

발간등록번호

11-1543000-001281-01

**마늘유산균발효액을 이용한 간기능 개선성
건강기능식품 개발**

Development of hepatoprotective functional food using
garlic extract fermented with lactic acid bacteria

주관기관 : (주)바이오랜드

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “마늘유산균발효액을 이용한 간기능 개선성 건강기능식품 개발” 과제의
보고서로 제출합니다.

2016년 01월 29일

주관연구기관명 : (주)바이오랜드

세부연구책임자 : 이 승 현

1 협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

1 협동연구책임자 : 조 홍 연

요 약 문

I. 제 목

“마늘유산균발효액을 이용한 간기능 개선성 건강기능식품 개발”

II. 연구개발의 목적

마늘유산균발효액을 이용한 간기능 개선성 건강기능식품 소재 개발 및 산업화

- 가. 간기능개선 효능을 가지는 천연물질 표준화 확립
- 나. 동물시험 혈액 분석 및 조직검사를 통한 원료의 간기능개선 효능 평가
- 다. 유효 물질을 활용한 건강기능식품 시제품 제작
- 라. 추출물 및 제품에 대한 원료의 안전성, 안정성, 지표물질 기준 확보
- 마. 동물실험을 통한 제품의 효능 규명
- 바. 임상시험을 통한 제품의 효능 규명
- 사. 식약청의 건강기능식품 개발을 위한 개별인정 추진
- 아. 과학적 입증이 검증된 복합 건강기능식품을 통한 국제 경쟁력 확보

III. 연구개발 내용

- (1) 간기능개선 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴
 - 가. 발효마늘을 이용한 간기능개선 효능을 가지는 천연소재 원료 발굴
 - 나. 동물실험을 활용한 원료의 탐색적 1차 효능 평가
 - 다. 간기능개선 효능을 가지는 천연소재의 원료화 및 기준 설정
- (2) 간기능개선 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴
 - 가. 간기능개선 효능을 가지는 천연원료를 복합물로 활용하여 건강기능식품 시제품 제작
 - 나. 동물 실험을 통한 안전성 확인 및 효능 규명
 - 다. 임상 시험을 통한 간기능개선 효능 평가
- (3) 간기능개선 효능을 가지는 건강기능식품의 제품화
 - 가. 기준이 명확하게 검증된 원료를 중심으로 상용화를 위한 제품화 추진
 - 나. 우수한 원료에 대하여 식약청 개별인정 추진

IV. 연구개발결과

- (1) 지표성분 분석이 가능하며, 미생물 및 중금속 등의 안전성이 확보된 간기능개선 효능을 가지는 천연물 유래 추출물 소재 스크리닝 완료
- (2) 간기능개선에 대한 동물실험(혈액 및 조직 분석)을 통한 효능 검증 결과 에서 가장 유효한 효능을 보임

- (3) 추출물의 지표성분에 대한 간기능개선 유효 효능 확인
- (4) 발효마늘 추출물을 이용하여 다양한 시제품 개발, 제형 안정성 및 제형에 따른 소비자 선호도를 확인하여 인체적용시험 시제품을 제작
- (5) 인체적용시험을 통한 발효마늘 추출물의 간기능개선 효능 검증
- (6) 국내 및 해외에서 소비되는 발효마늘에 대한 자료 조사 및 개별인정 원료 신청 자료 작성

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- (1) 본 과제외의 결과를 기초로 특허 등록 1건, 출원 2건이 완료 되었고, 제품화 진행에 발효마늘의 간기능개선에 대한 시장 독점권이 가능
- (2) 본 과제외의 전임상 및 임상시험 결과를 기초로 간기능개선 효능을 가지는 개별 인정형 건강기능식품 개발

Summary

I. Title

“Development of hepatoprotective functional food using garlic extract fermented with lactic acid bacteria”.

II. Purpose

Development of hepatoprotective functional food using fermented garlic extract for commercialization.

- 가. Screening and standardization of active natural products effective on hepatoprotection
- 나. Blood and tissue tests for evaluating hepatoprotective activity of fermented garlic extract
- 다. Trial product manufacturing using single or multiple ingredients with active molecules
- 라. Safety, stability, standardization of extracts and product
- 마. Efficacy test with in vivo animal model
- 바. Efficacy test with clinical trial
- 사. Registration for Individual Licensing from KFDA
- 아. Securing the international competitiveness by developing scientifically proven health functional food

III. Contents of research and product development

- (1) Excavation of hepatoprotective natural products
 - 가. Test of hepatoprotective natural products of fermented garlic extracts
 - 나. First efficacy test using animal model
 - 다. Materialization and standardization of active natural products
- (2) Efficacy evaluation of hepatoprotective natural product
 - 가. Trial hepatoprotective product manufacturing
 - 나. Efficacy evaluation with in vivo animal model
 - 다. Efficacy evaluation with clinical trials
- (3) Commercialization of hepatoprotective health functional food
 - 가. Commercialization of product with standardized materials
 - 나. Individual licensing of standardized quality materials

IV. Results

- (1) Screening of hepatoprotective natural products with standardization and safety guaranteed against microbials and heavy metals
- (2) hepatoprotective activity of fermented garlic extract in animal model (blood and tissue analysis)
- (3) Evaluation of hepatoprotective activity of index compound in the extract
- (4) Comparison of various trial products, types of stability test-type preference to choose the type of supplement for clinical trial
- (5) Efficacy evaluation of hepatoprotective activity of fermented garlic extract
- (6) Searching of all the information regarding fermented garlic extract and preparation of documents for individual licensing

V. Research result and outcome utilizing plan

- (1) Results of this project came up with 1 registered patent and 2 pending patents, so exclusivity for commercialization of hepatoprotective health functional food with fermented garlic extract is secured.
- (2) Commercialization of individual licensed health functional food with hepatoprotective indication based on pre-clinical and clinical data.

Table of Contents

Chapter 1	Outline of current research project	8
Verse 1	Objectives of the research	8
Verse 2	Needs of the research	8
Chapter 2	Current technology development (domestic/abroad)	16
Verse 1	Current technology development (domestic)	16
Verse 2	Current technology development (abroad)	18
Chapter 3	Contents and results of research project	23
Verse 1	Optimization of extraction and standardization	23
Verse 2	Efficacy evaluation	39
Verse 3	Manufacturing trial sample and Stability test	69
Verse 4	Clinical study	77
Chapter 4	Goal achievement and contribution to the related fields	88
Verse 1	Achievement of goal of project	88
Verse 2	contribution to the related fields	91
Chapter 5	Outcome of research project and outcome utilizing plan	92
Chapter 6	Collected global scientific and technological information during research	94
[Annex 1]	Patent, Publication, Market analysis	98

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 1 절	연구개발과제의 목적	8
제 2 절	연구개발의 필요성	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 1 절	국내 기술개발 현황	16
제 2 절	국외 기술개발 현황	18
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	23
제 1 절	추출조건 최적화 및 표준화	23
제 2 절	생리활성 검증	39
제 3 절	시제품 제작 및 안정성 시험	69
제 4 절	인체적용시험	77
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	88
제 1 절	연구개발목표의 달성도	88
제 2 절	관련분야 기술 발전 기여도	91
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	92
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	94
[별첨 1]	특허, 논문 및 시장분석 보고서	98

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 과제의 목적

본 연구과제에서는 간 기능개선 효과가 알려진 소재를 in vivo 실험으로 스크리닝하여 그 소재에 대한 인체적용시험을 통하여 간 기능개선 효능을 규명하고자 한다. 또한 원료의 안전성 및 표준화를 위하여 미생물, 중금속 검사 및 지표성분을 확립, 분석법을 확보하고자 하며, 시제품 개발을 통한 관능적으로 우수한 제품을 개발함으로써 건강기능식품의 스트레 스 제품의 다양화 및 시장 점유율 확보를 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

□ 과학기술적 필요성

○ 국내 생산 천연물 유래 건강기능식품용 소재의 연구개발 취약성

- 국내산 천연물 및 1차 농림산물 유래 건강기능식품에 대한 연구개발은 주로 홍삼을 대상으로 연구가 활성화되어 있을 뿐, 홍삼 이외 유용성이 있다고 알려진 천연물들은 대부분 체계적인 연구결과의 부재로 개별인정형 건강기능식품 원료로 인정받지 못한 실정임
- 이에 비하여 국외 천연물 소재의 경우 과학적, 체계적 연구결과로 식품의약품안전청으로부터 기능성 원료로 인정받은 건수가 크게 증가하고 있고, 매출액에 있어서도 국내천연물 소재보다 매우 큰 시장을 형성하고 있음. 대표적인 천연물의 기능성 원료로는 자일리톨, 바나바이, 가르시니아 캄보지아, 홍경천, 구아바이, 쏘팔메토, 밀크씨슬, 콜레우스포스콜리 등이 있음
- 이들 대부분의 소재는 해외에서 연구된 결과를 자료로 하여 기능성을 인정받았음
- 동의보감을 비롯하여 동양의약 고서에 알려져 있는 국내산 천연물 및 특용작물에 대한 체계적이고 과학적 연구부족으로 표 3에서와 같이 국내 기능성 원료 인정에 있어 국내 제조보다는 수입판매 건수가 3배 내외로 높음을 알 수 있음

<표1> 국내 기능성 원료 인정 현황

년도	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	총계
수입	4	15	19	27	65	72	50	253
국내제조	5	8	10	9	19	25	18	93
국내(%)	56	35	35	25	23	26	27	27

(자료: 식품의약품안전청)

○ 발효마늘(흑마늘, 숙성마늘 포함)의 국내 연구개발 현황

- 마늘의 우수성은 이미 국내·외로 널리 알려져 있음에도 마늘의 독특하고 강한 맛과 향으로 인하여 국내의 경우에도 소비가 줄고 있음. 정부출연 연구기관을 중심으로 초고압, 숙성, 발효, capsulation 등 다양한 기법으로 기호성을 향상시킨 제품의 연구 개발 노력에도 불구하고 현재 **흑마늘 이외 가공품은 미미한 실정임**
- 흑마늘 또는 흑마늘의 2차 가공품들이 음료, 파우치 등의 형태로 판매되고 있지만, 마늘에 대한 효능평가 연구에 비하여 **흑마늘에 대한 효능평가 연구는 부족하고 체계적이지 못함**

<표 2> 흑마늘/마늘의 한국학술정보 DB검색 결과

검색어 / 제한범위	검색수/생리활성논문	비고
흑마늘 / 활성	16건 / 3건	대부분의 논문이 흑마늘 제조 관련 논문임
마늘 / 활성	92건 / 43건	다수의 논문이 생리활성 관련 논문임

<표 3> 흑마늘/마늘의 한국과학기술정보연구원 DB검색 결과

검색어 / 제한범위	검색수/생리활성논문	비고
흑마늘 / 활성	49건 / 2건	대부분의 논문이 흑마늘 제조 관련 논문임
마늘 / 활성	136건 / 50건 이상	다수의 논문이 생리활성 관련 논문임

- 대부분의 흑마늘 관련 논문은 흑마늘 이용 **2차 가공품에 대한 논문**으로 기능성에 관련된 연구는 매우 부족한 것으로 나타났음
- 흑마늘 관련 생리활성 논문들을 시험방법에 따라 분류하였을 때 표 6에서와 같이 시험관시험 15건, 동물시험 5건, 인체시험 1건을 보임으로써 전체적으로 시험 건수가 적을 뿐만 아니라, 건강기능식품원료 **인정에 요구되는 필요충분조건인** 효능의 세기, 안전성의 확보, 시험물질에 대한 정보(지표성분/기능성분) 등을 만족시키지 못하고 있음

<표 4> 흑마늘 생리활성의 한국과학기술정보연구원 DB검색 결과

시험방법	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	임상
검색수	15건	5건	1건

- 따라서 개별 인정형 기능성원료로 인정받기 위해서는 지표성분 및 기능성분의 설정과 흑마늘의 시험관시험, 동물시험, 인체적용시험을 바탕으로 한 **기능성 기전을 nutrigenomics/proteomics**적으로 밝히는 연구와 **안전성**을 확보하는 연구가 필수적으로 요구되고 있음

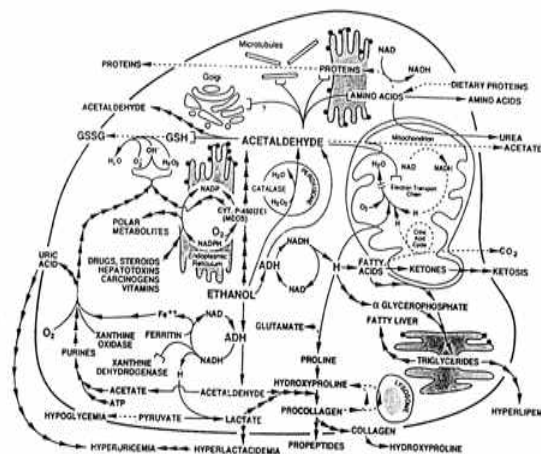
○ 마늘의 용도개발을 위한 유산균 발효기법 도입으로 흑마늘의 한계를 극복

- 국내 발효연구 중 전통발효에 관한 연구는 김치류, 장류, 젓갈류, 주류 분야의 연구가 대부분으로 천연물을 이용한 발효는 미비함. 현재 상품화 되어 있는 천연물 발효제품은 **발효홍삼**이 대표적임

- 특히 우리 고유의 농림산물과 천연물을 대상으로 발효를 이용하여 생물전환된 유도체나 신물질 창출하고, 이들의 생리·약리 활성을 탐색하는 개발전략은 국외의 기존 특허와 마찰을 피하고, 천연물 유래의 **신규선도물질**을 개발할 수 있는 최상의 대안임
- 따라서 대표적 특용작물인 마늘 발효 시 GRAS microorganism이면서 다양한 기능이 보고된 probiotics 유산균을 이용하여 최적 **발효조건의 설정** 기술을 개발하고, 과학적 기법에 의한 기호도와 기능이 향상된 기능성 마늘발효 공정을 개발하는 것은 **흑마늘의 한계**를 극복할 수 있는 최상의 전략이기도 함
- 특히, 천연물 생물전환기술의 과학화는 천연물의약, 기능성식품, 천연물화장품 산업에 있어 **원료다양성의 한계와 원료의 균일한 QC** 문제를 극복할 수 있는 최상의 대안임

○ 알코올성 간 손상/지방간 및 비알코올성 지방간 예방·개선성 소재의 개발

- 간내에서의 알코올 대사는 그림 1에서와 같이 크게 알코올 탈수소효소계(alcohol dehydrogenase: ADH pathway), 마이크로솜의 알코올 산화계(microsomal ethanol oxidizing system: MEOS) 및 카탈라이즈계(catalase pathway) 등 3 종류의 효소계가 있으며 이중 임상적으로 중요한 경로는 **ADH계와 MEOS계**로 양자 모두 alcohol이 acetaldehyde를 거쳐 acetate로 산화됨
- 본 연구그룹은 대표적 알코올성 간질환인 지방간 및 간경변과 비알코올성 지방간의 직접적 병인으로 작용하고 있는 활성산소종(reactive oxygen species : ROS), cytochrome P-450 2E1(CYP2E1), liver fatty acid binding protein(L-FABP), extracellular matrix(ECM) protein을 biomarker로 이용하여 1차적으로 *in vitro*에서 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals를 탐색함으로써 현재 간 건강 개선성 건강기능식품 원료로 시판되고 있는 소재들보다 **high efficacy와 multi-functionality**를 갖춘 발효마늘 소재를 개발하고자 함



<그림 1> 알코올의 간 대사

□ 사회·문화적 필요성

○ 우리나라 음주율과 알코올의 과다섭취로 인한 폐해

- 우리나라의 경우 20세 이상 성인 남자의 음주율은 83.3%로 매우 높고 여성의 음주율 또한 54.9%로 급격히 증가하는 추세에 있으며 술잔돌리기, 이어마시기, 술권유하

- 기, 폭음 등 잘못된 음주문화로 인하여 외국에 비해 과음에 심각하게 노출되어 있음
- 알코올의 과다섭취로 인한 폐해는 간질환을 비롯하여 각종 질환의 병인이 됨은 물론

개인, 가정, 사회의 정서와 생활에 부정적인 영향을 미침으로써 국가적으로 막대한 경제·사회적 손실을 야기하고 있음

- 우리나라 알코올리즘 유병률은 남자 45.6%, 여자 2.2%이며 이 중 알코올 의존 유병률은 구미 선진국과 비슷하지만 **알코올 남용 유병률**은 상대적으로 매우 높음으로써 상기 왜곡된 술문화의 폐해를 나타내고 있음

○ 간 건강을 위한 기능성 식품의 필요성

- 우리나라의 간암 발병률은 암 사망률 중 2위를 차지하고 있고, 이는 OECD 국가 중 가장 높은 수준임. 전체적으로 간 질환은 30~50대 연령층의 4대 사망원인중의 하나며, 특히 사회적 활동이 왕성하고 한 가정의 가장으로 중요한 **40대의 사망원인 중 암에 이어 2위**를 차지하고 있음
- 또한 2004년부터 2008년까지 간질환 진료인원증가율은 50~54세와 55~59세 연령에서 각각 남성이 24.5%와 12.5%로 증가하였으며 여성은 37.3%와 23.8%로 급격히 증가한 것으로 나타나고 있음(표 7).
- 알코올성 간질환의 경우 진료인원은 5년간 연평균 3.1%씩 하락하고 있으나, 총 진료비는 2009년도에 566억 6천만원으로 2005년 383억 6천만원 대비 약 183억원의 증가하였으며 이는 **5년간 연평균 10.3%씩 증가**한 것으로 나타나고 있음(표 8).
- 따라서 알코올성 간기능 개선성 소재를 개발하고 이를 이용한 식품의약, 기능성식품 등으로의 상품화는 개인 및 가정적인 측면에서는 물론 사회 및 **국가적인 측면**에서도 절실히 요구되는 연구개발 분야라 할 수 있음

<표 5> 간질환 진료인원증가율

나이	남성			여성		
	2004년	2008년	증가율	2004년	2008년	증가율
50~54세	60,954명	75,865명	24.5%	45,809명	62,879명	37.3%
55~59세	51,479명	57,898명	12.5%	40,450명	50,088명	23.8%
60~64세	44,533명	45,215명	1.5%	36,728명	40,288명	9.7%
65세 이상	55,175명	75,692명	37.2%	54,046명	79,167명	46.5%

<표 6> 알코올성 간질환 성별 진료인원 및 총진료비 현황

구분		2005년	2006년	2007년	2008년	2009년
진료인원 (명)	계	191,180	184,226	190,394	173,651	167,850
	남성	167,181	160,462	164,178	149,741	144,960
	여성	23,999	23,764	26,216	23,910	22,890
총 진료비 (천원)	계	38,357,324	42,898,631	50,247,445	52,562,700	56,662,077
	남성	34,561,481	38,274,726	44,881,213	46,590,900	49,221,720
	여성	3,795,843	4,623,905	5,366,232	5,971,800	7,440,357

(자료: 건강보험심사평가원)

□ 마늘 관련 국내·외 자료

○ 마늘 및 마늘의 기능성분 안정성 자료

- 마늘 식용근거 DB

<표 7> 마늘 식용근거 관련 DB검색 결과

검색 DB	내용	비고
식품공전	식품원재료 분류에서 채소류 중 근채류에 속하는 식품원재료임	
GRAS	일반적으로 사용하는데 있어 현재 위해에 대한 증거가 없음	GRAS →Type of conclusion "1"
WIKIPEDIA	중앙아시아에서 6000년 전부터 사용된 것으로 알려졌으며 현재도 많이 생산 및 소비되고 있음	
Plants for a future	생마늘 혹은 조리된 형태로 널리 이용되고 있음	식용등급(5등급): 1등급:섭취빈도 낮음 5등급:섭취빈도 높음
WHO monograph	생마늘의 1일 권장 섭취량은 2~5g으로 명시함	다양한 임상실험이 되어 있으며 과량의 마늘을 섭취하였을 때 부작용을 나타낼 수 있음

- 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용 및 독성 등) DB 검색정보

발효마늘의 주 원재료 마늘은 미국 FDA의 GRAS(Generally Recognized As Safe)에 마늘은 분류되어 안전한 식품소재로 알려져 있으며 다수의 검색 DB에서 마늘의 기능성분으로 알려진 cycloalliin과 SAC의 위해자료는 없음

<표 8> 마늘의 기능성분 관련 안전성관련 DB검색 결과

검색 site	검색어 / 제한범위	검색수 / 유효논문 수	요약 및 비고
Pubmed	cycloalliin / -	12개 / 0개	* 다수의 독성 논문 검색 DB를 검색한 결과, cycloalliin 및 S-allyl-L-cysteine이 독성이 있다는 내용 의 문헌은 없음
	S-allyl-L-cysteine / -	55개 / 0개	
Toxline	cycloalliin / -	1개 / 0개	
	S-allyl-L-cysteine / -	75개 / 0개	
US FDA poisonous plant DB	cycloalliin / -	0개 / 0개	
	S-allyl-L-cysteine / -	0개 / 0개	
한국학술정보	cycloalliin / -	0개 / 0개	
	S-allyl-L-cysteine / -	3개 / 0개	

• 유산균 안전성

Lactobacillus casei 등 유산균은 건강기능식품공전의 발효미생물류에서 프로바이오틱스에 명시되어 있어 식용 가능함

<표 9> 사용가능 프로바이오틱스(건강기능식품공전)

	종 류
<i>Lactobacillus</i>	<i>L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii ssp. bulgaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri, L.rhamnosus, L.salivarius</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E.faecium, E.faecalis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S.thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum, B.breve, B.longum, B.animalis spp. lactis</i>

• 위해성분분석결과

마늘유산균발효액을 이용하여 47종의 잔류농약 검사결과 불검출로 나왔으며 중금속, 벤조피렌 검사를 하였을 때 모두 안전한 범위 내에 있는 것으로 나타났음

○ 국내 연구현황

연구수행기관	연구개발 내용	연구개발 성과
남해마늘연구소외	단기 알코올 투여 시 마늘과 한약재 복합물이 체내 지질 조성 및 간기능 회복에 미치는 영향	일반식품개발 및 효능 확인

대구한의대학교	발효기간에 따른 마늘 발효액의 기능성	일반식품개발 및 효능 확인
호서대학교외	효소 처리와 유산균 배양에 의한 흑마늘의 항산화 활성 향상	일반식품개발 및 효능 확인
경성대학교	흑마늘추출물이 알코올을 투여한 흰쥐에 미치는 영향	효능 및 안전성 확인
전남대학교	흑마늘추출물이 만성 알코올을 투여한 쥐에 미치는 영향	효능확인
동의대학교	흑마늘 추출물에 의한 3T3-L1 지방전구세포의 분화 및 adipogenesis 억제에 관한 연구	체지방 억제효능확인
수원대학교	Pediococcus pentosaceus로 배양한 마늘의 항원활성증정	효능확인
충북대학교	고온고압처리에 따른 마늘의 이화학적 특성확인	처리조건에 따른 플라보노이드 함량 확인
남해마늘연구소외	국내 산지별 마늘의 향기성분 및 항균활성	성분확인 및 항균활성확인
부산대학교	마늘의 alcohol침지중 휘발성 향기성분과 침출 유리아미노산 함량	성분확인
농촌진흥청	발효 마늘 및 양파 부산물의 급여가 육계 생산성, 혈액성상 및 장내 미생물에 미치는 영향	사료개발 및 효능확인
남해마늘연구소외	발효마늘껍질의 이화학적 특성 및 항산화활성	성분확인 및 효능확인
순천대학교외	열처리방법에 따른 마늘의 성분분석	전환성분확인
국립농업과학원	온도 및 숙성기간이 마늘의 화학적 성분변화에 미치는 영향	전환성분확인
서울여자대학교외	초고압처리 시간과 pH 변화에 의한 마늘의 이취성분 저감화	전환성분확인
남해대학교외	흑마늘의 이화학적 특성	일반식품개발 및 성분확인
한국식품연구원	Allinase 첨가에 의한 열처리 마늘로부터 생성된 합황 화합물의 특성	일반식품개발 및 성분규명
경성대학교	바이오마커로서 숙성흑마늘의 생리활성물질	성분규명확인
농촌진흥청	가공방법이 마늘의 기능성 성분의 함량변화에 미치는 영향	전환성분확인
계명대학교외	숙성에 의해 제조된 흑마늘추출물의 생리학적 활성 및 항산화효과	일반식품개발 및 효능확인

○ 국외 연구현황

연구수행기관	연구개발 내용	연구개발 성과
Al-Azhar University, Egypt	Galctosamin과 LPS로 유발된 간독성에 대한 마늘추출물의 개선효과	간독성 효능확인

Madras University, India	Galactosamin/endotoxin에 의한 유발된 간독성에 대한 allicin이 미치는 영향	간독성 효능확인
Tohoku University, Japan	마늘의 단기배양시 tetrahydro-β-carboline 유도체의 증가에 미치는 영향	성분규명 및 전환확인
Cairo University, Egypt	NDEA로 유발된 간독성 유발모델에서 마늘과 실리마린의 영향평가	효능확인
Hiroshima University, Japan	Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage	전환성분규명
Hiroshima University, Japan	Pharmacokinetics of Cycloalliin, an Organosulfur Compound Found in Garlic and Onion, in Rats	흡수동태확인
Munich University Germany	Aged Garlic Extract Inhibits CD36 Expression in Human Macrophages via Modulation of the PPARγ Pathway	효능확인
Hiroshima University, Japan	S-Allyl cystein의 약물통태학	흡수동태확인
Atlanta University, USA	마늘의 황화합물과 allicin의 분광학적 정량방법	정량법
Manchester Metropolitan University, United Kingdom	숙성마늘과 SAC의 항당뇨효능 확인	효능확인
Stanford University, USA	임상평가에 사용된 마늘제품의 조성, 안정성, 생체흡수율 평가	성분확인 및 효능확인
Southern Research center, USA	마늘추출물의 마커인 황화합물의 확인 및 정량	성분확인
Food Composition Laboratory, USA	마늘에서 allicin을 정량하는 방법, 초임계추출법과 alliin의 첨가	정량법 확인

○ 지금까지 간 기능개선에 대한 관심은 높으나, 대부분이 단순추출물에 초점이 맞추어져 왔으나, 각각의 제품이 작용하는 기전이 서로 달라, 단순추출물 보다는 발효추출물이 보다 중요한 것으로 생각되며, 이러한 발효추출물은 이전의 단순추출물보다 보다 개선된 간 기능개선 효과를 가져와 지금까지 나와 있는 간기능개선 물질보다 국제 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.

○ 주관연구기관인 (주)바이오랜드는 과거 의약품으로만 사용이 허가되어 왔던 개별인정

획득을 통하여 건강기능식품의 제품화를 성공 하였으며, 인정받은 후 약 6개월 만에 제품이 출하되어 현재 수익 창출 중에 있음. 이러한 경험과 기술력은, 안정적이고 효과적인 간 기능개선소재의 검증 및 간 기능개선 기능성 건강기능식품의 개발에 보다 효과적으로 진행 될 것으로 여겨짐.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 국내 건강기능식품 시장 현황

(1) 국내 건강기능식품 생산실적(2013년)

식품의약품안전처(처장 정승)는 '13년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 '12년(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가로 나타났다고 발표하였음. 지난해 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 '개별인정형' 제품(전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품(전년대비 55% 증가)이 주도한 것으로 나타났으며, 13년 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억원으로 조사되어 '09년 이후 지속적인 성장세를 유지하였음. 지난해 건강기능식품 생산은 국내외 경기침체에도 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되어 성장세가 지속되는 것으로 분석되었음 (식약처 영양정책과 보도자료 2014년 8월)

(2) 국내 건강기능식품 품목별 추이

홍삼제품은 5,869억원으로 전체(1조 4,820억원)의 40%를 차지하여 여전히 가장 높은 점유율을 보였으나, 그 규모는 '11년 이후 지속적으로 감소하는 것으로 조사되었으며, 홍삼 다음으로 는 개별인정형 16%(2,324억원), 비타민·무기질 12%(1,747억원), 프로바이오틱스 5% (804억원), 알로에 4% (628억원) 제품 순으로 나타났음. 생산액 상위 10개 품목 중 '12년 대비 생산이 급증한 제품으로는 밀크씨슬추출물 제품이 128%(135억원→308억원)로 가장 높았고, 프로바이오틱스 제품 55%(518억원→804억원), 개별인정형 제품29% (1,807억원→2,324억원) 순으로 조사되었음. 밀크씨슬추출물 제품은 지난해에 개별인정형 원료의 독점적 사용권(3년)이 소멸되어 생산이 급증한 것으로 분석되었고, 프로바이오틱스 제품은 유산균과 장내면역, 장내미생물의 중요성에 대한 소비자의 인식이 높아진데 따른 것으로 풀이되었음. 지난해 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억원으로 '12년 1,807억원에 비해 29% 증가 하였으며, 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30%(704억원)를 차지하여 가장 많았으며, 헛개나무과병추출분말(간 건강) 23%(541억원), 당귀혼합추출물(면역기능) 14%(314억원), 마태열수추출물(체지방 감소) 10%(229억원) 등의 순임. 국내 고시형 건

강기능성식품과 개별인정형 건강기능성 식품 품목별 순위에서 간 건강 기능성은 시장 성장율이 높은 기능성으로, 유산균발효마늘추출물의 간 건강에 도움을 주는 기능성 인정 시, 간 건강 시장의 다양성과 시장의 확장에 도움을 줄 수 있을 것으로 예상됨

1) 국내 제품생산 및 시장 현황: 자체 시장조사자료

사진	제품명/제조사	함량/용법	용량/가격
	천호 통마늘진액100 프리미엄 천호식품	식품유형 : 액상차(다류식품) 마늘추출액(brix 16%이상) 100% 한팩 속에 12쪽의 마늘 함유 특허공법	80ml X 60팩 87,000원
	천호 통마늘진액 환 천호식품	식품유형 : 기타가공식품 가압마늘분말 67%, 마늘농축액 33% 가압처리공정으로 맛과 냄새 개선	4g X 60포 38,000원
	함께 먹어 더 좋은 마늘홍삼 천호식품	식품유형 : 액상차 마늘추출액 (Brix 5%이상) 84.5%, 사과농축액(Brix 65% 이상), 유기농아가베시럽, 홍삼농축액 (고형분 60% 이상) 1.5%	80ml X 60팩 98,000원
	굿베이스 홍삼담은 자연 흑마늘 한국인삼공사	홍삼농축액(6년근), 말토텍스트린시럽, 흑마늘농축액 5.0%, 별꽃(국산), 아가베시럽, 농축액(구기자, 복분자, 황기, 오미자, 녹용), 영지버섯추출분말, 홍삼농축액과 흑마늘농축액을 같이 섭취할 수 있는 제품 특허공법	50ml X 30포 57,000원
	폴비타 흑마늘 진 풀무원	흑마늘혼합추출액 (고형분 9%, 흑마늘 19.6%, 구기자 0.4%,(이상국산)92%, 배농축과즙(고형분 59%), 아가베시럽, 프락토올리고당 남해산 마늘을 구기자와 추출한 진한 흑마늘 음료 제품	80ml X 30포 54,000원

- 현재 마늘을 비롯하여 천연물이나 특용작물의 기능성을 표방한 제품들은 대부분 과학적 검증 없이 한방의 문헌과 구전으로 내려오는 **민간요법**에 의해 일반인에게 소비되는 경우가 다수임
- 또한 천연물에 대한 다양한 연구는 되었지만 사업체에 이용하기에 중요한 요건이 되는

- 생산성, 수율, 소재적성, 기호성, 제형 등이 고려되지 않은 연구가 대부분임
- 현재까지 수행된 대부분의 효능평가는 항암, 항산화, 항당뇨 등의 분야가 중점적으로 연구되었으며 간기능을 개선하는 효능평가는 미비하였음
 - 따라서 국내·외적으로 다양한 기능성이 알려져 있고 우리 고유의 농특산물인 마늘을 이용하여 기호성이 향상된 발효마늘제조공정을 개발한 후 체계적이고 과학적인 기법으로 기능성을 입증하고 인체적용시험을 거쳐 개별인정형 기능성원료로 인정을 받을 경우 **마늘에 대한 인지도와 선호도가 높아 홍삼과 같이 글로벌 기능성식품으로 창출될 수 있을 것으로 판단됨**

제 2 절 국외 기술개발 현황

1. 국외 건강기능식품 시장 현황

일본인간도크학회가 매년 발표하는 ‘인간도크 현황’에 따르면 인간도크 수신자 3명중 1명에서 지방간을 포함한 간 기능 이상이 확인되고 있고, 매년 그 비율이 증가하고 있음. 간 기능에 이상이 있는 사람이 증가하는 이유는 명확히 밝혀지지 않고 있으나, 건강검진자의 고령화, 스트레스 사회 등이 한 원인으로 지적됨. 또 건강검진을 받는 인구수가 증가함에 따라 간 기능에 이상이 발견되는 사함은 앞으로 더욱 증가할 것으로 예측됨. 알코올성 간염을 비롯한 간질환은 음주가 커다란 위험요소로 생각되어 왔음. 그러나, 최근에는 NASH(비알코올성 지방간염)의 증가가 문제되고 있으며, 술을 마시지 않음에도 불구하고 간염에 걸리는 사람이 증가하고 있음. 도쿄부립의과대학 의학연구과 소화기내과에서는 비알코올성 지방간질환(NAFLD)에는 사망 가능성이 낮은 ‘비알코올성 지방간(NAFS)’과 사망 가능성이 높은 비알코올성 지방간염(NASH)’이 존재한다’는 발표를 한 바 있음. 일본은 간질환과 관련하여 사망 가능성이 높은 NASH 환자가 약 200만명 존재하는 것으로 추정되고 있으며, 최근에는 NASH를 배경으로 한 간암의 증가도 뚜렷해지고 있다고 함. NASH는 1980년 제창된 질환개념으로 ‘거의 음주를 하지 않음에도 불구하고 간조직이 알코올성 간장애와 유사한 상태를 나타내는 증상’을 말하며, 암으로 진행되는 비율은 10 ~ 15 % 임. 중장년층 여성 및 비만자에게 많으며, 간경변으로 진행되기도 함. 이에, 일본에서는 ‘간 개선=알코올 대응’이라는 기존의 컨셉에서 벗어나 울금과 차별화를 시도하는 소재가 증가하고 있음. 특히, 스피루리나 및 오르니틴은 NASH개선에 대한 증례사례를 취득한 원료업체가 많아, 간기능 개선제품으로 알코올, 숙취 해소 대책상품이 아닌 비음주자용 제품으로도 제안을 강화하고 있음. 이밖에도 간 기능 개선에 효과를 표방하려는 소재가 많이 출시되고 있는 현황임. 이에, 연구 개발 중인 “발효마늘”은 알코올성 지방간염이 아닌 간 기능 개선에 전반적인 소재로서, 시장에서의 차별화 및 파급효과가 클 것으로 예상됨. 또한, 친숙하고 안전한 소재인 마늘을 일본인 취향에 적절한 “취가 적고 아린 맛이 낮은 제품”으로 개발하고 있으며, 이러한 장점으로 일본의 ‘간 건강 개선’ 시장을 적극적으로 공략할 것임

2) 국외 제품생산 및 시장 현황: 자체 시장조사 자료

사진	제품명/제조사	함량/용법	용량/가격
	ニンニクの力 (마늘의 힘) 하우스식품	- 고농축 마늘추출물(알린 함유) 100mg, 비타민B1 5 mg - 무취가공 마늘을 사용하여 마늘의 독특한 냄새와 쓴맛을 억제 - 생마늘 약5g(약1쪽)분의 추출물 섭취가능 - 원재료 : 사과식이섬유, 마늘추출물 , 생강추출물, 비타민B1 - 1일 2병 이하 섭취	100ml ¥200
	國産にんにくエキス (국산마늘추출물) 오리히로(주)	- 아오모리(青森)산 마늘을 독자적인 무취화 처리로 특유의 냄새를 제거 - 피로회복에 중요한 비타민B1의 흡수를 돕는 작용 - 영양성분 : 비타민B1 2mg, 무취화마늘추출물 350mg , *생마늘로써 7g 상당 - 1일 4정 섭취	30g (250mg X 120정) ¥1,680
	元氣なマカ& ニンニク (건강한 마카&마늘) 이토엔	- ‘안데스의 여왕’이라고도 불리는 페루산 허브 마카와 스테미너 보급원으로써 예전부터 즐겨 섭취한 마늘을 동시에 섭취할 수 있습니다. - 주요성분: 마카추출분말 50mg, 마늘추출분말 120mg , 비타민B1 5mg - 1일 1정 섭취	20정 ¥943
	ニンニクエキス (마늘추출물) 야마모토한방제약	- 무취마늘추출물분말 에 비타민B1을 플러스 - 생마늘 2쪽(약 4g)분의 영양 섭취가능 - 보건의능식품 (영양기능식품 : 비타민B1) - 1일 12정	70g (250mg X 280정) ¥1,575
	NINNIKU+ (마늘 플러스) HOMEOSTYLE	- 무취마늘 배합 - 피로회복에 중요한 비타민B1의 흡수를 돕는 작용 - 내용성분: 에조오갈피추출물분말, 옥수수단백, 무취마늘분말 , 비타민C, 비타민B1, 비타민B2, 비타민B6, 엽산, 비타민A - 1일 3회, 2정씩	168정 (6정/일 X 28일분) ¥3,000
	POWER SATIVUMIN U (주)피에스	- 무취마늘추출물 186mg , 비타민B1 0.95mg, 비타민B2 3.42mg, 비타민C 12.6mg (9g 당) - 원재료: 사티바밍복합체(무취마늘영양성분) , 난각칼슘, 비타민C, 비타민B1, 비타민B2 - 1일 3포	270g (3g X 90포) ¥4,800
	Odor Control Garlic Nature Made	- Concentrated from whole garlic - May help lower blood cholesterol levels - Contains 1,250mg of concentrated garlic bulb per serving	300 Tablets \$23.99

사진	제품명/제조사	합량/용법	용량/가격
	Mega Garlic Plus HERBALIFE	<ul style="list-style-type: none"> - helps support healthy circulation and a healthy heart - enteric-coated for absorption - 1 Tablet = 1 Clove - Supplement Facts : Vitamin C (as ascorbic acid) 70mg, Calcium (as dicalcium phosphate), Phosphorus (as dicalcium phosphate) 34mg, Garlic Powder (clove) 600mg - 1일 1tablet 	30 Tablets \$13.81
	GarliChol Planetary Herbals	<ul style="list-style-type: none"> - supports normal cholesterol levels - patented “no heat” process which protects the valuable compound allicin - The enteric-coating process further insures that the allicin potential is not destroyed by stomach acid - Supplement Facts (for 650mg) Garlic Clove Yielding : 650mg, Allicin 6mg, Thiosulfinates 6mg, gamma-glutamylcysteines 5.2mg, Sulfur 4.2mg 	100 Tablets \$19.98
	Garlicin® Nature’s way	<ul style="list-style-type: none"> - Exceeds clinically proven allicin release potency - 100% stomach acid protection - Using the SmartRelease® tableting à Rapid intestinal release - Enteric-coating technology à Odor-free Garlic - Ingredients Garlic powder (bulb) releasing 3,200mcg allicin 350mg - 1일 2회, 1 tablet 	300 Tablets \$23.99
	Garlicin® HC Nature’s way	<ul style="list-style-type: none"> - Combines the effectiveness of Garlicin® with the added benefits of Hawthorn extract, Cayenne and Vitamine E - Ingredients Garlic powder (bulb) releasing 2,800mcg allicin 310mg Hawthorn extract (top branches w/flowers) 25mg Cayenne Pepper (fruit) 15mg Rutin 12mg - 1일 2회, 1 tablet 	90 Tablets \$16.49
	Garlicin® CF Nature’s way	<ul style="list-style-type: none"> - Combines all the healthy benefits of Garlicin® with the added benefits of Echinacea, Vitamin-C and OptiZinc® - Ingredients Garlic powder (bulb) releasing 960mcg allicin 105mg Echinacea purpurea (stem, leaf, flower) 205mg Bioflavonoid complex (from citrus fruits) 15mg Zinc (as OptizincR) 5mg 1일 3회, 1 tablet 	100 Tablets \$19.98






사진	제품명/제조사	합량/용법	용량/가격
	Garlic&Parsley Source Naturals	<ul style="list-style-type: none"> • Tasteless and Odorless • contains true oils of garlic and parsley seed, extracted from whole fresh garlic bulb and parsley seed, and suspended in pure soybean oil • Supplement Facts for Softgels (serving size : 2 softgels) Garlic Oil (equivalent to 500 mg of fresh garlic) 10 mg Parsley Seed Oil (equivalent to 100 mg of fresh parsley) 400 mcg <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1~2 softgels 	100 softgels \$6.50
	Garlic Oil Source Naturals	<ul style="list-style-type: none"> • Tasteless and Odorless • contains true oil of garlic extracted from whole fresh garlic bulb, and suspended in pure soybean oil • Supplement Facts for Softgels (serving size : 1 softgel) Garlic Oil (from 500 mg raw garlic) 0.2 mg <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1~2 softgels 	100 softgels \$6.50
	Wellness GarliCell™ Source Naturals	<ul style="list-style-type: none"> • Garlic with No After-Odor • The proprietary enteric-coating process protects the potential of allicin, garlic's main active component, until it reaches the small intestine, where it is released and immediately absorbed • Supplement Facts for 6,000 mcg Tablet (serving size : 1 Tablet) Garlic Clove Yielding 650 mg Allicin 6mg <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1 tablet 	180 Tablets \$32.98
	Garlic Parsley SOLGAR	<ul style="list-style-type: none"> • Contains breath-freshening Parsley and the plant nutrient Chlorophyll • Supplement Facts (serving size : 2 tablets) Calcium (as dicalcium phosphate) 160 mg Dehydrated Garlic Powder 260 mg Dehydrated Parsley Powder 260 mcg <ul style="list-style-type: none"> • 1일 3회, 2 tablets 	250 Tablets \$14.97
	MaxGar™ Garlic SOLGAR	<ul style="list-style-type: none"> • Odor controlled • Supplement Facts (serving size : 1 softgel) Garlic Oil Macerate 280 mg (as 2.4:1 concentrate, equivalent to 672 mg fresh garlic) <ul style="list-style-type: none"> • 1일 2회, 1 softgel 	90 softgels \$14.5

사진	제품명/제조사	함량/용법	용량/가격
	Organic Garlic 500mg SOLGAR	<ul style="list-style-type: none"> • Vegetable capsules à Suitable for vegetarians • Supplement Facts (serving size : 1 Vegetable Capsule) Certified Organic Garlic Powder 500 mg Allicin Yield 750 mcg, Thiosulfinates 800 mcg, Allin 5000 mcg, Gamma-glutamylcysteines 8000 mcg <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1~2 capsules 	90 capsules \$14.00
	GarliPure® 500mg NATROL	<ul style="list-style-type: none"> • Odor controlled • Supplement Facts (serving size : 2 capsules) Pur-Gar® Garlic Extract (Allium sativum) (bulb) 1 g Gamma glutamylcysteines 15,000 mcg, Aliin 10,000 mcg, Sulfur 8,000 mcg, Thiosulfinates 1,600 mcg, Allicin Yield 1,500 mcg <ul style="list-style-type: none"> • 1일 2회, 2 capsules 	200 Tablets \$21.99
	GarliPure® NATROL	<ul style="list-style-type: none"> • Maximum Allicin Formula • Odor controlled • Supplement Facts (serving size : 1 caplet) Garlic (Allium sativum) Powdered extract (bulb) 600mg Gamma glutamylcysteines 12,000 mcg, Aliin 4,800 mcg, Sulfur 3,900 mcg, Thiosulfinates 3,800 mcg, Allicin Yield 3,600 mcg 1일 2회, 1 caplet	100 capsules \$19.49
	Garlicforce™ NEWCHAPTER	<ul style="list-style-type: none"> • Supplement Facts (serving size : 1 softgel) Garlic (bulb) hydroethanolic extract (min. 0.3 mg cycteine compounds) 160 mg, Garlic (bulb) supercritical extract (min. 1.6 mg sulphur containing compounds) 80 mg, Supercritical Herbal Extract Blend 22 mg Parsley (seed); Caraway (seed); Cardamom (seed); Clove (bud); Fennel (seed); Ginger (rhizome); Peppermint (leaf) <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1 softgel 	30 softgels \$31.95

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 추출 조건 최적화 및 표준화

1. 간기능 개선 활성물질의 추출 최적화 공정 설정

가. Scale up 추출공정의 최적화

(1) 연구 목적 : 제품 대량생산 process 확립 및 지표성분 Cycloalliin의 함량 최적화

(2) 연구 방법

제조공정	공정설명	Cycloalliin (mg/g)	수율(%)
마늘		0.8~1.5	
열처리	마늘:상수 1:2 (w/v) 100~110℃, 3hr		
유산균 배양	Lactobacillus plantarum 37℃, 16~24hr, pH 3.8~4.0	2.0~3.0	25~35
살균	121℃ 30분		
숙성	50℃, 12~16hr	2.2~4.2	35~45
열처리	95℃, 30분		
여과	퍼라이트 첨가		
농축	45~55℃		
살균	95℃, 1hr		
포장		2.2~4.2	35~45

(3) 연구 결과

○ 위의 제조 공정 확립을 위한 파일럿 테스트를 3반복 수행하였으며, 공정별 Cycloalliin의 함량을 분석하여 조건을 최적화 하였음

○ 제조 결과 Cycloalliin의 함량은 최종 제품에서 2.2 ~ 4.2 mg/g 의 함량을 나타내었으며, 최종 농축액(고형분 60% 이상)제품의 수율은 35 ~ 45 %mf 나타내었음

나. 상기 추출물의 이화학적 특성 분석

(1) 연구 목적 : 대량생산 제조 방법으로 제조된 제품의 기준 및 규격을 확립

(2) 연구 방법

○ 제품의 성상, 지표성분(Cycloalliin)의 함량, 중금속, 대장균군의 기준 및 규격을 설정

○ 당사는 자가품질검사가 가능한 연구소 기관으로 위의 항목을 시험하여 성적서를 발행

할 수 있으며, 자사의 타 제품에도 위와 같은 건강기능성식품 규격의 시험법을 확립하고 있음

(3) 연구 결과

항목	규격	유산균발효마늘추출물		
		Lot. 20140404	Lot. 20140506	Lot. 20140610
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 검은 갈색의 액상			
Cycloalliin (mg/g)	2.2~4.2	3.4	3.3	3.2
납 (mg/kg)	1 이하	0.1608	0.0993	0.1518
총비소 (mg/kg)	1 이하	0.1084	0.0815	0.1079
카드뮴 (mg/kg)	1 이하	0.0853	0.0590	0.0875
총수은 (mg/kg)	0.5 이하	0.001	0.001	0.001
대장균군	음성	음성	음성	음성

○ 건강기능성식품 규격의 ‘유산균발효마늘추출물’의 기준 및 규격을 위와 같이 설정하였음

다. 대량생산 공정 최적화

(1) 연구 목적 : 자사 생산설비 scale에 적절한 1회 생산 기준 확립

(2) 연구 방법

○ 당사는 건강기능성식품 GMP인증 기관으로 GMP기준에 적합한 위생관리와 제조관리기준을 수행하고 있음. 따라서 ‘유산균발효마늘추출물’의 당사 제조에 있어 GMP 기준서에 알맞은 제조관리가 필요하므로, 자사 생산설비 및 관리 기준에 적합한 생산 기준을 확립하였음

(3) 연구 결과

Lot.	No	제조일 (2014년)	Cycloalliin 함량 (mg/g)	수율 (%)
Lot	1	3월 15일	3.03	42.2
Lot	2	5월 25일	3.25	43.1
Lot	3	7월 15일	3.87	43.5
평균			3.29.	42.6

○ 1회 생산 기준인 마늘 400~600kg 의 공정 및 전처리 조건을 확립하였으며, 지표성분의 함량 및 생산 수율을 확인하였음

○ 1회당 마늘 400~600kg 기준으로 총 3회의 대량생산 공정에 적용하여 제품을 제조하였으며, 3회 이상의 제조 결과를 토대로 제품의 기준 및 규격을 확립하였음

5) 기기분석 조건

기기	UPLC-PDA
칼럼	AccQ Tag™(2.1*100mm)ULTRAC18, 1.7um
이동상	Solvent A - acetate-phosphate buffer Solvent B - 60% acetonitrile
유량	0.4ml/min
시료량	3.0ul
분석시간	20분
검출	254nm
칼럼온도	37℃

6) Gradient 조건

	Solvent A	Solvent B
0.33	98.0	2.0
5.94	93.0	7.0
7.48	90.0	10.0
12.51	67.0	33.0
12.89	67.0	33.0
14.00	10.0	90.0
16.00	0.0	100.0
18.00	100.0	0.0
20.00	100.0	0.0

(3) 연구결과

1) 함량 분석 결과

샘플명/지표물질	%함량
FLP13-01-01 / Cycloalliin	0.018
FLP13-01-01 / SMC	0.010
FLP13-01-01 / SEC	0.035
FLP13-01-01 / SAC	0.034
FLP13-01-01 / Alliin(+)	0
FLP13-01-01 / Alliin(-)	0

① SAC와 cycloalliin의 RT가 중첩되어 SAC를 기존의 16분 분석방법에서 gradient를 추가시켜 16분에서 20분으로 시간을 늘리면서 SAC와 cycloalliin peak를 분리하여 분석할 수 있는 방법을 확립하였다.

② Cycloallin의 경우 표준품 용해 용매를 메탄올을 사용하여 피크가 밀리는 것을 볼 수 있었다. 이는 주 이동상이 borate buffer임에 따라 발생한 현상으로 확인되었다. ACCQ-TAG method를 적용하여 cycloalliin 함량분석 시 용매는 3차 증류수를 적용하여야 할 것으로 사료된다.

라. 유산균발효마늘추출물중 cycloalliin 지표성분 분석법 검토(HPLC)

(1) 연구목적 : 유산균발효마늘추출물 제조시 마늘(원재료) 및 공정샘플의 지표성분함량변화 측정을 위하여 현재 분리되어 있는 cycloalliin 분석법을 통합하기 위하여 ACCQ-TAC method와 cycloalliin method의 분석편차를 확인한다.

(2) 연구방법 (AccQ-Tag method)

1) AccQ-Tga Method(UPLC)

① 분석기기: UPLC-PDA

② 표준품/시료

- 표준품 : cycloalliin

- 시료 : 유산균발효마늘추출물(FLP-13-01-01)

Cycloalliin(mg/ml)	FLP-13-01-01
1.018	5g/100ml
0.509	
0.1018	

- 용해 및 희석 시 3차 증류수를 이용하였다.

- FLP-13-01-01 용해액은 0.45um syringe filter로 여과하여 반응하였다.

2) 이동상 제조

- 이동상 A : AccQ-Tag eluent 50ml+ 3차 증류수 500ml

- 이동상 B : 60% acetonitrile 500ml

3) sample 및 standard 유도체화

- ① water bath 를 55℃까지 예열한다
- ② 70ul Borate buffer(Reagent 1)을 튜브에 담는다.
- ③ Standard, 샘플, 증류수 10ul를 각각 sample tube에 넣고 재빨리 vortexing시킨다.
- ④ 20ul AccQ Fluor Reagent를 sample tube에 가하고 몇 초간 vortexing한다.
- ⑤ 상온에서 몇 분간 방치시킨다.
- ⑥ Water bath에서 10분간 가운한다.
- ⑦ 3차 증류수 100ul로 희석한다.
- ⑧ UPLC 분석시 insert를 사용한다.(volume 보정용)

4) 기기분석 조건

기기	UPLC-PDA
칼럼	AccQ Tag™(2.1*100mm) ULTRAC18, 1.7um
이동상	Solvent A - acetate-phosphate buffer Solvent B - 60% acetonitrile
유량	4.0ml/min
시료량	3.0ul
분석시간	20분
검출	254nm
칼럼온도	37℃

5) Gradient 조건

	Solvent A	Solvent B
0.33	98.0	2.0
5.94	93.0	7.0
7.48	90.0	10.0
12.51	67.0	33.0
12.89	67.0	33.0
14.00	10.0	90.0
16.00	0.0	100.0
18.00	100.0	0.0
20.00	100.0	0.0

6) 함량 계산 시 환산계수

① Cycloalliin hydrochloride monohydrate의 분자량 = 231.7

② Cycloalliin의 분자량 = 177.2

③ 환산계수 = $177.2 / 231.7 = 0.766$

(3) 연구방법 (cycloalliin method)

1) 분석방법

- 분석기기: HPLC-PDA

2) 표준용액의 조제

① 표준품: Cycloalliin hydrochloride monohydrate (Wako 035-21151, 순도 98%)

② 표준품 10mg을 50mL 메탄올에 용해하여 (200ug/mL) 표준원액으로 한다.

③ 표준원액을 100, 20ug/mL로 희석하여 표준원액과 함께 분석한다.

3) 시험용액의 조제

① FLP-13-01-01 : 500mg을 50mL 메탄올에 완전히 용해시킨 후 0.45um filter로 여과하여 분석한다.

4) 기기분석 조건

검출기	자외부흡광광도검출기 210nm
컬럼	TSKgel amide (4.5 x 250mm, 5um)
온도	30℃
유속	1.0ml/min
주입량	20ul
이동상	이동상 A: 0.2% phosphoric acid 이동상 B: ACN A : B = 25 : 75

5) 함량 계산 시 환산계수

① Cycloalliin hydrochloride monohydrate의 분자량 = 231.7

② Cycloalliin의 분자량 = 177.2

③ 환산계수 = $177.2 / 231.7 = 0.766$

(4) 연구결과

1) 함량분석결과

분석방법	%함량
ACCQ-TAG method(UPLC)	0.17
Cycloalliin method(HPLC)	0.21

- ① 분석결과 0.04%의 함량편차가 발생하는 것을 확인 할 수 있었다.
- ② HPLC 분석에서 cycloalliin의 분리능이 보다 뛰어나서 cycloalliin은 자사에서 설정한 HPLC 방법을 적용하기로 결정함.

마. 원산지, 채취시기별 지표성분의 분석

(1) 연구목적

- 1) 원산지별 마늘(서산, 창녕, 의성, 남해, 고흥)을 동결건조하여 분쇄하고 이를 분석용 시료로 한다. 난지형(남해, 창녕, 고흥)/한지형(의성, 서산) 마늘에 의한 지표성분 편차가 있는지 확인 한다.
- 2) 분석법은 AccQ-Tag method를 적용하여 6가지 지표성분에 대한 함량을 분석한다.

(2) 연구방법

1) 마늘 건조

- ① 산지별 마늘 다섯쪽을 각각 -60℃에서 동결시키고 이를 동결건조하였다.
- ② 동결건조 된 마늘을 파우더믹서로 마쇄하여 분말화하고 지표성분 함량분석 시료로 사용하였다.

2) 수분함량 측정

- ① 산지별 마늘 다섯쪽씩 무게를 측정한 후 드라이오븐에 105℃ 4시간 건조 후
- ② 각 산지별 마늘을 반으로 갈라 2시간씩 더 건조하여 수분함량을 측정하였다.

3) 표준품/시료 제조

- ① 표준품 : Cycloalliin, (±)Alliin, S-allyl-Cysteine(SAC), S-methyl-Cysteine(SMC), S-ethyl-Cysteine (SEC)
- ② 시료 : 동결건조 마늘분말(서산, 창녕, 고흥, 의성, 남해)을 50mg/ml의 농도로 증류수에 용해하였다.

표준품농도	±Alliin (mg/ml)	SAC (mg/ml)	SMC (mg/ml)	SEC (mg/ml)	Cycloalliin (mg/ml)	Sample (mg/ml)
1/1	0.56	0.051	0.5	0.53	1.018	50
1/2	0.28	0.0255	0.25	0.265	0.509	
1/10	0.056	0.01275	0.05	0.053	0.1018	

- 희석 시 3차 증류수 이용

(3) 연구결과

1) 수분함량

	의성	창녕	남해	서산	고흥
마늘무게, 5쪽(g)	27.8962	34.8340	22.5649	35.9001	20.6505
건조 후 마늘무게, 5쪽(g)	16.0446	18.8798	13.1230	20.1827	13.9294
마늘 1쪽의 평균무게	5.58	6.96	4.51	7.18	4.13
수분율(%)	63.2	72.7	60.8	68.1	74.6
고형분(%)	36.8	27.3	39.2	31.9	25.4

2) 분말함량 분석 결과

원산지	SAC		SEC		SMC	
	마늘건조물 함량(%)	마늘 함량 (%)	마늘건조물 함량(%)	마늘 함량 (%)	마늘건조물 함량(%)	마늘 함량 (%)
고흥	0.089	0.022	0.014	0.003	0.162	0.041
의성	0.081	0.029	0.018	0.006	0.139	0.051
남해	0.014	0.005	0.010	0.003	0.045	0.017
창녕	0.008	0.002	0.008	0.002	0.044	0.012
서산	0.083	0.026	0.003	0.001	0.021	0.006

원산지	Alliin(+)		Alliin(-)	
	마늘건조물 함량(%)	마늘 함량 (%)	마늘건조물 함량(%)	마늘 함량 (%)
고흥	0.011	0.002	0.293	0.074
의성	0.015	0.005	0.972	0.357
남해	0.000	0.000	1.255	0.491
창녕	0.000	0.000	1.199	0.327
서산	0.000	0.000	0.197	0.062

시료		cycloalliin 함량(%)	1차 + 2차 cycloalliin 함량(%)
마늘 (창녕)	1차	0.091	0.107
	2차	0.016	
마늘 (서산)	1차	0.007	0.007
	2차	0.000	
마늘 (고흥)	1차	0.118	0.144
	2차	0.026	
마늘 (의성)	1차	0.046	0.054
	2차	0.008	
마늘 (남해)	1차	0.110	0.129
	2차	0.019	

- ① UPLC ACCQ-TAG method로 원재료 지표성분 함량 분석결과 SAC, SEC, SMC, (±)Alliin는 함량분석이 가능하였으나 Cycloalliin의 경우 미량으로 Peak가 출되지 않아 HPLC법을 사용하여 분석하였다.
- ② 원재료 내 SAC 함량은 고흥>서산>의성>남해>창녕 순으로 나타났으며 한지형/난지형의 편차는 명확히 나타나지 않았다.
- ③ 원재료 내 SEC 함량은 의성>고흥>남해>창녕>서산 순으로 나타났으며 한지형/난지형의 편차는 명확히 나타나지 않았다.
- ④ 원재료 내 SMC 함량은 고흥>의성>남해>창녕>서산 순으로 나타났으며 한지형/난지형의 편차는 명확히 나타나지 않았다. 고흥 의성 마늘의 경우 함량 0.04% 이상으로 확인되었다.
- ⑤ 원재료 내 cycloalliin 함량은 남해>창녕>고흥>의성>서산 순으로 나타났으며 난지형 마늘에 속하는 남해, 창녕, 고흥산 마늘의 cycloalliin의 함량이 한지형에 속하는 의성, 서산 마늘에 비하여 높은 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 마늘원재료 분석시 샘플 용해과정에서 샘플이 메탄올에 완전히 용해되지 않는 경향이 있어 메탄올 환류추출에 의한 원재료 내 cycloalliin 함량 측정의 재실험이 필요할 것으로 사료된다.
- ⑥ 원재료 내 (+)alliin 함량은 고흥, 의성 마늘에서만 정량되었고 의성마늘이 고흥마늘에 비하여 (+)alliin의 함량이 높게 확인되었다.
- ⑦ 원재료 내 (-)alliin 함량은 남해>의성>창녕>고흥>서산 순으로 나타났으며 남해, 창녕, 의성의 경우 약 0.3%농도의 (-)alliin이 다량 함유되어있는 것을 확인할 수 있었다.

(4) 최종 결론

- 1) 원재료 내 지표성분 분석결과 한지형/난지형에 의한 편차는 cycloalliin 함량에서 확인 되었으며 다른 지표성분들은 명확한 차이를 확인 할 수 없었다. 그러나 샘플 용해가 메탄올에서 원활하지 않은 관계로 메탄올 환류추출에 의한 결과를 재확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.
- 2) 마늘 내 함황아미노산 전구체에 해당하는 alliin의 함량은 (+)alliin의 경우 고흥, 의성 마늘에서만 정량되었으나 그 양이 미량이었으며 (-)alliin의 경우 남해, 창녕, 의성 마늘이 약 0.3%로 높은 함량을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. Alliin의 함량이 높을수록

SAC 및 기타 유용성 함황아미노산으로 전환될 가능성이 높으므로 남해, 창녕, 의성 마늘을 원재료로 발효를 통한 유용성 함황아미노산 증가경향을 확인 해야 할 것으로 사료된다.

3) 숙성흑마늘 내 효능성분으로 가장 널리 알려진 SAC의 경우 원재료 내에서는 미량 확인되었으나 발효마늘 공정을 통한 함량증가를 확인 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

4) SMC의 경우 고흥, 의성 마늘에서 함량이 높게 나타났으므로 발효마늘 공정에 따른 함량증가를 확인해야 할 것으로 사료된다. SEC의 경우 원재료에서 미량이나 발효공정에 의한 변화는 지속적으로 관찰하여야 할 것으로 사료된다.

바. 지표성분의 method validation, 발효공정 중 생성되는 지표성분의 분석법 method validation

(1) 연구목적 : 선행특허 검토를 토대로 마늘을 NaCl 침지, 세척하고 이를 유산균발효마늘 추출물 제조 공정에 도입하여 최종적으로 유산균발효마늘추출물의 취 개선 효과를 확인하고자 함. (NaCl 침지농도 : 10, 20, 30%)

(2) 연구방법

- 1) 깎마늘을 비이커에 500g 씩 가하고 10, 20, 30%의 NaCl 용액(정제수에 용해)를 각각 1kg 씩 가하여 1일간 침지하였다.
- 2) 1일간 침지한 액을 따라내어 버리고 동량의 상수 1kg으로 2회 세척하였다.
- 3) MRS배지 200ml을 멸균하고 *L. plantarum* 유산균 stock solution을 2%농도(4ml)로 접종한 후 37°C 24시간 정치배양하였다.
- 4) 3L 삼각플라스크에 세척한 깎마늘을 넣고 상수 1kg을 혼합하여 105°C, 3시간 멸균하였다.
- 5) 마늘멸균액을 흔들여 마늘을 으갠 후 제조한 종배양액을 2%농도로 접종하였다.
- 6) 인큐베이터에서 37°C, 20시간 정치배양하였다.
- 7) 배양액을 121°C, 30분간 살균하였다.
- 8) 살균액에 아밀라아제, 셀룰라아제 효소를 5g 가하고 각 효소의 최적온도로 150rpm, overnight 반응하였다.
- 9) 효소반응액을 90°C, 30분간 열처리하여 효소실활하였다.
- 10) 열처리액에 액량대비 펄라이트 2%를 처방하여 여과하였다.
- 11) 여과액을 60brix까지 진공농축하였다.
- 12) 농축액을 90~95°C 2시간 살균하였다.
- 13) 대조군으로 NaCl 침지 및 세척을 하지 않은 샘플과의 취를 비교하였다.

(3) 결론 및 고찰

- 1) 선행특허 검토를 통하여 NaCl을 10~30%까지 침지하고 세척하여 제조한 유산균발효마늘추출물의 취개선 효과를 검토한 결과 선행특허 검토결과와 달리 30%의 NaCl 세척에 의한 취 개선 효과가 다소 미비하였다.

2) 취 개선에 대한 사전문헌검토 및 방법적용이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

사. 열수추출 조건에 따른 최대 추출율, 기호성 향상, 선택변화 등 검토

(1) 연구목적

- 1) 효소를 사용하여 유산균발효마늘추출물 제조공정에 의해 샘플을 제조한다.
- 2) 당분해효소를 중점으로 검토하며 효소분해 공정에 의한 수율 및 지표성분 변화를 확인한다.

(2) 연구방법

1) 효소

- ① α -amylase(Novozyme, Fungamyl)
- ② β -amylase(Sigma, β -Amylase from barley)
- ③ Glucoamylase(Sigma, Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*)
- ④ Protease(자사제품, Protease)
- ⑤ Cellulase(자사제품, Cellulase 12T)
- ⑥ Xylanase(Sigma, Xylanase from *Trichoderma viride*)

2) 샘플제조(6종의 효소를 동일공정으로 처리함)

- ① MRS배지 200ml을 멸균하고 *L. plantarum* 유산균 stock solution을 2%농도(4ml)로 접종한 후 37°C 24시간 정치배양하였다.
- ② 1L 삼각플라스크에 마늘 100g과 상수 200g을 넣고 면전으로 입구를 막은 후 10°C, 3시간 멸균하였다.
- ③ 마늘멸균액을 흔들어서 마늘을 으갠 후 ①에서 제조한 종배양액을 2%농도로(6ml) 접종하였다.
- ④ 인큐베이터에서 37°C, 20시간 정치 배양하였다.
- ⑤ 배양액을 121°C, 30분간 살균하였다.
- ⑥ 살균액에 효소를 1g가하고 각 효소의 최적온도로 150rpm, overnight 반응하였다.
- ⑦ 효소반응액을 90°C, 30분간 열처리하여 효소실활하였다.
- ⑧ 열처리액에 액량대비 퍼라이트 2%를 처방하여 여과지 여과하였다.
- ⑨ 여과액을 60brix까지 진공농축하였다.

3) 대조샘플제조(효소 처리하지 않음)

- ① MRS배지 200ml을 멸균하고 *L. plantarum* 유산균 stock solution을 2%농도(4ml)로 접종한 후 37°C 24시간 정치배양하였다.
- ② 1L 삼각플라스크에 마늘 100g과 상수 200g을 넣고 면전으로 입구를 막은 후 10°C, 3시간 멸균하였다.
- ③ 마늘멸균액을 흔들어서 마늘을 으갠 후 ①에서 제조한 종배양액을 2%농도로(6ml) 접종하였다.
- ④ 인큐베이터에서 37°C, 20시간 정치배양하였다.

- ⑤ 배양액을 121℃, 30분간 살균하였다.
- ⑥ 살균액을 50℃, 150rpm, overnight 하였다.(본 실험에 사용된 효소의 최적반응 온도는 40~50℃)
- ⑦ 90℃, 30분간 열처리하였다.
- ⑧ 숙성액에 액량대비 펄라이트 2%를 처방하여 여과지 여과하였다.
- ⑨ 여과액을 60brix까지 진공농축하였다.

4) 지표성분 함량분석

- ① 표준품: Cycloalliin hydrochloride monohydrate (Wako 035-21151) 순도 98%
- ② 표준품 25.95mg을 50mL 메탄올에 용해하여 (519ug/mL) 표준원액으로 한다.
- ③ 표준원액을 259.5ug/ml , 51.9ug/mL, 25.95ug/ml로 희석하여 분석하고 검량선을 작성한다.

5) 기기분석 조건

검출기	자외부흡광광도검출기 210nm
컬럼	TSKgel amide (4.5 x 250mm, 5um)
온도	30℃
유속	1.0ml/min
주입량	20ul
이동상	이동상 A: 0.2% phosphoric acid 이동상 B: ACN A : B = 25 : 75

6) 함량 계산 시 환산계수

- ① Cycloalliin hydrochloride monohydrate의 분자량 = 231.7
- ② Cycloalliin의 분자량 = 177.2
- ③ 환산계수 = $177.2 / 231.7 = 0.766$

(3) 연구결과

1) 유산균발효마늘추출물 분석결과

샘플명	Cycloalliin(%)	추출수율(%)
대조구	0.26	25
α-amylase	0.29	30
β-amylase	0.26	28
Glucoamylase	0.27	28
Protease	0.27	26
Cellulase	0.41	32
Xylanase	0.37	30

- ① Cellulase와 xylanase로 마늘추출액을 효소분해 하는 경우 cycloalliin의 함량이

0.41%, 0.37%로 증가되는 것을 확인 함.

- ② 다른 당류가수분해 효소 및 단백질가수분해 효소에서는 cycloalliin의 함량 증가가 유의적으로 관찰되지 않음.
- ③ Cellulase 효소에 의한 추출수율 증가가 가장 뚜렷함.

(4) 최종결론

- 1) 섬유소 분해효소에 해당하는 cellulose, xylanase를 유산균마늘추출물 제조공정에 도입한 결과 cycloalliin함량이 0.35% 이상으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 마늘에 조직에 존재하는 셀룰로오스를 가수분해함으로써 조직 내 cycloalliin의 추출이 용이하게 되는 것으로 추정된다.
- 2) 기존 공정에 효소분해 공정을 추가하여 공정을 개선해야 할 것으로 사료된다.
- 3) Cellulase 효소분해에 의한 지표성분 함량증가 및 추출수율 최적화 가능. 당화에 의하여 제조된 유산균발효마늘추출물의 단맛이 증가하는 장점이 있음.

아. 열수추출액 안정성 및 저장성 등 검토

(1) 연구목적

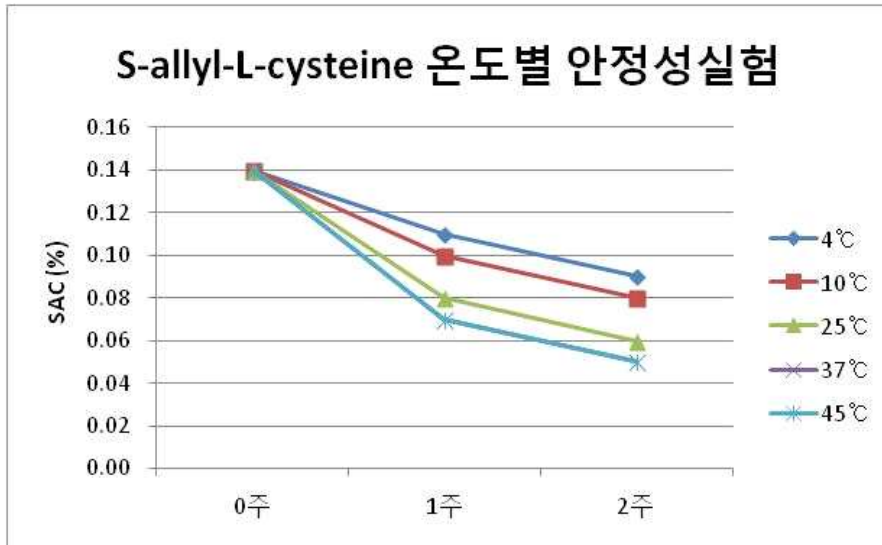
- 1) 유산균발효마늘추출물의 지표성분인 두 물질(S-allyl-L-cysteine(SAC), cycloalliin)의 온도에 의한 안정성을 확인한다.
- 2) 4, 10, 25, 37, 45℃의 각 온도에서 2주간 보관하여 초기 지표성분 함량대비 변화량을 확인한다.

(2) 연구방법

- 1) 샘플(마늘원산지 : 창녕, Sample Lot. : 20130321, 고형분 : 62%)
 - ① 유산균발효마늘추출물 제조공정에 따라 제조한 샘플을 10g씩 취하여 15ml falcon tube에 분주하고 밀폐하여 4, 10, 25, 37, 45℃ 각 온도에서 2주간 보관하였다.
 - ② 초기 실험샘플의 지표성분(S-allyl-L-cysteine(SAC), Cycloalliin) 함량을 분석하고 각각 온도의 보관샘플을 1주일 간격으로 취하여 지표성분의 함량을 분석하였다.
- 2) 분석방법 : Cycloalliin HPLC 분석법

(3) 연구결과

온도(℃)	S-allyl-L-cysteine 함량(%)					Cycloalliin 함량(%)				
	4℃	10℃	25℃	37℃	45℃	4℃	10℃	25℃	37℃	45℃
샘플초기	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
1주차	0.11	0.10	0.08	0.07	0.07	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
2주차	0.09	0.08	0.06	0.05	0.05	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31



1) S-allyl-L-cysteine(SAC) 온도안정성 실험결과

- ① 4 ~ 45°C 각 온도에서 시간이 경과함에 따라 초기함량대비 함량이 감소되는 것을 확인하였으며 특히 45°C의 경우 함량이 1/3으로 줄어 보관온도가 높을수록 함량이 더 빠르게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

2) Cycloalliin 온도안정성 실험결과

- ① 4 ~ 45°C 각 온도에서 시간이 경과하여도 함량의 변화가 관찰되지 않았고 2주차까지 함량이 안정한 것을 확인할 수 있었다.

(4) 최종결론

1) S-allyl-L-cysteine(SAC)의 경우 4 ~ 45°C 전 온도영역에서 함량감소가 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며 온도가 높을수록 더 빠르게 함량감소가 이루어졌다. 이는 SAC가 강한 radical scavenger 특성을 지녀 활성산소와 반응함에 따라 함량감소가 이루어지게 되는 것으로 추정된다. 따라서 불안정한 물질특성을 보이므로 유산균발효마늘추출물의 지표성분으로 하는 것은 바람직하지 않을 것으로 사료된다.

2) Cycloalliin의 경우 4 ~ 45°C 전 온도영역에서 함량감소가 이루어지지 않고 안정하였으며 따라서 유산균발효마늘추출물의 지표성분으로 적합한 것으로 사료된다. 단, 상기 실험은 단기안정성 실험에 해당하므로 장기안정성 경시 결과를 추가적으로 확인해야할 것으로 사료된다.

자. 최대 생육/간기능 개선활성 유산균 선정, 최대 기호성 향상을 갖는 유산균 선정, 간기능 개선 활성의 발효조건 최적화, 발효 전후 간기능 개선 활성 분석, 발효 전후 시료의 성분 및 기호성 분석, 유산균 선택 시 최소 6종이상을 비교 검토

(1) 연구목적 : 유산균 8종을 사용하여 유산균발효마늘추출물 제조공정에 의해 샘플을 제조한다.

(2) 연구방법

1) 균주

- ① *Lactobacillus plantarum*
- ② *Lactobacillus casei*
- ③ *Lactobacillus acidophilus*
- ④ *Lactobacillus fermentum*
- ⑤ *Lactobacillus ruteri*
- ⑥ *Lactobacillus heveticus*
- ⑦ *Pediococcus pentosaceus*
- ⑧ *Leuconostoc mensentericus*

- 각 균주에 의하여 발효된 제조샘플의 지표성분을 분석한다.
- 발효정도를 객관화하기 위하여 배양 전/후로 샘플링하여 배양 Profile을 확인한다.

2) 샘플제조(8종의 유산균을 동일공정으로 처리함)

- ① MRS배지 200ml을 멸균하고 유산균 stock solution을 2%농도(4ml)로 접종한 후 37°C, 4시간 정치배양하였다.
- ② 1L 삼각플라스크에 마늘 100g과 상수 200g을 넣고 면전으로 입구를 막은 후 10 5°C, 3시간 멸균하였다.
- ③ 마늘멸균액을 흔들어 마늘을 으갠 후 ①에서 제조한 종배양액을 2%농도로(6ml) 접종하였다.
- ④ 인큐베이터에서 37°C, 20시간 정치배양하였다.
- ⑤ 배양액을 121°C, 30분간 살균하였다.
- ⑥ 살균액에 셀룰라아제 효소를 가하여 50°C에서 1일간 효소분해하였다.
- ⑦ 효소분해액을 가온하여 90°C, 30분 효소실활하였다.
- ⑧ 숙성액에 액량대비 퍼라이트 2%를 처방하여 여과지 여과하였다.
- ⑨ 여과액을 60brix까지 진공농축하였다.

3) 지표성분 함량분석

- ① S-allyl-L-cysteine 함량분석(분석기기: UPLC-PDA)
- ② Cycloalliin분석 (분석기기: HPLC-PDA)

(3) 연구결과

1) 배양결과

균주명	접종초기 pH	발효 후 pH	접종초기 생균수(CFU/ml)	발효 후 생균수(CFU/ml)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.3	3.9	4.20 × 10 ⁵	1.10 × 10 ⁹
<i>Lactobacillus casei</i>	5.5	5.1	1.80 × 10 ⁵	3.42 × 10 ⁸
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5.4	5.0	8.40 × 10 ⁴	6.21 × 10 ⁶
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.5	4.9	6.25 × 10 ⁶	7.25 × 10 ⁸

<i>Lactobacillus ruteri</i>	5.5	4.8	1.90 × 10 ⁵	3.41 × 10 ⁷
<i>Lactobacillus heveticus</i>	5.4	5.2	1.10 × 10 ⁴	5.40 × 10 ⁶
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5.4	4.5	7.30 × 10 ⁵	1.01 × 10 ⁹
<i>Leuconostoc mensentericus</i>	5.5	5.4	6.30 × 10 ⁵	4.50 × 10 ⁶

① *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus pentosaceus* 균주가 특이적으로 마늘에서의 생육력이 높게 나타났으며 생육과 함께 pH의 감소가 확연하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

2) 유산균발효마늘추출물 분석결과(60Brix 농축액)

균주명	SAC(%)	Cycloalliin(%)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.25	0.35
<i>Lactobacillus casei</i>	0.14	0.18
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.13	0.23
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.14	0.20
<i>Lactobacillus ruteri</i>	0.11	0.24
<i>Lactobacillus heveticus</i>	0.18	0.22
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0.22	0.27
<i>Leuconostoc mensentericus</i>	0.18	0.19

- ① SAC 함량은 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus pentosaceus* 균주가 0.2% 이상으로 특이적으로 발효를 통해 SAC 함량을 증가시키는 것을 확인하였다.
- ② Cycloalliin 함량은 *Lactobacillus plantarum* 균주가 0.3% 이상으로 특이적으로 발효를 통해 SAC 함량을 증가시키는 것을 확인하였다.

(4) 최종결론

- 1) 마늘에서 특이적으로 생육력이 좋고 유산균의 특징인 유산생성에 의한 pH 감소가 증가되는 균주는 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus pentosaceus*로 확인되었다.
- 2) 8종의 유산균발효를 통해 발효 전/후의 SAC와 cycloalliin의 함량변화를 관찰한 결과 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus pentosaceus* 2종의 균주가 특이적으로 SAC와 cycloalliin 함량이 다른 균주에 비하여 높은 것을 확인할 수 있었다. 발효를 통한 대사 기전이 명확하지는 않으나 함황아미노산인 SAC와 cycloalliin의 생성이 증가하는 것으로 보아 두 균주가 함황아미노산 관련대사 능력이 있을 것으로 추정된다.
- 3) *Lactobacillus plantarum* 발효에 의한 젖산생성으로 유산균발효마늘추출물 제조 시 마늘특유의 아린 맛과 매운취가 마스킹 되어 맛이 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

제 2 절 생리 활성 검증

1. in vitro 및 in vivo 활성 검증

가. in vitro 활성

(1) in vitro assay 구축

발효 전 시료, 마늘 추출액과 발효 후 시료, 마늘유산균발효액의 간기능 개선 활성을 검색하기 위해 최적 조건을 검토한 후 아래와 같이 assay계를 구축하였음

1) 알코올성 간보호 활성 assay계 : HepG2 cell에 CYP2E1을 transfection시킨 HepG2/2E1 cell line을 사용하여 에탄올 3일간 처리 후 cell viability를 MTT assay를 통해 알코올성 간보호 활성을 측정하는 assay계를 다음과 같이 구축하였음

- HepG2 cell에 CYP2E1이 transfection된 HepG2/2E1 cell을 24 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후, 기존의 배지를 제거하고 FBS 5%, phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA) 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조성된 배지 900 μL 과 100 μL 의 sample을 첨가한 후 2시간 동안 배양한 다음 에탄올 300 mM을 처리하고 24시간 동안 배양하였음
- 상기 조작을 3일간 매일 1회씩 반복 한 후 MTT assay를 통해 cell viability를 측정하였음

2) 알코올성 지방간 억제 활성 assay계 : 상기와 동일하게 시료와 알코올을 처리, 배양한 후 알코올에 의한 지방 생성을 Oil Red O(ORO) staining에 의해 지방간 억제 활성을 측정하는 assay계를 다음과 같이 구축하였음

- HepG2/2E1 cell을 사용하여 sample과 알코올을 상기 방법에 따라 처리하여 알코올에 의한 간세포 내 지방축적을 유도하였음
- 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척, 10% formalin 용액으로 1시간 동안 처리하여 고정시킨 후 ORO solution을 200 μL 첨가하여 2시간 동안 염색시킨 다음 ORO solution을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 200 μL 의 isopropanol을 첨가하여 세포 내 지방질에 염색된 ORO solution을 용해시켜 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였음

3) 비알코올성 지방간 억제 활성 assay계 : HepG2 cell을 사용하여 oleic acid로 유도된 비알코올성 지방간 in vitro model system을 다음과 같이 구축하였음

- HepG2 cell을 2×10^5 cells/well 농도로 24-well plate에 seeding 후 24시간 배

- 양한 다음 sample을 처리하고 다시 24시간 배양하였음
- 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척 후 새로운 배지 900 μ L와 1% BSA solution에 용해시킨 3 mM oleic acid를 100 μ L 첨가하고 24시간 배양한 후 상기 2)항과 같이 ORO staining을 통해 세포 내 지방 축적률을 측정하였음
- 4) 세포 내 항산화 활성 assay계 : HepG2 cell을 사용하여 세포내 활성산소 수준을 DCF-DA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)법을 이용하여 측정함으로써 세포 내 항산화활성을 검토하는 assay계를 다음과 같이 구축하였음
- HepG2 cell을 96-well plate에 6×10^5 cells/well 농도로 seeding 후 24시간 배양한 다음 250 μ M의 DCF-DA 10 μ L와 sample 10 μ L, 80 μ L의 DMEM 배지의 조성으로 교체한 다음 1시간 배양하였음
 - 배지 제거 후 PBS로 2회 세척한 후 PBS에 희석시킨 500 μ M의 H₂O₂ 또는 AAPH(2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl)를 처리한 다음 1시간 후에 VICTOR3(Ferkin elmer, USA)를 사용하여 형광도를 측정하였음
- 5) Acetaminophen 간독성 보호 활성 assay계 : HepG2 cell을 사용하여 acetaminophen의 간독성으로부터 간세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 측정하는 assay계를 다음과 같이 구축하였음
- HepG2 cell을 5×10^4 cells/well 농도로 seeding 후 24시간 배양한 후 sample을 처리하고 24시간 배양한 다음 배지를 교체한 후 20 mM의 acetaminophen을 처리하여 24시간 배양하고 MTT assay에 의해 cell viability를 측정하였음. MTT assay는 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척 후 새로운 배지로 교체한 다음 50 μ L의 MTT solution을 첨가, 2시간 배양하였음. 배지를 제거하고 세포 내 형성된 formazan crystal을 500 μ L의 DMSO를 첨가하여 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였음
- 6) Tacrine 간독성 보호 활성 assay계 : HepG2 cell을 사용하여 200 μ M tacrine의 간독성으로부터 간세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 측정하는 assay계를 상기 5)항과 같이 구축하였음
- 7) AAPH 간독성 보호 활성 assay계 : HepG2 cell을 사용하여 10 mM AAPH의 간독성으로부터 간세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 측정하는 assay계를 상기 5)항과 같이 구축하였음
- 8) Acetaldehyde 간독성 보호 활성 assay계 : HepG2 cell을 사용하여 4 mM acetaldehyde의 간독성으로부터 간세포 보호 효과를 MTT assay를 통해 측정하는 assay계를 상기 5)항과 같이 구축하였음

(2) 구축 assay계를 활용한 cell-based in vitro 간기능 개선 활성 검색

상기에서 구축한 assay계를 사용하여 발효 전 시료, 마늘 추출액과 발효 후 시료, 마늘 유산균발효액의 간기능 개선 활성을 농도별에 따라 검색하고 positive/negative control 대비 활성의 세기를 측정하였음. 그 결과 Fig. 1~9에서와 같이 시료는 acetetaldehyde 간독성 보호 > acetoaminophen 간독성 보호 > 비알코올성 지방간 억제 활성 > 간세포 내 ROS 소거 활성 등의 순으로 높은 활성을 나타내었으며, 기타 활성은 미미하였음

1) 알코올성 간보호 활성

- HepG2/2E1 cell에서 3일간의 알코올 처리로 유도된 산화적 스트레스에 의한 cell viability 감소에 대한 간보호 활성을 측정한 결과, 3일간의 알코올 처리에 의해 cell viability가 40%로 감소하였고, 대조구로 사용한 헛개나무열매추출물(HDF)은 약 18%의 간보호 활성을 보였음
- 발효 전 마늘추출액 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 0%, 7%, 10%의 미미한 알코올성 간보호 활성을 나타내었고, 유산균발효마늘농축액의 경우 상기 농도에서 각각 4%, 6%, 6%의 미미한 간보호 활성을 보임으로써 발효 전/후 모두 알코올성 간손상에 대한 간세포 보호활성은 미미하였음(Fig. 12)

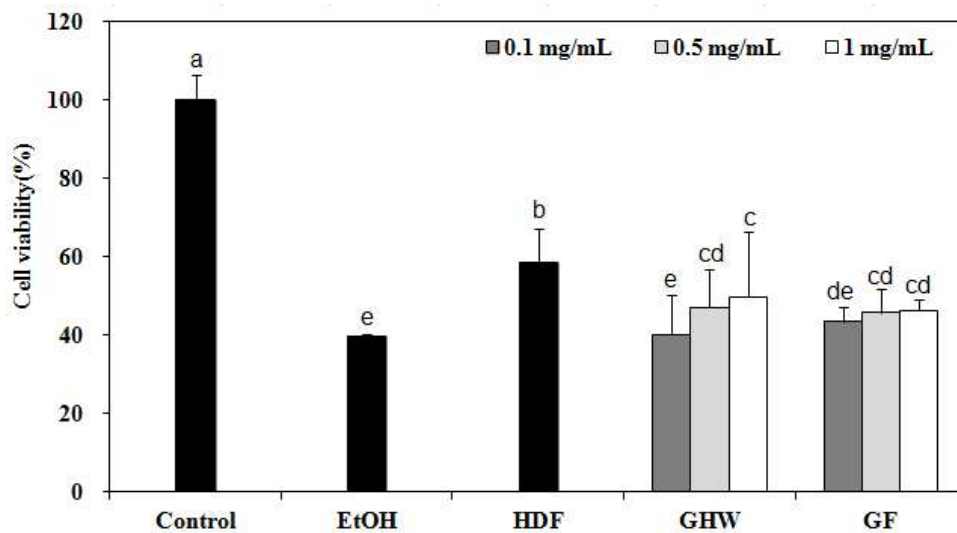


Fig. 1. Protective effect of non-fermented and fermented liquid garlic on ethanol-induced oxidative damage in HepG2/2E1 cells.

Ethanol was treated 300 mM for 3 days and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of Hovenia dulcis fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) ±S.D.

2) 알코올성 지방간 억제 활성

- HepG2/2E1 cell에서 3일간의 알코올 처리에 의해 세포 내 지방 축적을 유도한

알코올성 지방간 모델에서 발효 전/후 마늘 추출액의 알코올성 지방간 억제 활성을 검토하였음

- 300 mM의 알코올을 3일간 처리한 후 세포 내 축적된 지방의 양을 ORO staining에 의해 측정된 결과, 알코올을 처리하지 않은 대조군에 비해 알코올 처리군은 131%의 지방축적률을 보였음
- HDF 0.5 mg/mL 농도에서 120%의 지방축적률을 나타내었으며, 발효전 마늘추출액의 경우 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 133%, 131%, 135%의 지방축적률을 보였고, 발효 후 마늘의 경우 상기 농도에서 각각 135%, 130%, 128%의 지방축적률을 나타냄으로써 알코올성 지방간에 대한 억제 효과는 미미한 것으로 확인되었음 (Fig. 13)

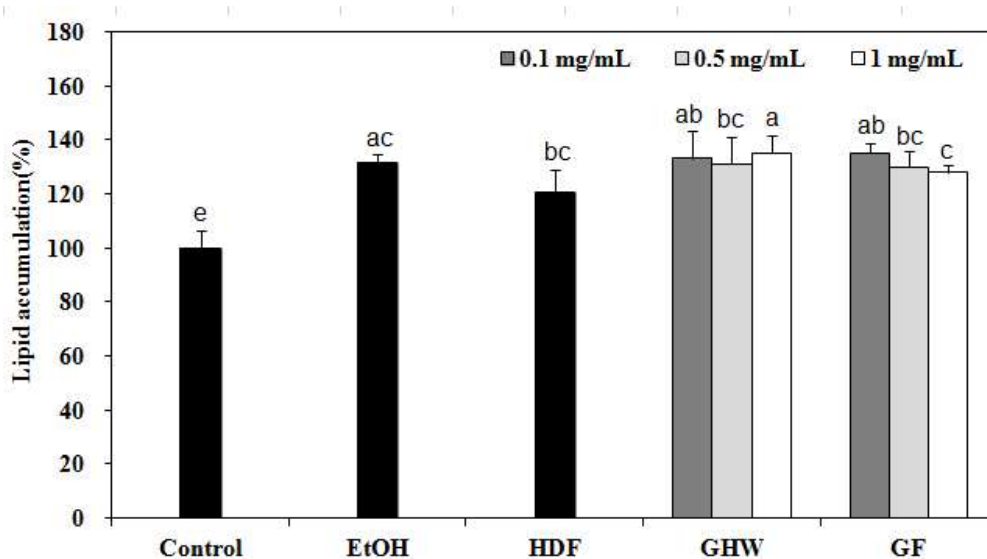


Fig. 2. Inhibitory effect of non-fermented and fermented liquid garlic on ethanol-induced lipid accumulation in HepG2/2E1 cells.

Ethanol was treated 300 mM for 3 days and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) ±S.D.

3) 비알코올성 지방간 억제 활성

- HepG2 cell에서 oleic acid로 유도된 비알코올성 지방간 in vitro model에서 발효 전/후 마늘추출액의 비알코올성 지방간 억제 활성을 검토하였음
- 그 결과, oleic acid에 의해 161%까지 세포 내 지방축적률이 증가하였고, HDF의 경우 0.5 mg/mL 농도에서 143%의 지방축적률을 보임으로써 약 19%의 비알코올성 지방간 억제 활성을 나타냄
- 발효 전 마늘추출액의 경우 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 169%, 165%, 164%의 지방축적률을 보임으로써 세포 내 지방축적 억제 효과를 나타내지 않은 반면, 발효 후 마늘 추출액의 경우 상기 농도에서 각각 152%, 139%, 131%의 지방축적률을 보임으로써 각각 10%, 22%, 31%의 비알코올성 지방간 억제 활성을 나타냄

- 발효 전 마늘 추출액에 비해 발효 후 마늘 추출액에서 비알코올성 지방간 억제 활성이 증가함을 확인하였음(Fig. 14)

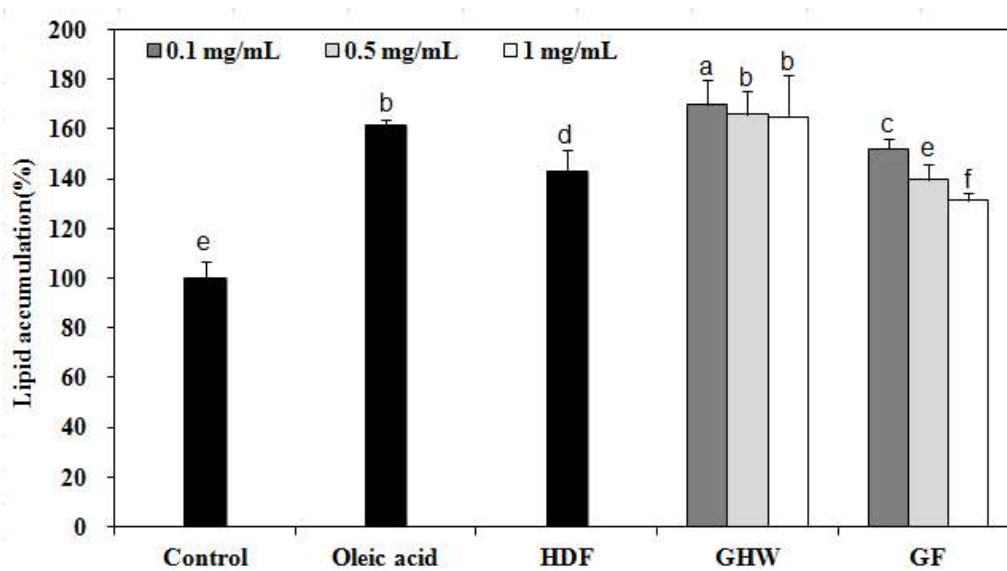


Fig. 3. Inhibitory effect of non-fermented and fermented liquid garlic on oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells.

Oleic acid was treated 0.3 mM and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) ±S.D.

4) 세포 내 항산화 활성

<H₂O₂로 유도된 세포 내 ROS 소거 활성>

- HepG2 cell에서 H₂O₂로 유도된 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 소거 활성을 통한 간세포 내에서의 항산화 효과를 검토한 결과, H₂O₂에 의해 173%까지 증가한 세포 내 ROS는 HDF에서 151%로 감소하며 약 22%의 소거 활성을 나타냄
- 발효 전 마늘 추출액이 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 약 167%, 170%, 153%의 지방축적률을 보이며, 각각 약 7%, 4%, 20%의 비알코올성 지방간 억제 활성을 나타내었음
- 발효 후 마늘 추출액은 상기 농도에서 각각 152%, 142%, 131% 수준으로 감소시키며, 약 21%, 32%, 38%의 비알코올성 지방간 억제 활성을 확인함(Fig. 15)

<AAPH로 유도된 세포 내 ROS 소거 활성>

- HepG2 cell에서 AAPH로 유도된 세포 내 ROS 소거 활성을 통한 간 세포 내에서의 항산화 효과를 검토한 결과, AAPH에 의해 약 153%까지 증가한 세포 내 ROS는 HDF에서 약 133%로 감소시키며 약 22%의 세포 내 ROS 소거 활성을 나타냄
- 발효 전 마늘 추출액은 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 약 146%, 135%, 139%까지 감소시키며 약 7%, 18%, 14%의 세포 내 ROS 소거 활성을 나타내었고, 발효

후 마늘 추출액은 각각 133%, 126%, 123%로 감소시키며, 약 20%, 27%, 30%의 세포 내 ROS 소거활성을 나타냄(Fig. 16)

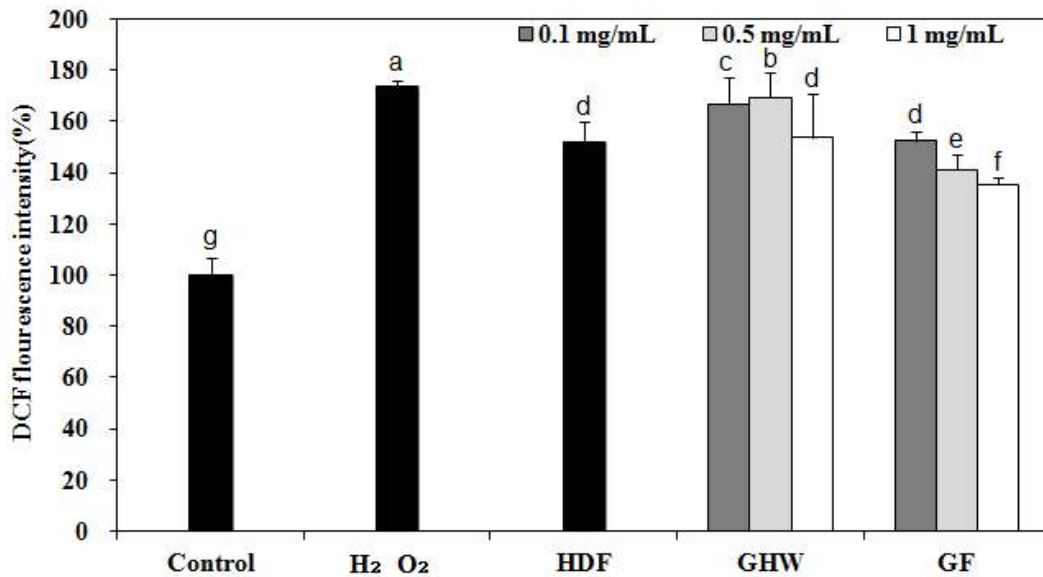


Fig. 4. H₂O₂-induced intracellular reactive oxygen species scavenging activity of non-fermented and fermented liquid garlic in HepG2 cells.

H₂O₂ was treated 500 μ M and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits, GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

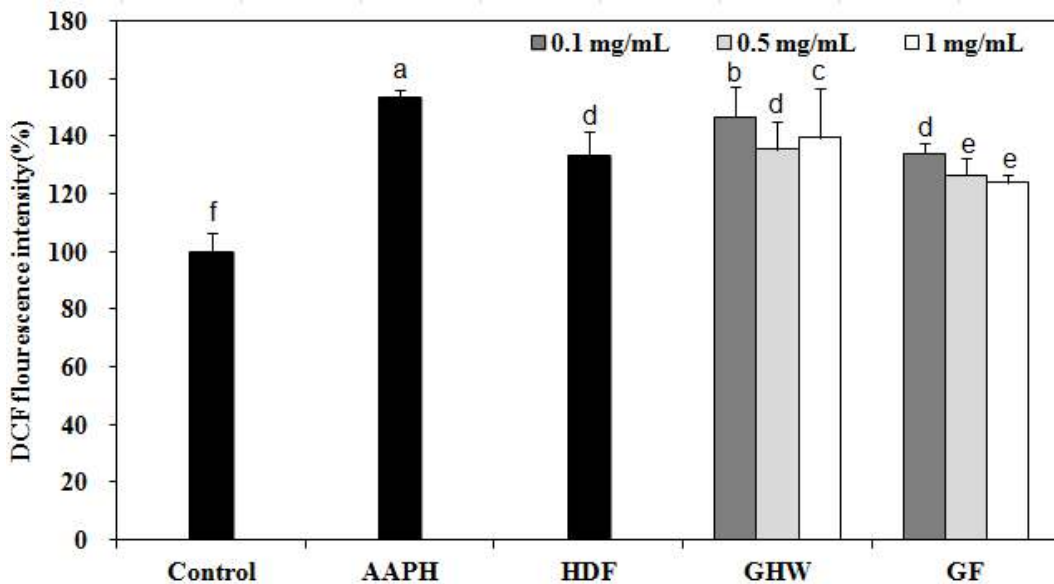


Fig. 5. AAPH-induced intracellular reactive oxygen species scavenging activity of non-fermented and fermented liquid garlic in HepG2 cells.

AAPH was treated 500 μ M and HDF was treated 0.5 mg/mL. AAPH: 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl, HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

5) Acetaminophen 간독성 보호 활성

- Acetaminophen에 의해 56%까지 감소한 cell viability는 HDF 0.5 mg/mL 농도에서 66%까지 cell viability를 증가시키므로써 약 10%의 간세포 보호 활성을 나타내었음
- 발효 전 마늘 추출액의 경우 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 약 59%, 57%, 67%의 cell viability를 보이며 약 3%, 1%, 11%의 간 보호 활성을 나타내었고, 발효 후 마늘 추출액의 경우 상기 농도에서 각각 64%, 76%, 81%의 cell viability를 나타냄으로써 약 8%, 20%, 25%의 간보호 활성을 나타내며 발효 전에 비해 발효 후 간 보호 활성이 증가하였음(Fig. 17)

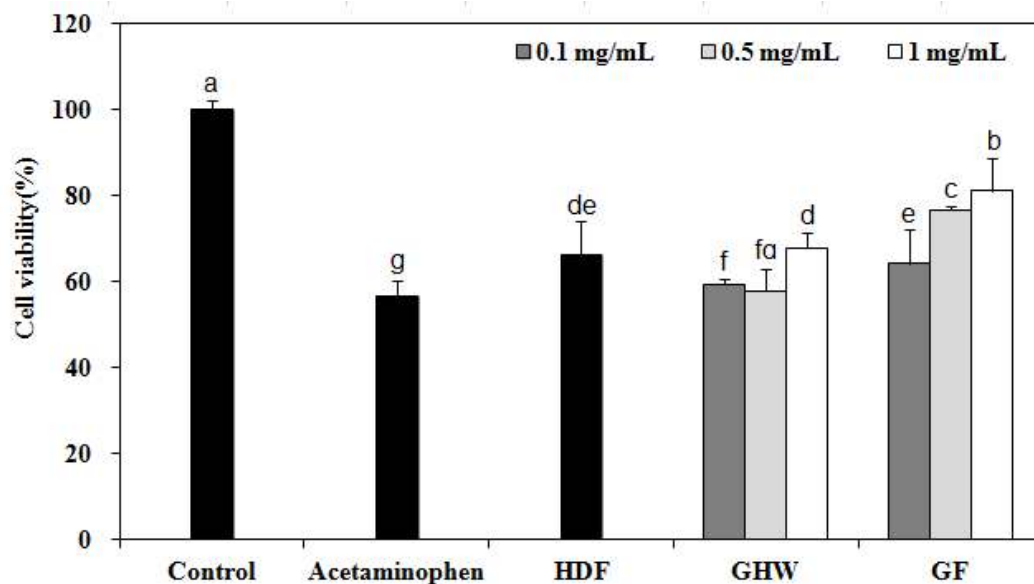


Fig. 6. Protective activity of non-fermented and fermented liquid garlic against cytotoxicity of acetaminophen in HepG2 cells.

Acetaminophen was treated 20 mM and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits, GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) ±S.D.

6) Tacrine 간독성 보호 활성

- Tacrine에 의해 53%까지 감소한 cell viability는 HDF 0.5 mg/mL 농도에서 61%까지 cell viability를 증가시키며 약 7%의 간 보호 활성을 나타냄
- 발효 전 마늘 추출액의 경우 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 60%, 66%, 70%의 cell viability를 보이며 약 7%, 13%, 17%의 간보호 활성을 나타냄
- 발효 후 마늘 추출액의 경우 상기 농도에서 각각 60%, 72%, 76%의 cell viability를 보임으로써 약 7%, 19%, 23%의 간 보호 활성을 나타내며 발효 전에 비해 발효 후 간 보호 활성이 증가되었음을 알 수 있었음(Fig. 18)

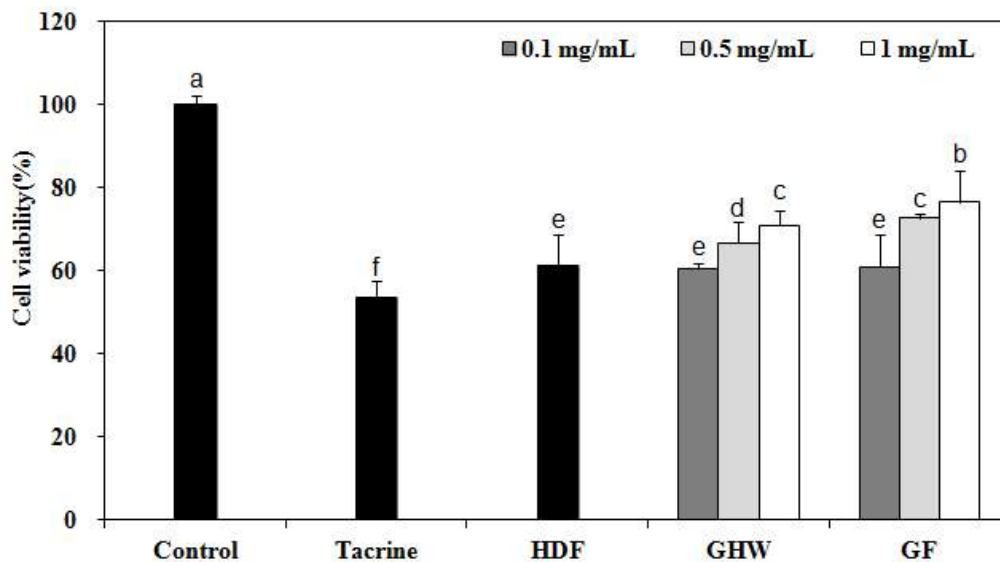


Fig. 7. Protective activity of non-fermented and fermented liquid garlic against cytotoxicity of tacrine in HepG2 cells.

Tacrine was treated 200 μ M and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of Hovenia dulcis fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

7) AAPH 간독성 보호 활성

- AAPH에 의해 cell viability는 60%까지 감소하였고, HDF 0.5 mg/mL 농도에서 70%까지 cell viability를 증가시켰으므로 약 10%의 간 세포 보호 활성을 나타내었음
- 한편 발효 전 마늘 추출액의 경우 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 57%, 63%, 68%의 cell viability를 보이며 약 0%, 3%, 8%의 미미한 간 보호 효능을 나타내었음
- 발효 후 마늘 추출액의 경우 상기 농도에서 각각 53%, 58%, 73%의 cell viability를 나타냄으로써 약 0%, 0%, 13%의 간 보호 활성을 나타냄으로써 발효 전에 비해 발효 후 간보호 활성이 증가함을 확인하였음(Fig. 19)

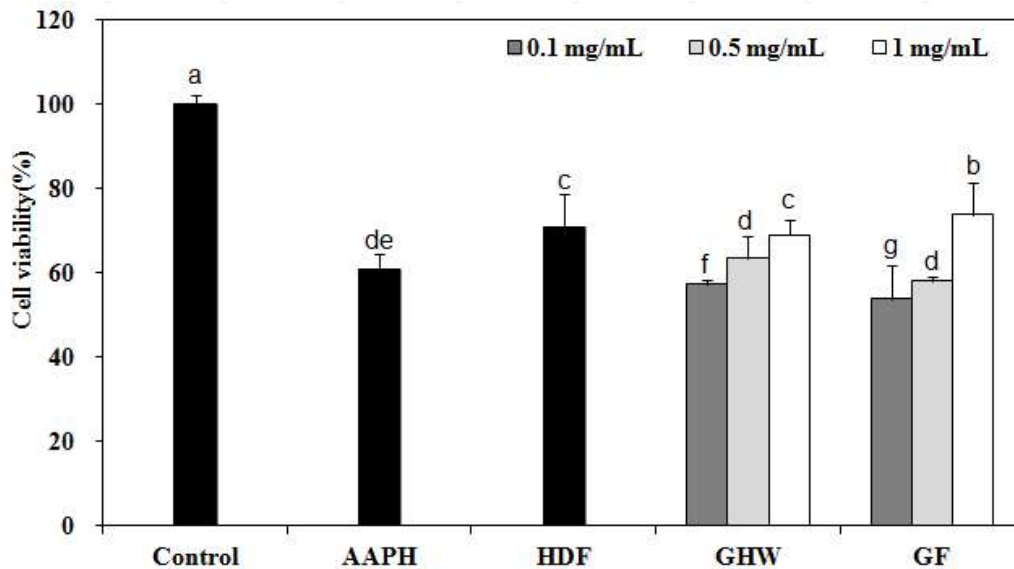


Fig. 8. Protective activity of non-fermented and fermented liquid garlic against cytotoxicity of tacrine in HepG2 cells.

AAPH was treated 10 mM and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) ±S.D.

8) Acetaldehyde 간독성 보호 활성

- Acetaldehyde는 cell viability를 53%로 감소시켰으며, HDF 0.5 mg/mL에서 cell viability를 78%, 즉 25%의 간 보호 활성을 나타냄
- 발효 전 마늘 추출액의 경우 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서 각각 60%, 68%, 74%의 cell viability를 보이며 약 7%, 15%, 20%의 간보호 활성을 나타내었고, 발효 후 마늘 추출액의 경우 상기 농도에서 각각 69%, 84%, 89%를 나타냄으로써 약 16%, 31%, 36%의 간 보호 활성을 보였음
- 발효 전에 비해 발효 후 간보호 활성이 크게 증가되었음을 알 수 있었고, 특히 발효 후 마늘 추출액은 동일한 농도의 HDF보다 약 11% 높은 간독성 보호활성을 나타내면서 acetaldehyde에 의한 숙취 개선용 기능성 소재로의 이용가능성을 시사하였음
- 발효 후 마늘 시료의 acetaldehyde 독성에 대한 간보호 활성이 가장 높게 나타남에 따라 이 assay계를 이용하여 유산균발효마늘농축액으로부터 간 보호 활성 성분의 분리, 정제 및 구조 분석하였음(Fig. 20)

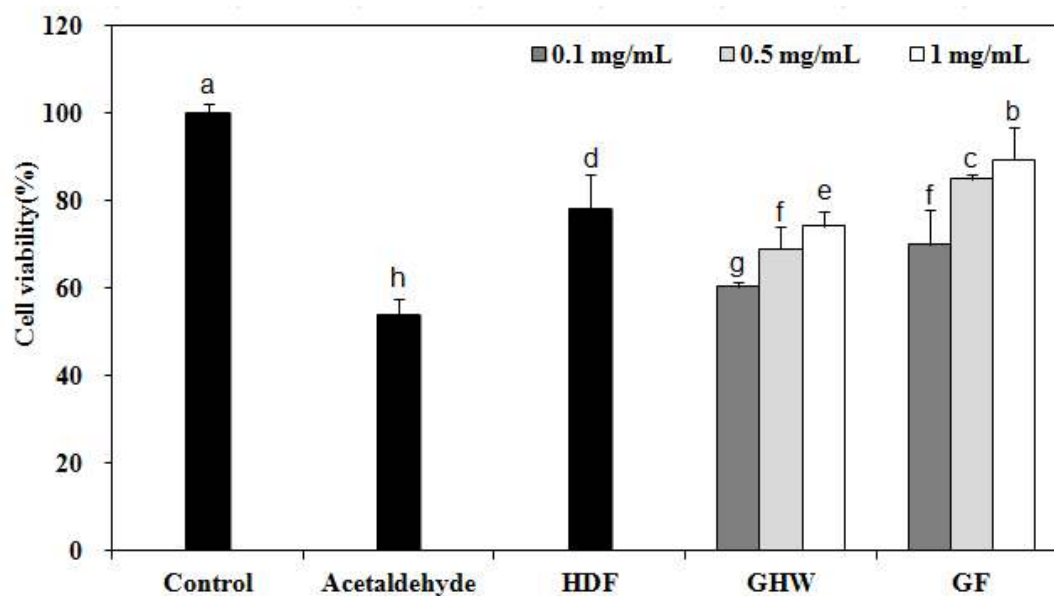


Fig. 9. Protective activity of non-fermented and fermented liquid garlic against cytotoxicity of acetaldehyde in HepG2 cells.

Acetaldehyde was treated 4 mM and HDF was treated 0.5 mg/mL. HDF: Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits. GHW: Non-fermented liquid garlic, GF: Fermented liquid garlic. Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

(3) RT-PCR에 의한 유산균발효마늘농축액의 간 기능 개선 활성 mechanism의 규명

유산균발효마늘 농축액의 비알코올성 지방간 개선 활성을 RT-PCR과 Western blot을 사용하여 그 작용 mechanism을 규명하고자 하였음

1) RT-PCR

- HepG2 cell을 6 x 10⁵ cells/well의 밀도로 6 well plate에 seeding한 후, 유산균발효마늘농축액을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 다음 배지 교체 후 0.3 mM의 oleic acid를 처리하고 24시간 배양하여 다음과 같이 RNA 추출 및 RT-PCR을 실시하였음
- 세포의 RNA를 추출하기 위해 배양세포를 PBS로 두 번 세척한 후, TRIzol과 클로로포름을 가하여 혼합하고 원심분리하였다. 상층액을 취하여 이소프로필알코올로 RNA를 침전시키고 원심분리 후 얻은 침전물을 75% DEPC-ethanol로 용해시키고 다시 원심분리한 다음 침전 RNA를 0.1% DEPC 증류수로 용해시켜 RNA를 회수하였음
- cDNA 합성하기 위해 동일량의 Oligo(dT)15 primer와 random hexamers, 추출한 RNA, RNase-free 증류수를 혼합한 후 가열 냉각한 다음 5X first-strand 완충액, dNTP mix, DTT 및 reverse transcriptase를 첨가하고 42°C에서 90분, 70도에서 15분간 반응시켜 합성하였다. 합성한 first-strand cDNA (DNA templet), Taq DNA polymerase, dNTP, 10XPCR buffer, forward primer, reverse primer을 PCR tube에 넣고 혼합하였음

Table 1. PCR condition depending on various primers

Pre-denaturation	95°C	5 min	40 cycle
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	50~65°C	30 sec	
Extension	72°C	30 min	
Last extension	72°C	7 min	
Storage	4°C	-	

- Table1 2와 같이 95°C에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95°C에서 30초간 denaturing과 50~65°C에서 30초간 annealing을 40 cycles 실시한 다음 최종적으로 72°C에서 30분간 extension하였음
- PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 2.5% agarose gel에서 100 V로 일정시간 전기영동한 후 자외선광으로 발현 정도를 확인하고, 밴드의 강도를 Gelpro 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다. 이 때 내부 표준물질로써 β -actin을 사용하였음

2) Western blotting

- 비알코올성 지방간 in vitro 모델 시스템에서 L-FABP, SREBP-1c, FAS, ACC, SCD-1, ATGL, HSL, MGL, PKA 등의 발현수준으로 해석하기 위해 다음과 같이 western blot을 실시하였음
- HepG2 cell을 6 x 10⁵ cells/well의 밀도로 6 well plate에 seeding한 후, 유산균 발효마늘농축액을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 다음 배지 교체 후 0.3 mM의 oleic acid를 처리하고 24시간 배양하여 단백질 추출 및 western blot을 실시하였음
- 조직을 파쇄한 후, lysis buffer를 첨가하여 얻은 cell lysate를 원심분리하고, protein이 포함된 상층액을 분리한 후 BCA assay를 통하여 단백질 함량을 측정하였음
- 회수한 단백질은 SDS-PAGE를 실시하여 단백질을 분자량에 따라 분리하고 membrane에 transfer하였고 transfer된 membrane에 5% bovine serum albumin solution으로 상온에서 1시간 blocking, 4°C에서 16시간 동안 1차 항체(Santacruz : 1:500, 기타 항체 : 1:1000, 3% BSA solution)를 결합시킨 후 세척하고 상온에서 다시 상온에서 1시간 동안 2차 항체(희석비율 1:3000, 5% BSA solution)를 반응시킨 다음 membrane을 세척 후 ECL solution을 사용하여 암실에서 developing, fixing을 통하여 현상을 실시하였음

3) L-FABP의 mRNA 및 protein 발현 수준에 미치는 영향

- 세포질에서 지방산과 결합한 후 미토콘드리아로 운반하여 지방산의 연소(β -oxidation)에 관여하는 인자인 liver fatty acid binding protein(L-FABP)의 발현 정도를 mRNA와 protein 수준에서 상기 방법에 따라 측정하였음
- 그 결과 oleic acid를 처리하지 않은 대조군에 비하여 oleic acid 처리군에서 약 L-FABP의 mRNA 발현량이 약 60%, 즉 대조군에 비해 40% 감소하였고, protein의 발현량이 약 70% 감소함을 확인하였으며, 이들의 발현량 감소로 인해 지방산의 연소가 방해되고 간 세포 내 지방축적을 유도한 것임을 확인하였음
- 유산균발효마늘농축액을 각각 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리한 경우, mRNA 발현량이 상기 농도에서 각각 약 60%, 70%, 82%로 농도의존적으로 발현량이 증가함을 확인하였고, protein 발현량에서도 같은 농도에서 각각 약 28%, 55%, 61% 증가하였음
- Oleic acid 처리에 의해 L-FABP의 mRNA와 protein 발현 수준이 감소하면서 지방축적으로 이어졌고, 유산균발효마늘처리에 의해 감소된 L-FABP의 mRNA와 protein의 발현 수준이 증가됨을 확인하였음(Fig. 21)

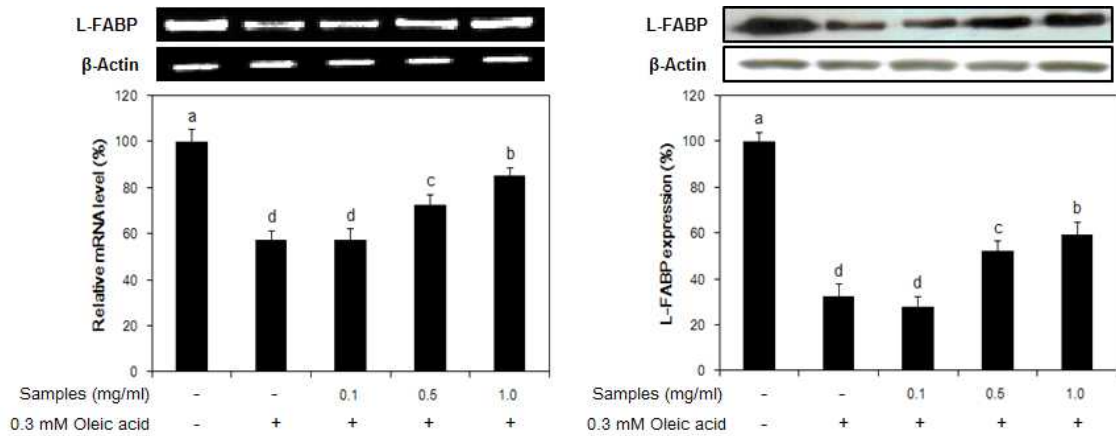


Fig. 10. Effect of fermented liquid garlic(GF) on the expression of L-FABP mRNA and protein in oleic acid-induced hepatic steatosis model system using HepG2 cells.

Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

4) SREBP-1c의 mRNA 및 protein 발현 수준에 미치는 영향

- Fatty acid synthase(FAS), Stearoyl Co-A desaturase-1(SCD-1), acetyl-Coa carboxylase(ACC) 등 lipogenesis에 관련된 유전자의 전사를 조절하는 상위유전자인 sterol regulatory element-binding proteic 1c의 정도를 mRNA와 protein 수준에서 상기 방법에 따라 측정하였음

- 그 결과 oleic acid를 처리하지 않은 대조군에 비하여 oleic acid 처리군에서 약 SREBP-1c의 mRNA 발현량이 약 99%, protein의 발현량이 약 109% 증가하였다. 이들의 발현량 증가는 FAS 등의 lipogenesis 관련 유전자 및 단백질의 발현, 활성화에 의한 지방축적을 야기하는 것으로 보고되어 있음

- 유산균발효마늘농축액을 각각 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리한 경우, mRNA 발현량이 상기 농도에서 각각 약 0%, 5%, 133%로 농도의존적으로 감소시킨 것을 확인하였고, protein 발현량에서도 같은 농도에서 각각 약 20%, 76%, 149%로 농도의존적으로 protein 발현량을 대조군보다도 낮은 수준으로 감소시켜 비알코올성 지방간 개선 효과가 탁월한 것을 확인하였음(Fig. 22)

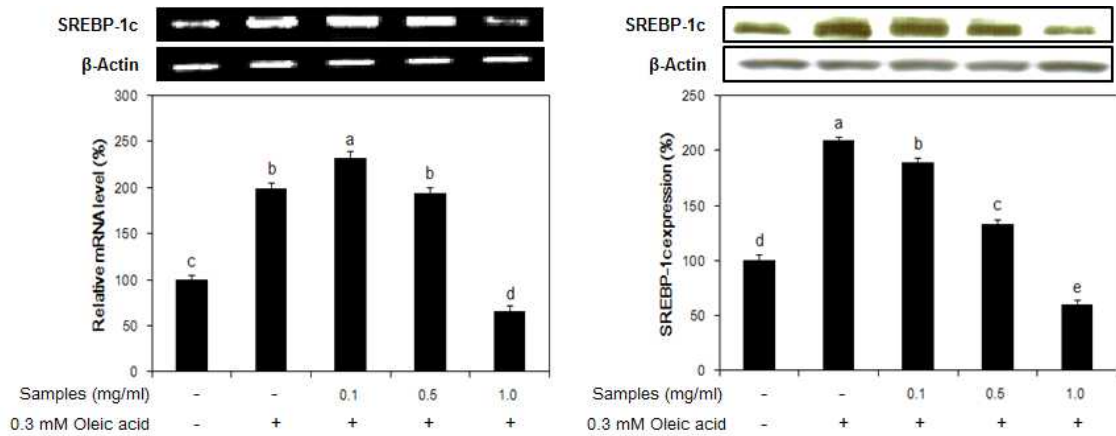


Fig. 11. Effect of fermented liquid garlic(GF) on the expression of SREBP-1c mRNA and protein in oleic acid-induced hepatic steatosis model system using HepG2 cells.

Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

5) Fatty acid synthase(FAS)의 mRNA 및 protein 발현 수준에 미치는 영향

- Acetyl-coenzyme A와 malonyl-coenzyme A로부터 long-chain fatty acid를 합성하는 FAS의 mRNA와 protein 발현 수준을 상기 방법에 따라 측정하였음
- 그 결과 oleic acid를 처리하지 않은 대조군에 비하여 oleic acid 처리군에서 약 FAS 발현량이 약 256%, protein의 발현량이 약 65% 증가하였음
- 유산균발효마늘농축액을 각각 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리한 경우, mRNA 발현량이 상기 농도에서 각각 약 0%, 0%, 302% 감소효과를 나타내었고, protein 발현량에서도 같은 농도에서 각각 약 44%, 65%, 69%로 농도의존적으로 protein 발현량을 대조군보다도 낮은 수준으로 감소시켜 FAS에 의한 지방산 합성 및 지방축적을 효과적으로 억제함으로써 비알코올성 지방간 개선 효과가 탁월한 것을 확인하였음(Fig. 23)

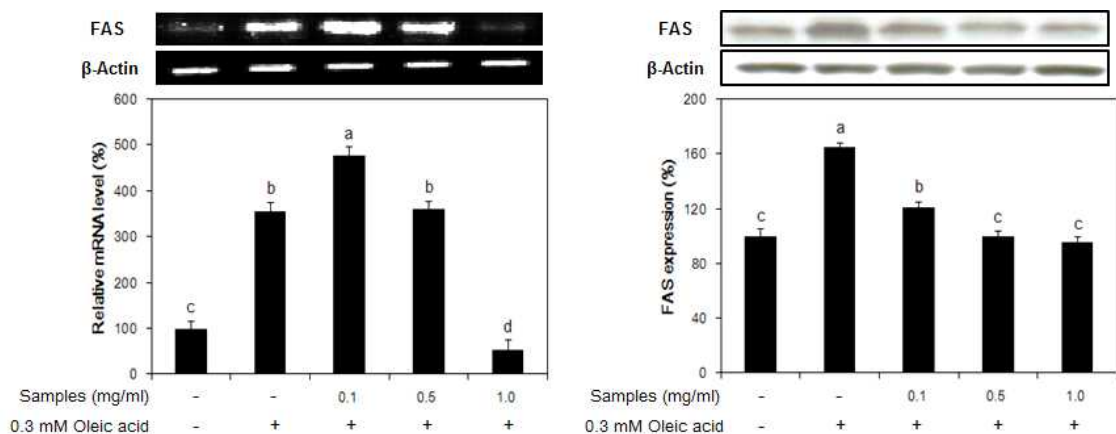


Fig. 12. Effect of fermented liquid garlic(GF) on the expression of FAS mRNA and protein in oleic acid-induced hepatic steatosis model system using HepG2 cells.

Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

6) Adipose triglyceride lipase(ATGL)의 mRNA 및 protein 발현 수준에 미치는 영향

- 지방세포(adipose) 내의 중성지방을 유리지방산으로 해리시켜 lipolysis에 관여하는 adipoase triglyceride lipase(ATGL)의 간 세포 내에서의 mRNA와 protein 발현 수준을 상기 방법에 따라 측정하였음
- 그 결과 oleic acid를 처리하지 않은 대조군에 비하여 oleic acid 처리군에서 약 ATGL 발현량이 대조군에 비해 85% 감소하였고, protein의 발현량이 약 65% 감소하였으며, ATGL의 mRNA 및 protein의 발현량 감소로 인해 lipolysis 작용이 저해되어 결과적으로 소모되는 지방보다 축적되는 지방이 많아 지방간이 유도된 것으로 생각할 수 있음
- 유산균발효마늘농축액을 각각 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리한 경우, mRNA 발현량이 상기 농도에서 각각 약 29%, 42%, 47% 증가시키는 효과를 나타내었고, protein 발현량에서도 같은 농도에서 각각 약 0%, 11%, 90% 발현량을 증가시키는 효과를 나타내었음
- 특히 유산균발효마늘농축액 1 mg/mL 처리는 대조군보다도 높은 수준의 protein 발현량을 증가시킴으로써 lipolysis 증대에 의한 지방을 분해하는 효과가 뛰어나며 이로 인한 비알코올성 지방간 개선 효과가 탁월한 것을 확인하였음(Fig. 24)

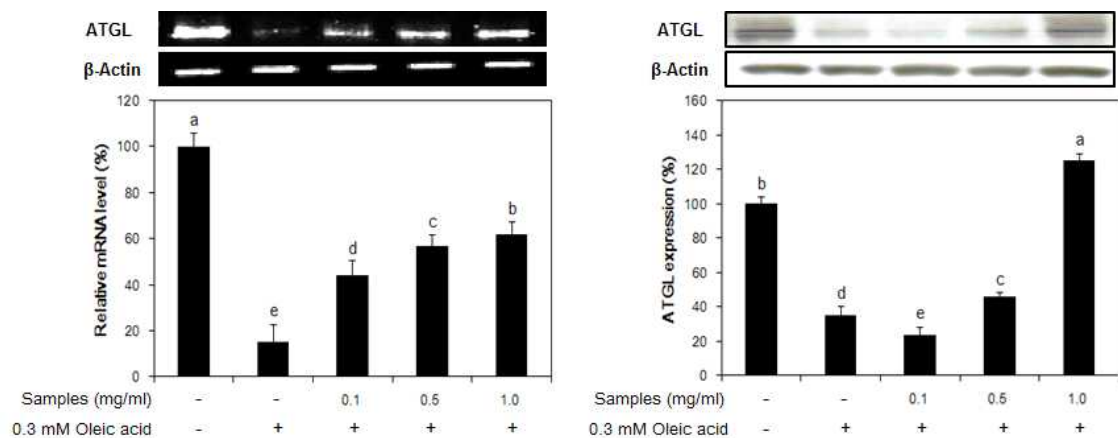


Fig. 13. Effect of fermented liquid garlic(GF) on the expression of ATGL mRNA and protein in oleic acid-induced hepatic steatosis model system using HepG2 cells.

Data represent the mean (n=3) ±S.D.

7) Hormonal sensitive lipase(HSL)의 mRNA 및 protein 발현 수준에 미치는 영향

- 중성지방을 유리지방산으로 분해하며, lipolysis에서 핵심적인 역할을 담당하는 lipase family 중 하나인 hormonal sensitive lipase(HSL)의 mRNA와 protein 발현 수준을 상기 방법에 따라 측정하였음
- 그 결과 oleic acid를 처리하지 않은 대조군에 비하여 oleic acid 처리군에서 약 HSL 발현량이 대조군에 비해 26% 감소하였고, protein의 발현량이 약 74% 감소하

였으며 HSL의 mRNA 및 protein의 발현량 감소로 인해 lipolysis 저하에 따른 지방 축적이 유도된 것임을 확인하였음

- 유산균발효마늘농축액을 각각 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리한 경우, mRNA 발현량이 상기 농도에서 각각 약 0%, 3%, 3%로 소폭 증가되었고, protein 발현량에서는 같은 농도에서 각각 약 7%, 17%, 43% 발현량을 증가시키는 효과를 나타내었음
- 유산균발효마늘농축액을 처리하였을 때, oleic acid 처리에 의해 크게 감소되었던 HSL protein의 발현량을 대폭 회복시킴으로써 lipolysis 증가에 의해 비알코올성 지방간 개선 활성이 뛰어난 것을 확인하였음(Fig. 25)

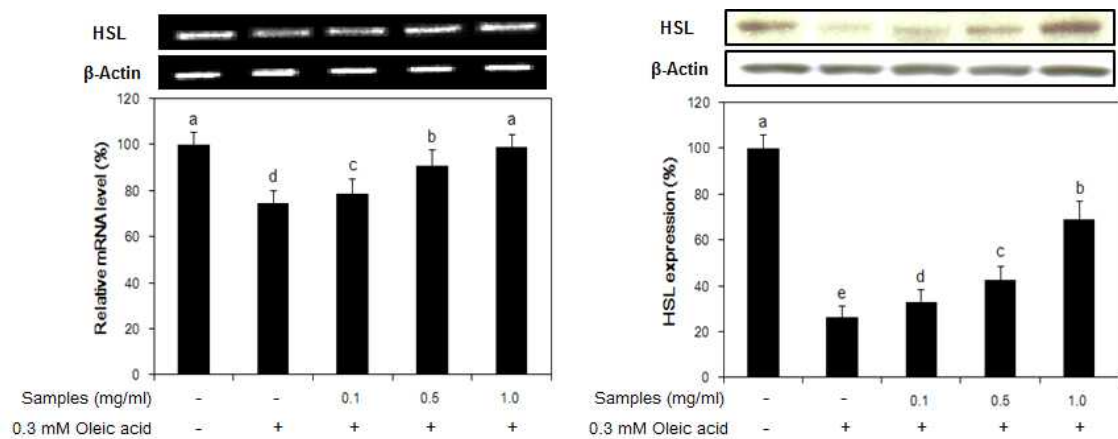


Fig. 14. Effect of fermented liquid garlic(GF) on the expression of HSL mRNA and protein in oleic acid-induced hepatic steatosis model system using HepG2 cells.

Data represent the mean (n=3) ±S.D.

- 상기에서와 같이 유산균발효마늘농축액은 lipolysis에 관련된 인자들(ATGL, HSL 등)의 발현 수준을 감소시키고, lipogenesis에 관련된 인자(SREBP-1c)의 발현 수준을 증가시킴으로써 간세포 내 지방축적을 억제함을 알 수 있었음
- 즉 유산균발효마늘농축액은 oleic acid에 의해 유도된 비알코올성 지방간 in vitro model system에서 감소된 lipolysis 및 lipogenesis 관련 인자들의 발현 수준을 효과적으로 증가, 감소시킬 뿐만 아니라 간세포의 미토콘드리아 내로 지방산의 도입 기능을 갖는 L-FABP를 up-regulation함으로써 비알코올성 지방간 예방 및 개선 효과를 나타내는 것으로 확인하였음

(4) 간기능 개선 활성 기능성 물질의 규명

- 유산균발효마늘농축액의 유기용매 분획 및 분획물의 간보호 활성 측정

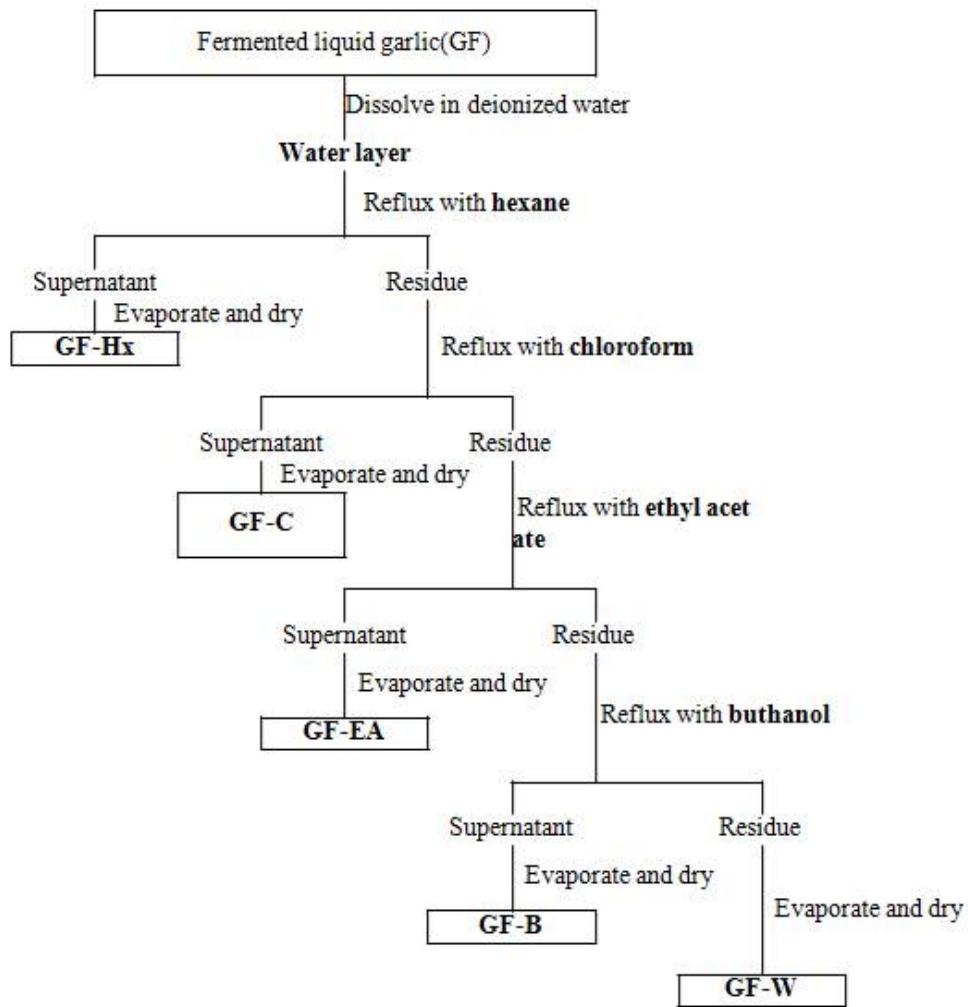


Fig. 15. Flow sheet for solvent partition from fermented liquid garlic.

- 동일농도에서 정제물질이 약 10배 높은 활성을 나타냄으로써 향후 물질의 공업적 대량생산계 개발여하에 따라 간기능 개선 활성용으로 실용화 가능성을 시사함.

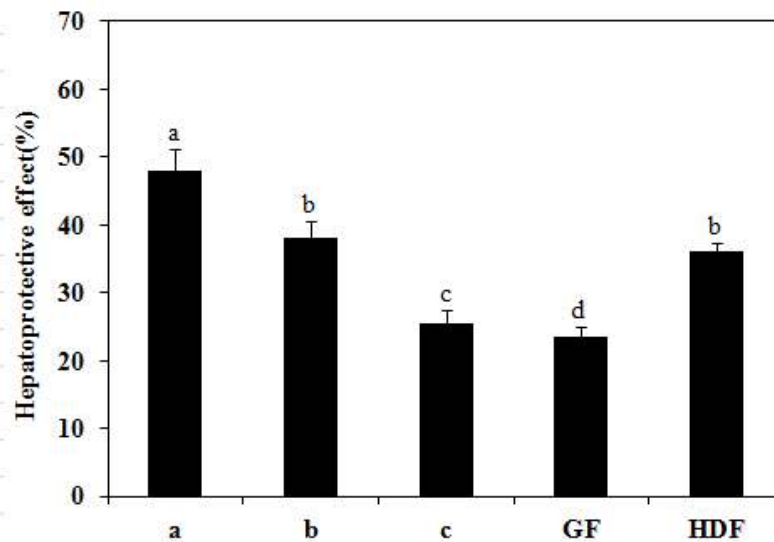
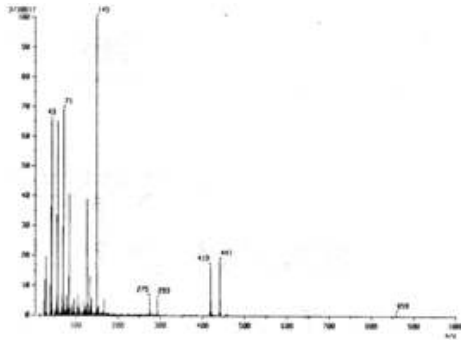


Fig. 16. Protective effect of hepatoprotective compound isolated from GF.

a : 0.1 mg/mL, b : 0.05 mg/mL, c : 0.01 mg/mL, GF : Hot water extract of fermented liquid garlic, HDF : Hot water extract of *Hovenia dulcis* fruits (0.5 mg/mL). Data represent the mean (n=3) ±S.D.

EI-MS와 FAB-MS spectrum은 $[H+H]^+$ 419 m/z와 $[H+Na]^+$ 441 m/z의 두 peak가 일치하였으며 EI-MS의 base peak(149 m/z)는 분자량 490 내외의 물질임을 나타내었음 또한, $FeCl_3$, bromocresol green 등에 의한 TLC 정색반응은 나타나지 않았으나 ninhydrin 정색반응을 나타냄으로써 아미노기 또는 질소를 함유한 amide 계 물질로 추정할 수 있었음.

(A)



(B)

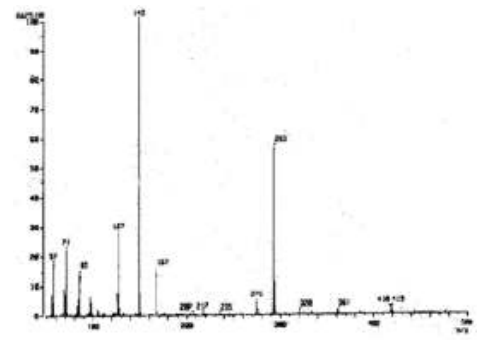


Fig. 17. EI-MS spectrum (A) and FAB-MS spectrum (B) of hepatoprotective compound isolated from GF. EI and FAB mass spectrometer (JMS-AX505WA, JEOL, Japan)

나. In vivo 유산균 발효 마늘 추출물의 간기능 개선 활성

I. 연구 목적

○ 유산균 발효 마늘 추출물(lactic acid bacteria fermented garlic extract, LAFGE)의 간 기능 개선 활성을 acetaminophen에 의한 간 손상 동물 모델에서 평가하고자 하였음

II. 연구 방법

(1) 실험동물

○ 실험에 사용된 동물은 5주령(150-200g) 수컷 wistar albino rat을 (주)오리엔트바이오(Sungnam, Korea)에서 구입하였고, 고려대학교 동물사육실의 항온항습장치를 이용하여 온도 $22\pm 3^\circ C$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조도 200-300 Lux, 12시간 간격의 명암 주기 환경에서 1주일간 순화시킨 후 시험에 사용하였음. 순화기간 동안 식이와 정수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 순화기간 후 난피법에 의해 각 그룹당 8마리씩 분류하였음

○ 실험군은 Table 1에 나타난 바와 같이 대조군(control), acetaminophen 단독투여군(AAP), acetaminophen과 silymarin 100 mg/kg 투여군(AAP+SM), acetaminophen과 유

산균 발효마늘 농축액 각각 250 mg/kg 투여군(AAP+LAFGE250)과 500 mg/kg 투여군(AAP+LAFGE500)의 총 8그룹으로 분류하였음

○ 각 시료는 하루 한번씩 7일간 경구투여하고, 마지막 투여 후 2시간 뒤에 acetaminophen을 2 g/kg 경구투여하였음. 24시간 후 ethyl ether로 마취한 다음 희생하여 간조직을 회수하고 무게를 측정하였음. LAFGE는 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)에 용해시켜 사용하였고, control군과 AAP군은 LAFGE 대신 동량의 PBS를 경구투여하였음

Table 1. Dose and the figuration of the test group.

Group	Diet	Test sample	Dose	Test sample treatment	Acetaminophen treatment	Rats
Control	AIN-93G	PBS	-	Once a day	-	8 rats
AAP	AIN-93G	PBS	-	Once a day	2 g/kg	8 rats
AAP+ SM	AIN-93G	Silymarin	100 mg/kg	Once a day	2 g/kg	8 rats
AAP+ LAFGE250	AIN-93G	LAFGE	250 mg/kg	Once a day	2 g/kg	8 rats
AAP+ LAFGE500	AIN-93G	LAFGE	500 mg/kg	Once a day	2 g/kg	8 rats

(2) 혈청 분석

○ 복부대동맥으로부터 채혈된 혈액은 3,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리한 후 혈청을 회수한 다음, 자동혈청분석기(Cobas c111, Roche, Germany)를 이용하여 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), alkaline phosphatase(ALP) 등을 측정하였음

(3) 조직 염색

○ Acetaminophen에 의한 간 손상 여부를 조직학적으로 분석하기 위해 실험종료 후 회수된 간조직을 액체질소로 급속동결 시킨 후 동결절편기를 이용하여 5 μm 두께로 절편한 다음 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학-형광현미경으로 관찰하였음

(4) Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) assay

○ 간 조직의 지질과산화물 함량을 측정하게 위해 간 100 mg에 차가운 1.15% KCl 용액 1 mL을 첨가하여 균질화한 후 4℃, 7,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 TBARS assay에 사용하였음

○ 상등액 200 μL, 1% phosphoric acid 400 μL, 0.6% thiobarbituric acid(TBA) 용액 400 μL를 혼합한 후 95℃ waterbath에서 25분간 반응시킨 다음 얼음에서 5분간 냉각시켰음. Butanol 500 μL를 첨가하여 10초간 vortexing하고, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻

은 상등액은 540 nm에서 흡광도를 측정하였음

○ 상기와 동일한 방법으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 MDA 표준 검량선을 작성한 후 시료의 흡광도 값으로부터 MDA 함량을 산출하였음

(5) 글루타치온(glutathione, GSH) 함량 분석

○ 간 0.1 g에 50 mM N-ethylmaleimide(NEM) 용액 1 mL를 첨가하고 마쇄한 후 원심분리하여 얻은 상등액 0.2 mL과 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 0.7 mL, 100 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 0.1 mL를 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였음. GSH 표준물질을 농도별로 측정하여 얻은 검량곡선으로부터 조직의 GSH 함량을 산출하였음

(6) 항산화 효소 활성 평가

○ 간 조직 100 mg에 PBS 1 mL을 첨가하여 마쇄한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 항산화 효소 활성 측정에 이용하였고, 단백질량은 bradford법으로 정량하였음

○ SOD(superoxide dismutase) 활성은 1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 50 mU xanthine oxidase 20 μ L, 6 mM hypoxanthine 10 μ L, 10 mM EDTA 5 μ L, 5 mM WST 10 μ L, DW 125 μ L, 간 조직 균질액 20 μ L를 혼합한 후 25°C에서 30분 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였음. 간 조직 균질액의 상등액을 단계적으로 희석하여 SOD inhibition rate curve를 작성한 후 SOD activity를 50% 저해하는데 필요한 sample의 양을 산출하여 SOD unit으로 환산하였고, SOD 1 unit은 superoxide anion에 의한 WST-1의 환원을 50% 저해하는데 필요한 SOD의 양으로 정의하였음

○ GST(glutathione S-transferase) 활성은 1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 50 μ L, 1 mM GSH 100 μ L, 1 mM CDNB 100 μ L, 간 조직 균질액 50 μ L, DW 700 μ L를 혼합한 후 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였음. 일정 시간 동안 분당 변화량(Δ 340)을 측정한 후 340nm에서의 GS-DNB 분자흡광계수(molecular extinction coefficient) 0.0096 μ M⁻¹cm⁻¹을 적용하여 분당 GS-DNB 생성량을 환산하였고, GST 1 unit은 1분 동안 1 μ M의 GS-DNB를 생성시키는 효소의 양으로 정의하였음

○ GR(glutathione reductase) 활성은 1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 10 μ L, 10 mM EDTA 10 μ L, 10 mM GSSG 20 μ L, 1 mM NADPH 20 μ L, 5 mM DTNB 10 μ L, 간 조직 균질액 20 μ L, DW 100 μ L를 혼합한 후 415 nm에서 흡광도 변화를 측정하였음. Glutathione reductase 1 unit은 1분 동안 1 μ M의 DTNB를 생성하는 효소의 양으로 정의하였음

○ 1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 50 μ L, 1.5% H₂O₂ 50 μ L, 간 조직 균질액

50 μ L, DW 850 μ L를 혼합한 후 240 nm에서 흡광도 변화를 측정하였음. 일정 시간 동안 흡광도 변화량으로부터 H₂O₂의 molecular extinction coefficient(43.6 cm²/mole)를 적용하여 소거된 양을 산출하고, 1분 동안 1 μ M의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였음

(7) RT-PCR에 의한 유전자 발현 수준 분석

○ Easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(iNtRoN Biotechnology Inc., Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 total RNA를 추출하고, NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)를 이용하여 RNA 함량을 측정하였음

○ RNA 2 μ g으로부터 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, Table 1에 나타낸 primer를 사용하여 합성된 cDNA를 증폭한 후, 증폭된 cDNA는 1.8% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 다음, 타겟 mRNA의 발현 정도를 Image J Software (NIH, MA, USA)를 사용하여 수치화하였음

Table 2. PCR primers for RT-PCR

Gene	F and R	Nucleotide sequences(5'→3')	Length of PCR products
CYP2E1	F	GACAGACTGGATATGCCCTA	401 bp
	R	ACTGTGACAGGACTGAGGTC	
Caspase-3	F	AAGACTATCCATGGAAGCAA	294 bp
	R	ACACACAAAACCTGCTCCTTT	
Bax	F	AGAAGCTGAGCGAGTGTCT	402 bp
	R	TCTTCTTCCAGATGGTGAGT	
Bcl-2	F	ACTTTGCAGAGATGTCCAGT	217 bp
	R	CGGTTTCAGGTACTIONCAGTCAT	
β -actin	F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	404 bp
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	

III. 연구 결과

(1) 간 무게 변화

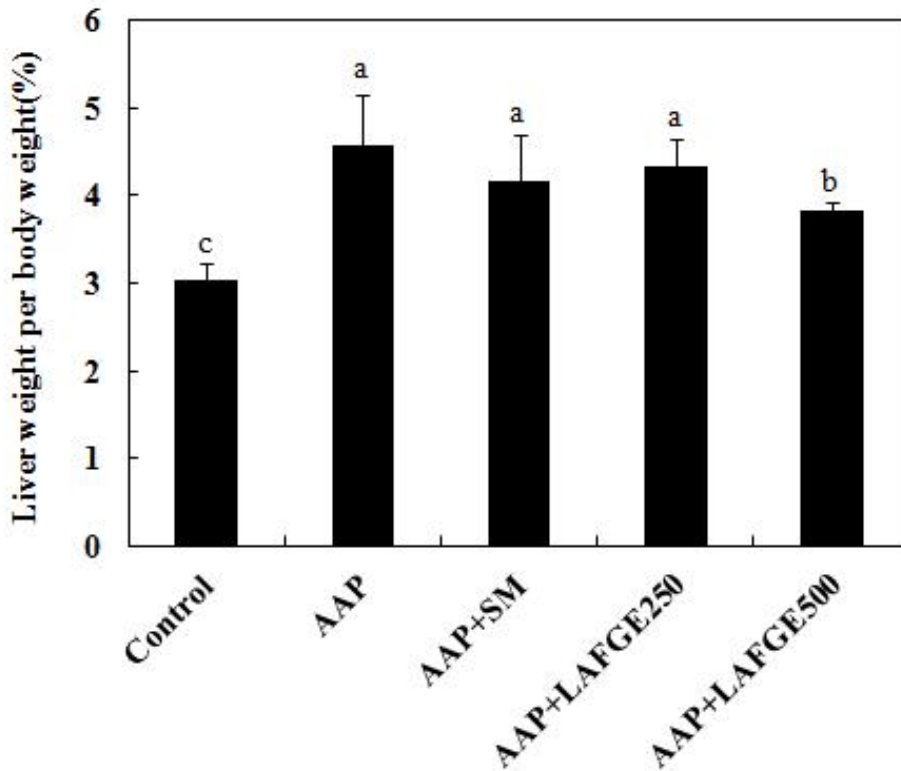


Fig. 18. Effects of LAFGE on liver weight ratio in acetaminophen-intoxicated rat livers. Data expressed \pm S.D. Different letters above the error bar indicate statistically significant difference at $p < 0.05$.

○ Acetaminophen에 의해 간 손상 유발시, 체중당 간 무게 비율 변화에 미치는 LAFGE의 영향을 평가하였음(Fig. 1)

○ 그 결과, acetaminophen을 투여하지 않은 대조군은 체중당 간 무게 비율이 약 3%였고, acetaminophen 단독투여그룹인 AAP군은 약 4.6%로 대조군에 비해 1.3% 증가하였음

○ 양성대조군으로써 silymarin 100 mg/kg 투여군(AAP+SM)은 약 4.2%로 AAP군에 비해 약 0.4% 감소된 수치를 나타내었으나 AAP군과는 통계적으로 유의적 차이를 보이지 않았음

○ LAFGE 250 mg/kg 투여군(AAP+LAFGE250)과 500 mg/kg 투여군(AAP+LAFGE500)은 각각 4.3%와 3.8% 비율을 나타내었고, AAP군과 비교하여 각각 0.3%, 0.8% 감소된 수치를 나타내었으며, AAP+LAFGE250 군은 AAP군과 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않는데 반해 AAP+LAFGE500 군은 AAP군과 통계적으로 유의적인 차이를 나타내었음

(2) 조직 염색

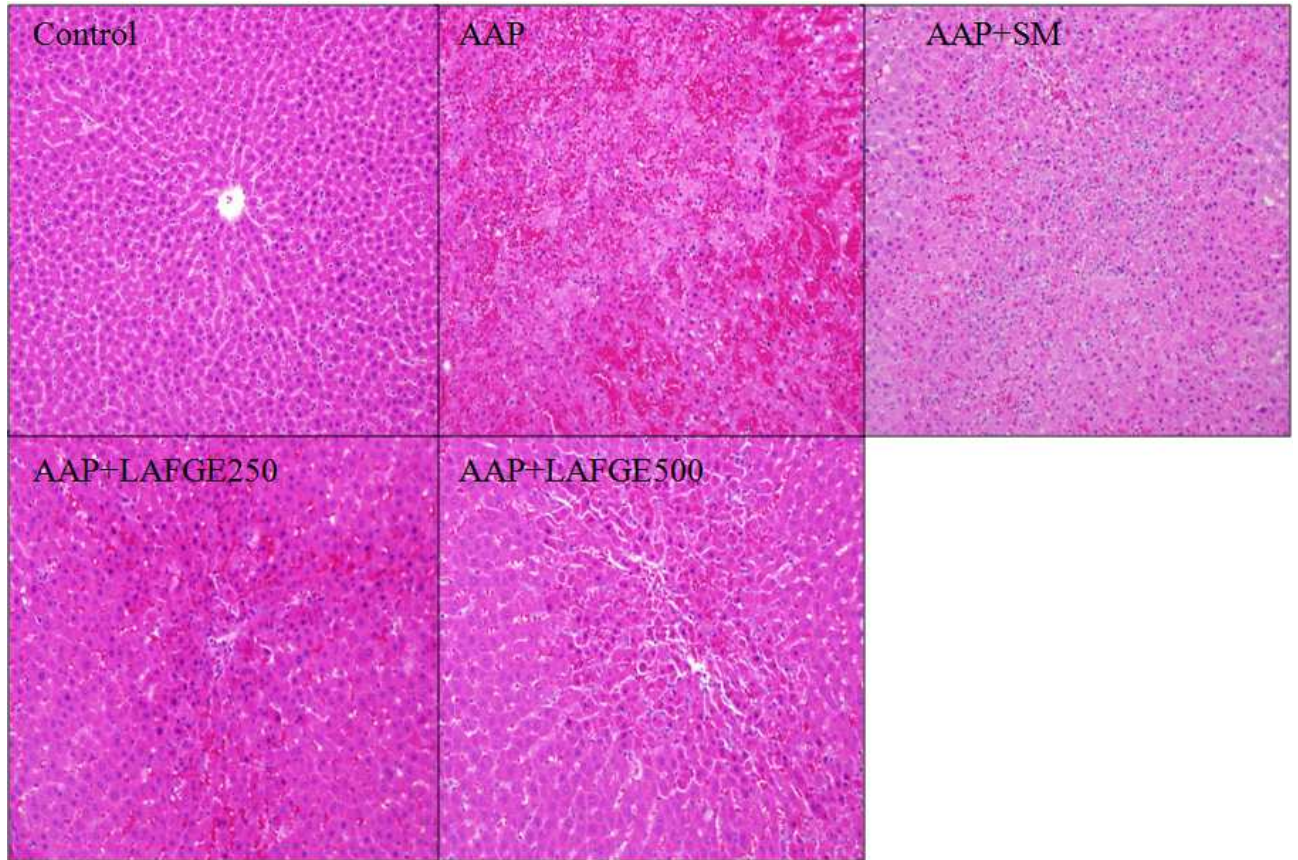


Fig. 19. Histological analysis of acetaminophen-intoxicated rat livers(x200).

- LAFGE가 acetaminophen에 의한 간 손상에 미치는 영향을 조직학적으로 검토하기 위해 H&E 염색을 실시하였음(Fig. 2)
- Acetaminophen 처리시, 대조군과 비교하여 세포와 세포 사이의 경계가 뚜렷하지 않고 핵과 세포질의 구조가 붕괴되는 괴사(necrosis)와 울혈(congestion) 증상이 관찰되었음
- 양성대조군인 AAP+SM 군은 울혈과 괴사 증상이 AAP군에 비해 크게 개선되었음을 확인할 수 있고, AAP+LAFGE250군과 AAP+LAFGE500군에서 AAP군에 비해 괴사와 울혈 증상이 크게 개선된 것을 확인하였음

(3) 혈청분석

Table 3. Serum levels of ALP, AST and ALT in acetaminophen-intoxicated rats.

Group	ALP(IU/L)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)
Control	495.72 ± 90.92 ^{c 1)}	86.72 ± 8.46 ^d	32.85 ± 4.53 ^d
AAP	782.18 ± 73.02 ^a	18644.50 ± 3417.45 ^a	3627.00 ± 186.68 ^a
AAP+ SM	632.50 ± 97.62 ^b	15190.00 ± 1467.95 ^b	3235.00 ± 181.02 ^b
AAP+ LAFGE250	647.44 ± 123.11 ^b	16586.00 ± 2838.01 ^{ab}	3185.00 ± 541.64 ^b
AAP+ LAFGE500	521.00 ± 128.39 ^c	5194.00 ± 1408.46 ^c	324.00 ± 124.86 ^c

Data expressed ± S.D.

1) Different superscripts indicate statistically significant difference at $p < 0.05$.

○ Acetaminophen으로 간 독성 유발시, LAFGE가 혈액 중 간 손상 지표 효소들에 미치는 영향을 평가하기 위해 혈액 중의 ALP, AST, ALT 활성을 측정하였음(Table 3)

○ 대조군의 ALP 활성은 약 496 IU/L로 나타났고, acetaminophen 투여에 의해 약 782 IU/L로 증가되었으며 AAP+SM군은 약 633 IU/L의 ALP 활성을 나타내며 AAP군에 비해 유의적으로 감소되었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 647, 521 IU/L의 유의적으로 감소된 활성을 나타내었음

○ 대조군의 AST 활성은 약 87 IU/L, AAP군은 약 18645 IU/L로 대폭 증가하였고, AAP+SM군은 15190 IU/L로 감소되었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 16586 IU/L, 5194 IU/L로 고농도 투여군에서 유의적인 감소 효과를 나타내었음

○ 대조군의 ALT 활성은 약 33 IU/L, AAP군은 약 3627 IU/L로 크게 증가하였고, AAP+SM군은 3235 IU/L로 소폭 감소되었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 3185, 324 IU/L로 특히 고농도 투여군에서 큰 폭으로 감소되었음

(4) 지질과산화

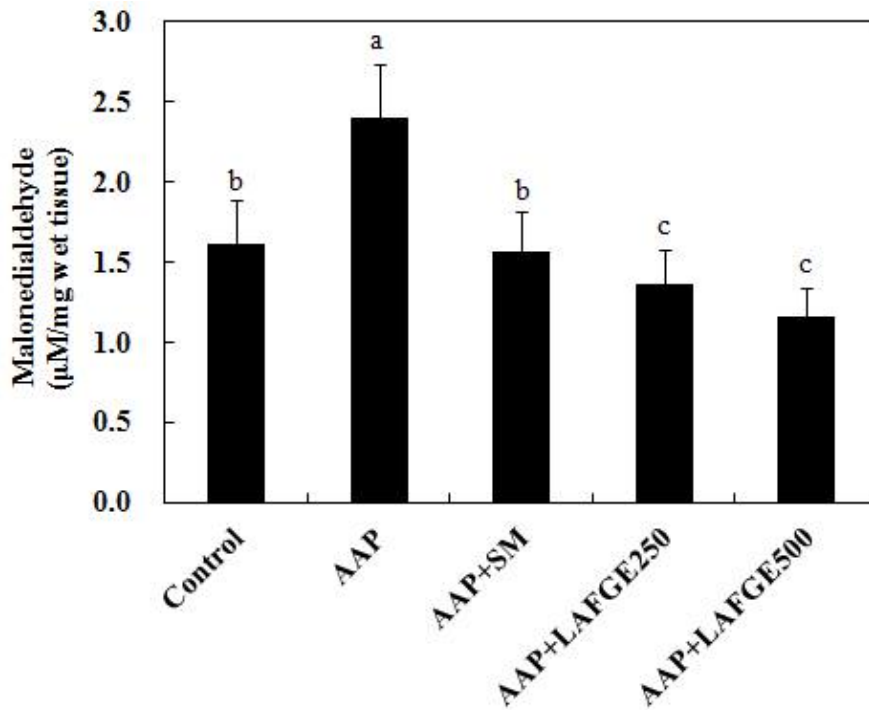


Fig. 20. Effects of LAFGE on malondialdehyde(MDA) levels of acetaminophen-intoxicated rat livers. Data expressed \pm S.D. Different letters above the error bar indicate statistically significant difference at $p < 0.05$.

○ LAFGE가 acetaminophen에 의한 간 손상에 대해 간 조직 내 지질과산화물 생성량에 대해 미치는 영향을 검토하기 위해 지질과산화물의 한 종류인 MDA 함량을 비교하였음 (Fig. 3)

○ 대조군의 MDA 함량은 조직 1 mg 당 약 1.6 μ M의 MDA 함량을 나타내었고, acetaminophen 투여에 의해 약 2.4 μ M로 증가되었으며, 양성대조군인 AAP+SM군은 약 1.6 μ M로 대조군과 유사한 수준으로 감소되었음

○ LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 1.4, 1.2 μ M의 MDA 함량을 나타내었고, 두 농도간의 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 정상군보다 더 낮은 지질과산화물 함량을 나타내었음

(5) 글루타치온 함량

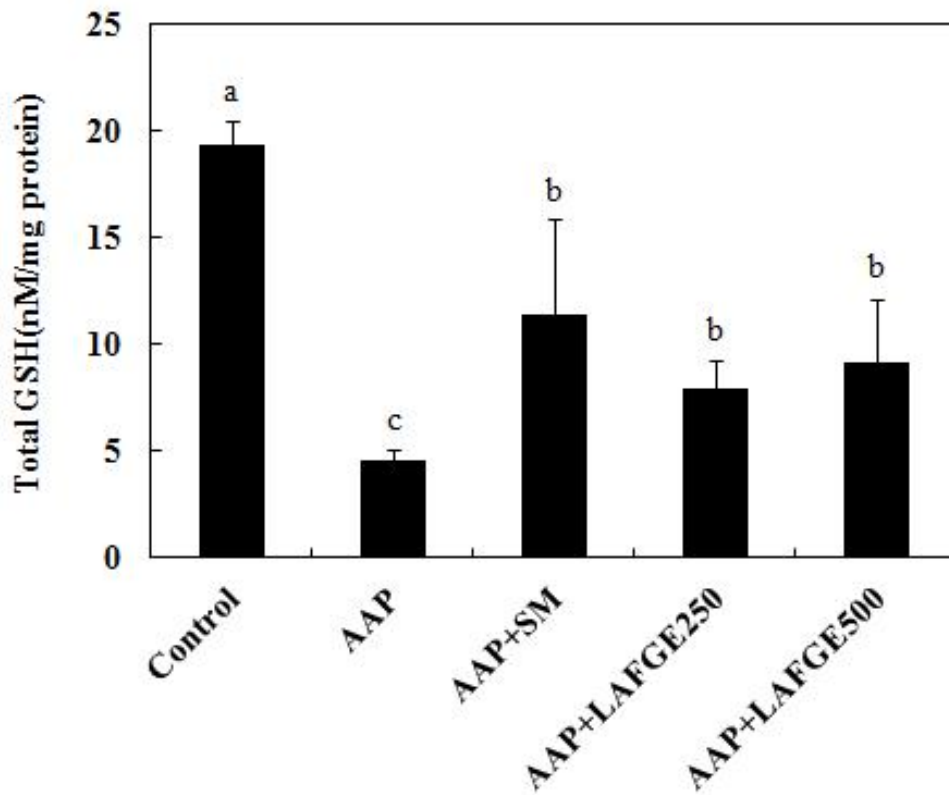


Fig. 21. Effects of LAFGE on glutathione(GSH) levels in acetaminophen-intoxicated rat livers. Data expressed \pm S.D. Different letters above the error bar indicate statistically significant difference at $p < 0.05$.

○ LAFGE가 acetaminophen에 의한 간 손상에 대해 간 조직 내의 글루타치온 함량에 미치는 영향을 확인하고자 하였음(Fig. 4)

○ 대조군의 경우 1 mg protein 당 약 19.3 nM의 GSH 함량을 나타내었고, AAP군에서 약 4.6 nm로 대폭 감소하였으며, AAP+SM군에서 약 11.4 nm로 GSH 함량이 크게 회복되었음

○ LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 8.0, 9.1 nm로 AAP군에 비해 농도의존적으로 GSH 함량을 증가시켰지만, 두 농도 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았음

(6) 항산화 효소 활성

Table 4. Effects of LAFGE on Antioxidant enzymes activities in acetaminophen-intoxicated rat livers.

Group	CAT (U/mg protein)	GR (U/mg protein)	GST (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)
Control	11.14 ± 0.95 ^{a 1)}	27.18 ± 2.19 ^b	3.03 ± 0.31 ^b	81.27 ± 6.18 ^b
AAP	9.27 ± 0.66 ^d	18.84 ± 1.95 ^c	2.32 ± 0.16 ^c	65.01 ± 3.43 ^c
AAP+ SM	13.06 ± 2.17 ^b	26.04 ± 4.45 ^b	2.83 ± 0.34 ^b	95.45 ± 2.15 ^a
AAP+ LAFGE250	14.61 ± 1.83 ^a	25.95 ± 3.69 ^b	3.03 ± 0.08 ^b	86.68 ± 2.48 ^b
AAP+ LAFGE500	14.87 ± 1.63 ^a	34.14 ± 3.13 ^a	3.81 ± 0.36 ^a	96.03 ± 9.83 ^a

Data expressed ± S.D.

1) Different superscripts indicate statistically significant difference at $p < 0.05$.

○ Acetaminophen에 의해 유도된 간 손상 모델에서 LAFGE가 간 내 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 catalase(CAT), glutathione reductase(GR), glutathione S-transferase(GST), superoxide dismutase(SOD) 등의 항산화 효소 활성을 측정하였음 (Table 4)

○ CAT는 대조군의 경우 1 mg protein 당 약 11 U의 활성을 나타내었고, AAP군은 약 9 U, AAP+SM군은 약 13 U의 활성을 나타내며 대조군보다 높은 활성을 나타내었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 15, 15 U으로 농도의존적 차이는 나타나지 않았으며, 대조군과 통계적으로 유사한 수준을 나타내었음

○ GR은 대조군의 경우 1 mg protein 당 약 27 U의 활성을 나타내었고, AAP군은 약 19 U, AAP+SM군은 약 26 U의 활성을 나타내며 대조군과 유사한 활성을 나타내었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 26, 34 U으로 활성이 증가되었고, 특히 고농도 투여군은 대조군보다 높은 활성을 나타내었음

○ GST는 대조군의 경우 1 mg protein 당 약 3 U의 활성을 나타내었고, AAP군은 약 2.3 U의 활성을, AAP+SM군은 약 2.8 U의 활성을 나타내며 대조군과 통계적으로 유사한 수준을 나타내었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 3.0, 3.8 U의 활성을 나타내며 저농도에서는 대조군과 유사한 수준을, 고농도 투여군에서는 대조군보다 높은 활성을 나타내었음

○ SOD는 대조군의 경우 1 mg protein 당 약 81 U의 활성을 나타내었고, AAP군은 약 65 U의 활성을, AAP+SM군은 약 95.5 U의 활성을 나타내었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 87, 96 U으로 대조군 이상의 활성을 나타내었음

(7) RT-PCR에 의한 유전자 분석

○ LAFGE의 acetaminophen-유도 간 손상에 대한 보호 활성 매커니즘을 유전자 수준에서

해석하기 위해 CYP2E1, caspase-3, Bax, Bcl-2 등의 mRNA에 대한 RT-PCR을 수행하였음(Fig. 5)

○ Acetaminophen의 대사에 관여하며 대사 과정 중 활성산소와 친핵성 분자인 NAPQI를 부산물로 생성하는 CYP2E1에 대한 유전자 분석 결과, AAP군은 대조군에 비해 약 2.4배 mRNA 발현량을 나타내었고, AAP+SM군은 약 1.5배 발현량을 나타내면서 CYP2E1의 mRNA 발현수준을 감소시켰음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 1.7, 1.3배로 감소되었으며 두 농도간의 통계적 차이는 없지만, AAP군에 대해 CYP2E1의 mRNA 발현을 효과적으로 억제하였음

○ Apoptosis의 마지막 단계에서 직접적으로 세포 구성 성분들의 분해에 관여하는 caspase-3의 mRNA 발현량을 분석한 결과, AAP군은 대조군에 비해 caspase-3 mRNA가 약 34배 증가되었으며 AAP+SM군은 약 6.5배로 mRNA 발현 수준을 크게 감소시켰음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 14배, 0.8배로 mRNA 발현량을 대폭 감소시켰음

○ Apoptosis의 시작 단계에서, 미토콘드리아로부터 signal cascade 반응을 촉매하는 cytochrome c의 방출을 돕는 Bax에 대한 mRNA 발현량을 분석한 결과, 대조군에 비해 AAP군은 약 19배 증가되었으며, AAP+SM군은 대조군 대비 약 9배의 mRNA 발현량을 나타내었음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 약 14배, 11배의 mRNA 발현량을 보이면서 LAFGE는 Bax에 대해 유의적인 감소효과를 나타내었음

○ Apoptosis의 시작 단계에서 Bax의 작용을 억제하여 anti-apoptotic protein의 역할을 하는 Bcl-2의 mRNA 발현량을 분석한 결과, AAP군은 대조군에 비해 약 0.4배로 감소된 것으로 나타났으며 AAP+SM군은 약 0.7배로 감소된 Bcl-2의 mRNA 발현량을 다시 증가시켰음. LAFGE 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 0.3배, 0.5배의 mRNA 발현량을 보이면서 고농도 투여군에서 유의적으로 mRNA 발현량을 증가시켰음

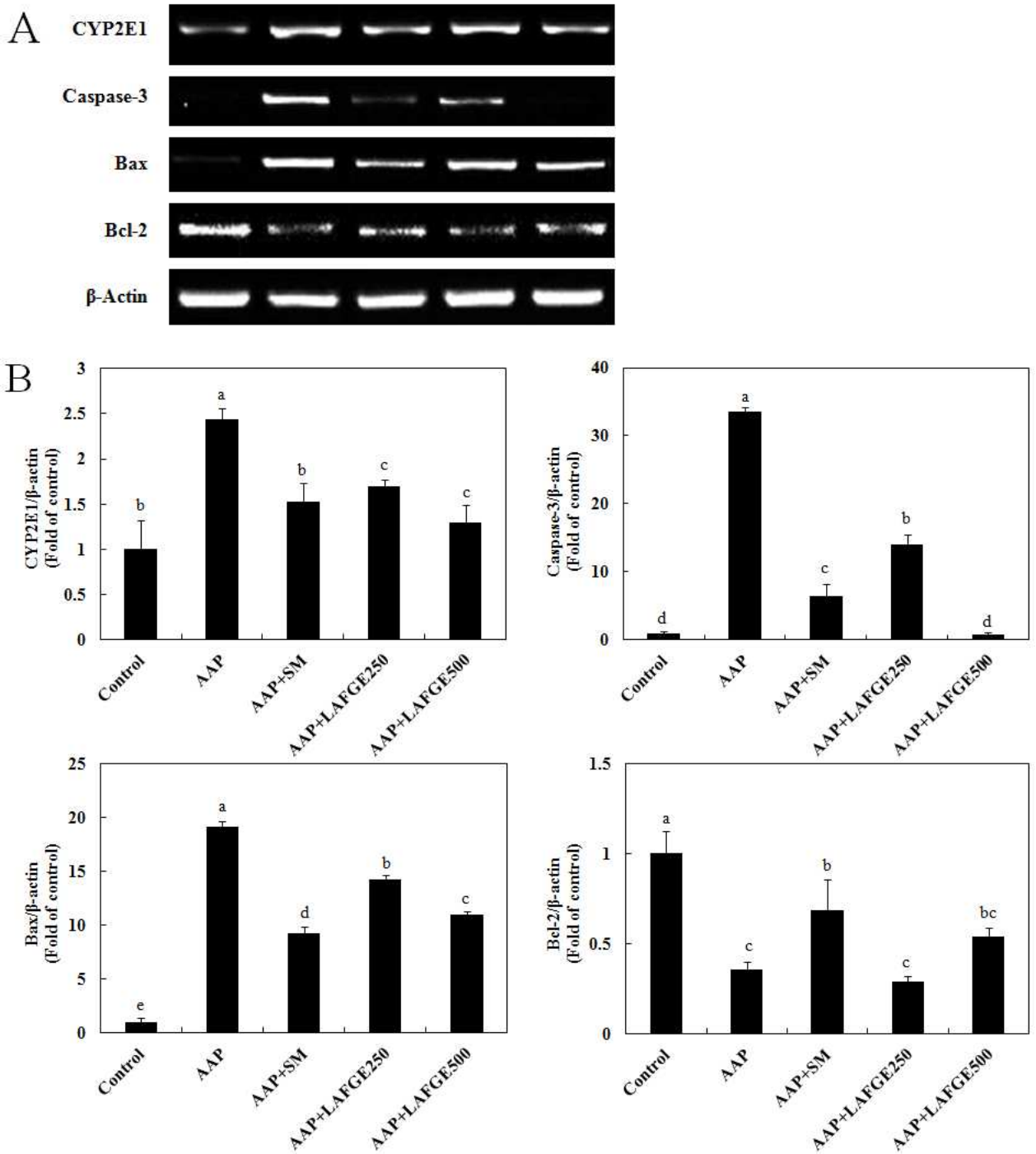


Fig. 22. Effects of LAFGE on mRNA expression of CYP2E1, caspase-3, Bax, and Bcl-2 in acetaminophen-intoxicated rat liver.

Data expressed \pm S.D. Different letters above the error bar indicate statistically significant difference at $p < 0.05$.

IV. 요약

○ LAFGE는 ALP, AST, ALT 등 acetaminophen에 의해 증가된 간 손상 지표 효소들의

혈중 수치를 감소시켰음

- Acetaminophen에 의한 피사와 울혈 증상을 개선시켰음
- 간 내 지질과산화물 생성을 억제하고, 글루타치온 함량을 증가시켰음
- CAT, SOD, GR, GST 등의 간 내 항산화 효소 활성을 증가시켰음
- CYP2E1과 caspase-3, Bax 등 apoptotic protein들의 mRNA 발현을 억제하고 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 mRNA 발현을 촉진시켜 apoptosis를 억제함으로써 acetaminophen 유도 간 손상 모델에 대한 간 보호 효능을 나타내었음

제 3 절 시제품 제작 및 안정성 시험

1. 시제품 제작

가. 제품명 : 유산균발효마늘추출물

나. 제품의 특성

- 제품유형 : 건강기능식품 원료
- 성 상 : 고유의 특이취가 있는 갈색의 농축액
- 사용원료 : 마늘 (*Alliumsativum* L.)의 비늘줄기
- 제조·가공과정 : 마늘 → 열처리 → 유산균 배양 → 살균 → 효소반응 → 열처리 → 여과 → 농축 → 살균 → 포장
- 포장재질, 포장방법, 포장단위
포장재질 : [속] 식품용 POLY ETHYLENE 포장(밀폐포장)

포장방법 및 단위: 식품용 POLY ETHYLENE 포장 (포장단위 : 1 ~ 20kg)

- 보존 및 유통온도 : 실온(직사광선을 피함)
- 지표성분 함량 : Cycloalliin (2.2 ~ 4.2 mg/g)
- 유해물질규격 : 납(mg/kg) : 1.0이하
총비소(mg/kg) : 1.0이하
카드뮴(mg/kg) : 1.0이하
총수은(mg/kg) : 0.5이하
세균수 : 1000cfu/g이하
대장균군 : 음성

2. 실험방법

가. 안정성시험

- (1) 시험기준 : 안정성시험 (가속시험)
- (2) 시험조건 : 정확한 유통기한 설정을 위해 4℃, 상온(25℃로 고정), 45℃에서 각각 1개월 간격으로 4개월 동안 시험
- (3) 실험기간 : 2013. 4. 22 ~ 2013. 7. 6

나. 성상

관능검사를 통하여 고유의 특이취가 있는 갈색의 농축액 확인

다. Cycloalliin 함량

- 1) 지표성분의 분석방법
- 1) 시약

- ① 표준품 : Cycloalliin hydrochloride monohydrate (Wako 035-21151)
- ② Acetonitrile
- ③ Phosphoric acid

2) 시약의 제조

A : 0.2% Phosphoric acid in water
 B : Acetonitrile

3) 기구 및 장치

HPLC system (waters, USA), 0.45 um membrane filter,
 1000 ml 정용플라스크, Magnetic stirrer, Sonicator

4) 표준용액의 조제

Cycloalliin hydrochloride monohydrate 표준품 일정량을 정밀히 취하여 메탄올에 녹이고 200 ug/mL, 100 ug/mL, 20 ug/mL로 희석하여 표준용액으로 하였다.

5) 시험용액의 조제

유산균발효마늘추출물 1 g을 메탄올에 용해하여 50 mL로 정용한 뒤 교반하여 용해한 후, 0.45 um filter로 여과하여 시험용액으로 하였다.

6) 시험조작

표 1의 조건으로 사용하되, 적용되는 기기에 따라 수정이 필요할 수 있다.

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
검출기 파장	210 nm
컬럼	TSKgel amide (4.5 x 250 mm, 5 um) 또는 이와 동등한 것
온도	30℃
유속	1.0 ml/min
주입량	20 ul
이동상	이동상 A: 0.2% Phosphoric acid, 이동상 B: Acetonitrile A : B = 25 : 75

6) 함량계산

표준용액 중 cycloalliin peak의 면적에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액 중 cycloalliin의 농도를 구하고, 다음의 식에 의하여 검체 중 cycloalliin의 함량을 구하였다.

[계산식]

$$\text{Cycloalliin 함량(\%)} = \text{검량선농도(ug/ml)} \times \frac{\text{시험용액의전량(ml)}}{\text{시료재취량(ug)}} \times \text{표준품순도(\%)} \times \text{환산계수}$$

$$\text{환산계수} = 177.2 / 231.7 = 0.766$$

$$\text{Cycloalliin hydrochloride monohydrate의 분자량} = 231.7$$

$$\text{Cycloalliin의 분자량} = 177.2$$

라. 납, 총비소, 카드뮴, 총수은

건강기능식품공전 납, 총비소, 카드뮴, 총수은 시험법에 따라 시험하였다.

마. 세균수, 대장균군

건강기능식품공전 세균수, 대장균군 시험법에 따라 시험하였다.

3. 실험결과

가. 유산균발효마늘추출물의 성상, 대장균군의 변화

유산균발효마늘추출물의 성상, 대장균군의 변화를 Table 1, 2에 나타내었으며 모든 시료는 저장기간 중 변화가 없기 때문에 적합으로 판정되었다.

Table 1. 성상

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	적합	적합	적합	적합	적합
25℃	적합	적합	적합	적합	적합
45℃	적합	적합	적합	적합	적합

주) 고유의 특이취가 있는 갈색의 농축액

Table 2. 세균수

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하
25℃	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하
45℃	10 CFU이하	10 CFU이하	10 CFU이하	음성	10 CFU이하

Table 3. 대장균군

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	음성	음성	음성	음성	음성
25℃	음성	음성	음성	음성	음성
45℃	음성	음성	음성	음성	음성

나. 유산균발효마늘추출물의 납, 총비소, 카드뮴, 총수은의 변화

유산균발효마늘추출물의 납, 총비소, 카드뮴, 총수은 함량을 Table 4, 5, 6, 7에 나타내었으며 기준규격에 따라 적합범위로서 적합으로 판정되었다.

Table 4. 납

(단위: mg/kg)

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	적합	-	-	-	적합
25℃		-	-	-	적합
45℃		-	-	-	적합

Table 5. 총비소

(단위: mg/kg)

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	적합	-	-	-	적합
25℃		-	-	-	적합
45℃		-	-	-	적합

Table 6. 총수은

(단위: mg/kg)

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	적합	-	-	-	적합
25℃		-	-	-	적합
45℃		-	-	-	적합

Table 7. 카드뮴

(단위: mg/kg)

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	적합	-	-	-	적합
25℃		-	-	-	적합
45℃		-	-	-	적합

다. 유산균발효마늘추출물의 cycloalliin함량 변화

유산균발효마늘추출물의 cycloalliin함량 변화는 Table 8과 같다. 저장온도에 따라 4개월간의 data를 분석한 결과 초기 cycloalliin함량은 시간 경과에 무관하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 제품에 함유되어 있는 지표성분 함량인 2.2~4.2 mg/g의 범위 내에 해당됨으로써 제품의 성분 변화에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다.

Table 8. Cycloalliin함량

(unit : mg/g)

저장기간 저장온도	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월
4℃	3.7541	3.66756	3.64758	3.58746	3.59124
25℃		3.67703	3.59863	3.42157	3.44561
45℃		3.62472	3.59742	3.54125	3.49482

라. 유통기간 산출

상기 가속시험의 지표성분(cycloalliin) 함량 결과에 따라 ‘유산균발효마늘추출물’의 유통기간을 다음과 같이 산출하였다.

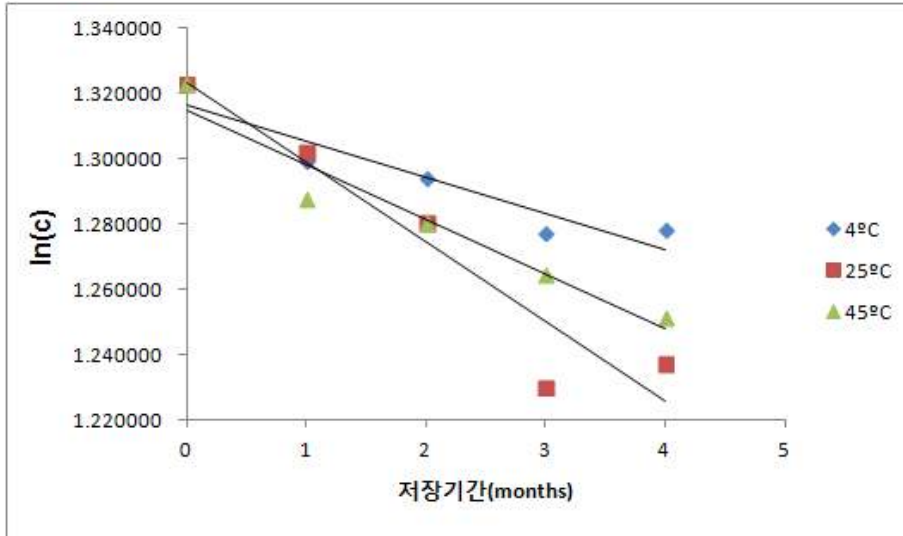


그림 1. 함량의 자연대수치와 시간에 따른 관계

(1) 반응속도상수 산출

함량의 자연대수치를 경과 개월 수에 대해 plotting하면 최소자승법으로 각 보관온도에 따른 3개의 직선의 방정식(아래)을 구할 수 있다. 각 보관온도에 따라 직선의 기울기로 소실속도상수(K)를 구하면,

Table 9. 저장온도별 품질지표의 반응속도상수

품질지표	반응차	온도	회귀방정식	결정계수	K
유산균발효 마늘추출물	1차 ¹⁾	4°C	$Y = -0.0111x + 1.3166$	0.8919	0.0111
		25°C	$Y = -0.0244x + 1.3232$	0.9113	0.0244
		45°C	$Y = -0.0166x + 1.3146$	0.9378	0.0166

1) $Y = KX + B$ (X:저장기간, Y:Ln A, B: Ln A₀, K:반응속도상수)

(A: 저장기간 X중의 시험항목의 Ln값, A₀: 저장전 제품중의 시험항목의 Ln값)

위에서 계산된 소실속도상수(K)와 보관온도를 사용하여 Arrhenius식으로부터 실온에서의 유통기간을 산출한다.

즉, 소실속도상수(K)의 자연대수치(LnK)를 절대온도 T(273 + 보관온도)의 역수에 대하여 plotting하여 최소자승법으로 계산하면 방정식을 구할 수 있다.

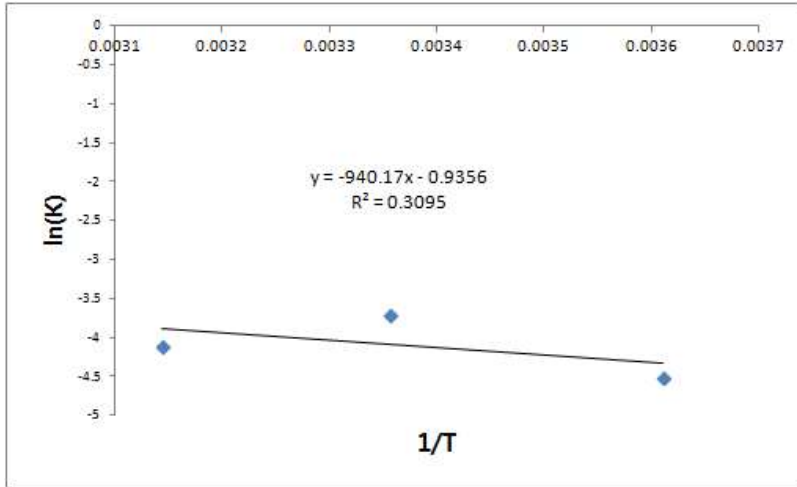


그림 2. 소실속도 상수치와 1/T와의 관계

(2) 활성화에너지 산출

Table 10. 활성화에너지 산출(1차반응식)

온도(°C)		온도(T)	1/T	K	LnK	LnK = -(Ea/R1)(1/T)+lnA
						가속 3온도 (4, 25, 45°C)
저장온 도	4	277	0.003610	0.0111	-4.500810	LnK = -940.17x - 0.9356 (R2= 0.3095) Ea(Kcal/mole) = -1490.01
	25	298	0.003356	0.0244	-3.713172	
	45	318	0.003145	0.0166	-4.098352	

1) R : 기체상수(1.987 cal/mol)

유산균발효마늘추출물이 1년간 우리나라 실온에 유통되므로, 현재 실험한 온도 구간(4, 25, 45°C)은 우리나라 1년 유통온도를 모두 반영한 것이 아니므로, 품질지표의 연간 변화량을 산출하기 위해서는 우리나라 월평균 온도를 기준으로 대표성을 갖는 온도 구간을 정하고, 그 온도구간에서의 온도 유지일수를 산출하여 실험하지 않은 구간에 대한 반응속도상수 산출이 필요하다.

실험하지 않은 구간의 유통온도설정은 우리나라 월별 평균온도를 고려하여 적용한다. 이에 따라 실온 유통시 1년간 온도별 예상 유통일수는 10°C(152일), 15°C(30일), 20°C(61일), 25°C(61일), 30°C(61일)로 하여 유통기간 산출의 근거로 사용하였다.

위의 방정식으로부터 실험하지 않은 구간의 반응속도상수(K), 연간변화 반응속도상수(K')를 구하고 이를 바탕으로 유통기간을 산출하였다.

(3) 온도별 반응속도상수 산출

Table 11. 실험하지 않은 온도의 반응속도상수 산출

온도	절대온도(T)	1/T	LnK	K
10	283	0.0035336	-4.257755477	0.014154
15	288	0.0034722	-4.200079167	0.0149944
20	293	0.003413	-4.144371331	0.0158534
25	298	0.0033557	-4.090532886	0.0167303
30	303	0.0033003	-4.038471287	0.0176244

1) K 산출과정 : $\text{LnK} = -\left(\frac{Ea}{R}\right) \times \left(\frac{1}{T}\right) + \text{LnA} \rightarrow \text{LnK} = \frac{S}{T} + I \rightarrow k = e^{\left(\frac{S}{T} + I\right)}$

(4) 연간변화 반응속도상수 산출

Table 12.연간변화 반응속도상수(K') 산출

저장온도 온도(°C)	국내 연간온도별 예상 유통일수(A)	반응속도상수 (B)	연간변화 반응속도상수 (K') (AxB)
10	152일(5개월)	0.014154	0.070770179
15	30일(1개월)	0.0149944	0.01499439
20	61일(2개월)	0.0158534	0.031706799
25	61일(2개월)	0.0167303	0.033460632
30	61일(2개월)	0.0176244	0.035248789
누계	365일(12개월)		0.186180788

1) 해당온도유통일수(A) × 해당온도 반응속도 상수(K) = K1+K2+K3+K4+K5 = K'

(5) 유통기간 산출

Table 13. 유통기간 산출

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K')	유통기한1)
1.3228486	0.7884574	0.534391216	0.186180788	34.4개월(1,047일)

1) $((A-B)/K') \times 12$, $((A-B)/K') \times 365$ (A: 최초함량의 Ln값, B: 품질규격 최소허용함량의 Ln값)

위의결과에 의해 유산균발효마늘추출물의 실제함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용함량인 80%에 달하는 농도인 3mg/g에 도달되는 시점은 34.4개월로 나타났으며, 이를 바탕으로

으로 건강기능식품 기준에 적합한 원료를 사용하여 각 공정에 따라 위생적이고 엄중한 품질관리를 한 이 제품은 밀폐포장재질로 포장하여 실온에서 유통되므로 24개월 이내에 상기 가속시험결과 이상의 품질의 변화요인은 없다고 판단된다. 따라서 적정 유통기간을 24개월로 설정함에 있어 품질관리상 이상이 없다고 판단된다.

4. 결론

유산균발효마늘추출물의 유통기한설정을 위한 실험결과, 성장, 대장균군 및 중금속은 실험기간 동안 변화 없이 초기상태를 유지하여 기준규격에 적합하였으며, 지표성분인 cycloallin의 경우도 저장초기에 비해 약간의 감소현상은 보이나 이는 제품에 함유되어 있는 지표성분 함량 2.2~4.2mg/g의 범위에 들며 최초 함량의 80%수준까지의 농도까지도 34.4개월로 나타나 제품의 성분의 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되며 각 공정에 따라 위생적이고 엄중한 품질관리를 한 이 유산균발효마늘추출물은 밀폐포장재질로 포장하여 실온에서 유통되므로 24개월 이내에 상기 가속시험결과 이상의 품질의 변화요인은 없다고 판단된다. 따라서 적정 유통기간을 24개월로 설정함에 있어 품질관리상 이상이 없다고 판정된다.

5. 참고자료

1. 건강기능식품 품목제조신고 해설서(2008. 10)
2. 식품의약품안전청 고시 제2008-53호 식품의 유통기한 설정기준
3. 제 2008-20호 건강기능식품 기능성 원료 인정서

제 4 절 인체적용시험

1. 인체 적용 시험 준비

가. 인체적용시험을 위한 CRO업체선정

(1) 연구 목적 : 인체적용시험의 원활한 진행을 위한 CRO업체 선정

(2) 연구 내용

○ 건강기능성식품 개별인정형 ‘간 건강에 도움을 줌’의 인체적용시험의 진행경험과 비용등을 고려하여 업체를 선정하였음. 비교 업체로는 전북대학교병원 임상지원센터, 움트, 네오뉴트라를 비교하였으며, 견적수령 및 간 건강 인체적용시험 경험등을 자체 평가하여 CRO업체를 선정하였음

(3) 연구 결과

○ 아래와 같은 내용으로 네오뉴트라를 CRO업체로 선정하였음

항 목		내 용
인체적용시험 명칭		유산균발효마늘추출물의 간보호활성 효과를 확인하기 위한 다기관, 무작위배정, 평행대조 인체적용시험
대상 피험자	인원수	80명 (대조 - 40명, 시험군 - 40명)
	선정기준	경계역 및 경도의 간기능 이상자 ALT, AST, GTP가 정상범위 초과 3배 범위 이내 등
	제외기준	간암, 바이러스성 간염, 약물 복용자 등
시험기관		한림대학교 강남성심병원 가톨릭대학교 성빈센트병원
기간	과제기간	17개월
	시험기간	10개월
	섭취기간	12주
섭취량		1.5g/day

나. 시료준비 및 위약 제조

(1) 연구 목적 : 인체적용시험에 사용될 시험군 시료와 대조군 시료 제조

(2) 연구 내용

○ 인체적용시험에 사용될 시료를 액상 파우치 제형으로 하였음. 연질캡슐의 경우 1g에 시료가 약 50% 첨가됨으로 섭취량을 1.5g으로 할 경우 3 capsule로 제조가 가능함. 제조비용 및 피험자의 섭취를 고려할 때, 제형으로 적절하지 않음. 분말제형의 경우 흡습성이 있어서 타정제형은 불가하고, 캡슐제형은 제조는 가능한데 장기간 보관시에 고형화될 우려가 있음. 따라서, 농축액 형태의 ‘유산균발효마늘추출물’은 액상형태가 적절하며, 연구비용 및 피험자의 편의성을 고려하여 액상파우치 형태로 임상시료를 제조하였음

(3) 연구 결과

○ 아래와 같이 시험군 및 대조군 시료가 필요하며, 여분 20%를 추가하여 임상시료를 제조하였음

구분	피험자 수	12주 섭취 파우치 량	총 생산량
시험군	48	204	9,792
대조군	48	204	9,792

○ 인체적용시험 시료를 아래와 같이 제조 하였음

가) 시험식품

1) 주성분명 : 발효마늘

- 2) 성상 및 제형 : 액상 포
- 3) 함량 : 20ml/포 (발효마늘로써 750mg/포)
- 4) 보관방법 : 직사광선을 피하고 서늘한 곳
- 5) 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 1포를 아침, 저녁 식후 30분 섭취 (발효마늘로써 1.5g/day)
- 6) 원재료 및 배합비율 :

구분	성분명	기준량(mg)
주성분	발효마늘	750
부형제	액상과당	1,000
	복합황금추출물	10
	정제수	18,240
총합		20,000

나. 대조식품

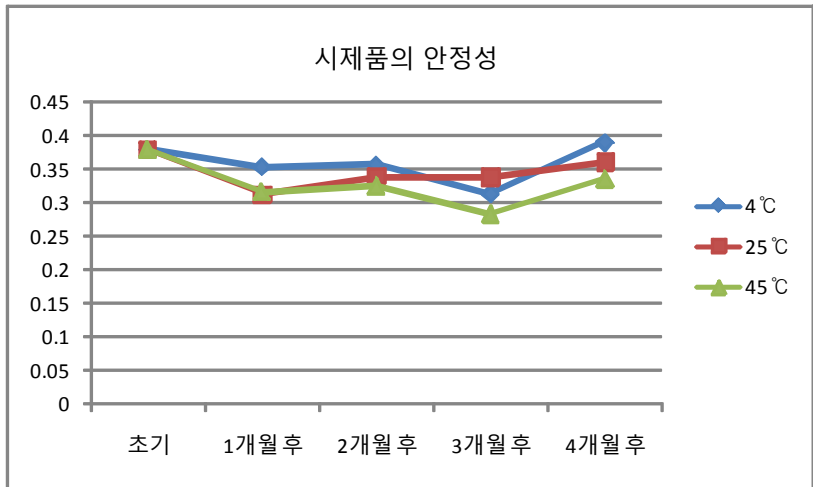
- 1) 주성분명 : 정제수
- 2) 성상 및 제형 : 액상 포
- 3) 함량 : 20ml/포
- 4) 보관방법 : 시험식품과 동일
- 5) 용법 및 용량 : 시험식품과 동일
- 6) 원재료 및 배합비율 :

구분	성분명	기준량(mg)
부형제	액상과당	1,000
	마늘향	2
	구연산	20
	카라멜색소	60
	복합황금추출물	10
	정제수	18,908
총합		20,000

○ 인체적용시험 시료는 2014년 5월에 제조하였으며, 제조 후 제품의 안전성과 안정성을 확인하기 위한 실험을 수행하였음. 파우치 포장 된 상태 그대로 4, 25, 45℃에서 4개월간 보관하며 1개월마다 cycloalliin 함량 및 균 수를 확인하였음

○ cycloalliin 함량(%)

		초기	1개월 후	2개월 후	3개월 후	4개월 후
인체적용 시험용 시험식품	4℃	0.378	0.352	0.356	0.312	0.389
	25℃		0.313	0.339	0.338	0.360
	45℃		0.315	0.324	0.282	0.334



[그림. 인체적용시험 시제품의 안정성]

○ 균 수(cfu/ml)

		초기	1개월 후	2개월 후	3개월 후	4개월 후
마늘파우 치제품	4°C	10 이하				
	25°C					
	45°C					

다. 모듬토의 신청 및 진행

○ CRO업체에서 검토한 결과, 간 기능 개선 기능성 인정에 관한 모듬토의는 생략하였음. 제조공정과 기준규격의 경우는 1차년도 연구시 식약처 현장상담기술 컨설팅을 받았고, 인체적용시험의 경우 CRO에서 타소재로 간기능개선의 기능성으로 진행을 해서 식약처로부터 인정을 받은 사례가 있기 때문에 모듬토의를 통해서 식약처와 사전조율은 불필요하다고 판단함.

라. IRB 구성

(1) 연구 목적 : 간 건강 개선에 미치는 유산균발효마늘추출물의 유효성 및 안전성 평가

(2) 연구 내용

○ 인체적용시험 시험기관으로 가톨릭대학교 성빈센트병원과 한림대학교 강남성심병원을 선정하였음. 피험자의 모집 및 임상시험의 진행 속도를 증진하고자 다기관으로 수행하였음

○ 간 건강 개선에 미치는 유산균발효마늘추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무 작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험 IRB 구성을 완료하였음

(3) 연구 결과

○ 섭취량 평가자료

섭취량	신청원료	국민 섭취량 자료(2005)			
		국민평균 섭취량		섭취자 평균 섭취량	
		평균	평균섭취량*3	평균	평균섭취량*3
신청원료섭취량	1.5g	-	-	-	-
원재료섭취량	3.75g	5.8g/day	17.4g/day	9.55g/day	21.15g/day
지표물질섭취량	0.1%	5.8mg/day	17.4mg/day	9.55mg/day	21.15mg/day

국민건강영양조사 제3기(2005) 심층분석영양부문 자료에서 국민 1인당 마늘의 평균 섭취량을 6g/day 전 후 인 것으로 발표하였으며, 2005년 국민평균섭취량은 5.8g/day인 것으로 조사되었음. 평균적으로 섭취하는 국민이(5.8g/day) 시료(1.5g/day)를 섭취하더라도 평균 섭취량의 3배 값(17.4g/day) 이하이므로 시료를 섭취하는 것은 안전할 것으로 예상됨

○ 독성시험 자료 : 아래자료로 대체함

Data Base (Garlic)	원료 안전성
WHO monograph	<ul style="list-style-type: none"> - 식품의 조미료로 널리 사용됨 - 알려진 약물 알러지 환자에게 섭취금지 - 과량의 마늘섭취는 수술 후 출혈의 위험이 있음, Warfarin을 복용해야하는 환자의 경우 혈액응고가 더욱 잘 일어나지 않을 수 있으므로 주의 - 임신부, 수유에 대한 영향 없음 - 영유아에 대한 영향은 자료없음 - 공복에 마늘인경, 마늘추출물, 마늘 기름 섭취 할 경우 가끔 복부 통증, 메스꺼움, 구토, 설사 등을 유발할 수 있음 - 달리 규정하지 않는 한 일일섭취량은 마늘 2~5g 건조분말 0.4~1.2g 마늘정유 2~5mg 마늘추출물 300~1000mg(건조물기준)
The Longwood herbal Task Force	<ul style="list-style-type: none"> - 접촉에 의한 알러지 반응 및 피부염 보고된 바 있음 - 마늘 내에 특정 독성성분은 보고된 바 없음 - GRAS로 인정되고 급성독성은 없음, 그러나 민감한 사람의 경우 다량 복용 시 위 자극을 일으키는 것으로 알려져 있음 - 드물게 마늘 섭취 시 가슴앓이, 메스꺼움, 구토, 설사, 헛배 부름, 저혈압, 홍조, 빈맥, 두통, 불면증, 땀이 나고 현기증뿐만 아니라 불쾌감을 일으키는 채취 등의 부작용이 발생할 수 있음 - 장시간(6시간) 국소부위에 접촉하는 경우 화상으로 이어짐 - 만성독성은 알려진 바 없음 - 3개월동안 생마늘 60g, 마늘 정유 120mg을 일일섭취 시 이상 없음 - 임신부, 영유아에 대한 섭취 영향은 알려진 바 없음

DrugDigest	<ul style="list-style-type: none"> - 혈액 응고를 방해 할 수 있음. 따라서 혈우병 또는 다른 출혈 장애가 있는 경우 많은 양의 마늘을 섭취하지 않도록 주의 - 마늘의 화학 물질이 위장 자극을 일으킬 수 있으므로 위궤양 또는 위장이 민감한 사람은 마늘을 섭취에 주의해야 함 - 임산부, 영유아에 대한 섭취 영향은 알려진 바 없음 - 특이적으로 알러지가 있는 사람의 경우 피부발진이나 위장장애가 발생할 수 있음 - 장시간 국소부위에 접촉하는 경우 화상으로 이어짐
Herbs & Supplements, EBSCO	<ul style="list-style-type: none"> - FDA에서 GRAS로 인정 - 중대한 부작용 없음
Health Canada	<ul style="list-style-type: none"> - 급성독성, 만성독성, 태아독성에 대하여 안전한 것으로 인정함

○ 섭취량 설정 : 섭취열량 대비 환산

Mouse의 체중 20g, 섭취열량을 5~7kcal/day 가정할 때, 200mg/kg BW/day는 4mg/20g BW/day에 해당되며, 1kcal당 섭취량은 0.5715 ~ 0.8mg/kcal가 됨. 성인 평균 1일 열량 섭취량 2,000kcal 대비 환산하면, 1.1 ~ 1.6g/day의 범위이며, 이에 1.5g/day로 설정하였음

마. 인체적용시험을 위한 전문가의 의견수렴

(1) 연구 목적 : 인체적용시험 평가 지표의 효용성 증진을 위한 전문가 의견 수렴

(2) 연구 내용

○ IRB 구성 전, 전문가 의견을 수렴하여 인체적용시험 평가 지표를 ALT(GPT), AST(GOT), ALP, γ -GT, bilirubin 등을 검토하였음. 이를 바탕으로 인체적용시험 임상프로토콜 작성에 반영하여, 인체적용시험 평가지표를 γ -GTP로 설정하였음

(3) 연구 결과

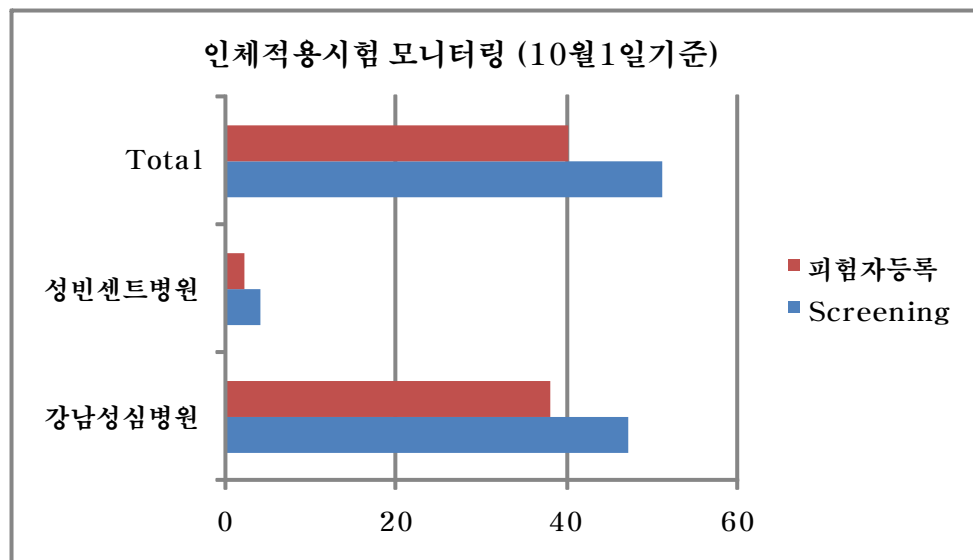
○ 피험자는 만 20세 이상 만 75세 이하의 남/녀로 혈액검사에서 γ -GTP의 수치가 연구기관의 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 이내의 범위에 있는 사람으로 설정하였음

바. 인체적용시험 진행 및 이체적용시험 모니터링

(1) 진행사항(10월 1일 기준)

80명 중에 40명이 등록되어서 50% 진행중임.

Center	Planned Enrollment	Screening	S/F	Randomization (%)	Active	Drop out	completed
강남성심병원	40	47	8	38(95%)	36	0	2
성빈센트병원	40	4	2	2	2	0	0
Total	80	51	8	40 (50%)			



[그림. 인체적용시험 모니터링 결과]

2. 임상시험

본 임상시험은 경계역 및 경도의 간기능 이상자를 대상으로 발효마늘을 섭취했을 때 간기능 개선에 있어 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위하여 계획되었다

가. 임상시험용 식품

(1) 임상시험용 식품의 개요

가) 시험식품 (BL_4)

- 주성분명: 발효마늘
- 성상 : 액상
- 제품의 중량 : 20ml (발효마늘로써 750mg/포)
- 일일섭취량 : 1일 2회, 1회 1포를 아침, 저녁 식후 30분 섭취 (발효마늘로써 15g/day)
- 저장방법 : 직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관
- 지표성분 : Cycloalliin

나) 대조식품 (Placebo)

- 주성분명: 정제수
- 성상 : 시험식품과 동일
- 제품의 중량 : 20ml (시험식품과 동일)
- 일일섭취량 : 시험식품과 동일
- 저장방법 : 시험식품과 동일

(2) 배정방법

본 임상시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정하여 병행시험으로 진행하였으며, 필요한 시험대상자 수는 탈락율(15%)을 고려하여 각 군당 40명씩 총 80명이었다.

방문 2(Randomization Visit, Week 0)에서 선정, 제외기준에 적합한 모든 시험대상자에 대하여 실시기관에 따라 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정하였다. 섭취군 간의 균형 있는 무작위배정을 위하여 동일한 블록의 크기를 적용하였고, 각 군의 시험대상자 수의 비는 1:1로 동일하게 하였다.

무작위배정표는 SAS® system의 Randomization program으로 발생된 난수(A, B 의 Random number)의 순열을 시험대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS® 를 통해 임상시험 전에 미리 고안하여 생성하였다. 의뢰자는 임상시험용 식품 포장 시 무작위 배정표에 따라 임상시험용 식품 라벨을 부착한 후, 임상시험 시작 전에 시험기관에 공급하였다.

이후, 방문 2에서 해당 시험대상자가 본 임상시험의 대상자로 적합한 경우에 다음의 시험대상자번호를 순서대로 부여하고, 이때 일련번호와 같은 번호의 시험/대조식품을 섭취하도록 하였다.

AA-R ZZZ {AA: 기관코드, R: Randomization의 첫글자, ZZZ: 일련번호(001, 002~)} 시험기관 기관코드는 다음과 같다.

가톨릭대학교 성빈센트병원: 01

한림대학교 강남성심병원: 02

(3) 이중눈가림

이중눈가림 유지를 위하여 본 임상시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 임상시험 시험자가 봉인된 상태로 관리하였으며, 중대한 약물유해반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 임상시험 종료시까지 공개하지 않았다. 임상시험 시험자는 선정된 시험대상자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 시험대상자에게 공급하였으며, 임상시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 눈가림을 유지하였다.

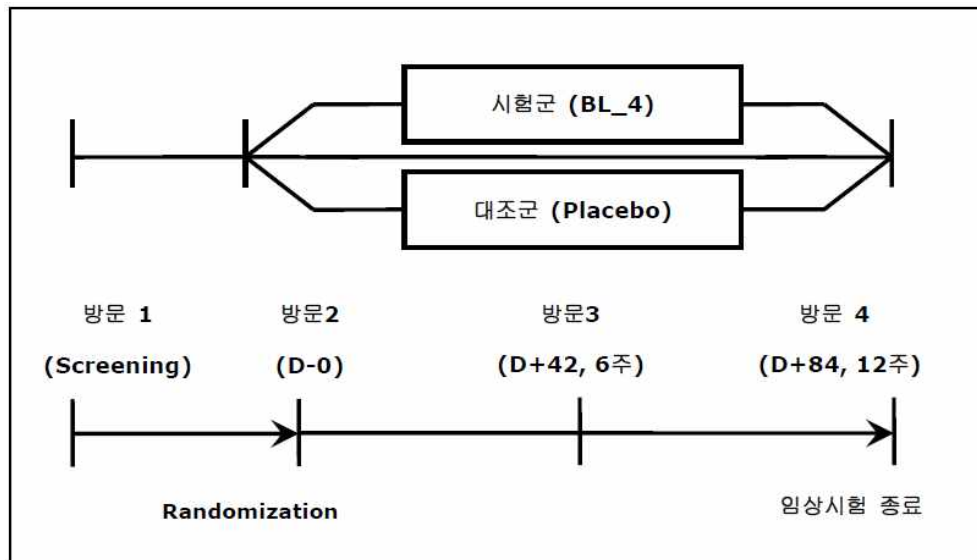
3. 임상시험 계획

가. 임상시험의 설계

본 임상시험은 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험으로 디자인되었다. 자의에 의해 임상시험 동의서에 서명한 사람이 본 임상시험에 참가하면 인구학적조사, 병력조사, 약물투여력조사, 이학적 검사, 활력징후, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당),

심전도 검사, 복부초음파 검사를 실시하여 선정, 제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 임상시험대상자 등록이 이루어졌다 시험군 또는 대조군으로 배정된 임상시험대상자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 하였다.

그림 임상시험 개요



나. 시험기간

본 임상시험은 방문 2를 시작으로 임상시험에 참여하는 기간은 총 12주(84일)이다. 시험기간은 임상시험 승인일로부터 12개월로 계획되었으며, 2014년 06월 18일에 첫 시험대상자가 한림대학교 강남성심병원에서 스크리닝 되었고, 2014년 06월 18일 첫 시험대상자가 등록되었다. 마지막 시험대상자의 방문은 한림대학교 강남성심병원에서 2015년 07월 06일에 이루어져서 총 13개월 동안 시험이 진행되었다.

다. 시험중지 및 탈락, 분석제외 기준

임상시험에 참여하는 모든 시험대상자의 시험 완료 여부를 기록하고, 임상시험용 식품 섭취나 관찰이 중단된 경우 시험 중단 사유 및 날짜 등을 증례기록서(CRF)에 기록하도록 하였다.

임상시험이 진행중인 시험대상자에 대하여 시험을 중단할 수 있는 경우는 다음과 같았다

- ① 선정기준/제외기준에 위배된 경우
- ② 시험대상자에게 중대한 이상반응(Serious Adverse Events) 혹은 이상반응(Adverse Events)에 의해서 시험대상자가 시험중단을 요구하는 경우
- ③ 섭취전 검사에서 발견치 못한 전신 질환이 발견된 시험대상자
- ④ 임상시험기간 중 만족스럽지 못한 치료 효과로 인하여 시험대상자 또는 시험대상자의 법정대리인이 시험중단을 요구하는 경우
- ⑤ 시험대상자가 임상시험 참가 동의를 철회한 경우
- ⑥ 시험대상자의 추적이 안 되는 경우
- ⑦ 시험대상자에게 시험/대조식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우

- ⑧ 임상시험기간동안담당의사의지시없이연구결과판정에영향을미칠수있는약물
등을복용한경우
- ⑨ 시험자의판단에의해연구의진행이적합하지못하다고판단되는경우
- ⑩ 임신이확인된 경우

라. 임상병리검사

임상 병리검사를 실시하여 시험대상자의 전신적인 건강 상태를 평가하였다. 시험자는 시험대상자로 하여금 검사 당일 8시간 공복 상태로 내원하도록 지시하였다. 검사항목에는 다음이 포함되었다.

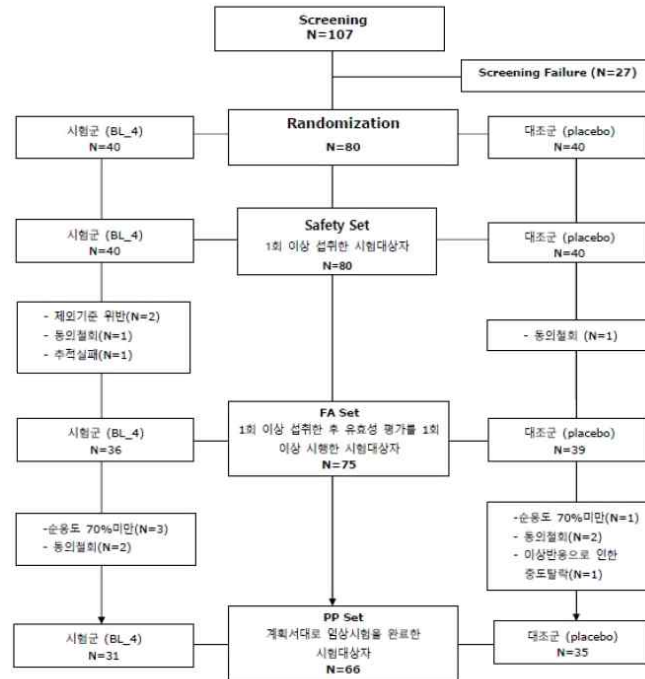
- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, WBC, Platelet, Seg Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV
- 혈액화학적 검사: Na, K, Cl, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDLcholesterol, Calcium, CK, AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, ALP, Creatinine, BUN, Uric acid, γ -GTP, LDH
- 혈액응고검사: PT, aPTT
- 소변검사: SG, pH, Leukocyte, Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Erythrocyte
- 임신반응검사: HCG (※ 가임기여성만 해당)
- 갑상선 호르몬 검사: TSH (방T문2에서만 실시)
- 종양표지자검사: AFP(방A문2에서만 실시)
- 간염바이러스검사: HBs Ag, HCV-Ab (방문2에서만 실시)

마. 심전도검사

방문2, 4에서 심전도검사를 실시하였다. 방문2의 심전도검사는 3개월 이내 검사 결과가 있을 시 생략이 가능하였다. 모든 심전도 검사결과는 각 시험 기관별로 판독하고 해석하였다. 결과의 해석은 자격을 갖춘 의사가 실시해야하며 증례기록서(CRF)에 기록하였다. 방문4에 임상적으로 유의한 비정상치는 시험대상자의 증례기록서의 ‘이상반응’ 페이지에 기록하였다. 시험대상자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과를 (주)네오뉴트라 모니터요원과 상의하였다.

바. 섭취기간

시험식품(BL_4) 또는 대조식품(Placebo)을 12주간 섭취



• 유효성결과

- 본 임상시험의 유효성 평가는 γ -GTP, AST(GOT), ALT(GPT), AST/ALT ratio, 다차원 피로척도(MFS), 혈중지질(Total-cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol)의 변화량으로 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

- γ -GTP 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 12주 후 456 ± 4326 감소하였으나 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다 ($P=0.0691$).

PP Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 12주 후 645 ± 4573 감소하였으며, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ($p=0.0461$).

- AST(GOT) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 12 주 후 228 ± 1237 감소하였으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0477$). PP Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 12 주 후 329 ± 1279 감소하였으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0328$).

- ALT(GPT) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 12 주 후 242 ± 1640 감소하였으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ($p=0.0429$).

PP Set으로 분석한 결과에서 시험군은 섭취 12 주 후 374 ± 1695 감소하였으며, 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ($p=0.0434$).

- AST/ALT ratio 변화량을 FA Set, PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 및 섭취 12주 후 섭취군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1 연도별연구목표에 따른 달성도

구분	연구개발의 목표	수행내용 및 달성도
1차년도	[제1세부:(주)바이오랜드] 마늘의 지표성분 분석	- 마늘 지표성분 분석방법의 확립 : 100% - 원산지, 채취시기별 지표성분의 분석 : 100% - 지표성분의 method validation : 100%
	제1세부:(주)바이오랜드 마늘의 추출 조건 최적화	- 열수추출 조건에 따른 최대 추출율, 기호성 향상, 선택변화 등을 검토 : 100% - 105℃, 3시간 열수추출을 통해 마늘의 특이취를 개선함 : 100%
	제1세부:(주)바이오랜드 발효공정 최적화	- 최대 생육/간기능 개선활성 유산균 선정 : 100% - 간기능 개선 활성의 발효조건 최적화 : 100% - 발효 전후 마늘 지표성분 변화 분석 : 100%
	[협동:고려대학교] 간기능 개선 활성 phytochemicals의 추출 및 정제	- Prep-TLC, open column chromatography, Prep-HPLC, analytical HPLC 등을 사용하여 정제 : 100% - 정제 phytochemicals의 순도 검정 : 100%
	[협동:고려대학교] 정제 간기능 개선 활성 phytochemicals의 구조해석과 수식	- 정제 phytochemicals의 구조해석 : 80%
	[협동:고려대학교] 마늘추출액 및 마늘유산균발효액의 간기능 개선 <i>in vitro</i> 활성 검색	- HepG2/2E1 cell line을 이용한 알코올성 간보호 활성 : 100% - HepG2/2E1 cell line을 이용한 알코올성 지방간 억제 활성 : 100% - HepG2 cell line을 이용한 비알코올성 지방간 억제 활성 : 100% - Acetoaminophen 간독성 보호 활성 : 100% - AAPH 간독성 보호 활성 : 100% - Acetaldehyde 간독성 보호 활성 : 100%
	[협동:고려대학교] RT-PCR에 의한 <i>in vitro</i> 활성 기전의 규명	- L-FABP의 발현 수준을 RT-PCR로 정량 : 100% - Lipogenesis 관련 SREBP-1C 의 발현 수준을 RT-PCR로 정량 : 100% - Lipogenesis 관련 FAS의 발현 수준을 RT-PCR로 정량 : 100% - 간세포의 lipolysis 관련 ATGL의 발현 수준을 RT-PCR로 정량 : 100% - 간세포의 lipolysis 관련 HSL의 발현 수준을 RT-PCR로 정량 : 100%
	[협동:고려대학교] Western blot에 의한 <i>in</i>	- Lipogenesis 관련 SREBP-1c의 발현 수준을 Western blot으로 정

	<i>vitro</i> 활성기전의 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Lipogenesis 관련 FAS의 발현 수준을 Western blot으로 정량 : 100% - Lipolysis 관련 ATGL의 발현 수준을 Western blot으로 정량 : 100% - Lipolysis 관련 HSL의 발현 수준을 Western blot으로 정량 : 100%
2차년도	[1세부:바이오랜드 이승현] 간기능 개선 활성 물질의 추출 최적화 공정 설정	<ul style="list-style-type: none"> - Scale up 추출공정의 최적화 :100% - 상기 추출물의 이화학적 특성 분석 : 100%
	[1세부:바이오랜드 이승현] 대량생산 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 대량생산 제조 공정에서의 시생산 :100% - 시생산 시료의 이화학적 특성 및 지표성분 변화 분석 : 100%
	[1세부:바이오랜드 이승현]인 체적용시험 준비	<ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험을 위한 CRO업체선정 :100% - 시료준비 및 위약 제조 : 100% - 모듬토의 신청 및 진행 :100% - IRB 구성 : 100%
	[1세부:바이오랜드 이승현] 인체적용시험 진행	<ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 진행 및 인체적용시험 모니터링: 100%
	[1협동:고려대학교 조홍연] <i>In vivo</i> 에서 마늘유산균발효 액의 간기능 개선 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간기능 개선 활성 평가 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물 간조직의 histological analysis : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 글루타치온 함량 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 지질과산화물 함량 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 catalase(CAT) 활성:100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 glutathione reductase(GR) 활성 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 glutathione S-transferase(GST) 활성 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 superoxide dismutase(SOD) 활성: 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 CYP2E1의 mRNA 발현량 검토 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 Bax의 mRNA 발현량 검토 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 Bcl-2의 mRNA 발현량 검토 : 100% - Acetaminophen으로 간독성을 유발시킨 실험동물의 간 조직 내 caspase-3의 mRNA 발현량 검토 : 100% - High fat diet 유도 비알코올성 지방간 동물모델에서 LAFGE의 지방간 개선 효과 : 100%
	[협동:고려대학교 조홍연] 신규활성물질 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - Cycloalliin 이외에 신규 생리활성물질 탐색 및 효능메카니즘 규명 : 80%

3차년도	[1세부:바이오랜드 이승현] 인체적용시험 진행 및 종료	- 인체적용시험 진행 현황 모니터링 - 인체적용시험 종료 후, 평가지표 통계처리 : 100% - CRO로부터 최종보고서 수령 : 100%
	[1세부:바이오랜드 이승현] 생산공정최적화	- 공정별 기능/지표 성분의 변화 분석 : 100% - 유용성분 및 물성 변화 확인 : 100% - 가속시험을 통한 시료의 안정성 시험 : 100% - Lot별 규격확인 : 100% - 생산제품의 규격설정 :100%
	[1세부:바이오랜드 이승현] 기호도 증진 기술 개발	- 마늘 특유의 맛, 냄새 저감기술 개발 : 100% - 포접기술 적용 가능성 검토 : 100%
	[1세부:바이오랜드 이승현] 판매단가산출 및 농가협약	- 창녕군 농업기술센터 기술지원과등에 자문을 받아 마늘의 유통현황 파악 (1차년도 수행: 남해마늘연구소 방문) - 최소 판매량을 감안하여 농가(가월영농조합)와 원료수급, 품질관리에 관한 계약체결 (완료)
	[1세부:바이오랜드 이승현] 개별인정형 원료 인정 신청 준비자료 작성 및 제출	- 기준규격, 영양성분, 잔류농약, 중금속 등 공인기관에 분석 의뢰 : 100% - Database를 통한 안전성 자료 탐색 :100% - 개별인정형 원료인정신청 제출자료 작성 및 제출: 100%
	[협동:고려대학교 조홍연] 간기능 개선 활성기전 규명 및 조절경로 작성	- RT-PCR, Western blot에 의거 활성의 up/down-regulation을 <i>in vitro</i> cell에서 분석하고, 조절경로를 작성함 : 100% - RT-PCR, Western blot에 의거 활성의 up/down-regulation을 <i>in vivo</i> 실험동물에서 분석하고, 조절경로를 작성함 : 100%

제 2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

- 발효마늘 추출물의 지표성분의 분석 가능 여부를 확인하고 미생물 및 중금속 안전성을 점검하여 개별인정진행에 충족하는 추출물을 확보하였음
- 본 연구는 표준화를 통해 원료의 지표물질을 제시하고 아울러 그 기능성분의 동물실험(1차, 2차) 검증을 통한 생리활성 연구를 통해 간 기능개선 소재 개발을 목표로 in vivo 및 인체적용시험상의 실험을 통하여 간 기능개선 효능을 평가하였음
- 추출물의 동물실험에서 간 기능개선 효과를 혈액검사, 조직 및 기관검사를 통하여 효능 평가하였으며, 산업화를 진행하였음
- 시제품의 안정성 평가를 통하여 유통기한을 설정하였으며, 시장성(상품성)평가를 통하여 제품화 진행 방향 설정하였음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타 (홍보)
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1								1	
	달성	1								1	
2차 년도	목표	1						1			
	달성	2	1							2	
3차 년도	목표	1	1					2			
	달성										1
4차 년도	목표										
	달성										
5차 년도	목표										
	달성										
계	목표	3	1					3	1		
	달성	4	2						3	1	

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

○ 연구개발 성과(논문)


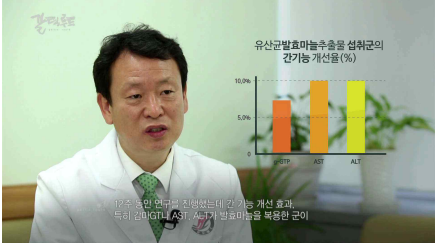
논문 제목	학술지	비고
유산균 발효마늘의 유기황화합물과 CYP2E1-Transfected HepG2 Cell에서 알코올 유발 세포독성에 미치는 영향	한국식품영양과학회지, <i>J Korean Soc Food Sci Nutr</i> 42(3). 342 ~ 347(2013)	비SCI (KCI), 1차년도 성과
알코올성 지방간을 유발시킨 마우스에서 유산균 발효 마늘추출물의 간 보호 효과	한국식품영양과학회지, <i>J Korean Soc Food Sci Nutr</i> 43(11), 1642 ~ 1647(2014)	비SCI (KCI), 2차년도 성과
유산균 발효 마늘 추출물의 oleic acid로 유도된 비알코올성 지방간에 대한 개선 효과	한국식품과학회지 KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 6, pp. 762~768(2014)	비SCI (KCI), 2차년도 성과
Hepatoprotective Effect of Lactic Acid-fermented Garlic Extracts against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Rats	한국식품과학회지	SCI(투고 중), 3차년도 성과
Anti-Obesity Effect of Lactic Acid-Fermented Garlic Extract in Diet-Induced Obese Mouse	Journal of medicinal food	SCI(투고 중), 3차년도 성과
Efficacy and safety of fermented garlic extract on improving hepatic function in adults with mild hepatic dysfunction: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial	Journal of Experimental Botany	SCI(투고 중), 3차년도 성과

○ 연구개발 성과(특허)

특허명	출원번호	비고
발효마늘추출물을 유효성분으로 포함하는 간 기능 개선용 조성물	10-2014-0032638	출원 및 등록 (2차년도 출원, 3차년도 등록)
싸이클로알리인(Cycloalliin) 함량이 증가된 마늘추출물 제조방법	10-2013-0064634	출원 (1차년도 출원)
상표등록 :LIVERTECT	40-2014-0043144	출원 및 등록 (2차년도 출원 및 등록)
특이취가 제거된 천연 추출물의 제조방법	10-2016-0011762	출원 (3차년도 출원)

○ 연구개발 성과(기타) : 홍보실적

대전MBC 창사51주년 특별기획 “갈릭루트” 에 본 과제의 연구과정을 소개

	<p>대전MBC 창사51주년 특별기획 “갈릭루트”</p>
	<p>2015년 11월 26일 오후 11시 10분에 방송 (주)바이오랜드 및 고려대학교의 본 과제 연구과정 소개</p>

○ 성과활용 계획

- 본 연구결과를 토대로 간 기능 개선 효능을 가지는 발효마늘 추출물의 개별인정형 원료로 승인 받아 건강기능식품 기능성 원료로 제품화할 계획임. 현재 식약처 3월 심의에 상정되었으며, 4월 중에 허가 받을 것으로 기대됨.
- (주)바이오랜드는 2011년 기준 건강기능식품 원료로 약 200억원의 매출을 달성하였음. 건강기능식품 고시형 원료는 홍삼농축액, 대두 이소플라본, 녹차추출물, 키토올리고당, 상어연골뮤코다당, 글루코사민 등을 제조, 판매하고 있으며, 개별인정형 원료는 히알루론산, 헛개나무과병추출분말, 바나바주정추출물, 홍경천추출물, 민들레복합추출물(위탁제조) 등을 개별인정형 원료로 인정받아 제조, 판매하고 있음. 이들 중 헛개나무과병추출분말의 경우 ‘알코올성 간손상으로부터의 보호효과’ 기능성으로 2010년 53억원을 제조, 판매하였음. 2011년 개별인정형 제품의 기능성별 판매현황은 간건강(37%), 면역기능(12%), 관절/뼈건강(11%), 피부건강(7%) 순으로 ‘간기능 개선에 도움’의 기능성을 인정 받은 **마늘유산균발효액**에 대한 소비자의 수요는 높을 것으로 예상됨
- (주)바이오랜드는 건강기능식품 원료 제조 전문기업으로 매출액 기준 국내 1위 기업임. 본 과제를 통하여 마늘유산균발효액의 간기능 개선 기능성을 인정받을 경우, 1차적으로 현재 주 건강기능식품 제조업 거래처인 KGC인삼공사, 아모레퍼시픽, LG생활건강 등의 업체를 대상으로 B/B 형태로 판매할 수 있을 것임
- (주)바이오랜드는 10여 년 전부터 일본에 히알루론산과 홍삼농축액 등을 수출하고 있음. 이 경험과 사업망을 활용할 경우 본 과제를 통하여 식약청의 인정을 받은 마늘유산균발효액은 일본인의 마늘에 대한 높은 인지도와 선호도를 고려할 때 현재 울금으로 편중되어 있는 **숙취해소음료의 대체 소재**로 진출이 가능할 것임

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제목	학술지명	내용
Hydrogen-rich water protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice	World J Gastroenterol 21(14): 4195-4209 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ① 실험동물에 acetaminophen (500 mg/kg)을 투여하고, hydrogen-rich water (5 mL/kg)를 3일간 경구투여하였을 때 간 손상 개선 효과를 검토하였음 ② 간 손상 혈액 지표(ALT, AST, ALP) 및 혈액 중 염증 지표(TNFα, IL-6)가 개선되었음 ③ 조직학적으로 간 손상이 개선되었음 ④ 간 조직 내 항산화 지표(MDA, SOD, CAT, GSH, GPX)들이 개선되었음. 산화적 스트레스의 지표인 nitrotyrosine-protein adducts가 감소된 것을 면역조직염색법으로 확인함 ⑤ 전자현미경 관찰 결과, 간 세포 소기관 손상이 개선되었음 ⑥ 조직학적 관찰 결과, apoptosis가 억제되었음 ⑦ 간 재생 관련 인자(Cyclin D1, PCNA)들이 증강되었음 ⑧ 항산화 효과에 의한 산화적 스트레스 억제 및 간 재생 인자 강화로 인해 간 손상이 완화되었음
Protective Effect of S-Allylcysteine on Hepatic Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes During Hamster Cheek Pouch	J Biochem Mol Biol Biophys 6(1):13-16 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ① DMBA로 유도한 구강암 모델에서 항암 효과를 검토하였음 ② Lipid peroxidation이 개선되었고, GPX, GST 등의 항산화 효소 활성이 증강되었으며 GSH level 또한 회복시키는 SAC가 항암 활성에 주요한 역할을 함을 시사하였음
Alleviative Effects of S-Allylcysteine and S-Ethylcysteine on MCD diet-Induced Hepatotoxicity	Food Chem Toxicol 46(11):3401-3406 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> ① SAC와 SEC를 1 g/L 농도로 물에 혼합하여 7주간 methionine-choline deficient (MCD)diet와 함께 공급하였음. ② ALT, AST 수치가 개선되었음 ③ 간 내 TG 함량은 개선되었지만, TC에는 효과 없음 ④ 콜레스테롤 합성에 관련된 HMGCR의 활성에는 영향이 없었지만, fatty acid synthesis에 관여하는 FAS의 활성이 크게 감소되었음 ⑤ GSH, GPX, CAT, SOD 등 항산화 지표가 증가되었음 ⑥ 염증 관련 인자 (IL-1, IL-6, TNFα) 감소 ⑦ Fibrosis 관련 인자 (hydroxyproline, MMP-9, TGF-β) 감소 ⑧ SAC와 SEC는 MCD-diet에 의한 간 손상 모델에서 간 기능을 개선하였음
Aqueous Garlic Extract Attenuates Hepatitis and Oxidative Stress Induced by Galactosamine/Lipopolysaccharide in Rats	Phytother. Res. 22(1):1372-1379 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> ① 마늘추출물(300 mg/kg)을 14일간 경구투여한 후, DGal/LPS (300 mg/kg, 30 μg/kg)을 투여한 후 간 손상 개선 효능을 확인함 ② 간 손상 관련 혈액 지표(ALT, AST, ALP, LDH, γGT, bilirubin)들이 개선되었음

제목	학술지명	내용
		<ul style="list-style-type: none"> ③ 염증 관련 지표(TNFα) 및 산화 스트레스 지표(myeloperoxidase, TBARS)가 개선되었음 ④ GPX, GSH, SOD, CAT 등의 항산화 효소 활성이 증강되었음 ⑤ 간 내 지질 수치가 개선되었음 ⑥ 항산화 효과에 의한 산화적 스트레스 억제로 인해 간 손상이 완화되었음
The Protective Effects of Garlic Extract Against Acetaminophen-Induced Oxidative Stress and Glutathione Depletion	Pakistan J Biol Sci 12(10): 765-771 (2009)	① isolated rat hepatocytes에 acetaminophen과 마늘추출물을 투여하였을 때, ROS formation과 glutathione depletion을 효과적으로 억제하였음
Protective Effect of s-Allyl Cysteine And s-Propyl Cysteine on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice	Food Chem Toxicol 44(3):393-397 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> ① 마늘의 주요 organosulfur compounds (OSCs) 중 SAC와 SPC를 1 g/L 농도로 물에 혼합하여 쥐에게 4주간 자유롭게 마시도록 하였음 ② 4주 후, acetaminophen (350 mg/kg)을 투여하고 24시간 후 간 손상 여부를 관찰하였음 ③ 4주 동안의 water intake는 대조군과 실험군 간에 차이가 없었음 ④ SAC, SPC는 ALT, AST 수치를 크게 감소시켰음 ⑤ IL-6, IL-10, TNFα 등의 염증 관련 지표가 크게 감소되었음 ⑥ GSH, GPX, CAT 등의 항산화 효소 활성이 증강되었고, 지질과산화 지표인 MDA 수치가 감소되었음 ⑦ 마늘의 주요 OSCs 중 SAC와 SPC는 항산화 효능 및 항염증 효능에 의해 acetaminophen에 의한 간 손상을 크게 예방하였음
Protective Effect of Ajoene on Acetaminophen-induced Hepatic Injury in Mice	Biosci Biotechnol Biochem 65(11):2555-2557 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ① 마늘 유래의 황 함유 화합물 중 하나인 ajoene을 mouse에 12시간 간격으로 하루 두 번, 20, 50, 100 mg/kg 농도로 경구투여한 후, 마지막 투여 두시간 뒤에 300 mg/kg 농도의 acetaminophen을 투여하여 6시간 후 간 손상 정도를 분석하였음 ② 혈청 내 GPT 수준이 감소되었음 ③ GSH depletion을 억제하여 산화적 스트레스에 의한 간 손상을 억제하였음
Garlic Essential Oil Protects against Obesity-Triggered Nonalcoholic Fatty Liver Disease through Modulation of Lipid Metabolism and Oxidative Stress	J Agric Food Chem 62(25):5897-5906 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ① Garlic essential oil (25, 50, 100 mg/kg) 및 주요 성분인 DADS (10, 20 mg/kg)를 12주간 고지방식이와 함께 투여하였음 ② 12주간 체중 증가 및 복부지방량이 감소하였음 ③ 혈중 glucose, insulin, FFA, TG, TC 등의 수치가 감소되었음 ④ AST, ALT 수치가 감소되었음 ⑤ Liver weight의 증가를 억제하였고, 간 내 지방, 콜레스테롤 및 fatty liver score를 효과적으로 감소시켰음 ⑥ 조직염색 결과, 간 조직 내 지방 침착이 감소

제목	학술지명	내용
		<p>되었음</p> <p>⑦ 지질과산화 지표(MDA), 항산화 지표(GSH, SOD, CAT, GST, GPx GR, GST), 염증 지표(TNFα, IL-1β, IL-6) 등이 감소되었음</p> <p>⑧ Lipogenesis (SREBP-1c, FAS) 및 cholesterol biosynthesis (ACC, HMGCR) 관련 marker의 protein 발현이 감소되었음</p> <p>⑨ 지방대사 활성화에 대한 biomarker (CPT-1, PPARα)가 증강되었음</p> <p>⑩ Garlic essential oil 및 그 주요 성분인 DADS 는 항산화/항염증, 지질대사 촉진, 지질합성 저해 등을 통해 지방간 및 지방간에 의한 산화적 스트레스에 따른 간 손상을 효과적으로 예방하였음</p>
<p>Lipid-lowering Effect of Monascus Garlic Fermented Extract (MGFE) in Hyperlipidemic Subjects</p>	<p>Hiroshima J Med Sci 55(2):59-64(2006)</p>	<p>① 220 mg/dl 이상의 혈중 콜레스테롤 수치, 140 mg/dl 이상의 LDL cholesterol 수치를 보이는 33-59세의 참가자들(남 11, 여 4)에게 Monascus pilosus로 발효한 마늘추출물 캡슐(225 mg/capsule)을 아침, 저녁 식후 한 알씩 4주간 섭취시켰음</p> <p>② 혈중 total cholesterol과 LDL-C이 2주, 4주 후 크게 개선되었음</p> <p>③ HDL-C 수치에는 영향이 없었음</p> <p>④ Atherogenic index (AI)가 크게 감소되었음</p>
<p>이상의 결과 등을 토대로, 마늘 및 마늘의 주요 성분들은 간 독성 물질에 의한 간 손상 및 비알코올성 지방간 등의 간 질환 모델에서 항산화 효능에 기반한 매커니즘을 통해 간 손상 및 간 질환을 예방 및 개선할 수 있음을 확인하였으며, 본 연구팀의 유산균 발효 마늘 추출물은 발효 후 SAC, SEC, SMC, cycloalliin 등의 황 함유 화합물들이 크게 증가하였으며 이들의 함량 증가로 인한 항산화 활성 증가가 간 손상 및 간 질환의 예방에 주요한 역할을 할 것으로 예상할 수 있었음</p>		

[별첨 1]

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
건강기능식품소재 개발	일본	50%	40%	80%	마늘을 이용한 건식소재 개발

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(한국, 미국, 일본, 유럽, 국제)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	fermented, garlic	hepatoprotective, garlic
검색건수	167	없음
유효특허건수	30	
핵심특허 및 관련성	특허명	유산균을 이용한 SAC 고함량 마늘발효물의 제조방법
	보유국	한국
	등록년도	2011년
	관련성(%)	100%
	유사점	본 연구진의 보유등록특허
	차이점	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

순서	특허 검색어	검색특허(건)	관련특허(건)	관련특허번호 및 발명의 명칭	중점내용
1	마늘, 유산균	33	0		
2	흑마늘, 유산균	0	0		
3	흑마늘	8	8	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2008-0103186 발효숙성 흑마늘 제조 방법 2. 2008-0097689 발효 흑마늘 제조 방법 3. 2008-0096307 천연 산야초 발효 흑마늘, 그 제조 방법, 및 그것을 포함하는 건강식품 4. 2008-0082945 흑마늘 발효물의 제조 방법 및 그 조성물 5. 2008-0082896 숙성마늘의 제조 방법 및 이를 함유하는 식품용 조성물 6. 2008-0074473 항산화 기능과 항암활성을 가진 수용성 알릴황화합물이 강화된 발효숙성 흑마늘 제조 방법 7. 2008-0046830 바실러스 속 미생물을 이용하여 배양한 흑 마늘 발효액을 함유하는 화장료 조성물 8. 숙성 쪽마늘과 그 숙성 방법 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 생마늘에 당을 첨가하여, 80-100도, 16일 20일숙성함 2. 마늘에 고주파 처리 후, 숙성 3. 산야초에 흑설탕을 넣고 만든 효소액을 마늘에 첨가 발효 숙성함 4. 흑마늘 분말, 탄소원(당),균(효모,초산균,유산균, 곰팡이)등을 접종하여, 흑마늘 식초 및 발효물을 제조함 5. 마늘에 효소처리를 통하여 단맛이 나게 함(엿기름 추출액, 폴리갈락트로나아제, 셀룰라아제, 자일라아제, 펙틴나아제, 프럭탄 분해 효소, 아밀라아제, 글로코아밀라아제) 콜레스테롤 저하용 제품 6. CO2 가스 포함, 저온 보관 통한 알린 성분 감소 억제 70-90℃, 7-10일 숙성, 알린 함량 6mg/g마늘 마이크로 웨이브 전처리 7. 흑마늘을 바실러스로 발효함. 발효물은 콜라겐 분해 효소 생성 억제로 피부주름 개선 화장료 조성 8. 껍질이 벗겨지지 않은 쪽마늘을 숙성함
4	Garlic, SAC	1	1	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2008-0074473 항산화 기능과 항암활성을 가진 수용성 알릴황화합물이 강화된 발효숙성 흑마늘 제조 방법 	

5	Garlic, pediococcus	0	0		
6	Garlic, lactobacillus	0	0		
7	마늘, lactobacillus	7	0		
8	마늘, pediococcus	0	0		
9	마늘, 효소	76	11	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2008-0107162 효소를 이용한 숙성흑마늘의 제조방법 2. 2008-0082896 숙성마늘의 제조 방법 및 이를 함유하는 식품용 조성물 3. 2008-0074473 항산화 기능과 항암활성을 가진 수용성 알릴황화합물이 강화된 발효숙성 흑마늘 제조 방법 4. 2008-0046830 바실러스 속 미생물을 이용하여 배양한 흑마늘 발효액을 함유하는 화장료 조성물 5. 2007-0114418 올리고당 마늘의 제조방법 6. 2007-0108340 마늘식초의 제조 방법 7. 2007-0011940 마늘을 주제로 한 건강식품의 제조 방법 8. 2006-0049360 마늘 발효 식용유 및 제조 방법 9. 2005-0045479 효소 처리를 통한 투명 마늘액 추출 방법 10. 2002-0003159 효소 분해를 이용한 무취 마늘분말 제조방법 11. 1998-0036244 마늘성분 중 티오설피네이 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 천연효소를 이용하여, 37-39.5℃, 5일 반응한 마늘발효 5. 마늘열탕처리 100℃ (효소불활화, 조직개선 목적) 올리고당을 마늘에 첨가함 6. 마늘과쇄액, 당, 효모 첨가하여 알콜 발효후, 초산균 접종하여, 20℃, 40일 저온 숙성한 마늘 식초 제조 7. 효소처리 후 초음파 추출 8. 마늘을 건조 후, 식용 유지 침지시켜 발효 숙성함 9. 섬유질 가수분해 효소를 이용한 투명 마늘액 추출 효소: 에코나아제 씨이, 비스코자임 엘, 평가밀 엘 10. 아밀라아제, 셀룰라아제 사용 자극성 냄새 제거(fructosan : 마늘의 fructose 화합물) 11. 마늘 성분중 티오설피네이류의 구조식에 특허를 걸음, 압관련 : 단백질 전이 효소 억제

				트류의 하네실 및 제라닐제라닐 단백질 전이효소 억제제로서의 용도	
10	마늘, enzyme	2	2	1. 2008-0107102 효소를 이용한 숙성흑마늘의 제조 방법 2. 2005-0045479 효소 처리를 통한 투명 마늘액 추출 방법	
11	Garlic, enzyme	2	2	1. 2008-0107102 효소를 이용한 숙성흑마늘의 제조 방법 2. 2005-0045479 효소 처리를 통한 투명 마늘액 추출 방법	
12	Garlic, 효소	13	7	1. 2008-0107102 효소를 이용한 숙성흑마늘의 제조 방법 2. 2008-0082896 숙성마늘의 제조방법 및 이를 함유하는 식품용 조성물 3. 2008-0074473 항산화 기능과 항암활성을 가진 수용성 알릴황화합물이 강화된 발효숙성 흑마늘 제조방법 4. 2007-0114418 올리고당 마늘의 제조방법 5. 2007-0108340 마늘식초의 제조방법 6. 2006-0049360 마늘 발효 식용유 및 제조방법 7. 2005-0045479 효소 처리를 통한 투명 마늘액 추출방법	
13	Garlic	236	26	1. 2009-0005678 흑마늘의 숙성 및 제조방법 2. 2009-0109560 숙성발효마늘의 제조방법 3. 2008-0107162 효소를 이용한 숙성마늘의 제조방법 4. 2008-0103186	1. 수증기 증자 숙성 2. 생마늘 숯불 가열 후, 상온숙성, 저온 숙성 반복 7. 마이크로 웨이브 처리 후, 3-4일 숙성 10. 단순 장치 12. 메타톡신과 마늘유를 합쳐서 알코올성 지방간 및 지방간 간염 치료제를 만듦 14. 수증기로 증숙하여 흑마늘을 제조함

			<p>발효숙성 흑마늘 제조방법</p> <p>5. 2008-0097689 발효 흑마늘 제조방법</p> <p>6. 2008-0096307 천연 산야초 발효 흑마늘, 그 제조방법, 및 그것을 포 함하는 건강식품</p> <p>7. 2008-0096092 숙성 단마늘 숙성 제조법</p> <p>8. 2008-0082945 흑마늘 발효물의 제조방법 및 그 조성물</p> <p>9. 2008-0082896 숙성마늘의 제조방법 및 이 를 함유하는 식품용 조성물</p> <p>10. 2008-0082499 숙성 마늘 제조 장치</p> <p>11. 2008-0074473 항산화 기능과 항암활성을 가진 수용성 알릴황화합물 이 강화된 발효숙성 흑마늘 제조방법</p> <p>12. 2008-0049416 메타독신 및 마늘유를 유효 성분으로 함유하는 알코올 성지방간 및 치료용 약학 조성물</p> <p>13. 2007-0114418 올리고당 마늘의 제조방법</p> <p>14. 2007-0078754 증숙으로 숙성 마늘을 제 조하는 방법</p> <p>15. 2006-0049360 마늘 발효 식용유 및 제조 방법</p> <p>16. 2005-0103261 자연발효에 의한 강장효과 를 갖는 무취의 기능성 마 늘발효음료 및 그 제법</p> <p>17. 2005-0100472 피부주름 개선 및 탄력 증 진용 피부 외용제 조성물</p> <p>18. 2005-0010171</p>	<p>16. 설탕, 과당, 올리고당, 마늘을 섞어, 25 일 동안 자연 발효함</p> <p>17. 피부주름 개선, 피부탄력 증진, 피부외 용제 알리신</p> <p>18. 마늘을 식용류에 담근 후, 1개월 이상 숙성</p> <p>19. 마늘이 숙취해소제의 한 성분임</p> <p>20. 알린나아제를 불활성화 시켜 항진균 천연 보존료를 만듦</p> <p>21. 마늘 함유한 합성종합 영양식 제조</p> <p>22. 미생물제제의 동결보존제로 마늘과쇄액 을 사용함(가능균 : 락토바실러스 플라 타룸, 락토바실러스 말타로미쿠스, 루코 노스톡 멘센터리쿠스)</p> <p>23. 취제거한 마늘을 화장품에 적용</p> <p>24. 마늘 분리 알리신 포함한 추출물의 전 립선 암, 방광암 예방</p> <p>25. 마늘과 라이코펜을 섞은 과콜레스테롤 제제</p> <p>26. 비페닐디메틸 디카복실레이트 (PMC)와 마늘유를 포함한 간질환치료 및 예방 제제</p>
--	--	--	--	---

			<p>마늘발효식용유</p> <p>19. 2004-0100010 숙취의 예방 및 해소에 효과 과적인 건강보조 식품</p> <p>20. 2004-0095413 가열된 마늘 추출액을 함유 하는 항진균용 천연 보존료</p> <p>21. 2004-0009999 발효마늘로 숙성된 합성중 합 영양식과 이의 제조방법</p> <p>22. 2002-0019995 마늘과쇄액을 이용한 젓산 균을 함유하는 김치발효미 생물체제 및 김치 조성물</p> <p>23. 2002-0019716 피부노화 억제 효과를 갖는 무취 마늘 추출물 및/ 또는 가시오갈피추출물을 함유하 는 화장료 조성물 및 그의 제조방법</p> <p>24. 2001-0095853 마늘추출물의 진립선암 및 방광암 예방 및 치료제로서 의 용도</p> <p>25. 2001-0024883 엘디엘 산화를 억제시키기 위한 마늘과 라이코펜의 상 승작용성 혼합물</p> <p>26. 1995-0010883 간질환 치료 및 예방용 의 약 조성물</p>	
--	--	--	---	--

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽, 한국
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), NDSL(www.ndsl.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		fermented, garlic	hepatoprotective, garlic
검색건수		168	26
유효논문건수		11	11
핵심논문 및 관련성	논문명	Inhibitory activity of garlic fermented by pediococcus pentosaceus KACC91419 against antibiotic-resistant pathogens	Hepatoprotective effect of aged black garlic on chronic alcohol-induced liver injury in rats
	학술지명	Asian-Aust. J. Anim. Sci	Journal of Medicinal food
	저자	J. S. Ham et al	M. H. Kim et al
	게재년도	2010	2010
	관련성(%)	50%	30%
	유사점	마늘 배지로 유산균을 배양한다는 점	에탄올 독성유발 모델에서 간기능개선 실험과정
차이점	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 균주로 배양시에 항균활성이 뛰어나며. 본 과제의 연구와 활성평가의 목적과 균주가 다름. 본 과제는 공정관리, 품질관리의 지표성분을 선정하였음	숙성흑마늘을 시료로 간개선효능을 확인하였음. 숙성흑마늘은 발효와는 다른 공정임. 숙성은 미생물에 의한 작용이 없이 온도, 습도만으로 제조하는 것임	

기능성관련자료

- (1) 기능성 내용 : 간 기능
- (2) 기능성자료 (단위 : 개수)

총 제출자료	검토자료	자료				기타자료
		human	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	참고자료	
6	2	1	5	-	-	

가. *In vivo* 에서의 간 기능개선관련 논문 - 1

학술지명	Journal of Medicinal Food					
	vol	14	게재연도	2011	페이지	732-738
논문제목	Hepatoprotective effect of aged black garlic on chronic alcohol-induced liver injury in rats					
실험목적	흑마늘의 이용하여 알코올성 간손상에 미치는 효과 확인					
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문					
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>					
시험물질	흑마늘 추출물 100mg/kg을 경구투여					
시험설계	S/D rats을 이용하였으며 정상대조군(식리염수투여군; 15mL 생리식염수 / kg), 음성대조군(에탄올투여군; 15mL of 20% Ethano)/kg), 샘플투여군(흑마늘 100mg + 15mL of 20% Ethanol) 정상대조군(n=5), 음성대조군(n=7), 샘플투여군(n=7)					
	물질명			측정방법		
지표물질	-			-		
바이오마커	Hepatotoxicity →AST, ALT, ALP, LDH			Enzyme assay kit(Asia pharmaceuticals)		
	Histopathological changes in liver			microscope		
	CYP2E1, GST and QR activities					
	TBARS			colorimetric methods(at 533)		
	Acitivities of the antioxidative enzymes glutathione peroxidase					
통계처리	Duncan's multiple range test					
시험결과	<p>-AST, ALT, ALP, LDH → 음성대조군(에탄올투여군)과 비교하였을 때 수치가 유의적으로 낮았으며 정상대조군(물투여군)과 유의적차이를 보이지 않음($P<0.05$).</p> <p>-Histopathological change → 음성대조군(에탄올투여군)에서 간에 지방이 축적되는 것으로 나타났으나 샘플투여군에서 지방이 줄어들음.</p> <p>-CYPE1, GST and QR activities2 → CYP2E1의 경우 정상대조군과 비교하였을 때 음성대조군에서 유의적으로 증가하였으나 샘플투여군의 경우 유의적 차이를 나타내지 않았으며 GST와 QR 활성의 경우 음성대조군에서 유의적으로 감소하였으나 샘플투여군에서는 정상대조군과 유의적 차이가 없었음.</p> <p>-TBARS in the plasma, liver, heart → 혈장, 간, 심장중의 TBARS 측정결과 정상대조군과 샘플투여군의 유의적 차이가 없었으며 음성대조군의 경우 유의적으로 높음.</p> <p>-Acitivities of the antioxidative enzymes glutathione peroxidase →GSH-Px, CAT, GR의 경우 정상대조군과 샘플투여군의 유의적 차이가 없었으나 음성대조군의 경우 유의적으로 낮았다. *GSH-Px: glutathione peroxidase, CAT: catalase, GR: glutathione reductase</p>					
결론	지방간 생성을 억제하고 간손상관련 효소활성을 억제하였으며 강한 항산화 효과를 나타내었다. 이는 알코올성 간손상에 효과적인 소재일 것이다.					
Comment						

가. *In vivo* 에서의 간 기능개선관련 논문 - 2

학술지명	Journal of Life Science					
	vol	20	게재연도	2010	페이지	225-230
논문제목	Effects of aged black garlic extract on ethanol induced hangover in rats					
실험목적	흑마늘의 이용하여 숙취에 미치는 효과 확인					
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문					
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>					
시험물질	흑마늘 추출물 130, 260mg/kg을 경구투여					
시험설계	1. S/D rats을 이용하였으며 40%에탄올을 5g/kg의 수준으로 1회 경구투여 후 30분 후 시료 경구투여 2. 시료 투여전 30분에 40%에탄올을 5g/kg의 수준으로 투여 에탄올투여군(n=7), 130mg/kg투여군(n=7), 260mg/kg투여군(n=7)					
	물질명			측정방법		
지표물질	-			-		
바이오마커	혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도			시판 분석 kit		
	간조직중 알코올 대사효소 활성 측정 →ALDH, NADH, 단백질 함량			Bergmeyer 방법으로 측정 Koivula & Koivusalo방법으로 측정		
	혈청 중 간기능지표효소활성 측정 →ALT, AST			시판 분석 kit이용		
통계처리	Duncan's multiple range test					
시험결과	<p>-혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도 → 시료섭취군에서 일정한 수준으로 알코올 함량이 감소($P<0.05$). → 시료섭취군에서 농도의존적으로 아세트알데하이드 농도 감소($P<0.05$).</p> <p>-간조직중 알코올 대사효소 활성 측정 → ADH활성은 대조군과 시료투여군과 유의적차이를 나타내지 않았으나 시료투여군이 약간 증가함. → ALDH활성은 tlfyxndurnsd서 농도의존적으로 유의적으로 증가함.</p> <p>-혈청 중 간기능지표효소활성 → 대조군과 시료투여군에서 전반적으로 감소하는 경향을 나타냈으나 유의적 차이를 나타내지 않음.</p>					
결론	알코올투여전후 시료투여하였을때 비슷한 경향을 나타냈으며 ADH활성은 정상군과 시료투여군 모두 큰 변화를 나타내지 않았으나 ALDH의 활성은 약간의 차이를 확인할 수 있다.					
Comment						

가. *In vivo* 에서의 간 기능개선관련 논문 - 3

학술지명	Journal of the Science of Food Agriculture					
	vol	88	게재연도	2008	페이지	2238-2243
논문제목	The protective effects of garlic oil on acute ethanol-induced oxidative stress in the liver of mice					
실험목적	마늘에서추출한 오일의 알코올성 간손상에 영향 및 기작에 대한 연구					
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문					
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>					
시험물질	GO(마늘오일) 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg					
시험설계	정상대조군, 음성대조군(12mL of 50%ethanol/kg), 샘플투여군(GO) + 12mL of 50% ethanol/kg) each group; n=15					
	물질명			측정방법		
지표물질	-			-		
바이오마커	ALT, AST, TG			commercial assay kit		
	Hepatic MDA, GSH			spectrophotometrically analysis using commercial assay kit		
	Hepatic antioxidant enzyme			commercial assay kit		
	Histopathological examination			microscope		
통계처리	Fisher's least significant difference method					
시험결과	<p>- ALT, AST, TG → GO투여군이 농도의존적으로 수치가 떨어짐. 200mg/kg투여시 정상대조군 수준으로 떨어짐.</p> <p>- Hepatic MDA, GSH → GO 투여시 농도의존적으로 MDA가 떨어졌으며, GSH는 증가함. → GO 100mg/kg, 200mg/kg으로 투여하였을 경우 MDA는 정상대조군 수준으로 떨어짐.</p> <p>- Hepatic antioxidant enzyme →SOD와 GR활성이 농도의존적으로 증가함.</p> <p>-Histopathological examination → GO 200mg/kg투여군에서 지방간이 정상대조군 수준으로 적음.</p>					
결론	GO는 항산화활성을 나타내어 알코올성 간손상을 보호하는 효과가 있을 것으로 판단됨.					
Comment						

가. *In vivo* 에서의 간 기능개선관련 논문 - 4

학술지명	Chemico-Biological Interactions					
	vol	176	게재연도	2008	페이지	234-242
논문제목	The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethnaol exposed mice					
실험목적	마늘에서 추출한 오일의 알코올성 간손상에 영향 및 기작에 대한 연구					
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문					
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>					
시험물질	GO(마늘오일) 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg					
시험설계	정상대조군, 음성대조군, 샘플투여군(GO)로 나누어 시료를 경구투여하고 2시간경과 후 에탄올 경구투여하고 간손상관련 지표 분석 차폴리페놀 및 실리마린과 비교분석					
	물질명			측정방법		
지표물질	-			-		
바이오마커	간지표, serum & hepatic TG			시판 분석 kit		
	Hepatic lipid peroxidation			TBARS, MDA level, 시판 분석 kit		
	Hepatic GSH, GR, SOD, GSH-Px, GST			시판 분석 kit		
	Histological examination			시판 분석 kit		
통계처리	Rank sum test($P<0.05$)					
시험결과	<p>- 간지표, serum & hepatic TG → GO투여군이 농도 의존적으로 serum TG 및 hepatic TG 수치가 떨어짐. ($P<0.01$)</p> <p>- Hepatic lipid peroxidation → GO투여군이 농도 의존적으로 MDA level이 떨어짐. ($P<0.01$)</p> <p>- Hepatic GSH, GR, SOD, GSH-Px, GST → GSH, GR, GST는 농도 의존적으로 감소함($P<0.01$) → SOD의 경우 100mg/kg, 200mg/kg에서 유의적으로 활성이 좋아짐 ($P<0.01$).</p> <p>-Histopathological examination → GO 투여군에서 지방간이 감소함.</p>					
결론	GO는 알코올섭취에 따른 지방간 축적을 억제한다.					
Comment						

학술지명	Journal of Environmental Health Science				
	vol	36	게재연도	2010	페이지
논문제목	마늘 추출물이 간 손상 랫드의 조직학적 변화에 미치는 영향				
실험목적	마늘열수추출물을 이용한 간손상 방지 효과에 대한 연구				
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문				
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>				
시험물질	마늘 열수 추출물(ASE)				
시험설계	정상군과 CCl ₄ 로 간손상을 일으킨 음성 대조군(식염수), 양성대조군(실리마린) 샘플투여군(ASE 0.30, 0.35, 0.70, 1.40g/kg/day)로 나누어 각각의 시료를 경구 투여하고 간기능 관련 지표를 측정				
	물질명		측정방법		
지표물질	-		-		
바이오마커	유해산소 효소활성 및 지질 과산화 함량 측정		XO, SOD, CAT, TBARS 측정		
	조직학적 관찰		H&E염색후 관찰, Masson's trichrome staining 관찰		
	전자현미경 관찰		-		
통계처리	Duncan's multiple range test ($P<0.05$)				
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> - 유해산소 효소활성 및 지질 과산화 함량 → 마늘추출물 투여군에서 음성대조군에 비하여 Xanthine oxidase, TBARS 활성이 유의적으로 감소함($P<0.05$) → Catalase 활성은 마늘추출물 투여군에서 음성대조군에 비하여 유의적으로 증가함($P<0.05$) - 조직학적관찰 → 마늘추출물 투여군에서 대조군에 비하여 간손상 회복되는 양상을 나타냄 - 전자현미경관찰 → 마늘추출물 투여군에서 모두 정상구조에 가까우며 미토콘드리아는 부종이 있었으나 정상군에 가까움. 				
결론	마늘추출물을 섭취함으로써 간기능 개선시켜 간질환 진행을 억제시키는 것으로 생각됨.				
Comment					

가. *In vivo* 에서의 간 기능개선관련 논문 - 6

학술지명	Chemico-Biological Interactions					
	vol	17	게재연도	2009	페이지	227-233
논문제목	Prevention of arsenic-induced hepatic apoptosis by concomitant administration of garlic extracts in mice					
실험목적	마늘추출물을 이용한 간손상 방지 효과에 대한 연구					
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문					
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>					
시험물질	마늘 추출물					
시험설계	정상군, 양성대조군(마늘추출물 500mg/kg투여), 음성대조군(비소 2.5mg/kg투여), 샘플투여군 1 (비소 2.5mg/kg + 마늘추출물 250mg), 샘플투여군 2 (비소 2.5mg/kg + 마늘추출물 500mg)으로 나누어 간기능관련 지표 분석 (n=5)					
	물질명				측정방법	
지표물질	-				-	
바이오마커	ROS & MMP(mitochondrial membrane potential)					
	ATP & Caspase 3 levels					
	G6PDH(Liver glucose-6-phosphate dehydrogenase)					
	SOD & Catalase					
	TBARS & GPx					
	ALT & AST					
통계처리	ANOVA, Student's <i>t</i> -test					
시험결과	<p>- ROS & MMP → 마늘추출물을 500mg/kg 투여하였을 때 ROS는 정상수준으로 떨어졌으며, MMP는 정상군과 양성대조군 수준으로 상승함. ($P<0.05$)</p> <p>- ATP & Caspase 3 & G6PDH levels → 마늘추출물을 500mg/kg 투여하였을 때 ATP와 G6PDH level이 정상군과 양성대조군 수준으로 상승하였으며, Caspase 3의 경우 정상군과 양성대조군 수준으로 떨어짐($P<0.05$).</p> <p>- SOD & Catalase → SOD의 경우 마늘추출물을 투여하였을 때 농도 의존적으로 상승하였으며 catalase의 경우 유의적 차이가 나타나지 않음.</p> <p>- TBARS & GPx → TBARS의 경우 마늘추출물을 500mg/kg으로 투여하였을 때 정상군과 양성대조군 수준으로 떨어졌으며($P<0.05$) GPx의 경우 농도 의존적으로 상승함.</p> <p>- ALT & AST → 마늘추출물을 500mg/kg 투여하였을 때 AST와 ALT가 정상군과 양성대조군 수준으로 상승함($P<0.05$)</p>					
결론	마늘추출물을 섭취하였을 때 강한 항산화효과를 나타냈으며 간손상에 효과적인 것으로 타남.					
Comment						

학술지명	Indian journal of Experimental Biology					
	vol	49	게재연도	2011	페이지	498-510
논문제목	Protective effect of aqueous garlic extract against lead-induced hepatic injury in rats					
실험목적	마늘열수추출물을 이용한 간손상 방지 효과에 대한 연구					
논문형태	■ 연구결과, □ 총설, □ 단문					
실험설계	□ 인체시험, ■ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>					
시험물질	마늘 추출물(AGE)					
시험설계	정상군, 음성대조군(납 15mg/kg 투여군), 양성대조군(마늘추출물 50mg/kg투여군) 샘플투여군(납 15mg/kg + 마늘추출물 50mg/kg투여군)					
	물질명			측정방법		
지표물질	-			-		
바이오마커	간손상 마커			Serum GPT, ALP, bilirubin		
	산화적 스트레스 마커			Lipid peroxidation level, GSH content		
	항산화 효소활성			SOD, Catalase		
통계처리	Student's <i>t</i> -test ($P < 0.01$)					
시험결과	<p>- 간손상 마커</p> <p>→ GPT, ALP, Bilirubin의 지표가 AGE를 경구 투여하였을 때 정상군과 유의적 차이가 없었으며 납만 경구 투여하였을 때 유의적으로 증가함. AGE와 납을 같이 투여하였을 때 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소 함.</p> <p>- 산화적스트레스 마커</p> <p>→ LPO 및 GSH가 AGE를 경구 투여하였을 때 정상군과 유의적 차이가 없었으며 납만 투여하였을 때 유의적으로 증가함. LPO의 경우 납과 AGE를 경구 투여하였을 때 유의적으로 감소하였으나 GSH의 경우 동시에 경구 투여하였을 때 오히려 더 증가하는 것으로 나타남.</p> <p>- 항산화 효소활성</p> <p>→ SOD의 경우 납을 경구 투여하였을 때 정상군에 비하여 떨어지는 것으로 나타났으며 AGE와 동시에 경구 투여하였을 때 유의적으로 증가하는 것으로 나타남. Catalase의 경우 납을 경구 투여하였을 때 정상군에 비하여 증가하는 것으로 나타났으며 AGE와 동시에 경구 투여하였을 때 유의적으로 감소함.</p>					
결론	마늘추출물을 섭취함으로써 산화적스트레스에 인한 간손상에 도움을 줄 것으로 판단된다.					
Comment						

나. 인체시험이용 알코올성 간기능 개선 관련 논문 - 1

학술지명		Jordan Journal of Biological Sciences				
		vol	3	게재연도	2010	페이지
논문제목		Curative effect of garlic on alcoholic liver diseased patient				
실험목적		마늘의 알코올성 간질환에 미치는 효과 연구				
논문형태		■ 연구결과, □ 총설, □ 단문				
실험설계		■ 인체시험, □ <i>in vivo</i> , □ <i>in vitro</i>				
시험물질		생마늘				
시험설계	디자인	non-RCT			섭취기간: 45일	
	대조군	placebo	-			
		positive	-			
		negative	알코올성 간질환자에 마늘섭취			
시험군	알코올성 간질환자에 마늘(2.4g)섭취					
		물질명	측정방법			
지표물질		-	-			
바이오마커		AST, ALT, ALP, GGT, LDH	마늘을 섭취하였을 때 섭취하기전보다 간기능관련 효소 수치가 유의적으로 낮아짐.($P<0.05$)			
		TBARS, SOD, CAT, GPx	마늘을 섭취하였을 때 섭취하기전보다 TBARS가 유의적으로 떨어졌으며 SOD, CAT, GPx는 유의적으로 높아짐.($P<0.05$)			
통계처리		Duncan's multiple rage test				
시험결과		-AST, ALT, ALT, GGT, LDH →마늘을 섭취하였을 때 섭취하기전보다 간기능관련 효소 수치가 유의적으로 낮아짐.($P<0.05$) -TBARS, SOD, CAT, GPx →마늘을 섭취하였을 때 섭취하기전보다 TBARS가 유의적으로 떨어졌으며 SOD, CAT, GPx는 유의적으로 높아짐.($P<0.05$)				
결론		마늘은 항산화효과를 나타내어 알코올성 간손상에 효과가 있을 것으로 판단됨.				
Comment		동일소재는 아니나 마늘의 유용성을 알 수 있음				

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황







1) 국내 제품생산 및 시장 현황: 자체 시장조사자료




사진	제품명/제조사	함량/용법	용량/가격
	천호 통마늘진액100 프리미엄 천호식품	식품유형 : 액상차(다류식품) 마늘추출액(brix 16%이상) 100% 한팩 속에 12쪽의 마늘 함유 특허공법	80ml X 60팩 87,000원
	천호 통마늘진액 환 천호식품	식품유형 : 기타가공식품 가압마늘분말 67%, 마늘농축액 33% 가압처리공정으로 맛과 냄새 개선	4g X 60포 38,000원
	함께 먹어 더 좋은 마늘홍삼 천호식품	식품유형 : 액상차 마늘추출액 (Brix 5%이상,) 84.5%, 사과농축액(Brix 65% 이상), 유기농아가베시럽, 홍삼농축액 (고형분 60% 이상) 1.5%	80ml X 60팩 98,000원
	굿베이스 홍삼담은 자연 흑마늘 한국인삼공사	홍삼농축액(6년근), 말토덱스트린시럽, 흑마늘농축액 5.0%, 벌꿀(국산), 아가베시럽, 농축액(구기자, 복분자, 황기, 오미자, 녹용), 영지버섯추출분말, 홍삼농축액과 흑마늘농축액을 같이 섭취할 수 있는 제품 특허공법	50ml X 30포 57,000원
	폴비타 흑마늘 진 풀무원	흑마늘혼합추출액 (고형분 9%, 흑마늘 19.6%, 구기자 0.4%,(이상국산)92%, 배농축과즙(고형분 59%), 아가베시럽, 프락토올리고당 남해산 마늘을 구기자와 추출한 진한 흑마늘 음료 제품	80ml X 30포 54,000원

2) 국외 제품생산 및 시장 현황: 자체 시장조사 자료

사진	제품명/제조사	함량/용법	용량/가격
	ニンニクの力 (마늘의 힘) 하우스식품	- 고농축 마늘추출물(알린 함유) 100mg, 비타민B1 5 mg - 무취가공 마늘을 사용하여 마늘의 독특한 냄새와 쓴맛을 억제 - 생마늘 약5g(약1쪽)분의 추출물 섭취가능 - 원재료 : 사과식이섬유, 마늘추출물 , 생강추출물, 비타민B1 - 1일 2병 이하 섭취	100ml ¥200
	國産にんにくエキス (국산마늘추출물) 오리히로(주)	- 아오모리(青森)산 마늘을 독자적인 무취화 처리로 특유의 냄새를 제거 - 피로회복에 중요한 비타민B1의 흡수를 돕는 작용 - 영양성분 : 비타민B1 2mg, 무취화마늘추출물 350mg , *생마늘로써 7g 상당 - 1일 4정 섭취	30g (250mg X 120정) ¥1,680
	元氣なマカ& ニンニク (건강한 마카&마늘) 이토엔	- ‘안데스의 여왕’이라고도 불리는 페루산 허브 마카와 스테미너 보급원으로써 예전부터 즐겨 섭취한 마늘을 동시에 섭취할 수 있습니다. - 주요성분: 마카추출분말 50mg, 마늘추출분말 120mg , 비타민B1 5mg - 1일 1정 섭취	20정 ¥943
	ニンニクエキス (마늘추출물) 야마모토한방제약	- 무취마늘추출물분말 에 비타민B1을 플러스 - 생마늘 2쪽(약 4g)분의 영양 섭취가능 - 보건기능식품 (영양기능식품 : 비타민B1) - 1일 12정	70g (250mg X 280정) ¥1,575
	NINNIKU+ (마늘 플러스) HOMEOSTYLE	- 무취마늘 배합 - 피로회복에 중요한 비타민B1의 흡수를 돕는 작용 - 내용성분: 에조오갈피추출물분말, 옥수수단백, 무취마늘분말 , 비타민C, 비타민B1, 비타민B2, 비타민B6, 엽산, 비타민A - 1일 3회, 2정씩	168정 (6정/일 X 28일분) ¥3,000
	POWER SATIVUMIN U (주)피에스	- 무취마늘추출물 186mg , 비타민B1 0.95mg, 비타민B2 3.42mg, 비타민C 12.6mg (9g 당) - 원재료: 사티바밍복합체(무취마늘영양성분) , 난각칼슘, 비타민C, 비타민B1, 비타민B2 - 1일 3포	270g (3g X 90포) ¥4,800
	Odor Control Garlic Nature Made	- Concentrated from whole garlic - May help lower blood cholesterol levels - Contains 1,250mg of concentrated garlic bulb per serving	300 Tablets \$23.99
	Mega Garlic Plus	- helps support healthy circulation and a healthy heart	30 Tablets

	<p>HERBALIFE</p>	<ul style="list-style-type: none"> - enteric-coated for absorption - 1 Tablet = 1 Clove - Supplement Facts : Vitamin C (as ascorbic acid) 70mg, Calcium (as dicalcium phosphate), Phosphorus (as dicalcium phosphate) 34mg, Garlic Powder (clove) 600mg - 1일 1tablet 	<p>\$13.81</p>
	<p>GarliChol Planetary Herbals</p>	<ul style="list-style-type: none"> - supports normal cholesterol levels - patented “no heat” process which protects the valuable compound allicin - The enteric-coating process further insures that the allicin potential is not destroyed by stomach acid - Supplement Facts (for 650mg) Garlic Clove Yielding : 650mg, Allicin 6mg, Thiosulfinates 6mg, gamma-glutamylcysteines 5.2mg, Sulfur 4.2mg 	<p>100 Tablets \$19.98</p>
	<p>Garlicin® Nature’s way</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Exceeds clinically proven allicin release potency - 100% stomach acid protection - Using the SmartRelease® tableting à Rapid intestinal release - Enteric-coating technology à Odor-free Garlic - Ingredients Garlic powder (bulb) releasing 3,200mcg allicin 350mg - 1일 2회, 1 tablet 	<p>300 Tablets \$23.99</p>
	<p>Garlicin® HC Nature’s way</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Combines the effectiveness of Garlicin® with the added benefits of Hawthorn extract, Cayenne and Vitamine E - Ingredients Garlic powder (bulb) releasing 2,800mcg allicin 310mg Hawthorn extract (top branches w/flowers) 25mg Cayenne Pepper (fruit) 15mg Rutin 12mg - 1일 2회, 1 tablet 	<p>90 Tablets \$16.49</p>
	<p>Garlicin® CF Nature’s way</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Combines all the healthy benefits of Garlicin® with the added benefits of Echinacea, Vitamin-C and OptiZinc® - Ingredients Garlic powder (bulb) releasing 960mcg allicin 105mg Echinacea purpurea (stem, leaf, flower) 205mg Bioflavonoid complex (from citrus fruits) 15mg Zinc (as OptizincR) 5mg 1일 3회, 1 tablet 	<p>100 Tablets \$19.98</p>
	<p>Garlic&Parsley Source Naturals</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tasteless and Odorless • contains true oils of garlic and parsley seed, extracted from whole fresh garlic bulb and parsley 	<p>100 softgels \$6.50</p>

		<p>seed, and suspended in pure soybean oil</p> <ul style="list-style-type: none"> • Supplement Facts for Softgels (serving size : 2 softgels) <p>Garlic Oil (equivalent to 500 mg of fresh garlic) 10 mg</p> <p>Parsley Seed Oil (equivalent to 100 mg of fresh parsley) 400 mcg</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1~2 softgels 	
	<p>Garlic Oil Source Naturals</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tasteless and Odorless • contains true oil of garlic extracted from whole fresh garlic bulb, and suspended in pure soybean oil • Supplement Facts for Softgels (serving size : 1 softgel) <p>Garlic Oil (from 500 mg raw garlic) 0.2 mg</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1~2 softgels 	<p>100 softgels \$6.50</p>
	<p>Wellness GarliCell™ Source Naturals</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Garlic with No After-Odor • The proprietary enteric-coating process protects the potential of allicin, garlic's main active component, until it reaches the small intestine, where it is released and immediately absorbed • Supplement Facts for 6,000 mcg Tablet (serving size : 1 Tablet) <p>Garlic Clove Yielding 650 mg Allicin 6mg</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1 tablet 	<p>180 Tablets \$32.98</p>
	<p>Garlic Parsley SOLGAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Contains breath-freshening Parsley and the plant nutrient Chlorophyll • Supplement Facts (serving size : 2 tablets) <p>Calcium (as dicalcium phosphate) 160 mg</p> <p>Dehydrated Garlic Powder 260 mg</p> <p>Dehydrated Parsley Powder 260 mcg</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 3회, 2 tablets 	<p>250 Tablets \$14.97</p>
	<p>MaxGar™ Garlic SOLGAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Odor controlled • Supplement Facts (serving size : 1 softgel) <p>Garlic Oil Macerate 280 mg (as 2.4:1 concentrate, equivalent to 672 mg fresh garlic)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 2회, 1 softgel 	<p>90 softgels \$14.5</p>
	<p>Organic Garlic 500mg SOLGAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Vegetable capsules à Suitable for vegetarians • Supplement Facts (serving size : 1 Vegetable Capsule) <p>Certified Organic Garlic Powder 500 mg</p> <p>Alliin Yield 750 mcg, Thiosulfinates 800 mcg, Allin 5000 mcg, Gamma-glutamylcysteines 8000 mcg</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1~2 capsules 	<p>90 capsules \$14.00</p>
	<p>GarliPure® 500mg</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Odor controlled • Supplement Facts (serving size : 2 capsules) <p>Pur-Gar® Garlic Extract (Allium sativum) (bulb) 1 g</p> <p>Gamma glutamylcysteines 15,000 mcg, Aliin 10,000</p>	<p>200 Tablets \$21.99</p>

	<p>NATROL</p>	<p>mcg, Sulfur 8,000 mcg, Thiosulfinates 1,600 mcg, Allicin Yield 1,500 mcg</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 2회, 2 capsules 	
	<p>GarliPure® NATROL</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Maximum Allicin Formula • Odor controlled • Supplement Facts (serving size : 1 caplet) <p>Garlic (Allium sativum) Powdered extract (bulb) 600mg</p> <p>Gamma glutamylcysteines 12,000 mcg, Aliin 4,800 mcg, Sulfur 3,900 mcg, Thiosulfinates 3,800 mcg, Allicin Yield 3,600 mcg</p> <p>1일 2회, 1 caplet</p>	<p>100 capsules \$19.49</p>
	<p>Garlicforce™ NEWCHAPTER</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Supplement Facts (serving size : 1 softgel) <p>Garlic (bulb) hydroethanolic extract (min. 0.3 mg cycteine compounds) 160 mg, Garlic (bulb) supercritical extract (min. 1.6 mg sulphur containing compounds) 80 mg, Supercritical Herbal Extract Blend 22 mg</p> <p>Parsley (seed); Caraway (seed); Cardamom (seed); Clove (bud); Fennel (seed); Ginger (rhizome); Peppermint (leaf)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1일 1 softgel 	<p>30 softgels \$31.95</p>

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 제품의 특징

- 색상 : 갈색의 농축액
- 고형분 : 60% 이상
- 기능성 : 간기능 개선에 도움을 줄 수 있음

○ 국내

- 현재 마늘을 비롯하여 천연물이나 특용작물의 기능성을 표방한 제품들은 대부분 과학적 검증 없이 한방의 문헌과 구전으로 내려오는 **민간요법**에 의해 일반인에게 소비되는 경우가 다수임
- 또한 천연물에 대한 다양한 연구는 되었지만 사업체에 이용하기에 중요한 요건이 되는 생산성, 수율, 소재적성, 기호성, 제형 등이 고려되지 않은 연구가 대부분임
- 현재까지 수행된 대부분의 효능평가는 항암, 항산화, 항당뇨 등의 분야가 중점적으로 연구되었으며 간기능을 개선하는 효능평가는 미비하였음

- 따라서 국내·외적으로 다양한 기능이 알려져 있고 우리 고유의 농특산물인 마늘을 이용하여 기호성이 향상된 발효마늘제조공정을 개발한 후 체계적이고 과학적인 기법으로 기능을 입증하고 인체적용시험을 거쳐 개별인정형 기능성원료로 인정을 받을 경우 **마늘에 대한 인지도와 선호도가 높아 홍삼과 같이 글로벌 기능성식품으로 창출될 수 있을 것으로** 판단됨
- 또한 2008년도부터 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 **6가지 제형 규제가 해소**됨에 따라 식품업계도 다양한 형태의 고부가가치를 가진 식품을 개발하기 위하여 노력 중에 있음. 대표적인 예로 한국야쿠르트가 기존 유산균 음료에 헛개나무과병의 기능 성분을 연계해 출시한 유산균음료가 큰 성공을 거둔 사례가 있음
- 소재화에 있어 단순히 정제수 혹은 주정을 이용하여 추출하여 제품을 제조할 경우 타 회사의 **me too제품**의 출시로 가격 경쟁력이 없기 때문에 제품개발을 한 업체를 비롯하여 마늘을 생산하는 농가의 수익에도 문제가 될 것임
- 본 연구과제의 유산균마늘발효액은 단순추출이 아닌 유산균발효를 접목하여 기능성분의 함량을 높였으며 **발효에 대한 전문적 기술과 발효조와 같은 설비가 없으면** 제품의 제조가 어렵기 때문에 무분별한 me too제품에 의한 피해는 크지 않을 것으로 판단됨
- 현재 식품에서 미생물 발효 이용 분야는 장류, 주류, 다류, 유가공 식품에 대한 연구가 대부분이며 천연물 자체를 기질로 한 발효는 발효홍삼을 제외하고 미흡한 실정임. 미생물발효는 생물전환에 의한 신규물질의 생산, 발효균주 대사산물의 생산, 기능성 물질의 활성 및 안정성 향상, 원료의 기호성 향상 등을 기대할 수 있어 **천연물을 배지로 이용한 미생물 발효기술**은 앞으로 다양한 건강기능식품 개발에 좋은 모델로 활용될 수 있을 것으로 판단됨
- 따라서 이번 과제를 통하여 *in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험 등으로 발효마늘의 간기능 개선성을 입증한다면 **건강기능식품 업체의 취약점인 국내 천연물을 이용한 건강기능성 식품 소재를 개발** 할 수 있을 것임

○ 국외

- 국외 시장의 진출은 과제 종료 시 1단계로 일본에 소개할 예정임. 일본은 울금 소재가 숙취해소 기능으로 매우 큰 시장을 형성하고 있고, **일본인의 마늘에 대한 높은 인지도와 선호도**를 고려할 때 이 시장의 일부를 대체할 수 있을 것임
- 또한 유산균을 접목시킨 발효마늘은 관능 면에서도 일본에서 판매되고 있는 **무취마늘**과 충분한 경쟁력을 갖고 있음
- 지난 10여년 이상 자사의 원료를 일본에 소개하고 판매하기 위해 거래하고 있는 Riverson, Toa Kasei 상사들과 **공동으로 전시회, 업체 방문** 등을 통해서 일본 시장을 공략할 예정임. 간기능 개선의 인체적용시험자료와 식약청에서 허가받은 인정서가 일본 메이저 회사들의 관심을 일으킬 수 있을 것으로 판단됨.
- 2단계는 일본에서의 반응과 판매현황을 바탕으로 **유럽시장**을 겨냥한 마케팅을 진행할 예정임. 현재 유럽지역의 소재를 수입하기 위해 확보해 놓은 거래선을 이용하여 역으로 제품을 소개하면서 단계적으로 진행할 예정이고, Vitafood 전시회를 적극 활용하여 유럽에 진출할 계획임

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	500	1,000	2,000	5,000	8,600
경제적 파급효과	20	100	200	400	1,000	1,720
부가가치 창출액	10	100	500	1,000	3,000	4,610
합 계	130	700	1,700	3,400	9,000	

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 유산균 배양 시에 마늘 이외의 배지로서 첨가물을 첨가하여 배양하였으나 본 연구과제는 항균활성을 가진 유산균에 적용이 가능한 유산균을 선별함으로써 마늘만을 배지로 적용한 **순 유산균마늘발효액**임
- 마늘에 대한 특허는 주로 흑마늘 제조방법에 대해서 등록되어 있음. 흑마늘을 제조하기 위해서는 고온에서 약 30일간 숙성시켜야 하는 **장기간의 제조공정**이 필요함
- 마늘을 숙성하면 숙성기간에 마늘의 아린 맛을 나타내는 allicin과 그 외의 황화합물이 전환되어서 마늘 그 자체로서의 상품성은 뛰어나지만 건강기능식품에서 규정하는 **제조공정을 표준화**하기가 어려움
- 마늘추출물을 발효할 경우 발효 후 추출물의 형상이 유사하거나 **S-allyl-cysteine** 등 일부 특정성분의 함량이 높은 것을 확인한 바 있음
- 이 연구는 ‘유산균을 이용한 SAC 고함량 마늘 발효물의 제조방법’(등록번호: 10-1091833) 명칭으로 **특허를 출원, 등록**하였음
- 현재 발효물의 상기 특허 이외 S-allyl-cysteine 고함량 발효물의 간기능개선의 효능을 확인한 후 추가 특허를 출원할 예정임

2) 논문분석 측면

- 마늘은 주로 마늘추출물, 흑마늘추출물, 효소처리 마늘추출물 등의 소재로 항암, 항산

화, 간기능 개선 등에 관한 기능성 연구가 수행되었으나 다음의 두 가지 관점에서 본 연구과제와 차이점을 나타내고 있음

- 하나는 **유산균 발효기법**을 도입한 연구가 없는 점임
- 다른 하나는 본 과제에서 목표로 하고 있는 **개별인정형 원료로 인정을 받기 위한 연구**가 없었음. 즉 동일한 소재, 동일한 제조방법에 의해 제조된 시료로 일관된 효능평가 자료가 확보되어야 함에도 유사한 연구결과는 많지만 지표성분, 기능성분, 제법, 시험디자인, 결과처리방법 등의 연구결과가 없었음
- 본 과제를 통해서 유산균마늘발효액의 제조공정에 대한 결과, *in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험에 대한 일관된 결과를 논문으로 발표함은 물론 지표성분으로 가능한 성분을 선정하여 **method validation**을 수행한 분석 관련 연구결과를 발표할 예정임
- 특히 본 연구진은 allin과 allicin의 낮은 안정성으로 인해 *S*-allyl-cysteine를 지표성분으로 하기에는 문제가 있음을 확인한 바 있음. 건강기능식품으로 개발하기 위해서는 기능성분의 확인과 동시에 장기간 동안 유통시에도 유산균마늘발효액이 적당량 함유되어 있는지의 여부를 판정하는 **특이성, 정확성, 정밀성을 구비한 지표성분**을 설정할 예정임

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내외 시장을 분석한 결과 국내에서는 천호식품의 ‘통마늘진액’과 같은 건강식품으로 판매되고 있고, 일본에서는 마늘취를 제거한 무취마늘제품이 판매가 되고 있을 뿐 마늘은 **1 차농산물 또는 단순가공품**(절임, 분말, 탈피 등) 형태로 가공품으로의 개발 및 시장형성이 매우 미흡하다고 볼 수 있음
- 2007년도에 일시적으로 흑마늘 붐이 있었지만, 건강기능식품으로 성장시키기에는 **표준화되기 어려운 제조방법**과 지표성분의 선정, 효능평가의 부족으로 주춤하고 있는 실정임. 이는 흑마늘이 영세한 농가와 벤처기업, 혹은 지역 연구단체에서 주로 개발됨으로써 체계적이고 과학적인 연구가 부족했고, 시장이 확대되지 못한 측면이 있음. 이를 해결하기 위해서는 건강기능식품의 제조, 영업, 마케팅의 능력을 갖추고 있는 업체를 통해서 체계적으로 접근할 필요가 있음
- 국내 2011년도 간기능 개선성 개별인정형 제품은 전체 **개별인정형 제품 중 37%**의 판매를 보임으로써 개별인정형 원료로 인정받은 제품 중에 가장 많이 판매되었고, 원료로는 헛개나무과병추출분말, 제품으로는 한국야쿠르트의 쿠퍼스가 시장을 이끌어 왔음. 이는 간건강에 대한 소비자의 선호도를 확인할 수 있는 명확한 자료로 판단됨
- 간건강의 소재로 마늘은 건강식품으로 누구나 알 수 있는 소재임. 홍삼시장이 전체 건강기능식품 시장의 53%를 차지할 정도로 선호도가 높은 소재인 배경에는 효능평가의 과학적인 근거 못지않게 소비자의 인식이 작용하고 있음. 마늘도 홍삼과 같은 인식을 갖고 있는 소재이기 때문에 **마늘이라는 소재의 인지도와 간건강에 대한 소비자의 선호도**를 접목시킬 수 있을 것으로 판단됨
- 따라서 본 과제를 성공적으로 수행함으로써 **표준화된 제조공정과 우수한 효능평가** 결과로 국민의 건강을 증진시키고 마늘 산업을 활성화시키는 성과를 달성하고자 함