

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000797-01

## 알레르기 유발성분을 정제한

## 농생명자원-봉독펩티드의 해외수출산업화 개발

(The agricultural biological resources export  
industrialization of non or low allergic reaction bee venom  
peptides)

(주)청진바이오텍

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “알레르기 유발성분을 정제한 농생명자원-봉독펩티드의 해외수출산업화 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 02 월 일

주관연구기관명 : (주)청진바이오텍

주관연구책임자 : 김 철 구

세부연구책임자 : 김 철 구

연 구 원 : 신 장 철

연 구 원 : 원 하 영

연 구 원 : 이 선 영

연 구 원 : 신 연 희

연 구 원 : 김 승 주

연 구 원 : 박 정 근

연 구 원 : 최 아 영

위탁연구기관명 : 경상대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 김 의 경

# 요 약 문

## I. 제 목

알레르기 유발성분을 정제한 농생명자원-봉독펩티드의 해외수출산업화 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 봉독은 천연 화장품, 천연물 신약, 동물 천연 항생제 등 기능성 천연원료로써의 가능성이 무한함
- 봉독은 두드러기, 가려움, 구토, 경련, 설사, 불안감 등의 부작용을 가짐. 이러한 봉독 알레르기 유발성분의 원천적 차단이 필요
- 봉독 및 분리-정제봉독의 해외 수출시, 소량이 아닌 다량으로 계약이 이루어지기에 대량 생산 필요성 대두
- 봉독의 유효성분(melittin, apamin 등)과 알레르기 유발성분(PLA<sub>2</sub>)의 분리 및 분석법을 확립
- 해외수출을 위한 분리-정제봉독의 대량 정제 생산 시스템 표준화
- 정제봉독(PBV) 및 분리-정제봉독(IPBV)의 안전성과 유효성 검사를 통해 상품가치 높임

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 정제봉독의 알레르기 유발성분 분리 및 분석 공정 확립
  - 정제봉독의 주요 성분인 melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>의 분자량 차이를 바탕으로 ultra filtration을 통해 분리
  - 시료농도, 분획분자량, 압력의 분리 조건에 따른 PLA<sub>2</sub> 분리의 최적조건 확립
  - 정제봉독 및 분리-정제봉독의 정량분석(HPLC), 정성분석(SDS-PAGE) 실시
  - Prep-HPLC를 이용하여 Reversed Phases Chromatography 방법을 통해 단일성분으로 분리, 분석
2. 분리-정제봉독의 해외수출을 위한 대량생산 시스템의 규격화
  - 다양한 조건을 바탕으로 Ultra filtration을 통한 최적의 PLA<sub>2</sub> 분리법 확립
  - 기존 분리방법이었던 FPLC Gel-filtration과 본 연구를 통해 확립한 ultra filtration의 생산율, 생산비용, 대량생산을 위한 수득률 비교 분석
3. 정제봉독과 분리-정제봉독의 해외수출을 위한 안전성 및 저장성과 유효성 연구
  - 저장성 연구: 건조 상태의 봉독과 1 mg/mL의 정제봉독 수용액의 저장 조건에 따른 주요 성분 변화를 확인 및 수출에 적합한 저장, 유통조건을 확립
  - 항산화 효능: DPPH 라디칼 소거능
  - 항균 효능: agar well diffusion, MIC
  - 알레르기 유발 비교: Histamine assay

- 항염효능: NO assay
  - 세포독성: agar diffusion test
  - 미백효능: Tyrosinase inhibitory effect
  - 주름개선효능: Elastase inhibitory effect
4. 자연적인 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가
- 인체섬유아세포의 세포독성 및 증식능 시험
  - 콜라겐 생성량 측정(ELISA법, western blot)
  - Matrix metalloproteinase(MMPs) 저해활성 측정
5. 자외선에 의한 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가
- UVB 조사로 인해 손상된 세포에서 정제봉독 및 분리-정제봉독의 보호효과
  - 정제봉독 및 분리-정제봉독의 처리 후 ELISA를 이용한 콜라겐 변화 측정
  - 정제봉독 및 분리-정제봉독 처리 후 Western blot을 이용한 콜라겐 변화 측정
  - 정제봉독과 분리-정제봉독의 MMPs 합성저해효과
  - 정제봉독과 분리-정제봉독의 UVB로 인한 ERK1/2, p38와 p65저해효과
6. 정제봉독과 분리-정제봉독의 화장품관련 임상평가
- *In vitro* 3T3 neutral red uptake(NRU) 광독성 시험
  - *In vivo* local lymph node assay(LLNA) 피부 자극 시험
  - patch test: “Dermatologically tested”법을 바탕으로 피부에 patch를 반복적으로 부착하여 정제봉독과 분리-정제봉독의 자극성 및 민감성 조사
  - 분리-정제봉독 에센스의 수분 및 탄력 개선조사: 시험제품 “에센스”를 1일 2회 안면 부위에 적당량을 사용한 뒤 수분 및 탄력 개선 효과를 평가
7. 국내외 전시회/박람회를 통한 시장조사
- 국내외 전시회/박람회 및 업체 미팅을 통해 정제봉독과 분리-정제봉독의 효능, 안전성 자료 제공

#### IV. 연구개발결과

1. 정제봉독의 알레르기 유발성분 분리 및 분석 공정 확립
- 봉독의 유효성분들이 가지는 분자량을 통해 filter의 분획분자량을 5 KDa, 10 KDa, 30 KDa으로 결정하고, 압력은 20, 30, 40 psi로, 정제봉독을 녹인 수용액의 농도는 1, 2, 10 mg/mL로 결정하였다. 다양한 조건 변화를 통해 PLA<sub>2</sub>가 제거되고 정제봉독의 apamin과 melittin 함량(50~60%)이 비슷한 조건(20 psi의 압력으로 1 mg/mL의 농도에서 10 KDa 막필터를 사용한 조건)을 찾을 수 있었다.
2. 분리-정제봉독의 해외수출을 위한 대량생산 시스템의 규격화
- 다양한 조건(농도, 압력, 분획분자량)에 따른 알레르기 유발성분의 분리연구를 바탕으로 분리-정제봉독의 대량생산 공정을 확립하였다. 분리-정제봉독을 생산하기 위해 정제봉독

(PBV)은 1 g/L의 농도로 증류수에 용해시켜 준비한다. 30 KDa filter를 이용하여 1차 여과 후, 수거한 하층액을 10 KDa filter로 2차 여과시킨다. 주 성분의 함량분석을 바탕으로 2차 여과 후 수거한 하층액을 1 KDa filter로 농축하는 과정을 추가하기도 한다.

- 봉독의 알레르기 유발성분은 PLA<sub>2</sub>를 분리하는 기존의 방식인 FPLC gel filtration과 비교하여 수득률은 약 26% 정도로 낮지만 분리 과정 후 PLA<sub>2</sub>를 포함하는 부분물질의 활용이 가능하고 비용 및 생산시간이 현저하게 향상되었음을 확인한 결과, ultra filtration이 대량생산에 적합하다고 평가된다.

### 3. 정제봉독과 분리-정제봉독의 해외수출을 위한 안전성 및 저장성과 유효성 연구

#### - 저장성 연구

건조상태의 정제봉독과 1 mg/mL의 정제봉독 수용액을 유리병에 밀봉하여 준비한 후, 아래의 조건에 따라 저장한다. 기간에 따라 성분분석을 통해 봉독의 저장성을 연구하였다.

- 조건 1 : 저장상태 (건조봉독, 정제봉독 수용액)
- 조건 2 : 저장온도 (-20°C, 5°C, 25°C, 40°C)
- 조건 3 : 저장조건 (차광, 투명)
- 조건 4 : 저장조건 (질소충전, 공기노출(산화))

정제봉독의 수출에 적합한 저장 및 유통조건을 확립하기 위해 저장 환경에 따른 성분의 변화를 시간별로 측정한 결과 세 가지 주요 성분 중 melittin이 가장 큰 함량 변화를 보였다. 또한 성분변화와 함께 실온에서는 침전물, 고온에서는 갈변현상을 보이며 외관상으로도 뚜렷한 변화를 보였다. 여러 가지 조건 중 건조 상태, 저온에서 보관했을 때 높은 안정성을 보였고 수분과 빛, 산화조건, 높은 온도에서는 두드러지는 감소를 보였다. 정제봉독의 장기간 보관 및 장거리 유통 시에는 건조한 상태 및 차광, 저온 및 수분과 산소 차단 등의 조건이 필요할 것으로 사료된다.

#### - 항산화 효능: DPPH 라디칼 소거능

정제봉독, 분리-정제봉독의 IC<sub>50</sub>값은 각각 0.32 mg/mL, 0.53 mg/mL으로 *Ilex Kudincha* 조추출물과 흡사한 결과로 보아 항산화 효능을 갖는 천연소재로 증명된다.

#### - 항균 효능: agar well diffusion, MIC

7개 균주(*E. Coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. mutans*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. acnes*)에 대한 정제봉독과 분리-정제봉독의 항균 효능을 평가하였다. 정제봉독과 분리-정제봉독 모두 3 mg/mL 이상의 농도에서 모든 균에 대한 항균 효능을 보였다. 특히 *S. typhimurium*과 *S. mutans*에서 가장 높게 나타났고, *P. aeruginosa*에서 가장 낮은 항균 효능을 보였다.

#### - 알레르기 유발비교: Histamine assay

시료의 농도가 증가함에 따라 histamine 분비량이 증가하는데 정제봉독에 비해 분리-정

정제봉독이 더 근소한 차이로 감소함을 확인 할 수 있다. 이에 따르면 정제봉독의 알레르기 유발성분을 제거한 분리-정제봉독은 정제봉독보다 histamine 분비량이 적은 것으로 보아 알레르기성은 감소되었음을 확인 할 수 있다.

- 항염효능: NO assay

LPS 처리군에서 유의성 있게 NO가 증가하였지만 정제봉독, 분리-정제봉독에서 NO가 감소하였다.

- 세포독성: agar diffusion test

정제봉독과 분리-정제봉독의 agar diffusion test는 FDA의 GLP기준에 따라 실험하였다. 0.1 mg/mL과 0.2 mg/mL에서 시행된 정제봉독의 경우, grade 0 으로 독성이 발견되지 않았다. 분리-정제봉독 또한 0.25 mg/mL과 0.5 mg/mL에서 독성이 발견되지 않았다.

- 미백효능: Tyrosinase inhibitory effect

정제봉독 및 분리-정제봉독의 IC<sub>50</sub>값은 각각 2.93±0.01 mg/mL 4.65±0.012 mg/mL으로 미백효능을 보였다.

- 주름개선 효능: Elastase inhibitory effect

정제봉독 및 분리-정제봉독의 IC<sub>50</sub>값은 각각 2.09±0.031 mg/mL, 1.62±0.012 mg/mL으로 주름개선효능을 보였다.

4. 자연적인 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가

정제봉독보다 분리-정제봉독이 세포내에 본래 존재하는 MMPs 발현을 더 낮은 세포독성으로 억제하는 것을 확인하였으며, 인체섬유아세포 증식능도 정제봉독 보다 분리-정제봉독이 더 탁월한 효과를 보였다.

5. 자외선에 의한 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가

자외선 조사로 인한 세포사를 감소시키는 효과 역시 정제봉독보다 분리-정제봉독이 더 뛰어났으며, 콜라겐 합성과 MMPs의 발현억제 부분에도 분리-정제봉독이 전체적으로 강한 약리활성을 보였다. 이런 약리효과는 ERK1/2와 p38의 인산화 억제를 진행하여 MAPKs를 통해 MMPs 발생을 저지하는 것으로 생각되며, p65의 인산화 역시 억제되어 NF-κB로 인한 MMPs 발현 역시 감소시키는 것으로 평가되었다.

6. 정제봉독과 분리-정제봉독의 화장품관련 임상평가

- 3T3 neutral red uptake(NRU) 광독성 시험(*In vitro*), local lymph node assay(LLNA) 피부 자극 시험(*In vivo*)

정제봉독과 분리-정제봉독 모두 광독성 및 광알러지 반응을 일으키지 않았으며, LLNA 결과 피부 자극성도 없어 정제봉독과 분리-정제봉독 모두 화장품 원료로 사용하기에 안전하다고 평가되었다.

- patch test

총 106명의 18세 이상 건강한 지원자로부터 피시험자 개체 내 비교법 및 single blind로 진행되었고, 9번의 'Induction'단계와 1번의 'Challenge'단계로 나누어 패치 적용을 받았다. 정제봉독과 분리-정제봉독에 대하여 피시험자로부터 본 연구의 'Induction'단계 동안 홍반이 발견되지 않았고, 'Challenge' 단계(38, 40일째) 동안 어떠한 의문의 반응도 발견되지 않았다. 시험 품목들은 이 연구의 조건 하에서 사용하는데 안전하며 "Hypoallergenic(저자극성)" 및 "Dermatologically tested(피부과학적으로 테스트됨)"이 입증 되었다고 간주할 수 있다.

- 분리-정제봉독 에센스의 수분 및 탄력 개선조사

시험제품 '에센스'를 1일 2회 아침, 저녁으로 안면(눈가) 부위에 적당량을 사용하였으며 사용 후 수분 및 탄력 개선 효과를 평가하였고, 만 30~55세의 성인 여성 20명을 대상으로 수행하였다. Cutometer를 이용하여 측정된 결과, 시험 제품 사용 전과 비교하여 제품 사용 4주 후의 통계적으로 유의한 수준의 수분 및 탄력개선 효과를 확인하였다. 또한 시험기간 동안 특별한 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.

7. 국내외 전시회/박람회를 통한 시장조사

국내 전시회 2건 부스설치, 국외 전시회 4건 부스설치 및 국외 전시회 2건 참가, 수출기업 바이어 미팅 2건

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 실용화 산업화

- 기술이전: 특허 10-13645006호에 대한 통상실시권 계약(2014. 03. 03.)
- 분리-정제봉독의 대량 생산 시스템 구축으로 해외 수출 기대

### 2. 홍보

- 국내: 2013 오송뷰티박람회, 2013 Bio Korea 참여기업
- 국외: 2014 상해 PCHi, 2014 함부르크 in-cosmetics, 2014 터키 Asian Apicultural Association, 2014 상파울로 in-cosmetics 참여기업
- 방송: KTV 방영 ("대한민국의 희망, 창조경제", 2013. 11. 22.)

### 3. 특허 및 논문 발표

- 특허: 3건  
10-1364506(특허등록), PCT-KR2013-005016(국제특허출원, 중국 1건, 미국 1건).
- 논문: 게재 2편(한국분석학회, 한국미용학회), 게재예정 2편(한국독성학회, 농업생명과학연구 각 1편), 투고 1편(한국분석학회).
- 학술발표: 한국분석학회 2건, 잠사양봉학회 1건, China-Japan-Korea symposium on analytical chemistry 2건, 한국식품영양학회 1건.

# SUMMARY

## I. Title of the Project

The agricultural biological resources export industrialization of non or low allergic reaction bee venom peptides

## II. Purpose and necessity of the Project

- Bee Venom has an infinite of possibilities as a functional natural raw materials including natural cosmetic products, natural product drugs, natural antibiotics for animal etc.
- Bee venom has side effects such as rash, itching, nausea, cramps, diarrhea, anxiety. It is necessary to block the these allergenic components of bee venom fundamentally.
- Necessity of mass production come to the fore because the contract is accomplished by the large quantity, not small quantity.
- Establish a method of separation and analysis for active ingredient(Melittin, Apamin) and allergy-induced component(PLA<sub>2</sub>) of purified bee venom.
- Standardize a mass purification system of Isolated and purified bee venom for overseas export.
- Enhance the value of the merchandise through safety and effectiveness test of purified bee venom(PBV) and Isolated and Purified bee venom(IPBV).

## III. Contents and range of the Project

1. Establishment for a separation and analysis process of allergy-induced component of PBV
  - The main three components(Melittin, Apamin, PLA<sub>2</sub>) of PBV are separated by Ultra filtration which based on difference of molecular weight.
  - Establish the optimum separation condition of PLA<sub>2</sub> according to condition of separation for the concentration of sample, molecular weight of cutoff, pressure.
  - Conduct a quantitative analysis(HPLC) and Qualitative analysis(SDS-PAGE) of PBV and IPBV.
  - Separate the main components of PBV to the each one-component by Prep-HPLC using Reversed Phases Chromatography method, and then analysis them.
2. Standardize a mass production system for overseas export of IPBV
  - Establish the optimum separation condition of PLA<sub>2</sub> by Ultra filtration which based on various conditions.
  - Compare and analyze with the yield of FPLC Gel-filtration that is the existing separation method and Ultra filtration which is established by this study for production rate, production cost, mass production.

3. Safety and effectiveness study for overseas export of PBV and IPBV
  - Study for shelf life : Check the change of main component according to the storage condition of the dried form and aqueous solution(1 mg/ml) for PBV. Accordingly, establish the appropriate condition of storage and distribution for export.
  - Antioxidant activities : DPPH radical scavenging effect
  - Antibacterial effect : Agar well diffusion, MIC
  - Anti-allergic effect : Histamine assay
  - Anti-inflammatory activities : NO assay
  - Cytotoxicity: MTT assay, Agar diffusion test
  - Skin-lightening effect : Tyrosinase inhibitory effect
  - Anti-wrinkle effect: Elastase inhibitory effect
  
4. Anti-aging activities evaluation by cell based methods in naturally aging
  - Cytotoxicity Test and Proliferation Assay in HDF Cell by PBV and IPBV
  - Collagen Synthesis by PBV and IPBV(ELISA assay, Western blot)
  - Inhibitory Activity of Matrix Metalloproteinase by PBV and IPBV
  
5. Evaluation of anti-wrinkle effects from UVB-induced damage on PBV and BV using cell experiments
  - Protective Effects of PBV and IPBV in UVB-damaged cells
  - Collagen Synthesis Activity of PBV and IPBV in UVB-damaged Cells using ELISA assay
  - Collagen Synthesis Activity of PBV and IPBV in UVB-damaged Cells using Western blot
  - Suppressions of MMPs by PBV and IPBV in UVB-damaged Cells
  - Mechanisms about Anti-wrinkle Activity by PBV and IPBV through ERK1/2, p38 and p65
  
6. The clinical evaluation of the PBV and IPBV related to the cosmetics
  - *In vitro* 3T3 Neutral Red Uptake(NRU) Phototoxicity
  - *In vivo* Local Lymph Node Assay(LLNA) Skin Sensitization
  - Patch test : Be based on the 'Dermatologically tested', investigate the irritation and sensitisation potential of PBV and IPBV following repeated cutaneous patch applications.
  - The investigation about the improvement of moisture and elasticity using essence which is made by IPBV : Apply the appropriate amount of test sample 'Essence' on the facial area twice a day and then evaluate the improvement of moisture and elasticity.

#### 7. Market research through the internal and external Exhibition/Exposition

Provide the efficacy and safety materials of PBV and IPBV to our potential customers through the internal and external exhibition/Exposition, business meeting.

### IV. Result of the Project

#### 1. Establish a method of separation and analysis for allergy-induced component(PLA<sub>2</sub>) of PBV

- We determined the molecular weight of cutoff as 5, 10, 30 KDa through the molecular weight of the each active ingredients which are contained in PBV. Also, we determined the pressure as 20, 30, 40 psi and the concentration of the aqueous solution which contains the PBV as 1, 2, 10 mg/mL.

- PLA<sub>2</sub> was removed through a change of various conditions. Contents of the Apamin and Melittin(50~60%) which is contained in PBV were measured under the similar condition(20 psi, 1 mg/mL, 10 KDa).

#### 2. Standardize a mass production system for overseas export of IPBV

- We established a mass production process of IPBV which based on the separation study of allergy-induced component according to various conditions(concentration, pressure. molecular weight of cutoff). We dissolved the PBV with the concentration of 1g/L in the distilled water to produce a IPBV. After we conducted primary filtration of it using 30 KDa filter, filtered the collected filtrate again using 10 KDa filter. We also added the enrichment process of the collected filtrate using 1 KDa filter after second filtration based on the content analysis of main components.

- As compared with FPLC gel filtration that is the existing separation method, yield of the Ultra filtration which is established by this study is lower about 26%. But, the utilization of partial substance including PLA<sub>2</sub> is available after the separation process. we also confirmed that the production cost and production time was remarkably improved. Accordingly, we think that the separation method of Ultra filtration is suitable for the mass production.

#### 3. Safety and effectiveness study for overseas export of PBV and IPBV

- Study for Shelf life

After preparing the each sealed glass bottles which include the dried form and aqueous solution(1 mg/mL) of PBV, storage them under the below conditions. We studied about the shelf life of PBV by component analysis according to the storage period.

- Condition 1 : storage form(dried form of PBV, liquid form of PBV)

- Condition 2 : storage temperature(-20°C, 5°C, 25°C, 40°C)

- Condition 3 : storage condition(lightproof, transparent)
- Condition 4 : storage condition(inflate nitrogen ,aerial exposure(oxidation))

We measured the changes of the component according to the storage environment for each hour to establish the appropriate condition of storage and distribution for export of PBV. As a result, Melittin showed the largest content changes among the three main components. In addition, it showed the sediment at room temperature and the maillard reaction at high temperature with changes of contents. It also showed a obvious change in appearance. When we store the dried form of PBV at a low temperature among the various conditions, it showed a high stability. It showed a noticeable decline under the moisture, light, oxidising condition and high temperature. We think that specific conditions such as dry condition, shade the light, low temperature, block of the moisture and oxygen are required during the long-term storage and long-distance distribution of the PBV.

- Antioxidant activities : DPPH radical scavenging effect

The IC<sub>50</sub> value of PBV and IPBV is a 0.32 mg/mL, 0.53 mg/mL respectively. These figures are similar to the value of the *Ilex Kudincha* crude extract. Therefore, PBV and IPBV are proved as a natural substance which has a antioxidant activity effect.

- Antibacterial effect : Agar well diffusion, MIC

We evaluated the antibacterial efficacy of PBV and IPBV for the seven strains. (*E. Coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. mutans*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. acnes*) It showed an antibacterial efficacy against all strains at a concentration of more than 3 mg/mL for PBV and IPBV. Especially, it showed the highest value against *S. typhimurium* and *S. mutans* in antibacterial activity test. But, it showed the lowest value against *P. aeruginosa*.

- Anti-allergic effect : Histamine assay

As the concentration of the sample increases, the secretion rate of histamine was also increased. In comparison with PBV, the value of IPBV was increased with a slight difference. According to the result of this test, the secretion rate of histamine of IPBV which doesn't contain the allergy-induced component(PLA<sub>2</sub>) is lower than that of PBV. So, we confirmed that allergic reaction of the IPBV was decreased.

- Anti-inflammatory activity : NO Assay

PBV and IPBV were examined for their anti-inflammatory by using detection of NO level. IPBV exhibits superior profile in comparison with regular PBV for suppressing the inductions of NO

- Cytotoxicity : MTT assay, Agar diffusion test

We conducted a MTT assay for RAW 264.7 cell and RBL-2H3 cell. More than 90 percentage of Raw 264.7 cell is survivable at the concentration which is showed a below the  $13.1 \pm 0.021 \mu\text{g/mL}$ ,  $19.88 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$  respectively for PBV and IPBV. More than 90 percentage of RBL-2H3 cell is survivable at the concentration which is showed a below the  $0.4 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.64 \pm 0.012 \mu\text{g/mL}$  respectively for PBV and IPBV. We eliminated allergy-induced components from the PBV. But, we found that it doesn't have much effect on the result of cytotoxicity.

The agar diffusion test of the PBV and IPBV has been tested according to GLP standards of the FDA. In case of the PBV, the toxicity was not observed as a 'grade 0' at the concentration of 0.1 mg/mL and 0.2 mg/mL. Also, in case of the IPBV, the toxicity was not observed at the concentration of 0.25 mg/mL and 0.5 mg/mL.

- Skin-lightening effect : Tyrosinase inhibitory effect

The  $\text{IC}_{50}$  value of PBV and IPBV is a  $2.93 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$ ,  $4.65 \pm 0.012 \text{ mg/mL}$  respectively. It means that they have a skin-lightening effect.

- Anti-wrinkle effect : Elastase inhibitory effect

The  $\text{IC}_{50}$  value of PBV and IPBV is a  $2.09 \pm 0.031 \text{ mg/mL}$ ,  $1.62 \pm 0.012 \text{ mg/mL}$  respectively. It means that they have an anti-wrinkle effect.

#### 4. Anti-aging activities evaluation by cell based methods in naturally aging

PBV and IPBV were examined for their anti-wrinkle activities by using detection MMPs inhibitory assay. From this, IPBV exhibits superior profile in comparison with regular PBV for inhibiting elastase activity as well as suppressing the inductions of NO and MMP-9, while still retaining the positive effects on cell proliferation and protection against UVB-induced damage in human dermal fibroblasts.

#### 5. Evaluation of anti-wrinkle effects from UVB-induced damage on PBV and BV using cell experiments

PBV and IPBV exhibited significant protective effects in UVB-irradiated human keratinocyte(HaCaT) and human dermal fibroblast(HDF) cells and they also induced type I collagen synthesis in UVB-irradiated HDF cells except BV at  $3 \mu\text{g/mL}$ . Furthermore, both PBV and IPBV showed the inhibition of UVB-stimulated matrix metalloproteinase-1(MMP-1), a major collagen degrading enzyme in skin. However, PBV, unlike IPBV, exhibited strong cytotoxicities in skin cells(both HaCaT and HDF) at its working concentrations showing anti-wrinkle effect. The underlying cell signaling mechanisms of these anti-wrinkle effects of PBV and IPBV were demonstrated by the activation of ERK1/2, p38 and p65.

## 6. The clinical evaluation of the PBV and IPBV related to the cosmetics

### - *In vitro* 3T3 neutral red uptake(NRU) phototoxicity test

The 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Assay can be appropriated to identify the phototoxic effect of a test substance upon exposure to ultraviolet A(UVA). Chlorpromazine(CPZ), a positive control, exhibited high levels of Photo Irritation Factor(PIF) and Mean Photo Effect(MPE) values, while PBV and IPBV had very less of these values.

### - *In vivo* local lymph node assay(LLNA) skin sensitization test in PBV and IPBV

Local lymph node assay is an alternative method to evaluate skin sensitization potential of chemicals. Eight weeks old female BALB/c mice were treated with p-phenylenediamine(PPD, a positive control), PBV or IPBV. In all of PPD concentrations(0.1, 1 and 3%), Stimulation Indexes(SI) as sensitizing potential of chemicals were  $\geq 1.6$ , determining to be sensitizer, while SI levels of PBV and IPBV were below 1.6. Hence, PBV and IPBV can be developed for cosmetic application because they considered to be non-phototoxic compounds and non-sensitizers.

### - Patch test

This was a single-blind, within subject comparison, study conducted in 106 healthy volunteers(aged at least 18 years) to evaluate the irritation and sensitisation potential of two test articles(PBV and IPBV), by means of repeated cutaneous patch applications. A total of 106 subjects received nine "induction" and one "challenge" patch applications. No erythema was observed during the Induction phase of the study and there were no questionable reactions during the Challenge Phase(Day 38 and 40) by any of the subjects to the test articles. The test articles can be considered as safe for use under the conditions of the study, and claims such as, "Hypoallergenic", and "Dermatologically Tested", are substantiated.

### - The investigation about the improvement of moisture and elasticity using essence which is made by IPBV

After apply the appropriate amount of test sample "Essence" on the facial area or around eyes twice a day(morning and evening), we evaluated the improvement of moisture and elasticity. This study was conducted with 20 adults, aged 30~55. As a result of measuring the efficacy using cutometer, we confirmed the improvement effectiveness of moisture and elasticity of statistically significant level after using the test sample "Essence" for 4 weeks as compared with before use of the test sample. Also, there were no questionable reactions during the test period.

## 7. Market research through the internal and external exhibition/Exposition

Exhibitor in the domestic exhibition(2), Exhibitor in the international exhibition(4),  
Visitor in the international exhibition(2), Having a meeting with export companies(2).

## **V. Attainment of the study and Application plans**

### 1. Commercialization and Industrialization

- Technology Transfer : The agreement for ordinary license about patent of No. 10-13645006(2014.03.03.)
- Expectation of the overseas export by establishment of mass production system for IPBV

### 2. Public relations

- Internal: Cosmetics & Beauty Expo Osong Korea 2013, Bio Korea 2013
- External: PCHi in Shanghai 2014, In-cosmetics in Haburg, 2014, 12th Asian Apicultural Association Conference in Turkey 2014, In-cosmetics in Brazil, 2014
- Broadcasting : KTV(Republic of Korea hopes of creating economic plan, 2013.11.22.)

### 3. Patents and Papers

- Patents: 10-1364506(Patent registration),  
PCT-KR2013-005016(International patent application, China, USA)
- Papers: Published for 4 papers(The Korean society of analytical sciences(1), Journal of the korean society of cosmetology(1), Journal of the Korean Society of Toxicology(1), Journal of Agriculture & Life Sciences(1)), Submission for an 1 paper (The Korean society of analytical sciences)
- Poster Presentation: The Korean society of analytical sciences(2), The Korea Society of Food and Nutrition(1), The Apicultural society of Korea(1), China-Japan-Korea symposium on analytical chemistry(2)

# CONTENTS

SUMMARY(Korean) .....	2
SUMMARY(English) .....	7
CONTENTS(English) .....	14
CONTENTS(Korean) .....	16
<b>Chapter 1. Overview of Project</b> .....	<b>18</b>
Section 1. Justification .....	18
Section 2. Purpose .....	22
<b>Chapter 2. Current Status in Technology Development of Related Project in Domestic and Overseas</b> .....	<b>23</b>
<b>Chapter 3. Contents and Results of the Project</b> .....	<b>25</b>
Section 1. Mass Production process of the IPBV and establishment of analysis technique for main components .....	25
1. Purchase of the Bee venom .....	25
2. Collection of the Bee venom .....	25
3. Advanced research using FPLC gel filtration .....	26
4. Development of separation process using Ultra filtration .....	28
5. Separation and analysis of main each-component for PBV .....	40
Section 2. Study for Safety and Shelf Life of PBV and IPBV .....	43
1. Assessment of Cytotoxicity by Agar Diffusion Test .....	43
2. Shelf Life of PBV to Storage Form, Storage Temperature, Storage Period .....	45
Section 3. Setting the standard processes and specification .....	51
Section 4. Study for Effectiveness of PBV and IPBV .....	60
1. Antioxidant Activities of PBV and IPBV .....	60
2. Antibacterial Effect of PBV and IPBV .....	62
3. Anti-allergic Effect of PBV and IPBV .....	66
4. Anti-inflammatory Activities of PBV and IPBV .....	69
5. Skin-lightening Effect of PBV and IPBV .....	71
6. Anti-wrinkle Effect of PBV and IPBV .....	73
Section 5. Anti-aging Activities Evaluation by Cell Experiments in Naturally Aging .....	75

1. Cytotoxicity Test and Proliferation Assay in HDF Cell by PBV and IPBV .....	75
2. Collagen Synthesis by PBV and IPBV(ELISA assay, Western blot) .....	77
3. Inhibitory Activity of Matrix Metalloproteinase by PBV and IPBV .....	78
 Section 6. Evaluation of Anti-wrinkle Effects from UVB-induced Damage on PBV and IPBV using Cell Experiments .....	80
1. Protective Effects of PBV and IPBV in UVB-damaged cells .....	80
2. Collagen Synthesis Activity of PBV and IPBV in UVB-damaged Cells using ELISA assay .....	81
3. Collagen Synthesis Activity of PBV and IPBV in UVB-damaged Cells using Western blot .....	82
4. Suppressions of MMPs by PBV and IPBV in UVB-damaged Cells .....	83
5. Mechanisms about Anti-wrinkle Activity by PBV and IPBV through ERK1/2, p38 and p65 .....	86
 Section 7. Clinical Evaluations of PBV and IPBV for Cosmetics .....	88
1. <i>In vitro</i> 3T3 Neutral Red Uptake(NRU) Phototoxicity test .....	88
2. <i>In vivo</i> Local Lymph Node Assay(LLNA) Skin Sensitization test .....	90
3. Assessment of Sensitisation by Path test .....	94
4. Evaluation for the Improvement of Moisture and Elasticity using Essence Made by IPBV .....	102
 Section 8. Market Research through the Internal and External Exhibition/Exposition ·	106
Section 9. Discussion .....	116
 <b>Chapter 4. Achievement of the Project and Contribution to the Related Fields</b>	117
Section 1. Achievement of the project .....	117
Section 2. Contribution to the Related Fields .....	121
 <b>Chapter 5. Attainment of the Project and Application Plans</b> .....	123
Section 1. Utilization and Industrialization .....	123
Section 2. Technology Dissemination(Education, Instruction and Publicity) .....	124
Section 3. Presentation(Patent and Publication) .....	124
Section 4. Additional Research and Application to Other Projects .....	125
 <b>Chapter 6. Collection of foreign informations</b> .....	126
<b>Chapter 7. Research facilities and equipment</b> .....	128
<b>Chapter 8. References</b> .....	129
<b>Chapter 9. Certification</b> .....	130

# 목 차

요 약 문 .....	2
SUMMARY .....	7
CONTENTS .....	14
목 차 .....	16
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	18
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	18
제 2 절 연구개발의 목적 .....	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	25
제 1 절 분리-정제봉독의 대량생산 공정 및 주요성분 분석 기술 확립 .....	25
1. 봉독의 수매 .....	25
2. 봉독 채취의 표준화 .....	25
3. FPLC gel filtration을 이용한 선행연구 .....	26
4. Ultra filtration을 이용한 정제봉독의 분리 공정개발 .....	28
5. 봉독의 주요 단일성분 분리 및 분석 .....	40
제 2 절 정제봉독과 분리-정제봉독의 안전성 및 저장성 연구 .....	43
1. Agar diffusion test를 통한 세포독성 평가 .....	43
2. 저장상태, 저장온도, 저장기간에 따른 정제봉독의 저장성 연구 .....	45
제 3 절 분리-정제봉독의 표준 공정 및 제품규격 설정 .....	51
제 4 절 정제봉독과 분리-정제봉독의 유효성 연구 .....	60
1. 정제봉독과 분리-정제봉독의 항산화 효능 .....	60
2. 정제봉독과 분리-정제봉독의 항균 효능 .....	62
3. 정제봉독과 분리-정제봉독의 알레르기 유발비교 .....	66
4. 정제봉독과 분리-정제봉독의 항염 효능(위탁) .....	69
5. 정제봉독과 분리-정제봉독의 미백 효능 .....	71
6. 정제봉독과 분리-정제봉독의 주름개선 효능 .....	73
제 5 절 자연적인 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가(위탁) .....	75
1. 인체섬유아세포의 세포독성 및 증식능 시험 .....	75

2. 콜라겐 생성량 측정(ELISA assay, western blot) .....	77
3. Matrix metalloproteinase(MMP) 저해활성 측정 .....	78
제 6 절 자외선에 의한 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가(위탁) .....	80
1. UVB 조사로 인해 손상된 세포에서 정제붕독 및 분리-정제붕독의 보호효과 .....	80
2. 정제붕독 및 분리-정제붕독의 처리 후 ELISA를 이용한 콜라겐 변화 측정 .....	81
3. 정제붕독 및 분리-정제붕독 처리 후 western blot을 이용한 콜라겐 변화 측정 .....	82
4. 정제붕독과 분리-정제붕독의 MMPs 발현억제효과 .....	83
5. 정제붕독과 분리-정제붕독의 UVB로 인한 ERK1/2, p38와 p65 인산화저해효과 .....	86
제 7 절 정제붕독과 분리-정제붕독의 화장품 관련 임상평가 .....	88
1. <i>In vitro</i> 3T3 neutral red uptake(NRU) 광독성 시험(위탁) .....	88
2. <i>In vivo</i> local lymph node assay(LLNA) 피부 자극 시험(위탁) .....	90
3. Path test를 통한 민감성 평가 .....	94
4. 분리-정제붕독 에센스의 수분 및 탄력 개선평가 .....	102
제 8 절 국내외 전시회/박람회를 통한 시장조사 .....	106
제 9 절 고찰 .....	116
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>117</b>
제 1 절 연구목표 달성도 .....	117
제 2 절 관련분야에의 기여도 .....	121
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>123</b>
제 1 절 실용화, 산업화 실적 및 계획(기술실시 등) .....	123
제 2 절 교육, 지도, 홍보 등 기술 확산 실적 및 계획 .....	124
제 3 절 특허, 품종 및 논문 발표 실적 및 계획 .....	124
제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 .....	125
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>126</b>
<b>제 7 장 연구시설·장비 현황 .....</b>	<b>128</b>
<b>제 8 장 참고문헌 .....</b>	<b>129</b>
<b>제 9 장 시험성적서 .....</b>	<b>130</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 수출을 위한 정제봉독(Purified Bee Venom, PBV)의 안전성 연구의 필요성

가. 고부가가치 기능성 천연 원료로서 정제봉독의 효능

삶의 질 향상과 의료서비스의 개선으로 수명이 연장됨에 따라 심장질환, 암, 당뇨, 정신 질환 등 만성 또는 난치성 질환이 증가하고 있으며 이런 만성질환에 대한 예방적 개념이 도입되고 있으며 치료형에서 예방형으로의 변화에 따른 전통의약의 역할 또한 증대되고 있다. 뿐만 아니라 전 세계적으로 기능성 제품의 안전성에 대한 관심이 높아지게 되었고, 천연 및 유기농 화장품에 대한 소비자의 요구 또한 증가하고 있다. 일반적으로 선진국에서는 합성성분이 천연성분에 비해 덜 안전하다는 인식에 따라 천연 및 유기농化妆품을 구매하고 있으며, 신시장의 경우 천연성분이 전통적으로 사용하고 있던 제품이므로 상대적으로 접근성이 높아 구매로 이어지는 것으로 알려져 있다.

봉독은 맑고 투명한 액체상태의 강한 쓴 맛이 나는 방향성 물질로서, 실온에서 빨리 증발되어 건조되며 증발 후 30~40%의 결정물로 남는다. 건조 봉독의 경우 섭씨 100°C에서 끓여도 그 특성을 잃지 않을 정도로 열에 매우 안정되어 있지만 산화성 물질에 의해서는 강한 파괴가 일어난다. 봉독에 대한 대부분의 약리작용은 전체 성분 혹은 단일 주요 성분군의 활성화에 기인한다. 아직 인체에 대한 봉독의 완전한 작용기작은 밝혀지지 않았지만 여러 질환에서 아래와 같은(표 1) 치료 및 예방효과를 보인다.

<표 1. 봉독의 약리 작용 및 성분>

성분명	약리작용
멜리틴 (Melittin)	세포 용해작용
아파민 (Apamin)	신경통 완화작용, 진통작용, 항염증작용, 면역작용
엠시디 펩티드 (MCD-Peptide 401)	항염증작용
아돌라핀 (Adolapin)	항염증작용, 진통작용, 해열작용
프로테아제 억제인자 (Protease inhibitor)	단백질과 에스테르용해 억제작용, 항염증작용
세카핀 (Secarpin)	저온증 진정작용
프로카민 (Procamine A, B)	방사선 보호작용
히알루로니다아제 (Hyaluronidase)	조직의 분해작용, 항원성 성분
포스포리파아제 (Phospholipase A <sub>2</sub> )	세포조직의 분해, 용혈, 촉매작용
리소포스포리파제 (Lysophospholipase)	항체역할증진
히스타민 (Histamine)	혈압강하, 장관수축, 위산분비촉진작용
도파민 (Dopamine)	신경전달물질

## 나. 유통되고 있는 봉독 관련 제품의 문제점

2010년, 동성제약의 봉독화장품으로 한때 주목을 받았지만 소비자들의 입장에서는 그 제품이 의약품인지 화장품인지 헷갈릴 수밖에 없었다. 화장품법에 따르면, 미백·주름개선·자외선차단 등 3가지 기능 외 다른 기능의 화장품은 ‘기능성’으로 심사·허가가 되지 않는다. 따라서 봉독화장품이 여드름 예방·치료효과를 인정받으려면 출시 전에 의약품 허가를 받아야 한다. 하지만 이를 의약품이 아닌 일반화장품으로 임의 분류해 식약청 허가 없이 시제품이 먼저 공개되었다. 결국 식약청으로부터 여드름 예방 및 치료에 효과가 있는 봉독을 주성분으로 만들어졌으나 의약품이 아닌 ‘트리블 화장품’으로 허가를 받았다.

봉독의 성분 중에서 알레르기 증상을 나타내는 항원의 역할을 하는 물질들은 포스포리파아제(Phospholipase A<sub>2</sub>), 히알루로니다아제(Hyaluronidase), 히스타민(Histamine) 등으로 알려져 있다. PLA<sub>2</sub>는 hyaluronidase와 함께 강력한 항원성을 나타내며, 인지질을 파괴하여 세포용해 촉매작용을 하고 봉독의 확산을 도와주며 allergen의 주요성분이다<sup>1)</sup>. 봉독의 allergen은 불안감, 두드러기, 가려움증, 구토, 경련, 설사 등이 수반될 수 있고, 호흡기 장애가 있을 시 현기증, 실신, 호흡곤란 등의 부작용이 있을 수 있으므로 임상에서는 신중을 가해야 한다. 이렇듯, 봉독의 성분 중 PLA<sub>2</sub>는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 immunoglobulin E(IgE)항체가 발견된다<sup>1)</sup>. 따라서 봉독을 임상에 사용할 때에는 안전을 위하여 알레르기 발생원인 성분을 원천적으로 차단하여야 한다.

인간 또는 동물의 혈액, 체액, 세포, 조직 및 기관 등을 이용하여 생산되는 생물·의약품과 세포 배양 과정을 이용하여 생산되는 생물공학·의약품은 제품의 원료 또는 생산세포주 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 끊임없이 제기되고 있다. 또한 WHO, 미국, 유럽 등을 중심으로 생물, 생명공학·의약품의 최종제품에 대한 품질검사와 함께 원료부터 완제품에 이르는 전체 제조공정에 대한 철저한 공정검증의 중요성이 강조되고 있다. 생물 및 생명공학·의약품은 다양한 단백질로부터 유효한 단백질성분만을 선택적으로 분리 및 정제하기 위해 다양한 크로마토그래피 방법을 사용하여 생산되고 있으며 때문에 봉독을 유효성분으로 하는 의약품 및 화장품 개발을 위해서 봉독의 대량 분리정제 기술이 요구되고 있다.

## 2. 수출을 위한 고부가가치 기능성 원료인 정제봉독 대량생산의 필요성

### 가. 정제봉독 및 분리-정제봉독(Isolated and Purified Bee Venom, IPBV)의 전망

천연화장품 원료로써 정제봉독: 2006년 프랑스 천연화장품 시장은 약 9억 달러 규모로 연평균 24.4%의 높은 성장률을 보이고 있으며, 영국은 12.9%, 독일은 9.0%, 스페인은 8.6%에 이르는 연평균 성장률을 보이고 있다. 2006년 미국의 유기농 화장품 시장은 약 2억 5천만 불 규모로 연평균 9.6%로 성장하여 올해에는 약 4억불 규모가 될 것으로 예상된다. 21C

의 신데렐라로 불리고 있는 케이트 미들턴이 영국의 윌리엄 왕세자와 결혼을 앞두고 봉독을 이용해 피부 관리를 해온 것이 이슈가 되어 많은 이들이 봉독화장품에 대한 관심이 세계적으로 높아졌다. 그로인한 국내외 봉독 관련 화장품의 수요도 증가하고 있는 추세이다.

천연물 신약의 원료로써 정제봉독: 현재 우리나라 천연물신약 1호이자 봉독을 이용한 첫 치료제는 ‘구주제약’의 골관절염 치료제인 ‘아피톡신’이다. 이를 이어 최근 (주)휴온스에서도 천연 봉독을 이용한 파킨스 질환 치료제의 국내 특허를 취득하고 임상시험을 기다리고 있다. 앞서 설명한 바와 같이 봉독 성분의 효과는 다음과 같다. a) 강력한 항염증작용으로 염증세포 제거, b) 면역기능을 조절하여 만성적인 염증 해소, c) 신경계의 흥분조절을 통하여 신경의 장애 개선, d) 혈관의 수축과 확장 조절을 통한 혈액순환 개선, e) 뇌하수체와 부신 피질계를 자극하여 호르몬의 분비촉진 등이 있다. 하지만 봉독 자체만으로는 의약품 원료로 허가가 되어 있지 않다. 식약청의 천연물의약품 허가를 받기 위해 개발 목적과 개별과정의 타당성이 입증되어야 하며 비임상 독성 및 약리시험자료와 임상시험용 의약품의 품질에 관한 자료가 필수적으로 요구되기에 장기적이고 체계적인 연구가 필요하다.

동물 천연 항생제의 원료로써 정제봉독: 항생제 등을 사용한 후 약사법 제 72조의 제 2항에 의거한 동물용 의약품 등 취급규칙 제 25조의 규정인 ‘동물용 의약품의 안전사용기준’에 명시된 휴약 기간(사용된 항생제 등이 동물체내에서 분해와 대사를 거쳐 충분히 제거될 수 있는 기간)을 준수하지 않고 출하 및 도축하여 시중에 유통시켰을 때는 항생제가 잔류된 식품을 국민이 섭취하게 되어 식품의 안전성에 문제를 야기할 수도 있다. 봉독은 순수 천연 물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖고 있으며 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 ‘봉침요법’으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다. 그러나 살아있는 벌을 이용한 봉침요법은 비숙련자의 취급상의 문제점과 함께 균일한 봉독의 확보가 어렵고 정량화 또한 이루어지지 않아 실용화에 한계를 지닌다. 또한 봉침요법을 가축에 적용할 경우 일시발열 등의 부작용이 있는 것으로 나타나 체계적인 효과 규명이 필요한 실정이다.

#### 나. 수출을 위한 정제봉독 및 분리-정제봉독의 대량생산의 필요

##### (1) 정제봉독의 대량생산

농가로부터 회수한 봉독은 농촌진흥청 국립농업과학원으로부터 기술이전 받은 ‘봉독의 간이 정제법’을 활용하여 약 50~60%의 회수율로 정제함으로써 정제봉독을 생산하기 시작하였다. 그러나 봉독의 간이 정제법의 경우 봉독의 순도를 최대한 보장하면서 정제과정 중 봉독의 변성을 최소로 한 기술이나, 여과과정에서 필터의 소모량이 많아 대량정제 시 비용 소모가 크다는 단점이 있었다. 이에 당사는 중소기업이전기술개발 사업을 통하여 기존의 간이 정제 방법을 업그레이드하여 고효율, 저비용의 대량정제 시스템을 구축함으로써 75% 이상의 회수율을 이루는 기술을 보유하고 있다.

##### (2) 분리-정제봉독의 대량생산

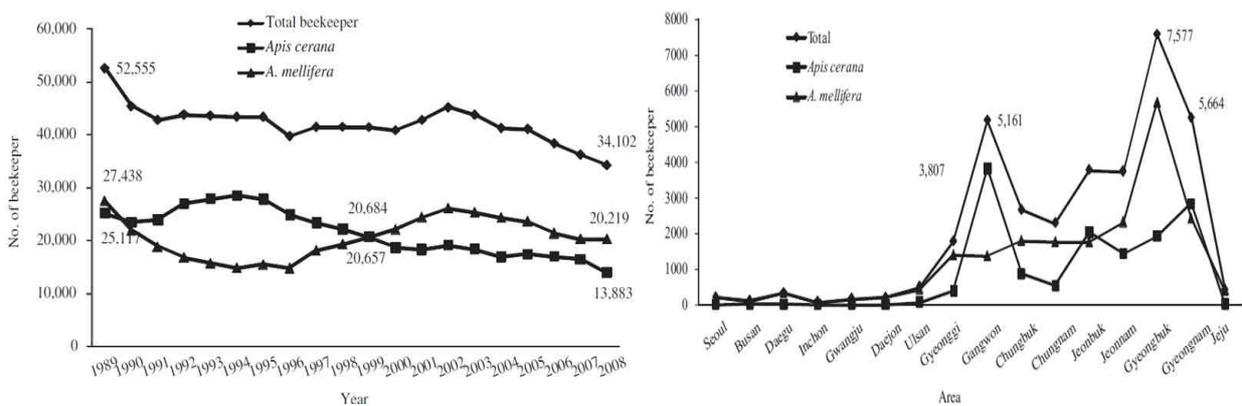
당사는 알레르기 반응과 발열반응을 유발하는 성분을 원천적으로 차단하기 위한

FPLC(Fast Performance Liquid Chromatography)를 통한 분리(특허:10-1413715, 봉독의 유효성분을 분리하는 방법)및 HPLC를 이용한 분석 공정을 확립하였다. FPLC를 이용한 분리는 봉독 유효성분의 분리가 각각 가능하며 성분 분리도가 높은 장점을 가지지만 column 안정화 및 packing, 용매에 따라 분리 및 분석의 소요 시간이 길며 공정의 복잡함이 단점이다. 하지만 본 연구는 Ultra filtration system을 이용하여 정제봉독의 알레르기 유발성분을 제거하는 동시에 분리-정제봉독의 대량생산까지 가능하다. 봉독의 해외 수출시, 소량이 아닌 다량으로 계약이 이루어지기 때문에 대량생산의 필요성이 대두된다.

### 3. 수출을 위한 국내산 정제봉독의 안전성 연구 필요성

#### 가. 국내 양봉산업의 성장 및 다원화

전체 양봉 농가 수(2008년)는 34,102호로 유지 되고 있으며 1989년도 52,555호로 정점을 이루다가 1990년대 평균 42,000호로 줄었으며 2005년 이후 평균 5%의 감소세를 보이면서 2008년 34,102호로 줄어들어 1989년 대비 64.9% 수준으로 감소되었다. 전국 시도별 전체 농가 수 분포는 경북 7,577호, 경남 5,236호, 강원 5,161호, 전북 3,763호, 전남 3,731호의 순으로 차지하고 있다. 동양종의 경우 강원, 경남, 전북, 경북, 전남의 농가 수가 76%이며 서양종의 경우 경북이 28%, 경남, 전남이 각각 11%로 유사하다. 양봉 농가 수는 점점 감소를 보이거나 농가당 소유봉구 수는 오히려 2.3%씩 꾸준히 증가하고 있다(그림 1)<sup>2)</sup>.



<그림 1. 국내 양봉 농가 수(좌), 전국 도시별 양봉 농가 수>

양봉산물은 주로 벌꿀, 프로폴리스, 화분, 밀납을 생산하며 그중에서 봉독은 선진국에서도 아직까지 연구가 미흡하고 최근 국내에서 봉독채취기를 개발하여 봉독의 대량생산 체계가 확립되어 충분히 경쟁력을 확보할 수 있는 분야로 손꼽히고 있다.

국내산 양봉산물의 부가 소득 향상효과는 <표 2>와 같다. 2010년 기준 꿀벌 100군 사양으로 꿀의 경우 약 1,300만원의 소득이, 부가소득원으로 봉독을 판매 했을 경우 1,800만원의 소득이 예상된다.

<표 2. 국내산 양봉산물의 소득 비교>

양봉산물(국내산)	원소득(천원)	부가소득(천원)
꿀*	12,223	-
봉독**	-	18,000

\*꿀벌 100군 사양 양봉농가 연간 소득 표본 산출표, 농식품 기타가축통계와 한국양봉협회, 2010

\*\*정제봉독 판매처 문의 후 합산한 자료

#### 나. 알레르기 유발물질이 분리된 정제봉독의 시장 및 국내 봉독의 수출 확대

오늘날 고도의 산업화와 기계화에 지친 사람들이 자연 친화적인 삶에 더욱 많은 관심을 갖게 되면서 에코 라이프 스타일이 강조되고 있다. 특히, 화장품 분야에서는 전 세계적으로 화학성분에 대한 부작용이 알려짐에 따라 사용자제에 대한 인식이 확산되고 있으며, 천연원료를 활용한 화장품 개발에 대한 관심이 증가하고 있는 실정이다. 일반적으로 천연 및 유기농化妆품을 고르는 법은 크게 2가지로 유럽의 신용도 높은 유기농 성분 인증 단체 에코서트, USDA, 코스메바이오가 검증한 성분을 다량 함유한 제품을 찾거나 또는 벤조페논, 파라벤, 미네랄오일, 인공색소, 인공향료, 동물성 성분, PEG계와 같이 피부에 자극을 줄 수 있는 화학적 유해성분을 뺀 제품을 찾는 방법이 있다. 당사는 화학성분을 최대한 배제하고 천연추출물과 봉독의 유효성분을 이용한 천연 화장품 원료를 개발함으로써 시장에서의 입지를 강화하고자 한다. 또한 미국, 유럽, 일본 등 현대의학이 발달한 지역에서는 천연 및 유기농 제품에 대한 인식과 수요가 높으므로 봉독을 화장품 원료로 하는 제품들은 해외시장 개척을 통해 높은 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 예측된다.

## 제 2 절 연구개발의 목적

이에 본 연구에서는 건조봉독의 유효성분(melittin, apamin, MCD-peptide 401 등)과 알레르기 유발성분의 분리 및 분석법을 확립하고 해외 수출을 위한 대량 정제생산 시스템의 표준화를 목적으로 한다. 또한 분리-정제봉독의 안전성 및 유효성 검사를 통해 상품가치를 높여, 국내산 봉독 시장을 넘어 해외 수출의 증가로 국내 양봉산업의 성장에 이바지하려 한다.

- 수출을 위한 정제봉독, 분리-정제봉독의 대량 정제법 개발을 통해 천연화장품, 천연항생제 등 원료 보급 확대
- 기존 판매 중인 정제봉독과 분리-정제봉독의 안전성 및 유효성 비교
- 정제봉독의 알레르기 유발성분을 제거한 ‘분리-정제봉독’ 상품 개발
- 국내산 분리-정제봉독의 해외 진출

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내 관련기술 현황

최근 웰빙과 천연소재의 부각으로 봉독에 대한 관심이 높아지고 있으며 이로 인해 국내외에서 다양한 분야의 연구가 진행되고 있다. 또한 원천 기술 확보를 위해 특허출원(등록)이 증가하고 있는 추세로 볼 때 봉독의 가능성은 매우 높다고 판단된다. 당사는 봉독을 이용한 천연 화장품 조성료, 천연 항생제 및 사료 첨가제 원료 등 꾸준한 연구와 함께 특허출원(등록)을 하고 있으며 국가기관과 화장품, 제약회사와 연계하여 봉독관련 연구를 진행하고 있다.

구분	관련 기술명 및 지식재산명	보유
특허출원	봉독을 포함하는 질염 예방 및 치료용 조성물	동성제약, 10-2014-0006132
특허등록	알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법	칭진바이오텍, 10-1364506
특허출원	봉독의 지용성 분획을 포함하는 항노화 화장료조성물 및 그 제조방법	비센, 10-1425018
특허등록	봉독을 이용한 멜리틴의 분리방법	권기록, 10-0744755
특허등록	봉독의 유효성분을 분리하는 방법	칭진바이오텍, 10-1413715
특허등록	봉독의 대량 정제방법	농진청, 10-1382404
특허등록	봉독을 유효성분으로 함유하는 진균성 피부질환 예방 및 치료용 약학조성 및 봉독을 유효성분으로 함유하는 진균성 피부질환 개선용 화장료 조성물	농진청, 동성제약 10-1340467
특허등록	봉독을 유효성분으로 포함한 피부질환 치료용 조성물	경희대학교 산학협력단 10-1165510
특허등록	봉독을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 피부질환 예방 및 치료용 조성물	농진청, 동성제약 10-1225114
특허등록	봉독 또는 봉독 추출물을 함유하는 화장료 조성물	아모레퍼시픽, 10-1394817
특허등록	젤여과크로마토그래피를 이용한 멜리틴의 분리방법	최석호, 10-0744755
특허출원	봉독 추출물을 함유하는 피부 미백 및 보습용 조성물	아모레퍼시픽 10-2010-0063890
특허등록	정제봉독과 비텍신을 유효성분으로 하는 천연항생제	칭진바이오텍, 10-1323769
특허등록	항균기능성 천연 사료첨가제	칭진바이오텍, 10-1359528

## 제 2 절. 국외 관련기술 현황

해외의 경우 국내에 비해 상대적으로 봉독에 관한 연구가 선행되었지만, 이는 대부분 봉독의 구조분석 및 유전 분석 등 기초학문적인 연구에 그쳤으며 봉독을 활용하여 질병을 치료하는 개념을 최근 도입되고 있다.

나라	지식재산명
이탈리아	Effects of petrosaspongiolide R on the surface topology of bee venom PLA <sub>2</sub> : A limited proteolysis and mass spectrometry analysis (Volume 37, <i>Bio. Chem.</i> , 2009).
이탈리아	Detection of Honeybee Venom in envenomed tissues by direct MALDI MSI (Volume 20, <i>Mass Spectrom.</i> , 2009).
스위스	Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee <i>osmia rufa</i> (Hymenoptera: Megachilidae) (Volume 55, <i>Toxicon</i> , 2010).
이탈리아	Allergens and allergoids from bee venom, PCT/IT2008/000767
이집트	Process for production of bee venom as pharmaceutical product which can be used effectively in the treatment of rheumatoid arthritis and viral diseases US 2003/0118597A1
중 국	Bee venom protein and gene encoding same, US6395306B1
프랑스	Use of bee venom for treating parkinson's disease, EP2173366B1
프랑스	Peptides and proteins for desensitizing subjects allergic to bee venom and compositions containing same, PCT/FR2000/000109

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 분리-정제봉독의 대량생산 공정 및 주요성분 분석기술 확립

#### 1. 봉독의 구매

당사의 전기충격식 봉독채취기(특허등록:10-0579899)를 구입한 농가를 대상으로 봉독의 지속적인 생산 장려를 위해 구매계약을 하였다. 당사는 서양종 꿀벌(*Apis Mellifera. L*)의 봉침액으로부터 봉독(Bee Venom)을 분리한 국내산 건조봉독을 2013년에 약 8.83kg, 2014년에 약 7.56kg 정도 전국 양봉농가로부터 구매하였다. 구매한 봉독을 증류수에 용해시킨 후 filter paper와 진공펌프를 이용한 진공여과방법을 통해 이물질을 제거하였으며 membrane filtration을 통해 제균한 뒤 동결 건조하여 분말 상태의 정제봉독(Purified Bee Venom)을 본 연구에 사용하였다.

#### 2. 봉독 채취의 표준화

본 연구에 구매된 봉독은 전국 농업기술센터에서 양봉 농가를 대상으로 교육하고 있는 방법을 통해 채취하였다. 사용된 채취기는 당사가 개발한 봉독채취기(특허10-0579899)를 이용하였으며 건조된 봉독을 얻기 위해 다음과 같은 과정을 통해 채집하였다.

- 벌통 입구에 채집판을 <그림2(a)>과 같이 설치한 후 전기를 흘려준다.
- 전압 12 V, shock time은 6초, pause time은 3초 간격으로 약 20~30분간 채취한다. (적정 시간과 전압을 지켜줌으로써 벌의 피해를 최소화하고, 봉독의 채취율은 극대화한다.)
- <그림 2(b)>처럼 전기 자극을 받은 벌들은 유리판에 봉독을 쏘게 된다.
- 채집이 끝난 후 채집판을 분리하여 어둡고 서늘한 곳에서 봉독을 건조시킨다.
- 완전 건조된 채집판에서 유리판을 분리하여 스크래퍼로 긁어 건조봉독을 채취한다(그림 3).
- 단백질의 변성을 막기 위해 모은 봉독은 밀폐용기에 넣어 냉동 또는 냉장보관을 한다.

봉독을 채취 및 수거할 시, 주의 사항은 다음과 같다.

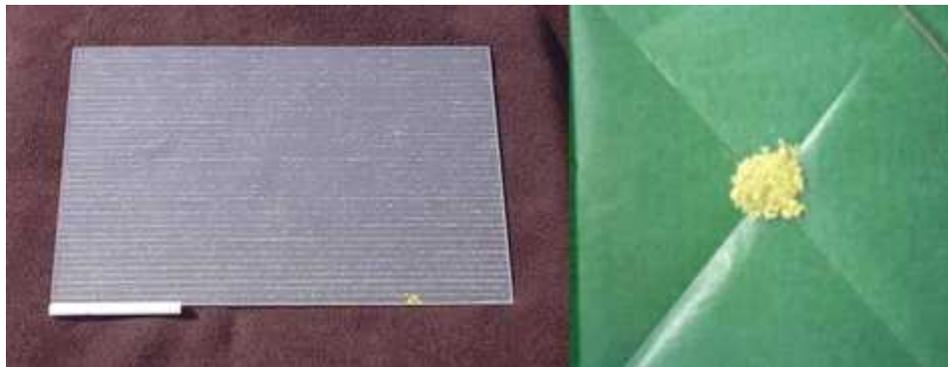
- 봉독 채집 장소는 봉독에 먼지, 불순물이 혼합되지 않도록 차량통행이 빈번한 도로로부터 직선거리 500 m 이상 떨어진 곳으로 한다. 공장근처 등을 피하여 주변 환경이 깨끗한 장소와 바람이 많이 불지 않는 장소로 선택한다. 또한 비가림막이 설치되어 있거나 그늘막 설치가 되어있어야 하며, 벌통바닥에는 흙먼지가 날리지 않도록 바닥에 깔판을 깔아준다.
- 봉독채취는 한국의 계절상 6월말~9월말이 적합하며 오전시간은 꿀 생산시간이므로 봉독은 낮 12시~6시에 채취한다. 또한, 15일령 이하의 벌들의 봉독은 성분상으로 상이하므로 그

이상 별만 이용한다.

- 봉독을 유리판위에서 긁어모으는 장소는 바람이 불지 않는 실내에서 실시한다.
- 봉독에 예민한 사람은 재채기, 눈의 충혈 등 부작용이 나타날 수 있으므로 주의한다.



<그림 2. 봉독채취기의 설치(a) 및 봉독 채집 과정(b)>

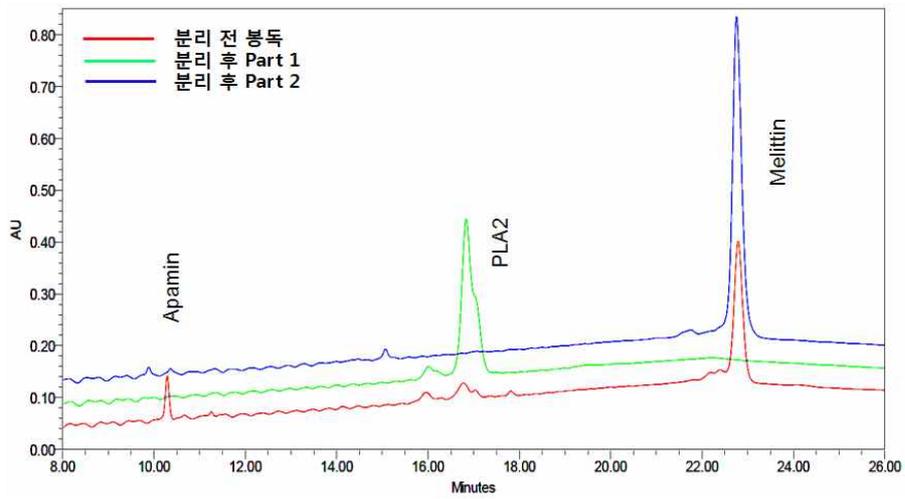
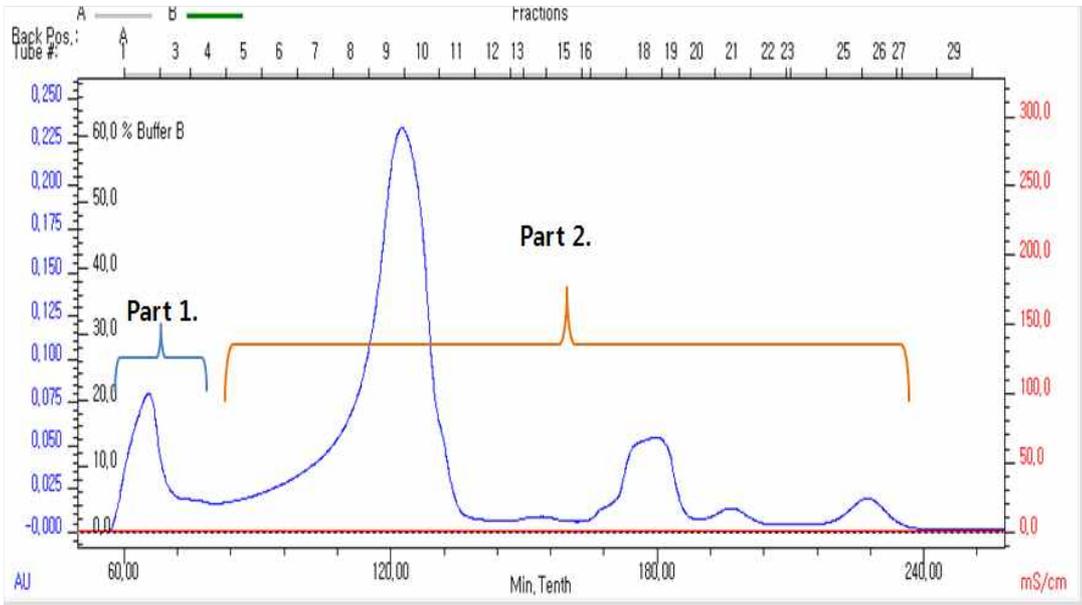


<그림 3. 유리판 위의 봉독과 건조봉독>

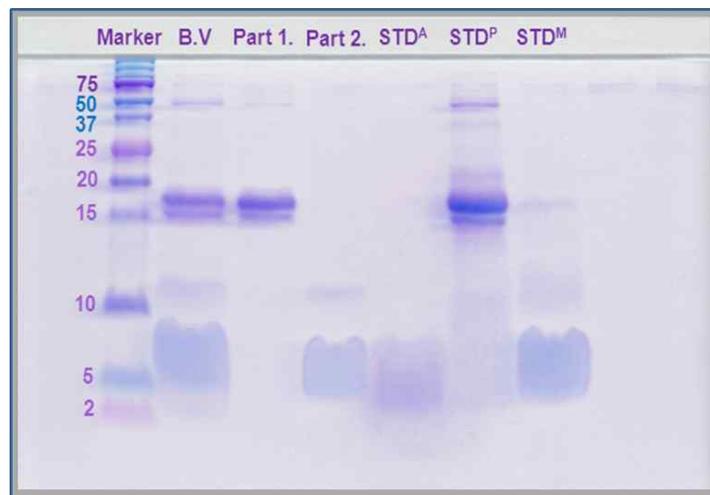
### 3. FPLC Gel filtration을 이용한 선행연구

당사는 알레르기 반응과 발열반응을 유발하는 물질로 알려진 성분을 차단하기 위해 봉독의 주 성분인 melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>의 분자량 차이를 이용한 분리법에 관한 선행연구를 진행하였다. 구체적으로 FPLC(Fast Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 Gel filtration법을 통한 분리법으로 melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>를 순수한 물로 분리하는 기술을 확립하였다(특허등록: 10-1413715). <그림 4>은 FPLC를 이용하여 분리하여 HPLC로 분석한 결과이며, <그림 5>은 SDS-PAGE를 통해 분리된 봉독을 정성 분석한 결과이다.

FPLC와 HPLC를 이용하여 확립한 봉독의 분리공정은 성분 분리도가 높고 각 유효성분의 분리가 가능한 장점을 가지고 있지만 컬럼 안정화 및 packing, 용매에 따라 분리/분석의 소요 시간이 길며 공정의 복잡한 단점을 가진다. 이에 생산공정의 시간 단축과 대량생산 system을 구축할 목적으로 본 연구를 진행하였다.



<그림 4. 분리된 정제봉독의 FPLC fraction 및 HPLC 분석 결과>



<그림 5. 분리된 정제봉독의 SDS-PAGE 결과>

#### 4. Ultra filtration을 이용한 정제봉독의 분리 공정개발

##### 가. 접근방법

정제봉독을 구성하는 주요 물질인 melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>의 분자량 차이를 이용하여 Ultra filtration을 통해 정제봉독을 분리하였다. 불순물과 PLA<sub>2</sub> 여과 및 제거를 위하여 여과 막 기공크기를 봉독 주요 성분의 분자량(표 3)과 비교하여 선택하였다.

<표 3. 봉독의 주요 성분별 분자량>

Classification	Ingredient	Molecular weight
Enzyme	Phospholipase A <sub>2</sub> , B	<13 KDa
	Hyaluronidase	38 KDa
	Phosphatase	50-160 KDa
	α-Glucosidase	51 KDa
Peptide	Melittin	2.8 KDa
	Apamin	2.0 KDa
	MCD peptide	2.6 KDa
	Procamine, Pamine	0.4 KDa
	Minimine	≤6.0 KDa
	Adolapine	11.5 KDa
	Protease inhibitor	9.0 KDa
	Fertiapine	≤3.0 KDa
Active amines and amino acids	Histamine	0.12 KDa
	Dopamine	0.15 KDa
	Noradrenalin	0.17 KDa
	Aminobutyric acid	0.18 KDa
	α-amino acids	

##### 나. 재료 및 방법

###### (1) 봉독시료

국내에서 사육중인 서양종 꿀벌(*Apis mellifera L.*)의 봉독을 봉독채집장치((주)청진바이오텍, 한국)를 사용하여 채집하고 봉독의 간이정제방법을 통해 불순물을 제거한 후 -56°C에서 -75°C의 온도로 동결 건조하여 분말형태인 정제봉독(PBV)을 사용하였다.

###### (2) 기기

Ultra filtration(한외여과기)는 millipore (amicon® Stirred Cell Model 8200)제품을 사용하였으며 기기에 사용된 membrane filter는 millipore (ultracel® ultrafiltration discs 5 KDa, 10 KDa, 30 KDa)제품을 사용하였다. 초정밀저울은 XP 105(Mettler toledo, USA) 모델을 사용하였다.

(3) Ultra filtration을 이용한 알레르기 성분 및 고분자 물질 제거

건조된 정제봉독(PBV)을 증류수에 1 g/100 mL, 1 g/500 mL, 1 mg/mL 되도록 각각의 농도에 맞추어 녹인 후, 불순물을 제거하기 위해 0.45 um(Sartosius, USA) syringe filter를 이용하여 여과하였다. 불순물과 PLA<sub>2</sub> 여과 제거를 위하여 여과막 기공크기를 실제 성분의 분자크기와 비교하여 선택하였다.

봉독의 유효성분이 변성되지 않고 효과를 유지하기 위해 온도를 0~4°C를 유지한 상태에서 증류수에 적신 Ultra filter를 Ultra filtration에 넣고 조립하고 교반하면서 소량의 증류수를 넣는다. 여과한 후 봉독을 녹인 수용액을 한외여과기에 넣고, 20, 30, 40 psi로 압력을 각각 다르게 여과하였다. 여과 후 동결건조하고 HPLC를 이용하여 함량을 분석하였다.

- 조건 1 : 시료농도(10 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL)
- 조건 2 : 분획분자량(5 KDa, 10 KDa, 30 KDa)
- 조건 3 : 압력(20 psi, 30 psi, 40 psi)

(4) 봉독의 유효성분 정량분석

봉독의 apamin, PLA<sub>2</sub>, melittin 정량분석을 위해 Waters의 HPLC system을 이용하였으며 column은 온도를 25°C로 설정하였다. 이동상으로는 0.2% TFA water(A)와 0.22% TFA acetonitrile(B)를 100:0 비율로 시작하여 20분간 서서히 50:50으로 용매비율을 변화시킨 후 30분간 서서히 다시 100:0 비율로 변화시켜 사용하였다. 1.0 mL/min의 유속을 유지하며 UV 220 nm에서 측정하였으며, HPLC 분석조건을 <표 4>에 요약하였다.

정제봉독(PBV)의 대표적인 3가지 주요 유효성분인 apamin, PLA<sub>2</sub>, melittin의 지표물질인 apamin(0.5 mg, 순도≥99.5%), PLA<sub>2</sub>(1 mg, 순도≥90.72%), melittin(5 mg, 순도≥92.0%)을 증류수 10 mL에 용해시켜 20, 30, 40 mL씩 측정하고, 시료의 농도는 1.0 mg/mL로 정확히 만들어 측정하여 표준곡선 정량분석법으로 분석하였다. 시료의 각 성분 함량은 standard의 calibration curve와 각 성분의 면적을 산출하여 아래 계산식(1)을 통해 함량을 계산하였다.

<표 4. HPLC를 이용한 봉독의 정량 분석 조건>

<b>Instrument</b>	<b>Pump Detector Autosampler Column</b>	Waters 1525u binary HPLC pump Waters 486 detector Waters 717 plus Phenomenex Jupiter 4u proteo 90A		
	<b>Mobile phase</b>	A: 0.2% TFA in water B: 0.22% TFA in acetonitrile		
	<b>UV absorbance</b>	220 nm		
	<b>Column temperature</b>	25°C		
	<b>Injection volume</b>	20 µL		
	<b>Folw rate</b>	1.0 mL/min		
	<b>Gradient</b>	min	A(%)	B(%)
		Ini.	100	0
		20	50	50
		50	100	0

$$\text{함량(\%)} = \text{표준품채취량}(mg) \times \frac{\text{표준품순도(\%)}}{100} \times \frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{표준액의 피크면적}} \times \frac{100}{\text{검체의 채취량}(mg)} \dots(1)$$

(5) SDS-PAGE를 통한 정성분석

Laemmli의 SDS-PAGE 방법<sup>3)</sup>을 이용하였으며, 20%의 gel 조성을 만들고 고정된 glass plate에 약 10 mL 정도 분주한 후 평형을 맞추기 위해 물을 약 1~2 mL정도 분주하여 separating gel을 굳히고, 위에 분주한 물을 제거하고 staking gel 조성물 약 5 mL 을 분주 후, gel이 굳기 전에 comb를 끼워 굳히고 staking gel까지 굳으면 comb를 제거하여 SDS-PAGE gel을 완성시킨다(표 5).

<표 5. SDS-PAGE의 separating gel 및 staking gel 조성>

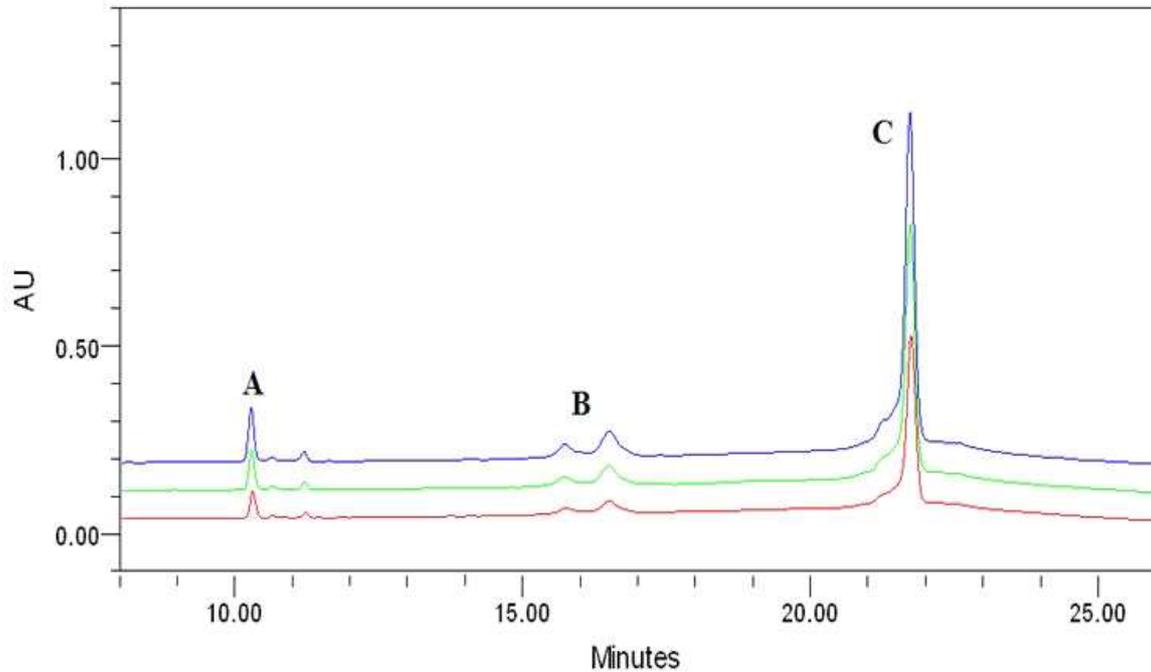
20% separating gel		5% staking gel	
DW	700 $\mu$ L	DW	3.4 mL
30% acrylamide mix	6.6 mL	30% acrylamide mix	830 $\mu$ L
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 mL	1.0 M Tris-HCl (pH8.8)	630 $\mu$ L
10% SDS	100 $\mu$ L	10% SDS	50 $\mu$ L
10% APS	100 $\mu$ L	10% APS	50 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L	TEMED	5 $\mu$ L

SDS-PAGE로 확인하고자 하는 분획과 sample buffer(Laemmli 2x Concentrate, sigma, S3401)를 1:1 비율로 혼합하고, 90°C의 water bath에서 5분 동안 중탕시킨다. Gel의 comb에 marker 5  $\mu$ L, sample 30  $\mu$ L씩 loading하고, gel을 SDS-PAGE 탱크에 끼워서 running buffer(25 mM Tris, 192 mM 글리신, 0.1% SDS, pH8.3)를 채워주었다. SDS-PAGE power supply 통하여 staking gel에서 60 V로 약 30분 동안 작동시키고, separating gel에서 120 V로 약 60~90분 동안 작동시킨다. 시료의 성분은 power supply에서 흘러주는 전류를 따라 gel에서 분자량 별로 분리되고, coomassie brilliant blue G-250 염료와 destaining solution으로 염색/탈색 후 band를 확인하여 봉독의 알레르기 유발물질인 hyaluronidase, PLA<sub>2</sub> 등의 물질이 분리되었는지 확인하였다.

다. 결과 및 고찰

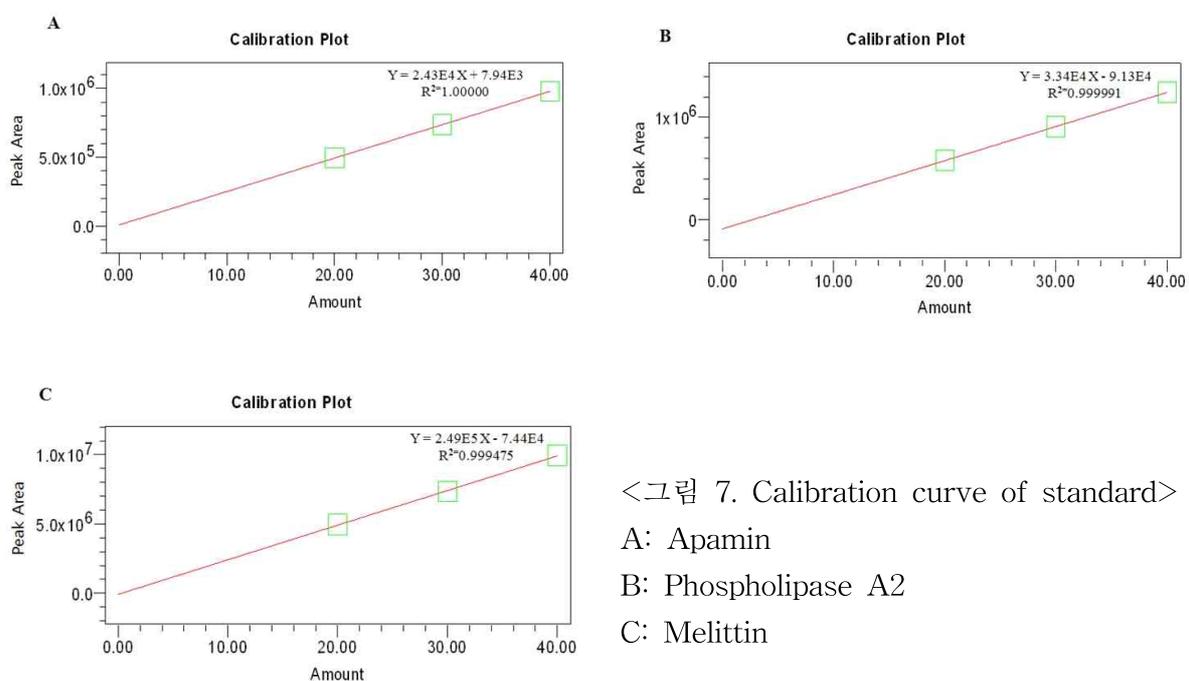
(1) HPLC를 이용한 정량분석의 정확도

정제봉독의 주요 유효성분인 apamin, PLA<sub>2</sub>, melittin의 정량을 분석하고 정확성을 검증하기 위해 지표물질을 20, 30, 40 μL로 loading하여 크로마토그램(그림 6)과 calibration curve(X축: amount, Y축: Peak area)(그림 7)를 작성하였다.



<그림 6. Chromatogram of standard. A: apamin, B: phospholipase A<sub>2</sub>, C: melittin>

크로마토그램을 통해 봉독의 주요 3가지 유효성분의 머무름시간(apamin: 10.7 min, PLA<sub>2</sub>: 16.4 min, melittin: 21.9 min)과 peak를 확인하고 실험의 재연성을 확인하였다(그림 6). 검정 곡선은 apamin, PLA<sub>2</sub>, melittin 각각의 주입량 대비 peak 면적비를 산출하여 계산하였고(그림 7) 회수율 test를 통하여 정확도를 확인하였다(표 6).



<표 6. The test of recoveries>

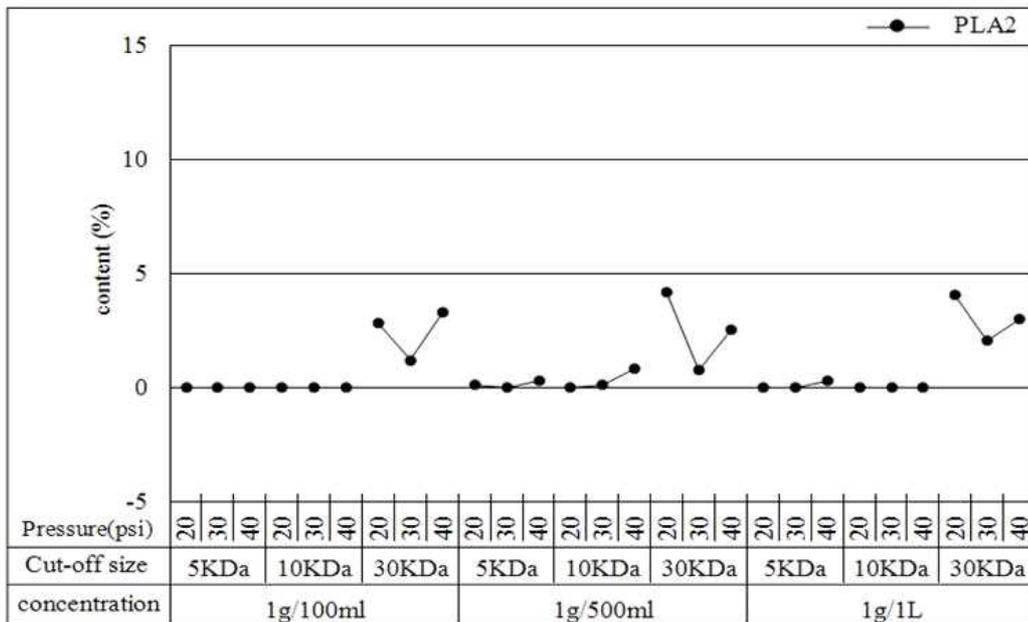
Species	Concent mg/mL	Added $\mu$ L	Found $\mu$ L	Recovery %	Mean $\pm$ SD <sup>a</sup>
Apamin	0.0498	20	20.014	100.07	100.00 $\pm$ 0.07
		30	29.971	99.90	
		40	40.014	100.04	
PLA <sub>2</sub>	0.0561	20	20.101	100.50	100.03 $\pm$ 0.50
		30	29.799	99.33	
		40	40.101	100.25	
Melittin	0.4825	20	19.948	99.74	99.99 $\pm$ 0.26
		30	30.105	100.35	
		40	39.948	99.87	

a) SD, Standard deviation

(2) 조건에 따른 봉독의 유효성분 변화

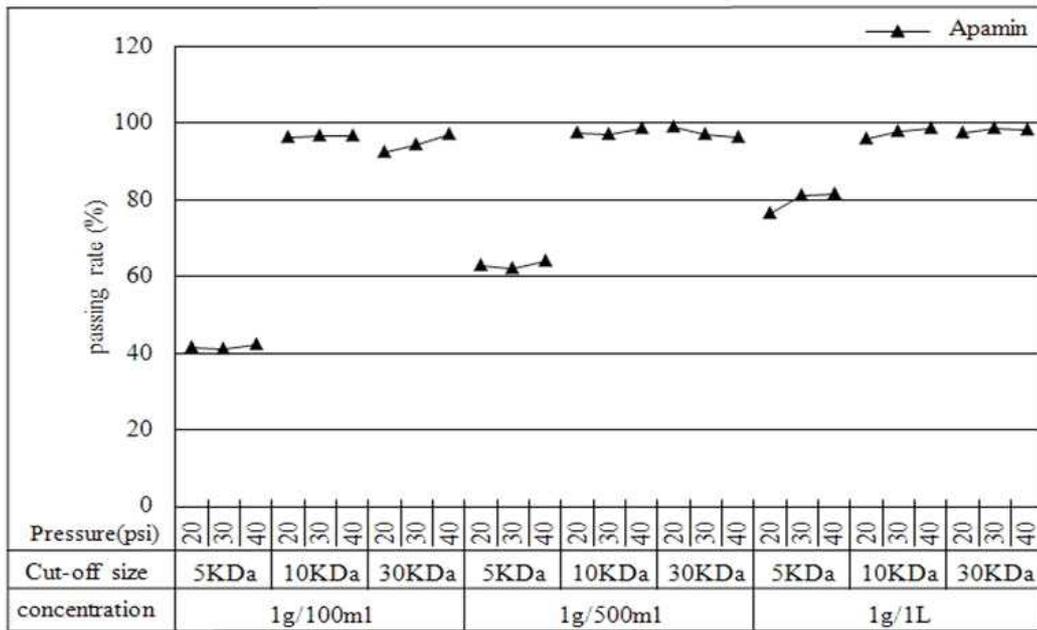
증류수를 이용하여 10 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL 각각의 농도에 맞추어 녹인 봉독 액을 압력과 분획분자량(cut off size)를 달리하여 Ultra filter하고 동결건조 후 정확성이 검증된 HPLC를 이용하여 함량을 측정하였다.

그 결과 PLA<sub>2</sub>의 경우 5 KDa, 10 KDa에서 제거가 되었으며 30 KDa에서는 제거 되지 않았다. 이는 PLA<sub>2</sub>의 분자량이 13 KDa으로 5 KDa, 10 KDa에 비해 cut-off pore size가 큰 30 KDa에서 완전히 걸러지지 않고 일부 유출되기 때문으로 보인다. 또한 압력에 따라 정제 봉독을 녹인 수용액의 농도에 상관없이 30 psi에서 함량이 낮고 20 psi, 40 psi에서 높은 일정한 패턴을 보였다(그림 8). 낮은 함량을 보인 30 psi의 경우 같은 교반속도에서 20 psi 보다 높은 압력인 30 psi를 가하게 되면 막 표면의 밀도가 높아지는 농도분극현상에 의해 PLA<sub>2</sub>가 유출되지 않았기 때문으로 보인다. 30 psi 보다 높은 40 psi를 가하게 될 경우 고압으로 인한 강제유출이 되어 30 psi 보다 높은 함량이 나타나지만 membrane filter의 수명을 단축시키는 요인이 된다.



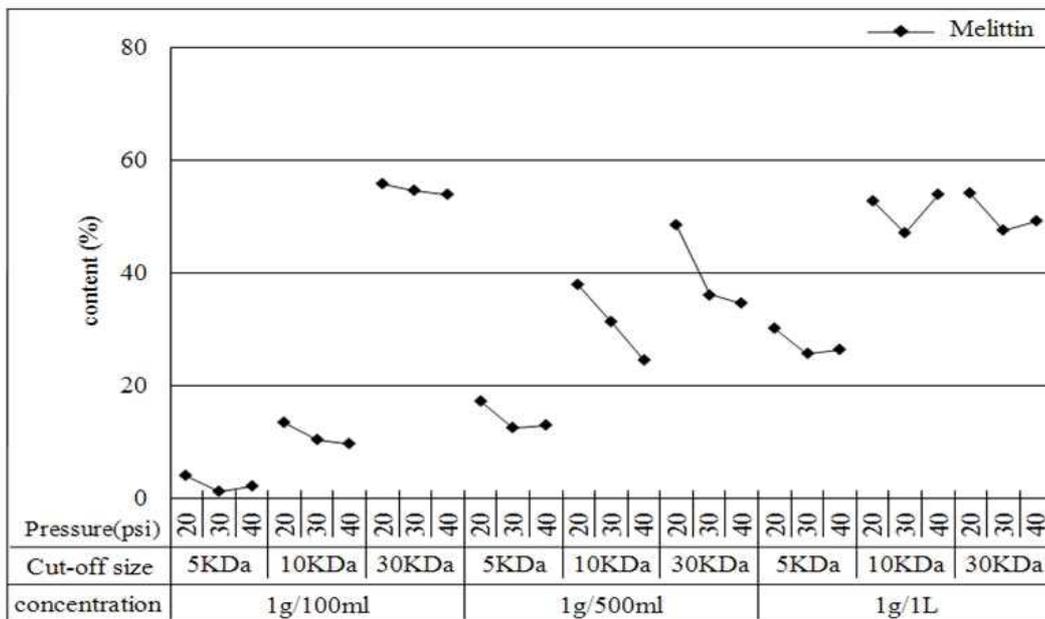
<그림 8. 조건에 따른 PLA<sub>2</sub> 함량변화>

Apamin의 경우 다양한 조건의 변화에도 정제봉독(PBV)의 함량을( $\geq 2\sim 3\%$ ) 유지하였으나 5 KDa에서 희석배수가 올라갈수록 통과율은 증가하지만 가장 높은 통과율을 보인 10 mg/mL에서도 80%미만으로 나타났다. 10 KDa, 30 KDa에서는 5 KDa에 비해 cut-off pore size가 크기 때문에 95%이상의 높은 통과율을 보였다(그림 9).



<그림 9. 조건에 따른 apamin 통과율>

봉독에서 가장 효과적인 성분인 melittin은 5 KDa 분획분자량의 membrane filter를 사용했을 때 봉독액의 농도가 낮아질수록 함량이 올라가지만 희석농도, 압력이 달라져도 통과율과 함량이 정제봉독에 비해 30%미만으로 나타났다. 10 KDa에서도 농도가 낮아질수록 함량이 증가하였으나 30 KDa의 경우에는 농도가 높을수록 함량이 증가함을 보였다. 압력변화에서도 20 psi를 가해주었을 때 가장 높은 함량을 보였는데(그림 10), PLA<sub>2</sub>와 마찬가지로 같은 교반속도에서 20 psi 보다 높은 압력인 30 psi를 가하게 되면 막 표면의 밀도가 높아지는 농도분극현상에 의해 melittin이 유출되지 않아 낮은 함량이 나타난 것으로 보이며 30 psi 보다 높은 40 psi를 가하게 될 경우 고압으로 인한 강제유출이 되어 30 psi에 비해 높은 함량이 나타난 것으로 보인다.



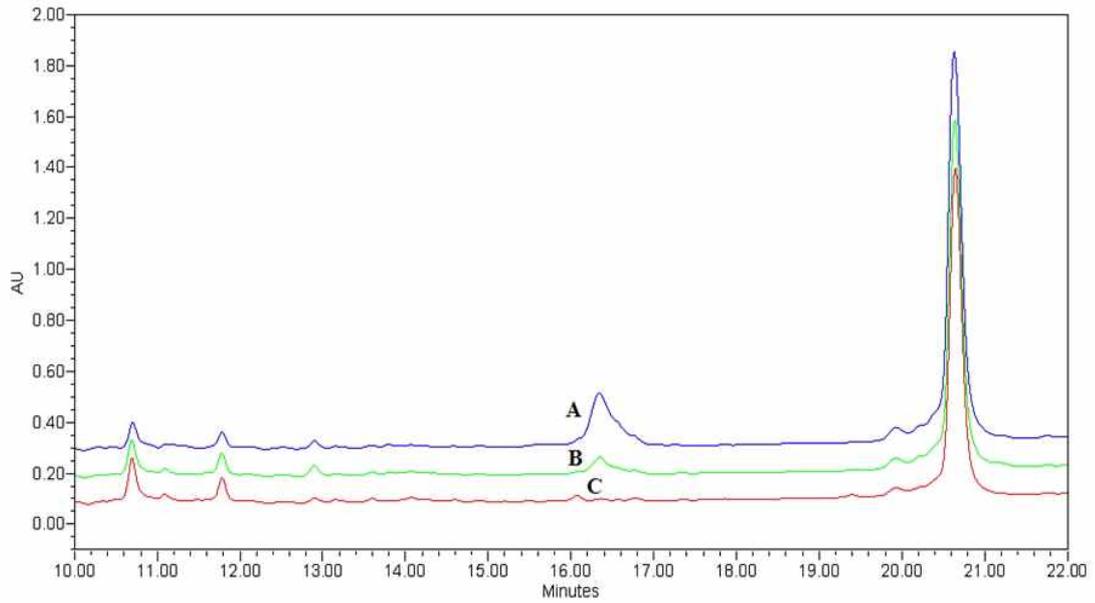
<그림 10. 조건에 따른 melittin 함량변화>

### (3) 분리된 봉독의 정성 및 정량평가

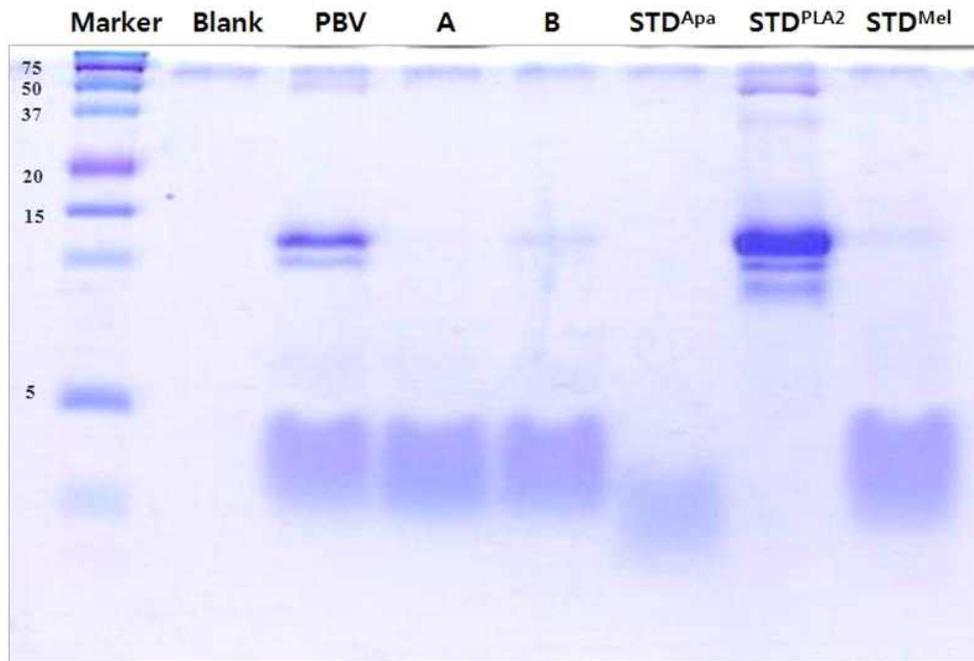
<그림 8>, <그림 10>을 통해 알 수 있듯이 20 psi의 압력으로 10 mg/mL의 농도에서 30 KDa membrane filter를 사용한 경우 여러 가지 조건 중에서도 가장 높은 melittin의 함량을 나타내었지만 PLA<sub>2</sub>가 완전히 제거되지 않고 2% 이하 함유하였다. 20 psi의 압력으로 1 mg/mL의 농도에서 10 KDa membrane filter를 사용한 경우에는 1 mg/mL의 농도에서 10 KDa membrane filter를 사용한 조건에 비해 melittin 함량이 3% 낮았으나 PLA<sub>2</sub>가 제거되었음을 알 수 있었으며 이를 HPLC와 SDS-PAGE를 통해 확인하였다(그림 11, 그림 12).

위에서 크로마토그램을 통해 봉독의 주요 3가지 유효성분의 머무름시간(apamin: 10.7 min, PLA<sub>2</sub>: 16.4 min, melittin: 21.9 min)과 peak를 확인한 결과를 바탕으로 PLA<sub>2</sub>의 머무름 시간인 16.4 min에서 20 psi 압력을 가해주고 10 mg/mL 농도에서 30 KDa filter를 사용한 조건에서 정제봉독에 비해 낮은 PLA<sub>2</sub> peak를 확인할 수 있었다. 20 psi 압력을 가해주고 1 mg/mL 농도에서 10 KDa filter 사용한 조건에서는 PLA<sub>2</sub> peak가 나타나지 않음을 확인하였다. 또한 두 조건 모두 melittin과 apamin은 정제봉독의 수준을 유지하고 있음을 알 수 있다.

SDS-PAGE를 이용한 결과 봉독의 주요 3가지 유효성분의 standard와 정제봉독, 두 가지 조건을 함께 비교하였을 때 HPLC와 마찬가지로 20 psi 압력을 가해주고 10 mg/mL 농도에서 30 KDa filter를 사용한 조건에서 정제봉독에 비해 옅은 PLA<sub>2</sub> band를 확인할 수 있었다. 20 psi 압력을 가해주고 1 mg/mL 농도에서 10 KDa filter 사용한 조건에서는 PLA<sub>2</sub> band가 나타나지 않음을 확인하였다.



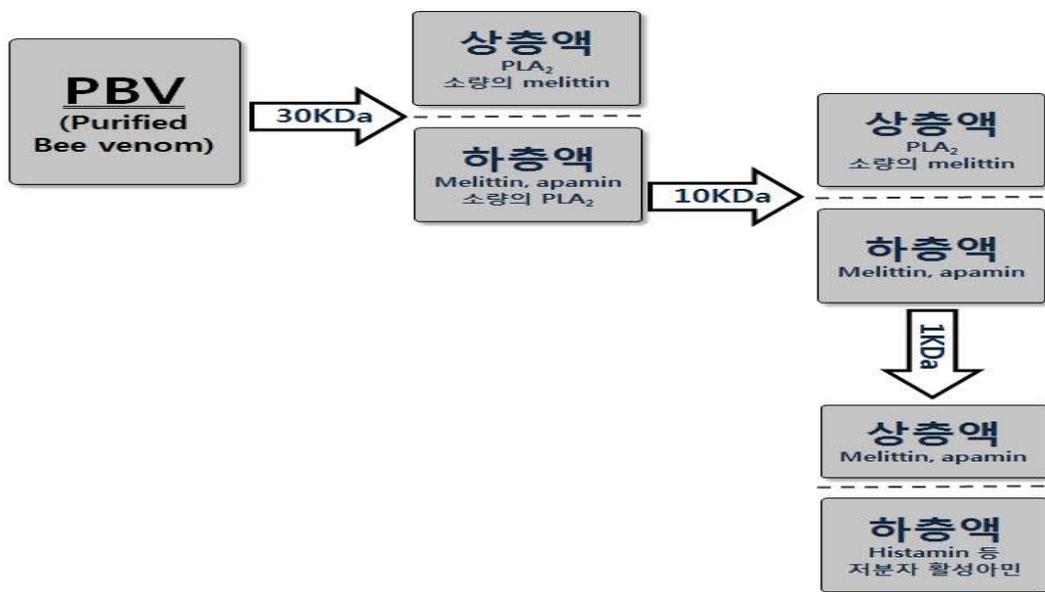
<그림 11. HPLC를 이용한 분리된 봉독의 정량분석  
(A: PBV, B: 10 mg/mL, 20 psi, 30 KDa, C: 1 mg/mL, 20 psi, 10 KDa)>



<그림 12. SDS-PAGE를 이용한 분리된 봉독의 정성분석  
(A: 1 mg/mL, 20 psi, 10 KDa, B: 10 mg/mL, 20 psi, 30 KDa)>

라. 분리-정제봉독(IPBV)의 대량생산 공정도

다양한 조건(농도, 압력, 분획분자량)에 따른 알레르기 유발성분의 분리연구를 바탕으로 분리-정제봉독의 대량생산 공정을 확립하였다. 분리-정제봉독을 생산하기 위해 정제봉독(PBV)은 1 g/L의 농도로 증류수에 용해시켜 준비한다. 봉독의 유효성분이 변성되지 않고 효능을 유지하기 위해 0~4°C의 상태에서 증류수에 적신 ultra filter를 ultra filtration 내에 넣어 조립하고 교반하면서 소량의 증류수를 넣는다. 준비된 봉독 수용액을 ultra filtration에 넣고 20 psi의 압력으로 여과시킨다. 30 KDa filter를 이용하여 1차 여과 후, 수거한 하층액을 10 KDa filter로 2차 여과시킨다. 주 성분의 함량분석을 바탕으로 2차 여과 후 수거한 하층액을 1 KDa filter로 농축하는 과정을 추가하기도 한다(그림 13).



<그림 13. 분리-정제봉독의 대량생산 공정도 및 ultra filtration system>

마. 분리-정제봉독의 생산방법에 따른 생산 효율 비교

(분리정제봉독의 대량생산법의 확립을 위한 생산 효율 비교실험 결과 보고서, 2014, 청진바이오텍)

(1) 목적

봉독의 알레르기 유발성분인 PLA<sub>2</sub>를 분리하는 기존의 방법이었던 FPLC gel-filtration<sup>4)</sup>과 본 연구를 통해 개발한 ultra filtration의 생산율, 생산비용, 대량생산을 위한 수득률을 비교하고자 한다.

(2) 방법

실험기간은 각 8주간 반복실험을 진행하였으며 30일 동안 생산할 수 있는 분리 정제 봉독의 양으로 생산시간을 비교하였다. 분리-정제봉독 1 g을 생산하기 위해 사용되는 재료비를 계산하여 비용을 환산하였으며 계산식(2)을 통해 수득률을 계산하였다. 또한 PLA<sub>2</sub>의 제거와 분리-정제봉독의 순도를 확인하기 위하여 HPLC 성분분석 검사를 실시하였다.

$$\text{수득률} = \frac{\text{동결건조된 분리정제봉독의 무게}}{\text{생산에 사용된 정제봉독의 무게}} \times 100 (\%) \dots\dots (2)$$

(3) 결과 및 고찰

FPLC를 통해 PLA<sub>2</sub>를 분리 할 경우 한번의 injection을 통해 20 mg의 봉독을 분리할 수 있으며 bio-gel 교체과정을 포함, 일주일에 약 9회의 injection이 가능하다. 수득률은 40% 이상, 순도는 90% 정도의 고순도의 melittin이 함유된 분리-정제봉독의 생산이 가능하다. 1 g의 분리-정제봉독을 생산하는데 약 476만원의 비용과 768시간이 소요된다.

Ultra filtration을 통해 PLA<sub>2</sub>를 분리 할 경우 한 번의 실험(1주)으로 16 g의 봉독을 대량 분리할 수 있으며 PLA<sub>2</sub>(수득률 25%이상)의 경우 ≤0.2%로 분리 제거됨을 확인할 수 있었다. 또한, 1 g의 분리-정제봉독을 생산하는데 약 24만원의 비용과 17시간이 소요되는 것을 확인하였다(표 7). FPLC gel filtration과 비교하여 수득률은 약 26% 정도로 낮지만 분리과정 후 PLA<sub>2</sub>를 포함하는 부분물질의 활용이 가능하고 비용 및 생산시간이 현저하게 향상되었음을 확인할 결과, ultra filtration이 대량생산에 적합하다고 평가된다.

<표 7. FPLC와 Ultra filtration을 이용한 분리-정제봉독 생산효율 비교>

차수	FPLC				Ultra filtration			
	수득률 (%)	순도 (%) (Melittin기준)	비용 (1g 당)	시간 (1g 당)	수득률 (%)	순도 (%) (Melittin기준)	비용 (1g 당)	시간 (1g 당)
1차	48	90.91	476만원	768시간	26.2	69.42	24만원	17시간
2차	38	97.81			28.1	66.49		
3차	49	97.54			26.8	69.47		
4차	48	92.00			28.1	67.00		
5차	30	89.95			26.2	65.67		
6차	35	88.63			25.6	64.39		
7차	53	82.3			26.8	67.04		
8차	53	92.47			26.2	61.38		
9차	-	-			26.2	60.09		
10차	-	-			25	67.97		
평균	44	91.45	476만원	768시간	26.52	65.89	24만원	17시간

## 5. 봉독의 주요 단일성분 분리 및 분석

### 가. 방법

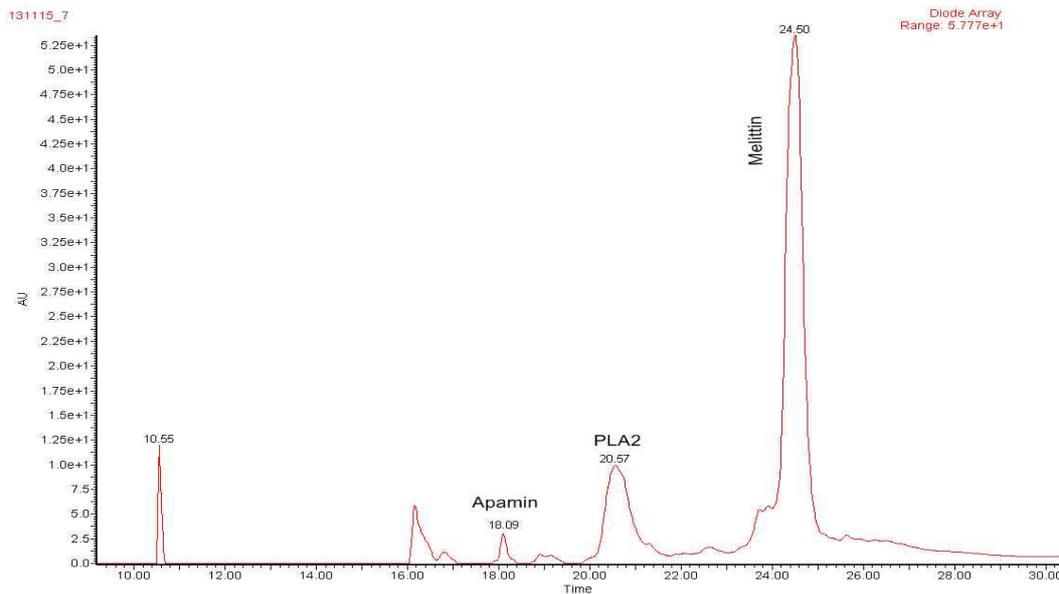
정제봉독의 유효성분 및 알레르기 유발성분 분리 공정을 바탕으로 더 나아가 Prep-HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 Reversed Phase Chromatography 방법을 통해 봉독의 유효성분인 apamin, melittin과 알레르기 유도성분인 PLA<sub>2</sub>를 분리하였다. 안정화 조건으로 column에 유속 8.0 mL/min으로 물을 흘려주며 안정화 시킨다. 안정화가 끝나면 봉독 샘플을 injection한 후, 용매의 유속을 8.0 mL/min으로 흘려주면서, A와 B용매를 gradient를 주면서 <표 8>의 조건으로 봉독 샘플을 분리한다. 분리되어지는 봉독의 peak는 성분별로 fraction collector로 모으며 각 peak의 성분을 기존 유통되는 함량이 알려진 standard와 비교하여 순도를 확인하였다.

<표 8. 봉독의 단일성분 분리 조건>

<b>Instrument</b>	<b>Pump Detector Autosampler collector</b>	Waters 2525u binary HPLC pump Waters 996 photodiode array Waters 717 plus Waters Fraction Collector III	
	<b>Mobile phase</b>	A: 0.2% TFA in water B: 0.22% TFA in acetonitrile	
	<b>UV absorbance</b>	220 nm	
	<b>Column</b>	Phenomenex Jupiter 10u Preteo 90A 250 X 21.20 mm	
	<b>Injection volume</b>	1,000 µL (10 mg/mL)	
	<b>Flow rate</b>	8.0 mL/min	
	<b>Gradient</b>	min	A(%) B(%)
		Ini.	100 0
		25	50 50
		60	100 0

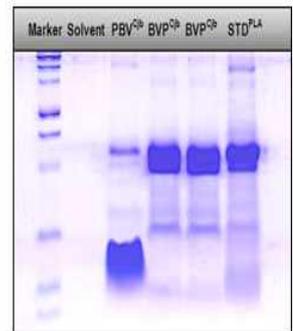
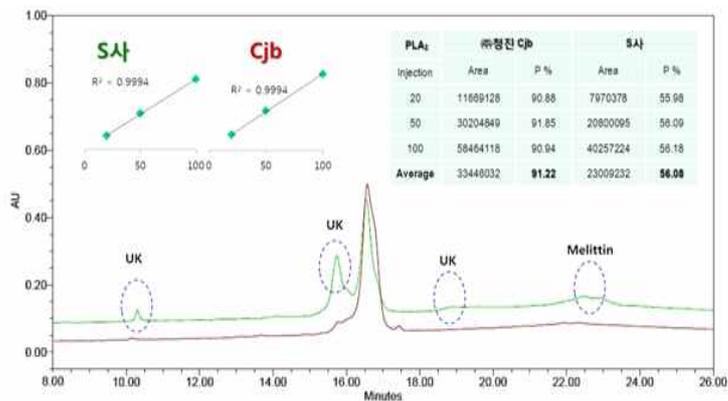
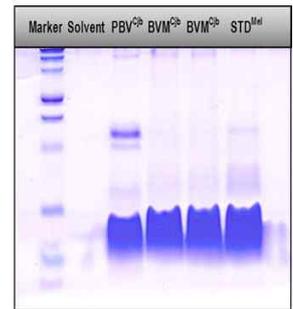
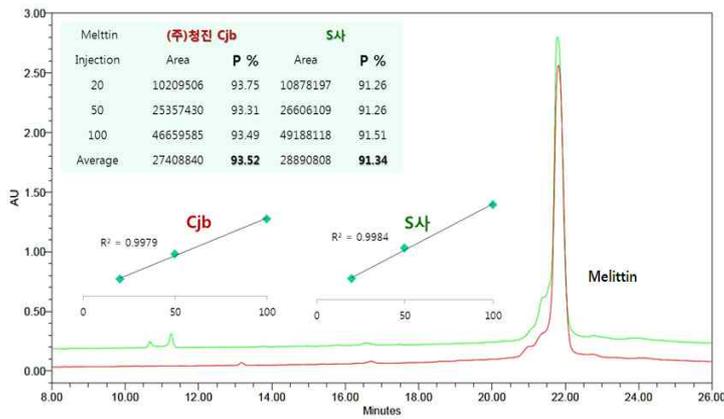
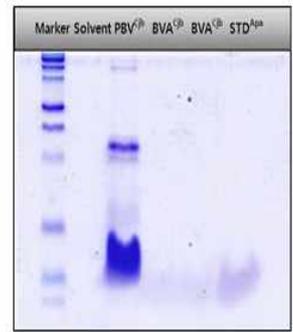
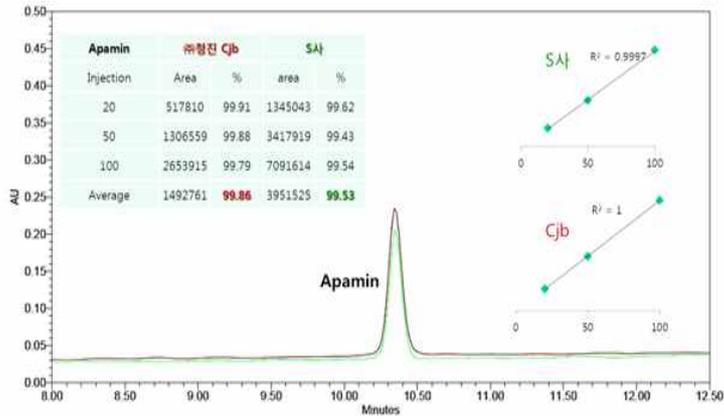
## 나. 결과 및 고찰

Reversed Phase Chromatography의 원리에 따라 고정상이 비극성이고 이동상이 극성이므로 극성 시료가 먼저 분리되었다. chromatography에서 20.57분에서 검출된 peak는 봉독에서 10~12%를 차지하는 봉독 알레르기 유발물질인 PLA<sub>2</sub>로 추정되며(그림 14) 지하는 봉독의 유효성분인 melittin은 24.5분에서 나타났다. 또한 18.09분에서 검출된 peak는 봉독에서 1~2%를 차지하는 apamin으로 사료된다.



<그림 14. 정제봉독의 Prep-HPLC 크로마토그램>

Prep-HPLC를 이용한 분리 기술을 이용하여 melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>가 분리되었음을 확인 하였고 이를 다시 SDS-PAGE, HPLC 분석을 통해 타사 표준물질과 비교 분석하였다(그림 15). melittin의 경우 당사제품의 경우 93.52%, 타사제품 91.34%로 두 제품 모두  $\geq 90\%$ 가 넘는 순도를 확인하였다. apamin의 경우 당사제품 99.86%, 타사제품 99.53%로 두 제품 모두 매우 높은 순도를 나타내었다. 또한 PLA<sub>2</sub>의 경우 당사제품 91.22%, 타사제품 56.08%의 순도로 차이를 보였다. 이는 타사제품의 경우, 분석하고자 하는 물질 외에 알 수 없는 unknown peak를 나타내는 것으로 보아 이 결과가 낮은 순도에 영향을 미친 것으로 사료된다.



<그림 15. HPLC 및 SDS-PAGE를 이용한 단일표준물질과 타사제품과의 비교분석>

## 제 2 절 정제봉독과 분리-정제봉독의 안전성 및 저장성 연구

### 1. Agar diffusion test를 통한 세포독성 평가

(미국FDA 지정기관을 통한 정제봉독 및 분리-정제봉독의 세포독성 평가, 2013, MMDG)

#### 가. 접근방법

Agar Diffusion Test는 간접접촉에 의한 체외 실험으로 질적 평가가 가능한 독성실험이다. 이 시험은 agar layer을 통해서 확산 할 수 없거나 agar와 반응 할 수 있는 용출물에는 적합하지 않다. ISO 10993-5:2009 요구 사항을 충족하는 세포 독성 평가를 위해 이 분석법이 사용되었다. 미국 Pharmacopeia에서는 다양한 모양의 탄성 중합체의 평가를 위해 이 시험법을 추천하고 있다.

#### 나. 재료 및 방법

##### (1) 세포배양

바이오물질의 독성을 평가할 때 신뢰성있는 L929 mammalian fibroblast를 이용하였으며 배지는 fetal bovine serum과 antibiotic-antimycotic이 함유된 MEM(minimum Essential Medium, Eagles)와 EBS(Earles Balanced Salts)에 배양시킨다.

##### (2) Agar diffusion test

60mm의 멸균된 tissue culture grade의 페트리 플레이트에 confluent 배양세포를 trypsin 처리와 계대배양을 하여 한 플레이트 당 약  $1 \times 10^6$  cell의 밀도로 세포를 배양하였다. 모든 플레이트는 실험을 위해 약 80%의 confluent 단층을 얻기 위하여  $5 \pm 1\%$ 의 CO<sub>2</sub>를 포함하는 37°C의 다습한 환경에서 24시간 이상 배양하였다. 배양 후, 배양세포의 subconfluency와 형태학을 현미경을 이용하여 확인하였다. 약 80% confluency와 일반적이고 건강한 세포를 포함한 배양세포가 실험에 사용되었다.

각 세포단층에서 배지를 조심스럽게 제거하고 1:1로 믹스된 2% w/v purified agar 와 2x Complete MEM 7 mL로 교체하였다. 덧입힌 agar를 상온에서 15분 이상 굳혔다. 실험을 시작하기 전에 0.01% neutral red 염색액 2~5 mL로 세포단층을 염색 후(최소 15분 동안 염색), 염색약을 조심스럽게 제거하였다.

적당한 농도의 시험물질 약 0.2 mL을 적신 멸균된 필터종이( $\sim 2.1 \text{ cm}^2$ )를 agar 표면에 올려놓아 약 10%의 cell agar 층 표면을 둘러싸도록 하고, 대조용 필터종이는 주사용 멸균증류수에 적신 필터 종이로 준비한다. 표준 양성 혹은 음성 대조물질은 라텍스 고무와 USP HDPE 표준시료를  $2.1 \text{ cm}^2$ 의 크기로 멸균 커팅하여 준비하고 agar 표면에 올린다. 모든 시험은 3번 반복하며 3개의 플레이트도 blank 대조군으로 준비하였다. 모든 플레이트는  $5 \pm 1\%$  CO<sub>2</sub>가 포함된 37°C의 다습한 환경에서 24~28시간 배양하였다.

(3) 독성평가

배양에 따라, 모든 플레이트는 <표 9>와 같이 정성적 생반응성으로 미시적 수치를 매겼다.

<표 9. 독성평가 반응성 지표>

grade	반응성	설명
0	None	표본 아래 혹은 주변에 감지영역이 없음
1	Slight	표본 아래 몇몇의 기형이나 퇴화된 셀
2	Mild	표본 아래 제한된 범위 안에 나타남
3	Moderate	표본 크기 1 cm까지 확장됨
4	Severe	표본 이후에 1 cm이상 확장됨

다. 결과 및 고찰

정제봉독과 분리-정제봉독의 agar diffusion test는 FDA의 GLP기준에 따라 실험하였으며 결과는 <표 10>와 같다. 0.1 mg/mL과 0.2 mg/mL에서 시행된 정제봉독의 경우, grade 0 으로 독성이 발견되지 않았다. 분리-정제봉독 또한 0.25 mg/mL과 0.5 mg/mL에서 독성이 발견되지 않았다(grade 0, None)

<표 10. 정제봉독과 분리-정제봉독의 agar diffusion test  
(Qualitative cytotoxicity Assessment, ISO method)>

Sample Description	Lot Identification	Grade (plate 1,2,3)	Reactivity
PBV(0.1 mg/mL, T13-1940)	NA	0,0,0	None
PBV(0.2 mg/mL, T13-1941)	NA	0,0,0	None
IPBV(0.25 mg/mL, T13-1942)	NA	0,0,0	None
IPBV(0.5 mg/mL, T13-1943)	NA	0,0,0	None
Filter Paper Control	Filter Paper: A549261 WFI: A110723-1	0,0,0	None
Positive Control	812407HT	3,3,3	Moderate
Negative Control	Iok217	0,0,0	None
Blank	N/A	Normal, Healthy Cells	

## 2. 저장상태, 저장온도, 저장기간에 따른 정제봉독의 저장성 연구

### 가. 접근방법

건조상태의 정제봉독과 1 mg/mL의 정제봉독 수용액의 저장 조건에 따른 주요 성분변화를 시간별로 확인하여 수출에 적합한 저장 및 유통조건을 확립하고자한다.

### 나. 재료 및 방법

정제봉독의 저장성 연구는 “생물의약품 안정성시험 가이드라인, 식품의약품안전청, 생물의약품국(2008)”의 장기보존시험기준, 가혹 및 가속 시험기준을 참고하여 디자인하였다. 건조상태의 정제봉독과 1 mg/mL의 정제봉독 수용액을 유리병에 밀봉하여 준비한다. 시험 조건으로는 광선(빛), 온도, 산화로 설정하여 수행하였다. 준비한 샘플은 빛을 차단하기 위해 호일을 이용하였으며 산화를 막기 위해 질소를 충전하여 저장하였다. 저장온도는 -20, 5, 25, 40°C로 설정하였으며 기간에 따라 성분분석을 통해 봉독의 저장성을 연구하였다.

- 조건 1 : 저장상태(건조봉독, 정제봉독 수용액)
- 조건 2 : 저장온도(-20°C, 5°C, 25°C, 40°C)
- 조건 3 : 저장조건(차광, 투명)
- 조건 4 : 저장조건(질소충전, 공기노출(산화))

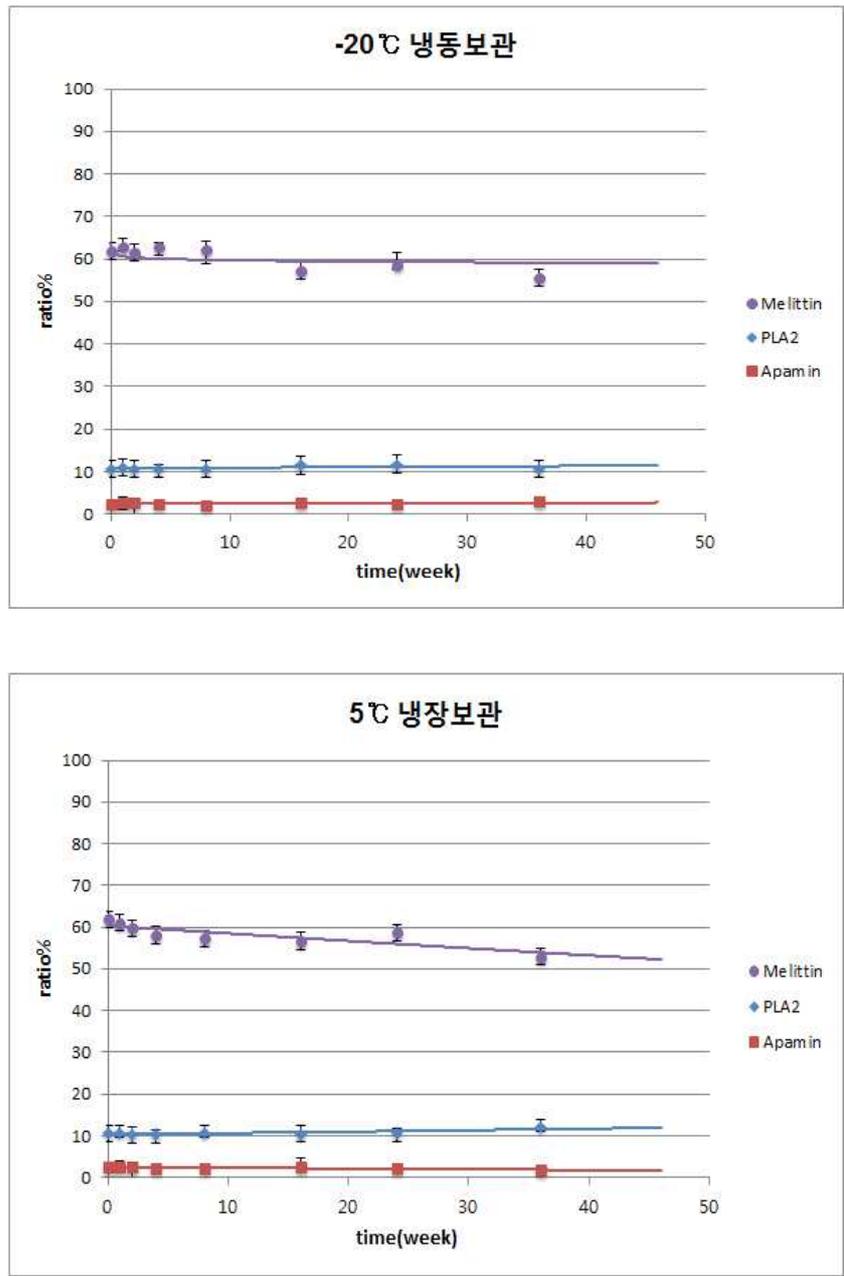
각 조건에 대상하는 샘플(그림 16)은 3배치로 준비하여 오차를 줄였으며 HPLC를 이용하여 정제봉독의 주 성분인 melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>의 표준물질과 비교 분석을 통해 성분함량의 변화를 살펴보았다.



<그림 16. 건조정제봉독(좌) 및 정제봉독수용액(우)의 보관 조건에 따른 보관예시>

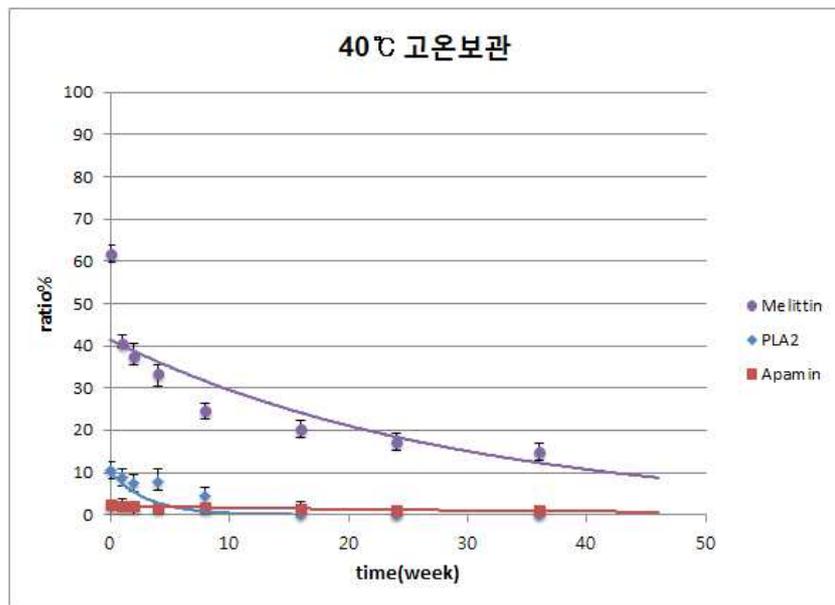
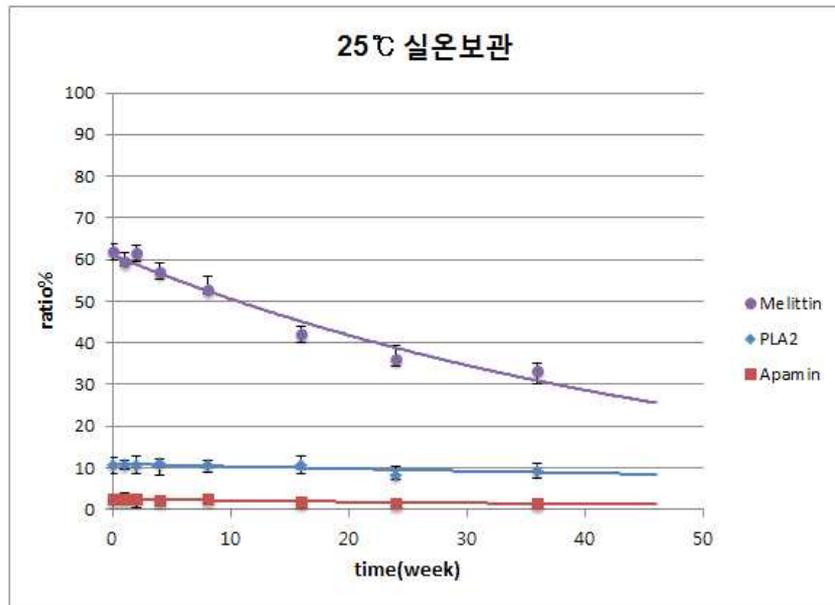
다. 결과 및 고찰

다양한 조건에 따른 건조정제봉독의 저장성 결과는 <그림17>과 같다.



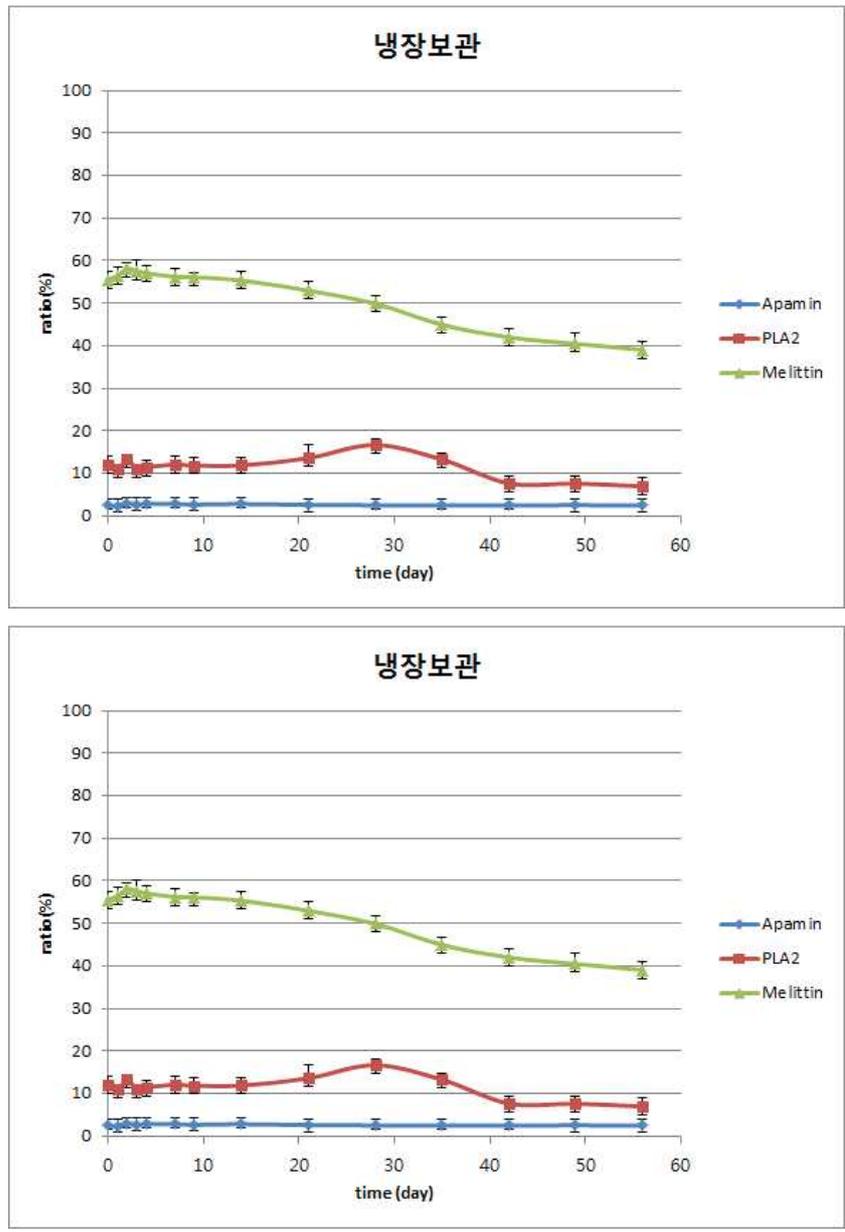
<그림 17. 다양한 온도에 보관한 건조 상태의 정제봉독의 성분변화(a)>

건조 정제봉독을 냉동보관(-20°C) 했을 때, 성분변화가 거의 없이 안정함을 보였다. 냉장 보관(5°C)한 건조 정제봉독은 약 24주까지 큰 변화를 보이지 않았고 melittin의 경우 소폭의 감소를 보였으나, PLA<sub>2</sub>와 apamin은 큰 변화를 보이지 않았다. 실온(25°C)에서 보관한 경우, melittin의 꾸준한 감소경향을 보였으며 PLA<sub>2</sub>와 apamin은 큰 변화를 보이지 않았다. 고온(40°C)에서는 melittin뿐만 아니라 PLA<sub>2</sub>, apamin 또한 큰 폭으로 감소하였으며 이 변화가 10일 이내로 빠르게 일어나는 것으로 보아 보관 시 건조 상태라도 고온의 환경을 피해야 하는 것을 알 수 있었다.



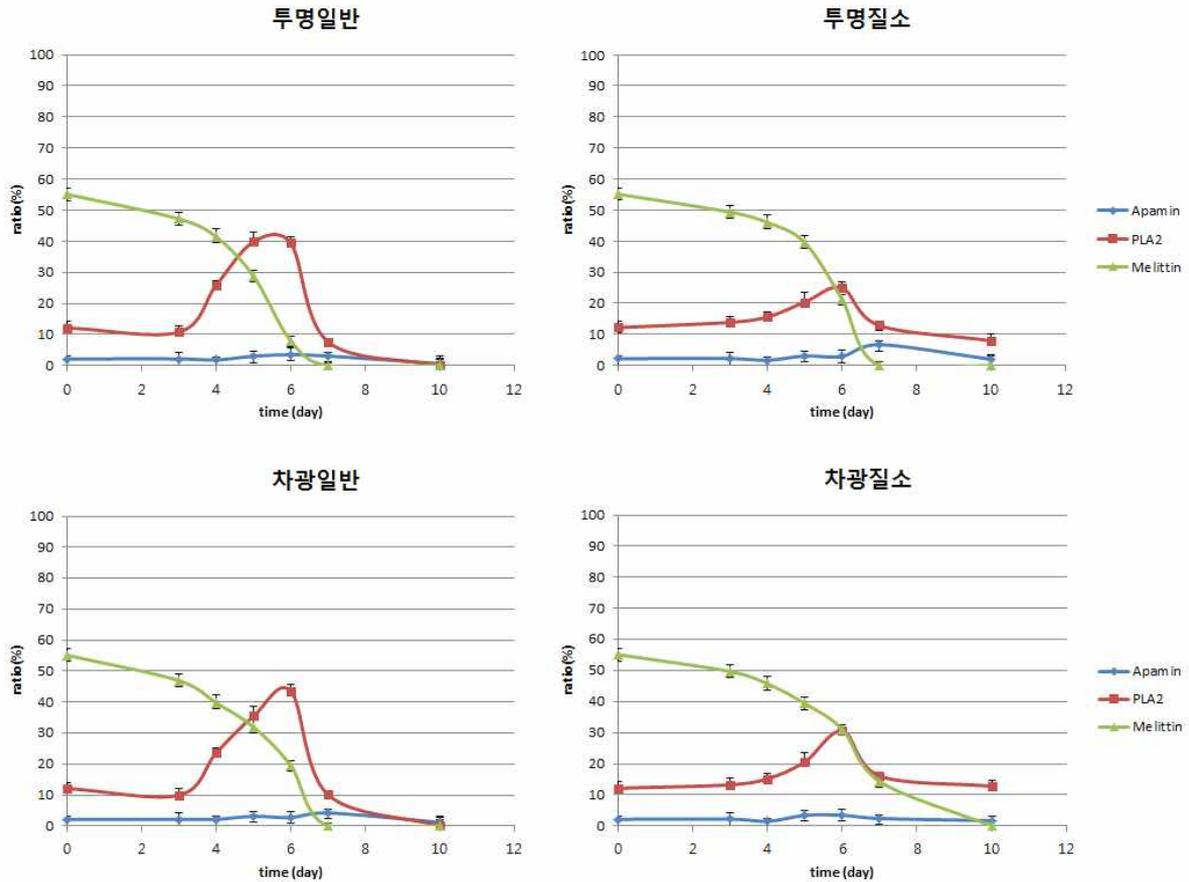
<그림 17. 다양한 온도에 보관한 건조 상태의 정제봉독의 성분변화(b)>

다양한 조건에 따른 정제봉독 수용액의 저장성 결과는 <그림18>과 같다. 정제봉독 수용액의 산화에 의한 변성 차이를 알아보기 위해 질소를 충전한 것과 그렇지 않은 것으로 분류하였다. 저온 상태에서 보관한 정제봉독 수용액은 약 10일 이후부터 melittin이 천천히 감소하였으며 약 20일 이후 PLA<sub>2</sub>의 성분변화를 보였으며 약간 증가했다가 감소하는 경향을 보였다. apamin의 경우 큰 성분 변화를 보이지 않았다. 또한 저온 상태에서는 질소의 유무가 저장성에 큰 영향을 끼치지 않은 것으로 사료된다(그림18(a)).



<그림 18. 다양한 조건(온도, 산화, 광선)에 보관한 정제봉독 수용액의 성분변화(a)>

실온에서 정제봉독 수용액을 보관하였을 때에는 산화 및 광선 등의 조건에 의한 차이가 뚜렷하게 나타났다(그림 18(b)). 질소충전 및 차광한 병에 보관된 정제봉독 수용액의 주요 성분들은 비교적 안정한 모습을 보였지만 3일 이후 melittin의 함량이 급격히 떨어지는 경향이 전반적으로 나타났다. 또한 melittin의 성분 변화가 시작되면서 PLA<sub>2</sub>의 성분이 증가했다가 감소하는 모습을 보인 것은 변성된 melittin이 PLA<sub>2</sub> 함량변화에 영향을 미친 것으로 사료된다. 특히 melittin의 변성이 크게 일어날수록 PLA<sub>2</sub>의 변화가 큰 폭으로 나타났다. <그림 19>와 같이 변성이 진행될수록 침전물 또한 생성됨을 확인하였다.

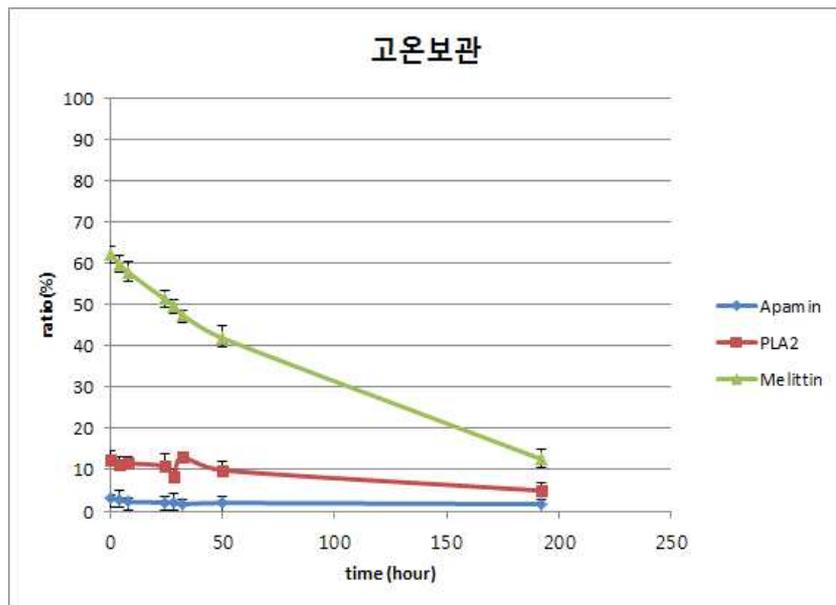


<그림 18. 다양한 조건(온도, 산화, 광선)에 보관한 정제봉독 수용액의 성분변화(b)>

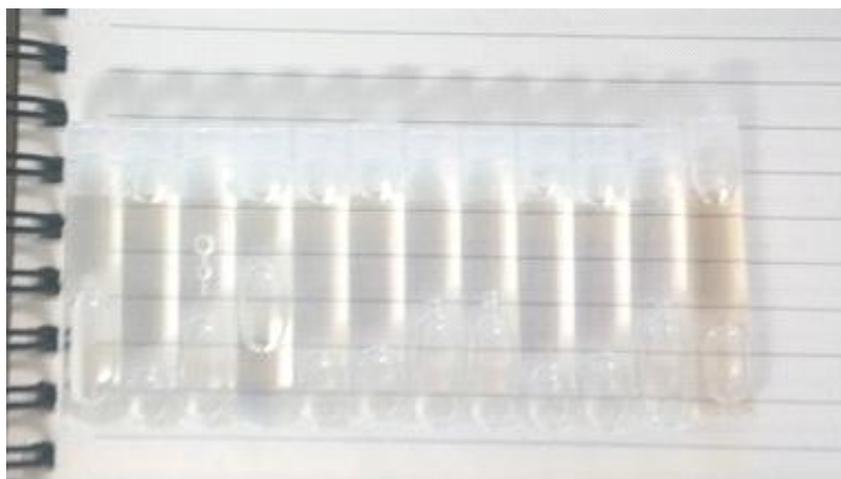


<그림 19. 정제봉독 수용액의 변성 후 침전물(상온, 질소충전-좌, 상온, 공기노출-우)>

고온에서 보관한 정제봉독 수용액은 약 10일 동안 꾸준히 감소하여 후에는 그 성분이 거의 남지 않았으며 변성과정 중 서로에게 다른 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 전체적인 성분이 꾸준히 감소하였으며 특히 melittin의 감소가 두드러지게 나타났다(그림 18(c)). 외관상으로는 침전물과 같은 이물질의 생성은 보이지 않았으나 뚜렷하게 갈변하는 모습을 보였다(그림 20).



<그림 18. 다양한 조건(온도, 산화, 광선)에 보관한 정제봉독 수용액의 성분변화(c)>



<그림 20. 고온에서 약 1주간 보관한 정제봉독 수용액의 갈변(맨 오른쪽)>

정제봉독의 수출에 적합한 저장 및 유통조건을 확립하기 위해 저장조건에 따른 성분 변화를 기간별로 측정된 결과 세 가지 주요 성분 중 melittin이 가장 큰 함량 변화를 보였다. 또한 성분변화와 함께 실온에서는 침전물이, 고온에서는 갈변현상을 보였다. 여러 가지 조건 중 건조 상태로 저온 보관했을 때 높은 안정성을 보였고 수분과 빛, 산화, 고온에서는 두드러지는 감소를 보였다. 정제봉독의 장기간 보관 및 장거리 유통 시에는 건조한 상태로 차광, 저온, 산소차단 등의 조건이 필요할 것으로 사료된다.

## 절 3 절 분리-정제봉독의 표준공정 및 제품규격 설정

### 1. 분리-정제봉독의 표준공정 및 품질관리 규정

#### 가. 목적

이 규정은 ISO 9001과 같은 품질관리의 규칙, 의약품등의 안정성·유효성심사에 관한 규정, 기능성화장품등의 심사규정을 바탕으로 의약품, 의약외품, 화장품등의 제조 위한 목적으로 실시되는 시험과정 및 결과에 대한 신뢰성을 확보하기 위하여 분리-정제봉독의 생산을 수행하는 원료수입·생산 공정·품질관리·제품포장 및 저장관리 등에 대한 준수사항을 규정함을 목적으로 한다.

#### 나. 목록

- 원재료관리
- 생산 공정관리
- 품질점검관리
- 제품포장 및 저장관리

#### 다. 정의

(1) 분리-정제봉독 품질관리 규정은 (주)청진바이오텍회사에서 봉독원재료부터 의약품, 기능성화장품원료 등의 사용목적으로 생산한 분리-정제봉독의 원재료, 생산공정, 품질점검, 포장 및 저장에 관한규칙.

(2) 원재료관리는 정제봉독의 품질보증 위하여 정제봉독에 대한 생산 공정을 수행하기 전 원재료(미 정제한 봉독, raw material )에 대한 품질관리규정.

(3) 생산 공정관리는 미 정제한 봉독원재료의 용해, 여과 건조 등이 여러 방법을 통하여 정제된 분리-정제봉독(IPBV)의 생산과정에 품질보증 위하여 공정에 관한규칙.

(4) 품질점검관리는 정제 및 분리된 분리-정제봉독에 각 유효성분의 함량을 보증위하여 고정밀도 기계를 이용하여 성분분석에 관한규칙.

(5) 제품포장 및 저장은 분리-정제봉독의 상품화를 위하여 용기병에 포장한 규칙 또한 포장 후 유효기간에 제품 저장방법에 관한 규칙.

라. 작업 표준서작성

당사의 품질관리 규정에 의거하여 분리-정제붕독을 생산함에 있어 각 단계마다 아래와 같은 작업표준서를 작성하도록 한다.

(1) 원재료관리(예시)

문서번호	QC-RMV-2014-10	붕독 원재료관리 작업표준			작성자		작성	검토	승인	표준번호	
제품명	붕독원료				작성팀	연구소					
원재료번호	XXX-YYY-0000				표준 공정 과정						
부품도번		공정NO		재질		번호	공정명			준수방안	
공정약도					1	원재료채취 및 정보 기재					
	2	원재료기준정보 기재									
	3	품질관리조사 요구문서 발송인									
	4	QC담당자 품질조사 및 결과보고									
	5	QA 및 QC결과검토									
	6	QA최종승인									
	붕독 원재료 기준관리표준										
	번호	항목	조건	확인방법	주기	준수방안					
	1	외관색상									
	2	수분함량									
3	비수용성 불순물										
4	정제붕독 함량										
5											
자주검사표준											
번호	항목	규격	검사기기	시료수	검사주기	준수방안					
0	색상										
1	수분함량										
2	불순물										
3	붕독순도										
4											
5											
6											
개정이력											
자주검사주기표			관리방법			번호	개정내용	개정일	작성팀	확인	
검사주기	주간	야간				1	신규작성	2014.10	연구소		
구분	v					2					
시간						3					
						4					

봉독 원재료 부적합 처리 통보서					담당	검토	승인
번호		작성자		작성일	2014.10.10	발송일	2014.10.10
수신처							
품명	건조 봉독						
제목	봉독 원재료 부적합 통보						
부적합 현상 및 내용		임시조치			지시사항 및 기타		
상기와 같이 품질이상이 발생되어 통보하오니 접수 후 ( )일 이내에 개선대책을 회신 바랍니다.							
재발 방지 대책					담당	검토	승인
수신		작성일					
발신		작성자					
부적합 원인		개선대책			기한	개선효과	
봉독의 주요 성분인 Melittin의 함량 미달							
유효성 확인 결과 (QA)					담당	검토	승인
					중앙연구소		
					<input type="checkbox"/> 만족	<input type="checkbox"/> 재개선	<input type="checkbox"/> 보류

(2) 생산 공정관리(예시)

분리-정제봉독 생산작업기록서							결재	작성	검토	승인
제품명	분리-정제봉독	제품번호		번호	검사특성	기준 규격	검증결과	검사방식	측정기기	비고
시행일자	2014.10.	Lot NO.		1	색상	황백색			visual	
				2	수득율	0.01% 이하				
				3	이론 수득율	42% 이상				
				4	수분함량	0.01% 이하				
				5	Apamin	2.0~4.5%				HPLC
				6	PLA2	1.0% 이하				HPLC
				7	Melittin	45~75%				HPLC
				8						
				9						
				10						
				11						
				번호	개정일자	개정내용 및 사유		확인		
1	2014.10	신규작성								
2										
3										
4										
5										

생산공정작업흐름도 (10g 기준)						결재일자	작성	검토	승인	표준번호
제품명	제품번호	Lot NO.	문서번호	시행일자	개정내용	확인	기호	개정일자	개정내용	확인
IPBV			PMC-DV-2014-00	2014.10	신규작성			2014.10	신규작성	
순번	도번	정제명	소요시간	재질	흐름도					
1	CJL-1	무게측정	1min	분말	Main Line					
2	CJL-2	용해	5mins	액체						
3	CJL-3	30KDa filtering	4hours	액체						
4	CJL-4	10KDa filtering	4hours	액체						
5	CJL-5	1KDa filtering	12hours	액체						
6	CJL-6	영하80도냉동	20hours	고체						
7	CJL-7	동결건조	5days	분말						
8	CJL-8	분석	5hours	액체						
9	CJL-9	보관	—	분말						

(3) 품질점검관리(예시)

 (주)정진바이오텍	문서번호 (Document No.)	XX-00-0000	제품번호 (Production NO.)	XX000
	시행일자 (Effective Date)		로트번호 (Lot NO.)	DV-000
<b>제품 품질 점검결과 보고서</b>				
제목(Title) :				

작성자(Prepared by)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명(Signature)

검토자(Reviewed by)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명(Signature)

승인자(Approved by)

부서(Dept.)	직위(Position)	이름(Name)	서명(Signature)

 (주)정진바이오텍	문서번호 (Document No.)	QC-00-0000
	시행일자 (Effective Date)	
<b>제품 품질 점검결과 보고서</b>		
제목(Title) :		

점검시료 사항

시료 제공회사	XXXXX	제품번호 (Production NO.)	XX000
점검자	XXXXX	로트번호 (Lot NO.)	DV-000
점검내용			

점검준비:

- 표준액 : Melittin, Apamin, PLA<sub>2</sub> 1mg을 증류수 10ml에 녹여서 사용 (Melittin(91.8%), Apamin(99.9%), PLA<sub>2</sub>(87%))
- 검액 : 시료 10mg을 증류수 10ml에 녹여서 사용

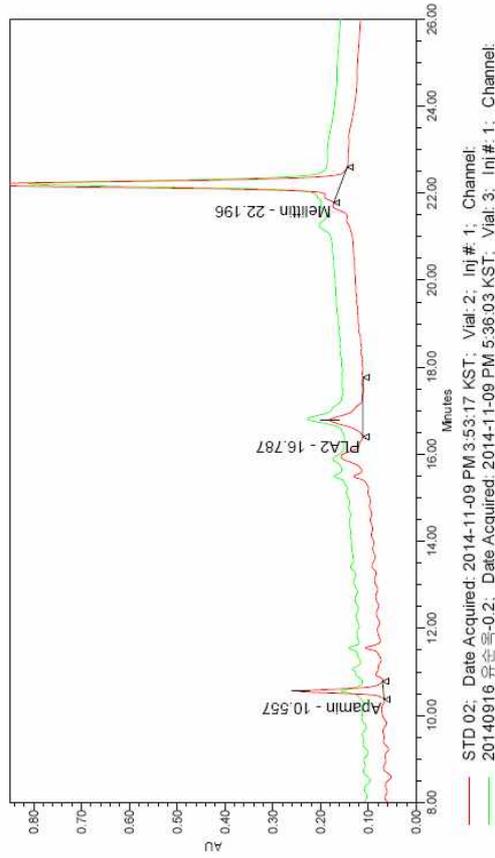
점검결과:

	Melittin	Apamin	PLA <sub>2</sub>
Ku	60.37%	5.40%	22.53%
Um	48.43%	3.92%	16.14%

계산식:

$$\text{합량(\%)} = \frac{\text{표준품채취량(mg)} \times \text{표준품순도(\%)}}{100} \times \frac{\text{검액의피크면적}}{\text{표준액의피크면적}} \times \frac{100}{\text{검체의채취량(mg)}}$$

SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	20140916 유순옥-0.2, STD 02
Sample Type:	Unknown, Standard
Vial:	3, 2
Injection #:	1
Injection Volume:	30.00, 20.00 ul
Run Time:	50.0 Minutes
Date Acquired:	2014-11-09 PM 3:53:17 KST, 2014-11-09 PM 5:36:03 KST
Date Processed:	2014-11-22 PM 3:55:18 KST, 2014-11-22 PM 3:57:05 KST
Acquired By:	System
Sample Set Name:	2014_11_09
Acq. Method Set:	BV_IM_An_0917
Processing Method:	2014_11_10
Channel Name:	486
Proc. Chnl. Descr.:	

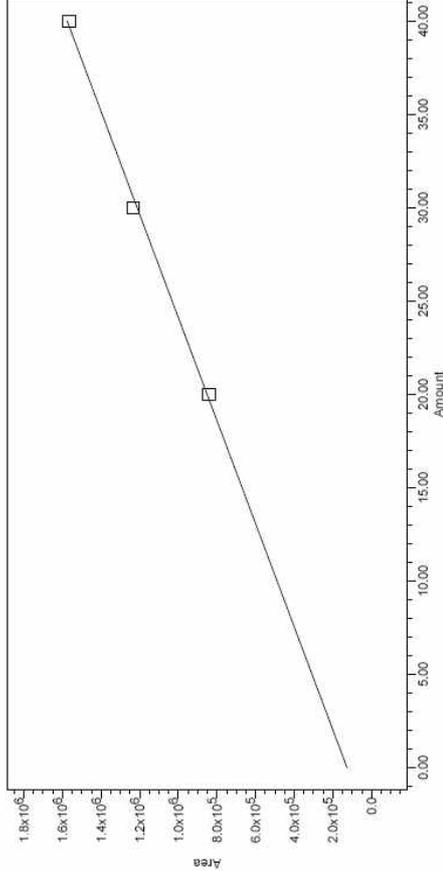


Peak Results		
RT	Area	% Area
1	10.557	1232785
2	10.564	439709
3	16.787	1381822
4	16.816	1382935
5	22.166	8408400
6	22.213	6843605

Reported by User: System  
 Report Method: Sample and STD  
 Report Method ID: D6797  
 Page: 1 of 1

Project Name: Bee venom 1  
 Date Printed: 2014-11-2  
 오후 4:03:02 Asia/Seoul

Processing Method:	2014_11_10	System:	Waters 1525u System
Processing Method ID:	6609	Channel:	486
Calibration ID:	6791	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Calibrated:	2014-11-22 PM 3:57:16 KST		



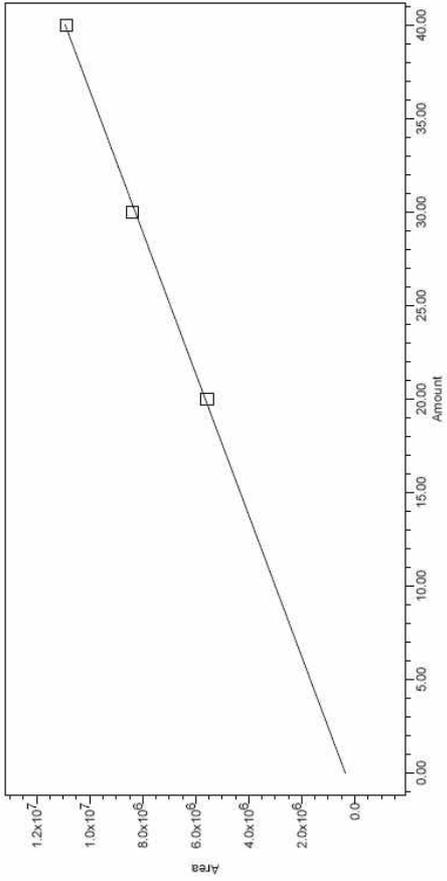
Peak Name: Apamin; RT: 10.549; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 6792; R: 0.996905; R<sup>2</sup>: 0.997811; Weighting: None; Equation:  $Y = 3.62e+004 X + 1.26e+005$ ; Normalized Intercept/Slope: 0.116034; RSD(E): 1.978248

Peak: Apamin

Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1 STD 01	6790	Apamin		20.000	841040.000	19,730	-1.35	No	No
2 STD 02	6795	Apamin		30.000	1232785.000	30,541	1.80	No	No
3 STD 03	6796	Apamin		40.000	1565742.500	39,730	-0.68	No	No

Reported by User: System  
 Report Method: LC Calibration Report  
 Report Method ID: 015  
 Page: 1 of 3

Project Name: Bee venom 1  
 Date Printed: 2014-11-22  
 오후 3:59:13 Asia/Seoul

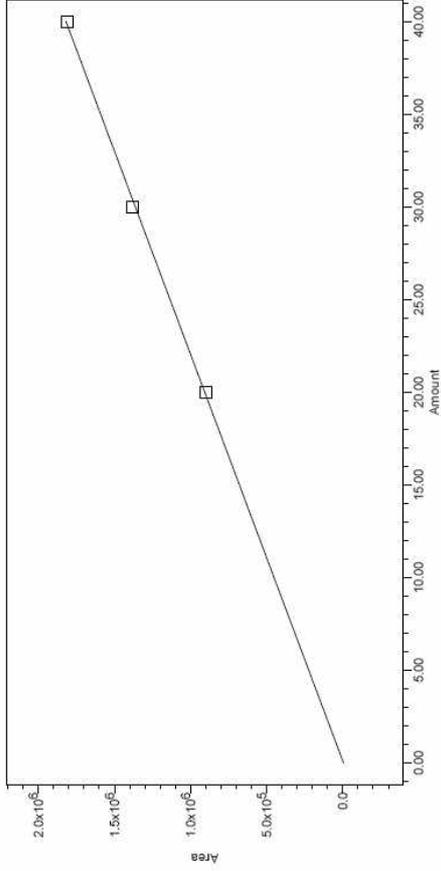


**Peak: Melittin**

Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1 STD 01	6790	Melittin		20.000	5579008.250	19.768	-1.16	No	No
2 STD 02	6795	Melittin		30.000	8406430.224	30.465	1.55	No	No
3 STD 03	6796	Melittin		40.000	10865378.298	39.768	-0.56	No	No

Reported by User: System  
 Report Method: LC Calibration Report  
 Report Method ID015  
 Page: 3 of 3

Project Name: Bee venom 1  
 Date Printed: 2014-11-22  
 오후 3:59:13 Asia/Seoul



**Peak: PLA2**

Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1 STD 01	6790	PLA2		20.000	896809.667	19.787	-1.06	No	No
2 STD 02	6795	PLA2		30.000	1381821.829	30.425	1.42	No	No
3 STD 03	6796	PLA2		40.000	1808677.167	39.787	-0.53	No	No

Reported by User: System  
 Report Method: LC Calibration Report  
 Report Method ID015  
 Page: 2 of 3

Project Name: Bee venom 1  
 Date Printed: 2014-11-22  
 오후 3:58:13 Asia/Seoul

(4) 제품포장 및 저장관리

제품명	분리-정제분독	완제품 포장및 저장 작업표준			작성자	작성	검토	승인	표준번호		
제품번호		공정명	유리병 멸균	설비명	작성팀	연구소					
로트번호		공정NO		재질	표준 공정 과정						
부품도번		공정NO		재질	번호	공정명	준수방안				
공정약도					1	병 외부 입고					
					2	1차 세척					
					3	1차 자연건조					
					4	2차 Dry oven 130도에서 30분 건조					
					5	3차 자외선 멸균					
					6	100mg 소분					
					7	2단 마개 작업					
					8	보관					
이상발생시조치					조건관리표준						
1. 이상 발생 시 작업을 정지시키고 상급자 지시에 따른다. 2. 부적합발생 시 "부적합 처리 절차"에 따른다.					번호	항목	조건	확인방법	주기	준수방안	
					1						
					2						
					3						
					4						
작업시 주의 사항					자주검사표준						
1. 신입사원은 반드시 설비작동요령 및 품질관리 요소 교육 할 것. 2. 이물질 관련 혼입방지를 작업 전 확인할 것.					번호	항목	규격	검사시기	시료수	검사주기	준수방안
					0	외관		육안			
					1	치수		저울			
					2	수량		육안			
자주검사주기표					관리방법						
검사주기	주간	야간				번호	개정내용	개정일	작성팀	확인	
구분	v					1	신규작성	2014.10.	연구소		
시간						2					
						3					

2. 분리-정제분독의 제품규격 설정

개발된 분리-정제분독에 대한 제품규격은 다음과 같다. 이를 바탕으로 시험성적서 (Certificate of analysis)를 작성하여 제품판매 시 첨부한다.

Standard	Specification	Method
Physical standard		
Appearance	Clear powder	Visual
color	Beige	Visual
Solubility	Soluble in water	
Density	1.1~1.4	
pH Value	5.1~5.5	Orion pH meter
Chemical Assay		
Melittin	45~75 %	HPLC
Apamin	2.0~4.5 %	HPLC
PLA <sub>2</sub>	≤1.0 %	HPLC
Heavy Metals	≤1.0 ppm	AOAC
Total Ash	≤4.0 %	AOAC
Microbial Assay		
Aerobic Plate Count	Negate	Petrifilm 3M
Mold & Yeast	Negate	Petrifilm 3M
<i>S. aureus</i>	Negate	Petrifilm 3M

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product :	<b>Isolated and Purified Bee Venom</b>		
Product Code :	IPBV		
Batch No. :	201410		
Lot No. :	20141010		
Date of Manufacture :	2014-10-10		
Date of Analysis :	2014-10-19	Certified By :	_____
Country of Origin :	Republic of Korea	Date of Issue :	2014-10-22

Test	Specification	Method	Result
<b>Physical Assay</b>			
Appearance	Clear powder	Visual	Pass
color	Beige	Visual	Pass
Solubility	Soluble in water		Pass
Density	1.1~1.4		1.13
pH Value	5.1~5.5	Orion pH meter	5.26
<b>Chemical Assay</b>			
Melittin	45~75 %	HPLC	69.38%
Apamin	2.0~4.5 %	HPLC	4.36%
PLA <sub>2</sub>	≤ 1.0 %	HPLC	Conform
Heavy Metals	≤ 1.0 ppm	AOAC	Conform
Total Ash	≤ 4.0 %	AOAC	Conform
<b>Microbial Assay</b>			
Aerobic Plate Count	Negate	Petrifilm 3M	Conform
Mold & Yeast	Negate	Petrifilm 3M	Conform
<i>S. aureus</i>	Negate	Petrifilm 3M	Conform
<b>Endotoxin test*</b>	< 0.25 EU/mL	EndoSafe®-PTS	Conform

The Endosafe®-PTS Endotoxin test utilizes existing FDA-licensed LAL formulation.



#309 HBI, Hanyang Univ., 1271 Sa3-Dong, Sangrok-Gu, Ansan-Si, Gyeonggi-Do, Korea

Phone: 82. 31. 400. 3707 FAX: 82. 31. 400. 3709

E-mail: younan99@biovenom.com Website: www.biovenom.com

## 절 4 절 정제붕독과 분리-정제붕독의 유효성 연구

### 1. 정제붕독과 분리-정제붕독의 항산화 효능

#### 가. 재료 및 방법

항산화 측정 시험은 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 사용하는 방법<sup>6)</sup>을 참고하여 측정하였다. 보라색의 DPPH 용액과 시료와 만나 라디칼이 소거되어 탈색되는 정도로 항산화 물질의 라디칼 소거능을 통하여 활성을 측정한다. 0.05~3 mg/mL의 시료에 0.5 mL DPPH 용액(in 100% Ethanol)을 가하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 조사하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)에 의한 환원력으로 항산화능을 표시하였다. 양성대조군으로 Ascorbic acid를 사용하였으며 시료의 항산화능을 비교하기 위해 EDA가 50%에 이르는데 필요한 시료의 양인 IC<sub>50</sub>값을 확인하였다.

$$\text{전자공여능 (EDA \%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 시료 무침가군의 흡광도

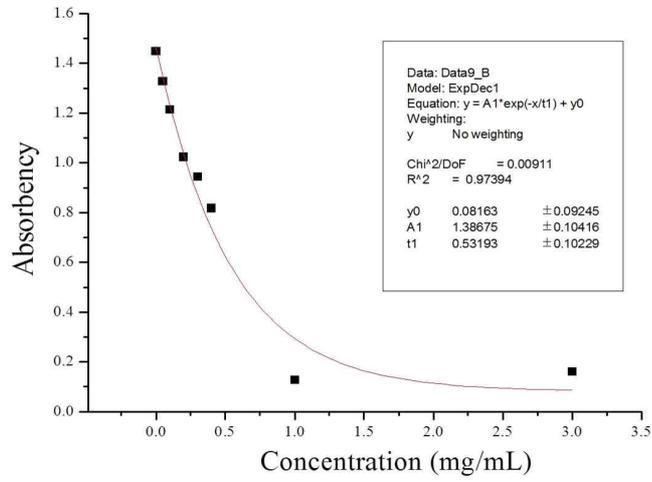
B: 시료 침가군의 흡광도

#### 나. 결과 및 고찰

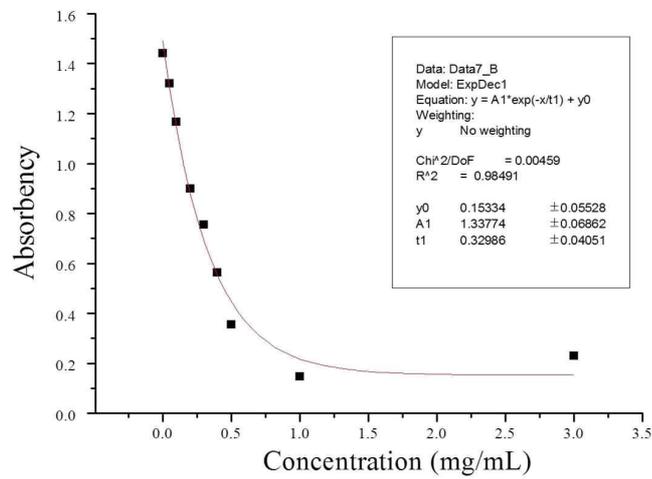
DPPH 라디칼을 이용한 항산화 효능 평가는 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용하는 방법이며, DPPH alcohol 용액은 517 nm에서 가장 강한 UV 흡수가 있으며 실온에서 1시간 정도는 매우 안정한 유리 라디칼이다.

단일 성분 대조군으로는 ascorbic acid, 천연추출물로는 *Ilex Kudincha* 조추출물과 비교하였다. Ascorbic acid는 신체의 활성산소로부터 보호하는 항산화 물질인 비타민C의 일종이며, *Ilex Kudincha*는 중국에서 녹차대용으로 쓰이는 쿠딩차로 뛰어난 항산화 효능을 가지고 있다. 붕독의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 각 시료의 농도가 증가할수록 전자공여능 비례하는 경향을 보였으며 정제붕독, 분리-정제붕독의 IC<sub>50</sub>값은 각각 0.53 mg/mL, 0.32 mg/mL으로 나타났다. Ascorbic acid와 *Ilex Kudincha* 조추출물의 IC<sub>50</sub>값은 각각 13.20 µg/mL, 0.36 mg/mL이다(그림 21)<sup>9)</sup>. 붕독 각 시료 또한 천연 추출물이므로 *Ilex Kudincha* 조추출물과 흡사한 결과로 보아 항산화 효능을 천연소재로 증명된다.

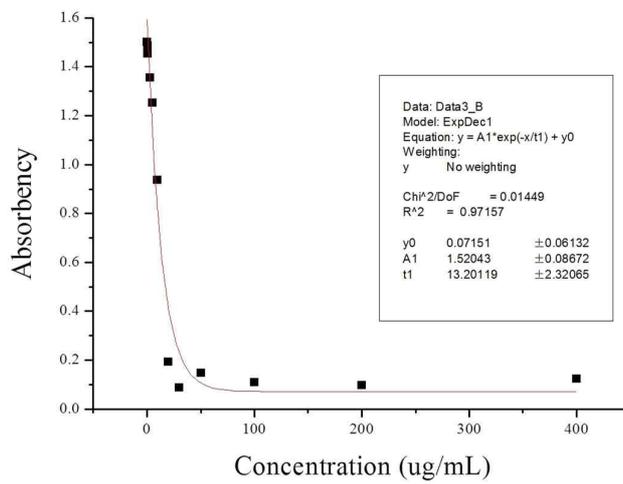
### DPPH radical scavenging of PBV



### DPPH radical scavenging of IPBV



### DPPH radical scavenging of Ascorbic acid



<그림 21. 정제봉독, 분리-정제봉독, Ascorbic acid의 DPPH 자유라디칼 소거능>

## 2. 정제봉독과 분리-정제봉독의 항균 효능

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 사용균주

실험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* KCCM 40253 (TSB/TSA, 37°C), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (TSB/TSA, 37°C), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (TSB/TSA, 37°C), *Escherichia Coli* ATCC 8739 (LB/LB Agar, 37°C), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (TSB/TSA, 37°C), *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (RCM/RCMA, 37°C, 72시간, 혐기성), *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (BHI/BHIA, 37°C, 72시간)을 한국미생물보존센터(KCCM; Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받아 사용하였다.

#### (2) Agar well diffusion assay

실험균주를 액체배지(broth)에 하루 배양한 후 활성화시켰다. 660 nm에서 실험균주의 흡광도 값이 0.5~0.7으로 확인한 후, 배양한 시험균주를 준비한 agar에 100 µL 분주한 후 도말하였다. Cork-boker를 이용하여 agar에 well을 뚫고 농도별로 시료를 80 µL loading 한 다음 37°C에서 18~24시간 배양한 후 균억제대(clear zone)의 크기를 관찰하였다.

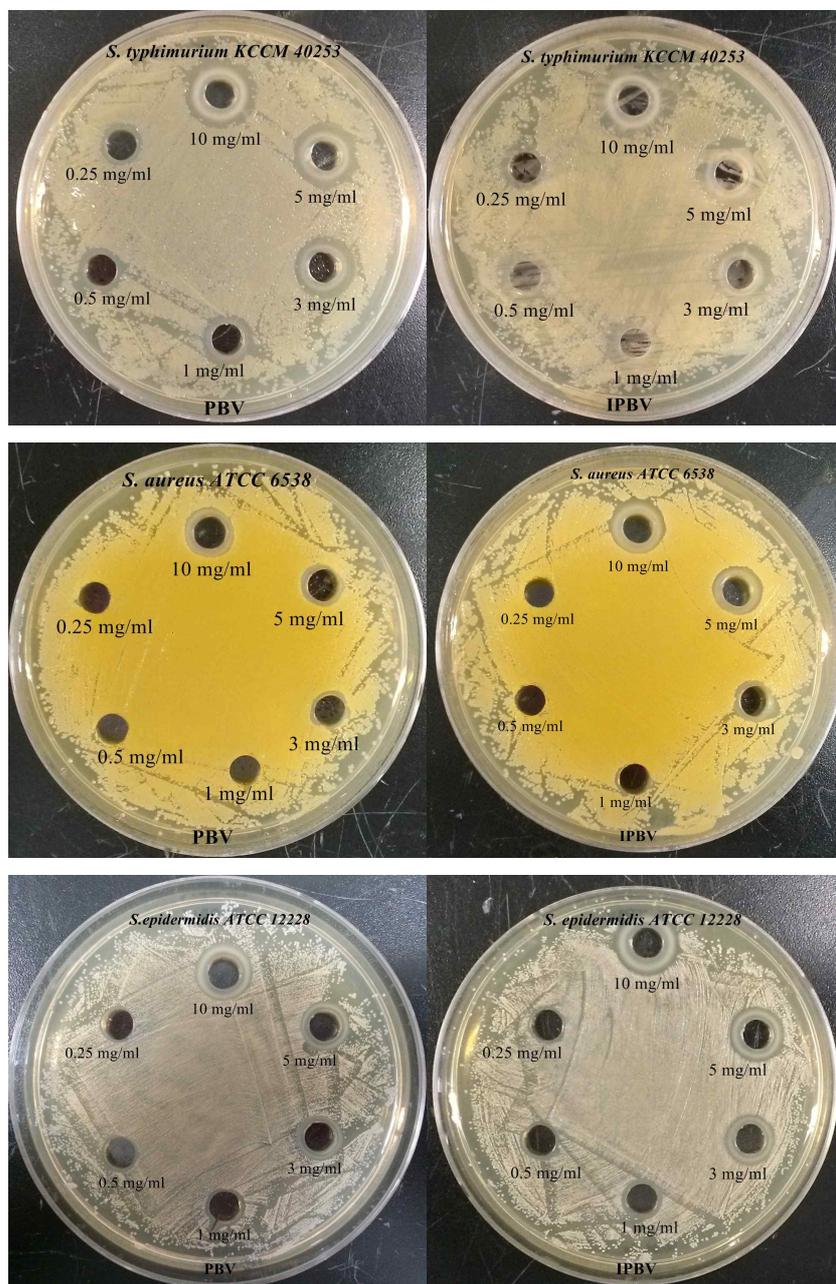
#### (3) 최소억제발육 농도검사법(MIC, Minimum inhibitory concentration)

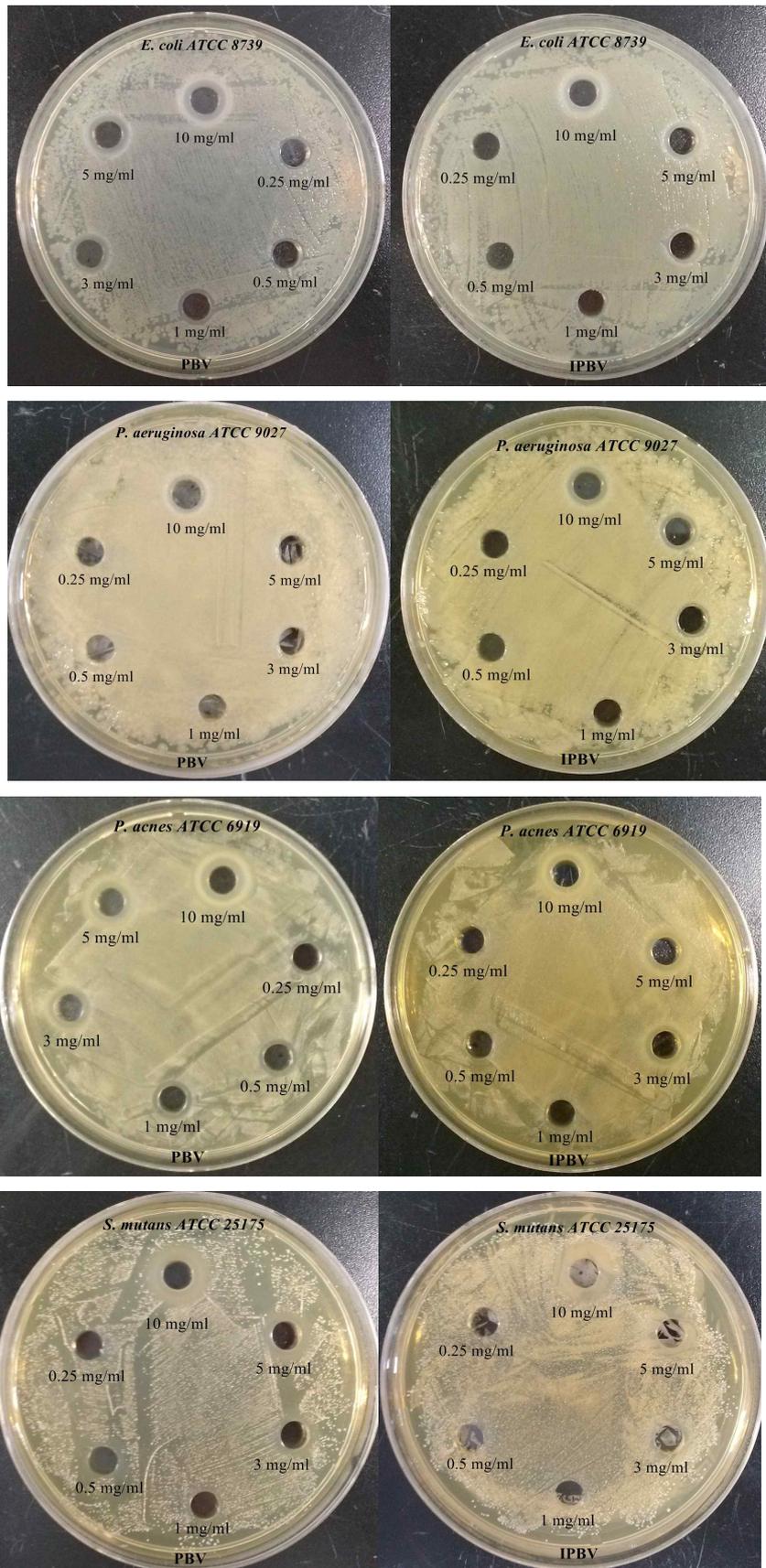
정제봉독과 분리-정제봉독을 준비된 broth에 넣고 희석 단계를 거쳐 다양한 농도의 시료를 준비하였다. 미리 배양된 실험균주의 농도를 약 4~5 Log CFU/mL로 하여 준비된 broth와 시료혼합액에 접종시켰다. 37°C에서 24시간 배양한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 희석배수의 시료와 control의 흡광도가 같은 결과를 나타내는 최소농도를 MIC로 결정하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) Agar well diffusion assay를 통한 항균 효능 비교

Agar well diffusion 법에 의한 정제봉독과 분리-정제봉독의 항균성 시험결과는 다음과 같다(그림 22, 표 11). 정제봉독과 분리-정제봉독 모두 3 mg/mL 이상의 농도에서 모든 균에 대한 항균 효능을 보였으며 특히 *S. typhimurium*과 *S. mutans*에서 가장 높게 나타났다. *P. aeruginosa*와 *S. aureus*에서 가장 낮은 항균 효능을 보였으며 1 mg/mL 이하의 농도에서는 정제봉독과 분리-정제봉독 모두 항균 작용이 나타나지 않았다.





<그림 22. Agar diffusion assay를 통한 정제붕독과 분리-정제붕독의 항균효능>

<표 11. 정제봉독과 분리-정제봉독의 clear zone 크기>

단위: mm

농도(mg/mL)		10	5	3	1	0.5	0.25
ST	PBV	18	16	15	13	12	10
	IPBV	21	16	14	12	12	12
SA	PBV	11.5	9.5	9	8	8	8
	IPBV	14	12.5	9.5	8	8	8
SE	PBV	13	11	11	9	8.5	8.5
	IPBV	15	13	12	9	8.5	8.5
EC	PBV	13	11.5	11	9	8.5	8.5
	IPBV	10	9.5	8.5	8	8	8
PAe	PBV	9.5	9	8.5	8	8	8
	IPBV	10	9.5	8.5	8	8	8
PAc	PBV	15	12.5	11	10	9	8.5
	IPBV	14	10	10	8.5	8.5	8.5
SM	PBV	18	16	15	11	10	9
	IPBV	18	16	15	12	10	9

(2) 최소억제발육 농도검사법(MIC)을 통한 항균 효능 비교

알레르기 유발성분을 분리 한 분리-정제봉독과 정제봉독의 MIC와 MBC의 값은 <표 12>와 같다. *E. Coli*, *S. typhimurium*, *S. mutans*는 정제봉독에서 >64 µg/mL의 MIC를 보였고, *S. aureus*의 경우 >16 µg/mL의 MIC를 보였다. 저해율 역시 98% 이상을 보여 높은 항균효과를 볼 수 있었다. 분리-정제봉독의 MIC값은 *S. aureus*와 *S. typhimurium*의 경우 각각 >8 µg/mL, >32 µg/mL의 MIC 농도를 보였으며 *E. Coli*는 128 µg/mL 이하로 약간 높은 농도를 보였으나, 분리 전과 후 모두 네 가지 균에 대한 항균작용을 보였다.

<표 12. 정제봉독과 분리-정제봉독의 MIC 및 MBC>

PBV	MIC (µg/mL)	inhibitory rate (%)	MBC (µg/mL)
<i>E. Coli</i>	>64	98.3	128
<i>S. typhimurium</i>	>64	99.9	64
<i>S. aureus</i>	>16	99.5	64
<i>S. mutans</i>	>64	99.9	128
IPBV	MIC (µg/mL)	inhibitory rate (%)	MBC (µg/mL)
<i>E. Coli</i>	>128	99.9	512
<i>S. typhimurium</i>	>8	99.5	32
<i>S. aureus</i>	>32	99.9	128
<i>S. mutans</i>	>64	98.3	128

### 3. 정제봉독과 분리-정제봉독의 알레르기 유발비교

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 세포배양

실험에 사용된 세포는 RBL-2H3 cell(rat basophilic leukemia)로 비만세포의 일종이며 ATCC(American Type Culture Collection) 세포주 은행으로부터 분양 받아 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic(1X)이 함유된 DMEM을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 실험과정의 모든 cell은 subculture passages 10 이하의 cell을 사용하였으며 80~90%의 confluency에서 실험하였다.

##### (2) 세포독성 평가

세포주는 비만세포의 일종인 RBL-2H3 cell(rat basophilic leukemia)을 American type culture collection(ATCC)으로부터 분양 받아 이용하였다. Petri plate 바닥에 접종한 후 10% FBS와 1% antibiotix-antimycotic(1X)이 함유된 DMEM을 넣고 37°C를 유지하여, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시료에 의한 RBL-2H3 cell에 미치는 영향은 MTT assay 방법<sup>5)</sup>을 참고하여 평가하였다. 배양한 RBL-2H3 cell을 96 well plate에 2.0×10<sup>5</sup> cells/well으로 seeding 하여 24시간 배양한다. 여러 농도(0.1~50 µg/mL)의 정제봉독 및 분리-정제봉독을 처리하여 18~20시간 배양한 후 MTT 용액(5 mg/mL in D-PBS) 10 µL씩 가하여 4시간 동안 환원반응을 유도시키고 DMSO로 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포 생존률(cell viability)을 평가하기 위하여 90% 생존 농도를 확인한다.

##### (3) Histamine assay를 통한 항염효능 비교

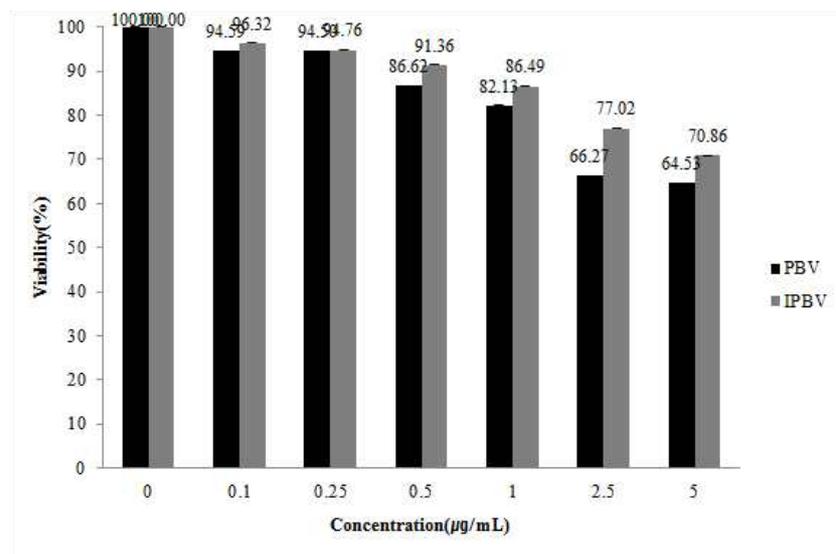
시료에 의한 RBL-2H3 cell에 미치는 영향은 histamine assay을 참고하여 평가하였다<sup>7,8)</sup>. 배양된 RBL-2H3 cell을 96-well plate에 2.0×10<sup>5</sup> cells/well로 seeding하여 24시간 배양한 후, 농도가 0~5 µg/mL인 시료를 전처리하여 1시간 배양하였다. Control을 제외한 모든 well에 compound 48/80의 최종농도가 10 µg/mL으로 처리하여 20분간 배양한 후 현미경으로 세포 탈과립을 확인하였다. 배양액(상층)을 100 µL씩 취하여 histamine assay 용 96-well plate에 분주 한 후, histamine enzymatic assay kit를 이용하여 kit 시약 100 µL씩 분주하여 mix 해주었다. 10분간 실온에서 반응 시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 나. 결과 및 고찰

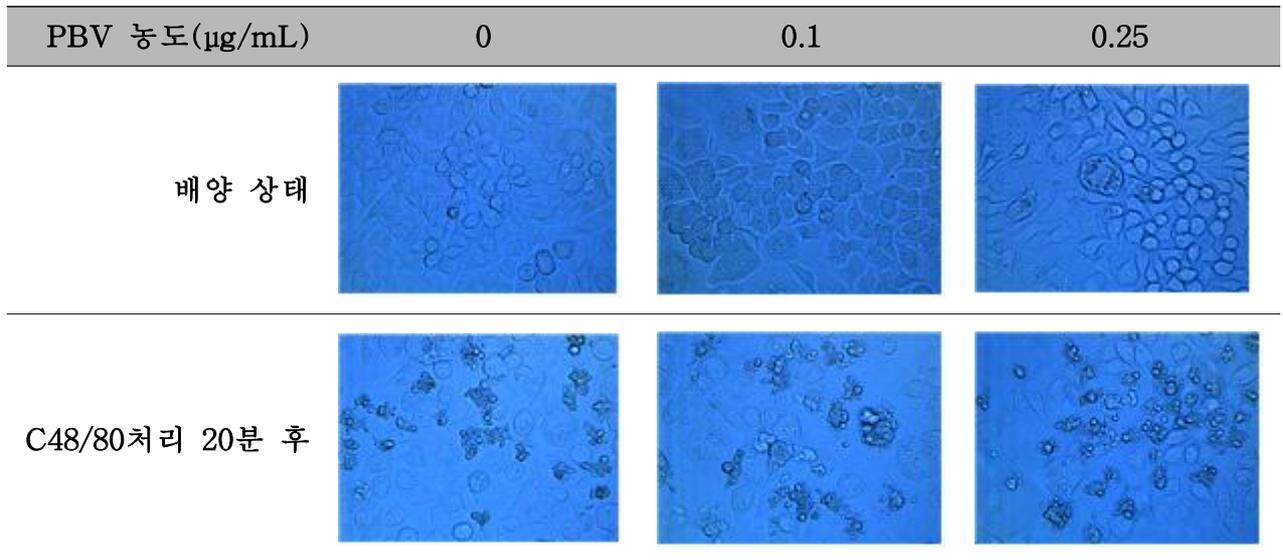
비만세포는 히스타민을 포함하여 다양한 화학매개 물질이 함유된 과립으로 채워져 있는데 외부자극에 의해 탈과립화하여 유리됨으로써 알레르기 반응을 유도하게 된다. 따라서 비만세포의 탈과립에 대한 시료의 탈과립 정도를 확인하고 히스타민 농도 변화를 확인하였다.

항알레르기 효능을 측정하기 앞서 RBL-2H3 cell의 독성을 살펴보기 위해 세포 생존률을 확인하였다(그림 23). 측정 결과 90%이상 생존 가능한 농도는 정제봉독, 분리-정제봉독 각각  $0.4 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.64 \pm 0.012 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. RBL-2H3 cell의 탈과립 현상을 현미경으로 관찰하였다(그림 24). 탈과립 유도제인 compound 48/80을 처리한 RBL-2H3 cell은 세포질 내 과립이 세포표면으로 표출되어 흩어지는 탈과립 현상을 관찰할 수 있었는데 정제봉독 농도가 높을수록 과립현상이 두드러지게 나타났다.

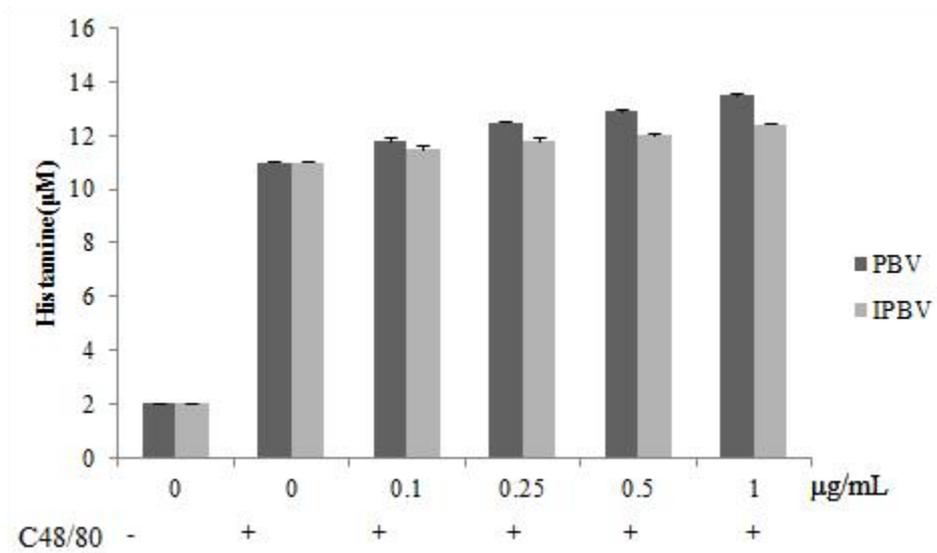
RBL-2H3 cell에 탈과립 유도제인 compound 48/80을 처리함으로써 histamine의 분비를 일으켰으며, 시료의 처리로 인하여 histamine의 분비를 증가시켰다(그림 25). 결과적으로 시료의 농도가 증가함에 따라 histamine 분비량이 증가하는데 정제봉독에 비해 분리-정제봉독이 더 근소한 차이로 증가함을 확인 할 수 있다. 이에 따르면 정제봉독의 알레르기 유발성분을 제거한 분리-정제봉독은 정제봉독보다 histamine 분비량이 적은 것으로 보아 알레르기성은 감소되었음을 확인 할 수 있다.



<그림 23. RBL-2H3 cell에 대한 정제봉독과 분리-정제봉독의 MTT assay>



<그림 24. 정제붕독 처리 후 탈과립된 RBL-2H3 cell>



<그림 25. 정제붕독과 분리-정제붕독의 Histamine assay>

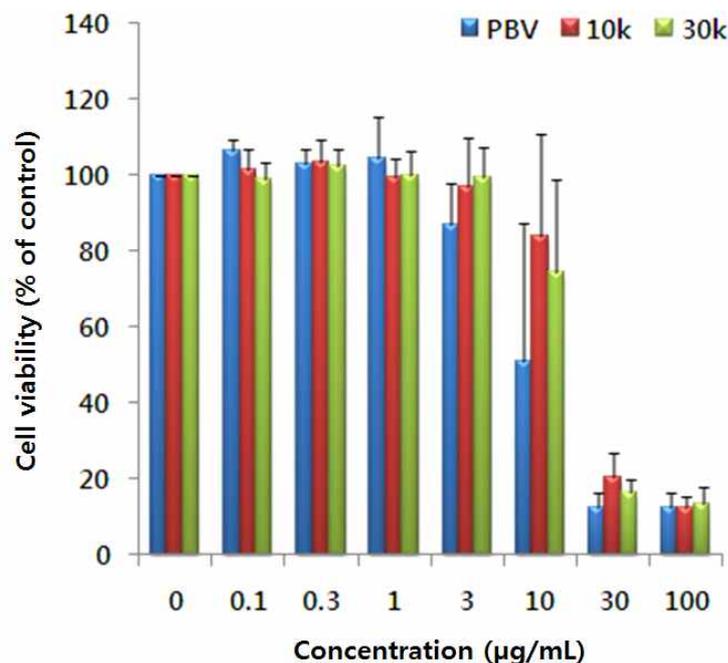
#### 4. 정제봉독과 분리-정제봉독의 항염 효능 (위탁)

##### 가. 세포독성 평가

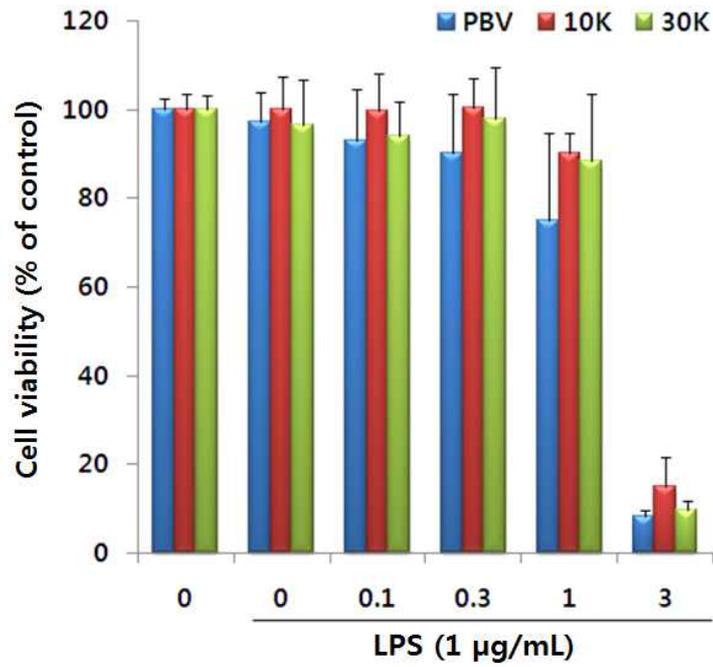
항염증 효과를 측정하기 위해 앞서 먼저 대식세포인 RAW 264.7의 독성을 알아보기 위해서 세포에 정제봉독, 분리-정제봉독 10 KDa, 분리-정제봉독 30 KDa를 처리 후 세포생존율을 확인하였다(그림 26). 결과, 세포의 반이 죽는 농도인 LC<sub>50</sub>값이 정제봉독에서는 11.9 µg/mL, 분리-정제봉독 10 KDa에서는 20.0 µg/mL, 분리-정제봉독 30 KDa에서는 17.4 µg/mL로 나타나 대식세포에서 세포독성은 정제봉독, 분리-정제봉독 30 KDa, 분리-정제봉독 10 KDa 순서로 강한 것으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 RAW 264.7 세포에서 독성이 없는 농도인 3 µg/mL를 최대농도로 잡고 항염증 시험을 실시하였다.

##### 나. 항염 효과 측정

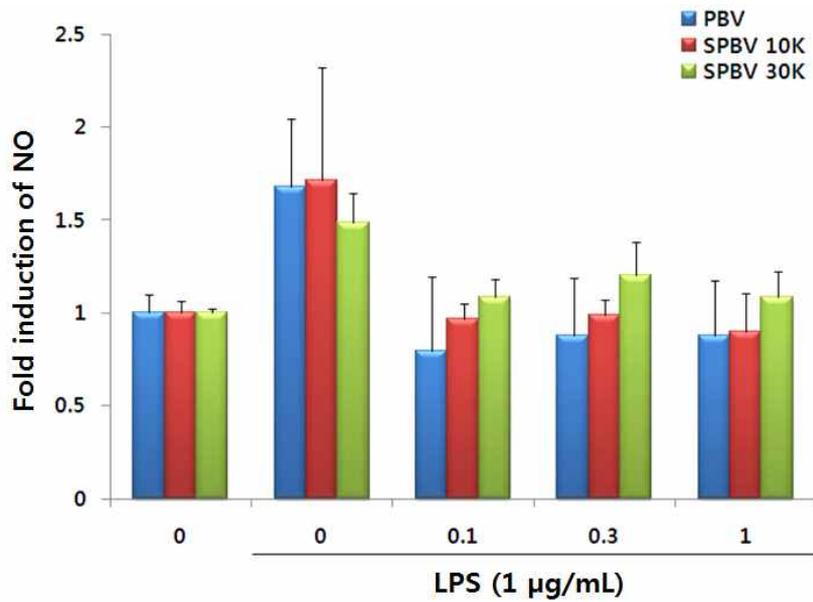
대식세포의 염증유발물질인 LPS를 처리한 후, 정제봉독, 분리-정제봉독 10 KDa 및 분리-정제봉독 30 KDa를 처리하여 세포독성을 측정한 결과(그림 27), 독성이 없는 것을 확인한 상태에서 iNOS를 측정하여 염증을 확인하였다. 그 결과, LPS 처리군에서는 유의성 있게 NO가 증가하였으며 정제봉독, 분리-정제봉독 10 KDa 및 분리-정제봉독 30 KDa 모두에서 NO가 감소하였다. 이 결과로 미루어 볼 때, LPS로 인해 증가한 염증이 정제봉독, 분리-정제봉독 10 KDa 및 분리-정제봉독 30 KDa 모두에서 감소한다는 것을 알 수 있다. 특히, 정제봉독에서 많이 감소하여 항염증작용이 가장 강하다는 것을 알 수 있었으며, 그 다음으로 분리-정제봉독 10 KDa, 분리-정제봉독 30 KDa 순인 것을 알 수 있었다(그림 28).



<그림 26. 대식세포 RAW 264.7세포에서 봉독의 독성>



<그림 27. 대식세포 RAW 264.7세포에서 LPS와 봉독 처리의한 세포독성>



<그림 28. 대식세포 RAW264.7세포에서 봉독과 LPS 처리후 NO 측정 >

## 5. 정제붕독과 분리-정제붕독의 미백 효능

### 가. 재료 및 방법

Tyrosinase는 L-tyrosine이 L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)를 거쳐 L-dopaquinone으로 전화하는 산소에 의한 산화반응을 촉매하는 효소로 멜라닌(melanin) 색소의 형성에 관여한다. 피부가 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 멜라닌이 합성되어 피부노화가 촉진된다. Tyrosinase 활성 저해 측정의 방법을 참고하여 측정하였다. 0.05~10 mg/mL의 시료에 2.5 mM tyrosine 용액(in 0.1 M PBS buffer, pH6.8)과 2100 U/mL tyrosinase(in 0.1 M PBS buffer, pH6.8)을 가하여 37°C에서 15분간 암반응한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해활성을 비교하였다. 각 시료의 저해율이 50%에 이르는 데 필요한 시료의 양인 IC<sub>50</sub>값을 확인하였으며 일정 시간 동안의 변화를 위하여 IC<sub>50</sub>값보다 높은 농도로 kinetic assay를 실시하였다.

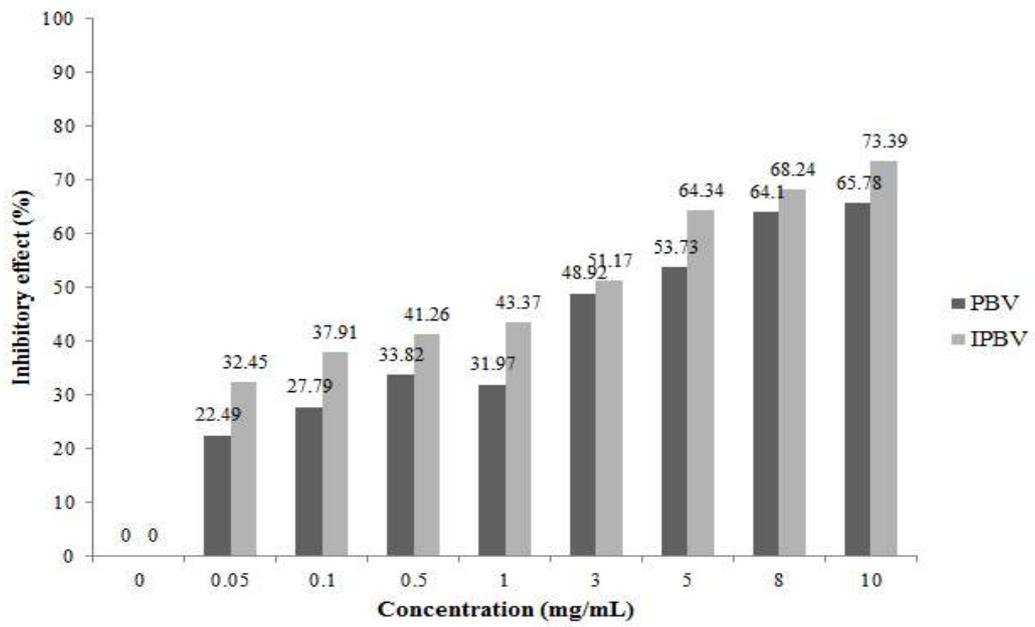
$$\text{저해율(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 시료 무침가군의 흡광도

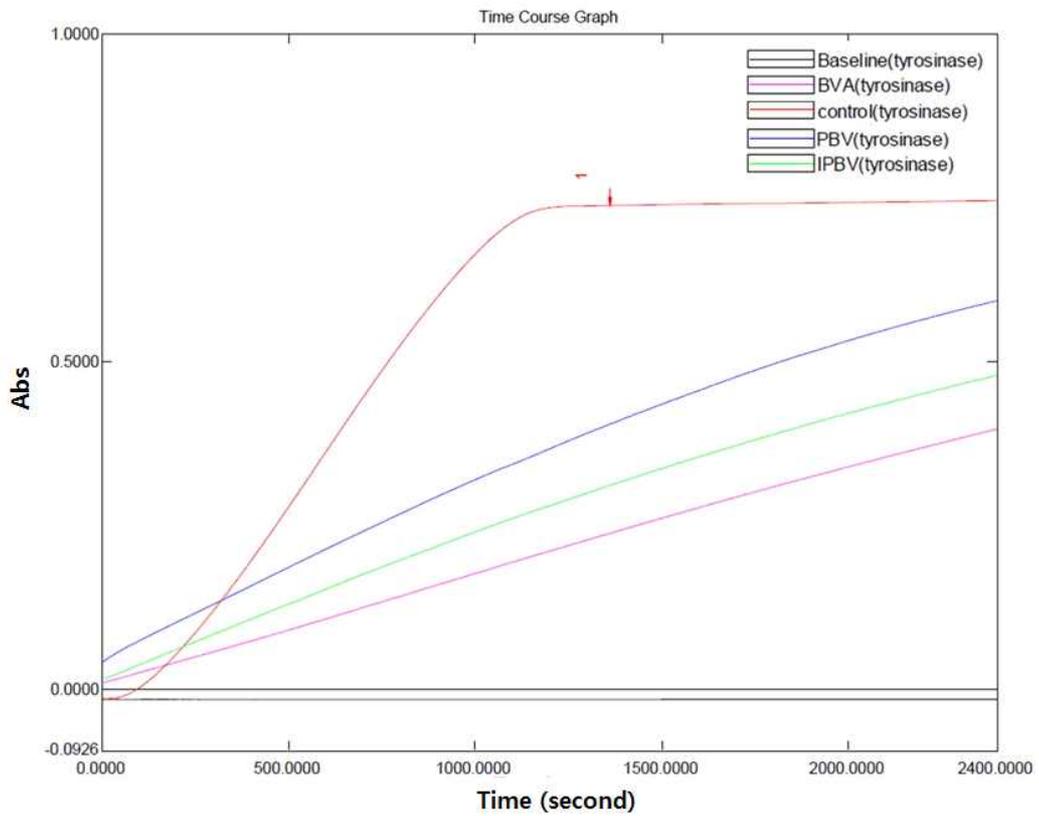
B: 시료 침가군의 흡광도

### 나. 결과 및 고찰

Tyrosinase의 활성억제실험을 통하여 피부 미백 효과를 측정하였다(그림 29). PBV, IPBV의 IC<sub>50</sub>값은 각각 4.65±0.012 mg/mL, 2.93±0.01 mg/mL이었다. 또한, 일정시간에 따라 효소의 활성을 억제하는 정도를 분석하기 위하여 각각의 시료를 IC<sub>50</sub>값보다 큰 5 mg/mL로 하고 kinetic assay를 총 2,400초 동안 진행하였으며 <그림 30>와 같다. 1,200초에서 control이 최대 활성을 나타내었고 정제붕독과 분리-정제붕독 모두 control에 비해 현저하게 효소 활성을 억제하는 것이 확인되었다. 붕독은 고유의 색(황갈색)을 가지고 있기 때문에 흡광도를 측정할 경우 고유 색상으로 인하여 초기부터 높은 흡광도의 변화가 나타날 수 있으며, 이러한 특성을 고려하면 실제로는 더 큰 효소 활성 억제효과를 나타낼 것으로 판단된다.



<그림 29. 정제봉독과 분리-정제봉독의 tyrosinase 저해 활성>



<그림 30. Kinetic assay를 이용한 정제봉독과 분리-정제봉독의 tyrosinase 저해활성>

## 6. 정제봉독과 분리-정제봉독의 주름개선 효능

### 가. 재료 및 방법

인체의 중성구, 과립구에 존재하는 elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는 중요한 기질 단백질인 elastin의 분해 효소이며, 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 또한 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 활성이 높아져 조직파괴의 직접적인 원인이 되며, 피부의 주름 및 탄력성 손실 등을 유발한다. 따라서 elastase의 활성을 저해하는 방법을 참조하여 효능을 비교하였다<sup>9)</sup>. 각각의 0.05~5 mg/mL의 시료에 0.1 mg/mL N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide 용액(in 0.05M Tris HCl buffer, pH8)과 0.1 mg/mL elastase 용액을 가하여 25°C에서 15분간 반응시킨 후 380 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 저해율이 50%에 이르면 필요한 시료의 양인 IC<sub>50</sub>값을 확인하였으며 일정 시간 동안의 변화를 확인하기 위하여 IC<sub>50</sub>값 보다 높은 농도로 kinetic assay를 실시하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

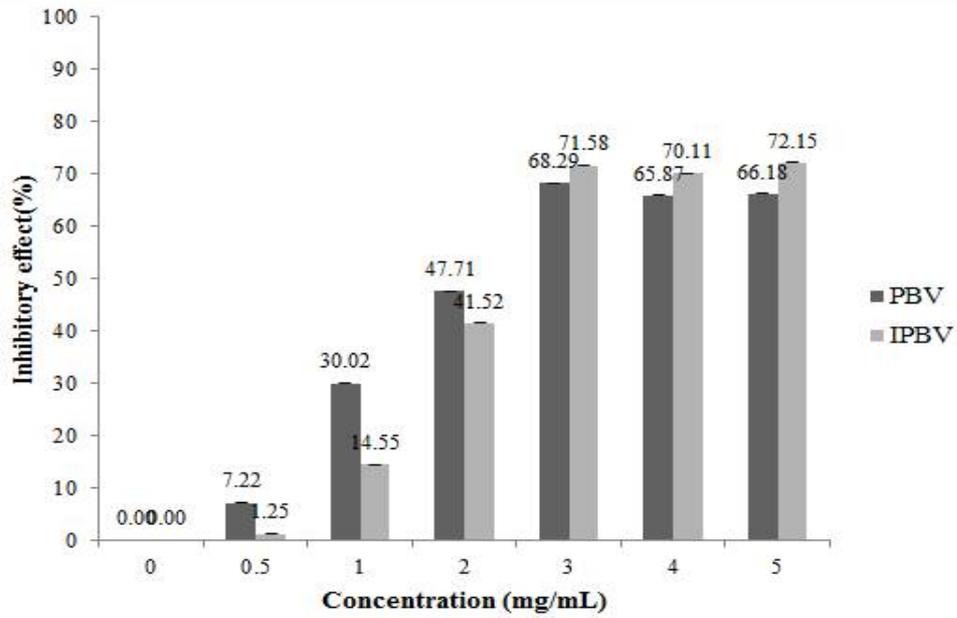
A: 시료 무침가군의 흡광도

B: 시료 침가군의 흡광도

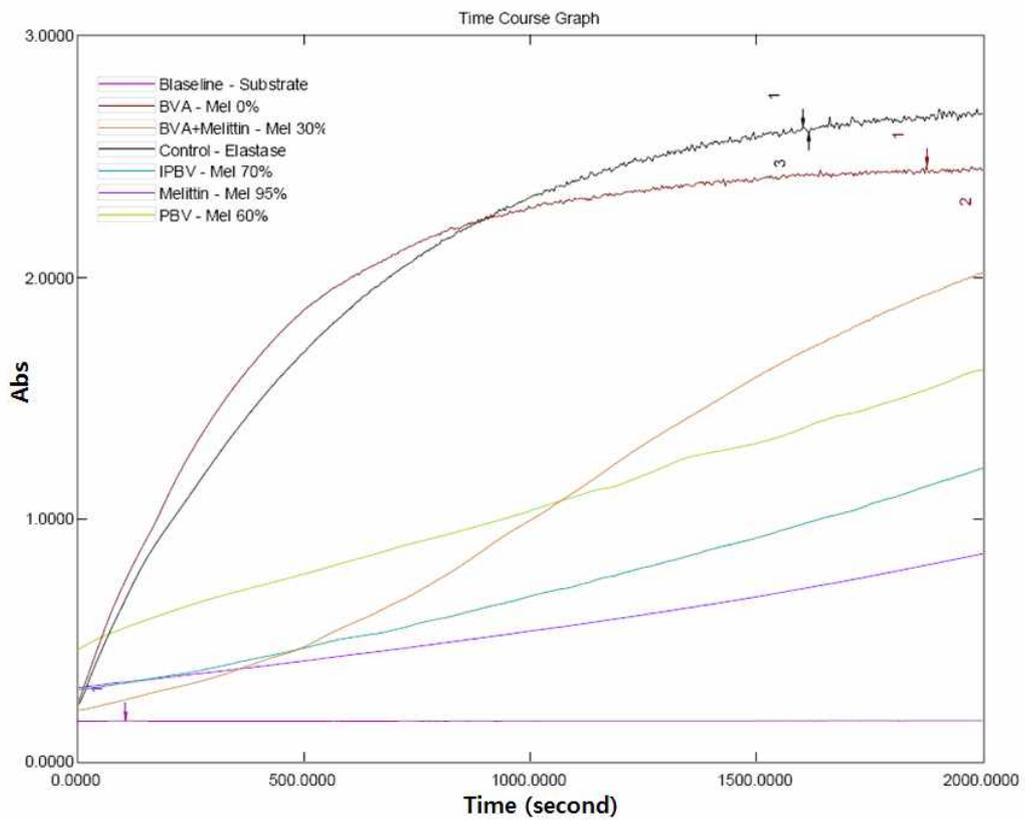
### 나. 결과 및 고찰

정제봉독과 분리-정제봉독의 elastase 억제효과 결과는 <그림 31>과 같다. PBV, IPBV의 IC<sub>50</sub>값은 각각 2.09±0.031 mg/mL, 1.62±0.012 mg/mL 이었다. Elastase에 대한 melittin의 영향을 더욱 자세히 조사하기 위해 melittin 함량에 차이를 주면서 melittin(95%)과 봉독 아민층+melittin(30%) 시료를 추가하여 일정 시간에 따라 효소를 억제하는 효과를 Kinetic assay로 측정하였다(그림 32). 총 2,500초 동안 진행하였으며 약 1,500초에서 control이 최대 활성을 나타냈다. Melittin(95%)이 효소활성 억제효과가 가장 큰 것으로 보아 melittin에 의해 elastase 효소가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 정제봉독(melittin 60%)과 분리-정제봉독(melittin 70%)은 elastase의 효소 활성을 확연히 억제하며 melittin 함량이 더 높은 분리-정제봉독이 정제봉독보다 억제 효과가 큼을 확인할 수 있었다.

여기에서 melittin은 내인성 PLA<sub>2</sub>의 활성제로 작용하는데, 농도 의존적으로 histamine과 arachidonic acid 유리를 증가시키며 이때 histamine은 collagen 고분자 합성을 증가시키는 caffeic acid를 억제 한다<sup>10)</sup>. 이들 선행연구 비교하면, melittin의 histamine 유리방출과 histamine의 caffeic acid 억제, caffeic acid의 collagen 고분자 합성 사이의 생체반응 관계를 설명할 근거가 아직 없으며 melittin의 elastase에 대한 효과 연구는 추후 정밀하게 진행되어야 할 것이다.



<그림 31. 정제붕독과 분리-정제붕독의 elastase 저해 활성>



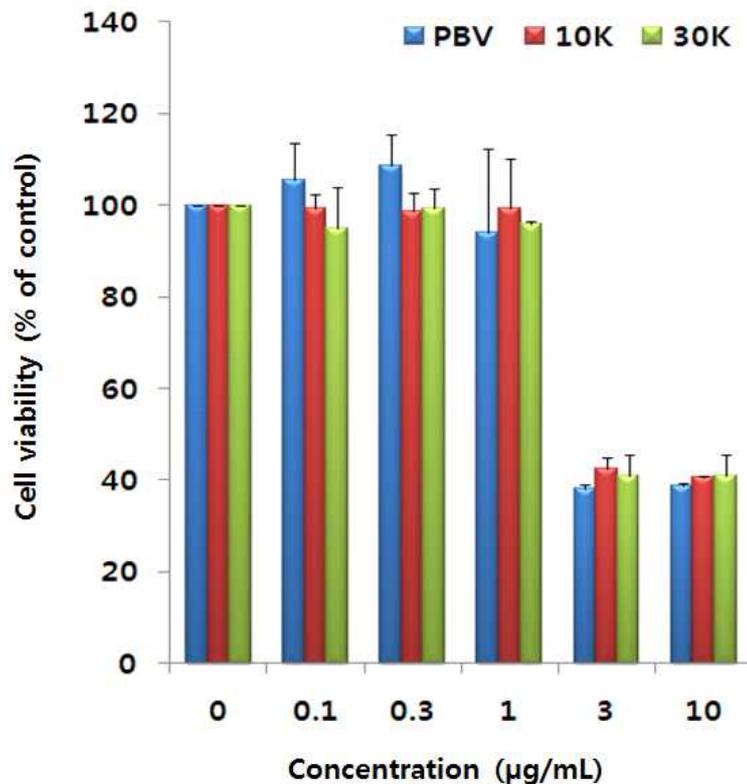
<그림 32. Kinetic assay를 이용한 정제붕독과 분리-정제붕독의 elastase 저해활성>

## 절 5 절 자연적인 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가(위탁)

### 1. 인체섬유아세포의 세포독성 및 증식능 시험

#### 가. 인체섬유아세포의 세포독성

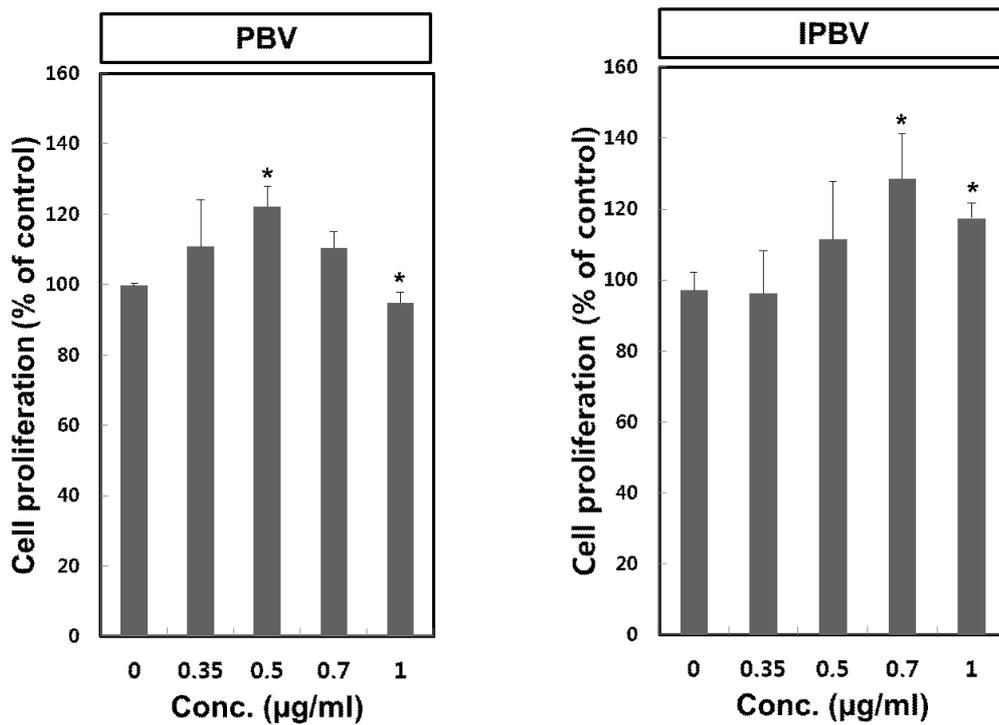
인체섬유아세포인 HDF 세포주에 대한 독성을 평가한 결과는 <그림 33>과 같다. 정제봉독의 LC<sub>50</sub>값은 4.42 µg/mL이고, 분리-정제봉독 10 KDa의 LC<sub>50</sub>값은 5.01 µg/mL이며, 분리-정제봉독 30 KDa의 LC<sub>50</sub>값은 5.02 µg/mL이다. LC<sub>50</sub>값을 기준으로 하였을 때 독성의 세기는 정제봉독, 분리-정제봉독 10 KDa, 분리-정제봉독 30 KDa 순으로 세계 나타나는 것을 알 수 있다. 봉독의 독성이 나타나지 않는 농도인 1 µg/mL를 기준으로 잡아서 이후의 실험을 진행하였다.



<그림 33. 인체섬유아세포에 봉독의 세포독성>

나. 인체섬유아세포의 증식능 시험

Collagen elastin을 생성하는 인체섬유아세포의 증식능이 증가하는 만으로도 anti-wrinkle 효과 가능성을 평가 할 수 있다. 인체섬유아세포의 증식능은 다음 <그림 34>과 같다. 정제봉독, 분리-정제봉독 모두 인체섬유아세포의 증식능을 높였으나, 분리-정제봉독 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 인체섬유아세포가 128%로 최대로 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 분리-정제봉독 정제봉독 모두 인체섬유아세포의 증식능을 높였으나, 정제봉독에 비해서 분리-정제봉독이 더 인체섬유아세포의 증식능에 더 좋은 효과를 보였다.



<그림 34. 정제봉독, 분리-정제봉독의 인체섬유아세포 증식능 측정>

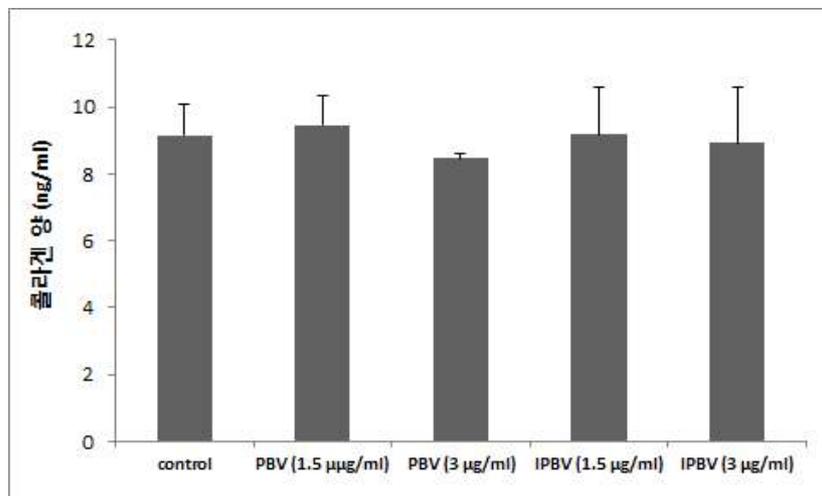
## 2. 콜라겐 생성량 측정(ELISA법, western blot)

### 가. 재료 및 방법

섬유아세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양한다. 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 정제된 봉독을 농도별로 처리하고 새로운 배지를 넣고 24시간 배양한다. 배지만을 모아서 콜라겐 생성량을 측정한다. 측정하는 방법으로는 ELISA 방법과 western blot을 이용 하였다.

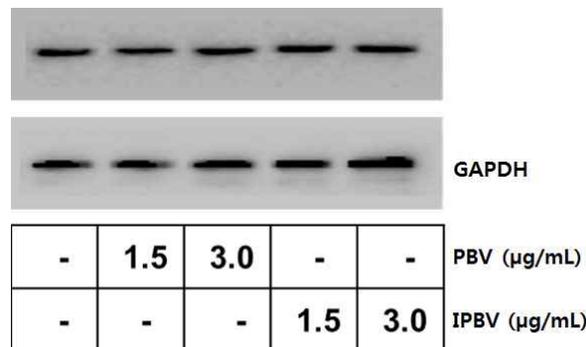
### 나. 결과 및 고찰

ELISA 방법을 이용한 콜라겐 생성량 측정은 <그림 35>와 같다. 외부로부터 어떠한 자극 없이 정상적으로 섬유아세포가 자라는 환경에서 콜라겐 생성에 대한 봉독샘플들의 콜라겐 생성 능력을 측정한 결과 특별히 유의성 있는 변화를 발견하지 못하였다.



<그림 35. 섬유아세포에서 콜라겐 생성량 측정>

Western blot으로 콜라겐 생성량 측정결과는 <그림 36>와 같다. 외부로부터의 아무런 스트레스가 없는 상태에서 정상적으로 자라나는 건강한 인체섬유아세포의 콜라겐 생성에 대한 봉독샘플들의 효과를 조사하였다. 이 실험 결과 봉독샘플들은 정상적으로 만들어지는 콜라겐 생성에 대해서는 특별히 유의성 있는 변화를 가져오지 못하는 것으로 평가되었다.



<그림 36. 섬유아세포에서 western blot을 이용한 콜라겐 생성량 측정>

### 3. Matrix metalloproteinase(MMP) 저해활성 측정

#### 가. 재료 및 방법

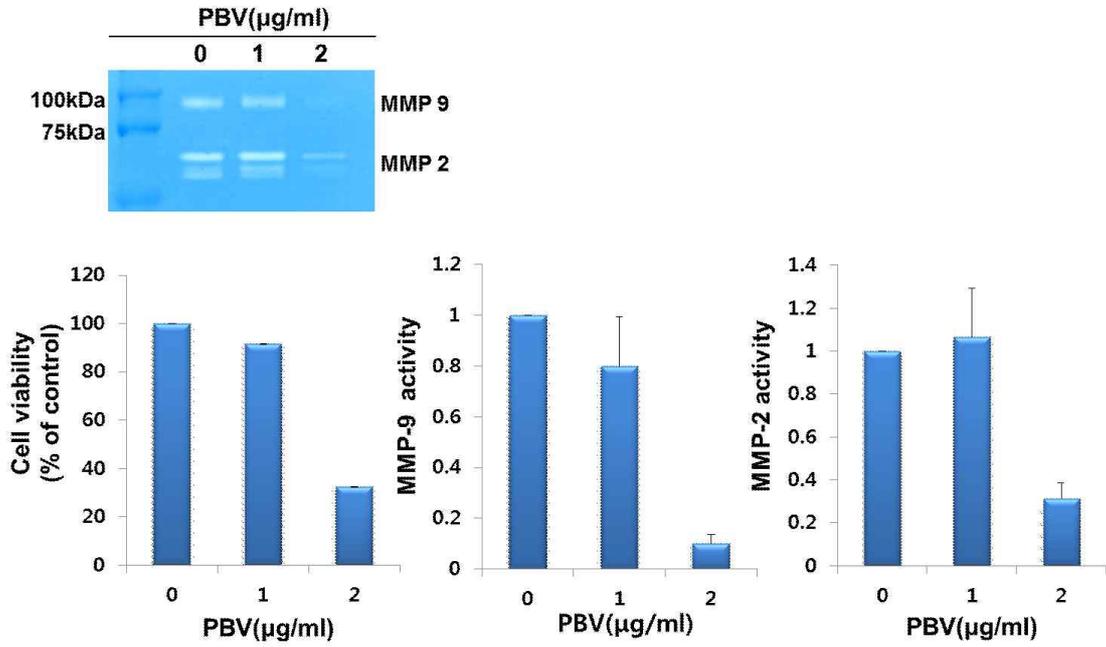
피부세포에서 정상적으로 발현되는 MMP 효소에 대한 봉독의 억제활성 관찰하였다. 실험에 사용한 세포는 HaCaT(Human keratinocyte: 인체각질세포) 및 HDF(Human dermal fibroblast: 인체섬유아세포)를 배양하여 사용하였다. 인체각질세포는 DMEM(100 U/mL of penicillin A and 100 U/mL streptomycin, FBS; fetal bovine serum; 소태아혈청 10%)배지를 제공하여 배양하였으며 인체섬유아세포는 FGMTM-2 BulletKit™을 세포에 제공하여 배양하였다. 인체각질세포는 Dr. T-J Yoon(University of Gyeongsang, Jinju, Korea)에게서 분양받아 사용하였으며, 인체섬유아세포는 MTCC(Modern cell & Tissue Technologies, Seoul, Korea)로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

인체각질세포를 6 well plate에 분주하고 24시간동안 배양후, 정제봉독과 분리-정제봉독(0-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 처리한다. 봉독처리 후 24시간 이후에 세포의 배양액은 zymography로 MMPs 발현을 확인하고, 남은 부착 세포는 MTT처리하여 세포 생존율을 측정하였다<sup>11)</sup>.

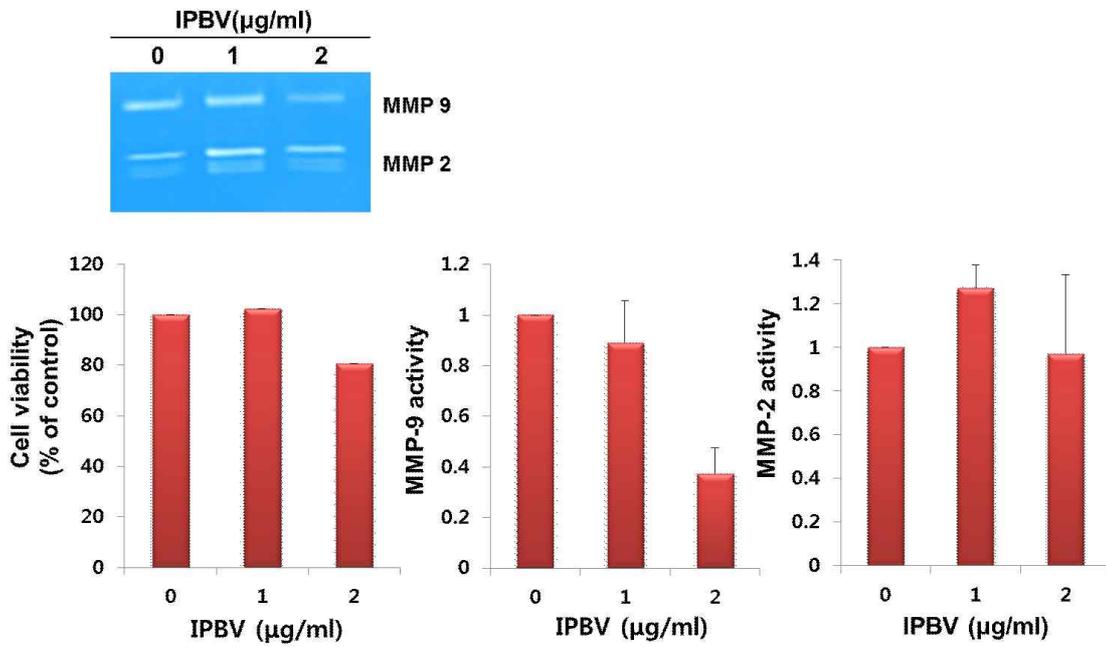
#### 나. 결과 및 고찰

기질단백질을 분해하는 MMP효소의 저해 활성 측정을 zymography에서 확인 한 결과는 다음 <그림 37, 그림 38>과 같다. 정제봉독에서 MMP-9 저해활성능은 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 서서히 발현되며, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 강하게 작용하는 것을 알 수 있었다. MMP-2에서도 역시 강하게 작용하여 줄어드는 것을 확인 할 수 있으나, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포독성 역시 강하게 나타나, MMP-9과 MMP-2에 영향이 없는 것으로 판단된다.

분리-정제봉독에서는 MMP-9이 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 줄어들었으나, MMP-2에서는 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 오히려 늘어나는 것을 볼 수 있었다. 하지만 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에는 MMP-2가 줄어드는 것을 확인 할 수 있으며, 분리-정제봉독에서는 세포독성도 없었으며 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 분리-정제봉독은 MMP-9을 저해시켜 주름개선효과가 있는 것으로 평가된다.



<그림 37. 정제봉독의 MMP 저해 활성 측정>



<그림 38. 분리-정제봉독의 MMP 저해 활성 측정>

## 절 6 절 자외선에 의한 주름개선 효과를 세포실험 통해 평가(위탁)

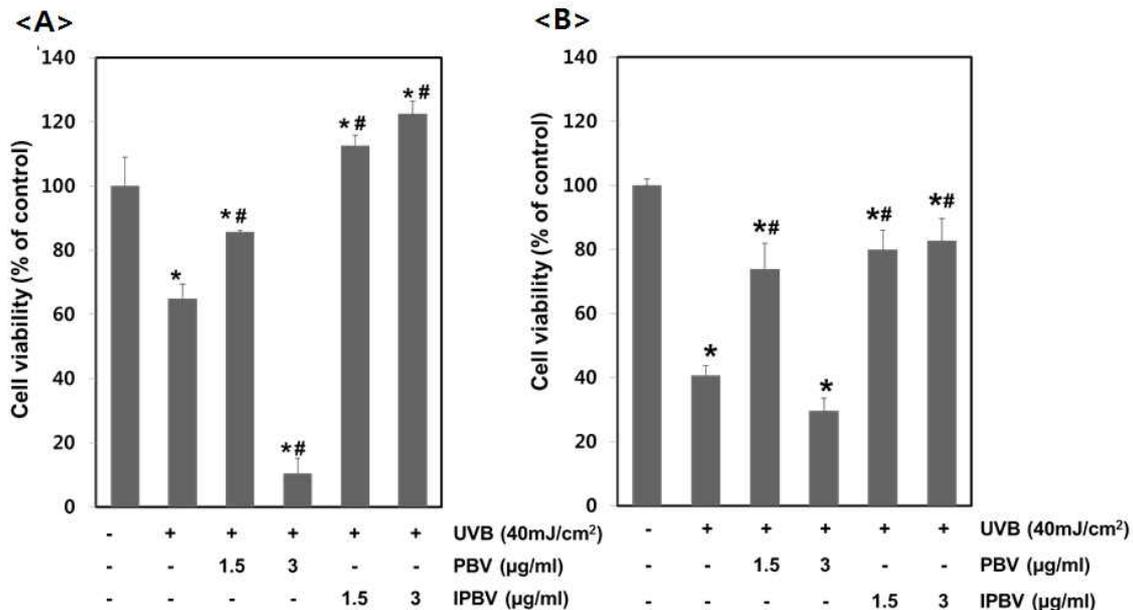
### 1. UVB 조사로 인해 손상된 세포에서 정제붕독 및 분리-정제붕독의 보호효과

#### 가. 재료 및 방법

정제붕독 및 분리-정제붕독 전처리 조건과 ultraviolet B(UVB) 조사조건 인체섬유아세포와 인체각질세포는 petri plate에 80%의 밀집도로 배양하여 혈청무첨가 배지로 교체하여 준비하였다. 그 이후 세포에 미리 UVB 조사 2시간 전에 1.5, 3.0 µg/mL의 농도로 정제붕독과 분리-정제붕독을 세포에 가한다. 처리 2시간 이후, 정제붕독과 분리-정제붕독을 제거하기 위해서 PBS로 세 번 세포를 씻어낸다. 씻어낸 다음 PBS를 다시 petri plate에 넣고 40 mJ/cm<sup>2</sup>로 UVB (312 nm UVB meter; VL-6.M ; Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex1, France)를 조사한다. 세포생존율과 콜라겐 합성량은 UVB 조사 이후 24시간 후에 실시하였으며, 그 이외의 실험은 UVB 조사 6시간 이후에 실시하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

무처리군의 세포생존율을 100%로 두고 계산을 하였을 경우 UVB(40 mJ/cm<sup>2</sup>) 조사 이후에 인체섬유아세포에서 세포생존율은 60%이었으며 인체각질세포는 세포생존율이 40%였다. 2시간 동안 정제붕독과 분리-정제붕독을 전처리 하고, UVB 자극을 주었을 경우 UVB 자극으로 인한 세포손상을 완벽하게 치료하는 모습을 보였다. 하지만 붕독을 3 µg/mL로 전처리 하였을 경우 매우 높은 독성효과를 보였다. 이번실험에서 정제붕독은 붕독보다 UVB 자극으로 인한 세포손상을 더 작은 부작용과 함께 완벽하게 복구하는 것으로 평가되었다(그림 39).



<그림 39. (A)인체섬유아세포와 (B)인체각질세포에서의 UVB 손상 세포에서의 보호효과 비교>

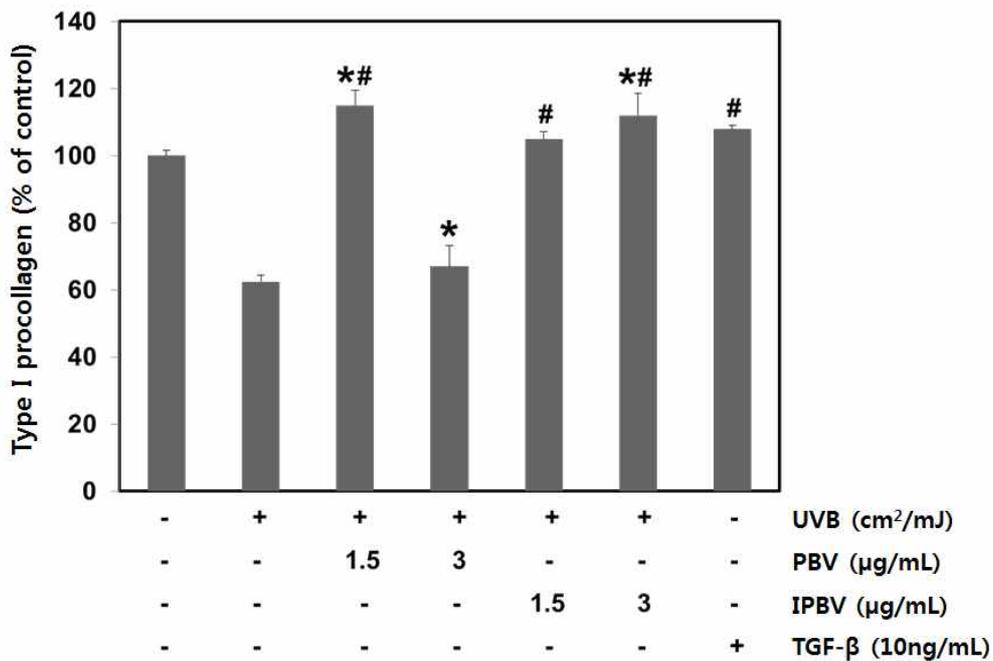
## 2. 정제봉독 및 분리-정제봉독 처리 후 ELISA를 이용한 콜라겐 양의 변화 측정

### 가. 재료 및 방법

콜라겐 양의 변화는 인체섬유아세포를 이용하여 알아보았으며 그 양은 ELISA kit(Takara Bio Inc., Japan)를 이용하여 측정하였다. 인체섬유아세포에 정제봉독과 분리-정제봉독을 2시간 전처리한 후 UVB를 조사하였다 UVB조사 24시간 이후에 세포의 배양액을 일부 채취하여 type I collagen 생성을 procollagen type I carboxy-treminal peptide(PIP)를 이용 면역방법을 통한 발색을 spectrophotometer로 450 nm에서 측정하였다.

### 나. 결과 및 고찰

UVB 자극을 준 인체섬유아세포의 콜라겐 양이 급격하게 줄어들었으나 3 µg/mL의 정제봉독 처리구를 제외한 모든 정제봉독과 분리-정제봉독을 처리구에서 콜라겐 생성량이 많이 복구되었다. 특히 분리-정제봉독 3 µg/mL는 양성대조군 TGF-β보다 더 많은 콜라겐 생성량이 측정되어 그 효능이 탁월하다고 평가 되었다(그림 40).



<그림 40. ELISA를 이용하여 UVB 손상을 받은 인체섬유아세포에서 콜라겐 생성량 조사>

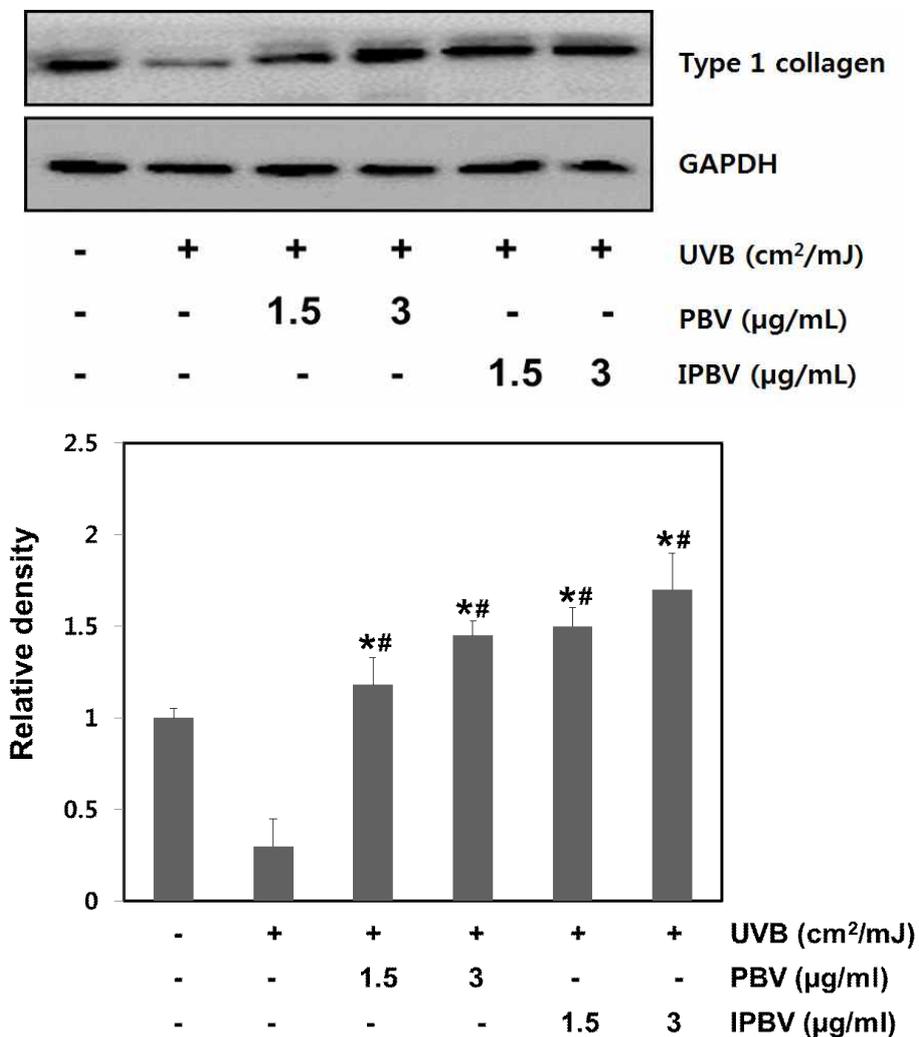
### 3. 정제봉독 및 분리-정제봉독 처리 후 western blot을 이용한 콜라겐 양의 변화 측정

#### 가. 재료 및 방법

인체섬유아세포를 이용하여 type I collagen을 western blot을 이용하여 알아보았다. 인체섬유아세포에 UVB 자극을 가한 후, 정제봉독과 분리-정제봉독을 처리하고 6시간 이후에 세포를 거두어 western blot을 위한 샘플링을 실시하였다. 차후 western blot 실험결과를 Image J를 이용, 무처리군의 콜라겐을 기준으로 비교하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

Western blot 실험결과 type I collagen은 인체섬유아세포에서 UVB 자극을 가한 군에서 급격하게 줄어들었다. 하지만 정제봉독과 분리-정제봉독을 전 처리 한 군에서는 콜라겐 생성량이 급격하게 증가하였다. 모든 콜라겐 생성량이 농도 의존적으로 증가하였으나 콜라겐 생성량은 정제봉독이 더 높은 것을 알 수 있었다(그림 41).



<그림 41. Western blot을 이용하여 UVB 손상을 받은 인체섬유아세포에서 콜라겐 생성량 조사>

#### 4. 정제봉독과 분리-정제봉독의 MMPs 발현억제효과

##### 가. 접근

최근, 몇몇 논문에 의하면 UVB가 MMPs(Matrix metalloproteinase)양을 증가시켜 노화를 촉진한다고 한다<sup>11,12)</sup>. 그에 따라 인체각질세포 및 인체섬유아세포에서 UVB 자극으로 인해 증가한 MMPs의 양을 정제봉독과 분리-정제봉독이 줄일 수 있는지 알아보았다.

##### 나. 재료 및 방법

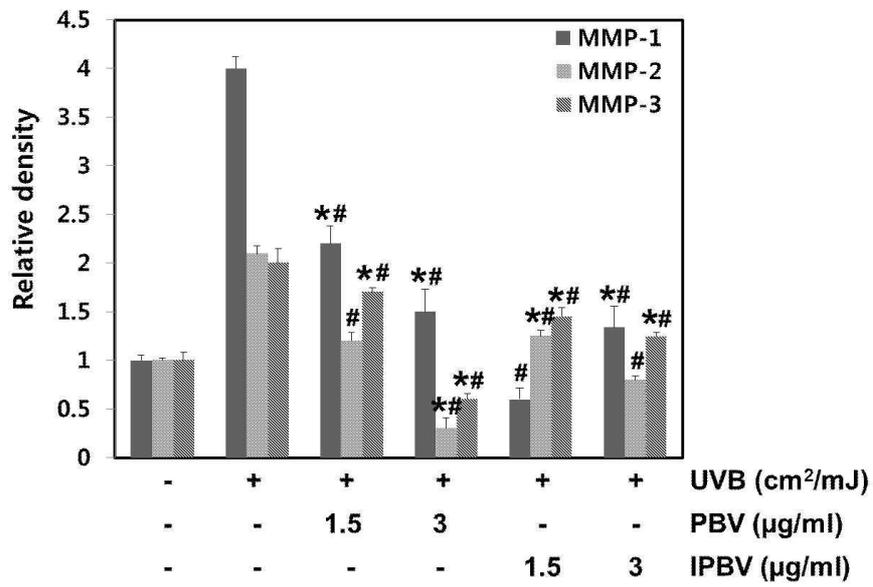
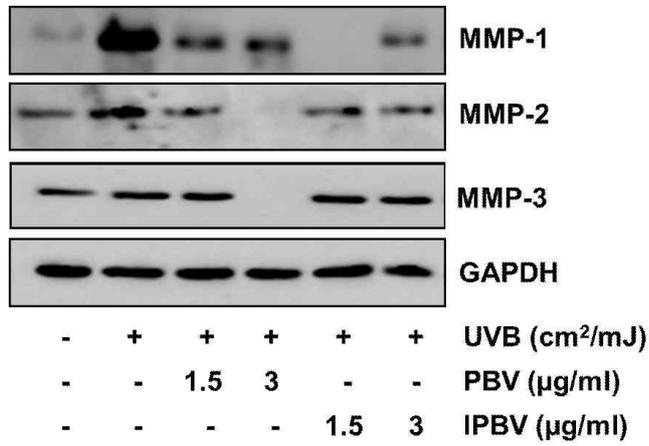
정제봉독과 분리-정제봉독의 MMP-1, 2, 3 및 MMP-1, 13의 발현억제효과를 실험하기 위해서 인체섬유아세포 및 인체각질세포에 정제봉독과 분리-정제봉독을 2시간 전처리 하고 그 이후에 UVB 자극을 가하였다. UVB 자극 6시간 후에 세포를 거두어 western blot을 이용하여 단백질 MMP-1, 2, 3 및 MMP-1, 13을 측정하였으며, RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction)을 이용하여 MMP-1, 3의 mRNA양을 알아보았다

##### 다. 결과 및 고찰

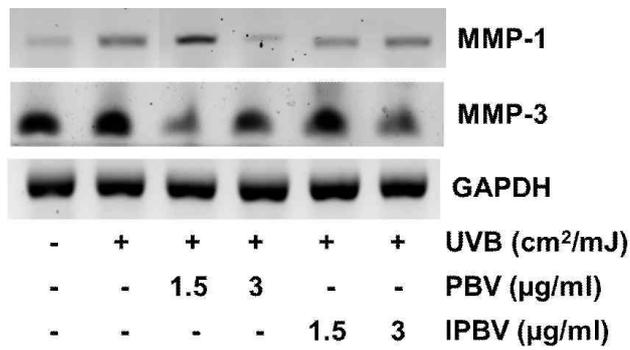
실험결과 인체섬유아세포에서 UVB로 인해 증가한 MMP-1, 2, 3가 정제봉독과 분리-정제봉독을 처리함에 따라 급격하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 특히, MMP-2는 정제봉독과 분리-정제봉독의 농도에 따라 감소하였으며 정제봉독 3 µg/mL에서 MMP-2를 급격하게 감소시켰다. MMP-3도 정제봉독 3 µg/mL이 가장 많이 그 양을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 42).

정제봉독과 분리-정제봉독은 RT-PCR 실험에서도 UVB자극에 의해서 증가한 MMP-1, 3의 양을 줄이는 것을 확인할 수 있었다. 특히 분리-정제봉독은 MMP-3의 mRNA양을 농도 의존적으로 감소시켜 분리-정제봉독의 MMP-3 저해효과가 탁월한 것을 알 수 있었다(그림 43).

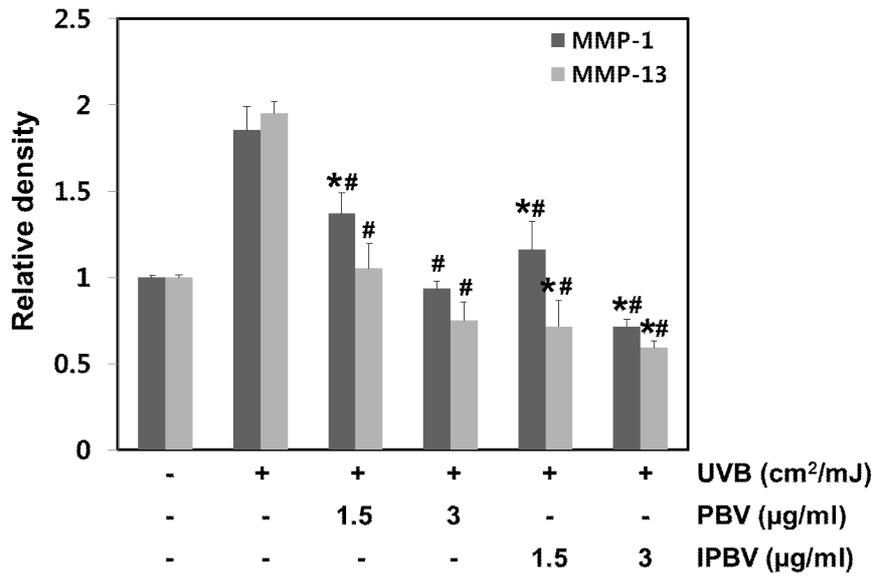
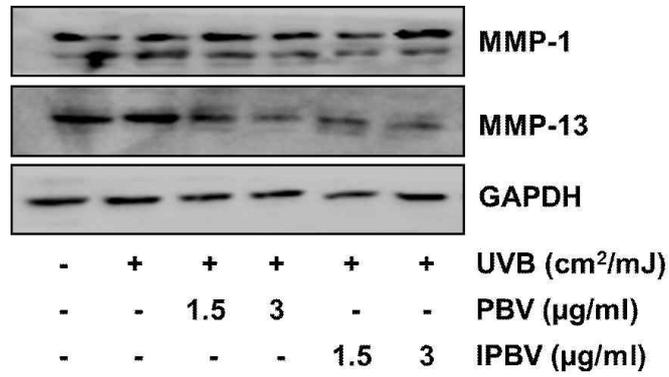
인체각질세포를 이용하여 MMP-1, 13 단백질 발현양을 정제봉독과 분리-정제봉독이 줄이는 것을 확인한 결과는 다음 <그림 44>과 같다. 인체각질세포에서 MMPs를 줄이는 것은 분리-정제봉독이 전체적으로 더 우수했으며, 모두 농도 의존적으로 감소하였다.



<그림 42. MMP-1, 2, 3 발현억제효과>



<그림 43. MMP-1, 3 mRNA 저해효과>



<그림 44. MMP-1, 13 발현억제효과>

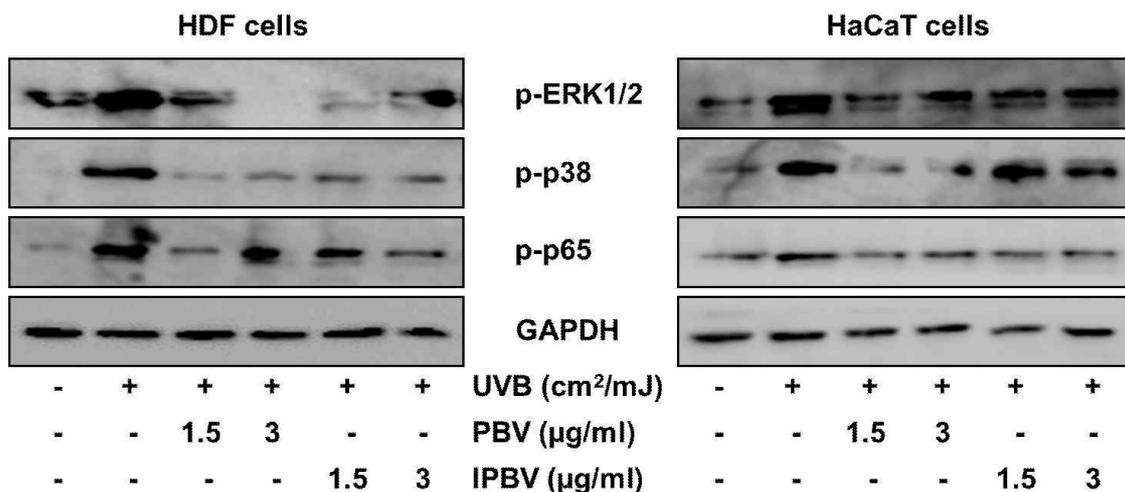
## 5. 정제봉독과 분리-정제봉독의 UVB로 인한 ERK1/2, p38와 p65 인산화저해효과

### 가. 접근 및 방법

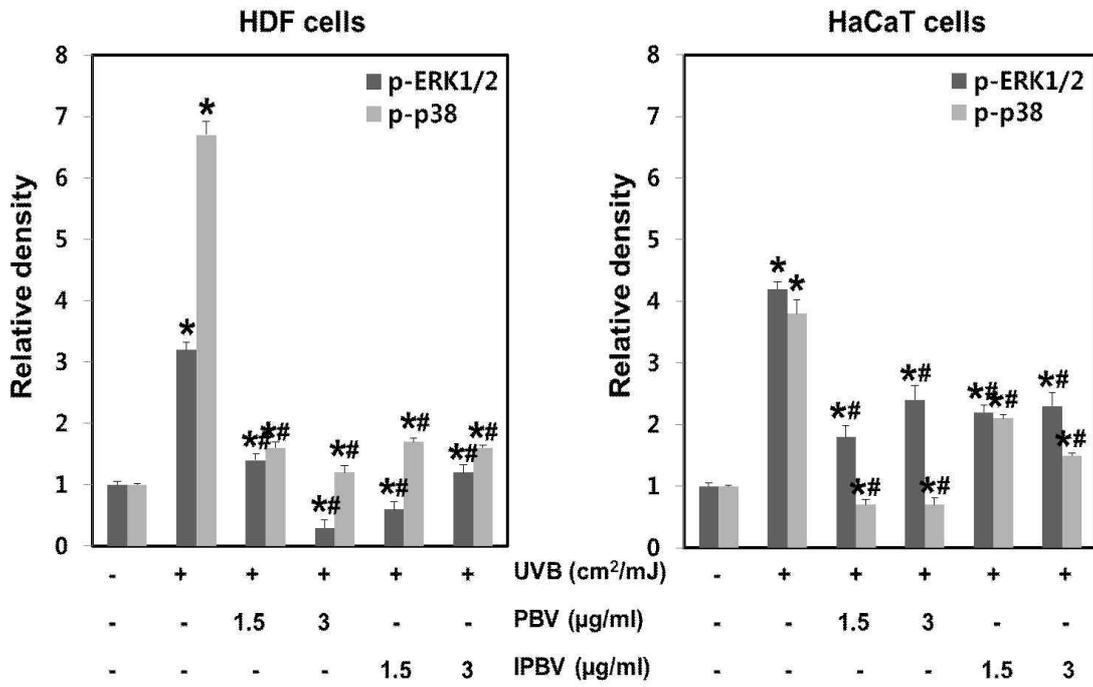
최근 몇몇 보고에 의하면 UVB에 의해 MMPs가 생성되는 요인은 MAPKs 기전과 밀접한 영향이 있다고 한다<sup>13)</sup>. 이에 따라 본 연구에서는 인체각질세포와 인체섬유아세포에서 MAPKs (Mitogen-activated protein kinase)인 ERK1/2(Extracellular signal-regulated kinase)와 p38(p38 mitogen-activated protein kinase)의 단백질 발현을 관찰하였으며 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 역시 관찰하였으나 JNK는 발현이 되지 못하여 본 실험결과에 신지 못하였다. 또, MMPs 발현을 촉진시킨다고 알려진 NF-κB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)의 기전 중 p65(Transcription factor p65)의 인산화효과를 알아보았다.

### 나. 결과 및 고찰

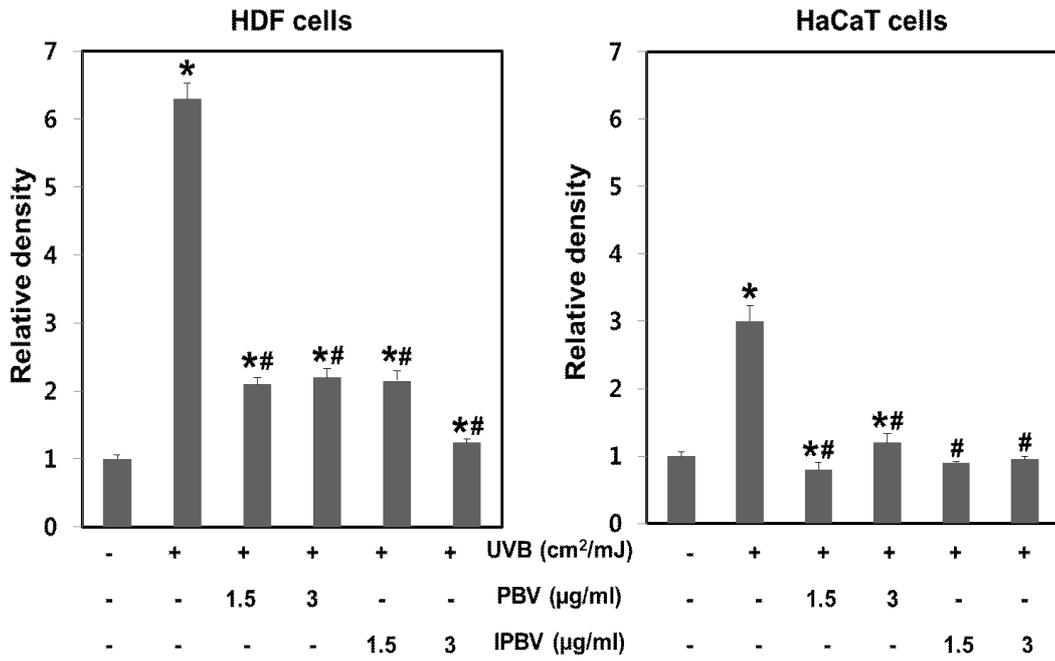
실험결과 인체섬유아세포와 인체각질세포 모두 UVB 자극에 의해서 ERK1/2, p38 및 p65의 인산화가 증가하여 모두 활성화 된 모습을 확인 할 수 있었다(그림 45). 하지만 정제봉독과 분리-정제봉독을 처리한 군에서는 ERK1/2, p38 및 p65의 인산화가 급격하게 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다(그림 46, 그림 47). 그 결과, 봉독과 정제봉독은 MAPKs 경로를 통하여 MMPs발현을 억제하는 것으로 평가되며, p65의 인산화를 억제시킴으로 인해서 NF-κB를 통한 MMPs 발현을 감소시키는 것으로 생각되었다.



<그림 45. ERK1/2, p38, p65의 인산화 정도 western blot 사진>



<그림 46. MAPKs 저해효과>



<그림 47. p65 저해효과>

## 제 7 절 정제봉독과 분리-정제봉독의 화장품 관련 임상평가

### 1. *In vitro* 3T3 neutral red uptake(NRU) 광독성 시험(위탁)

#### 가. 접근

화장품을 피부에 도포했을 경우 ultraviolet A(UVA)가 도포된 물질과 반응하여 일어날 수 있는 광자극성이나 광알레르기 가능성을 알아보기 위하여 3T3 NRU 광독성 시험을 수행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

BALB/c 3T3 마우스 종에서 유래한 섬유아세포 세포 주를 실험에 사용하였다. 세포를 2개의 96 well plate ( $1 \times 10^4$  cells/well)에 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 양성 대조물질 (Chlorpromazine; CPZ; 0~2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 정제봉독과 분리-정제봉독을 세포 독성이 나타나지 않는 8가지 농도 (0~1 mg/mL)를 처리하였다. 신선한 배지로 교체를 해준 후 한 쪽 plate에는 ultraviolet A(UVA; 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ )를 조사하였고 다른 한 쪽은 조사하지 않았다. 신선한 배지로 교체를 해준 뒤 밤새 배양하였다. Neutral red 시약을 plate에 처리하고 3시간 동안 배양한 뒤 추출 용액(물: 에탄올: 아세트산 = 49:50:1)을 처리하여 10분간 교반시켜 주었다. 분광기를 이용하여 540 nm 의 파장을 측정 하고 Phototox 2.0 소프트웨어를 이용하여 결과 값을 분석하였다. 이 시험 방법은 OECD (Organization For Economic Cooperation And Development) 432 가이드라인을 따라 수행하였다<sup>14)</sup>.

#### 다. 결과 및 고찰

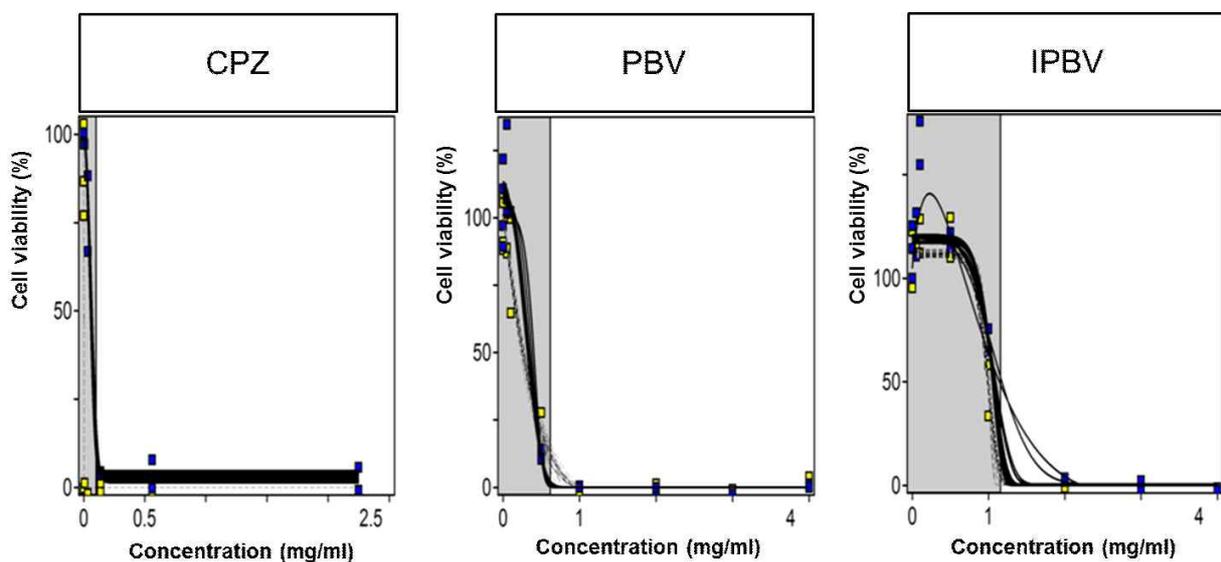
세포 주에 시험물질을 처리한 후 UVA를 조사한 plate와 비 조사한 plate의 유효농도를 비교하여 결과를 분석하였다(그림 48). 광독성의 판단 기준은 <표 13>과 같다. 양성대조물질인 CPZ의 경우 photo irritation factor(PIF)값과 mean photo effect(MPE)값이 35.68과 0.68로 광독성이 있는 물질로 평가되었다. 정제봉독의 경우 MPE값은 0.11로서 광독성의 가능성이 미미하게 보이나 PIF값은 1.97로 비광독성 물질로 판단되며 분리-정제봉독 또한 MPE값과 PIF값이 매우 낮으므로 비광독성물질로 판단되어 화장품 원료물질 사용으로 무리가 없는 것으로 평가되었다(표 14).

<표 13. PIF와 MPE지수를 통한 광독성 판단 기준>

	PIF	MPE
비광독성	PIF < 2	MPE < 0.1
광독성의 가능성이 있음	2 < PIF < 5	0.1 < MPE < 0.15
광독성	PIF > 5	MPE > 0.15

<표 14. 시험물질 처리 후 유효농도와 MPE, PIF값>

	UVA- ED <sub>50</sub>	UVA+ ED <sub>50</sub>	MPE	PIF
CPZ	8.49 ± 8.4 (µg/mL)	0.15 ± 0.15 (µg/mL)	0.65 ± 0.02	35.68 ± 9.8
PBVV	1.86 ± 2.7 (mg/mL)	1.61 ± 2.5 (mg/mL)	0.11 ± 0.13	1.97 ± 1.33
IPBV	1.37 ± 0.27 (mg/mL)	1.05 ± 0.08 (mg/mL)	0.01 ± 0.05	1.30 ± 0.23



<그림 48. MPE, PIF값 분석을 위한 그래프>

## 2. *In vivo* local lymph node assay(LLNA) 피부 자극 시험(위탁)

### 가. 접근

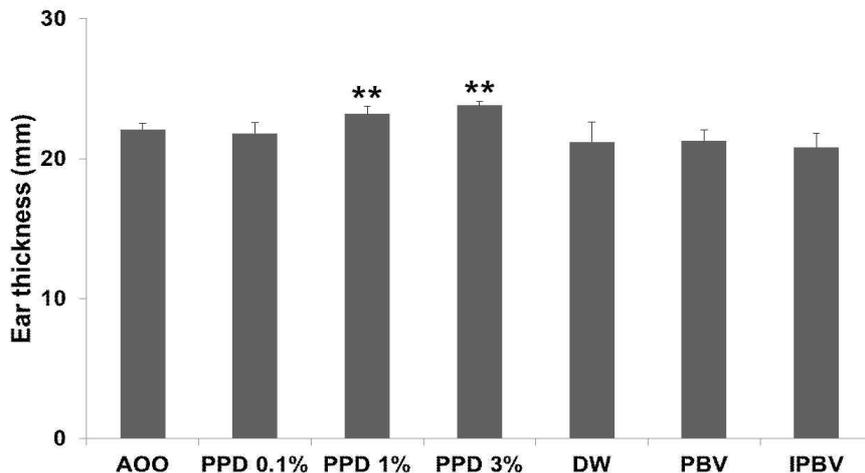
물질을 피부에 도포했을 경우 일어나는 피부자극성을 알아보기 위하여 정제봉독과 분리-정제봉독을 이용하여 LLNA 시험을 수행하였다.

### 나. 재료 및 방법

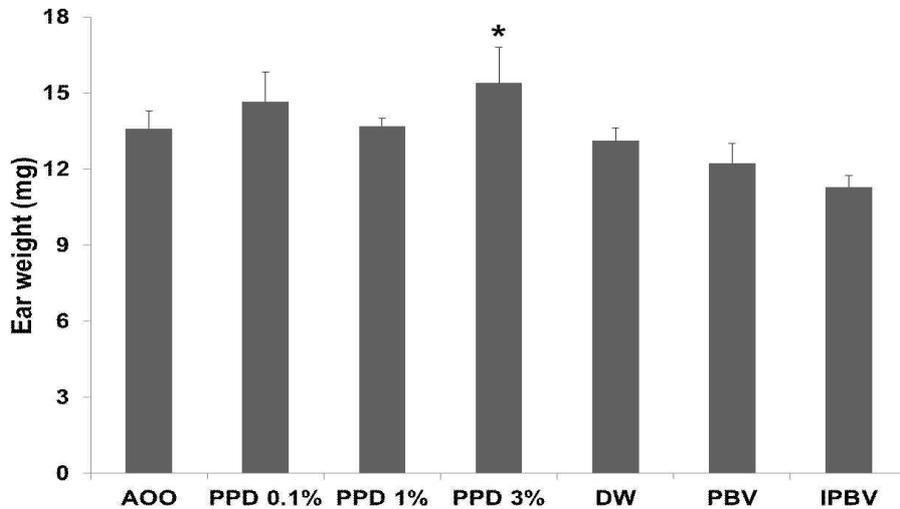
암컷 BALB/c 마우스 8주령을 실험에 이용하였다. 5마리로 나눈 각각의 군 양쪽 귀 배면에 25  $\mu$ L의 시험물질을 3일간 도포 하였다. 양성대조군 으로는 *p*-phenylenediamine(PPD : 0.1, 1, 3%)을 이용하였으며 정제봉독과 분리-정제봉독은 용해되는 최고농도(100 mg/mL)를 선택하여 실험을 수행하였다. 실험 시작 후 5일 째 되는 날에 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)을 20 mg/mL 의 농도로 각 개체 당 0.1 mL을 복강 주사 하였다. 마우스를 주사 24 시간 후에 마우스를 안락사 시켜 이개림프절을 적출하였다. 적출한 이개림프절은 PBS용액에 분쇄하여 림프절 현탁액을 만들어 이후 실험에 사용하였다. Roche사에서 구매한 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kits를 이용하여 림프절의 세포증식능을 측정하였으며 이는 BrdU와 anti-BrdU 항체가 반응하는 것을 이용한 것이다. Spectrophotometer를 이용하여 370 nm 의 파장을 측정하였으며 이 시험 방법은 OECD(Organization For Economic Cooperation And Development) TG 442B 가이드라인을 따라 수행하였다<sup>15)</sup>.

### 다. 결과 및 고찰

3일간 마우스의 귀 배면에 물질을 도포한 결과 양성대조군인 PPD 고 농도 처리군의 귀 두께에서는 미미하지만 유의적인 변화가 나타났다. 하지만 정제봉독과 분리-정제봉독 처리군 에서는 반응이 나타나지 않았다(그림 49). 시험 수행 6일 후 마우스를 안락사 시킨 후 펀치를 이용하여 귀를 적출하였다. 적출한 귀를 무게를 측정하였고 그 결과는 <그림 50>과 같다. 다른 군에서는 별다른 변화가 나타나지 않았으며 양성대조군인 PPD 3%에서만 유의적인 증가가 나타났다. 이에 정제봉독과 분리-정제봉독의 피부자극성이 귀 부종과는 관련이 없는 것으로 평가되었다.



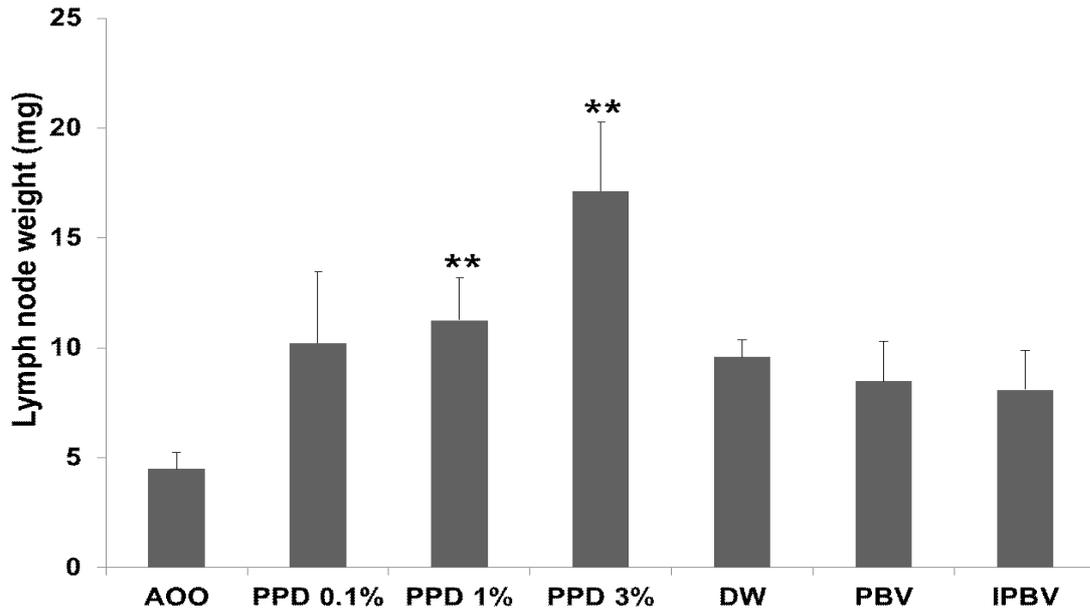
<그림 49. 물질도포 후 귀두께>



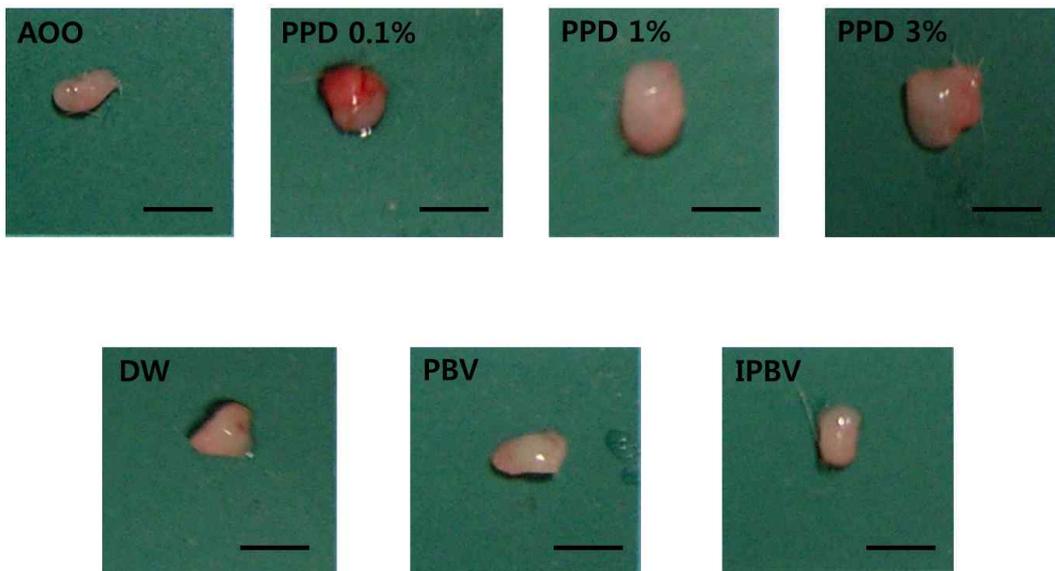
<그림 50. 안락사 후 귀 무게 측정>

귀의 피부자극성 실험이후, 경정맥 부근의 양쪽 이개림프절을 적출하였다. 림프절의 무게를 측정한 결과는<그림 51>와 같고 실제 사이즈는 <그림 52>와 같다. 음성 대조군에 비해 양성대조군인 PPD에서는 농도가 증가함에 따라 림프절 무게와 크기 또한 증가하는 양상을 보여 주었지만 정제봉독 분리-정제봉독 어느 것에서도 림프절의 무게와 크기가 증가하는 것이 보이지 않았다.

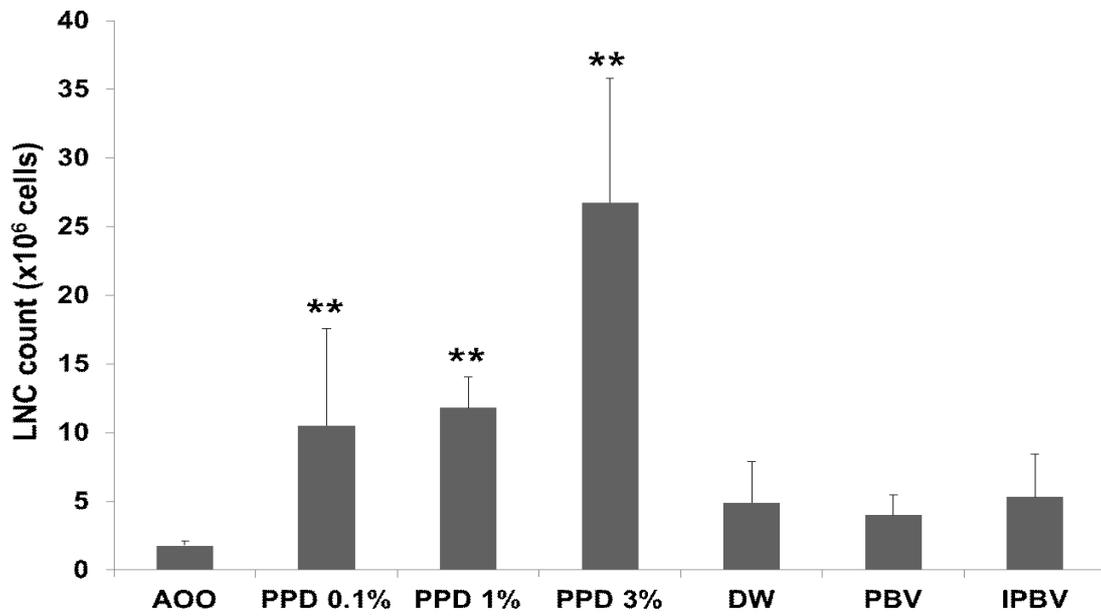
적출한 이개림프절을 PBS 현탁액으로 만들어 셀 개수를 측정해 본 결과 양성대조군 (PPD)에서는 농도 의존적으로 증가양상을 나타내었으며 앞선 결과와 마찬가지로 정제봉독과 분리-정제봉독에서는 변화가 관찰되지 않았다<그림 53>. 림프절 현탁액을 이용하여 자극지수를 측정한 결과 AOO에 비해서 PPD는 2배 이상의 자극지수를 나타내었으나 정제봉독과 분리-정제봉독은 어떠한 반응도 보이지 않았다(그림 54). 식약청 가이드라인에서는 자극지수가 1.6이상일 경우 자극성이 있는 물질로 판단되어 사용을 권고 하지 않지만, 정제봉독과 분리-정제봉독의 경우 자극지수가 모두 1.6이하 이므로 화장품 원료로 사용하기에 안전하다고 판단되었다.



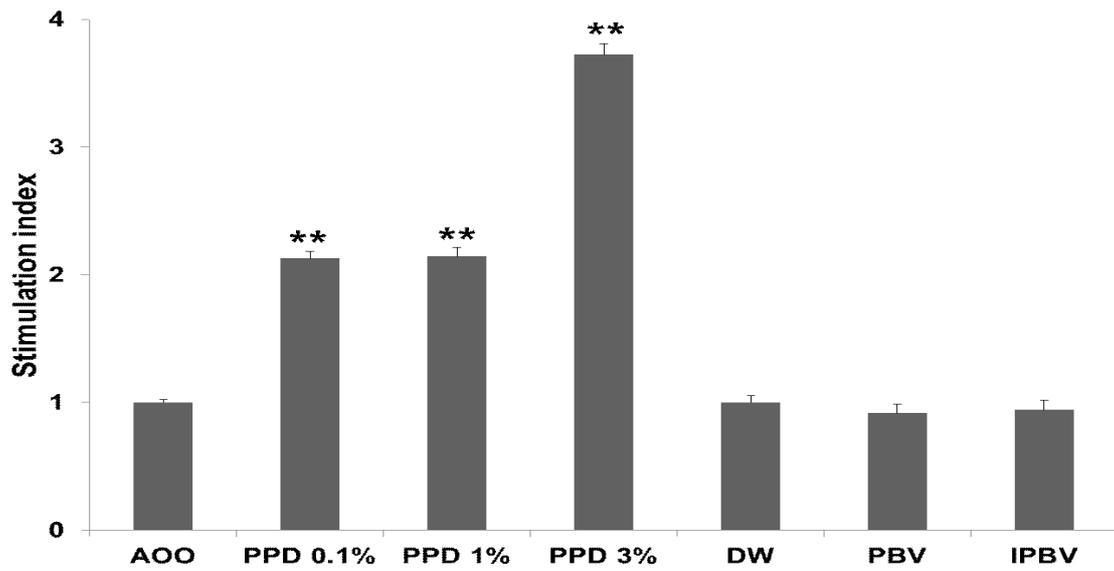
<그림 51. 적출한 이개 림프절의 무게>



<그림 52. 적출한 이개림프절의 크기 비교>



<그림 53. 림프절 세포 수 측정>



<그림 54. 자극지수>

### 3. Path test를 통한 민감성 평가

(A Shared Modified Draize Repeat Insult Patch Test in Healthy Volunteers, of Either sex, to Investigate the Irritation and Sensitisation Potential of Two Test Articles Following Repeated Cutaneous Patch Applications, Aspen Clinical Research, 2014)

#### 가. 접근방법

본 임상 평가는 “Hypoallergenic”과 “Dermatologically tested”법을 바탕으로 피부에 패치(patch)를 반복적으로 부착하여 정제봉독과 분리-정제봉독의 자극성 및 민감성을 조사하는 것이다. Single blind 법으로 진행하였으며 106명의 대상자가 참여하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### (1) 실험 대상자 선정, 연구기간 및 연구기간 동안 금지 및 제한 사항

피험자는 18세 이상의 건강한 성인(성별무관) 106명을 대상으로 실시하였으며 금지 및 제한 사항을 숙지시킨 후 시험 동의서를 받았다. 2014년 4월 21일에서 5월 30일 사이에 Harbour House, 23 Chandlers Quay, Maldon. Essex CM9 4LF United Kingdom의 Aspen 임상 연구소에서 진행되었다. 연구기간 동안 금지 및 제한사항은 다음과 같다.

- 아스피린이나 비스테로이드 소염제를 사용하지 않는다.
- 자연적 햇빛 외에는 테스트 부위에 고의적인 노출을 피하고 선베드 및 태양광램프를 사용하지 않는다.
- 첫 번째 패치를 하기 10일 전부터 연구가 끝날 때까지 예방접종을 하지 않는다.

##### (2) 시험품목 및 시험 패치

본 사는 정제봉독(PBV)과 분리-정제봉독(IPBV)를 Aspen Clinical Research에 제공하였다. Patch들은 “Finn Chambers”라 불리는 3개의 알루미늄판이 고정된 Scanpor<sup>®</sup> tape(Norges-plaster A/S)의 6 cm 정도의 넓은 조각으로 구성되었다. 다음 patch들의 정확한 재배치를 하기 위하여 테이프의 상단과 하단에 크리스탈 바이올렛 색의 점을 적용하였다. 각 피시험자들은 세척하는 동안 염색 마크 부위는 피하고 patch들을 건조 상태로 유지하도록 지시받았다.

##### (3) 시험 방법

###### (가) Part I- Induction

3주 이상 지속되었고 패치들은 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19일째에 적용되었다. 패치들은 매번 47동안 패치를 붙인 채 유지하도록 지시받은 모든 피시험자들의 위쪽 등에 적용되었고, 그 후 제거 및 폐기되었다. 패치 부위의 특정 붉은 상태 발생여부 평가는 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22일째의 다음 패치가 적용되기 바로 직전 1시간 이내에 시험 센터에서 5~15분간 바로 측정되었다.

(나) Part II - Break

넷째 주 월요일을 제외한 나머지 또는 다섯째 주는 방문하지 않았다.

(다) Challenge

36일째인 여섯째 주 월요일에 시험센터에 방문하여 Part I 에 적용된 패치들과 비슷한 패치 셋트가 피시험자 등의 다른 부위에 적용되었다. 패치들이 적용된 후 피시험자들은 한 시간 동안 시험센터에 머물도록 요구되었고, 47시간동안 패치부착을 유지하도록 지시받아 그 후, 패치가 제거 및 폐기되었다. 피시험자의 패치 부위의 평가는 패치 제거 후 1시간, 49시간째 (38, 40일째)에 관찰 되었다.

(4) 테스트 부위의 분류

Andrew King은 연구가 지속되는 동안 <표 15>의 채점 스케일에 따라 패치 부위를 평가하였다. 패치 부위 관찰의 조명은 부위로부터 대략 30 cm 떨어진 60와트의 pearl 전구에 의해 이뤄졌다.

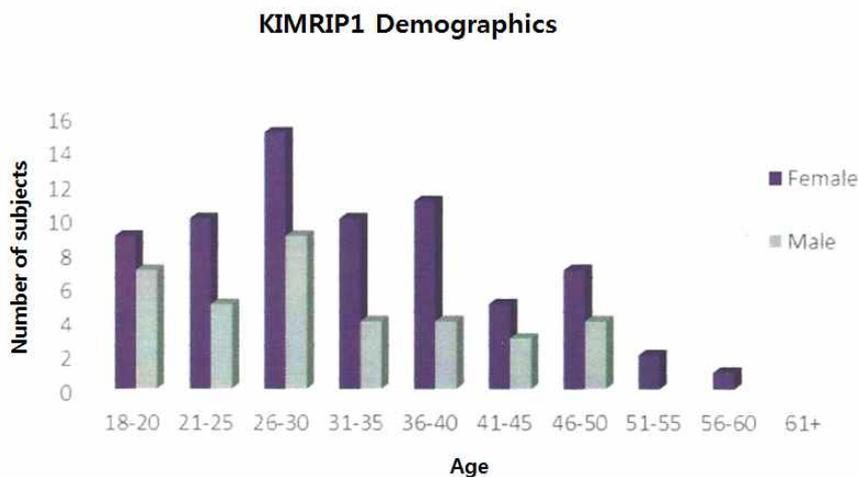
< 15. Scoring and definition of symbols used in tabulating data >

Scoring	Definition
0	No visible reaction. This score would include superficial skin responses such as glazing, peeling, cracking.
1	Mild erythematous reaction. Faint pink to definite pink.
1E	Mild erythematous reaction with papules and/or oedema.
2	Moderate erythematous reaction. Definite pink to re erythema (similar to sunbum)
2E	Moderate erythematous reaction with oedema and/or papules.
3	Strong erythematous reaction. Beet red.
3E	Strong erythematous reaction with marked oedema, papules and/pr few vesicles.
4	sever reaction with erythema, oedema, papules and vesicles (may be evidence of weeping).
5	Bullous reaction.
S	Reaction spread beyond chamber area.
Note	Erythema, papules, oedema and vesicles are judge to be present if they involve 25% or moer of the path site. If papules are present then add P i. e. 1EP. If vesicles then add V i. e 1EV.
Move Criteria	Any grade grater than 1 (which includes 1E and 1S) during induction necessitates relocation of the patch.
Multiple Grades	Multiple grades are recorded in the book as follows: First column - Original site Second column - First move Third column - Second move
A	Marked reaction to adhesive.
L	Patch came off(lost) during 12 hours.
W	Subject started test on Wednesday therefore no grade is recorded.
X	Succeeding patch not applied and succeeding grade is residual reaction.
-	Subject absent.
N9G	No ninth grade. Subject wore nine induction patches, but was not present for the scoring following the ninth induction application.

#### 다. 결과 및 고찰

본 연구는 건강한 지원자(성별무관)로부터 ‘Hypoallergenic’와 ‘Dermatologically tested’의 주장을 지지하는 Jordan과 King의 Draize repeat insult patch test를 변형하여 반복된 피부의 패치 적용에 따라 두 개의 시험 품목(정제봉독; Purified bee venom, 분리-정제봉독; Isolated and purified bee venom)의 피부 자극성과 민감성 가능성을 조사하기 위해 실시되었다.

총 106명의 18세 이상 건강한 지원자로부터 피시험자 개체 내 비교법 및 single blind로 진행되었고, 9번의 ‘Induction’단계와 1번의 ‘Challenge’단계로 나뉘어 패치 적용을 받았다. 이 시험에 적용된 패치들은 ‘Finn Chambers’라 불리는 3개의 알류미늄판이 고정된 Scanpor<sup>®</sup> tape (Norges-plaster A/S)의 6 cm 정도의 넓은 조각으로 구성되었다. 다음 patch들의 정확한 재배치를 하기 위하여 테이프의 상단과 하단에 크리스탈 바이올렛 색의 표시를 적용하였다. 각 피시험자들은 세척하는 동안 염색 마크 부위는 피하고 패치들은 건조 상태로 유지하도록 요구받았다. 시험품목들(0.02 g 또는 0.02 mL)은 작은 필터를 포함하는 알류미늄판에 직접 적용(주입)되었다. 총 106명의 피시험자가 모집되었으며(그림 55), 모두 연구를 완료 하였다.



<그림 55. 임상시험에 참여한 피시험자 통계>

연구 결과, 정제봉독과 분리-정제봉독에 대하여 피시험자로부터 본 연구의 ‘Induction’ 단계 동안 홍반이 발견되지 않았고, ‘challenge’ 단계(38, 40일째) 동안 어떠한 의문의 반응도 발견되지 않았다. 시험 품목들은 이 연구의 조건하에서 사용하는데 안전하며 ‘Hypoallergenic(저 자극성)’ 및 ‘Dermatologically tested(피부과학적으로 테스트됨)’이 입증 되었다고 간주될 수 있다. 106명의 정제봉독과 분리-정제봉독에 대한 결과는 <그림 56>, <그림 57>과 같다.

APPENDIX 7: INDIVIDUAL RESPONSES TO TEST ARTICLES 1 – PURIFIED BEE VENOM

Number	Code	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MU	1	47 hour
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
2	1	0	0	0	0	-	b/O	b/O	b/O	b/O		b/O	b/O
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
4	1	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
12	1	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
15	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
20	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
21	1	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
22	1	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
26	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
27	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
30	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Final

Page 23 of 30

31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
34	1	0	-	0	0	0	b/O	b/O	b/O	b/O		b/O	b/O
35	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
37	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
39	1	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
42	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
43	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
46	1	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
47	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
49	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
51	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
52	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
53	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
54	1	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
55	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
56	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
57	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
59	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
60	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0

Final

Page 24 of 30

<그림 56. 정제봉독에 대한 임상결과(a)>

61	1	0	0	-	0	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	0
62	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	1	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	0
70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	1	0	0	-	0	0	b/O	0										
77	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	1	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0
82	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	1	0	0	0	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0
84	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Final

Page 25 of 30

91	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	b/O	b/O
92	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	1	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	0
95	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	1	0	0	0	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0
102	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	0
106	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Standard Deviation		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Final

Page 26 of 30

<그림 56. 정제봉독에 대한 임상결과(b)>

APPENDIX 8: INDIVIDUAL RESPONSES TO TEST ARTICLE 2 - ISOLATED AND PURIFIED BEE VENOM

Number	Code	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MU	1	47 hour
1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
2	2	0	0	0	0	-	b/O	b/O	b/O	b/O		b/O	b/O
3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
4	2	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
7	2	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
12	2	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
15	2	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0
16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
17	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
18	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
19	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
20	2	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
21	2	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
22	2	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0 A	0
23	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
24	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
25	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
26	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
27	2	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
28	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
29	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
30	2	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Final

Page 27 of 30

31	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
32	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
33	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
34	2	0	-	0	0	0	b/O	b/O	b/O	b/O		b/O	b/O
35	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
36	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
37	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
38	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
39	2	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
40	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
42	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
43	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
44	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
45	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
46	2	0	0	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
47	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
48	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
49	2	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
50	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
51	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
52	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
53	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
54	2	0	0	0	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A		0	0
55	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
56	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
57	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
58	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
59	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
60	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0

Final

Page 28 of 30

<그림 57. 분리-정제봉독에 대한 임상결과(a)>

61	2	0	0	-	0	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	0
62	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	2	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	0
70	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	2	0	0	-	0	b/O										
77	2	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
81	2	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0
82	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	2	0	0	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A
84	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	2	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

91	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	b/O	b/O
92	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	2	0	0	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0	A	0	0
95	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	2	0	0	0	0	-	0	0	A	0	A	0	A	0	A	0
102	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	0	A	0	0
106	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Standard Deviation		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<그림 57. 분리-정제봉독에 대한 임상결과(b)>

#### 4. 분리-정제용독 에센스의 수분 및 탄력 개선 평가

(SMC-131122-4533, 세명대학교 한방방이오산업 임상지원센터, 2013)

(SMC-131122-4534, 세명대학교 한방방이오산업 임상지원센터, 2013)

##### 가. 재료 및 방법

###### (1) 피험자 선정

만 30세에서 55세의 성인 여성 중에서 선정 기준에 만족하며 제외기준에 해당 사항이 없는 사람을 대상으로 선정하였으며(20명 선정) 연구자가 구두와 문서로 자세하게 설명한 후 서면 동의서를 받았다.

###### (2) 시험 부위 및 방법

피험자의 눈가 부위에 실시하였다. 시험제품 ‘에센스’를 1일 2회 안면(눈가) 부위에 적당량을 사용하도록 하였다.

###### (3) 시험 방법

###### (가) 준비 단계

피부 수분 및 탄력을 측정하기 위해 시험 부위는 깨끗하고 마른 상태를 유지하였으며 최소 30분간 항온항습( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , R.H. 40~60%)이 유지되는 곳에서 피부 안정 취한 후 진행하였다.

###### (나) 시험 일정

① 방문 1 (0주차): 피험자 선정, 제외 기준에 따라 연구에 적합한 피험자 선정하고, 피험자의 피부 상태를 확인한 후, 기기평가(Cutometer)를 하였다.

② 방문 2 (2주차): 배포된 시험 제품을 사용방법에 따라 2주간 사용한 후, 피부자극 평가 및 기기평가를 시행하였다.

③ 방문 3 (4주차): 배포된 시험 제품을 사용방법에 따라 4주간 사용한 후, 피부자극 평가, 기기평가 및 설문 평가를 병행하여 효과를 평가하였다.

###### (다) 결과 분석

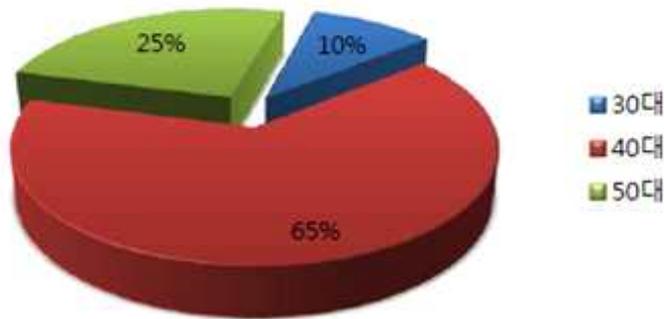
수분 및 탄력 측정은 Corneometer(CM825, Courage and Khazaka Electronic Co., Germany)로 하였으며, 기기적 평가는 5회 실시하였고, 최대값과 최소값을 제외한 3개의 값을 이용해 평균값을 구하였다. 변수로는  $R^2$ 값을 선정하였으며, 값이 높아질수록 피부탄력이 개선됨을 의미한다. 측정계수는 Arbitrary Unit(A.U.)이다.

나. 결과 및 고찰

본 임상 평가는 시험제품 ‘에센스’를 1일 2회 아침, 저녁으로 안면(눈가) 부위에 적당량을 사용하였으며 사용 후 수분 및 탄력 개선 효과를 평가하였고, 만 30~55세의 성인 여성을 대상으로 수행하였다.

시험에 참여하는 피험자들은 평균 45세로 연령대별로 30대가 10%, 40대가 65%, 50대가 25%로 참여하였다. 중도 탈락한 피험자는 없었으므로 시험에 참여한 피험자는 최종 20명이다(그림 58).

참여피험자 연령대



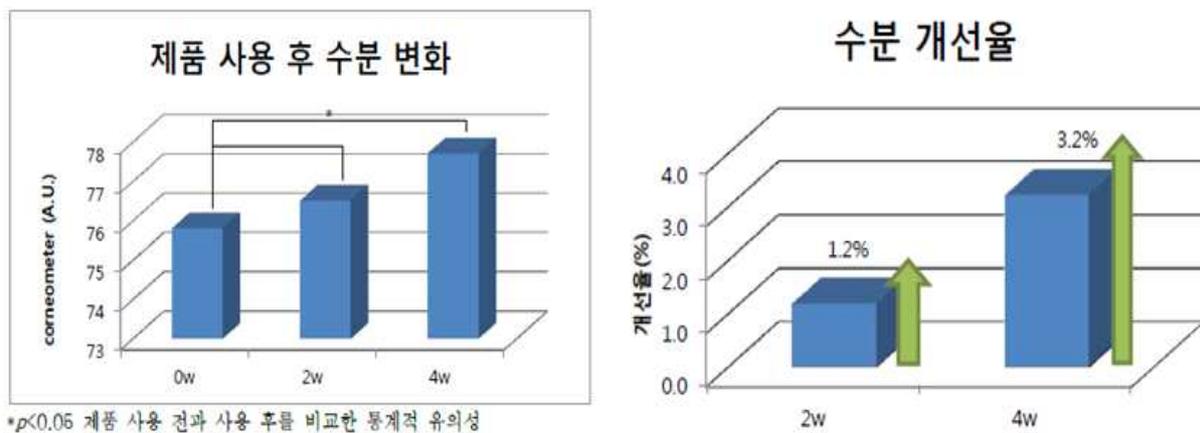
인원	구분	참여 피험자	탈락 및 중도 포기	시험을 종료한 총 피험자(%)
20명	30대	2	0	2(10%)
	40대	13	0	13(65%)
	50대	5	0	5(25%)

<그림 58. 임상 평가 참여피험자 연령대>

제품 사용 후 수분 개선 측정 결과는 <그림 59>와 같다. ‘에센스’의 수분 측정 결과값은 사용하기 전(0w) 75.8 A.U., 제품 사용 2주 후(2w) 76.4 A.U., 제품 사용 4주 후(4w) 77.9 A.U.으로 평가되었다. 제품 사용 전과 비교하여 제품 사용 2주 후에는 통계적 유의성을 확인하기 어려웠으나, 제품 사용 4주 후 통계적으로 유의한 수준으로 수분 개선 효과가 있음을 알 수 있다. 또한 시험 제품에 대한 수분 개선율(%)은 다음식에 따라 산출하였으며 “에센스”의 수분 개선율 분석 결과, 시험 제품 사용 전과 비교하여 제품 사용 2주 후 1.2%, 제품 사용 4주 후 3.2%의 수분 개선율을 확인하였다.

더불어, 피험자들은 이상반응 발생 즉시 본 센터로 보고하도록 하였다. 피부자극평가는 피험자에 의한 자가 설문 평가 및 연구자의 육안 평가를 토대로 실시하였으며, 그 결과 제품에 대한 이상반응은 관찰되지 않았다(표 16).

$$\text{수분개선율(\%)} = \frac{\text{각주의수분변화량결과}}{\text{0주(제품사용전)의수분측정결과}} \times 100$$



<그림 59. 분리-정제봉독 에센스의 수분변화 및 수분 개선율>

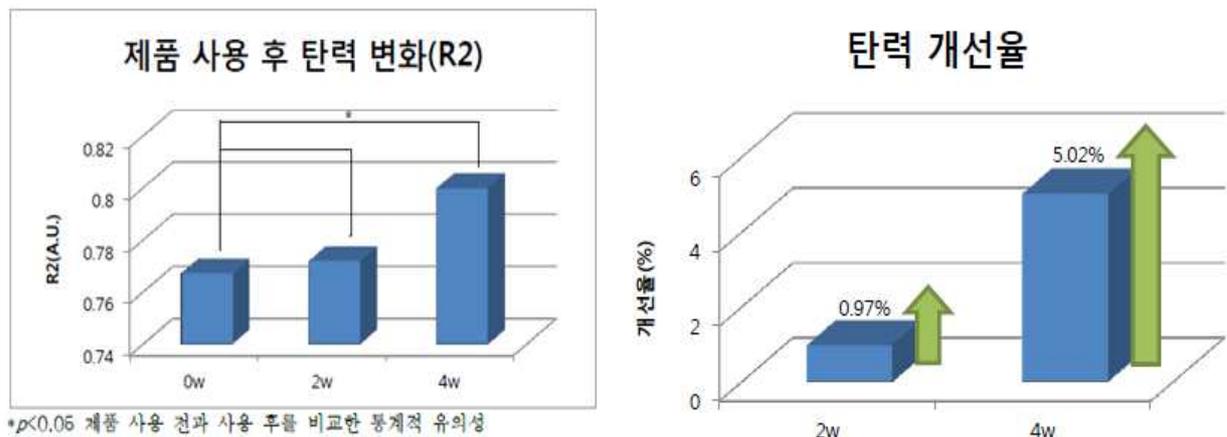
<표 16. 피시험자의 피부자극평가에 대한 결과>

	홍반	부종	가려움	자통	작열감	뻣뻣함	따끔거림
2W	-	-	-	-	-	-	-
4W	-	-	-	-	-	-	-

제품 사용 후 탄력 개선 측정 결과는 <그림 60>와 같다. ‘에센스’의 탄력 측정 결과값은 사용하기 전(0w) 0.7672 A.U., 제품 사용 2주 후(2w) 0.7720 A.U., 제품 사용 4주 후(4w) 0.8000 A.U.으로 평가되었다. 제품 사용 전과 비교하여 제품 사용 2주 후에는 통계적 유의성을 확인하기 어려웠으나, 제품 사용 4주 후 통계적으로 유의한 수준으로 탄력 개선 효과가 있음을 알 수 있다. 또한 시험 제품에 대한 탄력 개선율(%)은 다음식에 따라 산출하였으며 “에센스”의 탄력 개선율 분석 결과, 시험 제품 사용 전과 비교하여 제품 사용 2주 후 0.97%, 제품 사용 4주 후 5.02%의 탄력 개선율을 확인하였다.

더불어, 피험자들은 이상반응 발생 즉시 본 센터로 보고하도록 하였다. 피부자극평가는 피험자에 의한 자가설문 평가 및 연구자의 육안 평가를 토대로 실시하였으며, 그 결과 제품에 대한 이상반응은 관찰되지 않았다(표 17).

$$\text{탄력개선율(\%)} = \frac{\text{각주의 탄력 변화량 결과}}{\text{0주(제품사용 전)의 탄력 측정 결과}} \times 100$$



<그림 60. 분리-정제봉독 에센스의 탄력변화 및 탄력 개선율>

<표 17. 피시험자의 피부자극평가에 대한 결과>

	홍반	부종	가려움	자통	작열감	뺨뺨함	따끔거림
2W	-	-	-	-	-	-	-
4W	-	-	-	-	-	-	-

## 제 8 절 국내외 전시회/박람회를 통한 시장조사

### 1. 목적

화장품, 동물 항생제의 천연 소재로 시판되고 있는 정제붕독(PBV)을 넘어 알레르기 성분을 분리, 정제한 분리-정제붕독(IPBV)의 해외 수출을 위함이다. 전시회 및 박람회를 통해 시장 조사를 실시하였으며 업체 바이어들과 미팅을 통해 정제붕독, 분리-정제붕독의 효능, 안전성을 설명하였다.

### 2. 국내 전시회/박람회를 통한 국내 시장조사

기간/장소	행사명	내용
2013.05.08.- 2013.05.14.	2013 오송화장품뷰티세계박람회	
충북 오송	(부스설치)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 당사는 화장품 원료로써 정제붕독의 효능을 홍보하기 위하여 오송 국제 뷰티 화장품 박람회에 참가함. 국내외 350개 기업과 2000명 이상의 바이어들이 참가하였으며, 월드뷰티관, 생명뷰티관, 화장품 산업관, 뷰티산업관 등에서 화장품 전시뿐만 아니라 다양한 뷰티 체험 및 공연 또한 진행되었음. 전시기간동안 화장품 및 뷰티에 관심이 많은 일반인부터 수많은 국내외 바이어에 이르기까지 다양한 연령층이 참관.</li> <li>- 일반인의 경우 붕독에 대한 인식이 아직까지 매우 부족하였으며, 붕독의 정의 및 다양한 생리학적 효능에 대한 자세한 설명과 소개함.</li> <li>- 붕독에 대한 기본적 지식을 가지고 있는 바이어의 경우, 주로 붕독의 가격, 최소구매량, 화장품에 이용되</li> </ul>

는 봉독의 함량, 효능적 실험결과에 대한 질의응답진행.  
 - 당사는 이번 오송 국제 화장품 전시를 통하여 구체적인 바이어를 찾기보다는 마누카 닥터의 에센스, 로션, 클렌저 등을 이용하여 소비자들에게 봉독에 대한 인식 및 효능을 홍보하는데 유익한 기회라 사료됨.



2013.09.11.- 2013  
 2013.09.13. Bio Korea  
 경기 일산 (부스설치)

- 해외 36개국 190여개의 글로벌 기업을 비롯해 국내외 약 500개 전시부스로 참여한 2013 Bio Korea.  
 - 오송박람회의 경우 상담자들이 주로 연세가 있으시거나 화장품에만 관심이 많으셨으나 이번 전시회의 경우 상담자들이 주로 제약, 교수님, 대학원생들로 봉독 채취기나 기계 쪽 보다는 봉독의 효능 및 기능, 부작용 등에 대한 관심 컸음.  
 - 봉독을 원료로 판매중인 구주제약 아피톡신, 동성제약 a.c.care와 관련하여 문의하였고, FDA 등록은 있는데 국내 허가의 진행상태 및 FDA 인증서 요구하는 업체도 있었음.  
 -국내외 제약회사, 타이완, 파키스탄 소재의 회사에서 봉독채취기 및 봉독의 사용처에 대한 질의응답 진행.

## “**봉독**(Bee venom)을 이용한 신약개발”

2014년 6월 3일 [화] PM 2:30~6:00  
대구가톨릭의료원 **데레사관 3층강당(데레사홀)**

2014.06.03. 대구가톨릭대학교  
의과학연구소

주최 | 대구가톨릭대학교 의과학연구소  
바이오그린 21 연구팀

경북 대구

(심포지움 참석)

제목: “봉독(Bee venom)을 이용한 신약개발”  
- ‘봉독을 이용한 신약개발’을 주제로 봉독을 심도 있게 연구하고 있는 대구가톨릭대학교 연구진들 뿐만 아니라, 농진청, 동성 제약, 청진바이오텍 등 봉독의 다양한 생리활성 및 치료 효능을 연구하는 많은 업체들이 참가하여 심포지움이 진행됨.  
- 주로 봉독의 의학적 기전연구 및 신약개발에 관하여 진행되었으며, 마지막 섹션에는 대구가톨릭대학교의 교수님, 농진청의 박사님 등 봉독의 의학적 치료 효능에 대한 현재 연구현황에 대한 질의 및 토론으로 당사에서 할 수 없었던 봉독에 대한 의학적 접근에 대한 정보수집함.

### 3. 국외 전시회/박람회를 통한 국내 시장조사

기간/장소	행사명	내용
		
2013.08.03.-	마누카닥터	
2013.08.11.	영국 지사장 미팅	
영국	(업체미팅)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 마누카 닥터는 선케어 제품과 바디제품의 연구개발을 진행하고 있으나 영국의 복잡한 인허가 절차가 적어도 6개월 이상 소요되므로 12월경 출시를 목표로 준비에 박차를 가하고 있음.</li> <li>- 영국은 선케어 제품 시장이 매우 크고 천연물에 대한 소비자의 관심이 높아 가능성이 큰 시장이므로 앞으로 마누카 닥터는 바디제품의 개발을 통하여 제품을 다양화함으로써 제품라인을 형성을 목표로 하고 있음.</li> <li>- 초고가 제품을 출시하여 백화점 전문 라인을 출시하는 것을 염두 중.</li> <li>- 홀랜드&amp;베렛, 슈퍼드러그, 부츠 등의 여러 드러그스토어 및 백화점으로 진출된 마누카닥터 봉독 제품들은 국내보단 인지도가 높음을 알 수 있었음.</li> </ul>

2013.11.13.-  
2013.11.16.  
홍콩

Cosmoprof Asia  
(전시회 참관)



- 규모는 거의 오송화장품 박람회의 2배정도로 3일 동안 1, 2층을 주로 참관함. 한국을 포함한 아시아 부스가 70~80%정도 있었고 싱가포르, 뉴질랜드, 독일 등이 전시회를 참가하였음.

- 오일, 천연물, 천연 peptide, stem cell등을 이용한 화장품이 가장 많음. 봉독화장품 회사도 6~7개 정도.

- 우선 화장품 회사를 위주로 당사 제품의 팜플렛을 돌렸으나, 팜플렛이 화장품에 대한 효능보다는 주로 봉독 채취기, 면역기능으로만 설명이 되어있어서 타사제품 (화장품 회사)의 팜플렛 및 명함을 받아와서 자세한 내용 및 MSDS를 이메일로 홍보할 예정.

- 21개국 380업체 이상의 기업체가 참가한 PCHi에서는 유럽, 중국, 대만 등 100개 이상의 업체가 당사의 부스에 방문, 상담함.

2014.02.19.-  
2014.02-21.

PCHi

중국 상해

(부스설치)

- 홍보를 위하여 제품 사진 및 제품 설명, 제품의 효능 등이 수록된 catalog를 현장에서 배포하였고, 고객들이 정제봉독 화장품을 사용해 볼 수 있도록 당사의 제품을 함유한 마누카 닥터사의 화장품 샘플을 이용하였음.

- 대체적으로 아시아권에서 봉독에 대한 관심이 많았으며, 중국에서도 봉독이 생산되고 있으나 우수한 질을 가진 제품생산을 위한 정제기술이 부족하여 기술적으

로 상담하는 사람도 다소 보임. 또한 대만의 한 업체에서 화장품원료로써 봉독에 대한 관심이 굉장히 많았으며, 이에 따라 제품을 구입할 의사가 있으며 정제봉독과 관련된 HPLC 분석 data 및 항균활성, 항산화 활성 등 기타 추가 실험 자료 및 임상 데이터를 요청하였음.

- 본 전시회를 통하여 당사의 주요 제품인 고품질 정제봉독을 아시아, 유럽 등 여러 국가에 홍보 할 수 있던 기회였음.



in-cosmetics<sup>®</sup>  
Hamburg, 13 April 2014



2014.04.01. -  
2014.04.03. in-Cosmetics  
  
독일 (부스설치)  
함부르크



- 본 전시회가 열리는 3일 동안 참관 및 방문업체의 경향을 관찰한 결과 봉독에 대한 관심은 유럽보다는 아시아 쪽에서 더 많음.
- 대체적으로 '봉독'이라는 단어를 얘기했을 때 '봉독=독'이라는 인식이 강했으며, 독이 어떻게 화장품 원료로 사용이 되는지 질의문의 많음.
- 트러블개선, 주름개선 효과 등 봉독에 대한 효능을 설명해 주었을 때 비로소 관심을 가짐.

- 당사의 봉독을 이용하여 제조한 Manuka Doctor의 크림 및 로션 등을 알아보고 방문하는 업체들도 몇 있었음.
- 주로 중국, 대만, 태국, 터키의 업체에서 실질적으로 봉독을 구입하기 위하여 MSDS, 정제봉독의 세부적인 특징, 실험 데이터 등을 요구함.
- 유럽의 경우 주로 동물성 천연 원료보다는 허브, 오일 등 식물성 천연원료를 선호하였으며 봉독으로부터 유발되는 알레르기 반응에 대해 우려하는 경향이 강함.
- 이는 반대로 현재까지 유럽시장에서 봉독화장품에 대한 인식 및 제품이 차지하고 있는 비율이 크지 않기 때문에 앞으로 당사에서 봉독의 알레르기 반응에 대해 화장품 원료로써 문제가 없다는 실험적 및 임상 데이터를 가지고 접근함과 동시에 제품의 효능에 대한 꾸준한 홍보로 효과를 기대해 봄.

2014.04.04.-  
2014.04.07.      Cosmoprof  
  
이탈리아      (전시회참관)  
볼로냐



- 당사는 Cosmoprof 전시회에 참관하여 화장품 업체를 방문하여 화장품 원료로써 봉독제품 및 효능을 홍보하고자 Catalog를 배부함. 또한 봉독에 대해 관심을 가지는 업체에는 제품의 세부적인 특징 및 효능에 대한 몇 가지 자료 등을 첨부.
- 봉독, 벌꿀 등을 이용하여 만든 화장품이 전시되어 있었지만 유럽에서는 아직까지 화장품 원료로써 봉독이 익숙하지 않음을 느껴 봉독에 대한 안전성 연구와

꾸준한 홍보의 필요성 대두.

-본 전시회의 경우 in-cosmetics 전시회에 비해 화장품에 대한 전시품목 보다 nails, SPA, hair에 대한 전시품목이 반 이상을 차지하여 향후 in-cosmetics을 통하여 당사의 제품을 꾸준히 홍보하는 것이 더욱 효율적일 것으로 사료됨.

2014.04.24.-  
2014.04.27.  
터키  
Asian Apicultural  
Association  
(AAA)  
(부스설치)



2014.06.19.-  
2014.06.22.  
대만  
Compson 방문  
(업체미팅)



- 당사는 지난 3월 Compson(타이완 소재)과 계약이 성립되었고 이들은 지난 4월에 sample제조와 주름개선 등 간단한 임상실험을 위하여 당사의 정제분독 1 g을 주문함.

- 당사는 Compson과의 매출증대 및 제품생산, 판매계획 등 정보를 서로 공유를 목적으로 미팅진행.

- Compson은 현재 당사의 정제분독을 이용한 sample 제조를 진행하였고, 제품 홍보를 위하여 고객만족의 화

장품 용기를 디자인 하는 것을 완료함. 정제봉독 화장품의 주 기능은 주름개선이며 부작용이 많은 보톡스와는 달리 천연원료로써 각광받을 것으로 예상됨. 주요 품목으로 스킨토너, 에센스, 크림, 마스크 등 총 4가지 제품을 개발하고자 하며 3가지 품목을 제외한 마스크 팩의 샘플제조 및 생산은 현재 계획 중에 있음. 또한 주름개선 화장품으로써 이들의 효과를 증대시키기 위하여 봉독뿐만 아니라 주름개선효능을 가지는 뱀독과 같은 역할을 가지고 있는 SYN-HKE라는 원료를 혼합하고자 함. 주요 판매대상으로는 피부가 밝은 중년여성으로 현재까지 정제봉독 화장품의 인식이 높지 않아 고객들을 대상으로 한 세미나, 엑스포 등 홍보에 집중하고자 함.



in-cosmetics®  
BRASIL São Paulo, 9-10 September 2014

2014.09.09. -  
2014.09.10. in-cosmetics  
브라질 (부스설치)  
상파울로



- Cosmetic-brasil 전시회는 올해 브라질 상파울로에서

---

처음으로 개최되었으며, 이틀에 걸쳐 진행됨.

- 이전의 유럽 및 중국에서 개최된 화장품 원료박람회에 비해 규모 및 방문자 수가 크지 않았으며 주로 필리핀, 콜롬비아에서 붕독에 대해 깊은 관심을 보임.

- 대부분 붕독의 안전성과 관련된 인증 및 실험 data (임상실험)를 요청함. 이는 붕독이 피부와 직접적으로 관련된 화장품 원료이며 주름개선, 항균활성 등이 매우 우수하지만 일반적으로 사람들이 쉽게 다루지 않는 천연소재이기 때문인 것으로 사료됨.

- 또한 각국의 기자 방문 및 인터뷰가 진행되었으며, Cosmetic Design North America Homepage에 당사의 전시회 현장모습과 당사의 제품에 대한 간략한 소개글이 게시됨.

---

## 제 9 절 고찰

### 1. 분리-정제봉독(IPBV)의 개발 목적 및 결과 요약

수천 년 전부터 민간 및 한방요법으로 봉독이 사용되어져 왔다. 만성 염증치료, 류마티스성 질환, 피부질환 등 논문발표를 통해 효능 및 치료사례가 입증되었다. 하지만 봉독의 성분 중에는 알레르기 증상을 유발하는 phospholipase A<sub>2</sub>, hyaluronidase, histamine 등이 있다. 봉독의 allergen은 불안, 두드러기, 가려움증, 구토, 경련, 설사 등이 수반될 수 있고 심할 시 호흡곤란, 실신 등의 부작용에 대한 가능성이 충분히 있기에 임상에는 신중을 가해야 한다. 따라서 본 연구는 봉독의 효능은 유지하면서 보다 안전하게 사용하기 위해 알레르기 발생원인 성분을 원천적으로 차단하고자 하였다.

알레르기 유발성분이 분리된 분리-정제봉독과 기존 정제봉독의 효능에 대한 비교 연구를 진행하였다. 그 결과 항산화, 항균, 세포독성, 미백, 주름개선 효과가 분리-정제봉독에서 나타났으며 정제봉독보다 좋거나 유사하게 평가되었다. 더 나아가 화장품 원료로서의 피부 자극성과 민감성 평가(patch test), 정제봉독 및 분리-정제봉독을 함유한 에센스에 대한 효능 평가를 실시한 결과, 화장품 소재로서의 봉독안정성 및 효능을 입증하였다.

### 2. 정제봉독과 분리-정제봉독의 차이

본 연구를 통해 개발된 분리-정제봉독과 기존제품에 대한 정의 및 함량차이는 다음과 같다(표 18).

- 봉독원료(건조봉독): 당사가 개발한 봉독채취기(특허번호: 10-0579899)를 이용하여 살아있는 벌에게 전기적인 충격을 주어 채취한 봉독으로 화분, 프로폴리스, 왁스, 미세곤충, 먼지 등의 성분들이 섞여 있기도 하다.

- 정제봉독(PBV): 채취된 봉독원료를 충분히 증류수에 용해시켜 3차 여과를 거쳐 비수용성 물질(화분, 프로폴리스, 왁스, 미세곤충 등), 미세물질(꽃가루, 미세먼지 등), 미생물을 제거(멸균)한다. 여과된 여과액을 동결 건조시켜 정제봉독을 생산 및 제품화 한다.

- 분리-정제봉독(IPBV): 봉독의 알레르기 유발물질(PLA<sub>2</sub>, hyaluronidase 등)을 분리하여 봉독 제품에서 유래되는 발열, 두드러기, 기침 등의 알레르기 반응을 낮춘다.

<표 18. 정제봉독 및 분리-정제봉독의 주요 성분 함량 비교>

	Melittin	Apamin	PLA <sub>2</sub>
정제봉독 (PBV)	≥ 50%	2.0~3.0%	11.5~13.0%
분리-정제봉독 (IPBV)	45~75%	2.0~4.5%	≤ 1.0%

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구목표 달성도

#### 1. 1차년도 연구목표 및 달성도

양봉 농가로부터 수매한 건조봉독의 해외 수출을 위한 대량정제법 확립 및 생산법을 구축한다. 또한 봉독의 알레르기 유발 성분 제거 공정의 도입으로 ‘분리-정제봉독’의 대량 분리, 정제 시스템의 규격화와 분리-정제봉독의 안전성 및 유효성을 평가한다.

연구목표	연구내용	달성도
수출을 위한 채취봉독의 생산 이력제 및 표준함량 제정 (주관)	-양봉농가와 당사 전기 충격식 봉독채취기의 판매를 높여 농가와 봉독의 수매계약 체결함. -국내산 건조봉독을 2013년에 약 8.83 kg, 2014년에 약 7.56 kg 정도 전국 양봉농가로부터 수매하여 본 연구 원료로 사용함.	100%
정제봉독의 알레르기 유발성분 분리 및 분석 공정 확립 (주관)	-정제봉독의 주요 성분인 melittin, apamin, PLA <sub>2</sub> 의 분자량 차이를 바탕으로 ultra filtration을 통해 분리. Ultra filtration의 분리 조건에 따른 PLA <sub>2</sub> 분리의 최적조건 확립함. 조건 1 : 시료농도(10, 2, 1 mg/mL) 조건 2 : 분획분자량(5, 10, 30 KDa) 조건 3 : 압력(20, 30, 40 psi) - 정제봉독 및 분리-정제봉독의 주요 성분 분석은 HPLC를 통해 확인하였으며(정량분석), SDS-PAGE를 통해 정제봉독에서 PLA <sub>2</sub> 분리를 확인(정성분석)함. 더 나아가 Prep-HPLC를 이용하여 Reversed Phase Chromatography 방법을 통해 melittin, apamin, PLA <sub>2</sub> 를 분리, 분석함.	100%
분리-정제봉독의 해외 수출을 위한 대량생산 시스템의 규격화 (주관)	다양한 조건을 바탕으로 ultra filtration을 통한 최적의 PLA <sub>2</sub> 분리법 확립함. 기존의 분리방법이었던 FPLC Gel-filtration과 본 연구를 통해 확립한 ultra filtration의 생산	100%

	율, 생산비용, 대량생산을 위한 수득률 비교 분석함.	
해외수출을 위한 정제봉독 및 분리-정제봉독의 안전성 및 유효성 검사 (주관)	수출을 위한 정제봉독 및 분리-정제봉독의 안전성, 유효성 검사를 실시함 ( <i>in vitro</i> ). -항산화 효능: DPPH 라디칼 소거능 -항균 효능: agar well diffusion, MIC -알레르기유발 비교: Histamine assay -항염 효능: NO assay -세포 독성: MTT assay -미백 효능: Tyrosinase inhibitory effect	100%
자연적인 주름개선 효과를 세포실험을 통해 평가 (위탁)	-Elastase 저해활성 측정 -인체섬유아세포의 세포독성, 증식능 시험 -콜라겐 생성량 측정 -Western blot으로 콜라겐 생성량 측정 -Matrix metalloproteinase 저해활성 측정	100%

## 2. 2차년도 연구목표 및 달성도

알레르기 유발성분을 분리한 분리-정제봉독의 임상평가를 실시하여 해외 수출의 안전성을 확보한다. 뿐만 아니라 기존 정제봉독의 해외 수출 중 저장성을 평가하여 가장 적절한 운송 및 저장 조건을 확립하며 국내외 기능성 화장품, 제약 관련 전시회/박람회의 참가와 학회발표를 통해 분리-정제봉독의 우수성을 과학적으로 홍보한다.

연구목표	연구내용	달성도
수출을 위한 정제봉독의 저장성 연구 (주관)	건조 상태의 정제봉독과 1 mg/mL의 정제봉독 수용액의 저장 조건에 따른 주요 성분변화를 확인하여 수출에 적합한 저장, 유통조건을 확립 -조건 1 : 저장상태(건조봉독, 정제봉독 수용액) -조건 2 : 저장온도(-20°C, 5°C, 25°C, 40°C) -조건 3 : 저장조건(차광, 투명) -조건 4 : 저장조건(질소충전, 공기노출(산화))	100%
분리-정제봉독의 원료 안전성 시험 (위탁/주관)	-화장품 원료로써의 안전성 임상평가를 계획했으나 동물임상실험 대체시험 실행함. <i>In vitro</i> 3T3 neutral red uptake(NRU) 광독성 시험 <i>In vivo</i> local lymph node assay(LLNA) 피부 자극 시험 -정제봉독과 분리-정제봉독의 화장품 원료로서의 안전성 평가 실시함: 'Hypoallergenic' 과 'Dermatologically tested'법을 바탕으로 피부에 패치(patch)를 반복적으로 부착하여 정제봉독과 분리-정제봉독의 자극성 및 민감성 조사	100%
분리-정제봉독의 화장품 관련 임상평가 (주관)	분리-정제봉독을 함유하는 기능성 화장품의 수분개선 및 탄력개선에 대한 임상평가 실시	100%
자외선에 의한 주름개선 효과를 세포실험을 통해 평가 (위탁)	-자외선 조사에 의한 세포보호 효과 -정제봉독 및 분리-정제봉독 처리 후 ELISA를 이용한 콜라겐 양의 변화 측정 -정제봉독 및 분리-정제봉독 처리 후 Western blot을 이용한 콜라겐 변화 측정 -정제봉독 및 분리-정제봉독의 MMPs 합성 저해 효과	100%

	-정제봉독 및 분리-정제봉독의 UVB로 인한 ERK1/2, p38와 p65저해효과	
국내외 전시회/박람회 참석 및 해외 기업 조사와 탐방 (주관)	<p>국내외 전시회/박람회 및 업체 미팅을 통해 정제봉독과 분리-정제봉독의 효능, 안전성 자료 제공</p> <p>국내 2013 오송화장품뷰티세계박람회, 2013 Bio Korea</p> <p>국외: 영국 MANUKA DOCTOR 지사장 미팅 중국 상해 PCHi 부스 독일 함부르크 in-cosmetics 부스 아탈리아 볼로냐 cosmoprof 참석 터키 Asian Apicultural Association 브라질 상파울로 in-cosmetics 부스 대만 COMPSON 미팅</p>	100%
학술보고 및 특허등록을 통한 과학적 증거 발표 (주관/위탁)	<p>한국분석학회 게재(1편), 투고(1편)</p> <p>한국미용학회 게재(1편)</p> <p>한국독성학회 게재예정(1편)</p> <p>농업생명과학연구 게재예정(1편)</p> <p>학회발표(6건)</p> <p>국내특허 등록(1편)</p> <p>PCT특허 출원(2편, 중국, 미국)</p>	100%

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

붕독은 순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖고 있으며 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 ‘붕침요법’으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다. 그러나 살아있는 벌을 이용한 붕침요법은 비숙련자의 취급상의 문제점과 함께 균일한 벌침액의 확보가 어렵고 정량화 또한 이루어지지 않아 실용화에 한계를 지닌다. 또한 붕침용법을 가축에 적용할 경우 일시 발열 등의 부작용이 있는 것으로 나타나 체계적인 효과규명이 필요한 실정이다.

세계적으로 화장품의 안정성에 대한 관심이 높아지게 되었고, 천연 및 유기농 화장품에 대한 소비자의 요구 또한 증가하고 있다. 일반적으로 선진국에서는 합성성분이 천연성분에 비해 덜 안전하다는 인식에 따라 천연 및 유기농 화장품을 구매하고 있으며 신시장의 경우 천연성분이 전통적으로 사용하고 있던 제품이므로 상대적으로 접근성이 높아 구매로 이어지는 것으로 알려져 있다.

하지만 붕독의 성분 중에는 알레르기 증상을 유발하는 PLA<sub>2</sub>, hyaluronidase, histamine 등이 포함되어 있어 간지러움, 붓기, 몸살, 두드러기 같은 증상을 동반한다. 따라서 당사는 붕독을 항생제, 화장품 등에 천연 원료로 사용하기 위해 이러한 알레르기 및 발열 반응을 유발하는 성분을 원천적으로 차단하고자 했다. 이에 ultra filtration system을 이용한 분리-정제붕독의 최적의 생산기술을 확립하였으며 더불어 수출을 위한 대량생산공정을 확보하였다(특허: 10-1364506). 당사가 개발한 기존의 알레르기 유발성분을 분리하는 방법인 FPLC gel filtration(특허: 10-1413715)과 비교하여 분리 후 수득률은 낮았지만 분리 과정 후 PLA<sub>2</sub>를 포함하는 부분물질의 활용이 가능하고 비용 및 생산시간이 현저하게 향상되었음을 확인하였다.

### 2. 산업적 측면

현재 양봉산업은 저가의 수입산 양봉상품들의 시장 점유율의 상승추세와 값비싼 붕독 제품의 수입으로 어려움을 겪고 있으며 주 소득원이 벌꿀, 로얄제리, 프로폴리스, 채집화분의 부가가치도 하락하는 추세에 있다. 또한 대표적인 밀원식물인 아카시아 수종의 질병, 기상 이변으로 인한 체밀량 감소, 꿀벌 사료비 상승, 양봉상품의 안전성 미흡, 생산기반 및 관련 법령/제도 등의 문제점도 부각됨에 따라 양봉산업의 다방면에서 낙후성을 보였다.

이러한 시점에서 당사가 개발한 붕독채취기를 활용한 정제붕독 생산시스템의 보급으로 붕독의 국내생산이 가능해지고 대표적인 양봉산물인 벌꿀, 로얄제리, 프로폴리스의 뒤를 이어 붕독이라는 부가소득원이 발생할 수 있었다. 봉군 당 평균 6g의 붕독 채취가 가능하고 채취붕독 1g(정제 전)을 8만원의 단가로 계산한다면 한 개의 봉군에서 평균 48만원의 부가소득이 발생하게 된다.

### 3. 경제적 측면

농촌진흥청과 개발한 봉독 채집장치와 봉독정제 기술로 생산하는 정제봉독(Purified Bee venom)을 제작년부터 영국 화장품 생산업체에 천연 기능성 화장품 원료로 수출하고 있다. 당사는 제작년 3월 농진청 보도 자료를 통해 보도된 정제봉독을 생산 및 해외 수출하는 기업으로 지난해(2013년)와 올해(2014년) 정제봉독 매출 금액의 총 합은 1,017,000천원으로 이 중 수출 금액이 약 \$53만에 이른다. 또한 분리-정제봉독의 매출은 약 52,000천원(2014년)이상으로 추정된다. 이를 시작으로 본 연구를 통해 정제봉독 뿐 아니라 분리-정제봉독의 수출 또한 증가할 것으로 기대된다.

또한 본 연구를 통해 생산되는 분리-정제봉독을 기존 정제봉독(\$440/g)의 20% 인상된 \$528/g으로 판매 계획 중이다. 당사와 수출계약을 한 마누카닥터에서 정제봉독을 원료로 사용하는 화장품은 총 7종, 품목당 봉독 소요량은 약 5 mg이다. 만약 '분리-정제봉독'을 원료로 품목당 5만개 생산을 가정하면 7품목×5만개×5 mg=1.75 kg/년으로 산출되며 이는 \$528/g×1.75 kg/년=\$924,000의 매출을 기대할 수 있다.

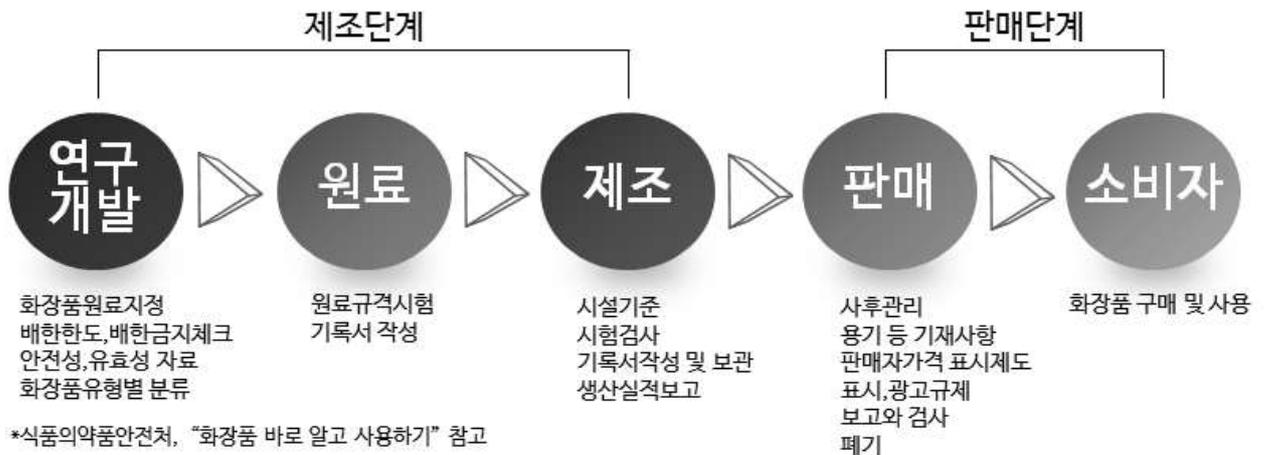
## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화, 산업화 실적 및 계획(기술실시 등)

1. 기술이전계약: 특허 10-1364506호에 대한 통상실시권 계약을 완료하였다(2014년 3월 3일).
2. 봉독의 알레르기 유발성분을 분리하는 기술을 바탕으로 대량생산 시스템 구축 및 수출 매출 증가를 기대한다.
3. 정제봉독 및 분리-정제봉독의 과학적인 효능을 확인하여 화장품, 동물의약품, 천연 의약품 등의 제품 개발에 활용한다.
4. 국내 봉독의 주요 단일성분 분리 기술 및 생산을 통해 standard급 표준물질의 시제품 개발(melittin, apamin, PLA<sub>2</sub>, 2013. 11), 제품화를 국내 봉독 R&D산업에 활용한다.
5. 산업화 계획

본 연구를 통해 개발된 알레르기 성분이 분리된 분리-정제봉독(IPBV)을 원료로 하는 기능성 화장품의 상품화를 산업화의 목적으로 한다. 더 나아가 봉독 주 성분의 함량을 조절하여 동물약품 소재로 확대 할 계획이다.

기능성 화장품 제품이 연구 단계부터 소비자가 구매할 때까지 과정은 다음과 같다.



연구개발: 본 과제를 통해 화장품 원료 안전성 및 기능성 화장품에 대한 효능 입증 완료

원료: 원료 표준 규격서 작성 및 분리-정제봉독의 생산공정 표준화 완료

제조: 화장품 제조 시설 기준에 맞는 제조 회사 리서치 및 계약 예정

판매: 시장조사 및 시제품 개발 후 홍보, 제품 표시제도 및 기재 사항 등 규제 준수

소비자: 분리-정제봉독을 함유한 기능성 화장품의 구입 및 사용 후기 작성자 모집

## 제 2 절 교육, 지도, 홍보 등 기술 확산 실적 및 계획

1. 국내외 전시회/박람회를 통한 홍보
  - 가. 2013 오송화장품뷰티박람회 (2013.05.08~14)
  - 나. 2013 Bio Korea (2013.09.11~13)
  - 다. PCHi, 중국 상해 (2014.02.19~21)
  - 라. in-cosmetics, 독일 함부르크 (2014.04~03)
  - 마. Asian Apicultural Association, 터키 (2014.04.24~27)
  - 바. in-cosmetics, 브라질 상파울로 (2014.09.09.~10)

2. 방송을 통한 홍보

KTV 방영: “대한민국의 희망, 창조경제” (2013년 11월 22일)

## 제 3 절 특허, 품종 및 논문 발표 실적 및 계획

1. 특허

- 가. 알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법(특허 제10-1364506호)
- 나. 알러지성분이 분리된 분리정제봉독 제조방법(PCT-KR2013-005016, 중국, 미국특허출원)

2. 논문

- 가. Ultrafiltration을 이용한 봉독의 phospholipase A<sub>2</sub> 제거에서 농도, 압력, 분자크기의 영향, 한국분석과학학회 제27권 6호 (2014년 12월 25일 발간)
- 나. 정제봉독(PBV)과 분리정제봉독(IPBV), 봉독아민(BVA) 분획시료에 대한 화장소재로서의 효능 비교, 한국미용학회 제20권 6호 (2014년 12월 31일 발간)
- 다. Pharmacological Profiles of PLA<sub>2</sub>-free Bee Venom Prepared by Ultrafiltration Method, 한국독성학회 제31권 1호 (2015년 3월 31일 발간예정)
- 라. UVB 자극을 받은 사람피부세포에서 PLA<sub>2</sub>를 제거한 봉독의 주름개선 효과, 농업생명과학연구 제49권 1호 (2015년 2월 28일 발간예정)

3. 학술발표

- 가. A composition comparison of honeybee venom with different regional distribution and collecting season in S. Korea, 한국분석학회 (2014. 06. 11.)
- 나. Effect of concentration, pressure and cut-off size for removing phospholipase A<sub>2</sub> in bee venom by ultrafiltration system, 한국분석학회 (2014. 06. 11.)
- 다. Isolated apamin, Phospholipase A<sub>2</sub>, Meittin from bee venom by Prep-HPLC, China-Japan-Korea symposium on analytical chemistry (2014. 08. 22.)
- 라. Effect of concentration, pressure and cut-off size on removing phospholipase A<sub>2</sub> in ultrafiltration system, China-Japan-Korea symposium on analytical chemistry (2014. 08. 22.)

- 마. 국내의 지역분포별 및 시기별로 수집한 꿀벌 봉독의 성분 분석에 관한 연구. 잠사양봉 학회 (2014. 09 .25.)
- 바. Phototoxic and skin sensitizing potentials of PLA<sub>2</sub>-free bee venom, 한국식품영양과학회 (2014. 10. 28.)

## 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

### 1. 추가연구

- 가. 본 연구에서는 알레르기 유발성분으로 알려진 PLA<sub>2</sub>의 분리법에 관해 연구가 진행되었으나 PLA<sub>2</sub>와 상호작용을 하는 봉독의 주 성분인 melittin의 분리법에 대한 연구로, 봉독을 이용한 치료의 종류 및 대상에 따라 봉독 성분함량을 조절할 목적으로 추가 연구가 필요하다 사료된다.
- 나. 본 연구에서는 정제봉독의 저장상태(차광/산화), 저장온도, 저장기간에 따른 저장성을 평가하였으나 생물의약품 개발의 기초연구를 위해 습도, 용기 및 마개 등 세부적인 조건을 추가하는 연구가 필요하다. 뿐만 아니라 분리-정제봉독에 대한 저장성 연구가 필요하다 사료된다.
- 다. 본 연구를 통해 개발된 ultra filtration system은 분리-정제봉독을 생산하는 방법으로 생산 중 최종적으로 걸러지는 하층액은 봉독의 저분자 물질로 peptide, amine 등의 성분이다. 이에 대한 효능 및 활성 연구를 추가적으로 진행함으로써 봉독의 활용도를 높인다.

### 2. 타연구에 활용 계획

- 가. melittin, apamin, PLA<sub>2</sub> 성분함량이 다양한 정제봉독을 제공함으로써 봉독을 소재로 하는 다양한 제품군(화장품, 의약품, 천연항생제 등) 연구에 활용이 가능하다.
- 나. 본 연구 결과를 바탕으로 알레르기 유발성분이 정제된 분리-정제봉독의 화장품원료로서의 기초자료(임상평가 및 유효성 안전성 평가)로 활용할 수 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 화장품 독성시험 동물 대체 시험법

가. EU는 2004. 9. 11 이후 화장품 완제품, 2009. 3. 11 이후 화장품 원료 및 복합물에 대한 동물 실험을 금지하였다. 2009. 3. 11 이후 실험장소와 관계없이 동물실험을 거친 원료를 포함한 화장품의 EU지역 내 판매를 금지하였다(다만, repeated-dose toxicity, reproductive toxicity and toxicokinetics의 일부 독성물질에 대한 동물실험을 거친 화장품 판매금지 2013. 3. 11까지 유예하였음). EU 집행이사회는 예외 없이 예정대로 2013. 3. 11 이후 동물실험을 거친 화장품의 EU(27개국)내 판매를 금지한다고 확인하였다.

#### 나. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test

세포독성을 나타내지 않는 수준의 빛에 노출되었을 때와 노출되지 않았을 때의 화학물질에 의한 세포독성을 비교하는 것이다. 세포독성은 화학물질 처리 후 염색시약인 neutral red 흡수의 감소 정도를 측정하여 평가한다. Neutral red는 비확산에 의해 세포막을 통과하여 라이소솜 안에 축적되는 양이온성 염색시약이다. 민감한 라이소솜 막의 변화로 라이소솜이 약하게 되고 비가역적인 다른 변화들이 유도된다. 생체이물질 활성화에 의해 유도된 변화는 결과적으로 neutral red의 흡수와 결합을 감소시켜 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별할 수 있게 한다.

- OECD Test guideline TG 432 *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity
- Lovell W.W. A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7: 95-102 (1993)
- Spielmann, H. *et al.* EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro* 8, 793-796 (1994)
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124 (1985)

#### 다. Local Lymph Node assay, LLNA

LLNA는 감작물질이 도포부위에서 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 원리에 근거한 시험법이다. 이러한 증식은 도포물질의 농도 및 알레르기 유발능에 비례하며, 감작능을 객관적이고 정량적으로 측정할 수 있도록 해준다. LLNA는 시험군의 증식 정도와 용매대조군의 증식 정도를 SI(stimulation Index, 자극지수)로 비교 평가한다. SI는 용매대조군과 시험군의 증식 비율로 결정하고, 시험물질의 피부감작물질 가능성에 대한 판정은 SI가 적어도 3이상이어야 한다. 본 시험법은 세포의 증식을 측정하기 위해 방사성동위원소를 이용한다.

- OECD test guideline TG 429 Skin sensitization: Local lymph node assay

- Kimber, I. and Basketter, D.A. The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165-169 (1992)
- Van Och, F.M.M, *et al.* A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology* 146, 49-59 (2000)
- Derman, R. J. *et al.* Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284 (1998)

#### 라. Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA

LLNA: BrdU-ELISA는 LLNA를 비방사선 방법으로 변형한 시험법으로 비방사선 물질인 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)(CAs No 59-14-3)를 ELISA로 측정하여 림프세포 증식을 평가하는 방법이다.

이 시험법은 동물을 이용하는 시험이나 기존 시험법에 비해 사용동물 수가 적고, 동물에 가해지는 고통을 경감시킨 시험법이라는 장점이 있다. 기존의 LLNA와 같이 피부감작성 반응 중 induction phase에 나타나는 반응을 측정한 시험법으로 용량 반응 평가에 적절한 정략적 자료를 제공한다. 또한 방사성 동위원소를 사용하지 않고 피부감작성을 확인하기 때문에 실험자가 방사성동위원소에 노출될 가능성이 없으며 방사성 폐기물을 발생시키지 않는다는 장점이 있다.

림프세포증식은 감작성을 정량적으로 측정할 수 있는 방법이다. 용매 대조군(VC, Vehicle treated control)의 평균증식정도를 각 시험군의 평균증식정도와 비교하여 림프세포 증식을 측정한다. 각 VC에 대한 시험군의 림프세포 증식 비율을 자극지수(SI)라고 하며,  $SI \geq 1.6$ 이면 감작성 물질로 판정한다. 이 시험법은 auricular lymph node 내의 BrdU 양을 측정하여 증식 세포 정도를 확인한다. BrdU는 방사선동위원소인 티미딘의 유사체로 티미딘과 유사하게 증식하는 세포의 DNA에 결합한다. DNA에 결합한 BrdU는 peroxidase가 표지된 BrdU 특이적인 항체를 이용한 ELISA 방법으로 측정한다. 기질을 넣어주면, 기질은 peroxidase과 반응하여 발색하며 microtiter plate reader기를 이용하여 특정 파장에서 발색정도를 정량한다.

- OECD test guideline TG 429 Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay
- Takeyoshi, M. *et al.* Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134 (2005)
- Haneke, K.E. *et al.* ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286 (2001)

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 없음.

## 제 8 장 참고문헌

1. LEE J.D. Bee-venom therapy: method of clinical approach. *J Korean Oriental Med.* 21;3. 3 - 8 (2000).
2. LEE M.Y., *et al.* Present Status of Korean Beekeeping Industry. *Korean J. Apiculture.* 25(2), 137-144 (2010).
3. U.K LAEMMLI. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685 (1970).
4. SHEN C. Z., *et al.* A Method for Separating an Active Ingredient of Bee Venom. 특허등록 제10-1413715 (2014).
5. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2), 55-63 (1983).
6. Shimada KK., *et al.* Antioxidative properties of xanthan on autooxidation of soybean oil in cyclodextrin. *J. Agriculture and Food Chemistry.* 40, 945-948 (1992).
7. JUNG J. K., *et al.* Anti-allergic effect of Osterici Radix water extract in human mast cells. *Kor. J. Herbology.* 25(3), 35-41 (2010).
8. KIM K. Y., *et al.* Anti-allergic Effects of Socheongyong-tang on RBL-2H3 Mast Cell and Mice-mediated Allergy Model. *Kor. J. Oriental Physiology and Pathology.* 21(5), 1260-1270 (2007).
9. Lixiang Liua *et al.* Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. *Tseng. J. tee science.* 28(4), 289-293 (2008)
10. 임혜원. Anti-oxidant Action and Anti-aging Activity of Phenylpropanoid Compounds. *약주대학교 의학박사 학의 논문*, 63-68 (2005).
11. Birkedal-Hansen, H., W. Moore, *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology&Medicine* 4(2): 197-250 (1993).
12. Kim, S.-W., B.-K. Jo, *et al.* Induction of extracellular matrix synthesis in normal human fibroblasts by anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* (Noni) fruit. *Journal of medicinalfood* 8(4): 552-555 (2005).
13. Bode, A. M., Dong, Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci. STKE.* RE2 (2003).
14. OECD. In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test. OECD Guideline for the testing of chemicals No. 432 (2004).
15. OECD, Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. 432 (2010).

## 제 9 장 시험성적서

- 본 연구개발 계획서상의 '평가의 착안점 및 기준

주요 성능지표	단 위	최종 개발목표	세계최고수준 (보유국/보유기업)	가중치 (%)	객관적 측정방법
					시험규격 <sup>4)</sup>
정제봉독 및 분리-정제봉독의 MIC	μg/ml	32~128μg/ml	32~128μg/ml/ 한국/농진청	15	MIC법, Disk확산법
정제봉독의 항산화능	%	75%		20	DPPH분석법, SOD유사활성, 폴리페놀
분리-정제봉독의 항산화능	%	75%			
정제봉독의 면역 활성 작용평가	%	90%		20	미토콘드리아 탈수소 반응에 의한 MTT assay
분리-정제봉독의 면역 활성 작용평가	%	90%			
정제봉독의 미백효과와 주름개선효과	%	80%		20	Tyrosinase and Elastase inhibition assay
분리-정제봉독의 미백효과와 주름개선효과	%	80%			
분리-정제봉독의 대량생산 수득률	%	60%		25	(분리-정제봉독/정제봉독)*100
<input type="checkbox"/> 측정결과의 증빙방법 제시					
<input type="checkbox"/> 시험성적서 제출					

KSC-R14002

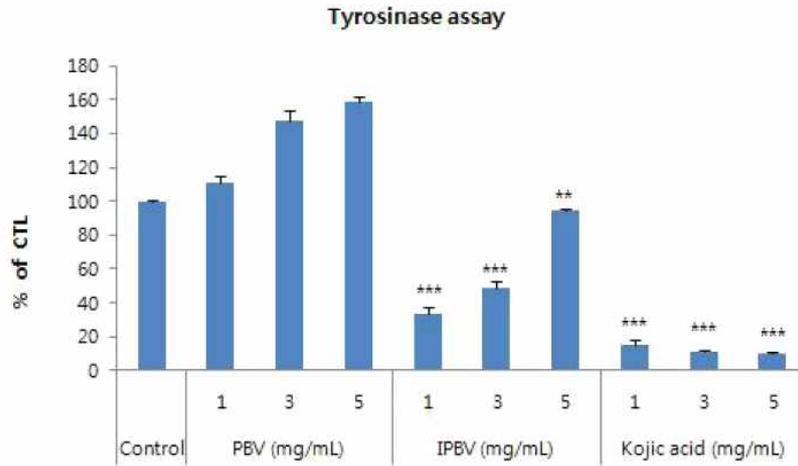
**대 외 비**

# 시 험 성 적 서

연구과제명	PBV 및 IPBV의 피부 효능평가	
연구기간	2014 년 2 월 12 일 ~ 2014 년 2 월 21 일	
참여연구원	오 수 진	
의뢰 기업	기업명	(주)청진바이오텍
	담당자	(성명) 김철구님 (Tel) 031-400-3707 (E-mail) younan99@biovenom.com
제출일	2014.02.21	

## 7. 시험 결과

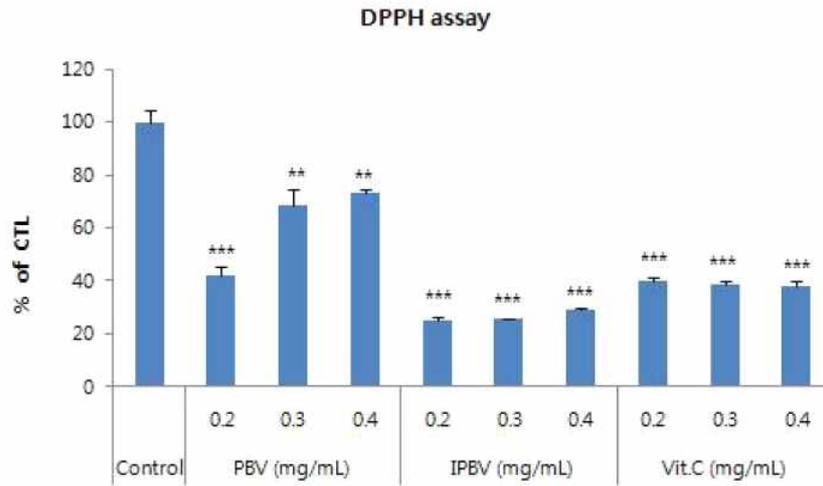
### 7-1. 미백 효능 시험 (Tyrosinase inhibition assay)



억제율(%)	1mg/ml	3mg/ml	5mg/ml
PBV	효능 없음	효능 없음	효능 없음
IPBV	66.0%	51.7%	5.9%
Kojic acid	85.2%	89.0%	90.2%

[그림 1. PBV 및 IPBV의 tyrosinase inhibitory effect]

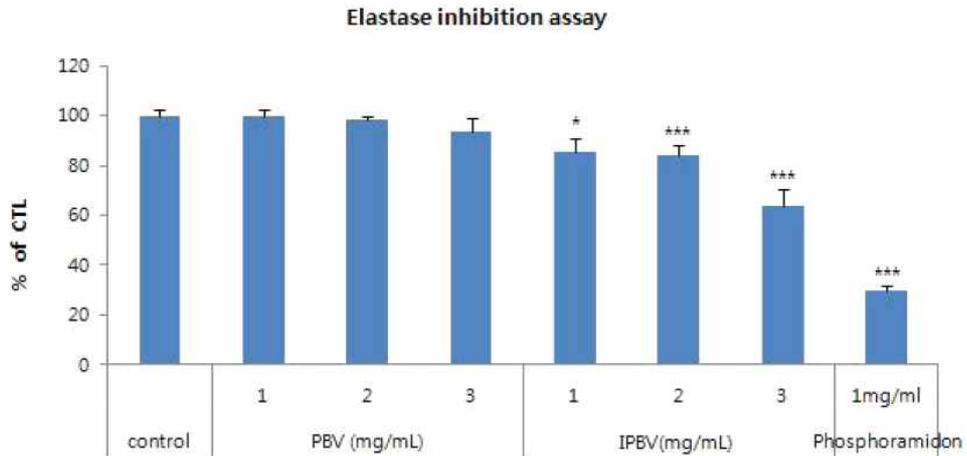
7-2. 항산화 효능 시험 (DPPH assay)



억제율 (%)	0.2mg/ml	0.3mg/ml	0.4mg/ml
PBV	57.8%	31.3%	27.0%
IPBV	74.7%	74.3%	70.8%
Vit.C	59.7%	61.6%	62.1%

[그림 2. PBV 및 IPBV의 DPPH inhibitory effect]

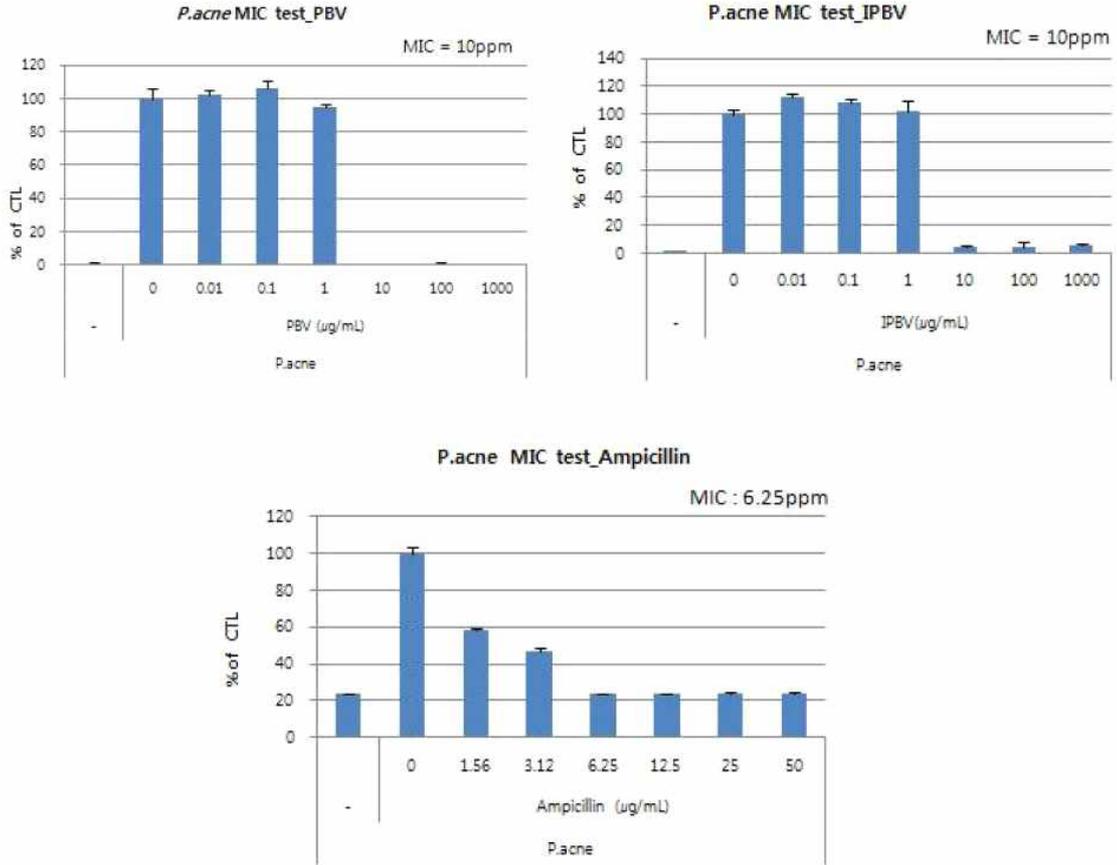
7-3. 주름 개선 효능 시험 (Elastase inhibition assay)



	1mg/ml	2mg/ml	3mg/ml
PBV	0.1%	2.0%	6.1%
IPBV	14.9%	16.1%	36.2%
Phosphoramidon	70.1%	-	-

[그림 3. PBV 및 IPBV의 Elastase inhibitory effect]

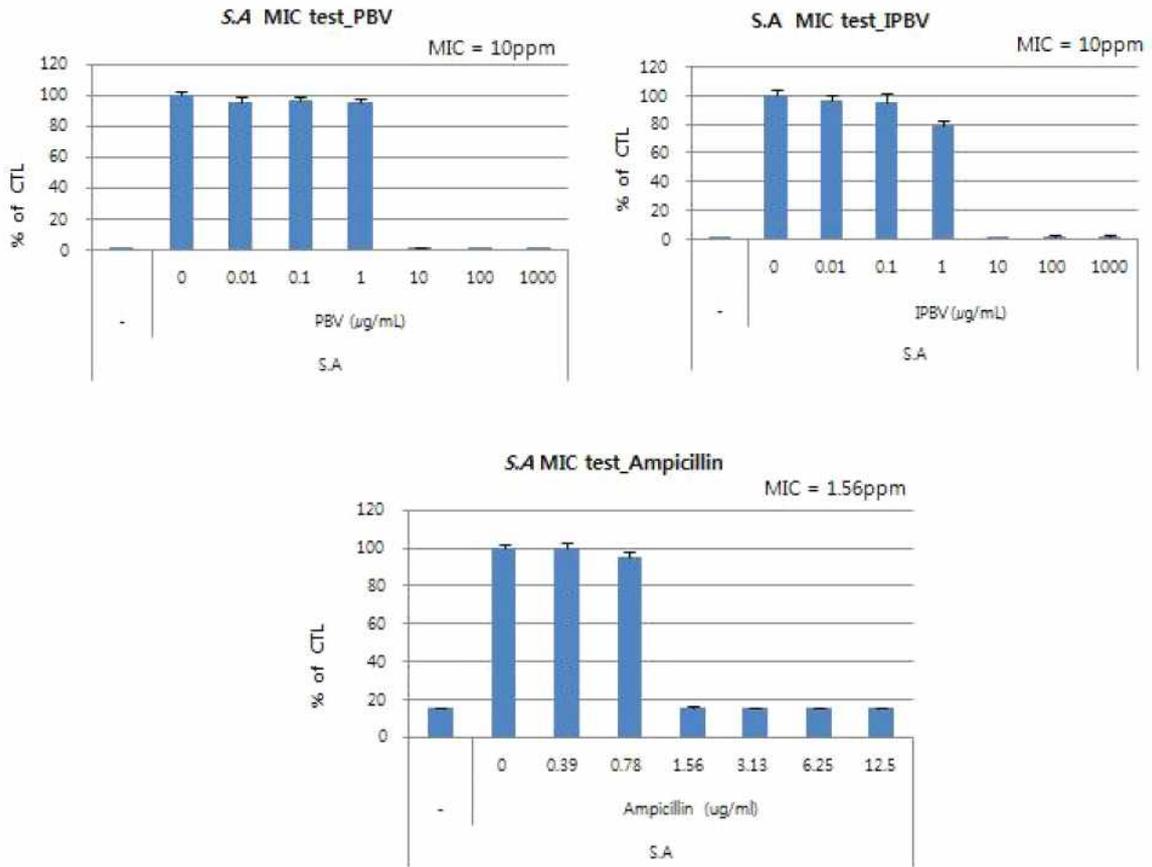
7-4. 항균 효능시험 (MIC test)  
7-4-1. *P.acne* MIC test



	PBV	IPBV	Ampicillin
<i>P.acne</i> MIC	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$

[그림 4. PBV 및 IPBV 의 *P.acne* MIC test]

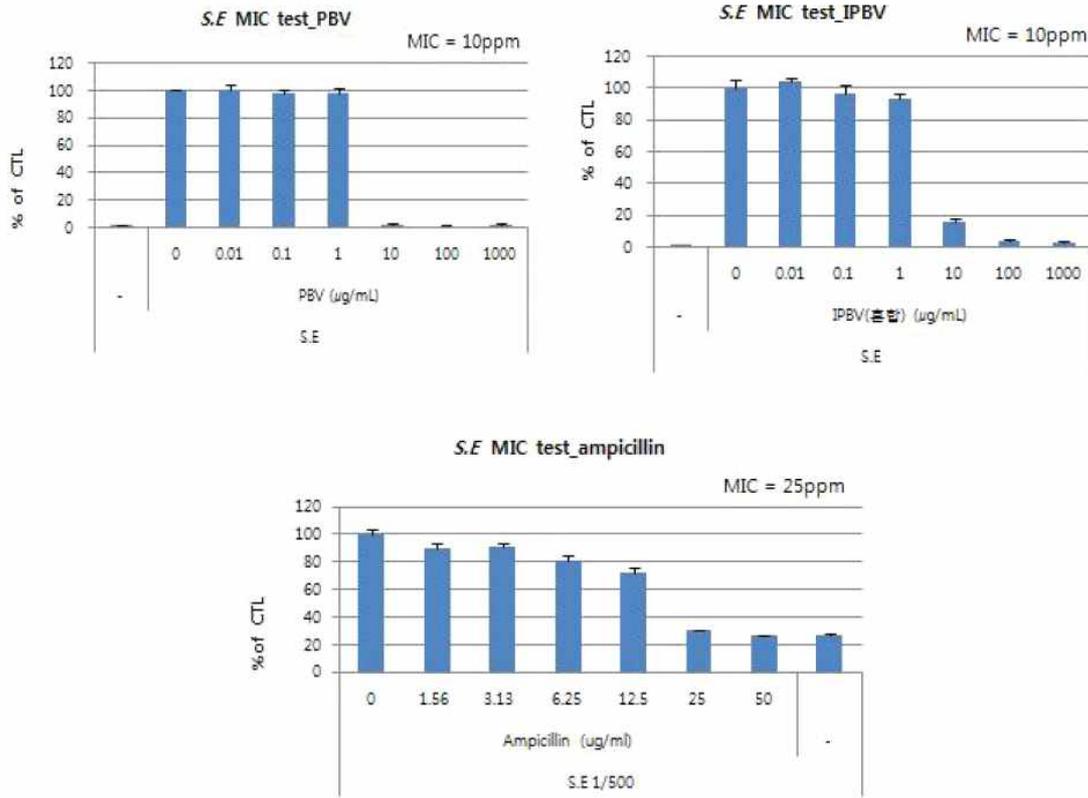
7-4-2. *S.aureus* MIC test



	PBV	IPBV	Ampicillin
<i>S.aureus</i> MIC	10µg/mL	10µg/mL	1.56µg/mL

[그림 5. PBV 및 IPBV의 *S.aureus* MIC test]

7-4-3. *S.epidermis* MIC test



	PBV	IPBV	Ampicillin
<i>S.epidermis</i> MIC	10 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL

[그림 6. PBV 및 IPBV 의 *S.epidermis* MIC test]

KSC-R14011

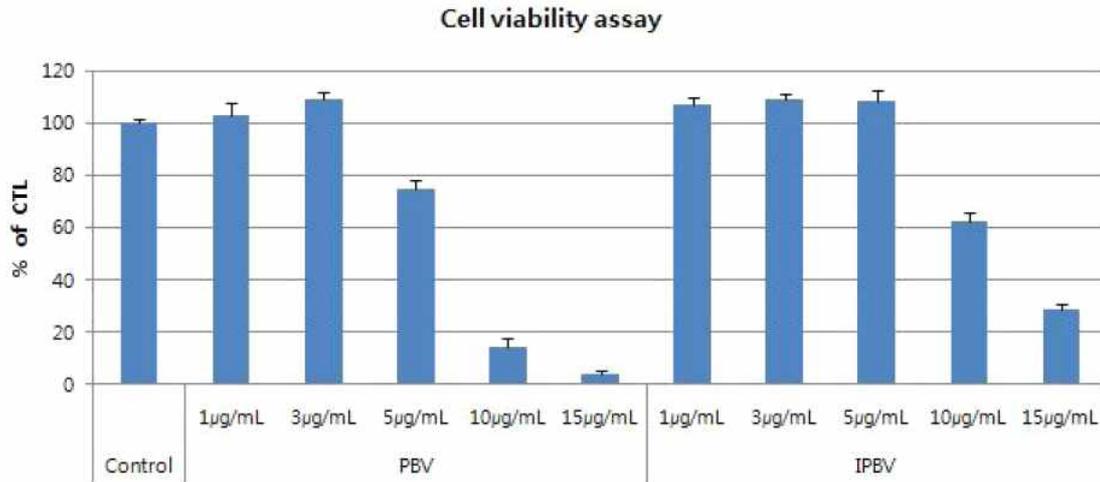
**대 외 비**

## 시 험 성 적 서

연구과제명	PBV 및 IPBV의 세포독성시험	
연구기간	2014 년 10 월 21 일 ~ 2014 년 10 월 31 일	
참여연구원	오 수 진	
의뢰 기업	기업명	(주)청진바이오텍
	담당자	(성명) 김철구 (Tel) 031-400-3707 (E-mail) younan99@biovenom.com
제출일	2014.11.07	

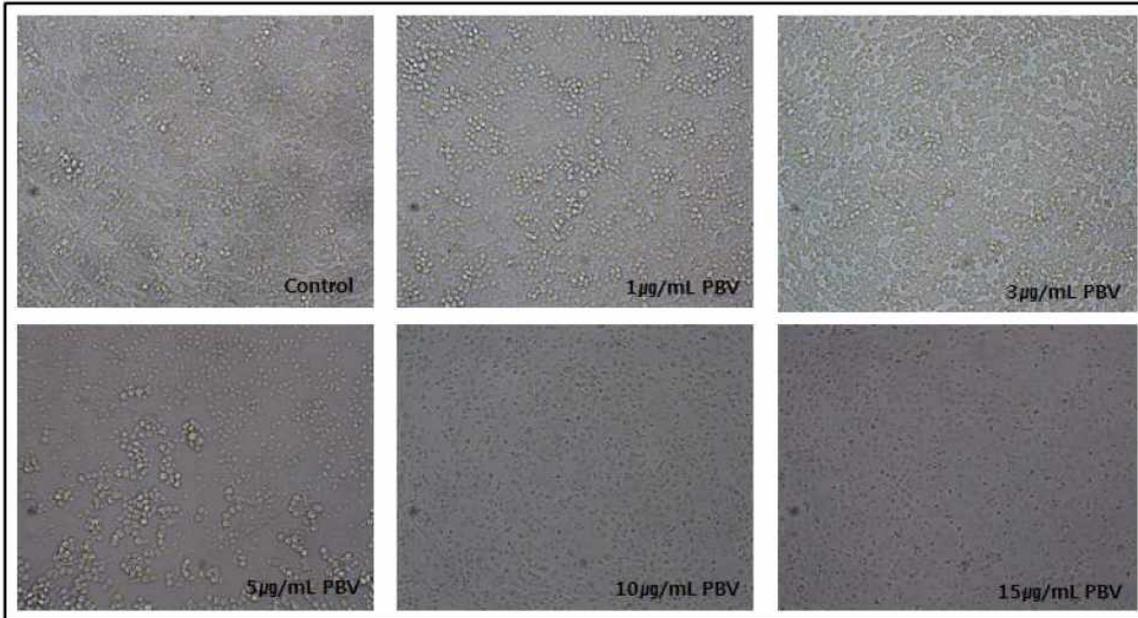
## 6. 시험 결과

### 6-1. 세포독성 시험 (MTT assay)

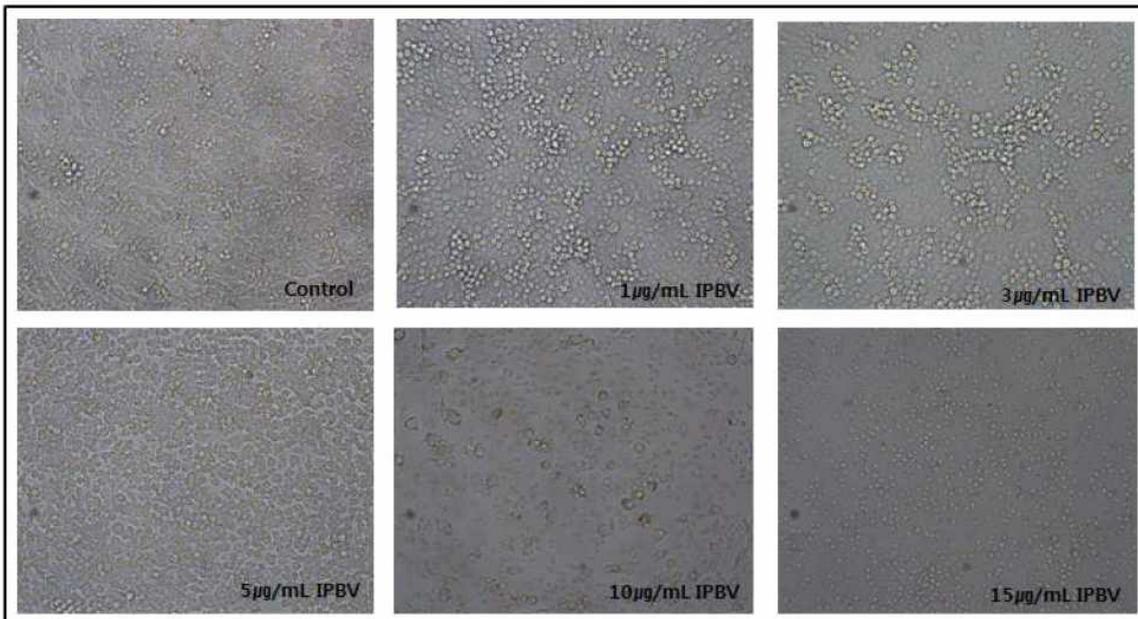


	PBV	IPBV
세포 생존 농도	3 µg/mL 이하	5 µg/mL 이하

[그림 1. PBV 및 IPBV의 세포독성시험]



[그림 2. PBV의 농도별 세포사진 (x200)]



[그림 3. IPBV의 농도별 세포사진 (x200)]

농림수산물 수출전략기술개발사업  
과제명 : 알레르기 유발성분을 정제한 농생명자원-봉독펩티드의 해외수출 산업화 개발

# 분리정제봉독의 대량생산법의 확립을 위한 생산 효율 비교실험 결과 보고서

(주)청진바이오텍 중앙연구소

#### IV. 실험결과

FPLC	수득률(%)	순도 (Melittin 기준)	비용	시간
1차 실험	48%(86.8mg)	90.91%	476만원/1g	768시간/1g
2차 실험	38%(69.9mg)	97.81%		
3차 실험	49%(59.2mg)	97.54%		
4차 실험	48%(96.1mg)	92.00%		
5차 실험	30%(48.5mg)	89.95%		
6차 실험	35%(49.1mg)	88.63%		
7차 실험	53%(97mg)	82.3%		
8차 실험	53%(150mg)	92.47%		
<b>평균</b>	<b>44%</b>	<b>91.45%</b>	<b>476만원/1g</b>	<b>768시간/1g</b>

Ultrafiltration	수득률(%)	순도 (Melittin 기준)	비용	시간
1차 실험	26.2%(4.2g)	69.42%	24만원/1g	17시간/1g
2차 실험	28.1%(4.5g)	66.49%		
3차 실험	26.8%(4.3g)	69.47%		
4차 실험	28.1%(4.5g)	67.00%		
5차 실험	26.2%(4.2g)	65.67%		
6차 실험	25.6%(4.1g)	64.39%		
7차 실험	26.8%(4.3g)	67.04%		
8차 실험	26.2%(4.2g)	61.38%		
9차 실험	26.2%(4.2g)	60.09%		
10차 실험	25%(4g)	67.97%		
<b>평균</b>	<b>26.52%</b>	<b>65.89%</b>	<b>24만원/1g</b>	<b>17시간/1g</b>

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.