에서, 글리세롤 방출량에 치는 영향을 측정하기 위해 분화되어 있는 지방세포에 잣송이 추출물을 처리한 후 분화 후기(11일째)에 배양액 내 free glycerol 함량을 측정한 결과는 그림 53과 같다.

전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 68.0% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 그리고 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 35.0%, 8.2%, 19.3%, 28.0% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$).

따라서 초임계 잣송이 추출물이 지방세포를 분해할 수 있을 것으로 확인되었다.

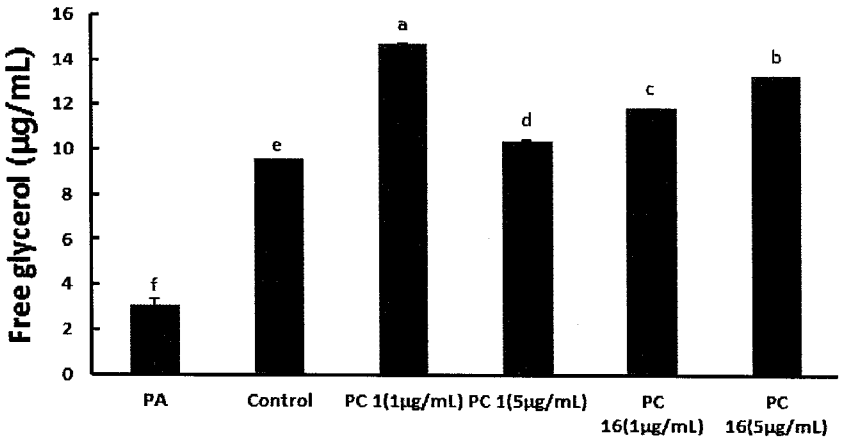


그림 53. Glycerol release in supercritical pine cone extracted 3T3-L1

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. Increase of lipolytic effect was evaluated by the release of glycerol to the cultured medium at 11 day. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(다) Real time PCR에 의한 adipogenic transcription factor (PPAR-ɣ, C/EBP) 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해과정에서 분화초기에 발현되는 유전자인 peroxisome proliferation activated receptors-ɣ(PPAR-ɣ), CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 54와 같다.

PPAR-ɣ 발현 정도는 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 77.2% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). PC 1 1 μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 38.0%, 49.0% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았고, PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 87.6%, 89.3%유의적으로 증가하였다($p<0.05$).

C/EBP 발현정도는 전비방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 23.5% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 81.7%, 88.3% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1μg/mL 처리군과 PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 21.4%, 14.0% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

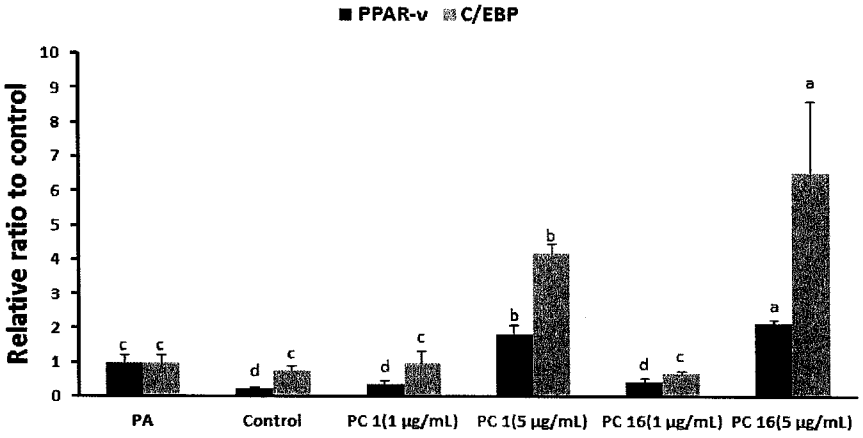


그림 54.. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of adipogenic enzyme(PPAR-γ, C/EBP) in 3T3-L1.

Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(라) Real time PCR에 의한 FAS 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해과정에서 지방합성 관련 유전자인 fatty acid synthase(FAS)의 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 55와 같다.

FAS의 발현 정도는 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 52.8% 유의적으로 증가하였고, PC 16 5 μg/mL 처리군이 지방 분화 유도군에 비해 30.3% 유의적으로 증가하였다. PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 1 5 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 14.7%, 08.%, 29.9% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$)

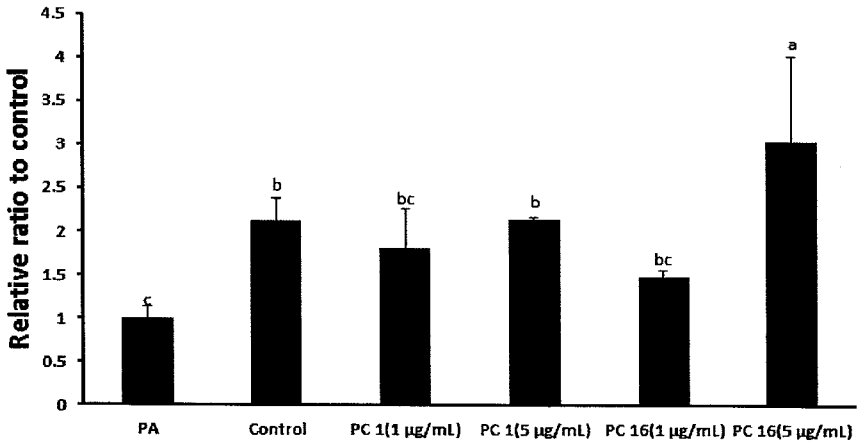


그림 55. **Effect of supercritical pine cone extracts on expression of FAS in 3T3-L1.**
Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.
PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(마) Real time PCR에 의한 LPL 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해과정에서 지방분해 관련 유전자인 lipoprotein lipase(LPL)의 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 56과 같다.

LPL 발현 정도는 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 32.6% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 38.7% 유의적으로 증가하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 18.9%, 4.4%, 24.3% 감소하거나 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

따라서, 초임계 잣송이 추출물을 고농도로 처리할 경우 지방 분해를 촉진 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

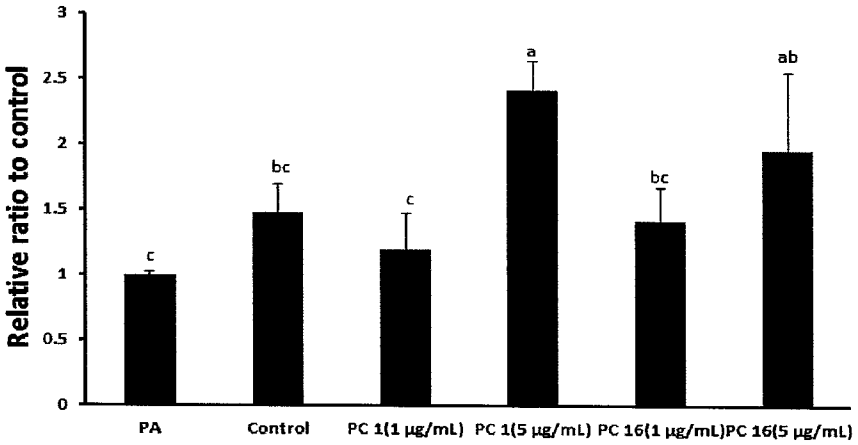


그림 56. **Effect of supercritical pine cone extracts on expression of LPL in 3T3-L1.** Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

(바) Real time PCR에 의한 HSL 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 지방세포 분해과정에서 지방분해 관련 유전자인 hormone-sensitive lipase(HSL)의 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 57과 같다.

HSL 발현 정도는 전지방세포군에 비해 지방 분화 유도군이 90.5% 유의적으로 감소하였고, PC 1 1 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 69.8% 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 5μg/mL 처리군, PC 16 1 μg/mL 처리군과 PC 16 5 μg/mL 처리군은 지방 분화 유도군에 비해 각각 94.1%, 93.0%, 88.3% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$).

따라서, 초임계 잣송이 추출물이 HSL 유전자 발현을 증가시켜 지방 분해를 촉진 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

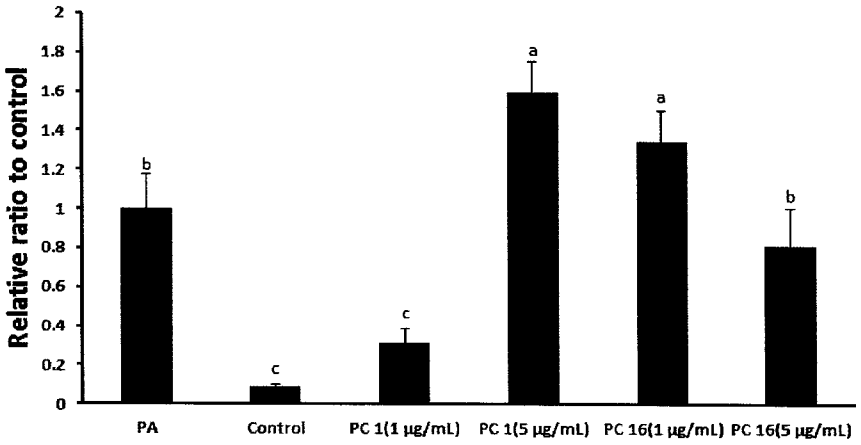


그림 57. **Effect of supercritical pine cone extracts on expression of HSL in 3T3-L1.**
Cell were differentiated with medium containing adipogenic cocktail for 9 days. After 9 days for differentiation, supercritical pine con extract treated 3T3-L1 for 2 days. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.
PA; Preadipocyte, PC 1; Pine cone extract 150 bp, 40℃ , PC16; Pine cone extract 300 bp, 70 ℃

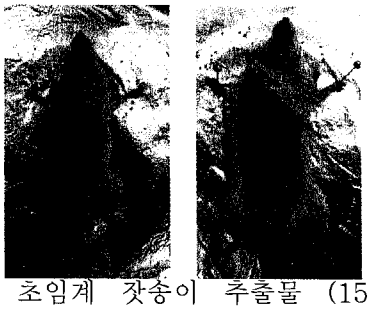
3.1.9. In vivo 동물실험을 통한 기능성 효능 평가

가. 선택한 추출물의 안전 적용 농도 결정을 위한 동물 독성 시험

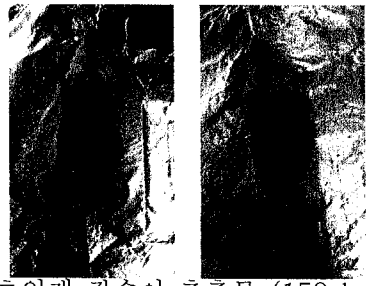
(1) 1일 단회 독성 평가

초임계 잣송이 추출물의 안정성 평가를 위해 0, 100, 300 mg/kg b.w.의 농도로 초임계 잣송이 추출물을 oil에 희석하여 1일 경구 투여한 결과는 그림 58, 표 48, 표 49 및 표 50과 같다. 생존율 100%를 보였으며 이상증상이 관찰되지 않았으며 부검소견 또한 이상소견은 관찰 되지 않았다. 식이효율을 계산한 결과, 성별, 잣송이 추출조건에 관계없이 초임계 잣송이 추출물을 섭취한 그룹과 control 그룹간의 유의성이 나타나지 않다($p<0.05$). 혈청 내 AST, ALT, glucose, creatine, urea의 함량은 모든 그룹에서 유의성이 나타나지 않았다($p<0.05$). 따라서 초임계 잣송이 추출물의 단일 섭취에서는 모든 농도에서 독성을 보이지 않았음을 확인하였다.

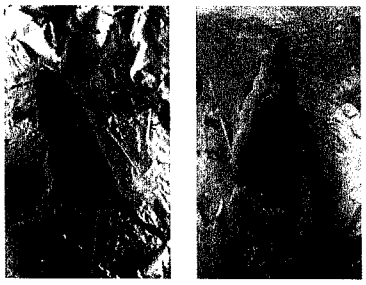
Control (Female, Male)



초임계 잣송이 추출물 (150 bp, 40℃)
100 mg/kg b.w (Female, Male)



초임계 잣송이 추출물 (150 bp, 40℃)
300 mg/kg b.w (Female, Male)



초임계 잣송이 추출물 (250 bp, 50℃)
100 mg/kg b.w (Female, Male)

초임계 잣송이 추출물 (250 bp, 50℃)
300 mg/kg b.w (Female, Male)

초임계 잣송이 추출물 (300 bp, 70℃)
100 mg/kg b.w (Female, Male)

초임계 잣송이 추출물 (300 bp, 70℃)
300 mg/kg b.w (Female, Male)

그림 58. Acute toxicity of supercritical pine cone extract in ICR mice

표 48. Acute toxicity of supercritical pine cone extract (150 bp, 40℃) on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group)

	Female			male		
	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.
FER (%)	−3.957 ± 6.396	-1.379 ± 3.277	−2.410 ± 3.408	-3.957 ± 6.396	1.408 ± 2.256	6.873 ± 3.661
AST (μM)	0.949 ± 0.153	1.007 ± 0.027	1.114 ± 0.084	1.075 ± 0.201	0.920 ± 0.52	0.859 ± 0.121
ALT (μM)	2.232 ± 0.155	1.479 ± 0.203	2.616 ± 1.099	2.144 ± 0.254	1.929 ± 0.214	2.214 ± 0.361
Glucose (μM)	0.973 ± 0.058	0.0867 ± 0.036	0.867 ± 0.076	0.906 ± 0.041	0.840 ± 0.037	0.840 ± 0.005
Creatine (μM)	2.156 ± 0.441	1.403 ± 0.110	1.429 ± 0.073	1.429 ± 0.147	1.506 ± 0.184	1.854 ± 0.441
Urea (μM)	0.238 ± 0.063	0.154 ± 0.016	0.132 ± 0.016	0.174 ± 0.051	0.179 ± 0.020	0.143 ± 0.039

표 49. Acute toxicity of supercritical pine cone extract (250 bp, 50℃) on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group)

	Female			male		
	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.
FER (%)	−3.957 ± 6.396	2.195 ± 3.104	−1.460 ± 1.809	-3.957 ± 6.396	2.195 ±3.104	1.901 ± 0.896
AST (μM)	0.949 ± 0.153	1.047 ± 0.136	1.042 ± 0.115	1.075 ± 0.201	0.794 ± 0.024	0.889 ± 0.038
ALT (μM)	2.232 ± 0.155	2.274 ± 0.195*	3.092 ± 0.160	2.144 ± 0.254	3.305 ± 1.514	2.969 ± 0.380
Glucose (μM)	0.973 ± 0.058	0.921 ± 0.028	0.850 ± 0.074	0.906 ± 0.041	0.816 ± 0.008	0.828 ± 0.005
Creatine (μM)	2.156 ± 0.441	2.026 ± 0.845	1.870 ± 0.37	1.429 ± 0.147	1.506 ± 0.184	1.299 ± 0.184
Urea (μM)	0.238 ± 0.063	0.207 ± 0.082	0.152 ± 0.004	0.174 ± 0.051	0.177 ± 0.047	0.135 ± 0.020

표 50. Acute toxicity effects of supercritical pine cone extract (300 bp, 70℃) on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group)

	Female			male		
	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.
FER (%)	−3.957 ± 6.396	-4.327 ± 1.101	−4.932 ± 0.456	-3.957 ± 6.396	3.535 ± 2.777	3.280 ± 1.128
AST (μM)	0.949 ± 0.153	1.186 ± 0.088	0.0992 ± 0.210	1.075 ± 0.201	0.997 ± 0.025	0.861 ± 0.102
ALT (μM)	2.232 ± 0.155	2.520 ± 1.085	2.623 ± 0.605	2.144 ± 0.254	2.628 ± 0.793	2.172 ± 0.276
Glucose (μM)	0.973 ± 0.058	0.945 ± 0.051	0.931 ± 0.007	0.906 ± 0.041	0.843 ± 0.041	0.810 ± 0.035
Creatine (μM)	2.156 ± 0.441	1.844 ± 0.661	1.532 ± 0.514	1.429 ± 0.147	1.481 ± 0.661	1.274 ± 0.037
Urea (μM)	0.238 ± 0.063	0.182 ± 0.079	0.127 ± 0.063	0.174 ± 0.051	0.174 ± 0.067	0.132 ± 0.024

(2) 14일 반복 독성 평가

초임계 잣송이 추출물의 안정성 평가를 위해 0, 100, 300 mg/kg b.w.의 농도로 초임계 잣송이 추출물을 oil에 희석하여 14일 경구 투여한 결과는 그림 59, 표 51, 표 52 및 표 53과 같다. 식이효율을 계산한 결과, 성별, 잣송이 추출조건에 관계없이 초임계 잣송이 추출물을 섭취한 그룹과 control 그룹간의 유의성이 나타나지 않다($p<0.05$). 혈청 내 AST, ALT, glucose 함량은 모든 그룹에서 유의성이 나타나지 않았다. 하지만 creatine 함량이 300 mg/kg b.w.을 섭취한 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 감소하였으며, urea 함량은 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 따라서 초임계 잣송이 추출물의 장기 섭취 시 300 mg/kg b.w.은 독성이 있는 것으로 확인하여 추후 진행된 동물실험에서는 안전성을 확인한 100 mg/kg b.w.을 최대농도로 하여 효능평가를 실시하였다.

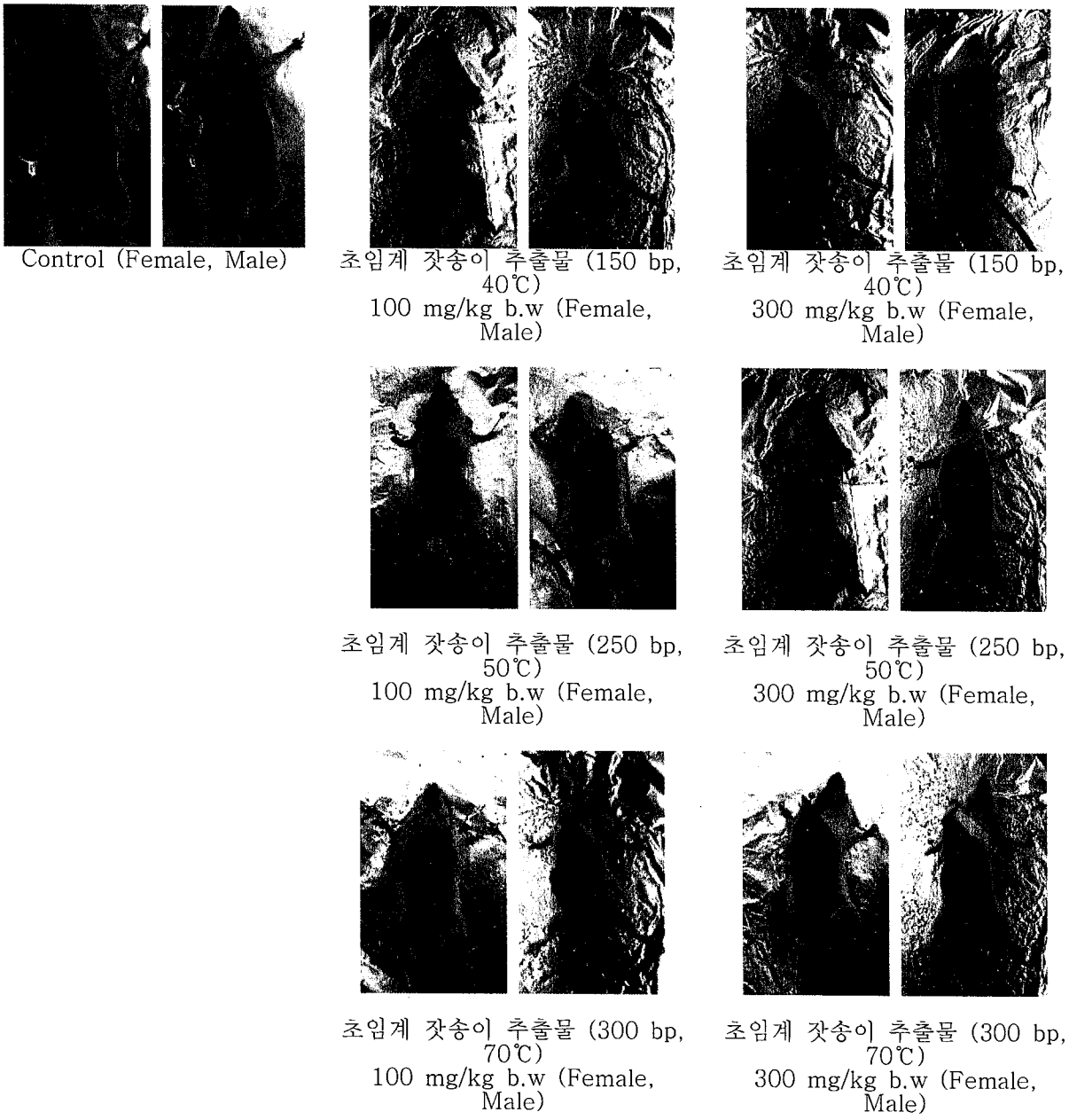


그림 59. Repeat toxicity of supercritical pine cone extract in ICR mice

표 51. Repeat toxicity of supercritical pine cone extract (150 bp, 40℃) on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group)

	Female			male		
	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.
FER (%)	0.471 ± 2.798	-1.439 ± 1.853	1.428 ± 1.881	0.471 ± 2.798	0.626 ± 8.693	3.451 ± 2.377
AST (μM)	0.998 ± 0.132	1.004 ± 0.079	0.827 ± 0.069	0.883 ± 0.036	0.789 ± 0.102	0.850 ± 0.094
ALT (μM)	2.386 ± 0.158	1.787 ± 0.413	2.122 ± 0.582	2.682 ± 1.057	1.762 ± 0.349	1.857 ± 0.380
Glucose (μM)	0.962 ± 0.049	0.933 ± 0.077	0.914 ± 0.147	0.992 ± 0.200	0.872 ± 0.047	0.876 ± 0.056
Creatine (μM)	2.312 ± 0.073	1.602 ± 0.197*	1.688 ± 0.270*	1.584 ± 0.074	1.463 ± 0.159	1.758 ± 0.317
Urea (μM)	0.027 ± 0.004	0.169 ± 0.041*	0.138 ± 0.042*	0.210 ± 0.024	0.153 ± 0.050	0.154 ± 0.051

표 52. Repeat toxicity of supercritical pine cone extract (250 bp, 50℃) on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice

	Female			male		
	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.
FER (%)	0.471 ± 2.798	0.878 ± 3.972	−3.078 ± 1.280	0.471 ± 2.798	0.878 ± 3.972	-0.362 ± 2.560
AST (μM)	0.998 ± 0.132	1.071 ± 0.207	0.918 ± 0.072	0.883 ± 0.036	0.842 ± 0.074	0.973 ± 0.221
ALT (μM)	2.386 ± 0.158	2.339 ± 0.808	2.504 ± 0.278	2.682 ± 1.057	2.034 ± 0.493	2.555 ± 0.681
Glucose (μM)	0.962 ± 0.049	0.956 ± 0.084	0.929 ± 0.016	0.992 ± 0.200	0.888 ± 0.021	1.003 ± 0.098
Creatine (μM)	2.312 ± 0.073	1.896 ± 0.735	1.325 ± 0.147*	1.584 ± 0.074	2.676 ± 0.808	1.558 ± 0.037
Urea (μM)	0.027 ± 0.004	0.196 ± 0.106	0.129 ± 0.027	0.210 ± 0.024	0.343 ± 0.094	0.129 ± 0.004

표 53. Repeat toxicity of supercritical pine cone extract (300 bp, 70℃) on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice(n=4/group)

	Female			male		
	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.	control	100 mg/kg b.w.	300 mg/kg b.w.
FER (%)	0.471 ± 2.798	-3.535 ± 0.833	-1.241 ± 3.009	0.471 ± 2.798	-2.357 ± 1.944	5.053 ± 0.376
AST (μM)	0.998 ± 0.132	1.024 ± 0.199	1.026 ± 0.226	0.883 ± 0.036	1.061 ± 0.294	0.884 ± 0.005
ALT (μM)	2.386 ± 0.158	2.640 ± 0.459	2.225 ± 0.754	2.682 ± 1.057	3.278 ± 0.215	2.174 ± 0.261
Glucose (μM)	0.962 ± 0.049	0.980 ± 0.060	1.044 ± 0.145	0.992 ± 0.200	0.933 ± 0.103	0.849 ± 0.020
Creatine (μM)	2.312 ± 0.073	1.922 ± 0.331	2.597 ± 1.800	1.584 ± 0.074	1.533 ± 0.661	1.273 ± 0.220
Urea (μM)	0.027 ± 0.004	0.204 ± 0.102	0.266 ± 0.259	0.210 ± 0.024	0.188 ± 0.102	0.123 ± 0.028

나. 선택한 추출물을 이용한 in vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가

(1) 실험동물의 체중변화, 식이효율, 장기와 지방조직 무게 변화

실험기간 8주 동안 초임계 잣송이 추출물이 60% high fat diet(HFD)를 공급한 C57BL/6J 마우스의 체중변화, 식이효율, 장기와 지방조직 무게 변화에 미치는 영향을 실험한 결과는 표 54와 같다.

본 연구에서 양성대조군으로 항비만 효능이 입증된 카테킨(Catechin)을 사용하여 비교하였다.

실험동물의 체중변화는 8주 동안 high fat diet를 공급한 그룹들이 normal diet를 공급한 그룹(Normal control;NC)에 비해 유의적으로 체중이 증가되어 비만이 유도되었음을 확인하였다($p<0.05$). 체중변화량이 HFD만을 공급한 그룹에 비해 초임계 잣송이 추출물(pine cone 150bp, 40℃; PC 1) 20 mg b.w.을 공급한 그룹에서는 1.1% 감소하였으며, 초임계 잣송이 추출물(pine cone 300bp, 70℃; PC 16) 20 mg/kg b.w.을 공급한 그룹에서 3.5% 증가하였으나, 두 군 모두 유의성을 나타내지는 않았다($p<0.05$). PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹과 PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹의 체중변화량은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 21.2%, 21.5% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 식이효율을 계산한 결과 NC에 비해 HFD를 공급한 그룹들이 유의적으로 증가하였고, HFD를 공급한 그룹 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다($p<0.05$).

간(liver)의 경우, PC 1 100 mg/kg b.w., PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 NC와 HFD만을 공급한 그룹과 유의적인 차이가 없었고, PC 1 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 NC와 HFD만을 공급한 그룹에 비해 유의적으로 증가하였으나 외형상에는 문제가 없었다($p<0.05$). 피하지방 (Subcutaneous fat)의 경우, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹에서는 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 35.5.%, 52.5% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹에서는 각각 25%, 63.5% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 내장지방(Visceral fat)의 경우, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹에서는 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 14.%, 15.0% 감소하였고, PC 16 100 mg/kg b.w., PC 16 300 mg/kg b.w.을 공급한 그룹에서는 각각 7.0%, 12.0% 감소하였으나 유의성을 나타내지는 않았다($p<0.05$). 갈색지방(Brown fat)의 경우, 모든 그룹에서 유의성이 나타나지 않았다.

따라서 비만 유도 마우스 모델에서 초임계 잣송이 추출물 100 mg/kg b.w.은 체중과 피하지방을 유의적으로 감소시키는 효과가 있었음을 확인하였다.

표 54. Effect of supercritical pine cone extracts on body weight gain, FER and tissue weight in mice fed high fat diet

	NC[1]	HFD[2]	HFD + Catechin	HFD + PC 1[3] (20 mg b.w.)	HFD + PC 1 (100 mg b.w.)	HFD + PC 16[4] (20 mg b.w.)	HFD + PC 16 (100 mg b.w.)
Initial body weight (g)	22.35 ± 0.95^{ns}	21.60 ± 0.74	21.65 ± 1.14	21.30 ± 1.47	21.27 ± 1.07	22.38 ± 1.43	21.87 ± 0.83
Final body weight (g)	30.25 ± 2.92^{c}	40.08 ± 2.79^{a}	38.83 ± 2.16^{ab}	37.98 ± 1.86^{ab}	35.83 ± 3.49^{b}	38.17 ± 0.81^{ab}	35.88 ± 2.66^{b}
Weight gain (g)	7.90 ± 2.54^{c}	18.48 ± 2.13^{a}	17.18 ± 1.38^{ab}	18.28 ± 2.29^{a}	14.57 ± 3.00^{b}	19.12 ± 2.85^{a}	14.50 ± 2.89^{b}
FER[5]	6.44 ± 2.07^{b}	14.14 ± 1.14^{a}	13.39 ± 0.22^{a}	13.90 ± 0.98^{a}	11.87 ± 2.45^{a}	14.34 ± 1.70^{a}	12.49 ± 1.90^{a}
Tissue weight (g/100 g b.w.)							
Liver	3.83 ± 0.53^{ab}	3.98 ± 0.47^{ab}	3.23 ± 0.34^{b}	4.84 ± 0.32^{a}	4.54 ± 0.22^{ab}	4.37 ± 0.68^{ab}	4.42 ± 0.75^{ab}
Subcutaneous adipose tissue	1.82 ± 0.80^{cd}	3.75 ± 0.39^{a}	3.16 ± 0.53^{ab}	2.42 ± 0.43^{bc}	1.78 ± 0.64^{cd}	2.80 ± 0.57^{b}	1.37 ± 0.39^{d}
Visceral adipose tissue	5.03 ± 1.92^{a}	8.05 ± 0.96^{b}	7.87 ± 0.93^{b}	6.90 ± 0.81^{b}	6.84 ± 1.39^{b}	7.49 ± 1.33^{b}	7.08 ± 0.94^{b}
Brown adipose tissue	0.29 ± 0.09^{ns}	0.35 ± 0.12	0.38 ± 0.11	0.31 ± 0.09	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.10	0.39 ± 0.20

[1] NC ; Normal control. [2] HFD ; High-fat diet. [3] PC 1 ; Pine Cone 150 bp, 40℃. [4] PC 16 ; Pine Cone 300 bp, 70℃. [5] FER (Food efficiency rate) = weight gain (g) / total food consumption (g) X 100. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

(2) 혈청의 leptin level과 lipid profile 측정

초임계 잣송이 추출물을 처리한 실험동물의 혈청 leptin 함량과 지질(TG, TC, LDL/VLDL-C, HDL-C) 함량을 측정한 결과는 표 55와 같다.

혈청 leptin level의 경우, HFD만을 공급한 그룹이 NC 그룹에 비해 194.5% 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 79.4%, 47.7% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 28.4%, 62.7% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

TG의 경우, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 39.9%, 59.2%, 45.8% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 9.8% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

TC의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 NC 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.,을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 11.1%, 21.5%,유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 300 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 21.8%, 23.2% 유의적으로 감소하였다 ($p<0.05$).

LDL의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 NC 그룹에 비해 103.8% 유의적으로 증가하였다. PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 35.0%, 61.6% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 26.4%, 52.9% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

HDL의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 NC 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 18.5%, 29.5%, 21.9% 유의적으로 감소하였고, PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 10.0% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

LDL/HDL ratio의 경우, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 21.4%, 57.1%, 40.5% 유의적으로 감소하였고, PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 4.8% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$).

따라서, 비만 유도 마우스 모델에서 초임계 잣송이 추출물은 혈청 leptin level, 혈청 지질 함량을 유의적으로 낮추는 것을 확인할 수 있었다.

표 55. Effect of supercritical pine cone extracts on leptin levels and lipid profile in mice fed high fat diet

	NC[1]	HFD[2]	HFD + Catechin	HFD + PC 1[3] (20 mg b.w.)	HFD + PC 1 (100 mg b.w.)	HFD + PC 16[4] (20 mg b.w.)	HFD + PC 16 (100 mg b.w.)
Leptin (ng/mL)	12.84 ± 0.69^{c}	37.81 ± 4.33^{a}	21.12 ± 2.60^{bc}	7.79 ± 1.20^{c}	19.76 ± 3.76^{cd}	27.07 ± 7.98^{b}	14.09 ± 2.70^{dc}
Triglyceride (mM)	18.30 ± 3.01^{a}	20.24 ± 3.33^{a}	20.60 ± 3.15^{a}	12.16 ± 0.61^{b}	8.26 ± 1.58^{c}	18.26 ± 1.91^{a}	10.96 ± 0.33^{bc}
Total cholesterol (mg/dL)	189.52 ± 36.78^{b}	210.83 ± 11.85^{a}	177.95 ± 10.43^{bc}	187.47 ± 10.97^{b}	165.56 ± 11.59^{c}	164.77 ± 11.53^{c}	162.01 ± 6.03^{c}
LDL/VLDL cholesterol (mg/dL)	19.69 ± 5.05^{c}	40.12 ± 3.84^{a}	26.69 ± 6.57^{b}	26.07 ± 2.43^{b}	15.39 ± 2.03^{c}	29.52 ± 5.37^{b}	18.91 ± 2.54^{c}
HDL cholesterol (mg/dL)	82.31 ± 7.53^{bc}	96.23 ± 4.21^{a}	84.06 ± 8.70^{bc}	78.46 ± 5.31^{bc}	86.61 ± 4.50^{a}	67.88 ± 5.46^{d}	75.39 ± 1.22^{cd}
LDL/HDL cholesterol (ratio)	0.24 ± 0.06^{c}	0.42 ± 0.04^{a}	0.32 ± 0.03^{cd}	0.33 ± 0.03^{bc}	0.18 ± 0.02^{c}	0.40 ± 0.08^{ab}	0.25 ± 0.03^{dc}

[1] NC ; Normal control. [2] HFD ; High-fat diet. [3] PC 1 ; Pine Cone 150 bp, 40℃. [4] PC 16 ; Pine Cone 300 bp, 70℃. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

(3) Real time PCR에 의한 adipogenic enzyme(PPAR-ɣ, C/EBP) 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 실험동물의 지방조직 내 adipogenic enzyme(PPAR-ɣ, C/EBP) 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 60과 같다. PPAR-ɣ의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 NC 그룹에 비해 178.5% 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 61.0%, 72.6% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD 만을 공급한 그룹에 비해 각각 53.1%, 48.4% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

C/EBP의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 NC 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 61.5%, 49.7% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD 만을 공급한 그룹에 비해 각각 49.3%, 77.1% 유의적으로 감소하였다 ($p<0.05$).

따라서 초임계 잣송이 추출물이 adipogenic enzyme(PPAR-ɣ, C/EBP)의 발현을 유의적으로 감소시켰음을 확인할 수 있었다.

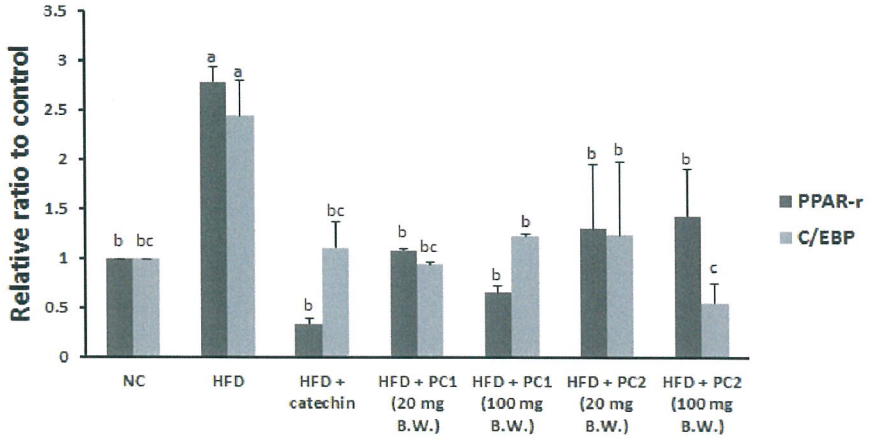


그림 60. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of adipogenic enzyme(PPAR-ɣ, C/EBP) in mice fed high fat diet.

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. NC; normal control, HFD; 60% high fat diet, HFD+catechin; catechin 100 mg/kg b.w., HFD+PC 1; pine cone 150 bp, 40℃, HFD+PC 16; pine cone 300 bp, 70℃.

(4) Real time PCR에 의한 adiponectin 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 실험동물의 지방조직 내 adiponectin 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 61과 같다.

HFD만을 공급하는 그룹이 NC 그룹에 비해 19.5% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았고, PC 1 20 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급하는 그룹에 비해 4.2% 증가하였으며, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급하는

그룹에 비해 각각 14%, 20.2% 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p<0.05$). PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급하는 그룹에 비해 42.9% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$).

따라서 초임계 잣송이 추출물(150bp, 40℃)이 adiponectin 발현을 증가한다는 것을 확인할 수 있었다.

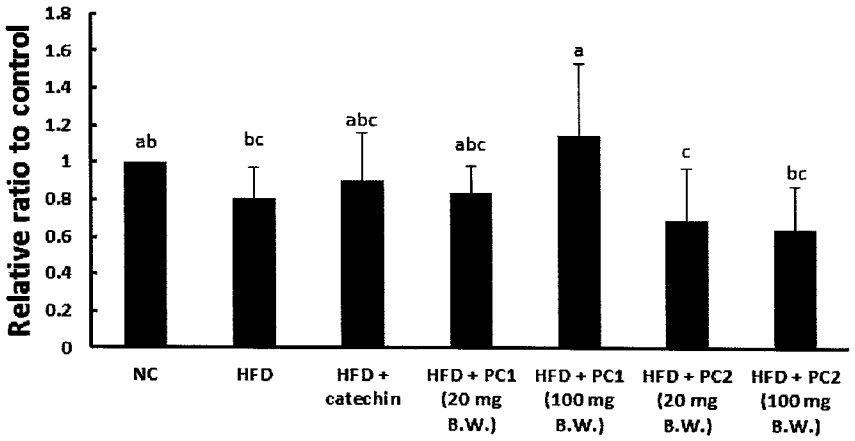


그림 61. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of adiponectin in mice fed high fat diet.

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. NC; normal control, HFD; 60% high fat diet, HFD+catechin; catechin 100 mg/kg b.w., HFD+PC 1; pine cone 150 bp, 40℃, HFD+PC 16; pine cone 300 bp, 70℃.

(5) Real time PCR에 의한 FAS 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 실험동물의 지방조직 내 FAS 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 62와 같다.

HFD만을 공급하는 그룹이 NC 그룹에 비해 150.4% 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 87.6%, 89.2% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD 만을 공급한 그룹에 비해 각각 91.6%, 89.9% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서 초임계 잣송이 추출물이 FAS 발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

(6) Real time PCR에 의한 LPL 발현 측정

초임계 잣송이 추출물이 실험동물의 지방조직 내 LPL 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 63과 같다.

HFD만을 공급하는 그룹이 NC 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, PC 1 20 mg/kg

b.w., PC 1 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 76.3%, 46.2% 유의적으로 감소하였고, PC 16 20 mg/kg b.w., PC 16 100 mg/kg b.w.을 공급한 그룹은 HFD 만을 공급한 그룹에 비해 각각 76.3%, 78.9% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서 초임계 잣송이 추출물이 LPL 발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

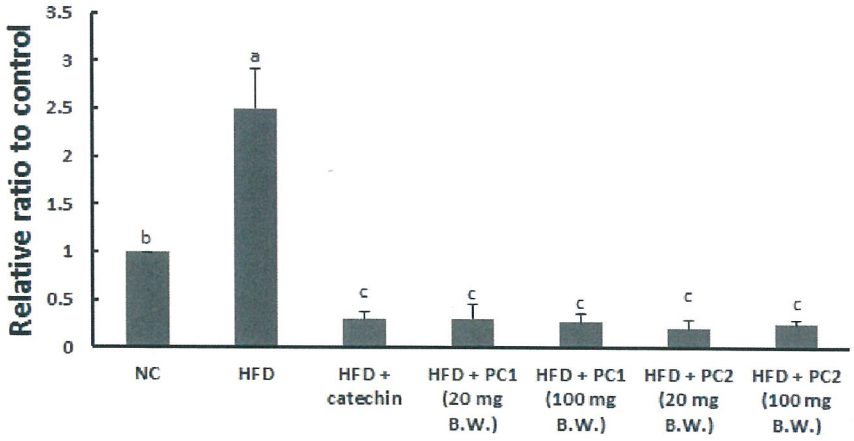


그림 62. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of FAS in mice fed high fat diet. All data are presented as mean±standard deviation.

Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. NC; normal control, HFD; 60% high fat diet, HFD+catechin; catechin 100 mg/kg b.w., HFD+PC 1; pine cone 150 bp, 40℃, HFD+PC 16; pine cone 300 bp, 70℃.

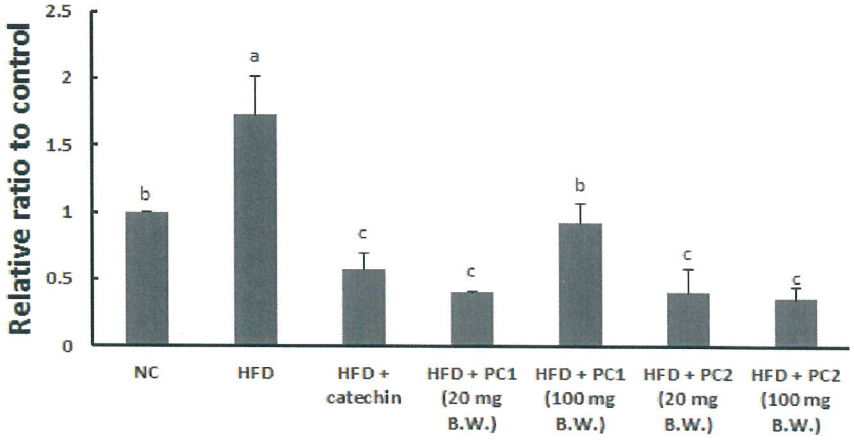


그림 63. Effect of supercritical pine cone extracts on expression of LPL in mice fed high fat diet.

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. NC; normal control, HFD; 60% high fat diet, HFD+catechin; catechin 100 mg/kg b.w., HFD+PC 1; pine cone 150 bp, 40℃, HFD+PC 16; pine cone 300 bp, 70℃.

다. 시제품을 이용한 in vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가

(1) 실험동물의 체중변화, 장기와 지방조직 무게 변화

실험기간 8주 동안 잣송이 추출물이 60% high fat diet(HFD)를 공급한 C57BL/6J 체중변화, 장기와 지방조직 무게 변화에 미치는 영향을 실험한 결과는 표 56과 같다.

실험동물의 체중변화는 8주 동안 high fat diet를 공급한 그룹들이 MCC만을 공급한 그룹(Control;MCC)에 비해 유의적으로 체중이 증가되어 비만이 유도되었음을 확인하였다($p<0.05$). 체중변화량이 HFD만을 공급한 그룹에 비해 카테킨(catechin 100 mg/kg b.w. positive control)을 공급한 그룹과 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹에서 각각 0.7%, 5.7%, 16.2% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

간(liver)의 경우, HFD를 공급한 그룹들이 MCC만을 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 카테킨(catechin 100 mg/kg b.w. positive control)을 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 29.2%감소하였다($p<0.05$). 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 21.7% 유의적으로 감소하였지만, 잣송이 추출물 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹에서는 HFD만을 공급한 그룹에 비해 4.7% 감소하였으나 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p<0.05$).

백색지방 (white adipose tissue)의 경우, HFD를 공급한 그룹들이 MCC만을 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 카테킨을 공급한 그룹과 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 11.2%, 15.4% 감소하였으나 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p<0.05$). 잣송이 추출물 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹에서는 HFD만을 공급한 그룹에 비해 27.9% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서 비만 유도 마우스 모델에서 잣송이 추출물 100 mg/kg b.w.은 체중과 백색지방을 유의적으로 감소시키는 효과가 있었음을 확인하였다.

표 56. Effect of pine cone extracts on body weight gain and tissue weight in mice fed high fat diet

	MCC[1]	HFD[2]	HFD + Catechin	HFD + PC[3] low (20 mg b.w.)	HFD + PC high (100 mg b.w.)
Initial body weight (g)	21.58 ± 1.22^{ns}	20.79 ± 1.13	21.27 ± 1.03	20.40 ± 0.60	21.48 ± 0.74
Final body weight (g)	29.93 ± 2.03^{d}	48.85 ± 1.44^{a}	41.83 ± 0.82^{b}	40.23 ± 1.21^{b}	37.45 ± 3.26^{c}
Weight gain (g)	8.10 ± 1.78^{d}	21.15 ± 1.31^{a}	21.00 ± 0.98^{b}	19.80 ± 1.28^{b}	16.38 ± 2.94^{c}
Tissue weight (g/100 g b.w.)					
Liver	3.65 ± 0.21^{c}	5.73 ± 0.61^{a}	4.06 ± 0.32^{bc}	4.49 ± 0.51^{b}	5.46 ± 0.76^{a}
white adipose tissue	7.95 ± 1.74^{c}	17.21 ± 1.56^{a}	15.28 ± 1.76^{ab}	14.57 ± 2.46^{ab}	12.41 ± 1.62^{b}
Brown adipose tissue	0.51 ± 0.23^{b}	0.79 ± 0.19^{a}	0.35 ± 0.07^{b}	0.38 ± 0.20^{b}	0.40 ± 0.16^{b}

[1] MCC ; control. [2] HFD ; High-fat diet. [3] Pine Cone 300 bp, 70℃. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

(2) 혈청의 lipid profiles와 leptin level측정

잣송이 추출물을 처리한 실험동물의 혈청 지질(TG, TC, LDL/VLDL-C, HDL-C) 함량과 leptin 함량을 측정한 결과는 표 57과 같다.

TG의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 30.1%, 44.7%, 53.7% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$)

TC의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 43.3%, 45.5%, 47.2% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

LDL의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 203.0% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 40.0%, 52.8% 유의적으로 감소하였으나, 잣송이 추출물 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 15.% 감소하였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$).

HDL의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 유의적으로 10.4% 감소하였다($p<0.05$). 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 113.3%, 113.0%, 112.8% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$).

LDL/HDL ratio의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 유의적으로 229.6% 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 48.4%, 25.8%, 54.8% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

혈청 leptin level의 경우, HFD만을 공급한 그룹이 MCC만을 공급한 그룹에 비해 유의적으로 773.5% 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 139.57%, 169.32% 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 잣송이 추출물 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 6.2% 감소하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$).

따라서, 비만 유도 마우스 모델에서 잣송이 추출물은 혈청 TG, TC, VLDL 함량을 유의적으로 낮추는 반면 HDL과 leptin 함량은 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

표 57. Effect of pine cone extracts on leptin levels and lipid profiles in mice fed high fat diet

	MCC[1]	HFD[2]	HFD + Catechin	HFD + PC[3] low (20 mg b.w.)	HFD + PC high (100 mg b.w.)
Triglyceride (mM)	10.08 ± 1.93^{bc}	18.25 ± 2.54^{a}	12.76 ± 3.27^{b}	10.10 ± 1.74^{bc}	8.45 ± 1.34^{c}
Total cholesterol (mg/dL)	74.36 ± 10.42^{b}	146.05 ± 9.14^{a}	82.81 ± 8.71^{b}	79.60 ± 4.12^{b}	77.16 ± 8.14^{b}
LDL/VLDL cholesterol (mg/dL)	0.51 ± 0.11^{b}	1.03 ± 0.13^{a}	0.62 ± 0.15^{b}	0.88 ± 0.23^{a}	0.49 ± 0.23^{b}
HDL cholesterol (mg/dL)	37.63 ± 0.35^{a}	33.71 ± 1.70^{b}	38.20 ± 0.08^{a}	38.10 ± 0.06^{a}	38.01 ± 0.14^{a}
LDL/VLDL cholesterol (ratio)	10.15 ± 2.26^{b}	20.61 ± 2.39^{a}	12.36 ± 2.95^{b}	17.52 ± 4.53^{a}	9.72 ± 4.53^{b}
Leptin (ng/mL)	116.25 ± 54.94^{d}	899.2 ± 103.7^{c}	1255.00 ± 158.68^{b}	1522.50 ± 122.04^{a}	843.13 ± 297.29^{c}

[1] MCC ; Control. [2] HFD ; High-fat diet. [3] PC ; Pine Cone 300 bp, 70℃. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$.

(3) Real time PCR에 의한 adipogenic transcription factors (PPAR-γ, C/EBP, SREBP) 발현 측정

잣송이 추출물이 실험동물의 지방조직 내 adipogenic transcription factors (PPAR-γ, C/EBP, SREBP) 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 64와 같다.

PPAR-γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ)의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 145.5% 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 74.2%, 68.6%, 75.0% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

C/EBP(CCAAT/enhancer binding proteins)의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 127.6% 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 96.0%, 38.7% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$). 잣송이 추출물 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 111.5% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$).

SREBP(sterol regulatory element binding protein)의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 149.3% 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 80.9%, 63.1%, 72.9% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서 잣송이 추출물이 adipogenic transcription factors (PPAR-γ, C/EBP, SREBP)의 발현을 유의적으로 감소시켰음을 확인할 수 있었다.

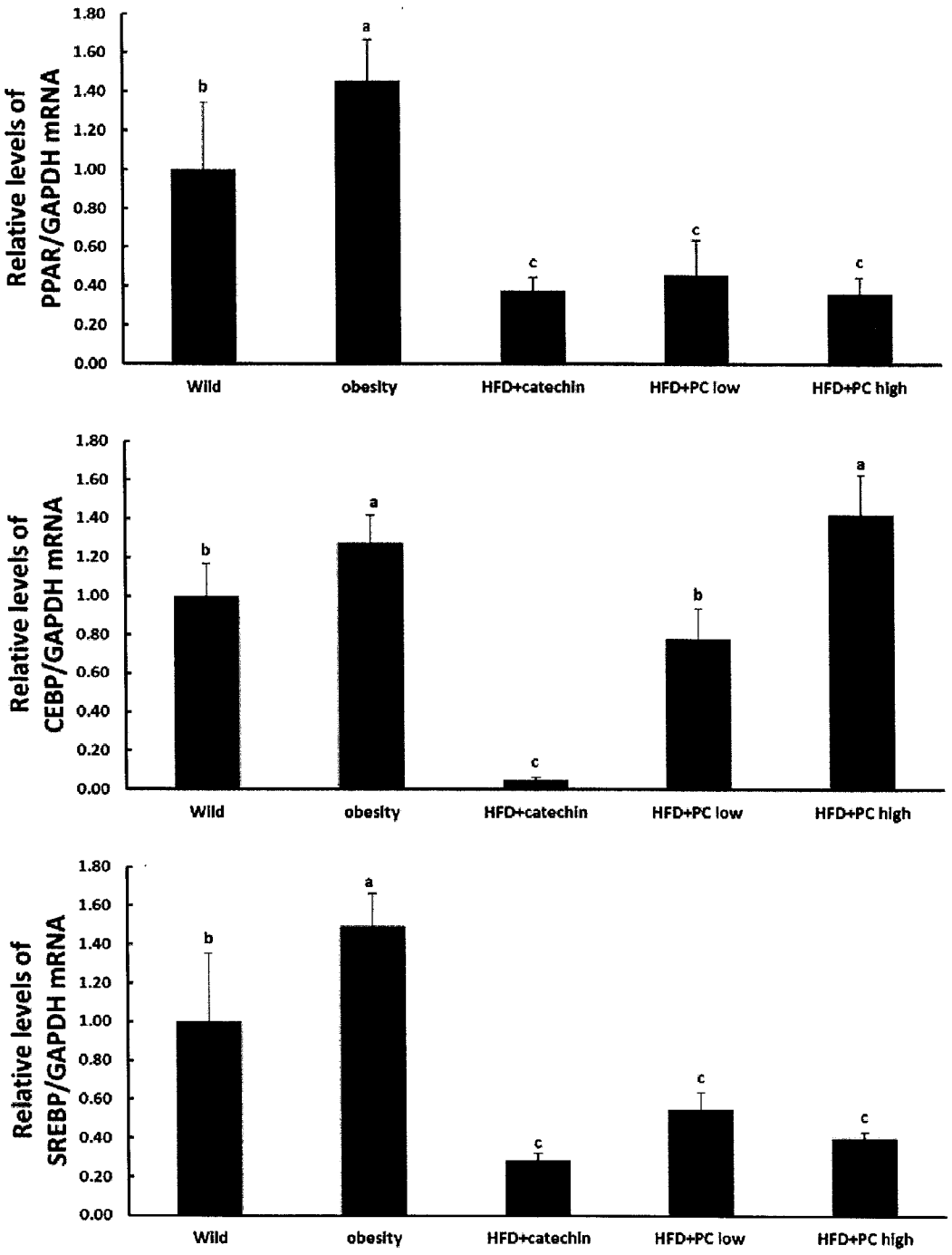


그림 64. **Effect of pine cone extracts on expression of adipogenic transcription factors (PPAR-ɣ, C/EBP, SREBP) in mice fed high fat diet.**

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. MCC; Control, HFD; 60% high fat diet, HFD+catechin; catechin 100 mg/kg b.w., HFD+PC low; pine cone 300 bp, 70℃, 20 mg/kg b.w., HFD+PC high; pine cone 300 bp, 70℃ 100 mg/kg b.w..

(4) Real time PCR에 의한 adiponic enzymes(FAS, LPL) 발현 측정

잣송이 추출물이 실험동물의 지방조직 내 adiponic enzymes(FAS, LPL) 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 확인하기 위하여 real time PCR을 실시한 결과는 그림 65와 같다. FAS(fatty acid synthesis)의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 184.3% 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 61.8%, 61.1%, 55.0% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

LPL(lipoprotein lipase)의 경우, HFD만을 공급한 그룹은 MCC만을 공급한 그룹에 비해 153.3% 유의적으로 증가하였고, 카테킨, 잣송이 추출물 low (20 mg/kg b.w.)와 high (100 mg/kg b.w.)를 공급한 그룹은 HFD만을 공급한 그룹에 비해 각각 98.2%, 83.3%, 82.4% 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

따라서 잣송이 추출물이 adiponic enzymes(FAS, LPL) 발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

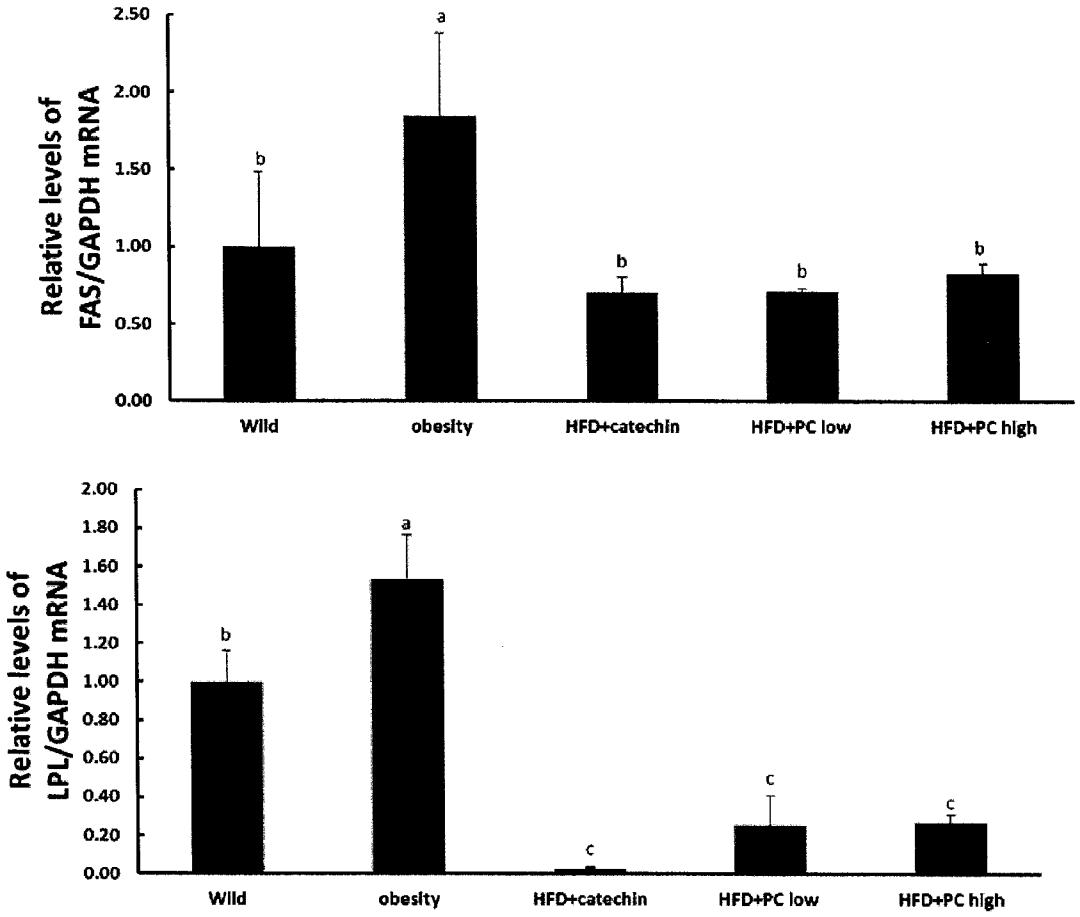


그림 65. **Effect of pine cone extracts on expression of adipogenic enzymes (FAS, LPL) in mice fed high fat diet.**

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. MCC; Control, HFD; 60% high fat diet, HFD+catechin; catechin 100 mg/kg b.w., HFD+PC low; pine cone 300 bp, 70℃, 20 mg/kg b.w., HFD+PC high; pine cone 300 bp, 70℃ 100 mg/kg b.w..

3.2.10. GLP 기관에서의 안전성 시험

GLP기관인 (주)바이오톡스텍에서 다음과 같은 항목으로 진행하였으며, 시험결과 및 결론을 아래와 같이 요약 기술하였다.

가. 초임계잣송이추출물(SPCE)의 조제물 중 Dehydroabietic acid의 농도분석법 및 validation 및 안정성 확인시험

1) 시스템 적합성(System Suitability)

QC 시료 5ug/mL의 농도를 6회 반복 측정한 결과 피크면적과 retention time의 정밀성은 각각 0.30 및 0.09%로 확인되었다.

2) 직선성(Linearity)

표준용액 1~20ug/mL의 농도 범위에서 측정한 검량선의 상관계수 r은 1.0000으로 나타났으며, 각 범위에서의 0일째 측정시 정확성은 98.75 ~ 102.40%로, 7일째 측정시 98.48~102.00%로 확인되었다.

3) 특이성(Specificity)

표준물질은 분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 이동상, 희석용매 및 부형제가 표준물질의 피크에 영향을 주는 성분은 검출되지 않았다.

4) 일내재현성(Intra-day Variation)

조제물 12.5 및 400mg/mL의 농도에서 시험물질의 정확성은 101.75 및 106.27%로, 정밀성은 2.01 및 0.68%로 확인되었다.

5) 표준원액 안정성(Stability of Stock Solution)

표준원액을 실온 4시간 및 냉장조건(5.5~7.7℃)에서 7일간 보관 후, 표준물질을 QC 농도로 조제하여 안정성을 확인한 결과 100.34 및 96.70%로, 정밀성은 0.08 및 2.11%로 확인되었다.

6) Autosampler 내에서의 안정성(Stability in Autosampler)

조제물 12.5 및 400mg/mL의 농도를 autosampler 내에서 15시간 방치 후 안정성을 확인한 결과 초기농도에 대한 변동율은 0.17 및 0.94%로, 정밀성은 1.69 및 0.53%로 확인되었다.

7) 균질성(Homogeneity)

조제물 12.5 및 400mg/mL의 농도에서 상층, 중층 및 하층의 균질성을 확인할 결과 정확성은 101.64 및 106.59%로, 정밀성은 1.36 및 0.66%로 확인되었다.

8) 안정성(Stability)

8-1. 실온 4시간 안정성

조제물 12.5 및 400mg/mL의 농도를 실온에서 4시간 동안 방치 후 안정성을 확인할 결과 조제 직후 초기농도에 대한 변동율은 -1.27 및 0.38%로, 정밀성은 0.86 및 0.58%로 확인되었다.

8-2. 냉장 7일간 안정성

조제물 12.5 및 400mg/mL의 농도를 냉장조건(5.5~7.7℃)에서 7일간 보관 후, 안정성을 확인한 결과 조제 직후 초기농도에 대한 변동율은 -4.49 및 -8.38%로, 정밀성은 6.12 및 3.01%로 확인되었다.

9) QC(Quality Control)

QC 시료 5ug/mL의 농도를 분석 종료 시에 3회 측정한 결과 정확성 및 정밀성은 0일째 측정시 102.64 및 1.36%로, 7일째 측정시 101.72 및 4.80%로 확인되었다.

이상의 결과로부터 초임계잣송이추출물(SPCE)의 조제물 중 Dehydroabietic acid의 농도분석을 위한 본 분석법은 적합한 것으로 확인. 또한 부형제(Corn oil)내에서 12.5 및 400mg/ml 농도의 조제물은 균질하였으며 실온 4시간 및 냉장 7일간은 안정한 것으로 확인되었다.

나. 초임계잣송이추출물(SPCE)의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구 투여독성시험

○ 본 시험은 시험물질인 초임계잣송이추출물 (SPCE)을 Sprague-Dawley계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.
○ 군구성은 시험물질 2,000 mg/kg 투여용량군 및 대조군 (Corn oil)으로 구성하였고, 군당 암수 각각 5 마리에 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사 시켜 부검하였다.
○ 암수 대조군 및 2,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.
○ 대조군의 암컷에서 투여당일 및 투여 후 1일에 점액변이 관찰되었다.
○ 2,000 mg/kg 투여군의 수컷에서는 투여 당일 시험물질 색변 및 점액변이 관찰되었고, 투여 후 1일에는 점액변이 암수에서 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.
○ 본 시험의 조건 하에서 초임계잣송이추출물 (SPCE)을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

다. 초임계잣송이추출물(SPCE)의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주 반복 경구 투여 용량결정(DRF)시험

○ 본 시험은 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초임계잣송이추출물 (SPCE)을 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.
○ 시험물질을 0 (Corn oil), 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day으로 군당 암수 각 5 마리에 4주간 반복 경구투여하였다.
○ 관찰기간 동안 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량을 측정하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.
○ 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.
○ 투여기간 동안, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 유연이 투여 후 일시적으로 관찰되었다.
○ 사료섭취량, 혈액학적 검사 및 부검소견에 있어서, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.
○ 체중측정 결과, 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 유의성 있는 체중 감소가 관찰되었다.

○ 혈액생화학적 검사 결과, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군의 알칼라인포스파타제 (ALP), 크레아티닌 (Crea), 총콜레스테롤 (T-Cho) 및 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군의 혈액요소질소 (BUN)의 증가 또는 증가 경향이 관찰되었다.

○ 장기중량측정 결과, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간 및 신장의 절대/상대 중량이 용량의존적인 증가 또는 증가경향이 관찰되었다.

○ 조직병리학적검사 결과, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 미만성 비대 (diffuse hypertrophy, hepatocyte) 소견이 관찰되었으나, 이러한 소견은 시험물질의 대사작용에 인한 적응성 변화로 판단하였다.

○ 이상으로, 본 시험조건 하에서 초임계잣송이추출물(SPCE)을 암수 랫드에 4주간 반복 경구투여한 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화로 암수 2,000 mg/kg/day 용량에서 체중증가 (수컷), 알칼라인포스파타제 및 크레아티닌 (수컷)의 증가, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 용량에서는 크레아티닌, 총콜레스테롤, 간장 및 신장 무게 증가가 관찰되었다.

○ 따라서, 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고 공비 3으로 하여 667 및 222 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단된다.

라. 13주반복투여독성시험 + 4주 회복시험(랫드-경구)

○ 본 시험은 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초임계잣송이추출물 (SPCE)을 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

○ 군구성은 시험물질 222, 667 및 2,000 mg/kg/day의 3개의 용량과 대조군 (corn oil)의 4군으로 하고, 군당 암수 각 10마리에 13주간 반복 경구 투여하였다. 또한, 독성의 가역성 여부를 확인하기 위하여 대조군과 2,000 mg/kg/day 투여군에는 암수 각 5마리씩 추가하여 4주간의 회복기간을 두었다.

○ 관찰기간 동안 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기 중량, 부검 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

○ 본 시험에서, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 총 8 마리의 사망동물 (수컷 5마리 및 암컷 3마리)이 발생하였다.

○ 일반증상 관찰 결과, 투여기간에 암수 시험물질 투여군에서 투여 전후의 유연이 용량상관성 있게 관찰되었다. 2,000 mg/kg/day 투여군의 암수 사망동물에서 사망하기 전에 사료섭취량의 감소, 변량의 감소, 거식, 무변, 불규칙호흡, 적색유루, 체온저하, 복부의 팽만, 혈뇨, 입주위의 오염, 항문주위의 오염 등이 관찰되었다.

○ 체중측정 결과, 투여기간에 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 체중증가억제 (투여 13주의 평균체중이 대조군에 비하여 약 30.0% 낮음)를 나타내었고, 4주 회복기간에는 회복경향을 보였다. 암컷에서는 투여 및 회복기간 모두 체중변화에서의 이상이 관찰되지 않았다.

○ 사료섭취량 측정 결과, 투여기간에 2,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 사료섭취량의 감소 및 감소경향, 암컷에서 사료섭취량의 증가 및 증가경향이 관찰되었고, 회복기간에는 암수 2,000 mg/kg/day 투여군 모두에서 사료섭취량의 증가 및 증가경향이 관찰되었다.

○ 안과학적 검사 결과, 주시험군 및 회복군 모두에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

○ 뇨검사 결과, 주시험군의 암수 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군 및 회복군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 뇨량의 증가경향 및 증가와 뇨비중의 감소경향 및 감소가 관찰되었다.

○ 혈액학적 검사 결과, 주시험군에서 백혈구수 (WBC), 혈소판수 (PLT) 및 망상적혈구 (Reti)가 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 중성호성백혈구 (NEU) 및 단핵구 (MONO)가 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 증가하였고, 적혈구수 (RBC) 및 부분활성트롬보플라스틴시간 (APTT)이 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 혈색소량 (HGB)이 암컷 667 mg/kg/day 투여군 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 헤마토크리트치 (HCT)가 암수 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 프로트롬빈시간 (PT)이 암컷 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 감소하였다. 회복군에서, HGB 및 HCT가 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 평균적혈구용적 (MCV) 및 평균적혈구헤모글로빈량 (MCH)이 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 증가하였고, Reti가 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 감소하였다.

○ 혈액생화학적 검사 결과, 주시험군에서 알라닌 아미노기전이효소 (ALT), 알칼라인 포스파타제 (ALP) 및 인 (P)이 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 혈액요소질소 (BUN)가 수컷

○ 667 mg/kg/day 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 크레아티닌 (crea) 및 총빌리루빈 (T-Bili)이 암수 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 총콜레스테롤 (T-Chol)이 암컷 667 mg/kg/day 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 칼슘 (Ca)이 암컷 222 mg/kg/day 투여군과 암수 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 증가하였다. 회복군에서는 P가 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 증가하였다.

○ 장기중량 측정 결과, 주시험군에서 신장의 절대 및 상대중량이 암수 222, 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 간의 절대 및 상대중량이 암수 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 비장 및 부신의 절대 및 상대중량이 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 증가경향 및 증가, 자궁의 절대 및 상대중량이 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 감소를 나타내었다. 회복군에서는 신장, 간, 비장 및 부신의 절대 또는 상대중량이 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 증가경향 및 증가를 나타내었다.

○ 부검 결과, 주시험군의 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 신장의 거친 면, 얼룩짐 또는 종대 및 간의 변색이 관찰되었고, 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 추가로 간의 종대, 흉선의 소형화 또는 비장의 종대가 관찰되었다. 회복군 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 신장의 거친면이 관찰되었다.

○ 조직병리학적 검사 결과, 시험물질에 의한 변화는 신장, 간, 부신, 고환, 난소, 자궁, 질, 부고환, 골수 (대퇴골 및 흉수), 비장 및 흉선에서 관찰되었다.

○ 신장에서 피질 및 수질의 세뇨관 상피의 변성, 괴사 및 재생, 세뇨관 내강에서 유리질, 과립 또는 백혈구 원주 및 세포 부스러기, 세뇨관 확장, 그리고 피질의 세뇨관 상피에서 색소 축적을 특징으로 하는 세뇨관 신증이 관찰되었고, 간에서 미만성 비대와 주로 간세포의 세포질에서 색소 축적, 골수 (대퇴골 및 흉골)에서 적혈구 및 과립구 계열의 증가를 위주로 하는 세포 충실도 증가, 비장에서 충혈 및 골수외 조혈, 흉선의 위축, 고환 (수컷) 및 난소 (암컷)에서 간질세포의 공포화, 자궁 (암컷)의 위축 및 질의 상피 위축이 주시험군의 암수

2,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었다. 부신에서 사구대의 두께 증가 및 주로 속상대의 미만성 공포화가 주시험군의 수컷 667 mg/kg/day 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서, 부고환에서 두부의 부고환관 상피의 공포화가 주시험군의 수컷 667 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었다.

○ 주시험군에서 관찰된 상기의 소견들은 4주 회복기간 후에 대부분이 완전히 소실되거나 또는 경감되어 회복성이 인정되었다. 그러나, 부고환의 소견은 4주 회복기간 후에도 주시험군과 차이가 없어 회복성이 인정되지 않았다.

○ 사망동물의 조직병리검사 결과, 관찰된 소견의 대부분은 생존동물들에서 확인되었다. 사망개체 대부분은 시험물질의 투여에 의한 신장기능부전으로 인해 일반증상이 악화되어 사망에 이른 것으로 추정은 되나 정확한 사망원인은 확인할 수 없었다.

○ 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 초임계잣송이추출물 (SPCE)의 무독성량 (NOAEL)은 수컷 222 mg/kg/day 및 암컷 667 mg/kg/day로 판단한다.

마. 초임계잣송이추출물(SPCE)의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

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

○ 본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 5,000 μg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1 및 19.5 μg/plate로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 균주는 313 μg/plate 이상, TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 78.1 μg/plate 이상에서, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 313 μg/plate 이상, WP2*uvrA*(pKM101) 균주는 5,000 μg/plate에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하의 WP2*uvrA*(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다.

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

균주명	S9 mix	본시험의 용량(ug/plate)
TA98	-/+	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
TA100, TA1535, TA1537	-	78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44
	+	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
WP2*uvrA*(pKM101)	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156

○ 본시험의 결과, 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

○ 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배이상 현저하게 증가하였다.

○ 이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 초임계잣송이추출물(SPCE)의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

바. 초임계잣송이추출물(SPCE)의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

○ 시험물질 초임계잣송이추출물(SPCE)의 염색체이상 유발성 유무를 검토하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 실시하였다.

○ 본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 5,000 μg/mL을 최고용량으로 하였고, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 μg/mL로 세포증식억제시험을 실시한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되었다. 50% 세포증식억제 용량 (Inhibition concentration 50%: IC50)을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 191.4 μg/mL, 존재하는 424.7 μg/mL, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 131.6 μg/mL이었다.

○ 따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 각각의 처리 계열에 대해 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	염색체이상관찰 대상용량(ug/mL0
단시간처리법	-	100, 50.0, 25.0
	+	215, 108, 53.8
연속처리법	-	70.0, 35.0, 17.5

○ 본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로, 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음석대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다.

○ 각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

○ 이상의 결과로부터 본 시험조건하에서 초임계잣송이추출물(SPCE)은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

사. 초임계잣송이추출물(SPCE)의 마우스를 이용한 소핵시험

○ 시험물질 초임계잣송이추출물(SPCE)의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발 유무를 평가하기 위하여 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토하였다.

○ 본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 2,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 1,000, 500, 250 및 125 mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 모든 용량에서 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

○ 따라서, 본시험의 최고용량은 2,000 mg/kg으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (1,000 및 500 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군에는 corn oil을, 양성대조군에는 Mitomycin C를 설정하였다.

○ 검체제작시간 설정시험에서는 용량설정시험에서 설정된 최고용량 (2,000 mg/kg)을 투여하고, 투여후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았다. 따라서 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 설정하였다.

○ 본시험의 결과, 시험물질군에서는 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵 다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한, 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 없었다.
○ 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한, 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다.
○ 이상의 결과로부터, 시험물질 초임계잣송이추출물(SPCE)는 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로 판단된다.

3.2.11. 인체적용시험을 위한 제형화

가. 초임계 잣송이 추출물의 분말화

초임계 추출방법으로 얻은 초임계 잣송이 추출물은 고점액성의 물질이므로 향후에 건강기능식품 소재로 활용할 경우 연질 캅셀의 제품으로만 가능하므로 경질 캅셀, 환, 테블릿 등의 제품으로 범위를 넓히기 위해서는 반드시 분말화 과정이 필요하다. 분말화 과정중 분무 건조 등의 방법이 있으나 초임계 잣송이 추출물은 공정 특성상 이미 농축물 형태로 추출물이 얻어지므로 이를 다시 물에 용해하기 위해 유화제 등의 불요한 부형재와 공정이 수반되게 되므로, 본과제에서는 미세결성셀룰로오스(MCC)를 이용한 간편한 분말화 공정을 검토하였다. MCC는 정제되고 부분적으로는 중합체가 깨진(depolymerized) 셀룰로오스로서 백색, 무취, 무미의 결정성 분말이며 다공성의 입자의 성질을 띄고 있어 잣송이의 분말화에 적합한 부형재이다.

정제된 초임계 잣송이 추출물에 3.3배의 95% 에탄올을 가하여 녹인후 MCC (Avicel(R) Microcrystalline Cellulose, Type: PH-200, FMC BioPolymer)를 넣고 진공증발 농축기를 통해 에탄올을 서서히 증발시키면서 추출물이 MCC에 흡착되도록하여 분말화를 진행하 그 결과를 그림 66에 나타내었다.

정제된 초임계 잣송이 추출물과 MCC의 비율을 3:7 (그림 66의 왼쪽)과 4:6 (그림 66의 오른쪽) 으로 하여 분말화를 진행한 결과, 3:7의 경우가 좀 더 양호한 유동성을 보였다.

그림 66. 초임계 잣송이 추출물의 분말화

상기의 수율을 고려한 잣송이 원료로부터 최종 분말화 제품 1Kg를 제조하기 위해 소요되는 원재료 및 부재료의 가격을 산정하면 아래와 같다.

공정	공정수율	원료 및 부재료	가격 (원/Kg)	소요량 (Kg)	금액 (원)
초임계 추출	3.7%	잣송이 분말	1,000	9.58	9,580
정제	95%	95% 에탄올	2,150	3.54	7,621
분말화	98%	95% 에탄올	2,150	2.22	4.778
		MCC	15,000	0.34	5,051
초임계 잣송이 추출물 분말 1Kg					**27,030**

향후에 건강기능식품 소재로 활용할 경우 연질 캅셀의 제품으로만 가능하므로 경질 캅셀, 환, 테블릿 등의 제품으로 범위를 넓히기 위해서는 반드시 분말화 과정이 필요하다. 분말화 과정중 분무 건조 등의 방법이 있으나 초임계 추출물은 공정 특성상 이미 농축물 형태로 추출물이 얻어지므로 이를 다시 물에 용해하기 위해 유화제 등의 불요한 부형재와 공정이 수반되게 되므로, 본과제에서는 미세결성셀룰로오스(MCC)를 이용한 간편한 분말화 공정을 검토하였다
정제된 초임계 잣송이 추출물과 MCC의 비율을 3:7과 4:6으로 하여 분말화를 진행한 결과, 3:7의 경우가 좀 더 양호한 유동성을 보였다

실제 인체적용시험의 시료 제품을 만들시에는 추출물 원료의 성상이 고점액성이므로 연질캡슐 제형으로 제품을 만드는 것이 바람직하다고 판단된다.

나. 인체적용시험을 위한 연질캡슐 제형화

인체적용시험을 위한 연질캡슐 제형화를 위해 예비실험을 알피코프 연구소 김명신 선임연구원의 도움으로 진행하였습니다. 예비실험 결과 초임계잣송이추출물(SPCE) 100% 충진하기에는 흐름성이 좋지 않아 연질캡슐 성형을 할 수가 없었습니다. 따라서 함량을 감소시켜 시험한 결과 45% 이하로 함유되어야 흐름성이 양호한 결과를 얻었습니다.

인체적용시험 제품의 캡슐함량을 결정하기 위해서는 GLP 기관에서 안전성 시험결과 섭취량 설정근거를 토대로 결정하여야 합니다.

(1) 섭취량 설정 사유

임상연구를 진행하기에 앞서, 추출물의 섭취 농도를 결정하기 위하여 전임상 연구에 따라 잣송이추출물의 섭취 농도를 결정하기로 하였음.

mouse ((8주) 21.5g BW)에 잣송이추출물을 100 mg/kg BW로 섭취시켰을 때, 체중, 체지방 및 혈중 지질 농도의 변화를 관찰하였음. rat (13주)에 잣송이추출물을 2000mg/kg BW로 섭취시켰을 때, 잣송이추출물의 무독성량(NOAEL)은 수컷 222mg/kg/day 및 암컷 667mg/kg/day으로 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단되어 100mg/kg/day로 설정함. 결과를 토대로 인체적용에 적용하는 용량은 U.S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug 의 "Guidance for Industry -Estimating the Maximum Safe Stating Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (2005)" 중, 동물의 섭취량을 사람의 동량으로 변환하는 공식 (Human equivalent dose, HED)에 근거하여 한국인 성인 남녀의 평균 체중 (60 kg)을 고려하여 섭취량을 설정하였습니다.

(가) 한국인 성인 표준 체중

성인남자 : 68kg, 성인여자 : 55kg

→ 남녀 평균 61.5 kg : 본 연구에서는 성인 모두 적용할 수 있는 60 kg을 기준으로 섭취량을 산정하였음

(나) Human equivalent dose (HED) 공식에 따른 체중 (kg) 당 Dose를 설정

아래 공식에 따라 섭취량을 설정할 수 있음.

Table 1: Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses Based on Body Surface Area

Species	To Convert Animal Dose in mg/kg to Dose in mg/m², Multiply by k_m	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED* in mg/kg, Either:	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
Human	37	---	---
Child (20 kg)†	25	---	---
Mouse	3	12.3	0.08
Hamster	5	7.4	0.13
Rat	6	6.2	0.16
Ferret	7	5.3	0.19
Guinea pig	8	4.6	0.22
Rabbit	12	3.1	0.32
Dog	20	1.8	0.54
Primates:			
Monkeys‡	12	3.1	0.32
Marmoset	6	6.2	0.16
Squirrel monkey	7	5.3	0.19
Baboon	20	1.8	0.54
Micro-pig	27	1.4	0.73
Mini-pig	35	1.1	0.95

Formula for Dose Translation Based on BSA
HED (mg/kg) = Animal dose (mg/kg) *multiplied by* $\frac{\text{Animal } Km}{\text{Human } Km}$

Table 1: Km values for various species according to FDA Guidance for Industry (FDA. 2005)

* HED (100mg/kg in rat) = 100mg/kg * (6 kg/m^2 : 37kg/m^2) = 16mg

(다) 섭취량 설정

Human equivalent dose (HED)에 따르면 체중 (kg)당 16 mg을 섭취할 수 있으며, 이를 한국인 표준 평균 체중 60 kg 인 성인의 섭취량은 960 mg 임을 알 수 있음. 따라서 본 인체적용시험에서는 1 캅셀 당 잣송이추출물 225 mg을 함유하고 있는 시험식품을 아침, 저녁 식후 2 캅셀씩, 하루 총 4 캅셀을 섭취하게 함으로써 900 mg 의 잣송이추출물을 섭취하도록 설정하였음.

알피코프에 인체적용시험 제품을 다음과 같은 조건으로 제조를 의뢰하였다.

제조조건	
캡슐용량	550mg
1일 섭취량	4캡슐(1캡슐당 잣송이 추출물 225mg 함유) 900mg 잣송이 추출물 섭취
군당 60명씩	550mg×175캡슐/병, 각 2병씩 제공 (대조구도 동일하게 제공)
1인당 12주(84일) 필요캡슐량	4캡슐×84일 = 336캡슐

캡슐배합 성분표

성분명	시험군		대조군	
	%	mg/cap.	%	mg/cap.
잣송이 추출물	40.91	225.005		
대두유	59.09	324.995	100	550
합 계	100	550	100	550

피막기재 성분표(시험군과 대조군 동일함)

성분명	함량(%)
젤라틴(돈피)	58.45
글리세린	18.31
폴리글리톨럽	21.13
안나토색소	2.11
합 계	100

인체적용시험 제조 제품의 블록 무작위배정(Block randomization) label 붙인 사진은 아래와 같습니다.

3.2.12. 과체중 성인에서 잣송이 추출물 섭취가 체지방 조성에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

가. 연구진행상황

2016년 2월 26일 경희대학교병원 IRB 승인을 받았으며, 임상시험제품 제조 및 출고기간을 고려하여 4월 26일부터 스크리닝을 시작하였습니다.

9월 29일 현재까지 104명을 스크리닝 하였고, 95명이 enroll 되었습니다. 내일까지 진행되는 스크리닝 인원을 포함하면 대상자 모집은 마무리됩니다. 스크리닝 후 enroll까지 2주의 기간이 소요되므로 10월 중순쯤에는 enroll이 모두 완료될 것으로 예상됩니다.

나. 연구대상자모집현황

현재 enroll 되어 있는 대상자의 평균 연령은 29.5세이며 남, 여 각각 26.2세, 33.5세입니다. BMI 평균은 27.6이며 남, 여 각각 27.3, 26.5입니다. enroll 대상자 중 drop out 인원은 10명입니다.

다. 추후진행예정상황

연구 종료는 마지막 대상자가 10월 중순쯤 enroll 되므로 그로부터 12주 후인 1월 말경을 종료 시점으로 예상하고 있습니다.

이후 통계처리기간을 고려하면 3월경에 개별인정 신청을 진행할 계획입니다.

3.2.13. 건강기능식품 개별인정 원료신청 및 제품화

먼저 경희대학교부설 임상영양연구소 임현정교수님과 인체시험 연구용역계약서를 체결하였으며 계약서 내용은 아래에 첨부하였습니다.

인체적용시험은 경희대학교병원 내분비내과 이상열교수, 경희대학교 동서의학대학원 임상영영연구소 소장인 임현정 교수님과 공동으로 경희대학교병원에서 진행중에 있으나, 3차년 과제 종료기한인 2016년7월15일까지는 인체적용시험결과가 도출되기에는 시간적으로 어려운 상황입니다. 따라서 기능성원료 인정신청과 제품화는 본 과제의 최종보고서가 제출된 이후에 진행될 예정입니다.

또한 가평군의 지원으로 설립된 (주)KOREA PINE과 과제산물인 특허출원명 " 초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물"의 내 초임계 잣송이 생산기술 허여 계약을 체결하여 매출액 중 3%를 로얄티로 받기로 계약하였으며, 그 계약서를 아래에 첨부하였습니다.

연구용역계약서

(주)키토라이프 (이하 "갑"이라 한다.)와 경희대학교 산학협력단(이하 "을"이라 한다.)는 "과체중 성인에서 잣송이 추출물 섭취가 체지방 조성에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험" (연구책임자 : 경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과 / 경희대학교부설 임상영양연구소 소장 임 현정)(이하 "연구"라 한다)에 대하여 "갑"과 "을"간의 권리와 의무를 명백히 하고자 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1 조 (목적)

본 계약의 목적은 과체중 성인에서 잣송이 추출물 섭취가 체지방 조성 및 혈중 지질 농도에 미치는 유효성을 평가하기 위한 12주, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험의 수행이다.

제 2 조 (기간)

본 계약의 기간은 IRB승인일로부터 24개월까지(이하 "연구기간"이라 한다)로 한다. 단, 연구내용 및 기간은 "갑"과 "을" 쌍방의 합의에 의하여 변경될 수 있다.

제 3 조 (연구비의 지급 및 관리)

① 본 계약에 의하여 "갑"이 "을"에게 지급하는 연구비는 금 일억오천만원정 (₩150,000,000원, VAT 별도)으로써, "갑"은 다음과 같이 "을"에게 지급 한다.

1 차분 : 계약 시 : 70,000,000원 지급

2 차분 : 첫 대상자 등록 후 15일 이내 : 40,000,000원 지급

3 차분 : 최종 연구보고서 제출 후 15일 이내 : 40,000,000원 지급

② "을"은 상기 제1항에서 수수한 연구비를 다른 용도의 자금과 분리하여 이를 지급받고 관리해야 한다.

③ "을"은 당해 연구수행 및 관리에 따른 비용으로 직접비의 5%를 간접경비로 사용한다.

④ 본 계약 제2조의 단서에 따라 연구기간이 연장되어 추가로 연구경비가 투입될 경우, 양 당사자는 제1항의 연구비와 별도로 추가비용 및 지급시기 등을 협의할 수 있다.

제 4 조 (회계처리)

"을"은 "갑"으로부터 지급된 연구비를 별도의 계정으로 구분하여 투명하게 관리한다.

제 5 조 (연구 및 연구보고서 제출)

① "을"은 "을"이 보유하고 있는 전문지식을 충분히 활용하여 선량한 관리자의 주의의무로써 충실하게 연구를 수행해야 하며, 연구 수행의 제반 사항에 대해서 "갑" 또는 "갑"이 지정한 자와 협의하여 진행해야 한다.

② "을"은 임상시험 종료일로부터 1개월 이내에 본 연구결과에 관한 연구보고서를 "갑"에게 제출하여야 한다. 다만, 연구기간 중에 제출하는 보고서 및 자료는 양자 합의에 의하여 제출하지 않을 수 있다.

③ 본 연구는 "갑"이 "을"로부터 제출 받은 연구보고서를 검토하고 연구가 완료된 것을 승낙함으로써 종료되며, "갑"은 필요한 경우 "을"에게 연구보고서 내용의 보완 또는 수정을 요청할 수 있다.

제 6 조 (연구결과의 귀속)

① 본 계약에 의한 산업재산권을 포함한 모든 지적재산권, 자료 및 연구결과는 "갑"의 소유로 한다.

② "을"은 "갑"이 소유한 연구결과를 제3자에게 실시권을 설정하거나 판매할 수 없다.

제 7 조 (신의성실 및 상호협조)

① (신의성실) "갑"과 "을"은 신의를 가지고 본 계약의 각 조항을 성실히 이행해야 한다.

② (상호협조) "을"은 전 연구과정을 통하여 "갑"의 요청이 있을 때에는 수시로 연구내용에 관하여 "갑"과 협의하여야 하며, "갑" 또한 본 연구와 관련하여 필요한 사항을 "을"에게 적극 협조하여야 한다.

제 8 조 (비밀보장)

"갑"과 "을"은 상호 상대방의 승인 없이는 본 연구와 관련하여 취득한 상대방의 모든 정보 및 데이터를 외부에 공개 누설 또는 제공하지 아니한다.

제 9 조 (계약상 지위 양도의 제한)

"갑"과 "을"은 상호 상대방의 서면 동의 없이 본 계약과 관련한 계약상의 지위를 제3자에게 양도할 수 없다.

제 10 조 (손해배상 및 보호)

"갑"과 "을"은 본 계약에서 정한 조항을 위반하여 상대방에게 손해를 입힌 경우, 가해자는 피해자에게 손해를 배상한다.

제 11 조 (계약의 변경)

"갑"과 "을"은 서면합의에 의하여 본 계약의 내용을 변경할 수 있다.

제 12 조 (계약의 해지)

① ("갑"의 해지) "을"이 본 연구를 수행할 능력이 없다고 인정될 경우, "갑"은 1개월 이상의 기간을 정하여 "을"에게 해지의 의사를 통보하여 협의한 후 본 계약을 해지할 수 있다.

② ("을"의 해지) "갑"이 본 계약을 위배하여 원활한 연구수행이 극히 곤란하다고 인정될 경우 "을"은 1개월 이상의 기간을 정하여 "갑"에게 이의 개선을 최고한 후 그 기간 내에 현저한 개선사실이 없을 경우에는 본 계약을 해지할 수 있다.

③ (해지협의) 본 조 제1항 및 제2항에 의하여 계약이 해지될 경우에는 "을"은 해지된 날로부터 1개월 이내에 해지 시까지의 연구비 집행정산서 및 해지 시까지의 연구보고서를 "갑"에게 제출하고, 연구비의 미집행분에 한하여 "갑"에게 반환한다.

④ (기타) 기타 해지에 필요한 사항은 "갑"과 "을" 양방의 협의에 의한다.

제 13 조 (불가항력)

본 계약의 당사자가 천재지변이나 전쟁 등 불가항력적인 원인에 의하여 본 계약상의 의무를 이행할 수 없는 경우에는 상대방에 대하여 이로 인한 손해배상책임을 지지 아니한다.

제 14 조 (해석 및 분쟁해결)

① 본 계약에 명기되지 아니한 사항 및 본 계약의 해석상 이의 이견이 있을 때에는 쌍방의 합의 또는 통상의 관행에 따라 원만히 해결하도록 노력한다.

② 제1항에도 불구하고 상호 분쟁이 해소되지 않을 경우 합의관할법원의 장소는 "갑"의 주소지로 한다.

제 15 조 (계약의 효력)

본 계약은 양방이 서명 날인한 날로부터 유효하다.

위 사항을 증명하기 위하여 본 계약서 2부를 작성하고 각 당사자가 기명 날인(또는 서명)한 후, 각각 1부씩 보관한다.

2015 년 8 월 26 일

"갑"

주 소 : 경기도 평택시 신단로 197번길 73(칠괴동)

기 관 명 : ㈜ 케노라이브

대 표 자 : 정 록 래 (인)

"을"

주 소 : 서울시 동대문구 회기

기 관 명 : 경희대학교 산학협력

대 표 자 : 단 장 조 민 행 (직인)

연구책임자 : 경희대학교 동서의학대학원
의학영양학과
경희대학교부설 임상영양연구소
김 현 정 (서명)

기술 허여 계약서

(주)KOREAN PINE 대표이사 이수근, 경기도 가평군 옴내리 489-23(이하 "갑"이라 한다)와 (주)키토라이프 대표이사 정록래, 경기도 평택시 산단로 197번길 73(칠괴동)(이하 "을"이라 한다)은 아래와 같이 기술 허여계약을 체결한다.

제 1 조【목 적】

본 계약은 "을"이 보유하고 있는 특허권인 초임계 잣송이 추출물 제조방법에 대해 "갑"이 사용하기로 하는 기술허여에 관한 내용을 규율함을 목적으로 한다.

제 2 조【특허】

1. 본 계약에서 "갑"에게 제공되는 "을"의 특허기술은 다음과 같다.
   1) 특허의 명칭 : "초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물"
   2) 출원인 : (주)키토라이프
   3) 특허출원일 : 2014 년 11월 12 일
   4) 특허출원번호 : 10-2014-0157412
2. 제1항의 특허출원사본은 본 계약서에 첨부한다.

제 3 조【기술 사용료】

1. "갑"은 "을"의 특허기술을 이용하여 생산한 제품의 반기별(6월, 12월 기준) 총 매출액의 3%를 특허기술 사용료로 "을" 에게 매 반기 익월 20일까지 "을"의 은행계좌에 현금 입금한다.
2. "을"은 거래은행 통장사본을 계약서에 첨부한다.
3. 제1항의 연체 시 연 5%의 연체이자를 가산하여 다만 제4조3항의 경우에는 예외로 한다.

제 4 조【매출보고】

1. "갑"은 매 반기 익월 10일까지 전 반기 총 매출관련 자료를 첨부하여 "을"에게 지급할 특허기술 사용료를 계산하여 고지한다.
2. "을"은 제1항의 고지일로 부터 10일 이내에 "갑"의 보고사항의 확인 결과 이상이 있다고 생각되거나 보충자료가 필요할 경우 "갑"에 대해 추가 회계자료를 요청하며 "갑"은 이에 응하여야 한다.
3. "갑"이 실제 매출액보다 적은 액수로 매출보고를 하였을 경우, 미지급된 특허기술 사용료에 추가하여 "을"이 그 사실을 안 날까지 정상적으로 해당 반기에 지급되어야 할 총 특허기술 사용료에 연 10%의 이자를 가산한 금액을 손해금으로 지급하여야 한다.
4. "갑"이 실제 매출액보다 많은 액수로 매출보고를 하였을 경우에는 "을"은 기 지급된 금액에 대한 반환을 하지 아니한다.

제 5 조【파생권리 등】

1. "갑" 또는 "갑"의 직원이 "을"의 특허기술과 관련하여 특허의 침해가 아닌 새로운 특허를 만들어서 특허 출원을 한 경우에는 "을"은 "갑"의 특허에 대하여 권리 주장을 할 수 없다.
2. "을" 또는 "을"의 직원이 "을"의 특허에 대한 개선을 통하여 실용신안을 출원한 경우 "갑"은 해당 실용신안에 대한 사용 권리를 주장할 수 없다.
3. 제2항의 경우 "을"은 "갑"에 대해 다른 기업보다 유리한 조건으로 실용신안을 이용할 수 있도록 하여야 한다.

제 6 조 【 신의성실 】

1. '갑"은 특허료를 회피하기 위하여 "을"의 특허기술 제품에 대한 위(변)조 제작사용을 하지 아니한다.
2. "갑"은 본 계약의 목적으로만 "을"의 특허기술을 사용할 수 있으며 제3자에게 양도, 처분, 담보제공 등의 행위를 할 수 없다.
3. 제3자가 특허침해 행위에 대해여 '갑"이 알았을 시 즉시 "을"에게 통보 하여야 한다.

제 7 조 【 해 지 】

1. '갑"은 다음 각호의 사유가 발생할 경우에는 '을"은 보완을 요구하고, 그럼에도 불구하고 해결되지 아니할 시 계약을 해지 한다.
   1) 본 계약의 의무사항을 이행하지 아니한 때
   2) (가)압류, 가처분 등의 담보권 실행이나 파산, 청산, 회사정리 사유가 발생한 때
   3) 기타 고의 또는 중과실로 상대방에게 손해를 끼치는 행위를 하였을 때
2. "을"의 당사자가 변경될 시에는 계약은 해지되지 아니하며 그 승계인이 "을"과 동일하게 본 계약상의 권리의무를 승계한다. 다만, '을"은 변경사항이 발생할시 이를 "갑"에게 통지함으로서 효력이 발생한다.

제 8 조 【 계약기간 】

1. 본 계약은 2016년 07월 01일부터 2020년 06월 30일까지로 한다.
2. 계약 만기일 기준 50일전부터 20일전까지 일방의 종료통보가 없는 경우 자동으로 계약이 갱신 된다.
3. 부당한 사유가 없는 "갑"과 "을"은 계약의 갱신을 거부하여서는 아니 된다.

제 9 조 【 분쟁해결 】

본 계약에 관하여 분쟁이 발생할 시에는 당사자 상호간에 원만하나 해결을 위하여 노력하도록 하여, 그럼에도 불구하고 분쟁이 해결되지 아니하는 경우에는 대한상사중재원의 중재규칙에 따라 중재로 최종해결 한다.

제10조 【 기타사항 】

1. 본 계약에서 정하지 아니한 사항은 관련 법률규정이 있을 시에는 그에 의하여, 그것이 없을 시에는 일반적인 상관습에 의하여 해결한다.
2. 본 계약 체결 이후 당사자 쌍방의 합의로 계약의 내용에 대해 변경사항의 발생 시 본 계약서 말미에 서명 날인하여 첨부하도록 하며 본 계약서에 우선하여 효력을 인정한다.

위와 같이 계약을 체결하고 계약서 2통을 작성, 서명 날인 후 "갑"과 "을"이 각각 1통씩 보관한다.

계약일자 : 2016년 07월 01일

(갑) 주　　소 :
회 사 명 : KOREANPINE
대 표 자 : 이 수 근
연 락 처

(을) 주　　소 : 경기도 평택시 산단로 197번길 73(칠괴동)
회 사 명 : (주)키토라이프
대 표 자 : 정 택 래
연 락 처

한시적 기준규격 원료사용 계약서

(주)KOREAN PINE 대표이사 이수근, 경기도 가평군 읍내리 489-23(이하 "갑"이라 한다)와 (주)키토라이프 대표이사 정록래, 경기도 평택시 산단로 197번길 73(칠괴동)(이하 "을"이라 한다)은 아래와 같이 개별인정 및 규격기준의 사용권한 계약을 체결한다.

제 1 조【목 적】

본 계약은 '을'이 보유하고 있는 초임계 잣송이 추출물 제조방법에 의한 잣송이원료 소재의 한시적 기준규격을 "갑"이 사용하기로 하는 사용권한에 관한 내용을 규율함을 목적으로 한다.

제 2 조【인증 규격】

1. 본 계약에서 "갑"에게 제공되는 '을'의 규격은 다음과 같다.
   1) "초임계 잣송이 추출물 제조방법에 의한 잣송이원료 소재의 한시적 기준규격의 인정".
   2) 인정업체 : (주)키토라이프

제 3 조【특약 사항】

1. "을"이 식약처로 부터 "초임계 잣송이 추출물 제조방법에 의한 잣송이원료 소재의 한시적 기준규격"을 인정받을시 "갑"과 "을"이 사용권한을 공동으로한다.

제 4 조【인정 및 기준규격 사용료】

1. 위 특약사항의 이행 조건으로 "갑"은 "을"의 추가실험인 전임상비용 5,000만원을 "을"에게 제공하므로 특약사항의 효력이 발생한다.
2. '을'은 거래은행 통장사본을 계약서에 첨부한다.

제 5 조【신의성실】

1. '갑'은 본 계약의 목적으로만 '을'의 한시적 기준규격을 사용할 수 있으며 제3자에게 양도, 처분, 담보제공 등의 행위를 할 수 없다.
2. 제3자가 "을"의 한시적 기준규격을 침해하는 행위에 대해여 '갑'이 알았을 시 즉시 "을"에게 통보 하여야 한다.

제 6 조【해 지】

1. "갑"은 다음 각호의 사유가 발생할 경우에는 '을'은 보완을 요구하고, 그럼에도 불구하고 해결되지 아니할 시 계약을 해지 한다.
   1) 본 계약의 의무사항을 이행하지 아니한 때
   2) (가)압류, 가처분 등의 담보권 실행이나 파산, 청산, 회사정리 사유가 발생한 때
   3) 기타 고의 또는 중과실로 상대방에게 손해를 끼치는 행위를 하였을 때
2. '을'의 당사자가 변경될 시에는 계약은 해지되지 아니하며 그 승계인이 "을"과 동일하게 본 계약상의 권리의무를 승계한다. 다만, "을"은 변경사항이 발생할시 이를 "갑"에게 통지함으로서 효력이 발생한다.

제 7조【계약기간】

1. 본 계약은 2016년 07월 01일부터 2020년 06월 30일까지로 한다.
2. 계약 만기일 기준 50일전부터 20일전까지 일방의 종료통보가 없는 경우 자동으로 계약이 갱신 된다.
3. 부당한 사유가 없는 "갑"과 '을'은 계약의 갱신을 거부하여서는 아니 된다.

제 8 조 【 분쟁해결 】

본 계약에 관하여 분쟁이 발생할 시에는 당사자 상호간에 원만하나 해결을 위하여 노력하도록 하며, 그럼에도 불구하고 분쟁이 해결되지 아니하는 경우에는 대한상사중재원의 중재규칙에 따라 중재로 최종해결 한다.

제 9 조 【 기타사항 】

1. 본 계약에서 정하지 아니한 사항은 관련 법률규정이 있을 시에는 그에 의하며, 그것이 없을 시에는 일반적인 상관습에 의하여 해결한다.
2. 본 계약 체결 이후 당사자 쌍방의 합의로 계약의 내용에 대해 변경사항의 발생 시 본 계약서 말미에 서명 날인하여 첨부하도록 하며 본 계약서에 우선하여 효력을 인정한다.

위와 같이 계약을 체결하고 계약서 2통을 작성, 서명 날인 후 '갑'과 '을'이 각각 1통씩 보관한다.

계약일자 : 2016년 07월 01일

(갑) 주 소
회 사 명 : KOREANPINE
대 표 자 : 이 수 [illegible]
연 락 처 :

(을) 주 소 : 경기도 평택시 산단로 197번길 73(참괴동)
회 사 명 : (주)키토라이프
대 표 자 : 정 록 [illegible]
연 락 처 :

<결론>

초임계 추출 압력과 온도의 변화에 의한 밀도(용해력)에 따라 가장 높은 생리활성을 보이는 추출물을 획득하기 위해 수율과 상관없이 최적의 온도와 압력을 확인하기 위해 여러 압력(150, 200, 250, 300, 400bar)과 온도(40, 50, 60, 70℃)에서 추출을 하였다.
그 결과 지방세포 분화 억제 활성이 가장 좋은 150bar, 40℃의 추출조건에서 CO_2 펌프의 유량을 최대인 60L/hr의 속도로 420분 추출을 수행한 결과 평균 추출 수율은 3.71%이고, 조추출물의 성상은 녹갈색의 고점액성이었다. 효능검증을 위해 초임계 조건별로 모두 40종류의 시료를 추출하여 제 3협동기관인 경희대학교에 제공하였다.
향후에 건강기능식품 소재로 활용할 경우 연질 캅셀의 제품으로만 가능하므로 경질 캅셀, 환, 테블릿 등의 제품으로 범위를 넓히기 위해서는 반드시 분말화 과정이 필요하다. 분말화 과정중 분무 건조 등의 방법이 있으나 초임계 추출물은 공정 특성상 이미 농축물 형태로 추출물이 얻어지므로 이를 다시 물에 용해하기 위해 유화제 등의 불요한 부형재와 공정이 수반되게 되므로, 본과제에서는 미세결성셀룰로오스(MCC)를 이용한 간편한 분말화 공정을 검토하였다
정제된 초임계 잣송이 추출물과 MCC의 비율을 3:7과 4:6으로 하여 분말화를 진행한 결과, 3:7의 경우가 좀 더 양호한 유동성을 보였다
지금까지 체지방 감소 기능성 소재는 총 21가지가 식약청에 등록되어 있으며 가격은 가르시니아 캄보지아 추출물(33,000원/kg), 클레우스 포스콜리 추출물(380,000원/kg) 등 가격대가 30,000~380,0000원 정도를 형성하고 있으며, 대부분 개별인정 원료이므로 독점으로 인해 가격대가 공개되어 있지 않고 있다. 저희 잣송이 추출물은 현재 제조가격을 kg당 100,000~150,000원으로 예상하고 있으므로 충분히 기존 체지방 감소 소재와 가격경쟁면에서도 우위에 있다고 판단된다.

초임계잣송이추출물 중 기능/지표성분으로 설정하기에 적절한 물질을 설정하기 위해 Terpene류, GC/MS Library, Oleaamide 확인 및 지방산 , Phenol류 실험을 진행하였다.

Terpene류 9종 중 Sabinene hydrate, Terpinolene, γ-Terpinene는 검출되지 않았으며, 5종의 성분 α-pinene, β-pinene, 3-carene , Limonene, α-Thujoue, Bornyl acetate이 검출되었으나 기능/지표성분으로 관리하기 미량성분이며, 초임계잣송이추출물에 특이적으로 검출되는 물질이 아니므로 지표성분으로 설정하기에는 적절하지 않다고 사료되었다.

GC/MS Library를 통해 시험을 진행한 결과, 유사도가 92.7% 인 9-Octadecenamide, (Z)- (이명:Oleamide) Peak가 검출되었다. Library를 바탕으로 상용화된 표준품 9-Octadecenamide, (Z)- (이명:Oleamide)을 이용하여 지방산 37종 분석법에 따라 실험을 진행하였다. 그 결과, 동일한 시간대에 Oleamide 와 Oleic acid 피크가 검출되어 함량 측정이 불가능 하였다. Oleamide에 대한 시험법으로는 기존의 지방산 분석법이 적절치 않다고 판단었으며, 함량을 정량한다면 약 15.24mg/g이지만 Oleic acid와 분리된다면 더 작아질 것으로 사료되어 기능/지표성분으로 적절치 않음을 확인 할 수 있었다.

초임계잣송이추출물에 함유된 Phenol 화합물의 함유 여부를 확인하기 위하여 10종의 Phenol류(Protocatechuic acid ethyl ester, p-hydroxybenzoic acid, Salicylic acid, Syringic acid,

p-Coumaric acid, Cinnamic acid, Gallic acid, Chlorogenic acid, Caffeic acid, Trans-Ferulic acid) 에 대해 254, 280, 329nm에서 실험을 진행한 결과, 254, 329nm에서는 검출되는 성분이 없었으며, 280nm에서는 Syringic acid, p-Coumaric acid, Cinnamic acid가 검출되었으나 표준용액과 시험용액의 Spectrum 불일치로 나타남에 따라 동일한 물질이 아닌 것으로 확인 되었다.

초임계잣송이추출물 내 들어 있는 함량이 높은 유효성분을 확인하기 위하여 초임계잣송이추출물을 분리정제하여 진행한 결과, 초임계추출물 83g을 분획하여 중성분획(77.8g)과 산성분획(4.4g)을 분리하여 얻었으며 중성분획을 칼럼크로마토그래피로 11개 분획을 얻었으며, 극성이 증가하는 순서로 PK-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -H로 명명하였으며, 이 중 PK-E 분획을 8.6을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻은 PK-E 분획을 Preparative HPLC로 분리하여 PK-E1과 PK-E2를 얻었으며, 초임계잣송이추출물에 함량이 많은 PK-E1을 기능/지표성분으로 설정하였고 물질 구조를 확인하기 전까지 "PK-E1"이라고 명명하였다.

초임계잣송이추출물에 함유된 PK-E1 함량을 측정하기 위한 시험법을 찾고 적절한 시험법인가 확인하는 것을 목적으로 1, 2차에 걸쳐 분석방법을 변경하여 진행하였다. 1차에서는 HPLC를 이용, ELSD를 이용하여 분석하였고 2차에서는 분석방법이 더 용이한 HPLC, UVD를 이용하여 검토하였다. 2차 확인에서는 peak 분리를 개선하기 위하여 여러차려 조건을 변경을 분석한 결과 약 11분대 단일 peak로 분리하였고 다음 아래와 같이 최종 시험법을 설정하였다.

 # 최종 설정된 시험법

○ 실험방법

(1) 장비

HPLC System Shiseido Nanospace SI2 series, Shiseido, Japan
Pump 3101 SI-2(Dual), Column oven 3004
Autosampler-Z 3133, PDA detector 3017 SI-2
Degagger 3010

Agilent 1260 Infinity, USA
G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
G1316A 1260 TCC, G1315D 1260 DADVL

(2) 시약 및 시액

1) 표준품 : PK-E1(분리정제)
2) Methanol : Duksan, HPLC grade
3) Acetonitrile : Duksan, HPLC grade
4) 3차 증류수

(3) 표준용액의 제조

PK-E1 표준품을 정밀히 단 후 메탄올에 녹인 것을 표준용액으로 하고, 이를 적절히 희석하여 사용한다.

(4) 시험용액의 제조

초임계잣송이추출물 50mg을 50mL 정용플라스크에 정밀히 단 후, 메탄올에 녹인 것을 시험용액

으로 사용한다.

(5) 기기분석조건

Instrument	HPLC system
Detector	UV detector(225nm)
Column	Cadenza CD-C18 3um, 4.6 × 150mm
Mobile Phase	A : DW(20%), B : Acetonitrile(80%)
Injection Vol.	5㎕
Run Time	30 min
Temperature	25℃

(6) 계산식

$$\text{PK-E1 함량 (mg/g)} = \frac{\text{검량선농도(ug/ml) x 시험용액전량(ml) x 표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

시험법 검증(Method Validation)은 초임계잣송이추출물 중 PK-E1의 함량을 측정하는데 있어 주어진 분석 조건하에 전처리 하여 HPLC를 이용하여 분리, 정량하는 시험법의 유효성을 검증하는데 목적이 있다. 분석법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 시료의 직선성(Sample Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였으며 특이성은 HPLC 분석시 검출시간(Retention time으로 검토)이 약 10분대에 PK-E1 peak가 검출되었고, 직선성 (Linearity) 은 표준용액과 시료을 6개 농도로 3반복 직선성 확인, 표준용액으로 약 15~470ug/mL범위에서 R^2=0.999 확인했으며, 시료는 70~280ug/mL 범위에서 R^2=0.999로 확인하였다. 정확도(Accuracy)는 회수율(Recovery)을 확인함으로서 표준용액을 3개 농도로 원료에 첨가하여 회수율 검토한 결과 20.71 ~ 62.13ug/mL 범위에서 회수율 101.087~103.941%, RSD 0.64~1.08% 확인할 수 있었으며, 정밀도(Precision)은 4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가한 결과, 함량 평균 140.0175mg/g,, SD 1.58, RSD 1.13%로 나타났으며 최종적으로 범위(Range)는 직선성, 정확성, 정밀성 결과를 다 포괄하는 15~470ug/mL로 설정하였다. 그러므로 위 분석방법으로 초임계잣송이추출물 중 PK-E1을 분석하는 데 타당함을 확인할 수 있었다.

본 유통기한 설정 실험은 초임계 잣송이 추출물의 유통기한을 설정하기 위한 것으로 제품을 5개월간 3개 온도구간에서 저장하며 품질지표의 변화를 측정하였으며, 측정 결과는 아레니우스식을 토대로 통계처리하였다.

초임계 잣송이 추출물의 품질지표를 Dehydroabietic acid 함량으로 선정하여 유통기간을 예측한 결과 해당 제품의 유통기간은 약 34.90년으로 산출되었다. 이는 온도변화에 의한 품질변화만을 고려하여 진행된 것으로 실제 유통 환경에서는 이와 다른 결과가 나타날 수 있다. 따라서 본 원료가 제품화 되었을 경우 제품의 유통기간 설정 시에는 온도 외에 유통기간에 영향을 미칠 수 있는 다른 환경적인 요인들과 판매 이후 소비자가 제품을 섭취하는 기간을 고려하여 1.0 미만의 안전계수를 적용하여 유통기간을 설정하는 것이 타당하다고 판단된다. 따라서 초임계 잣송이 추출물에 일반적인 건강기능식품 원료의 유통기한인 2년으로 설정하는 것에 문제가 없

다고 사료되나 포장형태의 변화, 습도, 빛 등의 요인에 노출될 가능성과 완제품 생산시 부원료의 영향, 제품판매 후 소비기간을 고려해야 할 것으로 판단된다.

여러 조건의 초임계 추출물에서 가장 효과가 뛰어난 추출물 선정

여러 조건의 초임계 추출물에서 가장 효과가 뛰어난 추출물을 선발하기 위해 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과 PC 1 추출물이 저농도와 고농도에서 라디칼 소거능이 뛰어난 것을 확인하였다. 3T3-L1세포에서 초임계 잣송이 추출물의 독성을 알아보기 위해 5, 10 μg/mL을 24 시간 처리한 결과, 10 μg/mL에서 세포 독성이 나타나 지방 세포 분화 억제 및 분해효과 검증은 5 μg/mL을 사용하였다. 지방 분화 과정에서 Oil red O staining을 측정한 결과, PC 1, PC 10, PC 16, PC 17에서 control에 비해 지방의 축적이 유의적으로 감소하였고, 지방 분해 과정에서는 PC 1, PC 10, PC 16에서 control에 비해 지방의 축적이 유의적으로 감소하였다. 이상의 결과를 바탕으로 PC 1, PC 16을 이용하여 초임계 잣송이 추출물의 항비만 기능성 효과를 평가하였다.

초임계 잣송이 추출물 지방 분화 과정에 미치는 영향

초임계 잣송이 추출물이 지방 분화과정에서 지방의 축적에 미치는 영향을 알아보기 위해 Oil red O staining을 측정한 결과, 고농도의 초임계 잣송이 추출물은 지방 분화를 억제하지만, 저농도의 초임계 잣송이 추출물은 지방 분화를 촉진하는 것을 확인하였다. 지방 분화 과정에서 초임계 잣송이 추출물이 글리세롤 방출량에 미치는 영향을 알아보기 위해 글리세롤을 측정한 결과, 고농도의 초임계 잣송이 추출물은 지방 분화를 억제하는 것을 확인하였다. 초임계 잣송이 추출물이 지방 분화 과정에서 있어서 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 real-time PCR을 실시한 결과, 분화 초기에 발현되는 유전자인 adipogenic transcription factor(PPAR-γ, C/EBP)가 분화 초기에 초임계 잣송이 추출물에 의해 감소하는 것을 확인하였고, 지방 합성에 관여하는 효소인 FAS는 분화 초기에 초임계 잣송이 추출물에 의해 감소하는 것을 확인하였다.

초임계 잣송이 추출물이 지방 분해 과정에 미치는 영향

초임계 잣송이 추출물이 지방 분해과정에서 지방의 축적에 미치는 영향을 알아보기 위해 Oil red O staining을 측정한 결과, 초임계 잣송이 추출물이 지방 세포를 분해할 수 있을 것으로 확인하였다. 지방 분해 과정에서 초임계 잣송이 추출물이 글리세롤 방출량에 미치는 영향을 알아보기 위해 글리세롤을 측정한 결과, 잣송이 추출물이 글리세롤 방출량을 증가시켜 지방 세포를 분해할 수 있을 것으로 확인되었다. 초임계 잣송이 추출물이 분해 과정에 있어서 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 real-time PCR을 실시한 결과, 분화 초기에 발현되는 유전자인 adipogenic transcription factor(PPAR-γ, C/EBP)가 분화 초기에 초임계 잣송이 추출물에 의해 분해 과정 중에는 고농도의 초임계 잣송이 추출물이 유전자 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다. 또한 지방 분해 과정에서는 지방 합성 관련 유전자인 FAS의 발현에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 지방 분해에 관여하는 효소인 LPL과 HSL은 지방 분해 과정에서 초임계 잣송이 추출물을 고농도로 처리 시 유전자의 발현을 증가시켜 분해를 촉진할 수 있을 것으로 확인되었다.

초임계 잣송이 고지방 식이를 섭취한 동물에 미치는 영향

초임계 잣송이 추출물을 이용한 in vivo 동물 실험을 통한 기능성 효과를 평가하기 위해 먼저 추출물의 안정성을 평가하였다. 안정성 평가를 위해 0, 100, 300 mg/kg b.w.의 농도로 초임계 잣송이 추출물을 oil에 희석하여 1일 경구 투여한 결과, 생존율을 100%를 보였고 이상증상이 관찰되지 않았으며 부검 소견 또한 이상 소견을 관찰되지 않았다. 동일한 농도로 14일 경구 투여한 결과, 생존율은 100%를 보였으나, 300 mg/kg b.w.을 섭취한 그룹에서 creatine 함량은 감소하였고, urea 함량 증가하였다. 따라서 잣초임계 송이 추출물의 장기 섭취 시 300 mg/kg b.w.은 독성이 있는 것으로 확인하여 추후 진행된 동물실험에서는 안정성을 확인한 100 mg/kg b.w.을 최대농도로 하여 효능평가를 실시하였다.

60% high fat diet를 섭취한 C57BL/6J 마우스에 초임계 잣송이 추출물을 20, 100 mg/kg b.w.의 농도로 공급하여 항비만 기능성 효과를 평가하였다. 8주간 잣송이 추출물을 공급한 결과, 비만 유도 마우스 모델에서 잣초임계 송이 추출물 100 mg/kg b.w.은 체중과 피하지방을 유의적으로 감소시키는 효과가 있었음을 확인하였고, 혈청 leptin level, 혈청 지질 함량을 유의적으로 낮추는 것을 확인할 수 있었다.

초임계 잣송이 추출물이 실험동물의 지방 조직 내 비만 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 Real-time PCR을 실시한 결과, 잣송이 추출물이 adipogenic transcription factor(PPAR-γ, C/EBP)를 유의적으로 감소시켰고, adiponectin은 유의적으로 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. FAS와 LPL 유전자의 발현은 초임계 잣송이 추출물이 유의적으로 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 잣초임계 송이 추출물은 지방 분화를 억제 할 수 있는 반면, 지방 분해 또한 촉진 시킬 수 있음을 확인하였다.

GLP 기관에서의 안전성시험 결과는 다음과 같다

초임계잣송이추출물 (SPCE)을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

13주 반복 경구투여 독성시험에서는 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고 공비 3으로 하여 667 및 222 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단된다.

초임계잣송이추출물 (SPCE)의 무독성량 (NOAEL)은 수컷 222 mg/kg/day 및 암컷 667 mg/kg/day로 판단한다.

초임계잣송이추출물(SPCE)의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

초임계잣송이추출물(SPCE)은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

초임계잣송이추출물(SPCE)는 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로 판단된다.

인체적용시험은 경희대학교병원 내분비내과 이상열교수, 경희대학교 동서의학대학원 임상영영연구소 소장인 임현정 교수님과 공동으로 경희대학교병원에서 진행중에 있으나, 3차년 과제 종료기한인 2016년7월15일까지는 인체적용시험결과가 도출되기에는 시간적으로 어려운 상황입니다. 따라서 기능성원료 인정신청과 제품화는 본 과제의 최종보고서가 제출된 이후에 진행될 예정입니다.

또한 가평군의 지원으로 설립된 (주)KOREA PINE과 과제산물인 특허출원명 " 초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물"의 내 초임계 잣송이 생산기술 허여 계약을 체결하여 매출액 중 3%를 로얄티로 받기로 계약하였습니다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06

제 1 절 목표달성도

연구목표	연구결과	달성도 (%)	비고
잣송이 추출조건 확립 및 표준화	- (사)가평잣협회등과 업무협약(MOU)을 통해 원료 확보 - CO_2의 임계점인 71기압, 31℃ 이상의 조건에서 150, 200, 250, 300, 400bar의 압력과 40, 50, 60, 70℃의 온도 범위에서 추출 수행. - 순환식 초임계 추출장비(용량 : 50L, CO_2 유량 : 60L/hr)를 이용하분말화 잣송이를 추출한 결과, 평균 3.7%의 추출 수율 확립. - 미세결정셀룰로오스를 부형재로 하여 초임계 잣송이 추출물을 분말화를 수행하였고, 초임계 잣송이 추출물 분말 1Kg당 150,000원 이내로 제조가능 하기에 기존 체지방감소 기능성 원료와 가격경쟁 우위에 있을 수 있다고 판단됨	100	
유효성분 검토 및 기능/지표성분 설정	○ 초임계 잣송이 추출물 중 유효성분분석 - Terpene류 확인 - 가스크로마토그래피 질량분석기(GC/MS)을 통한 초임계 잣송이 추출물 성분 확인 - Oleamide 확인 시험 및 지방산 분석 - 초임계 잣송이 추출물 중 Phenol 류 확인 - 초임계 잣송이 추출물 중 함량이 많은 유효성분 분리정제	100	
기능/지표성분 분석법 확립 및 Method validation	○ 초임계 잣송이 추출물 중 PK-E1 분석조건 확인 -고속액체크로마토그래프(HPLC)를 이용한 PK-E1 확인 ○ 특이성 (Specificity) HPLC 분석시 검출시간(Retention time으로 검토) ○ 직선성 (Linearity) 6개 농도로 3반복 직선성 확인 ○ 시료 직선성 (Sample Linearity) 6개 농도로 3반복 직선성 확인 ○ 정확도(Accuracy),회수율(Recovery) 3개 농도로 원료를 첨가하여 회수율 검토 ○ 정밀도(Precision) 4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가 ○ 범위(Range) 직선성, 정확성, 정밀성 검토 후 범위 설정	100	

지역별 원재료 중 기능/지표성분 함량 확인	○ 가평지역,홍천지역 잣송이분말 중 PK-E1 확인	100	
초임계 잣송이 추출물의 기준규격 설정	○초임계 잣송이 추출물 9Lot에 대한 기능/지표성분 함량 확인 ○기능/지표성분(Dehydroabietic acid), 유해물질(납, 총비소, 카드뮴, 총수은, 대장균군, 세균수) 기준규격 설정 ○수입 잔류농약 59종, 영양성분(열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 나트륨) 확인	100	
초임계 잣송이 추출물의 안정성 확인	○초임계 잣송이 추출물의 유통기한을 2년으로 예상 - 25, 35, 40℃ 세 온도에 저장 - 5개월 이상 저장하면서 일정 기간마다 꺼내어 기능/지표성분등의 변화 확인 - 저장기간 동안의 변화량을 아레니우스식을 이용하여 유통기한 산출	100	
GLP 기관에서의 안전성시험	- SPCE의 조제물 중 Dehydroabietic acid의 농도분석을 위한 본 분석법은 적합한 것으로 확인. 또한 부형제(Corn oil)내에서 12.5 및 400mg/ml 농도의 조제물은 균질하였으며 실온 4시간 및 냉장 7일간은 안정한 것으로 확인 - SPCE을 랫드에 단회 경구투여한 결과 개략의 치사량은 암수 모두 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단 - 본시험 조건하에서 시험물질 SPCE의 마우스 골수세포의 소핵유발성은 음성으로 판단 - SPCE의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단 - 본 시험조건에서 시험물질 SPCE의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단 -SPCE을 Sprague-Dawley계 암수 랫드에 4주간 반복 경구투여한 결과, 암수 2,000mg/kg/day 용량에서 체중증가 억제(수컷), BUN(수컷) 및 ALP의 증가가 관찰되었고, 암수 500, 1,000 및 2,000mg/kg/day 용량에서는 Crea, T-Chol, 간장 및 신장의 무게의 증가 또는 증가 경향이 관찰되었다. 따라서 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 2,000mg/kg/day를 고용량으로 설정하고 공비 3으로 하여 667 및 222mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단 - 본 시험조건하에서 SPCE의 무독성량(NOAEL)은 수컷 222mg/kg/day 및 암컷 667mg/kg/day로 판단된다.	100	

In vitro 실험을 통한 잣송이 추출물 기능성 효과 평가	- Oil red O staining - Glycerol release assay - 지방 대사 관여 효소의 발현을 확인을 위한 real time PCR - 부검을 통한 장기 이상 확인 - 혈액을 이용한 생화학 분석	100	
선택한 추출물을 이용한 In vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가	- 혈중 lipid profiles 분석 - 지방 조직에서의 지방대사 관련 인자들의 RNA 발현 확인을 위한 real time PCR	100	
시제품을 이용한 In vivo 동물실험을 통한 기능성 효과 평가	- 혈중 lipid profiles 분석 - 지방 조직에서의 지방대사 관련 인자들의 RNA 발현 확인을 위한 real time PCR	100	
인체적용시험	- 경희대학교부설 임상영양연구소 임현정교수님과 인체시험 연구용역계약서를 체결. - 경희대학교병원 내분비내과 이상열교수, 경희대학교 동서의학대학원 임상영영연구소 소장인 임현정 교수님과 공동으로 경희대학교병원에서 진행중	50	
기능성원료 개별인정 신청	- 3차년 과제 종료기한인 2016년7월15일까지는 인체적용시험결과가 도출되기에는 시간적으로 어려운 상황입니다. 따라서 기능성원료 인정신청과 제품화는 본 과제의 최종보고서가 제출된 이후에 진행될 예정.	0	
건강기능식품 제형 개발통한 시제품 생산	- 가평군의 지원으로 설립된 (주)KOREA PINE과 과제산물인 특허출원명 " 초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물"의 내 초임계 잣송이 생산기술 허여 계약을 체결하여 매출액 중 3%를 로알티로 받기로 계약.	0	

제 2 절 평가착안점에 입각한 달성도

평가항목		결과	달성도 (%)	비고
국내특허 출원 2건		특허명 "초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물" 출원인 : (주)키토라이프 출원일 : 2014.11.12 출원번호 : 10-2014-0157412	50	
논문 SCI, 비SCI 각각 2편		논문명 : 분화된 3T3-L1 세포에서 잣송이 초임계 추출물의 지방분해 효과 *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(9), 1342~1348(2014)	25	
동물독성시험(안전성) 1건		- 2014.04.30일 GLP기관인 (주)바이오톡스텍과 시험위탁계약서을 체결하고, "잣송이추출물"에 대한 안전성시험 다음과 같은 항목으로 진행, 완료하였음. 1) 단회투여독성시험(랫드-경구) 2) 4주반복 용량결정(DRF)시험(랫드-경구) 3) 13주반복투여독성시험+4주 회복시험(랫드-경구) 4) 복귀돌연변이시험 5) 염색체이상시험 6) 소핵시험(마우스-경구/복강)	100	
인체적용시험 1건		- 인체적용시험은 경희대학교병원 내분비내과 이상열교수, 경희대학교 동서의학대학원 임상영영연구소 소장인 임현정 교수님과 공동으로 경희대학교병원에서 진행중.	50	
기능성성분 인정신청 1건		- 3차년 과제 종료기한인 2016년7월15일까지는 인체적용시험결과가 도출되기에는 시간적으로 어려운 상황입니다. 따라서 기능성원료 인정신청과 제품화는 본 과제의 최종보고서가 제출된 이후에 진행될 예정.	0	
기술이전 2건		- 가평군의 지원으로 설립된 (주)KOREA PINE과 특허출원명 " 초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물"의 내 초임계 잣송이 생산기술 허여 계약을 체결하여 매출액 중 3%를 로얄티로 받기로 계약함.	50	
종료후 1차년도	제품화 2건	- 기존 자사가 시판되고 있는 체지방 개선 관련제품에 사용되는 원료와 복합처방으로 시너지를 극대화시킨 개선제품 - 기능성성분 인정신청을 획득하여 자사만 제조할 수 있는 초임계 잣송이 추출물 함유 체지방 개선 기능성제품		

특허 1편의 추가 출원은 인체적용시험이 완료되면 결과를 바탕으로 기능성 소재관련 특허를 출원할 예정이며, 논문의 진행사항은 아래와 같습니다.
KFN에는 "고지방식이로 유도한 비만 mice에서 잣송이 초임계 추출물의 항비만 효과"로 수정 후 채택으로 최종수정본을 제출하였으며 게재 가 판정을 받은 학회홈페이지 화면을 아래에 제시합니다.

K16-08-20 2016-08-17 17:26:58	고지방식이로 유도한 비만 mice에서 잣송이 초임계 추출물의 항 비만 효과		
	초교확인요청서작성중	연구논문	기능성식품학

논문상세정보

저자정보	이다솜,이민희,김혜숙,정록례,양한필,허석현,이성민		
영문 키워드	pine cone / Pinus koraiensis / supercritical extract / anti-obesity		
논문 종류	연구논문		
전화	031-201-3838	팩스	031-204-8119
체크리스트 파일	Submission_Checklist.hwp (size : 15,872 bytes)		
논문파일	K16-08-20.hwp (size : 103,936 bytes)		
그림원본파일	KFN figure.xlsx (size : 37,615 bytes)		
저작권이전동의서	저작권이전동의서.pdf (size : 397,520 bytes)		
1차 수정파일	K16-08-20_1_edit.hwp (size : 105,984 bytes)		
1차 체크리스트파일	check_list_modify (3).hwp (size : 27,136 bytes)		
최종파일	K16-08-20_last.hwp (size : 106,496 bytes)		
최종 그림원본파일	KFN figure.xlsx (size : 37,515 bytes)		
편집간사	편집간사		
편집위원	편집위원		
1차 심사결과	수정 후 채택		
최종 심사결과	게재 가		

논문심사정보

심사위원	1차 심사결과	1차 답변서
(A)	심사완료	답변서 보기
(B)	심사완료	답변서 보기

그리고 NRP에 제출한 논문 under review에 들어갔다는 메일을 아래에 첨부합니다.

Dear Jeongmin Lee

A manuscript number of your submission has been assigned by editorial office of Nutrition Research and Practice. You may check on the progress of your paper by logging on to http://www.nrpesubmit.org.

Please mention the below manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions.

Thank you for submitting your manuscript to Nutrition Research and Practice.

Sincerely,

■ Manuscript Information ■

Manuscript Title	Date Received	Manuscript ID
Pinus koraienis cone supercritical fluid extracts have an anti-obesity effect in mice with high-fat diet induced obesity	2016-08-18 13:43:22	nrp16064

- Web Site : http://www.nrpesubmit.org

2016-09-09

Nutrition Research and Practice

Editor-In-Chief

개별인정 획득을 최초 목표로 과제를 진행해 왔음으로 획득실패는 생각해 보지 않았으나 만약 개별인정을 받지 못할 경우 한시적기준규격을 받아 일반식품으로 사업을 전개해 갈 예정입니다.

제 3 절 관련분야의 기여도

○ 본 연구의 소재인 한국산 잣나무의 잣송이는 국내 자생 토종 소재로서 한국산 잣에 대한 평가가 재조명 되는 최근 시점에서 볼 때 타 기능성소재들과 견주어도 충분히 경쟁력이 있을 것으로 생각 되며

- 특히 전 세계적으로 나타나는 비만 인구 증가의 문제 해결에 도움을 줄 수 있는 제품을 생산하여 자사의 풍부한 경험과 실적을 통한 국내 및 국외 판매가 가능할 것임

- 국내 및 국외시장 분석결과 체지방 조절 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 소비자의 과학적 효과에 대한 기대치에 부흥하지 못하고 있으므로,

- 본 연구과제에서는 체지방 조절 제품 및 제형 등 제품화 방향으로 연구를 추진하여 소비자 욕구를 충족할 수 있는 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임

○ 본 과제는 유용한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있지만 그동안 식품 소재로서 이용되지 못했던 잣나무 부산물을 활용하여 잣송이 유래 항비만 관련 물질을 탐색하고 적절한 물리 및 생물학적인 처리 공정을 개발하여 부가가치 높은 건강기능식품 소재 개발 성과

- 나아가 환경오염원으로만 방치 되고 있던 잣송이의 효과적인 재활용으로 산림농가들의 새로운 소득자원으로 농가소득증대에 기여 될 수 있으며 국민 보건향상에도 크게 이바지 할 것으로 판단 됨

○ 체중조절 관련 기능성 기전의 규명을 통해 과학적(학술적)으로 증명 가능하며, 생산된 기능성 소재의 효능을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 실시하여 효능평가 및 인체효력 실험을 통한 유용성 및 안전성을 확보할 수 있음

- 표준화 원료의 안전성 및 안정성 자료 확보를 통한 개별인정형 건강기능식품 소재로 인정을 받아 신뢰성 확보

○ 식품의약품안전청의 체중조절 식품 소재를 개별인정형 건강기능식품 획득을 하게 되면 건강기능식품 및 소재 시장에 식품품목의 추가로 시장 확대 등의 파급효과를 예상할 수 있으며, 국민건강 및 삶의 질 향상에도 기여할 수 있을 것으로 사료됨

제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07

제 1 절 활용방안

1. 결과물의 활용

○ 잣송이 추출물 체지방감소 기능성 용도와 제조방법은 개발 즉시 특허를 출원하여 독점적인 지적 재산권을 참여 업체에서 확보함

2. 산업체 이전 및 실용화

○ 참여업체는 1년차에 개발결과를 즉시 산업화할 수 있는 시설 및 준비를 완료하고, 2년차에 개발에 직접 참여하게 되며, 3차년도 과제 종료와 동시에 제품화하고 시장에 진출할 수 있도록 함

3. 상품화

○ 참여기업은 제조가격, 생산비용 등을 감안하여 잣송이 추출물 기능성식품, 건강기능식품을 제조하여 상품화하여 유통하고, 미국 건강기능식품 NDI 인정 등록 신청

4. 현장보급 방안

○ 잣송이 생산 농가와 장기 계약을 통해 다량으로 원료를 확보할 수 있는 계획을 수립하며, 참여기관은 원료생산 지역의 안정적으로 원료공급 할 수 있는 기술을 지도함으로써 원료생산, 기술개발, 품질관리, 시장 확보를 유기적으로 확보함

5. 향후 추가 연구개발 및 제품화

○ 본 과제 종료 후 잣송이 추출물 연구결과를 기반으로 잣송이 추출물의 유효 성분의 분리/정제를 통한 천연 향기 및 향미 성분을 이용한 향장제품 및 식품첨가용 향료제품을 연구개발하여 제품화 추진,

- **향장제품** -항염치약, 항균샴프, 정신건강 피톤치드방향제, 화장수(플로럴워터), 이스트 등
- **식품첨가용(향료제품)** - 잣송이 향기 음료, 껌, 사탕 등

○ 잣송이 추출후 남는 찌거기 경우 목재펠릿제조 난방연료 대체하여 가정용 보일러에 보급

○ 본 과제 종료 후의 추가기술은 참여기업의 기술료로 충당하며, 지속적인 기술개발 완료를 위해 본 과제의 시제품으로 형성되는 매출의 일정부분을 연구개발에 투자함

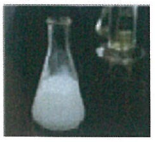
잣송이 추출물과 그 부산물의 기능성 제품화

잣송이 추출물과 그 부산물

잣송이

생리활성물질 추출, 분석, 기능성 검증

영양성분, 생리활성물질 분석 및 기능성 검증



잣송이 향장제품

기능별 용도

- 아로마테라피 향장제품
- 기능성 생활용품 제품화
  - 피톤치드방향제와 치약, 비누용 등 원료개발
- 식품첨가용 향료원료화
  - 껌,사탕 등

잣송이 플로럴워터

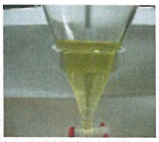
플로럴워터

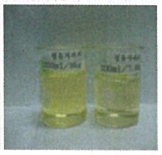
미스트

기능별 용도

- 화장품용 기초 향장품화
  - 플로럴워터, 미스트, 미용팩

잣송이 추출물





건강기능식품 제품화

제 2 절 기대성과

1. 산업적 측면

○ 우리 고유 약용식물인 잣송이 추출물의 과학적 임상시험을 통해 건강기능식품 제품화 및 글로벌화로 고부가가치 제품화, 국제적 경쟁력 확보로 세계화 추진

- 식품의약품안전처의 개별인정형 건강기능식품 인정되면 건강기능식품 및 기능성소재 시장의 확대 등의 파급효과와 세계 건강기능식품 시장 진출

○ 잣송이 추출물 건강기능식품 제품화는 제1차, 2차 , 3차 산업의 융합복합기술산업인 제6차 고부가가치사업으로 국가경제와 지역경제 활성화에 기여

- 원천기술 확보로 인한 국내 기능성원료 수입대체 및 수출 증대효과와 원료의 안정된 공급으로 건강기능식품 산업의 원료 안정성 확보
- 잣송이 추출물의 경우 판매단가 등 경쟁력이 매우 우수하며 특히 현재 사용되지 않는 부산물을 활용하여 사업 성공시 농가소득의 증대 및 일자리 창출

○ 잣송이 추출물의 건강기능식품 제품화 성공시 기능성원료로서 50억 정도의 매출이 가능하며, 관련 산업 파급효과시 약 500억 이상의 경제적 가치를 기대

- 원료비용이 저렴한 잣송이 부산물 이용함으로서 고가 원료인 잣원료를 이용할 경우에 비해 10배 이상의 수익 및 경제적 효과를 기대할 수 있음.
- 현재 잣송이 추출물의 경우 제품화할 경우 5만원/kg의 단가를 예상하고 있으며 이는 관련 경쟁 원료

○ 우리나라는 잣나무 소유권자로서 국제신품종보호동맹(UPOV)의 조약에 의한 개발이익 공유차원에서 개발된 품종의 무상이용이 가능할 뿐 아니라, 개발자가 제3국 수출시 잣나무 사용수수료(Royalty)를 받을 권리가 있음

2. 기술적 측면

○ 세계적으로 처음 잣송이 원료를 초임계추출법으로 생리활성 성분을 추출하여 기능성분 및 지표설분 설정과 과학적 건강기능식품 기능성평가 및 기전 규명

○ 기능성원료의 *in vitro* 및 *in vivo* 등의 실험을 실시하여 효능평가 및 인체적용시험을 통한 체지방감소 기능성 및 안전성 확보와 안정적 제품 제형화

- 잣송이 추출물 원료의 생리활성 우수 기능성 소재개발 및 그 작용기전을 규명함으로서 고부가가치 비만 예방 및 비만 보조식품제 개발 가능성 제시

○ 체지방감소와 관련된 기능성 성분의 추출, 분리 및 정제하여 기능성식품 소재화를 통해 용도의 다양화와 기능성 원료의 대량 산업화 공정 확립

○ 저이용 저비용 잣송이 부산물을 이용한 생리활성 성분 분리·정제 기술 확립을 통해 고부가가치화 융복합 가공기술기반 구축에 기여

6. 연구개발과제의 대표적 연구실적

						코드번호		D-12	
번호	구분 (논문 /특허 /기타	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	분화된 3T3-L1 세포에서 잣송이 초임계 추출물의 지방분해 효과	경희대학교	3협동과제	한국식품영양과학회지	1.28	2014.09.06	○ (단독사사)	비SCI
2	특허	초임계 잣송이 추출물을 포함하는 체지방 감소용 조성물	(주)키토라이프	주관과제	대한민국		2014.11.12	×	
3									
4									
5									

7. 참고문헌

코드번호	D-14

1) Spiegelman BM, Flier JS. 1996. Adipogenesis and obesity; rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389.

2) Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.

3) Critchfield WB, Little EL Jr. 1966. *Geographic Distribution of the Pines of the World.* US Dept Agriculture, Forest Service, Washington, DC, USA. No 991, p 4.

4) Lee HJ, Choe YJ, Choe DH, Hong IP. 2003. Extractives of *Pinus koraiensis* wood. *J Korean Wood Sci Technol* 31: 49-56.

5) Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethopharmacol* 79: 213-220.

6) Baricevic D, Milevoj L, Borstnik J. 2001. Insecticidal effect of oregano *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* Ietswaart) on bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say). *Inter J Horticult Sci* 7: 84-88.

7) Medeiros R, Passos GF, Vito CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF. 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol* 151: 618-627.

8) Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Legault J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol* 103: 99-102.

9) Hong WT, Ko KM, Lee JG, Jang HJ, Kwak JJ. 2002. Volatile compounds of pine needle (*Pinus rigida* miller) extracts. *J Korea Soc Tabacco Sci* 24: 53-59.

10) Kim YK, Chung KN, Hirosh I, Shigeru M. 1986. Volatile components of pinenut. *Korean J Food Sci Technol* 18: 105- 109.

11) Lee EK, Kim HS, Chung SJ. 2011. Antimicrobial activity of chitosan solution with PKS (*Pinus koraiensis S. et Z*) and PRM (*Pinus rigida* Mill) extract. *J Chitin Chitosan* 16: 117-122.

12) Hwang HJ, Yu JS, Lee HY, Kwon DJ, Han W, Heo SI, Kim SY. 2014. Evaluations on deodorization effect and anti-oral microbial activity of essential oil from *Pinus koraiensis*. *Korean J Plant Res* 27: 1-10.

13) Lee, S.J. and Chun, B.S.: Extraction of Volatile Oil from *Citrus junos* Peel by Supercritical Carbon Dioxide, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 17(2): 148-152 (2002)

14) Woo, G.Y., Kim, K.H., Lee, M.J., Lee, Y.B. and Yoo, J.R.: A Comparison of Volatile Compounds In Pine Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction with Those by Simultaneous Steam Distillation and Solvent Extraction. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31: 1268-1274 (1999)

15) Ryu, J.H., Park, M.R. and Lim, G.B.: Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil from Chlorella

vulgaris. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 26: 453-458 (2011)

16) Hwang, A.R., Jung, I.I., Lim, G.B. and Ryu, J.H.: Extraction of Oil from Canola Seeds with Supercritical Carbon Dioxide. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 24: 367-376 (2009)

17) Cocero, M.J., and Calvo, L.: Supercritical Fluid Extraction of Sunflower Seed Oil with CO2-Ethanol Mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1573-1578 (1996)

18) Yang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Ma, Y. and Wang, J.: Two New Diterpenoid Acids from *Pinus koraiensis*. *Fitoterapia* 79: 179-181 (2008)

19) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47: 943-946.

20) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.

21) Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207-233.

22) Haugen F, Zahid N, Dalen KT, Hollung K, Nebb HI, Drevon CA. 2005. Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *Lipid Res* 46: 143-153.

23) Tenney R, Stansfield K, Oekala PH. 2005. Interleukin 11 signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* 202: 160- 166.

24) MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9034-9037.

25) Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM. 1995. Coordinated regulation of hormone sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue *in vivo*: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme Regul* 35: 163-178.

26) Ronnett GV, Kim EK, Landree LE, Tu Y. 2005. Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. *Physiol Behav* 85: 23-35.

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 아니됩니다.