

최 종 보 고 서

(뒷면)

(앞면)

발간등록번호

11-1543000-000276-01

두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 산업적 응용

(Industrial utilization for
phytoplacenta tissue culture
technology using bioreactors from
leguminous grain crops resources)

향노화연구소((주)바이오에프디엔씨)

농림축산식품부

주 의
(편집순서 8)

두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 등록화에 관한 연구

농림수산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 산업적 응용” 과제 (세부과제 “두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 산업적 응용”)의 보고서로 제출합니다.

2013 년 10 월 21 일

주관연구기관명 : (주)바이오에프디엔씨

주관연구책임자 : 모 상 현

세부연구책임자 : 모 상 현

연 구 원 : 모 상 현

연 구 원 : 서 효 현

연 구 원 : 신 동 선

연 구 원 : 조 문 진

연 구 원 : 송 재 환

연 구 원 : 이 상 식

연 구 원 : 이 해 경

연 구 원 : 한 수 연

위탁연구기관명 : 연세대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 송 재 환

요 약 문

I. 제 목

두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 산업적 응용

제 1 세부과제: 두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 산업적 응용
위탁 연구과제: 분리·배양된 태좌의 생리활성물질 분석 및 대량 생산 조건 최적화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

자연계에 존재하는 식물체는 무한한 자원의 보고이며 인류에게 기본적으로 식량자원이 될 뿐만 아니라 향료, 의약품, 색소 등 원료로의 이용가치가 매우 높다. 실제로 사용되고 있는 의약품의 25% 이상이 식물에서 유래된 물질이나 현재까지 의약품, 화장품 등의 개발용도로 연구가 진행 중인 식물 종은 전체 30만종 식물체 중 5000여 종에 지나지 않는다. 순수한 식물유래 의약품관련 세계시장은 1997년에 226억불에 달하였고, 해마다 15-20% 이상 증가하고 있다.

따라서 기상요건을 포함하는 환경적 요인, 재배-수확-추출을 포함하는 생산-경제적 요인, 국가 간 이해관계 등의 요인에 좌우되지 않고 안정적으로 식물재료를 이용하기 위해서는 새로운 생산방법의 적용이 요구되고 있다. 즉, 식물조직배양 기술을 이용하여 대량배양한 후 이로부터 고부가성 유용성분을 추출하여 이용하는 대량생산 시스템의 확립이 필요하다.

한편, 식물유래 물질을 이용한 고부가가치 산업 중 화장품 산업은 인간의 미와 신체에 관련되는 욕구를 충족시켜주는 이미지 산업으로 경제성장에 따른 소득수준의 향상과 여성의 사회활동 증가에 힘입어 2007년 국내 기준 5.5조원의 시장으로 확대되고 있다. 기능성화장품(cosmeceuticals)은 일반적으로 세정과 미용 목적 이외의 특수한 기능이 부여된 화장품을 일컫는 말로 공식적으로 인정된 용어는 아니지만 화장품(cosmetics)과 의약품(pharmaceuticals) 사이에 존재하면서 유효성과 안전성이 향상된 제품을 의미하는 것으로 국제적으로 통용이 가능하다고 할 수 있다. 국내에서는 피부미백, 피부주름개선 등에 도움을 주는 기능성 화장품이 2007년 법조항에 포함됨에 따라 제품의 품질향상 및 고기능, 다기능을 추구하는 세계 화장품들과 경쟁할 수 있는 발판의 계기가 되어 기능성 화장품의 비중이 매년 8% 이상 급속히 증가하고 있다.

그러나 현재까지는 기술력과 브랜드 파워가 우수한 다국적 기업이 세계 시장을 주도하고 있고 내수 시장도 이들 회사들이 급속한 속도로 국내 시장 점유율을 높여가고 있는 실정인데 그 이유는 기능성 신소재의 개발수준이 낙후하여 고유의 기능성 소재가 전무한 실정이다. 만약 이에 대한 연구개발이 이루어진다면 고부가성 신소재를 기능성 화장품의 원료로 이용할 수 있어 막대한 경제적 효과를 기대할 수 있다.

따라서 제안하는 과제의 목표는 두(콩)류자원으로부터 태좌조직의 대량배양을 위한 생물반응

기 생산 공정 개발과 이로부터 생산되는 유용물질을 이용하여 화장품의 신소재로 개발하고 이를 산업화하는데 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 세부과제: 두(콩)류자원으로부터 생물반응기를 이용한 태좌조직배양기술의 산업적 응용

- 태좌조직배양 및 캘러스 유도 배양 방법 확립
- 태좌조직배양체로부터 유효성분 추출
- 생리활성물질의 함량 극대화를 위한 추출조건 확립
- 노지재배 식물과 조직배양 식물체의 유효성분 변화 분석
- 생리활성물질 함량증가를 위한 유인제 처리방법 확립
- Biotic, Abiotic stress 조건에 따른 secondary metabolite 함량 측정
- 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 국제화장품원료협회 소재 인허가
- 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 조성물 특허 출원
- 두(콩)류 태좌조직배양추출물의 누적접포에 의한 안전성 평가 및 인체적용 시험 연구
- 두(콩)류 태좌조직배양추출물 함유한 제형에 대한 유효성 평가
- 두(콩)류 태좌조직배양추출물 유효성분 분리 정제 및 분석
- 제품적용에 적합한 추출물 표준화 및 분석

위탁 연구과제: 분리·배양된 태좌의 생리활성물질 분석 및 대량 생산 조건 최적화

- 식물 태좌의 생리활성 물질 함량 측정
- 식물 태좌의 유효성 평가
 - 1) 생리활성물질 함유 추출물에 대한 세포 독성(Cytotoxicity Test) 실험
 - 2) 생리활성물질 함유 추출물에 대한 항산화 유효성 평가
 - 3) 생리활성물질 함유 추출물에 대한 미백 유효성 평가
 - 4) 생리활성물질 함유 추출물에 대한 주름개선 유효성 평가
 - 5) 생리활성물질 함유 추출물에 대한 항염 유효성 평가
 - 6) 생리활성물질 함유 추출물에 대한 항노화 유효성 평가
- 생물반응기를 이용한 대량 생산 조건 최적화
- 대두 태좌조직 배양체 Scale-up 생산 공정도 확립

Ⅳ. 연구개발결과

식물조직배양기술을 적용하여 두(콩)류 자원으로부터 태좌조직부위를 순수 분리·배양하여 연중 균일한 생리활성물질을 생산할 수 있는 최적화 대량생산 공정을 확립하였다. 또한, 생리활성물질의 분석 표준화, 유효성분 분리·동정 및 유효성 평가를 통하여 화장품 기능성 원료로의 신소재 개발을 체계적으로 확립하였다. 대용량 생물반응기에서 생산된 대두태좌조직배양체로부터 추출한 두(콩)류 자원 유래 고부가성 물질은 자연 상태에서 재배한 식물체에서 추출 가능

한 유효성분 함량보다 현저히 높았으며, 유효성분 분리·정제 및 분석법을 확립하여 그 효율성을 증가시켰다. 화장품 원료로서의 유효성 평가를 통하여 안티에이징 효과가 뛰어난 것을 확인하였고, 인체접촉실험을 비롯한 임상실험을 통하여 안정성 및 기능성을 확인하였다. 마지막으로, 대두태좌조직배양추출물을 함유한 화장품 시제품(하이드로겔마스크팩)을 제작하여 우수한 제형으로 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제를 통하여, ‘대두 태좌 조직 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물’, ‘두류 태좌 세포 배양 추출물을 함유한 항노화, 항염, 항산화 화장품 조성물’, ‘식물 세포 내 생리활성물질 함량 증가를 위한 고주파 장치 및 이를 이용한 식물 세포 배양방법’에 대한 국내 조성물 특허 3건 출원하였고, 2013년도 한국산화기술학회 춘계 학술발표논문집 및 한국생화학분자생물학회 포스터 발표를 통하여 대두태좌조직배양체 에탄올추출물은 MMP-1의 억제유전자인 TIMP-1의 발현을 증가시켜 MMP-1의 발현을 조절하여 자외선에 의한 광노화 보호 또는 피부주름 개선 효능을 갖는 새로운 화장품 원료로써 가능성을 제시하는 ‘대두태좌 조직배양추출물의 주름개선 효과’, ‘인간 피부섬유아세포(Human dermal fibroblast)에서 대두태좌조직배양 추출물의 항노화 효과’를 게재 및 발표하였다. 또한, SCI 논문 ‘CO₂-enriched microenvironment induces biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in bioreactor cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*’, ‘Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia*(L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor’, ‘A sensitive hydrogen peroxide optical sensor based on polysaccharide stabilized silver nanoparticles’ 3편을 게재하였다. 이러한 성과를 토대로 국내 마스크팩 및 하이드로겔패치 제조 전문업체인 (주)제이티, (주)LG생활건강 비온드 브랜드에 두(콩)류 피토플라젠타배양 추출물을 함유한 제품을 사업화하여 11,790,000원 판매실적을 이루었고, 본 과제 수행을 시작하며 종료시까지 본 사업체내 6명의 고용창출도 이루었다. 또한, 기술이전을 이미 마친 (주)긴자 토마토나 기능성 화장품 전문 브랜드 협력사인 TOA KASEI 등을 통한 일본콜마, NOF 소개를 통한 일본시장 진출을 계획하고 있다.

SUMMARY

Chemically diverse natural products are derived from plants. The production of plant secondary metabolites by means of large scale culture of plant cell in bioreactors offers an attractive option for producing many phytochemicals. The soybean (*Glycine max*) is a species of legume native to East Asia, widely grown for its edible bean which has numerous uses. The beans contain a variety of biologically active secondary metabolites such as phytic acid, alpha-linolenic acid and isoflavones. Moreover, Soybean extracts are being used as cosmetic ingredients such as antioxidants, thickening agents and moisturizing agents. In the present study, soybean placenta was sterilized cultured in bioreactors and extraction was carried out in 50% ethanol. Treatment with soybean placenta culture extract enhanced the expression of collagen synthetic markers and procollagen type I C-peptide (PIP). Soybean placenta cells by large-scale culture may provide a cost-effective and environmentally friendly platform for sustainable production of a variety of important plant natural products for cosmetic application. Therefore, this study suggests that soybeans (*Glycine max*) placenta culture extract can be developed as topical application of natural anti-aging cosmeceuticals by enhancement of collagen synthesis.

On the 2nd project: Production of biomass and bioactive compounds by placenta cell suspension cultures of *Glycine max*(L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor

To improve biomass and production of bioactive compounds such as daidzein, phenolics, and flavonoids by placenta cell cultures of *Glycine Max*, the effects of aeration rate, inoculum density were investigated using a 20 L balloon-type bubble bioreactor. Overall, an aeration rate of 0.05 vvm, 15 g/L⁻¹ inoculum density, 1% sucrose concentration were optimal for enhancing accumulation of *Glycine max* placenta cell dry biomass (4.38 g/L⁻¹), phenolics (54.81 mg/L⁻¹ DW), and flavonoids (49.27 mg/L⁻¹ DW).

CONTENTS

Chapter I. Introduction

Chapter II. Current status of technology development in domestic and overseas

Section 1. Current status of related technology in domestic and overseas

1. Market trends in overseas
2. Market trends in domestic

Section 2. Current status of related patent in domestic and overseas

Chapter III. Contents and result of research

Section 1. Final goal and evaluation

Section 2. Step goal and evaluation

Section 3. Method and result of research

1. Beans placenta culture
2. Effectiveness evaluation of soybeans placenta culture extract
3. Anti-aging effect on soybeans placenta culture extract
4. Safety evaluation by RIPT of soybeans placenta culture extract
5. Cosmeceutical formulations including soybeans placenta culture extract
6. Biologically active substances analysis and mass production optimization
7. Soybeans placenta culture extract compositions Patent
8. Journal articles published and released in Korea
9. SCI papers
10. Personal Care Products Council(PCPC) licensing
11. Technology transfers performance
12. Sales performance

Chapter IV. Achievement to the project targets and contribution to the related fields

Chapter V. Applications and utilization of researched results

Chapter VI. Scientific and technological information from abroad

Chapter VII. References

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 1절	국내외 관련기술의 연구동향	15
1.	국외 시장 동향	15
2.	국내 시장 동향	20
제 2절	국내외의 특허현황	27
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	40
제 1절	최종목표 및 평가방법	40
제 2절	단계목표 및 평가방법	41
제 3절	연구개발 수행방법 및 결과	45
1.	두(콩)류 자원 태좌조직배양	45
2.	대두 태좌조직 배양체의 유효성 평가	55
3.	대두 태좌조직 배양 추출물에 대한 항노화 유효성 평가	60
4.	두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 누적 첩포에 의한 안전성 평가	69
5.	두(콩)류 태좌조직 배양 추출물을 함유한 제형에 대한 유효성 평가	76
6.	분리·배양된 태좌의 생리활성물질 분석 및 대량 생산조건 최적화	76
7.	두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 조성물 특허 출원	88
8.	국내 학술지 논문 게재 및 발표	95
9.	SCI 논문 게재	96
10.	두(콩)류 태좌조직 배양 추출물 국제화장품원료협회 인허가	100
11.	기술이전 실적	107
12.	판매실적	108
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	109
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	111
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	119
제 7 장	참고문헌	120

제 1 장 연구개발과제의 개요

인간은 많은 화학적 의약품, 세제, 화장품, 식품첨가물을 개발하여 질병의 치료에서부터 모든 생활의 편리함에 이르기까지 삶의 질을 높여 온 것이 사실이지만 남용과 오용에 따른 부작용 또한 만만치 않아 농업생물소재로부터 새로운 기능을 갖거나 기존의 화학제품에 견줄만한 효능을 갖는 소재를 찾을 필요성이 계속 제기되어 왔다.

생물소재(Biological material)란 육상 생태계, 해양 및 수상생태계와 토양 지표면의 미소동물 및 미생물, 이들의 복합 생태계를 포함한 지구상의 모든 살아있는 동물, 식물, 미생물, 곤충 및 어류자원을 총칭하는 단어이다. 생물소재는 생물학적으로 활용될 수 있는 소재로서 특수한 기능성을 갖는다. 지금까지 인류는 필요한 소재들을 모두 생물종으로부터 직접 이용하여 왔다. 농업생물소재에는 많은 종류의 농작물이 존재하며, 그들이 가지고 있는 화합물의 종류 또한 방대하다. 단 하나의 식물 종에 1,000가지 이상의 화합물이 존재하고 여러 식물 종 전체에 함유되어있는 화합물은 수십만에 이르는 것으로 알려져 있다. 이들 농작물로부터 새로운 기능을 갖는 소재를 개발하고 산업화하는 일은 앞으로 국가경쟁력을 확보하는 과제와 긴밀하게 연관되어 있다고 할 수 있다. 국내외로부터 생물자원을 수집하고, 생리활성 및 산업용 기능성 물질을 탐색하고 선별하며, 물질의 분리 및 구조분석을 실시하고, 기능성을 검정한 후, 대량생산 공정법을 개발하여 산업화 할 수 있다. 따라서 이들 생물자원을 단순가공 처리하여 이용하는 것에서부터 배양, 발효, 추출, 분리, 동정, 효능검증 등의 여러 과정을 거쳐 고부가가치의 소재로 개발하는 연구가 절대적으로 요구된다.

생물은 생존에 필요한 일차대사(Primary metabolism)를 수행할 뿐만 아니라 생명활동에 필수적이지 않은 이차대사(Secondary metabolism)에 의해 생리활성물질과 같은 이차대사산물(Secondary metabolites)을 생산하기도 한다. 따라서 식물의 세포는 미생물세포처럼 공장 내에서 조직배양에 의하여 유용한 물질을 대량으로 생산하는 기술이 발달되어 있기 때문에 미생물이 생산하기 어려운 여러 종류의 유용 물질들도 식물세포의 배양에 의해 경제적으로 생산할 수 있게 되었다.

지금까지 생리활성물질을 갖는 식물종은 수 만여 종으로 밝혀졌으나 매년 약 1,500 종류 이상이 새로이 밝혀지고 있다. 식물은 저렴하고 친환경적인 자원이며 에너지 효율적 생산 시스템의 잠재성을 내포하고 있다. 열대우림에 서식하는 생물종들은 의학적으로 유용한 화학물질의 보고로 유명하다. 말라리아 치료제 생산에 쓰이는 페루의 퀴닌나무와 강력한 항암제를 생산하는 마다가스카르의 로지페리윙클(로지밍카)이라는 식물은 열대우림에서 나오는 의약식물들의 예이다.[1]

현재 이러한 생리활성물질로 연구되어지고 있거나 상품화되었거나 진행 중인 주요 식물들은 *Echinacea pupurea* L. *angustifolia*, DC and *pallida* Nutt, *Panax ginseng*, C.A. Meyer (ginseng), *Serenoa repens*(W.Bartam), Small (saw palmetto) Fruit, *Ginkgo biloba* L, *Hypericum perforatum* L(St John's wort) Shoot, *Valeriana officinalis* L.(valerian), *Allium sativum* L.(garlic), *Hydrastis canadensis* L.(goldenseal), *Matricaria chamomilla* L.(German chamomile), *Silybum marianum* Gaertn.(milk thistle), *Trigonella foenum-graecum* L.(fenugreek), *Tanacetum parthenium* Schultz-Bip.(feverfew), *Ephedra sinica* Stapf.(Ephedra, *Cimicifuga* Ma Huang), *Cimicifuga racemosa* Nutt.(black

cohosh) 등이 있다. 식물의 주요 사용부위는 shoot, root, herb가 주류를 이루고 있다. 또한, 식물의 태좌가 다양한 분야에서 활용되고 있다.

식물 밀씨의 발달은 태좌(태좌, Placenta)로부터 시작한다.[2, 3] 밀씨를 in vitro상에서 발달시킬 때 태좌를 포함하지 않고 발달시킬 경우보다 태좌가 보존된 채로 배양할 때 훨씬 더 빠르게 성장한다. 즉, 밀씨의 성장에 있어서 태좌는 중요한 역할을 한다.[4, 5] 태좌에는 주요한 phytochemical이 포함되어 있다. 고추(Capsicum annum)의 태좌에 고추의 주요 phytochemical 성분 중 하나인 capsaicin이 가장 많이 포함되어 있다.[6] ‘Phyto’는 그리스어로 식물을 의미하는 말로, ‘Phytochemical’이란 식물 속에 들어있는 화학물질이며, phytochemical은 주로 식품의 색과 맛, 그리고 향을 제공하는 물질을 의미하며 다양한 물질들이 발견되어 의료, 식품 및 미용 등 넓은 영역에서 활용되고 있다.

< Table 1-1. Phytochemical 종류 및 효능 >

종류	효능	함유 식물
카로티노이드	암세포 성장 억제, 항산화제 및 면역 증강	브로콜리, 당근, 익힌 토마토, 잎채소, 고구마, 겨울 호박, 살구, 멜론, 오렌지, 수박 등의 색이 진한 과일과 야채
플라보노이드	감염 및 암 성장 억제, 면역력과 체내 효소의 독을 제거하는 물질 증가	사과, 감귤류 과일, 양파, 콩, 두부 우유와 같은 콩 제품 및 커피, 차 등
인돌, 글루코놀레이트	발암 물질의 독성분과 암 발생 호르몬 감소, 암 성장 억제	브로콜리, 양배추, 컬리플라워 같은 십자화과 식물
이노시톨	세포성장 억제, 항산화제	옥수수,オート밀, 쌀, 호밀의 겨, 밀, 땅콩, 콩, 두부 우유와 같은 콩 제품
이소플라본	암의 성장과 암 관련 호르몬의 생성 억제, 항산화제	콩과 두부 우유와 같은 콩 제품
이소싸이오-싸이아네이트	발암 물질의 독성분과 암 발생 호르몬 감소, 암 성장 억제, 항산화제	브로콜리, 양배추, 컬리플라워 같은 십자화과 식물
폴리페놀	암 생성과 감염 억제, 항산화제	녹차, 포도, 와인, 시트러스 과일, 사과, 통곡물, 땅콩 등
테르펜	암세포 전이 및 암세포 성장 저해, 면역 기능 강화. 암 관련 호르몬의 생성 저해, 항바이러스 및 항산화제 기능	체리, 시트러스 과일 껍질, 로즈마리 등

최근 『화장품법』이 시행되고, 『기능성화장품 등의 심사에 관한 규정』이 제정됨에 따라, 화장품 산업은 보다 기능적이고, 자연주의적인 제품을 선호하는 소비자의 요구에 부응하여 전문적이고, 고도의 기술을 요하는 첨단 산업으로 점차 자리매김하고 있으며, 이에 따라 새로운

원료개발의 요구도 높아지고 있다. 최근에 일고 있는 자연 지향적이고, 환경 친화적인 추세에 따라 화장품에 들어가는 유효성분도 화학 물질뿐만 아니라 식물 또는 동물 유래의 천연물이 그 유용성을 기반으로 하여 여러 가지 형태로 화장품에 배합되어 사용되고 있다. 특히 자연주의의 바람을 타고 생약을 포함한 식물성원료에서 해양원료에 이르기까지 다양한 천연소재를 이용한 화장품의 개발이 이루어져 천연화장품, 한방화장품의 전성시대가 도래하고 있다.

< Table 1-2. 식물세포의 배양에 의해 생산되는 천연물질 >

(*자료출처: 현대의 생물공학과 생물 산업, 식물의 생물공학, 아카데미서적, 2003)

	Phenylpropanoids	Alkaloids	Terpenoids	Quinones
1	Anthocyanines	Acridines	Carotenoids	Anthraquinones
2	Coumarins	Betalains	Monoterpenes	Benzoquinones
3	Flavonoids	Quinolizidines	Sesquiterpenes	Naphtoquinones
4	Hydroxycinnamoyl derivatives	Furoquinolines	Diterpence	
5	Isoflavonoids	Harringtonines	Triterpence	
6	Lignans	Isoquinolines		
7	Phenalenones	Indoles		
8	Proanthocyanidins	Purines		
9	Stilbenes	Pyridines		
10	Tannins	Tropane alkaloids		

따라서 유용 자생 생물자원의 산업화를 위한 기능성 제품 개발은 이러한 다양한 소재들의 용도와 기능을 고려하여 Silver foods(노화억제 · 고령자용 식품소재), Medicinal foods(질병예방 · 환자용 식품소재), Well-being foods(건강 · 미용 · 에너지용 식품소재)로 분류하여 적용할 수 있고, 또한, 최근에는 식품 · 화장품 · 의약품분야에서 상호간의 기술 및 소재를 공통적으로 포함하는 융합산업(Fusion Industry)의 형성이 급증하고 있어 Nutraceuticals · Cosmeceuticals · Beauty Foods, 분자신의약, 바이오신약 등 과거의 별도 산업영역이 융합되어 신 산업군을 형성하는 추세이다.[7]

< Table 1-3. 화장품 개발 산업화 연구의 역사 >

	개발 내용		년도
국 외	식물세포배양으로 생산된 shikonin을 배합시킨 립스틱과 발효 생산된 hyaluronic acid를 배합시킨 피부 보습제 개발	-	1980
	발효생산 γ -Linolenic acid 함유 유지를 이용한 화장품 발매	일본 자생당	1986

바이오 향료와 색소 개발 및 생산: 지치를 원료로 한 바이오 립 스틱	가네보	
달맞이꽃과 앵초를 이용한 에멀전 개발	시세이도	
나노테크놀러지의 대표적 탄소소재 '플라렌(Fullerene)'을 사용한 최초의 화장품을 발매	일본	2005
천연 포도 종자 폴리페놀을 사용한 항균 필터를 개발	일본 NISSAN	
줄기세포(stem cells) 기술을 화장품 제조에 접목시켜 '아마토 킨' 제품 개발	프랑스	2007

국내외적으로 친환경 바이오산업의 하나로서 기능성화장품 개발을 위한 환경 친화적인 천연 소재의 발굴 및 개발이 새로운 분야로 대두되고 있고, 특히 국내의 경우 친환경 바이오 소재 개발이 국가적 전략사업의 하나로 특화되어 있다. 특히, 생명공학 기술을 이용한 배양기법 정립 및 친환경 추출법을 이용한 항노화 화장품 신소재를 개발하는 것은 세계적으로 뒤쳐진 소재산업 분야에 세계 경쟁력에서 우위를 점할 수 있다.

본 연구과제는 두(콩)류 자원으로부터 태좌를 순수 분리·배양하여 유인제(Elicitor)를 사용하여 콩에 많이 함유되어 있는 genistein과 같은 2차 대사산물의 생리활성물질 함량이 증가된 콩 태좌 조직 배양체의 생물반응기를 이용한 대량 생산화와 이를 이용한 고기능성 화장품 원료개발에 있다.

두(콩)류로부터 배주가 자방 안에 붙어 있는 자리인 태좌(胎座)를 적출 분리하여 기내배양 즉, 영양분이 함유되어 있는 배지에 무균적으로 배양하는 식물조직배양기술 및 유인제 처리를 통하여 콩에 함유되어 있는 이소플라본의 일종인 genisten과 같은 이차대사산물(Secondary metabolites)인 생리활성물질 생산을 증가시켜 고기능성 화장품 원료를 개발한다.

식물조직배양을 통하면 식물의 기관·조직· 및 세포를 공장처럼 조직배양에 의하여 유용한 물질을 대량으로 생산하는 기술이 발달되어 있기 때문에 식물로부터 직접 추출하기에 그 함량이 너무 낮고, 식물체의 부위별로는 생산성이 다르게 나타나기도 하고 혹은 기후, 계절, 장소 등의 영향에 의해 식물의 생육이 제한되는 등 많은 제약조건들을 식물세포 배양시스템의 개발로 극복됨으로써 뛰어난 생리활성효과를 보이는 2차 대사산물의 상업적 생산이 가능하다.

콩은 비교적 값이 싸고 동시에 영양적으로 우수한 식품소재로 알려져 왔다. 이러한 영양 성분 외에도 isoflavones, saponins, anthocyanins, tocopherol, phytic acid 등 여러 기능성 성분이 함유되어 있음이 밝혀지면서 기능성 식품 소재로서 관심을 받고 있다.[8]

콩에 들어있는 여러 기능성 성분 중 특히 isoflavone은 여성 호르몬인 에스트로젠과 유사한 기능을 하는 식물성 에스트로젠으로 폐경기에 유발되는 골다공증의 예방효과와 유방암, 전립선암, 심혈관계 질환 등과 같은 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.[9]

특히, 대두로부터 분리된 아이소플라본 화합물 중의 하나인 genistein은 대두 및 이집트콩과 같은 콩과 식물, 두부 및 템페(tempeh)와 같은 콩 가공품, 식물단백질 조직을 가진 식품에 포함되어 있다. 화학식 C₁₅H₁₀O₅. 분자량은 270.24이다. genistein은 약한 발정 촉진과 항산화 기능, 항암작용, 아테롬성 동맥경화, 골다공증을 억제한다는 보고가 있다.

항산화로서 기능 외에 많은 아이소플라본은 동물과 인간 에스트로젠 수용체와 상호작용을 하여 우리 몸에서 에스트로젠 호르몬과 유사한 효과를 나타낸다. 대두 아이소플라본들은 비호르몬과 같은 효과를 나타내기도 한다. 즉, 조직 안에서 자유라디칼 손상효과를 방해하는 산화방지제로서 활동한다. 에스트로젠처럼 에스트로젠을 다른 형태로 이용하는 세포를 방해하거나 여성의 특징을 유지하고 성장하도록 자극하는 활동을 한다. 또한 몸속에서 암세포의 성장과 관련된 억제되지 않는 세포 성장을 통제하고, 세포 성장(성장인자)과 세포분열을 규제하는 물질로 활동한다.[10, 11]

콩은 그 종류에 따라 단백질, 지방, 탄수화물과 같은 영양 성분의 함량에서는 큰 차이가 있다.

< Table 1-4. 콩 종류에 따른 특징 비교 >

종류	영명 및 학명	특 징
완두콩	Pea (<i>Pisum sativum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 원산지는 유럽의 지중해 연안과 아시아 인근 - 멘델의 유전법칙을 증명하는 식물 - 다른 콩에는 거의 들어있지 않는 비타민A 풍부, 피부를 윤택하게 함
대두	Soybean (<i>Glycine max</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 흰콩, 대두, 메주콩 혹은 백태라 불림 - 자양강장, 이뇨효과, 해독작용 - 콩의 대표, 된장, 청국장 및 두부 만드는데 사용
강낭콩	Kidney Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 원산지는 멕시코 - 칼슘, 칼륨, 아연 등의 미네랄 풍부 - 식욕부진, 변비, 피로, 신장염, 심장장애, 부종 등의 가벼운 증상에 효과 - 특히, 비타민 B₁, B₂, B₆가 많이 함유
서리태	Black Bean (<i>Glycine max</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 검정콩의 한 종류 - 겉모양은 검정콩과 같지만, 껍질을 벗기면 속이 파랗다. - 검정콩과 같은 용도로 사용, 효과도 비슷 - 비타민 함량은 높지 않지만 단백질과 식물성 지방질, 나이아신 성분, 이소플라본 성분이 매우 풍부하게 함유
돌콩	Wild Bean (<i>Glycine soja</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 콩의 원조 - 한반도 전역 들에서 자생되는 야생콩 - 항산화능과 미백을 유도하는 Isoflavone의 한 종류인 Genistein이 풍부

< Table 1-5. Amino acid contents of various beans >

Table 5. Amino acid contents of various beans (Unit : g/100 g)

Amino acids	Soybean	Kidney bean	Black soybean (Seoritae)	Kind of small bean (Seomoktae)	Sword bean	Green bean (Cheongtae)	Red bean
Aspartic acid	3.26	1.85	3.71	3.74	2.31	3.48	2.04
Threonine	1.07	0.57	1.18	1.18	0.85	1.12	0.56
Serine	1.23	0.69	1.39	1.38	0.96	1.29	0.73
Glutamic acid	5.34	2.52	6.18	6.06	2.68	5.66	3.11
Proline	1.39	2.53	1.63	1.53	0.68	1.55	0.72
Glycine	1.30	0.61	1.44	1.41	0.83	1.34	0.68
Alanine	1.24	0.62	1.42	1.37	0.87	1.32	0.76
Cystine	0.18	0.03	0.17	0.19	0.03	0.16	0.02
Valine	1.50	0.85	1.72	1.64	1.05	1.61	1.02
Methionine	0.09	0.04	0.08	0.10	0.02	0.08	0.06
Isoleucine	1.31	0.66	1.46	1.41	0.82	1.39	0.76
Leucine	2.26	1.24	2.58	2.49	1.73	2.46	1.49
Tyrosine	0.48	0.14	0.54	0.59	0.21	0.51	0.08
Phenylalanine	1.43	0.81	1.64	1.57	0.90	1.53	0.97
Histidine	0.77	0.48	0.93	0.89	0.54	0.83	0.59
Lysine	1.83	1.03	2.04	2.00	1.21	1.95	1.32
Arginine	1.87	0.83	2.47	2.56	0.95	2.11	0.86
Total	26.55	15.5	30.58	30.11	16.64	28.39	15.77

Values are mean(n=2).

* *J East Asian Soc Dietary Life* 21(2): 215 ~ 221 (2011)

따라서, 본 연구는 두(콩)류 자원을 이용하여 식물조직배양기술을 활용한 종자를 육성을 주관하는 중요한 부위인 단백질이나 아미노산 등이 풍부한 태좌부위를 순수 배양하고, 물리적 또는 화학적 유인제를 처리하여 생물반응기에서 배양하여 생리활성물질의 함량이 증가된 두(콩)류의 대량생산을 목적으로 하였다.

두(콩)류의 태좌조직 배양체와 더불어 노지재배 된 두(콩)류 및 캘러스 유도를 유도하여 화장품 원료로서의 유효성 평가(항산화, 미백, 주름개선)에 관련한 실험을 수행하였다. 배양된 태좌조직 배양체 및 대조군(노지재배 식물체 및 캘러스)을 최적의 유효성을 발휘할 수 있는 추출법을 개발하고, 추출조건도 확립하였다. 또한, 유인제 처리에 의하여 증가된 생리활성물질의 함량을 측정하였고, 생리활성물질을 분리·정제하였다. 특히, 콩에 함유량이 많은 아이소플라빈의 일종인 genistein의 함량의 비교분석하였다.

대량생산화 측면에서, 20L급이나 50L급에서도 안정적인 대량생산 시스템을 구축하기 위하여 접종밀도, 공기공급량 및 그 밖의 물리적인 요소에 대해서 최적의 조건을 확립하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련기술의 연구동향

1. 국외 시장 동향

가. 지역별 화장품 시장규모 추이

1) 2011년 세계 시장규모는 2,428억\$로 전년 대비 3.9% 증가, 우리나라 화장품 시장규모(63억\$)로 2.6% 차지한다. 우리나라 화장품 시장은 2008년에 3.9%, 2009년 1.8%, 2010년 5.3%, 2011년 4.8%의 성장률을 보인다.

2) 지역별 시장규모는 유럽(890억\$), 아시아·태평양(795억\$), 북·남미(676억\$), 중동·아프리카(67억\$) 순으로 차지한다. 지역별 비중을 보면 유럽 36.7%, 아시아/태평양 32.8%, 북미/중남미 27.8%, 중동/아프리카 2.8%의 비율을 보인다.

< Table 2-1. 지역별 시장규모 >

(단위: 십억\$, %)

지역	2006	2007	2008	2009	2010	2011			2012(E)
						시장규모	% of total	전년대비 증가율	
유럽	76.9	80.0	82.6	84.7	86.7	89.0	36.7	2.6	91.4
아시아/태평양	62.8	66.0	69.3	72.3	76.0	79.5	32.8	4.7	83.8
북미/중남미	55.7	58.3	60.3	62.4	64.7	67.6	27.8	4.4	70.2
중동/아프리카	4.7	5.1	5.5	5.9	6.3	6.7	2.8	6.5	7.2
세계시장(47개국)	200.1	209.4	217.7	225.3	233.7	242.8	100.0	3.9	252.6

자료 : Datamonitor Personal Care Market Data, 2012(10월)

출처 : 한국보건산업진흥원, 주간 보건산업 동향(Vol.27), 2012. 10. 29

나. 유형별 화장품 시장규모 추이

1) (유형) 스킨케어 및 헤어케어가 전체 시장의 53.1% 차지한다. 스킨케어는 802억\$(비중 33.0%, 전년대비 성장률 4.0%)를 차지하고 헤어케어는 486억\$(비중 20.0%, 전년대비 성장률 3.3%)의 시장규모를 갖는다.

< Table 2-2. 유형별 화장품 시장 규모 >

(단위: 십억\$, %)

유형	2006	2007	2008	2009	2010	2011			2012(E)
						시장규모	% of total	전년대비 증가율	
Skincare	64.9	68.2	71.2	73.9	77.1	80.2	33.0	4.0	83.8
Haircare	41.3	43.0	44.5	45.8	47.1	48.6	20.0	3.3	50.3
Personal hygiene	33.2	34.7	36.0	37.3	38.7	40.2	16.5	3.8	41.8
Make-up	29.1	30.6	32.1	33.3	34.6	36.2	14.9	4.6	37.8
Fragrances	26.0	27.1	28.0	28.8	29.8	30.9	12.7	3.9	32.0
Baby personal care	1.6	1.7	1.7	1.8	1.8	1.9	0.8	3.2	1.9
Male Toiletries	4.0	4.2	4.3	4.4	4.6	4.7	1.9	3.7	4.9

자료 : Datamonitor Personal Care Market Data, 2012(10월)

2) 메이크업 및 스킨케어 시장이 전년 대비 높은 성장 시현

메이크업 성장률은 Face make-up 3.7%, Lip make-up 3.8%, Nail make-up 9.6%이며, 스킨케어는 Face care(4.2%), Body care(3.3%), Suncare(4.8%), Hand care(3.2%)의 성장률을 나타낸다.

3) (기업) L'OREAL(佛)이 '10년에 이어 매출 1위 기록(280억불, 14.5%)

아모레퍼시픽(26억불, 17위), LG생활건강(13억불, 31위), 에이블씨엔씨(3억불, 65위)등 국내 기업 3개社 세계 100대 화장품 기업에 포함된다.

4) 세계 항노화 스킨케어 시장규모

Datamonitor에 의하면 2010년 세계 화장품시장 규모는 2,422억 달러로 3.9% 증가했으며 성장된 항노화 스킨케어 시장규모는 463억 달러로 2009년 대비 4.4% 성장하였다.

< Table 2-3. 세계 항노화 스킨케어 시장규모 >

(단위:백만달러, %)

	2002		2004		2006		2008		2010	
	전체	항노화								
시장 규모	175,477	32,299	189,474	35,519	206,339	38,874	225,142	42,641	242,223	46,335
성장률	3.5	4.3	4.0	4.5	4.5	4.7	4.1	4.4	3.9	4.4

자료 : Datamonitor Personal Care Market Data, 2011

가) 항노화 스킨케어 유형별 시장규모(2007년-2010년)

항노화 스킨케어로 선정된 세부유형별 시장규모는 다음과 같다. 2010년 Other moisturizers 시장규모는 147억 달러로 항노화 스킨케어 중 31.7%를 차지하였다. 그 다음이 Anti-agers로 124억 달러 규모이며 전년대비 성장률이 5.3%로 전체 화장품 및 항노화 스킨케어 시장 성장률보다 높게 나타났다.

< Table 2-4. 항노화 스킨케어 유형별 시장규모 >

(단위: 백만달러, %)

구분	2007년	2008년	2009년	2010년		
				시장규모	비중	YoY
Other moisturizers	13,012	13,556	14,102	14,699	31.7	4.2
Anti-agers	10,668	11,251	11,824	12,449	26.9	5.3
Night cream	4,922	5,086	5,246	5,438	11.7	3.7
Premium body care	4,694	4,890	5,051	5,246	11.3	3.9
Sun Protection	4,233	4,401	4,569	4,774	10.3	4.5
Premium hand care	1,458	1,496	1,532	1,577	3.4	2.9
After-sun	1,098	1,167	1,233	1,312	2.8	6.4
Fade cream	769	793	816	841	1.8	3.2
sum	40,854	42,641	44,372	46,335	100.0	4.4
Totals	216,256	225,142	233,094	242,223	-	3.9

주: 1) YoY는 전년대비 증가율

2) 비중은 항노화 스킨케어 시장규모에 대한 세부유형별 점유율임

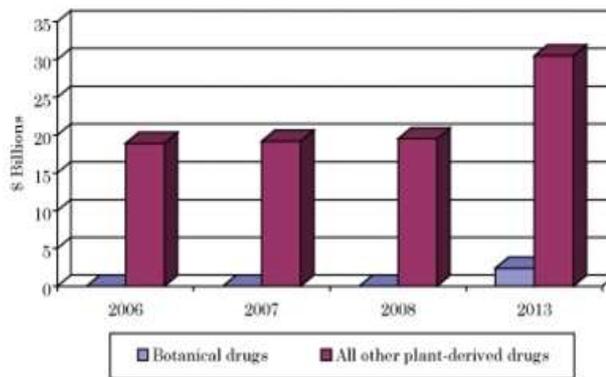
자료 : Datamonitor Personal Care Market Data, 2011

※ 항노화(Anti-aging)란 노화를 방지하여 젊음과 활력을 오래 유지시켜 건강한 삶을 영위할 수 있도록 하는 것이다.

5) 식물 추출 약물 시장규모

Phytochemical의 주요 활용 분야인 식물유래 천연물신약의 전 세계 시장은 2008년 195억 달러에서 2013년 329억 달러로 연간 11.0%의 높은 성장률로 성장할 전망으로, 이 중 식물유래 천연물 신약시장은 식물성 약품(botanical drug)과 모든 다른 식물 추출 약물로 구분되며, 식물 추출 약물은 2008년 195억 달러 대부분을 차지하는 것으로 보고되었다.

< Figure 2-1. 천연물 신약 시장 규모 >



식물 추출 약물 시장은 연간 9.4% 성장해 2013년 305억 달러 규모를 형성할 것으로 추정되며, 식물성 약품 시장은 2008년 12만 7000달러에 불과했으나 2013년 24억 달러 규모로 폭발적인 성장이 예상되었다.

< Table 2-5. 식물유래 천연물 신약시장 세계 규모 >

구분	2006	2007	2008	2013	CAGR% 2008-2013
천연물 의약품	0.0	0.0	0.0001 (\$127K)	2.4	651.7
식물추출 의약품	18.9	19.2	19.5	30.5	9.4
합계	18.9	19.2	19.5	32.9	11.0

* CAGR: Compound Annual Growth Rate, 누적 연평균 성장률 ** U.S. FDA approved

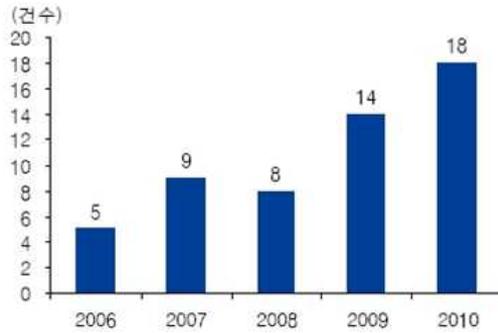
상기 시장 규모를 통해 보듯 천연물 신약시장은 현재 선진국의 경우에도 시장 진입 초기단계의 분야로, 천연물신약은 한국의 전통의약과 관련도가 높아 풍부한 한의학 데이터베이스의 과학적 체계화로 향후 한국이 세계시장 선점을 통한 경쟁력을 가질 가능성이 높은 것으로 평가되고 있으며, 특히 식물의약은 만성질환과 같이 다중병인이 있는 경우에 유효하며 안전성이 탁월하여 기술 확보가 선행된다면 향후 세계 시장 점유율을 확대할 수 있는 주요 타겟 분야로 판단된다.

< Table 2-6. 주요 천연물신약 매출액 현황 >

약물명	기업	주성분	적응증	비고 (' 09 매출)
아스피린	바이엘	버드나무	해열진통제	100년전 개발
탁솔	BMS	서양주목	항암제	연매출12억 달러
타미플루	길리어드	팔각회향	항바이러스제	연매출30억 달러
은행잎엑스	슈바베	은행잎	혈액순환	연매출 20억 달러
차전자엑스	P&G	질경이	정장제	연매출3억 달러
스티렌	동아제약	애엽	위염치료제	연매출836억원
조인스정	SK케미칼	위령선, 팔루근, 하고초	관절염	연매출263억원

현재 천연물 분야는 선진국 역시 시장 초기 단계로 미국과 유럽 내에서 각각 7건과 5건의 임상시험이 진행되고 있으며, 세계에서 가장 많이 이용되고 있으며, 만병통치약으로 불리는 아스피린을 비롯해 탁솔, 타미플루 등 다양한 약물이 높은 매출을 올리며 판매되고 있다.

< Figure 2-2. 천연물신약 임상시험 승인 현황 >



Phytochemical의 활용이 가장 용이한 분야인 화장품 시장의 경우, 2009년 전 세계 화장품 시장규모는 약 2,237억 달러 수준으로 스킨케어 시장이 753억 달러로 전체 화장품 시장의 33.66%를 차지함으로써 화장품 시장에서 가장 큰 점유율을 나타내고 있으며, 다음으로 헤어 케어와 향수가 전체 화장품 시장에서 각각 17.76%, 16.79%에 해당하는 비중을 차지하고 있다.

< Figure 2-3. 세계 화장품 시장 규모 (Datamonitor personal care market data) >



7) 국외 화장품 소재 시장

국외 화장품 소재 시장을 살펴보면, 우선 일본 고세에서 출시된 쌀을 젓산 발효한 원료가 있다. 이것은 보습소재로서의 기능이 우수하고 쌀과 젓산균이라는 소비자 친화적 소재를 사용하였다는 점이 특징이다. 이외에도 인체의 섬유아세포를 세포 배양하여 생산한 인체 친화적 콜라겐 소재가 관심을 끌고, 두부 생산 후의 두부박을 화장품 소재로 활용하기도 한다. 로레알, P&G 등 주요 다국적 기업에서도 경쟁력이 우수한 화장품 소재를 자체 개발하여 제품에 적용하고 있다.

고기능성 의학 화장품(Medicated Skin Care; 피부관련 효능군 제품) 인기 상승 시장조사 전문기관인 Euromonitor의 최근 분석 자료에 따르면, 2009년 미국의 화장품시장은 총486억 달러에 달하며 이 가운데 고기능성 피부 관련 효능군 제품시장은 33억 달러에 달해 화장품 시장의 6.8%를 차지 지속적 성장률을 기록하고 있다. 특수 기능성 전문제품들은 고가에 판매되더라도 의학적 치료효능이 강조되기 때문에 소비자들이 오히려 싼 제품을 선택하기 보다는 화장품 효능 대비 합리적 가격으로 인식하고 있는 중고가 제품(Affordable Luxury Product)을 오히려 선호하는 추세이며 Johnson & Johnson, GSK 등과 같은 제약기업들도 허브와 같은 천연성분을 활용한 여드름 관리제품이나 블랙헤드 관리제품, 클렌징티슈와 같은 제품을 출시하는 등 발 빠른 움직임을 보이고 있다. 한국 제품에 대한 수입은 2006년 약 2,400만 달러에 달했으며 전체 1.3%의 시장점유로 13위를 차지하였다.

향후 전망을 살펴보면, 전문가들의 견해에 따르면 의학적 효능을 강화한 고기능성 의학 화장품(Medical Cosmetic)은 소비자들의 소득수준이 향상되고 건강과 미용에 대한 관심이 높아지면서 향후 매출이 지속적으로 증가할 시장으로 분석하였고, 미용적 효능(Cosmetic Benefit)을 충족시키는 제품들이 향후 시장을 주도할 것으로 예상하고 있다.

개발 내용		년도
국 외	식물세포배양으로 생산된 shikonin을 배합시킨 립스틱과 발효 생산된 hyaluronic acid를 배합시킨 피부 보습제 개발	- 1980
	발효생산 γ -Linolenic acid 함유 유지를 이용한 화장품 발매	일본 자생당 1986
	바이오 향료와 색소 개발 및 생산: 지치를 원료로 한 바이오 립스틱	가네보
	달맞이꽃과 앵초를 이용한 에멀전 개발	시세이도
	나노테크놀러지의 대표적 탄소소재 '플라렌(Fullerene)'을 사용한 최초의 화장품을 발매	일본 2005
	천연 포도 종자 폴리페놀을 사용한 항균 필터를 개발	일본 NISSAN
	줄기세포(stem cells) 기술을 화장품 제조에 접목시켜 '아마토킨' 제품 개발	프랑스 2007

2. 국내 시장 동향

가. 국내 화장품 시장규모

2011년 화장품 시장규모는 6조 5,898억원으로 2010년 6조 3,084억원보다 4.5% 성장한 것으로 나타났다. 화장품 생산액은 6조 3,856억원으로 2010년 대비 6.2% 증가했고, 연평균 10.6% 성장하였다. 수출은 8,915억원으로 전년 대비 29.2% 성장하여 수입의 전년 대비 성장률과 세배가량 차이를 보였다. 2011년 화장품산업 무역수지 적자 폭은 2,042억원으로 2010년 2,939억원보다 감소하였다.

< Table 2-7. 국내 화장품 시장규모 >

(단위: 백만원, %)

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	YoY	CAGR ('08~'11)
시장규모	5,104,562	5,534,191	6,308,416	6,589,797	4.5	8.9
(백만 달러)	4,630	4,936	5,456	5,947	-	-
생산	4,720,053	5,168,589	6,014,551	6,385,617	6.2	10.6
(백만 달러)	4,281	4,049	5,202	5,763	-	-
수출	409,286	530,985	690,211	891,478	29.2	29.6
(백만 달러)	371	416	597	805	-	-
수입	793,795	896,587	984,076	1,095,658	11.3	11.3
(백만 달러)	720	702	851	989	-	-
무역수지	-384,509	-365,602	-293,865	-204,180	-	-
(백만 달러)	-349	-286	-254	-184	-	-

주: 1. 시장규모는 생산+수출+수입

2. 수출입에 대한 환율 적용은 한국은행의 연도별 연평균 기준 환율을 사용함

자료: 대한화장품협회, 화장품 생산실적 자료, 각 연도

한국의약품수출입협회, Facts & Survey Report, 각 연도

< Table 2-8. 화장품 표본 사업체 업종별 취급 품목 현황 >

(단위: 개, %)

구분	제조업		도소매(수입)업		도소매(비수입)업	
	조사업체수	비율	조사업체수	비율	조사업체수	비율
합계	103	100.0	161	100.0	377	100.0
영.유아용 제품류	28	27.2	25	15.5	187	49.6
목욕용 제품류	34	33.0	41	25.5	280	74.3
안체 세정용 제품류	51	49.5	41	25.5	279	74.0
눈 화장용 제품류	38	36.9	27	16.8	270	71.6
방형용 제품류	26	25.2	26	16.1	234	62.1
두발 염색용 제품류	18	17.5	10	6.2	236	62.6
색조 화장용 제품류	46	44.7	33	20.5	291	77.2
두발용 제품류	62	60.2	57	35.4	287	76.1
손발톱용 제품류	18	17.5	22	13.7	246	65.3
면도용 제품류	29	28.2	24	14.9	226	59.9
기초 화장용 제품류	79	76.7	107	66.5	339	89.9
채취 방지용 제품류	10	9.7	9	5.6	187	49.6

1) 유형별 화장품 시장규모 추이

모든 업종에서 기초화장품 취급 비율이 65%를 상회하며, 색조 화장용 제품류와 두발용 제품

류를 취급하는 업체도 많은 것으로 나타났다. 12개 유형군 중 취급하는 업체가 가장 많은 유형은 기초 화장품 제품류로 71.1%인 419개 업체가 취급하고 있는 것으로 나타났다. 다음으로는 두발용 제품류(51.5%), 인체세정용 제품류(37.1%), 목욕용 제품류(23.3%), 색조화장품 제품류(23.2%) 등의 순이다. 12개 유형군 중 매출액이 가장 많은 유형 역시 기초 화장품 제품류로 전체 매출의 절반 이상(57.9%)인 4조 1,950억원을 차지하고, 다음은 두발용 제품류(9,224억원, 12.7%), 색조 화장품 제품류(9,111억원, 12.6%) 등의 순으로 나타났다.

< Table 2-9. 화장품 제조업체 유형군별 매출 >

(단위 : 개, 백만원, %)

구분	취급		매출	
	업체수	비율	금액	비율
합계	589	100.0	7,246,837	100.0
영.유아용 제품류	83	14.1	82,042	1.1
목욕용 제품류	137	23.3	48,294	0.7
인체 세정용 제품류	219	37.1	319,619	4.4
눈 화장용 제품류	110	18.7	405,519	5.6
방향용 제품류	65	11.0	68,898	1.0
두발 염색용 제품류	48	8.1	95,476	1.3
색조 화장용 제품류	136	23.2	911,103	12.6
두발용 제품류	304	51.5	922,375	12.7
손발톱용 제품류	44	7.5	50,877	0.7
면도용 제품류	51	8.6	145,013	2.0
기초 화장용 제품류	419	71.1	4,194,969	57.9
채취 방지용 제품류	16	2.7	2,653	0.0

가) 기능성 화장품 매출

< Table 2-10. 화장품 도소매(비수입)업체 기능성화장품 매출 >

(단위 : 백만원, %)

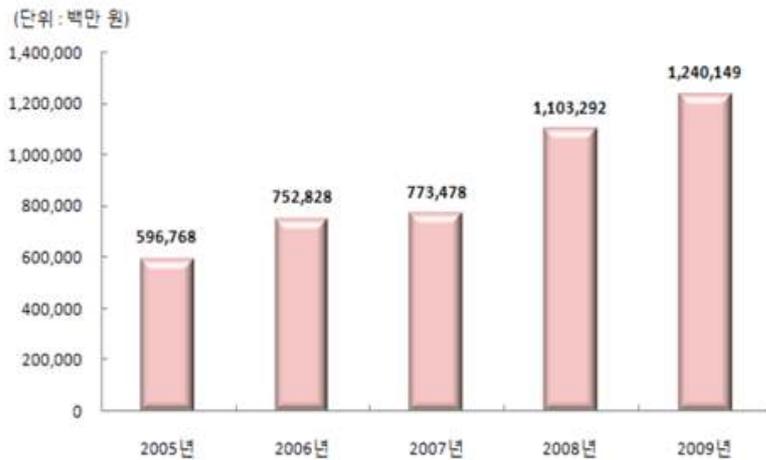
구분	취급비율	매출액	
		금액	비율
합계	87.2	1,893,431	100.0
색조 화장용 제품류	52.9	293,548	15.5
면도용 제품류	19.6	22,037	1.2
기초 화장용 제품류	85.3	1,517,228	80.1
기타	1.1	60,617	3.2

전체 화장품 도소매(비수입)업체의 87.2%가 기능성화장품을 취급하고 있으며, 매출액은 1조 8,934억원으로 전체 매출액(7조 5,832억원)의 25%로 나타났다. 유형군별로 살펴보면, 기초 화장품 제품류를 취급하는 업체가 85.3%로 가장 많고 색조 화장품 제품류 52.9%, 면도용 제

품류 19.6% 순으로 나타났다. 매출액 역시 기초 화장용 제품류가 1조 5,172억 원으로 기능성 화장품 매출액의 80.1%를 차지하고, 색조 화장용 제품류가 2,935억 원으로 15.5%로 나타났다.

국내 화장품 시장 중 기능성 화장품 시장의 경우 최근 연도별 시장점유율 변동 폭이 크게 나타나고 있음에 따라 기능성화장품에 대한 수요가 급증하고 있음을 간접적으로 확인할 수 있다.

< Figure 2-4. 국내 기능성 화장품 시장 규모 >



* 대한화장품협회, 화장품 생산실적 자료, 각 년도

2008년에는 전년대비 42.6% 수준으로 성장하여 처음으로 1조 원을 넘어섰고, 2009년에는 전체 화장품 생산실적의 전년대비 성장률보다 높은 성장률을 보이며 생산금액이 1조 2,401억 원으로 나타났다. 기능성 화장품 세부유형별로는 자외선 차단(32.7%), 복합유형(25.6%), 주름개선(23.0%), 미백(18.6%) 순으로 점유율이 큰 것으로 나타났고, 2007년에 이후 복합 유형의 생산액이 크게 증가하였으며 2009년 역시 전년대비 85.7% 성장하였다.

나. 국내 화장품 시장 전망

화장품이 필수 소비재로 인식되면서 경기와 무관하게 고성장세로 지속될 것으로 전망된다. 국내 화장품시장은 최근 3년 평균 10%대의 성장세를 보이며 2009년 시장규모는 7조 4,000억 원에 이른다. 이는 화장품이 점차 필수 소비재로 인식되면서 경기와 무관한 성장세를 보이고 있으며, 소비의 양극화로 인해 프리미엄 화장품과 중저가 화장품시장이 동반 성장한 것에 기인한다.

1) 프리미엄 화장품과 브랜드샵 화장품이 전체 화장품시장의 고 성장세를 주도

국내 화장품 시장의 50%를 차지하고 있는 프리미엄 화장품 시장은 최근 3년간 연평균 두 자리 수의 성장세를 지속해오고 있으며, 국내 상위 2개사와, 수입 화장품社들이 시장을 주도해 왔다. 브랜드샵 화장품 시장은 상위 업체들의 제품군 강화, 대기업의 참여 확대, 경기침체에 따른 수혜 등의 요인으로 지난 3년간 연평균 30%에 달하는 고성장세 지속되었다. 그러나 상위 업체의 시장 점유율 확대에 후발 브랜드샵 업체와 신규 진입 업체 간 경쟁이 치열하게 전개되는 상황이다. 온

라인 및 홈쇼핑 화장품 시장은 타 유통 채널대비 시장규모는 작으나, 진입장벽이 상대적으로 낮아 틈새시장으로서 중소형 화장품社들의 진출이 활발히 전개되고 있어 빠른 시장 확대 추세를 보인다.

2) 2010년대, 화장품시장 내 경쟁구도 변화가 본격화 예상

지난해 말 LG생활건강이 더페이스샵을 인수함으로써 외형확대, 중저가 화장품시장 진입 등의 시너지효과 예상된다. 이에 따라 아모레퍼시픽과의 선두 경쟁이 치열하게 전개될 전망이다. 결국 이로 인해 양사의 화장품 시장 내 지배력은 더욱 강화될 전망이다. 한편, 브랜드샵 시장에서는 선두 업체인 더페이스샵이 LG생활건강에 편입되는 과도기를 틈타, 미샤, 스킨푸드 등의 상위권 업체들은 선두 자리를 놓고 본격적인 경쟁에 돌입할 것으로 보인다. 또한, 화장품 고 성장세에 힘입어 중소형 화장품社들은 신규 판매채널 진출 등, 재기의 노력을 기울이며, 소형 가전업체들 또한 화장품시장 진입을 시도하고 있어 중하위 업체 간의 경쟁 과열될 전망이다.

3) 화장품 업계의 경쟁심화에 따른 리스크 관리 필요

화장품 업계의 경쟁구도 변화가 경쟁심화라는 부정적인 환경으로 이어져, 경쟁력 약한 업체들의 시장 도태가 예상되므로, 이에 따른 리스크 관리가 필요할 전망이다. 상위 업체의 영향력이 전 채널로 확대됨에 따라 중견업체들의 시장 도태 가능성 높아졌으며, 또한 중견 업체들의 신 유통채널로의 이동은 리스크가 클 것으로 보여 지속적인 모니터링 요구된다. 브랜드샵 시장에서도 상위 업체의 시장 과점 양상이 지속되는 가운데, 진출 업체 수 증가로 경쟁이 격화될 수밖에 없어 매출 성장률 둔화 및 감소세를 보이는 중·하위권 업체 위주의 리스크 관리가 필요하다.

다. 최근 화장품 시장 현황 및 경쟁 현황

1) 경기침체에도 불구하고 고성장세 지속

화장품 산업은 내수 경기 또는 민간소비의 영향을 직접적으로 받는 전형적인 내수 산업 중 하나로, 그동안 민간소비와 화장품 시장 성장세는 유사한 트렌드를 보여 왔다. 신용카드 부실 사태에 따른 국내 경기 침체로 가계 소득이 줄어들었던 2003~4년 마이너스 성장세를 보였으며, 2005년 이후 경기가 회복 국면에 접어들면서 화장품 시장도 성장세로 전환되었다. 제품군별로도 내수 경기 침체로 가계 소득이 위축됐던 시기에는 브랜드샵 화장품이 새로운 시장을 형성한 반면, 경기가 회복되었던 2005~6년에는 프리미엄 화장품 매출이 크게 증가하면서 전체 화장품시장 성장세를 견인하였다. 그러나 최근 국내 화장품 시장은 과거와 다른 양상을 보이며, 경기와 무관하게 고성장세 지속했으며, 2008년 말부터 시작된 글로벌 금융위기에 따른 국내 경기침체에도 불구하고 국내 화장품 시장 성장률은 오히려 상승하였다.

화장품 산업은 2004년을 저점으로 성장세를 지속해오고 있으며, 2009년 기준 국내 화장품 시장 규모는 약 7조 4,000억원 규모로 전년대비 무려 12.4%나 성장한 것으로 나타났다. 이것은 2009년 타 소비재 상품군이 전년대비 3.4% 성장한데 반해 높은 성장세 기록한 것이다. 이는 화장품이 점차 필수 소비재로서 인식되면서 타 소비재 대비 경기와 무관하게 성장 하고 있는 것으로 분석되며, 또한 2009년 백화점과 브랜드샵 판매 채널이 모두 각각 20% 이상의 성장세를 보이면서 화장품 시장의 외형확대에 기여했다는 점도 특징적이고, 이는 지난 몇 년 간 소비패턴이 양극화되고, 가치소비가 확산됨에 기인한 것으로 판단된다.

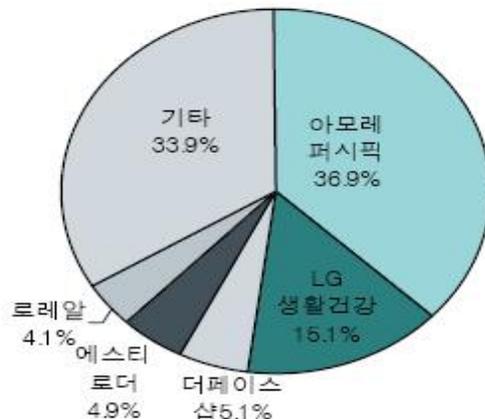
< Figure 2-5. 국내 화장품 시장 규모와 성장률 >



2) 선두 업체들의 시장 지배력은 더욱 강화

국내 화장품 시장은 아모레퍼시픽(시장점유율 36.9%)의 시장 주도하에 LG생활건강(시장 점유율 15.1%)이 그 뒤를 추격하는 구도를 보이며, 대기업 상위 2개 업체가 전체 시장의 약 52%를 점유하고 있는 과점 시장을 형성한다. 그 뒤를 브랜드샵 업체인 더페이스샵과 수입브랜드 에스티로더, 로레알이 4~5%의 점유율로 뒤따르고 있으며, 나머지 시장을 놓고 약 200여개 업체들이 경쟁하고 있다. 1990년대 이후 화장품 시장의 판매 경쟁이 심화됨에 따라 자금 동원력을 갖춘 대기업들이 품질, 마케팅 능력에 기반으로 한 브랜드 파워 확보, 견고한 유통망을 바탕으로 시장 지배력을 확대해 옴에 따라 대기업의 시장 과점 현상이 두드러지고 있다. 반면, 자금력이 부족한 대다수의 중소형 업체들의 경우 브랜드파워가 약하고, 유통채널다각화에 적극적으로 대응하지 못하는 상황이며 소비자의 수요는 점점 상위 업체로 집중 되고 있어 상·하위 업체 간 양극화는 더욱 심화되는 양상을 보였다. 이러한 가운데, 2008년 말 LG생활건강이 브랜드샵부문 1위, 전체 화장품시장 내 점유율 3위 업체인 더페이스샵의 인수를 완료함에 따라 2010년 이후 화장품 시장 내 선두 업체인 아모레퍼시픽과 LG생활건강의 순위 경쟁이 과열될 전망이다. 실제로, 아모레퍼시픽과 LG생활건강 양사의 2010년 시장점유율은 57%까지 확대될 것으로 보여 이들 업체들의 시장 지배력은 더욱 강화될 것으로 보이며, 또한 선두업체들의 시장 지배력 확대에 의해 나머지 시장을 차지하기 위한 중소형 화장품 업체들의 생존 경쟁은 더욱 격화될 것으로 전망된다.

< Figure 2-6. 국내 화장품 시장 점유율 (2009년 매출액 기준) >



라. 국내 화장품 유통경로별 시장전망

< Table 2-11. 국내 화장품 유통경로별 시장 전망 >

(단위: 억원)

구분	경로	2009	2010	2011E	YoY(%)
로드숍	일반점	4,020	2,800	2,720	-2.9
	원브랜드숍	7,780	8,800	9,500	8.0
	멀티브랜드숍	6,660	8,000	9,500	18.8
	소계	18,460	19,600	21,320	8.8
SIS(Shop In Soph)	백화점	19,030	20,570	22,000	7.0
	마트	7,630	8,230	8,580	4.3
	소계	26,660	28,800	30,580	6.2
인적판매	방판	17,890	19,400	20,400	5.2
	직판	2,850	2,950	3,000	1.7
	다단계	2,600	2,750	2,800	1.8
	소계	23,340	25,100	26,200	4.4
통신판매	인터넷	1,650	1,850	2,100	13.5
	홈쇼핑	3,200	3,650	2,900	6.8
	소계	4,850	5,500	6,000	9.1
전체		73,310	7,900	84,100	6.5

2011년 화장품 산업 성장은 주요 고객들이 포진되어 있는 원브랜드숍, 멀티브랜드숍, 인터넷, 홈쇼핑 등의 유통망이 이끌어갈 것으로 전망된다.

< Figure 2-7. 국내 화장품 국가 및 지역별 수출 비중 >



중저가 브랜드 화장품의 경우 생산의 대부분을 OEM/ODM 업체가 과점하고 있어서 제품 간의 차별성이 부족한 특징을 가지고 있으며, 국내 화장품 시장이 향후에도 중저가 브랜드 화장품을

중심으로 성장하고 경쟁 역시 심화될 전망이다, 이에 따라 증저가 화장품 업체들은 기존 제품에 기능성을 더해 자사 제품을 차별화 시키거나 고급화 시키려는 전략을 모색할 것이며 이런 과정에서 동사의 기능성 원료의 성장성은 더욱 가시화될 것이다. 우리나라에서 자체개발 되어 생산되고 있는 화장품 원료는 세계적인 수준으로 비교하여 볼 때 아직 미미한 수준이지만 최근 일부 기업을 중심으로 경쟁력이 있는 원료를 자체 생산하고 있다. 최근 식약청이 발표한 기능성 화장품 승인 현황을 보면 2003년 477종, 2004년 775종, 2005년 1,017종, 2006년 1,298종이 승인되었으며 이들 승인된 화장품을 기능별로 분류하면 자외선 차단제품이 1,790종, 미백 화장품 1,789종으로 가장 많았으면 그 다음이 주름개선 화장품 707종, 복합제 화장품이 209품목으로 기능성 화장품 법이 발효된 이후 총 4,495품목이 승인되었다. 우리나라에서 자체 개발되어 생산되고 있는 화장품 원료는 세계적인 수준으로 비교하여 볼 때 아직 미미한 수준이지만 최근 일부 기업을 중심으로 경쟁력이 있는 원료를 자체 생산하고 있다. 최근에는 해외 시장을 향한 주요 업체들의 움직임이 본격화되고 있는데, 주요업체들은 전략국가 선정, 수출전용 브랜드 개발, 지역별 제품 선별 등 전략적인 접근을 통해 보다 효율적인 판매확산을 꾀한다는 방침을 제시했다.

개발 내용		년도
국내	어드밴스드 타임리페어 VNP002 (주름개선 화장료로 특허출원된 해조추출물)	(주)벤티리 2001
	녹두·올무·현미·도토리 추출물, 마카데미아·살구씨·아보카드·올리브 오일, 감초 추출물로 세순 스킨 케어 개발; 행인유, 홍화씨유, 감초산유도체, 투어멀린, 자수정, 진주파우더, 키토산 등으로 한방 메이크업 화장품 개발 등 다수	(주)생그린
	천연 항산화제인 포도씨 추출물을 원료로 한 '인텐시스G' 라인을 출시	로템 화장품 2003
	항균효과가 높은 식물에서 추출한 물질을 이용, 천연 방부제 '네츄로 틱스(Naturotics)'를 개발	(주)바이오 스펙트럼 2004
	제주레몬을 원료로 하는 새로운 염증억제 화장품 원료 개발	(주)바이오 스펙트럼 2006
	지치의 뿌리(자근)에서 유출되는 색소인 시코닌을 배합, 식물 배양을 이용하여 대량생산하여 상품화	2006
	천연 보존료로 DF-100(자몽종자추출물)을 개발; 안전성과 효과가 인정되는 각종 천연 향균제, 천연 항산화제 및 기능성 소재를 발굴, 식품의 보존성 향상 및 위생에 관련된 제품을 개발	(주)에프에이뱅크 2007

제 2절 국내외의 특허현황

Phytochemical 기술은 1980년대 초반부터 기술권리화가 나타나기 시작했으며, 2002년 공개 특허 기준 50건 이상의 특허가 출원되기 시작하여 현재까지 꾸준한 출원이 이어지고 있다. 중국이 전체의 27.5%에 상당하는 특허를 보유함으로써 점유율이 가장 높게 나타났다. 국가별 특허 점유율은 중국에 이어 미국, 일본, PCT, 유럽, 한국 순임. 중국은 상위 10위에 속하는 주요 출원인은 존재하지 않으나, 2001년 이후 특히 2007년을 기점으로 다수의 출원인들에 의해 다양하고 양적으로도 다량의 특허를 출원하고 있는 것으로 조사되었다. 전체적인 특허출원 동향은 최근 관련 특허출원이 전반적으로 성장기의 단계에 해당하는 것으로 판단됨에 따라 향후 성장 가능성이 높을 것으로 판단된다. Phytochemical 기술의 주요 출원인으로는 미국의 Unigen사가 총 30건의 특허를 출원함으로써 시장을 선도하는 것으로 조사되었으며, 다음으로 Archer Daniels Midland, Nestec, Agriculture Victoria Services 등이 있다. 상위 10위의 주요 출원인은 미국과 유럽 국적의 출원인이 대부분으로 미국, 유럽 및 PCT를 중심으로 출원이 이루어지고 있다. 중국 출원인을 제외한 『Phytochemical』 기술의 주요 출원인들은 전반적으로 전 세계에 걸쳐 고른 출원을 진행하고 있음에 따라, 기술을 기반으로 한 세계 시장 확보가 활발히 진행되고 있는 것으로 조사되었다. 특히 PCT 특허를 통해 권리확보를 진행함으로써 개국 진입을 염두 한 지적재산권 포트폴리오 구성이 눈에 띈다. 2008년 이후 주요국의 신규 시장 진입을 꾀하고 있는 기업들을 살펴보면, 대부분 자국 출원인에 의한 출원이 대부분이나 이미 특허보유량 측면에서 확고한 자리를 선점하고 있는 SYNGENTA와 FUJI와 같은 기업이 각 주요국 내에 출원을 이어가고 있음에 따라, 향후 시장 점유율이 확대될 것으로 판단된다. 세부기술별 출원점유율은 phytochemical의 의약적 기능(ABA) (30%), 분리 및 생산(ACA) (20%), 기타(ABD) (12%) phytochemical 증가방법 (AAA) (12%), 화장품 기술이 (ABB) (10%) 순으로 나타났다.

아래의 표는 phytochemical 분야의 특허에서 기재하고 있는 phytochemical의 종류 및 유래 식물을 조사한 것으로 flavonoids, isoflavones, anthocyanin 및 기타 화합물로 구분할 수 있으며, 대두를 대표로 하는 콩과 식물을 포함한 생활에서 쉽게 접할 수 있는 많은 종류의 식물에서 추출할 수 있는 것으로 나타났다.

< Table 2-12. Phytochemical 종류 및 식물 >

phytochemicals	유래 식물
flavonoids	biomass, reed, Sarcopyramis nepalensis, 겨우살이(Loranthaceae mistletoe), 대나무(bamboo), 떡쭈(gnaphalium affine), 라한과(grosvener siraitia), 랑독(Chinese stelleria), 맹그로브(mangrove), 민들레(dandelion), 상동나무(Sageretia theezans), 영경귀(silybum marianum, 밀크티슬), 카놀라(canola), 한밤의 공포 나무(Oroxylum indicum), 황금(Sculltellaria baicalensis), 황해쭈(artemisia argyi), 포도, 체리,

		플럼, 인 나, 블루베리, 딸기, 감귤류, 과파야, 적색 양배추, 브로콜리, 양배추, 양배추, 인삼, 파슬리, 셀러리/뿌리용 셀러리, 양파, 마늘, 차, 커피, 카카오, 마테차, 홉, 대두, 유채씨, 엔 막연함, 밀, 라이보리, 아로니아 · 메라노칼파 (Aronia melanocarpa)
	luteolin	레세다과 (Resedaceae) 목서속 식물 Reseda luteola L, Reseda alba L., Reseda glauca L., Reseda lutea L., Reseda odorata L., Reseda phyteuma L., Reseda L. 물푸레나무속 식물 (Reseda) 반지련 (scutellariae barbatae), 숨 영경귀, 포도, 사과, 기장 큰
	gingko flavone	은행나무
	luteolin, apiolin	
	terpene	장미과 Aronia속, Malus속, Cydonia속, Pyrus속, Amelanchier속, Sorbus속, Rhamnus속, Aria속, Photinia속, Crataegus속, Cotoneaster속, Osteomeles속, Pyracantha속
	vitexin, orientin, isoorientin	
	saponins	토복령 (smilax glabra), 콩과식물 (Leguminous plant)
	퀴논류	차가버섯, 얼룩조릿대
	폴리페놀 proanthocyanidin	바시니움 (Vaccinium) 속, 덩굴월굴 식물
isoflavones		대두, Pueraria mirifica, Butea superba, Mucuna collettii, biomass, red clover (Trifolium pratense) 황기 (astragalus), onion, 칩 (kudzu), Argyreiae Seguinii (백화은배등), wheat, psyllium, rice, oats, red clover, kudzu, alfalfa, flax, cocoa 콩과식물 (Leguminosae plant), 마메과의 식물 → 대두
	tectoridin tectorigenin	범부채 근경 (rhizomes of Belamcanda chinensis)
	Puerarin	칩 (kudzu)
	genistein, daidzein	대두
	proanthocyanidin , oxoium,	크로톤 또는 칼로필럼 식물

	catechins, epicatechins, gallo catechins, galloepicatechins	
	phenolic compound	대두, chick pea, red clover, subterranean clover, ground pea, milk vetch, marama bean, sword bean, jack bean, seaside sword bean, carao bean, cluster bean, balu, hyacinth bean, grass pea, Indian vetch, garden pea, djenko bean, goa bean, yam bean, broad bean, earth pea, lentil, jumping bean, alfalfa, velvet bean, African locust bean, inga, Cyprus vetch, yebnut, tallow tree, Polynesian chestnut, kudzu root, oil bean tree, mesquite, tamarind, fenugreek, Indian licorice, ground nut, kinnow, gunpowder tea, buckwheat, clover
	genistein	검은콩, 흑미, 병풀, 녹차, 하수오 페튜니아, 버베나, 텔피니움, 그레이프, 아이리스, 프리지아, 수국속, 시클라멘, 포테이토, 팬지, 가지나무, 리지안투스 또는 초롱꽃속 및 가지
anthocyanin		
anthocyanoside		vaccinum myrtillus, Ribes nigrum, Vitis Vinefera, Sambucus nigra
other		대두, peanuts, rape, canola, cottonseeds, peas, wheat, 사사, 타케, 모시대 (Adenophora remotilfora), Vaccinum Myrtillus, Sylibum Marianum, Echinacea Angustifolia, Aesculus Hippocastanum, Calendula Officinalis, Centella Asiatica, Hamamelis Virginiana, Citrus Aurantium Amara, Citrus Aurantium Dulcis, Citrus Limonium, Equisetum Arvense, Glycyrritia Glabbra, Aloe Vera, Ruta Graveolans, Vitis Vinifera and Terminalia Sericea 우스네아 바르바타(지의류; Usnea barbata), 삼색제비꽃 (Viola tricolor), 금잔화 (lendula officinalis), 로즈마리 (Rosmarinus officinalis), 사루비아 중, 고수풀 (Coriandrum savitum) 및 꽃창포 (Iris germanica) 지치 (Lithospermum erythrorhizon), 왜황련 (Coptis japonica), 연초 (Nicotinia tabacum)

그러나 식물마다 포함하는 phytochemical의 종류와 상대적 함유량, 원료 획득의 용이성 및 추출 폐기물 관리 등에서 차이가 있음에 따라 대두가 phytochemical 추출에 주로 활용되고 있다. 아래의 표는 식물 내 phytochemical 함량을 증가시키기 위한 방법으로 출원된 특허들을 정리한 것으로 대표 사례를 표로 나타내었다.

< Table 2-13. 식물 내 Phytochemical 함량을 증가 방법 >

특허번호 (출원일)	출원인	발명의 명칭	핵심요지
US 7767416 (2002-10-04)	Agriculture Victoria Services	Manipulation of flavonoid biosynthesis in plants	플라보노이드 생합성 효소 유전자를 이용한 형질전환 식물 -chalcone isomerase (CHI), chalcone synthase (CHS), chalcone reductase (CHR), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) 등
US2010199370 (2008-02-06)	ISRAEL MIN AGRIC & RURAL DEV AGRIC RES	MEANS AND METHODS OF PRODUCING FRUITS WITH HIGH LEVELS OF ANTHOCYANINS AND FLAVONOLS	AFT 유전자 형질전환
JP1999505422 (1996-04-22)	PHYTERA	식물 세포 배양물 및 식물 조직 배양물의 처리 방법	DNA 메틸화 저해제와 elicitor계 처리 -DNA 메틸화 저해제: 5-azacytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine, 5-fluorocytidine, pseudoisocytidine, DL-ethionine 등 -elicitor: methyl jasmonate, salicylic acid, glutathione, 2-6-dichloroisonicotinic acid, cellulase, chitosan, chitin 등
KR 0145770 (1994-10-14)	조규현	식물세포 배양에 의한 2차 대사물의 생산성을 증가시키는 방법	식물세포 배양액에 사이클로덱스트린 처리
KR199000494 1 (1988-09-20)	한국과학기술 연구원	고분자 흡착물질을 이용한 식물세포 이차 대사산물의 생산 및 분리 방법	폴리우레탄이나 실리콘 고무 및 관련 소수성 고분자 처리

US 8105980 (2000-06-07)	BASF	Method of increasing the content of flavonoids and phenolic substances in plants	성장 조절 아실시클로헥산디온 처리
JP1998179147 (1996-12-27)	ISHIKAWAJI MA HARIMA HEAVY	식물 세포 배양 방법 및 2차 대사물 고생산성 식물 세포	안토시아닌 등의 2차 대사물의 생산 효율 향상 - 식물세포 연속 배양법(증식 배양->생산 배양) - 생산배양: 저영양, 저농도의 식물성장조정물질 환경제공
US 4717664 (1985-08-16)	Mitsui Petrochemical Industries	Method for producing secondary metabolites of plants	식물세포 액체 배양 - 세포 성장 속도 조절을 통한 대사산물 증가
EP 2181582 EP 1626620 (2004-05-24)	Fotofresh	Apparatus for altering the level of phytochemicals in plant cells by applying wavelengths of light from 400nm to 700nm	400nm~700nm 파장대의 빛 처리
JP2009240193 (2008-03-31)	SHIMIZU SHOKO KAIGISHO	광조사에 의한 플라보노이드류 합성계 유전자의 발현증강	435nm~780nm의 파장대의 빛 처리
KR201202912 3 (2010-09-16)	장문식	홍화새싹의 플라보노이드계 화합물 함량을 증가시키는 방법 및 상기 방법에 의해 수득된 홍화새싹을 포함하는 화장품 조성물	430nm 내지 460nm 파장 범위의 LED 청색 광원 조사

높은 농도의 phytochemical을 생산하기 위한 방법들을 정리해 보면 크게 phytochemical 관련 생합성 효소 관련 단백질의 형질전환, 식물 세포 배양 방법 및 배양액내 화합물 첨가, 특정 파장대 빛의 이용 등으로 구분될 수 있다. 상기와 같은 방법을 이용해 생성량을 증가시킨 식물 또는 자연발생적으로 식물에 존재하는 phytochemical은 추출 과정을 통해 정제되고 가공되어 식품, 의약품, 치료제, 화장품, 농약, 비료 등 다양한 분야에 이용되고 있다.

대표적 사례로는 COX-2 및 5-LO 억제와 항산화제로 이용되고 있는 free-B-ring

flavonoids를 들 수 있다. free-B-ring flavonoids는 Archer Daniels Midland에서 다각적으로 연구되고 있는 분야로 데즈모스(Desmos), 아키로클린(Achyrocline), 오록시룸(Oroxylum), 부체나비아(Buchenavia), 아나팔리스(Anaphalis), 코툴라(Cotula), 가나팔륨(Gnaphalium), 헬리크리쭌(Helichrysum), 센타우레아(Centaurea), 유파토리움(Eupatorium), 바카리스(Baccharis), 사피움(Sapium), 스큐텔라리아(Scutellaria), 몰사(Molsa), 콜레브룩키아(Colebrookea), 스타키스(Stachys), 오리가눔(Origanum), 지지피라(Ziziphira), 린데라(Lindera), 액티노대폰(Actinodaphne), 아카시아(Acacia), 데리스(Derris), 글라이시리자(Glycyrrhiza), 밀레치아(Millettia), 풍미아(Pongmia), 테프로시아(Tephrosia), 아토카푸스(Artocarpus), 피쿠스(Ficus), 피티로그래머(Pityrogramma), 노또래나(Notholaena), 피너스(Pinus), 울머스(Ulmus) 및 알피니아(Alpinia) 등의 식물 속으로부터 추출되고 있으며 건강보조식품, 피부미용제 및 인지 장애와 구강질환 등의 질병 치료제로 활용되고 있다.

free-B-ring flavonoids과 같은 phytochemical에 따른 유래 식물 및 사용용도에 대한 사례는 다음과 같다.

< Table 2-14. Phytochemical 유래 식물 및 이용 >

phyto-chemicals	유래 식물	치료질환
	Brickellia genus besides B. californica, B. ambigens, B. arguta, B. brachyphylla, B. cylindracea, B. eupatoriodes, B. glutinosa, B. grandiflora, B. laciniata, B. lemmonii, B. oblongifolia, B. veronicaefolia	당뇨 및 자가면역질환 치료, T 세포와 베타세포의 Kv1.3 칼륨 채널에 결합, 혈당에 의한 인슐린 배출 속도 조절
luteolin, myricetin, dihydrokaemferol, apigenin, quercetin	레세다과 (Resedaceae) 목서속 식물-luteolin Reseda luteola L, Reseda alba L., Reseda glauca L., Reseda lutea L., Reseda odorata L., Reseda phyteuma L., Reseda L.	피부질환 치료 신경피부염, 홍반, 화상, 편평태선, 양진, 건선, 수포창, 헤르페스성 피부염, Favre-Racouchot 증후군, 광선각화증, 탄력섬유증, 포진 (folliculitis simplex) 등
lumican, syndecan, versican, decorin, glypican, biglycan	완두 (Pisum sativum), Vigna aconitifolia	노화 및 산화 스트레스 억제

<p>phyto-sterols ,ethoxylated derivatives, pentacyclic triterpenes, isoflavones, isoflavone glucosides, coumestanes ,saponosides</p>	<p>glycyrrhizine - liquorice (Glycyrrhizz glabra) saponosides - marsh pennywort (Centella asiatical, Mimosa tenuiflora), marigold (Calendula officinalis), primula (Primula veris)</p>	<p>노화방지 TIMP억제자로서 결합조직의 파괴에서 외부세포성 매트릭스 역할 수행</p>
<p>catechin (flavan)</p>	<p>아카시아속의 종 아카시아 카테추(Acacia catechu), 아카시아 콘시나(Acacia concinna), 아카시아 세네갈(Acacia Senegal), 아카시아 스페시오사(Acacia speciosa), 아카시아 아라비카(Acacia arabica), 아카시아 아우리쿠리포르미스 (A.auriculiformis) 등</p> <p>운카리아 속 운카리아 감비르(Uncaria gambir), 운카리아 라노사(Uncaria lanosa), 운카리아 히르수테(Uncaria hirsute), 운카리아 아테뉴아테(Uncaria attenuate), 운카리아 아시다(Uncaria acida), 운카리아 호모말라(Uncaria homomalla), 운카리아 베르나이시이(Uncariabernaysii), 운카리아 시넨시스(Uncaria sinensis), 및 운카리아 보르넨시스(Uncaria borneensis) 등</p> <p>기타 아투나 라세모사(Atuna racemosa), 시지기움 카리노카퐁(Syzygium carynocarpum), 시지기움 말락센스(Syzygium malaccense) 및 반타니아 페루비아나(Vantanea peruviana)</p>	<p>COX-2 및 5-LO 경로 매개 질병 -> COX-2, 5-LO억제, mRNA 생성감소</p> <p>골관절염, 류마티즘 관절염, 월경통, 동맥경화증, 심장마비, 비만, 당뇨병, X 증후군, 알츠하이머 질병, 호흡기 알레르기 반응, 만성 정맥 부전, 치질, 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus), 건선, 만성 긴장 두통, 편두통, 염증성 장 질환; 바이러스, 박테리아 및 균에 의한 국부적 전염병, 일광화상, 화상, 접촉성 피부염, 흑색종 및 암종</p> <p>인지 쇠퇴 및 노화성 기억 장애 치료 염증 유발성 사이토카인 발현저해, ROS 생성 예방, 항산화제 기능</p>

<p>free-B-ring flavonoids</p>	<p>식물 속(plant genus) 데즈모스(Desmos), 코톨라(Cotula), 아키로클린(Achyrocline), 오록시룸(Oroxylum), 부체나비아(Buchenavia), 아나팔리스(Anaphalis), 가나팔륨(Gnaphalium), 헬리크리쑤(Helichrysum), 센타우레아(Centaurea), 유파토리움(Eupatorium), 바카리스(Baccharis), 사피움(Sapium), 스큐텔라리아(Scutellaria), 콜레브룩키아(Colebrookea), 몰사(Molsa), 스타키스(Stachys), 지지피라(Ziziphira), 린데라(Lindera), 액티노대폰(Actinodaphne), 아카시아(Acacia), 데리스(Derris), 글라이시리자(Glycyrrhiza), 밀레치아(Millettia), 풍미아(Pongmia), 테프로시아(Tephrosia), 아토카푸스(Artocarpus), 피쿠스(Ficus), 오리가눔(Origanum), 피티로그래머(Pityrogramma), 노또래나(Notholaena), 피너스(Pinus), 울머스(Ulmus) 및 알피니아(Alpinia)</p> <p>스큐테라 리어 속 식물 중 바이칼레인(baicalin), 바이칼린(baicalin), 우고닌(wogonin) 및 바이칼레노사이드(baicalenoside), 스큐텔라리아 바이칼렌시스(Scutellaria baicalensis)</p>	<p>COX-2 및 5-LO 경로 매개 질병 -> COX-2, 5-LO억제, mRNA 생성감소</p> <p>골관절염, 류마티즘 관절염, 월경통, 동맥경화증, 심장마비, 비만, 당뇨병, X 증후군, 알츠하이머 질병, 호흡기 알레르기 반응, 만성 정맥 부전, 치질, 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus), 건선, 만성 긴장 두통, 편두통, 염증성 장 질환; 바이러스, 박테리아 및 균에 의한 국부적 전염병, 일광화상, 화상, 접촉성 피부염, 흑색종 및 암종</p> <p>인지 쇠퇴 및 노화성 기억 장해 치료 염증 유발성 사이토카인 발현저해, ROS 생성 예방, 항산화제 기능</p>
<p>cherry bioflavonoids</p>	<p>펠로덴드론 아무렌센(Phellodendron amurense), 프루누스 아비움(Prunus avium) 과 프루누스 세라수스(Prunus cerasus)</p>	<p>COX 억제제 염증질환 치료</p>

isoflavone	마메과 대두	골다공증 치료 뼈 흡수 억제
<p>bioflavonoids, 이소플라보노이드류, 사포닌, 테르펜, 트라터펜스</p>	<p>Vaccinum Myrtillus, Sylibum Marianum, Echinacea Angustifolia, Aesculus Hippocastanum, Calendula Officinalis, Centella Asiatica, Hamamelis Virginiana, Citrus Aurantium Amara, Citrus Aurantium Dulcis, Citrus Limonium, Equisetum Arvense, Glycyrritia Glabbra 등</p> <p>Chrysanthellum genus Chrysanthellum americanum, Chrysanthellum indicum, Chrysanthellum integrifolium, Chrysanthellum involutum, Chrysanthellum keilii, Chrysanthellum michoacanum, Chrysanthellum perennans 등</p> <p>family Asteraceae Bidens alba</p>	<p>모세혈관 저항성 강화 및 안과 영역의 활성 증가</p>
<p>isoflavone</p>	<p>Indian liquorice (Abrus precatorius); various species of Acacia spp. including A. aneura, A. cibaria, A. longifolia, and A. oswaldii; ground nut (Apios tuberosa); ground pea (Arachis hyogea); milk vetch (Astragalus edulis); marama bean (Bauhinia esculenta); sword bean (Cajanus cajan indicus); jack bean (Canavalia ensiformis); sword bean (Canavalia gladiata); seaside sword bean (Canavalia rosea); various Cassia spp. including C. floribunda, C. laevigata, and C. occidentalis; carob bean (Ceratonia siliqua);</p>	<p>항암치료 항암제의 부작용(구역질, 입맛 감소, 레사지, 모발 손실, 리비도의 손실)감소</p>

<p>isoflavone</p>	<p>chick pea (<i>Cicer arietinum</i>); yebnut (<i>Cordeauxia edulis</i>); various <i>Crotalaria</i> spp. including <i>C. laburnifolia</i>, and <i>C. pallida</i>; cluster bean (<i>Cyamopsis psoralioides</i>); tallow tree (<i>Detarium senegalense</i>); word bean (<i>Entada scandens</i>); balu (<i>Erythrina edulis</i>); soya bean (<i>Glycine max</i>); inga (<i>Ingaedulis</i>); Polynesian chestnut (<i>Inocarpus fagifer</i>); hyacinth bean (<i>Lablab purpureus</i>); grass pea or Indian vetch (<i>Lathyrus sativus</i>); cyprus vetch (<i>Lathyrus ochrus</i>); lentil (<i>Lens culinaris</i>); jumping bean (<i>Leucaenal eucocephala</i>); various <i>Lupinus</i> spp. including <i>L. albus</i>, <i>L. luteus</i>, <i>L. angustifolium</i>, <i>L. mutabilis</i> and <i>L. cosentini</i>; ground bean (<i>Macotylma geocarpa</i>); horse gram (<i>Macrotyloma uniflorum</i>); alfalfa (<i>Medicago sativa</i>); velvet bean (<i>Mucuna pruriens</i>); yam beans (<i>Pachyrhizuz erosus</i>, <i>P. tuberosus</i>); African locust bean (<i>Parkia clappertoniana</i>); <i>Parkia speciosa</i>; oil bean tree (<i>Pentaclethra macrophylla</i>); various <i>Phaesolus</i> spp. including <i>P. acutifolius</i>, <i>P. vulgaris</i>, <i>P. luntus</i>, <i>P. coccineus</i>, <i>P. adenathus</i>, <i>P. angulris</i>, <i>P. aureus</i>, <i>P. calcaratus</i>, <i>P. mungo</i> and <i>P. polystachys</i>; garden pea (<i>Pisum sativum</i>); djenko bean (<i>Pithecolobium lobatum</i>); mesquite (various <i>Prosopsis</i> spp.); goa bean (<i>Psophocarpus scandens</i>, <i>P. tetragonolobus</i>); various <i>Psoralea</i> spp.; <i>Sesbania bispinosa</i>; yam bean</p>	<p>항암치료 항암제의 부작용(구역질, 입맛 감소, 레사지, 모발 손실, 리비도의 손실) 감소</p>
--------------------------	--	--

<p>isoflavone</p>	<p>(<i>Sphenostylis stenocarpa</i>); tamarind (<i>Tamarindus indica</i>); fenugreek (<i>Trigonella foenum-graecum</i>); vetches (various <i>Vicia</i> spp. including <i>V. sativa</i>, <i>V. atropurpurea</i>, <i>V. ervilia</i> and <i>V. monantha</i>); broad bean (<i>Vicia faba</i>); black gram (<i>Vigna mungo</i>); various <i>Vigna</i> spp. including <i>V. radialis</i>, <i>V. aconitifolia</i>, <i>V. adanatha</i>, <i>V. angularis</i>, <i>V. tribolata</i>, <i>V. umbellata</i> and <i>V. unguiculata</i>; and earth pea (<i>Voandzeia subterranea</i>); and clovers (<i>Trifolium</i>) including red clover (<i>T. pratense</i>), subterranean clover (<i>T. subterranean</i>) white clover (<i>T. repens</i>), or any clover related species</p>	<p>항암치료 항암제의 부작용(구역질, 입맛 감소, 레사지, 모발 손실, 리비도의 손실)감소</p>
<p>isoflavones</p>	<p>콩과, 장미과, 나한송과, 붓꽃과, 뽕나무과, 비름과, 국화과</p>	<p>테스토스테론 수용체를 이용한 모발 손실 감소</p>

Phytochemical 기술 특허 850건 중 1992년 이후 출원건들 대상으로 기술내용, 등록여부, 우선권주장 국가, 특허 피인용수, 패밀리수, 주요출원인 등을 고려해 중요하다고 판단되는 총 98건의 특허를 주요특허로 선정하고 분석하였다. 선별된 98건의 특허를 살펴보면, phytochemical의 의약적 활용(ABA) 기술이 총 50건으로 전체의 51%에 해당하는 높은 점유율을 나타내고 있으며, 주로 isoflavones(28%), flavonoids/flavans(22%), flavonoids(16%)와 관련된 연구가 주를 이루고 있는 것으로 조사되었다. Phytochemical 기술은 총 98건 중 phytochemical의 의약적 기능성(ABA) 분야의 특허가 50건으로 가장 많은 것으로 나타났으며, phytochemical이 증가된 식물(AAB) 분야의 특허가 17건의 출원으로 2위의 점유율을 보이고 있으므로, 기타 분야에 대한 연구가 필요하다.

Unigen은 phytochemical 기술을 가장 많이 보유한 기업으로 총 23건의 특허를 점유하고 있으며, 다음으로는 Archer Daniels Midland 17건, BASF 12건, Flower Developments 10등 국제적 대기업에 의한 중요 특허 점유가 높은 것으로 조사됨에 따라 핵심기술을 보유하고 있는 출원인들의 특허를 통해 현재 개발 방향과의 부합성 및 연구여부를 조사하고 회피할 수 있도록 해야 한다.

Flavonoid와 관련하여, Flavonoid pathway에서 주요 역할을 하는 효소들을 유전공학적인 방법을 통해 조절함으로써 식물 내 플라보노이드 함량을 증가시키는 방법 및 acyl

cyclonexane diketone를 이용해 식물의 플라보노이드 및 페놀계 성분의 함유량을 증가시키는 방법 등이 연구되었다. Isoflavones의 경우, 생리활성 효과가 있는 isoflavones의 생산방법이 주로 연구 되었다. 의약적 활용 기술의 경우 전체적으로 1990년대 후반은 flavonoid 관련기술이 선별되었으며, 1990년대 후반부터 2000년대 초반 isoflavone 관련 기술이 많이 개발되었다. 2000년대 초반은 기타 성분과 관련된 기술이, 2000년대 중반부터는 flavonoids/flavans 관련 기술들이 주를 이루는 것으로 나타났다.

phytochemical 기능성(AB) 기술 중 화장품, 식품 및 기타 분야 기술의 경우, 1990년대에는 식물에서 추출한 플라보노이드 및 페놀계 성분과 플라보노이드 물질 및 기타 식물 추출 phytochemical을 식품보조제 및 농약, 산화방지제, 화장품 등에 활용하는 기술이 개발되었다. Phytochemical 분리 및 생산(AC) 기술의 주요 특허 흐름을 살펴보면, 플라보노이드 및 페놀계 물질, 플라보노이드, 아이소플라본, 기타 물질 등 다양한 물질들을 활용하기 위해 추출하고 분리/정제하는 기술들이 JLB, Abbott, Archer Daniels Midland, Unigen 등에 의해 개발되었다.

세계 phytochemical 시장은 현재 성장기 단계로 미국과 중국의 기술성장세가 두드러진다. 중국의 경우, 역사적으로 한의학 연구가 많이 진행된 환경을 바탕으로 질환별 활용되는 식물군에 따른 phytochemical을 분류하고 약리학적 효과를 증명하는 연구가 많이 진행되고 있으나, 한국의 경우 현재까지 연구가 미미한 상태로 폭넓은 한의학 자료를 바탕으로 수천가지 종류로 분류되는 phytochemical을 구분하고 각각의 추출방법 및 적용 분야에 대한 연구를 진행하는 작업이 필요하다. phytochemical 분야는 한국의 특허장벽이 높지 않음에 따라 자료 확보와 기술 권리화가 함께 이루어진다면 향후 신약 시장 및 천연물 시장을 확보할 수 있을 것으로 판단된다. 천연식물추출물인 phytochemical 관련 기술은 기계 및 전자 분야의 발명과 달리 ‘신규성’ 측면에서 거절사정이 발생할 수 있으므로 한국, 미국을 비롯한 주요 시장에서는 물질과 물질의 효용성을 개별적으로 함께 증명하여야 하는 어려움이 있음에 따라 다수의 대상에 대해 권리를 확보하고자 할 경우 특허 출원서 상에 모든 자료를 기재하기 어려운 경우가 발생하기도 한다. 이에 따라 권리확보 대상이 다수이거나, 국내 시장 뿐만 아니라 세계 각국에 진출하고자 할 경우 PCT 출원을 진행함으로써 보다 강력한 지재권을 확보하는 것이 바람직하다.

현재 phytochemical을 type 별로 정제하는 기술이 개발되고 있으나, 아직 답보상태이고 또한 정제된 type 별 phytochemical의 활용에 대한 연구가 미진한 것으로 파악됨에 따라 집중적인 연구가 필요하며, 안정화되고 규격화된 생산설비와 식물 추출물의 효과를 증명하기 위한 임상 시험 환경 등을 정비함으로써 국내 뿐 아니라 세계시장을 타겟으로 제품개발 연구에 주력해야 할 필요가 있다.

노인인구의 증가 및 웰빙 트렌드에 의해 현대 의학은 합성화합물 신약에서 천연물 신약의 수요가 급증하고 있다. 이에 대한 해결 방안으로 식물에서 추출되는 많은 물질들이 신약 후보 물질로 연구되고 있으며, 특히 phytochemical의 경우 그 유용성과 효과, 공급의 용이성으로 인해 더욱 각광받고 있는 실정이다. 따라서 향후 phytochemical 관련 분야는 시장이 확대될 것임이 자명하고, 그 수요가 증가할 것이 분명하므로 후발주자로서 식물 내 phytochemical 함량을 증가시키는 방법 및 Type별 정제방법, 추출물에 대한 기전 연구 등을 통해 기술을 확보하고 시장 선점의 기회로 삼아야 할 것이다.

Phytochemical의 주요 활용 분야인 식물유래 천연물신약 시장은 연간 10% 이상의 높은 성장률을 기록하며 2013년 329억 달러 규모를 형성할 것으로 전망된다. 이 중 식물 추출 약물

시장은 연간 9.4% 성장해 2013년 305억 달러 규모를 형성할 것으로 추정되며, 식물성 약품 시장은 2013년 24억 달러 규모로 폭발적인 성장이 예상된다. 상기 시장 규모를 통해 보듯 천연물 신약시장은 현재 선진국의 경우에도 시장 진입 초기단계의 분야로, 천연물신약은 한국의 전통의약과 관련도가 높아 풍부한 한의학 데이터베이스의 과학적 체계화로 향후 한국이 세계 시장 선점을 통한 경쟁력을 가질 가능성이 높은 것으로 평가되고 있으며, 특히 식물의약은 만성질환과 같이 다중병인이 있는 경우에 유효하며 안전성이 탁월하여 기술 확보가 선행된다면 향후 세계 시장 점유율을 확대할 수 있는 주요 타겟 분야인 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 최종목표 및 평가방법

1. 최종목표

본 연구과제는 두(콩)류 자원으로부터 태좌를 순수 분리·배양하여 화학적·물리적 유인제(Elicitor)를 사용하여 두(콩)류에 많이 함유되어 있는 daidzein과 같은 2차 대사산물의 생리활성물질 함량이 증가된 고부가성 물질생산을 위해 두(콩)류 태좌 조직 배양체를 생물반응기를 이용한 대량생산화를 최적화하고 유효성 평가를 통한 고기능성 화장품 신소재 원료개발에 있다.

2. 개발기술의 평가방법 및 평가항목

평가항목	단위	전체항목에서 차지하는 비중 (%)	세계최고 수준 보유국/ 보유기업	연구개발 전 국내수준	개발 목표치	평가방법
			성능수준	성능수준	당해 년도	
1. 두(콩)류 태좌조직 배양조건 확립	%	20	중국/상하이대 80%	70%	90%	자체
2. 유용물질 함량분석	%	5	한국/충북대 30%	30%	50%	자체
3. 항산화 효능	%	10	미국/Amgen 60%	60%	대조군 대비 50%	자체
4. 항염 효능	%	10	미국/Amgen 60%	60%	대조군 대비 40%	자체
5. 유효성분 추출 공정의 표준화	유무	5	-	-	100%	자체
6. 유효성분 함유 안정화 제형개발	%	15	스위스/미벨 40%	20%	대조군 대비 40%	자체
7. 유효성분 분석 표준화	%	5	한국/아모레퍼시픽 40%	40%	40%	자체
8. 유효성분 임상 안전성 평가	%	10	한국/엘리드 50%	50%	50%	평가 보고서 (임상시험)
9. 국제화장품원료협회 (CTFA) 인허가	허가여부	10	-	-	10건 이상	등재확인 서신
10. 조성물 특허 출원	출원여부	10	-	-	3건 이상	출원여부
11. 소재 산업화	유무	-	-	-	3건 이상	산업화 실적

제 2절 단계목표 및 연차별 개발범위

1. 단계별 목표

- 1차년도 -

구분	단계 목표
주관기관	<ul style="list-style-type: none"> • 두(콩)류자원의 태좌조직배양 방법 확립 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양체로부터 유효성분 추출 • 생리활성물질의 함량 극대화를 위한 추출조건 확립 • 노지재배 식물과 조직배양 식물체의 유효성분 변화 분석 • 생리활성물질 함량증가를 위한 유인제 처리방법 확립 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 국제화장품원료협회 소재 인허가 10건 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 조성물 특허 출원 1건
위탁기관	<ul style="list-style-type: none"> • 두(콩)류 태좌조직배양체 추출물의 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 생리활성물질 함량 측정 - 생리활성물질 함유 태좌조직배양 추출물에 대한 항산화, 미백, 주름개선, 항염 및 항알러지 유효성 평가

- 2차년도 -

구분	단계 목표
주관기관	<ul style="list-style-type: none"> • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물의 누적접포에 의한 안전성 평가 및 인체적용 시험 연구 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 함유한 제형에 대한 유효성평가 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 유효성분 분리 정제 및 분석 • 제품적용에 적합한 추출물 표준화 및 분석 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 조성물 특허 출원 2건
위탁기관	<ul style="list-style-type: none"> • 대규모(20L이상) 생물반응기 배양시스템의 최적화 • 태좌조직배양체 대량생산공정 확립 • 두(콩)류 태좌조직배양체의 biomass와 생리활성물질의 함량 증가 조건 구명 • Biotic, Abiotic Stress 조건에 따른 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출의 Secondary Metabolite 함량 측정 • 생물반응기를 이용한 두(콩)태좌조직배양체 대량생산 조건 최적화 • Scale up 생산 공정도 확립

2. 연차별 개발 범위

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용 및 범위
1 차 년 도	2011	<ul style="list-style-type: none"> • 두(콩)류자원의 태좌조직배양 방법 확립 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양체로부터 유효성분 추출 • 생리활성물질의 함량 극대화를 위한 추출조건 확립 • 두(콩)류 태좌조직배양체 추출물의 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 생리활성물질 함량 측정 - 생리활성물질 함유 태좌조직배양 추출물에 대한 항산화, 미백, 주름개선, 항염, 및 항알러지 유효성 평가 • 노지재배 식물과 조직배양 식물체의 유효성분 변화 분석 • 생리활성물질 함량증가를 위한 유인제 처리방법 확립 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 국제화장품원료협회 소재 인허가 10건 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 조성물 특허 출원 1건 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 식물생장조절제의 영향 : 2,4-D, Kinetin, NAA, IBA, BA 등 auxin, cytokinin의 종류별, 농도별 처리 후 생체중, 건물중, % dry weight, growth rate 등의 조사 및 2차 대사산물 함량 변화 조사 2) 배지 내 무기물 농도의 영향 : MS배지의 전체 무기물 농도를 1/4, 1/2, 1, 2 배 등으로 다르게 처리 후 생체중, 건물중, % dry weight, growth rate 등을 조사 및 2차 대사산물 함량 변화 조사 3) 배지 내 당(Sucrose)의 영향 : Sucrose 농도를 0, 1, 3, 5, 7, 9 % 등으로 다르게 처리 후 생체중, 건물중, % dry weight, growth rate 등을 조사 및 2차 대사산물 함량 변화 조사 4) 온도의 영향 : 배양 온도를 10, 15, 20, 25, 30 °C로 처리하여 생체중, 건물중, % dry weight, growth rate 등을 조사 및 2차 대사산물 함량 변화 조사 5) 광주기·광도 등의 영향 : 광주기와 광도를 달리 처리하여 생체중, 건물중, % dry weight, growth rate 등을 조사 및 2차 대사산물 함량 변화 조사 6) Elicitation 방법에 따른 영향 : Methyl jasmonate, Salicylic acid, UV 및 Nitric acid 등의 농도 처리에 따른 생체중, 건물중, % dry weight, growth rate 등을 조사 및 2차 대사산물 함량 변화 조사 7) 접종밀도의 영향 : 초기 세포 접종밀도(wet weight기준)를 달리 처리 한 후 초기 접종한 양을 기준으로 다음 배양 시기까지 증가한 세포 성장률(growth rate)을 구하고 성장 정도를 비교 8) 태좌 조직배양체 식물로부터 유효성분 추출 <ul style="list-style-type: none"> - 조건별(열추출, Ethanol 추출, Methanol) 추출물 제조 - 용매별 분획추출물에 대한 Prep-HPLC를 이용한 분석 9) 두(콩)류 태좌조직배양체 추출물의 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 생리활성물질 함유 추출물에 대한 항산화, 미백, 주름 및 항알러지 효과 10) 소규모 생물반응기 내 공기 공급량이 세포생장에 미치는 영향 : 세포증식에 적합한 생물반응기 내 공기 공급량을 조사하기 위하여 공기흐름 조절장치를 이용하여 공기 주입량을 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.05~0.4 vvm 으로 처리 후 성장량과 stress 관련 물질 축적의 변화등에 대한 연구 실시 11) 생리활성물질의 함량 극대화를 위한 추출조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 추출용매에 따른 유효성분 함량 측정 및 추출 성분 비교 - 추출 방법에 따른 유효성분 함량 및 추출성분 비교 - 추출 온도 및 시간에 따른 유효성분 함량 측정 12) 두(콩)류 태좌 조직배양추출물의 국제 화장품 원료협회 인허가 <ul style="list-style-type: none"> - 화장품 및 의약품의 원료로서 두(콩)태좌 조직배양추출물이 함유된 제품을 사용하기 위하여 등재와 허가를 획득

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2 차 년 도	201 2	<ul style="list-style-type: none"> • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물의 누적 첩포(RIPT, Repeated Insult Patch Test)에 의한 안전성 평가 및 인체적용 시험 연구 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 함유한 제형에 대한 유효성평가 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 유효 성분 분리 정제 및 분석 • 제품적용에 적합한 추출물 표준화 및 분석 • 대규모(20L이상) 생물반응기 배양시스템의 최적화 • 태좌조직배양체 대량생산공정 확립 • 두(콩)류 태좌조직배양체의 biomass와 생리활성물질의 함량 증가 조건 구명 • Biotic, Abiotic Stress 조건에 따른 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출의 Secondary Metabolite 함량 측정 • 생물반응기를 이용한 두(콩)태좌조직배양체 대량생산 조건 최적화 • Scale up 생산 공정도 확립 • 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출물 조성물 특허 출원 2건 • 대규모(20L이상) 생물반응기 배양시스템의 최적화 • 태좌조직배양체 대량생산공정 확립 • 두(콩)류 태좌조직배양체의 biomass와 생리활성물질의 함량 증가 조건 구명 • Biotic, Abiotic Stress 조건에 따른 두(콩)류자원의 태좌조직배양추출의 Secondary Metabolite 함량 측정 • 생물반응기를 이용한 두(콩)태좌조직배양체 대량생산 조건 최적화 • Scale up 생산 공정도 확립 	<p>1) 대규모(20L이상) 생물반응기 배양시스템의 최적화 : 태좌 조직배양체의 대량생산을 위해 20L, 50L의 생물반응기를 대상으로 배양기간, 배지 조건, 배지 추가 접종 등에 대한 실험을 실시 후, 최적 배양시스템을 확립</p> <p>2) Elicitation 방법에 따른 Secondary Metabolite 함량비교 : Methyl jasmonate, Salicylic acid, UV 및 Nitric acid 등의 농도 처리에 따른 polyphenols, flavonoids, carotenoids 등의 2차 대사산물 함량 변화 조사</p> <p>3) 태좌 조직 배양체 유래 생리활성 단일물질의 작용기작 연구</p> <p>4) 태좌 조직 배양체 유래 생리활성물질에 대한 피부 안전성 시험 : 인체피부 누적첩포 및 감작성 시험(Repeat Insult Patch Test, RIPT)를 통하여 인체피부에 대한 누적자극 평가를 실시한다. 실시조건으로는 Induction period - 격일로 3주간 9회 첩포, Resting period - 2주간 무처리, Challenge period - 48시간 첩포 후 30분, 2차 대사산물 함량 변화 조사</p> <p>5) 태좌 조직 배양체 유래 생리활성물질을 함유한 제형에 대한 안정성 평가 - pH 측정: pH meter를 사용하여 30일동안 25℃에 보관한 후 pH를 측정 - 점도 측정: Brookfield viscometer를 이용하여 25℃에서 스피들(spindle) No. 4를 선택하여 20 rpm에서 3분간 3회 반복하여 평균값을 얻고, 1회 측정 후 3시간 뒤에 다시 측정하여 30일동안 측정값을 나타낸다. - 온도에 따른 경시변화 안정성 측정: 0℃, 25℃, 40℃의 온도조건에서 보관하여 경시적 변화에 따른 제형의 상태변화를 육안으로 평가한다. 관찰은 제형을 보관한 후 1일, 3일, 5일, 7일, 15일 및 30일 경과 후에 제형의 분리 및 침전, 변색, 응집과 같은 현상들을 관찰한다. - 온도순환(Cycle chamber)에 따른 보존 시험 평가: -15℃, -10℃, -5℃, 0℃, 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 37.5℃ 및 40℃에서 각각 24시간 동안 보관한 후 이를 1cycle로 하여 10회 반복 시행하여 온도 순환에 따른 제형의 안정성을 평가한다.</p> <p>6) 태좌 조직 배양체 유래 생리활성물질 분리 정제·성분 확인 및 표준화 - 태좌 조직배양시 변화된 성분·신규성분 확인: HPLC - 신규물질 분리·정제 및 구조 규명 확인: NMR, IT-TOF, FT-IR - 신규물질 분석 표준화: 대량 정제를 통한 표준물질 확보, HPLC/DAD, LC/MS/MS 등 분석기기를 통한 분석방법 확립</p> <p>7) 제품 적용에 적합한 추출물 제조 및 이에 대한 표준화 - 제조공법 및 표준화 작업: 반복 추출 및 이에 대한 유효성 평가를 통하여 제조 공법 및 이에 대한 공정 표준화 구축 - 대량 추출을 통한 최적 조건의 추출물 대량 획득</p>

3. 연구개발 추진일정

- 1차 년도 -

일련번호	세부 추진 사항	수행기관	추진 일정(개월)												진행도 (%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	두(콩)류자원의 태좌조직 분리 및 배양 방법 확립	주관	■	■	■	■										100
2	두(콩)류자원의 태좌조직배양체로부터 유효성분 추출	주관			■	■	■	■								100
3	두(콩)류 태좌조직배양체 추출물의 유효성 평가	위탁					■	■	■	■	■					100
4	두(콩)류 태좌조직배양체 추출물의 생리활성물질의 함량 극대화를 위한 추출조건 확립	주관				■	■	■	■	■						100
5	노지재배 두(콩)류와 두(콩)류 태좌조직배양체의 유효성분 변화 분석	주관							■	■	■	■				100
6	두(콩)류 태좌조직배양체의 생리활성물질 함량증가를 위한 유인제 처리방법 확립	주관					■	■	■	■	■	■	■	■		100
7	국제화장품원료협회 소재 인허가	주관													■	100
8	조성물 특허 출원	주관													■	100

- 2차 년도 -

일련번호	세부 추진 사항	수행기관	추진 일정(개월)												진행도 (%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	두(콩)류 태좌조직배양추출물의 누적접포에 의한 안전성 평가 및 인체 적용 시험 연구	주관	■	■	■	■										100
2	두(콩)류 태좌조직배양추출물 함유한 제형에 대한 유효성 평가	주관			■	■	■	■								100
3	Biotic, Abiotic stress 조건에 따른 두(콩)류 태좌조직배양체의 secondary metabolite함량 측정	위탁					■	■	■	■	■					100
4	두(콩)류 태좌조직배양추출물 유효성분 분리 정제 및 분석	주관				■	■	■	■	■						100
5	제품적용에 적합한 추출물 표준화 및 분석	주관						■	■	■	■	■				100
6	대규모(20L이상) 생물반응기 배양시스템의 최적화 및 대량생산 공정 확립	위탁										■	■	■	■	100
7	두(콩)류 태좌조직배양추출물의 조성물 특허 출원	주관													■	100

제 3절 연구개발 수행방법 및 결과

1. 두(콩)류 자원 태좌조직배양

가. 실험재료

경남 진주시 사봉면 등건리에서 수확한 대두(*Glycine max* (L.) Merr.)를 실험재료로 사용하였다. 실험재료의 소독을 위하여, 70% 에탄올에 30초 동안 침지한 후 멸균수로 세척하고 다시 소독액 (30% 락스 +Tween20)으로 20분 소독한 후 멸균수로 3회 수세하여 염농도를 1/2로 줄인 MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 agar 8g/L, sucrose 30g/L를 첨가한 배지에 파종하고, 25±1℃, 습도 70% 및 20 μmol m⁻²s⁻¹(16시간 명, 8시간 암) 조건으로 배지상에서 2개월간 배양하며 발아를 유도하였다.

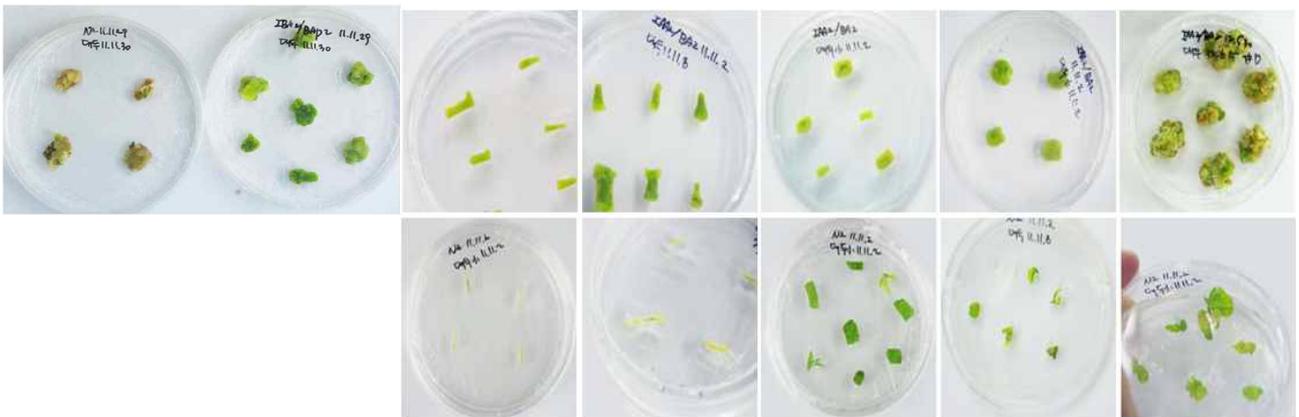
나. 두(콩)류 자원의 태좌조직배양 및 캘러스 유도 배양 방법 확립

1) 연구수행방법

발아된 시료들은 기본 MS배지상에서 계속 키웠고, 두 달 정도 키운 대두의 콩각지 내에서 태좌부위를 채취하였다. IBA(indole-3-butyric acid) 및 NAA (1-naphthalene acetic acid)가 대두 태좌조직배양 및 캘러스 유도에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 채취된 대두 태좌부위 및 캘러스의 최적의 적합한 옥신의 종류와 농도를 조사하기 위하여 sucrose 30g/L가 첨가된 MS배지에 IBA 및 NAA의 농도를 달리 조절하여 2개월간 기내 발아된 대두 식물체로부터 1.0 cm X 1.0 cm 씩 취하여 치상하였다. 배지는 1N NaOH를 이용하여 pH 5.8로 조정 한 후, plastic petridish(90 mm X 15 mm, SPL)에 25ml씩 분주하여 사용하였다. 배양은 25±1℃, 습도 70% 및 20 μmol m⁻²s⁻¹(16시간 명, 8시간 암) 조건으로 배양하였다.

2) 결과

IBA 및 NAA가 대두 태좌조직배양 및 캘러스 유도에 미치는 영향을 조사한 결과, 20 μmol m⁻²s⁻¹ 조건의 IAA 2mg/L 처리구에서 대두 태좌조직배양 및 캘러스 유도율이 가장 높았다. NAA 2mg 처리구의 경우는 유도된 캘러스가 누렇게 갈변되어 자라는 경향을 보였고, 이는 연속적인 배양에는 적합하지 않은 형태임을 알 수 있었다.



다. 두(콩)류 자원의 태좌조직배양체로부터 유효 추출조건 확립

1) 연구수행방법

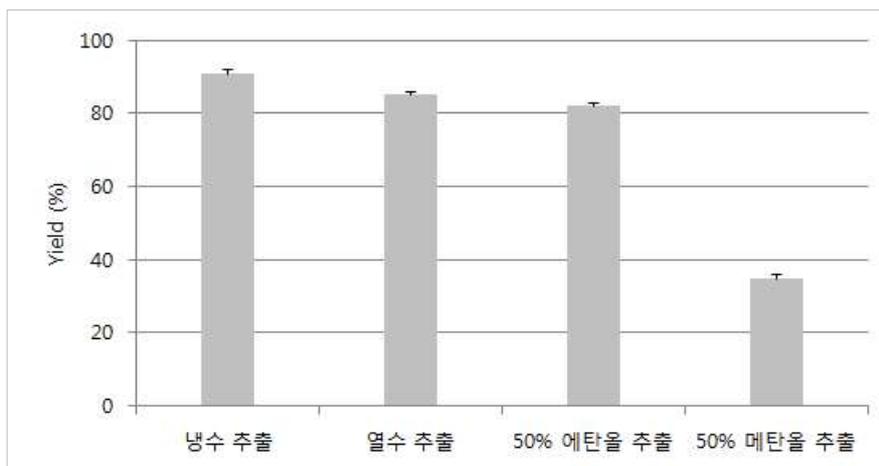
추출용매에 따른 함량비교, 추출용매 혼합 비율에 따른 함량, 추출시간 및 추출장치에 따른 유용물질의 함량 변화 및 추출 효율을 비교하여 유용성분을 최대한 용이하게 추출할 수 있고, 또한, 화장품 원료로서의 사용이 용이한 추출 조건을 확립하였다.

대두 태좌조직배양물의 유효활성 물질을 확인하기 위하여 극성이 다른 여러 종류의 추출용매를 사용하였다. 사용된 추출용매로는 물(열수 추출, 냉수추출), 50% 에탄올, 50% 메탄올을 사용하였다. 시료 5g에 각 용매별로 100ml를 넣고, 냉수 추출과 50% 에탄올 추출의 경우 실온에서 교반하여 3일 동안 추출하였고, 열수 추출의 경우 80℃ ~ 120℃에서 3시간동안 교반하며 추출하였다. 50% 메탄올의 경우에는 3시간동안 교반하며 실온에서 추출하였다. 추출된 시료는 원심분리를 이용하여 상층액만을 분리하여 동결건조하여 시험에 사용하였다.

2) 결과

대두 태좌조직배양물의 유효활성 물질을 확인하기 위하여 극성이 다른 여러 종류의 추출용매(열수 추출, 냉수추출), 50% 에탄올, 50% 메탄올을 사용하였다. 시료 5g에 각 용매별로 100ml를 넣고 추출한 결과 냉수 추출에서 약 90%의 가장 높은 수득율을 보였으며 열수 추출 및 50% 에탄올 추출에서도 80% 이상의 수득율을 보였다. 반면에 50% 메탄올 추출에서는 40%도 되지 않는 상대적으로 낮은 수득율을 가짐을 확인하였다.

< 수득율 >



라. 대두 태좌조직배양 추출물의 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)에 의한 유효성분 변화 분석

1) 연구수행방법

가) 대두 추출물과 대두 태좌조직배양 추출물 성분분석

대두 추출물과 대두 태좌조직배양추출물의 HPLC에 의하여 성분분석을 수행하였다. 분석조건은 다음과 같다.

구분	분석조건		
HPLC 기기 종류	Waters 1525 μ Binary HPLC Pump		
Column 종류	Gemini 5 μ C18 110 A (Phenomenex 사)		
Column 규격	250 * 4.60 mm, 5 micron		
용매 조건	- 용매 A : Water (0.1 % TFA (Trifluoro acetic acid) 함유) - 용매 B : Acetonitrile (0.1 % TFA (Trifluoro acetic acid) 함유)		
과장	234 nm (UV 램프)		
유속	1 ml/min		
용매 기울기	Time (min)	용매B(%) ACN	용매C (%) ACN
	0	100	0
	35	30	70
	40	30	70
	41	100	0
	46	100	0

나) 대두태좌조직 배양물 유효성분 구조분석

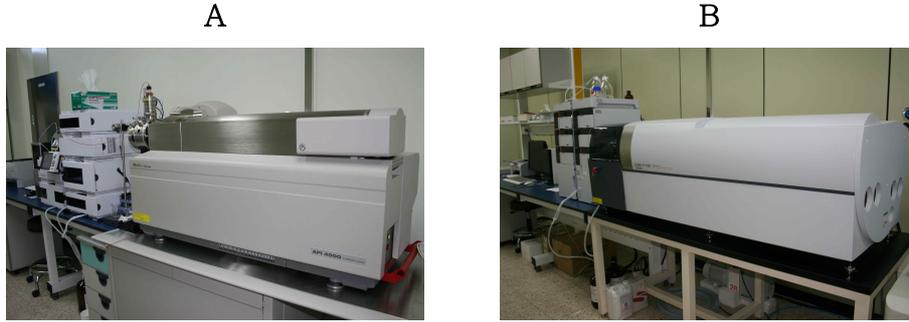
① HPLC 분석

Preparative HPLC로 정제된 시료는 HPLC를 이용한 Daidzein의 분석조건으로 분석하여 단일화합물 여부를 확인하였다.

② LC/MS/MS 분석

정제된 시료는 UHPLC-MS/MS인 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (LCMS-8040, Shimadzu, Japan)로 분자량 및 fragment를 확인하였다. LC/MS/MS 분석조건은 다음과 같다.

LC Conditions	Column: Shim-pack XR-ODS II(2.0 mmI.D. x 75 mmL., 2.2 μ m) Mobile phase A: 0.1 % formic acid in water Mobile phase B: 0.1 % formic acid in acetonitrile Gradient program: 10%B(0.20 min)-95%B(2.70-3.50 min) - 10%B(3.51-5.00 min) Flow rate: 0.4 mL / min Injection volume: 5 μ L Column temp. : 40 $^{\circ}$ C
MS Conditions	Nebulizing gas flow: 3 L/min Drying gas flow: 10 L/min DL temperature: 250 $^{\circ}$ C H temperature: 400 $^{\circ}$ C Ionization method: ESI Positive ion mode Data Acquisition: MRM mode (multiple reaction monitoring)



Identification apparatus (A: LC/MS/MS, B: Ion-time of flight).

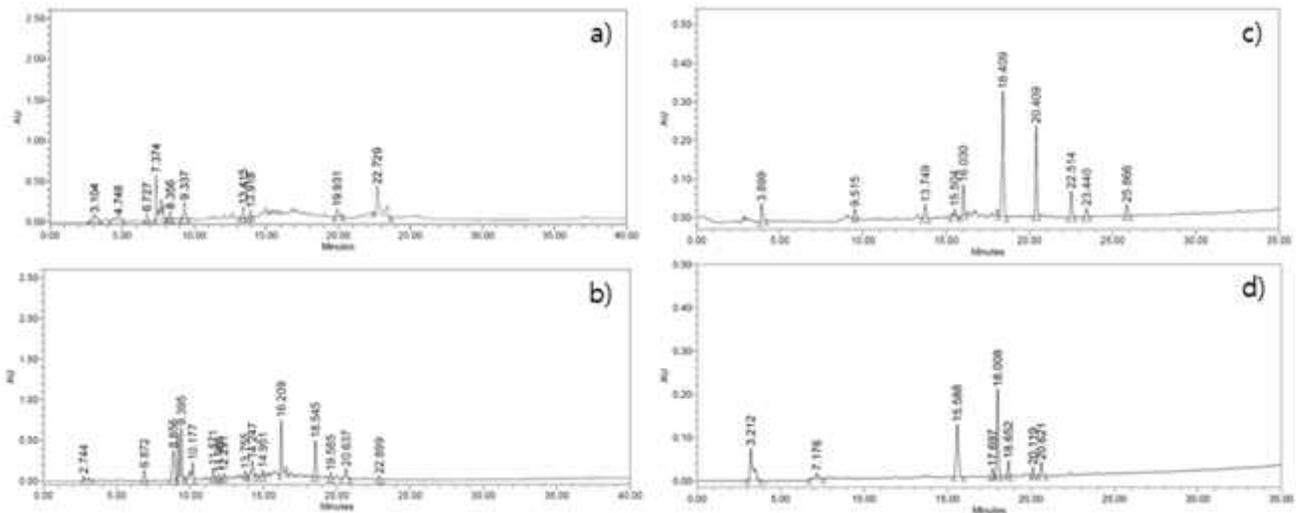
③ NMR 분석

HPLC분석에 의해 함량 증가 확인된 22분 peak만을 정제하여, 핵자기공명분광법(NMR spectroscopy)을 이용하여 증가된 물질을 분석하였다. 정제된 시료를 0.6ml의 methanol-d₄(contain 0.03v/v% TMS)에 녹여 NMR tube(NES-600, Japan)에 옮긴 후 NMR 300MHz로 ¹H를 분석하였다. 본 물질은 ¹H, ¹³C spectrum을 통해 수소의 종류와 수 그리고, 수소 주변의 환경에 대한 정보를 탐색하고, 또한 탄소의 수를 결정할 수 있다. 보다 정확한 구조를 확인하기 위하여 2차원적인 분석 방법인 ¹H-¹H Correlation spectroscopy (COSY법)와 ¹H-¹³C Heteronuclear Correlation spectroscopy (HMPC 법)을 실시하였다.

2) 결과

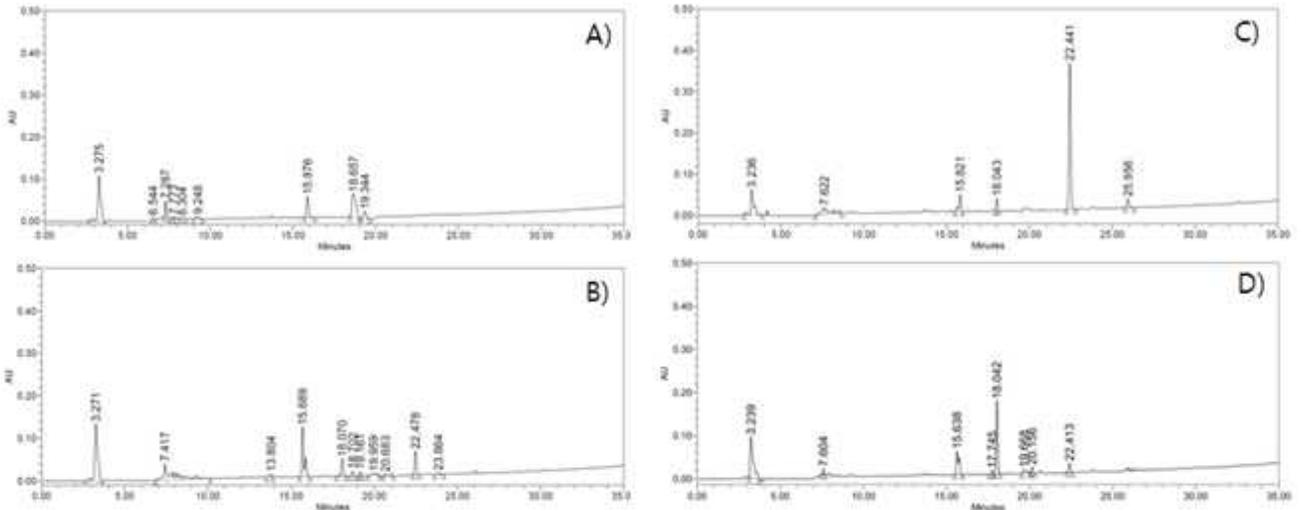
가) 대두 추출물과 대두 태좌조직배양추출물 성분분석

<대두 추출물>



a) 대두 냉수 추출물 b) 대두 열수 추출물 c) 대두 50% 에탄올 추출물 d) 대두 50% 메탄올 추출물

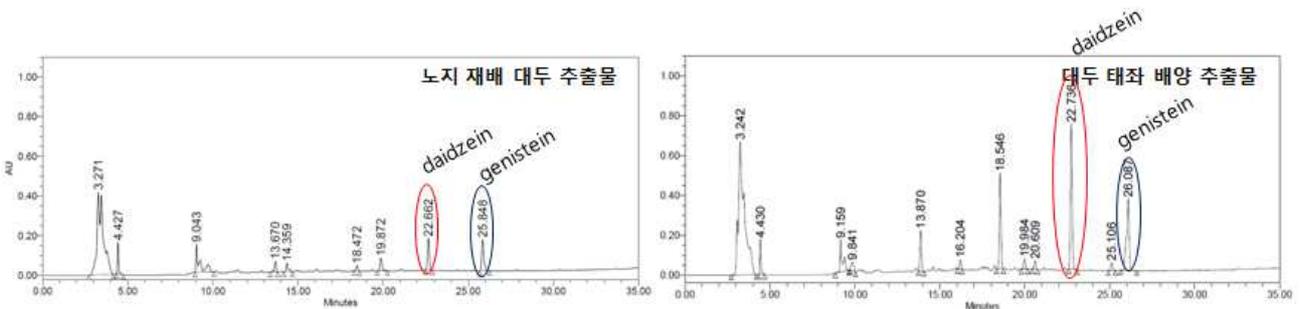
<대두 태좌배양 추출물>



A) 대두 태좌 배양 냉수 추출물 B) 대두 태좌 배양 열수 추출물 C) 대두 태좌 배양물 50% 에탄올 추출물
D) 대두 태좌 배양 50% 메탄올 추출물

< 노지재배 대두 추출물과 대두 태좌배양 추출물의 유효성분 수율 비교 >

: 노지에서 재배된 대두콩과 식물조직배양을 이용한 대두 태좌조직배양체를 50% 에탄올 추출하여 이소플라본의 유효성분으로 알려진 daidzein 및 genistein을 HPLC분석으로 비교해보았다.



50% 에탄올 추출에 의하여 daidzein 및 genistein의 함량분석결과, 노지에서 재배된 대두콩 추출물과 비교하여 대두 태좌배양

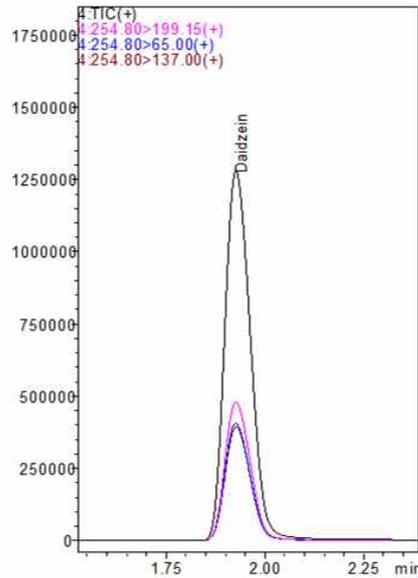
나) 대두태좌조직 배양물 유효성분 구조분석

① HPLC 분석

정제된 시료는 HPLC로 분석한 결과 머무름 시간(Retention Time, Rt)이 22분대로 Daidzein과 같았으며 HPLC 크로마토그램에서는 단일 화합물로 확인되었다.

②LC/MS/MS 분석

Preparative LC로 표준품 Daidzein 화합물을 LC/MS/MS로 분석한 결과 Molecular weight 값은 254.06이었으며 $[M+H]^+$ 는 254.8, 199.15로 확인되었다.

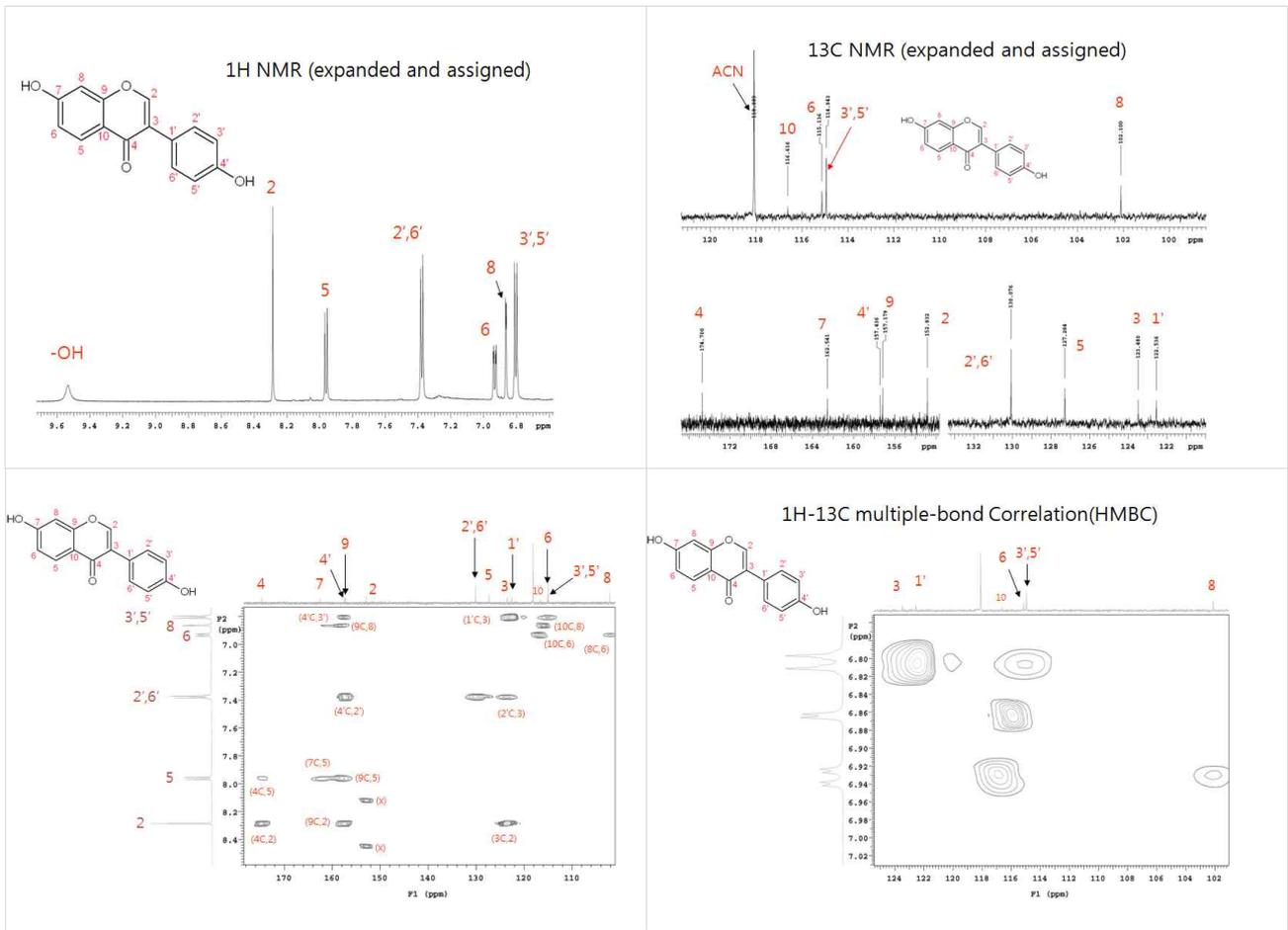


Pesticides	Formula	Molecular weight	Ion	Precursor ion	Product ions(CE, V)		
Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.06	[M+H] ⁺	254.80	199.15(24)	65.00(54)	137.00(26)

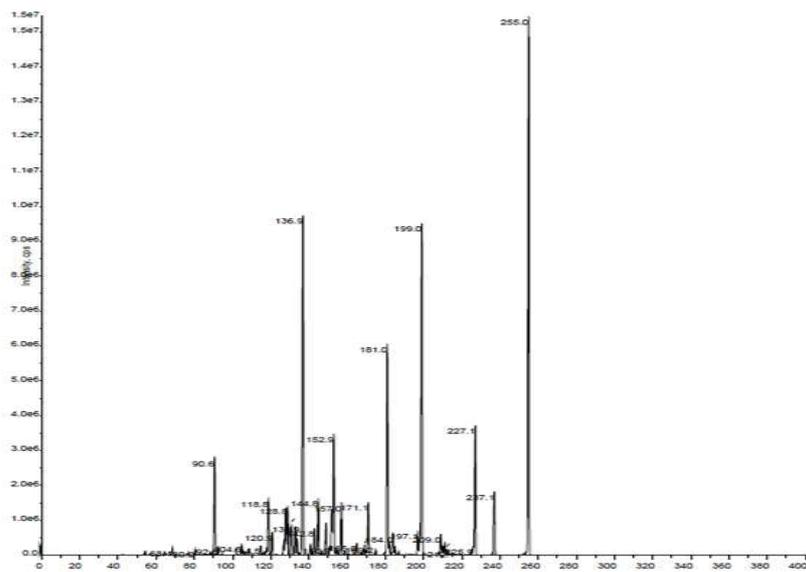
Preparative LC로 정제된 시료의 LC/MS/MS로 분석한 결과 [M+H]⁺는 254.8, 199.15로 확인되었다. Formula predictor로 예측한 결과 분자식은 C₁₅H₁₀O₄로 Daidzein과 동일한 화합물임을 확인하였다.

③ NMR 분석 결과

HPLC분석에 의해 함량 증가 확인된 22분 peak만을 정제하여, 핵자기공명분광법(NMR)을 이용하여 증가된 물질을 분석하였다. ¹H spectrum을 통해 수소의 종류와 수에 대한 정보 및 수소가 존재하는 주변정보를 탐색하고 ¹³C spectrum을 통해 단일 peak로 나타나는 탄소의 수를 결정할 수 있는데, 그 결과는 아래 그림으로 나타내었으며, 보다 상세한 화학적 이동값 (Chemical shift, δ)이 문헌상에 나타난 daidzein과 동일함을 보임으로써 대두 태좌조직배양물 50% 에탄올 추출에 의해 증가된 물질이 Daidzein 임을 확인할 수 있었다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm); 6.80 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'C), 6.86 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8C), 6.93 (1H, dd, J = 8.7, 2.1 Hz, H-6C), 7.37(2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'C), 7.96 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5C), 8.27 (1H, s, H-2C); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) :152.8 (C-2), 123.5 (C-3), 174.7 (C-4), 127.3 (C-5), 115.1(C-6), 162.5 (C-7), 102.1 (C-8), 157.2 (C-9), 116.6 (C-10), 122.5 (C-1'), 130.1 (C-2',C-6'), 114.9 (C-3',C-5'), 157.4 (C-4')



■ M22 (255.05): 30 MCA scans from Sample 1 (Bean_M22) of Bearplacenta Extract_254.wif (Turbo Spray) Max. 1.5e7 cps.



다. 생리활성물질 함량증가를 위한 유인제 처리방법 확립

식물체가 미생물의 침입을 받았을 때 식물체 내 생리활성물질 함량이 증가하는데 일반적으로 향생물질과 같은 역할을 하는 피토알렉신의 양이 먼저 증가한다. 따라서 기내 배양체의 생리활성물질 함량이 낮은 단점을 극복하기 위해 병원균 유래 화합물(elicitor)을 인위적으로 처리하여 배양체 내 피토알렉신의 양을 증가시켜 최종 생리활성물질의 축적을 유도하는 elicitation 방법이 널리 이용되고 있다. 식물조직배양에 이용되는 elicitor는 크게 biotic elicitor와 abiotic

elicitor로 구분된다. biotic elicitor는 식물체유래 유인제와 미생물유래 유인제로 다시 구분되며, 기내 배양에서 널리 이용되는 식물체 유래 유인제에는 효소, 세포벽유래물질, 식물방어기작의 발현에 관여하는 신호전달 물질 등이 있다. Abiotic elicitor에는 온도, 건조, 무기염, 중금속, UV, 오존 등과 같은 배양체의 성장을 억제시키는 환경 스트레스요인 등이 있다. 식물체가 유인제를 인식하게 되면 식물체 내부에 피토알렉신의 증가뿐만 아니라 다양한 방어기작이 발현되므로 식물체의 최종 성장량이 감소할 수 있다. 또한 각각의 생리활성물질들은 서로 다른 생합성 경로를 통하여 최종 합성되므로 생산하고자하는 생리활성물질의 양을 증가시킬 수 있으면서 배양체의 성장량 감소를 최소화하는 적정 유인제의 종류와 농도 선별이 필요하다.

1) 연구수행방법

가) Abiotic Elicitor (Methyl jasmonate (MJ) 처리)에 따른 이차대사산물의 함량 측정 실험방법

대두 태좌 조직 배양체를 MS 기본배지에 IAA 2mg 성장조절물질을 첨가하여 25℃ 배양 온도로 5주간 배양하고, 배양 6주부터 MJ를 50, 100, 200 및 400 μ M의 농도별로 처리한 후 상기의 조건과 같이 냉수 추출, 열수 추출, 50%에탄올 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두 태좌 조직 배양체의 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀화합물의 함량을 측정하였다.

나) Biotic Elicitor(UV-A처리)에 따른 이차대사산물의 함량 측정 실험방법

대두 태좌 조직 배양체를 MS 기본배지에 IAA 2mg 성장조절물질을 첨가하여 25℃ 배양 온도로 5주간 배양하고, 배양 6주부터 UV-A 형광 램프(20W, Sankyo Denki, 일본)를 이용하여 매일 0h, 0.5h, 1h, 4h 및 8h으로 UV-A에 장시간 처리한 후 상기의 조건과 같이 냉수 추출, 열수 추출, 50%에탄올 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두 태좌 조직 배양체의 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀화합물의 함량을 측정하였다.

2) 결과

가) Abiotic Elicitor (Methyl jasmonate (MJ) 처리)에 따른 이차대사산물의 함량 측정
(단위: mg/g DW)

	MJ 처리농도 (μ M)	카로티노이드	플라보노이드	페놀화합물	
	대조군	73.86	26.18	32.61	대두 태좌조직
냉수 추출	50	70.12	20.11	25.12	배양체에 A b i o t i c elicitor 일종 인 Methyl jasmonate를 50, 100, 200 및 400 μ M 의 농도별로 처리한 후 냉 수 추출, 열수 추출, 50%에 탄을 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두
	100	69.12	21.87	31.11	
	200	64.13	23.17	31.26	
	400	50.00	25.12	27.94	
열수 추출	50	69.10	24.31	32.61	50, 100, 200 및 400 μ M 의 농도별로 처리한 후 냉 수 추출, 열수 추출, 50%에 탄을 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두
	100	80.12	20.11	35.12	
	200	89.66	21.87	40.78	
	400	71.12	23.17	42.12	
50%에탄올 추출	50	118.20	51.39	71.22	50, 100, 200 및 400 μ M 의 농도별로 처리한 후 냉 수 추출, 열수 추출, 50%에 탄을 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두
	100	128.99	58.36	82.33	
	200	146.67	62.15	91.26	
	400	138.88	62.55	87.94	
50%메탄올 추출	50	73.12	23.17	32.61	50, 100, 200 및 400 μ M 의 농도별로 처리한 후 냉 수 추출, 열수 추출, 50%에 탄을 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두
	100	64.13	25.12	25.12	
	200	50.00	24.31	31.11	
	400	69.10	20.11	24.10	

대두 태좌조직 배양체의 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀화합물의 함량을 측정하였다. 측정결과, MJ 200 μ M 처리 후 50% 에탄올 추출에 의한 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀함량이 증가된 것을 확인하였다.

나) Biotic Elicitor (UV-A처리)에 따른 이차대사산물의 함량 측정

대두 태좌조직 배양체에 Biotic elicitor 일종인 UV-A를 매일 0h, 0.5h, 1h, 4h 및 8h으로 장시간 처리한 후 냉수 추출, 열수 추출, 50% 에탄올 추출 및 50% 메탄올 추출하여 대두 태좌조직 배양체의 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀화합물의 함량을 측정하였다. 측정결과, UV-A에 의한 유인제 처리에 의해서도 50% 에탄올 추출에 의한 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀함량이 증가된 것을 확인하였다. UV-A를 0.5h 처리에 의하여 카로티노이드, 페놀 화합물의 양이 대조군에 비해 증가하기 시작하였으며, 4h 처리에 의하여 카로티노이드, 플라보노이드 및 페놀 화합물의 양의 함량이 가장 극대화하여 추출된 것을 확인할 수 있었다.

(단위:mg/g DW)

	UV-A	카로티노이드	플라보노이드	페놀화합물
	0h	34	32	45
냉수 추출	0.5h	37	37	63
	2h	43	36	72
	4h	46	37	72
	8h	44	38	79
열수 추출	0.5h	34	32	45
	2h	37	37	63
	4h	43	36	72
	8h	46	37	72
50%에탄올 추출	0.5h	54	38	79
	2h	100	80	130
	4h	130	160	250
	8h	80	76	150
50%메탄올 추출	0.5h	43	37	57
	2h	42	39	67
	4h	45	36	80
	8h	46	35	89

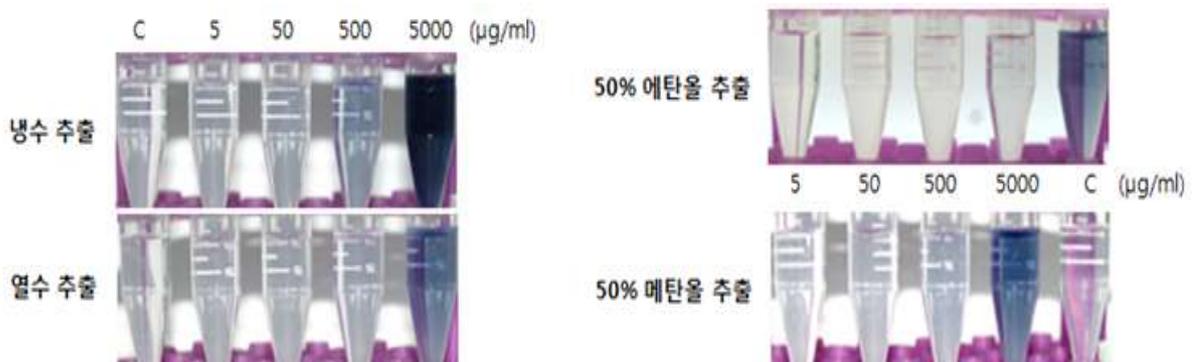
2. 대두 태좌 조직 배양체의 유효성 평가
가. 생리활성 물질 함량 측정
1) 연구수행방법

방법

총 페놀 함량은 Foline-Ciocalteu reagent가 대두 태좌조직 배양 추출물의 총 페놀물질에 의해 환원되면서 몰리브덴 청색으로 발색하는 Foline-Ciocalteu 방법(Folin와 Ciocalteu, 1927)에 기초한 Ali 등 (2006a)의 방법을 이용하여 총 페놀 함량을 측정하였다. 추출물과 표준물질용액 0.05ml에 증류수 2.55ml을 첨가한 뒤, 2N Folin-Ciocalteu reagent 용액(10 time dilution; Sigma chemical CO., St. Louis, MO, USA) 0.1 ml을 첨가하였다. 6분 뒤 혼합액에 20%(w/v) Na₂CO₃용액 0.5ml을 첨가한 후 30분간 암상태로 방치한 다음 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

표준물질로는 garlic acid를 사용하였으며, 총 페놀 함량은 mg · g⁻¹ · DW로 나타내었다.

2) 결과



- 대두 추출물

	50 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
냉수 추출	144.6	457.6	901.5
열수 추출	223.0	328.4	583.0
50% 에탄올 추출	62.3	388.4	530.0

50% 메탄올 추출	27.6	314.6	553.0
------------	------	-------	-------

- 대두 태좌조직배양 추출물

	50 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
냉수 추출	20.7	123.8	206.1
열수 추출	15.3	57.6	130.7
50% 에탄올 추출	32.3	164.6	219.2
50% 메탄올 추출	38.4	183.8	353.0

나. 세포 독성 (Cytotoxicity Test) 실험

1) 연구수행방법

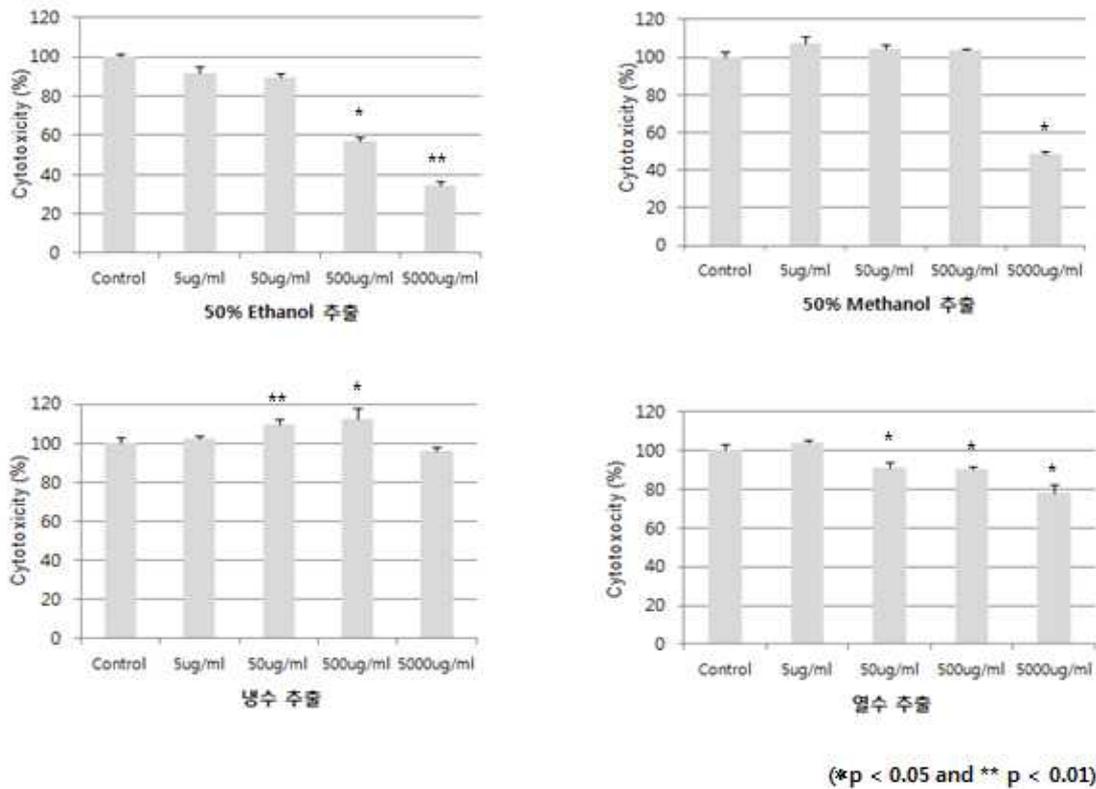
대두 태좌조직 배양체의 피부 세포에 대한 독성(Cytotoxicity) 효과를 알아보기 위하여, 인간 각질형성 세포(keratinocyte, HaCaT)는 한국세포주은행에서 분주 받아서 배양하였다. 각 세포를 1×10^4 cells/ml의 농도로 하여 24 well 배양판에 접종하였다. 배지는 10 % FBS를 함유한 DMEM(Dubelcco'S Modified Eagle Medium, BRL,USA)을 사용하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 48시간 배양하여 배양용기 표면적의 25 ~ 30%만큼 배양되면, 4가지 추출법에 의한 대두 태좌조직 배양체 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml, 5000 μ g/ml 함유된 FBS-free DMEM으로 교체하여 24시간 더 배양하였다. 배양 후 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브롬화물 (MTT, Sigma M5655, USA) 용액 (2.5 mg/ml)을 50 μ l 첨가하고 3시간동안 추가로 배양한 후 상등액을 제거하고, 각 well 당 200 μ l의 Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma D2650, USA)용액을 가한 후 20분간 교반하여 형성된 포르마잔(formazan) 결정을 녹인 다음, 100 μ l 씩을 96 well 로 취하여 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 피부 세포에 대한 Cytotoxicity는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 하기 수학적식에 따라 계산하여 백분율로 표시하였다.

[수학적식 1]

$$\text{세포독성효과}(\%) = [(\text{실험군 흡광도} - \text{대조군 흡광도})/\text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

2) 결과

상기 인간각질형성 세포(keratinocyte)를 이용한 Cytotoxicity(세포독성)에 미치는 영향시험 결과, 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml, 5000 μ g/ml의 대두 태좌조직 배양추출물 처리하였을 경우, 냉수 추출과 열수 추출에 의해서는 모든 농도에서 세포독성을 보이지 않았다. 반면, 50% 에탄올 추출의 경우, 500 μ g/ml 이상의 농도에서 40% 이상의 독성을 보이기 시작했으며, 50% 메탄올의 경우에는 5000 μ g/ml 처리 농도에서 50% 세포독성을 보였다.



다. DPPH radical 소거활성 시험

1) 연구수행방법

화합물 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH, Sigma D9132-1G, USA)는 에탄올 내에서 자유라디칼을 발생하는데, 대두 태좌조직 배양 추출물에 일정 비율로 혼합하여 생성된 자유라디칼의 양이 어느 정도 감소하는지(자유라디칼 소거활성 시험)를 확인함으로써 항산화 효과를 갖는지를 알아보았다. 자유라디칼 소거활성 실험은 Kim 등 (Kor. J. Pharmacogn., 24(4), 299-303(1993))의 방법을 변형한 것으로서, 안정한 자유라디칼인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma D9132-1G, USA)시약을 사용하였다. 0.2 mM DPPH 용액(Blank인 경우는 에탄올) 150 μ l에 대두 태좌조직 배양 추출물을 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml, 5000 μ g/ml 농도가 되도록 함유하도록 제작하여, 이들을 각각 150 μ l 첨가하여 혼합하고, 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군과 대조군에 대한 흡광도 측정 후, 항산화능의 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 백분율로 표시하였다.

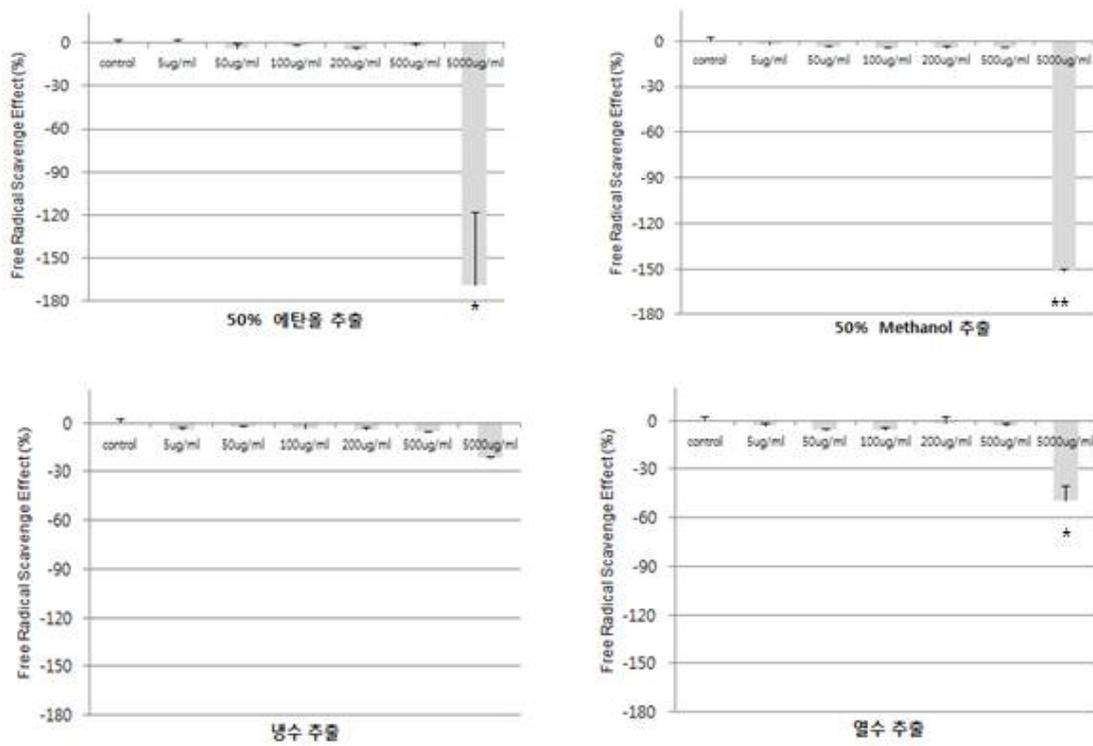
[수학식 2]를 이용하여 자유라디칼 소거활성 효과를 구하여 그 결과를 나타내었다.

[수학식 2]

$$\text{자유 라디칼 소거 효과 (\%)} = 1 - [(\text{실험군 흡광도} - \text{Blank 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

2) 결과

4가지 방법에 의해 추출된 대두 조직배양 추출물을 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml, 5000 μ g/ml 농도에서의 자유라디칼을 소거하는 항산화능을 측정한 결과, DPPH에 의한 항산화능은



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

측정되지 않았다. 특히, 5000 µg/ml 농도에서는 추출물 고유의 색깔로 간섭현상까지 일으켰다.

라. 티로시나아제 억제 효과에 의한 미백효과 시험

1) 연구수행방법

대두 태좌조직배양 추출물의 미백효과를 확인하기 위해, 생체 내에서 티로신(Tyrosine)이라는 물질의 산화과정을 촉진하여 멜라닌이 생성되게 도와주는 효소인 티로시나제(Tyrosinase)의 기능이 억제되는 정도를 알아보았다. 구체적으로는, 티로시나제의 기능을 억제함으로써 티로신이 산화되어 멜라닌이라는 흑색의 고분자 형성의 억제 정도를 측정하는 방법(Pomerantz S.H., J. Biochem., 24:161-168,1966)을 응용해 미백효과를 판정하였다.

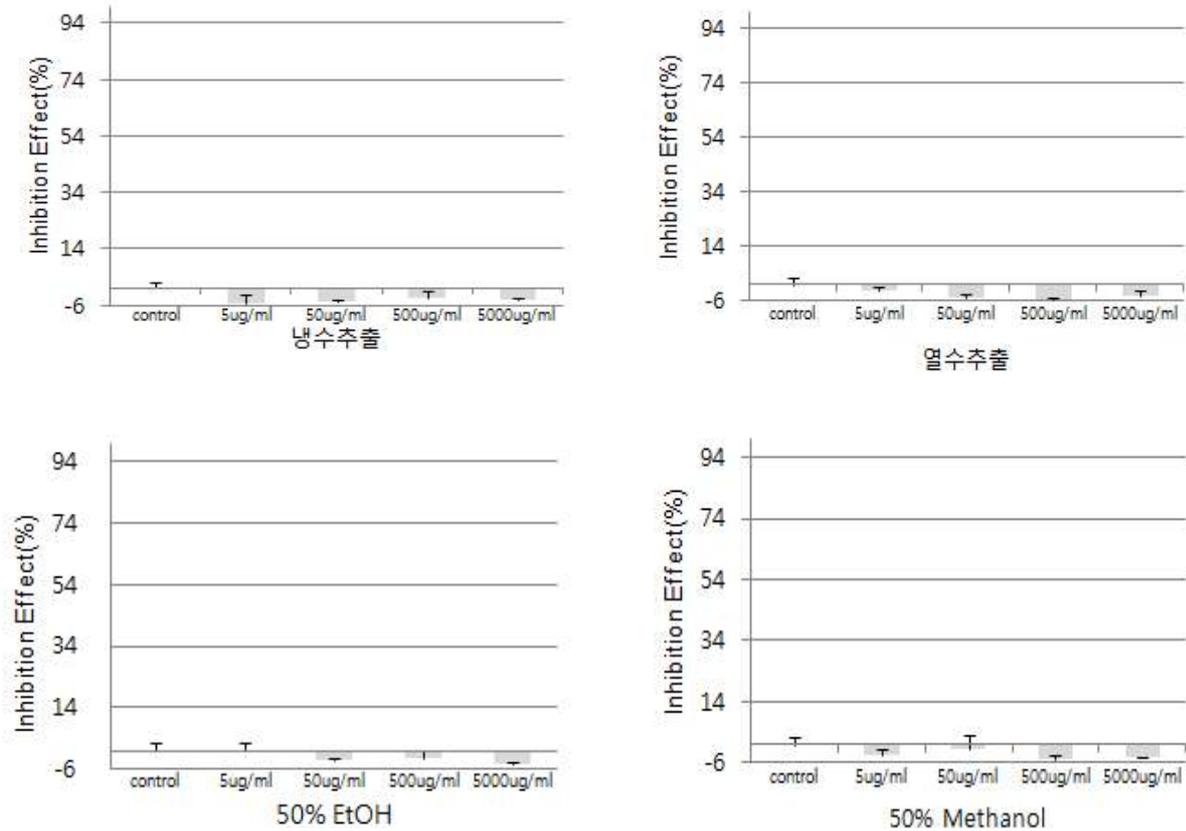
대두 태좌조직배양 추출물 각각 5 µg/ml, 50 µg/ml, 500 µg/ml, 5000 µg/ml 농도가 되도록 96 웰-플레이트에 넣고, 100mM의 소듐 포스페이트 완충액(pH 6.8)을 220µl, 1.5mM L-티로신 용액 40µl를 넣은 후, 머쉬룸 티로시나제(1,500units/ml, Sigma)를 20µl를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 0.2 ml을 취하여 96 웰 플레이트 (well plate)에 옮기고, 마이크로플레이트 판독기(Microplate reader)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나제에 대한 저해율을 측정하였다. 티로시나제(Tyrosinase)의 기능이 억제되는 저해능의 정도는 순수한 물을 사용한 대조구의 흡광 강도를 기준으로 백분율로 표시하였다.

[수학식 3]

$$\text{저해율}(\%) = 1 - [(\text{실험군 흡광도} - \text{Blank 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

2) 결과

4가지 방법에 의해 추출된 대두 조직배양 추출물을 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서의 티로시나아제 억제에 의한 미백효과를 측정된 결과, 미백효과도 확인하지 못했다.

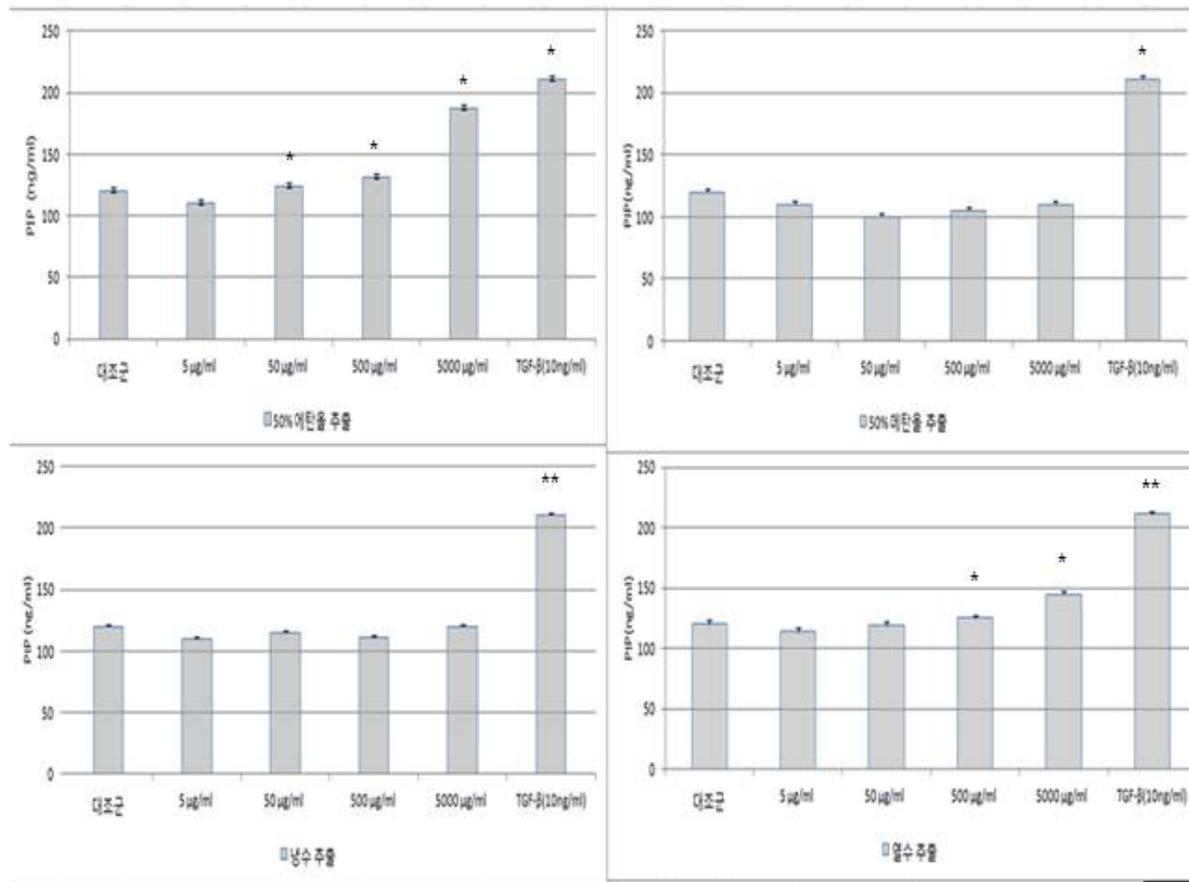


마. Procollagen 합성에 의한 주름 개선 효과

1) 연구수행방법

인간섬유아세포(Human Skin Fibroblast)를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 일정한 습도를 유지하는 세포 배양기내에서 10% FBS, Penicillin(50U/ml), Streptomycin(50/ml)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)으로 배양하여, 1×10^5 개/ml로 24 well plate에 500 μl 씩 분주한 다음 24시간 배양하였다. 대조군(DMEM 배지)과 대두 태좌조직배양 추출물 각각 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 함유한 배지를 넣고 48시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 48시간 후, 배지의 상층액을 각각 20 μl 을 취해 Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit(PICP, Takara, Cat No. MK101)를 이용하여 측정함으로써 새로 합성된 procollagen 양을 측정하였다. PICP양은 ng/ 10^5 세포로 환산하였으며, 하기 수학적식에 따라 계산하여 그 결과는 표에 나타나있다.

2) 결과



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

상기 표 4에서 볼 수 있듯이, 추출법에 따라 대두 태좌조직배양추출 처리하여 Procollagen 생합성량을 확인하였다. 결과는, 50% 에탄올 추출의 경우 대두 태좌조직배양 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 Procollagen 생합성량이 증가함을 알 수 있었다. 열수 추출의 결과는 Procollagen의 증가가 미비하였고, 냉수 추출의 경우와 50% 메탄올의 경우 주름개선과 관련 있는 Procollagen 생합성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

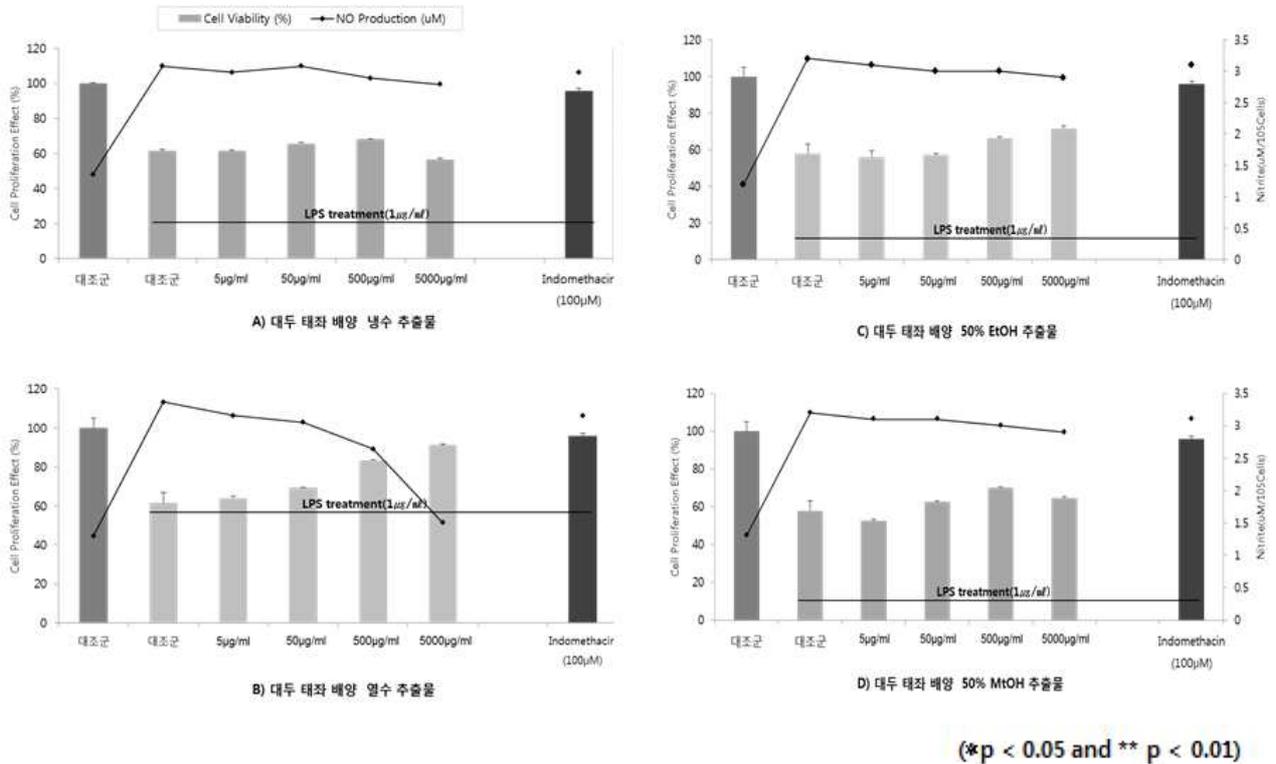
바. iNOS 활성 저해에 의한 염증 억제 시험

1) 연구수행방법

생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포를 이용하여 인위적으로 유발시킨 염증의 억제 효과를 알아보기 위하여, iNOS가 들어있지 않은 10% FBS-DMEM(Fetal Bovine Serum, 소태아혈청, Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO사) 배지에 1×10^5 세포를 현탁시켜 24 well plate에 접종하여 부착시켰다. 24시간 후, 4가지 추출법에 의해 추출된 대두 태좌조직배양 추출물 각각 5 µg/ml, 50 µg/ml, 500 µg/ml, 5000 µg/ml 농도별로 처리하여 18시간 배양한 후 1 µg/ml의 Lipopolysaccharide (Sigma사)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상층액을 회수하여 96 well plate에 100 µl씩 넣고 Griess reagent (Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 가볍게 흔들어 주어 570 nm에서 흡광도를 측정했다. Sodium Nitrite를 표준품으로 하여 검량선을 작성하고 각 시료를 배양액 중의 Nitric Oxide의 생성량을 구하였다. Lipopolysaccharide를 처리한 군의 Nitric Oxide의 생성량을 100%로 하여 각 시료의 % 수득율을 구하였다.

2) 결과

iNOS에 의한 항염 활성은 열수 추출에 의한 대두 태좌조직 배양 추출물이 눈에 띄는 효과를 보였다. 특히, 100 ppm 농도 이상 처리 시, 열수 추출에 의한 대두 태좌조직배양추출물은 대조군과 비교하여 NO 생산을 저해하며 염증효과를 확인하였다.



3. 대두 태좌조직 배양 추출물에 대한 항노화 유효성 평가

화장품 원료로서 대두 태좌조직 배양 추출물에 의한 피부 항노화 관련 유전자 분석을 Real-Time PCR을 통하여 수행하였다.

가. 콜라겐 합성에 관련한 유전자 (Procollagen) 발현 실험

1) 연구수행방법

본 시험은 인간섬유아세포주(CCD986나, Fibroblast)에서 콜라겐 합성에 관여하는 Procollagen 유전자의 발현정도를 mRNA 수준에서 확인하는 방법이다. 인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm² culture dish에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 5X10³ cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 100%이상 배양이 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를

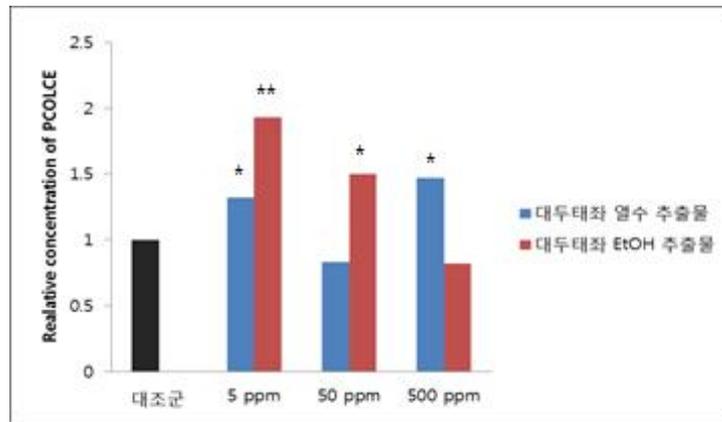
포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질인 대두 태좌조직 배양 추출물(열수 추출물, 에탄올 추출물)을 농도별로 5ppm, 50ppm, 500ppm으로 처리하였다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 주름 관련 유전자인 Collagen(PCOLCE, Procollagen C-endopeptidase enhancer)의 발현에 어떠한 영향이 있는지 보았다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다. RNA isolation은 FastLane Cell one-step buffer set(QIAGEN 216213)를 이용하였다. 배지를 제거한 세포는 FCW(cell wash buffer)로 세척하고, 50 ml의 cell processing mixture (Buffer FCPL이 첨가된 Buffer FCPW에 gDNA Wipeout buffer를 첨가한 mixture)을 첨가하여 실온에서 5분간 incubation 하였다. 이 후 새로운 E-tube에 옮긴 후 75 °C에서 5분간 반응시켰다. PCOLCE의 유전자 발현량을 분석하기 위하여 상기에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성하는 Reverse transcription 단계를 거쳐 합성된 cDNA를 template로하여 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen社)으로 진행하였다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primer assays를 사용하였다. 발현율은 Housekeeping gene(GAPDH, Cat.#QT01192646로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30min	50°C
PCR initial activation step	15min	95°C
3-step cycling:		
Denaturation	15sec	94°C
Annealing	30sec	60°C
Extension	30sec	72°C
Number of cycles	40	

2) 결과

콜라겐 합성에 관여하는 Procollagen의 mRNA의 발현량을 Real-Time PCR을 이용해 비교 분석하였다. 대두태좌 열수 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 열수 추출물의 경우는 5, 500ppm에서 대조군에 비해 발현량이 상대적으로 약간 증가하는 양상을 보였다. 대두태좌 에탄올 추출물을 처리한 결과 5ppm의 농도로 처리한 실험군에서 거의 2배정도로 증가하였고 농도가 증가함에 따라 Procollagen의 발현량이 점차 감소함을 확인하였다.

나. 생리 활성 조절과 관련된 유전자 (TGF-beta 1) 발현 실험



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

1) 연구수행방법

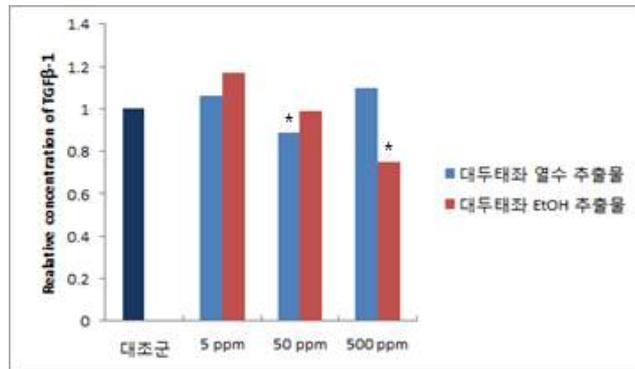
TGF-beta 1(Transforming growth factor beta 1)는 다양한 종류의 세포들에 작용하여 세포의 분열, 분화 그리고 생리 활성을 조절하는 성장인자다. TGF-beta 1 작용은 TGF-alpha의 존재 시 더 증대된다고 알려져 있으며, 피부 및 두피에 생긴 상처를 회복하는 과정에서 다양한 성장인자 및 사이토카인에 의한 조직의 재생과 회복을 촉진하는 중요한 역할을 합니다. 본 시험은 인간섬유아세포주(CCD986나, Fibroblast)에서 TGF-beta 1 유전자의 발현정도를 mRNA 수준에서 확인하는 방법이다. 인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm² culture dish에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 5X10³ cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 100%이상 배양이 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질인 대두 태좌조직 배양 추출물(열수 추출물, 에탄올 추출물)을 농도별로 5ppm, 50ppm, 500ppm으로 처리하였다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 생리활성을 조절하는 유전자인 TGF-beta 1의 발현에 어떠한 영향이 있는지 보았다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다. RNA isolation은 FastLane Cell one-step buffer set(QIAGEN 216213)를 이용하였다.

Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30min	50°C
PCR initial activation step	15min	95°C
3-step cycling:		
Denaturation	15sec	94°C
Annealing	30sec	60°C
Extension	30sec	72°C
Number of cycles	40	

배지를 제거한 세포는 FCW(cell wash buffer)로 세척하고, 50 ml의 cell processing mixture (Buffer FCPL이 첨가된 Buffer FCPW에 gDNA Wipeout buffer를 첨가한 mixture)을 첨가하여 실온에서 5분간 incubation 하였다. 이 후 새로운 E-tube에 옮긴 후

75 °C에서 5분간 반응시켰다. TGF-beta 1의 유전자 발현량을 분석하기 위하여 상기에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성하는 Reverse transcription 단계를 거쳐 합성된 cDNA를 template로하여 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen社)으로 진행하였다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primer assays를 사용하였다. 발현율은 Housekeeping gene(GAPDH, Cat.#QT01192646로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 위와 같다.

2) 결과



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

세포의 분열, 분화 그리고 생리 활성을 조절하는 성장인자인 TGF-beta 1의 mRNA의 발현량을 Real-Time PCR을 이용해 비교분석하였다. 대두태좌 열수 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 열수 추출물의 경우는 대조군과 비교해 보았을 때 농도별로 큰 차이를 보이지는 않았다. 반면 대두태좌 에탄올 추출물의 경우 대조군과 비교해보면 5ppm 농도로 처리한 경우에 상대적으로 약간 TGF-beta 1의 발현량이 증가함을 확인할 수 있었다. 그리고 농도가 증가함에 따라 TGF-beta 1의 발현량이 감소하는 경향을 보였다.

다. 피부 노화 억제와 관련된 유전자 (sirtuin 6) 발현 실험

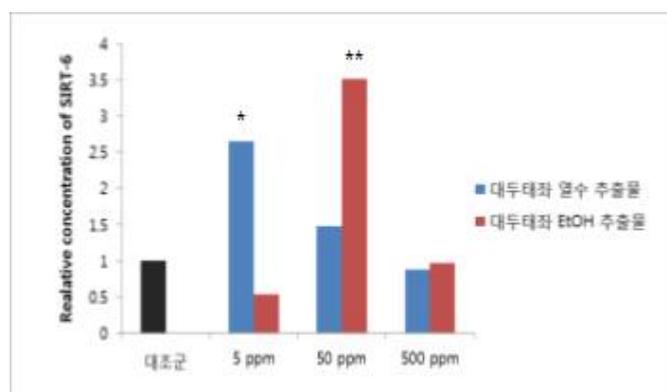
1) 연구수행방법

Sirtuin은 생체 내 존재하는 histone deacetylase 혹은 mono-ribosyltransferase 효소활성을 갖는 단백질을 통칭하며, 거의 모든 생물에 존재하는 수명에 연관된 효소로 알려져 있으며, 수명을 조절하고 유전자의 전사를 조절하며 apoptosis와 스트레스 저항성에 연관된다고 알려져 있다. 에너지 대사와 체내 칼로리 대사에도 중요한 역할을 수행한다. 화장품을 통해 공급되는 sirtuin은 피부와 모발의 노화를 억제하고 에너지 대사와 세포상태를 건강하게 유지할 수 있게 도움을 준다. 본 시험은 인간섬유아세포주(CCD986나, Fibroblast)에서 sirtuin 6 유전자의 발현정도를 mRNA 수준에서 확인하는 방법이다. 인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm² culture dish에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 5X10³ cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 100%이상 배양이 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시

함물질인 대두 태좌조직 배양 추출물(열수 추출물, 에탄올 추출물)을 농도별로 5ppm, 50ppm, 500ppm으로 처리하였다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 피부노화 억제와 관련된 유전자인 sirtuin 6의 발현에 어떠한 영향이 있는지 보았다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다. RNA isolation은 FastLane Cell one-step buffer set(QIAGEN 216213)를 이용하였다. 배지를 제거한 세포는 FCW(cell wash buffer)로 세척하고, 50 ml의 cell processing mixture (Buffer FCPL이 첨가된 Buffer FCPW에 gDNA Wipeout buffer를 첨가한 mixture)을 첨가하여 실온에서 5분간 incubation 하였다. 이 후 새로운 E-tube에 옮긴 후 75 °C에서 5분간 반응시켰다. sirtuin 6의 유전자 발현량을 분석하기 위하여 상기에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성하는 Reverse transcription 단계를 거쳐 합성된 cDNA를 template로하여 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen 社)으로 진행하였다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primer assays를 사용하였다. 발현율은 Housekeeping gene(GAPDH, Cat.#QT01192646로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30min	50°C
PCR initial activation step	15min	95°C
3-step cycling:		
Denaturation	15sec	94°C
Annealing	30sec	60°C
Extension	30sec	72°C
Number of cycles	40	

2) 결과



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

피부와 모발의 노화를 억제하고 에너지 대사와 세포상태를 건강하게 유지하는 데 연관된 유전자인 sirtuin 6 (SIRT-6)의 mRNA 발현량을 Real-Time PCR을 이용해 비교분석하였다. 대두태좌 열수 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 열수 추출물의 경우는 대조군과 비교해 보았을 때 5ppm 농도로 처리한 실험군에서 거의 2.5배 정도의 SIRT-6의 발현량이 증가함을 확인하였다. 또한 농도가 감소함에 따라 SIRT-6의 발현량도 감소하는 경향을 보였

다. 반면 대두태좌 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서는 50ppm에서 대조군과 비교해 상대적으로 3.5배정도로 급격히 증가함을 관찰하였다.

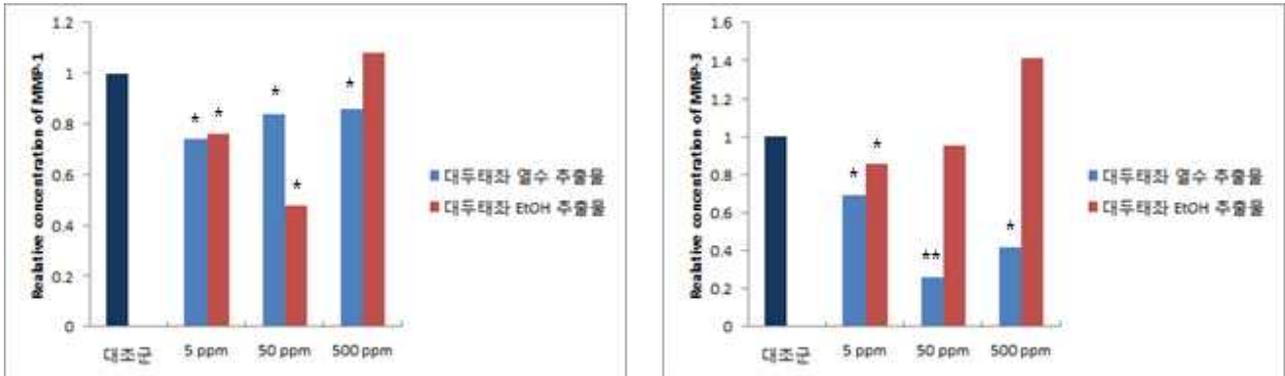
라. 콜라겐 분해에 관련된 유전자 (MMP-1, MMP-3) 발현 실험

1) 연구수행방법

피부 섬유아세포에서 분비되는 다양한 collagen은 노화과정 및 주름형성과 밀접한 연관이 있다. collagen과 같은 교원질들은 피부의 탄력을 유지하고 주름의 형성을 늦추는 기능을 한다. MMPs(Matrix Metalloproteinases)는 collagen을 분해 하는 효소들로 MMPs들의 활성을 억제함으로써 피부노화를 늦추거나 개선시킬 수 있다. 본 시험은 인간섬유아세포주(CCD986나, Fibroblast)에서 MMP-1, MMP-3 유전자의 발현정도를 mRNA 수준에서 확인하는 방법이다. 인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm² culture dish에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 5X10³ cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 100%이상 배양이 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질인 대두 태좌조직 배양 추출물(열수 추출물, 에탄올 추출물)을 농도별로 5ppm, 50ppm, 500ppm으로 처리하였다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 피부노화와 관련된 유전자인 MMP-1, MMP-3의 발현에 어떠한 영향이 있는지 보았다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다. RNA isolation은 FastLane Cell one-step buffer set(QIAGEN 216213)를 이용하였다. 배지를 제거한 세포는 FCW(cell wash buffer)로 세척하고, 50 ml의 cell processing mixture (Buffer FCPL이 첨가된 Buffer FCPW에 gDNA Wipeout buffer를 첨가한 mixture)을 첨가하여 실온에서 5분간 incubation 하였다. 이 후 새로운 E-tube에 옮긴 후 75 ℃에서 5분간 반응시켰다. MMP-1, MMP-3의 유전자 발현량을 분석하기 위하여 상기에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성하는 Reverse transcription 단계를 거쳐 합성된 cDNA를 template로하여 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen社)으로 진행하였다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primer assays를 사용하였다. 발현율은 Housekeeping gene(GAPDH, Cat.#QT01192646로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30min	50℃
PCR initial activation step	15min	95℃
3-step cycling:		
Denaturation	15sec	94℃
Annealing	30sec	60℃
Extension	30sec	72℃
Number of cycles	40	

2) 결과



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

노화과정 및 주름형성과 밀접한 연관이 있는 collagen을 분해와 연관된 MMP-1, MMP-3의 mRNA 발현량을 Real-Time PCR을 이용해 비교분석하였다. 대두태좌 열수 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 열수 추출물의 경우는 MMP-1, MMP-3 발현량이 모든 농도에서 상대적으로 감소함을 보였고, 특히 열수 추출물을 50ppm으로 처리한 실험군의 경우 MMP-3 발현량이 약 80%정도 감소함을 보였다. 반면 대두태좌 에탄올 추출물은 5, 50ppm의 농도로 처리한 실험군에서만 감소하는 경향을 보였고, 에탄올 추출물을 50ppm으로 처리한 실험군에서는 MMP-1의 발현량이 약 50%정도 감소함을 확인하였다.

마. 콜라겐 분해에 관련된 유전자 (MMPs)발현 억제 유전자 (TIMP-1) 발현 실험

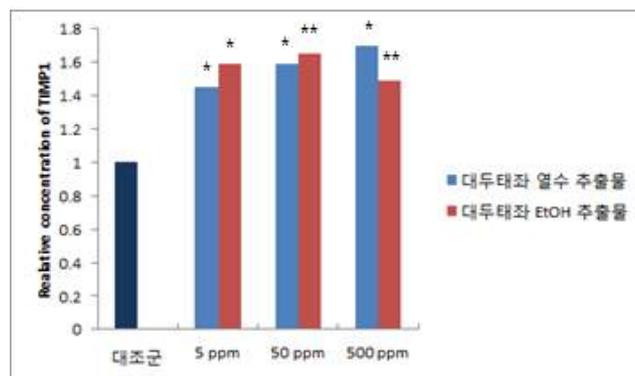
1) 연구수행방법

TIMP-1(Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 1)은 피부에서 발현되는 다양한 MMPs에 대한 생체 내 저해 분자로서 노화와 외인성 자극에 의한 노화 및 세포 손상에서 발견되는 세포간 물질의 분해를 저해하는 세포 보호 인자이다. 노화와 주름의 형성에 관여하는 단백질분해 효소를 저해하여 주름을 예방할 수 있는 생체 항노화 인자이다. 본 시험은 인간섬유아세포주 (CCD986나, Fibroblast)에서 TIMP-1 유전자의 발현정도를 mRNA 수준에서 확인하는 방법이다. 인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm² culture dish에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 5X10³ cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 100%이상 배양이 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질인 대두 태좌조직 배

양 추출물(열수 추출물, 에탄올 추출물)을 농도별로 5ppm, 50ppm, 500ppm으로 처리하였다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 노화와 주름의 형성에 관여하는 단백질분해효소를 저해하는 유전자인 TIMP-1의 발현에 어떠한 영향이 있는지 보았다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다. RNA isolation은 FastLane Cell one-step buffer set(QIAGEN 216213)를 이용하였다. 배지를 제거한 세포는 FCW(cell wash buffer)로 세척하고, 50 ml의 cell processing mixture (Buffer FCPL이 첨가된 Buffer FCPW에 gDNA Wipeout buffer를 첨가한 mixture)을 첨가하여 실온에서 5분간 incubation 하였다. 이 후 새로운 E-tube에 옮긴 후 75 °C에서 5분간 반응시켰다. TIMP1의 유전자 발현량을 분석하기 위하여 상기에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성하는 Reverse transcription 단계를 거쳐 합성된 cDNA를 template로하여 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen社)으로 진행하였다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primer assays를 사용하였다. 발현율은 Housekeeping gene(GAPDH, Cat.#QT01192646로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30min	50℃
PCR initial activation step	15min	95℃
3-step cycling:		
Denaturation	15sec	94℃
Annealing	30sec	60℃
Extension	30sec	72℃
Number of cycles	40	

2) 결과



(*p < 0.05 and ** p < 0.01)

노화와 주름의 형성에 관여하는 단백질분해효소를 저해하여 주름을 예방할 수 있는 생체 항노화 인자인 TIMP-1의 mRNA 발현량을 Real-Time PCR을 이용해 비교분석하였다. 대두태좌 열수 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 두 추출물의 모든 농도에서 대조군에 비해 상대적으로 약 1.4배정도 증가하는 양상을 보였다.

바. 세포노화에 관여하는 유전자 (p21, p16) 발현 실험

1) 연구수행방법

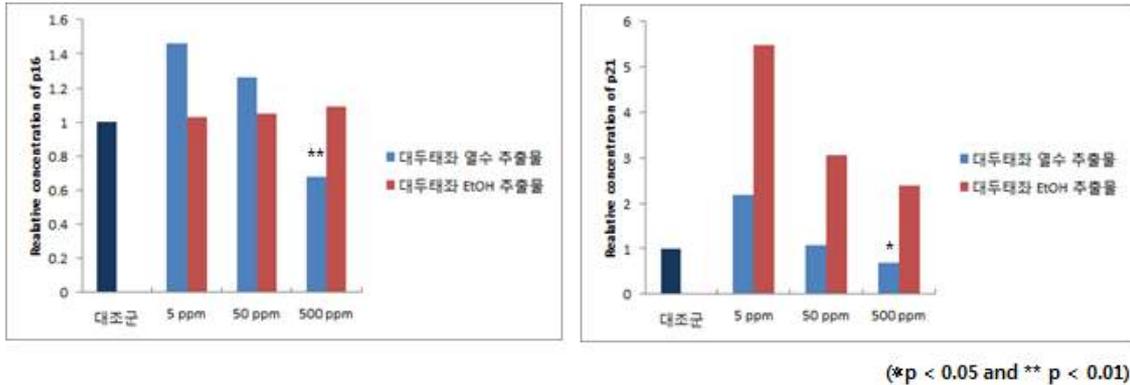
p21의 발현은 세포분열이 한계수명에 가까워질수록 증가하여 완전히 노화된 세포에서는 어린 세포보다 약 10~20배정도 많이 발현된다. p21의 발현이 노화의 진행에 중요한 인자임에는 틀림없다. 또한 p16의 발현도 노화의 진행에 비례해서 증가한다. 본 시험은 인간섬유아세포주 (CCD986나, Fibroblast)에서 p21, p16 유전자의 발현정도를 mRNA 수준에서 확인하는 방법이다. 인간섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 10% Fatal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO, Cat.# 15240-062)과 함께 100 mm/60.1 cm² culture dish에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 인간섬유아세포가 100%이상 confluence 될 때 96 well plate에 5X10³ cells/well 분주한 후 세포배양 조건에서 confluence가 100%이상 배양이 되면 배지를 제거한 다음 DMEM free 배지(FBS를 포함하지 않는 배지)로 교환 후 시험물질인 대두 태좌조직 배양 추출물(열수 추출물, 에탄올 추출물)을 농도별로 5ppm, 50ppm, 500ppm으로 처리하였다. 그 후 24시간 세포배양 조건에서 추가 배양하여 각 물질이 세포 노화에 관여하는 유전자인 p21, p16의 발현에 어떠한 영향이 있는지 보았다. 시험방법은 Real-time PCR 법을 수행하며, 그 시험 순서는 아래와 같다. RNA isolation은 FastLane Cell one-step buffer set(QIAGEN 216213)를 이용하였다. 배지를 제거한 세포는 FCW(cell wash buffer)로 세척하고, 50 ml의 cell processing mixture (Buffer FCPL이 첨가된 Buffer FCPW에 gDNA Wipeout buffer를 첨가한 mixture)을 첨가하여 실온에서 5분간 incubation 하였다. 이 후 새로운 E-tube에 옮긴 후 75 ℃에서 5분간 반응시켰다. p21, p16의 유전자 발현량을 분석하기 위하여 상기에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성하는 Reverse transcription 단계를 거쳐 합성된 cDNA를 template로하여 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix의 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR Machine (Qiagen社)으로 진행하였다. 실험에 사용한 primer들은 Qiagen사의 QuantiTect primer assays를 사용하였다. 발현율은 Housekeeping gene(GAPDH, Cat.#QT01192646로 Normalization였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같다.

Step	Time	Temperature
Reverse transcription	30min	50℃
PCR initial activation step	15min	95℃
3-step cycling:		
Denaturation	15sec	94℃
Annealing	30sec	60℃
Extension	30sec	72℃
Number of cycles	40	

2) 결과

세포노화에 관여하는 p16, p21의 mRNA 발현량을 Real-Time PCR을 이용해 비교분석하였다. 대두태좌 열수 추출물과 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 p16의 발현량은 열수 추

출물을 5ppm의 농도로 처리한 실험군에서 약 1.4배정도 증가함을 보였고 농도가 높아질수록 점차 감소하는 경향을 보였다. 반면에 대두태좌 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서는 p16의 발현량의 차이를 관찰할 수 없었다. p21의 발현량은 두 추출물에서 모두 크게 증가함을 확인하였다. 특히 대두태좌 에탄올 추출물을 5ppm의 농도로 처리한 실험군은 대조군보다 상대적으로 약 5.5배정도 증가하였고, 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다.



4. 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 누적 첩포에 의한 안전성 평가 및 인체적용 시험 연구

가. 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 인체 피부 누적 첩포 및 감작성 시험

1) 연구수행방법

피엠케이 피부임상연구센터에서 Common Bean Placenta Culture Extract / Pea Placenta Culture Extract / Black Bean Placenta Culture Extract의 인체 피부에 대한 감작성 유무를 확인하고자 본 연구를 실시하였다. 만 20~50세인 피부질환 및 급 만성 질환이 없는 성인을 대상으로 (주)바이오에프디엔씨의 Common Bean Placenta Culture Extract / Pea Placenta Culture Extract / Black Bean Placenta Culture Extract에 대한 인체 피부 누적 첩포 및 감작성 시험을 실시하였다. 피시험자의 모집인원은 총 35명이고 그 중 1명의 탈락인원을 제외하고 34명의 피시험자가 시험을 완료하였다. 시험물질에 대하여 2주 동안 5회 Induction으로 감작유도 후 2주 동안의 휴직기를 가지고 시험부위와 새로운 부위에 시험물질 20ul를 적용하여, 48시간동안 하완 내측에 첩포하였다. Finn chamber에 filter paper를 장착하고 시험액 20ul를 filter 중앙에 loading하고 피부에 밀착시킨 후 3M Micropore Tape로 고정하였다. 시험물질을 적용한 Finn chamber는 시험부위에 48시간동안 적용한 후 제거하였다. 제거 24시간 후 다시 48시간 부착함을 2주 동안 5회 반복 하였다. 2주 동안 아무런 처치 없이 휴직기를 가지도록 하였다. 휴직기가 지난 후 시험물질을 적용한 Finn chamber를 시험부위와 새로운 부위에 48시간동안 적용하였다. 첩포 48시간 후 Finn chamber를 제거하고 1시간, 48시간, 96시간 후 적용부위의 사진촬영 및 연구자에 의한 피부반응 정도를 평가하였다. 또한 시험물질 적용부위에서의 따끔함, 화끈거림, 가려움에 관한 설문평가를 실시하였다.

< 시험 일정표 >

연구자 육안평가는 Frosch & Kligman 과 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance

방문일	방문1	방문2	방문3	방문4	방문5	방문6	방문7	방문8	방문9	방문10	방문11	방문12	방문13	방문14
항목	9/7	9/9	9/10	9/12	9/13	9/15	9/16	9/18	9/19	9/21	10/5	10/7	10/9	10/11
피험자 동의서	<input type="checkbox"/>													
인구학적 조사	<input type="checkbox"/>													
선정제외 기준검토	<input type="checkbox"/>													
병력조사	<input type="checkbox"/>													
병용약물	<input type="checkbox"/>													
이상반응			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>								
철포부착	<input type="checkbox"/>													
철포제거		<input type="checkbox"/>												
사진촬영	<input type="checkbox"/>										<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
연구자 육안평가												<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
피험자 주관평가												<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Association(CTFA) guideline을 반영한 다음의 기준에 따라 평가하였다.

< Recording of patch test reactions >

기호	Grade	판정기준
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

< Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test >



피부 반응도는 다음 수식에 따라 구하였다.

$$\text{피부 반응도} = \left(\sum_{i=1}^{34} \text{평가값} / 34(\text{피시험자수}) \right)_{1h} + \left(\sum_{i=1}^{34} \text{평가값} / 34(\text{피시험자수}) \right)_{48h}$$

$$+ \left(\sum_{i=1}^{34} \text{평가값} / 34(\text{피시험자수}) \right)_{96h} \quad (i : \text{피시험자 번호})$$

시험물질의 피부자극지수를 다음 수식에 따라 구하였다.

$$\text{피부자극지수} = \text{피부 반응도} / n \quad (n : \text{평가 횟수})$$

시험물질의 피부자극정도는 피부자극지수표를 참조하여 판정하였다.

< 피부자극지수표 >

피부자극지수	구 분	비교
0.00 - 0.25	비 자극성	6.25%
0.26 - 1.00	약한 자극성	25.00%
1.01 - 2.50	중등도 자극성	62.50%
2.51 - 4.00	강한 자극성	100.00%

2) 결과

가) Common Bean Placenta Culture Extract의 인체 피부 누적 첩포 및 감작성 시험

본 시험에 참여한 35 중 1명이 임상시험 참여 동의 철회로 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다. 시험에 참여한 35 중 1명이 임상시험 참여 동의 철회로 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다.

< 피험자 연령 >

만 연령 (세)	인원수 (명)
20 ~ 29	7
30 ~ 39	13
40 ~ 49	14
50 ~ 59	1

<중도 탈락자 정보 (n=1)>

탈락자	12907-R5-17
탈락사유	임상시험 참여 동의 철회
탈락일	D2
성별	남
연령	35

① Common Bean Placenta Culture Extract의 누적 첩포에 의한 피부반응에 대한 연구자 평가 결과

Common Bean Placenta Culture Extract를 2주 동안 5회 감작 유도하는 기간 동안 누적 첩포에 의해 발생한 피부반응 정도를 판정한 결과, 시험제품에서 유도기에 다음과 같이 피부반응이 관찰되었다.

< 누적 첩포에 의한 피부반응 정도 >

product name	Cumulative exposure time															No. of Responder
	2 weeks															
	1 st			2 st			3 st			4 st			5 st			
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	
Common Bean Placenta Culture Extract	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

② Common Bean Placenta Culture Extract의 피부 감각반응에 대한 연구자 평가 결과 Common Bean Placenta Culture Extract를 감각유발(48hr) 후 1, 48, 96시간의 피부반응을 연구자가 육안으로 평가하여 피부자극지수 및 피부 감각정도를 판정한 결과, 피부자극지수가 0.02로 비자극성으로 판정되었다.

< 피부 감각에 의한 피부반응 정도 >

product name	Challenge time									No. of Responder
	1hr			48hr			96hr			
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	
Common Bean Placenta Culture Extract	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2

< 시험제품의 피부자극지수 및 피부자극정도 >

시험제품명	피부자극지수	피부자극정도
Common Bean Placenta Culture Extract	0.02	비 자극성

③ Common Bean Placenta Culture Extract의 피부자극에 대한 피험자 주관적 평가 결과 Common Bean Placenta Culture Extract의 피부자극정도에 대한 피험자 주관적 평가에서는 따끔함, 화끈거림 및 가려움에 대한 평가가 있었다. 평가 결과는 표로 정리하였다.

< 시험제품에 대한 피험자 주관적 피부자극정도 평가 >

시험제품	항목	확인 시간	총점	인원수 (명)
Common Bean Placenta Culture Extract	따끔함	1hr	0	0
		48hr	0	
		96hr	0	
	화끈거림	1hr	2	1
		48hr	0	
		96hr	0	
	가려움	1hr	2	2
		48hr	0	
		96hr	0	

④ Common Bean Placenta Culture Extract의 피부자극정도 평가 결과 Common Bean Placenta Culture Extract를 감각유발(48hr)한 후 1, 48, 96시간의 피부반응을 연구자 육안평가 결과 및 피험자의 주관적 평가 결과를 종합한 결과, 시험제품은 비자극성을 가지는 것으로 사료된다.

나) Pea Placenta Culture Extract의 인체 피부 누적 첩포 및 감각성 시험

본 시험에 참여한 35 중 1명이 임상시험 참여 동의 철회로 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다. 시험에 참여한 35 중 1명이 임상시험 참여 동의 철회로 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다.

< 피험자 연령 >

만 연령 (세)	인원수 (명)
20 ~ 29	7
30 ~ 39	13
40 ~ 49	14
50 ~ 59	1

<중도 탈락자 정보 (n=1)>

탈락자	12907-R5-17
탈락사유	임상시험 참여 동의 철회
탈락일	D2
성별	남
연령	35

① Pea Placenta Culture Extract의 누적 첩포에 의한 피부반응에 대한 연구자 평가 결과

Pea Placenta Culture Extract를 2주 동안 5회 감각 유도하는 기간 동안 누적 첩포에 의해 발생한 피부반응 정도를 판정한 결과, 시험제품에서 유도기에 다음과 같이 피부 반응이 관찰되었다.

< 누적 첩포에 의한 피부반응 정도 >

product name	Cumulative exposure time												No. of Responder			
	2 weeks															
	1 st			2 st			3 st			4 st				5 st		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	
Pea Placenta Culture Extract	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	2

② Pea Placenta Culture Extract의 피부 감각반응에 대한 연구자 평가 결과

Pea Placenta Culture Extract를 감각유발(48hr) 후 1, 48, 96시간의 피부반응을 연구자가 육안으로 평가하여 피부자극지수 및 피부 감각 정도를 판정한 결과, 피부자극지수가 0.02로 비자극성으로 판정되었다.

< 피부 감각에 의한 피부반응 정도 >

product name	Challenge time									No. of Responder
	1hr			48hr			96hr			
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	
Pea Placenta Culture Extract	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2

< 시험제품의 피부자극지수 및 피부자극정도 >

시험제품명	피부자극지수	피부자극정도
Pea Placenta Culture Extract	0.02	비 자극성

③ Pea Placenta Culture Extract의 피부자극에 대한 피험자 주관적 평가 결과

Pea Placenta Culture Extract의 피부자극정도에 대한 피험자 주관적 평가에서는 따끔함, 화끈거림 및 가려움에 대한 평가가 있었다. 평가 결과는 표에 정리하였다.

< 시험제품에 대한 피험자 주관적 피부자극정도 평가 >

시험제품	항목	확인 시간	총점	인원수 (명)
Pea Placenta Culture Extract	따끔함	1hr	0	0
		48hr	0	
		96hr	0	
	화끈거림	1hr	2	1
		48hr	0	
		96hr	0	
	가려움	1hr	2	2
		48hr	0	
		96hr	0	

④ Pea Placenta Culture Extract의 피부자극정도 평가 결과

Pea Placenta Culture Extract를 감작유발(48hr)한 후 1, 48, 96시간의 피부반응을 연구자 육안평가 결과 및 피험자의 주관적 평가 결과를 종합한 결과, 시험제품은 비자극성을 가지는 것으로 사료된다.

다) Black Bean Placenta Culture Extract의 인체 피부 누적 첩포 및 감작성 시험

본 시험에 참여한 35 중 1명이 임상시험 참여 동의 철회로 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다. 시험에 참여한 35 중 1명이 임상시험 참여 동의 철회로 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다.

< 피험자 연령 >

만 연령 (세)	인원수 (명)
20 ~ 29	7
30 ~ 39	13
40 ~ 49	14
50 ~ 59	1

<중도 탈락자 정보 (n=1)>

탈락자	12907-R5-17
탈락사유	임상시험 참여 동의 철회
탈락일	D2
성별	남
연령	35

① Black Bean Placenta Culture Extract의 누적 첩포에 의한 피부반응에 대한 연구자 평가 결과

< 누적 첩포에 의한 피부반응 정도 >

product name	Cumulative exposure time															No. of Responder
	2 weeks															
	1 st			2 nd			3 rd			4 th			5 th			
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	
Black Bean Placenta Culture Extract	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Black Bean Placenta Culture Extract를 2주 동안 5회 감작 유도하는 기간 동안 누적 첩포에 의해 발생한 피부반응 정도를 판정한 결과, 시험제품에서 유도기에 위와 같이 피부 반응이

관찰되었다.

② Black Bean Placenta Culture Extract의 피부 감각반응에 대한 연구자 평가 결과

Black Bean Placenta Culture Extract를 감각유발(48hr) 후 1, 48, 96시간의 피부반응을 연구자가 육안으로 평가하여 피부자극지수 및 피부 감각 정도를 판정한 결과, 피부자극지수가 0.01로 비자극성으로 판정되었다.

< 피부 감각에 의한 피부반응 정도 >

product name	Challenge time									No. of Responder
	1hr			48hr			96hr			
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	
Black Bean Placenta Culture Extract	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

< 시험제품의 피부자극지수 및 피부자극정도 >

시험제품명	피부자극지수	피부자극정도
Black Bean Placenta Culture Extract	0.01	비 자극성

③ Black Bean Placenta Culture Extract의 피부자극에 대한 피험자 주관적 평가 결과

Black Bean Placenta Culture Extract의 피부자극정도에 대한 피험자 주관적 평가에서는 따끔함, 화끈거림 및 가려움에 대한 평가가 있었다. 평가 결과는 표에 정리하였다.

< 시험제품에 대한 피험자 주관적 피부자극정도 평가 >

시험제품	항목	확인 시간	총점	인원수 (명)
Black Bean Placenta Culture Extract	따끔함	1hr	0	0
		48hr	0	
		96hr	0	
	화끈거림	1hr	2	1
		48hr	0	
		96hr	0	
	가려움	1hr	1	1
		48hr	1	
		96hr	0	

④ Black Bean Placenta Culture Extract의 피부자극정도 평가 결과

Black Bean Placenta Culture Extract를 감각유발(48hr)한 후 1, 48, 96시간의 피부반응을 연구자 육안평가 결과 및 피험자의 주관적 평가 결과를 종합한 결과, 시험제품은 비자극성을 가지는 것으로 사료된다.

3) 결론

만 20~50세인 피부질환 및 급 만성 질환이 없는 성인을 대상으로 Common Bean Placenta Culture Extract, Pea Placenta Culture Extract, Black Bean Placenta Culture Extract에 대한 인체 피부 누적 첩포 및 감각성 시험을 실시하였다. 시험물질에 대하여 2주 동안 5회

Induction으로 감각 유도 후 2주 동안의 휴식기를 가지고 시험부위와 새로운 부위에 시험물질 20ul를 적용하여, 48시간동안 하완 내측에 첩포하였다. Challenge 후 1, 48, 96시간의 피부 감각반응을 연구자가 육안으로 평가하였고, 또한 따끔함, 화끈거림, 가려움에 대한 피험자의 주관적 평가를 실시하였다. 별도로 이상반응 발생 및 병용약물 사용에 대하여 조사하였다. 시험에 참여한 피험자는 35명이고 1명이 탈락하여 총 34명이 시험을 종료하였다. 참여한 피험자들의 피부상태는 건성피부 2명, 중건성피부 19명, 중성피부 14명이었고, 민감성 피부특성을 가지고 있는 피험자는 없었으며 특이한 사항은 없었다. Common Bean Placenta Culture Extract, Pea Placenta Culture Extract를 감각유발(48hr)한 후 1, 48, 96시간의 피부 감각반응에 대한 연구자 육안평가 결과 및 피험자의 주관적 평가 결과를 종합한 결과, 피부자극지수는 0.02로 나타났으며, Black Bean Placenta Culture Extract는 피부자극지수가 0.01로 나타났다. 세 가지 Extracts는 모두 알레르기성 접촉 피부염 유발 가능성이 없는 비자극성의 안전한 물질로 판단되었다.

5. 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물을 함유한 제형에 대한 유효성 평가

가. 태좌조직 배양체 유래 생리활성물질을 함유한 제형에 대한 안정성 평가

1) 연구수행방법

온도에 따른 경시변화 안정성 측정을 위해 대두 태좌조직 배양체 유래 생리활성물질을 함유한 제형 2가지(로션, 크림)를 0℃, 25℃, 45℃의 온도조건에서 보관하여 경시적 변화에 따른 제형의 상태변화를 육안으로 평가한다. 관찰은 제형을 보관한 후 1일, 3일, 5일, 7일, 15일 및 30일 경과 후에 제형의 분리 및 침전, 변색, 응집과 같은 현상들을 관찰한다.

2) 결과



대두 태좌조직 배양체 유래 생리활성물질을 함유한 제형에 대하여 4℃, 25℃, 45℃의 온도조건에서 30일 동안 육안 관찰한 결과 제형의 분리 및 침전, 변색, 응집과 같은 현상들이 관찰되지 않고 구성성분들이 안정적으로 지속됨을 확인할 수 있었다.

6. 분리·배양된 태좌의 생리활성물질 분석 및 대량 생산조건 최적화

가. 옥신의 종류와 농도가 대두 태좌세포 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

1) 연구수행방법

대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 옥신의 종류와 농도를 조사하기 위하여 sucrose 30g l⁻¹가 첨가된 MS 배지에 IBA와 NAA를 각각 0, 1, 2, 3, 5mg l⁻¹로 달리하여 5주간 배양하였다. 배지는 1N NaOH를 이용하여 pH 5.8로 조정 후, 공기용적이 250ml인 삼각플라스크에 100ml씩 분주하여 121℃, 1.2기압에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 배양은 생체중을 기준으로 15g l⁻¹ 접종밀도로 대두 태좌세포를 접종한 후, 22±1℃가 유지되는 암조건에서 110rpm 속도로 각 처리구당 5반복하였다. 배양 4주 후, 성장량 측정을 위해 생체중, 건물중, 생체중에 대한 건물중 비율을 측정하였으며, 생리활성물질로는 총 phenolics, flavonoids 함량을 측정하였다.

2) 결과

옥신의 종류와 농도를 달리하여 대두 태좌세포를 5주간 배양한 결과 IBA 5mg l⁻¹ 처리구에서 생체중과 건물중이 각각 54.02g l⁻¹와 4.84g l⁻¹로 가장 높았다. 그러나 생리활성물질의 경우 IBA 5mg l⁻¹ 처리구에서 타 처리구에 비해 함량이 낮아 대두 태좌세포 내 생리활성물질의 함량을 증가시키기 위한 타 방법의 적용이 필요하다고 생각되었다.

Effects of type and concentration of auxin on placenta cell growth of *Glycine max* after 4 weeks.^{a, b}

Treatments	Concentration (mg l ⁻¹)	Fresh weight (g l ⁻¹)	Dry weight (g l ⁻¹)	
Control ^c	0	6.44±0.58	0.72±0.04	
	1	12.36±0.30	1.44±0.05	
	3	36.62±0.50	3.44±0.19	
	5	54.02±1.23	4.84±0.15	
	IBA	7	53.40±1.87	4.34±0.09
		9	47.42±1.43	4.18±0.11
NAA	1	17.86±1.29	2.04±0.11	
	3	36.54±1.76	3.50±0.09	
	5	47.30±1.64	4.40±0.07	
	7	51.34±0.32	4.50±0.10	
	9	52.10±1.04	4.56±0.13	

^aPlacenta cells were cultured in full strength MS medium containing 30g sucrose l⁻¹ and 10g inoculum l⁻¹

^bValues are five replicates along with standard error

^cControl = Without plant growth regulator

NAA 처리구들은 IBA 처리구에 비해 대두 태좌세포의 성장량은 낮았으나, 생리활성물질 함량은 높아 식물생장조절물질의 종류에 따라 대두 태좌세포의 성장양상이 다르게 나타남을 알 수 있었다.

Effects of type and concentration of auxin on total phenolics

and flavonoids content in *Glycine max* placenta cell after 4 weeks.^{a,b}

Treatments	Concentration (mg l ⁻¹)	Phenolics (mg g ⁻¹ dw)	Flavonoids (mg g ⁻¹ dw)
Control	0	23.72±0.35	45.00±0.79
	1	29.46±0.68	60.23±0.97
	3	22.66±0.71	30.43±0.06
IBA	5	9.20±0.65	20.75±0.18
	7	12.03±0.25	30.25±0.27
	9	16.65±0.71	36.11±0.59
	1	22.97±0.22	49.47±0.54
	3	14.35±0.27	36.47±0.38
NAA	5	8.65±0.05	28.44±0.39
	7	6.55±0.25	21.43±0.43
	9	4.54±0.18	14.73±0.59

^aplacenta cell were cultured in full strength MS medium containing 30 g sucrose l⁻¹ and 10 g inoculum l⁻¹

^bValues are three replicates along with standard error

나. 배지 내 당 농도가 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

1) 연구수행방법

배지 내 당 농도가 대두 태좌세포 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 IBA 5mg l⁻¹가 첨가된 0.25 MS 배지에 당 농도를 0, 1, 3, 5, 7, 9%로 달리하여 4주간 배양하였다.

2) 결과

배지 내 당 농도가 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사한 결과 생체중과 건물중이 각각 당 1% 처리구와 5% 처리구에서 51.43g l⁻¹와 5.40g l⁻¹로 가장 높았다. 그러나 건물 1g 속에 함유된 총 phenolics, flavonoids 함량은 당 1% 처리구에서 251.89g l⁻¹ dw, 165.14g l⁻¹ dw, 163.56g l⁻¹ dw로 가장 높은 함량을 나타낸 뒤, 배지 내 당 농도가 증가할수록 태좌세포내 함량이 급격히 감소하였다. 기내 배양용 배지를 만들 때 첨가하는 sucrose는 배양체의 탄소원과 에너지 공급원으로 사용되며 배지 내 삼투압을 조절해주는 기능을 한다. 따라서 당 0% 처리구의 경우 배지 내 에너지원 부족에 따라 태좌세포의 생장이 현저히 억제되고 생리활성물질의 축적도 거의 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 생산에 적합한 배지 내 초기 당 농도는 1%로 결정하였다.

Effects of sucrose concentration on placenta cell growth
of *Glycine max* after 4 weeks of culture.

Sucrose concentration (%)	Fresh weight (g l ⁻¹)	Dry weight (g l ⁻¹)	% dry weight	Growth Ratio
0	6.58e ^z	0.40d	6.07d	0
1	51.43a	4.55b	8.96c	10.38b
3	43.80ab	4.63b	10.65bc	10.56b
5	40.48bc	5.40a	13.34a	12.50a
7	32.88cd	4.60b	14.08a	10.50b
9	29.80d	3.75c	13.09ab	8.38c

^zMean separation within columns by Duncan' s multiple range test at 5% level.

Effects of sucrose concentration on the contents of secondary metabolites in placenta cell of *Glycine max* after 4 weeks of culture.

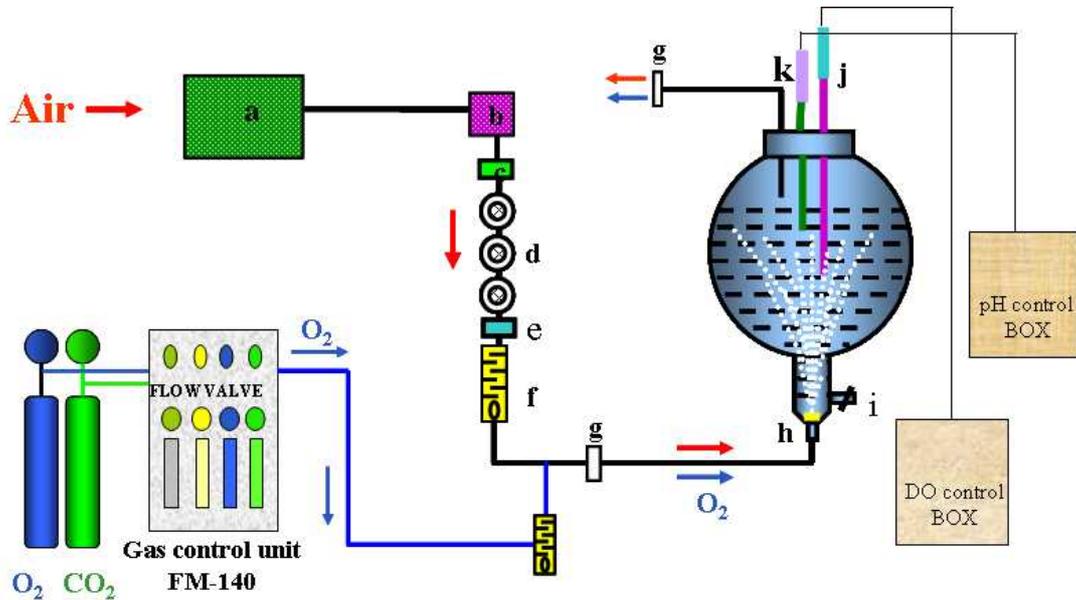
Sucrose concentration (%)	Total Phenolics (mg l ⁻¹ dw)	Total flavonoids (mg l ⁻¹ dw)
0	10.52f	4.74e
1	165.14a	163.56a
3	115.90d	113.26c
5	151.20b	139.94b
7	135.39c	134.07b
9	99.46e	74.67d

^zMean separation within columns by Duncan' s multiple range test at 5% level.

다. 공기공급량이 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

1) 연구수행방법

생물반응기 내 공기공급량이 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 공기용적이 3L인 풍전형 생물반응기에 공기공급량을 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.05 ~ 0.3vvm (0.05vvm으로 시작하여 1주 간격으로 0.4vvm까지 공기공급량을 증가시킴)으로 달리하여 4주간 배양하였다. 생물반응기 내부로 공급하는 공기는 일정한 온도 유지를 위하여 압축공기를 응축시킬 수 있는 공기압축기와 불순물을 제거할 수 있는 필터 및 공기 건조기 등을 순차적으로 통과시킨 후 기름을 사용하지 않는 공기 압축기를 이용하여 생물반응기 내부로 공급하였다. 배지는 앞선 실험에서 태좌세포의 성장과 생리활성물질 생산에 최적 배지조성으로 결정된 IBA 5mg l⁻¹, sucrose 10g l⁻¹가 첨가된 2L의 0.25 MS 배지를 이용하였으며, 1N NaOH를 이용하여 pH 5.8로 조정 후 121℃, 1.2기압에서 35분간 멸균하여 사용하였다. 배양은 생체중을 기준으로 15g l⁻¹ 접종밀도로 태좌세포를 접종한 뒤, 22±1℃가 유지되는 암조건에서 실시하였으며 각 처리구는 2반복하였다. 배양 4주 후, 성장량 측정을 위해 생체중, 건물중, 생체중에 대한 건물중 비율을 측정하였으며, 생리활성물질로는 총 phenolics, flavonoids 함량을 측정하였다.



Schematic diagram of a balloon type bioreactor (a: air compressor; b: air reservoir; c: air after cooler; d: air filter system; e: air dryer; f: air flow meter; g: membrane filter; h: glass sparger; i: medium feeding port; j: DO sensor; k: pH sensor).

2) 결과

생물반응기 내 공기공급량이 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사한 결과 가장 적은 양의 공기를 공급해 준 0.05vvm 처리구에서 생체중과 건물중이 각각 68.89g l^{-1} 와 4.59g l^{-1} 로 가장 높았다. 특히 배양 초기부터 상대적으로 많은 양의 공기를 공급한 0.3vvm 처리구의 경우 0.05vvm 처리구의 66% 이하의 성장량 증가만이 이루어져 태좌세포가 생물반응기 내부에 존재하는 강한 유량에 의해 유체역학적 스트레스를 받았음을 알 수 있었다.

Effects of aeration volume on placenta cell growth of *Glycine max* after 4 weeks cultured in bioreactors.

Aeration volume (vvm)	Fresh weight (g l^{-1})	Dry weight (g l^{-1})	% dry weight	Growth ratio
0.05	68.89a ^z	4.59a	6.66d	10.07a
0.1	40.18c	3.56c	8.85b	7.80c
0.2	32.91d	3.10d	9.44b	6.81d
0.3	28.02e	3.05d	10.91a	6.70d
0.05 – 0.3	50.70b	4.12b	8.13c	9.04b

^zThe same letter within a set of values indicates no significant differences by Duncan's multiple range test at 5% level.

건물 1g 속에 함유된 총 phenolics, flavonoids 함량의 경우 0.3vvm 처리구에서 각각 121.11g l^{-1} dw, 57.78g l^{-1} dw, 92.13g l^{-1} dw로 함량이 가장 높았으나 전체 생리활성물질 생산율은 태좌세포의 성장량이 가장 높았던 0.05vvm 처리구에서 가장 높아 0.05vvm 조건이 생리활성물질 생산에 경제적임을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 대두 태좌세포의 생

장과 생리활성물질 생산에 적합한 생물반응기 내 공기공급량은 배양 전 기간 동안 0.05vvm 공급하는 것으로 결정하였다.

Effects of aeration volume on secondary metabolite contents in placenta cell of *Glycine max* after 4 weeks cultured in bioreactors.

Aeration volume (vvm)	Phenolics		Flavonoids	
	Total (mg g ⁻¹ dw)	Yield (mg g ⁻¹ dw)	Total (mg g ⁻¹ dw)	Yield (mg g ⁻¹ dw)
0.05	41.76b	191.76a	54.97c	252.46b
0.1	43.72b	155.45b	56.68c	201.48d
0.2	55.55a	172.45ab	79.61b	247.18b
0.3	57.78a	176.51ab	92.13a	281.45a
0.05 – 0.3	45.67b	188.10a	54.95c	225.91c

^aThe same letter within a set of values indicates no significant differences by Duncan's multiple range test at 5% level.

라. 접종밀도가 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

1) 연구수행방법

초기 접종밀도가 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생체중을 기준으로 초기 접종밀도를 5, 10, 15, 20, 30g l⁻¹로 달리하여 4주간 배양하였다. 생물반응기 내 공기공급량은 배양 전 기간 동안 0.05vvm으로 조절하였다.

2) 결과

초기 접종밀도를 5g l⁻¹에서 30g l⁻¹로 달리하여 대두 태좌세포를 4주간 배양한 결과 초기 접종밀도가 증가할수록 최종 수확한 태좌세포의 생체중과 건물중이 증가하였다. 그러나 초기 접종 밀도의 증가비율과 최종 수확한 태좌세포의 증가비율이 달라 초기 접종량을 기준으로 배양 4주 후 증가된 태좌세포의 비율(태좌세포 성장률)을 계산하였다. 태좌세포 성장률은 초기 접종 밀도가 증가할수록 감소하였으며, 특히 20g l⁻¹ 이상 처리구들의 경우 가장 높은 태좌세포 성장률을 나타낸 5g l⁻¹ 처리구(5.47)의 50% 이하로 급격히 감소하여, 동일기간 동안 태좌세포의 생산 효율이 낮음을 알 수 있었다. 또한 1g 속에 함유된 총 phenolics, flavonoids 함량의 경우 초기 접종밀도가 증가할수록 태좌세포 내 함량이 감소하였으며, 이에 따라 배양기 내 초기 접종밀도가 증가할수록 배양 4주 후 태좌세포의 DPPH 활성과 태좌세포 내 H₂O₂ 함량도 감소하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 태좌세포 성장률과 생리활성물질 생산율을 고려한다면 15g l⁻¹가 가장 경제적인 초기 접종밀도라 생각되었다. 즉, 식물유래 산업시장의 원료로 대두 태좌세포를 이용하기 위해 태좌세포의 대량생산 체계를 확립하려는 본 실험의 의미를 고려하여 3L 생물반응기를 이용하여 4주간 배양할 경우 가장 경제적인 초기 접종밀도는 15g l⁻¹로 결정하였다.

Effects of inoculum density on placenta cell growth

of *Glycine max* after 4 weeks cultured in bioreactors.

Inoculum density (g l ⁻¹)	Fresh weight (g l ⁻¹)	Dry weight (g l ⁻¹)	Growth ratio
5	28.16±1.59	2.57±0.08	5.47
10	36.31±0.72	2.79±0.07	3.63
15	45.79±0.89	3.81±0.07	3.05
20	51.84±0.97	4.07±0.34	2.35
30	78.56±1.49	5.17±0.76	2.33

^aThe same letter within a set of values indicates no significant differences by Duncan's multiple range test at 5% level.

Effects of inoculum density on secondary metabolite contents in placenta cell of *Glycine max* after 4 weeks cultured in bioreactors.

Inoculum density (g l ⁻¹)	Phenolics		Flavonoids	
	Total (mg g ⁻¹ dw)	Yield (mg g ⁻¹ dw)	Total (mg g ⁻¹ dw)	Yield (mg g ⁻¹ dw)
5	56.84±0.36	146.08±1.88	52.32±0.15	134.47±1.25
10	42.73±1.49	119.46±1.03	57.09±0.47	159.50±1.11
15	35.36±0.03	134.83±0.69	41.82±0.46	159.44±1.32
20	33.99±0.86	138.77±1.07	38.71±0.66	157.90±1.84
30	28.08±0.53	144.89±1.62	28.41±0.49	147.33±2.12

^aThe same letter within a set of values indicates no significant differences by Duncan's multiple range test at 5% level.

마. 대규모 생물반응기 배양시스템의 최적화와 대두태좌조직 배양체 대량 생산 공정 확립
- 생물반응기 용기 부피에 따른 대두태좌조직 배양체의 성장과 생리활성물질 축적 양상 비교

1) 연구수행방법

소규모 배양용기를 이용하여 확립한 대두태좌조직배양체의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 배지 내 화학적 환경과 배양기 내 물리적 환경이 대용량 생물반응기를 이용한 공장형 주년 생산방법에 적용할 경우 발생가능한 대두태좌조직배양체 성장특성 변화를 확인하고자 부피가 서로 다른 생물반응기를 이용하여 대두태좌조직배양체를 배양하였다. 앞선 실험에서 대두태좌조직배양체의 성장과 생리활성물질 생산에 최적 조건으로 선정된 IBA 5mg l⁻¹, sucrose 10g l⁻¹가 첨가된 0.25 MS 배지에 3, 5, 10, 20, 100, 500L 크기의 생물반응기를 이용하여 총 5주간 배양하였다. 배양은 생체중을 기준으로 15g l⁻¹ 접종밀도로 대두태좌조직배양체를 접종한 뒤 배양용적에 따라 생물반응기 내부로 공급되는 공기공급량을 0.05 vvm으로 조절하였으며, 기타 배양조건은 동일하게 실시하였다. 배양 5주 후 성장량 측정을 위해 생체중, 건물중, 생체중에 대한 건물중 비율을 측정하였으며, 생리활성물질로는 총 anthraquinones, phenolics, flavonoids 함량을 측정하였다.

2) 결과

배양 5주 후 배양용기에 따른 대두태좌조직 배양체의 성장결과는 다음과 같다. 최종 수확 가능한 대두태좌조직 배양체의 생체중과 건물중은 생물반응기의 크기가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으나 건물 1g 당 함유하고 있는 총 anthraquinones, phenolics, flavonoids 함량은 배양용기의 크기와 비례적으로 증가하였다. 이와 같이 동일한 화학조성을 가진 배지를 이용하였으나 배양용기의 용적 증가에 따라 대두태좌조직 배양체의 성장특성이 달라지는 주요인은 배양용기 내부에서 발생하는 유체역학적 스트레스의 차이에서 기인한다. 즉 동일한 공기공급량을 생물반응기 내부로 공급한다 하더라도 배양용기의 부피가 클 경우 배양용기 내부의 배양체는 더 많이 회전하게 된다. 이에 따라 일반적으로 배양용기의 부피가 급격히 증가될 경우 각 배양체의 종류와 배양단계에 따른 배지 내 주요 화학적 요인 또는 배양기 내부의 물리적 요인에 대한 추가 실험이 필요하다.

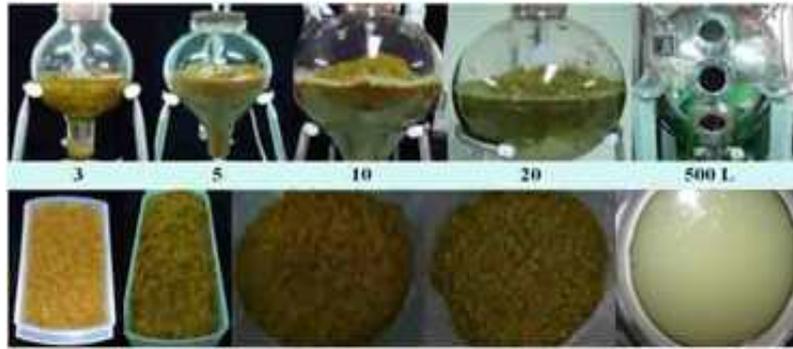
본 실험 결과 비록 배양 5주 후 최종 수확 가능한 대두태좌조직 배양체의 생체중과 건물중이 100L 이상의 생물반응기를 이용한 배양에서는 감소하였으나 건물 1g 당 함유하고 있는 생리활성물질 함량이 소규모 생물반응기를 이용하여 배양된 부정근 보다 높고 기외 식물체와 비교할 경우 대두태좌조직 배양체 내 생리활성물질 함량이 현저히 높으므로 충분히 경쟁력 있는 방법이라 생각된다. 또한 3L 생물반응기를 이용하여 확립한 대두태좌조직 배양체의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 배양 환경을 기준으로 500L 생물반응기 배양에 적합하도록 일부 배양환경을 개선한다면 최종 수확할 수 있는 대두태좌조직 배양체의 건물중도 증가시킬 수 있다고 생각된다.

Bioreactors (L)	Fresh weight (g L ⁻¹)	Dry weight (g L ⁻¹)	Anthraquinone (mg g ⁻¹ DW)	Phenolics (mg g ⁻¹ DW)	Flavonoids (mg g ⁻¹ DW)	Polysaccharide (mg g ⁻¹ DW)
3 ^z	79.22±1.97	4.89±0.13	87.54±0.51	47.90±0.22	59.45±0.27	124.37±0.26
5	127.92±1.83	9.60±0.15	92.63±0.25	42.78±0.03	61.14±0.12	153.23±0.12
10	95.30±1.04	7.21±0.32	109.99±0.14	43.92±0.14	69.50±0.18	146.35±0.05
20	74.40±0.330	5.75±0.032	116.71±0.42	47.30±1.02	72.65±0.20	143.82±0.18
100	38.80±0.60	3.01±0.03	154.74±0.23	57.04±2.06	93.34±0.46	-
500	31.33±0.330	2.80±0.03	205.75±0.29	90.26±2.88	82.23±0.31	128.97±0.12
Madder root	-	-	5.70±0.23	6.93±0.58	9.28±0.34	99.84±0.11

Values are mean of 3 replicates ± standard error.

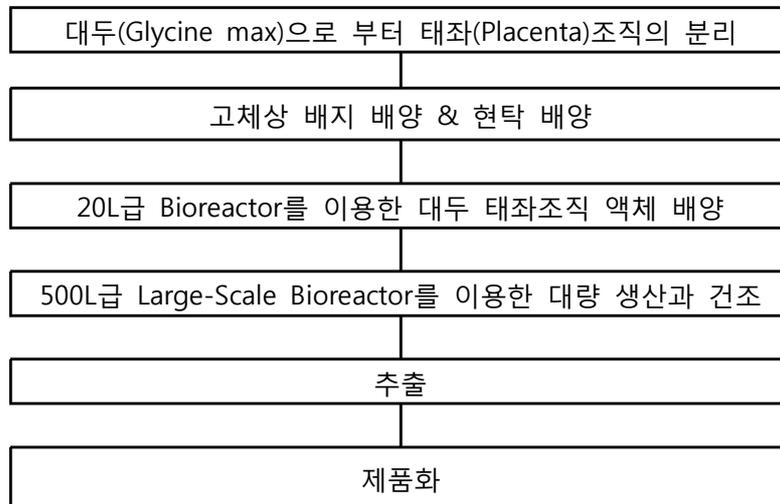
Initial inoculum size: 15 g l⁻¹ (FW)

< Scale-up of *Glycine max* placenta cells in large-scale and pilot-scale bioreactors >



바. 대두 태좌조직 배양체 Scale-up 생산 공정도 확립

1) 생물반응기를 이용한 대량 생산 조건 공정도 최적화



가) 대두 (*Glycine max*)콩으로 부터 태좌(Placenta)조직의 분리

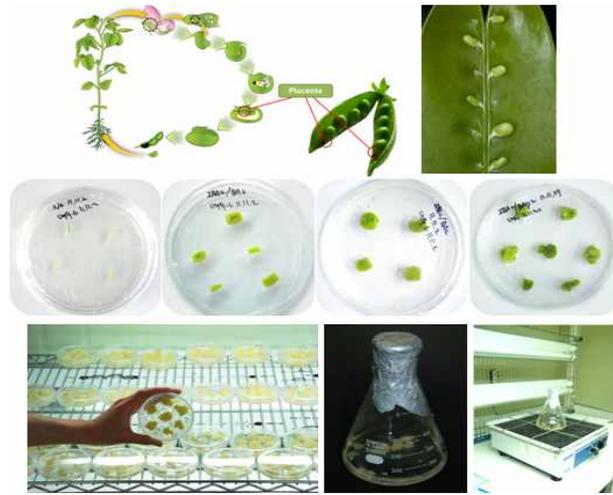
대두 콩 식물체로부터 태좌를 분리하여 고체배지 상에서 태좌조직세포 배양(1~6개월)한다. 이 과정에서 우수한 태좌조직세포라인만을 선별하여 Cell Line을 만든다.

나) 고체상 배지 배양 및 현탁 배양

선별된 대두태좌조직 cell line은 고체배지에서 2주 간격으로 계대 배양하여 증식시키고, 20L급 생물반응기(Bioreactor)로 접종하기 전에 100 ml 기본 MS 배지로 옮겨 4주간 현탁 배양한다.

다) 20L급 생물반응기(Bioreactor)를 이용한 대두태좌조직 세포배양

기본 MS배지 100 ml에 증식된 대두태좌조직 배양체를 3L 생물반응기에 접종하여 4주간 배양한 후, 다시 20 L 생물반응기로 계대 배양하며 증식시킨다. 증식된 대두태좌조직 배양체에 Methyl jasmonate를 Chemical Elicitor로 처리한다.



라) 500L급 Large-Scale Bioreactor를 이용한 대량 생산과 건조

0.5~1ton 규모의 대형 생물반응기에 집중하여, 배양 2주차에 methyl jasmonate Elicitor를

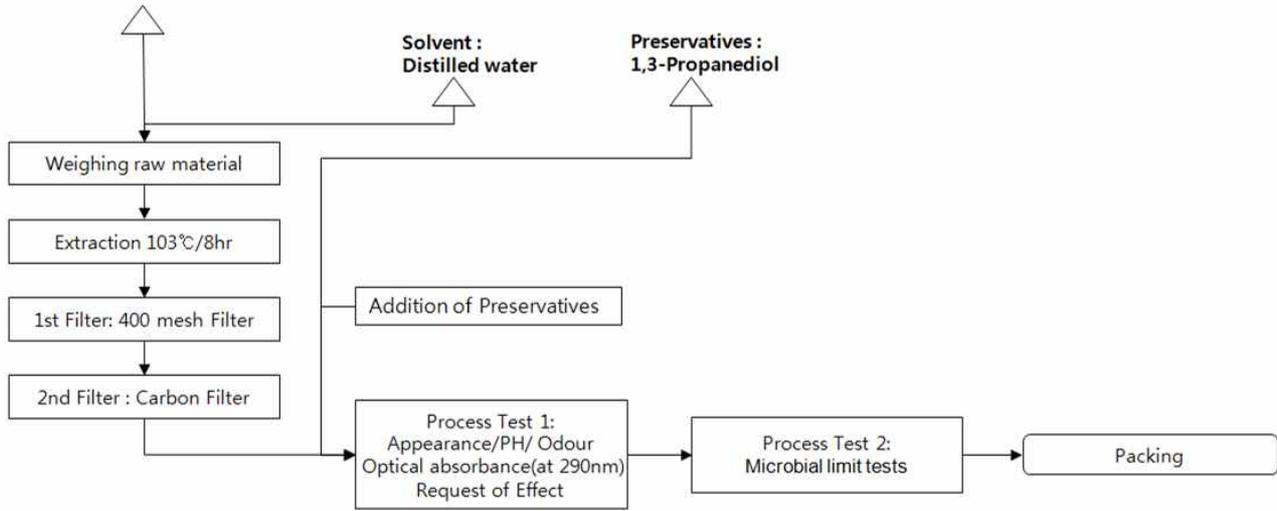
처리한다. 총 추가로 1주간 배양하여 수확한다. 수확된 대두 태좌조직배양추출물을 정제수로 여러 차례 세척하고, 50~55 °C에서 500L급 건조기에서 5시간 건조한다. 곱게 분쇄하여 보관한다.



		20 L Bioreactor	500 L Bioreactor
Culture Condition	공기공급량	0.05 vvm	0.05 vvm
	당농도	1 %	1 %
	접종밀도	15g/L	15g/L
	배양기간	4주	4주
	유인제 MeJA	200 μ M	200 μ M
Biomass	Fresh Weight	50 ~ 60 g/L	1.25 ~1.5 Kg/L
	Drying Weight	4~5 g/L	100~125 g/L
	Phenols	50~60 mg/g DW	1,250~1,500 mg/g DW
	Flavonoids	45~55 mg/g DW	1,125~1,375 mg/g DW

마) 추출 공정도

Main ingredient :
 Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Cell Powder
 Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Cell Powder
 Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Cell Powder



바) 제품화



7. 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 조성물 특허 출원

가. 대두 태좌 조직 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물

출원번호통지서	
출원일자	2012.07.17
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(CP12102)
출원번호	10-2012-0077888
접수번호	1-1-2012-0571349-62
출원인 성명	(주)바이오에프디엔씨(1-2005-045499-1)
발명자 성명	모상현, 정대현, 이정훈, 서효현, 신동선, 조문진, 강효석
발명의 명칭 (국문)	대두 태좌 조직 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물
발명의 명칭 (영문)	Composition for Skin External Application Comprising Culture Extract of Soy Bean Placenta
내용 요약	본 발명은 대두(大豆, 학명: Glycine max) 태좌조직 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부개선용 피부 외용제 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은, 특히, 프로콜라겐 증가, 콜라겐 생합성 증가능을 가지고 있어, 피부 노화 방지, 피부 주름 개선/방지용으로 적용될 수 있으며, 이외에도 iNOS 억제 활성을 통한 항염, 피부 염증 예방, 완화, 경감, 치료용으로 적용될 수 있다.
<p>관인생략</p> <h2 style="text-align: center;">출원번호통지서</h2> <p>출원일자 2012.07.17 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(CP12102) 출원번호 10-2012-0077888 (접수번호 1-1-2012-0571349-62) 출원인명칭 주식회사 바이오에프디엔씨(1-2005-045499-1) 대리인성명 한치원(9-2007-001526-6) 발명자성명 모상현 정대현 이정훈 서효현 신동선 조문진 강효석 발명의명칭 대두 태좌 조직 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물</p>	

【특허청구범위】

【청구항 1】

대두 태좌조직의 배양물 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부개선용 피부 외용제 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 대두 태좌조직의 배양물의 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 노화 방지용인 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 항염 조성물인 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

【청구항 5】

다음의 단계를 포함하는 대두 태좌조직의 배양물 또는 그 추출물을 함유한 피부개선용 피부 외용제 조성물의 제조방법:

- (a) 대두의 씨방내의 태좌조직을 분리하여 배양하는 단계 및
- (b) 상기 (a)단계에서 얻어진 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 조성물을 제조하는 단계.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 (b)단계는, (a)단계에서 얻어진 대두 태좌조직 배양물을 건조하고, 분말화하여 정제수에 혼합시켜 조성물을 제조하는 단계를 포함하는것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제5항에 있어서, 상기 (b)단계는, (a)단계에서 얻어진 대두 태좌조직 배양물을 건조하고, 분말화하여 정제수에 혼합시킨 다음, 에탄올 추출하여 조성물을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

나. 식물 세포 내 생리활성물질 함량 증가를 위한 고주파 장치 및 이를 이용한 식물 세포 배양 방법

출원번호통지서	
출원일자	2012.11.09
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2012-0127017
접수번호	1-1-2012-0924293-84
출원인 성명	(주)바이오에프디엔씨(1-2005-045499-1)
발명자 성명	모상현 이정훈 서효현 신동선 조문진 강효석 정해수 오현진 유영욱 모지홍 허문성 유서종 이현이 이진형 이유리 김은애 이승준
발명의 명칭 (국문)	식물 세포 내 생리활성물질 함량 증가를 위한 고주파 장치 및 이를 이용한 식물 세포 배양방법
발명의 명칭 (영문)	Radiofrequency device for increasing intracellular bioactive substance and plant cell culture method using the same
내용 요약	본 발명은 세포 내 생리활성물질 함량을 증가시키기 위한 고주파 장치 및 상기 고주파 장치를 이용하여 세포 내 유용한 이차대사산물 함량을 증가시키는 세포 배양방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 세포 배양에 의하면 세포 내 다이드제인(daidzein), 이퀄(equol) 같은 특정 이차대사산물의 함량을 증가시킴으로써, 생리활성물질을 함유한 다양한 의약품, 농약, 향신료, 색소, 식품 첨가물, 화장품으로의 개발에 유용하게 활용 가능할 것이다. 또한, 종래 특정 세포 혹은 특정 대사 산물에만 한정되어 사용할 수 있었던 세포 내 생리활성물질 증가를 위한 세포배양방식을 개선함으로써, 대다수의 세포 및 이차대사산물 생산에 광범위하게 적용할 수 있을 것이다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2012.11.09

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2012-0127017 (접수번호 1-1-2012-0924293-84)

출원인명칭 주식회사 바이오에프디엔씨(1-2005-045499-1)

대리인성명 위병갑(9-2004-000155-3)

발명자성명 모상현 이정훈 서효현 신동선 조문진 강효석 정해수 오현진 유영욱 모지홍 허문성 유서종 이현이 이진형 이유리 김은애 이승준

발명의명칭 식물 세포 내 생리활성물질 함량 증가를 위한 고주파 장치 및 이를 이용한 식물 세포 배양방법

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 식물 세포를 배지에 접종하여 배양하는 배양단계; 및 (b) 식물 세포 내 생리활성물질 함량을 증가시키기 위하여 배양된 세포에 고주파를 처리하는 고주파 처리단계를 포함하는, 세포 내 생리활성물질 함량 증가를 위한 세포 배양방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 고주파는 0.1 내지 15 MHz로 처리되는 것을 특징으로 하는 세포 배양방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 배양단계는 (a1) 발아한 식물로부터 캘러스를 유도하기 위하여 IAA(Indole acetic acid), BAP(6-benzylaminopurine), 수크로오스(sucrose), 젤라이트(gelite)를 함유한 MS 기본배지에서 2 내지 5주간 배양하는 캘러스 유도단계; 및 (a2) 상기 캘러스로부터 부정근을 유도하기 위하여 IBA(indole-3-butyric acid), MES Monohydrate(2-(N-morpholino), Benzyladenine, 수크로오스(sucrose), 젤라이트(gelite)를 함유한 MS 기본배지에서 2 내지 5주간 배양하는 부정근 유도단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양방법.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 고주파는 하루에 2 내지 10분 간격으로 3회 처리하되, 이를 5 내지 15일간 반복 처리하는 것을 특징으로 하는 세포 배양방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 생리활성물질은 알칼로이드(alkaloids), 플라보노이드(flavonoids), 테르페네노이드(terpenenoids), 글리코사이드(glycosides), 대사색소(metabolite pigments)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 이차대사산물인 것을 특징으로 하는 세포 배양방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 플라보노이드 이차대사산물은 이소플라본(isoflavones), 플라보놀(flavonols), 플라바논(flavanones), 플라본(flavones), 플라반-3-올(flavan-3-ols), 안토시아닌(anthocyanins)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 이차대사산물인 것을 특징으로 하는 세포 배양방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 이소플라본은 다이드제인(daidzein), 제니스테인(genistein), 이퀄(equol)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 이차대사산물인 것을 특징으로 하는 세포 배양방법.

【청구항 8】

내부에 수용되는 세포에 고주파 및 공기를 제공하여 배양시키는 바이오 리액터와 세포 내 생리활성물질 함량을 증가시키기 위하여 상기 바이오 리액터에 고주파를 제공하는 고주파 공급기와 상기 바이오 리액터에 공기를 제공하는 공기 공급기와 상기 고주파 공급기와 연결되고 상기 바이오 리액터의 진동을 기록하는 진동 기록기를 포함하여 이루어진 것을 특징으로 하는 고주파 세포 배양기.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 바이오 리액터는, 세포배양 및 배양액을 공급하는 주입구가 상부에 형성되고, 양측 동일선상에 는 고주파 장착부가 형성되며, 하부에는 공기 주입부가 형성되는 케이스와 상기 주입구를 개방 또는 폐쇄하는 상부 덮개와 상기 고주파 장착부에 각각 장착되고 상기 고주파 공급기를 통해 전달되는 고주파를 전달하는 고주파 단자와 판 형상으로 형성되고 중앙에는 케이스를 지지하는 고정공이 형성되는 수평 지지판과 상기 수평 지지판의 가장자리 둘레를 따라 하부에 수직으로 장착되는 고정봉을 포함하여 이루어진 것을 특징으로 하는 고주파 세포 배양기.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 케이스 및 수평 지지판과 상기 수평 지지판 및 고정 봉의 연결부분에는 충격 및 진동의 감소를 위하여 완충부재가 각각 장착되는 것을 특징으로 하는 고주파 세포 배양기.

다. 두류 태좌 세포 배양 추출물을 함유한 항노화, 항염, 항산화 화장품 조성물

출원번호통지서	
출원일자	2013.07.11
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(CP13132)
출원번호	10-2013-0081409
접수번호	1-1-2013-0623549-85
출원인 성명	(주)바이오에프디엔씨(1-2005-045499-1)
발명자 성명	모상현, 정대현, 이정훈, 서효현, 최수용, 신동선, 조문진, 모지홍, 이진형, 김은애
발명의 명칭 (국문)	두류 태좌 세포 배양 추출물을 함유한 항노화, 항염, 항산화 화장품 조성물
발명의 명칭 (영문)	Anti-aging and Anti-inflammatory and Anti-oxidant Cosmetic Composition including Beans Placenta CellCultures Extracts
내용 요약	본 발명은 두류 태좌 세포 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 두류 태좌 세포 배양 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부개선용 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 두류 태좌 세포 배양물 또는 그 추출물 함유 화장품 조성물은 피부 세포에 독성이 없으면서도 피부 콜라겐 합성능이 탁월하며, 모공축소, 피지분비억제, 보습, 항염, 여드름개선 효능을 가지고 있다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2013.07.11
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(CP13132)
 출원번호 10-2013-0081409 (접수번호 1-1-2013-0623549-85)
 출원인명칭 주식회사 바이오에프디엔씨(1-2005-045499-1)
 대리인성명 한치원(9-2007-001526-6)
 발명자성명 모상현 정대현 이정훈 서효현 최수용 신동선 조문진 모지홍 이진형 김은애
 발명의명칭 두류 태좌 세포 배양 추출물을 함유한 항노화, 항염, 항산화 화장품 조성물

【특허청구범위】

【청구항 1】

두류 태좌 세포 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 화장료 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 두류는 검정콩(서리태), 줄무늬콩, 완두(*Pisum sativum*), 녹두, 리마콩, 동부(*Vigna sinensis*), 땅콩(*Arachis hypogaea*), 잠두, 편두(*Dolichos lablab*), 덩굴강낭콩, 팔(*Phaseolus angularis*), 새팥(*Phaseolus nipponensis*), 덩굴팥(*Phaseolus calcaratus*), 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*), 붉은강낭콩(*Phaseolus multiflorus*), 또는 작두콩(*Canavalia gladiata*)인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 주름 방지 또는 개선용인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 항염용인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 모공 축소용인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 피지분비억제용인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 조성물은 여드름개선용인 것을 특징으로 하는 조성물.

겐 합성에 관여하는 procollagen type I C-peptide (PIP)의 발현 역시 EtOH 추출물을 처리하였을 때 증가하였다. 따라서, 이상의 결과로부터 대두태좌조직배양 추출물이 피부주름 개선 효능을 갖는 새로운 화장품 원료로서 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

Anti-aging effects of soybean(*Glycine max*) placenta culture extracts in human dermal fibroblasts

Moon Jin Cho¹, Hyun-E Lee¹, Hae-Soo Jung¹, Hyo Hyun Seo¹, Hyo Seok Kang¹, Ji Hong Moh¹, Dong-Sun Shin¹, Hyoung Shik Kim¹, Soo Yong Choi¹, Jeong-Hun Lee¹, Sang-Hyun Moh^{1*}

¹Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co., Ltd., Incheon 406-840, and
²Department of Horticulture, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763.

ABSTRACT

Chemically diverse natural products are derived from plants. The production of plant secondary metabolites by means of large scale culture of plant cell in bioreactors offers an attractive option for producing many phytochemicals. The soybean(*Glycine max*) is a species of legume native to East Asia, widely grown for its edible bean which has numerous uses. The beans contain a variety of biologically active secondary metabolites such as phytic acid, alpha-linolenic acid and isoflavones. Moreover, Soybean extracts are being used as cosmetic ingredients such as antioxidants, thickening agents and moisturizing agents. In the present study, soybean placenta was sterilized cultured in bioreactors and extraction was carried out in 50% ethanol. Treatment with soybean placenta culture extract enhanced the expression of collagen synthetic markers and procollagen type I C-peptide(PIP). Soybean placenta cells by large-scale culture may provide a cost-effective and environmentally friendly platform for sustainable production of a variety of important plant natural products for cosmetic application. Therefore, this study suggests that soybeans(*Glycine max*) placenta culture extract can be developed as topical application of natural anti-aging cosmeceuticals by enhancement of collagen synthesis.

METHODS

► **Cell culture** : The CCD986sk cell line was derived from a human skin fibroblast; cells were cultured in Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. 100 U/ml penicillin per ml and maintained on 75 cm² plastic tissue culture flasks.

► **Cell viability assay** :

► **procollagen type I C-peptide (PIP) production** : The level of procollagen type I Carboxyl-terminal peptide in the conditioned media was quantified using an ELISA kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan).

► **qRT-PCR** : Quantitative real-time PCR was performed using a QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Germany).

RESULTS

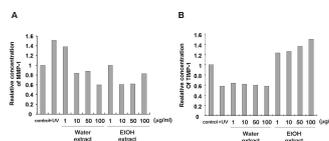


Figure 3. Anti-aging related gene expression effects of Glycine max phyto-placenta culture extract after UV irradiation. mRNA expression of Matrix Metalloproteinase-1(MMP-1) (A) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1(TIMP-1)(B).

RESULTS

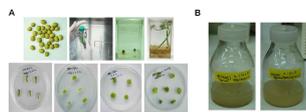


Figure 1. (A) Plant generation via seed of soybean(*Glycine max*). Phyto-placenta culture of soybean(*Glycine max*) (B) Water and 50% Ethanol extracts from Soybean(*Glycine max*)

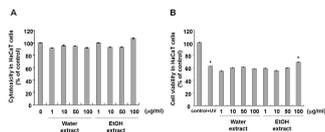


Figure 2. (A) Cytotoxicity effects on human keratinocytes. (B) Cell viability effects after UV irradiation of soybean(*Glycine max*) phyto-placenta extracts

DISCUSSION

Soybean (*Glycine max*) contains the isoflavones, genistein and daidzein, those are well known for many of the protective effects such as antioxidant activity. Despite many studies deal with the activity of soybean (*Glycine max*), there was no study about anti-aging effect of the soybean on UV-damaged skin.

In this study, extracts from placenta of soybean (*Glycine*) showed anti-aging effect on UV irradiated human skin fibroblast cell line, CCD986sk. In qRT-PCR results, expression of MMP-1 mRNA was decreased after treatment of the extracts. Moreover, ECH extract of soybean (*Glycine*) increased expression level of TIMP-1, an inhibitor of MMP-1, mRNA in a dose-dependent manner. In summary, present study demonstrated that extracts of soybean(*Glycine*) placenta have anti-aging effect by regulating the mRNA levels of MMP-1 and TIMP-1 by enhancing synthesis of collagen. According to our data, extracts of soybean(*Glycine*) placenta can be an attractive candidate material for natural anti-aging cosmetics.

REFERENCES

- MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.* 16, 4561-47-972 (1997)
- Neutral endopeptidase-24.11 (NEP) activity in human fibroblasts during development and aging. *Mech Ageing Dev.* 102, 15-23 (1998)
- Regulation of Collagen synthesis by ascorbic acid transforming growth factor-beta and interferon-gamma in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel (prolonging and aging-independents. *J. of Derna. Sci.* 15, 188-200 (1997)

9. SCI 논문

가. CO₂-enriched microenvironment induces biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in bioreactor cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.): the role of antioxidants and enzymes

- *Australian Journal of Crop Science (AJCS)*, 2013, 7(11), 1606-1616

1) 요약

본 연구에서는 0.03 ~ 5 % 범위에서 이산화탄소 (CO₂) 농도의 성장 및 이차 대사 산물에 미치는 영향 즉, 안트라퀴논(AQ), 모린다 시트리 폴리야의 세포 현탁액 배양에있는 총 페놀 및 플라보노이드가 3L 풍선형 생물 반응기에서 측정되었고, DPPH 라디칼 소거 활성, 산화 스트레스, 항산화 반응과 효소 활동도 측정하였다. 결과는 0.5 %, 1 % CO₂ 공급은 cell biomass

가 증가된 반면, 고농도 CO₂의 공급에 의해서는 세포 성장으로 이차대사산물이 올라갔다. 0.5 %, 1 % CO₂ 공급으로 높은 세포성장에도 불구하고 AQ의 최대 수율 (117.24 mg/L · DW), 페놀 (147.84 mg/L · DW), 플라보노이드 (68.20 mg/L · DW)은 2.5 % CO₂ 처리로 측정되었다. 이 shikimate 탈수소 효소, 페닐알라닌 암모니아 리아제 그리고 cinnamyl 알코올 탈수소 효소 upregulated 효소활성은 이러한 대사 산물의 생합성으로부터 이루어진다. 높은 CO₂ 공급과 현탁 세포배양은 점진적으로 SOD활성으로 자극된다. 하지만, 높은 H₂O₂, MDA 축적은 고농도의 CO₂ 공급(2.5 %, 5 %)에 의해 측정되었다. 이러한 결과는 고농도의 CO₂ 공급으로 CAT, G-POD의 활성은 toxic H₂O₂ 축적에 대응하기 위해 충분하지 않지만, 스트레스 정도를 감소시키는 중요한 역할을 담당한다.



나. Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor – *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 2013

1) 요약

모린다 씨트리폴리아 부정근 배양으로 AQ, 페놀, 플라보노이드와 같은 생리 활성물질의 뿌리 성장과 생산을 향상시키기 위해 공기량, 접종밀도, MS배지의 salt 농도 차이에 의한 조사를 풍선형 생물 반응기를 통하여 측정하였다. 가능한 메커니즘은 효소 활동 변화(superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase), vitamin E 항산화, 페닐알라닌 암모니아 lyase, Stress level(H_2O_2 축적, proline, lipid peroxidation)으로 연구되었다. 낮은 공기공급율 (0.05 vvm [air volume/culture volume/min])은 뿌리의 생중량과 건조중량의 축적을 증가시킨다. $0.1-0.3 \text{ vvm}$ 의 높은 공기공급율은 AQ, 페놀, 플라보노이드 축적과 감소된 뿌리 성장을 보였다. 낮은 접종밀도(5, 10 g/L)는 활성물질 축적은 증가시키는 반면 뿌리성장은 억제되었다. 높은 농도의 MS salt 농도($1\times, 1.5\times \text{ MS}$) 부정근 배양은 oxidative stress를 유도하고, 뿌리 성장을 감소시켰다. 전반적으로, 0.05 vvm 의 공기공급, 15 g/L 접종 밀도, $0.5x \text{ MS}$ salt 농도가 뿌리의 건조된 바이오메스 함량 증가(4.38 g/L), AQ 103.08 g/L , 페놀 54.81 g/L , 및 플라보노이드 49.27 g/L 최적화되었다.

In Vitro Cell Dev Biol—Plant
DOI 10.1007/s11627-013-9555-3

MOLECULAR FARMING/METABOLIC ENGINEERING/SECONDARY METABOLISM

Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor

Md. Abduhaliq Baque · Md. Humayun Kabir Shiragi · Sang-Hyun Moh · Eun-Jung Lee · Kee-Yeoup Paek

Received: 10 September 2012 / Accepted: 26 August 2013 / Editor: Pieter van Soest
© The Society for In Vitro Biology 2013

Abstract To improve root growth and production of bioactive compounds such as anthraquinones (AQ), phenolics, and flavonoids by adventitious root cultures of *Morinda citrifolia*, the effects of aeration rate, inoculum density, and Murashige and Skoog (MS) medium salt strengths were investigated using a balloon-type bubble bioreactor. The possible mechanisms underlying changes in activities of enzymic (superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase) and nonenzymic (vitamin E) antioxidants, phenylalanine ammonia lyase, and stress levels (accumulation of hydrogen peroxide and proline, peroxidation of lipids) were also studied. Low aeration

rate (0.05 vvm [air volume/culture volume/min]) accelerated accumulation of root fresh weight and dry weight (DW). High aeration rates (0.1 to 0.3 vvm) stimulated accumulation of AQ, phenolics, and flavonoids and reduced root growth. Low inoculum densities (5 and 10 g L^{-1}) increased accumulation of those metabolites but inhibited root growth. Culture of adventitious roots with high concentrations of MS salts ($1\times$ and $1.5\times \text{ MS}$) resulted in induction of oxidative stress that strongly inhibited root growth. Overall, an aeration rate of 0.05 vvm , 15 g L^{-1} inoculum density, and half-strength ($0.5\times$) MS medium were optimal for enhancing accumulation of root dry biomass (4.38 g L^{-1}), AQ ($103.08 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), phenolics ($54.81 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$), and flavonoids ($49.27 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11627-013-9555-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. A. Baque · E.-J. Lee · K.-Y. Paek (✉)
Research Center for the Development of Advanced Horticultural
Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,
Republic of Korea
e-mail: paekky@chungbuk.ac.kr

M. A. Baque (✉)
Department of Agronomy, Sher-e-Bangla Agricultural University,
Dhaka 1207, Bangladesh
e-mail: baque_ma@yahoo.com

M. H. K. Shiragi
Central Laboratory, Soil Resource Development Institute (SRDI),
Ministry of Agriculture, Govt. of Bangladesh, Farmgate,
Dhaka 1213, Bangladesh

S.-H. Moh
Anti-Aging Research Institute, BIO-PD&C Co., Ltd.,
310 So, Seowon Valley A, Seongju, Gyeongsang 406-840,
Republic of Korea

E.-J. Lee
Chungbuk Biotech Co. Ltd., Industry-Academic Cooperation
Foundation Apiculture Incubator Center 208, Chungbuk National
University, Cheongju 361-760, Republic of Korea

Keywords Adventitious roots · Anthraquinones · Biomass
culture · Oxidative stress · Phenylalanine ammonia lyase

Introduction

Morinda citrifolia (L.), commercially known as Noni, is a member of the Rubiaceae (coffee family) that has been used in folk remedies by Polynesians for over 2,000 yr. It has a broad range of therapeutic effects (Wang *et al.* 2002) and contains several medicinally active compounds including polyphenolics, organic acids, and alkaloids. Of the phenolic compounds, the most common are anthraquinones (AQ) (Wang *et al.* 2002).

The demand for Noni roots and extracts has increased in recent decades. For medicinal purposes, Noni root requires 2 to 5 yr of field cultivation in regions with high temperature and humidity levels (Ahmed *et al.* 2008). Additionally, Noni is susceptible to attack by a wide array of pests and diseases, and continuous harvesting from its natural stands has posed a major threat to the established mother plants. Procurement of valuable secondary metabolites

Published online: 11 September 2013

Springer

다. A sensitive hydrogen peroxide optical sensor based on polysaccharide stabilized silver nanoparticles

– *The Royal Society of Chemistry (RSC) Advances*, 2013, 1–4

1) 요약

본 연구는 은 나노파티클 (silver nanoparticles, Ag NPs)을 안정화시키는 다당류의 빠르고 간단한 합성을 연구하였다. 과산화수소의 환원을 촉진하는 은 나노파티클의 능력을 이용해 10^{-6} M에서 10^{-2} M의 농도범위에서 광섬유 과산화수소 센서의 개발이 성공적으로 연구되었다.

RSC Advances **RSC Publishing**

COMMUNICATION

A sensitive hydrogen peroxide optical sensor based on polysaccharide stabilized silver nanoparticles†

Chandrabanti K. Sagar,^{1,2} Hyeon U. Kim,¹ R. C. Ayres,³ Poornima Murty,² Taesung Kim,² Sang Hyun Choi,² Atul Kulkarni^{1,2,4} and Sushma G. Sabharwal^{1,2*}

† Full paper text available free of charge in the open access journal *RSC Advances*. View Article Online for full article text on the Royal Society of Chemistry website: www.rsc.org/advances

The paper reports a rapid and simple post-synthesis of polysaccharide stabilized silver nanoparticles (Ag NPs). The ability of Ag NPs to catalyze the reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) is successfully exploited for the development of an optical fiber H₂O₂ sensor in the concentration range of 10⁻⁶ to 10⁻² M.

Fiber optic sensors are attractive especially in biochemical sensing applications because of their unique characteristics such as low cost, small size, light weight, immunity to electromagnetic interference (EMI) and high flexibility. Various sensors for detection of chemicals have been reported using optical fiber technology.^{1–4} Hence, optical fiber based, reflective type portable hydrogen peroxide (H₂O₂) sensor having a wide detection range is reported. H₂O₂ is widely used in various industries like bleaching of wood pulp and paper, in food and pharmaceutical industries. Beside these applications, H₂O₂ is highly toxic and can pose various health and environmental hazards.^{5,6} Various techniques have been used for H₂O₂ sensing including fluorescence,⁷ chemochromism,^{8,9} microscopy,¹⁰ spectrophotometry,¹¹ electrochemical¹² and SPR.¹³ Most of these techniques have limitations of miniaturization, a complicated setup and high cost. However, there are very few reports on optical fiber H₂O₂ sensors, based on chemochromism,¹⁴ reflectance,¹⁵ transmittance¹⁶ and SPR.¹⁷ The use of optical fiber has made the sensors miniaturized and cost effective in addition to possibility of their use for online and remote sensing.^{18–20}

Chemical route of nanoparticles synthesis leads to potential health and environmental hazards. Hence green chemistry approach for synthesis of Ag NPs by using various biomaterials have been reported earlier.^{21–23} Recently, we have reported synthesis of Ag NPs using Lactose from Lacti (LFL) as a reducing and stabilizing agent for the first time.²⁴ The synthesis of Ag NPs was carried out at 40 °C and 72 h were required to complete the reaction. The size distribution was found to be in the range of 20 to 30 nm. In the present work, the reaction time is reduced to 20 min with smaller particle size and narrow size distribution. Further, the ability of Ag NPs to catalyze reduction of H₂O₂, resulting in decoloration of Ag NPs is successfully exploited for the fabrication of a simple and portable fiber optic sensor for a reflection mode to monitor the concentration of H₂O₂ as low as 10⁻⁶ M.

Sensing mechanism based on change in reflection index at the fiber and glass chip interface is shown in Scheme 5. The incident light interacts with the nanoparticles within the chip part of the light gets absorbed and part of it gets reflected back. Reflected light intensity for Ag NPs containing different concentrations of H₂O₂ was monitored using spectrometer. Scheme 4 also shows (right side) the H₂O₂ induced degradation of Ag NPs and concomitant reduction in the UV-vis absorption peak of Ag NPs at 400 nm.

Liquid synthesis of Ag NPs was achieved using LFL as a reducing and stabilizing agent. For the synthesis of Ag NPs, 4.4 g of LFL was dissolved in 400 ml distilled water by heating

Scheme 5 Sensing mechanism based on change in reflection index at the fiber and glass chip interface. A schematic diagram shows incident light entering a fiber optic chip. Part of the light is reflected back, and part is absorbed by Ag NPs. The diagram illustrates how the presence of Ag NPs affects the reflected light intensity, which is then measured by a spectrometer to determine H₂O₂ concentration.

Scheme 4 H₂O₂ induced degradation of Ag NPs. A diagram shows Ag NPs (yellow spheres) and their UV-vis absorption peak at 400 nm. The addition of H₂O₂ leads to the degradation of Ag NPs, resulting in a decrease in the absorption peak.

† Full paper text available free of charge in the open access journal *RSC Advances*. View Article Online for full article text on the Royal Society of Chemistry website: www.rsc.org/advances

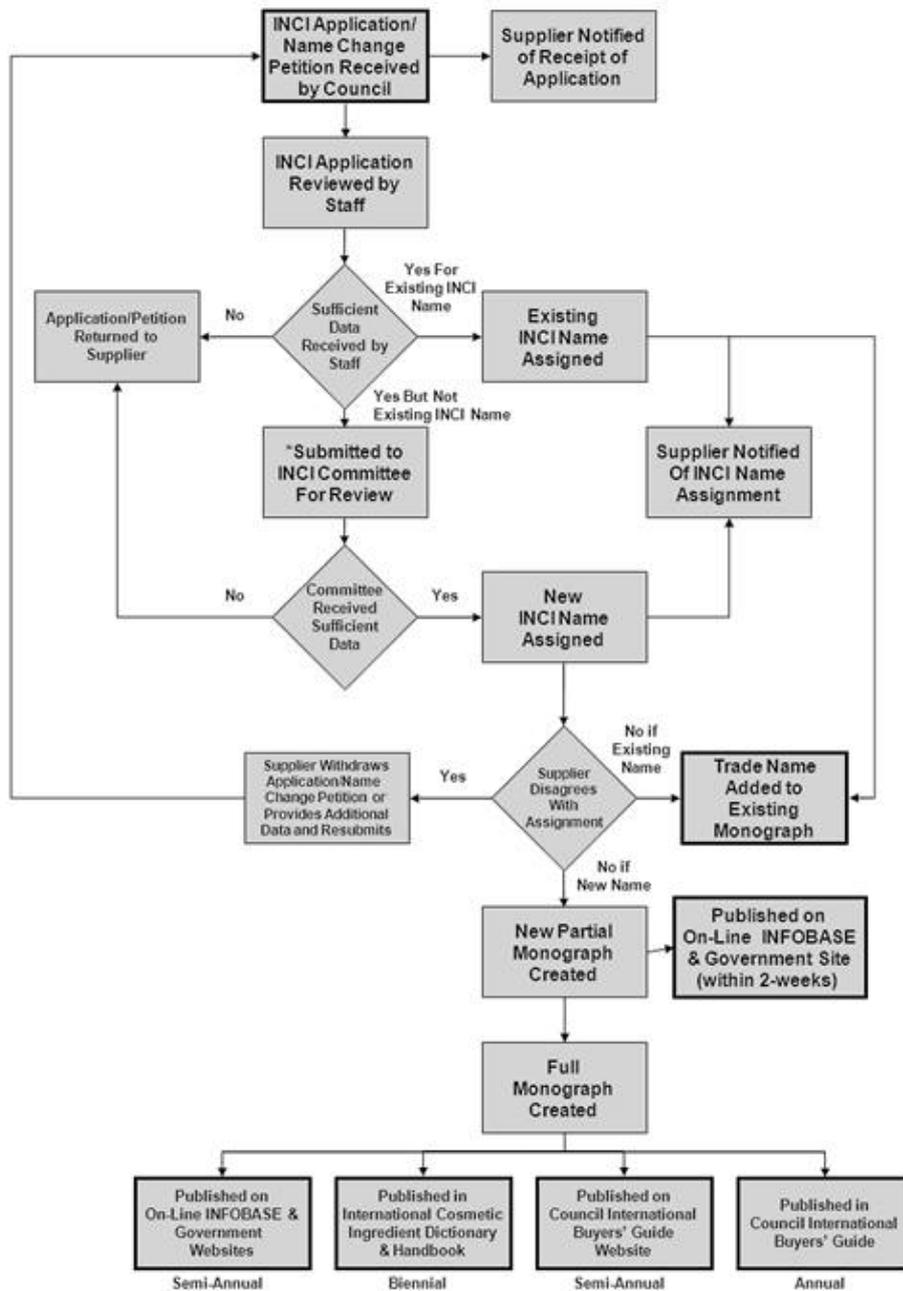
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Adv. Adv., 2013, **00**, 1–4 | 1

10. 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물 국제화장품원료협회 인허가

가. 인허가 진행 순서

화장품 및 의약외품의 원료로써 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물 함유 제품을 사용하기 위하여 등재와 허가를 획득하였다.



< 국제화장품원료협회에서 신규소재 INCI 인허가 절차 >

나. 국제화장품원료협회(Personal Care Products Council, PCPC) 인허가 10건

	Trade Name	INCI Name
1	Pea Placenta Culture Extract	Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Extract
2	Common Bean Placenta Culture Extract	Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Extract
3	Black Bean Placenta Culture Extract	Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Extract
4	Phytopla-PSM	Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Conditioned Media
5	Phytopla-PVM	Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Conditioned Media
6	Phytopla-GMM	Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Conditioned Media
7	PhytoCalli-GMC	Water (and) Glycine Max (Soybean) Callus Culture Extract
8	PhytoCalli-PVC	Water (and) Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Callus Extract
9	PhytoCalli-PSC	Water (and) Pisum Sativum (Pea) Callus Extract
10	Magnolia- P	Water (and) Magnolia Kobus Phytoplacenta Extract

다. 인허가 등재 서신

1) Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Extract



2) Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Extract

<p style="text-align: center;">  <small>Personal Care Products Council Cosmetics, Toiletries, & Fragrances</small> <small>Member of CIPA</small> </p> <p>October 24, 2011</p> <p>Sanghyun Mah Bio-FDAC Co., Ltd. 2NB-8LT, Namdong Ind. Complex, 451-7 Namyun-Dong, Namsong-Gu Incheon 400-840 Republic of South Korea</p> <p style="text-align: right;">PCPC File No. 2368</p> <p>Dear Sanghyun Mah:</p> <p>In response to your Form TN submission(s) for the assignment of the International Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI) name(s) to your material(s), please be advised that the International Nomenclature Committee has completed its review of your request.</p> <p>The name(s) assigned to your material(s) is listed on the attached printout. Please check the printout for accuracy, and advise if revisions are needed.</p> <p>Your name assignment(s) will be published in future editions of the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook and the International Buyer's Guide.</p> <p>Petitions requesting the revision of an INCI name assignment must be filed on Form TN and accompanied by a cover letter which explains the reasoning for the change. Relevant information on chemical composition or other criteria which support the revision should also be included with the petition.</p> <p>In addition, be advised that nomenclature assignments are subject to change if deemed necessary for technical accuracy or other reasons as determined by the International Nomenclature Committee.</p> <p>We trust this information is helpful.</p> <p>Sincerely,  Tara E. Gottschalk Manager - Cosmetic Ingredient Database</p> <p>Enclosure</p> <p style="font-size: small;">1100 11th Street, NW, Suite 500 Washington, D.C. 20036-4702 202-331-4772 202-331-1428 (fax) www.personalcareproducts.org</p>	<p style="text-align: right;">page 2</p> <p style="text-align: center;">PCPC FILE NUMBER: 2368</p> <p style="text-align: center;">TRADE NAMES WITH ASSIGNED INCI NAMES</p> <p>TRADENAME: Common Bean Placenta Culture Extract Assigned INCI Name(s): Mineral 26579 Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Extract</p>
---	---

3) Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Extract

<p style="text-align: center;">  <small>Personal Care Products Council Cosmetics, Toiletries, & Fragrances</small> <small>Member of CIPA</small> </p> <p>October 24, 2011</p> <p>Sanghyun Mah Bio-FDAC Co., Ltd. 2NB-8LT, Namdong Ind. Complex, 451-7 Namyun-Dong, Namsong-Gu Incheon 400-840 Republic of South Korea</p> <p style="text-align: right;">PCPC File No. 23681</p> <p>Dear Sanghyun Mah:</p> <p>In response to your Form TN submission(s) for the assignment of the International Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI) name(s) to your material(s), please be advised that the International Nomenclature Committee has completed its review of your request.</p> <p>The name(s) assigned to your material(s) is listed on the attached printout. Please check the printout for accuracy, and advise if revisions are needed.</p> <p>Your name assignment(s) will be published in future editions of the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook and the International Buyer's Guide.</p> <p>Petitions requesting the revision of an INCI name assignment must be filed on Form TN and accompanied by a cover letter which explains the reasoning for the change. Relevant information on chemical composition or other criteria which support the revision should also be included with the petition.</p> <p>In addition, be advised that nomenclature assignments are subject to change if deemed necessary for technical accuracy or other reasons as determined by the International Nomenclature Committee.</p> <p>We trust this information is helpful.</p> <p>Sincerely,  Tara E. Gottschalk Manager - Cosmetic Ingredient Database</p> <p>Enclosure</p> <p style="font-size: small;">1100 11th Street, NW, Suite 500 Washington, D.C. 20036-4702 202-331-4772 202-331-1428 (fax) www.personalcareproducts.org</p>	<p style="text-align: right;">page 2</p> <p style="text-align: center;">PCPC FILE NUMBER: 23681</p> <p style="text-align: center;">TRADE NAMES WITH ASSIGNED INCI NAMES</p> <p>TRADENAME: Black Bean Placenta Culture Extract Assigned INCI Name(s): Mineral 26578 Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Extract</p>
--	--

4) Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Conditioned Media



5) Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Conditioned Media



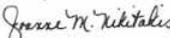
8) Water (and) Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Callus Extract

<p style="text-align: center;">  <small>Committed to Safety, Quality & Innovation</small> <small>Member of CIPA</small> </p> <p>July 26, 2012</p> <p>Sanghyun Moh Bio-FD&C Co., Ltd. 248L-BLT, Namsong Ind. Complex, 451-7 Noryu-h-Dong, Namsong-Gu Incheon 405-849 Republic of South Korea</p> <p style="text-align: right;">PCPC File No. 24975</p> <p>Dear Sanghyun Moh</p> <p>In response to your Form TN submission(s) for the assignment of the International Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI) name(s) to your material(s), please be advised that the International Nomenclature Committee has completed its review of your request.</p> <p>The name(s) assigned to your material(s) is listed on the attached printout. Please check the printout for accuracy, and advise if revisions are needed.</p> <p>Your name assignment(s) will be published in future editions of the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook and the International Buyer's Guide.</p> <p>Petitions requesting the revision of an INCI name assignment must be filed on Form TN and accompanied by a cover letter which explains the reasoning for the change. Relevant information on chemical composition or other criteria which support the revision should also be included with the petition.</p> <p>In addition, be advised that nomenclature assignments are subject to change if deemed necessary for technical accuracy or other reasons as determined by the International Nomenclature Committee.</p> <p>We trust this information is helpful.</p> <p>Sincerely,  Tara E. Guttschalik Manager - Cosmetic Ingredient Database</p> <p>Enclosure</p> <p><small>1-800-451-9400 ext. 528-300 Washington, DC 20044-4192 202.331.1716 202.331.1747 Fax www.personalcarecouncil.org</small></p>	<p style="text-align: center;">page 2</p> <p style="text-align: center;">PCPC FILE NUMBER: 24975</p> <p style="text-align: center;">TRADE NAMES WITH ASSIGNED INCI NAMES</p> <table border="0"> <tr> <td>TRADENAME: PhytoCali-PVP</td> <td>MonID: 3342 Water</td> </tr> <tr> <td>Assigned INCI Name(s):</td> <td>MonID: 27181 Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Callus Extract</td> </tr> </table>	TRADENAME: PhytoCali-PVP	MonID: 3342 Water	Assigned INCI Name(s):	MonID: 27181 Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Callus Extract
TRADENAME: PhytoCali-PVP	MonID: 3342 Water				
Assigned INCI Name(s):	MonID: 27181 Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Callus Extract				

9) Water (and) Pisum Sativum (Pea) Callus Extract

<p style="text-align: center;">  <small>Committed to Safety, Quality & Innovation</small> <small>Member of CIPA</small> </p> <p>July 26, 2012</p> <p>Sanghyun Moh Bio-FD&C Co., Ltd. 248L-BLT, Namsong Ind. Complex, 451-7 Noryu-h-Dong, Namsong-Gu Incheon 405-849 Republic of South Korea</p> <p style="text-align: right;">PCPC File No. 24975</p> <p>Dear Sanghyun Moh</p> <p>In response to your Form TN submission(s) for the assignment of the International Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI) name(s) to your material(s), please be advised that the International Nomenclature Committee has completed its review of your request.</p> <p>The name(s) assigned to your material(s) is listed on the attached printout. Please check the printout for accuracy, and advise if revisions are needed.</p> <p>Your name assignment(s) will be published in future editions of the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook and the International Buyer's Guide.</p> <p>Petitions requesting the revision of an INCI name assignment must be filed on Form TN and accompanied by a cover letter which explains the reasoning for the change. Relevant information on chemical composition or other criteria which support the revision should also be included with the petition.</p> <p>In addition, be advised that nomenclature assignments are subject to change if deemed necessary for technical accuracy or other reasons as determined by the International Nomenclature Committee.</p> <p>We trust this information is helpful.</p> <p>Sincerely,  Tara E. Guttschalik Manager - Cosmetic Ingredient Database</p> <p>Enclosure</p> <p><small>1-800-451-9400 ext. 528-300 Washington, DC 20044-4192 202.331.1716 202.331.1747 Fax www.personalcarecouncil.org</small></p>	<p style="text-align: center;">page 2</p> <p style="text-align: center;">PCPC FILE NUMBER: 24975</p> <p style="text-align: center;">TRADE NAMES WITH ASSIGNED INCI NAMES</p> <table border="0"> <tr> <td>TRADENAME: PhytoCali-PVP</td> <td>MonID: 3342 Water</td> </tr> <tr> <td>Assigned INCI Name(s):</td> <td>MonID: 27182 Pisum Sativum (Pea) Callus Extract</td> </tr> </table>	TRADENAME: PhytoCali-PVP	MonID: 3342 Water	Assigned INCI Name(s):	MonID: 27182 Pisum Sativum (Pea) Callus Extract
TRADENAME: PhytoCali-PVP	MonID: 3342 Water				
Assigned INCI Name(s):	MonID: 27182 Pisum Sativum (Pea) Callus Extract				

10) Magnolia Kobus Phytoplacenta Extract

 <p>Personal Care Products Council Committed to Safety, Quality & Innovation formerly CTFA</p>	<p>page 2</p> <p>PCPC FILE NUMBER: 26556</p> <p>TRADE NAMES WITH ASSIGNED INCI NAMES</p> <p>TRADENAME: Magnolia-P Assigned INCI Name(s): MonoID: 3342 Water MonoID: 28283 Magnolia Kobus Phytoplacenta Extract</p>
<p>August 7, 2013</p> <p>Sanghyun Moh Bio-FD&C Co., Ltd. 510, A block, Smartvalley 30 Song-Do Mirae-Ro Yeonsu-Gu, Incheon 405-840 Republic of South Korea</p> <p style="text-align: right;">PCPC File No. 26556</p> <p>Dear Sanghyun Moh:</p> <p>In response to your Form TN submission(s) for the assignment of the International Nomenclature Cosmetic Ingredient (INCI) name(s) to your material(s), please be advised that the International Nomenclature Committee has completed its review of your request.</p> <p>The name(s) assigned to your material(s) is listed on the attached printout. Please check the printout for accuracy, and advise if revisions are needed.</p> <p>Your name assignment(s) will be published in future editions of the <i>International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook</i> and the <i>International Buyer's Guide</i>.</p> <p>Petitions requesting the revision of an INCI name assignment must be filed on Form TN and accompanied by a cover letter which explains the reasoning for the change. Relevant information on chemical composition or other criteria which support the revision should also be included with the petition.</p> <p>In addition, be advised that nomenclature assignments are subject to change if deemed necessary for technical accuracy or other reasons as determined by the International Nomenclature Committee.</p> <p>We trust this information is helpful.</p> <p>Sincerely,</p> <p> Joanno M. Nikitakis Senior Cosmetic Chemist</p> <p>Enclosure</p>	
<p>1101 17th Street, N.W., Suite 300 Washington, D.C. 20036-4702 202.331.1770 202.331.1749 (fax) www.personalcarecouncil.org</p>	

11. 기술이전 실적

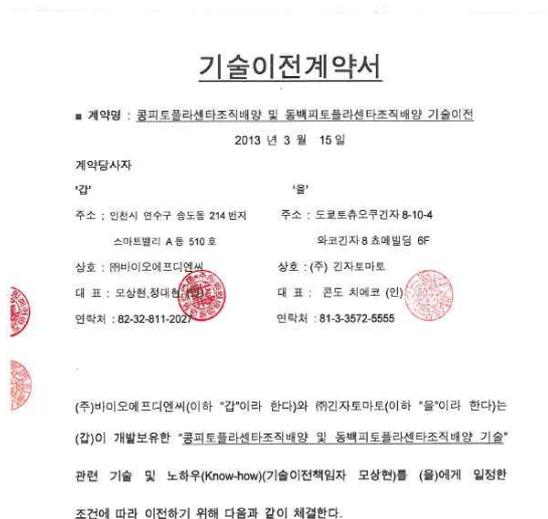
가. 대두 피토플라센타조직 배양 및 미세조류조직배양을 활용한 MAA 산업화

- 기술이전 업체 : (주) 긴자토마토
- 기술이전 내용 : 개발 보유한 “대두 피토플라센타조직 배양 및 미세조류조직배양을 활용한 MAA 산업화” 관련 기술 및 노하우(know-how)을 (주)긴자토마토사에게 기술이전 한다.
- 기술이전 일자 : 2013년 6월 1일
- 기술이전 비용 : 28,000,000 원



나. 콩 피토플라센타 조직배양 및 동백 피토플라센타 조직배양 기술이전

- 기술이전 업체 : (주) 긴자토마토
- 기술이전 내용 : 개발 보유한 “콩 피토플라센타 조직배양 및 동백 피토플라센타 조직배양 기술” 관련 기술 및 노하우(know-how)을 (주)긴자토마토사에게 기술이전 한다.
- 기술이전 일자 : 2013년 3월 15일
- 기술이전 비용 : 48,000,000 원



12. 판매실적

가. 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물 판매실적

품목	사업화 업체 개요			매출액 (단위 : 백만원)
	업체명	대표자	사업화형태	
Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Conditioned Media	(주)이효바이오 싸이언스	이효철	소소매 외	4.2
Black Bean Placenta Culture Extract	(주)이효바이오 싸이언스	이효철	소소매 외	4.5
Black Bean Placenta Culture Extract	LG생활건강	차석용	제조, 도매, 부동산	1.65
Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Extract	(주)제이티	김중택	제조, 도소매	1.44
합 계				11.79

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ 두(콩)류 자원 태좌조직배양 조건 확립

대두 태좌조직배양 및 캘러스 유도 배양 방법 확립을 위해 IBA 및 NAA가 대두 태좌조직배양 및 캘러스 유도에 미치는 영향을 조사한 결과, $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건의 IAA 2mg/L 처리구에서 대두 태좌조직배양 및 캘러스 유도율이 가장 높았다. NAA 2mg 처리구의 경우는 유도된 캘러스가 누렇게 갈변되어 자라는 경향을 보여 연속적인 배양에는 적합하지 않은 형태임을 알 수 있었다. (목표치: 100%달성)

○ 대두 태좌조직배양 추출물의 유용물질 함량 분석

대두 추출물과 대두 태좌조직배양 추출물과의 HPLC분석에 의해 증가된 peak만을 정제하여, 핵자기공명분광법(NMR)을 이용하여 물질을 분석하였다. 대두 태좌조직배양물 50% 에탄올 추출에 의해 증가된 물질이 Daidzein임을 확인할 수 있었다. (목표치: 100%달성)

○ 대두 태좌조직 배양 추출물에 대한 항노화 유효성 평가

대두 태좌조직 배양추출물의 피부 세포에 대한 독성효과를 확인한 결과, 냉수 추출과 열수 추출에 의해서는 세포독성이 보이지 않은 반면 50% 메탄올, 50% 에탄올 추출의 경우 고농도로 처리하였을 때 세포독성을 보였다. 4가지 방법에 의해 추출된 대두 조직배양 추출물의 다양한 효능평가를 진행한 결과 항산화, 미백관련 효능은 관찰되지 않았다. 반면에 주름관련 효능평가에서 50% 에탄올 추출의 경우 대두 태좌조직배양 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 Procollagen 생합성량이 증가함을 확인하였다. 또한 항염 효능평가에서 열수 추출에 의한 대두 태좌조직배양추출물은 대조군과 비교하여 50% 정도의 NO 생산을 저해하며 염증효과를 보였다. (목표치: 100% 달성)

화장품 원료로서 대두 태좌조직 배양 추출물에 의한 피부 항노화 관련 유전자 분석을 통해 유효성 평가를 진행한 결과 대두 태좌조직 배양 50% 에탄올 추출물을 처리한 경우 콜라겐 합성과 관련된 Procollagen, 피부 노화 억제와 관련된 sirtuin 6, MMPs 발현을 억제하는 TIMP-1, 세포노화에 관여하는 p16, p21의 mRNA 발현량이 증가함이 관찰되었고 콜라겐 분해에 관련된 MMP-1는 감소된 발현량을 보였다. 대두 태좌조직 배양 열수 추출물을 처리하였을 때에는 sirtuin 6, TIMP-1, p16, p21의 mRNA이 증가함이 관찰되었으며 MMP-1, MMP-3는 감소된 발현량을 보였다. (목표치: 100% 달성)

○ 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 유효성분 추출 공정 및 분석 표준화

대두 태좌조직배양물의 유효활성 물질을 확인하기 위하여 극성이 다른 여러 종류의 추출용매물(열수 추출, 냉수추출), 50% 에탄올, 50% 메탄올을 사용한 결과 냉수 추출에서 약 90%의 가장 높은 수득율을 보였으며 열수 추출 및 50% 에탄올 추출에서도 80% 이상의 수득율을 보였다. 대두태좌조직 배양물 유효성분을 HPLC, LC/MS/MS, NMR을 이용해 분석한 결과 대두 태좌조직배양물 50% 에탄올 추출에 의해 증가된 물질이 Daidzein임을 확인할 수 있었다. (목표치: 100% 달성)

○ 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물을 함유한 제형에 대한 안정화 제형개발

대두 태좌조직 배양체 유래 생리활성물질을 함유한 제형 2가지(로션, 크림)를 온도에 따른 경시변화 안정성 측정을 수행한 결과, 제형의 분리 및 침전, 변색, 응집과 같은 현상들이 관찰되지 않고 구성성분들이 안정적으로 지속됨을 확인할 수 있었다. (목표치: 100% 달성)

○ 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 누적 첩포에 의한 안전성 평가 및 인체적용 시험 연구

Common Bean Placenta Culture Extract / Pea Placenta Culture Extract / Black Bean Placenta Culture Extract에 대한 인체 피부 누적 첩포 및 감작성 시험을 한 결과 세 가지 Extracts는 모두 알레르기성 접촉 피부염 유발 가능성이 없는 비자극성의 안전한 물질로 판단되었다. (목표치: 100% 달성)

○ 분리·배양된 태좌의 생리활성물질 분석 및 대량 생산조건 최적화

대두 태좌조직 대량 배양을 최적화하기 위하여 배양에 영향을 주는 여러 인자들을 시험하였다. 배지 내 당 농도가 대두 태좌세포 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하고자 당 농도를 달리하여 배양한 결과, 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 생산에 적합한 배지 내 초기 당 농도는 1%로 결정하였다. 또한 생물반응기 내 공기공급량이 대두 태좌세포의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 공기공급량을 달리하여 배양하며 관찰한 결과를 토대로 배양 전 기간 동안 0.05vvm 공급하는 것으로 결정하였다. 또한 초기 접종밀도는 15g l⁻¹로 결정하였다. 최적화된 배양조건으로 대용량 생물반응기를 이용하여 대두태좌조직 배양체의 성장결과, 대두태좌조직 배양체의 생체중과 건물중은 생물반응기의 크기가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으나 건물 1g 당 함유하고 있는 총 phenolics, flavonoids 함량은 배양용기의 크기와 비례적으로 증가하였다. 앞선 결과들을 토대로 대두 태좌조직 배양체 Scale-up 생산 공정도를 확립하였다. (목표치: 100% 달성)

○ 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물 국제화장품원료협회 인허가 10건 완료 (목표치: 100% 달성)

○ 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 조성물 특허 출원 3건

본 과제의 성과물로 대두 태좌 조직 배양물 또는 그 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물 (출원번호 10-2012-0077888), 식물 세포 내 생리활성물질 함량 증가를 위한 고주파 장치 및 이를 이용한 식물 세포 배양방법(출원번호 10-2012-0127017), 두류 태좌 세포 배양 추출물을 함유한 향노화, 항염, 항산화 화장품 조성물(출원번호 10-2013-0081409) 국내 조성물 특허 출원 완료함. (목표치: 100% 달성)

○ 두(콩)류 태좌조직 배양 추출물의 소재 사업화

본 과제를 통하여 유효성 및 안전성이 검증되어 인허가 완료된 원료 Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Conditioned Media, Black Bean Placenta Culture Extract, Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Extract 등이 LG생활건강 비온드팀에 액티브 기초원료로 채택되어 12월 런칭을 앞두고 있고, 마스크팩 및 하이드로겔패치 전문업체에 판매되고 현재까지 11,790,000 원 매출 성과를 이루었다. (목표치: 100% 달성)

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용 계획

가. 연구개발결과 성과

연차별 성과목표	성과지표	측정방법	목표치	달성치
두(콩)류자 원생기 반응기 이용한 조직배양 기술의 산업적 응용	학술지 논문게재 건수	SCI급 학술지 게재 논문건수 × 1	1건	3건
		비 SCI급 학술지 게재 논문건수 × 1	2건	2건
	국내외 지적재산권 확보 건수	국내 특허 출원 건수 × 1	3건	3건
		국내 특허 등록 건수 × 1	1건	-
	국제화장품원료협회 인허가 건수	등재 건수 × 1	10건	10건
	기술이전	기술이전 건수 × 1	1건	2건
	사업화(상품화)	판매실적 × 1	1건	4건
	교육지도	교육지도 × 1	1건	4건
	언론홍보	언론홍보 × 1	2건	3건
고용창출	고용창출 × 1	-	6명	
합 계				

1) 논문게재 성과 (SCI급 학술지 게재)

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	CO2-enriched microenvironment induces biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in bioreactor cell suspension cultures of Morinda citrifolia (L.): the role of antioxidants and enzymes	Young Se Jang	Kee-Yo Paek	Md. Abdullah Baque, Md. Humayun Kabir Shiragi, Sang-Hyun Moh, Eun-Jung Lee,	Australian Journal of Crop Science (AJCS)	submission	국외	SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of <i>Morinda citrifolia</i> (L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor	Md. Abdullah Baque	Kee-Yo Paek	Md. Humayun Kabir Shiragi, Sang-Hyun Moh, Eun-Jung Lee,	In Vitro Cellular and Development Biology - Plant	submission	국외	SCI
2013	A sensitive hydrogen peroxide optical sensor based on polysaccharide stabilized silver nanoparticles	Chandrakant K. Tagad	Sushma G. Sabharwal	Hyeong U. Kim, R. C. Aiyer, Pooja More, Taesung Kim, Sang Hyun Moh, Atul Kulkarni,	The Royal Society of Chemistry (RSC) Advances	submission	국외	SCI

2) 학술대회 발표 성과

발표일	발표명	저자	학술대회명	국내외 구분
2013년 5월31일	대두태좌조직배양 추출물의 주름 개선 효과	조문진, 신동선, 이진형, 모지홍, 최수용, 김은애, 서효현, 이정훈, 조석형, 김영준, 모상현	(사) 한국산학기술학회 2013년도 춘계학술발표논문집II	국내
2013년 5월16일	인간 피부섬유아세포 (Human dermal fibroblast)에서 대두태좌 조직배양 추출물의 항노화 효과	조문진, 이현이, 정해수, 서효현, 강효석, 모지홍, 신동선, 김형식, 최수영, 이정훈, 모상현	한국생화학분자생물학회	국내

3) 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	대두배양액의 추출물 함유 조성물	(주)바이오에피디엔씨	대한민국	10-2012-0077888					
2012	식물성 내성량 위과 및 배양 방법	(주)바이오에피디엔씨	대한민국	10-2012-0127017					
2013	두류 배양액의 추출물 함유 조성물	(주)바이오에피디엔씨	대한민국	10-2013-0081409					

4) 국제화장품 원료협회 인허가 10건 완료

	Trade Name	INCI Name
1	Pea Placenta Culture Extract	Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Extract
2	Common Bean Placenta Culture Extract	Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Extract
3	Black Bean Placenta Culture Extract	Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Extract
4	Phytola-PSM	Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Conditioned Media
5	Phytola-PVM	Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Phytoplacenta Conditioned Media
6	Phytola-GMM	Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Conditioned Media
7	PhytoCalli-GMC	Water (and) Glycine Max (Soybean) Callus Culture Extract
8	PhytoCalli-PVC	Water (and) Phaseolus Vulgaris (Kidney Bean) Callus Extract
9	PhytoCalli-PSC	Water (and) Pisum Sativum (Pea) Callus Extract
10	Magnolia-P	Water (and) Magnolia Kobus Phytoplacenta Extract

5) 기술이전 2건

산업지원 성과 (단위 : 건)			
기술지도	기술이전	기술평가	합계
	2		

6) 사업화(상품화) 및 활용계획

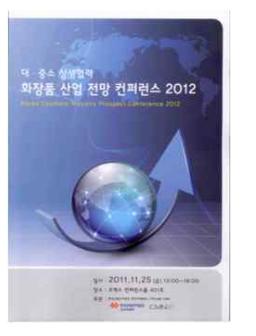
(단위 : 백만원)

사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	해당연도 매출액	매출액 합계
	업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
Glycine Max (Soybean) Phytoplacenta Conditioned Media/ Black Bean Placenta Culture Extract	(주)이효바 이오싸이 언스	이효철	25	소소매 외	-	8.7	8.7
Black Bean Placenta Culture Extract	LG생활 건강	차석용	3682	제조, 도매, 부동산	-	1.65	1.65
Pisum Sativum (Pea) Phytoplacenta Extract	(주)제이 티	김종택		제조, 도소매		1.44	1.44
합 계						11.79	11.79

- ◎ TOAKASEI를 통하여 일본콜마 R&D Skin Care 팀의 Manager인 Shunsuke Tokunaga 와 대두 태좌조직배양 추출물 신소재를 소개
 - 식물조직배양기술을 통하여 대두의 태좌조직을 대량생산, 표준화된 지표물질 분석법 등을 2013년 5월 일본 요코하마에서 개최된 CITE JAPAN 2013에 참가하여 대두태좌조직배양 추출물 소재를 제안하였고, 기술적인 지원을 현재에도 진행하고 있다.
- ◎ TOAKASEI를 통하여 NOF H&B Products research group의 Takashi Matsufufi, Takeshi Tamura 에게 대두 태좌조직배양 추출물 신소재를 소개
 - 식물조직배양기술을 통하여 대두의 태좌조직을 대량생산, 생리활성물질 극대화하는 유인제 처리법, 표준화된 지표물질 분석법 등을 2013년 5월 일본 요코하마에서 개최된 CITE JAPAN 2013에 참가하여 대두태좌조직배양추출물 소재를 제안하였다.
- ◎ ‘대두태좌조직배양기술’ 에 대한 기술이전을 마친 (주)긴자토마토사가 참석중인 식품박람회 부스에 참관하여 대두태좌조직배양체의 기능성식품으로서의 활용하기 위한 분석법과 지표물질에 대해 논의하였고, 파우더 상태의 샘플 전달하였다.
- ◎ LG 생활건강, 미샤, 올리브영, 네이처리퍼블릭, 코스맥스, 코스메카코리아, 한국콜마 등의 국내 장업사, 코스메슈티칼 브랜드 보유 피부과, 보령메디앙스 등 기초제품 전라인 및 그 밖의 국내 OEM업체를 통해 안전성 분야를 강화하여 이를 통한 브랜드 시장 진출 계획
- ◎ 현재, LG생활건강 타임리스 피토플라센타 크림 & 에센스 두 제품에 공급되고 있으나, 점차 전 라인에 공급하기로 협의

구 분		사 업 화 년 도				
		(2014년) 과제종료후 1년	(2015년) 과제종료후 2년	(2016년) 과제종료후 3년	(2017년) 과제종료후 4년	(2018년) 과제종료후 5년
사 업 화 품 목		화장품 소재 및 완제품				
투 자 계 획	인 건 비	2,000만원 X 5	2억	3억	7억	10억
	재료비 및 설비투자비	2억	4억	7억	8억	10억
	경상운영비	1억	2억	3억	4억	6억
	계	4억	8억	13억	19억	26억
생 산 계 획		1억	2억	5억	10억	15억
판매계획 (단위:억 원)	내 수	5억	10억	13억	18억	20억
	수 출	5억	10억	15억	22억	40억
	계	10억	20억	28억	40억	60억

7) 교육지도

	<p>□ 성과 및 기술명</p> <p>○주요 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국제 화장품과학 세미나 (International Cosmetic science seminar) 참석 - 일시 및 장소 : 2011년 10월 6일/ 인천 송도 컨벤시아 - 발표자: 모상현 대표이사(총괄 책임자) <p>○의의 및 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 안티 에이징 물질에 대한 식물 세포 배양 기술(Plant Cell Culture Technology for Anti-aging Materials) 및 사업화가능성 개진
	<p>□ 성과 및 기술명</p> <p>○주요 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2012년 화장품 산업 대중소 상생협력 전망 컨퍼런스 참석 - 일시 및 장소 : 2011년 11월 25일/ 코엑스 컨퍼런스룸 401호 - 발표자: 모상현 대표이사(총괄 책임자) <p>○의의 및 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 글로벌 화장품 신소재 개발 동향 : 식물세포배양을 활용 항노화 신소재 소개
	<p>□ 성과 및 기술명</p> <p>○주요 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 『2011 홍콩국제미용전(Hong Kong Electronics Fair 2011)』 출품단 참가 - 일시: 2011년 11월08일 ~ 11월12일 (5일간) - 장소: Hong Kong Convention & Exhibition Center - 참석자: 모상현 대표이사(총괄 책임자) - 참가주체: (주)바이오에프디엔씨 외 화장품관련업체 <p>○의의 및 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식물세포배양 응용 연구개발소개
	<p>□ 성과 및 기술명</p> <p>○주요 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - ‘ 2012 코스메틱 클러스터 활성화를 위한 국제심포지엄 ’ 발표 - 일시: 2012년 2월 17일 (금) 10:00 ~ - 장소: 제주도 라마다호텔 8층 탐라홀 - 참석자: 모상현 대표이사 (총괄 책임자) - 주관: 제주테크노파크 코스메틱클러스터사업단 · 용암해수사업단 경희대피부생명공학센터, 포항테크노파크 바이오정보지원센터 - 주최: 제주특별자치도 <p>○의의 및 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신소재 화장품 원료인 식물세포응용 연구개발소개

- 머니투데이 13년 1월 24일, [브랜드 파워대상] 바이오에프디엔씨 기능성 화장품 부분에 식물유래피토크미칼 융합 소재 소개

바이오에프디엔씨는 다양한 펩타이드 소재류, 식물 소식배양을 통한 칼러스(Callus) 소재류, 불기세포 배양액 소재류, 식물유래 피토크미칼 융합 소재류를 연구 개발해 여성들의 이목을 사로잡고 있다. 2005년에 설립한 바이오에프디엔씨는 최첨단 생명기술로 펩타이드, 식물 칼러스와 같은 항노화 원료를 개발하는 R&D 중심 벤처기업이다. 바이오에프디엔씨(BIO-FD&C)는 BIO-Food, Bio-Drug, Bio-Cosmetic을 의미한다.

바이오에프디엔씨 모상현 대표는 "There is no eternal youth" 즉, 영원한 젊음은 불가능하지만 항노화 연구를 통해 조금 더 건강한 젊음을 할 수 있을 것이다"며 "행복은 바이오에프디엔씨의 목표이며, 정도는 우리의 자질이며, 고객은 우리의 스승이며, 인재는 우리의 자산이며, 세계는 우리의 무대라는 기업 경영이념 아래 창립 이후 지속적인 항노화 연구개발에 최선을 다하고 있다"고 말했다.

바이오에프디엔씨는 바이오 벤처기업으로서 기능성 화장품, 피부질환 치료제에 적용 가능한 항노화소재를 개발하는데 초점을 맞추고 있다. 현재 보유한 지식재산권은 총 37건으로 이 가운데 '펩타이드 유도체 및 그를 포함하는 화장료 조성물'에 관한 연구가 미국과 유럽, 일본 3개국에서 출원되는 등 공식적으로 기술력을 인정받았다. 2008년에는 다양한 한방 및 자생 천연물로부터 아토피 피부염에 탁월한 항균성 신규 유전자를 발견, 세계유전자은행(Gene Bank)에 등재되기도 했다.

특히 현재 40여 종의 펩타이드와 50여 종의 식물 칼러스를 개발하여 신규 원료로 미국화장품원료협회(PCPC)에 등재되어 있다. 보다 진보된 생명과학기술로 더욱 다양하고 고기능화가 요구되는 피부 생물학 분야에서 천연물, 기능성 펩타이드, 기능성 단백질 및 식물줄기세포 소재를 바탕으로 하고 있다. 항노화 시장 및 피부질환 시장을 개척해 R&D를 기반으로 기업브랜드 가치를 창출함은 물론, 우수한 제품들을 바탕으로 수출 증대 경쟁력을 확보하고, 나아가 인간 항노화 발전에 기여하는데 앞장서고 있다.

사진표가기 이유인내



바이오에프디엔씨의 가치는 혁신적인 변혁을 위한 창조, 다양성, 열정이다. 지속적이고 혁신적인 연구개발을 통해 신개념의 기능성 화장품 시장을 선도하고, 세계 화장품 시장을 개척하고자 하는 꿈과 소비자만족을 위해 최선을 다하고 있다. 이러한 노력의 결실로 지난 2010년 6월 바이오에프디엔씨는 랑콤, 비오렘 등 유명 브랜드를 보유한 프랑스 로레알그룹과 항노화 신물질에 대한 원료효능 평가 계약을 맺은바 있다.

한편 지난해 12월 13일 바이오에프디엔씨는 전남 화순군 화순읍 내평리 저소득층에 화장품 세트 지원, 소년소녀가장들과 지원이 필요한 학생 6명에게 장학금을 지급하는 등 이웃돕기를 통해 기업의 사회 환원을 몸소 실천했다.

모 대표는 "2005년 회사 창립부터 오늘에 이르기까지 건강하고 아름다운 인류의 삶을 위해 꾸준히 기능성 및 고부가가치 생물소재의 개발과 산업화에 매진하고 있다"며 "앞으로도 최고의 생명공학 기업 및 연구소가 되기 위해 꾸준히 노력할 것이다"고 말했다

9) 경제사회 파급효과

고용창출 성과 (단위 : 명)		
창업	사업체 확장	합계
	6	6

2. 연구 성과 활용계획

1) 화장품으로의 상품화 활용방안

- 국내 최대 OEM/ODM 기업으로 구축되어 있는 유통망(거래처 약 300여 업체)를 통한 화장품 시장 적용
- 기능성 주름개선 및 미백 화장품에 적용: 식물 태좌 조직배양체 유래 유효성분 함유 주름개

선 기능성 화장품 또는 미백 기능성 화장품 적용

- 자외선에 의한 피부 보호용 화장품 적용: 자외선 차단 기능성 화장품 내 피부 보호제 및 After skin care 제품 적용
- 여드름, 아토피 등 피부질환 완화 화장품에 적용: 여드름 및 아토피 완화 화장품 등 피부과 판매 제품으로의 적용
- 기타 기능성 화장품 및 의약외품 소재로의 적용: 염증 완화, 가려움 완화 등의 독특한 기능성 화장품 및 발모, 양모 등의 의약외품 소재로의 적용과 이를 이용한 제품 적용
- 화장품 및 제약기술의 fusion을 통한 독특한 제약 제조 기술 및 KGMP생산 설비 및 기유통망을 이용한 의약품 소재 및 제품으로의 적용
- 향염 및 향알리지 연고류 소재 및 제품 적용
- 탈모 및 여드름 치료제로의 소재 및 제품 적용

2) 파급 효과

- 우수한 생리활성 성분을 함유하고 있으나 원재료의 수급 문제, 수확 시기 또는 장소에 따른 불규칙한 함량 등으로 인하여 제품에 활용되지 못하는 식물유래 고기능성 생리활성소재에 대하여 식물 조직배양 기술을 이용한 표준화 생산 기술을 개발하는 경우 적용범위가 광범위하여 막대한 효과가 예상
- 국내 시장에 수입되는 약용식물로부터의 기능성 화장품 원료를 대체하는 효과 및 이를 이용한 주름 방지 및 미백 등의 기능성 화장품 시장의 활성화 및 수출증대 기여
- 새로운 조직배양 기술로 개발된 식물 태좌 조직 배양체 유래 고기능성 생리활성 소재의 경우 원천적인 지적재산권 확보로 기능성 소재로서도 전세계 시장 대상 상업화 가능
- 확립된 조직배양 기술에 의한 생리활성 소재의 유도체 개발 기술을 기반으로 하여 타 분야 및 타대상 식물에 응용하여 보다 많은 부가가치 제품 및 소재를 개발가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

천연 기능성화장품의 경우 핵심성분으로 사용되고 있는 많은 것들이 생물자원에서 얻은 것들이라는 사실로 미루어 기능성 화장품의 소재를 계속적으로 탐색하고 효능을 검증해서 대량생산으로 연결시키는 일은 차별화된 농업과 경쟁력 있는 농업으로 우리의 농업을 개선시킬 수 있는 계기를 만들어 줄 수 있다. 기능성 화장품은 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품이라 볼 수 있다. 일반 화장품이 안전성을 강조한데 비해 기능성 화장품은 안전성외에 특히 효능 효과를 강조하는 것이 특징이 있다. 농업생물자원으로부터 기능성화장품 소재가 탐색되면 대량생산, 분리, 정제과정을 거쳐 기능성을 갖는 화장품으로 개발할 수 있을 것이다. 워낙 소비자자들의 욕구가 강하고 사용범위가 여성 중심에서 남성으로까지 확대되고 있고, 남녀노소 구분 없이 화장품의 사용범위가 확대되고 있는 추세이어서 농업생물자원으로부터의 기능성화장품 개발 분야에서 산-학-연-관이 힘을 모아 확실한 제품 몇 개를 개발하는 선택이 필요하다.

제 7 장 참고문헌

1. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 333–338 (2004)
2. *The Plant Cell, Regulation of Ovule Development* (2004) 16: 32–45
3. *Trend in Plant Science, Molecular Control of Ovule Development* (1996) 1:228–232
4. *Journal of Plant Physiology, Effects of Endosperm and Placenta on Development of Capsella Embryos in Ovules cultivated in vitro* (1985) 118(2): 127–137
5. *Plant Physiology, Comparative Transcriptional Profiling of Placenta and Endosperm in Developing Maize Kernels in Response to Water Deficit* (2003) 131: 568–582
6. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology, Accumulation of Capsaicin in Seed, Pericarp and Placenta of Capsicum annum L Fruit* (2008) 17(1): 23–27
7. Hong Yunho. *Food Physiological Active Substance Science*. Chonnam National University Press. Gwangju, Korea pp. 13–72 (2009)
8. Kalt W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidant. *J. Food Sci.* 70: 11–19 (2005)
9. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Agr. Food Chem.* 63: 1035–1042 (2000)
10. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53: 75–100 (2009)
11. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78: 2872–2888 (2006)

주 의

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