발간등록번호
11-1543000-000252-01

Baicalein 고함량 황금의 청각기능 개선 식품소재 개발 및 제품화

(Development of food ingredient for auditory function by enhancement of baicalein content in the *scutellaria baicaleinsis*)

(주) 이든네이처

농림축산식품자료실
0000808

농 림 축 산 식 품 부

0.7
239
013-177

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Baicalein 고함량 황금의 청각기능 개선 식품소재 개발 및 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 11 월 20 일

주관연구기관명 : 이든네이처
주관연구책임자 : 지민근
협동연구기관명 : 경희대학교
협동연구책임자 : 강 동 호
협동연구기관명 : 남부대학교
협동연구책임자 : 홍 빛 나

요 약 문

Ⅰ. 제 목

“Baicalein 고함량 황금의 청각기능 개선 식품소재 개발 및 제품화”

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

- 본 연구과제는 **황금을 식용 유산균 발효공정을 통하여 바이칼레인 고함유 황금으로 변환하여 청각 기능 개선 및 보호 효능 검증 후 제품화 하는 것을 목표**로 함
- 난청에 유효한 천연물 신약과 예방기술은 현재 치료제 혹은 예방기술이 전혀 없는 난청질환에 획기적인 기술이 될 것이고, 현재뿐만 아니라 미래의 고령화 그리고 산업화 사회의 대표적인 질환인 난청을 해소하는데 큰 도움이 될 것임.
- 본 연구의 수행은 관련 분야에서 전 세계에서 최초로 천연물 소재 청각 기능 보호 및 개선을 위한 제품 개발의 선도적인 기술력 확보의 의미가 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 바이칼레인 증대 공정 개발 : 황금을 유산균 발효공정을 통하여 바이칼레인 고함유 황금으로 변환
2. 바이칼레인 고함유 황금 표준화 : HPLC 분석을 통한 황금의 바이칼레인 함량 표준화
3. 황금 원료 및 제품 표준화 : HPLC 분석을 통한 황금의 표준화
4. 바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험 : 난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금의 예방적과 치료적 효능 평가
5. 시제품생산 : 바이칼레인 고함유 황금소재 시제품 생산

Ⅳ. 연구개발결과

1. 바이칼레인 고함유 황금소재 제품 제제 연구 및 제제 선정을 통하여 과립형의 시제품 생산 완료
2. 황금의 주요 성분 중 청각 기능 보호 효과를 나타내는 바이칼레인의 함량을 높이기 위한 발효 균주 및 공정 validation 결과, Aspergillus niger 유래 효소인 SM enzyme으로 bioconversion 조건 수립하여 바이칼레인 함량이 28배 높아지는 것을 확인함
3. HPLC 분석을 통하여 황금의 표준화 및 발효 황금의 함량 분석을 통한 표준화
4. 발효 황금의 안정성 실험을 위해 동물 모델을 통해 LD_{50} 평가한 결과 독성 나타나지 않음
5. 바이칼레인 고함유 황금 청각기능 개선 효능 비교시 발효 전보다 발효 후 황금의 청각 기능 개선 효능이 더 우수한 것으로 나타남
6. 발효 황금의 용량 별 청각 기능 개선 평가 결과 용량이 증가할수록 청각 기능 개선 효능이

더 우수한 것으로 나타남
6. 소음성 난청 개선 물질로 알려진 NAC와의 비교 실험에서 발효 전 황금은 NAC와 비슷한 효과를 나타내었고, 발효 후 황금은 NAC 보다 더 우수한 효능을 나타냄

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 특허 등록 1건이 완료 되었고 엔바이오텍 회사 설립 이후 SCI급 논문과 특허 출원, 그리고 기술이전 예정.
2. 난청 실험동물 모델을 통한 전임상 유효성 데이터를 확보를 통한 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발 가능
3. 전 세계에서 최초로 천연물을 이용한 난청 개선 및 청각 기능 보호를 위한 선도적인 기술력 확보
4. 본 과제의 전임상 결과를 기초로 난청개선 개별인정형 건강기능식품 개발 착수 가능

SUMMARY

Ⅰ. Subject

"Development of food ingredient for auditory function by enhancement of baicalein content in the *scutellaria baicaleinsis*"

Ⅱ. Purpose and need for research and development

- Purpose of this research is to commercialize of *scutellaria baicaleinsis*-containing high dose of baicalein through Lactic acid fermentation process improved the efficacy of hearing function enhancement and protection.
- Development of drugs or technology of hearing loss prevention or treatment in natural product will be a breakthrough technology, as well as the current and future major aging disease, hearing loss will be a big help to resolve.

Ⅲ. Content and scope of research and development

1. Baicalein increased process development: *scutellaria baicaleinsis*-containing high dose of baicalein through Lactic acid fermentation process development
2. Bioconversion *scutellaria baicaleinsis* containing high dose baicalein standard: HPLC analysis of *scutellaria baicaleinsis* standard containing high dose baicalein
3. Raw materials of *scutellaria baicaleinsis* and product standard: HPLC analysis of of *scutellaria baicaleinsis* and product
4. Auditory function tests of bioconversion *scutellaria baicaleinsis*: Electrophysiologic evaluation using hearing loss animal model to confirm the preventing or therapeutic efficacy of bioconversion *scutellaria baicaleinsis* against hearing loss and to compare the efficacy between before and after bioconversion.
5. Prototype production: Prototype production of bioconversion *scutellaria baicaleinsis* containing high dose baicalein

Ⅳ. Results of research and development

1. Completion of prototypes production of bioconversion *scutellaria baicaleinsis* containing high dose baicalein
2. Establishment of the optimal process and validation of bioconversion *scutellaria baicaleinsis* containing high dose baicalein
3. Standardization of bioconversion *scutellaria baicaleinsis* containing high dose baicalein through HPLC analysis

4. Safety confirmation of bioconversion *scutellaria baicaleinsis* in an animal model through the LD50 toxicity test
5. bioconversion of *scutellaria baicaleinsis* enhances auditory function in noise-induced hearing loss animal model compared with before bioconversion of *scutellaria baicaleinsis* treated animal.
6. bioconversion of *scutellaria baicaleinsis* showed the superior efficacy than NAC, is known as noise-induced hearing loss improved material, in animal model.

Ⅴ. Research utilization plan and performance

1. Patented one cases have been completed and SCI-grade paper is being prepared. In addition to the technology transfer agreement is being in Edennature.
2. Development of hearing-protection food using preclinical efficacy data in animal models
3. Secure the world's first leading technology of hearing loss prevention or treatment in natural product

CONTENTS

Chapter 1 Overview of research and development projects
Section 1 Domestic and international economic needs
1. Domestic and international economic status
2. Domestic and international economic issues
3. Domestic and international economic outlook
Section 2 Domestic and international industrial needs
1. Domestic and international industrial status
2. Domestic and international industrial issues
3. Domestic and international industrial outlook
Section 3 The need for research and development
Section 4 The purpose and scope of research and development
1. The purpose of research and development
2. A range of research and development
3. Cooperative task - specific research objectives and content

Chapter 2 Status of domestic and international technology development
Section 1 Status of domestic and international technology
1. Status of domestic and international technology
2. Problems of domestic and international technology
3. Outlook of domestic and international technology
Section 2 Position of domestic and international technology
1. Patent
2. Research
3. Product and market

Chapter 3 Results of research
Section 1 How to Research and Development
Section 2 Results of research
1. Prototype production
2. Process development of bioconversion of *scutellaria baicaleinsis*
3. The LD50 evaluation in animal models
4. Noise-induced hearing loss animal model validation
5. Auditory function tests after bioconversion of *scutellaria baicaleinsis*
6. Comparison the efficacy in the auditory function between baicalein and baicalin
7. Comparison the efficacy in the auditory function of *scutellaria baicaleinsis*
8. Comparison the efficacy in the auditory function after bioconversion of

scutellaria baicaleinsis
9. Comparison the efficacy in the auditory function between before and after bioconversion of *scutellaria baicaleinsis*
10. Comparison the efficacy in the auditory function by dose of bioconversion of *scutellaria baicaleinsis*
11. Comparison the efficacy in the auditory function between NAC and *scutellaria baicaleinsis*
12. Comparison the efficacy in the auditory function between NAC and bioconversion *scutellaria baicaleinsis*

Chapter 4 Goal achievement and contribution of related fields
Section 1 Goal and achievement of research and development
Section 2 Contribution of related fields
1. Technical aspects
2. Economic / industrial aspects

Chapter 5, Accomplishment and utilization plan of research and development
Section 1 Accomplishment of research and development
Section 2 Utilization plan of research and development
1. Technical aspects
2. Economic / industrial aspects

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요
제 1 절 국내외 경제적 필요성
1. 국내외 경제적 현황
2. 국내외 경제적 문제점
3. 국내외 경제적 전망
제 2 절 국내외 산업적 필요성
1. 국내외 산업적 현황
2. 국내외 산업적 문제점
3. 국내외 산업적 전망
제 3 절 연구개발의 필요성
제 4 절 연구 개발의 목표 및 범위
1. 연구 개발의 목표
2. 연구 개발의 범위
3. 협동 과제별 연구 목표 및 내용

제 2 장 국내외 기술개발 현황
제 1 절 국내외 기술적 현황
1. 국내외 기술적 현황
2. 국내외 기술적 문제점
3. 국내외 기술적 전망
제 2 절 연구 결과의 기술적 위치
1. 특허 측면
2. 연구측면
3. 제품 및 시장분석 측면

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과
제 1 절 연구 개발 방법
제 2 절 연구 내용 및 결과
1. 시제품생산
2. 바이칼레인 고 함량 발효 공정 개발
3. 동물 모델을 통해 LD50 평가
4. 소음성 난청 동물모델 validation
5. 바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험
6. 바이칼레인과 바이칼린의 청각기능 효능 비교 시험
7. 황금의 청각기능 효능 비교 시험
8. 발효 후 바이칼레인 고함유 황금의 청각기능 효능 비교 시험

9. 황금의 발효 전과 발효 후 청각 기능 비교
10. 발효 황금의 함량별 청각기능 비교
11. 함량별 황금과 NAC 투여 마우스의 청각기능 비교
12. 발효 황금과 NAC 투여 마우스의 청각기능 비교

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
제 1 절 연구개발의 목표 및 달성도
제 2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도
1. 기술적측면
2. 경제/산업적 측면

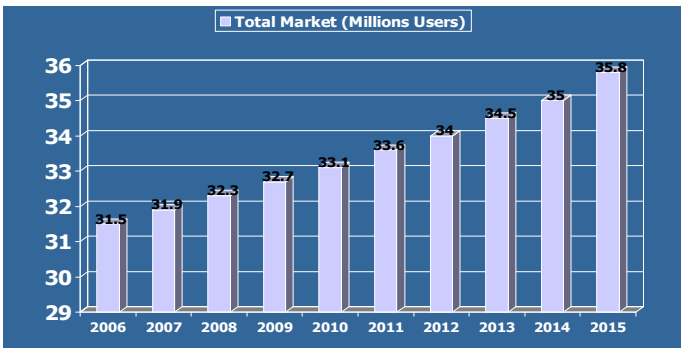
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
제 1 절 연구 개발 성과
제 2 절 연구 개발 성과 활용 계획
1. 기술적측면
2. 경제/산업적 측면

제 1 장　연구개발과제의 개요

제 1 절 국내외 경제적 필요성

1. 국내외 경제적 현황

- 전세계적으로 난청인구 급증
- 난청인구 증가 원인 : 1) 노인인구 증가
  2) 오디오기기사용 등에 따른 소음성 난청인구 증가
  3) 보청기 이외의 난청관련 치료기술 부재
- 2005년 세계보건기구(WHO)는 보청기 착용이 필요한 난청인구를 2억 6천만명으로 추산
- 미국 내 난청인은 전체 인구의 10%인 3230만명, 2015년에 3580만명으로 증가.

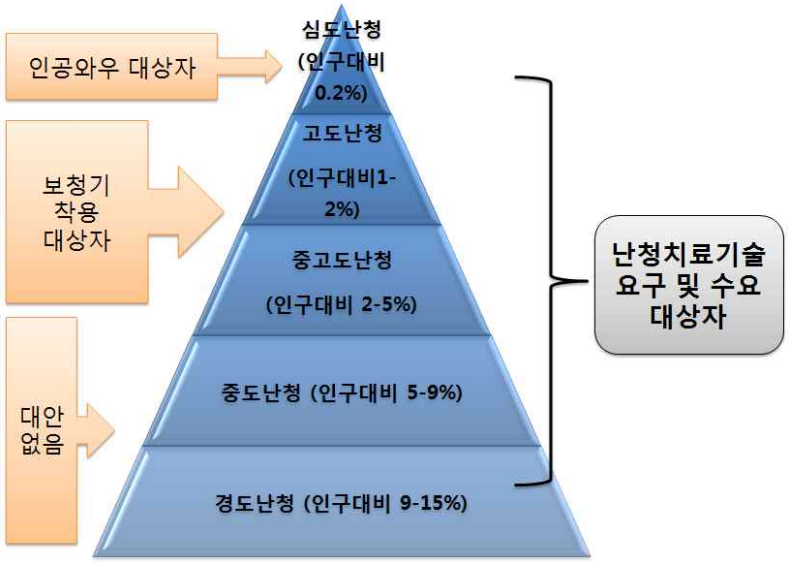


Better Hearing Institute Marke Trak VIITM Semi-Annual Hearing Aid Market Survey/ Sergei Kotchkin Phd

- 2015년 미국의 보청기 시장 약 3조원
- 세계 보청기 시장은 34억 달러 (Koncept Analytics사, 2007년 보고서)임

2. 국내외 경제적 문제점

- 난청관련 치료기술 및 의약품 부재
- 현재까지는 보청기와 인공와우만이 보조도구로 사용
- **국내의 경우 등록된 중도 이상의 청각장애인과 등록되지 않은 경도의 청각장애인을 합하면 최소 100만명 이상이 될 것으로 추정.**
- 보청기나 인공와우는 고가의 의료장비로써 전량 수입품임. 즉 국내에서 소비되는 난청 관련 의료장비 및 보장구들은 모두 수입품으로 현재까지 **관련 기술이 없는 국내에서는 청각장애인이 증가할수록 더 많은 외화를 소비해야 함.**



3. 국내외 경제적 전망

- 현재의 시장은 특별한 치료방법이 없는 관계로 기기적인 도움(보청기)으로 생활에 불편을 일부 개선하는 정도의 방법이 사용되고 있으나, **이 분야에 치료제 또는 개선 식품이 개발된다면 폭발적 수요와 매출이 발생할 것으로 예상**됨.
- 청각장애인의 증가는 사회, 경제적 비용의 증가로 연계되어 치료제 또는 개선 식품의 개발은 사회, 경제적 비용 절감에 큰 역할을 할 것으로 기대됨.

제 2 절 국내외 산업적 필요성

1. 국내외 산업적 현황

- 현재까지 난청을 치료하는 치료제는 개발되지 못한 상태이며, acetylcysteine이 미국에서 치료제로 허가 받기 위한 임상을 진행중인 정도임. 그리고 기능식품 소재로는 알파리포산이 미국과 일본 등에서 난청 개선 용도로 사용되고 있으나 개선 효과는 미미한 것으로 평가받고 있음.

2. 국내외 산업적 문제점

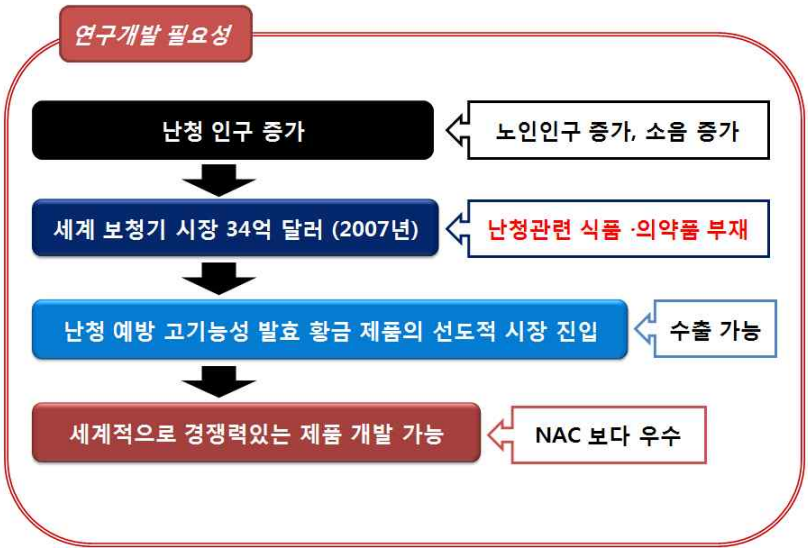
- 보청기나 인공와우는 증폭기로써 근본적인 난청 해소가 아닌 청각보조도구로써의 기능
- 국내의 난청 산업은 개념정립 단계임
- 난청의 예방 및 치료제 개발에 대한 연구인력, 관련 기술 등에 인프라 부족

3. 국내외 산업적 전망

- 세계의 제약 및 식품 산업에서 난치성 질환인 난청에 대한 관심 높음
- 난청 **분야에 치료제 또는 개선 식품이 개발된다면 폭발적 수요와 매출이 발생할 것으로 예상**됨.

제 3 절 연구개발의 필요성

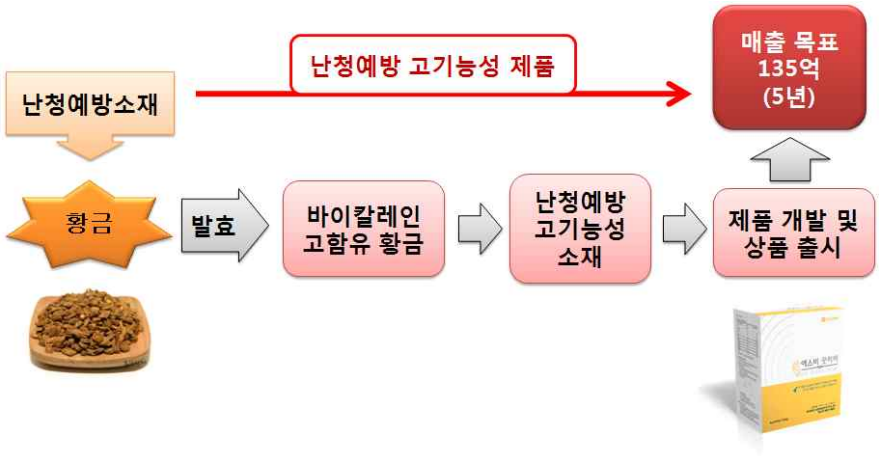
- 이미 본 연구팀은 소음성 난청 실험동물 모델에서 **NAC와 비교하여 약 40% 이상 efficacy 가 높은 황금 추출물과 주 효능 성분으로 바이칼레인(baicalein)을 발견하여 관련 원천기술을 보유하고 있음.**
- 그러나 바이칼레인의 황금 추출물 내 함량이 낮아 기능성의 개선이 필요함.
- 따라서 본 연구과제는 **황금을 식용 유산균 발효공정을 통하여 바이칼레인 고함유 황금으로 변환하여 청각 기능 개선 및 보호 효능 검증 후 제품화 하는 것을 본 연구의 목표**로 함
- 난청에 유효한 천연물 신약과 예방기술은 현재 치료제 혹은 예방기술이 전혀 없는 난청질환에 획기적인 기술이 될 것이고, 현재뿐만 아니라 미래의 고령화 그리고 산업화 사회의 대표적인 질환인 난청을 해소하는데 큰 도움이 될 것임.
- 본 연구의 수행은 관련 분야에서 전 세계에서 최초로 천연물 소재 청각 기능 보호 및 개선을 위한 제품 개발의 선도적인 기술력 확보의 의미가 있음.
- **본 과제의 전임상 결과를 기초로 2차 연구과제로 난청개선 개별인정형 건강기능식품 개발 착수 가능**



제 4 절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구 개발의 목표

- 본 연구과제는 **황금을 유산균 발효공정을 통하여 바이칼레인 고함유 황금으로 변환하여 청각 기능 개선 및 보호 효능 검증 후 제품개발, 상품 출시를 목표**로 함.



2. 연구 개발의 범위

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	바이칼레인 증대 공정 개발	황금을 유산균 발효공정을 통하여 바이칼레인 고함유 황금으로 변환
	바이칼레인 고함유 황금 표준화	HPLC 분석을 통한 황금의 바이칼레인 함량 표준화
	황금 원료 표준화	HPLC 분석을 통한 황금의 표준화
	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금의 예방적과 치료적 효능 평가
2차년도	제품 표준화	HPLC 분석을 통한 제품의 표준화
	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금의 예방적과 치료적 효능 비교
	시제품생산	바이칼레인 고함유 황금소재 시제품 생산

3. 협동 과제별 연구 목표 및 내용

구분	목표	주요 연구개발 내용
주관연구기관 (이든네이처)	바이칼레인 증대 공정 개발	황금을 유산균 발효공정을 통하여 바이칼레인 고함유 황금으로 변환
	바이칼레인 고함유 황금 시료 제작 및 공급	바이칼레인 고함유 황금 시료 제작 및 공급
	시제품생산	바이칼레인 고함유 황금소재 시제품 생산
협동연구과제 (경희대)	황금 원료 표준화	HPLC 분석을 통한 황금의 표준화
	제품 표준화	HPLC 분석을 통한 제품의 표준화
	바이칼레인 고함유 황금 표준화	HPLC 분석을 통한 황금의 바이칼레인 함량 표준화
	바이칼레인 고함유 황금소재 특허 출원 및 기술이전	바이칼레인 고함유 황금소재 특허 출원 및 기술이전
협동연구과제 (남부대)	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금의 효능 평가
	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 효능 비교	난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금과 기존의 NAC와의 효능 비교

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술적 현황

1. 국내외 기술적 현황

- 현재까지 **난청을 치료하는 치료제는 개발되지 못한 상태임.**
- **N-acetylcysteine(NAC) 성분으로 현재 소음성 난청 예방 및 치료 의약품 허가를 위한 임상실험 진행중**
- N-acetylcysteine(NAC) 성분인 The Hearing Pill (American BioHealth Group, USA, US Navy Patents 6,177,434 and 6,649,621, http://www.thehearingpill.com)이 건강보조제로 판매중
- 본 연구는 청각기능 보호 및 개선 식품 소재 개발 및 제품화를 목적으로 한 연구를 국내에서 처음 시도하고자 함.

2. 국내외 기술적 문제점

- 소음성 난청은 예방 외에 치료방법이 없어 보청기나 인공와우 등을 사용해야 함. 그러나 이러한 기계적 장치도 **청각장애를 완전히 해소하지 못하고, 기계적인 한계를 안고 있음.**

2. 국내외 기술적 전망

- 청각장애를 예방 및 치료하는 약물로써 경쟁 기술이 없고, 이는 선택적인 소비가 아닌 **절대적인 소비품목으로 소음성 난청에 대한 치료 약물이 개발되면 시장 규모가 전 세계적선도적 기술이 될 것임.**
- N-acetylcysteine(NAC)성분은 chemical compound인 반면, 본 과제에서 연구되는 물질들은 식용 가능한 전통 **한약재에서 추출한 물질로 경쟁력있는 제품**이 될 것으로 판단됨.

제 2 절 연구 결과의 기술적 위치

1. 특허 측면

○ 기존 특허 조사 결과 황금 발효 후 유효 성분 증가에 대한 특허는 없었고, 황금의 맛을 개선하기 위한 특허만 1개 있음

○ 황금과 난청에 대한 특허 조사 결과 본 연구팀이 보유한 특허 1개(황금 추출물을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 조성물) 만이 조사됨

○ 본 연구 결과를 통해 황금의 발효 후 증대된 유효성분의 청각 기능의 예방 및 보호 효능에 대한 특허 출원 중이고, 황금 유효 성분 중 바이칼레인이 청각 기능의 예방 및 보호 효능이 있음에 대한 특허는 등록되었음.

○ **발효 황금의 청각 기능의 예방 및 보호 효능에 대한 특허권 확보로 향후 제품화 및 사업화에 선도적인 역할이 기대됨**

2. 연구 측면

○ 기존 논문 조사 시 본 연구팀의 선행 연구만이 황금 또는 바이칼레인의 청각 기능 보호 효과를 확인한 논문으로 검색되고 발효 황금추출물 또는 바이칼레인의 발효에 대한 논문은 없음

○ 본 연구 팀은, 연구 결과인 황금추출물의 발효 후 유효성분 증대 기술과 청각 기능 보호 효과 연구 결과 등을 국제 학술대회에 발표하였고, 현재 국제 학술지에 게재 중임.

3. 제품 및 시장분석 측면

○ 국내 및 국외시장 분석결과 난청인구는 증가하고 있는 반면, 난청 치료 및 예방 기술은 부재하여 난청의 예방 및 치료를 위한 제품은 그 시장성이 국내외에 매우 큼

○ 본 연구과제에서는 황금 추출물의 발효를 통한 유효성분 바이칼레인을 증대시켜 난청의 예방 및 개선 식품 개발 방향으로 연구를 추진하여 관련 제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 방법

< 1년차 >

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
바이칼레인 증대 공정 개발	- 황금을 유산균으로 발효	- 유산균 발효를 통해 소음성 난청에 효능이 검증된 바이칼레인 고함유 황금으로 변환 - 발효 유산균주 선택과 발효 조건 수립
바이칼레인 고함유 황금 표준화	- HPLC 분석을 통한 황금의 바이칼레인 함량 표준화	- 후보 유산균주에 의해 발효된 황금을 HPLC 분석을 통해 바이칼레인 함량 분석 - 최종 결정된 유산균주의 발효 조건에 따른 바이칼레인 함량을 HPLC로 분석
황금 원료 표준화	- HPLC 분석을 통한 황금의 표준화	- 황금의 성분인 바이칼레인과 바이칼린의 정량분석을 위해 HPLC을 사용. - 황금 발효추출물의 바이칼레인과 바이칼린의 HPLC 정량분석을 통한 원료 표준화
소음성 난청 동물 모델 제작	- 소음성 난청 동물 모델의 제작을 위한 validation	- 소음성 난청 동물 모델 제작을 위해 소음 노출 강도 및 노출 시간에 따른 청각 기능 평가 - 청각 손상의 pattern을 평가하기 위해 장단기로 청각 기능 평가
바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	- 바이칼레인 고함유 황금의 소음성 난청 예방적과 치료적 효능 평가	- 동물 모델을 이용하여 바이칼레인 고함유 황금 투약 후 소음노출로 황금의 예방적 효과 평가 - 동물 모델을 이용하여 소음 노출 후 바이칼레인 고함유 황금 투약 후 치료적 효과 평가 - 전기생리학적 평가 방법인 auditory brainstem respopnse (ABR), auditory middle latency response (AMLR)과 otoacoustic emission (OAE)를 이용하여 평가

< 2년차 >

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
바이칼레인 증대 공정 개발	최적 제제 선정	- 바이칼레인 고함유 황금소재 제품 제제 연구 및 제제 선정
	시제품생산	- 바이칼레인 고함유 황금소재 시제품 생산
바이칼레인 고함유 황금 원료 및 제품 표준화	황금 발효 공정 validation	- 최적 유산 균주로 현재 식품으로 사용되고 있는 Aspergillus niger 유래 효소 (파우더 타입의 commercial 한 효소)를 이용하여 바이칼레인 고함유 황금 대량 생산을 위한 bioconversion 공정 validation - 효소 비율 및 발효 조건 수립
	바이칼레인 고함유 황금 제품 표준화	- HPLC로 bioconversion에 따른 바이칼레인 정량 분석 - Bioconversion 황금의 HPLC 분석 조건 수립 - HPLC 분석을 통한 바이칼레인 고함량 황금 제품의 표준화
	바이칼레인 고함유 황금소재 특허 출원 및 기술이전	- 바이칼레인 고함유 황금소재 특허 출원 및 기술이전
바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 효능 비교	- 동물 모델을 통해 LD_{50} 평가
		- 난청 동물 모델로 바이칼레인 고함유 황금 최종 표준화 시료에서 전기생리학적 측정으로 용량별 효능 비교
		- 난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금과 기존의 NAC와 효능 비교

제 2 절 연구 내용 및 결과

1. 시제품생산

가. 제품 제작

- 1일 섭취용량은 동물실험 결과를 기준으로 인체에 안전하면서 일정한 기능성을 나타낼 수 있도록 설정.
- 보존방법은 직사광선 및 고온다습한 곳을 피해 서늘한 곳에 보관하는 것을 권함. 유통기한은 관련법규에 따라 식품의 품목제조신고 기준을 준수하여 설정.
- 주의사항
  1) 포장지에 의한 상처에 주의(어린이들의 손에 닿지 않는 곳에 보관 권장)
  2) 유통기한 내 변질의 위험이 있는 경우 섭취를 중단하고 제품 수령처에서 확인필요.
  3) 섭취 과정중 알러지 등 이상 반응이 있을 시 즉시 섭취 중단 후 문의처에 확인 필요.

나. 제품 디자인

다. 발효 황금 대량 생산 시스템 구축

(1) 황금의 대량 추출

2) 황금추출액의 대량 발효

라. 이든네이처에서의 연구 결과 홍보 및 제품 발표

마. 이든네이처에서의 pilot 연구

- 이든네이처를 통하여 난청이 있는 지원자들에게 시제품 한달 복용 후 난청에 대한 자가설문지와 순음청력검사 평가한 결과, 시제품 복용 후 자가설문지 score가 5-10% 정도 낮아져 난청 개선에 대한 긍정적인 답변을 들었으며, 순음청력검사의 결과에서도 3-4 dB 정도 개선되는 효과를 보였음.

2. 바이칼레인 고 함량 발효 공정 개발

가. 바이칼레인 전환 최적 발효균 도출을 위해 유산균 균주 screening

바이칼레인 고 함량 발효 공정 개발

○ 연구 방법

- 바이칼레인 전환 최적 발효균 도출을 위해 유산균 균주 screening
- Screening 결과에서 바이칼레인 함량이 높은 후보 유산균주 도출
- 발효 후 HPLC 분석으로 발효 황금 내 바이칼레인 함량 증가 유산균주 검색
- 바이칼린에서 바이칼레인으로 bioconversion 시킨 유산균주의 발효 조건 수립

○ 연구 결과

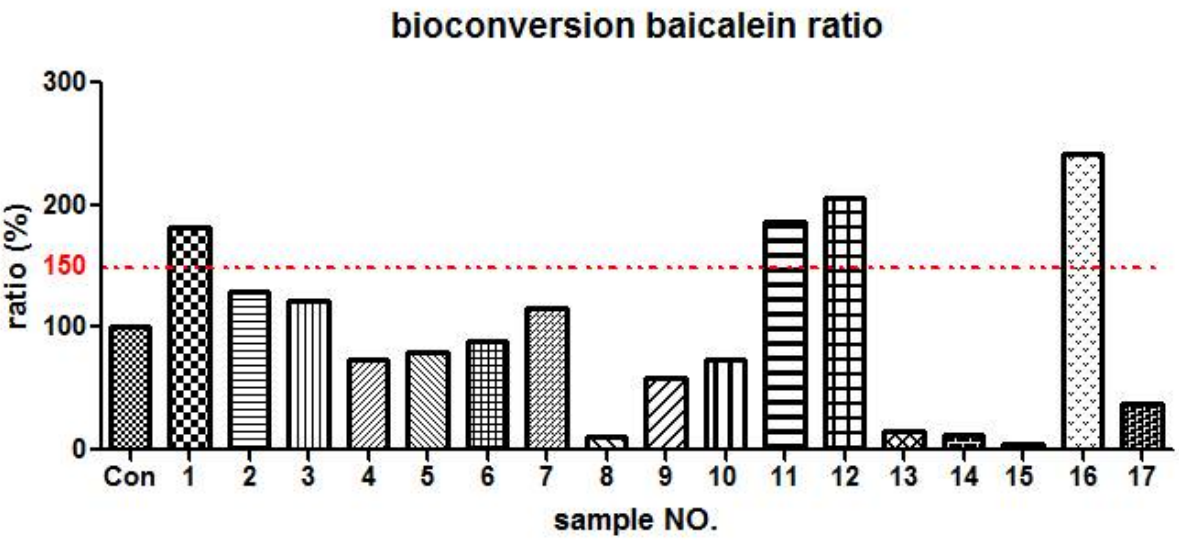
- 6종의 유산균의 발효 조건 또는 효소 함량에 따라 황금을 발효시킴
- 아래의 표는 6가지 유산균에 대한 균주 및 실험 방법임

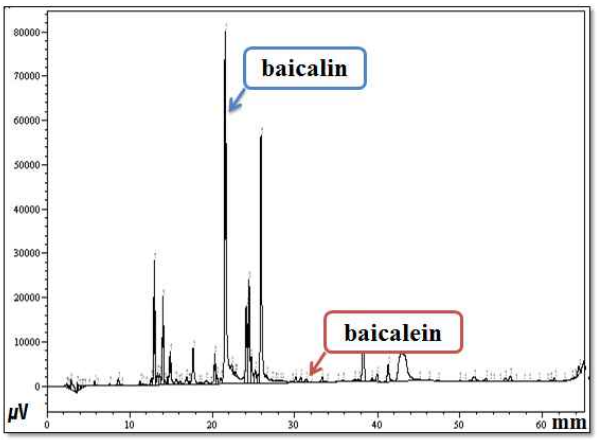
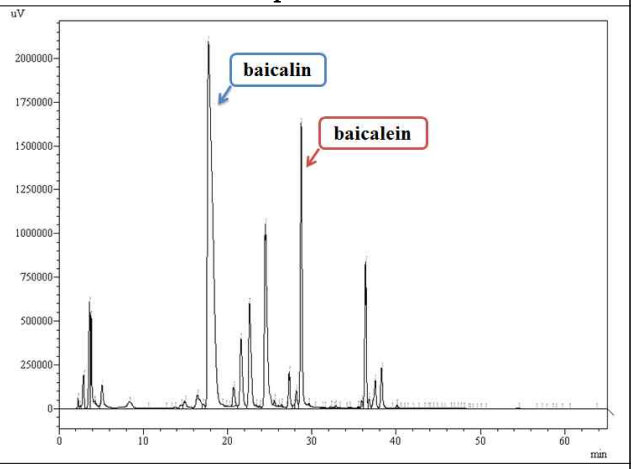
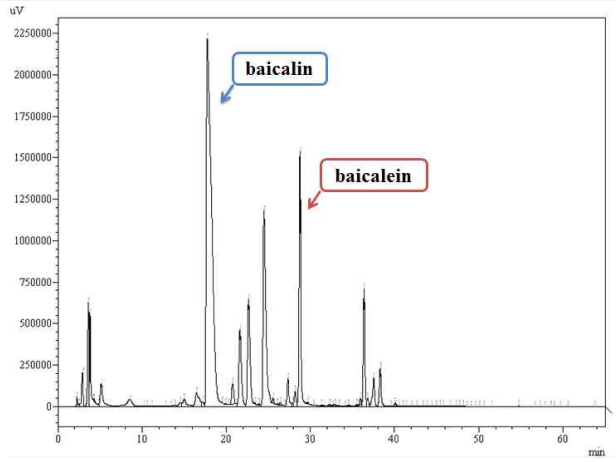
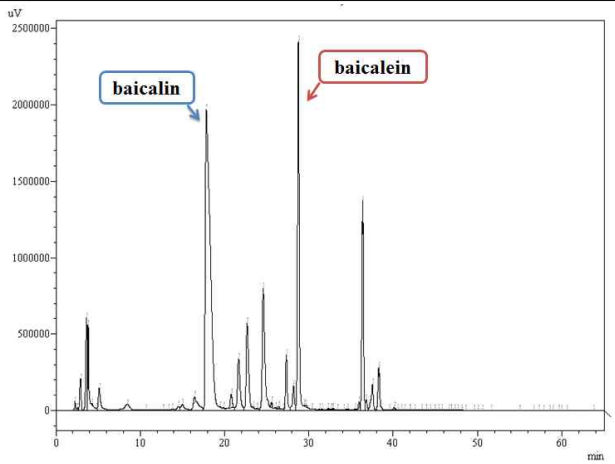
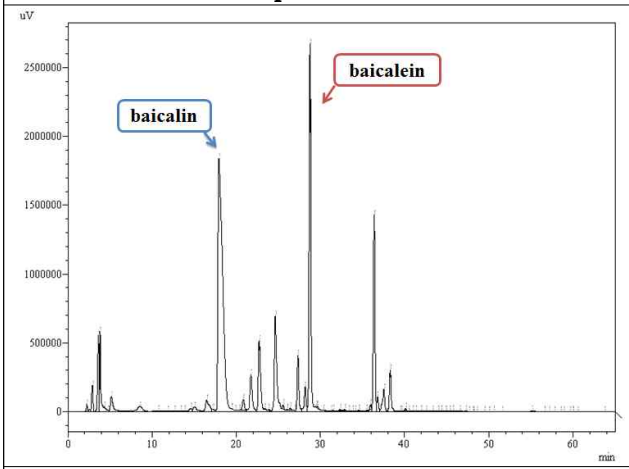
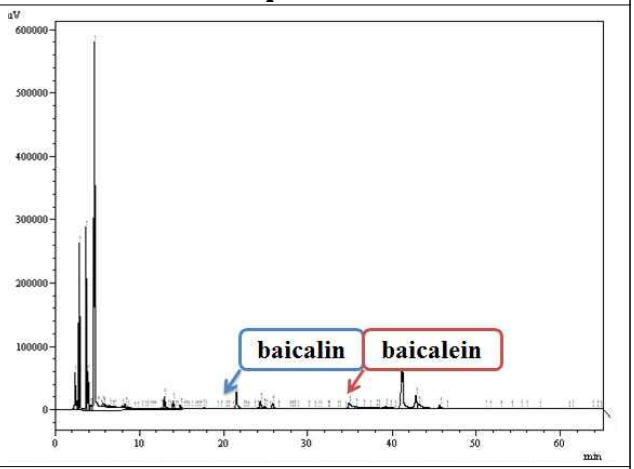
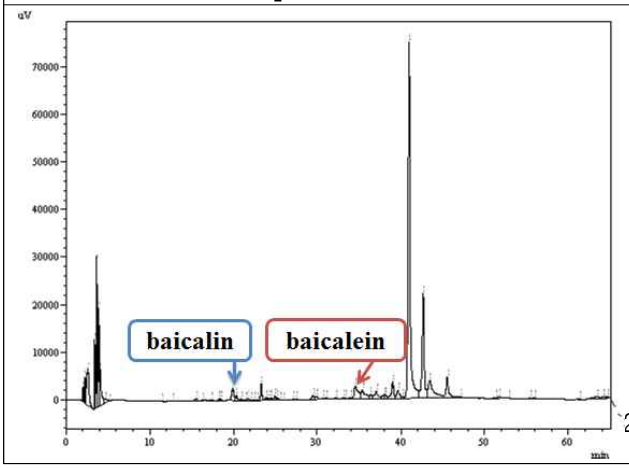
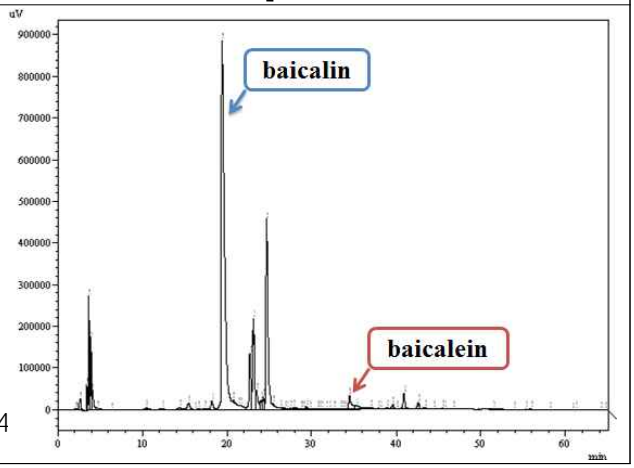
시료 NO.	발효 균주	황금 Ex.	효소 첨가량	물 첨가량	반응 시간	반응 온도	실험설명
CON	-	200 mg	-	2 ml	-	-	-
1	En1	200 mg	20 mg	2 ml	48 h	55℃	- Aspergillus niger유래 효소, 상용화
2	En1	200 mg	20 mg	2 ml			
3	En1	200 mg	10 mg	2 ml			- 1,2번과 동일한 효소 이용, 농도는 1/2로 줄임
4	En5	200 mg	20 mg	2 ml			- Aspergillus oryzae유래 효소, 상용화
5	En7-5	200 mg	20 mg	2 ml			- 신종 균주, Aspergillus niger와 99% 일치
6	En7-5-1	200 mg	20 mg	2 ml			- 신종 균주 ,Aspergillus niger와 99% 일치
7	En1	200 mg	40 mg	2 ml			- 1 번과 동일한 효소로 농도를 2배로 함
8	En5	200 mg	40 mg	2 ml			- 4번과 동일한 효소로 농도를 2배로 함
9	En7-5	200 mg	40 mg	2 ml			- 5번과 동일한 효소로 농도를 2배로 함
10	En7-5-1	200 mg	40 mg	2 ml			- 6번과 동일한 효소로 농도를 2배로 함
11	En8	200 mg	20 mg	2 ml			- Aspergillus niger유래 효소 - 액상 타입의 commercial 한 효소
12	En8-1	200 mg	20 mg	2 ml			- Aspergillus niger유래 효소 - 파우더 타입의 commercial 한 효소
13	bgp1	1 mg	1 mg	1 ml	18h		- 신종균주로 발효시간 18시간
14	bgp1	1 mg	1 mg	1 ml	24h		- 신종균주로 발효시간 24시간
15	bgp1	1 mg	1 mg	1 ml	48h		- 신종균주로 발효시간 48시간
16	DCY65	1 mg	0.1 mg	1 ml	18h		- 신종균주로 Lactobacillus brevis 유래 효소 - 발효시간 18시간
17	DCY65	1 mg	0.1 mg	1 ml	24h		- 13번과 동일한 효소로 발효 시간이 24시간임

- 위의 17가지 발효 황금에 대해 HPLC 분석으로 바이칼레인과 바이칼린 함량을 분석

HPLC 분석 조건	
Mobile phase(%)	WATER(85) : ACN(15)
Flow rate	1.0 ml/min
UV detector	280 nm
Oven	40℃
Column	Biochoff chromatography, ProntoSIL 250 * 4.6 mm
HPLC : LC-20A HPLC instrument, Shimadzu	

- 발효전 황금을 대조군 (Con)으로 하여 17가지의 각각의 발효 균주를 이용하여 황금을 발효시킨 후 HPLC 분석으로 바이칼레인 함량 비교 시 시료 NO. 1, 11, 12, 16 번에서 바이칼레인 함량이 발효전보다 50%이상 증가하는 것으로 나타남



Control	sample NO. 1
	
sample NO. 3	**sample NO. 11**
	
sample NO. 12	**sample NO. 14**
	
sample NO. 15	**sample NO. 17**
	

나. Aspergillus niger 유래 효소인 SM enzyme으로 bioconversion

- Aspergillus niger 유래 효소인 SM enzyme으로 55 ℃ 48시간 동안 incubator에서 bioconversion

Fig. 황금(좌)과 대량 추출된 파우더 형태의 황금 추출물(우)

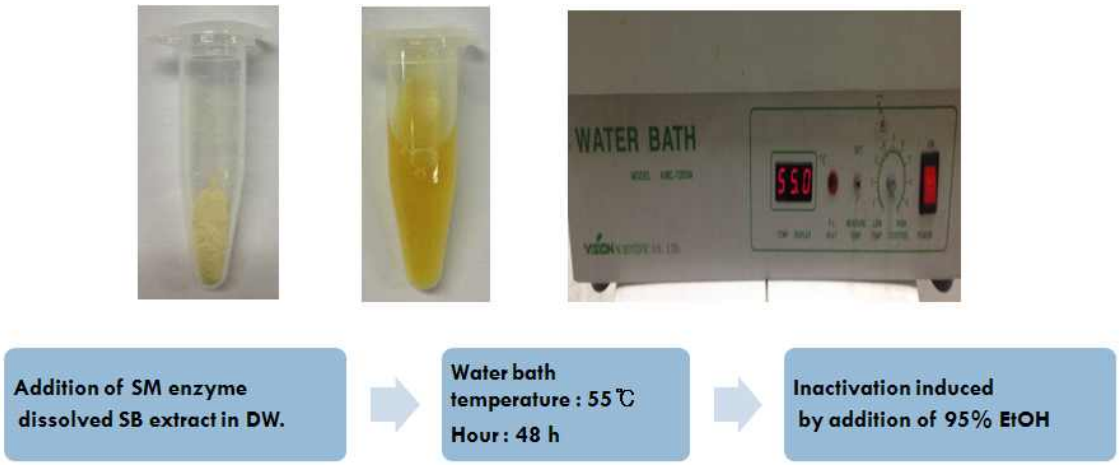


Fig. biocnversion 과정

다. HPLC를 이용한 발효 황금 표준화

- HPLC를 이용하여 바이칼레인, 바이칼린, 워고닌, 워고노사이드 standard 분석
- HPLC를 이용하여 황금 내 바이칼레인, 바이칼린, 워고닌, 워고노사이드 성분 분석

HPLC	
Mobile phase	Acetic acid 0.5% DW(80) : Acetonitrile(20)
Flow rate	1.0 ml/min
UV detector	254 nm
Oven	40℃
Column	Shimadzu, Shim-pack VP-ODS, 250*4.6 mm
HPLC : LC-20A HPLC instrument, Shimadzu	

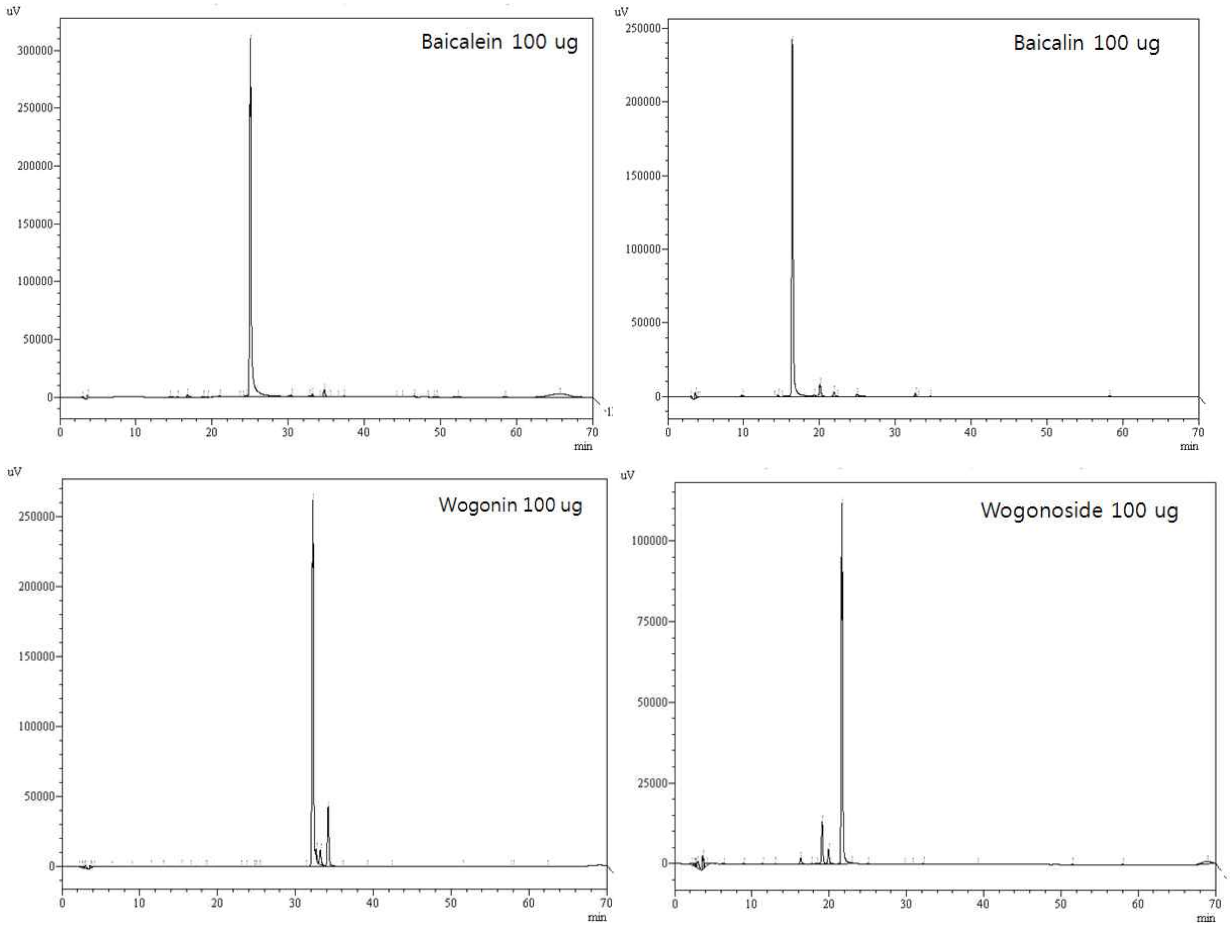


Fig. 바이칼레인, 바이칼린, 워고닌, 워고노사이드 standard chromatogram

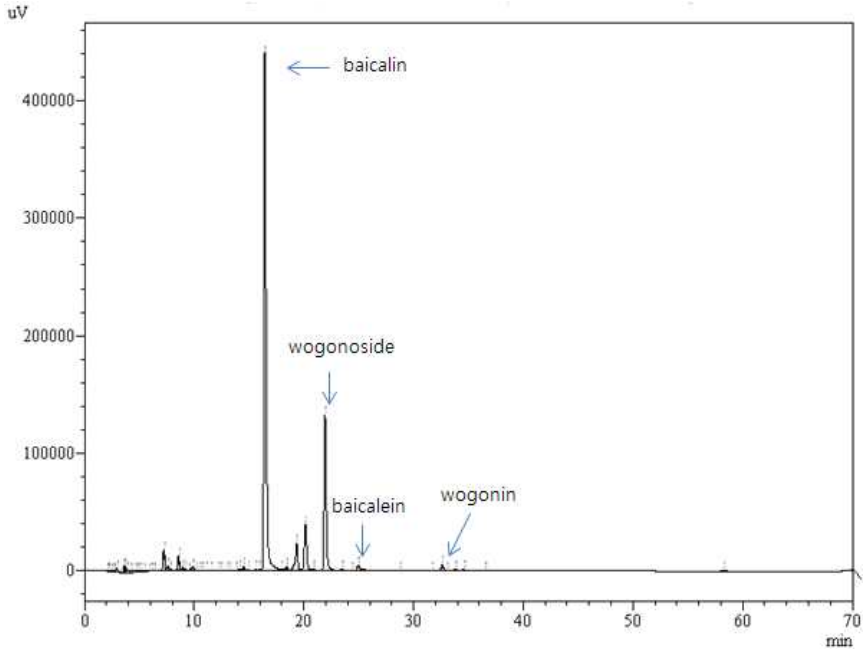
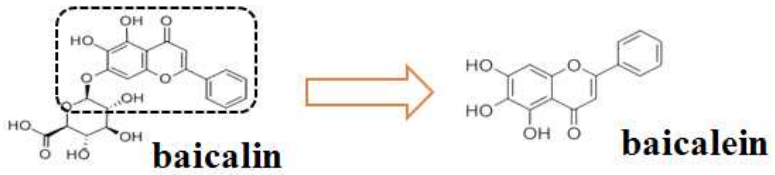
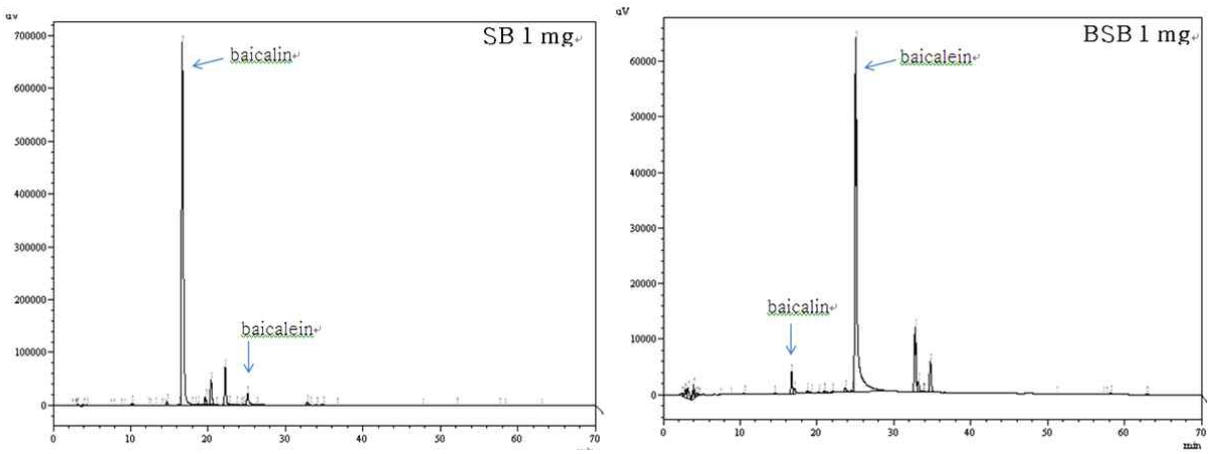


Fig. 황금 chromatogram

라. HPLC를 이용하여 SM enzyme 효소의 bioconversion

- SM enzyme 효소의 bioconversion 결과 바이칼레인이 발효 후 28배 함량이 증가하였음





함량 (%)	baicalin	baicalein
SB	3.39 %	0.04 %
BSB	0.08 %	1.13 %

Fig. 발효 황금의 바이칼린, 바이칼레인 함량 분석

마. HPLC를 이용하여 SM enzyme 효소의 함량증가에 따른 바이칼레인 함량 분석

- 황금 추출물의 양은 10 mg으로 동일하게 하고 SM enzyme의 량을 증가시켜 bioconversion 한 결과 효소량 8 mg 이상에서는 baicalein의 함량이 증가하지 않음

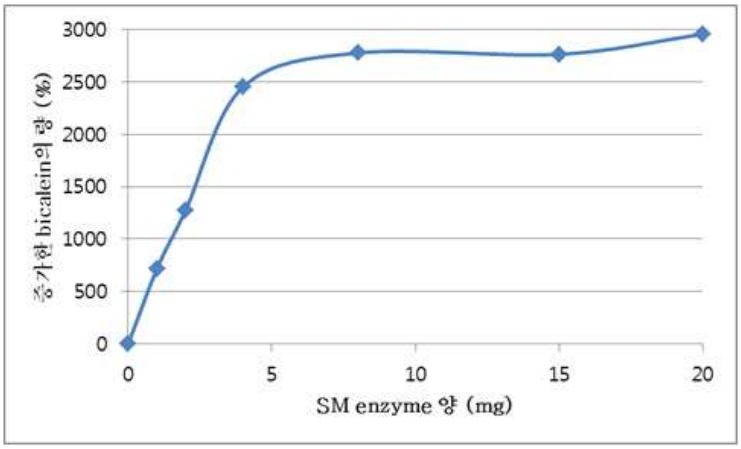


Fig. 효소 함량 별 바이칼레인 함량 분석

- 바이칼레인 고 함유 황금 발효로 사용할 유산균주를 찾기 위해 스크리닝 단계부터 총 12가지의 유산균으로 황금 내 바이칼레인의 함량을 높이는 균주를 탐색한 결과 4가지(sample NO. 1, 11, 12, 16)의 유산균주에서 황금의 바이칼레인 함량이 높아지는 것을 관찰하였음. **- 최적 유산균주로 도출된 SM enzyme을 이용하여 발효 후 바이칼레인의 함량이 높아지는 것을 HPLC 분석으로 정량화하였고, 최적의 유산균주와 최적의 발효 조건 공정을 수립함.**

3. 동물 모델을 통해 LD_{50} 평가

- 발효 황금의 안정성 실험을 위해 마우스 암컷, 수컷을 발효 황금 투여군과 비투여군으로 각각 5마리씩 그룹핑하여 총 20마리 마우스로 실험실시
- 발효 황금 투여군은 독성실험의 최고 용량인 5 g/kg 단회 투여 후 14일간 몸무게 및 육안 관찰한 결과 14일간 특이사항이나 죽은 마우스는 없었음
- 14일 후에 부검 결과 특이사항 없음

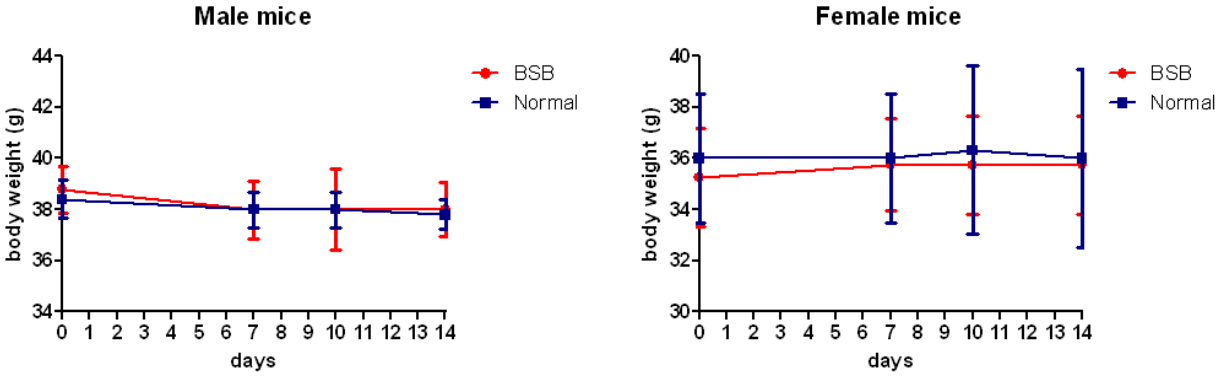


Fig. 발효황금(BSB) 투여군과 비투여군의 몸무게 변화

Fig. 발효황금(BSB) 투여군과 비투여군의 부검 사진

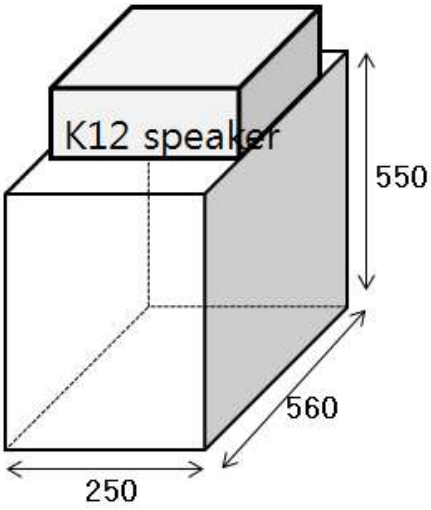
4. 소음성 난청 동물모델 validation

○ 연구 방법

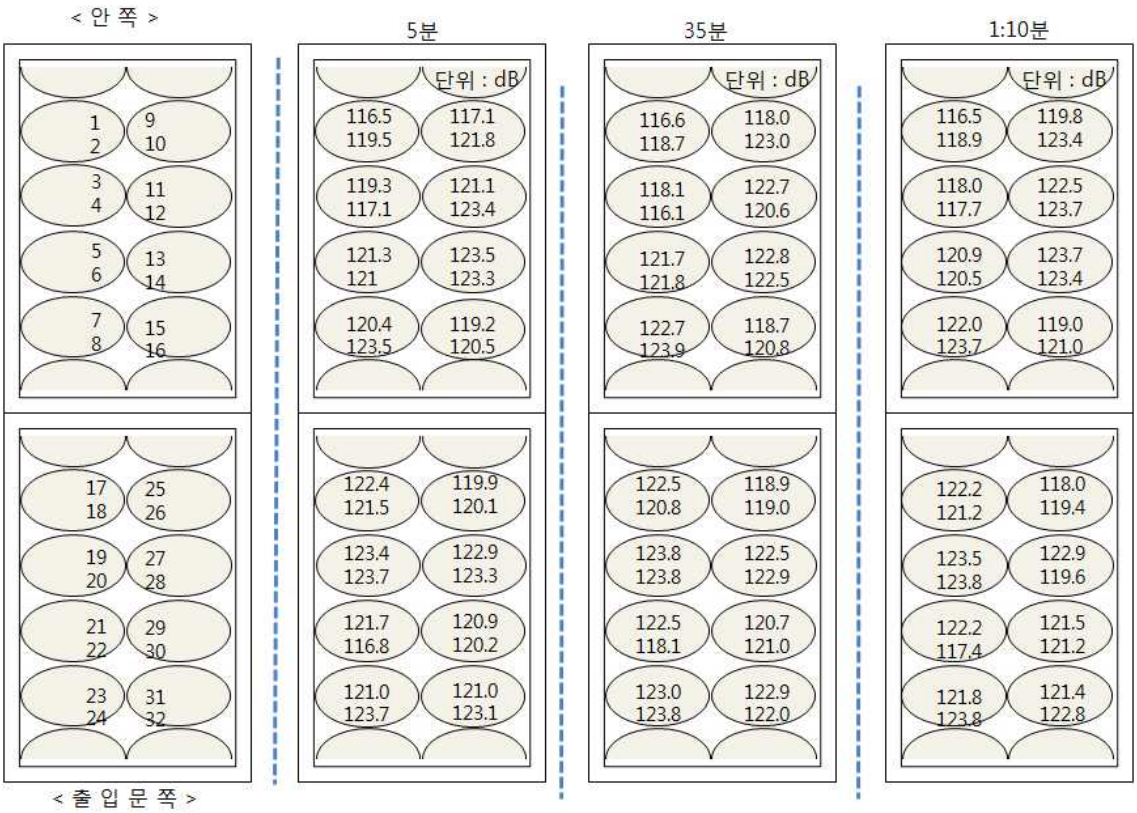
- 소음성 난청 동물 모델 제작을 위한 NIHL 유발 chamber 제작
- 노출 소음 강도 (110 dB, 120 dB)에 따른 소음성 난청 평가
- 소음 노출 전 동물의 청력 역치에 따른 소음성 난청 평가
- 청각기능 평가 방법으로 세계적으로 객관적 바이오마커인 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR)로 청신경의 청력역치를 평가

○ 연구 결과

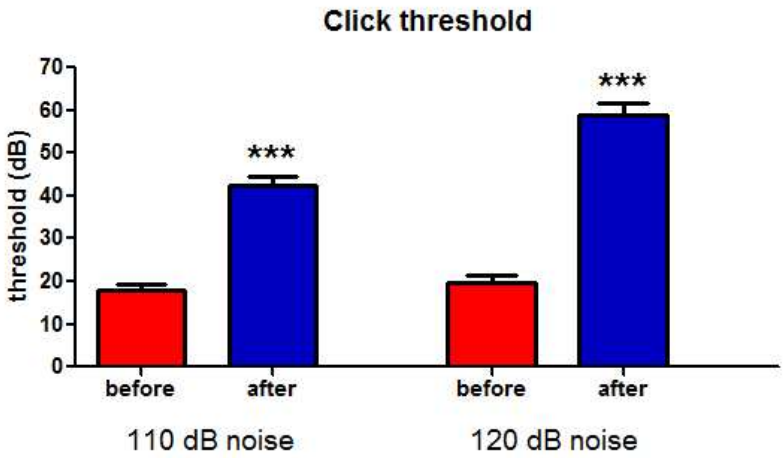
- 방음을 고려한 NIHL 유발 부스를 다음 그림과 같이 제작



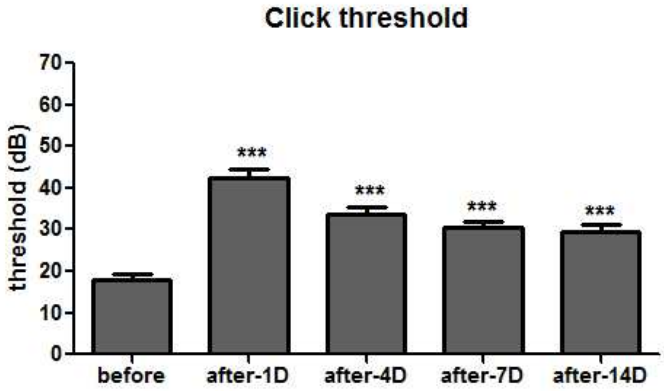
- 마우스 16마리를 동시에 유발할 수 있는 시스템으로 마우스 각 위치마다 동일 소음노출을 위한 위치별 소음 강도 mapping 결과 동일 위치의 시간에 따른 강도 변화 (소음발생 후 5분, 35분 70분에 측정)는 미미한 정도였으며, 위치에 따른 강도차이는 최대 7 dB 까지 나타남.



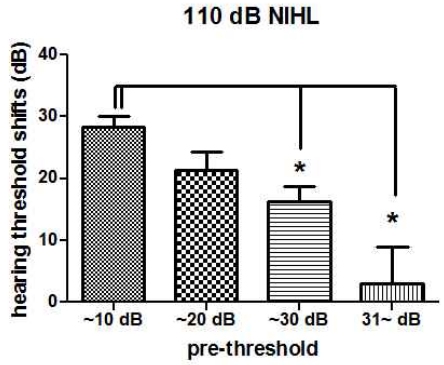
- 110 dB와 120 dB 소음 노출 전과 소음노출 1일 후의 청력역치 평가 시 110 dB 소음 노출 후에는 24 dB의 청력역치가 증가한 반면 120 dB 소음 노출 후에는 38.7 dB의 청력역치가 증가하여 120 dB 소음 노출이 소음성 난청 마우스 모델에 더 적절한 것으로 사료됨.



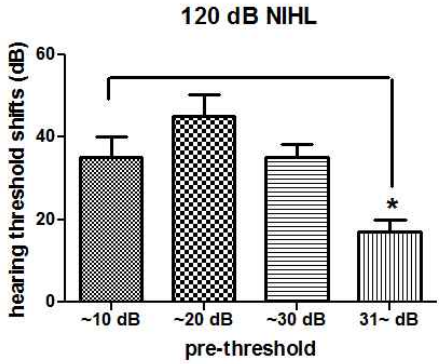
- 소음 노출 후 1일, 4일, 7일, 14일에 평가한 결과 1일째 청력역치 증가가 크게 나타나고 4일째 감소하는 경향이 나타났으며 그 이후에는 permanent한 청력역치 증가가 나타나 본 모델은 permanent 난청 모델로 적합한 것으로 사료됨



- 소음 노출 전 마우스 각각의 청력역치는 10 dB 이하(~10 dB), 10-20 dB (~20 dB), 20-30 dB (~30 dB) 그리고 31 dB 이상(31~ dB)로 분류하여 각각 110 dB와 120 dB 노출 후 증가된 청력역치 평가시 소음 노출 전 청력역치가 낮을 수록 노출 후 역치가 높아지는 것으로 나타남. 이러한 경향은 110 dB와 120 dB 모두 비슷하게 나타나 소음성 난청 모델 동물로써는 소음 노출 전 청력 평가 시 20 dB 이하의 동물을 사용하는 것이 바람직 할 것으로 사료됨



1D test after NIHL
mice without below 110 dB noise exposure

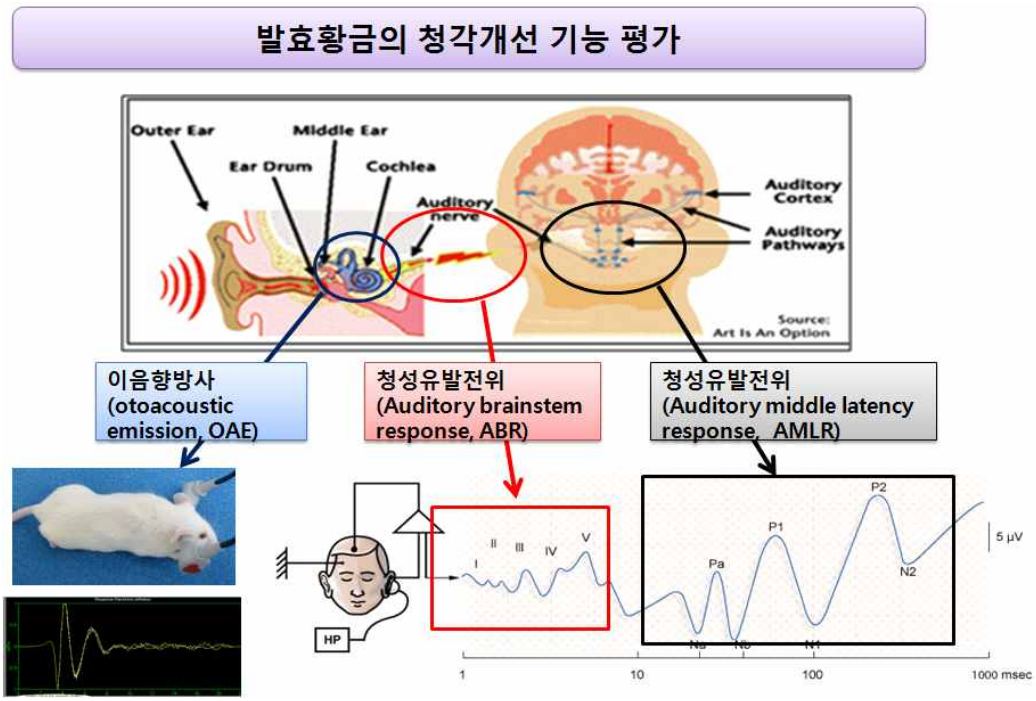


1D test after NIHL
all mice with over 120 dB noise exposure

5. 바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험

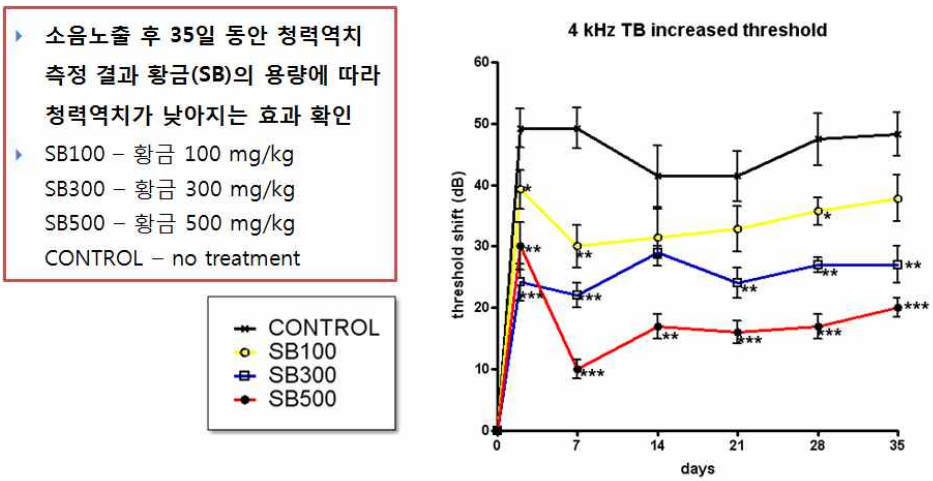
○ 연구 방법

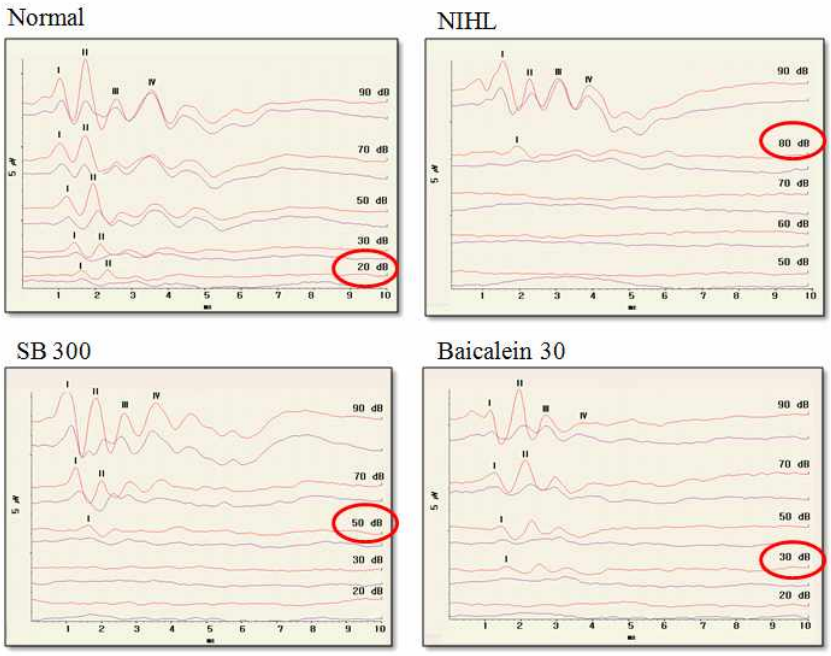
- 청각기능 평가 방법으로 세계적으로 객관적 바이오마커인 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR)로 청신경의 청력역치를 평가
- 중뇌의 중추청각신경계를 평가하는 방법인 청성중기반응(auditory middle latency response, AMLR)으로 청각 중추 기능 평가
- 달팽이관의 유모세포 상태를 평가하는 방법으로 이음향방사(otoacoustic emission, OAE)로 유모세포 상태 평가



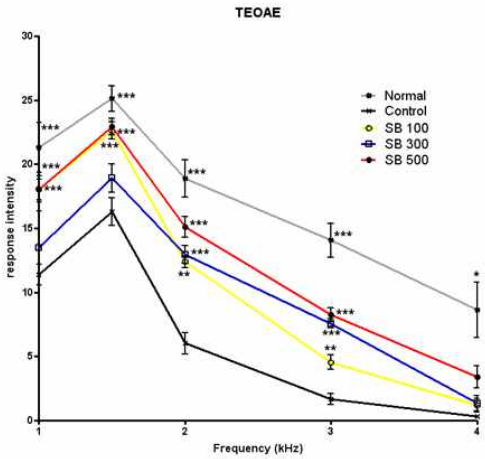
○ 연구 결과

- ABR을 이용하여 마우스 청력역치 평가 시 황금 투여 마우스의 청력역치가 시간이 지날수록 개선되어 황금의 청각기능 보호 효과 확인.
- ABR을 이용하여 마우스 청력역치 평가 시 wave 분석 결과 소음에 손상된 NIHL 은 낮은강도에서 반응이 사라진 반면 SB300와 baicalein 30은 낮은강도에서도 반응이 나타나 청각기능 보호 효과 확인.

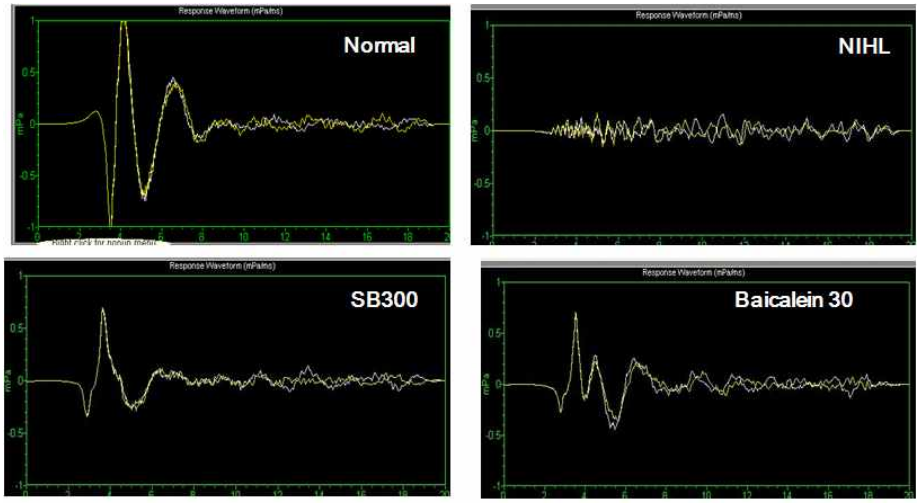




- OAE를 이용한 유모세포 반응 평가 시 황금 투여 마우스의 유모세포 반응이 높게 나타나 황금의 유모세포 보호 기능 확인
- 마우스 와우내 유모세포 반응 분석 결과 결과 소음에 손상된 NIHL 보다 황금 투여 그룹인 SB300와, 바이칼레인 투여 그룹인 baicalein 30의 유모세포 반응이 더 높았음.

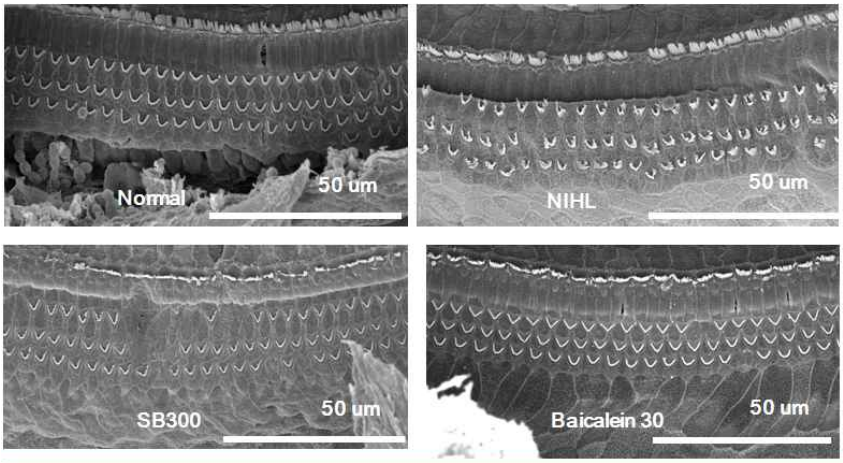


- **소음노출 후 주파수별 와우 기능 평가 결과 황금(SB)의 용량에 따라 와우 반응이 증가하여 유모세포 보호 효과 확인**
- SB100 – 황금 100 mg/kg, SB300 – 황금 300 mg/kg, SB500 – 황금 500 mg/kg



- **마우스 와우내 유모세포 반응 분석 결과 결과 소음에 손상된 NIHL 보다 SB300와 , baicalein 30의 유모세포 반응이 더 높았음.**
- SB300 – 황금 300 mg/kg, baicalein 30 – baicalein 30 mg/kg

- 마우스 와우내 유모세포의 현미경 관찰 결과 소음에 손상된 NIHL 보다 황금 투여 그룹인 SB300의 유모세포 상태가 더 좋았으며, 바이칼레인 투여 그룹인 baicalein 30의유모세포는 정상과 유사



- **마우스 와우내 유모세포의 현미경 관찰 결과 소음에 손상된 NIHL 보다 SB300의 유모세포 상태가 더 좋았으며, baicalein 30의유모세포는 정상과 유사**
- SB300 – 황금 300 mg/kg, baicalein 30 –baicalein 30 mg/kg

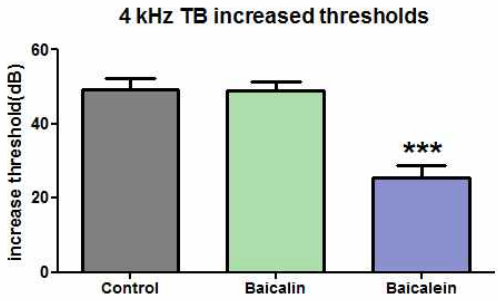
6. 바이칼레인과 바이칼린의 청각기능 효능 비교 시험

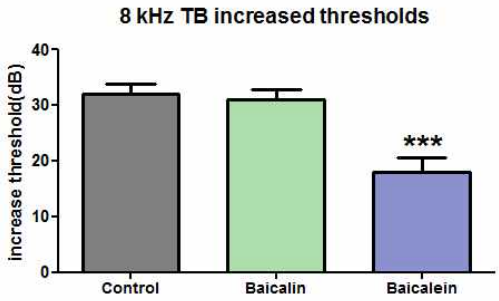
○ 연구 방법

- 청각기능 평가 방법으로 세계적으로 객관적 바이오마커인 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR)로 청신경의 청력역치를 평가
- 중뇌의 중추청각신경계를 평가하는 방법인 청성중기반응(auditory middle latency response, AMLR)으로 청각 중추 기능 평가
- 달팽이관의 유모세포 상태를 평가하는 방법으로 이음향방사(otoacoustic emission, OAE)로 유모세포 상태 평가

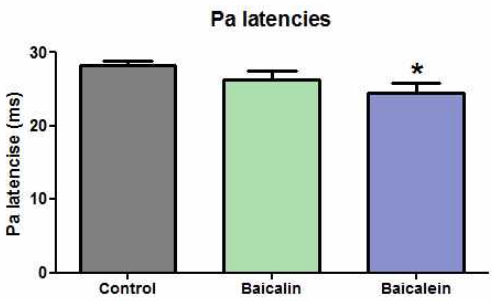
○ 연구 결과

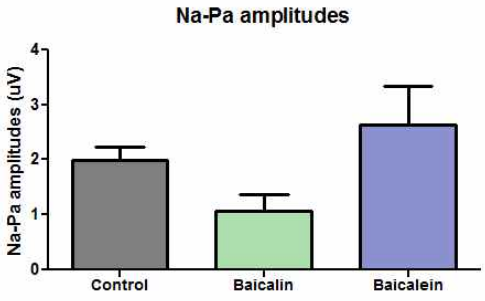
- 바이칼린과 바이칼레인 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 ABR을 이용한 청력역치 변동으로 확인
- 대조군과 바이칼린은 소음 노출 후 역치가 높아진 반면 바이칼레인 투여 그룹의 경우 유의적으로 역치가 낮아져 청각 기능 보호 효능이 나타남.



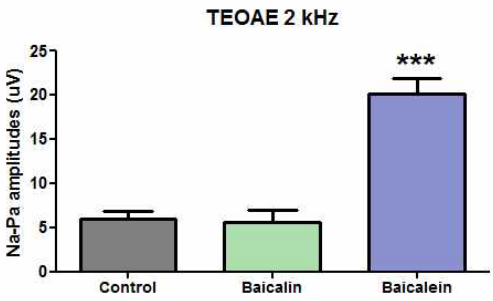


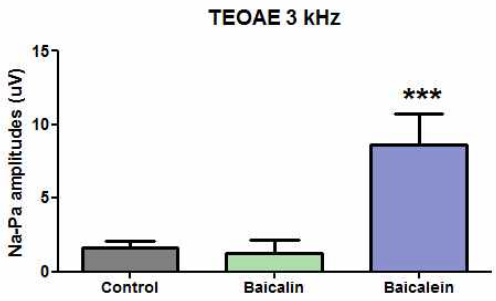
- 바이칼린과 바이칼레인 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 AMLR을 이용한 Pa latency와 amplitude로 확인
- 대조군에 비해 바이칼레인 투여 그룹은 Pa latency가 짧아지고, amplitude는 증가하여 청각 기능의 보호 효능을 보였음





- 바이칼린과 바이칼레인 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 달팽이관 유모세포의 상태를 평가하는 TEOAE로 확인
- 대조군에 비해 바이칼레인 투여 그룹은 TEOAE의 반응이 높게 나타나 청각 기능의 보호 효능 나타남



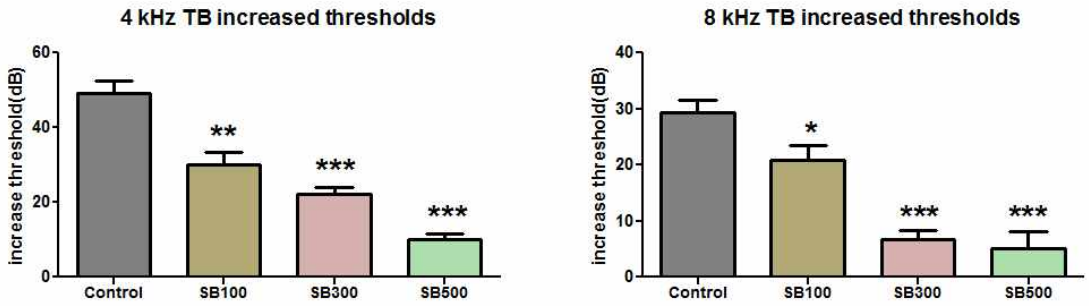


7. 황금의 용량별 청각기능 효능 비교 시험

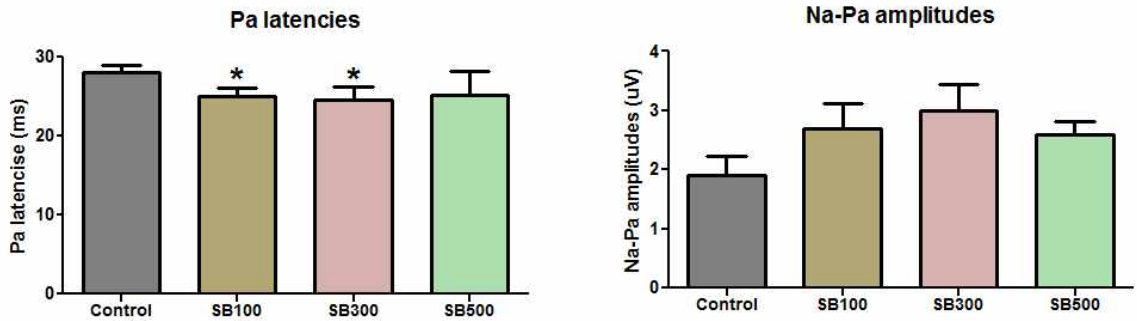
○ 연구 방법
- 청각기능 평가 방법으로 세계적으로 객관적 바이오마커인 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR)로 청신경의 청력역치를 평가

- 중뇌의 중추청각신경계를 평가하는 방법인 청성중기반응(auditory middle latency response, AMLR)으로 청각 중추 기능 평가
- 달팽이관의 유모세포 상태를 평가하는 방법으로 이음향방사(otoacoustic emission, OAE)로 유모세포 상태 평가

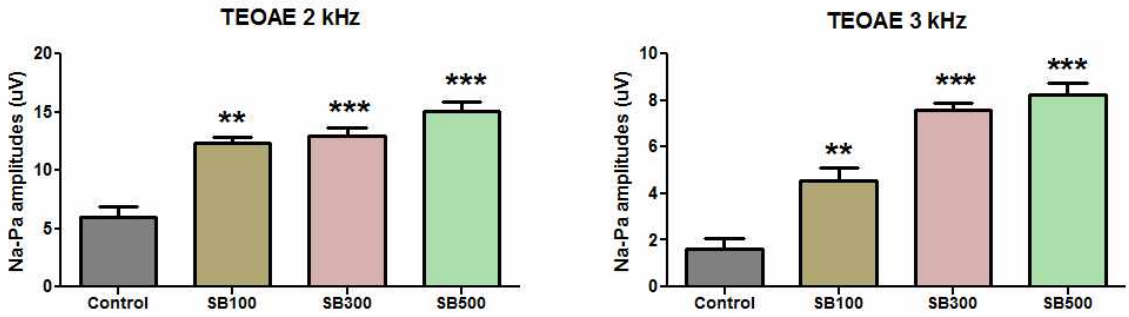
○ 연구 결과
- 황금(SB) 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 ABR을 이용한 청력역치 변동으로 확인
- 대조군에 비해 황금 100 mg/kg (SB100), 황금 300 mg/kg (SB300)과 황금 500 mg/kg (SB500) 투여 그룹은 용량의존적으로 그리고 유의적으로 역치가 낮아져 청각 기능 보호 효능이 나타남.



- 황금(SB) 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 AMLR을 이용한 Pa latency와 amplitude로 확인
- 대조군에 비해 황금 100 mg/kg (SB100), 황금 300 mg/kg (SB300)과 황금 500 mg/kg (SB500) 투여 그룹은 Pa latency가 짧아지고, amplitude는 증가하여 청각 기능의 보호 효능을 보였음



- 황금(SB) 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 달팽이관 유모세포의 상태를 평가하는 TEOAE로 확인
- 대조군에 비해 황금 100 mg/kg (SB100), 황금 300 mg/kg (SB300)과 황금 500 mg/kg (SB500) 투여 그룹은 TEOAE의 반응이 용량의존적으로 그리고 유의적으로 높게 나타나 청각 기능의 보호 효능 나타남



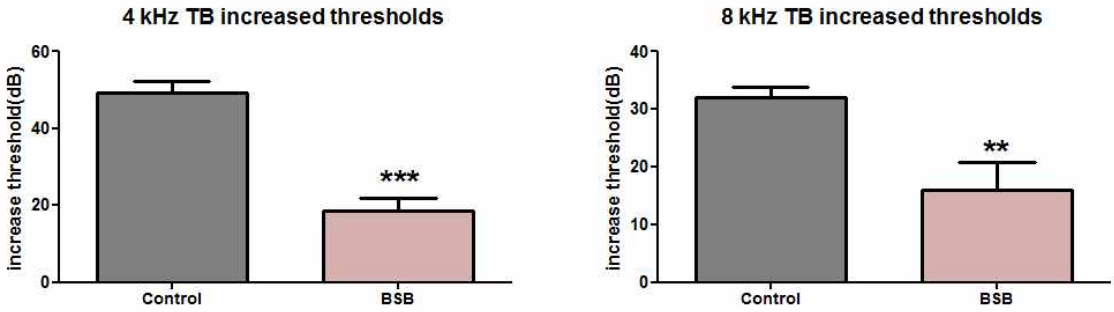
8. 발효 후 바이칼레인 고함유 황금의 청각기능 효능 비교 시험

○ 연구 방법

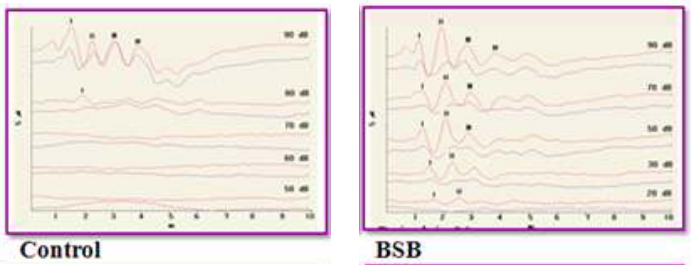
- 청각기능 평가 방법으로 세계적으로 객관적 바이오마커인 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR)로 청신경의 청력역치를 평가
- 중뇌의 중추청각신경계를 평가하는 방법인 청성중기반응(auditory middle latency response, AMLR)으로 청각 중추 기능 평가
- 달팽이관의 유모세포 상태를 평가하는 방법으로 이음향방사(otoacoustic emission, OAE)로 유모세포 상태 평가

○ 연구 결과

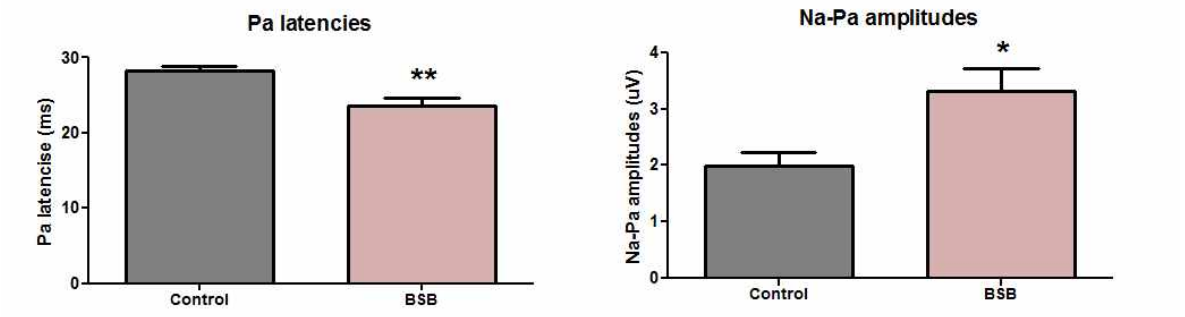
- 발효 후 바이칼레인 고함유 황금(BSB) 투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 ABR을 이용한 청력역치 변동으로 확인
- 대조군에 비해 바이칼레인 고함유 황금(BSB) 투여 그룹은 유의적으로 낮은 역치 증가를 보여 청각 기능의 보호 효능을 보였음



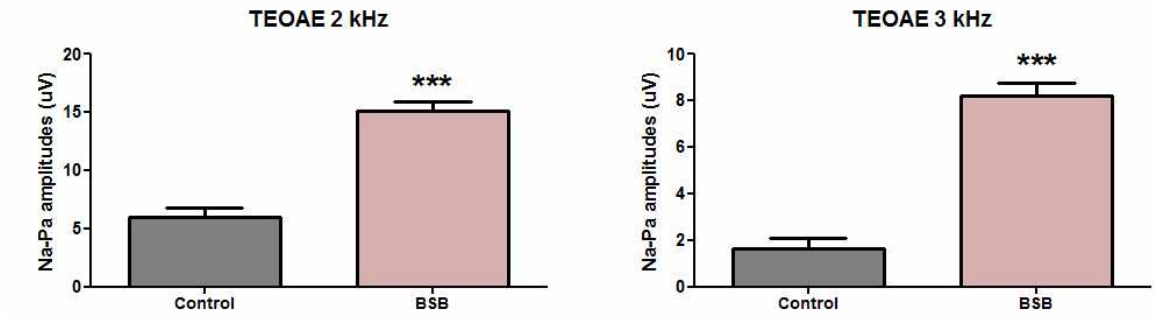
- ABR 평가 결과 나타난 wave 분석 시 BSB의 반응 peak가 더 낮은 강도에서도 관찰되어 바이칼레인과 BSB의 청각기능 보호 효과를 확인함

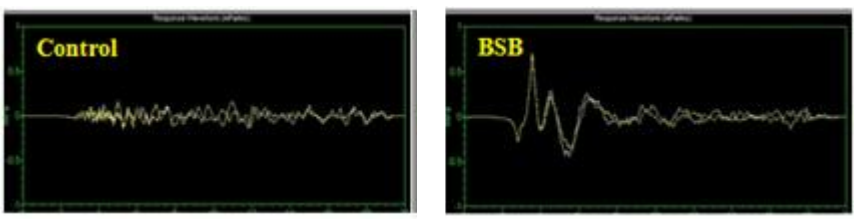


- 발효 후 바이칼레인 고함유 황금(BSB)투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 AMLR을 이용한 Pa latency와 amplitude로 확인
- 대조군에 비해 바이칼레인 고함유 황금(BSB) 투여 그룹은 유의적으로 Pa latency가 짧아지고, amplitude는 증가하여 청각 기능의 보호 효능을 나타남



- 발효 후 바이칼레인 고함유 황금(BSB)투여 후 소음성 난청 마우스의 청력 보호 효과를 달팽이관 유모세포의 상태를 평가하는 TEOAE로 확인
- 대조군에 비해 바이칼레인 고함유 황금(BSB) 투여 그룹은 TEOAE의 반응이 유의적으로 높게 나타나 유모세포 보호 효능을 나타냄





9. 황금의 발효 전과 발효 후 청각 기능 비교

- 소음성 난청 마우스에 발효 전 황금 (SB)와 발효 황금 (BSB)를 각각 300 mg/kg 투여한 후 청각 기능 평가
- ABR을 이용한 청력역치 평가 결과 자극음 click, 4 kHz TB, 6 kHz TB, 그리고 8 kHz TB에서 BSB의 역치가 SB보다 낮아 청력역치를 낮추는 효과를 확인함
- AMLR을 이용한 중추청각기능 평가 결과 BSB의 amplitude가 BS보다 높아 더 우수한 효능을 보임
- OAE를 이용한 와우기능 평가시 SB와 BSB가 비슷하게 나타남

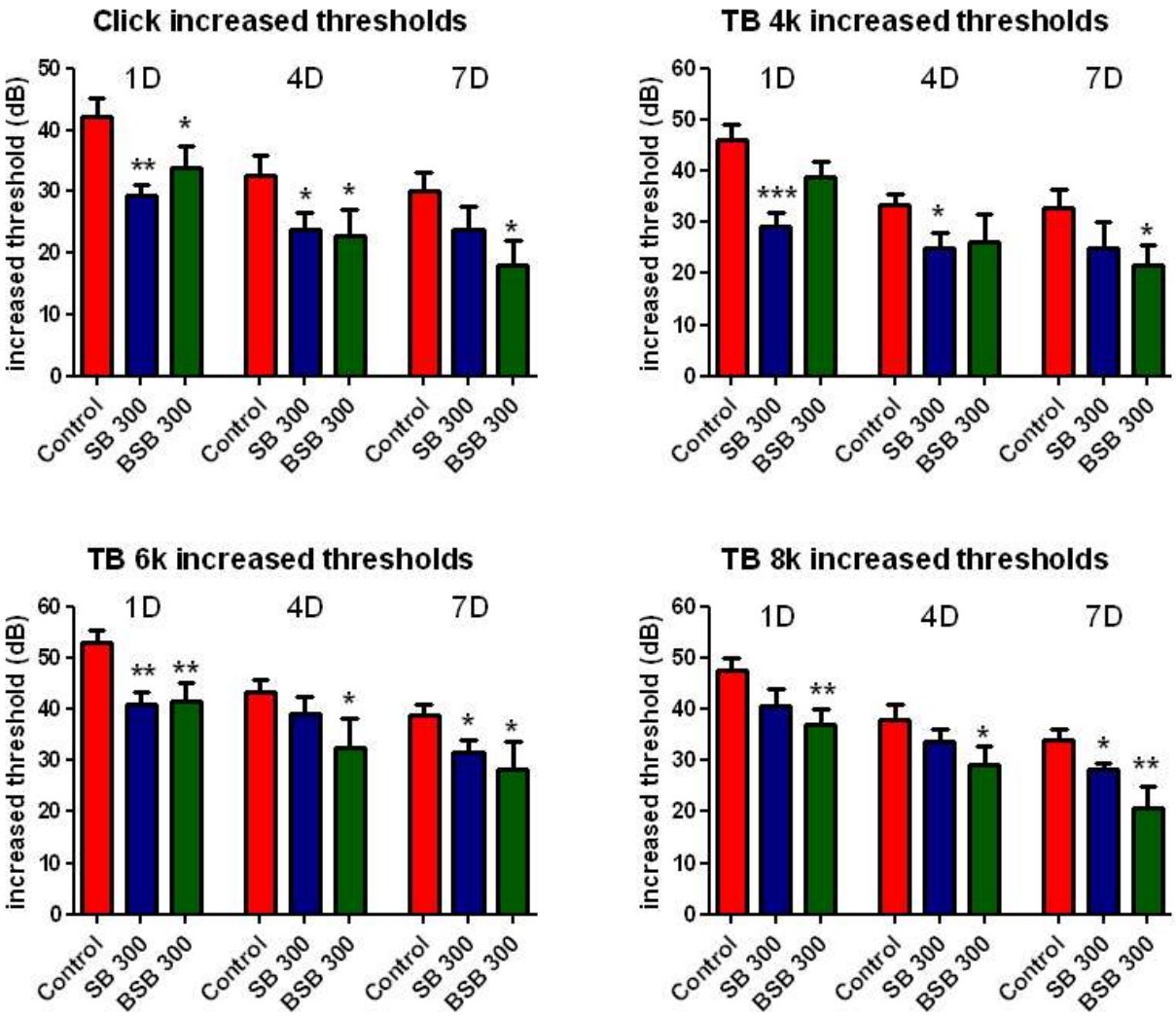


Fig. SB와 BSB 투여 마우스의 ABR 역치 결과

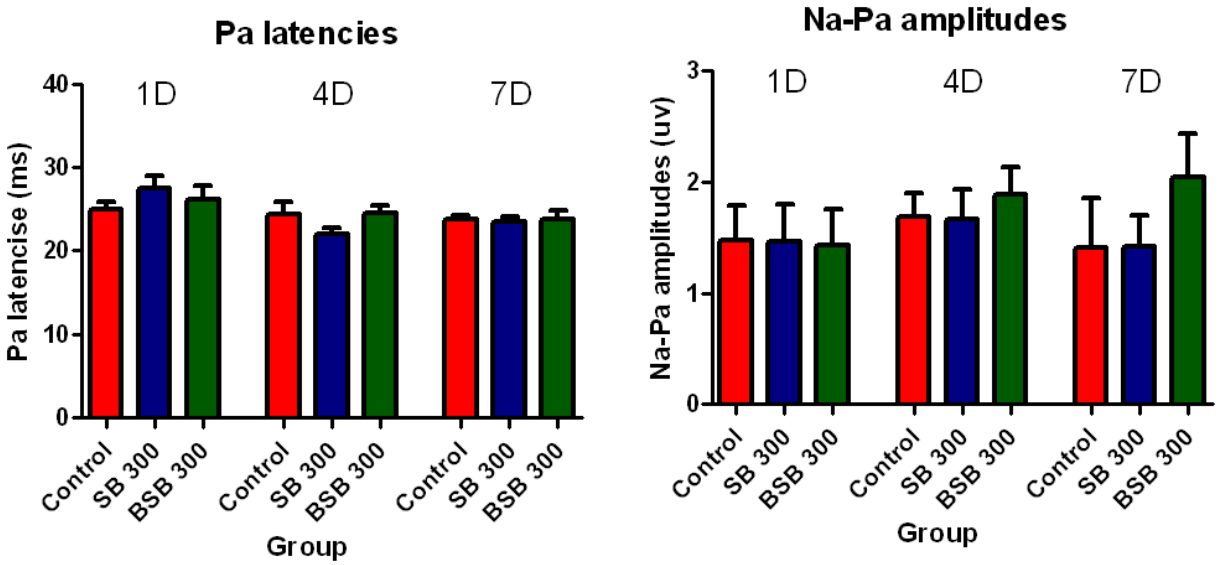


Fig. SB와 BSB 투여 마우스의 AMLR 결과

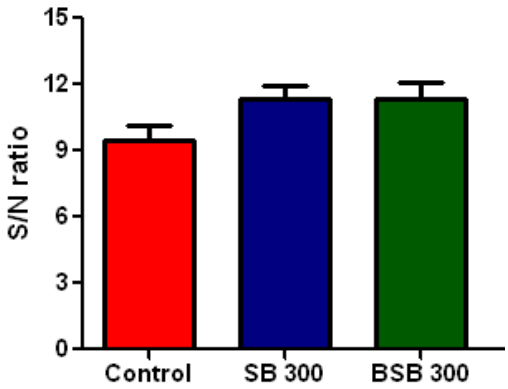


Fig. SB와 BSB 투여 마우스의 OAE 결과

10. 발효 황금의 함량별 청각기능 비교

- 소음성 난청 마우스에 발효 황금 (BSB)를 각각 100 mg/kg와 300 mg/kg 투여한 후 청각 기능 평가
- ABR을 이용한 청력역치 평가 결과 자극음 click, 4 kHz TB, 6 kHz TB, 그리고 8 kHz TB에서 BSB의 용량이 증가할수록 청력역치가 낮아 청력역치를 낮추는 효과를 확인함
- AMLR을 이용한 중추청각기능 평가 결과 BSB의 amplitude가 BSB의 용량이 증가할수록 높아지는 것을 확인함

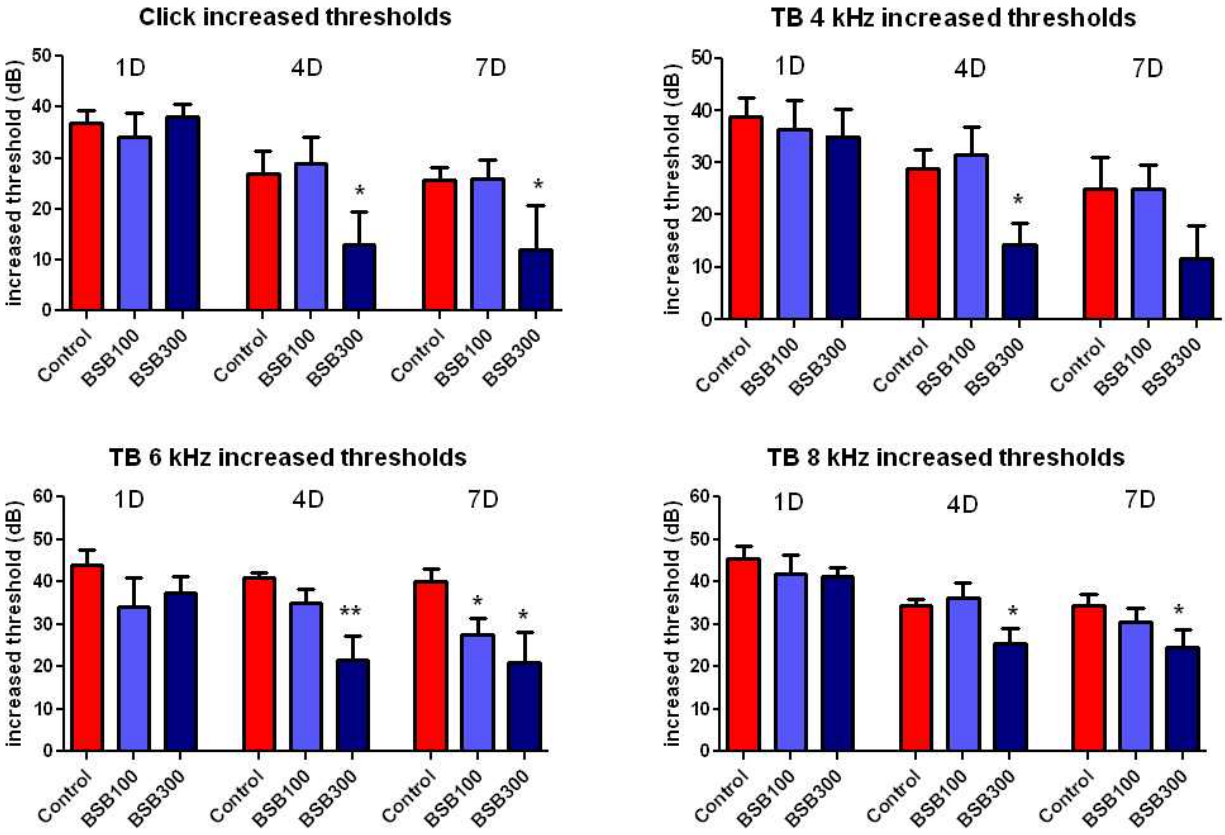
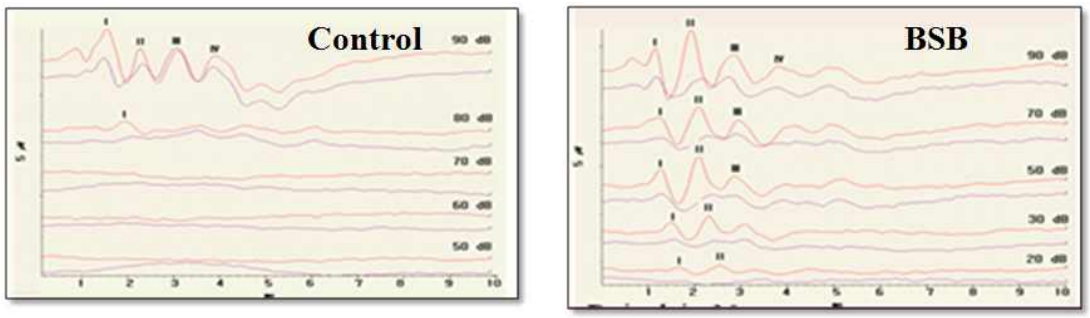


Fig. BSB 100 mg/kg와 BSB 300 mg/kg 투여 마우스의 ABR 역치 평가



Waveforms of ABR from control and BSB mice.

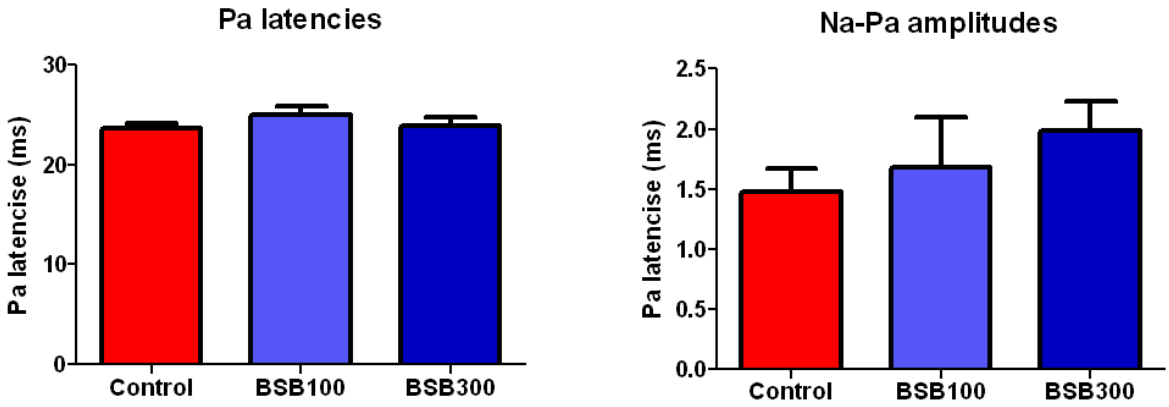


Fig. BSB 100 mg/kg와 BSB 300 mg/kg 투여 마우스의 AMLR 평가

11. 함량별 황금과 NAC 투여 마우스의 청각기능 비교

- 소음성 난청 마우스에 황금(SB)를 각각 100 mg/kg와 300 mg/kg 투여한 마우스와 NAC 300 mg/kg 투여한 후 청각 기능 평가
- ABR을 이용한 청력역치 평가 결과 자극음 click, 3 kHZ TB, 4 kHz TB, 6 kHz TB, 그리고 8 kHz TB에서 SB의 용량이 증가할수록 청력역치가 낮아 청력역치를 낮추는 효과를 확인함
- 황금과 NAC 비교 시 SB 300 mg/kg 투여 그룹과 NAC 300 mg/kg 투여 그룹의 청력역치가 비슷하여 청각 기능 개선에 비슷한 효과 나타냄
- AMLR을 이용한 중추청각기능 평가 결과 SB의 latency는 SB 용량이 증가할수록 짧아지고, amplitude가 SB의 용량이 증가할수록 높아지는 것을 확인하여 중추 청각 기능 개선을 확인함
- 황금과 NAC 비교 시 SB 300 mg/kg 투여 그룹과 NAC 300 mg/kg 투여 그룹의 latency와 amplitude가 비슷하여 청각 기능 개선에 비슷한 효과 나타냄
- OAE를 이용한 달팽이관 청각기능 평가 결과 SB의 latency는 SB 용량이 증가할수록 반응이 증가하여 달팽이관 기능 개선을 확인함
- 황금과 NAC 비교 시 SB 300 mg/kg 투여 그룹과 NAC 300 mg/kg 투여 그룹의 OAE 반응이 비슷하여 청각 기능 개선에 비슷한 효과 나타냄

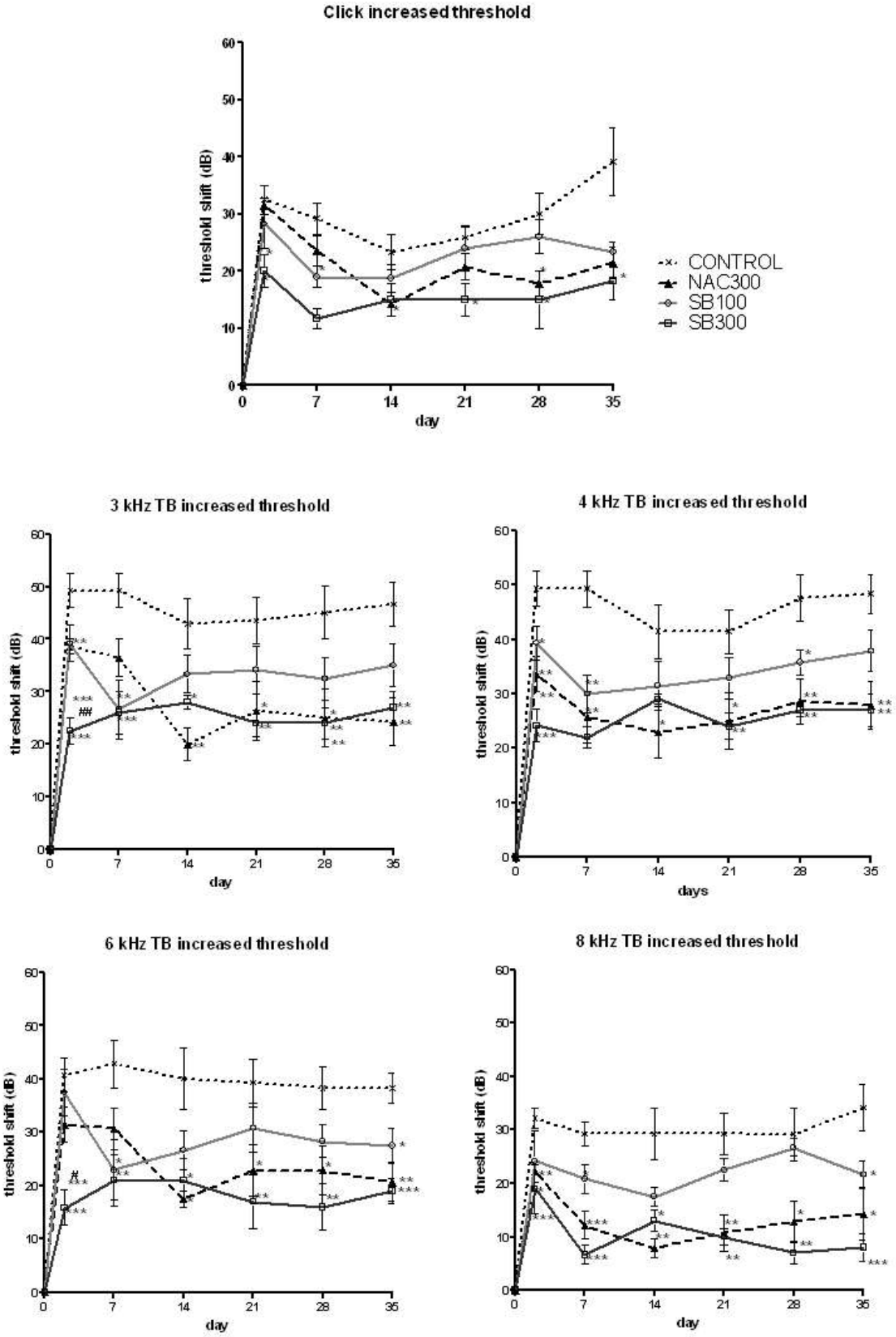


Fig. SB 100 mg/kg, SB 300 mg/kg, NAC 300 mg/kg 투여 마우스의 ABR 역치 평가

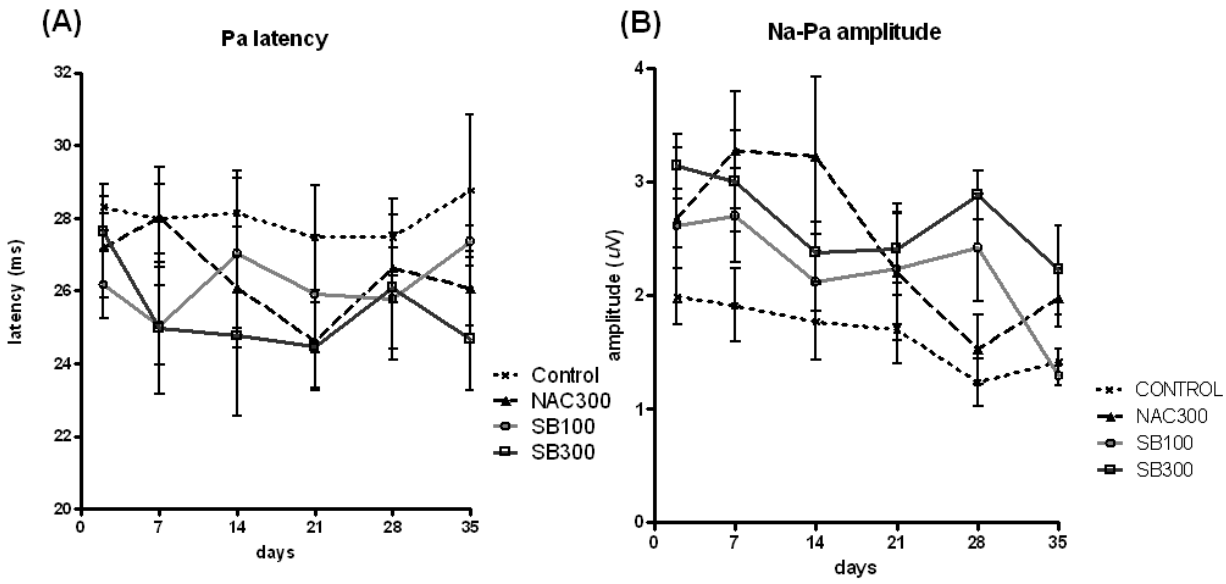


Fig. SB 100 mg/kg, SB 300 mg/kg, NAC 300 mg/kg 투여 마우스의 AMLR 평가

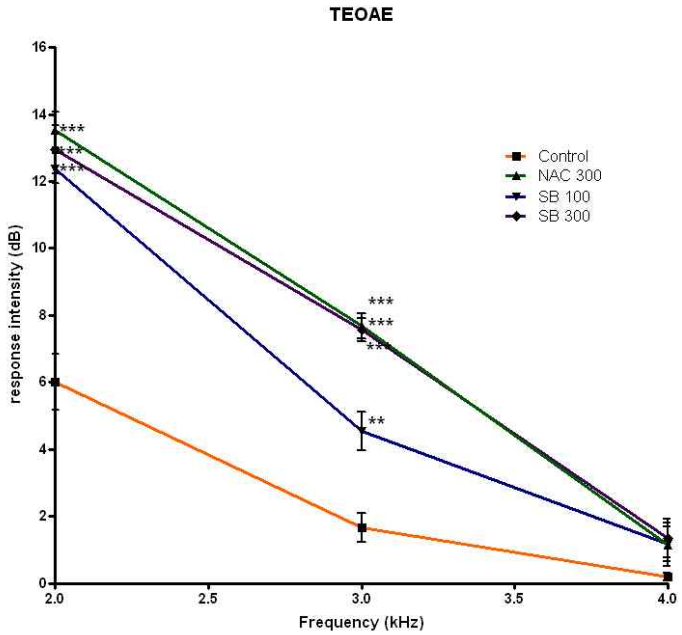


Fig. SB 100 mg/kg, SB 300 mg/kg, NAC 300 mg/kg 투여 마우스의 OAE 평가

12. 발효 황금과 NAC 투여 마우스의 청각기능 비교

- 소음성 난청 마우스에 발효 황금(BSB) 300 mg/kg 투여한 마우스와 NAC 300 mg/kg 투여한 후 청각 기능 평가

- ABR을 이용한 청력역치 평가 결과 자극음 click, 4 kHz TB, 6 kHz TB, 그리고 8 kHz TB에서 BSB 300 mg/kg 투여 그룹이 NAC 300 mg/kg 투여 그룹보다 청력역치가 낮아 청각 기능 개선이 더 우수한 것으로 나타남

- AMLR을 이용한 중추청각기능 평가 결과 BSB 300 mg/kg 투여 그룹과 NAC 300 mg/kg 투여 그룹의

latency는 비슷한 반면, amplitude는 BSB가 높아 발효 황금이 NAC보다 중추 청각 기능 개선 효과가 더 우수한 것으로 나타남

- OAE를 이용한 달팽이관 청각기능 평가 결과 BSB 300 mg/kg 투여 그룹이 NAC 300 mg/kg 투여 그룹의 OAE 반응이 더 높아 와우 기능이 더 우수한 것으로 나타남

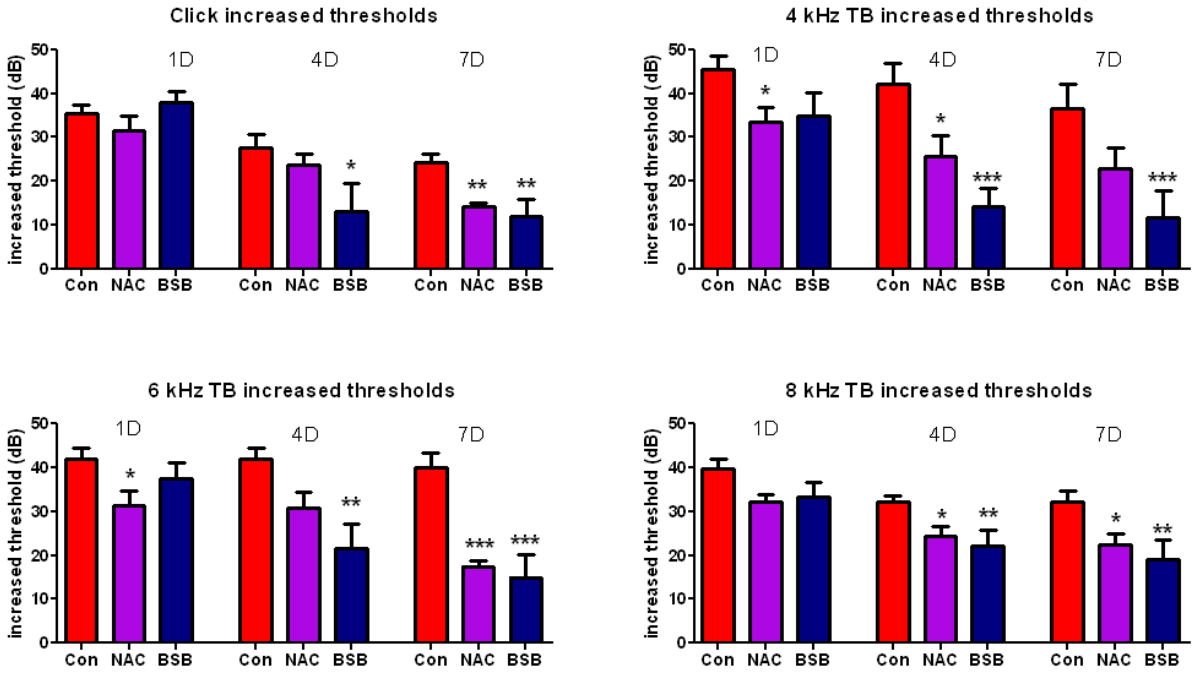


Fig. BSB 300 mg/kg, NAC 300 mg/kg 투여 마우스의 ABR 역치 평가

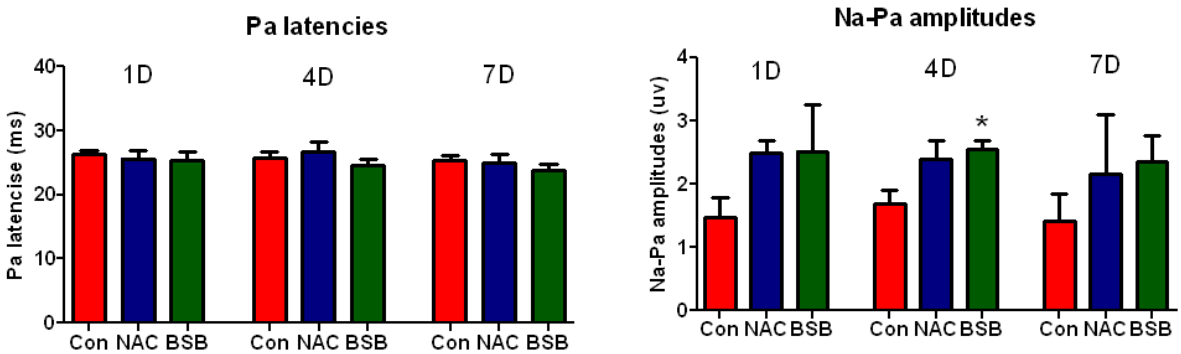


Fig. BSB 300 mg/kg, NAC 300 mg/kg 투여 마우스의 AMLR 평가

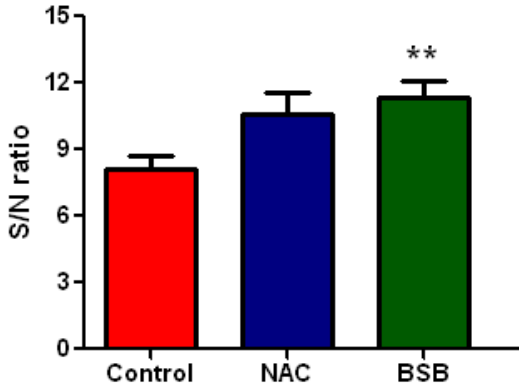


Fig. BSB 300 mg/kg, NAC 300 mg/kg 투여 마우스의 OAE 평가

< 연구 결과 요약 >

1. 바이칼레인 고함유 황금소재 제품 제제 연구 및 제제 선정을 통하여 과립형의 시제품 생산 완료

2. 황금의 주요 성분 중 청각 기능 보호 효과를 나타내는 바이칼레인의 함량을 높이기 위한 발효 균주 및 공정 validation 결과, Aspergillus niger 유래 효소인 SM enzyme으로 bioconversion 조건 수립하여 바이칼레인 함량이 28배 높아지는 것을 확인함

3. HPLC 분석을 통하여 황금의 표준화 및 발효 황금의 함량 분석을 통한 표준화

4. 발효 황금의 안정성 실험을 위해 동물 모델을 통해 LD_{50} 평가한 결과 독성 나타나지 않음

5. 바이칼레인 고함유 황금 청각기능 개선 효능 비교시 발효 전보다 발효 후 황금의 청각 기능 개선 효능이 더 우수한 것으로 나타남

6. 발효 황금의 용량 별 청각 기능 개선 평가 결과 용량이 증가할수록 청각 기능 개선 효능이 더 우수한 것으로 나타남

6. 소음성 난청 개선 물질로 알려진 NAC와의 비교 실험에서 발효 전 황금은 NAC와 비슷한 효과를 나타내었고, 발효 후 황금은 NAC 보다 더 우수한 효능을 나타냄

7. 본 연구 결과는 특허 등록 1건이 완료 되었고, 엔바이오텍 회사 설립 이후 SCI급 논문과 특허 출원, 그리고 기술이전 예정.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	바이칼레인 증대 공정 개발	바이칼레인 고 함량 발효 공정 개발	100	- 바이칼레인 전환 최적 발효균 도출 - 바이칼레인 전환 최적 발효균 특성 규명 연구
	바이칼레인 고함유 황금 원료 및 제품 표준화	바이칼레인 고함유 황금 표준화	100	- HPLC 분석을 통한 황금의 바이칼레인 함량 표준화
		황금 원료 표준화	100	- HPLC 분석을 통한 황금의 표준화
	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	소음성 난청 동물 모델 제작	100	- 소음성 난청 동물 모델의 제작을 위한 validation
		바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	100	- 난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금의 예방적과 치료적 효능 평가
2차 년도 (2012)	바이칼레인 증대 공정 개발	제제연구	100	- 바이칼레인 고함유 황금소재 제품 제제 연구
		시제품생산	100	- 바이칼레인 고함유 황금소재 시제품 생산
	바이칼레인 고함유 황금 원료 및 제품 표준화	Bioconversion 공정 validation	100	- 최적 유산 균주로 현재 식품으로 사용되고 있는 Aspergillus niger 유래 효소 (파우더 타입의 commercial 한 효소)를 이용하여 바이칼레인 고함유 황금 대량 생산을 위한 bioconversion 공정 validation
		제품 표준화	100	- Bioconversion에 따른 바이칼레인 함량 분석 - Bioconversion 황금의 HPLC 분석법 validation - HPLC 분석을 통한 제품의 표준화
		바이칼레인 고함유 황금소재 특허 출원 및 기술이전	100	- 바이칼레인 고함유 황금소재 특허 등록 및 기술이전 협의중
	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 시험	바이칼레인 고함유 황금소재의 청각기능 개선 효능 비교	100	- 동물 모델을 통해 바이칼레인의 섭취가능 농도 설정과 안전성 연구
			100	- 바이칼레인 함량 기준 설정 등 최종 표준화 시료로 효능 평가 실험 - 난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금의 용량별 효능 비교
			100	- 난청 동물 모델을 활용하여 전기생리학적 청각 기능 평가를 통해 바이칼레인 고함유 황금과 기존의 NAC와 효능 비교

제 2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

1. 기술적 측면

1) 유산균 발효를 통한 황성 성분 증대 기술 개발

- 천연물을 이용한 신약 및 식품 개발 시 활성 성분 증대 기술 제공

2) 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발

- 난청 실험동물 모델을 통한 전임상 유효성 데이터를 확보

3) 전 세계에서 최초로 천연물을 이용한 난청 개선 및 청각 기능 보호를 위한 선도적인 기술력 확보

4) 본 과제의 전임상 결과를 기초로 2차 연구과제로 난청개선 개별인정형 건강기능식품 개발 착수 가능

2. 경제/ 산업적 측면

1) 현재로서 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발은 국내에서는 전무한 실정으로 본 연구는 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발 산업 발전에 일조할 수 있을 것임.

2) 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발은 국민 보건 분야에서 지출되는 비용을 절약할 수 있음으로써 민간 및 보건 분야에 지출되는 재원의 절약을 가능하게 할 수 있을 것임.

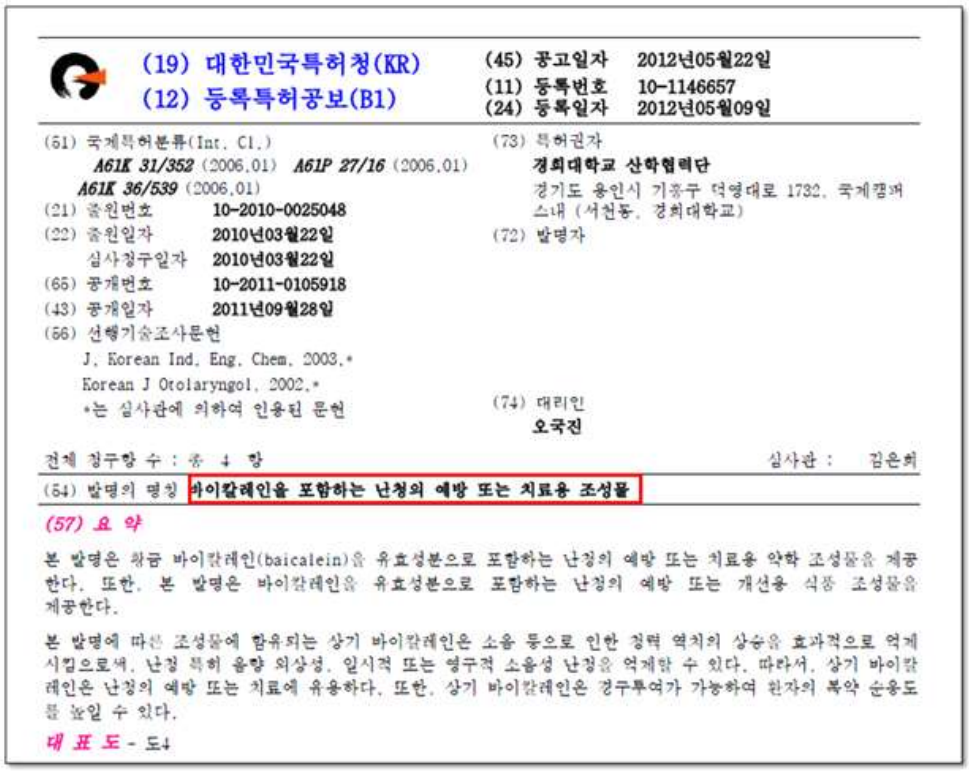
3) 건강식품을 개발, 성공적으로 마케팅 하여 시장에 성공적으로 런칭한 주관기업의 경험과 역량으로 본 과제의 성과물을 국내 뿐만 아니라 국제적으로 마케팅 하여 성공적으로 정착시킬 수 있을 것으로 기대되며, 해외 진출에서 필요시 현지 마케팅 능력을 보유한 대기업 또는 다국적 기업과 전략적으로 협력하여 해외 현지 마케팅의 성공 가능성을 높일 수 있을 것으로 기대됨.

제 5 장　연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 개발 성과

1. 바이칼레인 고함유 황금소재 제품 제제 연구 및 제제 선정을 통하여 과립형의 시제품 생산 완료
2. 황금의 주요 성분 중 청각 기능 보호 효과를 나타내는 바이칼레인의 함량을 높이기 위한 발효 균주 및 공정 validation 결과, Aspergillus niger 유래 효소인 SM enzyme으로 bioconversion 조건 수립하여 바이칼레인 함량이 28배 높아지는 것을 확인함
3. HPLC 분석을 통하여 황금의 표준화 및 발효 황금의 함량 분석을 통한 표준화
4. 발효 황금의 안정성 실험을 위해 동물 모델을 통해 LD_{50} 평가한 결과 독성 나타나지 않음
5. 바이칼레인 고함유 황금 청각기능 개선 효능 비교시 발효 전보다 발효 후 황금의 청각 기능 개선 효능이 더 우수한 것으로 나타남
6. 발효 황금의 용량 별 청각 기능 개선 평가 결과 용량이 증가할수록 청각 기능 개선 효능이 더 우수한 것으로 나타남
6. 소음성 난청 개선 물질로 알려진 NAC와의 비교 실험에서 발효 전 황금은 NAC와 비슷한 효과를 나타내었고, 발효 후 황금은 NAC 보다 더 우수한 효능을 나타냄
7. 본 연구 결과는 특허 등록 1건이 완료 되었고, 엔바이오텍 회사 설립 이후 SCI급 논문과 특허 출원, 그리고 기술이전 예정.

가. 바이칼레인 청각기능 개선에 대한 특허 등록



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월22일
(11) 등록번호 10-1146657
(24) 등록일자 2012년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 27/16* (2006.01)
A61K 36/539 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0025048
(22) 출원일자 2010년03월22일
심사청구일자 2010년03월22일
(65) 공개번호 10-2011-0105918
(43) 공개일자 2011년09월28일
(56) 선행기술조사문헌
J. Korean Ind. Eng. Chem. 2003.*
Korean J Otolaryngol. 2002.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
(74) 대리인
오국진

전체 청구항 수 : 총 4 항　　심사관 : 김은희

(54) 발명의 명칭 **바이칼레인을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 조성물**

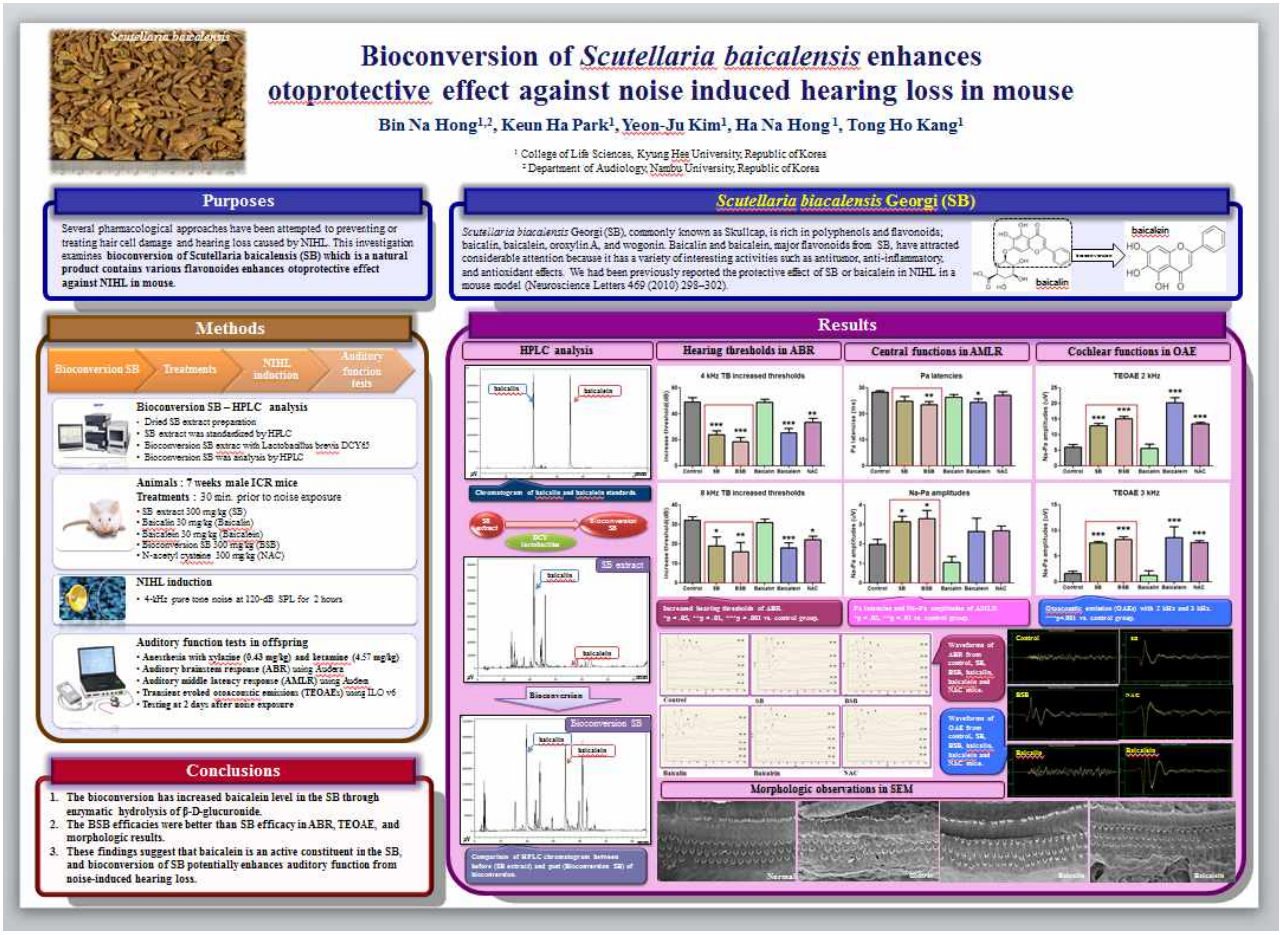
(57) 요 약

본 발명은 황금 바이칼레인(baicalein)을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 바이칼레인을 유효성분으로 포함하는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 조성물에 함유되는 상기 바이칼레인은 소음 등으로 인한 청력 역치의 상승을 효과적으로 억제시킴으로써, 난청 특히 음량 외상성, 일시적 또는 영구적 소음성 난청을 억제할 수 있다. 따라서, 상기 바이칼레인은 난청의 예방 또는 치료에 유용하다. 또한, 상기 바이칼레인은 경구투여가 가능하여 환자의 복약 순응도를 높일 수 있다.

대 표 도 - 도1

나. 2012년 미국 Association for Research in Otolaryngology 학회에서 본 연구 내용으로 발표(poster) 함.



다. 대한약학회 2012 추계학술대회에서 본 연구 내용으로 발표(poster) 함.

Bioconversion of *Scutellaria baicalensis* enhances otoprotective effect against noise induced hearing loss in mouse.

Keun Ha Park[1], You Ri Hur[1], Bin Na Hong[1,2], Tong Ho Kang[1]

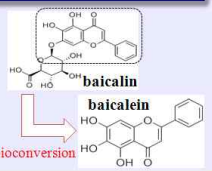
[1] College of Life Sciences, Kyung Hee University, Republic of Korea
[2] Department of Audiology, Nambu University, Republic of Korea

Purposes

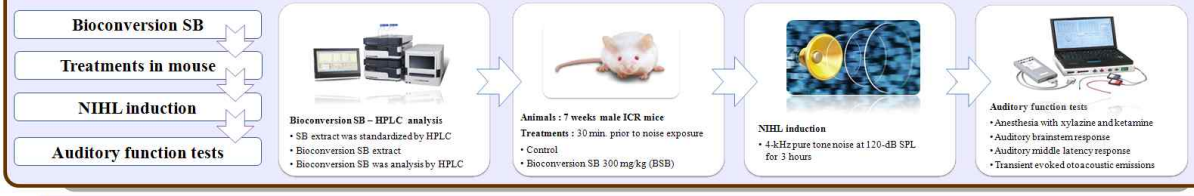
Several pharmacological approaches have been attempted to preventing or treating hair cell damage and hearing loss caused by NIHL. This investigation examines **bioconversion of *Scutellaria baicalensis* (SB) which is a natural product contains various flavonoides enhances otoprotective effect against NIHL in mouse.**

Scutellaria biacalensis Georgi (SB)

Scutellaria biacalensis Georgi (SB), commonly known as Skullcap, is rich in polyphenols and flavonoids; baicalin, baicalein, oroxylin A, and wogonin. Baicalin and baicalein, major flavonoids from SB, have attracted considerable attention because it has a variety of interesting activities such as antitumor, anti-inflammatory, and antioxidant effects. We had previously reported the protective effect of SB in NIHL in a mouse model and we had elucidated its active principle being baicalein. (Neuroscience Letters 469 (2010) 298-302). Therefore we developed bioconversion method to increase baicalein.

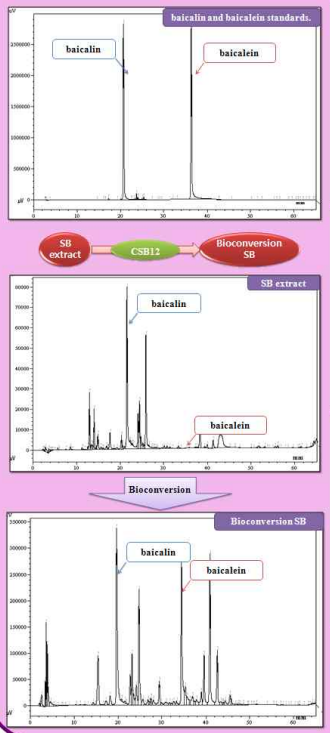


Methods

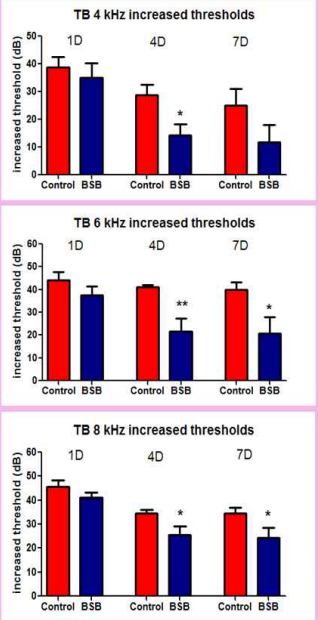


Results

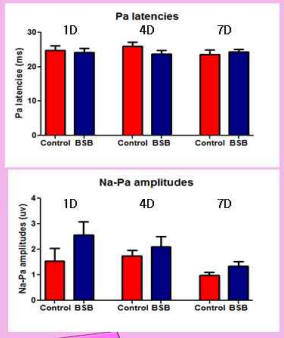
HPLC analysis



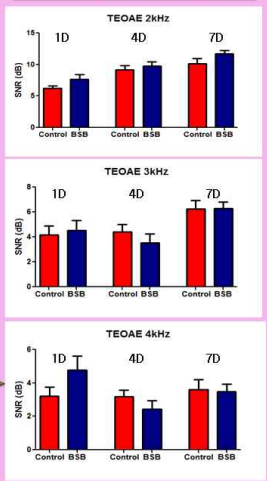
Hearing thresholds in ABR



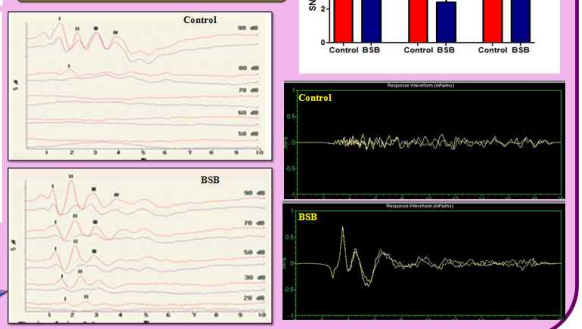
Central functions in AMLR



Cochlear functions in OAE



SNR of otoacoustic emission (OAEs) from control and BSB mice



Conclusions

1. The bioconversion has increased baicalein level in the SB through enzymatic hydrolysis by CSB12.
2. The BSB efficacies were shown in ABR, AMLR, and TEOAE.
3. These findings suggest bioconversion of SB potentially enhances auditory function from noise-induced hearing loss.

Acknowledgement

This research was supported by iPET(Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (111011-02-1-HD110).

제 2 절 연구 개발 성과 활용 계획

1. 기술적 측면

1) 천연물을 이용한 신약 및 식품 개발 시 활성 성분 증대 기술 제공

2) 난청 실험동물 모델을 통한 전임상 유효성 데이터를 확보를 통한 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발 가능

3) 전 세계에서 최초로 천연물을 이용한 난청 개선 및 청각 기능 보호를 위한 선도적인 기술력 확보

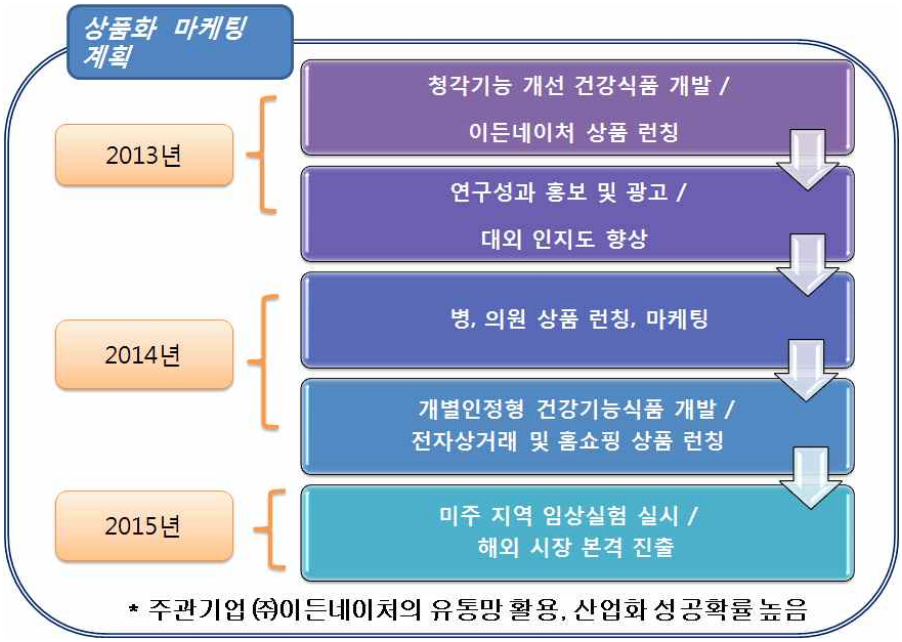
4) 본 과제의 전임상 결과를 기초로 2차 연구과제로 난청개선 개별인정형 건강기능식품 개발 착수 가능

2. 경제/ 산업적 측면

1) 현재로서 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발은 국내에서는 전무한 실정으로 본 연구는 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발 산업 발전에 일조할 수 있을 것임.

2) 난청 예방 및 청각기능 보호 식품 개발은 국민 보건 분야에서 지출되는 비용을 절약할 수 있음으로써 민간 및 보건 분야에 지출되는 재원의 절약을 가능하게 할 수 있을 것임.

3) 건강식품을 개발, 성공적으로 마케팅 하여 시장에 성공적으로 런칭한 주관기업의 경험과 역량으로 본 과제의 성과물을 국내 뿐만 아니라 국제적으로 마케팅 하여 성공적으로 정착시킬 수 있을 것으로 기대되며, 해외 진출에서 필요시 현지 마케팅 능력을 보유한 대기업 또는 다국적 기업과 전략적으로 협력하여 해외 현지 마케팅의 성공 가능성을 높일 수 있을 것으로 기대됨.


상품화 마케팅 계획
2013년
청각기능 개선 건강식품 개발 / 이든네이처 상품 런칭
연구성과 홍보 및 광고 / 대외 인지도 향상
2014년
병, 의원 상품 런칭, 마케팅
개별인정형 건강기능식품 개발 / 전자상거래 및 홈쇼핑 상품 런칭
2015년
미주 지역 임상실험 실시 / 해외 시장 본격 진출
* 주관기업 ㈜이든네이처의 유통망 활용, 산업화 성공확률 높음

국내 marketing
이든네이처 영업망
On-line 유통
난청 예방 고기능성 발효 황금 제품
약국
이비인후과병원
DISCOUNT PHARMACY
국외 marketing
On-line 판매
Off-line GNC/ 지역총판
국제행사참여 홍보
난청예방 고기능성 발효 황금 제품
100만불 수출