

315013-4

농생명산업기술개발사업 제4차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002901-01

생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터 의약품 소재생산 및 산업화 기술 최종보고서

2019. 11. .

주관연구기관 / 충북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 동국제약(주), 한의학연구원

생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터
신약용 소재생산 및 산업화 기술 최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터 식의약품 소재생산 및 산업화 기술” (개발기간 : 2015. 08. 14 ~ 2019. 08. 13.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자)
협동연구기관명 : 동국제약(주) (대표자)
참여기관명 : 한의학연구원 (대표자)

2019. 11.



주관연구책임자 : 박소영
협동연구책임자 : 정구영
참여기관책임자 : 김동선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315013-4	해 당 단 계 연 구 기 간	4년	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	기재하지 않음			
	세부 과제명	생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터 식의약품 소재생산 및 산업화 기술			
연구책임자	박소영	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 270,000천원 계: 670,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발 비	정부: 1,600,000천원 민간: 1,080,000천원 계: 2,680,000천원
연구기관명 및 소속부서명				참여기업명 동국제약(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	12	8	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) | 보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 과제는 생물반응기 시스템을 활용하여 본 연구팀에 의해 식품원료로 기인정 된 산삼부정근과 천연 식의약품원료로 유망한 에키네시아와 센텔라아시아티카의 고기능성 원료 대량생산체계를 구축하고, 비임상과 임상을 통해 식·의약품원료로서의 안전성을 확보하여 최종적으로 식물기반 기능성 의약품 소재의 개발 및 제품화를 통한 산업화를 하고자 함</p> <p>□ Pilot-scale 생물반응기를 이용한 고기능성 식물 식·의약품원료 대량생산</p> <p>기술개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 식·의약 원료용 고기능성 세포주 개발 ○ 기능성 물질 함량증진 기술 개발 ○ 고기능성 원료의 대량, 고품질 생산조건 최적화 ○ 생물공정 제어를 통한 고기능성 원료의 생산공정 최적화 ○ Pilot-scale 생산시스템 이용 고기능성 식·의약품원료 바이오메스 대량생산 <p>□ 고기능성 식물 식·의약품원료의 효능 및 안전성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 생산원료의 독성시험 및 효능평가 <p>□ 생물반응기 생산 고기능성 식물 식·의약품원료의 산업화</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 식·의약 원료용 소재 평가
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구에서는 산삼배양근과 에키네시아, 센텔라아시아티카의 부정근 생물반응기 배양 조건을 최적화하고 체계적 생산 시스템을 확립하였음. 기능성물질 함량 증진 및 Pilot-scale 생산시스템에서 유효성분 고함유 바이오메스 대량생산을 위해 생물반응기 형태에 따른 바이오메스를 조사한 결과 Ballon타입이 Drum type에 비해 산삼부정근과 센텔라아시아티카 모두에서 생산량이 높아 대량생산에 적합함을 확인하였으며, 센텔라아시아티카의 기능성물질 증진을 기능성 부정근라인 선발을 하였으며, 최적의 배양 조건 확립하였음. 또한 센텔라아시아티카 부정근과 야생 병풀식물체의 특이적 기능성물질 함량 비교시 부정근에서 더 높음을 확인하였음. 또한 센텔라아시아티카 부정근의 특이성분을 발굴 및 구조를 구명하였으며, 항염 및 면역증강 효능을 확인하였음. ○ 또한 산삼배양근의 표준화와 생산공정을 개발하였으며

	<p>Ginsenoside Rg3, Rh1, RG5, Compound K의 동시분석법을 개발하여 이를 통해 함량기준을 제시하였고 품질관리법이 개발되었음. 센텔라아시아티카 부정근을 이용하여 in vitro시험을 수행하여 항염증 효과가 우수함을 확인하였으며, 유효 및 지표성분 추출조건을 확립하였음.</p> <p>○ 그리고 산업화를 위하여 산삼배양근 유효성분의 독성평가를 위해 설치류에 경구 투여하였을 때 산삼배양근추출물농축액의 무독성량은 암수 모두 300mg/kg/day로 판단되었음. 또한 건강기능식품 소재 개발을 위해 지표성분으로 Rg3, Rg5, Rk1을 선정 및 기준을 설정하였으며, HPLC이용 지표성분 분석법을 확립하였음. 센텔라아시아티카 식물체와 배양근의 크로마토그램을 비교분석하여 식물체와 달리 배양근에서 특이적으로 나타나는 성분을 확인하여 이를 지표성분으로 활용할 계획임</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ BT 기반 식물세포배양을 통해 국제적으로 고부가가치 산물인 천연물을 생산하는 분야에서 우리나라는 세계적 수준 특수 기반 기술을 원천기술화</p> <p>○ 글로벌 요구 규격에 적합한 품질 관리, 효율성 제고 공정 기술 개발</p> <p>○ 기능성식물 원료의 안전성/안정성 확보 및 품질 제고</p> <p>○ 연중 계획생산이 가능한 생물반응기 시스템에서의 대량생산 기술, 환경조절 기술개발 완료</p> <p>○ 식물세포 및 기관 배양을 통한 향후 보건의료분야에 사용될 의약품 원료 생산 산업을 독보적으로 확립해 나갈 것으로 기대</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>생물반응기</p>	<p>약용식물</p>	<p>기능성 물질</p>	<p>바이오매스</p>	<p>생물공정</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Bioreactor</p>	<p>Medicinal crop</p>	<p>Functional substances</p>	<p>Biomass</p>	<p>Biological process</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
1절. 연구개발 목적	6
2절. 연구개발의 필요성	6
3절. 연구개발 범위	16
2. 연구수행 내용 및 결과	20
1절. 제1세부: Pilot-scale 생물반응기를 이용한 식물 식의약 원료 대량생산 시스템 개발 (충북대학교, 주관)	20
2절. 제1협동: 고기능성약용식물의 유효성분 분석 및 표준추출물 개발 (한국한의학 연구원)	105
3절. 제 2협동기관: 기능성원료 인허가 및 제품화를 통한 배양근의 산업화 기술개발 (동국제약)	125
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	208
1절. 목표	208
2절. 목표 달성 여부	208
3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)	209
4절. 관련분야 기여도	210
4. 연구결과의 활용 계획 등	211
붙임. 참고 문헌	212

<별첨 1> 연구개발보고서

<별첨 2> 주관연구기관의 자체평가의견서

<별첨 3> 연구결과 활용계획서

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

- 본 과제에서는 기 구축된 생물반응기 시스템을 활용하여 식품원료로 인정(2003년 4월)된 산삼부정근(혈행개선)과 천연 의약품원료로 유망한 에키네시아(면역증강)의 고기능성 의약품원료 대량생산체계를 구축 하고자 함
- 이를 이용하여 효능 및 독성시험을 통해 의약품원료로서의 안전성을 확보를 통해 최종적으로 안정적이고 규격화 된 식물원료 기능성 의약품을 개발, 신규 등록하는 것을 목표로 함

고기능성 의약품원료 대량생산체계 구축 및 규격화 된 식물원료 기능성 의약품을 개발, 신규 등록



2절. 연구개발의 필요성

1. 식물을 이용한 의약품 및 기능성 원료개발 관련 연구분야 및 시장 확대 잠재성 증가

가. 기본적으로 자연계에 존재하는 식물체는 무한한 자원의 보고이며 인류에게 식량자원이 될 뿐만 아니라 향료, 의약품, 색소들의 원료로 사용가치가 매우 높음

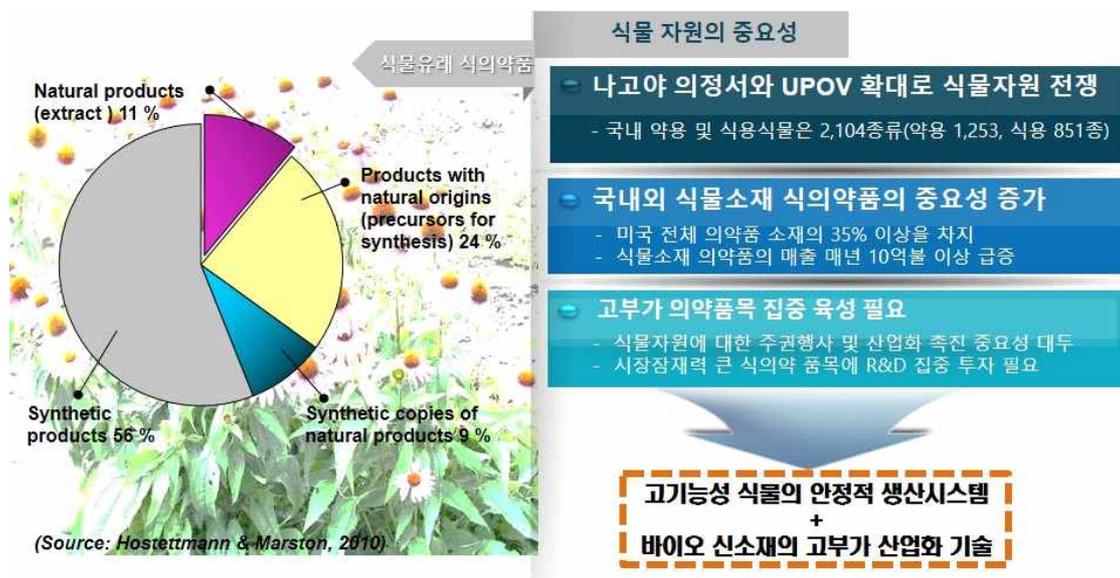
- (1) 순수한 식물유래 의약품관련 세계시장은 1997년에 226억불에 달하였고, 해마다 15~20% 이상 증가하고 있음
- (2) 미국의 경우 공공기관 조사 결과 1991년 식물의약품 이용률이 3%에서 1998년 37%, 2005년 52%로 크게 증가하였고 FDA가 승인한 120여종의 의약품에 대한 시장 규모만

도 약 10조 달러에 이릅니다. 또한 미국시장의 식물 의약품 판매도도 매년 10억불씩 급상승하고 있음

(3) 2010년 기능성 식품의 세계시장은 800억 달러 규모로, 미국이 3,000만 달러로 세계 최대의 시장이고 그 뒤를 일본 2,000만 달러, 유럽 1,500만 달러에 이릅니다

나. 실제로 사용되고 있는 의약품의 25% 이상이 식물에서 유래된 물질이나 현재까지 의약품, 화장품 등의 개발용으로 연구가 진행 중인 식물 종은 전체 30만종의 식물체 중 5,000여종에 지나지 않음

다. 이에 따라 대부분의 식물 중에서 아직까지 유효성분을 탐색하는 연구가 계속되고 있어서, 식물은 다음 세기에도 신약개발을 위한 화학적 모델이 될 뿐 아니라 새로운 천연산물을 공급하는 원료로 각광받고 있음



[그림] 식의약품 원료로 이용되는 식물유래 천연자원

라. 세계적으로 식물유래 기능성 식품, 치료제 등 제품 응용범위의 확대로 농림업이 점차 식품, 제약산업 등과 융복합화 되는 추세임

- (1) 신종플루 치료제인 타미플루 : 중국 자생식물인 ‘스타아니스(팔각나무)’ 종자에서 성분을 추출한 신약
- (2) 버드나무의 salicin으로부터 해열진통제인 aspirin, 엉겅퀴에서 간기능 개선제(silymarin), 은행잎에서 혈액순환 개선제(ginko-flavonoid), 개똥쑥으로부터 말라리아 치료제 (artemisinin) 개발 등

[표] 식물 유래 의약품과 그 가치

생산물	이 용	식물명	가격(kg당 US\$)
Ajmalicine Artemisinin	항고혈압제	<i>Cath. roseus</i>	37,000
Ajmaline	항말라리아제	<i>Artemisia annua</i>	400
Acinitine	-	<i>Ra. serpentina</i>	75,000
Berberine	-	<i>Acotinum spp.</i>	n/a
Camptothecin	장염억제	<i>C. japonica</i>	3,250
Capsaicin	항종양제	<i>Camptotheca acuminata</i>	432,000
Castanospermine	유도자극제	<i>Ca. frutescens</i>	
Codeine	배 당체억제제	<i>Castanospermum australe</i>	750
Colchicine	진정제	<i>P. somniferum</i>	n/a
Digoxin	항종양제	<i>Colchium autumnale</i>	17,000
Diosgenin	강심제	<i>Di. lanata</i>	35,000
Ellipticine	스테로이드성 전구체	<i>Dioscorea deltoidea</i>	3,000
Emetine	항종양제	<i>Orchrosia elliptica</i>	1,000
Forskolin	-	<i>Cephaclis ipecacuanha</i>	240,000
Ginsenosides	기관지천식	<i>Coleus forskolii</i>	1,500
Morphine	강장제	<i>Panax ginseng</i>	n/a
Podophyllotoxin	진정제	<i>P. somniferum</i>	n/a
Quinine	항종양제	<i>Podophyllum petalum</i>	340,000
Sanguinarine	항말라리아제	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	n/a
Shikonin	항피로제	<i>Sanguinaria canadensis</i>	500
Taxol	항바이러스제	<i>L. erythrorhizon</i>	4,800
Vincristine	항암제	<i>Taxus brevifolia</i>	4,500
Vinblastine	항백혈병제	<i>Cath. roseus</i>	600,000
	항백혈병제	<i>Cath. roseus</i>	2,000,000
			1,000,000

n/a: not available. (Ravishankar와 Ramachandra Rao, 2000)

2. 나고야 의정서와 품종보호권 확대로 세계 각국은 유전자원의 확보, 보호 및 활용을 위한 경쟁 치열

가. 국제식물신품종보호연맹(UPOV) 가입으로 품종보호권 설정 품종에 대한 로열티 지급 의무 발생 및 품종보호권 설정 품종 급증

(1) 품종보호 대상작물 종 수: ('98) 27 → ('02) 113 → ('08) 223

나. 이에 유전자원에 대한 규제 및 활용을 위한 국가 간 경쟁이 심화되고 있으며, 국내외 자생식물 유전자원 확보에 따른 종 다양성 증가 및 산업화 기반을 위한 임산자원 특성 연구 활용기반 구축이 절실히 요구되고 있음

다. 우리나라는 지형·지질·기후가 다양하여 온대지역 국가 중 상대적으로 식물종이 풍부한 나라이며, 선점한 유전자원에 대한 변이 특성 분석을 통한 유용자원의 발굴 용이

(1) 국내식물자원: 8,896종(자생식물 8458, 외래식물 438)

(2) 자생식물자원: 8,458종(목본 1,178, 초본 2,980, 선대식물 등 4,300)

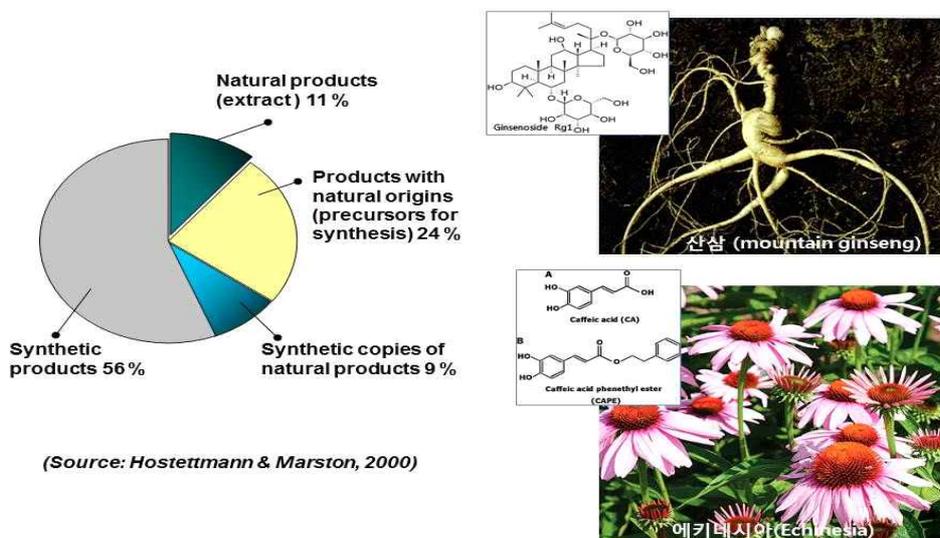
라. 국내 약용식물의 생산능가 및 생산면적은 감소추세이나, 재배기술 발달로 생산량은 오히려 증가추세

- (1) 생산자(면적): ('04) 38천호(12천 ha) → ('06) 35천호(11천 ha)
- (2) 생산량(생산액): ('04) 45천톤(4,051억원) → ('06) 57천톤(5,635억원)

마. 국내 약용 및 식용식물은 2,104종류(약용 1,253, 식용 851)로 풍부

- (1) 약용식물은 한약재뿐만 아니라 식용으로 이용되고 있으며, 일부는 건강 기능식품 또는 지역 특산식품으로 산업화
- (2) 국내생산 한약재 119종 중에서 67종은 약용보다 식품으로 주로 이용
- (3) 약용식물(한약재) 제조업체의 생산규모는 현재 약 2조원으로 2010년에는 3조원으로 확대될 것으로 전망

※ 한약·한약제재 33%, 기능성식품·음료 42%, 한방화장품 24%



[그림] 식물 기능성원료 이용 현황 및 약용식물 산삼과 에키네시아

3. 생물반응기(Bioreactor) 시스템

가. 생물반응기 시스템의 장점

- (1) 생물반응기는 통제된 시설내에서 빛, 온도, 습도, 양액, 대기가스 농도 등의 재배환경을 인공적으로 제어하여 계절이나 날씨에 관계없이 식물세포 및 조직을 공산품처럼 연속 생산하는 첨단 식물생명공학 기술의 한 형태임
- (2) 생물반응기는 광의의 개념에서 식물이 자라는 환경을 인공적으로 컨트롤하면서 한정된

면적(시설내, 혹은 시스템)에서 최고의 생산성을 낼 수 있다는 점에서 미래의 식물원료 생산의 방안으로 주목 받고 있음

- (3) 이러한 BT 세포공학적 기술을 이용하여 고부가가치 약용식물의 세포 및 조직을 온도, 양액 등을 무균적으로 컨트롤 환경하에서 대량생산하는 **BT 기반의 식물세포공장 (Pilot-scale plant cell factory)인 생물반응기(Bioreactor)**'는 1990년대 후반 우리나라에 도입되어 미국, 일본, 우리나라 등지에서 현재까지 고부가 식물 원료생산을 위해 꾸준한 연구와 산업적 적용이 이루어져 와서 유용한 기능성 식의약 원료생산의 경제적이며 미래 지향적인 새로운 대안이 되고 있음



4. 'BT 기반 생물반응기'를 이용한 고부가 기능성원료 대량생산 시스템 개발

가. 식물자원의 경우 첨단 생명공학기술을 활용한 지속적인 R&D 노력으로 고부가 창출이 가능한 사례가 다수임

(1) 독일은 은행나무의 ginkgo-flavonoid 성분을 이용한 혈액순환장애 치료제 개발로 연간 20억불(약 2조 4천억 원) 이상의 매출액 실현

나. 약용식물 중 고부가 기능성종들이 많으나 야외에서 노지 재배시 생장이 더디고 수확까지 오랜 기간이 소요되고 재배지도 한정되어 있어 식물체에서 유용한 물질을 추출하여 상업화하는 데에는 여러 가지 제약이 따르고 있음

다. 또한 토지재배를 통해 원료를 취하는 고부가 식약용 식물의 경우 기상요건을 포함하는 환경적 요인, 재배, 수확 및 추출을 포함한 생산 경제적 요건, 국가 간 이해관계 등의 요인에 좌우되지 않고 안정적으로 이용하기 위해서는 새로운 생산방법이 요구됨

라. BT 기술요소 중 '**Pilot-scale 생물반응기**'를 이용한 **기능성 원료의 대량생산** 기술을 개발함으로써 이러한 고부가 특용임산자원의 세포, 부정근을 대량배양한 후 이로부터 고부가성 유용성분을 대량생산하는 시스템이 필요함

마. 본 연구팀은 1998년부터 약용식물세포배양 및 원예작물의 종묘생산 등의 목적으로 생물

반응기 시스템 연구를 시작하여 2000년대에는 활발히 약용식물 생물반응기 배양 연구하여 이에대한 원천기술을 확보하고 있으며, 현재 2.5톤 규모의 pilot-scale 생물반응기를 구축하여 연구개발에 임하고 있음

[표] 식물 세포/기관배양으로부터 생산된 식품 첨가물

생산물	대상 식물명	참고자료
색소	<i>V. vinifera</i>	Pepin 등(1995)
Anthocyanins	<i>Euphorbia</i> spp	Yamamoto 등(1982)
	<i>D. carota</i>	Rajendran 등(1994)
Betalaines	<i>Pe. Frutescens</i>	Zhong와 Yoshida(1995)
	<i>B. vulgaris</i>	Klebnikov 등(1995)
Crocin	<i>Cheno. Rubrum</i>	Berlin 등(1986)
Crocetins	<i>Crocus sativus</i>	Sujata 등(1990)
Carotenoids Anthraquinones	<i>Gardenia jasminoides</i>	George와 Ravishankar(1995)
Naphthoquinones	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Fosket와 Radin(1983)
	<i>M. citrifolia</i>	Kieran 등(1993)
	<i>L. erythrorhizon</i>	Sim과 Chang (1993)
향기성분		
Vanillin	<i>Va. planifolia</i>	Dornenburg와 Knorr(1996)
Garlic	<i>Allium sativum</i>	Ohsumi 등(1993)
Onion	<i>Allium cepa</i>	Collin과 Masker(1988)
Basmati	<i>Oryza sativa</i>	Suvarnalatha 등(1994)
감귤향	<i>Citrus</i> spp.	Cresswell(1990)
코코아향	<i>Theobroma cacao</i>	Townsley(1972)
매운 맛나는 식품첨가물		
Capsaicin	<i>Ca. frutescens</i>	Lindsey와 Yeoman (1984)
	<i>Ca. annuum</i>	Johnson 등(1990)
감미료		
Stevioside	<i>Stevia rebaudiana</i>	Swanson 등(1992)
Glycyrrhizin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hayashi 등(1988)
Thaumatococcoside	<i>Thaumatococcus danielli</i>	van der Weij과 Ledebor(1989)

- 바. 현재 국내 식의약 제품의 글로벌 진출을 위해서는 글로벌 요구 규격에 적합한 품질 관리, 효율성 제고 공정 기술 개발이 필요하고 이를 위해 기능성식물 원료의 안전성/안정성 확보, 품질 제고 및 연중 계획생산이 가능한 생물반응기 시스템에서의 대량생산 기술, 환경조절기술 개발이 요구 됨
- 사. 주로 자연상태에서 원료를 취하는 고부가 식약용식물의 경우 기상요건을 포함하는 환경적 요인, 재배, 수확 및 추출을 포함한 생산 경제적 요건, 국가 간 이해관계 등의 요인에 좌우되지 않고 안정적으로 이용하기 위해서는 새로운 생산방법이 요구됨
- 아. BT 기술요소 중 ‘Pilot-scale 생물반응기 이용 기능성 원료의 대량생산 기술’을 개발함으로써 이러한 고부가 약용자원의 세포, 부정근을 대량배양한 후 이로부터 고부가성

유효성분을 대량생산하여 안정적으로 규격화된 고품질 의약품을 생산하기 위해서는 고부가 의약품의 대량생산 공정시스템 개발이 절실히 필요함

자. 식물세포나 기관을 배양하여 고부가가치 산물인 천연물을 생산하는 분야에서 우리나라는 세계적 수준의 특수 기반기술을 확보하고 있다고 할 수 있음. 이후 식물의 세포나 기관을 배양하여 향후 여러 보건의료분야에 사용될 의약물질을 생산하는 산업을 독보적으로 확립해 나갈 것으로 생각되며 이미 이러한 기술은 세계적 수준으로 인정받고 있음

[표] 생물반응기에서 식물세포 및 기관배양을 통한 유용물질 대량생산 및 산업화

개발자	대상물질 및 식물	사용 (년도)	방법
미쓰이	Shikonin(<i>Lithospermum rythrorhizon</i>)	화장품 (1983)	저분자물질
석유화학	Berberine(<i>Coptis japonica</i>)	색소	저분자물질
	Purpurin(<i>Rubia akane</i>)	색소	저분자물질
	Catharanthine(<i>Catharanthus roses</i>)	의약품	저분자물질
	택솔(주목나무)	의약품	저분자물질
Nitto Denko	인삼(세포배양)	건강식품(1999)	추출물
Kao	다당체(<i>Polianthes tuberosa</i>)	화장품(1994)	저분자물질
Kibun	Kinobeeon A(<i>Carthamus tinctorius</i>)	의약품(2000)	저분자물질
삼양제넥스	택솔(주목나무)	의약품(2000)	저분자물질
생명공학연구원	Peroxidase(<i>Ipomoea batatus</i>)	진단시약 (2002)	효소
CBN바이오텍	산삼 등 (부정근배양)	건강식품, 화장품 (2002)	추출물
마이크로 프란츠	가시오갈피 (체세포 배)	식품	분말, 추출물

[표] 국내외 식물 기능성원료 시장규모 및 수출입 현황

년도	2008년	2012년	2014년
세계 시장 규모	831억불	1045억불	1145억불
한국 시장 규모	11,783억원	15,000억원	17,000억원
년도	2006년	2007년	2008년
수출 규모	2860억원	3432억원	4004억원
수입 규모	1760억원	5500억원	2464억원

산업연구원: 생물, 의약산업의 발전 전략(2006)

5. 고기능성 식물 의약품원료로서의 산삼, 에키네시아, 병풀

본 연구의 식물소재



산삼(Mountain ginseng)

기능성 바이오소재의
연중생산 시스템



생물반응기 이용
식물 세포/조직배양 시스템



에키네시아(Echinesia)

- 국내 최고의 고기능성 약용식물
- 식물 세포 조직배양기술을 이용해 원료의 대량생산 공정이 개발
- 2003년 식약청에서 식품원료로 허가
- 혈행증강 의약품으로 개발

- 식물소재 미국건강식품 판매액 1위
- 에키네시아 부정근 원료의 대량생산 기초기술 개발 완료
- 세포독성 등 안전성 분석 필요
- 면역증강 의약품 개발

가. 산삼(Mountain ginseng)

- (1) 약용식물 중 산삼은 자연상태에서 희귀하고 고가라는 이유로 의약품원료로서의 대량생산에 대한 체계적인 연구가 미비한 실정이나 최근 충북대 첨단원예기술개발연구센터에서 식물 세포·조직배양기술을 이용해 원료의 대량생산 공정이 개발되었음
- (2) 본 연구진은 선행연구를 통해 200년 된 산삼으로부터 BT 기술을 이용하여 산삼 형성층으로부터 뿌리원기를 유도하고 이로부터 부정근을 유도, 증식하여 현재 다양한 라인을 기확보하고 있음. 또한 재배삼, 홍삼 등과 여러 효능효과를 분석한 결과 다양한 면에서 항산화 및 항당뇨, 함암, 성기능개선 등 다양한 면에서 우수한 약효능을 나타내었음

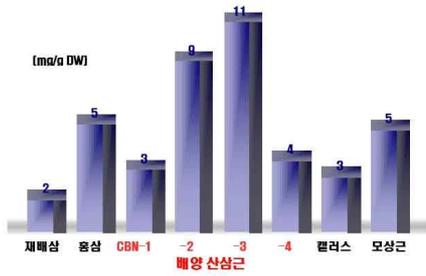


그림. 페놀 화합물은 주로 polyacetylene 과 sesquiterpene 로 구성되
양산화 및 항염증 효과를 나타낸다.

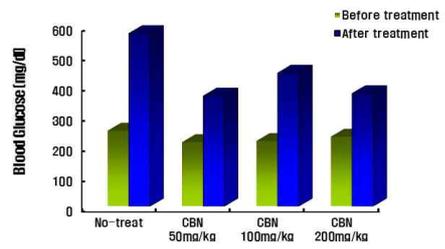
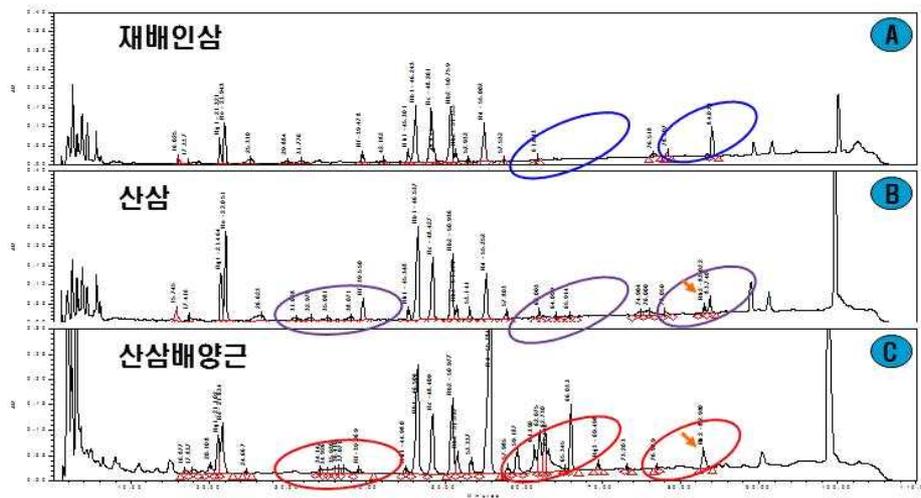


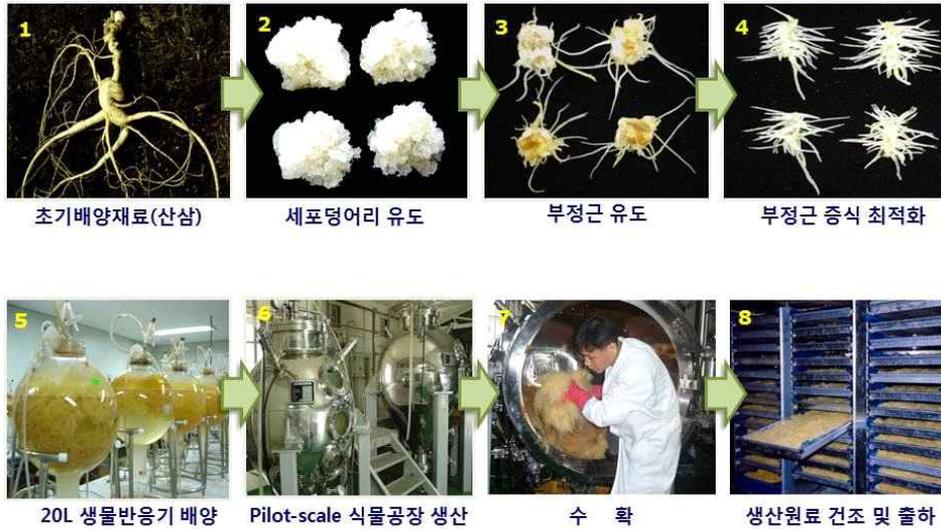
그림. 당뇨유발쥐에서 산삼배양근이 혈중 포도당 농도에 미치는 영향
[산삼배양근 농축액을 db/db mice 에 10주간 경구투여한 후 측정]



[그림] 배삼, 산삼 및 산삼배양근의 사포닌 크로마토그램

(A : 재배삼, B : 산삼, C : 산삼배양근 : 특이 사포닌 피크)

- (3) 본 연구팀은 2003년 식약처에서 산삼배양근에 대한 식품원료로 허가를 받은 바 있음
- (4) 에키네시아도 본 연구에서 세포독성 등 안전성 분석이 완료한 후 대량으로 생산시스템이 개발 된다면 부작용이 없는 기능성 식의약품을 개발 가능할 것임



[그림] 본 연구팀의 생물반응기로부터 산삼 부정근의 대량생산 공정

나. 에키네시아(Echinesia)

- (1) 에키네시아(Echinacea, 국화과)는 북미 원산인 다년생 약용식물임. 약용 에키네시아에 속하는 종은 *E. purpurea*, *E. angustifolia*, 그리고 *E. pallida* 등 3종임
- (2) 에키네시아의 북아메리카 등지에서 약용으로 원주민들에 의해 오래전부터 이용되어 왔고, 최근에는 에키네시아의 의약적 가치가 인정되어 각국에서 뿌리, 근경, 잎, 꽃과 종자 등을 이용한 의약품 및 건강 기능성 제품 등이 출시되고 있음
- (3) 에키네시아의 효능은 주로 면역체계에 있으며 주요하게 항산화, 항바이러스 등에 그 효능이 인정되었으며 호흡기관과 비뇨기 계통에도 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있음
- (4) 본 연구팀은 BT 기술을 이용해 이러한 고기능성 에키네시아로부터 산삼과 같은 부정근(adventitious root)을 이러한 시스템을 이용하여 약용성분이 다량 함유된 고기능성 에키네시아(Echinacea)의 대량생산 공정을 확립하고자 함



[그림] 국외 에키네시아를 원료로 한 기능성 의약품들

- (5) 산삼배양근과 에키네시아 배양근과 같은 고기능성 식물 원료의 특화된 수확 후 처리, 가공 및 추출 공정개발 등 생산 이후 제품화를 위한 산업화 통합공정 개발이 필요함

3절. 연구개발 범위

1. 1차년도

가. 개발 목표 : 생물반응기를 이용한 고기능성 식물 바이오소재 대량증식

(1) 산삼 배양근

(가) 고기능성 부정근 라인(line) 선발 및 기능성물질 함량 증진 기술개발

- ① 고기능성 부정근 라인 선발 및 생장조건 구명
- ② 기능성 물질함량 축적을 위한 배양조건 구명
- ③ 특이적 기능성물질 함량 증진
- ④ 산삼 부정근 : ginsenosides (triol, diol, D/T 등) 30% 증진

(나) 산삼 부정근의 특이성분 분리

(다) 산삼부정근 추출물의 HPLC 크로마토그램을 이용한 특이성분 검색

(라) 용매 분배를 이용한 분획 및 분획의 HPLC 패턴 분석

(마) Silica gel, Sephadex LH 등 다양한 컬럼크로마토그래피와 메탄올, 클로로포름, 에틸 아세테이트 등 용매를 이용한 특이성분의 분리 및 정제

(바) NMR IR, MS 등 분광학적 분석방법을 이용한 특이성분의 구조구명

(사) 산삼 배양근의 혈행개선(및 혈당조절)효능평가

(아) 기능성 원료 평가

- ① 이화학적 시험 규격 설정

(2) 에키네시아 배양근

(가) 기능성 바이오소재 개발

- ① 고기능성 부정근 라인(line) 선발 및 성장조건 구명
- ② 기능성 물질함량 축적을 위한 배양조건 구명
- ③ 특이적 기능성물질 함량 증진
- ④ 에키네시아 부정근 : caffeic acid 유도체 5종 등 20% 증진

(나) 에키네시아 배양근의 유효성분 분리

(다) 에키네시아 배양근의 면역효능평가 및 유효(지표)성분의 분리, 분석

(라) 기능성 바이오소재 평가

- ① 이화학적 시험 규격 설정

2. 2차년도

가. 개발 목표 : Pilot-scale 대용량 생물반응기를 이용한 고기능성 식물 바이오소재 대량생산 시스템 구축

(1) 산삼 배양근

(가) 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

- ① 생물반응기 시스템을 이용한 고기능성 식물원료 생산공정 최적화
- ② 생물공정 제어를 통한 고기능성 원료의 생산수율 증진
- ③ Pilot-scale 생산시스템에서 기능성 원료 고함유 바이오메스 대량생산

(나) 산삼배양근의 특이성분 구조 구명 및 함량분석

- ① 미량성분에 대한 추가 성분 분리
- ② 지표성분에 대한 추가 확보
- ③ 미량성분의 구조 분석
- ④ 추출물 중의 주성분 함량분석

(다) 산삼 배양근의 혈행개선(및 혈당조절)효능평가

(라) 기능성 원료 평가

- ① 이화학적 시험 규격 설정

(2) 에키네시아 배양근

(가) 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

- ① 생물반응기 시스템을 이용한 고기능성 식물원료 생산공정 최적화
- ② 생물공정 제어를 통한 고기능성 원료의 생산수율 증진
- ③ Pilot-scale 생산시스템에서 기능성 원료 고함유 바이오메스 대량생산

(나) 에키네시아 배양근 특이성분 분리

(다) 에키네시아 배양근의 면역효능평가 및 유효(지표)성분의 분리, 분석

(라) 생산 배양근의 세포독성 시험

- ① 에키네시아 배양근의 급성독성(반복독성) 분석

3. 3차년도

가. 개발 목표 : 고기능성 식물 바이오소재의 효능 및 안전성 평가

(1) 산삼 배양근

(가) 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

- ① Pilot-scale 생산시스템에서 기능성 원료 고함유 바이오메스 대량생산
- ② 생물반응기 생산공정의 경제성 분석

(나) 산삼 배양근의 혈행개선(및 혈당조절)효능평가

(다) 원료 의약품 평가

- ① 이화학적 시험 규격 설정
- ② 기준 및 시험법 확립(QC/QA)

(라) 기능성 임상시험

- ① 임상시험 계획서 작성(KFDA, CRO, 임상시험기관)

(2) 셀텔라아시아티카 배양근

(가) 기능성 바이오소재 개발

- ① 고기능성 부정근 라인(line) 선발 및 성장조건 구명
- ② 기능성 물질함량 축적을 위한 배양조건 구명
- ③ 특이적 기능성물질 함량 증진

(나) 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

- ① 생물반응기 시스템을 이용한 고기능성 식물원료 생산공정 최적화
- ② 생물공정 제어를 통한 고기능성 원료의 생산수율 증진
- ③ Pilot-scale 생산시스템에서 기능성 원료 고함유 바이오메스 대량생산

(다) 셀텔라아시아티카 특이성분 구조 규명 및 유효성분 함량 비교

- ① 셀텔라시아티카 특이성분 추출조건 비교
- ② 셀텔라시아티카 특이성분 효능 규명
- ③ 배양근 유효성분 분석법 개발
- ④ 배양근 유효성분 함량 분석

4. 4차년도

가. 개발 목표 : 고기능성 식물 의약품원료화 및 산업화 기반 구축

(1) 산삼 배양근

(가) 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

- ① Pilot-scale 생산시스템에서 기능성 원료 고함유 바이오메스 대량생산
- ② 생물반응기형 생산공정의 경제성 분석

(나) 원료 의약품 평가

- ① 기준 및 시험법 확립(QC/QA)

(다) 기능성 임상시험

- ① IRB 신청 및 승인

(2) 셴텔라아시아티카 배양근

(가) 기능성 바이오소재 개발

(나) 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

① 생물공정 제어를 통한 고기능성 원료의 생산수율 증진

② Pilot-scale 생산시스템에서 기능성 원료 고함유 바이오메스 대량생산

(다) 병풀 부정근 추출물의 피부적용을 위한 생리활성 평가

(라) 셴텔라아시아티카 조직배양체 관련 제품 출시

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 제1세부: Pilot-scale 생물반응기를 이용한 식물 식의약 원료 대량생산 시스템 개발 (충북대학교, 주관)

1. 산삼 배양근

가. 기능성 부정근 라인(line) 선발 및 기능성물질 증진 기술개발

(1) 고기능성 부정근 라인 선발 및 성장조건 구명

(가) 기 유도된 산삼 및 화기삼 부정근 및 세포 라인 성장 비교

① 식물재료 : 산삼 및 화기삼의 부정근, 세포

Line name	Scientific name	Explant type
화기삼 (AM)	<i>Panax quinquefolius</i>	Adventitious root, Cell
백두산삼 (BDS)	<i>Panax ginseng</i>	Adventitious root, Cell
청술산삼 (CS)	<i>Panax ginseng</i>	Adventitious root, Cell
CBN 산삼 (CBN)	<i>Panax ginseng</i>	Adventitious root, Cell

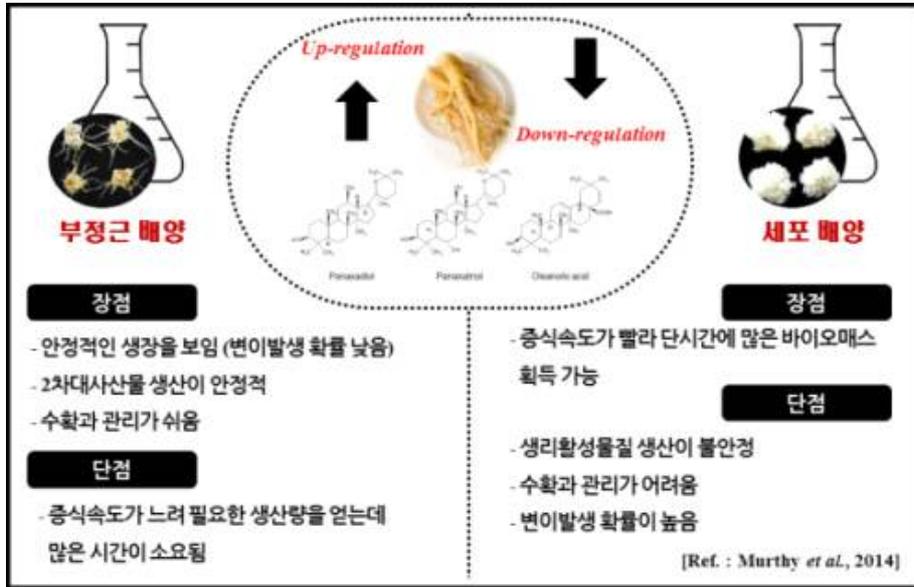
② 배지조성 (기 선발된 배지조성 이용)

㉠ 부정근 배지조성 : 3/4 MS, 5 mg/L IBA, 50 g/L sucrose, pH 5.7 ~ 5.8

㉡ 세포 배지조성 : MS, 1 mg/L 2,4-D, 40g/L sucrose, pH 5.7 ~ 5.8

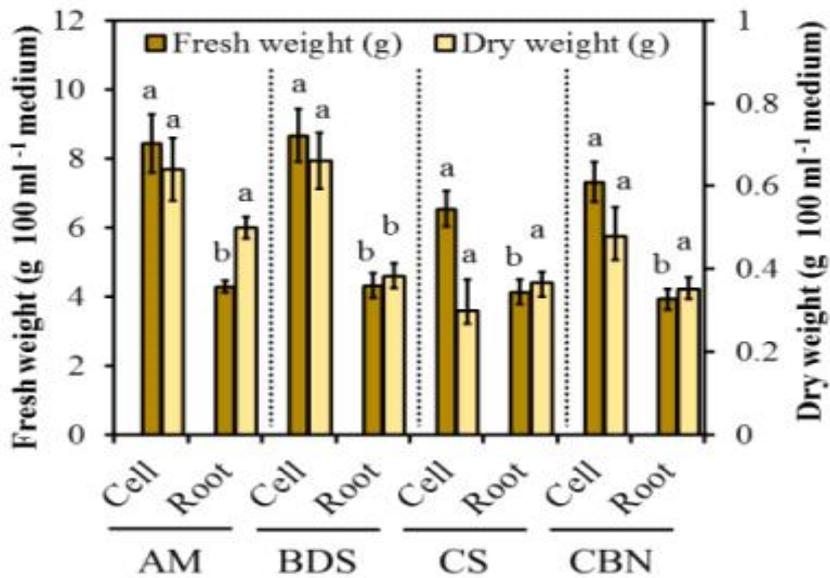
③ 배양 스케일 : 100ml의 배지가 첨가된 300ml 삼각플라스크

④ 선행연구에서 보고된 부정근 및 세포배양의 장·단점

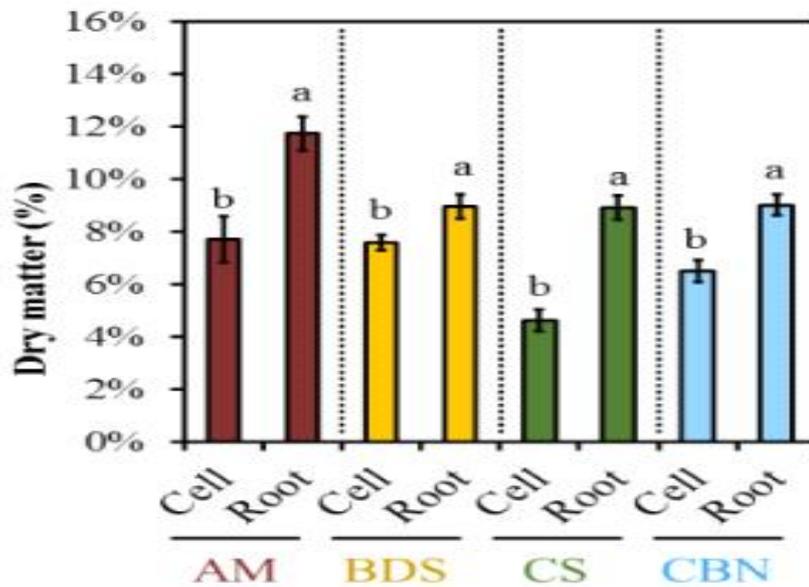


⑤ 바이오매스 조사결과

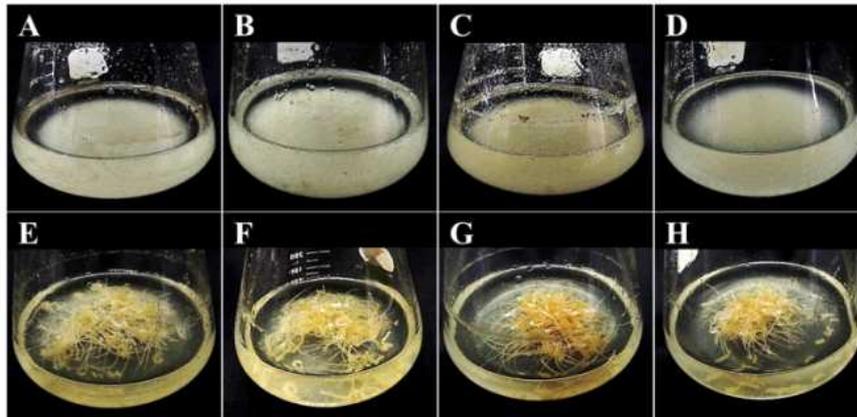
- ㉞ 모든 산삼 및 화기삼 세포라인의 생체중과 건물중이 부정근라인에 비해 유의적으로 1.4~2배 높았음.
- ㉟ 그러나 건물율(%)의 경우, 모든 부정근라인에서 2~4% 높은 것으로 나타남.
(건물율 = (건물중÷생체중)×100)
- ㊱ 바이오매스 생산효율 면에서 모든 부정근 라인의 생산성이 높았음. 따라서 부정근 시스템에서의 바이오매스 생산이 효율적일 것이라 생각됨.



[그림] 산삼 및 화기삼 부정근과 세포의 4주 배양 후 생체중과 건물중



[그림] 산삼 및 화기삼 부정근과 세포의 4주 배양 후 건물율



[그림] 산삼 및 화기삼 부정근과 세포의 4주 배양 후 모습
A,E; AM line, B,F; BDS line, C,G; CS line, D,H; CBN line

⑥ DNA 함량, 세포분열기 분석방법

㉞ 분석기기 : PA flow cytometry (Partec)

㉞ DNA 추출 버퍼

- 버퍼 1 : Nuclei Extraction Buffer
- 버퍼 2 : Staining Buffer

㉞ 내부 표준품 : 페튜니아(2배체)

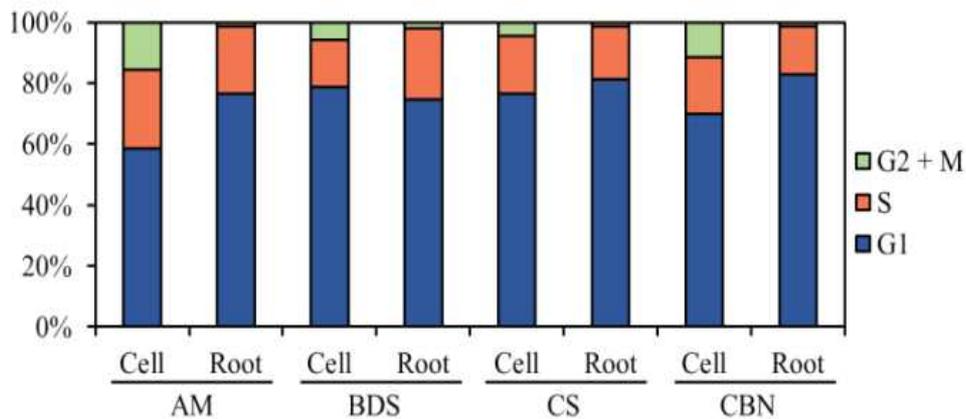
㉞ 분석결과

- 모든 부정근라인이 4배체로서(85~92) 안정적인 DNA 함량을 나타냄.
- 그러나 세포라인은 6~8배체로(118~164) 부정근 라인에 비해 불안정적이었음.
- 세포분열기 분석 결과, 모든 세포라인의 G2+M기 비율이 5.7~15.4%로 부정근 라인

(1.3~2.0%)에 비해 높아 빠른 분열능을 가지고 있음을 확인함.

[표] Flow cytometry를 이용한 산삼과 화기삼 부정근 및 세포 라인의 DNA 함량

Line	Type	DNA mean value	CV (%)
AM	Cell	121.75 ± 1.80	4.20 ± 0.54
	A. root	87.25 ± 0.48	2.72 ± 0.13
BDS	Cell	118.71 ± 1.81	3.27 ± 0.20
	A. root	92.52 ± 0.93	2.84 ± 0.13
CS	Cell	164.21 ± 1.85	3.13 ± 0.46
	A. root	87.93 ± 1.15	2.41 ± 0.11
CBN	Cell	122.68 ± 1.18	3.17 ± 0.22
	A. root	85.33 ± 1.04	2.65 ± 0.43



[그림] 산삼과 화기삼 부정근 및 세포라인의 세포분열기 분석

(나) 기 유도된 산삼 및 화기삼 부정근 및 세포 라인 사포닌 계 진세노사이드 함량분석

① 분석방법

㉠ 총 사포닌 함량 : vanillin-sulfuric acid colorimetric method (spectrophotometer, 540 nm)

㉡ 진세노사이드 함량 분석 : HPLC system (Waters 2695 module, 2996 detector)

㉢ 진세노사이드 표준품 : Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rc, Rb2, Rb3, Rd, Rg3, Rh2 (11가지)

㉣ 함량 및 생산량 계산법

· 진세노사이드 함량(mg/g DW)

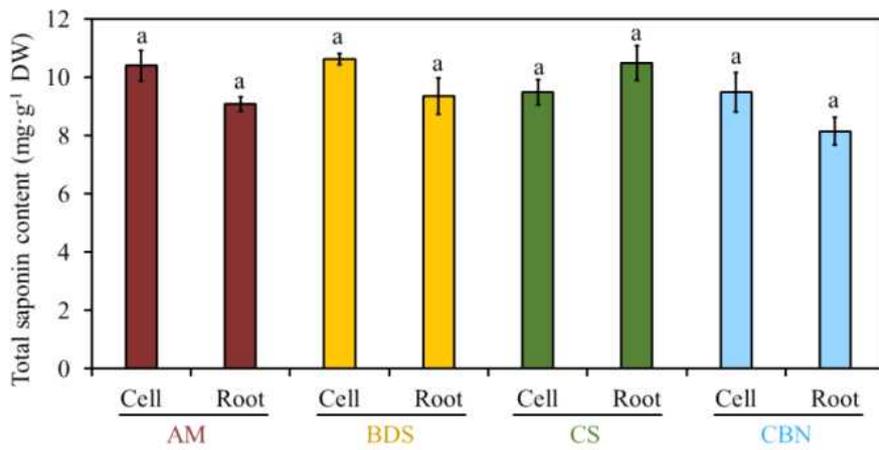
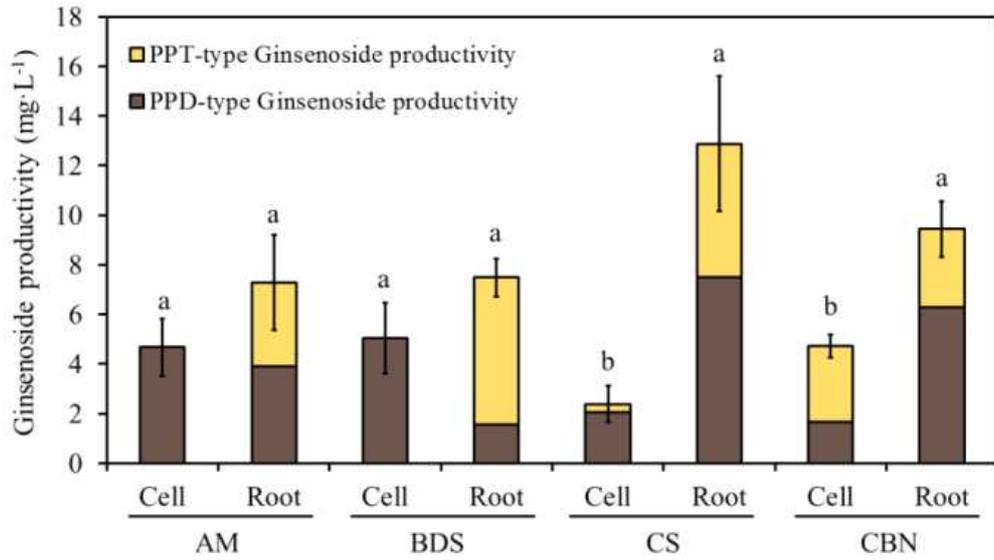
$$= \frac{HPLC\text{분석함량}(mg/L) \times \text{추출용매 부피}(L)}{\text{추출샘플 건물중}(g)}$$

· 진세노사이드 생산량(mg/L)

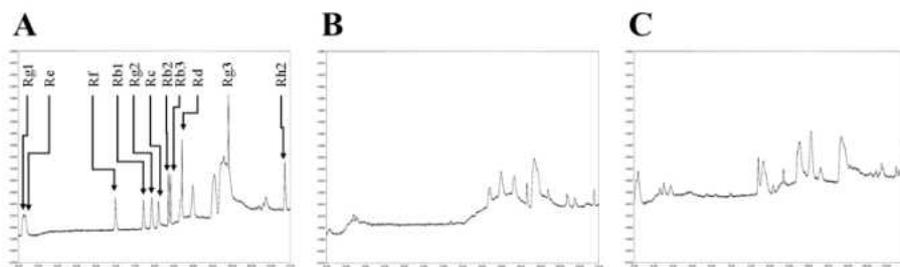
$$= \frac{\text{진세노사이드 함량}(mg/gDW) \times \text{샘플 총 건물중}(gDW)}{\text{샘플 총 배지부피}(L)}$$

② 분석결과

- ㉠ 총 사포닌 함량은 부정근 라인에서 8.14~10.48 mg/g DW, 세포 라인에서 9.50~10.62 mg/g DW 으로 비슷한 경향을 보임.
- ㉡ 11가지 진세노사이드 함량 분석 결과, 모든 부정근 라인(1.35~3.35 mg/g DW)이 세포 라인(0.65~0.92 mg/g DW)보다 높게 분석되었고 특히 PPD계 Rd 진세노사이드에서 큰 함량 차이를 보임. (부정근; 0.16~1.41 mg/g DW, 세포; 0.14~0.40 mg/g DW)
- ㉢ 특히 CS 부정근 라인에서의 총 진세노사이드 함량과 생산량이 각각 3.35 mg/g DW, 12.88 mg/L로 가장 높은 함량을 나타내었음.
- ㉣ 이는 모든 산삼 및 화기삼 라인에서 부정근이 바이오매스, 진세노사이드 생합성에 가장 효율적인 시스템을 확인함.

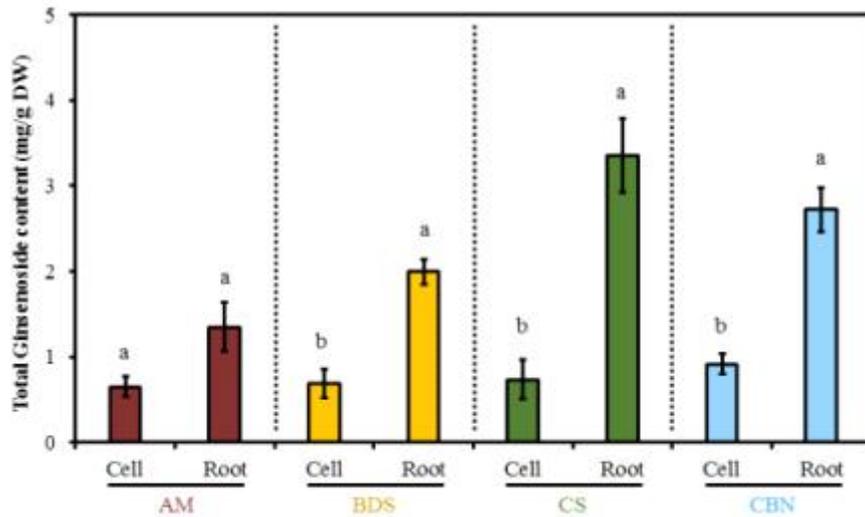


[그림] 산삼과 화기삼의 총 사포닌 함량



[그림] HPLC 분석 크로마토 그래피

A; 11가지 진세노사이드 표준품, B; CS 세포 라인, C; CS 부정근 라인



[그림] 산삼과 화기삼의 총 진세노사이드 함량

(2) 기능성 물질함량 축적을 위한 배양조건 구명

(가) 배양기간, pH, EC에 따른 2가지 산삼배양근 라인의 바이오매스 비교

① 식물재료 : 1-yr-old (CS), 20-yr-old (CBN) 산삼 배양근

② 배지조성 및 접종밀도 (기 선발된 배지조성 이용)

③ 배양근 배지조성 : 3/4 MS, 5 mg/L IBA, 50 g/L sucrose, pH 5.7 ~ 5.8

④ 접종밀도 : 5 g/L

㉠ 배양 스케일 및 배양기간 : 2L의 배지가 첨가된 3L 생물반응기에서 8주간 배양

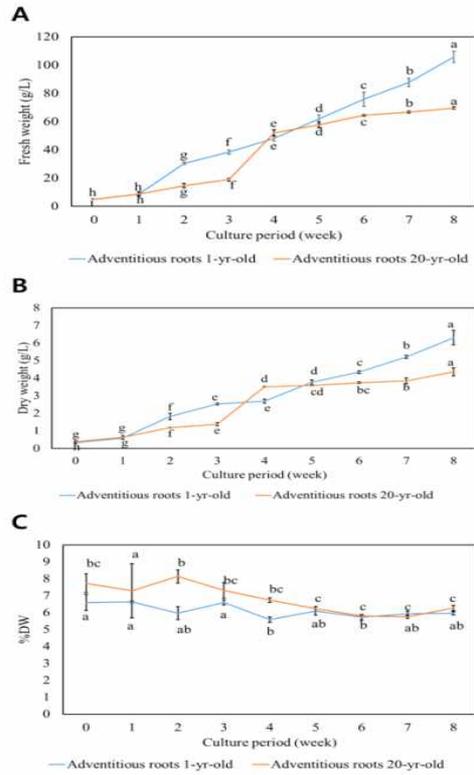
⑤ 배양 결과

㉡ 8주 배양 후, 2가지 라인의 생체중(60~100 g/L), 건물중(4~6 g/L), 건물율(6.3~6.7%)은 유사한 경향을 나타냄.

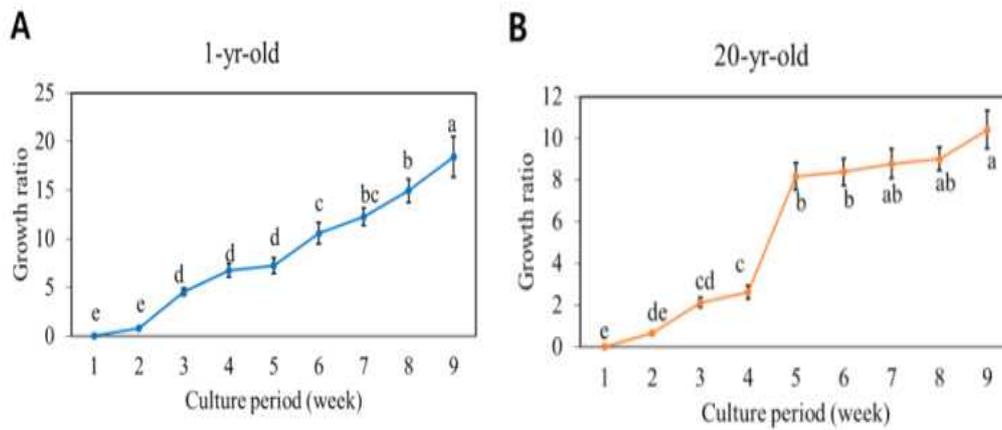
㉢ 20-yr-old (CBN) 라인은 배양 4~5주차에 빠른 성장을 보이는 S자 성장곡선을 나타냈고 1-yr-old (CS) 라인은 완만한 S자 성장곡선을 나타냄.

㉣ pH 5.0~5.7 사이의 조건에서 생체중은 양의 상관관계를 보임. (1yr-old; 0.2983, 20-yr-old; 0.8213)

㉤ EC 2.0~5.0 사이의 조건에서 생체중은 음의 상관관계를 보임. (1yr-old; -0.9783, 20-yr-old; -0.9959)



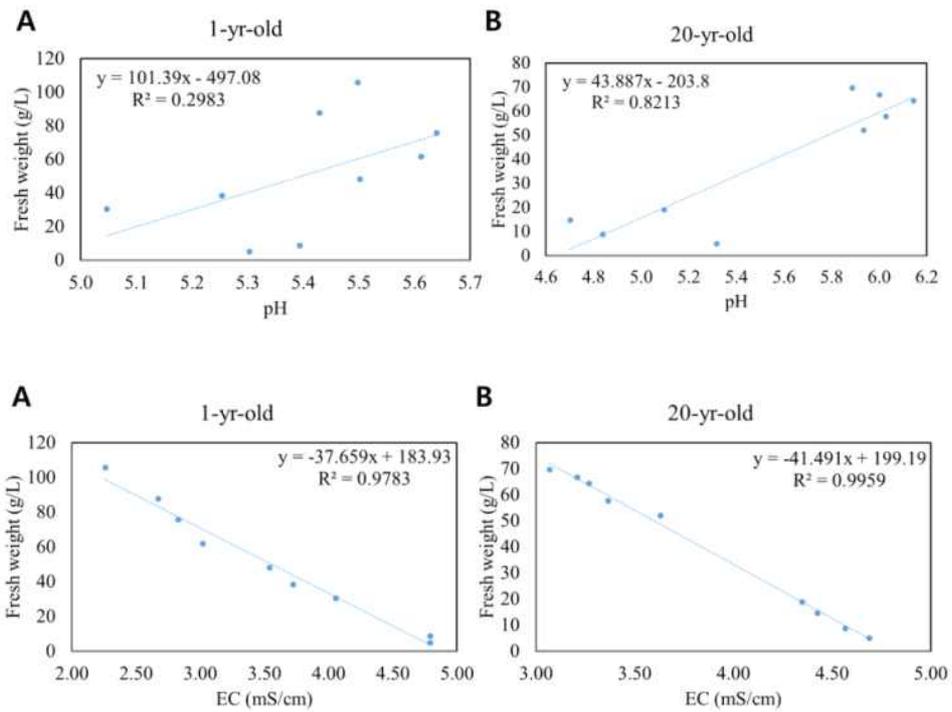
A; 생체중, B; 건물중, C; 건물율
 [그림] 배양기간에 따른 산삼배양근의 생체중, 건물중, 건물율



A; 1-yr-old (CS), B; 20-yr-old (CBN)
 [그림] 배양기간에 따른 산삼배양근의 성장율



A; 1-yr-old (CS), B; 20-yr-old (CBN)
 [그림] 배양기간에 따른 산삼배양근의 바이오매스



A; 1-yr-old (CS), B; 20-yr-old (CBN)
 [그림] pH와 EC에 따른 산삼 배양근의 생체중의 상관관계

(나) 배양기간에 따른 2가지 산삼배양근 라인의 사포닌계 진세노사이드 함량분석

① 분석방법

㉠ 총 사포닌 함량 : vanillin-sulfuric acid colormetric method (spectrophotometer, 540 nm)

㉡ 진세노사이드 함량 분석 : HPLC system (Waters 2695 module, 2996 detector

· 진세노사이드 표준품 : Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rc, Rb2, Rb3, Rd, Rg3, Rh2 (11가지)

② 함량 및 생산량 계산법

㉢ 진세노사이드 함량(mg/g DW)

$$= \frac{HPLC\text{분석함량}(mg/L) \times \text{추출용매 부피}(L)}{\text{추출샘플 건물중}(g)}$$

㉣ 진세노사이드 생산량(mg/L)

$$= \frac{\text{진세노사이드함량}(mg/g\text{ DW}) \times \text{샘플총건물중}(g\text{ DW})}{\text{샘플총배지부피}(L)}$$

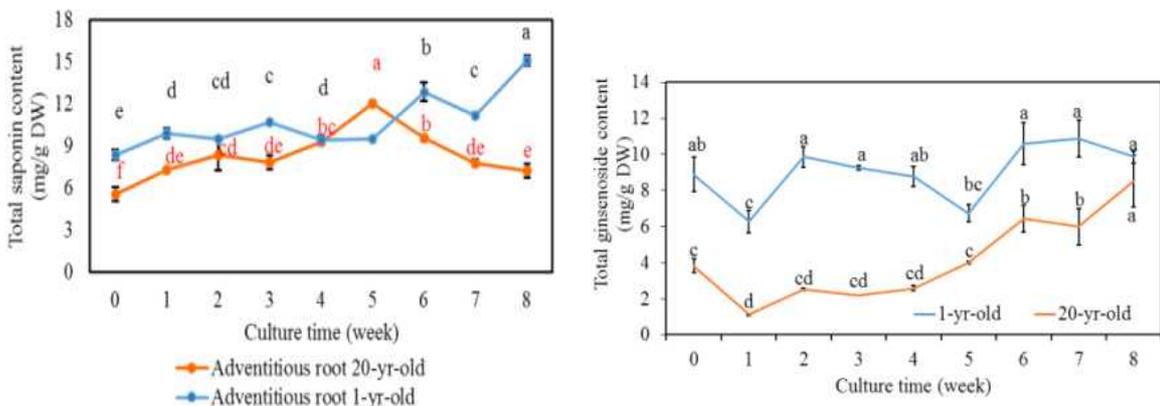
③ 분석결과

㉤ 배양기간이 경과함에 따른 총 사포닌 함량은 1-yr-old (CS) 라인에서는 점차 증가하여 8주차(15.20 mg/g DW)에 최대로 보였으나, 20-yr-old (CBN) 라인에서는 5주차(12.05 mg/g DW)를 최대로 감소하는 경향을 나타냄.

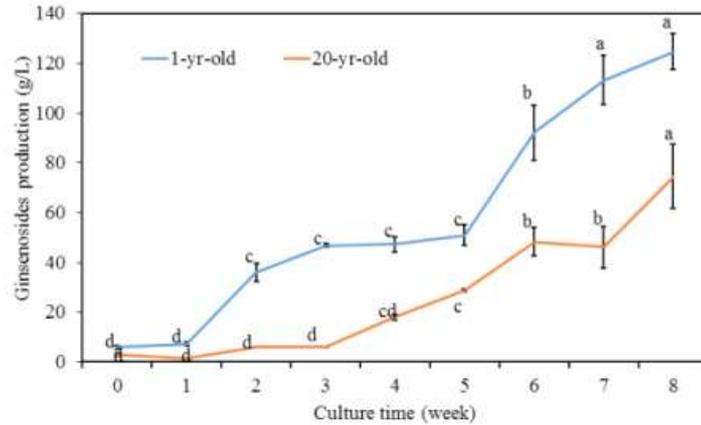
㉥ 배양기간에 따라 1-yr-old (CS) 라인은 6.45~10.38 mg/g DW, 20-yr-old (CBN) 라인은 1.15~7.93 mg/g DW 의 진세노사이드 함량이 분석되어 1-yr-old 의 함량이 우수하였음.

㉦ 1~8주차로 경과함에 따라 진세노사이드 생산량은 점차 증가하여 8주차 1-yr-old 의 생산량은 121.5 g/L, 20-yr-old 의 생산량은 68.7 g/L 을 보임.

㉧ 이는 앞서 플라스크 스케일에서의 라인별 진세노사이드 생산량 결과와 유사하며 1-yr-old (CS) 라인이 2차대사산물 생산에 효과적임을 확인함.



[그림] 배양기간에 따른 2가지 산삼배양근 라인의 총 사포닌과 진세노사이드 함량



[그림] 배양기간에 따른 2가지 산삼배양근 라인의 총 진세노사이드 생산량

(다) 바이오매스와 진세노사이드 함량 증진을 위한 생물학적 엘리시터 처리

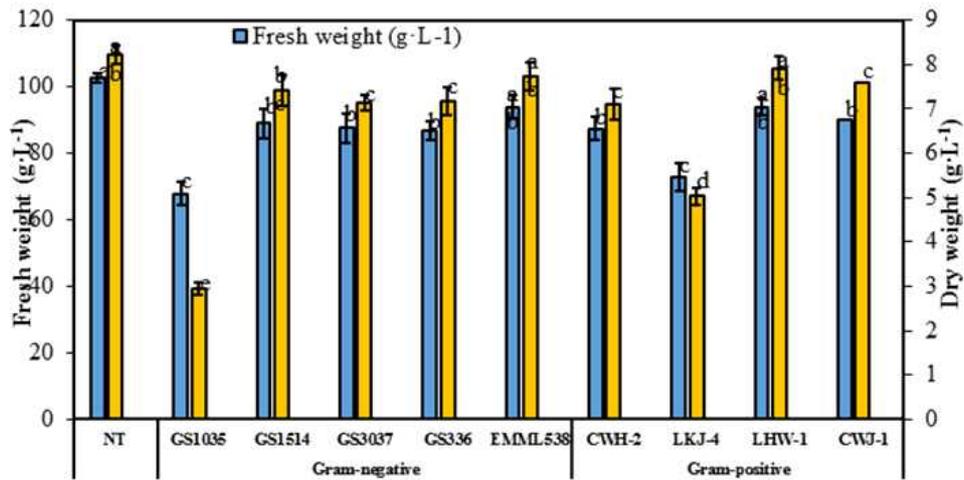
- ① 식물재료 : 콜히친 처리에 의해 유도된 산삼 돌연변이 부정근 (100-1-18)
- ② 배지조성 (기 선발된 배지조성 이용)
 - ㉠ 부정근 배지조성: 3/4MS, 5mg/L IBA, 50g/L sucrose, pH 5.7 ~ 5.8
- ③ 배양 스케일: 100ml의 배지가 첨가된 250ml 삼각플라스크
- ④ 접종밀도: 1g/flask
- ⑤ 박테리아 엘리시터의 종류

No.	Classification	Strain No.	Strain Name
1	Gram-negative	GS1035	<i>Mesorhizobium huakuii</i> AM 14158(T)
2		GS1514	<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i> RITF806(T)
3		GS3037	<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC 19665(T)
4		GS336	<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC 19665(T)
5		EMML538	<i>Azotobacter beijerinckii</i>
6	Gram-positive	CWH-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
7		LKJ-4	<i>Leuc.sp.</i>
8		LHW-1	<i>Bacillus sp.</i>
9		CWJ-1	<i>Bacillus sp.</i>

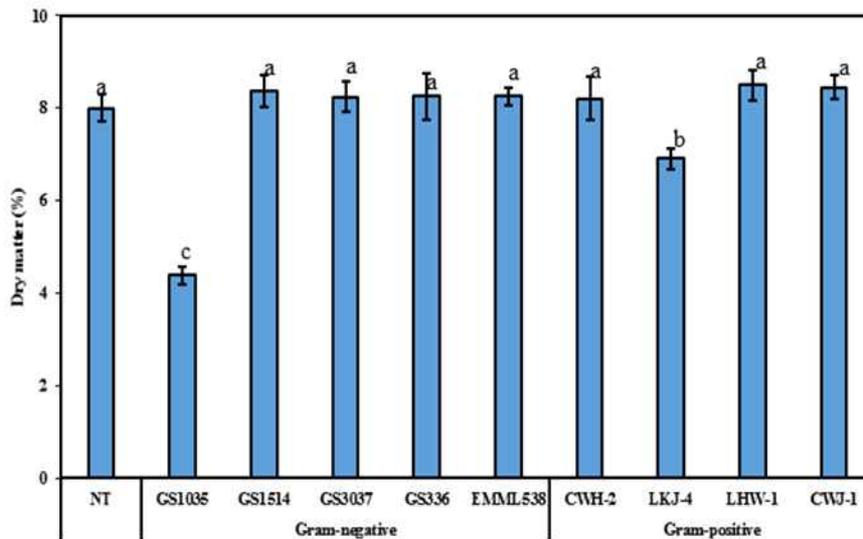
⑥ 바이오매스 조사결과

- ㉠ 모든 박테리아 엘리시터 처리구가 대조구와 비교하여 생체중과 건물중이 감소하였는데, GS1035 처리구의 경우 생체중은 약 47%, 건물중은 286% 감소함

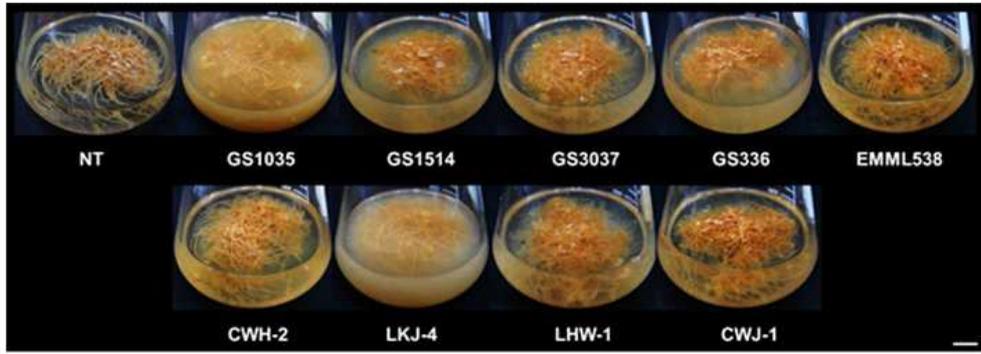
- ㉔ 건물율은 GS1035, LKJ-4를 제외한 처리구에서 대조구와 비슷한 경향을 보임
- ㉔ 바이오매스 생산효율 면에서 GS1035와 LKJ-4 처리구의 경우 다른 처리구와 비교하여 생산성이 낮았음. 따라서 다른 처리구가 바이오매스 생산에 효율적일 것이라 생각 됨



[그림] 산삼 부정근의 엘리시터 처리 5일 후 생체중과 건물중의 변화



[그림] 산삼 부정근의 엘리시터 처리 5일 후 건물율



[그림] 엘리시터 처리 된 산삼부정근

⑦ 배지 내 pH, EC 변화 분석

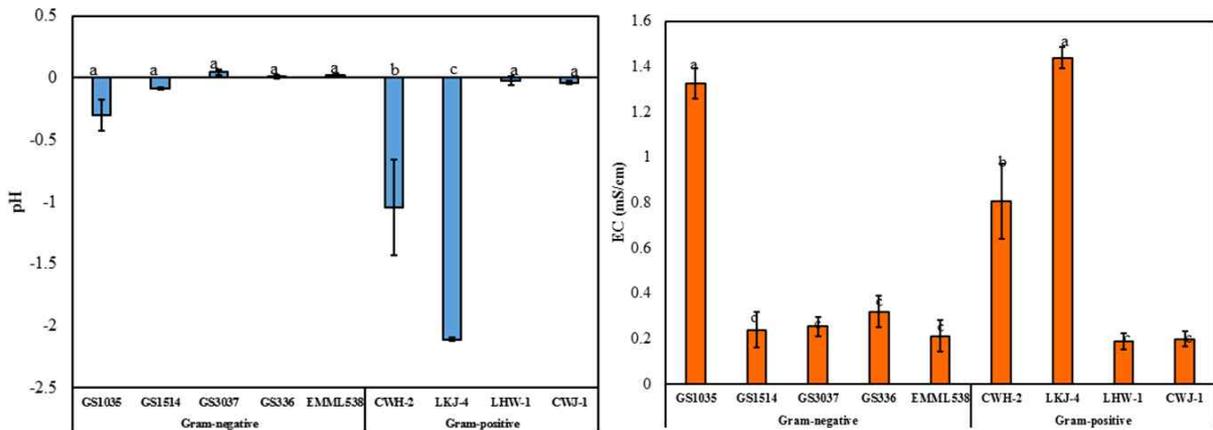
㉔ 측정방법 : 처리 5일 후 산삼 부정근 수확 후 배지에 센서를 넣어 측정함

⑧ 분석결과

㉔ 처리 후 배지의 pH 변화를 보았을 때, CWH-2, LKJ-4 처리구에서 각 약 -1, -2.2의 감소가 나타났는데, 이는 박테리아의 영향으로 생각됨

㉔ 처리 후 배지의 EC 변화를 보았을 때, GS1035, CWH-2, LKJ-4 처리구에서 각 1.3, 0.8, 1.4배 증가한 것으로 나타남

㉔ 기존 배지에서 pH와 EC의 변화는 식물생장에 부정적인 영향을 확인함. 따라서 CWH-2, LKJ-4 처리구의 경우 부정근 성장에 부적합할 것으로 판단됨



[그림] 산삼부정근 엘리시터 처리 후 배지 pH와 EC 변화

⑨ 산삼 부정근의 엘리시터 처리 후 사포닌계 진세노사이드 함량 분석

㉠ 총 사포닌 함량 : anillin-sulfuric acid colorimetric method(spectrophotometer, 540nm)

㉡ 진세노사이드 함량 분석 : HPLC system (Waters 2695 module, 2996 detector)

㉢ 진세노사이드 표준품 : Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rc, Rb2, Rb3, Rd, Rg3, Rh2, CK (12가지)

⑩ 함량 및 생산량 계산법

㉠ 진세노사이드 함량(mg/g DW)

$$= \frac{HPLC\text{분석함량}(mg/L) \times \text{추출용매 부피}(L)}{\text{추출샘플건물중}(g)}$$

㉡ 진세노사이드 생산량(mg/L)

$$= \frac{\text{진세노사이드 함량}(mg/g DW) \times \text{샘플 총 건물중}(g DW)}{\text{샘플 총 배지 부피}(L)}$$

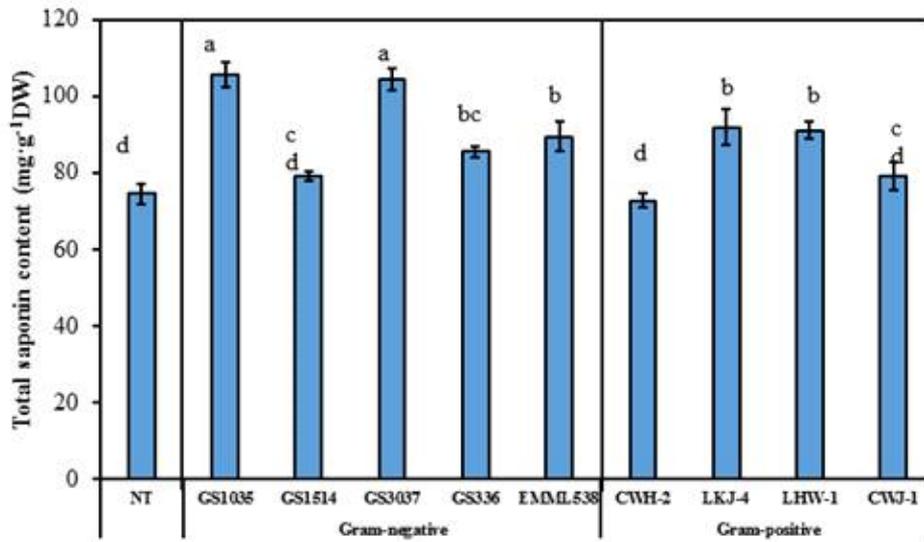
⑪ 분석결과

㉠ 총사포닌 함량은 CS1035, CS3037 처리구에서 가장 높은 경향을 보임

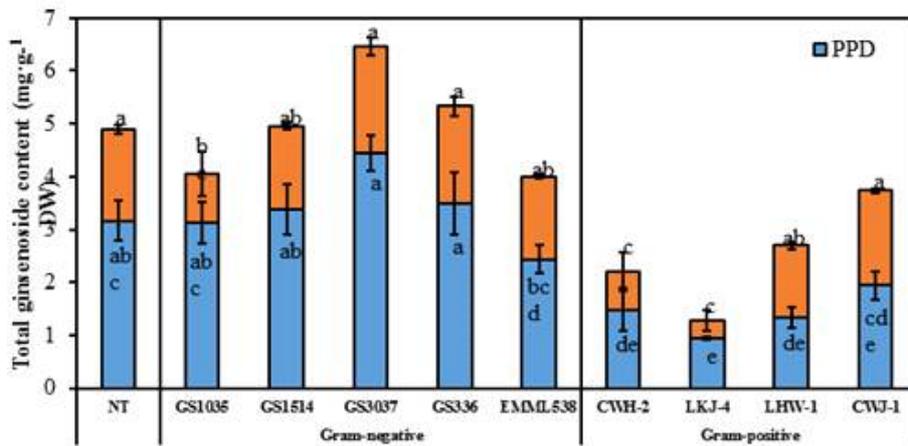
㉡ 12가지 진세노사이드 함량 분석 결과 PPD계에서 4개의 처리구에서 대조구와 비교하여 비슷하거나 높은 경향을 확인함. 특히 GS3037 처리구에서 유의하게 높았음 PPT계에서 4개의 처리구가 대조구보다 비슷하거나 높은 경향을 확인함. 특히 GS3037 처리가 가장 높았음

㉢ GS3037 처리가 총 사포닌 함량 PPD계, PPT계 총 진세노사이드 함량이 가장 우수한 것으로 나타남

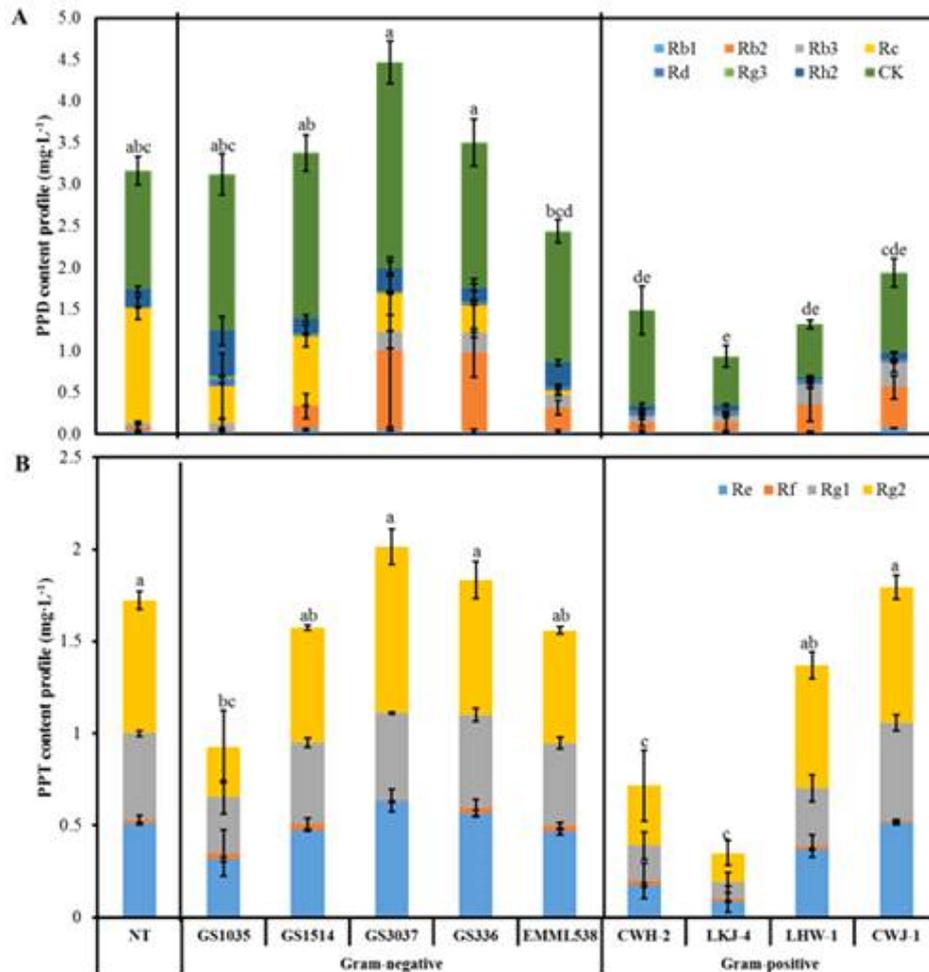
㉣ 이는 GS3037 처리가 다른 생물학적 엘리시터 처리보다 바이오매스, 사포닌 생합성, 진세노사이드 생합성에 가장 효율적인 엘리시터임을 확인함



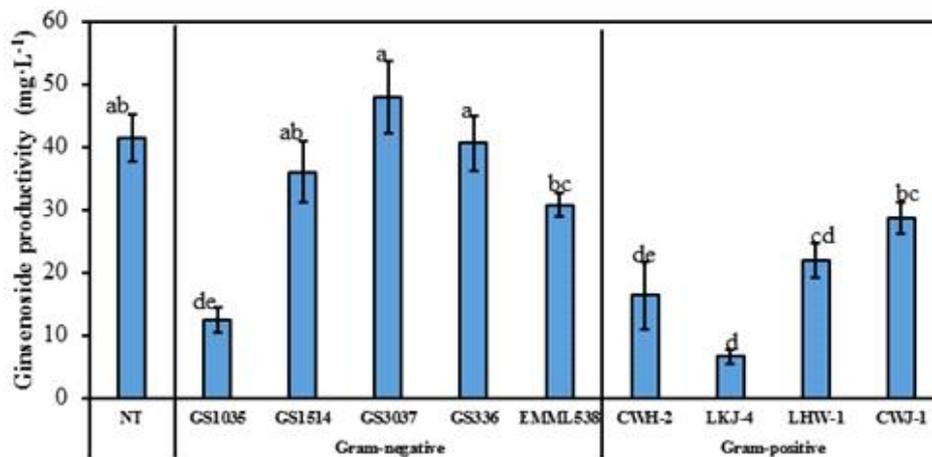
[그림] 산삼부정근 엘리시터 처리 후 총사포닌 함량



[그림] 산삼부정근 엘리시터 처리 후 총 진세노사이드 함량



A: PPD계, B: PPT계 진세노사이드
 [그림] 산삼부정근 엘리시터 처리 후 진세노사이드 함량



[그림] 산삼 부정근의 엘리시터 처리 후 진세노사이드 생산성

(라) 선발된 산삼부정근의 장기저장을 위한 cryopreservation 연구

① 식물재료: 산삼 부정근의 근단

② 배지조성 및 배양조건(기 선발된 배지 이용)

㉠ 부정근 배지조성: 3/4MS + IBA 5mg/L + sucrose 50g/L + gelrite 2.5g/L, pH 5.7 ~ 5.8

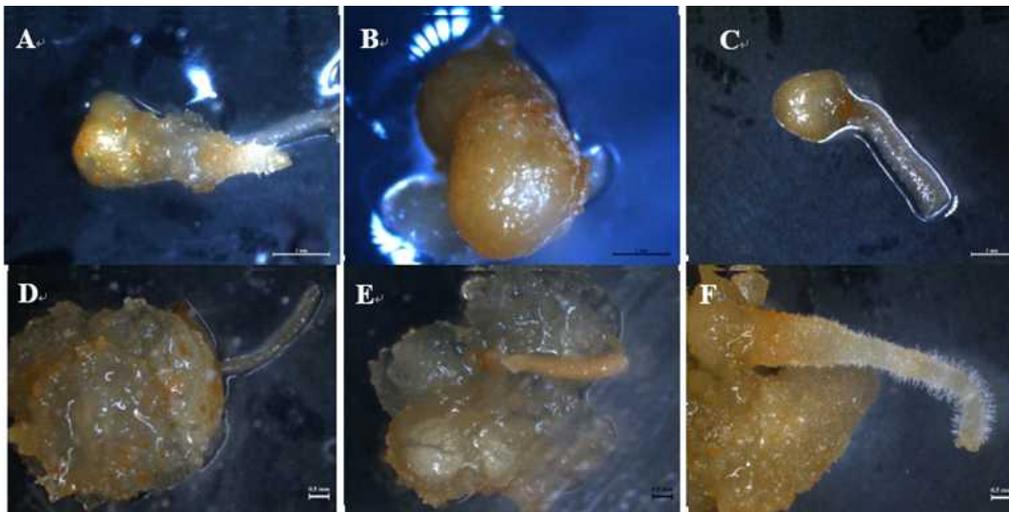
㉡ 배양조건: 암조건, 24±1°C

③ 실험결과

㉢ 수크로스 0.3M에서 전처리 후 회복시키는 것이 액체질소에 보존 후 회복시키거나 바로 회복시키는 두가지 상황 모두 전처리를 하지 않은 것 보다 회복율이 우수함

㉣ 로딩용액에 따른 효과는 C4로딩용액에서 가장 높은 회복율을 확인함

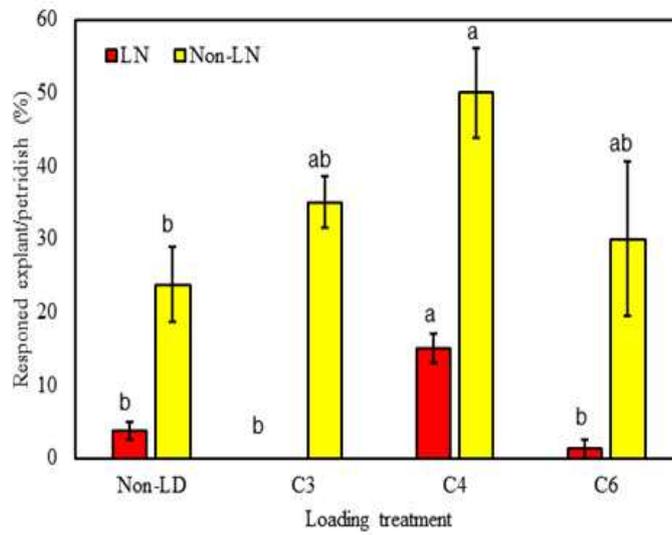
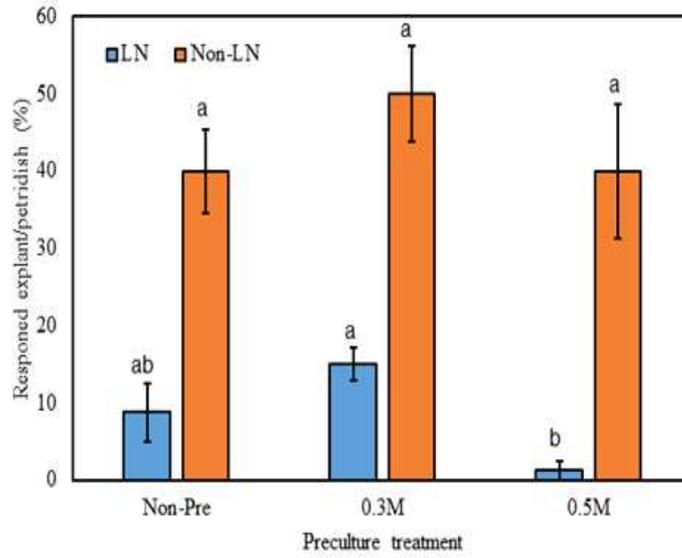
㉤ 유리화 용액의 경우 PVS3-10 용액이 가장 회복율이 높았음. 따라서 수크로스 0.3M에서 전처리를 실시하고 C4 로딩용액을 사용하며 PVS3-10유리화 용액을 사용하는 것이 초저온 보존 시 가장 우수한 것으로 확인함



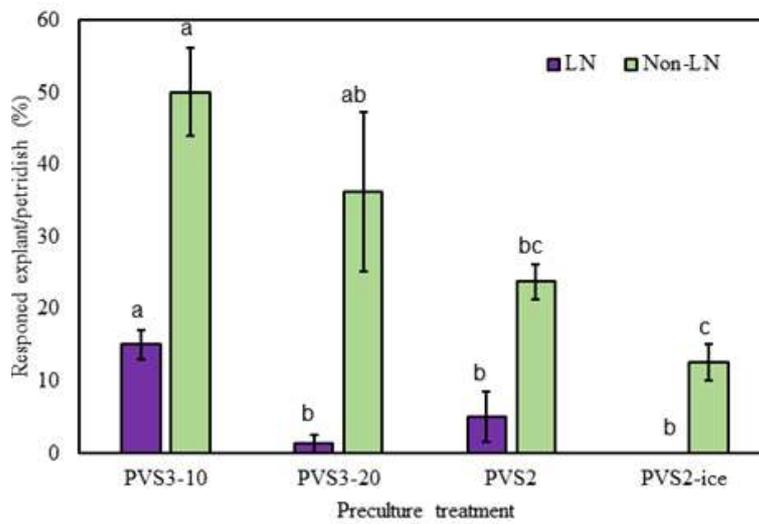
A, B: A3용액 처리 후 2개월, D, E: A3용액 처리 후 3개월

C: B5용액 처리 후 1개월, F: B5용액 처리 후 2개월

[그림] 장기저장 후 회복 모습



[그림] 장기저장시 전처리와 로딩용액이 회복에 미치는 영향



[그림] 장기저장시 유리화용액이 회복에 미치는 영향

(마) 산삼부정근 근단의 캡슐화에 의한 장기저장

① 식물재료: 산삼 부정근의 근단

② 배지조성 및 배양조건(기 선발된 배지조성 이용)

㉠ 부정근 배지조성: 3/4MS, IBA 5mg/L, sucrose 50g/L, gelrite 2mg/L pH 5.7 ~ 5.8

㉡ 배양조건: 암조건, 24±1°C

㉢ 처리조건

No.	Treatment		Material	Concentration	Temperature storage (°C)	Time to storage (month)	No. of bead
1	Encapsulation matrix	Sodium alginate	Root tip	3%	-	0	60
				5%	-	0	60
2	Storage solution	Free MS medium	Root tip	-	24°C	0, 1 ~ 12	720
-				4°C	0, 1 ~ 12	720	
3		3 rd sterilized DW	Root tip	-	24°C	0, 1 ~ 12	720
				-	4°C	0, 1 ~ 12	720
4		Sucrose	Root tip	7%	24°C	0, 1 ~ 12	720
				7%	4°C	0, 1 ~ 12	720
			Root tip	9%	24°C	0, 1 ~ 12	720
				9%	4°C	0, 1 ~ 12	720
5	PEG	Root tip	2%	24°C	0, 1 ~ 12	720	
			2%	4°C	0, 1 ~ 12	720	
		Root tip	4%	24°C	0, 1 ~ 12	720	
			4%	4°C	0, 1 ~ 12	720	
6	Explant source	-	Root tip			0	60
			Root cutting			0	60
			Callus			0	60
			Embryo			0	60

㉣ 보관조건: 4°C 혹은 24°C, 암조건,

㉤ 보관기간 : 0 ~ 12개월

③ 실험 결과

㉠ 캡슐의 발아는 8주간 배양 후 알긴산나트륨 3% 농도에서 가장 우수하였음

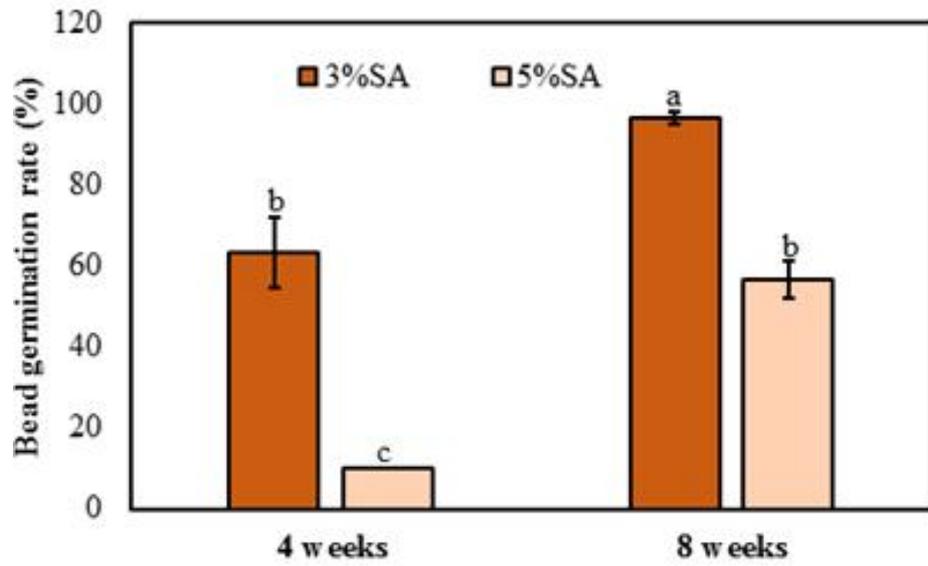
㉡ 캡슐의 장기간 보존은 free MS 배지가 멸균수와 비교하여 더 우수한 발아율을 보여 보존용액으로 적합함을 확인함

㉢ 수크로스의 농도는 7%와 9% 모두 비슷한 경향을 보이거나 지속적으로 확인 필요할 것으로 판단됨

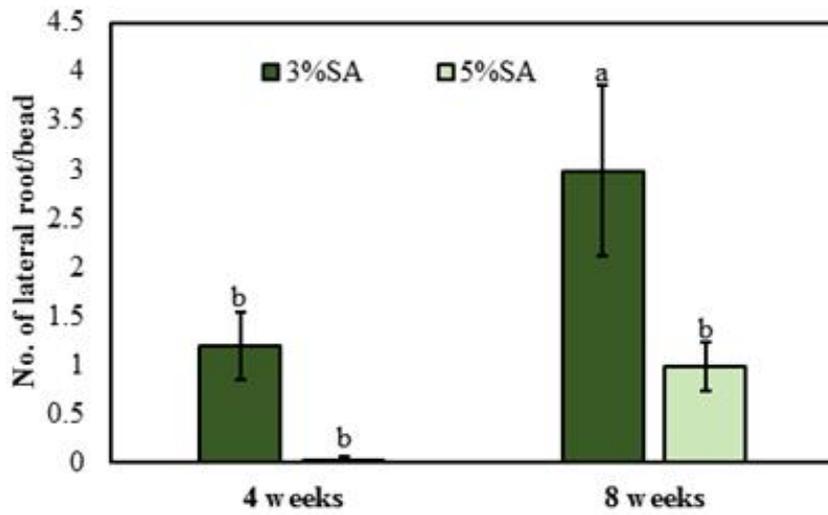
㉣ 전체적으로 4°C에 저장하는 것이 보존 후 발아율 향상에 25°C에서 저장하는 것보다 긍정적인 효과를 확인함

㉤ PEG처리 시 발아율이 0%인 부정적인 효과를 확인하여 적합하지 않음을 확인함

㉥ 식물체 이용부위에 따른 캡슐의 발아율은 세포가 가장 높았으며 엠브리오, 근단, 부정근의 경우 비슷한 경향을 확인함. 따라서 세포를 이용하여 4°C에서 수크로스 7% 농도의 저장용액을 사용하는 것이 가장 우수할 것으로 판단됨



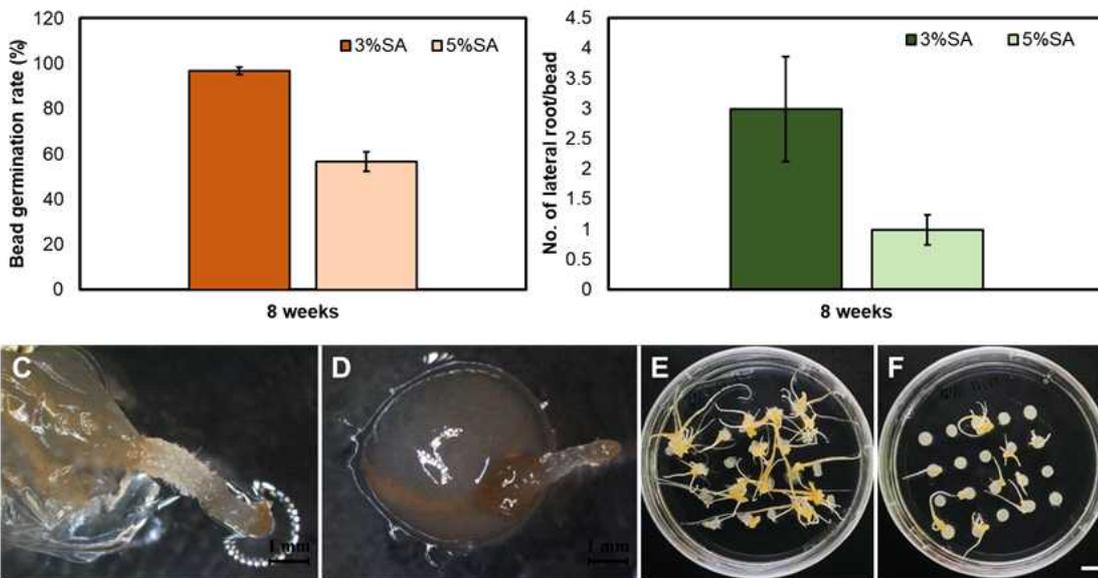
[그림] 산삼부정근 근단 장기저장 후 알긴산나트륨의 농도가 캡슐에서 부정근 발생에 미치는 영향



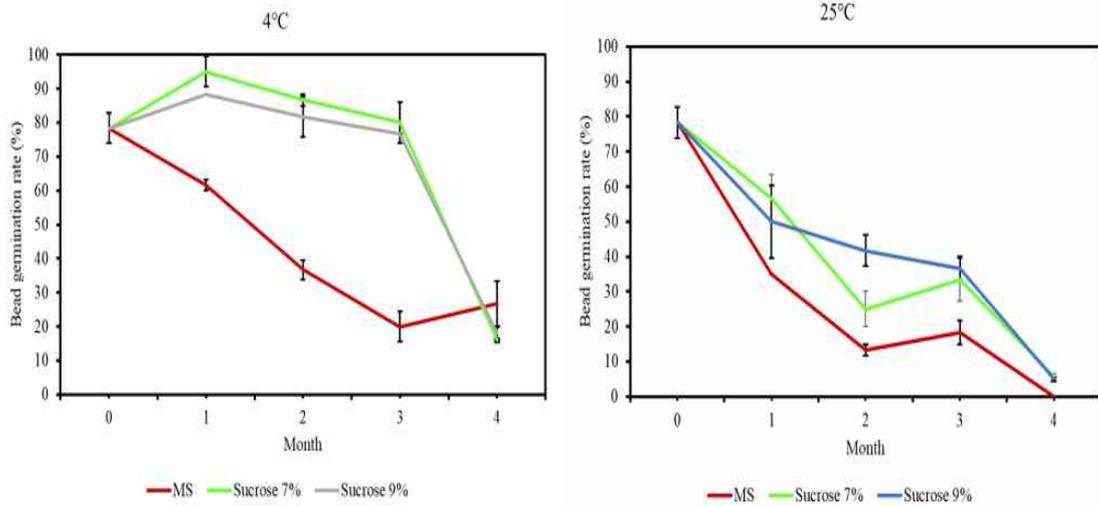
[그림] 산삼부정근 근단 장기저장 후 알긴산나트륨의 농도가 측근의 수에 미치는 영향

[표] 산삼부정근 근단 장기저장 후 알긴산나트륨의 농도가
발아 수와 측근의 수에 미치는 영향

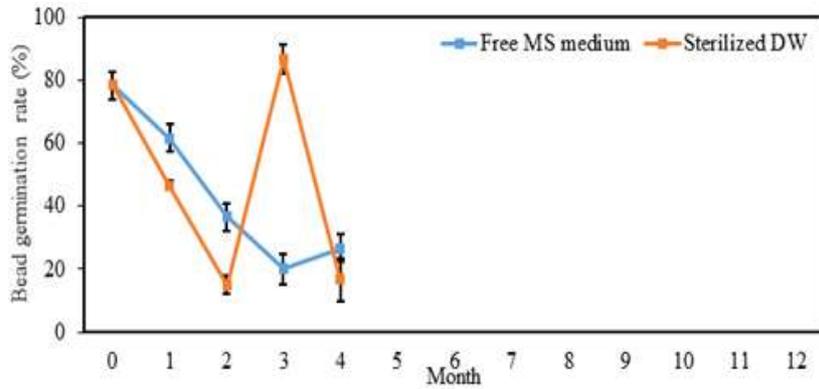
Investigation time (week)	Treatment	No. of bead germination /20 beads	Bead germination rate (%)	No. of lateral roots/bead
4	3%	12.67±1.76b	63.33±8.82b	1.20±0.35b
	5%	2.00±0.00c	10.00±0.00c	0.03±0.03b
8	3%	19.33±0.33a	96.67±1.67a	2.98±0.87a
	5%	11.33±0.88b	56.67±4.41b	0.98±0.25b



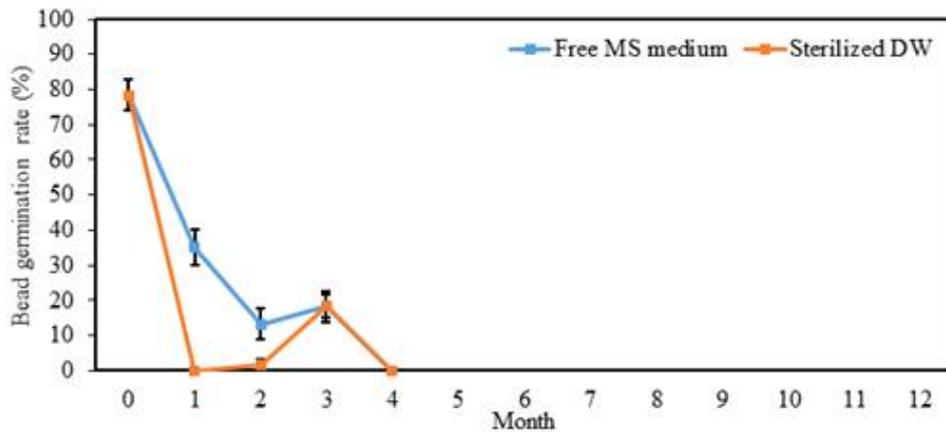
C,E : 소뿔알지네이트 3% 처리 8주 후 모습, D,F : 소뿔알지네이트 5% 처리 8주 후 모습
[그림] 소뿔알지네이트 농도가 산삼 부정근의 인공종자 발아율(A), 부정근의 수(B)에 미치는 영향



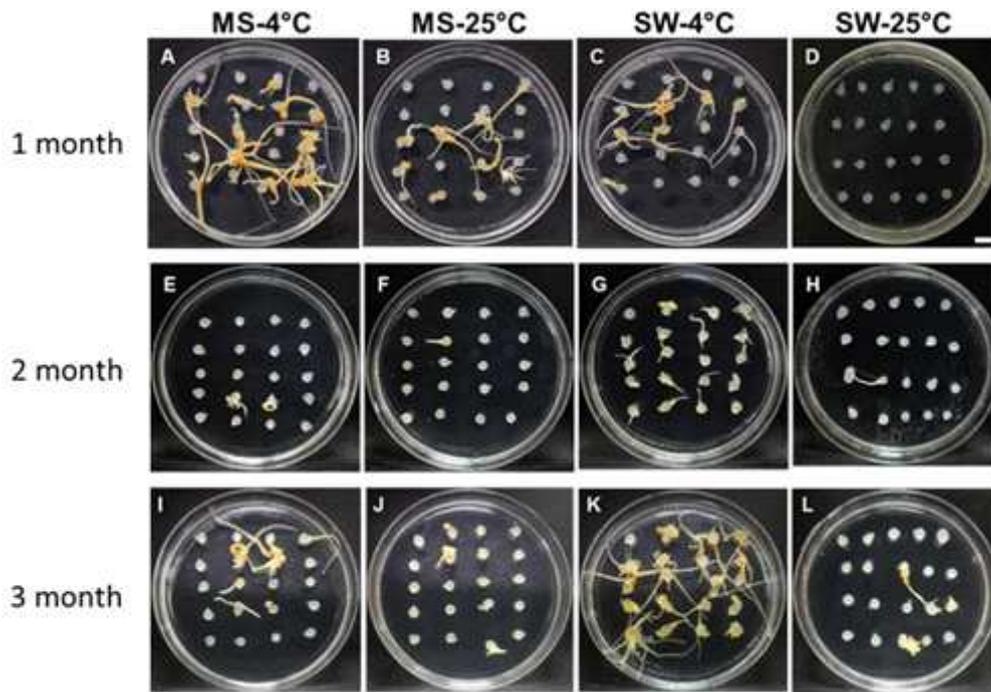
[그림] 저장 온도가 인공종자 발아율에 미치는 영향



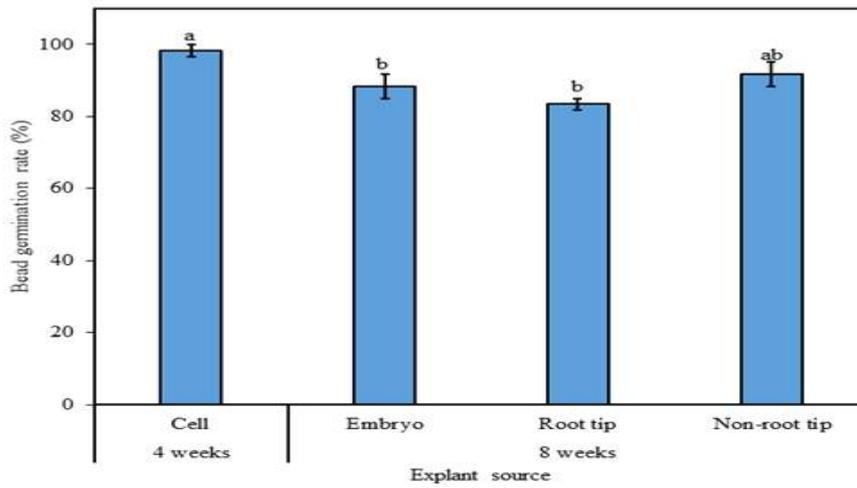
[그림] 산삼부정근 근단 4°C에서 장기저장 후 저장용액이 발아율에 미치는 영향



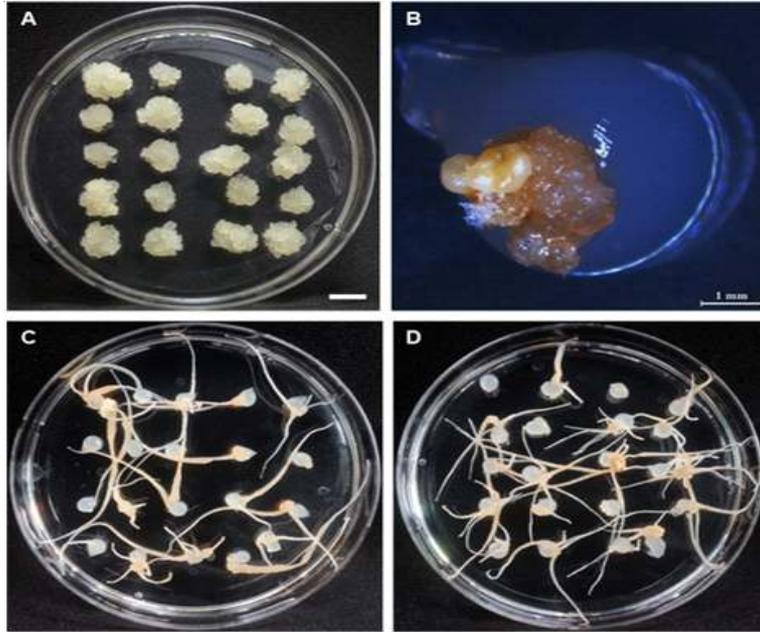
[그림] 산삼부정근 근단 25°C에서 장기저장 후 저장용액이 발아율에 미치는 영향



[그림] 산삼부정근 근단 장기저장 후 저장용액과 온도가 캡슐의 발아에 미치는 영향



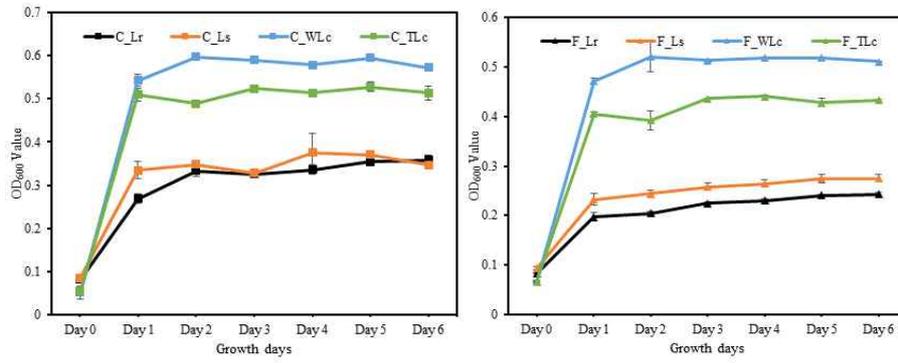
[그림] 식물체 이용부위가 장기저장 후 캡슐의 발아율에 미치는 영향



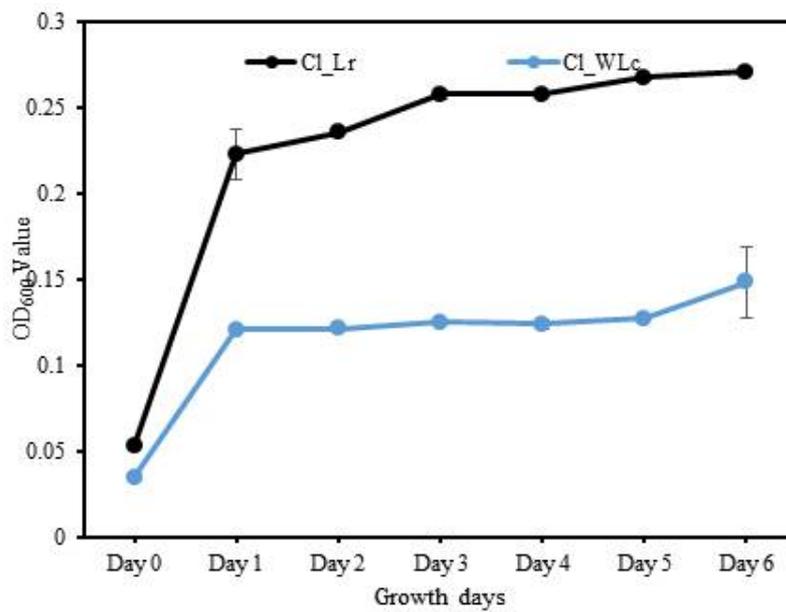
A : 세포 B : 체세포배(somatic embryo), C : 근단 D : 근단 체외 부정근
 [그림] 식물체 이용부위가 장기저장 후 캡슐의 발아율에 미치는 영향

(바) 산삼 부정근 배양 35일 후 배양배지에 4 종류의 균 처리시 성장 특성

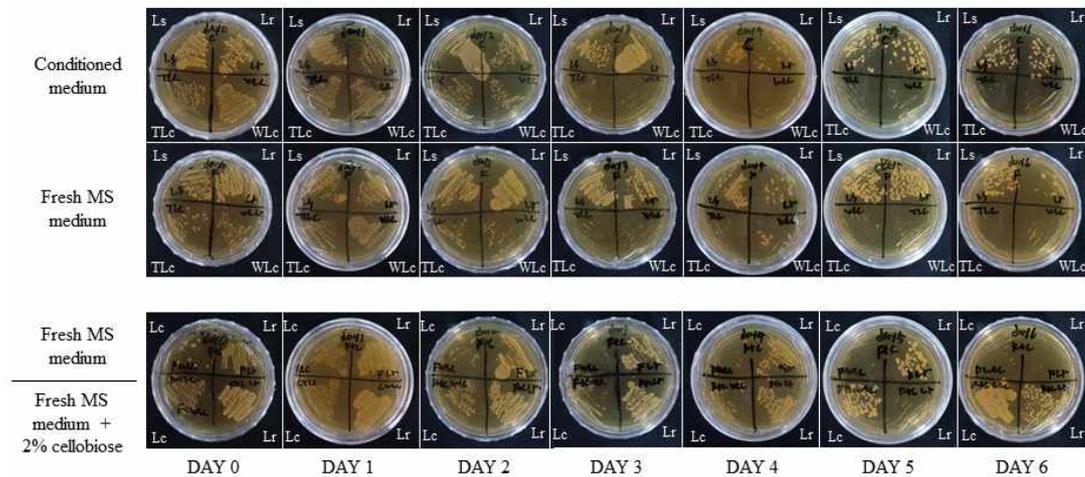
- ① 재료 : *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus sanfranciscensis*, wild type
Leuconostoc citreum, transgenic *Leuconostoc citreum*
- ② 처리 내용
 - ㉠ 처리 농도 : 2% (v/v medium), OD600 1
 - ㉡ 배양규모 : 9mL의 배지가 포함된 1mL 팔콘튜브
- ③ 조사항목 : OD600값, pH, EC, 배지에 도달 후 성장 조사
- ④ 실험 결과
 - ㉠ 균은 2일째까지 증식하다가 더 이상 증식하지 않았음
 - ㉡ 산삼부정근 배양용 배지에서 4종류의 균을 배양하는 동안 매일 균 현탁액을 채취하여 MRS 배지에 배양한 결과 균은 증식하지는 않았지만 살아 있음을 확인하였음
 - ㉢ 본 실험을 통해서 엘리시테이션 기간을 1주일로 하는 것이 적합하다는 것을 확인하였음
 - ㉣ 배지는 산삼부정근이 배양된 conditioned medium이 가장 최적인 것으로 확인되어 본 실험에서 35일간 배양하고 박테리아를 처리할 경우 아무 문제가 없음을 확인하였음
 - ㉤ 셀로비오즈 처리는 오히려 효과적이지 못했음



[그림] 4종류의 균처리가 컨디션드 배지의 OD₆₀₀ 값에 미치는 영향



[그림] 4종류의 균처리가 셀로비오스가 포함된 산삼부정균 배지의 OD₆₀₀ 값에 미치는 영향



[그림] 각 처리별 시간에 따른 4가지 종류 균의 성장관찰

(사) β -glucosidase 생산 균주와 균 처리 농도에 따른 진세노사이드의 bioconversion 효과

- ① 재료 : 청솔 line 산삼 부정균, *Lactobacillus rhamnosus*GG, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum*
- ② 처리 방법
 - ㉠ 처리농도 : OD₆₀₀ = 1, 0.02(20 μ L/ 100 mL medium), 0.2%(200 μ L/ 100 mL medium) (v/v)
 - ㉡ 처리시기 : 수확 1주일 전
 - ㉢ 배양밀도 : Bioreactor에서 30일간 배양된 부정균 7 g/ 100 ml
 - ㉣ 배양 규모 : 100mL 산삼부정균 배지가 포함된 배양통 (3/4MS+IBA 5mg·L⁻¹+sucrose 5%, pH 5.8)

[표] 농도가 다른 3종류 균 처리

Treatments	Live bacteria (% v/v)		
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
Non-treatment	-	-	-
LR 0.02	0.02	-	-
LS 0.02	-	0.02	-
LC 0.02	-	-	0.02
LR 0.2	0.2	-	-
LS 0.2	-	0.2	-
LC 0.2	-	-	0.2

③ 조사항목

- ㉠ 생육조사 : 생체중, 건물중, 건물율
- ㉡ 배지조사 : pH, EC 측정
- ㉢ 스트레스지표 : Malondialdehyde(MDA), Catalase(CAT), Peroxidase(POD)
- ㉣ 분석 : β -glucosidase, 총 사포닌 함량
- ㉤ HPLC 분석 : 진세노사이드 함량

④ 실험 결과

- ㉠ 생육조사에서 생체중과 건물중 간에는 유의한 차이가 나타나지 않음
- ㉡ 건물량은 Lc 0.2%(v/v)처리에서 가장 높았음(12.3%)
- ㉢ 배지조사에서 EC는 모든 처리구에서 서서히 감소하였으며, pH는 2일까지 증가한다음 감소함
- ㉣ 총 사포닌 함량은 모든 처리구에서 대조구보다 높았으며, 특히 0.2%처리(35.2mg·g⁻¹ DW)에서 가장 높았음

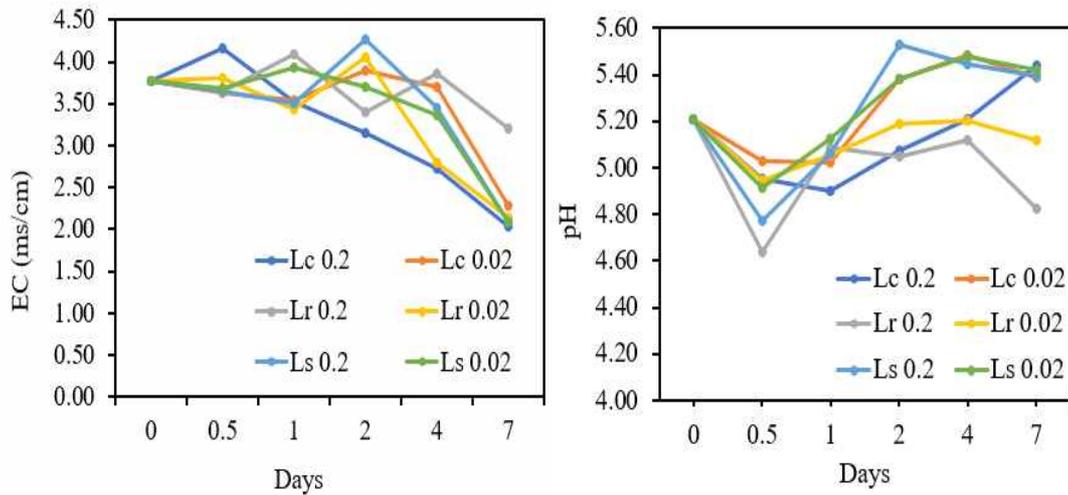
- ㉓ MDA분석에서 Lc 처리구를 제외한 다른 처리구는 1일까지 소폭 감소하였다가 증가하는 경향이 나타남
- ㉔ CAT분석에서 모든 처리구에서 0.5일까지 감소하였다가 1일에 증가하고 감소하는 경향을 보임

[표] 균과 산삼부정근 공동배양이 생장에 미치는 영향

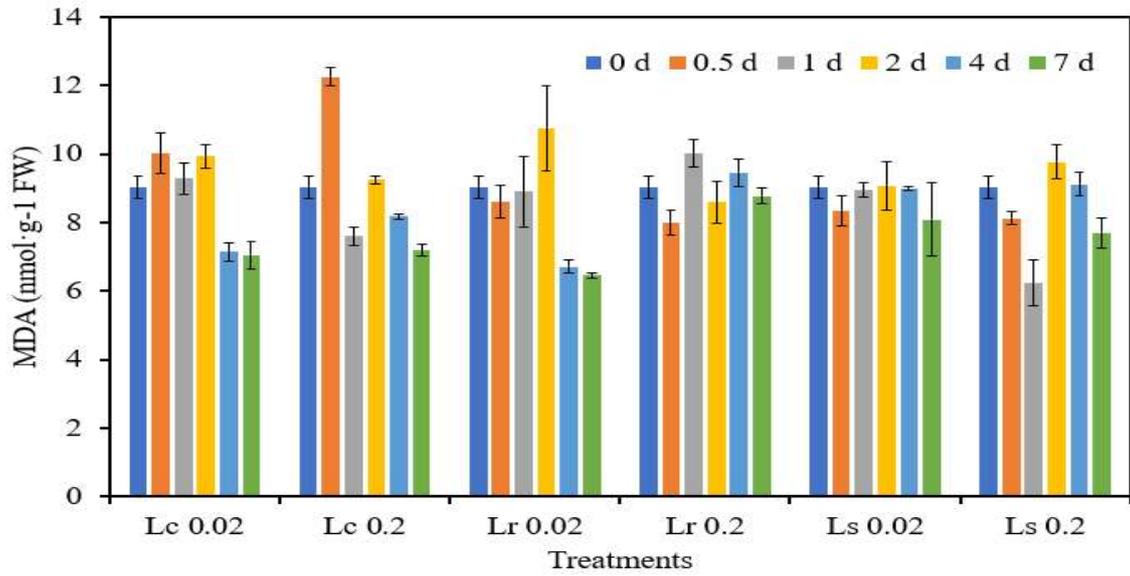
Treatment	Fresh weight (g/vessel) ¹⁾	Dry weight (g/vessel)	Dry matter ²⁾ (%)
Control	11.88 ± 0.24	1.35 ± 0.06	11.39
Lr 0.02	12.38 ± 0.12	1.46 ± 0.03	11.77
Lr 0.2	12.24 ± 0.94	1.41 ± 0.13	11.49
Ls 0.02	10.68 ± 1.26	1.26 ± 0.09	11.82
Ls 0.2	11.94 ± 0.59	1.43 ± 0.03	12.01
Lc 0.02	12.07 ± 1.29	1.40 ± 0.03	11.58
Lc 0.2	11.71 ± 1.28	1.43 ± 0.06	12.25

¹⁾Mean including 100 mL medium of 3/4 MS medium supplemented 24.6 μM IBA with 5% sucrose

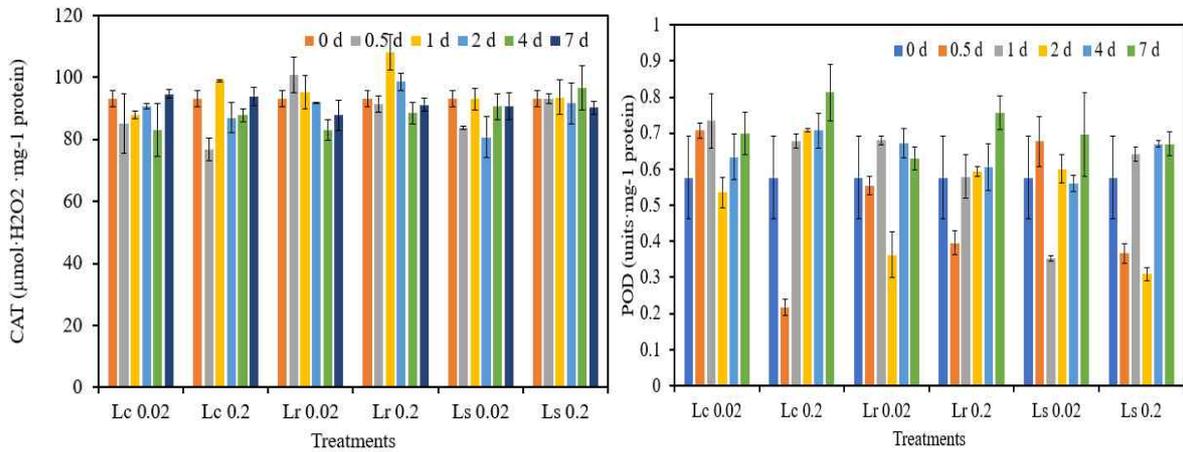
²⁾Dry matter calculated by DW / FW * 100



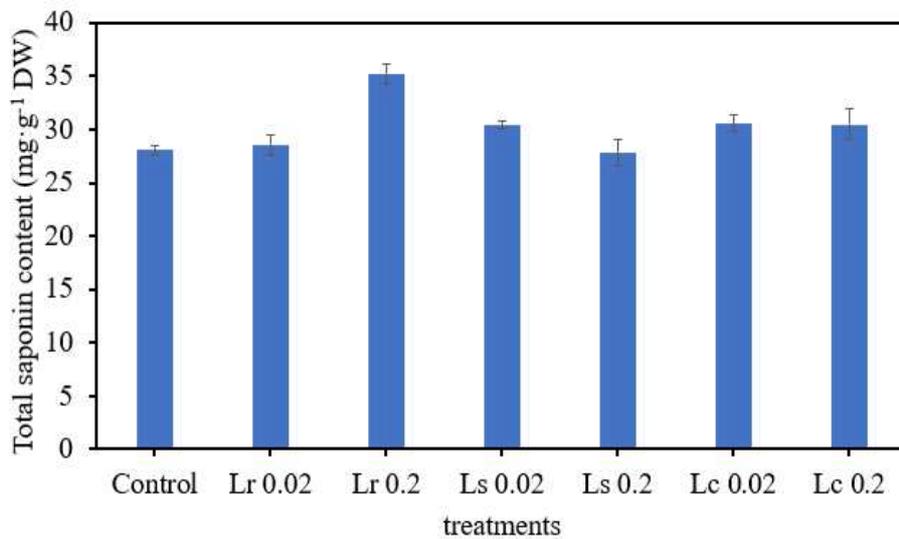
[그림] 균과 산삼부정근 공동배양이 EC와 pH에 미치는 영향



[그림] 3가지 균과 산삼부정근 공동배양이 MDA에 미치는 영향



[그림] 3가지 균과 산삼부정근 공동배양이 CAT와 POD에 미치는 영향



[그림] 균과 산삼부정근 공동배양이 총 사포닌 함량에 미치는 영향

(3) 특이적 기능성물질 함량 증진 (ginsenoside (triol, diol, D/T 등) 30% 증진)

(가) 콜히친 처리를 통한 산삼배양근의 배수체 라인 유도

① 식물재료 : 1-yr-old (CS) 라인 산삼배양근

② 배수체 유도를 위한 콜히친 처리 농도 및 시간

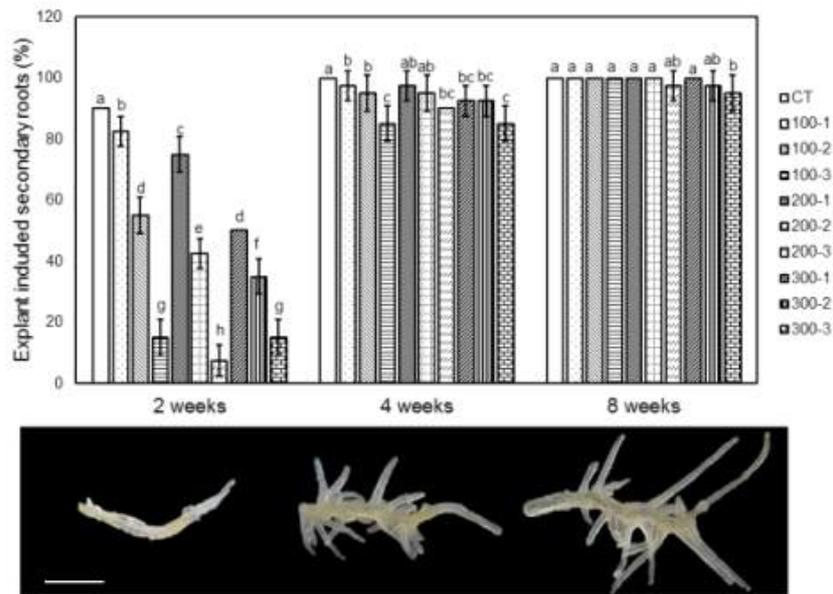
: 0, 100, 200, 300 mg/L / 1, 2, 3 days

③ 배수체 유도 결과

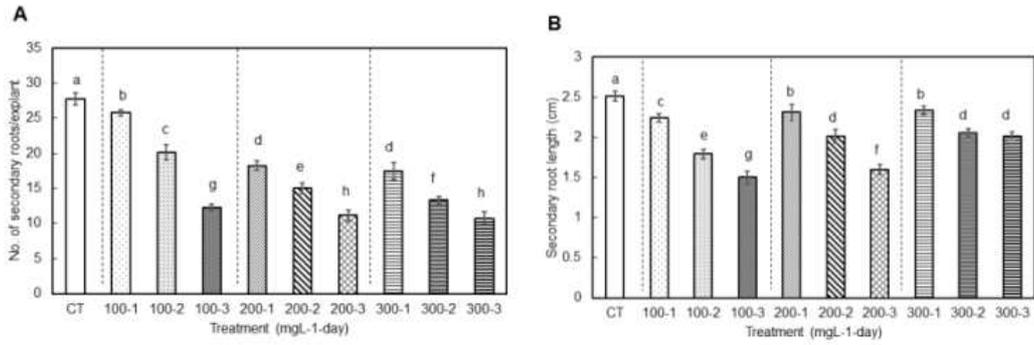
㉞ 콜히친 처리된 초기의 배수체 추정라인은 대조구에 비해 측근 유도수와 길이가 적은 경향을 나타냄.

㉟ Flow cytometry를 이용하여 DNA 함량을 분석한 결과, 8배체 배양근 39개라인 (100-1-2, 100-1-18, 300-1-16, 300-2-8 등)과 16배체 배양근 1개라인(300-3-19)을 선발함.

㊱ 100-1-18 라인(8배체)이 바이오매스 측면에서 가장 높은 경향을 나타냄. 이는 배수체가 됨에 따라 성장과 관련된 유전자의 증대와 관련있는 것으로 생각됨.



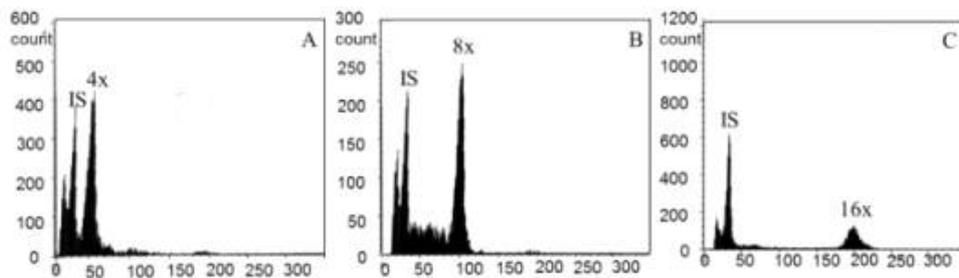
[그림] 콜히친 처리농도와 배양기간에 따른 산삼배양근의 측근 형성과 형태학적 특성



A; 측근 형성수, B; 측근 길이
 [그림] 콜히친 처리농도에 따른 산삼배양근의 측근 형성수와 길이

[표] 콜히친 처리농도에 따른 산삼배양근 배수체 유도율

Colchicine concentration (mg L ⁻¹)	Exposure time (day)	No. of treated roots	Ploidy ^a (%)		
			Tetraploid (4x)	Octoploid (8x)	Hexadecaploid (16x)
0 (control)	0	40	100.0	0.0	0.0
	1	40	95.0	5.0	0.0
100	2	40	95.0	5.0	0.0
	3	40	87.5	12.5	0.0
200	1	40	85.0	15.0	0.0
	2	40	85.0	15.0	0.0
	3	40	82.5	17.5	0.0
300	1	40	87.5	12.5	0.0
	2	40	90.0	10.0	0.0
	3	40	92.5	5.0	2.5



A; 대조구, B; 8배체, C; 16배체, IS; 내부표준(페튜니아)
 [그림] Flow cytometry를 이용한 산삼배양근 배수체 DNA 함량 히스토그램

[표] 산삼배양근 배수체의 4주 배양 후 바이오매스

Ployploidy lines	FW (g/L)	DW (g/L)	%DW	Growth ratio	Length (cm)	No. of lateral root
CT	73.36 ^d	5.39 ^c	7.34 ^{ab}	13.91 ^c	1.83 ^c	25.83 ^c
100-1-2	84.31 ^c	6.25 ^{bc}	7.42 ^{ab}	16.10 ^b	3.32 ^b	39.83 ^b
100-1-18	94.87 ^b	7.19 ^{ab}	7.59 ^{ab}	17.98 ^a	4.62 ^a	50.50 ^a
300-1-16	93.28 ^b	7.60 ^{ab}	8.15 ^a	17.66 ^a	3.08 ^b	39.50 ^b
300-2-8	99.84 ^a	6.87 ^{ab}	6.86 ^b	18.98 ^a	3.08 ^b	38.50 ^b



[그림] 산삼배양근 배수체의 형태학적 관찰

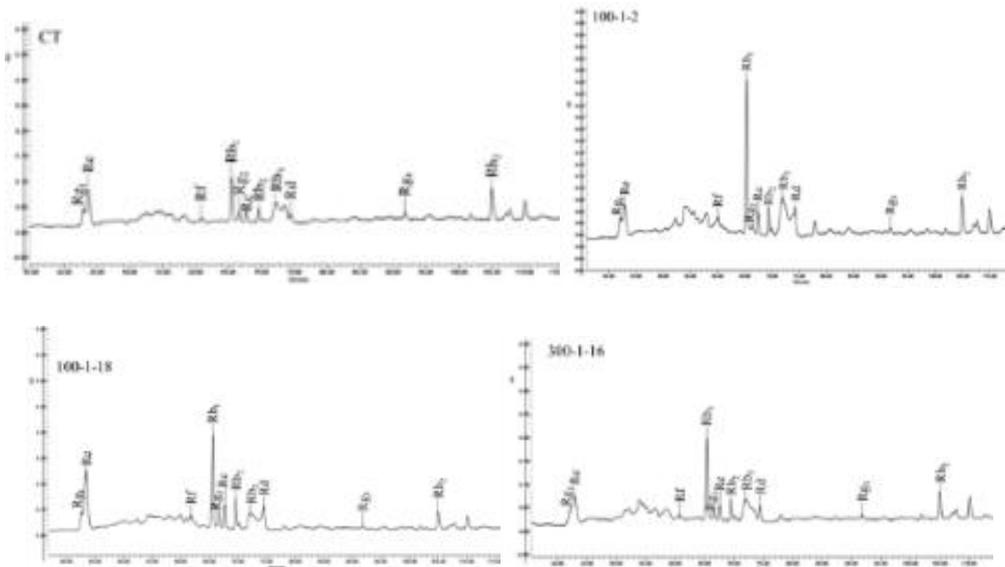
④ 배수체라인 진세노사이드 함량 및 생합성 관련 유전자 발현도 분석결과

- ㉠ 100-1-18 라인의 진세노사이드 함량(14.66 mg/g DW)이 가장 높았으며, 이는 PPD계 Rb2와 PPT계 Re에서 유사한 경향을 나타냄.
- ㉡ 100-1-18 라인의 진세노사이드 생산량(186.60 mg/L)은 대조구에 비해 약 6배(600% 증가) 높은 수치를 보임.
- ㉢ 100-1-18 라인은 진세노사이드 생합성 관련 유전자(*PgSS2*, *PgSE2*, *PPDS2*, *PPTS*)의 높은 발현도를 보여 앞선 결과를 뒷받침함.
- ㉣ 따라서 100-1-18 라인은 바이오매스와 진세노사이드 생합성에 있어 가장 우수한 8배 체 라인임을 확인함.

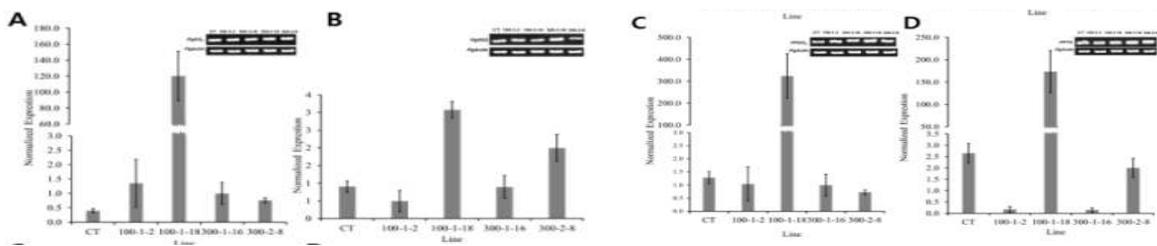
[표] 산삼배양근 8배체라인의 진세노사이드 함량

Ginsenoside content (ng/g DW)	PPD							PPT			
	Rb ₁	Rb ₂	Rb ₃	Rc	Rd	Rg ₃	Rh ₂	Re	Rf	Rg ₁	Rg ₂
CT	1.08d [*]	0.29c	1.23a	0.39b	0.24a	0.06a	0.52a	1.64c	0.07b	0.62b	0.22b
100-1-2	2.98b	0.51b	0.15b	0.59b	0.46a	0.06ab	0.53a	1.13c	0.09b	0.53b	0.18b
100-1-18	4.01a	1.19a	0.28b	0.85a	0.50a	0.05a	0.48a	4.72a	0.33a	1.06a	0.71a
300-1-16	2.18bc	0.52b	0.14b	0.35b	0.30a	0.05ab	0.44a	1.60c	0.05b	0.64b	0.25b
300-2-8	1.74cd	0.45bc	0.10b	0.29b	0.31a	0.10b	0.44a	2.29b	0.12b	1.16a	0.30b

^{*}Different letters within a column indicate significant difference at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test ($n = 3$)



[그림] 산삼배양근 8배체 라인 HPLC 크로마토그램



A; PgSS2, B; PgSE2, C; PPDS2, D; PPTS

[그림] 산삼배양근 8배체라인의 진세노사이드 생합성 유전자발현도

(나) 감마선 조사를 통한 산삼배양근의 돌연변이체 라인 유도

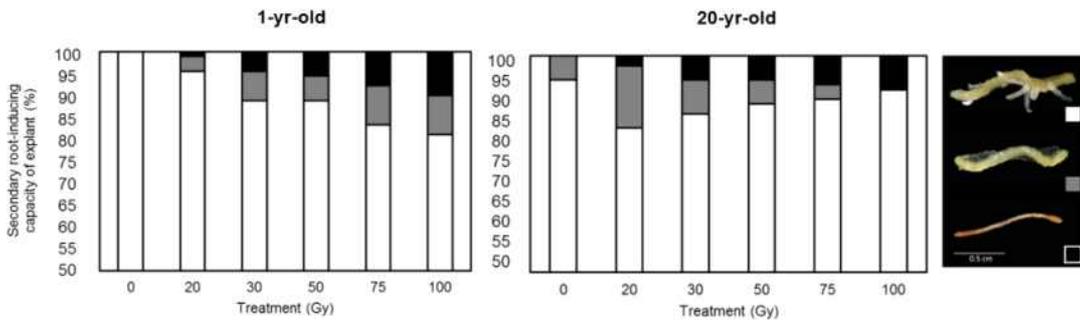
① 식물재료 : 1-yr-old (CS) 라인, 20-yr-old (CBN) 라인 산삼배양근

② 돌연변이체 유도를 위한 감마선 조사세기

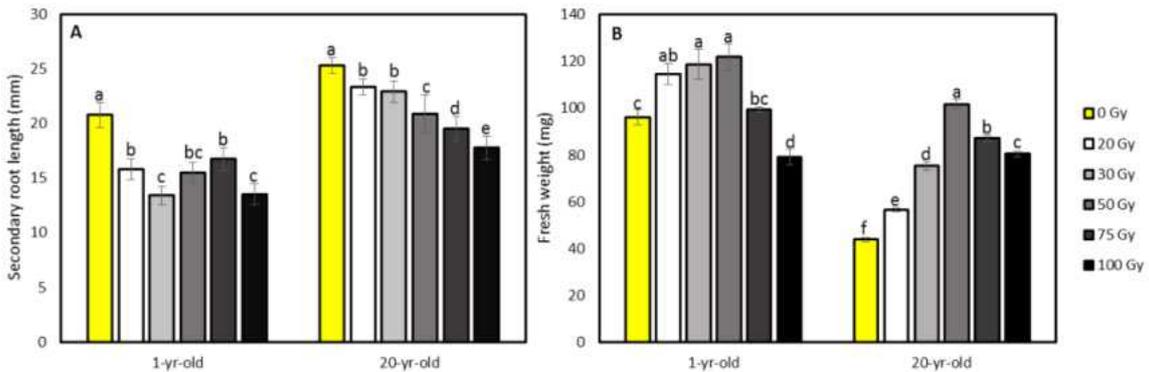
: 0, 20, 30, 50, 75, 100 Gray

③ 돌연변이체 유도 결과

- ㉞ 감마선을 조사한 결과, 감마선 세기가 커질수록 측근 발생률이 점차 감소하였음.
- ㉟ 무처리에 비하여 감마선 처리구의 측근 길이가 감소하였으나 생체중은 증가하였음. 이는 감마선에 의하여 배양근이 스트레스를 받았기 때문인 것으로 보임.
- ㊱ 생체중 측면에서 50 Gray 처리 시 2개 라인에서 모두 대조구보다 높은 것으로 나타남. 이는 배양초기에 감마선 처리시 측근분화는 억제되었으나 주근에서의 세포분열능이 빨라져 캘러스화에 기인한 것으로 생각됨.



[그림] 감마선 처리세기에 따른 산삼배양근의 측근 유도율



A; 측근길이, B; 생체중

[그림] 감마선 처리세기에 따른 산삼배양근의 측근 길이와 생체중

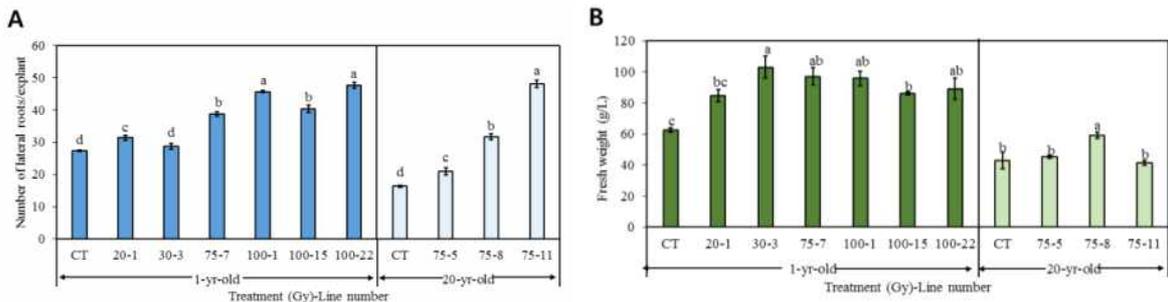
(다) 산삼배양근 돌연변이체 라인 선발

① 돌연변이체 라인 선발 결과

- ㉞ 1-yr-old (CS) 라인 산삼배양근에 감마선 조사처리를 한 결과 총 6개 라인의 돌연변이 추정체를 선발하였음. (20-1, 30-3, 75-7, 100-1, 100-15, 100-22)
- ㉟ 20-yr-old (CBN) 라인 산삼배양근에 감마선 조사처리를 한 결과 총 3개 라인의 돌

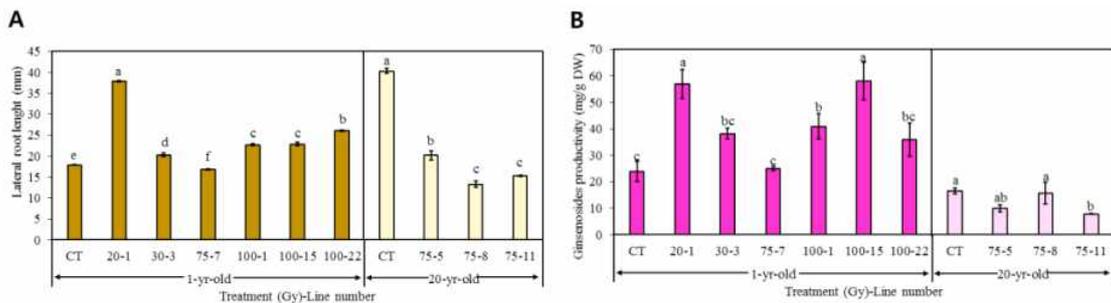
연변이 추정체를 선발하였음. (75-5, 75-8, 75-11)

- ㉔ 선발된 모든 돌연변이 추정체의 측근수와 생체중은 대조구에 비해 증가하였고, 측근 길이와 진세노사이드 생산량의 경우는 1-yr-old (CS) 라인의 돌연변이 추정체는 증가된 경향을 보였으나 20-yr-old (CBN) 라인의 돌연변이 추정체는 감소된 경향을 보였다. 이는 감마선 조사에 따른 영향이 각 라인별 바이오매스와 생리활성물질 생합성과 연관되어 다르게 작용한 것으로 추정됨.
- ㉕ 진세노사이드 생산량은 대조구에 비하여 1-yr-old (CS) 의 20-1과 100-15 돌연변이체 추정라인에서 2.3배 (230% 증가) 높은 수치를 나타냄.



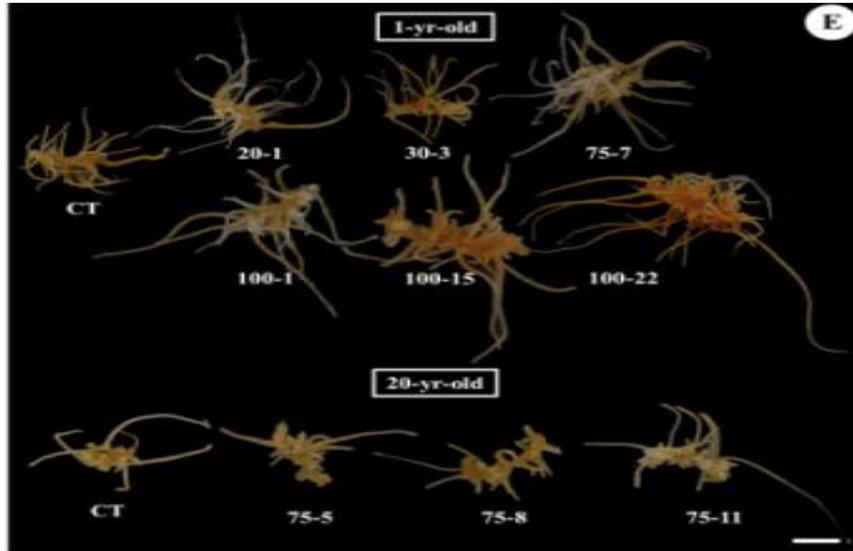
A; 측근수, B; 생체중

[그림] 선발된 돌연변이 추정체의 측근수와 생체중



A; 측근길이, B; 진세노사이드 생산량

[그림] 선발된 돌연변이 추정체의 측근길이와 진세노사이드 생산량



[그림] 감마선 처리에 따른 돌연변이 추정체의 형태학적 관찰

나. 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

(1) Pilot-scale 생산시스템에서 유효성분 고함유 바이오메스 대량생산

(가) 식물재료: 산삼부정근

(나) 배지조성(Lab scale에서 기 선발된 배지)

① 3/4MS, 5mg/L IBA, 50g/L sucrose, pH5.7~5.8

(다) 배양기간: 47일

① (1 단계, 1~40일) 식물생장 기간

② (2 단계, 41~47일) Elicitation 기간, Methyl Jasmonate 200 μ M처리

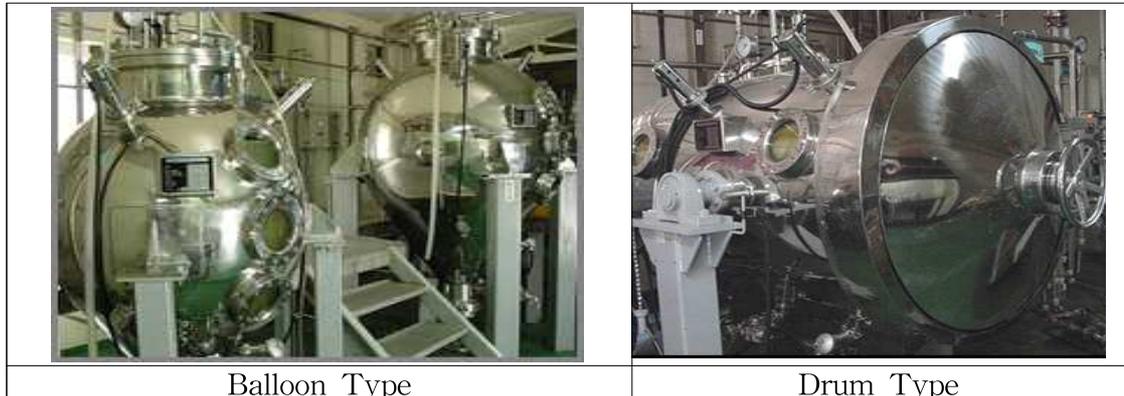
(라) 배양 용기: Pilot-scale 생물반응기

(마) 공기공급량: 0.1vvm

(바) 집중량: 5 & 10g/L medium

No.	Type	$k_{La}(h^{-1})$	Vol.(L)
1	Balloon	6.69	500
2			1,000
3	Drum	6.25	500
4			1,000

* K_{La} : 산소전달계수



Balloon Type

Drum Type

(사) 바이오매스 조사 결과

- ① 생물반응기 Type에 따른 산삼부정근의 바이오매스를 조사한 결과 Balloon type이 Drum type에 비해 바이오매스 생산량이 6~8% 정도 높게 나타났음. Balloon type의 생물반응기는 Drum type에 비해 반응기 내부의 dead zone이 적고 배양액의 교반이 우수하며 산소전달계수가 높아 바이오매스 생산에 효율적이라고 생각됨

No.	Type	Vol.(L)	Biomass(kg)	
			FW	DW
1	Balloon	500	65	5.2
2		1,000	115	10.5
3	Drum	500	55	4.9
4		1,000	100	9.7

- ② Balloon type 1,000L 생물반응기를 대상으로 접종량에 따른 산삼부정근 바이오매스를 조사한 결과 5g/L medium 처리구의 경우 생체중은 115kg, 건물중은 10.5kg로 나타남. 10g/L medium 처리구의 경우 생체중은 135kg, 건물중은 12.4kg로 바이오매스 생산성이 높게 나타남

Inoculum density(g/L)	Biomass(kg)	
	FW	DW
5	115	10.5
10	135	12.4

(아) 산삼부정근과 야생 인삼의 사포닌(진세노사이드) 함량 비교 분석

- ① 총 사포닌: anillin-sulfuric acid colormetric method(spectrophotometer, 540nm)
 ② 진세노사이드: HPLC system(Waters 2695 module, 2996 detector)
 ③ 진세노사이드 표준품 : Rg1, Re, Rf, Rh1, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rd, Rg3, Rh2, Compound K (13종)

(자) 함량 및 생산량 계산법

- ① 진세노사이드 함량(mg/g DW)

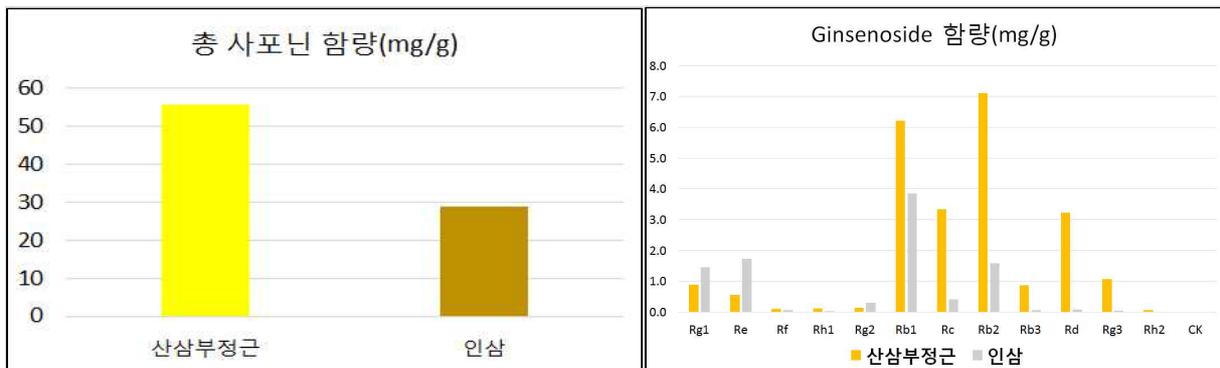
$$= \frac{HPLC \text{ 분석 함량}(mg/L) \times \text{추출용매 부피}(L)}{\text{추출 샘플 건물중}(g)}$$

(차) 분석결과

- ① 산삼부정근의 총 사포닌 함량은 55.86mg/g DW, 진세노사이드(13종) 함량은 23.72mg/g DW으로 나타남. PPT계 진세노사이드(5종)는 1.80mg/g DW, PPD계 진세노사이드(7종)는 21.91mg/g DW, Compound K 함량은 0.011mg/g DW으로 나타남

- ② 야생 인삼의 총 사포닌 함량은 28.77 mg/g DW이며 진세노사이드(13종) 함량은 9.63mg/g DW으로 나타남. PPT계 진세노사이드(5종)는 3.59mg/g DW, PPD계 진세노사이드(7종)는 6.03mg/g DW, Compound K 함량은 0.003mg/g DW으로 나타남
- ③ 산삼부정근과 6년근 인삼의 총사포닌과 진세노사이드(13종) 함량을 비교한 결과 총 사포닌은 1.94배, 진세노사이드(13종)는 2.46배 가량 높게 나타남.

구분		산삼 부정근	인삼	
Gin senoside(mg/ g dry wt.)	Proto panax triol (PPT)	Rg1	0.89	1.45
		Re	0.55	1.74
		Rf	0.11	0.06
		Rh1	0.11	0.04
		Rg2	0.13	0.30
	Proto panax diol (PPD)	Rb1	6.22	3.84
		Rc	3.34	0.42
		Rb2	7.11	1.58
		Rb3	0.87	0.06
		Rd	3.24	0.08
		Rg3	1.08	0.05
		Rh2	0.06	0.04
	Compound K		0.011	0.003
	Total Ginsenoside		23.72	9.63
총 사포닌		55.86	28.77	



[그림] 산삼부정근과 인삼의 총 사포닌과 진세노사이드 함량

다. *Agrobacterium* Ri-plasmid를 이용한 모상근 유도

(1) 박테리아의 분양 및 Rol gene 삽입여부 확인

(가) 박테리아 재료 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC), 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 5가지 스트레인의 *Agrobacterium rhizogenes*

(나) 배지조성

- ① LB medium : 10 g/L sodium chloride, 5 g/L yeast extract, 10 g/L peptone, 15 g/L agar
- ② Nutrient agar : 3 g/L nutrient broth, 5 g/L peptone, 15 g/L agar

(다) 배양방법

- ① 기 선발된 박테리아 고체배지에 백금봉을 이용하여 도말 후 항온인큐베이터에서 배양
- ② 고체배지에서 단일콜로니를 분리하여 박테리아 액체배지로 옮기고 항온진탕기에서 배양

(라) Plasmid DNA 추출 : *AccuPrep*[®] Plasmid Mini Extraction Kit(Bioneer, K-3030)

- ① 액체배지에서 배양된 박테리아 1 ml를 1.5 ml 튜브에 채취하여 원심분리 후 배지를 제거함.
- ② 박테리아 내 세포질 및 단백질을 제거함.
- ③ 에탄올을 이용하여 세척 후 Plasmid DNA를 정제함.

(마) 중합효소연쇄반응(PCR)

- ① 정제된 Plasmid를 Taq polymerase mix와 기 디자인된 프라이머 (Forward, Reverse) 와 혼합하여 반응시킴.
- ② .프라이머 : Ri-plasmid rol A gene, rol B gene, rol C gene
- ③ 중합효소연쇄반응 조건 :

초기변성(95°C, 5분) → {변성 (95°C, 30초) → 풀림(56°C, 30초) → 증폭(72°C, 1분)}
→ 후기증폭(72°C, 5분) → 반응종료(4°C, ∞)

※ { } 내 반응 35번 반복

(바) 전기영동

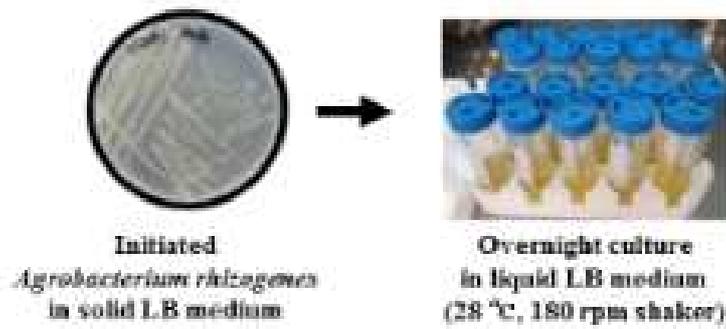
- ① 2% 아가로오스 이용 DNA 산물 크기를 확인
- ② 래더 : 100 bp DNA ladder
염색 : Nippon Genetics Europe (Midori green)
- ③ Rol gene 산물 크기 : rol-A (248 bp), rol-B (652 bp), rol-C (490 bp)

(사) Rol gene 삽입여부 확인 결과

- ① KCCM 11879 스트레인의 Plasmid DNA에서 rol A, rol B, rol C gene 삽입이 확인됨.
- ② KCTC 2744, KCCM 11683 스트레인의 Plasmid DNA에서 rol A, rol C gene의 삽입이 약하게 확인됨.

[표] 분양받은 *Agrobacterium rhizogenes* 스트레인과 배양배지조성

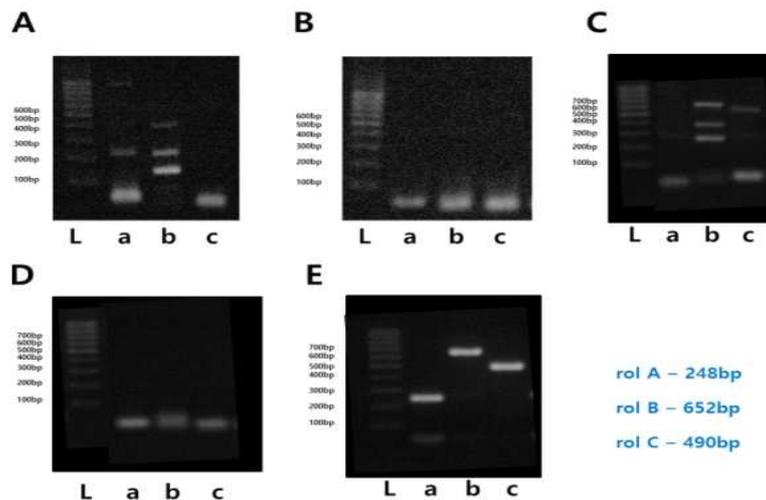
Strain No.	Culture medium, temperature
KCTC 2744	LB medium, 25°C
KCTC 12403	LB medium, 30°C
KCCM 11683	Nutrient agar, 26°C
KCCM 11743	Nutrient agar, 26°C
KCCM 11879	Nutrient agar, 26°C



[그림] 고체배지와 액체배지에 각각 접종된 *Agrobacterium rhizogenes*

[표] Rol gene 프라이머 시퀀스

Primer name	Sequence (5'→3')
rol A-F	CGTTGTCGGAATGGCCCAGACC
rol A-R	CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC
rol B-F	ACTATAGCAAACCCCTCCTGC
rol B-R	TTCAGGTTTACTGCAGCAGGC
rol C-F	TGTGACAAGCAGCGATGAGC
rol C-R	TGTGACAAGCAGCGATGAGC



A; KCTC 2744, B; KCTC 12403, C; KCCM 11683, D; KCCM 11743, E; KCCM 11879

[그림] 전기영동을 통한 *A. rhizogenes* Plasmid DNA내 rol gene 삽입 여부 확인

(2) *Agrobacterium rhizogenes* Ri-plasmid를 이용한 산삼 모상근 유도

(가) 박테리아 재료 : KCCM 11879 스트레인

(나) 식물재료 : 산삼배양근 8배체 라인 (100-1-18)

(다) 배지조성

① 대조구 배지 : 3/4 MS, 50 g/L sucrose, 3 g/L gelrite

② 모상근 유도 배지 : 3/4 MS, 50 g/L sucrose, 500 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite

(라) 모상근 유도 방법

① 기 선발된 박테리아 고체배지에 백금봉을 이용하여 도말 후 항온인큐베이터에서 배양

② 고체배지에서 단일콜로니를 분리하여 박테리아 액체배지로 옮기고 항온진탕기에서 배양(26°C, 150rpm)

③ 박테리아 액체배지 2 ml를 100µM Acetosyringone이 들어있는 MS 액체배지 18 ml와 혼합하여 항온진탕기에서 배양(26°C, 150rpm)

④ 배양된 박테리아 배지에 1~2cm로 절단된 산삼 배양근을 30분 간 접종하고, 멸균수로 세척 후 3일 간 새로운 배지에서 공동배양

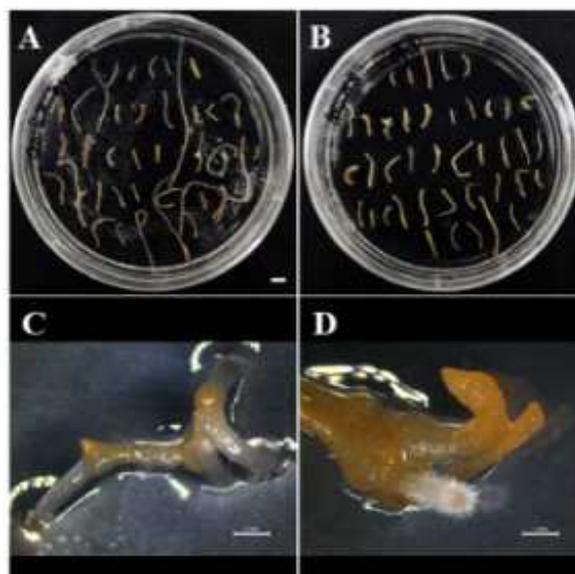
⑤ 항생제가 포함된 새로운 배지로 계대배양하여 박테리아를 제거시켜주고, 특이적으로 여러개의 부정근이 분화되는 모상근 추정개체를 선발함.

(마) 모상근 유도 결과

① 형태학적 관찰 : 접종 후 4주 경과, 총 600 접종 개체 중 5개의 모상근 추정개체를 선발함.

② 항생제가 없는 배지로 계대배양 후 더 많은 모상근 추정개체 선발 예정. (7월 중)

③ 최종 선발된 모상근 추정개체의 DNA를 추출하여 rol gene 삽입여부 확인 예정. (7~8월 중)



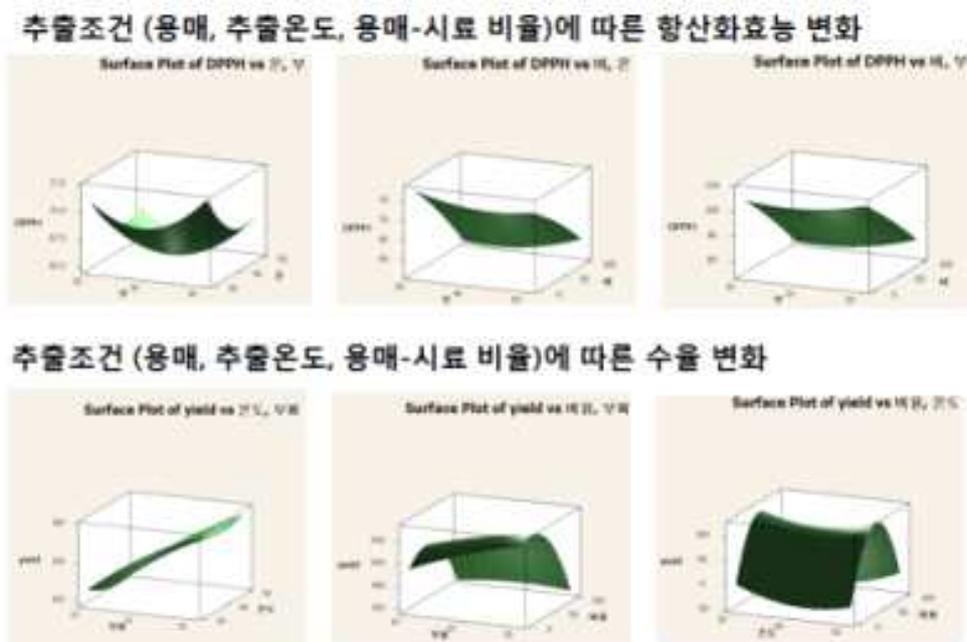
A; 대조구 배지, B; 모상근 유도 배지, C, D; 모상근 추정 개체
[그림] 대조구와 모상근 추정개체의 형태학적 관찰

라. 산삼 부정근 unknown 특이성분 분리

(1) 산삼 부정근 추출물의 HPLC 크로마토그램을 이용한 특이성분 검색

(가) 추출조건에 따른 산삼배양근의 항산화효능 및 수율 최적화

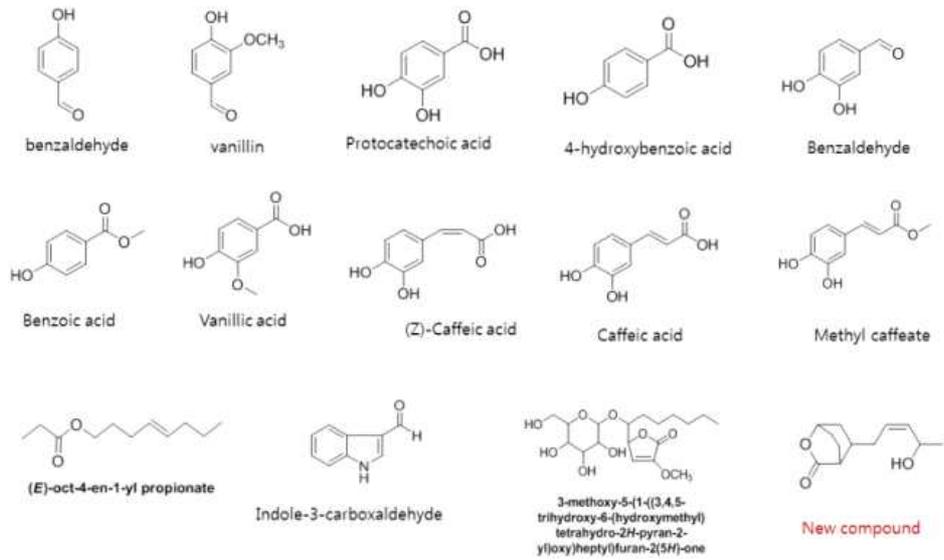
- ① 추출용매, 추출온도, 용매-시료비율에 따른 항산화효능을 비교한 결과 추출용매가 가장 큰 영향을 미쳤으며 에탄올에서 가장 높은 효능을 나타내었음.
- ② 수율의 경우 추출용매 및 용매-시료비율에 영향을 받았으며 76% 물로 1:30 비율로 추출이 최적의 조건이었음.



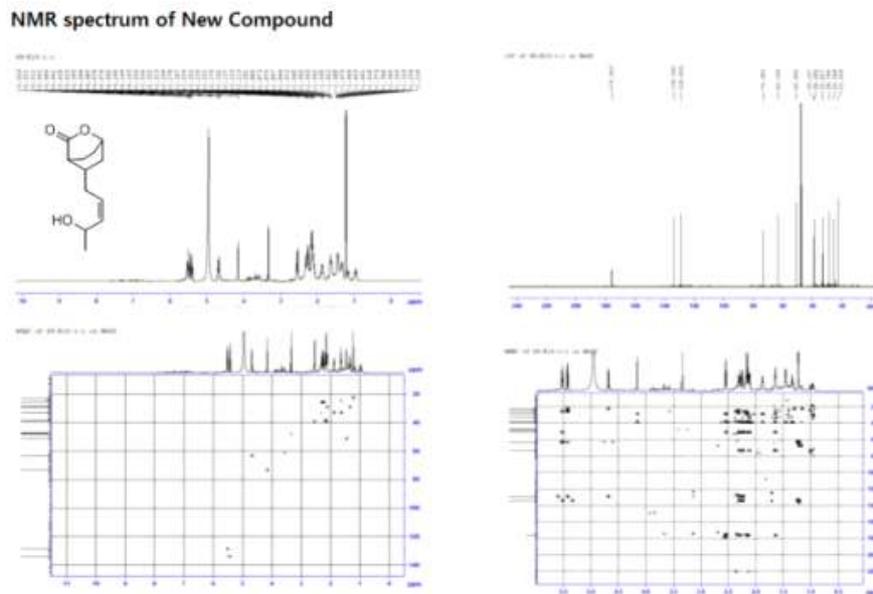
[그림] 추출조건에 따른 산삼배양근의 항산화효능 및 수율 최적화

(나) 산삼배양근의 성분 연구

- ① 산삼배양근으로부터 14종의 화합물을 분리, 구조 동정하였다.
- ② 이 중 1개는 천연조건에서 처음 분리 및 보고된 화합물로 NMR을 이용하여 그 구조를 결정함.



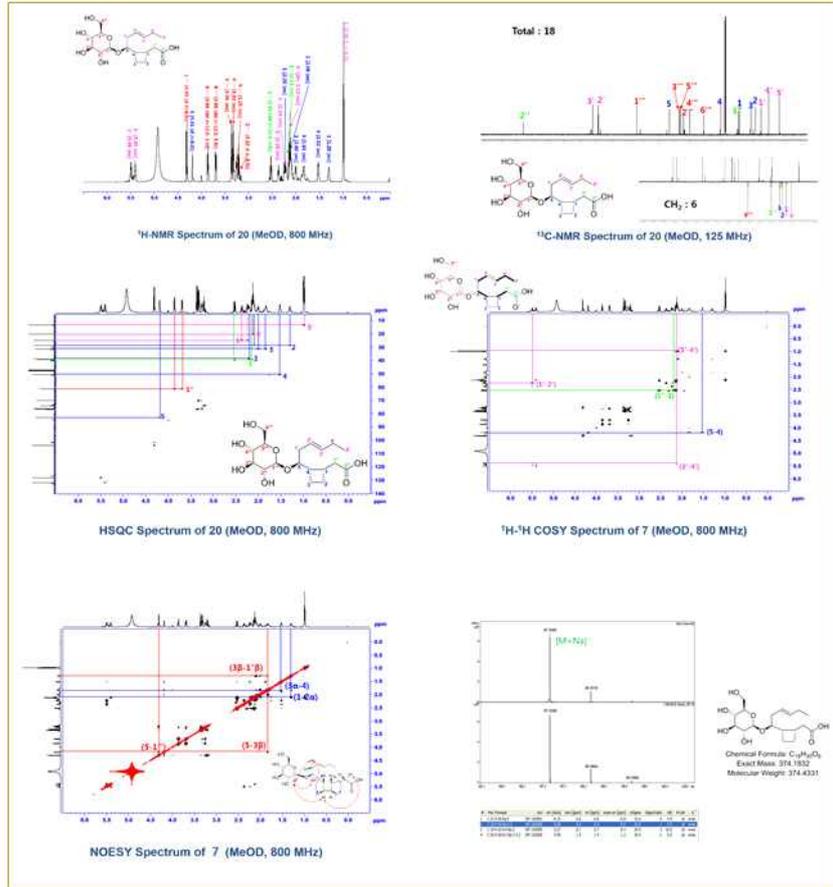
[그림] 산삼배양근의 성분 분자구조



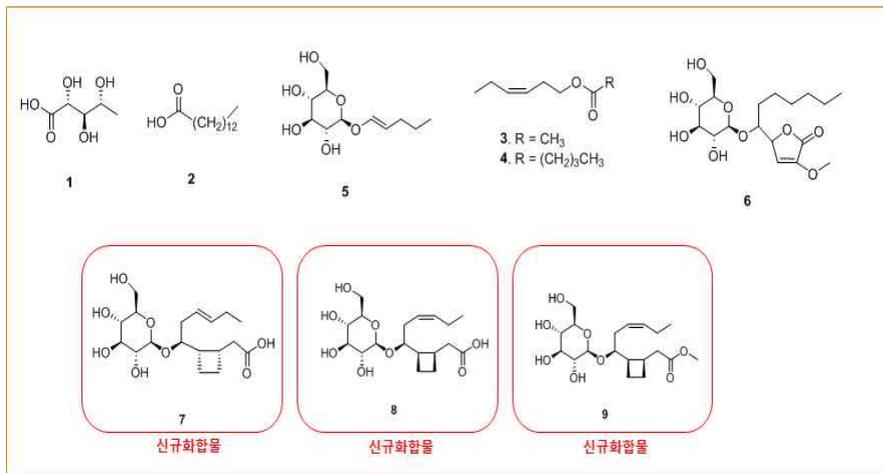
[그림] 새로운 화합물의 NMR 스펙트럼

(다) 산삼배양근 특이성분 구조규명

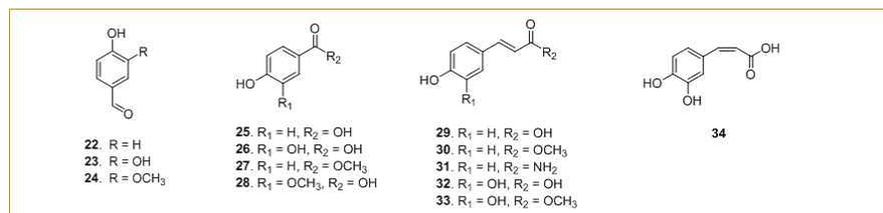
- ① 총 40종의 화합물 구조규명
- ② 신규화합물 10종 구조규명



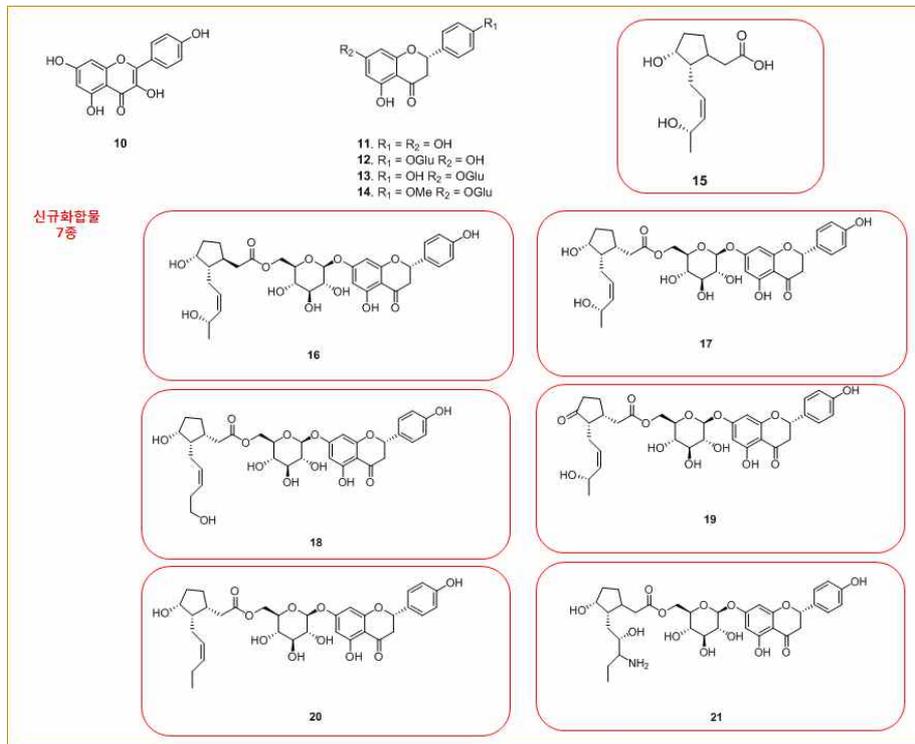
[그림] 40종의 화합물 분리 및 구조분석



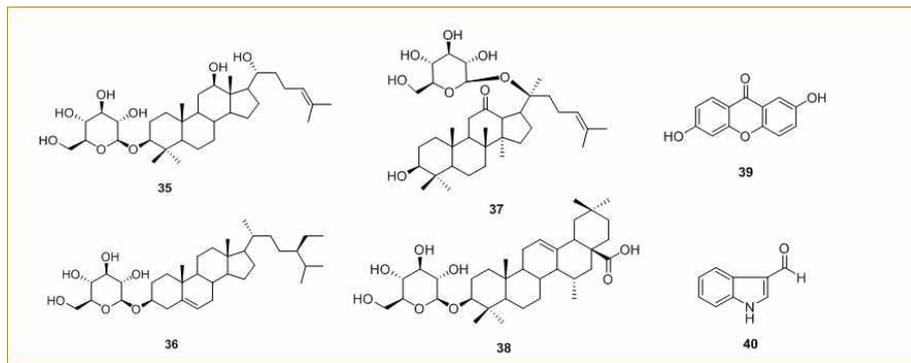
[그림] Cyclobutane계열 9종 (신규화합물 3종)



[그림] Flavonoid 유도체 9종 (신규화합물 7종)



[그림] Phenolic 화합물 13종



[그림] saponin, xanthone 등 6종

2. 에키네시아 배양근

가. 기능성 의약품 개발

(1) 고기능성 부정근 라인(line) 선발 및 성장조건 구명

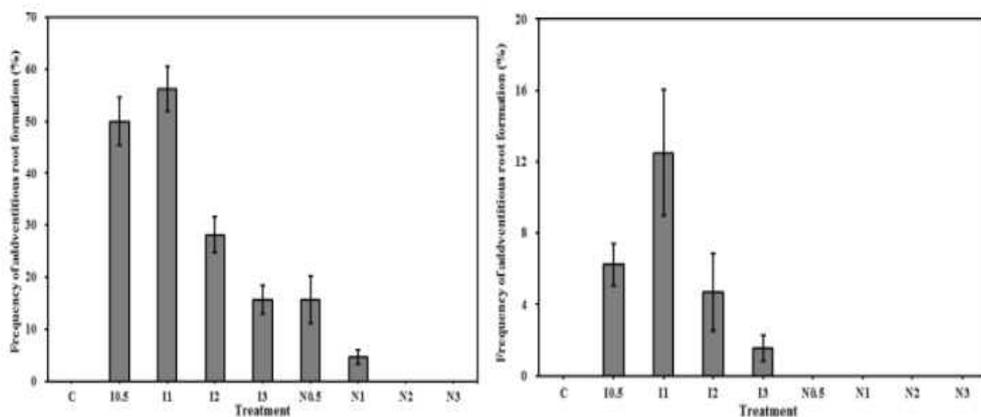
(가) 에키네시아 식물체로부터 부정근 유도

- ① 식물재료 : 에키네시아 두 품종(*pallida*, *angustfolia*)의 엽병 절편체(0.5-1cm)
- ② 배지조성 : MS + sucrose 50g/L+ gelrite 2.5g/L, pH 5.7 ~ 5.8
- ③ 처리구

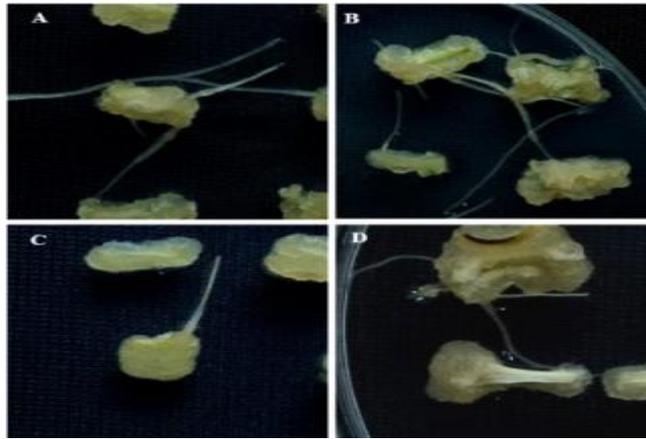
Leveling	Auxin (μM)	
	NAA	IBA
1	C	-
2	N0.5	2.69
3	N1	5.37
4	N2	10.74
5	N3	16.11
6	N4	21.48
7	I0.5	2.46
8	I1	4.92
9	I2	9.84
10	I3	14.76
11	I4	19.68

④ 실험결과

- ㉠ 에키네시아 파리다(*Echinacea pallida*) 품종의 부정근 유도율은 IBA 4.92 μM 처리구에서 가장 높았으며, NAA 처리에 비해 IBA 처리가 부정근 유도에 효과적이었다.
- ㉡ 에키네시아 앙구스트폴리아(*Echinacea angustfolia*) 품종의 부정근 유도율은 IBA 4.92 μM 처리구에서 가장 높았으며, NAA 처리에서는 부정근이 유도되지 않았다.
- ㉢ 에키네시아 앙구스트폴리아(*Echinacea angustfolia*) 품종에 비해 에키네시아 파리다(*Echinacea pallida*) 품종의 부정근 유도율이 4배 이상 더 높았다.



[그림] 에키네시아 파리다(*Echinacea pallida*)와 앙구스트폴리아(*Echinacea angustfolia*) 품종의 부정근 유도에 미치는 식물생장조절제의 영향



[그림] 두 품종의 에키네시아 엽병에서 유도된 부정근

(나) 감마선 처리에 의한 고기능성 부정근 라인 선발

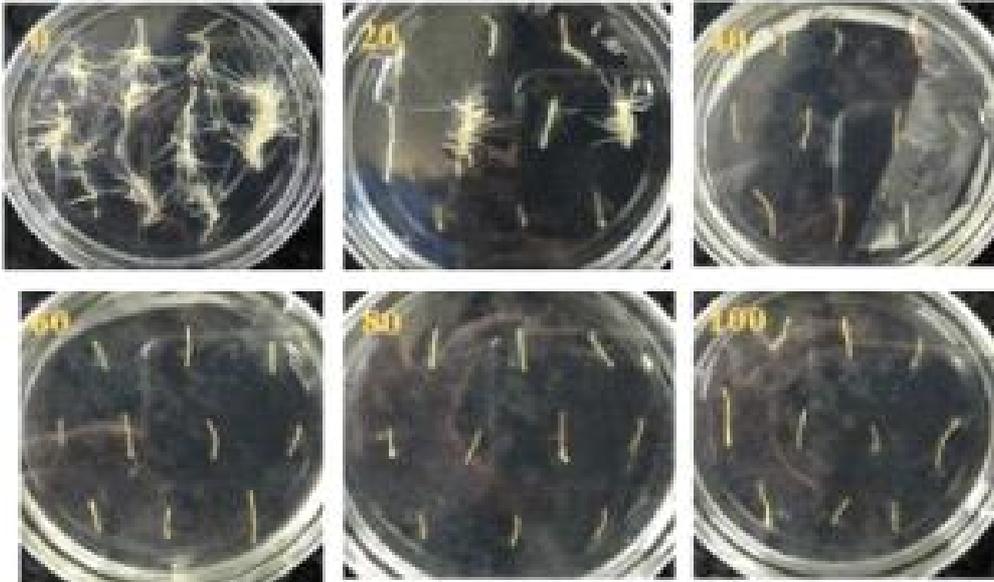
- ① 식물재료 : 에키네시아 풀푸레아(*Echinacea purpurea*) 품종의 부정근
- ② 배지조성 : 3/4MS + IBA 4.92 μ M + sucrose 30g/L, pH 5.7 ~ 5.8
- ③ 감마선 조사량 : 0, 20, 40, 60, 80, 100 Gray

(다) 실험결과

- ① 무처리에 비해 감마선 처리구에서 측근 발생률이 현저히 감소하였으며, 60Gy 이상의 감마선 처리구에서는 측근이 발생하지 않았다.
- ② 무처리에 비하여 감마선 처리구의 측근 개수와 길이가 감소하였다. 이는 감마선에 의하여 부정근이 스트레스를 받았기 때문인 것으로 보인다.

[표] 감마선 처리에 의한 측근 발생 양상 변화

Gamma ray treatment (Gy)	Lateral root induction rate (%)	Number of lateral roots (ea)	Length of lateral roots (cm)
0	88.0 \pm 4.8	21.8 \pm 2.2	1.8 \pm 0.1
20	32.9 \pm 5.2	9.5 \pm 2.7	1.1 \pm 0.2
40	2.0 \pm 2.0	1.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
60	0	-	-
80	0	-	-
100	0	-	-



[그림] 감마선 처리에 후 측근 발생 모습

(2) 기능성 물질함량 축적을 위한 배양조건 구명

(가) 식물생장조절제가 부정근 배양에 미치는 영향

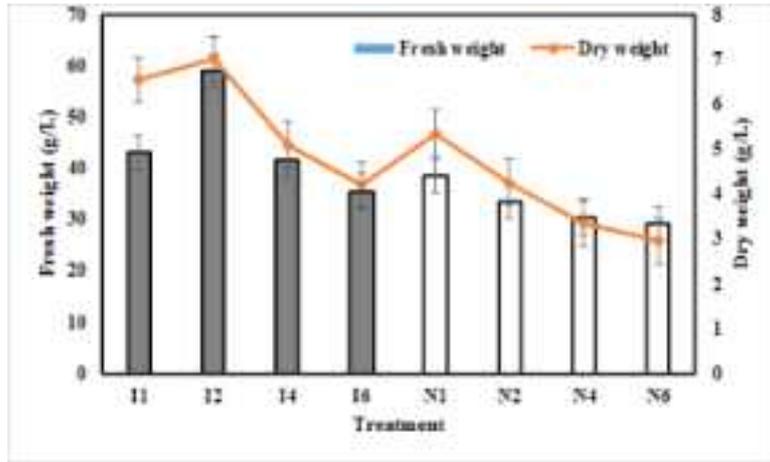
- ① 식물재료 : 에키네시아 풀푸레아(*Echinacea purpurea*) 품종의 부정근
- ② 배지조성 : 3/4MS + sucrose 30g/L, pH 5.7 ~ 5.8
- ③ 식물생장조절제 종류와 농도

Leveling		Auxin (μM)	
		IBA	NAA
1	I1	4.92	-
2	I2	9.84	-
3	I4	19.68	-
4	I6	29.52	-
5	N1	-	5.37
6	N2	-	10.74
7	N4	-	21.48
8	N6	-	32.22

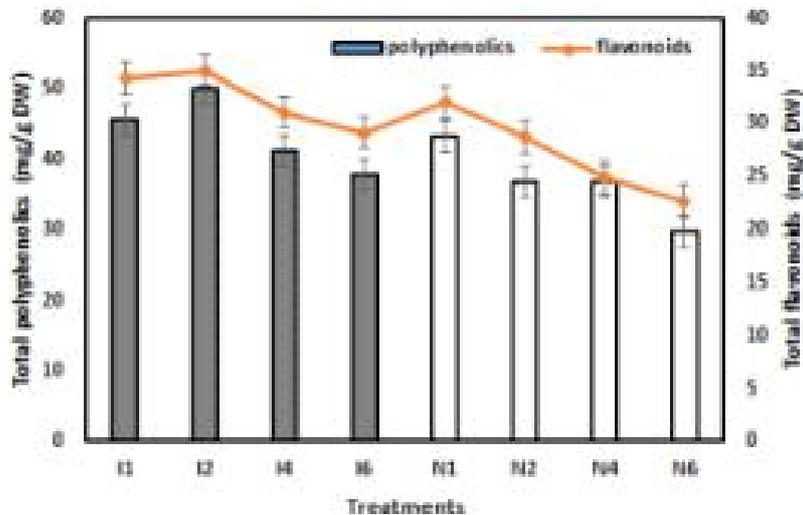
④ 실험결과

- ㉠ 부정근의 생장은 IBA 9.84 μM 처리구에서 생체중과 건물중이 가장 높았으며, 그 이상의 농도에서는 생장이 감소하였다.
- ㉡ NAA 처리구는 농도가 높을수록 생장이 감소하였으며, IBA에 비하여 농도와 상관없이 생장이 낮았다.
- ㉢ 총 페놀과 플라보노이드 함량은 IBA 9.84 μM 처리구에서 각각 50.0 mg/g DW와 35.1

mg/g DW로 가장 높았다.



[그림] 옥신의 종류와 농도가 부정근의 성장에 미치는 영향



[그림] 옥신의 종류와 농도가 총 페놀과 플라보노이드 함량에 미치는 영향

(나) 당 농도가 부정근의 성장에 미치는 영향

① 식물재료 : 에키네시아 풀푸레아(*Echinacea purpurea*) 품종의 부정근

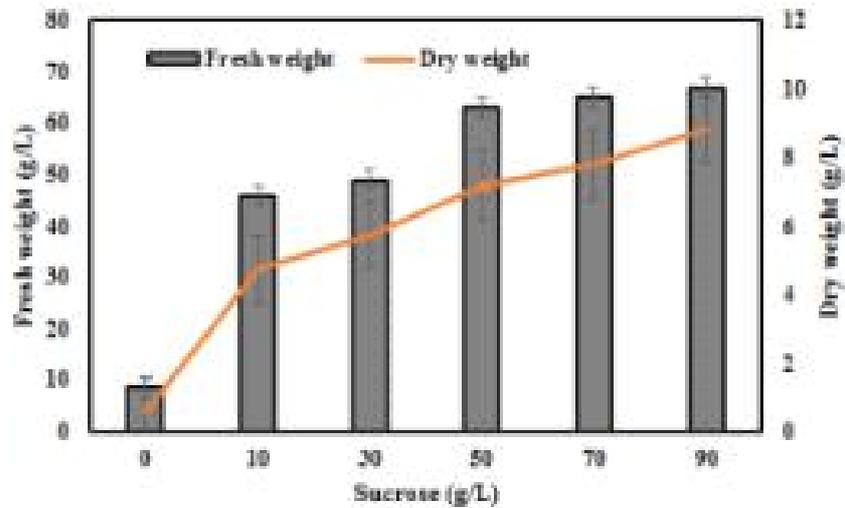
② 배지조성 : 3/4MS + IBA 4.92 μ M, pH 5.7 ~ 5.8

③ 당 농도 : 0, 10, 30, 50, 70, 90g/L

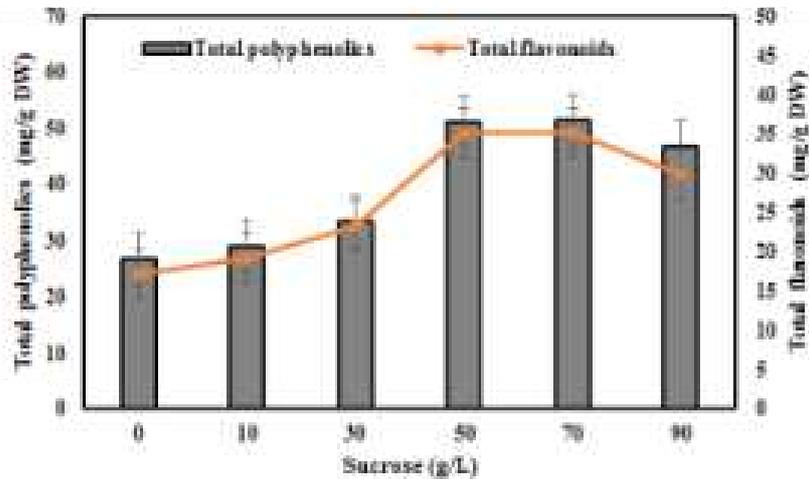
④ 실험결과

㉠ 당 농도가 증가할수록 생체중과 건물중이 증가하여 90g/L 처리구에서 가장 크게 증가하였다.

㉡ 총 페놀과 플라보노이드 함량은 70g/L 이상인 경우 감소하였으며, 50g/L와 70g/L 처리구의 유의차가 없었다.



[그림] 당 농도가 부정근의 생장에 미치는 영향



[그림] 당 농도가 부정근 내 총 페놀과 플라보노이드 함량에 미치는 영향

(3) 특이적 기능성물질 함량 증진 - 에키네시아 부정근: caffeic acid 유도체 5종 등 20% 증진

(가) Elicitation을 통해 특이적 기능성 물질 함량 증진

- ① 식물재료: 에키네시아 풀푸레아(*Echinacea purpurea*) 품종의 부정근
- ② 배지조성: 3/4MS + IBA 4.92 μ M + sucrose 50g/L, pH 5.7 ~ 5.8
- ③ 배양 스케일: 100ml의 배지가 첨가된 300ml 삼각플라스크
- ④ 접종밀도: 7 g/L
- ⑤ 처리구
 - ㉞ 효모 추출액(yeast extract) : 0, 100, 200, 400(mg/L)
 - ㉟ 키토산(chitosan) : 0, 100, 200, 400(mg/L)
 - ㊱ 살리실산(salicylic acid) : 0, 100, 200, 400(μ M)
 - ㊲ 메틸자스모네이트(methyl jasmonate) : 0, 100, 200, 400(μ M)

⑥ 실험결과

㉠ 효모 추출액 처리

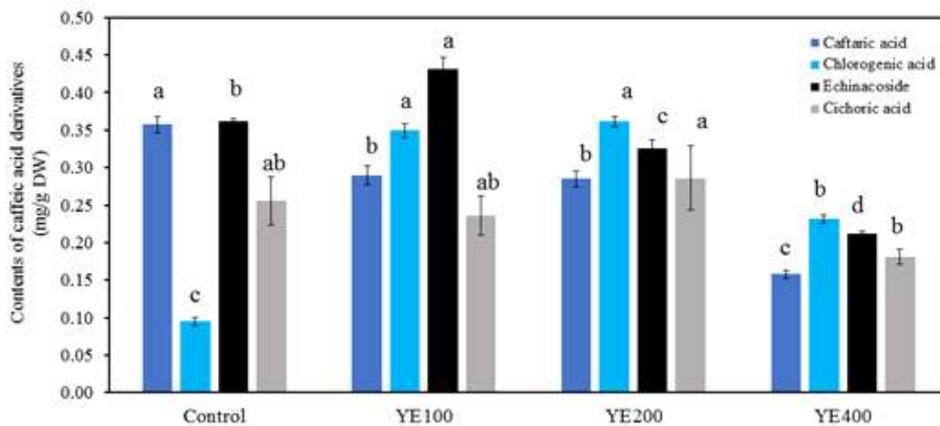
- 대조구와 비교하여 효모 추출액 처리에 의한 에키네시아 부정근의 색이나 형태적 변화는 보이지 않았다.
- 효모 추출액 처리에 의해 부정근의 바이오매스는 대조구에 비해 감소하였으나 건물률은 증가하였다.
- 효모 추출액의 농도별 차이는 보이지 않았다.

[표] 에키네시아 부정근의 바이오매스에 미치는 효모 추출액 처리의 영향

Concentration (mg/L)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Dry matter (%)
0	7.21±0.22	0.65±0.01	9.07±0.20
100	6.24±0.32	0.58±0.02	9.27±0.18
200	5.91±0.34	0.55±0.03	9.30±0.20
400	6.33±0.18	0.59±0.01	9.35±0.14

[표] 효모 추출액 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향

Concentration (mg/L)	Caffeic acid derivatives (mg/g dry biomass)				
	Caftaric acid	Chlorogenic acid	Echinacoside	Cichoric acid	Total
0	0.36±0.01	0.10±0.01	0.36±0.00	0.26±0.03	1.07±0.04
100	0.29±0.01	0.35±0.01	0.43±0.02	0.24±0.03	1.31±0.03
200	0.29±0.01	0.36±0.01	0.33±0.01	0.29±0.04	1.26±0.04
400	0.16±0.01	0.23±0.01	0.21±0.00	0.18±0.01	0.78±0.02



[그림] 효모 추출액 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향



[그림] 효모 추출액 처리에 의한 에키네시아 부정근 변화

㉔ 키토산 처리

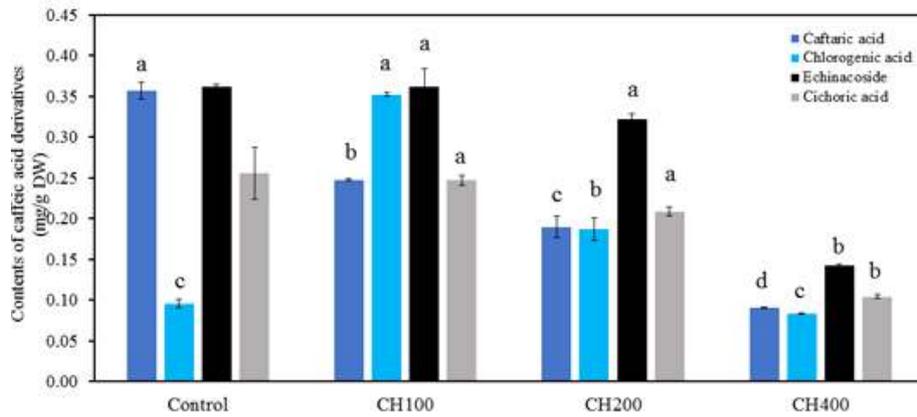
- 키토산의 농도가 증가할수록 대조구에 비해 에키네시아 부정근이 갈변되었다.
- 키토산의 농도가 증가할수록 에키네시아 부정근의 바이오매스가 감소하여, 400mg/L 처리구에서는 대조구에 비해 61% 이상 감소하였으나, 키토산의 농도가 증가할수록 건물률은 증가하는 경향을 보였다.

[표] 에키네시아 부정근의 바이오매스에 미치는 키토산 처리의 영향

Concentration (mg/L)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Dry matter (%)
Control	7.21±0.22	0.65±0.01	9.07±0.20
100	5.83±1.78	0.55±0.03	9.43±0.26
200	3.66±0.55	0.30±0.01	9.06±1.24
400	2.65±0.14	0.25±0.04	9.71±1.43

[표] 키토산 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향

Concentration (mg/L)	Caffeic acid derivatives (mg/g dry biomass)				
	Caftaric acid	Chlorogenic acid	Echinacoside	Cichoric acid	Total
0	0.36±0.01	0.10±0.01	0.36±0.00	0.26±0.03	1.07±0.04
100	0.25±0.00	0.35±0.00	0.36±0.02	0.25±0.01	1.21±0.02
200	0.19±0.01	0.19±0.01	0.32±0.01	0.21±0.01	0.91±0.02
400	0.09±0.00	0.08±0.00	0.14±0.00	0.10±0.00	0.42±0.00



[그림] 키토산 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향



[그림] 키토산 처리에 의한 에키네시아 부정근의 변화

㉔ 살리실산 처리

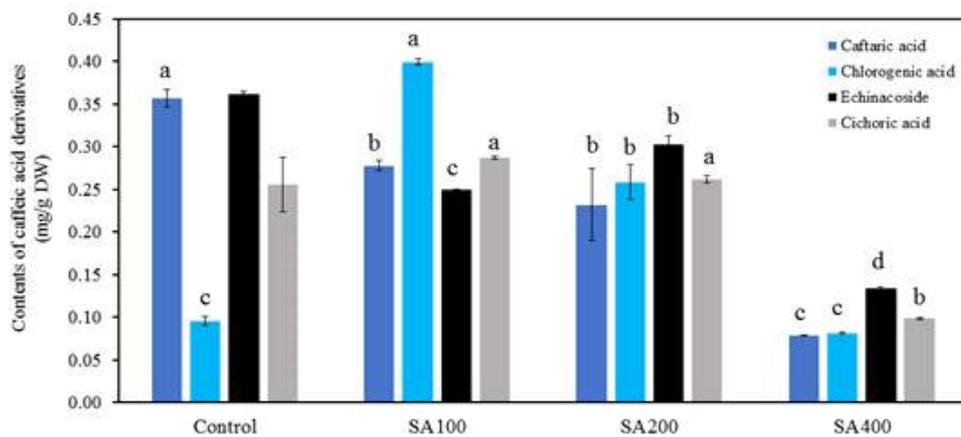
- 살리실산의 농도가 증가할수록 에키네시아 부정근이 심하게 갈변되었다.
- 살리실산의 농도가 증가할수록 에키네시아 부정근의 바이오매스가 감소하였으며, 400 μM 처리구에서는 대조구에 비해 53% 이상 건물중이 감소하였다.
- 반면에 살리실산의 농도가 증가할수록 부정근의 건물률이 증가하였다.

[표] 에키네시아 부정근의 바이오매스에 미치는 살리실산 처리의 영향

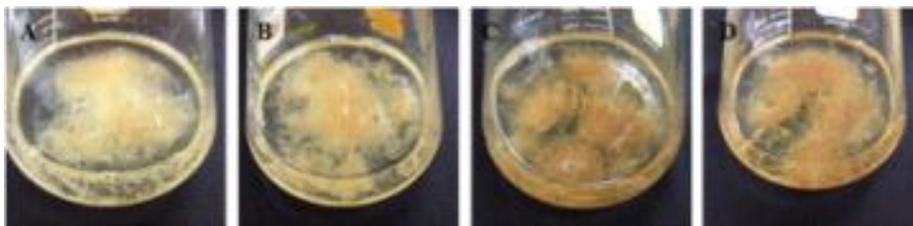
Concentration (μM)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Dry matter (%)
Control	7.21 \pm 0.22	0.65 \pm 0.01	9.07 \pm 0.20
100	6.98 \pm 0.05	0.62 \pm 0.01	8.87 \pm 0.12
200	4.49 \pm 0.18	0.46 \pm 0.02	10.25 \pm 0.30
400	2.94 \pm 0.17	0.30 \pm 0.01	10.21\pm0.43

[표] 살리실산 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향

Concentration (mg/L)	Caffeic acid derivatives (mg/g dry biomass)				
	Caftaric acid	Chlorogenic acid	Echinacoside	Cichoric acid	Total
0	0.36±0.01	0.10±0.01	0.36±0.00	0.26±0.03	1.07±0.04
100	0.28±0.01	0.40±0.00	0.25±0.00	0.29±0.00	1.21±0.00
200	0.23±0.04	0.26±0.02	0.30±0.01	0.26±0.00	1.06±0.05
400	0.08±0.00	0.08±0.00	0.14±0.00	0.10±0.00	0.42±0.00



[그림] 살리실산 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향



[그림] 살리실산 처리에 의한 에키네시아 부정근의 변화

㉔ 메틸자스모네이트 처리

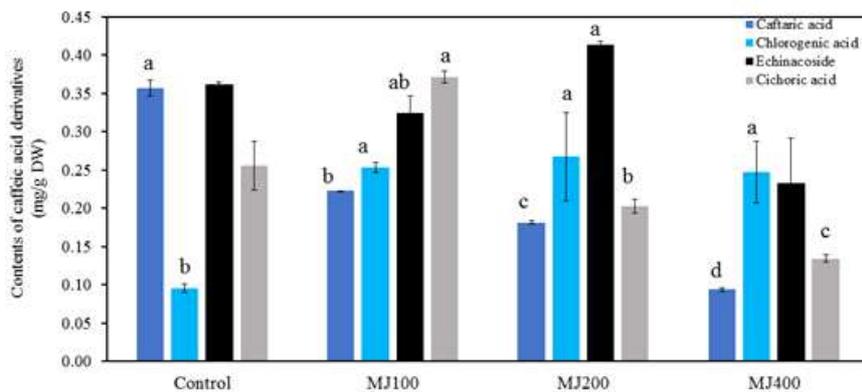
- 살리실산의 농도가 증가할수록 에키네시아 부정근이 심하게 갈변되었으며 부정근의 두께가 얇아지고 측근이 형성되지 않는 경향을 보였다.
- 살리실산의 농도가 증가할수록 에키네시아 부정근의 바이오매스가 감소하였으며, 400 μ M 처리구에서는 대조구에 비해 40% 이상 건물중이 감소하였다.
- 반면에 메틸자스모네이트의 농도가 증가할수록 부정근의 건물중이 증가하였다.

[표] 에키네시아 부정근의 바이오매스에 미치는 메틸자스모네이트 처리의 영향

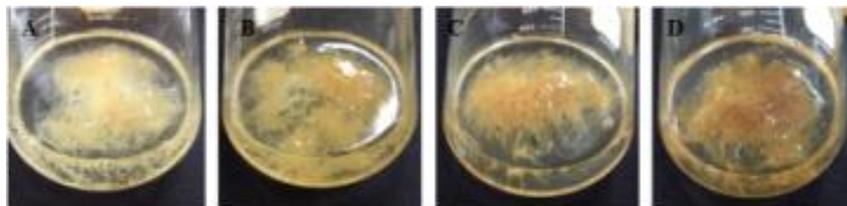
Concentration (μM)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Dry matter (%)
Control	7.21±0.22	0.65±0.01	9.07±0.20
100	6.25±0.25	0.59±0.02	9.48±0.13
200	4.95±0.23	0.48±0.01	9.72±0.22
400	3.65±0.23	0.40±0.02	11.01±0.27

[표] 메틸자스모네이트 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향

Concentration (mg/L)	Caffeic acid derivatives (mg/g dry biomass)				
	Caftaric acid	Chlorogenic acid	Echinacoside	Cichoric acid	Total
0	0.36±0.01	0.10±0.01	0.36±0.00	0.26±0.03	1.07±0.04
100	0.22±0.00	0.25±0.01	0.32±0.02	0.37±0.01	1.17±0.02
200	0.18±0.00	0.27±0.06	0.41±0.00	0.20±0.01	1.07±0.05
400	0.09±0.00	0.25±0.04	0.23±0.06	0.13±0.00	0.71±0.05



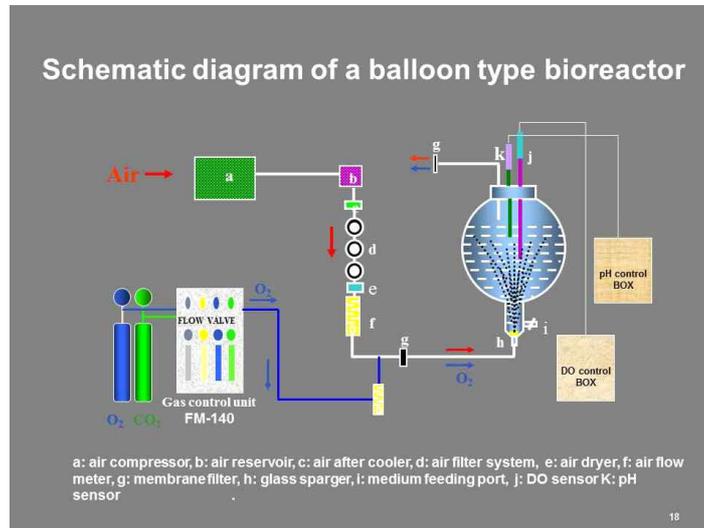
[그림] 메틸자스모네이트 처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향



[그림] 메틸자스모네이트 처리에 의한 에키네시아 부정근의 변화

(나) 수확후 열처리에 의한 기능성물질 함량 증진

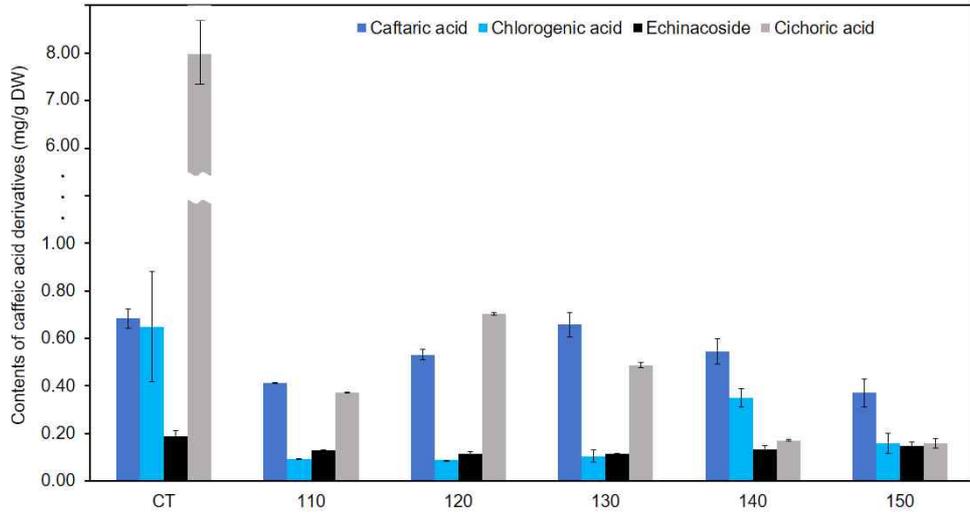
- ① 식물재료 : 에키네시아 풀푸레아(*Echinacea purpurea*) 품종의 부정근
- ② 배지조성 : 3/4MS + IBA 4.92 μ M + sucrose 30g/L, pH 5.7 ~ 5.8
- ③ 배양 스케일 : 3L 생물반응기
- ④ 접종밀도 : 7 g/L
- ⑤ 배양기간 : 3주
- ⑥ 처리구: 무처리, 110, 120, 130, 140, 150 $^{\circ}$ C
- ⑦ 실험결과 :
 - ㉠ 처리 온도가 증가할수록 에키네시아 부정근이 심하게 갈변되었다. 이는 온도가 증가할수록 부정근 내에 있는 당 성분이 갈변되었기 때문인 것으로 추측됨.



[그림] 실험에 사용된 air-lift bioreactor

[표] 열처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향

Temperature ($^{\circ}$ C)	Caffeic acid derivatives (mg/g dry biomass)				
	Caffaic acid	Chlorogenic acid	Echinacoside	Cidtric acid	Total
0	0.68 \pm 0.04	0.65 \pm 0.23	0.19 \pm 0.02	7.95 \pm 0.76	9.47 \pm 0.57
110	0.41 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.13 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	1.01 \pm 0.00
120	0.53 \pm 0.02	0.09 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.70 \pm 0.01	1.44 \pm 0.03
130	0.66 \pm 0.05	0.10 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01	1.37 \pm 0.08
140	0.55 \pm 0.05	0.35 \pm 0.04	0.13 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	1.20 \pm 0.02
150	0.37 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.84 \pm 0.07



[그림] 열처리가 카페익산과 유도체 함량에 미치는 영향



[그림] 열처리 후 에키네시아 부정근의 모습

3. 센텔라아시아티카

가. 기능성 의약품 개발

(1) 고기능성 부정근 라인 선발 및 성장조건 구명

(가) 식물재료: 센텔라아시아티카부정근

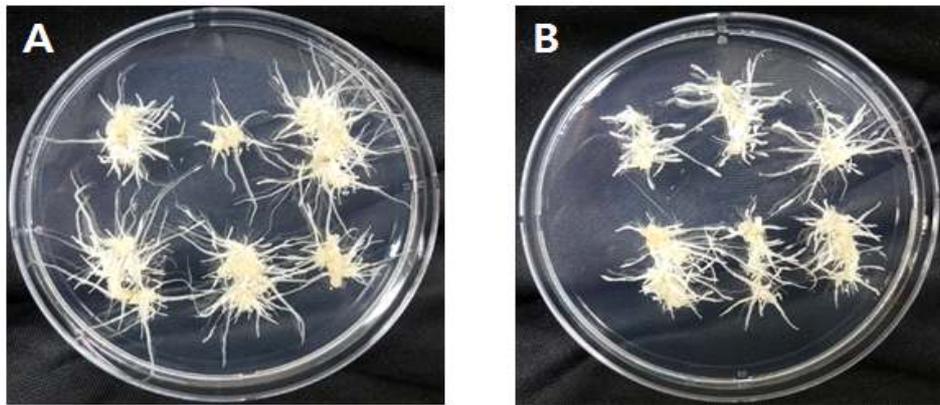
(나) 배지조성: 1.0MS, 1.0mg/L NAA, 50g/L sucrose, 2.3g/L gelrite, pH5.7~5.8

(다) 배양용기: 플라스틱 페트리디시

(라) 배양기간: 3주

(마) 라인선발 결과

- ① 센텔라아시아티카 잎 유래 부정근이 엽병 유래 부정근에 비해 측근 개수 및 길이신장 등 생육이 상대적으로 우수한 것으로 나타남



[그림] 센텔라아시아티카 잎 유래 부정근(A), 엽병 유래 부정근(B)

- ② 센텔라아시아티카 잎 유래 부정근을 3주 간격으로 계대배양을 실시하여 우수한 라인을 선발 증식함

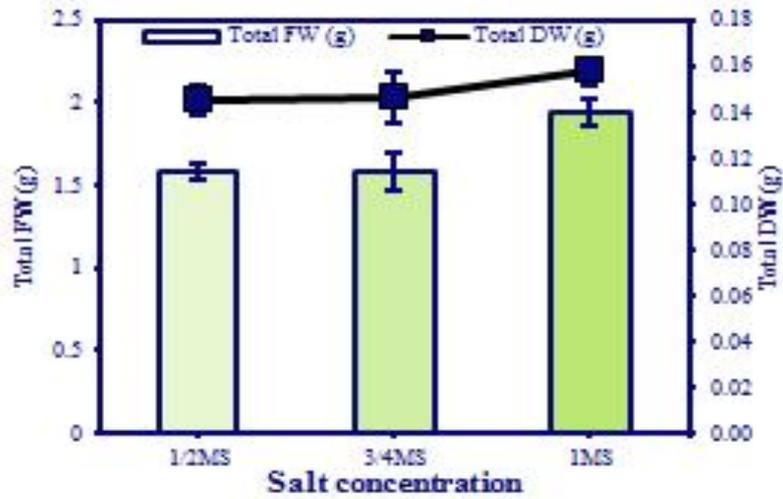
(바) MS배지 농도에 따른 바이오매스 조사 결과

① MS배지 농도: 1/2, 3/4, 1MS

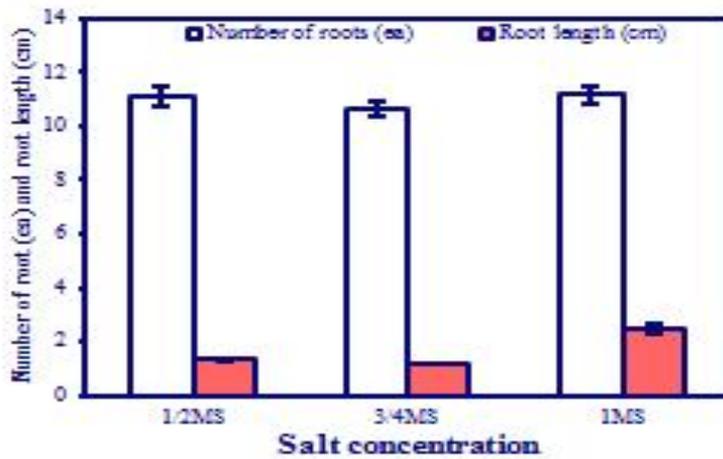
- ② 센텔라아시아티카부정근은 1MS 처리구 에서 다른 처리구와 비교하여 생체중과 건물중이 높게 나타났으며 측근 개수와 길이도 가장 양호한 것으로 나타남



[그림] MS배지 농도에 따른 센텔라아시아티카 부정근의 성장



[그림] MS배지 농도에 따른 센텔라아시아티카 부정근의 생체중 및 건물중



[그림] MS배지 농도에 따른 센텔라아시아티카 부정근의 측근 개수 및 길이

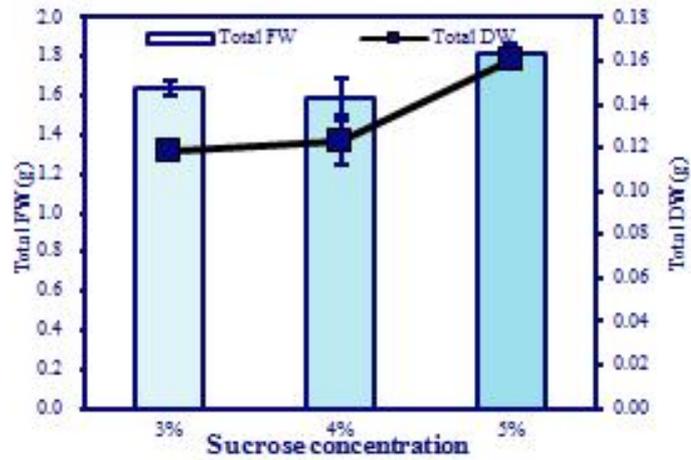
(사) 탄소원농도에 따른 바이오매스 조사 결과

① 탄소원 농도: 3, 4, 5% sucrose

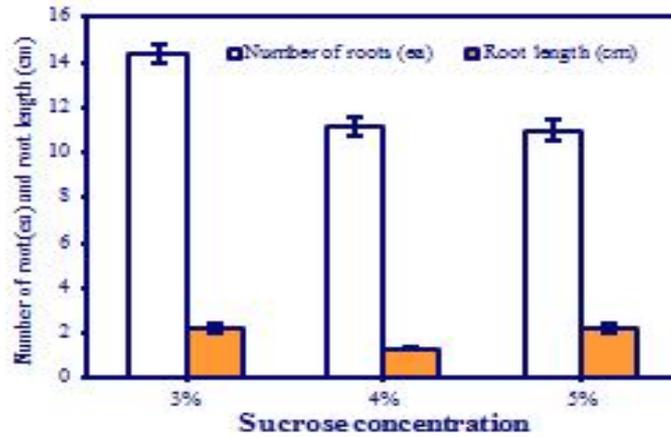
② 센텔라아시아티카부정근은 5% sucrose 처리구에서 다른 처리구와 비교하여 생체중과 건물중이 높게 나타남



[그림] 탄소원 농도에 따른 센텔라아시아티카 부정근의 생장



[그림] 탄소원 농도에 따른 센텔라아시아티카 부정근의 생체중과 건물중



[그림] 탄소원 농도에 따른 센텔라아시아티카 부정근의 측근 개수 및 길이

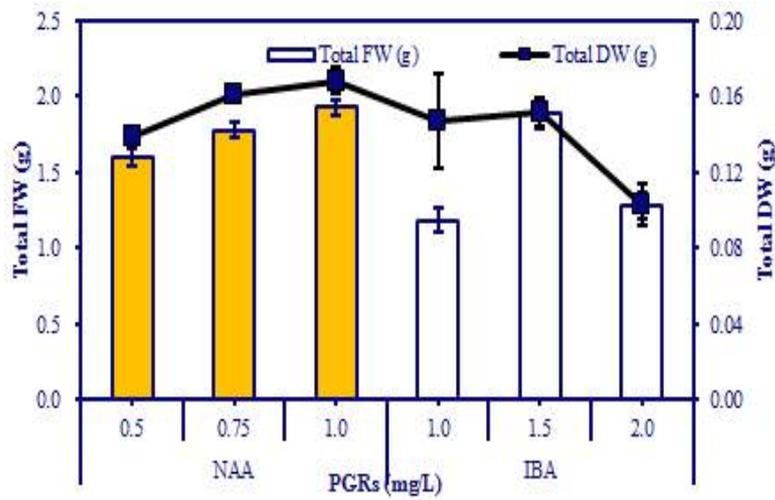
(아) 식물생장호르몬에 따른 바이오매스 조사 결과

① 식물생장호르몬: NAA 0.5, 0.75, 1.0mg/L / IBA 1.0, 1.5, 2.0mg/L

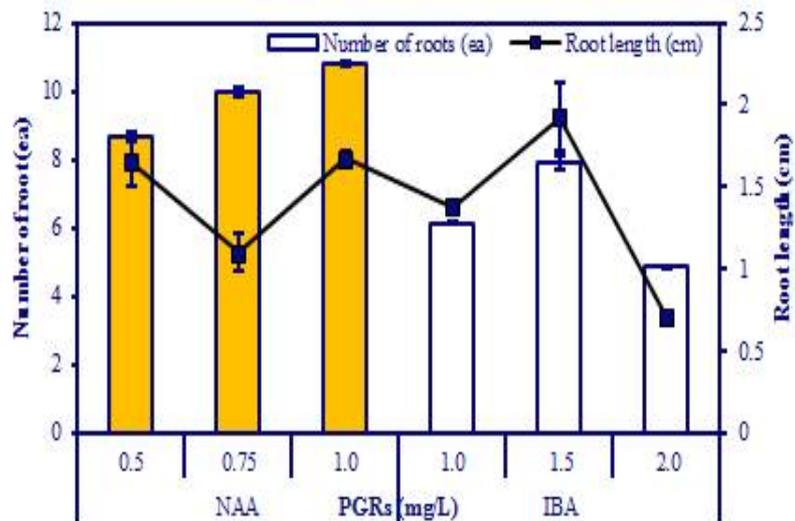
② 센텔라아시아티카부정근은 NAA 1.0 mg/L 처리구에서 다른 처리구와 비교하여 생체 중과 건물중이 높게 나타났으며 측근 개수와 길이도 가장 양호한 것으로 나타남



[그림] 식물생장호르몬 종류 및 농도에 따른 셴텔라아시아티카부정근의 성장



[그림] 식물생장호르몬 종류 및 농도에 따른 셴텔라 아시아티카부정근의 생체중 및 건물중



[그림] 식물생장호르몬 종류 및 농도에 따른 셴텔라 아시아티카부정근의 측근 개수 및 길이

나. 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화

(1) 생물반응기 시스템 이용 고기능성 식물원료 생산공정 최적화

(가) 식물재료: 셸텔라아시아티카부정근

(나) 배양용기: 3L 생물반응기(working volume 2L)

(다) 공기공급량: 0.1vvm

(라) 배양기간: 4주(28일)

① (1 단계, 1~21일) 식물생장 기간

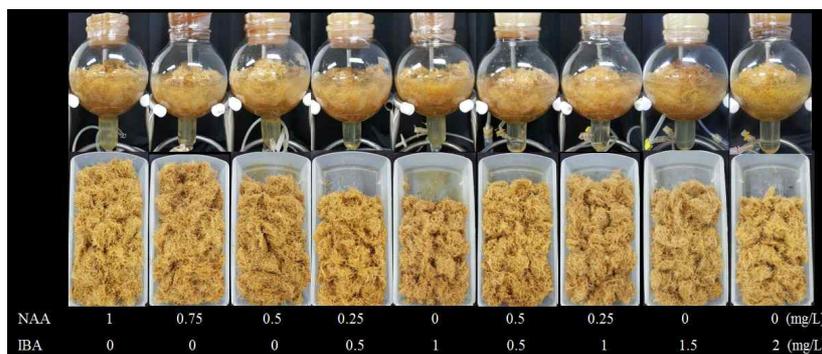
② 2 단계, 22~28일) Elicitation 기간, Methyl Jasmonate 200μM처리

(마) 배지조성: 1.0MS, 식물생장호르몬(옥신종류 및 농도 처리구 9종), 50g/L sucrose, pH5.7~5.8

(바) 바이오메스 조사 결과

① 부정근의 성장최적화를 위하여 옥신 농도를 달리하여 3주간 배양한 결과 NAA 1mg/L 처리구에서 생체중(222g)과 건물중(22.85g)이 가장 높게 나타남

No.	PGRs (mg/L)		Biomass(g)	
	NAA	IBA	FW	DW
1	1.0	0	222	22.85
2	0.75	0	222	22.67
3	0.5	0	208	20.10
4	0.25	0.5	173	17.56
5	0	1.0	150	15.60
6	0.5	0.5	212	21.74
7	0.25	1.0	188	18.97
8	0	1.5	168	16.39
9	0	2.0	158	15.87



[표, 그림] 셸텔라아시아티카부정근 성장에 미치는 식물생장호르몬의 영향

(2) 기능성 물질함량 축적을 위한 배양조건 구명

(가) 셸텔라아시아티카부정근과 야생 병풀식물체의 유효성분 함량 비교

① HPLC 분석조건 : (Column) LICHROART 250-4 HPLC- CARTRIDGE

LICHROSPHER 100 RP (250mm x 4mm, 5 μ m)

: (Detector) UV 206nm

② Triterpenoids 표준품

: Madecassoside(MS), Asiaticoside(AS), Madecassic acid(MA), Asiatic acid(AA)

(나) 유효성분 함량 조사 결과

- ① 센텔라아시아티카부정근의 Triterpenoids 성분을 조사한 결과 모든 처리구에서 야생 병풀식물체 보다 낮은 함량을 보였음
- ② 앞선 바이오메스 최적 결과에서는 NAA 1mg/L 가 효과적이었으나 Triterpenoids 함량 증진에는 IBA 1.5mg/L이 최적이라 판단됨

No.	PGRs(mg/L)		Triterpenoid 함량(%)				
	NAA	IBA	MS	AS	MA	AA	Total
야생 병풀 식물체			2.43	2.27	0.61	0.52	5.83
1	1.0	0	0.44	0.22	0.00	0.05	0.71
2	0.75	0	0.53	0.26	0.01	0.10	0.9
3	0.5	0	0.42	0.23	0.01	0.04	0.7
4	0.25	0.5	0.29	0.16	0.01	0.10	0.56
5	0	1.0	0.42	0.10	0.04	0.11	0.67
6	0.5	0.5	0.40	0.15	0.01	0.07	0.63
7	0.25	1.0	0.44	0.21	0.14	0.23	1.02
8	0	1.5	0.50	0.35	0.15	0.25	1.25
9	0	2.0	0.55	0.32	0.13	0.24	1.24

(3) 특이적 기능성물질 함량 증진

(가) 센텔라아시아티카 부정근 특이적 기능성물질 구명 및 야생 병풀식물체와의 함량 비교

8-acetoxy-1,9-pentadecadiene-4,6-diyne-3-ol
Araliadiol

(나) 식물재료: 센텔라아시아티카부정근

(다) 배지조성: 1.0MS, 1.5mg/L IBA, 50g/L sucrose, pH5.7~5.8

(라) 배양용기: 3L 생물반응기(working volume 2L)

(마) 공기공급량: 0.1vvm

(바) 배양기간: 4주(28일)

① (1 단계, 1~21일) 식물생장 기간

② (2 단계, 22~28일) Elicitation 기간, Methyl Jasmonate 200 μ M 처리

(사) 특이적 기능성물질 구명

① 추출조건

: 100% MeOH \Rightarrow 1g시료를 100ml 로 추출

② 성분비교

: 0.1g/ml 농도로 제조, TLC와 HPLC 확인

• HPLC 분석조건

: (System) Waters 515 pumps & Waters 717 Autosampler

: (Column) Phenomenex Gemini-NX 5 μ C18 110A

: (Mobile phase) MeOH:Water (70:30)

: (Flow rate) 2ml/min

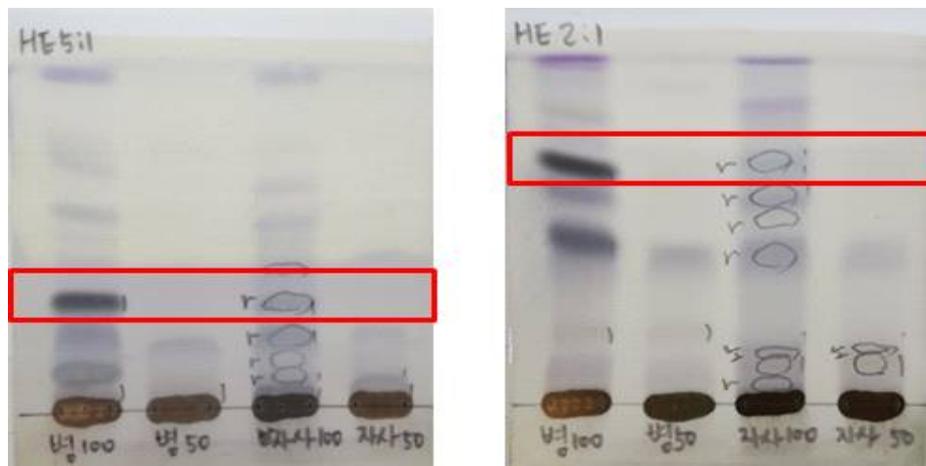
: (시료농도) 0.1g/ml,

: (시료 Injection) 30 μ l

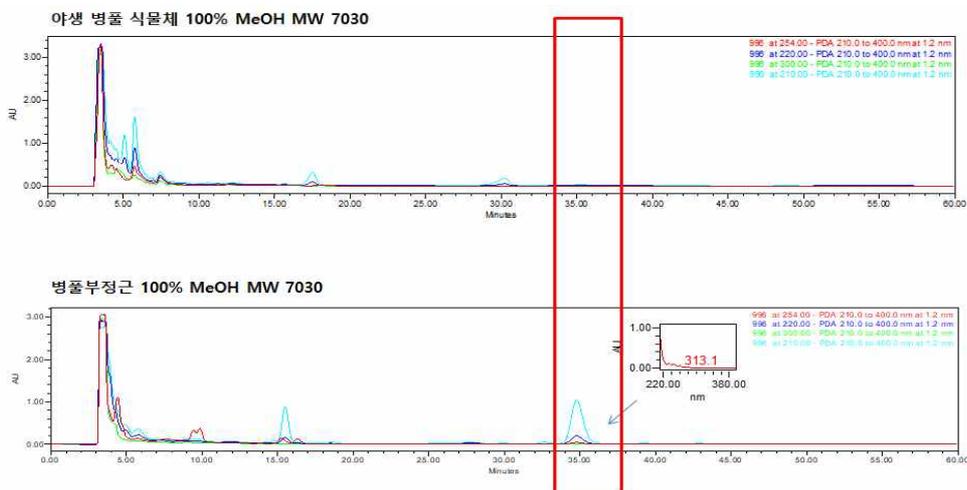
(아) 특이적 기능성물질 조사 결과(1)

8-acetoxy-1,9-pentadecadiene-4,6-diy-3-ol

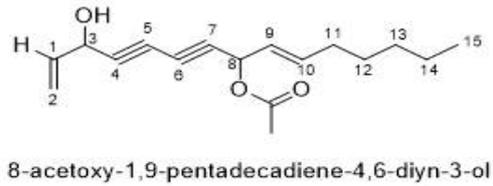
① 셸텔라아시아티카부정근의 특이적 기능성 물질을 TLC 분석을 통해 확인함



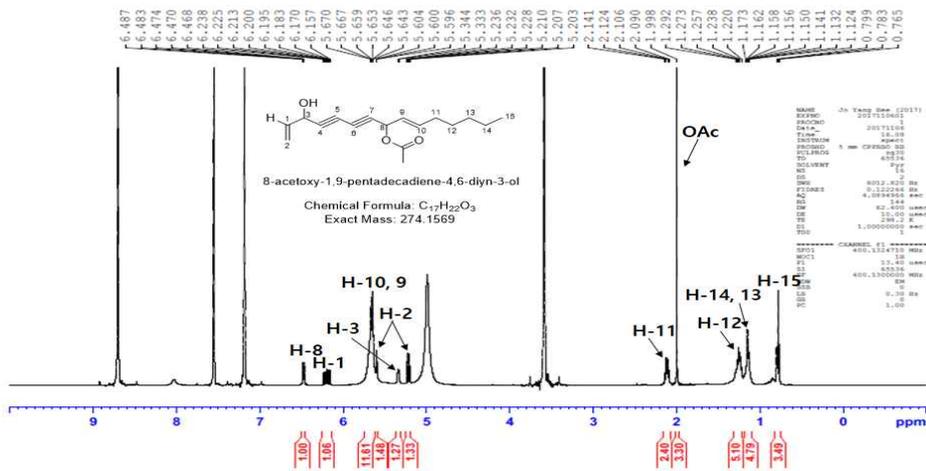
② 셸텔라아시아티카부정근의 특이적 기능성 물질을 HPLC 크로마토그램을 통해 확인함



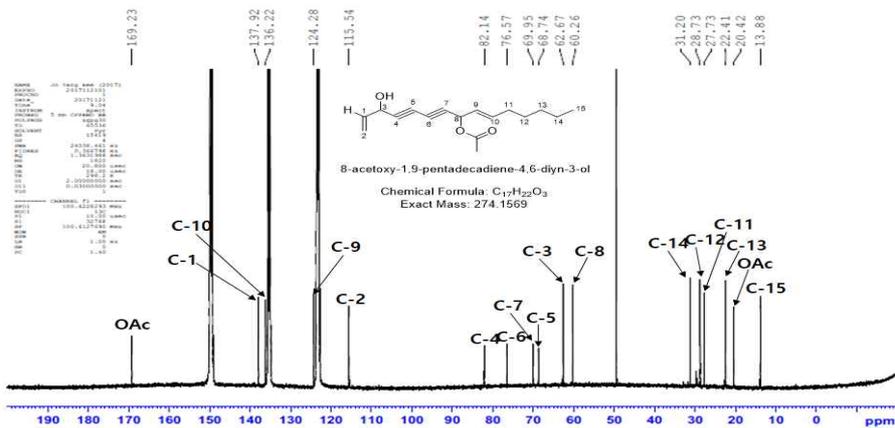
㉞ 성분분리 및 구조 규명



[그림] 크로마토그래피를 이용한 성분의 분리 및 구조규명



[그림] 화합물 구조 규명 (¹H NMR)



[그림] 화합물 구조 규명 (¹³C NMR)

: 문헌조사

January 2005 Notes Biol. Pharm. Bull. 28(1) 173-175 (2005) 173

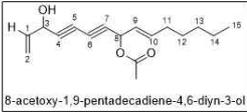
**Antiproliferative Constituents from Umbelliferae Plants VII.¹⁾
Active Triterpenes and Rosmarinic Acid from *Centella asiatica***

Miyako YOSHIDA, Masahiro FUCHIGAMI, Tsuneatsu NAGAO, Hikaru OKABE, Kazuhisa MATSUNAGA,
Jiro TAKATA, Yoshiharu KARUBE, Ryota TSUCHIHASHI, Junei KINJO, Kunihide MIHASHI, and
Toshihiro FUJIOKA*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University; 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan.
Received August 25, 2004; accepted October 18, 2004; published online October 19, 2004

The antiproliferative constituents in the MeOH extract from the aerial parts of *Centella asiatica* were investigated. Activity-guided fractionation of MeOH extract resulted in the isolation of ursolic acid lactone, ursolic acid, pomolic acid, 2 α ,3 α -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 3-epimaslinic acid, asiatic acid, corosolic acid, and rosmarinic acid. Antiproliferative activity of the isolated compounds against human gastric adenocarcinoma (MK-1), human uterine carcinoma (HeLa), and murine melanoma (B16F10) cells was estimated.

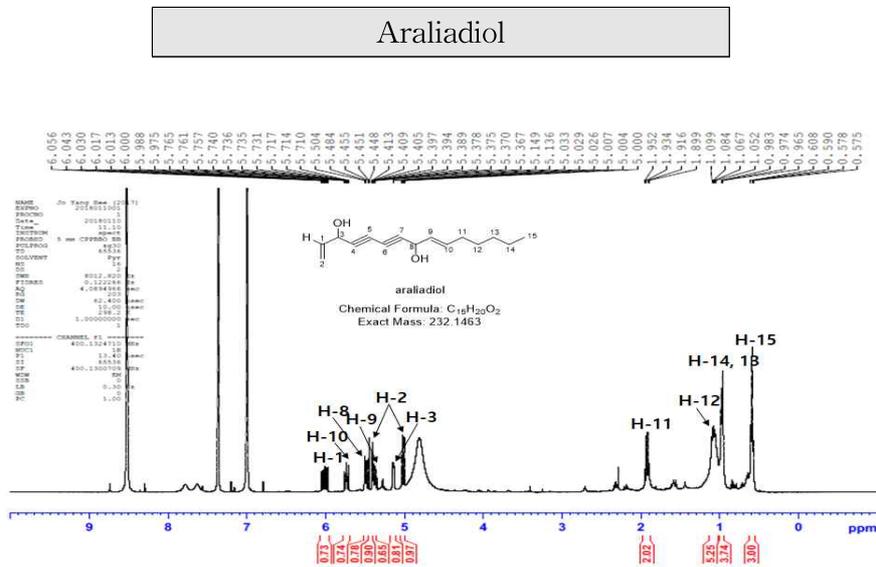
Key words *Centella asiatica*; antiproliferative activity; Umbelliferae; triterpene



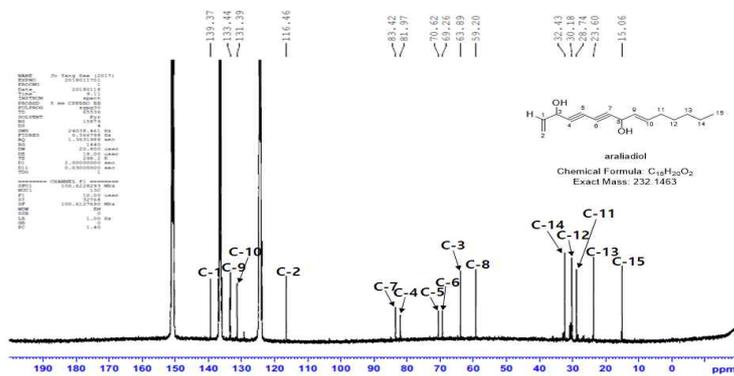
8-acetoxy-1,9-pentadecadiene-4,6-diyne-3-ol

병풀에만 존재하는 화합물로 확인 (문헌 내 compound 8)

(자) 특이적 기능성물질 조사 결과(2)



[그림] 화합물 구조 규명 (¹H NMR)



[그림] 화합물 구조 규명 (¹³C NMR)

: 문헌조사

Inhibitory Effect of Human Breast Cancer Cell Proliferation via p21-Mediated G₁ Cell Cycle Arrest by Araliadiol Isolated from *Aralia cordata* Thunb.

Authors: Wen-Ling Chang¹, Ting-Yu Lin¹, Yen-Hueih Tseng¹, Fang-Hua Chu², Pin-Ju Chuah³, Yueh-Hsiung Kuo⁴, Sheng-Yang Wang^{1,5}

Affiliations: The affiliations are listed at the end of the article

Key words:
 ○ araliadiol
 ○ cytotoxicity
 ○ cell cycle
 ○ G₁ arrest
 ○ *Aralia cordata*
 ○ Araliaceae

Abstract
 A new polyacetylenic compound, araliadiol, was isolated from the leaves of *Aralia cordata* Thunb. (Araliaceae). The structure of araliadiol was determined to be 3,5,18(R)-pentadeca-1,5,2)-diene-4,6-diyne-3,8-diol by MS, NMR, IR, and UV spectroscopic analysis as well as Mosher ester reaction. Araliadiol displayed a significant inhibitory effect on the growth of a human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7), with an IC₅₀ value for cytotoxicity of 6.41 μg/mL. Cell cycle analysis revealed that the proportion of cells in the G₁ phase of the cell cycle increased in a dose-dependent manner (from 54.7% to 72.0%) after 48 h exposure to araliadiol at dosages ranging from 0 to 80 μM. The results suggest that araliadiol inhibits cell cycle progression of MCF-7 at the G₁-S transition. After treatment with araliadiol, phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb) in MCF-7 cells was inhibited, accompanied by a decrease in the levels of cyclin D₁ and cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) and an increase in the expression of p21^{WAF1/Cip1}.

Abbreviations
 MCF-7: human breast adenocarcinoma cell line
 IC₅₀: half maximal inhibitory concentration
 cdk: cyclin-dependent kinase
 CKIs: cdk inhibitors
 MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
 Rb: retinoblastoma protein
 MTPA: α-methoxy-α-trifluoromethyl-phenylacetyl
 DMAP: dimethylaminopyridine
 PI: propidium iodide

received March 19, 2010
 revised June 28, 2010
 accepted July 1, 2010

(4) Pilot-scale 생산시스템에서 유효성분 고함유 바이오메스 대량생산

(가) 식물재료: 센텔라아시아티카부정근

(나) 배지조성(Lab scale에서 기 선발된 배지)

① 1.0MS, 1.5mg/L IBA, 50g/L sucrose, pH5.7~5.8

(다) 배양기간: 35 days

① (1 단계, 1~28일) 식물성장 기간

② (2 단계, 29~35일) Elicitation 기간, Methyl Jasmonate 200μM처리

(라) 배양 용기: Pilot-scale 생물반응기

(마) 배양밀도: 5g/L medium

No.	Type	k _L a(h ⁻¹)	Vol.(L)
1	Balloon	6.69	500
2	Drum	6.25	500

* K_La: 산소전달계수



Balloon Type

Drum Type

(바) 바이오매스 조사 결과

- ① 생물반응기 Type에 따른 센텔라아시아티카부정근의 바이오매스를 조사한 결과 Balloon type이 Drum type에 비해 바이오매스 생산량이 1.32배 정도 높게 나타났음. Balloon type의 생물반응기는 Drum type에 비해 반응기 내부의 dead zone이 적고 배양액의 교반이 우수하며 산소전달계수가 높아 바이오매스 생산에 효율적이라고 생각됨

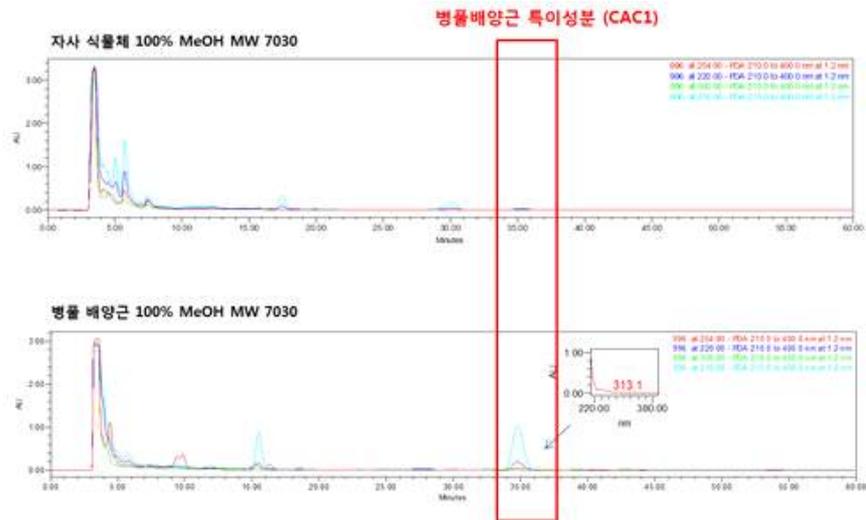
No.	Type	Vol.(L)	Biomass(kg)	
			FW	DW
1	Balloon	500	55	4.5
2	Drum	500	42	3.4

(사) 센텔라아시아티카 부정근과 야생 병풀식물체의 유효성분 및 특이적 기능성물질 함량 비교

- ① 센텔라아시아티카 부정근의 MS, AS, MA, AA 등 Triterpenoids 함량은 야생 병풀 식물체 보다 낮게 나타남
- ② 센텔라아시아티카부정근의 특이적 기능성물질 (8-acetoxy-1,9-pentadecadiene-4,6-diyne-3-ol, Araliadiol)은 야생 병풀 식물체 보다 배 가량 높게 나타남

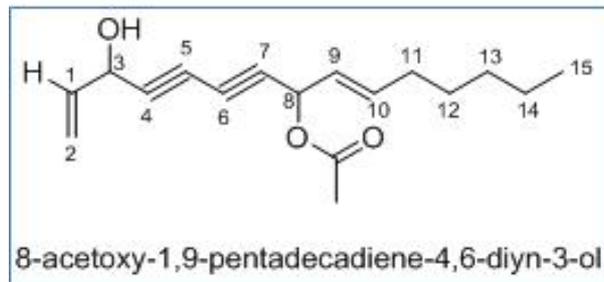
구분		병풀부정근	야생병풀
Triterpenoids (1)	MS	0.27	1.92
	AS	0.62	1.99
	MA	0.06	0.81
	AA	0.17	0.65
	Total	1.13	5.38

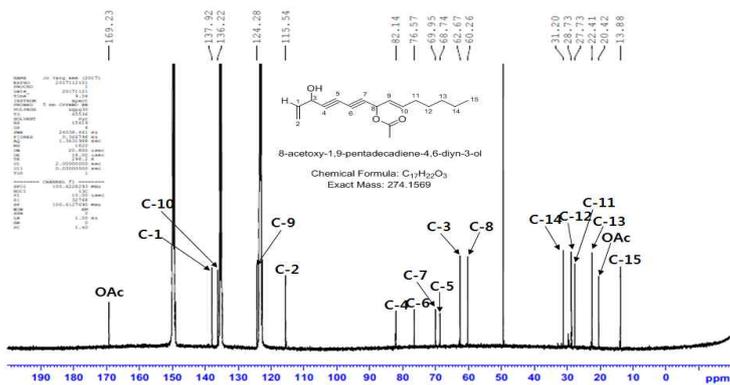
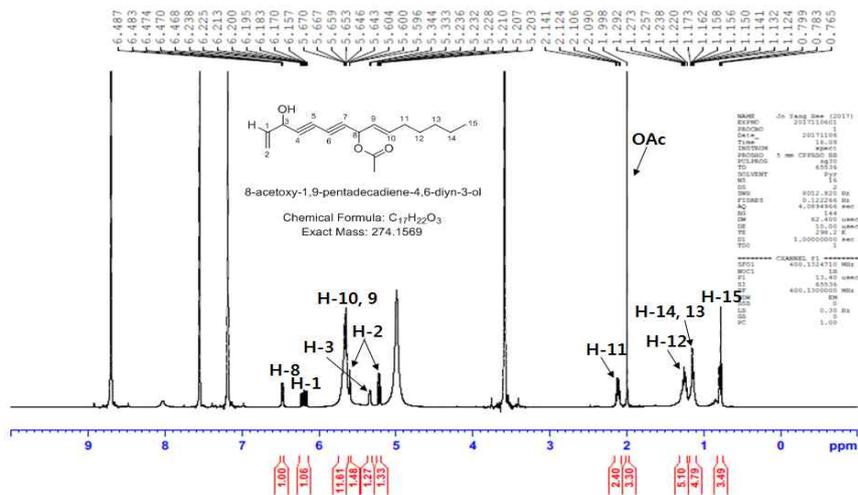
다. 센텔라아시아티카 특이성분 규명



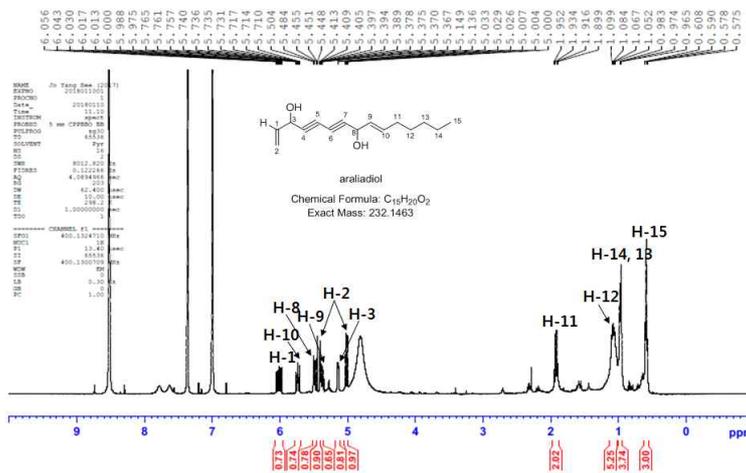
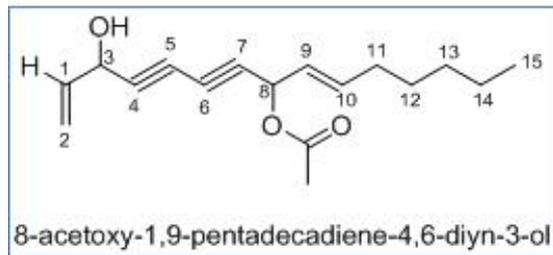
[그림] 센텔라아시아티카 특이성분의 발굴

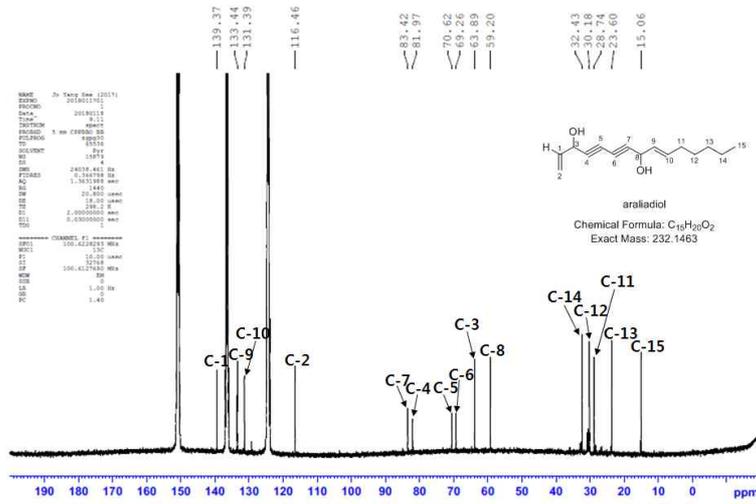
CAC1





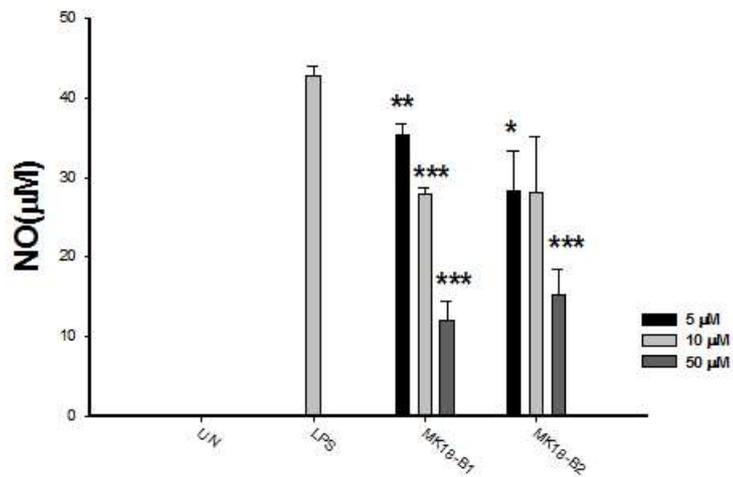
CAC2





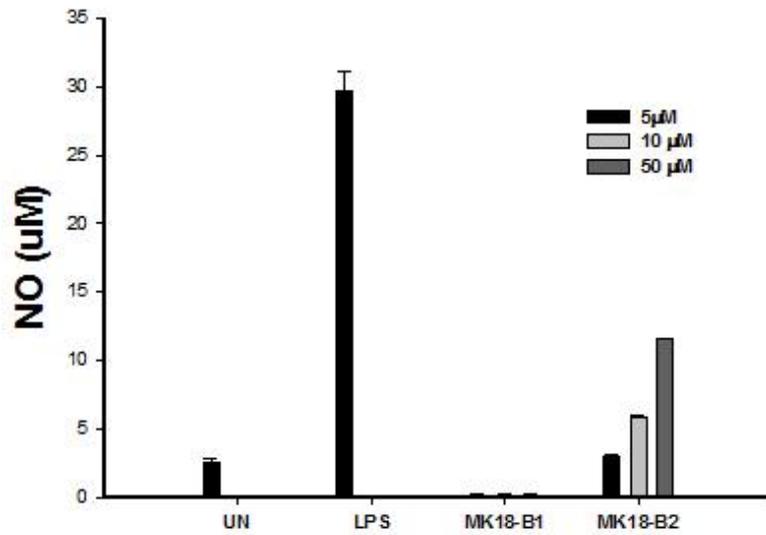
[그림] 셴텔라아시아티카 특이성분의 항염효능

(라) 셴텔라아시아티카 특이성분의 효능 규명



① CAC-1, CAC-2는 LPS로 유도된 NO의 생성을 유의성있게 감소시킴

[그림] 셴텔라아시아티카 특이성분의 항염효능



[그림] 센텔라아시아티카 특이성분의 면역증강 효능

② CAC-2는 정상세포에서 NO의 생성을 유의성 있게 증가시킴

(마) 센텔라아시아티카 특이성분의 추출조건 비교



① 메탄올의 함량이 높을수록 특이성분의 함량 증가 센텔라아시아티카 특이성분의 추출 조건비교

4. 식물세포주 은행 시스템을 이용한 산업화용 배양근 라인 관리 시스템 운영

가. 데이터베이스화를 위한 시스템

(1) 목적: 시스템을 이용하여 배양 이력 및 기타 정보 추적

(가) 본 연구를 통해 유도 된 많은 배양근 라인을 효율적이고 체계적으로 관리

- 입력항목 : 접수일자, 식물명, 라인명, 담당자, 배양기간, 배지조성 등 총 20여 항목
- 관리 방식 : Q바코드

The screenshot shows a web-based management system for plant cell culture. At the top, there are navigation buttons: '뱅킹업무' (Banking Business), '스마트검색' (Smart Search), and '환경설정' (Environment Settings). Below these are navigation icons and a breadcrumb trail: '배양체 생성 | 배양체 접수 | Scale Up | 지표물질 분석 | 시료 분양 | 배양체 폐기 | 모니터링'.

The main content area is titled '접수 대상 세포주' (Received Cell Culture) and '01BX000058 | 507호 > Shaker > shaker'. It includes a search bar for '식물명 | 기관(엽)명 | 세포주명 | 담당자' and a '검색' (Search) button. Below the search bar are filters for '바코드 출력일' (Barcode Output Date) with options for '당일' (Today), '3일' (3 days), and '일주일' (One week).

A table displays the following data:

No.	접수일자	출력일자	상태	식물명	기관(엽)명	세포주명	담당자
1	2019-09-26	2019-09-26	저장	산삼	화웨이생명공학 실험실	Pg_AR	장은비

Below the table is a '기본정보' (Basic Information) section with fields for '코드 *' (Code: 중식), '공정명 *' (Process Name: 산삼 부정근 중식), and '등록일 *' (Registration Date: 2019-09-11).

The '배양공정' (Cultivation Process) section contains a table with the following data:

선택	No.	배양 Scale *	배양 주기 *	배지 조성			배양 환경 *	온도 *
				기본배지 *	호르몬 *	탄소원 *		
<input checked="" type="checkbox"/>	1	삼각 플라스크	5주	M5	5 mg/L IBA	50 g/L sucrose	암	24

[그림] 세포주은행 시스템을 이용하여 관리하고 있는 산삼 부정근

This screenshot shows the same management system interface but for a different cell line, 'Shaker3'. The breadcrumb trail is '배양체 생성 | 배양체 접수 | Scale Up | 지표물질 분석 | 시료 분양 | 배양체 폐기 | 모니터링'.

The main content area is titled '접수 대상 세포주' (Received Cell Culture) and '01BX000060 | 507호 > Shaker > shaker3'. It includes a search bar and filters for '바코드 출력일' (Barcode Output Date) with options for '당일' (Today), '3일' (3 days), and '일주일' (One week).

A table displays the following data:

No.	접수일자	출력일자	상태	식물명	기관(엽)명	세포주명	담당자	타입	수량
1	2019-09-26	2019-09-26	저장	에키네시아	화웨이생명공학 실험실	Ed_AR	장은비	삼각 플라스크	3

기본정보

코드 * : 증식
 공정명 * : 에키네시아 부정균 증식
 등록일 * : 2019-09-11

배양공정

선택	No.	배양 Scale *	배양 주기 *	배지 조성			배양 환경 *	온도 *
				기본배지 *	호르몬 *	탄소원 *		
1		삼각 플라스크	4주	MS	1.5mg/L IBA	50 g/L sucrose	암	24

[그림] 세포주은행 시스템을 이용하여 관리하고 있는 에키네시아 부정균


뱅킹업무
스마트검색
환경설정





배양체 생성 | 배양체 접수 | Scale Up | 지표물질 분석 | 시료 분양 | 배양체 폐기 | 모니터링

접수 대상 세포주 01BX000059 | 507호 > Shaker > shaker2
 검색 (식물명 | 기관(엽)명 | 세포주명 | 담당자) 검색
 바코드 출력일 ~ 당일 3일 일주일
 바코드 출력일자 식물명 기관(엽)명 세포주명 담당자 타입

	접수일자	출력일자	상태	식물명	기관(엽)명	세포주명	담당자	타입	수량
1	2019-09-26	2019-09-26	저장	병풀	화훼생명공학 실험실	Ca_AR	강은비	삼각 플라스크	3

기본정보

코드 * : 증식
 공정명 * : 병풀 부정균 증식
 등록일 * : 2019-09-11

배양공정

선택	No.	배양 Scale *	배양 주기 *	배지 조성			배양 환경 *	온도 *
				기본배지 *	호르몬 *	탄소원 *		
1		삼각 플라스크	4주	MS	1.0 mg/L NAA	50 g/L sucrose	암	24

[그림] 세포주은행 시스템을 이용하여 관리하고 있는 센텔라아시아티카 부정균

5. (경제성 분석에 근거한) 경제적 성과

가. 생산성 비교 분석

- (1) 식물조직배양에 의해 대량으로 얻어진 배양체로부터 유용물질을 생산하는 방식은 환경 요인에 제한을 받지 않고, 계획적인 생산이 가능하며, 제품의 질과 수율을 일정하게 유지하면서도 단위 면적당 생산량이 많은 장점이 있다.

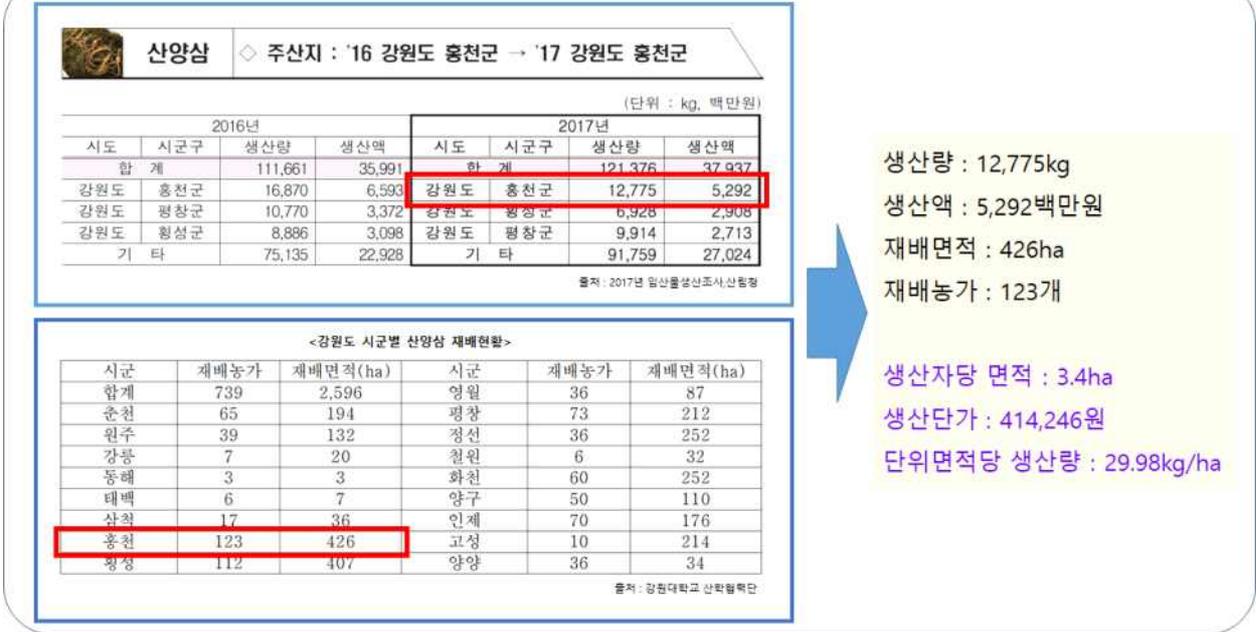
[표] 자연재배방식과 배양방식의 차이

구분	자연재배방식	배양방식
생산방법	대규모 농경지에서 재배	배양용기를 설치하여 배양
생산조절	기온, 강수, 바람 등에 의해 생산량 및 품질 결정	생산조건을 인위적으로 조절가능
생산기간	장기	단기
유용물질 함유	고정적	배양조건 변화, 전구물질 첨가 등으로 함량증진 가능
인체 유해물질	농약사용, 환경오염 등에 노출 위험	안전
초기 비용투자	저가	중저가

출처 : 산삼배양근 기술현황과 이용, BioWave Vol. 14, BRIC

- (2) 자연재배방식과 배양방식으로 생산된 각각의 산양삼 및 산삼배양근의 생산성 차이를 알아보기 위하여 하기와 같은 자료를 토대로 비교를 진행하였다.
- (3) 비교 분석을 위해 사용된 자료로는 산림청 및 강원대학교 산학협력단에서 발표한 자료를 활용하였으며, 비교 분석군을 설정하기 위해 2017년 기준 가장 많은 산양삼을 재배한 지역인 강원도 홍천군 재배농가를 기준으로 생산량, 생산액, 재배면적 등을 종합적으로 고려하여 생산단가 및 단위면적당 생산량을 산출하였다.

2017년도 강원도 홍천군에서 생산된 산양삼 분석



출처 : 산림청, 강원대학교 산학협력단 자료 가공
 [그림] 2017년도 산양삼 주산지인 강원도 홍천군 재배량을 기준으로 한
 생산단가 및 생산량 분석

(4) 상기 자연재배방식과 달리 배양방식을 살펴보면, 현재 보유한 Pilot-scale 식물탱크 배양시스템을 이용할 시 1톤 반응기 1회 수확기준으로 약 60kg의 산삼배양근을 수확할 수 있다.



출처 : 본 연구기관 소장 자료
 [그림] Pilot-scale 식물탱크 배양시스템을 이용한 생산량

따라서 상기 자료를 단적으로 비교하면 아래 표와 같다.

[표] 생산성 비교

구분	자연재배방식(산양삼)	조직배양방식(산삼배양근)
생산 면적(ha)	3.4	0.1
단위 면적당 생산량(kg/ha)	29.98	600
생산단가	414,246원	- (초기 배양재료 확보 후 비용발생x)

(5) 또한 생물 반응기를 활용하여 산삼배양근을 대량으로 생산 및 산업화하는 기술에 대해서 국내 및 해외(중국, 캐나다, 미국)에서 생산된 산삼배양근에 대해 생산자당 면적, 생산단가, 생산량에 대한 전반적인 비교 수치는 아래 표와 같으며, 이를 토대로 산삼배양근에 대한 생산성이 뛰어나다는 것을 확인할 수 있다.

[표] 국내외 산삼배양근의 생산성 비교

구분	단위	한국	중국	캐나다	미국	충북대
생산자 당 면적	ha	0.95	3~5	4~6	5~10	0.1
생산단가	won/kg	21,317	3,590	8,604	6,444	-
생산량	kg/10ha	523	553	850	800	30,000

나. 예상 매출액 산정을 통한 개발 대상 기술(제품)의 경제성 분석

(1) 예상 매출액 추산

(가) 매출액 추정을 위한 시장 분석

① 기술개발이 완료된 제품의 속한 시장이 명확하다면 산업분석 결과를 이용하여 매출추정 하는 것이 가능하다. 산업분석 결과, 국내의 거시경제요소에 대한 분석과 대상제품이 속한 산업에 대한 전반적인 평가가 이루어지면 시장규모 및 시장점유율 분석을 통해 매출추정이 가능하다. 시장점유율법에 의한 매출액 추정은 시장규모에 예상되는 시장점유율을 곱하여 다음 식을 이용하여 추정한다.

$$\text{추정매출액} = \text{시장규모} \times \text{시장점유율}$$

- ② 시장규모의 성장 또는 감소는 시장 및 산업특성 분석을 통하여 얻어지며, 시장점유율은 산업에 관한 지식(경쟁상태, 과점, 추세 등)과 관련 지식(생산능력, 제품종류, 사업계획 등)을 기반으로 추정이 가능하다.
- ③ 먼저 산삼배양근과 관련 시장을 알아보기 위해 유사시장으로서 산양삼 시장을 살펴보았다. 산림청에서 발표한 자료 중 최근데이터에 속하는 [2017 임산물 생산조사]를 살펴보면, 2017년 산양삼 생산량 및 생산액은 각각 121톤, 1,910억 원으로 전년도 대비 증가한 추세를 보였다. 건강에 대한 관심증가 등으로 인해 약용식물에 대한 전반적인 생산량 및 생산액은 꾸준히 증가해왔으며, 이러한 추세로 볼 때 생산량 및 생산액은 더 증가할 것으로 보인다.

[표] 생산량 및 생산액 추이('16~17)

단위 : 톤, 억원, %

분류(약용식물)	'16 생산량	'17 생산량	증감률	'16 생산액	'17 생산액	증감률
산양삼	112	121	8.7	360	379	5.4

출처 : 2017 임산물 생산조사, 산림청

- ④ 에키네시아 관련 시장을 살펴보면, 에키네시아는 해외에서는 건강 기능성 식품으로서 널리 알려진 소재로, 그 사용량이 매년 증가하는 것으로 나타났다. Nutrition Business Journal 자료에 따르면 세계 전체 건강기능 식품 시장 규모는 2016년 기준 약 1,263억 달러로 추산되며, 연평균 7.6% 성장률을 보이며 2021년에는 약 1,786억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망하였다.

[표] 세계 전체 건강기능 식품 시장 규모

단위 : 백만 달러, %

구분	'16	'17	'18	'19	'20	'21	CAGR
세계시장	126,333	135,368	145,050	155,204	166,068	178,689	7.6

출처 : Nutrition Business Journal

- ⑤ 미국에서는 선호도 식품으로 매년 10위 이내 순위를 기록하면서 널리 알려져 있으며, 네덜란드에서는 허브 보충제로 판매량 2위를 기록하는 등 북미·유럽 지역에서는 소비량이 매우 높은 것으로 나타났다. 최근 발표된 KOTRA 자료를 살펴보면(2019.07), 체코에서는 허브 건강보조제로서 에키네시아의 사용량이 지속적으로 증가하고 있음을 나타내었으며, 이는 전체 건강보조제의 0.02%에 해당하는 것으로 나타났다.

[표] 체코 건강보조제 시장규모 현황

구분	2016	2017	2018	'17/'18 증감률	2013-18 CAGR
허브 건강보조제	627.2	648.8	673.6	3.8	3.0
- 복합 허브 성분	338.1	357.2	382.5	7.1	6.4
- 은행	124.2	125.4	125.8	0.4	-0.5
- 에키네시아	8.2	8.4	8.5	2.2	2.3
- 인삼	7.2	7.4	7.5	1.8	5.3
- 마늘	5.0	5.1	5.1	1.2	1.5
- 달맞이꽃 오일	2.5	2.6	2.7	4.7	1.6
- 성요한플	2.6	2.7	2.6	-1.5	3.2
- 기타 허브 건강보조제	139.2	140.2	138.8	-1.0	-0.9
비허브 건강보조제	3,111.3	3,220.7	3,339.6	3.7	3.4
- 복합 비허브 성분	1,112.9	1,156.5	1,213.1	4.9	3.9
- 미네랄(칼슘, 철분 등)	916.5	926.0	935.3	1.0	1.2
- 프로바이오틱 보충제	518.7	550.4	582.6	5.8	5.7
- 글루코사민	448.6	470.4	489.5	4.1	4.2
- 피쉬오일/오메가 지방산	68.0	70.4	71.4	1.4	4.5
- 단백질 보충제	8.6	8.7	9.0	4.5	3.8
- 코엔자임 Q10	8.8	8.9	8.9	0.7	3.8
- 기타 비허브 건강보조제	29.3	29.4	29.8	1.4	2.3
합계	3,738.4	3,869.5	4,013.2	3.7	3.3

출처 : KOTRA, EUROMONITOR

- ⑥ 체코 시장의 현황 기준을 토대로 세계시장에서 에키네시아가 점유하는 시장 규모를 0.02%라고 가정할 경우, 세계 건강기능 식품 시장에서 에키네시아가 차지하는 시장 규모는 아래와 같을 것으로 추산된다.

[표] 에키네시아가 차지하는 세계 건강기능 식품 시장 예상 규모

단위 : 백만 달러, %

구분	'16	'17	'18	'19	'20	'21
세계시장 (에키네시아)	25.26	27.07	29.01	31.04	33.21	35.73

- ⑦ 국내의 경우 에키네시아에 포함된 치코린산의 부작용 사례에 따라, 수입 및 판매가 제한되면서 최근까지의 에키네시아에 대한 시장 규모를 추산하기 어려운 것으로 나타났다. 최근 2019년 4월에 발표된 경제활력대책회의에서 건강기능식품 신제품 개발과 관련된 규제를 개선하기로 함에 따라, 건강기능성 식품의 원료범위를 해외에서 식이보충제로 인정되는 알파-GPC(인지능력 개선 효과), 에키네시아(면역력 증진 효과) 등 동·

식물성 추출물 중심으로 확대하겠다는 방침에 따라, 에키네시아에 대한 수요 및 관련 시장이 완전히 형성되기까지는 다소 시일이 걸릴 것으로 보인다.

(2) 예상 매출액

(가) 생물 반응기를 활용한 산삼배양근 및 에키네시아 생산기술 내용을 기반으로 협동기관인 동국제약(주)에서 제시한 생산계획을 토대로 추산한 시장점유율 및 매출추정액은 아래와 같다.

<표> 개발종료 후 5년간 관련 시장에 대한 시장점유율 및 매출 추정액

		2019년	2020년	2021년	2022년	2023년
국내	시장점유율	0.01%	0.1%	0.2%	0.3%	0.5%
	판매량(단위/개)	7,000/12,500	10,000/14,000	15,000/25,000	22,000/36,000	33,000/47,000
	판매단가(원)	150,000/36,000	150,000/36,000	150,000/36,000	150,000/36,000	150,000/36,000
	매출추정액(백만원)	1,500	2,000	3,500	4,596	6,642
세계	시장점유율	0.0001	0.001	0.005	0.01	0.05
	판매량(단위/개)	2,500/4,100	5,000/8,200	7,500/12,300	10,000/16,400	12,500/20,500
	판매단가(\$)	140/35	140/35	140/35	140/35	140/35
	매출추정액(백만\$)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
합계(백만원)		2,097	3,194	5,290	6,984	9,626
생산능력(ton)		200ton	1,000ton	2,000ton	3,000ton	5,000ton

주) 산삼배양근/에키네시아 순이며 매출액은 두 가지 제품에 대한 총액임

주) 환율은 1달러/1,194원을 기준으로 함

(2) 평가파라메타 추정

(가) 매출원가 및 판관비

① 매출원가는 대상기술이 적용된 제품에 대한 제조비용으로서, 원재료 구입·조달 비용, 제조인원에 대한 인건비, 감가상각비 및 기타 경비 등으로 구성된다. 2017년 기업경영 분석(한국은행, 2018.11발간)자료를 따르면 본 기술이 해당하는 업종은 첨단기술업종¹⁾(제조업)으로 볼 수 있으며, 해당 업종의 평균 매출원가율인 70.07%와 판관비 15.08%를 적용하였다.

1) 예상 제품군에 따라 첨단기술업종에는 의약품 및 의약 관련 소재가 포함되어 있어, 이를 관련 업종으로 선정함

(나) 투자금액

① 운전자본 증감액

㉞ 운전자본이란 영업활동과정에서 매출채권, 재고자산 및 매입채무를 보유함으로써 소요되는 자금으로, 일반적으로 매출채권이나 재고자산에 투입된 자본에서 매입채무로 조달된 자본을 차감하여 산정한다. 이렇게 산정된 운전자본의 변동은 여유현금흐름 계산 시 고려된다. 운전자본증감액은 다음과 같이 계산된다.

운전자본증감액 = 매출증감액 × 운전자본소요율
운전자본소요율 = 1/매출채권소요율 + 1/재고자산소요율 - 1/매입채무소요율

㉞ 본 사업에서는 한국은행의 2017년 기업경영분석 보고서에 제시된 동업종의 평균적인 재무자료를 고려하였다. 따라서 동업종(첨단기술업종)의 평균 매출채권회전율, 재고자산회전율, 매입채무회전율을 이용하여 산출된 운전자본회전율의 역수를 취하여 운전자본소요율을 산정하였으며, 이에 따른 운전자본소요율은 18.19%이다.

② 자본적 지출액

㉞ 자본적지출액은 기술사업과 관련된 향후 투자계획 및 설비교체 주기를 고려하여 산정할 수 있다. 본 사업에서는 대상기술이 적용된 제품의 추정 매출액에 따른 자본적 지출액 산정을 위하여 동업종의 평균적인 유·무형자산구성비율 및 감가상각비율 등의 재무자료를 이용하였으며 이에 따른 유·무형자산구성비율은 37.49%이고 감가상각비율은 8.66%이다.

단위: 백만 원

[표] 자본적 지출액 산출내역

	추정1차년도 (2021년)	추정2차년도 (2022년)	추정3차년도 (2023년)	추정4차년도 (2024년)	추정5차년도 (2025년)
I.추정매출액	2,097	3,194	5,290	6,984	9,626
II.매출증감액	2,097	1,097	2,096	1,694	2,642
III.유무형자산구성비	37.49%				
IV.유무형자산증가액 (II×III)	786	411	786	635	990
V.감가상각비 등	182	276	458	605	833
VI.자본적지출액 (IV+V)	968	688	1,244	1,240	1,824

당기 감가상각비 등=매출증감액×감가상각비율

(다) 할인율

- ① 할인율은 대상기술에 의한 미래 현금흐름을 현재가치로 전환할 때 사용되는 환원율을 말하며, 기술사업화 과정에 내재된 다양한 위험이 포함된 할인율(Risk -adjusted Discount Rate)이다. 대상기술이 연관된 사업에서 발생 가능한 잠재적인 위험을 정량화한 것이므로 대상기술이 갖는 기술위험, 시장위험, 사업위험 등을 분석하여 그 결과를 반영하여야 한다.
- ② 사업화 과정에서 발생하는 제반 위험을 평가자가 직접 측정하여 할인율을 산출하는 것이 원칙이나, 실무에서는 직접 측정하기가 매우 어렵기 때문에 기업가치평가에서 널리 사용되고 있는 가중평균자본비용(Weighted Average of Cost of Capital, WACC) 개념에 조정계수 또는 추가 위험프리미엄(Spread 또는 risk premium)을 적용하고 있다.

[표] 할인율 모형

구분	기존모형	개선모형
자기자본비용	상장기업 CAPM+사업화 위험프리미엄+안정성 위험프리미엄+규모 프리미엄	상장기업 CAPM+규모 위험프리미엄+기술사업화 위험프리미엄
타인자본비용	타인자본비용+추가위험 스프레드	좌동
할인율	WACC	좌동
문제점 및 개선	- 자기자본비용의 안정성 위험 프리미엄 타당성 부족 - 경기나 금리변동에 따른 즉시 성 부족	- 자기자본비용의 안정성 위험 프리미엄 제외 - 매년 적용 할인율 갱신

- ③ 위 모형에 따라 자기자본비용과 타인자본비용을 가중평균하여 할인율인 WACC를 산출하며, 그 산식은 아래와 같다.

$$\text{할인율(WACC)} = \text{자기자본비용} \times \text{자기자본비율} + \text{타인자본비용} \times \text{타인자본비율} \times (1 - \text{법인세율})$$

- ④ 본 사업에서는 이러한 개선된 할인율 모형을 기반으로 하여 할인율(WACC)를 산출하였으며, 산출된 할인율은 4.10%이다.

(라) 수익성 지표 산출

- ① 순현재가치(NPV; Net Present Value)는 개발기간 및 매출추정기간 동안의 여유현금흐름을 현재시점으로 환산한 금액으로 NPV가 0 이상일 경우 수익성이 있다고 판단한다. 본 사업에서는 NPV가 209백만 원으로 0보다 크므로 수익성이 있는 것으로 판단된다.
- ② 내부수익률(IRR; Internal Rate of Return)은 개발기간 및 매출추정기간 동안 여유현금흐름의 현재가치를 0으로 만드는 이자율로 IRR이 NPV 산정시의 할인율인 4.10%보다 크면 수익성이 있는 것으로 판단한다. 본 사업에서 IRR은 4.86%로 4.10%보다 크므로 수익성이 있는 것으로 판단된다.
- ③ 투자수익률(ROI; Return on Investment)은 투자한 자본에 대한 수익의 비율을 나타내는 지표로, 본 사업에서는 매출추정기간 동안의 여유현금흐름 현재가치 합계액을 개발기간 동안의 개발비지출액의 현재가치 합계액으로 나누어 산정한다. ROI가 100%보다 크면 수익성이 있는 것으로 판단한다. 본 사업에서 ROI는 109.80%로 100%보다 크므로 수익성이 있는 것으로 판단된다.

(단위: 백만 원)

[표] 경제성 분석

구 분	개발기간				매출추정기간					분석 결과
	1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	
매출액					2,097	3,194	5,290	6,984	9,626	
매출원가					1,469	2,238	3,707	4,894	6,745	
판관비					316	482	798	1,053	1,452	
영업이익					311	474	786	1,037	1,429	
법인세 등					42	75	137	187	266	
감가상각비 등					182	276	458	605	833	
운전자본증 감액					381	200	381	308	480	
자본적지출 액					968	688	1,244	1,240	1,824	
개발비지출 액	560	560	560	560						
투자액회수									5,359	
여유현금흐 름	-560	-560	-560	-560	-898	-211	-519	-93	5,052	
현가계수	0.9606	0.9606	0.9606	0.9228	0.8864	0.8515	0.8180	0.7858	0.7548	
현재가치	-538	-538	-538	-517	-796	-180	-424	-73	3,813	
NPV										209
IRR										4.86%
ROI										109.80%

(4) 경제적 파급효과

(가) 생산유발효과

① 대상기술의 개발 사업으로 인한 산업전반에 걸친 경제적 파급효과를 객관적으로 추정하기 위해 한국은행의 산업연관분석을 이용하여 평가하였다. 대상기술이 속한 첨단기술업종의 생산유발계수 및 사업화 이후 5년간 생산유발효과는 다음과 같다.

[표] 생산유발효과

(단위: 백만 원)

산업분야	첨단기술업종			생산유발계수		1.119
	2019년	2020년	2021년	2022년	2023년	합계
매출 추정액	2,097	3,194	5,290	6,984	9,626	27,191
생산유발효과	2,347	3,574	5,920	7,815	10,771	30,427

② 생산유발계수는 어떤 산업부문의 최종수요가 한 단위 증가하였을 때 이를 충족시키기 위하여 각 산업부문에서 직/간접적으로 유발되는 생산액 수준을 나타내며, 추정되는 매출액에 대한 산업전반의 생산유발 효과는 5년간 총 30,427백만 원에 이르는 것으로 분석된다.

(나) 부가가치유발효과

① 부가가치유발계수는 어떤 산업부문의 최종수요가 한 단위 발생할 경우 각산업부문에서 직·간접으로 유발되는 부가가치 단위를 나타낸다. 연도별 부가가치유발효과는 부가가치유발계수에 해당연도 추정매출액을 곱하여 나타낸 값으로, 대상기술이 속한 첨단기술업종 분야의 부가가치유발계수는 0.619이고, 사업화 이후 5년간 부가가치유발효과는 총 16,831백만 원에 이르는 것으로 분석된다.

[표] 부가가치유발효과

(단위: 백만 원)

산업분야	첨단기술업종			부가가치유발계수		0.619
	2019년	2020년	2021년	2022년	2023년	합계
매출 추정액	2,097	3,194	5,290	6,984	9,626	27,191
부가가치유발효과	1,298	1,977	3,275	4,323	5,958	16,831

(다) 취업유발효과

[표] 취업유발효과

(단위: 백만 원)

산업분야	첨단기술업종			고용유발계수		8.96/10억원
	2019년	2020년	2021년	2022년	2023년	합계
매출 추정액	2,097	3,194	5,290	6,984	9,626	27,191
고용유발효과	19	29	47	63	86	244

- ① 취업유발계수는 어떤 산업부문의 최종수요가 일정금액(10억 원) 증가할 경우 각 산업 부문에서 직·간접으로 유발되는 고용지수를 나타낸다. 대상기술이 속한 전기변환·공급 제어장치 분야의 취업유발계수는 매출 10억 원당 8.96명이고, 사업화 이후 5년간 약 244명의 취업유발효과가 예상된다.

다. 결론

(1) 생산성

자연재배방식과 조직배양방식의 차이를 알아보고, 각 방식별 생산면적, 생산량 및 생산 단가 등을 비교 분석해본 결과 자연 재배방식의 단위 면적당 생산량은 29.98kg/ha, 생산단가는 414,246원이며 조직배양방식의 단위면적당 생산량은 600kg/ha, 생산단가는 0 원으로 생산성은 매우 높다고 볼 수 있다.

(2) 경제성

예상 매출액을 기준으로 순현재가치(NPV)는 209백만 원이며, 내부수익률(IRR)은 4.86%, 투자수익률(ROI)는 109.80%로 수익성이 있다고 볼 수 있다.

2절. 제1협동: 고기능성약용식물의 유효성분 분석 및 표준추출물 개발 (한국한의학 연구원)

1. 산삼배양근의 유효성분 분리

가. 활성 추적에 따른 분획화

(1) 시험 방법

(가) 건조 산삼배양근 50 g에 10배의 물, 30% 에탄올, 70% 에탄올을 각각 가하여 3 시간 동안 환류 추출한 후, 감압건조하였음.

(나) 유효성분 추적을 위하여 open column chromatography를 수행하였음

① 고정상 : D101

② 이동상 : 0%, 10%, 20%, 30%, 50%, 100% ethanol solution

(다) 유효성분 추적을 위하여 *in vitro* 효능 평가를 수행하였음.

① 혈소판 응집 분석기 (Aggregometer)를 이용한 탁도 측정법 이용

② Rat의 혈액에서 혈소판 분리 후 시료를 넣고 2분간 배양

③ collagen (7 μ g/ml)을 첨가하여 혈소판 응집반응을 5분간 측정

④ Inhibition (%) = $(A-B/A) \times 100$

A: Control의 응집능 (%)

B: 시료처리시 응집능 (%)

(2) 산삼배양근 추출 조건 확립

(가) 건조 산삼배양근 50g에 10배의 용매를 가하여 3시간 동안 환류 추출한 후, 감압건조 하였음.

추출용매	수율 (%)
100% 물	23.2
30% 에탄올	21.2
70% 에탄올	21.0

(3) 산삼배양근 분획물 제조

(가) 가장 좋은 효과를 보인 100% 물 추출물을 이용하여 D101 resin을 이용하여 이동상 중의 에탄올 비율을 높여가며 분획물을 제조하였음.

이동상 에탄올 비율 (%)	수율 (%)
0	20.7
10	0.84
20	0.63
30	0.58
50	0.65
100	1.15

(4) 산삼배양근 분획물의 *in vitro* 혈소판 응집 저해활성 측정

(가) 혈소판 응집 분석기 (Aggregometer)를 이용한 탁도 측정법을 이용하여 각 분획물의 혈소판응집저해율을 평가하였음.

Sample	농도 (ug/mL)	저해율 (%)
0% EtOH Fr.	400	-
10% EtOH Fr.	400	-
20% EtOH Fr.	400	12.7
30% EtOH Fr.	400	32.7
50% EtOH Fr.	400	7.3
100% EtOH Fr.	400	-
Aspirin	100	92.7

나. 추출물 및 분획물의 성분 분석

(1) 시험 방법

(가) 각 시료 및 분획물의 패턴 분석을 위하여 HPLC 분석을 수행하였음.

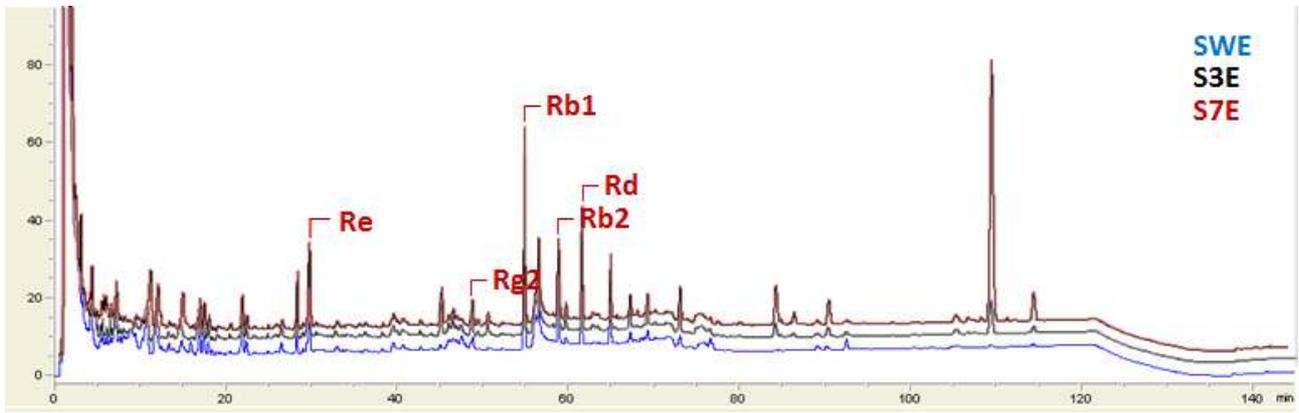
- ① Column : Thermo Scientific Acclaim™ Polar Advantage II, C18, 5um, 120Å, 4.6×250mm
- ② Mobile phase
 - ㉞ Water
 - ㉟ Acetonitrile

RT	A	B
0	90	10
120	50	50
130	0	100
135	0	100
140	90	10
145	90	10

- ③ Flow rate : 1.5 mL/min
- ④ Column Temperature : 40℃
- ⑤ Injection volume : 10μl
- ⑥ Detection : PDA
- ⑦ Quantification : 205 nm

(2) 산삼배양근 용매별 추출물의 HPLC 패턴비교

(가) 각 용매별 추출물을 20 mg/mL solution으로 제조한 후, HPLC-PDA를 이용한 프로파일링 및 정량분석을 수행하였음.

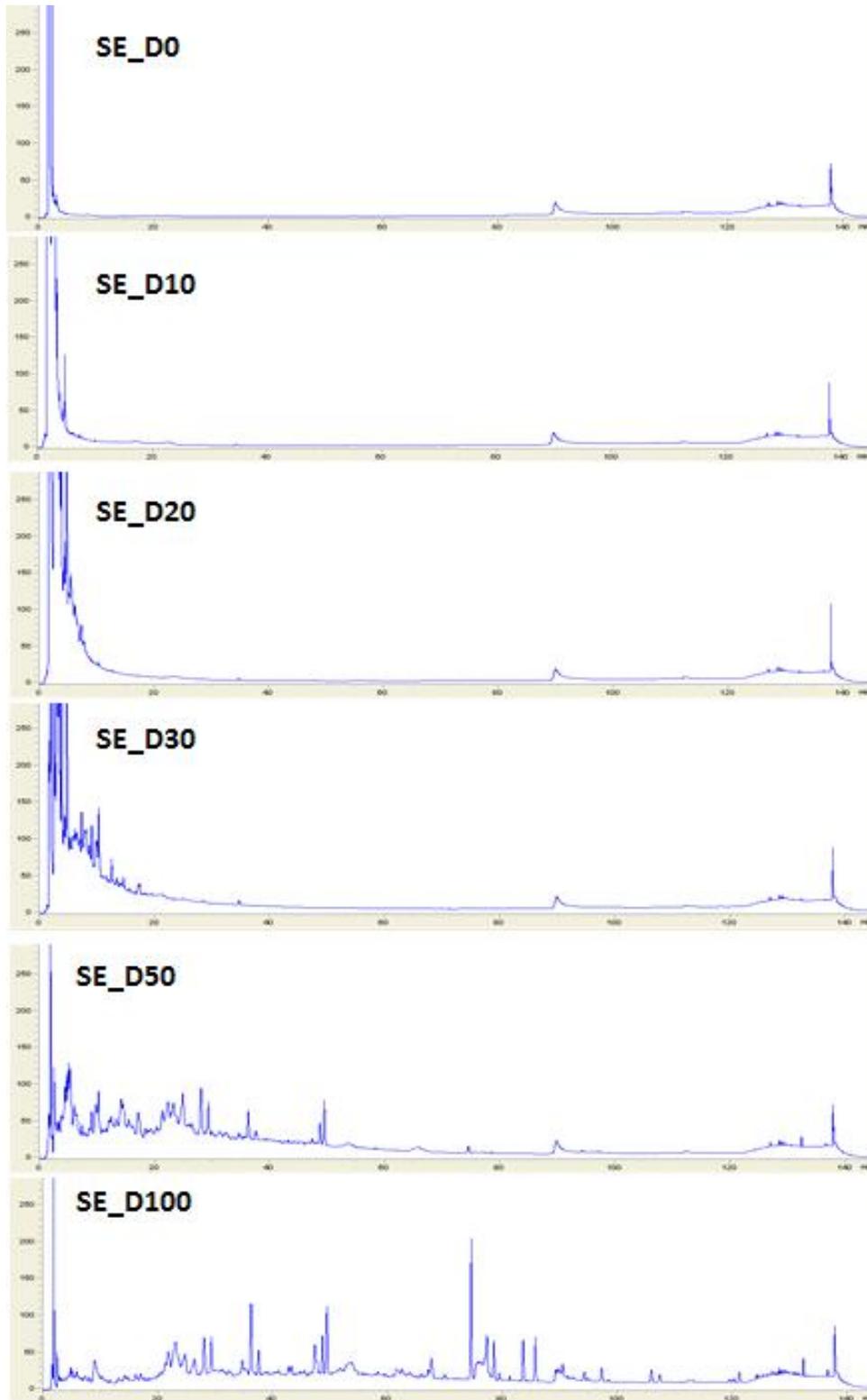


(나) 정량 가능한 13종의 ginsenosides에 대하여 정량분석을 수행하였음.

	RT	Conc. (%)		
		SWE	S3E	S7E
NG R1	26.212	0.4	0.4	0.3
PNG	28.198	3.3	5.6	6.3
Re	29.731	2.8	4.2	4.4
Rf	42.716	-	0.1	0.2
Rh1	47.342	0.4	0.4	0.0
Rg2	48.824	0.6	1.0	1.0
Rb1	54.807	4.0	7.9	8.9
Rc	56.621	0.7	1.2	2.1
Rb2	58.95	2.4	5.4	5.9
Rb3	59.801	0.3	0.7	0.8
Rd	61.683	1.7	4.2	4.9
F2	73.157	0.3	-	-
Rg3	76.549	0.5	0.1	-
Rg5	92.209	1.2	-	-

NG R1: Notoginsenoside R1, PNG : Panax notoginsenosides

(다) 산삼배양근 분획물의 각각의 HPLC 프로파일링을 수행하였음.



SE_D0; 0% EtOH Fr.; SE_D10; 10% EtOH Fr.;
 SE_D20; 20% EtOH Fr.; SE_D30; 30% EtOH Fr.;
 SE_D50; 50% EtOH Fr.; SE_D100; 100% EtOH Fr.

(라) 정량 가능한 10종의 ginsenosides에 대하여 정량분석을 수행하였음.

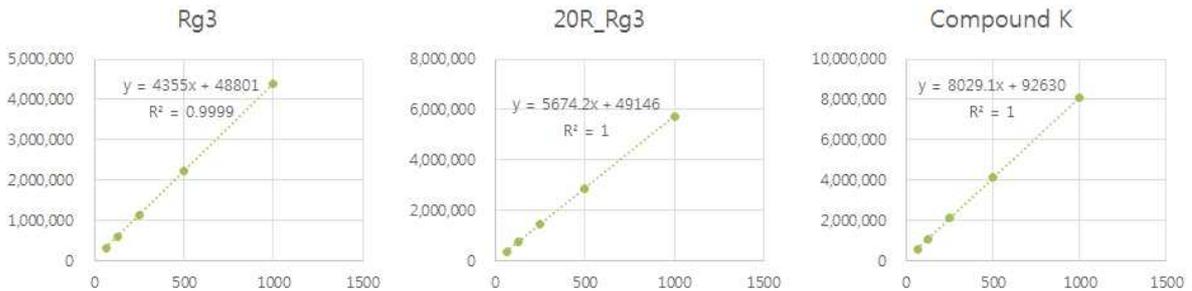
	Conc. (%)					
	SE_D0	SE_D10	SE_D20	SE_D30	SE_D50	SE_D100
NGR1	-	-	-	-	2.1	6.8
PNG	-	-	-	2.5	10.8	-
Re	-	-	-	-	2.3	-
Rf	-	-	-	-	0.6	1.9
Rh1	-	-	-	-	2.4	5.5
Rg2	-	-	-	-	5.7	7.2
Rb2	-	-	-	-	-	0.7
Rb3	-	-	-	-	-	0.2
Rd	-	-	-	-	-	4.1
Rg5	-	-	-	-	-	1.7

NG R1: Notoginsenoside R1, PNG : Panax notoginsenosides

(3) 산삼배양근 추출액 중 지표성분 정량 분석

(가) 생산단계별 산삼배양근 추출액의 지표성분 ginsenside Rg3 및 Compound K 함량 분석

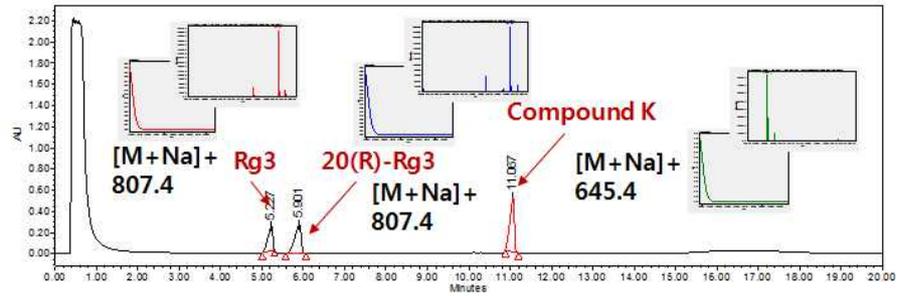
① Ginsenoside Rg3, 20R-Rg3, compound K의 직선성을 확인한 결과, 62.5 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도 수준에서 각각 0.9999, 1.0, 1.0의 R^2 값을 보여 해당 농도에서의 정량이 용이함을 확인하였음.



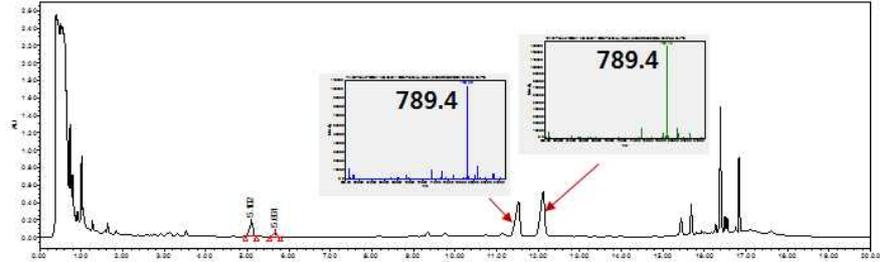
Area	Rg3	20R_Rg3	Comp. K	STDEV	Rg3	20R_Rg3	Comp. K	% RSD	Rg3	20R_Rg3	Comp. K
62.5	307,499	387,521	565,732	62.5	15,984	4,523	22,072	62.5	5.198	1.167	3.901
125	591,114	757,597	1,101,280	125	1,599	3,118	51,415	125	0.270	0.412	4.669
250	1,144,885	1,485,775	2,119,375	250	1,921	593	44,293	250	0.168	0.040	2.090
500	2,244,156	2,891,048	4,123,083	500	8,165	9,444	36,088	500	0.364	0.327	0.875
1000	4,394,091	5,717,526	8,110,119	1000	13,991	15,989	19,572	1000	0.318	0.280	0.241

② 표준용액과의 UV spectrum, retention time, molecular weight 확인 결과, Rg3, 20(R)-Rg3가 시료에 존재함을 확인하였고, 머무름시간이 유사한 compound K는 분자량 확인 결과, 시료 중에 존재하지 않는 것을 확인하였음.

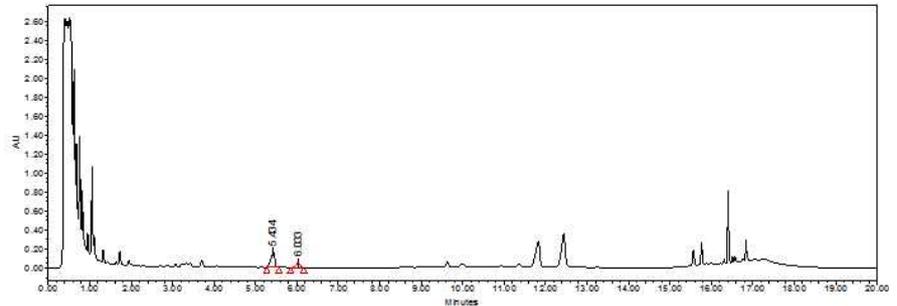
Standards (500 ppm)



Sample 1 (원액)



Sample 8 (20배 희석)



③ 산삼배양근 추출물 제조 공정 중의 시료를 단계별로 샘플링하여 Rg3, 20R-Rg3, compound K에 대하여 정량 분석을 수행한 결과, 아래와 같은 함량의 지표성분이 함유되어 있음을 확인하였음.

		mg/g	Rg3	20R_Rg3	Comp. K
S1	1차 추출액 (여과전)	S1	0.249	0.052	
S2	1차 추출액 (여과후)	S2	0.253	0.052	
S3	2차 추출액 (여과전)	S3	0.004		
S4	2차 추출액 (여과후)	S4	0.004		
S5	1차 농축물	S5	1.514	0.312	
S6	1,2차 농축물 여과전	S6	2.147	0.471	
S7	1,2차 농축물 여과후	S7	2.116	0.467	
S8	최종 농축물	S8	4.971	1.098	
Ext	이전 제조 최종 농축물(170322)	Ext	1.688	0.358	

		%	Rg3	20R_Rg3	Comp. K
S1	1차 추출액 (여과전)	S1	0.025	0.005	
S2	1차 추출액 (여과후)	S2	0.025	0.005	
S3	2차 추출액 (여과전)	S3	0.000		
S4	2차 추출액 (여과후)	S4	0.000		
S5	1차 농축물	S5	0.151	0.031	
S6	1,2차 농축물 여과전	S6	0.215	0.047	
S7	1,2차 농축물 여과후	S7	0.212	0.047	
S8	최종 농축물	S8	0.500	0.110	
Ext	이전 제조 최종 농축물(170322)	Ext	0.169	0.036	

(4) 산삼배양근 추출물로부터 ginsenoside Rg3, compound K, Rk1, Rg5 동시분석법 개발

(가) 시험 방법

① Column : XBridge™, C18, 5μm, 4.6 × 250mm

② Mobile phase

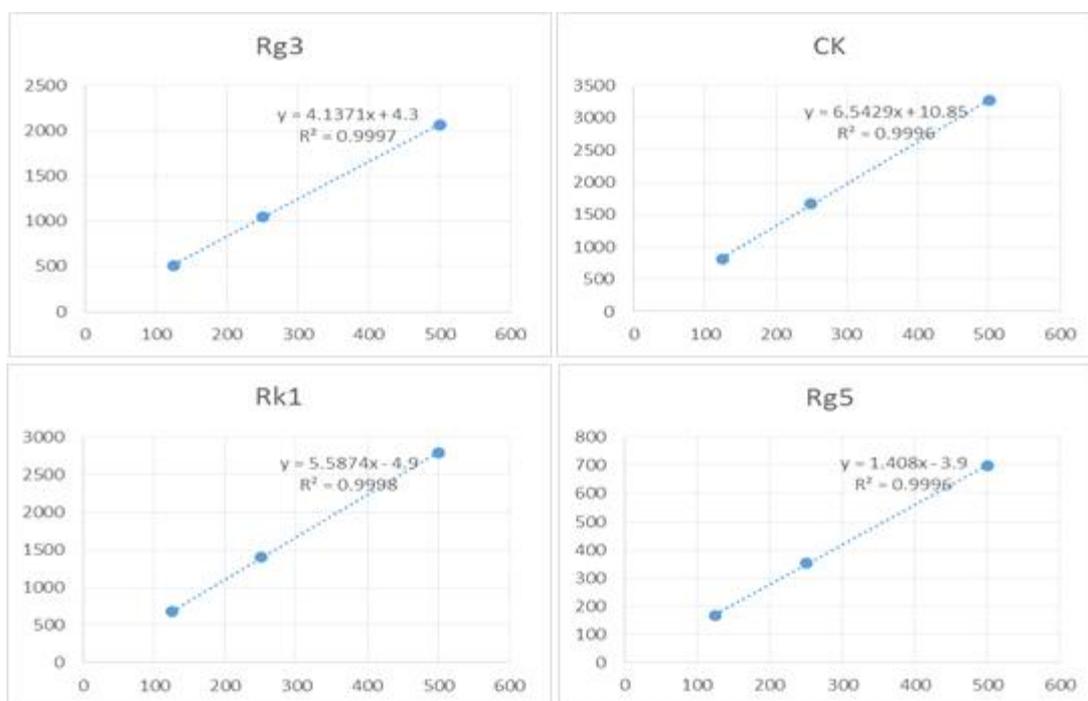
⊕ Acetonitrile

⊖ Water

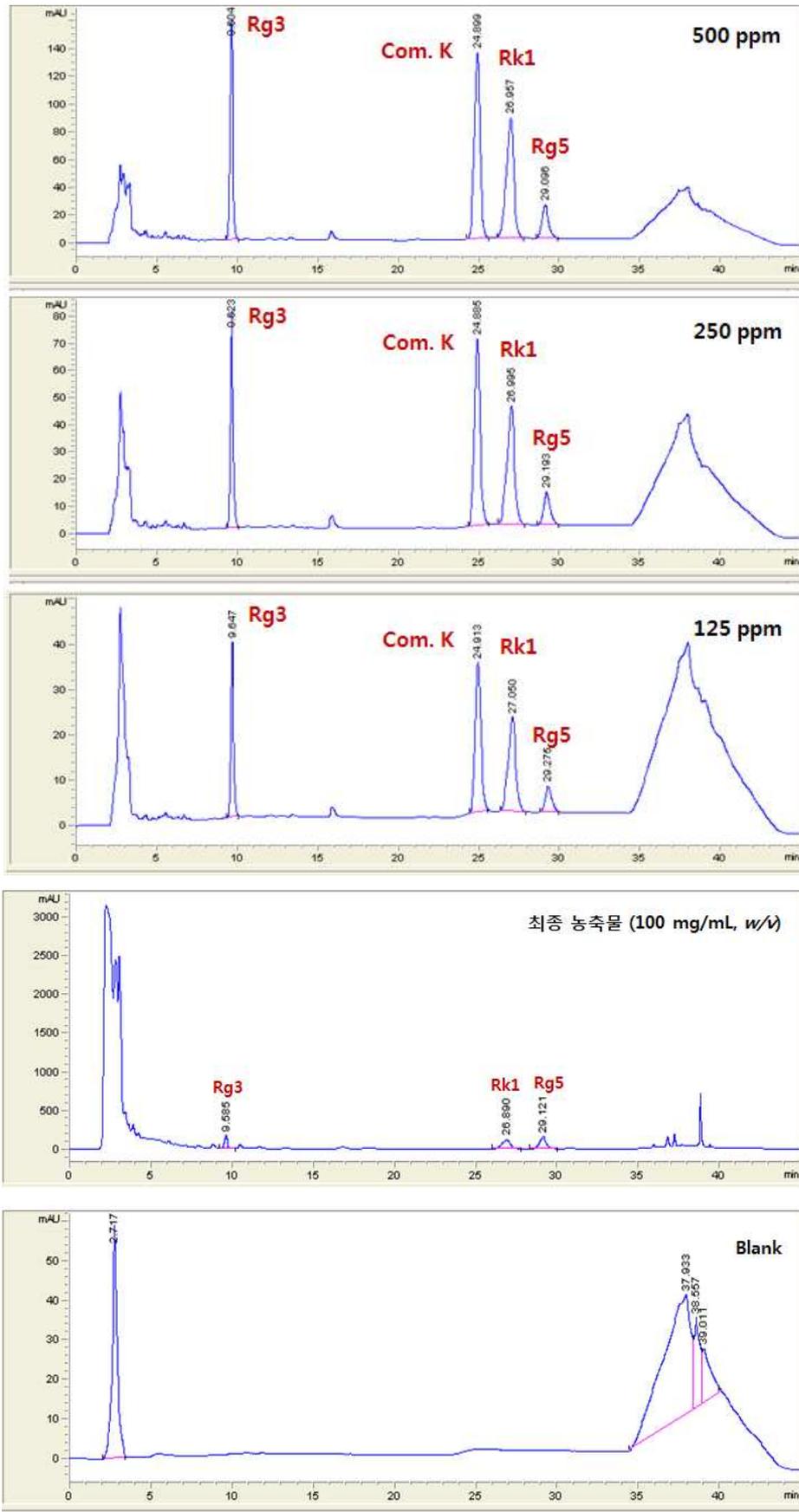
RT	A	B
0	50	50
20	50	50
21	52	48
31	52	48
35	100	0
40	50	50
45	50	50

- ③ Flow rate : 1.0 mL/min
- ④ Column Temperature : 35°C
- ⑤ Injection volume : 10 μ l
- ⑥ Detection : PDA
- ⑦ Quantification : 200 nm

(나) 지표성분 ginsenoside Rg3(Rg3), compound K(CK), ginsenoside Rk1(Rk1), ginsenoside Rg5(Rg5)에 대하여 125 ~ 500 μ g/mL의 농도 수준에서 직선성을 확인한 결과, 각각 0.9997, 0.9996, 0.9998, 0.9996의 R² 값을 보여 해당 농도에서 유의한 직선성을 보임을 확인하였음.



(다) Rg3, CK, Rk1, Rg5에 대하여 500, 250, 125 μ g/mL의 농도 수준에서 각각 chromatogram을 확인하였고, blank와 시료에서의 크로마토그램을 확인한 결과 4개의 성분에서 모두 특이성이 확인되어 정량분석을 수행하였음.



(라) 개발된 분석법을 이용하여 산삼배양근 농축물의 지표성분 정량분석을 수행한 결과,

아래의 표와 같이 Rg3가 0.58%, Rk1이 0.70%, Rg5가 3.20% 함유되어 있음을 확인하였음.

Content (%)				
	Rg3	Compound K	Rk1	Rg5
최종 농축물	0.58	-	0.70	3.20

2. 에키네시아 배양근

가. 활성 추적에 따른 분획화

(1) 분석 조건

(가) 각 시료 및 분획물의 패턴 분석을 위하여 HPLC 분석을 수행함

- ① Column : INNO column, C18, 5 μ m, 120Å, 4.6×250mm
- ② Mobile phase
 - ㉠ 0.1% Trifluoroacetic acid
 - ㉡ Acetonitrile

RT	A	B
0	90	10
60	10	90
65	0	100
70	0	100
75	90	10
80	90	10

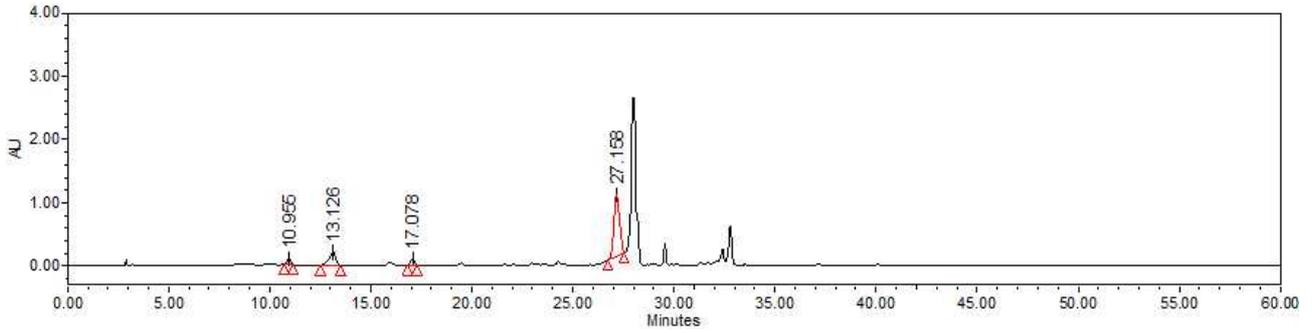
- ③ Flow rate : 1.0 mL/min
- ④ Column Temperature : 40°C
- ⑤ Injection volume : 20 μ l
- ⑥ Detection : PDA

(2) 에키네시아배양근 추출 조건 확립

(가) 건조 에키네시아배양근 10 g에 물, 30% 에탄올, 70% 에탄올 용매 15 배를 가하여 3 시간 동안 환류 추출한 후, 감압건조하였음.

추출용매	수율 (%)
100% 물	17.7
30% 에탄올	33.4
70% 에탄올	29.4

(나) 에키네시아 추출물의 주요성분을 확인 하였음.

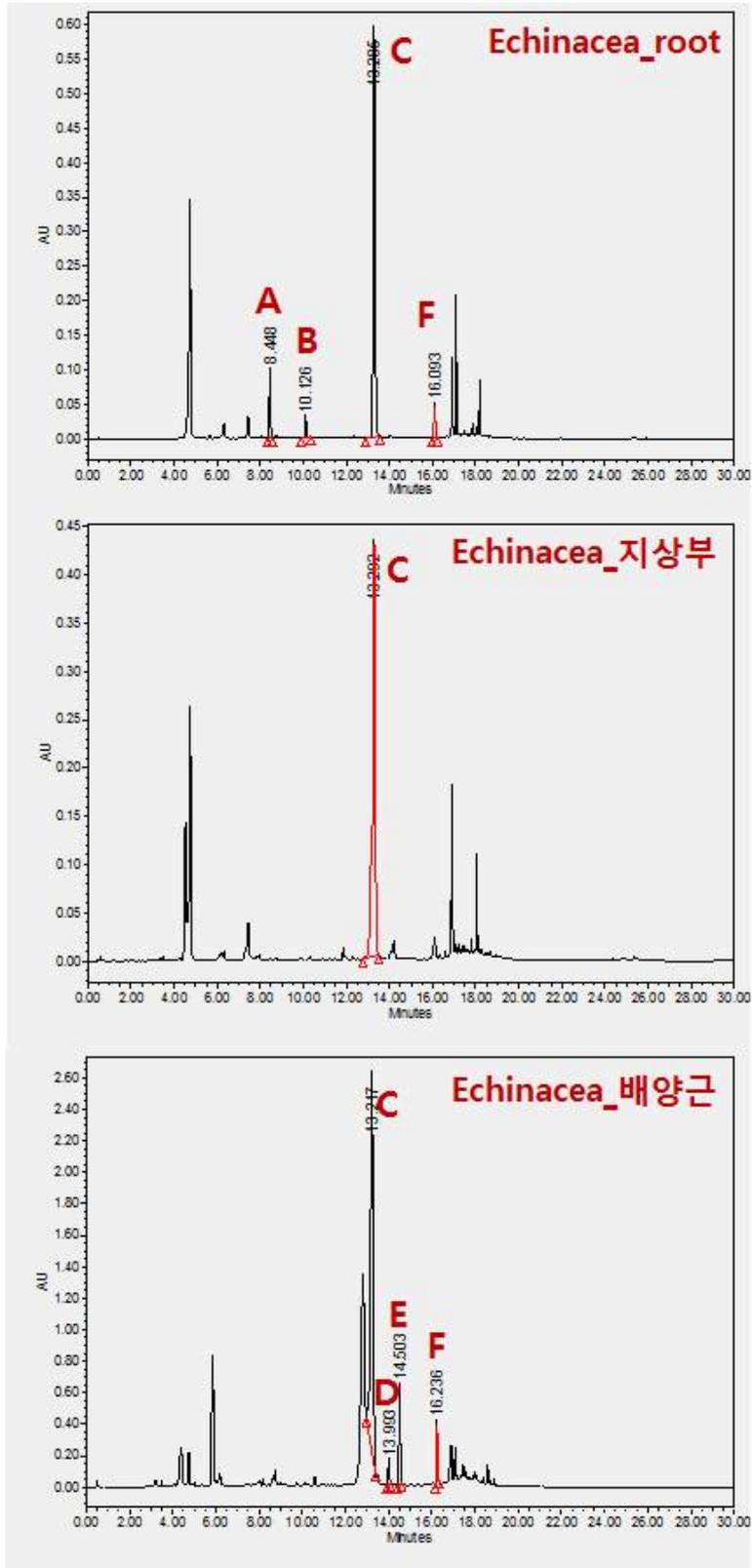


(다) 상기 HPLC/PDA 프로파일에서 보듯이 에키네시아 배양근의 주성분은 unknown 성분과 chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, chicoric acid 인 것으로 확인되었음.

(3) 에키네시아 부위별 추출물 및 배양근 추출물의 HPLC 프로파일 비교

(가) 분석 시료

- ① 에키네시아 뿌리 70% 에탄올 추출물
- ② 에키네시아 지상부 70% 에탄올 추출물
- ③ 에키네시아 배양근 70% 에탄올 추출물
- ④ 표준품 : 1,3-dicaffeoylquinic acid(cynarin), echinacoside, cichoric acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid(Isochlorogenic acid B), 3,5-dicaffeoylquinic acid(Isochlorogenic acid A), 4,5-dicaffeoylquinic acid(Isochlorogenic acid C)



A:1,3-dicaffeoylquinic acid, B:echinacoside, C:cichoric acid, D:3,4-dicaffeoylquinic acid, E:3,5-dicaffeoylquinic acid, F:4,5-dicaffeoylquinic acid

(나) 지표 성분 함량

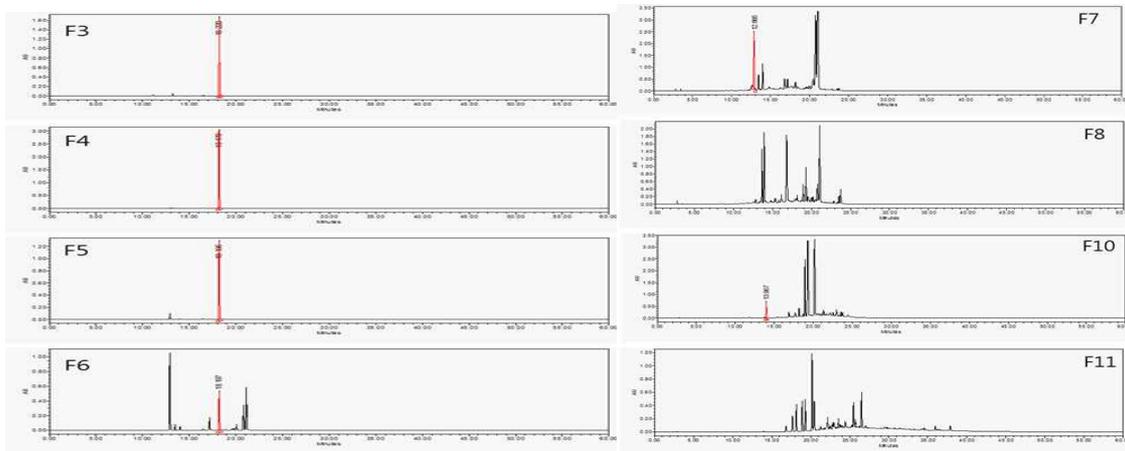
함량 (%)	함량 (mg/g)		
	에키네시아 뿌리	에키네시아 배양근	에키네시아 지상부
Cynarin	2.09	-	-
Echinacoside	1.82	-	-
Cichoric acid	15.07	83.55	12.40
Isochlorogenic acid B	-	12.49	-
Isochlorogenic acid A	-	3.12	-
Isochlorogenic acid C	0.84	4.57	-

(4) 에키네시아 배양근 분획 제조

(가) 에키네시아 배양근 (*E. purpurea*)의 유효성분 추적에 위하여 30% 에탄올 추출물을 이용하여 D101 column chromatography를 수행하여 100% water eluent부터 100% ethanol eluent까지 총 10개의 분획물을 제조하였음.

	분획물(g)	이동상	수율(%)
ECNCA_F1	3.38	loading	33.1
ECNCA_F2	1.04	water	10.2
ECNCA_F3	1.27	water	12.5
ECNFA_F4	0.49	10% ethanol	4.8
ECNFA_F5	0.71	10% ethanol	7.0
ECNFA_F6	0.56	20% ethanol	5.5
ECNFA_F7	0.43	20% ethanol	4.2
ECNFA_F8	0.48	30% ethanol	4.7
ECNFA_F10	0.74	50% ethanol	7.3
ECNFA_F11	0.53	100% ethanol	5.2

	함량(%)			
	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Echinacoside	Cichoric acid
ECNCA_F1	-	-	-	0.1
ECNCA_F2	-	-	-	4.1
ECNCA_F3	-	-	-	42.5
ECNFA_F4	-	-	-	85.8
ECNFA_F5	-	-	-	73.9
ECNFA_F6	-	-	-	13.6
ECNFA_F7	3.4	-	-	-
ECNFA_F8	-	-	-	-
ECNFA_F10	-	0.2	-	-
ECNFA_F11	-	-	-	-



3. 병풀 배양근

가. 유효성분 분석법 개발

(1) 분석 조건

(가) Column: Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm

(나) Mobile phase

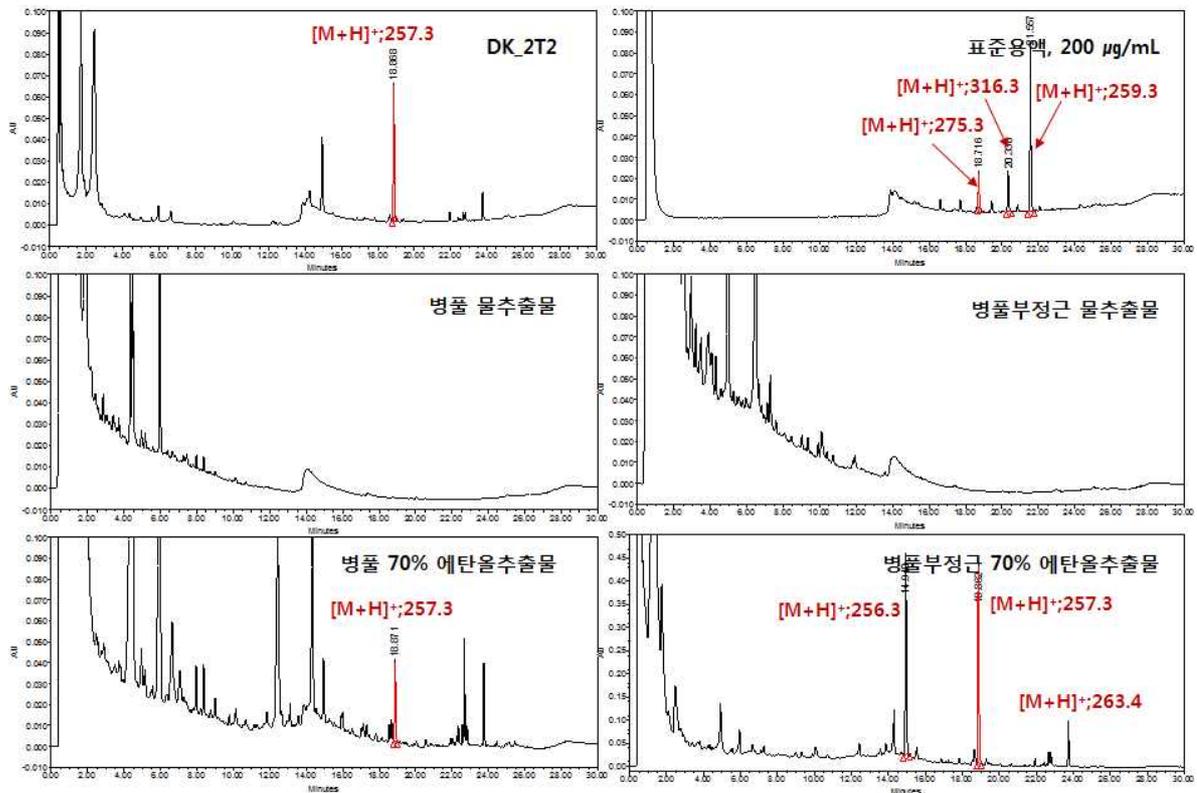
- ① Water
- ② Acetonitrile

RT	A	B
0	80	20
5	65	35
15	35	65
25	0	100
27	80	20
30	80	20

(다) Flow rate: 0.5 mL/min

- (라) Column Temperature: 40°C
- (마) Injection volume: 5 μ l
- (바) Detection: 200nm
- (사) QDa condition
 - ① Probe temperature : 600°C
 - ② Capillary voltage : 0.8 kV
 - ③ Ionization : ESI, Positive
 - ④ Dynamic range : 500 - 1100

[그림] 병풀 부정근 분석 chromatogram



나. 병풀 부정근 추출물의 피부적용을 위한 생리활성 평가

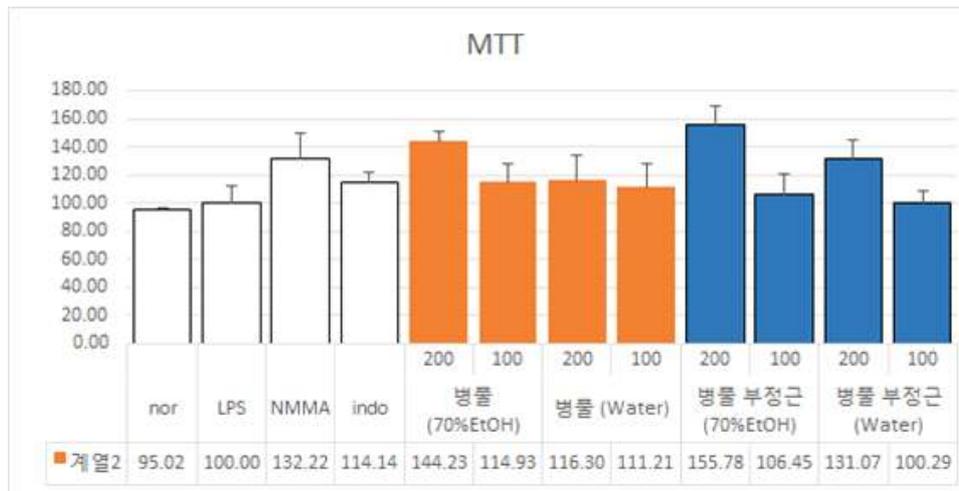
(1) 병풀 부정근 추출물 제조

- (가) 셀텔라아시아티카 배양근의 유효성분 추적을 위하여 분쇄 후, 용매별 추출물을 제조 하였음.
- (나) 건조 원물 10 g에 증류수와 70% 에탄올 용액을 각각 100 mL 씩 첨가하여 3시간 동안 환류 추출한 후, 여과하고 감압 농축 및 동결건조하여 추출분말을 확보하였음.

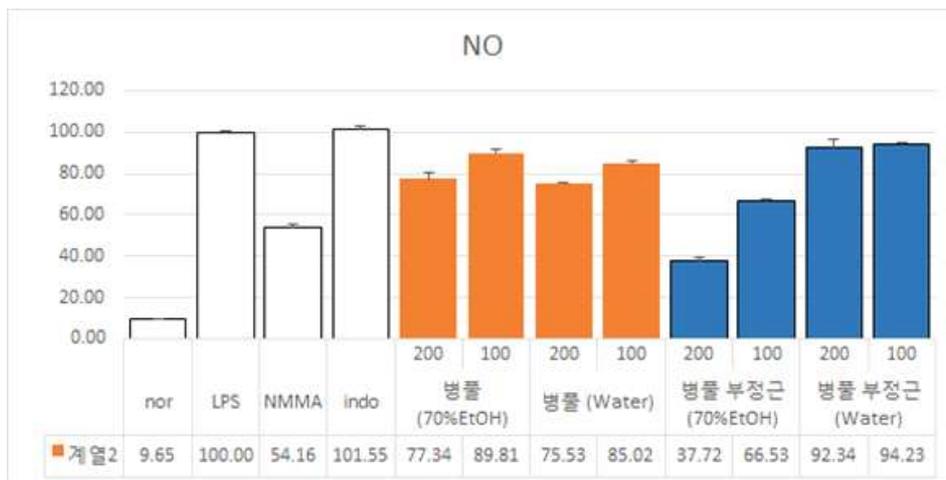
(2) 항염증 효능 평가

- (가) LPS로 염증반응을 유발한 RAW264.7 세포에서, 96 well plate에 2×10^5 cell/well로 분주하여 24시간 배양한 후, 시료를 처리하고 48시간 배양하여 MTT세포 생존율을 측정하였음. 그 결과는 하기 표에서 나타나는 바와 같이 병풀배양근 추출물들의 세포

생존율은 100%에 근접하는 바, 세포 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었음.



(나) LPS로 염증반응을 유발한 RAW264.7 세포에서, 96 well plate에 2×10^5 cell/well로 분주하여 24시간 배양한 후, 시료를 처리하고 48시간 배양하여 NO의 생성 억제 효과를 확인하였음. 그 결과 병풀배양근 70% 에탄올 추출물에서 가장 높은 NO 생성 억제 효과를 보임.



(3) 항균 효능 평가

(가) *Propionibacterium acne* 및 *Staphylococcus epidermidis* 균에 대하여 최소 생육 저해 농도를 확인함. *P. acne* 균은 혐기 조건의 37°C 인큐베이터에서 reinforced clostridial 배지를 이용하여 배양하였으며, *S. epidermidis*는 호기 조건의 37°C 인큐베이터에서 nutrient broth를 이용하여 배양하며, 시료의 항균 효과를 평가함.

(나) 셴텔라아시아티카 및 셴텔라아시아티카 부정균의 70% 에탄올 추출물에 대하여 *Staphylococcus epidermidis*와 *Propionibacterium acne* 균에 대한 항균활성을 평가한 결과 효과가 없음이 확인되었음.

(4) DPPH 라디칼 소거능 평가

- (가) 0.1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 190 μl 와 시료 10 μl 를 첨가한 후, 암실에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거능을 평가함.
- (나) 센텔라아시아티카 및 센텔라아시아티카 부정근의 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성을 평가한 결과 부정근 추출물이 보다 강한 효과가 확인됨.

	병풀 부정근	병풀
IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	18.5 \pm 4.6	184.0 \pm 9.8

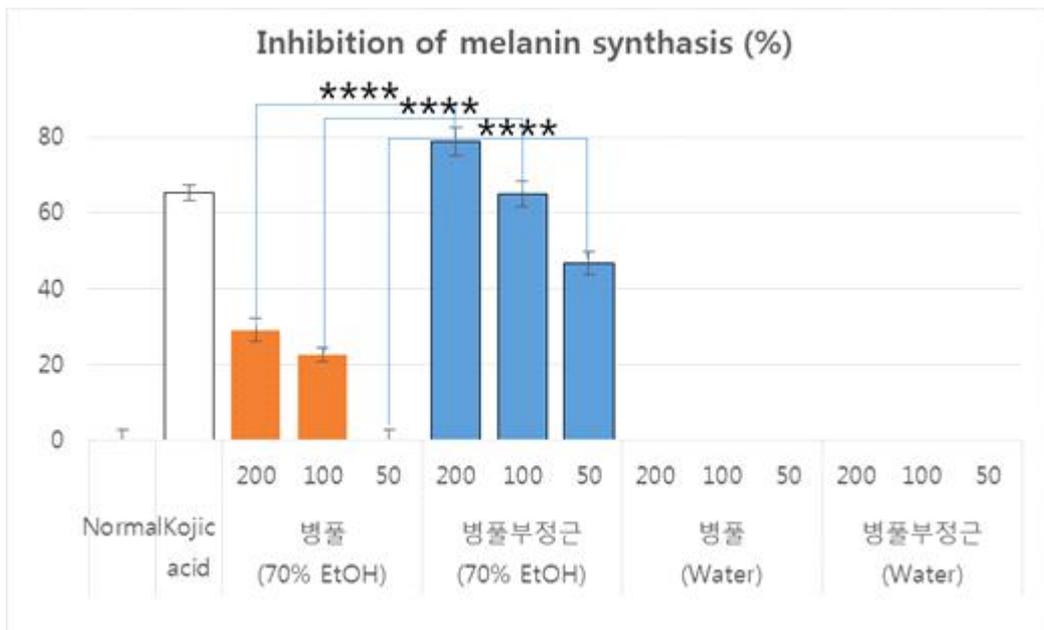
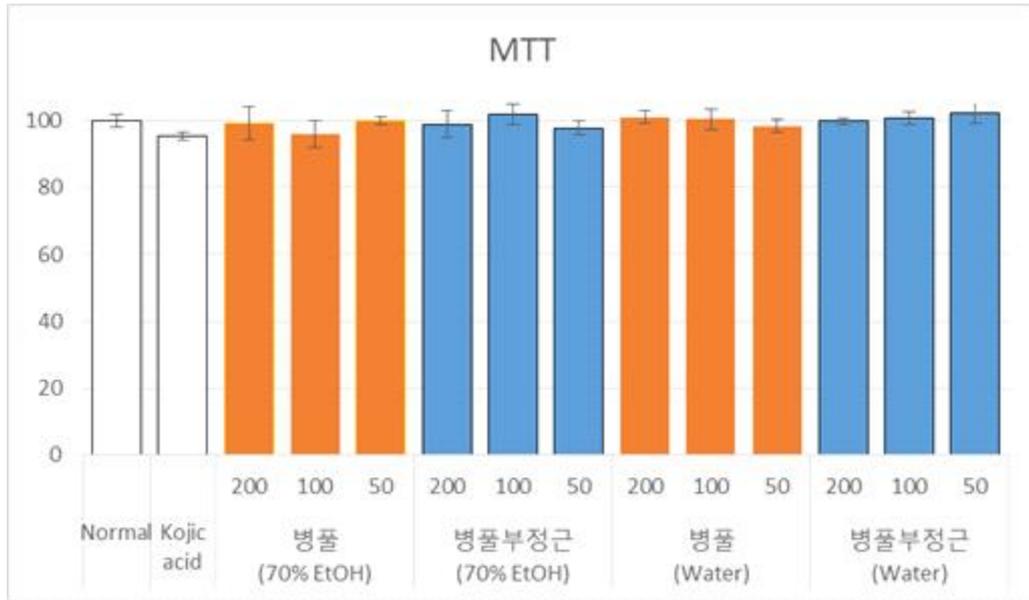
(5) 미백 활성 평가

- (가) 0.1 M sodium phosphate buffer 220 μl 와 시료 20 μl 를 첨가한 후, 1.5 mM L-tyrosine 40 μl , 1,500 unit/mL로 제조된 mushroom tyrosinase 20 μl 를 첨가한 후, 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 dopachrome의 양을 평가함.
- (나) 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 수준에서 센텔라아시아티카 추출물 및 센텔라아시아티카 부정근 추출물의 tyrosinase 저해 효과를 평가한 결과 낮은 저해 효과가 있음이 확인되었음.

	병풀 부정근	병풀
Inhibition (%)	26.6 \pm 1.7	30.6 \pm 11.5

- (다) 멜라닌 합성 억제 효과를 평가하기 위해 쥐의 멜라노마 세포(B-16 melanoma cell)의 배양액에 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 수준으로 처리하고, 3일간 배양한 후 세포를 트립신으로 처리하여 배양 용기로부터 세포를 떼어내 원심분리한 후, 멜라닌을 추출하였음. 추출된 멜라닌에 수산화 나트륨용액(1N) 1mL을 가하여 약 10분동안 끓여 멜라닌을 녹이고 400 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 멜라닌의 양을 단위 세포수당(10^6 cell)의 흡광도를 나타내는 방법으로 실험을 수행하였음
- (라) 병풀추출물 및 병풀부정근추출물은 물 및 70%에탄올 추출물 모두 세포 독성을 보이지 않았으며, 병풀 부정근 70%에탄올 추출물은 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리시 각각 78.8, 65.1, 46.8%의 멜라닌 생성 억제 효과를 보였음. 병풀 70%에탄올 추출물은 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리시 각각 65.4, 29.1, 22.5%의 멜라닌 생성 억제 효과

를 보였음. 이상의 결과를 통하여 병풀부정근추출물은 첨가량 증가에 따라 멜라닌 색소의 생성을 현저히 감소함이 확인되어 미백효과가 있음을 확인하였음.

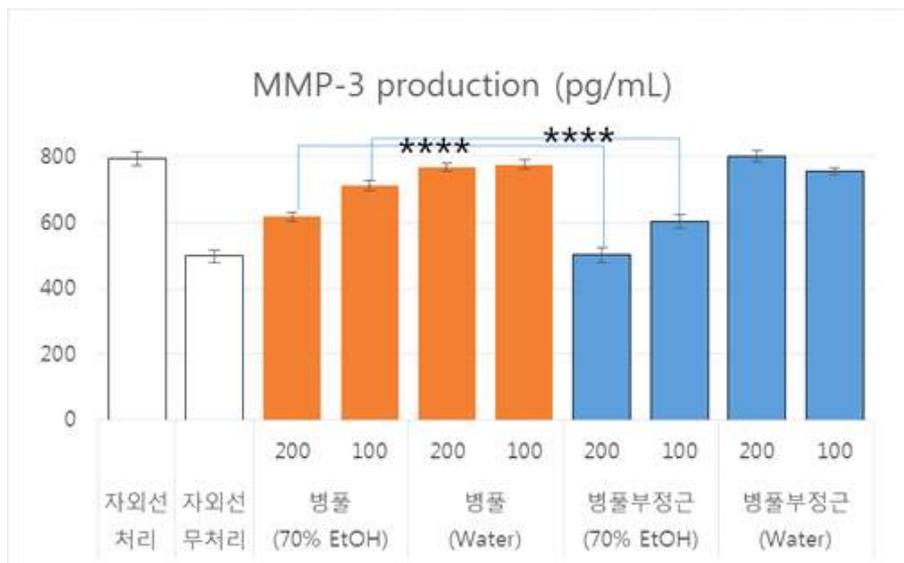
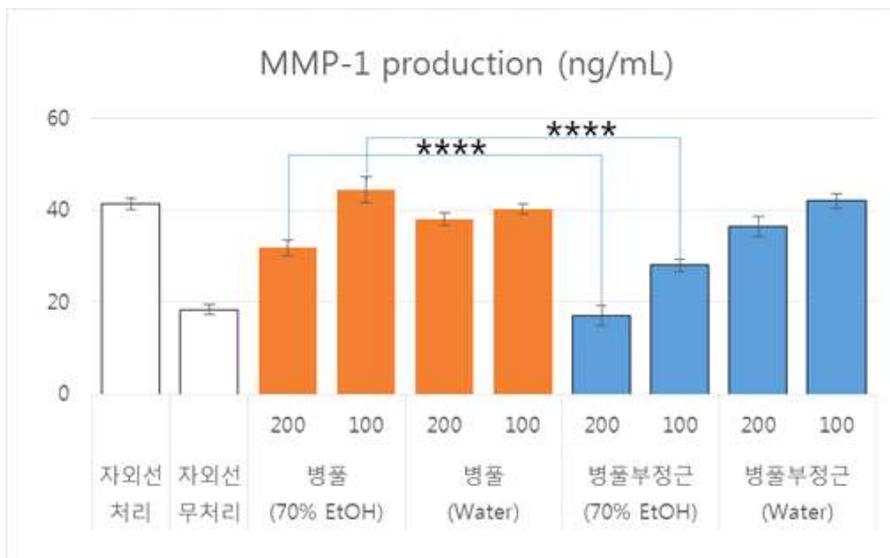


(6) 주름 개선 효능 평가

(가) 주름개선 효능을 확인하기 위하여 MMP-1 및 MMP-3 단백질의 합성 저해 효과와 프로콜라겐 단백질의 합성 촉진 효과를 확인하였음. 40 mm 세포 배양 접시에 2ml의 DMEM 배양액을 넣고, 인간섬유아세포를 약 1.2×10^5 의 농도로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 환경에서 24시간 동안 배양하였음. 그 후 UVB를 144 mJ/cm² 조건으로 조사한

후, 시료를 포함한 배지로 교체하여 3일간 배양하고 배양액을 회수하여 4℃, 7500 rpm 환경에서 5분간 원심분리하여 MMP-1과 MMP-3의 단백질 발현량 변화를 확인하였음.

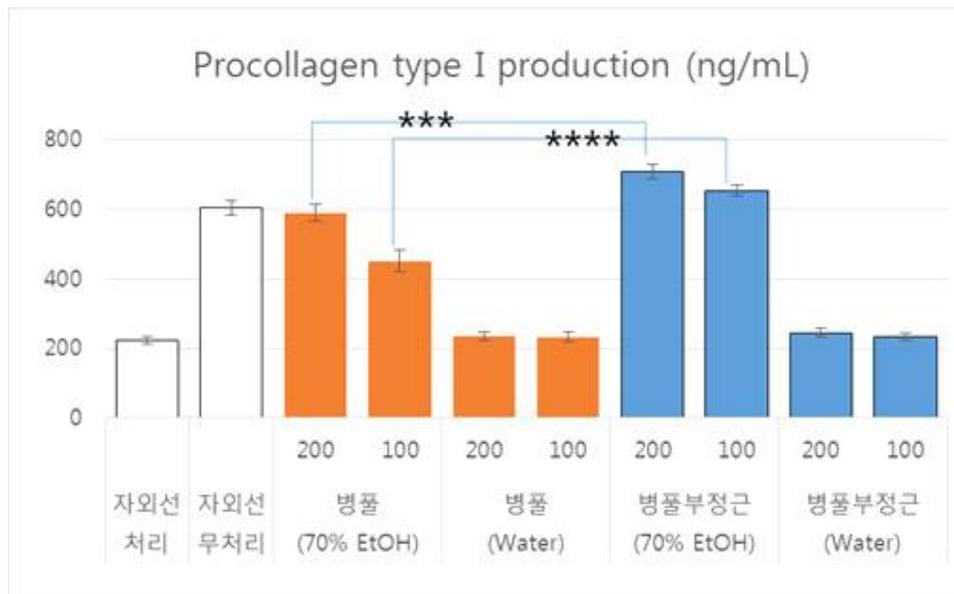
(나) 자외선 조사 처리한 인간섬유아세포는 자외선 무처리군에 비해 MMP-1 단백질의 생성량이 약 2배 증가하였으며, 자외선 조사 처리로 인한 MMP-1 단백질의 생성 증가는 병풀부정근 70%에탄올 추출물, 병풀 70% 에탄올 추출물 200 µg/mL 농도로 처리 시 각각 58.6%, 23.1%의 MMP-1 단백질 생성 저해 효과를 나타내었으며, MMP-3 단백질의 생성량에 있어서도 병풀부정근 70%에탄올과 병풀 70%에탄올 추출물의 200 µg/mL 처리 시에 각각 36.9%와 22.3%의 단백질 생성 저해 효과가 있음을 확인함.



(다) 40mm 세포 배양 접시에 2ml의 DMEM 배양액을 넣고, 인간섬유아세포를 약 1.2×10^5 의 농도로 접종한 후, 37℃, 5% CO₂ 환경에서 24시간 배양하였음. 이후 UVB를 144 mJ/cm²으로 조사하였고, 시료가 포함된 배지로 교체하여 3일간 배양하였음. 이후

배양액을 회수하여 4°C, 7500 rpm으로 5분간 원심분리하여 타입 I 프로콜라겐 (Procollagen Type I C Peptide EIA Kit, Takara, Shiga, Japan)의 단백질 발현량 변화를 확인함.

(라) 자외선 조사 처리한 인간섬유아세포는 자외선 무처리군에 비해 타입 1 프로콜라겐 단백질의 생성이 현저하게 감소하였으며, 이렇게 감소된 타입 1 프로콜라겐 단백질의 생성 감소는 병풀부정근 70%에탄올 추출물 및 병풀 70%에탄올 추출물 200 µg/mL 처리 시 각각 127.5%와 96.6%의 타입 1 프로콜라겐 단백질의 생성 증가 효과를 나타냄. 상기의 결과를 통하여 병풀배양근 70%에탄올 추출물은 TGF-β/Smad 신호전달 체계에 작용하여 타입 1 프로콜라겐의 생성을 촉진시키고, 콜라겐 분해 효소인 MMP-1 과 MMP-3의 발현을 억제하는 작용을 통해, 주름 생성을 효과적으로 예방하고, 생성된 주름을 개선하는 효과가 있음을 확인함.



3절. 제 2협동기관: 기능성원료 인허가 및 제품화를 통한 배양근의 산업화 기술개발 (동국제약)

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 산삼배양근추출물농축액의 제조

(1) 원재료: 산삼배양근(Adventitious roots of mountain ginseng)

원재료명	산삼(Mountain ginseng)
학명	Panax Ginseng C.A Meyer
원산지	대한민국
채취장소	강원도 오대산
채취시기	2002년 10월 25일
사용부위	뿌리

(2) 원재료의 기원

(3) 원재료의 제조원: 충북대학교

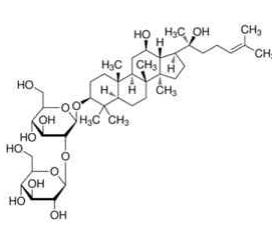
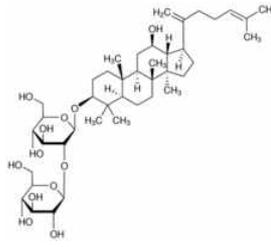
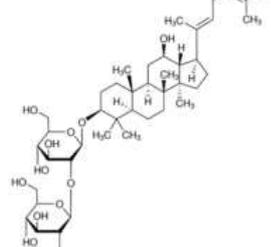
(4) 제조공정

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물
원재료	산삼배양근 건조물
↓	
1차 추출	발효주정:물(70:25) 혼합용매, 60℃, 8시간
↓	
여과 및 회수	300 mesh
↓	
1차 여과 회수물	열수, 60℃, 8시간
2차 추출	
↓	
여과	300 mesh
↓	
1차, 2차 추출물 혼합, 농축	진공농축
↓	
여과	300 mesh
↓	
최종 농축	진공농축, 60 Brix

나. 산삼배양근 추출물 농축액의 지표물질 분석법 확립

(1) 지표물질 분석조건 설정 및 시험법 밸리데이션

(가) 지표성분

일반명	Rg3(S)	Rk1	Rg5
CAS No.	14197-60-5	494753-69-4	186763-78-0
분자식	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂
분자량	785.01	767.00	767.00
제조사	Chromadex	Chromadex	Chromadex
구조식			

(나) 분석방법

- ① 분석장비: HPLC(Agilent)
- ② 컬럼: C18(250x4.6mm, 5 μ m, YMC)
- ③ 기기분석 조건

Method																									
Flow	1.0ml/min																								
Detector	UV 200nm																								
Oven temperature	35 $^{\circ}$ C																								
Injection	10 μ l																								
Mobile phase	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간 (min)</th> <th>A(ACN)</th> <th>B(Water)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>52</td> <td>48</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>52</td> <td>48</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	시간 (min)	A(ACN)	B(Water)	0	50	50	20	50	50	21	52	48	31	52	48	35	100	0	40	50	50	45	50	50
	시간 (min)	A(ACN)	B(Water)																						
	0	50	50																						
	20	50	50																						
	21	52	48																						
	31	52	48																						
	35	100	0																						
	40	50	50																						
45	50	50																							

(다) 실시항목 및 기준

실시항목 및 기준은 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정에 따라 진행하였다.

No.	항목	기준
1	시스템적합성	피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하 피크유지시간의 상대표준편차는 2.0% 이하
2	특이성	Rg3, Rk1, Rg5 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.
3	직선성	상관계수(R2)=0.99 이상
4	정확성	회수율 평균 : 100 ± 5.0%
5	정밀성	상대표준편차 2.0% 이하

(라) 시험방법

① 시스템 적합성

㉔ Rg3, Rg5, Rk1 각각의 농도 100 μ g/mL 에 해당하는 농도로 조제된 표준액을(시험농도, 100%) 6회 반복 분석하였다.

② 특이성

㉔ 산삼배양근추출물농축액 1g을 정밀하게 달아 증류수로 용해하여 정확하게 50ml로 하고 그 액을 25 $^{\circ}$ C에서 20분간 초음파 추출한 후, 0.45 μ m필터로 여과하여 검액으로 한다. 증류수를 넣고 잘 녹지 않을 경우 초음파추출을 한다. Rg3, Rk1, Rg5 표준품 1mg을 정밀하게 달아 메탄올로 용해하여 정확하게 10mL로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액을 가지고 다음 조건에서 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 주피크면적 AT 및 AS를 측정한다.

③ 직선성

㉔ Rg3, Rk1, Rg5 표준품을 가지고 Rg3, Rk1, Rg5 농도로서 60 μ g/mL, 80 μ g/mL, 100 μ g/mL, 120 μ g/mL, 140 μ g/mL로 조제한 표준액(시험농도 60%, 80%, 100%, 120%, 140%)을 각각 3회씩 입하여 얻어진 peak area를 가지고 회귀곡선을 구한다.

④ 정확성

㉔ Rg3, Rk1, Rg5 표준품을 가지고 Rg3, Rk1, Rg5 농도로서 80 μ g/mL, 100 μ g/mL, 120 μ g/mL 로 조제한 표준액(시험농도 80%, 100%, 120%)을 각각3회씩 주입하여 얻어진 peak area를 가지고 회수율을 구한다.

⑤ 정밀성

㉔ 재현성

· 산삼배양근추출물농축액으로서 농도 16mg/mL, 20mg/mL, 24mg/mL 조제한 검액을 (시험농도 80%, 100%, 120%) 각각3회씩 주입하여 얻어진 Data의 peak area 및 peak 용리 시간의 평균, 표준 편차 및 상대 표준 편차를 구한다.

㉔ 실험실내 정밀성

· 산삼배양근추출물농축액 함량 시험법에 의해 조제된 검액 및 표준액을 가지고 분석 날짜를 변경하여 함량 시험을 진행한다.

(마) 실험결과

① 지표성분 규격 설정

지표성분(Rg3, Rk1, Rg5) 함량 규격 설정을 완료하였다. 기존 고시형 원료인 홍삼농축액의 지표성분(Rg1, Rb1, Rg3)과 다른 규격을 확립하였다.

지표성분	함량 기준
Rg3	4.5mg/g 이상
Rg5+Rk1	54mg/g 이상

<지표성분 규격설정>

② 시험법 밸리데이션

㉠ 특이성

- Blank solution(methanol, water)의 크로마토그램에는 Rg3, Rk1, Rg5 peak가 검출되는 위치에 어떠한 peak도 검출되지 않음을 확인함
- 표준물질에 대한 Rg3, Rk1, Rg5의 머무름시간은 8.434, 22.869, 24.994분이고, 분리된 피크 정점에서의 DAD스펙트럼의 특이 파장은 모두 200nm임을 확인함
- 산삼배양근추출물농축액에 대한 Rg3, Rk1, Rg5의 머무름시간은 8.344, 22.894, 25.042분이고, 분리된 피크 정점에서의 DAD스펙트럼 특이 파장은 모두 200nm임을 확인함
- 따라서 표준품과 기능성 원료의 HPLC profile에서 분리된 피크의 머무름시간과 특이 파장이 동일함을 확인함

㉡ 직선성

- Rg3(S)를 60~140µg/mL 농도 범위 내에서 HPLC 분석하여 회귀식과 상관계수를 구함
- 상관계수(r2)은 0.99797이며 회귀곡선에 의한 실측치와 기대치간의 잔차 표준편차는 95% 신뢰구간 이내로 적합하여 직선성이 검증됨
- Rk1을 60~140µg/mL 농도 범위 내에서 HPLC 분석하여 회귀식과 상관계수를 구함
- 상관계수(r2)은 0.99655이며 회귀곡선에 의한 실측치와 기대치간의 잔차 표준편차는 95% 신뢰구간 이내로 적합하여 직선성이 검증됨
- Rg5를 60~140µg/mL 농도 범위 내에서 HPLC 분석하여 회귀식과 상관계수를 구함
- 상관계수(r2)은 0.99754이며 회귀곡선에 의한 실측치와 기대치간의 잔차 표준편차는 95% 신뢰구간 이내로 적합하여 직선성이 검증됨

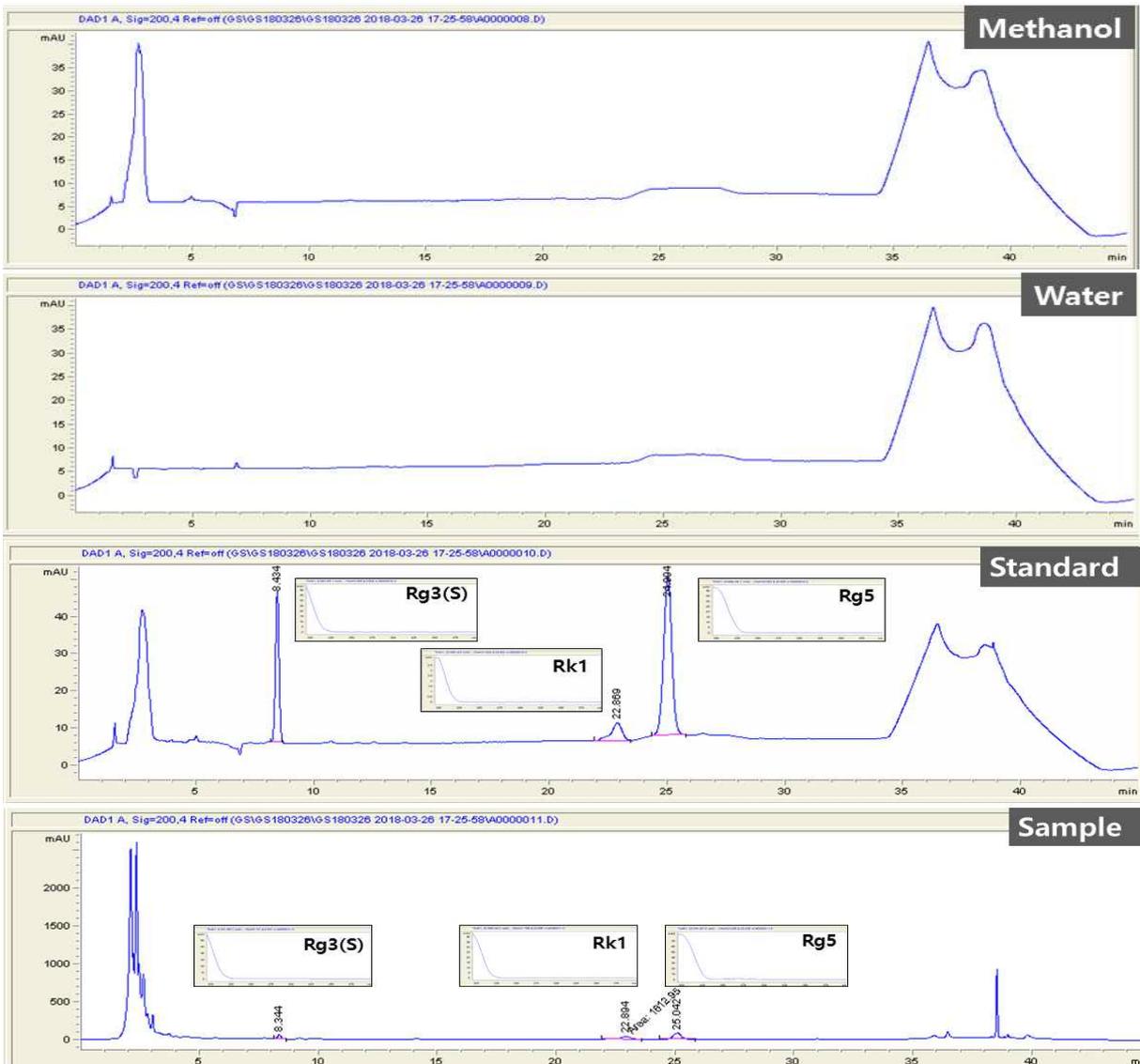
㉢ 정밀성 : 재현성

- Rg3(S)의 RSD는 0.9~1.7%로 나타남

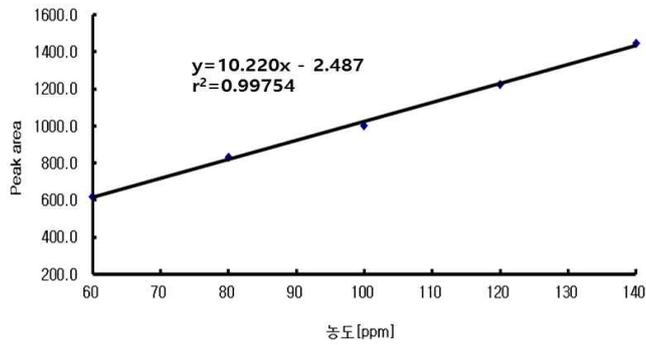
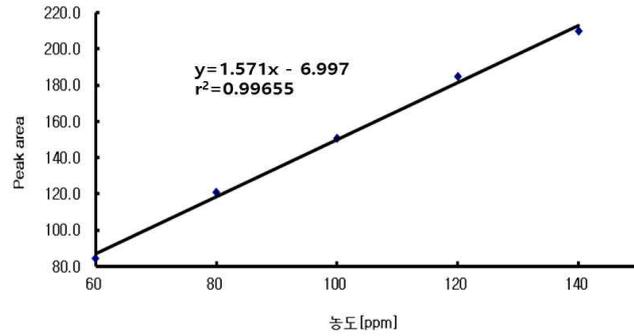
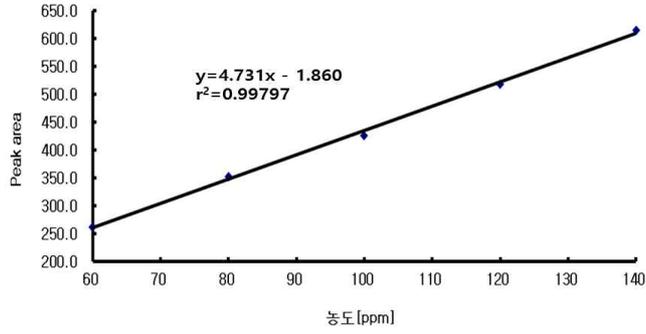
- Rk1의 RSD는 1.2~1.5%로 나타남
- Rg5의 RSD는 0.4~1.3%로 나타남
- RSD는 모두 2.0% 이내로 적합함

㉠ 정밀성 : 실험실내 정밀성

- RSD는 모두 2.0% 이내로 적합함



[그림] 특이성



[그림] 직선성

구분	80%	100%	120%
농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	80	100	120
Injection 1	99.716	98.374	99.043
Injection 2	98.458	101.623	93.132
Injection 3	98.801	108.830	96.183
평균 회수율(%)	98.991	102.942	96.119
전체 평균 회수율(%)	99.351		
회수율 구간(%)	96.119~102.942		

[그림] Rg3(S) 정확성

구분	80%	100%	120%
농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	80	100	120
Injection 1	102.151	100.306	101.303
Injection 2	101.594	111.253	102.788
Injection 3	106.924	97.123	102.152
평균 회수율(%)	103.556	102.894	102.081
전체 평균 회수율(%)	102.844		
회수율 구간(%)	102.081~103.556		

[그림] Rk1 정확성

구분	80%	100%	120%
농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	80	100	120
Injection 1	100.148	102.731	101.371
Injection 2	99.537	103.172	98.680
Injection 3	102.032	106.577	100.645
평균 회수율(%)	100.572	104.160	100.232
전체 평균 회수율(%)	101.655		
회수율 구간(%)	100.232~104.160		

[그림] Rg5 정확성

구분	1	2	3
농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	80	100	120
Injection 1	431.60	567.10	806.10
Injection 2	430.70	574.60	814.30
Injection 3	444.30	560.70	821.30
Average	435.53	567.47	813.90
S.D	7.61	6.96	7.61
%RSD	1.7	1.2	0.9

[그림] Rg3(S) 정밀성

[표] Rk1 정밀성

구분	1	2	3
농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	80	100	120
Injection 1	1183.80	1553.90	1776.20
Injection 2	1157.50	1540.70	1802.80
Injection 3	1178.50	1508.00	1821.00
Average	1173.27	1534.20	1800.00
S.D	13.91	23.63	22.53
%RSD	1.2	1.5	1.3

[표] Rg5 정밀성

구분	1	2	3
농도($\mu\text{g/mL}$)	80	100	120
Injection 1	1555.20	1952.70	2332.30
Injection 2	1549.20	1960.20	2350.70
Injection 3	1587.40	1944.70	2364.20
Average	1563.93	1952.53	2349.07
S.D	20.54	7.75	16.01
%RSD	1.3	0.4	0.7

[표] 실험실내 정밀성

분석자	함량(mg/g)		
	Rg3(S)	Rk1	Rg5
KYE	4.77	36.96	6.97
	4.83	36.99	6.93
	4.76	37.02	6.82
	4.77	36.35	6.92
	4.90	37.14	6.91
HSM	4.66	38.90	6.64
	4.90	37.93	6.78
	4.86	37.18	6.57
	4.92	37.49	6.74
	4.97	37.22	6.76
분석값(mg/g)	4.83	37.32	6.80
S.D	0.09	0.68	0.13
RSD(%)	1.92	1.83	1.93

다. 산삼배양근 추출물 농축액의 독성평가

(1) 설치류 단회투여 독성시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 부형제로 멸균 주사용수(대한약품공업(주))를 사용하였다.

② 실험동물

㉠ 실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 공급받은 특정병원체 부재(SPF) 랫드 (Sprague-Dawley [CrI: CD(SD)])를 사용하였다.

㉡ 실험동물은 온도 $23\pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55\pm 15\%$, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간 (8h-20h) 및 조도 150-300Lux로 유지되는 (주)켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 2

호실에서 사육되었다.

③ 실험방법

- ㉠ 시험에 사용된 랫드 수컷과 암컷 모두 8주령을 사용하였다. 시험군은 군당 10마리(암수 각 5마리)로 평균 체중이 비슷하도록 무작위 분배하였다.
- ㉡ 본 시험물질을 2000 및 5000 mg/kg 용량으로 Sprague-Dawley 랫드 암수 각 1 마리에 단회 예비 경구투여한 후 일반증상 및 체중을 관찰한 결과 특이사항은 관찰되지 않았다. 상기 결과를 바탕으로 시험물질이 건강기능식품임을 고려하여 5000 mg/kg을 고용량으로 설정하고 아래로 공비 2로 2개 군을 두었으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.
- ㉢ 투여 전에 하룻밤 절식(약 16-20 시간)시켜 위 내용물을 비운 후 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다. 시험물질 투여 후 약 4 시간 경과 후에 사료를 재급여하였다.

④ 실험결과

- ㉠ 본 시험은 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.
- ㉡ 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중 및 부검소견에서도 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㉢ 5000 mg/kg 투여군에서 관찰된 설사는 고용량군 모든 동물에서 관찰되어 시험물질에 의한 영향으로 판단하나, 절식 후 과량의 시험물질 투여에 의해 나타날 수 있는 증상이며, 체중 변화가 동반되지 않아 큰 의미는 없는 것으로 판단한다.
- ㉣ 이상의 결과로 보아, 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액을 Sprague-Dawley 랫드에 5000 mg/kg 이하의 용량으로 단회 경구투여하였을 때 사망동물이 관찰되지 않았으므로, 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

[표] 일반 증상

CLINICAL SIGNS					
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)
MALE					
1	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
2	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5
	Diarrhea	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
3-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
1	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
2	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5
	Diarrhea	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
3-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

The day of administration was designated Day 1.
Number of animals with the sign / Number of animals examined.

[표] 요검사

URINALYSIS								MALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)					
			G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
KET	-	0	3	2	0	0	0	
	+/-	1	2	1	2	0	2	
	1+	2	0	2	3*	5**	3*	
SG	1.010	0	3	1	0	0	0	
	1.015	1	1	1	0	0	0	
	1.020	2	1	1	0	0	1	
	1.025	3	0	2	4	3	3	
	≥1.030	4	0	0	1**	2**	1*	
pH	6.5	0	0	0	0**	3**	1	
	7.0	1	0	0	1	2	0	
	7.5	2	0	0	3	0	1	
	8.0	3	1	3	1	0	2	
	8.5	4	4	2	0	0	1	

URINALYSIS								FEMALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)					
			G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
KET	-	0	5	5	4	5	4	
	+/-	1	0	0	0	0	1	
	1+	2	0	0	1	0	0	
SG	1.010	0	4	4	1	3	1	
	1.015	1	0	1	3	1	3	
	1.020	2	1	0	1	0	1	
	1.025	3	0	0	0	1	0	
pH	6.5	0	0	0	0	0	0	
	7.0	1	0	0	0	0	0	
	7.5	2	1	0	0	1	0	
	8.0	3	1	1	2	1	0	
	8.5	4	3	4	3	3	4	
	≥9.0	5	0	0	0	0	1	

[표] 장기중량

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)					
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
Body weights (g)	362.61±24.80	363.97±20.49	379.85±27.89	382.11±18.50	374.63±26.30	
Kidney-left	1.3144±0.0540	1.3730±0.0705	1.3775±0.0588	1.5018±0.1461**	1.5128±0.0887**	
% to body weight	0.3636±0.0243	0.3782±0.0285	0.3641±0.0294	0.3929±0.0324	0.4042±0.0135	
Kidney-right	1.2987±0.0669	1.3454±0.0934	1.4024±0.1076	1.4551±0.1674	1.5560±0.1107**	
% to body weight	0.3590±0.0213	0.3699±0.0201	0.3703±0.0317	0.3808±0.0405	0.4157±0.0214**	

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)					
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
Body weights (g)	229.99±10.60	235.50±12.05	227.82±5.84	224.62±14.04	230.11±10.03	
Kidney-left	0.8240±0.0436	0.8978±0.0867	0.8368±0.0518	0.7878±0.0769	0.8152±0.0373	
% to body weight	0.3584±0.0134	0.3805±0.0219	0.3678±0.0300	0.3507±0.0241	0.3543±0.0084	
Kidney-right	0.8525±0.0750	0.9041±0.0897	0.8465±0.0231	0.8272±0.1246	0.8571±0.0798	
% to body weight	0.3704±0.0223	0.3831±0.0215	0.3719±0.0193	0.3673±0.0387	0.3719±0.0218	

(2) 설치류 2주 반복투여 독성시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 부형제로 멸균 주사용수(대한약품공업(주))를 사용하였다.

② 실험동물

㉠ 실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 공급받은 특정병원체 부재(SPF) 랫드 (Sprague-Dawley [CrI: CD(SD)])를 사용하였다.

㉡ 실험동물은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간 (8h-20h) 및 조도 150-300Lux로 유지되는 (주)켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 2호실에서 사육되었다.

③ 실험방법

㉠ 시험에 사용된 랫드 수컷과 암컷 모두 8주령을 사용하였다. 시험군은 군당 10마리(암수 각 5마리)로 평균 체중이 비슷하도록 무작위 분배하였다.

㉡ 본 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 5000 mg/kg 이하로 단회 투여한 독성시험 [주켄온시험번호: 16-RA-684] 결과, 사망은 관찰되지 않았고, 5000 mg/kg 투여군에서 설사가 관찰 되었다.

㉢ 상기 결과를 바탕으로 4000 mg/kg/day를 최고용량으로 설정하고 아래로 공비 2로 세 군을 두었다. 또한 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

㉣ 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다.

(나) 실험결과

① 본 시험은 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액을 Sprague-Dawley 랫드에 2주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 추후 실시할 반복투여 독성시험의 투여량 설정에 참고하기 위하여 실시하였다.

② 실험기간 동안 체중변화, 사료 및 물섭취량, 안과학적 검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검 소견에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

③ 일반증상에서 관찰된 시험물질색변은 4000 mg/kg/day 투여군 전 레에서 관찰되어 시험물질에 의한 영향으로 판단하며, 이는 색상을 띠는 시험물질 또는 그 대사체가 변으로 배설되면서 관찰된 것으로 추정한다.

- ④ 장기중량 중 2000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 좌우측 신장의 절대 및 상대중량의 증가는 용량-반응 상관성 있는 변화 경향 또는 유의적인 변화였기 때문에 시험물질에 의한 영향으로 판단한다. 또한, 요검사 항목 중 1000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 관찰된 KET 및 SG의 증가, 1000 및 2000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 관찰된 pH의 감소는 용량-반응 상관성이 뚜렷하지 않아 시험물질에 의한 영향이라고 판단하기는 어려우나, 상기 신장 중량 증가와 연관된 변화일 가능성이 있을 것으로 추정한다.
- ⑤ 이상의 결과로 보아, 산삼배양근 추출물 농축액을 Sprague-Dawley 랫드에 4000 mg/kg/day 이하 의 용량으로 2 주간 반복 경구투여하였을 때, 2000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 신장 중량의 증가가 관찰된 점을 고려하여, 추후에 실시할 13 주간 반복 경구투여 독성시험에서는 시험물질에 의한 변화가 나타날 것으로 예상되는 3000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

[표] 일반증상

CLINICAL SIGNS						
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)
MALE						
1	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
2-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE						
1	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
2-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

The day of first treatment was designated Day 1.

Number of animals with the sign / Number of animals examined.

[표] 요검사

URINALYSIS								MALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)					
			G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	5	5	
KET	-	0	3	2	0	0	0	
	+/-	1	2	1	2	0	2	
	1+	2	0	2	3*	5**	3*	
SG	1.010	0	3	1	0	0	0	
	1.015	1	1	1	0	0	0	
	1.020	2	1	1	0	0	1	
	1.025	3	0	2	4	3	3	
	≥1.030	4	0	0	1**	2**	1*	
pH	6.5	0	0	0	0**	3**	1	
	7.0	1	0	0	1	2	0	
	7.5	2	0	0	3	0	1	
	8.0	3	1	3	1	0	2	
	8.5	4	4	2	0	0	1	

URINALYSIS								FEMALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)					
			G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	5	5	
KET	-	0	5	5	4	5	4	
	+/-	1	0	0	0	0	1	
	1+	2	0	0	1	0	0	
SG	1.010	0	4	4	1	3	1	
	1.015	1	0	1	3	1	3	
	1.020	2	1	0	1	0	1	
	1.025	3	0	0	0	1	0	
pH	6.5	0	0	0	0	0	0	
	7.0	1	0	0	0	0	0	
	7.5	2	1	0	0	1	0	
	8.0	3	1	1	2	1	0	
	8.5	4	3	4	3	3	4	
	≥9.0	5	0	0	0	0	1	

[표] 장기 중량

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)					
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
Body weights (g)	362.61±24.80	363.97±20.49	379.85±27.89	382.11±18.50	374.63±26.30	
Kidney-left	1.3144±0.0540	1.3730±0.0705	1.3775±0.0588	1.5018±0.1461**	1.5128±0.0887**	
% to body weight	0.3636±0.0243	0.3782±0.0285	0.3641±0.0294	0.3929±0.0324	0.4042±0.0135	
Kidney-right	1.2987±0.0669	1.3454±0.0934	1.4024±0.1076	1.4551±0.1674	1.5560±0.1107**	
% to body weight	0.3590±0.0213	0.3699±0.0201	0.3703±0.0317	0.3808±0.0405	0.4157±0.0214**	

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)					
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)	G5 (4000)	
Body weights (g)	229.99±10.60	235.60±12.05	227.62±5.84	224.62±14.04	230.11±10.03	
Kidney-left	0.8240±0.0436	0.8978±0.0867	0.8368±0.0518	0.7878±0.0769	0.8152±0.0373	
% to body weight	0.3584±0.0134	0.3805±0.0219	0.3678±0.0300	0.3507±0.0241	0.3543±0.0084	
Kidney-right	0.8525±0.0750	0.9041±0.0897	0.8465±0.0231	0.8272±0.1246	0.8571±0.0798	
% to body weight	0.3704±0.0223	0.3831±0.0215	0.3719±0.0193	0.3673±0.0387	0.3719±0.0218	

(3) 비설치류 단회투여 독성시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 별도의 조제 없이 동물 체중에 맞게 각각의 시험물질을 칭량한 후 경구투여용 젤라틴 캡슐 (현대사이언스)에 충전하였다. 캡슐 충전작업은 투여 직전에 수행하였다.

② 실험동물

㉠ 실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 공급받은 특정병원체 Beagle dog를 사용하였다.

㉡ 실험동물은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 15\%$, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간 (8h-20h) 및 조도 150-300Lux로 유지되는 (주)켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 2호실에서 사육되었다.

③ 실험방법

㉠ 시험에 사용된 Beagle dog 수컷과 암컷 모두 약 5.5 ~ 6.6 월령을 사용하였다. 시험군은 군당 2마리(암수 각 1마리)로 평균 체중이 비슷하도록 무작위 분배하였다.

㉡ 본 시험물질을 500 및 1000 mg/kg 용량으로 Beagle dog 암수 각 1 마리에 단회 예비 경구 투여한 후 일반증상 및 체중을 관찰한 결과 특이사항은 관찰되지 않았다.

㉢ 상기 결과를 바탕으로 시험물질이 건강기능식품임을 고려하여 1 차 투여의 투여량을 1000 및 2000 mg/kg, 2 차 투여의 투여량을 3000 및 4000 mg/kg으로 설정하였다.

㉣ 투여 전에 하룻밤(16-20 시간)을 절식시켜 위 내용물을 비우게 하였다. 동물을 사육상자 내에서 자연스럽게 위치한 상태에서 입을 벌린 후 캡슐을 혀의 안쪽에 넣고 입을 다물게 한 다음, 인후두부를 부드럽게 쓰다듬어 삼키도록 하였다. 사료는 투여 후 약 4 시간째에 급여하였다.

(나) 실험결과

① 본 시험은 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액을 Beagle dog에 DE (dose escalation) 법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 수행하였다.

② 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중 및 부검소견에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

③ 일반증상에서 관찰된 시험물질 성상의 구토는 수컷에서 투여 후 짧은 시간 내에 관찰

되었고, 용량-반응 상관성을 보이므로 시험물질에 의한 영향으로 판단한다. 다만, 일반적으로 개는 구토증추의 발달로 인하여 독성작용 없이 경미한 위장관 자극에 의해 구토가 유발될 수 있고 1-2), 본 시험에서 전신적인 이상증상이나 체중 변화, 부검에서의 이상 소견 등이 동반되지 않았기 때문에 독성작용에 의한 것이 아닌 시험물질 고유의 맛, 냄새 등의 물리적 특성에 의한 것으로 생각된다.

- ④ 암컷의 경우, 시험물질 성상의 구토는 1000 mg/kg 투여군에서 투여 후 비교적 많은 시간 이 지난 후에 관찰되어 우발적인 변화로 판단하고, 2000 및 4000 mg/kg 투여군에서는 관찰되지 않는 등 용량-반응 상관성이 결여된 점으로 보아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단한다.
- ⑤ 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액을 Beagle dog에 DE (dose escalation)법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때, 본 시험조건하에서 시험물질에 의한 영향으로 3000 및 4000 mg/kg 투여군 수컷에서 시험물질 성상의 구토가 관찰되었다.
- ⑥ 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않은 최대용량은 수컷에서 2000 mg/kg, 암컷에서 4000 mg/kg으로 판단한다.

[표] 일반증상

CLINICAL SIGNS [1 st]			
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	SIGNS	OBSERVED ON
MALE			
G1 (1000)	1	Normal	DAY 1 (0.5-6 hrs), 2-7
G2 (2000)	2	Normal	DAY 1 (0.5-6 hrs), 2-7
FEMALE			
G1 (1000)	3	Normal Vomiting	DAY 1 (0.5-5 hrs), 2-7 DAY 1 (6 hr)
G2 (2000)	4	Normal Remaining of food	DAY 1 (0.5-6 hrs), 2 DAY 3-7
Days are those from the 1 st dosed Day (DAY 1).			
CLINICAL SIGNS [2 nd]			
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	SIGNS	OBSERVED ON
MALE			
G1 (3000)	1	Normal Vomiting Terminal sacrifice	DAY 1 (1-6 hrs), 2-15 DAY 1 (0.5 hr) DAY 15
G2 (4000)	2	Normal Vomiting Terminal sacrifice	DAY 1 (1-6 hrs), 2-15 DAY 1 (0.5 hr) DAY 15
FEMALE			
G1 (3000)	3	Normal Vomiting Terminal sacrifice	DAY 1 (1-6 hrs), 2-15 DAY 1 (0.5 hr) DAY 15
G2 (4000)	4	Normal Terminal sacrifice	DAY 1 (0.5-6 hrs), 2-15 DAY 15
Days are those from the 2 nd dosed Day (DAY 1).			

(4) 설치류 13주간 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 부형제로 멸균 주사용수(대한약품공업(주))를 사용하였다.

② 실험동물

㉠ 실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 공급받은 특정병원체 부재(SPF) 랫드 (Sprague-Dawley [CrI: CD(SD)])를 사용하였다.

㉡ 실험동물은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간 (8h-20h) 및 조도 150-300Lux로 유지되는 (주)켄온 비임상연구소 제2동물사육구역 2호실에서 사육되었다.

[표] 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1	M / F	15 / 15	1-15 / 51-65	10	0
G2	M / F	10 / 10	16-25 / 66-75	10	750
G3	M / F	10 / 10	26-35 / 76-85	10	1500
G4	M / F	15 / 15	36-50 / 86-100	10	3000

G1: 부형제대조군(멸균주사용수)

G1 및 G4 암수 각 끝번호 5 마리는 회복군임

③ 실험방법

㉠ 시험에 사용된 랫드 수컷과 암컷 모두 6주령을 사용하였다. 평균 체중이 비슷하도록 선발 한 후 '시험군 구성'표와 같이 무작위 분배하였다.

㉡ 본 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 4000 mg/kg/day 이하의 용량으로 2 주간 투여하는 DRF 독성시험[(주)켄온 시험번호: 16-RR-685] 결과, 1000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 요검사 항목 일부의 변화와 2000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 신장 중량의 증가가 관찰 되었다. 이를 바탕으로, 3000 mg/kg/day를 고용량군으로 설정하고, 아래로 공비 2로 두 개 군을 두었으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

㉢ 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존데를 장착한 syringe tube를 이용하여 위내에 직접 투여하였다.

(나) 실험결과

① 본 시험은 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액을 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반

복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 4 주간의 회복기간에 나타나는 변화를 확인하여 시험물질의 독성을 평가하고자 수행하였다.

- ② 본 시험에서 사료섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검조건, 조직 병리학적 검사에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- ③ 일반증상 관찰 결과, 3000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰된 유연과 시험물질색변은 투여기간 동안 지속적으로 관찰되었다. 이러한 유연은 시험물질의 맛이나 냄새 등 고유의 성상에 의해 나타나는 생리적인 작용으로 인해 나타나는 변화이며, 시험물질색변은 시험물질 또는 그 대사체가 배설되는 과정에서 나타나는 증상이므로 상기의 변화들은 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단한다.
- ④ 체중측정 결과, 750 mg/kg/day 투여군 수컷에서 Day 28-91 에 관찰된 평균체중 및 증체량의 증가는 투여기간 동안 지속적으로 관찰되었고, 부검 전 체중 기준으로 부형제대조건 대비 10 % 이상 증가하였지만, 용량-반응 상관성있게 관찰되지는 않았고, 조직병리학적 검사에서 연관된 변화가 관찰되지 않았으며, (주)캠온의 Historical control data10)의 정상범위 이내의 변화인 점으로 미루어 보아 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단한다.
- ⑤ 물섭취량 측정 결과, 3000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 Day 1-90 에 관찰된 물섭취량의 증가는 용량-반응 상관성있게 관찰되지는 않았으나, 투여기간 동안 지속적으로 약 20% 정도 높게 관찰되었다. 그러나 요검사 및 조직병리학적 검사에서 신장과 연관된 변화가 관찰되지 않은 점으로 미루어보아 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단한다.
- ⑥ 장기중량 측정 결과, 750 mg/kg/day 투여군 수컷에서 관찰된 폐 및 뇌의 절대중량의 증가는 체중 측정에서 관찰된 체중 및 증체량과 절식체중의 증가와 연관된 변화를 보였으며, 750 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 관찰된 심장 및 간장의 절대 중량의 증가는 절식체중의 증가 및 증가 경향과 연관된 변화로 판단한다. 단, 이러한 변화들은 용량-반응 상관성있게 관찰되지 않았거나, 상대 중량에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았고, 조직병리학적 검사에서 연관된 소견이 관찰되지 않은 점으로 미루어보아 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단한다.
- ⑦ 3000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 뇌하수체와 양측 신장의 절대 및 상대중량의 증가는 용량-반응 상관성있게 관찰되었으나 조직병리학적 검사에서 연관된 변화가 관찰되지 않았으며, (주)캠온의 Historical control data10)의 정상범위 이내의 변화인 점으로 미루어보아 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단한다.
- ⑧ 조직병리학적 검사 결과, 비장에서 관찰된 미만성 괴사는 혈전으로 인한 혈관폐색¹²⁾으로 인해 비장 세포가 광범위하게 괴사된 것으로 사료된다. 이와 동일한 원인으로 형성된 것으로 추정되는 혈관폐색으로 인하여 간세포 괴사도 유발된 것으로 여겨진다^{11,13)}. 괴사된 간세포 처리를 위하여 쿠퍼세포의 증식과 염증세포 침윤 및 미세육아종의 증식 등이 관찰되었는데 이는 비장의 괴사부 주위에서 관찰한 조직구와 다핵 거

대세포의 침윤 등의 소견들과 서로 부합하는 것으로 여겨진다.

- ⑨ 간과 비장의 괴사소견은 용량-반응 상관성이 없으므로 자연발생적 병변으로 판단되어 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단하였다.
- ⑩ 이상의 결과로 보아, 산삼배양근 추출물 농축액을 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질에 의한 변화로 750 mg/kg/day 투여군 수컷에서 체중 및 증체량의 증가가 관찰되었고, 750 mg/kg/day 투여군 수컷에서 폐 및 뇌의 절대중량의 증가, 750 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 심장 및 간장의 절대 중량 및 절식체중의 증가가 관찰되었으나, 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단하였다.
- ⑪ 따라서 본 시험 조건 하에서 산삼배양근 추출물 농축액의 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 3000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.

[표] 일반 증상

Table 1. Clinical signs

		CLINICAL SIGNS				MALE
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1-19	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	15 / 15	
20-22	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
23-38	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
39	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	7 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
40-66	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
67	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	11 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
68-91	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
92	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Terminal sacrifice	10 / 15	10 / 10	10 / 10	10 / 15	
93-112	Normal	5 / 5	-	-	5 / 5	
113-119	Normal	4 / 5	-	-	5 / 5	
	Loss of fur	1 / 5	-	-	0 / 5	
	Bite wound	1 / 5	-	-	0 / 5	
120	Normal	4 / 5	-	-	5 / 5	
	Loss of fur	1 / 5	-	-	0 / 5	
	Crust formation	1 / 5	-	-	0 / 5	
	Terminal sacrifice	5 / 5	-	-	5 / 5	

The day of first treatment was designated Day 1.
 Number of animals with the sign / Number of animals examined.
 -: Not applicable.

Table 1. Clinical signs

		CLINICAL SIGNS				FEMALE
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1-19	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	15 / 15	
20-22	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
23-38	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
39	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
40-66	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
67	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	12 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
68-82	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
83-92	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Salivation	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Loss of fur	0 / 15	0 / 10	0 / 10	1 / 15	
93	Normal	15 / 15	10 / 10	10 / 10	0 / 15	
	Compound-colored stool	0 / 15	0 / 10	0 / 10	15 / 15	
	Loss of fur	0 / 15	0 / 10	0 / 10	1 / 15	
	Terminal sacrifice	10 / 15	10 / 10	10 / 10	10 / 15	
94-119	Normal	5 / 5	-	-	5 / 5	
120	Normal	5 / 5	-	-	5 / 5	
	Terminal sacrifice	5 / 5	-	-	5 / 5	

The day of first treatment was designated Day 1.
 Number of animals with the sign / Number of animals examined.
 -: Not applicable.

[표] 체중 변화

Table 2. Body weights

DAYS	BODY WEIGHTS (g)				MALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1	201.23±7.46	201.85±6.59	200.43±6.07	200.42±6.25	
7	255.22±8.30	264.07±9.59	257.15±9.81	262.26±11.02	
14	316.25±11.94	331.01±13.93	321.84±12.19	329.25±18.75	
21	365.94±15.07	388.97±17.33	375.93±18.46	382.86±25.09	
28	401.79±18.24	433.33±23.60*	417.35±26.15	422.99±29.53	
35	437.05±24.54	470.73±28.06	454.63±30.58	458.56±31.78	
42	463.60±27.91	502.46±32.00	484.05±34.57	481.75±37.47	
49	487.50±31.51	531.88±39.73*	510.82±38.91	507.58±40.04	
56	508.49±35.42	558.15±42.90*	532.06±42.56	531.73±42.68	
63	523.15±41.18	581.56±46.18*	554.51±45.32	552.89±45.94	
70	538.09±41.69	597.96±52.65*	570.28±47.18	571.15±48.20	
77	555.19±44.77	620.39±50.69*	588.17±48.71	586.88±49.63	
84	566.81±48.27	636.98±53.05*	603.70±52.07	601.72±50.32	
91	570.00±48.32	643.79±59.24*	605.00±53.25	606.70±53.30	
GAIN	368.77±50.28	441.95±59.08*	404.57±52.30	406.28±49.09	
N	15	10	10	15	
91	574.76±47.01	-	-	590.72±43.12	
98	584.66±49.29	-	-	599.99±44.13	
105	580.34±46.37	-	-	611.63±45.48	
112	602.65±59.70	-	-	622.87±48.43	
119	609.12±64.60	-	-	627.43±48.33	
GAIN	34.36±20.45	-	-	36.71±10.60	
N	5	-	-	5	

The day of first treatment was designated Day 1.

Gain is body weight on Day 91 – body weight on Day 1 or body weight on Day 119 – body weight on Day 91.

Data are expressed as Mean ± S.D.

-: Not applicable.

* Significant difference at $P < 0.05$ levels compared with the Vehicle control.

Table 2. Body weights

DAYS	BODY WEIGHTS (g)				FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1	149.08±6.10	150.77±8.47	150.49±6.21	151.16±7.80	
7	173.25±11.34	171.21±6.64	171.89±8.80	174.33±8.15	
14	197.33±13.52	199.58±12.64	197.57±10.83	199.94±13.23	
21	213.41±13.59	217.99±17.47	217.79±10.82	221.15±16.61	
28	228.91±18.96	229.98±15.87	230.75±13.31	235.38±22.07	
35	239.91±21.30	237.16±19.97	239.90±17.43	247.10±21.10	
42	250.60±23.09	250.59±20.92	252.25±16.09	256.49±21.89	
49	257.22±21.54	255.97±23.18	257.72±15.77	266.11±24.20	
56	266.57±24.29	262.01±22.78	265.15±20.92	272.61±25.74	
63	276.55±27.54	268.56±23.30	272.53±22.10	279.37±27.50	
70	278.86±26.48	274.41±26.69	277.54±20.46	284.43±28.36	
77	283.11±25.91	277.47±28.04	280.91±19.57	290.92±30.88	
84	287.95±28.86	278.28±26.80	283.52±22.65	295.00±31.50	
91	287.79±27.42	278.84±26.49	282.75±23.87	295.78±31.57	
GAIN	138.71±24.28	128.08±22.20	132.26±22.85	144.62±28.84	
N	15	10	10	15	
91	272.65±32.13	-	-	292.67±29.97	
98	280.38±30.79	-	-	300.24±29.99	
105	280.00±30.72	-	-	300.72±30.78	
112	283.76±32.14	-	-	301.70±30.09	
119	282.77±28.35	-	-	307.58±32.78	
GAIN	10.11±5.87	-	-	14.90±19.46	
N	5	-	-	5	

The day of first treatment was designated Day 1.

Gain is body weight on Day 91 – body weight on Day 1 or body weight on Day 119 – body weight on Day 91.

Data are expressed as Mean ± S.D.

-: Not applicable.

[표] 사료섭취량

Table 3. Food consumptions

DAYS	FOOD CONSUMPTIONS (g/head/day)				MALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1	32.45±11.77	26.21±4.71	24.59±1.44	25.00±2.44	
7	24.77±1.70	27.01±1.32	26.10±2.07	27.40±3.12	
14	26.86±1.72	30.81±1.91	28.02±2.11	30.08±3.57	
21	26.14±2.11	28.46±3.30	27.74±2.45	28.89±2.79	
28	26.31±1.71	28.40±2.26	28.17±2.26	29.19±2.33	
35	25.96±1.94	28.40±3.07	27.44±2.21	27.89±2.49	
42	24.42±1.97	28.39±2.73*	26.90±1.37	26.46±2.70	
49	23.81±2.81	25.72±3.73	26.03±2.71	27.46±2.06	
56	23.45±3.24	28.05±2.81	26.65±3.59	25.59±2.55	
63	22.83±2.26	25.86±2.09	24.56±1.61	25.51±2.89	
70	21.71±1.74	25.23±3.06	24.40±1.96	24.69±3.22	
77	24.58±2.84	27.90±2.53	25.70±3.35	26.69±2.87	
84	21.76±2.20	24.19±2.66	22.69±2.66	24.11±2.24	
90	24.60±1.79	28.61±3.49	24.47±2.23	27.24±2.02	
N	15	10	10	15	
98	26.18±2.99	-	-	25.71±1.75	
105	23.82±4.11	-	-	24.53±1.42	
112	26.89±1.46	-	-	28.98±2.77	
118	22.63±2.36	-	-	21.98±2.15	
N	5	-	-	5	

The day of first treatment was designated Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

-: Not applicable.

* Significant difference at $P<0.05$ levels compared with the Vehicle control.

Table 3. Food consumptions

DAYS	FOOD CONSUMPTIONS (g/head/day)				FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1	16.28±2.52	15.87±0.86	16.00±1.39	15.98±2.14	
7	15.19±1.82	15.98±1.51	15.52±1.03	15.28±0.79	
14	15.91±1.43	14.62±2.04	15.69±1.80	16.46±1.56	
21	16.72±2.37	16.45±1.73	16.27±2.55	16.98±2.14	
28	14.85±1.84	16.81±1.67	16.02±1.38	16.70±1.82	
35	14.60±2.19	15.44±1.78	15.27±2.35	15.78±2.57	
42	16.20±2.13	14.09±1.83	15.15±2.00	17.10±2.51	
49	14.40±0.99	14.06±1.80	14.35±1.01	15.03±1.99	
56	12.72±2.01	14.48±1.73	14.68±1.62	14.61±1.25	
63	13.59±3.31	13.13±0.95	13.05±2.48	12.78±2.43	
70	12.35±1.84	11.67±1.24	11.75±2.09	12.53±1.63	
77	13.83±1.70	14.01±1.96	13.23±1.03	14.19±2.33	
84	11.61±1.09	12.48±1.36	11.71±2.43	13.55±1.64	
90	14.41±2.80	13.64±1.63	13.22±2.14	15.49±2.85	
N	15	10	10	15	
98	12.79±0.51	-	-	14.88±0.52**	
105	15.19±0.25	-	-	15.27±2.04	
112	14.15±2.37	-	-	16.50±1.73	
118	11.13±1.52	-	-	13.81±1.48	
N	5	-	-	5	

The day of first treatment was designated Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

-: Not applicable.

** Significant difference at $P<0.01$ levels compared with the Vehicle control.

[표] 물섭취량

Table 4. Water consumptions

DAYS	WATER CONSUMPTIONS (g/head/day)				MALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1	25.14±2.17	29.88±2.59 [*]	25.16±2.51	30.27±2.83 ^{**}	
7	27.82±3.85	29.52±2.99	28.59±3.37	32.35±4.14	
14	28.73±5.06	32.80±3.57	29.00±4.26	36.00±5.85	
21	28.25±3.24	33.41±3.45	33.32±4.34	36.83±5.36 ^{**}	
28	30.66±4.68	39.05±4.59	31.77±3.52	38.83±6.02 [*]	
35	27.30±3.69	32.18±2.53	29.62±4.47	37.36±9.45	
42	27.64±3.32	31.99±2.75	28.93±3.50	35.52±7.25 [*]	
49	27.04±5.51	31.04±3.99	29.20±4.49	36.97±7.72 [*]	
56	23.95±4.36	28.72±1.58	26.48±2.61	35.43±6.63 ^{**}	
63	23.23±3.18	26.20±3.60	24.08±2.97	32.51±7.51	
70	24.62±3.20	30.01±5.85	22.85±2.72	32.20±7.00	
77	24.94±4.75	26.85±3.30	24.52±4.16	29.98±6.56	
84	28.51±9.87	31.95±4.88	24.87±6.88	35.69±8.23	
90	29.18±3.50	34.32±1.90	27.92±4.16	36.52±5.83 [*]	
N	15	10	10	15	
98	36.77±5.46	-	-	30.63±4.03	
105	41.87±9.44	-	-	31.61±8.20	
112	33.46±8.24	-	-	34.38±6.33	
118	28.37±4.26	-	-	26.55±2.82	
N	5	-	-	5	

The day of first treatment was designated Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

-: Not applicable.

*/** Significant difference at $P<0.05/P<0.01$ levels compared with the Vehicle control.

Table 4. Water consumptions

DAYS	WATER CONSUMPTIONS (g/head/day)				FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
1	20.09±4.69	18.09±3.11	18.98±2.83	19.17±1.94	
7	18.75±3.27	19.35±1.56	19.50±2.48	19.02±2.88	
14	21.50±5.95	17.12±2.51	18.40±2.00	25.36±6.38	
21	21.37±4.16	20.74±5.17	22.24±5.32	24.39±6.80	
28	17.50±2.20	21.39±3.45	20.20±2.43	24.74±4.30 ^{**}	
35	19.02±4.21	20.09±2.80	20.78±7.32	22.75±5.90	
42	21.85±4.13	19.50±3.66	21.72±9.43	24.07±6.35	
49	18.96±3.57	21.81±8.30	16.57±3.52	23.00±7.80	
56	14.87±3.34	17.04±5.91	17.63±3.05	20.33±3.00	
63	14.92±3.60	14.82±1.88	16.75±4.43	18.40±4.94	
70	17.41±4.86	18.17±5.59	16.78±3.10	17.99±4.17	
77	15.30±3.93	15.96±4.15	14.19±3.28	16.08±4.66	
84	16.76±2.17	21.11±5.61	17.94±2.16	22.17±4.47	
90	19.94±5.74	21.80±5.06	18.28±4.12	24.93±6.31	
N	15	10	10	15	
98	19.00±2.59	-	-	21.65±3.94	
105	21.08±1.45	-	-	21.42±1.83	
112	19.55±2.77	-	-	25.05±6.16	
118	14.37±0.91	-	-	20.34±4.22	
N	5	-	-	5	

The day of first treatment was designated Day 1.

Data are expressed as Mean ± S.D.

-: Not applicable.

** Significant difference at $P<0.01$ levels compared with the Vehicle control.

[표] 요검사

Table 6. Urinalysis

TESTS	RESULT	GRADE	URINALYSIS (MAIN GROUPS)				FEMALE
			GROUPS (mg/kg/day)				
			G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	5	
KET	-	0	5	5	5	5	
SG	≤1.005	0	0	0	1	0	
	1.010	1	4	5	3	0	
	1.015	2	1	0	1	2	
	1.020	3	0	0	0	3*	
pH	6.5	0	0	0	0	0	
	7.0	1	0	0	0	0	
	7.5	2	0	0	0	0	
	8.0	3	1	0	0	1	
	8.5	4	4	5	5	4	
PRO	-	0	5	5	5	5	
URO	0.2	0	5	5	5	5	
NIT	-	0	3	5	5	3	
	+	1	2	0	0	2	
BLO	-	0	5	5	4	5	
	+/-	1	0	0	1	0	
CLARITY	-	0	5	5	5	5	
	VOLUME (mL)		8.8±2.9	10.6±3.0	8.0±2.1	8.0±2.4	
	COLOR-Yellow		5	5	5	5	
	N		5	5	5	5	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood.

* Significant difference at P0.05 levels compared with the Vehicle control.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	100	NA	Trace	15	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

NA: Not applicable, Sl: Slight.

Table 6. Urinalysis

TESTS	RESULT	GRADE	URINALYSIS (RECOVERY GROUPS)				FEMALE
			GROUPS (mg/kg/day)				
			MALE		FEMALE		
		G1 (0)	G4 (3000)	G1 (0)	G4 (3000)		
GLU	-	0	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	4	
KET	1+	2	0	0	0	1	
	+/-	0	1	1	3	4	
SG	1+	2	2	2	2	1	
	1+	2	2	2	0	0	
	≤1.005	0	0	0	0	0	
	1.010	1	1	5	0	3	
	1.015	2	1	0	3	1	
	1.020	3	1	0	0	0	
	1.025	4	2	0	1	1	
	≥1.030	5	0	0	1	0	
pH	6.5	0	0	0	1	0	
	7.0	1	0	0	0	0	
	7.5	2	1	0	0	0	
	8.0	3	2	2	2	0	
	8.5	4	2	2	2	5	
	≥9.0	5	0	1	0	0	
PRO	+/-	1	0	3	3	4	
	1+	2	2	1	2	0	
	1+	2	2	0	0	1	
URO	0.2	0	1	1	0	0	
NIT	-	0	5	5	5	4	
	+	1	0	0	0	1	
BLO	-	0	4	3	5	5	
	+/-	1	2	0	0	0	
CLARITY	-	0	5	5	5	5	
	VOLUME (mL)		15.4±3.2	14.0±3.3	12.4±2.3	14.0±2.0	
	COLOR-Yellow		5	5	5	5	
	N		5	5	5	5	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood.

* Significant difference at P0.05 levels compared with the Vehicle control.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	100	NA	Trace	15	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

Table 6. Urinalysis

TESTS	RESULT	GRADE	URINALYSIS (MAIN GROUPS)				MALE
			GROUPS (mg/kg/day)				
			G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	5	
KET	+/-	0	3	3	2	4	
	1+	1	2	2	2	1	
SG	1+	2	0	0	1	0	
	≤1.005	0	0	0	0	0	
	1.010	1	3	4	0	2	
	1.015	2	2	1	4	3	
	1.020	3	0	0	1	0	
pH	6.5	0	0	0	0	0	
	7.0	1	0	0	0	0	
	7.5	2	1	0	0	0	
	8.0	3	0	0	1	0	
	8.5	4	4	5	4	5	
PRO	-	0	1	3	2	3	
	+/-	1	4	2	1	1	
URO	0.2	0	5	5	5	5	
NIT	-	0	5	5	5	5	
BLO	-	0	1	3	3	3	
	+/-	1	4	4	2	2	
	1+	2	0	1	0	0	
CLARITY	-	0	5	5	5	5	
	VOLUME (mL)		14.6±3.9	15.2±4.1	10.6±3.0	15.6±4.1	
	COLOR-Yellow		5	5	5	5	
	N		5	5	5	5	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, BLO: Occult blood.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	BLO	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.2	Negative	Negative	Clear
+/-	1	100	NA	Trace	15	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

NA: Not applicable, Sl: Slight.

[표] 혈액학적 검사

Table 7. Urine sediments

URINE SEDIMENTS (MAIN GROUPS)						
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)			
			G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)
MALE						
RBC	-	0	5	4	5	5
	+/-	1	0	1	0	0
WBC	-	0	5	5	5	5
EPITHELIAL CELL	-	0	5	5	5	5
CAST	-	0	5	5	5	5
N			5	5	5	5
FEMALE						
RBC	-	0	5	5	5	5
WBC	-	0	5	5	5	5
EPITHELIAL CELL	-	0	5	5	5	4
	+/-	1	0	0	0	1
CAST	-	0	5	5	5	5
N			5	5	5	5

Grade	Result	RBC (mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Cast (mean/field)
0	-	0	0	0/20 fields	0
1	+/-	≤4	≤5	Few/20 fields	1
2	1+	5-8	6-20	Around 1/few fields	2-5
3	2+	9-30	21-50	Few/field	6-10
4	3+	31≤(local)	51≤(local)	10-20/field	11-30
5	4+	All over the fields	All over the fields	30≤/field	31≤

Table 8. Hematological test

HEMATOLOGICAL TEST (MAIN GROUPS)					
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)
MALE					
RBC	10 ³ /μL	8.64±0.59	8.58±0.37	8.59±0.36	8.61±0.39
HGB	g/dL	14.8±0.6	14.8±0.5	14.8±0.3	14.8±0.4
HCT	%	44.4±1.5	44.9±1.9	45.1±1.3	44.8±1.3
MCV	fL	51.5±2.2	52.3±1.2	52.5±1.9	52.1±1.0
MCH	pg	17.1±0.7	17.2±0.3	17.3±0.6	17.2±0.5
MCHC	g/dL	33.2±0.9	32.9±0.3	32.9±0.3	33.1±0.4
RDW	%	14.1±0.7	14.0±0.5	13.2±0.5*	14.1±0.9
HDW	g/dL	2.97±0.24	2.91±0.20	2.72±0.15	2.87±0.22
RET	%	2.75±0.49	3.05±0.55	2.69±0.29	2.94±0.39
PLT	10 ³ /μL	909.6±125.1	927.5±97.9	891.8±39.8	978.5±102.9
MPV	fL	5.34±0.29	5.19±0.25	5.28±0.30	5.25±0.27
WBC	10 ³ /μL	10.41±4.27	10.67±1.92	9.85±1.65	10.79±2.09
NEU	%	20.8±5.6	20.8±7.7	15.5±4.0	18.4±5.9
NEU	10 ³ /μL	2.2±1.3	2.2±0.9	1.5±0.4	1.9±0.5
LYM	%	73.3±5.9	73.4±6.4	77.7±4.1	75.3±6.4
LYM	10 ³ /μL	7.6±3.1	7.8±1.5	7.7±1.5	8.2±2.1
MONO	%	3.65±1.58	3.55±1.20	4.26±0.82	3.99±1.44
MONO	10 ³ /μL	0.37±0.16	0.39±0.18	0.42±0.10	0.42±0.13
EOS	%	1.19±0.57	1.19±0.28	1.21±0.44	1.13±0.42
EOS	10 ³ /μL	0.12±0.05	0.13±0.04	0.12±0.04	0.12±0.04
BASO	%	0.29±0.10	0.28±0.08	0.27±0.08	0.35±0.11
BASO	10 ³ /μL	0.03±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01
LUC	%	0.82±0.41	0.82±0.36	1.01±0.40	0.93±0.42
LUC	10 ³ /μL	0.08±0.04	0.09±0.05	0.10±0.04	0.10±0.06
PT	sec	9.0±0.3	8.8±0.4	8.9±0.3	8.7±0.4
APTT	sec	14.0±1.0	14.2±1.0	13.8±1.1	13.8±0.9
N		10	10	10	10

Data are expressed as Mean ± S.D.

* Significant difference at P<0.05 levels compared with the Vehicle control.

Table 8. Hematological test

HEMATOLOGICAL TEST (RECOVERY GROUPS)					
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		MALE		FEMALE	
		G1 (0)	G4 (3000)	G1 (0)	G4 (3000)
RBC	10 ¹² /μL	8.73±0.30	8.80±0.60	7.64±0.24	7.72±0.25
HGB	g/dL	15.1±0.5	14.9±0.8	14.1±0.4	13.9±0.4
HCT	%	46.8±1.9	46.3±2.3	42.3±1.7	42.2±1.2
MCV	fL	53.6±2.3	52.7±1.6	55.4±0.8	54.6±2.2
MCH	pg	17.3±0.7	16.9±0.5	18.5±0.4	18.0±0.6
MCHC	g/dL	32.2±0.4	32.0±0.2	33.4±1.0	33.0±0.3
RDW	%	13.4±0.5	13.6±0.8	12.5±0.9	12.2±0.3
HDW	g/dL	2.75±0.11	2.72±0.15	2.57±0.40	2.41±0.14
RET	%	2.86±0.85	2.82±0.71	2.95±1.45	2.43±0.13
PLT	10 ¹² /μL	954.6±69.2	878.8±135.8	1027.0±154.1	1000.2±69.0
MPV	fL	5.40±0.12	5.30±0.10	5.58±0.15	5.36±0.17
WBC	10 ⁹ /μL	11.44±2.88	11.97±3.11	6.55±2.05	5.70±0.96
NEU	%	20.5±5.1	23.8±3.1	13.1±4.1	15.0±5.5
NEU	10 ⁹ /μL	2.3±0.8	2.8±0.5	0.9±0.4	0.9±0.3
LYM	%	73.8±5.9	70.4±2.0	82.4±4.3	79.6±6.3
LYM	10 ⁹ /μL	8.5±2.6	8.5±2.3	5.4±1.8	4.5±0.9
MONO	%	3.56±1.44	3.60±1.20	2.90±1.02	3.50±1.39
MONO	10 ⁹ /μL	0.38±0.12	0.45±0.24	0.19±0.10	0.19±0.08
EOS	%	1.34±0.53	1.28±0.18	0.92±0.38	1.12±0.36
EOS	10 ⁹ /μL	0.15±0.05	0.15±0.04	0.05±0.01	0.06±0.02
BASO	%	0.26±0.05	0.24±0.05	0.20±0.10	0.20±0.07
BASO	10 ⁹ /μL	0.03±0.01	0.03±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00
LUC	%	0.50±0.00	0.62±0.41	0.52±0.36	0.60±0.44
LUC	10 ⁹ /μL	0.06±0.01	0.08±0.07	0.04±0.04	0.03±0.03
PT	sec	7.9±0.2	8.0±0.3	7.4±0.2	7.4±0.2
APTT	sec	13.3±1.4	14.0±0.9	12.5±1.3	12.2±0.7
N		5	5	5	5

Data are expressed as Mean ± S.D.

Table 8. Hematological test

HEMATOLOGICAL TEST (MAIN GROUPS)					FEMALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)
		RBC	10 ¹² /μL	7.52±0.38	7.65±0.40
HGB	g/dL	13.9±0.4	13.8±0.7	13.8±0.4	13.6±1.0
HCT	%	41.3±1.3	40.7±1.7	41.0±1.0	40.3±2.8
MCV	fL	54.9±2.7	53.3±1.2	54.2±1.4	53.5±2.0
MCH	pg	18.5±0.9	18.1±0.4	18.3±0.5	18.0±0.6
MCHC	g/dL	33.7±0.5	33.9±0.5	33.8±0.4	33.7±0.5
RDW	%	12.4±1.1	11.9±0.3	12.0±0.3	12.0±0.3
HDW	g/dL	2.39±0.06	2.45±0.09	2.42±0.07	2.46±0.13
RET	%	2.46±0.45	2.20±0.32	2.16±0.41	2.20±0.30
PLT	10 ¹² /μL	896.4±80.1	955.0±59.2	981.7±99.2	947.4±91.6
MPV	fL	5.68±0.43	5.38±0.16	5.46±0.34	5.49±0.43
WBC	10 ⁹ /μL	8.36±2.11	6.93±2.25	7.83±2.19	6.83±1.53
NEU	%	11.6±6.2	12.0±3.0	14.1±6.5	15.2±11.4
NEU	10 ⁹ /μL	1.0±0.6	0.8±0.3	1.1±0.5	1.1±1.2
LYM	%	83.4±6.1	82.3±3.2	80.6±7.4	78.6±12.9
LYM	10 ⁹ /μL	7.0±2.0	5.7±1.9	6.4±2.1	5.3±1.2
MONO	%	2.77±1.12	3.54±1.23	3.47±1.13	3.74±0.83
MONO	10 ⁹ /μL	0.22±0.08	0.25±0.11	0.26±0.08	0.25±0.07
EOS	%	0.90±0.32	0.98±0.31	0.86±0.21	0.91±0.28
EOS	10 ⁹ /μL	0.07±0.02	0.07±0.02	0.06±0.01	0.06±0.02
BASO	%	0.22±0.04	0.17±0.09	0.17±0.07	0.18±0.10
BASO	10 ⁹ /μL	0.02±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
LUC	%	1.08±0.48	0.96±0.36	0.84±0.27	1.45±1.66
LUC	10 ⁹ /μL	0.09±0.04	0.07±0.04	0.07±0.04	0.11±0.16
PT	sec	7.5±0.2	7.3±0.3	7.3±0.3	7.6±0.4
APTT	sec	12.3±0.7	11.3±0.9**	11.3±0.6**	12.3±0.6
N		10	10	10	10

Data are expressed as Mean ± S.D.

** Significant difference at P<0.01 levels compared with the Vehicle control.

[표] 혈액생화학적 검사

Table 9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST (MAIN GROUPS)				MALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
AST	U/L	109.7±24.1	97.3±15.5	100.3±24.0	100.4±18.7	
ALT	U/L	26.7±4.5	28.7±9.4	27.6±4.7	28.5±3.9	
ALP	U/L	94.0±25.7	88.2±23.3	89.8±22.0	88.2±11.7	
CPK	U/L	257.6±133.6	222.7±97.8	240.3±140.7	218.9±117.6	
TBIL	mg/dL	0.15±0.04	0.13±0.02	0.12±0.02	0.13±0.02	
GLU	mg/dL	150.6±18.7	155.0±20.9	154.1±27.0	152.2±10.6	
TCHO	mg/dL	72.0±19.1	83.1±16.8	74.9±12.5	79.2±21.7	
TG	mg/dL	60.1±22.2	71.6±23.6	70.1±33.6	72.2±21.9	
TP	g/dL	6.11±0.28	6.22±0.22	6.13±0.31	6.13±0.30	
ALB	g/dL	3.00±0.12	3.06±0.12	2.99±0.15	3.03±0.12	
A/G ratio		0.96±0.05	0.97±0.03	0.95±0.03	0.98±0.06	
BUN	mg/dL	13.5±1.3	12.4±1.7	13.1±1.8	12.0±1.9	
CRE	mg/dL	0.45±0.04	0.44±0.04	0.43±0.03	0.41±0.04	
IP	mg/dL	6.61±0.54	6.76±0.39	6.81±0.41	6.84±0.58	
Ca ²⁺	mg/dL	10.11±0.30	10.28±0.23	10.15±0.28	10.21±0.27	
Na ⁺	mmol/L	141.8±1.1	140.8±1.1	141.2±0.9	141.1±0.8	
K ⁺	mmol/L	4.56±0.14	4.68±0.18	4.71±0.19	4.70±0.24	
Cl ⁻	mmol/L	103.8±1.7	103.4±1.6	103.5±0.9	103.3±1.9	
N		10	10	10	10	

Data are expressed as Mean ± S.D.

Table 9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST (MAIN GROUPS)				FEMALE
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
AST	U/L	110.8±23.5	113.9±57.7	109.3±29.4	118.7±26.5	
ALT	U/L	20.1±3.8	22.9±11.4	22.7±6.9	22.0±5.6	
ALP	U/L	41.3±9.2	47.9±12.8	43.6±16.2	51.5±8.4	
CPK	U/L	329.6±186.7	237.4±94.5	297.6±177.6	311.2±121.3	
TBIL	mg/dL	0.19±0.03	0.16±0.03	0.17±0.03	0.16±0.02	
GLU	mg/dL	132.3±15.4	125.8±19.6	121.1±20.1	123.1±18.4	
TCHO	mg/dL	73.0±19.1	73.2±17.9	75.4±17.2	72.3±23.7	
TG	mg/dL	36.7±7.2	35.3±8.1	38.4±5.9	39.3±10.2	
TP	g/dL	6.43±0.28	6.25±0.31	6.26±0.31	6.36±0.51	
ALB	g/dL	3.49±0.19	3.34±0.21	3.40±0.22	3.32±0.40	
A/G ratio		1.18±0.07	1.15±0.07	1.19±0.08	1.10±0.13	
BUN	mg/dL	14.9±1.7	16.8±1.8	16.3±2.6	14.6±1.7	
CRE	mg/dL	0.48±0.04	0.50±0.03	0.48±0.03	0.45±0.03	
IP	mg/dL	6.45±0.66	6.45±0.48	6.65±0.40	6.90±0.29	
Ca ²⁺	mg/dL	10.31±0.28	10.20±0.30	10.10±0.33	10.23±0.36	
Na ⁺	mmol/L	142.4±1.1	142.2±1.1	141.4±3.0	142.5±0.9	
K ⁺	mmol/L	4.38±0.30	4.43±0.30	4.61±0.21	4.64±0.32	
Cl ⁻	mmol/L	105.4±1.7	106.6±1.9	106.1±1.9	104.9±1.1	
N		10	10	10	10	

Data are expressed as Mean ± S.D.

* Significant difference at P<0.05 levels compared with the Vehicle control.

Table 9. Clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST (RECOVERY GROUPS)			
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		MALE		FEMALE	
		G1 (0)	G4 (3000)	G1 (0)	G4 (3000)
AST	U/L	146.1±55.8	127.1±19.8	93.4±22.5	79.7±10.7
ALT	U/L	32.1±12.5	37.1±8.6	24.4±7.1	17.9±1.9
ALP	U/L	64.8±7.4	65.4±8.7	43.0±11.1	34.6±6.9
CPK	U/L	602.6±238.6	400.4±81.1	204.6±152.7	243.2±112.2
TBIL	mg/dL	0.14±0.03	0.14±0.04	0.18±0.03	0.17±0.00
GLU	mg/dL	117.1±7.5	127.6±18.0	129.3±14.3	137.6±8.1
TCHO	mg/dL	76.8±29.3	70.8±40.4	82.8±24.2	78.4±25.8
TG	mg/dL	64.6±9.5	78.8±25.5	38.4±12.1	35.0±8.2
TP	g/dL	6.17±0.27	6.08±0.24	6.39±0.50	6.44±0.24
ALB	g/dL	3.02±0.16	2.99±0.08	3.50±0.30	3.52±0.11
A/G ratio		0.96±0.07	0.97±0.07	1.22±0.10	1.20±0.05
BUN	mg/dL	12.4±1.0	12.3±0.9	15.3±3.1	14.2±3.2
CRE	mg/dL	0.42±0.03	0.43±0.05	0.52±0.06	0.47±0.01
IP	mg/dL	6.29±0.18	6.37±0.19	5.39±0.42	5.61±0.26
Ca ²⁺	mg/dL	9.81±0.19	9.70±0.27	9.69±0.56	9.87±0.17
Na ⁺	mmol/L	143.1±0.8	142.7±0.5	140.0±1.5	140.8±1.2
K ⁺	mmol/L	4.68±0.18	4.52±0.41	4.23±0.23	4.45±0.25
Cl ⁻	mmol/L	103.2±1.0	103.2±1.5	104.2±2.5	104.7±1.2
N		5	5	5	5

Data are expressed as Mean ± S.D.

[표] 장기중량

Table 10. Absolute and relative organ weights

PARAMETERS	ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS (MAIN GROUPS)				MALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
Body weights (g)	541.91±48.89	612.61±56.68**	579.83±51.30	585.45±54.48	
Adrenal gland-left	0.0306±0.0052	0.0325±0.0060	0.0302±0.0027	0.0270±0.0029	
% to body weight	0.0057±0.0011	0.0053±0.0009	0.0052±0.0006	0.0046±0.0007	
Adrenal gland-right	0.0295±0.0045	0.0317±0.0055	0.0292±0.0037	0.0280±0.0051	
% to body weight	0.0055±0.0010	0.0052±0.0009	0.0050±0.0005	0.0048±0.0008	
Pituitary gland	0.0125±0.0016	0.0137±0.0015	0.0119±0.0017	0.0138±0.0031	
% to body weight	0.0023±0.0004	0.0022±0.0003	0.0020±0.0002	0.0024±0.0005	
Thymus	0.2517±0.0663	0.3190±0.0826	0.3288±0.1056	0.3281±0.0750	
% to body weight	0.0465±0.0116	0.0521±0.0128	0.0568±0.0184	0.0562±0.0121	
Prostate gland	0.6797±0.1960	0.7862±0.2473	0.7268±0.1605	0.8093±0.1450	
% to body weight	0.1276±0.0430	0.1295±0.0421	0.1249±0.0216	0.1390±0.0253	
Testis-left	1.8708±0.1931	1.9599±0.1232	1.9044±0.1827	1.9377±0.1676	
% to body weight	0.3465±0.0358	0.3218±0.0300	0.3307±0.0419	0.3331±0.0384	
Testis-right	1.8685±0.1768	1.9917±0.1510	1.8945±0.2265	1.9375±0.1348	
% to body weight	0.3459±0.0305	0.3273±0.0365	0.3289±0.0479	0.3331±0.0345	
Epididymis-left	0.7126±0.0596	0.7637±0.0520	0.7303±0.0958	0.7579±0.0684	
% to body weight	0.1326±0.0171	0.1253±0.0103	0.1263±0.0159	0.1306±0.0186	
Epididymis-right	0.7175±0.0582	0.7734±0.0581	0.7077±0.0723	0.7575±0.0821	
% to body weight	0.1335±0.0165	0.1269±0.0121	0.1226±0.0134	0.1303±0.0179	
Spleen	0.9330±0.3693	0.9694±0.1210	0.8969±0.1269	0.9585±0.1656	
% to body weight	0.1714±0.0645	0.1579±0.0079	0.1544±0.0131	0.1630±0.0181	
Kidney-left	1.6299±0.1838	1.8378±0.1563	1.7551±0.2284	1.8618±0.2520	
% to body weight	0.3013±0.0273	0.3007±0.0198	0.3027±0.0294	0.3177±0.0261	
Kidney-right	1.6113±0.2366	1.8389±0.1488	1.7556±0.2307	1.8450±0.2203	
% to body weight	0.2970±0.0299	0.3009±0.0199	0.3024±0.0246	0.3151±0.0221	
Heart	1.5501±0.0832	1.8157±0.1873**	1.7192±0.1505	1.7696±0.2157**	
% to body weight	0.2878±0.0272	0.2974±0.0296	0.2972±0.0196	0.3027±0.0310	
Lung	1.7179±0.1440	1.9741±0.2625	1.7883±0.1689	1.8930±0.1956	
% to body weight	0.3182±0.0287	0.3234±0.0413	0.3089±0.0205	0.3255±0.0444	
Brain	2.1588±0.0889	2.2744±0.0949*	2.1565±0.0838	2.2501±0.1339	
% to body weight	0.4011±0.0377	0.3737±0.0331	0.3740±0.0294	0.3865±0.0327	
Liver	13.4397±1.5485	16.2561±2.2696**	15.7252±2.6394*	15.9893±1.9224*	
% to body weight	2.4799±0.1742	2.6492±0.2423	2.7010±0.2877	2.7284±0.1550	
N	10	10	10	10	

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D.

*/** Significant difference at P<0.05/P<0.01 levels compared with the Vehicle control.

Table 10. Absolute and relative organ weights

PARAMETERS	ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS (MAIN GROUPS)				FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)	
Body weights (g)	280.75±20.24	265.90±27.02	271.05±23.05	282.98±33.37	
Ovary-left	0.0379±0.0105	0.0409±0.0073	0.0408±0.0073	0.0423±0.0076	
% to body weight	0.0134±0.0032	0.0155±0.0031	0.0151±0.0030	0.0150±0.0026	
Ovary-right	0.0386±0.0085	0.0417±0.0100	0.0440±0.0096	0.0458±0.0065	
% to body weight	0.0137±0.0026	0.0160±0.0047	0.0162±0.0029	0.0163±0.0025	
Adrenal gland-left	0.0345±0.0046	0.0354±0.0052	0.0349±0.0020	0.0393±0.0075	
% to body weight	0.0123±0.0018	0.0134±0.0024	0.0130±0.0014	0.0139±0.0022	
Adrenal gland-right	0.0327±0.0048	0.0312±0.0040	0.0321±0.0042	0.0367±0.0058	
% to body weight	0.0117±0.0018	0.0119±0.0020	0.0119±0.0013	0.0130±0.0020	
Pituitary gland	0.0147±0.0018	0.0153±0.0021	0.0161±0.0025	0.0183±0.0031**	
% to body weight	0.0053±0.0007	0.0058±0.0010	0.0059±0.0007	0.0066±0.0014**	
Thymus	0.2512±0.0753	0.2450±0.0534	0.2336±0.0398	0.2334±0.0709	
% to body weight	0.0901±0.0282	0.0921±0.0169	0.0870±0.0182	0.0815±0.0185	
Uterus (with cervix)	0.7636±0.2217	0.6269±0.1549	0.6660±0.3273	0.7079±0.1997	
% to body weight	0.2768±0.0978	0.2403±0.0762	0.2438±0.1084	0.2504±0.0597	
Spleen	0.5184±0.0556	0.5068±0.0948	0.4931±0.0819	0.6499±0.4335	
% to body weight	0.1850±0.0189	0.1917±0.0387	0.1818±0.0254	0.2363±0.1771	
Kidney-left	0.8613±0.0693	0.8497±0.0931	0.8826±0.1122	1.0106±0.0664**	
% to body weight	0.3079±0.0305	0.3217±0.0408	0.3265±0.0387	0.3600±0.0340**	
Kidney-right	0.8557±0.0587	0.8753±0.0786	0.8796±0.1046	1.0035±0.0943**	
% to body weight	0.3054±0.0190	0.3317±0.0392	0.3251±0.0332	0.3566±0.0318**	
Heart	0.9098±0.0471	0.9273±0.0711	0.8781±0.0662	0.9536±0.1355	
% to body weight	0.3252±0.0226	0.3521±0.0472	0.3245±0.0142	0.3373±0.0318	
Lung	1.2440±0.1032	1.2126±0.1273	1.2310±0.0809	1.2535±0.1236	
% to body weight	0.4441±0.0359	0.4598±0.0676	0.4559±0.0323	0.4461±0.0509	
Brain	1.9850±0.1039	1.9853±0.0976	1.9868±0.0731	1.9679±0.0693	
% to body weight	0.7113±0.0743	0.7526±0.0739	0.7383±0.0741	0.7024±0.0696	
Liver	7.0372±1.1859	6.7918±0.8482	6.7580±0.7352	7.8710±1.3442	
% to body weight	2.5070±0.3799	2.5697±0.3592	2.4922±0.1408	2.8081±0.5795	
N	10	10	10	10	

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D.

** Significant difference at P<0.01 levels compared with the Vehicle control.

Table 10. Absolute and relative organ weights

PARAMETERS	ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS (RECOVERY GROUPS)		MALE
	GROUPS (mg/kg/day)		
	G1 (0)	G4 (3000)	
Body weights (g)	577.59±59.55	595.62±44.57	
Adrenal gland-left	0.0314±0.0025	0.0297±0.0029	
% to body weight	0.0055±0.0007	0.0050±0.0006	
Adrenal gland-right	0.0299±0.0049	0.0281±0.0028	
% to body weight	0.0052±0.0009	0.0047±0.0005	
Pituitary gland	0.0141±0.0011	0.0136±0.0016	
% to body weight	0.0024±0.0002	0.0023±0.0003	
Thymus	0.2588±0.0691	0.2531±0.0736	
% to body weight	0.0459±0.0149	0.0421±0.0101	
Prostate gland	0.7734±0.2050	0.8034±0.1563	
% to body weight	0.1339±0.0316	0.1346±0.0221	
Testis-left	2.0147±0.0932	1.8593±0.1356	
% to body weight	0.3525±0.0469	0.3124±0.0125	
Testis-right	1.9972±0.1123	1.8683±0.1394	
% to body weight	0.3492±0.0436	0.3137±0.0045	
Epididymis-left	0.7858±0.0418	0.7642±0.0483	
% to body weight	0.1373±0.0164	0.1285±0.0046	
Epididymis-right	0.8022±0.0359	0.7625±0.0808	
% to body weight	0.1404±0.0183	0.1279±0.0063	
Spleen	1.0315±0.0726	0.9518±0.0782	
% to body weight	0.1797±0.0175	0.1605±0.0171	
Kidney-left	1.7072±0.1711	1.7764±0.2268	
% to body weight	0.2960±0.0158	0.2988±0.0380	
Kidney-right	1.6396±0.1160	1.7616±0.1746	
% to body weight	0.2849±0.0170	0.2964±0.0291	
Heart	1.6335±0.1126	1.7384±0.2144	
% to body weight	0.2843±0.0241	0.2913±0.0176	
Lung	1.8985±0.1899	1.8636±0.2031	
% to body weight	0.3290±0.0143	0.3125±0.0198	
Brain	2.2310±0.1008	2.2675±0.0996	
% to body weight	0.3906±0.0534	0.3817±0.0217	
Liver	14.1214±1.6681	14.5983±1.4155	
% to body weight	2.4469±0.1880	2.4488±0.1049	
N	5	5	

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D.

Table 10. Absolute and relative organ weights

PARAMETERS	ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS (RECOVERY GROUPS)		FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)		
	G1 (0)	G4 (3000)	
Body weights (g)	270.48±30.51	289.71±30.99	
Ovary-left	0.0419±0.0130	0.0389±0.0071	
% to body weight	0.0153±0.0036	0.0134±0.0021	
Ovary-right	0.0434±0.0093	0.0416±0.0055	
% to body weight	0.0160±0.0023	0.0144±0.0018	
Adrenal gland-left	0.0367±0.0056	0.0378±0.0066	
% to body weight	0.0136±0.0017	0.0132±0.0028	
Adrenal gland-right	0.0307±0.0052	0.0344±0.0026	
% to body weight	0.0113±0.0014	0.0120±0.0019	
Pituitary gland	0.0184±0.0032	0.0180±0.0027	
% to body weight	0.0068±0.0011	0.0062±0.0007	
Thymus	0.1833±0.0356	0.1863±0.0604	
% to body weight	0.0679±0.0120	0.0646±0.0217	
Uterus (with cervix)	0.7294±0.1813	0.5869±0.1013	
% to body weight	0.2740±0.0797	0.2030±0.0335	
Spleen	0.5212±0.1490	0.5069±0.0217	
% to body weight	0.1908±0.0394	0.1768±0.0224	
Kidney-left	0.8426±0.0269	0.9349±0.1135	
% to body weight	0.3141±0.0294	0.3225±0.0120	
Kidney-right	0.8439±0.0274	0.9291±0.0785	
% to body weight	0.3152±0.0367	0.3214±0.0110	
Heart	0.8951±0.0862	0.9675±0.0483	
% to body weight	0.3316±0.0123	0.3361±0.0281	
Lung	1.3576±0.1156	1.4226±0.1375	
% to body weight	0.5041±0.0350	0.4932±0.0464	
Brain	2.0046±0.0610	1.9908±0.0715	
% to body weight	0.7477±0.0754	0.6947±0.0914	
Liver	6.4237±0.9232	7.0615±0.7961	
% to body weight	2.3682±0.0837	2.4378±0.1247	
N	5	5	

The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Data are expressed as Mean ± S.D.

[표] 부검소견

Table 11. Necropsy findings

NECROPSY FINDINGS					
MAIN GROUPS					
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (750)	G3 (1500)	G4 (3000)
MALE					
	No gross findings	9	10	9	10
Spleen	Increased size	1	0	0	0
Liver	Partially bulged area on the middle lobe	0	0	1	0
	bulged area adhesion with the diaphragm	0	0	1	0
	N	10	10	10	10
FEMALE					
	No gross findings	8	9	9	7
Uterus	Retention of clear fluid	2	1	1	2
Spleen	Increased size	0	0	0	1
	Rough surface, partial yellow discoloration	0	0	0	1
	N	10	10	10	10
RECOVERY GROUPS					
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G4 (3000)		
MALE					
	No gross findings	4	5		
Appearance	Loss of fur(right front leg)	1	0		
	Partial crust formation on loss of fur region	1	0		
	N	5	5		
FEMALE					
	No gross findings	3	5		
Uterus	Retention of clear fluid	2	0		
	N	5	5		

[표] 조직병리학적 검사

Text-table 1. Histopathological findings corresponding to gross lesions			
Organs	Gross lesions	Group (Individual ID #)	Histopathological findings
Main group			
Liver	Bulged area	G3 (#34)	Nodule, hepatodiaphragmatic
Spleen	Increased size	G1(#9)	Hematopoiesis, extramedullary
		G4(#90)	Necrosis, diffuse/focal
Uterus	Retention of clear fluid	G1 (#53,58) G2 (#72) G3 (#76) G4 (#91, 94)	Dilation, luminal
Recovery groups			
Skin	Loss of fur(front leg)	G1(#15)	Normal
Uterus	Retention of clear fluid	G1(#62, 65)	Dilation, luminal

(5) 복귀돌연변이 시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

- ㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 부형제로 멸균 주사용수(대한약품공업(주))를 사용하였다.
- ㉡ 양성대조물질은 2-Aminoanthracene (2-AA, Sigma-Aldrich Co.), Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma-Aldrich Co.), Sodium azide (SA, Sigma-Aldrich Co.), 2-Nitrofluorene (2-NF, Sigma-Aldrich Co.), 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO, Sigma-Aldrich Co.), Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

② 실험균주

- ㉠ 살히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 uvrA (Green and Muriel, 1976)를 사용하였다.
- ㉡ 실험에 사용된 균주는 Molecular toxicology, Inc. (157 Industrial Park Dr, Boone, NC 28607, USA)에서 구입 후 (주)켄온 비임상연구소에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였다.
- ㉢ 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2를 사용하였다. 이후 최소배지(Minimal glucose agar plate) 1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용하였다. 대장균(*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % L-tryptophan액을 0.25 mL/L로 첨가한 것을 사용하였다.
- ㉣ Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가하였다.

③ 실험방법

- ㉠ 본 시험의 처리 농도는 예비시험[(주)켄온 시험번호: 16-VG-688P]에서 본시험과 같은 방법으로 전술한 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.
- ㉡ 예비시험에서는 5 - 5000 µg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리 시 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수 시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였다. 그 결과, 모든 농도군에서 처리 시 침전은 관찰되지 않았으며, 계수 시 플레이트에서도 침전, 세포독성 및 집락수의 증가는 관찰되지 않았다.
- ㉢ 따라서, 본시험에서는 다음과 시험균을 구성하고, 음성 및 양성대조균을 포함하며, 농

도군당 3개의 플레이트를 사용하여 시험하였다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)				
		50	150	500	1500	5000
TA strains	+/-	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1500	5000

(나) 실험결과

- ① 시험타당성 기준은 모두 만족하였다. 모든 시험균주에서 대사활성계 적용 여부에 상관 없이 최소 1 개 균주에서 시험물질 처리군의 평균 집락 수가 농도 의존적으로 증가하거나, 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가는 관찰되지 않았으며, 이 결과는 양성 판정 기준을 만족시키지 못하였다.
- ② 따라서, 시험물질 산삼배양균 추출물 농축액은 본 시험조건 하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

[표] 복귀돌연변이 시험

Test Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Colonies/plate [factor] ^{a)}			
			With S9 mix		Without S9 mix	
TA100	Test article	0	153 ± 3		149 ± 3	
		50	169 ± 2	[1.1]	167 ± 3	[1.1]
		150	161 ± 2	[1.1]	163 ± 4	[1.1]
		500	186 ± 1	[1.2]	183 ± 3	[1.2]
		1500	198 ± 2	[1.3]	153 ± 3	[1.0]
		5000	186 ± 4	[1.2]	160 ± 2	[1.1]
TA1535	Test article	0	16 ± 3		14 ± 1	
		50	12 ± 3	[0.8]	17 ± 1	[1.2]
		150	14 ± 1	[0.9]	16 ± 3	[1.1]
		500	18 ± 2	[1.1]	13 ± 3	[0.9]
		1500	15 ± 3	[1.0]	12 ± 2	[0.9]
		5000	13 ± 3	[0.8]	15 ± 3	[1.1]
TA98	Test article	0	26 ± 1		22 ± 3	
		50	27 ± 3	[1.0]	17 ± 2	[0.8]
		150	19 ± 3	[0.8]	20 ± 2	[0.9]
		500	22 ± 2	[0.8]	19 ± 2	[0.8]
		1500	19 ± 2	[0.7]	18 ± 2	[0.8]
		5000	19 ± 0	[0.7]	17 ± 3	[0.8]
TA1537	Test article	0	10 ± 1		7 ± 1	
		50	10 ± 2	[0.9]	7 ± 1	[1.1]
		150	10 ± 1	[1.0]	6 ± 1	[1.0]
		500	10 ± 2	[1.0]	8 ± 2	[1.3]
		1500	12 ± 1	[1.2]	7 ± 1	[1.1]
		5000	12 ± 1	[1.2]	8 ± 1	[1.2]
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Test article	0	20 ± 1		17 ± 1	
		50	19 ± 2	[0.9]	17 ± 1	[1.0]
		150	16 ± 2	[0.8]	15 ± 2	[0.9]
		500	17 ± 2	[0.9]	17 ± 2	[1.0]
		1500	20 ± 1	[1.0]	16 ± 3	[1.0]
		5000	21 ± 3	[1.0]	17 ± 3	[1.0]
Positive controls						
TA100	2-AA	1.0	1923 ± 32	[12.6]		
TA1535	2-AA	2.0	117 ± 6	[7.3]		
TA98	B[a]P	1.0	128 ± 3	[5.0]		
TA1537	2-AA	1.0	163 ± 12	[15.7]		
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	107 ± 8	[5.3]		
TA100	SA	0.5			437 ± 26 [2.9]	
TA1535	SA	0.5			222 ± 16 [15.9]	
TA98	2-NF	2.0			208 ± 3 [9.4]	
TA1537	ICR-191	0.5			104 ± 7 [15.6]	
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5			182 ± 18 [10.7]	

Test article: 산삼배양근 추출물 농축액

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-Nitroquinoline-1-oxide; 2-NF, 2-Nitrofluorene.

(6) 염색체이상 시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

- ㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 부형제로 멸균 주사용수(대한약품공업(주))를 사용하였다.
- ㉡ 대사활성계 적용 시는 Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma-Aldrich Co.)을, 대사 활성계 비적용 시는 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

② 실험세포주

- ㉢ 본 시험에는 암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IU 세포주를 사용하였다.
- ㉣ 본 시험에서 사용한 세포주의 세포 증식률 및 핵형 검사는 ㈜켄온 비임상연구소에서 실시하였으며 그 결과, 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 15.41 시간이었다.
- ㉤ 배양액은 Minimum Essential Medium에 GlutaMax-I supplement, penicillin-streptomycin 및 Fetal Bovine Serum을 첨가하여 사용하였다.

③ 실험방법

- ㉥ 본 시험의 처리 농도는 예비시험 [㈜켄온 시험번호: 16-VG-690P]에서 본시험과 같은 방법으로 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.
- ㉦ 예비시험 결과 모든 처리계열의 모든 농도군에서 침전은 생성되지 않았다. 그러나 모든 처리계열에서 세포독성이 관찰되었다. 따라서 본시험에서는 RICC 값이 $45 \pm 5\%$ 가 되는 높은 농도를 추정하여 고농도를 설정하고 처리계획표와 같이 시험군을 구성하였다.

[표] 처리계획

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article ($\mu\text{g/mL}$)	Positive control and dose ($\mu\text{g/mL}$)
1	+	6-18	0, 1125, 2250, 4300, 4500	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 500, 1000, 2000, 2250	4NQO 0.4
3	-	24-0	0, 200, 400, 800, 900	4NQO 0.4

(나) 실험결과

- ① 시험타당성 기준은 모두 만족하였다. 염색체이상을 계수한 결과, 처리 방법에 상관없이 모든 시험물질 처리군에서 염색체의 구조적 및 수적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하지 않았으므로, 이 결과는 양성

판정 기준을 만족시키지 못하였다.

- ② 따라서, 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액은 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

[표] 대사활성계 적용-6시간 처리

Dose (µg/mL)	No. cells examined	Aberrations						PP+ER	No. aberrant metaphase ^{RI}		RICC (%)
		Chromosome type		Chromatid type		Others	Gaps		No.	+Gaps	
		osb	cse	otb	ote			No.		No.	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
1125	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82
	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.5)	
2250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
4300	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
4500	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	44
	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.0)	(1.0)	
20 B[a]P	100	0	1	1	36	0	2	0	22	22	36
	100	0	2	1	23	0	0	0	19	19	
	(mean)	(0.0)	(1.5)	(1.0)	(29.5)	(0.0)	(1.0)	(0.0)	(20.5)	(20.5)**	

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: 산삼배양근 추출물 농축액

a) 6-hour treatment - 18-hour recovery.

b) Inclusive/exclusive gaps. 100 metaphases were examined per culture.

PP: Polyploid

ER: Endoreduplication

B[a]P: Benzo[a]pyrene (positive control article)

RICC (%):

$$\text{Relative Increase in Cell Count} = \frac{\text{Increase in number of cells in treated cultures (final - starting)}}{\text{Increase in number of cells in control cultures (final - starting)}} \times 100$$

Gaps: Chromosome type + Chromatid type gaps

osb: Chromosome type breaks

cse: Chromosome type exchanges

otb: Chromatid type breaks

ote: Chromatid type exchanges

Other: Metaphases with more than 10 aberrations (including gaps) or with chromosome fragmentation

[표] 대사활성계 비적용-6시간 처리

Dose (µg/mL)	No. cells examined	Aberrations						PP+ER	No. aberrant metaphase ²⁾		RICC (%)
		Chromosome type		Chromatid type		Others	Gaps		No.	+Gaps	
		osb	ose	otb	ote			No.		No.	
0	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	100
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.5)	
500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
1000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70
	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.5)	
2000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
2250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
0.4 4NQO	100	0	1	0	23	1	0	0	16	16	72
	100	1	0	0	25	2	0	0	18	18	
	(mean)	(0.5)	(0.5)	(0.0)	(24.0)	(1.5)	(0.0)	(0.0)	(17.0)	(17.0)	

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: 산삼배양근 추출물 농축액

a) 6-hour treatment - 18-hour recovery.

b) Inclusive/exclusive gaps. 100 metaphases were examined per culture.

PP: Polyploid

ER: Endoreduplication

4NQO: 4-Nitroquinoline-1-oxide (positive control article)

RICC (%):

$$\text{Relative Increase in Cell Count} = \frac{\text{Increase in number of cells in treated cultures (final - starting)}}{\text{Increase in number of cells in control cultures (final - starting)}} \times 100$$

Gaps: Chromosome type + Chromatid type gaps

osb: Chromosome type breaks

ose: Chromosome type exchanges

otb: Chromatid type breaks

ote: Chromatid type exchanges

Other: Metaphases with more than 10 aberrations (including gaps) or with chromosome fragmentation

[표] 대사활성계 비적용-24시간 처리

Dose (µg/mL)	No. cells examined	Aberrations						PP+ER	No. aberrant metaphase ^{a)}		RICC (%)	
		Chromosome type		Chromatid type		Others	Gaps		No.	+Gaps		-Gaps
		osb	ose	otb	ote					No.		No.
0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.00 %)	(0.00 %)		
200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.00 %)	(0.00 %)		
400	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.00 %)	(0.00 %)		
800	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.00 %)	(0.00 %)		
900	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	(mean)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.00 %)	(0.00 %)		
0.4 4NQO	100	2	0	0	17	6	0	0	18	18	52	
	100	1	0	0	24	5	1	1	18	17		
	(mean)	(1.5)	(0.0)	(0.0)	(20.5)	(5.5)	(0.5)	(0.5)	(18.0)	(17.5)		

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: 산삼배양근 추출물 농축액

a) 24-hour treatment - 0-hour recovery.

b) Inclusive/exclusive gaps: 100 metaphases were examined per culture.

PP: Polyploid

ER: Endoreduplication

4NQO: 4-Nitroquinoline-1-oxide (positive control article)

RICC (%):

$$\text{Relative Increase in Cell Count} = \frac{\text{Increase in number of cells in treated cultures (final - starting)}}{\text{Increase in number of cells in control cultures (final - starting)}} \times 100$$

Gaps: Chromosome type + Chromatid type gaps

osb: Chromosome type breaks

ose: Chromosome type exchanges

otb: Chromatid type breaks

ote: Chromatid type exchanges

Other: Metaphases with more than 10 aberrations (including gaps) or with chromosome fragmentation

(7) 소핵 시험

(가) 재료 및 방법

① 시약 및 재료

- ㉠ 시험물질은 산삼배양근 추출물 농축액(동국제약 생명과학연구소)이며 부형제로 멸균 주사용수(대한약품공업(주))를 사용하였다.
- ㉡ 양성 대조물질로 Cyclophosphamide monohydrate [CPA, Sigma-Aldrich Co.]를 사용하였다.

② 실험동물

- ㉠ 실험동물은 (주)샘타코 바이오코리아에서 공급받은 특정병원체 부재(SPF) 랫드 (Sprague-Dawley [CrI: CD(SD)])를 사용하였다.
- ㉡ 실험동물은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간 (8h-20h), 및 조도 150-300Lux로 유지되는 (주)캠온 비임상연구소 제2동물사육구역 2호실에서 사육되었다.

③ 실험방법

- ㉠ 투여량을 결정하기 위하여 동일종 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험 [(주)캠온 시험번호:16-RG-692P]을 실시하였다.
- ㉡ 예비시험에서는 투여액량을 10 mL/kg/day로, 시험물질 용량을 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 설정하여 용량당 암수 각 3 마리에 2 일간 경구투여 하였고, 투여일을 포함하여 총 4 일간 관찰하였다.
- ㉢ 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며 성별에 따른 현저한 독성의 차이도 없었다.
- ㉣ 따라서 본 시험에서는 8주령 수컷 동물을 사용하였으며, 예비시험 결과에 따라 체중을 기준으로 5000 mg/kg/day를 본 시험의 고용량으로 설정하였고, 공비를 2 로 하여 '시험군 구성' 표와같이 시험군을 구성하였다.

[표] 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여일수	투여경로
G1	M	6	1-6	10	0	2	경구
G2	M	6	7-12	10	1250	2	경구
G3	M	6	13-18	10	2500	2	경구
G4	M	6	19-24	10	5000	2	경구
G5	M	6	25-30	10	40	1	경구

G1: 음성대조군(멸균주사용수)
G2-G4: 시험물질 투여군
G5: 양성대조군(Cyclophosphamide monohydrate)

(나) 실험결과

- ① 본 시험에 적용한 용량범위 내에서, 개체 당 2000 개의 PCE를 대상으로 MNPCE를 계수한 결과, 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 용량의존적으로 증가하거나, 한 용량 이상에서 확실한 양성반응을 나타내지 않았으므로, 양성판정 기준을 만족시키지 못한 것으로 판단하였다.
- ② 따라서 시험물질 산삼배양근 추출물 농축액은 본 시험조건 하에서 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

[표] 소핵 유발빈도 및 세포독성

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	MNPCE/2000 PCE (Mean±SD)	PCE:RBC Ratio (Mean±SD)	(% Control)
0	6	0.83 ± 1.17	0.53 ± 0.01	100
1250	6	1.00 ± 0.63	0.54 ± 0.02	101
2500	6	0.33 ± 0.52	0.55 ± 0.02	102
5000	6	0.83 ± 0.75	0.55 ± 0.01	102
CPA 40	6	66.17 ± 7.63	0.36 ± 0.02**	67

Test article: 산삼배양근 추출물 농축액
 Vehicle: Sterile distilled water for injection
 Vehicle and Test article were orally administered to rat for two consecutive days.
 CPA was orally administered to rat once on the day of the 2nd admin.
 Bone marrow smears were prepared about 24 hours after the final administration.

** Significantly different from the negative control group at $P < 0.01$.

Abbreviations
 PCE: Polychromatic erythrocyte
 RBC: Red blood cells (polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte)
 MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte
 CPA: Cyclophosphamide monohydrate (positive control article)

라. 산삼배양근 추출물 농축액의 혈행 개선 효능 평가

(1) 시험물질

(가) 시험물질인 산삼배양근추출물농축액(DK-MGAR101)은 동국제약(주)로부터 공급받아 냉장상태로 보관하면서 사용하였다. 시험물질에 대한 비교물질로는 홍삼추출물농축액(extract of Korean red ginseng, ERG)을 사용하였으며, 혈행개선 시험에 대한 비교물질로는 잘 알려진 혈행개선제 aspirin을 사용하였다.

(2) 실험동물

(가) *Ex vivo* 혈소판응집 억제시험용, 혈행 개선 시험용 동물로는 7주령 수컷 SD 랫드를 사용하였으며 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용하였다. 동물실험실의 환경은 온도 22±2℃, 상대습도 40-70%, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux 로 조절되었다. 실험동물용 pellet형 고형사료를 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를

자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행되었다.

(3) 실험방법

(가) In vitro 혈소판 응집 억제 효능 평가

- ① 수컷 랫드로부터 항응고제 citrate dextrose 용액(0.8% citric acid, 2.2% trisodium citrate 및 2% dextrose 함유)이 든 시험관에 혈액을 채취하였다. 혈액을 170 g에서 7분간 원심분리하여 혈장을 얻은 후, 120 g에서 7분간 원심분리하여 남아있는 적혈구를 제거하였다. 혈소판을 얻기 위해 350 g에서 원심분리하여 platelet-poor plasma (PPP)는 제거하고, platelet-rich plasma (PRP)를 얻었다. 분리한 혈소판에 Tyrode's buffer(137 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 2mM KCl, and 1mM MgCl₂ and NaHPO₄, pH 7.4)를 첨가하여 3 x 10⁸ platelets/mL의 washed platelets을 만들었다.
- ② 혈소판 응집을 aggregometer (Chrono-Log Co., Harbertown, PA, USA)를 사용하여 Born의 탁도측정 방법에 따라 측정하였다. 즉, washed platelets을 37°C의 aggregometer 내에서 1,200 rpm으로 교반하면서 CaCl₂을 처리하여 pre-incubation한 후 산삼배양근추출물농축액(125, 250 또는 500 µg/mL) 및 홍삼추출물농축액(125, 250 또는 500 µg/mL)과 반응시켰다. 3분간 반응시킨 후 collagen (0.625 µg/mL), adenosine diphosphate (ADP, 2.5 µM) 또는 thrombin (0.1 unit/mL)을 가하여 응집을 유도하면서 응집속도를 측정하였다. 용매만을 가한 100% 응집율에 대한 농도별 시험물질 및 비교물질의 억제효과를 제시하였다.

(나) Ex vivo 혈소판 응집 억제 효능 평가

- ① 랫드(n = 6/group)에 산삼배양근추출물농축액 및 비교물질인 홍삼추출물농축액은 250 또는 500 mg/kg으로, 비교약물인 aspirin은 50 mg/kg으로 7일간 경구로 투여하였다. 마지막 투여 40분 후 1 g/5 mL/kg의 urethane을 근육 내로 투여하여 마취시키고, 랫드로부터 항응고제 citrate dextrose 용액(0.8% citric acid, 2.2% trisodium citrate 및 2% dextrose 함유)이 든 시험관에 혈액을 채취하였다. 이후 *in vitro*에서와 같은 방법으로 3 x 10⁸platelets/mL의 washed platelets을 만들었다. Washed platelets을 37°C의 aggregometer 내에서 1,200 rpm으로 교반하면서 CaCl₂을 처리하여 pre-incubation한 후 collagen (0.625 µg/mL) 또는 ADP (2.5 µM)를 가하여 응집을 유도하면서 8분간 응집속도를 측정하였다. 용매만을 투여한 대조군 동물의 응집율에 대한 농도별 시험물질 및 비교물질의 억제효과를 제시하였다.
- ② 또한 dense granules 분비에 대한 산삼배양근추출물농축액 및 비교물질인 홍삼추출물농축액의 *ex vivo* 효과에 확인하기 위해 ATP 분석을 진행하였다. 채취한 washed platelets에 collagen (0.625 µg/mL) 또는 ADP (2.5 µM)를 가하여 응집을 유도하였으

며, 반응 종료 후 자극 반응물 시료를 원심분리하고, 상층액을 모아 분석에 사용하였다. 혈소판 과립에서 분비된 ATP양은 ATP 분석 키트(Biomedical Research Service Center, USA)를 사용하였으며 luminometer (GloMax 20/20; Promega, USA)로 측정하였다.

(다) In vitro Thromboxane B₂ 생성 억제 효능 평가

- ① TXB₂는 효능제에 의해 활성화 경로를 통해 혈소판 과립으로부터 분비되므로, collagen 및 ADP로 혈소판응집을 유도하는 과정에서 측정하였다.
- ② *In vitro*에서는 랫드 혈소판(4×10^8 cells/mL)을 37°C에서 3분간 시험물질(산삼배양근 추출물농축액 또는 홍삼추출물농축액)과 반응시킨 후 collagen (0.625 µg/mL) 및 ADP (2.5 µM)로 응집을 유도하였다. Indomethacin (100 µM)과 차가운 2.5 mM EDTA로 반응을 정지시키고 12,000 g에서 5분간 원심분리한 후, TXB₂생성량을 ELISA법으로 측정하였다. 용매만을 가미한 100% 생성량에 대한 농도별 시험물질 (125, 250 또는 500 µg/mL) 및 비교물질(200 µM indomethacin)의 억제효과를 제시하였다.

(라) Ex vivo Thromboxane B₂ 생성 억제 효능 평가

- ① *Ex vivo*에서는 7일간 시험물질 투여 후 채취한 혈소판(4×10^8 cells/mL)을 collagen (0.625 µg/mL) 및 ADP (2.5 µM)로 응집을 유도하여 TXB₂생성량을 ELISA법으로 측정하였다. 용매만을 투여한 생성량에 대한 용량별 시험물질(250 또는 500 mg/kg) 및 비교물질(50 mg/kg aspirin)의 억제효과를 제시하였다.

(마) 혈액응고 억제효능 평가

- ① 혈액응고 억제효능 평가를 위한 혈액을 혈행 개선효능 평가 과정에서 시험물질(산삼배양근추출물농축액 및 홍삼추출물농축액)을 3주간 경구투여한 랫드로부터 채취하였다. 항응고제로 3.8% sodium citrate을 사용하여, sodium citrate : blood = 1 : 9의 비율을 맞추어 채혈한 뒤, 2,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 동물용 혈액응고시간분석기 Vetscan VSPRO (Abaxis Inc., Union City, CA, USA)로 prothrombin time (PT)과 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하였다.

(바) 혈행개선 효능 평가

- ① 랫드(n = 6~9/group)에 산삼배양근추출물농축액 및 홍삼추출물농축액은 각각 150, 250, 375 또는 500 mg/kg으로, 비교약물인 aspirin은 30 mg/kg으로 3주간 경구투여하였다. 마지막 투여 40분 후 1 g/5 mL/kg의 urethane을 근육 내로 투여하여 마취시키고, heating pad (36~37°C) 위에서 체온을 유지하며 우측 경동맥을 노출시킨 다음, 주위 미주신경과 지방조직을 분리하였다. 혈관 위에 Laser doppler flow probe (AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA)를 장착하고 혈류측정기 상의 혈류 흐름을 확인하였다. 마지막 투여 후 1시간이 지난 시점에 35% FeCl₃로 충분히 적신 3 x 5

mm의 Whatman No. 1 filter paper를 probe가 장착된 부위로부터 심장 쪽으로 약 5 mm 떨어진 동맥표면을 5분 동안 감싸 노출시킨 후 제거하였다. FeCl₃적용시점부터 40분간 혈류를 기록하였다. 실질적인 혈관폐쇄시점(occlusion time)을 혈류량이 10%로 감소하는 시간을 통계적인 regression curve를 통해 산출하였다. 40분간의 관찰이 종료되면 동맥을 적출하여 혈전의 형성 정도를 현미경으로 관찰하였다.

(사) 통계처리

- ① 모든 측정값은 평균±표준편차로 나타내었다. 일원분산분석(one-way ANOVA)로 분석 후 유의성이 관찰되면 Dunnett's multiple-range test 및 Fisher's LSD test를 통하여 $P<0.05$ 의 수준에서 군간의 유의성을 검정하였다.

(4) 실험결과

(가) 혈소판 응집 억제 효능 평가

- ① 혈소판응집 억제효능을 평가하기 위해 *in vitro*로 혈소판에 시험물질(산삼배양근추출물농축액및홍삼추출물농축액)을 반응시킨 결과, 시험물질 모두 혈소판응집을 용량의존적으로 억제하는 것으로 확인되었다(Figure 1A). 산삼배양근추출물농축액은collagen (0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ADP (2.5 μM) 및 thrombin (0.1 unit/mL)으로 유도한 혈소판응집 모두에서 매우 유의적인 억제효능을 보인데 비해, 홍삼추출물농축액은 ADP로 유도된 혈소판응집에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 특히, 농도에 따른 억제효능에 있어서 산삼배양근추출물농축액은 홍삼추출물농축액에 비해 훨씬 우수하였다.
- ② 시험물질(산삼배양근추출물농축액, 홍삼추출물농축액 및 aspirin)을 7일간 용량별로 경구투여하고 채취한 혈소판으로 측정된 *ex vivo* 혈소판응집 억제효능 역시 유도된 혈소판응집을 억제하였다(Figure 1B). 특히, 산삼배양근추출물농축액은 홍삼추출물농축액에 비해 혈소판응집에 대한 억제력이 큰 것으로 나타났으며, 고용량(500 mg/kg)의 산삼배양근추출물농축액은 aspirin (50 mg/kg)과 유사한 효능을 보여주었다.
- ③ 혈소판이 활성화되면 alpha 및 dense granules을 분비하고, 이러한 dense granules 분비는 세포 내 신호전달 경로를 통해 혈소판을 더욱 활성화시킨다. 혈소판 활성화의 초기 단계는 ATP를 빠르게 분비하는 것이 특징을 이용하여 collagen과 ADP에 의해 유도된 ATP 분석을 진행하였다. 그 결과, Figure 2에서 보듯이 산삼배양근추출물농축액과 홍삼추출물농축액은 collagen과 ADP로 자극된 혈소판으로부터의 dense granules을 함유한 ATP 분비를 유의하게 억제하였다. 두 시험물질 모두 우수한 억제 효능을 보여주었는데, 산삼배양근추출물농축액이 홍삼추출물농축액보다 약간 더 강한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 주어진 추출물이 혈소판 granules 분비를 차단함으로써 혈소판응집을 억제함을 시사한다.

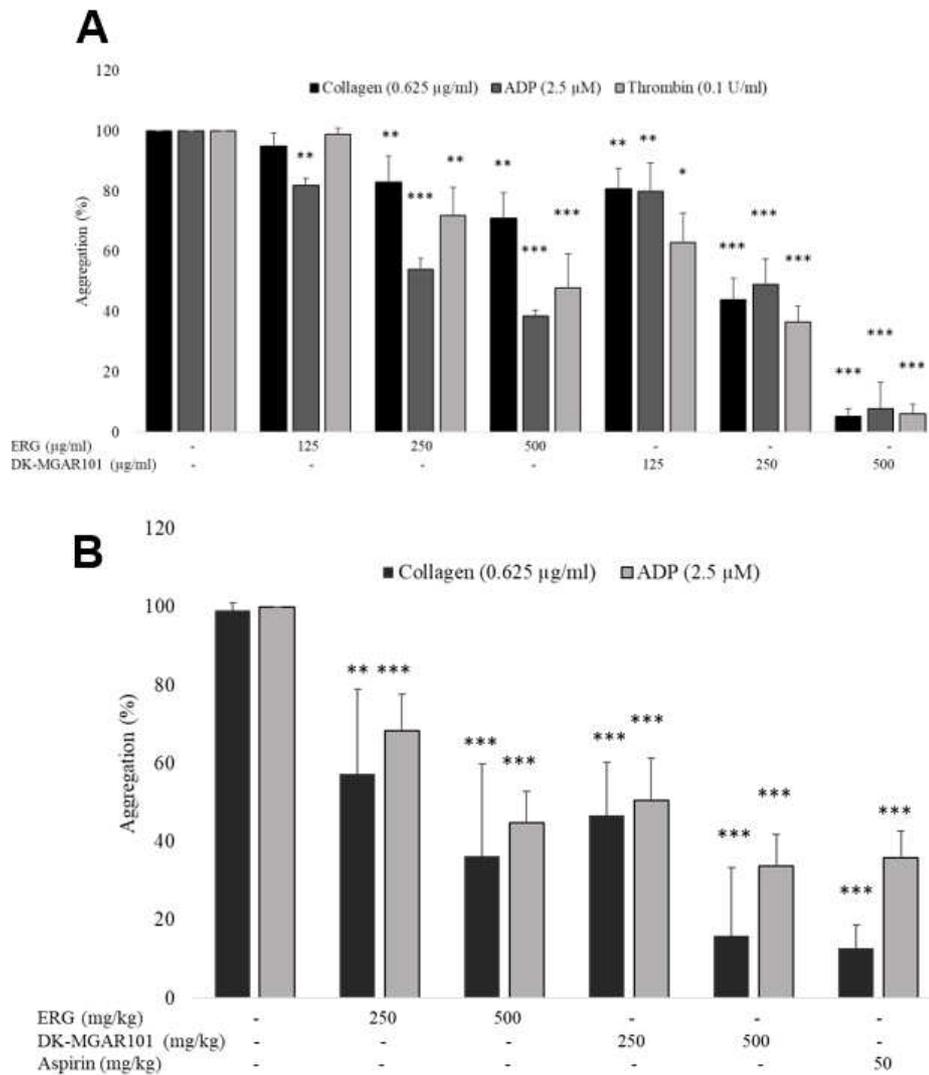


Figure 1. Effects of the extract of Korean red ginseng (ERG) and DK-MGAR101 on the agonist-stimulated platelet aggregation *in vitro* (A) and *ex vivo* (B). (A) Washed platelets were pre-treated with either ERG, DK-MGAR101 or vehicle for 2 min in presence of 1 mM CaCl₂, and stimulated with collagen, ADP or thrombin for 8 min. (B) Washed platelets obtained from vehicle, ERG, DK-MGAR101 or aspirin-treated rats were incubated at 37°C with continuous stirring and stimulated with collagen or ADP for 8 min. Graph represents the mean ± SEM of experiments performed on six independent days with n=1 on each day. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 compared with vehicle(FeCl₃ alone) control (Dunnett's multiple-range test).

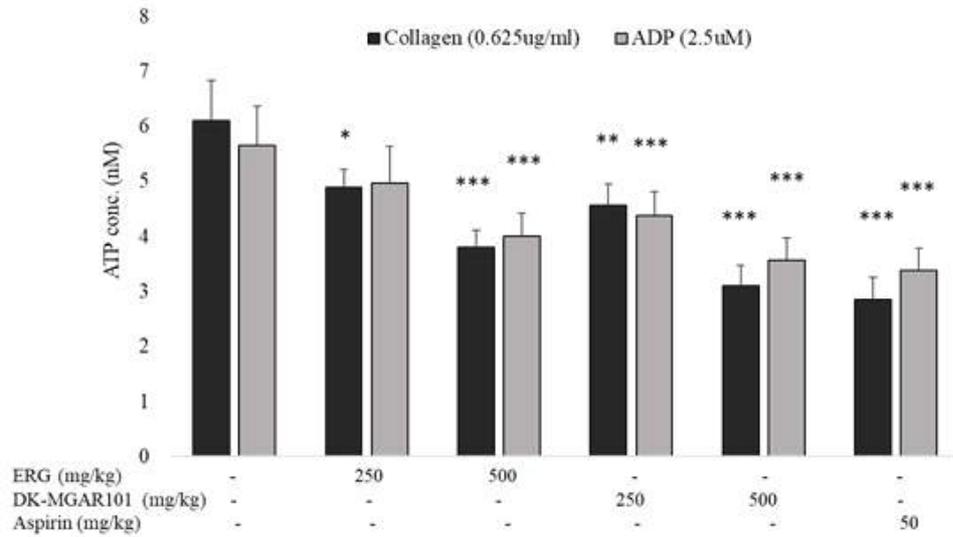


Figure 2. Effects of the extract of Korean red ginseng (ERG) and DK-MGAR101 on ATP secretion *ex vivo*. Washed platelets obtained from vehicle, ERG, DK-MGAR101 or aspirin-treated rats were incubated at 37°C with continuous stirring and stimulated with collagen or ADP for 8 min. Following termination of platelet aggregation reaction, the concentration of ATP was assessed using a luminometer. Results represent the mean \pm SEM of experiments performed on four independent days with n=1 on each day. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with vehicle (FeCl₃alone) control (Dunnett's multiple-range test).

(나) Thromboxane B₂ 생성 억제 효능 평가

- ① Cyclooxygenase 경로를 통한 arachidonic acid로부터의 thromboxane A₂(TXA₂)생성은 혈소판 활성화를 위한 중요한 feedback loop mechanisms이다. 더욱이 TXA₂는 지혈 중 혈소판 활성화를 매개체로 증폭한다. 그러나, 본 연구에서는 TXA₂가 생리학적으로 불안정하기 때문에 대사산물인 thromboxane B₂(TXB₂)생성을 분석하였다. 그 결과, *in vitro*에서 산삼배양근추출물농축액 및 홍삼추출물농축액이 collagen (0.625 µg/mL) 및 ADP (2.5 µM)로 유도된 TXB₂생성을 용량의존적으로 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다(Figure 3A). 특히, 농도별 억제효과에 있어서 산삼배양근추출물농축액이홍삼추출물농축액에 비해 훨씬 우수하였으며, 고농도(500 µg/ml)의 산삼배양근추출물농축액은 indomethacin (200 µM)에 버금가는 효능을 보여주었다. *Ex vivo*에서도 산삼배양근추출물농축액과 홍삼추출물농축액 모두 효과적으로 TXB₂생성을 억제하였는 바, 산삼배양근추출물농축액이 홍삼추출물농축액보다 상대적으로 우수하였다(Figure 3B).

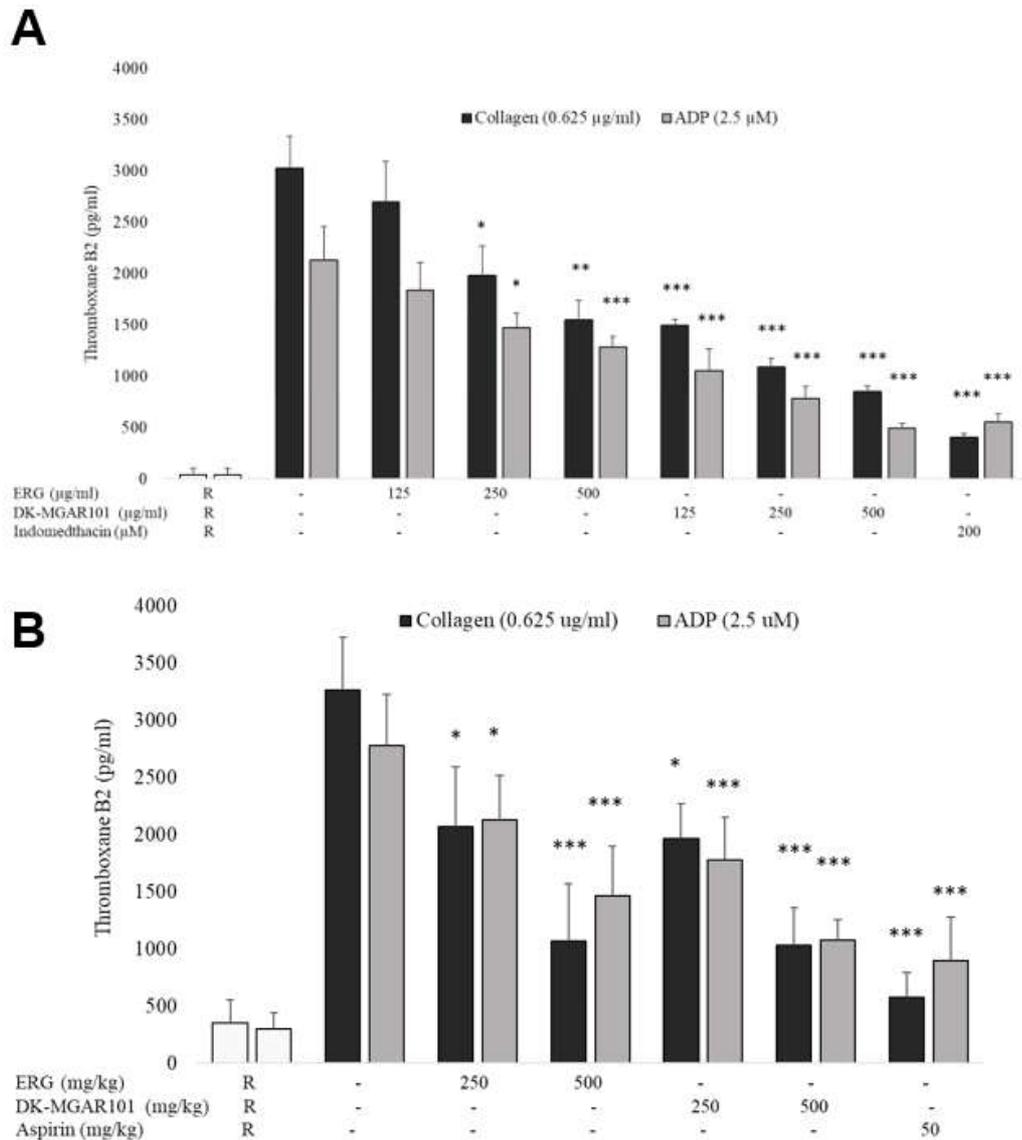


Figure 3. Effects of the extract of Korean red ginseng (ERG) and DK-MGAR101 on the thromboxane B₂ production during platelet aggregation *in vitro* (A) and *ex vivo* (B). (A) Washed platelets were pre-treated with either vehicle, ERG, DK-MGAR101 or indomethacin for 2 min in presence of 1 mM CaCl₂, and stimulated with collagen or ADP for 8 min. (B) Washed platelets obtained from vehicle, ERG, DK-MGAR101 or aspirin-treated rats were incubated at 37 °C with continuous stirring and stimulated with collagen or ADP for 8 min. Aggregation reaction was terminated by adding ice-cold 2.5mM EDTA and 100µM indomethacin. The mixture was centrifuged, the supernatant used and the concentration of thromboxaneB₂(TXB₂) was measured using a TXB₂ EIA kit(Rrepresent resting platelets). Bar graph shows the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus vehicle(FeCl₃ alone) control (Dunnett's multiple-range test).

(다) 혈액응고 억제 효능 평가

- ① 랫드에 용량별로 산삼배양근추출물농축액, 홍삼추출물농축액(125, 250, 375 또는 500 mg/kg) 또는 비교물질인 aspirin (30 mg/kg)을 3주일간 경구투여한 뒤, FeCl₃를 적용한 혈행 개선효능 평가 후 혈액을 채취하여 혈액응고의 내인성 경로(prothrombin time, PT)와 외인성 경로(activated partial thromboplastin time, aPTT)에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, PT는 홍삼추출물농축액(240~375 mg/kg)과 aspirin (30 mg/kg) 투여군에서 통계적으로 유의하지는 않으나 정제수만을 투여한 대조군(FeCl₃유발군)에 비해 응고시간이 다소 지연된 것으로 나타났다(Figure 4A). 반면, aPTT는 산삼배양근추출물농축액, 홍삼추출물농축액 및 aspirin에 의해 증가하였는 바, 산삼배양근추출물농축액이 홍삼추출물농축액에 비해 우수한 것으로 나타났다. 특히 250~375 mg/kg의 산삼배양근추출물농축액과 375 mg/kg의 홍삼추출물농축액은 aspirin (30 mg/kg)과 유사한 유의적인 효능을 보여주었다(Figure 4B). 따라서 산삼배양근추출물농축액과 홍삼추출물농축액의 혈액응고 억제효과는 실질적으로 내인성 경로(PT)보다는 외인성 경로(aPTT)를 통해 발현되는 것으로 여겨진다.

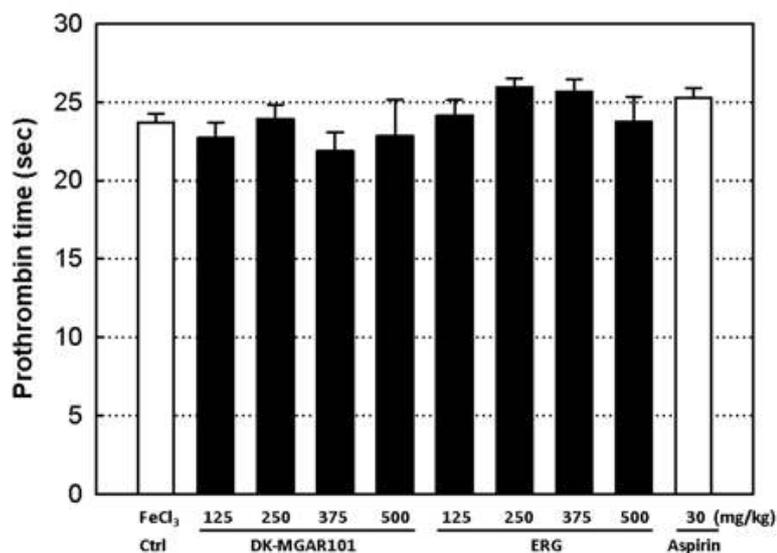
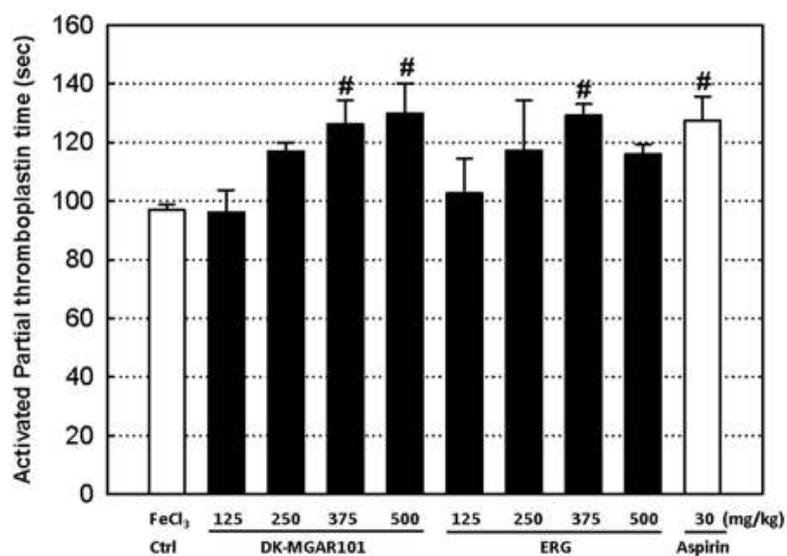
A**B**

Figure 4. Effects of the DK-MGAR101 and extract of Korean red ginseng (ERG) on the blood clotting *ex vivo*. Prothrombin time (A) and activated partial thromboplastin time (B) were measured using citrated blood (Veterinary Diagnostics VetScan VSpro). *Significantly different from vehicle (FeCl₃ alone) control ($P < 0.05$, Dunnett's multiple-range test). [#]Significantly different from vehicle (FeCl₃ alone) control ($P < 0.05$, Fisher's LSD test).

(라) 혈행개선 효능

- ① 혈전 유발 전 3주간의 시험물질 투여 전 기간에 걸쳐 용매대조군(FeCl_3 유발군), 산삼배양근추출물농축액 및 홍삼추출물농축액 투여군의 모든 동물에서 이상증상은 관찰되지 않았으며, 체중의 변화 또한 완만하게 증가하는 정상적인 상태를 나타냈다.
- ② 35%의 FeCl_3 를 적신 filter paper를 경동맥 표면에 5분간 감아 두었다가 떼 후부터 동맥 내 혈류를 측정된 결과, 혈류속도가 점차 느려져 약 30분 후에는 거의 흐름이 감지되지 않았다(Figure 5). 이에 비해 산삼배양근추출물농축액 또는 홍삼추출물농축액을 3주간 경구투여한 동물에서는 용량의존적으로 혈류감소가 억제되었으며, 비교물질인 aspirin (30 mg/kg)에 의해서도 탁월한 혈행개선 효과가 확인되었다. 전체적인 혈류유지 효능에 있어서 30 mg/kg aspirin > 500mg/kg 산삼배양근추출물농축액 > 500 mg/kg 홍삼추출물농축액 = 375 mg/kg 산삼배양근추출물농축액 > 475 mg/kg 홍삼추출물농축액 > 250 mg/kg 산삼배양근추출물농축액 ≥ 250 mg/kg 홍삼추출물농축액 > 125 mg/kg 산삼배양근추출물농축액 ≥ 125 mg/kg 홍삼추출물농축액의 순으로 우수한 것으로 확인되었다.
- ③ 이러한 혈행 개선효과를 정량적으로 평가하기 위해 혈류가 10% 이하로 떨어져 실제적으로 폐쇄된 것으로 여겨지는 혈관폐쇄 시간을 산정한 결과 용매대조군(FeCl_3 유발군)에서의 26.0분에 비해, 125, 250, 375 및 500 mg/kg의 산삼배양근추출물농축액 투여 후에는 각각 30.3분, 37.3분, 49.0분 및 62.3분으로, 125, 250, 375 및 500 mg/kg의 홍삼추출물농축액 투여 후에는 각각 29.6분, 35.3분, 41.5분 및 49.4분으로, 그리고 30 mg/kg aspirin 투여 후에는 76.6분으로 연장되었다(Figure 6). 따라서 산삼배양근추출물농축액이 홍삼추출물농축액에 비해 탁월한 혈행개선효과를 보여주었으며, 특히 500 mg/kg의 산삼배양근추출물농축액 투여 시 천연 추출물의 편차(개체차)가 상대적으로 컸지만 30 mg/kg의 aspirin에 버금가는 효능을 보여주었다.
- ④ FeCl_3 를 가한 후 40분간 혈류 측정을 마친 경동맥은 육안상으로 확인되는 혈전부위를 기준으로 앞과 뒤 각각 1 mm의 간격으로 절단하여 혈관길이(mm)와 혈관무게(mg)를 측정하여 thrombus 중량(mg/mm)을 산출하였다(Table 2). 그 결과, 대부분의 시험물질 투여군에서 용매대조군(FeCl_3 유발군)의 0.99 ± 0.08 mg/mm에 비해 낮은 수치를 나타냈다. 특히 약간 심한 개체차로 인해 용량의존성 변화는 명확하지 않았지만, 산삼배양근추출물농축액은 375 mg/kg 이상에서, 홍삼추출물농축액은 250 mg/kg 이상에서 유의한 혈전중량의 감소가 확인되었다. Aspirin (30 mg/kg) 역시 유의한 혈전중량 경감효과가 나타났다.
- ⑤ FeCl_3 적용 40분 후 동맥을 적출하여 생성된 thrombi를 관찰한 결과, 용매대조군에서는 thrombi가 동맥 내강을 완전히 폐쇄하고 있었으나, 산삼배양근추출물농축액(250~500 mg/kg), 홍삼추출물농축액(250~500 mg/kg) 및 aspirin (30 mg/kg)을 투여한 군에서는 thrombi가 다소 느슨하게 형성되어 있었으며, 혈류흐름이 가능한 작은 platelet plugs

가 다수 관찰됨에서 따라 platelet plugs에서 혈류흐름을 차단하는 blood clots (thrombi)으로 가는 혈전 생성단계의 억제효과에 대한 가능성을 보여주었다(Figure 7).

- ⑥ 이들 thrombi 내의 platelet plugs와 blood clots이 차지하는 면적을 비율로 산출한 결과, 용매대조군(FeCl_3 유발군)에서는 혈행이 가능한 platelet plugs가 20.88%를 차지하는 데에 비해 aspirin은 42.32%로, DK-MGAR101 125, 250, 375 및 500 mg/kg에서는 각각 29.25%, 33.39%, 27.60% 및 37.22%로, ERG 125, 250, 375 및 500 mg/kg에서는 각각 20.57%, 26.21%, 35.80% 및 40.99%로 나타났다. 상대적인 비교에서 낮은 용량(125-250 mg/kg)에서는 DK-MGAR101이, 고용량(375-500 mg/kg)에서는 ERG가 약간 우수한 경향을 나타냈다. 그러나 고용량에서 platelet plugs의 절대적인 수치에서만 ERG가 더 높은 것으로 관찰되었고, platelet plugs와 blood clots의 전체 비율에서는 용매대조군(FeCl_3 유발군) 100%, DK-MGAR101 125, 250, 375 및 500 mg/kg에서는 각각 99.61%, 91.99%, 86.12% 및 95.28%로, ERG 125, 250, 375 및 500 mg/kg에서는 각각 98.24%, 100%, 99.05% 및 100%로 나타남으로써 이들의 비율을 감안하면 용량별 평균값을 기준으로 aspirin > DK-MGAR101 > ERG 순으로 platelet plugs 생성 비율이 높은 것으로 나타났다(Figure 8).

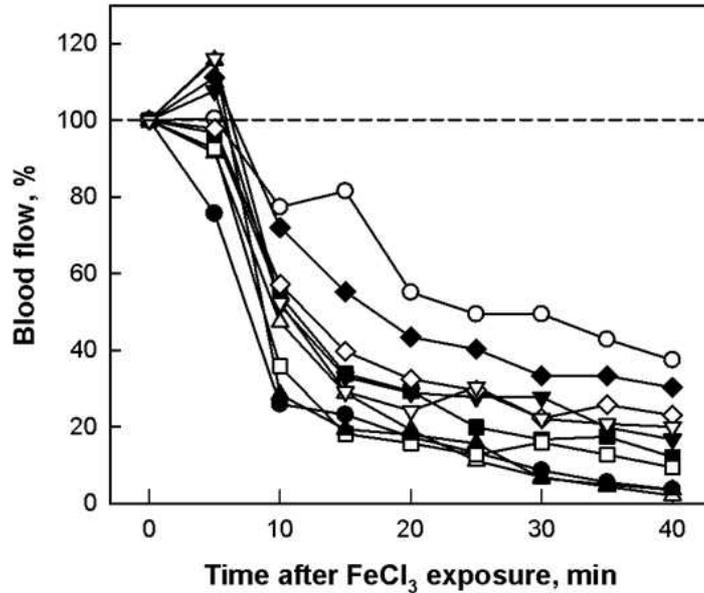


Figure 5. Time-course of carotid arterial blood flow following FeCl_3 application outside the arterial wall. DK-MGAR101, extract of Korean red ginseng (ERG) or aspirin were orally administered for 3 weeks prior to FeCl_3 exposure. ●, vehicle (FeCl_3 -induced) control; ▲, 125 mg/kg DK-MGAR101; ■, 250 mg/kg DK-MGAR101; ▼, 375 mg/kg DK-MGAR101; ◆, 500 mg/kg DK-MGAR101; △, 125 mg/kg ERG; □, 250 mg/kg ERG; ▽, 375 mg/kg ERG; ◇, 500 mg/kg ERG; ○, aspirin 30 mg/kg.

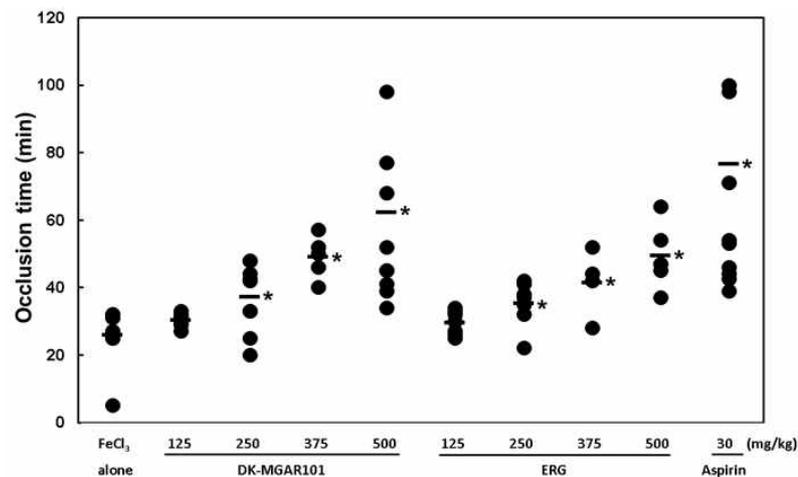


Figure 6. Time to occlusion of carotid arteries after application of FeCl_3 outside the arterial wall. DK-MGAR101, extract of Korean red ginseng (ERG) or aspirin were orally administered for 3 weeks prior to FeCl_3 exposure. *Significantly different from vehicle(FeCl_3 alone) control ($P < 0.05$, Fisher's LSD test).

Table 2. Effects of the DK-MGAR101, extract of Korean red ginseng (ERG) or aspirin (30 mg/kg) on the thrombus weights of rats orally administered for 3 weeks prior to FeCl₃ exposure.

Group	Dose(mg/kg)	Thrombus(mg/mm)
FeCl ₃ alone	0	0.99±0.08
	125	0.87±0.05
DK-MGAR101	250	0.94±0.04
	375	0.65±0.10*
	500	0.77±0.05*
	125	0.83±0.08
ERG	250	0.78±0.05*
	375	0.67±0.04*
	500	0.73±0.11*
	30	0.78±0.06*

*Significantly different from vehicle (FeCl₃alone)control($P<0.05$, Fisher's LSD test).

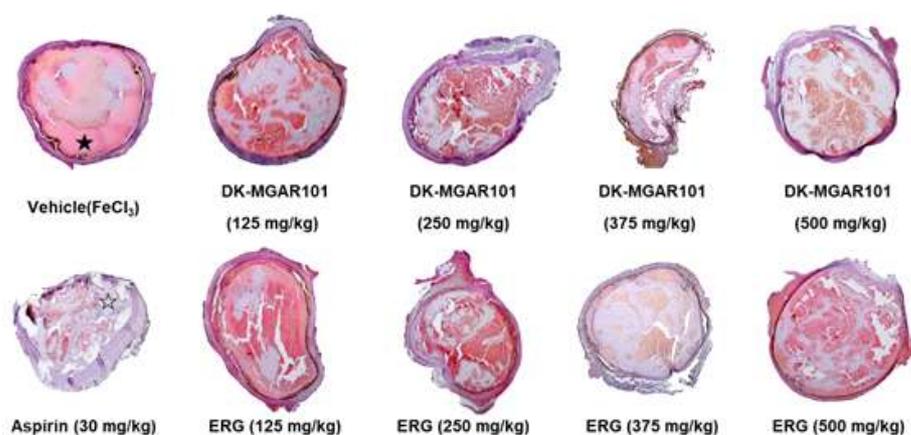


Figure 7. Representative findings of arterial thrombi produced by FeCl₃ application outside the arterial wall. DK-MGAR101, extract of Korean red ginseng (ERG) or aspirin (30 mg/kg) were orally administered for 3 weeks prior to FeCl₃ exposure. ☆: platelet plug (gray), ★: blood clot (reddish).

마. 산삼배양근추출물농축액의 인체적용시험 시제품 제작

(1) 제형 선정

- (가) 액상 제형으로 스틱형 파우치 포장
- (나) 인체적용시험 시험약으로 위약군과 본약 설정, 제조
- (다) 제품 10ml 중 산삼배양근추출물농축액 1.5g 함유

(2) 시제품 제작

(가) 시험식품(DK-MGAR101) 제조

성분	배합비율(%)	제품합량(mL)
정제수	85	8.5
산삼배양근추출물농축액	15	1.5
합계	100	10

(나) 대조식품(Placebo) 제조

성분	배합비율(%)	제품합량(mL)
정제수	96.7	9.67
산삼향	3.0	0.3
카카오색소	0.3	0.03
합계	100	10



[그림] 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제작

바. 산삼배양근 추출물 농축액의 인체적용시험

(1) 시험목적

대사증후군 대상자에서 산삼배양근추출물농축액(DK-MGAR101)을 경구 복용 후 혈소판 응집 억제와 혈행 개선 효과 및 안전성을 평가하고자 함.

(2) 시험방법

방문 1에서 대상자 적합성 평가에 적합한 대상자는 방문 2를 진행하였으며, 적합한 대상자에 한하여 시험군 또는 대조군에 각각 1:1로 무작위 배정되어 해당하는 인체적용시험용 식품을 교부 받았다. 이후 8주간 시험식품 혹은 대조식품을 복용하였으며, 8주간 복용 후 방문하여 기능성과 안전성을 평가하고 인체적용시험을 종료하였다.

(3) 인체적용시험용 식품

(가) 시험군: 산삼배양근추출물농축액(DK-MGAR101) 3mL/일

(나) 대조군: 대조식품(위약)

(4) 대상자 및 선정/제외기준

(가) 선정기준(대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 했다.)

① 만 20세 이상 만 65세 미만의 남성 또는 여성

② 다음 진단 기준에 3가지 이상 해당하여 대사증후군으로 진단되는대상자

(NCEP ATP III 진단기준)

㉠ 복부비만(허리둘레 남자 90cm, 여자 80cm 이상 또는 BMI 25kg/m² 이상)

㉡ 고중성지방혈증(TG 150mg/dL 이상)

㉢ 저HDL 콜레스테롤혈증(HDL 남자40mg/dL 미만, 여자50mg/dL 미만)

㉣ 높은 혈압(수축기 혈압 130mmHg 이상 또는 이완기 혈압 85mmHg 이상)

㉤ 혈당장애(공복혈당 100mg/dL 이상)

③ 본 인체적용시험동의서에 서면동의한 대상

④ 제외기준(다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다.)

㉠ 본 인체적용시험에 영향을 미칠 것으로 예상되는 인삼류 함유 식품에 대한 알레르기 등 과민반응 병력이 있는 자

㉡ 인체적용시험 참여 전 12주 이내 전신마취를 요하는 수술병력이 있는 자

㉢ 스크리닝 이전 2주 이내에 오메가-3 지방산 함유 유지, 홍삼 등 병용금지약물을 복용 하였거나 복용중인 자

㉣ 스크리닝 이전 2주 이내에 아스피린, 항응고제, 항혈소판 제제를 투여하였거나 투여중인 자

㉤ 약물로 조절되지 않는 고혈압환자(수축기 혈압 160mmHg 이상 또는 이완기 혈압 95mmHg 이상인 경우)

㉥ 당뇨 및 고지혈증으로 인해 본 인체적용시험의 금지약물을 복용중인 자

㉦ 관상동맥 질환 및 말초동맥경화성 질환(말초동맥 질환, 복부 대동맥류, 경동맥 질환)의 병력을 가지고 현재 약물치료를 진행 중인 자

㉧ 죽상경화에 의한 뇌경색, 뇌졸중 또는 일과성 허혈발작의 기왕력이 있는 환자

㉨ 증상을 동반한 울혈성 심부전이 있는 환자

㉩ 임상적으로 유의한 간 기능 장애(혈청 내 간수치 ALT, AST가 정상의 상한선보다 2.5배이상)가 있는 자

㉪ 임상적으로 유의한 신 기능 장애(Serum Creatinine이 2.0mg/dl 이상)가 있는 자

(5) 평가변수

(가) 기능성

① 1차 기능성 평가변수(Primary endpoint)

㉠ 혈소판 응집능(ADP induced platelet aggregation)의 변화치

② 2차 기능성 평가변수(Secondary endpoint)

㉠ 혈소판 응집능(ADP induced platelet aggregation)의 변화율

㉡ PT의 변화치 및 변화율

㉢ aPTT의 변화치 및 변화율

㉣ 혈청지질(Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride)의 변화치 및 변화율

㉤ Serotonin의 변화치 및 변화율

㉥ 혈압(수축기 및 이완기)의 변화치 및 변화율

㉦ 혈소판 수의 변화치 및 변화율

㉧ Total NO의 변화치 및 변화율

(나) 안전성

시험식품 복용 전과 복용 중, 복용 8주 후에 임상실험실 검사, 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.

(6) 시험결과

① 대사증후군대상자에서 “산삼배양근추출물농축액DK-MGAR101”을 하루 3 mL를 8주간 경구 복용하였을 때 대조식품과 비교하여 혈행개선 효과 및 안전성을 평가하고자 하였다.

② 무작위 배정된 102명 중 중도탈락 7명을 제외하고 95명이 인체적용시험을 종료하였다. 본 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수는 혈소판 응집능(ADP induced platelet aggregation) 변화치이며, ADP 변화치의 FAS 분석 및 PP 분석 결과 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ADP는 두 군 간 통계적으로 유의한 차이를 보여주지 못하였다.

③ 군내에서 대조군에서 통계적으로 유의한 차이를 보여주었으며 시험군보다 대조군 변화가 컸고 이는 통상적으로 대사증후군의 경우 혈액의 흐름이 아무런 치료 없을 경우 더 악화되고 있다고 가정할 때 임상적인 의미를 부여할 수 있을 것으로 보여진다.

④ 이차 기능성 평가 변수인 ADP 변화율도 대조군의 경우 통계적으로 경계 상의 유의한 차이를 보여주었으며 시험군보다 대조군 변화가 컸고 이는 통상적으로 대사증후군의 경우 혈액의 흐름이 아무런 치료가 없을 경우 더 악화되고 있다고 가정할 때 임상적

인 의미를 부여할 수 있을 것으로 보여진다.

- ⑤ PT, aPTT의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. Total Cholesterol의 FAS 분석 결과 시험 군의 경우 통계적으로 유의한 차이를 보여주었고 대조군은 보여주지 않았으며 군 간 차이도 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 각 군내 Total Cholesterol 변화율도 마찬가지로 양상을 보여주었다. HDL은 시험 군은 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 대조군은 유의한 차이를 보였고 군 간 차이도 통계적으로 유의하였다.
- ⑥ 각 군내 HDL 변화율도 비슷한 양상을 보여주었다. LDL의 분석 결과 각 군내 LDL 변화치는 시험 군의 경우 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 군 간 차이도 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 각 군내 LDL 변화율도 마찬가지였다.
- ⑦ Triglyceride는 군 간 차이가 없었고 Serotonin은 PP 분석 결과 시험 군의 경우 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 통계적으로 유의한 차이가 없었다. Serotonin 변화율에서 시험 군은 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다.
- ⑧ 수축기 혈압에서도 시험군은 모든 분석군에서 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 보여주지 않았으나 군간 차이는 없었다. 각 군 내 수축기 혈압 변화율은 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 수축기 혈압 변화율의 군 간 차이에서도 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 혈소판 수 FAS 분석 결과 변화치와 변화율은 각 군 내, 군 간 차이 모두 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 군 간 차이도 통계적으로 유의하지 않았다.
- ⑨ Total NOFAS 분석 결과 각 군 내 Total NO변화율에서 시험군이 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 없었고 군간 차이는 보여주지 않았다. 그러나 PP군 분석 결과에서는 군간 차이를 보여주었다. 안전성 분석 결과 이상반응은 시험군에서 만 1명의 대상자에게 발생하였으나 관련성 없음으로 판단되었으며 활력 징후 검사 결과, 소변검사 결과 및 이학적 검사에서는 각 군내 및 군간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.
- ⑩ 혈액학적 분석 및 혈액 화학적 분석에서 Creatinine, γ -GT, ALP, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol이 통계적으로 유의한 차이를 보여주었으나 정상 범위 이내에서의 변화로 임상적인 의미를 부여하기 어려울 것으로 판단된다.
- ⑪ 결론적으로 102명의 대사증후군 대상자에게 산삼배양근추출물농축액(DK-MGAR101)을 하루 3mL씩 8주 동안 경구 복용하였을 때, 혈소판 수에는 군 간 차이를 보이지 않았으나, ADP 변화치는 유의한 차이를 보여주었고, Total Cholesterol은 시험 군에서만 통계적으로 유의하게 개선되었고, 좋지 않은 콜레스테롤로 알려진 LDL cholesterol의 변화치는 대조군에 비해 시험 군에서 유의하게 감소하였으며, Total NO 변화율은 시험 군에서 통계적으로 유의한 차이를 보여주어, 시험식품인 산삼배양근추출물이 혈액

의 흐름을 원활하게 하고 혈액의 응고를 지연시키는 기능이 있는 것으로 판단되며, 하루 3mL를 8주간 경구 복용하였을 때 혈행 개선 효과가 있는 안전한 기능성식품으로 판단된다.

사. 센텔라아시아티카 배양근의 지표성분 추적

(1) 재료 및 방법

(가) 실험재료

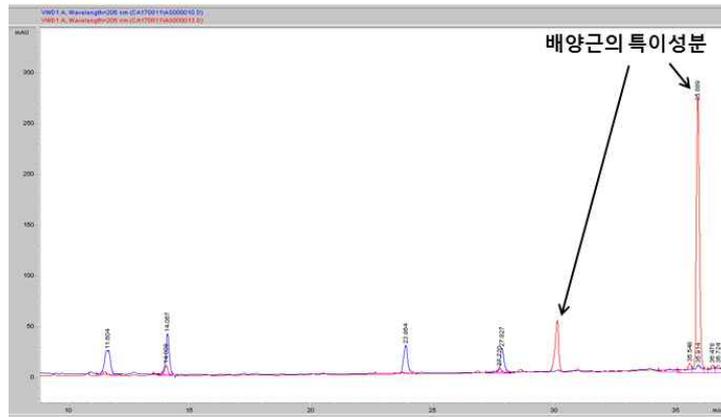
① 센텔라아시아티카 식물체, 센텔라아시아티카 배양근

(나) 실험방법

Method																									
Column	LICHROART 250-4 HPLC-CARTRIDGE LICHROSPHER 100 RP(250mm x 4mm, 5 μ m)																								
Flow	1.0ml/min																								
Detector	UV 206nm																								
Oven temperature	28 $^{\circ}$ C																								
Injection	20 μ l																								
Mobile phase	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간 (min)</th> <th>A(%) - Water</th> <th>B(%) - ACN</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	시간 (min)	A(%) - Water	B(%) - ACN	0	80	20	15	65	35	30	35	65	35	20	80	40	20	80	45	80	20	55	80	20
시간 (min)	A(%) - Water	B(%) - ACN																							
0	80	20																							
15	65	35																							
30	35	65																							
35	20	80																							
40	20	80																							
45	80	20																							
55	80	20																							

(2) 실험결과

(가) 센텔라아시아티카 배양근과 식물체의 HPLC 분석을 통하여 기존에 알려져 있는 triterpenoids(madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, asiatic acid) 함량을 비교한 결과, 식물체에 비해 배양근에서 triterpenoids 함량은 낮게 나타남



원료	Triterpenoid 함량(%)					X (times)	
	Madecassoside	Asiaticoside	Madecassic acid	Asiatic acid	Total triterpenoid	특이성분 1	특이성분 2
병풀 배양근	0.35	0.82	0.08	0.20	1.45	28	34
병풀 식물체	2.14	2.15	0.86	0.71	5.86	1	1

- (나) 그러나, 센텔라아시아티카 배양근에서 식물체에 비해 약 30배 높게 나타나는 특이성분 2가지를 확인함
- (다) 추출용매별로 비교하였을 때 triterpenoids 전체 함량은 Water<100% EtOH<100% MeOH<50% EtOH 순으로 증가됨
- (라) 추출용매별 특이성분 함량을 비교하였을 때 Water<50% EtOH<100% EtOH<100% MeOH 순으로 증가됨

Method		MS	AS	MA	AA	Triterpenoids 함량(%)	특이성분 1	특이성분 2
		함량(%)	함량(%)	함량(%)	함량(%)		Area	Area
병풀배양근 (2차 Tank)	100% MeOH	0.27	0.62	0.06	0.17	1.13	710.3	1167.65
	100% EtOH	0.18	0.33	0.08	0.17	0.76	585.2	954.9
	50% EtOH	0.54	1.03	0.07	0.27	1.91	1110.15	14.5
	Water	0.05	0.14	0.02	0.07	0.28	0	0

아. 센텔라아시아티카 배양근 추출물의 ICID 등재

(1) 국제화장품원료집(ICID) 등재

(가) 등재일: 2017.09

(나) INCI명: Centella Asiatica Adventitious Root Extract

(다) INCI Monograph ID: 32414

(라) Trade Name: Centella stem cell culture



Personal Care  Products Council

[On-Line INFOBASE >> Ingredient Database](#)

Centella Asiatica Adventitious Root Extract

- **INCI Name:** Centella Asiatica Adventitious Root Extract
- **INCI Monograph ID:** 32414
- **Definition:** Centella Asiatica Adventitious Root Extract is the extract of the adventitious roots of *Centella asiatica*.
- **[SAFETY/REGULATORY INFORMATION](#)**
- **Chemical Class(es):** [Botanical Products and Botanical Derivatives](#)
- **Reported Functions:** [Skin-Conditioning Agents - Miscellaneous](#)
- **Ingredient Source(s):** Plant
- **Trade Name(s):** [Click here to view full list of Trade Names](#)
- [International Buyers' Guide](#)

Centella Asiatica Adventitious Root Extract Trade Name(s):

- Centella Stem Cell Culture ([Dongkook Pharmaceutical, Ltd.](#))

자. 센텔라아시아티카 배양근의 특허 출원 및 등록

(1) 특허 출원 및 등록

- (가) 발명의 명칭: 병풀 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름 개선용 화장품 조성물
- (나) 출원인: 동국제약(주)
- (다) 출원번호(국내): 제 10-2018-0112354 호
- (라) 출원일자(국내): 2018.09.19.
- (마) 등록일자(국내): 2019.04.17
- (바) 등록번호(국내): 제 10-1971837 호
- (사) 출원번호(PCT): PCT/KR2019/010948

출원일자(PCT): 2019.08.27.

출원번호통지서

출원일자	2018.09.19
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2018-0112354 (접수번호 1-1-2018-0935721-00)
출원인명칭	동국제약 주식회사(1-1998-000828-0)
대리인성명	최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명	정구영 황영식 지형근 한수민 김영은
발명의명칭	병풀 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름개선용 화장품 조성물

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】	1545017807
【부처명】	농림축산식품부
【연구관리 전문기관】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	농생명산업기술개발사업
【연구과제명】	기능성원료 인허가 및 제품화를 통한 배양근의 산업화 기술 개발
【기여율】	1/1
【주관기관】	동국제약(주)
【연구기간】	2018.06.14 - 2019.08.13

[그림] 국내 특허 출원



[그림] 국내 특허 등록

특 허 협 력 조 약
(PATENT COOPERATION TREATY)

PCT

국제출원번호 및 국제출원일 통지서
(PCT 규칙 20.2(c))

발신: 수리관청 수신: 최규환 대한민국 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소		발송일 (일/월/년) 2019년 09월 04일 (04.09.2019)
출원인 또는 대리인의 서류참조기호 PCT1928		중요통지사항
국제출원번호 PCT/KR2019/010948	국제출원일 (일/월/년) 2019년 08월 27일 (27.08.2019)	우선일 (일/월/년) 2018년 09월 19일 (19.09.2018)
출원인 동국제약 주식회사		
발명의 명칭 병품 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름개선용 화장품 조성물		

[그림] PCT 특허 출원

차. 센텔라아시아티카 조직배양체 관련 제품 출시

- (1) 제품명: 센텔리안24마데카크림센텔라하이드레이팅 포플러 50ml, 15ml, 1ml
- (2) 제품출시일: 2016.09
- (3) 제품 전성분 중 관련 원료: 병폴캘러스추출물



[그림] 제품 사진

카. 에키네시아 배양근의 면역 효능 평가

- (1) in vitro 림프구 증식능에 미치는 영향

(가) 재료 및 방법

① 실험재료 및 동물

- ㉠ 시험물질은 에키네시아 배양근 추출물 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)을 사용하였다.
- ㉡ 실험동물은 수컷 Balb/c계 생쥐(n=5)를 사용하였다.

② 실험방법

㉠ MTT법

SPF에서 사육한 8주령의 Balb/c계 생쥐 (male)의 비장을 취하여 적당량의 무균 HBSS 용액이 담긴 용기에 넣고, 핀셋으로 잘게 절단하여 단일 비장세포 현탁액으로 만든다. Filter로 여과하여 HBSS액에 세 번 세척한다. 매 세척 시 1,000 rpm에서 원심분리한다. 세포를 완전배양액 2 ml에 띄워 염색한 후 생존 세포 수를 계산한다 (95%이상 생존도). 세포 농도를 $2 \times 10^6/ml$ 로 조절하고, 필요 시 순수 T 림프구 또는 B 림프구 등을 분리한다. 비장세포 현탁액을 24 well plate에 넣고 각 well마다 1 ml씩 넣고 한쪽은 50 μl 의 Con A액 (2 $\mu g/ml$ 에 해당)과 에키네시아 배양근 시료 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)를 500, 250, 125, 62.5, 31.25 $\mu g/ml$ 농도로 넣는다. 대조군과 함께 CO25%, 37°C 배양기에서 24시간 배양한다. 배양 종료 4

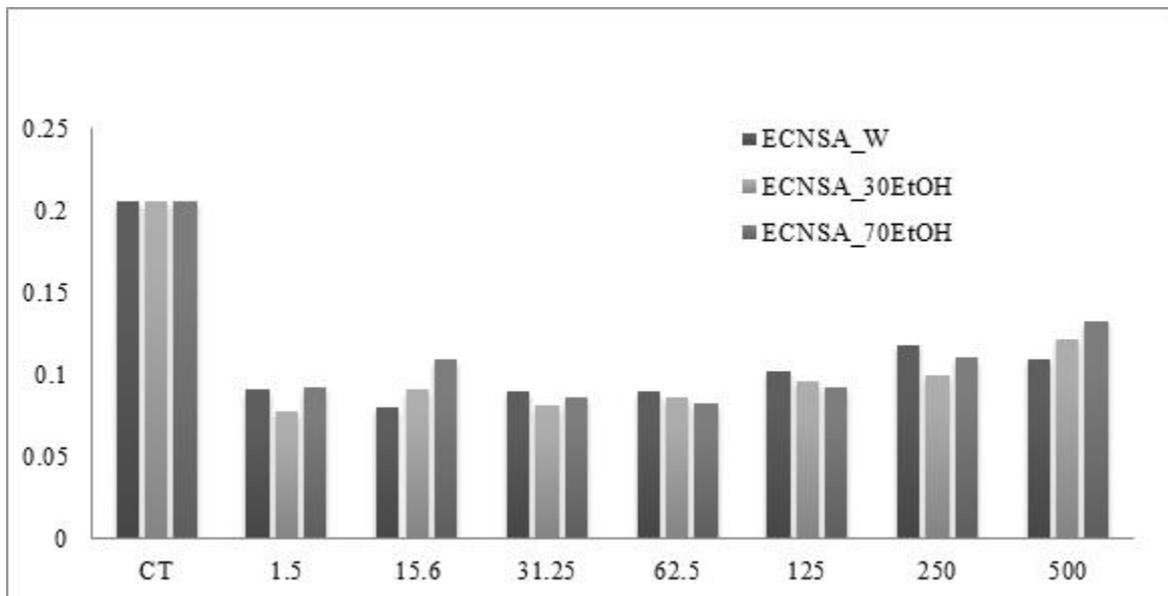
시간 전에 각 well마다 상등액 0.7 ml를 빼고 FBS를 함유하지 않은 RPMI 1640 배양액 0.7 ml를 넣는 동시에 MTT액 (5 mg/ml)을 50 μ l/well의 양으로 넣고 4시간 동안 계속 배양한다. 배양 종료 후, well마다 1 ml의 산성 아이소프로페놀을 넣어 보라색 결정체가 완전히 용해될 때까지 혼합한다. 그런 후 96 well plate에 나눠 담는다. 각 well은 3 well에 나눠 570 nm 파장에서 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 측정한다. 또는 용해액을 바로 1 ml 비색 비이커에 담아 분광 광도계로 570 nm에서 측정한다.

㉞ 나 Cell proliferation (EZ-CyTox법)

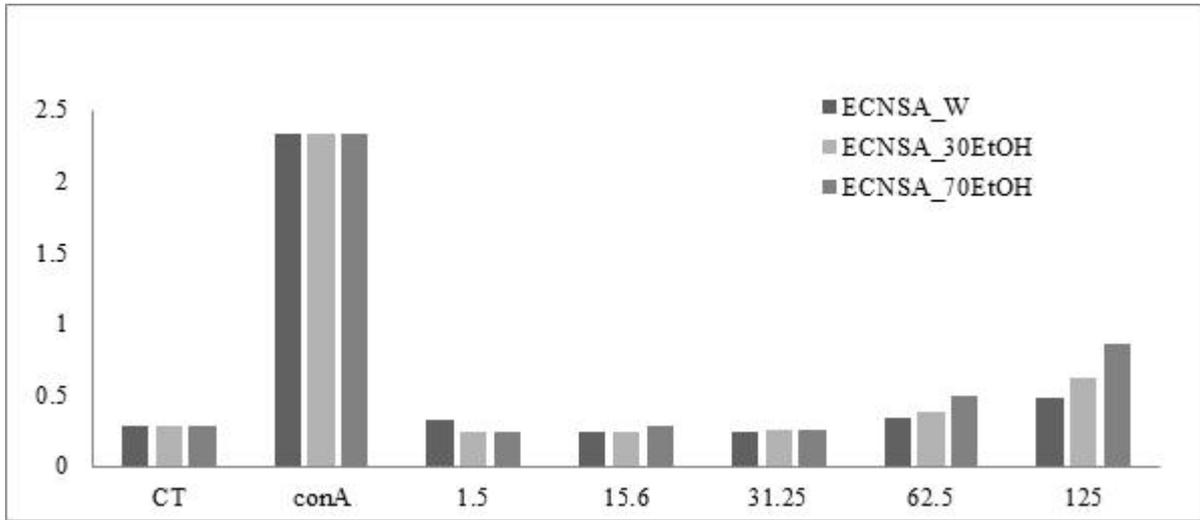
SPF에서 사육한 8주령의 Balb/c계 생쥐 (male)의 비장을 취하여 적당량의 무균 HBSS 용액이 담긴 용기에 넣고, 핀셋으로 잘게 절단하여 단일 비장세포 현탁액을 200 μ l/well의 양으로 96 well plate에 넣는다. 3개의 실험군은 Con A (10 μ g/ml)를 넣고 나머지 3개 실험군은 Con A를 넣지 않은 군, 그리고 3개 군은 에키네시아 배양균 시료(물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)를 125, 62.5, 31.25, 15.6, 1.5, 0 μ g/ml 농도로 처리한 실험군으로 한다. 5% CO₂, 37°C 배양기에서 24시간, 72시간 동안 배양한다. 배양 종료 6시간 전에 각 well에 EZ-CyTox assay reagent 10 μ l을 넣어 30분에서 6시간 동안 계속 배양한다. 배양 종료 후 420~480 nm 파장에서 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 비장세포 증식능을 측정한다.

(나) 실험결과

- ① 에키네시아 배양균 물층, 30% EtOH, 70% EtOH 모두에서 세포독성이 나타나지 않았다.
- ② 에키네시아 배양균 30% EtOH, 70% EtOH 모두에서 세포증식이 관찰되지 않았다.



[그림] MTT 분석 결과



[그림] Cell proliferation 결과

(2) in vitro 세포활성물질 수준 측정

(가) 재료 및 방법

① 실험재료 및 동물

㉠ 시험물질은 에키네시아 배양근 추출물 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)을 사용하였다.

㉡ 실험동물은 수컷 Balb/c계 생쥐(n=5)를 사용하였다.

② 실험방법

㉠ ELISA법

- 8주령의 Balb/c계 생쥐(male)의 비장을 취하여 적당량의 무균 HBSS 용액이 담긴 용기에 넣고, 핀셋으로 잘게 절단하여 단일 비장세포 현탁액 중 CD4+ T isolation kit를 이용하여 분리한 T 림프구를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO2배양기에서 48시간 동안 배양하였다. IFN-g, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 등 세포활성물질의 측정은 ELISA방법으로 수행하였다. 즉 anti-mouse IFN-g, IL-2, IL-4, IL-10 와 anti-mouse IL-12 capture 단클론 항체 등을 96-well plate에 1 µg/ml농도로 코팅하여 4°C에서 12시간 방치하였다. 코팅 후, 비특이적 결합부위를 막기 위해 2% BSA를 함유한 PBS에 blocking buffer를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 0.05% tween-20 을 함유한 PBS로 4회 세척 후 재조합 사람 IFN-g, IL-2, IL-4와 재조합 생쥐 IL-12 표준액과 고기능성 식물원료(125, 62.5, 15.6, 1.5, 0 µg/ml)를 처리한 검체의 배양 상등액을 각 well 에 100 µl씩 부가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 0.05% tween-20 을 함유한 PBS로 4회 세척 후 biotinylated anti-mouse IFN-g, IL-2, IL-4 와 anti-mouse IL-12는 1% BSA를 함유한 PBS를 이용하여 0.05 µg/ml 농도로 희석한 후 well에 처리하여 37°C에서 2시간 동안 방치한다. 세정용 완충용액으로 7회 세척한 후 avidin-conjugated enzyme을 2.5

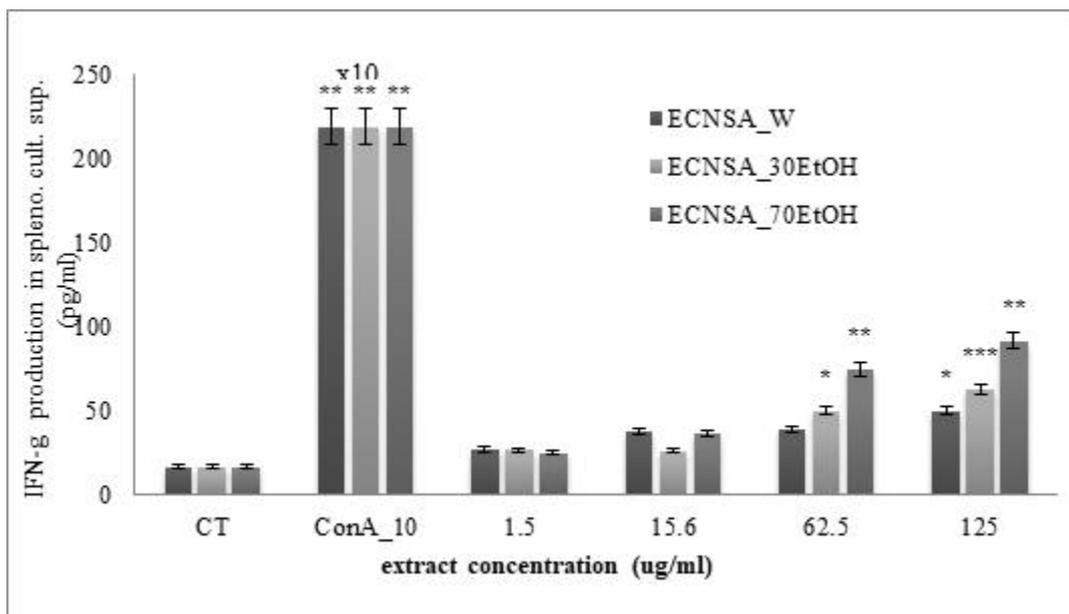
$\mu\text{g/ml}$ 농도로 각 well에 처리한 다음 37°C 에서 30분 방치한 후 7회 세척한다. ABTS 기질액을 각 well에 $100\ \mu\text{l}$ 씩 가하여 10분간 발색을 유도한 다음 ELISA reader를 이용하여 $405\ \text{nm}$ 파장에서 IFN-g, IL-2, IL-4, IL-12 등을 측정한다.

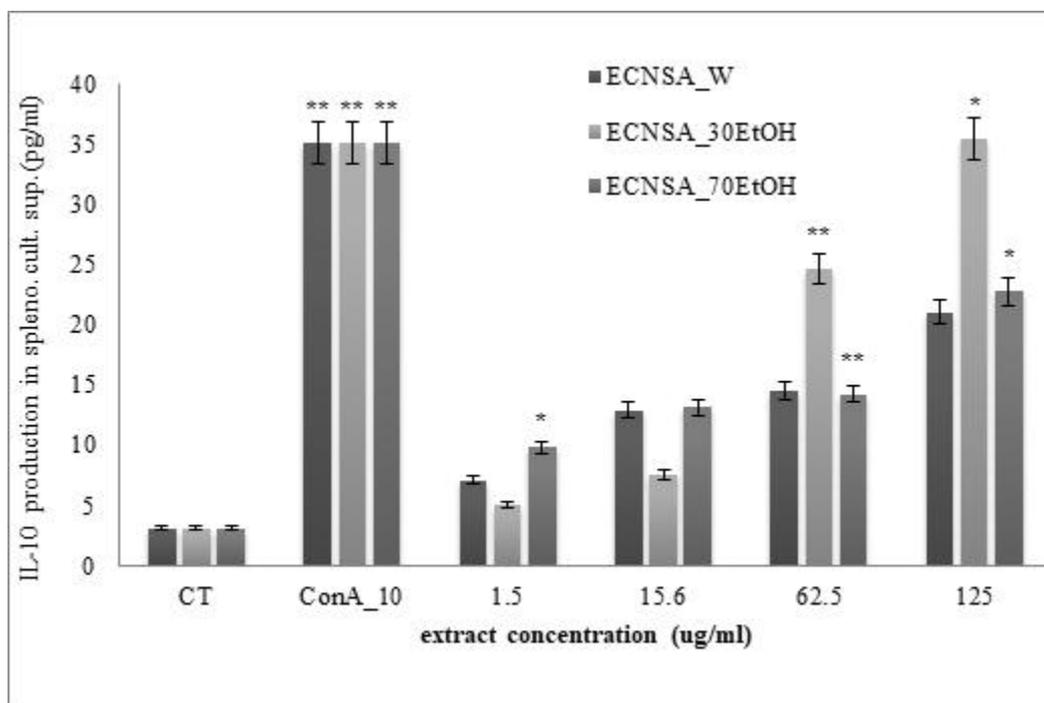
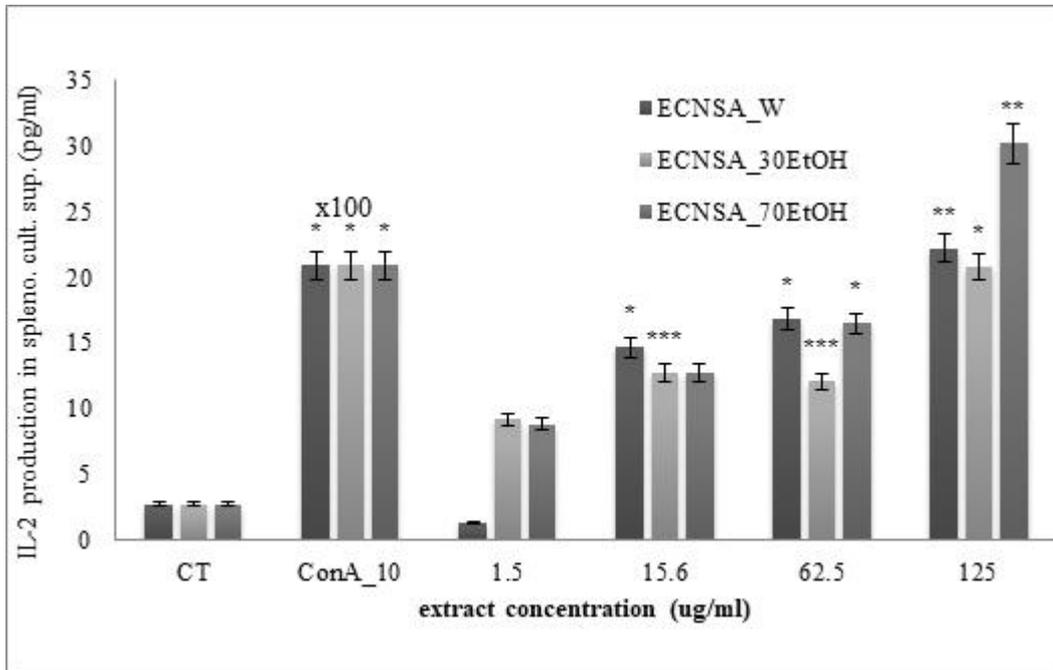
㉞ Real-time PCR

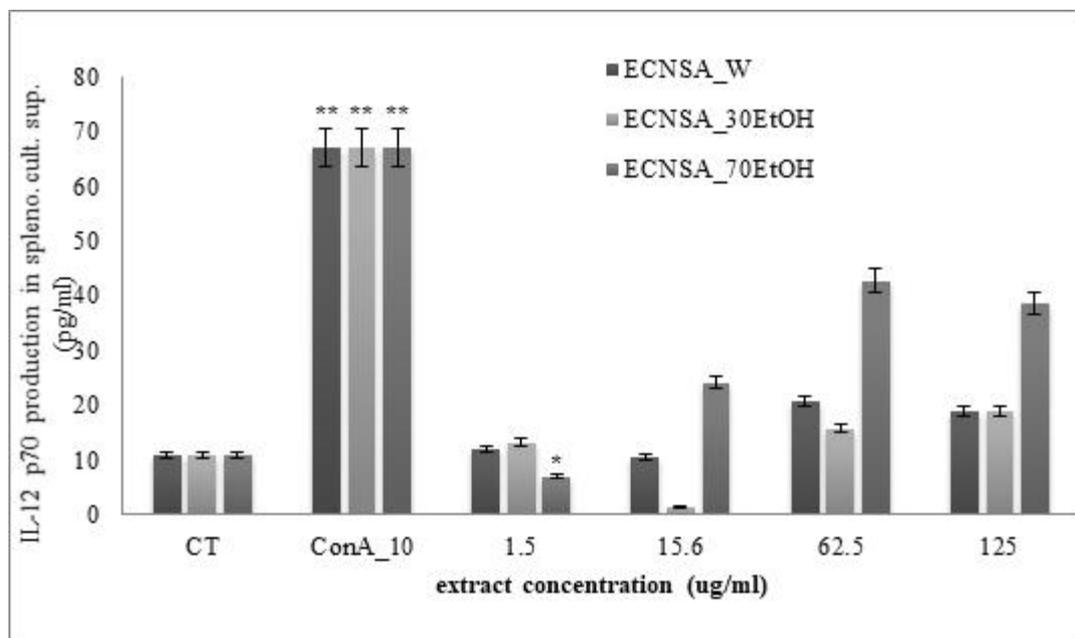
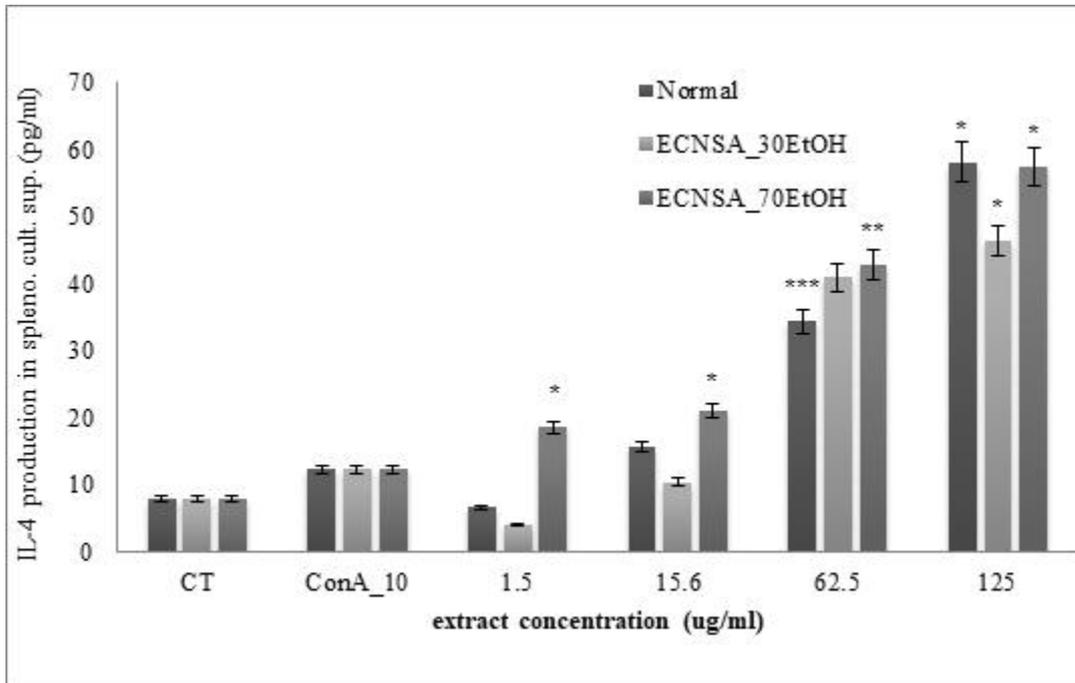
- total RNA($3\text{--}5\ \mu\text{g}$) 혹은 mRNA($0.2\text{--}0.5\ \mu\text{g}$)를 70°C 에서 10분간 열처리하여 변성시킨다. MMLV reverse transcriptase와 dNPT, oligomer d(T)를 이용하여 제조회사가 제공하는 완충용액과 방법에 따라 42°C 에서 45분간 반응하여 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA ($0.1\text{--}0.2\ \text{volume}$)에 증폭하고자 하는 특정 유전자의 primer와 $2.5\ \text{mM}$ dNTP, Taq polymerase ($0.3\ \text{U}/\mu\text{l}$), $10\times$ 완충용액을 첨가하여 PCR을 30-35 cycle을 수행한다. Real-time PCR(ABR 7500)로 측정한다.

(나) 실험결과

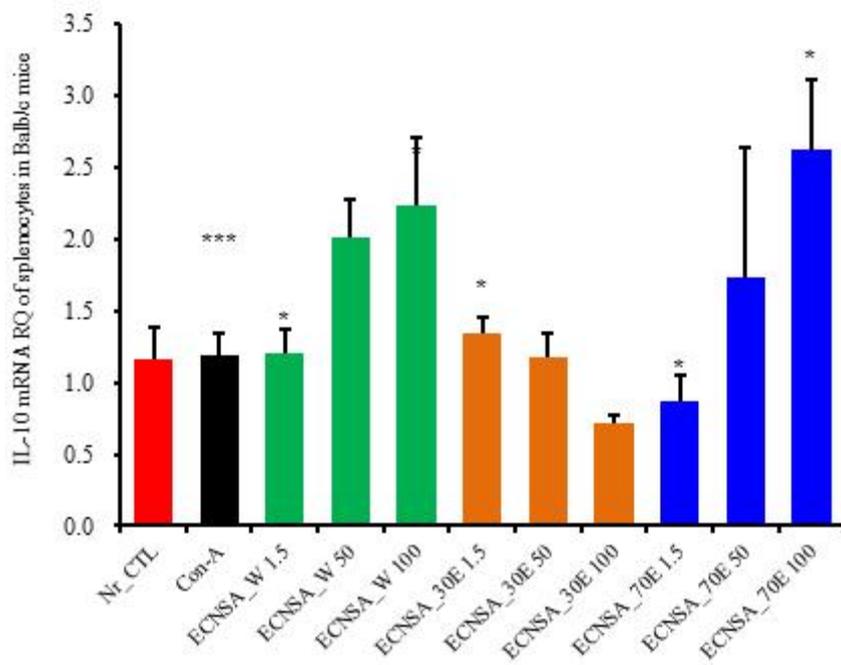
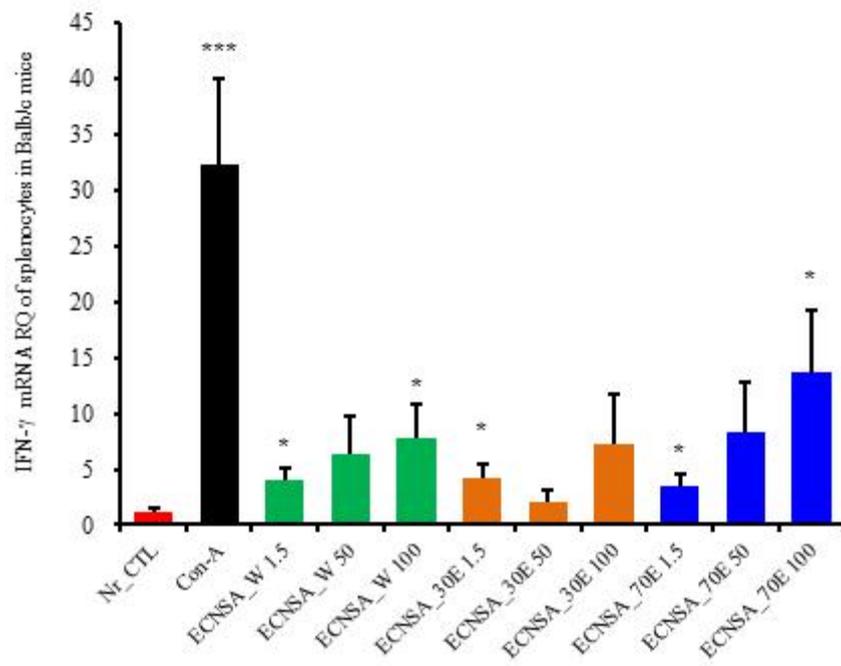
- ① 비장세포 활성화에서 에키네시아 배양근 물층, 30% EtOH, 70% EtOH와 동시배양결과 면역증진 사이토카인인 IFN- , IL-2, IL-10, IL-4, IL-12p40 production 측정에서 에키네시아 배양근 30% EtOH와 70% EtOH 처리군이 증가를 나타냈다. 특히 IL-10 생산량은 에키네시아 배양근 30% EtOH 처리군이 현저한 증가를 나타냈다.
- ② 비장세포에서 에키네시아 배양근 70% EtOH투여군에서 IL-10 mRNA와 IL-12p40 mRNA 유전자 발현이 투여농도에 따라 증가를 나타냈다.

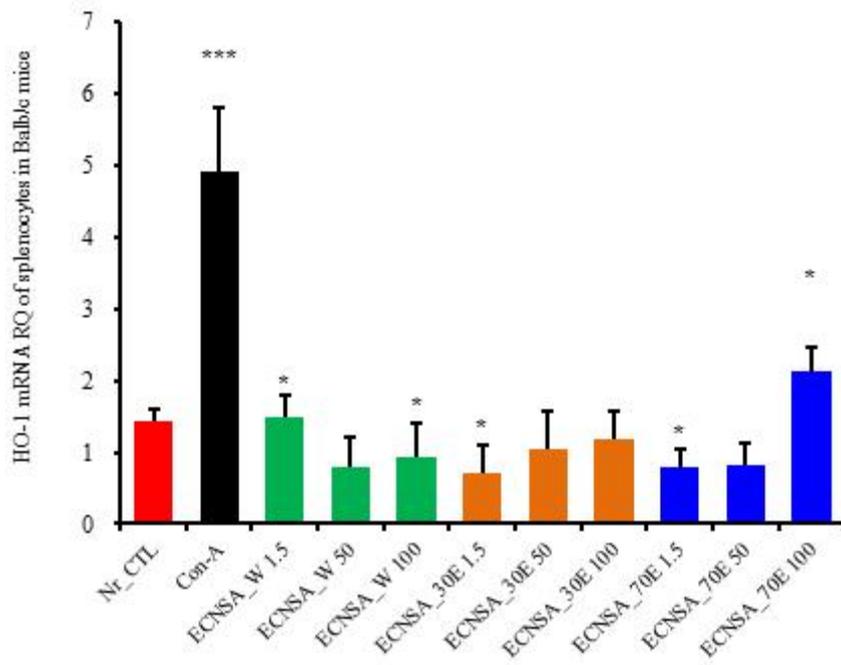
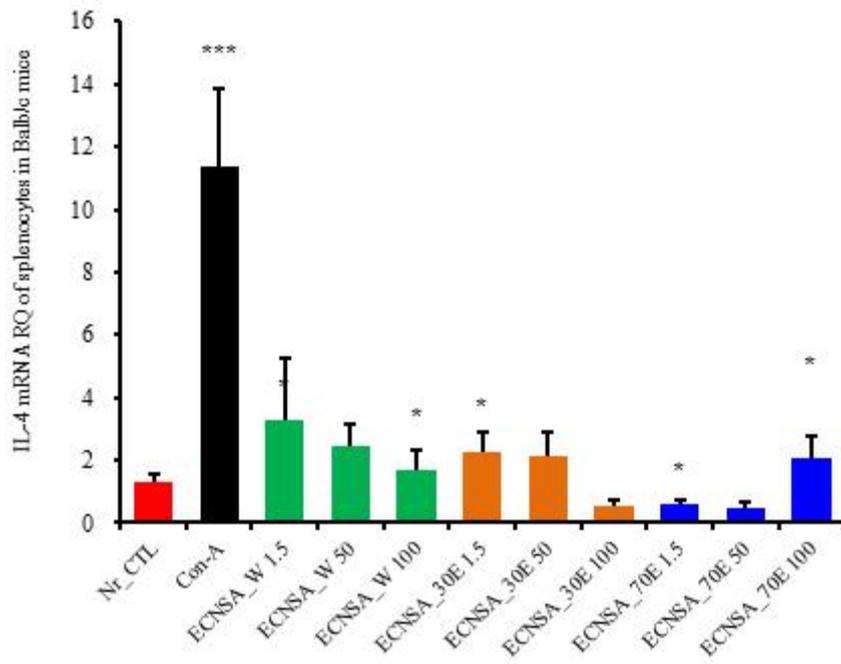


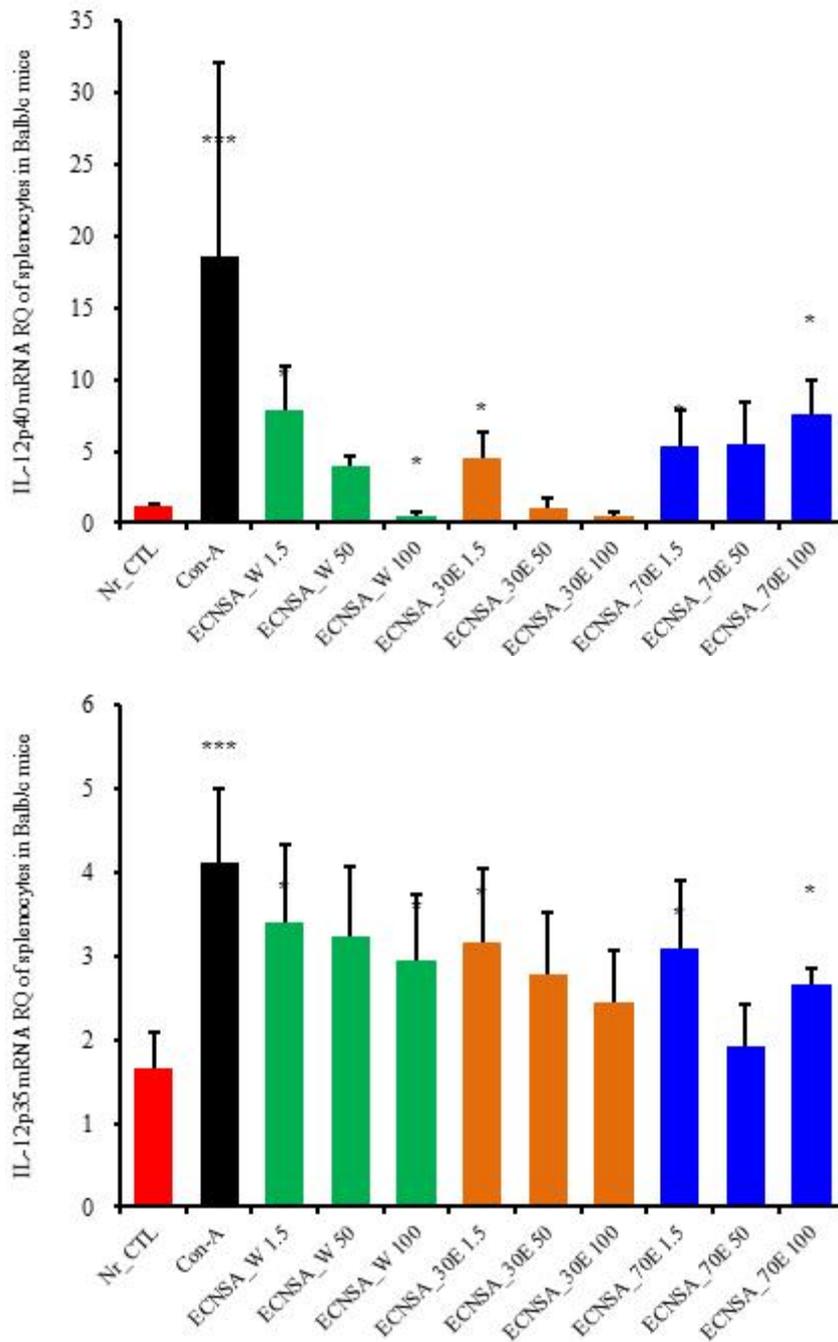




[그림] 세포활성물질 분석 결과







[그림] Real-time RT PCR 결과

(3) in vivo 대식세포로부터의 NO 생성량 측정

(가) 재료 및 방법

① 실험동물

㉞ 실험동물은 8주령의 Balb/c계 생쥐를 사용하였다.

㉞ 시험물질은 에키네시아 배양근 추출물 (물추출물, 30% EtoH 추출물, 70% EtOH 추출물)와 양성대조군 홍삼을 14일간(2주간) 경구 투여하였다.

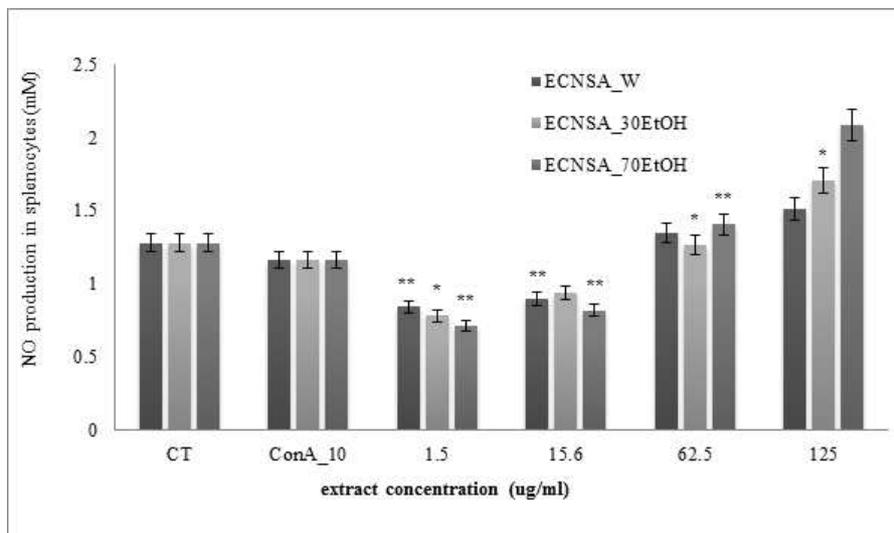
② 실험방법

㉠ 대식세포에서 산화질소 생성능 측정

- Balb/c계 생쥐에 에키네시아 배양근 시료 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)를 14일간(2주간) 경구 투여하였다. 투여 종료 3일전에 proteose peptone(Difco) 10% 수용액 1.5 ml을 생쥐 복강 내에 투여한 후 치사시키고 알코올로 복부를 소독하였다. 복부의 피부를 가위로 자르고 복막을 노출시킨 다음 냉각시킨 HBSS를 주사기로 복강 내에 4.5 ml 주입하고 30초간 복부를 마사지한 후 주사기로 회수하였다. 회수한 세포를 냉각시킨 다음 동일 HBSS용액으로 2회 세척한 후 냉각된 배지(RPMI1640)에 현탁시키고, tryphan blue 염색에 의해 살아있는 세포를 계산하여 2x10⁶cells/ml이 되도록 조정한 후 96 well 배양접시에 200 μl씩 분주하였다. CO₂배양기에서 1-2 시간 배양하여 대식세포를 부착시킨 다음 37℃의 HBSS 용액으로 3회 세척하여 부유세포를 제거하고 100 μl의 배지(RPMI 1640)를 넣는다. CO₂배양기에서 72시간 배양 후 배양상등액을 회수하여 냉동 보존하였다. 배양상등액 100 μl를 취하고 증류수 2 ml과 그리스(Griese) 시약 I 200 μl를 혼합하였다. 신속하게 Griese 시약 II 200 μl를 넣고 교반 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.
 - Griese 시약 I: sulfanilamide 0.5g을 25ml 강염산과 25 ml 증류수의 혼합용액에 용해
 - Griese 시약 II: N-1-naphtylene amidehydrochloride 0.06g을 50 ml의 증류수에 용해

(나) 실험결과

- ① 에키네시아 배양근 30% EtOH와 70% EtOH 처리군이 증가를 나타내었다.



[그림] NO 생산량

(4) in vivo T림프구 활성화 시험

(가) 재료 및 방법

① 실험동물 및 재료

- ㉠ 실험동물은 8주령의 Balb/c계 생쥐를 사용하였다.
- ㉡ 시험물질은 에키네시아 배양근 추출물 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)와 양성대조군 홍삼을 14일간(2주간) 경구 투여하였다.

② 실험방법

㉠ PBMC와 비장에서 활성화 T 림프구의 형광 유세포 분석

- PBMC(Peripheral blood mononuclear cell)는 에키네시아 배양근 시료 2주간 투여 후 heparin을 처리한 3 ml 주사기를 이용하여 심장천과법으로 채혈하였다. 미리 준비한 10 ml의 ACK용액 (8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 ℓ of demineralized water + 0.1 mM EDTA)에 혼합하여 실온에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 제거하였다. 비장을 적출하여 100 mesh로 비장세포를 분리하여 D-PBS로 5 분간 원심분리(1700 rpm)하고 세척한 후 cell strainer(FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 분리된 PBMC와 비장세포를 2 회 1%의 FBS가 함유된 PBS(FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer(FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거하였다. 각각의 시험 관에 PBMC 세포를 5 × 10⁵세포로 조정 한 후 4℃에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-CD25-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD44-cy5.5-PE, anti-CTLA-4-FITC, anti-NK1.1-PE, anti-CD49b-FITC를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시킨 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4+CD25+,CD44+CD69+,CD49b+NK1.1+,그리고 CD25+CTLA-4+의 활성화세포 빈도(%)를 분석하였다.

㉡ 복강세포군의 증식능에 미치는 영향 측정

- Balb/c계 생쥐에 에키네시아 배양근 시료 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)를 14일간(2주간) 경구 투여. 투여 종료 2일전에 2% starch 생리식염수 현탁액 0.5 ml을 생쥐 복강 내에 주사하여 면역시킴. 생쥐를 치사시키고 알코올로 복부를 소독한 다음 복부의 피부를 가위로 자르고 복막을 노출시킨 다음 냉각시킨 HBSS을 주사기로 복강 내에 5 ml 주입하고 30초간 복부를 마사지한 후 주사기로 3 ml 정도를 회수. 회수한 세포를 냉각시킨 다음 동일 HBSS용액으로 2회 세척한 후 이중에 존재하는 복강 세포 수를 직접 현미경 하에서 hemocytometer로 측정. 총 복강세포수의 측정이 끝난 복강 세척액을 4℃에서 400g로 10분간 원심 분리하여 세포 침전물을 얻어 PBS로 현탁함. 각각의 시험 관에 복강세포를 5 × 10⁵세포로 조정 한 후 4℃에서 면역 형광염색(immunofluorescence staining)을 실시. 각각에 anti-CD11b-FITC, anti-CD3-cy5.5-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD14-PE를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시킨 후 3 회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD11b+CD14+,CD3+CD4+,그리고 CD3+CD8+의 활성화세포도(%)

를 분석한 다음 총 세포수를 적용하여 복강세포군의 절대 세포수(absolute number)를 산출한다.

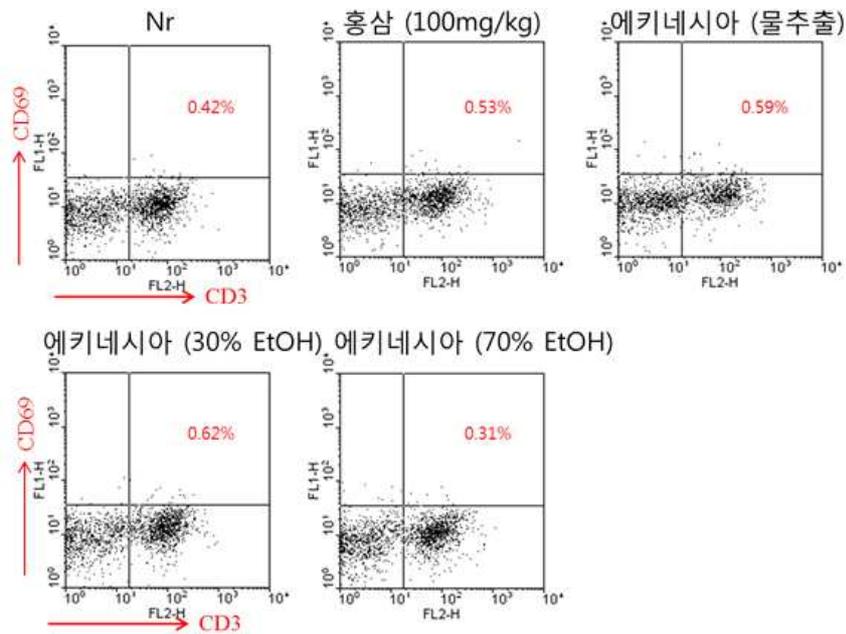
㉔ 비장, 림프 및 흉선의 총 세포수 측정

- Balb/c계 생쥐에 에키네시아 배양근 시료 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)를 14일간 (2주간) 경구 투여. 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 비장, 림프, 그리고 흉선을 분리하여 총 면역세포수를 측정함. Balb/c 생쥐에서 비장, 림프 그리고 흉선을 각각 적출하여 100mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer(FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였고, 이 세포들에 ACK 용액(8.3g NH₄Cl, 1g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypanblue로 염색한 후 세포수를 측정함.

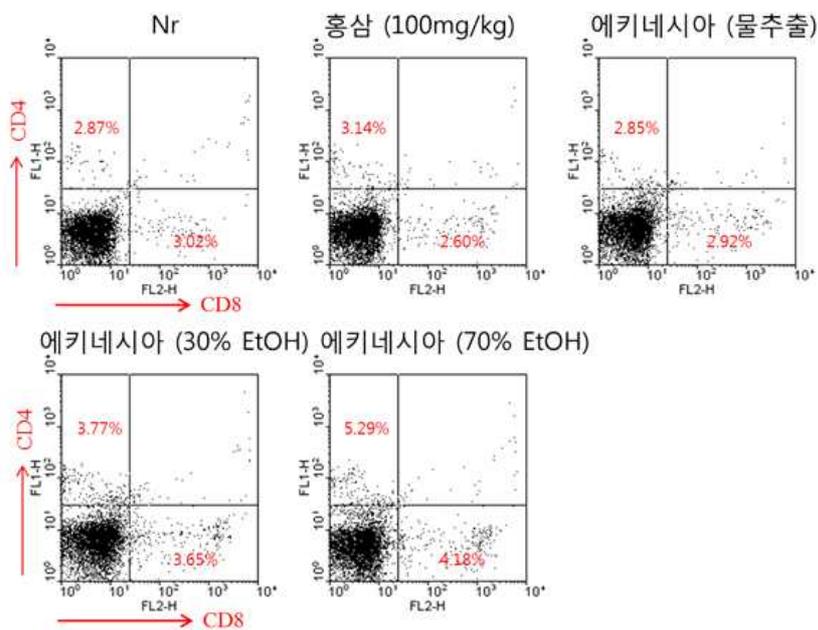
(나) 실험결과

- ① 본 연구결과 2주간 시료를 경구 투여 후 비장 (spleen)에서 활성 CD3+/CD69+T 림프구 세포의 빈도수(%)가 대조군(Normal)이 0.42%로 나타났고, 양성대조군인 홍삼 투여군은 0.53%로 대조군에 비하여 약간 증가를 나타냈다.
- ② 에키네시아 배양근 물추출물과 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물에서 활성 CD3+/CD69+T 림프구 세포의 빈도수(%)가 대조군에 비하여 각각 29%, 33% 증가한 반면 에키네시아 배양근 70% EtOH 추출물에서는 오히려 활성 CD3+/CD69+T 림프구 세포의 빈도수(%)가 대조군에 비하여 감소하는 경향성을 보였다.
- ③ 본 연구결과 2주간 시료를 경구투여 후 복강(peritoneal)에서 활성 Th 림프구 세포의 빈도수(%)가 대조군(Normal)이 2.87%로 나타났고, 홍삼 투여군은 3.14%로 대조군에 비하여 9% 증가를 나타냈다.
- ④ 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물 투여군은 대조군에 비하여 24% 이상 활성 Th 림프구 빈도수가 증가하였고, 에키네시아 배양근 70% EtOH 추출물 투여군은 46% 이상 증가를 나타내었고 에키네시아 배양근 물추출물 투여군은 차이가 없었음(Fig. 8). 즉, 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물과 에키네시아 배양근 70% EtOH 추출물에서는 홍삼 보다 높은 Th 면역세포 활성 빈도가 나타내는 것으로 사료된다.
- ⑤ 본 연구결과 2주간 시료를 경구투여 후 복강(peritoneal)에서 활성 대식세포 (CD11b+) 세포의 빈도수(%)가 대조군(Normal)이 0.67%로 나타났고, 홍삼 투여군은 1.85%로 대조군에 비하여 약간 증가를 나타냄. 에키네시아 배양근 물추출물 투여군과 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물은 대조군에 비하여 각각 23%와 42% 이상 활성 대식세포 빈도수가 증가하였다. 하지만 에키네시아 배양근 70% EtOH 투여군은 차이가 없었음(Fig. 9). 에키네시아 배양근 물추출물과 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물에서 활

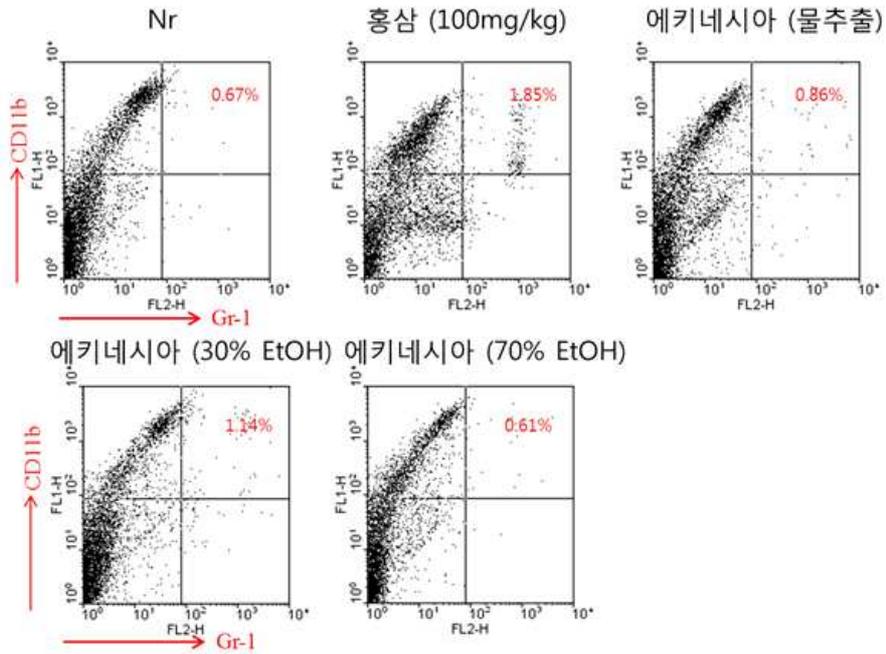
성 대식세포 빈도수가 증가하는 것으로 나타났고, 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물에서는 대조군이 차이가 나타나지 않아 에키네시아 배양근 추출법에 따른 흥미로운 결과를 나타냄. 즉, 에키네시아 배양근 물추출물과 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물이 복강 대식세포의 활성화에 관여하여 생체 내에서 면역 증진 효과를 나타내는 것이 확인되었다.



[그림] 비장 T세포활성



[그림] 복강 T세포활성



[그림] 복강 T세포 형광

(5) In vivo 비장세포에서 T세포활성물질 IL-10, IL-4, IFN-g 생산량 측정 시험

(가) 재료 및 방법

① 시험물질 및 실험동물

㉠ 실험동물은 8주령의 Balb/c계 생쥐를 사용하였다.

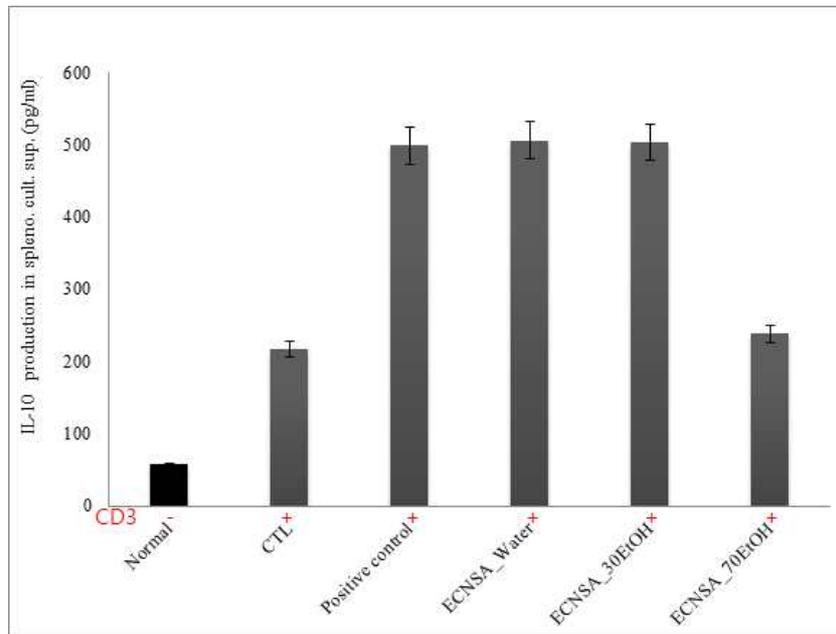
㉡ 시험물질은 에키네시아 배양근 추출물 (물추출물, 30% EtoH 추출물, 70% EtOH 추출물)와 양성대조군 홍삼을 14일간(2주간) 경구 투여하였다.

② 실험방법

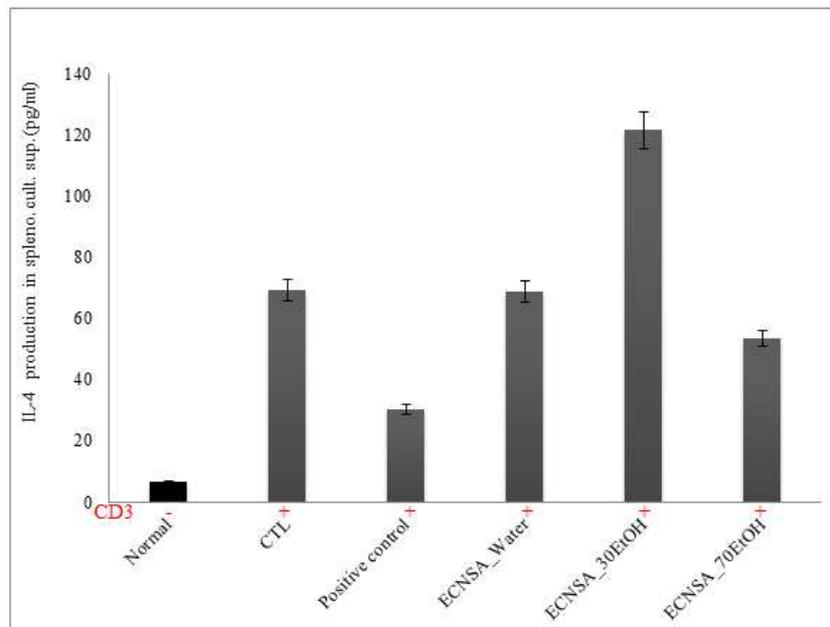
㉠ 14일간 경구투여 후 비장을 적출하여 100 mesh로 비장세포를 분리하였다. 전날 anti-CD3 mAb 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 96 well plate에 coating하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2 회 수세하였다. 분리한 비장세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 anti-CD3 mAb가 coating된 각각의 well에 5×10^5 세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후 원심분리기 2,000 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 200 μl 의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액내의 IFN-g (BioSource, U.S.A.), IL-2(BioSource, U.S.A.), IL-4(R&D system, U.S.A.)의 수준 측정은 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각 well에 배양상층액 50 μl 를 분주하고 2 시간 동안 25 $^{\circ}\text{C}$ 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-IgE conjugated를 넣고 2 시간 방치하였다. 다시 2 회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl 를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl 씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μl 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다

(나) 실험결과

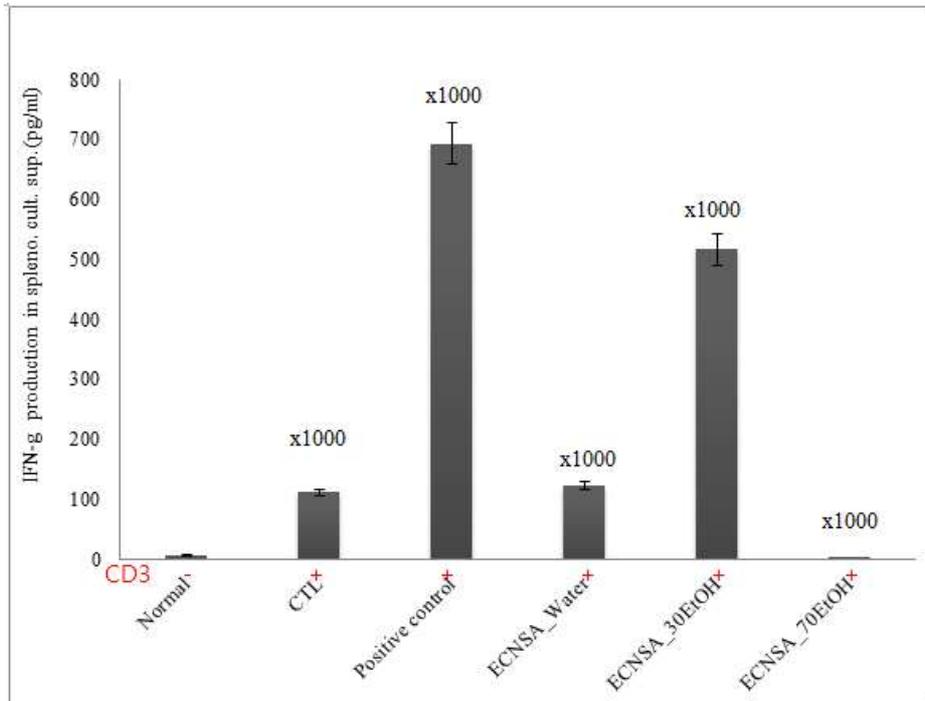
- ① 본 연구결과에서는 2주간 시료를 투여한 후 비장세포를 분리하여 미리 CD3 mAb를 coating한 plate에 48시간 동시 배양하여 배양 상층액내에서 IL-10, IL-4, IFN-g 생산량을 측정된 결과이다.
- ② IL-10 생산량(Fig. 10)은 대조군(CTL)에 비하여 홍삼 투여군, 에키네시아 배양근 물추출물 투여군, 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물 투여군에서 약 50% 이상 IL-10 생산량이 증가를 나타낸 반면, 에키네시아 배양근 70% EtOH 추출물 투여군은 대조군(CTL)에 비하여 IL-10 생산량의 차이는 보이지 않았다.
- ③ 또한, IL-4 생산량(Fig. 11)은 대조군(CTL)에 비하여 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물 투여군에서만 약 30% 이상 IL-4 생산량이 증가를 나타낸 반면, 양성대조군인 홍삼투여군과 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물 투여군은 오히려 IL-4 생산량이 대조군에 비하여 감소하는 경향성을 나타냈다.
- ④ 또한 에키네시아 배양근 물추출물 투여군은 대조군에 비하여 IL-4 생산량의 차이는 보이지 않았다.
- ⑤ IFN-g 생산량(Fig. 12)은 대조군(CTL)에 비하여 양성대조군인 홍삼투여군 그리고 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물 투여군에서만 IFN-g 생산량이 증가를 나타낸 반면, 에키네시아 배양근 70% EtOH 추출물 투여군은 오히려 IFN-g 생산량이 대조군에 비하여 감소하는 경향성을 나타냈다. 또한 에키네시아 배양근 물추출물 투여군은 대조군에 비하여 IFN-g 생산량의 차이는 보이지 않았다.
- ⑥ 본 연구 결과를 토대로, 에키네시아 배양근 추출법 (물추출물, 30% EtOH 추출물, 70% EtOH 추출물)중에서 에키네시아 배양근 30% EtOH 추출물 투여군이 가장 세포성 면역반응을 조절하는 면역증진 효능이 있는 것으로 판단된다.



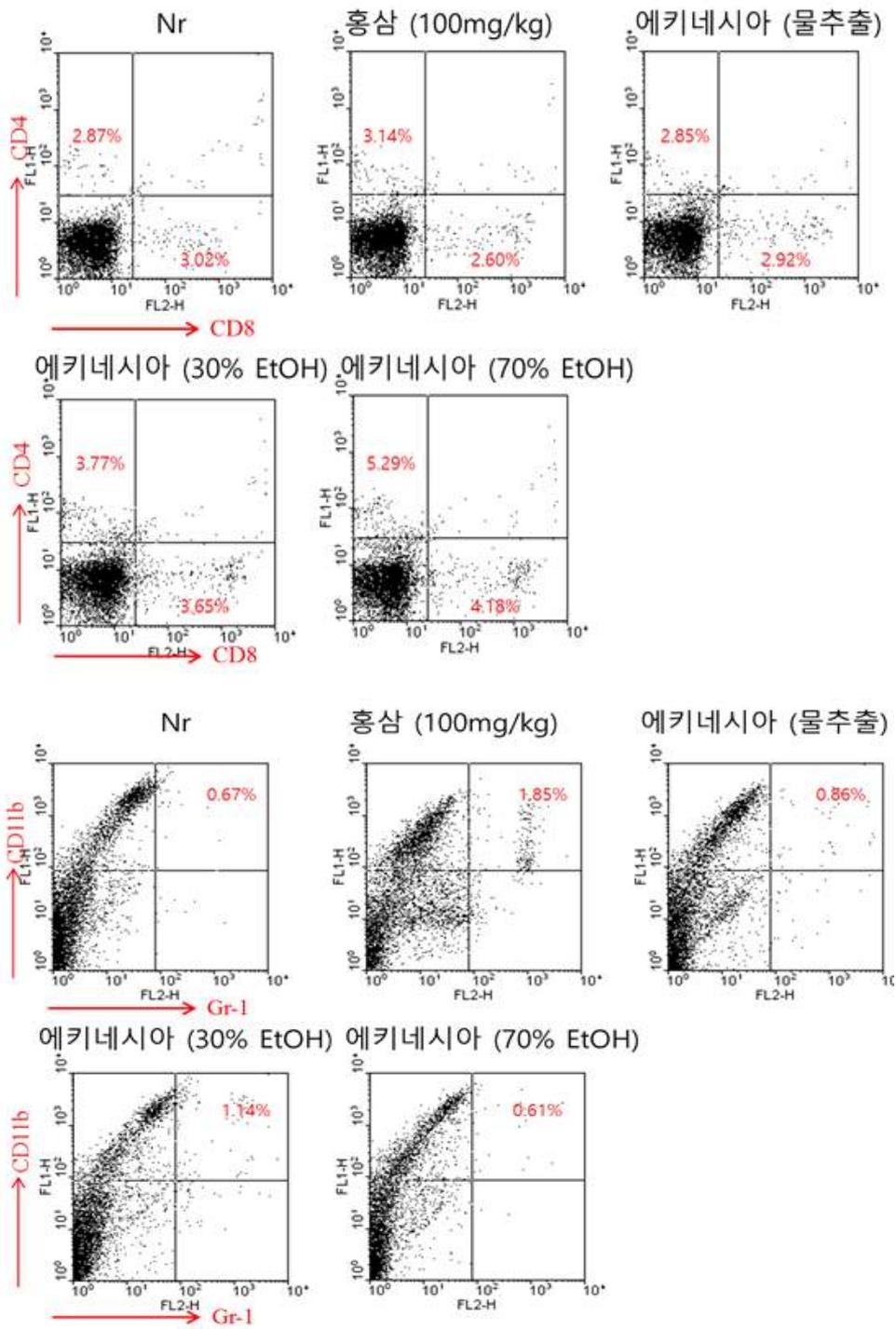
[그림] IL10생산량



[그림] IL4 생산량



[그림] IFN-g 생산량



[그림] 복강내 세포 생존력

2. 연구개발 성과

가. 논문

- (1) Blood flow-improving activity of methyl jasmonate-treated adventitious roots of mountain ginseng, 2017, Laboratory Animal Research, 34(1): 48.

나. 특허

- (1) 국내 출원번호: 제 10-2018-0112354호, 병풀 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름개선용 화장품 조성물, 2018.09.19.
- (2) 국내 등록번호: 제 10-1971837호, 병풀 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름개선용 화장품 조성물, 2019.04.17.
- (3) PCT 출원번호: PCT/KR2019/010948, 병풀 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름개선용 화장품 조성물, 2019.08.27.

다. 인력양성

- (1) 본 연구과제와 관련된 연구개발인력으로 6명을 고용 창출하였음

라. 홍보

(1) 온라인 기사

- (가) 데일리팜: 동국, '마데카크림 센텔라 하이드레이팅 포뮬러' 출시

<http://www.dailypharm.com/News/216486>

- (나) 한국경제TV: 동국제약, 가을·겨울 전용 '마데카크림' 화장품 런칭

<http://www.wowtv.co.kr/newscenter/news/view.asp?bcode=T30001000&artid=A201609220223>

- (다) 소비자경제: 동국제약, '센텔리안24' 등 화장품으로 제2의 도약

<https://cp.news.search.daum.net/p/50255456>

- (라) CCTV뉴스: 홈쇼핑 기초화장품 1위 '센텔리안24' 페이스북 오픈이벤트 실시

<http://www.cctvnews.co.kr/news/articleView.html?idxno=57659>

(2) 지면 기사

- (가) 약발 받은 화장품 잘 나가네_한국경제_21면_2017년 01월 16일

- (나) 원조 넘어선 마데카솔 화장품_한국경제_21면_2017년 03월 13일

- (다) 마데카솔을 화장품으로 바른다_매일경제_B03면_2016년 11월 17일

마. 시제품

- (1) 본 연구를 진행하면서 산삼배양근추출물농축액에 대한 인체적용시험용 시제품을 제조함.

바. 관련제품

- (1) 본 연구를 진행하면서 센텔라아시아티카캘러스 원료를 이용한 기능성 화장품 3종을 출시함.

3. 사업화성과 및 매출실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	-
		관련제품	개발후 현재까지	273억원
			향후 3년간 매출	300억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : - % 국외 : - %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0.91% 국외 : 0.03%
			향후 3년간 매출	국내 : 1.00% 국외 : - %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		-

나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	20억			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	-	-	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	-	-
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	센텔라아시아티카 배양근 함유한 세계 일류 화장품 제품 개발 모색(현재 PCT 출원중)			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	-	-	

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목 표

본 과제는 생물반응기 시스템을 활용하여 본 연구팀에 의해 식품원료로 기인정 된 산삼부 정근과 천연 식의약원료로 유망한 에키네시아와 센텔라아시아티카의 고기능성 원료 대량생산체계를 구축하고, 비임상과 임상을 통해 식·의약원료로서의 안전성을 확보하여 최종적으로 식물기반 기능성 의약품 소재의 개발 및 제품화를 통한 산업화를 하고자 함

2절. 목표 달성 여부

구분	연구개발의 목표	가중치 (%)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1 차 년도	산삼배양근의 혈행개선 효능 평가(비임상)	40	100	In vitro/ex vivo 혈소판 응집 억제 효능 평가
				In vitro/ex vivo Thromboxane B2 생성 억제 효능 평가
				혈액응고 억제효능 평가
1 차 년도	산삼배양근 유효성분의 독성평가(비임상)	30	100	독성평가 시험항목 설정 및 시험기 관 계약
	에키네시아 배양근의 면역효능 평가(비임상)	30	100	In vitro 림프구 증식능에 미치는 영 향 In vitro 세포활성물질 수준 측정
2 차 년도	산삼배양근 유효성분의 독성평가(비임상)	70	100	산삼배양근 추출물 농축액의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 산삼배양근 추출물 농축액의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주간 반복 경구투여 DRF 독성시험 산삼배양근 추출물 농축액의 Beagle dog에 DE(dose escalation)법을 이용한 단회 경구투여 독성시험 산삼배양근 추출물 농축액의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 산삼배양근 추출물 농축액의 배양 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상 시험

				산삼배양근 추출물 농축액의 Sprague-Dawley 랫드 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험
	에키네시아 배양근 유효성분의 면역효능평가 (비임상)	30	100	In vivo 대식세포로부터의 NO 생성량 측정 In vivo T림프구 활성화에 미치는 영향 In vivo 비장세포에서 T세포활성물질 IL-10, IL-4, IFN-g 생산량 측정 시험
3 차 년도	산삼배양근추출물농축액의 독성평가(비임상)	30	100	산삼배양근 추출물 농축액의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주간 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험
	산삼배양근의 기능성 원료 평가	20	100	지표성분 함량 규격 설정 지표성분 함량 분석법 밸리데이션
	산삼배양근의 기능성 임상시험	40	100	인체적용시험 시제품 제작 인체적용시험 계획서 작성
	센텔라아시아티카 배양근 지표성분 추적	10	100	센텔라아시아티카 배양근 지표성분 스크리닝
4 차 년도	산삼배양근의 기능성 임상시험	70	100	인체적용시험 결과보고서 작성
	센텔라아시아티카 배양근 특허 출원	30	100	센텔라아시아티카 피부 개선 관련 특허 출원 및 등록

3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)
- 해당 없음

4절. 관련분야 기여도

1. 학술적 기여 : 산삼부정근, 에키네시아부정근, 센텔라아시아티카 부정근배양 관련 배양 조건최적화, 엘리시테이션 분야에 있어 SCI급 논문 10 여 편(과제기간 4년)을 게재함. 또한 논문 “Blood flow-improving activity of methyl jasmonate-treated adventitious roots of mountain ginseng, 2017, Laboratory Animal Research, 34(1): 48.”을 게재함으로써 생체 내 동물 모델에서 산삼배양근의 혈행개선 효능을 뒷받침해주는 결과를 도출
2. 국내특허 “제 10-1971837호, 병풀 부정근 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및 주름개선용 화장품 조성물” 등록 및 PCT 출원을 통하여 미백 및 주름개선 효능을 가진 센텔라아시아티카 배양근 추출물을 기능성 화장품 소재로의 활용 가능성 확인
3. 국제화장품원료집(ICID)에 “Centella Asiatica Adventitious Root Extract“을 등재함으로써 다양한 화장품 제조 원료로 적용 및 세계 각국 바이어의 검색 가능
4. 본 과제에서 산삼배양근추출물농축액의 진세노사이드 정량, 혈행개선 및 혈중지질 분석, 독성평가 등을 통해 우수성을 확인
5. 추출물 확보 및 DB 구축, 유효성분 및 지표성분의 분리정제와 구조규명, 혈행개선 효능 연구 및 인체수준에서 건강기능식품 원료의 안전성 및 효능평가 체계는 국내 관련 연구자들에게 피드백이 가능
6. 표준화된 기준 및 시험방법을 확립하였으므로 산삼배양근추출물농축액에 대한 품질을 검증 가능
7. 천연원료의 대량생산 및 가공할 수 있는 제조공정의 최적화 및 대량 생산, 가공 공정 확립으로 유사 연구에 적용 가능
8. 혈행개선을 위한 건강기능식품 소재 개발과 효능 입증에 대한 비임상, 임상 등의 과학적인 자료를 제공
9. 기존에 사용되는 화장품 원료에 대한 수입 대체 효과 뿐만 아니라 센텔라아시아티카 배양근 원료 자체를 수출 가능성 확인
10. 향후 산삼배양근을 활용한 건강기능식품, 의약품 등 응용범위 확대

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 산삼배양근의 혈행개선 효과에 대한 연구결과를 바탕으로 향후 자체 연구비 투자 및 타 정부과제 지원을 통해 건강기능식품 및 의약품 등의 관련제품 사업화를 모색할 계획임
2. 본 연구의 연구방법과 연구 결과를 바탕으로 산삼배양근에 대한 새로운 기능성 개발 연구를 시도할 계획임
3. 센텔라아시아티카 배양근의 미백, 주름개선, 항염 등에 대한 연구결과를 바탕으로 기능성 화장품 개발 및 산업화에 활용할 계획임

붙임. 참고문헌

1. Kim-Cuong Le 등. 2018. Biotic elicitation of ginsenoside metabolism of mutant adventitious root culture in *Panax ginseng*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1687 - 1697
2. Kim-Cuong Le 등. 2019. Ginsenoside accumulation profiles in long and short term cell suspension and adventitious root cultures in *Panax ginseng*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(1), 125-134
3. Kim-Cuong Le 등. 2019. Low dose gamma radiation increases the biomass and ginsenoside content of callus and adventitious root cultures of wild ginseng (*Panax ginseng* Mayer). *Industrial Crops and Products*, 130, 16-24
4. Kim-Cuong Le 등. 2019. Modification of the droplet vitrification method of cryopreservation to enhance survival rates of adventitious roots of *Panax ginseng*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(4), 501-510
5. Thanh-Tam Ho 등. 2017. Adventitious root culture of *Polygonum multiflorum* for phenolic compounds and its pilot-scale production in 500 L-tank. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(1), 167 - 181
6. Thanh-Tam Ho 등. 2018. Enhanced production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* and its metabolite discrimination using HPLC and FT-IR methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9563-9575
7. Thanh-Tam Ho 등. 2018. Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 199 - 209
8. Thanh-Tam Ho 등. 2019. Attributes of *Polygonum multiflorum* to transfigure red biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3317-3326
9. Thanh-Tam Ho 등. 2019. Effect of explant type and genotype on the accumulation of bioactive compounds in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(1), 115-124
10. 박소영 등. 2016. Safety Issues of Food Ingredients from Plant Cell, Tissue, and Organ Cultures An Explication. *Food Toxicology*, 151-168
11. 박소영 등. 2018. Production of Ginsenosides by Hairy Root Cultures of *Panax ginseng*. *Production of plant derived natural compounds through hairy root culture*, 203-216
12. 이미경 등. 2018. Optimization of extraction condition of methyl jasmonate treated wild ginseng adventitious root cultures using response surface methodology. *Natural Product*

Sciences, 24(2), 103-108

13. 이종두 등. 2018. Cell culture system versus adventitious root culture system in Asian and American ginseng. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 132(2), 295-302
14. 정구영 등. 2017. Blood flow-improving activity of methyl jasmonate-treated adventitious roots of mountain ginseng. *Laboratory Animal Research*, 33(2), 105-113

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터 식의약품 소재생산 및 산업화 기술				
	(영문) Industrialization Technology for the Mass Production of Functional Compounds from high-value Medicinal Crop Resources by using Bioreactor				
주관연구기관	충북대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 응용생명과학부	
참 여 기 업	동국제약(주)			(성명) 박 소 영	
총연구개발비 (2,680,000 천원)	계	2,680,000	총 연 구 기 간	2015.08.14. ~ 2019.08.13. (4년)	
	정부출연 연구개발비	1,600,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	92명
	기업부담금	1,080,000		내부인원	44명
	연구기관부담금	-		외부인원	48명

○ 연구개발 목표 및 성과

본 과제는 생물반응기 시스템을 활용하여 본 연구팀에 의해 식품원료로 기인정 된 산삼부정근과 천연 식·의약품원료로 유망한 에키네시아의 고기능성 원료 대량생산체계를 구축하고, 비임상과 임상 을 통해 식·의약품원료로서의 안전성을 확보하여 최종적으로 식물기반 기능성 의약품 소재의 개발 및 제품화를 통한 산업화를 하고자 함

○ 연구내용 및 결과

1. Pilot-scale 생물반응기를 이용한 고기능성 식물 식·의약품원료 대량생산 기술개발

- 식·의약 원료용 고기능성 세포주 개발 및 기능성 물질 함량증진 기술 개발
- 고기능성 원료의 대량, 고품질 생산조건 구명
- 생물공정 제어를 통한 고기능성 원료의 생산공정 최적화
- Pilot-scale 생산시스템 이용 고기능성 식·의약품원료 바이오매스 대량생산
- 노지 재배와 비교한 경제성 분석 완료
- 산삼배양근 등 2건 유상 기술이전 완료

2. 고기능성 식물 식·의약품원료의 효능 및 안전성 평가

- 생산원료의 독성시험 및 효능평가

3. 생물반응기 생산 고기능성 식물 식·의약품원료의 산업화

- 원료 식·의약 원료용 소재 평가
- 의약품원료 등재를 위한 비임상, 임상 시험 완료
- 센텔라아시아티카 배양체 함유 화장품(센텔라24)의 제품화
- 센텔라아시아티카 배양체 함유 화장품(센텔라24) 매출 26,095백만원 달성으로 성공적인 산업화

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 연구결과의 학술적 성과는 당해년도 SCI급 논문의 경우 목표치의 300%를 달성하였고, 총 연구기간 동안은 목표치 대비 166%(10편) 초과달성 하였고, 논문 IF도 3~4였음
- 특허출원과 등록은 성과목표에 다소 못미쳤으나, 기능성 고함유 배양근 제조 방법 2건을 유상 기술이전하였고 400%를 초과하는 제품화 실적과 매출을 달성하여 '산업화'라고하는 연구목표를 충분히 달성하였음
- 산삼배양근 추출물의 개별 인정형(혈액순환 개선) 기능성 원료가 될 것임
- 산삼배양근 추출물을 이용한 의약품 원료화 : 혈관계질환-고지혈증, 협심증, 당뇨병
- 셀텔라아시아티카는 수입원료를 기내배양근으로 대체함으로써 나고야 대응 바이오소재로 중요한 의미가 있음
- 식물세포조직배양체로서는 국내에서 첫 번째 부정근 원료의 개별인정형 제품이 되는 것으로 관련 산업을 활성화 시키는데 이바지할 것임
- 의약품원료 허가 취득시 세계적으로 주목을 받고 있는 천연물신약에 한 걸음 더 다가갈 것으로 기대됨

자체평가의견서

1. 과제 현황

			과제번호	315013-4	
사업구분	농생명사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터 식의약품 소재생산 및 산업화 기술			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	충북대학교 산학협력단			연구책임자	박소영
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.08.14 - 2016.08.13	400,000	270,000	670,000
	2차연도	2016.08.14 - 2017.08.13	400,000	270,000	670,000
	3차연도	2017.08.14 - 2018.06.13	334,000	225,000	559,000
	4차연도	2018.06.14 - 2019.08.13	466,000	315,000	781,000
	계	48개월	1,600,000	1,080,000	2,680,000
참여기업					
상대국				상대국연구기관	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019년 9월 23일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충북대학교 산학협력단	부교수	박소영

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을
확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구결과는 국내 최초로 2003년 본 연구실에서 식품으로 식약처 인증을 받은 산삼배양근을 개별인증형 기능성 원료로 인증받기 위한 연구이며, 이 과정에서 산삼배양근과 에키네시아배양근에서 신규물질을 물질을 찾고 동정하였으며 효능을 분석하여 특허출원하였기에 원천기술로서의 창의성이 매우 우수하다고 판단함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 약용식물의 배양근을 이용한 노지재배 식물, 혹은 수입대체 바이오소재로 대량생산 플랫폼을 구축하고 산업화를 달성했다는 점에서 식물천연물 산업에서 무균기내배양의 가능성을 보여준 좋은 선례로 앞으로 동 분야 연구와 산업화의 발전에 있어 큰 파급 효과를 불러 올 것으로 판단 됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구를 통해 개발 된 센텔라아시아티카 부정근은 화장품의 원료로 이용되어 2018년에 6가지의 화장품으로 개발되어 홈쇼핑 등을 통해 많은 매출을 올렸으며, 산삼배양근은 의약품원료로 인증받기 위해 비임상과 임상시험을 실시하여 기능성을 인정받았기에 추후 기능성 원료로 산업적으로 유용하게 활용 될 것임

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1세부, 1협동과 2협동 연구팀은 유기적으로 연구 네트워크를 형성하며 성과목표를 달성하기 위해 성실히 노력하였고 연구결과를 공유하고 소통하여 우수한 연구성과를 도출하였음. 연구를 수행한 대학의 연구원이 공동연구한 2협동으로 신규취업을 함으로써 실질적인 기술이전이 이루어짐. 단지 연구실적을 내는 것이 아니라 연구결과를 진정한 산업화로 연결하기 위해 최선을 다하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구를 통해 도출된 성과는 연구결과의 학술적 성과는 당해년도 SCI급 논문의 경우 목표치의 300%를 달성하였고, 총 연구기간 동안은 목표치 대비 166%(10편) 초과달성 하였음(논문 IF 3~4). 또한 특허출원과 등록은 성과목표에 다소 못미쳤으나, 기능성 고함유 배양근 제조 방법 2건을 유상 기술이전하였고 400%를 초과하는 제품화 실적과 매출을 달성하여 ‘산업화’라고하는 연구목표를 충분히 달성하였음

II. 연구목표 달성도

구 분	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산삼배양근 고기능성 부정근 라인(line) 선발 및 기능성물질 함량 증진 기술개발 ○ Agrobacterium Ri-plasmid를 이용한 모상근 유도 ○ 산삼부정근 unknown 특이성분 분리 ○ 산삼 배양근의 혈행개선(및 혈당조절)효능평가 ○ 에키네시아 기능성 의약품 개발 ○ 에키네시아 배양근의 면역효능평가 및 지표성분의 분석 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 산삼배양근 고기능성라인 유도 및 선발기술 ▶ 아그로박테리움을 이용한 라인 유도 ▶ HPLC 특이성분 검색 ▶ 혈행개선 효능 분석 ▶ 에키네시아 부정근 대량증식 ▶ 지표성분의 분리
2년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산삼배양근 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화 ○ Agrobacterium Ri-plasmid를 이용한 모상근 유도 ○ 산삼부정근 unknown 특이성분 추가적 분리 ○ 산삼 배양근의 효능평가 및 원료의약품 평가 ○ 에키네시아 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화 ○ 생산 배양근의 세포독성 시험 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 고기능성 원료생산 조건 확립 ▶ 아그로박테리움을 이용한 라인의 기능성분석 ▶ 특이성분 추가적 검색 ▶ 효능분석 및 평가 여부 ▶ 에키네시아 배양근의 급성독성 여부
3년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot-scale 생산시스템에서 유효성분 고함유 바이오메스 대량생산 ○ 산삼 배양근의 혈행 개선 효능평가 	20	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대용량 생물반응기 배양조건 개발 ▶ 혈행개선 및 혈당조절 효능평가 여부 ▶ 효능평가 기준 및 시험방법 확립

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산삼 배양근의 기능성 원료 평가 ○ 기능성 물질함량 측적을 위한 배양조건 구명 ○ 셀렐라아시아티카 고기능성 원료의 대량·고품질 생산 조건 최적화 ○ 셀렐라아시아티카 배양근 지표성분분석 			<ul style="list-style-type: none"> ▶ 기능성물질 20% 이상 증진 ▶ 고기능성 원료의 생산수율 증진 ▶ 지표성분 분리
4년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고기능성 원료의 생산공정의 경제성 분석 ○ 추출물 대량생산 기술 개발 ○ 산삼배양근의 기능성 평가 및 기능성임상시험 ○ 셀렐라아시아티카 추출물 대량생산 기술 개발 ○ 셀렐라아시아티카 배양근 화장품 원료 평가 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 생산시스템의 경제성 ▶ 표준추출물 대량생산공정 개발 ▶ 기준 및 시험법 확립 ▶ 대량생산공정 개발 ▶ 기능성 확인
최 종	생물반응기를 이용한 고기능성 식물 화장품 및 의약품 원료 대량증식			대량생산 체계 및 산업화구축 여부
	합계	100	400	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

종합적으로 본 연구결과는 학술적인 면과 연구성과의 산업화라고 하는 면에서 목표한 바를 성실히 달성하였다고 판단되며, 이 과정에서 연구팀간에 원활한 기술적 교류와 함께 인적교류도 이루어져 좋은 연구성과로 연결되었다고 생각 됨. 본 연구를 통해 동분야 학문과 산업이 발전하는데 기초를 제공했다고 생각 됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 정량적 연구성과면에서 연국논문의 비SCI논문 실적이 미흡하나, 이는 대부분의 논문이 SCI급 논문으로 게재가 되었기 때문에 오히려 초과 달성한 것으로 이해해 주시기 바람
- 특허출원, 등록이 목표치에 다소 못미쳤으나 제품화, 매출 및 홍보 등 특허부분 부족한 성과를 상쇄할 만큼 산업화 실적이 높음을 고려해 주시기 바람

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 산삼배양근의 혈행개선 효과에 대한 연구결과를 바탕으로 향후 자체 연구비 투자 및 타 정부과제 지원을 통해 건강기능식품 및 의약품 등의 관련제품 사업화를 모색할 계획임
- 본 연구의 연구방법과 연구 결과를 바탕으로 산삼배양근에 대한 새로운 기능성 개발 연구를 시도할 계획임
- 셀렐라아시아티카 배양근의 미백, 주름개선, 항염 등에 대한 연구결과를 바탕으로 기능성 화장품 개발 및 산업화에 활용할 계획임

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

o 본 연구결과는 특허와 앞으로의 특허를 위한 기술들이 상당수 포함되어 있기에 보안이 필요한 과제임

2. 연구기관 자체의 검토결과

o 연구기관 자체의 검토결과 역시 연구책임자 의견과 동일함

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	생물반응기 시스템 이용 약용식물 부정근으로부터 식의약품 소재생산 및 산업화 기술			
주관연구기관	충북대학교 산학협력단	주관연구책임자	박 소 영	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,600,000	1,080,000	-	2,680,000
연구개발기간	2015. 08. 14 - 2019. 08. 13 (48개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
제1세부: 충북대학교	
○ 산삼배양근의 기능성 부정근 라인(line) 선발 및 기능성물질 증진 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> - 캡슐화에 의한 장기저장기술, 냉동 보존기술을 확립하여 기능성 부정근 라인의 장기저장이 가능케 됨으로서 우수한 라인으로 선발된 부정근의 장기저장이 가능하게 되었음 - β-glucosudase 생산 균주 4종류 처리를 통해 산삼배양근의 주요 기능성 성분인 사포닌과 진세노사이드 함량 증진을 확인 하여 기능성 물질 증진 연구목표를 달성함
○ 산삼배양근의 고기능성 원료의 대량 생산 조건 최적화 - Pilot-scale 생산시스템에서 유효성분 고함유 바이오메스 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> - 생물반응기 형태에 따른 바이오메스를 조사한 결과 Ballon 타입이 Drum type에 비해 생산량이 높게 나타나 산삼부정근 바이오메스 생산에 효율적임을 구명하였음 - 점중밀도에 따른 바이오메스는 10g·L⁻¹밀도로 처리시 가장 우수하였음을 구명하였으며, 산삼 부정근과 6년근 인삼의 사포닌 함량을 분석한 결과 산삼 부정근의 사포닌함량이 더 우수하였음
○ 센텔라아시아티카 배양근의 고기능성 부정근 라인 선발 및 성장조건, 기능성물질 증진 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 센텔라 잎 유래 부정근이 생육이 가장 우수함을 구명하였으며, 최적의 성장조건은 MS+NAA 1mg·L⁻¹+수크로스 5%가 가장 우수함을 구명하여 3년차 목표를 달성함 - 센텔라 부정근과 야생 병풀식물체의 유효성분 및 특이적 기능성물질 함량 비교에서 센텔라 부

	정근의 MS, AS, MA, AA, 등 Triterpenoids는 야생 병풀 식물체보다 낮게 나타났지만, 센텔라 부정근의 특이적 기능성물질(Araliadiol)은 더 높게 나타남을 구명하여 연구목표를 달성함
○ 센텔라아시아티카 배양근의 Pilot-scale 생산시스템에서 유효성분 고품유 바이오메스 대량생산	- 생물반응기 형태에 따른 바이오메스를 조사한 결과 Ballon 타입이 Drum type에 비해 생산량이 1.3배 높게 나타나 바이오메스 대량 생산에 효율적임을 구명하여 연구목표를 달성하였음
○ 센텔라아시아티카 배양근의 특이성분 및 효능 구명	- 센텔라 부정근의 특이성분 CAC1와 CAC2 발굴하였음 - CAC1과 CAC2의 효능구명실험에서 항염효능과 면역증강 효능을 구명함 - 센텔라아시아티카 특이성분 추출시 메탄올 함량이 높을수록 특이성분 함량이 증진됨을 구명하여 3년차 목표를 달성함
제1협동: 한국한의약연구원	
○ 산삼배양근 추출물의 표준화	- 산삼배양근으로부터 경제성과 효율성을 고려하여 표준화와 생산공정을 개발하였음. - 기준 및 시험법 개발을 위하여 Ginsenoside Rg3, Rh1, Rg5, Compound K의 동시분석법을 개발하였으며, 이로부터 함량 기준이 제시되었고, 품질관리법이 개발되어 연구목표 대비 100% 달성하였음.
○ 센텔라아시아티카 부정근의 표준화	- 센텔라 부정근으로부터 유효성분 추적에 위하여 항산화, 항염, 항균 효능 평가를 위한 in vitro 시험을 수행하였으며, 센텔라 대비 센텔라 부정근이 항염증 효과가 우수함이 확인되었음. - 센텔라 부정근으로부터 유효 및 지표성분이 확인되어 이를 기반으로 한 추출 조건이 개발되어 연구목표 대비 100% 달성하였음.
제2협동과제 동국제약	
○ 산삼배양근 추출물 농축액의 독성평가(GLP)	- Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 4주간의 회복기간에 나타나는 변화를 확인하여 시험물질의 독성을 평가하였음 - 본 시험조건 하에서 산삼배양근 추출물 농축액의 무독성량(no observed adverse effect level. NOAEL)은 암수 모두 3000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않음을 확인하여 연구목표를 달성한 것으로 판단됨
○ 산삼배양근 기능성 원료 평가	- 건강기능식품 개별 인정형 소재 개발을 위해 산삼배양근추출물농축액의 지표성분으로 Rg3, Rg5, Rk1을 선정 및 기준을 설정하였으며, HPLC법을 이용하여 지표성분의 분석법을 확립하고자 분석법 밸리테이션을 수행하여 연구목표

○ 산삼배양근 혈행개선 효능 평가	를 달성하였음 - 인체적용시험을 위해 시험기관과 연구자를 선정하였으며, 18년 4월에 IRB 신청하였음 - 혈행개선 효능 평가 비임상 시험을 진행하여 18년 7월에 완료하였음
○ 센텔라아시아티카 배양근 지표성분 추적	- HPLC를 이용해 센텔라 식물체와 배양근의 크로마토그램을 비교분석하고 식물체와 달리 배양근에서 특이적으로 나타나는 성분을 확인하여 이를 지표성분으로 활용하였음

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 전시		
												SCI	비SCI						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	7	5		2		1					6	5		16		11		1		
연구기간내 달성실적	5	3		2	5	8	26, 23 1		10		12	1		25		11		8	3	
달성율(%)	71	60		100		400					200	20		156		100		800		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	약용식물의 부정근 배양 생물반응기 시스템의 플랫폼 기반 구축
②	Pilot 스케일의 탱크배양을 통한 유효성분 고함유 바이오메스 대량생산
③	배양근 추출물의 표준화 및 지표성분 탐색
④	임상, 비임상을 통한 배양근의 바이오소재 원료화로 산업화

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v			
②의 기술					v		v			
③의 기술		v				v				
④의 기술		v						v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> BT 기반 식물세포배양을 통해 국제적으로 고부가가치 산물인 천연물을 생산하는 분야에서 우리나라는 세계적 수준 특수 기반기술을 원천기술화 연중 계획생산이 가능한 생물반응기 시스템에서의 대량생산 기술, 환경조절 기술 개발 완료
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 글로벌 요구 규격에 적합한 품질 관리, 효율성 제고 공정 기술 개발
③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 기능성식물 원료의 안전성/안정성 확보 및 품질 제고
④의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 식물세포 및 기관 배양을 통한 향후 보건의료분야에 사용될 의약품 생산 산업을 독보적으로 확립해 나갈 것으로 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						

														IF					
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건		건		명		
가중치																			
최종목표	8	6		4		2	1					8	5		19		13		3
연7기간내 달성실적	5	3		2	5	8	26,231		10			12	1		25		11		8 3
연7종료후 성과창출 계획	1	1		2		3	0					2	0		3		2		2

핵심기술명 ¹⁾	테카성분이 증가된 센텔라아시아티카 모상근 라인		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2주	실용화예상시기 ³⁾	2021
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	전문가 기술지도 필요		

핵심기술명 ¹⁾	산삼배양근 유래 신규 물질		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2주	실용화예상시기 ³⁾	2021
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	전문가 기술지도 필요		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)