

**보건의료기술진흥사업**  
**Health & Medical Technology R&D Program**

뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 이용한 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발 및 실용화 연구  
**Development of memory-improving functional food using an ingredient similar to brain  
phosphatidylserine**

주관연구기관 : 경희대학교산학협력단

직인

보건복지부

1. 겉표지 (측면, 뒷면)

A091037  
뇌내 P S  
강기능식품  
유사  
소재  
포스파티딜세린을  
개발 및 실용화  
이용한  
연구  
기억력  
개선  
건  
보건복지부

1. 이 보고서는 보건복지부에서 지원한 보건  
의료기술진흥사업의 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 보건  
복지부에서 지원한 보건의료기술진흥사업의  
연구결과임을 밝혀야 합니다.

## 2. 제출문

### 제출문

#### 보건복지부 장관 귀하

이 보고서를 '뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 이용한 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발 및 실용화 연구 (A091037)' 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011. 04. 28

주관연구기관 : 경희대학교산학협력단

직인

주관연구책임자 : 심인섭

직인

제 1 세부과제명 : 동물모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 행동학적 변화 및 생체영상분석을 통한 기억력 개선 효능 규명

(경희대학교산학협력단/심인섭)

제 2 세부과제명 : 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 신경세포보호 및 분화촉진에 의한 기억력 향상 기전연구

(경희대학교산학협력단/함대현)

제 3 세부과제명 : 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린 함유 건강기능식품 소재 개발

((주)두산 글로넷 바이오텍사업부/한정준)

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	A091037		총연구기간	2009/05/01 ~ 2011/03/31		
연구사업명	보건의료연구개발사업					
보건산업기술분류	대분류	기능성 식품·신소재 기술	중분류	기능성 식품소재 개발 기술	소분류	기타 기능성 식품소재 개발 관련기술
	대분류	기능성 식품·신소재 기술	중분류	기능성 식품소재 개발 기술	소분류	기타 기능성 식품소재 개발 관련기술
연구단계	개발			실용화대상여부	실용화	
연구과제명	국문	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 이용한 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발 및 실용화 연구				
	영문	Development of memory-improving functional food using an ingredient similar to brain phosphatidylserine				
주관연구기관	경희대학교산학협력단					
주관 연구책임자	소속기관명	경희대학교		소속부서	한의대	
	성명	심인섭		직위	부교수	
세부과제현황						
세부과제	세부과제명			세부기관명	연구책임자	
1	동물모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 행동학적 변화 및 생체영양분석을 통한 기억력 개선 효능 규명			경희대학교산학협력단	심인섭	
2	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 신경세포보호 및 분화촉진에 의한 기억력 향상 기전연구			경희대학교산학협력단	함대현	
3	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린 함유 건강기능식품 소재 개발			(주)두산 글로벳 바이오텍 사업부	한정준	
최종보고서 평가 면제 신청여부		<input type="checkbox"/> 매출액 초과달성 <input type="checkbox"/> SCI논문실적 달성(중개연구만 해당)				
최종보고서 비공개 승인 신청 여부		<input type="checkbox"/> 비공개 승인 (신청기간 : 년 월 ~ 년 월)				
과제 요약						
<p>뇌내 포스파티딜 세린(Phosphatidylserine,PS)과유사한DHA함유포스파티딜세린을개발하고동물모델에서의기억력개선효능과기전연구를통해가장효능이높은포스파티딜세린을검증하여경제적으로가장효율적이며치매개선,인지능력및기억력개선의유효한포스파티딜세린제품을함유한건강기능식품소재를개발하여활용화하고자한다.</p> <p>따라서,DHA를함유한뇌내PS유사포스파티딜세린의인지능력및기억력개선효과검증및생리활성인지질의문자및신경생물학적기능성규명에의한의약품,식품으로의신규수요창출 및 진단용방사성추적자및생체영상분석기술을이용한약물의기억력개선효능측정법개발하여 뇌내 포스파티딜 세린과유사한포스파티딜 세린의제조를통해고기능의치매개선및기억력개선건강기능식품소재대량생산구축하고,나노유화기술개발로포스파티딜 세린의수용화를통해건기식제형확대시소재응용가능범위의확대를통한상품성증대하고자 함</p>						
색인어	한글	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린 건강기능식품 기억력 개선				
	영문	Brain PS -like ester + brain lipid/serine functional food memory improvement				

#### 4. 요약문 (한글)

##### 요약문

연구과제명	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 이용한 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발 및 실용화 연구		
주관연구기관	경희대학교산학협력단	주관연구책임자	심인섭
참여기업	(주)두산 글로벳 바이오텍사업부		
총연구기간	2009/05/01 ~ 2011/03/31		

I. 연구개발의 목적 및 필요성

(1)연구개발의 목적

정상의 젊은동물과 노령 및 기억손상 동물모델에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증 및 비교 분석한다.

MicroPET/SPECT/CT 생체 영상 분석을 이용한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명 및 기억과 관련된 acetylcholinesterase (AChE)의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성 및 생물학적 평가를 한다.

(2)연구개발의 필요성

국내외적으로 새로운 인지개선제 또는 치매 치료물질 개발 목적으로 여러 가지 실험적 모델을 통해 접근하고 있다. 예를 들어, 학습과 기억에 acetylcholine 신경세포가 중요한 기능을 한다는 연구결과와 치매 환자와 acetylcholine 신경세포 변성의 밀접한 관련성이 보고됨에 따라, 학습 손상 연구모델로 acetylcholine의 작용을 차단하는 여러 가지 실험 모델들이 제시되어왔다. 하지만, 현재까지 이상과 같은 국소의 전해질 손상 모델, 화학적 손상 방법과 스트레스 등을 통해 학습과 기억 장애를 유발시켜 학습과 기억력 개선에 관한 인지개선제 또는 치매 치료 후보물질의 치료 효과와 기전을 연구해오고 있다. 따라서, 본 연구에서는 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 이용한 정상동물과 노화 및 기억손상 동물 모델에서 학습과 기억에 관련된 행동학적 변화를 규명하고, 뇌 영상 생체분석을 통하여 기억력 개선 효과 규명 및 뇌내의 glucose activitynesterase의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성 및 생물학적 평가를 통해서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 활용한 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발 및 실용화 연구에 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

## 5. 요약문 (영문)

### SUMMARY

Title	Development of memory-improving functional food using an ingredient similar to brain phosphatidylserine		
Institute	Kyunghee Industry Cooperation Foundation	Project Leader	INSOP SHIM
Associated Company	Doosan Glonet		
Project Period	2009/05/01 ~ 2011/03/31		
<p>I. Goals &amp; Backgrounds</p> <p>(1)The purpose of research and development</p> <p>Normal young animals and in animal models of aging and memory impairment and behavioral changes similar to PS phosphatidylserine brain through the improvement of the memory are verified and analyzed.</p> <p>The memory improving effect of biological brain PS phosphatidylserine analyzed using the microPET / SPECT / CT. Also, acetylcholinesterase (AChE) tracer used for memory disorder diagnostic of the animal.</p> <p>(2) The necessity of research and development</p> <p>New animal model, locally and abroad, is approached with the purpose of developing a new therapeutic substance for the improving cognition. Phosphates, or dementia at home and abroad is a new therapeutic substance for the purpose of developing experimental models through various approaches are. For example, acetylcholine has an important role in learning and memory functions in dementia and neurodegenerative patients. Up to now, learning and memory deficit animal model used by blocking of acetylcholine action. However, many studies report the mechanism and treatment of dementia, therapeutic candidate using the electrolytic and chemical injury model and repeated stress induced memory deficit animal model. Therefore, this study, the cognitive improvement effect of Krill-PS on the normal young rats was investigated by assessing the Morris water maze test and passive avoidance task (PAT) and by a PET/CT scan of the inferior temporal lobe. Through this study, phosphatidylserine represent a potential useful agents that are able to improve the function of impaired cognitive process.</p> <p>II. Contents and coverage of research</p> <p>-Memory improvement effect of phosphatidylserine was analyze and investigated effect in the neurotoxins-induced memory deficits rats and normal young rat.</p> <p>-The cognitive improvement effect of Krill-PS on the normal young rats was investigated by assessing the Morris water maze test and passive avoidance task (PAT)</p> <p>-Comparision of brain activity after treatment of brain phosphatidylserine</p>			

## 6. 연구 성과 실적 및 향후 계획

### 6.1 총괄연구개발과제의 연구성과 실적 및 향후 계획 종합성과현황

연구성과 유형				성과목표	연구성과 실적		최종연구종료
					연구성과 실적	달성도(%)	2년후 계획
1. 연구 (학술) 성과	가.연구논문	국외	SCI(E)등재학술지	6	1	17	2
			SCI(E)비등재학술지	0	0	0	0
		국내	SCI(E)등재학술지	2	1	50	2
			SCI(E)비등재학술지	6	0	0	2
2. 개발 (산업) 성과	가.지적재산권	국제출원		1	0	0	1
		국제등록		0	0	0	0
		국내출원		1	0	0	1
		국내등록		2	0	0	2
	나.제품개발	시제품개발		3	4	133	0
		상품화출시		0	0	0	1
	다.공정개발	신공정개발		2	0	0	1
		기존공정개선		0	0	0	0
	라.신보건의료기술개발	신보건의료기술개발		0	0	0	0
		기존보건의료기술개선		0	0	0	0
	마.기술이전	국외		0	0	0	0
		국내		0	0	0	0
	바.사업화			0	0	0	0
3. 기타 성과	가.인력지원	학사		0	0	0	0
		석사		4	3	75	2
		박사		4	0	0	2
		기타		0	0	0	0
	나.장·단기 연구지원	장기		0	0	0	0
		단기		0	0	0	0
	다.기술료 징수	직전년도 징수액		0	0	0	0
		당해년도 징수액		0	0	0	0
	라.산업기술인력 양성 성과			0	0	0	0
	마.학술회의 개최			2	0	0	0
	바.기술무역 성과			0	0	0	0
	사.인력교류 성과	외국 연구자 유치		0	0	0	0
		해외 파견		0	0	0	0
	아.국제협력 기반	MOU 체결		0	0	0	0
		수요조사		0	0	0	0
	공통연구			0	0	0	0
	자.경제사회 파급효과	산업지원 성과		0	0	0	0
		고용창출 성과		0	0	0	0
	차.임상연구자원 확보			0	0	0	0
	카.임상시험실시			0	0	0	1
	타.진료지침개발			0	0	0	0
	파.품목	승인		0	0	0	0
		인증		0	0	0	1
		허가		0	0	0	0

## 6.2. 세부과제별 연구성과 실적 및 향후 계획

제 1 세부과제								
연구성과 유형				성과목표	연구성과 실적			최종연구종료 2년 후 계획
					연구성과 실적 (누계치)		달성도 (%)	
1. 연구 (학술) 성과	가.연구논문	국외	SCI(E)등재학술지	4 건	건	%	1 건	
			SCI(E)비등재학술지	건	건	%	건	
		국내	SCI(E)등재학술지	1 건	건	%	1 건	
			SCI(E)비등재학술지	4 건	건	%	1 건	
2. 개발 (산업) 성과	가.지식재산권	국제출원		건	건	%	건	
		국제등록		건	건	%	건	
		국내출원		건	건	%	건	
		국내등록		건	건	%	건	
	나.제품개발	시제품개발		건	건	%	건	
		상품화출시		건	건	%	건	
	다.공정개발	신공정개발		건	건	%	건	
		기존공정개선		건	건	%	건	
	라.신보건의료기술개발	신보건의료기술개발		건	건	%	건	
		기존보건의료기술개선		건	건	%	건	
	마.기술이전 (실시계약체결)	국내	건	건	%	건		
		국외	건	건	%	건		
	바. 사업화		건	건	%	건		
3. 기타 성과	가.인력지원	학사		명	명	%	명	
		석사		2 명	2 명	100 %	1 명	
		박사		2 명	명	%	1 명	
		기타		명	명	%	명	
	나.장·단기 연수지원	장기		명	명	%	명	
		단기		명	명	%	명	
	다. 기술료 징수	직전년도 징수액		원	원	%	원	
		당해년도 징수액		원	원	%	원	
	라. 산업기술인력 양성 성과			건	건	%	건	
	마. 학술회의 개최			1 건	건	%	건	
	바. 기술무역 성과			건	건	%	건	
	사. 인력교류 성과	외국 연구자 유치		명	명	%	명	
		해외 파견		명	명	%	명	
	아. 국제협력 기반	MOU 체결		건	건	%	건	
		수요조사		건	건	%	건	
		공동연구		건	건	%	건	
	자. 경제사회 파급효과	산업지원 성과		건	건	%	건	
		고용창출 성과		건	건	%	건	
	차. 임상연구자원 확보			건	건	%	건	
	카. 임상시험실시			건	건	%	건	
	타. 진료지침개발			건	건	%	건	
	파. 품목	승인		건	건	%	건	
		인증		건	건	%	건	
		허가		건	건	%	건	
계				14 건	2 건	14.3 %	5 건	



제 2 세부과제							
연구성과 유형				성과목표	연구성과 실적		최종연구종료 2년 후 계획
					연구성과 실적 (누계치)	달성도 (%)	
1. 연구 (학술) 성과	가.연구논문	국외	SCI(E)등재학술지	2 건	1 건	50 %	1 건
			SCI(E)비등재학술지	건	건	%	건
		국내	SCI(E)등재학술지	1 건	1 건	100 %	1 건
			SCI(E)비등재학술지	2 건	건	%	1 건
2. 개발 (산업) 성과	가.지식재산권	국제출원		건	건	%	건
		국제등록		건	건	%	건
		국내출원		건	건	%	건
		국내등록		건	건	%	건
	나.제품개발	시제품개발		건	건	%	건
		상품화출시		건	건	%	건
	다.공정개발	신공정개발		건	건	%	건
		기존공정개선		건	건	%	건
	라.신보건의료기술개발	신보건의료기술개발		건	건	%	건
		기존보건의료기술개선		건	건	%	건
	마.기술이전 (실시계약체결)	국내	건	건	%	건	
		국외	건	건	%	건	
	바. 사업화		건	건	%	건	
3. 기타 성과	가.인력지원	학사		명	명	%	명
		석사		2 명	1 명	50 %	1 명
		박사		2 명	명	%	1 명
		기타		명	명	%	명
	나.장·단기 연수지원	장기		명	명	%	명
		단기		명	명	%	명
	다. 기술료 징수	직전년도 징수액		원	원	%	원
		당해년도 징수액		원	원	%	원
	라. 산업기술인력 양성 성과			건	건	%	건
	마. 학술회의 개최			1 건	건	%	건
	바. 기술무역 성과			건	건	%	건
	사. 인력교류 성과	외국 연구자 유치		명	명	%	명
		해외 파견		명	명	%	명
	아. 국제협력 기반	MOU 체결		건	건	%	건
		수요조사		건	건	%	건
		공동연구		건	건	%	건
	자. 경제사회 파급효과	산업지원 성과		건	건	%	건
		고용창출 성과		건	건	%	건
	차. 임상연구자원 확보			건	건	%	건
	카. 임상시험실시			건	건	%	건
	타. 진료지침개발			건	건	%	건
	파. 품목	승인		건	건	%	건
		인증		건	건	%	건
		허가		건	건	%	건
계				10 건	3 건	33.3 %	5 건


제 3 세부과제								
연구성과 유형				성과목표	연구성과 실적			최종연구종료 2년 후 계획
					연구성과 실적 (누계치)	달성도 (%)		
1. 연구 (학술) 성과	가.연구논문	국외	SCI(E)등재학술지	건	건	%	건	
			SCI(E)비등재학술지	건	건	%	건	
		국내	SCI(E)등재학술지	건	건	%	건	
			SCI(E)비등재학술지	건	건	%	건	
2. 개발 (산업) 성과	가.지식재산권	국제출원		1 건	건	%	1 건	
		국제등록		건	건	%	건	
		국내출원		1 건	건	%	1 건	
		국내등록		2 건	건	%	2 건	
	나.제품개발	시제품개발		3 건	4 건	133 %	건	
		상품화출시		건	건	%	1 건	
	다.공정개발	신공정개발		2 건	건	%	1 건	
		기존공정개선		건	건	%	건	
	라.신보건의료기술개발	신보건의료기술개발		건	건	%	건	
		기존보건의료기술개선		건	건	%	건	
	마.기술이전 (실시계약체결)	국내		건	건	%	건	
		국외		건	건	%	건	
	바. 사업화				건	건	%	건
3. 기타 성과	가.인력지원	학사		명	명	%	명	
		석사		명	명	%	명	
		박사		명	명	%	명	
		기타		명	명	%	명	
	나.장·단기 연수지원	장기		명	명	%	명	
		단기		명	명	%	명	
	다. 기술료 징수	직전년도 징수액		원	원	%	원	
		당해년도 징수액		원	원	%	원	
	라. 산업기술인력 양성 성과			건	건	%	건	
	마. 학술회의 개최			건	건	%	건	
	바. 기술무역 성과			건	건	%	건	
	사. 인력교류 성과	외국 연구자 유치		명	명	%	명	
		해외 파견		명	명	%	명	
	아. 국제협력 기반	MOU 체결		건	건	%	건	
		수요조사		건	건	%	건	
		공동연구		건	건	%	건	
	자. 경제사회 파급효과	산업지원 성과		건	건	%	건	
		고용창출 성과		건	건	%	건	
	차. 임상연구자원 확보			건	건	%	1 건	
	카. 임상시험실시			건	건	%	건	
	타. 진료지침개발			건	건	%	건	
	파. 품목	승인		건	건	%	건	
		인증		건	건	%	1 건	
		허가		건	건	%	건	
계				9 건	4 건	44.4 %	8 건	

### 6.3 연구성과 유형별 세부 내역

#### 6.3.1 연구논문

순번	구분	SCI(E) 여부	저자 구분	논문명	학술지명	게재일	IF	세부 표기	별기 표기
1	국내	SCI	교신저자	오징어 유래 포스파티딜세린 (phosphatidylserine)의 in vitro 항염 효과	대한스트레스학회	2011/03/12		2	단독사 사
2	국외	SCI	교신저자	Krill phosphatidylserine improves learning and memory in Morris water maze in aged rats	PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	2010/04/02	2.638	2	2
합계					2 건				

### 6.3.3 제품개발 1

기업유형	(○)1. 대기업 ( )2. 중소기업 ( )3. 벤처기업 ( )4. 기타				
개발유형	(○)1. 시제품개발 ( )2. 상품화출시				
해당세부 과제표기	제3세부과제 : 뇌내 PS유사 포스파티딜세린 함유 건강 기능 식품 소재 개발				
개발업체명	(주)두산글로벌	대표자	제임스 비모스키		
개발제품명	해산물 유래 DHA함유 포스파티딜세린 액상제형				
개발완료일	2011. 03		제품출시일		
제품국내 매출액	직전년도 누적액		제품국외 매출액	직전년도 누적액	( )백만원
	당해년도			당해년도	( )백만원
제품의 용도 및 성과의의	기존의 포스파티딜세린 소재는 DHA등의 다가불포화지방산이 구성지질에 incorporation되어 있지 않아 단순혼합 제형의 제품으로만 구성된 경우가 있었으나 금번 과제를 통하여 세계최초로 해산물 유래 DHA가 함유된 포스타티딜세린 액상제형을 개발 완료하였음.				
주요내용	<p>해산물유래 DHA 함유 포스파티딜세린 액상 제형</p> 				

### 6.3.3 제품개발 2

기업유형	(○)1. 대기업 ( )2. 중소기업 ( )3. 벤처기업 ( )4. 기타				
개발유형	(○)1. 시제품개발 ( )2. 상품화출시				
해당세부 과제표기	제3세부과제 : 뇌내 PS유사 포스파티딜세린 함유 건강 기능 식품 소재 개발				
개발업체명	(주)두산글로벌		대표자	제임스 비모스키	
개발제품명	해산물 유래 DHA함유 포스파티딜세린 분말제형				
개발완료일	2011. 03		제품출시일		
제품국내 매출액	직전년도 누적액		제품국외 매출액	직전년도 누적액	( )백만원
	당해년도			당해년도	( )백만원
제품의 용도 및 성과의의	기존의 포스파티딜세린 소재는 DHA등의 다가불포화지방산이 구성지질에 incorporation되어 있지 않아 단순혼합 제형의 제품으로만 구성된 경우가 있었으나 금번 과제를 통하여 세계최초로 해산물 유래 DHA가 함유된 포스타티딜세린 분말제형을 개발 완료하였음				
주요내용	<p>해산물유래 DHA 함유 포스파티딜세린 분말 제형</p> 				

### 6.3.3 제품개발 3

기업유형	(○)1. 대기업 ( )2. 중소기업 ( )3. 벤처기업 ( )4. 기타				
개발유형	(○)1. 시제품개발 ( )2. 상품화출시				
해당세부 과제표기	제3세부과제 : 뇌내 PS유사 포스파티딜세린 함유 건강 기능 식품 소재 개발				
개발업체명	(주)두산글로넷	대표자	제임스 비모스키		
개발제품명	음료적용을 위한 나노유화액 개발				
개발완료일	2011. 03		제품출시일		
제품국내 매출액	직전년도 누적액		제품국외 매출액	직전년도 누적액	( )백만원
	당해년도			당해년도	( )백만원
제품의 용도 및 성과의의	기존의 포스파티딜세린 소재는 DHA등의 다가불포화지방산이 구성지질에 incorporation되어 있지 않아 단순혼합 제형의 제품으로만 구성된 경우가 있었으나 금번 과제를 통하여 세계최초로 해산물 유래 DHA가 함유된 포스타티딜세린을 시장성이 큰 음료에 적용하기 위하여 나노유화액을 개발 완료하였음.				
주요내용	<p>액상에 적용가능한 나노유화액</p> 				

### 6.3.3 제품개발 4

기업유형	(○)1. 대기업    (   )2. 중소기업    (   )3. 벤처기업    (   )4. 기타				
개발유형	(○)1. 시제품개발        (   )2. 상품화출시				
해당세부 과제표기	제3세부과제 :    뇌내 PS유사   포스파티딜세린   함유   건강   기능   식품   소재 개발				
개발업체명	(주)두산글로넷		대표자	제임스 비모스키	
개발제품명	Krill-PS   캡셀제형   개발				
개발완료일	2011. 03		제품출시일		
제품국내 매출액	직 전 년 도		제품국외 매출액	직전년도	(        )백만원
	누적액			누적액	
	당해년도			당해년도	(        )백만원
제품의 용도 및 성과의의	기존의   포스파티딜세린   소재는   DHA등의   다가불포화지방산이   구성지질에 incorporation되어   있지   않아   단순혼합   제형의   제품으로만   구성된   경우가 있었으나   금번   과제를   통하여   세계최초로   해산물   유래   DHA가   함유된 포스타티딜세린의   섭취가   용이하도록   캡셀제품을   개발   완료하였음.				
주요내용	Krill-PS   캡셀   제품				
					

6.3.4 공정개발 (해당사항 없음)

공정유형	(    ) 1. 신공정개발      (    ) 2. 기존공정개선			
해당세부 과제표기				
개발공정명		개발완료일		
개발기업명/ 대표자		기존공정 대비 기술향상효과		
생산비용 절감비율		생산비용 절감액 누계	국 내	(            )백만원
			국 외	(            )백만원
주요내용				



6.3.5 신보건의료기술개발 (해당사항 없음)

치료기술유형	( )1. 신보건의료기술개발      ( )2. 기존보건의료기술개선
해당세부과제표기	
기술개발구분	1. 예방 ( )    2. 진단 ( )    3. 치료 ( )    4. 재활 ( )
기술개발명	
기술방법 및 내용	

### 6.3.6 기술이전 (해당사항 없음)

이전유형	( ) 1.노하우이전    ( ) 2.특허매매    ( ) 3. 전용실시권허여 ( ) 4. 통상실시권허여    ( ) 5.기타			
기술이전국가		해당세부과제 표기		
이전기술명		기술유형	제품기술( ) 공정기술( ) 치료기술( ) 기    타( )	
이전업체명 /대표이사		주소/연락처		
계약조건	선금금( ), 총매출로알티( ) 기타( )	계약일		
총예상기술료	(            )백만원	기징수기술료	직전년도 누적액	(            )백만원
			당해년도	(            )백만원
주요내용				

6.3.7 사업화 현황 (해당사항 없음)

사업화명				해당세부 과제표기	
사업화 업체 개요	업체명	대표자명	종업원수	사업화형태	
사업화형태	연구책임자 창업( )      기술이전에 의한 창업( ) 창업지원                      ( )      기존업체에서 상품화( )				
직년년도 누적액	(      )백만원	당해연도 매출액	(      )백만원		
사업화내용					

### 6.3.8 인력지원 성과

석사 3명을 배출하였음.

### 6.3.9 장·단기 연수지원 성과 (해당사항 없음)

### 6.3.10 기술료 징수 현황 (해당사항 없음)

직전년도 징수 누적액 (백만원)	당해연도 징수액 (백만원)	향후 징수액 (백만원)	합계

### 6.3.11 산업기술인력 양성 성과 (해당사항 없음)

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

### 6.3.12 국제학술회의 개최 성과 (해당사항 없음)

명칭	기술분야	규모			개최장소	지원금액 (백만원)
		참가국	인원	기간(일)		



### 6.3.18 임상시험실시 성과 (해당사항없음)

임상시험명			
해당세부과제표기			
임상시험구분	1. 비임상 ( )	2. 임상 1상 ( )	3. 임상 2상 ( )
	4. 임상 3상 ( )	5. 기타 ( )	
IND 여부	1. 유 ( )		2. 무 ( )
IRB 여부	1. 유 ( )		2. 무 ( )
국내/외 구분	1. 국내 ( )		2. 해외 ( )
임상시험내용			

### 6.3.19 진료지침개발 성과 (해당사항없음)

진료지침명		
해당세부과제표기		
학회검증여부	1. 검증 ( )	2. 비검증 ( )
진료지침내용		

6.3.20 품목 승인/인증/허가 성과 (해당사항없음)

제품명	
세부과제표기	
승인일자	
승인/인증/허가 번호	
승인/인증/허가인 또는 법인	
승인/인증/허가인 주민등록번호 또는 사업자등록번호	
승인/인증/허가국	
내용	

## 7. 참여연구원 현황표

세부	소속 기관명	성명	직급	전공 및 학위				구분
				학위	연도	전공	학교	
1세부책임자	경희대학교	심인성		*****				내부
1참여연구원	가톨릭대학교	김지현						외부
1참여연구원	가톨릭대학교	오진경						외부
1참여연구원	가톨릭대학교	박현정						외부
1참여연구원	가톨릭대학교	남경미						외부
1참여연구원	가톨릭대학교	심현수						외부
1참여연구원	가톨릭의과대학교	정혜영						외부
1참여연구원	가톨릭의과대학교	정은미						외부
1참여연구원	가톨릭대학교	이현주						외부
2세부책임자	경희대학교	함대현						내부
2참여연구원	경희대학교	이불비						내부
2참여연구원	경희대학교 수원캠퍼스	염미정						내부
2참여연구원	미정	채을예정 2						외부
2참여연구원	미정	채을예정 3						외부
2참여연구원	미정	채을예정 1						외부
2참여연구원	경희대학교	서봉준						내부
2참여연구원	경희대학교	박종봉						내부
2참여연구원	경희대학교 산학협력단	김성준						내부
2참여연구원	경희대학교	김명환						내부
2참여연구원	경희대학교	권선오						내부
3참여연구원	(주)두산	정국훈						내부
3세부책임자	(주)두산 글로벌 바이오텍사업부	한정준						내부
3참여연구원	(주)두산 글로벌 바이오텍사업부	김영범						내부
3참여연구원	(주)두산	최일						내부
3참여연구원	(주)두산	양영래						내부
3참여연구원	(주)두산글로벌 바이오텍사업부	남상준						내부
3참여연구원	(주)두산 글로벌 바이오텍사업부	한지영						내부
3참여연구원	(주)두산 글로벌 바이오텍사업부	정유리						내부



## II. 총괄연구과제 연구결과

## 1. 연구개발과제의 배경 및 필요성

현대사회에서 크게 주목받고 있는 기억력 증진 및 학습능력 향상에 대해 효과가 있고 더 나아가 치매 예방 및 치료에 바람직한 건강기능식품 소재의 개발이 요구되고 있으며, 특히 독성이 없고 경제적인 식품소재 추출물을 이용하여 천연물 자원의 산업화에 기여할 뿐 아니라 수요자가 손쉽게 접근할 수 있는 건강기능식품 소재의 개발이 절실히 요구되고 있다.

국내외적으로 새로운 인지개선제 또는 치매 치료물질 개발 목적으로 여러 가지 실험적 모델을 통해 접근하고 있다. 예를 들어, 학습과 기억에 acetylcholine 신경세포가 중요한 기능을 한다는 연구결과와 치매 환자와 acetylcholine 신경세포 변성의 밀접한 관련성이 보고됨에 따라, 학습 손상 연구모델로 acetylcholine의 작용을 차단하는 여러 가지 실험 모델들이 제시되어왔다. 예를 들면, 중추성 muscarinic receptor 차단제인 scopolamine을 투여하는 모델과 acetylcholine성 신경세포가 주로 위치한 medial septum 이나 nucleus basalis등을 전기적으로 손상 (electrolytic lesion) 시키거나 kainic acid, ibotenic acid 등 신경독소로 손상시키거나 (neurotoxin lesion), acetylcholinergic 신경세포에 특정적으로 손상시키는 immunotoxin 192 IgG-saporin을 이용한 모델들이 사용되어 왔다. 또는 Trimethyltin(TMT)을 투여하여 해마, 신피질, 편도핵 등 특정부위의 신경세포를 선택적으로 손상시키거나, 다양한 스트레스를 가한 후 여러 가지 학습 및 기억과제를 이용하여 약물과 스트레스에 의한 기억장애의 효과를 규명하여 왔다.

현재까지 이상과 같은 국소의 전해질 손상 모델, 화학적 손상 방법과 스트레스 등을 통해 학습과 기억 장애를 유발시켜 학습과 기억력 개선에 관한 인지개선제 또는 치매 치료 후보물질의 치료 효과와 기전을 연구해오고 있다.

본 연구에서는 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 이용한 정상동물과 노화 및 기억 손상 동물모델에서 학습과 기억에 관련된 행동학적 변화를 규명하고, 뇌 영상 생체분석을 통하여 기억력 개선 효과 규명 및 기억과 관련된 acetylcholinesterase의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성 및 생물학적 평가를 통해서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 활용한 기억력 개선 건강기능식품 소재 개발 및 실용화 연구에 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

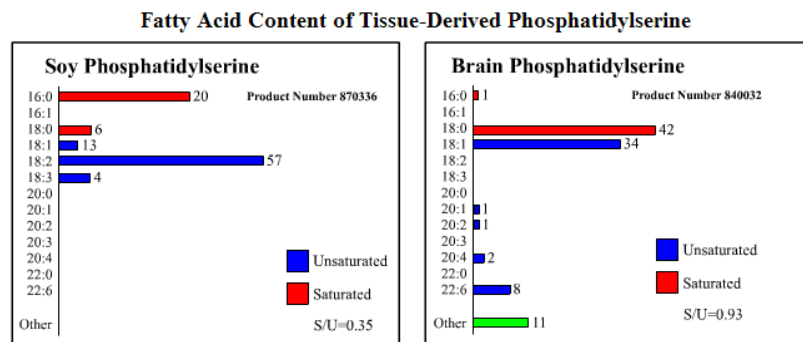
## 2. 국내외 기술개발 현황

○ 미국과 유럽에서는 이미 50년 전부터 뇌의 건강과 포스파티딜세린의 관계에 대한 방대한 연구가 행해져 왔으며 많은 문헌들을 통해 포스파티딜세린이 치매환자의 기억력 재생과 학습증진에 상당한 도움을 주고 뇌 대사를 활성화시키는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 대표적인 예로, 평균연령 60.5세의 환자 50명을 대상으로 매일 300mg 단위의 포스파티딜세린을 12주간 투여한 결과 각각 기억력은 13.9년, 학습능력은 11.6년, 전날 본 사람에 대한 인지능력은 7.4년, 그리고 10자리 숫자 암기능력은 3.9년이 증가되는 효과를 나타낸 것으로 보고되었다. 포스파티딜세린은 1980년대부터 초기 치매나 인지 능력 개선용으로 연구 및 상용화 되어 왔으며 지금까지 구미, 일본 등에서 많이 이용되고 있다. 초기 치매개선이나 인지 능력 개선등의 임상 보고도 상당수 보고가 되었다. 지금까지 알려진 포스파티딜세린의 기억력 관련 학회발표 및 연구논문의 수는 수천 건을 넘는다. 그 중 인체를 대상으로 하는 임상시험은 1997년까지 64건에 이른다.

○ 그러나 대부분의 임상은 소뇌로부터 추출된 포스파티딜세린에 대한 임상이다. 소뇌로부터 추출된 포스파티딜세린은 광우병 위험으로 사용이 금지가 되었으며 그 이후로는 대두 레시틴의 포스파티딜콜린을 포스포리파제 D에 의한 효소 전이 반응을 통해 포스파티딜세린을 제조하는 것이 상용화되어 시장에서 사용되어져 왔다. 이러한 효소 전이반응을 통해 제조된 포스파티딜세린에 대한 동물 실험들이 행해졌고 소뇌에서 추출된 포스파티딜세린과 동등한 효능을 나타낸다고 보고하였다. 미국 FDA의 경우 포스파티딜세린의 qualified health claim 인정 관련하여 대두 포스파티딜세린에 대하여 치매 예방 및 인지 능력 저하를 막는데 도움을 줄 수 있다고 하면서도 매우 제한된 과학적 근거가 있는 정도로 제한하고 있다 그 이유로는 대두 포스파티딜세린의 임상 문헌건이 매우 제한 되었고 소뇌 유래의 포스파티딜세린과 대두 유래의 포스파티딜세린의 지방산 조성의 차이와 통상의 대두 유래 포스파티딜세린의 제품에 존재하는 포스파티딜세린 이외의 인지질 등에 의한 다른 영향의 가능성들을 들어 완전히 동등하다고 보기 어렵다고 하고 있다.

○ 포스파티딜세린은 섭취시 체장에 있는 포스포리파제 A2에 의해 인지질의 sn-2 위치에 있는 지방산이 잘리게 되고 이렇게 잘린 리소포스파티딜세린은 장에서 흡수되어 혈액을 돌며 reacylation과 deacylation 등이 반복되며 지방산이 재구성되며 각 기관에 도달하여 기능을 발휘하는 것으로 추정하고 있으나 확실하지 않다. 소뇌에서 추출한 경우는 sn-2 위치에 DHA가 8% 수준결합 되어 있으며 이 DHA 역시 섭취 시 장에 있는 포스포리파제 A2에 의해 DHA는 가수분해 되어 별도의 기작을 통해 대사될 것으로 생각된다. 따라서 한 분자내에 세린과 DHA를 가지고 있는 형태로 경구 섭취가 되나 체장을 거치면서 DHA는 분리되어 대사되는 것으로 추정되므로 DHA 오일이나 DHA 인지질을 포스파티딜세린과 함께 섭취해주면 될 것으로 추정을 할 수 있다. 그러나 이에 대한 학술적 문헌 보고가 있지 않아 비교 결과는 알 수 없다.

○ 실제로 DHA는 뇌에 여러가지 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 그 한 예로 잘못된 식생활은 뇌의 포스파티딜세린의 함량에 부정적인 영향을 미치는 결과가 보고되어 있다. 동물 실험의 결과의 예를 들면,  $\omega$ -3-지방산이 결핍된 식이를 하게되면, 뇌의 포스파티딜세린이 약 28% 감소하고, 이는  $\omega$ -3 지방산 결핍과 관련된 뇌-해마의 기능의 생화학적 변화를 일으키는 한 원인이 될 수 있다고 한다. 따라서 DHA는 포스파티딜세린과 상당한 시너지가 있을 수 있을 것으로 예상이 된다. DHA를 함유한 유지도 DHA 에틸에스터, DHA 오일, DHA 인지질 형태에 따라 흡수되는 속도가 다르며 인지질의 형태가 가장 흡수 전달이 빠르다고 보고한 문헌이 있다. 결국 DHA와 대두 포스파티딜세린이 함께 섭취될 경우 훨씬 더 좋은 효능을 얻어 낼 수 있을지가 관심사가 된다.



○ 가장 경제적이고 효율적인 포스파티딜세린 제품을 만들기 위해서 먼저 연구 비교가 되어야 할 것은 다음의 세가지 종류의 포스파티딜세린 제형이다

1. 일정 함량의 DHA를 포함하는 oil과 대두 포스파티딜세린을 혼합한 제제
2. 일정 함량의 DHA 함유 인지질과 대두 포스파티딜세린을 혼합한 제제
3. 일정 함량의 DHA를 한분자내에 포함하는 난황 유래 포스파티딜세린

○ 산업적 생산 측면에서 어류 레시틴을 활용하여 효소전환한 포스파티딜세린의 경우는 생산 공정 중 산화 안정성 등의 어려움으로 인해 쉽게 제조하기 어려울 것으로 판단되며 1번의 경우는 그 효능을 대두 포스파티딜세린 단독과 비교한 보고는 없지만 이미 시판이 되고 있는 형태이다. 포스파티딜세린의 효능적인 측면에서는 뇌에 있는 형태와 가장 유사하게 만드는 것이 바람직해 보이지만 닭에게 DHA를 feeding하여 제조된 난황 인지질을 이용하여 포스파티딜세린을 제조하는 경우 제조의 어려움과 경제성 문제가 존재하고 실제로 그렇게 만들어진 제품이 시장에서 나온 적도 없으며 임상 또한 실시된 예가 없다. 하지만 기존에 노화로 인한 인지능력 저하 개선 및 초기 치매 개선 관련하여 수많은 임상이 보고 되었던 소뇌 유래의 포스파티딜세린과 유사하게 제조한다는 점에서 가장 바람직하다고 할 수 있다. DHA를 가장 인체에 흡수를 빠르게 하여 주는 형태인 DHA 인지질과 대두 포스파티딜세린을 혼합하여 줄 경우가 인체에 흡수가 가장 빠른 DHA 형태와 포스파티딜세린을 동시에 섭취시킨다는 측면에서

가장 경제성이 있을 것으로 생각할 수 있으나 효과적인 측면에서 동등할지 조사할 필요가 있다.

○ 본 연구팀은 상기의 여러 종류의 DHA 함유 포스파티딜세린에 대해 동물모델에서의 기억력 개선 효능과 기전연구를 통해 가장 효능이 높은 포스파티딜세린을 검증하고 경제적으로 가장 효율적이며 치매개선, 인지능력 및 기억력 개선의 유효한 포스파티딜세린 제품을 함유한 건강기능식품 소재를 개발하고자 한다. 오랜 기간 동안의 임상경험과 문헌에 근거하여 포스파티딜세린을 이용하여 기억력 개선 건강기능식품 소재의 개발 및 활용 가능성이 매우 높으며, 국제시장에 진출할 경우 고부가가치 상품 개발을 통해 국가경쟁력도 제고할 수 있을 것이다.

### 3. 연구개발과제의 추진체계

구분		1단계 (09년 ~'11년)								단계없음		
		1년차				2년차				○ 년 차	○ 년 차	○ 년 차
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4			
제 1 세 부	정상의 젊은동물 및 노령동물에서 행동학적 변화 검토 및 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 비교 분석	→	→									
	MicroPET/SPECT/CT 생체영상 분석을 이용한 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명 과 기억과 관련된 acetylcholinesterase의 영상화			→	→							
	기억손상 동물에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능검증					→	→					
	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린, aricept의 생체영상 결과 분석과 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성 및 생물학적 및 PS의 BBB 통과 평가							→	→			
제 2 세 부	베타아밀로이드 유발 세포독성에 대한 세포주 기반 신경세포보호 효과 검증 및 작용기전 규명	→	→									
	흥분성 아미노산인 글루타메이트 유발 세포독성에 대한 세포주 기반 신경세포 보호 효과 규명	→	→									
	일차배양 신경세포에서의 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구			→	→							
	신경세포증식 촉진효과 및 세포주 기반 세포신호전달체계 규명					→	→					
	신경세포분화 촉진효과 및 세포주 기반 세포신호전달체계 규명					→	→					
제 3 세 부	DHA 함유 난황 및 해산물 유래 인지질 수배	→										
	DHA 함유 포스파티딜세린 제조 및 분리 정제	→										
	DHA 함유 포스파티딜세린 대량 생산 타당성 검토		→	→								
	경제성, 효용성 검토에 의해 선발된 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린 제제 대량 생산 시스템 구축				→	→						
	건강기능식품 소재화를 위한 규격화 및 안전성, 안정성 연구					→	→					
	DHA 함유 PS 수용성 나노 유화 제형 개발					→	→					
	DHA 함유 PS 수용성 나노 유화 제형 안정성 test 및 제형 개선 연구							→	→			

#### 4. 연구개발수행 내용 및 결과

구분	연구 방법	연구내용	연구결과	결론
1년 차 (’09 년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•정상의 젊은동물 및 노령 동물에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증 및 비교분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•정상 및 노령 동물모델에서 행동장애 관찰과 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 효능 확인</li> <li>•행동학적 변화의 유의성을 통한 기억력 개선 효능 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-정상의 젊은 동물에서 PS의 반복 투여 결과 수중미로 시험에서 유의한 기억증진 효과가 나타남</li> <li>-노령의 동물에서도 PS의 투여시, 기억 행동이 유의하게 증가함</li> </ul>	노령의 동물 모델뿐 아니라 젊은 동물에서도 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 투여는 기억행동을 증진함
	<ul style="list-style-type: none"> <li>•MicroPET/SPECT/CT 생체영상 분석을 이용한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명 및 기억과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자 합성</li> <li>•기억과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자 합성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-정상의 젊은 동물에 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 투여 후 뇌내의 glucose activity를 관찰한 결과 Normal 군에 비해 유의하게 증가함.</li> </ul>	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린은 brain activity를 증가시킴
	<ul style="list-style-type: none"> <li>•세포독성에 대한 세포주기 기반 신경세포 보호효과 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•세포독성에 대한 세포독성 억제 및 뇌세포사 보호 활성을 비교 분석하여 작용기전 규명</li> <li>•뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 교세포 활성화 억제효과 규명 등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-MTT assay 및 raw 264.7에 LPS로 염증 유발 후 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 항염효과 검증</li> </ul>	-뇌내 PS 유사 포스파티딜세린은 LPS로 유도된 염증 반응을 유의하게 줄임
	<ul style="list-style-type: none"> <li>•일차배양 신경세포에서의 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•PS의 일차배양 신경세포에서 독성물질 및 흥분성 아미노산에 의해서 뇌세포보호 효과 및 작용기전 연구</li> <li>•뇌신경세포배양 및 뇌세포 보호 효과 및 작용기전 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-BAEC cell에 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 angiogenesis에 미치는 효과 검증</li> </ul>	-BAECcell에 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린 처리 시 angiogenesis가 증가 됨
	<ul style="list-style-type: none"> <li>•DHA 함유 난황 인지질로부터 포스파티딜세린 제조 및 대량 생산 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•DHA 함유 포스파티딜세린 분리 정제 및 세부과제 제공</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-새로운 공정방법으로 DHA 함유 포스파티딜세린 분리 정제하여 세부과제에 제공하였음</li> </ul>	-새로운 공정방법으로 DHA 함유 포스파티딜세린 분리 정제하여 세부과제에 제공함
	<ul style="list-style-type: none"> <li>•해산물 유래 DHA함유 인지질 제조 및 대두 포스파티딜세린 복합 제제 제조</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•DHA 함유 인지질 대두 포스파티딜세린과의 복합 제제 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-DHA 함유 인지질 대두 포스파티딜세린과의 복합 제제 개발하였음</li> </ul>	-DHA 함유 인지질 대두 포스파티딜세린과의 복합 제제 개발하였음

구분	연구 방법	연구내용	연구결과	결론
2년 차 (’10 년)	•TMT, ibotenic acid 또는 saporin 등 신경독성물질 주입에 의한 기억손상 동물모델에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증 및 비교분석	•기억장애 동물모델에서 행동장애 관찰 및 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 효능 확인 •행동학적 변화의 유의성을 통한 기억력 개선 효능 확인 및 비교 분석	-TMT를 injection한 동물에서는 정상군에 비해 유의하게 기억행동이 감소했다. 하지만, 뇌내 PS유사 포스파티딜세린을 투여하면, TMT로 인한 기억장애 행동이 유의하게 줄어들었음	뇌내 PS유사 포스파티딜세린을 투여하면, TMT로 인한 기억장애 행동이 유의하게 감소함
	•뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 세포주 기반 기억력 증진기전 규명	•PC 12 cell에 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 처리 후 세포분화 증진 효과 규명	-PC 12 cell에 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린을 처리 후 neurite 길이 측정	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린은 PC12 cell의 neurite 증진효과가 있음
	•DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술	•DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술	-DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술	-DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술 보유함
	•DHA 함유 PS 제품 생산 기술	•DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술	-DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술	-DHA 함유 PS 나노 유화액 개발 기술 보유함



## 5. 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 5.1. 총괄연구개발과제의 목표달성도

구분	연구목표	연구개발 수행내용	가중치(%)	평가기준	성과실적	자체평가(%)
제1세부과제	•정상의 젊은 동물 및 노령 동물에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증 및 비교 분석	•정상 동물모델에서 행동장애 관찰과 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 효능 확인	25%	•정상 동물모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 투여 후 기억 행동 효능 확인 •정상 동물모델에서 뇌내 PS유사 포스파티딜세린의 투여 후 뇌세포 성장 촉진 효과 확인	국외 학술대회 발표 1건	100%
	•MicroPET/SPECT/CT 생체영상 분석을 이용한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명 및 기억과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성	•뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자 합성	25%	•정상 쥐에서 동물 모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 투여 후 기억 관련 뇌부위 glucose activity 증가 확인	국외 학술대회 발표 1건	100%
	•TMT로 유도된 기억장애 모델에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증 및 비교 분석	•TMT로 유도된 기억장애 동물모델에서 행동장애 관찰과 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 효능 확인	25%	•TMT로 유도된 기억장애 동물모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 투여 후 기억 행동 효능 확인 •TMT로 유도된 기억장애 동물모델에서 뇌내 PS유사 포스파티딜세린의 투여 후 뇌세포 성장 촉진 효과 확인	국내 학술대회 발표 1건	100%
	•MicroPET/SPECT/CT 생체영상 분석을 이용한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명 및 기억과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성	•뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자 합성	25%	•TMT로 유도된 기억장애 모델에서 동물모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 투여 후 기억관련 뇌부위 glucose activity 증가 확인	국내 학술대회 발표 1건	100%
	계		100%			100%

구분	연구목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	평가기준	성과실적	자체평가 (%)
제2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>포스파티딜세린(PS)의 배양 세포에서의 신경독성물질인 베타아밀로이드에 의한 독성 억제 및 뇌세포사 보호 활성을 비교 분석하여 작용기전 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Raw264.5세포에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포독성 및 염증억제 관련 활성 인자 비교 분석</li> </ul>	30%	LPS 유발 세포독성에 대한 세포주 기반 신경세포보호 효과 검증 및 작용기전 규명	Raw264.5세포에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포독성 및 염증억제 관련 활성 인자 비교 분석 완료	100%
	<ul style="list-style-type: none"> <li>PS의 흥분성 아미노산인 glutamate에 의한 뇌신경세포에서의 세포독성 억제 및 뇌세포사 보호 활성을 비교 분석하여 작용기전 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y에서 MTT+처리 세포독성에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 신경세포보호효과 비교 분석</li> </ul>	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>흥분성아미노산에 의한 세포사역제의 생화학적 기전규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y에서 MTT+처리 세포독성에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 신경세포보호효과 비교 분석 완료</li> </ul>	100%
	<ul style="list-style-type: none"> <li>일차배양 신경세포에서의 신경세포보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>임신 15~16일째의 Rat embryo로부터 대뇌피질을 분리하여 neuron 1차 배양</li> </ul>	40%	일차배양 신경세포에서의 신경세포보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 증가, glutamate 유리량, 활성산소(ROS) 생성, caspase 활성화에 대한 억제효과를 검토</li> </ul>	20%
	계		100%			

구분	연구목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	평가기준	성과실적	자체평가 (%)
제3세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ DHA 함유 난황 인지질로부터 포스파티딜세린 제조 및 대량 생산 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 포스포리파제A를 이용한 DHA의 인지질내로 incorporation 제조 연구 및 이를 기질로 이용 포스포리파제 D를 이용한 포스파티딜세린 제조 연구</li> <li>◦ DHA 함유 난황 인지질로부터 포스포리파제 D를 이용한 포스파티딜세린 제조 연구</li> <li>◦ DHA 함유 포스파티딜세린 분리 정제 및 세부 과제 제공</li> </ul>	25%	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 난황 유래DHA 함유 인지질을 이용한 PS 생산타당성 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 각 원료로부터 PS 제조 검토 완료</li> </ul>	100%
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 해산물 유래 DHA함유 인지질 제조 및 대두 포스파티딜세린 복합 제제 제조</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 해산물 유래 DHA 함유 인지질 원료 수배</li> <li>◦ DHA 함유 인지질 원료별 분석 및 농축 정제</li> <li>◦ DHA 함유 인지질 대두 포스파티딜세린와의 복합 제제 개발 및 세부 과제 제공</li> </ul>	25%	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 해양 유래DHA 함유 인지질을 이용한 PS 생산 조건 최적화 실시 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 대량생산을 위한 원료 타당성 검토 실시</li> </ul>	100%
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ DHA 함유 포스파티딜세린 대량 생산 공정 수립 및 규격화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ DHA 함유 난황 인지질로부터 포스파티딜세린 대량 생산 공정 검토</li> <li>◦ 해산물 유래 DHA 함유 인지질 대량 생산 위한 생산 공정 검토</li> <li>◦ 선발된 기억력 개선 등의 효능이 높은 제제의 대량 생산 최적화</li> </ul>	25%	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 양산 가능한 원료로 PS 대량 생산을 위한 시생산 조건 확립 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 타당성이 높은 크릴 유래 원료로 PS 대량 시생산 실시 완료</li> </ul>	100%
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 건강 기능 식품 소재화</li> <li>◦ 음료 적용을 위한 나노 유화액 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 건강 기능 식품 소재화를 위한 소재 규격화, 안정성 및 안전성 검토</li> <li>◦ 음료 적용이 가능하도록 수용성 가용화 나노 유화 제형 개발</li> </ul>	25%	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 음료에 적용가능한 용해도와 입도를 지닌 PS 제형개발 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 음료에 적용가능한 용해도와 입도를 지닌 PS 제형개발 완료 및 시제품 제조</li> </ul>	100%
	계		100%			

## 5.2. 관련분야 기여도

### 1. 과학·기술적 측면

- 정상인의 학습과 기억기전이해와 더불어 기억증지제제 개발을 위한 동물모델 확립이 시급한 시점에서, 이런 문제점 해결을 위해 학습과 기억에 관련된 중요 신경회로를 규명하고, 이에 근거한 실험적 기억, 학습 연구 동물 모델 확립하였음.
- 표준화된 동물모델에서의 효과 검증된 천연재료를 이용하여, 기능성 신소재의 응용·제품화 할 수 있는 가능성을 열었음.

### 2. 산업·경제적 측면

- 신경세포 손상약물과 다양한 처치 방법을 통한 기억장애 동물모델 확립과 기억증진 후보 물질검증을 하였고, 검증된 후보물질은 통해 고부가가치상품을 창출해 국가경쟁력을 재고할 수 있으며, 국민경제에 이바지하고 삶의 질과 만족도를 향상시킬 수 있음
- 유효성과 안정성이 확보된 제품의 개발로 국민건강증진에 이바지하여 수출을 통한 스타상품을 개발할 가능성을 열었음

### 3. 사회·문화적 측면

- 2015년 우리나라 65세 이상 치매노인은 9.0%으로 늘어날 것으로 전망하여 이로 인한 개인과 환자의 고통과 경제적 생산성의 손실 및 사회문제 또한 매우 심각할 전망
- 효과적인 기억증진물질을 위하여 국가 및 개인기업 차원의 관심 있는 투자를 늘릴 기회를 창출.
- 우수한 연구결과를 도출하여 해외 학회지에 발표하고 국내 언론에 홍보함

## 6. 향후 연구성과 추진 계획 (해당사항 없음)

## 7. 연구개발결과의 파급효과

### 7.1. 기술적 파급효과

본 연구를 통하여 정립된 여러 가지 기억장애 동물모델은 실험동물을 이용한 전 임상연구에서 기억장애모델의 정확한 기준과 실험데이터의 체계적인 정립을 기대할 수 있다. 또한 본 연구에서의 각 동물모델에서의 뇌내 포스파티딜세린을 이용한 실험데이터의 비교, 분석은 임상연구 및 기능성 물질의 메카니즘을 증명하는 데 있어서 중요한 자료가 된다.

### 7.2. 경제, 산업적 파급효과 (해당사항 없음)

### 7.3. 사회적 파급효과

-또한, 고령화 사회로의 변화에 있어서 본 연구는 'well-being'을 주도하는 연구로써, 동물실험 뿐 아니라 더 나아가 임상실험을 거쳐 효능이 확인된다면, 의약학계의 발전에 기여할 것이며 나아가 인간의 삶의 질 향상에 있어 큰 영향을 미치게 될 것이다.

## 8. 연구개발결과의 활용계획

### 8.1. 연구개발결과의 활용계획 및 추가연구의 필요성

크릴 유래의 PS는 대두 PS와 비교하여 볼 때 인지질에 DHA 및 EPA가 결합되어 있기 때문에 뇌에 존재하는 PS에 보다 가깝고 대두 유래 PS와 효능이 더 강하다. 또한 아스타잔틴 함유 및 오메가 3 결합 인지질이 갖는 항혈전, 혈행 개선 작용, 눈 건강 개선 등 추가적인 효능이 예상된다. 따라서 이에 따른 부가적인 효능의 규명이 이루어지게 되면 현재 시장의 main인 대두 PS를 빠른 시간 내에 대체할 수 있을 것으로 기대가 된다.

그러나 현재의 결과를 가지고 사업화를 하기엔 실제 임상에서의 결과가 부재하고 독성데이터에 대한 결과가 부족하여 실제적인 사업화를 위해서는 현 과제의 결과를 토대로 독성 테스트 및 임상 시험이 필수적이다.

## 8.2. 사업화(기업화) 목표 달성도 및 계획

과제에서 목표로 하였던 Krill PS의 효능 검증이 이루어졌으며 대두 PS와 비교하여 보다 비교 우위에 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 실제 상업화를 위해서는 장벽이 있는 것이 현실이다.

우선 크릴 PS의 원료가 되는 크릴 인지질의 가격이 현재 매우 고가이며 이의 경제적 생산이 매우 중요하다. 그래야만이 현재의 시장이 main인 대두 PS 대비 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단되며 이를 위해 다양한 루트를 통해 경제적 크릴 인지질의 확보를 위해 노력 중이다.

또한 본 연구 결과는 크릴 유래의 PS가 대두 PS 대비 효능 효과 측면에서 어느 정도 우위에 있는지를 확인하는 과정이었고 이것이 사업화까지 연결이 되기 위해서는 제조된 크릴 PS의 독성 시험 및 임상 시험이 수행되어 실제로 사람에게 효능이 있는 지 확인이 되어야 사업화가 비로서 가능하다. 따라서 현재 도출된 결과는 크릴 PS의 사업화를 위한 시작이라고 볼 수 있다.

현재 본 연구 결과를 토대로 경제성 및 시장성을 판단한 후에 임상 시험 진입 여부를 결정할 예정이다.

## 8.3. 사업화 수준(계획 및 완료 포함)

기 확보된 사항

- DHA 및 EPA가 결합된 크릴 PS의 세포실험, 동물 실험 data가 확보 되었다.
- 크릴 PS의 대량 양산 공정이 확립되었다.
- 크릴 PS의 분말 원료 제품 및 오일타입의 원료 제품의 시제품 확보

추후 실행 계획

- 대두PS 및 크릴 PS의 효능 대비 경제성 비교
- 기억력 개선 및 치매 예방 등 뇌기능 개선 관련 국책과제 연구비 조달을 통한 독성 시험 및 인체 시험을 통해 실제적 사업화를 위한 효능 효과를 검증할 예정이다.
- 사업화 시기는 이의 임상 결과가 도출 완료되어 인체 효과가 입증되게 되면 2013년부터 하반기부터 해외 전시회 및 해외 사업 파트너를 통한 프로모션을 통해 선진 시장인 미국, 일본, 유럽으로의 사업화 가능성을 타진해 볼 예정이다.

## 9. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 9.1 동 연구 분야의 국외 시장 현황 및 시장 규모

#### ◆ 미국

국립보건원 (NIH)은 1990년 1월 의회가 선언한 [Decade of the Brain]을 실천하기 위해 뇌연구에 대규모 연구비를 투자 했다. 2004년 회계연도를 기준해 NIH의 재정지출 현황을 보면 17개 사업 중 가장 많은 재정이 투입된 분야는 신경과학 연구로 무려 48억1천 190만 달러, 당시 환율을 기준해 한화 5조 7천 500만원을 지출한 것으로 돼 있다. NIH는 산하에 NIA (National Institute on Aging)를 설치하여 치매에 관한 기초의학, 임상연구, 임상시험과 역학 연구를 수행하고 있다. NIA의 연구지원 분야는 노인층에서 유병률이 높은 파킨스병, 당뇨, 심혈관, 암 등 다양한데 그 중에서도 치매 연구에 70% 이상의 예산을 투입하며 연구에 관심을 쏟아 붓고 있다. 특히 치매의 경우에는 미국 전역에 산재한 대학 임상 연구센터 형태의 29개 치매센터 (ADC, Alzheimer's Disease Center)를 지정해 치매의 진단, 치료 및 임상시험 연구에 힘을 기울이고 있는데 전국 규모의 NACC (National Alzheimer's Coordinating Center)를 두고 각 치매센터 간의 연구결과를 표준화하고 네트워크를 구축해 연구결과 협력 및 시너지 효과를 도출하고 있어 치매 연구의 모델케이스가 되고 있다.

기업내의 연구현황 : 노바티스 [엑셀론] '98년 FDA 승인

#### ◆ 일본

과기청은 이화학연구소 소속 뇌 과학 종합연구소에 연간 약 100억 엔을 투자하여 뇌의 이해 보호 창조 연구를 추진하였으며, 정부가 직접적으로 뇌 과학 연구에 관여하면서 중앙통제시스템이 구축되고 있다. 국립장수과학연구소 (NILS)에서는 노인병, 유전자, 전염병 등 21개 분야에 걸쳐 실험실을 두고 노화와 노인질환의 기초 및 임상연구, 역학연구를 수행해왔는데 2004년 4월 NILS와 추부 국립병원 (NMCG)를 국립노인병 의료센터 (NCGG)로 합병하고 종합 연구시스템을 구축했다.

기업내의 연구현황 : 에자이사 [아리셉트] '99년 FDA 승인

#### ◆ 유럽등

프랑스의 경우 고학기술조정위원회는 정부지원 연구의 우선순위에서 “살아있는 것의 과학 (게놈, 약품학, 뇌연구등)”을 1순위로 발표 하였으며, 1999/2000년도에 뇌 연구를 포함한 생명과학분야에 총 4억 프랑을 투자하였다.

또한, OECD 거대과학포럼 (Mega Science Forum)은 신경정보학 연구의 촉진과 범국가적 공동연구의 필요성을 제안 (1999년 1월 신경정보학 소위원회)하였다.

이스라엘은 뇌 연구를 주요 국가사업으로 정하고 Weizmann Institute of Science등에서 활발하게 연구 중에 있다.

### 9.2. 동 연구 분야의 국내 시장 현황 및 시장 규모

우리나라는 인구의 노령화가 급속히 진행되고 있어 2010년이면 노인인구 비율이 9.9%로 증가하여 고령화 사회로의 진입을 목전에 두고 있다 (통계청, 1996). 따라서 우리나라도 향후 20년간 치매노인의 수가 급속히 증가할 것으로 예상되며 2020년에 이르면 최소한 약 40-60만 명의 치매환자가 있을 것으로 추정된다. 치매로 우리나라는 연간 7조 3000억원(국민건강보험공단, 2005) 정도이며, 향후 치매노인 환자의 급증과 이로 인한 사회적 부담이 더욱 증가될 것으로 전망. 현재 추세라면 45%인 90세 이상의 생존율이 21세기 중반에는 65%로 50%이상 증가될 것으로 보인다. 하지만, 치매 치료제는 98% 이상이 외국 제약회사에서 개발된 제품이다.

이에, 한국도 뇌 과학과 관련 세계적인 추세를 따라가고 있다. 1997년 9월 30일 '뇌 연구 개발기본계획'을 발표한 데 이어 세계에서 최초로 98년 6월 '뇌연구촉진법'을 입법화하고 뇌과학을 21세기 프론티어 사업으로 선정했다. 뇌연구촉진법에 따라 지난 1998년 8월 NIH 내에 성치된 질병관리본부 뇌의약연구센터에서는 치매, 우울증, 약물중독, 뇌졸중, 정신분열증, 간질 등 그동안 불치의 병으로 알려진 뇌 관련 질병들의 원인과 예방, 치료에 관한 연구를 진행하고 있다. 그러나, 뇌과학만을 전담 연구할 수 있는 규모 있는 이렇다 할 공공 연구기간이 부재한 상황에서 연구수행에 어려움을 겪고 있는 것으로 알려졌다.

하지만, 최근 기업 또는 외국기업과의 기술 제휴 등으로 연구가 점차 확대되어 가고 있는 실정이다.

◆ (주)KT&G (구 한국담배인삼공사)

- 인삼 및 홍삼 등의 생약을 이용해 뇌기능 보호효과 있는 보조제 연구 개발 추진

◆ (주)일양약품

- "BT-11"이라는 아세틸콜린 에스터라제를 억제해 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하지 않도록 함으로써 치매예방, 기억력과 학습력 증진 등 효과를 내는 건강음료 개발.

◆ (주)시넵텍

- "HSC-101"로 이름 붙인 이 추출물을 투약한 생쥐는 뇌손상이 60% 감소했고 신경세포 성장과 기억력 실험에서는 30% 이상 증진효과가 나타났다.
- 현재까지 규명된 약효로 미뤄 성장기 학생들의 학습효능 증진 등 응용분야는 매우 광범위하다. 또한, HSC-101은 뇌졸중 및 치매 예방과 치료에 활용할 수 있기 때문에 의약품과 식품으로 함께 개발할 예정임.

◆ (주)광동제약

- 메디프론디비티와 공동 개발중인 DBT-1339 치매 치료제의 특허를 미국, 유럽, 일본, 중국 등 전 세계 20개국 공동으로 출원.



## 10. 참고문헌

- (1) 김근우, 구병수. 동국대학교 한의과대학 신경정신과교실. L-NAME으로 유발된 학습기 기억장애와 뇌허혈 손상에 관한 대조환의 효과 2000.08 21(2) 대한한의학회지
- (2) 박찬원, 이진우, 채한, 홍무창, 신민규. 경희대학교 한의과대학 생리학교실. 비기능이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구 2000.01 20(4) 대한한의학회지
- (3) 이웅석, 황의완, 김현택, 박순권. 조위승청탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향 1998.11 21(1) 경희대논문집
- (4) 정재환, 김덕곤, 정승기, 이진용, 김장현, 조규석. 경희대학교 한의과대학 소아과학교실. 녹용 및 보아탕 가 녹용이 어린 흰쥐의 학습과 기억에 미치는 영향 2000.07 23(1) 경희대논문집
- (5) Carli M, Balducci C, Samanin R. Low doses of 8-OH-DPAT prevent the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine through 5-HT(1A) receptors in the dorsal raphe.
- (6) Hiramatsu M, Inoue K. Improvement by low doses of nociceptin on scopolamine-induced impairment of learning and/or memory. *Eur J Pharmacol.* 2000 Apr 28;395(2):149-56.
- (7) Hsieh MT, Lin YT, Lin YH, Wu CR. Radix Angelica Sinensis extracts ameliorate scopolamine- and cycloheximide-induced amnesia, but not p-chloroamphetamine-induced amnesia in rats. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):263-72.
- (8) J Altern Complement Med 1997 Winter;3(4):327-36. Effect of Trasina, an ayurvedic herbal formulation, on experimental models of Alzheimer's disease and central cholinergic markers in rats. Bhattacharya SK, Kumar A. Department of Pharmacology, Banaras Hindu University, Varnasi, India.
- (9) Janis LS, Glasier MM, Fulop Z, Stein DG. Intraseptal injections of 192 IgG saporin produce deficits for strategy selection in spatial-memory tasks. *Behav Brain Res.* 1998 Jan;90(1):23-34.
- (10) Ma JY, Yang JM, Joo HJ, Lee MY, Park JH, Jung KY. Improvement of cerebral ATP and choline deficiencies by Shao-Yin-Ren Shi-Quang-Da-Bu-Tang in senescence-accelerated mouse prone 8. *J Ethnopharmacol.* 1999 Nov 30;67(3):297-305.
- (11) Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci.* 2000 Feb 15;20(4):1568-74.
- (12) Nag S, Tang F. Department of Physiology, The University of Hong Kong, China. Cholinergic lesions of the rat brain by ibotenic acid and 192 IgG-saporin: effects on somatostatin, substance P and neuropeptide Y levels in the cerebral cortex and the hippocampus. *Neurosci Lett* 1998 Aug 14;252(2):83-6
- (13) Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res.* 1993 Dec

31;632(1-2):36-40.

(14) Sarkisian MR, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Hori A, Holmes GL, Stafstrom CE. Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia*. 1997 Nov;38(11):1157-66.

(15) Shen J, Barnes CA, Wenk GL, McNaughton BL. Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav Neurosci*. 1996 Oct;110(5):1181-6.

(16) Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000;97(2):253-66.

(17) Stubbley-Weatherly L, Harding JW, Wright JW. Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res*. 1996 Apr 15;716(1-2):29-38.

(18) Toriizuka K, Hou P, Yabe T, Iijima K, Hanawa T, Cyong JC. Effects of Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San), on choline acetyltransferase activity and norepinephrine contents in brain regions, and mitogenic activity of splenic lymphocytes in ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol*. 2000 Jul;71(1-2):133-43.

(19) Tusda T, Liu YZ, Sugaya A, Katoh K, Hori K, Tanaka S, Nomura M, Sugaya E. Reinforcement effects of *Boschniakia rossica* on discrimination learning in cholinergic lesions of rats. *J Ethnopharmacol*. 1994 Oct;44(2):67-71.

(20) Wiley JL, Willmore CB. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on timing and short-term memory in rats. *Behav Pharmacol*. 2000 Aug;11(5):421-9.

(21) Wrenn CC, Wiley RG. The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: lessons from 192 IgG-saporin. *Int J Dev Neurosci*. 1998 Nov-Dec;16(7-8):595-602. Review.

### III. 제 1세부 연구과제 연구결과

#### 제 1 세부 연구과제 연구결과

세부연구과제명 : 동물모델에서 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의  
행동학적 변화 및 생체영상분석을 통한 기억력 개선 효능 규명

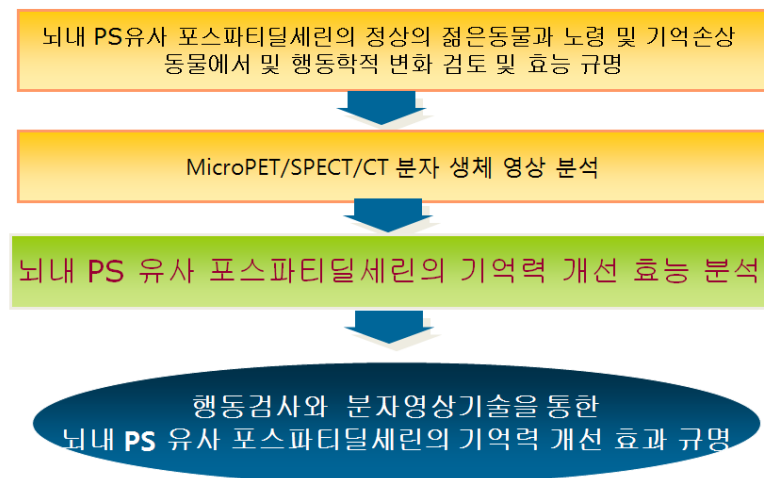
세부연구책임자 : 심인섭 / 경희대학교 / 행동신경과학

## 1. 연구개발과제의 목표

- 정상의 젊은동물과 노령 및 기억손상 동물모델에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증 및 비교 분석
- MicroPET/SPECT/CT 생체 영상 분석을 이용한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명 및 기억과 관련된 AChE의 영상화와 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성 및 생물학적 평가

## 2. 연구개발과제의 추진체계

### 2.1.추진전략



### 2.2.추진체계

구분		1단계 ('09년 ~ '11년)							
		1년차				2년차			
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
제 1 세 부	정상 및 노화 동물에서 행동학적 변화 검토 및 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 분석	→	→						
	MicroPET/SPECT/CT 생체영상 분석을 이용한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효과 규명과 기억과 관련된 acetylcholinesterase의 영상화				→				
	기억손상 동물에서 행동학적 변화 검토 및 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능 검증					→	→		
	뇌내 PS 유사 포스파티딜세린, aricept의 생체 영상 결과 분석과 기억장애 진단용 방사성 추적자의 합성 및 생물학적 평가							→	→

## 3. 연구개발수행 내용 및 결과

### 3.1. 연구개발 수행 내용

기존에 시판되고 있는 대두 포스파티딜세린 이외에 신규한 뇌내 포스파티딜세린과 유사한 DHA함유 포스파티딜세린을 개발하고 이에 대한 아직 시도 되지 않았던 기억력 개선 효능 과 아울러 인지 능력 개선능의 효능을 조사하고자 한다.

#### 3.1. 실험 동물 (정상적 젊은 동물)

정상적 젊은동물 에서 행동학적 변화를 통한 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 기억력 개선 효능검증 및 비교분석

#### 3.2. 기억장애 동물 모델

○ Trimethyltin (organotin compound, 8mg/kg, single dose) 복강 내 투여에 의한 변연계 손상을 시사하는 이상 신경행동 유발과 신경병리학적으로 해마의 과립세포, 아몬각의 추체세포, 신피질, 편도핵 등 특정부위 신경세포의 선택적 손상

#### 3.2. 학습 및 기억 행동 시험

3.2.1. Morris water maze(수중미로검사)를 이용한 공간학습능력 측정을 통하여 행동학적 변화 관찰

-수중미로를 균등하게 4등분하고 한 구역 중간에 2 cm 정도 수면 아래에 원형 플랫폼(12cm diam)이 위치하게 하였다. 수중미로의 주변은 비디오 카메라 그리고 공간 단서들을 일정하게 유지한다. 행동검사 1주일 중 6일동안은 획득시행 (acquisition test)을 실시하여 하루에 4시행씩 훈련을 하고 학습능력을 평가하며, 7일째는 파지시행(retention test)을 실시하여 자유수영 검사를 통해 실험동물의 학습능력과 기억력을 테스트 한다. 모든 동물들의 행동은 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 자유수영 검사 시행에서는 훈련시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 측정하여 분석한다.

3.2.2. Passive avoidance task(수동회피검사)를 통한 명시적기억 측정을 통하여 행동학적 변화 관찰

-실험동물을 상자 바깥에 설치되어 있는 난간에 동물의 머리가 어두운 상자 반대로 향하게 올려놓는 동시에 상자를 통하는 문을 열고, 난간 위 45cm 지점에 설치된 조명장치를 통해 50W의 불빛을 동물에게 비춘다. 장치는 바닥에서 62cm 되는 지점에 설치되어 있어서 난간 위의 동물은 위험 상태에 노출된다. 이런 조건에서 동물은 밝은 곳을 피해 어두운 상자로 들어가는 회피반응을 보인다. 24시간 후, 동물이 어두운 상자로 들어가는 순간 슬라이드 문을 닫음과 동시에 불을 끄고, 불이 꺼지는 순간 자동적으로 타이머로 세팅된 전기충격이 상자의 바닥에 깔려있는 알루미늄 격자를 통해 부여된다. 24시간 후, 동일한 절차를 사용하되 전기충격을 넣지않고, retention test를 실시한다. 훈련시행과 검사시행 모두에서 동물이 위험상황인 높은 위치의 난간에서 어두운 상자를 들어가는데 소요된 response latency가 기억성적으로 측정된다.

### 3.3. MicroPET/SPECT/CT 분자 영상 분석

뇌 질환 영상을 획득하기 위해 정상의 젊은동물 및 기억장애 동물모델을 구축하여 PET 또는 SPECT의 영상을 얻고자 한다. 방사성동위원소가 표지 되어 있는 glucose 방사성추적자를 꼬리정맥에 주사한다. 그리고 각 시간 별 (5, 15, 30, 60, 120, 180 분)로 PET 또는 SPECT의 영상을 얻음으로써, 시간의 변화에 따른 기억손상 부위에서의 영상을 통해 기억장애 조기진단의 여부뿐만 아니라 방사성추적자의 체내 분포를 영상을 통해 살펴본다. 알려져 있는 기억손상 부위의 길항제와 방사성추적자를 함께 주사하여 영상 결과의 변화를 비교해 봄으로써, 새로운 방사성추적자의 표적 부위의 결합에 대한 선택성을 관찰 한다.

### 3.4. Immunohistochemistry를 이용한 뇌조직 분석

Medial septum, hippocampus 부위에서 ChAT(choline Acetyltransferase), AchE(acttylcholinesterase), CREB, BDNF, IGF 면역화학조직염색을 통한 신경세포 관찰: 모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital(100mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 고정액(fixative) 900ml로 심장을 통해 관류한다. 처음 고정액 200ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700ml은 25분간 천천히 관류한다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2~3시간동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 인산완충액(PBS)에 넣어 4℃에서 하루동안 보관한다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 microtome(Leica, CM1850, Germany)을 이용하여 뇌 조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마, 내측 중격 부위에서 30μm의 두께로 자른 다음 PBS로 조직을 몇 차례 씻은 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT, AchE, CREB, BDNF antibody(Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용한다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azide(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4℃에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양한다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep and rabbit serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 행군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine(DAB)을 사용하여 발현시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰하였다. 200×200 μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 내측 중격과 해마에서 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정한다.

### 3.1. 연구개발 수행 결과

#### 3.2. 정상 젊은 동물에서의 대두, 새우 유래 PS의 기억증진 효과 비교 분석

##### 3.2.1. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 획득시행에 미치는 효과

정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 획득시행에 미치는 효과는 다음 그림 1과 같다. Normal군에 비해 Krill 100 투여군은 latency time이 시간이 지남에 따라 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 하지만, 그룹간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

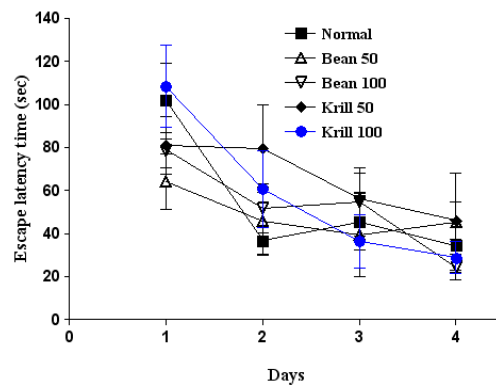


Fig. 1. Time to escape (latency) during acquisition trials during the Morris water maze test.

##### 3.2.2. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 획득시행에 미치는 효과

수중미로의 획득시행 결과는 다음 그림 1과 같다. Normal군에 비해 Krill 100 투여군은 Crossing number와 도피대 주위를 머무는 시간이 증가하는 것을 알 수 있다.

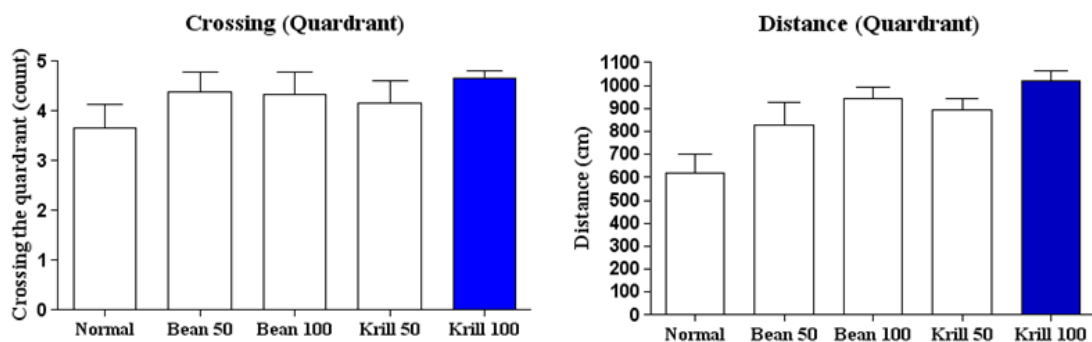


Fig. 2. Time spent around the platform and crossing number on the platform during the retention test.

### 3.2. 정상 젊은 동물에서의 대두, 새우 유래 PS의 기억증진 효과 비교 분석

#### 3.2.3. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 수동회피학습의 검사시행에 미치는 효과

정상의 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 수동회피학습의 검사시행에 미치는 결과는 다음과 같다. Krill 50군은 2,3,4일째 기억행동이 증가 하는 경향을 보였다. 하지만, 그룹간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

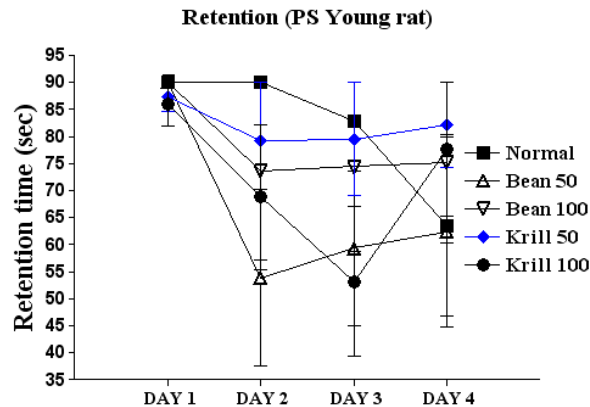


Fig. 3. Retention time on the passive avoidance test.

#### 3.2.4. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 뇌내의 BDNF의 발현에 미치는 효과

행동 실험이 끝난 후, 뇌를 적출하여 hippocampus에서 BDNF의 발현을 관찰한 결과는 다음과 같다. Krill 50군은 Normal군에 비해 약 50%가량 증가하는 것을 알 수 있다.

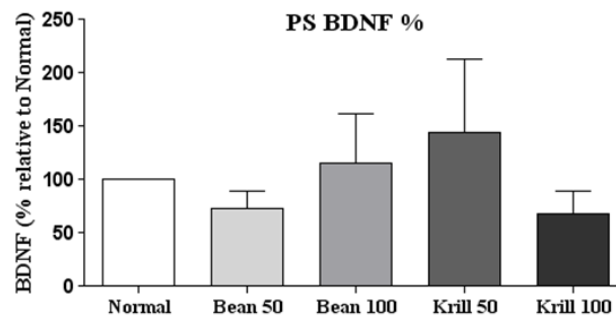


Fig. 4. The expression of BDNF in the hippocampus

#### 3.2.5. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 BDNF의 발현에 미치는 효과

행동 실험이 끝난 후, 뇌를 적출하여 hippocampus에서 BDNF의 발현을 관찰한 결과는 다음과 같다. Hippocampus의 CA1에서 Krill 100군과 Bean 100 군은 Normal군에 비해 BDNF의 발현이 유의하게 증가된 것을 알 수 있다. 또한, CA3부위에서도 Bean 100군과 Krill 50군이 Normal에 비해 유의하게 BDNF가 증가하는 것을 알 수 있다.



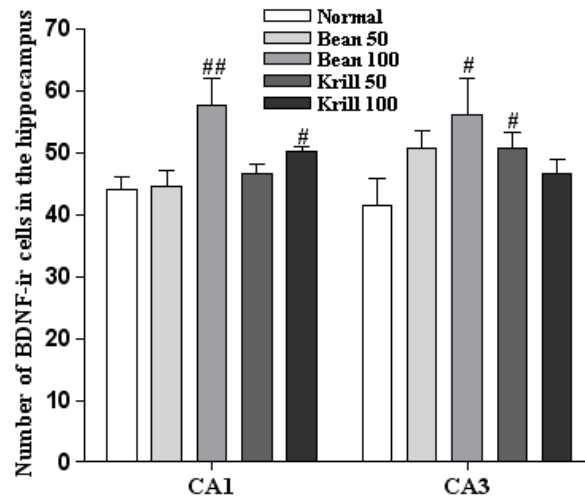


Fig. 5. The expression of BDNF in the hippocampal CA1

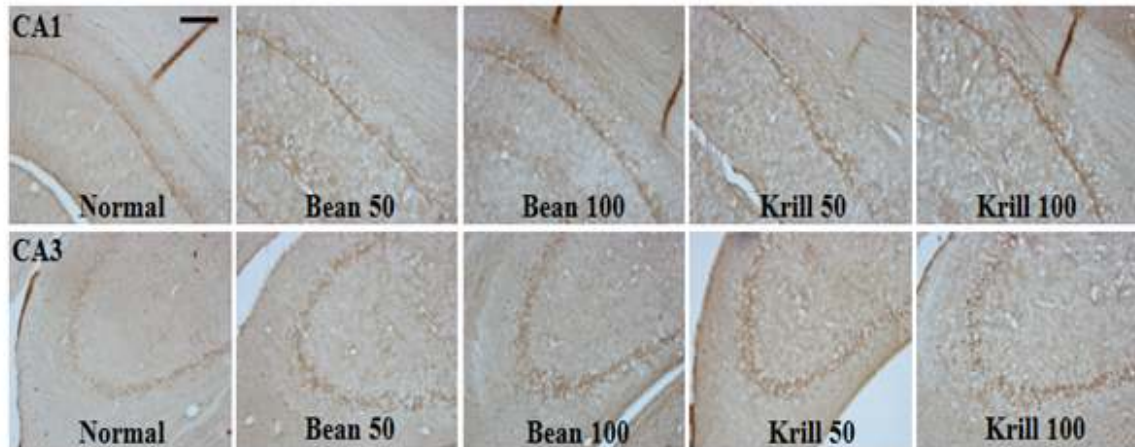


Fig. 6. The representative photographs of BDNF ir neurons in the hippocampal CA1 and CA3

3.2.6. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 IGF의 발현에 미치는 효과  
 행동 실험이 끝난 후, 뇌를 적출하여 hippocampus에서 IGF의 발현을 관찰한 결과는 다음과 같다. Krill 100군은 Normal군에 비해 약 13%가량 증가하는 것을 알 수 있다.

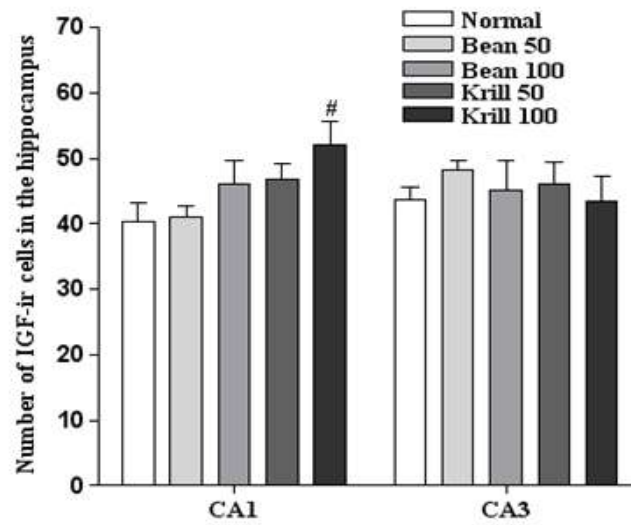


Fig. 7. The expression of IGF in the hippocampal CA1



Fig. 8. The representative photographs of IGF ir neurons in the hippocampal CA1 and CA3

3.2.7. 정상 젊은 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 Glucose activity에 미치는 효과  
 Normal 군에 비해 Krill 50군의 뇌내 glucose activity가 유의하게 증가하였다. 또한, Bean 50군과 Bean 100 군에서도 Normal군에 비해 유의하게 증가된 것을 알 수 있다.

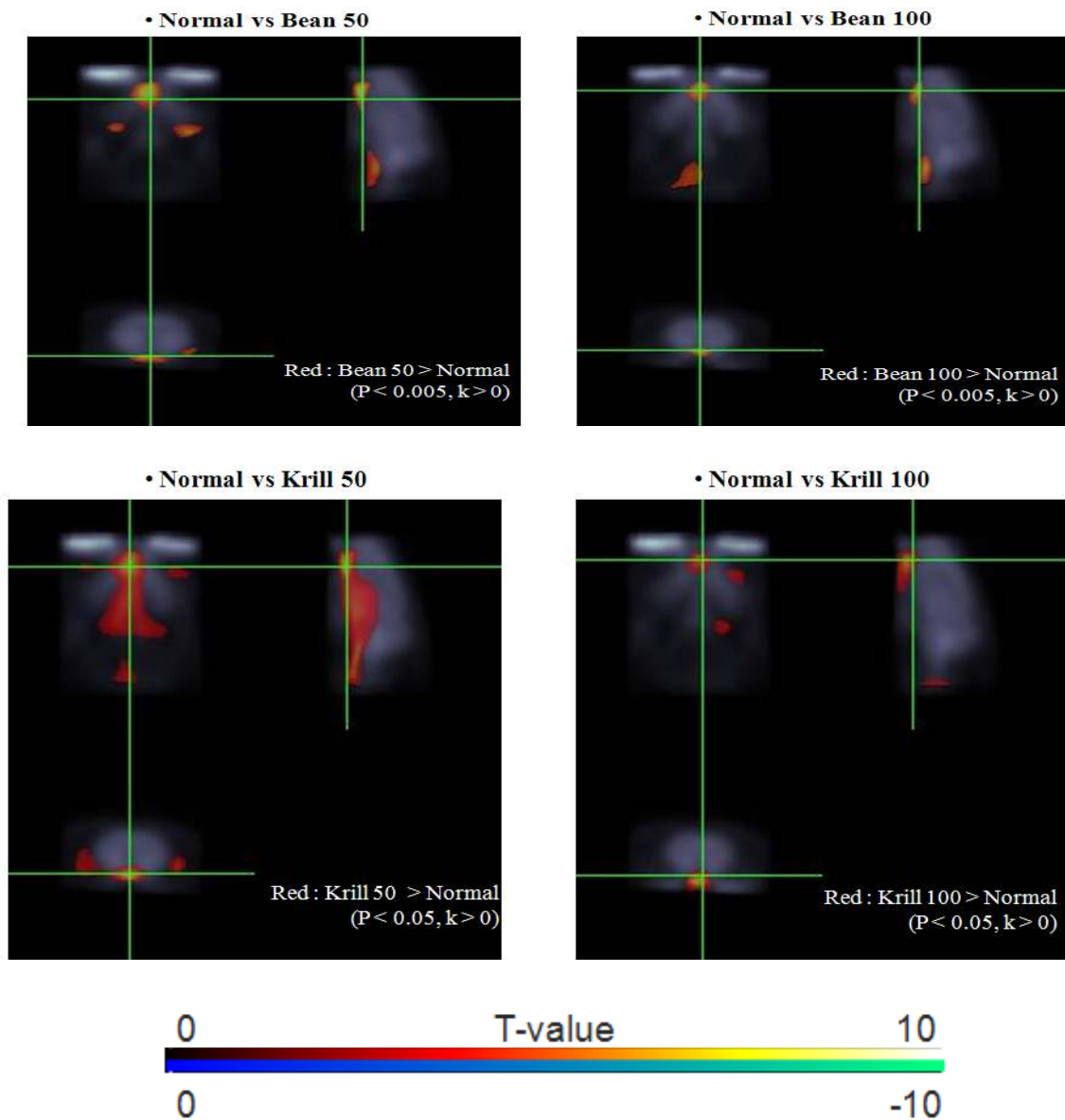


Fig. 9. Changes in brain glucose metabolism

#### 4.2. TMT로 인한 기억장애 동물에서의 새우 유래 PS의 기억증진 효과 비교 분석

##### 4.2.1. TMT로 인한 기억장애 동물에서 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 획득시행에 미치는 효과

수중미로의 획득시행 결과는 다음 그림 1과 같다. Normal군에 비해 MCT군은 시간이 지남에 따라 도피대를 찾아가는 시간이 길어졌다. 하지만, Bean 50, 100 그룹 및 Krill 100 투여군은 latency time이 시간이 지남에 따라 MCT에 비해 도피대를 찾아가는 시간이 유의하게 줄어드는 것을 확인할 수 있다.

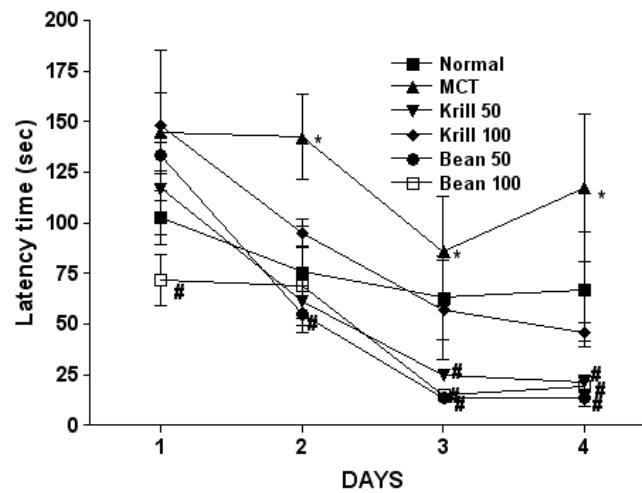


Fig. 10. Time to escape (latency) during acquisition trials during the Morris water maze test.

4.2.2.TMT로 인한 기억장애 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 검사시행에 미치는 효과

수중미로의 검사시행 결과는 다음 그림 1과 같다. Normal군에 비해 MCT군은 도피대에 머문 시간이 짧았다. 하지만, Bean 100 그룹 및 Krill 100 투여군은 도피대 주위에 머문 시간이 MCT에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

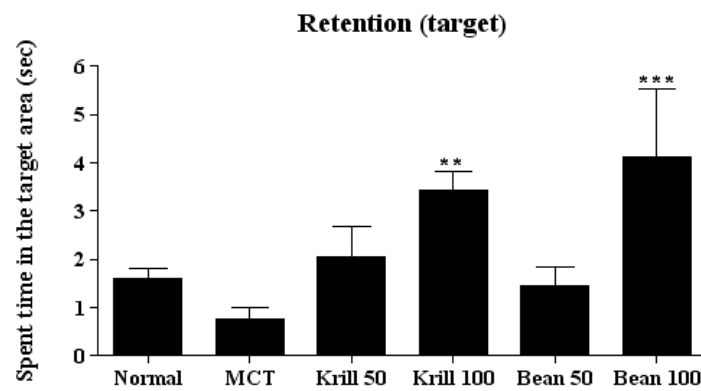


Fig. 11. spent time around the platform during the Morris water maze test.

4.2.3.TMT로 인한 기억장애 동물에서 대두, 새우 유래 PS가 뇌내의 cholineacetyltransferase 의 발현에 미치는 효과

행동실험이 끝난 뒤 실험동물의 뇌에서 cholineacetyltransferase 의 발현 결과는 다음과 같다. MCT군에 비해 Bean 및 Krill PS의 투여 군에서는 ChAT의 발현이 약 1.5~2배 가량 증가하는 것을 알 수 있다.

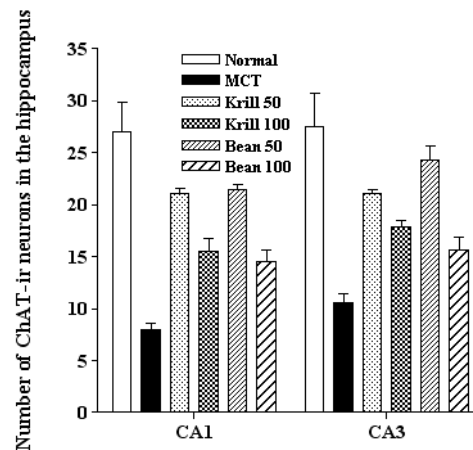


Fig. 12. The number of ChAT immunoreactive neurons in the hippocampus.

#### 4. 참고문헌

- (1) 김근우, 구병수. 동국대학교 한의과대학 신경정신과교실. L-NAME으로 유발된 학습기 기억장애와 뇌허혈 손상에 관한 대조환의 효과 2000.08 21(2) 대한한의학회지
- (2) 박찬원, 이진우, 채한, 홍무창, 신민규. 경희대학교 한의과대학 생리학교실. 비기능이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구 2000.01 20(4) 대한한의학회지
- (3) 이웅석, 황의완, 김현택, 박순권. 조위승청탕이 Alzheimer's disease 모델 백서의 학습과 기억에 미치는 영향 1998.11 21(1) 경희대논문집
- (4) 정재환, 김덕곤, 정승기, 이진용, 김장현, 조규석. 경희대학교 한의과대학 소아과학교실. 녹용 및 보아탕 가 녹용이 어린 흰쥐의 학습과 기억에 미치는 영향 2000.07 23(1) 경희대논문집
- (5) Carli M, Balducci C, Samanin R. Low doses of 8-OH-DPAT prevent the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine through 5-HT(1A) receptors in the dorsal raphe.
- (6) Hiramatsu M, Inoue K. Improvement by low doses of nociceptin on scopolamine-induced impairment of learning and/or memory. Eur J Pharmacol. 2000 Apr 28;395(2):149-56.

- (7) Hsieh MT, Lin YT, Lin YH, Wu CR. Radix Angelica Sinensis extracts ameliorate scopolamine- and cycloheximide-induced amnesia, but not p-chloroamphetamine-induced amnesia in rats. *Am J Chin Med*. 2000;28(2):263-72.
- (8) J Altern Complement Med 1997 Winter;3(4):327-36. Effect of Trasina, an ayurvedic herbal formulation, on experimental models of Alzheimer's disease and central cholinergic markers in rats. Bhattacharya SK, Kumar A. Department of Pharmacology, Banaras Hindu University, Varnasi, India.
- (9) Janis LS, Glasier MM, Fulop Z, Stein DG. Intraseptal injections of 192 IgG saporin produce deficits for strategy selection in spatial-memory tasks. *Behav Brain Res*. 1998 Jan;90(1):23-34.
- (10) Ma JY, Yang JM, Joo HJ, Lee MY, Park JH, Jung KY. Improvement of cerebral ATP and choline deficiencies by Shao-Yin-Ren Shi-Quang-Da-Bu-Tang in senescence-accelerated mouse prone 8. *J Ethnopharmacol*. 1999 Nov 30;67(3):297-305.
- (11) Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci*. 2000 Feb 15;20(4):1568-74.
- (12) Nag S, Tang F. Department of Physiology, The University of Hong Kong, China. Cholinergic lesions of the rat brain by ibotenic acid and 192 IgG-saporin: effects on somatostatin, substance P and neuropeptide Y levels in the cerebral cortex and the hippocampus. *Neurosci Lett* 1998 Aug 14;252(2):83-6
- (13) Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res*. 1993 Dec 31;632(1-2):36-40.
- (14) Sarkisian MR, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Hori A, Holmes GL, Stafstrom CE. Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia*. 1997 Nov;38(11):1157-66.
- (15) Shen J, Barnes CA, Wenk GL, McNaughton BL. Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav Neurosci*. 1996 Oct;110(5):1181-6.
- (16) Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000;97(2):253-66.
- (17) Stubley-Weatherly L, Harding JW, Wright JW. Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res*. 1996 Apr 15;716(1-2):29-38.
- (18) Toriizuka K, Hou P, Yabe T, Iijima K, Hanawa T, Cyong JC. Effects of Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San), on choline acetyltransferase

activity and norepinephrine contents in brain regions, and mitogenic activity of splenic lymphocytes in ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol.* 2000 Jul;71(1-2):133-43.

(19) Tusda T, Liu YZ, Sugaya A, Katoh K, Hori K, Tanaka S, Nomura M, Sugaya E. Reinforcement effects of *Boschniakia rossica* on discrimination learning in cholinergic lesions of rats. *J Ethnopharmacol.* 1994 Oct;44(2):67-71.

(20) Wiley JL, Willmore CB. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on timing and short-term memory in rats. *Behav Pharmacol.* 2000 Aug;11(5):421-9.

(21) Wrenn CC, Wiley RG. The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: lessons from 192 IgG-saporin. *Int J Dev Neurosci.* 1998 Nov-Dec;16(7-8):595-602. Review.

### III. 제 2세부 연구과제 연구결과

#### 제 2 세부 연구과제 연구결과

세부연구과제명 : 뇌내 PS 유사 포스파티딜세린의 신경세포보호 및 분화촉진에 의한 기억력 향상 기전연구

세부연구책임자 : 함대현 / 경희대학교 / 세포, 분자생물학



## 1. 연구개발과제의 목표

### 1) 연구개발 최종목표

○ 베타 아밀로이드 또는 글루타메이트 유발 세포 독성에 대해 생리활성 인지질인 포스파티딜세린의 신경세포보호 효과를 신경세포주 또는 배양뇌신경세포의 세포사멸기전과 관련하여 실험적으로 검증하고 포스파티딜세린의 신경세포의 증식 및 분화 촉진 효과를 세포주 수준에서 검증함.

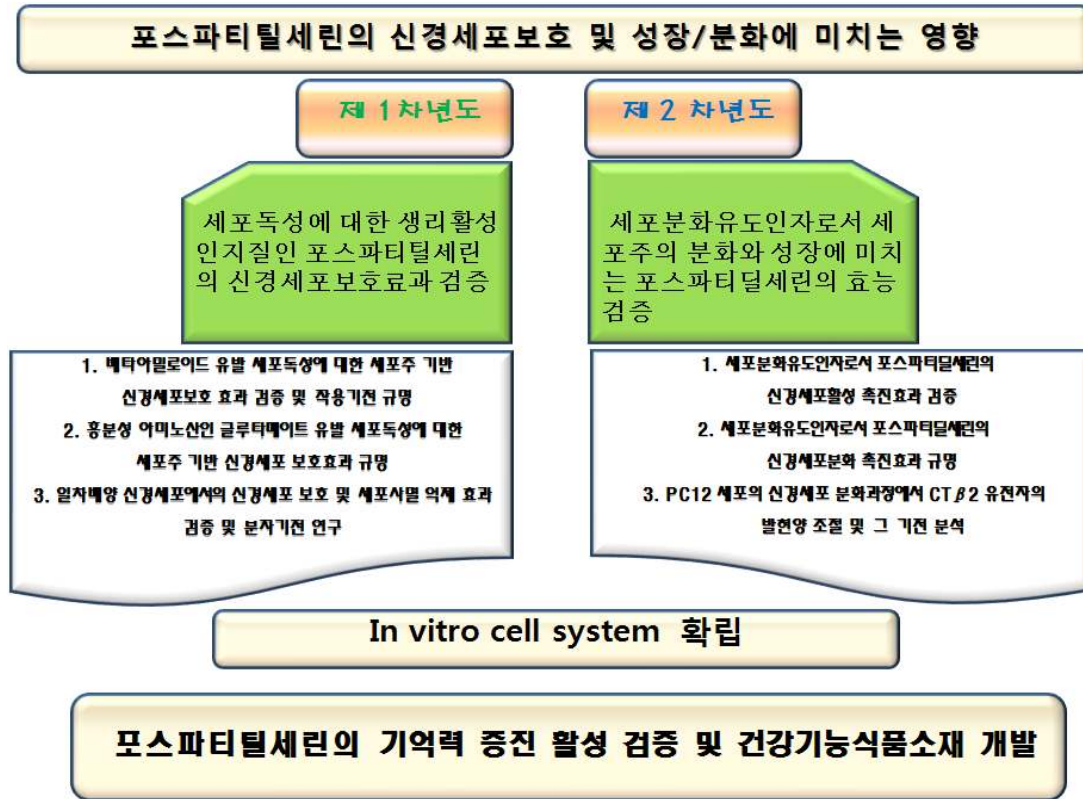
○ 포스파티딜세린의 신경세포의 증식 및 분화 촉진 효과를 세포주 수준에서 검증하고 그 세포신호전달체계를 규명함으로써 생리활성지질인 포스파티딜세린의 기억력 증진효능을 확립함.

### 2) 연차(단계)별 목표 및 내용

구분	연차별 목표
1차년도	- 뇌신경세포주와 배양뇌신경세포에서의 세포독성물질에 따른 뇌세포사멸 유도 및 포스파티딜세린의 뇌신경세포보호 효능 검증 - In vitro 상에서의 기억 관련 위험 인자의 탐색 및 포스파티딜세린의 뇌신경세포 방지의 최적화 구축 - 뇌신경세포사멸/보호의 기전 및 조절연구를 통해, 포스파티딜세린의 기억 증진 효능 검증
2차년도	- 세포분화유도인자로서 세포주의 분화와 성장에 미치는 포스파티딜세린의 효능 검증과 신경세포 분화과정에서 CT $\beta$ 2유전자의 발현양 조절 및 그 기전 분석 연구 - 포스파티딜세린의 어린쥐와 노화쥐에서의 기억력 향상에 대한 효능 비교

## 2. 연구개발과제의 추진체계

### 1) 추진전략



### 2) 추진체계

구분		1단계('09년~'11년)								단계없음		
		1년차				2년차				○ 년 차	○ 년 차	○ 년 차
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4			
제 2 세 부	베타아밀로이드 유발 세포독성에 대한 세포주 기반 신경세포보호 효과 검증 및 작용기전 규명	→									해당	
	흥분성 아미노산인 글루타메이트 유발 세포독성에 대한 세포주 기반 신경세포 보호효과 규명	→									사항	
	일차배양 신경세포에서의 신경세포 보호 및 세포사멸 억제 효과 검증 및 분자기전 연구			→							없음	
	신경세포증식 촉진효과 및 세포주 기반 세포 신호전달체계 규명					→	→	→				
	신경세포분화 촉진효과 및 세포주 기반 세포 신호전달체계 규명					→	→	→				
	포스파티딜세린의 세포주 기반 기억력증진기전 규명							→				

### 3. 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1) In vitro system을 이용한 대두, 오징어, 새우 유래 phosphatidylserine (PS)의 세포독성 및 항염증 효과 비교 분석

##### (1) RAW264.7 대식세포주에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포독성 효과 비교 분석

대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포독성 및 항염증 효과를 관찰하기 위하여 RAW264.7 대식세포주에서 MTT cytotoxic assay, IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 와 같은 proinflammatory cytokine의 발현 변화 분석을 실시함.

##### 가. RAW264.7 대식세포주에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포독성 효과 비교

RAW264.7 대식세포주에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 농도별 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행함. 대두, 오징어, 새우 유래 PS를 농도별 처리 24시간 후에 세포독성을 측정함(Fig. 1). 대두, 오징어, 새우 유래 PS에서는 세포 독성을 보이지 않았으며, LPS (1  $\mu$ g/ml)로 염증이 유도된 상황에서도 대두, 오징어, 새우 유래 PS에서는 세포 독성을 보이지 않음.

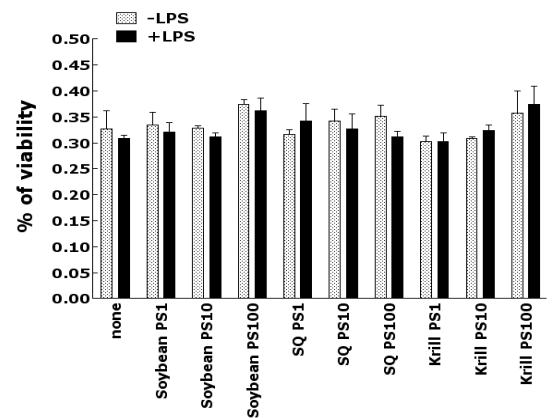


Fig. 1. Comparison of effect of Soybean PS or Krill PS on RAW 264.7 cell viability using MTT assay.

##### 나. RAW264.7 대식세포주에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ mRNA 발현 억제 효과 비교

대두, 새우 유래 PS에 의한 대표적인 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  발현에 대한 억제 효과를 알아보기 위해, RAW264.7 대식세포에 LPS (1  $\mu$ g/ml)을 사용하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  발현을 유도한 후, 대두 유래 PS를 농도별로 처리하고 24시간 후 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  발현 억제 정도를 RT-PCR 이용하여 알아봄. 우선 LPS에 의해 뚜렷하게 증가한 IL-1 $\beta$  mRNA 및 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현은 대두 유래 PS에 의하여 별 차이를 보이지 않음(Fig. 2A). 또한 새우 유래 PS를 대두 유래 PS와 마찬가지로 농도별로 처리한 후에 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  발현 억제 정도를 관찰한 결과, LPS에 의해 뚜렷하게 증가한 IL-1 $\beta$  mRNA 및 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 새우 유래 PS에 의하여 별 차이를 보이지 않음(Fig. 2B).

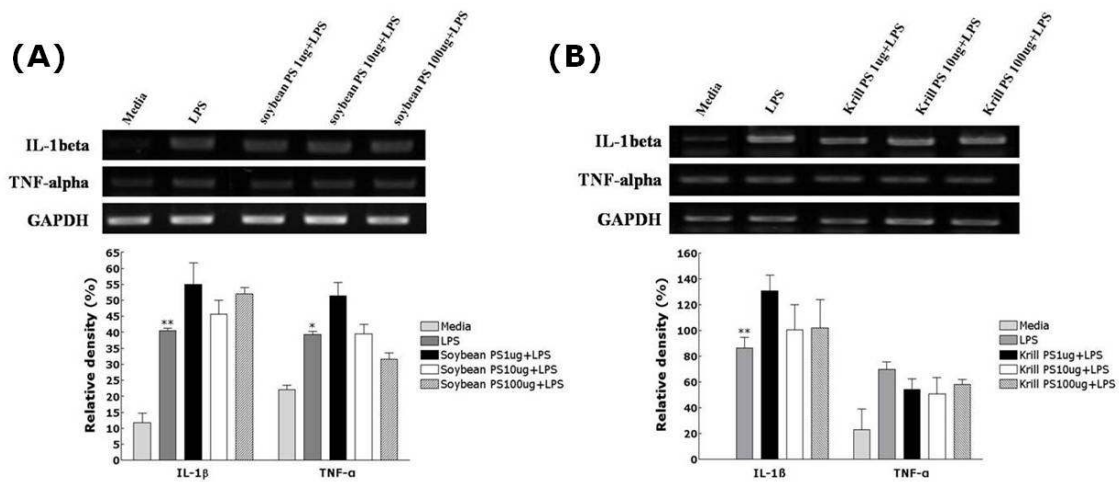


Fig. 2. Comparison of effect of Soybean PS (A) or Krill PS (B) on the expression levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA in RAW 264.7 cells.

#### 다. RAW264.7 대식세포주에서 오징어 유래 PS와 새우 유래 PS의 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 단백질 발현 억제 효과 비교

오징어 유래 PS와 새우 유래 PS에 의한 대표적인 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$  protein과 TNF- $\alpha$  protein 발현에 대한 억제 효과를 알아보기 위해, RAW264.7 대식세포에 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 사용하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  발현을 유도한 후 오징어, 새우 유래 PS를 농도별로 처리하고 24시간 후 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  발현 억제 정도를 ELISA assay를 통하여 알아봄. 우선 LPS에 의해 뚜렷하게 증가한 IL-1 $\beta$  단백질의 발현은 오징어 유래 PS에 의하여 유의하게 감소함을 보였으며(Fig. 3A), 오징어 유래 PS와 마찬가지로 새우 유래 PS를 농도별로 처리한 후 IL-1 $\beta$  단백질 발현 억제 정도를 관찰한 결과, IL-1 $\beta$  단백질 발현이 새우 유래 PS에 의하여 농도별로 감소함을 보여줌(Fig. 3B).

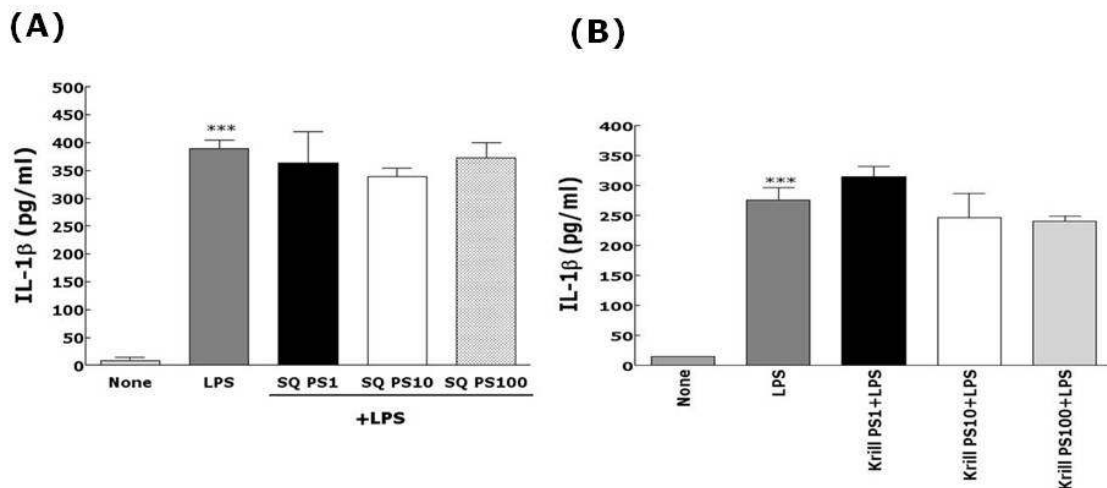


Fig. 3. Effect of Squid(SQ) PS (A) or Krill PS (B) on the expression levels of IL-1 $\beta$  protein in RAW 264.7 cells.

또한, LPS에 의해 뚜렷하게 증가한 TNF- $\alpha$  단백질의 발현은 오징어 유래 PS에 의하여 농도별

로 유의하게 감소함을 보였으며(Fig. 4A), 오징어 유래 PS와 마찬가지로 새우 유래 PS를 농도별로 처리한 후 TNF- $\alpha$  단백질 발현 억제 정도를 관찰한 결과, TNF- $\alpha$  단백질 발현이 새우 유래 PS에 의하여 농도별로 유의하게 감소함을 보여줌(Fig. 4B).

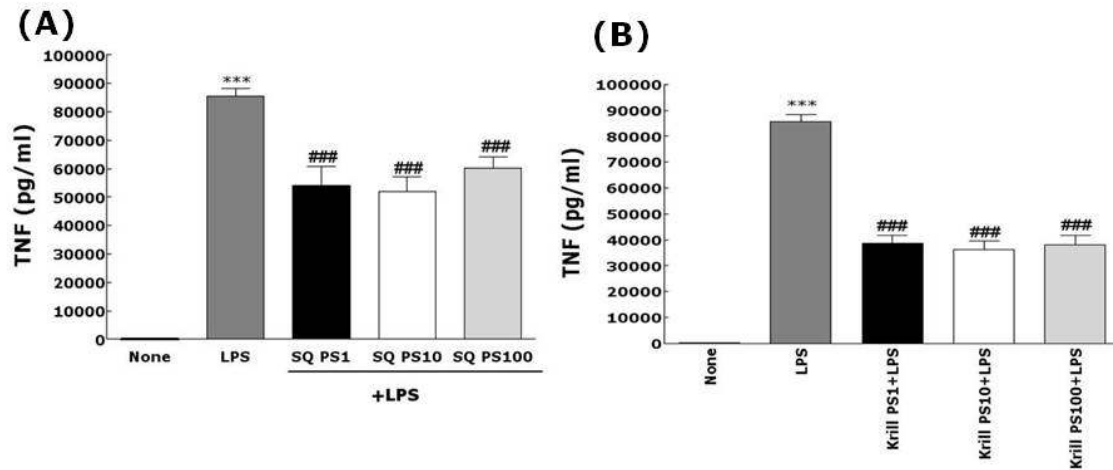


Fig. 4. Effect of Squid(SQ) PS (A) or Krill PS (B) on the expression levels of TNF- $\alpha$  protein in RAW 264.7 cells.

**결론:** RAW264.7 대식세포주에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS는 세포독성을 지니지 않고, 염증성 cytokine의 발현 억제를 통해 염증억제 효과가 있음을 확인 할 수 있음.

## (2) Bovine Aortic Endothelial cell (BAEC)에서 angiogenesis에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 효과 비교 분석

신혈관형성이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정으로, 혈관내피세포가 활성화됨으로써 일어나는 분열(proliferation), 이동(migration), 관형성(tube formation)을 포함한 다단계 과정을 통해 일어남. 신혈관형성은 태아의 발생, 상처치유와 같은 정상적인 과정에서 뿐만 아니라, 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환, 암의 성장과 전이와 같은 질병 등의 비정상적인 과정에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 따라서 BAEC에서 proliferation, cell migration, tube formation에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 효능 분석을 통해 신혈관형성 기전에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 효과를 검증함.

### 가. 대두, 오징어, 새우 유래 PS이 BAEC 혈관내피세포의 세포 증식에 미치는 효과 비교 분석

BAEC 세포에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포 독성 실험을 통하여, 세포 증식에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 효과를 시험함. 24시간 배양했을 때 세포 독성 효과에는 별 영향을 미치지 않지만, 대두, 오징어, 새우 유래 PS가 세포증식에는 유의적인 효과를 보여줌(Fig. 5).

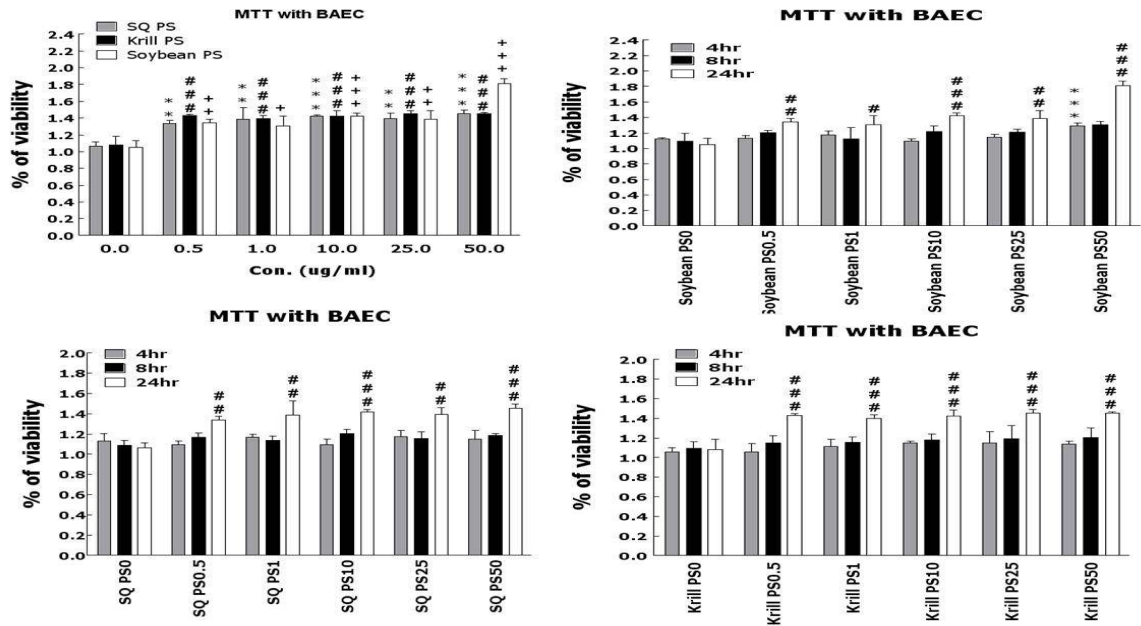


Fig.5. Effect of Soybean PS, Squid PS, Krill PS on BAEC cell viability using MTT assay.

## 나. BAEC 혈관내피세포에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포 이동(migration)에 미치는 효과 비교

BAEC세포에서 wounded area로 이동한 세포수의 측정을 통해 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포 이동에 미치는 영향을 관찰함. 대두 유래 PS의 농도별 처리는 세포 이동에 유의적인 영향을 미침을 보여주었으며(Fig. 6A), 오징어 유래 PS의 농도별 처리도 또한 세포 이동에 유의적인 영향을 미침을 보여줌(Fig. 6B).

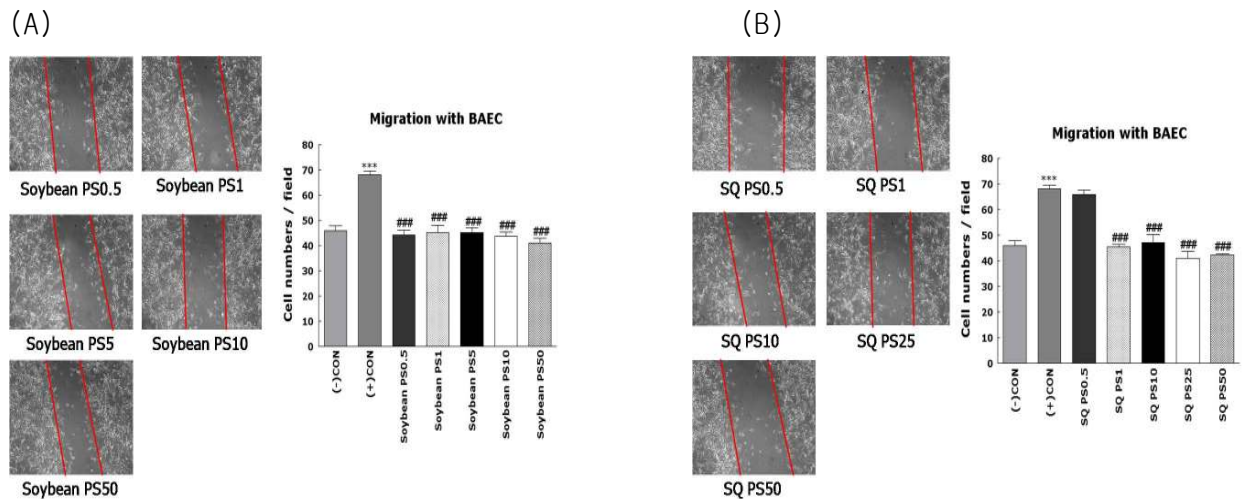


Fig.6. Effect of Soybean PS and Squid PS on cell migration in BAEC cells.

또한, 새우 유래 PS의 농도별 처리는 대두 유래 PS와 오징어 유래 PS와 마찬가지로 세포 이동에 유의적인 영향을 미침을 보여줌(Fig. 7).

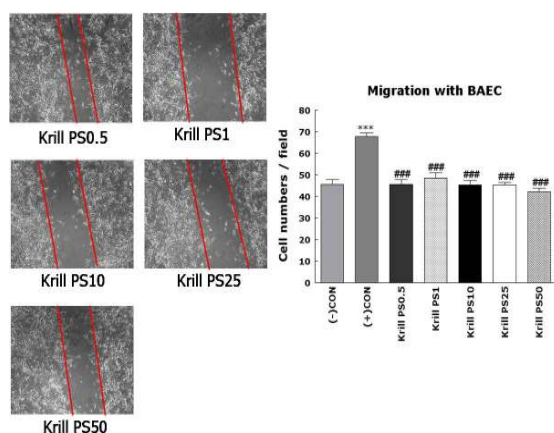


Fig.7. Effect of Krill PS on cell migration in BAEC cells.

#### 다. BAEC 혈관내피세포에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS이 튜브형성(tube formation)에 미치는 효과 비교

BAEC세포에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS이 세포분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 튜브형성에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 영향을 관찰함. 대조군에서는 세포들이 분화하여 튜브가 분명하게 형성됨. 하지만 대두 유래 PS를 농도별로 처리한 결과, 튜브형성에 대해 거의 영향을 미치지 않았으며(Fig. 8A), 오징어 유래 PS를 농도별로 처리한 결과, 튜브형성에 별 영향을 미치지 않았지만, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 결과, 튜브형성을 유의적으로 증가시켰음을 보여줌(Fig. 8B).

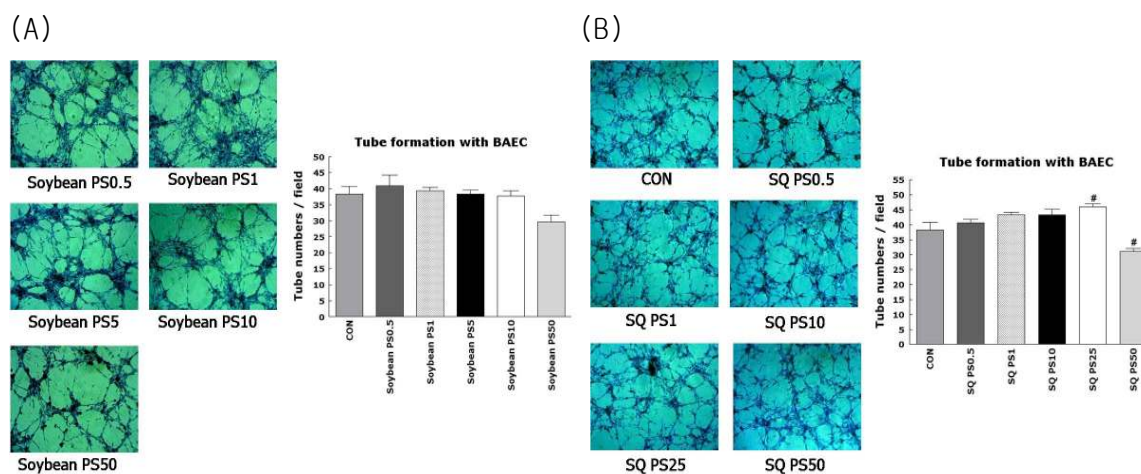


Fig 8. Effect of Soybean PS and Squid PS on tube formation in BAEC cells

또한, 새우 유래 PS의 농도별 처리는 대두 유래 PS와 오징어 유래 PS와 마찬가지로 튜브형성에 대해 거의 영향을 미치지 않음을 보여줌(Fig. 9)



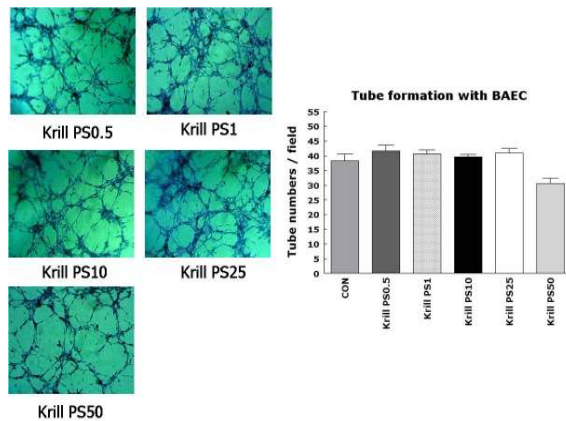


Fig. 9. Effect of Krill PS on tube formation in BAEC cells.

결론: 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 처리는 BAEC 세포의 증식, 세포이동, 튜브형성에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 보아, 혈관내피세포의 활성화 단계에 중요한 역할을 함으로써 상처치유나 염증성 질환에 치료 효과가 있을 것으로 판단됨.

### (3) Human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 신경세포보호효과 비교 분석

#### 가. SH-SY5Y cell에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 세포독성 효과 비교 분석

SH-SY5Y에 대한 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 농도별 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행함. PS를 농도별 처리 24시간 후에 세포독성을 측정함(Fig. 10). 오징어, 새우 유래 PS에서는 세포 독성을 보이지 않았으나, 대두 유래 PS의 경우 농도별로 처리한 결과, 세포의 독성으로 보임을 나타냄.

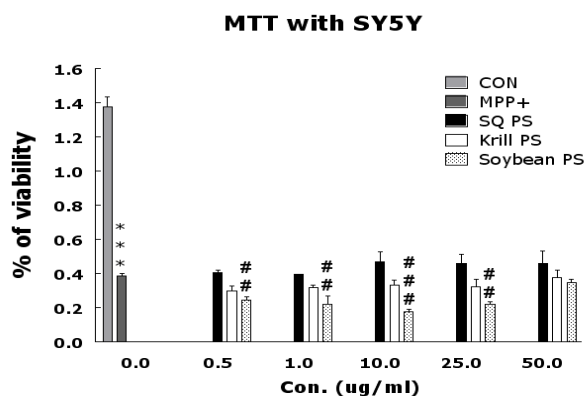


Fig. 10. Effect of Soybean, Squid, Krill PS on SH-SY5Y cell viability using MTT assay.

결론: Human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y에서에서 오징어, 새우 유래 PS는 세포독성을 지니지 않았으나, 대두 유래 PS는 세포독성을 지님을 확인 할 수 있음.



## 2) In vitro system을 이용한 대두, 새우 유래 phosphatidylserine (PS)의 신경세포 보호 및 분화촉진 효과 비교 분석

### (1) Neuro2A 세포주에서 대두, 새우 유래 PS의 neurite outgrowth(신경돌기성장) 효과 비교 분석

신경세포가 분화될 때 나타나는 형태학적인 변화 중에 하나인 신경돌기의 형성에 있어서 새우 유래 PS가 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 신경세포의 분화, 세포사 억제 효능, 세포독성 검증 등에 많이 활용되고 있는 신경아세포인 Neuro-2A 세포를 활용하였으며, 이 세포주에 PS를 처리한 후 24시간 동안 배양한 후 신경돌기의 길이를 측정한 후 이를 평균화하여 농도별로 측정하였으며 하나의 세포에 여러 개의 신경돌기가 자라거나 분지(branch)가 형성된 경우에는 이를 모두 합산하여 신경돌기의 길이로 간주하는 방식으로 neurite outgrowth를 측정하였음.

### 가. Neuro2A 세포주에서 대두, 새우 유래 PS의 처리 농도에 따른 neurite outgrowth 효과 비교

Neuro2A 세포주에 대한 대두, 새우 유래 PS의 처리 농도에 따른 neurite outgrowth(신경돌기 성장)을 알아보기 위하여 PS를 농도별로 처리한 후, 24시간 후에 neurite outgrowth를 측정함(Fig. 11). 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 대두, 새우 유래 PS를 처리 결과 세포에서 유의적으로 neurite outgrowth를 보여주었으며, 이는 처리한 농도(50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )가 증가할수록 더 유의적임을 보여줌.

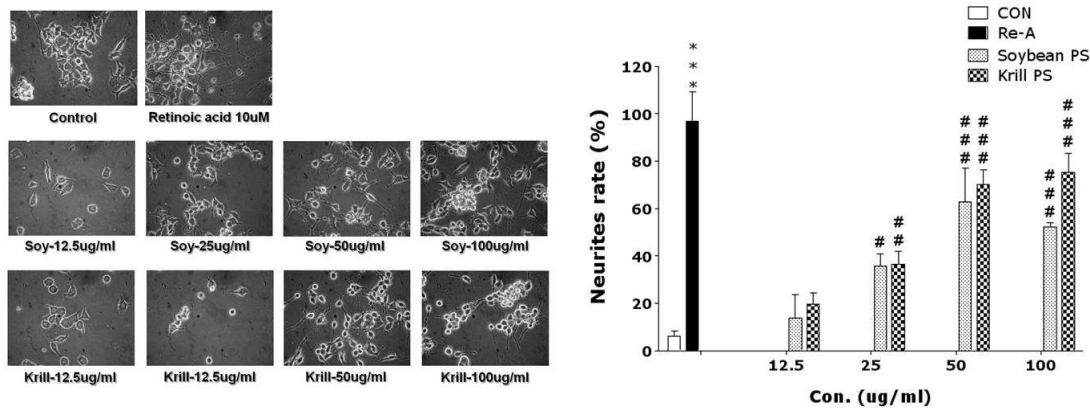


Fig. 11. Comparison of effect of neurite outgrowth on Neuro-2A cells cultured for 24 h following concentration of treatment of Soybean PS and Krill PS.

### 나. Neuro2A 세포주에서 대두, 새우 유래 PS의 처리 시간에 따른 neurite outgrowth 효과 비교

Neuro2A 세포주에 대한 대두, 새우 유래 PS의 처리 시간에 따른 neurite outgrowth(신경돌기 성장)을 알아보기 위하여 PS를 시간대별로 처리한 후, 24시간 후에 neurite outgrowth를 측정함(Fig. 12). 대두, 새우 유래 PS를 30초만 처리한 후, 24시간 후에 neurite outgrowth를 분석한 결과, 세포에서 유의적인 neurite outgrowth를 보여주었으며, 이는 처리 시간대에 관계없이 처리한 모든 시간대에 유의적인 증가를 보여줌.

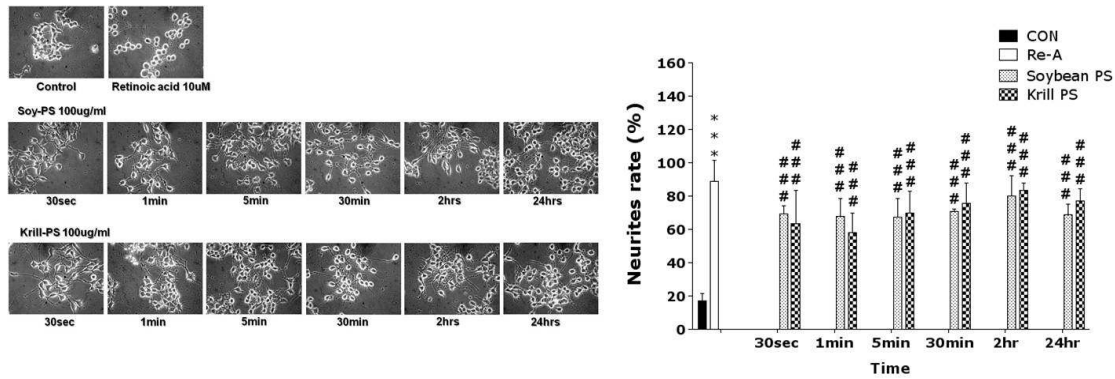


Fig. 12. Comparison of effect of neurite outgrowth on Neuro-2A cells cultured for 24 h following concentration of treatment of Soybean PS and Krill PS.

#### 다. Neuro2A 세포주에서 대두, 새우 유래 PC와 PS의 처리 시간에 따른 neurite outgrowth 효과 비교

Neuro2A 세포주에 대한 대두, 새우 유래 PC와 PS의 처리 농도에 따른 neurite outgrowth(신경돌기성장)을 알아보기 위하여 PC와 PS를 농도별로 처리한 후, 24시간 후에 neurite outgrowth를 측정함(Fig. 13). 대두, 새우 유래 PS를 50와 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 24시간 후에 neurite outgrowth를 분석한 결과, 세포에서 유의적인 neurite outgrowth를 보여주었으나, 동일한 농도의 PC를 처리한 결과 유의적인 증가를 보여주지 않았음(Fig. 14).

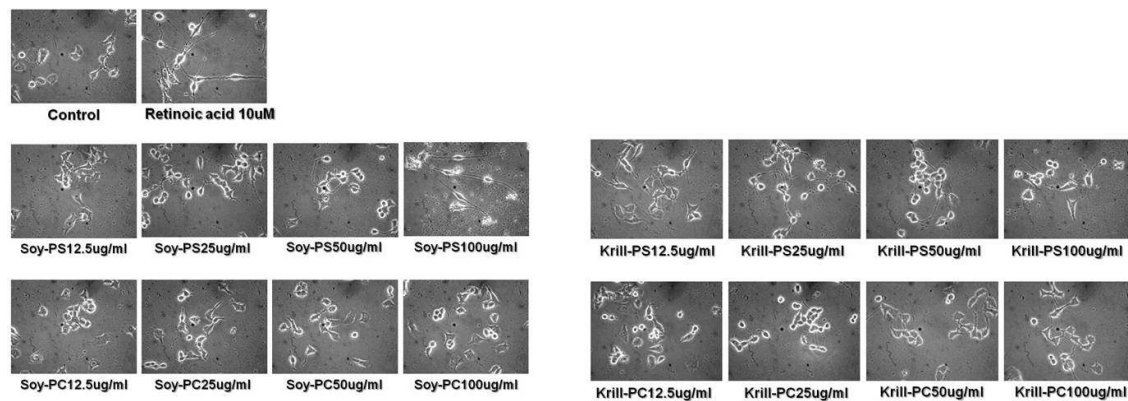


Fig. 13. Representative photographs showing the neurite outgrowth on Neuro-2A cells cultured for 24 h following time of treatment of Soybean PS, Soybean PC, Krill PS and Krill PC.

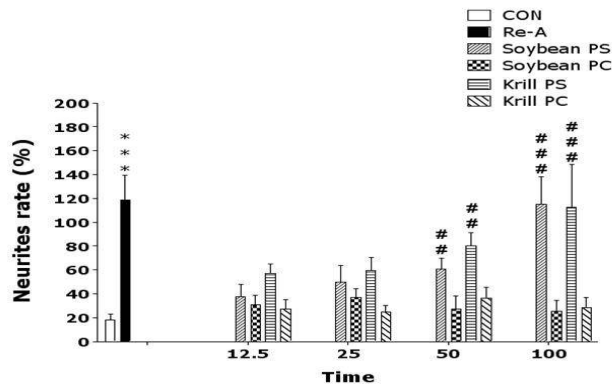


Fig. 14. Comparison of effect of neurite outgrowth on Neuro-2A cells cultured for 24 h following time of treatment of Soybean PS, Soybean PC, Krill PS and Krill PC.

결론: Neuro2A 세포에서 대두, 새우 유래 PS는 세포 분화 촉진 및 성장에 영향을 주는 neurite outgrowth에 효과가 있음을 확인 할 수 있음.

## (2) Neuro2A 세포주에서 대두, 새우 유래 PS의 기억 증진 효과 비교 분석

학습과 기억에 중요한 아세틸콜린 합성물질인 ChAT (choline acetyltransferase)의 세포내 발현량을 확인하기 위하여, 형광면역조직염색법을 통해 ChAT 발현량을 측정하여, 새우 유래 PS의 기억 증진 효능을 in vitro system을 활용하여 측정하였음.

### 가. Neuro2A cells에서 새우 유래 PS의 ChAT(choline acetyltransferase) 발현량 비교 분석

학습과 기억에 중요한 ChAT의 발현량을 분석한 결과, 새우 유래 PS의 경우 ChAT의 발현량이 농도가 증가할수록 유의적으로 증가함을 보여줌(Fig. 15).

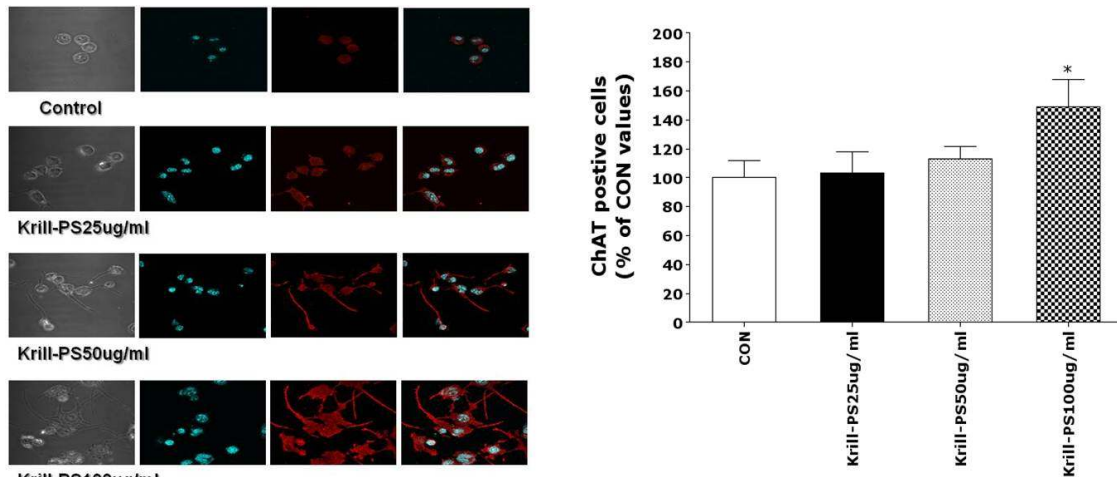


Fig. 15. Effect of Krill PS on ChAT expression in Neuro-2A cells cultured for 24 h following concentration of treatment.

결론: 새우 유래 PS가 Neuro-2A 세포의 ChAT 발현량을 유의적으로 증가시키는 것으로 보아, 기억과 관련된 아세틸콜린 신경세포의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 판단됨.

### 3) In vivo 동물모델을 이용한 대두와 새우 유래 phosphatidylserine (PS)의 기억증진 효과 비교 분석

#### (1) 노화쥐에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 기억증진 효과 비교 분석

노화에 따른 기억력 감퇴에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 기억력 증진 효능을 검토하기 위하여, 행동학적, 신경화학적, 분자생물학적 방법을 이용하여, 효능을 검증하였음. 학습 및 기억력 검사에 가장 일반적으로 사용되는 수중미로 검사와 기억력과 관련된 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성물질과 분해물질을 기억력과 관련된 뇌 부위인 해마에서 면역조직화화법을 이용하여 분석하였음.

#### 가. 대두, 오징어, 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 획득시행 및 검사시행에 미치는 효과 비교 분석

수중 미로 학습에서 6일 동안 180초내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제1일째에는 유의성 없이 비슷하게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 집단간에 유의성 있는 차이를 보임(Fig. 16A). 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 대두, 오징어 새우 유래 PS 투여군이 노화쥐에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었으며, 공간 인지기억 학습수행 능력에 대한 증진효과를 보여줌. 또한 수중 미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 집단간에 유의적인 차이를 보여주었으며(Fig. 16B), 대두, 오징어 새우 유래 PS 투여군은 파지검사에서 공간 기억력에 대한 증진효과를 보여줌.

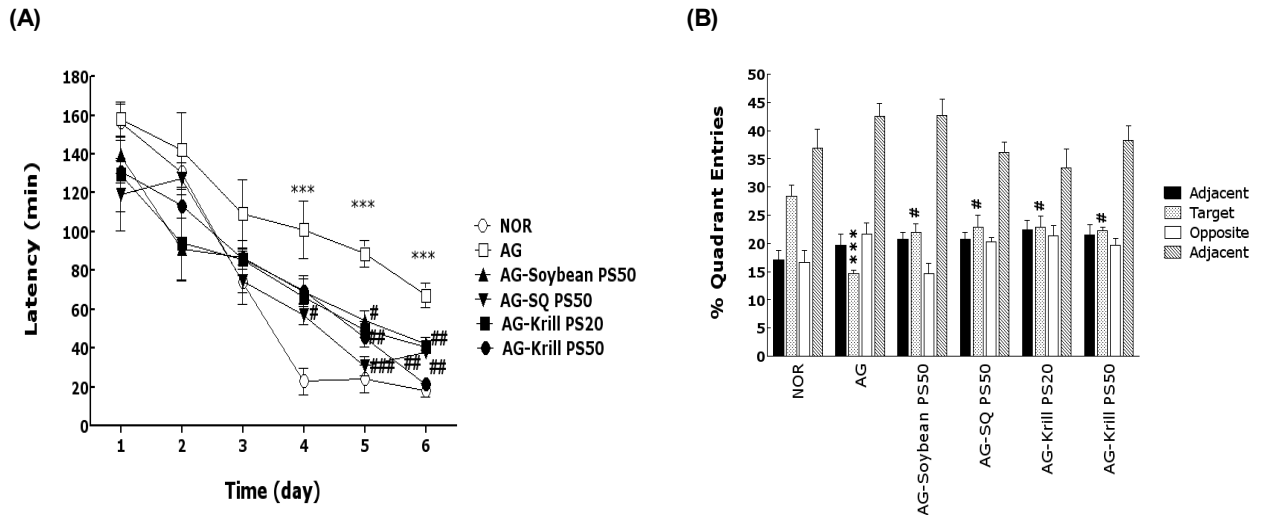


Fig. 16. Time to escape (latency) during acquisition trials (A) and time spent around the platform (B) during the Morris water maze test.

### 나. 대두, 오징어, 새우 유래 PS가 학습과 기억에 중요한 ChAT (choline acetyltransferase), AchE (acetylcholinesterase) 면역조직염색을 통해 cholinergic 신경계의 acetylcholine성 신경세포에 미치는 효과 비교 분석

Hippocampus 부위에서 학습과 기억에 중요한 ChAT와 AchE의 발현량을 분석한 결과, 대조군인 노화쥐에서는 아세틸콜린 관련 신경세포의 발현량이 현저하게 줄어들었으나, 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 경우 ChAT와 AchE의 발현량이 유의적으로 증가함을 보여줌(Fig. 17).

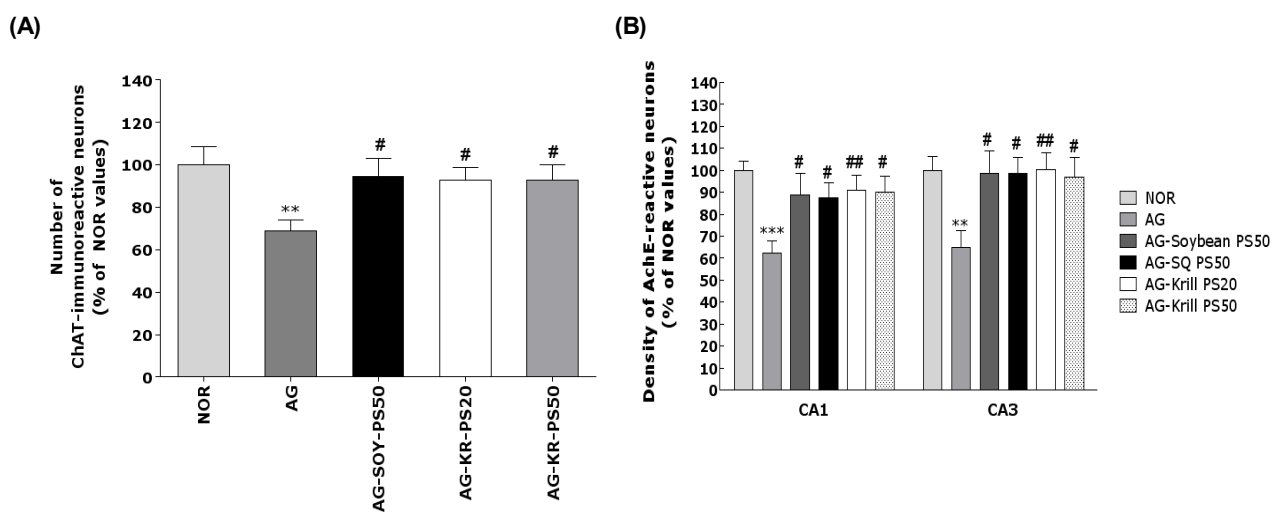


Fig. 17. Representative photographs showing the distribution of choline acetyltransferase (A) and acetylcholinesterase (B) reactive cells in the hippocampus.

### 다. 대두, 오징어, 새우 유래 PS가 학습과 기억에 중요한 choline transporter (CHT1)과 muscarinic acetylcholine receptor type 1 (m1AChR) mRNA에 미치는 효과 비교 분석

Hippocampus 부위에서 학습과 기억에 중요한 CHT1와 m1AChR의 mRNA 발현량을 분석한 결과, 대조군인 노화쥐에서는 아세틸콜린 신경세포와 관련된 CHT1와 m1AChR의 mRNA 발현량이 현저하게 줄어들었으나, 대두, 오징어, 새우 유래 PS의 경우 CHT1와 m1AChR의 mRNA의 발현량이 유의적으로 증가함을 보여줌(Fig. 18).

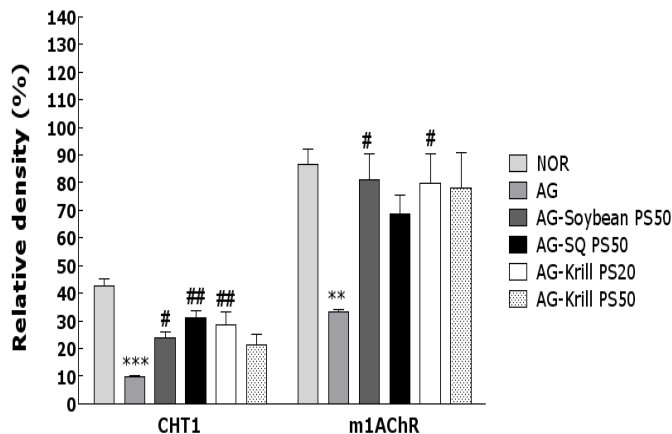


Fig. 18. The PCR relative intensities for the choline transporter and muscarinic acetylcholine receptor type 1 in the hippocampus of rats that received aged rats.

결론: 노화쥐로 인한 기억감퇴 동물모델에서 대두, 오징어, 새우 유래 PS는 기억증진 관련 행동검사에서 기억증진의 효과가 있는 것으로 판단되며, 기억과 관련된 아세틸콜린 신경세포 손상에도 신경세포보호효과가 있는 것으로 사료됨.

본 연구 성과 중 "(1) 노화쥐에서 대두, 새우 유래 PS의 기억증진 효과 비교 분석"의 연구결과는 2010년 국제전문학술지인 *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological psychiatry* (IF=2.638)에 게재되었음.

### (2) 뇌내 신경세포독성물질 주입에 의한 기억 손상 동물모델에서 새우 유래 PS의 기억증진 효과 분석

뇌내 신경세포독성물질 주입에 의한 세포손상에 따른 기억력 감퇴에서 새우 유래 PS의 기억력 증진 효능을 검토하기 위하여, 행동학적, 신경화학적, 분자생물학적 방법을 이용하여, 효능을 검증하였음. 학습 및 기억력 검사에 가장 일반적으로 사용되는 수중미로 검사와 기억력과 관련된 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성물질과 분해물질을 기억력과 관련된 뇌 부위인 해마에서 면역조직화화법을 이용하여 분석하였음.

### 가. 새우 유래 PS가 수중미로 학습의 획득시행 및 검사시행에 미치는 효과 분석

수중 미로 학습에서 6일 동안 180초내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제1일째에는 유의성 없이 비슷하게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 3일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 집단간에 유의성 있는 차이를 보임(Fig. 19B). 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 새우 유래 PS 투여군이 신경세포독성물질 주입에 의한 기억손상 동물모델인 대조군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었으며, 공간 인지기억 학습수행 능력에 대한 증진효과를 보여줌. 또한 수중 미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 집단간에 유의적인 차이를 보였주었으며(Fig. 19C), 새우 유래 PS 투여군은 파지검사에서 공간 기억력에 대한 증진효과를 보여줌.

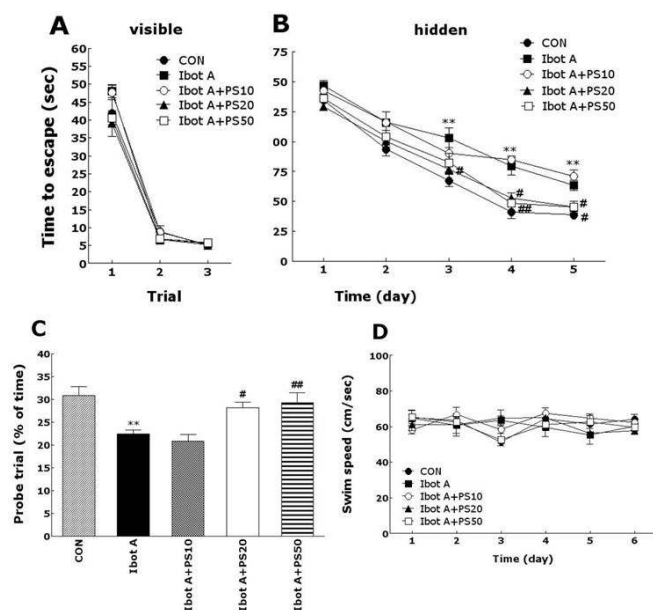


Fig. 19. Time to escape (latency) during acquisition trials of visible platform (A), hidden platform (B), time spent around the platform (C), and swim speed (D) during the Morris water maze test.

#### 나. 새우 유래 PS의 수동회피검사에서 기억 수행 능력에 미치는 효과 분석

새우 유래 PS가 학습에 미치는 효과를 평가하기 위하여 수동회피검사를 실시함. 혐오자극에 대한 회피반응으로 조명에 대한 회피 training을 받은 쥐에 전기쇼크를 가한 다음 날 (acquisition), 전기쇼크에 대한 기억을 검사하기 위하여(retention test) 전날 쇼크를 받은 쇼크실로 잘 들어가지 않는 회피반응으로 쇼크실에 도달시간을 측정한 결과, 신경세포독성물질 주입에 의한 기억손상 동물모델인 대조군은 도달시간이 정상군에 비해 유의적으로 짧았는데 반해, 새우 유래 PS 투여군은 도달시간이 유의적으로 길었음을 보여줌(Fig. 20).

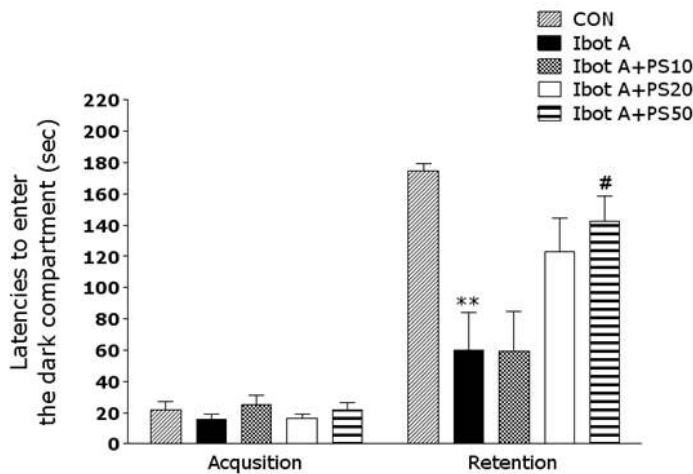


Fig. 20. Effect of Krill PS on the latencies to enter the dark compartment for the acquisition trial and for the retention test during the PAL test.

다. 새우 유래 PS가 학습과 기억에 중요한 ChAT (choline acetyltransferase) 면역조직염색을 통해 cholinergic 신경계의 acetylcholine성 신경세포에 미치는 효과 비교 분석

Hippocampus 부위에서 학습과 기억에 중요한 ChAT의 발현량을 분석한 결과, 신경세포독성물질 주입에 의한 기억손상 동물모델인 대조군에서는 아세틸콜린 관련 신경세포의 발현량이 현저하게 줄어들었으나, 새우 유래 PS의 경우 ChAT의 발현량이 유의적으로 증가함을 보여줌 (Fig. 21).

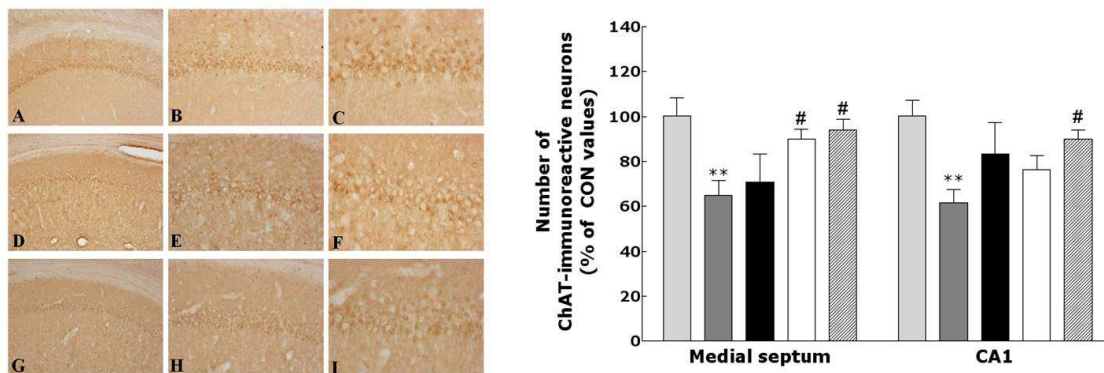


Fig. 21. Representative photographs showing the distribution of choline acetyltransferase reactive cells in the hippocampus.

결론: 뇌내 신경세포독성물질 주입에 의한 기억감퇴 동물모델에서 새우 유래 PS는 기억증진 관련 행동검사에서 기억증진의 효과가 있는 것으로 판단되며, 기억과 관련된 아세틸콜린 신경세포 손상에도 신경세포보호효과가 있는 것으로 사료됨.

#### 4. 참고문헌



1. Abe Y, Aoyagi A, Hara T, Abe K, Yamazaki R, Kumagae Y, Naruto S, Koyama K, Marumoto S, Tago K, Toda N, Takami K, Yamada N, Ori M, Kogen H, Kaneko T. Pharmacological characterization of RS-1259, an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci.* 2003;93(1):95-105.
2. Blokland A, Hogig W, Brouns F, Jolles J. Cognition-enhancing properties of subchronic phosphatidylserine (PS) treatment in middle-aged rats: comparison of bovine cortex PS with egg PS and soybean PS. *Nutrition* 1999;15:778-783.
3. Calderini G, Teolato S, Bonnetti S. Effect of lysophosphatidylserine on rat hypothalamic cAMP in vivo. *Life Sci* 1981;28:2367-2377.
4. Casamenti F, Mantovani P, Amaducci L. Effect of phosphatidylserine on acetylcholine output from the cerebral cortex of the rat. *J Neurochem* 1979;32:529-533.
5. Casamenti F, Scali C, Pepeu G. Phosphatidylserine reverses the age-dependent decrease in cortical acetylcholine release: A microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 1991;194:11-16.
6. Corwin J, Dean RL, Bartus RT, Rotrosen J, Watkins DL. Behavioral effects of phosphatidylserine in the aged Fisher 344 rat: Amelioration of passive avoidance deficits without changes in psychomotor task performance. *Neurobiol Aging* 1985;6:11-15.
7. Delwaide PJ, Gyselynck-Mambourg AM, Hurlet A, Yliff M. Double-blind randomized controlled study of phosphatidylserine in senile demented patients. *Acta Neurol Scand* 1986;73:136-140.
8. Drago F, Canonico PL, Scapagnini U. Behavioral effects of phosphatidylserine in aged rats. *Neurobiol Aging* 1981;2:209-213.
9. Frey L, Dreyfus J, Vincendon C. Asymmetry of brain microsomal membranes. In: *Phospholipids in the Nervous system*, vol. 1, edited by L. Horrocks. New York, Raven Press, 1982;37-47.
10. Furushiro M, Suzuki S, Shishido Y, Sakai M, Yamatoya H, Kudo S, Hashimoto S, Yokokura T. Effects of oral administration of soybean lecithin transphosphatidylserine on impaired learning of passive avoidance in mice. *Jpn J Pharmacol* 1997;75:447-450.
11. Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Shido O. Docosahexaenoic acid-induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:934-9.
12. Hosokawa W, Shimatani T, Kanabe T, Inoue Y, Takahashi K. Conversion to docosahexaenoic acid-containing phosphatidylserine from squid skin lecithin by phospholipase D-mediated transphosphatidylation. *J Agric Food Chem* 2000;48:4550-4554.
13. Jorissen BJ, Brouns F, Van Boxtel MPJ, Ponds RWHM, Verhey FRJ, Jolles J, Riedel WJ. The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated

memory impairment. *Nutr Neurosci* 2001;4:121-134.

14. Leon A, Benvegnu D, Toffano G, Massari P. Effect of brain cortex phospholipids on adenylate cyclase of mouse brain. *J Neurochem* 1978;30:23-26.

15. Mantovani P, Aporti F, Bonetti AC, Pepeu G. Effects of phosphatidylserine on brain chlonergic mechanisms. In: Horrocks, L., ed. *Phospholipids and the nervous system*, vol. 1, Metabolism. New York, Raven Press, 1982:165-172.

### III. 제 3세부 연구과제 연구결과

#### 제 3 세부 연구과제 연구결과

세부연구과제명 : 뇌내 PS유사 포스파티딜세린 함유 건강  
기능 식품 소재 개발

세부연구책임자 : 한정준 / (주) 두산 글로넷 / 생물공학

## 1. 연구개발과제의 목표

포스파티딜세린은 1980년대부터 초기 치매나 인지 능력 개선용으로 연구 및 상용화 되어 왔으며 지금까지 구미, 일본 등에서 많이 이용되고 있으며 국내에도 2008년 시판되기 시작하였다. 초기 치매개선이나 인지 능력 개선 등의 임상 보고도 상당수 보고가 되었다. 그러나 대부분의 임상은 소뇌로부터 추출된 포스파티딜세린에 대한 임상이다. 소뇌로부터 추출된 포스파티딜세린은 광우병 위험으로 사용이 금지가 되었으며 그 이후로는 대두 레시틴의 포스파티딜콜린을 포스포리파제 D에 의한 효소 전이 반응을 통해 포스파티딜세린을 제조하는 것이 상용화되어 시장에서 사용되어져 왔다. 이러한 효소 전이 반응을 통해 제조된 포스파티딜세린에 대한 동물 실험들이 행해졌고 소뇌에서 추출된 포스파티딜세린과 동등한 효능을 나타낸다고 보고하였다.

미국 FDA의 경우 포스파티딜세린의 qualified health claim 인정 관련하여 대두 포스파티딜세린에 대하여 치매 예방 및 인지 능력 저하를 막는데 도움을 줄 수 있다고 하면서도 매우 제한된 과학적 근거가 있는 정도로 제한하고 있다 그 이유로 소뇌 유래의 포스파티딜세린과 대두 유래의 포스파티딜세린의 지방산 조성의 차이와 통상의 대두 유래 포스파티딜세린의 제품에 존재하는 포스파티딜세린 이외의 인지질 등에 의한 다른 영향의 가능성들을 들어 완전히 동등하다고 보기 어렵다고 하고 있다.

그렇다면 포스파티딜세린의 기능에 있어서 지방산 잔기에 따른 활성의 차이가 존재할 것인가가 주요 관심사가 된다. 포스파티딜세린은 섭취 시 체장에 있는 포스포리파제 A2에 의해 인지질의 sn-2 위치에 있는 지방산이 잘리게 되고 이렇게 잘린 리소포스파티딜세린은 장에서 흡수되어 혈액을 돌며 reacylation과 deacylation 등이 반복되며 지방산이 재구성되며 각 기관에 도달하여 기능을 발휘하는 것으로 추정하고 있으나 확실하지 않다. 소뇌에서 추출한 경우는 sn-2 위치에 DHA가 8% 수준 정도가 결합되어 있으며 이 DHA 역시 섭취 시 장에 있는 포스포리파제 A2에 의해 DHA는 가수분해되어 별도의 기작을 통해 대사될 것으로 생각된다. 따라서 한 분자 내에 세린과 DHA를 가지고 있는 형태로 경구 섭취가 되나 체장을 거치면서 DHA는 분리되어 대사되는 것으로 추정되므로 DHA 오일이나 DHA인지질을 포스파티딜세린과 함께 섭취해주면 될 것으로 추정을 할 수 있다. 그러나 이에 대한 학술적 문헌 보고가 있지 않아 비교 결과는 알 수 없다. 다만 DHA를 함유한 유지도 DHA에틸에스터, DHA 오일, DHA 인지질 형태에 따라 흡수되는 속도가 다르며 인지질의 형태가 가장 흡수 전달이 빠르다고 보고한 문헌이 보고되어 있다. (*Am J Clin Nutr* 1998;67:97-103)

실제로 DHA는 뇌에 여러 가지 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 그 한 예로 식이에서의 DHA 결핍이 뇌의 PS의 함량에 부정적인 영향을 미치는 결과가 보고되어 있다. 동물 실험의 결과의 예를 들면,  $\omega$ -3-지방산이 결핍된 식이를 하게되면, 뇌의 PS가 약 28% 감소하고, 이는  $\omega$ -3 지방산 결핍과 관련된 뇌-해마의 기능의 생화학적 변화를 일으키는 한 원인이 될 수 있다고 한다. (Murthy, M., J. Hamilton, R.S. Greiner, T. Moriguchi, N. Salem Jr., H.Y. Kim, *J. Lipid Res.*, vol.43, 611-617, 2002) 따라서 DHA는 PS와 상당한 시너지가 있을 수 있을 것으로 예상이 된다. 결국 DHA와 대두포스파티딜세린이 함께 섭취될 경우 훨씬 더 좋은 효능을 얻어 낼 수 있을지가 관심사가 된다. 뇌에 존재하는 포스파티딜세린은 DHA가 8% 정도 존재하고 있으며 이것이 중요한 역할을 할 수 있을지를 살펴 볼 필요가 있다. 이를 위해 우선 뇌내 PS와 유사한 지방산 조성을 갖는 포스파티딜세린을 제조하기 위해

1. 원료가 되는 레시틴에 DHA가 함유되도록 사료급여를 통해 인지질내에 DHA가 포함되도록

한 난황 레시틴을 얻고 이를 정제한 후 효소전환하여 일정량의 DHA가 분자내에 결합된 포스파티딜세린을 제조하여 그 효능을 조사할 필요가 있다.

2. 이와 더불어 인지질내의 DHA가 경구 섭취 시 PLA2에 의해 DHA가 가수분해되어 별도로 대사되는 것으로 추정되므로 이럴 경우 DHA가 반드시 포스파티딜세린 분자와 같이 있을 필요는 없다. 따라서 인지질 형태의 DHA 함유 인지질과 대두 포스파티딜세린을 DHA 함유 난황 유래 포스파티딜세린과 DHA 함량이 동일하게 조절하여 제조한 포스파티딜세린의 효능을 비교하여 볼 필요가 있다.

이를 통해 뇌내 PS와 유사하며 효과가 높고 경제성이 있는 포스파티딜세린의 형태를 찾아내고 이의 대량생산 공정 수립 및 양산을 통해 건강 기능 식품으로 이용될 수 있도록 하고 나아가 세계적 수준의 포스파티딜세린을 통해 세계 시장을 공략하려고 한다.

## 2. 연구개발과제의 추진체계



- DHA 함유 해산물의 효율적인 수배, 저장 조건 및 처리 조건 조기 수립
- 원료 품질의 균일화 및 제조후의 **제품 안전성 확보**를 위한 품질관리 지표 설정 및 신속한 평가 시스템의 확보
- 국내외의 관련 업체 및 협력업체 등을 통해 기반 조사를 하여 사업타당성 분석, 시장 조사 및 국내외 규제 동향 분석으로 해외시장에 빠르게 대처
- FDA 및 KFDA 등의 기능성 식품 안전성, 효능 평가 가이드라인 최신 정보 수시 입수
- 저명 학술지 기능성 물질 및 소재의 안전성 연구결과 리뷰로 관련 연구 동향 파악
- 주력시장과 전략제품을 선정하여 각종 홍보 전략을 강화
- 중국, 일본, 한국, 미국, 유럽 등 각국의 regulation에 적합한 제품, 제형의 **다양화** 전략과 제품의 **표준화** 연구
- 시장 개척을 위하여 국내 고객사 프로모션을 비롯하여 중국, 유럽, 일본 등 해외 식품 전시회에 참가하여 제품 알리기에 주력

- 식약청 인정 가능 수준의 효능 연구 결과를 토대로 인체 대상 효능 evidence-base 및 생리활성 지질의 적절한 formula를 개발을 통해 효과가 높은 고부가 기능성 식품개발
- 주관기관 및 위탁기관 역할분담과 협력 및 유기적 연구 추진에 의한 신속한 연구진행
- 효능 평가를 위한 포스파티딜세린의 순수 분리 및 효능 평가용 시료 지속적 제공.
- 경제성을 갖춘 효능이 우수한 포스파티딜세린 소재의 최종 복합 formula 개발
- 최종 규격 제품의 대량 생산화
- (주) 두산 글로넷 바이오 사업부는 20여년 이상의 리피드 연구를 해온 전문 기업으로 많은 경험과 know-how를 축적하고 있을 뿐만 아니라 국내 유일의 고부가 인지질 및 스피그 지질의 대량 생산 설비를 보유하고 있음. 이를 통해 각종 천연 및 합성 지질 제품류를 국내는 물론 세계로 수출을 하고 있으며 2009년에는 당사의 인지질 제품이 지식 경제부 선정 차세대 일류 상품으로 선정된 바 있다. 따라서 본 연구과제의 수행에 있어 준비기간의 소비없이 연구결과를 곧바로 산업화 시킬 수 있는 역량을 가지고 있음.
- 포스파티딜세린을 함유한 기능성 음료 작용을 위한 제형 제품 생산을 위해 국내 협력사들의 식품용 GMP 급 microfluidizer type의 초고압 유화기를 이용 생산
- 기술개발에 필요한 기초연구장비 및 고가 시험분석장비는 경기바이오센터 및 바이오 산업지원센터에 구축된 연구기자재를 공동으로 활용하여 추진함.
- 추진일정

구분		1단계('09년 ~ '11년)								단계없음		
		1년차				2년차				○ 년 차	○ 년 차	○ 년 차
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4			
제 3 세 부	DHA 함유 난황 및 해산물 유래 인지질 수배	■										
	DHA 함유 포스파티딜세린 제조 및 분리 정제	■	■									
	DHA 함유 포스파티딜세린 대량 생산 타당성 검토		■	■								
	경제성, 효용성 검토에 의해 선발된 포스파티딜세린 제제 대량 생산 시스템 구축				■	■	■					
	건강기능식품 소재화를 위한 규격화 및 안전성, 안정성 연구							■	■			
	DHA 함유 PS 수용성 나노 유화 제형 개발					■	■					
	DHA 함유 PS 수용성 나노 유화 제형 안정성 test 및 제형 개선 연구							■	■			

### 3. 연구개발수행 내용 및 결과

□ PUFA 함유 PS제조 방법의 탐색

DHA, EPA 등 고도 불포화지방산 (PUFA)를 함유한 PS를 제조하는 방법으로서 크게 두가지 방법이 있다. 이미 만들어진 대두 PS에 포스포리파제 A를 이용하여 transesterification을 시도하는 방법 (그림 1)이 있으며 이미 고도 불포화지방산 (PUFA)를 함유한 포스파티딜콜린을 이용하여 포스포리파제 D를 이용하여 transphosphatidylaton을 시도하는 방법 (그림 2)이다.



그림 1. PLA Transesterification에 의한 PS 제조 모식도

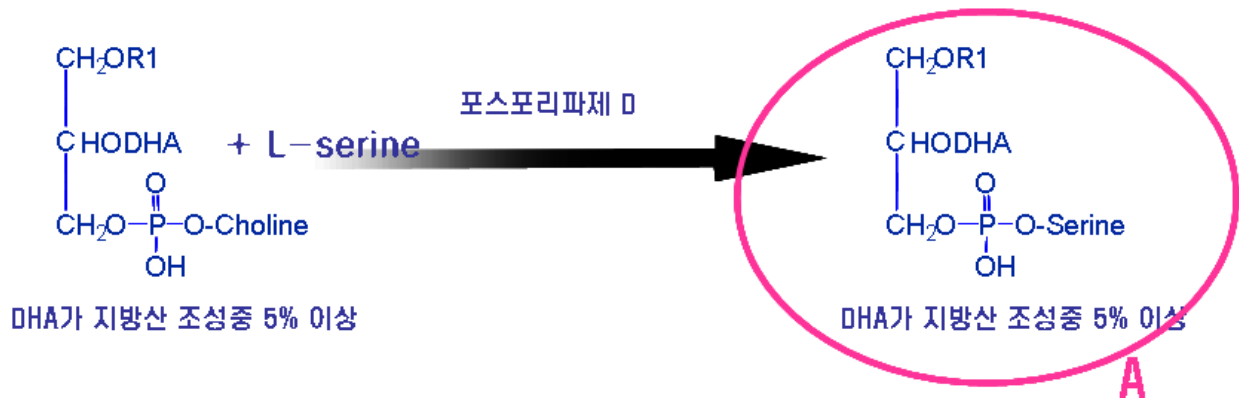


그림 2. PLD transesterification에 의한 PS제조 모식도

포스포리파제 A를 이용한 transesterification 반응 (그림 1)의 경우 대두 PS를 에틸아세테이트, 헥산 두가지 식품으로 사용가능한 유기 용매를 이용하여 대두 PS에 몰비율의 10배에 해당하는 DHA, EPA 함유 에틸에스터를 혼합하여 동결건조한 포스포리파제 A를 첨가하여 반응을 시도하였다. 그러나 모든

조건에서 대부분의 DHA, EPA가 대두 레시틴에 incorporation 되는 것이 나타나지 않았다.

이에 반해 포스포리파제 D를 이용한 transphosphatidyltion 반응 (그림 2)의 경우 DHA, EPA등의 PUFA를 함유한 오징어 유래 오일을 활용하였다. 인지질을 함유한 크릴 유래 오일을 에틸아세테이트에 녹인 후 L-세린 및 물에 포스포리파제 D를 넣고 24시간 반응하였다. 그 결과 포스파티딜세린이 합성이 원활하게 이루어짐을 확인 하였다.

따라서 PUFA 포함 인지질을 함유한 유지를 포스포리파제 D를 이용한 transesterification 반응이 PUFA 함유 PS를 제조하는데 있어 더 적합한 것임을 확인 하였다.

#### □ DHA 함유 PS제조를 위한 원료의 탐색

##### 1. 원료의 선정 및 DHA, EPA 함량 조사

DHA, EPA등을 함유한 고도 불포화 지방산 (PUFA)을 함유한 원료로서 해양 유래 레시틴을 함유한 오일을 탐색하였다. 우선 DHA, EPA 등의 고도 불포화 지방산이 높은 원료로서는 해양 유래의 원료가 매우 유력하였으며 이들 중에 실제 양산이 가능할 수 있다고 판단되는 것이 갑각류인 크릴에서 추출된 레시틴을 포함하는 기름과 오징어로부터 추출된 인지질 및 DHA를 사료 급여하여 얻어진 난황유가 있다. 이러한 원료를 일본 협력사를 통하여 원료 시제품을 얻을 수 있었으며 크릴 유래와 난황유의 경우는 상업적으로 양산이 되고 있으며 오징어 유래의 레시틴은 아직 양산 단계로 공급이 가능한 곳은 없었다. 일단 각 유력한 원료를 PS합성에 적합한지의 여부를 검토하기 위하여 일본 협력사를 통해 다음의 원료를 입수하였다. 해양 유래의 오징어와 크릴 유래의 레시틴을 검토하였으며 DHA, EPA를 함유한 사료를 급여한 닭의 난황으로부터 추출한 난황 레시틴 함유 oil을 원료로서 검토 하였다. 각 원료의 인지질 함량과 DHA, EPA 등 고도 불포화 지방산의 함유량을 검토하였다. 그 결과는 Table 1에 나타나 있다.

Table 1. 각 원료의 DHA 및 EPA의 함량 %

	Krill oil	Squid lecithin
EPA	15.4 %	19.5 %
DHA	7.0%	39.5 %

##### 2. 원료의 인지질 함량

PS의 제조를 위해 직접적으로 전환이 되는 인지질의 원료 중의 함량을 조사하기 위해 식품 첨가물 공전에서 레시틴 규격부분의 아세톤 가용물 측정방법을 사용하여 역산을 통하여 인지질 함량인 아세톤



불용물을 측정하였다.

아세톤 가용물 함량: 원료 2g을 달아 50ml 원심 분리관에 넣어 석유에테르 3ml를 가하여 녹이고 아세톤 15ml를 가하여 잘 뒤섞은 후 얼음물에 15분간 방치한다. 이것에 미리 0~5℃로 냉각한 아세톤을 가하여 50ml로 만들어 잘 뒤섞어 얼음물 속에 15분간 방치한 후 매분 약 3,000 회전으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 플라스크에 취한다.. 그리고 원심 분리관의 침전물에 0~5℃ 아세톤을 가하여 50ml로 만들어 얼음물 속에서 냉각하면서 잘 뒤섞은 후 같은 방법으로 원심분리 한다. 이 상층액을 앞의 플라스크에 합하여 수욕상에서 증류하고 잔류물을 105℃에서 1시간 건조하여 그 중량을 정밀히 단다.

인지질 함량 = 아세톤불용물 (acetone insoluble) =원료무게 -아세톤 가용물

이렇게하여 측정한 결과는 table 2에 나타나있다.

Table 2. 원료의 인지질 함량

	Krill oil	Squid oil	Egg oil (DHA)
인지질 함량 (아세톤 불용물)	46.5%	45.2%	31.4%

□ PUFA 함유 인지질로부터 PS제조 반응 테스트.

각 원료를 이용하여 다음과 같은 조건에서 반응을 테스트 하였다.

L-세린 20g을 소듐 아세테이트 완충용액 (pH 5.6) 60ml에 넣고 포스포리파제 D (두산 제조)를 원료의 2% 넣고 40℃에서 교반하여 세린을 완전히 녹인 후, 여기에 각 원료 10 g을 에틸아세테이트 용매 100ml에 녹인 것을 섞어, 200rpm으로 교반하면서 24 시간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 30분간 정치시킨 후, 상층부를 회수하여 3 시간 정치한 후 여과하여, 여액을 물로 4차례 수세한 후 감압 증발시켜 용매를 완전히 농축시킨다. 이렇게 얻은 결과물의 무게와 포스파티딜세린의 함량을 HPLC로 측정하였다.

크릴 유래의 레시틴 함유 유지의 경우는 수율이 91.2%, 오징어 유래 레시틴 함유 유지의 경우는 78%, 난황 유래 유지의 경우는 65% 정도 였다 난황 유래 유지의 경우는 특히나 포화 지방산이 매우 높은 관계로 용해도가 좋지 않아 수세 시 손실이 많이 생겨서 수율이 70% 이하로 되었다.

Table 3. 각 원료로부터 PS 제조 시 수율 및 PS 함량

	Krill oil	Squid lecithin	Egg oil (DHA)
수율	91.2%	78.3%	64.9%
PS 함량	36.5%	32.5 %	21.5%

#### □ PUFA 함유 인지질로부터 PS 분말 제조 및 분석

PS 반응 후 농축된 농축 유지에 30배의 아세톤을 교반하면서 처리하여 중성 지질을 제거하여 침전물을 만들고 이를 여과하여 감압 농축 한 후 분쇄기로 갈아서 분말 처리하였다. DHA 및 EPA등의 고도 불포화 지방산의 지방산은 이렇게 분말화 한 각 PS에 대해 각 지방산 조성을 조사하였다.

Table 4. 각 원료별 분말 PS의 지방산 조성

	Krill oil	Squid lecithin
EPA	32.0 %	13.5 %
DHA	14.4%	39.5 %

#### □ PUFA 함유 인지질을 함유하는 유지 및 세린 기질 비율에 따른 PS 제조 조건 탐색

앞서 검토하였던 원료로서 해양 유래 원료인 크릴 및 오징어 유래의 경우가 수율면에서 좋았으며 불포화 지방산 등 유기용매에 보다 용해성이 좋아 분리 정제 시에도 장점이 있다고 판단 되었다. DHA 사료를 급여한 난황유의 경우 상업적으로 구하는 것이 매우 고가이며 분리 정제 시 loss가 매우 많아 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 해양유래의 레시틴을 포함하는 크릴 유래와 오징어 유래의 유지 두가지를 DHA 함유 PS 원료로서 선정하여 이에 대한 생산 최적화를 수행하였다.

##### 1. 기질 비율에 따른 PS 전환율 조사

우선 원료의 비율을 결정하기 위해 각 유지와 세린의 비율을 결정하는 실험을 행하였다. 그 비율로서

1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3의 조건으로 반응 하였으며 효소량은 평형을 조사하기 위해 충분히 사용하도록하여 원료 유지에 3%를 첨가 하여 24시간 반응하여 포스파티딜콜린으로 (PC)부터 포스파티딜세린 (PS)으로 전환율을 조사하였다.

Table 5. PS 제조를 위한 원료 기질의 비율 조사

기질 비율 (원료 유지:세린)	Conversion from PC to PS (Krill)	Conversion from PC to PS (Squid)
1: 0.5	50.1%	41.2%
1: 1	65.4%	55.5%
1: 1.5	80.5%	67.8%
1: 2	90.8%	85.2%
1: 2.5	94.3%	90.3%

그 결과 크릴 유래의 경우나 원료 유지 및 세린의 비율이 1:2의 경우가 전환율이 90%수준으로 적절하였으며 오징어 유래의 경우 1: 2.5 정도에서 90% 수준의 전환율에 도달하였다.

## 2. 효소량의 결정

크릴 유래 오일과 오징어유래 오일을 이용하여 효소 반응을 하는데 있어서 크릴 유래의 오징어 유래 오일의 경우는 오일 대 세린의 비율을 1:2, 오징어 유래의 유지의 경우는 1:2.5의 비율로 하고 효소를 원료 유지의 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%를 넣어 24시간 반응을 하였다.

Table 6. PS 제조를 위한 효소량 조사

효소량	Conversion from PC to PS (Krill)	Conversion from PC to PS (Squid)
-----	-------------------------------------	-------------------------------------

0.5%	49.1%	43.2%
1%	65.6%	58.7%
1.5%	82.5%	77.1%
2%	90.8%	88.9%
2.5%	93.3%	94.1%

조사한 결과 효소량은 2% 수준이 적절하였다.

효소 반응 시간은 분리 정제 등 실제 양산 시 시간 등을 고려해 22~24시간으로 고정하였다.

### 3. Krill유래 DHA함유 PS 표준품 제조

상기와 같이 제조된 PS의 함량을 정량하기 위하여 해산물 유래 DHA함유 포스파티딜세린의 표준품을 아래와 같이 제조하였다.

#### [Step I]. Normal Phase(for PC제거)

1. silica gel을 Chloroform에 갠다
2. column에 솜을 채우고 sea sand를 갠 후 chloroform을 1/5가량 채운다
3. 앞에 제조한 silica를 컬럼에 잘 packing한다
4. chloroform을 silica gel이 마르기 전까지 밑으로 빼준다
5. sample을 100% solution( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 9 : 1)이 되게 녹이고 loading한다
6. Chloroform에 MeOH의 비율을 늘려가며 fraction을 받는다
7. 받은 fraction을 차례로 TLC 체크하여 PC 제거 여부를 확인한다

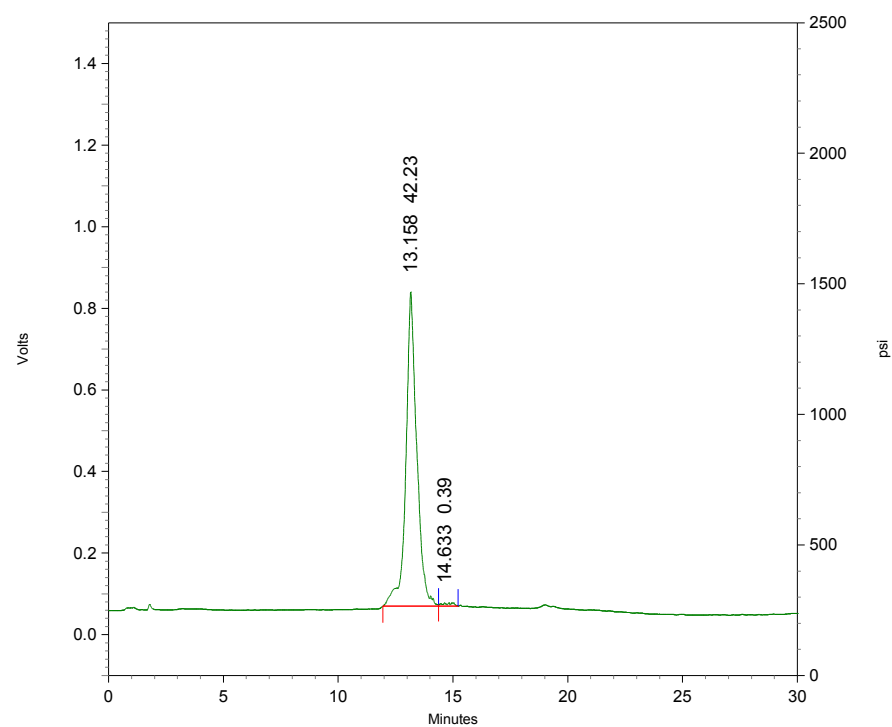
#### [Step II]. Reverse Phase(for PA와 PS분리)

1. silica gel을 DCM : MeOH : 28%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (100 : 10 : 1)에 갠다
2. column에 솜을 채우고 sea sand를 갠 후 eluent를 1/5가량 채운다
3. 개어 둔 silica를 컬럼에 잘 packing한다
4. eluent를 silica gel이 마르기 전까지 밑으로 빼준다

5. sample을 100% solution( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 9 : 1) 이 되게 녹이고 loading한다
6. PA가 더 이상 나오지 않을 때까지 fraction을 test tube로 받는다
7. eluent를  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 9 : 1 바꿔 fraction을 받는다
8. eluent를  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 2 : 1로 바꿔서 PS가 더 이상 나오지 않을 때까지 받는다

상기와 같이 제조한 크릴 유래 DHA함유 포스파티딜세린을 TLC와 HPLC로 분석하여 98% 이상의 단일 물질임을 확인하였다.

그림 3. HPLC chromatogram of Krill PS Standard

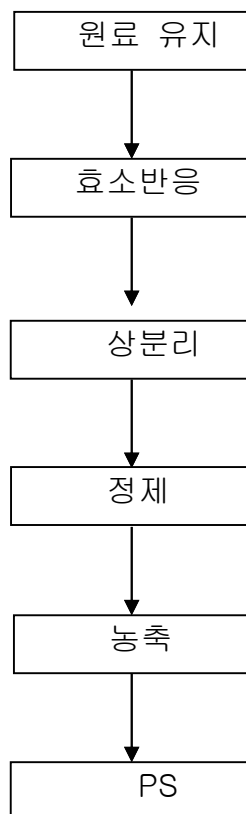


(injection concentration:5% sol.)



## □ Krill PS scale-up 테스트

○ 앞서 결정된 최적화된 조건에서 대량 생산을 위한 scale-up 실험을 실시하였다. 크릴 원료를 10kg의 scale로 하여 3 batch의 반응을 시도하였다. 보다 자세히 기술하면 크릴오일 1kg을 에틸아세테이트 10L에 녹인 후 세린 2kg를 초산완충용액 10L에 녹인 후 포스포리파제 200g을 넣고 24 시간 교반 반응 하였다. 이후 반응물을 물로 수세하여 효소 세린 등을 제거하고 용매층을 감압 농축하여 PS 반응 물을 얻었다. 그 결과 수율은 88.7%, 90.8%, 91.9%로 각각 얻어졌으며 PS전환율은 89.1% 수준으로 얻어졌다.



<PS 생산 공정 모식도>

○ 상기의 최적화된 조건에서 대량 생산을 수행한 3 batch의 PS 순도를 분석하였다. oil-type의 경우 순도 35.92~36.65%의 제품을 생산할 수 있었고 powder-type의 경우 83%순도의 제품을 생산할 수 있었다. Krill-PS의 순도 정량을 위해 Krill-PS를 silica gel column을 사용하여 분리하여 얻은 표준품으로 사용하여 정량하였다.



<Krill PS scale up 생산 테스트>



<Krill PS scale up 생산 테스트>

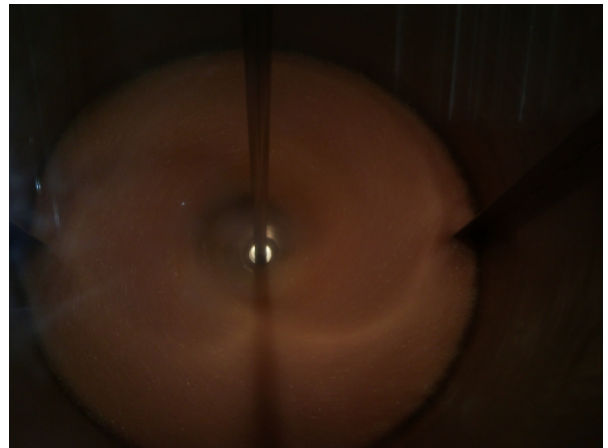
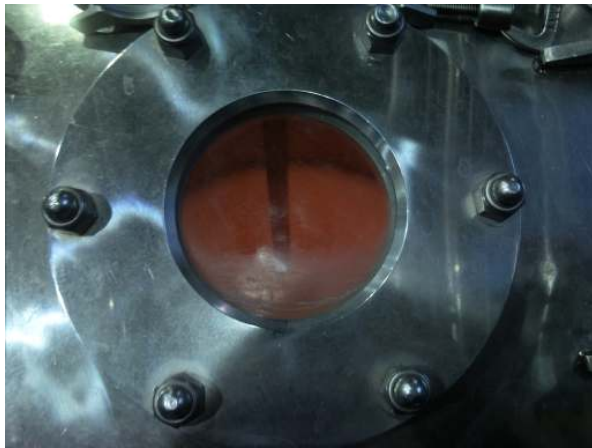


○ Krill PS 대량 생산 테스트

당사의 생산 설비에서 크릴 원료를 50kg의 scale로 하여 반응을 시도하였다. 보다 자세히 기술하면 크릴오일 50kg을 에틸아세테이트 500L에 녹인 후 세린 100kg를 초산완충용액 500L에 녹인 후 포스포리파제 1kg을 넣고 24 시간 교반 반응 하였다. 이후 반응물을 물로 수세하여 효소 세린 등을 제거하고 용매층을 감압 농축하여 PS 반응물을 얻었다. 그 결과 수율은 각각 88.7%와 91.6%로 얻어졌으며 PS 전환율은 91.3 % 수준으로 얻어졌다.



<크릴 PS 대량 생산 테스트>



<Krill PS 대량 생산 테스트>



<Krill-PS 시생산 시제품>

상기 50kg 수준의 대량 생산 시 얻어진 크릴 PS를 토대로 당사 제품에서 분석을 실시하는 specifications 항목에 해당하는 검사를 실시 하였으며 그 결과는 다음과 같다.

크릴 PS 원료 제품의 잠정적 specifications.

Test Items	Krill-PS
Appearance	Dark red sticky liquid
Phosphatidylserine	36.24%
Peroxide value	0.9 meq/kg
Heavy metals	3.5 ppm
Arsenic	3.2 ppm
Total aerobic count	100 cfu/g
Residual Hexane	0.9 ppm
Residual Ethylacetate	1.0 ppm

#### □ Krill PS 수용성 유화 제형개발

앞서의 대량 생산을 통하여 얻어진 DHA/EPA 함유 krill유래 포스파티딜세린을 원료로 하여 우유나 유음료에 적용 가능한 제형을 개발하기 위하여 다양한 유화제를 선정한 후 각 최적의 조성비를 탐색하고자 하였다. 유화제로서 대두레시틴, 글리세린, 글리세린지방산에스터, 폴리글리세린 지방산에스터의 조합을 검토하였다.

포스파티딜세린은 물에 약간 분산되기는 하지만 분산 후 안정성이 떨어져 침전이 되는 현상이 발생하고 우유, 유음료 등의 적용을 위해 안정화가 필요하였다. 이에 포스파티딜세린이 4% 함유된 유화 제형을 개발하였다. 포스파티딜세린에 MCT를 첨가하여 균질 혼합 후 용매를 제거한 기름상에 글리세린, 유화제, 증류수 혼합물인 수상을 첨가하여 잘 혼합한 후 APV 타입의 초고압 유화기를 이용하여 평균 입자크기 70~90nm의 에멀전을 얻었다. 제조한 에멀전 원액을 상온 암소, 상온, 4도 및 40도에 보관하면서 시간이 경과함에 따른 침전물 확인 및 입경변화를 측정하여 24주간 안정성을 확인하였다.

**포스파티딜세린** : 유상 타입의 PS 함량 40% 오일 타입의 유지를 이용하였다.

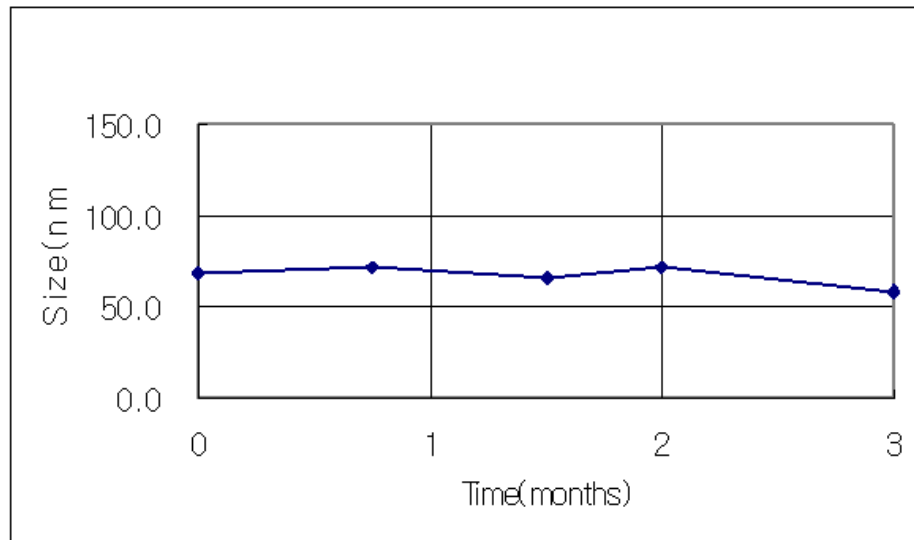
**에멀전 제조** : 유상의 포스파티딜세린과 물: 유화제: 글리세린을 아래와 같은 다양한 조건으로 혼합하여 섞은 후 50도로 가온, 혼합하여 두 상을 잘 섞어 준 다음 Homogenizer (APV LAB2000)에 넣고 300bar에서 1pass, 1000bar에서 2 pass를 통과시켜 에멀전을 제조하였다. 상세한 유화 조건 검토를 위하여 다음의 유화제를 이용하여 유화제 조성변화 및 유상의 비율을 변화시키면서 적정 제형조건을 탐색 하였다.

표 1. PS 유화 조건에 따른 유화제형의 입경

	PS	유화제1	유화제2	Oil	glycerine	water	size(nm)	유화제명
1	0.5					4.5	침전	
2	0.5	0.5				4.5	152.5	A-75
3	0.5	0.3	0.2			4.5	182	A-75, B-50
4	0.5	0.3				4.2	161.8	A-75
5	0.5	0.3				4.2	189	C-75
6	0.5	0.3			1	3.2	78.1	C-75
7	0.5	0.3				4.2	168.3	C-75
8	0.5	0.3	0.1	0.6	1	2.5	157	M-75, L-10
9	0.5	0.3	0.1	0.4	1	2.7	228	M-75, L-10
10	0.5	0.3	0.1	0.2	1	2.9	180	M-75, L-10

여러 조건에서 탐색을 한 결과 PS:유화제:글리세롤:물의 비율이 5:3:10:32의 비율의 경우가 입자 크기가 가장 작게 나타났으며 안정적으로 유지하였다. PS 농도로서 4% 유화액으로 이의 안정성을 테스트하기 위해 저장성 실험을 실시 하였다.

**저장성 실험 :** 4% PS 함유 에멀전 원액을 40 ℃에 보관하면서 , 시간이 경과함에 따른 침전물 확인 및 입경변화를 측정하여 12주간 안정성을 확인하였다.



PS 유화액의 저장 안정성 test (40도)

그림에 나타나 있듯이 제조된 PS 유화액이 40도 3개월간 입경의 변화가 없었으며, 우유에 적용 테스트를 위해 80도 30분간 열처리 전후 및 2개월까지 입경의 변화가 크지 않은 상태로 40도 3개월까지 유화액이 안정한 것으로 판단된다. 따라서 상온에서 6개월 이상 유화액이 안정할 것으로 예측되었다. 따라서 우선적으로 우유, 요구르트 등의 적용에 큰 문제가 없을 것으로 판단이 되었다.

그림 krill PS 유화 제형의 우유 적용 test 예 (5mg/100ml)



□ Krill PS 캡셀 제조 및 안정성 test



분말 크릴 PS 및 오일타입 PS



실험조건:

- ① 온도:  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,
- ② 기간: 48주(11개월)
- ③ 주기: 1개월마다 실험

구분	기준	상온										
		1 개 월	2 개 월	3 개 월	4 개 월	5 개 월	6 개 월	7 개 월	8 개 월	9 개 월	10 개 월	11 개 월
맛, 향	고유맛	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
색상	붉은색	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
인지질	아세톤불용 물로써 15%이상	16 .5	16 .3	16 .4	16 .8	16. 5	16. 2	15. 9	16. 1	15. 8	15. 5	15. 3
포스파티 딜세린	200~240mg/g	23 .1	23 .3	23 .2	23 .0	23. 3	23. 5	23. 0	23. 2	22. 9	22. 5	22. 8
대장균군	음성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성

○ : 우수, △ : 양호, × : 부적합

유지타입의 PS를 이용하여 캡셀 제조 후 현재까지 11개월간 상온 저장한 결과 함량의 변화 및 산화 안정도 등의 변화 없이 안정된 상태를 유지하였다.

#### □ 결론

○ DHA/EPA등 고도불포화지방산(PUFA)을 함유하는 PS를 제조하는 데 있어서 적합한 해양유래 크릴 및 오징어로부터 인지질을 함유한 유지를 검토하였고 이 중 실제 산업적 양산이 가능한 크릴 유래의 인지질을 이용하여 효율적인 대량 양산 시스템을 구축 완료하였다.

○ DHA, EPA 등의 고도 불포화 지방산이 결합된 PS가 대량 양산을 통해 뇌기능에 있어서 기존 대두 PS 보다 우수할 뿐만 아니라 혈행 개선 등의 다른 기능도 강하게 갖는 PS를 생산 할 수 있기 때문에 고도 불포화 지방산 결합 인지질로서 항여 효능의 소재가 사회에 공급된다면 현재 치매예방 및 개선 등의 효능으로 고령화 사회에서의 큰 도움이 되고 기여할 수 있는 소재가 될 수 있을 것으로 기대한다.

○ 크릴 유래의 PS를 이용하여 연질 캡셀을 제조하였고 저장 안정성 테스트를 수행하였으며 안정적인 상태를 유지하였다. 또한 4% 유화제형을 개발하여 우유 등에 적용 테스트를 한 결과 관능적으로 문제없이 안정하게 적용함을 확인하였다.

#### 4. 참고문헌

1. VP Carnielli, G Verlato, F Pederzini, I Luijendijk, A Boerlage, D Pedrotti and PJ Sauer, Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67, pp97-1032.
2. Mahadev Murthy, Jillonne Hamilton, Rebecca S. Greiner, Toru Moriguchi, Norman Salem Jr. and Hee-Yong Kim<sup>1</sup>, *J. Lipid Res.*, 2002, 43, pp611-617



## Ⅳ. 첨부서류