

RS-2021-  
IP821024

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
기술사업화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004689-01

# 국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발

2024.07.09.

주관연구기관 / 주영엔에스(주)  
공동연구기관 / 한국생명공학연구원

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

국내 미래농산자원을 이용한

개별인정형 기능성 식품 개발

최종보고서

2024

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01. ~ 2023. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024.07.09.

주관연구기관명 : 주영엔에스주식회사 (대표자) 오성훈 (인)  
공동연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김장성 (인)

주관연구책임자 : 권창주 (인)  
공동연구책임자 : 노문철 (인)

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		기술사업화지원사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)		공공기술 사업화 촉진(식품)				연구개발과제번호	
						821024-03	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0906	60%	LB1801	30%	LA0904	10%
	농림식품 과학기술분류	PA0201	70%	PA0204	20%	PA0205	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발					
연구개발과제명		국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 ~ 2023. 12. 31					
총 연구개발비		총 1,100,000 천원 (정부지원연구개발비: 825,000 천원, 기관부담연구개발비 : 275,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준(4 ) 종료시점 목표(8 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용		최종 목표					
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 미래농산자원인 개머루덩굴을 이용한 피부의 과민면역 상태 개선용 개별인정형 기능성 식품을 개발하여 인체적용 시험에서 효과를 검증하고 시제품을 생산함.</li> <li>○ 개발 소재의 제품화를 통한 사업화</li> <li>○ 야생 개머루 덩굴의 작물로서의 가치와 농가 소득 증대에 기여</li> </ul>					
연구개발 목표 및 내용		전체 내용					
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 소재의 원물 표준화 자료 구축                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 원재료 유사종 확인</li> <li>• 부위별 유효성분 함량 비교</li> <li>• 산지별 평가 비교</li> <li>• 채취 시기별 유효성분 함량 비교</li> <li>• 보관온도 설정(냉장, 실온)</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 반응표면분석을 이용하여 유효성분 함량이 높고 생리활성이 우수한 최적 조건 도출</li> <li>• 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시제품 제작</li> <li>• 표준화된 원재료와 제조공정을 이용하여 3개 롯트 이상의 대량 생산 실시</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 품질관리 기준 마련                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 주요성분 규명 및 표준물질 제작</li> <li>• 분석법 확립: 개머루 덩굴 추출물의 성분 연구 및 분석법 확립을 통하여 추가적인 지표성분 평가</li> </ul> </li> </ul>					

연구개발 목표 및 내용	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 소재의 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 단회투여 독성 시험</li> <li>• 2주 DRF/90일 반복 투여 독성시험</li> <li>• 유전 독성 시험</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 기준규격 설정 및 시험법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 롯트 별 지표성분 함량 및 유해물질 등 검사 후 기준규격 및 규격에 관한 시험법 확립</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 유효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 알레르기 관련 면역세포를 이용한 면역력 효과 연구: CCL-17 저해활성 등</li> <li>• 아토피 피부염 동물모델을 이용한 효능평가 및 기전연구</li> <li>• 알레르기 관련 면역세포를 이용한 작용기전 연구: MAPK와 NF-κB의 활성화 등</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 안정성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 기준규격 중 경시적 변화가 있는 항목 및 물리적인 추가 항목 선정하여 안정성 평가 지표를 설정</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 과립, 정제, 캡슐, 액상(음료) 제형 연구</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 개시(프로토콜 개발, CRO 선정, IRB 승인)</li> <li>• 종료(결과보고서 확보 및 분석)</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 제품화 및 사업화</li> </ul>
	목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 소재의 원물 표준화</li> <li>○ 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화</li> <li>○ 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시작품 제작</li> <li>○ 기능성 소재의 품질관리 기준 마련</li> <li>○ 기능성 소재의 안전성 평가</li> <li>○ 기능성 소재의 기준규격 설정 및 시험법 확립</li> <li>○ 기능성 소재의 유효능 평가</li> <li>○ 기능성 소재의 안정성 평가</li> <li>○ 기능성 소재의 인체적용시험</li> </ul>
	1단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 소재의 원물 표준화 자료 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 원재료 유사종 확인 : 유전정보 확보, 재배원물의 유전자 검사 및 성분검사 비교 연구</li> <li>• 사용부위 : 부위별 유효성분 함량 비교</li> <li>• 원산지 : 산지별 평가 비교</li> <li>• 채취시기 : 채취 시기별 유효성분 함량 비교</li> <li>• 보존 : 보관온도 설정(냉장, 실온)</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 선행연구에서 에탄올 끓는점(78℃)을 상회한 추출방법(88℃)으로 scale up(tank 추출) 제조시 유증기 발생 및 압력상승에 의한 위험성 문제 발생됨.</li> <li>• 반응표면분석을 이용하여 유효성분 함량이 높고 생리활성이 우수한 최적 조건 도출</li> </ul> </li> </ul>

연구개발 목표 및 내용	1단계	내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시작품 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준화된 원재료와 표준화된 제조공정을 이용하여 3개 롯트 이상의 대량생산 실시</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 품질관리 기준 마련 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 주요성분 규명 및 표준물질 제작: 선행연구에서 지표 물질로 설정된 (+)-Catechin 및 Ethyl gallate는 천연물의 폴리페놀로 널리 알려져 있어 원재료를 대표하는 주요 활성성분을 추가 확보하고자 함.</li> <li>• 분석법 확립: 개머루덩굴 추출물의 성분 연구 및 분석법 확립을 통하여 추가적인 지표성분으로서의 요건을 평가하고자 함.</li> <li>• 밸리데이션 : 설정된 지표성분에 대한 분석법 밸리데이션 실시</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 단회투여 독성 시험</li> <li>• 2주 DRF/90일 반복 투여 독성시험</li> <li>• 유전 독성 시험</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 기준규격 및 시험법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 롯트별 지표성분 함량 및 유해물질 등 검사 후 기준규격 및 규격에 관한 시험법 확립</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 유효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 알레르기 관련 면역세포를 이용한 면역력 효과 연구 : CCL-17 저해활성 등</li> <li>• 아토피피부염 동물모델을 이용한 효능평가 및 기전연구</li> <li>• 알레르기 관련 면역세포를 이용한 작용기전 연구 : MAPK와 NF-κB의 활성화 등</li> <li>• 아토피피부염 동물모델을 이용한 효능 검증 및 유효용량 결정</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 안정성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 기준규격 중 경시적 변화가 있는 항목 및 물리적인 추가항목 선정하여 안정성 평가 지표를 설정.</li> <li>• 포장재질, 포장방법, 포장단위를 설정</li> <li>• 보존 및 유통온도 설정</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 개시(프로토콜 개발, IRB 승인)</li> </ul> </li> </ul>
			목표
	2단계	내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성 소재의 안정성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설정된 항목으로 유통기한 설정 실험 수행 후 결과도출</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 과립, 정제, 캡슐, 액상(음료) 제형 연구</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 종료(결과보고서 확보 및 분석)</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 소재의 제품화 및 사업화</li> </ul>

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개머루덩굴을 이용한 기능성 소재의 원물 표준화 및 제조공정 표준화 자료 구축</li> <li>○ 개머루덩굴을 이용한 기능성 소재의 품질관리 기준을 마련하고 기준 규격 설정 및 시험법 확립</li> <li>○ 개머루덩굴을 이용한 기능성 소재의 효력시험 등을 통한 기능성, 안전성, 안정성 자료 확보</li> </ul>											
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개머루덩굴을 이용한 기능성 소재의 시제품 생산을 통한 제품화 및 사업화</li> <li>○ 개별인정 기능성 원료 신청자료를 확보하고 인체적용시험을 통하여 과민면역 개선용 건강기능식품 개별인정형 기능성 원료 등록</li> <li>○ 주영엔에스(주)는 기능성 원료의 품질관리 노하우를 기반으로 건강기능식품 상용화 추진</li> <li>○ 국내 신규 농산물 보급으로 재배 지역 농가 소득 증대 및 산업구조 변화에 기여</li> <li>○ 국내용 건강기능식품 개발 및 당사의 기능성 소재 수입대체 및 역수출의 기회로 삼을수 있음.</li> <li>○ 본 연구개발 경험을 통하여 천연물을 이용한 식품, 의약품 개발을 더욱 확산시킴으로써 국내 관련 산업 및 시장의 확대가 기대됨.</li> <li>○ 기능성 소재 개발을 통한 국가 생산성 증가 효과를 나타낼 것으로 기대됨.</li> </ul>											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신제품	
	2		2					생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	개머루덩굴		면역조절		대량생산		표준화		기능성식품			
영문핵심어 (5개 이내)	Ampelopsis glandulosa		Immunoregulation		Mass production		Standardization		Functional food			

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
1) 개발대상 기술의 개요 .....	7
2) 연구개발 과제 관련 현황 및 문제점 .....	7
3) 과민면역에 대한 기능성 식품소재의 필요성 증대 및 중요성 .....	9
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	10
1) 기능성 소재의 원물 표준화 .....	10
2) 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화 .....	16
3) 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시제품 제작 .....	19
4) 기능성 소재의 품질관리 기준 마련 .....	22
5) 기능성 소재의 안전성 평가 .....	42
6) 기능성 소재의 기준규격 설정 및 시험법 확립 .....	50
7) 기능성 소재의 유효능 평가 .....	52
8) 기능성 소재의 안정성 평가 .....	59
9) 기능성 소재의 시제품 생산 .....	63
10) 기능성 소재의 인체적용시험 .....	69
11) 기능성 소재의 제품화 및 사업화 .....	74
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	77
1) 연구수행 결과 .....	77
2) 목표 달성 수준 .....	84
4. 목표 미달 시 원인분석 .....	84
1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용 .....	84
2) 자체 보완활동 .....	84
3) 연구개발 과정의 성실성 .....	85
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	85
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	85
별첨 자체평가 의견서	
연구성과 활용계획서	
연구부정행위 예방 확인서	

최종보고서							보안등급		
							일반[ <input checked="" type="checkbox"/> , 보안[ <input type="checkbox"/> ]		
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명		기술사업화지원사업		
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원				내역사업명 (해당 시 작성)		공공기술 사업화 촉진(식품)		
공고번호	농축2021-41호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
				연구개발과제번호		821024-03			
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0906	60%	LB1801	30%	LA0904	10%		
	농림식품과학기술분류	PA0201	70%	PA0204	20%	PA0205	10%		
총괄연구개발명 (해당 시 기재)	국문	국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발							
	영문	Functional food development using domestic future agricultural resources							
연구개발과제명	국문	국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발							
	영문	Functional food development using domestic future agricultural resources							
주관연구개발기관	기관명	주영엔에스(주)			사업자등록번호				
	주소	서울시 송파구 송파대로 201 테라타워2 A동 1403~1410호			법인등록번호				
연구책임자	성명	권창주			직위		이사		
	연락처	직장전화			휴대전화				
		전자우편			국가연구자번호				
연구개발기간	전체	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)							
	단계	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)						
		2단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년 개월)						
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계	연구개발 외 지원금
		현금	현물	지방자치 단체	기타( )				
총계	825,000	27,500	247,500				852,500	247,500	1,100,000
1단계	1년차	225,000	7,500	67,500			232,500	67,500	300,000
	2년차	300,000	10,000	90,000			310,000	90,000	400,000
2단계	1년차	300,000	10,000	90,000			310,000	90,000	400,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고			
공동연구개발기관	한국생명공학연구원	노문철	책임연구원			공동	정부출연	연	
위탁연구개발기관									
연구개발기관 외 기관									
연구개발과제 실무담당자	성명	오재훈			직위		부장		
	연락처	직장전화			휴대전화				
		전자우편			국가연구자번호				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 02월 2일

연구책임자: 권창주

주관연구개발기관의 장: 주영엔에스(주) 대표이사 오성훈 (직인)

공동연구개발기관의 장: 한국생명공학연구원 원장 김장성 (직인)

농림축산식품부장관 · 농림식품기술기획평가원장 귀하



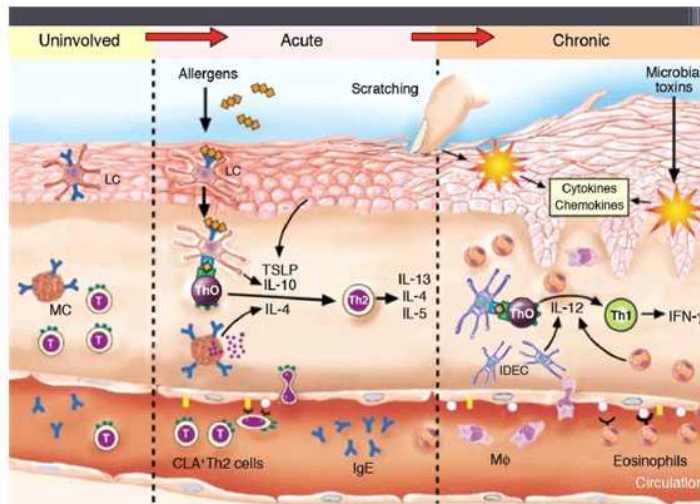
# 1. 연구개발과제의 개요

## 1) 개발 대상 기술의 개요

- 개머루덩굴을 이용한 피부의 과민면역상태 개선용 개별인정형 기능성 식품을 개발함.
- 주관연구개발기관(주영엔에스주식회사)은 공동연구개발기관(한국생명공학연구원)이 보유한 기술 “개머루덩굴 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물(특허 등록번호 : 10-2006998-0000)” 을 이전하여 사업화 대상 기술로 이용함.
- 본 연구에서는 과민면역 반응에 관한 조절의 가능성을 규명하기 위해 공동연구개발기관인 한국생명공학연구원과 연계하여 개머루덩굴 추출물의 표준화를 확립하고, 동물시험 및 인체적용시험을 수행할 예정임.
- 개발된 면역조절용 기능성 소재는 KFDA 건강기능식품 기능성 원료 인정을 추진하고, 개발된 기능성 원료 및 완제품을 활용하여 사업화함.
- 원료인 개머루덩굴의 재배 기술 및 재배지 확보를 통하여 농산물로서의 가치를 확보하고 신규 시장 및 고용 창출을 이루고자 함.

## 2) 연구개발과제 관련 현황 및 문제점

- 과민반응이란 특정 항원에 대해 과도한 면역반응이 일어나 조직 손상 등의 부적절한 피해를 주는 면역 반응을 지칭함. 과민반응은 제 1형부터 제 4형까지 분류되며, 제1형 과민반응은 알레르기로 잘 알려져 있음.
- 알레르기(allergy)란 그리스어인 “allos”에서 유래되었으며 이는 “변형된것”을 의미하며 1906년 프랑스 학자 Clemens Von Pirquet가 처음으로 알레르기란 용어를 사용하였음. 그는 알레르기를 ‘이물질에 대한 신체의 잘못 변화된 능력’으로 정의하였는데, 이는 면역학적 반응을 포함하는 극히 광범위한 정의로 간주 됨. 현재 알레르기는 ‘다양한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병’으로 보다 제한된 의미로 정의됨. 알레르기는 과민반응(hypersensitivity reactions)으로서 면역 반응들의 여러 유해반응들 중 하나이며, 이런 유해 반응들은 조직 손상을 일으키며 심각한 질병을 일으킬 수 있음.
- 피부는 대다수 알레르겐들의 출입구에 대한 효과적인 방어벽을 형성하나, 소량의 알레르겐이 국소적으로 주입되면 방어벽은 무너질 수 있음. 표피나 진피로의 알레르겐 침입은 국소적인 알레르기 반응을 유발함. 피부에서의 국소적으로 비만세포(mast cell)가 활성화되면 즉시 혈관 투과성을 국소적으로 증가시켜 수분(혈장 단백질과 혈장액)을 혈관 외로 이동시키며 부종을 일으킴. 알레르겐에 의해 활성화된 비만세포가 분비한 히스타민은 피부에 가려움을 동반하는 붉은 팽창을 일으킴. 때로는 보다 오래 지속되는 염증반응이 피부에서 나타나는데, 이것은 주로 알레르기 소인이 있는 어린이들에서 발생함. 이들 어린이들은 습진 혹은 아토피 피부염이라 부르는 지속적인 피부 발적이 생기는 만성염증을 유발함.
- 아토피피부염은 피부의 면역과민반응을 특징으로 하며, 산업이 발달하고 서구화된 나라에서 더욱이 흔히 나타나는 질환으로 소아는 10-20 %, 성인은 1-3 % 정도의 유병률을 보이며 우리나라도 이와 유사한 유병률을 나타내고 있음. 아토피피부염은 70-80 % 정도에서 가족력이 있을 만큼 유전적인 소인이 매우 중요하게 작용하지만, 환경적인 요인도 강력하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있음. 대표적인 증상은 건조하고 가려운 피부, 얼굴과 팔꿈치 안쪽과 무릎 뒤 및 손발의 발진 등임.



J. Clin. Invest.2004;113:651-657

**피부의 면역과민반응 매커니즘**

(출처: J. Clin. Invest.2004,113, 651 - 657, 59)

- 피부의 면역과민반응은 우리나라를 포함한 산업이 발달하고 서구화된 나라에서 흔히 나타나고 있음. 대개 유소아기에 시작하여 장기간 지속되며 사춘기까지 약 90 %는 자연 치유되는 경향이 있으나 나머지 10 %의 경우 성인이 되어서도 지속될 수 있음. 특히 어린 시절에 발생하여 장기간 지속되기 때문에 정상적인 성장발달과정을 저해할 수 있으며 여러 가지 환경 항원에의 노출이나 심한 소양감으로 인해 굵은 행위 자체가 피부상태를 더욱 악화시킨다는 특성상 이를 돌보는 가족들에게 육체적 피로뿐만 아니라 정서적인 면, 가족 관계 및 사회생활 등 여러 가지 면에서 영향을 끼치게됨. 이는 전반적으로 삶의 질에도 많은 영향을 끼치는 것으로 알려져 있음. 또한 장기간의 지속적인 치료가 필요하다는 점에서 경제적 비용 또한 상당함.
- 국내 전체 인구대비 아토피 진료 실인원은 줄어드는 경향을 보이거나 전체 인구의 2% 내외를 유지하고 있으며, 영·유아기에는 유병률이 20%에 육박하고 학령기에는 10%이며 최근 증가하고 있는 성인기 아토피피부염은 1~3%로서 전 연령에 걸쳐 영향을 미치는 질환임.

**[아토피 진료 실인원 추이]**

구분	2012년	2013년	2014년	2015년	2016년	2017년
진료 실인원	995,558	1,008,823	977,761	950,518	954,252	932,483
국민(총수)	50,199,853	50,428,893	50,746,659	51,014,947	51,245,707	51,446,201
국민(총수)대비 아토피 진료인원 비중(%)	1.98	2.00	1.93	1.86	1.86	1.81

**아토피피부염 진료인원**

연도(심사 기준)	2015	2019
진료인원(만명)	92.7	95
비중 (%)	0~19세	61.6
	20세 이상	38.4

자료: 건강보험심사평가원

- 면역과민반응과 관련된 개별인정형 소재로는 구아바 잎 추출물 등 복합물, 다래추출물, 피카오프레토 분말 등 복합물, 합성 PLAG, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, 과채유래유산균(L.plantarum CJLP133), Lactobacillus sakei Probio65, Lactobacillus rhamnosus IDCC3201 열처리배양건조물 등이 있으나 식물자원으로 개발된 면역과민반응에 의한 피부상태 개선용 소재는 전무한 상황임.

### 3) 과민면역에 대한 기능성 식품소재의 필요성 증대 및 중요성

- 세계 아토피피부염 시장은 2022년까지 연평균 3.8% 성장하여 56억 달러에 이를 것으로 전망됨.



[세계 아토피 피부염 시장 규모(단위: 억달러)]

\*자료: GlobalData

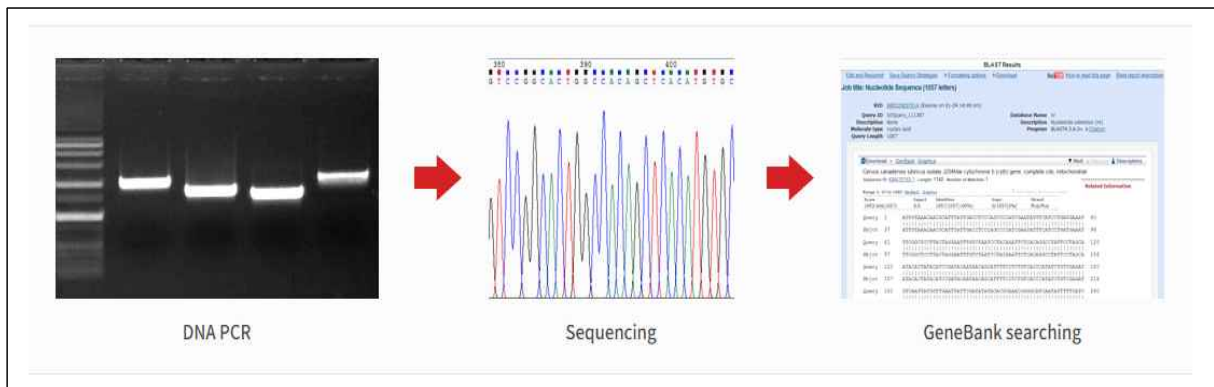
- 현재 아토피피부염의 치료로는 피부보습, 악화요인의 제거, 스테로이드 외용제 및 환자와 가족 교육을 기본으로 하고 증상의 정도에 따라 항히스타민제, 광치료, 면역반응 조절제, 면역억제제 등을 사용하고 있으나, 오랜 기간 비특이적 치료제로 인해 많은 부작용이 나타나, 보다 효과적이고 부작용이 적은 치료제나 건강기능식품의 개발을 필요로 함. 특히 **장기복용 시 부작용이 적고 독성이 없는 천연물을 이용한 소재 개발이 절대적으로 필요함.**
- 또한, 아토피피부염은 가려움, 세균증식, 건조증과 같은 **다양한 악화인자에 의해 유발됨으로 다양한 인자를 복합적으로 억제하는 기능을 갖는 소재 발굴이 필요함.**
- 따라서 피부의 면역과민반응 상태를 개선시킬 수 있는 건강기능식품 기능성 원료개발은 피부의 정상적인 기능 유지에 도움을 줄 수 있으며, 더 나아가 아토피 피부염으로 진행될 수 있는 요인을 억제할 수 있으므로 보건학적, 사회적, 경제적으로 중요한 의미를 지님.
- 본 기술의 원물인 개머루덩굴은 아직 상용화 연구가 안 된 농산물로서 강원권에서 경북권까지 재배가 용이하고, 실제 영주시 장수면에 위치한 영농조합의 재배지에서도 생육이 잘 이루어져 원물의 국산화가 용이하여 본 기술 개발 및 공공기술 사업화로 **당사의 기능성 소재 수입대체 및 수출의 기회를 마련하고자 함.**

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 기능성 소재의 원물 표준화

#### 가. 연구방법

- 식물은 보통 수천 개의 성분을 포함하고 있으며, 부위에 따라 함유하는 성분도 각기 다름. 동일종이라 하더라도 재배 환경(기후, 토질 등) 및 채취 시기에 따라 성분의 조성 및 함량은 달라질 수 있음. 또한, 식물은 유사종이 전 세계적으로 분포하며 동일종도 각기 다른 이름으로 불리어지기도 하여 혼돈을 야기하는 경우가 많음. 따라서 기능성 보강과 동시에 일정한 품질을 유지하기 위해서는 원재료 표준화는 필수적이며, 원재료 표준화를 위해서는 식물종의 기원, 사용한 식물의 부위, 성장 및 재배 조건(원산지 및 재배 조건), 채취 시기, 저장조건 등을 고려해야 함.
- 개머루덩굴(*Ampelopsis brevipedunculata*)의 기원은 포도과 개머루속에 속하는 덩굴성 낙엽 관목으로 식약처 식품안전나라 검색 결과 식품원료목록에 등재가 되지 않은 원료이며 국가생물종지식정보 시스템(국립수목원), 국가생물종목록(국립생물자원관), TPI, WFO 데이터베이스(유엔생물다양성협약 프로젝트) 검색결과 털개머루 *Ampelopsis brevipedunculata* f. *ciliata* (Nakai) T.B.Lee, 1966., 가새잎개머루 *Ampelopsis brevipedunculata* f. *citruloides* (Lebas) Rehder, 1921., 자주개머루 *Ampelopsis brevipedunculata* f. *elegans* Rehder, 1921.의 3종의 품종이 보고되어 있음.
- DNA Library 및 gene bank를 활용하여 원물의 유전정보를 확보함.
- 종 식별 DNA 검사(유사종 확인) : 식물의 종(species)을 DNA 분석을 통해 확인하는 검사로 해당 식물의 nuclear DNA 또는 chloroplast DNA, mitochondria DNA 중 종마다 특이성을 나타내는 DNA 부분을 분석 하여 종을 동정함. Nuclear DNA에서는 ITS(intergenic transcribed spacer), IGS(Intergenic spacer), Ribosomal RNA gene (ex. 18s rDNA, 28s rDNA) 또는 specific gene을 분석하고 cpDNA에서는 Ribosomal or Transfer RNA gene(ex. trnA(UGC)~Y(GUA), rpl, rps 등) 또는 그 spacer, Transcription/translation apparatus genes(ex. rpo, atp, pet, psb, ndhA~K, matK, rbcL 등), Conserved reading frames (ex. ycf 1~4) 등의 염기서열을 분석해 종을 동정함. 그림 1과 같이 종마다 특이성을 보이는 DNA의 염기서열을 해독해 기존의 유전자은행(GeneBank)에 이미 보고된 종과 비교하여 종을 동정하게 됨.



[그림-1] 식물의 종 동정 방법

- 채취시기 : 월별 또는 계절별 기능/지표성분 함량변이 확인
- 사용부위 : 부위별로 기능/지표성분으로 설정하고자 하는 성분이 많이 함유하는지를 우선적으로 검토
- 보존 : 수확한 후의 보관 및 처리조건 등에 의한 기능/지표성분의 함량 변이 확인



나. 연구내용

○ 원재료(원물) 확보

- 천연물은 다양한 화합물들을 포함하고 있으며, 계절적, 지역적 등 여러 요인들에 따라 함유된 성분들의 함량 변화가 다양한 것으로 보고되고 있음. 이러한 품질의 변화는 기존의 안전성 및 유효성에 영향을 미칠 수 있으므로 품질의 일관성 확보 및 유지를 위하여 선행연구를 통하여 채집된 개머루덩굴 소재를 경상북도 영주시에 위치한 영주시 농업기술센터에서 증식 재배 연구(그림 2)를 실시하였고 본 연구를 통하여 영주시 장수면에 2000㎡의 면적에서 대량 재배하고 있으며 단순가공(절단→건조→선별→칭량→포장)하여 매년 원재료를 생산하고 있으며 제품 양산시 재배면적을 증가시킬 계획임.(그림 3).



[그림-2] 개머루 덩굴의 증식 재배 연구



[그림-3] 개머루 덩굴의 대량 재배 및 가공(절단, 건조, 선별, 포장, 보관)

○ 원재료의 정확한 종 확인

- 개머루덩굴의 정확한 종 확인을 위하여 국내 식물분류 사이트를 검색하였으며 그림 4, 5와 같이 국립수목원의 국가생물종지식정보시스템에서는 *Ampelopsis heterophylla* (Thunb.) Siebold & Zucc로, 국립생물자원관의 국가생물종목록에는 *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv로 여러 학명이 사용되고 있었음.



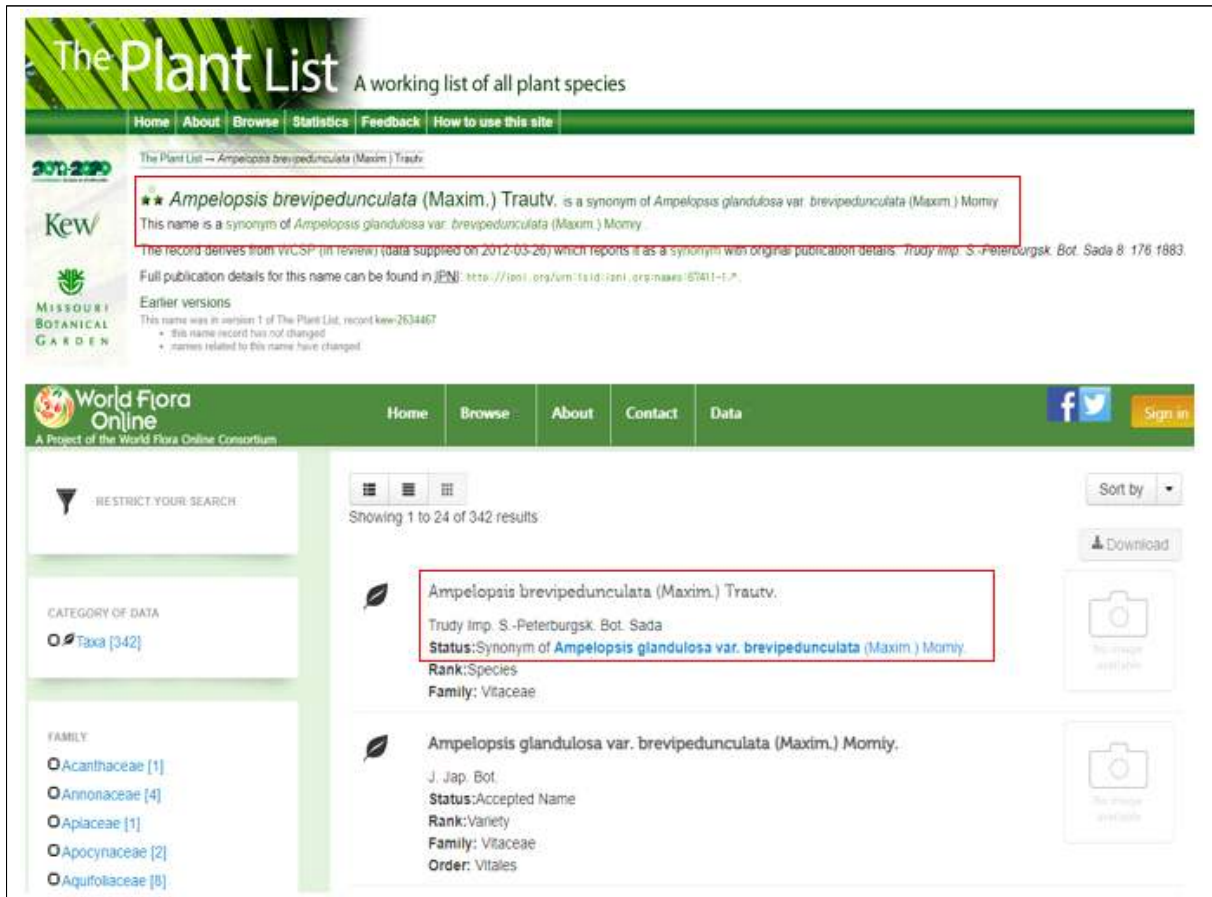
[그림-4] 국가생물종지식정보시스템



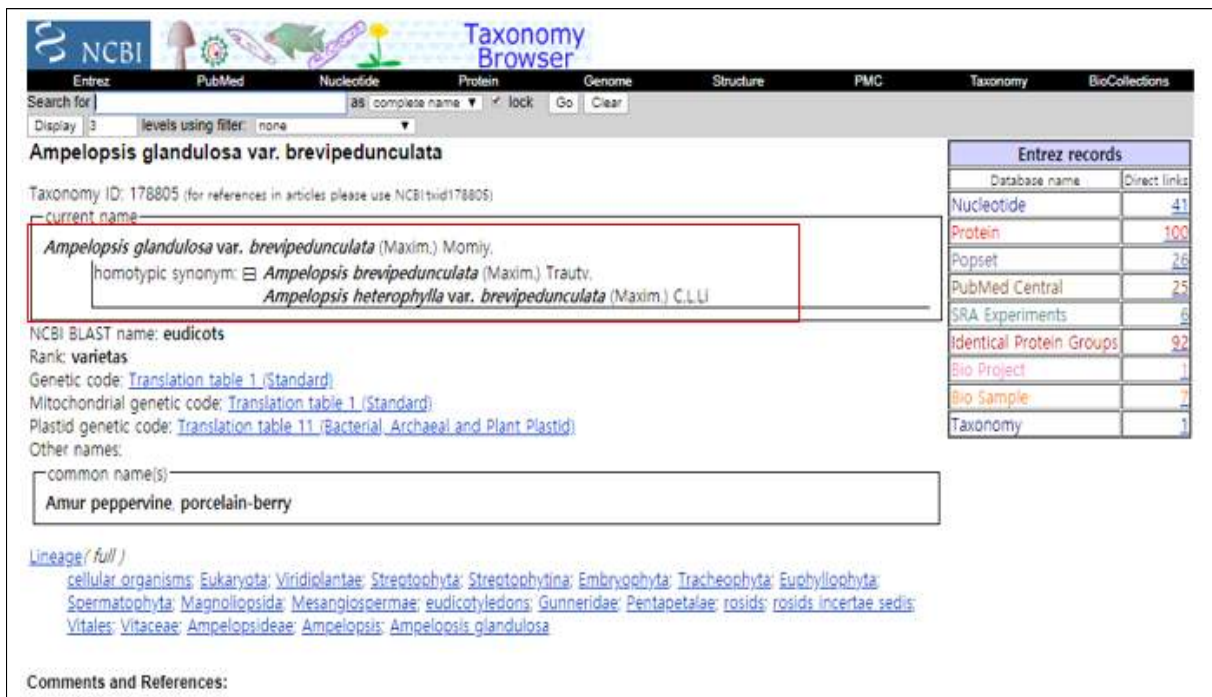
[그림-5] 국가생물종목록

- 국제식물학회의 식물명명규약에 식물에 유일하게 사용하는 올바른 학명을 정명(legitimate)이라 하고 정명이 아닌 다른 이름을 이명(synonym)이라고 하고 있으며 학명 표기는 속명+종소명+명명자로 표기하고 종명 표기는 속명+종소명으로 표기하도록 되어 있어 현재까지 사용하고 있던 개머루덩굴 (*Ampelopsis brevipedunculata*)의 학명은 *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv이며 이 학명은 그림 6, 7과 같이 TPL, WFO 및 미국국립생명공학정보센터(NCBI) taxonomy browser에서 *Ampelopsis glandulosa* var. *brevipedunculata* (Maxim.) Momiy.의 동의어로 이명 처리되어 있으며 *Ampelopsis glandulosa* var. *brevipedunculata* (Maxim.) Momiy.가 정명으로 accepted 되어 있음. 따라서 *Ampelopsis glandulosa*가 *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv의 정확한 종명 표기이며 그림8과 같이 미국국립생명공학정보센터(NCBI) taxonomy browser에서 *Ampelopsis* 속의 하위분류에 *Ampelopsis brevipedunculata*라는 종분류는 없으므로 개머루덩굴의 종명 표기는 *Ampelopsis glandulosa*가 정확한 표기임을 확인함.





[그림-6] TPL, WFO(유엔생물다양성협약 프로젝트 데이터베이스)

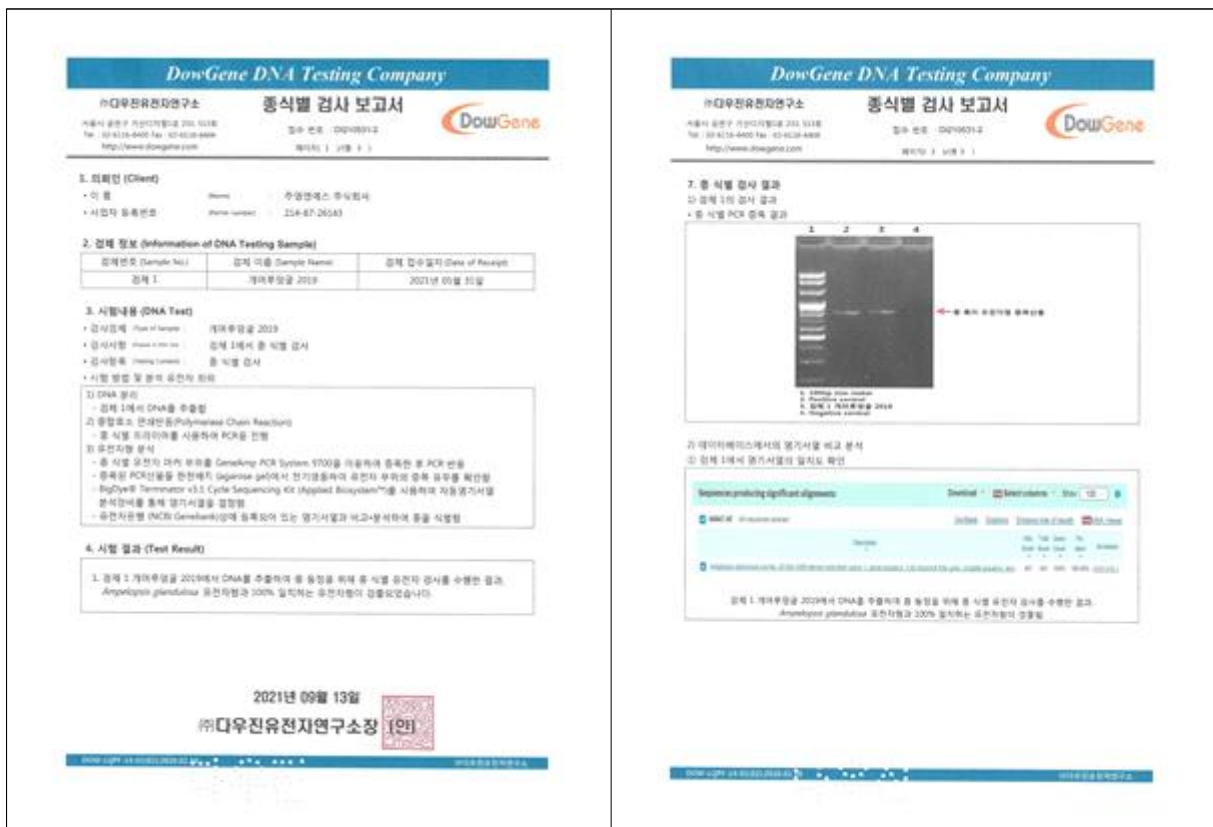


[그림-7] 미국국립생명공학정보센터(NCBI) taxonomy browser



[그림-8] 미국국립생명공학정보센터(NCBI) taxonomy browser

- 원재료의 정확한 종 및 유사종의 혼입 여부를 확인하기 위하여 재배된 원료에 대하여 종식별 DNA 검사를 KOLAS 국제공인시험기관인 (주)다우진유전자연구소에서 의뢰하여 그림 9와 같이 종식별 검사 보고서를 확보하였으며 원재료의 정확한 증명인 *Ampelopsis glandulosa*를 확인하였음.








[그림-9] 종식별 검사 보고서



○ 원재료의 수확(채취) 시기 설정

- 재배되는 원재료의 수확시기를 결정하기 위하여 2개월 마다 지표성분의 함량분석을 실시하여 그림 10과 같이 12월에 (+)-Catechin의 함량이 높은 분석 결과를 보였으며 원재료 수확시 절단, 건조, 선별, 포장 등의 작업성을 고려하여 잎이 80%이상 떨어지고 난 후인 **12월에 수확하는 것으로 설정함.**

구분	4월	6월	8월	10월	12월
재배사진	 ※생육없음				
(+)-Catechin 함량(mg/g)	-	ND	ND	8.93	9.34
Ethyl gallate 함량(mg/g)	-	ND	1.49	7.18	2.28

[그림-10] 채취시기별 지표성분의 함량 변이

○ 원재료의 사용부위 설정

- 재배되는 원재료의 사용부위를 결정하기 위하여 잎, 줄기, 및 열매의 지표성분의 함량분석을 실시하여 표 1과 같이 줄기에서 가장 높은 지표성분 함량 분석 결과를 보였으며 선행연구의 부위별 효능 활성을 측정(아토피 질환의 대표적인 인자로 알려진 CCL-17의 저해활성 측정)하여 뿌리 및 잎보다 줄기에서 농도 의존적인 결과를 보인 것과도 일치하여 **사용부위를 줄기로 설정함.**

[표-1] 부위별 지표성분의 함량 분석 결과

구분	줄기	잎	열매
(+)-Catechin(mg/g)	<b>9.34</b>	1.22	N.D
Ethyl gallate(mg/g)	<b>2.28</b>	N.D	1.52

○ 원재료의 보존 조건 설정

- 선행연구에서 원재료 수확 후 냉장 보관하였으나 표 2와 같이 실온에서 1년 이상 보관된 원재료의 품질 지표(성상 등)를 검사하여 보존기간 동안 모든 품질 지표가 품질한계 내에서 안정함을 확인하였고 경제성 및 용이성을 고려하여 원재료의 **보존 조건을 실온으로 설정함.**

[표-2] 보존기간에 따른 원재료 검사 결과

품질지표	품질한계	검사결과 (2020. 10. 13)	검사결과 (2021. 11. 01)
성상	이미, 이취가 없는 갈색의 건조 줄기	적합	적합
외관	변질, 곰팡이 유무	무	무
수분	10% 이하	9.2	9.5
(+)-Catechin(mg/g)	10mg/g의 80~100%	9.49	9.34
Ethyl gallate(mg/g)	2mg/g의 80~100%	2.11	2.28

○ 원재료의 기준 규격 설정

- 원재료 표준화 연구결과를 바탕으로 표 3과 같이 원재료의 기준 규격을 설정함.

[표-3] 원재료의 기준규격

원재료 기준규격	
원재료명	개머루 덩굴
종명	<i>Ampelopsis glandulosa</i>
원산지	국내산(경북 영주)
사용부위	줄기
성상	이미·이취가 없는 3~8cm크기로 절단된 갈색의 건조 줄기
수분	10%이하
보관조건	실온보관

2) 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화

가. 연구방법

- 제조공정이 표준화되지 않으면, 기능(지표)성분 함량이 다르거나 불순물 등이 존재하여 불량제품을 생산할 수 있음. 따라서 시간, 온도, 압력, 제조의 각 단계에서 추출용매, 추출공정, 건조과정 등과 같은 중요한 공정 변수들을 관리해야 제품의 재현성을 향상시켜 기능성과 안전성이 보장되는 제품을 생산할 수 있음.
- 추출시간, 추출온도 등을 반응표면분석(RSM)을 통하여 최적조건 도출.

나. 연구내용

- 반응표면분석(RSM)을 통한 최적 추출 조건 확립
  - 선행연구에서의 에탄올 끓는점(78℃)을 상회한 추출방법(88℃)으로 scale up(tank 추출) 제조시 유 증기 발생 및 압력상승에 의한 위험성 문제를 해결하고 수율, 지표성분 함량 및 활성효능을 최대로 갖는 제조공정을 확립하고자, 반응표면 분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하여 추출 조건 최적화를 진행함.
  - 추출조건은 그림 11과 같이 중심합성계획법(central composite design, CCD)에 의해 총 17구간의 실험이 통계프로그램(MINITAB)에 의해 도출 되었으며, 주요 인자인 추출 시간, 추출 온도와 에탄올 농도를 독립 변수로 설정하고, 추출물의 품질 특성에 관련된 종속(반응)변수로서 추출 수율(%), 지표성분 함량(mg/g) 및 CCL-17 저해 활성율로 설정하여 분석함.

Run order	Coded level			Response(독립변수)			종속변수				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> (추출온도)	X <sub>2</sub> (추출농도)	X <sub>3</sub> (추출시간)	Y <sub>1</sub> (수율, %)	Y <sub>2</sub> (카타킨, mg/g)	Y <sub>3</sub> (EG, mg/g)	Y <sub>4</sub> (저해율, 30µg/mL)	Y <sub>5</sub> (저해율, 60µg/mL)
1	-1.00	-1.00	-1.00	31.8	19.3	3.2	2.925	0.41	0.37	45.381	63.342
2	1.00	-1.00	-1.00	66.2	19.3	3.2	4.675	5.76	1.26	74.376	82.55
3	-1.00	1.00	-1.00	31.8	75.7	3.2	4.625	10.29	0.48	53.943	62.116
4	1.00	1.00	-1.00	66.2	75.7	3.2	8.325	24.33	1.19	57.621	73.15
5	-1.00	-1.00	1.00	31.8	19.3	9.8	4.425	0.32	1.49	61.708	71.924
6	1.00	-1.00	1.00	66.2	19.3	9.8	8.775	8.47	1.82	77.646	77.237
7	-1.00	1.00	1.00	31.8	75.7	9.8	4.575	9.21	0.43	66.612	76.011
8	1.00	1.00	1.00	66.2	75.7	9.8	8.725	22.00	2.60	79.689	93.896
9	-1.68	0.00	0.00	20.0	47.5	6.5	4.275	1.69	1.04	80.508	87.454
10	1.68	0.00	0.00	78.0	47.5	6.5	12.125	15.67	3.59	45.487	57.841
11	0.00	-1.68	0.00	49.0	0.0	6.5	5.275	0.60	0.00	31.942	46.618
12	0.00	1.68	0.00	49.0	95.0	6.5	4.625	15.77	0.08	30.791	41.728
13	0.00	0.00	-1.68	49.0	47.5	1.0	4.025	5.29	0.99	40	59.568
14	0.00	0.00	1.68	49.0	47.5	12.0	7.575	6.70	1.95	50.935	67.913
15	0.00	0.00	0.00	49.0	47.5	6.5	7.775	5.00	1.60	50.935	67.05
16	0.00	0.00	0.00	49.0	47.5	6.5	7.025	7.40	2.13	52.661	67.625
17	0.00	0.00	0.00	49.0	47.5	6.5	7.575	5.37	1.55	50.935	66.474

   : 최대값       : 최소값

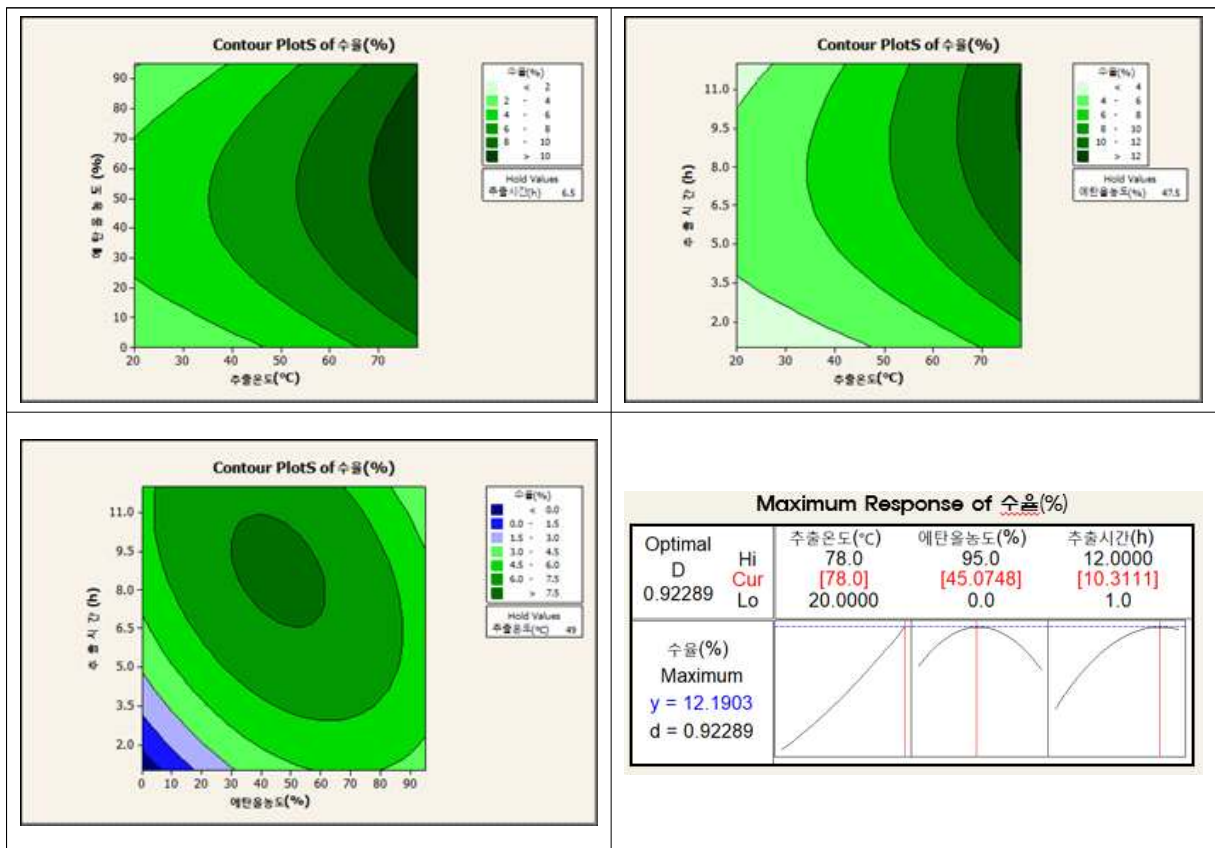
[그림-11] 최적추출조건 설정을 위한 중심합성계획 및 실험 결과

- 모델식의 적합도(degree of fit)를 나타내는 척도로 이용되는 결정계수(R<sup>2</sup>)는 그림 12와 같이 수율이 0.942(94.2), (+)-Catechin(mg/g)의 함량이 0.954(95.4%), Ethyl gallate(mg/g)의 함량이 0.932(93.2%)로 추정된 회귀모형을 신뢰할 수 있으며, 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었고, CCL-17 저해 활성율의 적합도는 다소 떨어지나 40% 이상의 신뢰도를 보여 최적조건 도출에 활용함.

	Polynomina equations	R <sup>2</sup> (결정계수)	P-value	lack-of fit
Yield	$Y_1=7.4819+1.9882X_1+0.3190X_2+0.8728X_3+0.1809X_1^2-0.9681X_2^2-0.6676X_3^2+0.2188X_1X_2+0.3813X_1X_3-0.6563X_2X_3$	0.942	0.001	0.136
Catehcin content	$Y_2=5.91649+4.49572X_1+5.53489X_2+0.09382X_3+1.37491X_1^2+1.26885X_2^2+0.49456X_3^2+1.60500X_1X_2+0.12000X_1X_3-0.59500X_2X_3$	0.950	0.001	0.204
Ethyl gallate contents	$Y_3=1.78572+0.60768X_1-0.00140X_2+0.34512X_3+0.18888X_1^2-0.63844X_2^2-0.12578X_3^2+0.22500X_1X_2+0.11250X_1X_3-0.2750X_2X_3$	0.926	0.003	0.454
CCL17 저해율 (30ug/mL)	$Y_5=50.3302+0.2035X_1-0.2315X_2+5.3266X_3+8.1224X_1^2-3.0570X_2^2+1.9285X_3^2-3.5248X_1X_2-0.4598X_1X_3+1.8900X_2X_3$	0.420	0.793	0.02
CCL17 저해율 (60ug/mL)	$Y_6=66.0260+0.6324X_1+0.5047X_2+4.1697X_3+5.5052X_1^2-4.5624X_2^2+2.3561X_3^2+1.1748X_1X_2-0.2555X_1X_3+4.5465X_2X_3$	0.417	0.797	0.01

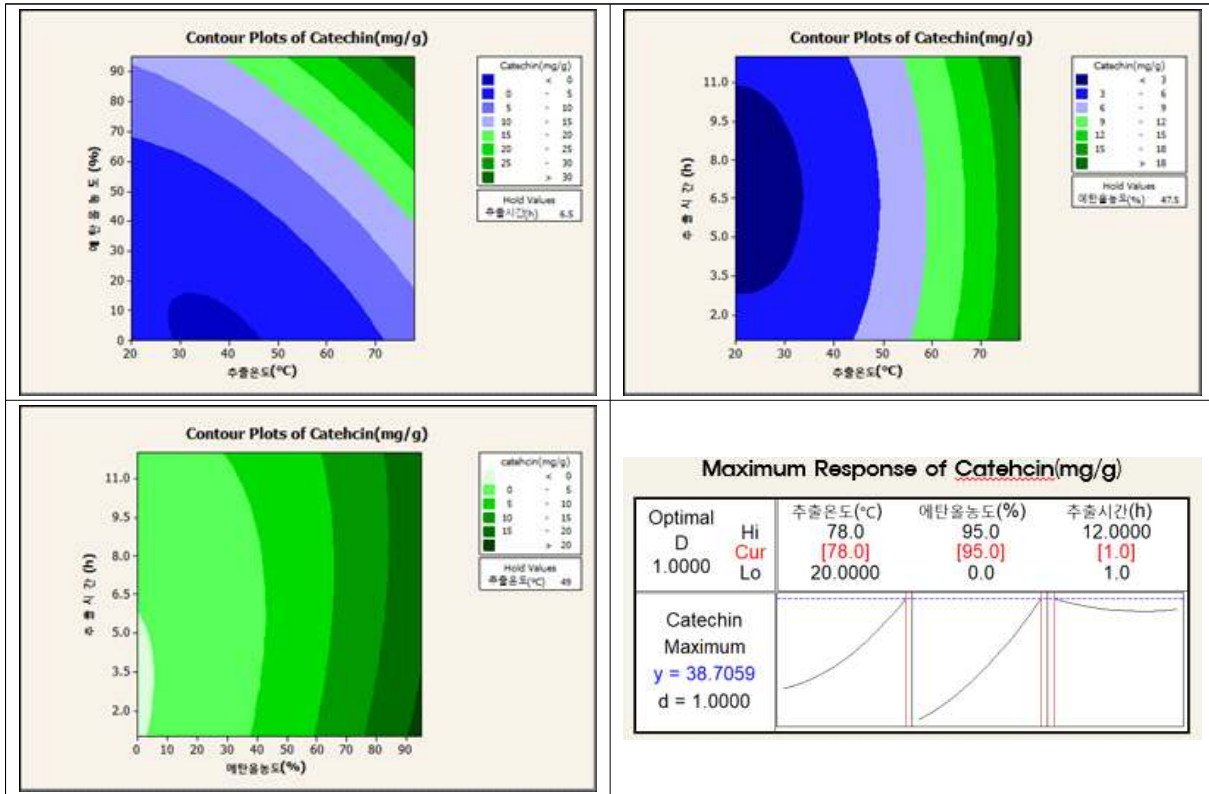
[그림-12] 모델식의 적합도를 나타내는 회귀식의 결정계수(R<sup>2</sup>) 및 유의성

- 반응표면 분석 결과 그림 13과 같이 수율은 추출온도 78℃, 45%에탄올 농도, 10.3hrs 추출조건에서 12.1903%의 최대 수율이 예측되며 전반적으로 추출온도가 높을수록 수율이 증가하였고 추출용매는 에탄올의 농도비 45%를 상점으로 증가 후 감소하는 능선형태를 보였으며 추출시간에 따른 수율은 8.7시간까지 증가하다가 유지되는 경향을 보여주었음.



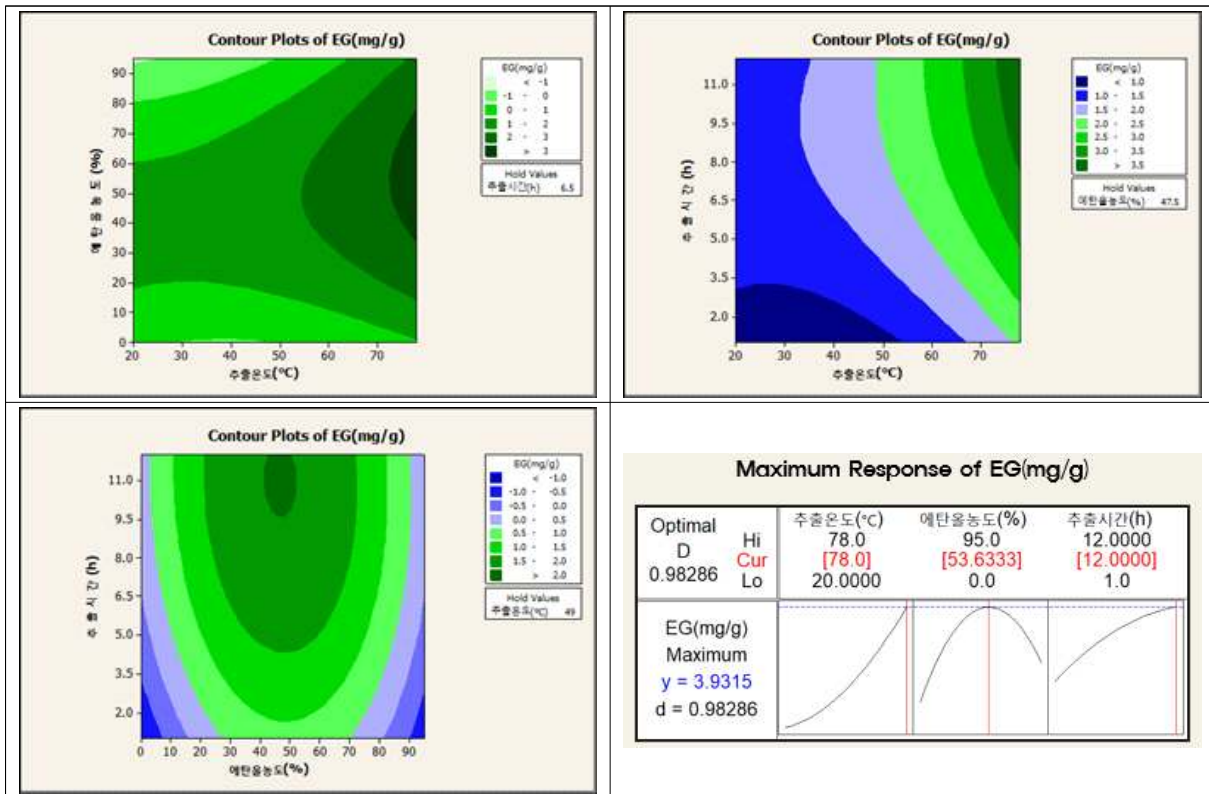
[그림-13] 종속변수 수율에 대한 독립변수의 반응표면 분석 결과

- 반응표면 분석 결과 그림 14와 같이 (+)-Catechin(mg/g)의 함량은 추출온도 78℃, 95%에탄올 농도, 1hrs 추출조건에서 38.7059mg/g의 최대 함량이 예측되며 전반적으로 추출온도가 높을수록 (+)-Catechin(mg/g)의 함량이 증가하였고 추출시간은 (+)-Catechin(mg/g)의 함량에 영향이 거의 없는 형태를 보여주었음.



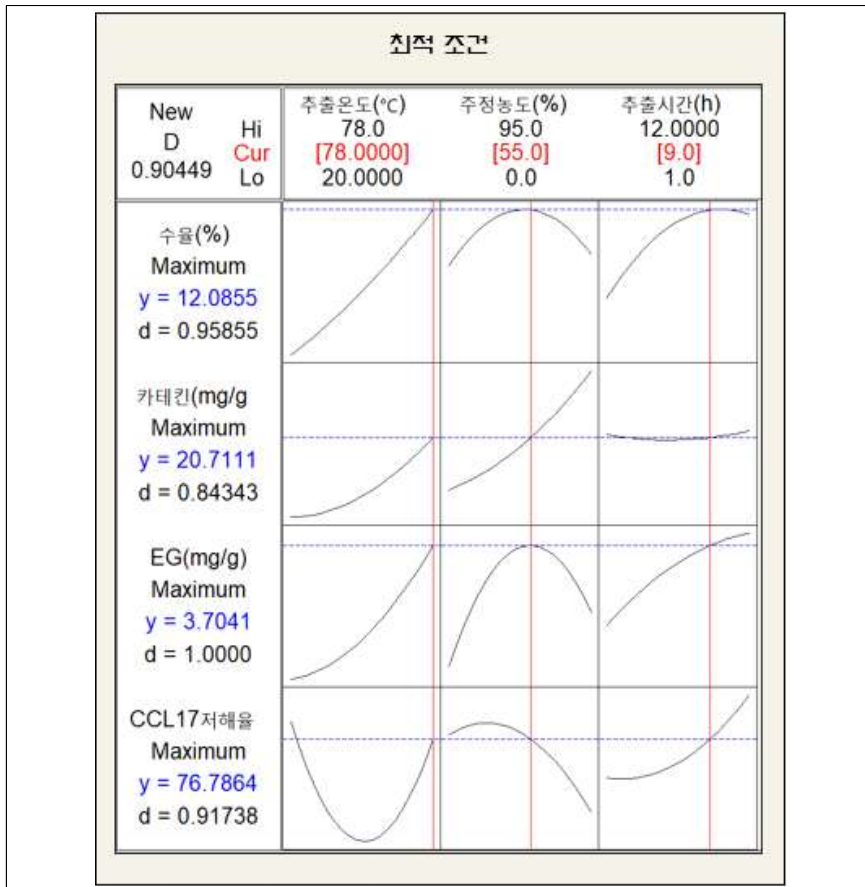
[그림-14] 종속변수 (+)-Catechin(mg/g)의 함량에 대한 독립변수의 반응표면 분석 결과

- 반응표면 분석 결과 그림 15와 같이 Ethyl gallate(mg/g)의 함량은 추출온도 78℃, 53.6%에탄올 농도, 12hrs 추출조건에서 3.9315mg/g의 최대 함량이 예측되며 전반적으로 추출온도가 높을수록, 추출시간이 길어질수록 함량이 증가하였고, 추출 용매는 에탄올의 농도비 54%를 상점으로 증가 후 감소하는 능선 형태를 보여주었음.



[그림-15] 종속변수 Ethyl gallate(mg/g)의 함량에 대한 독립변수의 반응표면 분석 결과

- 반응표면 분석결과 그림 16과 같이 수율과 유효성분인 Ethyl gallate(mg/g) 함량의 최대점이 능선 형태로 나타나고 8.7시간 이후 최대 수율이 유지되었기 때문에 범용 추출장치 셋팅 및 작업의 용이성을 감안하여 **추출온도 78℃, 55% 에탄올 농도, 9hrs 추출 조건을 최적 추출 조건으로 설정함.**



[그림-16] 반응표면 분석결과(optimized)

### 3) 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시작품 제작

#### 가. 연구방법

- 3로트 이상의 기능성 원료 생산
  - 비임상 시험 및 제품 제형 연구용
  - 안정성 (유통기한 설정실험) 시험용
- 기능성 원료 제조공정 확립 : 기능성 원료 생산 통한 제조공정의 문제점 확인 및 보완

#### 나. 연구내용

- 3로트 이상의 기능성 원료 생산
  - 표준화된 원재료(60kg)와 제조공정(최적조건)으로 그림 17과 같이 대량생산(1ton tank 추출)을 실시 하였으며 lab scale에서 가능했던 분무건조가 대량 생산용 분무건조기에서는 분말 회수가 되지 않는 문제가 발생하여 동결건조 테스트 및 부형제(덱스트린)를 첨가한 분무건조 테스트를 진행하였 음.





[그림-17] 개머루 덩굴 추출공정(pilot)

- 개머루덩굴 추출물 100% 성분으로 동결건조하여 분말화가 가능하였으며 표 4와 같이 개머루덩굴 추출농축액에 덱스트린의 비율을 늘여 가면서 1차 분무건조 테스트를 진행하여 개머루덩굴 농축액 80%, 덱스트린 20% 성분비에서 분무건조 가능함을 확인하였고 덱스트린 함량을 최소화 하고자 수량을 늘여 2차 분무건조 테스트를 진행하였으며 개머루덩굴 추출물 80%, 부형제(덱스트린) 20%의 성분비로 대량생산 공정 최적화 하였음.

[표-4] 개머루덩굴 추출농축액 분무 건조 테스트

구분	농축액량(g)	덱스트린량(g)	성분비 (추출물 : 덱스트린)	결과
1차 테스트	500	41.3	70 : 30	- 분무건조 가능
	500	24.1	80 : 20	- 분무건조 가능 - 분말 회수율 높음
	500	10.7	90 : 10	- 분무건조 가능 - 분말 회수율 낮음
	500	0	100 : 0	- 분무건조 불가 - 분말 회수 안됨
2차 테스트	2500	85.0	85 : 15	- 분무건조 가능 - 분말 회수율 낮음
	2500	120.5	80 : 20	- 분무건조 가능 - 분말 회수율 높음

- 생산비용 등 경제성을 고려하여 그림 18과 같이 5롯트의 대량생산을 부형제를 첨가한 분무건조 공정으로 대량생산 공정 최적화를 하여 개머루덩굴 추출물(시작품)을 제조하였으며 주요 제조단계에 따른 수율 및 지표성분의 함량 변화는 그림 19와 같음.



[그림-18] 대량생산 공정 최적화 제조공정도 및 생산내역



[그림-19] 주요 제조단계에 따른 수율 및 지표(기능)성분의 함량 변화

#### 4) 기능성 소재의 품질관리 기준 마련

##### 가. 연구방법

###### ○ 활성소재로부터 유용성분의 분리정제 분석 및 시험법 확립(품질관리 기준 마련)

- 활성소재 추출물로부터 정제용 수지 및 기기를 이용하여 생리활성물질을 추출·정제함
  - 유기용매에 의한 분배: BuOH, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, hexane 등 다양한 유기용매에 의한 물질의 분배.
  - 다양한 column chromatography: Silica gel, Diaion HP-20, Amberlite XAD-2, activated carbon 등 의 흡착성 수지를 이용한 column chromatography.
  - Gel filtration: Sephadex LH-20 resin, Sephadex G series를 이용한 물질의 정제.
  - Preparative TLC 및 HPLC를 이용한 정제.
- 활성소재 추출물로부터 정제한 활성물질의 화학구조 결정
  - Mass spectrum 분석: EIMS 혹은 FABMS등을 이용하여 화합물의 분자량을 밝힘.
  - NMR 분석에 의한 화학구조 구명: <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DQF-COSY, HMQC, HMBC, NOESY 등.
  - 기타: 그 외에 specific rotation, melting point등을 측정하여 물리화학적 특성 구명.
- 분리된 화합물의 신규성 여부 확인
  - database를 이용하여 분리한 화합물의 신규성 여부를 확인. Database로는 현재 한국생명공학연구원 이 보유하고 있는 Kitasato database (KMC), Chapman and Hall, chemical abstract (CA), Beilstein commander 2000 및 SciFinder 등을 활용함.
- Quantitative & Qualitative chemical analysis
  - LC/MS 기기를 이용하여 생물소재로부터 생리활성물질 또는 활성분획물의 최적 추출·분리분석 조건 을 수행함.
  - DAD(PDA)를 이용하여 여러 파장( $\lambda$ )의 검출한계와 ESI-MS를 통하여 분획물 및 활성물질의 분자 량와 쪼개짐을 바탕으로 정확한 성분분석이 가능함.
  - 생물소재의 생육 시기별, 추출 용매별, 추출 온도별 등의 분석조건을 수립하여 대량생산의 기반을 제공함.
  - 생물소재 및 유효성분에 대한 chemical library 구축, 유효성분의 효능 연구
- 소재 표준화 및 CMC 연구
  - 성분 프로파일: 지문분석법 확립(HPLC, TLC 분석, 동등성확보 R = 0.99% 이상)
  - 유해성분: 원료생약 관리 (중금속, 잔류농약 등), 원료관리 (COA 규정)
  - QC/QA 확립, 분석 벨리데이션 확립
  - 성분규명: 지표성분 규명, 활성성분 규명, 원료 성분 규명

##### 나. 연구내용

###### ○ 주요성분 규명 및 지표물질 설정

- 선행연구에서 지표물질로 설정된 (+)-catechin 및 ethyl gallate는 천연물의 폴리페놀로 널리 알려져 있어 원재료를 대표하는 주요 활성성분을 추가 확보 하고자 개머루덩굴 추출물에서 보고된 화합물 및 분리한 화합물(그림 20)들을 분석하여 HPLC Chromatogram을 확인하여 지표물질 후보로 선정 하고자 하였음.



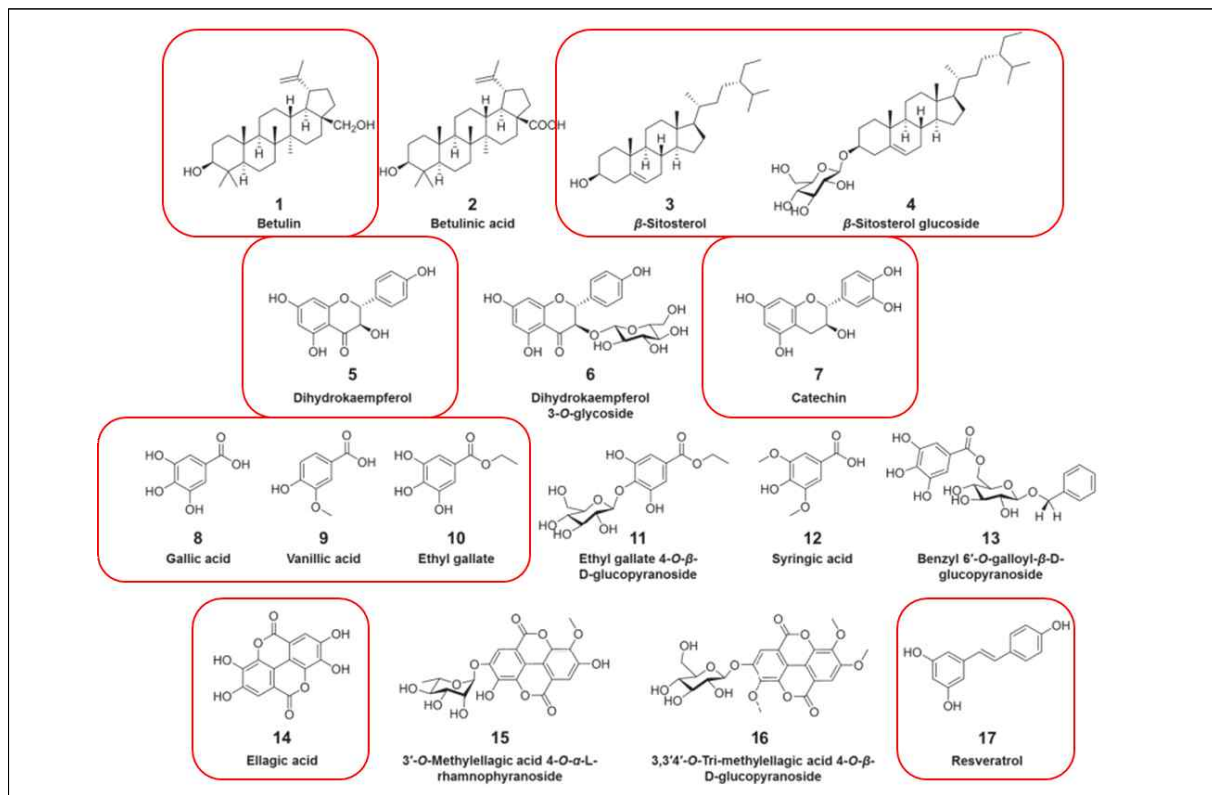
[표-5] 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 $\mu$ L
칼럼온도	25 $^{\circ}$ C
이동상	A 용매 - 증류수 (0.1% TFA) B 용매 - 아세토나이트릴 (0.1% TFA)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	275 nm

[표-6] 이동상 조건

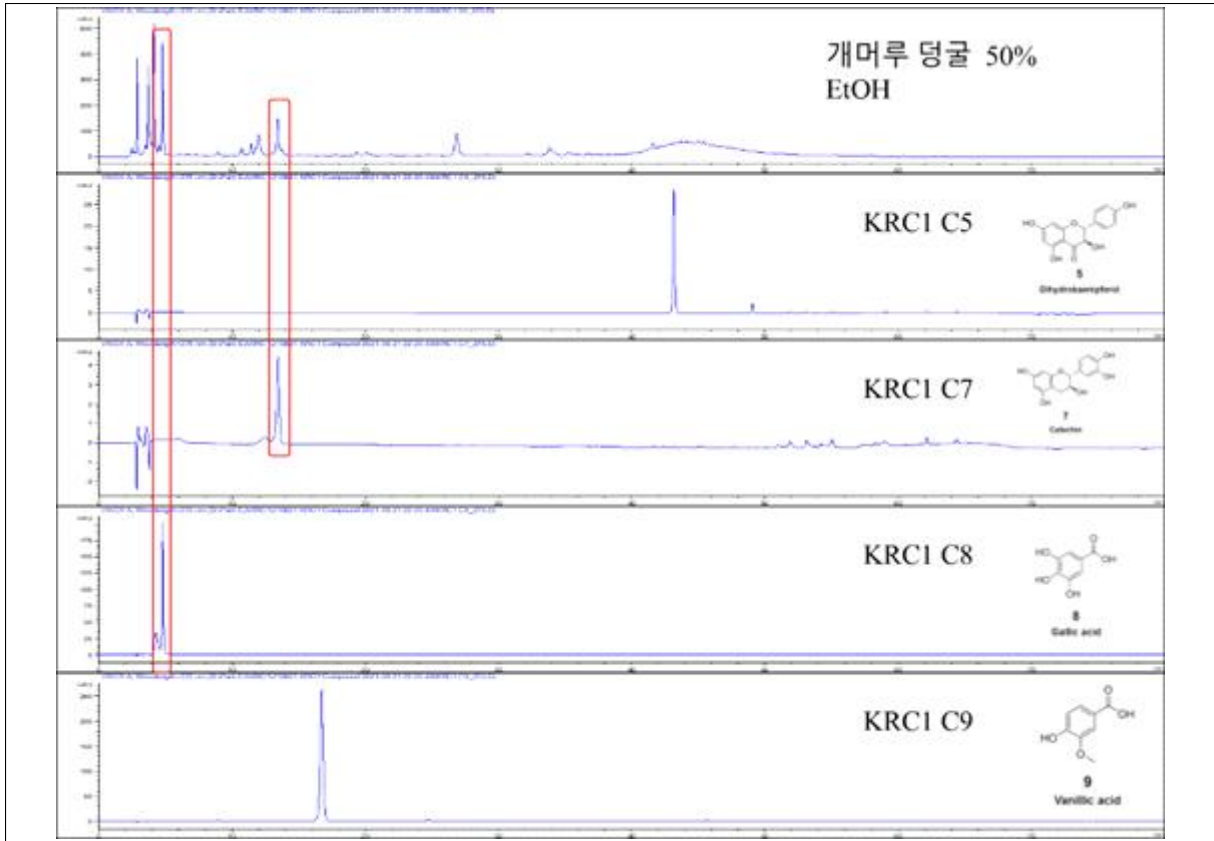
시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	90	5
15	90	5
25	87	13
30	87	13
45	80	20
60	0	80
65	0	100

- 위의 표 5, 6과 같은 조건으로 분석을 실시하였으며, 총 10개 화합물을 분석 비교하여 화합물들의 HPLC Chromatogram을 비교하였음.

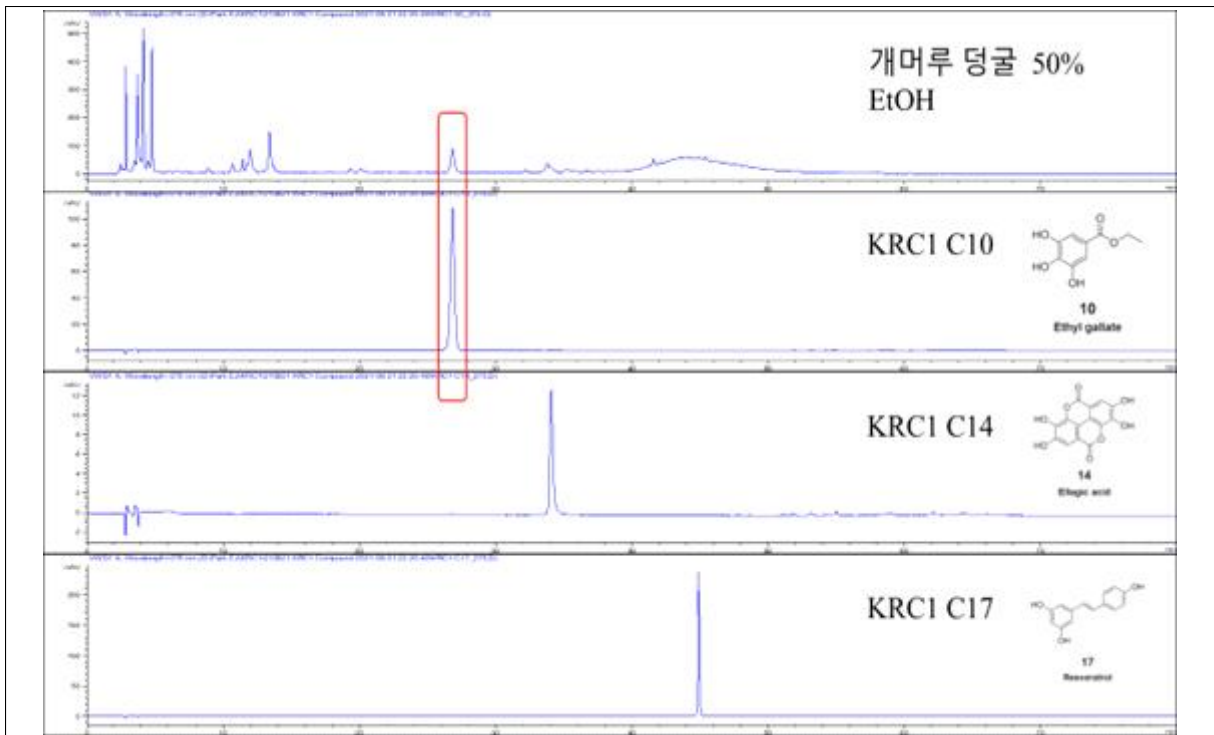


[그림-20] 개머루덩굴 추출물에서 보고된 화합물 및 분리한 화합물

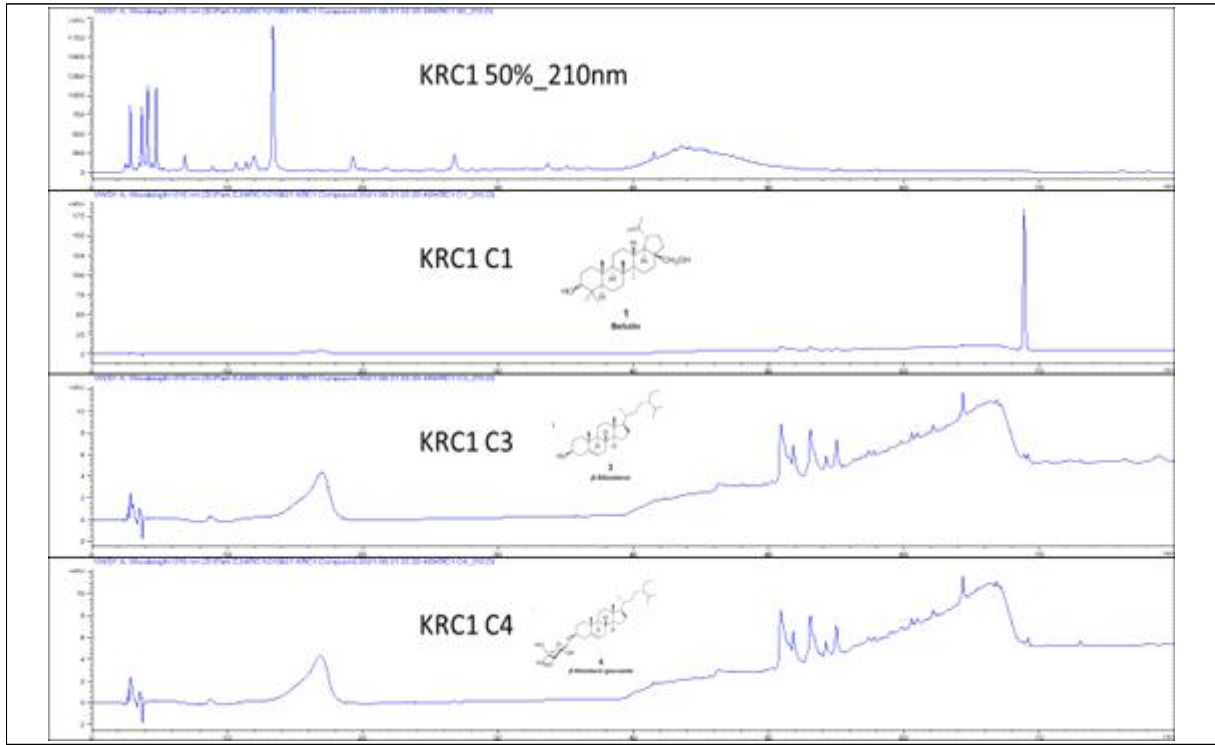
- 보유한 화합물 중 10종의 화합물에 대하여 분석을 실시하여 그림 21, 22, 23과 같이 5, 8, 10번 화합물이 chromatogram상 유의미하게 확인 되었으며, 각각의 화합물들은 catechin, gallic acid, ethyl gallate였고 이중 gallic acid에 대한 추가 실험을 실시하여 후보 지표성분으로 가능한지 확인하고자 하였음.



[그림-21] 개머루 덩굴 화합물의 HPLC Chromatogram 1

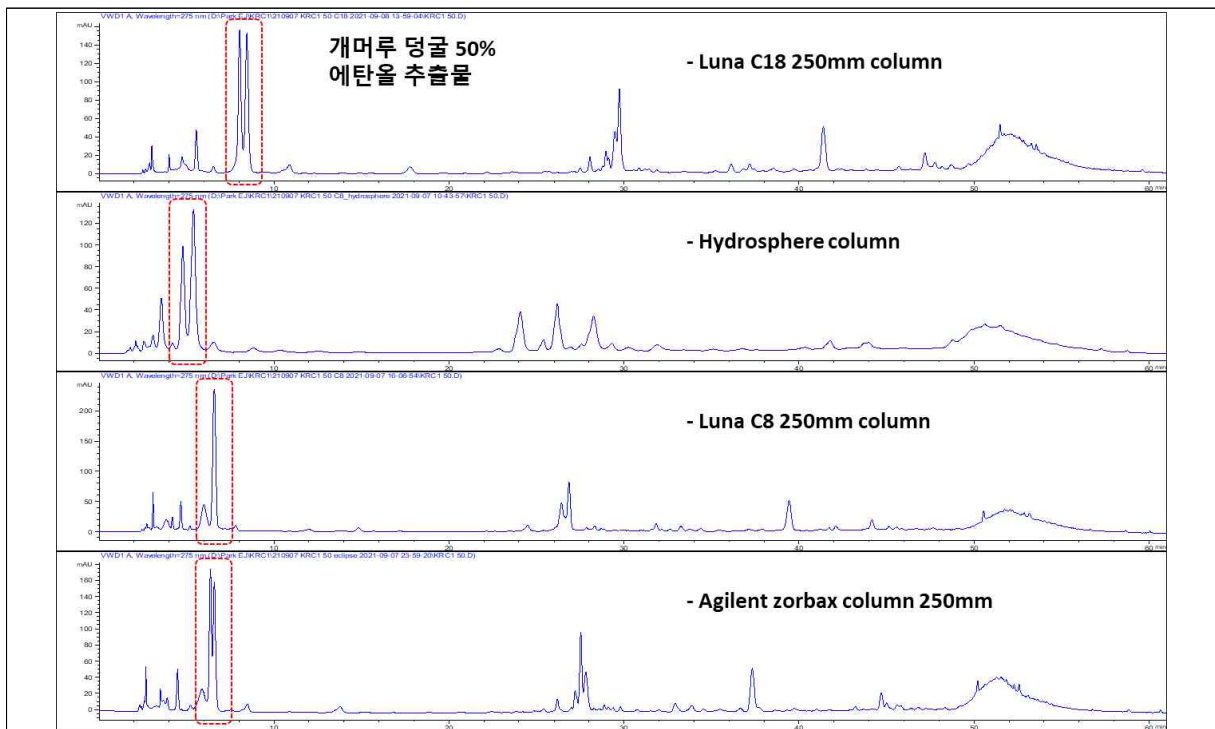


[그림-22] 개머루 덩굴 화합물의 HPLC Chromatogram 2



[그림-23] 개머루 덩굴 화합물의 HPLC Chromatogram 3

- Gallic acid 화합물을 개머루 덩굴 추출물과 비교 분석하여 column별 혹은 조건 별로 분석 패턴을 확인하여 gallic acid의 가능성 유무를 확인하였음(그림 24).



[그림-24] 개머루 덩굴 추출물의 HPLC Chromatogram

- Gallic acid 화합물을 개머루 덩굴 추출물과 비교 분석하여 column별 혹은 조건 별로 분석 패턴을 확인한 결과 10분 안쪽에서 peak가 나타났으며 다른 peak들의 간섭이 나타나고 조건에 따라 peak가 일정하게 나타나지 않아 지표성분으로 적절치 않은 것으로 판단함.

○ 분석법 확립 및 밸리데이션

- 개머루덩굴 추출물의 지표성분(Catechin, ethyl gallate)을 정량하고자 관련 논문들을 참고하여 분석조건을 설정하였고, 설정된 시험법을 적용하여 확인시험 및 정량법의 적합성 및 유효성을 검증하였음. 정해진 시험법에 따라 특이성(Specificity), 직선성(Linearity) 검출·정량한계(LOD ·LOQ), 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)의 항목을 검토하여 시험법의 유효성을 검증하였음(표 7).

[표-7] 개머루덩굴 추출물의 정량

항목	평가방법	설정값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석시 검출시간(Retention time), UV Spectrum 및 peak purity 검토	▶ $\lambda_{max}$ : 275nm ▶ 검출시간 (+)-Catechin : 13.6 min Ethyl gallate : 27.8 min
직선성 (Linearity)	지표성분의 표준원액 조제 후 이를 희석하여 6개 이상의 농도로 직선성 확인 및 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 평가	▶ (+)-Catechin 검출농도 - 1 ~ 250 $\mu$ g/ml( $R^2=0.9999\sim 1$ ) - LOD : 3.76 $\mu$ g/ml, LOQ : 11.41 $\mu$ g/ml ▶ Ethyl gallate 검출농도 - 1 ~ 500 $\mu$ g/ml( $R^2=0.9999\sim 1$ ) - LOD : 2.78 $\mu$ g/ml, LOQ : 8.41 $\mu$ g/ml
정확성 (Accuracy)	3개 농도로 표준물질을 첨가하여 회수율 검토	▶ (+)-Catechin 회수율 (시험용액 농도 5 mg/ml로 3가지 농도로 표준용액의 recovery를 측정함) - 79.80~100.27% ▶ Ethyl gallate 회수율 (시험용액 농도 5 mg/ml로 3가지 농도로 표준용액의 recovery를 측정함) - 101.46~107.95%
정밀성 (Precision)	3일간 시험자가 반복재현성, 일간, 분석농도별 정밀성 평가	▶ 시료 중 (+)-Catechin 측정 결과 - 17.13 mg/g (%RSD=3.46%) ▶ 시료 중 Ethyl gallate 측정 결과 - 2.92 mg/g (%RSD=3.07%)

- 개머루덩굴 추출물(Lot No. JY206MM210930)의 지표물질인 카테킨((+)-catechin), 에틸갈레이트(Ethyl gallate)을 대상으로 확립된 확인시험 및 정량법의 적합성을 검증하기 위하여 HPLC를 이용하여 분석방법 밸리데이션을 실시하였음(표 8~10).

[표-8] 개머루 덩굴추출물의 지표물질(표준물질) 정보

분석물질	(+)-Catechin	Ethyl gallate
Structure		
CAS Number	154-23-4	831-61-8
Chemical formular	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Molecular weight(MW)	290.26	198.17

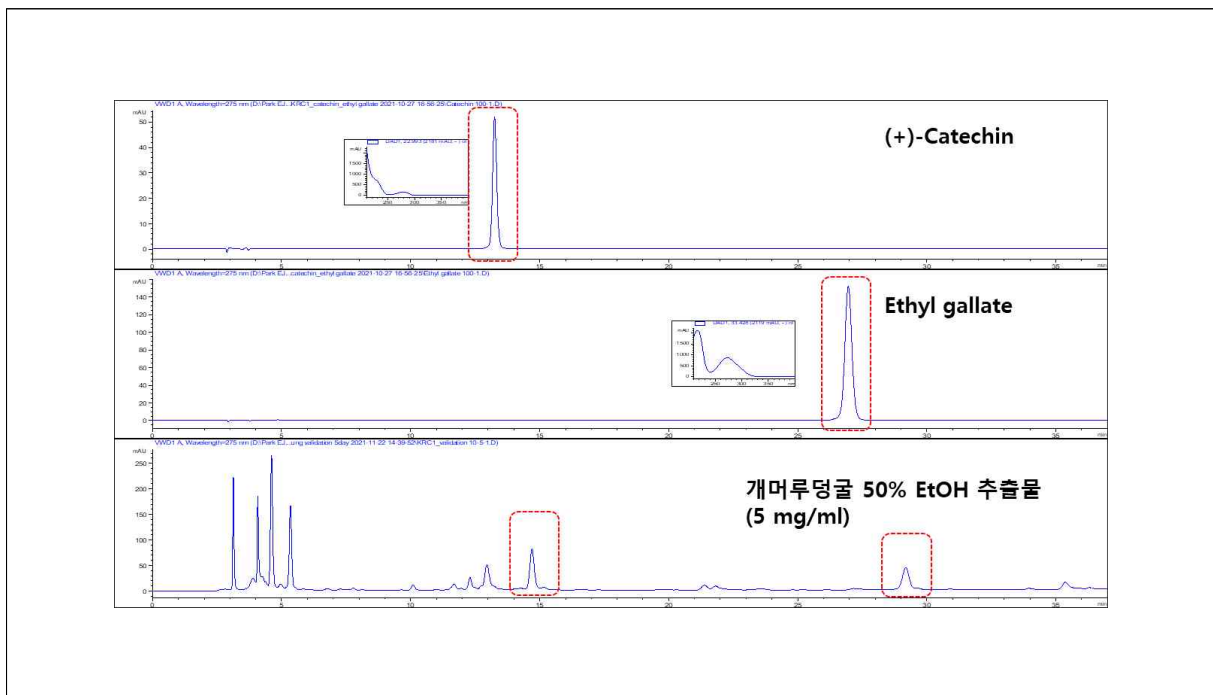
[표-9] 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 $\mu$ L
칼럼온도	25 $^{\circ}$ C
이동상	A 용매 - 증류수 (0.1% TFA) B 용매 - 아세토나이트릴 (0.1% TFA)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	275 nm

[표-10] 이동상 조건

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	90	10
5	90	10
7	87	13
15	87	13
35	80	20
36	0	100
50	0	100
55	90	10
60	90	10

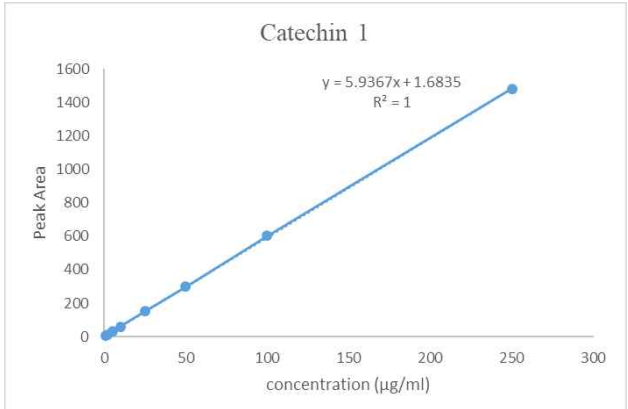
- 특이성(Specificity) : 시료 중 카테킨((+)-catechin), 에틸갈레이트(Ethyl gallate)의 확인을 위하여 표준물질과 개머루 덩굴 추출물을 본 분석법으로 분석하여 검출된 카테킨((+)-catechin), 에틸갈레이트(Ethyl gallate) peak 및 spectrum을 확인하고 표준물질 분석 결과 카테킨((+)-catechin), 에틸갈레이트(Ethyl gallate) peak는 13분, 27분대에 검출되었으며 시험용액 분석 결과 13분, 27분대에 peak가 확인되었으며 spectrum을 확인 한 결과 표준물질과 유사한 spectrum 패턴이 나타나는 것을 확인함(그림 25).



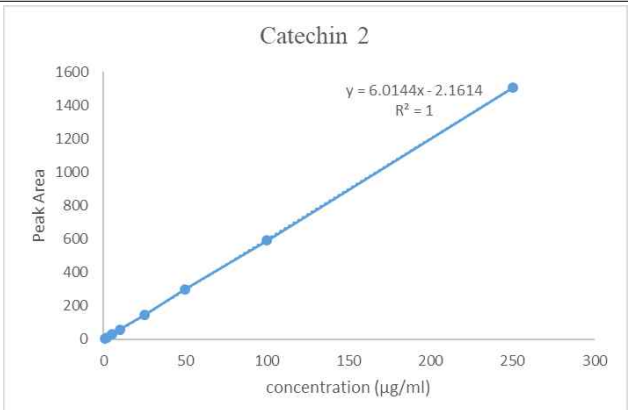
[그림-25] 표준물질 및 검체의 HPLC chromatogram

- 카테킨(+)-catechin의 직선성(Linearity) : 표준물질을 농도별로 조제하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였고 1~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 직선성이 확인되었으며, 이 때 직선의 상관계수는 해당 농도 범위에서 0.9999 ~ 1로 나타남(표 11~13).

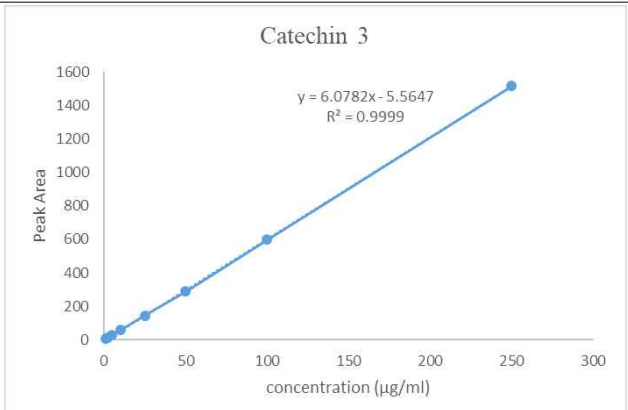
[표-11] Catechin 표준용액을 이용한 검량선 작성(1차)

Catechin 1	농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	면적 (Area)	STD curve  Catechin 1 $y = 5.9367x + 1.6835$ $R^2 = 1$ 
	1	6.2463	
	2	12.2446	
	5	29.681	
	10	60.3053	
	25	150.2009	
	50	298.5005	
	100	603.6261	
	250	1482.625	
	기울기	5.9367	
	y 절편	1.6835	
	$R^2$	1	

[표-12] Catechin 표준용액을 이용한 검량선 작성(2차)

Catechin 2	농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	면적 (Area)	STD curve  Catechin 2 $y = 6.0144x - 2.1614$ $R^2 = 1$ 
	1	5.66575	
	2	11.3499	
	5	28.63725	
	10	58.50733	
	25	146.4889	
	50	300.0321	
	100	592.6201	
	250	1503.912	
	기울기	6.0144	
	y 절편	-2.1614	
$R^2$	1		

[표-13] Catechin 표준용액을 이용한 검량선 작성(3차)

Catechin 3	농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	면적 (Area)	STD curve  Catechin 3 $y = 6.0782x - 5.5647$ $R^2 = 0.9999$ 
	1	5.27599	
	2	10.4075	
	5	26.43242	
	10	56.89406	
	25	144.2011	
	50	289.0999	
	100	598.3405	
	250	1517.464	
	기울기	6.0782	
	y 절편	-5.5647	
	$R^2$	0.9999	

- 검출한계(LOD)는 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 의미하며, 정량한계(LOQ)는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 없는 검체 중 분석대상 물질의 최소량을 의미함. 본 실험방법의 LOD 및 LOQ 설정을 위하여 분석 절차의 모든 단계를 포함하여 시료에 대한 분석을 수행하였고 이 때 8가지 농도의 시험물질을 3반복하여 분석하여 농도와 표준편차의 상관관계를 구하였으며, 이를 통하여 반응에 대한 표준편차 및 검량선의 기울기를 추정하여 LOD는 S/N=3.3, LOQ는 S/N=10을 기준으로 검출한계 및 정량한계를 정하였음(표 14).

[표-14] Calibration curve에 대한 통계분석(n=3)

	농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area(mAU)	STD curve
	Catechin	1	5.66575
2		11.3499	
5		28.25022	
10		58.5689	
25		146.9636	
50		295.8775	
100		598.1956	
250		1501.33	
기울기		6.0097	
y 절편		-2.0142	
LOD		3.77	
LOQ		11.41	

LOD:  $3.3 \times (\text{Standard deviation of the response} / \text{Slope of calibration curve})$

LOQ:  $10 \times (\text{Standard deviation of the response} / \text{Slope of calibration curve})$

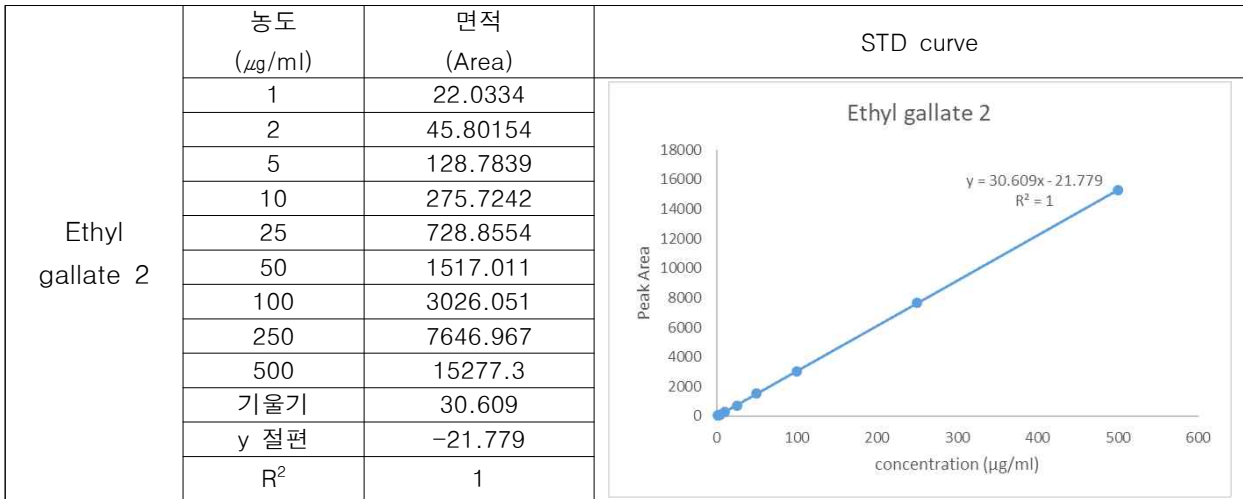
- 에틸갈레이트(Ethyl gallate)의 직선성(Linearity) : 표준물질을 농도별로 조제하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였으며 그 결과 1~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 직선성이 확인되었고, 이 때 직선의 상관계수는 해당농도 범위에서 0.9999 ~ 1로 나타남.(표 15~17)

[표-15] Ethyl gallate 표준용액을 이용한 검량선 작성(1차)

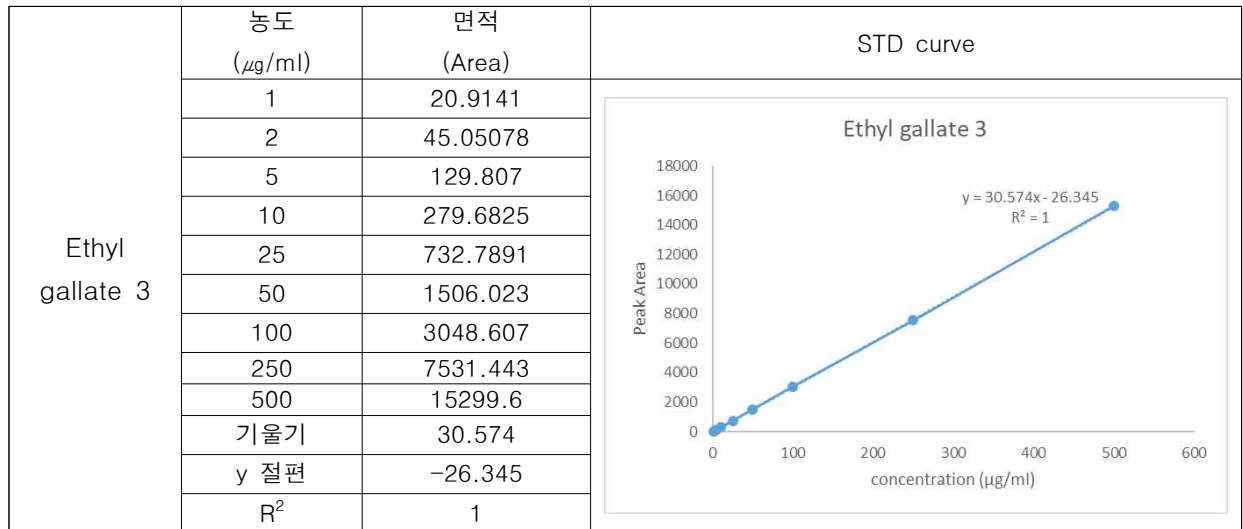
	농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )	면적 (Area)	STD curve
	Ethyl gallate 1	1	23.8418
2		48.27174	
5		129.9644	
10		280.2879	
25		743.699	
50		1491.496	
100		3010.056	
250		7605.288	
500		15046.5	
기울기		30.178	
y 절편		-8.6719	
R <sup>2</sup>		1	



[표-16] Ethyl gallate 표준용액을 이용한 검량선 작성(2차)

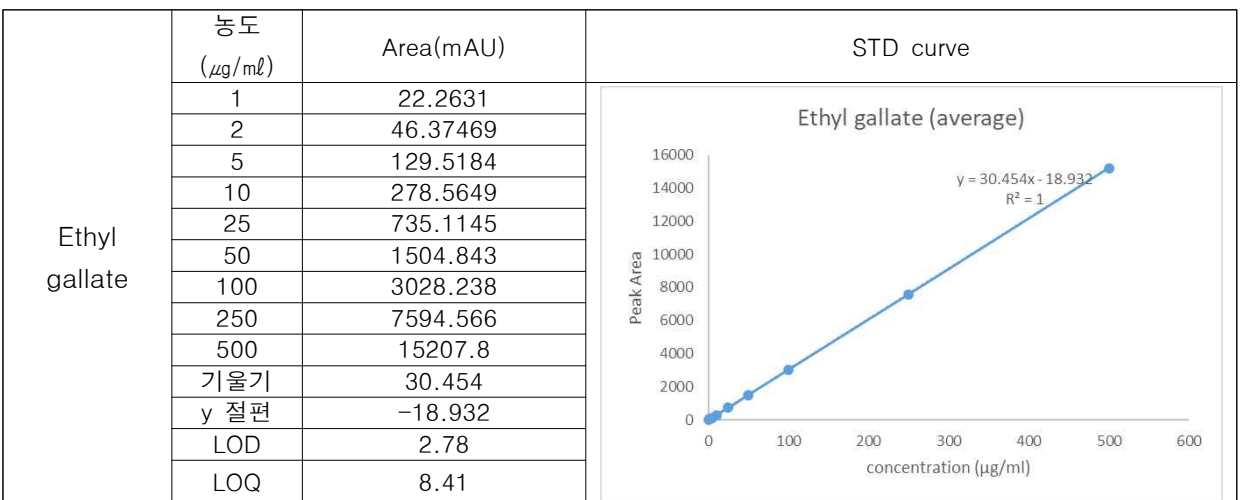


[표-17] Ethyl gallate 표준용액을 이용한 검량선 작성(3차)



- 검출한계(LOD)는 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 의미하며, 정량한계(LOQ)는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 없는 검체 중 분석대상 물질의 최소량을 의미함. 본 실험방법의 LOD 및 LOQ 설정을 위하여 분석 절차의 모든 단계를 포함하여 시료에 대한 분석을 수행하였고 이 때 9가지 농도의 시험물질을 3반복하여 분석하여 농도와 표준편차의 상관관계를 구하였으며, 이를 통하여 반응에 대한 표준편차 및 검량선의 기울기를 추정하여 LOD는 S/N=3.3, LOQ는 S/N=10을 기준으로 검출한계 및 정량한계를 정하였음(표 18).

[표-18] Calibration curve에 대한 통계분석 (n=3)



LOD: 3.3x(Standard deviation of the response/Slope of calibration curve)

LOQ: 10x(Standard deviation of the response/Slope of calibration curve)



- 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery) : 분석방법의 정확성을 측정하기 위하여 이미 농도를 알고 있는 시료에 표준용액을 농도별(25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 넣어 전처리 한 후 그 회수율을 측정하였고 그 결과 카테킨((+)-catechin)의 회수율은 79.80~100.27%이었으며, %RSD는 0.90~2.46%, 에틸갈레이트(ethyl gallate)의 회수율은 101.46~107.95%이었으며, %RSD는 0.42~1.37%로 나타났음. (표 19, 20).

[표-19] 카테킨((+)-catechin)의 농도별 정확성, 회수율 확인

- (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) spiking

	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	피크면적	Spike 피크면적-검액의 피크면적	참값( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	회수율(%)
1	25	636.4095	123.6423	50.91	83.64
		630.6467	117.8795	19.95	79.80
		637.1879	124.4207	21.04	84.15
		638.3468	125.5796	21.23	84.93
		633.9898	121.2226	20.51	82.03
		평균		20.73	82.91
		표준편차		0.51	2.04
		RSD(%)		2.46	

- (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) spiking

	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	피크면적	Spike 피크면적-검액의 피크면적	참값( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	회수율(%)
2	50	789.7478	276.9806	46.42	92.85
		785.1353	272.3681	45.66	91.31
		789.2813	276.5141	46.35	92.69
		792.0041	279.2369	46.80	93.60
		789.8831	277.1159	46.45	92.89
		평균		46.33	92.67
		표준편차		0.42	0.83
		RSD(%)		0.90	

- (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) spiking

	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	피크면적	Spike 피크면적-검액의 피크면적	참값( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	회수율(%)
3	100	1113.372	600.6045	100.27	100.27
		1098.878	586.1105	97.86	97.86
		1084.767	571.9995	95.51	95.51
		1084.688	571.9208	95.50	95.50
		1086.602	573.8351	95.81	95.81
		평균		96.99	96.99
		표준편차		2.08	2.08
		RSD(%)		2.14	

[표-20] 에틸갈레이트(Ethyl gallate)의 농도별 정확성, 회수율 확인

- (10 µg/ml) spiking

	농도 (µg/mL)	피크면적	Spike 피크면적-검액의 피크면적	참값(µg/mL)	회수율(%)
1	10	735.0816	309.8132	10.79	107.95
		728.0748	302.8063	10.56	105.65
		728.8089	303.5405	10.59	105.89
		722.7363	297.4678	10.39	103.89
		727.2381	301.9697	10.54	105.37
		평균		10.58	105.75
		표준편차		0.15	1.45
		RSD(%)		1.37	

- (25 µg/ml) spiking

	농도 (µg/mL)	피크면적	Spike 피크면적-검액의 피크면적	참값(µg/mL)	회수율(%)
2	25	1197.467	772.1990	26.00	103.91
		1191.878	766.6094	25.79	103.17
		1192.669	767.4006	25.82	103.28
		1188.263	762.9943	25.48	102.70
		1191.210	765.9418	25.77	103.09
		평균		25.81	103.23
		표준편차		0.11	0.44
		RSD (%)		0.42	

- (50 µg/ml) spiking

	농도 (µg/mL)	피크면적	Spike 피크면적-검액의 피크면적	참값(µg/mL)	회수율(%)
3	50	1951.281	1526.013	50.73	101.46
		1988.496	1563.228	51.95	103.90
		1980.550	1555.281	51.69	103.38
		1960.318	1535.049	51.03	102.05
		1992.511	1567.242	52.08	104.17
		평균		51.50	102.99
		표준편차		0.59	1.18
		RSD(%)		1.14	

- 정밀성(Precision) : 개머리 덩굴 추출물의 지표성분 함량 분석방법의 반복성 및 재현성 확인을 위해 분석 일자(표 21) 및 분석 농도를 달리하여 분석을 진행하였고 본 시험법의 기기조건에 적합한 분석 장비는 Agilent HPLC 1100series만 보유한 관계로 분석 장비간 비교는 하지 않았으며 시험법의 정밀성 확인을 위하여 시료를 5 mg/ml 농도로 5회 반복씩 총 3회 진행하였고 시료 중 지표성분 함량 분석 결과, 실험농도별, 실험일자간 실험 시 카테킨((+)-catechin)의 함량은 17.13 mg/g으로 분석되었고, 이때 %RSD는 3.46%이며, 에틸갈레이트(ethyl gallate)는 함량은 2.92 mg/g, %RSD는 3.07%로 나타났음(표 21).

[표-21] 분석일자간 정밀성(Intermediate precision)

	1차(1일차)	2차(3일차)	3차(5일차)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
	분석일: 11/19 분석자: A 분석기기: Agilent	분석일: 11/21 분석자: A 분석기기: Agilent	분석일: 11/23 분석자: B 분석기기: Agilent			
(+)-catechin	17.23	18.22	15.94	17.13	0.58	3.46
Ethyl gallate	2.85	3.12	2.78	2.92	0.09	3.07

- 분석농도별 반복성(Repeatability, Intra-assay precision) : 분석법의 정밀성 확인을 위하여 시료를 2.5, 5, 10 mg/ml 농도로 5회 반복씩 총 3회 진행하였으며 시료 중 지표성분 함량 분석 결과, 카테킨((+)-catechin)의 함량은 평균 17.96 mg/g으로 분석되었고, 이때 %RSD는 1.86~4.68%이며, 에틸갈레이트(ethyl gallate)는 함량은 3.11 mg/g, %RSD는 1.65~4.33%로 나타남(표 22~24).

[표-22] 분석농도 2.5 mg/g, Agilent 1100 series/DAD 275nm

	1	2	3	4	5	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
카 테 킨 ((+)-catechin)	17.31	17.52	17.95	19.43	18.45	18.13	0.85	4.68
에 틸 갈 레 이 트 (Ethyl gallate)	3.23	3.28	3.30	3.32	3.38	3.30	0.05	1.65

[표-23] 분석농도 5 mg/g, Agilent 1100 series/DAD 275nm

	1	2	3	4	5	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
카 테 킨 ((+)-catechin)	17.64	18.39	18.44	18.19	18.43	18.22	0.34	1.86
에 틸 갈 레 이 트 (Ethyl gallate)	3.20	3.16	3.11	3.02	3.12	3.12	0.07	2.17

[표-24] 분석농도 10 mg/g, Agilent 1100 series/DAD 275nm

	1	2	3	4	5	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
카 테 킨 ((+)-catechin)	18.05	16.80	18.33	17.21	17.26	17.53	0.64	3.63
에 틸 갈 레 이 트 (Ethyl gallate)	3.04	2.89	2.98	2.95	2.71	2.91	0.13	4.33

○ 추가 지표성분(gallic acid) 확보를 위한 분석 연구

- 1차년도 연구에서 원재료를 대표하는 주요 활성성분 외에 추가 활성성분을 확보하고자 HPLC 크로마토그램 10분 이내의 peak를 정성 분석한 결과 Gallic acid의 존재를 확인함. Gallic acid에 대한 정량 분석을 시도하여 표25, 26 및 27과 같은 새로운 분석법을 도출하였고 그림 26과 같이 peak 특이성을 확보하여 정량 분석한 결과, 개머루덩굴 추출물 내 Gallic acid 함량은 2.77 mg/g으로 확인됨. 기존 기능(지표)성분과 동시 분석이 불가하고 상대적인 함량이 낮아서 추가 연구를 진행하지 않았음.

[표-25] 고속액체크로마토그래프 조건

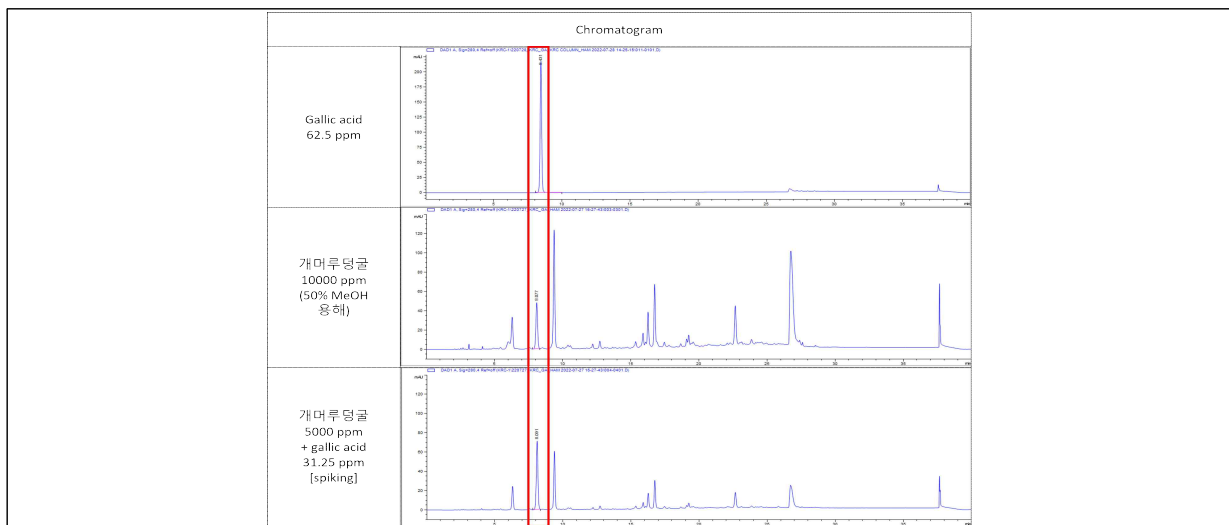
항목	조건
주입량	15 µL
칼럼온도	40°C
이동상	A 용매 - 증류수 (0.1% Formic acid) / B 용매 - 아세토나이트릴 (0.1% Formic acid)
유속	1.0 mL/분
검출기 파장	280 nm

[표-26] 이동상 조건

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	97	3
3	97	3
23	75	25
24	0	100
34	0	100
35	97	3
40	97	3

[표-27] Gallic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성

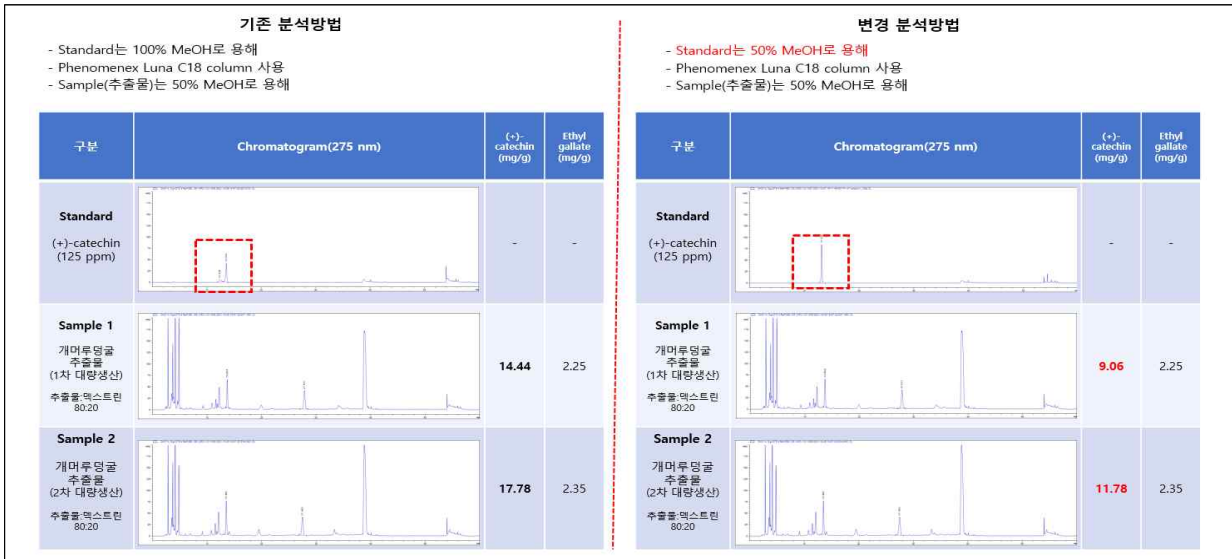
	농도(µg/ml)	면적(Area)	STD curve
	Gallic acid	31.25	
	62.5	12.2446	
	125	29.681	
	250	60.3053	
	500	150.2009	
	1000	298.5005	
	기울기	5.9367	
	y 절편	1.6835	
	R <sup>2</sup>	1	



[그림-26] 개머루덩굴 추출물의 HPLC Chromatogram

○ 분석법 문제 발생에 따른 개선 연구

- 또한 1차년도 수행된 밸리데이션에서 (+)-catechin 표준품의 고농도 peak에서 분리현상이 나타나는 문제가 발생하여 이를 해결하고자 그림 27과 같이 기존 분석법을 변경하여 표준품의 peak 특이성을 확보하였고 그에 따른 개머루덩굴 추출물에서의 (+)-catechin 함량 또한 변경 적용하여 정량함.



[그림-27] 개머루덩굴 추출물의 분석방법 변경

- 1, 2차년도 지표물질 설정 및 분석법 연구를 토대로, 원물의 채취시기에 따른 함량 편차가 큰 Ethyl gallate와 추출물 내에 미량성분인 Gallic acid를 지표성분으로서 배제하였음.
- 문헌자료에 의하면 (+)-catechin은 알레르기 반응을 유발하는 Mast cell의 Down-regulation 효과, LPS로 염증을 유도한 Macrophage에서의 TNF- $\alpha$  저해 효과, IL-6와 염증 관련 신호전달 인자인 NF- $\kappa$ B를 억제시키는 효과 등 면역과민반응에 대한 개선 효과를 가지고 있어 개머루덩굴 추출물의 기능을 대표할 수 있으며 제조공정 중 농축되어 함량이 증가하는 특이성을 보이고 있고 표준품 확보가 용이함. 이러한 근거를 바탕으로 (+)-catechin을 지표성분으로 설정하였음.
- 새롭게 개발된 지표성분 분석법으로 기존 원료의 함량을 재분석한 결과 14.44mg/g에서 9.06mg/g으로 변화가 있는 것을 확인하였으며 (+)-catechin의 변경 분석법에 대한 유효성을 검증하고자 밸리데이션을 재 실시하였음. 연구책임기관에서 분석한 동일 시료와 변경 분석법으로 공인검사기관(한국기능식품연구원)에서 분석하여 시험성적서(그림 28)를 확보함으로써, 실험실간 실험자간 정밀성이 확보되는 표준 분석법을 정립하였음.



[그림-28] 공인검사기관 시험성적서

○ 분석법 개선에 따른 밸리데이션(유효성 검증) 보완 연구

- 개머루덩굴 추출물 지표성분의 변경 분석법에 대한 유효성을 검증하였음(표 28).

[표-28] 지표성분 분석법 밸리데이션

밸리데이션 항목		내용
특이성(Specificity)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC 크로마토그램(275 nm)에서 명확한 피크분리가 확인됨</li> <li>• 표준용액과 시험용액에서 동일한 스펙트럼 및 머무름 시간(약 13분대)이 확인됨</li> <li>• 분리도(resolution)가 1.5이상으로 확인됨</li> </ul>
직선성(Linearity)		• 6개 농도(약 15.625~500 µg/mL) 범위에서 R2=0.9999 이상
정확도(Accuracy)		• 회수율(%): 97.06 ~ 100.77
정밀도(Precision)	반복성(Repeatability)	• 평균함량(mg/g): 11.84, RSD(%): 0.40 ~ 1.35
	재현성(Reproducibility)	• 평균함량(mg/g): 11.56, RSD(%): 2.16

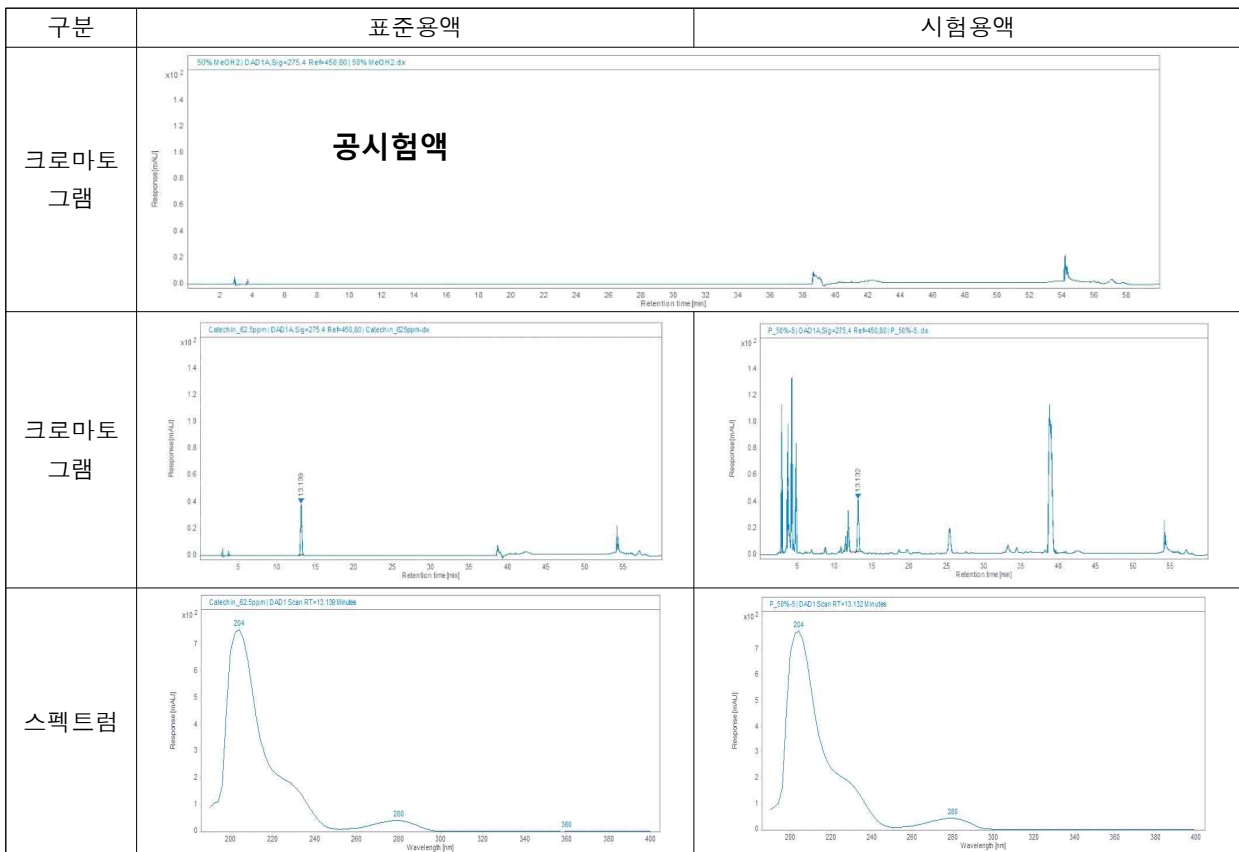
• 특이성(Specificity)

1) 시험방법

- 공시험용액 조제: 공시료를 전 처리 방법에 따라 제조한 시험용액을 공시험용액으로 함.
- 시험용액 조제: 시료를 공시험용액의 전 처리 방법과 동일한 방법으로 시험용액을 제조함.
- 표준용액: 시험용액 제조에 사용된 동일한 용매를 이용하여 표준용액을 제조하였고, 시료 중 함유된 분석 대상물질의 농도범위로 제조함.
- 기기분석 방법: 위에서 제시한 동일한 시험 방법 및 조건으로 분석함.

2) 시험결과

- 공시험용액을 분석하여 표준용액, 시험용액의 분석에 간섭현상이 없음을 확인하였고, 표준용액, 시험용액의 머무름시간, 스펙트럼 등이 일치함을 확인하였음.(그림 29).



[그림-29] HPLC 크로마토그램 및 스펙트럼

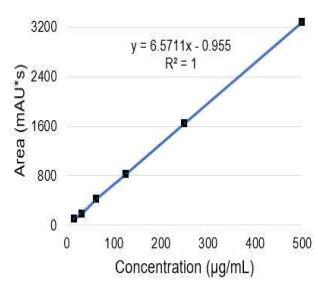
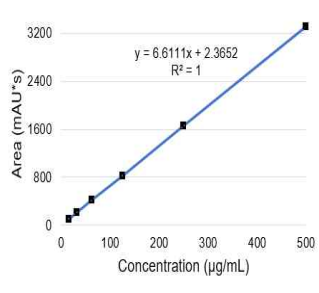
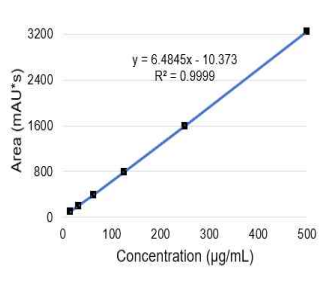
• 직선성(Linearity)

1) 시험방법:

- 표준용액 제조: 15.625 ~ 500 µg/mL 농도범위를 갖도록 표준용액을 제조함.
- 검량선 작성: 위에서 제시한 시험방법을 이용하여 3회 분석한 후 각각의 검량선을 작성함.

2) 시험결과: 결정계수(Coefficient of determination) R2: 0.9999 ~ 1.0000으로 확인하였음(표 29).

[표-29] 직선성 분석 결과

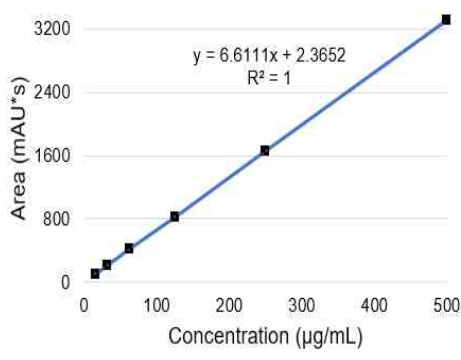
반복 수	1회		2회		3회	
	농도(µg/mL)	피크면적	농도(µg/mL)	피크면적	농도(µg/mL)	피크면적
1	15.625	105.965	15.625	105.107	15.625	99.412
2	31.25	188.350	31.25	208.415	31.25	199.408
3	62.5	415.002	62.5	414.594	62.5	397.865
4	125	825.548	125	828.390	125	792.915
5	250	1646.806	250	1659.476	250	1586.710
6	500	3281.055	500	3306.009	500	3244.647
기울기	6.5711		6.6111		6.4845	
y절편	0.9550		2.3652		10.3730	
R2	1.0000		1.0000		0.9999	
검량선						

• 정확도(Accuracy)

1) 시험방법

- 표준용액 제조 및 검량선 작성: 정확성 측정을 위해 3개 이상의 농도 범위의 표준용액을 제조하고, 이에 대해 아래와 같이 검량선을 작성함.(표 30)

[표-30] 정확성 측정을 위한 검량선

	표준용액 농도(µg/mL)	피크면적	검량선
1	15.625	105.107	
2	31.25	208.415	
3	62.5	414.594	
4	125	828.390	
5	250	1659.476	
6	500	3306.009	
기울기	6.6111		
Y절편	2.3652		
r2	1.0000		

- Control(시험용액): 표준용액이 첨가된 검체와 표준용액이 첨가되지 아니한 검체를 위의 시험방법과 동일하게 전처리하여 HPLC 분석을 위한 시험용액을 제조함.
- 표준물질 첨가 (spiking): 시료 약 1000 mg(지표(기능)성분으로서 11 mg/g에 해당)을 취한 후, 시료 중의 함유된 지표(기능)성분 함량의 50%, 100%, 150%의 농도가 되도록 Stock 표준원액 (1280 µg/mL)을 5.0 mL, 10.0 mL, 15.0 mL씩 첨가함.

2) 시험결과

- 회수율은 97.06 ~ 100.77%로 확인하였음.
- AOAC 기준 ( $\geq 1\%$ (1 g/100 g)일 때 92 ~ 105%)에 적합임을 확인하였음(표 31).

[표-31] 정확도 결과

항 목	시료 채취량 (mg)	첨가한 표준물질의 농도 (이론치, A) (µg/mL)	시험용액(분석값)		첨가된 표준물질의 농도 (실측치, C-B) (µg/mL)	희석 배수	회수율 $\{(C-B) / [A] \times 100\}$ (%)	평균 회수율 (%)	표준 편차 (SD)	상대 표준 편차 (%R SD)
			피크 면적	농도(C) (µg/mL)						
Spiking 한 시료	저농도	62.0	1229.600	185.63	61.02	1	98.43	99.08	0.57	0.57
			1233.903	186.28	61.68	1	99.48			
			1233.322	186.20	61.59	1	99.33			
	중농도	124.0	1648.057	248.93	124.32	1	100.26	100.47	0.27	0.27
			1649.025	249.08	124.47	1	100.38			
			1652.288	249.57	124.96	1	100.77			
	고농도	186.0	2019.694	305.14	180.53	1	97.06	97.33	0.27	0.27
			2022.953	305.64	181.03	1	97.33			
			2026.260	306.14	181.53	1	97.60			
Blank 검체		-	844.943	127.45	-	-	-	-	-	-
			815.513	123.00						
			818.025	123.38						
			평균 (B)							



• 정밀도(반복성)

1) 시험방법

- 위에서 제시한 시료방법에 시료량(3개 이상의 함량)의 50%, 100%, 150%에 해당되는 양을 취하여 5회 이상 반복 측정 후 측정값들 사이의 근접한 정도(상대표준편차)를 구함.

2) 시험결과

- 반복성: 상대표준편차(RSD%)는 0.40 ~ 1.35% 이며, 평균 함량은 11.84 mg/g으로 확인하였음.
- AOAC 기준 ( $\geq 1\%$ (1 g/100 g)일 때, 상대표준편차 2% 범위 이내로 확인하였음(표 32).

[표-32] 반복성 분석 결과

반복수		시료량 (mg)	피크면적	검출농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	표준편차	RSD (%)
500 mg (50%)	1	500.1	397.941	60.70	11.51	11.56	0.06	0.55
	2	500.3	397.880	60.70	11.50			
	3	500.8	400.575	61.11	11.57			
	4	500.4	397.814	60.69	11.50			
	5	501.1	402.421	61.39	11.61			
	6	501.9	404.183	61.65	11.65			
1000 mg (100%)	1	1001.7	816.293	124.37	11.77	11.82	0.05	0.40
	2	1002.5	818.044	124.64	11.79			
	3	1002.9	822.058	125.25	11.84			
	4	1003.2	826.022	125.85	11.89			
	5	1002.3	818.985	124.78	11.80			
	6	1002.9	823.431	125.46	11.86			
1500 mg (150%)	1	1501.2	1254.221	191.01	12.06	12.13	0.16	1.35
	2	1500.7	1252.853	190.81	12.05			
	3	1501.2	1245.716	189.72	11.98			
	4	1503.4	1255.678	191.24	12.06			
	5	1504.6	1296.110	197.39	12.44			
	6	1503.2	1267.754	193.07	12.18			

	표준용액 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	피크면적	검량선
1	15.625	105.965	
2	31.25	188.350	
3	62.5	415.002	
4	125	825.548	
5	250	1646.806	
6	500	3281.055	
기울기	6.5711		
Y절편	0.9550		
$r^2$	1.0000		

• 정밀도(재현성)

1) 시험방법

- 위에서 제시한 시험방법과 동일하게 시료량을 정량하여 시험자, 분석기기, 일자를 달리하여 5회 이상 반복 측정하여 측정값들 사이의 근접한 정도(상대표준편차)를 구함.

2) 시험결과

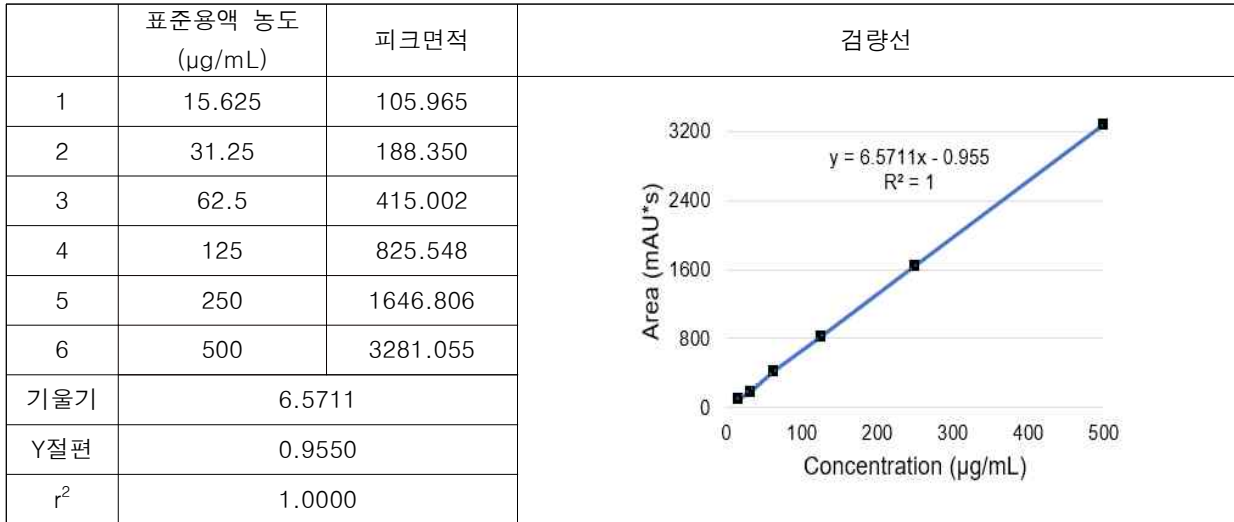
- 재현성: 상대표준편차(RSD%)는 0.38~0.91% 이며, 평균 함량은 11.56 mg/g으로 확인함.
- AOAC 기준 ( $\geq 1\%$ (1 g/100 g) 일 때, 상대표준편차 4% 범위 이내로 확인하였음(표 33).

[표-33] 재현성 분석 결과

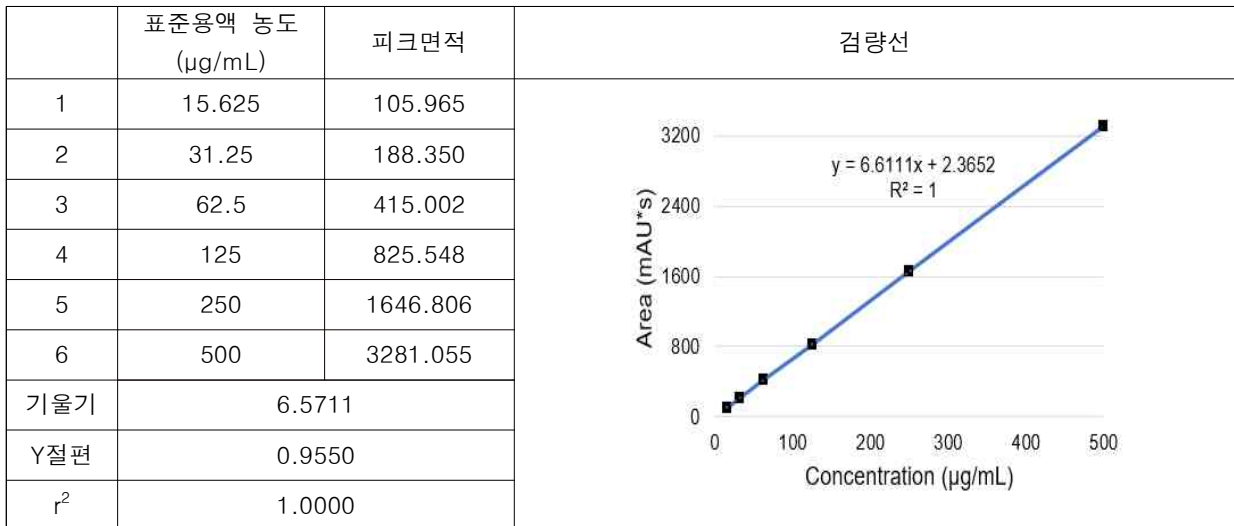
반복수	시험자 A, 1 day (사용기기 : Agilent 1260 infinity II A)				시험자 B, 2 day (사용기기 : Agilent 1260 infinity II A)				시험자 A, 3 day (사용기기 : Agilent 1260 infinity II B)			
	시료 량 (mg)	피크 면적	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	함량 (mg/g)	시료 량 (mg)	피크 면적	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	함량 (mg/g)	시료 량 (mg)	피크 면적	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	함량 (mg/g)
1	1001.7	816.293	124.37	11.77	1000.7	808.893	122.00	11.56	1000.7	751.403	117.48	11.13
2	1002.5	818.044	124.64	11.79	1000.9	807.447	121.78	11.53	1000.4	752.970	117.67	11.15
3	1002.9	822.058	125.25	11.84	1001.7	816.587	123.16	11.66	1001.2	759.224	118.68	11.24
4	1003.2	826.022	125.85	11.89	1001.9	813.811	122.74	11.61	1001.5	763.778	119.38	11.30
5	1002.3	818.985	124.78	11.80	1002.3	812.024	122.47	11.58	1002.6	766.064	119.74	11.32
6	1002.9	823.431	125.46	11.86	1002.1	814.252	122.81	11.62	1002.4	770.723	120.46	11.39
평균 분석값 (mg/g)	11.82				11.59				11.26			
표준 편차	0.05				0.04				0.10			
RSD (%)	0.40				0.38				0.91			
전체 평균 분석값 (mg/g)	11.56											
전체 표준 편차	0.25											
전체 RSD (%)	2.16											

※ 정밀도 중 재현성 측정에 사용된 검량선(표 34~36)

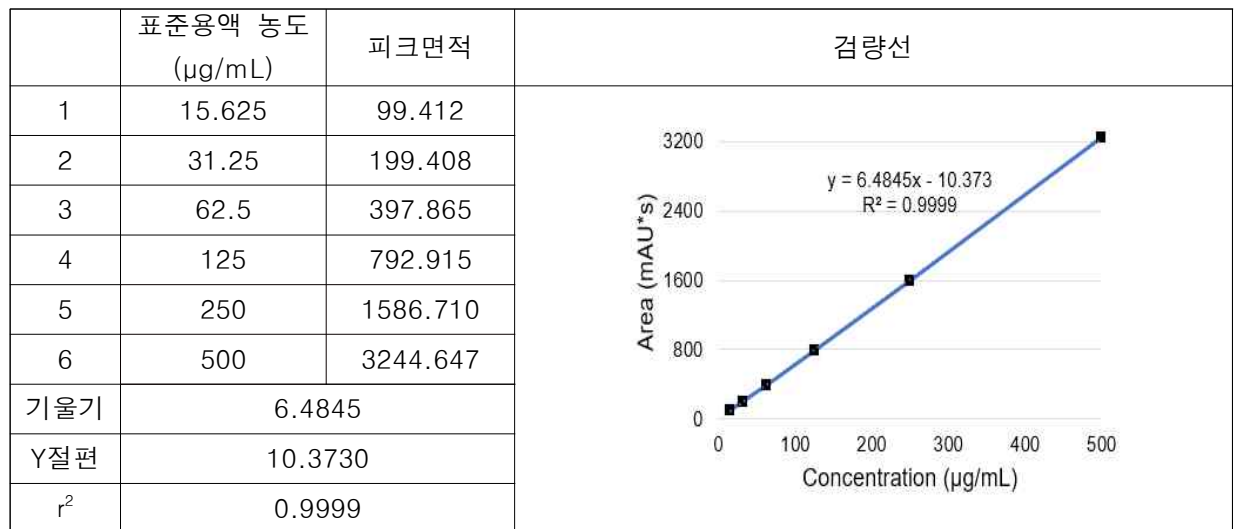
[표-34] 시험자 A, 1 day (사용기기: Agilent 1260 infinity II A) 검량선



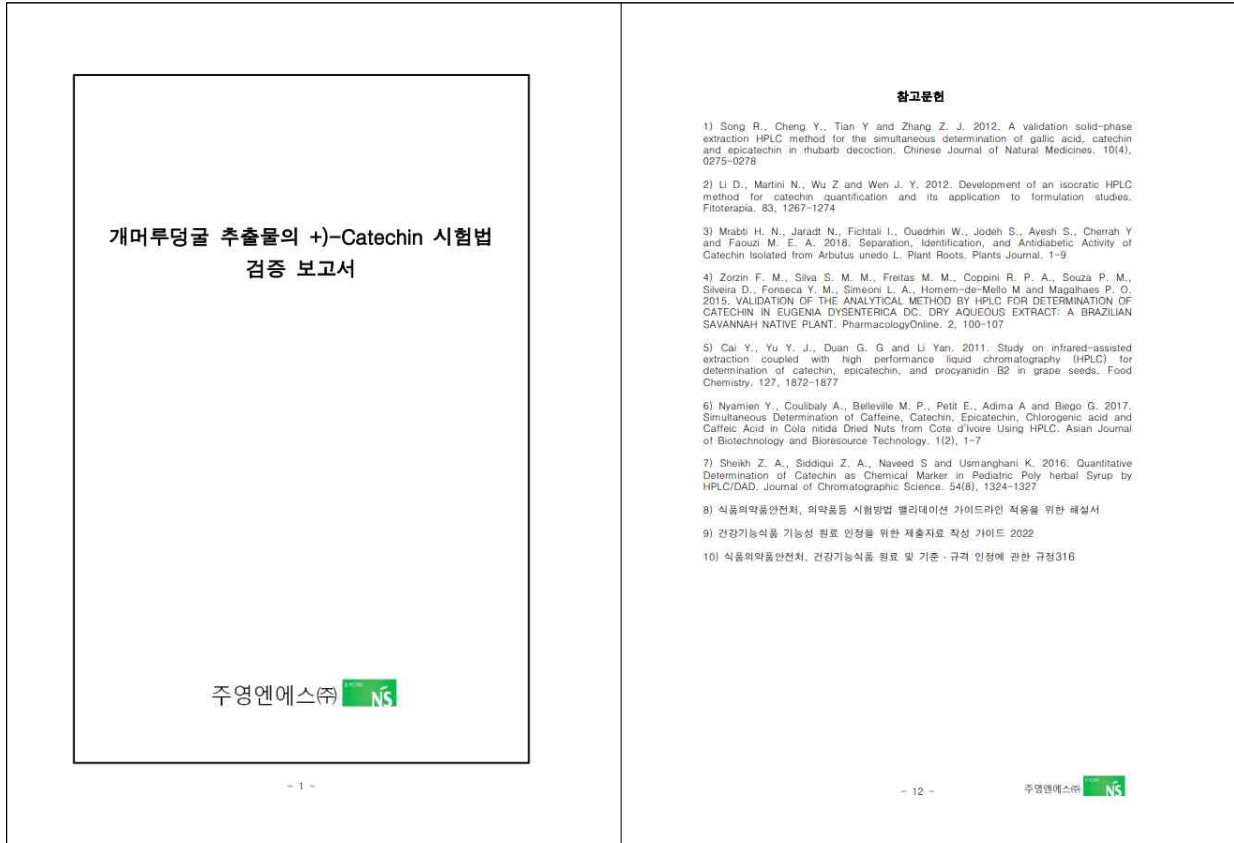
[표-35] 시험자 B, 2 day (사용기기: Agilent 1260 infinity II A) 검량선



[표-36] 시험자 A, 3 day (사용기기: Agilent 1260 infinity II B) 검량선



- 본 시험법의 유효성 검증을 진행한 결과, +)-Catechin의 peak 특이성을 확보하였고, 직선성의 경우, 6개 농도(약 15.625~500 µg/mL) 범위에서 R<sup>2</sup>=0.9999 이상으로 확인되었으며, 정확도는 3가지 다른 농도에 대해 97.06~100.77%의 회수율을 확인하였으며, 각각 다른 시험 일자, 시험장비에 따른 반복성 및 재현성을 확인한 결과, AOAC의 반복성 및 재현성 상대표준편차(RSD) 기준에 만족하여, HPLC를 이용한 개머루덩굴 추출물의 +)-Catechin 시험법이 적합함을 검증하였고 그림 30과 같이 시험법 검증 보고서를 작성하였으며 개별인정형 기능성 원료 신청 자료로 활용할 예정임.

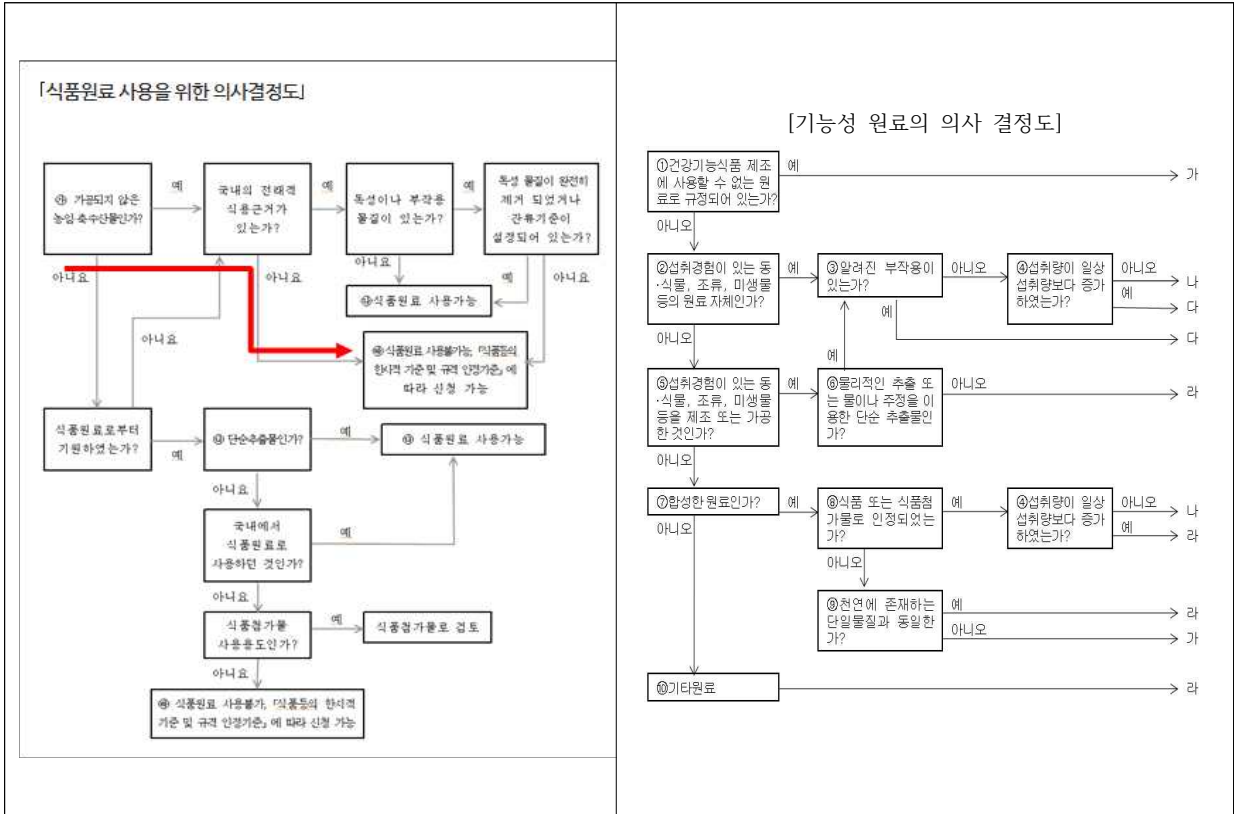


[그림-30] 개머루덩굴 추출물의 +)-Catechin 시험법 검증 보고서

## 5) 기능성 소재의 안전성 평가

### 가. 연구방법

- 경제협력개발기구(OECD)에서 정하는 시험법(test guideline)에 따라 시험한 자료를 제출요건에 따라 실험을 실시함.
  - 개머루 덩굴은 식품의약품안전처 식품원료목록에 등재 되어 있지 않기 때문에 식품원료 사용을 위한 의사결정도 및 기능성원료의 의사결정도(그림 31)에 따라 개별인정 시 제출되어야 하는 안전성 자료는 모두 확보되어야 함.
  - 표 37과 같이 제출되어야 하는 안전성 자료는 섭취근거 자료, 해당 기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 정보 자료, 섭취량 평가자료, 인체적용시험자료, 독성시험자료임.
  - 독성시험은 '건강기능식품 기능성 원료 기준 및 규격 인정에 관한 규정'에 따라 단회 투여 독성시험, 13주 반복투여독성 시험과 유전독성시험(소핵, 염색체이상, 복귀돌연변이) 항목을 설정하였고 시험의 수행은 GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 실시하였으며, OECD 독성시험기준과 MFDS 의약품등의 독성시험기준에 준하여 수행하였음.



[그림-31] 식품원료 사용을 위한 의사결정도 및 기능성원료의 의사결정도

[표-37] 제출되어야 하는 안전성 자료

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다
건강기능식품 기능성 원료로 신청할 수 없음	√		
섭취 근거 자료 <sup>1)</sup>		√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 <sup>2)</sup>		√	√
섭취량평가자료 <sup>3)</sup>		√	√
인체적용시험자료			√
독성시험자료 <sup>4)</sup>			√

1)섭취근거자료 : 당해 원료가 안전하다고 판단할 수 있는 역사적 사용 기록 뿐 아니라 제조방법, 용도, 섭취량 등이 기술된 과학적 자료 구축

2)해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 : 국내외 학술지에 게재되거나 게재증명서를 받은 것, 국내외 정부 보고서 또는 국제기구 보고서, 관련 데이터베이스 검색결과 자료 구축

3)섭취량 평가 자료 : 섭취실태조사자료, 통계 자료 등 구축

4)단회투여 독성시험, 13주 반복투여 독성시험, 유전독성시험(복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험) : 특히 설치류 90일 반복투여 독성시험은 식약처 안내서-1069-01 식품등의 독성시험 가이드라인에 준하여 암컷의 성주기 검사, 호르몬 검사 등 생식기계 관련 검사와 장기 검사 추가 내용을 관찰하고자 함.

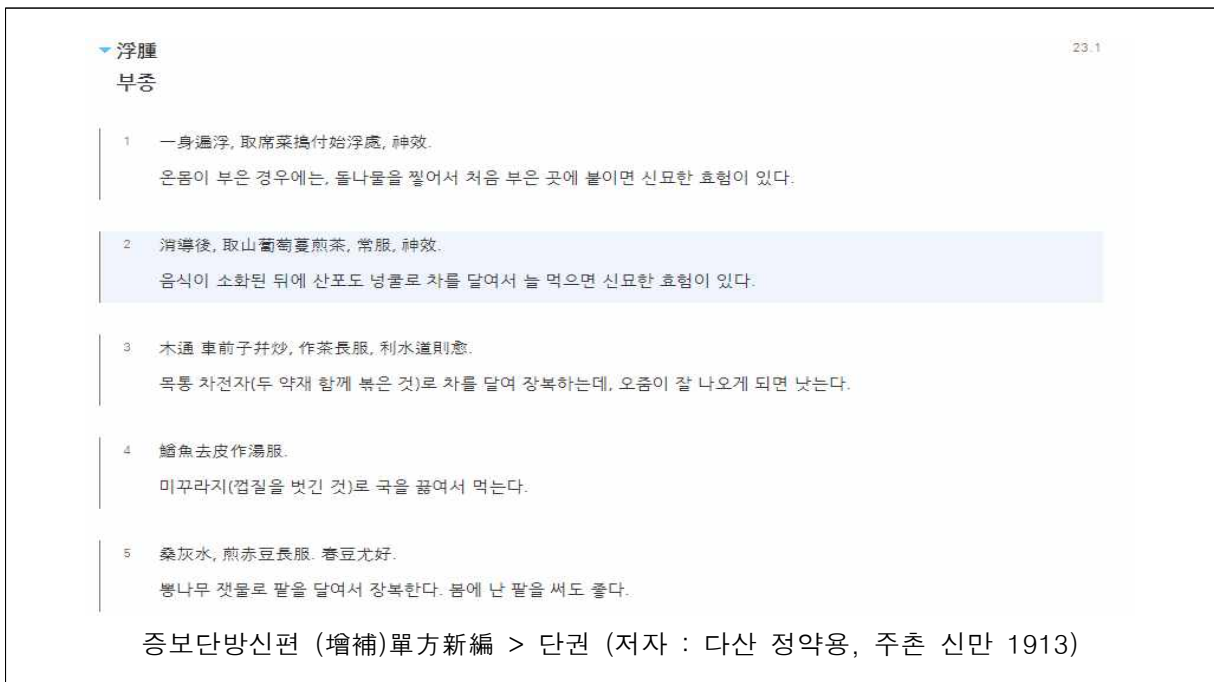
나. 연구내용

○ 섭취근거 자료

- 개머루 덩굴 추출물(JY206)의 원재료(개머루 덩굴)는 국내외 일상적(25년 이상) 섭취(유통 판매 섭취) 경험 기록은 없으며 그림 32와 같이 개머루의 잎은 야채박록 초부1권에 식용법이 기술되어 있고 그림 33과 같이 줄기(덩굴)는 약용으로 사용된 국내 전통적 사용 기록이 있고 국외의 경우 중국에서 사포도(개머루의 경엽)는 중약대사전 제2판 (하) 4562 3011(책/번호/쪽수) 및 중화본초 (5) 4235 279(권/번호/쪽수)에 약용으로 등재된 전통적 기록이 있음.



[그림-32] 개머루 잎의 식용 섭취 근거 자료



[그림-33] 개머루 줄기의 약용 섭취 근거 자료

○ 해당 기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 정보 자료

- 개머루덩굴 추출물의 지표성분인 (+)-catechin 및 원재료(Ampelopsis glandulosa)의 안전성(독성, 부작용 등) DB 검색 정보 자료는 표 38과 같음.

[표-38] 지표성분 및 관련물질의 안전성 DB 검색 결과

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부
Pubmed	Ampelopsis glandulosa or (+)-catechin And safety or adverse or toxic	x	x (인체독성영향 정보 없음)
Pubchem	(+)-catechin	x	x (인체독성영향 정보 없음)
ECHA	(+)-catechin	x	x (인체독성영향 정보 없음)
NLM Technical bulletin(Toxnet)	(+)-catechin	x	x (인체독성영향 정보 없음)
Tox-Info	(+)-catechin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 반수치사량(LD50)</li> <li>= 68 mg/kg (mouse, IP)</li> <li>&gt; 100 mg/kg (mouse, IV)</li> <li>&gt; 10,000 mg/kg (mouse, PO)</li> <li>&gt; 5,000 mg/kg (mouse, SC)</li> <li>= 1,084 mg/kg (Rat, IP)</li> <li>&gt; 100 mg/kg (Rat, IV)</li> <li>&gt; 10,000 mg/kg (Rat, PO)</li> <li>&gt; 5,000 mg/kg (Rat, SC)</li> </ul>	x (인체독성영향 정보 없음)
North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox	Ampelopsis glandulosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>[Poison to humans]</li> <li>• Poison severity: Low</li> <li>• Poison Symptoms</li> <li>- Poisonous through ingestion of fruits</li> <li>- Symptoms: unknown, questionably poisonous, but use caution</li> <li>• Causes contact dermatitis: No</li> <li>• Poison part: fruits</li> </ul>	x (인체독성영향 정보 없음)

- Extension gardener에 나와있는 정보에 따르면 개머루덩굴의 과육이 약간의 독성을 가지고 있으나, 증상과 기전이 명확히 알려져 있지 않고 개머루덩굴 줄기가 인체에 미치는 독성에 대한 보고는 없으며, 건강상의 위험이나 부작용은 알려져 있지 않음. 지표성분인 (+)-catechin 또한 Tox-info에 따르면 동물 및 인체에 대한 발암성 자료는 없고, IARC 발암물질 분류에는 포함되어 있지 않음. 그리고 임상시험에서 (+)-catechin을 하루에 3g 섭취했을 때 용혈성 빈혈을 일으킨다는 문헌자료 (Toxicology and safety of flavonoids, John Wiley & Son. P. 257 )가 있으나 이는 본 기능성 소재의 일일 섭취량(1 g)에 함유되어 있는 (+)-catechin 함량의 약 300배에 해당하는 양으로 본 기능성 소재의 안전성(독성, 부작용 등) 자료로는 증거가 불충분함.


○ 섭취량 평가 자료

- 개머루덩굴 추출물(JY206)의 원재료를 약용으로 섭취한 전통적 사용자료를 바탕으로 제안한 기능성 소재(개머루덩굴 추출물)의 일일 섭취량을 원재료로 환산하였을 때 표 39와 같이 약용의 복용량 보다 많지 않은 것을 확인함.





[표-41] 13주 반복투여독성시험 자료요약서


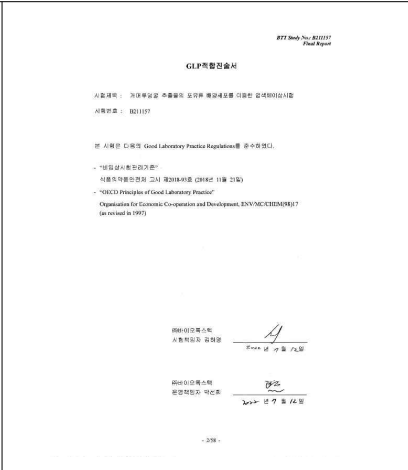
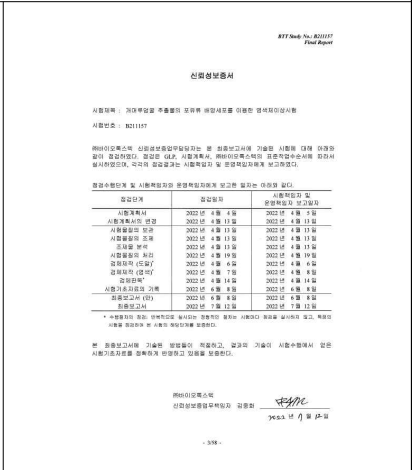
		Study No.	B211155							
시험목적	JY206의 암수 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 매일 경구투여 시 나타나는 안전성과 독성을 평가									
시험기관 (책임자)	(주)바이오톡스텍(정장훈)									
시험물질	개머루덩굴 추출물	Lot No.				JY206MM210930				
시험내용	실험군	대조군		저용량		중용량		고용량		
	투여량(mg/kg)	0		1,250		2,500		5,000		
	실험동물(M/F)	M	F	M	F	M	F	M	F	
	군당 동물수	10	10	10	10	10	10	10	10	
	사망 동물수	-	-	-	-	-	-	-	-	
평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 일반증상                      ■ 사료/물 섭취량                      ■ 체중측정                      □ 기타</li> <li>■ 혈액학적 검사                ■ 혈액생화학적 검사                ■ 장기중량</li> <li>■ 병리육안 검사                ■ 병리조직 검사                      ■ 뇨 검사</li> </ul>									
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사망개체                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 관찰기간 중 투여 35일 차에 수컷 2,500 mg/kg/day 투여군의 1레가 측와위(Lying on side) 자세로 사망했음. 해당 개체에서 생존 기간 중 유의미한 일반증상의 이상은 관찰되지 않음. 또한 부검 시, 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았으며, 조직병리학적 검사결과 시험물질 및 개체의 사망과 연관성을 갖는 것으로 판단되는 이상병변은 동반되지 않음. 따라서 개체의 사인은 명확히 알 수 없지만 이는 독립적으로 발생된 우발적 사망례로 사료됨.</li> </ul> </li> <li>• 계획부검                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질과 연관성을 갖는 이상소견은 관찰되지 않음. 이외에 조직병리학적 검사 결과 위(stomach)에서 시험 물질 투여와 연관성을 갖는 변화가 관찰됨.</li> <li>- 암수 5,000 mg/kg/day 투여군 및 수컷 2,500 mg/kg/day 투여군의 위 한계능(Limiting ridge)에서 과다화증(Hyperkeratosis)이 동반되거나 동반되지 않은 편평 상피세포(Squamous cell)의 과증식(Hyperplasia)이 관찰됨. 이러한 변화는 시험물질 투여군에서만 관찰되었으며, 발생 빈도가 용량의존적으로 증가하는 경향성을 보였으므로, 시험물질 투여와 연관성을 갖는 변화로 판단함. 그러나 이는 미란(Erosion), 궤양(Ulcer), 염증세포(Inflammation cell) 또는 비정형세포(Atypical cell)와 같은 변화는 동반되지 않은 최소(Minimal) 및 경미(Slight)한 수준의 변화로 독성학적 의미는 없는 수준의 변화로 사료됨.</li> <li>- 그 외 다른 장기 및 조직에서 산발적으로 관찰된 변화는 기관 내 배경 데이터 범위 내 수준으로 관찰됨. 따라서 해당 소견들은 독립적으로 관찰된 우발적 변화로 사료되므로 독성학적 의미는 없는 것으로 판단됨.</li> </ul> </li> <li>• JY206의 랫드에 대한 무독성량(NOEL)은 암수 공통적으로 5,000 mg/kg/day가 적절한 것으로 판단됨.</li> </ul>									
 <p><b>시험보고서</b></p> <p>개머루덩굴 추출물(Sprague-Dawley, 정장훈) 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험번호: B211155</p> <p>시험일자: 2021.05.10</p> <p>시험장소: 서울특별시 강남구 테헤란로 129, 바이오톡스텍 (주) 연구개발센터</p> <p>시험목적: 개머루덩굴 추출물(Sprague-Dawley, 정장훈) 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험대상: B211155</p> <p>시험종류: 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험결과: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 요약: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 상세: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 결론: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 요약: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 상세: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 결론: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p>		<p>시험목적: 개머루덩굴 추출물(Sprague-Dawley, 정장훈) 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험대상: B211155</p> <p>시험종류: 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험결과: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 요약: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 상세: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 결론: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p>				<p>시험목적: 개머루덩굴 추출물(Sprague-Dawley, 정장훈) 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험대상: B211155</p> <p>시험종류: 13주 반복 투여독성시험</p> <p>시험결과: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 요약: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 상세: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p> <p>시험결과 결론: 사망 1건, 일반증상 1건, 혈액학적 검사 1건, 혈액생화학적 검사 1건, 장기중량 1건, 병리육안 검사 1건, 병리조직 검사 1건, 뇨 검사 1건</p>				

[표-42] 복귀돌연변이시험 자료요약서

		Study No.	B211156
시험목적	히스티딘 요구성인 살모넬라균(Salmonella typhimurium)과 트립토판 요구성인 대장균(Escherichia coli)을 이용하여 JY206의 유전자 돌연변이 유발성 여부 확인		
시험기관 (책임자)	(주)바이오톡스텍(안효진)		
시험물질	개머루덩굴 추출물	Lot No.	JY206MM210930
시험의 성립	<ul style="list-style-type: none"> <li>해당시험은 유전자 돌연변이 유발성 결과에서 재현성이 확보되었고 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4단계 이상 확보되었음.</li> <li>음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이 콜로니수 평균치가 historical control data 범위 내에 속하였고 각 군주에 있어서 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 증가함.</li> <li>잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단됨.</li> </ul>		
시험결과	<ul style="list-style-type: none"> <li>복귀돌연변이 콜로니수의 계측                     <ul style="list-style-type: none"> <li>-시험물질 군에서는 대사 활성화 유무에 관계없이 각 군주의 모든 용량에서 복귀변이 콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가함.</li> </ul> </li> <li>시험물질에 의한 생육저해 및 침전                     <ul style="list-style-type: none"> <li>-대사활성화 비존재하 및 존재하의 각 군주의 모든 용량에서 시험물질에 의한 생육저해는 관찰되지 않았고 시험물질에 의한 침전은 313 µg/plate 이상의 용량에서 관찰됨.</li> </ul> </li> <li><b>JY206의 유전자 돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단됨.</b></li> </ul>		

[표-43] 염색체이상시험 자료요약서

		Study No.	B211157
시험목적	포유류 배양세포주인 CHL/IU cell line을 이용하여 JY206의 염색체 이상 유발성 여부 확인		
시험기관 (책임자)	(주)바이오톡스텍(김하영)		
시험물질	개머루덩굴 추출물	Lot No.	JY206MM210930

<p>시험의 성립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>음성대조군 및 양성대조군에서 염색체 구조 이상을 가진 세포의 출현 빈도가 historical control data 관리 범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 양성대조군에서 통계학적으로 유의하게 증가함.</li> <li>또한 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열증기상이 300개 이상 관찰되었으며, 판독 가능한 용량이 3단계 이상 확보됨.</li> <li>음성대조군 내 세포 증식 기준이 충족되었고 세가지 실험 조건 중 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하에서 양성을 나타내지 않아서 세 조건 모두 수행함.</li> <li>용량설정시험을 통해 최고 농도를 설정하였기 때문에 최고 농도를 선정하기 위한 기준도 적함하여 해당 시험은 적절한 시험 조건하에서 실시된 것이 확인됨.</li> </ul>	
<p>시험결과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>염색체 이상 출현빈도 -단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었고 각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 구조 이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교했을 때 통계학적으로 유의한 증가가 확인됨.</li> <li>JY206의 염색체 이상 유발성은 없는 것으로 판단됨.</li> </ul>	
		

[표-44] 소핵시험 자료요약서

		Study No.		B211158		
시험목적	SD 랫드 골수세포를 이용하여 JY206의 소핵 유발성 여부 확인					
시험기관 (책임자)	(주)바이오텍스텍(손동원)					
시험물질	개머루덩굴 추출물	Lot No.		JY206MM210930		
양성대조물질	Cyclophosphamide(CPA)					
시험내용	실험군	음성	양성	저용량	중용량	고용량
	투여량(mg/kg)	0	20	1,250	2,500	5,000
	실험동물	Male				
	군당 동물수	5	5	5	5	5
시험의 성립	<ul style="list-style-type: none"> <li>음성대조군 및 양성대조군에서 소핵 다염색적혈구의 출현빈도가 historical control data 관리 범위 내에 있고 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가함.</li> <li>투여군과 관찰용 세포의 수가 적절하였고 용량 설정 기준에 따라 최고 투여용량을 설정하였기 때문에 본 시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단함.</li> </ul>					



[표-45] 3로트 시작품의 지표성분 함량 및 유해물질 성적서

구분	시험항목		제안 기준 및 규격	실측치	성적서
규격항목	성상		갈색의 분말	갈색의 분말	자체 성적
	기능성분(지표성분)(mg/g)		11(80~120%)	11.78(LOT 1)	
				10.75(LOT 2)	
				11.15(LOT 3)	
	중금속 (mg/kg)	납	1.0 이하	0.0448	
		비소	1.0 이하	0.0737	
		카드뮴	0.5 이하	0.0017	
		수은	0.5 이하	0.0033	
	미생물	대장균군	음성	음성	
		세균수(cfu/g)	액상에 한함.	-	
곰팡이 독소	총아플라톡신( $\mu\text{g/kg}$ )		15.0 이하	식품일반공통기준	
	초산에틸 외 4종		물, 주정 만을 사용하였음.	불검출	
규격 미설정 항목	잔류용매	초산에틸 외 4종	물, 주정 만을 사용하였음.	불검출	
	동물용의약품	-	항생제 잔류오염 가능성 없음.	-	
	잔류농약	BHC 외 4종	-	전항목 불검출	

[표-46] 기능성 소재의 기준 규격

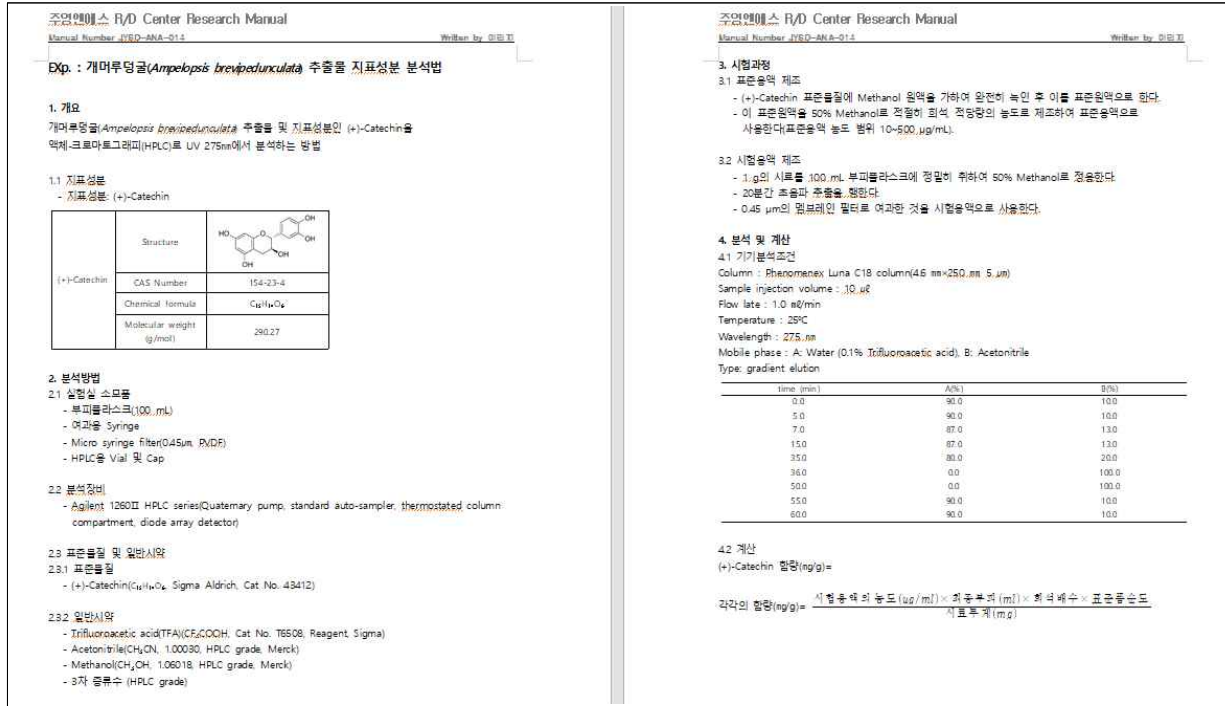
기능성 소재(개머루덩굴 추출물) 기준규격	
성상	고유의 향미가 있고 이미, 이취가 없는 갈색의 분말
+)-catechin(mg/g)	11 (표시량의80~120%)
수분(%)	7.0 이하
납(mg/kg)	1.0 이하
비소(mg/kg)	1.0 이하
카드뮴(mg/kg)	0.5 이하
수은(mg/kg)	0.5 이하
대장균군	음성
총아플라톡신( $\mu\text{g/kg}$ )	15.0 이하

[표-47] 기능성 소재의 영양 정보 자료

시험항목	분석 결과	성적서
열량(Kcal/100g)	385.90 kcal/100g	
탄수화물(%)	90.89 %	
조단백질(%)	1.94 %	
조지방(%)	1.62 %	
수분(%)	1.53 %	
회분(%)	4.02 %	
나트륨(mg/100g)	76.67 mg/100g	

○ 기능성 소재의 시험법 확립

- 지표성분(+)catechin 시험법은 정립된 표준 분석법을 그림 34과 같이 매뉴얼화 하였음.



[그림-34] 지표성분 시험법 매뉴얼

- 성상, 수분, 중금속 및 대장균군에 대한 시험은 식품공전 및 건강기능식품공전에 따라 실시함.

7) 기능성 소재의 유효성 평가

가. 연구방법

○ 세포수준의 활성 검증 및 작용기전 연구

- 아토피관련 사이토카인을 확인하기 위해 배양된 HaCaT 세포에 TNF- $\alpha$ /INF- $\gamma$ 를 처리하여 아토피 유사 환경을 유도한 세포에서 RNA를 추출하여 PCR로 확인. 염증 유발성 사이토카인의 발현을 억제하는 과정에 관여하는 신호전달 기전을 밝히기 위해, STAT1의 인산화와 염증성 사이토카인의 전사를 조절하는 인자로서 중요한 신호 전달 물질인 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 인산화에 대해 측정하며 실험디자인은 표 48과 같이 설계하였음.

[표-48] HaCaT cell을 이용한 피부 면역과민반응 개선 시험

세포주	HaCaT cell(피부각질세포주)	
시험물질	JY206(ABE-M)	
양성대조물질	Cyclosporin A	
시험방법	TNF- $\alpha$ /INF- $\gamma$ 를 처리하여 염증 환경 조성 후 개머루덩굴 추출물을 처리하여 바이오마커에 대해 유전자(real-time PCR)와 단백질(ELISA) 발현 수준에서 확인	
바이오마커	면역조절	Cytokine: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 Chemokine: CCL17, CCL22
	피부장벽	Filaggrin(FLG), Involucrin(IVL), Loricrin(LOR), Occludin(OCLN), Tight Junction Protein(TJP1, ZO-1) Serine palmitoyltransferase1, 2(STP1,2), Ceramidase

○ 동물 모델(DNCB 유도 아토피 모델)을 이용한 효능 평가

- 개머루덩굴추출물(JY206) 1차 시작품(Lot No. JY206MM210615)과 2차시작품(Lot No. JY206MM210930)의 효능 확인을 위해 동물 실험을 진행하였으며 실험 디자인은 표49와 같이 설계하였음.

[표-49] DNCB 동물모델을 이용한 면역과민반응 개선 시험

시험모델	동물	BALB/C mouse
	유도물질	Dinitrochlorobenzene(DNCB)
투여방법	4주간 1일 1회 경구투여	
시험군 설정	실험군	시험물질 및 투여량
	정상군	PBS
	유발군	
	양성대조군	Dexamethasone 1 mg/kg
	저용량군	JY206 50 mg/kg
	중용량군	JY206 100 mg/kg
	고용량군	JY206 200 mg/kg
측정항목	육안평가, 귀 두께, Immunoglobulin, 조직병리학검사(H&E stain, Toluidine blue) Cytokine(TSLP, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6), Chemokine(CCL17, CCL22)	

○ 동물 모델(집먼지 진드기 유도 아토피 모델)을 이용한 효능 검증 및 유효 용량 결정

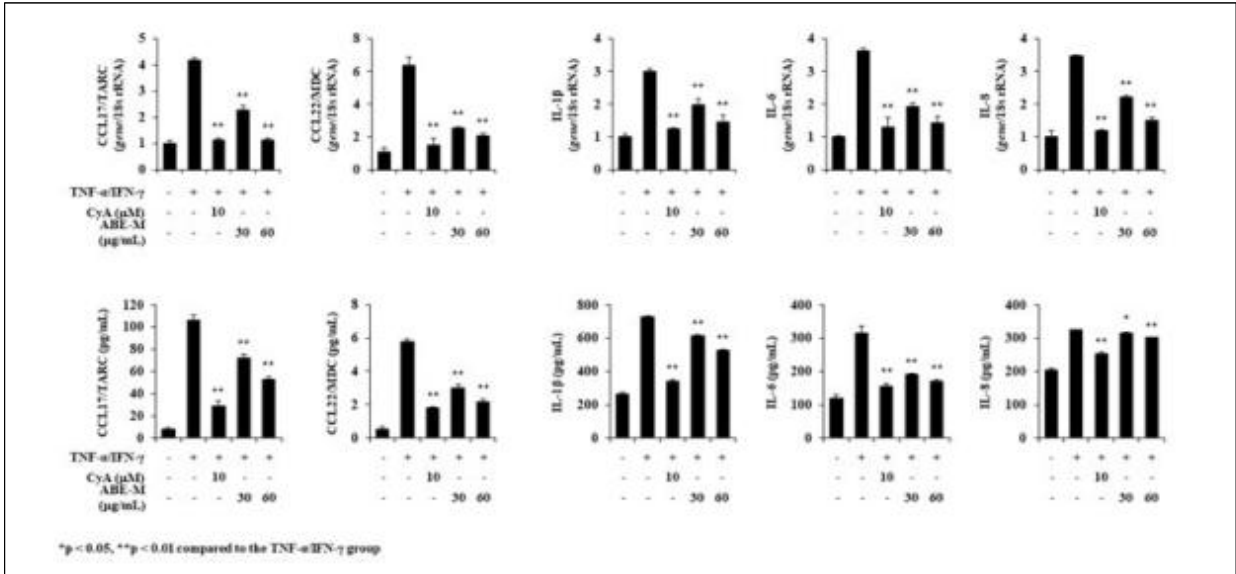
- 투여용량을 다양화하여 기능성 원료의 인체적용 시험 용량 및 상용화를 위한 최종 임상 용량을 결정하기 위한 동물 실험을 비임상유효성평가 전문기관인 (주)노터스에 의뢰하여 진행하였으며 실험 디자인은 표50과 같이 설계하였음.

[표-50] 집먼지 진드기 동물모델을 이용한 면역과민반응 개선 시험

시험모델	동물	Nc/Nga mouse	
	유도물질	천연 집먼지 진드기(Biostir 연고)	
투여방법	4주간 1일 1회 경구투여		
시험군 설정	실험군	시험물질 및 투여량	
	G1	정상군	DW
	G2	유발군	
	G3	양성대조군	Dexamethasone 2 mg/kg
	G4	저용량군	JY206 50 mg/kg
	G5	중용량군	JY206 100 mg/kg
	G6	고용량군	JY206 200 mg/kg
측정항목	피부임상지수 육안평가, 백혈구 비율 감별 조직병리학적 검사, Total IgE, IL-4		

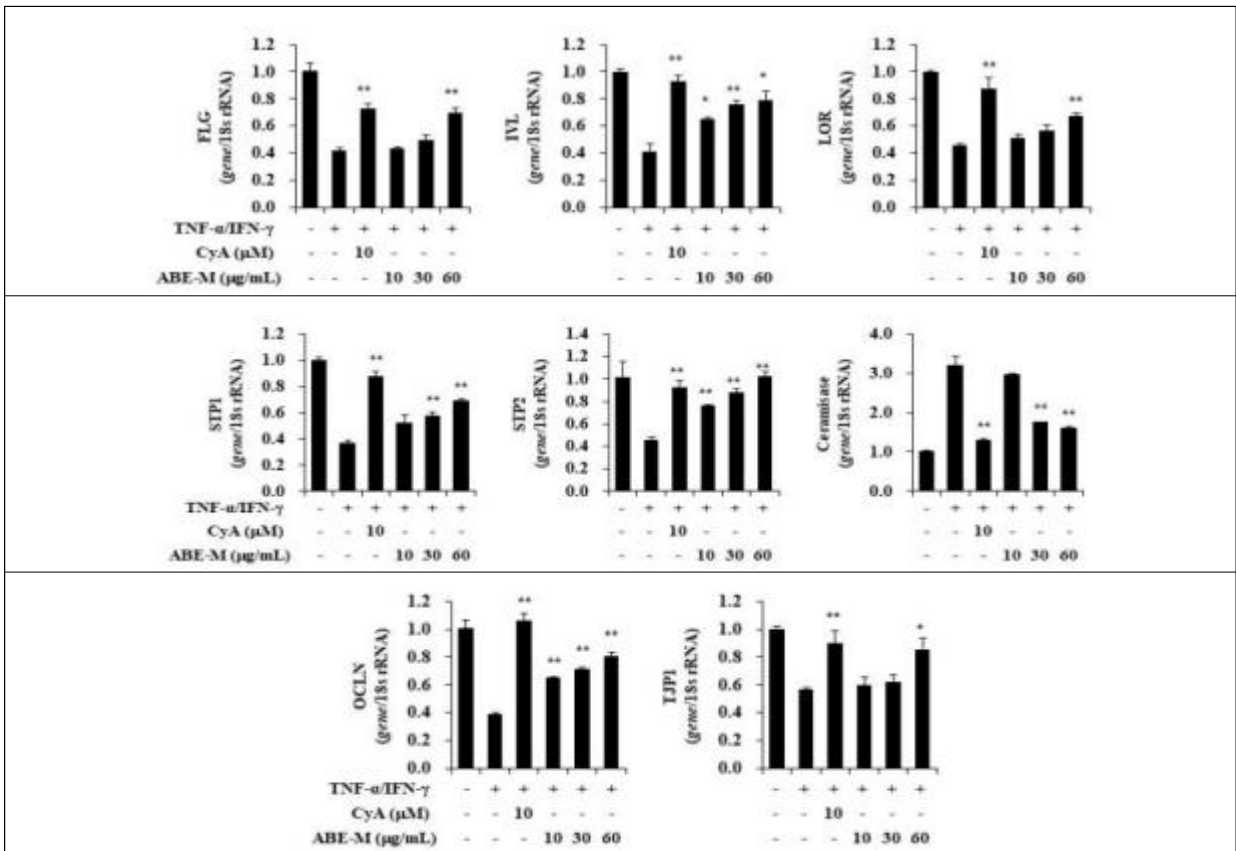
나. 연구내용

○ 세포수준의 활성 검증 및 작용기전 연구 결과



[그림-35] JY206이 면역조절 관련인자에 미치는 영향

- 그림 35과 같이 염증 환경이 조성된 세포에 JY206을 30, 60 μg/mL 처리 시, 유전자와 단백질 발현 수준에서 사이토카인과 케모카인이 농도 의존적으로 억제되었음.

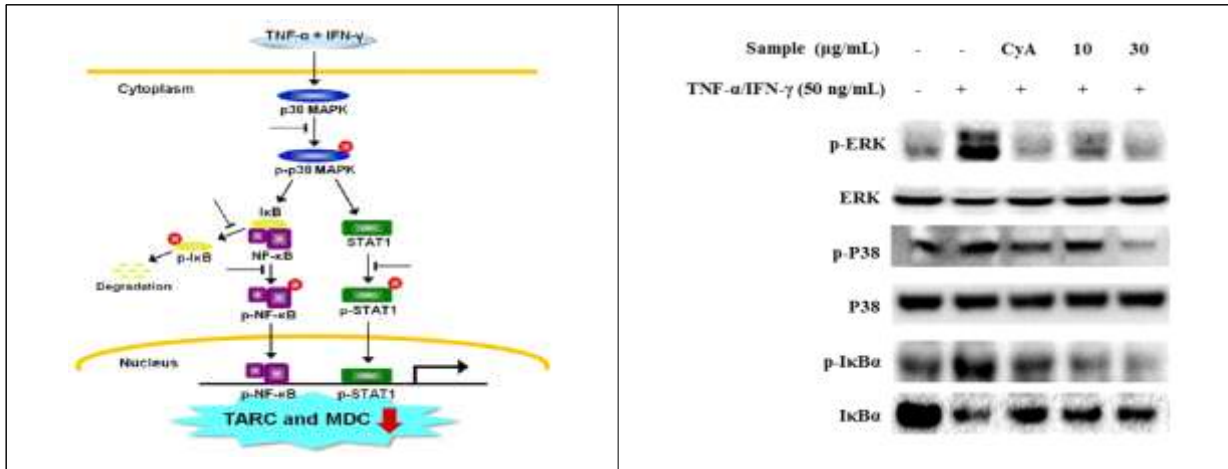


[그림-36] JY206이 피부장벽단백질에 미치는 영향

- 피부장벽 관련인자에 대한 JY206의 영향을 확인한 결과, JY206을 10, 30, 및 60 μg/m 처리 시 각 질세포의 분화 촉진인자로 알려진 FLG, IVL, LOR은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였음(그림 36).

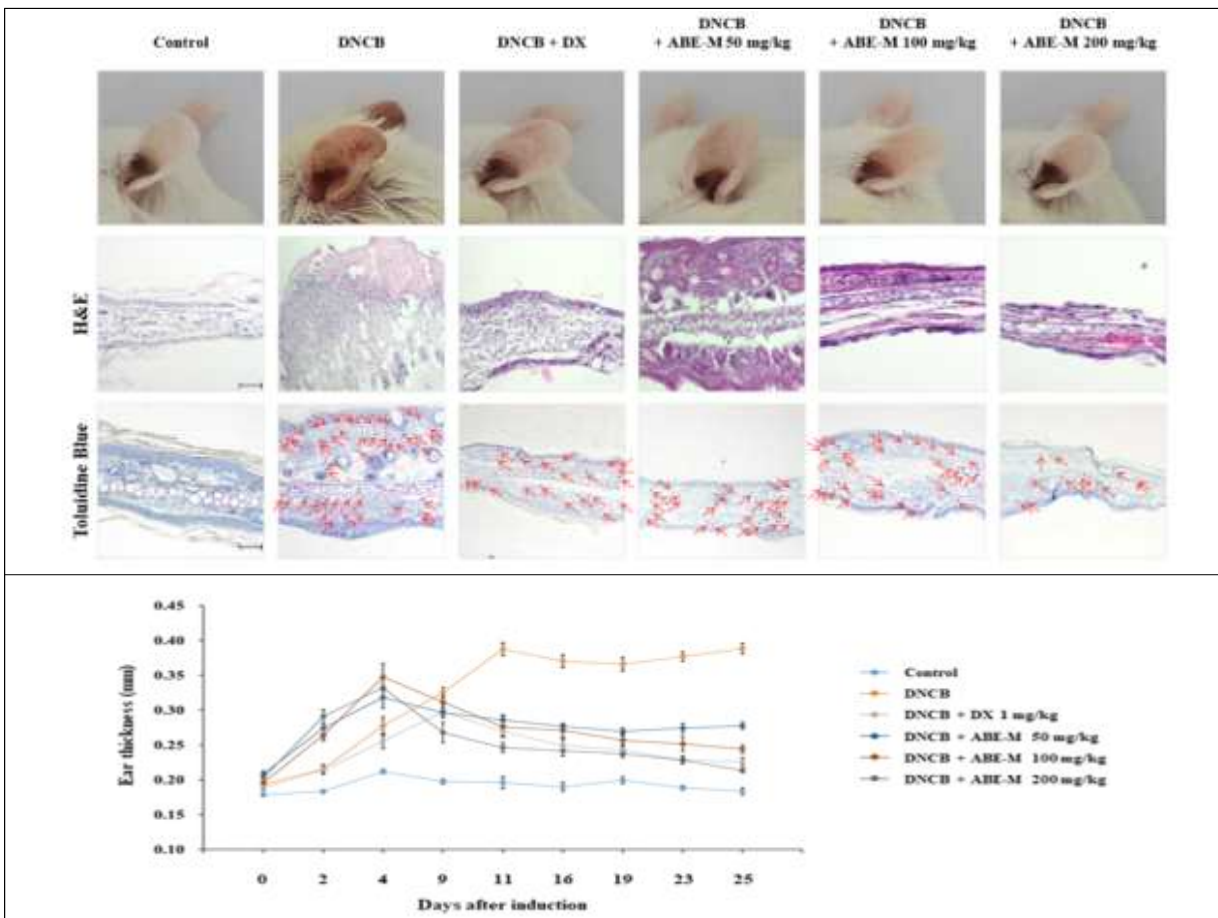


- 피부장벽조절과 보습에 직접적으로 관여하는 OCLN과 ZO-1 또한 JY206을 처리했을 때 농도 의존적으로 증가하였고, 양성대조군 보다 높은 촉진 활성을 보임(그림 36).
- 세라마이드 합성에 관여하는 STP1,2 역시 농도 의존적으로 증가하였으며, 세라마이드 저해에 관여하는 ceramidase는 농도 의존적으로 감소함(그림 36).



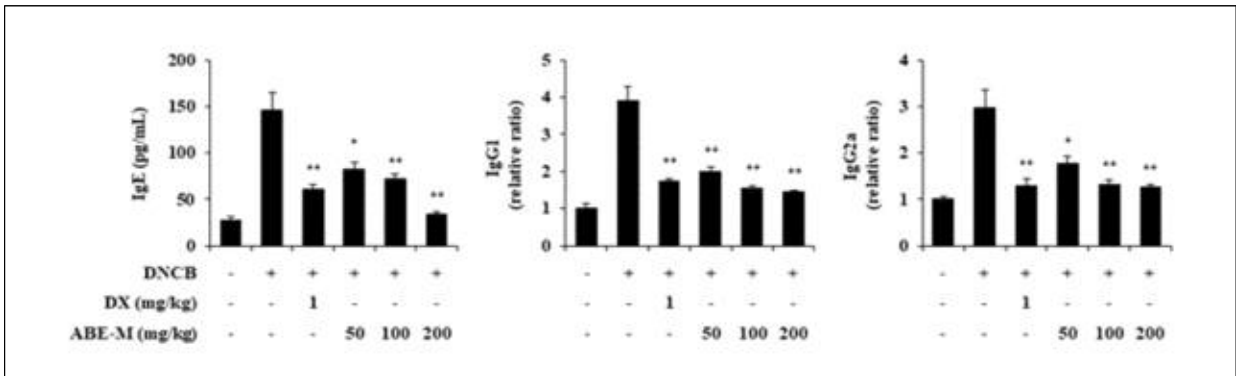
[그림-37] 피부 면역과민반응 신호전달기전과 관련 인자에 대한 JY206의 효과

- 피부 각질세포에서 TNF-α/IFN-γ에 의해 유도되는 염증성 사이토카인과 케모카인들의 발현은 p38, ERK와 같은 MAPK, 그리고 NF-κB 신호전달기전 관여를 통해 억제된다고 알려져 있음(그림 37).
  - NF-κB와 MAPK pathway의 신호전달인자인 ERK, p38, 및 IκBα의 단백질 발현을 측정 한 결과 JY206은 농도 의존적으로 신호전달인자의 발현을 감소시킴(그림 37).
- 동물 모델(DNCB 유도 아토피 모델)을 이용한 효능 평가 결과



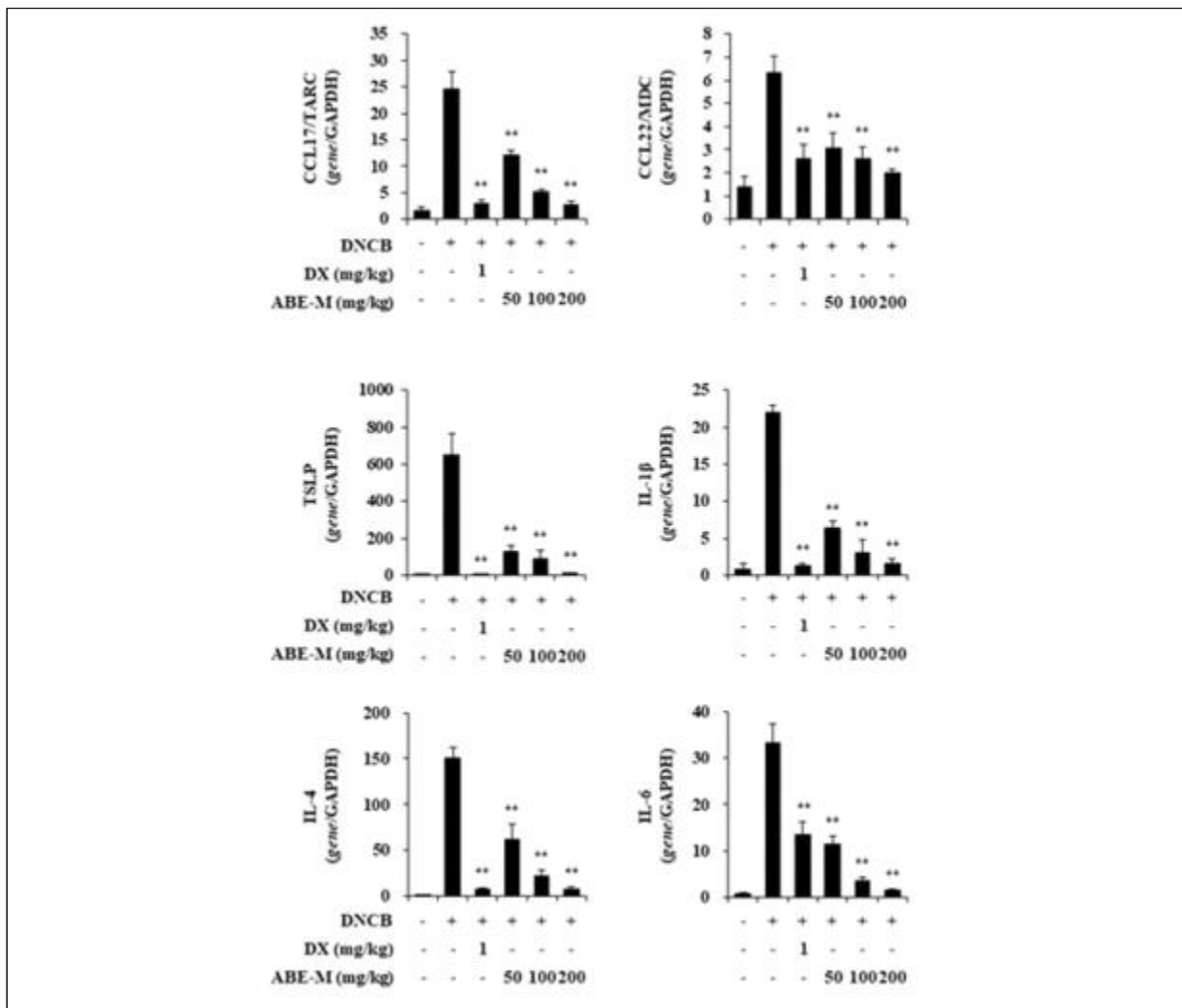
[그림-38] 육안평가, 조직병리학적 검사, 귀 두께 측정 결과

- 유발군은 정상군 대비 귀 두께가 상당히 증가했고, JY206과 dexamethasone 투여군은 유발군에 비해 현저히 감소했으며, 육안평가, 조직병리학적 검사, 및 귀 두께 측정 결과 모두 동일한 양상을 나타냄(그림 38).



[그림-39] 면역글로불린 측정 결과

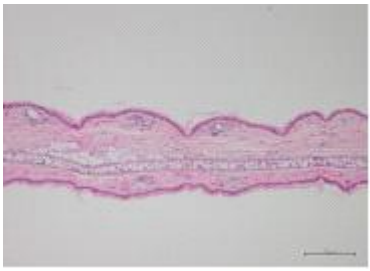
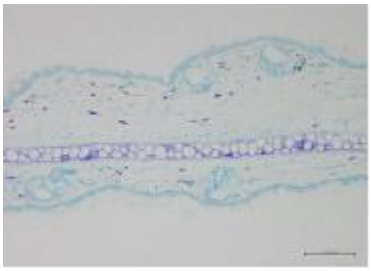
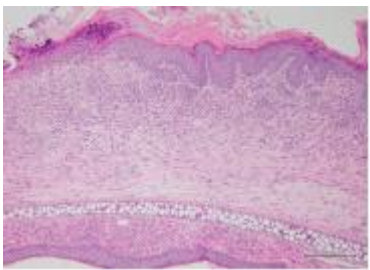
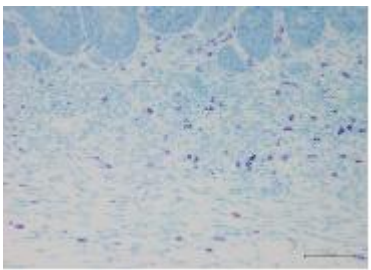
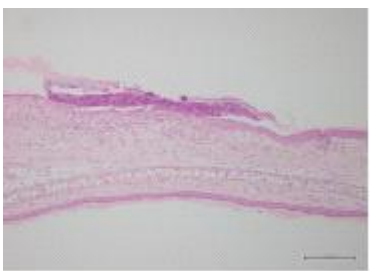
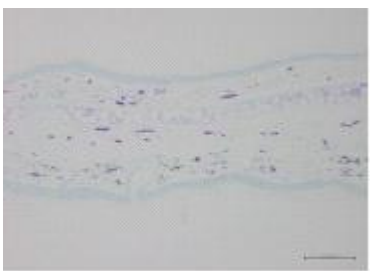

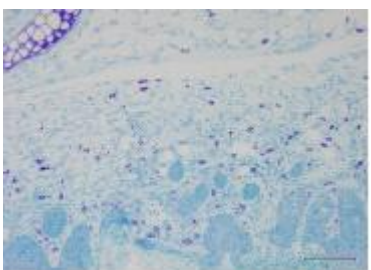
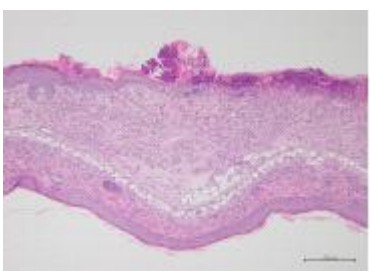
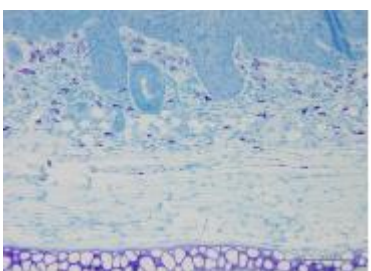
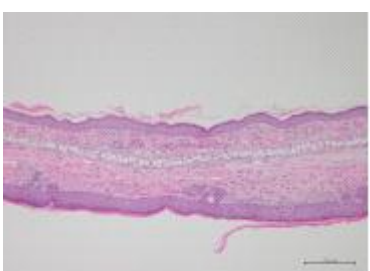
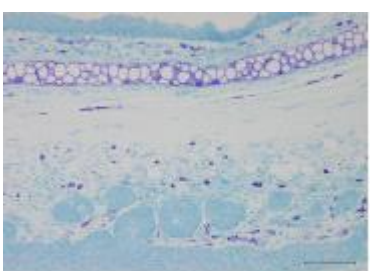
- JY206 투여군에서 농도 의존적으로 면역글로불린의 수치가 감소했고, 특히 200 mg/kg 투여군은 양성대조군보다 그 수준이 월등하게 억제됨(그림 39).



[그림-40] 염증성 사이토카인과 케모카인 측정 결과

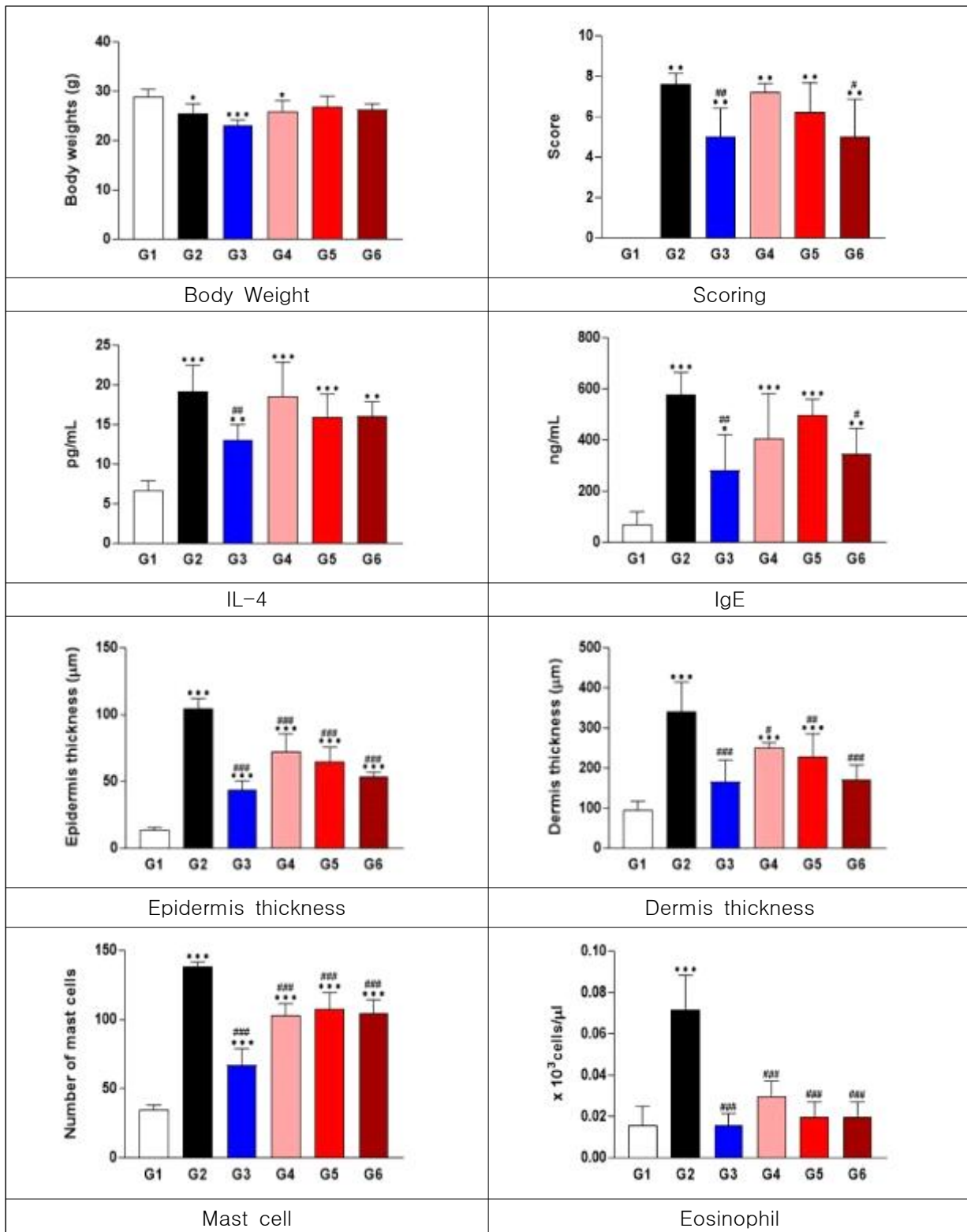
- 인간 각질세포주에서 뿐만 아니라 동물모델에서도 염증성 사이토카인과 케모카인이 JY206 투여 시 농도 의존적으로 감소함(그림 40).

○ 동물 모델(집먼지 진드기 유도 아토피 모델)을 이용한 효능 검증 및 유효 용량 결정 결과

Group	H&E staining	Toluidine blue
정상군		
유발군		
양성대조군		
저용량군		
중용량군		
고용량군		

[그림-41] 조직병리학적 검사결과(H&E staining, Toluidine blue)

- 정상군 대비 유발군에서 표피 비대 및 진피 내 염증세포 침윤 수준은 유의하게 높았고, JY206 200 mg/kg 투여군에서 표피 내 염증세포 침윤 수준이 유의하게 감소함. 양성대조군과 JY206 모든 용량군에서 표피 두께 수준이 유발군 대비 현저하게 낮아졌음을 확인함(그림 41).



[그림-42] JY206의 과민면역반응 개선 실험 결과

- 체중에서 유의적 차이가 없었고 피부임상지수(피부염 증상 평가)를 평가한 결과, 유발군 대비 JY206 투여군에서 농도 의존적으로 임상지수 수준이 감소함. IgE, Eosinophil, Mast cell, 표피 및 진피의 두께를 측정할 결과, 모두 유발군 대비 200 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소했으며, 양성대조군과 비교 동등한 수준으로 나타남(그림 42).

## 8) 기능성 소재의 안정성 평가

### 가. 연구방법

#### ○ 기능성 소재의 소비기한 설정실험(안정성 실험)

- 소비기한 설정실험을 통하여 기능성 소재의 성상 및 지표성분 등의 안정성 기간을 평가함.
- 안정성 시험 항목은 설정된 기준규격 중 경시적인 변화가 있는 항목 및 물리적인 추가항목을 선정하고 가속실험으로 진행하여 획득한 데이터를 화학반응식을 사용하여 정상 저장 조건으로 외삽하여 안정성 기간(소비기한)을 예측함.

### 나. 연구내용

- 기능성 소재의 소비기한 설정 실험을 위하여 표 51과 같이 안정성 평가지표(품질 지표)를 기준규격 중 경시적 변화가 있는 성상(관능평가), 수분, 대장균군, +)-catechin 항목으로 설정하였고 포장재질은 차광 밀봉 용도로 분말 및 액상시료에 광범위하게 사용되며 외부 공기 유입 및 수분흡수 방지로 미생물 오염으로 인한 품질변화를 최소화 할수 있는 은박지퍼백(PET+AL+CPP)으로 설정하였으며 본제품과 제품특성이 유사한 기존 유통제품(농축액분말)의 유통기한, 보존 및 유통온도를 감안하여 기능성 소재의 예상 소비기한은 2년, 보존 및 유통온도는 실온으로 설정하였음. 예상 소비기한 2년을 바탕으로 '식품, 식품첨가물, 축산물 및 건강기능식품의 소비기한 설정 기준(식품의약품안전처고시 제 2022-31호)'에 의거하여 실험조건(표 52) 및 품질한계값(표 53)을 설정하여 자사 및 식약처 지정 검사기관(바이오푸드랩)에서 소비기한 설정 실험을 수행하였음.

[표-51] 안정성 평가지표 및 실험방법

품질지표		실험방법
미생물	대장균군(정성)	식품 공전 제8. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7. 대장균군 1. 정성시험 나. BGLB법
이화학	수분(%)	식품공전 제8. 일반시험법 2.1.1.1.가 상압가열건조법
	+)-Catechin 함량(mg/g)	자사(주영엔에스주식회사) 내 분석법 매뉴얼(JYRD-ANA-014)
관능	종합기호도검사	9점 기호도 척도법

[표 52] 실험조건

품질지표	보관조건
저장온도	25 ℃, 35 ℃, 45 ℃
저장기간	360 일
실험주기	59 ~ 61일

[표-53] 품질한계값 설정

품질지표	품질한계	근거
대장균군(정성)	음성	건강기능식품 제 3. 개별 기준 및 규격 2) 기능성 원료
수분(%)	7% 이하	자사(주영엔에스주식회사) 기준 및 규격
+)-Catechin 함량(mg/g)	11.0mg/g (80~120% 내)	자사(주영엔에스주식회사) 기준 및 규격
관능평가	5 이상	9점 기호도 척도법

• 시험결과

1) 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량 변화 분석

- 25℃, 35℃, 45℃ 저장온도에서 360일간 저장 동안 품질지표의 함량 변화는 표 54~56과 같음.

[표-54] 기능성 소재 25℃ 저장결과

저장기간(일)	대장균군(정성)			수분(%)	+)-Catechin 함량(mg/g)	관능평가
	음성	음성	음성			
0	음성	음성	음성	2.38 ± 0.03	11.15 ± 0.02	9.00 ± 0.00
60	음성	음성	음성	2.23 ± 0.09	11.06 ± 0.05	8.76 ± 0.09
119	음성	음성	음성	2.39 ± 0.24	11.37 ± 0.06	8.52 ± 0.11
180	음성	음성	음성	1.70 ± 0.16	10.54 ± 0.09	8.32 ± 0.11
239	음성	음성	음성	2.42 ± 0.07	10.46 ± 0.08	8.08 ± 0.11
300	음성	음성	음성	1.73 ± 0.19	10.57 ± 0.02	7.72 ± 0.11
360	음성	음성	음성	2.11 ± 0.22	10.59 ± 0.02	7.44 ± 0.09

[표-55] 기능성 소재 35℃ 저장결과

저장기간(일)	대장균군(정성)			수분(%)	+)-Catechin 함량(mg/g)	관능평가
	음성	음성	음성			
0	음성	음성	음성	2.38 ± 0.03	11.15 ± 0.02	9.00 ± 0.00
60	음성	음성	음성	2.26 ± 0.03	11.08 ± 0.03	8.68 ± 0.11
119	음성	음성	음성	2.41 ± 0.09	11.45 ± 0.10	8.44 ± 0.09
180	음성	음성	음성	1.59 ± 0.29	10.60 ± 0.04	8.20 ± 0.00
239	음성	음성	음성	2.35 ± 0.12	10.21 ± 0.07	8.00 ± 0.14
300	음성	음성	음성	1.55 ± 0.21	8.89 ± 0.01	7.64 ± 0.09
360	음성	음성	음성	2.11 ± 0.10	9.91 ± 0.03	7.36 ± 0.09

[표-56] 기능성 소재 45℃ 저장결과

저장기간(일)	대장균군(정성)			수분(%)	+)-Catechin 함량(mg/g)	관능평가
	음성	음성	음성			
0	음성	음성	음성	2.38 ± 0.03	11.15 ± 0.02	9.00 ± 0.00
60	음성	음성	음성	2.25 ± 0.09	10.76 ± 0.03	8.56 ± 0.09
119	음성	음성	음성	2.22 ± 0.09	10.62 ± 0.06	8.32 ± 0.11
180	음성	음성	음성	1.55 ± 0.16	9.85 ± 0.03	8.16 ± 0.17
239	음성	음성	음성	2.28 ± 0.09	9.35 ± 0.01	7.88 ± 0.23
300	음성	음성	음성	1.81 ± 0.34	9.47 ± 0.03	7.56 ± 0.17
360	음성	음성	음성	2.14 ± 0.19	9.03 ± 0.01	7.28 ± 0.11

2) 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

[표-57] 저장온도별 품질지표의 반응속도상수

품질지표	반응차	온도(°C)	회귀방정식	결정계수
관능	0차 <sup>1)</sup>	25	$y = -0.0043x + 9.0332$	0.9965
		35	$y = -0.0044x + 8.9845$	<b>0.9978</b>
		45	$y = -0.0045x + 8.9215$	0.9945
관능	1차 <sup>2)</sup>	25	$y = -0.0002x + 0.9570$	0.9941
		35	$y = -0.0002x + 0.9547$	0.9966
		45	$y = -0.0002x + 0.9516$	0.9948
수분(%)	0차	25	$y = -0.0011x + 2.3267$	0.4429
		35	$y = -0.0014x + 2.3372$	0.4757
		45	$y = -0.0009x + 2.2532$	0.3935
+)-Catechin 함량(mg/g)	0차	25	$y = -0.0021x + 11.2050$	0.5754
		35	$y = -0.0056x + 11.4707$	0.6644
		45	$y = -0.0061x + 11.1268$	0.9440
+)-Catechin 함량(mg/g)	1차	25	$y = -0.0002x + 2.4161$	0.5773
		35	$y = -0.0005x + 2.4427$	0.6458
		45	$y = -0.0006x + 2.4119$	<b>0.9454</b>

1)Y= KX+B(X: 저장기간, Y: 저장기간 X중의 시험 항목의 결과 값, K: 반응속도상수)

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

(A:저장기간 X중의 시험 항목의 Ln 값, A0: 저장 전 제품 중의 시험 항목의 Ln값)

- 표 57과 같이 각 품질 지표의 결정계수 분석결과, 관능평가의 0차 반응식과 +)-Catechin 함량(mg/g)의 1차 반응식의 결정계수가 0.9983 및 0.9454로 나타나 안정성 기간(소비기한) 설정을 위한 품질지표로 결정함.

3) 온도영향에 따른 품질지표별 활성화 에너지 산출(표 58, 59)

[표-58] 관능평가 활성화 에너지 산출(0차 반응식)

온도(°C)	온도(T)	1/T	K	LnK	LnK = -(Ea/R)(1/T)+LnA
저장 온도	25	298	0.003356	0.0043	LnK = -255.70X - 4.59 (R <sup>2</sup> = -0.9944) Ea(kcal/mole)=508.07
	35	308	0.003247	0.0044	
	45	318	0.003145	0.0045	

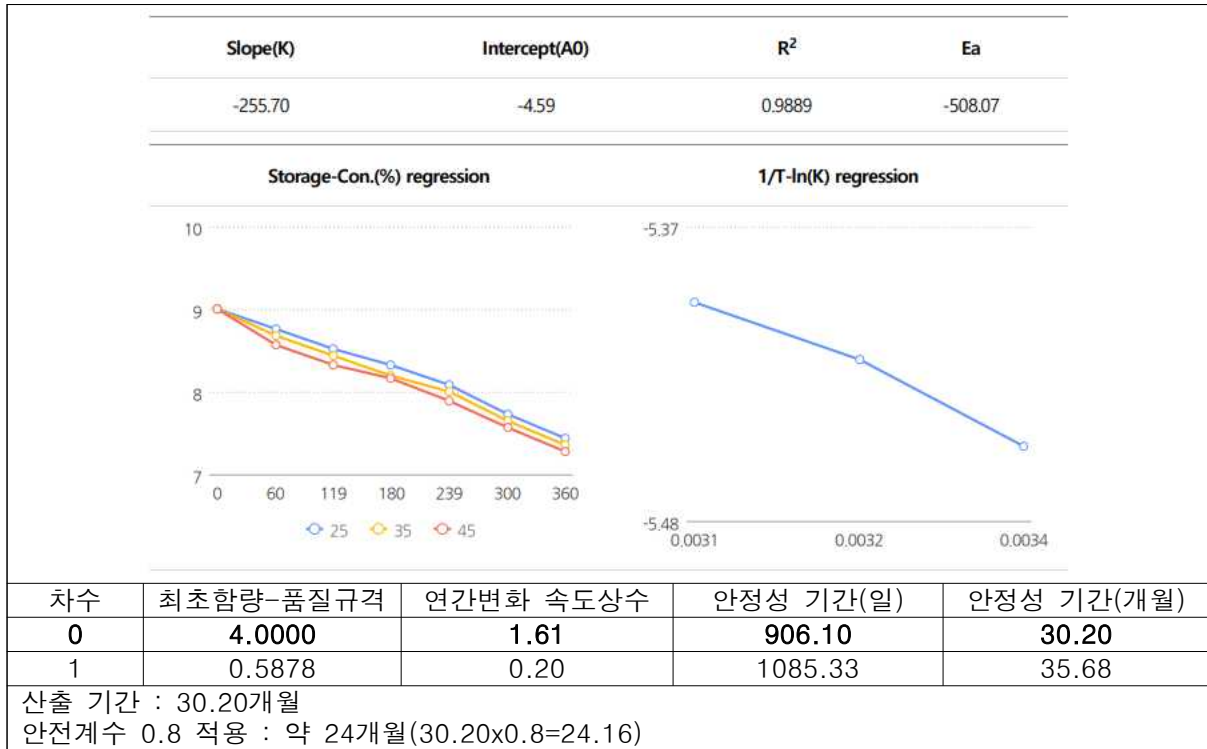
[표-59] +)-Catechin 함량(mg/g) 활성화 에너지 산출(1차 반응식)

온도(°C)	온도(T)	1/T	K	LnK	LnK = -(Ea/R)(1/T)+LnA
저장 온도	25	298	0.003356	0.0002	LnK = -5389.81X + 9.69 (R <sup>2</sup> = -0.8371) Ea(kcal/mole)=10709.56
	35	308	0.003247	0.0005	
	45	318	0.003145	0.0006	

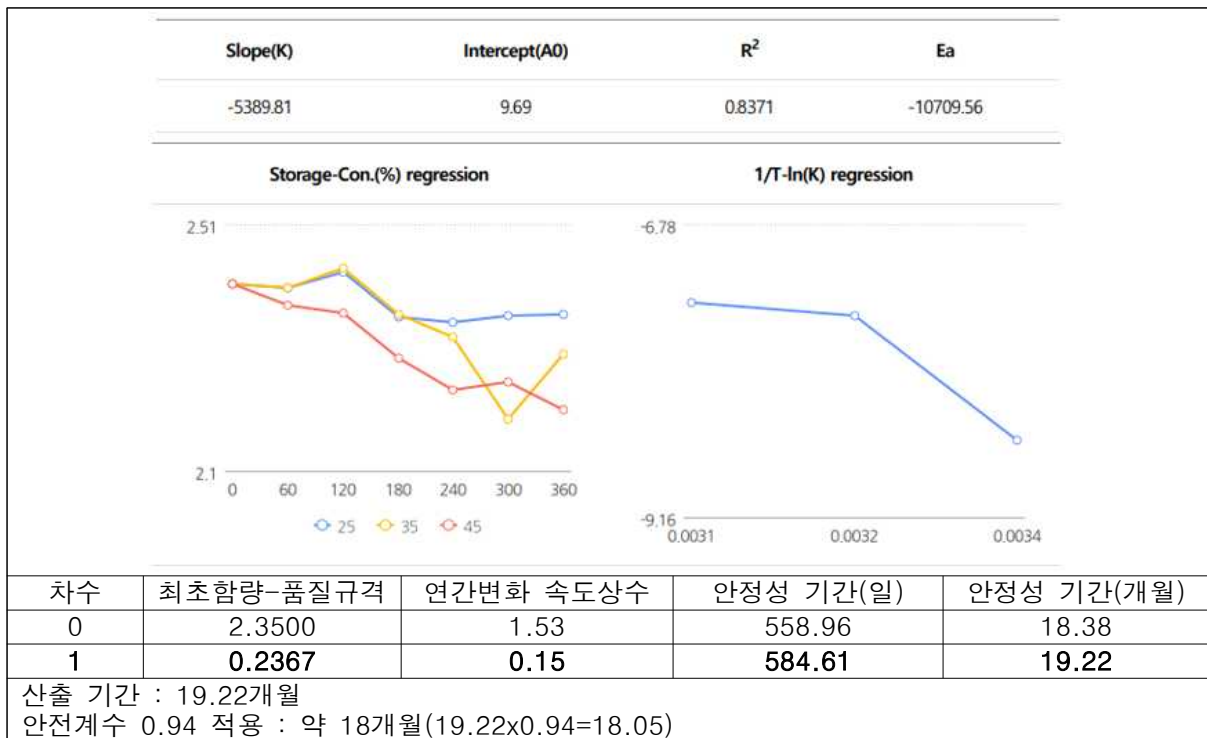


4) 안정성 기간(소비기한) 산출

[표-60] 관능평가 활성화 에너지 0차 반응식 차트 및 35℃ 소비기한 산출

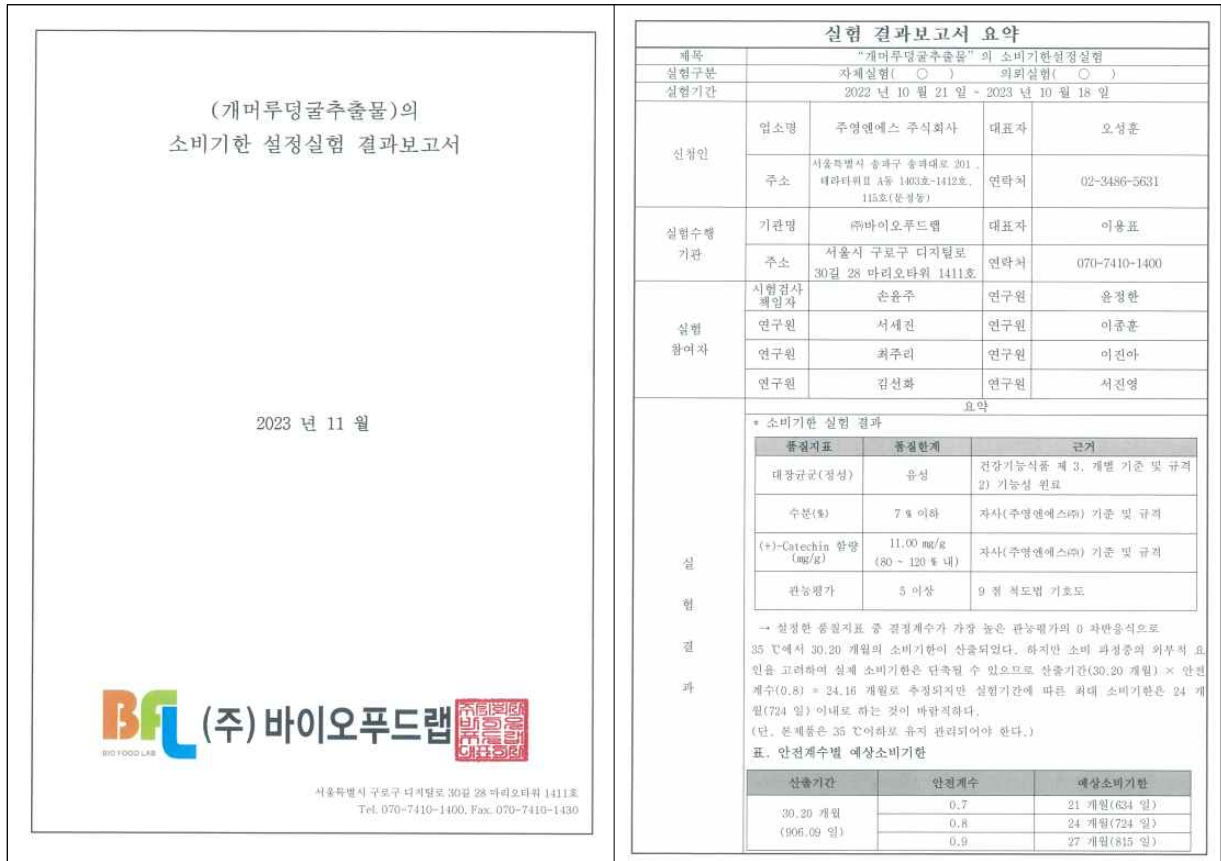


[표-61] +)-Catechin 함량(mg/g) 활성화 에너지 1차 반응식 차트 및 35℃ 소비기한 산출



- 표 60, 61과 같이 설정한 품질지표 중 결정계수가 높은 관능평가의 0차 반응식과 +)-Catechin 함량(mg/g)의 1차 반응식으로 35℃에서 각각 24개월과 18개월의 안정성 기간(소비기한)이 산출된 것을 바탕으로 기능성 소재(개머루덩굴 추출물) 및 지표성분(+)-Catechin의 안정성 기간은 18개월로 설정하였으며 그림 43과 같이 소비기한 설정실험 결과 보고서는 개별인정형 원료 품목신고 자료로 활용할 예정입니다.





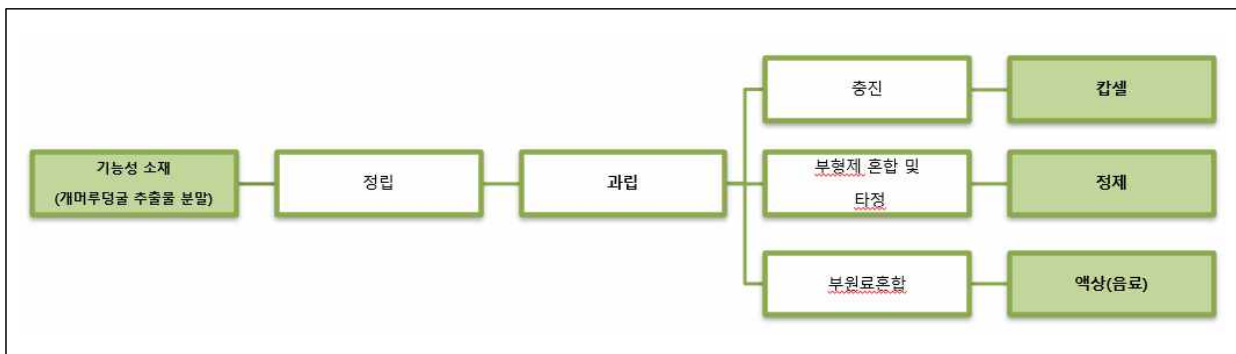
[그림-43] 개머루덩굴 추출물의 소비가한 설정실험 결과보고서

## 9) 기능성 소재의 시제품 생산

### 가. 연구방법

#### ○ 제형의 설계 및 개발

- 분말 혹은 bulk 상태의 건강기능식품을 소비자가 직접 섭취하면 섭취용량이나 건강기능식품의 안정성을 보장할 수 없기에, 건강기능식품의 안정성을 보장하고 정확한 섭취용량을 소비자가 섭취하도록 하기 위해서 적절한 제형의 개발이 이루어져야 함. 또한 건강기능식품을 적절한 제형으로 개발하게 되면 대기 중의 산소 혹은 습기로부터 제품을 보호할 수 있으며 원료 특유의 맛이나 냄새 등을 masking하여 제품의 섭취를 용이하게 도와주는 효과도 얻을 수 있게 됨.
- 그림 44와 같은 방법으로 건강기능식품의 일반적인 제형 형태인 과립, 캡슐, 정제 및 액상 제형에 기능성 소재(개머루덩굴 추출물)에 대한 제형 적합성을 판단하고 시제품을 제작하여 인체적용시험 및 사업화에 적용하고자 함.



[그림-44] 개머루덩굴 추출물의 제형연구방법

나. 연구내용

○ 과립 제형 연구

- 개머루덩굴 추출물과 같이 천연물 추출 분말의 경우 응집성이 커 분체의 유동성이 불량하기 때문에 미세한 분말을 입상형태의 분체로 만드는 과립공정을 실시하였음.
- 개머루덩굴 추출물은 응점이 낮아 습식과립방법을 적용하였으며 표 62와 같이 설정된 조건으로 혼합기에서 균질하게 혼합하고 열풍건조기로 55℃에서 1시간 동안 판건조를 하여 정립하였음.

[표-62] 개머루덩굴 추출물의 과립 조건 설정 시험결과

구분	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
추출물량(분말)	100g	100g	100g	100g	100g
결합제	95% 주정	95% 주정	90% 주정	90% 주정	85% 주정
결합제 비율 (원물량 대비)	20.0%	10.0%	20.0%	10.0%	5.0%
안식각	30.0°	34.1°	33.5°	28.5°	과립불능 (용해됨)

- 개머루덩굴추출물의 과립 조건의 적정성은 분체측정기(PTG- S3SARTORIUS)를 이용하여 측정하였고 25~30° 범위의 안식각으로 판정하였으며 조건1과 조건4가 범위내에 측정되었으나 경제성을 고려하여 주정사용량이 적은 조건4로 최종 결정하였고 과립제의 특성 및 성상은 표 63과 같음.

[표-63] 개머루덩굴 추출물 과립제의 특성 및 성상

구 분	성적	기능성 소재(분말)	과립제
유출시간	8.3 s		
안식각	28.5°		
부피	78.0 ml		
중량	21.8 g		
밀도	0.288g/ml		
수분	3.89%		

○ 캡슐 제형 연구

- 개머루덩굴 추출물 과립을 캡슐 충전기(DMF-150, 대산파마텍)를 이용하여, 0호 캡슐에 충전량 평가를 하였으며 표 64와 같이 충전 후 총 중량 및 충전물의 중량을 측정하여 이에 대한 평균값으로 캡슐 제형의 적합성을 확인하였음.

[표-64] 개머루덩굴 추출물 캡슐제의 특성 및 성상

조 성	개머루덩굴 추출물 과립 : 100%						
	기타 부형제 : 0%						
구 분	성 적				사 진		비 고
질량(g)	1	0.601	평균질량	0.603		적합	
	2	0.592					
	3	0.611					
	4	0.618					
	5	0.596					
충진량(g)	1	0.503	평균중량	0.506			
	2	0.497					
	3	0.511					
	4	0.521					
	5	0.499					
성상	흰색의 0호 경질캡슐						

○ 정제 제형 연구

- 타정기(금성산기 KT30MS)를 이용한 정제 제형 연구는 표 65와 같이 capping(상부 도는 하부 일부가 모자 모양으로 분해되는 현상), sticking(타정 장비 펀치 부분 표면에 분말이 달라붙는 현상)을 억제하기 위한 활택제, 윤활제만을 사용하여 부형제를 최소화한 1차 조성으로 우선 진행하였으나 정제의 모양을 형성시키는 타정기의 최대 압축압력(160KN)에서도 결합력과 경도가 떨어지는 문제가 발생하여 이를 개선하고자 기능성 소재의 함량을 줄이고 결합 및 결합제 역할을 하는 결정셀룰로스와 히드록시프로필메틸셀룰로스(HPMC)를 부형제로 첨가하여 타정하였음.
- 결합 및 결합제를 첨가한 2차 조성으로 경도가 우수한 정제가 타정되었으나 붕해도가 30분을 초과하는 문제가 발생되었음.
- 표 65와 같이 붕해제인 가교카복시메틸셀룰로스나트륨을 2% 추가하여 붕해도 문제를 해결하고 원료 분말의 유동성을 개선해 타정기에서의 충전성을 향상하고 매끄러움의 정도를 높여 방출 시 부착을 방지하여 제품 표면의 광택을 향상시킬 수 있는 코팅제 및 윤활제 등을 추가한 3차 조성으로 최적의 정제 조성 조건을 도출하였음.

[표-65] 개머루덩굴 추출물 정제 조건 설정 시험결과


첨가목적	성분	조성 1(%)	조성 2(%)	조성 3(%)
주성분	개머루덩굴 추출물	90.90	50.00	<b>50.00</b>
결착제	결정셀룰로스	7.10	45.50	<b>39.05</b>
결합제	히드록시프로필메틸셀룰로스(HPMC)	-	2.50	<b>2.50</b>
코팅제	이산화티타늄	-	-	<b>1.20</b>
윤활제	글리세린지방산에스테르	-	-	<b>0.25</b>
활택제	이산화규소	1.50	1.50	<b>1.50</b>
윤활제	스테아린산마그네슘	0.50	0.50	<b>0.50</b>
결합제, 코팅제	히드록시프로필셀룰로스	-	-	<b>3.00</b>
붕해제	가교카복시메틸셀룰로스나트륨	-	-	<b>2.00</b>
total	합계	100	100	<b>100</b>

- 유효능 평가를 통한 기능성 소재의 인체적용시험 대상 적용량이 1,000mg/day로 설정된바, 1일 2정 섭취를 목표로 정제연구를 진행하였으며 장방형(소) 500mg의 경우 주성분 함량 250mg으로 4정을 섭취하게 되어 주성분 함량이 500mg 함유된 장방형(대) 1000mg 정제로 설정하여 타정을 진행하였으며 최적 조건에 의한 정제 제형의 조성은 표 66과 같으며 특성 및 성상은 표 67과 같음.

[표-66] 개머루덩굴 추출물 정제 제형 조성

조성	성분명	비율(%)	함량(mg)
	개머루덩굴 추출물	50.00	500.00
	결정셀룰로스	39.05	390.50
	히드록시프로필메틸셀룰로스(HPMC)	2.50	25.00
	이산화티타늄	1.20	12.00
	글리세린지방산에스테르	0.25	2.50
	이산화규소	1.50	15.00
	스테아린산마그네슘	0.50	5.00
	히드록시프로필셀룰로스	3.00	30.00
	가교카복시메틸셀룰로스나트륨	2.00	20.00
	합계	100	1,000

[표-67] 개머루덩굴 추출물 정제 제형의 특성 및 성상

구 분	성 적				사 진	비 고
질량(g)	1	0.985	평균질량	1.008		적합
	2	1.051				
	3	0.995				
	4	0.986				
	5	1.023				
경도(kp)	1	8.75	평균경도	9.02		
	2	9.06				
	3	8.94				
	4	9.26				
	5	9.11				
직경(mm)	1	19.54	평균직경	19.52		
	2	19.42				
	3	19.68				
	4	19.51				
	5	19.46				
마손도(%)	0.47 (20ea)					
붕해도	22분 30초					

○ 액상 제형 연구

- 개머루 덩굴 추출물을 휴대 및 섭취가 간편한 액상스틱 컨셉으로 액상 제형 연구를 진행하였음. 개머루덩굴 추출물은 물에 용해되지 않는 난용성 및 불용성 성분들을 많이 포함하고 있기 때문에 액상 형태에서 침전되지 않고 균질하게 분산될 수 있도록 분산안정제 역할을 하는 식품첨가물인 증점제(구아검)를 사용하였으며 특유의 짙은맛을 차폐하기 위해 기능성 감미제인 프락토올리고당을 사용하였고, 무수 구연산을 산도조절제로 사용하였으며 면역과민 피부개선 기능성의 상승효과 및 영양강화를 위해 비타민류를 첨가하였음. 일반적으로 시판되고 있는 액상스틱 1회 제공량인 50ml을 기준으로 배합비를 설계하였음(표 68).

[표-68] 개머루덩굴 추출물의 액상제형(음료) 제조법(배합비, 50mL기준)

첨가목적	성분	조성 1(%)	조성 2(%)	조성 3(%)	비고
주성분	개머루덩굴추출물	2.00	2.00	2.00	분말 일일섭취량: 1000mg
감미제	프락토올리고당	5.00	5.00	5.00	
산도조절제	구연산	0.03	0.03	0.03	
증점제	구아검	<b>0.10</b>	<b>0.50</b>	<b>1.00</b>	
영양강화제	비타민B1염산염	0.01	0.01	0.01	
	비타민B2	0.01	0.01	0.01	
	비타민B6염산염	0.01	0.01	0.01	
향미증진	사과농축과즙	1.00	1.00	1.00	
	포도농축과즙	1.00	1.00	1.00	
보존제	안식향산나트륨	0.05	0.05	0.05	
	정제수	90.79	90.39	89.89	
total		100	100	100	

- 증점제를 0.1% 첨가하는 조성 1의 비율은 증점제 비율이 낮아 고형물의 침전이 일어나 액상제형으로 적합하지 않았으며 증점제를 0.5%이상 첨가하여야 침전이 일어나지 않는 겔형태의 액상제형이 가능하였으나 주성분(개머루덩굴 추출물)의 용해도 특성으로 인해 균질된 액상 형태가 아닌 페이스트상의 성상으로서 스틱 형태로 정량 충전하는 것이 불가능하였으며 증점제를 1% 첨가하는 조성 3의 비율은 일반적인 교반 방식으로는 증점제를 정제수에 용해 및 분산시킬수 없었음. 따라서 기능성 소재의 난용성 및 불용성 특성으로 인해 일반적인 식품첨가물 사용 및 혼합방식으로는 개머루덩굴 추출물의 액상제형은 어려울 것으로 판단하였고 시제품 제조에 배제하였음.

○ 시제품 제작

- 개머루덩굴 추출물의 시제품(품목 : JY206 시험식품)은 인체적용시험식품 제조를 목적으로 진행하였고 기능성 소재의 흡습 특성을 고려하여 경질 캡슐 보다 더 안정적인 정제 제형으로 선택하였음.
- 표 69와 같은 제조 공정으로 GMP 제조업소인 (주)보락과 (주)비오팜에서 제조하였으며 시제품 생산 작업일지는 그림 45와 같음.





## 10) 기능성 소재의 인체적용시험

### 가. 연구방법

- 건강기능식품 인체적용시험 설계안내서(식약처 간행물 11-1470550-000265-14)에 준하여 실시할 계획임.
- 프로토콜 개발 및 인체적용시험자 자료집(IB) 작성
- CRO 선정, IRB 승인 및 개시

#### • 연구 정보

인체시험의 명칭		안전성, 기능성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 대조식품 비교 인체적용시험
시험 대상자	인원 수	100명(2개군)
	선정 기준	성인 SCORAD 점수 25-50점
시험기관 및 수		국내 2개 사이트
기간	과제기간	18개월
	시험기간	12개월
	섭취기간	12주 이하
인체적용시험 디자인		다기관, 무작위배정, 이중맹검, 대조식품 비교 임상

#### • CRO 예상비용

CRO 비용	100,000 천원
세부내역	인체적용시험 CRO 세부건적
건적 변동 사항	인체적용시험 기간(시험대상자 모집/등록, 섭취 등), 시험대상자 수, 인체적용시험기관 수 등에 의해 건적은 변동될 수 있습니다.
결제조건	계약 후 30%, FPI 30%, LPO 30%, CSR draft 10%

#### • 인체적용시험기관 및 예상 연구비

인체적용시험기관	국내 (대학)병원 2 처
예상 연구비	250,000 천원 (검사항목, 기관별 검사비, 간접비 등에 따른 변동 가능)
건적 변동 사항	인체적용시험 기간(시험대상자 모집/등록, 섭취 등), 시험대상자 수, 인체적용시험기관 수 등에 의해 건적은 변동될 수 있습니다.
건적 포함 항목	인체적용시험 연구비(시험대상자교통비 등)
예상 검사 항목	유효성 평가(IGA, SCORAD, 호산구수, IgE, ECP, 보습제 사용량 등), 안전성 평가항목(혈액검사, 소변검사, 심전도 검사 등)

- 종료 : 인체적용시험 수행, 완료 후 결과 보고서 확보 및 분석

나. 연구내용

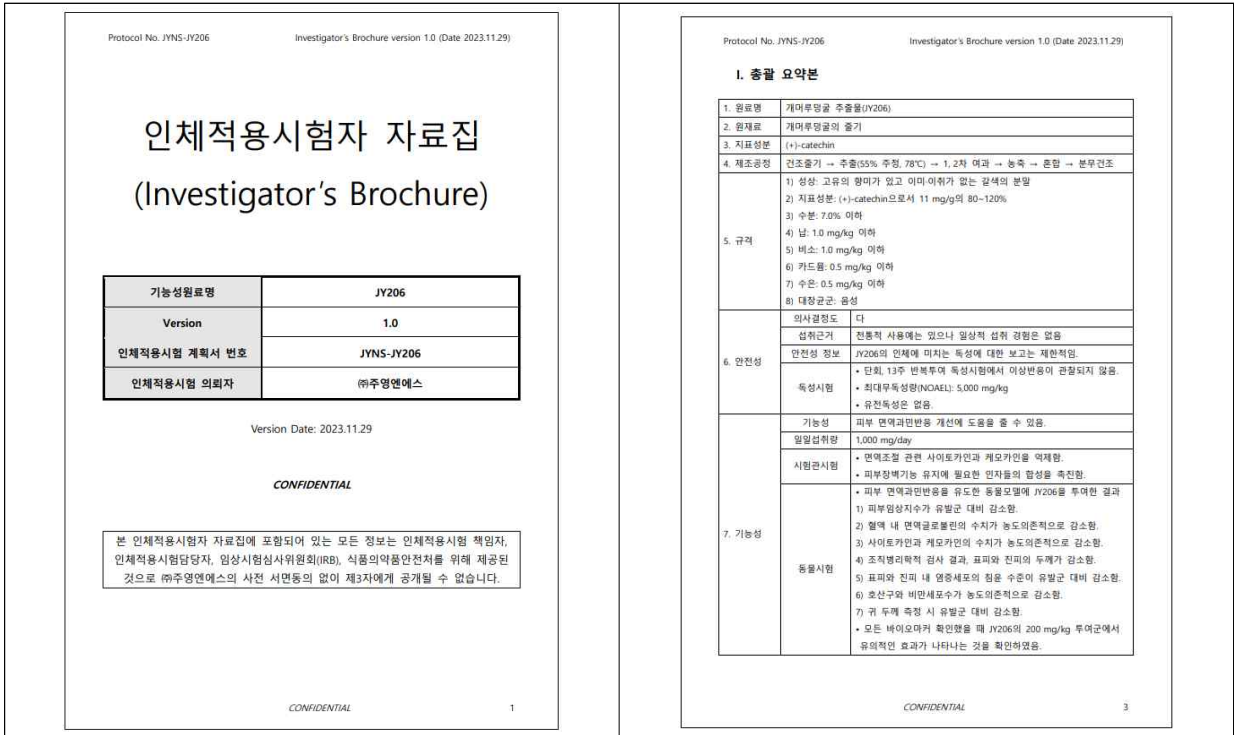
○ 프로토콜 개발 및 인체적용시험자 자료집(IB) 작성

- 인체를 대상으로 유효성과 안전성을 확인하기 위하여 표 70과 같이 ‘건강기능식품 기능성 평가 가이드라인(면역과민반응 관련 피부 상태 개선)’에 의거하여 프로토콜 개발을 완료하였으며 그림 46과 같이 인체적용시험자 자료집(IB) 작성을 완료하였음.

[표-70] 정립된 인체적용시험 프로토콜 시놉시스

구분	내용
인체적용시험 제목	경증 또는 중등증의 아토피 피부염 대상자에서 개머루덩굴추출물(JY206)의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 비교 인체적용시험
인체적용시험 조정자	세명대학교부속 제천한방병원 김희택 교수
인체적용시험 실시기관 및 책임자	세명대학교부속 제천한방병원 김희택 교수 부산대학교 한방병원 서형식 교수
대상 질환	경증 또는 중등증의 아토피 피부염
인체적용시험 목적	경증 또는 중등증의 아토피 피부염 대상자에서 시험 식품인 개머루덩굴추출물(JY206)을 복용하였을 때 대조 식품과 비교하여 피부장벽기능개선 효과 및 아토피 피부염 증상 개선 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 함.
인체적용시험 디자인	다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험용 식품	시험식품: 개머루덩굴 추출물(JY206) 대조식품: placebo(위약)
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험군: 1일 1회, 1회 2정을 물과 함께 섭취(개머루덩굴추출물 1000mg/day) 대조군: 시험군과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험용 식품 섭취기간	12주
인체적용시험 대상자 수	100명 [중도탈락율 전체 대상자의 22% 고려하여 군당 50예, 평가가능 예수 군당 39예]
선정기준	<b>선정기준</b> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 함.) 1) 스크리닝 당시 만 19세 이상 만 65세 이하의 남녀 2) 대한부과학회 한국인 아토피피부염진단 기준에 따라 아토피피부염으로 진단받은 자 3) SCORAD total score 20~50인 자 4) 아토피 병변 부위가 BSA 15% 이하이며, IGA(investigator's global assessment)가 2(mild) 또는 3(moderate)에 해당하는 자 5) 6개월 이상 간헐적 또는 지속적인 아토피 피부염 증상이 있는 자 6) 본 연구 기간 동안 아토피 피부를 포함한 모든 피부과적 처치나 치료를 중단할 것에 동의한 자 7) 본 인체적용시험에 설명을 듣고 서면동의서에 자발적으로 서명한 자

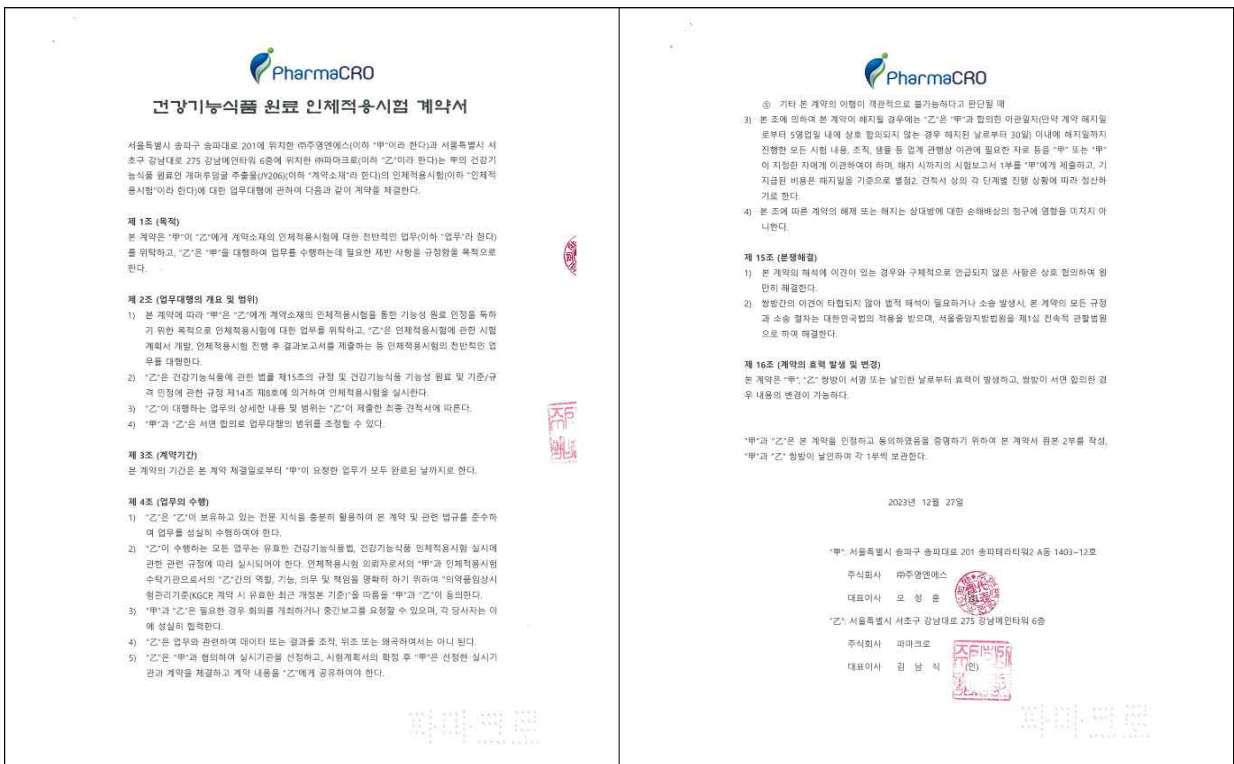
제외기준	<p><b>제외기준</b>(다음 어느 하나라도 해당 되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없음.)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 본 인체적용시험 참여 4주 이내에 아토피 피부염과 관련하여 항생제, 스테로이드제, 면역억제제, 면역조절제를 사용하였거나, 관련 요법 치료력이 있는 자</li> <li>2) 본 인체적용시험 참여 2주 이내에 아토피 피부염과 관련하여 항히스타민제를 투여하였거나 국소적 약물치료로서 스테로이드제, 항생제/항진균제, 국소면역억제제를 도포한 자</li> <li>3) 본 인체적용시험 참여 2주 이내에 아토피 피부염 또는 피부 상태 개선 및 면역기능에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품을 섭취한 자</li> <li>4) 임신중이거나 수유중인 여성 또는 적절한 피임법*을 사용할 의사가 없는 자 <ul style="list-style-type: none"> <li>*적절한 피임법 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 호르몬성 피임법, 자궁내 장치[IUD(Intrauterine device) 또는 IUS(Intrauterine system)]의 사용</li> <li>• 차단피임법(남성용 또는 여성용)과 살정제 동시 사용</li> <li>• 수술(정관절제술, 난관절제술/결찰술, 자궁적출술)</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>5) 건선, 심한 피부감염, 혹은 그 외의 중증 피부 질환이나 전신질환이 있는 자</li> <li>6) 약물로 조절되지 않는 고혈압 환자(160mmHg≤SBP 또는 160mmHg≤DBP)</li> <li>7) 약물치료 중이거나 조절되지 않는 당뇨병자(HbA1c 6.5%이상)</li> <li>8) 갑상선 기능 항진증 또는 저하증인 환자(TSH 0.1μIU/mL 미만 또는 10μIU/mL 이상)</li> <li>9) 임상적으로 유의한 신장애/간장애 환자 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum creatinine: 1.5mg/dL 초과</li> <li>• ALT 또는 AST: 정상 상한치의 2.5배 초과</li> </ul> </li> <li>10) 알코올 또는 약물남용의 과거력이 있는 환자</li> <li>11) 스크리닝 전 과거 3개월 이내에 임상시험용의약품을 투여 받았거나 인체적용시험용 식품을 복용한 경험이 있는 자</li> <li>12) 과거 5년 이내에 백혈병 및 림프종을 포함한 악성종양의 기항력이 있는 환자</li> <li>13) 시험자가 판단하기에 부적절하다고 판단된 자</li> </ol>												
시험 방법	<table border="1" data-bbox="496 1167 1390 1261"> <tr> <td>방문1(-14일)</td> <td>방문2(0일)</td> <td>방문3(42±5일)</td> <td>방문4(84±5일)</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 방문</td> <td>무작위배정방문</td> <td>중간방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: center;">12주 복용</td> </tr> </table> <p>Visit 2에서 대상자 적합성 평가에 적합한 대상자는 시험군 또는 대조군에 각각 1:1로 무작위 배정되어 해당하는 인체적용시험용식품을 교부 받음. 이후 12주간 시험식품 혹은 대조식품을 복용하게 되며, 기능성과 안전성을 평가하고 인체적용시험을 종료함.</p>	방문1(-14일)	방문2(0일)	방문3(42±5일)	방문4(84±5일)	스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문	12주 복용			
방문1(-14일)	방문2(0일)	방문3(42±5일)	방문4(84±5일)										
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문										
12주 복용													
기능성 평가	<p><b>1차 기능성 평가(Primary endpoint)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 SCORAD total score 변화량</li> </ul> <p><b>2차 기능성 평가(Primary endpoint)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 3의 SCORAD total score 변화량</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 3, Visit 4의 IGA(investigator's global assessment) 변화량</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 IgE 변화량</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 Eosinophil 변화량</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 Cytokine(IL-4, IFN-γ, TARC/CCL17) 변화량</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 피부수분손실량(TEWL) 변화율</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 피부수분함유량 변화율</li> <li>• Visit 2(Baseline) 대비 Visit 4의 피부산성도 변화율</li> </ul>												
안전성평가	이상반응, 실험실적 검사, 활력징후												
통계분석	인구학적 정보 및 기타 기저 특성에 대한 분석과 안정성 평가 시에는 SS를 대상으로 한다. 기능성 평가 시 FAS를 주 분석군으로 하고, 추가로 PPS 대상으로 통계분석을 실시함. 인체적용시험용 식품 복용 후 기능성 평가 변수에 대하여 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 인체적용시험이 종료되기 전에 대상자가 탈락하면 Last Observation Carried Forward(LOCF) Analysis로 결측치를 처리함. 결측치 보정은 FAS에 대해서만 적용함. 안전성 평가 항목의 경우에는 결측치가 발생하더라도 원자료(Raw Data)를 그대로 분석함.												



[그림-46] Investigator's Brochure

○ CRO 선정, IRB 승인 및 개시

- 면역과민반응 관련 피부상태 개선 적응증의 경우 프로토콜이 일반화 되어 있지 않고 대상자(소아, 청소년, 성인)에 따라 연구 디자인이 변경되기 때문에 피부 면역과민반응 관련 임상시험 진행 경향이 있는 CRO 기관 선정이 필요함.
- 여러 CRO 기관들과 협의하였으나 대부분 피부 면역과민반응 임상시험 진행 경험이 없었으며 최종적으로 피부 면역과민반응 기능성에 대하여 4건의 수행 경험이 있으며 인체적용시험 기관의 적정성 및 피험자 모집의 용이성이 있는 '파마크로' CRO 기관과 인체적용시험 계약 체결을 완료함.(그림47)



[그림-47] 인체적용시험 대행업무 계약서

- IRB 승인이 완료됨에 따라 그림 48과 같이 인체적용시험 실시기관(병원)과의 계약을 체결하고 인체적용시험을 개시하였음.

### 임상연구계약서

연구과제명: 경증 또는 중등증의 아토피피부염 대상자에서 '개미부성글루코수용체(α206)의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

위 인체적용시험연구에 관하여 계약 당사자들은 다음과 같이 인체적용시험을 체결한다.  
연구계약 당사자:  
(갑) 주식회사 우당연엑스 대표이사 오성훈  
(을) 세명대학교부속 재천한방병원 병원장 김희덕

**제 1 조 (연구 계약 목적)**  
본 계약은 (갑)이 (을)에게 상기 인체적용시험을 의뢰하고 (을)이 이를 수행하는데 필요한 제반 사항을 규정함을 그 목적으로 한다.

**제 2 조 (연구 목표 및 내용)**  
(갑)인 ㈜우당연엑스로부터 의뢰받은 건강기능식품 기능성 원료로써 개미부성글루코수용체의 아토피피부염 증상 개선 등의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 연구이며 연구의 목표 및 내용은 인체적용시험계획서에 명시된 내용으로 한다.

**제 3 조 (연구기간)**  
연구의 기간은 "실시기관"의 기관윤리심의위원회(IRB)의 승인일로부터 2025년 03월 29일까지(24개월)로 한다. 단 (갑)은 본 계약기간 변경이 필요 시, 변경에 따른 서류를 서면으로 통보하여 상호합의에 의해 계약 기간을 변경할 수 있다.

**제 4 조 (기관윤리심의위원회)**  
(을)은 연구의 실시 및 연구결과에 대하여 '의약품임상시험관리기준(KGCP)'의 규정에 따라 기관윤리심의위원회의 심의를 거쳐야 한다.

**제 5 조 (연구책임자)**  
연구책임자는 인체적용시험을 총괄하여 인체적용시험이 인체적용시험계획서에 준하여 적절히 실시되고 있는지 확인, 감독하고 (갑)과 연구책임자와 상호 연락하여 협의해야 한다.

Confidential 1 / 4

위 인체적용시험 관련문서 보관에 따른 내용이 발생될 경우, 그에 따른 비용은 (갑) 또는 (갑)의 의뢰자 부담으로 별도 정산한다.

**제 17 조 (기타)**  
본 계약을 체결함에 있어 어떠한 사항도 거래에 따르며 해석상에 이견이 있을 때는 상호간의 합의에 따른다.

본 계약을 증명하기 위하여 계약서 2부를 작성하여 한방이 서명 날인한 후 (갑)과 (을)이 각각 1부씩 보관한다.

과 액 : 26

(갑) 주 소: 서울 송파구 송파대로 201, 테라타워2 A동 1403-1412호  
회 사 명: 우당연엑스  
성 명: 대표이사 오성훈

(을) 주 소: 중목 재천시 서명로 66  
상 호: 세명대학교부속 재천한방병원  
성 명: 병원장 김희덕

Confidential 4 / 4

---

임상연구 계약 체결 및 실시  
일련번호: 4001-02

SOP No. : 연구책임자4001  
Version No. : 6.1

### 임 상 연 구 계 약 서

임상연구 실시기관인 부산대학교한방병원(이하 "실시기관"이라고 한다)과 임상연구책임자 서명식(이하 "연구책임자"라 함.)은 임상연구 의뢰기관인 (주)우당연엑스(이하 "의뢰기관"이라 함.)은 임상연구 실시에 대한 계약을 아래와 같이 체결한다.

**제 1 조 (목적)**  
본 계약은 "의뢰기관"이 "실시기관"에게 의뢰받는데 거래항을 목적으로 연구 수행을 의뢰하고 "실시기관"이 소속된 연구자(이하 "연구책임자")가 본 연구를 실시하는데 필요한 제반사항을 규정함을 그 목적으로 한다.

**제 2 조 (연구과제명 및 연구책임자)**  
본 계약의 연구과제명, 연구책임자 및 본 임상연구계약을 체결하는 근거는 다음과 같다.

연구명 (IRB 승인 연구명)	경증 또는 중등증의 아토피 피부염 대상자에서 '개미부성글루코수용체(α206)의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험(IRB 승인번호 : PNUKH-IRB-2024-03-002)
연구책임자	부산대학교한방병원 한방원리비인추외부과 서명식
관련 기관명 (연구책임자) 또는 임상연구계약 근거 (연구) 자술기관명 필수 기재)	지원기관 : ㈜우당연엑스 제 약 명 : 건강기능식품 기능성 원료로써 개미부성글루코수용체의 아토피피부염 증상 개선 등의 기능성 및 안전성 평가 연구

**제 3 조 (계약기간)**  
본 임상연구 계약기간은 계약일 ~ 연구종료 시까지로 한다. 단 연구윤리심의위원회서 기관 연장 승인한 연구종료일이 계약 종료일 이후일 경우, 연구윤리심의위원회서 승인된 연구종료일을 계약의 만료일로 한다. "실시기관"과 "의뢰기관"은 본 계약기간 만기일 전 30일, 연장 필요 시, 변경에 따른 서류를 서면으로 통보하여 상호합의에 의해 계약기간을 연장할 수 있다.

**제 4 조 (연구기간)**  
연구기간은 연구윤리심의위원회의 연구계약서 승인일(2024년 04월 12일)로부터 2025년 09월 30일 까지로 한다. 단, 연구기간은 추후 "의뢰기관"과 "실시기관"의 합의에 의해 IRB 변경 승인 이후 연장 및 변경할 수 있다.

**제 5 조 (연구계약서의 심사 및 승인 및 준수)**  
1) 연구계약서는 "실시기관"의 연구윤리심의위원회(IRB)의 승인을 득하고 그 실시 방법은 승인된 연구계약서를 준수하여 실시한다.  
2) 연구계약서의 변경 시에는 "실시기관"의 연구윤리심의위원회(IRB)의 사전 승인을 득하고 변경 승인된 연구계약서를 준수하여 실시한다.

Confidential

PNUKH IRB SOP (Ver. 4.0 / 2021.10.01.)  
315. 연구비 산출 내역서

본 "자원기관"의 명칭을 표시하거나 사용할 수 없다.

**제 13 조 (문서외 보류)**  
1) "실시기관"과 "의뢰기관"은 의약품임상시험관리기준(KGCP)에서 정하는 자료의 기록, 보고, 보존에 관한 절차를 준수하고 연구와 관련된 문서는 연구 종료 보고 승인 후 3년간 "실시기관"의 문서보관실에 보관한다.  
2) 3년 이후 보관에 관한 사항은 "의뢰기관"과 "실시기관"에 별도 합의하여 정한다.

**제 14 조 (계약의 효력)**  
본 계약은 "의뢰기관"과 "실시기관"이 날인한 날로부터 유효하다.

**제 15 조 (해역)**  
본 계약에 당사자 외 어떠한 사람도 일 이해가 있는 사항에 관해서는 "의뢰기관"과 "실시기관"에 별도 합의하여 정한다.

**제 16 조 (기타)**  
본 계약서는 총 3부 작성하며 계약 당사자가 각 1부씩 보관한다.

2024년 08월

의뢰기관	실시기관
주 소 : 서울특별시 송파구 송파대로 201, 테라타워2 A동 1403-1412호	주 소 : 경남 창원시 마산합포구 마산대로 20
기관명 : ㈜우당연엑스	기관명 : 부산대학교한방병원
대표자 : 오성훈	대표자 : 이 인
	연구책임자 : 서명식

Confidential

[그림-48] 2개 실시기관의 임상연구계약서

- 세명대학교 한방병원은 24.04.29에 개시모임을 진행하였으며, 부산대학교 한방병원은 24.05.16에 개시모임을 진행함.
- 인체적용시험 결과 보고서 확보를 위한 인체적용시험 일정을 표 71과 같이 구체화하였으며 수행 단계별 세부 내용은 표 72와 같음.

[표-71] 인체적용시험 일정(Time Table)

구분	2023	2024												2025										
	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Contact for CRO	■																							
Project setup		■	■	■	■																			
Initiation activities																								
IRB submission/approval					■																			
Site initiation					■																			
Study stage						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
DM/SA																								
Clinical Study Report																						■	■	■

[표-72] 인체적용시험 수행 단계별 세부 내용

항목	내용	예상 일정 (년.월)	소요 기간 (개월)	비용(원)
Contract for CRO	인체적용시험 CRO 계약 체결	23.12	-	<b>자사부담 : 1.5억</b>
Project Setup	제공된 자료 검토 전략 수립 시험 디자인 연구자/연구기관 선정 프로토콜/CRF 등 개발	24.01	3	
Initiation Activities	시험대상자 모집 방안 등 제반준비 인체적용시험용 대조식품 제조 인체적용시험용 식품 검사	24.01	3	
IRB submission/Approval (protocol)	다기관인 경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요	24.04	1	
Site initiation	인체적용시험 기관 계약 개시모임	24.04	0.5	<b>자사부담 : 3.0억</b>
Study Stage	등록기간 : 12 개월 섭취기간 : 12 주 모니터링	24.05	15	
Data Management(DM)	DB 구축, 코딩 등	25.08	2	
Statistical Analysis(SA)	통계분석 및 표/그림 제작	25.08	1	
Clinical Study Report (CSR)	결과보고서 작성 및 연구자 고찰 삽입	25.11	-	

○ 인체적용시험 종료

- 결과보고서 확보 후 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출 자료 및 마케팅 자료로 활용할 예정입니다.

### 11) 기능성 소재의 제품화 및 사업화

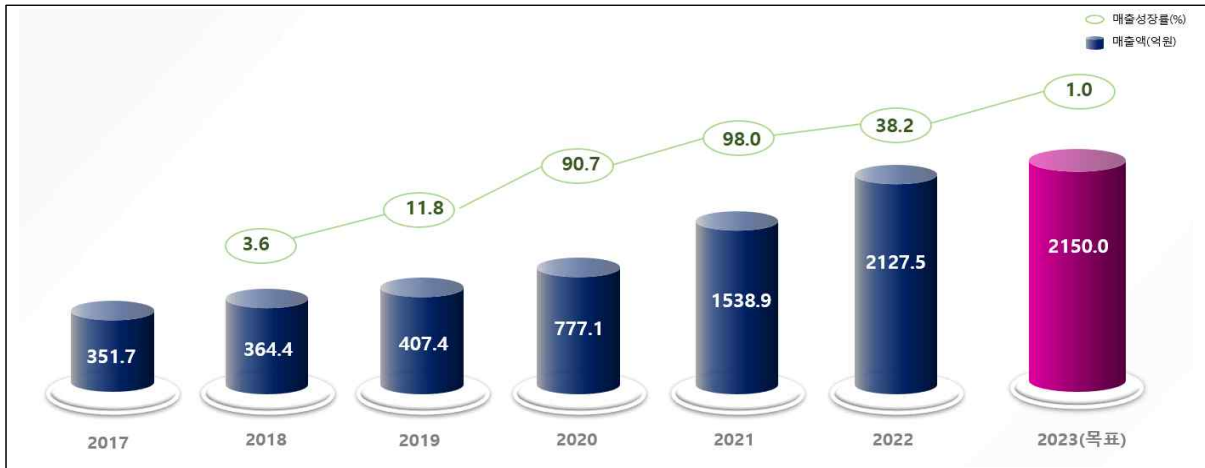
#### ○ 사업화 목표

(단위 : 백만원)

구분		사업화 년도			
년도		2024년 (종료 1차년도)	2025년 (종료 2차년도)	2026년 (종료 3차년도)	2027년 (종료 4차년도)
사업화 목표		인체적용시험	개별인정 추진	원료 시장 진입	완제 시장 진입 및 성장
사업화 내용		인체적용시험 및 응용제품 확대	인체에서의 기능성 정보 확보 및 개별인정 추진	개별인정 식약처 허가 및 원료 사업화	완제 사업화
사업화 성과 지표 (판매 계획)	예상 총매출액(A)	220,000	226,000	233,000	240,000
	예상 연구개발 결과물 제품 매출액(B)			1,000	5,000
	연구개발 결과물 제품 점유 비율(C) (C=B/A)			0.43%	2.08%

#### ○ 사업화 목표 산정 근거

- 그림 48과 같이 당사의 최근 5년간 연 매출액은 400억에서 2,100억으로 성장하고 있으며 25건의 개별인정(그림 49)획득 경험이 있고 면역 기능 관련 품목(스피루리나)은 연 20억 이상의 매출을 기록하고 있어 이를 근거로 본 연구개발 결과물의 제품 매출액을 설정함.



[그림-49] 주영엔에스(주)의 매출 변화

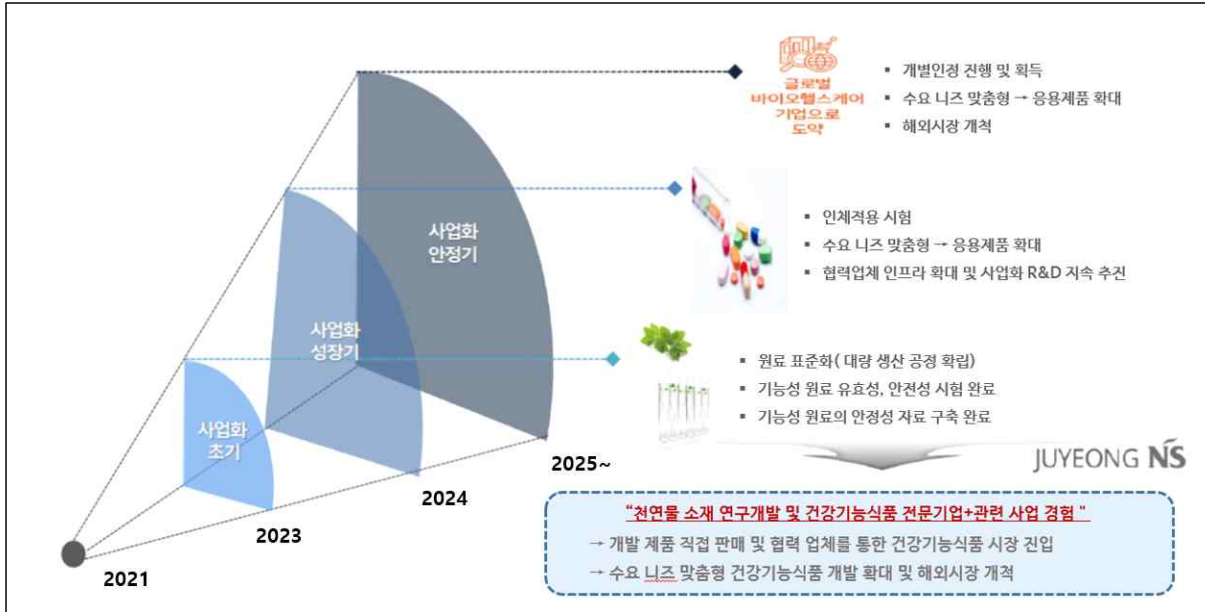


[그림-50] 주영엔에스(주)의 연도별 개별인정 획득(25건)



○ 사업화 전략

- 사업화 초기 : 2023년 표준화 완료된 원료 대량 생산 공정을 적용하여 생산된 기능성 원료의 안정성, 안전성, 유효성 자료 구축을 완료하고 한국생명공학연구원 특허에 대한 전용 실시권을 확보함.
- 사업화 성장기 : 2024년에는 구축된 연구개발 기술 자료를 바탕으로 인체적용시험을 실시하고 동시에 제형 다양화를 통해 응용제품을 확대하고 사업화 R&BD를 지속 추진함.
- 사업화 안정기 : 2025년에는 개별인정을 추진하고 2026년에는 제품을 상용화하여 시장에 진입하여 매출을 발생시키고 해외 영업 인력의 확충 등을 통하여 해외영업망을 구축하고 수출계약 등을 구체화하여 해외시장을 개척함.(그림 50)



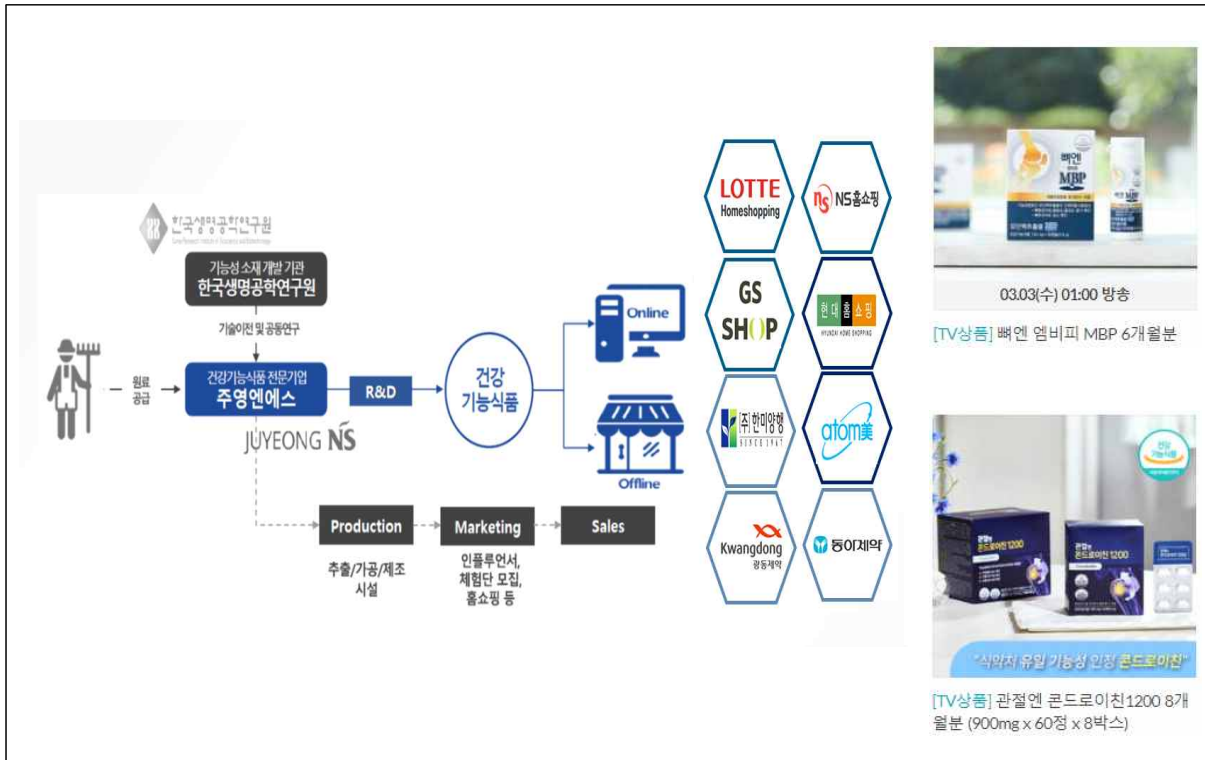
[그림-51] 사업화 전략

○ 사업화 전략 세부 내역

구분	추진계획
전시회 참가	개별인정 완료 후, 원료 및 완제 시장 진입시, 국내 Bio Korea, Cphl korea 등의 전시회 및 국외 Vitafoods, Supply side West Healthplex Expo 등의 전시회를 참가 하고자 함.
On/Off 홍보 활동	Off line을 활용한 홍보로서, 일간지 및 전문지를 활용하거나, 리플렛(leaflet) 및 팜플렛(pamphlet) 하여 홍보할 수 있음. On line을 활용한 홍보로서 홈쇼핑 광고, On line cafe 및 Blog를 활성화할 수 있음.
공급·유통 채널 확보를 통한 판로 개척	에터미(주), (주)노바렉스, 코스맥스바이오(주), (주)서흥, 콜마비엔에이치(주), (주)휴림, (주)뉴트리바이오텍, 종근당건강(주) 등과의 영업망이 구축 되어 있어, 이를 통한 공급, 유통을 통해 시장을 확대하고자 함.
판매 전략	NS홈쇼핑, GS홈쇼핑등을 통한 제품의 광고, 원료와 완제 생산 및 판매 등의 판매채널이 확립되어 있어 이를 활용하고자 함.
연령층에 따른 제형 개발	- 아토피 시장의 주요 대상은 영유아와 성인으로 나눌 수 있어, 대상에 따른 제형 및 제품 개발을 하고자 함. - 어린이의 경우 대표적으로, paste, syrup, gel, jelly type의 제형에 맛과 향을 입힌 제형 개발이 요구되며, 성인은 복용이 간편한 tablet, capsule, granule type의 제형 개발로 소비자 접근을 보다 용이하게 하고자 함.

○ 당사 사업화 전략의 특징

- 기능성 원료 사업과 동시에 완제사업이 가능한 조직 시스템이 확보되어 있음.
- 국내 유수의 건강기능식품 회사를 통해 기능성 원료를 납품하고 있으며, 자체 완제 사업을 통해 현재 홈쇼핑 등에서 활발히 제품 판매가 이루어지고 있음(그림 51)
- 판매망의 다채널을 통해서 시장 확대가 가능하고 상품의 주기를 늘리려는 노력을 하고 있음.



[그림-52] 주영엔에스(주) 사업화 구성 및 판매망(홈쇼핑)

○ 사업화를 위한 원물 확보 방안 및 가격 경쟁력에 대한 전략

- 사업화 목표 달성을 위하여 표 73과 같이 원물 재배 면적을 증가시키고 밀식재배를 통하여 필요한 원물을 확보할 예정임.

[표-73] 원물 재배 계획 및 확보 수량

구분	2023년	2024년	2025년	2026년
재배면적(m <sup>2</sup> )	2000	2000	4000	4000
재배방식 (지주를 활용한 유인재배)	이랑간격 200cm, 포기간격 80cm 삼목	이랑간격 200cm, 포기간격 80cm 삼목	이랑간격 100cm, 포기간격 40cm 삼목	이랑간격 100cm, 포기간격 40cm 삼목
확보수량(ton)	2	2	8	8
누적총량(ton)	2	4	12	20

- 현재 기능성 소재의 1달분 가격은 원물단가 20,000원/kg을 기준으로 10,338원이며 제품 상용화 및 양산시 원물의 재배면적을 늘리면(2배) 원물단가를 10,000원/kg 이하, 기능성 소재의 1달분 가격을 6,048원 이하로 제조가 될 것으로 판단되어 그림 52와 같이 현재 시판되는 동일 기능성의 제품들과도 가격 경쟁력이 있으며 홈쇼핑 판매에 특화된 당사의 마케팅 노하우로 제품 경쟁력이 있음.

		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다래 추출물</li> <li>• 24,000원/1개월분</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다래 추출물</li> <li>• 99,000원/1개월분</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 과채유래유산균CJLP133</li> <li>• 21,900원/1개월분</li> </ul>

[그림-53] 면역과민 피부상태 개선 건강기능식품 판매가

○ 제품 산업화 방안

- 인체적용 시험 종료 후 개별인정 획득 및 원물 생산 확대를 통하여 상용화 단계를 완료하고 1차 인체적용시험 후 연령별 추가 인체적용시험을 통하여 그림 54와 같이 타겟 연령에 따른 차별화된 제품을 개발할 예정임.

구분	제형	이미지			
성인	Tablet/Capsule Granule/Liquid				
어린이 (영유아)	Paste/Syrup Gel/Jelly				

[그림-54] 타겟 연령에 따른 최종 완제품 이미지

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

- 야생 채취 식물의 증식 재배에 따른 작물화
- 원재료(원물) 계약재배에 따른 농가 소득 발생
- 제조공정 개선에 따른 대량생산 공정의 안정성 확보
- 효능 검증을 통한 인체적용시험의 섭취 용량 결정
- 독성시험을 통한 식품 섭취 이력이 없는 식물 소재의 안전성 확보
- 안정성 평가를 통한 기능성 소재 및 지표 성분의 소비기한 확인

##### (2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발 성과표 >

성과지표명		단계	1단계		2단계	계	가중치 (%)	
			2021년	2022년	2023년			
전담기관 등록·기탁지표	논문	목표		SCI논문 1건, 비SCI논문 1건	SCI 논문 1건	3건	0	
		실적		0건	SCI 논문 1건 비SCI 논문 1건	2건		
	보고서 원문	목표	연차보고서1건	단계보고서1건	최종보고서1건	3건	0	
		실적	연차보고서1건	단계보고서1건	최종보고서1건	3건		
연구개발과제 특성 반영 지표	기술이전 건수	목표		1건		1건	16.7	
		실적		1건		1건		
	기술료 (정액)	목표		₩ 120,000,000		₩ 120,000,000	33.4	
		실적		₩ 150,000,000		₩ 150,000,000		
	고용창출	목표	2명	1명	1명	4명	16.7	
		실적	2명	1명	1명	4명		
	논문 평균IF	목표		2.0	2.0	2.0	8.3	
		실적		0	3.9	1.95		
	학술발표	목표		1건	1건	2건	8.3	
		실적		1건	1건	2건		
	인력양성	목표		1명		1명	8.3	
		실적		1명		1명		
	홍보전시	목표		1건		1건	8.3	
		실적		3건		3건		
	계							100

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고수준 보유국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치			목표 설정 근거
			성능수준	성능수준	1단계		2단계	
					2021년	2022년	2023년	
원물 표준화	%	10	60	50	100			선행연구
제조공정 개선 및 표준화	%	5	50	50	100			선행연구
대량생산 공정 최적화 및 시작품 제작	%	5	20	20	80	100		선행연구
품질관리 기준 마련	%	5	40	30	80	100		선행연구
안전성 평가	%	10	30	0	10	100		선행연구
기준규격 및 시험법 확립	%	5	20	10	30	100		선행연구
유효능 평가	%	20	50	40	60	90	<b>100</b>	선행연구
안정성 평가	%	10	0	0	0	50	<b>100</b>	선행연구
시제품 생산	%	5	0	0	0	0	<b>100</b>	선행연구
인체적용시험	%	25	0	0	0	20	<b>30</b>	선행연구

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Effect of Ampelopsis brevipedunculata (Maxim.) Trautv extract on skin barrier function	Food and Life	박선경	2023(1)	국내	한국동물자원식품과학회	비SCIE	2023.01.30	2714-0865	70
2	Effect of Ampelopsis brevipedunculata (Maxim.) Trautv extract on a model of atopic dermatitis in HaCaT cells and mice	Food Science & Nutrition	박선경	11(10)	국외	Wiley	SCI	2023.10.10	2048-7177	70

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국 분자·세포생물학회 정기학술대회	박선경	2022. 09. 29	제주 중문 ICC	국내
2	한국식품영양과학회	박선경	2023. 10. 18	부산 벅스코	국내

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

국내 표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	jj206	2023. 12. 27	주영엔에스(주)	-	인체적용시험	3년		

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	전용실시권	기술이전계약서	주영엔에스(주)	2023. 10. 19	1.5억	

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

- \* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 1) 기술이전 또는 자기실시 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국내 또는 국외 중 해당하는 사항을 기재합니다.

매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					



□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2021년	2022년	2023년	
1	기술사업화지원사업	주영엔에스(주)	2	1	1	4
합계			2	1	1	4

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	5	
		생산인력	-	
	개발 후	연구인력	9	
		생산인력	-	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1		2022	1					1					1	

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함), <b>품종인 경우 품종 보호권 등록증 또는 생산판매 신고증명서</b>
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 기능성 소재의 원료 표준화	○ 원재료(원료) 표준화 완료 ○ 원재료(원료) 기준 규격 설정 완료	100
○ 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화	○ 제조공정 표준화 완료 ○ 제조공정도 및 공정 SOP 설정 완료	100
○ 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시제품 제작	○ 대량생산 공정 최적화 완료 ○ 시제품 제작 5건 완료	100
○ 기능성 소재의 품질관리 기준 마련	○ 주요성분 규명 및 지표성분 설정 완료 ○ 지표성분 표준 분석법 정립 ○ 지표성분 분석법 타당성 검증(Validation) 완료	100
○ 기능성 소재의 안전성 평가	○ 안전성 평가 완료 ○ GLP 독성시험 보고서 확보	100
○ 기능성 소재의 기준규격 설정 및 시험법 확립	○ 기준규격 설정 완료 ○ 시험법 확립	100
○ 기능성 소재의 유효능 평가	○ 활성 평가 자료 확보 ○ 기전 연구 확립	95
○ 기능성 소재의 안정성 평가	○ 안정성(소비기한 설정) 실험 완료 ○ 기능성 소재 및 지표성분의 안정성 기간 확인	100
○ 기능성 소재의 시제품 제작	○ 과립, 정제, 캡슐, 액상제형 연구 완료 ○ 1종의 시제품 생산 완료	100
○ 기능성 소재의 인체적용시험	○ 인체적용시험자 자료집(IB) 작성 및 프로토콜 개발 완료 ○ 인체적용시험 CRO 기관 선정 및 계약 완료	30

## 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 유효능 평가를 완료하였으나 정량적 연구개발성과 중 SCI 논문 1건 미확보 되었음.
- 인체적용시험의 제반 연구인 기능성 소재의 원료표준화, 유효능 평가, 안전성 평가는 계획대로 진행되었으나 기능성 소재의 안정성 평가 및 시제품 제작의 지연으로 인해 인체적용시험의 개시가 지연되어 결과물 미확보 되었음.

### 2) 자체 보완활동

- 기능성 소재의 유효능 평가관련 논문(SCI 1편)에 대하여 Food Biotechnology에 투고 예정임.
- 기능성 소재의 안정성 평가 및 시제품 제작을 완료하였고 피부 면역과민반응 기능성에 대하여 4건의 수행 경험있어 피험자 모집에 용이성이 있는 '파마크로' CRO 기관과 인체적용시험 계약 체결을 완료하였으며 인체적용시험 전과정을 자체비용으로 수행할 예정임.

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 본 연구를 충실하게 수행하기 위하여 연구진의 업무 분담을 효율적으로 구성하여 연구를 추진하였음.
  - 우수한 결과 도출을 위하여 외부 전문 기술을 활용하였음.
- 

### 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 국내 미래농산자원인 개머루 덩굴을 이용한 기능성 식품 개발을 통해 국내 신규 농산물 보급으로 재배 지역 농가 소득 증대 및 산업구조 변화에 기여.
  - 국내산 원물의 재배 성공 및 재배지 확보가 완료되어 국내 유전자원 주권에 기여.
  - 아토피 치료효과 증진을 위한 건강기능식품 개발에 요구되는 효능평가기술, 독성평가기술 등의 기반 기술 및 노하우를 확보함으로써 향후 다양한 천연물 건강기능식품 개발을 위한 기반 기술 확립에 기여.
  - 염증질환에 대한 예방적 개념 도입으로 치료형에서 예방형으로 변화됨으로서 장기간 복용 가능하고 부작용이 적은 천연 식의약품등의 자원화와 산업발전에 기여.
- 

### 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

- 국내 미래농산자원인 개머루 덩굴을 이용한 추출물의 기능성, 안전성, 표준화 자료를 확보하고 과민면역 개선용 건강기능식품 기능성원료의 개발을 위한 개별인정형 신청자료로 활용함.
  - 인체적용시험 결과를 최종 취합하여 과민면역 개선 건강기능식품 기능성 원료 개별인정을 등록.
  - 개별인정형 기능성 원료 신청의 승인 후 주영엔에스(주)는 기능성 원료의 품질관리 노하우를 기반으로 건강기능식품 상용화를 추진할 예정임.
  - 상용화 후 국내 신규 농산물 및 영농 기술의 농가 보급
  - 국내용 건강기능식품 개발 및 당사의 기능성 소재 수입대체 및 역수출의 기회로 삼을 수 있음.
  - 대량 생산공정 및 품질관리 기준 자료를 기반으로 건강기능식품 전문 제조 공장을 설립할 예정임.
  - 과민면역 개선 기능성 식품의 마케팅의 주요 자료로 활용 할 예정이며 국내 개발소재를 통하여 이익 구조를 개선할 예정임.
  - 관련 학회 및 전시회 등의 참가 자료로 활용하여 국내외 산업화 역량을 강화할 계획임.
  - 연구 network 형성 및 지속적인 연구개발을 통해 신소재를 발굴하고 지역 연구 인력 창출에 기여할 예정임.
-

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	건강기능식품 기능성 원료	1	
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보(박람회 참가)		6	
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서(주관연구개발기관)
	4) 연구부정행위 예방 확인서(공동연구개발기관)
2. 세부 정량적 연구개발성과 증빙자료	5) 과학적 성과 - 논문(국내외 전문학술지) 게재 1
	6) 과학적 성과 - 논문(국내외 전문학술지) 게재 2
	7) 과학적 성과 - 국내 및 국제 학술회의 발표 1
	8) 과학적 성과 - 국내 및 국제 학술회의 발표 2
	9) 경제적 성과 - 시제품 제작
	10) 경제적 성과 - 고용 창출
	11) 사회적 성과 - 전문 연구 인력 양성

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	821024-03		
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	기술사업화지원사업				주관
총괄과제				총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발			과제유형	개발
연구개발기관	주영엔에스(주)			연구책임자	권창주
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021.04.01. ~ 2021.12.31	225,000	75,000	300,000
	2차년도	2022.01.01. ~ 2022.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2023.01.01. ~ 2023.12.31	300,000	100,000	400,000
	계	2021.04.01. ~ 2023.12.31	825,000	275,000	1,100,000
참여기업	주영엔에스(주)				
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024. 02. 23

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
주영엔에스(주)	이사	권창주

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	권창주
----	-----



## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 식품 섭취 이력이 없는 야생 채취 식물 소재를 증식 재배하여 작물화 하였고 독성시험을 통하여 안전성을 확보한 연구개발 성과는 창의적이고 우수함.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 국내 미래농산자원인 개머루 덩굴을 이용한 기능성 식품 개발을 통해 국내 신규 농산물 보급으로 재배 지역 농가 소득 증대 및 산업구조 변화에 기여
- 유용성이 인정되는 국내 농산자원 또는 특용자원으로부터 새로운 소재로 발굴, 보존함으로써 생물다양성 보존을 위한 국제협약 강화에 대한 대응책으로 활용할 수 있을 것으로 기대됨.
- 염증질환에 대한 예방적 개념 도입으로 치료형에서 예방형으로 변화됨으로써 장기간 복용 가능하고 부작용이 적은 천연 식의약품등의 자원화와 산업발전에 기여

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 연구개발 결과 확보된 개머루 덩굴 추출물의 표준화 자료, 기능성 평가 및 안전성 평가 자료를 과민면역 개선 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출 자료로 활용함.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 본 연구를 충실하게 수행하기 위하여 연구진의 업무 분담을 효율적으로 구성하여 연구를 추진하였음.
- 우수한 결과 도출을 위하여 외부 전문 기술을 활용하였음.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 본 연구를 통하여 2건의 논문(SCI 1건, 비SCI 1건)을 도출하였음.
  - Effect of Ampelopsis brevipedunculata (Maxim.) Trautv extract on skin barrier function, Food and Life, 2023(1)
  - Effect of Ampelopsis brevipedunculata (Maxim.) Trautv extract on a model of atopic dermatitis in HaCaT cells and mice, Food Science & Nutrition, 2023 11(10)

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
• 기능성 소재의 원물 표준화	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>원재료(원물) 표준화 완료</li> <li>원재료(원물) 기준 규격 설정 완료</li> </ul>
• 기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>제조공정 표준화 완료</li> <li>제조공정도 및 공정 SOP 설정 완료</li> </ul>
• 기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시작품 제작	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대량생산 공정 최적화 완료</li> <li>시작품 제작 5건 완료</li> </ul>
• 기능성 소재의 품질관리 기준 마련	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>주요성분 규명 및 지표성분 설정 완료</li> <li>지표성분 표준 분석법 정립</li> <li>지표성분 분석법 타당성 검증(Validation) 완료</li> </ul>
• 기능성 소재의 안전성 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>안전성 평가 완료</li> <li>GLP 독성시험 보고서 확보</li> </ul>
• 기능성 소재의 기준규격 설정 및 시험법 확립	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>기준규격 설정 완료</li> <li>시험법 확립</li> </ul>
• 기능성 소재의 유효능 평가	20	95	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성 평가 자료 확보</li> <li>기전 연구 확립</li> </ul>
• 기능성 소재의 안정성 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>안정성(소비기한 설정) 실험 완료</li> <li>기능성 소재 및 지표성분의 안정성 기간 확인</li> </ul>
• 기능성 소재의 시제품 제작	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>과립, 정제, 캡슐, 액상제형 연구 완료</li> <li>1종의 시제품 생산 완료</li> </ul>
• 기능성 소재의 인체적용시험	25	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체적용시험 프로토콜 개발 완료</li> <li>인체적용시험 CRO 기관 선정</li> </ul>
합계	100	81.5	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 기능성 소재의 표준화 자료 구축, 안전성 평가, 기능성 평가 등 제반 연구는 완료된 상태이며 인체적용시험을 자체비용으로 수행하여 연구개발을 완료하겠음.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출 자료 확보 여부

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 미완료된 인체적용시험을 자체비용으로 수행하여 결과보고서를 확보하고 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료 및 마케팅의 주요 자료로 활용할 계획임.

IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	국내 미래농산자원을 이용한 개별인정형 기능성 식품 개발			
주관연구개발기관	주영엔에스(주)		주관연구책임자	권창주
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	825,000,000	275,000,000	-	1,100,000
연구개발기간	2021. 04. 01 ~ 2023. 12. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체실시) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①기능성 소재의 원물 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원재료(원물) 표준화 완료</li> <li>• 원재료(원물) 기준 규격 설정 완료</li> </ul>
②기능성 소재의 제조공정 개선 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제조공정 표준화 완료</li> <li>• 제조공정도 및 공정 SOP 설정 완료</li> </ul>
③기능성 소재의 대량생산 공정 최적화 및 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대량생산 공정 최적화 완료</li> <li>• 시제품 제작 5건 완료</li> </ul>
④기능성 소재의 품질관리 기준 마련	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 주요성분 규명 및 지표성분 설정 완료</li> <li>• 지표성분 표준 분석법 정립</li> <li>• 지표성분 분석법 유효성 검증(Validation) 완료</li> </ul>
⑤기능성 소재의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 안전성 평가 완료</li> <li>• GLP 독성시험 보고서 확보</li> </ul>
⑥기능성 소재의 기준규격 설정 및 시험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기준규격 설정 완료</li> <li>• 시험법 확립</li> </ul>
⑦기능성 소재의 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 활성 평가 자료 확보</li> <li>• 기전 연구 확립</li> </ul>
⑧기능성 소재의 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 안정성(소비기한 설정) 실험 완료</li> <li>• 기능성 소재 및 지표성분의 안정성 기간 확인</li> </ul>
⑨기능성 소재의 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 과립, 정제, 캡슐, 액상제형 연구 완료</li> <li>• 1종의 시제품 생산 완료</li> </ul>
⑩기능성 소재의 인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체적용시험 프로토콜 개발 완료</li> <li>• 인체적용시험 CRO 기관 선정</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용)
	특허출원	특허등록	품질인증	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SCI	비SCI	JCR JCI			학술발표	정책 활용	
												건				백만원	건			백만원
가중치					10	20	20	20		10				5	5		5		5	
최종 목표					1	120	1	6,000		9		3	1	2.0	2		1		7	
당해 목표 년도 실적					1	120				1		1		2.0	1					
달성률 (%)					100	125				100		100		195	100					

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	원물 표준화
②	제조공정 개선 및 표준화
③	대량생산 최적화 및 시작품 제작
④	품질관리 기준 마련
⑤	기준규격 및 시험법 확립
⑥	유효능 평가
⑦	안전성 평가
⑧	안정성 평가
⑨	시제품 생산
⑩	인체적용시험

### 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	산업체 (제품화)	이전 해결	현장애 로결	정책 자료	기타
①원물 표준화		√									자체실시
②제조공정 개선 및 표준화		√									자체실시
③대량생산 최적화 및 시작품 제작		√									자체실시
④품질관리 기준 마 련		√									자체실시
⑤기준규격 및 시험 법 확립		√									자체실시
⑥유효능 평가		√									자체실시
⑦안전성 평가		√									자체실시
⑧안정성 평가		√									자체실시
⑨시제품 생산		√									자체실시
⑩인체적용시험		√									자체실시

\* 각 해당란에 √ 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①원료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료 품질관리 및 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>상용화 후 신규농산물 및 영농기술 농가보급</li> </ul>
②제조공정 개선 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>제조공정 관리 및 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>제조공정의 안전성 확보</li> </ul>
③대량생산 최적화 및 시작품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>대량생산 관리 및 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>건강기능식품 전문제조공장설립의 기반</li> </ul>
④품질관리 기준 마련	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>상용화 제품의 품질 보증</li> </ul>
⑤기준규격 및 시험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>상용화 제품의 품질 보증</li> </ul>
⑥유효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>마케팅의 주요 자료로 활용</li> </ul>
⑦안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>안전성 확보로 식품 섭취 이력이 없는 야생식물 소재의 작물화</li> </ul>
⑧안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>상용화 제품의 품질 보증</li> </ul>
⑨시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>응용 제품 확대</li> </ul>
⑩인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 제출자료로 활용</li> <li>마케팅의 주요 자료로 활용</li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) ()
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T P R O J E C T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문 S C I	비 S C I			논 문 평 균 I F	학 술 발 표	
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치					10	20	20	20	10					5	5		5	5	
최종목표					1	120	1	6,000	9			3	1	2.0	2		1	7	
연구기간내 달성실적					1	150			4			1	1	1.95	2		1	1	
연구종료후 성과창출 계획								1	6,000	5		1		2.0				6	





## 연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
변조	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 계재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 02. 23

기관명 : 주영엔에스(주)

점검자 : 권창주

(서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

## 연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 02. 23

기관명 : 한국생명공학연구원

점검자 : 노문철

**농림식품기술기획평가원장** 귀하



## 개머루덩굴 추출물의 자극에 의한 피부장벽 개선 효과



박성경<sup>1</sup>, 임형진<sup>1</sup>, 원영선<sup>1</sup>, 박은재<sup>1</sup>, 오제훈<sup>2</sup>, 김지은<sup>2</sup>, 이민자<sup>2</sup>, 이소영<sup>1</sup>, 이승웅<sup>1</sup>, 이승재<sup>1,3,\*</sup>, 노문철<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>기능성바이오소재연구센터, 한국생명공학연구원

<sup>2</sup>주영엔에스(주)

<sup>3</sup>응용바이오공학전공, 과학기술연합대학원대학교

### Effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract on skin barrier function

Seon Gyeong Bak<sup>1</sup>, Hyung Jin Lim<sup>1</sup>, Yeong-Seon Won<sup>1</sup>, Eun Jae Park<sup>1</sup>, Je Hun Oh<sup>2</sup>, Ji Eun Kim<sup>2</sup>, Min Jee Lee<sup>2</sup>, Soyoung Lee<sup>1</sup>, Seung Woong Lee<sup>1</sup>, Seung Jae Lee<sup>1,3,\*</sup>, Mun Chul Rho<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Korea

<sup>2</sup>Ju Yeong NS Co., Ltd., Seoul 05854, Korea

<sup>3</sup>Applied Biological Engineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Korea

#### Abstract

The skin is the largest organ that blocks invasion to the outside. Due to external stimuli, the skin barrier collapses and immune function abnormalities occur. This leads to skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis. Through this study, we attempted to develop a natural material that can be used for various dermatitis diseases. In this study, the gene expression of skin barrier-related proteins was confirmed using tumor necrosis factor- $\alpha$ /interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells through real-time PCR. As a result, it was confirmed that the gene expression of skin barrier-related proteins and ceramide-related proteins was improved by the ABE-M. In this study, it was confirmed that the gene expression of filaggrin, involucrin, and loricrin, which are skin barrier-related proteins, was improved by ABE-M, and it was confirmed that the gene expression of the tight junction-related proteins, occludin and zonula occludens proteins-1, was also increased. As such, it is expected that ABE-M can be used as a material for skin inflammation such as atopic dermatitis.

**Keywords:** skin barrier, tight junction, serine palmitoyltransferase (SPT), ceramidase

#### 서론

피부는 외부로부터 몸을 보호하는 역할을 하며, 인체에서 가장 큰 기관이다. 피부는 크게 표피와 진피로 구분되며, 표피는 각질 형성 세포로 분화 정도에 따라 기저층, 유각층, 과립층, 각질층으로 나뉜다(Benson, 2012). 피부 장벽의 주요 단백질은 filaggrin (FLG), involucrin (IVL), loricrin (LOR) 및 ceramide로 구성되어 있으며, 각질층에 존재한다(Howell et al., 2009; Imokawa and Ishida, 2014; Kim et al., 2008). 또한 표피층에 존재하는 tight junction을 구성하는 단백질은 claudin, occludin, zonula occludens proteins(ZO)-1 등이 있다(Bäslar and Brandner, 2017;

Bäslar et al., 2016). 하지만, 피부 장벽의 붕괴는 외부 물질의 유입으로 인해 피부 하층의 대식세포, T 세포 등의 면역세포 활성화를 도모함으로써 염증 환경을 조성한다(Bäslar and Brandner, 2017). 하여, 이는 염증 환경의 조성으로 인해 아토피 피부염과 건선 등의 피부질환의 원인이 된다. 최근 연구에 따르면, FLG, LOR, 및 ceramide 등의 피부 장벽 단백질들의 유지를 통해 건선 병변의 완화에 도움을 준다는 흥미로운 결과를 보여준다. 또한, 각질 세포에서 활성화된 STAT3에 의해 피부 장벽 기능이 붕괴되어 건선과 유사한 피부질환이 발생할을 확인한 바 있다(Sano, 2015). 일반적으로 피부질환 치료를 위해

\*Corresponding author : Seung Jae Lee. Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Korea. Tel: +82-63-570-5267, Fax: +82-63-570-5239, E-mail: seung99@kribb.re.kr

Mun Chul Rho. Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Korea. Tel: +82-63-570-5230, Fax: +82-63-570-5239, E-mail: rho-m@kribb.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

스테로이드 제제 및 항히스타민제제 등을 사용하나, 사용 기간에 따른 피부 부작용을 초래한다(Arellano et al., 2007; Hajar et al., 2015). 따라서 안전하고 효과적인 치료제 연구가 필요하며, 이를 위해 천연 소재를 이용한 소재 발굴을 하고자 한다.

개머루덩굴은 포도와 개머루 속에 속하는 낙엽성 덩굴 식물로, 아시아와 북미 동부, 멕시코, 과테말라에 널리 분포하여 자생한다(Byng, 2014). 개머루 덩굴의 전통 약용은 허준의 동의보감과 중국의 한약서에 잘 기록되어 있다(Yan et al., 2018). 개머루 덩굴의 효능은 개머루덩굴의 메탄올 추출물은 리놀산과 산화플라스미드 DNA 산화를 억제 시켰으며(Wu et al., 2004), 개머루덩굴의 에탄올 추출물은 항산화능이 있으며(Rhim and Choi, 2010), JAK2/STAT3의 신호전달을 억제 통해 항염증 활성이 보고되었다(Jang et al., 2018). 또한, 개머루 덩굴 에탄올 추출물이 아토피 피부염의 염증 억제하는 등의 약리 활성이 보고되었다(Choi et al., 2019). 앞선 연구에 따라, 피부염의 완화는 피부 장벽 유지와 연관이 있음이 보고되었기에, 본 연구를 통해 개머루덩굴의 피부 장벽 유지 효능을 확인함에 따라 치료제로서의 소재 가능성뿐만 아니라, 다양한 적용점을 제시하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 재료 준비

개머루 건조 줄기 39 kg을 추출기에 넣고 55% 주정 468 L를 가하여 78°C에서 9시간 추출한 다음, 1 µm 카트리지 필터를 이용하여 여과하고 고형분 함량 20%가 되도록 농축하였다. 개머루 덩굴 추출물의 성분비가 추출물 80%, 부형제 20%가 되도록 적정량의 부형제(말도덱스트린, Ⓜ대상)를 넣어 혼합하고 분무 건조하여 4.8 kg의 개머루 덩굴 추출물(제조번호: JY206M M210930)을 얻었으며, 수율은 12.3%로 나타내었다.

### 세포 배양

인간 각질세포주인 HaCaT 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 1% penicillin/streptomycin을 배합한 배지에 의해 배양되었으며, 5% CO<sub>2</sub>를 지속해서 공급하는 37°C 배양기 내에서 유지되었다.

### 실시간 증합효소 연쇄반응

세포의 RNA는 TRIzol에 의해 추출하였다. 1 µg의 RNA를 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit(Takara Bio, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 유전자 발현을 비교 측정하기 위해 Real-time PCR을 진행하였다. 실험이

사용된 특정 Taqman Gene expression assay는 다음과 같다: FLG(Hs00856927\_g1), IVL(Hs00846307\_s1), LOR(Hs01894962\_s1), occludin(Hs05465837\_g1), ZO-1(Hs01551867\_m1), SPT1(Hs00272311\_m1), SPT2(Hs01027014\_m1), Ceramidase(ASAH2, Hs01015655\_m1).

### 통계 분석

연구 자료의 분석을 위해 Prism 5 소프트웨어 프로그램(Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA)을 이용하였으며, 등분산 가정하에  $p < 0.01$ 로 유의 수준을 정하였다.

## 결과

### Improvement of skin barrier function of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract

우리는 각질세포인 HaCaT 세포에서 개머루 덩굴 추출물이 주요 피부 장벽의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 1과 같이 피부 장벽 단백질인 FLG, IVL, 및 LOR의 유전자 발현은 대조군 세포에 비해 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ /interferon(IFN)- $\gamma$ 로 감작 처리한 세포에서 유의하게 감소하였다. 그러나 개머루 덩굴 추출물 처리그룹에서는 농도의존적으로 회복되는 것을 확인하였다. 이는 개머루 덩굴 추출물이 피부 장벽 단백질을 회복 능력이 있는 것으로 나타나고 이에 밀착 접합 주요 요인을 분석하였다.

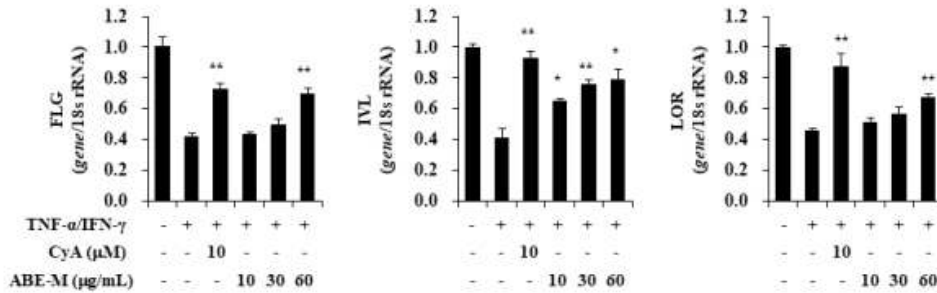
### Tight junction improvement effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract

밀착 접합은 피부 장벽으로서 각질층과 보편적인 기능을 수행하는 것으로 보고되어 있는데, 본 연구에서는 이러한 밀착 접합을 구성하는 occludin 및 ZO-1 단백질의 발현에 개머루 덩굴 추출물이 미치는 영향에 대해 조사하였다. Occludin, ZO-1의 분석 결과, 대조군에 비해 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리군에서 유의하게 감소하였고, 개머루 덩굴 추출물 처리 그룹에서 농도의존적으로 회복하는 현상을 확인하였다(Fig. 2).

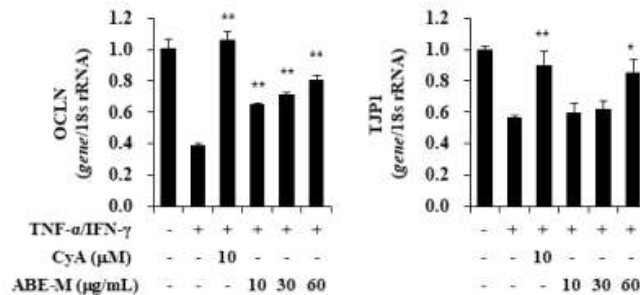
### Ceramide-improving effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract

Ceramide 합성을 조절하는 효소인 serine palmitoyltransferase(SPT) 1, 2의 유전자 발현은 대조군에 비해 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리군에서 유의하게 감소하였고, 개머루 덩굴 추출물 처리시 유의적으로 발현량이 증가함을 확인하였다(Fig. 3). 또한, ceramidase의 유전자 발현은 대조군에 비해 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리시 증가한 반면, 개머루 덩굴 추출물 처리 그룹에서 농도의존적으로 감소되었다.





**Fig. 1.** Effect of ABE-M on gene expression level of skin barrier proteins in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation. Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 h, and RNA was extracted from the cells using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated group. FLG, filaggrin; IVL, involucrin; LOR, loricrin; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon.

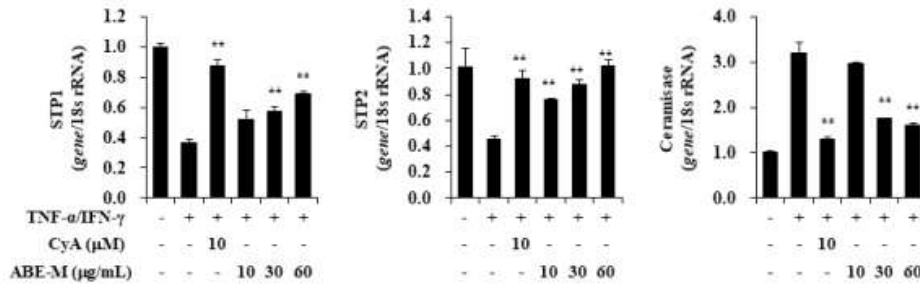


**Fig. 2.** Effect of ABE-M on gene expression level of tight junction proteins in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation. Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 h, and RNA was extracted from the cells using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated group. OCLN, occludin; TJP1, tight junction protein 1; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon.

## 고찰

인체의 항상성 유지에도 매우 중요한 신체 기관 중 일부인 피부는 외부환경의 다양한 자극으로부터 신체를 보호(Yoon et al., 2013)하는 것으로 잘 알려져 있는데, 과도한 자외선 노출, 미세먼지, 미생물의 번식 등의 외부 자극은 피부 세포의 DNA 돌연변이, 세포막 및 단백질 손상, 노화, 면역 기능 이상 등의 문제점을 야기한다. 이러한 결과들은 특히 두드러기, 건선, 습진, 접촉성 피부염, 아토피 피부염과 같은 염증성 피부질환으로 이어지는 것으로 알려져 있다(Benson, 2012). 피부에 염증 자극이 발생하면 면역 세포인 대식세포가 활성화되어 nitric oxide, prostaglandin E2, TNF- $\alpha$ , 및 interleukin(IL) 같은 염증반응의 유발인자들이 분비된다(Saha et al., 2017). 또한 피부염 환자

피부에서는 피부 장벽 약화 및 보습 기능 저하가 흔히 관찰(Morita and Miyachi, 2003)되는데, 일반적으로 피부 장벽 조절과 보습에는 tight junction이 직접적으로 관여한다. 대표적인 tight junction 단백질인 claudin과 occludin 단백질은 transmembrane domain을 포함하고 있어 세포막 내에 존재하고, ZO-1 그리고 ZO-2 단백질이 함께 결합하여 신호 전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 수분 또는 이온들의 이동을 조절(González-Mariscal et al., 2003; Tsukita et al., 2001)한다. 이는 아토피 피부염 같은 염증성 피부질환에서 피부 장벽 보호 지표 물질로 볼 수 있다. 본 연구에서 외부 자극에 의한 붕괴된 피부 장벽의 개선 효과를 확인한 결과, 피부 장벽 기능을 이루는 단백질인 FLG, IVL, 및 LOR이 HaCaT 세포에서 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리에



**Fig. 3.** Effect of ABE-M on gene expression level of SPT1,2 and ceramidase in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation. Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 h, and RNA was extracted from the cells using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. \*\* $p$ <0.01 compared with the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated group. SPT, serine palmitoyltransferase; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon.

의해 무처리군 대비 현저히 감소했으나, 개머루 덩굴 추출물에 의해 농도의존적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 1), Tight junction 단백질인 occludin, ZO-1의 유전자 발현이 개머루 덩굴 추출물에 의해 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Ceramide는 지질 분자의 하나로써, 피부 장벽을 유지하고 각질 세포 간의 구조적 안전성을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Elias and Menon, 1991). 또한, 각질 형성 세포의 외부로 둘러싸고 있는 대표적인 수분 보유 물질로 아토피성 피부염에서는 ceramide가 감소한다고 보고되어지기 때문에 ceramide 생성 및 유지는 아토피 피부염 치료의 중요한 요인으로 작용될 수 있다(Imokawa and Ishida, 2014). 이러한 ceramide는 단백질 및 인지질의 분해 과정에서 얻어지는 serine과 palmitoyl-CoA와의 결합 후 SPT에 의해 합성되며, 이후 sphingosine 대사과정을 거쳐 ceramidase에 의해 sphingosine과 fatty acid로 분해된다(Hong et al., 2007). 따라서, 피부질환에서 SPT의 level은 피부 장벽의 손실 정도를 나타내는 중요한 척도로 사용될 수 있기 때문에, 본 연구에서는 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리에 의해 염증 환경이 조성된 HaCaT 세포에서의 SPT level을 분석하였고 결과로 SPT level이 유의적으로 저하되는 것을 확인할 수 있었고, 개머루 덩굴 추출물 처리에 의해 회복되는 것을 확인하였으며, ceramidase 또한 개머루 덩굴 추출물 처리에 의해 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이는, 개머루덩굴이 SPT의 활성을 유지시키고 ceramidase를 억제함으로써 피부 장벽을 유지시킴에 도움을 줄 수 있음을 시사한다. 이처럼 본 연구에서 사용한 개머루 덩굴 추출물은 피부 장벽을 강화하고 수분 함량 또한 증가됨으로써 피부질환 개선을 위한 천연물 소재로의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 예상되지만 이를 증명하기 위해 세포모델에서의 기전연구와 인공피부를 활용한 추가적인 연구

가 필요하다.

### Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

### Acknowledgments

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) Technology Commercialization Support Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (821024-03), and the KRIBB Research Initiative Program (KGM5242221).

### Ethics Approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants

### Author Contributions

Conceptualization: Bak SG, Lee SJ, Rho MC.

Data curation: Bak SG, Lim HJ.

Formal analysis: Bak SG, Lim HJ, Won YS.

Methodology: Oh JH, Kim JE, Lee MJ.

Investigation: Park EJ.

Writing - original draft: Bak SG, Lee SJ.

Writing - review & editing: Bak SG, Lim HJ, Won YS, Park EJ, Oh JH, Kim JE, Lee MJ, Lee S, Lee SW, Lee SJ, Rho MC.



### Author Information

Seon Gyeong Bak (Post Doctoral Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-9035-5002>

Hyung Jin Lim (Post Doctoral Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-0158-6766>

Yeong-Seon Won (Post Doctoral Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0009-0000-0950-7834>

Eun Jae Park (Doctor's student, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0003-2283-210X>

Je Hun Oh (Researcher, Ju Yeong NS Co., Ltd.)

<https://orcid.org/0009-0008-5572-060X>

Ji Eun Kim (Researcher, Ju Yeong NS Co., Ltd.)

<https://orcid.org/0009-0001-9535-8341>

Min Jee Lee (Researcher, Ju Yeong NS Co., Ltd.)

<https://orcid.org/0000-0002-6647-4554>

Soyoung Lee (Senior Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-9949-6477>

Seung Woong Lee (Principal Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0003-1025-7363>

Seung Jae Lee (Senior Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-1908-7666>

Mun Chual Rho (Principal Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0003-0855-3585>

### References

- Arellano FM, Wentworth CE, Arana A, Fernández C, Paul CF. 2007. Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 127:808-816.
- Bäsler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM. 2016. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 242:105-118.
- Bäsler K, Brandner JM. 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 469:3-14.
- Benson HAE. 2012. Skin structure, function, and permeation. In *Topical and transdermal drug delivery: Principles and practice*. 1st ed. Benson HAE, Watkinson AC (eds). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA. pp 1-22.
- Byng JW. 2014. *The flowering plants handbook: A practical guide to families and genera of the world*. Plant Gateway, Hertford, UK.
- Choi YA, Yu JH, Jung HD, Lee S, Park PH, Lee HS, Kwon TK, Shin TY, Lee SW, Rho MC, Jang YH, Kim SH. 2019. Inhibitory effect of ethanol extract of *Ampelopsis brevipedunculata* rhizomes on atopic dermatitis-like skin inflammation. *J Ethnopharmacol* 238:111850.
- Elias PM, Menon GK. 1991. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 24:1-26.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1-44.
- Hajar T, Leshem YA, Hanifin JM, Nedorost ST, Lio PA, Paller AS, Block J, Simpson EL. 2015. A systematic review of topical corticosteroid withdrawal ("steroid addiction") in patients with atopic dermatitis and other dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 72:541-549.
- Hong KK, Cho HR, Ju WC, Cho Y, Kim NI. 2007. A study on altered expression of serine palmitoyltransferase and ceramidase in psoriatic skin lesion. *J Korean Med Sci* 22:862-867.
- Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DYM. 2009. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 124:R7-R12.
- Imokawa G, Ishida K. 2014. Role of ceramide in the barrier function of the stratum corneum, implications for the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Clin Exp Dermatol Res* 5:206.
- Jang HJ, Lee SJ, Lim HJ, Jung K, Lee S, Park CS, Lee SW, Rho MC. 2018. Inhibitory effects of compounds and extracts from *ampelopsis brevipedunculata* on IL-6-induced STAT3 activation. *BioMed Res Int* 2018:3684845.
- Kim BE, Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD. 2008. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* 126:332-337.
- Morita K, Miyachi Y. 2003. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci* 31:81-89.
- Rhim TJ, Choi MY. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. *Korean J Plant Resour* 23:445-450.
- Saha S, Shalova IN, Biswas SK. 2017. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunol Rev* 280:102-111.
- Sano S. 2015. Psoriasis as a barrier disease. *Dermatol Sin* 33:64-69.

- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293.
- Wu MJ, Yen JH, Wang L, Weng CY. 2004. Antioxidant activity of porcelainberry (*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv.). *Am J Chin Med* 32:681-693.
- Yan X, Xie G, Zhou J, Milne GW. 2018. Traditional Chinese medicines: Molecular structures, natural sources and applications. Routledge, London, UK.
- Yoon Y, Bae S, Seong-gwan A, Choi Y, Kyu-joong A, In-suk A. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Korean J Aesthet Cosmetol* 11:417-426.

---

© Copyright. Korean Society for Food Science of Animal Resources.

Date Received	Dec. 26, 2022
Date Revised	Jan. 26, 2023
Date Accepted	Jan. 29, 2023















Received: 21 December 2022 | Revised: 13 July 2023 | Accepted: 25 July 2023

DOI: 10.1002/fsn3.3610

## ORIGINAL ARTICLE

Food Science & Nutrition 

# Effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract on a model of atopic dermatitis in HaCaT cells and mice

Seon Gyeong Bak<sup>1</sup>  | Hyung Jin Lim<sup>1</sup>  | Yeong-Seon Won<sup>1</sup>  | Eun Jae Park<sup>1</sup>  |  
Young Hee Kim<sup>2</sup>  | Seung Woong Lee<sup>1</sup>  | Je Hun Oh<sup>3</sup>  | Ji Eun Kim<sup>3</sup>  |  
Min Jee Lee<sup>3</sup>  | Soyoung Lee<sup>1</sup>  | Seung Jae Lee<sup>1,4</sup>  | Mun Chual Rho<sup>1</sup> <sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongseup, South Korea<sup>2</sup>Division of Biotechnology and Advanced Institute of Environment and Bioscience, College of Environmental and Bioresource Sciences, Jeonbuk National University, Iksan, South Korea<sup>3</sup>Ju Yeong NS Co., Ltd, Seoul, South Korea<sup>4</sup>Applied Biological Engineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology, Daejeon, South Korea**Correspondence**

Seung Jae Lee and Mun Chual Rho, Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongseup, South Korea.

Email: seung99@kribb.re.kr and rho-m@kribb.re.kr

**Funding information**

Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Grant/Award Number: 821024-03; Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Grant/Award Number: KGM5242322; National Research Council of Science &amp; Technology, Grant/Award Number: CRC21022-100

**Abstract**

*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. has been used for a long time as a folk remedy. According to studies, it possesses anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties. However, its effects on atopic dermatitis (AD) are poorly studied. Thus, we investigated the therapeutic effect of *A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract (ABE-M) on 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced AD. For in vitro analysis, keratinocytes cell lines (HaCaT cells) were used. To evaluate the gene and protein expression levels of cytokines and chemokines, TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells were treated with ABE-M. The cells and the supernatant were collected, then gene and protein levels were analyzed by real-time polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay analysis. For in vivo analysis, BALB/c mice (6 weeks) were randomly separated into five groups ( $n=5$ ). The mice were applied DNCB and phosphate-buffered saline, dexamethasone (DX) or ABE-M (50, 100, and 200mg/kg) was orally administrated for 28 days. At the end, ear tissues and blood were collected for histological analysis and evaluation of cytokines and chemokines. In keratinocytes, ABE-M inhibited the protein and mRNA levels of chemokines, and cytokines exposed by TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . Similarly, the expression of chemokines was suppressed by ABE-M in AD animal model induced by DNCB and the level of pro-inflammatory cytokines was decreased in a dose-dependent manner. Our research indicates that ABE-M could be a candidate material that can be used to improve skin immunity enhancement, health, and beauty.

**KEYWORDS***Ampelopsis brevipedunculata*, atopic dermatitis, skin barrier, skin inflammation

## 1 | INTRODUCTION

The skin is at the forefront through which the body limits moisture loss and prevents the ingress of detrimental environmental

substances and microorganisms (Nestle et al., 2009). The skin contains epithelium, stroma, and immune cells, which interact to influence local and systemic immunity (Di et al., 2011). Keratinocytes are mainly involved in the immunity of the skin, which is colonized

Seon Gyeong Bak and Hyung Jin Lim equally contributed to this study.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Food Science & Nutrition* published by Wiley Periodicals LLC.

by non-epithelial immune cells (dendritic epithelial T cells and Langerhans cells) (Pasparakis et al., 2014; Walters & Roberts, 2002). Immunomodulation of these cells contributes to disease onset and exacerbation in atopic dermatitis (AD) (Di et al., 2011). AD is a kind of chronic skin inflammatory disease, recognized as Th2 responses (Brandt & Sivaprasad, 2011). The predominant Th2-type cytokines are deeply involved in the initiation and exacerbation of AD (Brandt & Sivaprasad, 2011; Raap et al., 2012; Ren et al., 2022). Since mediating AD can prevent the development of skin inflammation, timely treatment is important for skin health. Thymus and activation-regulated chemokine (CCL17/TARC) and macrophage-derived chemokines (CCL22/MDC) were detected in inflamed skin of patients with AD (Homey et al., 2006; Nakazato et al., 2008). CCL17/TARC is expressed during the pathogenesis of allergic diseases such as AD and is selectively expressed in Th2 cells (Furukawa, Nakamura, et al., 2004; Saeki & Tamaki, 2006). CCL17/TARC and CCL22/MDC increase infiltration of CC chemokine receptor 4 (CCR4) expressing cells, such as Th2 lymphocytes, basophils, and natural killer cells, by binding to CCR4 (Saeki & Tamaki, 2008). They also promote the differentiation of Th2 cells (Hirata et al., 2019). In addition, CCL22/MDC has been reported to be interrelated with rash strength in children with AD (Hashimoto et al., 2006). This finding suggests that CCL17/TARC and CCL22/MDC would be good markers for AD.

*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. has been used as a folk medicine since ancient times. It has been reported in previous studies that the vine of *A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. has excellent effects in the treatment of liver disease and liver fibrosis (Yum et al., 2017). Moreover, its antioxidants (Kundaković et al., 2008), antibacterial activities (Kundaković et al., 2008), and its effects against Alzheimer's disease have been reported in previous studies (Rashed et al., 2015). Recently, *A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. ethanol extract has been reported to inhibit the effect of STAT3 activity on IL-6 in inflammatory and immune diseases (Jang et al., 2018). In addition, studies have shown that this agent is effective for treating DFE/2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced AD such as skin inflammation (Choi et al., 2019).

In this study, we studied the effects of *A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract (ABE-M) on HaCaT cells and DNCB-induced AD and the findings indicated that ABE-M may be useful as a functional food and therapeutic agent for AD.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Preparation of ABE-M

*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv was obtained from HeukSaRang agricultural association corporation (Yeongju, Korea). The authenticity of the plant was verified by DowGene Co., Ltd (Seoul, Korea) using DNA analysis. Dried the vine of *A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv was extracted with 55% alcohol (468L) at 78°C (9h) and filtered using a 1 µm cartridge filter. Then, the filtrates

were concentrated to 20% solid content. An appropriate amount of excipient (maltodextrin, Daesang Co., Ltd.) was added, mixed, and spray-dried, resulting in a component ratio of 80% of ABE and 20% of the excipient. Also, 4.8kg of ABE preparation in total produced a yield of 12.3% (ABE-M, Production No. JY206MM210930).

### 2.2 | Preparation of ABE-M for HPLC and HPLC-UV analysis

ABE-M (1.0g) was relocated to a 100mL volumetric flask and was dissolved 50% MeOH (100mL) to obtain the 10mg/mL concentration. Then, 1 mL of solution was filtered using a hydrophobic syringe filter unit (Thermo scientific, 13mm, 0.45µm). The chromatographic peaks of the sample solution were confirmed by comparing the retention time with the standard material. Quantitative analysis was done by the integration of peaks through an external standard method.

The reference standards of catechin and ethyl gallate were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). The standard stock solutions of two reference standards were dissolved in 50% MeOH to obtain 10mg/mL concentration. The working solutions were prepared using serial dilution of stock solutions to seven concentrations, 2.0–250.0 µg/mL with 50% MeOH. Linear regression data were determined by calculating the integrated peak area (y) of each concentration (x, µg/mL) versus the continuous minimum concentration. Two reference standards were expressed as milligrams per gram of extract. HPLC-UV analysis was done on an Agilent 1200 series HPLC instrument armed with a vacuum degasser, a binary pump, a VWD detector, and a temperature-controlled column oven. The calibration standards and sample extracts were injected via a 10 µL sample loop and the Phenomenex C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm) was adjusted for the analysis. The detection wavelength was 275 nm and the column temperature were set at the 25°C. The mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient mode was as follows: 10% B for 0–5 min; 10%–13% B for 5–7 min; 13% B for 7–15 min; 13%–20% B for 15–35 min; 20%–100% B for 35–36 min; and 100% B for 36–50 min. The flow rate was set at 1.0 mL/min. HPLC chromatogram is shown in Figure S1 and the amount of catechin and ethyl gallate in 1 g of ABE-M was 17.73 ± 0.81 and 2.97 ± 0.08 mg.

### 2.3 | Cell culture

The human keratinocyte cell line (HaCaT cells) was subcultured according to the laboratory method at 37°C with 90%–95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. The composition of the culture medium is as follows: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and 1% penicillin-streptomycin.



## 2.4 | Cell viability assay

Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, which was performed as the same method in previous studies (Bak et al., 2022). Different concentrations (10, 30, 60, and 100 µg/mL) of ABE-M were used.

## 2.5 | Enzyme-linked immunosorbent assay

HaCaT cells were seeded  $1 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates. After incubating overnight, they were pretreated with ABE-M or cyclosporine A for 1 h. Then, after being stimulated with TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)/IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), the cells were incubated for 24 h. Cyclosporin A was used as positive control, following a previous study (Choi et al., 2013). Cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8) and chemokines (CCL17/TARC, CCL22/MDC) levels in the cell culture medium were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, R&D systems, Minneapolis, MN, respectively), and Serum Immunoglobulin (Ig) E, G1, and G2a from mouse blood were determined using an ELISA kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The protein (p-ERK, p-JNK and p-NF- $\kappa$ B) from mouse ear tissue were determined using an ELISA kits (Cell Signaling Technology). The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader.

## 2.6 | Real-time polymerase chain reaction

Total RNA from HaCaT cells and mouse ear tissue was isolated using TRIzol reagent. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed as the same method in the previous study (Bak et al., 2022), and as endogenous controls for normalization, eukaryotic 18s rRNA and mouse GAPDH was used. TaqMan primers and probes (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) were used as follows: interleukin (IL)-1 $\beta$  (Hs01555410\_m1, Mm00434228\_m1), IL-4 (Mm00445259\_m1), IL-6 (Hs00174131\_m1, Mm00446190\_m1), IL-8 (Hs00174103\_m1), CCL17 (Hs00171074\_m1, Mm01244826\_g1), CCL22 (Hs01574247\_m1, Mm00436439\_m1), and TSLP (Mm01157588\_m1).

## 2.7 | Western blotting

Detailed protein extraction and western blot procedures applied here are described in previous studies (Bak et al., 2022, 2023). Total protein was isolated in 100 µL of cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) from HaCaT cells stimulated with TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)/IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) for 30 min. Quantification of proteins was performed with the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad). Identical quantified protein lysates were electrophoresed on

SDS-PAGE gels and then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Primary antibodies against target proteins (p-ERK, p-JNK, p-NF- $\kappa$ B and b-actin) were identified. Bands were developed using the West-Queen RTS Western Blot Detection Kit (iNTRON Bio). Antibodies purchased from Cell Signaling Technology and Santa Cruz were used.

## 2.8 | Animal model

BALB/c mice (female, 6 weeks) were purchased from Samtako (Osan, Korea). All animals were housed during the study period in the same environment as presented in previous studies (Bak et al., 2022). Animal care and treatment protocols were conducted according to the guidelines established by the Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB-AEC-21259, October 25, 2022).

## 2.9 | Generation of DNCB-induced AD-like skin lesions

A total of 25 mice ( $n=5$ /group) were divided into the phosphate-buffered saline (PBS) vehicle, DNCB vehicle (PBS), DNCB plus ABE-M (50, 100, and 200 mg/kg), and DNCB plus DX (1 mg/kg) groups. In the first week of induction, the mice were sensitized by the application of DNCB (2%, 20 µL/ear) once on each ear. After 1 week, both ears of each BALB/c mouse were challenged with DNCB (1%, 20 µL/ear, twice/week) for 4 weeks. During the DNCB challenge, ABE-M or DX was administered orally by gavage for five consecutive days per week. DX was used as positive control, based on previous studies (Choi et al., 2013; Jeong et al., 2020). After the experiment, the mice were sacrificed by cervical dislocation under isoflurane anesthesia.

## 2.10 | Histological analysis

Mouse ear tissue was fixed with 10% (w/v) para-formaldehyde. Paraffin-embedded tissues were sectioned at 3 µm thickness by microtome. After removing paraffin, they were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue.

## 2.11 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5 software (GraphPad Software). The data are presented as the mean  $\pm$  SD of nine individual experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons tests.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Effect of ABE-M on the viability in HaCaT cells

Before investigating the anti-inflammation activity of ABE-M, the cell viability of ABE-M treated HaCaT cells was evaluated using MTT assay. The results confirmed that ABE-M was not cytotoxic at 10 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure 1). Therefore, subsequent experiments proceeded using 30 and 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations of ABE-M.

#### 3.2 | Effect of ABE-M on chemokine and cytokine levels in HaCaT cells

The effect of ABE-M was evaluated using real-time PCR and ELISA. Human keratinocytes, HaCaT cells were stimulated with the pro-inflammatory mediator TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . The expression of chemokines such as CCL17 and CCL22, which are biomarkers of AD, in the stimulated group was compared with the control group (Figure 2a). The expression of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) was elevated in the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  treatment group contrasted to the control group (Figure 2b). However, the increase in gene expression was abrogated by treatment with the ABE-M in a concentration-dependent manner ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ; Figure 2a,b). Furthermore, 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ABE-M suppressed these genes similar to cyclosporine A. The protein levels of chemokines and cytokines showed the same trends as in gene expression ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) (Figure 2c,d). Therefore, our results indicated that the treatment with ABE-M suppresses AD and inflammatory response mediators in keratinocytes.

#### 3.3 | Effect of ABE-M on protein levels in HaCaT cells

The effect of ABE-M on signaling pathway was evaluated using western blot. HaCaT cells were stimulated with the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$

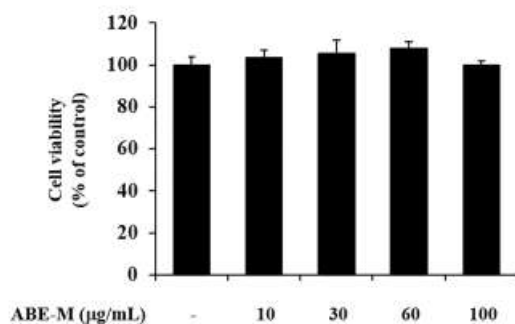


FIGURE 1 Effect of ABE-M on cell viability. The viability of ABE-M-treated HaCaT cells was assessed by MTT assay. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to the control. ABE-M, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

for 30 min. The expression of p-ERK and p-JNK was elevated in the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated group compared to that of the control group (Figure 3). However, the elevated expression was reduced by the treatment of 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ABE-M. Moreover, it was confirmed that p-NF- $\kappa\text{B}$  was also inhibited by ABE-M. Thus, the inhibition of these signaling pathways by ABE-M indicated that ABE-M inhibits the secretion of cytokines and chemokines through these pathways.

#### 3.4 | Effect of ABE-M on AD-like skin lesions in BALB/c mice

To evaluate the anti-AD effect of ABE-M, an animal model was constructed by applying DNCB in the ears of mice for 4 weeks. Reiterated topical skin application of DNCB twice per week significantly increased ear edema compared to that in the control group. However, the ABE-M treated group showed a greater decrease in ear edema than the DNCB group (Figure 4a upper panel). To analyze the ABE-M effect on skin hypertrophy, ear tissues were stained with H&E and observed by light microscopy. Continuous DNCB exposure caused strong inflammatory changes such as thickening of the dermis and epidermis in the ear tissues of AD mice compared to the control group (Figure 4a middle panel). It has been reported that mast cell infiltration occurs in skin lesions such as atopy. Therefore, we investigated the mast cell infiltration through toluidine blue staining. Mast cell infiltration was increased by DNCB compared to the control, and the increased mast cell invasion was decreased by ABE-M (Figure 4a lower panel). Moreover, ear thickness was increased by DNCB ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) (Figure 4b). However, the ABE-M treatment group had significantly reduced epidermal and dermal thickness when compared with the AD group (Figure 4a middle panel and B). In AD conditions, predominant Th2-type cytokines stimulate B cells to secrete IgE, which affects IgG1 and IgG2a levels (Bieber, 2008; Dokmeci & Herrick, 2008; Wood et al., 1996). To determine the inhibitory effect of ABE-M on immunoglobulin levels in the AD model, we measured IgE, IgG1, and IgG2a levels using ELISA. DNCB-induced mice showed an increase in IgE, IgG1, and IgG2a levels. However, the ABE-M treatment significantly reduced the levels of these immunoglobulins ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) (Figure 4c). Especially, 200 mg/kg of ABE-M treatment showed a superior inhibitory effect compared to DX in IgE level ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ). Therefore, our results indicated that ABE-M ameliorates AD lesions.

#### 3.5 | Effect of ABE-M on the mRNA expression of chemokines and cytokines in ear tissues of DNCB-induced BALB/c mice

To understand the mechanism by which ABE-M alleviates AD lesions, we investigated the expression of AD-associated chemokines and pro-inflammatory cytokines in ear tissues by real-time PCR. The expression of chemokines such as CCL17 and CCL22 ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) was enhanced in the DNCB group compared to that of the



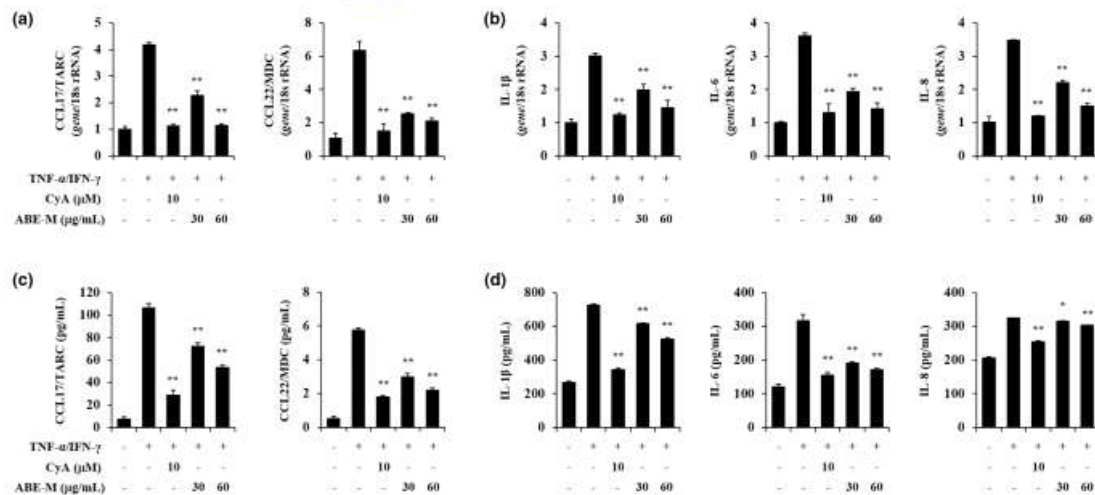


FIGURE 2 Effect of ABE-M on pro-inflammatory cytokine secretion in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells. The gene expression of pro-inflammatory chemokines (a) and cytokines (b) was detected by using real-time PCR. The protein levels of pro-inflammatory chemokines (c) and cytokines (d) in the culture supernatants were measured by ELISA. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to the TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  group. ABE-M, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract; CyA, cyclosporine A; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PCR, polymerase chain reaction.

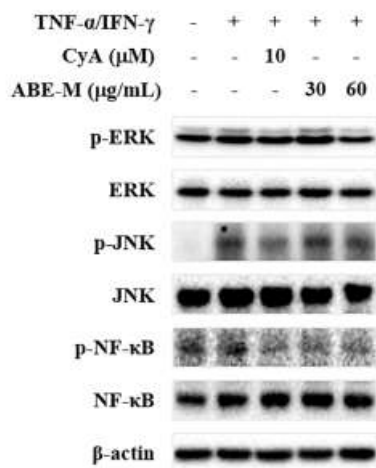


FIGURE 3 Effect of ABE-M on HaCaT cell signaling pathway. The protein level was confirmed in the signaling pathway in HaCaT cells by western blot. ABE-M, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract.

control group. However, the increased gene expression was abrogated by treatment with the ABE-M (Figure 5a). Furthermore, the pro-inflammatory cytokines (such as TSLP, IL-1 $\beta$ , IL-4, and IL-6) expression was significantly increased with DNCB treatment compared to the control group. However, the increased gene expression was abrogated by treatment with the ABE-M in a dose-dependent manner. It was found that 200 mg/kg of ABE-M treatment decreased

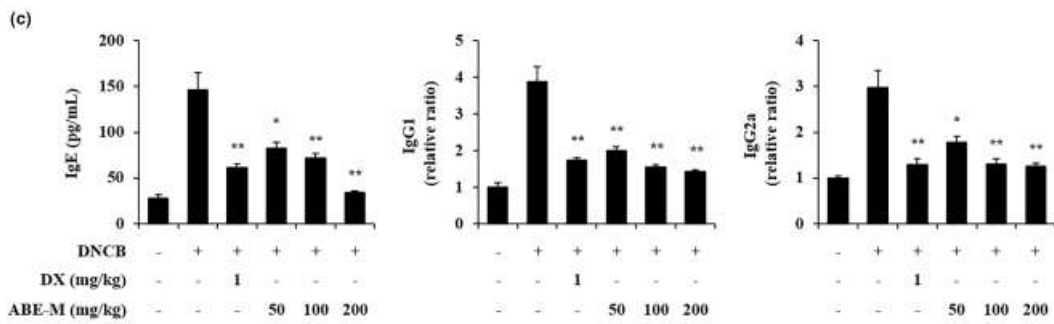
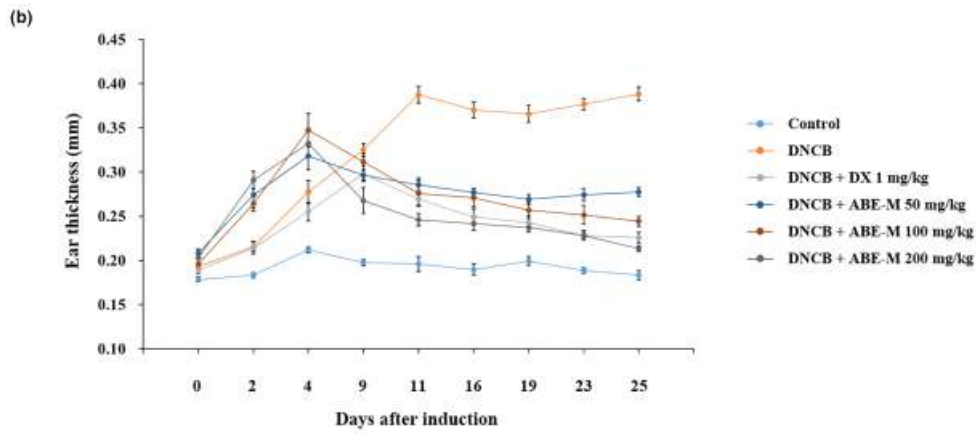
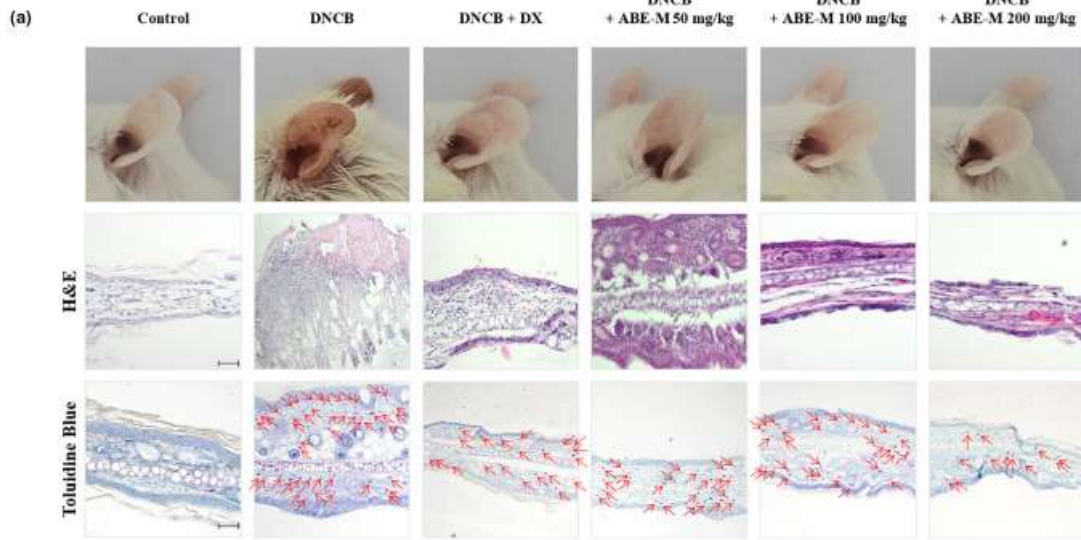
the gene expression to a similar degree as that of DX ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) (Figure 5b). Therefore, our results indicated that ABE-M suppresses the gene expression of chemokines and cytokines in DNCB-induced AD mice.

### 3.6 | Effect of ABE-M on the protein levels in ear tissues of the DNCB-induced BALB/c mice

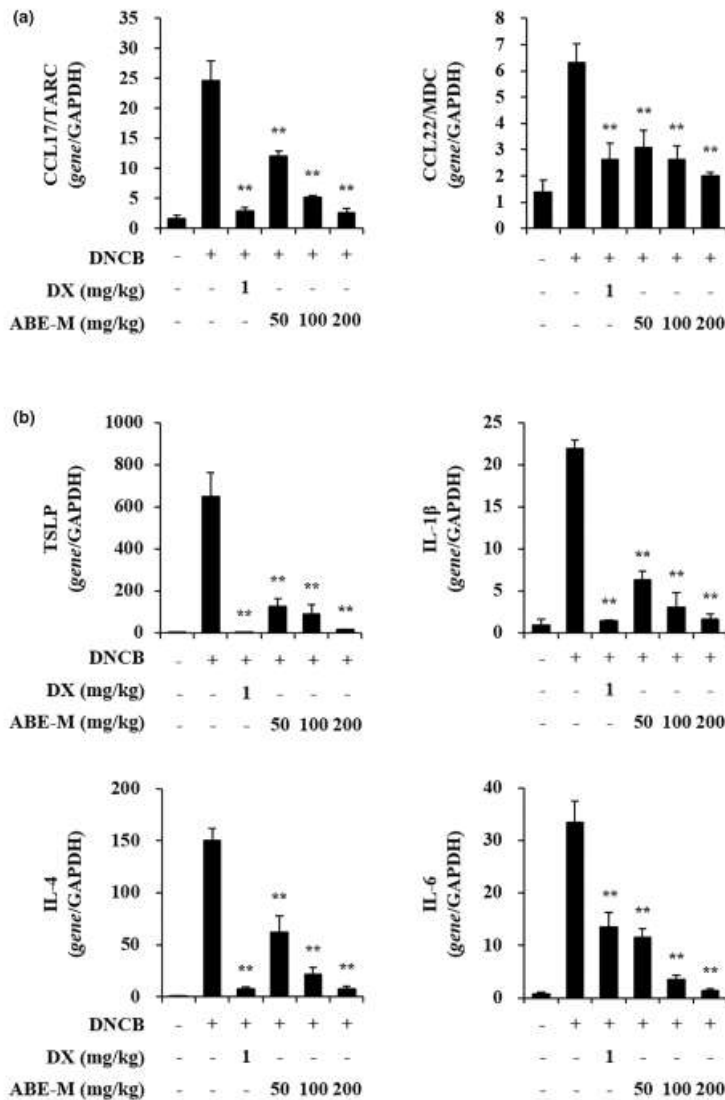
The effect of ABE-M on signaling pathways for cytokines and chemokines in ear tissues was evaluated using ELISA. After protein isolation from ear tissues, the expression levels of p-ERK, p-JNK, and p-NF- $\kappa$ B were measured. Protein expressions of p-ERK and p-JNK ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) were increased in the DNCB group compared to the control group (Figure 6). However, it was reduced with the treatment of ABE-M. In addition, the expression of p-NF- $\kappa$ B was also inhibited ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ). Therefore, it was confirmed that the elevated secretion of cytokines and chemokines by DNCB is suppressed by ABE-M through the inhibition of these signaling pathways.

## 4 | DISCUSSION

*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. has been used widely for medicinal purposes because of its excellent antioxidant activity (Kundakovic et al., 2008) and the effect of restoring liver function (Yabe et al., 1998). In addition, previous research has reported that 95% ethanol extract of *A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. is effective for treating AD (Choi et al., 2019). Our study was conducted to make an industrial product by mixing co-solvent (dextrin) with



**FIGURE 4** Effect of ABE-M on skin lesions and IgE, IgG1, and IgG2a levels in DNCB-induced AD mouse model. (a) The ear tissue was fixed with 10% formalin and paraffin-embedded. The paraffin blocks were cut into 3  $\mu$ m sections and stained with H&E and toluidine blue. Sections were evaluated at an original magnification of 200 $\times$ , scale bar = 100  $\mu$ m. (b) Ear thickness was assessed using a micrometer on days after DNCB induction (c) Serum IgE, IgG1, and IgG2a levels were determined by ELISA. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to the DNCB group. ABE-M, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract; AD, atopic dermatitis; DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; H&E, hematoxylin and eosin.



**FIGURE 5** Effect of ABE-M on pro-inflammatory gene expression levels in DNCB-induced AD mouse model. The expression of CCL17/TARC, CCL22/MDC, and TSLP, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 from ear tissue was determined by real-time PCR. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to the DNCB group. ABE-M, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract; AD, atopic dermatitis; CCL17/TARC, thymus and activation-regulated chemokine; CCL22/MDC, macrophage-derived chemokines; DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; PCR, polymerase chain reaction.

*A. brevipedunculata* (Maxim.) Trautv., which has excellent activity. It is extracted through previously reported research. As shown in Figure S2, the yield and content of catechin and ethyl gallate, which are index components, were higher in the 50% ethanol extract than in the 95% ethanol extract. Therefore, we conducted experiments by mixing dextrin, with 50% ethanol extract. We investigated the

mechanisms and effects of ABE-M on regulating inflammatory mediators in vitro via TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  stimulated HaCaT cells. First of all, when the toxicity of ABE-M was confirmed through HaCaT cells, it seemed that there was no toxicity. CCL17/TARC and CCL22/MDC are overexpressed in keratinocytes in AD (Kwon et al., 2012). The chemokines expressed by AD upregulate Th2 cytokines. AD is an



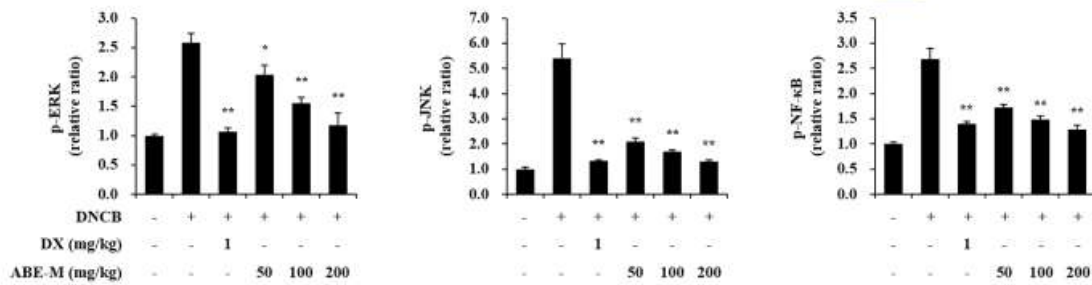


FIGURE 6 Effect of ABE-M on signaling pathway protein levels in DNCB-induced AD mouse model. The protein level of p-ERK, p-JNK, and p-NF- $\kappa$ B from ear tissue was determined by ELISA. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to the DNCB group. ABE-M, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract; AD, atopic dermatitis; DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

inflammatory response by Th2 cells, which is highly depend on Th2 chemokines (Akids et al., 2000; Muñoz et al., 2017). We found that the levels of inflammatory chemokines, including CCL17/TARC and CCL22/MDC, and cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8, increased after treatment with TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ , and was inhibited when treated with ABE-M. In addition, in the reported studies, it is known that AD is involved in MAPK and NF- $\kappa$ B (Bak et al., 2023; Choi et al., 2013). Studies have shown that stimulation of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  not only activates various signaling pathways such as MAPK, STAT, and p-NF- $\kappa$ B but also increases various inflammatory chemokines/cytokines (Furukawa, Takahashi, et al., 2004). We found that ABE-M decreased phosphorylation of ERK and JNK in a dose-dependent manner, and the expression of NF- $\kappa$ B p65 also tended to decrease. These results showed that ABE-M co-regulated ERK, JNK, and NF- $\kappa$ B activation and significantly suppressed mRNA expression of inflammatory chemokines and cytokines. These data imply that ABE-M has the potential to modulate inflammatory mediators.

The atopy alleviating effect of ABE-M was verified in a DNCB-induced AD-like mouse model. It was visually confirmed that keratinization was alleviated in the positive control group and the ABE-M administration group compared to the control group. In addition, in order to confirm the efficacy of ABE-M in histological aspects, the ear tissue was stained with H&E and toluidine blue, and significant reduction in thickness and number of mast cells was confirmed in the ABE-M group. These results demonstrated the potential of ABE-M as an atopy improving agent. In AD, IL-4 and IL-5 are mainly secreted by Th2 cells, and the secreted cytokines stimulate B cells to secrete IgE, which affects IgG1 and IgG2a levels and the production of various inflammatory cytokines (Bieber, 2008; Dokmeci & Herrick, 2008; Muñoz et al., 2017). Furthermore, IgE levels are involved in the sensitization of allergens in AD (Gould et al., 2003; Werfel, 2009). As a result of examining blood immunoglobulins of AD-like model in this study, it was confirmed that IgE, IgG1, and IgG2a were reduced by oral administration of ABE-M. In the initiation of AD, environmental triggers promote the release of dendritic cell activation cytokines such as IL-1 $\beta$ , CCL17/TARC, CCL22/MDC, and TSLP by keratinocytes (Kim et al., 2019). The TSLP-activated dendritic cells produce CCL17/TARC and CCL22/MDC, and they promote the infiltration and differentiation of Th2 cells (Ying et al., 2005). In this

study, the mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , and TSLP in DNCB-induced mouse ear tissue was significantly reduced by ABE-M. These results support that ABE-M is a potential candidate for atopy-improving drugs. After protein isolation from ear tissue, it was confirmed that p-ERK, p-JNK, and p-NF- $\kappa$ B were reduced by ABE-M. These data imply that ABE-M has the potential to modulate inflammatory mediators, suggesting a specific role for p-ERK, p-JNK, and p-NF- $\kappa$ B in alleviating AD.

Together with these reports and experimental data, we suggest that compounds containing ABE-M synergistically alleviate atopy in vivo and in vitro. Steroid drugs commonly used to treat AD are associated with several side effects with long-term use. Therefore, it is important to use natural resources to replace steroid drugs. Based on the findings obtained in in vitro and in vivo models of AD, ABE-M is expected to be an effective therapeutic agent. In addition, a detailed study is needed to reveal the interaction between compounds constituting ABE-M.

## 5 | CONCLUSIONS

In conclusion, the results of our study showed that oral administration of ABE-M ameliorates the AD-like skin inflammation caused by DNCB. In keratinocytes, ABE-M suppressed the expression of inflammatory cytokines and chemokines induced by TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . Similarly, the histopathological changes in DNCB-induced mice were significantly suppressed by ABE-M. Therefore, the immunosuppressive effect of ABE-M shows the potential anti-allergic activities and alleviates AD, suggesting that it can be used as a pharmacological agent.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Seon Gyeong Bak:** Conceptualization (equal); formal analysis (equal); writing - original draft (equal). **Hyung Jin Lim:** Conceptualization (equal); formal analysis (equal); writing - original draft (equal). **Yeong-Seon Won:** Formal analysis (equal); investigation (equal). **Eun Jae Park:** Investigation (equal). **Young Hee Kim:** Investigation (equal). **Seung Woong Lee:** Data curation (equal); methodology (equal). **Je Hun Oh:** Formal analysis (equal); methodology (equal). **Ji**



Eun Kim: Methodology (equal). Min Jee Lee: Methodology (equal). Soyoung Lee: Data curation (equal); investigation (equal); methodology (equal). Mun-Chual Rho: Conceptualization (equal); methodology (equal). Seung Jae Lee: Conceptualization (equal); methodology (equal); writing – review and editing (equal).

#### FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) through functional food development using domestic future agricultural resources project, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (821024-03), and the KRIBB Research Initiative Program (KGM5242322). This research was funded by grants from the National Research Council of Science & Technology (NST) funded by the Korean government (MIST), grant numbers CRC21022-100.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no competing interests.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ETHICS STATEMENT

Animal care and treatment protocols were conducted according to the guidelines established by the Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (approval number: KRIBB-AEC-21259).

#### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

#### ORCID

Seon Gyeong Bak  <http://orcid.org/0000-0002-9035-5002>  
 Hyung Jin Lim  <https://orcid.org/0000-0002-0158-6766>  
 Yeong-Seon Won  <http://orcid.org/0009-0000-0950-7834>  
 Eun Jae Park  <http://orcid.org/0000-0003-2283-210X>  
 Young Hee Kim  <http://orcid.org/0009-0003-1955-7773>  
 Seung Woong Lee  <http://orcid.org/0000-0003-1025-7363>  
 Je Hun Oh  <https://orcid.org/0009-0008-5572-060X>  
 Ji Eun Kim  <https://orcid.org/0009-0001-9535-8341>  
 Min Jee Lee  <http://orcid.org/0000-0002-6647-4554>  
 Soyoung Lee  <https://orcid.org/0000-0002-9949-6477>  
 Seung Jae Lee  <https://orcid.org/0000-0002-1908-7666>  
 Mun Chual Rho  <http://orcid.org/0000-0003-0855-3585>

#### REFERENCES

Akids, C., Akids, M., Trautmann, A., & Blaser, K. (2000). Immune regulation in AD. *Current Opinion in Immunology*, 12, 641–648.  
 Bak, S. G., Lim, H. J., Park, E. J., Won, Y. S., Lee, S. W., Lee, S., Park, S.-I., Lee, S. J., & Rho, M.-C. (2023). Effects of *Vigna angularis* extract and

its active compound hemiphloin against atopic dermatitis-like skin inflammation. *Heliyon*, 9, e12994.  
 Bak, S. G., Lim, H.-J., Won, Y.-S., Lee, S., Cheong, S. H., Lee, S. J., Bae, E. Y., Lee, S. W., Lee, S. J., & Rho, M.-C. (2022). Regulatory effects of Lycium barbarum extract and isolated Scopoletin on atopic dermatitis-like skin inflammation. *BioMed Research International*, 2022, 2475699.  
 Bieber, T. (2008). Mechanisms of disease: Atopic dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, 358, 1483–1494.  
 Brandt, E. B., & Sivaprasad, U. (2011). Th2 cytokines and atopic dermatitis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 2(3), 110.  
 Choi, J. K., Oh, H.-M., Lee, S., Park, J.-W., Khang, D., Lee, S. W., Lee, W. S., Rho, M.-C., & Kim, S.-H. (2013). Oleonic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(1), 72–80.  
 Choi, Y.-A., Yu, J.-H., Jung, H. D., Lee, S., Park, P.-H., Lee, H.-S., Kwon, T. K., Shin, T.-Y., Lee, S. W., & Rho, M.-C. (2019). Inhibitory effect of ethanol extract of *Ampelopsis brevipedunculata* rhizomes on atopic dermatitis-like skin inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 238, 111850.  
 Di Meglio, P., Perera, G. K., & Nestle, F. O. (2011). The multitasking organ: Recent insights into skin immune function. *Immunity*, 35(6), 857–869.  
 Dokmeci, E., & Herrick, C. A. (2008). The immune system and atopic dermatitis. *The Immune System and Atopic Dermatitis*, 27(2), 138–143.  
 Furukawa, H., Nakamura, K., Zheng, X., Tojo, M., Oyama, N., Akiba, H., Nishibu, A., Kaneko, F., Tsunemi, Y., & Saeki, H. (2004). Enhanced TARC production by dust-mite allergens and its modulation by immunosuppressive drugs in PBMCs from patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 35(1), 35–42.  
 Furukawa, H., Takahashi, M., Nakamura, K., & Kaneko, F. (2004). Effect of an anti-allergic drug (Olopatadine hydrochloride) on TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production by PBMCs from patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 36(3), 165–172.  
 Gould, H. J., Sutton, B. J., Beavil, A. J., Beavil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D., & Smurthwaite, L. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 579–628.  
 Hashimoto, S., Nakamura, K., Oyama, N., Kaneko, F., Tsunemi, Y., Saeki, H., & Tamaki, K. (2006). Macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 produced by monocyte derived dendritic cells reflects the disease activity in patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 44(2), 93–99.  
 Hirata, H., Yukawa, T., Tanaka, A., Miyao, T., Fukuda, T., Fukushima, Y., Kurasawa, K., & Arima, M. (2019). Th2 cell differentiation from naive CD 4+ T cells is enhanced by autocrine CC chemokines in atopic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*, 49(4), 474–483.  
 Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T., & Leung, D. Y. (2006). Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(1), 178–189.  
 Jang, H. J., Lee, S. J., Lim, H. J., Jung, K., Lee, S., Park, C. S., Lee, S. W., & Rho, M. C. (2018). Inhibitory effects of compounds and extracts from *Ampelopsis brevipedunculata* on IL-6-induced STAT3 activation. *BioMed Research International*, 2018, 3684845.  
 Jeong, N.-H., Lee, S., Choi, J. K., Choi, Y.-A., Kim, M.-J., Lee, H.-S., Shin, T.-Y., Jang, Y.-H., Song, K.-S., & Kim, S.-H. (2020). Polyozellin alleviates atopic dermatitis-like inflammatory and pruritic responses in activated keratinocytes and mast cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 122, 109743.  
 Kim, J., Kim, B. E., & Leung, D. Y. M. (2019). Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(2), 84–92.  
 Kundaković, T., Stanjoković, T., Grubin, J., Juranić, Z., Stevanović, B., & Kovačević, N. (2008). Antioxidant and cytotoxic activity of *Ampelopsis brevipedunculata* and *Parthenocissus tricuspidata*. *Planta Medica*, 74(9), PA62.

- Kundakovic, T., Stanojkovic, T., Milenkovic, M., Grubin, J., Juranic, Z., Stevanovic, B., & Kovacevic, N. (2008). Cytotoxic, antioxidant, and antimicrobial activities of *Ampelopsis brevipedunculata* and *Parthenocissus tricuspidata* (Vitaceae). *Archives of Biological Sciences*, 60(4), 641–647.
- Kwon, D.-J., Bae, Y.-S., Ju, S. M., Goh, A. R., Youn, G. S., Choi, S. Y., & Park, J. (2012). Casuarinin suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production via blockade of NF- $\kappa$ B and STAT1 activation in HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(4), 1254–1259.
- Muñoz, F. C., Cervantes, M. M., Cervantes-García, D., Jiménez, M., Ventura-Juárez, J., & Salinas, E. (2017). Glycomacropeptide attenuates inflammation, pruritus, and Th2 response associated with atopic dermatitis induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene in rat. *Journal of Immunology Research*, 2017, 6935402.
- Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., & Shinomiya, N. (2008). Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19(7), 605–613.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 679–691.
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 289–301.
- Raap, U., Weißmantel, S., Gehring, M., Eisenberg, A. M., Kapp, A., & Fölster-Holst, R. (2012). IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 23(3), 285–288.
- Rashed, K., Said, A., Feitosa, C., & Sucupira, A. C. C. (2015). Evaluation of anti-Alzheimer activity of *Ampelopsis brevipedunculata* and the isolated compounds. *Research Journal of Phytochemistry*, 9(1), 16–24.
- Ren, S., Gao, Y., Wang, L., Qiu, C., Yang, L., Li, L., Xiao, Y., Xiao, N., Liao, L., & Zuo, Z. (2022). Sacran polysaccharide improves atopic dermatitis through inhibiting Th2 type immune response. *Life Sciences*, 288, 120205.
- Saeki, H., & Tamaki, K. (2006). Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *Journal of Dermatological Science*, 43(2), 75–84.
- Saeki, H., & Tamaki, K. (2008). Role of TARC/CCL17 and CTACK/CCL27 in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Current Immunology Reviews*, 4(4), 221–229.
- Walters, K. A., & Roberts, M. S. (2002). The structure and function of skin. In *Dermatological and transdermal formulations* (pp. 19–58). CRC press.
- Werfel, T. (2009). The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(8), 1878–1891.
- Wood, L. C., Elias, P. M., Calhoun, C., Tsai, J. C., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (1996). Barrier disruption stimulates interleukin-1 $\alpha$  expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(3), 397–403.
- Yabe, N., Tanaka, K., & Matsui, H. (1998). An ethanol-extract of *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) berries decreases ferrous iron-stimulated hepatocyte injury in culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 59(3), 147–159.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., & Lee, T. H. (2005). Thymic stromal lymphopietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *The Journal of Immunology*, 174(12), 8183–8190.
- Yum, M. J., Koppula, S., Kim, J. S., Shin, G. M., Chae, Y. J., Yoon, T., Chun, C. S., Lee, J. D., & Song, M. (2017). Protective effects of *Ampelopsis brevipedunculata* against in vitro hepatic stellate cells system and thioacetamide-induced liver fibrosis rat model. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1577–1585.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Bak, S. G., Lim, H. J., Won, Y.-S., Park, E. J., Kim, Y. H., Lee, S. W., Oh, J. H., Kim, J. E., Lee, M. J., Lee, S., Lee, S. J., & Rho, M. C. (2023). Effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract on a model of atopic dermatitis in HaCaT cells and mice. *Food Science & Nutrition*, 11, 6616–6625. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3610>



# 한국분자세포생물학회 개인 발표 증빙자료

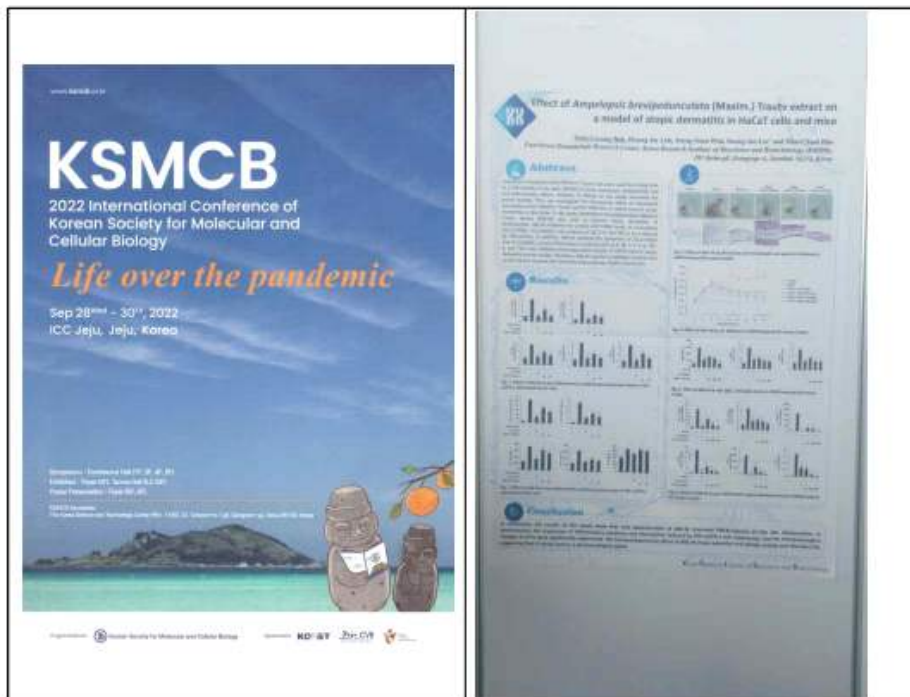
1. 증명서




## 2. 요약 정보

Abstract information	
Submission Number	22F-1077
Posting Number	M-80
Posting date & time	13:30-15:20
Abstract type	Poster (Participant only)
Category	1 <sup>st</sup> Priority : M) Immunology 2 <sup>nd</sup> Priority : U) Others
Click here if the authors listed in the posters include high school students.	No
Title	Regulatory effects of <i>Ampelopsis brevipedunculata</i> extract against atopic dermatitis-like skin inflammation
Author(s)	Seon Gyeong Bak, Hyung Jin Lim, Yeong Seon Won, Seung-Jae Lee*, and Min-Chul Rho
Abstract	<p><i>Ampelopsis brevipedunculata</i> (Maxim.) Trautv. is a material that has been used for a long time as a folk remedy. It has been reported to have antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory effects. However, studies related to the skin barrier caused by atopic dermatitis are scarce. In this study, <i>Ampelopsis brevipedunculata</i> (Maxim.) Trautv. EICH extract (ABE) was used to improve atopic dermatitis and improve skin barrier due to atopic dermatitis. In keratinocytes, ABE inhibited both protein and mRNA levels of chemokines (CCL17/TRAC, CCL22/MDC) and cytokines (IL-1<math>\beta</math>, IL-6 and TNF-<math>\alpha</math>, etc.) expressed by TNF-<math>\alpha</math>/IFN-<math>\gamma</math>. In addition, there are biomarkers of the skin barrier: flaggrin (FLG), loricrin (LOR), and involucrin (IVL). ABE recovered TNF-<math>\alpha</math>/IFN-<math>\gamma</math>-induced destroy of the skin barrier factors such as FLG, LOR, and IVL in a concentration-dependent manner. In addition, ABE inhibited the expression of CCL17/TRAC and CCL22/MDC, and proinflammatory cytokines such as IL-1<math>\beta</math>, IL-6 and TNF-<math>\alpha</math> was inhibited dose dependent manner in DNCB-induced atopic dermatitis animal model. Moreover, ABE restored destroy of FLG, LOR and IVL in DNCB-induced atopic dermatitis. These results show that ABE inhibits inflammation of atopic dermatitis and induces improvement of the skin barrier caused by atopic dermatitis. Therefore, ABE can be suggested as a candidate material that can be used for skin immunity enhancement, health and beauty.</p>
Keyword(s)	atopic dermatitis, skin barrier, <i>Ampelopsis brevipedunculata</i> (Maxim.) Trautv., chemokines, cytokines
Application for Excellent Poster Awards	No

## 3. 팜플렛 및 포스터 현장사진



4. 발표내용

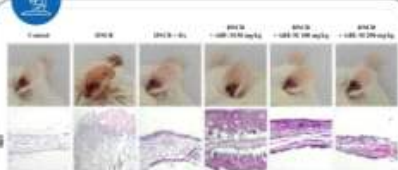


## Effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract on a model of atopic dermatitis in HaCaT cells and mice

Seon Gyeong Bak, Hyung Jin Lim, Yeong-Seon Won, Seung-Jae Lee\* and Mun-Chul Rho  
Functional Biomaterials Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),  
181 Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeonbuk 56212, Korea

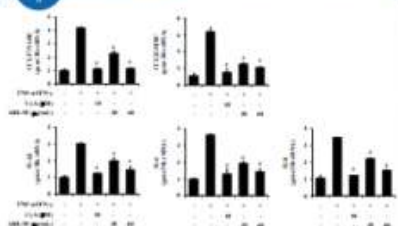
### Abstract

*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. has been used for a long time as a folk remedy. It has been reported to have antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory effects. However, its effects on the atopic dermatitis are poorly studied. Thus, we investigated the therapeutic effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract (ABE-M) on DNCB-induced atopic dermatitis, in this study. In this study, *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv. extract (ABE-M) was used to improve atopic dermatitis. In keratinocytes, ABE-M inhibited the protein and mRNA levels of chemokines (CCL17/TRAC, CCL22/MDC) and cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , etc.) induced by TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . In addition, ABE-M inhibited the expression of CCL17/TRAC and CCL22/MDC, and proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , and TSP. These were inhibited in a dose-dependent manner in DNCB-induced atopic dermatitis animal model. Therefore, ABE-M may be a candidate material that can be used to improve skin immunity enhancement, health, and beauty.

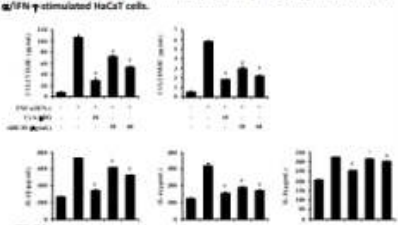


**Fig. 3.** Effect of ABE-M on skin lesion and hematoxylin and eosin for thickness in DNCB-induced AD mouse model.

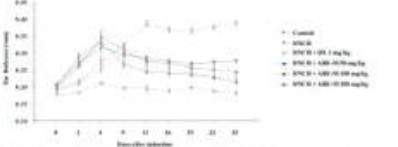
### Results



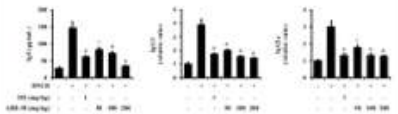
**Fig. 1.** Effect of ABE-M on pro-inflammatory cytokine gene expression levels in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells.



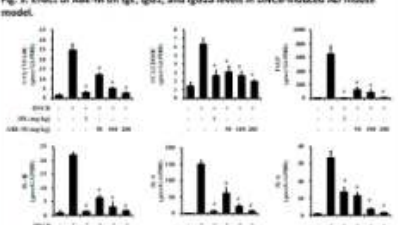
**Fig. 2.** Effect of ABE-M on pro-inflammatory cytokine protein levels in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT cells.



**Fig. 4.** Effect of ABE-M on ear thickness in DNCB-induced AD mouse model.



**Fig. 5.** Effect of ABE-M on IgE, IgG1, and IgG2a levels in DNCB-induced AD mouse model.



**Fig. 6.** Effect of ABE-M on pro-inflammatory gene expression levels in DNCB-induced AD mouse model.

### Conclusion

In conclusion, the results of this study show that oral administration of ABE-M improved DNCB-induced AD-like skin inflammation. In keratinocytes, the expression of inflammatory cytokines and chemokines induced by TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  was suppressed, and the histopathological changes in mice were significantly suppressed. The immunosuppressive effect of ABE-M shows potential anti-allergic activity and alleviates AD, suggesting that it can be used as a pharmacological agent.

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology


# 한국식품영양과학회 개인 발표 증빙자료

1. 포스터





2. 요약 정보



**KFN** The Korean Society of  
Food Science and Nutrition

2023 Meeting Program Registration Call for Abstracts Sponsorship & Exhibition General Info

2023 KFN International Symposium and Annual Meeting

## Sustainable Food System for a Healthy & Value-Oriented Life

Oct. 18 (Wed) - 20 (Fri), 2023 | BECCO, Busan, Korea

Abstracts

Programmatic Guide  
Submission Guidelines  
Cooperation / Mobilization

### Abstract Submission (Review)

P09-01

**Effects of *Alga* vulgaris extract and its active compound hecogenin against atopic dermatitis-like skin inflammation**

Sooeun Park<sup>1,2</sup>, Young-hyun Kim<sup>1</sup>, Anusaka Chandra<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology

Background: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease. *Alga vulgaris* is a natural source of hecogenin, a flavonoid compound. Hecogenin has been reported to have anti-inflammatory and anti-oxidative effects. In this study, we investigated the effects of hecogenin on skin inflammation in a mouse model of AD. Hecogenin significantly reduced the skin inflammation and restored the skin barrier. Hecogenin also inhibited the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. These results suggest that hecogenin may be a potential therapeutic agent for AD. This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82073000).

3. 팜플렛



2023 KFN International Symposium and Annual Meeting

## Sustainable Food System for a Healthy & Value-Oriented Life

Oct. 18 (Wed) - 20 (Fri), 2023  
BECCO, Busan, Korea



 The Korean Society of Food Science and Nutrition
  Ministry of Food and Drug Safety

P09-00 **Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of various polyphenols (flavonoid polyphenols) against atopic dermatitis-like skin inflammation**  
 Eun-yeon Park<sup>1,2</sup>, Young-hyun Kim<sup>1</sup>, Anusaka Chandra<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology

P09-01 **Effects of *Alga* vulgaris extract and its active compound hecogenin against atopic dermatitis-like skin inflammation**  
 Sooeun Park<sup>1,2</sup>, Young-hyun Kim<sup>1</sup>, Anusaka Chandra<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology

P09-02 **Regulatory Effects of Polyphenols on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Atopic Dermatitis**  
 Yoon-yeon Park<sup>1,2</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology

P09-03 **Regulatory Effects of Polyphenols on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Atopic Dermatitis**  
 Yoon-yeon Park<sup>1,2</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology

P09-04 **Regulatory Effects of Polyphenols on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Atopic Dermatitis**  
 Yoon-yeon Park<sup>1,2</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology



P09-05 **Regulatory Effects of Polyphenols on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Atopic Dermatitis**  
 Yoon-yeon Park<sup>1,2</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>, Eun-yeon Park<sup>1</sup>, Young-ae Lee<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBR), <sup>2</sup>Applied Biological Engineering, School of Biotechnology, University of Science and Technology

4. 포스터 현장사진





JY206 작업일지						결	작성	검토	승인	
						재	강동형	/	유수진	
						11/23	/	11/23		
지시자	유수진	인수자	강동형	지시일자	2023년 11월 21일					
지시수량	12.21 kg	착수일자	2023년 11월 21일	작업자	강동형					
제조번호	F12311001	제조일자	2023년 11월 21일	제조단위	82 kg					
원료 사 양	원료명	사용량	단위	칭량자	시험의뢰번호	생산일자 : 2023년 11월 21일				
	개머루	66	kg	강동형	/	포 장	포장단위	8.2 kg		
	정제수	277.89	kg	강동형	/		이론량	12.21 kg		
	에탄올	311.99	kg	강동형	/		생산량	8.2 kg		
	덱스트린	2.44	kg	강동형	/		생산수율	67.2 %		
제 조 기 록	공정명	작업시간	관리항목		관리기준		측정치			
	원료 투입	11/21 08:20 ~ 08:30	중량	이물	처방준수	없음	처방준수	없음		
	추출	09:10 ~ 18:10	추출온도	추출시간	78±5℃	9시간	78℃	9시간		
	여과	18:30 ~ 18:40	여과방법	규격	카트리지 여과	1μm	카트리지 여과	1 μm		
			여과액량	고형분	참고치	참고치	462.5 kg	2.12 %		
	감압농축	11/22 08:30 ~ 16:10	농축온도	고형분	60±5℃	참고치	60℃	34.89%		
			농축액량	이른고형분	참고치	참고치	28 kg	9.77 kg		
덱스트린 혼합	16:30 ~ 16:50	중량	이물	처방준수	없음	2.44kg	없음			
분무건조	11/23 08:50 ~ 14:40	Inlet Temp.	Outlet Temp.	150±5℃	80±5℃	150℃	80℃			
공 정 검 사	항목	규격	결과		설비점검 및 기타사항					
	감압농축-고형분	참고치	34.89%		※ 일일점검 작업 전.후 ※ 주간점검 매주 화요일 ※ 월간점검 매월 셋째주 월요일					
					점검일시 :       년   월   일 점검시간 :   시   분					
	※ 작업 중 지연, 수율감소 및 원인분석, 조치, 향후대책				점검상태 : (○) (△) (X) 점검자 :					
				※고장 및 수리사항 기계명 : 원인 : 조치 : 대책 :						
※기구 및 기계청소 :				※청소방법 :						

제조기록서				PAGE: 1-1		
제품명	JY206 시험식품					
단위중량	1000mg	Lot 중량	14,000g			
제조년월일	2023.12.27	제조번호	JY206MM231227			
유형 및 특성	인체적용시험용 식품으로, 갈색의 분말을 함유한 백색의 경체					
1. 내용물 칭량 지시 및 기록						
성분명	배합비(%)	정당(mg)	Lot량(Kg)	사용량(Kg)	코드번호	기록자
개머루영글 추출물	50.00	500.00	7	7	JY205	김태현
결정셀룰로스	39.05	390.50	5.467	5.467	1799	김태현
HPMC	2.50	25.00	0.35	0.35	1411	김태현
이산화티타늄	1.20	12.00	0.168	0.168	147	김태현
글리세린지방산에스테르	0.25	2.50	0.035	0.035	1413	김태현
이산화규소	1.50	15.00	0.21	0.21	379	김태현
스테아린산그네슘	0.50	5.00	0.07	0.07	14	김태현
히드록시프로필셀룰로스	3.00	30.00	0.42	0.42	1715	김태현
가교카복시메틸셀룰로스나트륨	2.00	20.00	0.28	0.28	2513	김태현
합계	100.00	1000.00	14	14		김태현
2. 혼합						
2.1 브이(V) 믹서에 칭량한 원료를 넣고 7분간 혼합한다.				혼합시간 : 7 min		
3. 정립						
3.1 20메쉬 체가 결합된 진동체를 이용하여 정립한다						
4. 타정 및 공정관리						
4.1 타정기를 이용하여 타정한다.						
4.2 공정이 완료되면 중량, 경도, 마순도 및 분해도를 측정한다.						
구분	설 적			사 진	적합여부	
질량(g)	1	0.995	평균질량 0.997		적합	
	2	0.986				
	3	0.997				
	4	1.002				
	5	1.008				
경도	1	8.95	평균경도 9.09			
	2	9.12				
	3	9.15				
	4	8.94				
	5	9.30				
마순도	0.56					
분해도	23분					
5. 병포장 140C/S(1000mg × 100캡슐)						
5.1 병바닥에 방습제를 넣고, 지시수량(100캡슐)의 캡슐을 충전한 뒤, 뚜껑을 닫아 밀봉한다.						
차재명	단위	기준량	충전량	사 진	적합여부	
1. 병	EA	140	140		적합	
2. 방습제	EA	140	140			
3. 완충비닐	EA	140	140			
4. 실링지	EA	140	140			




1 / 1

발급번호 : G2021080301122623				
<b>건강보험자격득실확인서</b>				
확인청구자	성명	주민등록번호		
	이민지			
<b>자격득실확인내역</b>				
No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	주영엔에스(주)	2021.06.21	
2	직장가입자		2016.03.21	2021.06.19
	-----	이하여백	-----	-----

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.  
2021.08.03

**국민건강보험공단 이사장**



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공인인증서 필요)
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(제직증명용, 경력증명용, 대출용 등)









발급번호 : G202210170112221

## 건강보험자격득실확인서

확인청구자	성명	주민등록번호
	김일주	

### 자격득실확인내역

No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	주영엔에스(주)	2022.08.01	
2	직장가입자		2020.09.01	2022.08.01
3	직장가입자		2020.04.20	2020.09.01
4	지역세대주		2019.10.01	2020.04.20
5	직장가입자		2018.06.11	2019.10.01
6	지역세대원		2018.05.12	2018.06.11
7	직장가입자		2017.12.28	2018.05.12
8	직장가입자		2017.11.06	2017.12.28
9	지역세대원		2017.11.01	2017.11.06
10	직장가입자		2017.01.02	2017.11.01

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.

2022.10.17

**국민건강보험공단 이사장**



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.





발급번호 : G202210170112221

## 건강보험자격득실확인서

확인청구자	성명	주민등록번호
	김일주	

### 자 격 득 실 확 인 내 역

No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
11	지역세대원		2017.01.01	2017.01.02
12	직장가입자		2016.02.01	2017.01.01
13	직장피부양자		2015.09.01	2016.02.01
	-----	이하어백	-----	-----

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.

2022.10.17

**국민건강보험공단 이사장**



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.



발급번호 : G202303240112996

## 건강보험자격득실확인서

확인청구자	성명	주민등록번호
	이지영	

### 자격득실확인내역

No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	주영엔에스(주)	2023.01.02	
2	직장가입자		2022.07.01	2023.01.01
3	직장가입자		2021.06.01	2022.07.01
4	직장가입자		2018.01.01	2021.06.01
5	직장가입자		2016.07.04	2017.12.27
6	직장가입자		2010.07.19	2011.01.01
7	직장가입자		2008.01.07	2010.06.18
		이하여백		

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.

2023.03.24

**국민건강보험공단 이사장**



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(제직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.

문서확인번호 ■ XDCE-AFC2-EF36-6752 ■

제 2022 - 153163 호

## 학 위 수 여 증 명 서

성 명 : 박선경

생 년 월 일 :

입학 년월일 :

대 학 원 일반대학원 박사과정

학 과 식품공학·영양학과

학위수여년월일 2022. 08. 26

학 위 종 별 이학박사

학위 등록 번호

위 사실을 증명합니다.

2022 년 10 월 24 일

전 남 대 학 교 총



\*본 증명서는 해당대학 및 출판물관리 홈페이지([www.webtmn.com](http://www.webtmn.com))에서 24시간 유효대로 확인을 할 수 있습니다.





### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.