

11-154300
0-002724-
01

PhytoMeal(염생식물 탈염소재)을 이용한 인지기능 개선
기능성 및 식품 대체소재 개발과 수출전략 상품화

최종보고서

2019

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-002724-01

PhytoMeal(염생식물 탈염소재)을 이용한 인지기능 개선 기능성 및 식품 대체소재 개발과 수출전략 상품화

최종보고서

2019. 06. 04.

주관연구기관 / (주)파이토코퍼레이션
협동연구기관 / 건국대학교
협동연구기관 / 서울대학교병원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “PhytoMeal(염생식물 탈염소재)을 이용한 인지기능 개선 기능성 및 식품 대체소재 개발과 수출전략 상품화”(개발기간 : 2016.07.07 ~ 2018.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 06. 04.

주 관 연 구 기 관 명 : (주)파이토코퍼레이션 (대표자) 김 득 회 (인)

제1협동연구기관명 : 건국대학교 글로벌산학협력단 (대표자) 이 승 현 (인)

제2협동연구기관명 : 서울대학교 병원 (대표자) 서 창 석 (인)

주 관 연 구 책 임 자 : 권 미 향

제1협동연구책임자 : 최 동 국

제2협동연구책임자 : 김 만 호

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

보고서 요약서

과제고유번호	116018-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.07.07 ~ 2018.12.31	단 계 구 분	3차년도/ 총 3차년 과제
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치 식품기술 개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	PhytoMeal(염생식물 탈염소재)을 이용한 인지기능 개선 기능성 및 식품 대체소재 개발과 수출전략 상품화			
	세 부 과 제 명	제1협동: 염생식물 탈염소재 추출물을 이용한 신경손상 억제 및 인지 기능 개선 효능평가 제2협동: 통통마디추출물의 인지기능 개선 임상연구			
연구책임자	권 미 향	해당단계 참여연구원 수	총: 12명 내부: 4명 외부: 10명	해당단계 연구개발비	정부:190,000 천원 민간:63,334 천원 계:253.334 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 20명 내부: 8명 외부: 12명	총 연구개발비	정부:500,000 천원 민간:166,668 천원 계:666,668 천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	주관연구기관: (주)파이토코퍼레이션 협동연구기관: 건국대학교글로벌산학협력단 협동연구기관: 서울대학교병원			참여기업명	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급 (비공개) 사유: 주요 연구개발기술 현재 해외특허(미국, 유럽) 출원 중				
[요약] 본 과제를 통하여 1. 세계 최초로 염생식물의 탈염(desalination)을 통하여 염생식물 고부가가치 기 능성 소재화 기술을 개발하였으며, 국내 특허등록 및 해외특허출원(미국, 유					보고서 면수 233

<p>럽, 중국, 일본, 인도)을 완료하였음</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 국내 주요 염생식물이며 대규모로 경작이 되고 있는 통통마디의 기능성 영양 탈염소재인 ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 응용(application) 및 제품화 완료 3. ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 체지방감소 및 지방세포분화 억제 효과 확인 4. 탈염 통통마디 소재 유래의 항혈전성분을 파이토밀에 가미한 ‘파이토밀-플러스(PhytoMeal-Plus)’의 제품화 5. 파이토밀의 효소가수분해 주정 추출물인 ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 뇌 신경보호 및 인지기능개선 전임상 기능성 (in vitro, in vivo) 효과 확인 6. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 인지기능개선 효능평가를 위한 인체적용시험 시행 7. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 지표 및 기능성 성분 선정, 분석법 확립 8. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’와 ‘파이토밀(PhytoMeal)’을 활용한 통통마디엑상차 “메모리티(MemoryTea)”의 개발 및 제품화 	
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

<요약문>

<p align="center">연구의 목적 및 내용</p>	<p>최종목표: PhytoMeal(염생식물 탈염소재)을 이용한 인지기능 개선 기능성 및 식품 대체소재 개발과 수출전략 상품화</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 염생식물 탈염 공정 조건 확립 및 염생식물 탈염소재의 식품소재 개발 2. 염생식물 탈염소재로부터 뇌혈류 개선 및 뇌기능보호 지표성분 추출 및 정제공정의 표준화 3. 신경 세포주(cell-line)를 이용한 염생식물 탈염소재 분획물의 뇌세포 보호 기능성 확인 및 안정성 검증 4. 염생식물 탈염소재의 효소 가수 분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화 5. 염생식물 탈염소재의 임상시험을 위한 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작 6. 동물실험을 통한 염생식물 탈염소재의 인지기능 개선, 신경손상 억제 기능성 확인 및 안전성 검증 7. 염생식물 탈염소재의 기억력 및 인지기능 개선 임상연구 8. 기능성 지표성분의 표준화 공정 확립 9. 염생식물 탈염소재로부터 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품 소재의 제품화 및 수출전략 상품화
<p align="center">연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 세계 최초로 염생식물의 탈염(desalination)을 통하여 염생식물 고부가가치 기능성 소재화 기술을 개발하였으며, 국내 특허등록 및 해외특허출원(미국, 유럽, 중국, 일본, 인도)을 완료하였음(주관) 2. 국내 주요 염생식물이며 대규모로 경작이 되고 있는 통통마디의 기능성 영양 탈염소재인 ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 응용(application) 및 제품화 완료 (식약처 제품품목허가 득) (주관) 3. ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 체지방감소 및 지방세포분화 억제 효과 확인(SCI 논문 게재)(제1협동: 건국대학교) 4. ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 지방세포분화억제 성분 분리 및 규명 (주관) 5. ‘파이토밀(PhytoMeal)’ 추출물의 항혈전성분(Irilin B) 분리, 정제 및 구조 규명 (국내특허등록 및 해외 PCT출원 완료) (주관) 6. 탈염 통통마디 소재 유래의 항혈전성분을 파이토밀에 가미한 ‘파이토밀-플러스(PhytoMeal-Plus)’의 제품화 (식약처 제품품목허가 득) (주관) 7. 파이토밀의 효소가수분해 주정 추출물인 ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 인지기능개선 기능성 (in vitro, in vivo) 효과 확인 (국내 및 해외(미국, 유럽) 특허출원 및 SCI논문 게재) (제1협동 및 주관) 8. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 인지기능개선 효능평가를 위한 인체적용시험 시행 (제2협동: 서울대병원 신경과 수행) 9. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 지표(trans-Ferulic acid) 및 기능성 성분(Acanthoside B) 선정, 분석법 확립 (주관) 10. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’와 ‘파이토밀(PhytoMeal)’을 활용한 통통마디엑상차 ‘메모리티(MemoryTea)’의 개발 및 제품화 (주관)
<p align="center">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 탈염 통통마디 유래 인기기능개선 건강기능성 소재 ‘파이토메모리’의 기술사업화를 통한 해외수출 및 국내시장 점유 2. 탈염 통통마디의 엑상차음료 ‘메모리티’의 기술사업화를 통한 해외수출 및 국내시장 점유 3. 국내 및 해외(미국, 유럽, 중국, 일본, 인도) 지적재산권 확보로 독점적인 사업화

	4. 글로벌 푸드기업(Nestle, GB Food, GNC 등)으로부터 LOI 확보 5. 염생식물로부터 미래 혁신적인 식품소재 기술가치평가를 통한 해외투자 유치 6. 염생식물 재배 농가의 소득 증대 7. 국내 해안 간척지, 유희지 등의 토지이용 확대				
국문핵심어 (5개 이내)	염생식물	통통마디	파이토밀	인지기능개선	탈염
영문핵심어 (5개 이내)	Halophyte	<i>Salicornia europaea</i>	PhytoMeal	Cognitive improvement	Desalination

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

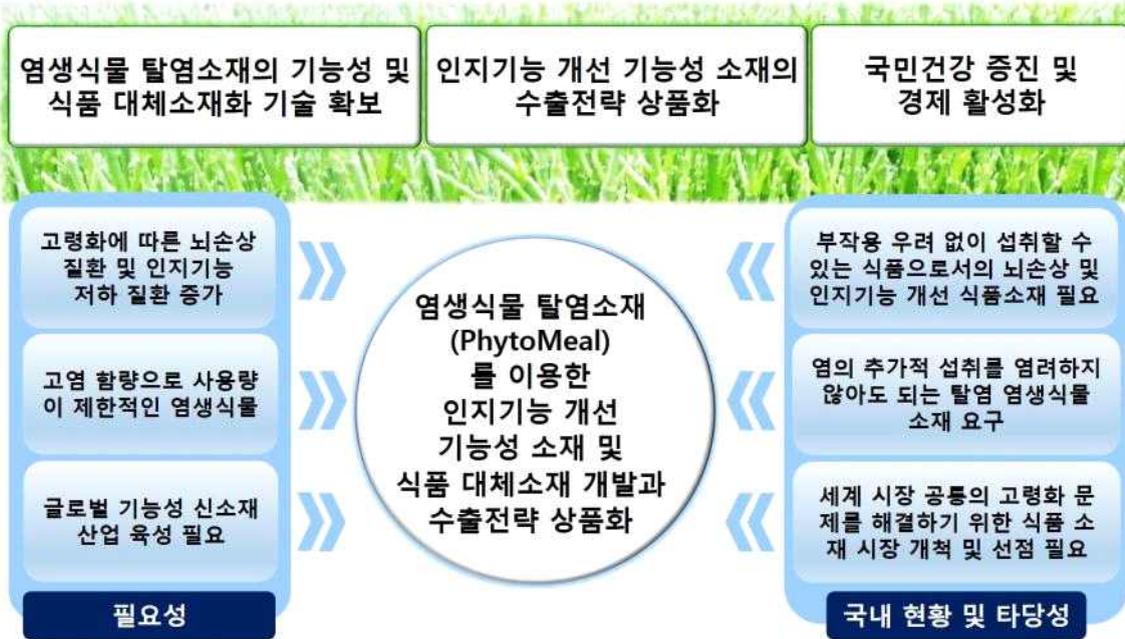
1. 연구개발과제의 개요	7
1-1. 연구개발 목표 및 제품의 개요	7
1-2. 연구개발 대상 국내외 현황	17
1-3. 연구개발의 중요성	21
1-4. 연구개발의 창의성 및 혁신성	25
2. 연구개발목표	27
2-1. 연구개발의 세부목표 및 범위	27
2-2. 연차별 개발목표 및 내용	29
2-3. 연구개발 추진체계 및 일정	33
3. 연구수행 내용 및 결과	39
3-1. 주관기관(파이토코퍼레이션) 수행 연구내용 및 방법	39
3-2. 주관기관(파이토코퍼레이션) 수행 연구개발 결과	51
3-3. 제1협동(건국대학교) 연구내용 방법 및 결과	136
3-4. 제2협동(서울대학교병원) 연구내용 및 결과	170
4. 주요 연구개발 성과	202
5. 목표달성도 및 관련분야 기여도	208
6. 연구결과의 활용 계획 등	222
붙임. 참고 문헌	228

<별첨> 연구개발보고서 초록, 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목표 및 제품의 개요

- 연구개발 개요 및 목표 : 염생식물 탈염소재 (파이토밀, PhytoMeal)로부터 뇌혈관 보호 기능 및 인지기능 개선 기능 성분을 탐색, 규명하고, 세포주(Cell-line)실험, 동물실험 및 임상시험을 통하여 입증함으로써 새로운 고부가가치 기능성 염생식물 탈염소재의 식품 소재 개발 및 제품화와 수출전략 상품화

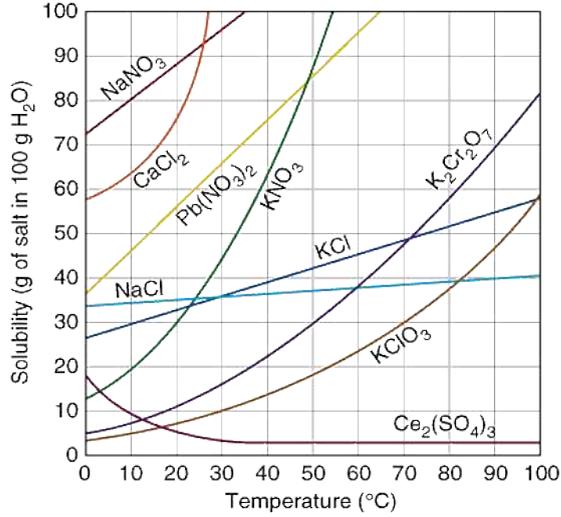


<연구개발의 개요 및 목표>

○ 연구개발의 핵심 기술

- 식품으로서 예로부터 섭취해 온 염생식물은 salt-stress에 견디기 위하여 다양한 생리활성 물질을 보유하고 있으나 염의 함량으로 인해 식품 소재로 사용하는 데에 제한이 있음
- 온도에 따른 소금(NaCl)과 기타 염의 용해도(solubility)차를 이용해 0-4°C의 냉수에서 단시간에 염생식물로부터 저온 냉소 추출 소금과 탈염소재로 분리하는 기술을 개발함

- 염생식물 탈염소재는 저온의 냉수로만 처리되고 동결건조하여 분말로 회수하므로 탈염 전 분말보다 생리활성 기능성 성분의 증가와 녹색의 클로로필을 그대로 유지하는 고부가가치 소재임



<출처: General Chemistry>

- 뇌기능개선과 관련하여 혈관성 치매 예방 및 치료에 활용 가능한 항혈전 활성(프로트롬빈타임, 에이피타임), 알츠하이머성 치매 예방 및 치료에 활용 가능한 Anti-AChE(아세틸콜린에스테라제 저해활성), ROS소거를 통한 뇌신경세포 보호 및 항염증 효능을 뇌인지기능 개선에 활용 가능한 Anti-Oxidant(항산화) 활성을 평가하기 위한 assay 기법 확립
- 염생식물 탈염소재 추출물로부터 뇌기능 개선 관련 생리활성-guided 정제 기법 확립
- 유효활성 정제 획분으로부터 지표물질의 단리 및 구조분석 기술 구축
- 유효활성 지표물질의 정량분석 및 표준화 구축



- 염생식물의 저온 냉수 탈염 기술을 이용하여 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)를 다양한 제품으로 이용할 수 있는 기술을 구축함

○ 연구개발과 관련하여 주관 연구기관이 보유한 기술력 및 연구역량

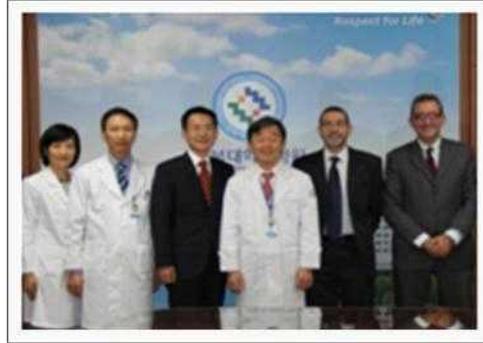
- (주)파이토코퍼레이션은 ‘저나트륨 식물성 소금대체재’ 제조기술의 독창성 및 제품의 시장성을 인정받아 2013년 12월 23일 미국 Oxford Bioscience Partners와 한화 인베스트먼트로부터 20억 원을 투자 유치하였음. (서울시 바이오 메디칼 신성장동력 펀드)

- (주)파이토코퍼레이션은 2007년 세계최초로 통통마디(함초)로부터 100% 식물성 조미소재 (파이토솔트)를 개발하는 데 성공하였으며 한국, 미국, 중국, 일본, 인도, 유럽 6개국에서 물질특허를 취득하였음 (이들 지역의 전체 인구는 약 36억 명으로 세계 인구의 절반을 상회함). 최근의 연구에서는 통통마디의 항혈전 기능성을 입증하는 특허를 출원하였으며, 항고혈압 기능을 가지는 염미소스에 관한 특허를 출원하였음. 나문재속 염생식물의 항혈전 및 항균기능에 관한 연구를 통해 특허를 출원하였으며, 본 연구과제를 신청하게 된 계기가 되는 ‘염생식물 탈염소재의 개발 및 기능성’을 확인하고 특허를 출원하였음

구분	등록번호 (출원번호)	등록일자 (출원일자)	등록명칭 (출원명칭)
한국특허 출원	10-2016-0055486	2016.05.04	염생식물 유래의 탈염 및 기능성이 강화된 영양 조성물과 그 제조방법
인도특허 등록	271922	2016.05.01	<i>Salicornia spp.</i> -derived salt and its production process
한국특허 출원	10-2015-0178211	2015.12.14	나문재속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품
한국특허 출원	10-2015-0178189	2015.12.14	나문재속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균성 조성물
한국특허 출원	10-2015-0154424	2015.11.04	관능성 및 기능성이 강화된 통통마디 유래의 염미소스 및 그 제조 방법
한국특허 출원	10-2015-0127594	2015.09.09	통통마디 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품
일본특허 등록	5561161	2014.06.20	<i>Salicornia spp.</i> -derived salt and its production process
중국특허 등록	1643780	2015.04.22	<i>Salicornia spp.</i> -derived salt and its production process
유럽특허 등록 (영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인,	2144516	2013.10.07	<i>Salicornia spp.</i> -derived salt and its production process

아일랜드, 6개국)			
미국특허 등록	US8420152	2013.04.16	<i>Salicornia spp.</i> -derived salt and its production process
한국특허 등록	10-0784229	2007.12.04	통통마디 유래의 식물성조미소재 대체물 및 그 제조 방법

- (주)파이토코퍼레이션의 대표이사이자 PhytoSalt의 최초 발명자인 김득희 사장은 파이토솔트의 개발 성과에 대한 공로로, 2008년 ‘농림식품과학기술대상’을 수상하였음

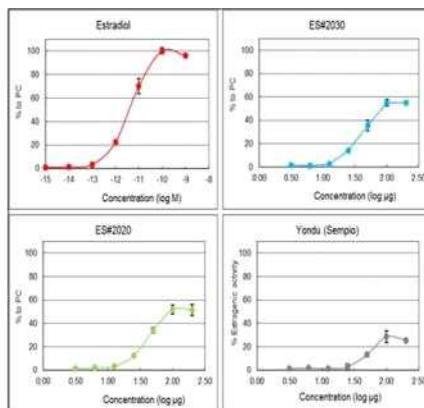
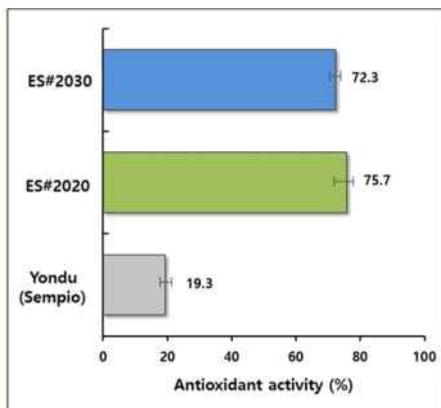


- 그동안 글로벌 식품기업인 네슬레(Nestle), 갈리나블랑카스타(GB Foods), 펩시(PepsiCo), 유니레버(Unilever), 크래프트(Kraft Foods), 제너럴 밀즈(General Mills), Tate and Lyle, McCormick 등이 파이토솔트에 관심을 가지고 자사 제품 적용 샘플테스트를 요청해 옴
- 특히 글로벌 식품기업 ‘갈리나 블랑카 스타(Gallina Blanca Star)’는 식물성 조미소재(파이토솔트)를 기존 식물성 조미소재의 문제점들을 해결할 수 있는 유일한 솔루션으로 선정하고 대량구매 및 파이토솔트 맛의 다양화와 샘플 적용시험에 의한 공동제품 개발을 위한 MOU 체결함
- 또한 세계 최대 식품기업 ‘네슬레’(Nestle)는 파이토솔트 샘플 적용시험을 1, 2차 진행한 결과, 매우 positive 결과가 나왔음. 현재 3차 시험 중임
- 현재 당사는 농식품부의 ‘2014년~2016년 수출전략 기술개발 사업’ 및 ‘2015년~2017년 고부가가치 식품기술개발 사업’을 수행하고 있으며, 유럽의 갈리나블랑카스타(GB Foods)와 파이토솔트 및 유로소스(Euro-Sauce)에 대한 공동 R&D를 수행 중



<유럽의 글로벌 식품회사 GB Foods의 R&D 팀에서 공동 R&D 수행을 위해 당사를 방문함>

- 최근 당사는 글로벌 식품회사 GB Foods와 공동 R&D를 수행하여 2종의 유로소스를 개발하고, 현재 GB Foods R&D Center에서 적용 테스트를 진행 중임. 2종의 유로소스 (Euro-sauce #2020, Euro-sauce #2030)는 파이토솔트를 주원료로 당사가 개발한 발효공법을 적용하여 개발한 천연 조미소스 임. 본 조미소스는 기능성으로 우수한 항산화활성 및 에스트로제닉 활성을 보유하고 있음을 확인



- (주)파이토코퍼레이션은 통통마디를 포함하여 다양한 염생식물을 원료로하는 식품 개발 및 식품 소재의 개발과 기능성 생리활성 물질의 분리 정제 및 지표성분의 규명 등을 통해 국내 뿐 아니라 글로벌 시장으로 영역을 확대하고자 하는 국내 유일의 염생식물 R&D 연구 역량을 보유하고 있음
- 당사는 우리나라 청정 해역인 신안군에서 재배하는 염생식물을 안정적으로 공급받으며 지자체와 상생할 수 있도록 하는 “지자체와 상생협력 MOU” 를 체결하고 있음(첨부: 지자체 상생협력 MOU 체결 문서)

○ 연구개발 제품의 적용 분야

- 건강기능식품

- 인체적용시험 결과를 토대로 인지기능개선 효과 확인 및 인증 절차를 통한 건강기능식품 소재화
- 분말, 캡슐 또는 정(tablet) 등의 다양한 형태로 상품화

- 식품

- 소금성분 함유량이 높아 식용하기 어려운 염생식물을 저온냉수추출로 탈염하여 파이토밀을 개발하여 염 함량으로 인한 사용량의 제한 없이 사용 가능한 식품으로 제품화
- 차(tea), 쿠키, 면, 크림치즈, 아이스크림 등 다양한 제품에 적용 가능함을 물성 테스트 및 관능평가로 확인한 결과 대표적 녹색 제품인 녹차분말보다 높은 수준의 관능성 확인

- 식량 대체제

- 밀가루에 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)를 10~15% 적용시 제면 및 제과제빵에서 우수한 물성과 관능성 확인
- 전 세계적 문제인 식량부족 문제를 해결 할 수 있는 가능성 제시

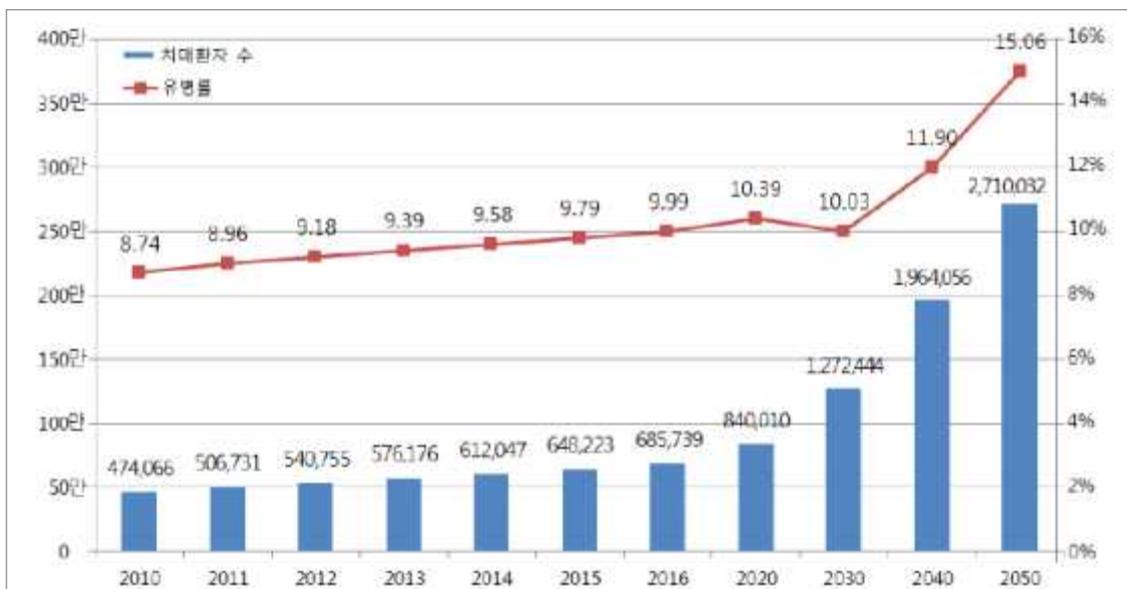


<통통마디 탈염소재 분말의 다양한 제품 적용 예>

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 우리나라는 급격한 고령화가 진행되고 있는 국가로 분류되며, 20년마다 치매 환자 수가 2배 가량 증가할 것으로 예측되고 있다. 국내 치매 유병률 조사에 의하면 2012년에 우리나라 고령 인구 중 치매 유병률은 9.18%이며 그 환자 수는 540,000명으로 추정됨. 2025년에는 처음으로 100만 명을 넘고, 2030년에는 127만명, 2050년에는 271만명의 치매환자가 국내에 거주할 것으로 전망됨



<2012년 치매 유병률 조사, 2012, 보건복지부>

- 현재까지 치매에 처방되는 약제는 인지기능 향진제(cognitive enhancer)라고 하는, 치료제라기보다는 치매 증상을 경감시키고 진행을 억제하는 효과를 가진 약물일 뿐, 완치를 가능케 하는 치료제는 개발되어 있지 않음. 약물치료 외에도 인지 재활 훈련과 같은 비약물적 치료법도 치매환자의 인지·행동학적 장애증상을 경감시키는 효과를 기대할 수 있음
- 2012년 건강보험공단 집계에 의하면, 치매 관련 총 진료비가 2006년 2,051억 원에서 2011년 9,994억 원으로 약 4.9배 증가하였는데, 이 수치는 노인성 질환 총 진료비의 약 30%를 차지하는 수준이고, 치매환자 1인당 진료비로 환산했을 때, 연간 310만 원으로 5대 만성질환보다 높은 비용임. 전 세계적으로 치매 관련 총 비용은 이미 2010년에 670조 원이라는 천문학적인 액수에 육박했으며, 국내 총 비용도 2010년 기준 8조 7천억 원으로 적지 않은 사회·경제적 부담을 지불해야하는 실정인데, 이 비용이 10년 후 두 배가 될 것으로 추산됨

○ 기술현황

- 국내 식품과학 관련 기술들의 선진국 대비 기술수준은 약 65%선에 위치하고 있지만 핵심 기술의 기술격차는 5년 이상을 보이고 있을 뿐만 아니라 대부분의 기술들이 도입기에 있어 건강기능식품 기술의 기반기술인 식품과학 관련 기술의 선진화가 요구되고 있음

기술	선진국대비 기술수준(%)	기술격차(년)	국내 기술발전 단계
식품공학기술	71.2	2.9	성장기
식품안전성평가 관리기준	72.2	5.4	성장기
유전공학기술	56.7	4.4	도입기
단백질공학기술	65.9	3.1	도입기
탄수화물공학기술	65.0	5.3	도입기
미생물이용기술	63.2	5.0	도입기
효소공학기술	71.7	5.8	도입기
생물공정기술	82.0	2.9	성장기
동물자원이용기술	65.8	6.2	도입기

분류	세분류	기술활용도	기술격차(년)
가능성 및 식품신소재 탐색기술	미생물 소재 탐색기술	1.2	1.9
	동물소재 탐색기술	0.95	1.3
	식품소재 탐색기술	1.7	2.7
	기타 가능성 및 식품신소재 탐색 관련기술	-	-
식품 기능성 규명 및 평가기술	기능성 소재 동정 및 정량기술	2.6	2.53
	<i>in vitro</i> 기능성 평가기술	2.55	2.3
	<i>in vivo</i> 기능성 평가기술	1.75	2.4
	식품 기능성 규명 임상평가 관련기술	0.6	1.73
	기타 식품 기능성 규명 및 평가 관련기술	-	-
가능성 식품소재 개발기술	전통식품 유래 기능성 소재 개발기술	2.3	2.2
	기능성 탄수화물소재 개발기술	1.65	2.25
	기능성 단백질 및 펩타이드 소재 개발기술	1.25	1.75
	기능성 지질소재 개발기술	1.05	1.4
	식물성분 소재 개발이용 기술	2.1	2.25
	기타 가능성 식품소재 개발 관련 기술	-	-
식품 신소재 개발기술	식품 풍미소재 개발기술	1.45	2.2
	식품 색소소재 개발기술	0.75	0.75
	식품 물성소재 개발기술	1.25	1.8
	기타 식품신소재 개발 관련기술	-	-
가능성 및 식품신소재 생산공정 기술	기능성 및 식품 신소재 분리 및 정제기술	2.2	1.7
	기능성 및 식품 신소재 대량생산 기술	2.25	2.65
	기능성 및 식품 신소재 제품화 기술	2.5	2.95
	기타 기능성 및 식품 신소재 생산공정 관련기술	-	-

<건강기능식품 기반기술 선진국 대비 기술격차 (출처: 한국식품개발연구원 보고서)>

- 국내 건강기능식품 기술은 자체 연구개발보다 수입 의존도가 높고 다른 나라에 비해 원천기술력도 낮음. 특히 미국의 경우 관련기술의 73%가 원천기술인 반면, 우리나라는 23%에 불과함
- ‘맞춤형 신기능 식품 개발기술’의 격차는 6.5년, ‘기능성 식품소재 관리.계측.평가 기술’의 격차는 8.7년. 식약처는 농산물, 자생 약용식물, 생약성분 등 기초연구는 지속적으로 수행했으나 산업계와의 연계가 미흡하고 제품화를 고려하지 않은 개발로 전임상 수준에 머무르는 등 제품화 실적은 저조함
- 수입원료 대비 가격과 효능 면에서 경쟁력을 갖춘 국내 토종의 기능성 농수산물 자원을 발굴하고 수입 원료를 대체할 수 있는 국산 기능성 원료 등록이 시급한 상황임. 식약처 건강기능식품기준과가 지난 2013년 발표한 ‘건강기능식품 개발 지원 및 활성화 방안’에 따르면, 정부의 전체 연구개발 총투자액 중 건강기능식품 개발 비율은 0.3%에 불과함(2010년 8개 부처 조사)

○ 시장현황

- 식품의약품안전처가 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년 (1조 4,091억원)에 비해 5% 증가하였다. 2013년도의 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 개별 인정형제품 (전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품 (전년대비 55% 증가)이 주도하고 있음. 2013년 국내건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억원으로 조사되어, 2009년 이후 지속적인 성장세를 유지하고 있음. 수출은 754억원으로 2012년 (584억원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3,854억원으로 2012년

(3,532억원)보다 9% 증가함

- 홍삼제품은 5,869억원으로 전체 (1조 4,820억원)의 40%를 차지하여 여전히 가장 높은 점유율을 보였으나, 그 규모는 2011년 이후 지속적으로 감소하고 있음. 홍삼 다음으로는 ▲개별인정형 16%(2,324억원) ▲비타민·무기질 12%(1,747억원) ▲프로바이오틱스 5% (804억원) ▲알로에 4% (628억원) 제품 순으로 나타남
- 생산액 상위 10개 품목 중 2012년 대비 생산이 급증한 제품으로는 밀크씨슬추출물 제품이 128% (135억원→308억원)로 가장 높았고, 프로바이오틱스 제품 55% (518억원→804억원), 개별인정형 제품29% (1,807억원→2,324억원) 순이었음. 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순
- 2013년도 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억원으로 2012년 1,807억원에 비해 29% 증가하였으며, 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30% (704억원)로 가장 많음
- 건강기능·고령친화 식품 시장은 첨단기술과의 융복합을 통하여 타 산업과의 접목 가능성이 높은 미래 성장 동력산업으로 웰빙라이프 시대에 맞게 시장이 지속적으로 증가할 전망

○ 경쟁기관현황

- 2012년 2013년 국내 기능성식품 생산실적 상위 10개 업체의 현황은 아래 표와 같음. 인지능력 및 기억력 개선용 기능성 식품을 제조하는 회사는 아래 10개 업체에 속하지 못함
- ‘ESP-102L’은 서울대학교 약대 교수진이 개발한 천연 소재로 당귀, 삼백초, 오미자 등의 한방재료를 원료로 한 복합 조성물에 가바와 팔라티노스를 첨가한 제품으로, 뇌신경세포 사멸을 억제해 기억력 및 인지기능을 활성화하는 것으로 알려져 있음. 글루탐산의 전환물인 가바(GABA)는 신경흥분을 억제해 스트레스를 낮춰 학습능력을 높여주는 효과가 있으며, 팔라티노스는 천연당 성분으로 집중력과 주의력 향상에 도움이 됨

2012 · 2013년 생산실적 상위 10개 업체 단위: 억원

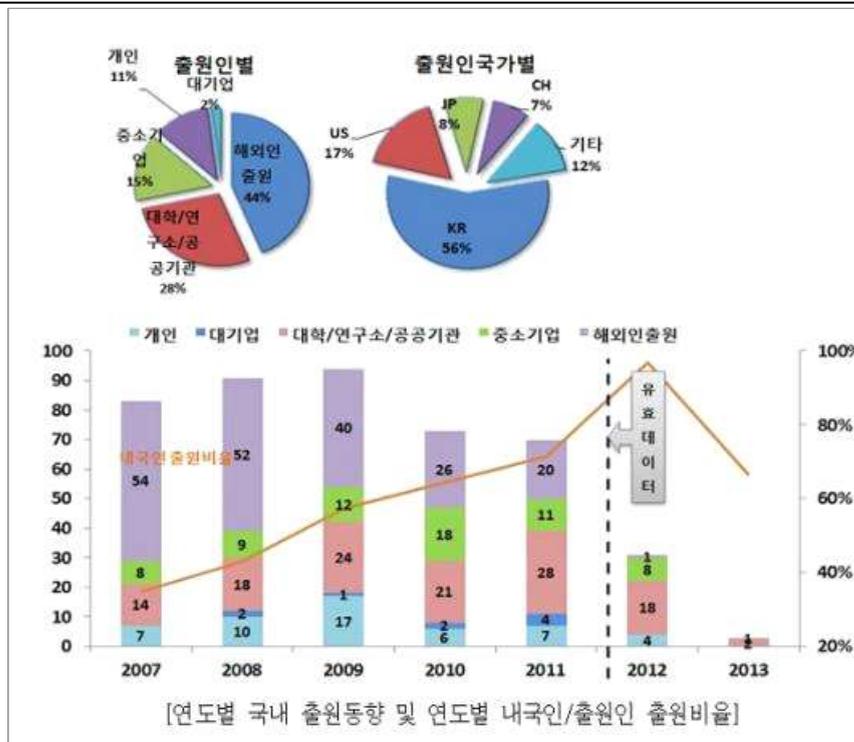
순위	2012		2013	
	업체명	출하액	업체명	출하액
1	(주)한국인삼공사	4744	(주)한국인삼공사	4288
2	(주)한국아쿠르트	697	(주)한국아쿠르트	786
3	코스맥스바이오(주)*	506	(주)서흥캡셀	583
4	(주)마임	505	(주)노바렉스*	509
5	(주)태평양제약	411	코스맥스바이오(주)*	507
6	(주)서흥캡셀	399	(주)내츄럴연도텍	473
7	종근당건강(주)	293	(주)아모레퍼시픽	469
8	풀무원건강생활(주)	273	콜마비엔에이치(주)	425
9	(주)네이처텍*	265	(주)마임	414
10	롯데제과(주)건강사업본부	241	고려은단(주)	365

*주)네이처텍: 구(주)남양, 코스맥스바이오(주): 구 일진제약(주), (주)노바렉스: 구 렉스진바이오(주)
 자료: 식품의약품안전처 BUSINESSwatch

- 일양약품의 브레인300은 서울대 의대 교수팀이 개발한 ‘BT-11’에 천연물을 복합한 조성물로, 뇌의 신경전달 물질인 아세틸콜린을 분해하는 효소의 활성화와 뇌 내 아밀로이드-베타 단백질, C 단백질 등 흥분성 아미노산의 독성을 억제하고 혈중 코르티코스테론을 감소시켜 뇌신경 세포를 보호하고 뇌기능 손상을 방지하는 것으로 기억력과 학습력을 향상시키는데 도움이 됨

○ 지식재산권현황

- 건강기능·고령친화식품의 국내특허 출원동향을 살펴보면, 출원건수는 2012년까지 매년 증가추세이며, 내국인 출원비율에 있어서는 2008년을 제외하면 매년 90%이상으로 매우 높은 비중을 차지
- 국내 전체특허의 내외국인 비율은 한국인이 95%, 외국인 5%로 한국인의 특허출원비율이 매우 높아 기술자립도가 높은 것으로 분석
- 출원인을 구분하면 연구소/대학/공공기관의 특허비율이 44%로 가장 높았고, 개인이 24%로 그 뒤를 이었으며, 중소기업이 17% 그리고 해외출원인과 대기업이 각각 9%, 6%로 분석되어 건강기능·고령친화식품 분야는 대학/연구소/공공기관 및 개인에 의한 특허출원이 많은 분야로, 시장 진출을 위한 기술기반을 마련하고 있다고 판단됨



<중소기업 기술로드맵 조희결과>

○ 표준화 현황

- 한국식품의약품안전평가원에서는 기능성 식품 인허가에 원료의 표준화를 엄격하게 규정하고 있음. 원료의 원산지 확인, 원재료와 사용부위가 식품으로 사용가능 여부 및 국제적인 규제사항 적부 여부, 제조과정에서의 이물질 혼입, 이행, 잔류물질 가능성, 기능성 지표성분 설정근거의 타당성, 원산지 및 채취시기 별 기능성 성분 함량차이, 재배환경에 따른 화학조성의 차이 등을 고려한 표준화를 요구하고 있음



나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술 현황

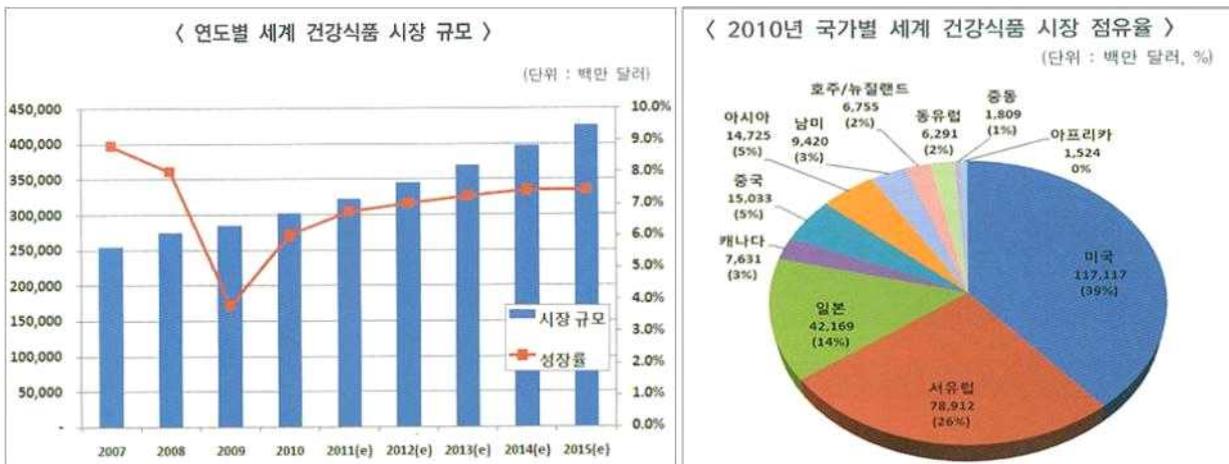
- 세계에서 판매되는 의약품의 50% 정도가 천연물의약품이거나 천연물에서 유래된 단일물질임. 대표적인 예로 신종인플루엔자 치료제인 타미플루(오셀타미비르)는 중국의 토착식물인 팔각회향(star anise)이라는 천연물질로부터 개발되어 2009년 전 세계 매출액이 약 30억 달러에 이르렀으며, 그 밖에도 아스피린, 탁솔, 은행잎엑스, 차전차엑스 등이 개발되어 오래전부터 시판되어 큰 매출을 올리고 있음 (BCC research)
- 2004년에는 미 FDA에서 처음으로 botanical drug에 대한 산업 가이드라인인 Botanical drugs Guidance를 제정해 천연물 의약품 시장에서 주도권을 잡기 위한 노력을 기울여 왔으며, 그 결과 1982년 이후 868종의 신약후보물질, 40종의 신약, 209종의 천연물유래 반합성 물질을 승인했으며, 2002년까지 천연물에서 유래한 20종의 항암제를 개발한 것으로 집계되었음(Science Times, 2010)
- 미국 FDA 판매 승인 천연물의약품으로는 독일의 Medigen사에서 개발한 Veregen Ointment 15%(Veregen®, Phynova, 음부 사마귀치료제, 2006년도 승인)가 있음. 이 제품은 녹차잎으로부터 부분 정제된 물 추출물로 주성분인 카테킨과 다른 녹차 성분들의 혼합물인 외용제로 2009년에는 450만 달러 매출을 기록함. 천연물 의약품 2호인 풀리작(Fulyzaq®)은 미국의 살릭스 파마슈티칼스에서 아마존 강 유역에서 서식하는 자생하는 식물로부터 프로안토시아니딘 중합체를 추출하여 개발한 최초의 경구용 제품이며, 2012년 판매 허가를 받은 에이즈 환자 설사 증상 완화제인 희귀 의약품임
- 유럽의 경우 천연물 신약 Sativex(Oromucosal Spray)는 영국제약사인 GW Pharmaceuticals에서 개발한 제품으로 마리화나의 추출물이고, 다발성경화증에 따른 경직에 적응증이 있으며 2012년도 1,100만불의 매출을 이루고 있음
- 중국은 세계에서 가장 큰 중약 천연화합물 베이스 구축을 위하여 초대형 프로젝트를 진행하고 있음. 중성약의 매출은 의약품시장의 22.7%를 차지하고 있고 전문의약품이 높은 비중을 차지하고 있으며 최근 5년간 연평균 35%의 고성장을 기록해왔으며 향후에도 그 성장세가 이어질 것으로 예상되고 있음

○ 시장 현황

- 세계 천연물과 관련된 시장은 의약품, 건강기능식품등을 포함하여 약 1000조원 수준에 이르고 있는 것으로 추정되며, 연간 8~10%의 성장률을 기록하고 있다. 뉴트리션의 세계시장은 70조원대 규모로 건강기능식품용(34%), 식품/음료용(31%), 동물사료용(19%), 기타 영유아용(16%)으로 구분됨. 광의의 뉴트리션은 탄수화물과 지방, 단백질 등 식품으로 섭취하는 영양성분을 의미하지만, 기업의 사업 관점에서는 섬유질, 비타민과 미네랄, 지방산 등 인위적인 보충·강화가 필요한 영양성분을 공급하는 사업 영역을 의미함. 뉴트리션 사업은 과거 영유아용과 동물사료용이 주를 이루었으나, 선진국을 중심으로 건강에 대한 관심이 높아지면서 건강기능식품 및 영양강화 첨가제로 새로운 성장이 시작되어 연평균 5% 이상의 꾸준한 성장세를 지속하고 있음
- 웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가, 가속화되는 고령화 등의 이유로(현재20% 이상의 유럽인구가 65세 이상이고, 2030년에는 30%를 넘을 것으로 예상) 기능성식품의 성장 잠재력은 높게 인식되어지고 있음. 건강기능식품의 분류기준에 따라 세계시장규모의 추정에는 차이가 있으며, 국내건강기능식품의

정의에 부합하는 제품의 생산실적을 비교하는데 어려움이 있으나 Nutrition Business Journal(2012)의 자료에 따르면 2010년 건강기능식품 세계시장 규모는 약 845억 달러로 추정되며, 세계건강기능식품 시장규모는 2009년 대비 802억 달러로 5.4%의 성장을 보이고 있음

- 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7% 임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높은 수준이며, 최근 중국, 인도, 라틴아메리카 등 신흥 개발국이 잠재력이 높은 시장으로 경제 성장과 함께 수요가 크게 증가하는 추세임. 이러한 건강기능식품 시장의 높은 성장세는 ‘건강 지향적 소비자’의 증가에 따라 지속·확대 될 것으로 예상됨. 건강기능식품의 대표상품으로 이미 소비자들에게 깊게 인식된 비타민과 미네랄이 가장 큰 규모의 시장으로 2011년 36십억 달러이며 전년대비 5.3%의 성장률을 기록함. 또한 최근 건강에 대한 소비자들의 관심이 체중 조절과 체력 향상을 돕는 Performance enhancers, Muscle builders, Weight gainers 등 건강 증진용 제품의 판매확대로 연결되면서 스포츠 영양제 (Sports nutrition) 시장의 최근 5년간 연평균 성장률이 가장 높은 6.2%를 기록함



(가) 미국

- 칼슘, 무기질, 프로바이오틱스 제품, 비타민이 주류를 이루고 있으며, 노화에 따른 질병인 관절염, 골다공증 및 갱년기 등과 관련된 보조제(칼슘, 글루코사민)의 소비가 증가하고 있음. 2008년 미국 기능성식품 시장은 전년 대비 8.8% 성장한 1,040억불로 집계되었으며, 소아비만, 체중과다, 성인병 등에 대한 경각심과 인구의 고령화 및 건강보험료에 대한 부담 등으로 인하여 질병의 예방에 대한 관심이 높아지고 있는 점등을 미루어 볼 때 미국 기능성식품 시장은 향후에도 지속적으로 성장할 것이며, 이에 따라 미국은 2008년 대비 63.5% 성장한 1,700억 달러를 형성할 것으로 전망하고 있음 (Nutrition Business Journal)

(나) 일본

- 단일국가로는 미국 다음으로 큰 시장을 형성하고 있는 일본 건강식품 시장은 건강식품에 대한 법규제 및 행정 감시 강화(2004년 4월부터 2005년 6월 보건기능식품 관리제도와 법규를 재정비 함), 부정 상법 적발 등에 의한 소비자 심리의 악화 등으로 2006년부터 2009년까지 4년 연속 하락을 지속하다 2010년에는 고령화 사회의 확대, 경제 환경의 악화로 인한 의료, 복지, 건강정책 불안, 건강식품에 대한 소비자의 기대치 상승 등의 원인으로 전년 대비 6.0% 성장을 하며 1조 1800억엔(약 146억불) 시장을 형성하고 있음. 미용, 관절이 시장의 키워드로 자리매김하면서 콜라겐, 히알루론산, 글루코사민 등의 인기가 특히 높아지고 있음(Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012)

(다) 중국

- 노령 소비자들은 중국 전통 의약품을 더 선호하며, 한방/한의학에 대한 오랜 전통, 명절용 선물로 건

기능식품을 주고받는 것이 일상임. 비타민, 글루코사민, 오메가3 등 전 세계 기능식품 원료의 절반 이상이 중국에서 생산, 관련사업의 규모가 크다. 대다수 다국적 기업이 중국에 지사를 설립, 현재 가장 역동적인 모습을 보이고 있음

(라) 독일

- 프로바이오틱 음료수, 프로바이오틱 요구르트, 소화 촉진기능 식품, 콜레스테롤 수치를 낮춰주는 바이오 식품이 가장 많이 팔리고 있으며, 주요 소비자는 웰빙 및 건강을 중시하는 젊은 중산층이 대다수임

(마) 영국

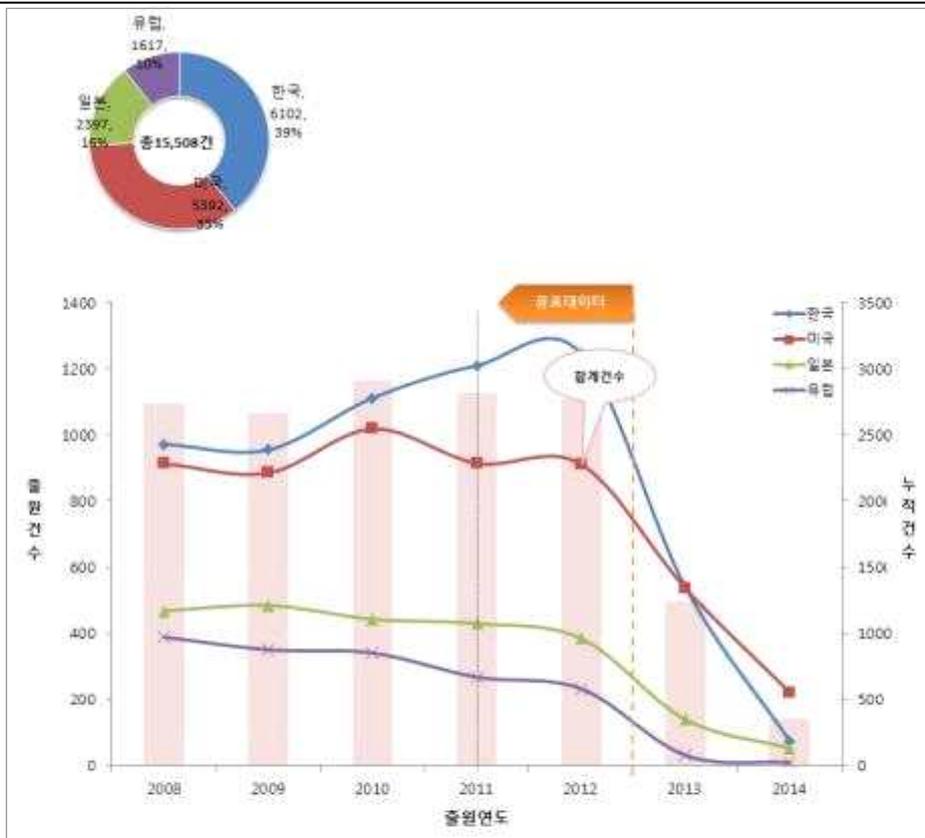
- 포장에 ‘자연’을 강조한 제품이 주류를 이루며, 아침식사 대용의 시리얼, 요거트, 유산균음료, 저지방 마가린 등에 주로 함유된다. 질병 및 건강 악화에 대한 소비자들의 걱정이 과다 약물복용 대신 기능성 식품으로 건강을 유지하는 방향으로 향하고 있음

○ 경쟁기관 현황

- 글로벌 화학기업들의 생명과학기업으로의 변신 2014년 매출 기준 글로벌 20대 화학기업 중에서 전문기업 9개사(석유화학 7사와 코팅 2사)를 제외하면, 종합화학기업 11개사 중 8개 기업이 생명과학사업에 참여하고 있으며, 생명과학매출 비중에서 농업 및 식품분야가 상당한 비중으로 차지하고 있음
- 해외에서는 이미 존슨앤존슨이 건강기능식품 자회사 맥닐 뉴트리셔널스를 통해 칼로리가 없는 인공감미료 ‘스플렌다(Splenda)’를 판매하고 있고, 로레알이나 시세이도 등은 ‘이네오브(Inneov)’, ‘콜라겐 EX’ 등의 브랜드를 통해 ‘먹는 화장품’ 시장에 진출해 있음

○ 지식재산권 현황

- 건강기능식품 소재화 기술에 대한 해외 특허는 1991년부터 최근까지 총 4,456건이며 2000년대 초반 이후 매년 300건 이상 출원되는 것으로 보아 꾸준히 성장을 하는 추세임
- 세계동향건강기능·고령친화식품의 대상특허 15,508건에 대한 각 국가의 연도별 출원동향을 살펴보면, 한국을 제외한 국가에서는 감소세를 보이고 있으며, 한국이 가장 많은 특허를 보유
- 출원규모에 있어서는 한국이 6,102(38%)로 높은 점유율을 나타내며, 이어서 미국이 5,392 (35%), 일본 2,397(16%), 유럽 1,617(10%)의 특허점유율을 기록



<건강기능·고령친화식품의 국가·연도별 출원동향>

○ 표준화 현황

- 기능성식품 시장은 건강증진, 질병예방의 중요성이 강조됨에 따라 향후 연평균 10% 수준으로 성장이 전망되는 미래 고성장 시장으로 선진국에서는 이미 기능성평가를 위한 기관을 설립하고 기능성식품 R&D를 활발하게 진행하고 있음
- 미국 기능성식품은 1994년 발효된 법에 의해 안전성·유효성 입증시험이 불필요했으며 특별한 제조기준도 적용되지 않았으나 납으로 오염된 제품을 비롯하여 함량 미달이거나 유효성분 미함유 제품, 불법 성분 제품들이 양산되는 결과를 낳았음
- FDA는 표준제조기준을 통해 이같은 잘못을 해소하기 위하여 완제품의 성분 보장과 미오염 상태를 입증하기 위한 품질관리 시험과 라벨 표시 양식도 소비자의 편의를 위해 개정하였음. 현재 적용중인 식품법과 일반의약품(OTC)법을 적절히 혼합하여 기능성식품법을 제정하였음
- FDA(Food and Drug Administration)는 2002년 이전에는 건강기능식품과 의약품의 시판후감시체계가 개별적으로 운영되다가, 2002년 이후 의약품, 의료기기, 건강기능식품을 포괄하여 부작용감시시스템인 메드와치(MedWatch)프로그램 으로 통합되었음. 부작용 증상의 기술방식은 홈페이지상에서 신고하는 온라인 쿼리와 종이보고 모두에서 부작용 증상을 빈칸에 텍스트 형식으로 기술하도록 하고 있으며, 유해사례의 중증도만을 선택하도록 하고 있다. 이렇게 수집된 부작용 증상을 MedDRA 분류체계를 이용하여 코딩함
- 네덜란드의 푸드밸리내 위치한 식품개발연구소인 니조(NIZO) 연구소는 건강부서(Health Department)를 두고

기능성식품관련 산업화 연구를 활발히 진행하고 있으며, 캐나다의 리차드슨(Richardson) 기능성식품 센터는 서부 식품자원을 경쟁력 있는 기능성식품으로 개발·지원하는 역할을 담당하고 있음

- 캐나다 MHPD(Marketed Health Products Directorate)에서는 2002년에 의약품, 생물학적 제제, 건강기능식품, 의료기기를 모두 통합하는 부작용감시(Health product vigilance)체계를 구축하였음. 캐나다는 온라인 형태의 보고는 받고 있지 않고, 메일, 팩스, 전화를 통하여 부작용신고를 받고 있음

1-3. 연구개발의 중요성

1. 최초의 염생식물 탈염 기술 개발

- 염생식물(halophyte)이란 바닷가, 염전 주위 등 염기가 있는곳에서 바닷물을 먹고 자라는 식물들로 대표적으로는 통통마디(*Salicornia europaea*), 나문재(*Suaeda aspragoides*), 칠면초(*Suaeda japonica*) 등이며 토양의 염분 농도가 높아 일반 육상식물이 자랄 수 없는 환경에서 생육하므로 염 스트레스(salt stress)를 이겨내는 대사활동을 하여 생체 내에 다양한 생리활성 및 소금성분을 함유함
- 염생식물의 생리활성으로는 항심혈관, 항고혈압, 항당뇨, 항산화, 항암, 항고지혈 및 면역 조절 기능 등 100여 편의 학술논문으로 발표될 정도로 다양한 기능성을 보유하고 있는 식물이지만 염분을 다량 함유하고 있으므로 이를 그대로 섭취하는 상품으로 제조하는 데에 제약이 있음
- 당사는 염생식물의 탈염에 성공하였으며 이 기술을 이용하여 탈염후 다양한 제품으로의 기술개발이 가능해짐

2. 기존 염생식물 제품과의 차별성

- 탈염하지 않은 제품의 섭취시 나트륨의 추가 섭취로 인한 피해 발생
 - 기존의 염생식물에서 염분을 제거하는 방식으로는 나트륨을 50% 이하로 탈염하는 것이 어려움
 - 탈염되지 않은 제품으로는 기능성 식품소재로의 개발이 어려웠지만 염생식물 탈염소재로는 다양한 제품으로의 개발이 용이해짐
- 탈염으로 인해 우수한 관능성 획득
 - 기존 제품들은 염생식물 특유의 짜고 비린맛으로 인해 관능성이 좋지 못해 제품화가 어려웠지만 염생식물 탈염소재(파이토밀, PhytoMeal)는 짠맛의 제거 뿐 아니라 좋은 맛과 향이 드러나 관능적으로도 우수해짐

3. 경제산업 및 사회문화적 측면에서의 필요성

- 한국은 세계에서 가장 빠르게 고령사회 (2019년) 및 초고령 사회 (2026년)로 진입하는 국가로서, 노인문제 관리를 위한 국민 부담이 가중되고 재정수지 악화를 초래하고 있음. 노인의 가장 큰 문제 중 하나인 기억과 인지기능저하로 인해 지출되는 비용은 보건 재정과 국가재정에 부담이 되므로 사회경제적 부담과 막대한 사회적 손실 비용을 초래함
- 2050년에는 전체 노인의 13.2%인 237만 명으로 확산되어 관리 및 지원금이 134조 6000억원이 소요

될 것으로 예상. 즉, 치매사회 도래를 경고하고 있음

- 미국 정부 지원 연구기관에서 발표한 바에 의하면, 현재 노령인구 확산 속도로 볼 때 500만 명에서 2050년에는 3배 가까이 (1380 만명) 늘어날 것이며, 이는 미국 1개 주 인구 전체 수에 예측되는 숫자임. 이를 미 정부는 “대유행 (epidemic)” 수준으로 경고
- 인구의 고령화 문제가 심각히 대두되면서 뇌혈관 질환 및 알츠하이머로 인한 사망률이 크게 증가함. 이러한 치매 질환은 인간의 삶의 질을 현저히 저하하는 질환으로 예방 및 치료가 어려운 질환 중 하나로 사회적 문제로 급부상중임



<2014 사망원인 : 통계청>

- 빠르게 고령화가 진행됨에 따라 퇴행성 뇌질환 연구의 필요성이 절실해 지는 시점에서 기초과학적으로 효능이 검증된 퇴행성 뇌질환을 예방/치료할 수 있는 산업화 소재 개발의 필요성이 대두되고 있음
- 한국은 삶의 질 향상 욕구의 향상과 더불어 기능성 식품의 중요성이 증대되고 있으며, 이에 부합하듯 2016년 기능성 식품 시장은 약 37억 달러의 규모를 나타냄
- 2014년 식품의약품 안전처에서 발표한 ‘건강기능식품 기능성 원료 인정 현황’에서 2004년부터 2013년까지의 기능성 인정 현황 자료를 보면 기억력 개선에 24종의 원료만이 인정이 되어 있으며, 생산현황에서도 아직 3%에 불과함



<개별인정형 세부품목별 생산현황 (출처: 식품의약품 안전처, '14년 식품의약품 산업 동향)>

- 또한 식약처장이 고시한 원료 또는 성분 (84종) 중, 대나무 잎 추출물의 수종의 항산화 및 혈중 콜레스테롤 개선에 도움이 되는 것으로 보고되었으며 아직 기억력 개선 소재 및 시장의 잠재성은 크다고 볼 수 있음
- 따라서 본 연구진은 염생식물 탈염소재의 추출물 및 지표·유효성분이 식약 소재로서 충분한 가치가 있다고 판단되며, 충분한 과학적 근거를 기반으로 하여 뇌손상 억제, 뇌혈류 개선, 기억력 개선의 기능성 원료로서 충분히 활용 가능할 것이라고 사료되므로 식품 소재를 개발하고 이를 수출전략 상품화하여 고부가가치 식품기술 개발을 실현하고자 함
 - 세계 유수의 글로벌 식품회사와 대형마트는 물론이고 각국의 학교, 병원, 군대 등의 단체, 그리고 건강을 중시하는 가정 등 모든 분야에 공급될 수 있을 것으로 기대됨
 - 그동안 Global 식품기업인 Nestle, PepsiCo, Unilever, Kraft Foods, General Mills, Tate and Lyle, McCormick, Gallia Blanca Star 등이 자사의 통통마디 제품에 꾸준히 관심을 가지고 샘플테스트를 요청하고 있음
 - 특히 글로벌 식품기업 ‘갈리나 블랑카 스타(Gallina Blanca Star)’와 자사의 통통마디 이용 제품의 공동연구를 제의하여 2014년 7월에 MOU를 체결하고 현재까지 공동 연구개발이 활발히 이뤄지고 있으며 연구 성과에 따라 대량 구매 및 투자 예정이 논의되고 있음
 - 본 연구개발 성과를 통해 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)를 상품화하여 국민 건강에 도움이 되며 경제산업 발전을 높이는 고부가가치 기술개발을 도모하고자 함

1-4. 연구개발의 창의성 및 혁신성

○ 창의성 및 혁신성

- 염생식물을 탈염하기 위한 기존의 방법으로는 전기투석법을 이용하거나(대한민국 등록특허 제 10-1218355호(적색 통통마디로부터 천연식용색소 베타시아닌의 제조 방법), 상온 이상이며 1% 이하의 염용액에 장시간 침지하는 방법(대한민국 등록특허 제10-1095619호(통통마디 저염화 방법 및 그 저장 방법) 등이 있음
 - 전기투석법은 이온성분을 용액으로부터 분리하는 공정으로 용액속의 이온성분이 전기장에 걸어준

전압에 의해 양이온 교환수지 막과 음이온 교환수지 막을 선택적으로 통과하여 일어나는 물질전달 원리에 이론적 기초를 두고 있는 방법으로 물성이 액상 외에는 어려운 점이 있으며, 전기 투석시 나트륨 염 외에 인체에 유용한 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 철분 등의 미네랄과 저분자의 다른 유용성분들이 함께 소실됨

- 장시간 상온 이상의 1%이하 염용액에 침지하는 것은 실온 이상의 고온에서 염 용액에 담궈 장기간 교반추출하기 때문에 함초 내 비수용성 식이섬유 외 대부분의 유기화합물이 소실되며 탈염의 효과도 50% 이하로 크지 않음

- 기존의 기술과 달리 저온(4°C 이하)의 냉수로 5분 미만의 짧은 시간에 교반하여 탈염하는 기술은 염생 식물에서 90% 이상의 탈염효과가 있음

- 이때 탈염된 염용액의 대부분은 염화나트륨으로, 염생식물이 갖고 있는 인체에 유익한 미네랄 성분인 칼륨, 칼슘, 철분, 마그네슘 및 플라보노이드, 폴리페놀, 클로로필, 사포닌 등은 그대로 남아 있는 것을 확인함

영양소	통통마디		나문재		칠면초	
	탈염전	탈염후	탈염전	탈염후	탈염전	탈염후
칼로리(Kcal/100g)	151.63	224.89	150.84	217.62	143.60	201.11
총 탄수화물(%)	37.98	74.44	39.41	73.18	32.25	67.20
단백질(%)	9.79	13.84	9.12	12.79	8.97	12.71
나트륨(%)	13.96	1.34	12.15	1.26	12.77	1.29
칼륨(%)	2.14	3.56	1.99	3.02	2.03	3.09
칼슘(%)	0.41	0.64	0.51	0.78	0.60	0.91
마그네슘(%)	0.74	0.99	0.63	0.81	1.02	1.33
철분(%)	0.007	0.012	0.012	0.020	0.061	0.077
총 폴리페놀(mg/g)	6.8	11.8	5.9	10.6	6.6	10.9
총 플라보노이드(mg/g)	3.3	5.8	2.5	5.0	3.4	5.3
총 클로로필(mg/g)	29.49	54.25	25.63	45.85	15.71	32.09
조 사포닌(mg/g)	16.65	21.08	14.58	19.67	17.08	24.54

<염생식물 탈염 전 후의 미네랄 및 유용성분 비교>

- 염생식물 탈염물은 탈염전의 함량이 비해 약 40~50% 증가된 영양성분 및 기능성 물질을 함유하고 있는 식량대체 소재 및 기능성 식품소재임.

2. 연구개발 목표

- 최종목표 : 엽생식물 탈염소재(PhytoMeal)를 이용한 뇌신경세포 보호, 인지기능 개선
기능성 식품 소재 및 식량 대체 소재 개발과 수출전략 제품화

<1차년도>

1. 주관연구기관 : 파이토코퍼레이션

- 엽생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 식품 소재 개발을 위한 공정 개발
- 엽생식물 탈염소재로부터 뇌혈관 기능개선 물질의 분획
- 엽생식물 탈염소재의 유효활성 분획물로부터 지표물질 분석 및 인지기능 개별인정 경쟁소재와의 유효성검증 비교 평가(in vitro)

2. 협동연구기관 : 건국대학교글로벌산학협력단

- 주관기관으로부터 제공받은 엽생식물 탈염소재의 활성 유효 성분으로부터 신경교세포실험을 통한 기능성 및 독성 검증

<2차년도>

1. 주관연구기관 : 파이토코퍼레이션

- 뇌혈류 개선 및 뇌기능 보호 지표성분 추출 및 정제공정의 표준화
- 엽생식물 탈염소재의 효소 가수 분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화
- 임상시험을 위한 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작
- 인체적용시험수탁기관(Contract Research Organization, CRO)을 활용하여 임상시험 시작 전 인체적용 시험 프로토콜 제작 및 제반마련

2. 협동연구기관 : 건국대학교글로벌산학협력단

- 동물실험을 통한 통통마디 추출물의 인지기능(기억력) 개선 기능성 확인

<3차년도>

1. 주관연구기관 : 파이토코퍼레이션

- 기능성 지표물질의 표준화 공정 확립
- 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성을 갖는 엽생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 기능성 식품 소재 제품화 및 수출전략 상품화
- 인체적용시험수탁기관을 활용하여 인체적용시험 통계처리 및 결과 도출

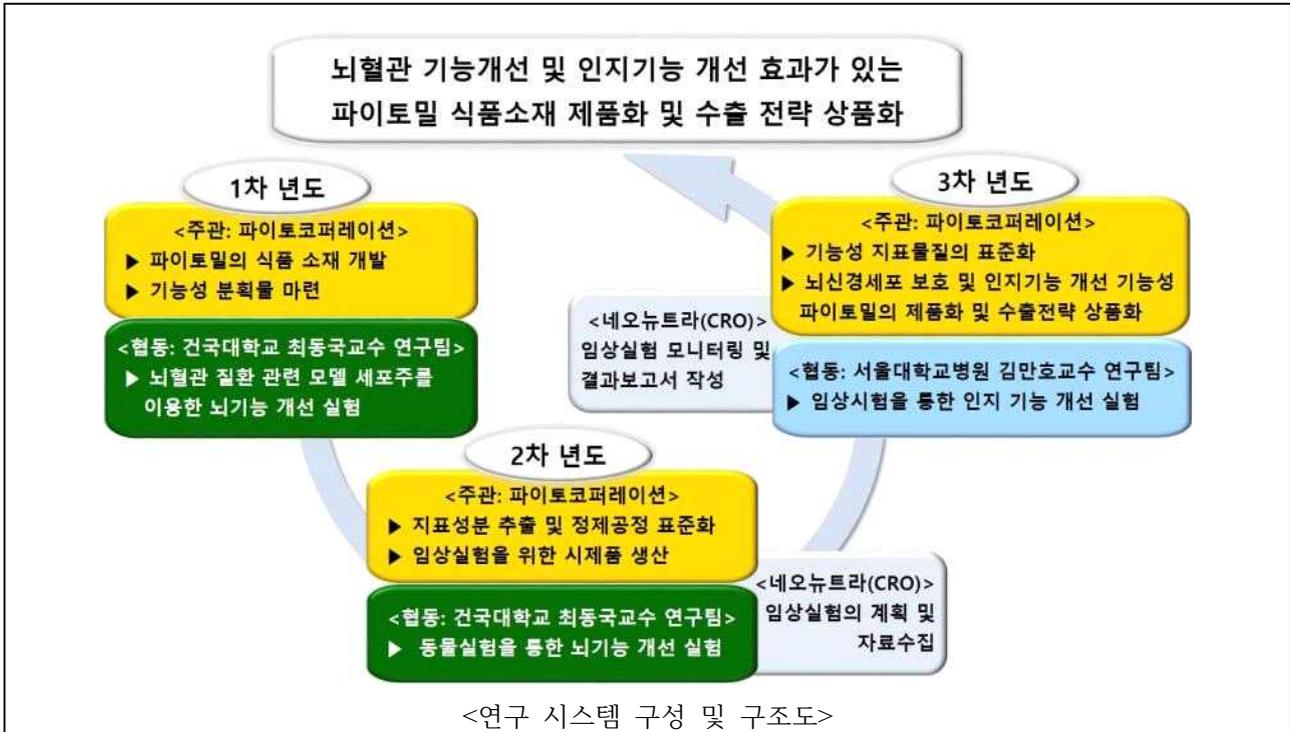
2. 협동연구기관 : 서울대학교병원

- 임상시험을 통한 엽생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 기억력 및 인지기능 개선 기능성 검증

2-1. 연구개발의 세부목표 및 범위

구분	내용
세부목표	<p><1차년도></p> <p>1. 주관연구기관 : 파이토코퍼레이션</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 식품 소재 개발을 위한 공정 개발 ○ 염생식물 탈염소재로부터 뇌혈관 기능개선 물질의 분획 ○ 염생식물 탈염소재의 유효활성 분획물로부터 지표물질 분석 및 인지기능 개별인정 경쟁소재와의 유효성검증 비교 평가(in vitro) <p>2. 협동연구기관 : 건국대학교 글로컬 산학협력단</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 주관기관으로부터 제공받은 염생식물 탈염소재의 활성 유효 성분으로부터 신경교세포 실험을 통한 기능성 및 독성 검증 <p><2차년도></p> <p>1. 주관연구기관 : 파이토코퍼레이션</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 뇌혈류 개선 및 뇌기능 보호 지표성분 추출 및 정제공정의 표준화 ○ 염생식물 탈염소재의 효소 가수 분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화 ○ 임상시험을 위한 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작 ○ 인체적용시험수탁기관(Contract Research Organization, CRO)을 활용하여 임상시험 시작 전 인체적용시험 프로토콜 제작 및 제반마련 <p>2. 협동연구기관 : 건국대학교 글로컬 산학협력단</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험을 통한 통통마디 추출물의 인지기능(기억력) 개선 기능성 확인 <p><3차년도></p> <p>1. 주관연구기관 : 파이토코퍼레이션</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 지표물질의 표준화 공정 확립 ○ 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성을 갖는 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 기능성 식품 소재 제품화 및 수출전략 상품화 ○ 인체적용시험수탁기관을 활용하여 인체적용시험 통계처리 및 결과 도출 <p>2. 협동연구기관 : 서울대학교병원</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 임상시험을 통한 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 기억력 및 인지기능 개선 기능성 검증

2-2. 연차별 개발목표 및 내용



<각 기관의 연구분야 및 연구자의 역량>

기관명	구분	연구역량
파이토코퍼레이션	주관연구기관	식품소재 개발 및 제품화, 기능성 지표 물질 단리 및 동정, 표준화
건국대학교 글로컬 산학협력단	1차년도 협동기관, 2차년도 협동기관	뇌신경 및 신경교세포 세포주 실험 및 동물모델 실험
서울대학교병원	3차년도 협동기관	치매환자의 인지기능 개선 임상시험
네오뉴트라	인체적용시험수탁 기관(CRO)	임상시험 전략 계획, 모니터링, 통계 및 결과 보고서 작성

가. 1차년도

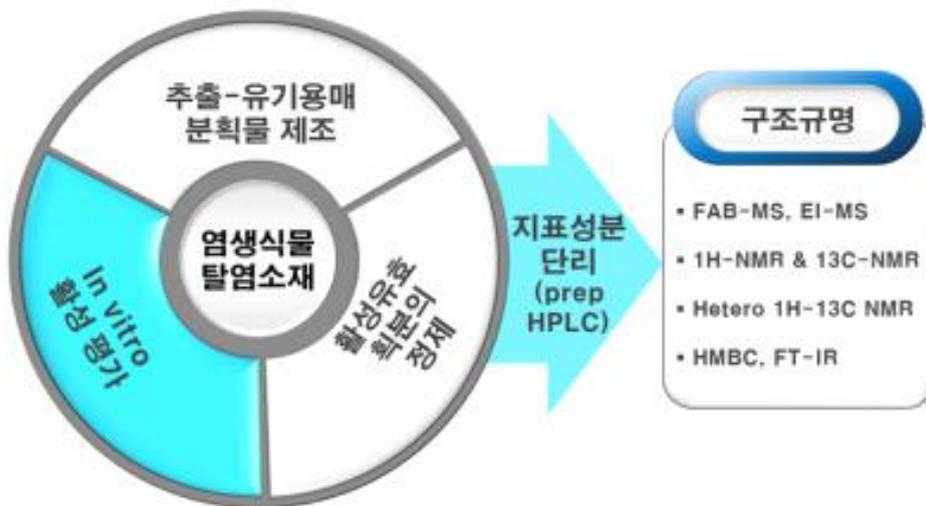
① 개발 목표

- **주관연구기관 (파이토코퍼레이션)** : 새로운 탈염방법에 의해 탈염된 염생식물 탈염소재 (PhytoMeal)의 식품소재 개발을 위한 공정 개발 및 염생식물 탈염소재로부터 뇌혈관 기능 개선 관련 *in vitro* 활성 평가 및 유효활성 지표물질의 분리 및 동정
- **협동연구기관 (건국대학교 글로컬 산학협력단)** : 신경염증 및 신경세포사 억제 기전 분석을 통한 염생식물 탈염소재의 신경손상 억제 및 인지기능 개선 효능 평가

② 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관 (파이토펜리션) : 염생식물 탈염소재의 식품 소재 개발 및 지표물질 분석

- 염생식물 탈염소재를 식품소재로 개발하기 위한 공정 개발 및 개선
 - 원료의 표준화를 위한 염생식물 수확시기 및 건조 조건 확립
 - 염생식물 탈염소재의 탈염 시간 및 탈염시 사용되는 물의 온도에 따른 영양성분 분석
 - 식품소재로 이용하기 위한 최적의 온도, 시간, 건조 조건 등의 탈염 조건 확립
 - 탈염 공정의 개선
- 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 뇌혈관 기능개선 관련 유효 물질의 분획 및 지표물질 분석
 - 뇌혈관 혈류 개선을 위한 항혈전(anti-thrombous) 활성능 분석
 - Acetylcholine esterase 저해활성 분석
 - 유효활성 성분의 추출공정 확립
 - 유효활성 획분으로부터 지표물질의 정제
 - 활성 지표물질의 단리 및 구조규명을 위한 기기분석



○ 협동연구기관 (건국대학교 글로컬 산학협력단) : 기 확립된 뇌신경세포주를 이용하여 염생식물 탈염소재 추출물 및 지표·유효성분의 신경 염증 / 세포사 억제 활성 기작 확인

- 주관연구기관으로부터 제공받은 염생식물 탈염소재 분획물을 뇌신경세포주를 통한 효능 분석 진행
 - 신경염증 모델인 BV-2 신경교세포를 이용하여 감소된 일산화질소의 양을 Griess 방법을 통하여 정량적인 분석
 - 신경세포사 모델인 N27 또는 SH-SY5Y 신경세포 모델계를 이용하여 세포생존에 효능을 MTT 방법을 통하여 정량적인 분석
 - 최종 염생식물 분획물로부터 분리된 지표성분의 효능분석 및 기전 분석

- 염생식물 탈염소재 추출물 소재의 기능성 확인
 - 신경염증 모델인 BV-2 신경교세포를 이용하여 염증반응 유도 후, 염생식물 탈염소재 추출물의 신경염증 억제 효능 확인 및 기전 분석
 - 신경세포사 모델인 N27 또는 SH-SY5Y 신경세포 모델계를 이용한 염생식물 탈염소재 추출물의 신경세포사 억제 효능 확인 및 기전 분석
 - 신경염증 및 신경세포사 억제 기전 분석을 통한 염생식물 탈염소재의 기능성 강화
- 대표적인 인지기능(기억력)손상 실험동물 모델로서 스코폴라민을 이용한 실험동물모델 실험
 - 스코폴라민 동물모델의 인지기능 (기억력)손상 기전은 ROS 증가로 인한 신경교세포의 활성이 중요한 기전이므로 통통마디 추출물 또는 지표물질의 항산화 및 항염증 활성이 가장 좋은 물질을 리드 물질로 in vitro 실험을 진행
 - 통통마디 추출물 또는 지표물질의 ROS Signaling 저해 여부를 DPPH 소거능 등을 통하여 추가 확인
 - 통통마디 추출물 또는 지표물질의 항염증 효능 확인은 in vitro 모델인 BV2 신경 교세포를 통하여 신경염증 바이오마커인 (iNOS, COX-2) 또는 억제 기전 (MAPKs, NFkB) 분석

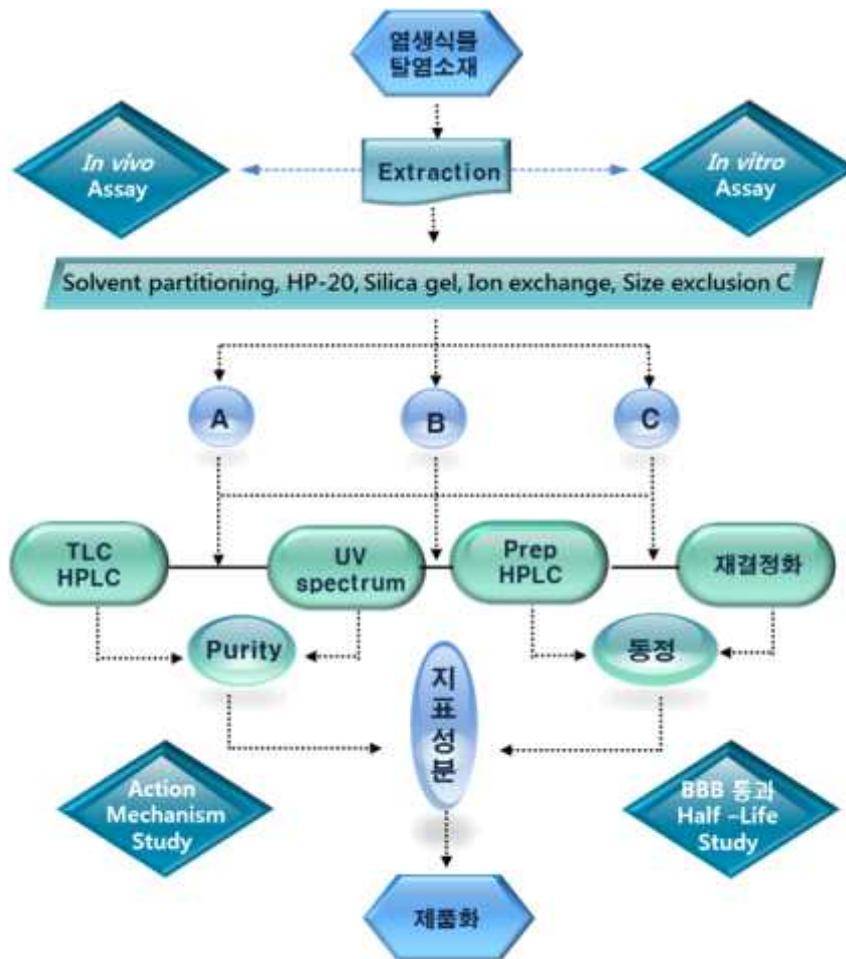
나. 2차년도

① 개발 목표

- **주관연구기관 (파이토코퍼레이션)** : 뇌혈류 개선 및 뇌세포 보호 효능 기능성 지표물질의 추출 및 정제공정의 표준화와 임상시험을 위한 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작. 인체적용시험 전 인체적용시험수탁기관(CRO)을 활용하여 사전 제반 마련
- **협동연구기관 (건국대학교 글로벌 산학협력단)** : 동물실험을 통한 염생식물 탈염소재의 뇌세포 보호 기능성 및 안전성 검증

② 개발 내용 및 범위

- **주관연구기관 (파이토코퍼레이션)** : 뇌혈류 개선 및 뇌기능보호 지표성분 추출 및 정제공정 표준화 및 임상시험을 위한 시제품의 제작
 - 염생식물 탈염소재의 유효활성 획분으로부터 지표물질의 정제공정 표준화
 - 조추출물, 조정제 획분에서의 지표성분 추출 및 정제공정 확립
 - 유효 활성획분내 지표성분의 정성 및 정량 분석
 - 지표성분 함량 예측을 위한 2차 지표성분의 분석
 - 지표성분의 뇌신경세포보호(항염증) 활성 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성 성분을 각각 선정할 예정임
 - 지표성분의 정성 및 정량은 HPLC 분석 및 UV스펙트럼 분석을 통하여 실시
 - 염생식물 탈염소재의 효소 가수분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화
 - 식물체 가수분해 효소인 pectinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, α-amylase, exopeptidase, endopeptidase의 단일 또는 복합 효소작용에 의한 최적 효소 조합 확립



- 선정된 효소들의 가수분해조건 최적조건(pH, 온도, 가수분해 시간, shaking 속도 등) 확립
- 가수분해 전후 추출물의 항혈전, 항산화, 아세틸콜린 저해활성 비교
- 가수분해 전후의 유효 생리활성 성분의 비교 정량분석
 - a) 총폴리페놀 함량 비교분석
 - b) 총플라보노이드 함량 비교분석
 - c) 총알칼로이드 함량 비교 분석
 - d) 총사포닌 함량 비교 분석
- 염생식물 탈염소재에 확보된 항혈전, 항염증, 뇌신경세포보호, 아세틸콜린에스터라제 저해효능이 우수한 각각의 획분을 혼합 또는 GABA, EPA, DHA, lycopene, rasvertriol, curcumin, 기타 수용성 비타민 류 등의 뇌혈류개선 도움 물질로 알려진 물질의 조합을 통해 플러스 제품으로 개발
- 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작
 - 기능성 식품 개발을 위한 제품 배합비 및 제형 검토
 - 인체적용시험을 위한 인지능력개선 복합 기능성 식품 시제품 완성
 - 통통마디 탈염소재 열수(또는 발효주정) 추출물을 파이토밀에 첨가하여 임상시험 시제품 제작
- 인체적용시험수탁기관(CRO) 선정 및 전략 수립
 - IRB(임상시험심사위원회, Institutional Review Board) 승인 신청을 IB 작성
 - 대상자 모집(약 60명 예상) 방안 등 제반 준비
 - 인체적용시험 식품 제작 용량 등의 확인
 - 인체적용시험 개시 모임

- **협동연구기관 (건국대학교 글로컬 산학협력단)** : 기 확립된 퇴행성 신경변성질환 동물 모델계를 이용한 염생식물 탈염소재 추출물 및 지표·유효성분의 신경손상 억제 / 인지기능개선 효능 확인 및 안전성 검증
 - 실험동물모델 (*in vivo*)을 이용한 통통마디 추출물 및 유효물질의 신경손상억제(신경염증) 효능 확인
 - 기 확립된 Scopolamine을 이용한 인지기능(기억력) 이상 유발 동물 모델을 통한 통통마디 추출물 및 유효성분의 효능을 Y-maze test 및 수동회피 행동분석을 진행하여 확인
 - ROS Signaling는 신경손상 (신경염증) 및 인지기능손상에 관여함. 통통마디 추출물 또는 지표물질의 ROS Signaling 저해 여부를 DPPH 소거능 등을 추가 확인
 - 또한 스크폴라민 동물모델에서 기억력을 담당하는 해마를 적출하여 신경교세포의 활성을 Iba-1, Mac-1, iNOS 등을 통하여 확인
 - 경쟁소재 대비 통통마디 추출물의 인지기능 손상 억제력을 확인하기 위해 양성대조군으로 주관기관에서 1차년도에 테스트한 아세틸콜린 저해 활성 결과를 바탕으로 당귀(또는 원지) 추출물을 사용하여 실험
 - 기 확립된 신경독소 실험동물 모델을 이용하여, 통통마디 추출물 및 유효물질의 효능 검증을 행동분석 및 바이오마커의 발현변화를 western blot을 활용하여 분석
 - Y-maze test 및 수동회피 행동분석에서 통통마디 탈염소재 추출물의 인지기능손상 억제력에 대한 유효성 평가는 동물의 n수를 추가하여 실험
 - 동물실험을 이용한 통통마디 소재 유래 유효성분의 뇌혈관장벽(BBB) 통과여부 분석
 - 통통마디 추출물 및 지표성분이 뇌 안으로의 투입여부를 확인하며, 체내로 유입되어 분해되는 반감기를 HPLC-MS 분석
 - 협동기관에서는 주관기관에서 제공한 시료를 동물에 투여하여 샘플을 제공하며, 주관기관에서 HPLC-MS 기기를 사용하여 분석
 - 인지기능(기억력) 개별인정된 물질로서 시판되고 있는 당귀, 원지 추출물과 통통마디 추출물을 신경 전달 물질인 아세틸콜린의 분해 효소인 아세틸콜린 에스터라아제의 저해 효능 (acetylcholinesterase inhibition assay) 비교 실험한 선행연구 결과로부터 기존 소재와의 경쟁력을 확인
 - 인지기능(기억력) 동물실험시 비교 물질로서 당귀(또는 원지) 추출물을 사용하여 통통마디 추출물과 비교함으로써 통통마디 탈염소재의 기능성 확인 및 기전 분석을 통해, 기존의 소재와의 차별적 경쟁력 확보

다. 3차년도

① 개발 목표

- **주관연구기관 (파이토코퍼레이션)** : 기능성 지표물질의 표준화 공정 설정 및 염생식물 탈염소재의 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품 소재의 제품화와 수출전략 상품화. 인체적용시험수탁기관(CRO)을 활용하여 인체적용시험 모니터링 및 결과 보고서 작성
- **협동연구기관 (서울대학교병원)** : 인체 대상 임상시험을 통한 염생식물 탈염소재의 인지기능 개선 기능성 검증

② 개발 내용 및 범위

○ **주관연구기관 (파이토코퍼레이션)** : 기능성 지표성분의 표준화 공정 확립 및 고부가가치 기능성 PhytoMeal(염생식물 탈염소재)의 제품화와 수출 전략 상품화. 인체적용시험수탁기관(CRO)에 의한 임상시험 추진 및 결과보고서 작성

- 기능성 지표성분의 표준화 공정 설정
 - 지표성분 극대화를 위한 대량 추출 공정 확립
 - 지표성분 극대화를 위한 정제 공정 및 순도 검사 확립
 - 시제품 내 지표성분의 정량분석 표준화
 - 추출물, 시제품 내 지표성분의 안정성 확인
- 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성을 갖는 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 기능성 식품 소재 제품화 및 수출 전략 상품화
 - 염생식물 탈염소재에 대한 기능성 평가 및 안전성 테스트를 통한 소비자 안심 제품 개발
 - 기능성 지표물질의 규명을 통한 효능 지표를 활용한 마케팅
 - 미국 수출 및 샘플 테스트를 위한 FDA 식품제조시설 인증 추진
 - 해외 IR 미팅을 통한 개발 제품 소개 및 시리즈 B 투자 유치 추진
 - 해외 글로벌 식품기업으로부터 개발제품 대량 생산시 LOI 확보
- 인체적용시험수탁기관(CRO)에 의한 임상시험 추진, 진행, 통계처리 및 결과 보고서 작성
 - 인체적용시험 모니터링
 - DB구축 및 코딩
 - 통계분석 및 표/그림 제작 및 결과보고서 작성
 - 연구자 고찰을 첨부한 결과보고서의 작성
 - IRB 승인 취득
- 파이토밀 소재의 기억력 및 인지능력 향상 기능성 개별인정 신청

○ **협동연구기관 (서울대학교병원)** : 임상시험을 통한 염생식물 탈염소재의 기억력 및 인지기능 개선 효과 검증

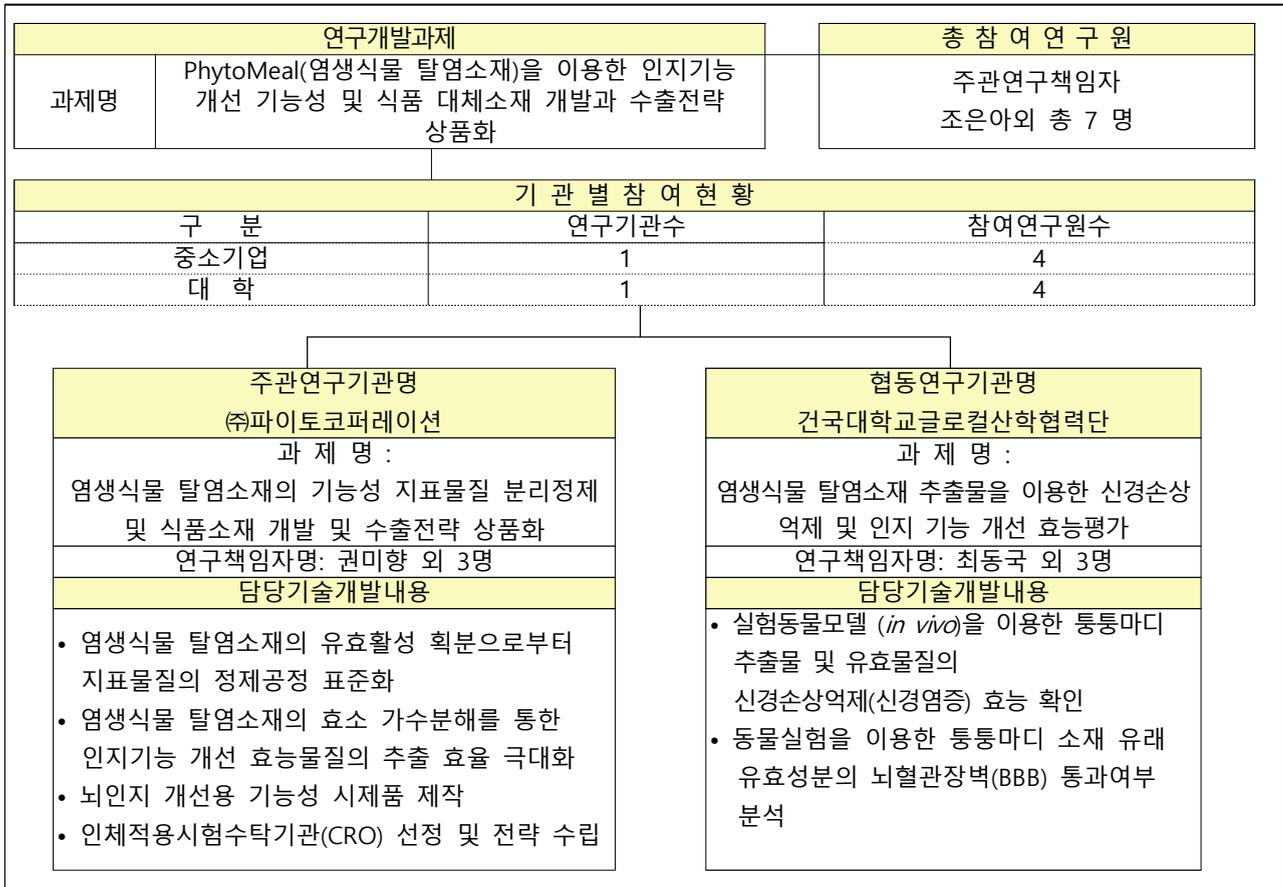
- 임상시험을 통한 염생식물 탈염소재의 기억력 및 인지기능 개선 기능성 검증
 - CRF form(Case Report Form, 증례 기록지) 작성
 - 투약 및 관찰
 - 신경심리검사 및 Lab test
 - 최종보고서 작성
 - 논문 작성

2-3. 연구개발 추진체계 및 일정

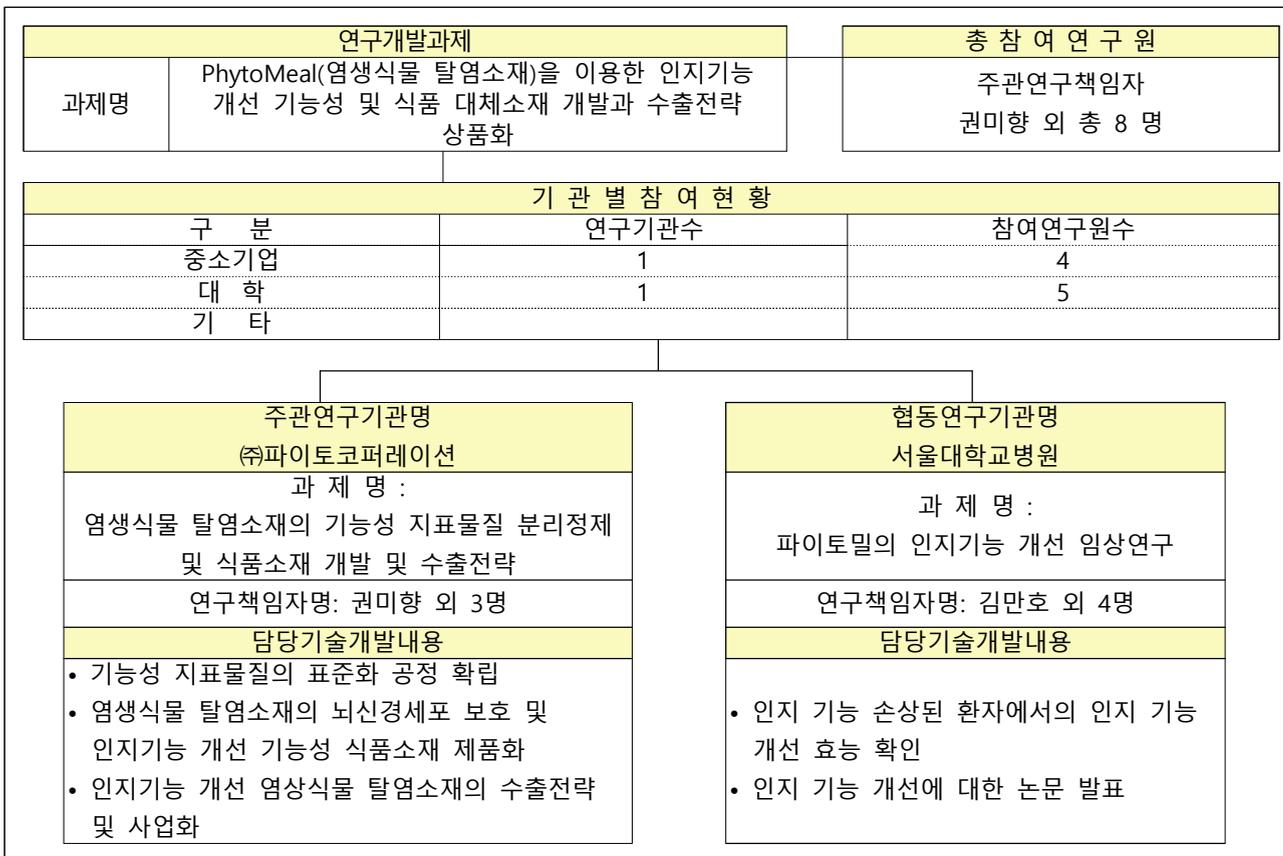
1) 1차년도 추진체계



2) 2차년도 추진체계



3) 3차년도 연구개발 추진체계



[과제 추진일정]

1차년도 (2016.07 ~ 2016.12)															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	저온 냉수추출 기술에 의한 엽생식물 탈염공정 확립													10,000	조은아(파이토코퍼레이션)
2	엽생식물 탈염소재를 이용한 식품소재 개발													20,000	조은아(파이토코퍼레이션)
3	엽생식물 탈염소재의 기능성 분리 및 시료 제공													30,000	조은아(파이토코퍼레이션)
4	기능성 분획물의 항염전 활성 성분의 분획 및 정제													20,000	조은아(파이토코퍼레이션)
5	세포실험을 통한 탈염 통통마디 추출물 소재 기능성 분석 및 타겟 제공													10,000	최동국(건국대학교글로벌산학협력단)
6	세포실험을 통한 통통마디의 신경염증 억제 효능 분석													10,000	최동국(건국대학교글로벌산학협력단)
7	세포실험을 통한 통통마디의 신경세포사 억제 효능 확인(MTT)													20,000	최동국(건국대학교글로벌산학협력단)
2차년도 (2017.01 ~ 2017.12)															
1	뇌인지기능 및 기억력개선 기능성성분 분리, 규명 및 정제공정 표준화													40,000	권미향(파이토코퍼레이션)
2	임상시험을 위한 뇌인지 기능 개선용 시제품 제작													45,000	권미향(파이토코퍼레이션)
3	CRO를 활용하여 임상시험 시작 전 인체적용시험계획서 및 IB 작성													35,000	권미향(파이토코퍼레이션)
4	신경독소 실험동물 모델을 이용하여, 통통마디 추출물 및 유효성분의 효능 확인													35,000	최동국(건국대학교글로벌산학협력단)
5	인지기능(기억력) 스크폴라민 동물 모델을 사용하여, 통통마디 추출물의 효능 확인													35,000	최동국(건국대학교글로벌산학협력단)

3차년도 (2018.01 ~ 2018.12)

1	지표성분 선정, 자사시험법 확립, 규격설정, 위해성분, 영양성분 분석																	20,000	권미향(파이토코퍼레이션)
2	염생식물 탈염소재의 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품소재 제품화 및 수출전략 사업화																	40,000	권미향(파이토코퍼레이션)
3	CRO를 통한 임상시험 진행 및 통계처리 등의 결과 작성 및 기능성개별인정 신청 자료 작성																	30,000	권미향(파이토코퍼레이션)
4	임상시험 대상자 모집 및 IRB승인, CRF form 작성																	10,000	김만호(서울대학교병원)
5	파이토밀 투약 및 신경심리검사, Lab test, sample test																	80,000	김만호(서울대학교병원)
6	최종보고서 작성 및 논문작성																	10,000	김만호(서울대학교병원)

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1. 주관 파이토코퍼레이션 수행 연구개발 내용 및 방법

가. 주관 파이토코퍼레이션 수행 주요 연구내용

- 1) 저온 냉수추출 기술에 의한 염생식물 탈염공정 확립
- 2) 통통마디 탈염소재를 이용한 식품소재 “파이토밀(PhytoMeal)” 개발
- 3) 통통마디 탈염소재인 “파이토밀(PhytoMeal)” 추출물의 항혈전 활성 및 뇌신경세포 보호 기능성 분획물의 분리 및 전임상용 시료 제공4
- 4) 통통마디 탈염소재인 “파이토밀(PhytoMeal)”로부터 기능성 분획물의 항혈전 활성 성분의 분리 및 정제, 구조 규명
- 5) 통통마디 탈염소재인 “파이토밀(PhytoMeal)”로부터 인지기능개선 소재의 추출 효율 극대화 및 제조공정 표준화 확립
- 6) 통통마디 탈염소재인 “파이토밀(PhytoMeal)”의 주정추출물(PM-EE)로부터 뇌인지기능 및 기억력 개선 기능성성분 분리, 규명 및 정제공정 표준화
- 7) 통통마디 탈염소재 추출물(PM-EE) 지표성분의 선정, 자사시험법 확립, 규격설정, 위해성분, 영양 성분 분석
- 8) 통통마디 탈염소재인 “파이토밀(PhytoMeal)” 주정추출물(PM-EE)의 임상시험을 위한 뇌인지 기능 개선용 시제품 제작
- 9) 통통마디 탈염소재 추출물(PM-EE)의 임상시험을 위한 CRO를 활용하여 임상시험 시작 전 IB 및 인체적용시험계획서 작성 및 IRB 승인
- 10) 염생식물 탈염소재의 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품소재를 활용한 제품화 및 수출전략 사업화
- 11) CRO를 통한 임상시험 진행 및 통계처리 등의 결과 작성 및 기능성개별인정 신청 자료 작성

나. 주요 연구수행 방법

나-1. 실험재료

1) 통통마디

- ‘통통마디’는 식약처 식품공전에 명시된 식이가능한 식품 원료이며 건강기능성 식품원료로 개발이 가능함. 통통마디(*Salicornia europaea*)는 유럽 식품안전위원회(EC Food & Safety)에서 규정하는 Novel food의 카테고리에서 안전한 식품 등급인 그린레벨로써 유럽에서도 널리 섭취되어 온 일반 식품재료임. 본 과제의 실험 원재료인 통통마디는 전라남도 신안군 (주)다사랑에서 전량 구매하여 실험에 사용하였으며, 구입한 통통마디는 잎이 붉게 물들고 개화하기 이전, 생육이 완성된 시점인 8월 말부터 9월 중순 경에 뿌리부분을 남기고 지상부(잎과 줄기)만을 수확하여 흐르는 물로 깨끗이 세척하고, -40°C이하에서 동결하고 진공상태에서 동결건조 함.

나-2. 실험방법

1) 통통마디 동결 및 열풍건조

- 통통마디의 건조는 동결건조와 열풍건조 2가지 방법으로 실시하였다. 동결건조는 통통마디 세척

후 -80°C deep freezer(DTF-35, NIHON Freezer Co. Ltd, Tokyo, Japan)에서 동결 후 동결건조기(FDU-2200, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 실시하였다. 열풍건조는 통통마디 세척 후 열풍건조기(TG 200, Retsch, Hann, Germany)를 이용하여 80°C, blow 30에서 3시간 동안 실시하였다. 열풍건조의 경우 통통마디의 갈변반응을 방지하기 위해 건조하기 전 별도의 열처리를 통해 효소를 불활성화시키는 과정을 실시하였다. 열처리 방법으로는 끓는물 증기처리, 고온열풍처리를 이용하였고, 각각 시간을 달리하여 실시하였다.

2) 통통마디 건조물의 분쇄 및 탈염

- 건조한 통통마디는 cutting mill(SM 100, Retsch, Hann, Germany)을 이용하여 분쇄하였고, 0.25 mm의 sieve를 사용하였다. 탈염은 통통마디 건조분말 100 g에 각각 2 L의 냉수(4°C, 9°C)와 실온수(20°C), 열수(100°C)를 첨가하여 실시하였다. 이때 냉수와 실온수의 경우 자석 교반기(MS-17B, JEIO TECH, Daejeon, Korea)를 이용하고, 열수의 경우 환류추출기(WHM12037, DAIHAN Scientific, Wonju, Korea)를 이용하였다. 5분 간격으로 원심분리기(1736R, Gyrogene, Daejeon, Korea)를 이용하여 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)한 뒤 각각 상등액과 탈염된 침전물을 비교하였다. 이를 통해 탈염 최적 조건을 찾고 통통마디 건조물의 탈염을 실시하였다.

3) 염도 및 °Brix 측정

- 통통마디 건조물의 탈염과정에서 발생한 추출물은 염도와 °brix를 측정하였다. 염도는 digital salt meter(ATAGO ES-421, ATAGO Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 %로 나타내고, °brix는 pocket refractometer(ATAGO PAL-1, ATAGO Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 나타내었다. 또한 추출물을 감압농축기(N-1100, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축한 뒤 동결건조를 실시하여 총고형분 함량을 측정하였다.

4) 통통마디 탈염물의 분말화

- 통통마디 탈염물은 열풍건조하여 cyclone이 달린 ultra centrifugal mill(ZM 200, Retsch, Hann, Germany)을 이용하여 분쇄하였고, 0.25 mm의 sieve를 사용하였다.

5) 색도측정

- 통통마디 건조물의 탈염 전후 색도는 색차계(CR-400, Konica minolta, Osaka, Japan)를 사용하여 측정하였고, L*, a*, b*값으로 나타내었다.

6) 나트륨 함량 측정

- 통통마디 건조물 탈염 전 후 분말의 나트륨 함량 분석을 실시하였다. 나트륨 함량 측정은 초음파 및 가온 추출을 통한 시료의 전처리 후 Ion Chromatography(IC, ICS-3000, Dionex, Sunnyvale, California, USA)법을 이용하여 분석하였고, 서울대학교 농생명과학 공동기기원(National Instrumentation Center for Environmental Management College of Agriculture and Life Sciences, NICEM, Seoul National University)을 통해 실시하였다.

7) 영양성분 및 생리활성성분 조성

- 통통마디 건조물 탈염 전후 분말의 영양성분 조성을 분석하였다. 일반성분 분석은 식품공전상의 일반 시험법을 이용하였고, 한국기능식품연구원(Korea Health Supplement Association, Bundang-gu, Gyeonggi-do, Korea)을 통해 실시하였다. 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 철분, 칼슘은 질산을 이용하여 산분해하는 습식분석법을 실시한 후 Inductively coupled plasma spectrometry(ICP)를 이용하였다.

- 총 폴리페놀 함량은 Folin-Danis법(19)을 변형하여 96-well microplate에서 실시하였다. 통통마디 건조물의 탈염 전후 분말을 70% 메탄올로 추출·건조하여 다양한 농도로 증류수에 녹인 시료액 20 µL에 250 µL의 2% sodium carbonate을 혼합하고, 15 µL의 50% Folin-ciocalteau(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 가하여 실온에서 30분 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 Microreader기(xMark, Bio-RAD, Hercules, California, USA)로 측정하였다. 표준시약으로 0~500 µg/mL의 tannic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 시료 대신 반응시켜 얻은 검량곡선으로부터 추출시료에 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.
- 총 플라보노이드 함량은 Abdel-Hameed법(20)을 변형하여 96-well microplate에서 실시하였다. 통통마디 건조물의 탈염 전후 분말을 70% 메탄올로 추출·건조하여 다양한 농도로 증류수에 녹인 시료액 30 µL에 90% diethylene glycol 200 µL를 첨가하고 다시 1 N NaOH 5 µL를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 Microreader기를 이용하여 측정하였다. 표준시약으로는 0~500 µg/mL의 rutin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 시료대신 반응시켜 얻은 검량곡선으로부터 추출시료에 함유되어 있는 총 플라보노이드함량을 계산하였다.
- 총 클로로필은 통통마디 건조물의 탈염 전후 분말 1 g을 80% 아세톤 50 mL로 실온에서 색깔이 없어 질 때까지 추출하여 상등액을 분리하고, 645 nm와 663 nm에서 각각의 Optical density(OD)를 측정 한 후, 다음의 계산식에 따라 chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll 함량을 구하였다.

$$\text{chlorophyll a (mg/mL)} = 12.72\text{OD}_{663} - 2.58\text{OD}_{645}$$

$$\text{chlorophyll b (mg/mL)} = 25.88\text{OD}_{645} - 5.50\text{OD}_{663}$$

$$\text{Total chlorophyll (mg/mL)} = 7.22\text{OD}_{663} + 20.3\text{OD}_{645}$$

8) 통통마디 추출물의 기능성 평가

- 통통마디 탈염 전후 분말 각각 100 g에 증류수 2 L를 가하고, 100°C에서 2시간 동안 환류냉각 추출을 실시한 후 원심분리, 감압여과 및 감압농축을 한 후, 동결건조하여 각각 탈염 전후 통통마디의 열수 추출물을 조제하였다. 각각의 열수추출물에 대한 기능성 평가를 위하여 항산화, 항고혈압 및 항당뇨 활성을 비교 측정하였다. 항산화 활성은 DPPH radical 소거활성으로 Chen 등(21)의 방법에 준하여 측정하였다. 96-well microplate에 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액(4 mg/50 mL 에탄올) 180 µL를 가하고 시료를 25, 50 및 100 µg/mL의 농도로 20 µL를 첨가하여 5초 동안 혼합한 후 20분 동안 실온에서 반응시켰다. 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 가하지 않은 대조군에 대한 흡광도 감소치를 DPPH radical 소거활성(%)으로 나타내었다. 항산화 활성의 양성대조군으로 아스코르브산(ascorbic acid, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 농도별 (1, 10, 250, 100 µg/mL)로 실험하여 IC₅₀ 값을 구하여 비교하였다.
- 항고혈압활성은 Cushman과 Cheung(22)의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 Angiotensin I Converting Enzyme(ACE) 저해활성을 측정하였다. 0.3 M NaCl를 함유하는 0.1 M sodium borate buffer 10 mL에 Rabbit lung acetone powder(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1 g을 넣어 추출한 ACE 상등액(2.5 unit) 25 µL와 0.3 M NaCl를 함유하는 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 50 µL, 다양한 농도 (0.25, 0.5 및 1 mg/mL)의 시료 용액 25 µL을 혼합하여 37°C 온도 하에서 10분간 preincubation 시켰다. 기질로서 Hip-His-Leu 용액을 이용하였으며, 같은 온도 하에 30분간 반응시킨 후 1 N HCl로 반응을 정지시키고, ethyl acetate 1 mL를 가하여 1분간 추출하고 원심분리하여 분리된 에틸아세테이트 상등액 0.8 mL를 취하였다. 이 상등액은 후드 내에서 가온하면서 완전히 휘발시킨 뒤 동일조건의 sodium borate buffer 1 mL에 용해시키고, 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성(%)을 나타내었다. 항고혈압활성의 양성대조군으로 캡토프릴(captopril, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 농도별 (1, 10, 250, 100 µg/mL)로 동일한 조건에서 실험하여 IC₅₀ 값을 구하여 비교하였다.
- 항당뇨활성은 α-Glucosidase 저해활성으로 Norén 등(23)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 효소반

응은 96-well microplate에 다양한 농도(0.25, 0.5 및 1.0 mg/mL)의 시료 20 μ L와 α -Glucosidase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)(2 unit/mL) 20 μ L 및 100 mM phosphate buffer(pH 7) 180 μ L을 가하여 37°C에서 10분간 preincubation 후, 20 mM p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranose 기질용액 30 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. α -Glucosidase 저해활성은 효소와 기질 반응 중 생성되는 p-nitrophenol을 540 nm에서 비색정량하고 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 나타내었다. 항당뇨활성의 양성대조군으로 아카보스(arcabose, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 농도별(0.1, 1, 2, 10, 20 μ g/mL)로 동일한 조건에서 실험하여 IC₅₀ 값을 구하여 비교하였다.

9) 통계분석

- 통통마디 추출물에 대한 기능성 평가시, 실험은 독립적으로 3회 반복하여 동일한 결과를 얻었으며, One-way ANOVA 분석 및 Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 탈염후 활성증가의 유의성을 $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통통마디 탈염분말의 색도분석에서는 3회 반복 실험을 통하여 평균값(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 각 시료 간의 통계적 유의성 검증을 위해 SPSS를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 통계적 유의성을 검증하였다.

10) 통통마디 탈염 추출물의 영양성분 분석

- 영양성분 분석은 식품공전 식품성분시험법 중 일반성분시험법으로 분석하였음. 일반성분시험법은 식품의 규격, 순도의 검사 및 영양가를 평가하기 위하여 수분, 회분, 질소화합물, 탄수화물(당질) 및 지질의 시험방법과 열량계산법에 대하여 기재한 것임.
- 열량은 에트워터 계수를 사용하여 검체 100 g중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 킬로칼로리(Kcal)단위로 산출하고 그 총계로 나타냄. 단위는 킬로칼로리 또는 킬로줄(KJ)로 하고 킬로칼로리 단위에서 킬로줄 단위로의 환산은 1Kcal = 4.184KJ에 의해 표기함.
- 수분은 건조감량법으로 분석하였음. 검체를 물의 비점보다 약간 높은 온도 105°C에서 상압건조시켜 그 감소되는 양을 수분량으로 하는 상압건조법의 원리를 이용함. 미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 검체 5 g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열고 105°C로 세팅된 건조기에 넣어 5시간 건조한 후 데시케이터 중에서 약 30분간 식히고 무게를 측정하였음. 다시 칭량접시를 2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복하고 그 측정값을 다음의 계산방법으로 수분량을 계산함.

$$\text{수분(\%)} = (b - c / b - a) \times 100$$

a : 칭량접시의 무게(g)

b : 칭량접시와 검체의 무게(g)

c : 건조 후 항량이 되었을 때의 무게(g)

- 식이섬유는 효소-중량법을 이용하였음. 건조된 시료 두 개를 준비하고 이를 내열성 α -아밀라아제(Thermophile α -amylase), 프로테아제, 아밀로글루코시다제 효소로 연속적으로 분해하여 전분과 단백질을 제거하여 준비함. 총 식이섬유(TDF) 정량은 효소분해물에 녹아 있는 식이섬유를 에탄올로 처리하여 침전시켜 여과하고 에탄올과 아세톤으로 세척한 후, 건조하여 그 무게를 확인함. 물불용성 식이섬유(IDF)는 효소분해물을 여과하여 잔사(residue)를 따뜻한 물로 세척하고 그 무게를 확인하여 정량함. 수용성식이섬유(SDF)는 IDF의 전처리과정에서 얻은 여과액과 세척액을 합하여 에탄올로 침전시킨 후 여과하여 잔류물을 건조하고 무게를 확인하여 정량함. 총 식이섬유, 물불용성 및 수용성식이섬유 함량계산 시 잔사(residue)의 무게 중 단백질 및 회분량은 보정해줌.
- 조단백질의 분석은 단백질 분석기를 이용하여 검체를 황산으로 분해하고 증류하여 질소를 유리시킨 후 염산 용액으로 적정하였음. 검체 1g을 정밀하게 측정하여 분해튜브에 넣고 분해촉진제

(H₂SO₄ : K₂SO₄ = 2 : 1)를 넣고 진한 황산 12 mL를 넣음. 420°C의 분해장치에서 45~60분간 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른색이 되면 상온으로 냉각시킴. 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 조심스럽게 첨가하고 25 mL의 혼합지시약이 섞인 포집용액을 삼각 플라스크에 넣은 후, 이를 증류장치에 놓고 삼각플라스크 받침대를 들어 올림. 증류시 증류액이 포집용액으로 들어감. 40% NaOH 50 mL를 분해튜브에 넣고 증류장치에서 3~4분간 증류함. 증류장치의 삼각 플라스크에 있는 포집용액이 증류액에 함유되어 있는 암모니아를 포집하면서 녹색으로 변하고 증류액을 0.1 N 염산용액을 이용하여 종말점이 엷은 핑크빛에 도달할 때까지 적정하고 사용된 산의 양을 기록함.

$$\text{조단백질(\%)} = \{(\text{HCl 소비 mL} - \text{공시험 mL}) \times M \times 14.01 / \text{검체량(mg)}\} \times F \times 100$$

14.01 : 질소의 원자량

M : HCl의 몰농도

F : 킬달 계수

- 조지방은 속슬렛추출장치로 에테르를 순환시켜 검체 중의 지방을 추출하여 정량하였음. 미세한 분말로 한 검체 2 g을 원통여과지에 넣고 검체 위에 탈지면을 충전 후 용기에 담아 105°C 건조기에서 2시간 건조한 후, 데시케이터에서 식히고 속슬렛추출장치의 추출관에 넣고 받는 그릇에 무수에테르 약 1/2용량을 넣어 장치하고 8시간 추출함. 추출이 끝난 후 냉각기를 떼고 추출관 속의 원통여과지를 핀셋으로 꺼내 다시 냉각기를 모두 추출관에 연결하여 수욕상에서 가온하여 받는 그릇 중의 에테르가 전부 추출관에 옮겨지면 받는 그릇을 떼어 수욕중에서 에테르를 완전히 증발시킴. 받는 그릇의 바깥을 거저로 깨끗이 닦은 후, 100°C 건조기에 넣어 약 1시간 향량이 될 때까지 건조한 다음 데시케이터에서 식히고 칭량하여 다음의 식에 따라 조지방을 산출하였음.

$$\text{조지방(\%)} = (W_1 - W_0 / S) \times 100$$

W₀ : 받는 그릇의 무게(g)

W₁ : 조지방을 추출하여 건조시킨 받는 그릇의 무게(g)

S : 검체의 채취량(g)

- 콜레스테롤은 검체 중 지질을 고온에서 수산화칼륨 에탄올 용액으로 비누화한 후 콜레스테롤을 톨루엔으로 추출하고 트리메틸실릴(TMS) 에테르화하여 유도체화하여 이를 기체크로마토그래피로 정량하였음. 검출기는 불꽃이온화검출기(GC-FID)를 이용하였으며 컬럼은 HP-5(25m×0.32mm×0.17um)를 이용하였음. 주입부의 온도는 250°C, 검출기는 300°C이고 오븐 온도 190°C에서 2분간 유지하고 20°C/min의 비율로 230°C까지 상승시켜 3분간 유지하고 40°C/min로 255°C까지 상승시켜 25분간 유지하였음. 캐리어 가스는 헬륨을 이용하였고 2.0 mL/min의 유속으로 분석하였음.

11) 통통마디 탈염 추출물의 이온분석

- 통통마디 탈염 추출물의 이온분석은 NICEM(National Instrumentation Center for Environmental Management, 서울대학교 농생명과학대학)에 분석 의뢰하였음. Dionex ICS3000(Dionex, USA)를 이용하였으며, Ionpac CS12A column (4 x 250 mm Dionex, USA)을 사용하였음. Column oven Temperature 30°C, flow rate는 1.0 ml/min이었으며 injection volume는 25 µl, 20 mM MSA(Methanesulfonic acid)로 elution 함. 검출기는 suppressed conductivity(CSRS URTRA, 4mm) recycle mode에서 검출함. 표준시료는 sigma의 HPLC 등급 시료로 Li, Na, Mg, K, Ca, NH₄를 사용하였음.

12) 뇌혈관 혈류 개선 및 인지기능 활성을 위한 in vitro 평가

- 시험원료의 뇌기능 관련 in vitro 활성 측정은 혈액응고 경로중 외인성 경로를 담당하는 프로트롬빈 타임(prothrombin time, PT), 외인성경로를 담당하는 에이피타임(activated Partial Thromboplastin

Time, aPTT), 기억력개선 향상에 도움이 되는 아세틸콜린의 아세틸콜린 에스테라제 저해활성 (Anti-acetylcholine esterase activity, AchE 저해), 뇌신경세포의 항염증활성을 위한 항산화활성(DPPH radical scavenging activity)을 도입하여 평가함.

13) 프로트롬빈 타임(prothrombin time, PT)

- 표준혈장(MD Pacific Co., China) 30 μ l와 다양한 농도의 시료액 5 μ l를 Genius Semi-auto Coagulometer CA 51-52 (Shenzhen, China)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 40 μ l의 PT reagent(Diagon, Hungary)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 4회 반복한 실험의 평균치로 나타냄. 양성대조군로는 아스피린(Sigma Co., USA)을 사용하며, 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용함. DMSO의 경우 평균 17-18초의 응고시간을 기록하고 있고, 프로트롬빈 저해활성은 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고 시간으로 나눈 값(Ts/Tc)으로 기록함.

14) 에이피타임 (activated Partial Thromboplastin Time, aPTT)

- 혈장 30 μ l와 다양한 농도의 시료 추출액 5 μ l를 Genius Semi-auto Coagulometer CA 51-52 (Shenzhen, China)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온한 후, 20 μ l의 aPTT reagent(Diagon, Hungary)를 첨가함. 다시 37°C에서 3분간 배양 후 20 μ l CaCl₂ (35mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정함. 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하며, 이 경우 평균 55-58.0초의 응고시간을 나타낸다. aPTT의 결과는 4회 반복한 실험의 평균치로 나타내며, 혈액응고인자 저해활성은 시료 첨가시의 aPTT시간을 용매 대조구의 aPTT시간으로 나눈 값(Ts/Tc)으로 기록함.

15) 아세틸콜린에스테라제 저해활성(Anti-acetylcholine esterase activity, AChE)

- 뇌혈관중 acetylcholinesterase(AChE)의 농도가 증가할수록 신경세포의 콜린성 신경전달물질이 결핍되어 기억 및 인지기능장애를 유발할 수 있다고 보고되고 있음. 효소활성측정 방법은 Ellman's coupled enzyme assay를 이용함. 96-well microplate에 100mM Phosphate buffer (pH8) 170 μ l, 2mM DTNB(dithiobisnitrobenzoic acid) 20 μ l, 추출시료 20 μ l를 가하고 20 μ l의 AChE 0.25U/mL in the Buffer를 분주하고 37°C에서 10분간 pre-incubation 한후, 3.75mM acetylcholine Iodide의 기질용액을 가함. 반응액을 37°C에서 10분간 incubation한 후 410nm의 UV-VIS microreader에서 흡광도를 측정함. 기질과 시료가 포함되지 않는 대조군의 흡광도와 시험군의 흡광도 비교하여 효소저해활성을 나타내었음.

16) 항산화활성(DPPH radical scavenging activity)

- 항산화 활성은 블로이스의 방법에 준하여 1,1-디페닐-2-피크릴 하이드라질(1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl, DPPH, Sigma Co., USA)을 이용하여 측정함. DPPH 4mg을 에탄올 50mL에 녹여 DPPH 용액을 만든 후 96-well microplate에 200 μ l를 가하고 시료를 (25, 50 및 100 μ g/mL)의 농도로 첨가하고, 5초 동안 혼합한 후 20분 동안 실온에서 반응시키고, 517nm에서 시료를 가하지 않은 대조군에 대한 흡광도 감소를 유리라디칼 소거 활성(%)으로 나타내었음.

17) 총폴리페놀 함량 분석

- 총 폴리페놀 함량은 Folin-Davis 방법을 수정하여 96-well microplate에서 실시하였다(Lee et. al., 1997). 즉 각 추출 또는 정제시료 1mg을 증류수 1ml에 용해하여 10배로 희석한 100 μ g/ml의 시험액을 조제하였으며, 표준물질로 tannic acid(Sigma Co.,USA)를 농도별로 (0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml)로 사용하였다. 측정을 96-Well-microplate를 이용하여 시료액 또는 표준액 20 μ l에 2%

sodium carbonate 250ul를 가한 후 16ul의 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Folin-C, Sigma, USA) 용액을 첨가하고 30분간 실온에서 반응시켰다. 반응 후 나타나는 청색의 반응물을 725nm 흡광도를 UV-VIS microwell plate reader(Bio-RAD, x-Mark, USA) 기를 이용하여 측정하였으며, 표준물질의 표준곡선으로부터 시료내 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

18) 총플라보노이드 함량 분석

- 총 플라보노이드 함량은 Chung(2014)의 방법을 수정하여 96-well microplate에서 실시하였다. 다양한 농도로 증류수에 녹인 시료액 30 μ l에 90% diethylene glycol 200 μ l를 첨가하고 다시 1 N NaOH 5 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420nm에서 흡광도를 Microreader 기(Bio-RAD, x-Mark, USA)를 이용하여 측정하였다. 표준시약으로는 0~500 μ g/ml의 rutin(Sigma Co., USA)을 사용하여 시료대신 반응시켜 얻은 검량곡선으로부터 추출시료에 함유되어 있는 총 플라보노이드함량을 계산하였다.

19) 총알칼로이드 함량 분석

- 시험시료 분말 1g을 에탄올 15 mL를 첨가하고 3시간동안 교반 후 10,000 rpm 에서 5분간 원심분리를 실시하였음. 원심분리 된 상등액은 다시 메탄올로 희석(상등액 1 mL + 메탄올 1 mL)하였고, syringe filter(0.45 μ m)로 여과한 뒤 감압농축하고 증류수로 재용해 한 후 pH3으로 조정하여 생기는 침전물은 제거하고, 다시 pH 10으로 조정후, 분액여두에서 클로로포름 분배 분획을 실시하고 클로로포름층을 회수하여 감압농축으로 용매를 제거한 후 남은 잔사를 방냉한 후 중량을 측정함.

20) 항혈전 및 아세틸콜린 저해활성 물질의 추출 및 공정 확립

- 파이토밀로부터 항혈전, 항산화 및 아세틸콜린 저해활성 유효활성 물질의 추출은 물과 에탄올을 사용하였으며, 시료대비 용매의 부피, 추출온도, 추출시간, 추출수율 등의 조건을 달리하여 최적화하였음. 추출물로부터 분자량 및 용해도 차이를 이용한 에탄올 침전과 추출물 내 화합물들의 극성도 차이에 따라 분배분리하는 유기용매 분획법을 이용하여 조정제 획분을 조제함.

21) 파이토밀 열수추출물의 제조조건 확립

- 염화나트륨이 95% 이상 탈염된 통통마디 탈염분말(파이토밀)은 7-8월 경에 씨앗이 달리기 전 식물이 완전히 성장하였을 때 수확한 것으로 생초 40Kg으로부터 건조된 4kg의 통통마디 건물로부터 탈염하고, 100mesh이하로 분말화한 것을 사용하였음. 50g의 파이토밀에 1L의 증류수를 가하여 저온 감압추출(75C, 8시간), 무압력추출(100C, 4시간), 압력추출(121C, 4시간)의 조건을 달리하여 추출한 후 원심분리(10,000g, 25min)하고 상등액을 수득하여 농축 후 동결건조하여 확보된 추출시료의 수율, 항혈전활성, 항산화활성을 평가하여 열수추출의 최적 조건을 확립함.

22) 파이토밀 에탄올추출물의 제조조건 확립

- 50g의 파이토밀에 500mL의 50%에탄올을 가하여 12시간 실온 교반추출, 70%에탄올을 가하여 초음파실온 추출, 95%에탄올을 가하여 70 \pm 2°C 환류추출의 조건을 달리한 에탄올추출을 실시하고, 감압여과 및 원심분리(10,000g, 25min) 후 수득된 상등액을 감압회전농축하고 동결건조하여 조제된 시료에 대하여 수율과 아세틸콜린 에스테레이스 저해활성을 평가하여 에탄올추출의 최적조건을 확립함.

23) 파이토밀 열수추출물로부터 유기용매 분배 분획

- 파이토밀 2Kg을 20L의 증류수를 가하여 무압력으로 100±5°C에서 4시간 동안 열수추출(경서추출기, Cosmos660, 한국)하고 수득된 추출물을 방냉한 후, 여과하여 생성된 추출잔사에 대하여 동일한 방법으로 열수추출을 반복함. 2회로 추출된 열수추출물(35L)을 감압농축하여 3L의 농축액을 획득하고 7L의 에탄올을 가하여 4°C에서 하룻밤 정치하여 생긴 고분자 침전물을 원심분리(4°C, 10,000rpm, 30분) 및 감압필터 여과로 제거하고, 여과액을 감압건조하여 에탄올을 완전 제거한 액을 증류수 2L에 재용해 시키고 그림 3과 같이 polarity-guided organic solvent partitioning을 실시하여 핵산분획물인 PM-H, 클로로포름 분획물인 PM-C, 에틸아세테이트 분획물인 PM-EA, 부탄올 분획물인 PM-B, 그리고 마지막 물 잔류층인 PM-Q를 분획하였음

24) 파이토밀 에탄올 추출물로부터 아세틸콜린 저해활성 알칼로이드 획분 분획

- 파이토밀 2Kg에 10L의 95%에탄올을 가하여 70±2°C에서 환류냉각 방법으로 6시간 추출하고 방냉하고, 감압여과로 추출액을 분리한 추출잔사에 5L의 95%에탄올을 가하여 동일조건으로 재추출하였음. 에탄올 추출 여과액(15L)을 감압회전농축기로 농축하여 에탄올을 제거한 후 증류수 3L에 용해한 후 6N HCl을 가하여 pH 2.6이하로 조정하고 4°C에서 12시간 정치하고 생성되는 침전물을 원심분리(10,000g, 25분)하여 제거하고 분액여두로 옮겨 핵산 및 클로로포름 추출을 통하여 비알칼로이드성 화합물을 제거함. 수층에 다시 6N NH₄OH를 가하여 pH를 10이상으로 조정하고 4°C에서 12시간 정치하고 생성되는 침전물을 제거하고 분액여두로 옮겨 diethylether로 추출하여 2차 불순물을 제거함. pH10의 수층에 클로로포름을 가하여 2회 진탕추출 후 클로로포름층을 분리하여 감압회전 농축 후 수득되는 추출물을 증류수에 현탁하여 동결건조하여 파이토밀의 알칼리 획분 (PM-AL, 2.5g)을 제조하였음.

25) PM-EA획분으로부터 항혈전 유효활성 지표성분의 정제를 위한 컬럼크로마토그래피

- PM-EA 획분으로부터 항혈전 및 항산화 유효활성 지표성분이 정제를 위하여 활성탄 또는 Diaion HP-20 resin을 이용한 소수성흡착 컬럼 크로마토그래피, Sicagel 60G를 이용한 극성컬럼 크로마토그래피, Dowex-50, Dowex-1 또는 Amberlite IRA 400 등의 이온교환수지를 이용한 이온교환컬럼 크로마토그래피, Sephadex LH-20, G-10 레진을 이용한 Size exclusion 컬럼 크로마토그래피, ODS역상 컬럼 크로마토그래피 등을 이용한 정제적성도 및 효율을 검토하고, 최종 대량정제로 Diaion HP-20 resin, Silicagel 60G, Shephadex LH-20, 및 박층크로마토그래피(TLC)를 이용하여 정제함.

26) 분석용 HPLC 및 분취용 MPLC를 이용한 활성지표 물질의 단리

- 컬럼크로마토그래피를 통하여 최종 정제된 유효활성획분에 대하여 분석용 고속액체크로마토그래피 (analytical HPLC, Agilant, USA)와 분취용 고속액체크로마토그래피(Prep-MPLC, YMC, Japan) 장비를 이용하여 항혈전 및 항산화 유효활성 지표 성분을 단리하였음. 분석용 HPLC는 졸박스 이클립스 C18 분석 컬럼 (Zorbax Eclips, 5µm, 4.5 × 250mm, Agilent)이 장착된 모델(1260 Infinity, Agilent, USA)을 사용하였고, 고속분취 액체크로마토그래피는 일본 YMC사의 프렙용 컬럼(Triart C18, 20mm × 150mm, 5µm, YMC, Japan)이 장착한 모델(Multiple Preparative HPLC(LC-forte/R, YMC, Japan)을 사용하였다. 이동상 용매 조건은 메탄올과 3차 증류수를 이용한 그라디언트 조건에서 1~3ml/분의 유속으로 흐르게 하여 분석하였으며, Agilent, 1200 DAD 검출기(detector) 또는 YMC UV-3400 UV 검출기를 사용하였으며, 두 파장영역 (260 및 330nm)의 흡수도를 이용하여 화합물들을 순수분획함.

27) PM-AL 획분에 존재하는 alkaloid 화합물들의 확인을 위한 GC-MS 분석

- 파이토밀로부터 분리한 아세틸콜린 저해활성을 나타내는 PM-AL 획분은 알칼로이드 화합물 지향 추출 및 분획법으로 실시되었으므로, 분획물 내의 알칼로이드 화합물들의 프로파일을 검토하고자 PM-AL 5mg을 diethyl-ether에 용해시키고 High Resolution GC-MS(CLARUS 600T, Perkin Elmer, USA)를 실시하였음. 분석조건은 PB5MS(0.25mm x 60m) 컬럼과 이온화모드는 EI를 사용하였으며, 이온 소스의 이온화 및 MS transfer line의 온도는 250°C를 유지하였으며, total run time은 40분, carrier gas는 헬륨으로 유속은 1.0ml/min, 검출은 FID를 이용하였으며, 검출기 온도는 300°C를 유지하였고, TIC(total ion chromatogram)은 relative abundance를 구하여 나타내었음.

28) 컬럼크로마토그래피 정제 및 박층크로마토그래피 실시

- PM-AL 획분으로부터 아세틸콜린 에스테레이즈 저해활성을 나타내는 알칼로이드계 유효 지표성분을 정제하기 위하여 활성탄 또는 Diaion HP-20 resin을 이용한 소수성흡착 컬럼 크로마토그래피, Sicagel 60G를 이용한 극성컬럼 크로마토그래피, Dowex-50, Dowex-1 또는 Amberlite IRA 400 등의 이온교환수지를 이용한 이온교환컬럼 크로마토그래피, Sephadex LH-20, G-10 레진을 이용한 Size exclusion 컬럼 크로마토그래피, ODS역상 컬럼 크로마토그래피 등을 이용한 정제적성도 및 효율을 검토하고, 최종 대량정제로 Diaion HP-20 resin, Silicagel 60G, Shephadex LH-20, 및 박층크로마토그래피(TLC)를 이용하여 정제함.

29) HPLC 분석 및 분취용 MPLC 정제

- 컬럼크로마토그래피를 통하여 최종 정제된 유효활성획분에 대하여 분석용 고속액체크로마토그래피(analytical HPLC, Agilent, USA)와 분취용 고속액체크로마토그래피(Prep-MPLC, YMC, Japan) 장비를 이용하여 아세틸콜린 에스테레이즈 저해활성의 알칼로이드 화합물을 분리함

30) 항혈전 및 항산화 유효지표 성분(Compound A)의 구조 분석

- 자외선 최대 흡수대를 측정하기 위하여 각 시료를 메탄올에 1mg/mL의 농도를 용해시켜 자외선-가시광선 분광기를 이용하여 190-400nm 영역내에서 측정함. 시약첨가에 따른 자외선 흡수대의 변화를 관찰하기 위하여 AlCl₃, NaOH, NaOAc 등을 사용함. 적외선 흡수 영역을 조사하고자 각 화합물 2-3mg을 포타슘브로마이드 (KBr)와 함께 잘 혼합 후 직경 0.5 cm의 디스크로 만들어 적외선 분광기에서 최대 IR 흡광도를 측정함. 화합물의 분자량 결정은 전자포말이온화 (ESI) 질량분석기 (Micromass Quattro II)와 고해석능 펌프스 질량분석기 (JMS-700 Mstation mass spectrometer)를 이용하여 글라이세롤 매트릭스로 하여 하이 레조루션(High resolution)MS를 측정함. 핵자기공명 (NMR)분석은 순수 정제 화합물 들 (3-5 mg)을 완전 건조하여 CD₃OD (0.5 mL)에 용해한 후 5 mm NMR 튜브에 주입하고 브루커 모델 기종 (Bruker AMX-500)으로 NMR분석을 실시하였으며, ¹H-NMR은 500MHz로, ¹³C-NMR은 125MHz로 각각 측정하였음.

31) 통통마디 탈염

- 건조된 통통마디를 커팅 밀러를 사용하여 100 mesh로 분쇄함. 분쇄한 통통마디 동결건조 1kg에 4°C이하의 정제수 10L를 가하고 3분간 교반 한 후 원심분리(5500rpm, 25분)함. 원심분리 후 침전물에 4°C이하의 정제수 10L를 가하고 3분간 2차 교반한 후 원심분리(5500rpm, 25분) 후 침전물에 4°C이하의 정제수 5L를 가하고 1.5분간 3차 교반하고 원심분리(5500rpm, 25분)하여 침전물을 열풍건조로 건조하여 나트륨 0.8% 이하의 탈염된 통통마디 분말을 수득함

32) PhytoMeal의 효소가수분해

- 통통마디 탈염분말(PhytoMeal)내 유용 생리활성 물질을 극대화하기 위하여 효소가수분해를 실시함. 효소는 식품공전에 명기된 식품첨가물로 사용이 가능한 cellulase, amylase, protease, β -glucanase, hemicellulase, pectinase 등 (식품첨가물 제품명, Plantase, Optivine-Mash, Pyr Flo, Rohament CL, Rapidase, Spezyme LT., 제조회사명: Conell Bros, Australasia) 을 사용하였음. 효소사용량은 기질(파이토밀)의 0.25 ~ 1.5% (v/v)의 범위내에서 실험하였으며, 제조회사에서 제공하는 각 효소들의 최적온도(50-60°C)에서 가수분해를 실시함

33) PhytoMeal-효소가수분해물의 추출

- PhytoMeal-효소가수분해물의 추출은 식품첨가물로 식품에 사용이 허가되어 있는 발효주정(대한주정 라이프)을 사용함. PhytoMeal-효소가수분해물의 주정추출 조건의 표준화를 위하여 발효 주정 농도 (0, 25, 50, 60, 70, 100%), 추출온도(20, 40, 60, 80, 100°C), 추출시간(1, 2, 3, 4, 5, 6 시간) 및 추출횟수(1차, 2차) 별로 분류하여 실험하였으며, 최적 추출조건은 추출물의 수율과 지표 및 기능성 성분의 함량으로 선정함. 또한 통통마디의 분쇄 입자크기(0.125, 0.25, 0.5mm Sieve)에 따른 t-ferulic acid와 acanthoside B의 함량과 추출수율도 파이토밀의 추출조건으로 표준화하였음

34) 주정추출물의 농축 및 건조

- 통통마디 탈염 분말의 가수분해물에 60% 주정을 가하고 80±1°C에서 3시간 동안 1차 환류 추출 후 방냉하여 여과함. 여과 추출 잔사에 정제수 60%의 주정을 가하여 80±1°C에서 3시간 동안 2차 환류 추출후 방냉하여 여과함. 농축 및 동결건조는 1, 2차 주정 환류추출 여과액을 혼합한 후 회전 감압진공 농축기를 이용하여 55°C에서 에탄올을 제거하였고 동결건조(EYELA, Tokyo, Japan)를 실시함. 동결건조된 추출물을 미분쇄하여 통통마디 탈염분말의 대비 수율 22-24%의 기능성 원료인 탈염 통통마디 주정추출물(PM-EE)을 수득함

35) 탈염 통통마디 주정추출물(PM-EE)로부터 알칼로이드 분획물 (PM-AL)을 수득

- 통통마디 추출물 (PM-EE) 100g을 2L의 증류수에 용해한 후 6N의 염산을 가하여 pH를 2.0으로 조정하여 30분간 교반하고 4°C에서 12시간 정치함. 이 과정에서 생성되는 침전물은 원심분리 및 감압여과로 제거 후, 6N 암모니아수를 가하여 pH를 10이상으로 조정하고 분액여두로 옮겨 동량의 클로로포름으로 분배분획을 실시함. 수층에 다시 동량의 클로로포름을 가하여 분액여두에서 두 번째 분배 분획을 실시 후, 1, 2차 클로로포름 분획물 중의 클로로포름을 진공회발농축기로 제거하고 이를 증류수에 현탁하여 동결건조함하여 탈염 통통마디의 알칼로이드 분획물 (PM-AL)을 수득함

36) PM-AL 획분의 컬럼 크로마토그래피를 이용한 활성획분의 정제

- PM-AL 2g을 극성 실리카겔 (Silicagel 60G, Merck, Germany)이 충전된 컬럼(3.3×40 cm)에 로딩한 후 클로로포름과 메탄올의 혼합비율을 달리한 이동상 용매를 이용하여 유속 0.3 ml/분의 속도로 용출시켜 100 ml씩 8개의 분획물들(PM-1, PM-2, PM-3, PM-4, PM-5, PM-6, PM-7, PM-8)을 획득함. 그 중 AChE 저해활성이 우수한 획분(PM-S7, 187mg)을 감압건조 후 3 ml의 메탄올에 용해하고, 저분자용 겔여과 세파덱스(Sephadex) LH-20이 충전된 세 번째 컬럼(2.5×33 cm)에 도입하여 100% 메탄올(유속 0.2 ml/분)을 이동상 용매로 흘려보내면서 50 ml씩 총 7개의 분획물(PM-7-L1, ~L2, ~L3, ~L4, ~L5, ~L6, ~L7)을 수득함. 상기 7개의 분획물 중 AChE 저해활성이 가장 우수한 PM-S7-L3 획분을 감압농축, 동결건조하여 90 mg을 수득함

37) 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography)를 이용한 분획물들의 프로파일 확인

- 컬럼크로마토그래피 정제 과정중에 수득되는 분획물들을 소량의 메탄올에 용해시켜 극성 실리카젤이 도포된 박층크로마토그래피 플레이트(20x20 cm, 0.25 μ m)에 10 μ l 씩 점적 후, n-부탄올 : 메탄올 : 물 = 4 : 2 : 1 또는 클로로포름 : 에틸아세테이트 : 메탄올 = 4 : 3 : 2의 이동상 용매로 전개하고, 후드내에서 이동상 용매를 휘발시켜 제거한 후 암실에서 자외선 등(254nm, 365nm)으로 분리된 밴드를 확인하여, 비슷한 Rf값 영역에 있는 분획물들은 모아서 AChE 저해활성을 측정하여, AChE 저해활성이 우수한 획분을 선정하여 다음 정제에 사용함

38) 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 기능성분 확인 및 정제

- 세파덱스(Sephadex) LH-20 컬럼 크로마토그래피 정제에서 AChE 저해활성이 가장 우수한 PM-S7-L3 분획물(90mg)을 2ml의 HPLC 용 메탄올에 용해 후 0.22 μ m 필터로 여과한 다음 분석 및 분취용 고속액체크로마토그래피를 이용하여 AChE 저해활성이 강한 단일물질(S7-L3-3)을 분리함. 분석용 HPLC는 C18 분석 컬럼(Zorbax Eclipse, 5 μ m, 4.5x250mm, Agilent)이 장착된 모델(1260 Infinity, Agilent, USA)을 사용하였고, 고속분취 액체크로마토그래피는 일본 YMC사의 프랩용 컬럼(Triart C18, 20mmx150mm, 5 μ m, YMC, Japan)이 장착한 모델(Multiple Preparative HPLC(LC-forte/R, YMC, Japan)을 사용함. 이동상 용매 조건은 아세토니트릴과 0.04% trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 3차 증류수를 이용한 그래디언트 조건에서 1ml/분의 유속으로 흐르게 하여 분석하였으며, Agilent, 1200 DAD 검출기(detector) 또는 YMC-YUV-3400 UV 검출기를 사용하였으며, 두 파장영역 (254 및 210 nm)의 흡수도를 이용하여 화합물들을 순수분획한 결과 머무름시간 26.5 분에서 화합물 S7-L3-3 1(38.5mg)을 수득함

39) 아세틸콜린에스테라제 저해활성(Anti-acetylcholine esterase activity, AChE)

- 뇌혈관중 acetylcholinesterase(AChE)의 농도가 증가할수록 신경세포의 콜린성 신경전달물질이 결핍되어 기억 및 인지기능장애를 유발할 수 있다고 보고되고 있음. 효소활성측정 방법은 Ellman's coupled enzyme assay를 이용함. 96-well microplate에 100mM Phosphate buffer(pH8.0) 170 μ l, 2mM DTNB(dithiobisnitrobenzoic acid) 20 μ l, 추출시료 20 μ l를 가하고 20 μ l의 AChE 0.25U/mL in the Buffer를 분주하고 37°C에서 10분간 pre-incubation 한후, 3.75mM acetylcholine Iodide의 기질용액을 가함. 반응액을 37°C에서 10분간 incubation한 후 410nm의 UV-VIS microreader에서 흡광도를 측정함. 기질과 시료가 포함되지 않는 대조군과 시험군의 흡광도 비교하여 효소저해활성을 나타냄

40) S7-L3-3의 분자량과 UV λ max 결정

- S7-L3-3의 분자량 결정을 위하여 1 mg 의 화합물 A를 전자포말이온화(ESI) 질량분석기(LC-ESI mass spectrometer, AGILENT 1100, USA Micromass Quattro II)로 포지티브 및 네거티브 스캔을 실시하고, high resolution MS를 측정함. 분리된 화합물 S7-L3-3의 자외선 최대 흡수대는 시료를 메탄올에 1 mg/ml의 농도로 용해시킨 후 자외선 분광기(Genesys 10S UV-VIS spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 190-400 nm 영역 내에서 측정함

41) 핵자기공명(NMR)분석

- 화합물 S7-L3-3(5 mg)을 완전 건조하여 CDCl₃(0.5 ml)에 용해한 후 5mm NMR(JNM-ECA 600, Jeol, Japan)로 분석 하였으며, ¹H-NMR은 600MHz로, ¹³C-NMR 150 MHz로 측정함. HMBC-NMR과 ¹H-¹H COSY-NMR 측정을 통하여 화합물 S7-L3-3내 수소와 탄소의 위치와 입체구조를 결정함

42) 지표 및 기능성 성분의 분석방법

- 추출분말 20mg을 1mL의 60% 메탄올에 용해한 후 0.22um filter로 여과하고 HPLC 분석을 통하여 t-Ferulic acid 및 acanthoside B를 동시에 분석함. HPLC 이동상은 0.04% TFA(trifluoreacetic acid)과 아세토니트릴을 그래디언트조건(7%~33% CAN)으로 하여 역상컬럼(C18, Zorbax Eclips, 5µm, 4.5×250mm, Agilent)과 UV325 및 UV210nm 파장을 이용하여 분석함. 페룰산과 아칸토싸이드 B의 검량은 표준품을 이용하여 동일조건에서 농도별로 분석하여 검량선을 작성하였으며, 시료들의 분석 후 동일 retention time, UV spectrum, MS 분석 등을 통하여 해당 피크물질을 확인 후, 각 피크에 해당하는 면적값을 이용하여 비교 검량하였음

3-2. 주관 파이토코퍼레이션 수행 연구개발 결과

가. 통통마디 탈염을 통한 식품품질 및 기능성 향상

1) 동결건조와 열풍건조에 따른 통통마디 분말의 색도 비교

건조방법에 따른 통통마디 분말의 색도는 Table 1과 같다. 열풍건조의 경우 갈변화 방지를 위하여 100°C 증기 2분, 4분, 100°C 열풍 5분, 10분 열처리를 실시하였는데, 열처리를 하지 않은 대조군에 비해 밝기를 나타내는 L*값은 약간 높게 나타났고 적색도를 나타내는 a*값은 낮게 나타났다. 열처리를 통해 효소가 불활성화되어 갈변화되지 않은 것으로 판단되고, 그 중에서도 증기 2분, 열풍 10분의 열처리가 효과적인 것으로 나타났다($p < 0.05$). 동결건조의 경우 대조군보다 높은 L*값($p < 0.05$), 가장 낮은 a*값을 나타냈으며($p < 0.05$), 저온의 건조과정에서 효소의 활성이 억제되어 갈변화 되지 않은 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Kim과 Lee(24)의 연구에서도 보고되었음

각각의 건조물을 분쇄 후 같은 조건으로 탈염을 실시하여 염도와 brix를 비교한 결과 열풍건조의 탈염율이 동결건조의 70~80%정도로 나타났다(data not shown). 이러한 결과는 동결건조 분말의 용해도가 열풍건조보다 더 크다는 Kim과 Lee(24)의 보고와 비슷한 양상으로 동결건조물에서 특징적으로 나타나는 다공질구조에 기인한 것으로 보여진다(25). 또한 열풍건조 탈염의 경우 추출물의 brix 대비 염의 비율이 동결건조보다 낮은 것으로 나타나 통통마디의 탈염에 적합하지 않은 건조방법으로 판단하여 앞으로의 실험은 동결건조된 통통마디로 진행하였음

Table 1. Comparison of color between freeze dried and hot-air dried *Salicornia europaea* powders

<i>Salicornia europaea</i> powder	Color value			
	L*	a*	b*	
Freeze dried powder	72.16±0.77 ^{b2)}	-6.35±0.17 ^c	22.47±0.48 ^a	
Control ¹⁾	70.61±0.29 ^a	-2.90±0.12 ^a	22.36±0.23 ^a	
Hot-air dried powder	100°C Steam 2min	71.27±0.82 ^{ab}	-6.14±0.16 ^c	23.23±0.40 ^{ab}
	100°C Steam 4min	73.78±0.25 ^{bc}	-5.70±0.06 ^{bc}	22.88±0.17 ^a
	100°C Hot-air 5min	71.78±0.46 ^{ab}	-4.93±0.08 ^b	22.49±0.32 ^a
	100°C Hot-air 10min	71.22±0.33 ^{ab}	-5.88±0.09 ^{bc}	23.14±0.21 ^{ab}

¹⁾Control is hot-air dried without heat treatment. ²⁾Values are expressed as mean±SD in triplicate experiments. The same superscripts(a-c) in a column are not significantly different each other at $p < 0.05$ level by the Duncan's multiple range test.

2) 통통마디의 탈염조건 설정

통통마디 동결건조 분말의 탈염조건을 설정하기 위한 추출온도, 탈염시간에 따른 총 염도, °brix, 총 고형분 등을 측정 결과는 Table 2와 같다. 추출온도에 따른 총 염함량을 비교하면 염의 용출정도는 거의 차이가 없었고, 탈염 시간에 따른 총 염량은 1분을 제외하고는 5분부터 30분까지 거의 비슷하게 나타났다. 총 고형분의 경우는 추출온도와 탈염시간에 따라 차이를 보였는데, 온도가 높아지고, 시간이 늘어남에 따라 함량이 증가하였다. 탈염시간 30분 기준에서 10°C와 20°C의 총고형분 함량은 4°C보다 각각 2.47배, 3.28배 높았음

가용성 고형분의 brix/염도지수는 각각을 측정한 후 비로 나타내었고, 그 값이 낮을수록 탈염물의 유

기고형분의 손실이 적은 것으로 판단하여 이를 이상적인 탈염효과의 지표로 설정하여 비교하였다. 4°C, 9°C의 추출온도에서는 1.26~1.36으로 지수 값이 낮고 탈염시간에 따른 차이가 완만하였으나, 20°C 이상의 추출온도에서는 지수 값이 1.5 이상으로 탈염시간에 따라 급격히 증가하였다. 총 고형분 중 염의 비율을 통해서도 이러한 결과를 확인할 수 있는데, 추출온도와 탈염시간이 증가할수록 고형분 중 염의 비율이 낮아져 염 이외의 유기 고형분들이 용출되는 정도가 크다는 것을 알 수 있다. 이를 통해 탈염을 목적으로 할 경우 9°C 이하, 5분 이내로 추출하는 것이 바람직하다고 판단되고, 앞으로의 실험은 4°C 이하의 냉수로 3분 추출하는 것을 탈염 조건으로 설정하고 실시하였음

Table 2. Effect of extraction temperature and time on salinity and brix of *Salicornia europaea* extract obtained form each desalting process

Extraction temperature (°C)	Extraction time (min)	brix/salinity ratio	Total solid content (%)	Total salinity content (%)	Solid content excluding salinity(%)	Percentage of salinity in solid content(%)
4	1	1.26	33.00	26.20	6.80	79.39
	5	1.25	35.00	28.00	7.00	80.00
	10	1.27	35.60	28.10	7.50	78.93
	15	1.29	36.30	28.20	8.10	77.69
	20	1.30	36.80	28.30	8.50	76.90
	25	1.31	37.20	28.40	8.80	76.34
	30	1.32	37.50	28.50	9.00	76.00
9	1	1.30	34.30	26.30	8.00	76.68
	5	1.30	36.40	28.00	8.40	76.92
	10	1.31	37.00	28.20	8.80	76.22
	15	1.33	37.80	28.30	9.50	74.87
	20	1.35	38.30	28.40	9.90	74.15
	25	1.36	38.70	28.50	10.20	73.64
	30	1.36	39.00	28.60	10.40	73.33
20	1	1.52	40.30	26.50	13.80	65.76
	5	1.51	42.30	28.00	14.30	66.19
	10	1.63	45.80	28.20	17.60	61.57
	15	1.67	47.30	28.30	19.00	59.83
	20	1.71	48.80	28.50	20.30	58.40
	25	1.76	50.30	28.60	21.70	56.86
	30	1.78	51.00	28.70	22.30	56.27
100	1	1.53	44.10	27.10	17.00	61.45
	5	1.56	43.60	27.90	15.70	63.99
	10	1.71	48.00	28.10	19.90	58.54
	15	1.87	52.80	28.30	24.50	53.60
	20	1.94	55.30	28.50	26.80	51.54
	25	1.98	56.70	28.70	28.00	50.62
	30	2.02	58.60	28.90	29.70	49.32

3) 탈염 횟수에 따른 통통마디 탈염분말의 특성

설정된 탈염조건으로 탈염횟수에 따른 비교를 실시하였다(Table 3). 1차 탈염은 통통마디 동결건조 분말 50 g에 4°C의 냉수 1 L를 첨가하여 3분간 교반 후 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하였고, 2차 탈염은 분리된 침전물에 냉수 1 L를 넣고 같은 방법으로 탈염을 실시하였다. 3차 탈염의 경우 물의 양과 시간을 반으로 줄여서 실시하였음

탈염 횟수가 증가할수록 용출되는 총 염과 총 고형분 함량이 증가하였다. 1번의 탈염으로 상당량의 염이 용출되고, 탈염 횟수가 증가할수록 계속해서 용출되었지만 그 차이는 줄어들었다. 이러한 결과와 유사하게 탈염횟수가 증가할수록 고형분이 용출되는 것과 비례하게 통통마디 탈염 분말의 수율이 줄어드는 것을 확인하였다. °brix(가용성 고형분)대비 염도 지수는 3회 탈염한 것이 가장 낮았음
탈염횟수에 따른 통통마디 탈염분말의 색도는 Table 4와 같다. 탈염 후 L*값과 a*값이 감소하고 b*값은 증가한 것으로 나타났고, a*값의 경우 탈염횟수가 증가할수록 감소하였다. 염이 빠져나가면서 색이 짙어지고, 탈염횟수가 증가할수록 초록빛이 더 진해진다는 것을 확인하였다. 따라서 3번 탈염한 통통마디 탈염 분말이 가장 진한 초록색을 보였다(L*: 67.27, a*: -8.65, b*: 23.83). Table 3의 결과처럼, 1번의 탈염으로 흰색 결정의 염이 상당량 빠져나가면서 큰 색도차이를 보이는 것으로 사료됨

탈염횟수에 따른 나트륨 함량의 변화는 Fig.1과 같다. 탈염을 하지 않은 통통마디 건조분말의 경우 14.71%의 나트륨 함량을 나타냈다. 1번 탈염한 경우 상당량의 나트륨이 용출되어 3.26%의 함량을 나타냈고, 2번, 3번의 탈염은 변화가 크지 않지만 0.83%, 0.36%로 점점 나트륨 함량이 줄어들고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 탈염횟수를 조절함으로써 원하는 나트륨 함량의 통통마디 탈염분말을 만들 수 있을 것으로 사료됨

Table 3. Changes in salinity, brix of extract and yield of desalted *Salicornia europaea* powder according to desalting frequency

Number of desalting time	Freeze dried <i>Salicornia europaea</i> powder(g)	Total Water Volume(L)	Extract			desalted powder
			Total salinity content(g)	Total solid content(g)	brix/salinity ratio	Yield(%)
1	50	1	19.40	28.60	1.45	48.18
2	50	2	20.04	29.88	1.49	42.80
3	50	2.5	20.70	29.75	1.44	39.60

Table 4. Change in color of desalted *Salicornia europaea* powder according to desalting frequency

Number of desalting time	Color value		
	L*	a*	b*
0	71.66±0.34 ¹⁾	-5.85±0.12	21.98±0.43
1	67.15±0.23	-7.74±0.16	24.48±0.37
2	67.55±0.36	-8.32±0.11	23.88±0.17
3	67.27±0.37	-8.65±0.20	23.83±0.28

¹⁾Values are expressed as mean±SD in triplicate experiments.

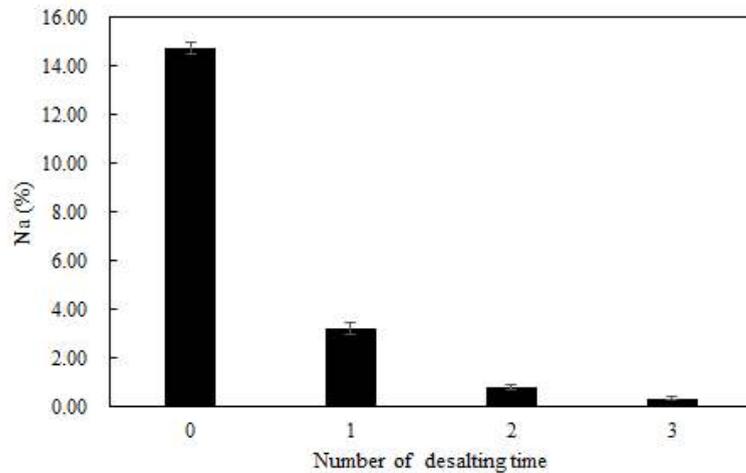


Fig. 1. Change in sodium content of desalted *Salicornia europaea* powders according to desalting frequency. Values are expressed as mean±SD in triplicate experiments.

4) 통통마디 탈염분말의 영양성분 조성

탈염시 고형분의 brix 대비 염도지수와 색도, 나트륨 함량을 고려하였을 때, 기능성 식품 소재나 식품가공품의 원료로서 활용가치가 높은 것은 3번 탈염한 통통마디 분말이라고 판단하여 3번 탈염한 통통마디 탈염분말의 영양성분을 분석하였음 (**Table 5**).

통통마디 건조물의 탈염 전 후 영양성분 분석 결과, 나트륨을 제외하고 대체로 증가하는 경향을 보였다(**Table 5**). 미네랄 성분의 경우, 탈염 전 나트륨이 대부분을 차지하고 칼륨, 마그네슘, 망간, 칼슘, 철 순서로 나타났는데, 이는 Cha 등(4)의 결과에서도 확인할 수 있다. 탈염 후 미네랄의 대부분을 차지하던 나트륨 함량은 크게 감소하고(14.71%에서 0.36%) 칼슘과 철의 비율이 증가하는 것으로 나타났다. 칼륨과 마그네슘도 감소하긴 하지만 나트륨에 비해 상대적으로 미미하여, 이를 통해 탈염의 주된 성분이 나트륨이라는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Bharmoria 등(18) 이 보고한 “온도변화에 따른 물에 대한 염류의 용해도 차이” 의 원리와 일치하게, 염류 중 다른 염류와는 달리 나트륨은 온도변화에 따른 물에 대한 용해도가 크지 않음을 확인하였음

Table 5. Changes in nutritional compositions of *Salicornia europaea* powders before and after desalination

(%, dry basis)

	Desalination	
	Before	After
Calorie(Kcal/100g) ¹⁾	151.63	224.89
Carbohydrate	37.98	74.44
Crude protein	11.23	9.13
Crude fat	2.53	4.35
Moisture	4.97	5.85
Na	13.96	0.39
K	2.14	0.08
Ca	0.41	1.43
Mg	0.74	-
Fe	0.007	0.02
Total polyphenol(mgTAE/g)	6.8	11.8
Total flavonoid(mgRE/g)	3.3	5.8
Total chlorophyll(mg/g)	29.49	54.25

¹⁾A nutritional analysis of the *Salicornia* powders was conducted and certified by the Korea Health Supplement Association(Bundang-gu, Gyeonggi-do, Republic of Korea). Briefly, the total carbohydrate content was calculated as the sum of anhydrosugars, which was determined using the phenol-sulfuric acid method. The total protein content was determined using the protein digestion/micro-Kjeldahl method, while the mineral contents were analyzed by inductively coupled plasma(ICP). The other minor components were determined according to the methods of the Association of Official Analytical Chemists(AOAC).

총단백질 함량은 탈염과정에서 일부 수용성 단백질 및 아미노산이 용출되어 함량이 줄어든 것으로 사료된다. 통통마디의 성분 중 폴리페놀, 플라보노이드류 화합물, 클로로필의 경우 탈염 후 함량이 증가하였다. 이는 소수성 폴리페놀과 플라보노이드류 등은 냉수에서 단시간 탈염하였을 때 용출되지 않는 것으로 생각되며, 이와 같은 결과로 Park 등(16)의 보고에서도 전기투석을 이용하여 염생식물(칠면초)을 탈염했을 때 폴리페놀이 제거되지 않고 오히려 함량이 증가한 것으로 나타났다. 클로로필은 엽록체에 다량 들어있는 녹색색소로써 화학적으로 porphyrin(tetrapyrrole) 핵 중앙에 마그네슘이 들어 있으며, 산기에 긴 사슬의 탄화수소가 연결되어 있는 소수성 화합물이다(26). 이러한 구조로 인해 탈염과정 중 냉수에 용출되지 않고 그대로 잔존하는 클로로필의 함량이 높은 것으로 사료된다. 또한 Kwak과 Kim(27)의 보고에 따르면 탈염 후 이루어진 건조 과정도 클로로필의 파괴에 큰 영향을 주지 않는 온도와 시간 내로 이루어져 클로로필의 함량이 높게 유지된 것으로 사료된다. 통통마디에 함유되어 있는 폴리페놀과 플라보노이드류, 클로로필의 성분들은 성분은 주로 식물에 함유되어 항산화, 항염, 항당뇨 및 면역강화 등의 생리활성 기능을 갖는 것으로 알려져 있어(27,28), 통통마디 탈염분말이 생리활성 물질이 증가된 기능성 영양조성물로서 활용될 수 있다고 사료됨

5) 통통마디 추출물의 기능성 평가

통통마디의 탈염을 통한 기능성 향상을 평가하고자 탈염 전후의 분말에 대하여 열수추출을 실시하고

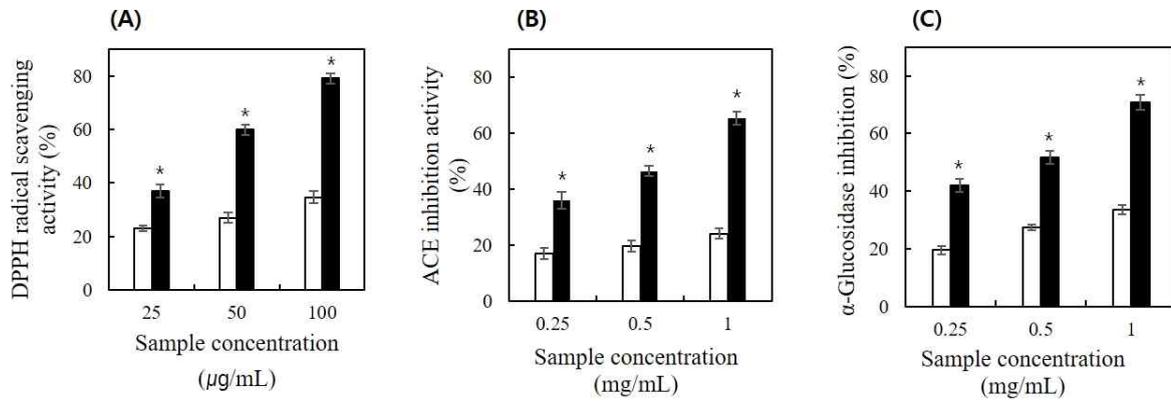
수득된 각각의 추출물에 대하여 항산화, 항고혈압 및 항당뇨 활성을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 항산화 활성의 경우, 탈염 전 모든 농도(0.25, 0.5, 1 mg/mL)에서 35% 이하의 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈지만, 탈염 후 모든 농도에서 활성이 증가하였다. 특히 100 µg/mL의 농도에서 79.17%의 높은 활성을 보였고 ($p>0.05$), 탈염 전보다 약 2.3배 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2 (A)) 또한 양성대조군으로 사용한 아스코르브산을 농도별로 동일한 조건으로 DPPH 라디칼 소거능을 실험하여 보았을 때, IC₅₀ 값이 약 0.49 mg/mL으로 측정되어(data not shown), 탈염한 통통마디 추출물의 우수한 항산화효능을 확인할 수 있었음

산화 활성을 측정하여 지금까지 통통마디의 항산화 활성에 관한 많은 연구 결과가 보고되어 왔는데, 주로 통통마디에 함유되어 있는 폴리페놀 및 플라보노이드계 화합물부터 기인한 것으로 알려져 있다(5,29). 폴리페놀 화합물은 기본구조, 하이드록실기의 결합 위치 등에 따라 항산화 활성에 영향을 미치는데, 통통마디 내에 함유된 3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoyl quinic acid, isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside, quercetin, chlorogenic acid 등이 강력한 항산화 활성을 갖고 있다고 보고되고 있다(30,31). 이러한 보고를 토대로 통통마디의 탈염 후 폴리페놀, 플라보노이드의 함량 증가가 항산화 활성의 증가에 영향을 준 것으로 사료된다. Park과 Jung(15)과 Park 등(16)의 보고에서도 이러한 결과를 확인할 수 있는데, 탈염을 통해 폴리페놀의 함량이 증가하였고, 더불어 항산화 활성이 증가되었음

항고혈압 활성의 경우 (Fig. 2(B)) 탈염 전 통통마디 분말의 열수추출물에서는 모든 농도(0.25, 0.5, 1 mg/mL)에서 25%이하의 비교적 낮은 ACE저해활성을 나타내었으나, 탈염 후의 통통마디 열수추출물은 모든 농도에서 2배 이상 활성이 증가한 것을 확인하였고($p>0.05$), 1 mg/mL의 농도에서 65.3%의 높은 ACE 저해율을 나타내었다($p>0.05$). 이러한 결과는 통통마디의 탈염 후 폴리페놀 등 생리활성물질이 증가한 것과 관련해 ACE 저해에 관여하는 물질 또한 증가하여 활성에 영향을 미친 것으로 사료된다. 일부 보고에서는 폴리페놀 함량과 비례하게 ACE 저해 활성을 보이기도 하였다(32-34). 또한 양성대조군으로 사용한 캡토프릴(captopril)을 농도별(1, 10, 250, 100 µg/mL)로 동일한 조건으로 ACE 저해활성을 실험하여 보았을 때, IC₅₀ 값이 약 12.1 µg/mL으로 측정되어(data not shown), 항고혈압약으로 처방되는 캡토프릴보다는 낮았으나, 기능성식품소재로서의 탈염한 통통마디 추출물의 우수한 항고혈압활성을 확인할 수 있었음

항당뇨활성의 경우, 탈염전의 통통마디 열수추출물은 모든 농도(0.25, 0.5, 1 mg/mL)에서 40% 이하의 α-glucosidase 활성을 나타내었으나, 탈염 후의 통통마디 열수추출물은 모든 농도에서 그 활성이 증가하여, 1 mg/mL의 농도에서 탈염 전 33.6%에서 탈염 후 70.8%로 그 활성이 현저하게 증가하였다 ($p>0.05$) (Fig 2(C)). Kim 등(9)도 통통마디의 항당뇨 활성을 보고하였는데, 고온의 수침처리를 통해 탈염한 통통마디를 효소처리하여 당뇨유발실험군의 식이로 첨가한 결과 소장 중간부분의 이당류 분해효소 활성을 저해함으로써 혈당 상승을 억제시키는 것을 확인할 수 있었고, 이는 통통마디 내 다량 함유되어 있는 식이섬유와 폴리페놀성 아글리콘 화합물로부터 기인한 것으로 보고되어 있다 (29,35). 또한, Lee 등(36)은 통통마디의 항당뇨 지표성분으로 isorhamnetin-3-β-D-glucose를 보고한 바 있는데, 이는 본 연구에서 통통마디 탈염을 통한 추출물의 강화된 항당뇨활성 및 증가된 플라보노이드 함량과 관련성이 있을 것으로 사료된다. 또한 양성대조군으로 사용한 아카보스(arcabose)을 농도별(1, 10, 250, 100 µg/mL)로 동일한 조건으로 알파글루코시다제 저해활성을 실험하여 보았을 때, IC₅₀ 값이 약 98.5 µg/mL으로 측정되어(data not shown), 항당뇨제로 처방되는 아카보스보다는 다소 낮았으나, 기능성식품소재로서의 탈염한 통통마디 추출물의 우수한 항당뇨활성을 확인할 수 있었음

Fig. 2. DPPH radical scavenging, ACE inhibition, and α-glucosidase inhibition activities of how water



extracts of *Salicornia europaea* powders before and after desalination. (A), antioxidant activity was measured using DPPH radical scavenging assay; (B), anti-hypersensitive activity was measured using ACE inhibition assay; (C), anti-diabetic activity was measured using α-glucosidase inhibition assay. □, before desalination; ■, after desalination; Values are expressed as mean±SD in triplicate experiments. *: $p < 0.05$ was analyzed by parametric multiple comparison procedures, One-way ANOVA test. When the result of ANOVA was significant, and Dunnett's multiple comparison test was applied *versus* the before desalination. Positive controls for DPPH radical scavenging, ACE inhibition, and α-glucosidase inhibition activities were ascorbic acid (IC₅₀: 0.49 mg/mL), captopril (IC₅₀: 12.1 µg/mL), and arcabose (IC₅₀: µg/mL), respectively (data not shown).

나. 통통마디 탈염소재를 이용한 식품소재 “파이토밀(PhytoMeal)” 개발

1) 원료의 표준화를 위한 염생식물 수확시기 및 건조 조건 확립

(1) 통통마디 생초(9월초)의 열처리 방법에 따른 변화 비교

○ 통통마디 생초로부터 탈염소재를 개발하는 공정에는 산화효소에 의한 갈변반응 방지를 위해 효소를 억제시키는 공정이 필요함. 효소를 억제시키는 공정으로 열처리를 선택하였고, 세가지 방법을 이용하였음. 표 1-1과 같은 조건으로 열처리 방법, 시간을 달리하여 실시하였음

표 1-1. 통통마디 탈염분말의 갈변방지를 위한 생함초의 열처리 방법

	시료	열처리	건조
①	생초 300g	열처리 없음	80°C, 6~7시간
②	생초 300g	끓는물 10초 → 찬물	80°C, 6~7시간
③	생초 300g	끓는물 1분 → 찬물	80°C, 6~7시간
④	생초 300g	끓는물 증기 2분 → 찬물	80°C, 6~7시간
⑤	생초 300g	열풍 100°C, 15분	80°C, 3시간

○ 열처리 직후의 생초를 보면 ②의 경우 열처리 전과 크게 다르지 않았음. ③의 경우 열처리 전보다 좀 더 초록색을 띄었고 잎 부분이 탱탱해짐. ④의 경우도 열처리 전보다 좀 더 초록색을 띄었

고, ⑤은 앞부분은 어느정도 초록색을 띄었으나 장시간 고온의 열풍으로 인한 갈변화가 관찰됨. 건조 후에는 열처리를 하지 않은 ①의 경우 완전히 갈변화가 진행되었고, ②의 경우도 크게 다르지 않았음. ③,④,⑤는 어느정도 초록빛을 유지하고 있었음(그림 1-1).

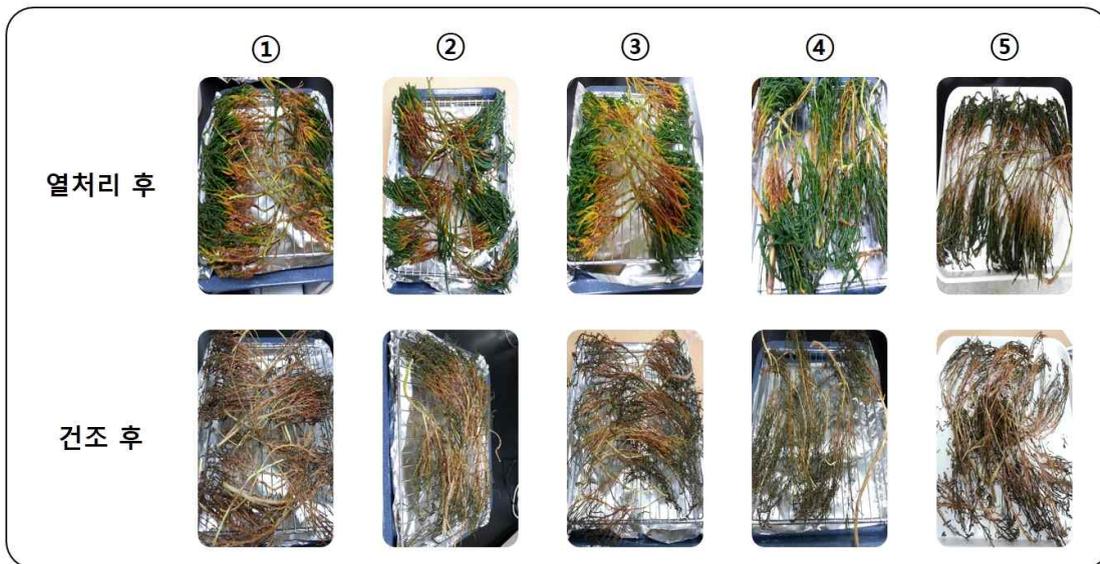


그림 1-1. 각각의 조건에 따른 통통마디 생초의 열처리 및 건조 후 모습



그림 1-2. 열처리 조건에 따른 건조 통통마디의 탈염 전후(열처리 조건 : ①, ③, ④, ⑤).

좌: 탈염전, 우: 탈염후

○ 열처리 조건별 비교에서 갈변화 방지 효과가 없었던 ②을 제외하고, 건조 통통마디를 믹서로 분쇄하여 탈염을 실시함. 분쇄한 통통마디 20 g에 400 ml의 냉수를 첨가하여 3분 추출하였고, 원심분리를 한 뒤 침전물을 회수하여 건조하였음. 그림 1-2를 보면 탈염 후에 색이 짙어지고 동량대비 부피가 증가하였음. 열처리를 하지 않은 ①의 경우 갈색의 건조가 되었고, ③,④,⑤는 초록색을 유지하였음. 그 중에서도 ④이 가장 좋은 결과를 나타냄. 끓는물 처리는 갈변화 방지 효과는 좋았으나 그 과정 중 가용성 고형분의 손실이 클 것으로 판단되어 제외하고, 끓는물 증기와 열풍의 열처리의 조건을 조절하여 다시 실시함.

표 1-2. 통통마디 생초의 끓는물 증기와 열풍 열처리 조건

	시료	열처리 조건	건조
①	생초 300g	열처리 없음	80°C, 6~7시간
②	생초 300g	끓는물 증기 1분 → 찬물	80°C, 6~7시간
③	생초 300g	끓는물 증기 2분 → 찬물	80°C, 6~7시간
④	생초 300g	끓는물 증기 4분 → 찬물	80°C, 6~7시간
⑤	생초 300g	열풍 100°C, 5분	80°C, 3시간
⑥	생초 300g	열풍 100°C, 10분	80°C, 3시간



그림 1-3. 통통마디 생초의 열처리 방법에 따른 건조 분쇄물

○ 끓는물 증기 처리의 경우 1, 2, 4분, 열풍의 경우 5, 10분으로 처리 시간을 조절하여 실시함(표 1-2). 그림 1-3을 보면 열처리하지 않은 건조 분쇄물은 완전히 갈변화 되었고, ②은 ①과 큰 차이가 없었음. 끓는물 증기 처리 시간이 짧아 갈변화 억제 효과가 없었던 것으로 판단됨. ③~⑥은 대체로 초록색을 유지하고 있어 탈염을 실시하여 비교함.



그림 1-4. 끓는물 증기와 열풍, 처리시간 따른 건조 통통마디의 탈염 전후(열처리 조건 : ③, ④, ⑤, ⑥. 좌: 탈염전, 우: 탈염후)

표 1-3. 끓는물 증기와 열풍, 처리시간 따른 건조 통통마디의 탈염 전후 색도

열처리	탈염전			탈염후		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
①	70.61±0.29	-2.90±0.12	22.36±0.23			
③	71.27±0.82	-6.14±0.16	23.23±0.40	68.64±0.81	-6.62±0.23	24.15±0.31
④	73.78±0.25	-5.70±0.06	22.88±0.17	70.80±0.57	-5.93±0.07	24.06±0.27
⑤	71.78±0.46	-4.93±0.08	22.49±0.32	68.56±0.44	-5.44±0.08	23.18±0.26
⑥	71.22±0.33	-5.88±0.09	23.14±0.21	68.97±0.33	-6.34±0.16	23.68±0.94

○ 분쇄한 통통마디 25 g에 냉수 500 ml을 첨가하여 3분간 추출 후 원심분리하여 탈염물을 회수하고 건조하였음. 그림 1-4를 보면 모두 탈염 전보다 후에 색이 짙어졌고, 부피가 증가하였음. 밀러 분쇄 후 표 1-3의 색도값을 보면 탈염 전보다 탈염 후 L*, a*값이 감소하고, b*값은 증가하는 경향을 보임. ①은 열처리를 한 시료와 비교했을 때, 적색도를 의미하는 a*값의 차이가 커 갈변화가 됐음을 알 수 있음.

○ 끓는물 증기 처리한 경우는 ③의 L*,a*값이 더 낮아 좀 더 짙은 초록색을 띄고, ④은 밝은 초록색을 띠는 것을 알 수 있음. 끓는 물 증기 처리 시간이 짧았을 때는 갈변화가 되었고, 길어졌을 때는 갈변화 방지는 되었으나 오히려 색이 바래는 경향을 보여 끓는물 증기처리 시간은 2분이 적절한 것으로 판단됨.

○ 열풍 처리의 경우는 ⑤는 초록색을 띄지만 일부는 갈변화 되어 a*값이 다른 시료들에 비해 더 높음. ⑥은 ⑤보다 a*값이 더 낮고 ③과 비슷한 결과값을 보임. 열풍처리의 경우 처리시간 5분은 효소 불활성화를 하는데 짧은 시간이고, 15분은 고온의 열풍에 오랜 시간 노출되어 색이 갈변화 되는 단점이 있어 10분이 적절한 것으로 판단됨. 따라서 생초를 열처리하여 탈염소재를 만드는 경우 끓는물 증기처리는 2분, 열풍 처리는 10분이 적절함.

(2) 통통마디 생초(9월초)의 건조 방법에 따른 변화 비교

○ 통통마디 생초의 동결건조와 열풍건조에 따른 차이를 알아봄. 동결건조는 별도로 효소 불활성화 과정을 거치지 않았고, 생초를 세척 후 잘게 잘라 실시하여 2주가 소요되었음. 열풍건조의 경우 효소의 불활성화를 위해 끓는물 증기 2분 처리 후 80°C에서 열풍건조를 실시하였고, 2일이 소요됨. 건조 후 수율은 동결건조 16.6%, 열풍건조 16.9%로 큰 차이를 보이지 않았음. 각각의 건조 통통마디는 분쇄 후 탈염을 실시하고, 밀러 분쇄 후 색도를 비교하였음.

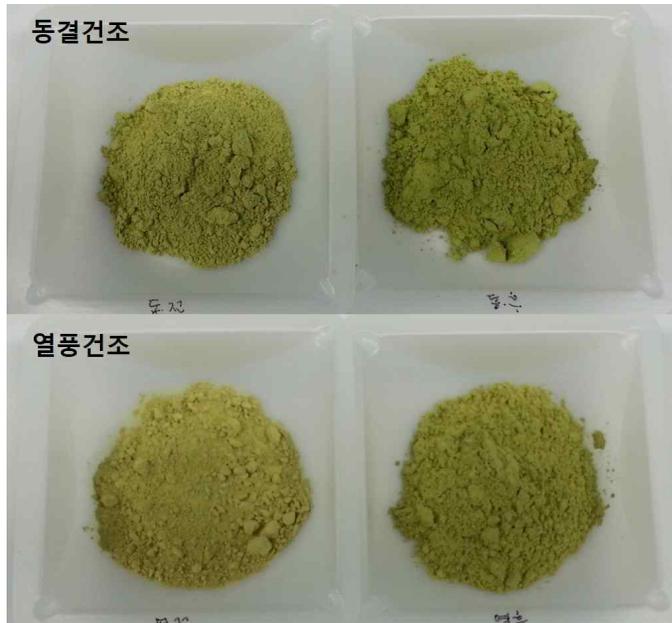


그림 1-5. 통통마디 생초의 건조방법에 따른 탈염 전후. 좌: 탈염전, 우: 탈염후

표 1-4. 통통마디 생초의 건조방법에 따른 건조 통통마디의 탈염 전후 색도

	탈염전			탈염후		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
동결건조	72.16±0.77	-6.35±0.17	22.47±0.48	66.46±0.34	-8.25±0.16	23.79±0.41
열풍건조	71.27±0.82	-6.14±0.16	23.23±0.40	67.72±0.50	-7.36±0.07	23.44±0.10

○ 표 1-4의 결과 값을 보면 건조방법에 따라 큰 차이를 보이지 않았지만, 탈염 후를 비교하면 동결 건조를 한 경우 L*, a*값이 더 낮아 좀 더 짙은 초록색을 띤다는 것을 알 수 있음. 색도에 있어 동결건조가 더 우수하지만 큰 차이가 없고, 건조하는데 소요되는 시간, 에너지, 비용 등을 고려했을 때 열풍건조가 더 효율적인 방법이라고 판단됨.

(3) 통통마디의 수확시기(7월초 vs 9월초)에 따른 비교

○ 통통마디의 수확시기에 따른 차이를 보기 위하여 유초(7월초)와 성초(9월초)를 각각 비교하였음. 각각의 동결건조 통통마디를 탈염한 뒤 밀러로 분쇄하여 색도를 측정하였음. 7월초 탈염 분말의 색도는 L*:66.55±0.63, a*:-6.11±0.15, b*:16.97±0.22로 9월초 탈염 분말과 비교하였을 때, L*,a*값은 비슷하였지만 b*값이 크게 차이가 났음. 황색도를 의미하는 b*값이 9월초가 더 높아 9월초는 노란 빛이 많이 도는 초록색이고 7월초는 선명도가 높은 초록색을 띤다. 식품소재로서 적용하는 목적에 따라 적합한 수확시기를 선택하는 좋을 것으로 판단됨.

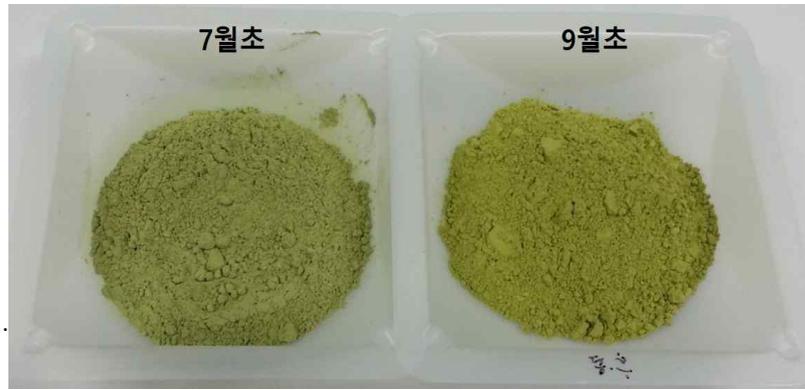


그림 1-6. 수확시기에 따른 동결건조 통통마디의 탈염 분말

○ 통통마디가 완전히 성숙하기 전 7월에 수확하여 수세 후 동결건조한 시료와 통통마디가 붉게 물 들기 전 성숙시기인 9월에 수확하여 수세 후 동결건조한 시료를 동일한 크기로 분쇄함. 각각의 시료 50 g에 2~4°C 냉수1L를 부어 3분간 교반한 뒤 원심분리하여 침전물을 회수후 건조함. 건조된 탈염물은 0.25mm의 sieve를 이용하여 ultra miller로 미분쇄함. 이를 시료로 cation chromatograph를 실시하였으며 이로부터 수확시기(7월, 9월)별 통통마디 탈염물의 양이온 함량 비교를 실시하여 표에 나타냄(표 1-5, 그림 1-7).

표 1-5. 수확시기별 원료를 이용한 통통마디 탈염물의 양이온 함량 비교

mg/kg	Na	K	Mg	Ca
7월 수확하여 동결건조한 통통마디 탈염물	13,392	25,727	2,204	500
9월 수확하여 동결건조한 통통마디 탈염물	8,817	1,315	1,952	418

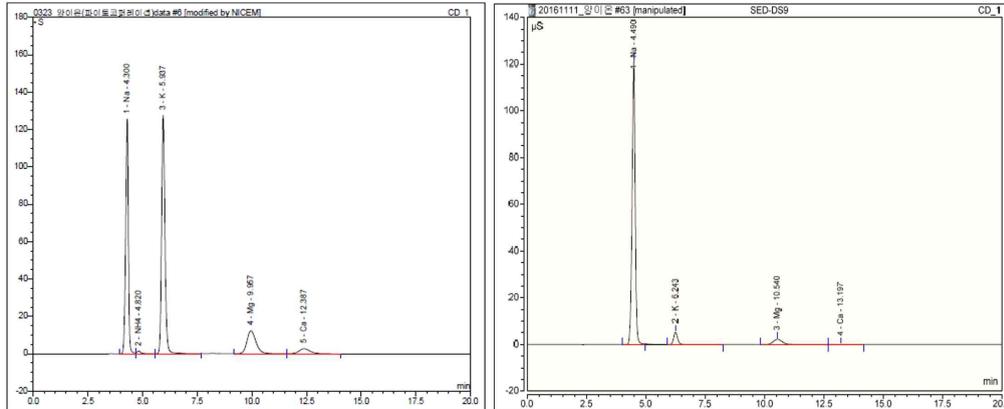


그림 1-7. 수확시기별 원료를 이용한 통통마디 탈염물의 양이온 크로마토그램

2) 염생식물 탈염물소재의 탈염시간 및 탈염시 사용되는 물의 온도에 따른 영양성분 분석

(1) 건조 통통마디(7월초) 분말의 탈염시 추출온도, 추출시간에 따른 비교

○ 통통마디 시료는 7월에 수확하여 동결건조한 건조를 마쇄하여 사용하였으며, 탈염 시간과 온도를 달리하여 냉수추출 실시하였음. 건조 50 g에 2~4°C의 냉수 1 L에 5분, 7분간 또는 같은 양의 건조에 9~10°C의 물 1 L에 3분간 교반 후 원심분리하여 상등액을 분리하고 침전된 탈염물만을 얻어

건조기에서 건조 후 miller로 미분쇄하여 양이온 크로마토그래피법으로 분석하였음. 원심분리 후 분리된 상등액, 즉 통통마디 건조의 마쇄물로부터 탈염으로 빠져나온 미네랄 부분도 모두 모아 표 2-1과 같이 농축하여 건조 후 양이온 크로마토그래피법으로 분석하여 탈염부분과 그 염이 빠져나온 부분의 미네랄 차이를 확인하였음. 용해도 차에 의한 Na와 그 외 미네랄인 K, Ca, Mg 등 통통마디에 주요한 양이온들을 비교하였을 때, 탈염에 사용하는 물의 온도가 Na의 탈염을 좀 더 쉽게 하는 것을 확인할 수 있었음. 물의 온도가 비슷하면 물에 담겨 교반되는 시간이 5분 7분 간격으로 차이가 있어도 통통마디 탈염물에 남는, 또는 탈염 후 빠져나가는 부분으로 모이는 Na와 기타 염의 비율이 비슷한 것을 확인할 수 있음. 이로써 통통마디의 탈염은 냉수가 담겨져 있는 시간보다는 탈염할 물의 온도가 중요한 것을 확인함.

표 2-1. 통통마디 탈염소재에서 탈염시간 및 사용되는 물의 온도에 따른 미네랄 함량 변화

통통마디 탈염물에 존재하는 양이온 함량(mg/kg)					Na : K 의 비율	
조건	Na	K	Mg	Ca	Na	K
2~4°C, 5분	8,676	1,447	2,390	811	6.0	1
2~4°C, 7분	9,209	1,487	2,524	727	6.2	1
9~10°C, 3분	8,767	1,402	2,143	551	6.3	1

표 2-2. 통통마디 탈염시 탈염 시간, 사용되는 물의 온도에 따라 탈염물로부터 빠져나오는 액에 존재하는 미네랄 함량 변화

탈염으로 빠져나온 액에 존재하는 양이온 함량(mg/kg)					Na : K 의 비율	
조건	Na	K	Mg	Ca	Na	K
2~4°C, 5분	15,266	1,682	492	8	9.1	1
2~4°C, 7분	15,148	1,658	486	9	9.1	1
9~10°C, 3분	15,002	1,645	460	9	9.1	1

3) 식품소재로 이용하기 위한 최적의 온도, 시간, 건조 조건 등의 탈염 조건 확립

(1) 통통마디 분말의 추출온도, 추출시간에 따른 탈염 정도 비교

○ 통통마디 건조분말 100 g에 4°C, 9°C, 20°C에 해당하는 증류수 2L를 첨가한 뒤 각각의 온도에서 300 rpm으로 교반하여 5분 간격으로 샘플링하였고, 100°C의 경우 환류냉각기를 이용하였음. 샘플은 원심분리(10,000 rpm, 20분)를 한 뒤 상등액을 필터링하여 염도와 브릭스를 측정하였고, 상등액을 감압농축하여 동결건조한 뒤 총고형분 함량을 측정하였음. 또한 총고형분 대비 염 및 염제외 고형분 함량을 계산한 각각의 결과를 표 3-1에 나타내었음.

○ 추출온도에 따른 총염량을 비교하면 염의 용출정도는 거의 차이가 없음. 추출시간에 따른 염의 용출정도를 비교해보면 추출시간 1분을 제외하고는 5분부터 30분까지 거의 비슷한 총 염량을 관찰할 수 있음. 따라서 5분에서 30분 이내에 통통마디 분말에 함유된 염이 거의 용출된 것으로 볼 수 있음.

- 그러나 총고형분을 보면 추출온도와 시간에 따라 차이가 있음. 염을 제외한 고형분을 비교하면 추출온도가 높아지고, 추출시간이 늘어남에 따라 증가하였음. 추출시간 30분 기준에서 20°C와 10 0°C 추출은 4°C 추출보다 각각 2.47배, 3.28배 높았음.
- 추출물의 가용성 고형분(Brix %)/ 염도(%) 지수는 그 값이 낮을수록 탈염물의 유기고형분의 손실이 적은 것으로 판단할 수 있어 이를 이상적인 탈염효과의 지표로 설정하여 비교하였음. 4°C, 9°C의 추출온도에서는 1.26 ~ 1.36으로 지수값이 낮고 추출시간에 따른 차이가 완만하였으나, 20°C 이상의 추출온도에서는 지수값이 1.5 이상으로 시간에 따라 급격히 증가하였음.
- 통통마디 분말 추출물의 염도, 고형분, 고형분/염도 지수를 비교하였을 때, 통통마디 분말을 식품 소재로서 이용하기 위한 바람직한 탈염의 조건은 4°C 이하의 냉수로 4분 이내 추출하는 것으로 판단됨. 이러한 조건에서 통통마디 분말의 유기물 추출을 최소화하고, 염을 효과적으로 제거할 수 있음.

표 3-1. 추출온도와 추출시간에 따른 탈염정도의 비교

시료량 (g)	추출 (°C)	가수량 (L)	추출시간 (min)	총고형분(g)	가용성고형분 (Brix%)/염도(%)	고형분 중 염 비율(%)	총염량(g)	염제외고형분(g)
100	4	2	1	33.0	1.26	79.4	26.2	6.8
100	4	2	5	35.0	1.25	80.0	28.0	7.0
100	4	2	10	35.6	1.27	78.9	28.1	7.5
100	4	2	15	36.3	1.29	77.7	28.2	8.1
100	4	2	20	36.8	1.30	76.9	28.3	8.5
100	4	2	25	37.2	1.31	76.3	28.4	8.8
100	4	2	30	37.5	1.32	76.0	28.5	9.0
100	9	2	1	34.3	1.30	76.6	26.3	8.0
100	9	2	5	36.4	1.30	76.9	28.0	8.4
100	9	2	10	37.0	1.31	76.2	28.2	8.8
100	9	2	15	37.8	1.33	75.0	28.3	9.5
100	9	2	20	38.3	1.35	74.2	28.4	9.9
100	9	2	25	38.7	1.36	73.7	28.5	10.2
100	9	2	30	39.0	1.36	73.3	28.6	10.4
100	20	2	1	40.3	1.52	65.8	26.5	13.8
100	20	2	5	42.3	1.51	66.2	28.0	14.3
100	20	2	10	45.8	1.63	61.5	28.2	17.6
100	20	2	15	47.3	1.67	59.8	28.3	19.0
100	20	2	20	48.8	1.71	58.4	28.5	20.3
100	20	2	25	50.3	1.76	56.9	28.6	21.7
100	20	2	30	51.0	1.78	56.3	28.7	22.3
100	100	2	1	44.1	1.53	65.3	27.1	14.9
100	100	2	5	43.6	1.56	64.0	27.9	15.7
100	100	2	10	48.0	1.71	58.5	28.1	19.9
100	100	2	15	52.8	1.87	53.6	28.3	24.5
100	100	2	20	55.3	1.94	51.5	28.5	26.8
100	100	2	25	56.7	1.98	50.6	28.7	28.0
100	100	2	30	58.5	2.02	49.4	28.9	29.6

4) 탈염 공정의 개선

(1) 식품소재로 이용하기 위한 통통마디 분말의 탈염공정 확립

- 지금까지 실험의 결과를 토대로 식품소재로 이용하기에 적합한 통통마디 분말의 탈염 조건을 도출하였음. 2~4°C의 냉수로 4분이내로 추출하는 것이 적합하다고 판단되었고, 실험은 2~4°C의 냉수로 3분 추출하고 회수하는 것으로 진행되었음.
- 이러한 탈염공정을 현재의 lab-scale에 맞게 개선하였음. 한번에 처리할 수 있는 통통마디 분말 50g에 2~4°C의 냉수 1L를 첨가한 뒤 3분간 교반하여 추출함. 추출 후에는 원심분리(10,000 rpm, 20분, 4°C)하여 상등액을 분리하고 침전물을 회수함. 염제외 고형분의 손실을 최소화하면서 염을 확실하게 제거하기 위하여 같은 방법으로 한 번 더 추출을 실시함. 회수한 통통마디 탈염물은 건조 후에 입자의 크기가 100~ 150 μm가 되도록 분쇄함. 그림 4-1에 공정도를 나타내었고, 식품소재로서 통통마디 탈염소재 제조에 적합한 탈염공정을 확립하였음.



그림 4-1. 통통마디 탈염공정의 표준화 확립

(2) 식품회사 공급용(B to B) 파우치 제품 및 가정 공급용(B to C) 유리병 제품 시제품 개발

- 탈염공정 개선한 통통마디 탈염분말을 일광 및 습기와 차단하기 위하여 식품회사 공급용 1kg, 5kg, 10kg 제품의 경우 알루미늄 파우치를 이용하였음. 알루미늄 파우치에 보관시 외부로부터의 빛과 습기가 차단되는 것을 약 3개월간 모니터링하며 확인함. 통통마디 탈염분말 100 g을 투명한 비닐과 알루미늄 파우치에 각각 넣고 두 경우 모두 열을 가해 입구를 밀폐함. 두 경우 모두 형광 등이 1일 평균 9시간, 오후 2시~4시의 일광이 들어오는 테이블 위에 두고 색 변화를 살펴본 결과 투명한 비닐에 담긴 탈염분말의 색이 약 1달 후 빛에 직접 노출된 부분부터 갈색으로 변하는 것을 색차계로 확인함. 투명비닐 포장시 일광에 1달간 노출된 후 측정한 색차계 값에서 a*값이 두드러지게 커지는 것은 갈변화가 많이 진행된 것을 의미함. 알루미늄파우치 포장의 경우 색차계로 측정한 값의 차이가 1달 전후로 거의 없는 것을 확인함(표 4-1).

표 4-1. 공정개선 후 탈염한 통통마디 분말을 투명비닐 및 알루미늄파우치포장에 담아 1개월간 일광에 노출후 색차계 비교

	일광 노출전			일광 노출후(1개월)		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
투명비닐 포장	66.51±0.18	-8.23±0.33	23.68±0.22	70.12±0.08	-5.06±0.37	24.14±0.36
알루미늄파우치 포장	66.49±0.23	-8.23±0.27	23.56±0.19	66.83±0.26	-8.16±0.17	23.74±0.11

○ 따라서 대량으로 포장되고 외부에 적재되어 있는 경우가 빈번한 B to B 제품의 경우 일광 및 습기를 차단할 알루미늄 파우치를 이용하는 것이 바람직할 것으로 판단함. 현재는 제품의 미려한 색상을 잘 드러내기 위한 홍보의 효과로 가정용 260 g 제품은 유리병을 사용하고 있지만 추후 스타커를 전면으로 두르거나 불투명 플라스틱 제품으로 바꾸어 제품포장 단가 절감 및 내용물 보호를 추진할 계획임.



그림 4-2. 통통마디 탈염소재 분말 “파이토밀(PhytoMeal)” 제품의 색상 및 흡습방지를 위한 알루미늄파우치 포장 개발 및 가정용 유리병 제품 개발

다. 염생식물 탈염소재(PhytoMeal)의 뇌혈관 및 뇌신경세포 보호 기능개선 관련 유효물질의 분획 및 지표 물질 분석

1) 뇌혈관 혈류 개선을 위한 항혈전(anti-thrombous) 활성능 분석

(1) 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 프로트롬빈 및 에이피타임 측정

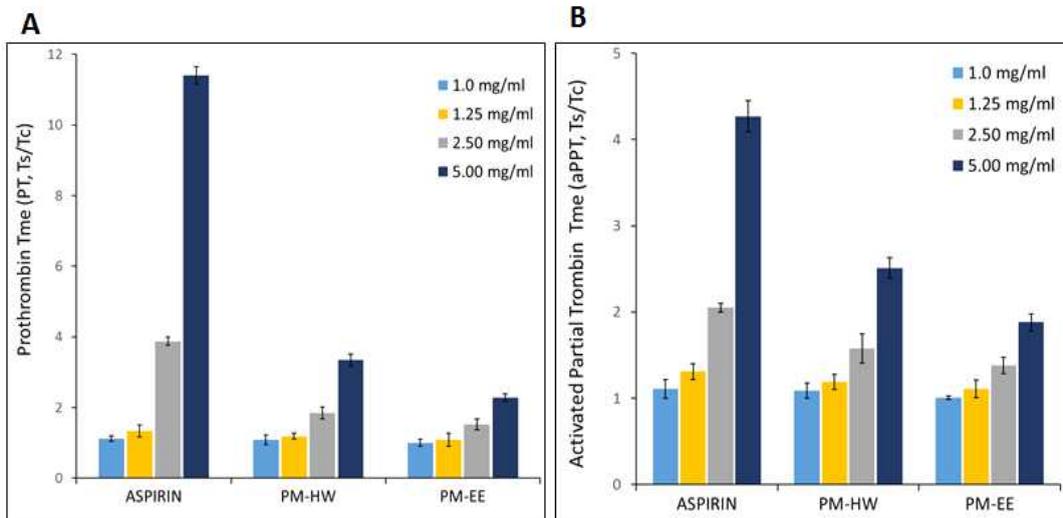
○ 통통마디 탈염분말인 파이토밀(10g)에 대하여 각각 열수 및 에탄올 환류 추출을 실시하였음. 각각의 추출물을 감압농축 후 동결건조하여 수득된 시료(열수추출물: PM-HW, 에탄올추출물: PM-EE)에 대하여 혈액 응고경로 중 외인성 경로의 혈액응고저해활성을 나타내는 프로트롬빈 타임(Prothrombin Time, PT)과 내인성 경로의 혈액응고 저해활성을 나타내는 에이피타임(activated Partial Prothrombin Time, aPTT)을 측정하였음. 그림 1-1의 결과에서 열수추출물 및 에탄올 추출물의 시료농도별 (5.0, 2.5, 1.25, 1.0, 0.5, 0.1mg/ml)로 aPTT와 PT를 측정하였으며, 양성대조군으로 임상 항혈전제로 시판되고 처방되는 아스피린(aspirin)을 2.5~1.0 mg/ml의 농도로 비교 평가하였음.

그림 1-1. 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 프로트롬빈 및 에이피타임

A: Prothrombin Time, B: activated Partial Prothrombin time

PM-HW: 파이토밀 열수추출물, PM-EE: 파이토밀 에탄올추출물

○ 그림 1-1의 결과에서 파이토밀의 추출물은 1.25 mg/ml 이상의 용매대조군 보다 혈액응고를 지연시켰으며, 전반적으로 에탄올 추출물(PM-EE) 보다 열수추출물(PM-HW)에서 DMSO용매 대조군보다 프로트롬빈타임과 에이피타임을 더 길게 지연시켜 파이토밀의 열수추출물이 항혈전 활성 지표성분의 탐색소재로 적합함을 확인할 수 있었음. 파이토밀 열수추출물(PM-HW)은 정제합성물인 아스피린보다 항혈전 활성이 약하였으나, 정제되지 않은 천연 추출물임을 감안하고, 또한 유효성분을 정제하였을 때 장출혈등의 부작용을 나타내는 아스피린보다 우수한 항혈전성 소재화가 가능할 것으로 판단되었음.



(2) 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 총폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화활성

○ 통통마디 탈염분말인 파이토밀(10g)에 대하여 각각 열수 및 에탄올 환류 추출을 실시하였음. 각각의 추출물을 감압농축 후 동결건조하여 수득된 시료(열수추출물: PM-HW, 에탄올추출물: PM-EE)에 대하여 각 농도별(2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 mg/ml)로 동일조건에서 DPPH 라디칼 소거능을 이용하여 항산화활성을 측정하였음. 전반적으로 열수추출물보다 에탄올 추출물에서 항산화활성이 다소 우수하였으나 (그림 1-2A), 전체 추출수율과 항응고활성을 고려할 때 본과제의 뇌신경염증 억제와

뇌혈류개선 효과 연구를 위한 소재로 열수추출물을 유효지표성분 탐색 소재로 선택하였음.

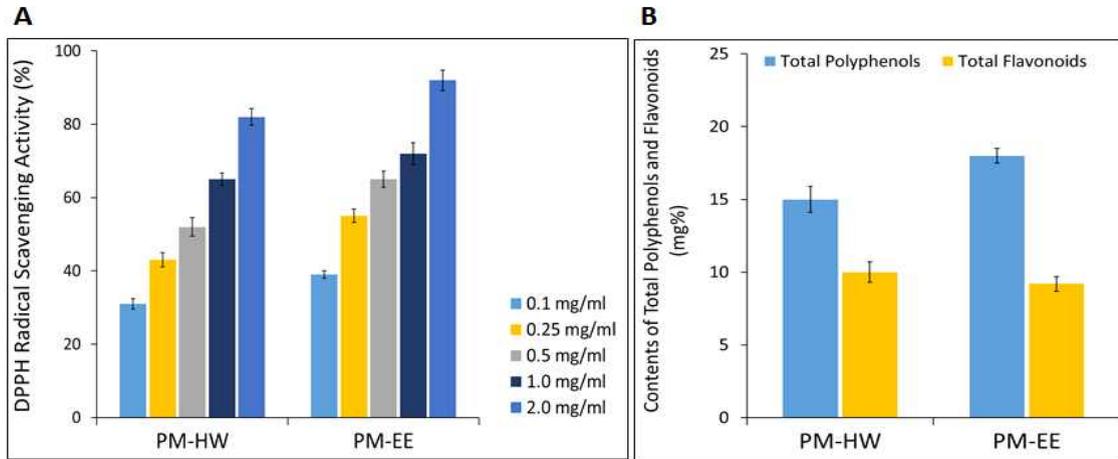


그림 1-2. 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 항산화활성 및 총폴리페놀, 플라보노이드 함량
 A: 항산화활성, B: 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량
 PM-HW: 파이토밀 열수추출물, PM-EE: 파이토밀 에탄올추출물

○ 또한 열수추출물과 에탄올추출물 내의 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량을 분석한 결과(그림 1-2B) 전반적으로 열수추출물보다 에탄올 추출물에서 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높았음. 플라보노이드의 경우 에탄올 추출물보다는 열수추출물에서 전체 폴리페놀 함량 대비 비율이 높게 나타났으며, 두 추출물의 수율과 추출용재의 비용을 고려할 때, 에탄올 추출물보다는 열수 추출물이 소재화로 유리하다고 판단됨.

2) Acetylcholinesterase 저해활성 분석

(1) 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 AChE 저해활성 분석

○ 통통마디 탈염분말인 파이토밀(10g)에 대하여 각각 열수 및 에탄올 환류 추출을 실시하였음. 각각의 추출물을 감압농축 후 동결건조하여 수득된 시료(열수추출물: PM-HW, 에탄올추출물: PM-EE)에 대하여 각 농도별(2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1mg/ml)로 동일조건에서 Ellman's coupled enzyme assay를 이용하여 AChE 저해활성을 측정하였음. 양성대조군으로 임상 AChE 저해제로서 알려져 있는 알칼로이드계의 galanthamine과 berberine을 10, 100µg/ml의 농도를 비교평가 하였음. 전반적으로 열수추출물보다 에탄올 추출물에서 아세틸콜린 에스테라제 저해활성이 다소 우수함을 확인하였음 (그림 2-1A).

(2) 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 총알칼로이드 함량 분석

○ 그림 2-1B에는 두 추출물의 총알칼로이드 함량을 나타내었는데, 아세틸콜린 에스테라제 저해활성이 더 높은 에탄올추출물에서 알칼로이드 함량이 높음을 확인할 수 있었음. 따라서, 본 과제의 목표인 파이토밀로부터 기억력개선 향상에 도움이 되는 소재개발을 위한 탐색소재로는 파이토밀의 에탄올 추출물을 선택하기로 하였음.

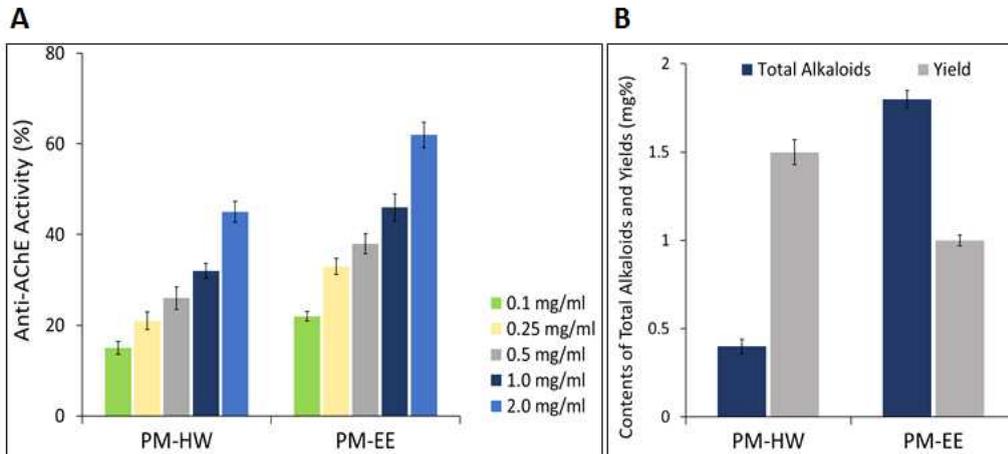


그림 2-1. 파이토밀 열수 및 에탄올 추출물의 AChE 저해활성 및 알칼로이드 함량
 A: Anti-AChE activity, B: 알칼로이드함량 및 수율
 PM-HW: 파이토밀 열수추출물, PM-EE: 파이토밀 에탄올추출물

3) 유효활성 성분의 추출공정 확립

(1) 파이토밀 열수 및 에탄올 추출의 최적화 조건 확립

○ 열수추출 조건 최적화

50 g의 파이토밀에 1 L의 증류수를 가하여 저온 감압추출(75°C, 8시간), 무압력추출(100°C, 4시간), 압력추출(121°C, 4시간)의 조건을 달리하여 추출한 후 원심분리(10,000 g, 25min)하고 상등액을 수득하여 농축 후 동결건조하여 확보된 추출시료의 수율, 항혈전활성, 항산화활성을 평가한 결과 (표 3-1), 100°C 무압력추출 4시간 조건에서 수율이 가장 높았을 뿐 아니라 항혈전활성과 항산화 활성도 우수하였으므로, 열수추출물의 대량 조제 조건은 100°C 무압력추출 4시간(2회)으로 결정하였음.

표 3-1. 파이토밀 열수추출 조건 최적화

	추출수율(%)	항혈전 활성 (Ts/Tc)		항산화활성(%) (1mg/ml)
		PT (2.5mg/ml)	aPTT (2.5mg/ml)	
저온 감압 추출 (75°C, 8시간)	13.0	1.65	1.47	60.9
무압력추출 (100°C, 4시간)	22.4	1.84	1.58	67.2
압력 추출 (121°C, 2시간)	15.1	1.72	1.66	62.0

○ 파이토밀 에탄올추출물의 제조조건 확립

50 g의 파이토밀에 500 mL의 50%에탄올을 가하여 12시간 실온 교반추출, 70%에탄올을 가하여 초음파실온 추출, 95%에탄올을 가하여 70±2°C 환류냉각추출의 조건을 달리한 에탄올추출을 실시하고, 감압여과 및 원심분리(10,000g, 25min) 후 수득된 상등액을 감압회전농축하고 동결건조하여 조제된 시료에 대하여 수율과 아세틸콜린 에스터레이스 저해활성과 총알칼로이드 함량을 분석한 결

과 (표 3-2), 95% 에탄올의 70±2°C 환류냉각 추출(6시간 2회)을 최적조건으로 확립하였음.

표 3-2. 파이토밀 에탄올추출 조건 최적화

	추출수율(%)	Anti-AChE activity		총알칼로이드 (mg%)
		1mg/ml	2mg/ml	
50% 에탄올 (RT, 12시간)	13.28	31.2	44.0	1.21
70% 에탄올 (초음파, 1시간)	11.17	34.4	52.8	1.49
95% 에탄올 (70±2°C, 6시간)	15.34	42.8	65.1	1.63

(2) 파이토밀 열수추출물로부터 유기용매 분획과 항혈전활성

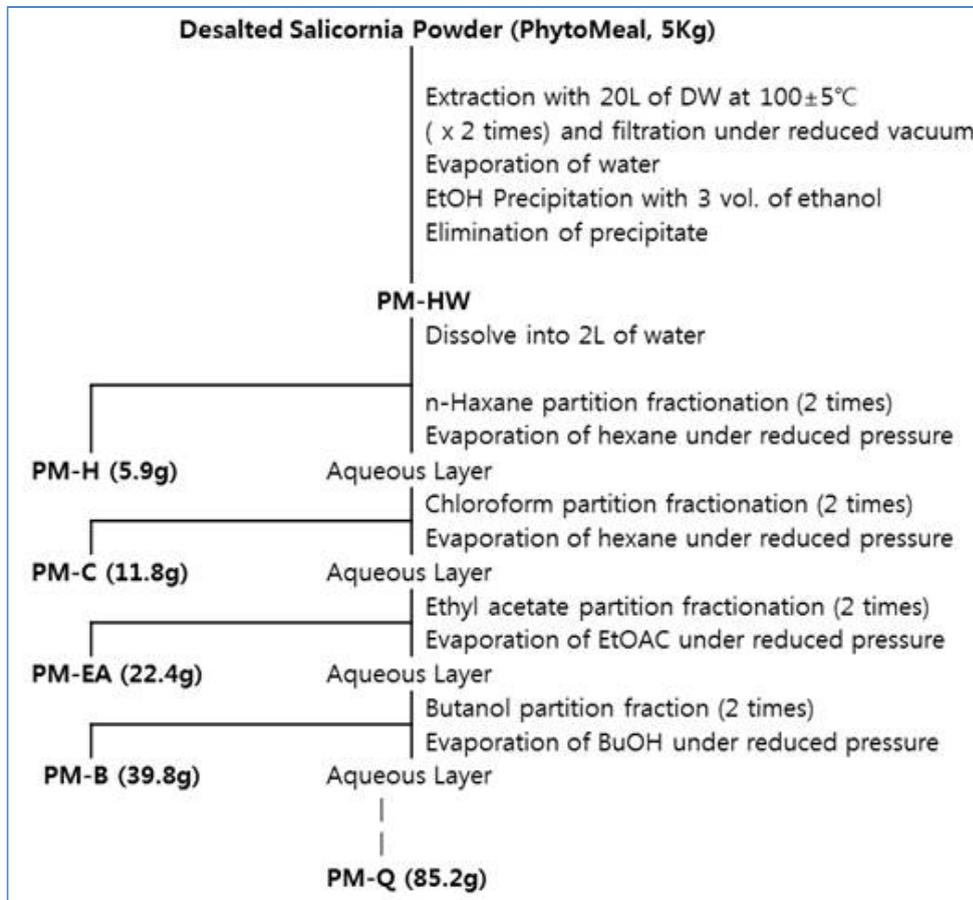


그림 3-1. 파이토밀 열수추출물로부터 유기용매 분획 도식도

○ 파이토밀 2 Kg을 20 L의 증류수를 가하여 무압력으로 100±5°C에서 4시간 동안 열수추출(경서추출기, Cosmos660, 한국)하고 수득된 추출물을 방냉한 후, 여과하여 생성된 추출잔사에 대하여 동일한 방법으로 열수추출을 반복함. 2회로 추출된 열수추출물(35L)을 감압농축하여 3L의 농축액을 획득하고 7L의 에탄올을 가하여 4°C에서 하룻밤 정치하여 생긴 고분자 침전물을 원심분리(4°C,

10,000rpm, 30분) 및 감압필터 여과로 제거하고, 여과액을 감압건조하여 에탄올을 완전 제거한 액을 증류수 2L에 재용해 시켰음. 다음으로 5L 부피의 분액깔대기에 2L의 n-헥산을 혼합하여 헥산층과 수층으로 2회 분획하였음. 상기 수층에 2L의 클로로포름을 첨가하여 클로로포름층과 수층으로 2회 분획하고, 수층에 다시 에틸아세테이트 2L를 첨가하고 에틸아세테이트층과 수층으로 2회 분획하였음. 최종적으로 수층에 n-부탄올을 2L 가하여 부탄올층과 수층으로 2회 분획하였으며, 다음으로 각각의 분획층들을 감압건조하여 각 유기용매를 제거하고 동결건조시켜, 헥산 분획물(5.9g), 클로로포름 분획물(11.8g), 에틸아세테이트 분획물(22.4g), 부탄올 분획물(39.8g) 및 물 분획물(85.2)을 제조하였음(그림 3-1). 그림 3에서 수득된 5개의 유기용매 분획물(5.0, 2.5, 1.25, 1.0 mg/ml)에 대하여 PT와 aPTT 활성을 측정한 결과 에틸아세테이트 획분인 PM-EA에서 내인성 및 외인성 경로의 혈액응고 저해활성을 가장 강력하게 저해함을 확인하였음 (그림 3-2).

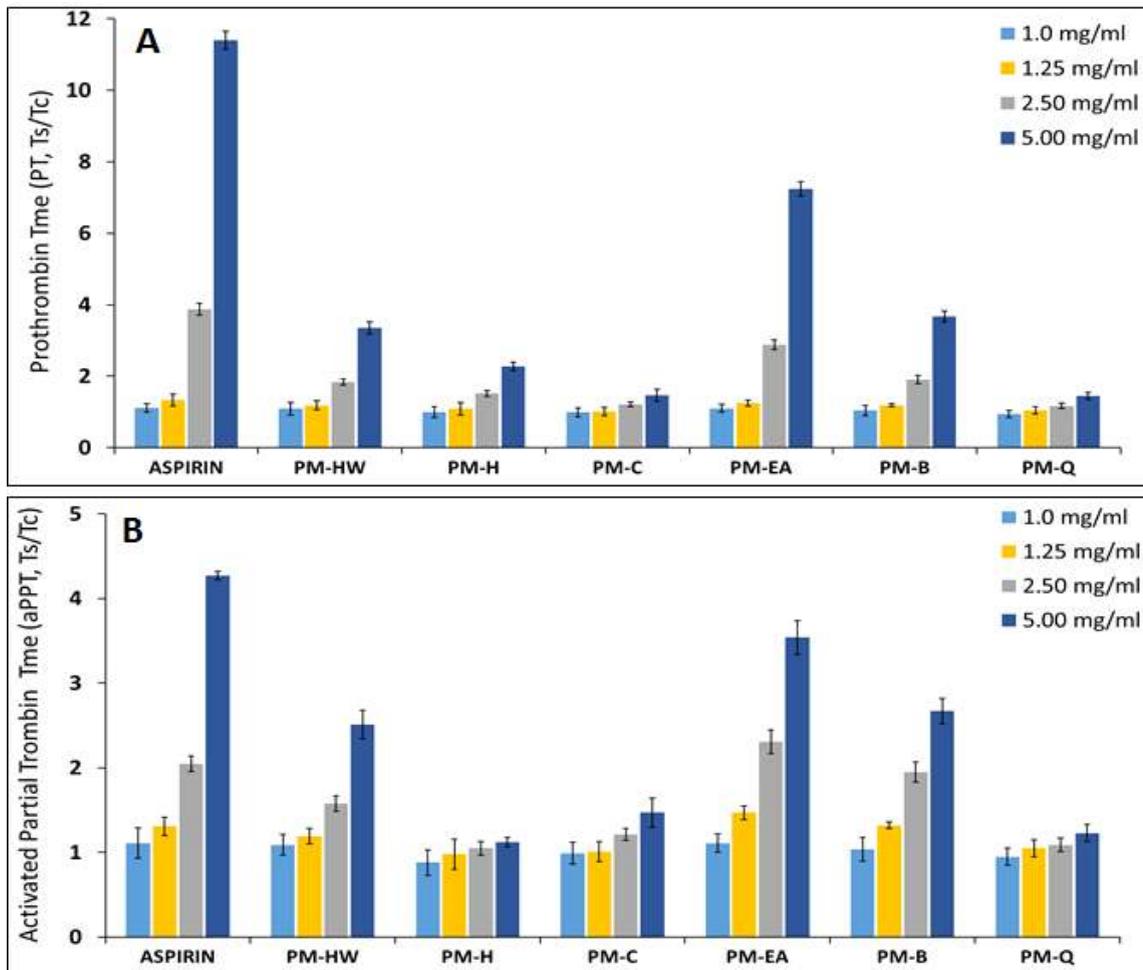


그림 3-2. 파이토밀 열수추출물 유기용매 분획의 항혈전 활성 비교

A: 프로트롬빈타임 저해활성, B: 에이피타임 저해활성

(3) 파이토밀 열수추출물 유기용매 분획물의 항산화 활성과 총폴리페놀, 플라보노이드 함량 분석

○ 파이토밀 열수추출물의 유기용매 분획물에 대하여 항산화 활성과 총폴리페놀과 플라보노이드의

함량을 분석한 결과 에틸아세테이트획분(PM-EA)과 클로로포름획분(PM-C)에서 비교적 높은 항산화활성과 총폴리페놀 및 플라보노이드가 풍부하게 함유되어 있음을 확인할 수 있었음. 두 획분의 수율과 항혈전활성을 종합적으로 고려할 때 파이토밀 열수추출물의 에틸아세테이트 획분(PM-EA)을 유효 지표성분의 정제를 위한 활성획분으로 결정하였음 (그림 3-3)

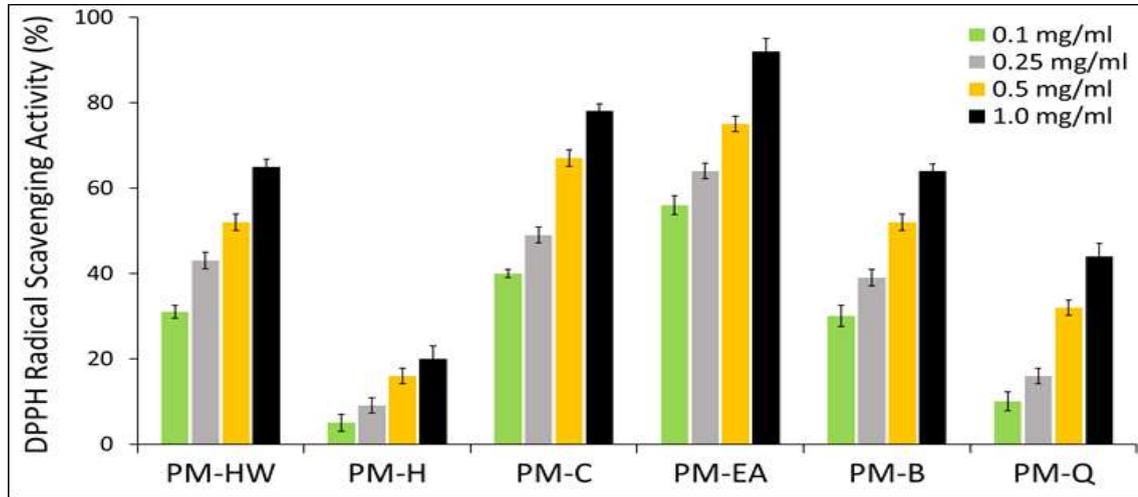


그림 3-3. 파이토밀 열수추출물 유기용매 분획의 항산화 활성 비교

4) 유효활성 획분으로부터 지표물질의 정제

(1) PM-EA 획분으로부터 항혈전 활성 지표성분의 정제

○ PM-EA 획분의 컬럼크로마토그래피 정제

- 내인성 및 외인성 경로의 항응고활성, 즉 프로트롬빈타임과 에이피타임을 가장 오래 연장시켜 항응고활성이 가장 우수한 파이토밀의 에틸아세테이트 분획물(PM-EA) (20g)을 100 ml의 증류수(pH 4)에 용해시켜 흡착성 디아이온 HP-20 레진이 충전된 첫 번째 컬럼 (5 × 50 cm) 상단부위에 흡착시킨 후 증류수, 30% 메탄올, 70% 아세톤 및 70% 아세톤으로 순차적으로 용출시켜 5개의 분획물들(PMEA-H1 ~ PMEA-H5)을 획득함. 그 중 항응고활성이 가장 우수한 70% 메탄올 용출획분(PMEA-H3, 5.7g)을 극성 실리카겔이 충전된 두 번째 컬럼 (3.3 × 60 cm)에서 메탄올과 클로로포름을 1:1로 혼합한 이동상 용매를 이용하여 유속 0.5 ml/분의 속도로 용출시켜 200 ml씩 5개의 분획물(PMEA-S-1 ~ PMEA-S-5)을 획득함. 이 중 항응고활성이 가장 우수한 획분(PMEA-S-3, 1.43g)을 감압건조 후 메탄올에 용해하고, 저분자용 겔여과 세파덱스 (Sephadex) LH-20이 충전된 세 번째 컬럼 (2.5 × 40 cm) 상단에 도입한 다음 100% 메탄올(유속 0.1 ml/분)을 이동상 용매로 사용하여 흘려보내면서 30 ml씩 총 10개의 분획물(PMEA-L-1 ~ PMEA-L-15)을 수득함. 최종적으로 상기 15개의 LH-20 분획물 중 프로트롬빈타임과 에이피타임을 오래 연장시켜 항응고활성이 가장 높은 획분 PMEA-L-12 획분을 감압농축, 동결건조하여 각각 189 mg을 수득함 (그림 4-1).

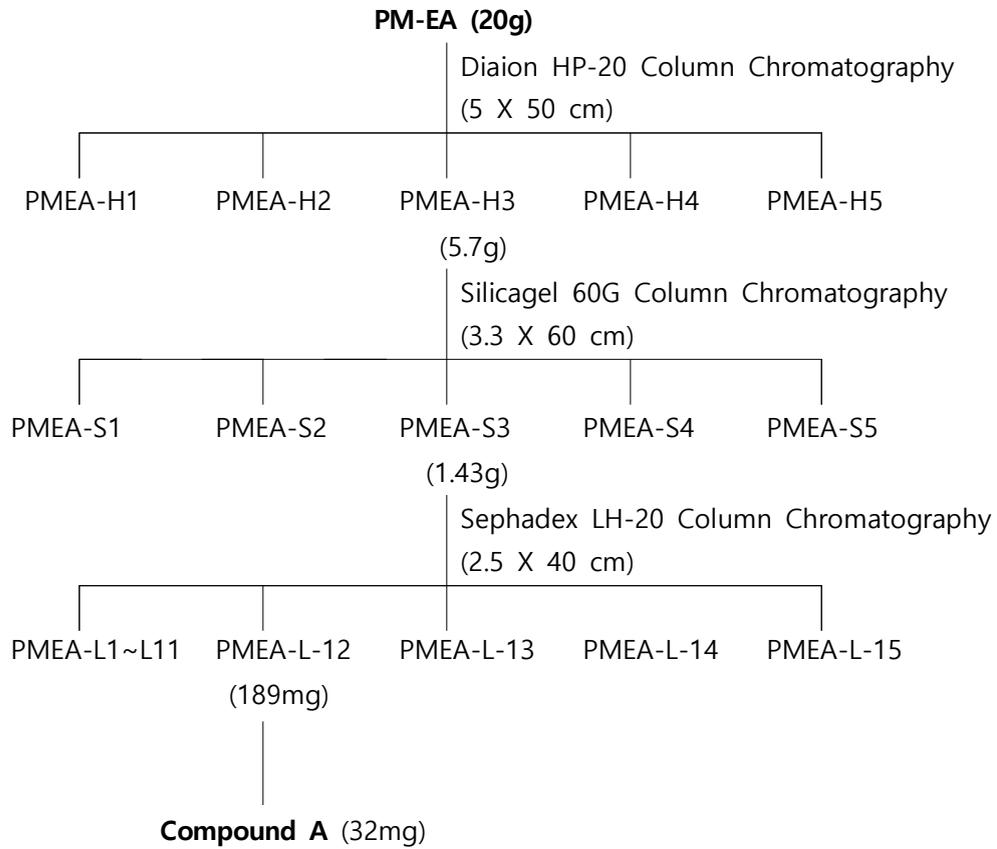


그림 4-1. PM-EA 획분으로부터 항혈전 활성 치료성분의 정제 도식도

○ 정제단계별 주요획분의 항혈전 활성 비교

- 그림 4-2는 컬럼크로마토그래피 각 단계의 주요활성 획분들의 항혈전 활성을 비교측정한 결과임. 동일조건에서 동일농도(2.5, 1.25 mg/ml)로 실험한 결과 초기 파이토밀의 열수추출물 대비 마지막 정제 분획물(PMEA-L-12)은 1.25mg/ml의 농도에서 PT 활성은 약 4배 증가됨을 확인할 수 있었음.

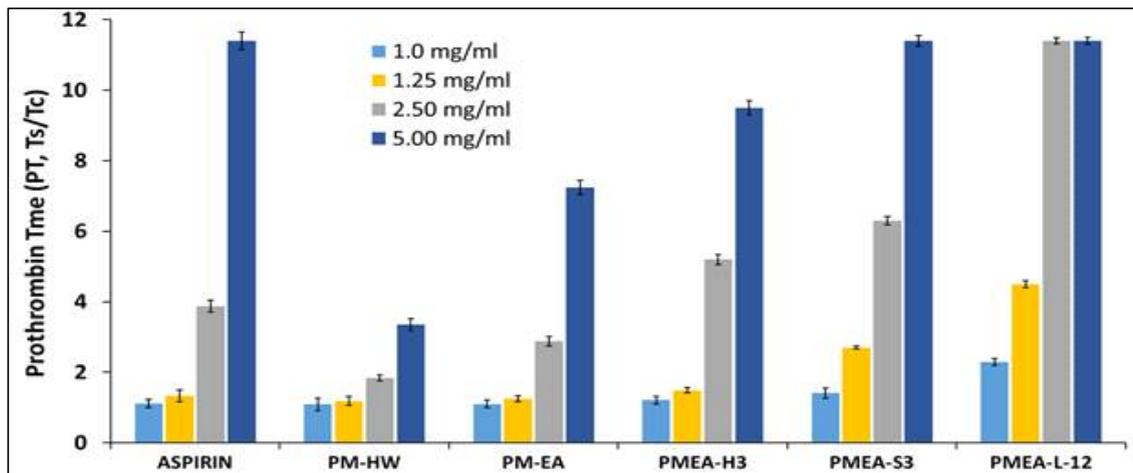


그림 4-2. PM-EA획분으로부터 정제한 주요 활성획분들의 항응고활성 비교

2) PM-EA 획분으로부터 항혈전 유효지표 성분(Compound A)의 단리

○ PMEAL-12로부터 Compound A 분리

- 컬럼크로마토그래피 마지막 정제 항혈전 유효 활성 성분인 PMEAL-12를 분석용 HPLC에서 분석한 결과(그림 4-3A), 4개의 주요피크 물질을 분리하였으며, 활성을 측정한 결과 머무름시간 18.1분대의 피크가 활성피크로 확인하여 고속분취용 prep HPLC를 이용하여 활성피크 물질을 분취 정제하여 PMEAL-12획분으로부터 약 32mg을 분리하여 Compound A로 명명하였으며, 분석용 HPLC에서 순도(purity, 99%)를 확인하였음(그림 4-3B).

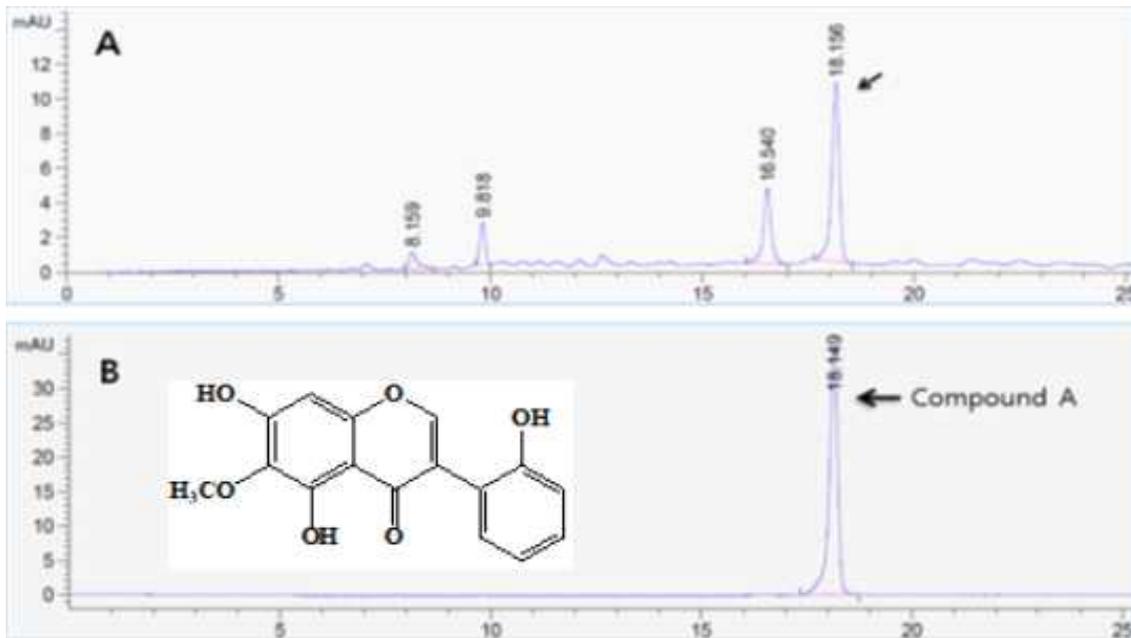


그림 4-3. PM-EA 획분으로부터 항혈전 유효지표 성분(Compound A)

A: PMEAL-12의 HPLC chromatogram, B: PMEAL-12로부터 분리된 Compound A

○ 분리된 Compound A의 항혈전 활성 및 항산화활성

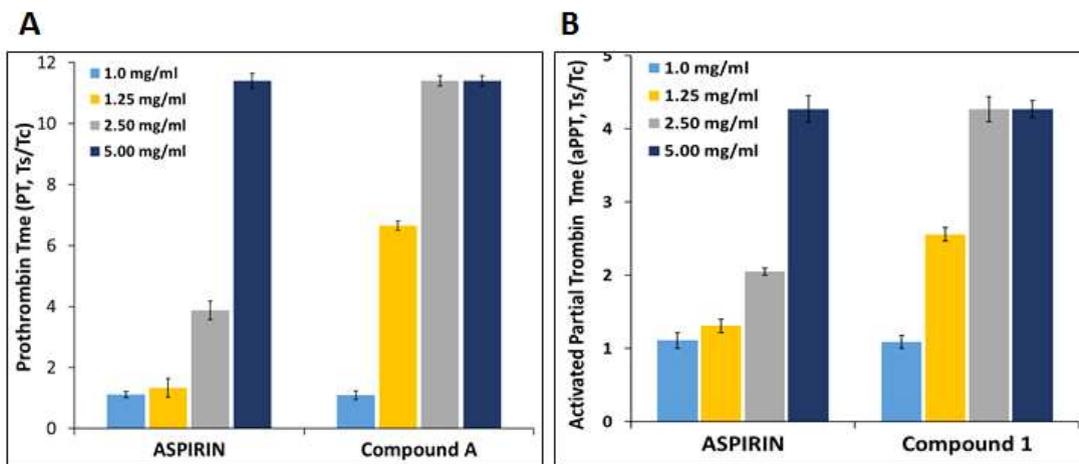


그림 4-4. Aspirin과 분리된 Compound A의 항혈전 활성 비교

A: 프로트롬빈타임, B: 에이피타임

- Compound A는 시판 항혈전제로 장출혈의 부작용이 있는 아스피린과 1.25 mg/ml에서 비교시 PT의 경우 약 5배, aPTT의 경우 약 2배 이상의 우수한 항응고활성을 나타냄 (그림 4-4), Compound A의

항산화활성을 대표적인 항산화 비타민인 토코페롤과 비교 측정한 후 IC₅₀값을 계산하여 표 4-1에 나타내었음. Compound A는 식품공전에 등재되어 있는 통통마디 천연물로부터 분리되고 독성이 없는 혈류개선 및 뇌신경영양증저해 성 화합물로 개발할 가치가 높으며, 파이토밀 역시 관련분야 기능성 소재로 활용될 가능성이 크다고 보임.

표 4-1. Compound A와 Tocopherol의 항산화활성 비교

	Compound A	Tocopherol
IC ₅₀ (µg/ml)	15.3	49.5

(3) PM-AL 획분으로부터 아세틸콜린 에스테레이즈 저해활성 성분의 정제

○ HR_GC-MS 분석을 통한 PM-AL 획분의 알칼로이드계 화합물 프로파일 분석

- 파이토밀로부터 분리한 아세틸콜린 저해활성을 나타내는 PM-AL획분은 알칼로이드 화합물 지향 추출 및 분획법으로 실시되었으므로, 분획물 내의 알칼로이드 화합물들의 프로파일을 검토하고자 PM-AL 5mg을 diethyl-ether에 용해시키고 High Resolution GC-MS(CLARUS 600T, Perkin Elmer, USA)를 실시한 결과 수십종의 알칼로이드계 화합물들의 이온피크를 확인할 수 있었음 (그림 4-5), 주요 메이저 이온 피크에 대한 Search 결과를 나타내었으며(그림 4-6), 그림 4-7에는 30종의 라이브리리 중 시중에서 구입할 수 있는 알칼로이드 화합물들의 화학구조를 나타내었음.

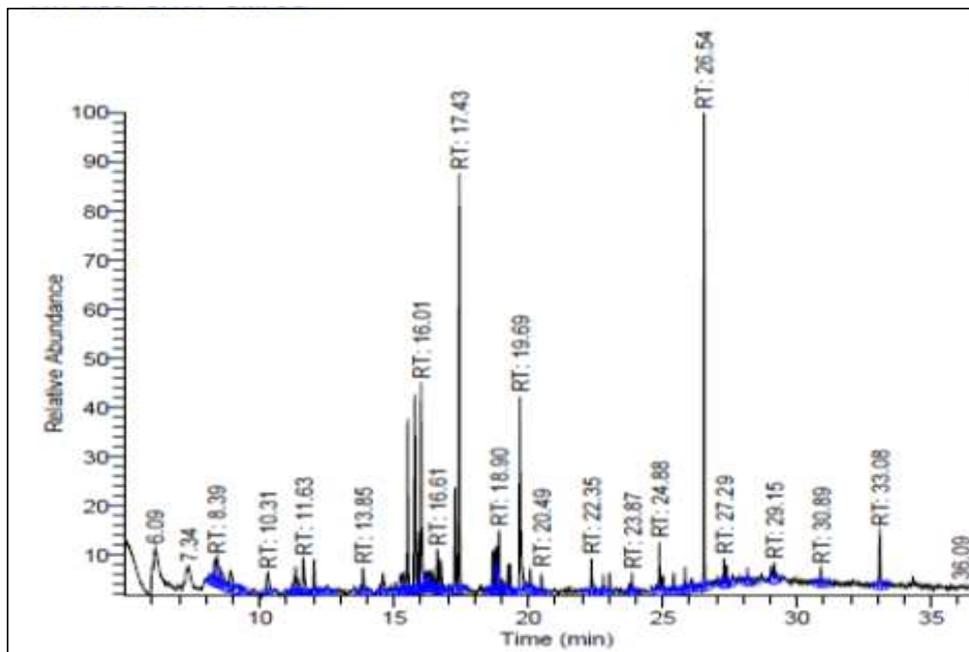


그림 4-5. PM-AL의 GC-MS 분석을 통하여 취득된 TIC(Total Ion Chromatography)

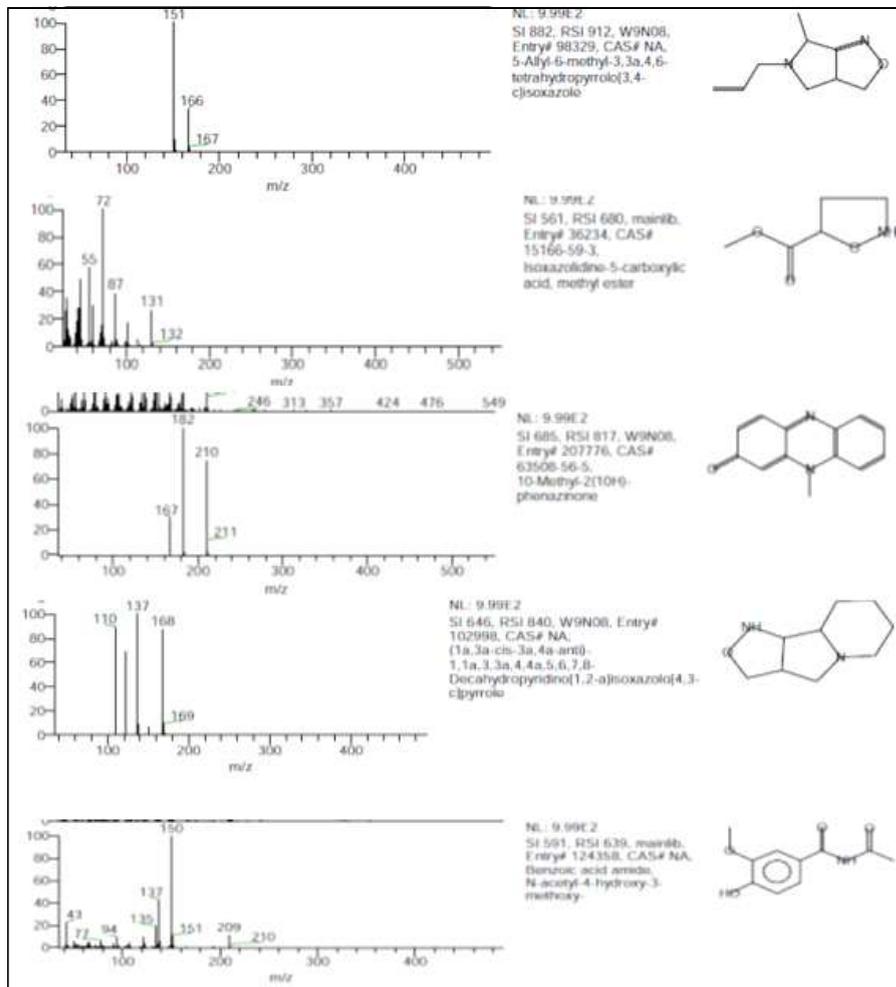


그림 4-6. 주요 메이저 이온 피크에 대한 Serch 결과

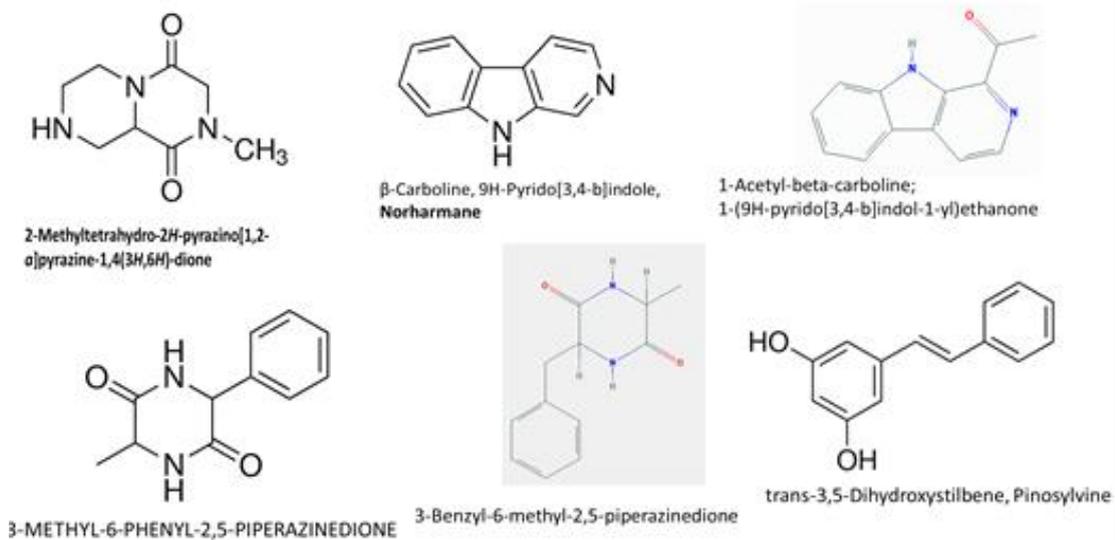


그림 4-7. PM-AL획분에서 확인된 알칼로이드계 화합물들의 화학구조

○ 컬럼크로마토그래피 정제 및 AChE 저해활성 단일성분의 분리

- PM-AL 핵분으로부터 아세틸콜린 에스테레이즈 저해활성을 나타내는 알칼로이드계 유효 지표성분을 정제하기 위하여 활성탄 또는 Diaion HP-20 resin을 이용한 소수성흡착 컬럼 크로마토그래피, Sicagel 60G를 이용한 극성컬럼 크로마토그래피, Dowex-50, Dowex-1 또는 Amberlite IRA 400 등의 이온교환수지를 이용한 이온교환컬럼 크로마토그래피, Sephadex LH-20, G-10 레진을 이용한 Size exclusion 컬럼 크로마토그래피, ODS역상 컬럼 크로마토그래피 등을 이용한 정제적성도 및 효율을 검토하고, 최종 대량정제로 Diaion HP-20 resin, Silicagel 60G, Shephadex LH-20, 및 박층크로마토그래피(TLC)를 이용하여 정제하고 단리하여 구조분석을 진행하고 있음.

5) 단리된 유효활성 지표성분(Compound A)의 구조분석

(1) 분자량 결정을 위한 ESI-MS 분석

○ Compound A의 분자량 결정을 위하여 1 mg 의 화합물 A를 전자포말이온화 (ESI) 질량분석기 (LC-ESI mass spectrometer, AGILENT 1100, USA Micromass Quattro II)로 포지티브 및 네거티브 스캔을 실시하고, 하이 레조루션(High resolution) MS를 측정하였음 (그림 5-1). ESI-MS: m/z 299.1 [M-H]⁺, m/z 301.1 [M+H]⁺ 를 확인하여 분자량은 300으로 확인되었음.

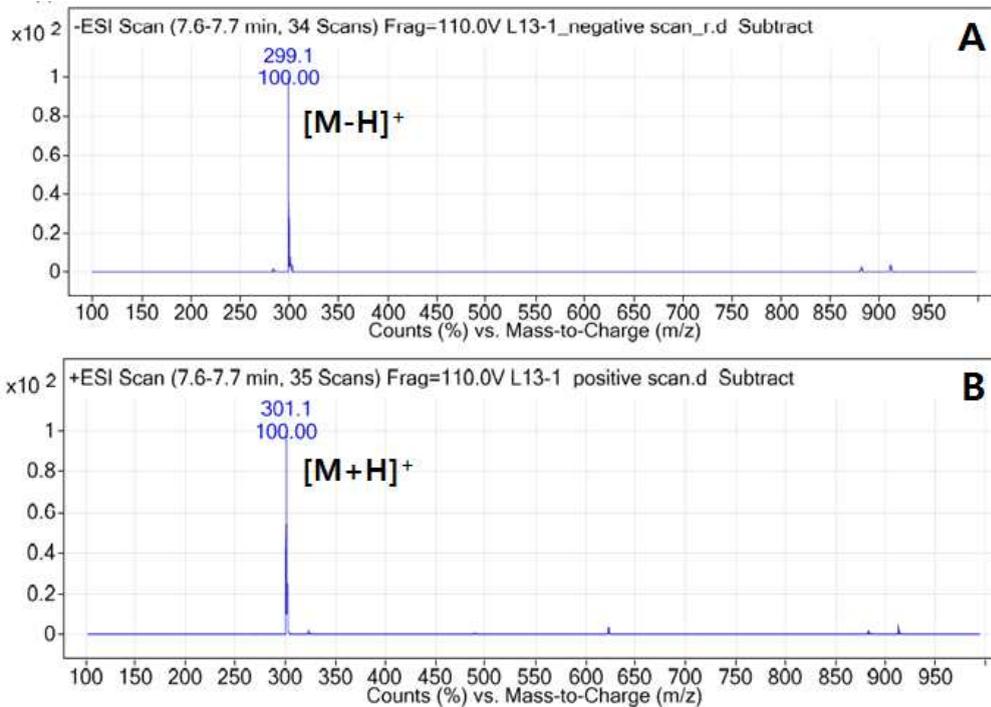


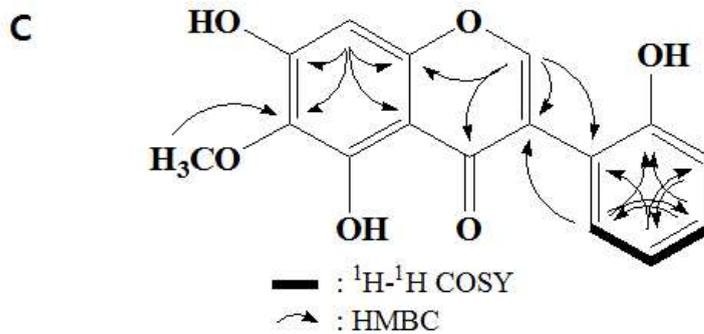
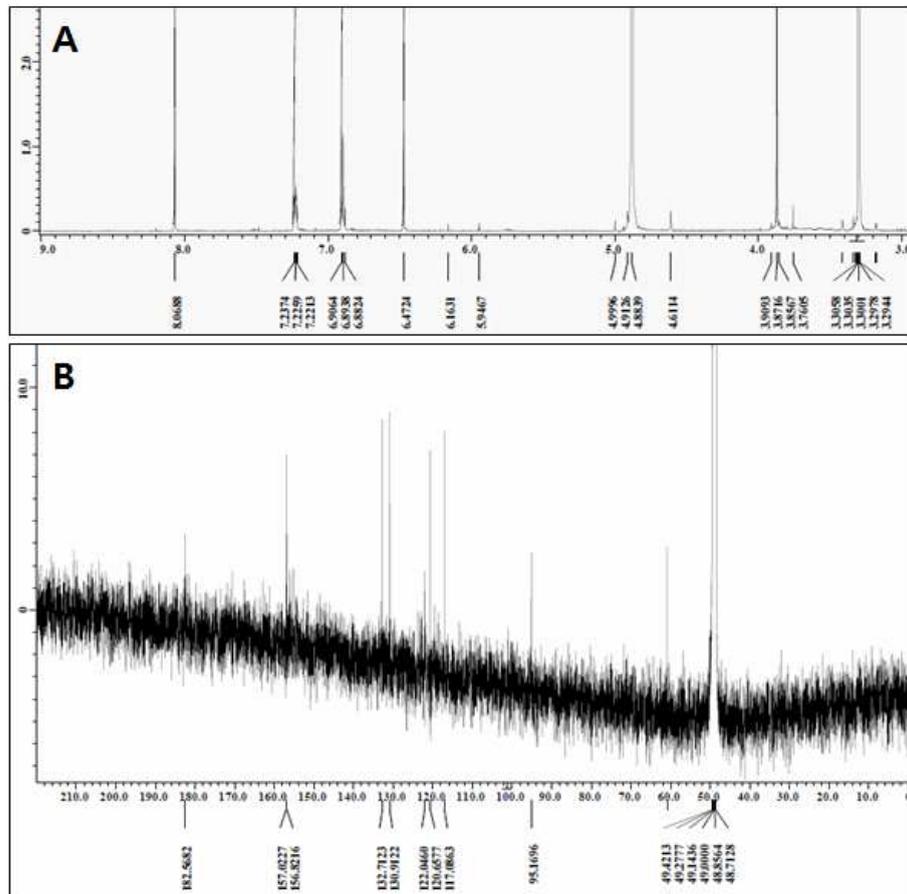
그림 5-1. Compound A의 ESI-MS 스펙트럼

A: Negative mode scan, B: Positive mode scan

○ NMR 분석

핵자기공명(NMR)분석은 화합물 A(3 mg)을 완전 건조하여 DMSO-d₆ (0.5 ml)에 용해한 후 5 mm NMR 튜브에 주입하고 제올 모델 기종 (JNM-ECA 600, Jeol, Japan)으로 분석 하였으며, ¹H-NMR (그림 5-2A)은 600MHz로, ¹³C-NMR(그림 5-2B)은 150 MHz로 각각 측정하였음. 그리고, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC spectrum 측정을 통하여 화합물 A내 수소와 탄소의 위치를 결정하였다(그림 5-2C). 상기와 같이 측정한 결과, Compound A는 아이리린 B(irilin B, 5,7,2'-트리하이트록시-6-

메톡시이소플라본)로 동정되었고 물리·화학적 성질은 다음과 같음.



Irilin B(5,7,2'-trihydroxy-6-methoxy-isoflavone)

그림 5-2. Compound A의 NMR 분석을 통한 구조결정

- 분자식 : $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$
- 분자량 : 300, ESI-MS: m/z 299.1 $[\text{M}-\text{H}]^+$, m/z 301.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$
- 녹는점 : 183°C
- 성상 : 황색분말 (pale yellow powder)

- 용해성 : 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름에 용해되고 물에 불용성
- TLC 발색 : FeCl₃(양성), 브로모크레졸그린 (음성), UV light(양성, 황녹색), 아니린디페닐라민(음성), 안티모니(음성), 드라겐돌프(음성)
- 자외선 최대 흡수파장 영역 (메탄올, λ_{max}, nm) : 214, 263, 289sh, and 338sh, (+NaOAc) : 271, 340, (+AlCl₃) : 215, 271, 317, 368 : (+NaOAc + H₃BO₃) 214, 263, 289sh, and 338sh
- ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 3.87(1H, d, 3-H), 6.47(1H, d, 8-H), 8.07(1H, d, 2-H), 6.90(1H, d, 3'-H), 7.23(1H, m, 4'-H), 6.89(1H, d, 5'-H), 7.23(1H, s, 4'-H) (그림 5-2A)
- ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ ppm : 157.0(2-C), 122.0(3-C), 182.6(4-C), 156.8(5-C), 133.0(6-C), 159.0(7-C), 95.2(8-C), 155.0(9-C), 106.4(10-C), 119.3(1'-C), 155.9(2'-C), 117.1(3'-C), 130.9(4'-C), 120.7(5'-C), 132.7(6'-C), 60.7(OCH₃) (그림 5-2B)

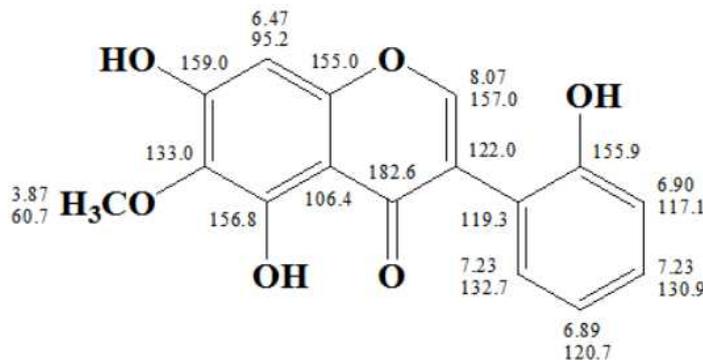


그림 5-3. 화학구조식 (Irilin B)

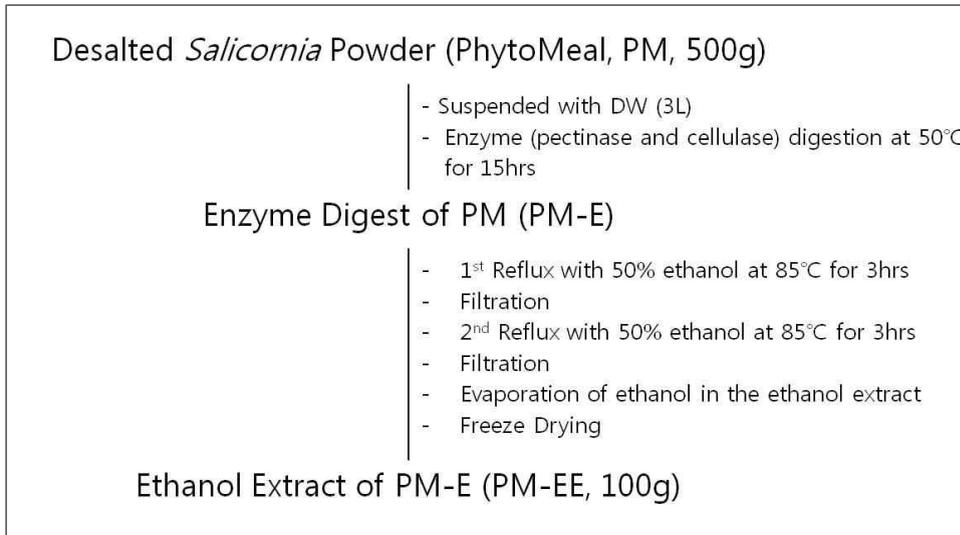
- 본 과제에서 통통마디 달염물인 파이토밀 열수추출물에서 분리한 항혈전 및 항산화 화합물 Irilin B는 플라보노이드의 한 종류인 이소플라본계열의 화합물이나, 이소플라본으로 널리 알려져 있는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein), 글리시테닌(glycitenin)과는 달리 플라보노이드 환구조 내에 메톡실화되어 있는 것이 특징으로, 1991년 구리염화물(cupric chloride)로 처리한 붓꽃류(*Iris pseudacorus*)의 잎에서 스트레스 대사체물질(stress metabolite)로 처음으로 보고되었음. Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. 1991. *Phytochemistry*. 30(1): 157-163). Irilin B는 현재까지 붓꽃과류(*Iris spp*)를 제외한 다른 식물에서는 분리 보고된 예는 없으므로 뇌신경세포 보호 및 기억력개선 분야 기능성 소재화와 더불어 학문적 연구가치도 높다고 봄.

라. 통통마디 탈염소재 추출물 (PM-EE)로부터 인지기능개선 기능성 성분의 분리, 정제 및 규명

1) 조추출물, 조정제 획분에서의 지표성분 추출 및 정제과정 확립

(1) 시험원료 통통마디 추출물 (PM-EE)의 제조과정

건조 통통마디로부터 염화나트륨(NaCl) 함량을 1% 내외로 탈염한 파이토밀 500g로부터 효소가 수분해 및 주정추출물인 탈염 통통마디 추출물 (PM-EE, 100g)를 그림 1과 같이 수득하였음



[그림 1] 통통마디 탈염분말로부터 PM-EE 추출물의 제조과정

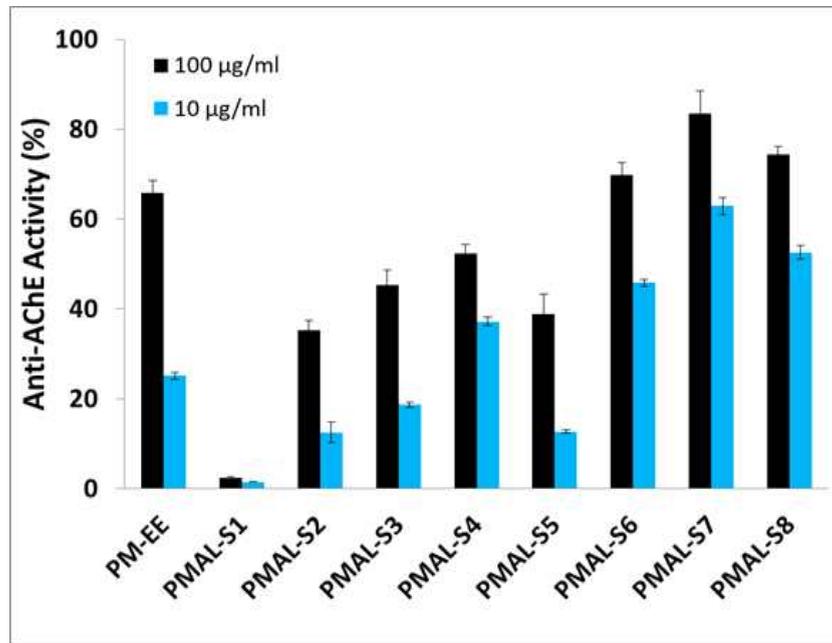
(2) 통통마디 추출물 PM-EE로부터 아세틸콜린저해활성 기능성 성분의 분리

통통마디 추출물(PM-EE) 100g을 2L의 증류수에 용해시킨 후 6N의 염산을 가하여 pH를 2.0으로 조정하여 30분간 교반하고 4°C에서 12시간 정치함. 이 과정에서 생성되는 침전물은 원심분리 및 감압여과로 제거한 후, 6N 암모니아수를 가하여 pH를 10이상으로 조정하고 분액여두로 옮겨 동량의 클로로포름으로 분배분획을 실시하였다. 수층에 다시 동량의 클로로포름을 가하여 분액여두에서 두 번째 분배 분획을 실시한 후, 1, 2차 클로로포름 분획물 중의 클로로포름을 진공회발 농축기로 제거한후, 증류수에 현탁하고 동결건조함으로써 탈염 통통마디의 알칼로이드 분획물 (PM-AL)을 수득하였음

PM-AL 획분 8g을 극성 실리카겔이 충전된 컬럼에 로딩한 후 클로로포름과 메탄올의 혼합비율을 달리한 이동상 용매를 이용하여 유속 0.3 ml/분의 속도로 용출시켜 100 ml씩 8개의 분획물인 PM-1, PM-2, PM-3, PM-4, PM-5, PM-6, PM-7, PM-8을 획득하였음(표 1). 그 중 AChE 저해활성이 우수한 획분인 PM-S7 (187mg) (그림 2)을 감압건조 후 3 ml의 메탄올에 용해하고, 저분자용 겔여과 세파덱스 LH-20이 충전된 세 번째 컬럼에 도입한 다음 100% 메탄올로 50 ml씩 총 7개의 분획물인 PM-7-L1, ~L2, ~L3, ~L4, ~L5, ~L6, ~L7을 수득하였음(그림 3). 최종적으로 상기 7개의 분획물 중 AChE 저해활성이 가장 우수한(표 2, 그림 3) PM-S7-L3 획분을 감압농축, 동결건조하여 90 mg을 수득하였음

[표 1] 통통마디 추출물(PM-EE)로 알칼로이드획분(PM-AL)의 실리카젤컬럼 크로마토그래피

Fractions and Yields obtained from Silcagel 60G column chromatography of PM-AL								
PM-AL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Fr1 ~ Fr23	Fr2 ~ 4	Fr5	Fr 6	Fr 7 ~ 10	Fr 11 ~ 15	Fr 16	Fr 17,18	Fr 19 ~ 23
2.0g	120mg	40mg	37mg	68mg	155mg	230mg	287mg	270mg
50mg/mL in MeOH	2.4	0.8	0.54	1.36	0.3	4.6	4	5.4
1mg/ml (ul)	20 μ L							
DW	980 μ L							

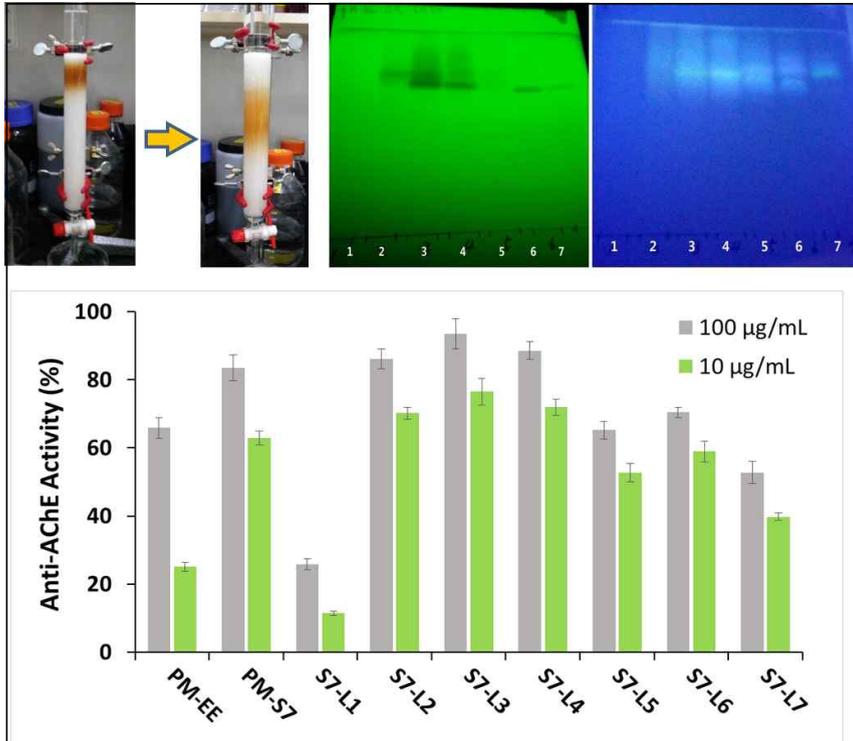


[그림 2] PM-AL 획분의 실리카젤 컬럼 정제 분획물들의 아세틸콜린 저해활성 비교

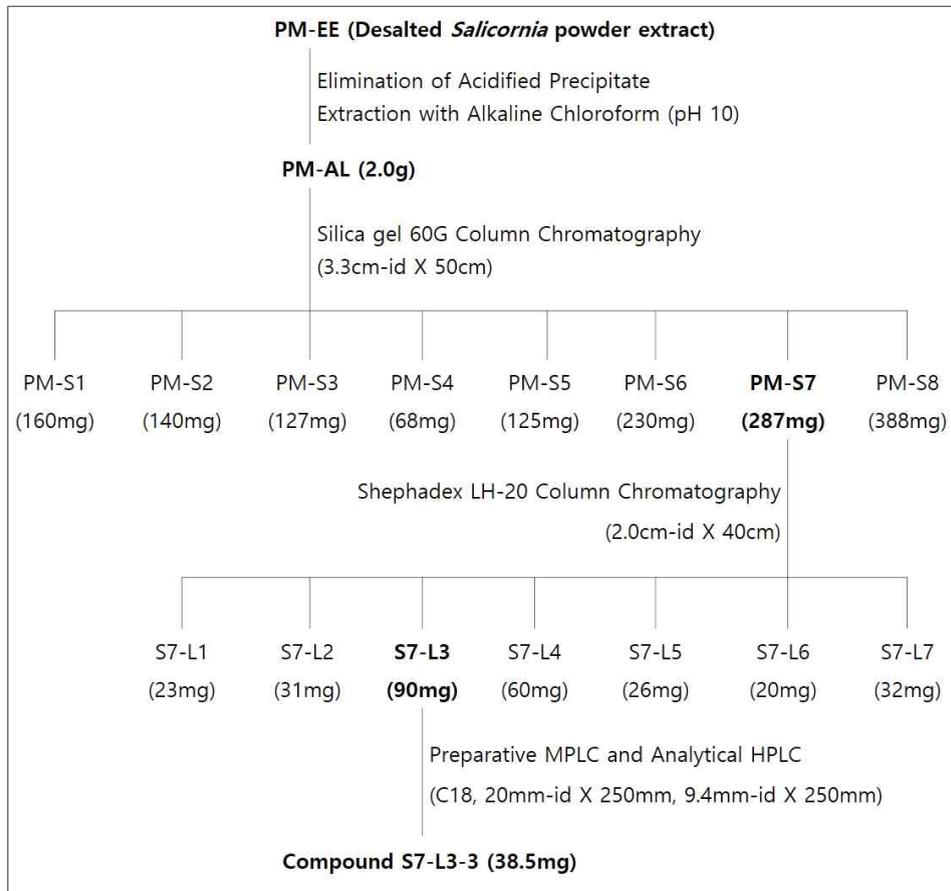
수득된 PM-S7-L3 분획물 90mg을 2mL의 HPLC 용 메탄올에 용해한 후 여과한 다음 분석 및 분취용 고속액체크로마토그래피를 이용하여 AChE 저해활성이 강한 단일물질 S7-L3-3을 분리함(그림 5, 그림 6).

[표 2] 실리카젤 컬럼 정제 분획물들의 IChE activity, Antioxidant activity(%), and UV 흡광도

Fraction I	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
IChE activity	-	±	*	*	±	**	***	**
Antioxidant activity(%)	-	+	+	±	++	++	±	±
210nm	3.8	3.471	3.574	3.703	3.991	3.797	3.514	3.564
254nm	3.594	3.724	3.826	3.946	(+)	3.943	3.681	3.664
300nm	2.257	(+)	(+)	(+)	3.867	(+)	3.022	1.931



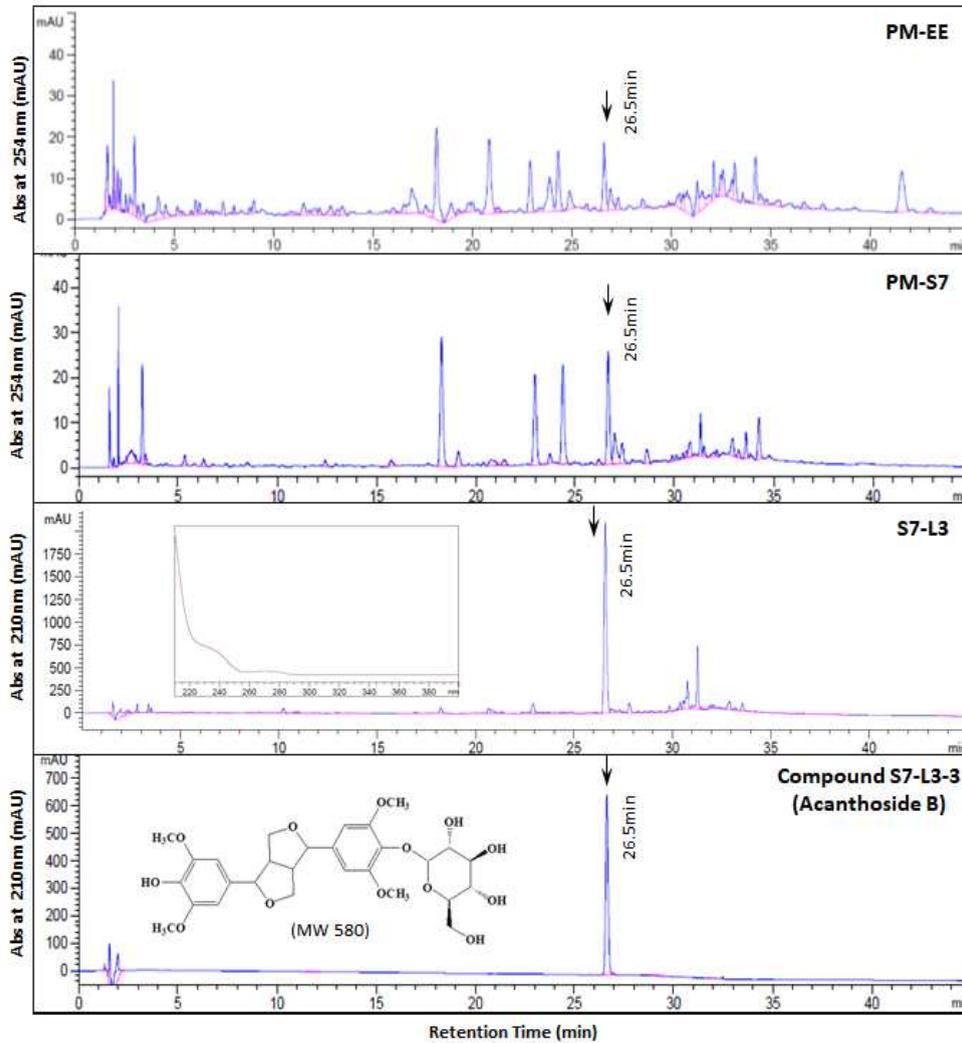
[그림 3] PMAL-S7의 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피 분획 및 아세틸콜린 저해활성



[그림 5] 통통마디추출물(PM-EE)로부터 AChE 저해활성 기능성성분의 정제과정

(3) 통통마디 추출물 PM-EE로부터 아세틸콜린저해활성 획분들의 HPLC 분석

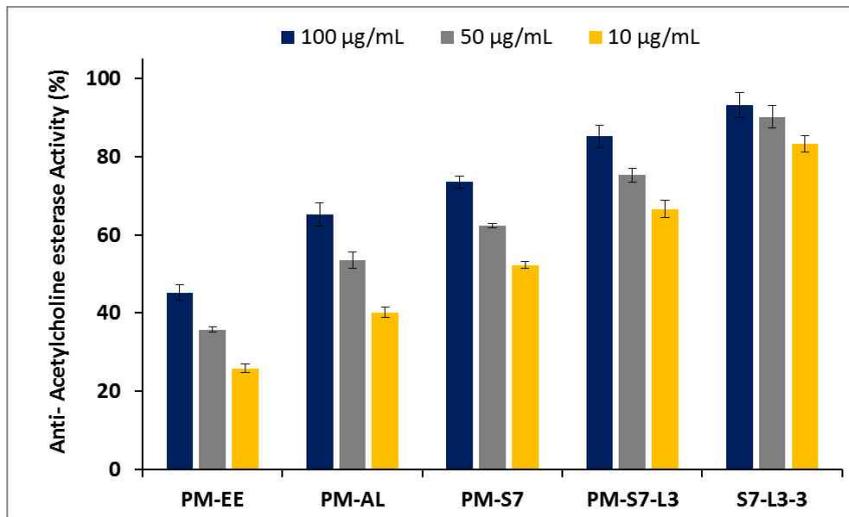
그림 6 에서는 통통마디추출물(PM-EE), 알칼로이드분획물(PM-AL), 컬럼 정제 분획물인 PM-S7 과 PM-S7-L3, 및 분취용 HPLC로 최종 단리된 화합물 S7-L3-3의 분석용 HPLC 크로마토그램 프로파일들을 비교하였으며, 정제가 진행될수록 유효성분인 S7-L3-3의 머무름시간인 26.5분대의 피크의 크기가 커지고 전체 크로마토그램이 단순하여 짐을 확인할 수 있으며, 순수정제된 S7-L3-3의 구조분석으로 밝혀진 acanthoside B의 UV 스펙트럼과 화학구조를 나타내었음



[그림 6] 통통마디추출물(PM-EE)로부터 AChE 저해활성 기능성성분의 정제과정 중에 수득된 활성 분획물과 최종 단리된 기능성 성분의 HPLC 크로마토그램 비교

(4) 통통마디추출물(PM-EE)과 정제 분획물들 및 단리화합물의 AChE 저해 활성 측정

통통마디추출물(PM-EE)로부터 AChE 저해활성 기능성성분의 정제과정 중에 수득된 활성 분획물들과 최종 단리된 기능성 성분의 S7-L3-3의 AChE 저해활성을 비교측정하였으며, 각 시료의 농도는 각각 100, 50 및 10 μ g/mL 농도로 3회 이상 반복 실험한 평균값으로 그림 7에 나타냄. 100 μ g/mL 농도에서 통통마디 추출물(PM-EE)의 AChE 저해활성은 45.2%로 최근 공개된 대한민국 특허공보 10-2016-0088622에서 개시된 발효 아로니아 추출물보다 상당히 우수한 편이며, 정제가 진행될수록 각 분획물의 AChE 저해활성은 점차 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 최종 정제된 화합물 S7-L3-3의 AChE 저해활성은 10 μ g/mL 의 농도에 PM-EE(25.8%) 보다 현저히 증가하였음 (83.2%). 따라서 통통마디 추출물(PM-EE)로부터 AChE 저해활성을 추적하여 두 번째로 단리한 화합물 S7-L3-3은 추출물 대비 50%이상의 AChE 저해활성을 나타내므로 기능성분으로 설정하기로 하였음



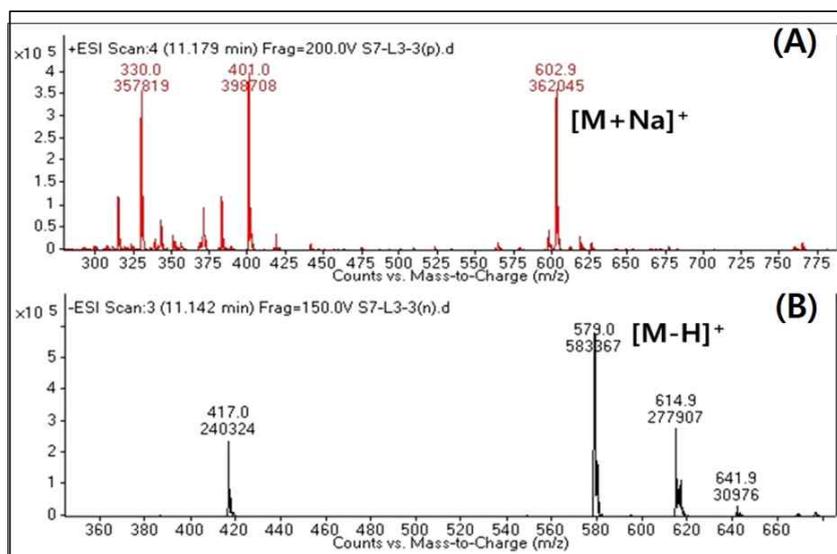
[그림 7] 통통마디추출물(PM-EE)과 활성획분 및 단리화합물의 AChE 활성 비교

2) 유효 활성획분내 인지기능개선 기능성분의 정성 및 정량 분석

(1) 통통마디 추출물(PM-EE)로부터 단리한 기능성분 S7-L3-3 구조분석

○ S7-L3-3의 분자량과 UV λ_{max} 결정

S7-L3-3의 분자량 결정을 위하여 1 mg 의 화합물 A를 ESI 질량분석기로 포지티브 및 네거티브 스캔을 실시하고, High resolution MS를 측정함(그림 8A 및 8B). 분리된 화합물 S7-L3-3의 자외선 최대 흡수대는 시료를 메탄올에 1 mg/ml의 농도로 용해시킨 후 자외선 분광기를 이용하여 190-400 nm 영역 내에서 측정하기로 함



[그림 8] 단리 기능성분 S7-L3-3의 ESI-MS 분석, (A); positive, (B); negative

○ 핵자기공명(NMR)분석

화합물 S7-L3-3 5 mg을 완전 건조하여 $CDCl_3$ 0.5 ml에 용해한 후 5 mm NMR 튜브에 주입하고 분석 하였으며, 1H -NMR(그림 9A)은 600MHz로, ^{13}C -NMR(그림 9B)은 150 MHz로 측정함. 그리고 HMBC-NMR(그림 10A) 과 1H - 1H COSY-NMR(그림 10B) 측정을 통하여 화합물 S7-L3-3내

수소와 탄소의 위치와 입체구조를 결정함(그림 11). 상기와 같이 측정된 결과, 화합물 S7-L3-3는 통통마디에서는 현재까지 보고된 바 없는 분자량 580의 아칸토사이드 B (acanthoside B, (2S,3R,4S,5S,6R)-2-[4-[(3S,3aR,6S,6aR)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[3,4-c]furan-6-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3, 4,5-triol) 로 동정되었고 물리·화학적 성질은 다음과 같음

○ 기기분석을 통한 기능성지표성분의 물리화학적 성질

(가) 분자식 : C₂₈H₃₆O₁₃

(나) 분자량 : 580, ESI-MS: m/z 579.0 [M-H]⁺, m/z 602.9 [M+Na]⁺ (도 4)

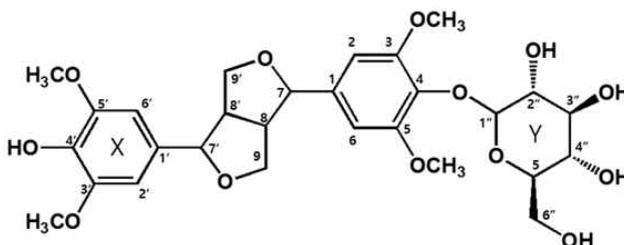
(다) UV λ_{max} : 210nm, 238sh, 272nm

(라) 색상 : 흰색 분말 (white powder)

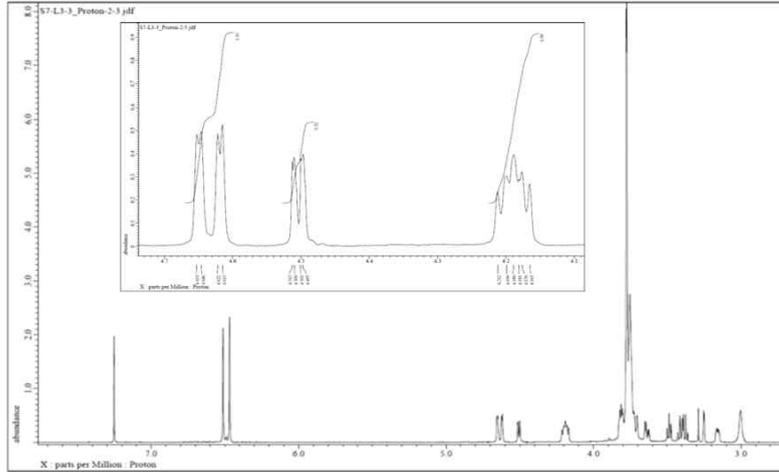
(마) 용해성 : 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 피리딘에 용해

(바) ¹H 및 ¹³C-NMR : ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): d 6.47 (2H, s, H-2 and H-6), 4.62 (1H, d, J 4.6 Hz, H-7), 3.00 (1H, m, H-8), 3.81 (1 H, m, H-9a), 4.19 (1H, m, H-9b), 6.51 (2H, 1H, H-2' and H-6'), 4.65 (1H, H-7'), 4.50 (1H, H-1''), 3.49 (1H, H-2''), 3.37 (1H, H-3''), 3.41 (1H, H-4''), 3.16 (1H, H-5''), 3.71 (1H, H-6''a), 3.64 (1H, H-6''b), 3.77 (6H, s, 2-OCH₃), 3.78 (6H, s, 2-OCH₃) (도 5A); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): d131.2 (C-1), 102.3 (C-2), 147.3 (C-3), 134.4 (C-4), 147.3 (C-5), 102.7 (C-6), 86.0 (C-7), 53.9 (C-8), 71.6 (C-9), 56.1 (2 X-OCH₃), 56.2 (2 Y-OCH₃), 138.2 (C-1'), 102.9 (C-2'), 152.6 (C-3'), 134.4 (C-4'), 152.6 (C-5'), 102.9 (C-6'), 85.6 (C-7'), 54.2 (C-8'), 71.7 (C-9'), 105.4 (C-1''), 73.9 (C-2''), 75.9 (C-3''), 69.5 (C-4''), 76.2 (C-5''), 61.5 (C-6'')

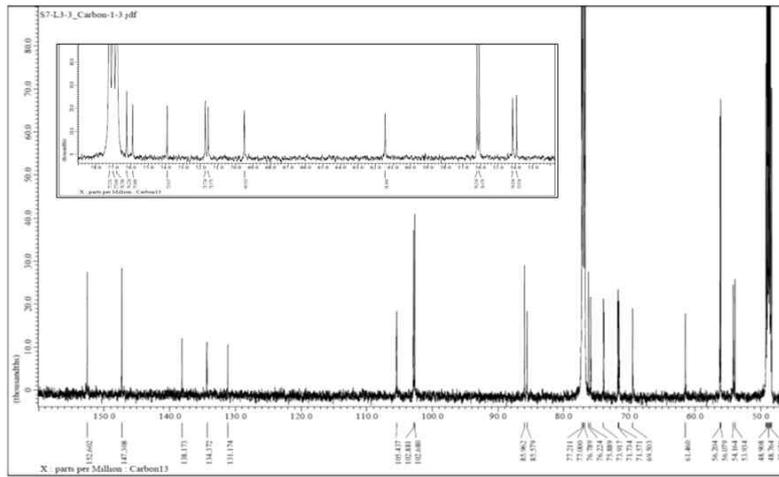
(바) 화학구조식: acanthoside B



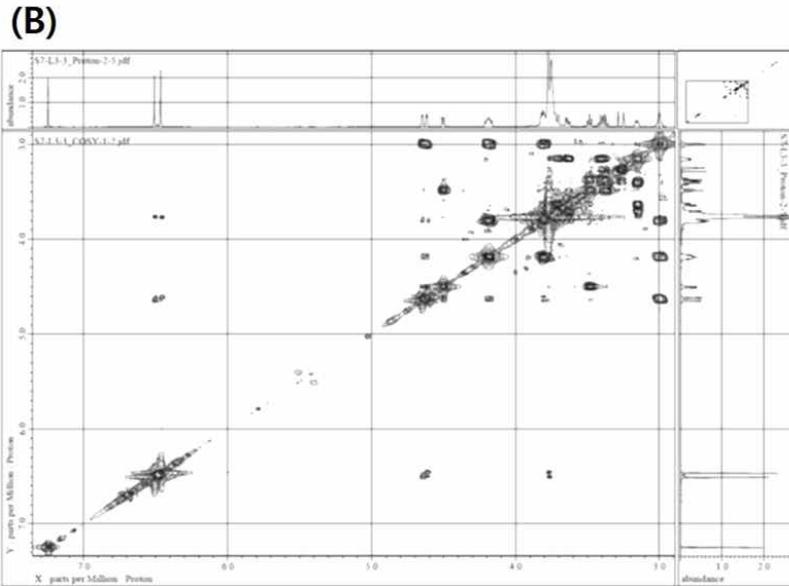
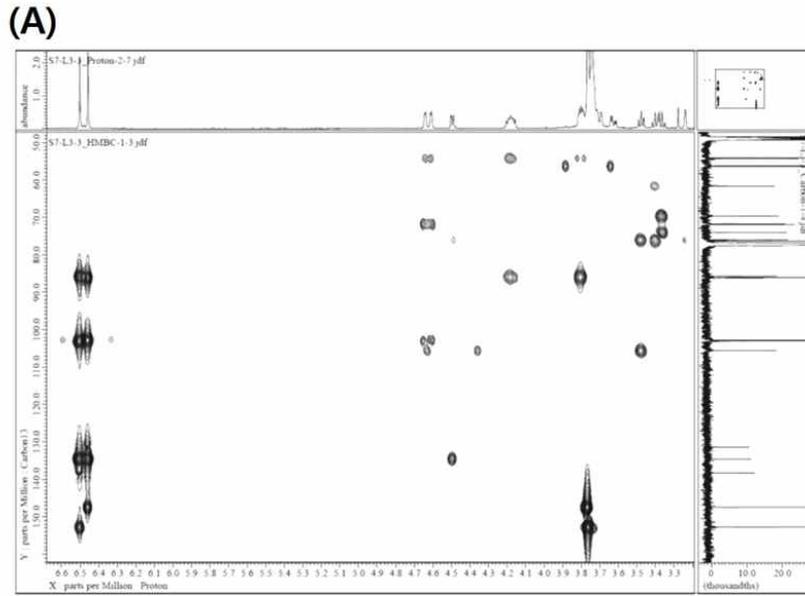
(A)



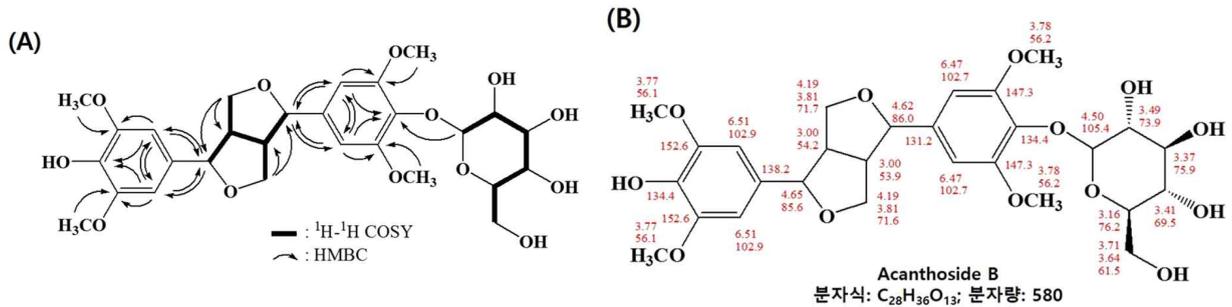
(B)



[그림 9] 단리 기능성분 acanthoside B의 NMR 분석, A: 1H-NMR, B; 13C-NMR



[그림 10] 단리 기능성분 acanthoside B의 HMBC-NMR(A)과 ^1H - ^1H COSY(B)스펙트럼

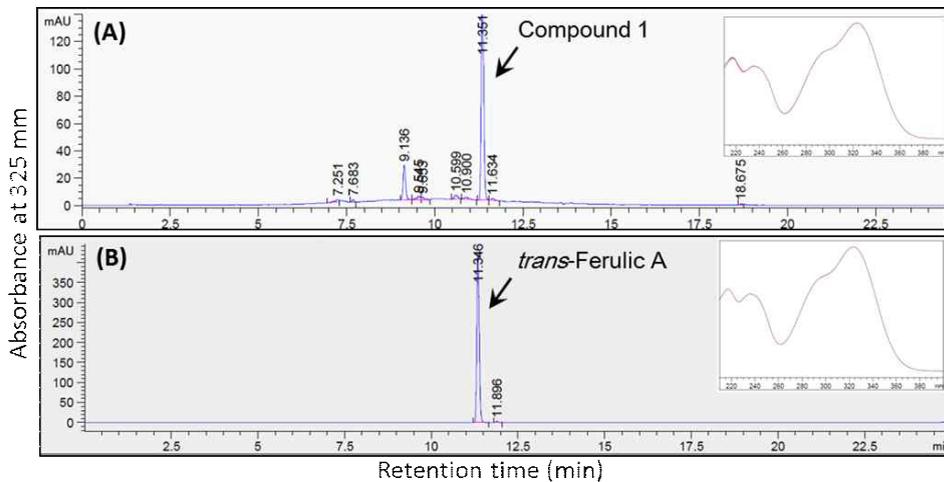


[그림 11] ^1H 및 ^{13}C -NMR과 2D-NMR 분석을 통한 단리 기능성분 S7-L3-3의 입체구조(A) 및 분자내 탄소 및 수소 위치 결정을 통한 S7-L3-3의 동정 및 화학구조 결정(B)

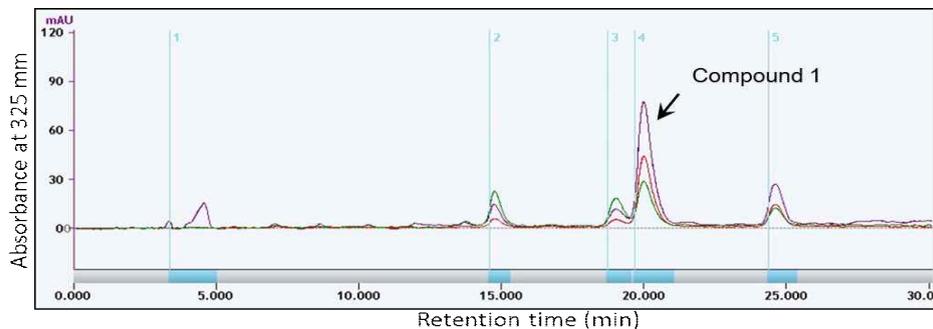
마. 탈염 통통마디 추출물(PM-EE) 내 지표성분의 선정, 자가시험법, 표준화, 및 규격 설정

1) 지표성분 (trans-ferulic acid(TFA)의 분리 및 동정

탈염 통통마디 추출물(PM-EE)을 역상컬럼을 이용하여 UV(325 nm)-HPLC 분석시 아래 크로마토그램에서 나타나는 11.3분대의 피크가 전형적인 페놀릭산이 UV spectrum (223, 240, 325nm)을 나타내는 것을 확인하고 5종의 페놀릭산 (caffecic acid, chlorogenic acid, t-ferulic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid) 표준품을 이용하여 HPLC 머무름시간과 UV스펙트럼을 비교한 결과 탈염 PM-EE의 주요피크인 Compound 1 화합물은 t-ferulic acid와 일치함(그림 12A, 1B).



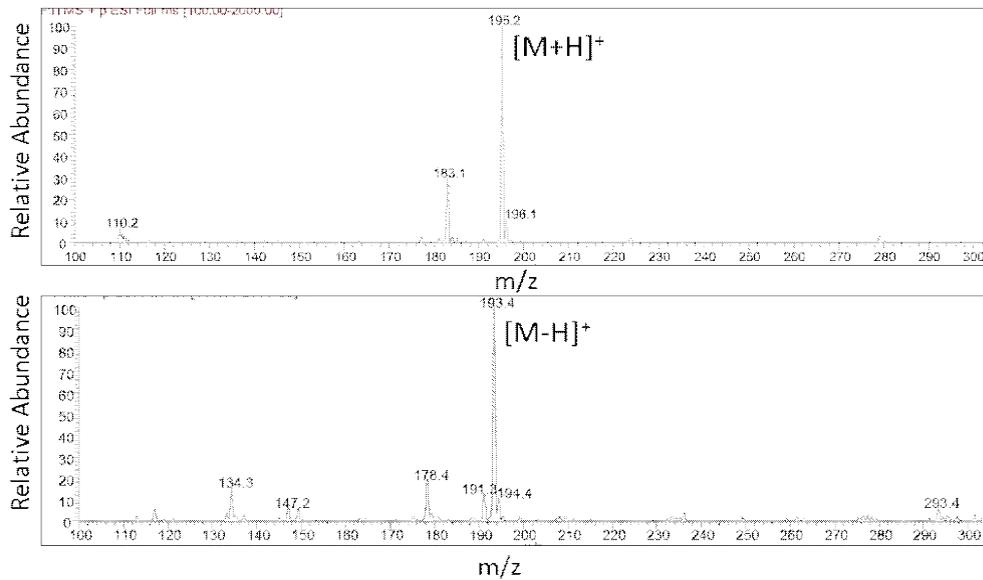
[그림 12] 통통마디추출물(PM-EE) 내 주요 피크성분의 UV-HPLC 분석



[그림 13] MPLC 프랩을 통한 Compound 1 화합물의 단리

주요피크인 Compound 1 화합물의 동정을 위하여 Prep-C18 역상컬럼을 장착한 MPLC 정제를 통하여 그림 2에서 주요피크 화합물 3번 피크를 단리함(그림 13).

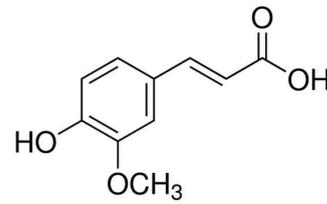
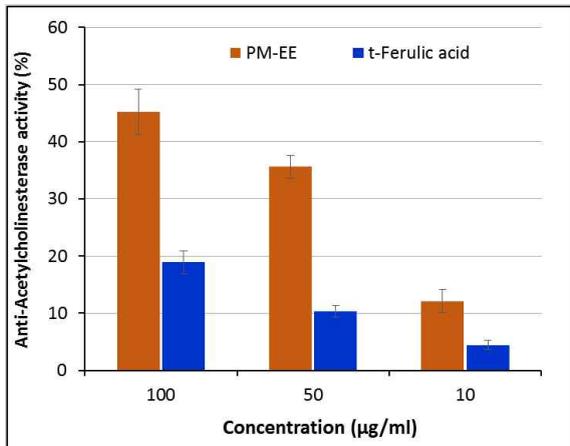
단리한 10mg의 화합물을 메탄올에 용해하여 LC-MS를 분석한 결과, $[M+H]^+$ 195.2 및 $[M-H]^-$ 193.4 가 확인되어 Compound 1은 분자량이 194인 페룰산으로 동정함(그림 14).



[그림 14] Compound 1의 ESI-MS spectra (top; positive, bottom; negative)

2) 지표성분으로서 트랜스-페룰산(trans-ferulic acid, TFA)을 설정한 근거

기억력 감퇴 현상은 뇌신경전달물질인 acetylcholine 함량과 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있음. 치매 환자의 뇌에서 아세틸콜린 분비 및 콜린성 신경세포의 수가 감소한다는 사실이 증명된 이후 “Cholinergic deficient hypothesis” 즉, 치매의 증상이 신경세포 presynapse의 아세틸콜린 감소에 기인한다는 가설을 바탕으로 하면 아세틸콜린을 분해하는 효소를 억제하여 아세틸콜린을 증가시킴으로써 치매증상을 치료할 수 있을 것으로 받아들여져 왔음(Francis PT, 1999). 또한, 뇌혈관내에 acetylcholine esterase (AChE)의 농도가 증가될수록 신경세포의 콜린성 신경전달물질이 결핍되어 기억 및 인지능력 장애를 유발할 수 있다고 보고되고 있음. 현재 FDA 승인 치료제 4종은 모두 acetylcholine esterase(AChE) 저해 화합물들로서 Tacrine(Cognex), Donepezil (Aricept), Rivastigmine (Exelon), Galantamine (Reminyl) 이 알려져 있음. 탈염 통통마디 추출물(PM-EE)도 in vitro 환경에서 항산화활성과 아세틸콜린에스테라아제 저해활성을 나타냄. PM-EE로부터 주요 피크성분으로서 단리된 트랜스 페룰산은 대표적인 식물유래 페놀릭산으로서 항산화활성 외에 산화스트레스에 대항하여 항염증, 항노화, 지방세포분화억제, 혈당강하 등 생리활성 기능이 다양한 것으로 보고되고 있음. 또한 최근 페룰산이 치매 치료제로서의 가능성을 타진하는 연구보문이 발표되기도 하였음. 따라서, 트랜스-페룰산의 아세틸콜린에스테라아제 저해활성을 탈염 통통마디 추출물(PM-EE)과 비교 측정하였으며 결과를 그림 15에 나타냄. 각 시료의 농도는 각각 100, 50 및 10 μ g/mL 농도로 3회 이상 반복 실험한 평균값임. 트랜스-페룰산은 모든 농도에서 추출물(PM-EE)과 비교시 AChE 저해활성이 50% 이상 낮은 것으로 평가되어 트랜스-페룰산은 탈염 통통마디 추출물(PM-EE)의 인지능향상 기능성 성분이 될 수 없음을 확인하였으므로, 기능성 성분이 아닌 지표성분으로 설정하기로 하였음



t-Ferulic acid의 화학구조식

[그림 15] 탈염통통마디추출물(PM-EE)과 트랜스-페룰산(t-Ferulic acid)의 AChE 저해활성 평가

3) 지표성분과 아세틸콜린에스테라제 저해활성 성분 분석을 통한 통통마디 원료의 표준화

(1) 지표(t-ferulic acid) 및 기능성분(acanthoside B) 함량에 따른 원료의 표준화

○ 원산지

통통마디는 해안을 끼고 국가 중심 즉 미국, 영국, 일본, 중국, 호주, 캐나다를 중심으로 자생 또는 재배되고 있으나 원료 제품의 기능성을 보장하고 재현성 향상을 위하여 사용 원재료는 국내산으로 한정하였으며, 국내 산지별 수종의 원재료를 수집하여 추출물을 제조하고 추출원료 내에 지표성분 (t-ferulic acid) 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성 기능성분(acanthoside B) 함량을 분석하여 비교함 (표 3). 분석은 HPLC를 이용하여 정량함

[표 3] 연구개발에 수집된 산지별 원재료에 따른 성분 함량 차이

수집 원재료 (sample)	t-Ferulic acid(mg/g)	Acanthoside B(mg/g)
Sample 1*	1.14	1.65
Sample 2*	1.24	1.70
Sample 3*	1.28	1.76
Sample 4	1.38	1.21
Sample 5	1.53	1.19
Sample 6	1.66	1.20
Sample 7	1.22	1.48
Sample 8	1.14	1.55
Sample 9	1.33	1.46
Sample 10	1.09	1.32
Sample 11	1.1	1.21
Sample 12	1.15	1.43

* 지표 및 기능성분 함량이 높은 우수한 원재료

상기 표 에서 sample 1, 2, 3은 모두 전남 신안군에서 수집된 통통마디 원료로서 순천만이나 부안 및 울진 등에서 수집된 통통마디 원료들 보다 특히 기능성 성분이 상대적으로 높아 원재료로서 선택하였으며, 국내 최대규모로 통통마디를 생산하고 있는 전남 신안군 ㈜다사랑으로부터 매년 통통마디를 구매하여 안정적으로 원료를 제조하고 있음

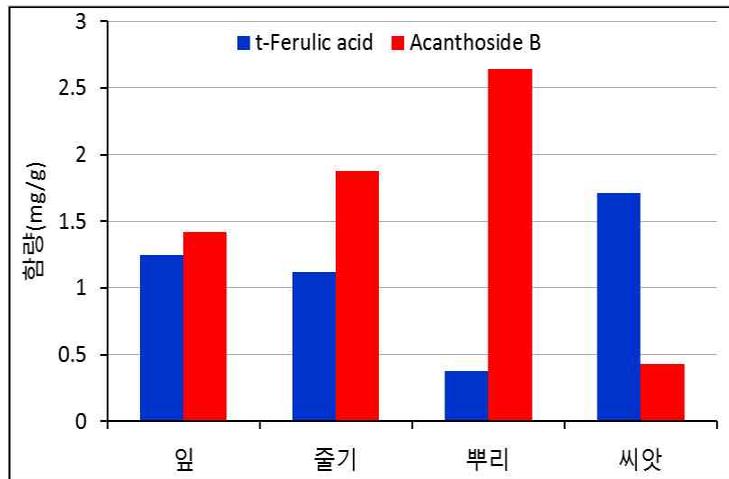
○ 통통마디 사용부위

현재 식품공전에 따르면 통통마디는 아래 표 4과 같이 식용이 가능한 원료로 등재되어 있음

[표 4] 통통마디의 식용가능 여부 및 식용가능 부위

식용가능여부	가능
용도(이용부위)	잎과 줄기
동·식물 분류	식물

아래 그림 16와 같이 통통마디의 잎, 줄기, 뿌리, 씨앗의 부위별 지표 및 기능성분을 분석한 결과 특히 뿌리에는 기능성분인 acanthoside B의 함량이 높았으며, 씨앗부위에는 지표성분인 t-ferulic acid 의 함량이 높았다. 그러나 뿌리와 씨앗은 식품공전에 식용가능 부위가 아니므로, 통통마디의 씨앗이 형성되기전에 수확한 통통마디의 식용부위로 등재되어 식용으로써 사용에 제한이 없는 잎과 줄기 부분만을 선택하여 본 신청원료의 사용부위로 선정함



[그림 16] 통통마디 부위별 지표 및 기능성분 함량 비교

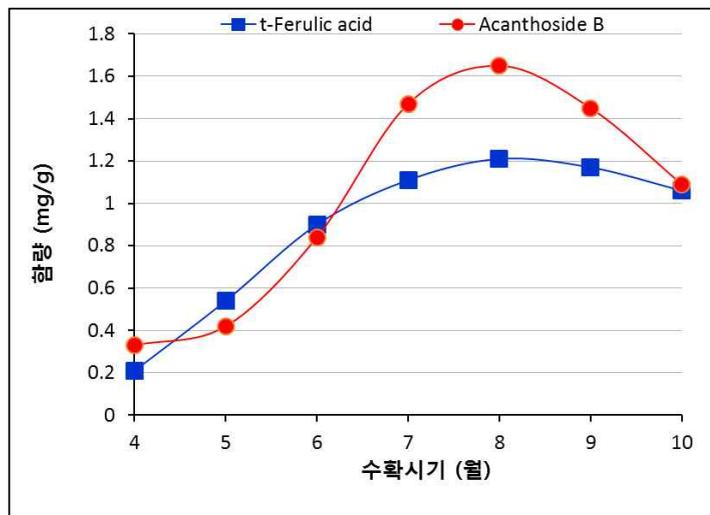
○ 1년생 통통마디의 수확시기

통통마디는 일정한 염분이 유지되는 짠토양에서만 자라기 때문에 소금기를 간직하고 있는 식물이 라고 해서 함초라고 불리는 특이한 1년생 초본으로서 2월경에 파종을 하고 그림 17과 같이 4월 초 순 경에 싹이 터 여름 내내 진녹색으로 성장하면서 8월에 생육 최고를 나타내다 9월에 꽃이 피면서 씨앗이 달리고, 녹색에서 점점 붉은색으로 변화하여 11월 경에 낙엽이 지게 됨. 줄기에 마디가 많고 가지가 한 두번 갈라지며 키는 10~30cm임. 잎과 가지의 구별이 거의 없으며, 마디가 굵고 통통하고 토실토실하여 통통마디로 불리움. 통통마디 식물의 수확시기 별 (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 지표 및 기능성분의 함량을 측정한 결과 (그림 18) 8월 중순 경에 수확한 통통마디로부터 제조한 추추

출물에 t-Ferulic acid 와 acanthoside B의 함량이 가장 높아 결과를 얻어 8월을 수확시기로 결정함



[그림 17] 파종 후 시기별 통통마디 생육 및 형상

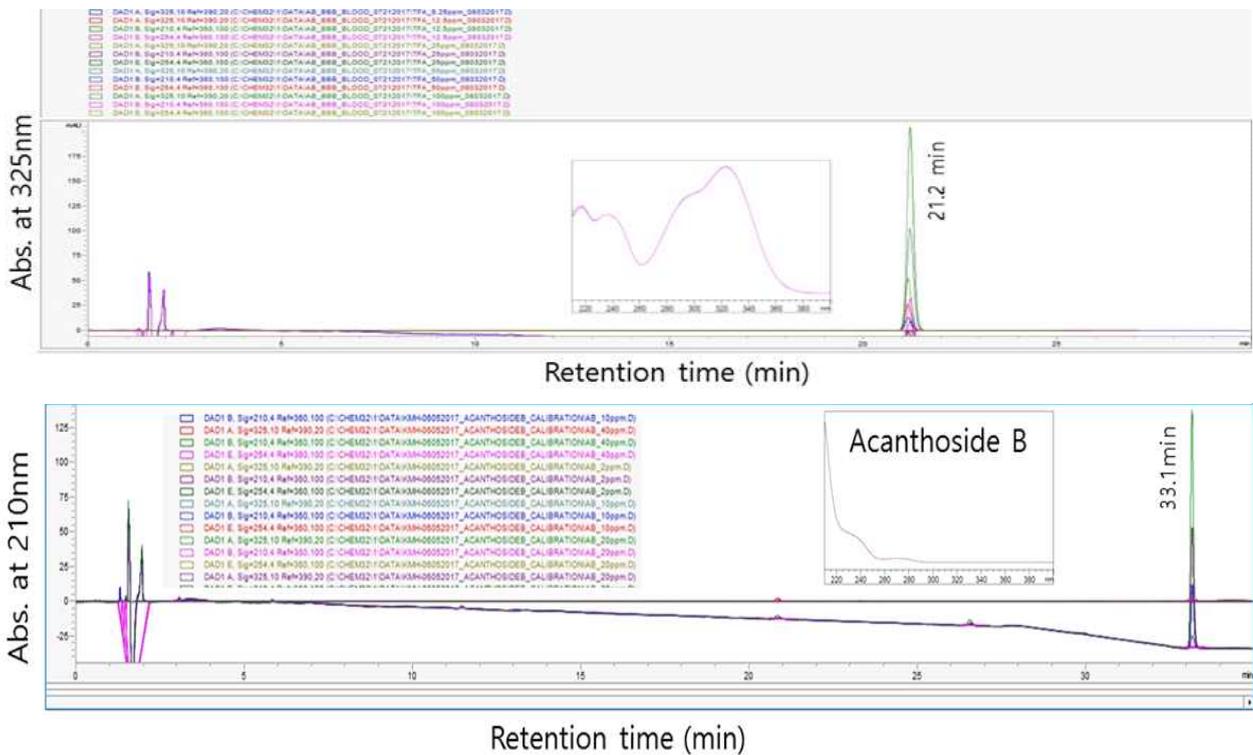


[그림 18] 채취시기 별 통통마디 식물의 지표 및 기능성분이 함량 변화 (매월 15일 기준으로 ±5일 이내에 채취된 시료를 사용하였음)

4) 지표성분의 정성 및 정량_HPLC 분석 및 UV스펙트럼 분석

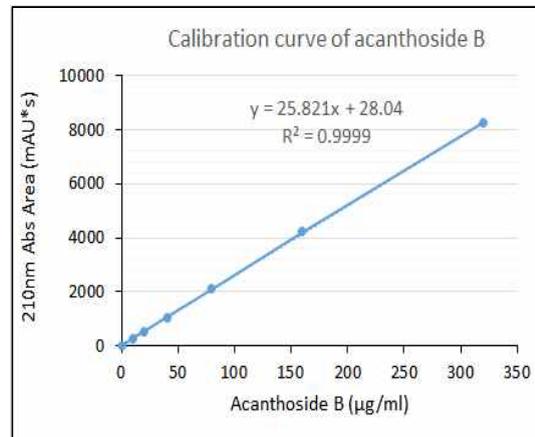
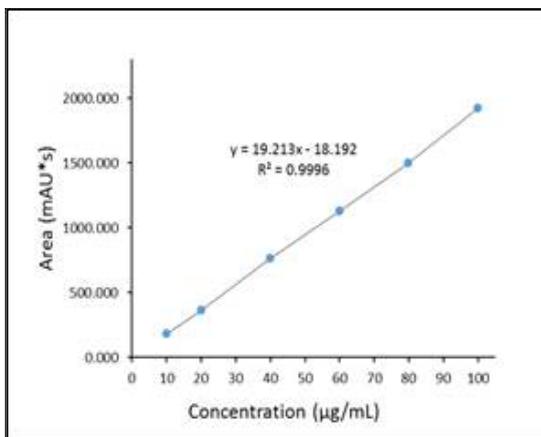
(1) 지표 및 기능성분인 t-Ferulic acid 및 acanthoside B의 정성 및 정량분석

추출분말 20mg을 1mL의 60% 메탄올에 용해시킨 여과하여 HPLC 분석을 통하여 t-Ferulic acid 및 acanthoside B를 동시에 분석함. 페룰산과 아칸토싸이드 B의 검량은 표준품을 이용하여 동일조건에서 농도별로 분석하여 검량선을 작성하였으며, 시료들의 분석 후 동일 retention time, UV spectrum, MS 분석 등을 통하여 해당 피크물질을 확인 후, 각 피크에 해당하는 면적값을 이용하여 비교 검량함(그림 19).

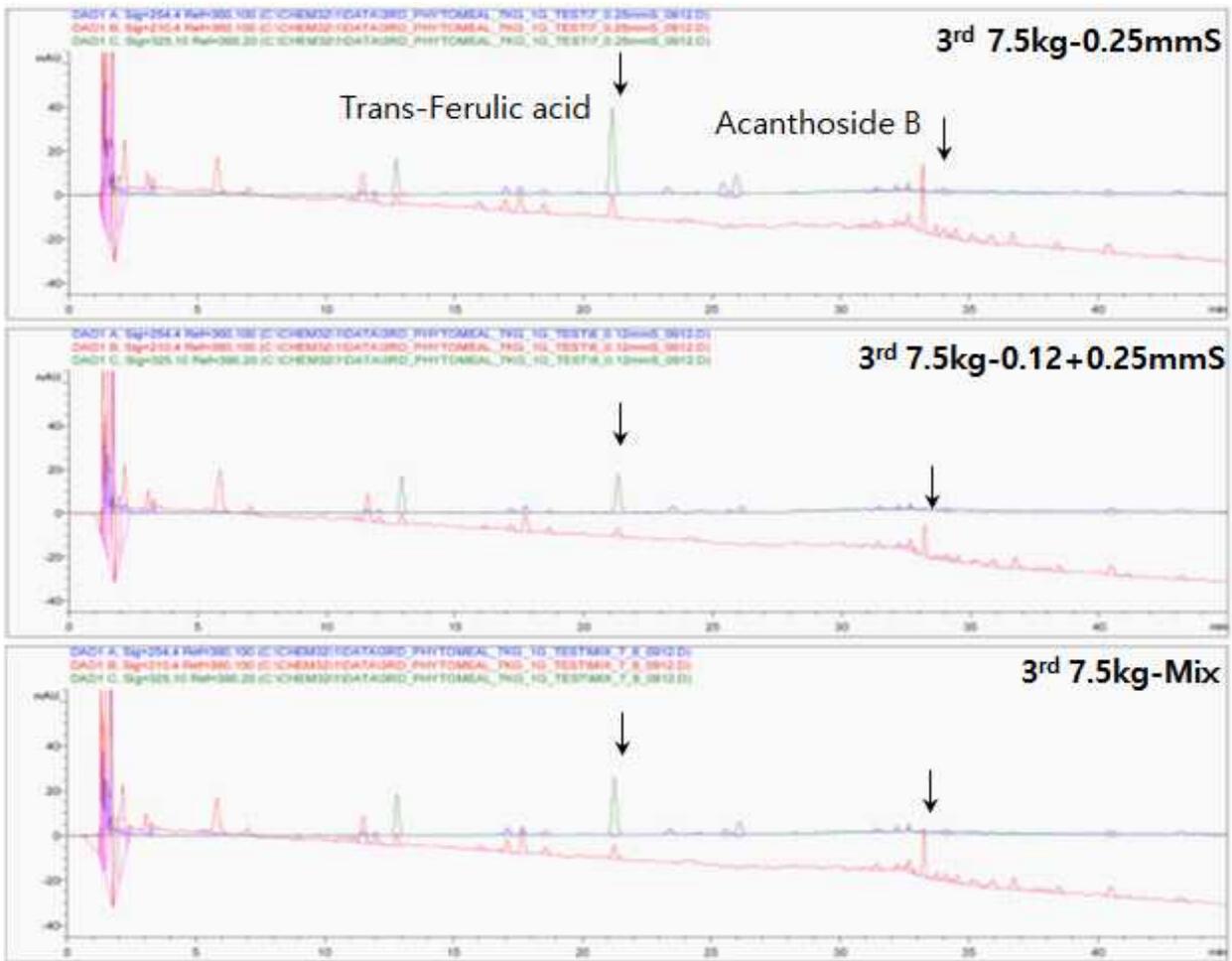


[그림 19-1] HPLC Profiles and UV spectrum of trans-Ferulic acid (top) and Acanthoside B (bottom)

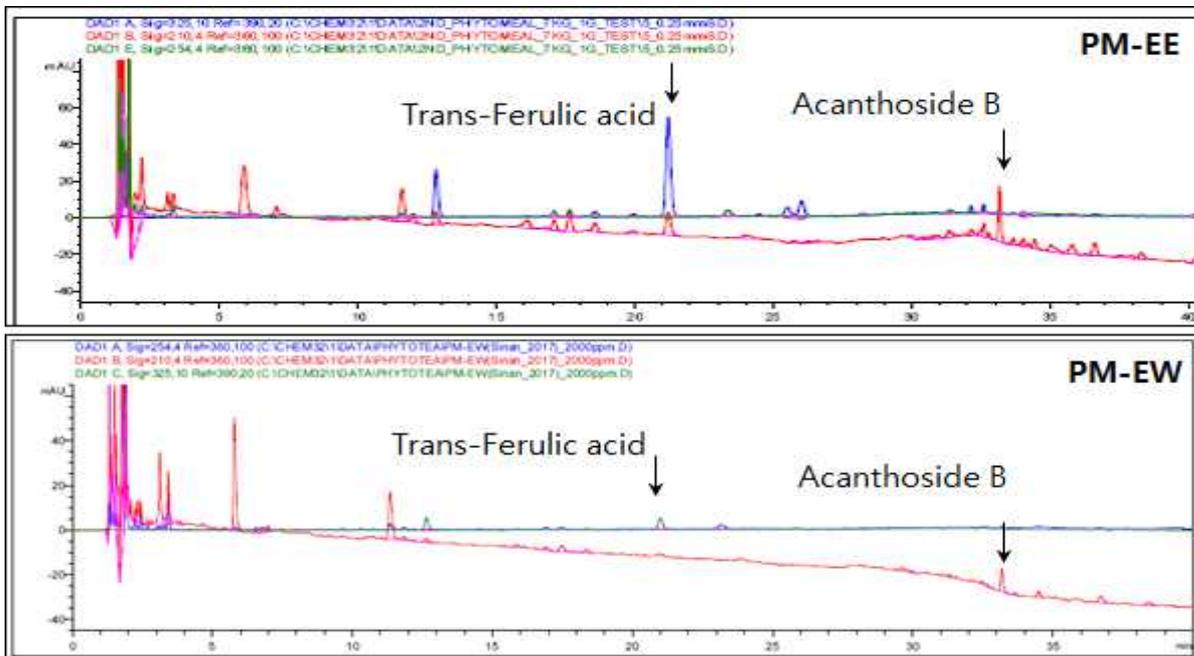
Conc (µg/mL)	Area, mAU*s (Abs at 325nm)	Acanthoside B(µg/mL)	Peak Area (mAU*s)
10	179.099	0	0
20	360.871	10	292.4996
40	762.267	20	533.48639
60	1124.693	40	1057.82068
80	1500.173	80	2105.64136
100	1919.630	160	4211.28272
		320	8262.56544



[그림 19-2] 지표성분 Ferulic acid 및 기능성분 acanthoside B의 HPLC 정량분석을 위한 검량그래프 작성



[그림 19-3] Typical HPLC profiles of PM-EE samples using dual UV wavelengths (325 and 210nm)



[그림 19-4] HPLC profiles of PM-EE and PM-EW using dual UV wavelengths (325 and 210nm)

5) 지표성분, trans-Ferulic acid 의 선정과 자사시험법 확립 및 Validation

(1) PM-EE 내 trans-Ferulic acid 분석 시험법 확립

통통마디추출물 시험시료(PM-EE)의 인지기능기능성 화합물로 규명한 Acanthoside B 화합물의 경우, 표준품을 구하기가 쉽지 않고, 중국업체를 통하여 구입할 경우에도 100mg에 500만원 이상의 고가이어서, 향후 지표성분으로 규격설정시 QC가 용이하지 않을 것으로 사료되어, 식약처 모듬토의와 기술상담을 통하여 지표성분으로 확인한 trans-Ferulic acid 만을 대상으로 지표성분 선정 및 규격기준을 결정하는 것이 좋겠다는 답변을 들어, 최종적으로 PM-EE의 지표성분은 trans-Ferulic acid 1종으로 정하기로 하였음. 또한 기존의 분석방법은 UV dual wavelength를 이용하여 2종의 지표 및 기능성분(trans-Ferulic acid, Acanthoside B)을 동시에 분석하는 HPLC 조건이었으나, trans-Ferulic acid 1종을 분석할 수 있는 single UV 파장 조건과, 전체 분석시간을 단축하는 방향으로 이동상 용매조건을 변화시켜 기존 머무름시간 21분대에서 15.8분으로 단축시켰음..

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(100 mL)
- 1.1.2 비이커(100 mL)
- 1.1.3 HPLC용 유리병, 바이알, 샘플병 등
- 1.1.4 용매용 일회용 실린지
- 1.1.5 시험 시료용액 여과용 멤브레인필터(PVDF, 0.22 μm)
- 1.1.6 초음파진탕기
- 1.1.7 진탕기(Vortex)
- 1.1.8. 마그네틱교반기(Stirrer)
- 1.1.9. 에펜돌프-원심분리기(Effendolf-Centrifuge)

1.2 분석장비

- 1.2.1 고속액체크로마토그래프(Agilent HPLC)
- 1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector) 또는 다이오드어레이 검출기(Diode Array Detector)
- 1.2.3 Zorbax Eclips Plus C18(4.6mm I.D. × 150 mm, 3.55 μm, Agilent) 또는 동등한 것

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

- 2.1.1 트랜스-페룰산(trans-Ferulic acid, TFA)
분자식 : C₁₀H₁₀O₄, 분자량 : 194.2, CAS No. : 537-98-4

2.2 일반시약

- 2.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- 2.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 2.2.3 트리플루오르아세트산(Trifluoroacetic acid, HPLC grade)
- 2.2.4 증류수(Distilled water, HPLC grade)

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

- 3.1.1 표준물질 적정량(10-20mg)을 50% 메탄올용액으로 용해하여 1.0 mg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 한다.
- 3.1.2 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 50% 메탄올로 희석하여 표준용액으로 다음과 같이 조제한다

다. (100, 80, 60, 40, 20, 10 $\mu\text{g/mL}$)

3.2 시험용액 제조

- 3.1.1 100mL 부피 비이커에 시험시료 통통마디 추출물(PM-EE) 2g(trans-ferulic acid로서 약 2.3mg)을 직접 발란스에서 칭량한다. (시료의 수분 흡습성이 강하므로, 비이커에 직접 무게를 달 것)
- 3.1.2. 2g의 시료가 들어있는 비이커에 30 ~ 40 mL의 50% 메탄올(HPLC grade)를 가하고 마그네틱 바를 사용하여 10분간 교반한 후 100mL 부피플라스크(volumetric flask)에 옮기고, 비이커에 30mL의 50% 메탄올 용액을 다시 가하여 3분간 교반하여 벽면에 묻은 시료액을 용해하여 다시 100mL 부피 플라스크 (volumetric flask)에 옮긴다. 비이커에 50%메탄올(15-20mL)을 소량 부어 다시 교반 및 비이커를 씻어 부피플라스크에 옮긴다. 50% 메탄올로 100mL 표선까지 맞추어 mess-up하고 뚜껑을 닫고 상하로 진탕한다
- 3.1.3 시료용액이 들어 있는 100mL부피플라스크를 초음파진탕으로 10분간 용해한다.
(초음파 용해 후 용액의 부피가 늘어나 표선위 약 1Cm 정도 올라옴)
- 3.1.4 상하로 진탕한 후 1시간이상 실온에서 정지 및 방냉한다. (부피가 원래 표선으로 돌아감)
- 3.1.5. 시료가 완전히 용해하지 않으므로 시료용액을 마이크로튜브에 옮겨담아 14000rpm에서 약 3분간 원심분리한다
- 3.1.6. 용매용 실리지를 이용하여 상등액을 취하고 멤브레인 필터링(PVDF)하여 1-2mL을 HPLC 분석 시료로 사용한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	5 μL
칼럼온도	25 $^{\circ}\text{C}$ (Inlet, Outlet)
이동상	A 용매 - 0.04% Trifluoroacetic acid B 용매 - 아세토니트릴(Acetonitrile)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	325 nm (ref. 390nm)

표 2. 이동상 조건

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	90	10
10	85	15
20	70	30
30	30	70
33	90	10
40	90	10

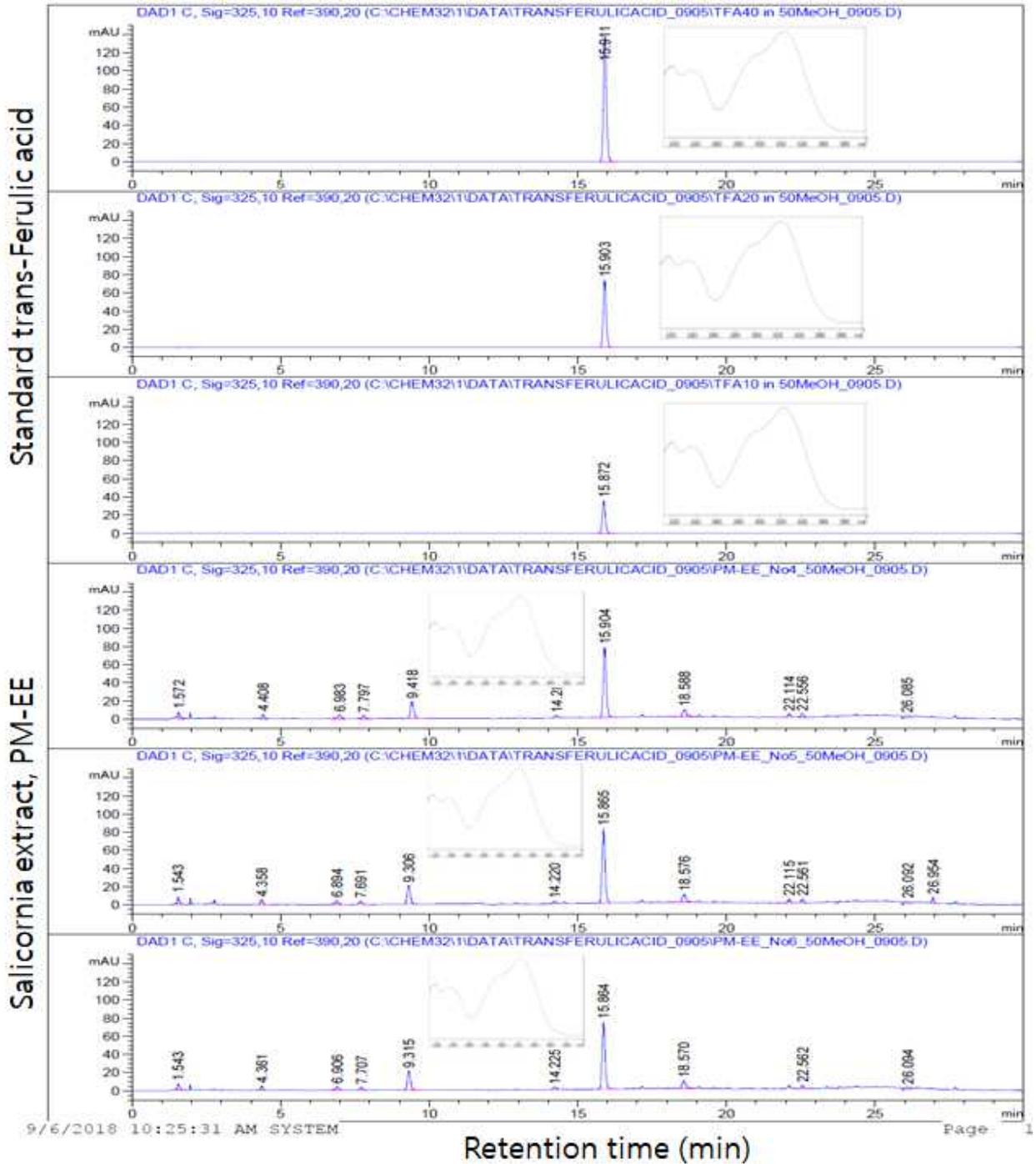
4.2 계산

트랜스-페룰산(trans-Ferulic acid) 함량(mg/g) = $C \times V / W/1000$

C : 시험용액중의 trans-Ferulic acid) 농도($\mu\text{g/mL}$)

V : 시험용액의 전량(mL), W : 시료채취량(g)

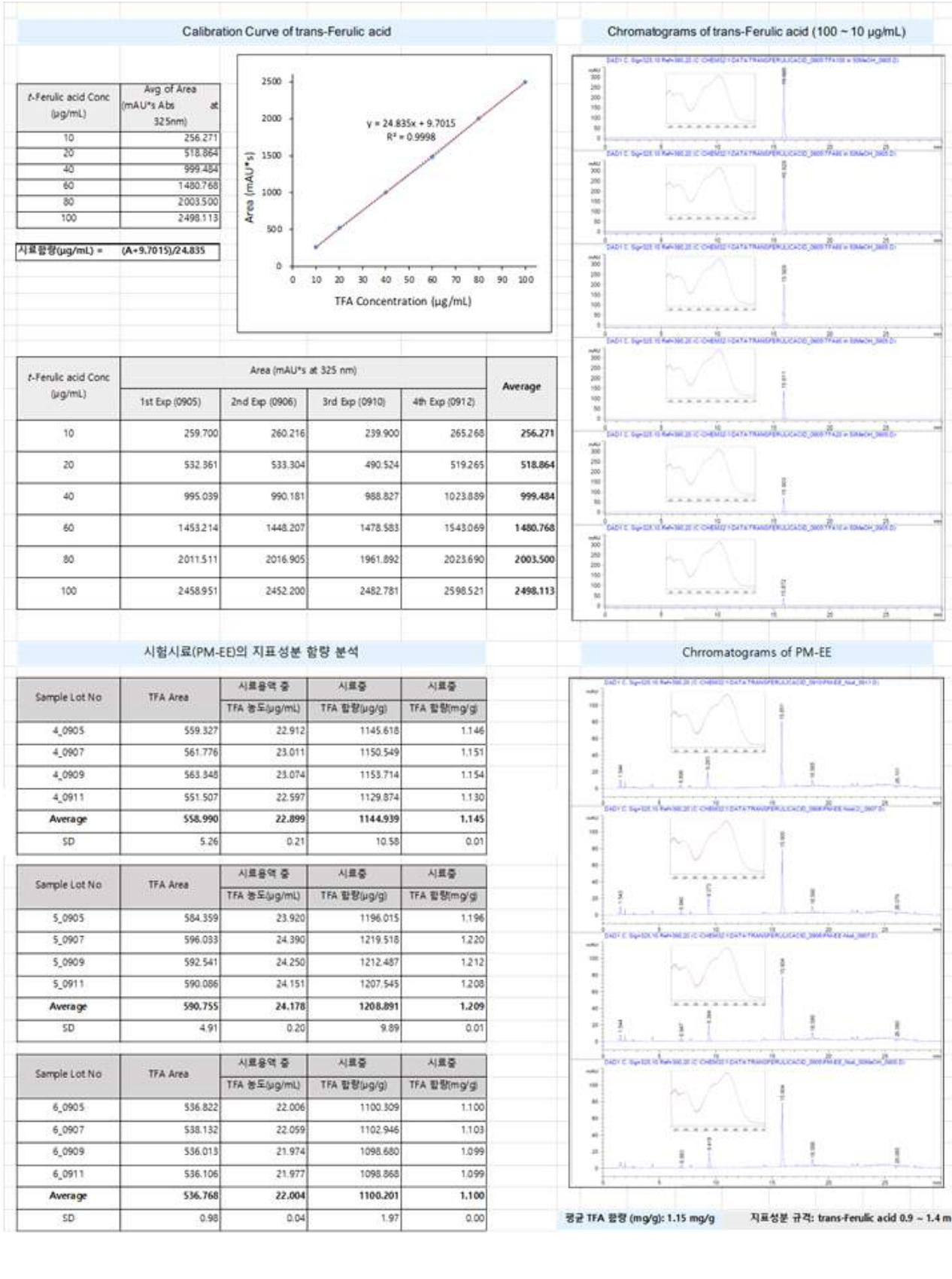
(2) 자사시험법을 활용한 탈염 통통마디추출물(PM-EE) 내 지표성분 분석 및 대표적인 크로마토그램 안정적으로 머무름시간 15.8 ~ 15.9 분대에서 Sigma Co 제품의 표준품인 trans-Ferulic acid, 통통마디 시료인 PM-EE 내 지표성분인 trans-Ferulic acid가 다른 물질의 간섭없이 정확하고, 반복적으로, 안정적으로, 분석됨을 확인할 수 있었으므로, 이 조건을 활용하여 시험시료 내 지표성분인 trans-Ferulic acid 함량에 대한 Validation을 실시하였음



특이성 확인 : - 표준용액과 시료용액의 크로마토그램 등을 통해 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인함
 - 표준용액과 시료용액에서 지표성분에 대한 RT 및 UV-spectrum의 패턴의 일치 확인

6) 자사시험방법을 활용한 탈염 통통마디추출물(PM-EE) 내 지표성분 분석 Validation 구축

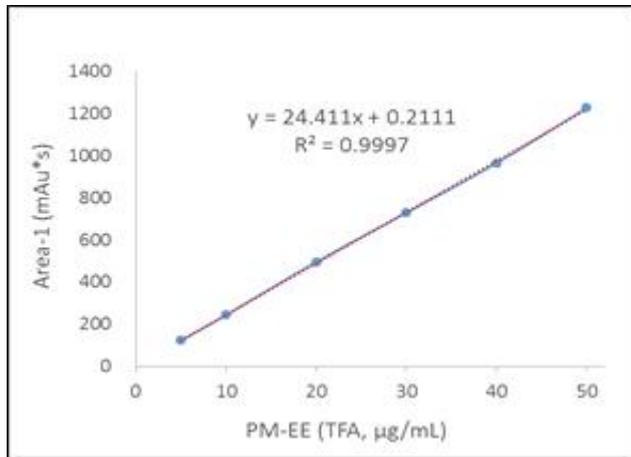
(1) 지표성분 trans-Ferulic acid (TFA) 의 검량선 및 시험시료(PM-EE)의 TFA 함량 분석



(2) 시료 주입량에 따른 지표성분의 직선성 (linearity)

Sample Lot No	TFA Area	시료용액 중	2g/100mL 시료용	시료중
		TFA 농도(µg/mL)	액 중의 함량 (mg/100mL)	TFA 함량(mg/g)
4_0905	559.327	22.912	2.291	1.146
4_0907	561.776	23.011	2.301	1.151
4_0909	563.348	23.074	2.307	1.154
4_0911	551.507	22.597	2.260	1.130
Average	558.990	22.899	2.290	1.145

PM-EE(TFA µg/mL)	시료량	주입량	Area-1 (mAu*s)	Area-2 (mAu*s)	Area-3 (mAu*s)	Average
5	0.437	1.09	121.82458	123.51786	120.64360	121.99535
10	0.873	2.18	242.60530	245.42784	241.05327	243.02880
20	1.747	4.37	494.19989	496.24670	497.82463	496.09041
30	2.620	6.55	727.08630	731.35321	730.64327	729.69426
40	3.494	8.73	966.28015	967.68594	963.25891	965.74167
50	4.367	10.92	1226.35767	1228.67892	1230.20015	1228.412247
직선 회귀 방정식			$y = ax + b$ ($y = 24.411x + 0.2111$)			
기울기평균(s)	24.41	절편(b)	0.21110	결정계수(R ²)	0.9997	



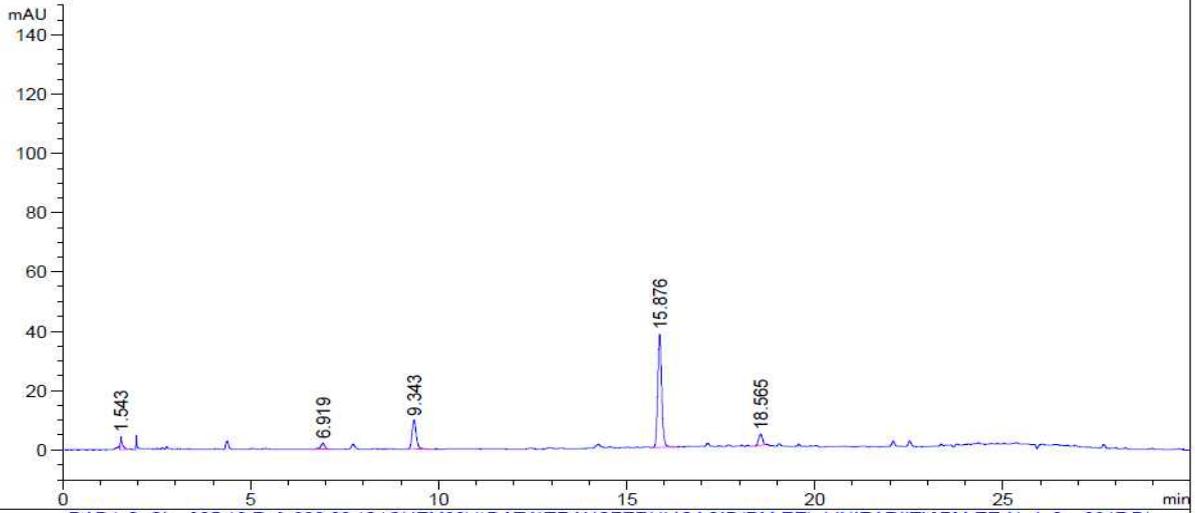
(3) 시료량에 따른 직선성

시료번호	검체량 (PM-EE #4)								
	1g			2g			3g		
	Area(mAU*s)	µg/mL	µg/g	Area(mAU*s)	µg/mL	µg/g	Area(mAU*s)	µg/mL	µg/g
1 (PM-EE_No4_0917)	278.54935	11.607	1160.664	540.76672	22.165	1108.251	822.68573	33.491	1116.378
2 (PM-EE_No4_0918)	273.44055	11.401	1140.093	555.49030	22.758	1137.894	854.16187	34.759	1158.625
3 (PM-EE_No4_0919)	278.03540	11.586	1158.594	544.26013	22.306	1115.284	847.75262	34.501	1150.022
4 (PM-EE_No4_0920)	275.78659	11.495	1149.539	552.84180	22.651	1132.562	853.58728	34.736	1157.854
5 (PM-EE_No4_0921)	275.96738	11.503	1150.267	552.63885	22.643	1132.153	824.56604	33.567	1118.901
Average	276.355854	11.518	1151.832	549.19956	22.50457	1125.229	840.550708	34.211	1140.356
RSD	1.82	0.07	7.34	5.66	0.23	11.40	14.01	0.56	18.81
검체측정값(µg/g)에 대한 RSD 구간	7.34 ~ 18.81								
시료내 TFA 농도(µg/mL) = (A+9.7015)/24.835									
시료내 TFA 함량(µg/g) = 시료농도(µg/mL) X 100/2									

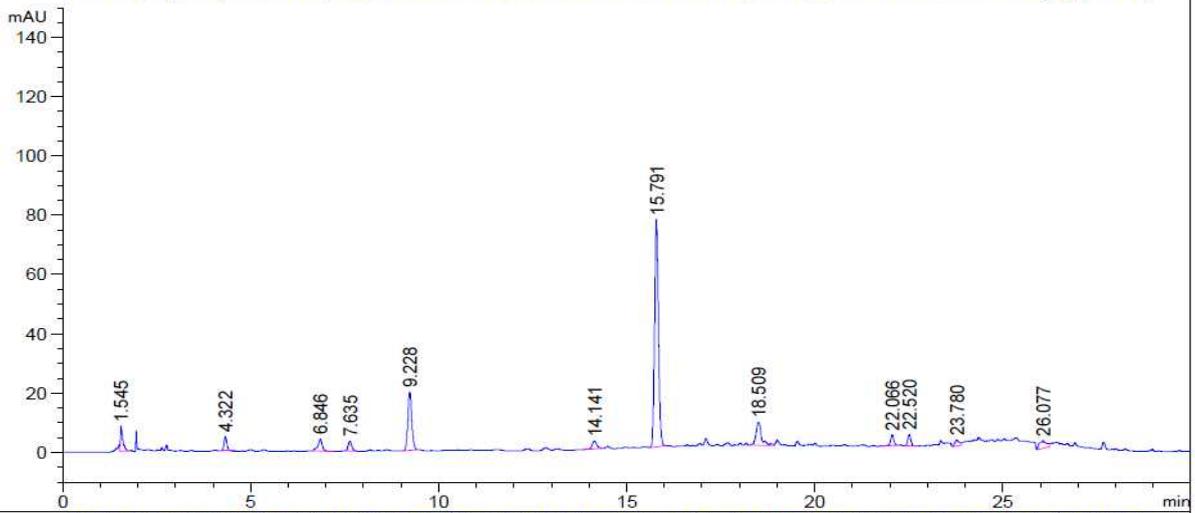
(2-1) 시료함량에 따른 직선성 분석 HPLC 크로마토그램 예

Current Chromatogram (s)

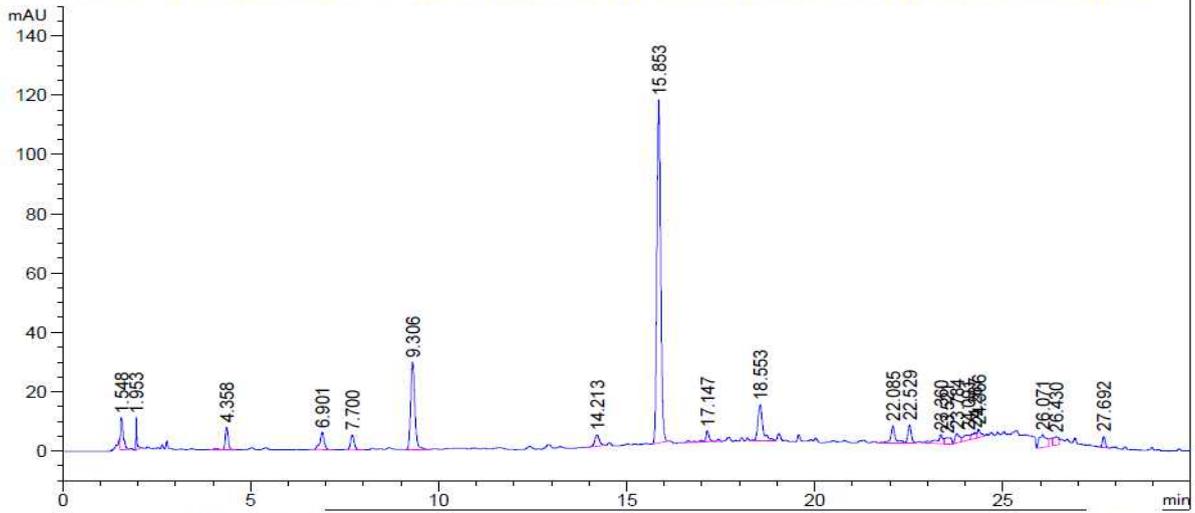
DAD1 C, Sig=325,10 Ref=390,20 (C:\CHEM32\1\DATA\TRANSFERULICACID(PM-EE)_LINEARITY\PM-EE-No4_1g_0917.D)



DAD1 C, Sig=325,10 Ref=390,20 (C:\CHEM32\1\DATA\TRANSFERULICACID(PM-EE)_LINEARITY\PM-EE-No4_2g_0917.D)



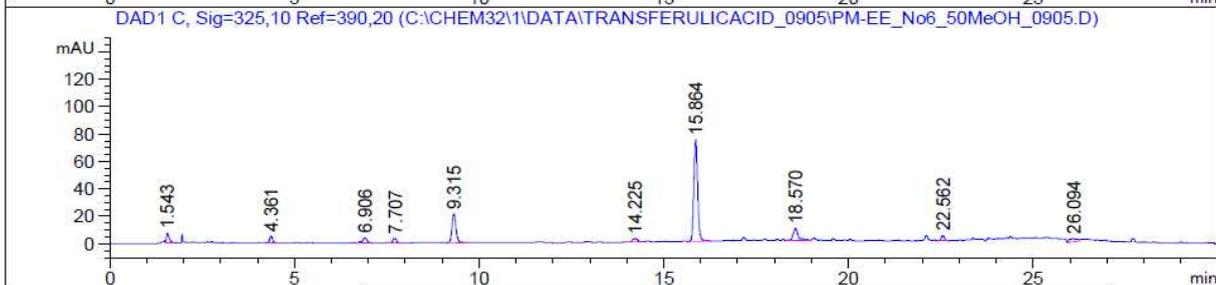
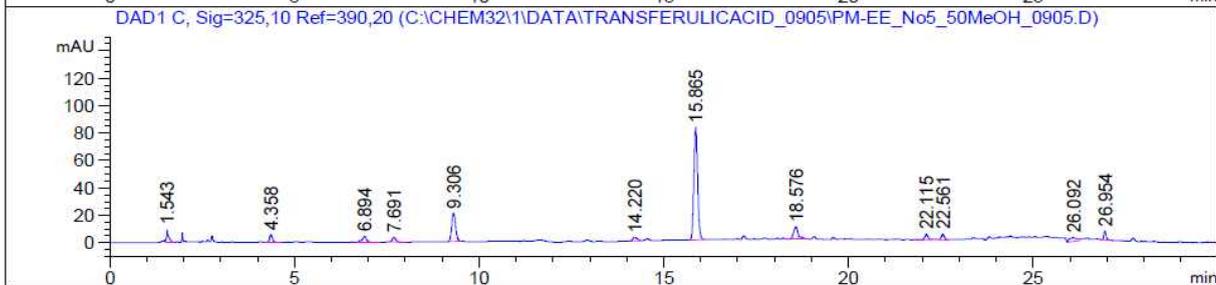
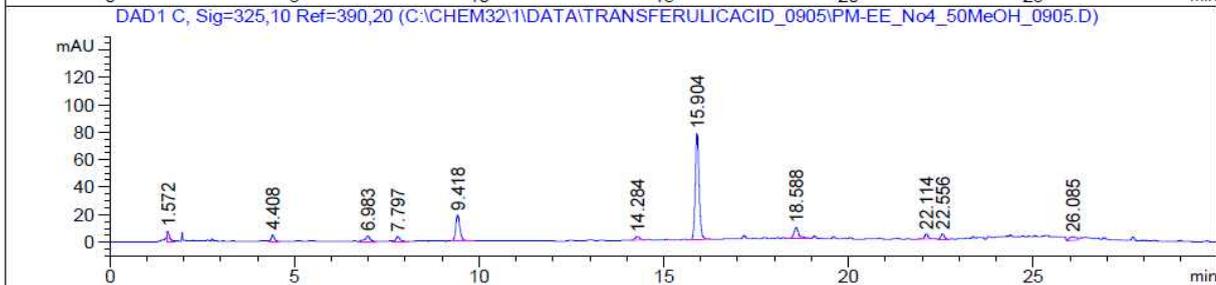
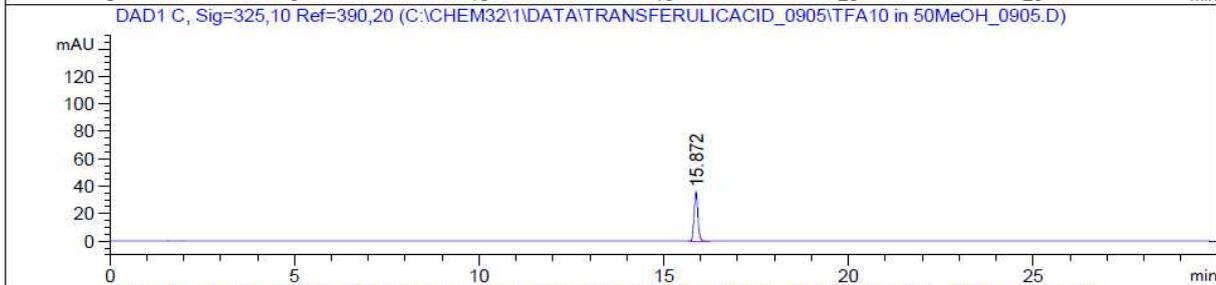
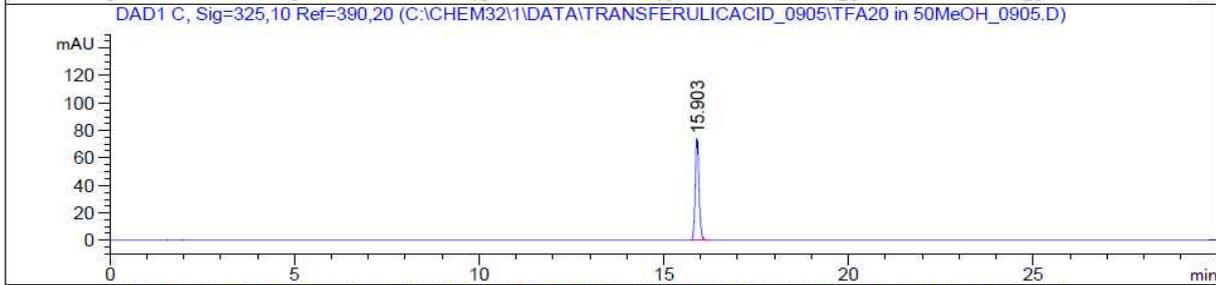
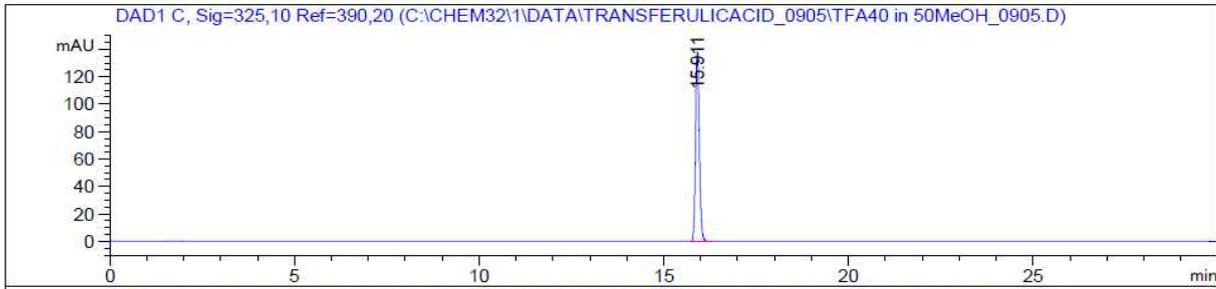
DAD1 C, Sig=325,10 Ref=390,20 (C:\CHEM32\1\DATA\TRANSFERULICACID(PM-EE)_LINEARITY\PM-EE-No4_3g_0917.D)



18/2018 5:59:05 PM SYSTEM

Page 1

(2-2) 시료 주입량에 따른 직선성 분석 HPLC 크로마토그램 예



(3) 표준품 시료 첨가에 따른 회수율 측정

50% (11.5µg)	TFA Area(mAu)	TFA첨가 시험용액 중 TFA 분석농도 (µg/mL)	TFA첨가 시료 중 TFA 분석함량 (mg/g)	이론적 TFA 농도 (µg/mL)	이론적 TFA 함량 (mg/g)	농도 회수율	함량 회수율
No4_50%_0913	840.198	34.249	1.712	34.348	1.717	99.713	99.713
No4_50%_0914	840.781	34.273	1.714	34.348	1.717	99.781	99.781
No4_50%_0918	840.961	34.280	1.714	34.348	1.717	99.802	99.802
No4_50%_0919	825.002	33.637	1.682	34.348	1.717	97.930	97.930
No4_50%_0927							

**50% TFA 첨가 시료조제 방법: 1mg/mL TFA 용액 1.145mL 과 PM-EE No4 시료 2g을 비이커에서 칭량하고, 50% 메탄올로 용해하여 100mL 부피 플라스크에 mess up 한 후 10분 초음파용해하고 흔들어 방냉 한 (1시간 이상) 후, 2-3 mL을 에펜들프 튜브에 넣어 원심분리 (14000rpm) 3분 후 상등액을 멤브레인 필터링 하여 HPLC 분석시료로 사용함.

시료함량(µg/mL) (A+9.7015)/24.835

100% (22.9µg)	TFA Area(mAu)	TFA첨가 시험용액 중 TFA 분석농도 (µg/mL)	TFA첨가 시료 중 TFA 분석함량 (mg/g)	이론적 TFA 농도 (µg/mL)	이론적 TFA 함량 (mg/g)	농도 회수율	함량 회수율
No4_100%_0913	1107.431	45.018	2.251	45.798	2.290	98.299	98.299
No4_100%_0914	1120.442	45.543	2.277	45.798	2.290	99.444	99.444
No4_100%_0918	1127.924	45.844	2.292	45.798	2.290	100.102	100.102
No4_100%_0919	1109.249	45.092	2.255	45.798	2.290	98.459	98.459
No4_100%_0927							

**100% TFA 첨가 시료조제 방법: 1mg/mL TFA 용액 2.29mL 과 PM-EE No4 시료 2g을 비이커에서 칭량하고, 50% 메탄올로 용해하여 100mL 부피 플라스크에 mess up 한 후 10분 초음파용해하고 흔들어 방냉 한 (1시간 이상) 후, 2-3 mL을 에펜들프 튜브에 넣어 원심분리 (14000rpm) 3분 후 상등액을 멤브레인 필터링 하여 HPLC 분석시료로 사용함.

시료함량(µg/mL) (A+9.7015)/24.835

150% (57.25µg)	TFA Area(mAu)	TFA첨가 시험용액 중 TFA 분석농도 (µg/mL)	TFA첨가 시료 중 TFA 분석함량 (mg/g)	이론적 TFA 농도 (µg/mL)	이론적 TFA 함량 (mg/g)	농도 회수율	함량 회수율
No4_150%_0913	1393.855	56.561	2.828	57.247	2.862	98.801	98.801
No4_150%_0914	1406.179	57.057	2.853	57.247	2.862	99.669	99.669
No4_150%_0918	1401.465	56.867	2.843	57.247	2.862	99.337	99.337
No4_150%_0919	1409.809	57.204	2.860	57.247	2.862	99.925	99.925
No4_150%_0927							

**150% TFA 첨가 시료조제 방법: 1mg/mL TFA 용액 2.29mL 과 PM-EE No4 시료 2g을 비이커에서 칭량하고, 50% 메탄올로 용해하여 100mL 부피 플라스크에 mess up 한 후 10분 초음파용해하고 흔들어 방냉 한 (1시간 이상) 후, 2-3 mL을 에펜들프 튜브에 넣어 원심분리 (14000rpm) 3분 후 상등액을 멤브레인 필터링 하여 HPLC 분석시료로 사용함.

* 함량 회수율 계산식	* 함량 회수율 계산식
회수율(%) = $C_f / C_u \times 100$	회수율(%) = $C_f / C_u \times 100$
C_f : 분석한 분석대상물질의 함량(실험치)	C_f : 분석한 분석대상물질의 함량(실험치)
C_u : 첨가한 분석대상물질의 함량(이론치)	C_u : 첨가한 분석대상물질의 함량(이론치)

**표준품 직접달기 보다 1mg/mL soln 이용하는 것이 정확함. 직접 무게달시 시험오차 큼

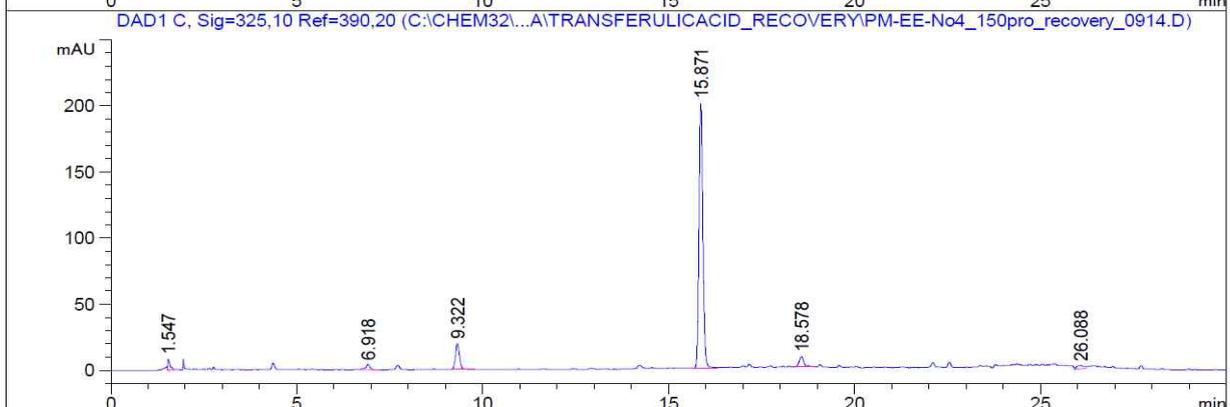
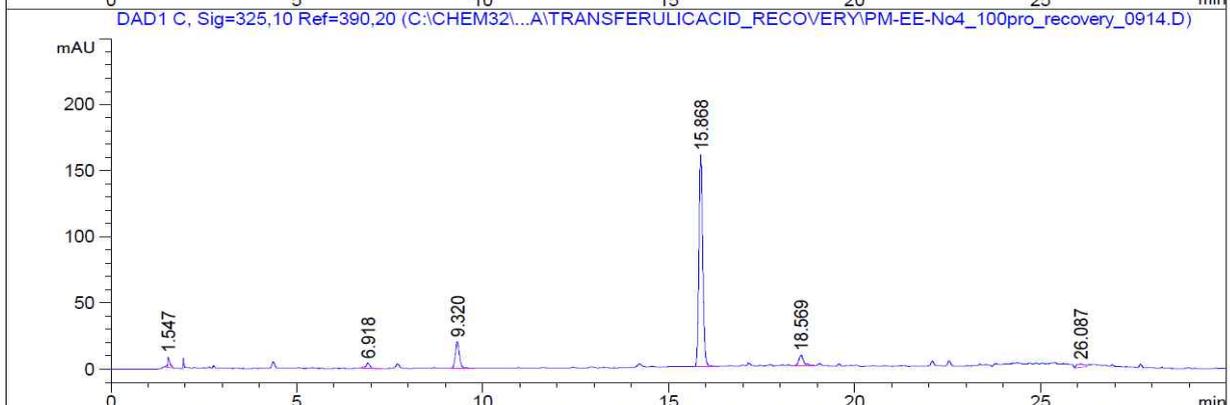
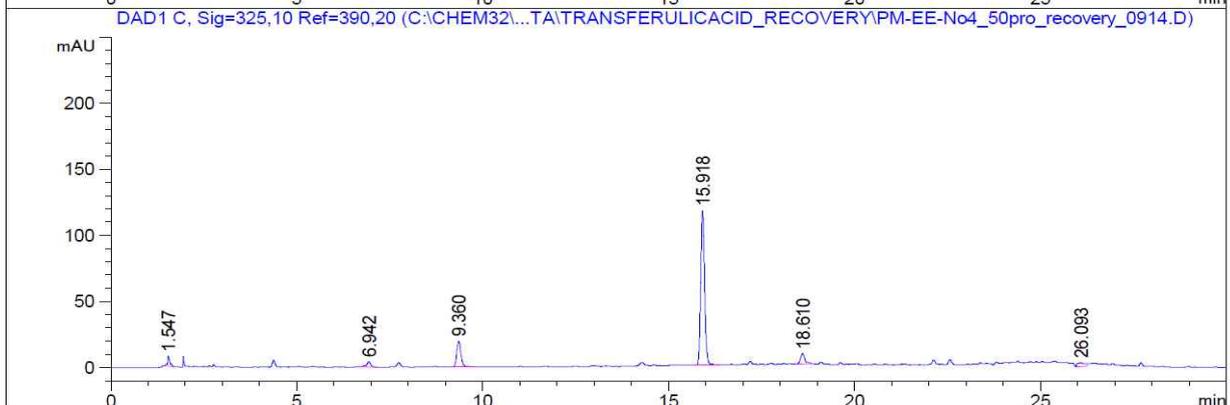
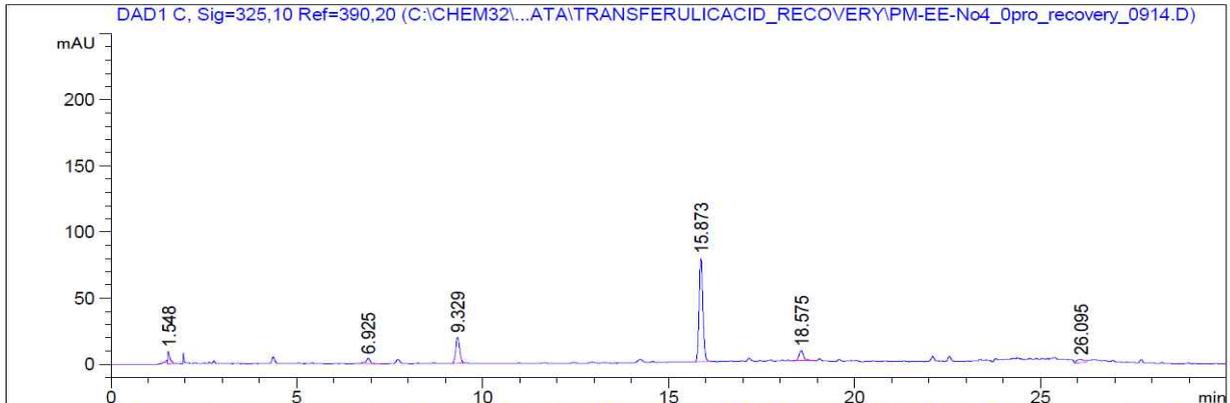
- 검체 중 이미 알고 있는 분석물질 함량의 50%, 100% 및 150% 등 3 개 이상으로 첨가하여 3 회 이상 반복 측정하고, 회수율을 구함

* 반복 측정의 경우 전처리부터 분석까지 일련의 과정 포함

* 회수율 계산식
회수율(%) = $C_f / C_u \times 100$
C_f : 분석한 분석대상물질의 함량
C_u : 첨가한 분석대상물질의 함량

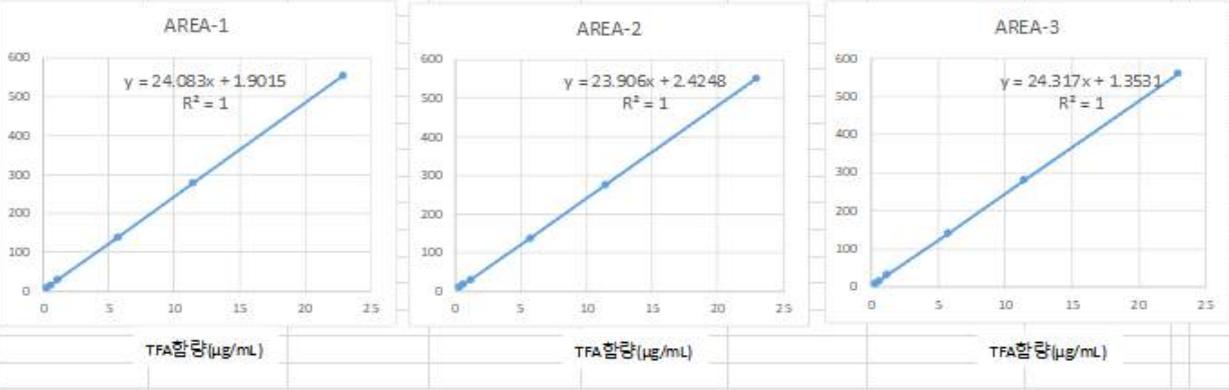
(3-1) 표준품 시료 첨가에 따른 회수율 측정을 위한 HPLC 크로마토그램 예

Current Chromatogram(s)



(4) 지표성분 Validation: Qanitation Limit (정량한계) 설정: 0.125µg

	1		2		3	
	TFA(µg/mL)	Area-1 (mAu*s)	TFA(µg/mL)	Area-2 (mAu*s)	TFA(µg/mL)	Area-3 (mAu*s)
	0.286	8.1327	0.286	10.2449	0.286	7.7072
	0.573	15.6442	0.572	17.3027	0.572	15.3042
	1.145	30.7998	1.144	29.3229	1.144	30.8061
	5.725	139.4359	5.725	137.9857	5.725	139.7391
	11.450	277.0231	11.450	274.6479	11.450	278.9940
	22.899	553.7273	22.899	550.8990	22.899	558.6945
기울기	24.083		기울기	23.906	기울기	24.317
y절편	1.9015		y절편	2.4248	y절편	2.4248
기울기평균(S)	24.102		y절편의 표준편차 (σ)	0.3021	정량한계	0.125
(정량한계 = 10×σ/S)						



(5) 지표성분 분석 정밀도 및 반복성 시험

시험시료(PM-EE #4)의 지표성분 분석 정밀도 (Precision)

시료번호	검체량 (PM-EE #4)								
	1g			2g			3g		
	Area(mAU*s)	µg/mL	µg/g	Area(mAU*s)	µg/mL	µg/g	Area(mAU*s)	µg/mL	µg/g
1 (PM-EE_No4_0917)	278.54935	11.607	1160.664	540.76672	22.165	1108.251	822.68573	33.491	1116.378
2 (PM-EE_No4_0918)	273.44055	11.401	1140.093	555.49030	22.758	1137.894	854.16187	34.759	1158.625
3 (PM-EE_No4_0919)	278.08540	11.586	1158.594	544.26013	22.306	1115.284	847.75262	34.501	1150.022
4 (PM-EE_No4_0920)	275.78659	11.495	1149.539	552.84180	22.651	1132.562	853.58728	34.736	1157.854
5 (PM-EE_No4_0921)	275.96738	11.503	1150.267	552.63885	22.643	1132.153	824.56604	33.567	1118.901
Average	276.355854	11.518	1151.832	549.19956	22.50457	1125.229	840.550708	34.211	1140.356
RSD	1.82	0.07	7.34	5.66	0.23	11.40	14.01	0.56	18.81
검체특성값(µg/g)에 대한 RSD 구간(%)	7.34 ~ 18.81								

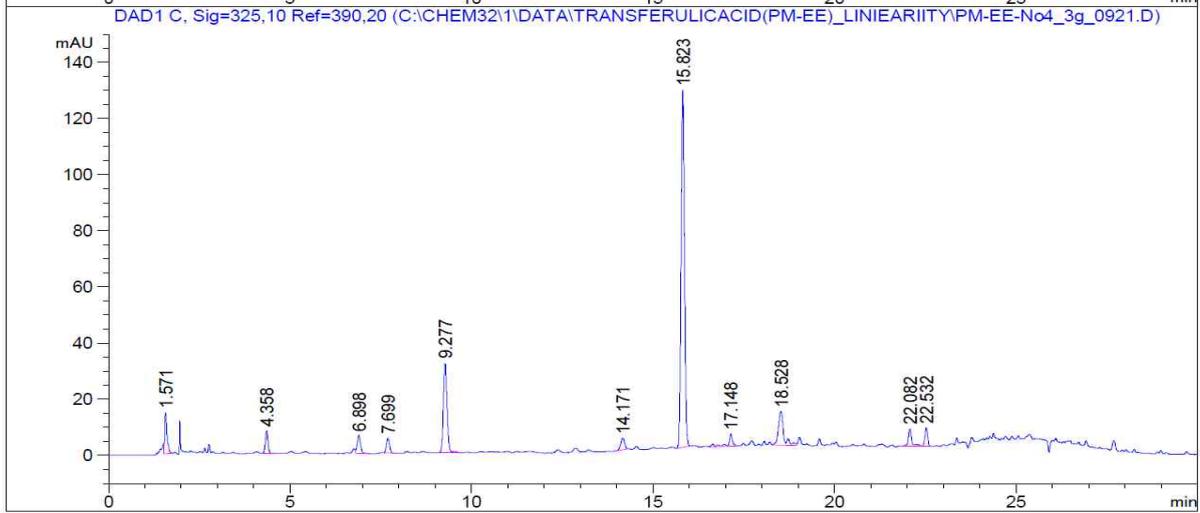
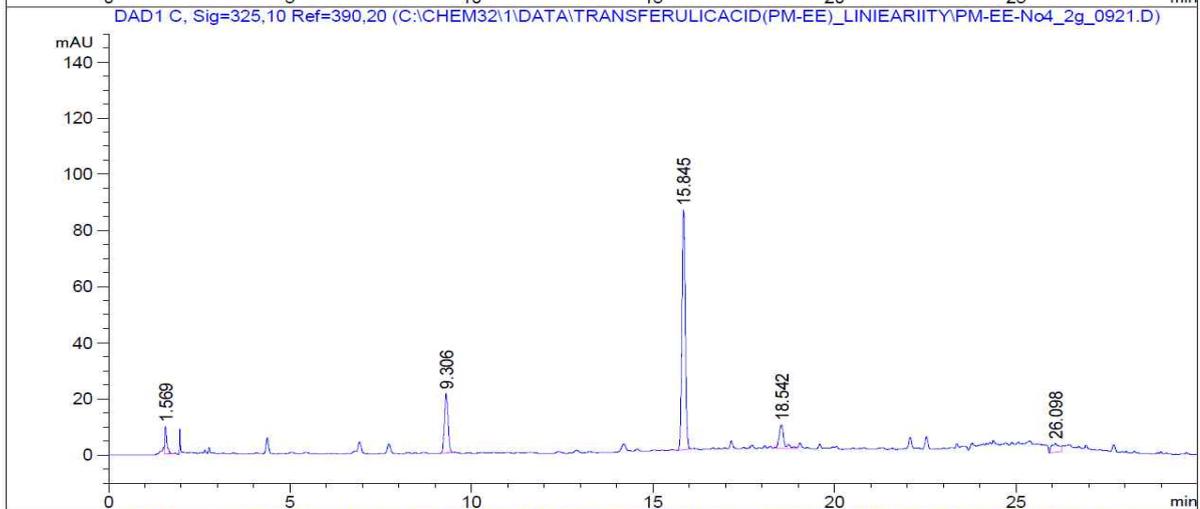
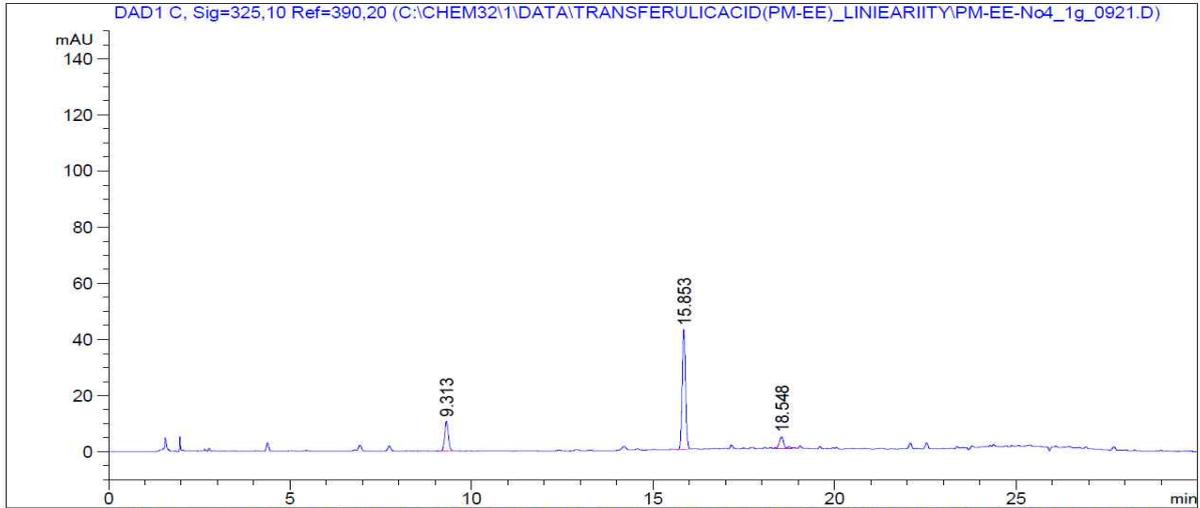
시료내 TFA 농도(µg/mL) = (A+9.7015)/24.835
 시료내 TFA 함량(µg/g) = 시료농도(µg/mL) X 100/2

	A(Kweon)				B(Lee)			
	AREA	µg/mL	µg/g	mg/g	AREA	µg/mL	µg/g	mg/g
1 (PM-EE_No5-A1 or B1_1004)	600.0626	24.553	1227.658	1.228	598.1339	24.4750	1223.748	1.224
2 (PM-EE_No5-A2 or B2_1004)	594.6881	24.337	1216.837	1.217	597.3179	24.4421	1222.105	1.222
3 (PM-EE_No5-A3 or B3_1004)	599.8876	24.546	1227.305	1.227	607.0825	24.8353	1241.764	1.242
4 (PM-EE_No5-A4 or B4_1004)	590.0860	24.151	1207.572	1.208	586.4529	24.0046	1200.230	1.200
5 (PM-EE_No5-A5 or B5_1004)	600.0626	24.553	1227.658	1.228	592.7374	24.2577	1212.883	1.213
Average	596.9574	24.428	1221.406	1.221	596.3449	24.4029	1220.146	1.220
RSD	4.479	0.180	9.017	0.009	7.588	0.306	15.277	0.015
시료함량(µg/mL) =	(A+9.7015)/24.835							

(4-1) 지표성분 Validation: Qanitation Limit (정량한계) 설정을 위한 HPLC 분석 크로마토그램 예

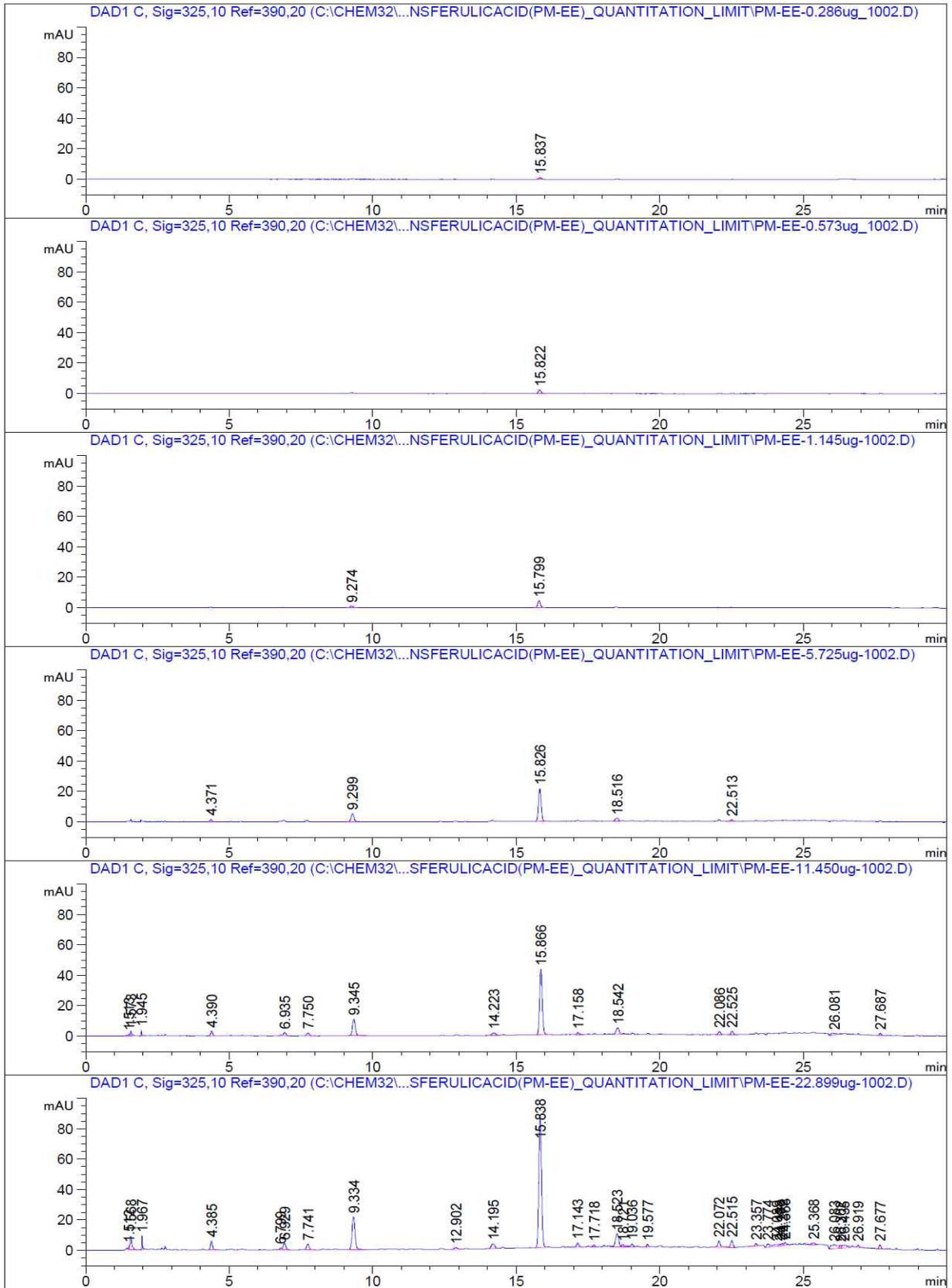
(5-1) 지표성분 분석 정밀도 - 반복성시험 HPLC 분석 크로마토그램 예

Current Chromatogram(s)



**반복성의 경우 3개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도를 구함

Current Chromatogram (s)

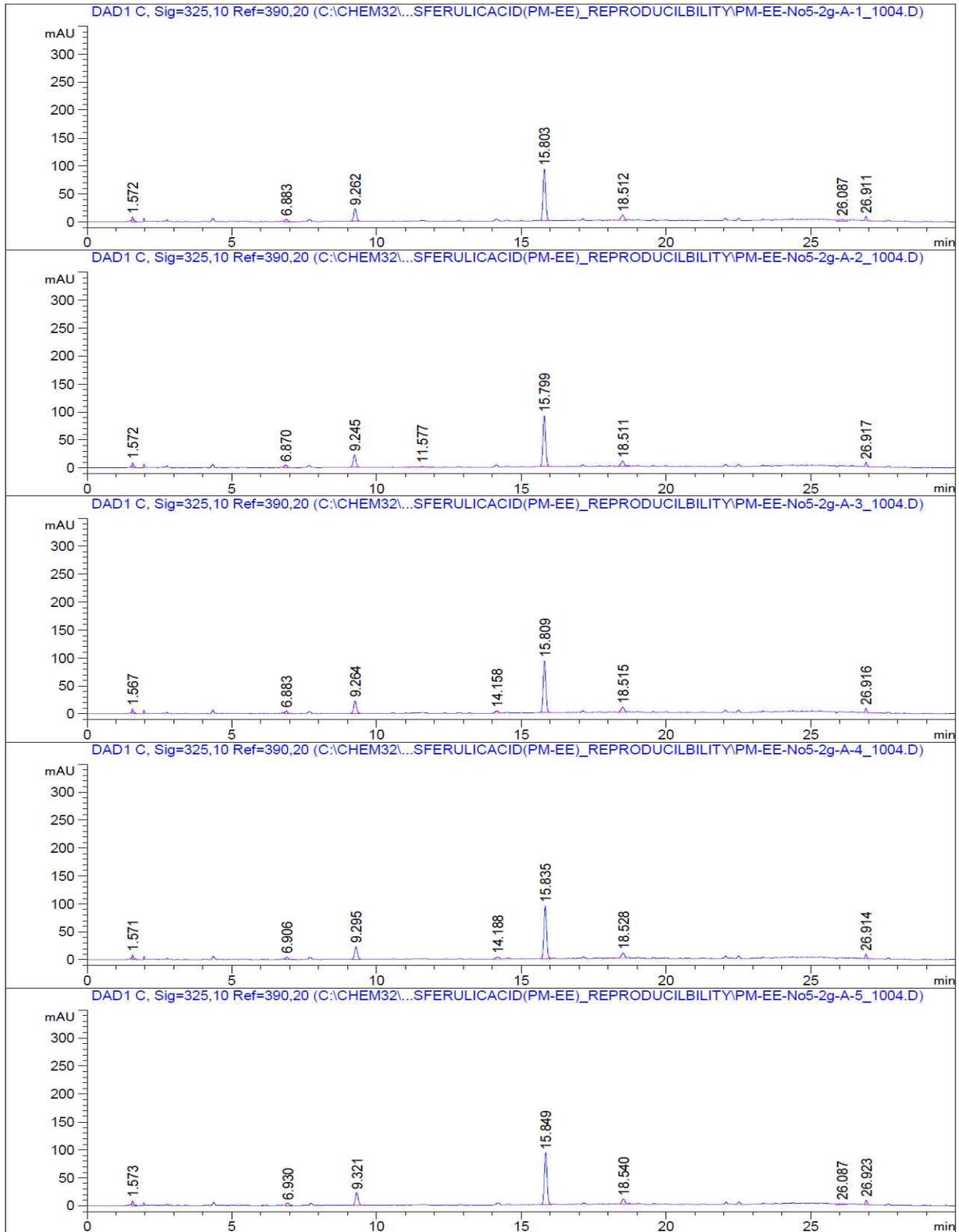


10/11/2018 9:34:26 DM SYSTEM

Page 1

(5-1) 지표성분 분석 정밀도 - 재현성시험 HPLC 분석 크로마토그램 예

Current Chromatogram(s)



10/25/2018 9:46:01 AM SYSTEM

Page 1

**재현성의 경우 각 실험실 간 1개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도를 구함. 단, 단일 실험실에서 수행할 경우 다른 시험일, 다른 시험자, 다른 시험장비 등으로 시험하여 얻은 측정값들 사이의 근접한 정도의 값 비교가 필요함

7) 건강기능성 개별인정 시험시료, 통통마디추출물(PM-EE)의 규격 시험 (자사시험법을 이용한 한국기능식품 연구원 분석자료임)

(1) 지표성분(또는 기능성분)의 규격 및 근거

- Validation을 확립한 자사시험방법으로 공인인증시험기관에서 시험시료(통통마디 추출물, PM-EE)의 3 Lot 3반복 실험을 통한 평균 함량을 기준으로 80 ~ 120%로 설정함

(2) 지표성분(또는 기능성분)의 규격 : **trans-Ferulic acid(지표성분): 0.8 ~ 1.2mg/g**

(3) 설정근거

○ 통통마디추출물(PM-EE) 지표성분의 공인인증시험기관 성적서

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

Lot No. 반복수	1 (Lot 4)	2 (Lot 5)	3 (Lot 6)	평균
1반복 (mg/g)	1.04	1.06	0.98	
2반복 (mg/g)	1.04	1.07	0.99	
3반복 (mg/g)	1.04	1.07	0.98	
평균 (mg/g)	1.04	1.07	0.98	1.03

(4) 지표성분 정보

○ 트랜스-페룰산 (trans-Ferulic acid)

■ 시판되는 표준품	표준품명	trans-Ferulic acid
	제조·판매회사명	Sigma-Aldrich
	구조식	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
	CAS No.	537-98-4

8) 건강기능성 개별인정 신청시료, 통통마디추출물(PM-EE)의 영양성분

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	258	당류(mg/g)	27
탄수화물(%)	59	나트륨(mg/100g)	670.5
조지방(%)	1	트랜스지방산(g/100g)	0.04
조단백질(%)	3	포화지방산(g/100g)	1.9
수분(%)	9.7	콜레스테롤(mg/100g)	불검출
회분(%)	23.7		

9) 건강기능성 개별인정 신청 시료, 통통마디추출물(PM-EE)의 유해물질 분석

(1) 중금속 1 일 노출량

중금속명	실측치 ^{a)} (mg/kg)	최대 섭취량 ^{b)} (g)	제안규격 ^{c)} (µg/g)	제안규격에 의한 일일 최대섭취량 ^{d)} (µg)	규정규격 (µg)
납	0.0714	1.5	1	1.5	10.8
총비소	0.0562		1	1.5	150
카드뮴	0.0820		0.3	1.5	3.0
총수은	불검출		0.5	0.75	2.1

^{a)}실측치 : 한국기능식품연구원 3LOT 실측치의 평균값

^{b)}최대섭취량 : 신청원료 1일 최대섭취량 1.5 g/일로 설정

^{c)}제안규격 : 신청인이 제안한 규격

^{d)}제안규격에 의한 일일최대섭취량 : b × c

10) 건강기능성 개별인정 신청 시료, 통통마디추출물(PM-EE)의 시험성적서 요약

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
규격항목	성상	-	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색의 분말			
	지표성분: (mg/g)	trans-Ferulic acid 0.83 ~ 1.24	1.04	1.07	0.98	
	중금속 (mg/kg)	납	1.0 이하	0.0773	0.0868	0.0501
		총비소	1.0 이하	0.0909	0.0437	0.0340
		카드뮴	1.0 이하	0.0909	0.1024	0.0526
		총수은	0.5 이하	불검출	불검출	불검출
	미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
		세균수(cfu/g)	-			
	곰팡이 독소	독소명 기재	-			
	잔류용매	용매명 :	-			
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 :	-			
	잔류농약	5종	불검출 (엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)			

바. 통통마디 탈염소재로부터 인지기능개선 효능 물질의 추출 효율 극대화 및 추출 공정 표준화 확립

1) 염생식물 탈염소재의 효소가수분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화

(1) 통통마디 탈염분말의 효소가수분해를 통한 염도 및 Brix 변화

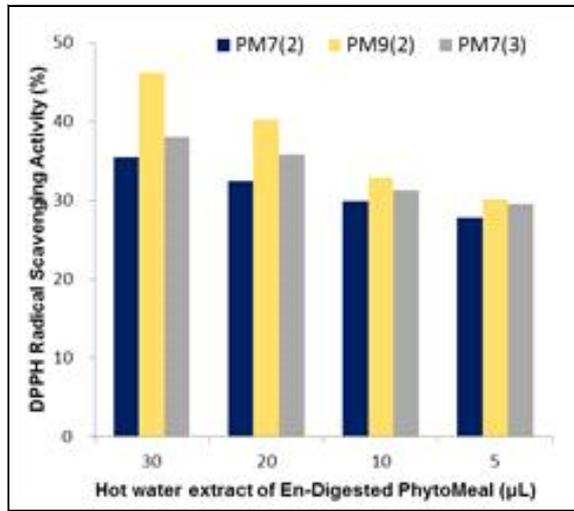
통통마디로부터 기능성 원료개발 인정을 위한 영양성분 규격기준 중 Na함량 기준에 적합하고, 기능성 성분의 추출 극대화를 위하여 식품첨가물 효소인 과일청징화 효소를 이용하여 통통마디 중의 식이섬유의 분해와 리그린 결합 폴리페놀 및 플라보노이드 성분을 용출을 유도한 후 효소분해 전후 추출물의 염도와 브릭스를 비교한 결과 (표 5) 파이토밀 PM7과 PM9 시료 모두에서 효소가수분해시 추출물의 염도는 감소하고 브릭스는 증가하는 경향을 나타내었음. 이는 원료의 효소가수분해가 통통마디 원료의 추출에 매우 효과적임을 확인하였음

[표 5] 통통마디 탈염분말의 효소가수분해를 통한 염도와 Brix 비교

	Vortex mixing (salinity/Brix)	Sonication (salinity/Brix)	Sonication at 60°C (salinity/Brix)	En-Digested (salinity/Brix)	En-Digested and 1hr Boiling (salinity/Brix)
PM7(2)	0.13 /0.6	0.13/ 0.8	0.13/ 1.3	0.16/ 1.7	0.17/ 1.7
PM9(2)	0.17/ 0.7	0.17/ 0.9	0.17/ 1.7	0.19/ 2.0	0.2/ 2.1
PM7(3)	0.04/ 0.4	0.04/ 0.6	0.04/ 1.1	0.08/ 2.4	0.09/ 2.4
	Total salt contents of each sample (%)				
PM7(2)	21.6	16.2	10.0	8.9	10.0
PM9(2)	24.2	18.8	10.0	9.5	9.5
PM7(3)	10	6.6	3.6	3.3	3.7

(2) 효소가수분해 파이토밀의 항산화활성 비교

표 3에서의 효소가수분해 시료들의 항산화활성을 비교하고자 각 효소분해물을 열수추출하고 농도별 (5-30 μ l) DPPH scavenging activity를 측정하여 결과를 그림 20에 나타냄. 추출수율, 염함량, 및 항산화활성 측면에서 7월 수확 파이토밀(PM7) 보다 9월에 수확한 파이토밀(PM9)이 기능성 원료 추출용으로 유리함을 확인하였음. 특히 추출시료의 염함량에서 3번 탈염시료가 건기식 원료의 Na 규격기준 (0.4% 이하)을 맞출 수 있을 것으로 사료됨



[그림 20] 통통마디 탈염분말 효소가수분해물들의 항산화활성 비교

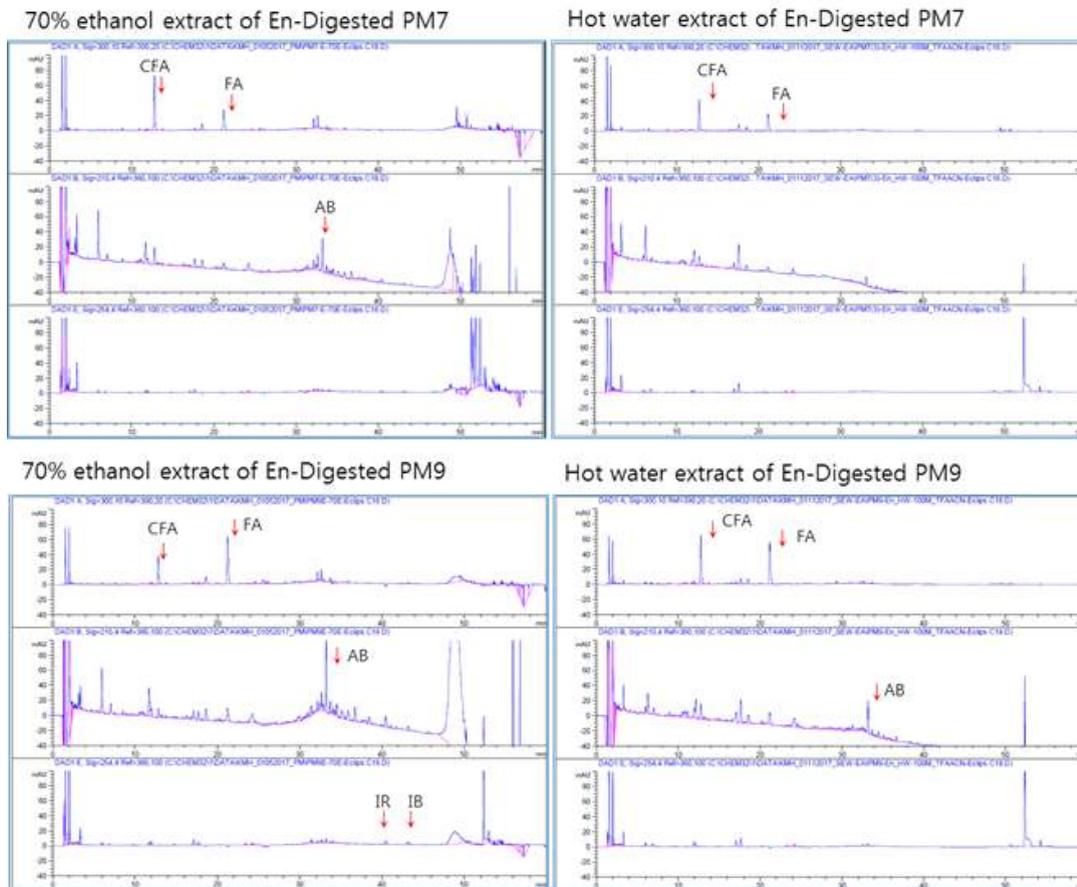
(3) 효소가수분해물의 추출용매별 추출물의 수율, 염도 및 지표성분의 비교

파이토밀 효소가수분해물의 추출용매별 수율, 염도 및 지표성분함량을 비교하고자 7월 수확 파이토밀(PM7) 보다 9월에 수확한 파이토밀(PM9)을 과일청징화효소로 효소가수분해 후, 각각 50% 메탄올과 70% 주정을 이용하여 환류추출하고 추출물의 농축 및 동결건조 후 수율과 추출물의 염도는 표 6에 나타내었으며, 각 추출물의 지표성분인 Caffeic acid, Ferulic acid는 그림 21에 나타냄

[표 6] 파이토밀 효소가수분해물의 추출용매별 추출물의 수율과 염도

	Yield (mg)	Yield (%)	Salinity (10mg/ml)	Total Salt content(%)
PM7-50M	74.8	7.5	0.12	12
PM9-50M	78.0	7.8	0.13	13
PM7-En-70E	164.7	6.5	0.07	7
PM9-En-70E	224.4	22.4	0.08	8

상기 표에서 파이토밀 효소가수분해물의 추출시 50% 메탄올 보다 70% 주정을 사용하는 것이 수율과 염도 측면에서 유리함을 확인하였고, 파이토밀 PM7과 PM9의 효소가수분해물의 70% 주정추출물과 열수추출물에 함유되어 있는 지표성분인 Caffeic acid, Ferulic acid, Acanthoside B의 추이를 HPLC 분석을 통하여 확인함(그림 21). 비교결과 파이토밀 PM9이 PM7보다, PM9 효소가수분해물의 열수추출물보다 70% 주정추출물에서 가장 높은 함량의 지표성분(Caffeic acid, Ferulic acid, Acanthoside B)의 추이를 확인함. 따라서 통통마디 탈염분말로부터 기능성성분 개발은 효소가수분해 후 주정추출을 실시하는 것이 가장 최적의 시료를 확보할 수 있을 것으로 판단하였음



[그림 21] 파이토밀 PM7과 PM9_효소가수분해물의 열수추출물 및 70% 주정추출물내 지표성분 분석

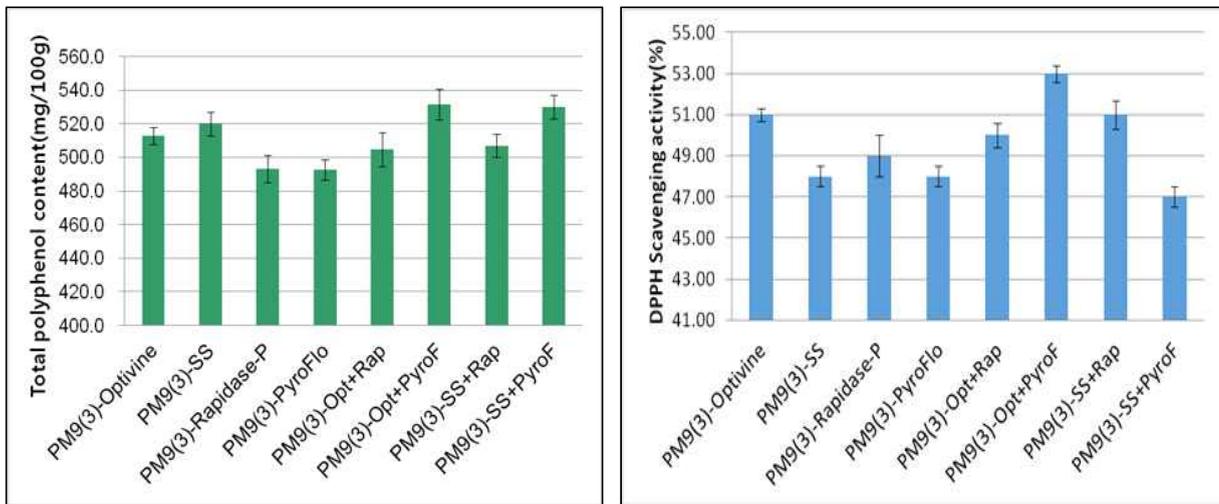
(4) 통통마디 탈염분말, 파이토밀의 효소가수분해를 위한 최적 효소 선정

통통마디 탈염분말, 파이토밀 9의 효소가수분해를 위한 최적화 효소를 선정하고자, 식품첨가물공전에 허용되어 있는 효소들을 중심으로 실험하였음. 즉 Spezyme (α -amylase), Optivine-Mash (cellulase), Rohament (β -glucanase), Plantase (hemicellulose), Pyroflo (pectinase), Alpalase (protease) 등의 효소들을 선정하였으며, 효소가수분해 조건을 기질이 되는 파이토밀 부피 대비 (1g/6mL DW) 0.5%를 사용하였으며, 반응온도는 50°C, 반응시간은 18시간, pH5.5에서 실시하였으며, 최적 효소선정을 위하여 효소가수분해물을 주정추출하고, 추출물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량과 지표성분 함량을 분석하였음. 표 7 및 그림 22에는 각 효소가수분해 추출물의 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량을 나타내었음

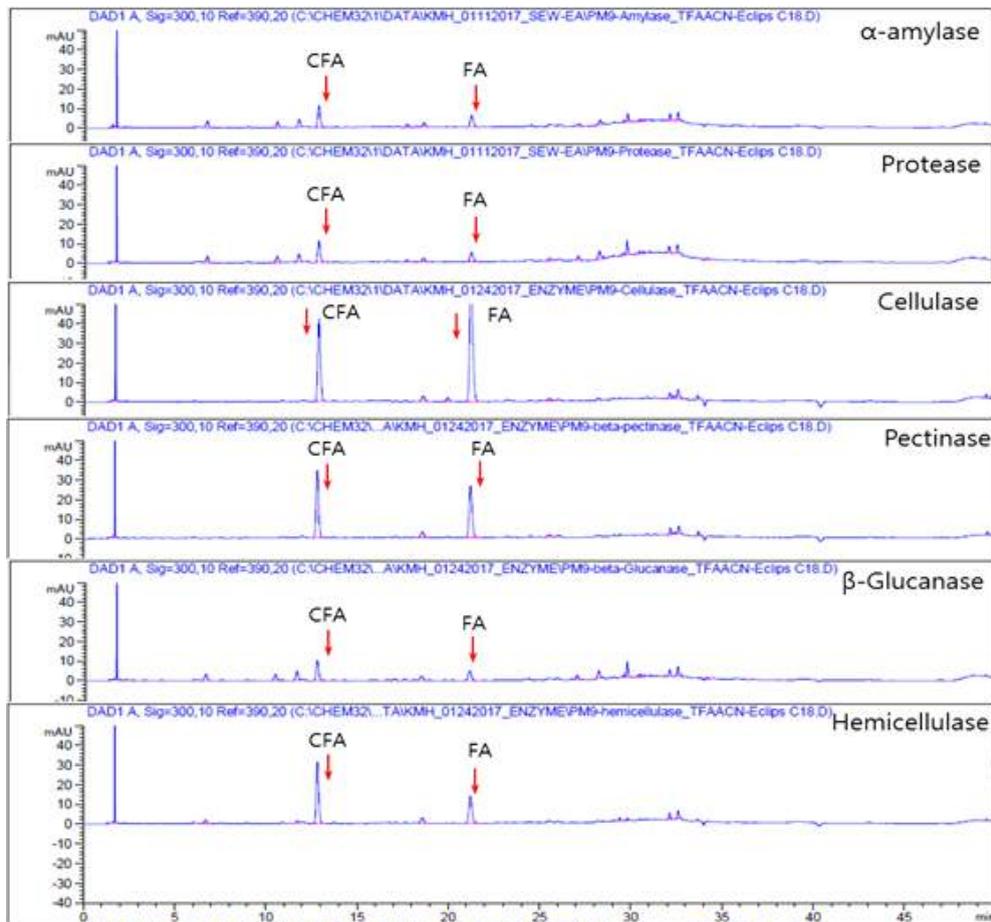
[표 7] 통통마디 탈염분말 (파이토밀, PM9)의 효소가수분해물들의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량

Enzymes used	Total Polyphenols ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total Flavonoids ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
α -Amylase	49.4 \pm 2.1	25.1 \pm 1.6
Protease	58.5 \pm 5.6	36.1 \pm 6.3
Cellulase	118.9 \pm 8.4	53.7 \pm 5.7
Pectinase	88.2 \pm 6.2	55.6 \pm 4.5
β -Glucanase	64.7 \pm 7.3	35.1 \pm 3.9
Hemicellulase	71.7 \pm 5.1	43.8 \pm 2.5
No enzyme	45.3 \pm 3.0	24.4 \pm 1.8

상기 표 의 결과에서 파이토밀의 가수분해 전보다 가수분해 후 기능성이 우수한 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증가되었음을 볼 수 있고, 특히 Cellulase와 pectinase 처리 시료에서 가장 높은 함량의 폴리페놀과 플라보노이드가 존재함을 확인할 수 있었음. 이들 각 효소분해물들에 대하여 70% 주정추출을 실시하였으며, 각 추출물에 함유된 지표성분 caffeic acid, ferulic acid의 함량을 HPLC 분석을 통하여 비교함(그림 23)



[그림 22] 파이토밀 PM9의 가수분해효소별 추출물 내 총폴리페놀 및 항산화활성 비교



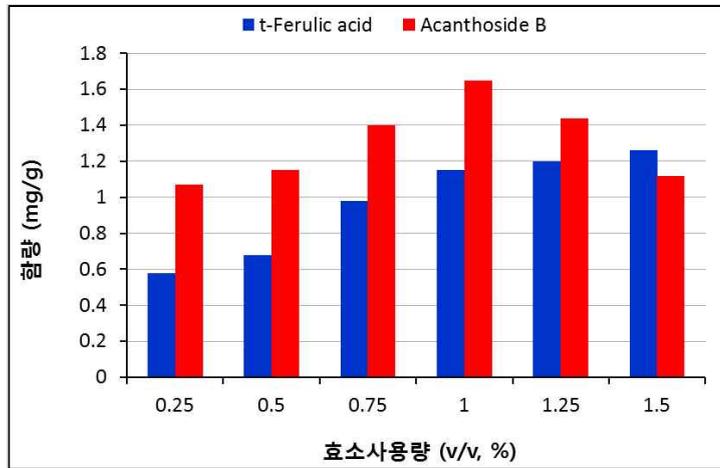
[그림 23] 파이토밀 효소가수분해물들의 지표성분 (caffeic acid, ferulic acid) HPLC 분석

상기 표와 그림의 결과에서 총폴리페놀, 총플라보노이드, 및 지표성분 함량이 우수하였던 cellulase와 pectinase의 복합효소제인 과일청징화 식품첨가물 효소제(Optivine-Mash)를 통통마디 탈염분말의 효소처리제로 선정하였음

2) 선정된 효소의 가수분해조건 및 추출 조건 확립

(1) 가수분해효소 사용량

지표 및 기능성분인 t-ferulic acid와 acanthoside B는 탈염 통통마디 내 리그난 성분에 결합한 형태가 많이 알려져 있어, 리그난 및 기타 다당류 가수분해 시 이들 두 성분의 용출이 증가함을 확인하였다. 따라서 “건강기능성 기능성원료 인정에 관한 규정”에 따라 식품첨가물 공전에 사용이 허가되어 있는 펙티나제(pectinase)와 셀룰라제(cellulase) 복합효소를 사용하여 추출함에 있어서, t-ferulic acid와 acanthoside B의 함량을 확인하고 특히 기능성 성분인 acanthoside B의 함량이 가장 높은 cellulase/pectinase 효소의 사용량을 최적조건으로 선정하고자 하였음

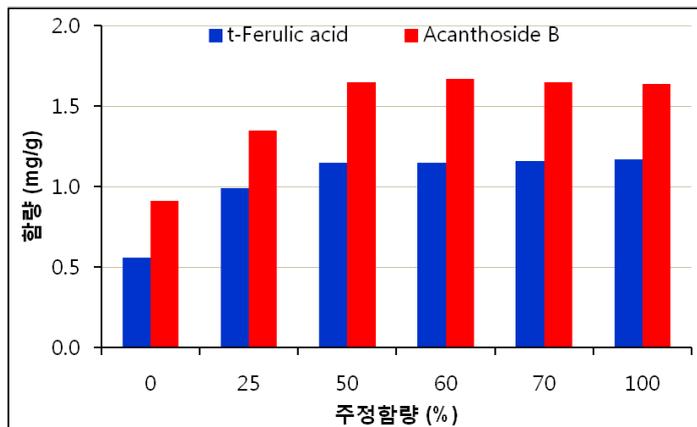


[그림 24] 사용효소량에 따른 지표 및 기능 성분의 함량

그림 15의 결과에서 사용 효소량을 원료 대비 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5% (v.v)로 혼합하여 최적온도인 50°C에서 최적시간인 15시간 동안 가수분해하고 주정추출을 실시한 후 추출물 내의 t-ferulic acid와 acanthoside B의 함량을 측정하였을 때 1.0% 첨가군에서 지표 및 기능성 성분의 함량이 가장 높아 효소사용량은 1.0%로 결정하였음

(2) 효소가수분해물의 추출을 위한 주정 농도

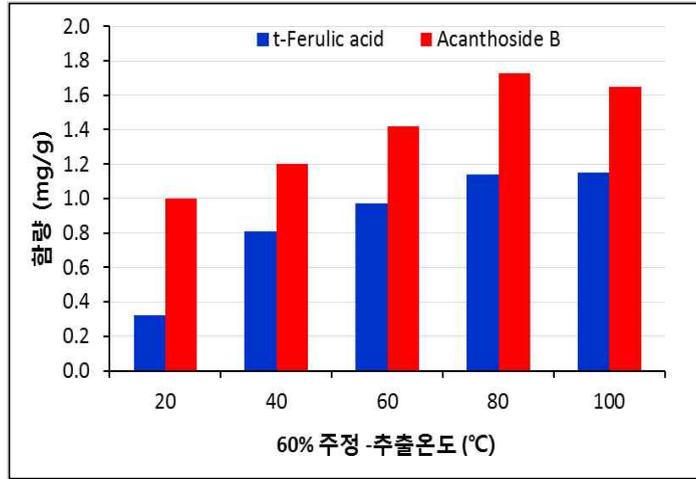
통통마디에서 분리한 t-ferulic acid와 acanthoside B는 물리화학적으로 상이한 값을 가지므로 이들이 가장 잘 용출될 수 있으며, 식품원료의 추출용매로서 안정하고 식품용도로 허용이 되어 있는 주정을 사용하여 추출함. 추출에 있어서 주정의 농도에 따른 추출물 내에 t-ferulic acid와 acanthoside B의 함량을 분석하여 경제적이고도 최적 주정함량을 선정하고자 함. 그림 25와 같이 용매비율별 두 성분의 함량을 확인한 결과 50% 주정 농도이상에서 t-ferulic acid와 acanthoside B의 함량이 가장 높은 것으로 나타남 활성 측정 결과 조추출물과 유사한 정도의 활성도를 보임. PM-EE의 추출용매 SMS 50% 주정으로 결정함



[그림 25] 추출용매 주정함량에 따른 지표 및 기능성분의 함량 변이

(3) 효소가수분해물의 추출 온도

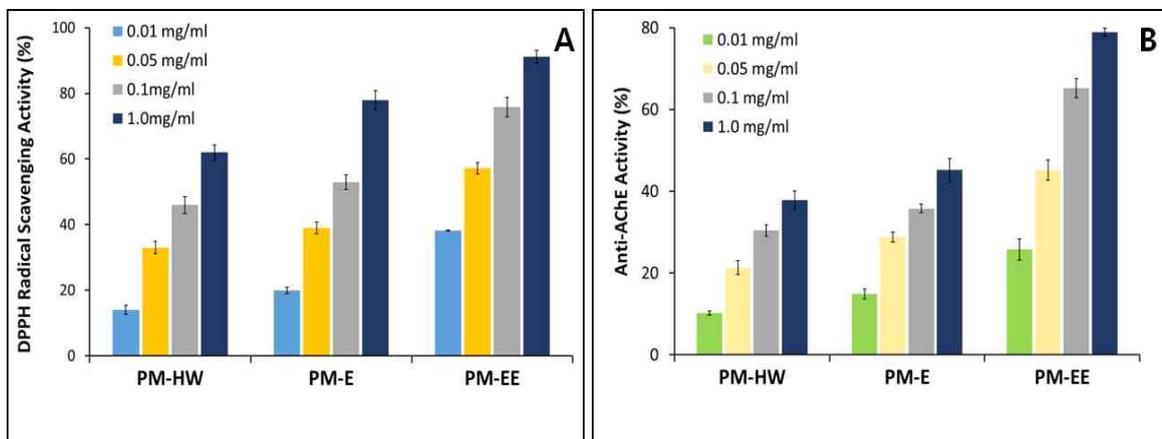
추출온도 0, 25, 50, 60, 70, 100°C 별 두 성분의 함량을 확인한 결과 80°C 온도 농도에서 t-ferulic acid와 acanthoside B의 함량이 가장 높은 것으로 나타남. 활성 측정결과 조추출물과 유사한 정도의 활성도를 보임. 따라서 PM-EE의 주정 추출온도는 80°C로 설정함



[그림 26] 추출용매 주정함량에 따른 지표 및 기능성분의 함량 변이

3) 가수분해 전후 추출물의 항산화 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성 비교

식품첨가물 효소(cellulase/pectinase)를 이용하여 통통마디 탈염분말로부터 주정추출물을 제조하였을 때 기능성 성분인 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량과 지표(ferulic acid) 및 기능성 성분 (acanthoside B)의 증가로 통통마디 탈염분말의 가수분해 전후 추출물의 항산화 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성에도 차이가 있을 것이라는 가정하에 농도별 (0.01, 0.05, 0.1, 1.0mg/ml)로 두 활성을 비교 실험한 결과를 그림 27에 나타냄. 탈염통통마디 가수분해 전 열수추출물< 탈염통통마디 가수분해 전 주정추출물<탈염 통통마디 효소가수분해 주정추출물(PM-EE) 순으로 활성의 증가를 보임



[그림 27] 가수분해전후 열수추출물 및 주정추출물의 항산화 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성 A,DPPH radical scavenging activity; B, Anti-acetylcholinesterase activity, PM-HW; 탈염통통마디 가수분해 전 열수추출물; PM-E, 탈염통통마디 가수분해전 주정추출물; PM-EE, 탈염 통통마디 효소가수분해 주정추출물

4) 가수분해 전후의 유효 생리활성 성분의 비교 정량분석

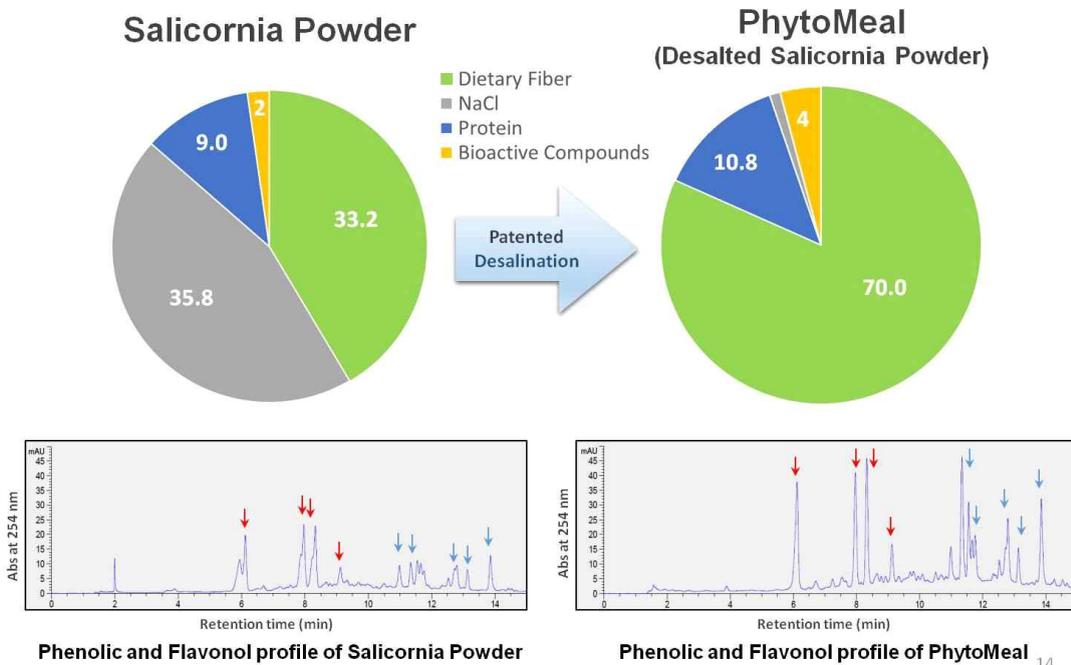
식품첨가물 효소(cellulase/pectinase)를 이용한 통통마디 탈염분말의 가수분해 전후 주정 추출물들 (PM-E, PM-EE)간의 주요 영양성분(총당, 총산성당, 총단백질) 및 기능성분(총폴리페놀, 총플라보노이드, 총사포닌) 함량을 비교분석한 결과 특히 기능성성분 함량이 효소가수분해를 통하여 증가됨을 확인함(표 8). 이는 효소가수분해 추출물인 PM-EE가 가수분해 전 시료인 PM-E보다 기능성원료로서 우수한 것으로 확인함. 그림 28에는 통통마디 분말과 탈염 후 통통마디 분말인 파이토밀의 화학적 조성을 나타냄

[표 8] 통통마디 탈염분말 가수분해 전후 추출물간의 영양 및 생리활성성분 비교

Specification	가수분해전시료 (PM-E)	가수분해후시료 (PM-EE)
Total Carbohydrates	56.79%	58.26%
Total Uronic acids	11.23%	12.80%
Total Proteins	11.06%	10.93%
Total Polyphenols ^a	11.71	51.29mg/g
Total Flavonoids ^b	15.45	19.87%mg/g
Total Saponins	12.52	15.64mg/g

^aExpressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g sample.

^bExpressed as mg rutine equivalents(REQ)/g sample.



[그림 28] 통통마디 및 통통마디 탈염 분말의 성분 조성 비교

4) 탈염 통통마디 추출물(PM-EE)의 대량 제조공정표 및 지표/기능성분 프로파일

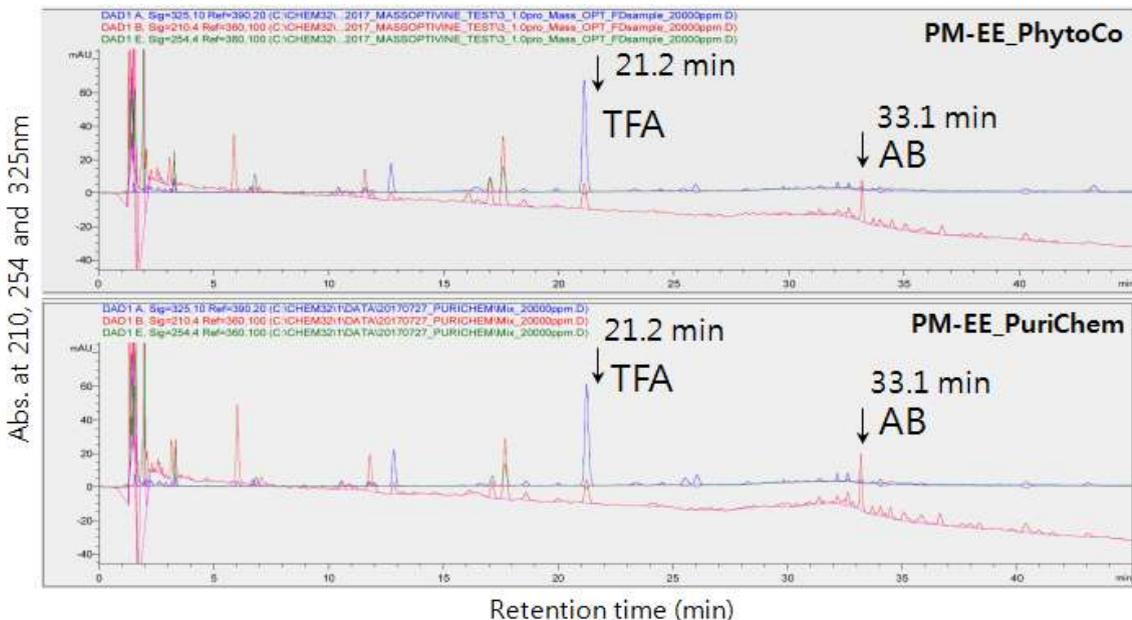
○ 제조공정의 표준화



제조공정	공정조건	수율(Kg)
1) 원재료	8월-9월 중 통통마디의 가용부위인 지상부(잎과 줄기)를 수확하고 고압살수로 세척	1000
2) 건조 및 분말화	세척한 통통마디를 -40°C이하에서 동결후 동결건조하고 100 (동결건조기 모델명, 커팅밀러 모델명)	120-130
3) 탈염 및 건조	1kg에 4°C이하의 정제수 10 L를 가하고 3분간 교반 한 후 원심분리 (5500rpm, 25분)3회 열풍건조 (원심분리기; High speed centrifuge Continent 512R Plus-Hanil) 및 열풍건조기; Dryer TG200)	60-65
4) 효소가수분해	통통마디 탈염분말 중량 대비 6배의 정제수를 가하고, 정제수 부피 대비 0.5-1.5%의 과일청징화효소(식품첨가물인 펙티나아제 및 셀룰라아제; Optivine-Mash, Connell Bros, Australia)를 가하여 50°C, 15시간 효소가수분해	-
5) 추출	효소가수분해물에 포함된 정제수의 부피대비 1.66배의 주정을 가하여 85±1°C에서 3시간 동안 1차 추출 및 여과 후 추출 잔사에 50%의 주정을 가하여 85±1°C에서 2시간 동안 2차 추출	-
6) 농축 및 건조	1차 및 2차 주정 추출액의 진공농축 및 동결건조 (Brix 20까지 농축 후 -70°C 이하에서 동결건조	13.0-15.0
7) 분말원료(PM-EE)	동결건조 시료의 미분쇄	13.0-15.0

- 제조공정 중 사용된 효소(셀룰라제, 펙티나제)는 식품첨가물로서 식품에 사용이 허가된 효소로서 건기식 원료 제조공정에 사용할 수 있는 효소임

○ PM-EE 함유 지표 및 기능성분의 HPLC 분석



- PM-EE의 지표성분 설정의 타당성/대표성은 식약처 민원상담, “건강기능식품 기능성 평가가이드, 영업자를 위한 건강기능식품 인정 안내서, 건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서(식약처, 2014.12)“를 기준하여 설정 함.

- PM-EE OEM(PuriChem) 생산: 총 25kg의 파이토밀로부터 약 5.5 Kg의 PM-EE 생산됨 (1, 2, 3 차), 1 차분(5 Lot), 2 차분(4 Lot), 3 차분(4Lot)로 나누어, 각각의 지표 및 기능성분 분석함

PM-EE produced by PuriChem				
Date	PhytoMeal (Kg)	Lyophilized #	weight(g)	total yield (Kg, %)
1차 (07242017-08012017)	10 (5 + 5)	#1	511	2.34Kg (23.0%)
		#2	491	
		#3	503	
		#4	473	
		#5	369	
2차 (08212017-09012017)	7.5	#6	440	1.65Kg (22.3%)
		#7	480	
		#8	390	
		#9	390	
3차 (09142017-09252017)	7.5	#10	458	1.61Kg (21.9%)
		#11	444	
		#12	449	
		#13	255	

탈염통통마디 추출소재(PM-EE)의 lot별 지표 및 기능성분의 함량 변이

PM-EE Lot No	TFA(mg/g)	AB(mg/g)	신청소재(PM-EE)의 크로마토그램			
#1	1.143	1.732				
#2	1.146	1.716				
#3	1.170	1.792				
#4	1.130	1.638				
#5	1.102	1.672				
#6	1.141	2.078				
#7	1.120	2.008				
#8	1.107	2.000				
#9	1.109	1.989				
#10	1.057	2.115				
#11	1.088	2.102				
#12	1.048	2.132				
#13	1.092	2.187				
			지표 및 기능성분 함량			
Average	1.112	1.936		중량(Kg)	TFA(mg/g)	AB(mg/g)
Std	0.035	0.196	원재료 (생초)	1000	0.019	0.031
Min	1.048	1.638	건초	120	0.158	0.258
Max	1.170	2.187	탈염건초	60	0.317	0.516
TFA 범위 (%)	94.2 ~ 105.2		추출분말	15	1.130	1.847
AB 범위 (%)	85.3 ~ 113.0		농축물(배)	66.6	66.6	66.6

사. 염생식물 탈염소재에 확보된 항혈전, 항염증, 뇌신경세포보호, 아세틸콜린에스터라제 저해효능이 우수한 각각의 획분을 혼합 또는 GABA, EPA, DHA, lycopene, rasvertriol, curcumin, 기타 수용성 비타민 류 등의 뇌혈류개선 도움 물질로 알려진 물질의 조합을 통해 플러스 제품으로 개발

○ 파이토밀-플러스 혼합제품은 항혈전 및 뇌신경염증억제능이 강한 항통통마디 에틸아세테이트 획분(SEW-EA)과 뇌신경염증억제 및 인지기능개선 효능이 밝혀진 lycopene, GABA, quercetin, curcumin 등을 파이토밀 중량대비 5-10%로 가미하여 개발하였음. 혼합 후 제품의 색도, 제형 및 혼합 후 제품의 기능성을 비교하였을 때, 통통마디 에틸아세테이트획분을 혼합한 PytoMeal-Plus제품이 가장 우수하였음 (그림 29)



[그림 29] 통통마디로부터 제조된 파이토밀과 파이토밀 플러스

아. 인지기능개선 평가 임상시험을 위한 시험식품 제작

- 통통마디 식물을 이용하여 pilot-scale에서 표준 추출 분말을 제조하기 위하여 원재료 및 제조공정의 표준화를 통하여 표준 분말(PM-EE)을 제조하였음. 지표(t-Ferulic acid) 및 기능성성분 (acanthoside B)의 농축률은 탈염과 추출수율을 고려하여 계산하였을 때 원재료인 통통마디 생초 대비 약 66.6배의 농축율을 보였음. 이는 통통마디 표준 분말 1g 섭취시 66.6g의 생초를 섭취함을 의미함

○ 시험자 대상 섭취기간은 12주이며 1일 600mg 섭취예정

○ 섭취량 평가: 동물실험 유효량 (100mg/kg bw/mouse)을 인간에게 적용시 통통마디추출물 (PM-EE)은 50~100mg/kg body 농도 투여 범위 내에서 scopolamine-유도 기억력 감퇴 모델에서 농도의존

적으로 인지 및 기억력 개선능을 보였으므로, 동물시험에서의 유효함량을 근거로 하였을 때 인체 대상 적용 예측량은 약 486.5mg/60kg [HED(mg/g) = 100mg/kg × 3/37] 으로 산출되어 2017년 11월 9일 식약처 “기능성 식품 소재 상용화를 위한 식품산업체 컨설팅 교육”에서 전문가와 상담결과, 섭취량은 HED를 크게 벗어나지 않고 제형성을 고려하여 600mg/day로 결정함

1) 인체적용시험용 기능성 식품 개발을 위한 제품 배합비 및 제형 검토

(1) 건강기능전문기업 (주)코스맥스바이오와 PM-EE의 임상시험을 위한 제형 시험

- 형태 (캡슐, 태블릿): 제형성, 보관성, 안정성을 고려할 때 캡슐보다 태블릿이 우수하였음
- 부형제 비율 및 종류: 주부형제 CMC, dextrin, 유당 중심으로 제형테스트 실시

(2) 인체적용 시험식품 PM-EE의 조성, 제조방법 및 그에 관한 자료

가. 시험식품(주약군)

- 1) 주성분명 : 통통마디추출물 (PM-EE)
- 2) 성상 및 제형 : 녹색 절선장방형 제피정제
- 3) 함량 : 통통마디추출물(PM-EE) 150mg/1g 정제 (4정/1일)
- 4) 보관방법 : 냉암소
- 5) 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 2정
- 6) 원재료 및 배합비율 :



Code	원료명	배합비	단위중량	표시량 (mg/1일)
[배합비율]-내용물				
NEW	PM-EE	15.0000 %	150.0000 mg	600mg
6100567	유당	35.0000 %	350.0000 mg	
6300465	결정셀룰로오스(102D)	44.8157 %	448.1570 mg	
6300085	스테아린산마그네슘	1.2000 %	12.0000 mg	
6300104	이산화규소	1.5000 %	15.0000 mg	
[코팅]				
6300189	HPMC	1.5000 %	15.0000 mg	
6301131	글리세린지방산에스테르	0.1500 %	1.5000 mg	
6300136	이산화티타늄	0.4920 %	4.9200 mg	
6300302	치자황색600(#M4015)	0.1405 %	1.4050 mg	
6300155	치자블루에스비(#M1637,치자청색소)	0.2018 %	2.0180 mg	
6100385	주정 코팅주정	18.8000 %	188.0000 mg	
합계		100.0000 %	1000.0000 mg	

7) 임상시험 1일 섭취량: PM-EE 600mg

8) 제조공정

나. 대조식품

- 1) 주성분명 : 결정셀룰로스
- 2) 성상 및 제형 : 녹색 절선장방형 제피정제

제조공정			비고
칭량		○	
과립		○	
내용물 혼합 / 조제		○	
피막조제			
타정 / 충전 / 성형		○	
코팅 (투명 / Color)		○	
선별		○	
예상 Loss율		3%	

3) 함량 : PM-EE 추출물 0mg/1g 정제 (4정/1일)

4) 보관방법 : 냉암소

5) 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 2정

6) 원재료 및 배합비율 :

Code	원료명	배합비	단위중량	표시량 (mg/1일)
【배합비율】-내용물				
6100567	유당	35.0000 %	350.0000 mg	
6300465	결정셀룰로오스(102D)	59.8157 %	598.1570 mg	
6300085	스테아린산마그네슘	1.2000 %	12.0000 mg	
6300104	이산화규소	1.5000 %	15.0000 mg	
【코팅】				
6300189	HPMC	1.5000 %	15.0000 mg	
6301131	글리세린지방산에스테르	0.1500 %	1.5000 mg	
6300136	이산화티타늄	0.4920 %	4.9200 mg	
6300302	치자황색600(#M4015)	0.1405 %	1.4050 mg	
6300155	치자블루에스비(#M1637,치자청색소)	0.2018 %	2.0180 mg	
6100385	주정 코팅주정	18.8000 %	188.0000 mg	
합계		100.0000 %	1000.0000 mg	

7) 임상시험 1일 섭취량: PM-EE 0g

8) 제조공정

제조공정			비고
칭량		○	
과립			
내용물 혼합 / 조제		○	
피막조제			
타정 / 충전 / 성형		○	
코팅 (투명 / Color)		○	
선별		○	
예상 Loss율		3%	



[그림 29] 통통마디추출물(PM-EE)의 임상시험 용 주약군 및 위약군 식품
- 위탁생산: (주)코스맥스바이오

(2) IRB 심의 신청을 위한 인체적용시험자 자료집 (IB, Investigator's Brochure) 작성

- IRB 승인 신청 자료로서, 신청원료에 대한 정보 (총괄요약본, 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용 현황, 기능성 원료의 제조 및 방법, 원료의 특성, 섭취량, 섭취량 평가, 섭취시 주의사항, 기능성에 관한 자료, 안정성에 관한 자료, 인체적용시험용 식품의 제조방법 등)을 정리하여 작성하였음

(3) 인체적용시험수탁기관 (Contact Research Organization, CRO) 네오뉴트라와

인체적용시험 위탁계약 체결

- 주식회사 파이토크퍼레이션은 주식회사 네오뉴트라에 인체적용시험 대행업무(CRO)에 관한 계약을 체결하였음 (2017년 6월 8일, 2018년 11월 수정 계약 1회)
- 기능성 내용: 인지기능개선(또는 노인의 기억력 개선)에 도움
- 목적 및 CRO 범위: 안전성, 유효성 검사 인체적용시험으로써 프로토콜 개발, 모니터링, 통계, 보고서 등 CRO 업무 대행

1.1.2 개략적인 과제 정보

인체적용시험 명칭	안전성, 기능성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험	
시험 대상자	인원 수	88명 (2개군-시험군, 대조군)
	선정 기준	CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상 감소한 사람, 즉, MCI(경도 인지 장애)에 근접한 자 등 또는 기억력 저하자
	제외 기준	질환자 등
시험기관 및 수	대학부속병원 1개 사이트	
기간	과제기간	15개월
	시험기간	8개월
	섭취기간	12주
인체적용시험 디자인	단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조시험	
위약 및 시험식품의 공급	동일포장, 인체적용시험용 제품이라는 라벨, 무작위 배정에 의한 라벨 등	

- 상기 인체적용시험 규모는 귀사에서 제공한 자료를 바탕으로 디자인한 것으로 확정된 사항은 아닙니다.

- CRO 예상 일정 계획

1.2 예상 일정 계획

귀사에서 제공해주신 정보 및 당사와 인체적용시험기관의 일정을 기준으로 인체적용시험 진행에 대한 각 업무단계별 예상 소요일정입니다.

번호	항목	예상 기간(m)	예상 일정	내용
1	Contract for CRO			인체적용시험 CRO 계약 체결
2	Project Setup	1	-	제공된 자료 검토 전략 수립 시험 디자인 연구자/연구기관 선정 프로토콜/CRF 등 개발
3	IRB Submission /Approval (Protocol)	2		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요
4	Initiation Activities	1	-	대상자 모집 방안 등 제반 준비 인체적용시험식품 제조 인체적용시험기관 계약 인체적용시험 study material 제작 등 인체적용시험 개시 모임
5	Study Stage	8	2018. 1. 1 -	등록기간 : 5 개월 섭취기간 : 12주 모니터링
6	Data Management	1	-	DB 구축, 코딩 등
7	Statistical Analysis	1	-	통계분석 및 표/그림 제작
8	Clinical Study Report	1	-	결과보고서 작성 및 연구자 고찰 삽입
9	IRB Submission (CSR)	1		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요

- 상기 예상 소요기간은 평균적으로 소요되는 예상 기간을 나타낸 것이며, 상황에 따라 변동될 수 있습니다.

(4) 인체적용시험 프로토콜 작성-CRO 대행

가. 시험식품 섭취량 결정: 통통마디추출물로써 600mg/day

통통마디추출물(PM-EE)은 50~100mg/kg body weight 의 농도 투여 범위 내에서 scopolamine-유도 기억력 감퇴 모델에서 농도의존적(dose-dependenat)으로 인지 및 기억력 개선능을 보였으며, 동물시험에서의 유효 함량을 근거로 하였을 때 인체대상 적용 예측량은 약 486.5mg/60kg [HED(mg/g) = 100mg/kg × 3/37]으로 산출되었다.

식용채소인 통통마디 생초 100g 은 국민 1 인당 1 일 채소류 평균 섭취량인 300g 의 1/3 의 수준이다. 통통마디추출물(PM-EE)로써의 600mg 은 제조공정 상 약 66.6 배 농축된 것이므로 생초 39.9g 을 섭취하는 양이며, 시중 판매중인 함초 건조분말 약 4.8g 에 해당된다. 이는 함초 건조분말 판매제품들의 1 일 권장 섭취량이 8g ~ 18g 임을 감안하면 통통마디추출물(PM-EE)로써의 600mg 은 매우 안전한 섭취량에 해당된다.

통통마디 에탄올 추출물(SH-E)의 단회 급성독성시험에서 통통마디 에탄올 추출물의 2000mg/kg 을 마우스에 구강투여시에도 독성소견을 보이지 않음(1B, 54 페이지, 4.1. 참조)을 고려하면 본 시험시료인 통통마디추출물(PM-EE) 600mg 은 안전한 섭취량이라 할 수 있다.

따라서 본 인체적용시험에서는 유효성과 안전성을 확보할 수 있는 용량인 600mg 을 1 일 섭취량으로 최종 설정하였다.

나. 인체적용시험대상자 수

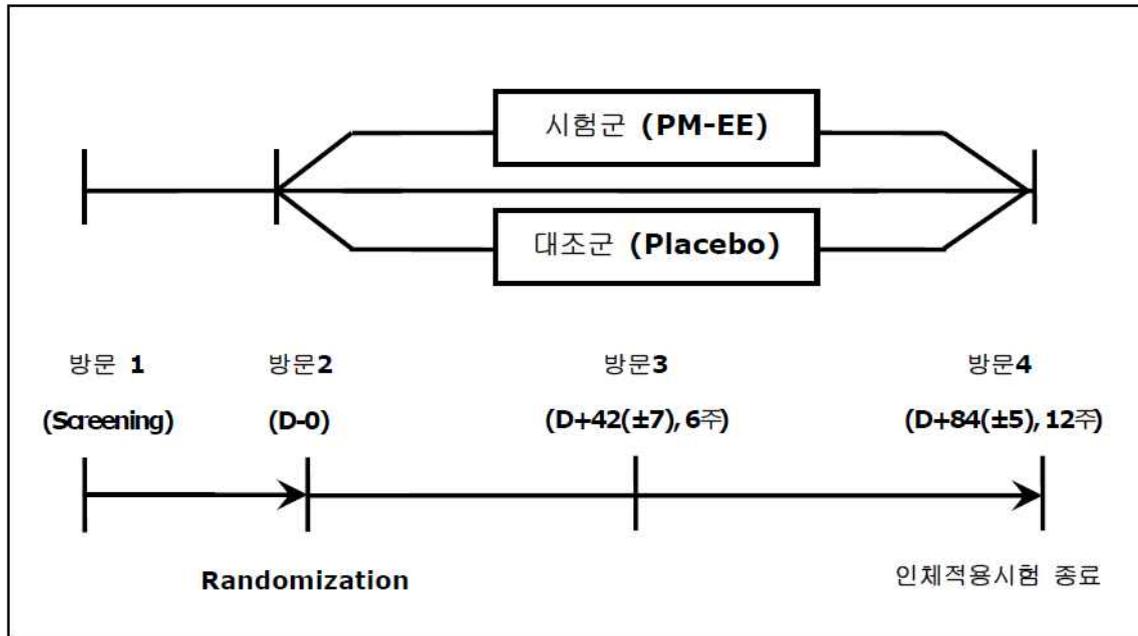
6.2.1. 인체적용시험대상자 수

	시험군 (PM-EE)	대조군 (Placebo)	합 계
최종 평가 레수(PP Set)	24	24	48
Drop-out(20%) 고려예수	30	30	60

다. 인체적용시험기관 : 서울대학교병원 신경과 김만호 교수

라. 인체적용시험의 설계

본 인체적용시험은 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험으로 디자인되었다. 자의에 인체적용시험 동의서에 서명한 사람이 본 인체적용시험에 참가하면 인구학적 조사, 병력 조사, 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후, 신체계측, 임상병리검사, 심전도검사, CERAD-K 검사를 실시하여 선정/제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 인체적용시험대상자 등록이 이루어진다. 시험군 또는 대조군으로 배정된 인체적용시험대상자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하게 된다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 한다.



마. 시험 중 병용가능한 약물

- 1) 1일 투여용량 400 IU 미만의 비타민E 제제는 인체적용시험기간 동안 투여할 수 있다.
- 2) Estrogen replacement therapy 중 국소 도포용제는 인체적용시험기간 동안 사용이 가능하다.
- 3) 인체적용시험대상자가 본 인체적용시험에 참여하기 이전부터 투여하고 있던 병용약물 및 건강기능식품 중 본 인체적용시험의 결과해석에 영향을 미치지 않을 것으로 사료되는 병용약물과 건강기능식품은 시험자의 판단 하에 허용한다.
- 4) 기타 질환의 일과성 치료를 목적으로 사용되는 약제는 시험자와 상의를 통하여 병용 투여하기로 한다.

바. 시험 중 병용 불가능한 약물

- 1) 항정신용제(Antipsycotics); Amisulpride, Aripiprazole, Blonanserin, Bromperidol, Sulpiride, Chlorpromazine, Clozapine, Haloperidol, Levomepromazine, Molindone, Nemonapride, Olanzapine, Paliperidone, Perphenazine, Pimozide, Quetiapine, Risperidone, Ziprasidone, Zotepine 등
- 2) 퇴행성 질환용제(Neurodegenerative Disease Drugs); Cerebrolysin, Donepezil, Galantamine, Memantine, Rivastigmine 등
- 3) 뇌기능 개선제(Nootropics&Neurotonics); Acetyl-L-carnitine, Choline alfoscerate, Citicoline, Hydrochloride, Nimodipine, Oxiracetam, Piracetam, Protirelin tartrate 등

- 4) 삼환계 항우울제(Tricyclic antidepressant); Amineptine, Amitriptyline, Clomipramine, Dothiepin, Imipramine, Nortriptyline, Quinupramine, Setiptiline 등
- 5) 비타민E 제제 1일 투여용량 400 IU 이상
- 6) Estrogen replacement therapy(국소 도포용제 제외)
- 7) 인지기능 개선을 목적으로 하는 건강기능식품

사. 인체적용시험 진행 일정표

Period		Screening ¹⁾	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week ¹⁾		-2	0	6	12
Window period ²⁾				+/- 7	+/- 5
서면동의서		✓			
인구학적 조사 ³⁾		✓			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾		✓	✓		
이학적검사		✓		✓	✓
활력징후 (혈압, 맥박) 측정		✓		✓	✓
신체계측 ⁵⁾			✓	✓	✓
식사지도 및 식이조사 ⁶⁾			✓	✓	✓
생활습관 지도 ⁷⁾		✓	✓	✓	
임상병리검사 ⁸⁾		✓			✓
심전도검사 ⁹⁾		✓			✓
CERAD-K ¹⁰⁾		✓			
유효성 검사	ADAS-K		✓		✓
	K-CWST		✓		✓
	ADCS-ADL		✓		✓
	SGDS		✓		✓
인체적용시험대상자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
인체적용시험용 식품의 처방			✓	✓	
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인 ¹¹⁾				✓	✓
병용약물 및 병용요법 변화 확인				✓	✓

2) IRB 심의 신청 및 심의결과

1-1. 초심의

심의 상태	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간
초심의	2017.11.10	2017.12.06	보완 후 재심의	1.0	1.0	1.0	1.0	-
보완 후 재심의	2017.12.21	2018.01.03	수정 후 신속심의	1.1	1.1	1.1	1.1	-
수정 후 신속심의	2018.01.24	2018.01.24	승인	1.2	1.2	-	-	~2019.01.24

2017년 11월 10일 최초심의 접수하여, 2번의 수정/보완을 거쳐 2018년 1월 24일 최종적으로 서울대학교 IRB 승인을 득하였음

서울대학교의과대학/서울대학교병원
의학연구윤리심의위원회



서울대학교의과대학/서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회

Tel : 82-02-2072-0694/2266
FAX : 82-02-3675-6824 서울특별시 종로구 대학로 101번지 (우)03080

심의결과통보서

IRB No.	H-1711-092-901		제출경로	서울대병원	
수신	책임연구자	김만호	소속	신경과	직위 교수
	의뢰기관	주식회사 파이토코퍼레이션			
연구과제명	경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 PM-EE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험				
Protocol No.	PHC_PM-EE	Version No.	1.2		
생명 윤리법에 따른 분류	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물연구 <input type="checkbox"/> 배아줄기세포주이용연구 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 단성생식배아연구 <input type="checkbox"/> 배아생성의료기관 <input type="checkbox"/> 인체유래물은행				
연구종류	임상 시험외 연구	<input type="checkbox"/> 증례보고 <input type="checkbox"/> 생태학적 연구 <input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 조사, 설문, 인터뷰 연구 <input type="checkbox"/> 환자군 연구 <input type="checkbox"/> 환자-대조군연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물저장소 연구 <input type="checkbox"/> 등록(레지스트리) 연구 <input type="checkbox"/> 시판후사용성적조사 <input type="checkbox"/> 전향적 코호트 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 코호트연구 <input type="checkbox"/> 기타			
		임상 시험	연구 대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물학적제제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 기타	
	Phase		<input type="checkbox"/> 제1상 <input type="checkbox"/> 제1/2상 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제2/3상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> 생물학적동등성 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (건강식품 연구)		
	식약처 승인 대상 여부		<input type="checkbox"/> 식약처승인대상 <input checked="" type="checkbox"/> 승인 제외 대상		
	임상시험 목적	<input type="checkbox"/> 학술용 <input checked="" type="checkbox"/> 국내(MFDS)허가용 <input type="checkbox"/> 해외 허가용			
연구계획서승인일	2018년 01월 25일 (정기보고주기 : 12개월)				
승인유효 만료일	2019년 01월 24일	심의대상	연구계획서의 의뢰서(수정후신속심의에 대한 답변)		
심의종류	신속심의	심의일자	2018년 01월 24일		
접수일자	2018년 01월 24일	심의결과통보일	2018년 01월 25일		
심의목록	1. 연구계획서의 의뢰서(수정후신속심의에 대한 답변) 2. 연구계획서 PT ver 1.2 3. 증례기록서 CRF ver 1.2, 추가방문 CRF ver 1.2 4. 연구대상자 모집 문건, 모집공고문 ver 1.2 5. 연구비내역서, 연구비실행예산계획서 ver 2.0 6. 기타 검토의견 답변서, 변경대비표				
심의결과	승인				
연구의 위험도	저위험 연구(low risk)				
심의의견	[검토의견에 대한 답변을 확인하였고, IRB의 승인 기준에 부합하여 승인합니다.]				

의학연구윤리심의위원회 위원



본 통보서에 기재된 사항은 IRB의 기록된 내용과 일치 함을 증명합니다.
 본 기관 IRB는 생명윤리 및 안전에 관한 법률, 약사법, 의료기기법 및 ICH-GCP 등 관련
 본 연구와 이해관계(Conflict of Interest)가 있는 위원이 있을 경우 연구의 심의에서 배제하였습니다.

차. 염생식물 탈염소재의 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품소재를 활용한 제품화 및 수출전략 사업화

1) 파이토밀(PhytoMeal) 제품화

○ 바닷가 고염의 극한환경에서 생장하는 물질대사(metabolism)를 하는 염생식물(halophyte)은 salt stress를 이겨내는 물질 등 우리 몸에 유익한 기능성 성분과 영양 성분을 다량 함유하고 있음. 그러나 염생식물 체내 염 함유량이 지나치게 높아 염생식물을 식품소재로 유용하기에 어려움이 많음



○ 이에 당사는 ‘저온 냉수 추출법’으로 염생식물 내의 염성분을 탈염하여 ‘PhytoMeal(파이토밀)’을 개발하였고 2016년에 특허를 출원(10-2016-0183473)하고 2018년에 등록시켰으며, PCT출원을 거쳐 현재 해외 5개국(미국, 유럽, 중국, 일본, 인도)에 국제출원중에 있음. (국내 등록특허명: 염생식물 유래의 탈염 및 기능성이 강화된 영양 조성물과 그 제조방법/특허등록번호: 10-1922245)

○ 파이토밀(PhytoMeal)은 파이토밀 100%로도 이용 가능하며, 또한 밀, 옥수수, 쌀 등의 곡류와 혼합하는 방식으로도 이용이 가능함. 이로서 식량부족시대에 적합한 양질의 “식량 및 식품 대체소재”로서의 역할을 할 수 있어, 국내 식약처 기타가공식품유형으로 “식품품목제조허가”를 득함 (식약처 식품품목허가번호: 201700948543, 2017.08.30)

○ 당사가 파이토밀(PhytoMeal)을 이용하여 식품응용 개발한 제품

: 파이토밀 가루, 크림치즈, 차류(tea), 캡슐(capsule)형 기능성식품, 푸딩, 아이스크림, 면류, 과자류(snacks) 등



2) 파이토밀-플러스(PhytoMeal-Plus) 제품화

- 파이토밀-플러스(PhytoMeal-Plus): 파이토밀에 Irilin B를 유효성분으로하는 통통마디 유래 분획물을 첨가하여 뇌혈류 개선용 건강보조제품(Dietary Supplement)인 파이토밀-플러스(PhytoMeal-Plus)를 개발하였으며, 글로벌 식품회사들에게 샘플테스트를 의뢰하였음. 이와 관련한 기술 및 용도로 국내특허 등록 및 PCT출원을 완료하였음(등록특허 10-1812319, PCT/KR2017/014763)



3) 기타가공품 “파이토메모리(PhytoMemory)” 제품화

- 통통마디추출물(PM-EE, 제품명: 파이토메모리)은 통통마디의 건조분말에 함유되어 있는 35% 내외의 염화나트륨을 유기물의 손실을 최소화 하는 저온냉수탈염법을 통하여 1% 이하로 탈염한 후, 식품첨가물 효소로 가수분해하고 주정으로 추출하였으므로, 원재료에 다량 함유되어 있는 나트륨이 제거되어 원재료보다 안전한 원료라고 할 수 있다. 당사에서는 신청원료인 “파이토메모리에” 대하여 식약처로부터 “식품제조품목허가”를 득하였음.
- 식약처 식품제조품목허가번호 : 201700948542 (2017.08.30)
- 유형: 기타가공식품 (분말제품으로 고유의 맛과 향이 있음)
- 향후 임상시험 결과자료와 함께 식약처 인지기능 개선 건강기능식품 개별인증원료로 허가받은 후 건강기능성 식품으로 사업화 영역을 넓힐 예정임



4) RTD 음료 “메모리티(MemoryTea)” 제품화

- 본 개발품은 탈염한 함초로부터 1차 개발된 파이토티의 추출액에 당사 특허소재인 인지기능개선 소재(PM-EE)를 배합하여 바쁜 현대인, 직장인, 수험생의 두뇌활력과 기억력 개선에 컨셉을 둔 유기농/무가당 액상차음료(Ready-To-Drink)임. 최종목표로 “메모리(MemoryTea)”의 기술 상용화 및 수출을 목표로 하고 있음
- 식약처 식품제조품목허가번호 : 201700948545 (2018.11.07)
- 메모리티의 핵심기술
- 염생식물인 함초 원료에 대한 독점적인 탈염(desalination) 및 고품형 함초차 파이토티(PhytoTea) 제조 기술 이용
- 파이토티로부터 액상차의 침출, 여과, 살균, 포장기술
- 효소가수분해 기법으로 Acanthoside B 생물전환 기술
- 인지기능개선 소재(PM-EE) 내의 기능성 지표성분 (Acanthoside B) 함량 분석기술



5) 파이토밀, 파이토메모리, 메모리티의 수출을 위한 전략 수립

(1) 글로벌 식품회사 제품소개 및 샘플테스트

- 미국 몬델레츠(Mondelez), 네슬레(Nestle), 네슬레 퓨리나(Nestle Purina, 일본 가루비(Calbee), Synder's lance, Hils Pet Nutrition, 스페인 GB food 등에 파이토밀 (PhytoMeal)을 샘플을 보내고 테스트를 받음, 그중 네슬레 퓨리나와 GB Food사로부터 향후 대량생산시 구매 의향을 나타내는 사전구매의향서를 확보하였음

MEMORANDUM OF UNDERSTANDING
FOR THE DEVELOPMENT OF THE PHYTOSALT BUSINESS COLLABORATION

Calbiochem **STAB**

Barcelona, 3rd October 2012

Dear Mr. Deuk-Hoi Kim (President of PhytoCo),

We, Calbiochem Inc., are interested in PhytoMeal, the "100% Plant-based Salt" developed by PhytoCo. We believe that PhytoMeal can have a lot of opportunities in the development of new food products especially as an alternative to regular salt.

We intend to purchase quantities of PhytoMeal once PhytoMeal is mass-produced. Details regarding the Phytosalt purchase will be discussed at the time of purchase.

We further look forward to continue to cooperate with PhytoCo for the Phytosalt business. Especially, we hope to obtain the exclusive rights to sell PhytoMeal in the market in Spain.

Effectiveness of the statements above is subject to the signing by both parties and entry into force of the corresponding agreement.

Sincerely,

Clara Berrio, A D'Agostino
Innovation Officer, R&D Director

Calbiochem Inc.
Health, 40 (Pth. Ind. C'pte Iberia)
08191 Sabadell, Barcelona (Spain)
Phone: +34 93 987 39 60
Fax: +34 93 987 34 66

Dear Mr. Deuk-Hoi Kim,

We, Nestlé, are very interested in the PhytoMeal product developed by Phyto Corporation. After having conducted many tests using PhytoMeal at our R&D center, we believe PhytoMeal provides many opportunities in the development of new food and pet food products, due to its enhancement of taste and functionality in products and PhytoMeal's highly applicable usage.

Therefore, we intend to purchase large quantities of PhytoMeal to use PhytoMeal as a new ingredient for our products, once PhytoMeal is mass-produced. Details regarding such purchase will be discussed at the time of purchase. We look forward to continuing to cooperate with Phyto Corporation for the research and development and business of PhytoMeal.

Sincerely,

Thierry LAVALLARD
Ingredient team
Genève R&D Nestlé SAS
rue de l'Europe
EP 47
69000 Aubigny - FRANCE
phone: +33 (0)3 22 96 30 27
fax: +33 (0)3 22 96 82 27
e-mail: thierry.lavallard@rdm.nestle.com

(2) 파이토메모리, 파이토밀, 메모리티의 미국 수출을 위한 미국 FDA 식품제조시설 인증을 받음

FDA | U.S. Food and Drug Administration
Food Facility Registration

Date: 04/11/2018 3:37:58

Please review the registration.

Created Date: 2018-04-10 04:37:20 | Created by: che26619

<p>Facility Name Phyto</p> <p>Facility Name Suffix Corporation</p> <p>Facility Street Address, Line 1 #105-207, 1, Gwanak-ro</p> <p>Facility Street Address, Line 2</p> <p>City Gwanak-gu</p> <p>State/Province/Territory Seoul Teugbyeolsi</p> <p>Zip/Postal Code 08826</p> <p>Country/Area KOREA, REPUBLIC OF</p>	<p>Telephone Number 082 70 48660320</p> <p>Fax Number 082 70 86200100</p> <p>E-Mail Address dhkim@phytoco.com</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(3) 해외 IR 미팅을 통한 시리즈 B 투자 유치 활동

- 해외 IR 미팅을 통하여 파이토밀, 파이토메모리, 메모리티 제품을 소개하고 제품의 기술력과 가능성을 인정받아 현재 글로벌 소재회사인 에보닉(Evonik)사로부터 시리즈 B 투자 유치를 위하여 노력하고 있음

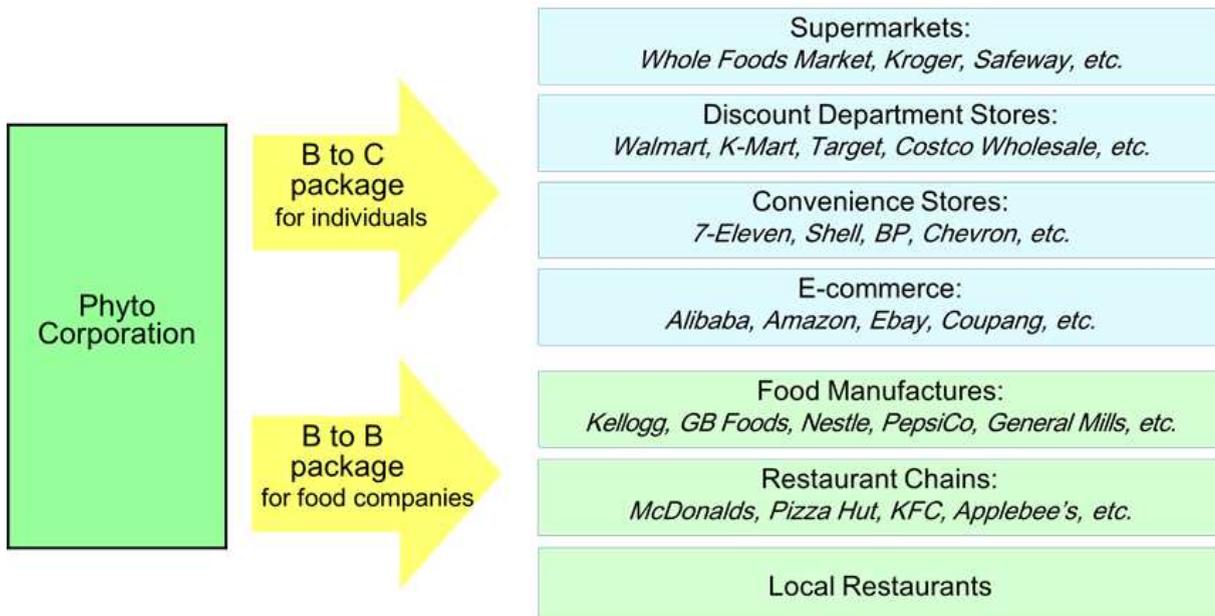


Unit: US\$

Need		
	Raising of Funds	10,000,000
Uses	Land for Manufacturing Plant	2,147,043
	Construction of Manufacturing Plant	2,030,870
	Establishment of Mass-Production Line	3,072,087
	Operating Expenses	2,750,000
	Total	10,000,000

(4) 해외수출 및 판로를 위한 마케팅, 판매 전략

- 해외판로를 위한 SNS 마케팅(Facebook, Linktin, Wikipedia 등)과, 해외 리워드 클라우드 펀딩 (Indiegogo)을 위하여 컨택을 하여 왔음



(5) 기타 해외 수출을 위한 추진 현황

- 식품대체제로서 통통마디 탈염분말(파이토밀)을 곡물가루 특히 밀가루 가공식품의 혼합을 통한 식량대체제 또는 밀가루 대체제로서 글로벌 식품 및 사료회사에 적극 홍보 중임. 몬델레츠, Calbee, Frito-lay, Nestle-Purina, Synder's lance, Hills Pet Nurtition)의 기업 연구소와 샘플테스트 중임
- 한국식품연구원 개설 수도권 수출상담실 (중소/중견기업기술혁신센터, 판교창조경제혁신센터)의 수출관련 지원(수출식품 및 건강기능식품 등 분석지원컨설팅, 식품중소기업의 수출애로 상담 및 지원)을 적극 활용 중임
- 한국농수산물유통공사 수출전략처, 농식품부 수출진흥과, 식품안전정보원 등을 활용하여 대미, 대중국, 대유럽 맞춤형 수출 전략 및 컨설팅을 받도록 할 것임

3-3. 제1협동 건국대학교 최동국 교수팀 수행 연구개발 방법 및 결과

가. 연구방법 및 재료

1. Griess reagent assay

- 신경염증의 지표로 빈번히 언급되는 bio-radical인 NO (nitric oxide)를 검출하기 위한 실험으로, 시료에 NO의 산화형태인 NO₂, NO₃와 반응하여 붉은 azo dye를 형성하는 Griess 반응을 이용한 assay

1) 실험재료

- Griess agent A (sufanilamide 10 mg/ml), Griess agent B (naphthylamide 1 mg/ml, 5% phosphoric acid), Standard sodium nitrite (10 µg/ml), 96 well culture plate, Spectrophotometer 등을 이용함.

2) 실험방법

(1) 실험 직전에 Griess agent A와 B를 1:1로 섞음

(2) Sodium nitrite로 만든 standard solution을 원하는 농도만큼 희석하여 standard curve를 만듦

- 예시로, 96 well plate의 하단에 10 µg/ml의 standard solution 100 µl를 넣어주고, 한 칸씩 위로 이동하면서 standard solution의 농도가 반이 되도록 희석을 함

- Standard curve를 이용하면 NO의 정량값을 구하는 것이 가능

(3) NO의 농도를 측정하고자 하는 시료의 배지 (혹은 조직의 균질액)를 100 µl 씩 96 well culture plate에 넣고, 동량의 Griess agent mixture를 넣어줌

(4) 즉시 발색반응이 일어나며, spectrophotometer로 450 nm의 파장대 (적색) 흡광도를 측정함

2. MTT cell viability assay

- Cell viability의 분석에 빈번히 이용되는 high-throughput assay임

- 기본 원리는 MTT 화합물이 mitochondria의 전자전달계 분자들 (ex. NAD(P)H)에 의하여 환원되는 원리를 이용한 것으로 MTT 분자는 환원이 되면 보라색의 발색반응을 일으킴

- 따라서 단기간에 MTT 분자의 발색을 근거로하여 세포의 생존률을 간접적으로 측정 가능함

1) 실험재료

- MTT (=Thiazoly Blue Tetrazolium bromide) powder, 1x PBS (pH 7.6), Dissolving solution (DMSO, 0.05M HCl 10% SDS (or isopropanol)), 96 well culture plate, Spectrophotometer

2) 실험방법

- (1) MTT powder를 적정 농도로 PBS에 녹임 MTT solution (2~5 mg/ml)을 세포가 있는 multi well plate에 배지의 1/10의 volum 만큼 넣고, 차광을 시킨 뒤 이것을 1~24시간 incubation 함
- (2) 배지를 제거한 뒤, 형성된 insoluble MTT formazan crystal을 dissolving solution (유기용매인 DMSO 혹은 acidified isopropanol (혹은 10% SDS))으로 녹여 균질화 과정을 거침
- (3) 96 well culture plate에 200 μ l의 MTT 균질액을 넣고 spectrophotometer에서 540 nm 파장대 (보라 색)로 측정함

3. Western blot analysis

- Western blot은 두 단계의 독립적인 실험 (SDS-PAGE, immunoblotting)을 연속으로 하여 목표로 하는 단백질의 정량적 분석을 가능하게 해 주는 분석법임
- SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)로 환원된 단백질들은 matrix 내에서 크기별 분리과정이 일어나며, 연이어 단백질과 친화력이 높은 반투과성 막 (membrane)에 단백질을 옮기는 transfer 과정을 거침
- 반투과성 막에 결합된 크기별로 나뉜 단백질 band를 확인하기 위하여 목표 단백질과 친화성이 높은 1차 항체 (primary antibody), 1차 항체의 host와 강한 친화력이 있으며, 이미징화 가능한 효소가 결합된 2차항체 (secondary antibody)를 반응시켜 목표로 하는 단백질의 정량적 분석이 가능

1) 실험재료

- 30% bis-acrylamide mix, ddH₂O, 1.5M tris buffer (pH 8.8), 1.0M tris buffer (pH 6.8), 10% APS (Ammonium persulfate), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), Electro buffer (Tris 3.03 g/l, Glycine 14.4 g/l, pH 8.3, 0.1% SDS), Transfer buffer (Tris 3.03 g/l, Glycine 14.4 g/l, pH 8.3, 20% methanol), Ponceau S, membrane (NC, PVDF), TBS-T buffer, blocking buffer, target specific antibody, HRP-conjugated host specific antibody, chemoluminescence detector

2) 실험방법

(1) SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

- SDS-gel casting cassette에, running gel mixture (30% bis-acrylamide mix, ddH₂O, 1.5M tris buffer (pH 8.8), 10% APS, TEMED)를 부어 굳힌 뒤, stacking gel mixture (30% bis-acrylamide mix, ddH₂O, 1.0M tris buffer (pH 6.8), 10% APS, TEMED)와 성형용 comb을 넣고 SDS-poly-acrylamide gel을 준비함
- casting한 SDS-polyacrylamide gel을 electrophoresis cassette에 조립, electrophoresis tank에 electro buffer를 채운 뒤 gel의 각 well에 환원된 단백질 시료를 넣음
- 전원공급장치를 연결하고 적정 전압을 고정시킨 뒤 2~3시간 정도 electrophoresis 과정을 거침

(2) Transfer 과정

- sponge-paper-Polyacrylamide-membrane-paper-sponge 순으로 transfer cassette에 조립
- Electrophoresis tank에 trans하고 transfer buffer에 담근 뒤 전원을 공급하여 transfer과정 진행함
- Transfer가 종료된 뒤 membrane을 Ponceau S에 담금으로써 membrane에 부착된 단백질 확인 가능

(3) Immunoblotting

- matrix에서 membrane으로 옮겨온 단백질을 detection하는 과정

- TBS-T로 membrane을 세척한 뒤, 5% skimm milk (혹은 3% BSA)로 blocking과정을 거침
- Membrane 세척 후, TBS-T (혹은 blocking buffer)에 희석한 primary antibody를 membrane과 반응
- Membrane 세척 후, HRP-conjugated secondary antibody를 반응시킴
- biotin, luciferin solution을 이용하여 화학 발광현상을 유도하고 이것을 chemoluminescence detector로 digitizing 함

4. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) analysis

- Retro virus에서 유래한 reverse transcriptase 효소를 이용한 실험으로 화학적으로 불안정한 RNA를 주형으로써 화학적, 물리적으로 안정한 cDNA를 합성하는 과정을 거쳐 시료를 만들고, 이 시료를 PCR 과정으로 in vitro상에서 2ⁿ (n은 thermo cycler의 cycle 수)만큼 증폭하여 transcriptome의 정량적 분석을 가능하게 함

1) 실험재료

- RNazol, Chloroform, Isopropanol, DEPC-treated water, 75% ethanol, cDNA synthesis kit, PCR pre-mix strip, Thermocycler, pair of primers (forward, reverse), Centrifuge

Gene	Sequence (5'→3')		Accession No.	AF a (bp)
iNOS	Forward	TGAAGAAAACCCCTTGTGCT	NM_010927	100
	Reverse	TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG	NM_012611.3	106
COX2	Forward	CAAGACAGATCATAAGCGAGGA	NM_011198	107
	Reverse	GGCGCAGTTTATGTTGCTGT	NM_011198.4	107
			NM_017232.3	107
TNF-α	Forward	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	NM_013693	103
	Reverse	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	NM_012675.3	103
IL-1 β	Forward	TGTGAAATGCCACCTTTTGA	NM_008361	94
	Reverse	GGTCAAAGGTTTGGAAGCAG	NM_031512.2	94
IL-6	Forward	TGATGCACTTGCAGAAAACA	NM_031168	109
	Reverse	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	NM_012589.2	109
GAPDH	Forward	AAGGGCTCATGACCACAGTC	NM_001289726	160
	Reverse	TTCAGCTCTGGGATGACCTT		

표. 본 실험에서 사용한 primer의 sequences

2) 실험방법

(1) Chloroform-phenol RNA extraction

- RNazol을 사용하여 homogenate를 만들고, 여기에 1/5의 volume에 해당하는 chloroform을 넣어 aqueous phase를 분리함
- 1200 g, 4°C, 10분 동안 centrifugation 실시
- centrifuge 후, aqueous phase와 동량의 isopropanol을 넣어 RNA를 침감시킴
- 1200 g, 4°C, 10분 동안 centrifugation 실시
- centrifuge 과정으로 RNA pellet을 획득
- 75% ethanol을 넣고, 1200 g, 4°C, 10분 동안 centrifugation 실시하여 washing과정을 거침
- washing 과정이 끝난 뒤, 공기중에 두어 잔여 ethanol을 증발시켜 RNA를 물에 잘 녹도록 함
- DEPC-treated water로 RNA pellet을 녹이고, 정량과정을 거침

(2) cDNA synthesis

- 정량한 RNA 시료를 동량 (예로써, 2500 ng/ 10 μ l)으로 정량 뒤 oligo dT, random hexamer를 넣고 75°C에서 5분 반응시킴
- mixture가 충분히 식으면, RTase buffer, dNTP, MgCl₂, RTase를 넣어 제조사에서 권장하는 온도에서 1시간 30분 동안 cDNA를 합성함
- 합성된 cDNA를 실험에 사용할 정도로 희석함

(3) PCR

- 증폭하고자하는 부분의 sense, anti-sense primer와 내열성을 갖춘 DNA polymerase를 이용하여 특정 sequence를 증폭
- thermocycler에서 온도, cycle, 시간등의 조건을 입력하고 증폭
- 예시로, GAPDH는 1cycle당 56°C에서 40초 동안 증폭이 되며, 이것을 24회 반복함
- 마지막으로, Agarose gel electrophoresis를 통하여 bp 크기별 분리를 하고, UV light에서 band를 확인, 카메라로 형광을 이미지화2. 실험 재료 및 방법

5. DCFDA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) ROS(reactive oxygen species) activity assay

- DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) ROS activity assay는 세포내로 유입된 DCFDA가, 세포 내부에서 생성된 ROS에 의해 산화됨으로써 생성되는 DCF (2',7'-Dichlorofluorescein)의 형광을 측정하는 원리를 응용한 것으로, high-throughput assay의 하나로 자주 이용이 됨

1) 실험재료

- DCFDA (Sigma-aldrich, USA); 50 mM 용액으로 aliquot -20°C 보관, 96 well plates, Spectrophotometer; Fluorescence, chemoluminescence 기능 지원 기기, 1x PBS (pH 7.4) buffer

2) 실험방법

- (1) 적정 농도의 실험에 사용될 세포를 seeding, incubation 함; Plate reader기기의 성능에 따라 다르지만 일반적으로 96 well culture plate를 사용 함
- (2) 검증하려는 시약을 treatment하고 3~24 H (세포에 따라, 메커니즘에 따라 적정 시간대 선정) incubation
- (3) 기존 배지를 제거 후 적정 volume을 투여 (96 well plate의 경우 100 μ L 권장) 100x Stock solution (50 mM의 DCFDA aliquot)을 배양액에 1x의 농도가 되도록 treatment, 10~40 min incubation
- (4) 배지 제거 후, 1x PBS (pH 7.4) solution으로 washing
- (5) 다음과 같은 조건으로 plate reader로 결과를 측정한다. Reading setting: Fluorescence, excitation: λ =485 nm, emission: λ =538 nm

6. Western blot analysis

- Western blot은 두 단계의 독립적인 실험 (SDS-PAGE, immunoblotting)을 연속으로 하여 목표로는 단백질의 정량분석을 진행함
- SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)로 환원된 단백질들은 matrix 내에서 크기별 분리과정이 일어나며, 연이어 단백질과 친화력이 높은 반투과성 막 (membrane)에 단백질을 옮기는 transfer 과정을 거침
- 반투과성 막에 결합된 크기별로 나뉜 단백질 band를 확인하기 위하여 목표 단백질과 친화성이

높은 1차 항체 (primary antibody), 1차 항체의 host와 강한 친화력이 있으며, 이미징 가능한 효소가 결합된 2차항체 (secondary antibody)를 반응시켜 목표로 하는 단백질의 정량적 분석이 가능

1) 실험재료

- 30% bis-acrylamide mix, ddH₂O, 1.5M tris buffer (pH 8.8), 1.0M tris buffer (pH 6.8), 10% APS (Ammonium persulfate), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), Electro buffer (Tris 3.03 g/l, Glycine 14.4 g/l, pH 8.3, 0.1% SDS), Transfer buffer (Tris 3.03 g/l, Glycine 14.4 g/l, pH 8.3, 20% methanol), Ponceau S, membrane (NC, PVDF), TBS-T buffer, blocking buffer, target specific antibody, HRP-conjugated host specific antibody, chemoluminescence detector

2) 실험방법

(1) SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

- SDS-gel casting cassette에, running gel mixture (30% bis-acrylamide mix, ddH₂O, 1.5M tris buffer (pH 8.8), 10% APS, TEMED)를 부어 굳힌 뒤, stacking gel mixture (30% bis-acrylamide mix, ddH₂O, 1.0M tris buffer (pH 6.8), 10% APS, TEMED)와 성형용 comb을 넣고 SDS-poly-acrylamide gel을 준비함
- casting한 SDS-polyacrylamide gel을 electrophoresis cassette에 조립, electrophoresis tank에 electro buffer를 채운 뒤 gel의 각 well에 환원된 단백질 시료를 넣음
- 전원공급장치를 연결하고 적정 전압을 고정시킨 뒤 2~3시간 정도 electrophoresis 과정을 거침

(2) Transfer 과정

- sponge-paper-Polyacrylamide-membrane-paper-sponge 순으로 transfer cassette에 조립
- Electrophoresis tank에 trans하고 transfer buffer에 담근 뒤 전원을 공급하여 transfer과정 진행함
- Transfer가 종료된 뒤 membrane을 Ponceau S에 담금으로써 membrane에 부착된 단백질 확인 가능

(3) Immunoblotting

- matrix에서 membrane으로 옮겨온 단백질을 detection하는 과정
- TBS-T로 membrane을 세척한 뒤, 5% skimm milk (혹은 3% BSA)로 blocking과정을 거침
- Membrane 세척 후, TBS-T (혹은 blocking buffer)에 희석한 primary antibody를 membrane과 반응시킴
- Membrane 세척 후, HRP-conjugated secondary antibody를 반응시킴
- biotin, luciferin solution을 이용하여 화학 발광현상을 유도하고 이것을 chemoluminescence detector로 digitizing 함

7. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) analysis

- Retro virus에서 유래한 reverse transcriptase 효소를 이용한 실험으로 화학적으로 불안정한 RNA를 주형으로써 화학적, 물리적으로 안정한 cDNA를 합성하는 과정을 거쳐 시료를 만들고, 이 시료를 PCR 과정으로 in vitro상에서 2n (n은 thermo cycler의 cycle 수)만큼 증폭하여 transcriptome의 정량적 분석을 가능하게 함

1) 실험재료

- RNazol, Chloroform, Isopropanol, DEPC-treated water, 75% ethanol, cDNA synthesis kit, PCR pre-mix strip, Thermocycler, pair of primers (forward, reverse), Centrifuge

Gene	Sequence (5'→3')		Accession No.	AF a (bp)
iNOS	Forward	TGAAGAAAACCCCTTGTGCT	NM_010927	106
	Reverse	TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG		
COX2	Forward	CAAGACAGATCATAAGCGAGGA	NM_011198	107
	Reverse	GGCGCAGTTTATGTTGTCTGT		
TNF-α	Forward	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	NM_013693	103
	Reverse	AGGGTCTGGGCCATAGAACT		
IL-1 β	Forward	TGTGAAAATGCCACCTTTTGA	NM_008361	94
	Reverse	GGTCAAAGGTTTGAAGCAG		
IL-6	Forward	TGATGCACCTTGCAGAAAACA	NM_031168	109
	Reverse	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC		
GAPDH	Forward	AAGGGCTCATGACCACAGTC	NM_001289726	160
	Reverse	TTCAGCTCTGGGATGACCTT		

표. 본 실험에서 사용한 primer의 sequences

2) 실험방법

(1) Chloroform-phenol RNA extraction

- RNAzol을 사용하여 homogenate를 만들고, 여기에 1/5의 volume에 해당하는 chloroform을 넣어 aqueous phase를 분리함
- 1200 g, 4°C, 10분 동안 centrifugation 실시
- centrifuge 후, aqueous phase와 동량의 isopropanol을 넣어 RNA를 침강시킴
- 1200 g, 4°C, 10분 동안 centrifugation 실시
- centrifuge 과정으로 RNA pellet을 획득
- 75% ethanol을 넣고, 1200 g, 4°C, 10분 동안 centrifugation 실시하여 washing과정을 거침
- washing 과정이 끝난 뒤, 공기중에 두어 잔여 ethanol을 증발시켜 RNA를 물에 잘 녹도록 함
- DEPC-treated water로 RNA pellet을 녹이고, 정량과정을 거침

(2) cDNA synthesis

- 정량한 RNA 시료를 동량 (2500 ng/ 10 μl)으로 정량 뒤 oligo dT, random hexamer를 넣고 75°C 에서 5분 반응시킴
- mixture가 충분히 식으면, RTase buffer, dNTP, MgCl₂, RTase를 넣어 제조사에서 권장하는 온도에서 1시간 30분 동안 cDNA를 합성함
- 합성된 cDNA를 실험에 사용할 정도로 희석함

(3) PCR

- 증폭하고자하는 부분의 sense, anti-sense primer와 내열성을 갖춘 DNA polymerase를 이용하여 특정 sequence를 증폭
- thermocycler에서 온도, cycle, 시간등의 조건을 입력하고 증폭
- 예시로, GAPDH는 1cycle당 56°C에서 40초 동안 증폭이 되며, 이것을 24회 반복함
- 마지막으로, Agarose gel electrophoresis를 통하여 bp 크기별 분리를 하고, UV light에서 band를 확인, 카메라로 형광을 이미지화 함

8. MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 실험동물 모델

- MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)은 도파민성 신경세포에 특이적으로 독소로 작용하는 화합물임. 생체내로 흡수된 MPTP는 BBB (blood brain-barrier)를 통과하고 glial cells의 대사과정에 의해 MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) 형태로 환원이 됨. 이 물질은 Dopamine transporter에 의해 도파민 신경세포 내부로 이동하게 되고, MPP⁺는 신경세포 내부 미토콘드리아의 complex I에 손상을 일으킴.

1) 실험재료

- C57BL/6 mice, MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Sigma-aldrich, USA), 0.9% saline, 0.5 혹은 1 mL insulin injector/syringe, oral gavage catheter (mouse용)

2) 실험방법

- (1) 6~8 weeks post natal C57BL/6 mice (body weight: 22±4 g)는 1 week 동안 acclimation period를 가짐
- (2) 정기적으로 무게를 측정하며 대조군에는 0.9% saline을, 실험군에는 적정 농도로 희석한 시료 in 0.9% saline을 7~14 days 동안 p.o/i.p로 투여 함
- (3) 시료의 dose를 끝 낸 뒤, 20 mg/kg의 MPTP in saline solution을 2 H intervals로 4회 i.p injection 실시. 독성에 의한 폐사를 방지하기 위하여 30분~1시간 간격으로 mouse care 실시

9. Pole test

- Pole test는 비교적 간단한 실험장치를 이용하여 도파민성 신경세포 기능을 확인할 수 있는 방법이며, 도파민성 신경계와 pole test 결과 사이의 상관관계를 뒷받침해 주는 결과가 다수 보고됨

1) 실험재료

- Pole (자체제작, 0.7~1.5 cm 지름, 15~25 cm의 수직으로 세워진 목재 기둥, 표면은 쉽게 잡을 수 있도록 거칠게 유지), timer, 기록지

2) 실험방법

- (1) 2~3일 간격으로 mouse의 머리가 위를 향하도록 놓고 맞으로 돌아 내려오도록 연습 시킴
- (2) MPTP-intoxication이후 1,3,7 days에서 time of turn, time of descendant를 측정함
- (3) 수 회 측정한 뒤 측정값을 통계분석 실시

10. IHC (immunohistochemistry)

- Immuno staining의 조직염색 방법인 IHC는 특정 단백질의 위치, interaction을 검증하기 위한 방법으로 결과는 DAB, flurophore conjugated secondary antibodies를 이용하여 시각화 함

1) 실험재료

- Cryosection용 compound (Leica, Germany), cryosection용 microtomb (Leica, Germany), 광학 현미경 (Nicon, Japan), Hydroperoxide (Sigma-Aldrich, USA), DAB staining kit (Vector Laboratories, USA), primary antibodies, secondary antibodies, 1x PBS (pH 7.4), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), mounting solution, ethanol, xylene, 시료용 slide, cover slide, 30% sucrose solution, 4% para-formaldehyde, 23% urethane, 전자 외부 순환장치

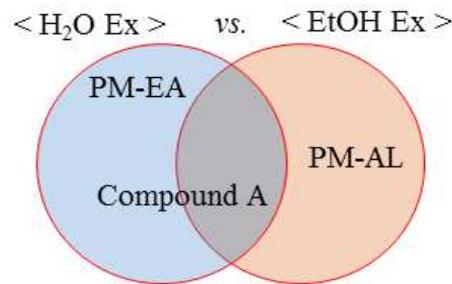
2) 실험방법

- (1) 대상 mice를 23% urethane으로 운동신경을 마비, 0.9% perfusion 실시. 혈액이 제거된 후 4% para-formaldehyde를 사용하여 brain tissue fixation
- (2) 적출한 뇌를 4% para-formaldehyde 용액에 담근 뒤, 30% sucrose 용액으로 옮겨 dehydration 실시
- (3) 고정이 된 brain tissue를 mold에 고정한 뒤 cryosection용 compound로 포매, -20°C에서 mold 보관

- (4) mold를 microtomb으로 표본을 제작하고 (두께는 8~30 μm) 1x PBS에 보관함
- (5) hydroxylperoxidase blocking solution(0.3% hydroperoxide solution)으로 background를 제거
- (6) PBS-T (PBS + 0.1% triton X-100) solution로 tissue를 3 times washing
- (7) normal goat serum을 포함한 blocking solution을 이용하여 2h, RT에서 blocking 실시, 이후 3회 PBS-T로 washing
- (8) primary antibody를 4°C, overnight 반응, 이후 PBS-T로 3회 washing
- (9) secondary antibody를 1H RT에서 반응, 이후 PBS-T로 3회 washing
- (10) BCA kit solution 반응, 1H RT에서 반응, 이후 PBS-T로 3회 washing
- (11) DAB kit로 발색반응
- (12) 염색된 조직을 dehydration 과정을 거친 후 mounting solution을 넣고 cover slide를 덮은 뒤 보관
- (13) 현미경으로 이미징

나. 실험결과 및 고찰

1. LPS로 유도된 BV-2 microglial cells에서 PM-AL, PM-EA, 그리고 Compound A의 항염증 효능 확인



[제공받은 시료들과 서로의 관계에 대해 간략화한 모식도]

- 주관기관으로부터 3종의 시료를 제공받았으며, BV-2 microglial cells에서 항신경염증에 대한 *in vitro* 실험을 진행함
- PM-AL
 - 파이토밀 (통통마디 탈염분말)의 에탄올 추출물의 alkaloids 분획물
 - Alkaloid compounds의 농도가 높으며, acetylcholinesterase activity inhibition 효능이 강함
 - Antioxidant activity는 크지 않음
- PM-EA
 - 파이토밀 (통통마디 탈염분말)의 열수 추출물의 ethylacetate 분획물
 - Poly-phenols와 flavonoids의 함량이 높으며, anti-thrombosis, antioxidant activity가 큼

○ Compound A

- PM-EA에서 유효활성 지표성분으로 분리된 isoflavone 계열의 화합물
- Anti-thrombosis 및 항산화 활성이 큼

1) PM-AL의 항신경염증 효능 확인

(1) Griess reagent assay, MTT cell viability assay 결과

- 세포의 생존률은 mitochondrial activity와 비례관계에 있는 MTT formazan 환원률을 비교함으로써 측정함
- BV-2 microglial cells in vitro 실험에 사용할 PM-AL의 실험 농도를 확인하기 위하여 최대 400 μ g/ml부터 시작하여 세포독성을 확인함 (그림 1-1)

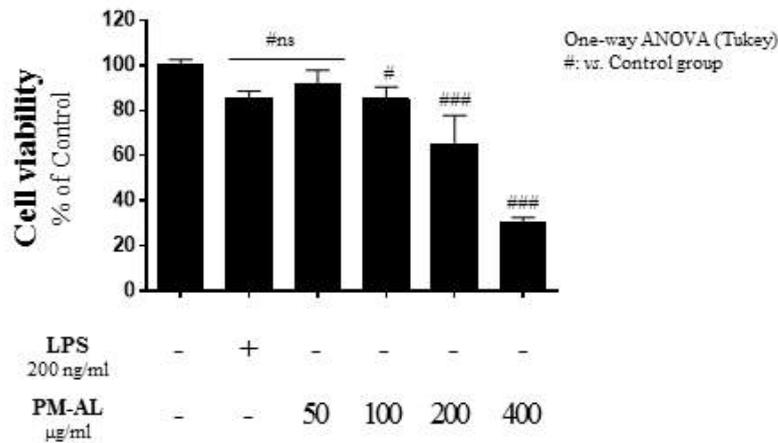


그림 1-1. *in vitro* 실험에 적용하기 위한 PM-AL의 적정 농도를 확인하기 위하여 BV-2 microglial cells에 대한 세포독성을 확인

- 세포독성에 대한 유의성이 확인되지 않는 최대 농도인 50 μ g/ml를 최대로 추가 실험을 진행함
- PM-AL 50 μ g/ml를 최대농도로 설정하고, 신경염증의 지표로 사용되는 Nitric oxide (이하, NO)의 방출량 감소와 세포생존률에 대한 추가 실험을 진행함 (그림 1-2) (독립적인 2회의 실험 실시)

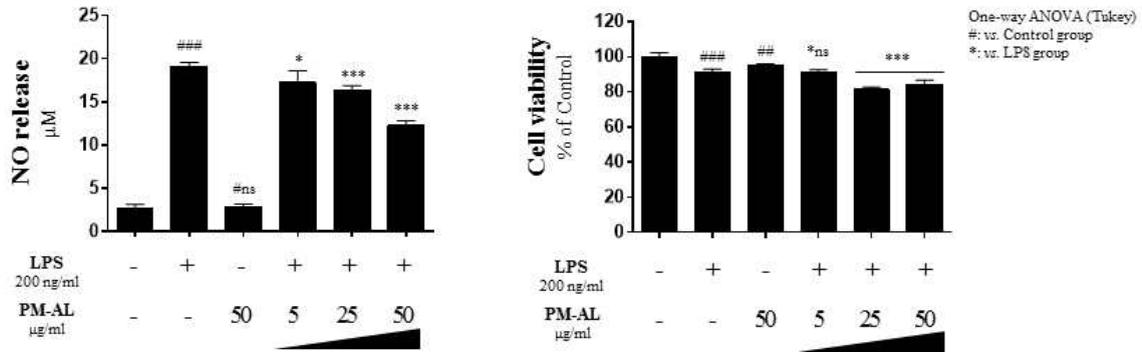


그림 1-2. PM-AL 신경염증의 지표인 NO방출량의 감소 확인 및 세포독성 확인

- 충분히 PM-AL fraction의 농도를 낮췄음에도 불구하고 (50 µg/ml) BV-2 microglial cells에 대한 cytotoxicity를 보였으며, 저농도 (5, 25 µg/ml) 구간에서는 큰 항염증 활성을 보이지 않았음
- 조건을 바꿔 새로 분획을 하거나 (lot 변경), 재분획 과정을 거쳐 새로운 samples를 얻는 등의 과정이 필요함

2) PM-EA의 항신경염증 효능 확인

(1) Griess reagent assay, MTT cell viability assay 결과

- *In vitro* neuro-inflammation cell model에서 PM-EA의 항염증 효능을 검증하기 위하여 적정 농도의 검색을 실시
- PM-EA 단독 400 µg/ml의 고농도를 적용하여 세포독성을 검색하였으며, BV-2 microglial cells에는 독성을 보이지 않음을 확인함

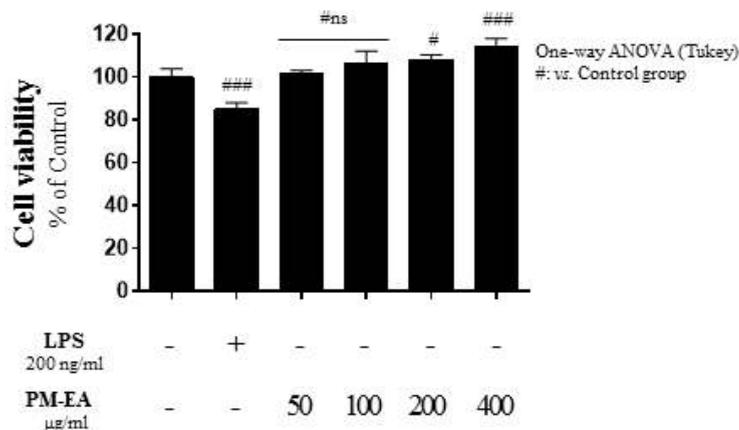


그림 2-1. PM-EA의 BV-2 microglial cells에 대한 cytotoxicity 확인

○ 따라서, 경제적인 측면과 용매인 DMSO에서의 용해성을 고려, 최대농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 을 임의로 설정하였으며 이 농도를 기준으로 항신경염증 효능을 실험적으로 검증하려고함

○ LPS (055:B5 strain, 200 ng/ml)로 활성화된 BV-2 microglial cells에서 신경염증 지표인 NO의 방출저해를 확인하였으며, PM-EA의 농도에 의존적으로 염증이 저해되는 것을 확인함 (그림 2-2) (3번의 독립적인 실험 실시)

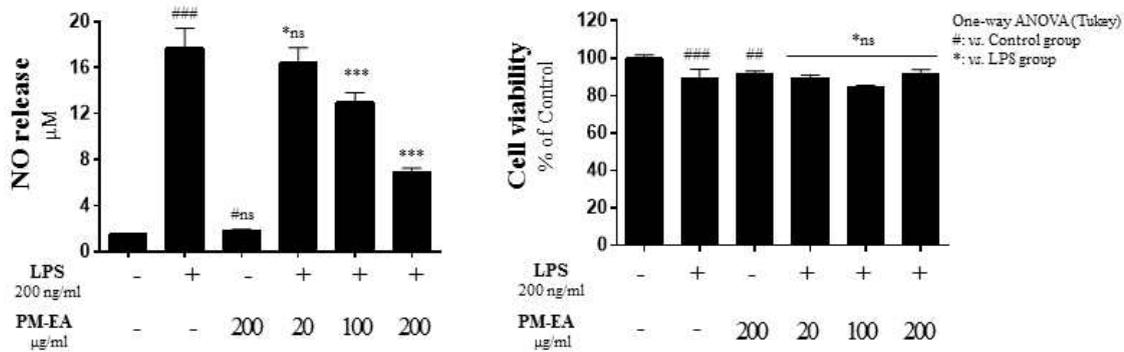


그림 2-2. LPS로 활성화된 BV-2 microglial cells에서 PM-EA는 농도에 의존적으로 NO의 방출량을 저해함

○ 그리고, LPS를 처리한 PM-EA의 최대농도 실험군 (200 $\mu\text{g/ml}$)에서 세포생존률에 영향을 주지 않는 것을 통계적으로 확인, PM-EA는 BV-2 cells에 대하여 실험적으로 적합한 물질임을 확인

(2) Western blot 방법을 통한 염증성 매개인자 발현 확인

○ BV-2 microglial cells에 대한 항염증 효능을 증명하기 위하여 단백질체 분석방법인 western blot으로 염증성 매개인자들의 활성 억제를 검증함

○ 적정 농도로 culture된 BV-2 microglial cells에 PM-EA (농도 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 30분 뒤 LPS (200 ng/ml)로 BV-2 cells를 활성화 하였으며, 20시간 뒤 단백질을 시료를 획득하여 western blot 분석을 실시함

○ 전-염증성 매개인자로 주로 언급되는 iNOS와 COX-2를 표적으로하는 항체를 사용하여 western blot을 실시하였으며, 동일량의 단백질 시료에서 표적 단백질의 정량적 변화를 확인함 (그림 2-3)

- iNOS는 염증성 radical인 NO (nitric oxides)를 합성하는 효소이며, 이 효소의 활성이 제어되지않을 경우 퇴행성 신경질환으로 진행할 수 있다는 많은 기전연구가 발표됨
- COX-2는 PGs (prostaglandins)를 합성하는 효소이며, PG는 염증반응을 활성화하는 신호분자임
- 다수의 상용 해열제, 진통제의 표적 단백질임

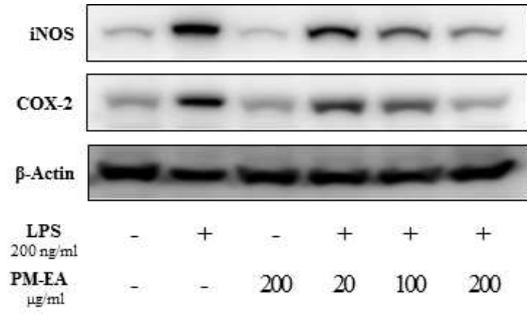


그림 2-3. Western blot 결과, LPS로 활성화된 BV-2 cells에서 PM-EA는 농도 의존적으로 염증성 매개인자의 발현을 억제함을 확인

○ Western blot 결과 PM-EA는 농도에 의존적으로 염증성 매개인자의 발현을 줄임을 확인함 (4회의 독립적인 실험 실시)

(3) RT-PCR을 통한 cytokine 발현 분석

- PM-EA의 항신경염증 기전을 분석하기 위하여 mRNA 분석을 위하여, RT-PCR 분석을 실시함
- 적정 농도의 BV-2 cells에 PM-EA (농도 20, 100, 200 μg/ml)를 처리한 후 1시간 뒤 LPS로 microglial cells를 자극하였으며, 3시간 뒤 RNA extraction buffer로 RNA 시료 획득
- 이후, RNA정제과정을 거쳐, RNA를 주형으로 하는 cDNA를 합성, 마지막으로, mRNA의 발현을 PCR로 증폭하여 분석함
- PM-EA는 western blot의 표적이었던 염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2는 미미한 억제를 보였으나, 전염증성 cytokine인 IL-1β에 특이적으로 전사억제효능을 보임 (그림 2-4) (2번의 독립적인 실험 실시)

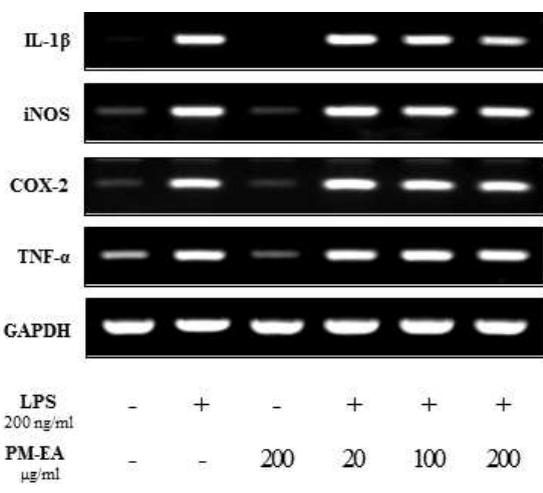


그림 2-4. LPS로 자극된 BV-2 microglial cells에서 mRNA의 발현량을 RT-PCR방법으로 정량분석 실시

○ 정량적 분석을 위하여 qPCR 실험을 실시하여 본 결과 검증함

○ PM-EA는 LPS로 활성화된 BV-2 microglial cells에 대하여 iNOS, COX-2의 억제효능보다, 주로 염증성 cytokine인 IL-1 β 의 발현을 억제함으로써 신경염증을 억제함을 확인함 (그림 2-5)

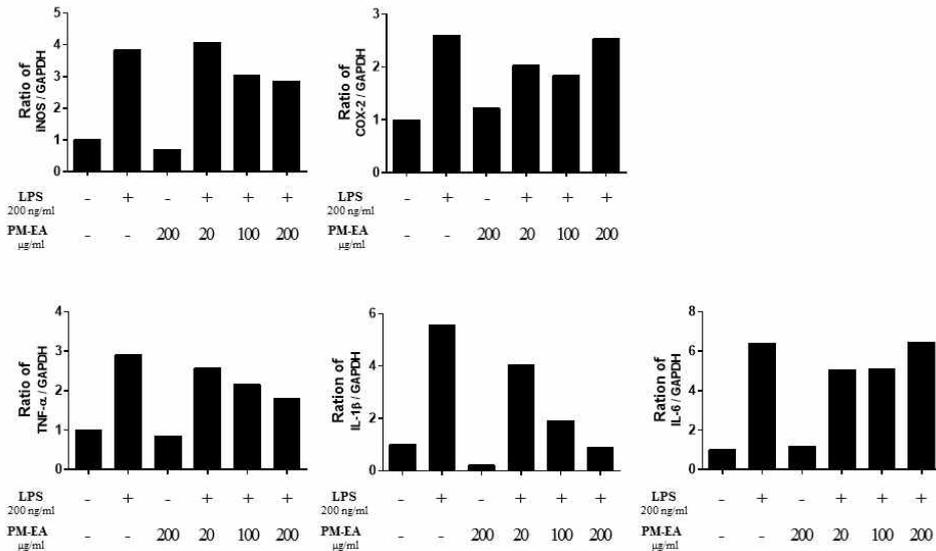


그림 2-5. LPS로 자극한 BV-2 cells의 mRNA sample을 qPCR 과정을 통하여 염증성 cytokines, mediators의 발현을 정량적으로 분석함

(4) Western blot을 통한 initial mechanism 분석

○ 상세한 PM-EA의 기전분석을 위하여 인산화 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 염증의 초기 기전의 분석을 실시함

- LPS는 TLR4 receptor를 경유하여 염증성 신호를 전달하는 과정을 거치며, 염증성 신호를 전달하는 신호의 한 갈래인 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)의 활성을 확인하는 실험을 실시함

○ 적정 농도의 BV-2 cells를 serum free media에서 2시간 incubation, 이후, PM-EA를 처리하였으며, 1시간 뒤 LPS로 자극한 뒤, 30분 뒤에 단백질 시료를 획득하였음

○ 인산화된 ERK (MAPKs의 일종)에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 초기신호의 활성화를 확인하였으며, PM-EA의 농도에 의존적으로 활성화가 감소하는 것을 확인함 (그림 2-6)

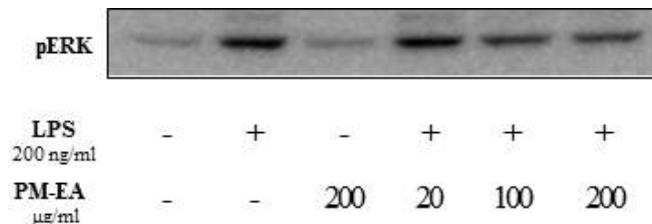


그림 2-6. MAPKs의 하나인 ERK의 활성화를 확인함

- 염증성 cytokines, mediators의 전사를 유도하는 인자인 NF-κB신호에 대하여 실험을 실시
 - NF-κB는 이것의 활성억제 단백질인 IκB-α에 의해 활성의 조절을 받음
- PM-EA는 농도에 의존적으로 IκB-α의 인산화를 억제하여 염증반응을 조절함을 확인함

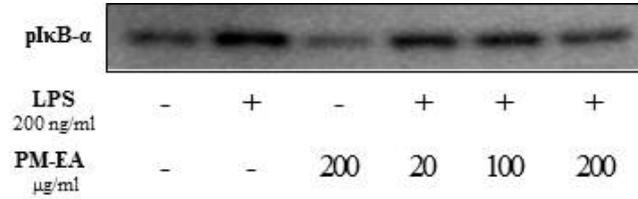


그림 2-7. NF-κB의 활성을 억제하는 분자인 IκB-α의 해리를 확인함

- PM-EA의 효능검증을 완료하기 위하여 초기신호 기전에 대한 추가실험이 필요함

3) Compound A의 항신경염증 효능 확인

(1) Griess reagent assay, MTT cell viability assay 결과

- PM-AL, PM-EA fraction에 공통으로 포함 된 단일 화합물인 compound A의 효능분석을 위하여 적정농도 검색을 실시함
- 단일 화합물로서 상당한 고농도 (100 μM)에서도 BV-2 microglial cells에 대한 독성을 보이지 않음을 확인함 (그림 3-1)

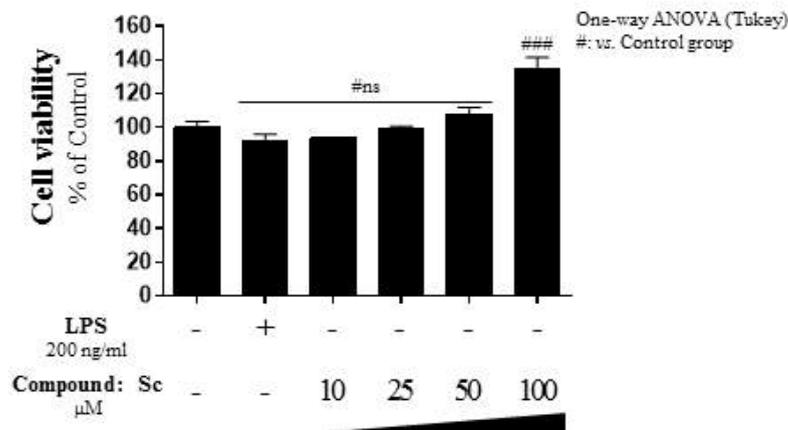


그림 3-1. BV-2 microglial cells에 대한Compound A의 세포독성 검색 실시

- 경제적이면서 실험에 용이한 농도인 20 μM을 임의로 설정하고 LPS로 자극된 BV-2 microglial cells에 대한 Compound A의 항신경염증 효능을 확인함 (그림 3-2) (3번의 독립적인 실험 실시)
 - 이후 기전 분석실험에서 사용할 compound A의 농도는 2, 10, 20 μM로 설정하고 결과를 분석함

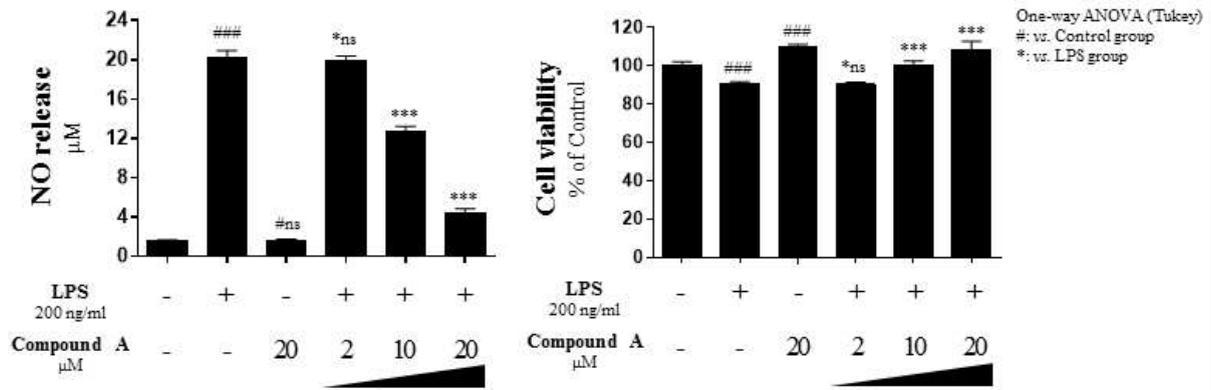


그림 3-2. LPS로 자극된 BV-2 cells에서 Compound A의 항염증 효능을 확인

(2) Western blot 방법을 통한 염증성 매개인자 발현 확인

- 이전 실험과 동일한 조건에서 compound A를 처리한 BV-2 cells에 LPS로 자극한 후, 20시간 뒤 단백질 samples를 획득하였으며, 이것을 western blot 방법으로 정량적 분석 실시
- PM-EA와는 다르게 염증성 매개인자인 iNOS의 발현은 농도에 의존적으로 줄어들었으나, 또 다른 매개인자인 COX-2의 경우 감소하는 경향을 확인하지 못함 (그림 3-3) (4번의 독립적인 실험 실시)

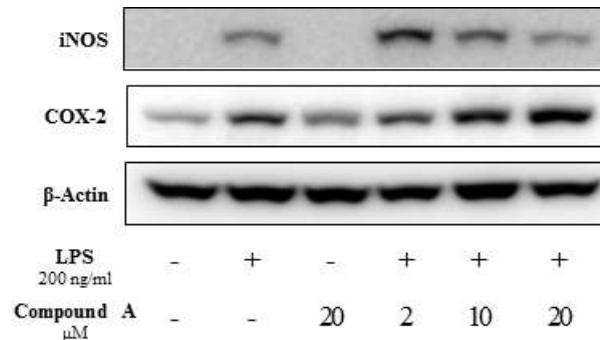


그림 3-3. LPS로 자극된 BV-2 cells에서 염증성 mediators의 발현을 확인함

- 이와 같은 경향을 확인하고, 확실하게 compound A의 항신경염증 기전분석을 위하여 mRNA분석을 실시함

(3) RT-PCR을 통한 cytokine 발현 분석

- LPS로 자극한 BV-2 microglial cells에서 3시간 짜의 mRNA 발현을 분석, compound A의 항염증 기전을 분석함 (그림 3-4) (3번의 독립적인 실험 실시)

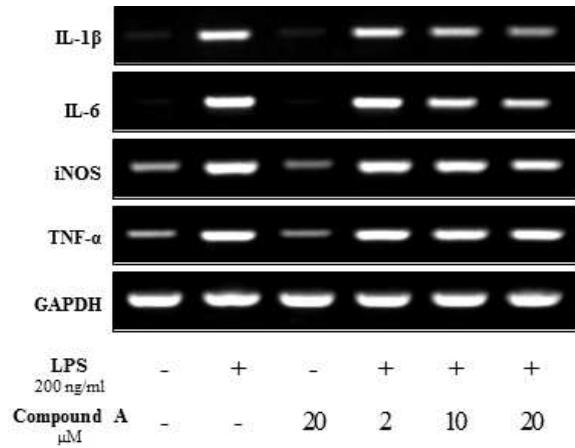


그림 3-4. Compound A의 LPS로 자극한 BV-2 cells에서 염증성 cytokines, mediators의 발현을 확인함

- PM-EA와 마찬가지로 염증성 mediator인 iNOS보다는, 전염증성 cytokine인 IL-1β의 발현을 특이적으로 억제함을 확인함
- 다른 신호를 경유하는 전염증성 cytokine, IL-6역시 compound A 농도 의존적으로 감소함을 확인함

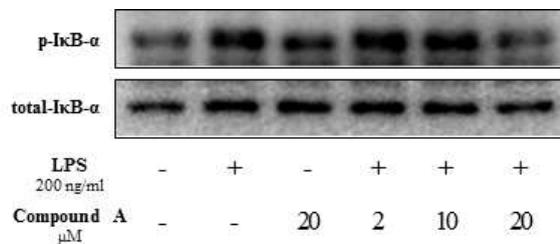


그림 3-5. IκB-α의 유리를 확인함으로써 염증성 transcription factor인 NF-κB의 활성도를 측정함

(4) Western blot을 통한 initial mechanism 분석

- Compound A는 농도에 의존적으로 IκB-α의 유리를 억제함으로써 염증성 transcription factor NF-κB의 활성을 억제하는 기전을 가짐을 확인함
- Compound A의 정확한 기전을 확인하기 위하여 일반적으로 많이 언급되는 MAPKs의 신호분자중 하나인 p38의 활성도를 확인함 (그림 3-6)

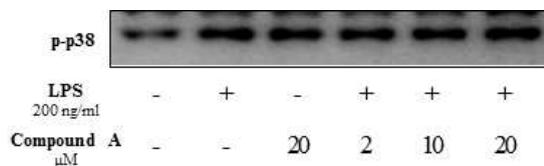


그림 3-6. MAPKs의 일종인 p38 분자의 활성을 확인함

○ Compound A의 농도에 따른 p38의 활성화의 변화가 안보이는 것으로 보아 다른 신호를 억제함으로써 항신경염증 효능을 보이는 것으로 추측함

○ Compound A 효능검증을 완료하기 위하여 초기신호 기전에 대한 추가실험이 필요함

2. 탈염 염생식물 소재 (PM-EA) 및 유효성분 Irillin B의 신경염증억제 효능 분석

■ LPS로 유도된 BV-2 microglial cells에서 PM-EA의 신경염증 억제 효능 분석

○ 퇴행성신경질환 연구에서 주 연구 대상은 두 가지로 크게 나눌 수 있음

- 하나는 신경세포의 과도한 산화적 스트레스의 감소 및 세포자멸사의 저해, 다른 하나는 퇴행성 신경변성질환의 원인이 되는 신경염증반응의 억제가 주요 연구 대상임

○ 최근 신경 교세포에 의한 신경염증 반응은 퇴행성 신경변성질환의 주요 원인으로 주목받고 있음

- PM-EA 및 주요 단일 화합물인 Irillin B 연구는 BV-2 미세교세포 및 MPTP-유도 도파민신경세포사 모델에서 신경염증의 억제효능 및 그 기전에 대하여 연구를 수행하였음

1) Griess reagent assay, MTT cell viability assay 결과

○ PM-EA 시료

- 파이토밀 (통통마디 탈염분말)의 열수 추출물의 ethylacetate 분획물

- Poly-phenols와 flavonoids의 함량이 높으며, anti-thrombosis, antioxidant activity가 큼

○ 주관기관으로부터 PM-EA 시료를 제공받았으며, BV-2 microglial cells에서 항신경염증, 항산화 효능에 대한 *in vitro* 실험을 진행함

- LPS (055:B5 strain, 200 ng/ml)로 활성화된 BV-2 microglial cells에서 신경염증 지표인 NO의 방출 저해를 확인하였으며, PM-EA의 농도에 의존적으로 염증이 저해되는 것을 확인함 (그림 1-1)

- 그리고, LPS를 처리한 PM-EA의 최대농도 실험군 (200 µg/ml)에서 세포 생존률에 영향을 주지 않는 것을 확인하였음

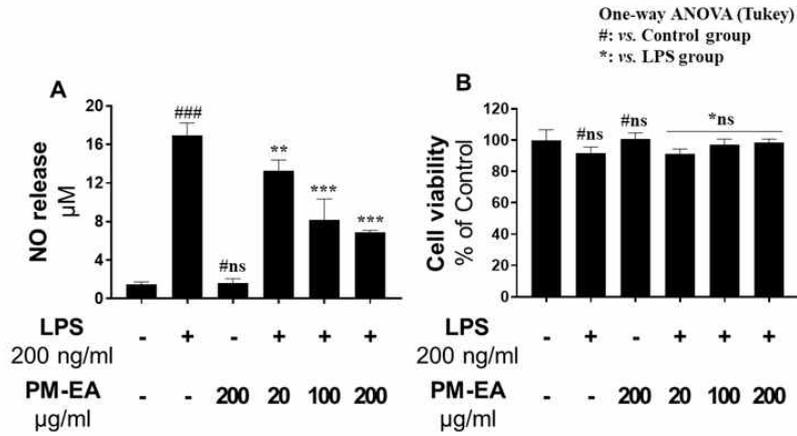


그림 1-1. BV-2 미세교세포에서 PM-EA 시료에 대한 신경염증억제 효능 확인. PM-EA는 염증 지표인 NO분자 방출을 유의적으로 저해함. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

2) DCFDA ROS activity assay 결과

- DCFDA는 세포내 산화적 손상을 확인하기위해 수행하는 high-throughput assay 중의 하나로써, 세포 내에서 산화된 DCF 분자의 형광을 측정하는 방법으로 수행 됨
- 시료 PM-EA의 항산화 효능을 확인하기 위하여, DCFDA assay를 진행함. 농도 의존적으로 대조군에 대하여 ROS 수준이 낮아진 것을 확인함

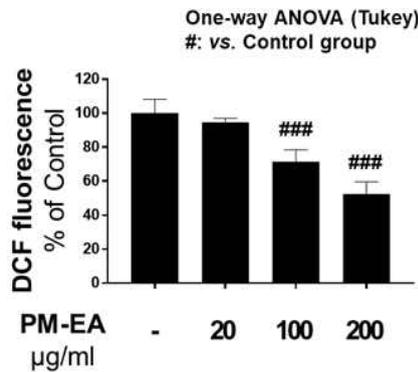


그림 1-2. BV-2 미세교세포에서 PM-EA 시료에 대한 활성산소의 감소를 확인. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

3) Western blot analysis 결과

- 시료 PM-EA의 신경염증억제 효능의 기전 분석을 위하여, Western blot 등의 방법을 사용하여 실험을 진행하였음.
- PM-EA의 실험농도는 Griess reagent, MTT 및 DCFDA assay와 동일하며, 실험재료 및 방법에 서

술한 것과 동일한 조건에서 실험을 수행함

- 실험결과, Griess reagent에서 확인 했듯이 iNOS의 발현 감소를 확인했으며, 염증 인자인 COX-2의 발현 감소 역시 확인함
- 또한, 세포내 항산화 활성의 마커로 사용되는 HO-1 단백질의 발현 증가를 확인하였음

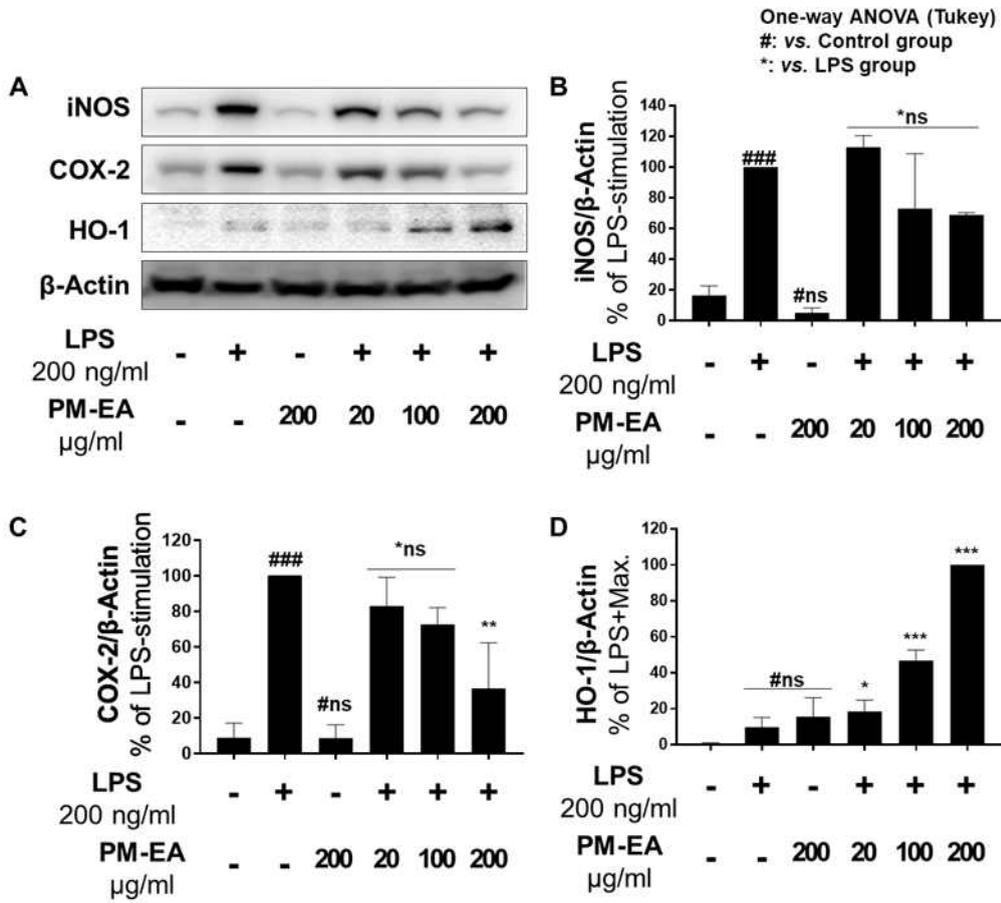


그림 1-3. BV-2 미세교세포에서 PM-EA의 염증인자 발현의 저해 효능 확인. 반면에 항산화인자 HO-1은 농도 의존적으로 발현의 증가를 확인함. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. Image J (NIH, USA) 프로그램을 사용하여 이미지 정량분석을 실시함. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

4) qPCR (quantitative polymerase chain reaction) analysis 결과

- 시료 PM-EA의 기전 분석을 위하여, BV-2 미세교세포로부터 mRNA를 분리한 뒤, cDNA를 합성하고, 이후 이것을 주형으로 하여 qPCR 실험을 수행함.
- 염증성 cytokines의 발현 분석을 통해 신경염증에 관한 세포기전을 추정할 수 있음
- 실험결과, 염증성 매개인자인 iNOS, COX-2의 정량적 감소를 확인하였으며, 염증성, cytotoxic cytokines인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 감소 역시 확인함.
- Western blot analysis의 결과와 마찬가지로 HO-1 단백질의 증가를 확인함.

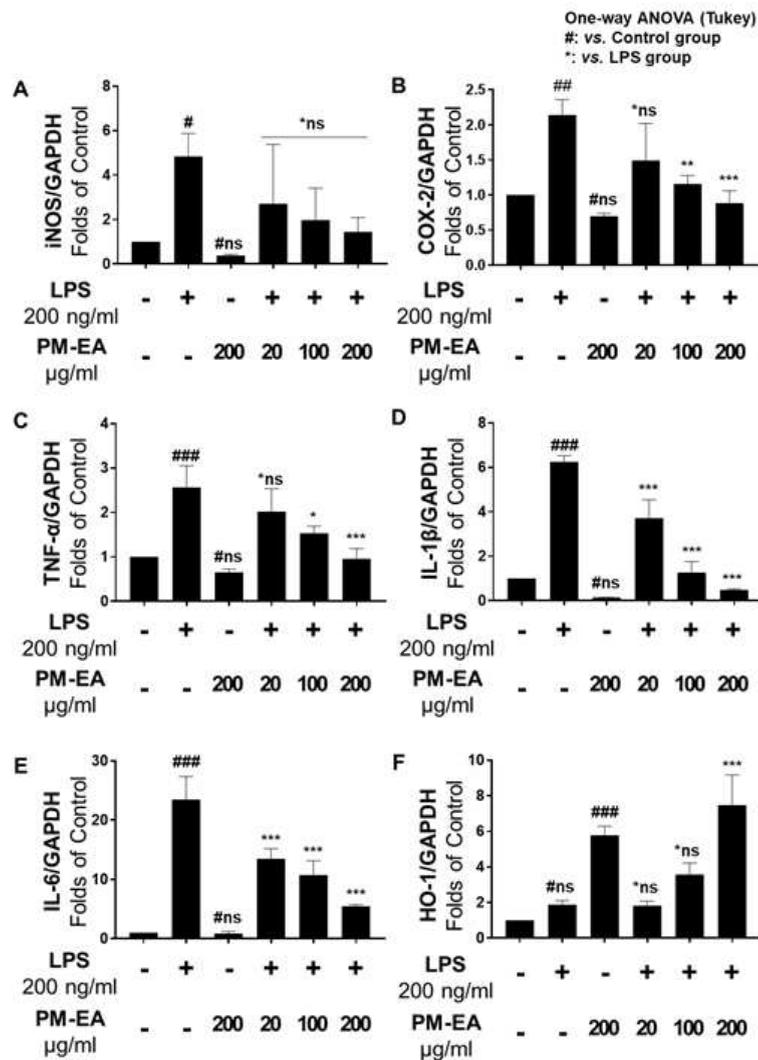


그림 1-4. LPS로 자극한 BV-2 미세교세포에서 PM-EA의 항신경염증 효능 및 세포보호 효능을 확인. cytotoxic, pro-inflammatory cytokine의 감소 확인. HO-1의 유전적 발현의 증가 확인. 실험은 독립적으로 3~4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

3. MPTP 실험동물 모델에서 PM-EA의 신경염증 억제효능 및 행동양상 분석

- MPTP는 도파민 신경세포에 특이적으로 작용하는 신경독소로 잘 알려져 있으며, 퇴행성신경질환 동물모델 연구 등에 사용되고 있음
- 도파민성 신경세포는 MPP+ (생체에 들어간 MPTP는 다른 신경 교세포에 의하여 MPP+형태로 환원됨)에 의하여 ATP 생성 저해 및 ROS 생성 등을 통하여 신경세포사를 유도함
- MPTP acute model을 이용하여 신경염증을 유도하며, 활성화된 미세교세포가 방출하는 NO radical, cytotoxic 및 pro-inflammatory cytokine 등에 의하여 염증을 악화시키며, 주변 신경조직에 손

상을 주게 됨

- 신경염증의 효과적인 조절은 이후 일어나게 되는 신경 조직의 퇴행을 막을 수 있으며, 이에 관하여 많은 선행연구 결과가 보고되어 있음

○ 실험 동물군은 4 종류의 군 (대조군, MPTP 양성대조군, PM-EA 50, 100 mg/kg/7days 투여군)으로 나뉘었으며, 각 군에 맞도록 7일 동안 시료를 투여함 (대조군과 MPTP 투여군은 0.9%식염수)

○ 이후, MPTP를 20 mg/kg, 2 hours intervals 4 회 투여하여 MPTP acute model로 본 연구에 사용하였음

1) Pole behavior test

○ 행동분석 중 pole test를 진행 함

○ 대조군과 시료처리군 등을 Pole 끝 부분에서 위를 바라보게 놓아두고 회전에 걸리는 시간, 바닥에 내려오는 시간을 측정 후 통계분석을 하였음

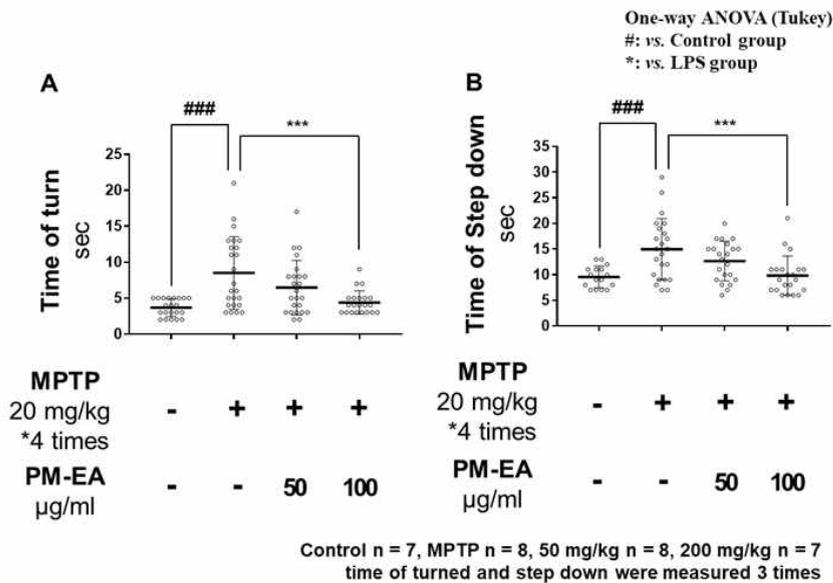


그림 2-1. MPTP를 투여한 C57BL/6 mice model에서 PM-EA의 행동양상 분석. 실험은 동일 mice를 30분 간격으로 3회 반복하였으며, 결과를 바탕으로 행동기능 평가를 진행함. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, p<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

○ 실험결과, PM-EA를 투여한 군에서 행동기능의 개선을 확인할 수 있었음

2) Western blot analysis 결과

○ 신경염증반응이 활발히 일어나는 1, 3 days, 도파민신경세포사기 일어나는 7 days 시료로 나누어 Western blot analysis를 진행하였음

○ Western blot analysis는 *in vitro* 실험법과 동일하게 진행되었음

- 중뇌의 SNpc 부위를 중심으로 시료를 채취 한 후 RIPA buffer로 단백질을 추출함
- MPTP에 의하여 도파민 신경세포사가 유도되었으며, 염증성 매개인자 COX-2 발현의 증가를 확인하였고, PM-EA 추출물 처리 후 염증인자억제를 확인하였음

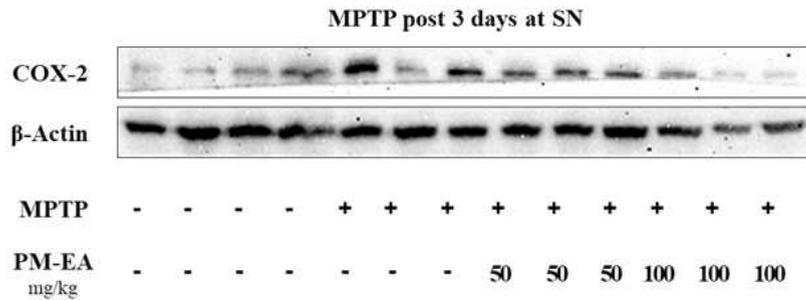


그림 2-2. MPTP를 투여한 C57BL/6 mice model에서 COX-2의 발현을 확인함. 각 그룹은 n=3 이상

- MPTP injection post 7 days에서 MPTP에 의한 신경세포사를 확인 (marker는 TH), PM-EA의 투여에 의한 신경세포 보호효능을 분석하였음

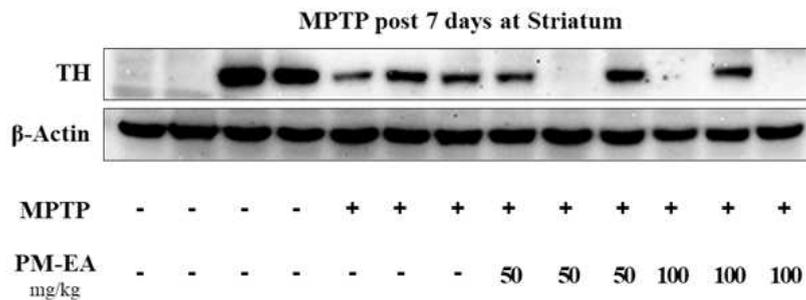


그림 2-3. MPTP를 투여한 C57BL/6 mice model에서 도파민성 신경세포의 marker인 TH 발현을 확인함.

3) IHC (immunohistochemistry) 결과

- MPTP mice model의 brain 시료를 cryosection 방법 등을 활용하여 immunohistochemistry을 수행하였음
- MPTP에 의하여 신경세포사 및 fiber의 손상을 확인 하였고, PM-EA 투여에 의한 신경보호효능을 일부 확인함
 - 도파민성 신경세포, 운동 활동의 중추로 여겨지는 Striatum, SNpc (substantia nigra pars compacta) 부분에 해당하는 section에 면역염색법을 수행함

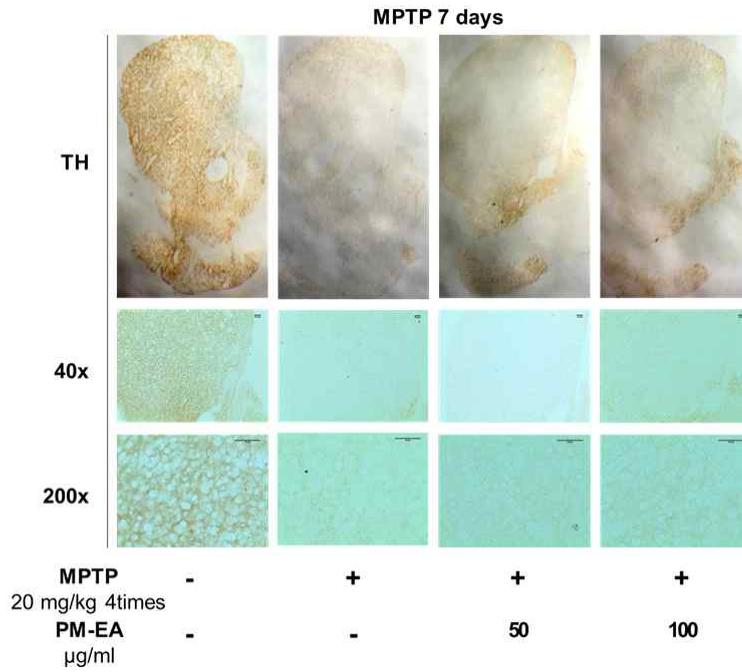


그림 2-4. MPTP post 7 days, Striatum 부분에서 도파민성 신경세포의 marker인 TH 발현을 확인함. DAB staining으로 시각화하였음. 좌측 배울 표기

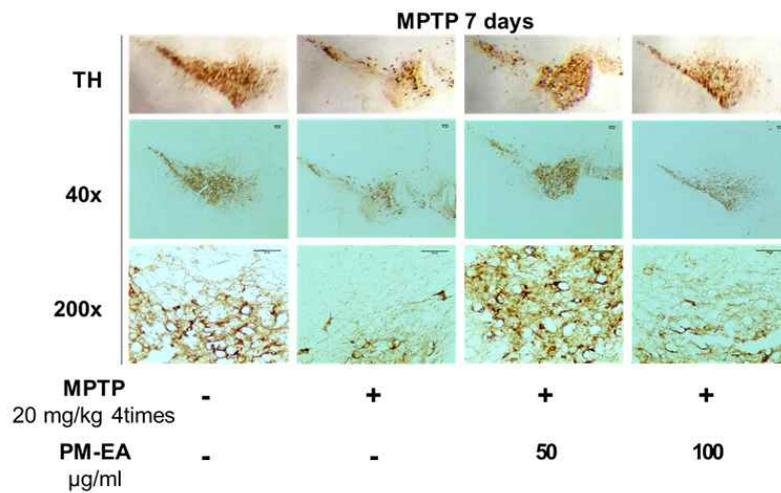


그림 2-5. MPTP post 7 days, SNpc 부분에서 도파민성 신경세포의 marker인 TH 발현을 확인함. DAB staining으로 시각화 하였음. 좌측 배울 표기

4. PM-EA의 주요 단일물질인 Iriilin B의 항신경염증 효능 및 기전 확인

1) Griess reagent assay, MTT cell viability assay, DCFDA ROS activity assay 결과

- PM-EA에서 분리한 주요 단일화합물 중 하나인 Iriilin B를 분리 하였으며, 이 단일 화합물의 신경염증에 대한 효능을 연구하였음
- MTT 실험 분석 결과, 세포활성에는 큰 영향을 주지는 않으면서 NO분자의 방출을 농도 의존적

으로 억제하는 것을 확인함

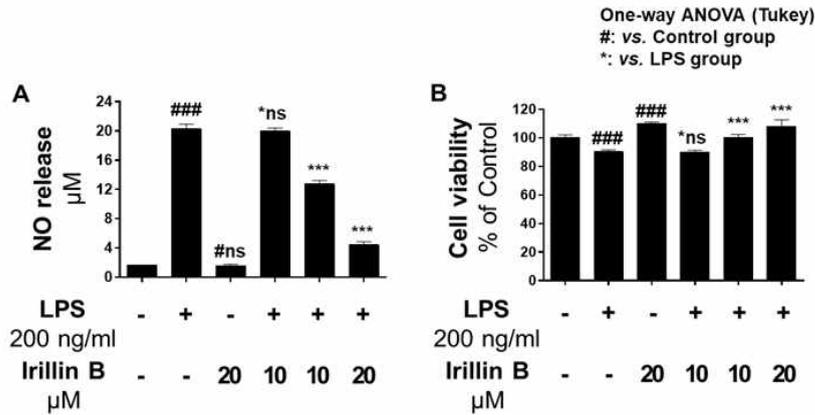


그림 3-1. BV-2 미세교세포에서 Irillin B 시료에 대한 NO분자 방출 (Griess reagent assay) 및 세포 활성도 (MTT assay)를 확인함. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

- BV-2 신경미세교세포에서 DCFDA assay를 수행 하였으며, 원 시료 PM-EA와 동일한 패턴으로 ROS level의 농도 의존적인 감소를 확인함

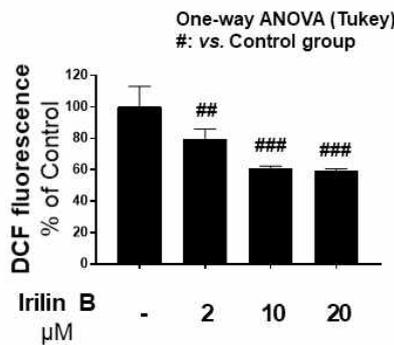


그림 3-2. Irillin B 시료가 BV-2 미세교세포의 ROS level을 감소시키는 것을 확인 함. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

2) Western blot analysis 결과

- MTT 실험 분석 결과, 세포활성에는 큰 영향을 주지는 않으면서 NO분자의 방출을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인함
- 원 시료인 PM-EA와 유사한 패턴으로 iNOS의 발현을 감소시키는 것을 확인함
- 이와는 반대로 염증을 매개한 다른 신호인 PGE 경로를 매개하는 분자 COX-2의 발현을 감소시키지 않았음
- Irillin B는 iNOS 상위 기전에 관여하는 경로를 억제하는 방식으로 항염증 작용을 하는 것으로 판단 가능함

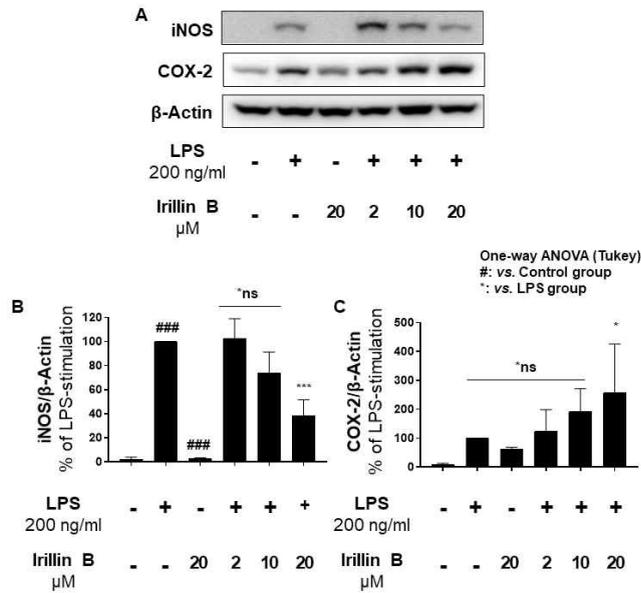


그림 3-3. BV-2 미세교세포에서 Irillin B 시료에 대한 항신경염증 효능을 확인. iNOS 분자의 발현 감소를 확인함. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

○ 원 시료인 PM-EA와 동일하게 항산화 인자인 HO-1의 발현을 농도의존적으로 발현을 증가 시킬 수 확인 함

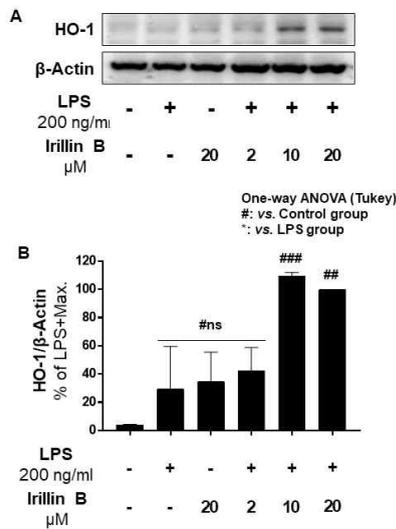


그림 3-4. BV-2 미세교세포에서 Irillin B 시료에 대한 HO-1의 발현양상을 분석하였음. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

3) qPCR (quantative polymerase chain reaction) analysis 결과

○ Irillin B의 LPS로 자극 된 BV-2 미세교세포에서의 상세한 항신경염증 기전을 확인하기 위하여 qPCR 분석을 실시함

○ 원 시료 PM-EA와 유사한 패턴의 염증인자 감소 양상을 확인 함

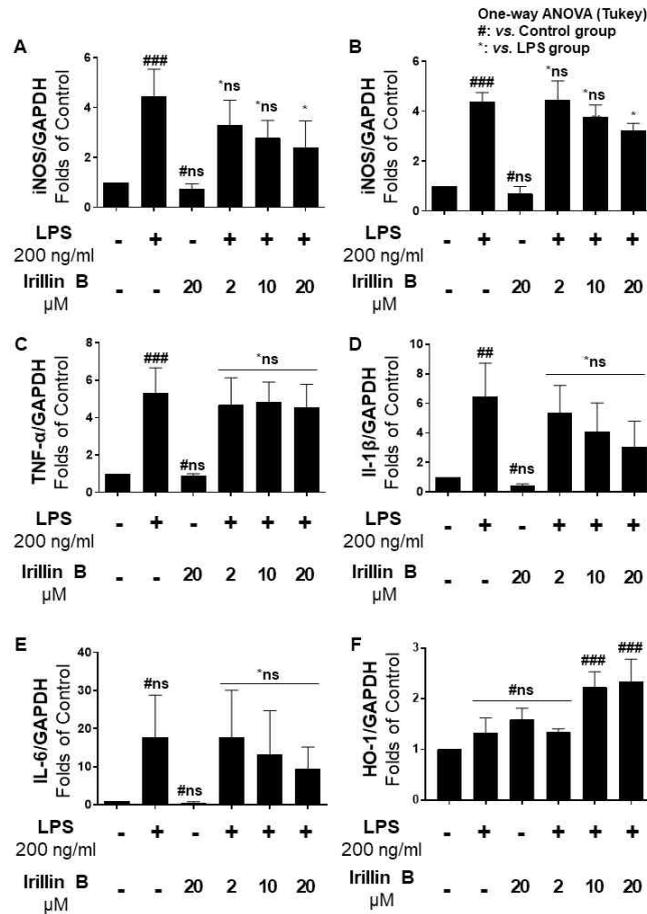


그림 3-5. LPS로 자극된 BV-2 미세교세포에서 Irillin B 시료에 대한 항염증 작용을 확인. iNOS, COX-2의 염증성 매개인자, IL-1β, IL-6와 같은 cytotoxic cytokine의 mRNA 발현의 억제를 확인함. 세포내 항산화활동의 marker인 HO-1의 농도 의존적인 발현 증가를 확인함. 실험은 독립적으로 4회 반복하여 동일한 결과를 얻음. (One-way ANOVA 분석, Tukey's method, $p > 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주)

5. 탈염 통통마디 주정 추출물 (PM-EE)의 인지기능(기억력) 개선 효능분석 ;인지기능 손상모델 (*in vivo*)에서 PM-EE의 효능 분석

○ Scopolamine을 이용한 인지기능 손상모델 제작, 추출물 투여 및 행동실험

- Scopolamine 동물모델 : 25±5g 내외의 mouse을 사용하여 고정 사료 및 일정 조건 (온도:20±2°C, 습도:50%, 명암:12시간 light/dark cycle)하에서 충분히 적응시킨 후 사용함. 추출물은 생리 식염수에 용해하여 농도별 7일간 oral needle을 사용하여 경구 투여 하고, 이 후 같은 동물에 scopolamine을 2mg/Kg 투여하여 중추신경을 차단시킨 다음, 2시간 행동반응 결과를 측정함

○ 동물모델을 이용한 유효성분 Acanthoside-B의 뇌혈관장벽 투과 여부

- 57BL/6 mouse 이용하여 물질을 경구투여 (p.o.) 및 복강주사 (i.p.) 후, 뇌 안으로의 통과 여부를 확인하고자 하였으며, 물질이 체내로 유입되어 분해되는 반감기를 분석하였다. 이는 혈액채취 및

뇌 조직을 적출하고 lysate를 이용하여 HPLC-MS의 기기를 사용하여 분석하였음

○ 면역항체학적 방법

- Immunohistochemistry와 Immunoblots를 이용하여 효능분석을 진행하였음. 시료 처리전과 처리 후의 mouse의 뇌조직을 분리한 후 고정시킨다. 대조군과 시료를 처리한 mouse 해마 조직을 채취한 후 homogenization buffer를 이용하여 homogenate한 후 추출물을 polyacrylamide gel에서 전기영동을 시킨다. 결과는 NIH image 장치를 통하여 분석하였음

1) 수동 회피 (Passive avoidance) 실험을 통한 학습 능력 효과 측정

○ Scopolamine을 이용한 인지기능 손상 동물모델에서 PM-EE를 농도별로 처리하여 수동 회피 실험을 진행함. 어두운 방과 밝은 방, 그리고 전기적 자극을 주어 인지기능이 손상된 마우스 모델에서 밝은 방에서 어두운 방으로 회피하는데 걸리는 시간 TLT (Transfer latency time)을 컴퓨터를 통해 기록한 결과 대조군에서는 Retention Times가 300이였으나, Scopolamine을 처리한 군에서는 22±25ms로 대폭 줄였으며, 100mg/Kg의 PM-EE를 처리한 군 중에서는 Retention Times이 292±17.7 ms으로 증가하는 것을 확인하여 PM-EE가 학습능력을 상승시킴을 확인함(그림 1A)

2) Y-미로실험 (Y-maze test)

○ Y자 미로실험을 통하여 PM-EE 효능을 행동학적으로 분석해 본 결과 PM-EE를 처리한 군에서 대조군에 비하여 총 입장횟수 (Total Arm entr, 행동성)가 소폭 증가되는 것을 확인하였고 (그림 1B), 변경 행동력 (Percentage alternation, 인지능력)의 개선 효능이 확연히 증가하는 것을 확인함 (그림 1C)

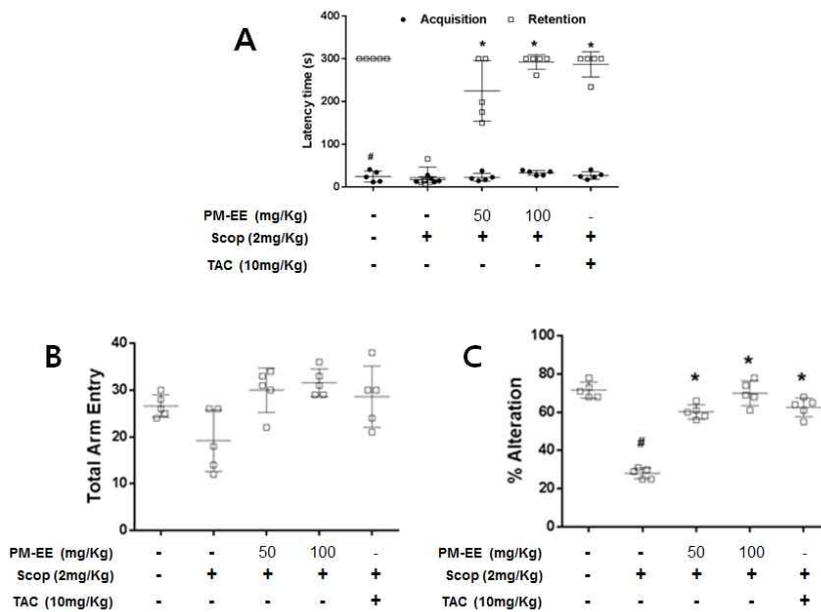


그림 1. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE의 TLT(Transfer latency time) (A) 및 Y-maze test (B,C) 분석

3) 아세틸콜린에스터라제 활성 측정(AChE activity assay)

○ 정상마우스와 인지력을 저해 시킨 마우스에 시료를 처리한 후, 행동실험을 진행함. 이후, 뇌를 적출 하여 해마 (Hippocampus)와 대뇌피질 (Cerebral cortex) 부위를 분리한 후 AChE 활성 실험을 분석함. scopolamine 투여한 생쥐는 27.13±0.75 U/mg의 값과 20.02±0.42 U/mg로 대조군과 비교하여 해마와 대뇌 피질 모두에서 AChE 활성이 유의미하게 증가되는 반면 PM-EE처리된 실험동물들은 scopolamine 처리 집단과 비교하여 해마와 대뇌 피질 모두에서 AChE 활성의 현저한 감소가 관찰됨. 100mg/kg의 PM-EE를 처리한 군에서 9.35±0.25 U/mg (해마), 8.96±1.37 7.40±0.19 U/mg (대뇌피질)의 활성을 나타냄. 이는 PM-EE가 acetylcholinesterase의 활성을 저해하는 것을 알 수 있음 (그림 2)

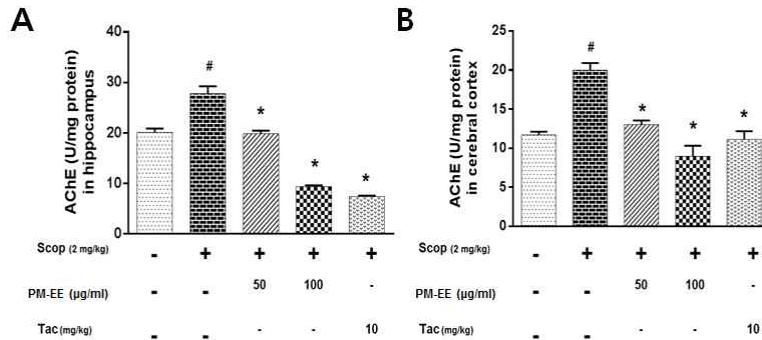


그림 2. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE에 의한 AChE 활성 분석. A:해마, B:대뇌피질

4) 지질과산화 및 항산화 활성 효소 측정

○ Scopolamine는 산화성 스트레스와 연관되어 있다고 보고되고 있다. 지질과산화물 관련 malonaldehyde (MDA) 및 항산화 biomarkers (SOD, CAT and GPx) 들을 측정했다. PM-EE를 처리

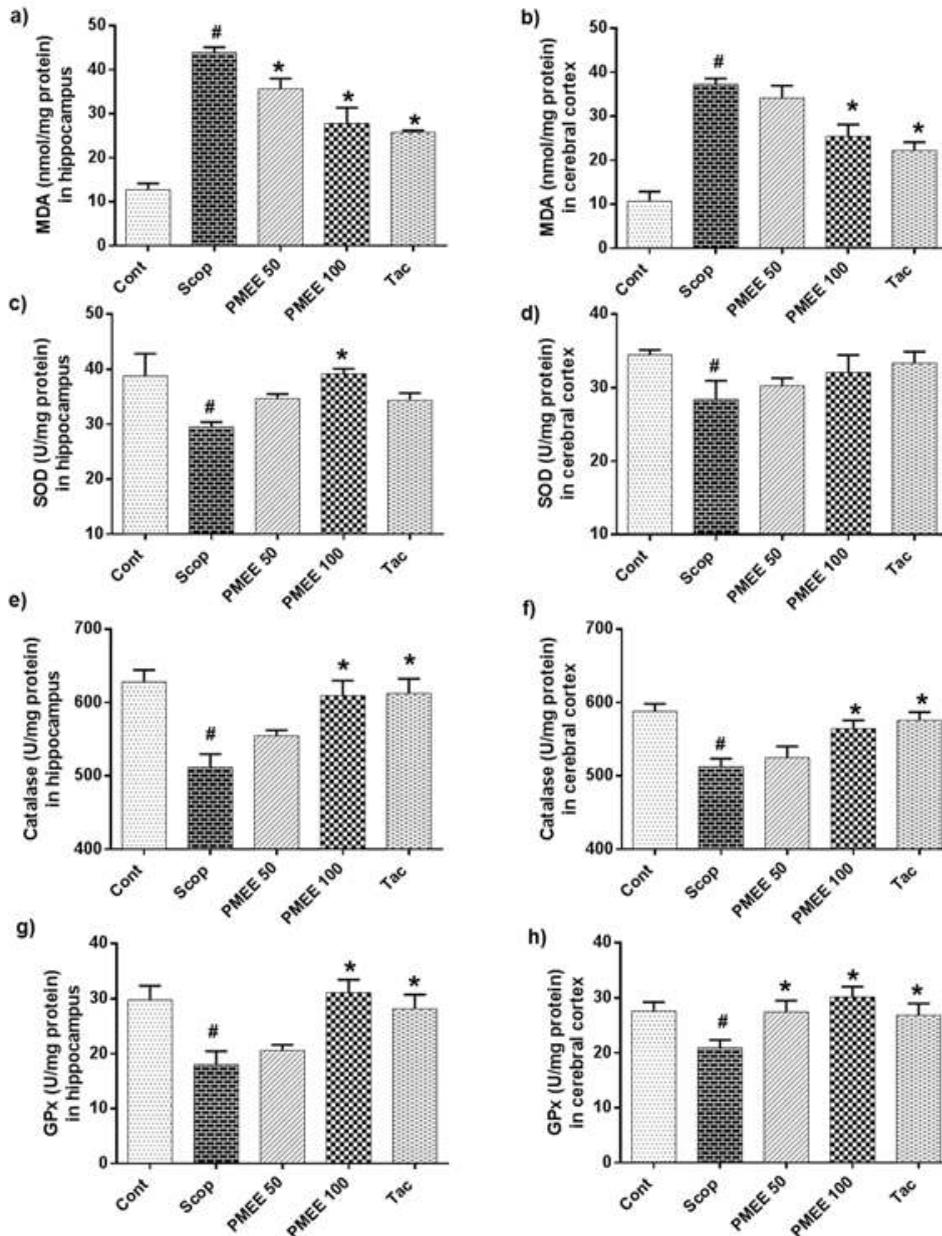


그림 3. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE에 의한 지질과산화 및 항산화 활성 분석

한 시료에서 MDA level이 대뇌피질(그림 3A)에서는 전체적으로 저해 되는 것을 확인 하였으며 해마(그림 3B)에서도 농도 의존적으로 저해되는 것을 확인함. 또한 항산화 biomarkers (SOD, CAT and GPx)을 각 조직에서 측정된 결과 Scopolamine을 처리한 군에서는 일괄적으로 이 효소의 활성이 저해되었지만, PM-EE를 처리한 군에서는 농도 의존적으로 활성이 증가함을 확인할 수 있음(그림 3 C,D,E,F,G,H). 이는 PM-EE가 지질과산화물의 축적을 억제하고 항산화 효소의 활성을 증가시킴을 확인할 수 있음

5) 인지기능 손상동물모델에서 PM-EE의 염증성 바이오 마커의 억제 효능

○ Scopolamine 동물모델의 해마에서 PM-EE의 염증성 마커들의 변화 양상을 분석함. 이를 위하여 염증반응에서 NO의 생성에 관한 iNOS, PGE2 (prostaglandin 2)의 COX-2의 단백질 발현양상 분석

(그림 4) 및 염증의 활성화에 관련된 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10) 분석(그림 5)을 수행한 결과, PM-EE를 처리한 군에서 염증성 바이오 마커의 발현 등이 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었음. 이는 PM-EE가 인지기능 손상모델의 염증반응을 조절할 수 있음을 시사함

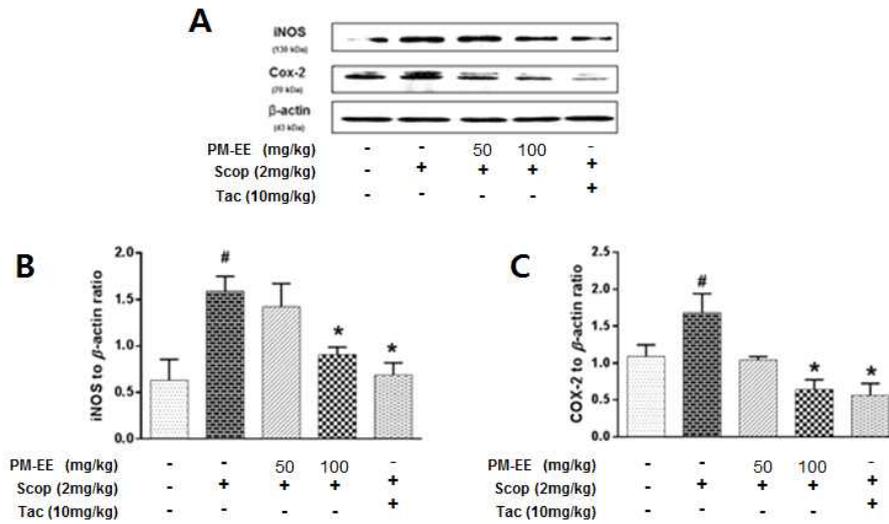


그림 4. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE에 의한 iNOS 및 COX-2 활성화 분석.

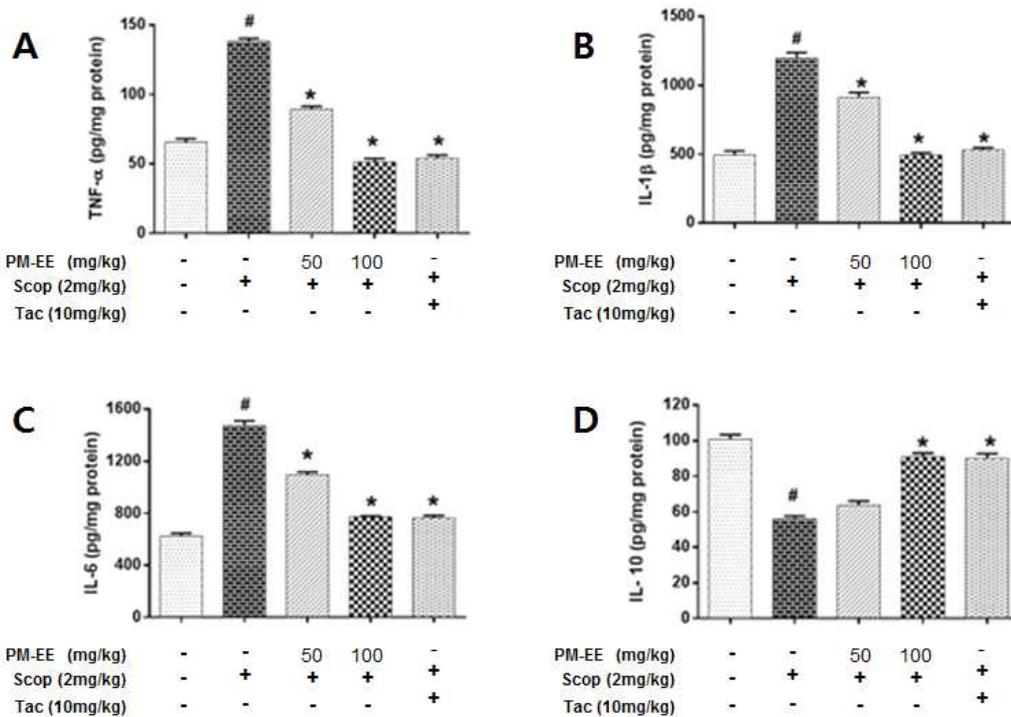


그림 5. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE에 의한 염증성 사이토카인 활성화 분석.

6) 인지기능 손상동물모델에서 PM-EE의 뉴트로핀인 CREB/BDNF 억제 효능

○ 뇌의 활성인자로서 뉴트로핀은 대뇌피질과 피질하부의 세포성장의 조절인자 중 하나이며, 신경성장인자 (Nerve growth factor;NGF), 뇌-유도 신경영양 인자 (Brain-derived neurotrophic

factor;BDNF), 신경교-유도 신경영양인자 (Glial-derived neurotrophic factor;GDNF) 등이 있음. 뉴트로핀은 신경세포의 생존과 분화를 결정짓는 인자 중 하나로서 중추신경에서는 연접활동의 신경 조절 인자로 말초신경에서는 영양인자로 작용하는 중요한 역할을 하며 축색돌기의 방향성, 수상돌기의 성장 신경 전달 물질의 분비, 새로운 신경연접의 형성, 신경 연접부 가소성을 조절하는 역할을 담당하고 최근에는 신경재생, 통증, 공격성, 우울증 등 행동과 신경활동에도 큰 영향을 주는 것으로 보고 되고 있음. 특히 BDNF는 해마에서 직접적인 뇌세포 생성을 대표하는 인자이며, 본 연구에서는 해마에서 BDNF와 BDNF의 활성화에 중요한 역할을 하는 CREB의 발현양상을 분석하였음. PM-EE를 투여한 군에서는 그림 6B,C에서 보는 바와 같이 p-CREB 및 BDNF의 양이 증가함을 확인 할 수 있었음. 이는 PM-EE가 뉴트로핀의 증가를 통하여 뇌신경 손상을 억제할 수 있음을 시사함

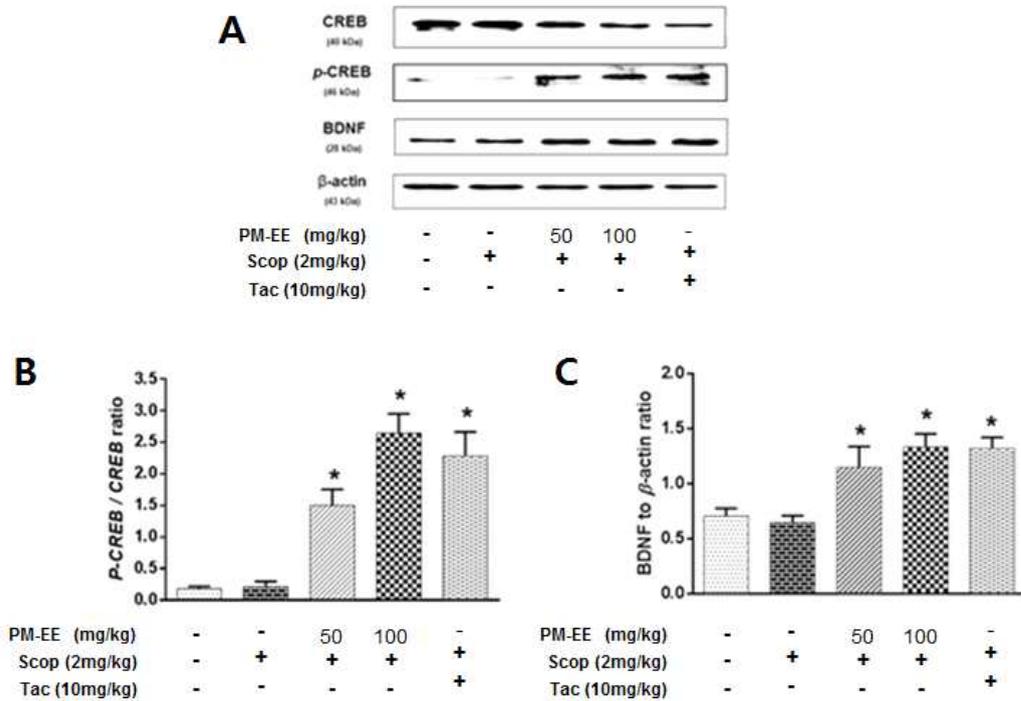


그림 6. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE에 의한 CREB 및 BDNF 발현양상 분석.

7) 인지기능 손상동물모델에서 PM-EE의 neuronal cell proliferation 및 neurogenesis 효능 분석

○ PM-EE의 neuronal cell proliferation 및 neurogenesis을 분석하기 위하여 해마부위의 Ki67 및 DCX 염색법을 통하여 확인함. Scopolamine을 처리한 군에서는 DG의 신경세포 수가 줄어들음을 확인 할 수 있었으며, PM-EE를 처리한 군에서는 상대적으로 이를 억제함을 관찰할 수 있음(그림 7).

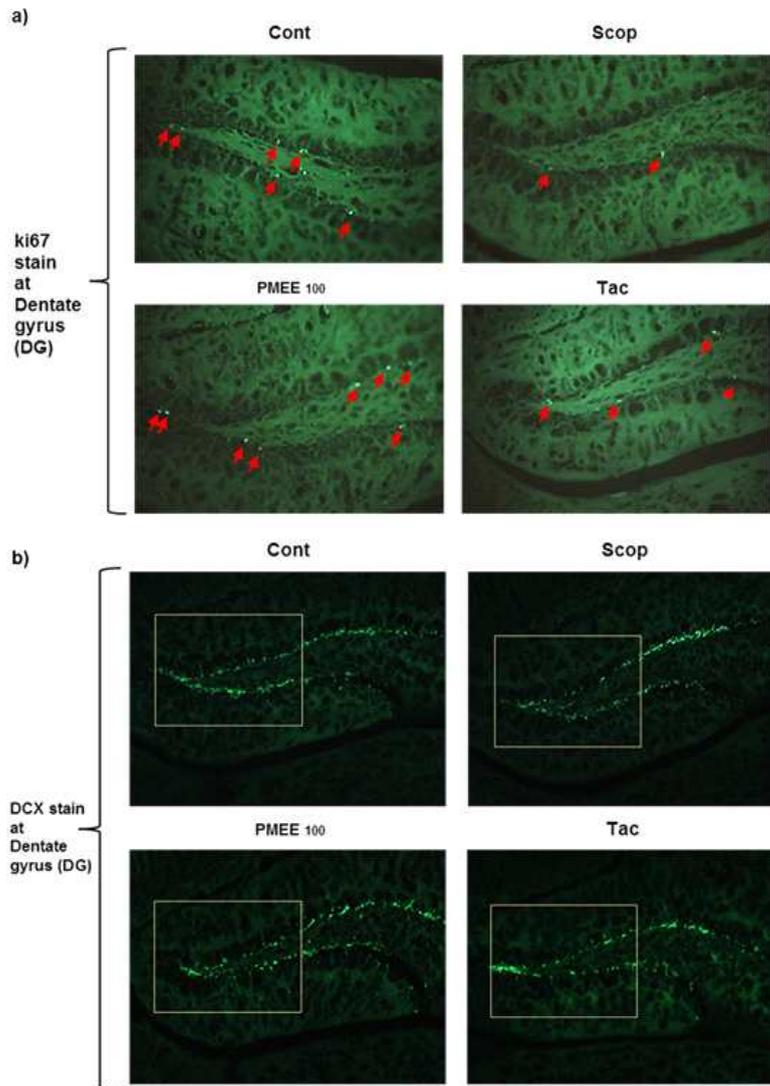


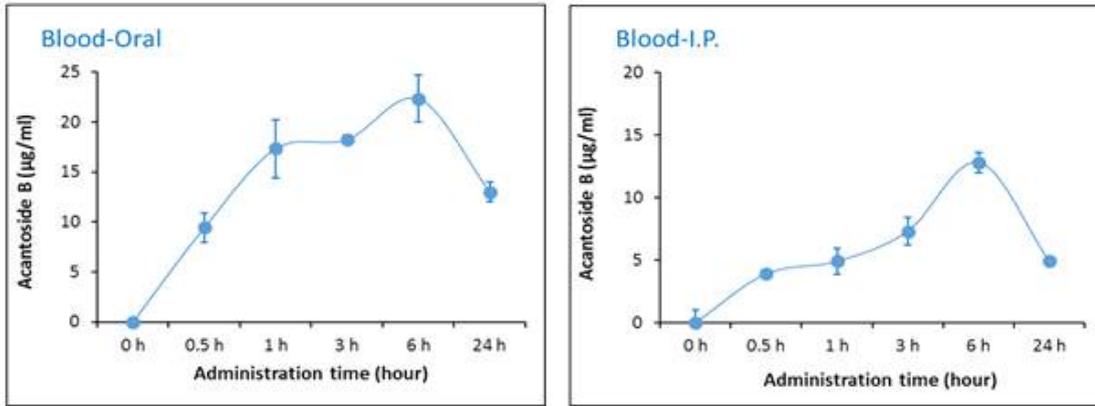
그림 7. 인지 손상 동물모델에서 PM-EE에 의한 neuronal cell proliferation 및 neurogenesis 효능 분석

6. PM-EE의 유효성분인 Acanthoside-B의 효능 평가

1) 동물실험을 이용한 Acanthoside-B의 뇌혈관장벽(BBB) 통과여부 실험

○ 뇌에 존재하는 ‘혈액 뇌 장벽 (Blood Brain Barrier, BBB)’은 약물 혹은 다른 유해물질들이 뇌로 전달되는 것을 억제함. 효능이 우수한 물질이라도 BBB를 통과하지 못하면 뇌세포로 전달될 수 없으므로, C57BL/6 mouse 이용하여 PM-EE의 유효성분인 Acanthoside-B의 경구투여 (p.o.) 및 복강주사 (i.p.) 후, Acanthoside-B의 뇌 안으로의 유입여부를 확인하였고, Acanthoside-B가 체내로 유입되어 분해되는 반감기를 분석함. C57BL/6 mouse에 Acanthoside-B를 복강주사 및 경구투여 후 정해진 시간 (0, 0.5, 1, 3, 6, 24h)에 맞춰 혈액채취 및 뇌 조직을 적출하고 lysate를 이용하여 HPLC-MS의 기기를 사용하여 Acanthoside-B의 유무와 반감기를 확인함(그림 8). 측정 결과 경구 투여와 복강주사 모두 BBB를 통과하는 것을 확인하였으며 경구 투여 시, Acanthoside-B의 뇌 내 축적이 가장 길다는 것을 확인하였고, 이 후의 실험동물모델의 실험은 경구 투여를 통하여 진행함

a)



b)

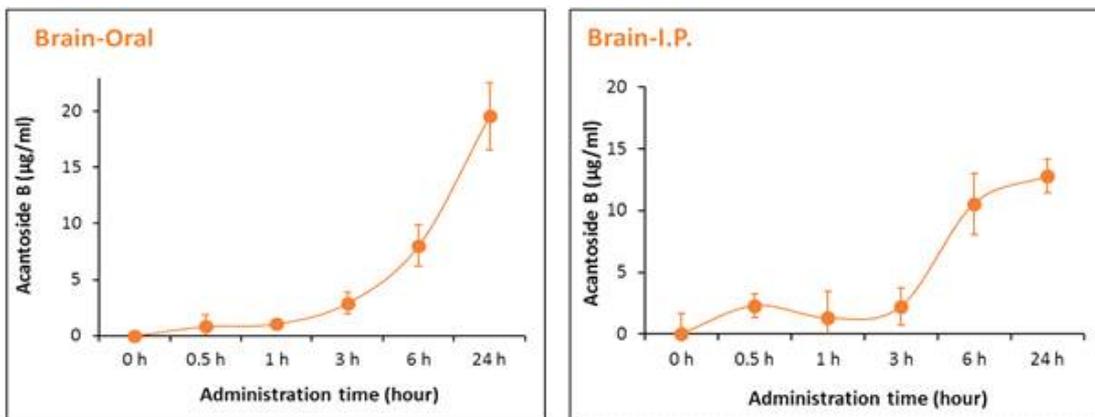


그림 8. Acanthoside-B의 약역학내성 평가

2) 인지기능 손상모델 (*in vivo*)에서 Acanthoside-B의 기억력개선 동물행동 효능 분석

○ 수동 회피 (Passive avoidance) 실험에서 대조군에서는 Retention Times가 300이었으나, Scopolamine를 처리한 군에서는 $90 \pm 28s$ 로 대폭 줄었으며, 20mg/Kg의 Acanthoside-B를 처리한 군에서는 Retention Times이 $286 \pm 26s$ 으로 증가하는 것을 확인하여 Acanthoside-B가 학습능력을 상승시킴을 확인함(그림 9A). 또한 Y-미로실험에서 Acanthoside-B 효능을 행동학적으로 분석해 본 결과 Acanthoside-B를 처리한 군에서 변경 행동력 (Percentage alternation)의 개선 효능이 증가하는 것을 확인함(그림 9B)

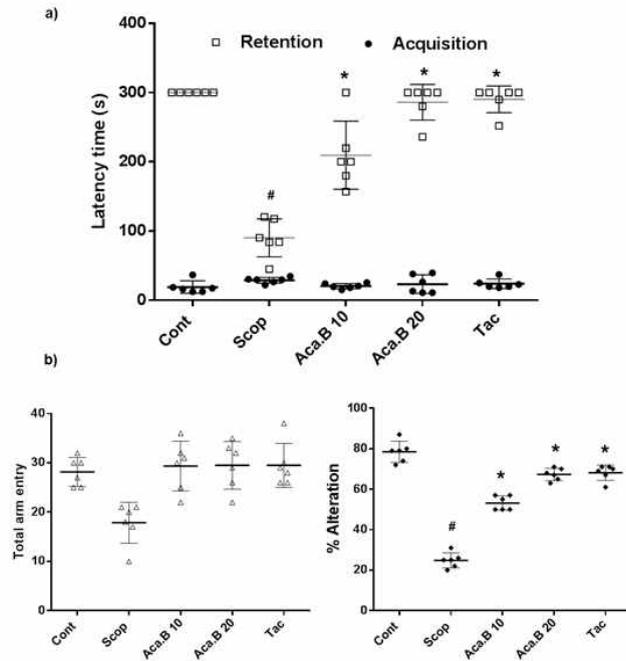


그림 9. 인지 손상 동물모델에서 Acanthoside-B의 TLT(Transfer latency time)(A) 및 Y-maze test (B) 분석

3) 아세틸콜린에스터라제 활성 측정(AChE activity assay)

○ 정상 마우스와 인지력을 저해 시킨 마우스에 시료를 처리한 후, 행동실험을 진행함. 이후, 뇌를 적출 하여 해마 (Hippocampus)와 대뇌피질 (Cerebral cortex) 부분을 분리하여 AChE 활성 실험을 분석한 결과 scopolamine투여된 생쥐는 31.49 ± 0.62 U/mg과 29.05 ± 1.67 U/mg 로 대조군과 비교하여 해마와 대뇌 피질 모두에서 AChE 활성을 증가시킴. 반면에, Acanthoside-B처리된 동물들은 scopolamine치료 집단과 비교하여 해마와 대뇌 피질 모두에서 AChE 활동의 농도 의존적으로 감소를 보임. 이는 Acanthoside-B가 acetylcholinesterase의 분해를 저해하는 것을 알 수 있음(그림 10).

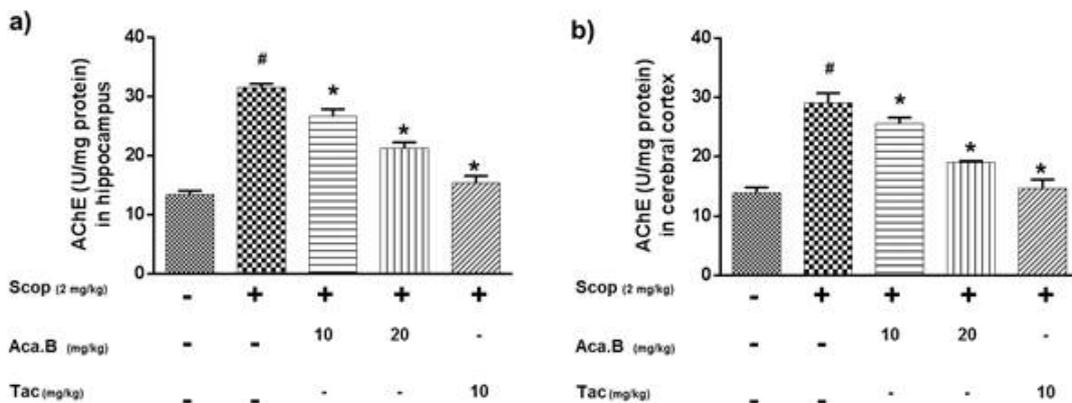


그림 10. 인지 손상 동물모델에서 Acanthoside-B에 의한 AChE 활성 분석. A:해마, B:대뇌피질

3-4. 제2협동 서울대학교 신경과 김만호 교수팀 연구수행 내용 및 결과

인체적용시험 결과보고서

경도인지저하자에서 인지기능에 미치는 **PM-EE**의

유효성 및 안전성을 평가하기 위한

12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

시험식품	PM-EE(SE-EE, 통통마디 추출물)
인체적용시험 의뢰자	(주)파이토코퍼레이션 서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 유전공학특화창업보육센터 207호
인체적용시험 시작일	2018.03.02 (첫 인체적용시험대상자 스크리닝일)
인체적용시험 종료일	2018.12.28 (마지막 인체적용시험대상자 시험완료일)
인체적용시험 책임자	김만호 (서울대학교병원 신경과 교수)
인체적용시험 실시기관	서울대학교병원 (서울특별시 종로구 대학로 101)
인체적용시험 결과보고서 작성일	2019.01.22

본 인체적용시험은 국제 임상시험관리기준(ICH GCP)에 준하여 시행되었습니다.

본 보고서에 포함된 모든 정보는 (주)파이토코퍼레이션의 서면 동의없이 공개될 수 없습니다.

4.2. 인체적용시험 시험자 및 담당자

4.2.1. 인체적용시험 책임자

실시기관명	소 속	성명
서울대학교병원	신경과	김만호 교수

4.2.2. 인체적용시험 공동연구자

실시기관명	소 속	성명
서울대학교병원	신경과	신용원 전임의
	신경과	정혜연 전임의
	신경과	신은경 연구원

4.2.3. 인체적용시험 담당자

실시기관명	소 속	성명
서울대학교병원	신경과	김다은 연구원
	신경과	심지영 연구원
	신경과	정예슬 연구원
	신경과	한성주 연구원

4.3. 인체적용시험 의뢰자

파이토코퍼레이션㈜

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 유전공학특화창업보육센터 207호

4.4. 인체적용시험 수탁기관 (Contract Research Organization, CRO)

네오뉴트라㈜

서울시 종로구 대학로 44(효제동 20) 우일빌딩 3, 4층

8.1.2.2. 인체적용시험계획서 위반에 대한 처리

본 인체적용시험의 시험책임자와 시험담당자는 인체적용시험계획서의 위반이 발생하지 않도록 인체적용시험계획서에 대해 충분히 숙지하고 철저히 이행하였다. 본 인체적용시험에서 인체적용시험대상자는 처방된 인체적용시험용 식품을 지시된 사용방법을 준수하여 섭취하도록 교육하였다. 인체적용시험용 식품의 정확한 사용과 방문 일정 준수를 위하여 시험담당자는 인체적용시험계획서에서 정한 방문 계획에 따라 외래 방문할 수 있도록 적절한 조치, 예컨대 차기 방문시간에 대한 서면 통보나 전화 모니터링 등을 필히 실시하였다. 반면, 부득이하게 발생된 인체적용시험계획서 위반 사항에 대해서는 다음에 따라 처리하였다.

중대한 인체적용시험계획서 위반의 경우, 예컨대, 인체적용시험대상자 중지/탈락 기준에 해당하거나, 인체적용시험대상자 선정/제외기준 위반, 동의서 미취득, 인체적용시험용 식품을 섭취하지 않은 경우 등 인체적용시험대상자의 안전과 인체적용시험 결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위반의 경우 해당 인체적용시험대상자를 시험자와 협의 후 인체적용시험에서 탈락처리(Drop-out) 하도록 하였다.

기타 경미한 위반 사항은 위반 또는 지연 정도와 사유를 정확히 기재하고 결과분석 시 인체적용시험에 영향을 주었는지 고찰하였다.

8.2. 관찰항목, 임상검사 항목 및 방법

8.2.1. 관찰항목

8.2.1.1. 인체적용시험대상자 동의 및 인구학적 조사

인체적용시험에 들어가기 전, 본 시험의 목적과 내용에 대하여 인체적용시험대상자(혹은 법정대리인)에게 상세히 설명하였고, 서면 동의를 받았다. 서면 동의는 인체적용시험대상자(또는 법정 대리인)가 자의로 서명하였다. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사하였다.

인구학적 조사의 기록사항은 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 음주여부, 운동여부, 흡연여부, 스트레스 자각 정도였다.

8.1.2.2. 인체적용시험계획서 위반에 대한 처리

본 인체적용시험의 시험책임자와 시험담당자는 인체적용시험계획서의 위반이 발생하지 않도록 인체적용시험계획서에 대해 충분히 숙지하고 철저히 이행하였다. 본 인체적용시험에서 인체적용시험대상자는 처방된 인체적용시험용 식품을 지시된 사용방법을 준수하여 섭취하도록 교육하였다. 인체적용시험용 식품의 정확한 사용과 방문 일정 준수를 위하여 시험담당자는 인체적용시험계획서에서 정한 방문 계획에 따라 외래 방문할 수 있도록 적절한 조치, 예컨대 차기 방문시간에 대한 서면 통보나 전화 모니터링 등을 필히 실시하였다. 반면, 부득이하게 발생된 인체적용시험계획서 위반 사항에 대해서는 다음에 따라 처리하였다.

중대한 인체적용시험계획서 위반의 경우, 예컨대, 인체적용시험대상자 중지/탈락 기준에 해당하거나, 인체적용시험대상자 선정/제외기준 위반, 동의서 미취득, 인체적용시험용 식품을 섭취하지 않은 경우 등 인체적용시험대상자의 안전과 인체적용시험 결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위반의 경우 해당 인체적용시험대상자를 시험자와 협의 후 인체적용시험에서 탈락처리(Drop-out) 하도록 하였다.

기타 경미한 위반 사항은 위반 또는 지연 정도와 사유를 정확히 기재하고 결과분석 시 인체적용시험에 영향을 주었는지 고찰하였다.

8.2. 관찰항목, 임상검사 항목 및 방법

8.2.1. 관찰항목

8.2.1.1. 인체적용시험대상자 동의 및 인구학적 조사

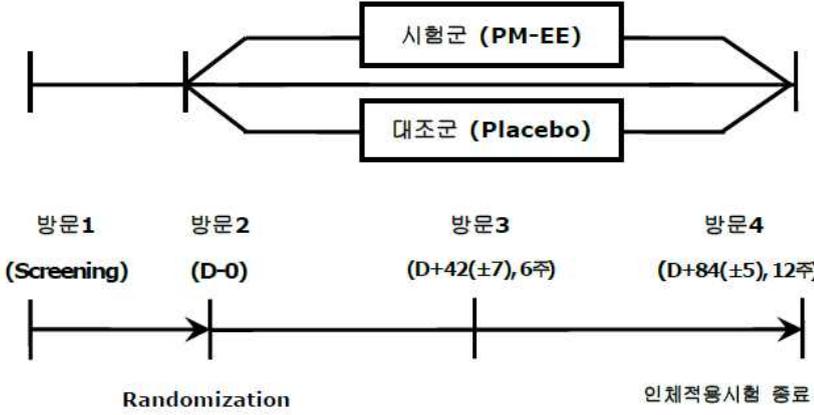
인체적용시험에 들어가기 전, 본 시험의 목적과 내용에 대하여 인체적용시험대상자(혹은 법정대리인)에게 상세히 설명하였고, 서면 동의를 받았다. 서면 동의는 인체적용시험대상자(또는 법정 대리인)가 자의로 서명하였다. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사하였다.

인구학적 조사의 기록사항은 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 음주여부, 운동여부, 흡연여부, 스트레스 자각 정도였다.

	<p>3) 활력징후(맥박, 혈압), 체중</p> <p>4) 심전도검사</p>
통계분석방법	<p>통계분석은 SAS® (Version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석하였다.</p> <p>1. 유효성</p> <p>1) 1차 유효성 평가 변수 분석</p> <p>1차 유효성 평가 변수인 ADAS-cog 총점의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 정규성에 위배되는 경우 Wilcoxon rank sum test를 실시하였다.</p> <p>2) 2차 유효성 평가 변수 분석</p> <p>2차 유효성 평가변수인 ADAS-cog 기억력, ADAS-K, K-CWST, ADCS-ADL, SGDS, CERAD-K의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 정규성에 위배되는 경우 Wilcoxon rank sum test를 실시하였다.</p> <p>2. 안전성</p> <p>1) 이상반응</p> <p>인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 되었으며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가하였다.</p> <p>각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.</p> <p>2) 임상병리검사</p>

1. 인체적용시험 결과보고서 요약

인체적용시험 제목	경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 PM-EE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 계획서 번호	Protocol No.: PHC_PM-EE Version No.: 2.0
인체적용시험 실시기관	서울대학교병원 (서울특별시 종로구 대학로 101)
인체적용시험 의뢰자	㈜파이토코퍼레이션 서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 유전공학특화창업보육센터 207호
인체적용시험 책임자	김만호 (서울대학교병원 신경과 교수)
인체적용시험 공동연구자	신용원 (서울대학교병원 신경과 전임의) 정혜연 (서울대학교병원 신경과 전임의) 신은경 (서울대학교병원 신경과 연구원)
인체적용시험 기간	인체적용시험 시작일: 2018.02.28 (첫 인체적용시험대상자 스크리닝일) 인체적용시험 종료일: 2018.12.28 (마지막 인체적용시험대상자 시험완료일)
단계 및 디자인	단 계 : 기타 (건강기능식품) 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험 대상자	만 50세 이상~만 85세 이하의 경도인지저하자
인체적용시험 목적	만 50세 이상~만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 PM-EE(SE-EE, 통통마디추출물)를 섭취했을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
인체적용시험용 식품	시험식품: PM-EE(SE-EE, 통통마디추출물) 대조식품: Placebo
인체적용시험용 식품 섭취방법	<ul style="list-style-type: none"> 시험군 : 1일 2회, 1회 2정을 아침, 저녁 식후에 섭취 (통통마디추출물로써 600mg/day) 대조군(placebo): 시험군과 동일한 방법으로 섭취

<p>인체적용시험 방법</p>	 <p>인체적용시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 하였다. 배정된 인체적용시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취하였다.</p>												
<p>대상자 수</p>	<p>● 계획된 인체적용시험대상자 수:</p> <table border="1" data-bbox="422 974 1340 1164"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>총 시험대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수(PP Set)</td> <td>24</td> <td>24</td> <td>48</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(20%) 고려예수</td> <td>30</td> <td>30</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>		시험군	대조군	총 시험대상자 수	최종 평가 레수(PP Set)	24	24	48	Drop-out(20%) 고려예수	30	30	60
	시험군	대조군	총 시험대상자 수										
최종 평가 레수(PP Set)	24	24	48										
Drop-out(20%) 고려예수	30	30	60										
<p>선정기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 만 50세 이상~만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남·녀 K-MMSE 점수가 23점 이상인 자 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자 												
<p>제외기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 악성종양, 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전 치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원 중이거나 퇴원 후 3개월이 경과하지 않은 자 조현병을 앓고 있거나 병력이 있는 자 DSM-V(The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) 주요 우울장애에 해당하는 자 치매, 파킨슨, 뇌경색 등 인지기능 저하가 동반되는 질환이 있는 자 (치매 진단의 기준은 DSM-V에 근거한다.) 												

8.1.1. 시험기간

본 인체적용시험은 방문2를 시작으로 인체적용시험에 참여하는 기간은 총 12주(84일)이었다.

인체적용시험 실시기간은 인체적용시험 승인일로부터 12개월로 계획되었으며, 2018년 2월 28일에 첫 인체적용시험대상자가 스크리닝 되었고, 2018년 3월 8일 첫 인체적용시험대상자가 등록되었다. 마지막 인체적용시험대상자의 마지막 방문은 2018년 12월 28일에 이루어져 총 10개월 동안 시험이 진행되었다.

8.1.2. 인체적용시험 중지 및 탈락기준, 계획서 위반 처리

8.1.2.1. 인체적용시험 중지 및 탈락기준

인체적용시험에 참여하는 모든 인체적용시험대상자의 인체적용시험 완료 여부를 기록하였고, 인체적용시험용 식품 섭취나 관찰이 중단된 경우에는 그 이유를 기록하였다. 인체적용시험이 진행중인 인체적용시험대상자에 대하여 인체적용시험을 중단할 수 있는 경우는 다음과 같았다.

- ① 선정기준/제외기준에 위배된 경우
- ② 인체적용시험대상자에게 중대한 이상 반응(Serious Adverse Events) 혹은 이상반응(Adverse Events)으로 인하여 인체적용시험대상자가 시험 중단을 요구하는 경우
- ③ 섭취 전 검사에서 발견치 못한 전신질환이 발견된 인체적용시험대상자
- ④ 인체적용시험 기간 중 만족스럽지 못한 치료 효과로 인하여 인체적용시험대상자 또는 인체적용시험대상자의 법정 대리인이 인체적용시험 중단을 요구하는 경우
- ⑤ 인체적용시험대상자가 인체적용시험 참가 동의를 철회한 경우
- ⑥ 인체적용시험대상자의 추적이 안 되는 경우
- ⑦ 인체적용시험대상자에게 인체적용시험용 식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우
- ⑧ 인체적용시험 기간 동안 담당의사의 지시 없이 인체적용시험 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우
- ⑨ 시험자의 판단에 의해 인체적용시험의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

	<p>5) 인체적용시험 시작 4주 이내에 치매나 다른 인지기능의 이상으로 약물 (항정신용제, 퇴행성 질환용제, 뇌기능 개선제, 삼환계 항우울제)을 투여한 경험이 있는 자</p> <p>6) 비타민E 제제 1일 투여량이 400 IU 이상이거나 투여량 감소가 불가피할 것으로 예상되는 자</p> <p>7) 인체적용시험 시작 2개월 이내에 Estrogen replacement therapy (극소도포용제 제외)를 투여한 경험이 있는 자</p> <p>8) 인체적용시험 시작 2주 이내에 인지기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자</p> <p>9) 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자</p> <p>10) TSH 0.1 uIU/ml 이하 이거나, 10 uIU/ml 이상인 갑상선 질환자</p> <p>11) Creatinine이 수행기관 정상 상한치의 2배 이상인 자</p> <p>12) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 수행기관 정상 상한치의 3배 이상인 자</p> <p>13) 조절되지 않는 고혈압 환자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준)</p> <p>14) 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자 (공복 혈당 180mg/dl 이상)</p> <p>15) 본 인체적용시험 시작 3개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 인체적용시험에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>16) 시험자에 의해 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자</p>
<p>유효성 평가</p>	<p>• 1차 유효성 평가 변수</p> <p>1) ADAS-cog 총점</p> <p>• 2차 유효성 평가 변수</p> <p>1) ADAS-cog 기억력</p> <p>2) ADAS-K</p> <p>3) K-CWST</p> <p>4) ADCS-ADL</p> <p>5) SGDS</p> <p>6) CERAD-K</p>
<p>안전성 평가</p>	<p>1) 이상반응</p> <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p>

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 one-way ANOVA test를 이용하여 분석하였다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

3) 활력징후(혈압, 맥박), 체중

활력징후(맥박, 혈압), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다.

3) 심전도검사

심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

◎ 약어

ADAS-K-cog	Alzheimer's Disease Assessment Scale-Korean version-cognitive subscale
ADCS-ADL	Alzheimer's Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living
ALT(GPT)	Alanine Aminotransferase
AST(GOT)	Aspartate Aminotransferase
BUN	Blood Urea Nitrogen
CERAD-K	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease-Korean version
CRF	Case Report Form
CRA	Clinical Research Associate
CRO	Contract Research Organization
Hb	Hemoglobin
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
Hct	Hematocrit

3. 윤리적 고려에 대한 기술

3.1. 인체적용시험 관리기준

시험책임자는 계획서에 서명함으로써, 본 인체적용시험 계획서와 KGCP 규정, 국내의 모든 관련 법규와 인체적용시험 수행에 관련된 규칙 및 규정에 따라서 효과적이고 성실하게 연구를 수행할 것을 동의하였다. 이와 관련된 구체적인 사항을 보면, 시험책임자는 KGCP와 국내의 모든 관련 법규, 규정, 규칙에 따라 인체적용시험 관련 문서를 정확히 준비, 관리, 완성하였다. 또한 인체적용시험에 참여하는 각 인체적용시험대상자에 대하여 인체적용시험이 종료되거나 이를 중단하는 경우, 또는 ㈜파이토코퍼레이션의 계약에 의거하여 요구되는 경우에 모든 작업일지 원본과 그 이외에 본 인체적용시험 계획서에서 요구되는 자료들을 ㈜파이토코퍼레이션에게 즉시 제출하도록 하였다. 또한, 실시기관에서는 본 인체적용시험과 관련된 문서를 항상 가용한 상태로 보관하도록 하였다.

3.2. 인체적용시험계획서의 승인

본 인체적용시험은 실시 전, 인체적용시험계획서 및 동의서에 대하여 인체적용시험 실시기관의 독립된 의학연구윤리심의위원회(IRB)의 검토와 승인하에 수행되었다. 서울대학교병원에서 2018년 2월 28일에 최초 인체적용시험대상자의 스크리닝 방문이 시행되었으며, 2018년 3월 8일에 첫 인체적용시험대상자가 등록되었다. 실시기관의 의학연구윤리심의위원회(IRB) 승인일 및 개시모임일과 첫 인체적용시험대상자 스크리닝일 및 등록일을 Table 1에 제시하였다.

실시기관명	승인일	최초 승인된		첫 시험대상자 스크리닝일	첫 시험대상자 등록일
		protocol version	개시모임일		
서울대학교병원	2018.01.24	Ver. 1.2	2018.02.07	2018.02.28	2018.03.08

Table 2. 인체적용시험계획서 변경에 대한 의학연구윤리심의위원회(IRB)의 승인일

실시기관명	승인일	승인된 protocol version	주 변경내용
서울대학교병원	2018.04.25	2.0	선정기준 변경 -연령 하한선 변경 -불필요한 선정기준 삭제 -스크리닝 검사 및 기준 변경

3.3. 인체적용시험대상자 동의

시험자는 인체적용시험에 참여하는 인체적용시험대상자에게 사전에 시험의 성격, 범위, 예상되는 결과 등에 대해 쉽게 이해할 수 있도록 설명한 후 서면으로 참가동의를 획득하였다. 인체적용시험대상자에 대한 설명은 서면 및 구두로 하였으며, 인체적용시험대상자 동의는 시험자 및 인체적용시험대상자의 서명 및 날짜가 함께 기재되었다. 시험자 혹은 시험담당자는 인체적용시험대상자로부터 동의를 얻기 이전에는 인체적용시험을 목적으로 한 특정한 검사를 하지 않도록 하였다. 또한, 인체적용시험대상자 및 시험자의 서명을 받은 인체적용시험대상자 동의서의 사본은 인체적용시험대상자에게 제공하였으며, 원본은 시험자가 보관하도록 하였다.

인체적용시험대상자 동의서에 포함된 내용은 다음과 같았다.

- 인체적용시험의 목적
- 인체적용시험용 식품에 대한 정보 및 안전성
- 시험군 또는 대조군 배정방법
- 인체적용시험대상자가 받게 되는 검사 및 절차
- 인체적용시험대상자 준수 사항
- 본 인체적용시험의 검증되지 않은 실험적인 측면
- 예견되는 위험(부작용)이나 불편사항
- 인체적용시험용 식품의 보관 및 취급 시 주의사항
- 인체적용시험에 참여함으로써 발생하는 보상
- 인체적용시험에 참여함으로써 기대되는 이익
- 인체적용시험대상자의 권리 및 참여 거부 또는 중단

- 인체적용시험 도중 인체적용시험 참여가 중지 또는 탈락되는 사유
- 피해발생 시 보상 및 치료대책
- 자료의 비밀보장
- 인체유래물의 보관 및 폐기 방법
- 서명
- 인체적용시험 예상 인체적용시험대상자 수 및 참여기간
- 인체적용시험 관련/책임자

인체적용시험대상자 동의서는 각 인체적용시험실시기관의 의학연구윤리심의위원회(IRB)로부터 사전 승인을 받았다. 인체적용시험대상자 동의서 양식은 시험의뢰자가 시험책임자에게 공급하였으며, 의뢰자로부터 위임받은 모니터요원은 인체적용시험의 모든 절차를 시작하기 전에 인체적용시험대상자가 동의서에 서명하였음을 확인하였다.

3.4. 비밀보장

모든 인체적용시험대상자명은 비밀로 하고 시험 도중 부여한 번호로 기록 및 평가 시 확인하도록 하였다. 인체적용시험대상자에게 모든 시험 자료가 컴퓨터에 저장되고 엄격히 비밀 사항으로 다루어진다는 것을 알려주었다.

4. 시험자 및 실시기관 조직

시험자 및 실시기관 조직을 아래에 기술하였다.

4.1. 인체적용시험 실시기관

본 인체적용시험에는 1개 기관이 참여했으며, 참여기관은 아래와 같았다.

실시기관명	주소
서울대학교병원	서울특별시 종로구 대학로 101

4.2. 인체적용시험 시험자 및 담당자

4.2.1. 인체적용시험 책임자

실시기관명	소 속	성명
서울대학교병원	신경과	김만호 교수

4.2.2. 인체적용시험 공동연구자

실시기관명	소 속	성명
서울대학교병원	신경과	신용원 전임의
	신경과	정혜연 전임의
	신경과	신은경 연구원

4.2.3. 인체적용시험 담당자

실시기관명	소 속	성명
서울대학교병원	신경과	김다은 연구원
	신경과	심지영 연구원
	신경과	정예솔 연구원
	신경과	한성주 연구원

4.3. 인체적용시험 의뢰자

파이토코퍼레이션㈜

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 유전공학특화창업보육센터 207호

4.4. 인체적용시험 수탁기관 (Contract Research Organization, CRO)

네오뉴트라㈜

서울시 종로구 대학로 44(효제동 20) 우일빌딩 3, 4층

예방효과가 우수한 건강기능식품이 개발된다면, 국민의료비 부담을 감소시킴으로써 개개인과 국가의 의료비 부담을 줄여주는 역할을 할 수 있을 것이라 기대된다.

통통마디는 식품의약품안전처 식품의 기준 및 규격의 "식품에 사용할 수 있는 원료 목록"에 수록되어 있는 원료로써, 유럽 식품안전위원회(EC Food & Safety)에서 규정하는 안전한 식품 등급인 그린레벨을 받았으며, 예로부터 유럽에서도 일반 식품재료로 널리 사용되어 왔다.

통통마디추출물(PM-EE, SE-EE)은 통통마디의 건조분말에 함유되어 있는 염화나트륨을 저온냉수탈염법을 통하여 1% 이하로 탈염 한 후 효소로 가수분해하고 추출한 원료로서, scopolamine으로 기억력 감퇴를 유도한 동물시험에서 수동회피실험(Passive Avoidance Test)과 Y-maize 실험을 통하여 기억력 및 인지능 향상 효과를 확인하였다. 이러한 효과는 해마 신경세포내 산화스트레스, 지질과산화 및 염증억제와 BDNF/CREB 활성화를 통한 해마신경세포 재생 및 신경형성을 통한 작용기전임을 확인하게 되었다.

따라서 본 인체적용시험에서는 경도인지저하자를 대상으로 전임상에서 효과가 확인된 통통마디추출물(PM-EE, SE-EE)이 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성과 안전성을 확인하고자 하였다.

5. 인체적용시험의 목적 및 배경

5.1 인체적용시험의 목적

본 인체적용시험은 만 50세 이상~만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 PM-EE(SE-EE, 통통마디추출물)를 섭취했을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.

5.2 인체적용시험의 배경

뇌의 지능(Intelligence)을 이용하여 문제를 인식하고 해결할 수 있는 방법 또는 과정을 생각해내는 능력을 인지능력(Cognition)이라고 할 수 있으며 문제를 해결하는 방법을 생각해내기 위해서는 과거의 체험 등을 응용하게 되는데 이 때 과거의 체험을 기억해 낼 수 있는 기억력(Memory)이 필요하게 된다.

인지(라틴어:Cognoscere로 아는 것 개념화하는 것 또는 인식하는 것)란 정보를 가공하는 과정 지식을 적용하는 것 및 적용사례 바꾸는 능력으로 정의될 수 있으며 사용하는 분야에 따라 인지 력 의 의미가 달라질 수 있다. 그 예로 심리학과 인지과학에서는 인지는 개인의 정보 처리 능력을 의미하며 인지력의 발달된 다른 개념으로 개인의 심리상태 집단 및 조직 간의 사회적 연결기능을 포함한다.

2013년 통계청이 보도한 자료에 의하면 2013년 총 인구에서 65세이상 고령자가 차지하는 비율은 12.2%로 1970년 2.2%에서 지속적으로 증가하여 2030년 24.3%, 2050년 37.4% 수준에 이를 것으로

예측된다.

특히 85세 이상 초고령 인구 비율은 2013년 0.9%에서 2030년 2.5%, 2050년 7.7%로 크게 증가할 것으로 전망된다.

고령화로 인해 자연적으로 또는 치매 등의 퇴행성 질환에 의해 인지기능이 감퇴된 경우 본인의 사회 활동 뿐 아니라 주변인들의 생활에 많은 장애를 초래한다.

치매를 예방하기 위해서는 장기적인 복용이 가능해야 하나, 현재 치매치료제는 치료 효과는 거의 없으면서 부작용은 심하여 장기적인 복용이 어렵다. 따라서 장기적인 복용이 가능하면서, 치료 및

예방효과가 우수한 건강기능식품이 개발된다면, 국민의료비 부담을 감소시킴으로써 개개인과 국가의 의료비 부담을 줄여주는 역할을 할 수 있을 것이라 기대된다.

통통마디는 식품의약품안전처 식품의 기준 및 규격의 "식품에 사용할 수 있는 원료 목록"에 수록되어 있는 원료로써, 유럽 식품안전위원회(EC Food & Safety)에서 규정하는 안전한 식품 등급인 그린레벨을 받았으며, 예로부터 유럽에서도 일반 식품재료로 널리 사용되어 왔다.

통통마디추출물(PM-EE, SE-EE)은 통통마디의 건조분말에 함유되어 있는 염화나트륨을 저온냉수탈염법을 통하여 1% 이하로 탈염 한 후 효소로 가수분해하고 추출한 원료로서, scopolamine으로 기억력 감퇴를 유도한 동물시험에서 수동회피실험(Passive Avoidance Test)과 Y-maze 실험을 통하여 기억력 및 인지능 향상 효과를 확인하였다. 이러한 효과는 해마 신경세포내 산화스트레스, 지질과산화 및 염증억제와 BDNF/CREB 활성화를 통한 해마신경세포 재생 및 신경형성을 통한 작용기전임을 확인하게 되었다.

따라서 본 인체적용시험에서는 경도인지저하자를 대상으로 전임상에서 효과가 확인된 통통마디추출물(PM-EE, SE-EE)이 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성과 안전성을 확인하고자 하였다.

6. 무작위배정

본 인체적용시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정 하여 평행시험으로 진행하였으며, 필요한 인체적용시험대상자 수는 탈락률(20%)을 고려하여 각 군당 30명씩 총 60명이었다.

방문2(Baseline Visit, Week 0)에서 선정/제외기준에 적합한 모든 인체적용시험대상자에 대하여 인체적용시험기관에 따라 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정하였다.

섭취 군간의 균형 있는 무작위배정을 위하여 각 군의 인체적용시험대상자 수의 비는 1:1로 동일하게 하였다.

무작위배정표는 SAS[®] system의 Randomization program으로 발생된 난수(A, B 의 Random number)의 순열을 인체적용시험대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS[®]를 통해 인체적용시험 전에 미리 고안하여 재현 가능하도록 생성하였다. 의뢰자는 인체적용시험용 식품 포장 시 각 인체적용시험기관의 무작위배정표에 따라 인체적용시험용 식품 라벨을 부착한 후, 인체적용시험 시작 전에 인체적용시험기관에 공급하였다.

인체적용시험기관에서는 동의서에 서명하고, 스크리닝 검사를 시행하는 인체적용시험대상자에게 다음의 스크리닝 번호를 부여하였다.

AA-S ZZZ {AA: 기관코드, S: Screening의 첫글자, ZZZ: 일련번호(001, 002~)}

이후, 방문2에서 해당 인체적용시험대상자가 본 인체적용시험의 인체적용시험대상자로 적합한 경우에 다음의 인체적용시험대상자 등록번호를 순서대로 부여하였고, 이때 일련번호와 같은 번호의 인체적용시험용 식품을 섭취하도록 하였다.

AA-R ZZZ {AA: 기관코드, R: Randomization의 첫글자, ZZZ: 일련번호(001, 002~)}

인체적용시험기관 코드는 다음과 같았다.

서울대학교병원 : SN

6.1. 이중눈가림

이중눈가림 유지를 위하여 본 인체적용시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 인체적용시험 책임자가 봉인된 상태로 관리하였으며, 중대한 약물이상반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않았다. 본 인체적용시험에서는 시험기간 중 눈가림 해제가 발생하지 않았다. 인체적용시험 시험자는 선정된 인체적용시험대상자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 인체적용시험대상자에게 공급하였으며, 인체적용시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 눈가림을 유지하였다.

7. 인체적용시험 계획

7.1. 인체적용시험의 설계

본 인체적용시험은 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험으로 디자인되었다. 자의에 인체적용시험 동의서에 서명한 사람이 본 인체적용시험에 참가하면 인구학적 조사, 병력 조사, 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후, 신체계측, 임상병리검사, 심전도검사, K-MMSE 검사를 실시하여 선정/제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 인체적용시험대상자 등록이 이루어졌다. 시험군 또는 대조군으로 배정된 인체적용시험대상자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하게 되었다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 하였다.

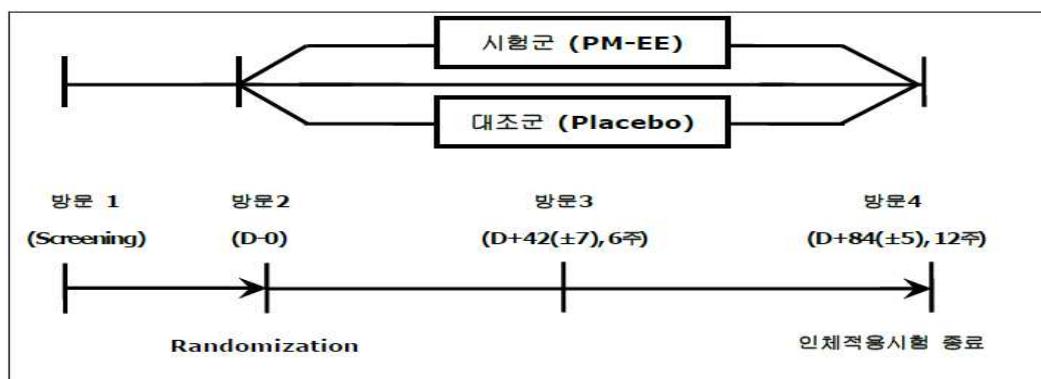


Figure 1. 인체적용시험 개요

7.1.2. 시험기간

본 인체적용시험은 방문2를 시작으로 인체적용시험에 참여하는 기간은 총 12주(84일)이었다.

인체적용시험 실시기간은 인체적용시험 승인일로부터 12개월로 계획되었으며, 2018년 2월 28일에 첫 인체적용시험대상자가 스크리닝 되었고, 2018년 3월 8일 첫 인체적용시험대상자가 등록되었다. 마지막 인체적용시험대상자의 마지막 방문은 2018년 12월 28일에 이루어져 총 10개월 동안 시험이 진행되었다.

7.1.3. 인체적용시험 중지 및 탈락기준, 계획서 위반 처리

7.1.3.1. 인체적용시험 중지 및 탈락기준

인체적용시험에 참여하는 모든 인체적용시험대상자의 인체적용시험 완료 여부를 기록하였고, 인체적용시험용 식품 섭취나 관찰이 중단된 경우에는 그 이유를 기록하였다. 인체적용시험이 진행중인 인체적용시험대상자에 대하여 인체적용시험을 중단할 수 있는 경우는 다음과 같았다.

- ① 선정기준/제외기준에 위배된 경우
- ② 인체적용시험대상자에게 중대한 이상 반응(Serious Adverse Events) 혹은 이상반응(Adverse Events)으로 인하여 인체적용시험대상자가 시험 중단을 요구하는 경우
- ③ 섭취 전 검사에서 발견치 못한 전신질환이 발견된 인체적용시험대상자
- ④ 인체적용시험 기간 중 만족스럽지 못한 치료 효과로 인하여 인체적용시험대상자 또는 인체적용시험대상자의 법정 대리인이 인체적용시험 중단을 요구하는 경우
- ⑤ 인체적용시험대상자가 인체적용시험 참가 동의를 철회한 경우
- ⑥ 인체적용시험대상자의 추적이 안 되는 경우
- ⑦ 인체적용시험대상자에게 인체적용시험용 식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우
- ⑧ 인체적용시험 기간 동안 담당사의 지시 없이 인체적용시험 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우
- ⑨ 시험자의 판단에 의해 인체적용시험의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

7.1.3.2. 인체적용시험계획서 위반에 대한 처리

본 인체적용시험의 시험책임자와 시험담당자는 인체적용시험계획서의 위반이 발생하지 않도록 인체적용시험계획서에 대해 충분히 숙지하고 철저히 이행하였다. 본 인체적용시험에서 인체적용시험대상자는 처방된 인체적용시험용 식품을 지시된 사용방법을 준수하여 섭취하도록 교육하였다. 인체적용시험용 식품의 정확한 사용과 방문 일정 준수를 위하여 시험담당자는 인체적용시험계획서에서 정한 방문 계획에 따라 외래 방문할 수 있도록 적절한 조치, 예컨대 차기 방문시간에 대한 서면 통보나 전화 모니터링 등을 필히 실시하였다. 반면, 부득이하게 발생된 인체적용시험계획서 위반 사항에 대해서는 다음에 따라 처리하였다.

중대한 인체적용시험계획서 위반의 경우, 예컨대, 인체적용시험대상자 중지/탈락 기준에 해당하거나, 인체적용시험대상자 선정/제외기준 위반, 동의서 미취득, 인체적용시험용 식품을 섭취하지 않은 경우 등 인체적용시험대상자의 안전과 인체적용시험 결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위반의 경우 해당 인체적용시험대상자를 시험자와 협의 후 인체적용시험에서 탈락처리(Drop-out) 하도록 하였다. 기타 경미한 위반 사항은 위반 또는 지연 정도와 사유를 정확히 기재하고 결과분석 시 인체적용시험에 영향을 주었는지 고찰하였다.

7.2. 관찰항목, 임상검사 항목 및 방법

7.2.1. 관찰항목

7.2.1.1. 인체적용시험대상자 동의 및 인구학적 조사

인체적용시험에 들어가기 전, 본 시험의 목적과 내용에 대하여 인체적용시험대상자(혹은 법정대리인)에게 상세히 설명하였고, 서면 동의를 받았다. 서면 동의는 인체적용시험대상자(또는 법정 대리인)가 자의로 서명하였다. 서면 동의를 받는 순서에 따라 스크리닝 번호를 부여한 후 인구학적 정보를 조사하였다.

인구학적 조사의 기록사항은 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 음주여부, 운동여부, 흡연여부, 스트레스 자각 정도였다.

7.2.1.2. 병력 및 약물투여력 조사, 병용약물 및 병용요법 확인

방문1, 2에 문진과 과거 진료 기록 점검 및 면담 등을 통하여 조사하였다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 6개월 이내 병력을 상세히 조사하여 기록하였다. 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 지속여부, 임상적 의미 등을 기재하였다. 약물투여력은 스크리닝 시점을 기준으로 3개월 이내의 선행약물을 모두 확인하였다.

인체적용시험용 식품 섭취 이후 방문3과 방문4에서 병용약물 및 병용요법을 확인하였다.

7.2.1.3. 이학적검사

방문1, 3, 4에서 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 인체적용시험대상자의 임상적 상태를 근거로 이학적검사를 실시하였다.

1) 활력징후 (혈압, 맥박)

방문1, 3, 4 에서 혈압과 맥박을 측정하여 기록한다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 인체적용시험담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다하였다.

2) 식사지도 및 식이조사

인체적용시험대상자로 적합하다고 판정될 경우, 인체적용시험기간 동안 인체적용시험대상자에게 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 신체활동량, 식이섭취량을 유지하도록 하였고, 통통마디 관련 식품 및 건강기능식품을 정기적으로 먹거나 마시지 않도록 권고하였다. 이에 대한 지난 2주일 간의 섭취여부를 방문2에 조사하였다. 또한, 인체적용시험대상자에게 인체적용시험 기간 동안 자신의 식이조사지에 자신이 섭취한 통통마디 관련 식품의 빈도수를 매주 1회 기록하도록 교육하였다.

방문2에서는 인체적용시험대상자의 평상시 식이조사를 위해 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 인체적용시험담당자가 기록하였다.

인체적용시험기간 동안 인체적용시험대상자의 평상시 식이를 조사하기 위해 방문2, 3에 인체적용시험대상자에게 식이조사지를 배부하였다. 인체적용시험대상자는 식이조사지에 다음 방문일 전 최근 일주일 중 3일 동안(가능하면 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 식사를 기록하였다. 방문3, 4에 시험담당자는 작성된 인체적용시험대상자의 식이조사지를 확인하였다.

인체적용시험기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 Can pro program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석하였다.

3) 신체계측(신장, 체중)

신장은 방문2에서 측정하며, 체중은 방문2, 3, 4에서 측정하였다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 인체적용시험대상자의 신체계측을 동일한 인체적용시험담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다하였다.

가벼운 옷차림 상태에서 신장은 0.1cm, 체중은 0.1kg 단위까지 반올림하여 측정하였다.

4) 생활습관 지도

방문1, 2, 3에 인체적용시험담당자는 인체적용시험대상자에게 방문 전 음주 및 무리한 운동 등 평소 생활과 다른 행동을 금지하고 충분한 수면 후 방문하도록 교육하였다.

5) 심전도검사

심전도검사는 방문1, 4에 실시하였고, 방문1의 심전도검사는 방문1 기준 3주(21일) 이내의 검사결과가 있을 시 적용이 가능하였다.

결과의 해석은 자격을 갖춘 의사가 실시하였고, 임상적으로 유의한 비정상치는 인체적용시험대상자의 증례기록서 ‘이상반응’ 페이지에 기록하였다. 인체적용시험대상자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과를 네오뉴트라(주) 모니터요원과 상의하도록 하였다.

6) 임상병리검사

방문1, 4에서 임상병리검사를 실시하여 인체적용시험대상자의 전신적인 건강상태를 평가하였다. 시험자는 인체적용시험대상자로 하여금 검사 전 8시간 공복상태로 내원하도록 지시하였다. 방문1 기준 3주(21일) 이내의 검사결과가 있을 시 적용 가능하였으며, 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 임상병리검사 등을 재시행 하였다. 검사 항목에는 다음이 포함되었다.

- 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
- 혈액화학적 검사: Glucose, Uric acid, Total Protein, Albumin, Total bilirubin, AST(GOT), ALT(GPT), ALP, BUN, Creatinine, Total Cholesterol, TSH(TSH는 방문1에서만 실시)
- 소변검사: S·G, pH, Protein, Glucose, Nitrite, Urobilinogen, Ketone, Bilirubin, Occult Blood(RBC), Leucocyte(WBC)

임상적으로 의미가 있는 비정상 임상병리검사 결과는 시험자가 인체적용시험대상자의 증례기록서(CRF) 시험자 의견(Comments)란에 평가를 기재하였고, 시험자가 적절하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하였다. 비정상 임상병리검사 결과치로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 인체적용시험대상자의 증례기록서(CRF)의 ‘이상반응’ 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력하였다.

7) K-MMSE

MMSE는 인지기능 선별 검사로 Folstein등(1975)이 개발한 검사이며, 전세계적으로 가장 널리 사용되고 있다. K-MMSE 검사는 우리나라에서 강연옥 등(1997)22)이 원문 그대로를 번안하여 개발한

검사로 검사 소요시간은 5~10분이며, 검사자는 피검사자와 일대일로 검사를 시행한다. K-MMSE의 구성은 시간에 대한 지남력(5점), 장소에 대한 지남력(5점), 기억등록 (3점), 주의집중 및 계산(5점), 기억회상(3점), 언어능력(8점), 시공간 구성능력(1점)을 측정하는 총 19문항으로 구성되어 있으며 총점은 30점이고, 점수가 낮을수록 인지기능 저하를 의미한다.

8) CERAD-K

인지기능의 포괄적이고 객관적인 평가를 위해 2002년에 표준화한 CERAD-K(Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease-Korean version)⁵⁾에 포함된 신경심리 검사집을 사용하여 평가한다(Lee et al., 2002)²⁾. 이 검사의 평가자간 신뢰도는 Pearson 상관계수가 0.97-1로 매우 높다. 각 검사의 1개월 간격 검사/재검사 신뢰도도 Pearson 상관계수가 0.54-0.98로 상당히 높았다. CERAD-K는 언어유창성 검사, 보스톤 이름대기 검사, 간이 정신상태 검사, 단어목록기억/회상/인식검사, 구성행동 검사, 구성회상 검사, 길 만들기 검사로 구성되어 있어서 언어기능 평가, 전두엽기능 평가, 언어기억력 평가, 공간지각력 평가, 공간기억력 평가, 집중력 평가 등 여러 인지영역을 한 번에 검사할 수 있도록 구성되어 있다. 언어 유창성 검사, 보스톤 이름대기 검사, 단어목록기억/회상/인식 검사, 구성행동 검사, 구성회상 검사의 점수를 합해 총점을 계산하도록 되어 있으며 총점은 100점이다. 본 인체적용시험에서는 기억요인과 관련된 검사인 단어목록기억/회상/인식검사(Word list memory, Word delayed recall, Word recognition)를 통해 인지기능을 평가하며 방문1, 4에 실시하였다.

9) 알츠하이머병 평가척도 (ADAS-K)

치매 환자의 조기 진단과 치매 환자의 질병 진행에 따른 인지기능 저하를 민감하게 평가해 주는 종합적인 인지기능 평가도구이다. ADAS-K(Alzheimer's Disease Assessment Scale-Korean version)는 원래 경미한 인지기능장애를 보이는 치매 환자를 정확하게 감지해 내고, 치매 환자의 시간에 따른 기능 저하 정도를 측정하기 위하여 개발된 평가 도구이며, 최근 치매 치료약물의 인체적용 약물시험에서 인지기능 영역의 인체적용효과를 밝히는 데 표준 평가 도구로써도 사용되고 있다.

본 인체적용시험에서는 원저자 Richard C. Mohs³⁾의 개정을 따라 ADAS-non cog의 한 항목을 추가한 ADAS-K를 측정한다. ADAS-K는 원저자의 허락을 받은 후, 한국의 문화와 언어의 특성에 맞도록 제작되었다. 척도 표준화 연구에서 ADAS-K-cog는 높은 신뢰도와 타당도를 보였다⁸⁾. 한국어판 본 척도 ADAS-K는 인지기능 평가도구로써, 인지 소척도 ADAS-cog(Cognitive subscale of the ADAS)의 11개 항목에 비인지 소척도 ADAS-non cog(Noncognitive subscale of the ADAS)의 1개 항목을 추가하여 12개 항목으로 구성되어 있다. 점수범위는 0~75점이며, 각 항목의 오류 점수를 합산하므로 고득점을 할수록 장애 정도가 심함을 의미한다.

인지 소척도 ADAS-cog는 기억력 4항목(단어재생, 지남력, 단어재인, 검사지시), 언어능력 5항목(언어 구사능력, 언어의 청각적 이해, 대화 중 언어발견곤란, 구두 명령 따르기, 손가락 및 물건이름 말하기), 수행능력 2항목(구성행위, 관념행동)으로 3개의 영역으로 구성되어 있다. 비인지 소척도 ADAS-non cog는 관찰을 통하여 행동을 평가하는 1개 항목(집중력/주의산만)으로 구성되어 있으며, 방문2, 4에 실시하였다.

10) Stroop Test (Korean-Color Word Stroop Test, K-CWST)

스트룹(stroop) 과제는 집행기능 중 주로 억제기능을 측정하는 것으로 알려져 있다. K-CWST는 단어읽기와 색깔읽기 조건 2장의 카드로 구성되어 있다. 검사 카드는 빨강, 노랑, 파랑, 검정의 네 가지 색으로 빨강, 노랑, 파랑, 검정이라고 쓰여 있으며 2조건의 카드 모두 글자와 색깔은 일치하지 않는다. 단어읽기 조건에서는 카드에 쓰인 글자를 읽어야 하고, 색깔읽기 조건에서는 글자의 색깔을

말해야 한다. 각 조건은 112개의 자극으로 구성되어 있으며, 반응수 및 시간을 기록한다⁴⁾. 방문2, 4에 실시하였다.

11) 일상생활활동 평가 (ADCS-ADL)

알츠하이머병의 인체적용시험에 사용할 목적으로 개발된 현재 사용하고 있는 기능평가 척도 중 하나인 ADCS-ADL(Alzheimer's Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living)^{5, 6)}을 사용하여 일상생활활동을 평가한다. ADCS-ADL은 식사, 보행, 화장실에서 대소변의 해결, 목욕하기, 몸단장, 옷입기, 전화 사용, 쇼핑(장보기), 여가활동 등 23개 문항으로 일상생활에 필요한 기술과 기능성을 측정하도록 되어있으며, 방문2, 4에 실시하였다.

12) 노인우울척도 (SGDS)

방문2, 4에 실시하는 Yesavage 등⁷⁾에 의해 개발된 30문항의 자기 보고형 우울척도로써, 예/아니오로 간단히 대답할 수 있는 응답방식의 채택과 우울증의 신체 증상을 묻는 문항이 포함되지 않는 등의 특징들을 가지고 있어서 노인층에서의 우울증상을 선별하고 측정하는데 유용하게 사용되고 있다. GDS(Geriatric Depression Scale)는 지역사회 대상군, 정신건강의학과 입원 환자군 등 다양한 노인 인체적용군이나 지역사회 노인 대상군에서 우울증상 측정 도구로써의 신뢰도와 진단적 타당도가 널리 입증되어 왔다. SGDS(Short form of Geriatric Depression Scale)는 Sheikh와 Yesavage⁸⁾가 기존의 GDS에 대한 진단적 타당도 연구를 바탕으로 해서 GDS의 문항 중에서 우울증상과 상관관계가 가장 높은 문항을 15문항 선택해서 축소 제작하였는데 GDS와 SGDS가 상당히 높은 상관관계가 있음을 보고하였다($r = 0.84, p < 0.001$). 이후 다른 연구들에서 다소 차이는 있지만 두 도구가 서로 밀접한 상관관계가 있고, 또한 SGDS가 GDS의 적절한 대안이 될 수 있다고 보고되었으며, 가장 적절한 절단점은 6~7점으로 추정되었다⁹⁻¹¹⁾. SGDS 문항 모두가 GDS문항에 포함되어 있으므로 본 인체적용시험에서는 배재남과 조맹제(1999)¹²⁾등 많은 연구자들이 국내에서 타당화한 한국어판 GDS 중 SGDS 문항만을 사용하였다.

13) 선정기준/제외기준 확인(인체적용시험대상자 적합성 평가)

방문1, 2에 이루어진 인체적용시험대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후, 심전도검사, 임상병리검사, K-MMSE 검사 결과를 종합하여 6.1.1항 및 6.1.2항의 선정기준/제외기준에 적합한 인체적용시험대상자 인지를 평가하여 기록하였다.

14) 이상반응 점검

이상반응에 대한 정보는 인체적용시험 기간 동안의 각 방문에서 인체적용시험대상자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색하였다. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 인체적용시험대상자가 자발적으로 보고하거나 이학적검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인할 수 있었다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계, 인체적용시험용 식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함되었다.

15) 무작위 배정 및 섭취

방문2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 인체적용시험대상자를 대상으로

시험군 또는 대조군으로 무작위배정하였고, 무작위배정번호에 따라 인체적용시험용 식품을 배부하여 섭취하도록 하였다.

16) 순응도 확인

시험식품 및 대조식품의 섭취상황에 대하여 시험식품/대조식품 처방 후 인체적용시험 담당자가 기록하였고, 방문3, 4에 시험대상자가 지참하고 온 복용일지와 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 인체적용시험 담당자가 점검하였다. ‘시험/대조식품 처방 날~ 다음방문 전날’ 섭취량을 원칙으로 하였으며, 순응도 확인시 섭취율(%)은 반올림하여 소수점 1자리까지 표기하였다.

$$* \text{섭취 순응도}(\%) = \text{실제 섭취한 식품 수} / \text{섭취해야 하는 식품 수} \times 100$$

7.3. 관찰 검사 방법 (방문별)

7.3.1. 1차 방문 ((Screening Visit, Week -2)

본 인체적용시험에 참가하도록 인체적용시험대상자는 인체적용시험에 대한 설명을 들었고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 인체적용시험대상자를 인체적용시험에 참여 시키기 전에 인체적용시험 과정을 설명하고, 인체적용시험대상자에게 서면 동의서를 받았다.
- ② 인체적용시험대상자는 스크리닝 번호를 지정 받았다.
- ③ 인구학적 조사를 실시하였다.
- ④ 병력 및 약물투여력 조사를 실시하였다.
- ⑤ 이학적검사를 실시하였다.
- ⑥ 활력징후(혈압, 맥박)를 측정하였다.
- ⑦ 임상병리검사를 실시하였다.
- ⑧ 심전도검사를 실시하였다.
- ⑨ K-MMSE 검사를 실시하였다.
- ⑩ CERAD-K 검사를 실시하였다.
- ⑪ 생활습관지도를 실시하였다.
- ⑫ 1차 인체적용시험대상자의 적합성 평가 후 다음 방문 일을 지정해 주었다.

7.3.2. 2차 방문 (Baseline Visit, Week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 병력 및 약물투여력 변화를 조사하여 기록하였다.
- ② 신장, 체중을 측정하였다.
- ③ ADAS-K 검사를 실시하였다.
- ④ K-CWST 검사를 실시하였다.
- ⑤ ADCS-ADL 검사를 실시하였다.
- ⑥ SGDS 검사를 실시하였다.
- ⑦ 식사지도 및 식이조사를 실시하였다.

- ⑧ 생활습관지도를 실시하였다.
- ⑨ 1, 2차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 평가하였다.
- ⑩ 무작위배정을 하였다.
- ⑪ 인체적용시험용 식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육하였다.
- ⑫ 인체적용시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

7.3.3 3차 방문 (Interim Visit, Week 6)

3차 방문은 2차 방문일 이후 42일(±7) 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 이상반응 유무를 확인하였다.
- ② 병용약물 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- ③ 이학적검사를 실시하였다.
- ④ 활력징후(혈압, 맥박) 및 체중을 측정하였다.
- ⑤ 식사지도 및 식이조사를 실시하였다.
- ⑥ 생활습관지도를 실시하였다.
- ⑦ 섭취순응도를 확인하였다.
- ⑧ 인체적용시험용 식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 설명하였다.
- ⑨ 인체적용시험대상자의 다음 방문일을 지정하였다.

7.3.4. 4차 방문 (Closing Visit, Week 12)

마지막 4차 방문은 2차 방문일 이후 84일(±5) 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- ① 이상반응 유무를 확인하였다.
- ② 병용약물 및 병용요법 변화를 확인하였다.
- ③ 이학적검사를 실시하였다.
- ④ 활력징후(혈압, 맥박) 및 체중을 측정하였다.
- ⑤ 임상병리검사를 실시하였다.
- ⑥ 심전도검사를 실시하였다.
- ⑦ ADAS-K 검사를 실시하였다.
- ⑧ K-CWST 검사를 실시하였다.
- ⑨ ADCS-ADL 검사를 실시하였다.
- ⑩ SGDS 검사를 실시하였다.
- ⑪ CERAD-K 검사를 실시하였다.
- ⑫ 식이조사를 실시하였다.
- ⑬ 섭취순응도를 확인하였다.

7.4. 인체적용시험대상자의 선정기준, 제외기준

7.4.1. 인체적용시험대상자

만 50세 이상~만 85세 이하의 경도인지저하자

7.4.1.1 선정기준

다음 기술된 조건에 모두 부합되는 사람을 시험대상자로 선정하였다.

- 1) 만 50세 이상~만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남·녀
- 2) K-MMSE 점수가 23점 이상인 자
- 3) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자

7.4.1.2. 제외기준

$$n = \frac{2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2}{\Delta^2}$$

12주 섭취 후 ADAS-cog 변화	Treatment(n=24)		Placebo(n=48)
	평균변화	-3.58	1.38
합동표준편차	6.11		

$$n = \frac{2 \times (1.96 + 0.84)^2 \times 6.11^2}{4.96^2}$$

다음 기술된 조건에 한 가지 이상 해당되는 사람은 시험대상자에서 제외하였다.

- 1) 악성종양, 중증의 뇌혈관질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전 치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원 중이거나 퇴원 후 3개월이 경과하지 않은 자
- 2) 조현병을 앓고 있거나 병력이 있는 자
- 3) DSM-V(The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) 주요 우울장애에 해당하는 자
- 4) 치매, 파킨슨, 뇌경색 등 인지기능 저하가 동반되는 질환이 있는 자(치매 진단의 기준은 DSM-V에 근거한다.)
- 5) 인체적용시험 시작 4주 이내에 치매나 다른 인지기능의 이상으로 약물(항정신용제, 퇴행성 질환용제, 뇌기능 개선제, 삼환계 항우울제)을 투여한 경험이 있는 자
- 6) 비타민E 제제 1일 투여량이 400 IU 이상이거나 투여량 감소가 불가피할 것으로 예상되는 자
- 7) 인체적용시험 시작 2개월 이내에 Estrogen replacement therapy(국소 도포용제 제외)를 투여한 경험이 있는 자
- 8) 인체적용시험 시작 2주 이내에 인지기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자
- 9) 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자
- 10) TSH 0.1 uIU/ml 이하이거나, 10 uIU/ml 이상인 갑상선 질환자
- 11) Creatinine이 수행기관 정상 상한치의 2배 이상인 자

- 12) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 수행기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- 13) 조절되지 않는 고혈압 환자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준)
- 14) 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자 (공복 혈당 180mg/dl 이상)
- 15) 본 인체적용시험 시작 3개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 인체적용시험에 참여할 계획이 있는 자
- 16) 시험자에 의해 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자

7.4.2. 목표한 인체적용시험대상자의 수 및 산정근거

7.4.2.1. 인체적용시험대상자의 수

인체적용시험대상자 선정, 제외기준에 적합한 60명을 확보하여 섭취하도록 하였고, Protocol에 명시된 PP Set 기준에 적합한 최종 유효성 평가 레수로 48명 이상(군당 24명 이상)을 분석하기로 계획하였다.

Table4. 목표한 인체적용시험대상자의 수

	시험군 (PM-EE)	대조군 (Placebo)	합 계
최종 평가 레수(PP Set)	24	24	48
Drop-out(20%) 고려예수	30	30	60

7.4.2.2. 산정근거

본 인체적용시험의 목적은 시험군에서 섭취기간 12주 후 ADAS-cog(Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive sections)의 개선도가 대조군과 비교하여 우월하다는 것을 증명하고자 하였다.

이를 검정하기 위한 가설은 다음과 같았다.

$H_0: \mu_t = \mu_c$ (시험 후 시험군의 평가변수 변화값이 대조군의 값과 같다.)

$H_1: \mu_t \neq \mu_c$ (시험 후 시험군의 평가변수 변화값이 대조군의 값과 다르다.)

유효한 인체적용시험대상자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정하였다.

- 1) 평가변수의 통계적 가설검정은 양측검정으로 한다.
- 2) 유의수준(Level of significance)은 5% 이다.
- 3) 제 2종 오류(β)는 0.2로 하여 검정력(Power of the test)은 80%를 유지한다.
- 4) 시험군과 대조군의 시험예수의 비율은 같다. 즉, n_t (시험군의 예수) = n_c (대조군의 예수), 1:1로 한다.
- 5) 기존의 연구 중에서 본 인체적용시험과 동일한 평가변수인 ADAS-cog(Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive sections)에서 효과를 보인 임상시험인 Ying-chun Miao et al. (2012)¹⁾의 논문의 결과를 이용하여 인체적용시험대상자의 수를 산정하였다. 시험대상자 수 산정을 위하여 12주에서의 유의확률 (0.0009)을 이용하여 평균에 차이에 대한 합동표준편차(pooled standard deviation)를 약 6.1으로 추정할 수 있다.

위의 1) - 5)를 가정하였을 때 인체적용시험에 필요한 시험예수는 다음과 같았다(양측검정).

$Z_{\alpha/2}$:표준정규분포에서 오른쪽 꼬리부분 면적이 $\alpha/2$ 가 되는 임계치 혹은 분위수

Z_{β} :표준정규분포에서 오른쪽 꼬리부분 면적이 β 가 되는 임계치 혹은 분위수

α : 제1종 오류의 크기

β : 제2종 오류의 크기

σ : 합동표준편차

Δ : 임상적으로 의미가 있는 시험군과 대조군간 평균변화 차이

상기 식으로부터 군당 표본의 크기(n)를 구하면 다음과 같았다.

$$\approx 24$$

상기 식으로 인체적용시험대상자의 수를 계산하면, 최소 시험대상자 수는 군당 24명이었다. 여기에 탈락률 20%를 고려하면, 유효성 평가를 위해 군당 등록할 인체적용시험대상자의 수는 30명이며, 총 인원은 60명으로 하였다.

7.5. 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

7.5.1. 1일 섭취량 및 섭취방법

- 시험식품: 1일 2회, 1회 2정을 아침, 저녁 식후에 섭취(통통마디추출물로써 600mg/day)
- 대조식품(Placebo): 시험식품과 동일한 방법으로 섭취

7.5.2. 섭취기간

시험식품 또는 대조식품(Placebo)을 12주(84일)간 섭취

7.5.3. 섭취량 설정사유

통통마디추출물(PM-EE)은 50~100mg/kg body weight의 농도 투여 범위 내에서 scopolamine-유도 기억력 감퇴 모델에서 농도의존적(dose-dependenat)으로 인지 및 기억력 개선능을 보였으며, 동물시험에서의 유효 함량을 근거로 하였을 때 인체대상 적용 예측량은 약 486.5mg/60kg [HED(mg/g) = 100mg/kg × 3/37]으로 산출되었다.

식용채소인 통통마디 생초 100g은 국민 1인당 1일 채소류 평균 섭취량인 300g의 1/3의 수준이다. 통통마디추출물(PM-EE)로써의 600mg은 제조공정 상 약 66.6배 농축된 것이므로 생초 39.9g을 섭취하는 양이며, 시중 판매중인 함초 건조분말 약 4.8g에 해당된다. 이는 함초 건조분말 판매제품들의 1일 권장 섭취량이 8g ~ 18g 임을 감안하면 통통마디추출물(PM-EE)로써의 600mg은 매우 안전한 섭취량에 해당된다.

통통마디 에탄올 추출물(SH-E)의 단회 급성독성시험에서 통통마디 에탄올 추출물의 2000mg/kg 을 마우스에 구강투여시에도 독성소견을 보이지 않음(IB, 54페이지, 4.1. 참조)을 고려하면 본 시험시료인 통통마디추출물(PM-EE) 600mg은 안전한 섭취량이라 할 수 있다.

따라서 본 인체적용시험에서는 유효성과 안전성을 확보할 수 있는 용량인 600mg을 1일 섭취량으로 최종 설정하였다.

7.6. 병용요법

7.6.1. 병용금지 약물(또는 식품)

다음 사항은 안전성, 내약성 또는 유효성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서, 다음에 열거하는 사항은 인체적용시험 기간 동안 금지하였다.

- 1) 항정신용제(Antipsycotics); Amisulpride, Aripiprazole, Blonanserin, Bromperidol, Sulpiride, Chlorpromazine, Clozapine, Haloperidol, Levomepromazine, Molindone, Nemonapride, Olanzapine, Paliperidone, Perphenazine, Pimozide, Quetiapine, Risperidone, Ziprasidone, Zotepine 등
- 2) 퇴행성 질환용제(Neurodegenerative Disease Drugs); Cerebrolysin, Donepezil, Galantamine, Memantine, Rivastigmine 등
- 3) 뇌기능 개선제(Nootropics&Neurotonics); Acetyl-L-carnitine, Choline alfoscerate, Citicoline, Hydrochloride, Nimodipine, Oxiracetam, Piracetam, Protirelin tartrate 등
- 4) 삼환계 항우울제(Tricyclic antidepressant); Amineptine, Amitriptyline, Clomipramine, Dothiepin, Imipramine, Nortriptyline, Quinupramine, Setiptiline 등
- 5) 비타민E 제제 1일 투여용량 400 IU 이상
- 6) Estrogen replacement therapy(국소 도포용제 제외)
- 7) 인지기능 개선을 목적으로 하는 건강기능식품

인체적용시험 동안 인체적용시험대상자가 이들 사항 중 어느 것이라도 해당하는 경우에는 인체적용시험 모니터요원에게 즉시 알리도록 하였다. 인체적용시험 모니터요원에게 연락될 때까지는 인체적용시험대상자를 인체적용시험에서 중도 탈락시켜서는 안되었으며, 이들 사항에 해당한 인체적용시험대상자의 시험 중단 여부 결정은 사례 별로 시험자와 상의한 뒤에 인체시험결과(유효성)에 영향을 미칠 수 있는 경우 인체적용시험에서 제외/탈락될 수 있었다.

인체적용시험용 식품 섭취를 시작한 후에 새로운 약물 및 건강기능식품을 투여/섭취한 경우 인체적용시험 시험자에게 보고하도록 인체적용시험대상자를 교육하였다. 인체적용시험대상자의 인체적용시험용 식품 섭취 개시 이후의 모든 약물투여 및 유의한 비약물 치료(물리치료 및 수혈 포함)를 증례기록서 ‘약물투여력/병용약물 확인’ 에 기재하였다.

7.7. 유효성 및 안전성 관련 평가 변수

7.7.1. 유효성 평가

7.7.1.1. 1차 유효성 평가 변수

- 1) ADAS-cog 총점

7.7.1.2. 2차 유효성 평가 변수

- 1) ADAS-cog 기억력
- 2) ADAS-K
- 3) K-CWST
- 4) ADCS-ADL
- 5) SGDS
- 6) CERAD-K

7.7.1.3. 1차 유효성 평가 방법

섭취 전(방문2: Baseline visit, week 0)과 섭취 종료 시(방문4: Closing visit, week 12) ADAS-cog 총점의 평균을 비교하고 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

7.7.1.4. 2차 유효성 평가 방법

섭취 전(방문1, 2: Baseline visit, week -2, 0)과 섭취 종료 시(방문4: Closing visit, week 12) ADAS-cog 기억력, ADAS-K, K-CWST, ADCS-ADL, SGDS, CERAD-K 검사치의 평균을 비교하고 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

7.7.2. 안전성 평가

7.7.2.1. 안전성 평가 변수

- 1) 이상반응
- 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)
- 3) 활력징후(맥박, 혈압)
- 4) 심전도검사

7.7.2.2. 안전성 평가 방법

인체적용시험대상자 개인별 이상반응 기록표에 기재된 이상반응 빈도, 정도 등과 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사의 임상병리검사, 활력징후(혈압, 맥박) 및 체중 결과에서의 이상소견을 고려하여 평가하였다.

임상병리검사의 이상치, 활력징후 결과의 이상소견 중 임상적인 유의성이 있는 경우에는 증례기록서(CRF)의 인체적용시험대상자 개인별 이상반응 기록표에 기재하도록 하였으며, 통계분석으로 평가하였다.

7.8. 자료의 질 보증

본 인체적용시험 자료의 질을 보증하기 위하여 다음과 같은 활동이 이루어졌다.

7.8.1. 인체적용시험계획서의 승인 및 수정

인체적용시험의 승인을 얻거나 승인 받은 인체적용시험을 변경하여 실시하고자 하는 경우,

인체적용시험 단계별로 계획서 또는 변경 계획서에 대하여 각 실시기관의 의학연구윤리심의위원회(IRB)의 승인을 받았다. 승인 이전에 인체적용시험대상자를 인체적용시험에 참여 시킬 수 없었다.

7.8.2. 인체적용시험계획서의 변경

시험자나 의뢰자 어느 쪽도 상대방의 동의 없이는 인체적용시험 도중 본 인체적용시험계획서의 내용을 변경하지 않았다. 일단 인체적용시험이 시작된 후에는 상대방의 동의를 얻어 수정할 수 있도록 하였다. 수정된 내용은 의학연구윤리심의위원회(IRB)에 보고하고 윤리적 측면에서 승인을 받아 진행하였다.

7.8.3. 인체적용시험계획서 준수에 대한 모니터링

인체적용시험의 모든 상황은 (주)파이토코퍼레이션이 지정한 인체적용시험 수탁기관인 네오뉴트라(주)의 담당 CRA에 의해 주의 깊게 모니터링 되었다. 담당 CRA는 인체적용시험을 시작하기 전에 시험자에게 모니터링 계획에 대해 설명하였고, 매 모니터링은 KGCP에 따라 진행되었다. 담당 CRA는 정기적으로 인체적용시험실시기관을 방문하여 시험자가 인체적용시험계획서와 관련 규정에 따라 인체적용시험을 수행하는지를 확인하였다. 진행 중 발견된 시험진행관련 문제는 의뢰자 또는 시험자와 적절히 논의하였다.

7.9. 통계분석 방법

통계분석은 SAS[®](Version9.4,SASInstitute,Cary,NorthCarolina,USA)를 이용하여 분석하였다.

인구학적 평가 분석, 유효성 평가 분석, 안전성 평가 분석은 유의수준 0.05로 설정하여 양측검정을 실시하였다. 모든 분석의 p-value에 대해서는 소수점 4자리까지 제시하였으며, 모든 분석의 p-value가 <0.05이면 유의한 것으로 간주하였다. 평균, 표준편차, 백분율 등 소수점 이하의 값을 가지는 수치에 대해서는 소수점 2자리까지 제시하였다.

7.9.1. 결과분석의 일반적 원칙

본 인체적용시험의 인체적용시험대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety Set 분석, FAS(Full Analysis Set) 분석과 PPS(Per Protocol Set)분석의 세 가지 형태로 이루어졌다.

Safety Set분석은 안전성 평가변수 분석 시 적용되는 분석법으로, 무작위배정 후 인체적용시험용 식품을 한번이라도 섭취한 인체적용시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌다.

본 인체적용시험에 무작위 배정을 받은 모든 인체적용시험대상자를 분석 대상으로 하는 원칙(ITT)에 따라, FAS 분석은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행한 인체적용시험대상자이며 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 이루어졌다.

PPS 분석은 FAS 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험 결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항(선정/제외기준 위반 등)이 없는 인체적용시험대상자 집단을 대상으로 이루어졌다.

유효성에 대한 자료는 PPS 분석을 주 분석법으로 하고, FAS 분석을 추가적으로 실시하였다.

인구학적 및 영양분석에 대한 자료는 PPS 분석을 주 분석법으로 하고, 안전성에 대한 자료는 Safety Set 분석을 주 분석법으로 실시하였다.

결측치가 발생한 경우, 결측치가 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻어진 자료를 이용하여 보정(LOCF)하여 분석하였다.

본 인체적용시험에서 얻은 자료는 적당한 기술통계량으로 평균(Mean)과 표준편차(Standard deviation)를 산출하여 제시하며, 차이(Difference)에 대한 유의성은 양측검정으로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

유효성 평가변수에 대한 분석방법으로 평가변수와 연관이 있는 인체적용시험대상자의 기저특성(공변량, 인체적용시험대상자가 인체적용시험용 식품을 복용하기 전에 관찰되거나 측정된 일차 유효성 평가변수에 영향을 미칠 것으로 예상되는 변수)을 고려하여 분석하는 ANCOVA를 실시할 수 있었다.

Sub-set(group) analysis(소집단 분석)는 무작위배정 이전 또는 치료시작 전의 인체적용시험대상자의 초기 특성으로 범주화하여 분석할 수 있었다.

7.9.2. 인구통계학적 기초자료

인체적용시험대상자의 인구통계학적 혹은 임상학적 특성을 파악하기 위하여 인체적용시험 전 시험대상자의 특성에 대하여 기술하였다. 인구통계학적 자료 및 생활습관 자료에 따라서 적당한 기술통계량(시험대상자 수, 평균, 표준편차, 최소값, 최대값)을 제시하였다. 군간 비교를 위하여 Two sample t-test 를 실시하고 유의확률 값을 제시하였다. 범주형 자료는 각 수준별로 빈도와 비율을 제시하고 독립성 검정을 위한 카이제곱 검정(Chi-square test) 혹은 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 실시하고 유의확률 값을 제시하였다.

7.9.3. 1차 유효성 평가 변수에 대한 분석

1차 유효성 평가인 ADAS-cog 총점의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 정규성에 위배되는 경우 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있었다.

7.9.4. 2차 유효성 평가 변수에 대한 분석

2차 유효성 평가인 ADAS-cog 기억력, ADAS-K, K-CWST, ADCS-ADL, SGDS, CERAD-K의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 정규성에 위배되는 경우 Wilcoxon rank sum test를 실시하였다.

7.9.5. 안전성 평가 변수에 대한 분석

안전성평가는 크게 임상적으로 측정된 이상반응 여부, 임상병리검사 결과, 체중 및 활력징후(맥박, 혈압), 체중, 심전도검사 측정 결과의 이상에 근거하였다.

7.9.5.1. 이상반응

인체적용시험기간 동안 보고된 모든 이상반응은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 하였으며, 인체적용시험용 식품 투여 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가하였다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.

7.9.5.2. 임상병리검사

섭취 전(방문1: Screening visit, week -2)과 섭취 후(방문4: Closing visit, week 12)의 임상병리검사 결과를 비교하여 변화값을 산출하였다.

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

7.9.5.3. 활력징후(맥박, 혈압), 체중

활력징후(맥박, 혈압), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석하였다.

8. 임상시험 연구책임자(김만호 교수) 고찰

8.1. 인지능과 기억력개선 관련사항

일반적으로 인지기능과 기억력 증진에 대한 부분에 대해 혼선이 오는 경우가 많으나 식약처의 기준은 인지기능은 일정한 연령에 도달한 후 기능이 저하되어 (결국은 인지기능 장애, 치매 등)뇌의 기능을 손상하는 경우이고, 반면 기억력증진에 대한 기준은 비슷하게 고려될 수도 있으나, 이는 연령의 구별 없이 기억이라는 기능 증가에 중점이 있다. 따라서 선정 및 제외기준을 선택함에 있어서도 연령에 대한 고려가 중요하다고 할 수 있다.

8.2. 인지기능 test관련사항

뇌의 인지기능을 보는 신경심리검사는 많이 개발이 되어 있다. 가장 간단한 MMSE부터 복잡하게 computerized되어 있는 program을 사용하기도 한다. 따라서 검사의 종류에 따라 소요되는 시간과 노력의 차이가 상이하게 다르다. 한편 개개인의 교육정도에 따라 판단할 수 있는 방법이 상이하다. 예를 들면 MMSE 점수 자체 정상범주에 속하고 있더라도 경도인지저하 또는 치매로 진행되는 과정중에 있을 수 있으며, 그 반대로 낮은 MMSE라고 하더라도 저교육 현실에서는 치매의 기준에 해당되지 않는다. 따라서 일정한 점수를 기준으로 선정 또는 제외기준을 나누는 일은 잘못된 오류를 범할 수 있다. 기존의 reference를 참고할 수도 있으나, 이 역시 하나의 기준일 뿐 test의 기준을 정할 수 있는 경우가 아니었다. 따라서 본 연구에 있어서도 MMSE의 cut-off기준을 정하는 데 있어서 시행착오가 없었다고는 할 수 없다.

한편 인지검사의 종류의 경우도 다양하나, 제일 중요한 기준, 즉 MMSE 와 ADAS-cog에 대해서는 primary endpoint이며, 반드시 포함되어야 하는 검사인 반면, 다른 검사의 경우는 보조적인 검사로 반드시 필요한 요소는 아니었다. 그러나 반면 MMSE 검사등은 그 검사의 sensitivity가 낮기 때문에 본 연구에서는 stroop test를 (해당 지시에 걸리는 시간을 data로 하여) 적용하여 정상인의 경우에도 더 개선될 수 있는 여지를 보고자 하였다.

특히 MMSE의 경우는 K-MMSE, MMSE-K 등 비슷한 검사를 여러연구자들이 혼용되어 사용하는 경향이 있고, 문헌상 10여년이 지난 reference를 인용하여 기준을 삼는 경우가 있어, 주된 screening의 도구이기는 하지만, 인지기능장애를 호소하는 또는 거의 정상인에 있어서는 특별한 도움이 안될 수 있다. 따라서 ADAS-cog이나 다른 종류의 검사 (예시로 BDNF 측정 등)을 병행하는 것이 안전할 수 있다고 볼 수 있다. 연구자별로 사용되는 연구검사방법이 다를 수 있으나 현재 치매관련 의약품을 인정하는 기준은 MMSE아 ADAS-cog에 의한 것이 주된 방법이고, 특히 처음 개발된 donepezil의 경우는 6개월간 MMSE의 호전이 1 점 가량 정도밖에 안되었다는 점에서 의미를 두고 허가를 받고 사용되기 시작하였다.

따라서 이러한 신경심리검사를 정함에 있어서 연구자-지원자-CRO간의 이견차이가 있어서 혼선이 있었던 적이 있었다. 따라서 이러한 test를 실제로 psychology측면에서 apply하는데 어느 정도의 의미가 있는 지 본 경험사례를 토론허기 위해 해당분야를 전문적으로 연구하는 학술대회에 참가하여 기준을 확인해보기도 하였다. 그러나 결론적으로는 연구자나 검사방법에 따라 상당히 다양하게 사용될 수 있다는 다양성을 인정해야 한다는 점을 파악하였고, 사용되는 방법들은 임상시험에 사용되고 있는 식이의 근본적인 기능을 확인하기 위한 tool로서 사용되어야 한다는 점이다. 이 부분을 서로간 정립하는데 시간적인 delay가 있었으나, 각자의 role을 재정립하고 임상심리 test에 대한 것을 정하고 이후론 비교적 순조롭게 진행될 수 있었고, 본 연구자들은 이러한 경험을 국제학술대회에서 공유할 기회가 있었다.

8.3. 추가의 구체적인 식이조사나 임상심리 test

본 연구에 사용된 성분이 식이이다 보니 섭취하고 있는 기존의 식이 습관에 대한 조사도 필요한 부분이라고 사료될 수 있고, 또한 이에 대해 자세한 병력 등이 필요할 수 있다. 반대로 이러한 식이습관에 대한 기록은 피험자의 번거로움을 증가시킬 수 있어 compliance를 저하시키는 요소가 될 수도 있다.

이에 대한 연구디자인에 대한 판단은 자세한 식단 조사가 data에 도움은 되지만 실제로 이에 참여하는 피험자들에게는 곤란하고 번거로운 일이 될 수 있었다고 사료된다.

8.4. 부작용과 효과와의 관계

전반적인 개선효과 또는 아무런 효과가 없다고 나왔을 경우 모든 경우 각각 세분화된 검사에 대해 세부항목별로 재분석을 해볼 필요성이 있다고 사료된다. 특히 기존의 전임상시험에서 acetylcholine esterase inhibition의 효과로 증상의 개선을 본 점을 감안할 때 특히 기억력 부분에서 개선여부를 검토해볼 필요성이 있다고 사료된다.

반면 현재 치매약제로 나와 있는 donepezil, galantamine, rivastigmine 모두 AchE inhibitor의 효과로 사용되고 있고 (단 memantine은 NMDA) 동시에 증량시 nausea 등의 부작용이 있어서 어느 정도의 한계점은 있다고 볼 수 있다. 이러한 약제와 비교하여 본 약제의 개선여부를 검토해볼 필요성이 있다.

8.5. CRO측의 monitoring 및 newsletter

본 연구에서 monitoring을 통해 위반된 사례는 주로 환자 개인적인 사정에 의한 window period내의 방문이 이루어지지 않았다는 점 외에는 특이한 사례는 없었다.

무엇보다도 정기적으로 CRO측에서 screening환자 수, 방문 및 등록환자 수 등에 대한 연구의 진행상황을 newsletter를 통하여 참여하고 있는 모든 연구자들이 알 수 있도록 공지를 해주었다.

따라서 연구책임자의 입장에서는 연구의 progress상황을 인식할 수 있었고 진행에 편리성을 제공해주었다.

일반적으로 CRO의 경우 monitoring을 하여 위반사례를 확인하는 일에 중점이 되어 있으나 위와 같은 연구자 입장에서 연구 progression을 확인할 수 있도록 정보를 제공하여 주는 일은 잘못된 부분을 지적하는 점 보다 좀 더 중요한 의미가 있었다고 사료된다.

특히 1년간 300 여번의 이메일 교신이 있었고, 10차례의 CRO측으로부터 newsletter 발송이 있었으면서 전반적인 흐름을 파악하면서 진행할 수 있었다.

4. 연구개발 성과

4-1. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
최종목표	3	3		1	1	4	2				3	1		3		5		1		
연구기간내 달성실적	16	3		1	1.1	4	22		2		1	3	1		6		6		5	1
달성율(%)	53 3	10 0		10 0	11 6	10 0	11 00					10 0	10 0		20 0		12 0		50 0	

4-2. 주요 연구개발 성과

■ 특허 등록 (3건, 목표대비 달성도 100%)

등록번호	등록일	등록권자	특허명	발명자
10-1812319	2017-12-19	(주)파이토코퍼레이션	아이리린 B를 포함하는 혈전증 예방 및 치료용 조성물	김득희, 권미향 외
10-1922245	2018-11-20	(주)파이토코퍼레이션	염생식물 유래의 기능이 강화된 탈염 영양 조성물과 그 제조방법	김득희, 권미향 외
10-1938396	2019-01-08	(주)파이토코퍼레이션	통통마디 추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지기능 개선용 약제학적 조성물	김득희, 권미향 외



■ 특허 출원 (16건, 목표대비 달성도 533%)

연번	구분	출원번호	출원일	출원인	특허명	발명자
1	국내	10-2016-0099655	2016-08-04	(주)파이토코퍼레이션	아이리린 B를 포함하는 혈전증 예방 및 치료용 조성물	김득희, 권미향 외
2	국제	PCT/KR2017/000949	2017-02-06	(주)파이토코퍼레이션	Functionally Reinforced Desalted Nutritional Compositions from Halophytes and Preparation Method Thereof.	김득희, 권미향 외
3	국내	10-2017-0059906	2017-05-15	(주)파이토코퍼레이션	통통마디 추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지기능 개선용 약제학적 조성물	김득희, 권미향 외
4	국제	PCT/KR2017/014763	2017-12-14	(주)파이토코퍼레이션	A composition comprising irilinB for prevention or treatment of thrombosis	김득희, 권미향 외
5	국내	10-2016-0183473	2016-12-30	(주)파이토코퍼레이션	염생식물 유래의 기능성이 강화된 탈염영양 조성물과 그 제조방법	김득희, 권미향 외
6	국내	10-2018-0019987	2018-02-20	(주)파이토코퍼레이션	항고혈압활성을 갖는 5-deoxy-irilin B 및 이를 함유하는 조성물	김득희, 권미향 외
7	국내	PCT/KR2018/005502	2018-05-14	(주)파이토코퍼레이션	통통마디추출물을 포함하는 치매예방 또는 치료 및 인지기능개선용 약제학적 조성물	김득희, 권미향 외
8	국내	10-2018-0058915	2018-05-24	(주)파이토코퍼레이션	아이리린 B를 포함하는 피부 항노화 조성물	김득희, 권미향 외
9	국내	10-2018-0082133	2018-07-16	(주)파이토코퍼레이션	비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료능이 있는 이소람네티를 함유하는 통통마디 물추출물의 에틸아세테이트 분획물	김득희, 권미향 외
10	인도	201827040545	2018-10-26	(주)파이토코퍼레이션	FUNCTIONALLY REINFORCED DESALTED NUTRITIONAL COMPOSITIONS FROM HALOPHYTES AND PREPARATION	김득희, 권미향 외
11	유럽연합	17792789.4	2018-10-30	(주)파이토코퍼레이션	FUNCTIONALLY REINFORCED DESALTED NUTRITIONAL COMPOSITIONS FROM HALOPHYTES AND PREPARATION METHOD THEREOF	김득희, 권미향 외
12	일본	2018-558181	2018-11-02	(주)파이토코퍼레이션	FUNCTIONALLY REINFORCED DESALTED NUTRITIONAL COMPOSITIONS FROM HALOPHYTES AND PREPARATION METHOD THEREOF	김득희, 권미향 외
13	미국	16099070	2018-11-05	(주)파이토코퍼레이션	FUNCTIONALLY REINFORCED DESALTED NUTRITIONAL COMPOSITIONS FROM HALOPHYTES AND PREPARATION METHOD THEREOF	김득희, 권미향 외

14	중국	201811140058810	2018-11-19	(주)파이토코퍼레이션	FUNCTIONALLY REINFORCED DESALTED NUTRITIONAL COMPOSITIONS FROM HALOPHYTES AND PREPARATION METHOD THEREOF	김득희, 권미향 외
15	미국	16304585	2018-11-26	(주)파이토코퍼레이션	A pharmaceutical composition for the prevention or treatment of dementia and improvement of cognitive function comprising extract of Salicornia spp.	김득희, 권미향 외
16	유럽연합	18802179.4	2018-11-26	(주)파이토코퍼레이션	A pharmaceutical composition for the prevention or treatment of dementia and improvement of cognitive function comprising extract of Salicornia spp.	김득희, 권미향 외

■ 제품화 (4건, 목표대비 달성도 100%)

연번	제품명 (국문/영문)	제품특성	식약처 식품제조 품목보고 번호	지적재산권 확보	제품사진
1	파이토밀 (PhytoMeal)	통통마디 탈염분말소재 (항비만, 체지방감소, 식량대체소재)	201700948543	KR10-1922245	
2	파이토밀-플러스 (PhytoMeal-Plus)	통통마디 뇌신경세포보호 혈류개선소재 (파이토밀에 통통마디 유래 항산화, 항혈전획분 첨가)	201700948541	10-1812319	
3	파이토메모리 (PhytoMemory)	통통마디 인지기능개선소재 (PM-EE, 인지기능개선 임상시험 식품원료)	201700948542	KR10-1922245 KR10-1938396	
4	메모리티 (MemoryTea)	기억력개선 RTD 액상차음료 (인지기능개선 성분을 함유한 탈염 함초차, 무카페인, 무가당)	201700948545	KR10-1922245 KR10-1938396	

■ 논문 (SCI 3건, 목표대비 달성도 100%)

연번	논문제목	저널명	권,호, 페이지	구분	IF
1	Toxin-Induced Experimental Models of Learning and Memory Impairment	International Journal of Molecular Sciences	17(9):1447-1481 (2016)	SCI	3.482
2	Ameliorative potential of desalted Salicornia europaea L. extract in multifaceted Alzheimer's-like scopolamine-induced amnesic mice model	Scientific Reports	8(1): 7174 ~ 7190 (2018)	SCI	4.296
3	Desalted Salicornia europaea powder and its active constituent, trans-ferulic acid, exert anti-obesity effects by suppressing adipogenic-related factors	Pharmaceutical Biology	56: 183 ~ 191 (2018)	SCI	3.150
4	통통마디 탈염을 통한 식품품질 및 기능성 향상	한국식품영양학회지	30(6): 1~5	KSCI	-

■ 학술발표 (6건, 목표대비 달성도 200%)

연번	발표제목	학술회의명	발표일시	발표도시, 국가	발표자
1	Anti-neuroinflammatory effects of Plant S.E extract in LPS-induced BV-2 microglial cells	2016 한국분자세포생물학회	2016-10-12	서울, 대한민국	김준수
2	Desalted Salicornia extract suppressed LPS-induced neuroinflammation on BV-2 microglial cells	The 5th International Agricultural Science and Food Engineering Conference (ASFE 2017)	2017-05-18	Hangzhou, China	Joon-Su Kim
3	PM-EE bioactive extract ameliorates scopolamin-induced memory impairment via modulation of cholinergic, antioxidant, inflammatory systems and CREB/BDNF	2017 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	2017-06-22	제주도, 대한민국	카티바산 고빈다잔
4	DPLWE effectively alleviated neuro-inflammation in MPTP-induced Parkinson's mice model and its behavior	2017 International Conference Korean Society for Molecular and Cellular Biology	2017-09-13	서울, 대한민국	김준수

5	The ameliorative effects of the ethyl acetate fraction of <i>Salicornia europaea</i> L. and its bioactive candidate, Irilin B on LPS-induced microglial infl	2018 한국세포분자생물학회	2018-08-24	충북수안보 대한민국	김준수
6	Cognitive improvement by Food Substitutes using PhytoMeal, Pitfalls for Neuropsychological testing	Applied Psychology Congress 2018	2018-11-27	Los Angeles, USA	한성주

■ 홍보전시 (5건, 목표대비 달성도 500%)

연번	홍보유형	제목	매체명	홍보일시
1	외국홍보	2017 서울시 중국투자 미팅 Presentation/해외 IR 미팅	2017 서울시 중국 투자협력	2017-07-05
2	중앙일간지기사	바이오벤처 파이토 "인지기능 개선 식물성 소재 개발"	연합뉴스	2018-02-27
3	Internet/SNS	(주)파이토코퍼레이션_ "인지기능 개선효과 인체적용 시험 대상자 모집" 홍보	유튜브	2018-03-26
4	Internet/SNS	Salicornia - "Innovative Salicornia technology" and "Phyto Corporation"	Wikipedia	2018-05-18
5	외국홍보	K-Startup Summit Shanghai 2018-PhytoCorporation IR 투자설명회	PWC China	2018-12-11

■ 인력양성 (5건, 목표대비 달성도 100%)

연번	인력양성명	학위수	유형	인력양성일시
1	조덕연	석사학위	건국대졸업	2016
2	박선영	석사학위	전북대졸업	2016
3	이상미	석사학위	부산대졸업	2016
4	김준수	석사학위	건국대졸업	2017
5	고현명	기타. 박사후연구원	우석대 생명과학과 교수 취업	2017

■ 기술이전 (1건, 목표달성 100%)

기술실시 계약명	기술실시권 유형	실시기술유형	기술료구분	당해연도 기술료
탈염 통통마디 추출물을 이용한 인지기능개선 건강기능식품 원료 제조 기술	직접실시	특허출원	정액기술료	5,800,000원 중 1,160,000원 1차 분납

■ 고용실적 (2건, 당초 목표성과에 포함되지 않음, 초과달성)

고용인력명	부서/직급	학위	전공	취업일자
박선영	파이토코퍼레이션 부설연구소 연구원	석사(전북대)	식품공학	2016.03.07
이상미	파이토코퍼레이션 부설연구소 연구원	석사(부산대)	생명환경화학	2018.03.26

■ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	22백만원
			향후 3년간 매출	20억원
		관련제품	개발후 현재까지	55백만원
			향후 3년간 매출	50억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 3 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 2 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		10 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2

	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모		현재까지	3년후	5년후
			22백만원	10억원	20억원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	3	5
국외		-	0.5	1	
향후 관련기술, 제품을 응용한 다 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	5	10
	수 출		-	10	20

5. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

5-1. 최종목표

염생식물 탈염소재(PhytoMeal)를 이용한 인지기능 개선 기능성 식품 소재 및 식량 대체 소재 개발과 수출전략 제품화

5-2. 년차별 목표 달성여부

■ 1차년도 (2016.07.07 ~ 2016.12.31.)

1) 주관연구기관 파이이토크퍼레이션

세부목표: 염생식물 탈염소재의 기능성 지표물질 분리정제 및 식품소재 개발 및 수출전략 상품화

1차년도 주관 세부목표	주관(파이토크퍼레이션) 연구개발수행내용	달성도 (%)
○ 저온 냉수추출 기술에 의한 염생식물 탈염공정 확립	- 통통마디 탈염소재의 탈염 시간 및 탈염시 사용되는 물의 온도에 따른 영양성분 분석 - 식품소재로 이용하기 위한 최적의 온도, 시간, 건조 조건 등의 탈염 조건 확립	100

	<ul style="list-style-type: none"> - 냉수~열수로 추출온도를 달리하고, 추출 시간에 따라 통통마디 추출물의 염 함량, 고형분 함량을 비교하여 적합한 탈염조건을 확립함 	
○ 원료의 표준화를 위한 염생식물 수확시기 및 건조 조건을 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 갈변화 반응을 억제하기 위한 열처리 방법(끓는물, 끓는물 증기, 열풍)에 따른 갈변화 정도 및 색도 비교 - 생초의 건조방법(동결건조, 열풍건조)에 따른 탈염과정 및 색도비교 - 통통마디의 수확시기(7월초, 9월초)에 따른 탈염분말의 색도비교 - 통통마디를 7월에 수확하여 세척 후 동결건조한 마쇄물을 이용해 추출온도를 2~4°C, 9~10°C의 물로 탈염하되 탈염 시간을 3분, 5분, 7분으로 구별하여 탈염 정도를 탈염 분말 내에 존재하는 양이온(Na, K, Mg, Ca)의 함량으로 비교함 	100
○ 염생식물 탈염소재를 이용한 식품소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 식품소재로서 이용하기 위한 통통마디 분말의 탈염공정 확립 - 식품소재로서 이용하기에 적합한 통통마디 탈염분말 제조를 위해 현재의 lab-scale에 적합하게 탈염공정을 개선함 - 최적의 통통마디 탈염소재(파이토밀)의 대량생산을 위한 탈염공정의 개선 - 최종적으로 통통마디 탈염 기능성/영양소재인 “파이토밀(PhytoMeal)”을 개발함 	100
○ 염생식물 탈염소재의 항혈전 기능성 추출물 및 시료 제공	<ul style="list-style-type: none"> - 파이토밀(PhytoMeal)의 뇌혈관 혈류 개선을 위한 항혈전(anti-thrombous) 활성능 분석을 위한 열수추출, 에탄올추출, 각 추출물의 유기용매 분획을 실시하여 협동연구기관인 건국대 팀에 시료를 제공하였음 	100
○ 항혈전 기능성 분획물의 항혈전 활성 성분위 분리 및 정제	<ul style="list-style-type: none"> - Protrombin Time(PT)의 응고시간 측정 - activated Partial Thrombin Time(aPTT) 의 응고시간 측정 - DPPH-Radical Scavenging을 이용하여 항산화활성 측정 - 파이토밀의 열수추출물과 에탄올추출물의 PT, aPTT 활성 측정결과 열수추출물이 우수하였음 - 열수추출물의 유기용매분획을 통하여 수득된 PM-H, PM-C, PM-EA, PM-B, PM-Q 획분들에 대하여 PT, aPTT활성을 비교 측정함 - 열수추출물의 유기용매분획을 통하여 수득된 PM-H, PM-C, PM-EA, PM-B, PM-Q 획분들에 대하여 항산화활성을 비교 측정함 - 열수추출물의 유기용매분획을 통하여 수득된 PM-H, PM-C, PM-EA, PM-B, PM-Q 획분들에 대하여 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량을 비교 분석함 	100

<p>○ 유효활성 성분의 추출공정 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성물질의 용해도, 극성, 분자량크기 등의 성질을 이용한 추출방법 도입 - 파이토밀 열수추출물로부터 에탄올 침전을 이용하여 고분자 물질(다당류, 단백질) 제거 - Hexane, chloroform, ethylacetate, butanol을 이용하여 물질의 극성도에 따른 순차적 유기용매 분배 분획 실시 	<p>100</p>
<p>○ 유효활성 획분으로부터 지표물질의 정제</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 소수성흡착제로 재생이 가능한 다공성 폴리비닐소재인 Diaion HP20 resin, 극성화합물과 흡착이 강한 Sicagel 60G resin, 분자량 사이즈에 의한 분리가 가능한 겔여과 합성 레진인 Sephadex LH-20을 이용한 컬럼크로마토 그래피를 이용한 정제 - PM-EA 획분의 Dianion HP-20 chromatography 정제 - PME-AH2 획분의 Silicagel chromatography 정제 - PME-AH-S3 획분의 LH-20 chromatography 정제 - PME-AH-S 획분들의 TLC 확인 	<p>100</p>
<p>○ 통통마디 탈염소재 추출물의 Acetylcholine esterase 저해활성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 파이토밀 에탄올추출물로부터 알칼로이드계 화합물의 선택 추출 및 분획을 이용하여 PM-AL 획분을 수득함. - 알칼로이드 획분에 대하여 양성대조군인 galantamine, berberine과 함께 AChE 저해활성을 비교 측정함 	<p>100</p>
<p>○ 활성 지표물질의 단리 및 구조규명을 위한 기기분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 소수성 분배분리를 이용한 reverse phase HPLC를 물질정제 조건을 확립하고 분취용 HPLC를 이용하여 유효활성 성분을 단리함 - HPLC, Preparative MPLC를 이용한 Compound A의 단리 - ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³H-NMR, ¹H-¹H COSY, HMBC를 이용한 구조결정 (Irlin B로 최종 동정하고 특허화 하였음) - PM-EA 획분과 Compound A 시료를 협동기관에 제공 	<p>100</p>
<p>○ 개발제품의 수출전략</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 통통마디 탈염을 통하여 기능성과 영양성이 강화된 소재인 파이토밀(PhytoMeal)을 개발하였으며, 해외 글로벌 식품기업 (스페인 GB Food, 미국 네슬레, 일본 Galbee 등)에 샘플테스트를 진행함과 동시에 중국 상하이 해외 IR 미팅에서 본 개발품을 소개하였음 <div style="text-align: center;">  </div>	<p>100</p>

2) 협동연구기관 건국대학교 최동국 교수팀

세부목표: 염생식물 탈염소재 추출물을 포함한 지표물질의 신경손상 억제 및 뇌인지기능 개선 효능 평가

1차년도 협동 세부목표	협동기관(건국대학교) 연구개발수행내용	달성도 (%)
○ 신경염증 모델인 BV-2 신경교세포를 이용하여 감소된 일산화질소의 양을 Griess 방법을 통하여 정량적인 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 염생식물 탈염소재 분획물 PM-EA, PM-AL과 BV-2 신경교세포를 이용하여 Griess reagent 등을 활용 분석하여 NO 억제효능을 확인하였음 - 염생식물 탈염소재 분획물인 PM- EA (ethylacetate 분획물), PM-AL (alkaloids) 의 NO 저해 효능 분석하였음 	100
○ 신경세포사 모델인 N27 또는 SH-SY5Y 신경세포 모델계를 이용하여 세포생존에 효능을 MTT 방법을 통하여 정량적인 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 6-OHDA를 이용하여 도파민성 뉴런에 특이적으로 산화적 손상을 주며, 이것에 대한 보호효능을 MTT assay로 측정 - N27을 이용한 신경세포사 보호효능 측정 분석 중 (MTT assay) 	100
○ 최종 염생식물 분획물로부터 분리된 지표성분의 효능분석 및 기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 염생식물 분획물로부터 분리된 compound A의 iNOS, COX-2 의 발현 양상을 분석 - compound A의 iNOS 억제 효능을 발현분석법으로 확인하였음 	100
○ 신경염증 모델인 BV-2 신경교세포를 이용하여 염증반응 유도 후, 염생식물 탈염소재 추출물의 신경염증 억제 효능 확인 및 기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> - BV-2 신경교세포에 염증반응 유도 후, NOS, COX-2의 Western blot, RT-PCR analysis 실험법을 통하여 분석 - 염생식물 탈염소재 열수추출물의 ethylacetate 분획물 및 분리 정제한 Compound A를 이용하여 iNOS, COX-2 의 발현 양상을 Western blot, RT-PCR 분석을 통하여 확인하였음 	100
○ 신경세포사 모델인 N27 또는 SH-SY5Y 신경세포 모델계를 이용한 염생식물 탈염소재 추출물의 신경세포사 억제 효능 확인 및 기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> - Cell viability assay (MTT assay) 방법을 이용하여 신경세포사 억제 효능 확인 중 - N27을 이용한 신경세포사 보호효능 (MTT assay) 측정을 통한 효능 분석 	100
○ 신경염증 및 신경세포사 억제 기전 분석을 통한 염생식물 탈염소재의 기능성 강화	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro, in vivo</i> 신경질환 model을 이용하여 추출물, 분획에 대한 효능 분석 - <i>In vitro</i> model에서 PM-EA와 PM-AL의 신경손상 억제 효능 분석 진행함 	100

■ 2차년도 (2017.01.01 ~ 2017.12.31.)

1) 주관연구기관 파이이토크퍼레이션

세부목표: 염생식물 탈염소재의 인지기능개선 기능성 지표성분의 분리 정제 및 식품소재 개발 및 수출전략 상품화

2차년도 주관 세부목표	주관(파이이토크퍼레이션) 연구개발수행내용	달성도 (%)
○ 조추출물, 조정제 획분에서의 지표성분 추출 및 정제과정 확립 염생식물 탈염과정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 통통마디 탈염소재의 지표 및 기능성분 추출 극대화를 위한 추출 및 정제 공정 확립 - 효소가수분해 실시 - 효소가수분해물의 주정 추출 (PM-EE 소재확보) - Silicagel 컬럼 크로마토그래피 정제 - LH-20 Sephadex 컬럼 크로마토그래피 정제 - TLC 크로마토그래피 - HPLC 분석 및 Prep-HPLC 순수정제를 통하여 38mg의 S7-L3-3(기능성분)를 확보하였음 	100
○ 유효 활성획분내 지표성분의 정성 및 정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 유효활성 분획물의 아세틸콜린 저해활성 비교 및 기능성 정제 화합물의 구조 분석 - 순수정제 S7-L3-3 기능성분의 구조분석을 실시함 - ¹H and ¹³C-NMR분석 - 2d ¹H-¹H COSY 분석 - 2d-¹H-¹³C-HMBC 분석 - ESI-MS 분석 - UV 스펙트럼 분석을 통하여 기능성분 S7-L3-3는 분자량 580의 Acanthoside B임을 확인하였음 	100
○ 지표성분 함량 예측을 위한 2차 지표성분의 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 2차 지표성분을 t-Ferulic acid로 선정 - 기능성소재 PM-EE 내에 주요화합물로 존재하는 페놀릭산을 Prep-HPLC 순수정제 - LC-MS를 통한 동정을 통하여 2차 지표성분으로 t-Ferulic acid를 선정하였음 - 지표성분의 뇌신경세포보호(항염증) 활성 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성 성분을 각각 선정 	100
○ 지표성분의 정성 및 정량은 HPLC 분석 및 UV 스펙트럼 분석을 통하여 실시	<ul style="list-style-type: none"> - 지표성분(t-Ferulic acid) 및 기능성성분 (Acanthoside B)의 정량 및 정성분석 확립 - HPLC 표준품의 검량선 작성후 지표 및 기능성성분의 정량분석 조건 확립 - UV 스펙트럼 및 HPLC Rt 비교분석을 통한 정성분석 확립 	100
○ 염생식물 탈염소재의 효소	<ul style="list-style-type: none"> - 식물체 가수분해 효소인 pectinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, α-amylase, exopeptidase, endopeptidase의 단일 또 	100

<p>가수분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화</p>	<p>는 복합 효소작용에 의한 최적 효소 조합 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선정된 효소들의 가수분해조건 최적조건(pH, 온도, 가수분해 시간, shaking 속도 등) 확립 - 가수분해 전후 추출물의 항혈전, 항산화, 아세틸콜린 저해활성 비교 - 식품첨가물 효소제를 이용하여 탈염 통통마디 추출물의 수율 및 지표성분 극대화를 시도함 - 각각의 효소와 복합효소를 사용하여 최적 효소제를 선정함 - 식품첨가물 효소 중 cellulase와 pectinase 가 혼합된 복합효소 (Optivine-Mash)를 선정함 - 효소첨가량은 파이토밀 대비 1%(v/v)로 결정함 - 최적 pH조건(5.0-6.0) - 최적 온도조건(50°C) - 최적 가수분해시간(15h) - 최적 shaking속도를 확립하였음 - 최적 효소 가수분해 추출물과 가수분해 전 시료의 주정추출물에 대한 항혈전, 항산화, 아세틸콜린 저해활성을 비교 측정함 	
<p>○ 최적 효소 가수분해 후 가수분해 전 시료의 기능성 화합물 함량 변화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 가수분해 전후의 유효 생리활성 성분의 비교 정량분석 a) 총폴리페놀 함량 비교분석 b) 총플라보노이드 함량 비교분석 c) 총알칼로이드 함량 비교 분석 d) 총사포닌 함량 비교 분석 - 효소가수분해 추출물에서 총폴리페놀, 총플라보노이드, 총알칼로이드, 총사포닌 함량이 현저히 높게 (약 3배 이상) 측정되었음을 확인하였음 	100
<p>○ 통통마디 탈염소재를 이용한 뇌세포 보호 및 뇌혈류개선 기능성 식품 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 염생식물 탈염소재에 확보된 항혈전, 항염증, 뇌신경세포보호, 아세틸콜린에스테라제 저해효능이 우수한 각각의 획분을 혼합 또는 GABA, EPA,DHA,lycopene,rasvertriol, curcumin, 기타 수용성 비타민 류의 뇌혈류개선 도움 물질로 알려진 물질의 조합을 통해 플러스 제품 개발 - 에틸아세테이트 획분, lycopene, GABA, quercetin, curcumin)은 파이토밀 중량대비 5%로 가미하여 개발하였음 - 혼합 후 제품의 색도 - 혼합 후 제품의 제형 - 혼합 후 제품의 기능성 	100
<p>○ 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> - “퓨리캠(PuriChem)”과 인체적용시험 원료 (PM-EE)의 대량생산 - 인체적용시험을 위한 인지능력개선 복합 기능성 식품 시제품 	100

	<p>완성함</p> <ul style="list-style-type: none"> - “인지기능 개선을 위한 임상시험” 원료를 확보하고, 임상시료에 대한 지표 및 기능성 성분 규격 및 기준 설정을 확립함. 	
<p>○ 인체적용시험수탁기관(CRO) 선정 및 전략 수립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 인증 관련 전문성이 우수한 CRO 업체로 네오뉴트라 선정 - IRB(임상시험심사위원회, Institutional Review Board) 승인 신청을 위한 계획 수립 - 전문성 및 경험을 기준으로 CRO기관 선정 및 계약체결 - 유효성 평가변수, 안전성 평가변수, 연구진행 일정표, 예상 일정을 수립함 - Protocol 개발과 IRB 심의신청을 준비함 - 시험대상자등록 및 모집일정은 2018년 1월~ 2018년 5월로 함 - 임상시험 protocol을 개발함. 시험대상자를 모집하는 포스터 제작 및 보건소 홍보를 통해 모집 예정임 - 선정 기준 및 모집방법, 섭취량 및 섭취기간, 유효성 평가변수, 안정성 평가변수, 연구진행 일정표, 병용금지약물 및 식품군을 정함 - IRB 심의신청을 위해 2차년도 동물실험결과 및 안정성과 유효성 평가 자료를 바탕으로 승인 준비 중 - PM-EE의 건강기능성원료 인정을 위한 식약처 모듬토의 및 기술상담를 통해 지표성분의 대표성, 특이성 가능 여부, 기전 연구, 동물실험 및 인체시험관련하여 일관성 있는 결과를 도출할 수 있도록 준비하였음 	<p>100</p>
<p>○ 인체적용시험 개시 모임</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 개시 모임 - 2017.06.26. CRO(네오뉴트라), 임상실험연구팀(서울대학교병원), 주관연구기관(파이토코퍼레이션) 모임 - 시험대상자는 병원내 포스터 부착, 구청 및 보건소의 홍보(CERAD-K)를 통해 모집 - 만 55~85세 이하 기억력 저하를 호소하는 남녀를 기준 - 악성종양, 뇌혈관질환, 중증 심장질환 등으로 입원 또는 퇴원후 3개월 이내는 제외 - DSM-V 주요 우울장애자 제외 	<p>100</p>



2) 협동연구기관 건국대학교 최동국 교수팀

세부목표: 염생식물 탈염소재 추출물을 포함한 지표물질의 신경손상 억제 및 뇌인지기능 개선 효능 평가

2차년도 주관 세부목표	협동(건국대학교) 연구개발수행내용	달성도 (%)
○ 염생식물 탈염소재 추출물(PM-EE) 및 지표물질 소재의 신경염증(<i>in vitro</i>) 억제효능 검증신경 손상억제(신경염증) 효능 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 신경염증의 바이오 마커인 iNOS, COX-2, 염증성 사이토카인의 유전자 및 단백질의 발현 양상 확인 - 신경교세포 (BV-2 microglia cells)을 이용한 신경염증 억제 기전 분석. 염생식물 탈염소재 (PM-EE) 및 Irillin B의 신경염증(<i>in vitro</i>) 억제 효능 분석 	100
○ 신경세포사 모델인 N27 또는 SH-SY5Y 신경세포 모델계(<i>in vitro</i>)를 이용한 염생식물 탈염소재추출물 (PM-EE)의 신경세포사 억제 효능분석	<ul style="list-style-type: none"> - SH-SY5Y 신경세포 및 Rat Dopaminergic neural cell N27a 신경세포모델계에서 신경 독소인 MPP+ 및 β-amyloid 을 이용하여 신경세포사 저해 효능을 MTT 방법을 통하여 정량적인 분석 	100
○ 동물실험을 이용한 염생식물 탈염소재 추출물(PM-EE) 유래 유효성분의 뇌혈관장벽 (BBB) 통과여부 분석	<ul style="list-style-type: none"> - C57BL/6 mouse에 염생식물 탈염소재와 유래 유효·지표 성분을 복강주사 및 경구 투여 후 시간 경과별(0, 5, 10, 20, 30분)로 혈액채취 및 뇌 조직을 적출하고 lysate를 이용하여 HPLC-MS의 기기를 사용 하여 뇌혈관장벽(BBB) 통과 여부를 확인 하였음 	100
○ 실험동물모델 (<i>in vivo</i>)을 이용한 염생식물 탈염소재 추출물(PM-EE) 및 유효물질의 신경손상 (신경염증) 억제 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> - MPTP 실험동물 모델을 이용하여, 염생식물 탈염소재 추출물 및 유효성분의 효능 검증 - 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현 감소 확인 - 염증성 매개인자 iNOS와 COX-2 단백질의 감소확인 - 선조체 및 흑질치밀부에서 MPTP에 의한 신경교세포의 활성화 감소 및 TH+ 신경세포 (dopaminergic neuron)의 억제 효능 확인 - 동물의 행동분석 (Behavior test)을 통한 염생식물 탈염소재 추출물의 효능 분석 	100
○ 인지기능 스코폴라민 동물 모델을 사용하여, 염생식물 탈염소재 추출물(PM-EE) 및 기능성성분(Acanthoside B)의 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 스코폴라민 동물모델에서 염생식물 탈염소재 추출물 (PM-EE)의 효능을 해마 및 대뇌피질을 분석하여 확인 - Y-maze 및 Passive Avoidance test 등의 실험동물 분석을 통한 기억력 행동 개선 효능 확인 - Oxidative stress 방어 관련 catalase, SOD, GPx 등의 발현 증가 및 Lipid oxidation 마커인 MDA의 감소 확인 - Akt/CREB pathways를 통한 신경세포 성장인자 BDNF의 발현증가 확인 	100

■ 3차년도 (2018.01.01 ~ 2018.12.31.)

1) 주관연구기관 파이토크퍼레이션

세부목표: 염생식물 탈염소재의 인지기능개선 기능성 지표성분의 분리 정제 및 식품소재 개발 및 수출전략 상품화

3차년도 주관 세부목표	주관(파이토크퍼레이션) 연구개발수행내용	달성도 (%)
○ 인지기능개선 소재 내 기능성성분 극대화를 위한 대량 추출공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 통통마디 탈염소재인 파이토밀(PhytoMeal)의 효소가수분해 추출물에서 우수한 아세틸콜린에스테라제(AChE) 효소 저해활성을 확인하였으므로, 수율과 AChE 효소저해활성, 기타 기능성 화합물 함량(total polyphenol, total saponin, total flavonoid) 등을 기초로 추출공정을 표준화하였음 - 통통마디 탈염소재인 파이토밀(PhytoMeal)의 효소가수분해 추출물(PM-EE) 내 아세틸콜린에스테라제(AChE) 효소 저해 기능성 성분이 Acanthoside B임을 확인하였으므로, 추출물 내에 Acanthoside B 함량이 최대화되는 추출조건을 확립하였음 - 최적 추출 공정: 효소는 식품첨가물 효소(Optivin: cellulose, pectinase mixture 0.5 ~ 1%), 추출용매는 주정으로서 20 ~ 50%, 효소처리 조건 50~55°C 12~15시간, 추출온도는 60 ~ 80°C 의 조건으로 확립하였음 	100
○ 인지기능개선 소재(탈염 통통마디 추출물, PM-EE) 내 지표성분의 자사시험법 및 표준화 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 인지기능개선 소재(탈염 통통마디 추출물, PM-EE)의 QC를 위하여 지표성분은 trans-Ferulic acid 1종으로 최종 결정하였음 (식약처 모뎀토의 및 기술상담 자문) - 인지기능개선 소재(탈염 통통마디 추출물, PM-EE) 내 지표성분 함량 분석과 규격기준은 자사시험법을 통하여 수행되었으며, 공인시험분석기관인 한국기능식품연구원의 시험 분석결과와도 일치하였음 - 분석시료량 (2g), 사용추출용매 (50% 메탄올), 추출방법(초음파추출), 0.22µm 실린지 여과, HPLC 분석, 사용컬럼(C18 역상컬럼), 이동상용매(0.04% TFA, 아세트니트릴), 검색파장(UV 325nm) 	100
○ 인지기능개선 소재(탈염 통통마디 추출물, PM-EE) 내 지표성분 함량의 Validation 실시	<ul style="list-style-type: none"> - 자사시험법의 HPLC 분석을 통하여 안정적으로 머무름시간 15.8 ~ 15.9 분대에서 Sigma Co 제품의 표준품인 trans-Ferulic acid, 통통마디 시료인 PM-EE 내 지표성분인 trans-Ferulic acid 가 다른 물질의 간섭없이 정확하고, 반복적으로, 안정적으로, 분석됨을 확인할 수 있었으므로, 이 조건을 활용하여 시험시료 내 지표성분인 trans-Ferulic acid 함량에 대한 Validation을 실시함 - 시료내 지표성분 trans-Ferulic acid의 함량의 반복성, 직선성, 회수율, 정량한계, 정밀도, 재현성 등을 확인하였음 	100

<p>○ 인지기능개선 소재(탈염 통통마디 추출물, PM-EE) 내 지표성분의 규격 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 지표성분 함량은 PM-EE 3 Lot, 3반복 분석을 통하여 평균값을 구하고, 규격기준은 평균값의 80 ~ 120% 이내로 설정하였음 - 통통마디추출물 PM-EE,의 지표성분 규격은 trans-Ferulic acid(mg/g): 0.83 ~ 1.24 mg/g으로 설정하였음 	<p>100</p>
<p>○ 인지기능개선 소재(탈염 통통마디 추출물, PM-EE) 내 영양성분 및 유해성분 검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 영양성분: 칼로리, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 당류, 회분, 수분, 나트륨, 총레스테롤, 트랜스지방산, 포화지방산을 분석하였음 - 성상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색의 분말 - 중금속: 한국기능식품연구원을 통하여 3Lot 3반복실험을 통하여 납(0.1714), 총비소(0.0562), 카드뮴(0.0820), 총수은(불검출) 4종에 대하여 분석하였으며, 최대섭취량, 제안규격, 제안규격에 의한 일일 최대섭취량을 계산하였음 - 대장균: 3Lot 실험에서 불검출 - 잔류농약 5종 (엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT) : 불검출 	<p>100</p>
<p>○ CRO를 통한 통통마디 추출물(PM-EE)의 인체적용시험을 위한 IB작성, IRB 승인, 서울대 임상시험을 위한 IP제공, 인체적용시험의 모니터링</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 인제적용 시험자 자료집 (Investigator's Brochure, IB)는 원료의 기원, 개발경위, 기능성원료 제조공정, 원료의 특성, 섭취량 평가, 안전성, 기능성 성분, 지표성분, 시험식품 등에 관하여 파이토크퍼레이션에서 작성을 완료하였음 (IB: PHC-PMEE- ver. 1.1) - 경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 PM-EE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험에 관한 CRF(Case Report Form)을 작성 (네오뉴트라) - 만50세이상~만85세이하의 경도인지저하자를 대상으로 PM-EE(SE-EE, 통통마디추출물)를 섭취했을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 인지기능을포함하는 학습능력개선에 미치는 유효성 및 안전성을평가하기 위하여 계획된 프로토콜, 대상자선정, 설문지(CRF), CERAD-K 검사지, 식이조사지, 모니터링 계획등을 작성하여 서울대학교 병원의 의학연구윤리심의위원회(IRB) 심의를 최종 통과함 (2018년 1월 25일) - 시험대상자등록 기간: 2018.03.08.일 첫 시험대상자 방문일로부터 마지막 등록대상자의 검사종료일(2018년 12월 28일)까지 CRO로부터 주기적인 모니터링 보고 받음 - 특히 1년간 300 여번의 이메일 교신이 있었고, 10차례의 CRO측으로부터 newsletter 발송이 있었으면서 전반적인 흐름을 파악하면서 진행할 수 있었음 	<p>100</p>
<p>○ 뇌인지기능개서 통통마디 탈염소재를 활용한 기능성식품</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 통통마디추출물(PM-EE)의 인지기능개선평가 인체적용시험을 위한 시험제품은 코스맥스바이오와 위수탁협약을 체결하여 제형실험 후, 최종적으로 태블릿형태로 제조하였으며, 위약군 	<p>100</p>

개발 및 수출전략 상품화

- 과 주약군의 식별방지를 위하여 녹색코팅으로 절선장방형 제피정제를 제조하였음
- 시험제품의 제형 실험시 배합 부원료로 CMC, dextrin, 유당 등을 비교실험하였으며 최적의 배합 부원료를 설정하였음
- 기타 부원료로 스테아린산마그네슘, 이산화규소등의 배합비율을 설정하였음
- 탈염한 함초로부터 1차 개발된 파이토티의 추출액에 당사 특허소재인 인지기능개선 소재(PM-EE)를 배합하여 바쁜 현대인, 직장인, 수험생의 두뇌활력과 기억력 개선에 컨셉을 둔 유기농/무가당 액상차음료(Ready-To-Drink)를 개발하였음. 최종목표로 “메모리티(MemoryTea)”의 기술 상용화 및 수출을 목표로 하고 있음
- 식약처 식품제조품목허가번호 : 201700948545 (2018.11.07.)
- 2019년 2월에 ㈜다원 OEM을 통하여 대량생산 및 유통 계획

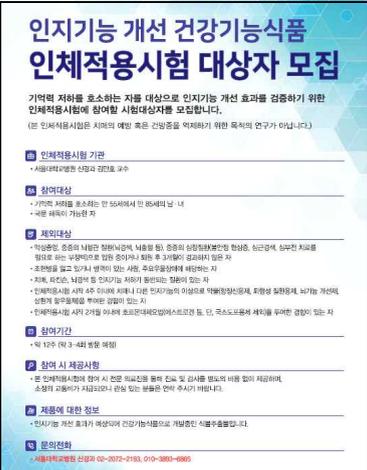


- 미국 몬델레츠(Mondelez), 네슬레(Nestle), 네슬레 퓨리나(Nestle Purina, 일본 가루비(Calbee), Synder's lance, Hils Pet Nutrition, 스페인 GB food 등에 파이토밀(PhytoMeal)을 샘플을 보내고 테스트를 받음, 그중 네슬레 퓨리나와 GB Food사로부터 향후 대량생산시 구매 의향을 나타내는 사전구매의향서를 확보하였음
- 파이토메모리, 파이토밀, 메모리티의 미국 수출을 위한 미국 FDA 식품제조시설 인증을 받음
- 해외 IR 미팅을 통하여 파이토밀, 파이토메모리, 메모리티 제품을 소개하고 제품의 기술력과 가능성을 인정받아 현재 글로벌 소재회사인 에보닉(Evonik)사로부터 시리즈 B 투자 유치를 위하여 노력하였음



2) 협동연구기관: 서울대학교병원 신경과 김만호 교수팀

세부목표: 임상시험을 통한 염생식물 탈염소재(통통마디추출물, PM-EE)의 기억력 및 인지기능개선 표능 평가

3차년도 협동 세부목표	협동(서울대학교병원) 연구개발수행내용	달성도 (%)																																				
<p>○ 인체적용시험 개시 모임</p>	<p>[인체적용시험 개시 모임: 2018년 2월 8일]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2017.06.26. CRO(네오뉴트라), 임상실험연구팀(서울대학교병원 신경과 김만호 교수, 신은경전임의, 한성주박사, 정예솔 연구원, 심지영간호사, 이진아 관리약사), - 의뢰자: 주관연구기관(파이토코퍼레이션 김득회이사, 권미향박사) - CRO: (주)네오뉴트라 (박상욱이사, 유지숙CRM, 서은정, 유지혜CRA) - 시험대상자는 병원내 포스터 부착, 구청 및 보건소의 홍보(CERAD-K)를 통해 모집 - 만 55~85세 이하 기억력 저하를 호소하는 남녀를 기준 - 악성종양, 뇌혈관질환, 중증 심장질환 등으로 입원 또는 퇴원후 3개월 이내는 제외 - DSM-V 주요 우울장애자 제외 	100																																				
<p>○ 인체적용시험을 위한 서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회(IRB) 심의 승인 및 변경 승인</p>	<p>1. IRB 진행 현황</p> <p>1-1. 초심의</p> <table border="1" data-bbox="491 1518 1225 1715"> <thead> <tr> <th>심의 상태</th> <th>접수일</th> <th>심의일</th> <th>결과</th> <th>PT</th> <th>CRF</th> <th>ICF</th> <th>IB</th> <th>승인 유효기간</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>초심의</td> <td>2017.11.10</td> <td>2017.12.06</td> <td>보완 후 재심의</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>보완 후 재심의</td> <td>2017.12.21</td> <td>2018.01.03</td> <td>수정 후 신속심의</td> <td>1.1</td> <td>1.1</td> <td>1.1</td> <td>1.1</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>수정 후 신속심의</td> <td>2018.01.24</td> <td>2018.01.24</td> <td>승인</td> <td>1.2</td> <td>1.2</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>~2019.01.24</td> </tr> </tbody> </table> <p>IRB 최종 승인: 2018년 1월 24일</p> <ul style="list-style-type: none"> - 경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 PM-EE의 유효성 및 안전성을 평가하기위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험 <p>IRB 변경 승인: 선정기준 및 연령 하한선 변경(2018.04.10.)</p>	심의 상태	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간	초심의	2017.11.10	2017.12.06	보완 후 재심의	1.0	1.0	1.0	1.0	-	보완 후 재심의	2017.12.21	2018.01.03	수정 후 신속심의	1.1	1.1	1.1	1.1	-	수정 후 신속심의	2018.01.24	2018.01.24	승인	1.2	1.2	-	-	~2019.01.24	100
심의 상태	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간																														
초심의	2017.11.10	2017.12.06	보완 후 재심의	1.0	1.0	1.0	1.0	-																														
보완 후 재심의	2017.12.21	2018.01.03	수정 후 신속심의	1.1	1.1	1.1	1.1	-																														
수정 후 신속심의	2018.01.24	2018.01.24	승인	1.2	1.2	-	-	~2019.01.24																														

<p>○ 인체적용시험 대상자 등록</p>	<p>3. Enrollment status (2018.12.31(월))</p> <table border="1" data-bbox="496 215 1230 327"> <thead> <tr> <th>Planned Enrollment</th> <th>Screened</th> <th>Screening Fail</th> <th>Randomized n (%)</th> <th>Active</th> <th>D/O</th> <th>Completed</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>60+3*</td> <td>80</td> <td>17</td> <td>63(100%)</td> <td>0</td> <td>6</td> <td>57</td> </tr> </tbody> </table> <p>*선정기준 위반자 등록으로 3명 추가모집 -FPI (First Patient In): 2018.03.08 -LPI (Last Patient In): 2018.10.08 -LPO (Last Patient Out): 2018.12.28 - 목표: 60명/4개월 (2018.02 ~ 2018.05) - 결과: Screened 80명, Randomized 63명/8개월 (2018.10.08.완료) ** 선정/제외기준 위반자 등록으로 3명 추가모집함</p>	Planned Enrollment	Screened	Screening Fail	Randomized n (%)	Active	D/O	Completed	60+3*	80	17	63(100%)	0	6	57	<p>100</p>	
Planned Enrollment	Screened	Screening Fail	Randomized n (%)	Active	D/O	Completed											
60+3*	80	17	63(100%)	0	6	57											
<p>○ 인체적용시험: CRF form 작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 서면동의서, 인구학적조사, 병력 및 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후(혈압, 맥박)측정, 신체계측, 식사지도 및 식이조사, 생활습관지도, 임상병리검사, 심전도검사 - CERAD-K, 유효성검사(ADAS-K, K-CWST, ADCS-ADL, SGDS), 인체적용시험대상자 적합성 평가, 무작위배정, 인체적용시험용 식품처방, 이상반응 및 순응도확인, 병용약물 및 병용요법 확인 	<p>100</p>															
<p>○ PM-EE 투약 및 모니터링</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 총 12차에 걸친 모니터링 실시: (1차: 2018년 3월 28일) ~ 마지막 12차 (2019년 1월 3일) - 인체적용시험식품 보관장소: 서울대학교병원 의생명연구원 3층 임상시험약국 (15 ~ 25°C) - 2018.11.20. 모든시험대상자 IP 불출 완료 - 시험대상자의 이상반응: 특이한 이상소견 없었음 - 총 시험등록자 63명 중 6명 dropped out: 선정기준위반 2인, 동의철회 3인, 병용금지약물 복용 1인 - 임상시험 완료 등록시험자 (57명) 현황 <ul style="list-style-type: none"> 1) 위약군 : 29명 2) 시험군 : 28명 	<p>100</p>															
<p>○ 최종보고서 작성 및 논문 작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 임상시험 완료료 CRF 수거 및 결과 분석 중에 있으며, - 늦어도 2019년 상반기 중 논문 투고 예정 중에 있음 <table border="1" data-bbox="549 1617 1106 1942"> <tr> <td rowspan="7" style="background-color: #e6e6fa;">시험등록자 현황</td> <td>시험군</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td>시험군 D/O</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>완료시험군</td> <td>28</td> </tr> <tr> <td>대조군</td> <td>31</td> </tr> <tr> <td>대조군D/O</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>완료대조군</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>완료등록자</td> <td>57</td> </tr> </table>	시험등록자 현황	시험군	32	시험군 D/O	4	완료시험군	28	대조군	31	대조군D/O	2	완료대조군	29	완료등록자	57	<p>90</p>
시험등록자 현황	시험군		32														
	시험군 D/O		4														
	완료시험군		28														
	대조군		31														
	대조군D/O		2														
	완료대조군		29														
	완료등록자	57															

5-3. 목표 미달성 시 원인(사유)

1) 미달성 목표 내용 : 임상시험의 완료가 당사 계획보다 지연되어 현재 시험식품의 인지능개선 효능(유의성) 검증을 위한 통계분석 중에 있음

- 서울대학교병원 의학윤리심사위원회 의 승인을 득하여 PM-EE의 인지능개선 효능 평가를 위한 인체적용시험은 계획대로 차질없이 수행/완료되었으며, 임상시험 중 대상자들의 특이한 이상반응은 없었음
- 시험대상자 등록기간의 지연으로 전체 임상시험 기간이 길어졌음. 현재, 임상 시험결과의 유의성 평가를 위한 통계분석 등이 진행되고 있음
- 임상시험 종료 후, 인지능개선 효능을 확인하고, IRB 승인보고서와 함께 PM-EE의 식약처 인지능개선 건강기능성 개별인정 원료 신청까지가 당초 목표이었으나, 마지막 등록대상자의 검사종료일이 2018년 12월 28일로서, 현재 임상시험 결과의 통계분석을 통한 유의성 검증 중에 있음. 식약처 개별인정 원료 신청은 본 과제 종료후 1년차 이내로 목표를 산정하였으므로, IRB 승인된 임상시험보고서와 함께 2019년 4~5월 경에 신청할 예정임
- 시험도중 특이한 이상반응은 없었음

2) 미달성 사유: 선정기준에 맞는 대상자의 등록이 예상보다 3개월 지연되었음

- 선정기준에 맞춘 시험대상자 모집에 어려움이 있어, 등록기간이 당초계획보다 3개월 지체 되었음
- 시험대상자의 등록을 위한 인지검사와 선정기준 변경 → IRB 변경신청
- 당초의 선정기준은 만 55세 이상 ~ 만 85세 이하의 기억력을 호소하는 남녀로서, CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준 연령대와 비교하였을 때, 1.0SD 이사 1.5SD 미만인자(CERAD Word list memory or Word delayed recall or Word recognition) 로 스크리닝을 실시하였으나, 등록기준을 다음과 같이 변경하고 IRB 변경신청을 하게되었음 (변경승인일: 2018년 4월 25일)
- 변경된 대상자 선정 기준은 만 50세 이상 ~ 만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남녀로서 K-MMSE 점수가 23점 이상인자로 변경하였음
- 이는 기존의 스크리닝 검사(CERAD-K) 보다 검사가 용이하고, 인지기능검사로 가장 보편적으로 사용되는 K-MMSE 선별검사 및 선정기준을 변경하였음

3) 인체적용시험 책임자인 서울대병원 신경과 김만호 교수의 의견

- 인지검사의 종류의 경우도 다양하나, 제일 중요한 기준, 즉 MMSE 와 ADAS-cog에 대해서는 primary endpoint이며, 반드시 포함되어야 하는 검사인 반면, 다른 검사의 경우는 보조적인 검사로 반드시 필요한 요소는 아니었음. 그러나 반면 MMSE 검사등은 그 검사의 sensitivity가 낮기 때문

에 본 연구에서는 stroop test를 (해당 지시에 걸리는 시간을 data로 하여) 적용하여 정상인의 경우에도 더 개선될 수 있는 여지를 보고자 하였음.

- 특히 MMSE의 경우는 K-MMSE, MMSE-K 등 비슷한 검사를 여러연구자들이 혼용되어 사용하는 경향이 있고, 문헌상 10여년이 지난 reference를 인용하여 기준을 삼는 경우가 있어, 주된 screening의 도구이기는 하지만, 인지기능장애를 호소하는 또는 거의 정상인에 있어서는 특별한 도움이 안 될 수 있다. 따라서 ADAS-cog이나 다른 종류의 검사 (예시로 BDNF 측정 등)을 병행하는 것이 안전할 수 있다고 볼 수 있음.

1. IRB 진행 현황

1-1. 초심의

심의 상태	접수일	심의일	결과	PT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간
초심의	2017.11.10	2017.12.06	보완 후 재심의	1.0	1.0	1.0	1.0	-
보완 후 재심의	2017.12.21	2018.01.03	수정 후 신속심의	1.1	1.1	1.1	1.1	-
수정 후 신속심의	2018.01.24	2018.01.24	승인	1.2	1.2	-	-	~2019.01.24

1-2. 변경심의

	접수일	승인일	변경내용	PT	CRF	ICF	IB
1 차	2018.02.14	2018.02.16	1. 원내, 원외용 포스터 제작 2. 담당 CRA 변경 - 서은정->유지혜	-	-	-	-
2 차	2018.02.28	2018.03.02	1. 모집광고문, 포스터 문구 수정 - 전화번호 추가	-	-	-	-
3 차	2018.04.10	2018.04.25	1. 선정기준 변경 - 연령 하한선 변경	2.0	2.0	2.0	-

- 연구자별로 사용되는 연구검사방법이 다를 수 있으나 현재 치매관련 의약품을 인정하는 기준은 MMSE아 ADAS-cog에 의한 것이 주된 방법이고, 특히 처음 개발된 donepezil의 경우는 6개월간 MMSE의 호전이 1 점 가량 정도밖에 안되었다는 점에서 의미를 두고 허가를 받고 사용되기 시작하였다. 따라서 이러한 신경심리검사를 정함에 있어서 연구자-지원자-CRO간의 이견차이가 있어서 혼선이 있었던 적이 있었음.
- 이러한 test를 실제로 psychology측면에서 apply하는데 어느 정도의 의미가 있는 지 본 경험사례를 토론하기 위해 해당분야를 전문적으로 연구하는 학술대회에 참가하여 기준을 확인해보기도 하였으나, 결론적으로는 연구자나 검사방법에 따라 상당히 다양하게 사용될 수 있다는 다양성을 인정해야 한다는 점을 파악하였고, 사용되는 방법들은 임상시험에 사용되고 있는 식이의 근본적인 기능을 확인하기 위한 tool로서 사용되어야 한다는 점이었음.

6. 연구결과의 활용 계획 등

○ 예상되는 연구성과의 활용분야 및 활용방안

- 통통마디의 탈염기술을 통하여 세계 최초로 국내산 함초의 기능성 소재화 성공은 국내산 소재연구의 활성화에 일조하였으며, 탈염 통통마디 소재의 다양한 효능실험을 통하여 기능성 소재영역의 확대를 기할 수 있음
- Acanthoside B 화합물은 탈염 통통마디의 효소가수분해 공정을 통하여 생물전환된 화합물로 본 과제 연구를 통하여 세계최초로 인지기능개선 효능이 밝혀지게 되었으며, 당사가 이 화합물의 인지기능/

기억력 개선 식품 및 치매 치료 및 예방용 의약품 용도로 특허를 보유하게 되었음 (국내 특허 등록 및 미국 및 유럽 해외 출원 중). 따라서 이를 활용하여 다양한 기억력 관련 기능성 식품 기술 상용화를 기할 수 있게 되었음. 이미 아칸토사이트 B를 함유한 기억력개선 “메모리티” 액상차를 개발하고 현재 사업화를 위하여 박차를 가하고 있음

- 임상시험 소재의 “탈염 통통마디주정추출물인 PM-EE”의 식약처 인지기능개선 개별인정 원료 신청 및 승인을 통하여 2년 내에 통통마디 최초의 식약처 허가 건강기능성 원료 소재화 목표를 달성할 예정이며, 국내 및 해외 사업화를 추진할 계획임
- 임상시험결과, 유효성평가에서 유의성이 없는 결과가 도출되었을 시, 일반식품의 소재화 활용할 예정임 (이 일환으로, 이미, 파이토메모리 소재를 가미한 일반 RTD음료를 사업화 하고 있음)
- 현재 추진되고 있는 시리즈 B 투자유치를 통하여 년내에 대량생산/시설을 완비할 예정임

○ 추가연구의 필요성

- 본 과제를 통하여 개발된 통통마디 탈염소재(PhytoMeal)는 식이섬유, 항산화성분, 폴리페놀, 클로로필, 유용미네랄 등이 풍부하여 **체지방감소 및 체중감소 효과가 탁월하였으므로 (Pharmaceutical Biologh 2018)**; 항비만 펫사료로서 글로벌 펫사료 회사들(네스레 퓨리나, 어피니티)에 소개하였을 때, 반려견을 활용한 임상시험 데이터를 요구받았음. 따라서, 향후 파이토밀의 체지방감소 건강기능성 소재화를 위하여 반려견 및 인체 대상 체지방 감소효능 평가 등 추가연구가 필요함.

1 Pharmaceutical Biology 저널 게재

Pharmaceutical Biology
 ISSN: 1388-0209 (Print); 1344-5114 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2018.1482222>

Desalted Salicornia europaea powder and its active constituent, trans-ferulic acid, exert anti-obesity effects by suppressing adipogenic-related factors
 Md. Mahbubur Rahman, Myung-jin Kim, Jin-Hyoung Kim, Sok-Ho Kim, Hyeon-Kyu Go, Mee-Hyang Kweon & Do-Hyung Kim

2 글로벌 펫푸드 기업 “네스레 퓨리나”, “GB Affinity” 에

- 파이토밀을 펫푸드 항비만소재로 소개
- 샘플 테스트/폴리페놀, 비타민 분석 데이터
- 기능성지표/영양/유해성분 데이터 교환

3 반려견 대상 임상시험 요청/동의

Dear Kim,
 Our Nestlé partnership team agree to sign a letter for your beagle dog tests on phytomeal product.
 Please can you send me a draft document with your proposal request then we could review it and copy it on a Nestlé letter head.
 Don't hesitate to contact me if you need more information.

Best regards,
 Dear Doek Uik,

Thierry LAVALLARD
 Ingredient team
 Centres R&D Nestlé SAS
 rue de l'Europe
 BP 47
 80500 Aubigny - FRANCE
 phone + 33 (0)3 22 98 30 23
 fax + 33 (0)3 22 98 62 27
 e-mail thierry.lavallard@rdcentr.nestle.com

Permitted product Affinity applications the project remains open, but pending to achieve a competitive cost and animal acceptance. Feel the feedback from U'vian.
 The presence of Phytomeal as an ingredient in Affinity pet food formulation:
 As an ingredient with low energy and high fiber content for products for overweight animals, but studying the influence of polyphenols on body fat.
 *Depend on the dose of the ingredient and the "real" effect on body and fat mass evolution in dogs and cats with a target inclusion.
 A Research study would be needed and is not in Affinity plan now.
 Let's keep in touch, and let us know if any news regarding your product's production and progress.
 Kind regards,
 Clara Basso
 Scientific Content Director
 T +33 613642913
 M +33 676996239
 www.thegoodfoods.com

Trigger!! Start up!!

글로벌 수준의 기능성 프리미엄 펫사료 개발

○ 타 연구에의 응용

- 통통마디 냉수 탈염 과정 중에 수득되는 솔트는 당사의 기존 통통마디 열수추출소금인 “파이토솔트”를 대체할 수 있는 제품으로 개발이 가능하며, 특히 냉수추출 “파이토솔트”는 최근 미세플라스틱 오염으로 사회적으로 큰 문제가 되고 있는 천일염과는 달리 “미세플라스틱-프리” 건강 기능성 소금으로

로 프리미엄화가 가능한 기술상용화 소재연구에 응용이 가능하다고 판단됨

- 본 과제를 통하여 일반식품으로 제품화된 액상차음료인 “메모리티(MemoryTea)를 시작으로 통통마디 효소전환 화합물인 ”아칸토사이드 B“를 함유하는 다양한 제품의 개발과, 본 과제를 통하여 분리된 통통마디 유래 항혈전성분인 Irilin B는 강한 항산화 활성과 미백효과도 있으므로, 향후 Irilin B 화합물을 이용한 피부건강 기능성 식품이나 기능성 화장품 연구로도 활용이 가능할 것으로 보임

표. Irilin B와 Arbutin의 타이로시나제 저해활성 비교

시료	농도(μg/ml)	타이로시나제 저해활성(%)
Irilin B	20	21.5±1.7
	50	46.3±3.8
	100	78.6±5.0
	200	94.2±6.4
Arbutin	20	12.2±0.6
	50	24.8±4.1
	100	42.9±1.8
	200	65.4±2.8



○ 기업화 추진 방안

- 임상시험 소재의 “탈염 통통마디주정추출물인 PM-EE”의 식약체 건강기능성 개별인정 신청 완료
- 당사의 위수탁생산기업인 (주)코스맥스바이오를 통하여 OEM 생산
- 제품명 인지기능개선 건강기능성식품 “파이토메모리”의 원가 계산 및 판매단가 설정
- 시장조사, 마케팅 전략수립, SWOT, PEST 분석을 통한 제품의 핵심경쟁요인 설정
- “파이토메모리”의 해외 및 국내 마케팅 - 주로 SNS홍보 및 온라인 마케팅
- B to B 대상 글로벌 기업 노크를 통한 해외 수출 상품화 추진
- 국내는 B to C 중심으로 일반소비자 대상 유통망 개척
- 주요 고객층 설정 등 수익확보 전략



- 제품명: PhytoMemory
- 상품의 종류 : 인지· 기억력 개선 건기식
- 품집 : 통통마디 효소분해추출물
- 제품의 성상 : Tablet
- 제품의 색깔 : 녹색

- 제품의 용량 : 120 tablets
- 포장재 및 규격 : 고밀도 폴리에틸렌

○ 기술이전

- 농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제 35조 제9항에 따라 본과제의 정부출연금에 대응하는 정액기술료(5,800,000원)으로 납부함
- 기술시시 유형: 직접실시(특허기반)
- 기술명: 탈염 통통마디 추출물을 이용한 인지기능개선 소재 제조
- 특허기술: 통통마디 추출물을 포함하는 치매예방 또는 치료 및 인지기능 개선용 약제학적 조성물 (특허등록번호: 10-1938396)



농림 식품 기술 기획 평가 원



수신자 파이토코퍼레이션(주관연구책임자)

(경유)

제목 기술료 감면 승인 알림(파이토코퍼레이션)

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제35조(기술료의 징수)와 관련됩니다.
3. 귀 기관에서 요청한 기술료 감면 건에 대해 아래와 같이 승인합니다.

사업명	과제명	연구기관 (책임자)	실시기업 (대표자)	정부출연금	당초기술료*	최종 기술료**
식품	PhytoMeal(영양식물 유산소)을 이용한 인지기능 개선 기능성 식품 대항산화 및 수송능력 향상을	파이토코퍼레이션 (김미향)	파이토코퍼레이션 (김복희)	290,000천원	29,000천원	총 5,800,000원 + 2019년~2023년 5회 (각 1,160,000원) 분할납부 (원스텝 연구개발 참여 70% 80% 적용) 정부납부기술료 납부계좌 신한은행(가상계좌) 56213499991912

- * 주관연구기관(영리)이 기술실시계약을 체결함에 따라 정부출연금의 10~40% 수준에서 정액으로 책정되는 정부납부기술료로 감면되기 이전의 금액
- ** 주관연구기관(영리)이 실시기업으로부터 징수하여 전문기관에 납부해야 하는 기술료(실시기업의 유형, 납부방식에 따라 기술료 감면을 적용한 금액)

끝

붙임. 참고문헌

김득희, 권미향, 조은아, 윤현주, 박선영 (2016). 염생식물 유래의 탈염 및 기능성이 강화된 영양 조성물과 그 제조방법. 대한민국 특허 10-2016-0055486.

Abe, N., Nemoto, A., Tsuchiya, Y., Hojo, H., & Hirota, A. (2000). Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 306-333

Natalie C., Rafael A, Edison HO, Fernando A., Strahil B. Edison O. (2015) Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. 102, 222-228

Lannello C, Pigni NB, Antognoni F, Poli F, Maxia A, Andrade JP, Bastida J. (2014) A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancreaticum illyricum* L.. 92, 163-167

Kim, T.H., Ku, S.K., Bae, J.S., 2012. Antithrombotic and profibrinolytic activities of eckol and dieckol. *J. Cell. Biochem.* 113, 2877-.2883

Park M.K., Kweon, M.H., Cho H.Y., and Yang H.C. (1999) Anti-coagulant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Codium fragile*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42(2), 140-146

Su Z.R., Fan S.Y., Shi W.G., Zhong B.H., (2015). Discovery of xanthine oxidase inhibitors and/or α -glucosidase inhibitors by carboxyalkyl derivatization based on the flavonoid of apigenin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(14):2778-2781

Peralta M.A., Ortega M.G., Agnese A.M., Cabrera J.L., (2011), Prenylated flavanones with anti-tyrosinase activity from *Dalea boliviana*. *J. Nat. Prod.*, 74(2):158-162

Rasouli M, Ostovar-Ravari A, Shokri-Afra H. (2014) Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 18(14):2020-2024

Kweon M.H., Hwang H.J., Sung H.C.. (2003) Isolation and characterization of anticomplementary uronic acids from the shoots of bamboo *Phyllostachys edulis*, *Planta Med.*, 69(1):56-62

Lee Y.C., Hwang K.H., Han D.H., Kim S.D.. 1997. Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Korean J Food Sci Technol* 29:847-853

Chung, H. J. (2014) Comparison of Total Polyphenols, Total Flavonoids, and Biological Activities of Black Chokeberry and Blueberry Cultivated in Korea, *J. Korean Soc. Food Sci.* 43(9), 1349 ~ 1356

- Choung, M. G., Kang, S.T., Han, W. Y., Baek, I.Y., Kim, H.K., Shin, D.C., Kang, N.S., Hwang, Y.S., An, Y. N., Lim, J. D., Kim, K. S., Park, S. H., Kim, S. L., 2006. Variation of isoflavone contents in Korean soybean germplasm, Korean J. Crop Sci. 51(S), 146-151
- Sung J,H,, Park S,H,, Seo D,H,, Lee J,H,, Hong S.W., Hong S.S. (2009), Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(3):552-556
- Chung Y.C., Chun H.K., Yang J.Y., Kim .JY., Han E.H., Kho Y.H., Jeong H.G. (2005) Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. Arch, Pharm, Res., 28(10):1122-1126
- Lee Y.S., Lee S., Lee H.S., Kim B.K., Ohuchi K., Shin K.H. (2005), Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O-beta-D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues., Biol. Pharm. Bull. 28(5):916-918
- Jang H.S., Kim K.R., Choi S.W., Woo M.H., Choi J.H. (2007) Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts. Ann. Nutr. Metab., 51(2):119-125
- Ku S.K., Kim T.H., Lee S., Kim S.M., Bae J.S., 2013, Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. Food Chem. Toxicol. 53:197-204
- Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. Cancer Lett. 1999 Sep 1;143(2):173-8.
- The effect of Eleutheroside E on behavioral alterations in murine sleep deprivation stress model. Eur J Pharmacol. 2011 May 11;658(2-3):150-5
- Inhibition of Lung Inflammation by *Acanthopanax divaricatus* var. *Albeofructus* and Its Constituents. Biomol Ther (Seoul). 2016 Jan;24(1):67-74
- Eleutheroside E ameliorates arthritis severity in collagen-induced arthritis mice model by suppressing inflammatory cytokine release. Inflammation. 2014 Oct;37(5):1533-43
- High glucose induces rat mesangial cells proliferation and MCP-1 expression via ROS-mediated activation of NF- κ B pathway, which is inhibited by eleutheroside E. J Recept Signal Transduct Res. 2016;36(2):152-7Guerrero A, Piasecki M (2008). Problem-based behavioral science and psychiatry. Springer. pp.141-150
- Kim BW, More SV, Yun YS, Ko HM, Kwak JH, Lee H, Suk KH, Kim IS, Choi DK (2016). A novel synthetic compound MCAP suppresses LPS-induced murine microglial activation in vitro via inhibiting NF- κ B and p38 MAPK pathways. Acta Pharmacologica Sinica 37:334-343

Kim BW, Koppula S, Kumar H, Park JY, Kim IW, More SV, Kim IS, Han SD, Kim SK, Yoon SH, Choi DK (2015). α -Asarone attenuates microglia-mediated neuroinflammation by inhibiting NF kappa B activation and mitigates MPTP-induced behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 97:46-57

Kim BW, Koppula S, Park SY, Hwang JW, Park PJ, Lim JH, Choi DK (2014). Attenuation of inflammatory-mediated neurotoxicity by *Saururus chinensis* extract in LPS-induced BV-2 microglia cells via regulation of NF- κ B signaling and anti-oxidant properties. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 14:e502

Lee HY, Weon JB, Jung YS, Kim NY, Kim MK, Ma CJ (2016). Cognitive-Enhancing Effect of *Aronia melanocarpa* Extract against Memory Impairment Induced by Scopolamine in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016

Poirier E.A, Forgues D, Staub-French S (2017). Understanding the impact of BIM on collaboration: a Canadian case study. *Building Research & Information* 2017;1-15

Kim BW, More SV, Yun YS, Ko HM, Kwak JH, Lee H, Suk KH, Kim IS, Choi DK (2016). A novel synthetic compound MCAP suppresses LPS-induced murine microglial activation in vitro via inhibiting NF- κ B and p38 MAPK pathways. *Acta Pharmacologica Sinica* 37:334-343

Kim BW, Koppula S, Kumar H, Park JY, Kim IW, More SV, Kim IS, Han SD, Kim SK, Yoon SH, Choi DK (2015). α -Asarone attenuates microglia-mediated neuroinflammation by inhibiting NF kappa B activation and mitigates MPTP-induced behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 97:46-57

Kim BW, Koppula S, Park SY, Hwang JW, Park PJ, Lim JH, Choi DK (2014). Attenuation of inflammatory-mediated neurotoxicity by *Saururus chinensis* extract in LPS-induced BV-2 microglia cells via regulation of NF- κ B signaling and anti-oxidant properties. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 14:e502

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) PhytoMeal(염생식물 탈염소재)을 이용한 인지기능 개선 기능성 및 식품 대체소재 개발과 수출전략 상품화						
	(영문) Development of food substitutes having cognitive function-improving capabilities using PhytoMeal (desalted food substitute from halophyte) and commercialization of its export strategy						
주관연구기관	(주)파이토코퍼레이션		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 기업부설연구소			
참 여 기 업				(성명) 권 미 향			
총연구개발비 (666,668천원)	계	666,668,000	총 연 구 기 간	2016.07.07. ~ 2018.12.31. (2년 6월)			
	정부출연 연구개발비	500,000,000		총 인 원	20		
	기업부담금	166,668,000		총 참 여 연 구 원 수	내부인원	8	
	연구기관부담 금				외부인원	12	

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 염생식물 탈염 공정 조건 확립 및 염생식물 탈염소재의 식품소재 개발
2. 염생식물 탈염소재로부터 뇌혈류 개선 및 뇌기능보호 지표성분 추출 및 정제공정의 표준화
3. 신경 세포주(cell-line)를 이용한 염생식물 탈염소재 분획물의 뇌세포보호 기능성확인 및 안정성 검증
4. 염생식물 탈염소재의 효소 가수 분해를 통한 인지기능 개선 효능물질의 추출 효율 극대화
5. 염생식물 탈염소재의 임상시험을 위한 뇌인지 개선용 기능성 시제품 제작
6. 동물실험을 통한 염생식물 탈염소재의 인지기능 개선, 신경손상 억제 기능성 확인 및 안전성 검증
7. 염생식물 탈염소재의 기억력 및 인지기능 개선 임상연구
8. 기능성 지표성분의 표준화 공정 확립
9. 염생식물 탈염소재로부터 뇌신경세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품 소재의 제품화 및 수출전략 상품화

○ 연구내용 및 결과

1. 세계 최초로 염생식물의 탈염(desalination)을 통하여 염생식물 고부가가치 기능성 소재화 기술을 개발하였으며, 국내 특허등록 및 해외특허출원(미국, 유럽, 중국, 일본, 인도)을 완료하였음(주관)
2. 국내 주요 염생식물이며 대규모로 경작이 되고 있는 통통마디의 기능성 영양 탈염소재인 ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 응용(application) 및 제품화 완료 (식약처 제품품목허가 득) (주관)
3. ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 체지방감소 및 지방세포분화 억제 효과 확인(SCI 논문 게재)(제1협동: 건국대학교)
4. ‘파이토밀(PhytoMeal)’의 지방세포분화억제 성분 분리 및 규명 (주관)
5. ‘파이토밀(PhytoMeal)’ 추출물의 항혈전성분(Irilin B) 분리, 정제 및 구조 규명 (국내특허등록 및 해외 PCT출원 완료) (주관)
6. 탈염 통통마디 소재 유래의 항혈전성분을 파이토밀에 가미한 ‘파이토밀-플러스(PhytoMeal-Plus)’의 제품화 (식약처 제품품목허가 득) (주관)
7. 파이토밀의 효소가수분해 주정 추출물인 ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 인지기능개선 기능성 (in

- vitro, in vivo) 효과 확인 (국내 및 해외(미국, 유럽) 특허출원 및 SCI논문 게재) (제1협동 및 주관)
8. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 인지기능개선 효능평가를 위한 인체적용시험 시행 (제2협동: 서울대 병원 신경과 수행/CRO (주)네오뉴트라)
 9. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’의 지표(trans-Ferulic acid) 및 기능성 성분(Acanthoside B) 선정, 분석법 확립 (주관)
 10. ‘파이토메모리(PhytoMemory)’와 ‘파이토밀(PhytoMeal)’을 활용한 통통마디엑상차 “메모리티(MemoryTea)”의 개발 및 제품화 (주관)

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 탈염 통통마디 유래 인기기능개선 건강기능성 소재 ‘파이토메모리’의 기술사업화를 통한 해외수출 및 국내시장 점유
2. 탈염 통통마디의 엑상차음료 ‘메모리티’의 기술사업화를 통한 해외수출 및 국내시장 점유
3. 국내 및 해외(미국, 유럽, 중국, 일본, 인도) 지적재산권 확보로 독점적인 사업화
4. 글로벌 푸드기업(Nestle, GB Food, GNC 등)으로부터 LOI 확보
5. 염생식물로부터 미래 혁신적인 식품소재 기술가치평가를 통한 해외투자 유치
6. 염생식물 재배 농가의 소득 증대
7. 국내 해안 간척지, 유희지 등의 토지이용 확대

주 의

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