

(옆면)

(앞면)

11-1543000-002391-01

천연물 유래 성분을 이용한 할랄 인증용 기능성 소재 및 수출용 화장품 개발

최종보고서

2018

농림축산식품부

수출전략기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-002391-01

천연물 유래 성분을 이용한 할랄 인증용 기능성 소재 및 수출용 화장품 개발 최종보고서

2018. 12. 10

주관연구기관 / (주)케미랜드  
협동연구기관 / 계명대학교  
동국대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물 유래 성분을 이용한 할랄 인증용 기능성 소재 및 수출용 화장품 개발”  
(개발기간 : 2015. 08. ~ 2018. 08.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 12. 10.

주관연구기관명 : (주) 케미랜드

(대표자) 이 범 주



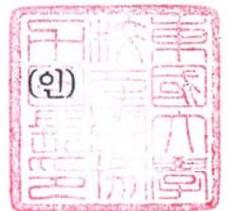
협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

(대표자) 남 재 열



동국대학교 산학협력단

(대표자) 이 용 규



주관연구 책임자 : 이 범 주

제 1 협동 책임자 : 김 배 환

제 2 협동 책임자 : 홍 광 원

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



요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성)

보고서 면수

- 할랄 인증 취득 : 총 26건의 화장품 소재 및 화장품에 대한 할랄 인증 취득
- 모델링 마스크에 대한 수출- 제품명: “Green Clay 02” 외 3종 품목 수출
- NET 신기술 취득 : 기술명-“할랄 인증 당근 크림 마스크팩 제조기술” (인증번호 61-052호)
- 개발 추출물의 ICID 등재 완료 : 제품명- “HAS-floral Carrot Bromelain Ex” 외 1종으로 총 2건의 화장품 소재의 ICID 등재 완료
- 특허출원 3건
  - : [10-2017-0141231] 당근, 느타리버섯 및 솔잎의 효소처리 추출물과 이를 포함하는 기능성 화장료 조성물 및 그 제조방법
  - [10-2018-0075248] 식물성 소재의 2단계 순차적 효소처리 추출물과 이를 포함하는 기능성 화장료 조성물 및 그 제조방법
  - [10-2018-0102014] 홍삼과 녹두의 효소처리 추출물 및 이를 적용시킨 크림의 제조방법과 이를 포함하는 화장료 조성물
- 논문 게재 현황
  - Antioxidant and antimicrobial activities of trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract.  
J. Environ. Health Sci., 2018, 44(3), 645~651
  - Antioxidant activity and anti-wrinkle effects for enzymatic hydrolysates of carrot extracts.  
J. Kor. Soc. Cosm., 2018, 24(4): 645~651
  - Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR.  
Appl. Biol. Chem., 2018, 61(5): 549~555
  - PCR Analysis for Halal Authentication of Cosmetics Containing Carrot, Oyster Mushroom and Pine Needle Extracts.  
Food Engineering Prog., 2018, 22(4): 309~314
  - Anti-wrinkle effect and mechanism of bromelain-treated *Pleurotus ostreatus* extract in human dermal fibroblasts.  
in progress

206 page

### <요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>국내 농산물인 당근, 느타리버섯, 솔잎, 녹두, 홍삼 등 5종의 농산물을 식물성효소인 papain 및 bromelain을 이용하여 추출을 극대화 시킨 후 이들 추출물의 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 보습, 항노화, 주름개선효능, 독성, 안전성, 안정성, 최적제형, 인체임상시험, 작용기전 등 전주기 연구개발을 통하여 어류나 동물성 콜라겐을 대체할 수 있는 기능성화장품 신원료를 개발하였으며 이들 신원료로 “할랄크림마스크팩”을 국내외 최초로 개발하였다. 또한 할랄, 비할랄(돼지, 개, 사람, GMO 및 알코홀) 물질의 신속 검출법을 개발하였다. 본 기술은 농림축산식품부 장관으로부터 농림식품신기술(NET) 인증을 받았으며, 화장품 분야에서는 국내 최초로 인도네시아 LPPOM MUI 할랄 인증을 받았고 국제화장품원료집에 등재신청을 완료하고 수출을 시작하였다. 본 기술로 국내 농산물의 고부가가치화에 따른 농산물 재배농가의 소득증대와 할랄제품의 수출 증대가 기대된다.</p>				
<p>연구개발 성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ <u>할랄 인증 취득</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인도네시아 LPPOM MUI Halal 인증(인증번호 : 00150083580617)</li> <li>- 효소처리 추출물 : 8건 [Carrot SEL Extract 외 7건]</li> <li>- 크림모델링마스크 : 8건 [Modeling Mask (Powder) for Carrot SEL 외 7건]</li> <li>- 크림 : 10건 [Carrot SEL Cream 외 9건]</li> </ul> </li> <li>◦ <u>NET 신기술 인증 취득</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신기술명 : 할랄 인증 당근 크림 마스크팩 제조기술, 인증번호 : 61-062</li> </ul> </li> <li>◦ <u>개발 화장품 소재 2건의 ICID 등재</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당근을 원물로 한 Bromelain 처리 추출물(제품명: HAS-floral Carrot Bromelain Ex) 외 1건을 국제화장품협회인 Personal Care Products Council (PCPC)가 발간하는 국제화장품원료집(ICID, International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 원료 등재 완료</li> </ul> </li> <li>◦ <u>개발 모델링 마스크 수출</u> 제품명 “Green Clay 02” 외 3종 품목 수출개시</li> <li>◦ <u>논문 게재 (총 5건)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antioxidant and antimicrobial activities of trypsin-treated <i>Pinus densiflora</i> ethanol extract, J. Environ. Health Sci., 44(3): 645~651(2018)</li> <li>- Antioxidant activity and anti-wrinkle effects for enzymatic hydrolysates of carrot extracts, J. Kor. Soc. Cosm., 24(4): 645~651(2018)</li> <li>- Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR, Applied Biological Chemistry, 61(5): 549~555(2018)</li> <li>- PCR Analysis for Halal Authentication of Cosmetics Containing Carrot, Oyster Mushroom and Pine Needle Extracts, Food engineering, 22(4): 309~314(2018)</li> <li>- Anti-wrinkle effect and mechanism of bromelain-treated <i>Pleurotus ostreatus</i> extract in human dermal fibroblast. (in progress)</li> </ul> </li> </ul>				
<p>연구개발성과 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ <u>할랄 인증 제품군 확대 및 다각화</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 현재 할랄 인증 받은 제품군에 대한 판매 확대 및 제품군 다각화 진행중</li> <li>- 인도네시아는 2019년부터 할랄 제품만 수입을 진행하겠다고 규정, 본 사업으로 할랄 인증받은 제품군 이외의 타 화장품소재 및 화장품도 인증 신청중. 기존 할랄인증 화장품소재 및 화장품 외 주관기관에서 취급증은 다른 화장품소재 및 제품군도 인증 취득 후 수출 계획중</li> </ul> </li> <li>◦ <u>할랄 인증 국가 확대</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 사업에서는 인도네시아에 대해서만 할랄 인증을 신청하여 인증 취득</li> <li>- 레아시아의 할랄인증 기관인 JAKIM 이나 걸프협력회의 (Gulf Cooperation Council, GCC) 국가 내 인증기관을 통해 할랄인증 취득 후 수출을 계획중</li> </ul> </li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>동물성 콜라겐 대체소재</p>	<p>효소처리 추출물</p>	<p>화장품 소재 효능 평가</p>	<p>할랄인증</p>	<p>할랄화장품</p>

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	9
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	18
가. 주관기관 수행 연구 결과 .....	18
나. 제 1 협동기관 수행 연구 결과 .....	81
다. 제 2 협동기관 수행 연구 결과 .....	128
라. 연구개발 성과 .....	193
마. 연구 성과 .....	194
바. 연구개발목표 대비 결과 총괄 .....	199
사. 사업화 성과 및 매출 계획 .....	200
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	201
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	204
참고문헌 .....	206

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 가. 국내 농산 자원 중 향산화, 항균, 미백, 주름개선 등의 효과가 있는 원료를 이용한 기능성 소재 및 화장품을 제조하여 할랄 인증을 받고 대상 국가로의 수출을 목표로 하고 있다
- 나. 동물성(돼지) 콜라겐 대체 소재로 당근과 느타리버섯을 활용한 할랄 마스크팩 제품을 개발하며, 당근, 느타리버섯, 솔잎을 적용한 할랄 크림 제품을 개발한다.
- 다. 녹두, 홍삼을 이용한 할랄 크림 제품을 개발한다.
- 라. 상기 화장품들에 대한 인도네시아 할랄 인증을 취득하여 대상 국가로 수출한다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 할랄 제품의 정의

- (1) 할랄 (Halal)의 사전적 의미는 이슬람법에 따라 '허용되는 것'을 의미한다.
- (2) 이슬람법에서 금지되는 것은 '하람'(Haram)이라고 한다. 모든 종류의 채소, 과일, 곡류 등 비육류성 식품과 모든 종류의 해산물이 할랄에 해당한다.
- (3) '하람(Haram)'에 속하는 동물은 육식 동물들과, 돼지, 벌레, 바퀴벌레, 올빼미, 및 독수리등이며 술과 마약 또한 하람에 해당. 금기된 음식에 접촉되어 오염된 할랄 음식 또한 하람에 속한다
- (4) 식품 원료의 경우 1차 원재료까지 철저히 점검하며, 알코올의 경우 제조장비 소독제라 할지라도 일체 사용이 금지되는 등 그 절차가 매우 까다로워 실사과정에서 인증에 실패하는 기업들이 많은 것으로 알려져 있다.
- (5) 제품의 할랄 상태는 공장을 현장 조사하는 것뿐 아니라, 원료의 할랄 상태를 어떻게 항상 유지 및 감시하는지를 검사하는 것과는 관련 있다.
- (6) 육류의 경우 양, 소, 닭 등 허용된 고기로 한정, 할랄에서 허용된 방법으로 도축된 것만 할랄식품으로 인정한다.
- (7) 또한 과자, 빵, 주스 등 가공식품도 돼지나 알코올 성분이 없어야 한다

### 나. 할랄 제품 현황

- (1) 할랄 식품 현황
  - (가) 할랄 식품은 견고한 육식 문화를 자랑하는 유럽에서도 대규모 사육 동물 학대 운동에 힘입어 친(親) 동물 바람이 일고 있다. 이로 슈퍼마켓 체인점에서 친 동물 제품의 입점수가 점차 늘고 있는 추세이다.
  - (나) 특히 유럽에서 할랄푸드 및 할랄시장 확대가 두드러지고 있는 가운데, 무슬림뿐 아니라 “깨끗한” 제품을 찾는 비무슬림 소비자 역시 이들 제품에 많은 관심을 갖는다
  - (다) “Nestlé”는 향후 10년간 유럽에서 할랄푸드 판매가 15~20% 증가할 것으로 전망하였다
  - (라) 할랄제품의 주 판매지는 중동국가이나 전 세계적으로 할랄제품의 증가세가 매년 약 10~20%에 달하며, 유럽도 본격적으로 할랄 trend에 눈을 뜨고 있다
  - (마) 특히 이슬람식 율법에 따른 도살 및 관리 과정을 거친 할랄 푸드는 보다 많은 유럽 내 대형 슈퍼마켓 내 입점을 앞두고 있어, 그 수요는 앞서 언급한 바와 같이 증가할 것으로 전망된다

## (2) 할랄 화장품 현황

- (가) 화장품을 사용하는 무슬림들은 돼지고기 지방이나 알코올이 들어가지 않은 화장품 사용을 선호해 알코올, 동물성분, 유전자 조작성분을 함유하지 않으며, 방사선을 이용해 파괴된 미생물도 금기시하고 있다
- (나) 할랄 푸드가 의식적인 도살 이미지를 연상시키고 동물 학대 논란을 안고 있는 데 반해 할랄 미용 제품 (화장품)은 이러한 논란에서 비교적 자유롭다
- (다) 순수하고 자연 상태의 미용용품 및 에코화장품 수요가 증가하는 추세 속에서 무슬림여성뿐만 아니라 비무슬림계 여성들도 할랄 화장품에 관심 확대되고 있다
- (라) 할랄 화장품은 최근의 에코 트렌드 (Eco trend)의 일종으로, “이슬람을 따르면서, 화학품을 멀리하고 깨끗한 제품의 사용을 추구하는” 제품으로 그 이미지를 옹호하려는 움직임도 있다

## (3) 국내 할랄 시장 대응 현황 및 문제점

- (가) 할랄 산업의 시장 규모만 1조 800억 달러(약 1,200조원)에 육박하며, 국내는 120여개 업체 430여개 품목만이 “할랄 마크”를 취득하였다. 할랄은 종교적인 의미와 함께, 위생적이고 안전한 제품이란 이미지도 같이 가진다
- (나) 할랄 인증은 원재료부터 생산공정, 보관 관리, 운송까지 모든 공정에 대한 엄격한 심사를 진행하는 세계에서 가장 까다로운 최고 수준의 규격이다. 특히 할랄 인증 화장품은 엄격한 이슬람 율법에 따라 동물성, 유해 성분을 배제한 화장품에만 부여한다
- (다) 상기의 관점에서 볼 때 국내의 경우 할랄 제품 (식품 및 화장품)에 대한 인식이 부족하기 때문에 할랄 시장에 참여할 준비가 되어 있지 않아 시장 상실의 위험이 높은 상태이다
- (라) 이슬람 문화권과는 별도로 할랄 화장품 시장은 인증 과정에 있어 규제 벽이 높지 않음에도 이들 시장에 대한 접근이 이루어지지 않고 있다. 깨끗한 이미지를 강조하기 때문에 에코 및 유기농 제품과 같이 생각하는 소비자의 수도 점차 늘고 있다
- (마) 이들 시장에 대한 정확한 이해와 할랄 인증을 받으려는 움직임이 뒷받침된다면 이들 시장에 대한 공략도 가능할 것으로 예상된다. 중국 시장의 경우 타국에 비해 수출이 용이하지 못했던 당시와는 달리 최근 중국 수출에 많은 업체들이 집중하고 있는 것을 보면, 할랄 시장 역시 잠재된 가능성은 충분할 것으로 전망된다

## (4) 할랄 제품 시장 대응 활성화 방안

### (가) 이슬람 문화에 대한 이해

- : 무슬림 여성이라 하면 주로 짙은 눈화장을 하고 있는 여인들이 주로 연상된다. 이는 눈을 제외한 모든 부위가 히잡으로 얼굴을 감싸고 있어 외부에서 보면 눈만 집중적으로 보이기 때문에 이와 같이 생각할 수 있다
- : 이슬람 문화는 일부 다처제가 허용된 국가이다. 이로 무슬림 여성들은 그들의 남편에게 좋은 모습을 보여주기 위해 집에서도 항상 완벽한 화장(full makeup)을 하고 있다. 가계별 소득 수준에 따라 개인차가 있겠지만, 이들은 집에서도 최고 수준의 화장품을 사용하고 있는 여성들이 많다.
- : 유로모니터 인터내셔널 (Euromonitor International) 보고서는 향후 2017년에는 걸프협력회의 (GCC · 사우디아라비아, 쿠웨이트, 카타르, 바레인, 아랍에미리트, 오만) 국가의 1인당 화장품 소비는 48.70~68.20 달러 수준에 이를 것으로 전망하고 있다 [프랑스 (89.60달러), 영국 (70.60달러)]

러), 미국 (65.80달러 예상)]

: 이로 할랄 화장품의 마케팅 및 판매에 앞서 이들 문화를 이해하려는 노력이 선행되어야 한다

(나) 정부 등 공공기관 주도에 의한 할랄 인증 기관 마련

: “이슬람 경제 현황 보고서 2014-2015 (Thomson Reuters State of the Global Islamic Economy 2014~2015)” 는 글로벌 할랄 화장품 시장 규모가 2013년 400억달러 (42조 7,600억 원) 에서 2019년 730억달러 (78조 370억원)로 두배 가량 증가할 것으로 예상하고 있다.

: 무슬림은 전세계 약 70억 인구의 25%인 18억명으로 2025년도에는 전세계 무슬림 비율이 30%를 넘을 것으로 예상된다.

: 할랄 인증기관은 전 세계적으로 수천개에 달할 것으로 예상된다. 비 이슬람국가인 일본에도 약 60~100개 인증기관을 보유하고 있다. 할랄 인증기관은 자발적인 조직으로 개인이 만들 수 있기 때문에 정확한 통계를 산출하기 어렵다

: 인증기관에 대한 순위를 매길 기준이 없으며, 그 효력도 다르고, 인증기관의 권위도 나라마다 다르다. 즉 특정 국가에 수출을 하고 싶다면 해당 국가에서 가장 권위있는 인증기관에서 인증을 받는 것이 제일 유리하다. 많은 무슬림이 알고 있는 인증서를 보유하고 있는 기관일수록 향후 제품 판매에 유리하게 작용할 것으로 예상된다

: 이상과 같이 국내 할랄 인증 기관의 경우 숫자상으로는 많을 수 있으나 대외 공신력 또는 인증기관의 권위 등이 일률적이지 않다면, 할랄 제품에 대한 인증을 처음 시작하는 단계에서는 정부 주도의 설립된 인증기관을 통해 이들 기관을 중심으로 인증을 받고, 그 과정중 거치게 될 시행착오를 통해 보다 정확하고 빠르게 인증을 거칠 수 있을 것으로 전망된다

(다) 기술력이 집약된 소재 및 제품을 개발에 의한 독자적인 제품 경쟁력 확보

: 하람(Haram) 에 속하는 대표적인 동물은 돼지이며, 이들을 이용한 제품(식품, 화장품 등)은 그 어떤 경우에도 이슬람 문화권 국가에 대한 판매는 불가능하다. 이로 돼지에서 유래된 소재를 대체할 수 있는 원천 기술이 있다면, 이 자체가 해당 업체만의 경쟁력을 갖춘 개발품이 될 것으로 예상된다

: 한 예로, “비온드 미트 (Beyond Meat)”라는 업체는 2012년 설립된 벤처기업으로 미국 미주리 대학 교수들로부터 식물성 원료(대두)를 이용한 닭고기 대체 식품 (소위 “인조 닭고기”)를 개발하였다. 이들은 동물을 보호할 목적과 동시에 육류 소비를 줄여 인체의 건강을 증진할 목적으로 이들 식품군을 개발하게 되었다. 이들이 만든 가짜 닭고기는 실제 닭고기와 구별하기 어려울 정도로 맛과 육질이 비슷한 것으로 알려져 있다 (참고로 가짜 소고기는 완두콩으로 제조함)

: 상기 예시로 든 닭고기는 하람 (Haram) 해당하는 소재는 아니지만, 이와 같은 기술력을 가진 업체들이 하람 (Haram) 에 해당하는 대체 소재를 개발, 공급할 수 있다면 향후 이들 시장에서 긍정적인 결과가 나올 수 있으리라 예상된다

: 화장품 소재 역시 식품 등 타 분야에서 유통중인 소재를 선택하여 기존 하람에 해당하는 소재를 대체할 수 있다면 이 자체로도 이전까지는 접근하지 못했던 새로운 시장을 개척할 수 있는 계기가 될 것으로 전망된다.

(5) 국내 농산 자원을 활용, 돼지 콜라겐 대체할 농산식물 소재 및 이들의 특성

(가) 당근

- : 당근 유래의 당 단백질은 콜라겐 생합성 시 이용되는 히드록시프롤린이 다량 함유되어 있으며, 글리신 함량의 비율이 동물성 콜라겐 펩타이드와 유사하게 보여진다. 일반적으로 히드록시프롤린은 동물 콜라겐 이외의 단백질에서는 보이지 않고 있다.
- : 당근 당 단백질은 일차 세포벽의 중요한 구성 단백질로서 외부의 자극에 대한 방어 역할을 담당하고 있는 물질이다. 아미노산의 조성에서 추측해 볼 때 분자 측쇄에 수산기를 가진 세린의 함량이 높기 때문에 보습력이 뛰어나며, 인체 내에서 콜라겐의 생합성에 용이한 것으로 기대된다. 피부의 탄력과 관계되는 피부 조직의 수복작용의 역할을 통해 화장품 소재로서의 기능을 갖추고 있으므로 기초화장품, 모발제품 등에 배합·응용되어 지고 있다.
- : 이 단백질을 “Extensin (A plant glycoprotein similar to collagen) 이라고 명명하였고, 일반적인 단백질에서 많이 발견되지 않는 히드록시 프롤린을 많이 함유하고 있어 이의 구조와 기능을 동물성 단백질 및 엘라스틴과 연관짓게 되었다.
- : Hydrolyzed Extensin 안에 함유된 Serine은 천연 보습인자로 약 12~16%를 함유하고, 이들은 피부 친화력이 좋고, 사용감이 우수하며, 피부를 젊게 하고, 노화방지 및 주름개선 등의 효과가 있어 동물성 콜라겐을 대체할 수 있는 소재로 적합하다. 본 성분은 일본 후생성에도 캐롯 엑스로 인정되어 있으며 일본에서도 기능성 성분으로 이용되고 있다.

(나) 느타리버섯

- : 다양한 기능을 가진 기능성 식품으로 주목받고 있는 느타리버섯은 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있다.
- : 느타리 버섯은 단백질과 지방 함량이 높으며 수분 89.2%, 단백질 15.7%, 탄수화물 54.4%, 지방 4.2%, 조섬유 12.0%, 철분 7.9%, 비타민 C 3.0mg/100g 이 함유되어 있으며, 아미노산은 alanine, methionine, arginine, aspartic acid, serine, isoleucine, threonine 등 함유되어 있다.
- : 비타민 D<sub>2</sub>의 모체인 에르고스테롤이 많이 함유되어 콜레스테롤 수치를 낮춤으로써 고혈압과 동맥경화 등의 성인병을 예방한다. 비타민 B<sub>2</sub>는 성장을 촉진, 지방과 단백질, 당질의 소화 및 흡수를 도우며, 나이아신은 피부염을 예방한다. 비타민 D는 뼈의 조직을 만드는데 필수적이고 골다공증을 예방하며, 유아의 뼈와 치아를 튼튼히 한다
- : 또한 lactic acid, oxalic acid, fumaric acid, succinic acid, malic acid, citric acid, pyroglutamic acid 등의 유기산과 지방산, trehalose, glucose, fructose, mannitol, arabitol, glycerol 등의 유리당 및 당알코올류의 다양한 성분 연구 및 폴리페놀 화합류의 항산화능에 대해 보고된 바 있으며, 셀레늄 성분이 풍부하고 특히 버섯 중에서 나이아신 성분이 가장 풍부한 것으로 알려져 있다.
- : 항산화 영양소인 셀레늄, 혈압을 조절해주는 칼륨, 변비 예방에 좋은 식이섬유소 등 뇌졸중 예방에 좋은 영양 성분들이 많이 함유되어 있다. 느타리 버섯의 셀레늄 함량은 100g 당 18.4 μg으로 당근의 8배, 양과의 12배나 되며, 칼륨이 나트륨의 약 90배정도 함유되어 나트륨의 배설을 촉진시킨다.
- : 플루란 (Pleuran) 이라는 성분이 함유되어 항종양, 콜레스테롤 강하, 요추동통, 근육경련, 수족마비 개선, 면역체계 강화에 효과적이다.
- : 느타리는 면역 기능을 높여 직장암과 유방암의 암세포 증식을 정지, 느타리 추출물은 유방암, 폐

암, 간암 등에 효과가 크고, 암치료중 일어나는 구토, 탈모, 설사 등의 부작용에 효과가 있다.

(다) 솔잎

- : 솔잎은 아스코르브산, 카로틴, 비타민 K 등의 비타민이 풍부하며, 피넨, 캄펜, 펠란드렌, 리모넨, 카디넨, 보르네올 등의 정유 성분이 알려져 있다.
- : 솔잎에는 인체에 침입하는 각종 세균이나 박테리아를 억제하는 항균 능력이 뛰어나고, 테르펜이 함유되어 활성 산소의 생성을 감소시켜 피부 노화를 늦추어주는 효능이 있다고 보고되어 있다.
- : 솔잎의 병원성 및 식중독 미생물에 대한 항균효과에 관한 연구가 활발히 진행되어 지고 있으며, 솔잎 내 다량 함유되어 있는 benzoic acid가 강력한 항균활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 또한, 솔잎에 함유되어 있는 flavonoid, alkaloid, lignan, 유기산류 등은 혈청 콜레스테롤 저하효과, 항당뇨 효과, 지질저하 및 항산화효과, 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다.

(라) 홍삼

- : Ginsenoside Rg<sub>3</sub>를 Human Dermal Fibroblasts 에 첨가한 후 PICP 의 생산량을 확인한 결과 Rg<sub>3</sub>를 첨가농도와 비례하여 Type I Collagen은 시간이 경과함에 따라 대조군 시료에 비해 급격히 증가하였다. 또한 홍삼에 존재하는 Rg<sub>3</sub>의 첨가 농도에 따라 TGF- $\beta$  1 역시 이에 비례하여 합성을 촉진하는 것으로 확인되었다.
- : 홍삼의 ginsenoside F1이 인간 각질세포에서 자외선 조사로 인한 세포 사멸을 감소시킬 뿐 아니라, 자외선으로 촉진되는 세포 자기사멸 (apoptosis)로부터 각질 세포를 보호하는 효과가 있으며, ginsenoside-Rb<sub>2</sub>는 in vitro에서 피부세포의 증식효과가 있다고 보고되어 있다.
- : Compound K는 인간의 각질세포에서 피부 탄력 성분 중의 하나로 알려진 히아루론산 생합성에 관련되는 hyaluronan synthase2 (HAS2) 유전자 발현을 증진시키는 것으로 알려져 있다.
- : 최근 홍삼추출물을 hairless mouse에 경구 투여 하였을 때 주름 생성을 예방하는 효과가 있다고 보고가 있었으며, 홍삼엑기스를 복강 내 투여했을 때, UV-B를 조사시킨 마우스에서 피부손상을 억제하는 효과가 있었고 피부에 도포했을 때는 그 효과가 보다 뚜렷하였다고 보고되었다.

(마) 녹두

- : 콩과에 속하는 녹두 (Phaseolus radiatus L.)는 전분이 40~50%, 단백질이 20~30%로 함유, 필수 아미노산과 불포화 지방산 및 Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 및 니코틴산 등이 함유되어 혈압강하 및 혈중 콜레스테롤의 수치 강하에 도움이 되는 것으로 알려져 있다.
- : 녹두에 함유된 vitexin 및 isovitexin은 유리 라디칼 제거 기작에 의한 항산화 효능이 뛰어나 건강한 피부를 유지하는 데 도움을 주며 녹두에는 보습 성분 및 미네랄이 다량 함유되어 촉촉하고 탄력있는 피부로 가꿀수 있게 한다.
- : 또한 vitexin 및 isovitexin은 피부 자극 완화 효과에 결정적인 도움을 주는 성분으로 보고되어 있다. 녹두를 기존 추출이 아닌 초임계 추출기법을 적용하여 추출물을 제조하고 이의 활성을 확인한 결과, 기존 추출기법으로 제조된 추출물보다 초임계 추출로 제조한 녹두 추출물이 피부 자극 완화 및 항염증 효과가 보다 뛰어난 것으로 보고되어 있다.

(6) 본 사업의 궁극적인 목표

: 동물성 콜라겐 대체 소재인 국내 농산물을 이용한 할랄 인증 화장품 소재 및 화장품 개발 및 이들 제품군의 수출

(7) 연구개발의 최종 목표 및 주요 내용

- 천연자원을 통한 동물성 콜라겐 대체 가능성 확인
  - 동물성 콜라겐과 국내 농산 자원 적용 추출물간 in vitro 효능 확인 및 비교 (in vitro 효능 측정 항목 : 항산화, 주름개선, 항균, 미백)
- 천연물 유래 성분을 이용한 마스크팩, 크림 제형 개발
  - 5종의 국내 농산 자원을 원료로 사용한 추출물 개발 및 이를 적용한 마스크팩과 크림 제형 개발
  - 개발 완제품군에 대한 유전자 확인을 통한 하람(Haram) 성분 검출여부 확인 및 에탄올 분석
- 추출물 및 이를 적용한 완제품의 할랄인증 및 수출
  - 개발 제품군(추출물, 마스크팩 및 크림)에 대한 할랄 인증
  - 개발 제품군에 대한 할랄 인증 국가로의 수출

1-3. 연구개발 범위

가. 기관별 연구 범위

(1) 제 1 세부 [(주) 케미랜드]

**<국내 농산 자원 적용 추출성분과 완제품 개발, 할랄 인증을 통한 화장품 수출>**

- 국내 농산 자원 (당근, 느타리 버섯, 솔잎, 홍삼, 녹두 등)을 통한 동물성 (돼지) 콜라겐 대체 가능성 확인 및 할랄 인증의 이해, 국가별 제품 선호도 조사
- 국내 농산 자원을 이용한 화장품 소재로 적용 : 상기 5종 원료에 대한 추출성분 개발
- 당근, 느타리, 솔잎, 녹두, 홍삼 등 돼지콜라겐 대체 소재 적용 추출성분을 이용한 기능성크림 제형 개발 및 완제품에 대한 보습 평가 (in vivo)
- 개발 제품군의 할랄 인증 및 국가별 수출

(2) 제 1 협동 [계명대학교 산학협력단]

**<동물성 콜라겐 대체 소재 유래 추출성분에 대한 항산화, 항균, 미백, 주름 개선 효능평가>**

- 당근, 느타리 버섯 유래 추출성분에 대한 항산화, 보습 및 주름개선 효능 평가
- 솔잎 유래 추출성분에 대한 항산화, 항균 및 미백 효능 평가
- 녹두, 홍삼 유래 추출성분에 대한 항산화, 주름, 미백 효능 평가

(3) 제 2 협동 [동국대 ]

**<수출용 할랄 제품 인증 지원 및 개발 화장품의 DNA와 알코올 분석>**

- 마스크팩, 크림 제품에 대한 할랄 인증 지원
- 동물성(돼지) 콜라겐 대체 소재 및 이를 적용한 화장품 완제품의 DNA 추출조건 확립
- 화장품 완제품의 DNA와 알코올 분석

나. 연차별 연구범위

(1) 1차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>1차년도</p> <p>당근과 느타리 버섯 유래 성분을 이용한 마스크팩 개발 및 수출</p>	<p>2015</p>	<p>(제 1 세부)</p> <p>당근, 느타리 버섯 유래 추출성분 개발 및 이를 적용한 마스크팩 제품 개발, 본 제품의 할랄 인증 및 수출</p>	<p>1) 할랄 인증의 이해와 국가별 선호제품 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 할랄 인증 이해 및 할랄 인증 국가별 화장품 소재와 제품 선호도 조사</li> </ul> <p>2) 동물성 (돼지) 콜라겐 대체 소재 발굴 및 화장품 소재화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당근, 느타리 버섯 유래 추출성분 개발 (액상 또는 고농도 분말 소재화)</li> </ul> <p>3) 당근, 느타리 버섯 유래 추출성분 적용 마스크팩 개발 및 보습평가 (in vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 상용중인 돼지 콜라겐 적용 마스크팩과 당근, 느타리 버섯 소재 적용 제품간 효능 비교</li> <li>- 당근, 느타리버섯을 원물로 한 추출물 적용 마스크팩의 보습평가 (in vivo)</li> <li>- 두 제품간 효능 검토에 의한 대체 가능성 확인</li> <li>- 당근, 느타리 버섯 소재 적용 마스크팩 제품의 대량 생산 체제 확립</li> </ul> <p>4) 개발 제품에 대한 할랄 인증 및 수출</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발 제품의 할랄 인증 확인</li> <li>- GCC (Gulf Cooperation Council) 국가 의 할랄 인증 국가에 대한 수출 가능국 검토</li> <li>- 국가별 수출화 전략 수립</li> </ul>
		<p>(제 1 협동)</p> <p>당근과 느타리버섯 유래 추출성분을 이용한 항산화, 보습, 주름개선 효능평가</p>	<p>1) 항산화 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DPPH법에 의한 항산화 활성 평가</li> <li>- Superoxidase dismutase (SOD) 활성 측정</li> <li>- 총 Polyphenol 함량 측정</li> </ul> <p>2) 주름개선 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collagenase 저해활성</li> <li>- Elastase 저해활성</li> <li>- Fibroblasts 세포주를 이용한 주름개선평가 (세포내 MMP-1 저해활성 측정)</li> </ul>
		<p>(제 2 협동)</p> <p>당근과 느타리버섯 유래 추출성분을 이용한 마스크팩 제품의 할랄 분석</p>	<p>1) 마스크팩 제품에 대한 할랄인증 기준 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 할랄 제조공정 및 비할랄 성분확인</li> </ul> <p>2) 콜라겐 대체 소재 및 마스크팩 제품에서 DNA 추출 조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소재와 완제품에서 최적 DNA 추출법 확인</li> </ul> <p>3) 마스크팩 제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석과 알코올 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA 분석법으로 돼지, 개, GMO, 인체성분 확인</li> <li>- 효소법 또는 GC를 이용한 알코올 분석</li> </ul>

(2) 2차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>2차년도</p> <p>당근, 느타리버섯, 솔잎 적용 크림 개발 및 수출</p>	<p>2016</p>	<p>(제 1 세부)</p> <p>당근, 느타리 버섯, 솔잎 유래 추출성분 개발 및 이를 적용한 기능성 크림 개발, 완제품의 할랄 인증 및 수출</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 당근, 느타리 버섯, 솔잎 적용 크림 제형의 할랄 국가별 선호도 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발 제품군에 대한 수출 대상 후보국 선정</li> </ul> </li> <li>2) 국내 농산 자원 활용 화장품 소재화               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당근, 느타리 버섯, 솔잎 유래 추출성분 개발</li> </ul> </li> <li>3) 상기 소재 적용 기능성 크림 제품 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반 및 초미립 유화 공정 적용 크림 제품 개발</li> <li>- 각 소재 적용 크림의 상안정도 확인</li> <li>- 실온, 항온, cycling chamber 등 서로 상이한 온도 조건에서의 제품 안정도 확보</li> <li>- 개발 크림의 보습평가 (in vivo)</li> </ul> </li> <li>4) 기능성 크림에 대한 대량 생산 체제 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소재별 적용 크림 제형간 대량 생산체제 확립</li> </ul> </li> <li>5) 개발 제품의 할랄 인증 및 개발 제품 수출               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발 제품의 할랄 인증</li> <li>- 수출 대상국 결정 및 이들 국가에 대한 수출화 전략 수립</li> </ul> </li> </ol>
		<p>(제 1 협동)</p> <p>당근, 느타리버섯 유래 추출성분에 대한 항산화, 보습, 주름개선 효능 및 솔잎 추출물에 대한 항산화, 항균 및 미백평가</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 항산화 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- DPPH법에 의한 항산화 활성 평가</li> <li>- Superoxidase dismutase (SOD) 활성 측정</li> <li>- 총 Polyphenol 함량 측정</li> </ul> </li> <li>2) 항균 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정</li> </ul> </li> <li>3) 미백 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mushroom tyrosinase 저해활성 측정</li> <li>- Melanoma 세포주를 이용한 미백평가 (세포 내 멜라닌 함량 측정, 유전자 발현)</li> </ul> </li> </ol>
		<p>(제 2 협동)</p> <p>당근과 느타리 버섯, 솔잎 유래 추출성분을 이용한 크림 제품의 할랄 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 크림 제품에 대한 할랄인증 기준 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 할랄 제조공정 및 비할랄(non-halal) 성분 확인</li> </ul> </li> <li>2) 크림 제품에서 DNA 추출 조건 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 완제품에서 최적 DNA 추출법 확인</li> </ul> </li> <li>3) 크림제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석과 알코올 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA 분석법으로 돼지, 개, GMO, 인체 성분 확인</li> <li>- 효소법 또는 GC를 이용한 알코올 분석</li> </ul> </li> </ol>

(3) 3차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>3차년도</p> <p>녹두, 홍삼 적용 크림 개발 및 수출</p>	<p>2017</p>	<p>(제 1 세부)</p> <p>국내 농산 자원 적용 녹두, 홍삼 유래 추출성분 개발 및 이를 이용한 크림 제형 개발, 개발 제품군의 할랄 인증 및 수출</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 녹두, 홍삼 소재 적용 제품군에 대한 할랄 국가별 선호도 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발 제품군에 대한 수출 대상 후보국 선정</li> </ul> </li> <li>2) 녹두, 홍삼 유래 추출성분 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 녹두 유래 단백질 추출 성분 개발</li> <li>- 홍삼 유래 추출성분 개발</li> </ul> </li> <li>3) 상기 소재 적용 기능성 크림 제품 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반 또는 초미립 유화 공정 적용 크림 개발</li> <li>- 각 소재 적용 크림의 장기 안정도 검토</li> <li>- 실온, 항온, cycling chamber 등 서로 상이한 온도 조건에서의 상안정도 확보</li> <li>- 개발 크림의 보습평가 (in vivo)</li> </ul> </li> <li>4) 기능성 크림에 대한 대량 생산 체제 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상기 소재 적용 크림 제형간 대량 생산 체제 확립</li> </ul> </li> <li>5) 개발 제품의 할랄 인증 및 수출               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발 제품의 할랄 인증</li> <li>- 수출 대상국 결정 및 수출화 전략 수립</li> </ul> </li> </ol>
		<p>(제 1 협동)</p> <p>녹두, 홍삼 유래 추출성분을 이용한 주름, 항산화, 미백평가</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 주름개선 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collagenase 저해활성</li> <li>- Elastase 저해활성</li> <li>- fibroblasts 세포주를 이용한 주름개선평가 (세포 내 MMP-1 저해활성 측정)</li> </ul> </li> <li>2) 항산화 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- DPPH법에 의한 항산화 활성 평가</li> <li>- Superoxidase dismutase (SOD) 활성 측정</li> <li>- 총 Polyphenol 함량 측정</li> </ul> </li> <li>3) 미백 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정</li> <li>- Melanoma 세포주를 이용한 미백평가 (세포 내 멜라닌 함량 측정)</li> </ul> </li> </ol>
		<p>(제 2 협동)</p> <p>녹두, 홍삼 유래 추출성분을 이용한 크림 제품의 할랄 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 녹두, 홍삼 유래 추출성분 함유 크림 제품에서 DNA 추출 조건 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소재 및 완제품에서 최적 DNA 추출법 확인</li> </ul> </li> <li>2) 크림제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석과 알코올 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA 분석법으로 돼지, 개, GMO, 인체성분 확인</li> <li>- 효소법 또는 GC를 이용한 알코올 분석</li> </ul> </li> </ol>

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 주관기관 수행 연구 결과

[국내 농산 자원 적용 효소처리 추출물 및 화장품 개발, 할랄 인증을 통한 개발품 수출]  
(수행기관 : (주) 케미랜드)

- 국내 농산 자원인 당근, 느타리 버섯, 솔잎, 녹두, 홍삼을 대상으로 효소 처리 추출물을 개발하고 이들에 대한 물성을 연구한다
- 개발 추출물을 적용한 마스크팩과 크림을 개발하고, 개발 제품군에 대한 임상평가를 통해 기존 등 물성 콜라겐을 적용 제품군에 비해 효능이 우수한지를 확인한다
- 추출물 및 화장품 완제품에 대해 인도네시아 할랄 인증기관인 LPPOM MUI로부터 할랄 인증을 취득한다
- 할랄 인증 제품군을 수출한다

#### (1) 할랄 인증용 화장품 소재 개발

##### (가) 추출물 개발을 위한 효소의 선정

본 연구에서는 당근 및 느타리버섯, 솔잎, 녹두 및 홍삼을 원물로 하여 열수 방법에 의한 추출 조건을 확립하고 추출시 단백질성분을 보다 많이 용출시키기 위해 효소로 처리하였다. 본 연구에 사용한 효소는 기존의 특허 및 논문들을 참조하여 하람(Haram)에 해당하지 않으면서 천연물에서 유래한 Papain과 Bromelain으로 하였다. 이들 효소군은 식품 및 화장품 산업에서 범용적으로 사용되는 것으로 할랄 제품의 용도로도 적용이 가능함을 확인하였다. 효소의 순도에 따라 용출되는 단백질성분의 종류 또는 그 농도가 다를수 있기에 본 연구에 적용한 효소는 고순도와 저순도의 효소로 나누어서 열수 추출 중 적용하였고, 본 연구에서 사용한 효소의 순도는 표 1에 기재하였다.

표 1. 사용 효소의 순도

Papain (EC 3.4.22.2, endopeptidase)		Bromelain (EC 3.4.22.4, protease)	
고순도	저순도	고순도	저순도
1.5~10 unit/mg solid (from Papaya latex)	식물성 protease 11%	≥ 3 unit /mg protein (from Pineapple stem)	식물성 Protease 65%

#### ※ 참고

##### ◦ 파파인 (Papain)

- 파파야 과실의 유액에서 결정으로 얻어지는 단백질 가수분해효소. 분자량은 2~3만, 등전점 pH 8.75
- 묽은 염류용액에는 녹지 않고 70% 알코올에 가용성
- pH 4.0~8.0에서 안정, 단백질을 분해하여 펩톤 (peptone)을 생성
- 각질을 분해해 주고, 모공속 노폐물의 제거에 도움
- 땀속의 지방산과 피지에 섞인 단백성분을 파파인이 분해시켜서 땀냄새 제거에도 도움

◦ 브로멜라인 (Bromelain)

- 파인애플 주스에서 단백질 분해 효소로 처음 발견, 보통 파인애플 줄기에서 많이 발견
- 분자 구조는 papain과 비슷하고 당을 포함
- 고기에 연육작용을 하며, 고기와 함께 섭취시 단백질의 소화를 도움.
- 항염증(anti-inflammatory) 작용을 통해, 조직손상 시 유발되는 통증을 완화

(나) 추출물 개발

본 연구에서 개발한 추출물의 제조 공정을 그림 1에 기재하였다. 아래의 방법을 통해 추출하였으며, 물에 대한 흡수 능력이 높은 시료군에 대해서는 용매와 원물의 비율을 조절하면서 추출을 진행하였다.

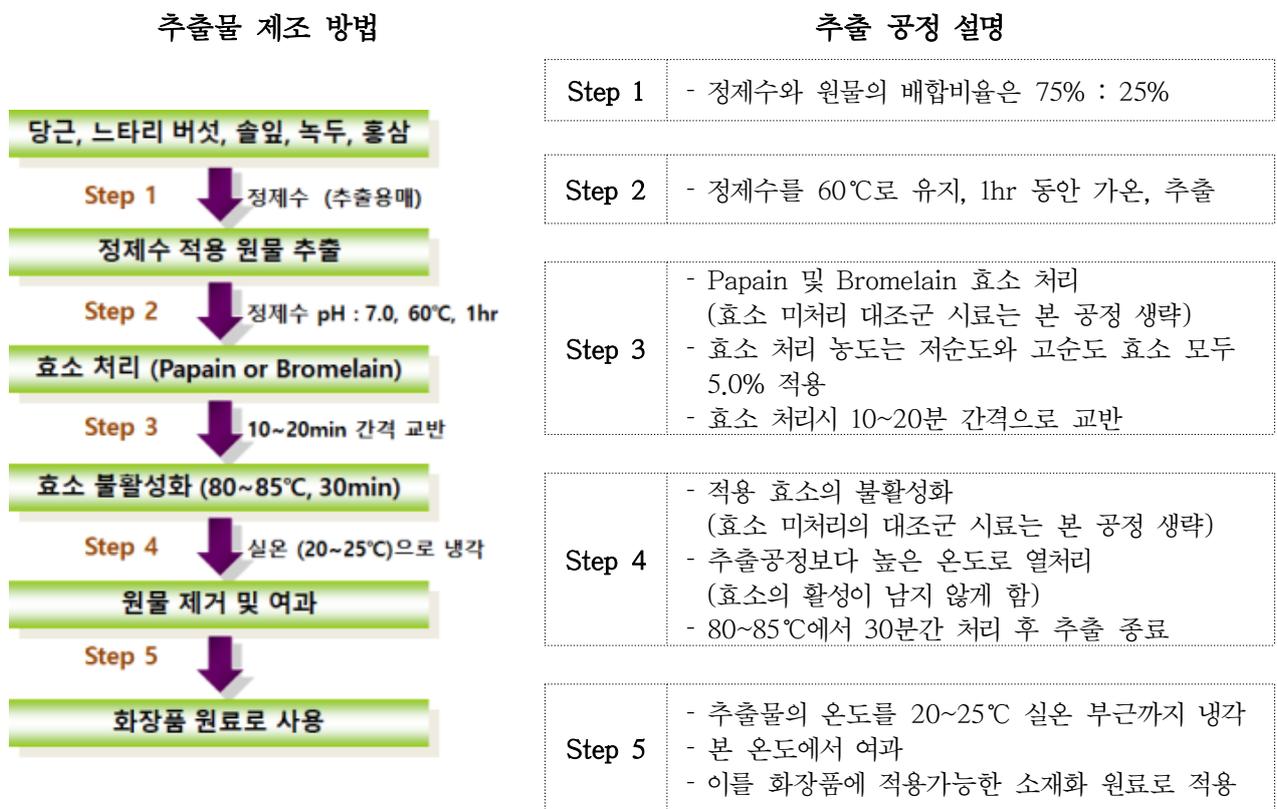


그림 1. 추출공정 및 공정별 세부 설명

(다) 개발 추출물의 화장품 소재화

1~3차년도 연구에서 개발한 추출물을 그림 2~4에 기재하였다. 1차년도와 2, 3차년도의 경우 최종 개발하는 완제품이 각각 크림 모델링 마스크와 기초 화장품인 크림으로 상이했기 때문에 원물은 동일하지만 적용 가능한 추출물이 다를 것으로 예상하여 동일 원물인 당근과 느타리버섯을 대상으로 순도가 다른 효소를 처리하여 추출물을 개발하였다.

① 당근, 느타리버섯을 원물로 한 추출물 개발

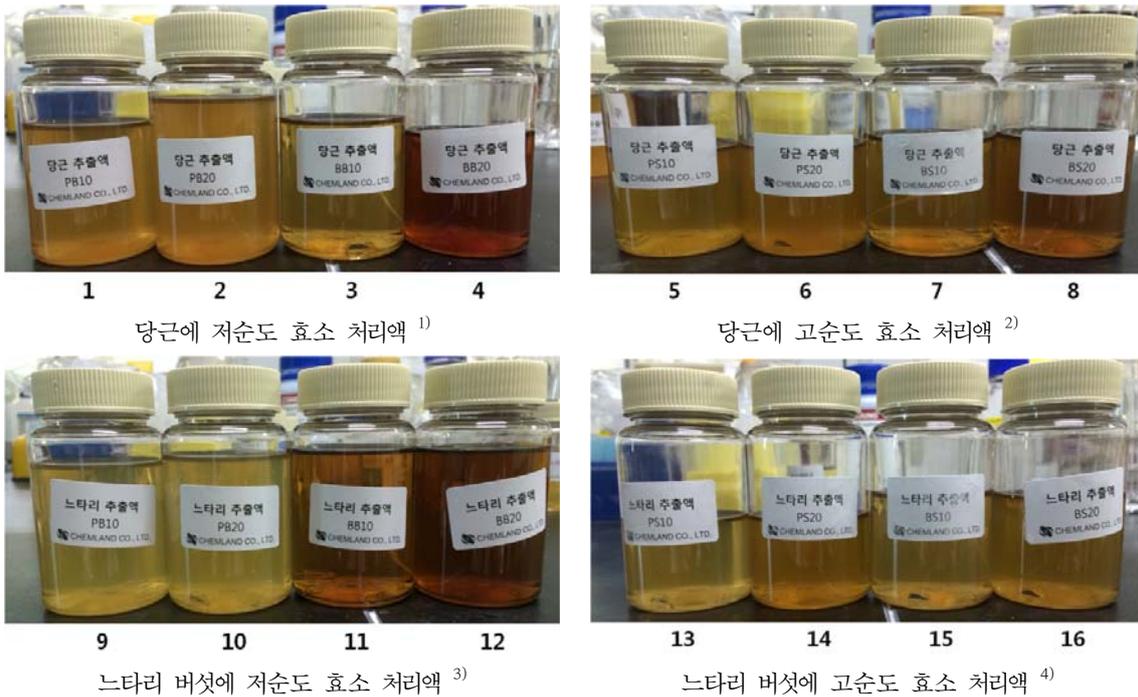


그림 2. 당근, 느타리버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물

- |                                                |                                                |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1) 1. 당근 PB 10 : 당근 추출액에 저순도 papain 2.5% 처리    | 2. 당근 PB 20 : 당근 추출액에 저순도 papain 5.0% 처리       |
| 3. 당근 BB 10 : 당근 추출액에 저순도 Bromelain 2.5% 처리    | 4. 당근 BB 20 : 당근 추출액에 저순도 Bromelain 5.0% 처리    |
| 2) 5. 당근 PS 10 : 당근 추출액에 고순도 papain 2.5% 처리    | 6. 당근 PS 20 : 당근 추출액에 고순도 papain 5.0% 처리       |
| 7. 당근 BS 10 : 당근 추출액에 고순도 Bromelain 2.5% 처리    | 8. 당근 BS 20 : 당근 추출액에 고순도 Bromelain 5.0% 처리    |
| 3) 9. 느타리 PB 10 : 느타리 추출액에 저순도 papain 2.5% 처리  | 10. 느타리 PB 20 : 느타리 추출액에 저순도 papain 5.0% 처리    |
| 11. 느타리 BB 10 : 느타리 추출액에 저순도 Bromelain 2.5% 처리 | 12. 느타리 BB 20 : 느타리 추출액에 저순도 Bromelain 5.0% 처리 |
| 4) 13. 느타리 PS 10 : 느타리 추출액에 고순도 papain 2.5% 처리 | 14. 느타리 PS 20 : 느타리 추출액에 고순도 papain 5.0% 처리    |
| 15. 느타리 BS 10 : 느타리 추출액에 고순도 Bromelain 2.5% 처리 | 16. 느타리 BS 20 : 느타리 추출액에 고순도 Bromelain 5.0% 처리 |

본 연구에서는 당근과 느타리버섯을 원물로 papain과 bromelain 효소를 고순도와 저순도 효소를 각각 서로 다른 함량으로 처리하여 총 16종의 시료를 제조하였다. (원물 2종 × 효소 2종 × 순도 2종 × 적용농도 2종 = 총 16종)

상기의 공정으로 당근 및 느타리버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물의 경우 이들의 색상이나 투명도는 시료마다 모두 상이하였고, 외관 색상의 경우 16종 시료 모두 처리한 효소의 종류에 관계없이 적용 효소의 농도가 높을수록 색상이 진해진 것을 알 수 있었다.

② 당근, 느타리버섯, 솔잎을 원물로 한 추출물 개발  
 상기 원물을 대상으로 2차년도에 개발한 추출물을 그림 3에 기재하였다.



(전면) 당근 적용 추출물 5종



(후면) 당근 적용 추출물 5종



(전면) 느타리버섯 적용 추출물 5종



(후면) 느타리버섯 추출물 5종



(전면) 솔잎 적용 추출물 5종



(후면) 솔잎 적용 추출물 5종

그림 3. 당근, 느타리버섯 및 솔잎을 원물로 한 효소 처리 추출물

※ 제품명에 기재된 약어 설명

- SEL : Papain 효소 처리
- LP : Low Purity, 저순도 효소로 처리
- ANFLA : Bromelain 효소 처리
- HP : High Purity : 고순도 효소로 처리

그림 3에는 당근, 느타리버섯, 솔잎을 원물로 한 효소 처리 추출물에 대해 기재하였다. 원물별, 적용 효소별 색상은 모두 상이하였다. 1차년도 연구를 통해 적용 효소의 농도간 차이가 거의 없었음을 확인한 후, 적용 효소의 농도를 5%로 고정시켜 서로 다른 추출물에 동일한 농도로 적용하였다.

③ 녹두, 홍삼을 원물로 한 추출물 개발

3차년도에 녹두 및 홍삼을 원물로 적용하여 개발한 효소 처리 추출물을 그림 3-1에 기재하였다.



(전면) 녹두 적용 추출물 5종



(후면) 녹두 적용 추출물 5종



(전면) 홍삼 적용 추출물 5종



(후면) 홍삼 적용 추출물 5종

그림 3-1. 당근, 느타리버섯 및 솔잎을 원물로 한 효소 처리 추출물

※ 제품명에 기재된 약어는 2차년도 때와 동일

그림 3-1에서와 같이 홍삼을 원물로 한 추출물이 녹두를 사용했을 경우보다 전반적으로 색상이 진하였다. 녹두를 원물로 한 추출물의 경우 아무 효소도 처리하지 않은 대조군 시료는 미적색을 띄었고, 효소 처리한 시료군에서는 Papain으로 처리했을 때보다 Bromelain을 처리한 시료가 더 진한 황색을 나타냈다. 홍삼을 적용한 추출물의 경우 대조군 시료와 Bromelain 저순도 효소로 처리한 2종의 추출물의 색상이 연한 황색을 띄었고, 나머지 추출물들의 색상은 유사하였다.

(라) 개발 추출물의 아미노산 분석

본 연구에서는 3년간에 걸쳐 개발한 추출물에서의 아미노산을 정량하였다. 일반적으로 추출물에 단백 분해효소를 처리할 경우 추출물 내 단백질이 아미노산으로 분해, 전환되어 이들의 수치가 증가된다. 이로 서로 다른 효소처리를 통해 추출물 내 아미노산 조성 및 농도전환의 정도를 확인하기 위해 본 분석을 수행하였다.

① 실험방법

본 연구는 기초과학지원연구소에 의뢰하여 아래의 실험방법을 통해 분석을 진행하였다.

㉠ Liquid 상태의 시료를 30 $\mu$ l씩 분주

㉡ 취한 시료 각각을 완전히 건조

㉢ PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체화

(유도체화 용액 : MeOH: H<sub>2</sub>O: TEA: PITC= 7: 1: 1: 1)- 20 $\mu$ L, 상온에서 30분간 반응

㉣ 시료를 완전히 말린 후 200 $\mu$ l의 A solvent에 용해

㉤ 원심분리 후 상층액을 따서 HPLC의 autosampler로 이동

(A solvent에 녹인 시료는 0.45  $\mu\text{m}$  filter로 filtering 후 사용)

② HPLC Condition

- HPLC : Hewlett Packard 1100 Series
- Column : Waters Nova-Pak C18 4 $\mu\text{m}$  (3.9 $\times$ 300 mm)
- Column oven temperature : 46  $^{\circ}\text{C}$
- HPLC pump : HP 1100 Series, Binary Pump
- HPLC injector : HP 1100 Series, Autosampler
- Variable Wavelength Detector : HP 1100 Series, 254 nm

③ 실험 결과

㉑ 당근을 원물로 한 효소 처리 추출물

표 1에는 당근을 원물로 한 효소 처리 추출물에서의 아미노산 조성과 그 농도를 기재하였다. 저순도의 Papain 5% 처리시 아미노산 총량은 603  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이었던 반면, 고순도 처리시 4,757  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 약 680%의 증가율을 보였다. 그러나 Bromelain의 경우 동일 농도에 대해 저순도 효소 처리시 생성된 아미노산 총량은 1,334  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이었던 반면, 고순도 처리시 1,129  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 약 8%의 감소되었다. 이로써 Papain의 경우 Bromelain으로 처리했을 경우에 비해 효소 순도에 따라 생성되는 아미노산의 농도에 차이가 있음을 알 수 있었다. 이 중 Papain 고순도 효소 처리시 GLY, ALA, TRP, LYS 의 농도가 다른 아미노산에 비해 높았다.

표 1. 당근을 원물로 한 효소처리 추출물의 아미노산 조성 변화

AA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Papain (저순도)		Papain (고순도)		Bromelain (저순도)		Bromelain (고순도)	
	당근 PB10	당근 PB20	당근 PS10	당근 PS20	당근 BB10	당근 BB20	당근 BS10	당근 BS20
CYS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	34.35	21.38	91.26	122.22	69.94	72.77	53.82	58.22
GLU	31.96	17.90	168.27	278.64	10.30	9.30	8.92	8.96
ASN	90.53	63.07	285.60	444.13	163.30	184.16	126.98	154.62
SER	40.77	30.36	132.20	212.34	62.07	69.00	48.95	59.67
GLN	62.64	45.99	104.88	114.33	88.91	88.20	84.71	68.05
GLY	34.95	14.61	397.61	729.77	11.77	15.55	9.89	13.90
HIS	8.49	5.92	37.72	64.57	12.04	11.57	8.91	10.28
ARG	53.46	45.08	181.95	295.82	64.71	72.41	46.52	56.16
THR	15.29	12.81	69.08	120.08	18.80	25.84	15.25	21.43
ALA	196.02	149.91	322.13	420.77	289.13	279.24	216.40	237.33
PRO	9.03	7.36	21.81	29.27	16.64	21.58	13.56	18.92
TYR	14.17	13.56	67.97	129.41	36.63	60.38	26.29	48.34
VAL	26.43	20.34	76.21	130.08	47.53	62.07	35.51	50.85
MET	6.85	5.35	13.89	22.51	24.45	37.76	17.78	31.98
ILE	22.76	19.15	90.97	156.65	40.63	57.78	29.05	46.78
LEU	34.82	31.72	151.79	282.83	45.31	73.43	33.92	60.13
PHE	19.75	16.75	84.54	153.95	29.00	46.84	22.92	38.62
TRP	69.45	57.65	320.29	544.12	77.66	92.11	77.80	99.83
LYS	35.22	24.69	218.29	505.68	44.46	54.78	30.68	45.03
<b>합계</b>	<b>806.93</b>	<b>603.62</b>	<b>2,836.45</b>	<b>4,757.17</b>	<b>1153.29</b>	<b>1,334.75</b>	<b>907.86</b>	<b>1,129.09</b>

Bromelain의 경우 추출 중 저순도와 고순도 효소를 통해 생성된 전체 아미노산의 총량에는 큰 차이를 보이지 않았고, 오히려 고순도 아미노산으로 처리했을 시 생성된 전체 아미노산의 함량이 감소하였다. Bromelain 처리시 가장 많은 비중을 차지하는 아미노산은 Alanine 이었다.

당근을 원물로 한 효소처리 추출물의 경우 고순도의 Papain 처리시 생성된 아미노산 총량은 급격히 증가했던 반면, Bromelain 처리시에는 Papain 처리시보다 오히려 낮은 정량값을 보였다.

㉔ 느타리버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물

표 2에서 느타리버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물에서의 아미노산 조성 및 농도를 나타내었다. 앞선 당근을 원물로 한 추출물에서와 마찬가지로 Bromelain의 경우 효소의 순도에 따라 정량된 아미노산에는 큰 차이를 보이지 않았으나, Papain의 경우에는 효소의 순도에 따라 정량된 아미노산의 농도가 달랐다. 특히 효소 농도 5%를 적용한 추출물에서의 아미노산 총량은 저순도 효소 처리시 2,904  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이었던 반면, 고순도 효소 처리시 7,146  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 약 146%의 증가율을 보였다.

표 2. 느타리버섯을 원물로 한 효소처리 추출물의 아미노산 조성 변화

AA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Papain (저순도)		Papain (고순도)		Bromelain (저순도)		Bromelain (고순도)	
	느타리PB10	느타리PB20	느타리PS10	느타리PS20	느타리BB10	느타리BB20	느타리BS10	느타리BS20
CYS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	62.69	67.42	117.09	150.81	116.03	109.63	122.81	112.94
GLU	162.41	163.85	346.81	474.29	86.22	62.20	101.28	64.38
ASN	56.69	68.22	252.87	381.20	122.40	163.51	143.16	182.27
SER	93.14	105.94	200.69	287.88	136.05	140.47	152.37	161.10
GLN	166.61	166.10	196.83	205.75	211.07	204.53	262.01	199.84
GLY	40.62	60.10	450.40	816.44	43.01	47.05	48.96	54.48
HIS	73.00	75.65	129.95	168.32	94.99	86.70	107.66	98.43
ARG	259.39	290.62	437.70	574.43	313.77	301.81	384.79	340.77
THR	93.49	103.16	160.82	222.13	119.34	117.72	141.43	131.87
ALA	270.46	294.82	355.66	451.42	367.41	357.06	404.78	406.84
PRO	26.00	28.65	37.23	43.59	31.68	36.33	38.72	40.86
TYR	100.70	129.91	169.93	259.90	188.76	189.85	207.72	223.98
VAL	96.34	109.34	136.82	208.25	152.32	153.15	173.65	172.44
MET	25.20	35.05	25.47	46.65	65.22	75.86	70.91	85.29
ILE	86.69	105.16	170.49	263.67	174.61	174.63	194.41	199.92
LEU	162.14	216.48	290.75	455.49	206.79	220.57	234.44	256.01
PHE	130.31	164.12	215.58	321.93	206.76	202.11	227.15	238.72
TRP	393.48	461.75	771.19	1048.29	540.95	507.93	659.24	666.65
LYS	200.31	257.71	483.69	765.91	406.27	358.46	422.85	421.38
<b>합계</b>	<b>2,499.67</b>	<b>2,904.03</b>	<b>4,949.98</b>	<b>7,146.33</b>	<b>3,583.67</b>	<b>3,509.60</b>	<b>4,098.33</b>	<b>4,058.16</b>

Papain 고순도 효소로 처리한 추출물의 경우 TRP, LYS, ARG, ALA 등의 아미노산이 많은 비중을 차지했으며, Bromelain 으로 처리시에는 TRP, LYS 함량이 높게 정량되었다. 느타리버섯을 원물로 한 추출물의 경우 가장 많이 생성된 아미노산은 TRP, ALA 이었다. Papain 처리시 저순도보다 고순도 효소로 처리할 경우 단백질에서 분해된 아미노산이 비교적 높게 측정되었고, Bromelain 으로 처리했을 경우에는 효소의 순도와는 관계없이 일정한 농도 수준의 아미노산이 생성됨을 확인하였다.

㉔ 솔잎을 원물로 한 효소처리 추출물

이전 연구에서 확인한 결과 추출물에 적용한 효소의 순도 및 적용 농도가 최종 아미노산 정량수치에 많은 영향을 미치지 않음을 확인하여 아미노산 분석시 고순도 효소만으로 추출물을 개발하였고, 그 적용 농도는 5%로 하였다. 효소 처리 전후 정량된 아미노산의 종류 및 함량이 다를 수 있으므로 효소처리하지 않은 추출물을 본 실험에서의 대조군 시료로 이용하였다. 솔잎을 원물로 한 효소처리 추출물에서의 아미노산 정량값을 표 3에 기재하였다.

표 3. 솔잎을 원물로 한 효소처리 추출물에서의 아미노산 정량

Amino Acid	효소 무처리		Papain 처리		Bromelain 처리	
	함량 (μg/ml)	비율 (%)	함량 (μg/ml)	비율 (%)	함량 (μg/ml)	비율 (%)
CYS	3.84	1.73	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	3.54	1.60	2.10	2.15	18.73	5.73
GLU	0.00	0.00	4.23	4.34	6.71	2.05
ASN	3.35	1.51	5.32	5.46	58.36	17.84
SER	11.78	5.31	2.65	2.72	11.04	3.38
GLN	20.69	9.33	1.46	1.50	4.81	1.47
GLY	29.74	13.41	7.92	8.13	6.28	1.92
HIS	15.93	7.18	1.04	1.07	2.86	0.87
ARG	89.91	40.54	7.14	7.33	24.17	7.39
THR	3.29	1.48	1.91	1.96	6.68	2.04
ALA	11.89	5.36	8.63	8.85	26.17	8.00
PRO	7.96	3.59	11.03	11.32	23.98	7.33
TYR	2.81	1.27	6.86	7.04	17.69	5.41
VAL	0.96	0.43	4.59	4.71	19.07	5.83
MET	1.62	0.73	4.35	4.46	7.26	2.22
ILE	0.83	0.37	6.24	6.40	16.58	5.07
LEU	0.79	0.36	4.55	4.67	20.81	6.36
PHE	3.79	1.71	5.98	6.14	19.20	5.87
TRP	4.72	2.13	5.10	5.23	16.92	5.17
LYS	4.34	1.96	6.37	6.54	19.71	6.03
합계	221.78	100.00%	97.46	100.00%	327.04	100.00%

이 경우 Bromelain 처리시 3종의 추출물 중 가장 많은 농도의 아미노산이 정량되었고, 반면 Papain 처리시에는 열수 추출물에 비해서도 아미노산 농도가 낮게 확인되었다. 아무 효소도 처리하지 않은 열수 추출물의 경우 ARG, GLY의 순으로 높은 함량을 보였고 Bromelain 처리시에는 ASN의 함량이 가장 높았다. Papain 처리시에는 고른 아미노산 분포를 보였고, 이중 PRO가 가장 많은 비중을 차지하였다. 특이한 것은 효소 미처리시에는 함량 아미노산 중 하나인 CYS가 검출되었으나 효소 처리시에는 확인되지 않아, 효소 처리로 인해 CYS는 다른 아미노산군으로 전환되었거나 소실됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 효소처리시 원래 원물이 갖고 있는 아미노산과는 다른 조성으로 변화되고, 각각의 아미노산 정량값 또한 원래의 아미노산 농도와는 전혀 다른 농도로 전환됨을 확인하였다.

㉕ 녹두를 원물로 한 효소처리 추출물

상기의 연구와 동일한 방법으로 녹두 및 홍삼을 원물로 한 열수 및 효소 처리 추출물에서의 아미노산

조성을 확인하였고, 이를 표 4에 기재하였다.

표 4. 녹두를 원물로 한 열수 및 효소처리 추출물의 아미노산 조성 변화

Amino Acid	효소 무처리		Papain 처리		Bromelain 처리	
	함량 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	비율 (%)	함량 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	비율 (%)	함량 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	비율 (%)
CYS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	3.92	12.16	55.73	2.07	57.35	5.62
GLU	6.12	18.99	189.43	7.04	10.60	1.04
ASN	1.67	5.18	209.10	7.77	141.73	13.90
SER	1.19	3.69	119.64	4.44	49.73	4.88
GLN	0.31	0.96	14.94	0.55	21.92	2.15
GLY	0.69	2.14	524.29	19.48	23.01	2.26
HIS	1.45	4.50	54.58	2.03	11.59	1.14
ARG	6.11	18.96	205.03	7.62	73.75	7.23
THR	0.81	2.51	77.14	2.87	32.24	3.16
ALA	1.88	5.83	119.67	4.45	79.39	7.78
PRO	1.34	4.16	173.70	6.45	34.17	3.35
TYR	1.47	4.56	110.20	4.09	89.41	8.77
VAL	0.00	0.00	51.73	1.92	59.85	5.87
MET	0.00	0.00	42.21	1.57	51.60	5.06
ILE	0.00	0.00	120.29	4.47	60.41	5.92
LEU	0.86	2.67	202.33	7.52	92.31	9.05
PHE	0.00	0.00	144.41	5.36	80.41	7.88
TRP	3.39	10.52	104.69	3.89	50.47	4.95
LYS	1.01	3.13	172.96	6.42	0.00	0.00
<b>합계</b>	<b>32.23</b>	<b>100.00</b>	<b>2,692.08</b>	<b>100.00</b>	<b>1,019.94</b>	<b>100.00</b>

녹두를 원물로 한 효소 처리 추출물의 경우 Papain과 Bromelain 처리시 아미노산 함량이 급격히 증가함을 알 수 있었다. 무처리 효소 대비 Papain 처리 추출물에서의 아미노산 정량값은 약 8,300% 이상, bromelain 처리시에는 3,000% 이상의 증가율을 보여 앞선 솔잎을 원물로 한 추출물과는 다른 양상을 보였다. 이중 열수 추출물의 경우 VAL, MET, ILE 등의 비극성 아미노산은 정량되지 않았고, 이중 가장 많은 비중을 보인 아미노산은 극성을 나타내는 ARG 이었다. Papain 처리 추출물의 경우 GLY이 가장 많은 비중을 차지했으며, Bromelain 처리시 가장 많은 비중을 차지한 것은 ASN 이었다.

녹두에는 약 24~26%의 단백질이 함유되어 본 연구에서 사용한 원물 중 단백질 함량이 높은 편에 속한다. 효소처리로 아미노산 함량이 증가한 것은 다량의 단백질이 서로 다른 효소처리로 인해 다량의 아미노산으로 전환되어 그 농도가 급격히 증가된 것으로 판단되며, 이중 Papain 의 경우 녹두 내 단백질에 대한 분해능력이 높았음을 알수 있었다.

㉞ 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물

이상의 연구와 동일한 방법으로 홍삼을 원물로 한 열수 및 효소처리 추출물을 개발하였고, 이에 대한 아미노산 조성을 표 5에 기재하였다.

표 5. 홍삼을 원물로 한 열수 및 효소처리 추출물의 아미노산 조성 변화

Amino Acid	효소 무처리		Papain 처리		Bromelain 처리	
	함량 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	비율 (%)	함량 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	비율 (%)	함량 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	비율 (%)
CYS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	20.82	3.18	46.67	2.29	37.54	4.33
GLU	24.59	3.76	142.92	7.00	20.39	2.35
ASN	7.91	1.21	144.39	7.07	82.72	9.54
SER	4.41	0.67	68.55	3.36	21.32	2.46
GLN	0.00	0.00	3.71	0.18	9.85	1.14
GLY	0.84	0.13	362.33	17.75	10.51	1.21
HIS	3.08	0.47	30.24	1.48	6.08	0.70
ARG	559.03	85.51	456.16	22.35	345.92	39.89
THR	1.91	0.29	45.83	2.25	11.55	1.33
ALA	9.31	1.42	84.59	4.14	38.45	4.43
PRO	3.65	0.56	107.43	5.26	18.22	2.10
TYR	1.73	0.26	63.15	3.09	36.65	4.23
VAL	3.10	0.47	49.55	2.43	24.11	2.78
MET	3.70	0.57	0.00	0.00	25.88	2.98
ILE	1.33	0.20	89.97	4.41	31.09	3.59
LEU	1.80	0.28	124.22	6.09	41.06	4.74
PHE	0.00	0.00	73.24	3.59	29.99	3.46
TRP	3.07	0.47	61.69	3.02	32.12	3.70
LYS	3.48	0.53	86.36	4.23	43.64	5.03
합계	653.75	100.00	2,041.00	100.00	867.10	100.00

열수 추출물 대비 Papain 및 Bromelain 처리시 아미노산 농도는 모두 증가하였고, 이중 Papain의 경우 열수추출물 대비 약 212%의 증가율을 보여 약 32%의 증가율을 보인 bromelain 처리 추출물에 비해 아미노산 증가폭이 높았다. 열수 추출물에서의 ARG 비율은 85%로 확인되어 본 연구에서 확인한 국내 농산자원 적용 추출물 내 아미노산 중 단일 성분으로는 최대의 함량을 보였다.

그 이유로 홍삼은 수삼을 증기로 수회 찌는 과정을 통해 제조되는데, 이때 수삼에 함유된 ARG가 Maltose와 반응하여 홍삼에 ARG-FRU-GLU (Arginine-fructose-glucose) 조성의 복합 아미노당이 생성된다. 열수 추출물에서 확인된 ARG는 바로 이 성분에서 유래한 것으로 판단된다.

Papain 처리시에도 ARG의 비율이 가장 높았고, GLY가 그 다음으로의 높은 비율을 보였으며, Bromelain 처리시에도 ARG가 가장 높은 농도를 보여 ARG는 홍삼 추출물에 존재하는 대표 아미노산임을 알 수 있었다. Papain과 Bromelain으로 처리시 극성과 비극성을 나타내는 아미노산이 모두 높은 농도로 증가하여 홍삼추출물에 대해서는 이들의 효소 처리로 다량의 아미노산을 얻을수 있었다. 이중 함황 아미노산인 CYS는 모든 추출물에서 확인되지 않았고, MET 역시 Papain 처리시에는 확인되지 않았으나, Bromelain 처리시에는 열수추출물 대비 비교적 많은 농도 증가를 보였다.

즉 홍삼을 원물로 한 추출물에서 Papain 처리시에는 함황 아미노산은 정량되지 않았던 반면, Bromelain 처리시에는 함황아미노산인 MET이 낮은 농도로 확인되었다.

## (2) 할랄 인증용 화장품 개발

### (가) 마스크팩 개발

본 연구에서는 당근 및 느타리버섯을 원물로 한 추출물 적용 마스크팩을 개발하였다. 기존 화장품시장에서 상용화된 제품은 부직포 type 인데, 자사에서 할랄 수출국으로 선정한 인도네시아의 경우 모델링 마스크 제품군의 수요가 높기 때문에, 본 연구에서는 모델링팩 중 할랄인증을 받기에 적합한 모델링 마스크를 타겟제품으로 선정, 개발하였다.

#### ① Clay Modeling mask

현재 시판중인 마스크팩의 종류로는 부직포 type 부터 수년전 방송 매체를 통해 그 수요가 급증했던 하이드로겔 마스크에 이르기까지 이들 제품군의 종류가 다양해졌다. 최근 아시아 국가에서의 국내 마스크팩 제품군 수요가 급증하고, 한류 문화 영향에 의해 마스크 제품군의 수출 물량과 국내 마스크팩 시장도 급격히 성장하였다.

Clay Modeling Mask는 파우더를 물에 혼합한 후 일정시간이 경과되면 굳는 특성을 이용한 제품이다. Gel화되는 특성 때문에 모델링 (Modeling) 마스크라는 이름으로도 불리며, 겔화 후 제품의 물성이 고무와 같다고 해서 러버 (Rubber) 마스크라고도 불리고 있다. Clay 마스크는 피부 세정 후에도 제거되지 않은 노폐물을 흡착하여, 피부에서 제거하는 특성이 있고, 이때 마스크 안에 함유된 영양 성분들이 피부에 전달시킬 수 있어 현재 많은 업체에서 다양한 종류의 마스크 제품군이 개발중에 있다.

일반적으로 모델링 마스크의 주 효능은 보습이지만, 최근 콜라겐, 참숯, 녹차 등 다양한 컨셉원료를 적용하여 보습효능 이외에 피부 탄력, 미백 등의 효능 제품들이 출시되고 있다. 이로써 기존 마스크 제품군에서 내세우기 어려웠던 다양한 특징들을 효능으로 마케팅 중인 업체 수는 꾸준히 늘고 있다.

본 사업으로 개발된 마스크팩의 전 성분은 표 6에 기재하였다. 규조토 (Diatomaceous Earth)와 카올린(Kaolin)이 Clay modeling pack 의 주 성분으로, 이중 규조토는 다공성 구조로 되어 있어 영양성분의 포집능력 및 피부 속 잔존하는 노폐물을 흡착하는데 효과적인 것으로 알려져 있다.

표 6. Clay Modeling Mask 제품에 대한 전성분

제품명	제품 전성분
Clay Modeling Mask	Diatomaceous Earth, Kaolin, Silica, Sodium Alginate, Calcium Sulfate, Glucose, Tetrapotassium Pyrophosphate

Clay modeling mask의 사용방법 및 순서는 그림 4에 기재하였다.

- ㉠ 먼저 깨끗이 세안 후, Clay modeling powder를 전용 용기에 계량
- ㉡ 파우더에 적당량의 물을 첨가한 뒤 균일하게 혼합.
- ㉢ 단시간 내에 그림 4의 ④와 같이 분산되지 않은 파우더가 보이지 않도록 균일하게 분산
- ㉣ 피부에 균일한 두께로 도포
- ㉤ Dough가 완전히 굳은 후 일정 시간 경과한 뒤 제거



그림 4. Clay modeling mask 사용법

위의 전성분으로 개발된 Clay modeling mask 의 시간에 따른 보습력과 연관된 액상 성분의 함유능력을 그림 5에 기재하였다. 일반적으로 화장품에서 보습력을 제공하기 위해서는 물 대신 오일이 주로 많이 사용된다. 그러나 수상과 파우더를 특정 비율로 혼합해야 하는 본 제품군에서는 오일을 사용하기는 쉽지 않으므로 보습력을 나타내는 물을 얼마나 오랫동안 clay dough가 보유하고 있는지가 가장 중요한 특성 중 하나이다. 마스크팩 내에 수상 보유 능력을 아래의 방법으로 간단히 확인하였다.



그림 5. Clay modeling mask 도포 후 시간경과에 따라 배어나온 액상성분 비교

이는 동일한 Clay modeling mask로 2종 dough로 만들고 이를 A4지에 도포한 뒤 1시간과 12시간이 경과한 후 dough 아래에 둔 A4지에 묻은 액상 성분이 얼마나 남아있는지 확인하여 dough가 갖는 보습력을 육안으로도 쉽게 구별하도록 도기한 것이다. 그림 5의 ① 하단의 경우 dough 모양을 따라 액상 성분들이 배어 나온 것을 육안으로 쉽게 확인할 수 있으나, 그림 ②의 하단에서는 ①과 같은 dough지만 배어나온 액상 성분을 육안으로 확인하기 어려웠다.

즉 위 그림 5의 ①에서는 Clay modeling mask 를 A4지 상에 도포, 겹화 1시간 후 확인시 Dough에서 유래한 액상 성분에 의해 일정 수준의 보습력이 있으나, 동일 제품을 12시간 이상 두고 관찰한 경우 A4지에 배어나온 액상성분은 거의 없었다. 이로 본 제품군의 경우 시간 경과에 따라 보습력을 유지하는 능력이 그다지 뛰어나 않음을 알 수 있었다.

이와 같이 시간경과에 따라 보습력이 나타나지 않는다면, 보다 보습력을 강화할 수 있는 제품 개발이 필요한 것으로 판단된다. 그러므로 이보다 보습력을 강화시킬 수 있는 제품 개발로 다양한 종류의 추출물을 이들에 적용하려 한다.

② Glucose Modeling mask

본 연구에서는 Clay Modeling Mask에서 확인된 부족한 보습력을 보다 강화시킨 제품을 개발하였다. 보습력을 보다 강화시키기 위해 앞선 Clay modeling mask에서 Glucose 농도를 강화시킨 Glucose modeling mask를 개발하였고, 이의 전 성분을 표 7에 기재하였다.

표 7. Glucose Modeling Mask 제품에 대한 전성분

제품명	제품 전성분
Glucose Modeling Mask	Glucose, Zea Mays (Corn) Starch, Silica, Calcium Sulfate, Algin, Tetrapotassium Pyrophosphate

기존 Clay mask에서는 규조토, 카올린 등의 원료가 주성분 이었으나, 본 제품군에서는 이들 대신 Glucose의 농도를 높여 피부에 보습력을 제공할 수 있게 하였다. 그러나 본 제품도 제조 후 시간 경과 및 보관 온도를 달리할 경우 문제점이 발견되었고, 이를 그림 6에 기재하였다.



그림 6. Glucose modeling mask의 보관 온도 안정성 test 결과

\* Cycling chamber 온도 조건 : 하루 8시간 간격으로 -5°C, 25°C, 50°C 의 온도로 전환

Glucose modeling mask를 제조 후 Cycling chamber (8시간 간격으로 -5~50°C 범위에서 하루 3회 온도 변화)에서 2주간 보관한 결과 dough의 외관이 균일하지 않게 변화되었다. 제조 직후 Glucose modeling mask는 광택이 있고, 표면이 매끄러웠던 반면, cycling chamber에서 2주간 보관했을 시 광택이 떨어지면서 표면이 균일하지 않았다. 이는 단지 시각적인 부분에만 영향을 미치는 것이 아니라 궁극적으로 제품의 품질에도 좋지 못했던 것을 확인하였다.

본 제품은 국내뿐 아니라 인도네시아 시장을 목표로 하고 있기 때문에 온도 변화에 대한 안정성은 확보되어야 하고 온도 안정성은 modeling mask 품질을 결정하는 중요한 요소 중 하나이다. 본 제품군에 대한 온도 안정성을 확보하지 않으면 그만큼 수출을 목표로 하는 인도네시아 시장에서 긍정적인 반응을 얻지 못하게 된다.

이로써 본 Glucose modeling mask 의 경우 온도에 대한 안정성이 좋지 못하고, 본 사업에서 목표로 하는 추출물 적용에 제한을 받으므로 이 두 가지 요건을 충족시킬 수 있는 새로운 modeling mask 제품군 개발이 필요하였다.

### ③ Cream Modeling Mask

본 연구에서는 이전 Glucose modeling mask의 온도변화에 대한 안정성이 떨어지는 단점을 보완해서 액상의 효소처리 추출물을 적용할 수 있는 Cream modeling mask를 개발하였다. Cream Modeling Mask란 이전 clay 또는 glucose 마스크에 사용된 파우더를 정제수가 아닌 점도가 높은 크림에 균일하게 분산하고 이를 피부에 도포하는 제품을 말한다. 이후 일정시간이 경과한 후 피부에서 제거하는 것은 기존 modeling mask와 동일하며, 본 마스크팩의 장점은 아래 4가지로 요약하였다.

- ㉠ 액상 또는 파우더상의 모든 active ingredients 를 적용 가능
  - 기존 제품의 경우 아무리 좋은 성분이어도 파우더 상만 modeling mask 에 적용해야 하는 단점
- ㉡ 다양한 원료 제공과 함께 보습력 강화 제품의 개발이 가능
  - 기존 마스크 제형에 적용된 Glucose 와 함께 현 업계에서 보습력 제공원료로 사용되는 glycol 및 glycerin류도 본 제품군에 적용 가능
- ㉢ 파우더와 액상제에 혼합시킨 Dough의 점도를 일정하게 유지
  - 파우더 성분만 판매되는 제품의 경우 물을 파우더에 넣고 dough를 만들 때 물을 잘못 계량한다면 dough의 점도가 달라질 수 있음. 즉 물을 적정 농도 이상 첨가할 경우 dough의 점도가 낮아져 얼굴에 도포시 dough가 얼굴 밑으로 흐를수 있으며, 물을 적정 농도 이하로 적용할 경우 dough의 점도가 지나치게 높아져 얼굴에 균일하게 도포되지 않는 문제가 발생할 수 있음
  - 본 cream modeling mask에 사용되는 cream 의 점도는 10,000 cps 이상이므로 언제든지 일정 수준의 dough 점도를 유지해서 소비자가 사용할 수 있는 장점
- ㉣ 기존 제품 대비 피부에 대한 흡착이 용이
  - 기존 clay 또는 modeling mask는 물에 개어 사용했기 때문에 사람마다 피부에 대한 밀착력이 다소 차이가 났으나, 본 제형은 물 이외의 다른 성분들이 첨가되므로 피부에 대한 밀착감을 개선하여 궁극적으로 보습력을 높일 수 있음

본 제품에 대한 전성분 및 기존 Clay modeling mask 대비 보습력이 강화된 점을 표 8과 그림 7에 각각 기재하였다.

표 8. Cream modeling mask에 대한 전성분

제품명	전성분
Cream modeling mask (Powder)	Glucose, Calcium sulfate, Diatomaceous Earth, Silica, Tetrapotassium Pyrophosphate, Algin
Cream modeling mask (Cream)	Water, Butylene Glycol, Hydrogenated Castor Oil, Algin, 1,2-Hexanediol, Pearl, Fragrance, Ethylhexyl Glycerin, Disodium EDTA

Cream modeling mask 제품은 크게 파우더 (powder)와 크림(cream)제로 구분하였다. 파우더의 경우 기존 Glucose modeling mask와 비교했을 시 크게 달라진 것은 없으며, Cream제의 경우 물을 제외한 나머지 Glycol류 및 다가 알코올 성분을 첨가하여 보습력을 강화시켰고, 피부와의 부착력을 높이기 위해 일정 수준 이상의 점성을 필요로 하므로 점도 부여를 위한 여러 성분들이 첨가되었다. 이들 제품군에 대한 보습력은 이전 clay modeling mask 제품에서 사용한 것과 동일한 방법을 통해 확인하였다.



그림 7. Cream modeling mask 도포 후 시간경과에 따른 액상성분 용출량 비교

그림 7에서 ①과 ②의 하단부 회색으로 보이는 것이 cream modeling mask에서 유래한 보습력을 알 수 있는 액상 성분이다. 육안으로 확인하기에도 도포 1hr이 경과했을 때보다 12hr이 경과했을 시 dough에서 용출된 액상 성분이 보다 더 많아졌음을 확인하였다. 이는 기존 Clay 내지 Glucose Modeling Mask에서는 피부에 도포시키는 매질로 물을 사용했지만 본 제형에 적용된 매질은 물을 비롯한 glycol 및 다가 알코올 성분이 함유되었기 때문에 수분 보유 능력이 기존 clay modeling mask 제형보다 현저하게 높았음을 알 수 있다.

본 제형의 또 다른 특징 중 하나는 바로 pearl을 사용할 수 있다는 것이다. 그림 7의 노란색 dough는 색소가 함유된 특정 pearl이 적용된 것으로 시각적으로도 기존 제품군과는 차별화할 수 있다. 또한 본 마스크팩에서 매질로 사용한 액상은 그 점도를 10,000 cps 이상으로 증가시켰기에 제조 후 정치시 pearl이 침강되지 않는다. 이상 본 사업에서 기존 mask에 pearl을 첨가하여 기존 제품군과 시각적으로 차별화할 수 있는 새로운 제형의 Cream Modeling Mask를 개발할 수 있게 되었다.

지금까지의 modeling mask 3종 제품의 dough의 젤링 후 시간경과에 따른 dough의 외관변화를 그림 8에 기재하였다. Clay modeling mask의 경우 도포 직후에는 광택이 있었으나 시간이 경과함에 따라 광택이 줄어 도포 15시간 이후에는 표면이 급격하게 건조되었다. Glucose modeling mask 역시 도포 직후에는 광택이 있어 촉촉함을 유지하는 것을 육안으로도 확인할 수 있었으나, 시간이 경과함에 따라 clay modeling mask와 마찬가지로 광택이 없어지면서 그 표면도 건조해졌다.

Cream modeling mask는 도포 직후 다른 2종류의 modeling mask에 비해 광택이 살아있지 않았으나, 도포 6시간 및 15시간 경과시 다른 2종류의 제품에 비해 광택을 일정수준으로 유지하였고, 특히 15시간 경과시 매끄러운 외관을 보였다. 앞선 Cream modeling mask의 보습력을 나타낸 그림에서와 같이 도포 12hr 경과시에도 dough에 충분히 많은 양의 액상 성분을 보유하고 있는 것으로 보아 Cream modeling mask는 기존 두 제품에 비해 피부에 보습력을 충분히 제공할 수 있을 것으로 판단하였다.

Clay Modeling Mask			
	① 도포 직후	② 도포 6hr 경과	③ 도포 15hr 경과
Glucose Modeling Mask			
	① 도포 직후	② 도포 6hr 경과	③ 도포 15hr 경과
Cream Modeling Mask			
	① 도포 직후	② 도포 6hr 경과	③ 도포 15hr 경과

그림 8. Modeling Mask 3종의 시간 경과에 따른 외관 변화

이상의 결과로 본 사업에서 개발한 3종 modeling mask 중 당근 및 느타리 버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물을 적용시킬 제형은 Cream Modeling Mask로 결정하였고, 본 제품군으로 할랄 인증을 진행하였다.

#### (나) 크림 개발

앞서 개발한 효소처리 추출물을 이용하여 기초 화장품중 하나인 크림을 개발하였다. 크림의 경우 범용적으로 많이 사용중인 일반 유화 제형과 피부로의 흡수를 보다 용이하게 할수 있는 초고압 유화 제형 등의 2가지 제품군으로 나누어 개발하였다.

##### ① 초고압 유화 크림

자사의 추출물이 적용될 크림은 현재 인도네시아의 식품의약품화장품연구소 (LPPOM MUI)를 통해 할랄 인증을 받고 수출할 예정이다. 인도네시아는 고온 다습한 지역으로 무거운 사용감의 제품군을 선호하지 않기에 사용감은 크림에 있어서 중요한 요소 중 하나이다.

초고압 유화 제형의 장점은 2차 유화를 통해 유화 입자의 크기를 작고 균일하게 하여 기능성분을 비롯한 기타 영양성분 및 유화입자를 피부에 보다 효과적으로 공급한다는 점이다. 그러나 이 제품군의 단점으로 유화 입자가 작아지면 작아질수록 전체적인 크림의 안정성을 저해할 수 있다는 점이다.

본 연구에서는 초고압 유화 기법을 통해 크림을 개발한 후 서로 다른 온도 조건에서 30일간 보관한 뒤 상안정도를 관찰하였으며, 이의 결과를 그림 9에 기재하였다.

실온에서 보관한 크림은 색상변화를 수반하지 않았으나, 고온 보관 시료의 경우 상층부가 황색으로 변화하였다. 이로 본 사업에서 초고압 유화 베이스를 적용한 크림의 경우 고온 보관시 상안정도가 좋지 않게 됨을 확인하였다.

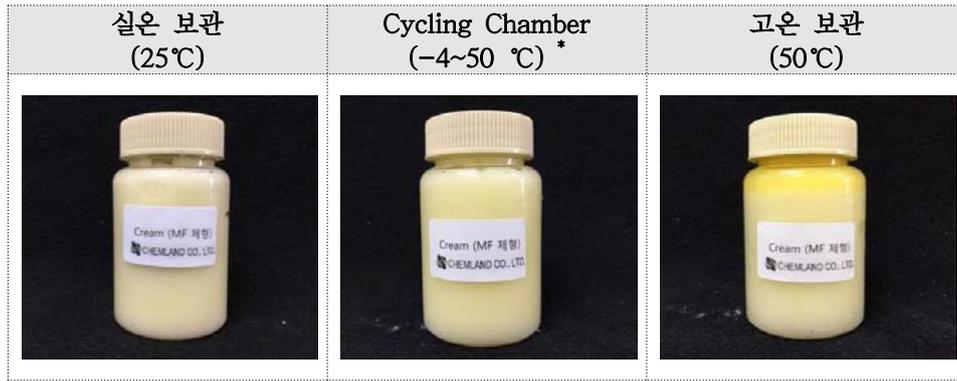


그림 9. 초고압 유화 기법 적용 개발 크림

\* -4, 25, 50 ℃ 에서 각각 8시간씩 보관한 것으로 24시간 중 총 3회의 온도 변화 수반

할랄 인증 후의 수출 대상국은 인도네시아로 수출 예정 지역은 고온 다습하기 때문에 고온에서 안정도가 떨어지는 제형은 수출 대상으로 적합하지 않으므로 이들 제품군은 초고압 유화가 아닌 일반 유화 제형을 사용하였다.

② 당근, 느타리버섯, 솔잎을 원물로 한 크림 개발

본 연구에서는 일반 유화 기법으로 제조한 크림을 인도네시아의 할랄 인증기관인 LPPOM MUI로부터 인증받은 수출 제품으로 결정하였고, 당근, 느타리버섯 및 솔잎을 원물로 한 크림을 개발하여 아래의 항목들을 확인하였다.

㉠ 개발 크림 전성분 및 비율

당근, 느타리버섯, 솔잎을 이용하여 제조한 효소처리 추출물을 적용하였고, 이들을 주 성분 적용하여 크림을 개발하였고, 이를 표 9에 기재하였다.

표 9. 추출물 함유 크림 전성분 및 배합비율

원료 (INCI Name)		함량 (%)
A	당근, 느타리버섯, 솔잎 함유 추출물 (효소 포함)	to 100
	Glycerin	5.00
	Butylene Glycol	4.00
	1,2-Hexanediol	2.00
	Niacinamide	2.00
	Betaine	0.10
	Adenosine	0.04
	Disodium EDTA	0.02
B	Stearic Acid	1.00
	Cetostearyl Alcohol	1.50
	Shea Butter	2.00
	Polysorbate-60	0.70
	Sorbitan Stearate	0.50
	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	1.00
	Hydrogenated Polydecene	4.00

	Caprylic/Capric Triglyceride	3.00
	Macadamia Nut oil	2.00
	Olive Oil	1.00
	JoJoba Oil	0.50
	Dimethicone	0.60
	Cyclopentasiloxane	2.00
C	Sodium Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate	2.00
D	Sodium Hyaluronate	1.00
	Sodium Polyglutamate	1.00
	Centella Asiatica	q.s
	Copper Tripeptide-1	q.s
	Centella Asiatica Extract	q.s
	Ethylhexylglycerin	q.s
	Fragrance	q.s
Total		100.00

#### ㉔ 개발 크림의 온도 안정성 연구

본 사업에서 개발한 일반 유화 크림을 그림 10에 기재하였다. 본 크림을 실온 (25℃ 항온), Cycling temperature (-4 ~ 50℃), 고온 (50℃, 항온) 등 서로 다른 온도에서 보관하면서 크림의 온도 안정성을 확인하였다.

서로 다른 원물 3종으로 제조한 추출물군을 적용하여 크림을 제조하고 30일 이상 서로 다른 온도에서 보관하면서 물성 변화를 확인한 결과, 당근 및 느타리버섯 적용 크림은 온도 조건에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 솔잎 적용 추출물이 함유된 크림의 경우 고온 보관시 색상이 미황색으로 변함을 확인하였다. 이는 모든 추출물에 동량의 효소가 사용되었고, 크림에 적용된 추출물도 동량 사용되었지만, 크림 물성에 차이를 보이는 이유는 추출물에 적용된 원물이 다르기 때문인 것으로 판단된다. 솔잎에는 테르펜 (Terpene) 등의 불포화 탄화수소가 다량 함유되어 있는데, 이들이 (낮은 극성을 나타내지만) 열수 추출 과정 중 일부 용출되어 최종 크림의 색상을 변하게 한 것으로 판단된다.

본 업계에서 일반적으로 사용하는 스킨케어 제품군의 온도 안정성 평가는 약 50℃의 온도에서 30일 이상 보관 후 대조군 시료와 물성 차이가 있는지 확인하는 가속 저장 실험 방법이 많이 사용된다. 이는 제품을 개발하는 단계에서 온도 안정성 및 제품의 유통기한과 보관 조건을 설정하기 위해 필요한 것으로, 가속 실험 (ex 보관 온도 및 시간 등등) 조건은 각 업체마다 차이를 보일수 있다.

본 연구에서도 가속 실험을 수행한 결과 솔잎을 원물로 한 추출물 적용 크림이 다른 것에 비해 저장 중 색상이 약간 변했으나 이는 제품 처방을 변경함으로써 극복할 수 있을 것으로 판단된다. 그 이외에 다른 물성 변화는 수반되지 않아 이들은 모두 할랄 인증 및 사업화가 가능한 제품군이라 판단된다.

원물	시료명	실온 (25°C, 향온)	Cycling Temp. (-4 ~ 50°C) <sup>1)</sup>	고온 (50 °C)	3종 시료의 색상
당근 적용 추출물 함유	Carrot SEL <sup>2)</sup> Cream				
	Carrot ANFLA <sup>3)</sup> Cream				
느타리버섯 적용 추출물 함유	Mushroom SEL Cream				
	Mushroom ANFLA Cream				
솔잎 적용 추출물 함유	Pine needle SEL Cream				
	Pine needle ANFLA Cream				

그림 10. 서로 다른 온도에서 당근, 느타리 및 솔잎을 원물로 한 추출물 적용 크림의 색상 변화

<sup>1)</sup> 온도 변화 조건 - 하루 (24시간) 중 각각 -4°C에서 8시간, 25°C에서 8시간, 50°C에서 8시간 유지

<sup>2)</sup> SEL : Papain 효소를 처리한 추출물 적용 크림

<sup>3)</sup> ANFLA : Bromelain 효소를 처리한 추출물 적용 크림

#### ㉔ 개발 크림의 점도

본 연구에서는 상기 개발한 크림을 30일간 서로 다른 온도에서 보관한 후 물리적 특성 중 점도를 측정하였으며, 그 결과를 표 10에 기재하였다.

실험에 적용한 모든 크림의 점도는 실온 보관시보다 고온 보관시 전반적으로 낮아졌다. 보관온도를 달리한 cycling chamber에서의 실험에서 점도는 실온 대비 5% 전후로 점도가 상승했으나, 고온에서 보관시에는 실온 대비 10% 내외 또는 그 이상으로 점도가 강하되었다. 즉, cycling chamber에서 크림의 점도는 실온에서 보관한 시료와 비교해볼 때 일률적으로 증가한 반면, 고온 보관시의 점도는 실온대비 감소하였다. 이는 크림의 경우 보관온도가 변하는 과정 중 -4~50°C 까지 급격한 온도 변화를 수반함

에 따라 고온에서는 조직이 연해지는 반면, 0℃ 이하 온도에서는 연해진 조직이 경화되므로, 실온에서 보관한 것과 큰 차이가 없었던 반면 50℃의 고온에서만 보관했던 시료의 경우 온도 에너지에 의해 점증제가 약화되어 시간 경과에 따라 이들의 점도는 서서히 낮아진 것으로 판단된다.

표 10. 추출물 적용 크림의 보관 온도에 따른 점도 변화

단위 : cps, 적정점도 : 45,000~65,000 cps

원물	시료명	실온 (25℃, 향온)	Cycling Temp. (-4 ~ 50℃)		고온 (50℃)	
			점도	실온대비 점도 변화율 <sup>1)</sup>	점도	실온 대비 점도 변화율 <sup>2)</sup>
당근	Carrot Cream <sup>3)</sup>	57,300	59,300	3.49%	51,750	-9.69%
	Carrot SEL Cream	53,300	55,700	4.50%	48,500	-9.01%
	Carrot ANFLA Cream	52,200	54,800	4.98%	49,200	-5.75%
느타리 버섯	Mushroom Cream	59,200	59,500	0.51%	54,000	-8.78%
	Mushroom SEL Cream	55,700	58,000	4.13%	51,500	-7.54%
	Mushroom ANFLA Cream	57,700	60,600	5.03%	55,300	-4.16%
솔잎	Pine Needle Cream	59,100	62,000	4.91%	48,600	-17.77%
	Pine Needle SEL Cream	55,000	55,500	0.91%	49,700	-9.64%
	Pine Needle ANFLA Cream	54,600	58,500	7.14%	47,500	-13.00%

<sup>1)</sup> 실온 대비 온도 변화 조건에서 보관 중 점도 변화율 (%)

<sup>2)</sup> 실온 대비 50℃에서 보관 중 점도 변화율 (%)

<sup>3)</sup> Cream - 효소가 첨가되지 않은 추출물 적용 크림 (Ex, Carrot Cream : 당근을 원물로 한 열수 추출물 적용 크림)

\* Measuring Temperature - 25℃, Spindle Number - 67, RPM - 6,  
Model - LVT, Manufacturer - Brookfield

(실온 보관 샘플 이외의 두 제품군은 30일간 서로 다른 온도에서 보관하였고, 측정 1일전 25℃ 향온조에 옮긴 후 점도측정)

이중 솔잎을 원물로 한 추출물 적용 크림의 경우 실온대비 고온 보관시 다른 크림군에 비해 10~15%의 점도가 감소되었다. 이는 앞서 언급한 바와 같이 솔잎에는 온도에 민감한 방향족 성분 및 탄화수소류가 함유됨에 따라 이들이 크림 점도에 다양한 영향을 미친 것으로 판단된다.

실온에서의 점도와 비교시 이들 제품군의 점도 모두 개발 크림의 적정 점도범위인 45,000 ~ 65,000 cps 에 해당되어 가혹조건에서 보관에 따른 점도 문제는 없었던 것으로 판단된다. 이로 본 연구에서 개발한 크림의 경우 할랄 인증을 통한 사업화가 가능할 것으로 판단하였다.

#### ㉔ 개발 크림의 pH

본 연구에서는 추출물 적용 크림을 실온, 온도변화 (Cycling), 고온 (50℃)에서 30일간 저장 한 후 pH를 측정하였고, 이의 결과를 표 11에 기재하였다. 본 연구에 적용한 모든 크림은 실온보다 온도 변화 및 고온보관시 pH가 낮아짐을 확인하였고 모든 크림에서의 pH 편차는 약 0.1~0.4의 수준이었다.

이중 솔잎을 원물로 한 추출물 적용 크림이 다른 2종류를 원물로 추출한 크림에 비해 pH의 변화폭이 컸음을 확인하였다. 개발 크림군에 대해 자사가 정한 적정 pH는 범위는 5.5 ~ 7.5로 모든 개발 크림군이 이 본 범위 내에 포함되므로 본 제품군에 대한 할랄 인증 및 제품 사업화에서 pH의 차이는 문제되지 않았다.

표 11. 서로 다른 원물 적용 추출물 함유 크림의 보관온도별 pH 변화

(개발 크림의 pH 적정 범위 : 5.5 ~ 7.5)

원물	시료명	실온 (25℃, 항온)	Cycling Temp. (-4 ~ 50℃)	고온 (50℃)	표준편차
정제수	Cream (Std) <sup>1)</sup>	6.80	6.59	6.6	0.12
당근	Carrot Cream <sup>2)</sup>	6.75	6.55	6.37	0.19
	Carrot SEL Cream	6.98	6.77	6.3	0.35
	Carrot ANFLA Cream	6.47	6.3	6.19	0.14
느타리 버섯	Mushroom Cream <sup>3)</sup>	6.77	6.62	6.4	0.19
	Mushroom SEL Cream	6.64	6.5	6.36	0.14
	Mushroom ANFLA Cream	6.90	6.81	6.47	0.23
솔잎	Pine Needle Cream <sup>4)</sup>	6.98	6.68	6.38	0.30
	Pine Needle SEL Cream	6.87	6.61	6.39	0.24
	Pine Needle ANFLA Cream	7.1	6.81	6.36	0.37

1) Cream (Std) : 추출물 무첨가

2) Carrot Cream : 당근을 원물로 추출시 효소 무첨가 추출물 적용 크림

3) Mushroom Cream : 느타리버섯을 원물로 추출시 효소 무첨가 추출물 적용 크림

4) Pine Needle Cream : 솔잎을 원물로 추출시 효소 무첨가 추출물 적용 크림

(실온 보관을 제외한 나머지 두 제품군 모두 30일간 서로 다른 온도에서 보관 후 측정 전일에 25℃ 항온조에 옮긴 후 pH 측정)

각 크림간 pH는 6.0 ~ 7.2의 사이로 일정한 수준을 유지하였고, 추출물이 함유되지 않은 크림의 경우 pH의 표준편차는 0.11의 범위에서 유지되었다. 당근 등 원물이 적용된 추출물 함유 크림의 경우 이보다 높은 pH 편차가 높아짐을 알 수 있었다.

이중 당근과 느타리버섯에 비해 솔잎을 원물로 한 추출물이 적용된 크림의 경우 pH의 편차가 증가하여 실온 이외의 변온(cycling) 및 고온 조건에서 보관시 pH는 낮아지는 경향을 보였다. 솔잎을 원물로 한 추출물이 적용된 크림의 경우 당근 또는 느타리버섯을 원물로 한 추출물 적용 크림에 비해 보관 온도에 따라 pH 편차가 커진 것은 솔잎 추출물 내 다양한 성분들과 크림에 적용시킨 원료와의 반응이 그 원인이라 판단된다.

#### ㉔ 크림 내 기능성분 정량

본 연구에서는 개발 크림군에 함유된 niacinamide를 정량하여 온도 변화 및 시간의 경과에 따라 소실되는지의 여부를 확인하였다. 이는 앞선 물리적 특성에서 본 바와 같이 실온에서 보관했을 때보다 고온에서 보관시 점도와 pH의 변화폭이 컸었는데, 본 제형에 함유된 미백 기능성분인 niacinamide도 보관 온도 조건에 따라 그 함량이 달라지는지의 여부를 확인하였다.

본 실험의 목적은 서로 다른 온도 조건에서 보관한 크림에 함유된 niacinamide의 정량을 통해 화학적 특성이 변화되는지를 확인하기 위함이다. 보관온도는 앞선 점도 및 pH 측정과 마찬가지로 실온, 고온, 변온 (-4 ~ 50℃)이었으며, 저장기간은 30일이었다. 실온을 제외한 나머지 두 온도에서 보관한 시료들은 측정 전날 25℃ 항온 인큐베이터에 모두 옮긴 후 시료군의 온도가 실온 범위로 된 것을 확인한 후

정량하였다.

본 실험에 적용한 모든 크림에 niacinamide를 2.0% 동일 농도로 첨가하였고, 분석은 식품의약품안전처에서 발행한 “기능성화장품 기준 및 시험법” 중 “나이아신아마이드 크림제” 정량법에 따라 분석하여 그 결과는 표 12에 기재하였다. 이들의 결과는 3회 반복 측정에 대한 평균값으로, 정량 수치간 차이는 표준 편차를 통해 확인하였다.

표 12. 서로 다른 보관온도에의 Niacinamide 함량 변화<sup>1)</sup>

[단위 : % <sup>2)</sup>

원물	시료명	실온 (25℃, 항온)	Cycling Temp. (-4 ~ 50℃)	고온 (50℃)	표준편차 <sup>3)</sup>
무첨가	Cream	2.02	2.08	1.81	0.14
당근	Carrot SEL Cream	2.05	2.07	2.11	0.03
	Carrot ANFLA Cream	2.22	1.94	2.13	0.14
느타리버섯	Mushroom SEL Cream	2.07	2.09	2.15	0.04
	Mushroom ANFLA Cream	2.04	2.03	2.11	0.04
솔잎	Pine Needle SEL Cream	2.07	2.01	2.06	0.03
	Pine Needle ANFLA Cream	2.08	1.91	1.97	0.09

1) Niacinamide 함량 측정법 : 식품의약품안전처 발행 “기능성 화장품 기준 및 시험방법” 중 “나이아신아마이드 크림제” 정량법

2) Niacinamide 측정 조건

- 검출기 : 자외부 흡광 광도계 (측정파장 : 263 nm)
- 칼 럼 : 안지름 약 4.6 μm, 길이 약 25cm 인 스테인레스관에 5μm의 액체크로마토그래프용 옥타데실릴화한 실리카겔을 충전
- 이동상 : 0.05M 인산이수소칼륨용액 (pH 7.0, 25% 수산화 나트륨액) • 메탄올 혼합액 (75 : 25)
- 유 량 : 1.0 ml / min

3) 서로 다른 온도에서 보관한 3종 크림 내 Niacinamide 정량 수치간 표준편차

확인 결과 서로 다른 온도 조건에서 보관한 크림 내 함유된 niacinamide 정량값은 시료별 큰 차이를 보이지 않았다. 당근, 느타리버섯을 원물로 papain 효소처리 추출물이 적용된 2종 크림의 경우 표준편차의 범위는 0.03 ~ 0.04로 측정된 시료군 중 가장 낮은 편차를 보였다.

이외 모든 시료들에서의 표준 편차는 0.15 미만으로 실온, 온도변화 및 고온 조건에서의 Niacinamide 측정값은 큰 차이를 보이지 않았다. 서로 다른 온도 조건에서 30일간 보관된 크림 내 niacinamide 가 처음 첨가된 농도로 일정하게 유지된다는 것은 본 개발크림이 화학적으로 안정하다는 것을 의미한다.

할랄 인증을 받으려하는 인도네시아는 아열대 기후 지역으로 연평균 25℃ 이상의 고온을 유지하기 때문에 경우에 따라서는 보관조건에 따라 40℃ 내지는 그 이상의 온도에서 화장품 소재 또는 화장품이 보관될 수 있다. 본 실험의 결과로 기능성분에 대한 농도는 큰 편차가 없는 것으로 보아 수출 이후에도 보관온도에 따른 화학적 특성 변화는 거의 발생하지 않을 것으로 예상된다.

Niacinamide의 표준품 및 서로 다른 크림에서의 Niacinamide의 정량 크로마토그램을 그림 11에 기재하였다. 모든 제품 내에서 Niacinamide의 정량 Peak를 확인할 수 있었고, LC 분석에 필요한 Baseline

도 안정하게 유지하여 본 niacinamide 정량 분석은 잘 진행되었음을 알 수 있었다.

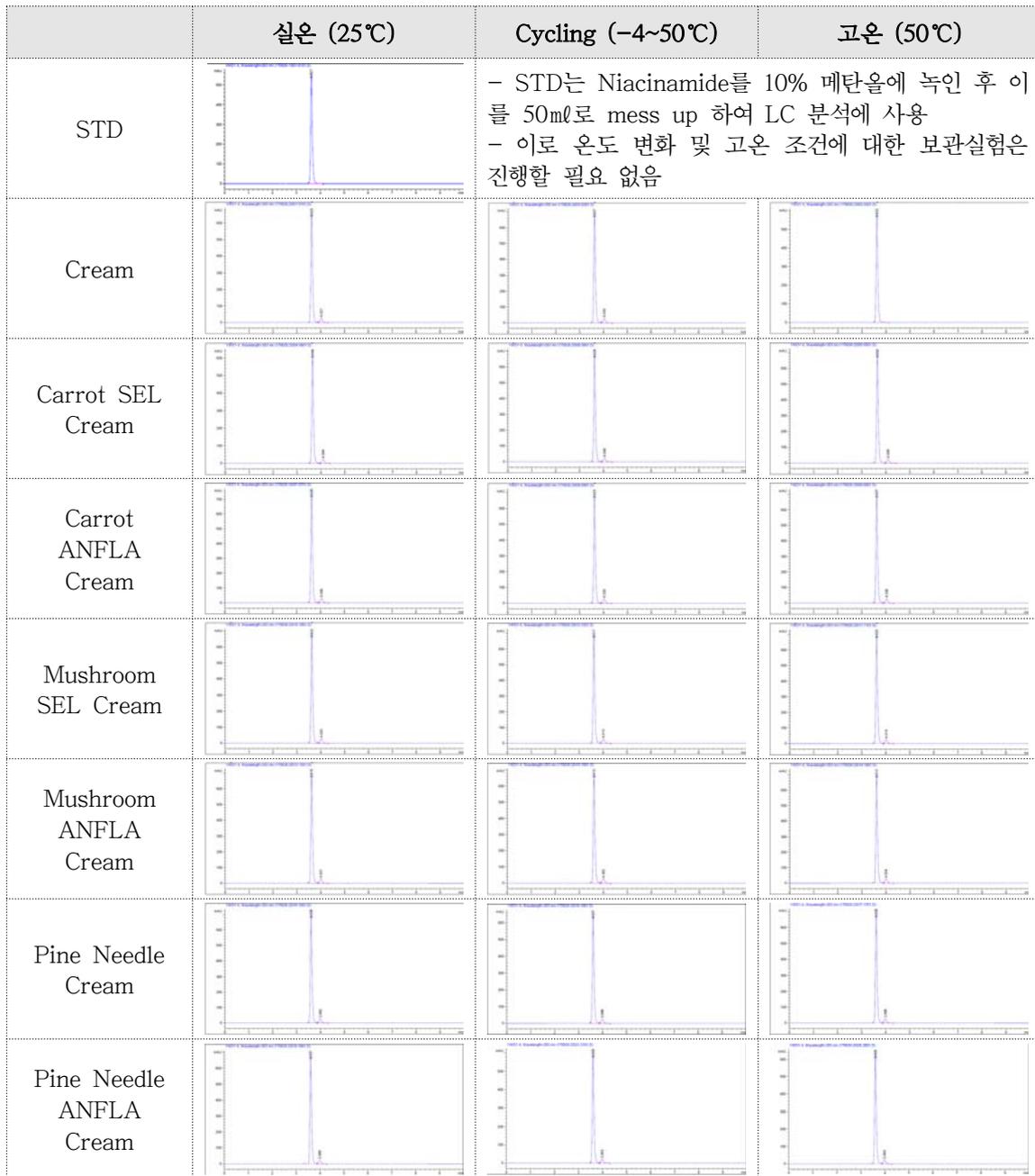


그림 11. 표준품 및 서로 다른 크림에서의 Niacinamide 정량 크로마토그램

③ 녹두, 홍삼을 원물로 한 크림 개발

본 연구에서는 이전 연구결과를 토대로 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소 처리 추출물 적용 새로운 크림 제형을 개발하였다. 이는 이전 연구에서 문제시되었던 고온에서의 색상변화 수반 등의 문제를 해결하기 위함이며, 이전 연구에서 개발한 크림중 일부 원료와 배합비율을 변경하여 크림의 품질을 향상시킬 수 있도록 신제형의 크림을 개발하였다.

㉠ 개발 크림 전성분 및 비율

본 연구에서는 개발한 크림의 전성분 및 성분의 농도는 표 13에 기재하였다. 앞서 언급한 바와 같이 제

형의 안정성을 향상시킬 수 있는 방향으로 이전 크림에서의 배합성분과 비율을 조정하였다.

표 13. 녹두, 홍삼원물 추출물 적용 크림의 전성분 및 배합비율

구분	원료 (INCI Name)	함량 (%)
A	녹두, 홍삼 함유 추출물 (효소 포함)	to 100
	Water	30.00
	Glycerin	5.00
	Butylene Glycol	4.00
	1,2-Hexanediol	2.00
	Niacinamide	2.00
	Betaine	0.10
	Adenosine	0.04
	Disodium EDTA	0.02
B	Stearic Acid	1.00
	Cetostearyl Alcohol	1.50
	Polysorbate-60	0.70
	Sorbitan Stearate	0.50
	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	1.00
	Hydrogenated Polydecene	4.00
	Caprylic/Capric Triglyceride	3.00
	Macadamia Nut oil	2.00
	JoJoba Oil	0.50
	Dimethicone	0.60
Cyclopentasiloxane	2.00	
C	Sodium Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate	q.s
D	Sodium Hyaluronate	1.00
	Ethylhexylglycerin	q.s
	Fragrance	q.s
	Total	100.00

㉔ 개발 크림의 온도 안정성 연구

상기의 처방을 통해 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보관온도별 색상 변화를 그림 12에 기재하였다.

이전 연구의 경우 솔잎을 원물로 한 추출물이 적용된 크림에서 고온 (50℃) 보관시 색상에 미황색으로 변했었는데, 본 연구에서는 모든 시료에서 색상 변화가 수반되지 않았다. 이는 크림에 대한 처방 변경을 통해 가능해진 것으로 판단된다. 크림의 경우 대부분 고온 (50℃ 이상)에서 물성 변화가 수반되는데, 본 연구에서 색상변화가 수반되지 않은 점은 보관 온도 변화에 대한 크림의 색상 안정성을 확보한 것으로 판단된다.

원물	시료명	실온 (25°C, 항온)	Cycling Temp. (-4 ~ 50°C) <sup>7)</sup>	고온 (50 °C)	3종 시료의 색상
녹두 적용 추출물 함유	Mung Bean Cream <sup>1)</sup>				
	Mung Bean SEL Cream <sup>2)</sup>				
	Mung Bean ANFLA Cream <sup>3)</sup>				
홍삼 적용 추출물 함유	Red Ginseng Cream <sup>4)</sup>				
	Red Ginseng SEL Cream <sup>5)</sup>				
	Red Ginseng ANFLA Cream <sup>6)</sup>				

그림 12. 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보관온도별 색상 변화

- 1) 녹두를 원물로 효소 무처리 추출물 적용 크림  
2) 녹두를 원물로 papain 처리 추출물 적용 크림  
3) 녹두를 원물로 bromelain 처리 추출물 적용 크림  
4) 홍삼을 원물로 효소 무처리 추출물 적용 크림  
5) 홍삼을 원물로 papain 처리 추출물 적용 크림  
6) 홍삼을 원물로 bromelain 처리 추출물 적용 크림  
7) 하루 24 시간 중 -4°C, 25°C, 50°C에서 각각 8시간씩 순환

㉔ 개발 크림의 점도

본 연구는 상기 크림군에 대한 점도를 확인하였고 이는 표 14에 기재하였다. 본 연구에서는 크림 제조 시 추출물 대신 물을 넣은 일반 크림을 대조군으로 실험을 진행하였다.

표 14. 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보관온도별 점도변화

원물	시료명	실온 (25℃, 향온)	Cycling Temp. (-4 ~ 50℃)		고온 (50 ℃)	
			점도	실온대비 점도 변화율 <sup>7)</sup>	점도	실온 대비 점도 변화율 <sup>8)</sup>
물	Cream (Std)	85,000	90,900	6.94%	75,200	-11.53%
녹두	Mung Bean Cream <sup>1)</sup>	69,700	63,700	-8.61%	59,400	-14.78%
	Mung Bean SEL Cream <sup>2)</sup>	79,800	78,300	-1.88%	70,200	-12.03%
	Mung Bean ANFLA Cream <sup>3)</sup>	84,100	75,600	-10.11%	69,700	-17.12%
홍삼	Red Ginseng Cream <sup>4)</sup>	70,000	60,000	-14.29%	55,000	-21.43%
	Red Ginseng SEL Cream <sup>5)</sup>	75,600	77,400	2.38%	68,200	-9.79%
	Red Ginseng ANFLA Cream <sup>6)</sup>	80,500	71,400	-11.30%	67,600	-16.02%

<sup>1)-6)</sup> 상기 표 주석 참조

<sup>7)</sup> 실온 대비 온도 변화 조건에서 보관 중 점도 변화율 (%) <sup>8)</sup> 실온대비 고온 보관 조건에서 보관 중 점도 변화율 (%)

\* Measuring Temperature - 25℃, Spindle Number - 67, RPM - 10,  
Model - RVT, Manufacturer - Brookfield

본 연구에서 가장 높은 점도를 보인 것은 아무 추출물을 첨가하지 않은 cream 이었고 실온 대비 변 온 또는 고온보관시 온도 변화율도 10% 내외로 확인되었다. 이 경우에도 상온 및 변온 (cycling temperaure) 조건보다 고온에서 보관했을 경우 점도가 감소하였다. 녹두를 원물로 한 추출물 적용 크림의 경우 bromelain 효소 처리 추출물 적용시, 그리고 홍삼 원물시에는 무처리 효소 추출물 적용시 그 감소폭이 커짐을 알 수 있었다. 원물이 서로 다른 추출물 적용 크림의 경우 큰 점도 차이를 보이지 않았다. 녹두 추출물이 적용된 크림에서 효소가 처리됨에 따라 보관조건별 점도가 높아졌고 이중 Bromelain으로 처리시 Papain 처리 추출물이 적용시보다 점도가 소폭 상승하였다.

전반적으로 이전 연구에 비해 모든 실험에서 점도값이 상승함을 알 수 있었다. 이는 본 연구에서 고온에서의 안정성을 유지하기 위한 결과로, 할랄 수출국으로 정한 인도네시아에서도 본 제품을 런칭할 경우 상안정성이 확보된 제품으로 마케팅할 수 있을 것이라 판단된다.

#### ㉔ 개발 크림의 pH

녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보관온도에 따른 pH 변화를 표 15에 기재하였다. 보관온도에 따라 pH의 편차가 가장 적은 것은 추출물을 적용하지 않은 대조군 크림이었고, 가장 높았던 시료는 녹두를 원물로 한 Bromelain 처리 추출물 적용 크림이었다. 그러나 본 실험에 적용된 크림 모두 일반적인 크림 pH 범위에 속한 것으로 할랄 인증 및 수출품으로 적합한 것이었다.

표 15. 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보관온도별 pH 변화

원물	시료명	실온 (25℃)	Cycling Temp. (-4 ~ 50℃)	고온 (50℃)	표준편차 <sup>7)</sup>
정제수	Cream (Std)	7.02	7.07	6.63	0.24
녹두	Mung Bean Cream <sup>1)</sup>	7.29	7.33	6.39	0.53
	Mung Bean SEL Cream <sup>2)</sup>	7.24	7.29	6.34	0.53
	Mung Bean ANFLA Cream <sup>3)</sup>	7.33	7.39	6.39	0.56
홍삼	Red Ginseng Cream <sup>4)</sup>	7.21	7.26	6.41	0.48
	Red Ginseng SEL Cream <sup>5)</sup>	7.27	7.41	6.41	0.54
	Red Ginseng ANFLA Cream <sup>6)</sup>	7.31	7.39	6.41	0.54

<sup>1)-6)</sup> 상기 표 주석 참조

<sup>7)</sup> 보관온도에 따른 pH 측정값간의 표준 편차

㉔ 크림 내 기능성분 정량

본 연구에서는 앞선 연구에서와 마찬가지로 서로 다른 온도에서 보관한 크림내 함유된 niacinamide를 정량하여 보관온도에 따른 화학적인 변화가 수반되었는지 확인하였다. 정량 방법은 식품의약품안전처에서 규정한 “기능성 화장품 기준 및 시험방법”의 “나이아신아마이드 크림제 정량법”에 따라 수행하였고 그 결과를 표 16에 기재하였다.

표 16. 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보관온도별 niacinamide 농도

원물	시료명	실온 (25℃)	Cycling Temp. (-4 ~ 50℃)	고온 (50℃)	표준편차
물	Cream (Std)	1.82	1.85	1.82	0.02
녹두	Mung Bean Cream	1.93	1.94	1.92	0.01
	Mung Bean SEL Cream	1.97	1.68	1.75	0.15
	Mung Bean ANFLA Cream	1.97	1.79	1.87	0.09
홍삼	Red Ginseng Cream	1.87	1.78	1.90	0.06
	Red Ginseng SEL Cream	1.85	1.97	1.88	0.06
	Red Ginseng ANFLA Cream	2.08	1.93	1.93	0.09

본 정량은 HPLC 장비를 이용하여 분석했으며 각 시료에 함유된 niacinamide 정량 크로마토그램을 그림 13에 기재하였다. STD는 Niacinamide를 10% 메탄올에 녹인 후 이를 50ml로 mess up 하여 LC 분석에 사용하였다.

정량 크로마토그램을 보면 분석을 진행한 모든 크림에서 niacinamide 단일 성분으로만 정량이 진행되었고, Baseline도 흔들리지 않는 직선을 유지하여 본 분석은 정상적으로 잘 진행되었다고 판단된다.

상기의 결과에서 보여지는 바와 같이 모든 크림에는 2%의 niacinamide를 첨가하였고, 모든 결과값에서 90% 이상의 수율을 보였다. 이중 정량값의 편차가 제일 적었던 시료는 녹두 원물에 효소 무처리 추출물을 적용한 크림이었고, 가장 높은 편차값을 보인 시료는 동일 원물에 papain 처리 추출물을 적용한 크림이었다. Mung Bean SEL Cream의 변온조건에서 보관한 크림 내 niacinamide 값은 1.68%로 첨가량 대비 84% 수준으로 가장 낮은 수율을 보였다. 홍삼을 원물로 한 추출물 적용 크림의 경우 표

준편차는 0.05~0.10의 사이를 유지하였다.

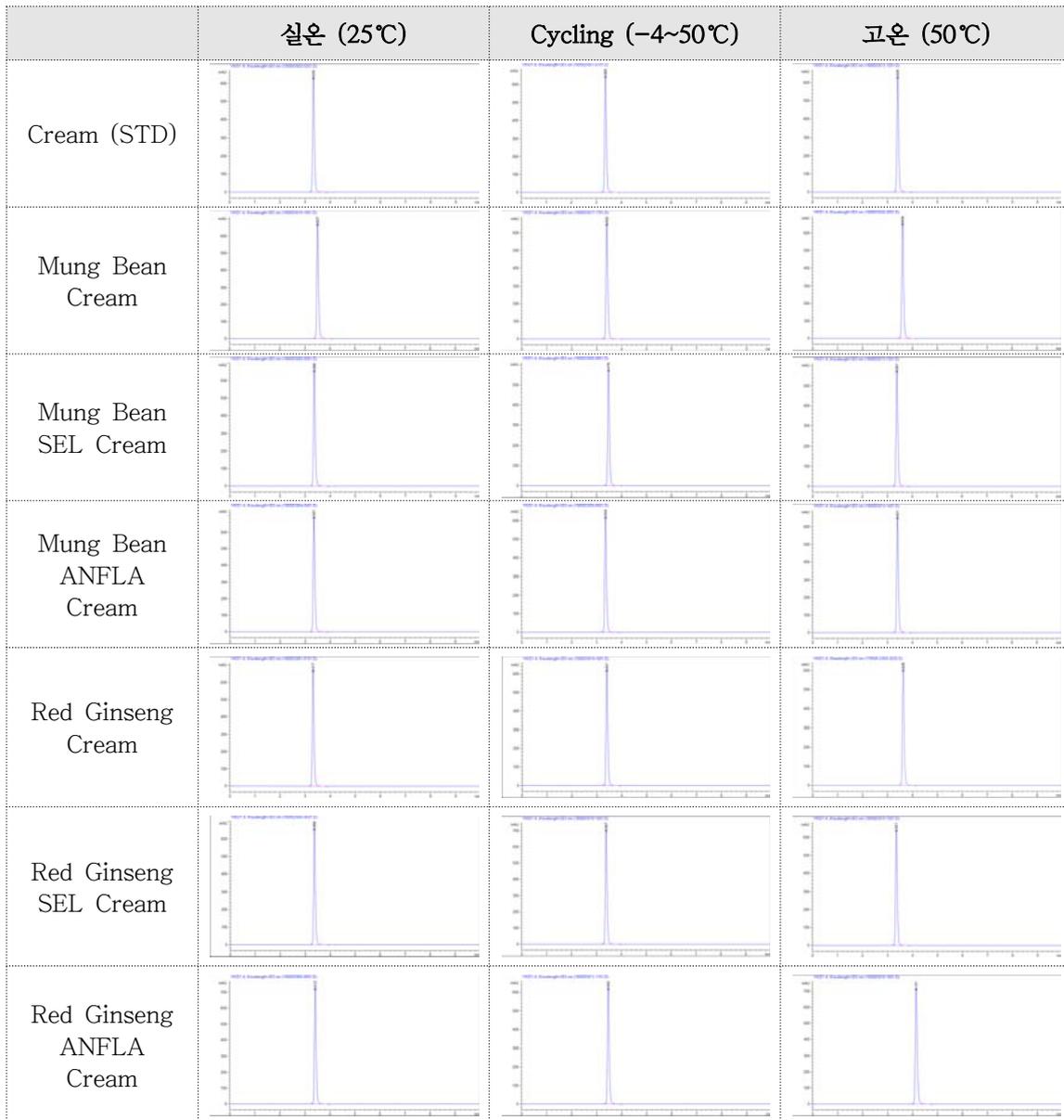


그림 13. 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림 내 함유된 기능성분 정량 크로마토그램

결과적으로 앞선 연구에서 보면 고온에서 보관한 시료의 경우 점도 및 pH 등의 물리적 항목에 대한 측정치가 좋지 않게 평가되었는데, 본 연구에서는 이와 유사한 패턴의 결과는 확인되지 않았다. 이로 고온에서 보관한 시료의 경우에도 전체 첨가 농도의 90% 이상의 niacinamide 가 정량되어서 본 크림의 보관온도에 따라 특정 성분의 함량이 낮아지는 경향은 확인되지 않았다.

본 크림은 인도네시아 수출을 위한 할랄 인증 및 현지에서 수출되어도 화학적 항목에 있어서 문제가 되지 않는 제품임을 niacinamide 정량 분석을 통해 확인하였다.

### (3) 개발 화장품의 보습 효능 (in vivo)

이상 개발한 크림 모델링 마스크팩, 기초 화장품 중 가장 범용적으로 사용하는 크림에 대해 물리 화학적 특성을 확인하였다. 이들의 결과값을 기반으로 사업화를 위해 마스크팩 및 크림 제형을 임상기관에 의뢰하여 보습력을 확인하였고, 이들 제품군이 동물성 콜라겐 대체소재로 적합한지의 여부와 동물성 콜라겐이 적용된 완제품에 비해 보습능력이 있는지를 확인하였다.

#### (가) 크림 모델링 마스크의 보습효능 (원물 : 당근, 느타리버섯)

본 연구에서는 동물성 콜라겐이 함유된 마스크팩 2종 (Clay modeling mask 1종, Cream modeling mask 1종)과 당근 및 느타리버섯을 원물로 효소처리 추출물이 함유된 크림 모델링 마스크팩 2종을 국내 임상연구기관인 엘리드에 의뢰하여 보습효능을 확인하였다. 보습효능은 수분 보유도의 분석을 통해 확인하였고, 수분 보유도는 Corneometer 장비를 사용하였다. 24시간동안의 피부 보습 효능을 in vivo test로 진행하였으며, 이를 위한 세부 사항들은 아래와 같다

#### ① 실험 대상 제품

본 연구에 적용된 제품 정보는 표 17에 기재하였고, 이를 대상으로 피부 보습 평가에 적용하였다.

표 17. 임상평가에 적용한 모델링 마스크 정보

No	제품명	제품 정보
제품 #1	Collagen Clay Modeling Mask	Clay Modeling Mask에 동물성 콜라겐 적용
제품 #2	Carrot ANFLA Cream Modeling Mask	당근을 원물로 하고 Bromelain을 처리한 추출물이 적용된 Cream Modeling Mask
제품 #3	Mushroom ANFLA Cream Modeling Mask	느타리 버섯을 원물로 하고 Bromelain을 처리한 추출물이 적용된 Cream Modeling Mask
제품 #4	Collagen Cream Modeling Mask	동물성 콜라겐이 적용된 Cream Modeling Mask

#### ② 연구 대상자

- 자발적으로 모집된 연구 대상자들에 대해 피부과 전문의의 피부에 대한 이화학적 검사와 문진을 실시
- 선정 기준에 부합되고, 제외기준에 포함되지 않는 20~45세 여성 20명을 대상으로 시험 진행

#### ③ 효능 평가 방법

㉠ 효능 측정 장비 : Corneometer (CM825, Courage & Khazaka, Germany)

㉡ 효능 측정 부위 및 방법]

- 시험 부위 (전완부)는 연구 대상자의 왼쪽과 오른쪽 팔의 손목으로부터 약 5cm 거리의 전박 굴측 부 부위로 하였으며, 시험 부위마다 가로, 세로 3 × 3cm의 정사각형을 1.5cm 간격으로 총 5개를 그려 제품 미적용 부위와 적용 부위를 무작위로 선정
- 연구 대상자는 시험 전 항온항습 (20 ~ 24℃, 40 ~ 60% RH) 조건의 대기실에서 30분간 대기, 연구자가 각 시험부위를 3회 측정 후, 측정값의 평균을 구하여 제품 적용 전 (0시간)의 보습량을

측정

- 측정 후 연구 대상자의 제품 적용 부위에 1.5ml 씩 제품을 적용하고, 충분히 흡수되도록 한 다음, 적용 전과 동일한 방법으로 제품 적용 1시간, 3시간, 6시간 및 24시간 경과 후의 보습량을 측정

④ 측정값 계산

㉑ 피부 보습 증가율

- 20명의 연구 대상자들의 보습효능을 Corneometer로 측정한 평균값을 이용하여 피부 보습 증가율 (%)은 아래의 공식으로 계산

$$\text{피부 보습 증가율 (\%)} = \frac{\text{제품 적용 후 측정값} - \text{제품 적용 전 측정값}}{\text{제품 적용 전 측정값}} \times 100$$

㉒ 보습량이 증가된 연구 대상자 비율

- 제품 적용 전에 비해 제품 적용 후 보습량이 증가된 연구 대상자 비율은 아래의 공식으로 계산

$$\text{보습량이 증가된 연구 대상자 비율 (\%)} = \frac{\text{제품 적용 전에 비해 보습량이 증가된 연구 대상자 수}}{\text{총 연구 대상자 수}} \times 100$$

⑤ 실험결과

Corneometer는 피부 보습 상태가 높을수록 좋은 수치를 나타내는데, 이때 보습력 측정단위는 임의의 단위인 A.U. (Arbitrary Unit) 를 사용하였다. 본 평가에 적용된 5종 (미적용 포함) 제품에 대한 피부 보습 측정값을 표 18에, 이 때 시간 경과에 따른 피부 보습 측정값의 변화를 그림 14에 기재하였다.

표 18. 서로 다른 제품군에 대한 시간 경과에 따른 피부 보습 측정값의 변화

[측정값 : 피부 보습 측정값 평균 ± 표준편차, (단위 : AU)]

측정 시점	적용 전	적용1시간후	적용3시간후	적용6시간후	적용24시간후
미적용	36.642±4.241	36.553±3.847	36.640±4.121	36.637±4.125	36.647±4.085
제품#1	36.642±3.718	39.260±4.544	38.545±4.213	37.848±3.769	37.498±3.798
제품#2	36.750±3.084	44.628±4.159	42.210±3.343	40.807±3.213	39.806±3.274
제품#3	35.973±3.731	45.537±5.537	41.405±4.219	40.037±4.034	39.195±3.569
제품#4	36.480±3.824	43.958±4.765	41.788±4.119	40.450±4.194	39.335±3.906

본 결과와 같이 아무것도 도포하지 않은 <미적용> 제품의 경우 피부 보습 측정값은 36.5~36.7의 범위를 유지하여 제품 #1~#4에 비해 수분 보유도가 가장 낮았다. 적용 1시간 후에는 <제품 #3>의 수분 보유도가 가장 높았고, 적용 3, 6, 24시간 후에는 <제품 #2>의 수분 보유도가 가장 좋았다. 반면 <미적용> 제품을 제외하고 측정 시점마다 가장 낮은 수분 보유도를 나타낸 것은 <제품 #1>이었다.

이상의 결과에서와 같이 제품 #2, #3, #4의 경우 시간 경과에 따른 수분 보유도는 큰 차이를 보이지 않아 이들 3종의 제품간의 보습 능력은 거의 유사함을 확인하였다. 이들 3종 제품은 모두 Cream Modeling Mask 제품으로 시간 경과에 따른 수분 보유 능력이 기존 Clay Modeling Mask보다 우수함을 확인했는데, 본 임상 평가에서도 이와 유사한 결과로 확인되었다.

이중 당근을 원물로 한 효소처리 추출물이 적용된 제품 #2는 동물성 콜라겐을 적용한 제품 #4에 비

해 측정을 실시한 모든 시간대에서 수분 보유도가 높게 측정되어 본 연구에서 사용한 국내 농산 자원 적용 추출물이 함유된 화장품 완제품의 경우 그 보습능력이 동물성 콜라겐을 적용한 제품군에 비해 우수했음을 확인하였다.

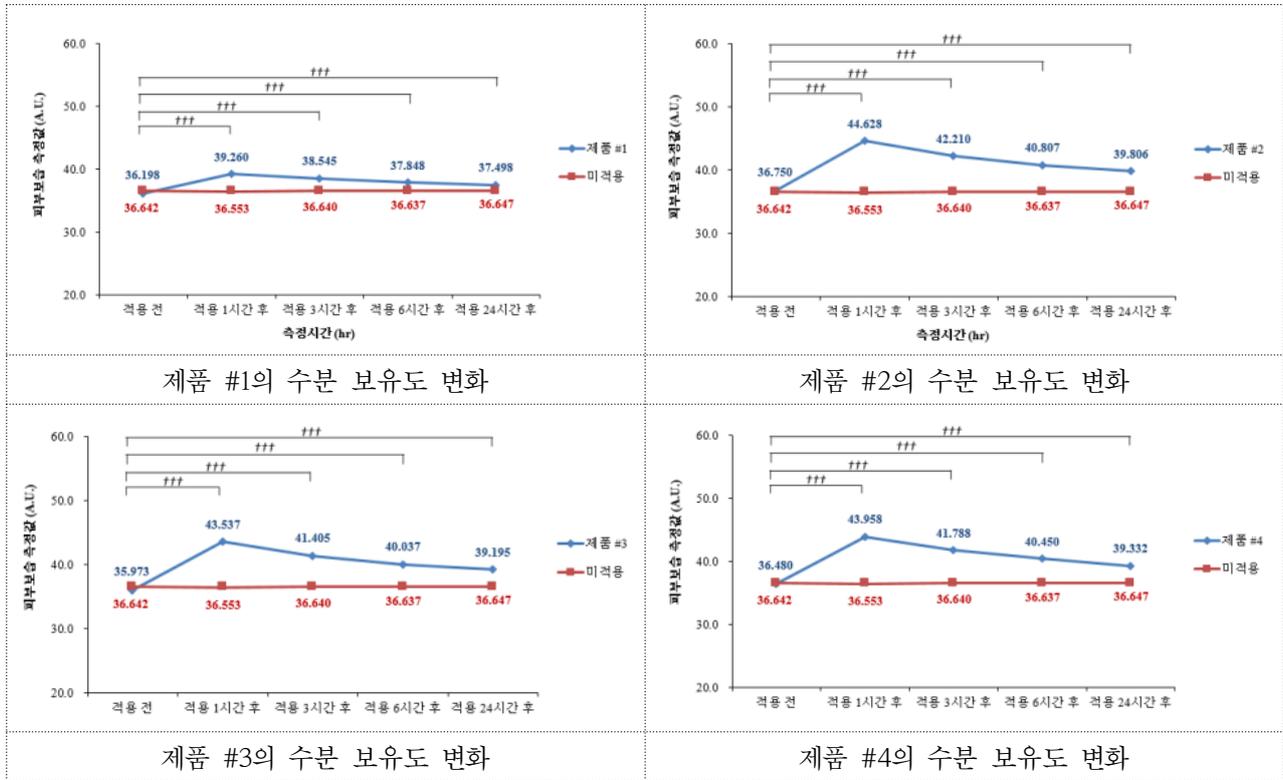


그림 14. 제품 4종의 시간 경과에 따른 수분 보유도 변화

본 임상 결과로 Cream Modeling Mask에 기존 동물성 콜라겐 대신 당근과 느타리버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물을 사용한 결과, 최종 화장품 완제품에서의 보습 능력은 제품간 큰 차이가 없음을 확인하였다. 이로써 당근 및 느타리버섯을 원물로 한 효소 처리 추출물은 기존 동물성 콜라겐에 대한 대체 소재로 적합함을 알 수 있었다. 본 연구와 관련해서 시간 경과에 따른 각 연구 대상자별 피부 보습 증가율의 평균값을 표 19에 기재하였다.

표 19. 적용전 대비 시간 경과에 따른 개인별 피부 보습 증가율의 평균

(단위 : %)

실험 제품군	적용 1시간 후	적용 3시간 후	적용 6시간 후	적용 24시간 후
미적용	-0.082	0.076	0.043	0.093
제품 #1	8.396	6.478	4.628	3.649
제품 #2	21.730	15.053	11.162	8.419
제품 #3	20.981	15.307	11.412	9.163
제품 #4	20.680	14.813	11.003	7.984

적용 1시간 후에서의 평균 피부 보습 증가율은 <미적용> 제품의 경우 다른 4개의 제품군에 비해 보습력 증가가 일어나지 않았으며, <제품 #2>의 경우 가장 높은 피부 보습 증가율을 나타냈다. 적용 3시간, 6시간 및 24시간 이후에는 <제품 #3>이 가장 높은 피부 보습 증가율을 보여 제품 #2와 제품 #3이 제품 #4에 비해 피부 보습 증가율이 우수함을 알수 있었다.

본 결과를 통해 동물성 콜라겐을 적용한 제품에 비해 당근 및 느타리 버섯을 원물로 한 효소처리 추출물을 적용시킨 크림 모델링 마스크의 평균 피부 보습 증가율이 높았음을 확인하였다.

이상의 임상 평가를 통해 서로 다른 소재가 적용된 추출물의 보습능력을 임상실험으로 확인한 결과 당근 및 느타리 버섯은 동물성 콜라겐의 대체소재로 적용이 가능하며, 이중 당근을 원물로 한 화장품 소재는 동물성 콜라겐에 비해 화장품 완제품에서 더 우수한 보습 효능을 보였다.

**(나) 당근을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보습 효능**

본 결과를 토대로 당근을 원물로 한 효소 처리 추출물이 적용된 크림의 보습 효능을 위와 동일한 기관에 의뢰하여 in vivo 방법을 통해 보습력을 확인하였다. 본 연구 역시 국내 농산 자원을 화장품 원료로 사용했을 경우 기존 동물성 콜라겐의 대체 소재로 적합한지의 여부를 확인한 것으로 크림 모델링 마스크 제품을 평가한 것과 동일한 방법을 통해 보습력 평가를 진행하였다.

**① 실험 대상 제품**

본 실험에 적용한 크림의 제품 정보를 표 20에 기재하였다. 제품 #1은 아무것도 적용하지 않은 일반 크림이며, 제품 #2는 동물성 콜라겐을 적용시킨 크림이고, 제품 #3, 4는 당근을 원물로 한 papain과 bromelain으로 처리한 추출물 적용 크림이다.

본 실험을 통해 효소처리 추출물이 기존 동물성 콜라겐 대체 소재로 적합한지의 여부를 알아보았다

표 20. 보습력 평가에 적용한 크림 제품 정보

No	제품명	제품 정보
#1	Cream	대조군 크림
#2	Collagen Cream	동물성 콜라겐을 첨가한 크림
#3	Carrot SEL Cream	당근 추출시 Papain으로 처리한 추출물을 첨가한 크림
#4	Carrot ANFLA Cream	당근 추출시 Bromelain으로 처리한 추출물을 첨가한 크림

**② 평가 방법**

연구 대상자, 효능 평가 방법, 측정값 계산은 이전 마스크팩의 임상시험과 수행했던 것과 동일한 방법으로 진행하였다

**③ 실험 결과**

Corneometer를 통한 결과값은 피부 보습 상태가 좋을수록 높은 수치를 나타내며, 측정단위는 임의의 단위인 A.U. (Arbitrary Unit)를 사용하였고, 미적용 결과를 포함한 본 연구에 사용한 크림 제품 4종의 피부 보습 결과 및 표준편차를 표 21에, 그리고 시간경과에 따른 수분보유도의 변화 그래프를 그림 15에 기재하였다.

표 21. 크림의 시간에 따른 수분보유도

[측정값 : 피부 보습 측정값 평균 ± 표준편차, (단위 : A.U.)]

제품종류	적용전	적용 1시간 후	적용 3시간 후	적용 6시간 후	적용 24시간 후
미적용	31.162 ± 4.335	31.180 ± 4.735	31.100 ± 4.614	30.880 ± 4.677	31.702 ± 4.854
제품 #1	30.643 ± 4.226	55.208 ± 8.162	49.157 ± 8.368	42.525 ± 7.876	37.583 ± 6.951
제품 #2	30.977 ± 4.932	56.560 ± 11.414	50.057 ± 11.575	43.245 ± 9.975	38.163 ± 8.216
제품 #3	30.822 ± 4.505	58.987 ± 8.897	53.523 ± 8.984	46.647 ± 8.321	40.157 ± 7.070
제품 #4	31.335 ± 4.808	59.370 ± 9.860	53.682 ± 10.110	46.927 ± 9.483	40.552 ± 8.595

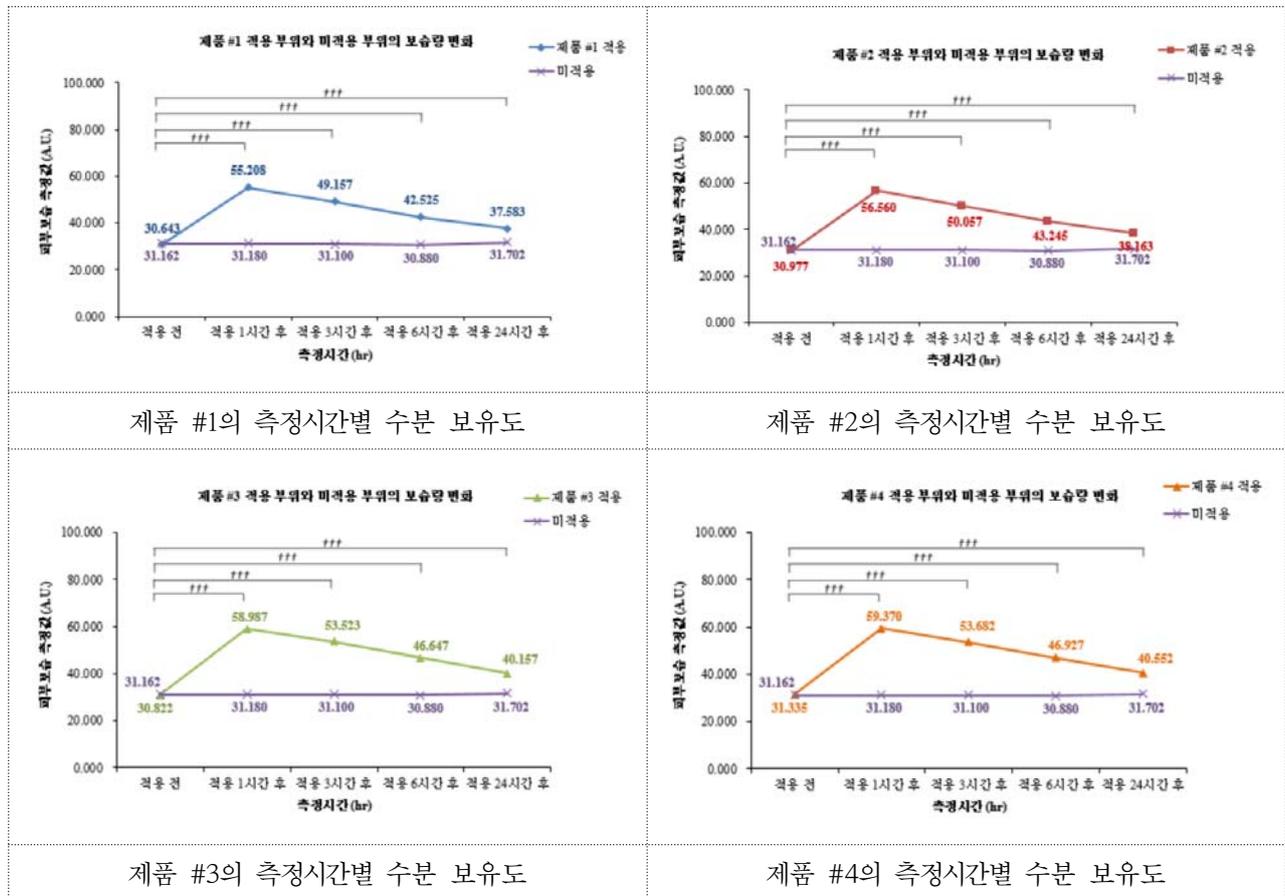


그림 15. 크림별 시간경과에 따른 수분보유도 변화

아무 시료도 도포하지 않은 미적용 시료의 수분 보유도는 모든 측정시간대에서 30 ~ 32 A.U.로 일정한 수준을 유지하였다. 제품 #1과 #2는 대조군 시료로 두 제품 모두 적용 1시간 후 가장 높은 수분 보유도를 보였고, 이때 수분 보유도는 제품 #1은 55.208 A.U., 제품 #2는 56.560 A.U. 이었으며, 적용 3시간부터 24시간까지의 수분 보유도는 순차적으로 낮아졌다. 두 제품간 시간 경과에 따른 수분 보유도는 큰 차이를 보이지 않았다.

이와 달리 제품 #3, #4의 도포 1시간 경과 후 수분 보유도는 각각 58.987 A.U., 59.370 A.U.로 제품 #1, #2에 비해 5% 이상 수분보유도가 높았으며, 이들 제품의 3~24시간 경과 후 수분보유도 역시 제품 #1, #2 대비 5% 이상 일정하게 높은 수준을 유지하였다.

이와 관련하여 본 크림 제품군에 대한 적용전 대비 개인별 피부 보습 증가율(%)의 평균을 확인하였고, 이를 표 22에 기재하였다.

표 22. 적용전 대비 시간 경과에 따른 개인별 피부 보습 증가율의 평균

(단위 : %)

실험 제품군	적용 1시간 후	적용 3시간 후	적용 6시간 후	적용 24시간 후
미적용	-0.069	-0.251	-0.996	1.617
제품 #1	80.699	60.516	38.687	22.562
제품 #2	82.286	60.981	38.884	22.954
제품 #3	92.133	74.209	51.567	30.282
제품 #4	89.742	71.219	49.613	29.079

일반 크림과 동물성 콜라겐을 적용한 크림의 피부 보습 증가율의 평균값은 측정된 시간대별로 비슷한 수준을 유지한 반면, 당근을 원물로 한 서로 다른 효소를 적용한 추출물이 적용된 제품 #3, #4의 경우 측정 시간대에서 이들보다 높은 보습 증가율을 보였다. 이중 papain으로 처리한 추출물 적용 크림이 bromelain으로 처리한 추출물 적용 크림에 비해 약 3% 이상의 높은 보습 증가율을 보였다.

이상과 같이 크림의 수분 보유도와 피부 보습 증가율의 평균값을 확인한 결과, 일반 및 동물성 콜라겐을 화장품 소재로 한 크림보다 당근을 원물로 한 추출물 적용 크림의 경우 모든 측정시간대에서 일정하게 높은 수준으로 측정되었다.

이로써 일반 및 동물성 콜라겐 적용 크림에 비해 당근을 원물로 한 효소 처리 추출물을 적용시킨 크림이 우수한 보습 효능이 있었음을 본 연구로 확인하였다.

**(다) 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림의 보습 효능**

① 보습력 평가 대상 제품

본 연구 역시 원물을 녹두와 홍삼으로 변경하여 앞서 진행한 2개의 임상평가와 동일한 항목 (수분 보유도)을 동일 기관에 의뢰하여 임상평가를 수행하였고, 본 임상을 진행한 제품 정보를 표 23에 기재하였다. 본 임상평가 역시 in vivo 방법을 통해 이전 모델링 마스크 및 크림의 보습력을 평가했던 것과 동일한 방법으로 동일 기관에 의뢰하여 진행하였다.

표 23. 보습력 측정에 적용한 크림 제품 정보

No	제품명	제품 정보
제품 #1	Cream (Std)	동물성 콜라겐 적용 크림
제품 #2	Mung Bean SEL Cream	녹두를 원물로, Papain 처리 추출물 적용 크림
제품 #3	Mung Bean ANFLA Cream	녹두를 원물로, Bromelain 처리 추출물 적용 크림
제품 #4	Red Ginseng ANFLA Cream	홍삼을 원물로, Bromelain 처리 추출물 적용 크림

② 실험 결과

홍삼, 느타리버섯을 원물로 한 추출물 적용 크림의 수분보유도 측정결과를 표 24에 기재하였고, 시간 경과에 따른 수분 보유도 변화 그래프를 그림 16에 기재하였다.

표 22. 크림의 시간에 따른 수분보유도

[측정값 : 피부 보습 측정값 평균 ± 표준편차, (단위 : A.U.)]

제품종류	적용전	적용 1시간 후	적용 3시간 후	적용 6시간 후	적용 24시간 후
미적용	35.937±5.360	35.965±5.377	35.879±5.389	35.741±5.427	36.252±5.045
제품 #1	35.454±4.666	57.883±7.456	53.752±7.391	50.095±7.890	42.914±6.947
제품 #2	35.189±5.023	63.052±6.791	57.149±7.515	52.281±6.779	44.190±6.381
제품 #3	35.313±4.967	63.889±7.309	58.224±8.215	52.987±7.294	45.319±7.797
제품 #4	35.186±4.685	60.875±7.554	56.224±7.588	50.062±6.890	42.575±6.021

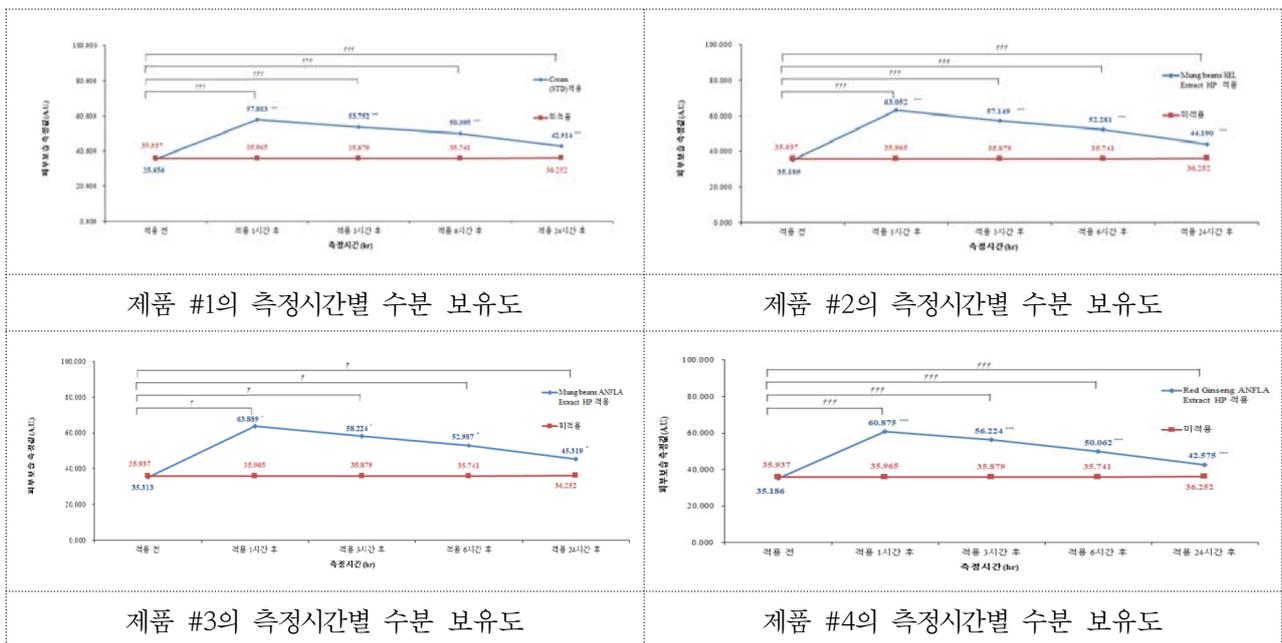


그림 16. 크림의 시간에 따른 수분 보유도 변화

동물성 콜라겐을 사용한 제품 #1에 비해 녹두와 홍삼을 원물로 한 추출물이 적용된 제품 #2, #3, #4의 경우 모든 시간대에서 우수한 수분 보유도를 보였다. 이중 녹두를 원물로 한 크림의 경우 동물성 콜라겐을 적용한 크림에 비해 매시간대별 높은 수분 보유도를 보였다. 녹두를 원물로 한 크림 중 가장 우수한 보습력을 보인 것은 Bromelain 처리 추출물이 적용된 크림 (제품 #3)이었고, 이는 사용 6시간 및 24시간 경과 후에도 동물성 콜라겐 적용 크림 대비 약 4% 이상의 높은 수분 보유도를 보여 본 연구에 사용한 시료중 가장 우수한 보습력을 나타냈다.

홍삼을 원물로 한 추출물 적용 크림의 경우 사용 3시간까지는 동물성 콜라겐을 사용한 것에 비해 5% 이상의 높은 수분 보유도를 보였으나, 적용 6시간에는 이와 유사한 보습력을 보이더니, 적용 24시간에는 콜라겐을 사용한 크림 대비 약 1%의 낮은 수분보유도를 보였다. 이로써 홍삼을 원물로 한 bromelain 처리 추출물 적용 크림은 동물성 콜라겐 적용 크림에 비해 적용 직후 단기간에서 보습력이 있음을 확인하였다.

이와 관련하여 이들 크림에 대한 적용전 대비 시간경과에 따른 개인별 피부 보습 증가율의 평균값을 표 23에 기재하였다.

표 23. 적용전 대비 시간 경과에 따른 개인별 피부 보습 증가율의 평균

(단위 : %)

실험 제품군	적용 1시간 후	적용 3시간 후	적용 6시간 후	적용 24시간 후
미적용	0.120	-0.140	-0.571	1.050
제품 #1	63.877	52.081	41.628	21.089
제품 #2	80.920	63.501	49.687	26.083
제품 #3	82.986	66.258	51.276	29.010
제품 #4	74.352	60.843	43.231	21.660

녹두와 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 크림은 동물성 콜라겐이 적용된 크림에 비해 모두 높은 수분 보유도를 보였다. 적용시킨 원물의 경우 녹두를 적용한 크림이 홍삼을 적용한 크림에 비해 높은 수분 보유도를 보였고, 이중 papain보다 bromelain을 적용시킨 크림의 수분 보유도가 3~10% 씩 높았음을 확인하였다.

이상 녹두 및 홍삼을 원물로 한 추출물 적용 크림에 대해 보습력을 확인한 결과, 동물성 콜라겐을 적용한 크림에 비해 녹두와 홍삼을 적용한 크림의 보습력이 더 높게 측정되었다. 이중 녹두를 원물로 사용한 크림이 홍삼을 원물로 사용한 크림에 비해 높은 보습력을 보였다. 이로써 녹두 및 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물이 적용된 크림 역시 동물성 콜라겐을 적용한 것과 유사하거나 이보다 우수한 보습력을 보여, 이들은 동물성 콜라겐에 대한 대체 소재로 적합함을 본 연구로 확인하였다.

#### (라) 크림의 피부 자극 평가

이상 임상평가에 적용한 크림의 경우 동물성 콜라겐을 적용한 크림에 비해 높은 보습력이 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 이들 크림의 인체 안전성을 확인하기 위해 임상 평가로 피부 자극 여부를 확인하였다. 본 피부 자극도 평가는 당근과 느타리버섯을 원물로 한 추출물 적용 크림을 대상으로 수행하였고 수분 보유도를 평가했던 동일 기관에 의뢰하여 실험을 진행하였다. 본 임상평가를 수행하기 위한 세부 측정 방법 및 결과는 아래와 같다.

##### ① 연구 대상자

- 20~55세의 성인남녀 중 31명 (평균연령 43.74세)
- 기타 선정기준과 연구 대상자 제외기준은 보습효능 측정에 참여한 연구 대상자 조건과 동일

##### ② 효능 평가 방법

###### ㉠ 피부 첩포 시험 (Patch Test)에 의한 안전성 평가 인체적용 시험

연구 대상자 각 31명을 대상으로 Van der Bend chamber (Van der Bend, the Netherlands) 를 이용하여 등에 척추를 중심으로 어깨뼈와 허리선 사이에 시료를 적용하였다. 시험 부위를 증류수로 닦아내고 건조한 다음, 시험 대상 크림 8종 (시료 #1~#8)을 각각 35  $\mu$ l 씩 Van der Bend chamber에 적하한 후 시험부위에 고정시켰다. 총 24시간 동안 피부에 첩포했으며 첩포를 제거한 후에는 marking pen으로 시험부위를 표시하여 각각 30분, 24시간, 48시간 경과 후 시험 부위를 관찰하였다.

피부 반응은 Draize Dermal Irritation Scoring System의 평가 기준에 따라 자극 정도를 평가하였고 이 기준은 표 24에 기재하였다. 평균 피부 자극도 계산 공식에 따라 Mean Irritation Index (M.I.I.)를 산정한 후 EPA (Environmental Protection Agency) Standard Evaluation Procedure Dermal Classification System의 자극 분류법 기준을 반영한 피부 1차 자극 시험 결과 판정표에 따라 자극군을 판정하였고, 이 판정표는 표 25에 기재하였다.

표 24 Draize Dermal Irritation Scoring System의 평가기준

Erythema and Eschar Formation (홍반 및 가피 형성)	Value	Edema Formation (부종 형성)	Value
No erythema	0	No edema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1	Very slight edema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2	Slight edema (edges of area well-defined by definite raising)	2
Moderate to severe erythema	3	Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe erythema (best redness) to slight, eschar formation (injuries in depth)	4	Severe edema (raised more than 1mm and extending beyond the area of exposure)	4

※ 평균 피부자극도 (M.I.I. : Mean Irritation Index) 계산 공식

$$\text{Mean Irritation} = \frac{\sum \text{quotation of the 3 reading (all volunteers)}}{\text{Number of volunteers} \times 3 \text{ (readings)}}$$

표 25. 피부 1차 자극 시험 결과 판정표 (EPA Dermal Classification System)

자극군	M.I.I
무자극 (Negligible)	0.00 ≤ M.I.I. ≤ 0.50
미자극 (Slight)	0.50 ≤ M.I.I. ≤ 2.00
중자극 (Moderate)	2.00 ≤ M.I.I. ≤ 5.00
강자극 (Strong)	5.00 ≤ M.I.I. ≤ 8.00

③ 피부 자극 시험 결과

상기의 방법으로 피부 자극을 시험을 수행하여, 그 결과를 표 26에 기재하였다.

본 연구에서 진행한 크림 8종의 피부 평균 자극도는 0.50 미만으로 피부 1차 자극 시험결과 판정표에서 확인한 결과 “무자극 (Negligible)” 으로 판정되어 본 임상실험에 사용한 크림은 피부 자극을 수반하지 않는 안전한 제품임을 확인하였다.

표 26. 크림 8종의 피부 첩포시험 결과

No	시료명	반응자수		30분 경과 후				24시간 경과 후				48시간 경과 후				피부 평균 자극도
				1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
#1	Cream	홍반	10	5	-	-	-	3	-	-	-	5	-	-	-	0.14 <sup>1)</sup>
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#2	Collagen Cream	홍반	9	2	-	-	-	5	-	-	-	5	-	-	-	0.13
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#3	Carrot SEL Cream	홍반	6	2	-	-	-	4	-	-	-	5	-	-	-	0.12
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#4	Carrot ANFLA Cream	홍반	6	2	-	-	-	3	-	-	-	5	-	-	-	0.11
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#5	Mushroom SEL Cream	홍반	10	3	-	-	-	5	-	-	-	4	-	-	-	0.13
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#6	Mushroom ANFLA Cream	홍반	7	2	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-	0.11
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#7	Pine Needles SEL Cream	홍반	15	5	-	-	-	6	-	-	-	7	-	-	-	0.19
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#8	Pine Needles ANFLA Cream	홍반	8	2	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-	0.11
		부종	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>1)</sup> 계산식 = (5+3+5)/(31×3)=0.14

이상 서로 다른 마스크팩 및 크림 제품을 대상으로 임상평가를 수행한 결과 농산자원을 추출원물로 한 효소처리 추출물 적용 화장품은 동물성 콜라겐을 소재로 한 화장품에 비해 수분 보유 능력이 유사하거나 우수하였다. 이로 본 연구에서 수행한 국내 농산 자원을 원물로 한 효소처리 추출물 적용 화장품 (cream modeling mask, cream)은 기존 동물성 콜라겐의 대체 소재로 적합한 것을 확인하여 이들의 화장품 소재 및 화장품을 대상으로 할랄 인증 작업을 수행하였다.

### (3) 할랄 인증 절차

본 사업에서는 할랄 인증 대상 국가로 인도네시아를 선정했으며, 이들 국가에서 할랄 인증을 평가, 발급하는 기관은 LPPOM MUI이다. LPPOM MUI (Lembaga Pengkajian Pangan Obat-obatan dan Kosmetika Majelis Ulama Indonesia)는 식품, 의약품, 화장품 등의 할랄성을 평가하는 MUI의 기능을 수행하기 위하여 인도네시아에서 1989년 1월 6일에 설립된 기관으로 1개 중앙기구와 33개 지역별 기구를 두고 있다. 인도네시아 종교부령 2001년 519호에 의거한 유일의 할랄 인증 기관이다.

주관기관은 인도네시아에 소재한 고객사에 다양한 제품군을 수출중으로, 본 고객사는 자사 수출액의 많은 비중을 차지하고 있다. 할랄 인증은 본 수출전략사업의 목표임과 동시에 2019년부터 인도네시아로 수출되는 모든 제품군에 대해 할랄 인증이 의무화 되었기 때문에 주관기관은 본 고객사로의 수출을 목

표로 할랄 인증을 작업을 수행하였다.

(가) 할랄 인증 대행업체의 선정

주관기관은 국내에서 유일하게 LPPOM MUI와 인증 대행 관계를 맺은 “인니 할랄 코리아”와 계약을 체결하고(그림 17) 할랄 인증에 필요한 절차를 단계별로 진행하였다.

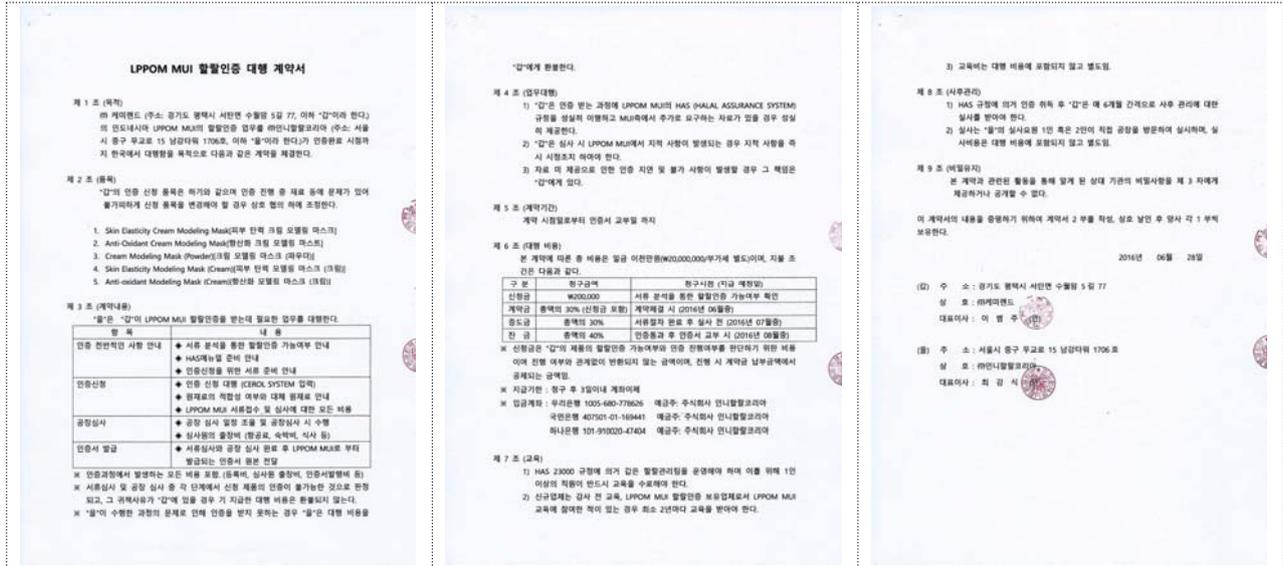


그림 17. 주관기관과 LPPOM MUI 에이전트인 “인니할랄코리아”와 체결한 계약서 사본

(나) 할랄 인증

① 용어 정리

할랄 인증을 받기 위해서는 할랄 인증 매뉴얼을 작성해야 하며, 관련 문서로는 HAS 23000:1 (할랄 보증 시스템 기준한 할랄인증 요구사항, Persyaratan Sertifikasi Halal : Kriteria Sistem Jaminan Halal)과 HAS 23000:2 (할랄 인증 요구 사항 : 정책 및 절차, Persyaratan Sertifikasi Halal: Kebijakan dan Prosedur) 이 있다.

- 할랄 보증 시스템 (Sistem Jaminan Halal : SJH)은 LPPOM MUI 의 요구에 따라 할랄 생산 과정의 지속 가능성을 유지하기 위하여 재료, 생산 과정, 제품, 인적 자원 및 절차를 관리할 목적으로 수립, 시행, 유지되는 통합 관리시스템
- 할랄 인증은 업체의 SJH 시행이 LPPOM의 요구 사항을 충족시킴을 입증하기 위한 여러 단계를 통하여 할랄 인증을 획득하기 위한 과정을 의미
- 할랄 인증서는 이슬람 권고 위원회 (Komisi Fatwa) 회의의 결정을 통해 MUI 에서 발행하는 서면 파트와 LPPOM MUI 에 의해 시행되는 감사 과정을 바탕으로 한 제품의 할랄성에 대해 기술.
- 이슬람 권고 위원회는 MUI 위원회로 특정 사안의 법적 지위에 관한 이슬람 법률의 칙령을 내리는 것을 그 책임
- 할랄 인증은 원료, 중간제품, 완제품 및 이를 뒷받침하는 제품의 형태로 되어 있는 식품, 음료, 의약품, 화장품 등을 포함한 모든 완제품에 대해 요청 가능

② 할랄 인증 시스템 (SJH)

- 정직 : 업체는 반드시 SJH 매뉴얼을 따라 사용한 모든 재료와 수행한 생산 과정을 정직하게 기술하여야 하며, SJH 매뉴얼에 기재된 내용을 바탕으로 일상적인 할랄 생산 운영
- 신뢰 : LPPOM은 업체가 스스로 SJH 수립, 시행, 유지할 것을 요청하고 이를 신뢰
- 참여적 개입 : 업체는 경영진과 인력이 SJH 시행을 유지
- 절대성 : 할랄 생산에 사용되는 모든 재료는 반드시 할랄(Halal)임을 확인. SJH는 제품의 할랄성과 관련, 저, 중, 고도의 위험이 있는 재료의 등급을 인정치 않음

### ③ 할랄 보증 시스템 기준

#### ㉠ 할랄 정책

- 최고 경영진은 반드시 일관되게 할랄 제품만을 생산하겠다는 업체의 약속과, SJH 개발 및 시행 근거를 나타내는 서면 할랄 정책을 수립.
- 최고 경영진은 업체의 모든 이해 관계자들에게 할랄 정책을 배포, 알릴 것

#### ㉡ 할랄 관리팀

- 최고 경영진은 반드시 SJH 개발, 관리, 평가 원한을 지닌 할랄 관리팀을 수립
- 할랄 관리팀의 의무, 책임, 권한은 분명하게 정의 되어야 하며, 관련된 모든 당사자/ 부서/ 부문 이 이해하고 있을 것
- 할랄 관리팀은 반드시 핵심 활동에 관련된 모든 부서를 포함할 것
- 최고 경영진은 SJH 개발, 시행, 연속성 개선에 필요한 자원을 제공할 것

#### ㉢ 훈련 및 교육

- 업체는 반드시 신규 직원을 포함하여 핵심활동에 연관된 모든 자들의 훈련 관련 서면 절차를 보유
- 훈련(내부 또는 외부)은 최소 일년에 한 차례 이상 또는 필요에 따라 그 예정된 시간에 실시
- 업체는 반드시 LPPOM MUI에서 실시하는 훈련에 참여할 것
- 신규 업체 감사 전
- 할랄 인증 보유 업체로 LPPOM MUI 의 훈련에 참여한 적이 없는 경우, 또는 할랄 인증 갱신 전
- 할랄 인증 보유 업체로 LPPOM MUI 의 훈련에 참여한 적이 있는 경우 , 또는 최소 2년에 한번
- 훈련에는 인력의 역량을 확인하기 위한 이수 기준이 규정될 것
- 훈련 기록은 반드시 유지, 보관될 것

#### ㉣ 사용 재료

- 돼지 또는 그 파생물에서 유래한 것은 사용 불가
- 캄르 (Khamr, 알콜성 음료) 또는 캄르에서 물리적으로 분리된 캄르 유래물은 사용 불가
- 피, 부패한 고기, 인체의 일부의 것은 재료로 사용 불가
- 돼지 또는 그 파생물을 재료의 하나로 사용하는 제품을 만드는 동일한 생산 시설에서 제조되는 제품은 할랄 인증 불가
- 첨가제, 가공 보조제 및 생산시설에서 유래할 수 있는 하람 (Haram, 정결하지 않은 것) 또는 나지스 (Najis, 불결한 것) 재료와 혼용 불가
- 동물 기반 재료는 반드시 할랄 동물에서 유래한 것이어야 하며, 도축된 동물에 대해 도축은 반드시

시 이슬람의 샤리아 율법에 의해 이루어져야 하며, MUI 또는 MUI 가 승인한 할랄 인증 기관 또는 LPPOM MUI가 실시하는 직접 감사에 의한 할랄 인증으로 증명될 것

- 미생물 제품 기반의 재료
  - 재료는 인간에게 감염 또는 중독을 유발해서는 안됨
  - 배지의 원료, 첨가제, 가공 보조제에는 돼지 또는 그 파생물에서 비롯된 재료가 포함되어서는 안됨
  - 배지에서 분리하지 않고 얻은 미생물 제품의 배지는 반드시 순수한 할랄 재료로 구성되어야 함
  - 배지에서 분리하여 얻은 미생물 제품은 배지 원료가 돼지 또는 그 파생물에서 유래한 것이 아닌 하람 (금지된 것) 또는 나지스 (불결한 것) 재료로 사용하는 경우 반드시 하방 가공 공정에서 이슬람의 원칙 [타타이르 샤란 (tatahir syar'an)]에 따라 정화되어야 함
  - 미생물 제품이 재조합 미생물에서 비롯된 경우, 해당 미생물은 돼지 또는 인간에서 유래한 유전자를 사용해서는 안됨
- 알코올 / 에탄올
  - 알코올은 캄르 산업 (알코올성 음료 산업)의 부산물이어서는 안 됨
  - 식품 또는 음료의 생산 과정에서 알코올의 사용은 완제품에서 알코올을 탐지할 수 없는 수준이며 중간제품 (직접적으로 소비되지 않는 제품)의 알코올 함량이 1%를 넘지 않을 경우 허용 가능
  - 캄르에서 물리적으로 분리된 액체 형태의 캄르 (알코올성 음료) 부산물 또는 그 파생물은 사용할 수 없음
  - 양조 효모와 같이 고체 형태의 캄르 (알코올성 음료) 부산물 또는 그 파생물을 이슬람 원칙 [타타이르 샤란 (tatahir syar'an)]에 따른 과정을 통해 세척한 후 사용 가능
  - 캄르 (알코올성 음료) 부산물 또는 그 파생물은 그 재료/제품이 화학적 또는 생물학적 변형 반응(효소 또는 미생물 사용)을 통해 새로운 화합물을 만들기 위한 추가 반응 후 사용 가능
- 업체는 반드시 사용되는 모든 재료에 대한 근거 서류를 보유할 것
- 업체는 사용되는 재료의 모든 근거 서류가 유효함을 담보하기 위한 절차를 반드시 보유
- 돼지 또는 그 파생물에서 비롯된 재료와 동일한 시설에서 제조될 개연성/가능성이 있는 재료는 반드시 제조사의 돼지 미사용 시설 증명서로 뒷받침될 것

㉓ 제품

- 제품 브랜드 또는 명칭은 하람인 것 또는 이슬람 율법에서 부적절한 행위를 연상시키는 이름을 사용할 수 없음
- 제품의 특성 또는 감각적 설명은 하람 제품 또는 MUI 에서 하람 제품으로 명시하고 있는 것을 연상시켜서는 안됨

㉔ 생산시설

- 가공 산업
  - 생산 라인 또는 이를 뒷받침하는 장비는 절대로 할랄 제품과 돼지 또는 그 파생물을 포함하는 제품 사이에서 교대로 사용되어서는 안됨
  - 돼지 또는 그 파생물을 포함하는 제품을 사용하는 데에 사용된 적이 있는 생산 라인 또는 이를 뒷받침하는 장비를 할랄 제품 생산에 사용하고자 할 경우 반드시 물로 일곱(7) 차례 세척해야 하며 그중 한번은 흠, 또는 오염물의 맛, 향, 색을 제거할 수 있는 기타 재료를 사용해서 세척
  - 생산라인 또는 이를 뒷받침하는 장비를 할랄 인증 제품과 비할랄 인증 제품 (돼지 또는 그 파생

물을 포함하지 않는 것) 생산에 사용하는 경우, 교차 오염을 방지하기 위한 방법으로 반드시 세척할 것

- 창고 또는 임시 보관 시설에서의 재료와 제품의 저장은 반드시 하람 (금지된 것)과 나지스 (불결한 것) 재료와의 교차 오염이 없도록 할 것
- 생산 장비의 세척을 위한 장소 또는 시설은 절대로 돼지 또는 그 파생물을 포함하는 재료와 접촉한 적이 있는 장비와 함께 또는 교대로 사용할 수 없음

#### ㉔ 핵심 활동에 관한 서면 절차

- 업체는 반드시 핵심 활동의 수행에 관한 서면 절차를 보유하고 있을 것
- 서면 절차는 반드시 핵심 활동과 연관된 모든 당사자들에게 배포되어야 하며, 시행 기록을 반드시 유지, 보관하여야 함
- 핵심 활동에 관한 서면 절차의 유효성을 반드시 최소 일년에 한 차례 이상 평가해야 함. 평가 결과는 핵심 활동을 책임지는 당사자들에게 전달될 것. 필요한 시정 조치 및 그 제한 시간을 반드시 결정할 것
- 핵심 활동에는 새로운 재료의 선택, 재료 구매, 제품 조성, 반입 재료의 점검, 생산, 생산 시설의 세척, 재료 및 제품의 저장 및 취급, 운송, 전시, 방문자 규제, 메뉴 결정, 마취, 도축 등이 포함될 수 있으며 새로운 사업 과정에 맞게 조정
- 서면 절차 기준
  - 새로운 재료 선택 : 절차는 반드시 인증 제품에 사용될 모든 재료가 LPPOM MUI의 승인을 받은 것임을 담보
  - 재료 구매 : 절차는 반드시 인증 제품에 사용될, 구입하는 모든 재료가 LPPOM MUI의 승인을 받은 것임을 담보
  - 제품 조성 / 신제품 개발 : 절차는 반드시 조성에 사용되는 모든 재료가 LPPOM MUI의 승인을 받은 것임을 담보해야 하며, 표준 조제법을 규정할 것
  - 반입 제품의 점검 : 절차는 반드시 라벨에 표시되는 정보에 대한 근거 서류에 명기된 정보의 적합성을 담보. 그러한 정보에는 재료명, 생산자명, 원산지, 할랄 로고 등이 포함되며, 선적을 위해서는 할랄 인증서에 로트 번호와 생산일이 표시
- 생산 : 절차는 반드시 생산 과정에 사용되는 모든 재료가 LPPOM MUI의 승인을 받은 것이며, 생산 과정에 사용되는 모든 조제법이 표준 조제법과 동일한 것임을 담보
- 생산 시설 및 이를 뒷받침하는 장비 세척 : 반드시 세척 과정을 통해 돼지 이외의 하람 (금지된 것)과 나지스 (불결한 것)의 재료를 포함한 일체의 오염 재료가 제거될수 있음을 담보, 세척제는 하람과 나지스의 재료로 만든 것은 사용할 수 없음
- 재료 및 제품의 저장과 취급 : 절차는 반드시 재료/제품의 저장 및 취급 중 하람 (금지된 것)과 나지스 (불결한 것)의 재료/제품의 오염이 일어나지 않음을 담보
- 운송 : 절차는 반드시 할랄 제품이 하람 (금지된 것) 또는 나지스 (불결한 것) 재료에 의해 오염되지 않았음을 담보

#### ㉕ 이력 관리

- 업체는 반드시 인증 제품의 이력 관리를 위한 서면 절차를 보유하고 있을 것
- 절차는 반드시 인증 제품이 승인된 재료에서 유래한 것이며, 할랄 생산 시설을 충족하는 시설에서

만들어진 것임을 담보

- 업체가 재료의 코딩을 실시하는 경우, 업체는 반드시
  - 동일 코드의 재료가 동일한 할랄 등급을 가지며,
  - 모든 핵심 활동에서 재료에 대한 정보를 추적 가능하도록 담보
- 만약 재포장 또는 재라벨링 한 재료의 경우, 새 라벨과 원래의 라벨에 적힌 정보 (제품명, 생산자명, 원산지, 그리고 할랄 로고)의 적합성이 보장될 것

㉔ 할랄 비적합 제품의 취급

- 업체는 반드시 할랄 기준을 충족하지 않는 재료로부터 가공된 것 또는 그러한 시설에서 생산된 제품의 취급을 위한 서면 절차를 보유할 것
- 기준을 충족하지 않는 제품은 절대로 할랄 제품을 요구하는 소비자에게 판매될 수 없음
- 기준을 충족하지않고 이미 판매된 제품은 회수
- 비적합 제품의 취급에 대한 기록은 반드시 유지, 보관할 것

㉕ 내부 감사

- 업체는 반드시 할랄 보증 시스템의 내부 감사를 위한 서면 절차를 보유하고 있을 것
- 내부 감사는 최소 6개월마다 또는 필요시 그 이상 일정을 바탕으로 시행될 것
- 내부 감사는 권능 있는 독립 내부 할랄 감사에 의해 실시될 것
- 내부 감사의 결과는 감사 대상이 된 각 활동을 담당하는 당사자들에게 제공될 것
- 필요한 시정조치 및 그 제한 시간을 꼭 결정할 것
- 시정 조치의 결과는 반드시 그로써 내부 감사 중에 밝혀진 비적합 사항을 해결하고 향후 재발을 방지할수 있는 것이어야 할 것
- 내부 감사의 결과는 매 6개월마다 정기 보고서로서 LPPOM MUI에 전달할 것
- 내부 감사의 결과는 반드시 유지, 보관되어야 할 것

㉖ 경영진의 검토

- 최고 경영진은 반드시 할랄 보증 시스템 시행의 유효성을 최소 일년마다, 또는 필요시 그보다 잦은 빈도로 검토할 것
- 평가의 결과는 반드시 각 활동을 담당하는 당사자에게 제공될 것
- 평가 결과의 후속 조치는 반드시 시간제한이 정해져야 함
- 경영진 검토의 기록은 반드시 보관, 유지되어야 함

(㉗) 공장에 대한 할랄 인증

주관기관은 상기 “㉔ 생산시설” 중 “가공산업”에 따라 타 제품 제조에 첨가되는 성분이 하람 (금지된 것) 내지 나지스 (불결한 것)일 확률이 있으므로, 본 사업에서 진행중인 할랄 인증을 위한 마스크 제품을 제조할 장소는 공장중의 일부에 대한 공간으로 확보하였고, 이의 도면을 그림 18에 기재하였다.

출입문을 두 곳으로 나누어 한 곳은 제품과 원료 보관 장소로 통하는 곳과, 다른 한쪽은 원료 보관 및 계량실이 위치한 제조실로 연결, 출입문의 폭은 2m로 하여 제조에 필요한 원료 및 제조가 완료된 제품을 운송하는 데에 불편함이 없도록 설계하였다.

원료 보관시에는 본 할랄 인증 제품에 사용되는 원료만을 따로 보관하여 다 만들어진 완제품도 이 곳

에서 보관할 수 있도록 하였다. 그 옆 공간에는 계량실과 쓰고 남은 원료를 보관하는 잔량 원료 보관 실로 명하여 제조 직전 원료를 칭량하고, 이에 남은 원료를 이곳에서 보관할 수 있는 공간을 마련하였다. 1차년도 할랄 인증 제품은 Cream Modeling Mask 로 본 제품군의 제조에 필요한 설비를 아래와 같이 정리하였다.

- 추출기 : 원물 적용 효소 처리 추출물 제조
- V-Cone Mixer : 칭량된 파우더 원료를 혼합
- Disper (mixer) : Modeling Mask (Cream) 제조용 액상 장비
- 건조기 : 하절기 수분 흡수된 원료에 대한 건조 처리

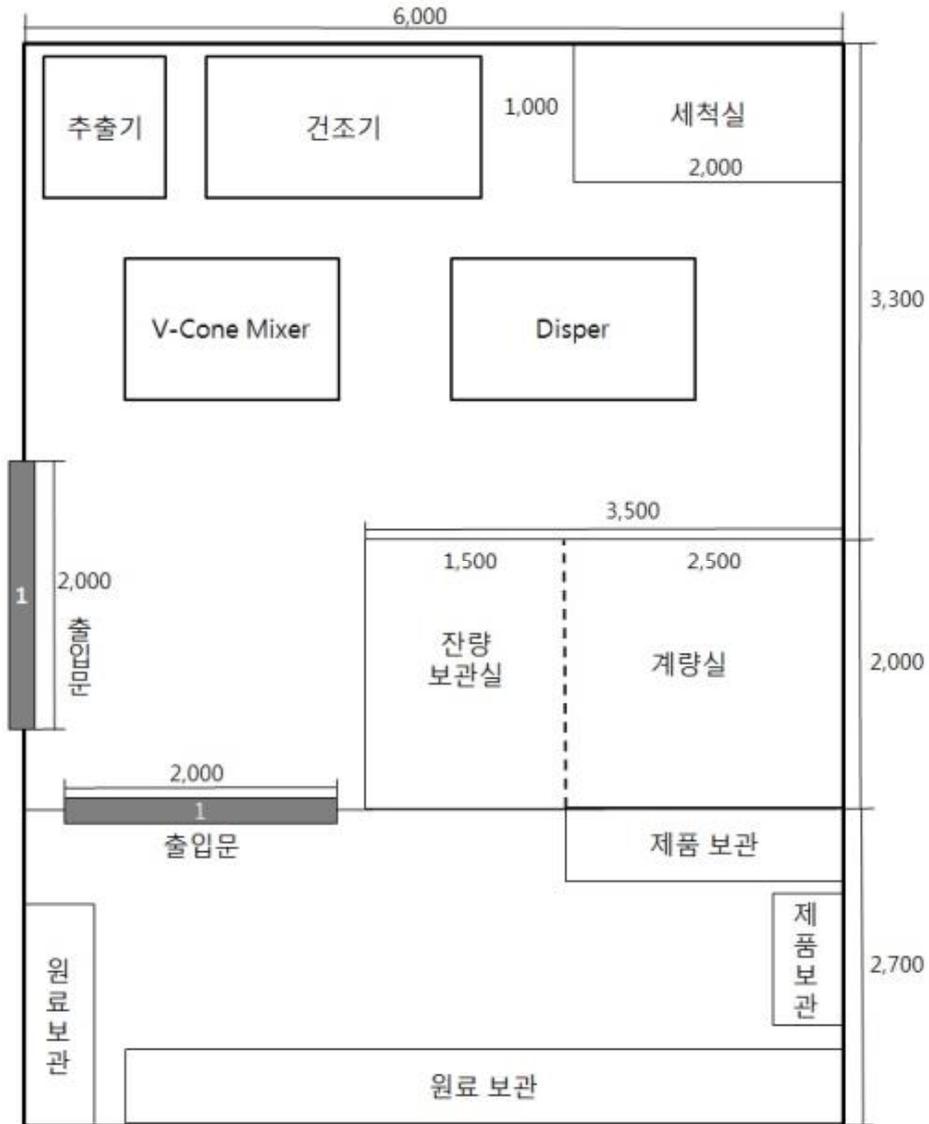


그림 18. 할랄 인증을 위한 공장 배치 도면

상기 열거한 4가지 장비 이외에 다른 장비가 필요할 경우 별도의 장비를 도입하여 타제품 제조에 사용되는 장비와 혼용되지 않도록 배치하였다. (Ex, 파우더 사용시 발생될 미세 파우더 입자에 대한 인체 흡입을 방지하기 위해 이동식 집진 설비 등) 생산도구의 경우 세정을 위해 세척 공간을 별도로 마련, 이들 도구들을 청결하게 사용, 관리할 수 있도록 하였고 본 공간 역시 다른 생산 설비와의 교차 오염을 방지하기 위해 본 할랄 인증 제품 제조 구획 내에 별도의 세척실을 두어 별도로 관리하였다.

(4) 주관기관의 할랄 인증을 위한 준비작업

(가) HAS 23000 에 입각한 할랄 보증 시스템 (인증기관 : LPPOM MUI) 확립

이상 설명한 바와 같이 추출물 및 크립 모델링 마스크팩 제품군에 대한 할랄 인증은 LPPOM MUI 를 통해 진행하였고, 자사에서 할랄 인증을 신청한 제품군은 추출물 4종, 마스크팩 12종으로 총 16종 으로 이를 표 27에 기재하였다.

표 27. 할랄 인증을 위한 16종 신청 제품

구분	제품명 (영문)	제품명 (국문)	제품 설명
추출물	Carrot SEL Extract	당근 SEL 추출물	원물 - 당근, 적용 효소 - Papain
	Carrot ANFLA Extract	당근 ANFLA 추출물	원물 - 당근, 적용 효소 - Bromelain
	Mushroom SEL Extract	버섯 SEL 추출물	원물 - 느타리버섯, 적용 효소 - Papain
	Mushroom ANFLA Extract	버섯 ANFLA 추출물	원물 - 느타리버섯, 적용 효소 - Bromelain
모델링 마스크 (파우더)	Carrot SEL Modeling Mask (Powder)	당근 SEL 모델링 마스크 (파우더)	보습력 강화 및 겔화 속도 조절제 함유 파우더 (마케팅 원물 및 효소 - 당근 및 Papain)
	Carrot ANFLA Modeling Mask (Powder)	당근 ANFLA 모델링 마스크 (파우더)	보습력 강화 및 겔화 속도 조절제 함유 파우더 (마케팅 원물 및 효소 - 당근 및 Bromelain)
	Mushroom SEL Modeling Mask (Powder)	버섯 SEL 모델링 마스크 (파우더)	보습력 강화 및 겔화 속도 조절제 함유 파우더 (마케팅 원물 및 효소 - 느타리버섯 및 Papain)
	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Powder)	버섯 ANFLA 모델링 마스크 (파우더)	보습력 강화 및 겔화 속도 조절제 함유 파우더 (마케팅 원물 및 효소 - 느타리버섯 및 Bromelain)
모델링 마스크 (크림)	Carrot SEL Modeling Mask (Cream)	당근 SEL 모델링 마스크 (크림)	Carrot SEL Extract 적용 모델링 마스크 크림
	Carrot ANFLA Modeling Mask (Cream)	당근 ANFLA 모델링 마스크 (크림)	Carrot ANFLA Extract 적용 모델링 마스크 크림
	Mushroom SEL Modeling Mask (Cream)	버섯 SEL 모델링 마스크 (크림)	Mushroom SEL Extract 적용 모델링 마스크 크림
	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)	버섯 ANFLA 모델링 마스크 (크림)	Mushroom ANFLA Extract 적용 모델링 마스크 크림
모델링 마스크 (파우더 + 크림)	Carrot SEL Cream Modeling Mask	당근 SEL 크림 모델링 마스크	Carrot SEL Modeling Mask (Powder) + Carrot SEL Modeling Mask (Cream)
	Carrot ANFLA Cream Modeling Mask	당근 ANFLA 크림 모델링 마스크	Carrot ANFLA Modeling Mask (Powder) + Carrot ANFLA Modeling Mask (Cream)
	Mushroom SEL Cream Modeling Mask	버섯 SEL 크림 모델링 마스크	Mushroom SEL Modeling Mask (Powder) + Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)
	Mushroom ANFLA Cream Modeling Mask	버섯 ANFLA 크림 모델링 마스크	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Powder) + Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)

본 연구에서는 ① 추출물, ② 모델링 마스크 (파우더), ③ 모델링 마스크 (크림), ④ 모델링 마스크 (파우더 + 크림) 등 상기 16종의 제품군을 개발하여 이에 대한 할랄 인증 작업을 진행하였다.

- 추출물은 2종 원물을 대상으로 Papain 및 Bromelain 을 처리한 효소 처리 추출물 사용
- Modeling Mask (Powder) 는 보습성분 및 겔화 속도 조절제가 첨가, 각 제품 Brand의 컨셉에 맞게 차별화
- Modeling Mask (Cream)은 본 사업에서 개발한 추출물 4종이 첨가된 것, 첨가 원물에 따라 다른

효능 구현이 가능

- Modeling Mask (Power + Cream)은 상기 파우더와 크림을 서로 합친 세트에 대한 제품명, 본 사업에서 개발한 파우더와 크림이 서로 교반, 반응해야 마스크팩으로써의 효능 발현 가능

**(나) 할랄 보증 시스템 매뉴얼**

할랄 보증 시스템 매뉴얼이란, 할랄 생산 지속 가능성을 보증하는 매뉴얼로 할랄 인증을 받기 위해 가장 기본이 되는 서류로, 본 사업에서 할랄 인증을 받기 위해 주관기관인 (주) 케미랜드에서는 할랄 보증 시스템 매뉴얼을 작성하였고, 이에 대한 요약본을 그림 19에 기재하였다. 본 문서는 자국어 및 영문으로 표기하여 LPPOM MUI 담당 심사관이 그 내용을 확인할 수 있도록 하였으며, 자국어로의 표기를 통해 할랄 담당자가 이의 내용을 숙지하도록 하였다.

01. 할랄 보증 시스템 매뉴얼 결장	02. 목차	03. 승인서	04. 문서 배포 목록	05. 개정 문서 목록	A. 기본사항
B. 용어 및 약어 목록	C. 할랄 보증 시스템 및 기준	부록 1	부록 2	부록 3	부록 4

그림 19. 할랄 보증 시스템 매뉴얼의 주 내용

위 그림에서 기재한 할랄 보증 시스템의 주요 내용은 아래와 같이 정리하였다.

- ① 승인서 : (주) 케미랜드의 할랄 보증 시스템 매뉴얼을 변경하거나 추가할 경우 회사 대표자의 서명이 기재된 문서
- ② 문서 배포 목록 : 할랄 보증 시스템 매뉴얼을 제공받을 회사 관련 부서 리스트
- ③ 개정 문서 목록 : 할랄 인증을 받은 후 특정 원료 및 공정 변경이 수반될 경우 변경내용을 문서화, 명문화된 모든 문서를 한 번에 볼수 있는 리스트
- ㉗ 기본사항 : 할랄 인증을 받을 회사의 기본 정보 및 할랄 인증의 목적 및 인증 범위를 기술
- ㉘ 용어 및 약어 목록 : 할랄 보증 시스템에 사용되는 용어 또는 약어를 설명
- ㉙ 할랄 보증 시스템 기준
  - 할랄 정책 : (주) 케미랜드가 할랄 인증을 받기 위해 회사에서 어떠한 정책을 통해 할랄 인증을 취득하려 하는지를 밝힌 정책 목표
  - 할랄 관리팀 : (주) 케미랜드 내 할랄 인증을 받기 위해 최소한의 팀과 구성원을 명시. 할랄 관리팀

의 요건 및 업무, 책임, 권한 등을 밝힘

- 연수 및 교육 : 할랄 관리팀장 및 담당자의 할랄 보증 시스템에 대한 교육을 정기적으로 이수할 것, 교육 목적은 LPPOM MUI의 할랄 인증 규정 (HAS 23000)을 이해시키기 위함. 직원 중 최소 한명은 2년에 1회마다 외부 교육을 받아야 하며 내부 교육은 외부 교육을 받은 자가 전 직원을 대상으로 최소 1년에 2회 진행
- 재료 : 할랄 보증 시스템의 기준에 따라 LPPOM MUI 승인을 얻은 재료만 할랄 제품을 생산하기 위해 사용, 재료 목록표 변경이 있을 경우 6개월에 한번 보고서 제출과 함께 LPPOM MUI에 통보, 도살된 가축, 할랄 이력 추적이 어려운 재료 그리고 복합 비타민과 초콜릿 등은 할랄 인증을 받아야 함
- 제품 : (주) 케미랜드는 이슬람 율법에 어긋나지 않는 상표명 내지 제품명을 사용한 할랄 제품을 생산하며, 할랄 제품 출시 전에 생산하는 모든 제품은 할랄 인증을 받아 등록
- 생산 시설 : 할랄 제품 생산시 회사 소유의 생산 시설을 사용, 수탁업체의 생산 시설도 제품에 적용 가능, 추가 생산 시설이 있을 때마다 할랄 보증 시스템에 새로 등록할 것
- 주요 작업 절차 : (주) 케미랜드는 HAS 23000 시스템 절차를 토대로 주요 작업 실행과 관련하여 절차를 구성, 이는 할랄 관리팀과 전 직원이 공유하고 최소 1년에 한번 내부 감사를 통해 평가
  - 1 재료 선택 절차 : 신재료는 할랄 경영팀을 통해 보고, LPPOM의 신재료 사용 허가 받을 것
  - 2 재료 구매 절차 : LPPOM MUI가 허락한 재료 목록표 참고, 재료 구매는 ERP 시스템을 통해 구매부가 주관
  - 3 제품 성분 구성 및 신제품 개발 : 제품 생산의 주재료, 제품 성분 구성표와 신제품 절차를 빠짐없이 문서화
  - 4 입고 재료 검사 절차 : (주) 케미랜드 공장이 구매한 재료 (Positive List 상의 재료 제외)가 입고될 때마다 재료 포장 라벨을 QC 부서에서 검사, 입고 재료 검사는 모든 재료들의 샘플링을 통해 진행
  - 5 생산 절차 : 생산 시설 기준을 충족시키는 시설로 제품 생산, 생산 과정 기록은 모두 문서화,
  - 6 생산 시설 및 생산 도구 세척 과정 : 불결한 것으로 오염된 생산 시설 및 도구는 모두 깨끗하게 세척, 세척제는 모두 할랄 제품으로 구성할 것, 세척은 물을 사용하거나 물 대신 다른 것 (가루, 텍스트린, 솔질, 건조)을 사용할 수 있음
  - 7 재료 및 제품 취급과 보관 절차 : 생산시설과 창고에서의 제품 보관은 비할랄 재료로부터 오염시키지 말 것, 공장 창고에서 보관중인 재료는 LPPOM MUI 가 허가한 재료 목록에 있는 재료여야 함
  - 8 운송절차 : 운송은 재료를 공급 업체에서 회사 창고로 운반, 회사 창고에서 수탁 창고로 운반 및 회사에서 대리점으로 운반하는 것을 의미, (주) 케미랜드 공장에서는 운송도구는 할랄 재료/ 제품을 운반하는데 사용, 비할랄 제품으로부터 오염을 방지할 것
- 재료 이력 추적 : (주) 케미랜드에서 생산되는 모든 제품은 재료 이력 추적이 가능해야 함. 이는 LPPOM MUI가 허가한 재료만을 사용해야 하며, 특히 돼지고기 성분이 사용되지 않은 제조 설비에서 생산된 것
- 기준 미달의 제품 처리 : 기준 미달 제품군은 모두 별도로 구분, 이들은 내부 감사, 공급 업체 감사, 제품 검열, 연구소 분석 및 외부 정보 업체 등을 통해 전달 받음, 기준 미달 제품은 폐기 처분할 것
- 내부 감사 : 할랄 내부 감사는 6개월에 한번 또는 필요시 더 자주 시행, 적용 범위는 할랄 보증

시스템 (11개의 기준) 적용과 시행 결과임. 내부 감사는 인터뷰, 시찰, 서류 감사, 시스템 확인 등을 통해 진행, 할랄 내부 감시자는 할랄 인증 규정에 따라 HAS23000 방문 교육 또는 외부 교육에 참여한 적이 있어야 함

- 경영 관리 진단 : 경영진 평가는 ISO 9001/14001 시스템 경영진 평가와 동일하게 이루어 짐. 경영진 평가 자료는 내부 감사 결과, 외부 감사, 이전 경영진 평가로부터의 시정 조치, 할랄 보증 시스템 변경 사항 등임

부록 1. (주) 케미랜드 생산 시설 목록 : 공장 및 생산 시설 목록 기재

부록 2. (주) 케미랜드 할랄 관리팀 결정서 : 회사를 대표해 아래와 같이 할랄 관리팀을 구성

할랄 관리팀 매니저, 구매, QC/QA, 해외 영업, 국내 영업, 물류팀, 생산

부록 3. 재료 기준 : 사용하면 안되는 원료들 : 알코올 함유된 식품, 피, 시체, 인간의 신체 일부, 돼지고기 또는 돼지고기 첨가물을 생산하는 생산 시설에서 생산된 재료, 알코올 음료에서 추출한 알코올

부록 4. 전 제품의 재료 목록표 : 재료명, 생산지명, 생산지 위치, 할랄 인증서 여부, 할랄 인증서 정보, 품목제조 보고서, 제조 공정도 등등 기재

#### (다) 케미랜드 SOP 매뉴얼

SOP (Standing Operating Manual)는 상기에 언급한 11가지의 할랄 보증 시스템을 수행하기 위한 세부 절차서로, 본 할랄 인증을 받기 위해 작성한 SOP 매뉴얼 종류를 표 28에 기재했으며, 이들의 각 결면을 그림 20에 기재하였다.

표 28. 할랄 보증 시스템에 대한 SOP 종류

No	SOP	No	SOP
01	교육 표준 절차서 (CL-HDR-01)	10	세척제 및 생산도구 위생 입증 절차서 (CL-PRO-02)
02	할랄 재료 모니터링 절차서 (CL-HAS-01)	11	재료와 제품의 보관 및 취급절차서 (CL-WH-01)
03	신제품 개발 절차서 (CL-NDP-01)	12	운송 절차서 (CL-WH-02)
04	수탁공장 채택 절차서 (CL-QA-01)	13	이력 추적 절차서 (CL-QA-02)
05	신재료 선택 절차서 (CL-NPD-02)	14	기준 미달제품 처리 절차서 (CL-QA-03)
06	재료 구매 절차서 (CL-PUR-01)	15	판매된 제품의 수거 절차서 (CL-QA-04)
07	입고재료 제품 샘플링 절차서 (CL-QC-01)	16	감사 표준 절차서 (CL-QA-05)
08	입고재료 검사 절차서 (CL-QC-02)	17	경영진 평가 절차서 (CL-QA-06)
09	생산 표준 절차서 (CL-PRO-01)		

					
01. CL-HDR-01	02. CL-HAS-01	03. CL-NDP-01	04. CL-QA-01	05. CL-NPD-02	06. CL-PUR-01
					
07. CL-QC-01	08. CL-QC-02	09. CL-PRO-01	10. CL-PRO-02	11. CL-WH-01	12. CL-WH-02
					
13. CL-QA-02	14. CL-QA-03	15. CL-QA-04	16. CL-QA-05	17. CL-QA-06	

그림 20. 할랄 실사를 위한 각종 절차서 (SOP) 17종

**(라) 할랄 정책**

할랄 정책이란 (주) 케미랜드가 일관성 있고, 지속적인 할랄 제품 생산하겠다는 최고 경영진의 약속 서명서로 별도 또는 다른 시스템 정책과 통합하여 작성될 수 있다. (주) 케미랜드는 이를 약속하는 정책을 마련하였고 이를 그림 21에 기재, 할랄 정책은 본사 및 지사에 각각 비치하여 모든 직원들에게 공유하여 출입구 등 눈에 잘 띄는 곳에 게시하였다.

		
국문	영문	액자화하여 자사에 비치

그림 21. (주) 케미랜드의 할랄 정책

**(마) 할랄 관리자 임명**

할랄 관리팀을 구성하기 위해 각 부서에서 한명씩 관리자로 임명하고, 이들이 할랄 정책을 수행하는데

문제가 없도록 하였다. 할랄 관리팀장은 LPPOM MUI에서 진행하는 외부 교육에 참석한 직원이어야 하며, 할랄 관리팀원은 회사 대표자가 임명하는데, 이를 증빙할 수 있는 문서를 그림 22에 기재하였다. 주 관기관은 17년 3월 31일 해당 부서를 대표하는 관리자를 각각 한명씩 임명하였다.

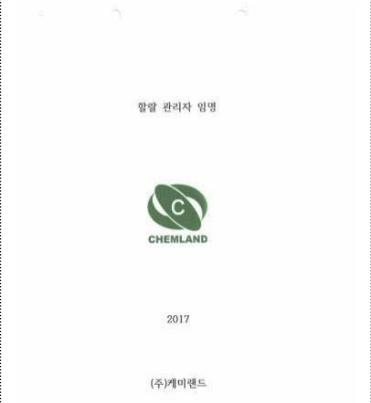
 <p>할랄 관리자 임명</p> <p>CHEMLAND</p> <p>2017</p> <p>(주)케미랜드</p>	 <p>(주) 케미랜드</p> <p>할랄 관리자 임명 증빙 공문</p>
할랄 관리자 임명 서류	회사 대표자 직인을 통한 할랄 관리자 임명 증빙 공문

그림 22. 할랄 관리팀 임명 관련 증빙 자료

**(바) 할랄 정책 전파 증거**

상기 회사에서 정한 할랄 정책을 국내, 외 거래처에 전파했다는 증빙서류로 이들 자료는 벽보(포스터), 메일, 팩스 등의 방법이 있다. 자사는 국내 거래선의 경우 국내 영업팀이, 해외 거래선의 경우 해외 영업팀에서 메일을 통해 이들 정책을 전파하였고, 이들의 증빙은 그림 23에 기재하였다.

					
할랄 정책 알립문 (국문)	01. 아모레퍼시픽	02. LG 생활건강	03. 한국콜마	04. 코스맥스	05. 애경산업
<b>국내 거래처</b>					
					
할랄 정책 알립문 (영문)	01. 인도네시아 거래처	02. 말레이시아 거래처	03. 태국거래처	04. 터키거래처	05. 인도거래처
<b>해외 거래처</b>					

그림 23. 국내 및 해외 거래처에 (주) 케미랜드의 할랄 정책 전파 증거

주관기관의 할랄 정책을 알린 국내 업체로는, 화장품 판매 1, 2위 업체인 아모레 퍼시픽, LG 생활건강과 화장품 OEM 제조 1, 2위 업체인 한국콜마와 코스맥스 그리고 화장품과 생활용품을 주로 생산하는 애경산업 등에 전파했으며 그 이외의 화장품 제조 중소기업에 전파를 완료하였다. 해외 거래처의 경우 인도네시아에 소재 업체를 비롯, 자사 매출에 높은 비중을 차지하는 업체 위주로 전파하였다.

**(사) 내부 교육 시행 증거**

LPPOM MUI에서 주관하는 HAS 23000 외부 교육을 참석한 직원이 관리팀장이 되어 1년에 2회 내부 교육을 진행하도록 규정하였다. 자사는 2016년 12월 23일을 시작으로 매년 6개월에 한번씩 할랄에 대한 내부 교육을 시행하였고, 교육 후 직원들을 대상으로 평가했던 자료를 그림 24에 기재하였다.

외부에서 HAS 23000 교육을 받은 할랄 관리 팀장이 해당일에 군포 및 안성(평택)에서 근무중인 직원을 대상으로 할랄 인증과 관련된 교육을 진행한 후 그 내용을 확인하였으며, 해당 평가서를 내부 교육 시행의 증거로 LPPOM MUI에 제출 완료하였다.

(주) 케미랜드 군포사무실 직원 대상 내부교육 시행 증거

(주) 케미랜드 평택공장 직원 대상 내부교육 시행 증거

그림 24. (주) 케미랜드 내부 교육 시행 증거

**(아) 제조 공정도**

할랄 인증을 받으려고 하는 총 제품 16종 [추출물 4종, 모델링 마스크 (크림) 4종, 모델링 마스크 (파우더) 4종 및 크림 모델링 마스크 (세트, 파우더 + 크림) 4종] 에 대한 제조 공정도를 준비하여 LPPOM MUI에 제출 완료하였다.

본 공정도를 할랄 인증시 확인하는 목적은 인증 대상 제품 제조시 동물 유래 성분 내지 알코올 음료에서 유래한 알코올 성분이 혼입되었는지의 여부를 확인하기 위함이며, 제출 서류에 대해서는 그림 25에 기재하였다.

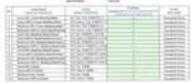
				
01. 할랄 인증 대상 제품 16종	02. 추출물 4종	03. 모델링 마스크 (크림 4종)	04. 모델링 마스크 (파우더 4종)	05. 크림 모델링 마스크 (파우더 + 크림)

그림 25. 할랄 인증 대상 제품 16종의 제조 공정도

(자) 기타

돼지고기 미사용 증명서 및 공장 위치 및 지도를 그림 26에 기재하였다. 돼지고기 미사용 증명서 (Pork Free Statement)는 할랄 인증 대상 제품 16종에 돼지고기 또는 돼지고기 유래 첨가물을 포함하고 있지 않다는 사실을 자사에서 약속하는 서류이다.

할랄 인증 시설 배치도는 자사에서 할랄 인증 제품이 비할랄 제품 제조시설과 별도로 구분되어 있음을 확인하는 서류로, 할랄인증 제품의 제조설비가 일반 제조 시설과 별도로 구획되어 있지 않을 경우 할랄 인증을 받는데 더 많은 서류가 필요하다. 주관기관은 할랄 제품을 기존 제조 라인과 분리하여 이들만 별도의 공간에서 제조할 수 있도록 구획을 정비하였다.

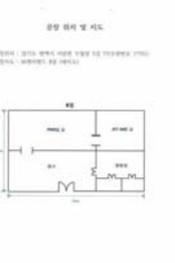
			
Pork Free Statement	공장위치 및 할랄인증제품 제조 설비 라인		

그림 26. 돼지고기 미사용 증명서류 및 공장 배치도

(차) 할랄 인증 제품 제조 라인

이전에 언급한 바와 같이 할랄 인증 제품 대상 제조 설비를 별도로 구분하였고, 이의 상세한 내용을 그림 27에 기재하였다. 할랄 제품 제조실에는 추출물 제조시 사용되는 추출기, 크림 모델링 마스크 (파우더) 제조시 사용되는 V-Cone Mixer (파우더 혼합기), 크림 모델링 마스크 (크림) 제조시 사용되는 Agi-mixer (액상 교반기) 등의 장비를 배치하였다.

원료 보관실은 추출물 및 마스크팩을 제조하고 남은 원료를 보관하는 곳으로 할랄 제품 제조시 신규 원료가 필요할 경우 이곳으로 이동하며, 사용 후 남은 잔량을 이곳에서 보관하는 장소이다. 사용 후 남은 원료는 외부로 유출하거나 비할랄 제품 제조에는 사용할 수 없다.

반제품 보관실은 추출물을 비롯한 모델링 마스크 크림 또는 파우더를 최소 출고 단위 (Ex 20 kg)로 포장하고 남은 잔량을 보관하는 공간으로, 외부의 먼지 또는 이물질이 유입되지 않기 위해 할랄 제조실

또는 원료 보관실로부터 격막 설치를 통해 분리하였다.



그림 27. 할랄 인증 제품 제조실

## (5) LPPOM MUI의 할랄 실사

### (가) 서면심사

앞서 기술한 서류를 모두 할랄 실사에 적용할 것으로 준비한 후 2017년 5월 31일 ~ 6월 1일의 이틀간의 일정으로 할랄 실사를 위해 인도네시아 LPPOM MUI에서 근무중인 연구원이 (주) 케미랜드 본사 (경기도 평택시 서탄면 수월암 5길 77 소재)를 방문하여 서면 및 현장 실사를 진행하였다.

현지 LPPOM MUI에서 파견한 연구원으로는 제품 생산 및 연구와 관련된 내용을 조사하는 연구원 1인과, 연구 및 제조 외 모든 항목 (Ex, 관리, 할랄 정책 및 기타)을 조사할 연구원 1인으로 구성, 또한 국내에서 LPPOM MUI의 국내 agent 업체 (회사명 : 인니할랄 코리아)에서 근무중인 선임 연구원 1인 등 총 3인이 해당일에 방문하여 실사를 진행하였다

주관기관에서 할랄 인증 대상 제품군으로 신청한 제품은 총 16개의 제품군이었고, 실사를 진행하는 과정 중 크림과 파우더를 같이 함유한 완제품은 기존 두 제품과 동일하다는 이유로 이들은 기존 제품에 포함시켰다.

크림 모델링 마스크 (파우더)의 경우 실제 당근 또는 느타리버섯이 원물로 함유되어 있지 않기 때문에 "Carrot" 내지 "Mushroom" 이라는 명칭 대신 아래 표와 같이 제품명을 변경하였고, 실사 전, 후로 변경된 내용은 표 29에 기재하였다.

표 29. 할랄 심사 중 할랄 인증 대상 제품에 대한 변경 사항

구분	할랄 인증 신청 제품명	할랄 심사 후 변경 내용	변경 사유
추출물	Carrot SEL Extract	변경 사항 없음	해당사항 없음
	Carrot ANFLA Extract		
	Mushroom SEL Extract		
	Mushroom ANFLA Extract		
모델링 마스크 (파우더)	Carrot SEL Modeling Mask (Powder)	Modeling Mask (Powder) for Carrot SEL	<제품명 변경> “당근 (Carrot)” 또는 “느타리버섯 (Mushroom)” 의 명칭을 간접적으로 사용하도록 변경
	Carrot ANFLA Modeling Mask (Powder)	Modeling Mask (Powder) for Carrot ANFLA	
	Mushroom SEL Modeling Mask (Powder)	Modeling Mask (Powder) for Mushroom SEL	
	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Powder)	Modeling Mask (Powder) for Mushroom ANFLA	
모델링 마스크 (크림)	Carrot SEL Modeling Mask (Cream)	변경 사항 없음	해당 사항 없음
	Carrot ANFLA Modeling Mask (Cream)		
	Mushroom SEL Modeling Mask (Cream)		
	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)		
크림 모델링 마스크 (파우더 + 크림)	Carrot SEL Cream Modeling Mask	본 제품군은 개별 할랄 인증 대상 제품군에 포함	<개별 할랄 인증 대상 제품군에 포함> 본 제품군은 파우더와 크림을 동일 공간에 포장한 것임
	Carrot ANFLA Cream Modeling Mask		
	Mushroom SEL Cream Modeling Mask		
	Mushroom ANFLA Cream Modeling Mask		

할랄 심사는 앞서 기술한 “(2) 할랄 보증 시스템 매뉴얼”의 HAS 23000에 입각한 11가지 항목을 중심으로 진행되었고, 심사원 2명이 확인한 최종 서면 심사 결과를 그림 28에 기재하였다.

결과서에 따르면 HAS 23000 Manual 기준 11가지 항목에 입각해서 심사를 진행한 결과 이슈가 된 부분은 할랄 인증 대상 제품군 수의 감소이었고, 그 이외의 원료에 대한 부분 및 세척도구에 대한 부분 등과 같은 세부적인 내용에 대해 지적을 받아, 이 부분에 대해서는 심사 이후 모두 서류를 보완하여 LPPOM MUI에 제출완료 하였다.

<p>01. 신청 업체 정보 및 할랄 인증 신청 제품</p>	<p>02. 할랄 정책, 경영팀 및 연수, 교육 관련 업체 준비 현황</p>	<p>03. 재료, 제품 및 생산 설비 관련 업체 준비현황</p>	<p>04. 주요활동 서면절차 관련 업체 준비현황 - 1</p>
<p>05. 주요활동 서면절차 관련 업체 준비현황 - 2</p>	<p>06. 추적기능 관련 업체 준비현황</p>	<p>07. 기존 미달 제품, 내부감사 및 경영진 평가 관련 업체 준비현황</p>	<p>08. HAS Manual 및 신청전후 변경내용 확인</p>

그림 28. 할랄 실사 결과서

(나) 현장실사

서면 실사의 진행과 함께 할랄 인증 제품을 생산하는 현장도 LPPOM MUI의 실사 담당 연구원 2인이 가서 직접 공장 내 생산시설을 확인하였고, 이의 과정을 그림 29에 기재하였다. 원료 보관 창고를 시작으로 할랄 제조실, 원료 보관실 및 반제품 보관실을 모두 확인한 후 할랄 인증 신청시 접수한 원료가 모두 맞는지를 기존 주관기관에서 제출한 문서와 실물간 대조를 통해 확인 작업을 진행하였다.



원료 보관실 실사

반제품 보관실 실사

제조실 실사

LPPOM MUI 할랄 실사 연구원, 주관기관 담당자와의 기념 촬영

그림 29. 할랄인증시 실사 과정

(5) 할랄 인증

(가) 1차 할랄 인증

할랄 실사를 받기 위한 준비서류 제출 및 제출 서류를 통한 LPPOM MUI의 담당 직원에 의한 할랄 심사 과정을 거쳐 최종 할랄 인증을 받았고, 할랄 인증 서류는 그림 30에 기재하였다.



MUI 발행 할랄 인증서

할랄 인증 대상 12종 제품군

그림 30. LPPOM MUI 발급 할랄 인증서

- 할랄 인증 번호 : 00150083580617
- 할랄 인증 취득일 : 2017년 6월 21일
- 할랄 인증 만료일 : 2019년 6월 20일
- 할랄 인증 유효기간 : 취득일로부터 2년, 이후 갱신 가능

이상의 실사를 통해 할랄 인증받은 최종 12제품군을 표 30에 기재하였다. 그리고 추출물 4종, 크림 모델링 마스크 (Powder) 4종, 크림 모델링 마스크 (Cream) 4종 등 총 12종의 제품군에 대한 할랄 등급서도 수여받았으며, 이는 그림 31에 기재하였다. 할랄 인증의 경우 인증을 받은 업체간에도 A-C까지의 등급이 존재하는데 본 사업의 주관기관인 (주) 케미랜드는 이중 가장 우수한 A 등급을 받았다. 이는 할랄 실사시 취약한 부분이 있을 경우 2주 이내에 문제를 해결한 업체에 주어지는 등급이다. 이상과 같이 주관기관은 할랄 실사에서도 우수한 대응을 보여 할랄 인증 수여에 최적화된 업체임을 확인할 수 있었다.

표 30. LPPOM MUI 할랄 인증 제품 List

구분	할랄 인증 제품명
추출물 (4종)	Carrot SEL Extract
	Carrot ANFLA Extract
	Mushroom SEL Extract
	Mushroom ANFLA Extract
모델링 마스크 파우더 (4종)	Modeling Mask (Powder) for Carrot SEL
	Modeling Mask (Powder) for Carrot ANFLA
	Modeling Mask (Powder) for Mushroom SEL
	Modeling Mask (Powder) for Mushroom ANFLA
모델링 마스크 크림 (4종)	Carrot SEL Modeling Mask (Cream)
	Carrot ANFLA Modeling Mask (Cream)
	Mushroom SEL Modling Mask (Cream)
	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)



그림 31. 할랄 인증 등급서

(나) 2차 할랄 인증

앞서 취득한 할랄 인증은 당근 및 느타리 버섯을 주 원물로 한 효소 처리 추출물 및 이를 적용시킨 크림 모델링 마스크 제품군에 관한 것이다. 본 사업의 2차, 3차년도인 경우 당근, 느타리 버섯, 솔잎, 녹두, 홍삼 등의 국내 농산 자원을 이용한 화장품 소재와 이를 적용시킨 화장품(크림)에 대한 할랄인증의 취득을 목표로 하여, 본 연구에서는 이들 제품군에 대한 할랄 인증 취득을 앞서 기술한 동일한 방법을 거쳐 진행하였다.

크림에서 할랄 인증 신청 및 진행중 가장 어려운 부분은 각 개별 원료에 대한 기본 history (또는 source)를 제조사 또는 유통사로부터 받는 일이다. 이는 LPPOM MUI의 경우 할랄 인증을 진행함에

있어 고객사의 신청 대상 제품군 내에 하람 (Haram) 성분이 해당 원료로 사용되었는지를 알아보기 위해 필요한 사항이다.

그러나 이를 고객사로부터 요청받는 화장품 원료 제조 또는 유통사의 경우 각 원료가 어떤 과정을 거쳐 만들어졌는지에 대한 상세 제조 공정도를 제시해야 할수도 있으며, 본 내용들은 각 제조사의 기밀에 해당하는 경우가 많다. 화장품 원료 제조사 내지 유통사로부터 이들을 받기는 어려우므로 이 과정이 할랄 인증을 취득함에 있어 가장 오랜 시간이 필요하다.

또한 크림의 경우 마스크팩에 비해 더 많은 원료가 첨가되기 때문에 그만큼 할랄 인증 취득에 더 많은 시일이 소요되었다. 이상의 과정을 통해 취득한 할랄 인증과 관련된 서류들은 아래에 기재하였다.

① 할랄 인증 협약서

본 과정을 통해 수여받은 협약서를 그림 32에 기재하였다.

				
협약서 - 01	협약서 - 02	협약서 - 03	협약서 - 04	협약서 - 05
				
협약서 - 06	협약서 - 07	협약서 - 08	협약서 - 09	협약서 - 10

그림 32. 주관기관과 LPPOM MUI 간 협약서

본 협약서는 인도네시아 할랄 인증 기관인 LPPOM MUI와 주관기관인 (주)케미랜드와의 협약서로 사업 최종년도인 2018년에 수여받았다.

② 원료 목록 확인서

할랄 인증서 수여와 함께 본 인증제품 제조가 가능한 원료 품목에 대해서도 허가를 받았으며, 할랄 인증 제품군에 사용가능한 원료 List를 그림 33에 기재하였다.

BAJAL APPROVED MATERIAL										
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87
88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89
90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91
92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93
94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

원료 목록 확인서 - 1

원료 목록 확인서 - 2

원료 목록 확인서 - 3

그림 33. 할랄 인증 제품군에 사용 가능한 원료 목록 확인서

상기 원료는 효소처리 추출물 등의 화장품 소재와 크림 모델링 마스크팩, 크림 등 화장품 완제품에 적용 가능한 원료군이다. 이들은 모두 할랄 인증 받은 제품군에 사용할 수 있도록 LPPOM MUI로부터 허가받은 화장품 소재이다.

③ 할랄 로고 사용 확인서

다른 인증 제품군과 마찬가지로 할랄 제품의 경우 할랄 인증을 받은 모든 제품(화장품 소재 포함)은 할랄 로고를 사용할 수 있다. 이도 LPPOM MUI로부터 할랄 인증 받은 제품에 한해 아래의 로고를 사용할 수 있다는 허가를 받았고, 이는 그림 34에 기재하였다.

Kejudo : Yb. Pnglapan CHEM-LAND CO., LTD. Korea  
 TA : Director of CHEM-LAND CO., LTD. Korea

Dengan ini LPPOM MUI memberikan izin kepada CHEM-LAND CO., LTD. Korea untuk dapat menggunakan logo Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-obatan dan Kosmetika Majelis Ulama Indonesia (LPPOM MUI) sebagai berikut:

The Assessment Institute for Food, Drugs and Cosmetics, the Indonesian Council of Ulama (AIFDC) / LPPOM MUI hereby permits CHEM-LAND CO., LTD. Korea to use MUI Halal Logo as follows:

Produk yang dipertahakan di bawah pemberitahuan dengan yang tercantum dalam sertifikat Halal MUI No. 001-0000000017 berlaku di 29 Juni 2019. Izin penggunaan logo LPPOM MUI dapat dilampirkan pada dokumen Certification Agreement point 2.

as the product manufactured in the factory address as listed on the MUI Halal Certificate No. 001-0000000017 which is valid up to June 30, 2019. The access regarding MUI Halal Logo usage can be seen on the article 2 of Certification Agreement document.

Dislaimer:  
 1. Perizinan ini sah jika tidak menggunakan nama merek untuk produk selain yang tercantum.  
 This agreement is valid and document register agreement name manufacturer/processor from the system.

F:2019-01-01/29 Jun 2017

그림 34. 할랄 로고 사용 확인서

④ 할랄 인증서

앞서 언급한 당근, 느타리 버섯을 원물로 한 추출물 및 이를 적용한 마스크팩 이외의 다른 추출물과 크림에 대한 할랄 인증을 수여받았고, 이에 대한 인증서를 그림 35에 기재하였다.



그림 35. 추출물 및 크림에 대한 할랄 인증

상기와 같이 2차년도에 수여받은 추출물 및 마스크팩 제품군 외에 3차년도에 추가로 다른 추출물과 크림 제품군에 대한 할랄 인증을 받았으며, 현재까지 할랄 인증 받은 화장품 소재와 화장품을 표 30에 기재하였다.

표 30. 주관기관에서 LPPOM MUI로부터 인증받은 화장품 소재 및 화장품군

구분	No	할랄 인증 제품명	제품 설명
Extract [8 EA]	E1	Carrot SEL Extract	당근을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E2	Carrot ANFLA Extract	당근을 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물
	E3	Mushroom SEL Extract	느타리버섯을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E4	Mushroom ANFLA Extract	느타리버섯을 원물로 한 bromelain 처리 추출물
	E5	Red Ginseng SEL Extract	홍삼을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E6	Red Ginseng ANFLA Extract	홍삼을 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물
	E7	Bean SEL Extract	녹두를 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E8	Bean ANFLA Extract	녹두를 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물
Cream Modeling Mask (Powder, Cream) [8 EA]	P1	Modeling Mask (Powder) for Carrot SEL	E1 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	P2	Modeling Mask (Powder) for Carrot ANFLA	E2 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	P3	Modeling Mask (Powder) for Mushroom SEL	E3 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	P4	Modeling Mask (Powder) for Mushroom ANFLA	E4 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	CM1	Carrot SEL Modeling Mask (Cream)	E1 함유 크림 모델링 마스크 적용

			cream
	CM2	Carrot ANFLA Modeling Mask (Cream)	E2 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream
	CM3	Mushroom SEL Modling Mask (Cream)	E3 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream
	CM4	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)	E4 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream
Cream [10 EA]	C1	Carrot SEL Cream	E1 함유 크림
	C2	Carrot ANFLA Cream	E2 함유 크림
	C3	Mushroom SEL Cream	E3 함유 크림
	C4	Mushroom ANFLA Cream	E4 함유 크림
	C5	Pine Needle SEL Cream	솔잎을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물 함유 크림
	C6	Pine Needle ANFLA Cream	솔잎을 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물 함유 크림
	C7	Red Ginseng SEL Cream	E5 함유 크림
	C8	Red Ginseing ANFLA Cream	E6 함유 크림
	C9	Bean SEL Cream	E7 함유 크림
	C10	Bean ANFLA Cream	E8 함유 크림

이상 총 26개의 화장품 소재 및 화장품에 대해 할랄 인증을 받아 협약 당시 총 24개의 제품군에 대한 사업화를 계획했던 기존 연구 목표보다 초과 달성할 수 있었다.

#### (6) 시제품 제작

본 사업을 통해 개발한 화장품 소재 및 화장품을 아래에 기재하였다.

#### (가) 추출물 군

본 사업으로 개발한 추출물 8종의 사진을 그림 36에 기재하였다. 이들은 모두 크림 모델링 마스크 및 크림 이외의 다른 화장품으로도 적용이 가능한 천연물 유래 화장품 소재이다. 본 소재의 경우 일반 원료로도 수출 또는 내수 판매가 가능한 것으로 물에 의한 추출물이라는 점을 감안할 때 업계에서 많이 사용하는 다가 알코올류가 방부력을 나타내는 화장품 소재로 첨가되었다.

장기간 보관에도 상분리가 없으며, 효소 처리에 의한 유효 아미노산이 다량 함유되었다는 장점이 있다.

#### (나) 크림 모델링 마스크

본 사업을 통해 개발한 크림 모델링 마스크팩의 시제품을 그림 37에 기재하였다. 이들은 모두 본 사업을 통해 개발한 할랄 인증 받은 제품군이다.

#### (다) 크림

본 사업을 통해 개발하고 할랄 인증 받은 크림 시제품을 그림 38에 기재하였다. 이들은 모두 국내 및 해외로의 수출이 가능한 제품군이다.



그림 36. 개발 추출물 시제품



그림 37. 개발 크림 모델링 마스크 시제품



그림 38. 개발 크림 시제품

### (7) 할랄 인증 관련 마스크팩의 수출

이전 그림 33에는 할랄인증 받은 제품군에 사용가능한 원료 목록을 기재한 바 있다. 이들 원료들을 이용해서 개발한 모델링 마스크를 대상으로 인도네시아에 수출을 진행하였고, 이들의 제품명 및 수출량을 표 31에 기재하였다.

표 31. 수출 마스크팩의 제품명과 수출량

No	제품명	수출량 (kg)
01	Clay OA 02	12,380
02	Clay SS 02	7,820
03	Clay DS 02	5,820
04	Green Clay 02	6,440
	<b>합계</b>	<b>32,460</b>

※ 수출산정기간 : 2017년 7월 ~ 2018년 9월

이중 천연물 유래 성분이 가미된 제품은 “Green Clay 02”이다. 본 제품은 알로에 파우더를 가미한 마스크팩으로 본 사업에서 사용되었던 당근, 느타리버섯, 솔잎, 홍삼, 녹두에 해당하는 원물은 아니지만, 천연 유래 성분이 기존 clay mask에 적용된 것에 의의가 있다. 고객사의 요구로 주관기관에서의 연구를 통해 "Clay OA 02", "Clay SS 02", Clay DS 02" 등의 제품도 수출을 진행하게 되었다.

이상과 같이 효소처리 추출물 및 이를 적용시킨 크림에 대한 물리, 화학적 특성과 화장품 완제품에서의 보습능력, 그리고 개발한 화장품 소재 및 화장품으로 취득한 할랄 인증과 인증 제품에 대한 시제품 및 수출제품까지 확인하였다.

주관기관인 (주) 케이랜드는 현재까지 기술한 화장품 소재 및 화장품 이외에도 할랄 인증을 신청, 진행 중인 제품이 다수 있으며, 할랄 인증은 앞으로도 진행해야 할 사항이기 때문에 본 사업으로 개발한 제품군과 앞으로 취득하게 될 할랄 인증 제품군에 대한 수출 및 제품 다각화를 위해 현재 매진중이다.

## 나. 제 1 협동기관 수행 연구 결과

[동물성 콜라겐 대체 소재 유래 추출성분에 대한 항산화, 항균, 미백, 주름 개선 효능평가]  
(수행기관 : 계명대학교 산학협력단)

### (1) 연구개발 범위 및 연차별 연구 수행 내용

- 1차년도 : 당근, 느타리버섯 유래 추출성분의 항산화, 보습, 주름개선 효능 평가
- 2차년도 : 당근, 느타리버섯 추출성분의 항산화, 주름개선 효능 평가  
술잎 추출성분에 대한 항산화, 항균, 미백 효능 평가
- 3차년도 : 녹두, 홍삼 유래 추출성분에 대한 항산화 효능, 주름개선, 미백 효능 평가

### (2) 효능평가방법

#### (가) 항산화 평가

##### ① ABTS free radical 소거능에 의한 항산화 활성 평가

- 7.4mM ABTS 2.6mM potassium persulfate를 이용하여 라디칼을 형성 후 실험물질과 10분간 반응하여 732nm 파장에서 흡광도를 측정. 시료용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 표시를 통해 ABTS free radical 소거능 평가 실시. ABTS free radical 소거능 평가는 시료용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 표시.

##### ② Superoxidase dismutase(SOD) 활성 측정

- SOD 유사활성은 Marklund-Marklund의 방법(Marklund and Marklund 1974)에 의거하여 측정. 각 시료용액 0.2mL에 tris-HCl 완충용액(50mM tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2.6mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지.
- 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm 파장에서 흡광도를 측정. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 표시.

##### ③ 총 Polyphenol 함량 측정

- 총 페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin and Denis 1912)에 의거하여 측정. 추출한 시료 1mL에 증류수 7.5mL를 첨가한 후, phenol reagent 0.5mL를 가하여 골고루 섞어주고 3분간 방치. 35% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 1mL 첨가하여 1시간 가한 다음 1N HCl(0.1mL)을 넣고 760nm 파장에서 흡광도를 측정
- 총 페놀 함량은 tannic acid를 이용한 표준곡선으로 양을 환산.

#### (나) 항균 평가

##### ① Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

- 항균활성 평가는 paper disc법(Conner and beuchat 1984)를 일부 변형하여 실시.
- 실험에 사용되는 균주는 *Escherichia coil*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*으로 항균력 측정은 paper disc 방법으로 측정하였으며, 균 배양액을 배지에 도말한 다음

시험물질을 확산시켜 24시간 배양 후 형성된 생육 저해환의 크기로 항균활성의 정도를 측정.

- 이후 각 균의 조건에 맞추어 배양한 후 disc 주위로 미생물 생장이 저해되는 clear zone의 직경 (mm)을 caliper로 측정하여 항균력 계산.

#### (다) 미백 평가

##### ① Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정

- L-tyrosine (0.3 mg/ml) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합 후 37 °C에서 10 min 동안 배양한 다음, 반응 혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 이 때 생성되는 DOPA chrome의 양을 흡광도 475 nm에서 측정.

##### ② Melanoma 세포주를 이용한 미백평가

- B16F10 cell을 이용한 세포 내 멜라닌 함량 측정  
B16F10 cells에 시료를 농도별로 2일간 배양 후 PBS로 세척, 1N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해 후 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정.
- 유전자 발현  
RT-PCR (역전사중합효소연쇄반응)을 이용하여 B16F10 cells에 시료를 농도별로 처치하고 2일간 배양 후 다양한 유전자의 발현량 측정

#### (라) 주름개선 평가

##### ① Collagenase 저해활성

- Collagenase 저해효과는 Wüunsch과 Heindrich (1963)의 방법에 따라 4mM의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 0.1M의 Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3mg/ml)를 녹인 기질액 250μL 시험물질을 100μL를 혼합한 후, collagenase (0.2mg/ml) 150μL를 첨가하여 실온에서 20분간 반응.
- 여기에 6%의 citricacid 0.5mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethylacetate 1.5mL를 넣고 혼합하여 상등액만을 취하여 320nm에서 흡광도를 측정.

##### ② Elastase 저해활성

- 증류수 60 μL, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 10 μL, 10 mM의 기질 (N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-4-nitroanilide) 10 μL를 넣은 후 37°C에서 5분 동안 반응한다. 반응 된 기질, 시료 혼합액에 elastase (1unit/ml) 10 μL를 첨가한 후 415 nm에서 흡광도를 측정.

##### ③ Fibroblasts 세포주를 이용한 주름개선평가

- Fibroblasts cell을 이용한 세포 내 MMP-1 저해활성 측정  
Fibroblasts cell에 시험물질을 농도별로 처치하여 24시간 배양 후 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 첨가. 원심분리하여 상층액을 취해 세포 내 MMP-1 저해활성을 측정.
- 유전자 발현  
RT-PCR(역전사중합효소연쇄반응)을 이용하여 fibroblasts cell에 시료를 농도별로 처치하고 2일간 배양 후 다양한 유전자 발현량 측정

(3) 연구결과

(3)-1. 1차년도

(가) 시료

○ 당근을 서로 다른 4종류의 효소를 2가지 농도로 적용하여 유효성분을 추출(Table 1).

Table 1. Experimental group categorization of Carrot extract.

시료	효소	원물 대비 효소 처리 농도 (%)	
당근	Papain 저순도	10	당근 PB10
		20	당근 PB20
	Papain 고순도	10	당근 PS10
		20	당근 PS20
	Bromelain 저순도	10	당근 BB10
		20	당근 BB20
	Bromelain 고순도	10	당근 BS10
		20	당근 BS20

○ 느타리버섯을 서로 다른 4종류의 효소를 2가지 농도로 적용하여 유효성분을 추출(Table 2).

Table 2. Experimental group categorization of Pleurotus ostreatus.

시료	효소	원물 대비 효소 처리 농도 (%)	
느타리버섯	Papain 저순도	10	느타리 PB10
		20	느타리 PB20
	Papain 고순도	10	느타리 PS10
		20	느타리 PS20
	Bromelain 저순도	10	느타리 BB10
		20	느타리 BB20
	Bromelain 고순도	10	느타리 BS10
		20	느타리 BS20

(나) 항산화 효능평가

① DPPH로부터의 전자소거활성 및 ABTS free radical 소거능

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 DPPH로부터의 전자소거활성 및 ABTS free radical 소거능을 측정된 결과를 다음과 같음(Table 3, Fig. 1). 시료의 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 3. DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (ppm)					
	31.25	62.5	125	250	500	1000
DPPH	88.7±1.2	89.8±0.5	89.1±0.5	90.4±0.2	90.0±0.3	89.2±0.3
ABTS	100.1±1.1	100.1±0.2	100.0±0.3	100.2±0.2	99.8±0.3	99.5±0.3

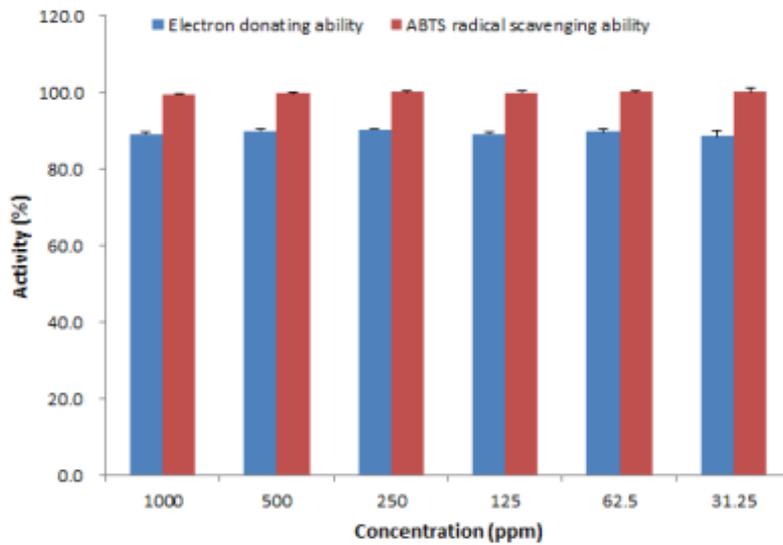


Fig. 1. DPPH and ABTS radical scavenging activities of Ascorbic acid.

○ 실험의 대조군으로 사용되어지는 동물성(돈피) 콜라겐의 DPPH로부터의 전자소거활성 및 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 4, Fig. 2). 처치 농도는 화장품 적용농도의 약 10배의 농도인 10% 이하의 농도로 설정함. DPPH로부터의 전자소거활성 측정결과는 매우 낮아 활성능을 보인다고 판단할 수 없으나 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과는 매우 높게 나타나 활성능을 보여주었음. 그러므로 동물성(돈피) 콜라겐은 DPPH로부터의 전자소거활성보다는 ABTS free radical 소거능에서 활성능을 보여주는 것으로 보여짐. 동물성(돈피) 콜라겐의 대체소재 확보를 위해 평가방법으로 DPPH로부터의 전자소거활성 측정보다는 ABTS free radical 소거능을 측정이 과 제성격에 더욱 알맞다고 판단 됨.

Table 4. DPPH and ABTS radical scavenging activities of Pigskin Collagen.

unit : %

	Groups (ppm)					
	312.5	625	1250	2500	5000	10000
DPPH	-8.7±6.2	-0.4±5.3	-0.4±3.5	-1.9±2.8	0.3±3.0	7.2±1.1
ABTS	29.9±0.9	42.3±0.5	58.0±0.4	75.4±0.3	88.8±0.2	98.1±0.2

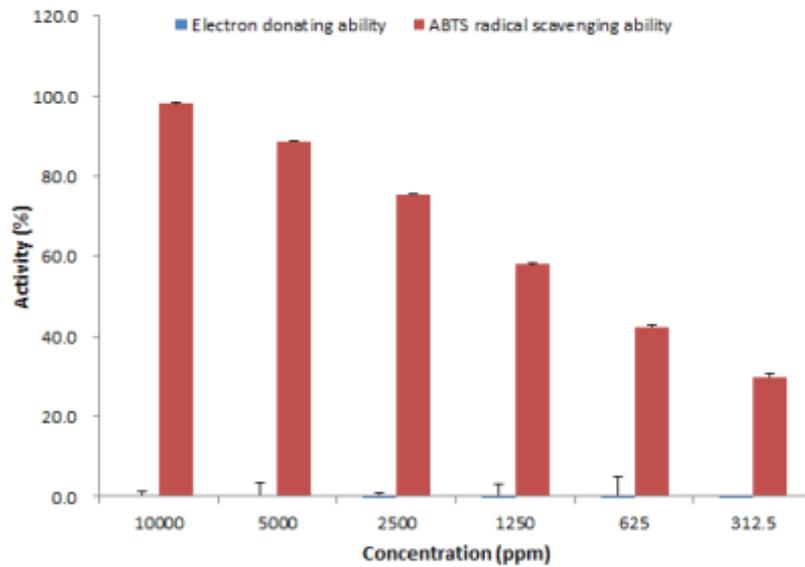


Fig. 2. DPPH and ABTS radical scavenging activities of Pigskin Collagen.

○ ABTS free radical 소거능 측정 시 당근 추출물의 처치 농도는 동물성(돈피) 콜라겐 처치농도의 2배 이하의 농도로 설정함. 추출된 시료의 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 5, Fig. 3). 효소 간 차이를 비교했을 때 Papain 보다는 Bromelain 처리 시 ABTS free radical 소거 능이 높아지는 것을 볼 수 있음. 같은 효소를 처리했을 시 효소처리 농도가 높을수록 ABTS free radical 소거능이 높아지는 것을 볼 수 있으며, 효소의 순도가 높을수록 ABTS free radical 소거능이 대체적 높아지는 것을 볼 수 있으나 Bromelain 20%를 처치한 결과를 분석해보면 저순도(5%이후)에서도 ABTS free radical 소거능이 높아지는 것을 볼 수 있음.

Table 5. ABTS radical scavenging activities of Carrot extract

unit : %

	Groups (%)				
	1	5	10	15	20
당근 PB10	12.0±1.0	35.1±1.3	50.7±0.7	61.3±0.6	68.2±0.3
당근 PB20	19.6±0.7	48.2±0.2	66.8±0.2	76.4±0.4	85.0±0.2
당근 PS10	26.4±1.0	59.2±0.6	76.8±0.3	85.9±0.2	93.9±0.4
당근 PS20	37.8±0.2	70.3±0.5	89.9±0.2	98.6±0.2	99.5±0.3
당근 BB10	30.0±1.3	64.6±0.7	92.7±0.6	98.9±0.2	99.6±0.1
당근 BB20	44.4±1.0	99.1±0.2	100.0±0.2	99.8±0.3	99.5±0.2
당근 BS10	32.5±0.7	66.7±0.3	97.1±0.3	99.4±0.2	99.4±0.2
당근 BS20	41.0±0.6	85.3±0.2	99.7±0.1	99.5±0.3	99.9±0.4

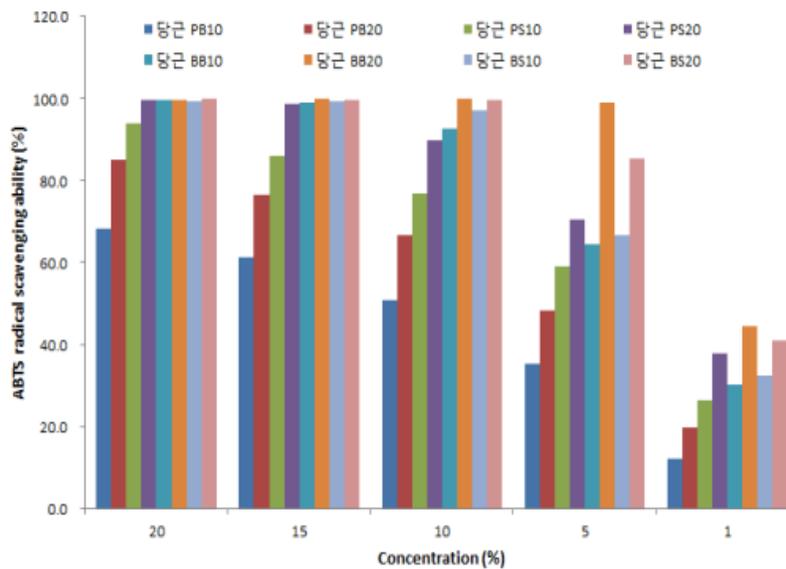


Fig. 3. ABTS radical scavenging activities of Carrot extract

○ ABTS Free radical 소거능 측정 시 느타리버섯 추출물의 처치 농도는 동물성(돈피) 콜라겐 처치농도의 2배 이하의 농도로 설정함. 추출된 시료의 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 6, Fig. 4). 10% 이상에서는 최고활성을 나타내며 5% 이하에서 실험군간 차이가 나타남. 같은 효소를 처리했을 시 효소처리 농도가 높을수록 ABTS free radical 소거능이 높아지는 것을 볼 수 있으며, 효소의 순도가 높을수록 ABTS free radical 소거능이 대체적 높아지는 것을 볼 수 있음.

Table 6. ABTS radical scavenging activities of *Pleurotus ostreatus* extract

(unit : %)

	Groups (%)				
	1	5	10	15	20
느타리 PB10	42.1±0.4	92.3±0.1	99.7±0.1	99.6±0.1	99.8±0.2
느타리 PB20	49.6±0.3	95.8±0.2	100.0±0.1	99.8±0.2	99.6±0.3
느타리 PS10	51.5±0.7	93.2±0.2	99.8±0.1	99.8±0.1	99.7±0.1
느타리 PS20	71.1±0.6	99.2±0.2	99.9±0.1	99.9±0.2	99.6±0.4
느타리 BB10	53.4±1.4	90.5±0.2	99.4±0.1	99.8±0.0	99.4±0.6
느타리 BB20	54.2±1.0	89.1±0.3	99.5±0.1	99.8±0.2	99.7±0.2
느타리 BS10	55.4±0.8	100.1±0.1	100.0±0.2	100.0±0.2	100.0±0.2
느타리 BS20	71.6±0.3	100.2±0.3	100.5±0.2	100.1±0.3	99.7±0.3

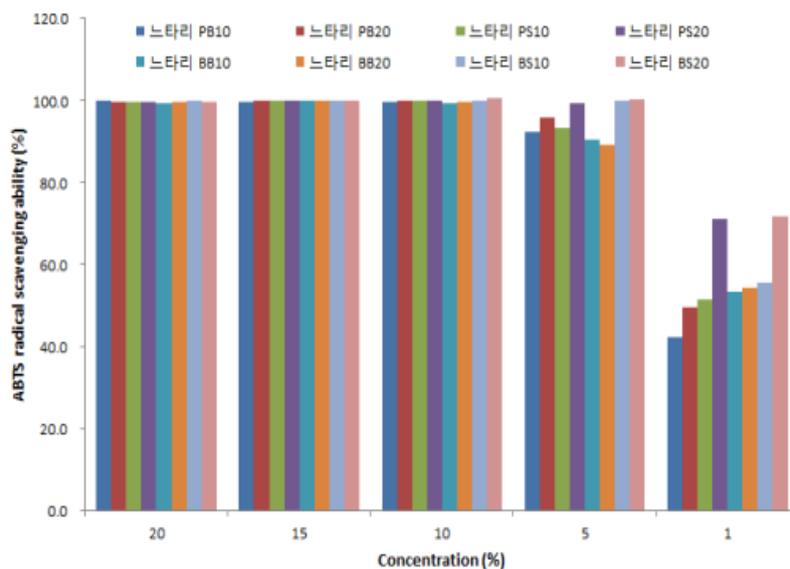


Fig. 4. ABTS radical scavenging activities of *Pleurotus ostreatus* extract

② SOD 유사활성

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 SOD 유사활성능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 7, Fig. 5). 시료의 농도 의존적으로 활성도를 보이고 있음.

Table 7. Superoxide dismutase(SOD) activity of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (ppm)					
	31.25	62.5	125	250	500	1000
SOD-like	6.3±3.29	8.0±0.41	14.4±1.81	36.2±1.10	62.7±0.72	93.5±0.72

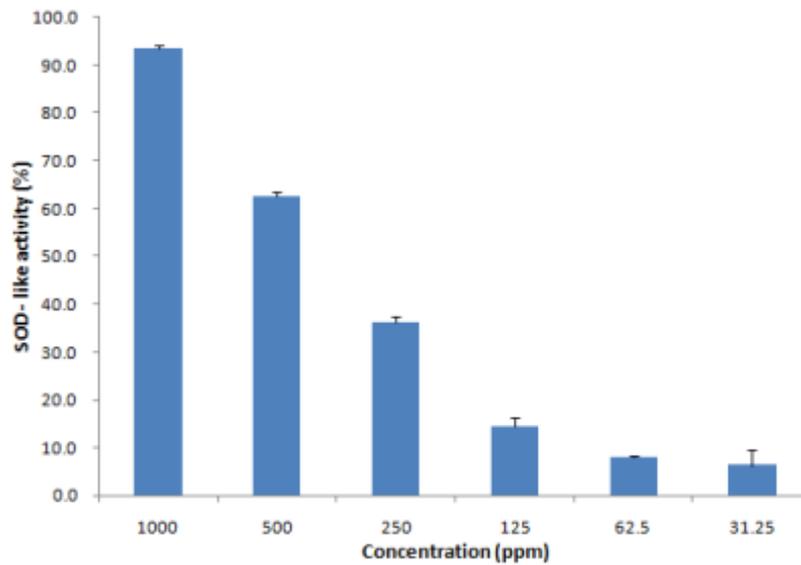


Fig. 5. Superoxide dismutase(SOD) activity of Ascorbic acid.

○ 실험의 대조군으로 사용되어지는 동물성(돈피) 콜라겐의 SOD 유사활성능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 8, Fig. 6). 처치 농도는 화장품 적용농도의 약 10배의 농도인 10% 이하의 농도로 설정함. 5000ppm에서 편차가 크게 나타났으나 전체적으로 농도 의존적으로 SOD 유사활성능이 나타남. 화장품 적용농도에서도 20% 정도의 활성도나 나타나는 것을 볼 수 있음.

Table 8. Superoxide dismutase(SOD) activity of Pigskin Collagen.

unit : %

	Groups (ppm)					
	312.5	625	1250	2500	5000	10000
SOD-like	8.3±1.81	16.8±4.62	22.6±2.72	31.3±5.80	52.6±12.52	56.6±3.59

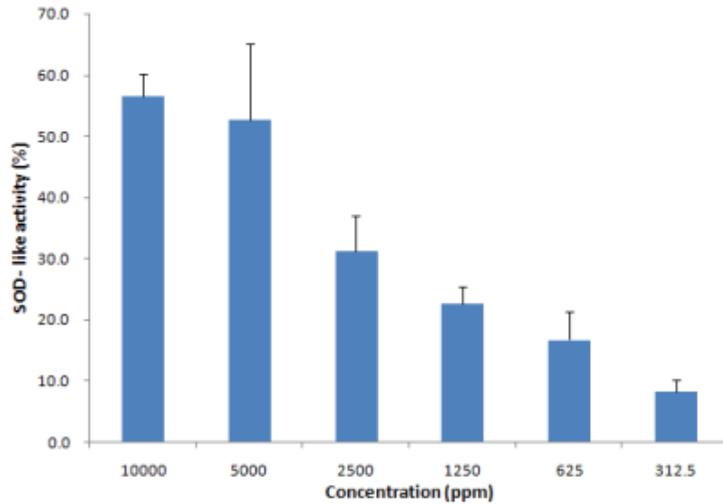


Fig. 6. Superoxide dismutase(SOD) activity of Pigskin Collagen.

○ 당근 추출물의 SOD 유사활성능 측정시 동물성(돈피) 콜라겐 처리농도 2배 이하의 농도에서는 대체적으로 낮은 활성능을 보여주어 이보다 높은 농도에서의 SOD 유사활성능도 함께 측정함 (100%부터 측정하였음). 당근 추출물의 SOD 유사활성능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 9, Fig. 7). 효소 종류 및 처리농도에 따라 SOD 유사활성능은 다르게 나타났음.

Table 9. Superoxide dismutase(SOD) activity of Carrot extract

unit : %

	Groups (%)					
	1	20	40	60	80	100
당근 PB10	1,6±3,13	1,9±1,1	8,9±3,95	12,4±1,24	20,8±6,02	22,5±3,73
당근 PB20	6,1±6,11	16,4±1,44	24,4±4,33	30,0±1,44	32,5±3,29	35,1±2,19
당근 PS10	7,4±0,72	10,4±3,24	28,0±4,78	33,0±7,74	45,8±4,00	52,7±8,92
당근 PS20	10,8±3,68	19,6±3,13	30,8±4,33	41,1±5,03	51,2±9,17	57,9±1,49
당근 BB10	16,2±7,19	16,7±1,9	26,5±2,31	29,4±0,83	23,8±5,39	28,8±2,72
당근 BB20	15,9±1,66	19,2±2,49	21,0±4,97	29,6±8,71	31,7±7,88	45,3±0,41
당근 BS10	14,4±0,83	21,9±3,24	22,1±0,0	29,4±5,09	28,7±2,9	32,4±9,56
당근 BS20	11,6±1,66	22,2±2,07	30,6±2,9	34,3±5,18	38,7±2,52	42,9±3,13

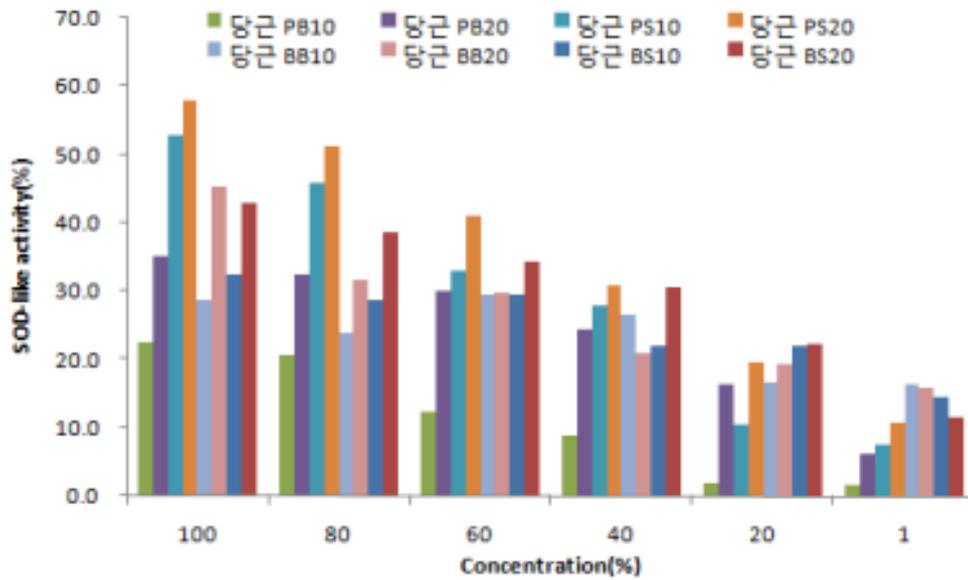


Fig. 7. Superoxide dismutase(SOD) activity of Carrot extract.

○ 느타리버섯 추출물의 SOD 유사활성능 측정 시 동물성(돈피) 콜라겐 처리농도 2배 이하의 농도에서는 대체적으로 낮은 활성능을 보여주어 이보다 높은 농도에서의 SOD 유사활성능도 함께 측정함 (100%부터 측정하였음). 느타리버섯 추출물의 SOD 유사활성능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 10, Fig. 8). 효소 종류 및 처리농도에 따라 SOD 유사활성능은 다르게 나타났음.

Table 10. Superoxide dismutase(SOD) activity of Pleurotus ostreatus extract

unit : %

	Groups (%)					
	1	20	40	60	80	100
느타리 PB10	5.06±7.54	11.9±2.25	23.1±2.19	28.6±0.00	37.5±2.49	38.5±7.88
느타리 PB20	4.5±1.90	16.4±0.72	29.4±3.24	41.4±1.81	51.3±0.41	55.6±3.39
느타리 PS10	7.7±3.29	27.1±0.72	43.6±1.90	57.5±1.10	65.5±2.49	70.2±1.90
느타리 PS20	9.8±3.61	41.2±0.83	59.2±2.72	74.6±1.81	75.1±0.83	83.4±1.49
느타리 BB10	13.4±1.49	14.9±2.87	22.7±8.38	40.2±4.33	44.4±2.87	49.0±7.29
느타리 BB20	11.7±1.44	28.6±3.29	33.8±1.81	47.0±5.44	53.8±1.49	56.3±4.62
느타리 BS10	6.1±7.26	29.6±1.90	37.2±1.24	50.3±2.72	60.4±1.49	65.7±1.49
느타리 BS20	16.4±1.44	36.8±4.37	50.2±2.90	69.5±1.24	76.7±8.00	82.6±8.98

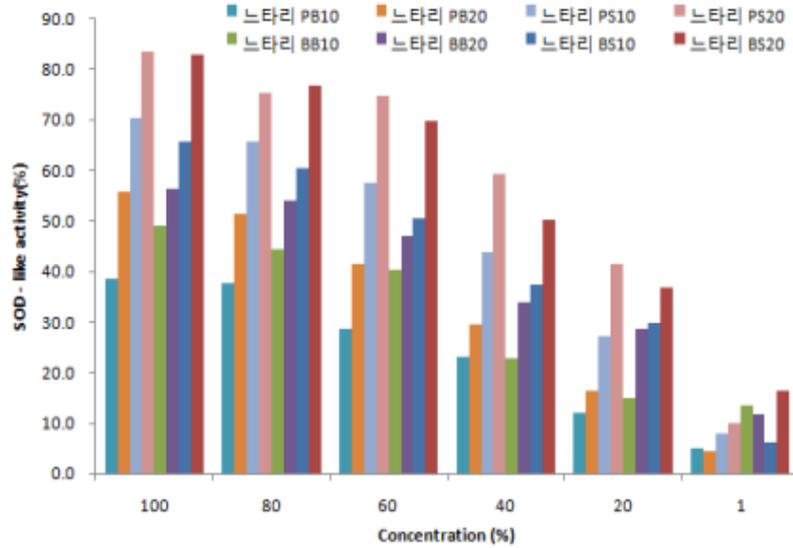


Fig. 8. Superoxide dismutase(SOD) activity of Pleurotus ostreatus extract

③ 총 폴리페놀

○ 당근 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 11과 같다.

Table 11. Total polyphenol content of Carrot extract

unit : mg/g

	Groups (%)			mean ± SD
	1st	2st	3st	
당근 PB10	1.282657	1.329397	1.296187	1.302747±0.024051
당근 PB20	1.62706	1.786962	2.358918	1.924313±0.384776
당근 PS10	1.58401	1.670111	1.668881	1.641±0.049359
당근 PS20	1.866913	1.929643	1.922263	1.906273±0.034286
당근 BB10	1.404428	1.458549	1.459779	1.440918±0.031608
당근 BB20	1.869373	1.892743	1.906273	1.805002±0.022857
당근 BS10	1.61476	1.651661	1.660271	1.64223±0.024176
당근 BS20	1.861993	1.943173	1.921033	1.881673±0.074484

○ 느타리버섯의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 12와 같다.

Table 12. Total polyphenol content of *Pleurotus ostreatus* extract

unit : mg/g

	Groups (%)			mean ± SD
	1st	2st	3st	
느타리 PB10	1.694711	1.751292	1.768512	1.738171±0.03861
느타리 PB20	2.170726	2.230996	2.270357	2.224026±0.05018
느타리 PS10	1.328167	1.838622	1.725461	1.63075±0.268083
느타리 PS20	1.488069	1.56925	1.55203	1.536449±0.042774
느타리 BB10	1.59754	1.665191	1.656581	1.63977±0.036825
느타리 BB20	1.869373	1.892743	1.906273	1.889463±0.018668
느타리 BS10	1.62583	1.6492	1.715621	1.663551±0.046584
느타리 BS20	1.861993	1.943173	1.921033	1.908733±0.041965

(다) 주름개선 효능평가

① Collagenase 저해활성

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 Collagenase 저해활성을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 13, Fig. 9). 시료의 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 13. Collagenase inhibition activity of ascorbic acid

unit : %

	Groups (ppm)			
	1250	2500	5000	10000
Collagenase inhibition	71.6±0.2	82.8±0.2	99.2±0.1	99.1±0.0

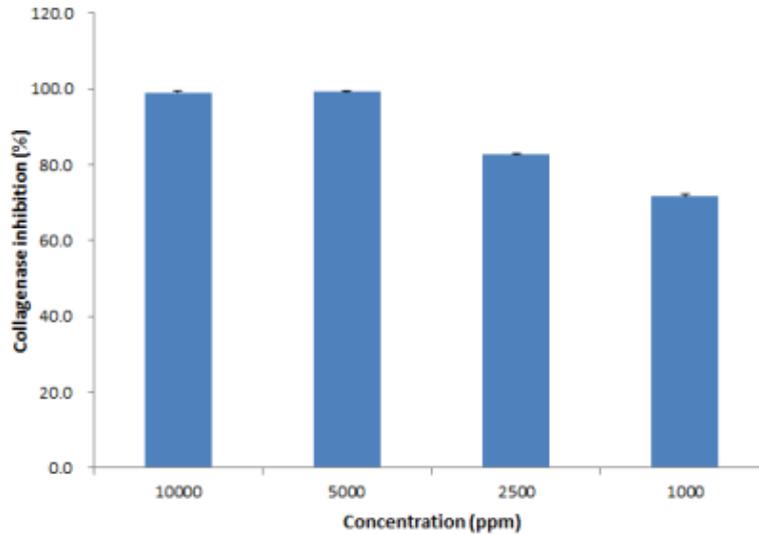


Fig. 9. Collagenase inhibition activity of ascorbic acid

○ 실험의 대조군으로 사용되어지는 동물성(돈피) 콜라겐의 Collagenase 저해활성을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 14, Fig. 10). 처치 농도는 화장품 적용농도의 약 10배의 농도인 10% 이하의 농도로 설정함. 동물성(돈피) 콜라겐의 활성정도는 양성대조군인 Ascorbic acid보다 높게 나타났음.

Table 14. Collagenase inhibition activity of Pigskin Collagen

(unit : %)

	Groups (ppm)			
	1250	2500	5000	10000
Collagenase inhibition	91.7±0.2	93.6±0.0	97.0±0.1	96.9±0.1

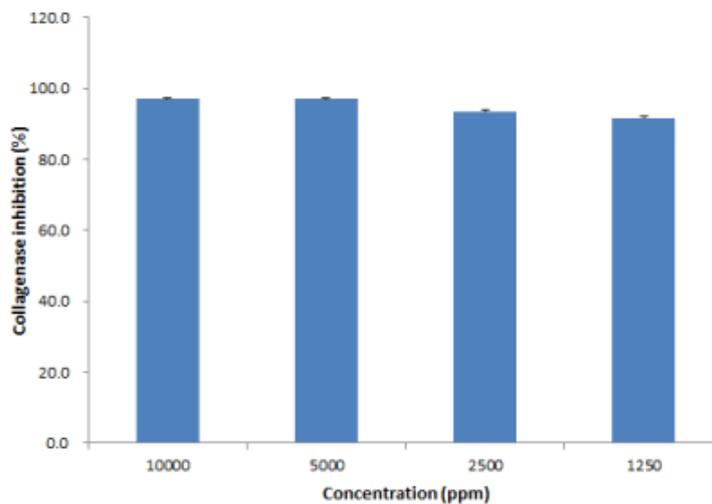


Fig. 10. Collagenase inhibition activity of Pigskin Collagen

○ Collagen에 다량 함유되어 있는 물질인 Hydroxyproline의 Collagenase 저해활성을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 15, Fig. 11). 처치 농도는 화장품 적용농도의 약 10배의 농도인 10% 이하의 농도로 설정함. Hydroxyproline의 활성정도는 양성대조군인 Ascorbic acid와 동물성(돈피) 콜라겐보다 다소 낮은 결과로 나타났음.

Table 15. Collagenase inhibition activity of Hydroxyproline

unit : %

	Groups (ppm)			
	1250	2500	5000	10000
Collagenase inhibition	78.4±0.2	80.0±0.1	84.4±0.2	82.0±0.1

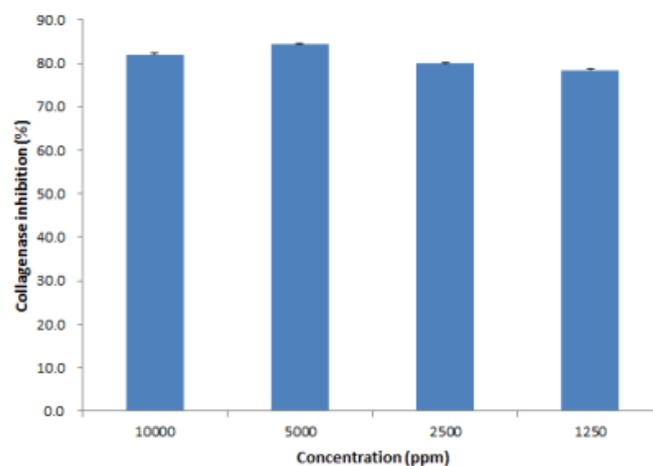


Fig. 11. Collagenase inhibition activity of Hydroxyproline

○ 당근 추출물의 Collagenase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 16, Fig. 12). 1% 동물성(돈피) 콜라겐의 Collagenase 저해활성능과 100% 당근추출물의 Collagenase 저해활성능이 매우 유사하게 나타났음. 농도 의존적으로 Collagenase 저해 활성능을 보여주고 있으나 농도에 따른 큰 차이는 보이지 않음.

Table 16. Collagenase inhibition activity of Carrot extract

unit : %

	Groups (%)			
	1	50	75	100
당근 PB10	77.0±0.07	75.5±0.10	77.9±0.08	80.4±0.08
당근 PB20	68.3±0.06	72.6±0.13	79.7±0.13	80.8±0.12
당근 PS10	75.6±0.09	74.9±0.11	79.3±0.10	82.4±0.13
당근 PS20	66.0±0.06	71.3±0.09	80.8±0.28	83.2±0.12
당근 BB10	77.0±0.17	81.3±0.14	65.9±0.09	90.4±0.03
당근 BB20	74.9±0.16	76.3±0.07	64.4±0.19	79.5±0.57
당근 BS10	77.4±0.12	77.6±0.08	80.7±0.09	78.3±0.15
당근 BS20	63.4±0.07	74.5±0.19	80.8±0.01	74.8±0.13

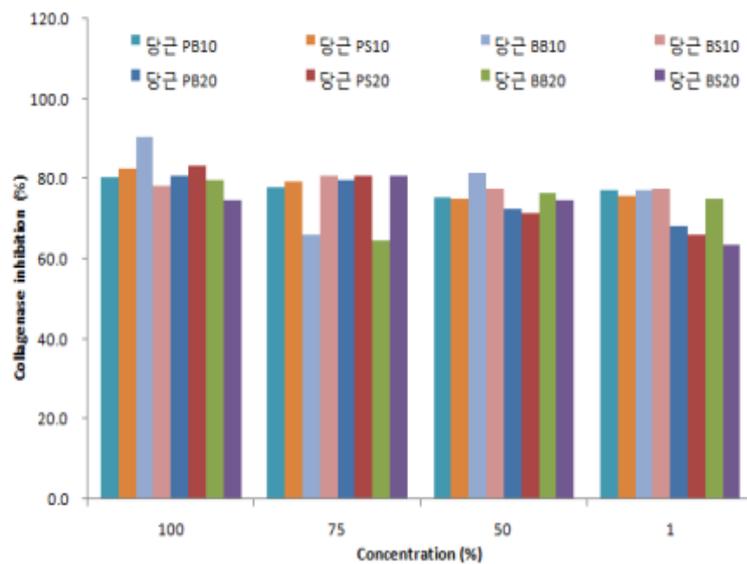


Fig. 12. Collagenase inhibition activity of Carrot extract

○ 느타리버섯 추출물의 Collagenase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 17, Fig. 13). 1% 동물성(돈피) 콜라겐의 Collagenase 저해 활성능보다 100% 느타리버섯 추출물의 Collagenase 저해활성능이 조금 낮게 나타났으나 농도 의존적으로 Collagenase 저해 활성능을 보여주고 있으며 농도에 따른 큰 차이는 보이지 않음. 효소처리 농도가 작을수록 Collagenase 저해 활성능이 높게 나타나지만 그 차이는 미미함.

Table 17. Collagenase inhibition activity of Pleurotus ostreatus extract

T unit : %

	Groups (%)			
	1	50	75	100
느타리 PB10	71.3±0.82	69.7±0.30	74.7±0.32	84.3±0.11
느타리 PB20	55.9±0.34	74.1±0.22	71.3±0.47	79.9±0.59
느타리 PS10	69.0±0.37	73.0±0.13	79.0±0.18	86.3±0.18
느타리 PS20	63.1±0.14	78.1±0.70	78.4±0.18	82.7±0.11
느타리 BB10	57.7±0.10	60.8±0.45	73.3±0.13	94.7±0.28
느타리 BB20	56.7±0.07	65.4±0.19	76.3±0.03	86.4±0.08
느타리 BS10	57.7±0.10	60.8±0.45	64.6±0.08	81.4±0.39
느타리 BS20	58.4±0.03	63.7±0.16	66.0±0.14	67.1±0.33

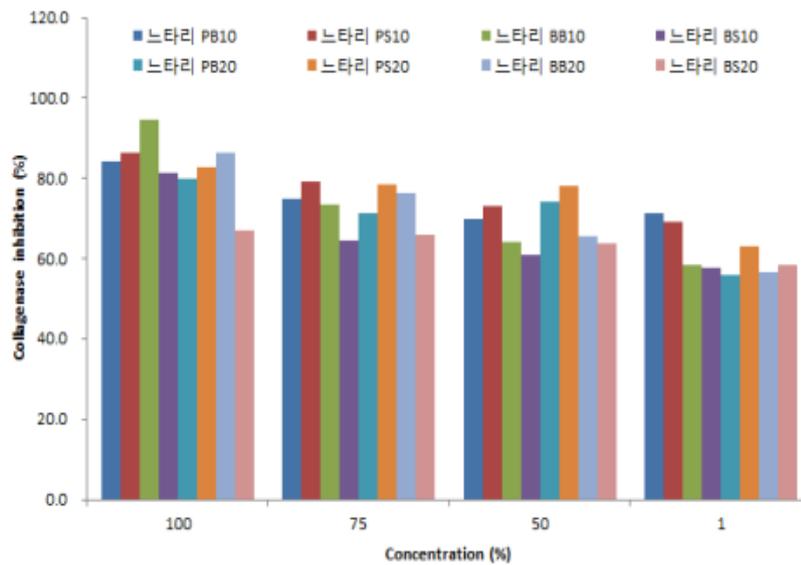


Fig. 13. Collagenase inhibition activity of *Pleurotus ostreatus* extract

② Elastase 저해활성

○ Elastase 저해활성 측정방법

증류수 60  $\mu$ L, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 10  $\mu$ L, 10 mM의 기질 (N-succinyl-(Ala)<sup>3</sup>-4-nitroanilide) 10  $\mu$ L를 넣은 후 37°C에서 5분 동안 반응 후 반응 된 기질, 시료 혼합액에 elastase (1unit/ml) 10  $\mu$ L를 첨가한 후 415 nm에서 흡광도를 측정.

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 Elastase 저해활성을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 18, Fig. 14). 실험물질의 농도에 따라 농도의존적으로 Elastase 저해활성을 나타내고 있음.

Table 18. Elastase inhibition activity of ascorbic acid

unit : %

	Groups (ppm)			
	1250	2500	5000	10000
Collagenase inhibition	4.9±2.5	16.1±9.0	29.0±7.0	81.3±1.0

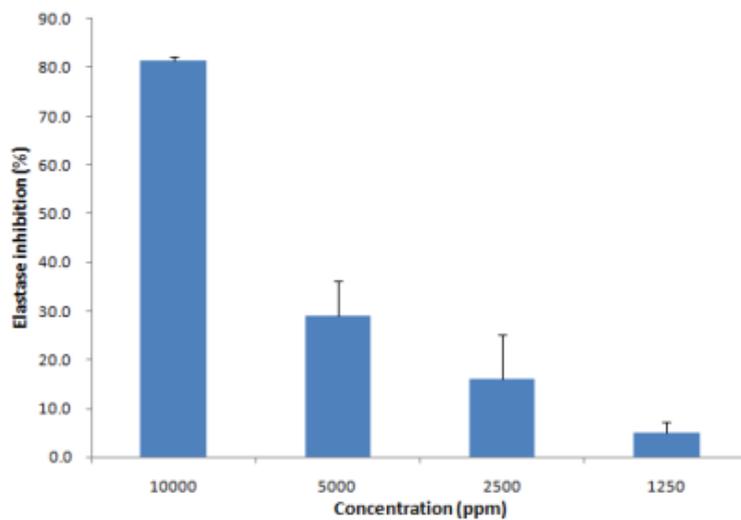


Fig. 14. Elastase inhibition activity of ascorbic acid

- 실험의 대조군으로 사용되어지는 동물성(돈피) 콜라겐의 Elastase 저해활성을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 19, Fig. 15). 처치 농도는 화장품 적용농도의 약 10배의 농도인 10% 이하의 농도로 설정함. 동물성(돈피) 콜라겐의 활성정도는 양성대조군인 Ascorbic acid보다 다소 낮게 나타났으며 화장품 처리농도인 1%에서는 활성도가 보이지 않았다.

Table 19. Elastase inhibition activity of Pigskin Collagen

unit : %

	Groups (ppm)			
	1250	2500	5000	10000
Collagenase inhibition	-7.9±5.67	6.1±2.34	14.3±4.52	33.3±1.34

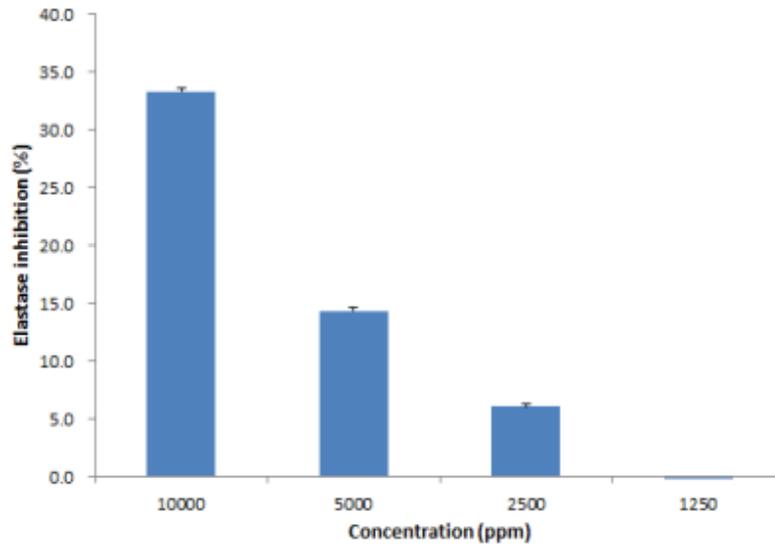


Fig. 15. Elastase inhibition activity of Pigskin Collagen

○ 당근 추출물의 Elastase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 20, Fig. 16). 고 농도로 처치시에도 대부분 낮은 활성도를 보이지만 상대적으로 Papain보다는 Bromelain을 처치한 시험군에서 높은 활성이 보여진다.

Table 20. Elastase inhibition activity of Carrot extract

unit : %

	Groups (%)			
	1	50	75	100
당근 PB10	-14.8±5.35	-1.2±4.75	-3.8±1.45	-14.8±5.35
당근 PB20	-19.1±18.49	-8.0±6.04	-13.6±5.00	-14.3±2.34
당근 PS10	-8.6±8.80	3.4±1.15	0.1±1.02	8.6±1.83
당근 PS20	-29.7±9.15	9.1±1.71	3.7±1.71	7.0±1.20
당근 BB10	-4.9±6.24	9.0±4.09	12.6±3.65	19.0±2.84
당근 BB20	-2.3±3.50	21.7±4.90	21.7±3.00	21.6±2.03
당근 BS10	-14.1±3.78	15.6±2.50	16.1±0.19	17.8±1.20
당근 BS20	-4.3±6.73	44.5±5.28	41.8±0.88	52.1±4.19

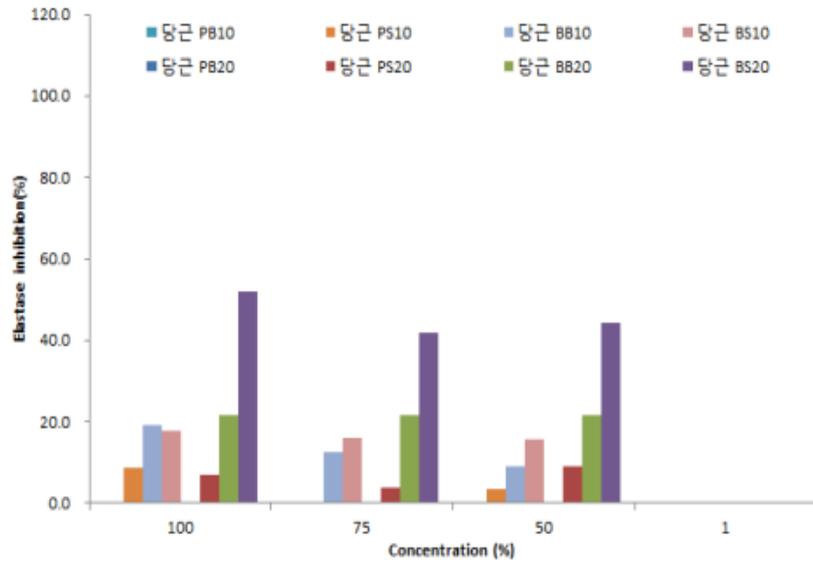


Fig. 16. Elastase inhibition activity of Carrot extract

○ 느타리버섯 추출물의 Elastase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 21, Fig. 17). 고 농도로 처치시에서는 활성도가 높게 나타나는 양상을 보이지만 농도가 낮아질수록 급격히 활성도가 떨어지는 것을 볼 수 있음. Papain보다는 Bromelain 처치 시 조금 더 높은 활성을 보이며 효소처리 농도가 높을수록 활성도가 높아지는 것을 알 수 있음.

Table 21. Elastase inhibition activity of Pleurotus ostreatus extract

unit : %

	Groups (%)			
	1	50	75	100
느타리 PB10	-10.1±2.69	1.5±4.53	11.9±4.19	11.0±7.20
느타리 PB20	6.2±0.88	10.4±1.64	11.1±4.53	18.8±5.44
느타리 PS10	1.7±9.32	15.2±2.02	15.2±1.83	20.8±3.28
느타리 PS20	0.6±1.07	22.9±3.20	25.3±2.03	30.9±2.21
느타리 BB10	6.2±20.03	21.0±5.73	20.2±3.66	23.1±5.09
느타리 BB20	-1.7±1.71	27.3±2.84	34.8±4.15	36.4±1.71
느타리 BS10	-6.7±1.83	29.5±3.88	32.8±3.17	39.0±3.70
느타리 BS20	-10.4±3.33	53.7±4.81	57.2±4.43	60.6±2.00

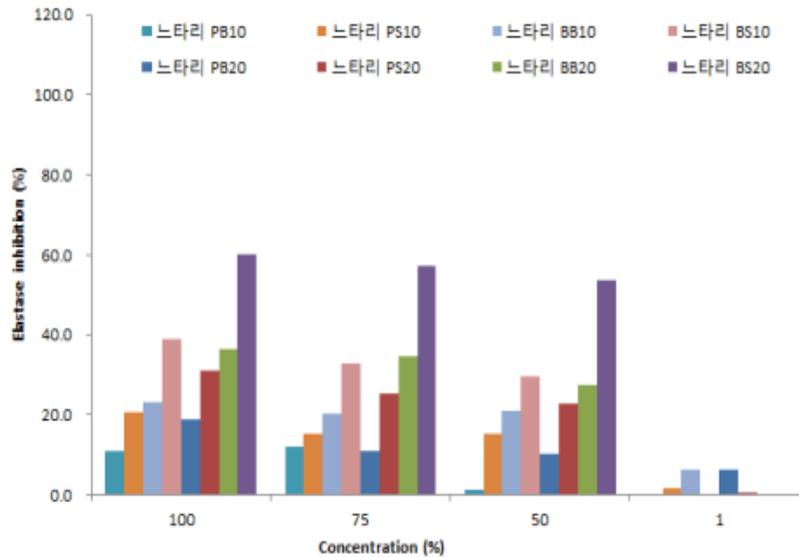


Fig. 17. Elastase inhibition activity of Pleurotus ostreatus extract

③ Human dermal fibroblasts (HDF) 세포주를 이용한 주름개선평가

○ 주름개선평가 방법

HDF 세포주를  $0.8 \times 10^5$  cells/well로 seeding 후 다음날 PBS로 세척한 다음 PBS (400  $\mu$ l)를 각 well에 넣고 UVB (15 mJ/cm<sup>2</sup>) 조사 후 FBS가 없는 세포배지에 각각의 시료를 정해진 농도로 8시간 경과 후 세포단백질을 분리하여 항체를 이용한 Western blot 방법을 사용하여 분리된 세포 단백질내 MMP-1, type I collagen 및 actin 단백질 발현 변화를 측정하였음. 또한 현미경을 사용하여 각 실험군에서 세포의 수 및 형태적 변화를 관찰하였음.

○ Fig. 18A에서 보이는 것처럼, 대조군 (lane 1)과 비교하여 UVB 조사 HDF 세포주에서 MMP-1 mRNA 발현이 약하게 증가하였음 (lane 2). 그러나 당근 PS20 (100  $\mu$ l/ml) (lane 4), 당근 BS20 (50 100  $\mu$ l/ml) (lane 5) 및 hydroxyproline (300  $\mu$ g/ml) (lane 9) 투여 시 UVB 유도 MMP-1 단백질 발현이 약간 억제되었음. Fig. 18B에서 보이는 것처럼, 대조군 (lane 1)과 비교하여 UVB 조사 HDF 세포주에서 type 1 collagen mRNA 발현이 감소되었음 (lane 2). lanes 5, 7, 8, 9에서 UVB 유도 type 1 collagen mRNA 발현이 크게 회복되었음. 그러나 Fig 18C와 18D에서 보이는 것처럼, UVB 조사 시 MMP-2 및 MMP-3 mRNA 발현은 큰 변화가 없었으며, 또한 각각의 시료 처리 시에도 MMP-2 및 MMP-3 mRNA 발현에는 큰 변화가 보이지 않았음. Fig 18E에서 보이는 것처럼, 상기 실험조건에서 actin mRNA 발현은 동일하였음.

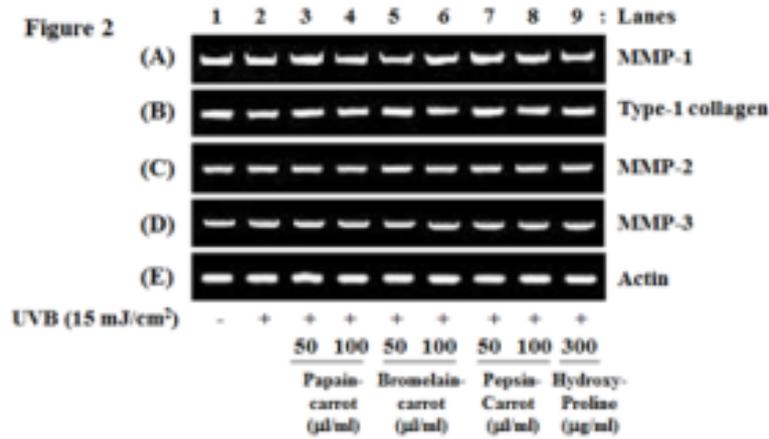


Fig. 18. Effects of carrot treated with different protein degrading enzymes or hydroxyproline on mRNA expression of MMPs and type 1 collagen proteins in control or UVB-irradiated human dermal fibroblasts

○ Fig. 19에서 보이는 것처럼, 대조군 (no UVB)과 비교하여 UVB 조사 HDF 세포주에서 약간의 세포 수 감소와 더불어 세포의 형태가 둥글게 변화되는 것이 관찰되었으며 세포독성으로 인한 형태변화가 나타나는 것으로 의심됨. 당근 PS20 (50 또는 100 μl/ml), 당근 BS20 (50 μl/ml), pepsin-carrot (50 또는 100 μl/ml) 또는 hydroxyproline (300 μg/ml) 투여 시 UVB 유도 세포의 형태 변화가 일어나지 않았음. 그러나 당근 BS20 (100 μl/ml) 투여 시 UVB 조사 상태에서 세포의 수적 감소가 크게 나타났으며, 또한 둥근 형태의 세포수 역시 증가하였음. 즉, 당근 BS20(100 μl/ml) 투여는 UVB 조사 조건에서 세포 독성을 유도 할 수 있음을 시사하였음.

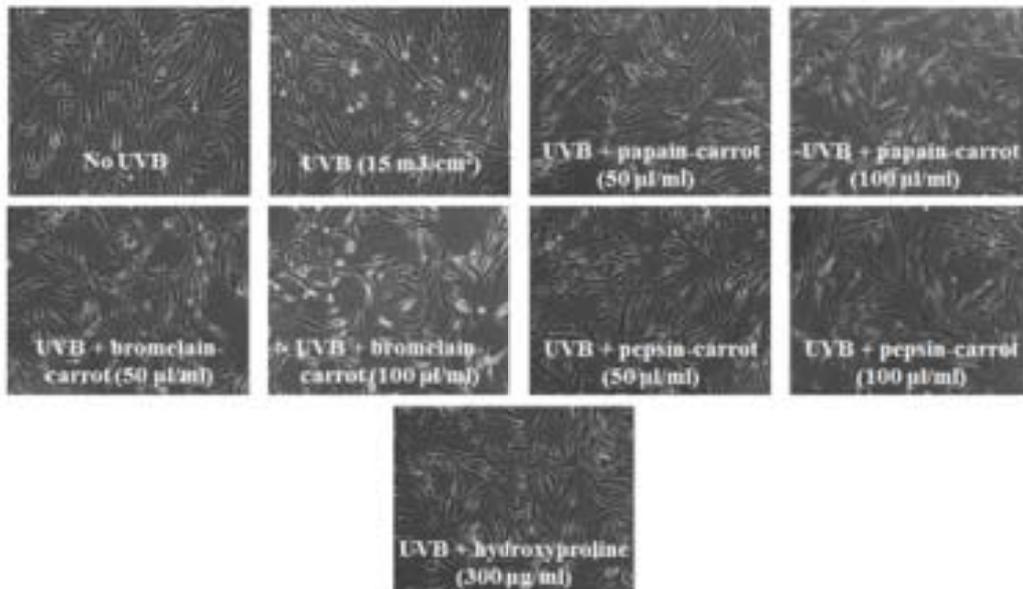


Fig. 19. Effects of carrot treated with different protein degrading enzymes or hydroxyproline on growth in control or UVB-irradiated human dermal fibroblasts

### (3)-2. 2차년도

(가) 시료

○ 당근을 서로 다른 4종류의 효소를 적용하여 유효성분을 추출(Table 22).

Table 22. Experimental group categorization of Carrot extract.

시료	효소	
당근	Papain 저순도	당근 PB
	Papain 고순도	당근 PS
	Bromelain 저순도	당근 BB
	Bromelain 고순도	당근 BS

○ 느타리버섯을 서로 다른 4종류의 효소를 적용하여 유효성분을 추출(Table 23).

Table 23. Experimental group categorization of Pleurotus ostreatus.

시료	효소	
느타리버섯	Papain 저순도	느타리 PB
	Papain 고순도	느타리 PS
	Bromelain 저순도	느타리 BB
	Bromelain 고순도	느타리 BS

○ 솔잎을 서로 다른 4종류의 효소를 적용하여 유효성분을 추출(Table 24).

Table 24. Experimental group categorization of Pine.

시료	효소	
솔잎	Papain 저순도	솔잎 PB
	Papain 고순도	솔잎 PS
	Bromelain 저순도	솔잎 BB
	Bromelain 고순도	솔잎 BS

(나) 주름개선 효능평가

① Human dermal fibroblasts (HDF) 세포주를 이용한 주름개선평가

○ Fig. 20(A)에서 보이는 것처럼, 대조군 (lane 1)과 비교하여 UVB 조사시킨 HDF에서 type-1 collagen 단백질 발현이 감소하였음 (lane 5). 이때 50 u1/ml 당근 BS (lane 7) 또는 당근-pepsin (PeP) (lane 8) 처치 시 UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소가 부분적으로 억제되었음. 동량의 hydroxyproline (HP) 300 ug/ml) 처치 역시 UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소를

부분적으로 억제하였음 (lane 9). 그러나 Fig. 1(B)에서 보이는 것처럼, 50 ul/ml 당근PB (lane 6), 당근BB (lane 7) 처치 시 UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소의 차단효과는 보이지 않았음. 대조군에서도 역시 UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소의 차단효과는 나타나지 않았음 (lane 8). 당근BS 또는 당근PS(사용용량: 50 ul/ml)이 피부주름 개선 효능(UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소 억제 효과)을 보유하고 있음을 확인하였음. 본 결과는 당근BS 또는 당근PS의 피부주름 개선 효능(UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소 억제 효과) 관련 작용기전 분석 연구에 활용하려 함.

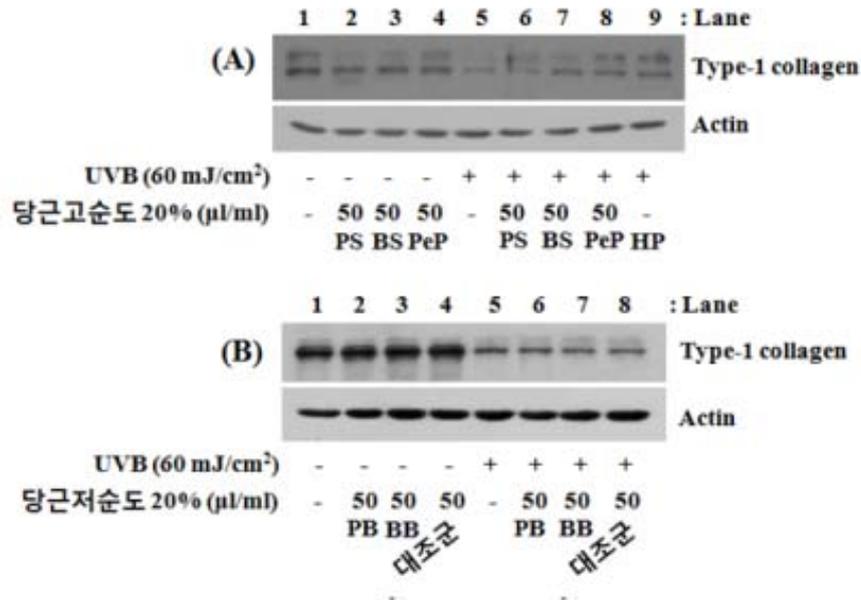


Fig. 20. Effects of Carrot extract with different protein degrading enzymes or hydroxyproline on mRNA expression of MMPs and type 1 collagen proteins in control or UVB-irradiated human dermal fibroblasts

○ Fig. 21(A)에서 보이는 것처럼, 대조군 (lane 1)과 비교하여 UVB 조사시킨 HDF에서 type-1 collagen 단백질 발현이 감소되었음 (lane 5). 그러나 50 ul/ml 느타리BS 처치 시 UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소가 부분적으로 억제되었음 (lane 7). 이와는 달리 50 ul/ml 느타리PS (lane 6) 또는 느타리-pepsin (PeP) (lane 8) 처치 시 UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소에 대한 억제 효과는 나타나지 않았음. 한편, Figure 2B에서 보이는 것처럼, 50 ul/ml 처치와 비교하여 (lane 5), 25 ul/ml 느타리BS 처치 시 UVB 조사 조건에서도 type 1 collagen 단백질의 세포내 발현이 크게 증가되었음 (lane 4). 흥미롭게도 75 ul/ml 느타리 BS 처치 시 (UVB 미조사) HDF에서 높은 type 1 collagen 단백질 발현이 관찰되었음 (lane 2). 그러나 75 ul/ml 느타리 BS 처치 시 UVB 조사 조건에서 type 1 collagen 단백질 발현 증가가 보이지 않았음 (lane 6). Figure 2(C)에서 보이는 것처럼, HDF를 이용한 추가적인 triplicate 실험 (#1-3)에서 역시 UVB 단독 조사 시 type 1 collagen 발현 감소 (lanes 3,7,11)와 비교하여 25 ul/ml 느타리 BS는 UVB 조사 조건에서 type 1 collagen 단백질 발현을 약간 증대시키는 효능을 가지고 있음 (lanes 4,8,12)을 확인하였음. 시료 protein loading/expression control로 actin 단백질을 사용하였음. 느타리 BS (사용용량: 25 ul/ml)이 피부주름 개선 효능(UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소 억제 효과)을 가장 강하

게 보유하고 있음을 확인하였음. 본 결과를 토대로 느타리 BS 의 피부주름 개선 효능(UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소 억제 효과) 관련 작용기전 분석 연구에 활용하려 함.

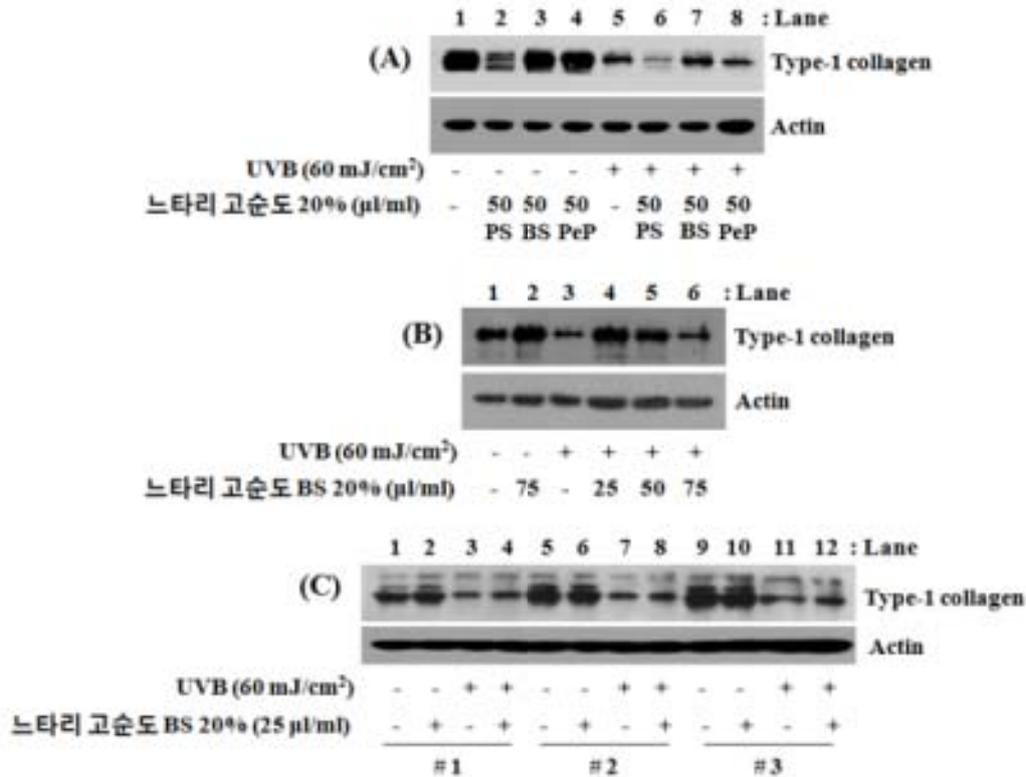


Fig. 21. Effects of Pleurotus ostreatus extract with different protein degrading enzymes or hydroxyproline on mRNA expression of MMPs and type 1 collagen proteins in control or UVB-irradiated human dermal fibroblasts

○ Fig. 22에서 보이는 것처럼, 대조군 (lane 1)과 비교하여 2 시간 동안 UVB 조사시킨 HDF에서 여러 신호전달 단백질 (ERK-1/2, PKB, p38, JNK-1/2, SMAD2/3)의 활성화(인산화)가 관찰되었음 (lane 3). 이때 특이적으로 25 ul/ml 느타리 BS 처치 시 UVB 유도 ERK-1/2 신호전달 단백질의 인산화가 크게 억제되었음. 그러나 25 ul/ml 느타리 BS 처치 시 UVB 유도 PKB, p38, JNK-1/2 및 SMAD2/3 신호전달 단백질의 인산화는 변화가 없었음 (lane 4). 느타리 BS (사용용량: 25 ul/ml)이 피부주름 개선 효능(UVB 매개 type 1 collagen 단백질 발현 감소 억제 효과)이 ERK-1/2 활성화 (인산화) 제어 작용/기능을 통해 일어나고 있음을 확인하였음. 본 결과를 토대로 느타리 BS의 HDF-UVB-type 1 collagen 단백질 발현 감소-ERK-1/2 활성화 감소 간 상호관련성/상호조절성에 대한 분자/신호작용기전 규명 연구에 적용.

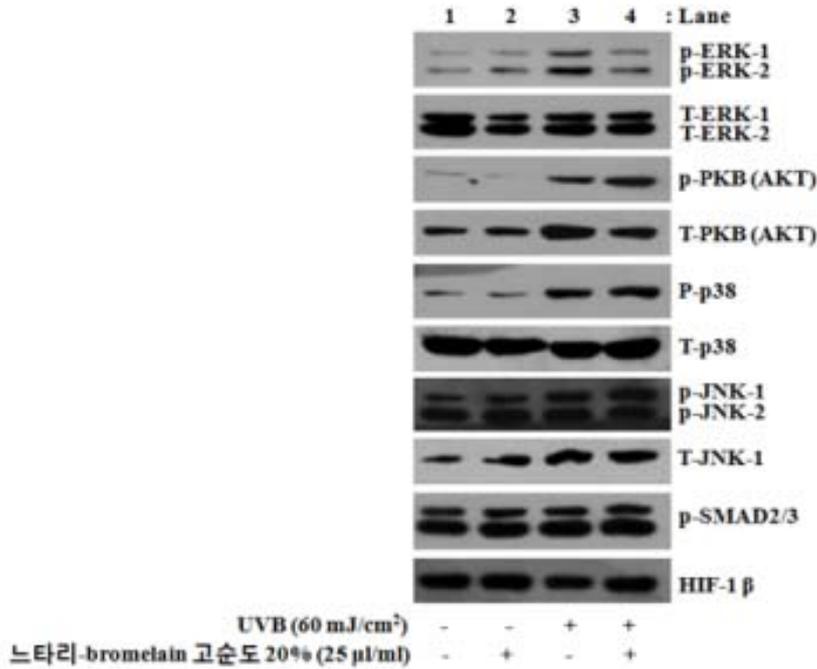


Fig. 22. Effects of Pleurotus ostreatus extract in UVB-irradiated human dermal fibroblasts

(다) 항산화 효능평가

① ABTS free radical 소거능

- 1차년도 진행 결과 DPPH로부터의 전자소거활성 측정결과는 매우 낮아 활성능을 보인다고 판단할 수 없으나 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과는 활성능을 확인할 수 있었음. 본 연구의 평가방법으로 DPPH로부터의 전자소거활성 측정정보는 ABTS free radical 소거능을 측정이 과제성 격에 더욱 알맞다고 판단 됨.
- 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 25, Fig. 23). 시료의 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 25. ABTS radical scavenging activities of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (ppm)			
	1000	500	250	125
ABTS	99.8±0.3	100.2±0.2	99.8±0.2	100.1±0.3

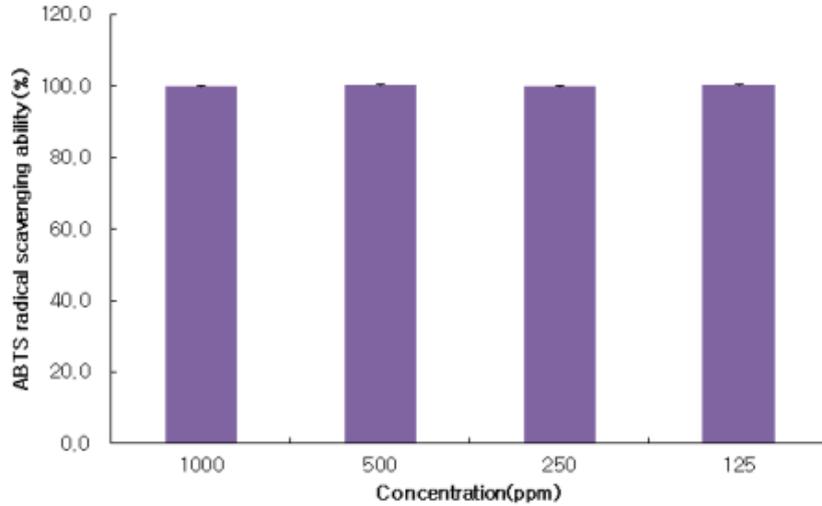


Fig. 23. ABTS radical scavenging activities of Ascorbic acid.

- 본 연구는 동물성(돈피) 콜라겐의 항산화 효능 대체소재 확보를 위한 실험으로서 1차년도 연구 시 동물성(돈피) 콜라겐의 적용농도는 10% 이하로 설정하였음. ABTS free radical 소거능 측정 시 솔잎 추출물의 처치 농도는 동물성(돈피) 콜라겐 처치농도의 2배 이하의 농도로 설정하였으며, 추출 시 원물의 비율이 5%으로 추출 된 시료 원액을 이용하여 실험을 진행하였음. 추출된 시료의 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 26, Fig. 24). 효소 무처리 군에서 매우 높은 항산화능을 보이고 있으며, 효소를 처리한 군에서 효소 무처리 군보다 높은 결과를 보이지는 않음. 이것은 솔잎 자체의 항산화능이 너무 높기때문이라고 짐작됨. 효소 처리군간 항산화능을 비교했을 때 고 순도의 파파인을 처리한 솔잎에서 ABTS free radical 소거능이 가장 높아진 것을 볼 수 있음.

Table 26. ABTS radical scavenging activities of Pine extract.

unit : %

	Groups				
	효소 무처리	솔잎 PB	솔잎 PS	솔잎 BB	솔잎 BS
ABTS	99.5±0.21	99.9±0.14	99.1±0.14	98.7±0.00	99.6±0.80

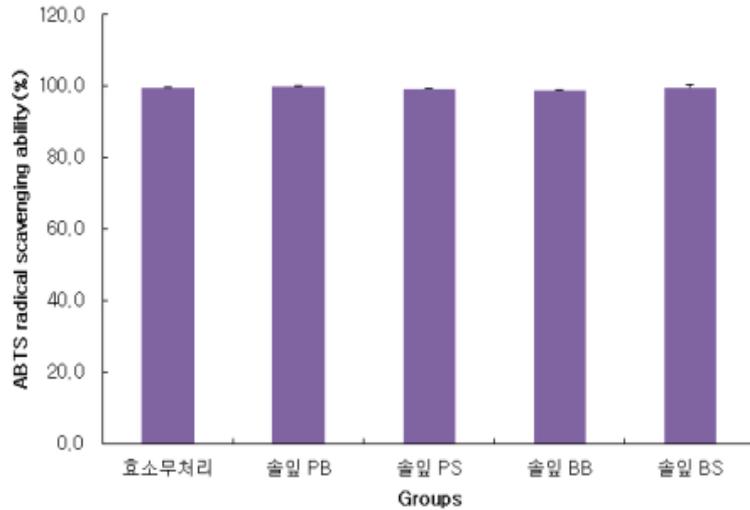


Fig. 24. ABTS radical scavenging activities of Pine extract.

② SOD 유사활성

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 SOD 유사활성능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 27, Fig. 25). 시료의 농도 의존적으로 활성도를 보이고 있음.

Table 27. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (ppm)			
	1000	500	250	125
SOD-like	97.1±0.9	86.3±3.98	40.5±2.41	12.8±0.91

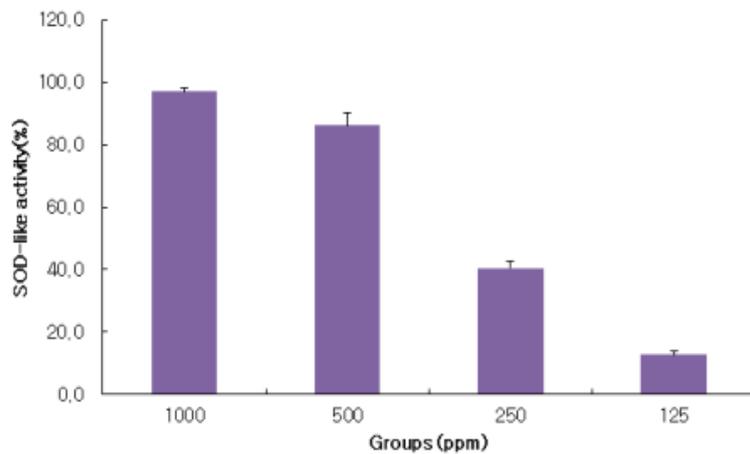


Fig. 25. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of Ascorbic acid.

- 본 연구는 동물성(돈피) 콜라겐의 항산화 효능 대체소재 확보를 위한 실험으로서 1차년도 연구시 동물성 (돈피) 콜라겐의 적용농도는 10% 이하로 설정하였음. Superoxide dismutase(SOD)-like activity 측정 시 솔잎 추출물의 처치 농도는 동물성(돈피) 콜라겐 처치농도의 2배 이하의 농도로 설정하였으며, 추출 시 원물의 비율이 5%으로 추출 된 시료 원액을 이용하여 실험을 진행하였음. 추출된 시료의 Superoxide dismutase(SOD)-like activity를 측정한 결과는 다음과 같음(Table 28, Fig. 26). 효소 무처리 군에서 매우 높은 항산화능을 보이고 있으며, 효소를 처리한 군에서 효소 무처리 군보다 일정 이상의 높은 Superoxide dismutase(SOD) activity를 보이고 있음. 하지만 솔잎 BS 군에서는 효소 무처리 군 보다 다소 낮은 항산화능을 확인할 수 있음. 효소 처리군간 항산화능을 비교했을 때 고순도의 파파인을 처치한 솔잎에서 ABTS free radical 소거능이 가장 높아지는 것을 볼 수 있음.

Table 28. Superoxide dismutase(SOD) activity of Pine extract.

unit : %

	Groups				
	효소 무처리	솔잎 PB	솔잎 PS	솔잎 BB	솔잎 BS
SOD-like	91.0±1.8	98.4±4.7	93.9±3.6	96.6±0.9	89.7±2.7

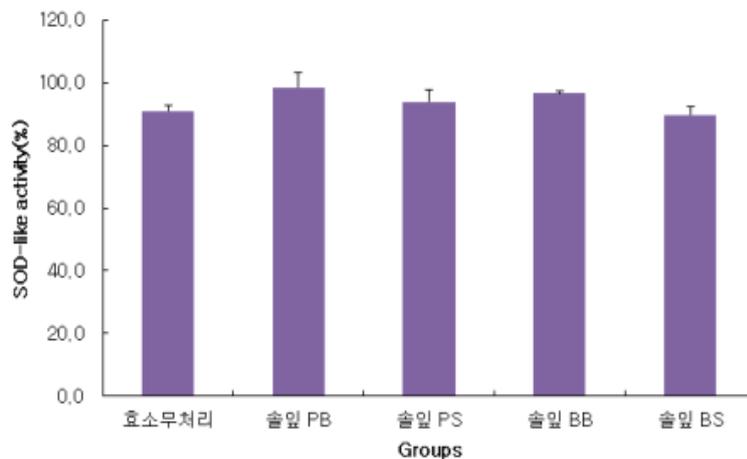


Fig. 26. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of Pine extract.

② 총 폴리페놀

- 솔잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 29와 같음. 모든 군에서 유사한 총 폴리페놀 함량이 나타났음. 효소 무처리군에서 가장 높은 총 폴리페놀 함량이 나타났으며, 효소처리를 한 군 중에서는 솔잎 PS에서 가장 높은 총 폴리페놀 함량이 나타났음.

Table 29. Total polyphenol content of Pine extract.

unit : mg/g

	Groups (mg/g)			mean ± SD
	1st	2nd	3rd	
효소 무처리	100.50	104.25	99.25	101.33±2.60
솔잎 PB	93.00	96.75	93.00	94.25±2.16
솔잎 PS	100.50	99.25	99.25	99.67±0.72
솔잎 BB	94.25	95.50	96.75	95.50±1.25
솔잎 BS	98.00	95.50	96.75	96.75±1.25

(라) 항균 효능평가

① Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

- 대조군으로는 penicillin과 phenoxyethanol이 사용되었으며, penicillin은 대표적인 항생제이며, phenoxyethanol은 일반적으로 많이 사용되고 있는 화장품 보존제임.
- *Escherichia coli*에 대한 솔잎 추출물 및 대조군의 항균 효능을 측정한 결과는 Fig. 30과 같음. Penicillin과 phenoxyethanol은 *Escherichia coli*에서 균 생성 억제가 나타나 생육저해환을 보이고 있으나 실험군은 모두 균 생성 억제가 미미한것으로 보임.

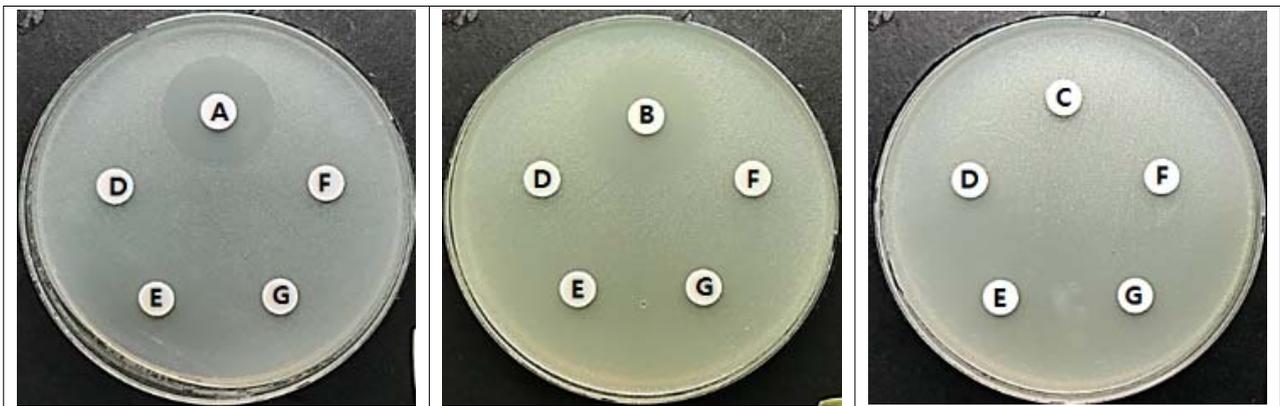


Fig. 30. Anti-microbial effect of Pine extract and control.

A: Penicillin, B: Phenoxyethanol, C: 효소무처리 D: 솔잎BB, E: 솔잎BS, F: 솔잎PB, G: 솔잎PS

- *Staphylococcus epidermidis*에 대한 솔잎 추출물 및 대조군의 항균 효능을 측정한 결과는 Fig. 31과 같다. Penicillin과 phenoxyethanol은 *Staphylococcus epidermidis*에서 균 생성 억제가 나타나 생육저해환을 보이고 있으나 실험군은 모두 균 생성 억제가 미미한것으로 보임.

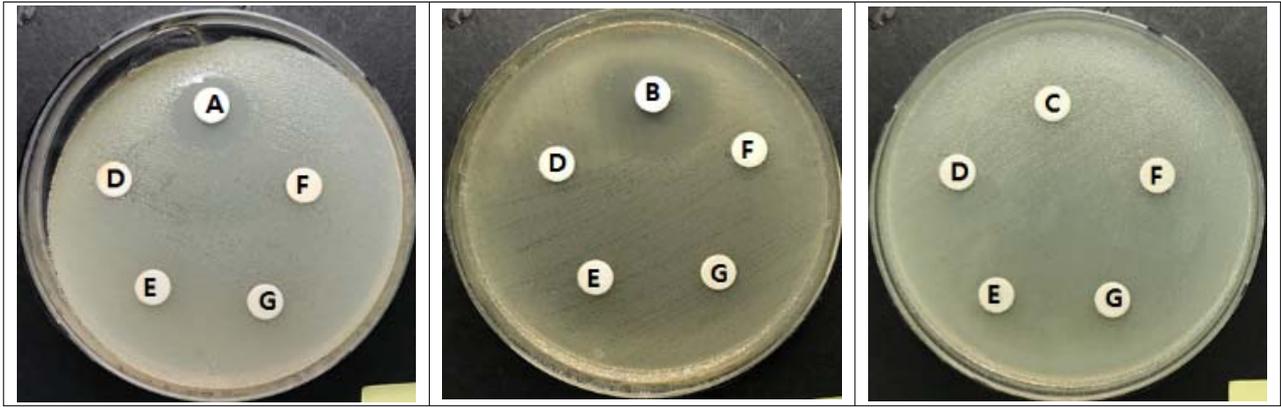


Fig. 31. Anti-microbial effect of Pine extract and control.

A: Penicillin, B: Phenoxyethanol, C: 효소무처리 D: 솔잎BB, E: 솔잎BS, F: 솔잎PB, G: 솔잎PS

○ *Propionibacterium acnes*에 대한 솔잎 추출물 및 대조군의 항균 효능을 측정한 결과는 Fig. 32와 같다. Penicillin과 phenoxyethanol은 *Propionibacterium acnes*에서 균 생성 억제가 나타나 생육 저해환을 보이고 있으나 실험군은 모두 균 생성 억제가 미미한것으로 보임.

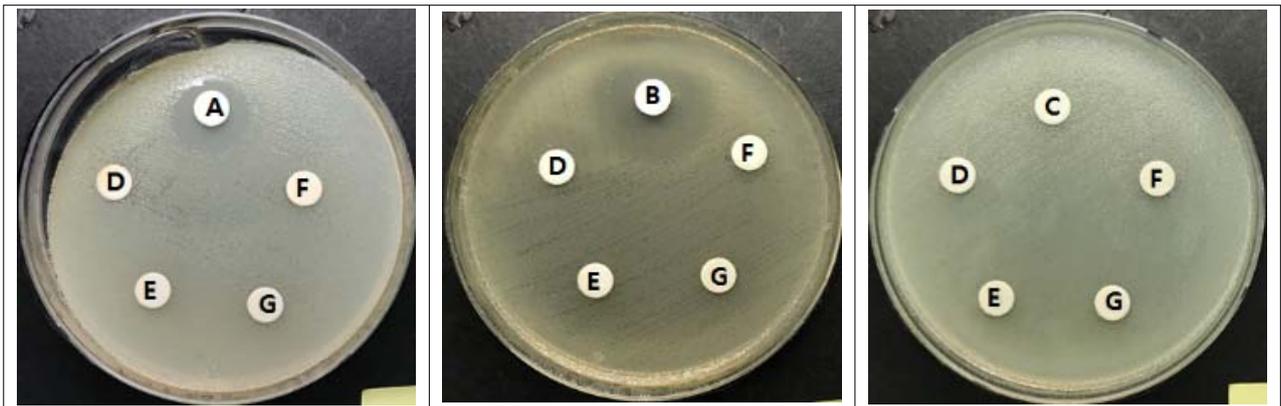


Fig. 32. Anti-microbial effect of Pine extract and control.

A: Penicillin, B: Phenoxyethanol, C: 효소무처리 D: 솔잎BB, E: 솔잎BS, F: 솔잎PB, G: 솔잎PS

(마) 미백 효능평가

① Mushroom tyrosinase 저해활성 측정

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 Mushroom tyrosinase 저해활성능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 31).

Table 31. Mushroom tyrosinase activity of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (mg/g)			mean ± SD
	1st	2nd	3rd	
Ascorbic acid	49.5	49.5	55.2	51.4±3.30

○ 본 연구는 추출 시 원물의 비율이 5%으로 추출 된 시료 원액을 이용하여 실험을 진행하였음. 추출 된 시료의 mushroom tyrosinase activity를 측정 한 결과는 다음과 같음(Table 32). 효소 무처리의 mushroom tyrosinase activity의 결과는  $3.8 \pm 3.3$ 로 매우 낮은 활성을 보임. 효소처리를 한 모든 군에서 활성도가 전혀 나타나지 않음. 솔잎 자체의 mushroom tyrosinase activity가 매우 낮으며 효소처리를 하면 전혀 활성이 나타나지 않으므로 효소처리 된 솔잎추출물의 미백기능 연구에서는 다른 기전을 살펴보아야 함.

Table 32. Mushroom tyrosinase activity of Pine extract.

	Groups				
	효소 무처리	솔잎 PB	솔잎 PS	솔잎 BB	솔잎 BS
Mushroom tyrosinase activity	$3.8 \pm 3.3$	$-26.7 \pm 3.30$	$-28.6 \pm 5.95$	$-107.6 \pm 5.71$	$-96.2 \pm 1.65$

unit : %

② Melanoma 세포주를 이용한 미백평가

○ B16 mouse melanoma cells (B16 세포)을 대상으로  $\alpha$ -MSH (2.5 uM) 처치 주 시험물질을 처치 함. 세포생존에 미치는 영향 분석과 함께, 세포 내 melanin 함량 분석함. 대조군은  $\alpha$ -MSH (2.5 uM) 처치하지 않은 B16세포이고 positive control 시약으로 PTU (기존 melanin 합성 촉진제)를 사용하였음

○ Mushroom tyrosinase activity에서 효소처리 군 중 합성률이 가장 낮은 군인 솔잎 PS군을 이용하여 실험을 진행하였음. Fig. 33. 에서 보이는 것처럼, 대조군 (column 1)과 비교하여  $\alpha$ -MSH 단독 (column 5) 또는  $\alpha$ -MSH plus 솔잎 PS 처치 시 B16 세포생존이 일부 감소하였음. 이때 3.125 또는 6.25 ul/ml 솔잎 PS 처치 시 melanin 함량이 감소되었음. 또한 3.125 또는 6.25 ul/ml 솔잎 PS 처치 시  $\alpha$ -MSH 매개 melanin 생성을 부분적으로 억제시켰음. 솔잎 PS(사용용량: 3.125 또는 6.25 ul/ml)이 미백 효능 (melanin 생성 억제 효과)을 약하게 보유하고 있음을 확인하였음. 솔잎PS(사용용량: 3.125 또는 6.25 ul/ml)의 미백 효능 (melanin 생성 억제 효과) 관련 작용기전 규명 연구에 적용 가능.

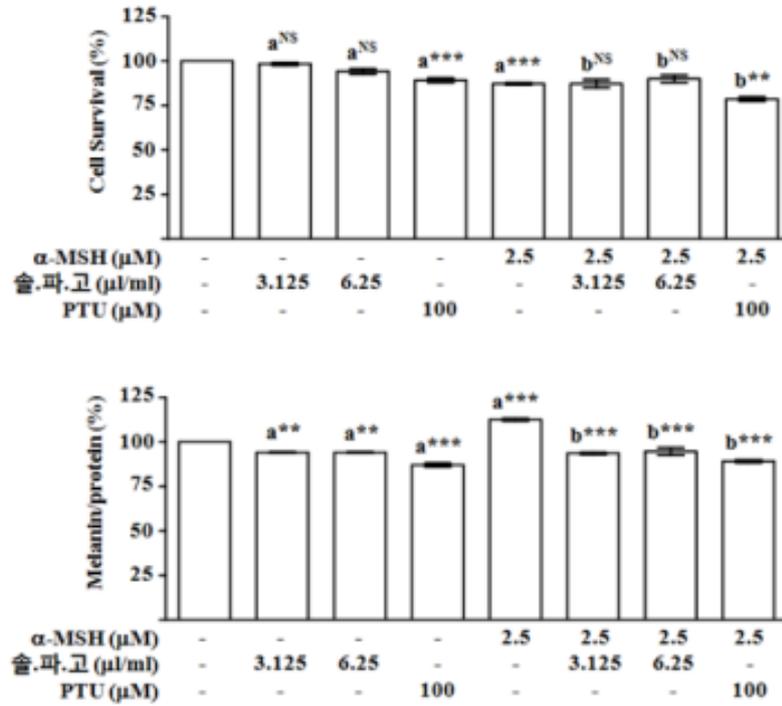


Fig. 33. Effects of Pine extract in  $\alpha$ -MSH irradiated B16 cell

(3)-3. 3차년도

(가) 시료

○ 녹두를 효소를 적용하지 않은것과 서로 다른 2종류의 효소를 적용한 것으로 나누어 유효성분을 추출(Table 32).

Table 32. Experimental group categorization of mung beans extract.

시료	효소	
녹두	-	녹두 열수 추출
	Papain 고순도	녹두 파파인
	Bromelain 고순도	녹두 브로멜라인

○ 홍삼을 효소를 적용하지 않은것과 서로 다른 2종류의 효소를 적용한 것으로 나누어 유효성분을 추출(Table 33).

Table 33. Experimental group categorization of red ginseng.

시료	효소	
홍삼	-	홍삼 열수 추출
	Papain 고순도	홍삼 파파인
	Bromelain 고순도	홍삼 브로멜라인

(나) 항산화 효능평가

① ABTS free radical 소거능

- 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 ABTS free radical 소거능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 34, Fig. 34). 시료의 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 34. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (ppm)					
	31.25	62.5	125	250	500	1000
ABTS <sup>+</sup>	100.1±0.2	100.0±0.1	100.2±0.1	100.0±0.1	100.1±0.1	100.0±0.1

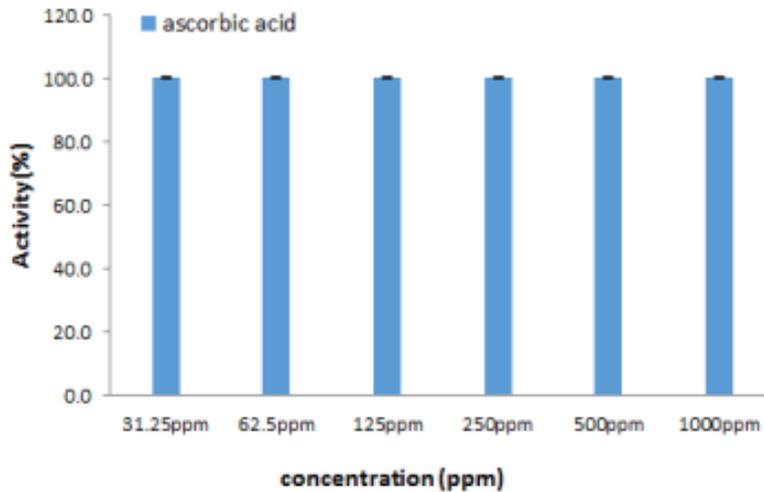


Fig. 34. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Ascorbic acid

- ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능 측정 시 100 % 녹두 열수 추출과 녹두에 처리 된 효소 농도는 각 20 %로 설정. 추출된 시료의 ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 35, Fig. 35). 열수 추출과 효소 간 차이를 비교했을 때 100 %에서 열수와 Bromelain 보다는 papain 처리 시 ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능이 더 높았음. 녹두 열수 추출의 결과 농도 의존적으로 증가함. 각 효소 처리 된 물질을 분석해보면 1 %이후 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 35. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Mung beans

unit : %

	Groups (%)					
	1	20	40	60	80	100
녹두 열수 추출	2.8±2.9	35.3±0.7	68.6±0.3	86.0±0.4	96.9±0.4	99.5±0.2
녹두 파파인	58.8±0.7	99.9±0.7	100.5±0.3	99.5±0.0	100.0±0.2	114.9±0.6
녹두 브로멜라인	42.3±0.6	100.1±0.3	104.1±1.0	103.3±0.4	100.0±0.5	100.1±0.1

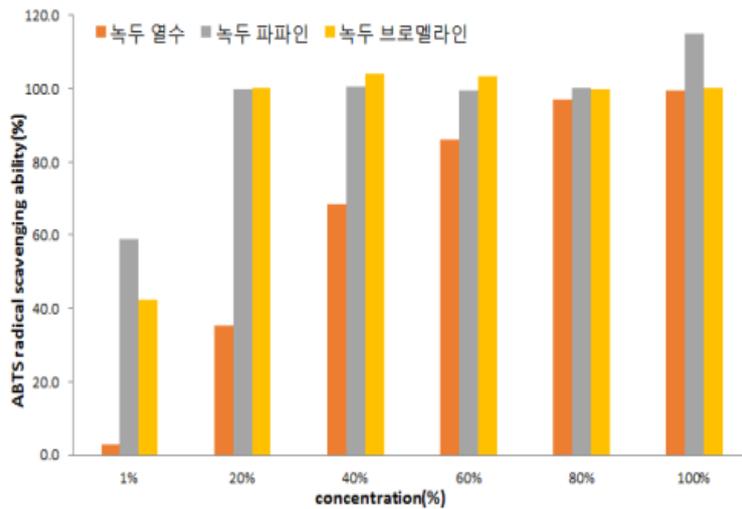


Fig. 35. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Mung beans

○ ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능 측정 시 100 % 홍삼 열수 추출과 홍삼에 처리 된 효소 농도는 각 20 %로 설정. 추출된 시료의 ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 36, Fig. 36). 열수 추출과 효소 간 차이를 비교했을 때 100 %에서 열수와 Bromelain 보다는 papain 처리 시 ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능이 더 높았음. 홍삼 열수 추출과 각 효소 처리 된 물질을 분석해보면 1 %이후 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 36. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Red ginseng

unit : %

	Groups (%)					
	1	20	40	60	80	100
홍삼 열수 추출	7.7±0.1	95.4±0.5	96.7±1.3	97.4±0.2	95.4±0.6	97.4±0.4
홍삼 파파인	16.3±10.3	97.7±0.2	98.8±0.4	98.8±0.2	96.3±0.4	99.3±0.2
홍삼 브로멜라인	24.0±2.1	91.6±0.5	91.5±0.3	90.1±0.5	90.0±0.2	91.9±0.5

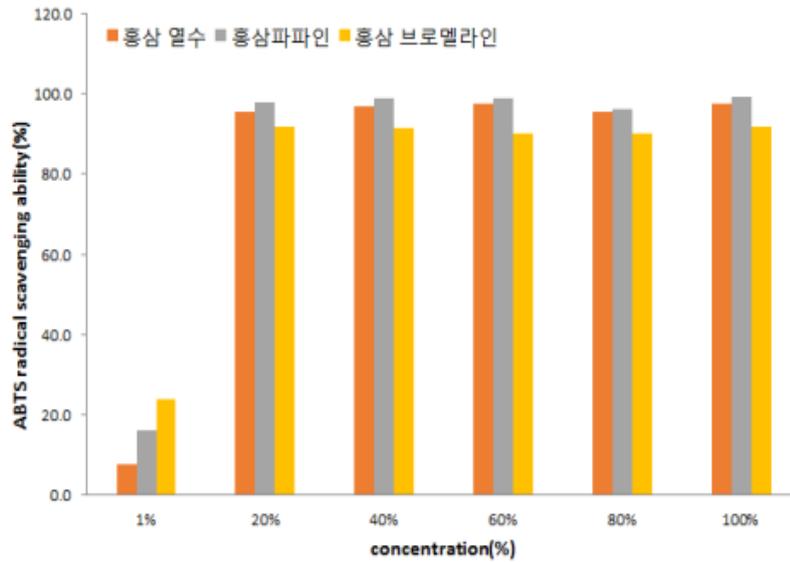


Fig. 36. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of Red ginseng

② SOD 유사활성

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 SOD 유사활성능을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 37, Fig. 37). 시료의 농도 의존적으로 활성도를 보이고 있음.

Table 37. Superoxide dismutase(SOD) activity of Ascorbic acid.

unit : %

	Groups (ppm)				
	62.5	125	250	500	1000
SOD-like	6.4±0.65	8.9±0.82	21.9±0.97	46.9±0.67	99.2±0.00

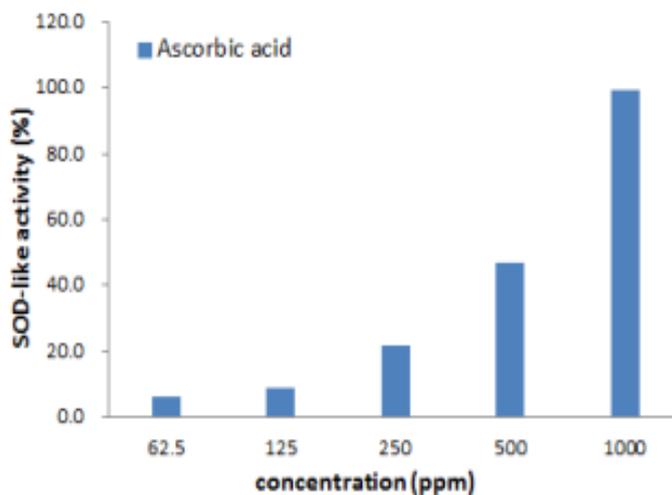


Fig. 37. Superoxide dismutase(SOD) activity of Ascorbic acid.

○ 녹두 추출물의 SOD 유사활성능은 농도 의존적으로 증가하였음. 녹두 열수와 녹두 브로멜라인 보다 녹두 파파인이 더 높음. 녹두 추출물의 SOD 유사활성능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 38, Fig. 38). 효소 종류 및 처리농도에 따라 SOD 유사활성능은 다르게 나타났음.

Table 38. Superoxide dismutase(SOD) activity of Mung beans

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
녹두 열수	3.1±1.46	3.5±1.17	3.8±0.19	4.3±0.65	5.4±0.32
녹두 파파인	4.6±0.97	11.6±1.71	13.1±0.67	17.2±2.43	19.1±1.46
녹두 브로멜라인	6.7±1.71	9.7±3.68	13.7±0.49	14.2±1.53	14.6±0.75

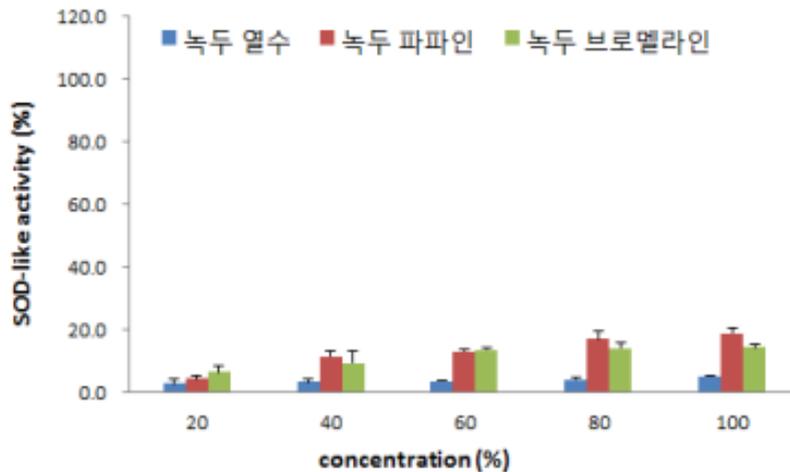


Fig. 38. Superoxide dismutase(SOD) activity of Mung beans

○ 홍삼 추출물의 SOD 유사활성능은 농도 의존적으로 증가하였음. 홍삼 열수와 홍삼 브로멜라인 보다 홍삼 파파인이 더 높음. 홍삼 추출물의 SOD 유사 활성능을 측정한 결과는 다음과 같음(Table 39, Fig. 39). 효소 종류 및 처리농도에 따라 SOD 유사 활성능은 다르게 나타났음.

Table 39. Superoxide dismutase(SOD) activity of Red ginseng

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
홍삼 열수	9.5±1.04	9.6±1.41	9.7±0.82	13.7±0.67	14.8±0.37
홍삼 파파인	23.1±4.42	24.9±5.06	30.8±0.65	33.7±1.04	37.7±0.82
홍삼 브로멜라인	3.9±3.91	9.9±1.12	10.7±0.99	10.9±0.49	11.2±0.32

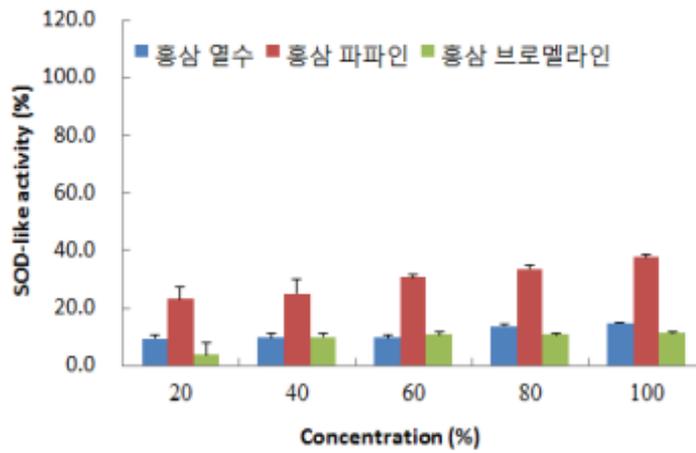


Fig. 39. Superoxide dismutase(SOD) activity of Red ginseng

③ 총 폴리페놀

○ 녹두 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 40과 같다.

Table 40. Total polyphenol content of Mung beans extract

unit : mg/g

	Groups			
	1st	2st	3st	mean ± SD
녹두 열수 추출	0,127379	0,126690	0,126690	0,126920±0,000398
녹두 파파인	0,970138	0,969103	0,969103	0,969448±0,000597
녹두 브로멜라인	0,746345	0,747034	0,746690	0,746690±0,000345

○ 홍삼 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 41와 같다.

Table 41. Total polyphenol content of Red ginseng extract

unit : %

	Groups			
	1st	2st	3st	mean ± SD
홍삼 열수추출	0,559448	0,559448	0,561517	0,560138±0,001195
홍삼 파파인	1,035655	1,036345	1,036345	1,036115±0,000398
홍삼 브로멜라인	1,000828	0,999448	0,999793	1,000023±0,000718

(다) 주름개선 효능평가

① Collagenase 저해활성

- 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Epigallocatechin gallate를 이용하여 Collagenase 저해활성을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 42, Fig. 40). 시료의 모든 농도에서 높은 활성도를 보이고 있음.

Table 42. Collagenase inhibition activity of Epigallocatechin gallate

unit : %

	Groups (ppm)				
	62.5	125	250	500	1000
Collagenase inhibition	84.8±0.3	86.3±0.4	91.7±0.3	95.9±0.2	99.6±0.2

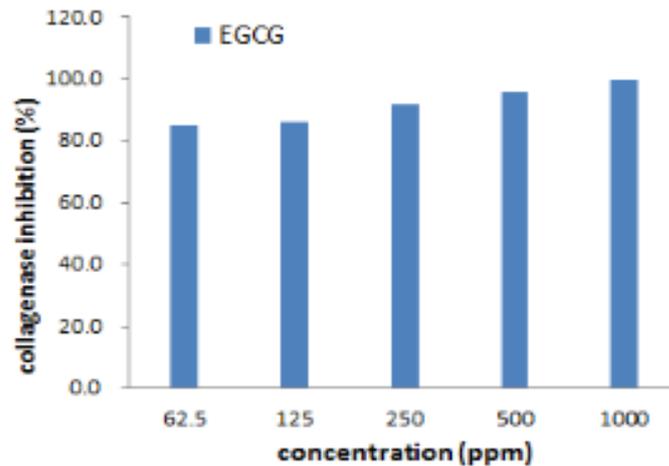


Fig. 40. Collagenase inhibition activity of Epigallocatechin gallate

- 녹두 추출물의 Collagenase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 43, Fig. 41). 100% 녹두추출물의 Collagenase 저해활성능이 제일 낮았으며 각 효소 농도 20 %처리 한 녹두 브로멜라인 보다 녹두 파파인이 Collagenase 저해활성능이 높았음. 농도 의존적으로 Collagenase 저해활성능을 보여 주고 있으나 농도에 따른 큰 저해활성은 보이지 않음.

Table 43. Collagenase inhibition activity of Mung beans

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
녹두 열수	7.02±0.15	9.87±0.27	10.49±0.15	11.64±0.15	13.87±0.00
녹두 파파인	17.78±0.62	27.47±0.46	36.80±0.46	39.73±0.46	40.09±0.15
녹두 브로멜라인	17.51±0.67	23.64±0.15	32.89±0.67	38.04±0.56	38.67±0.53

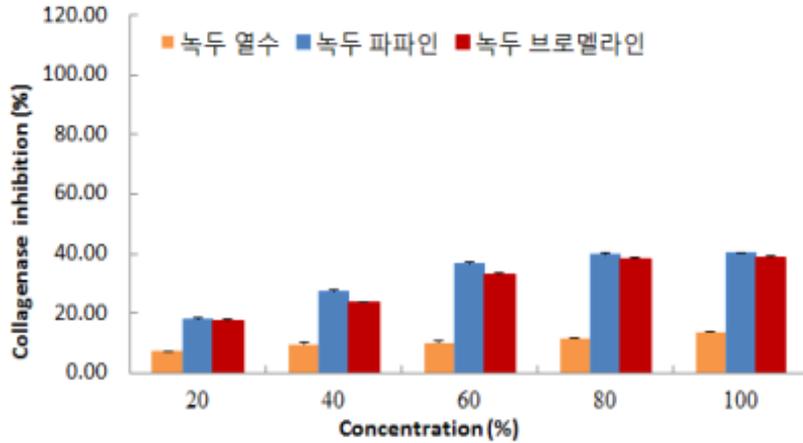


Fig. 41. Collagenase inhibition activity of Mung beans

○ 홍삼 추출물의 Collagenase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 44, Fig. 42). 100% 홍삼추출물의 Collagenase 저해활성능이 제일 낮았으며 각 효소 농도 20 %처리 한 홍삼 브로멜라인 보다 홍삼 파파인이 Collagenase 저해활성능이 높았음. 농도 의존적으로 Collagenase 저해활성능을 보여주고 있으나 농도에 따른 큰 저해활성은 보이지 않음.

Table 44. Collagenase inhibition activity of Mung beans

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
홍삼 열수	5.8±0.8	7.4±0.6	9.2±0.2	9.7±0.2	13.5±0.7
홍삼 파파인	13.96±0.15	25.96±0.41	36.98±0.31	41.16±0.62	47.11±0.62
홍삼 브로멜라인	4.80±0.00	14.93±0.27	16.00±0.27	17.60±0.27	24.09±0.15

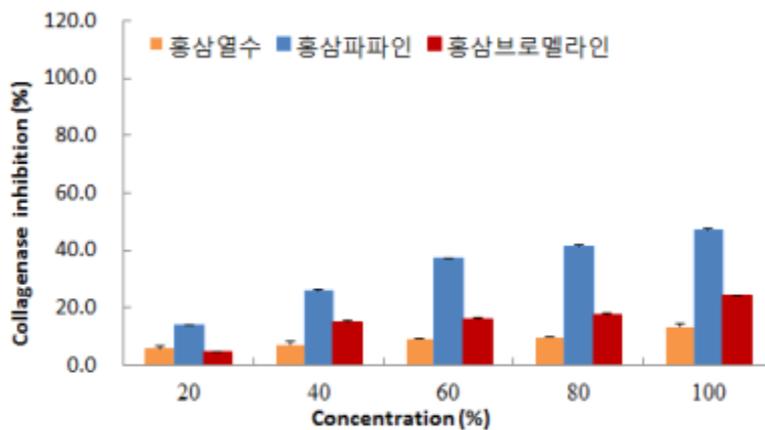


Fig. 42. Collagenase inhibition activity of Red ginseng

② Elastase 저해활성

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ursolic acid를 이용하여 Elastase 저해활성을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 45, Fig. 43). 실험물질의 농도에 따라 농도 의존적으로 높은 Elastase 저해활성을 나타내고 있음.

Table 45. Elastase inhibition activity of Ursolic acid

unit : %

	Groups (ppm)				
	62.5	125	250	500	1000
Elastase inhibition	106,1±0.15	111,7±0.00	113,6±0.06	115,3±0.12	118,1±0.10

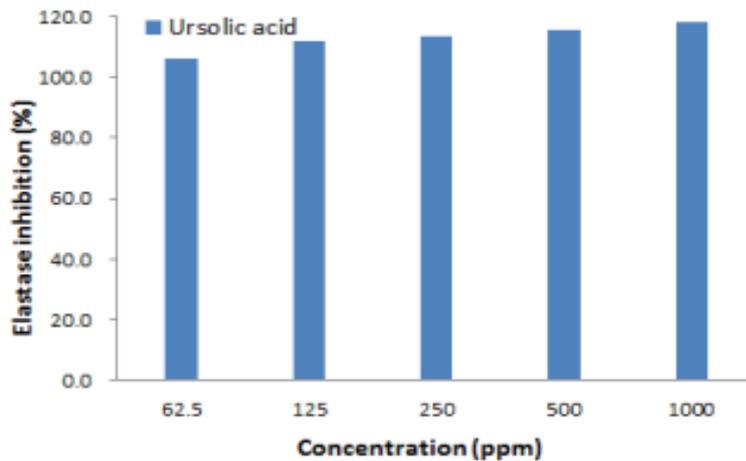


Fig. 43. Elastase inhibition activity of Ursolic acid

○ 녹두 추출물의 Elastase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 46, Fig. 44). 모든 시료에서 농도 의존적이 양상을 보임. 홍삼 열수와 Papain보다는 Bromelain 처치 시 더 높은 활성을 보이며 효소처리 농도가 높을수록 활성도가 높아지는 것을 알 수 있음.

Table 46. Elastase inhibition activity of Mung beans

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
녹두 열수	81,1±0.29	81,2±0.06	81,8±0.15	83,2±0.17	90,3±0.36
녹두 파파인	81,0±0.35	81,2±0.36	81,3±0.15	81,7±0.47	85,6±0.76
녹두 브로멜라인	78,1±0.21	81,2±0.49	85,9±1.19	89,4±0.42	91,8±0.32

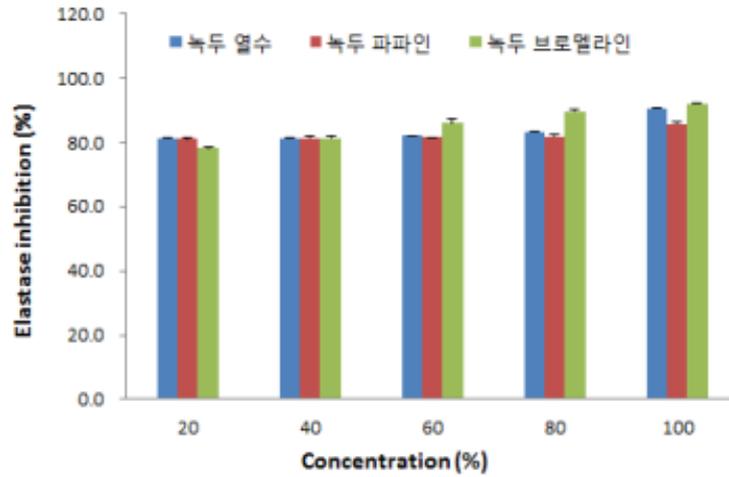


Fig. 44. Elastase inhibition activity of Mung beans

○ 홍삼 추출물의 Elastase 저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 47, Fig. 45). 모든 시료에서 농도 의존적이 양상을 보임. 홍삼 열수와 Papain보다는 Bromelain 처치 시 더 높은 활성을 보이며 효소처리 농도가 높을수록 활성도가 높아지는 것을 알 수 있음.

Table 47. Elastase inhibition activity of Red ginseng

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
홍삼 열수	75.7±0.10	76.8±0.50	77.4±0.40	78.8±0.23	80.3±0.53
홍삼 파파인	76.3±0.32	77.5±0.17	80.8±0.21	82.2±0.23	84.9±0.26
홍삼 브로멜라인	79.8±0.35	83.9±0.17	87.3±0.26	90.2±0.44	94.2±0.06

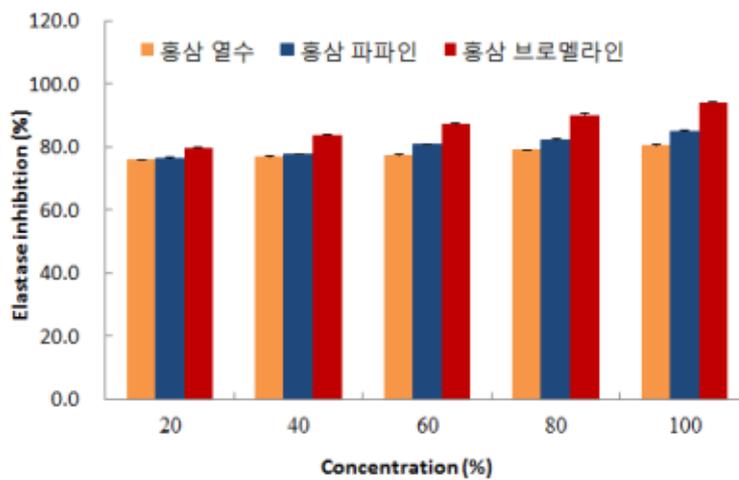


Fig. 45. Elastase inhibition activity of Red ginseng

③ L-DOPA 산화저해활성

○ 실험의 정확성을 검증하기 위해 양성대조군으로 사용되는 Ascorbic acid를 이용하여 L-DOPA 산화 저해활성을 측정한 결과를 다음과 같음(Table 48, Fig. 46). 실험물질의 농도에 따라 농도 의존적으로 높은 L-DOPA 산화저해활성을 나타내고 있음.

Table 48. L-DOPA-oxidation inhibition activity of Ascorbic acid

unit : %

	Groups (ppm)				
	62.5	125	250	500	1000
L-DOPA-oxidation inhibition	52.4±8.2	59.5±16.5	73.8±8.2	81.0±8.2	100.0±0.00

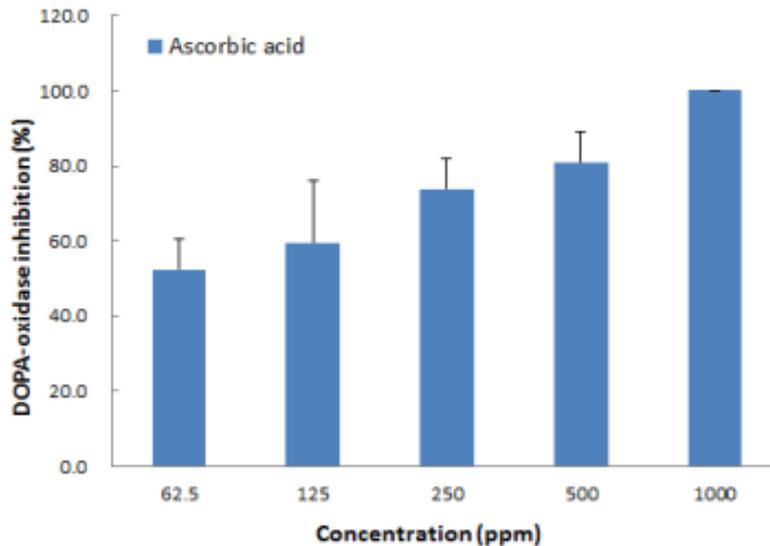


Fig. 46. L-DOPA-oxidation inhibition activity of Ascorbic acid

○ 녹두 추출물의 L-DOPA 산화저해활성 측정 결과는 다음과 같음(Table 49, Fig. 47). 모든 시료에서 농도 의존적이 양상을 보임. 녹두 열수와 Bromelain보다는 papain 처리 시 더 높은 활성을 보이며 효소처리 농도가 높을수록 활성도가 높아지는 것을 알 수 있음.

Table 49. L-DOPA-oxidation inhibition activity of Mung beans

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
녹두 열수	0.0±14.3	14.3±0.0	23.8±8.2	54.8±8.2	61.9±8.2
녹두 파파인	14.3±14.3	35.7±14.3	57.1±14.3	69.0±8.2	152.4±8.2
녹두 브로멜라인	7.1±14.3	16.7±8.2	42.9±14.3	71.4±14.3	83.3±8.2

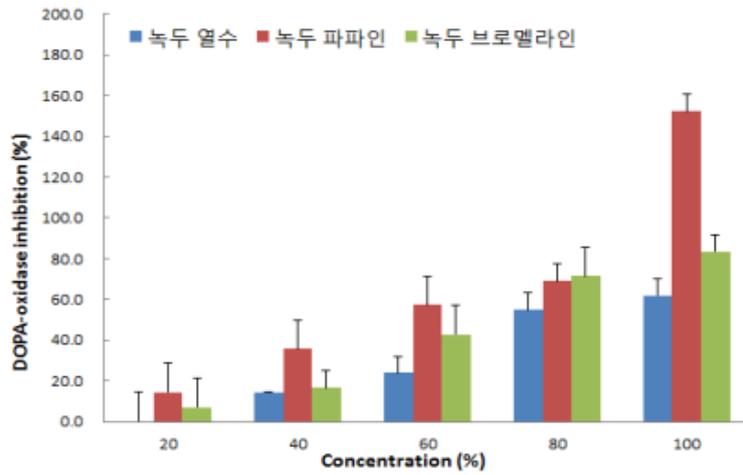


Fig. 47. L-DOPA-oxidation inhibition activity of Mung beans

○ 홍삼 추출물의 L-DOPA 산화저해활성측정 결과는 다음과 같음(Table 50, Fig. 48). 모든 시료에서 농도 의존적이 양상을 보임. 녹두 열수와 Bromelain보다는 papain 처치 시 더 높은 활성을 보이며 효소처리 농도가 높을수록 활성도가 높아지는 것을 알 수 있음.

Table 50. L-DOPA-oxidation inhibition activity of Red ginseng

unit : %

	Groups (%)				
	20	40	60	80	100
홍삼 열수	4.8±8.2	7.1±0.0	16.7±16.5	26.2±8.2	66.7±8.2
홍삼 파파인	19.0±8.2	38.1±8.2	52.4±8.2	76.2±8.2	161.9±21.8
홍삼 브로멜라인	4.8±8.2	38.1±8.2	50.0±0.0	76.2±8.2	100.0±24.7

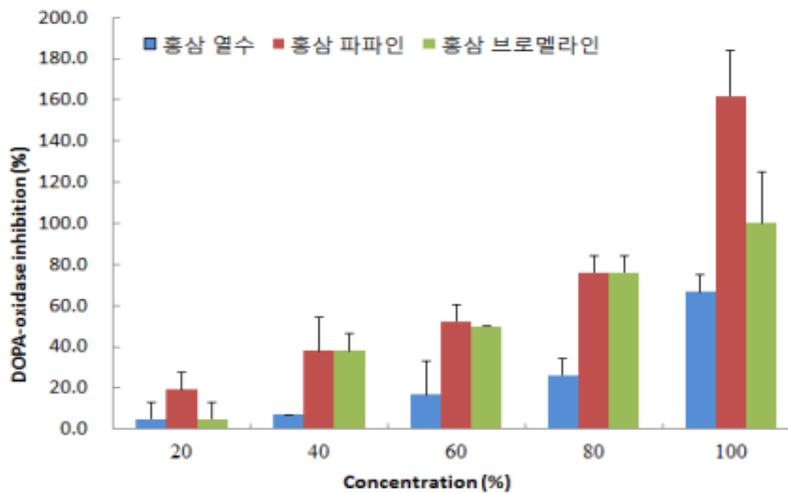


Fig. 48. L-DOPA-oxidation inhibition activity of Red ginseng

④ HDF 세포를 이용한 피부 주름 개선 효과

㉞ 홍삼을 원물로 한 효소 처리 추출물의 주름 개선 효능

㉠ 실험내용

Human dermal fibroblast (HDF)에 no UVB, 시료 (홍삼 열수 추출물, 홍삼-고순도 papain 추출물 또는 홍삼-고순도 bromelain 추출물) 단독 투여, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) 단독 조사, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) plus 홍삼 열수 추출물, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) plus 홍삼-고순도 papain 추출물 또는 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) plus 홍삼-고순도 bromelain 추출물을 병용 투여 후 각 세포내 피부주름 인자 type I collagen 단백질 발현량을 비교 분석하였음. 또한, 상기 실험조건인 HDF 세포를 대상으로 각 세포의 증식률 및 생존율 변화를 각각 비교 분석하였음.

㉡ 실험방법

Western blot analysis, Cell proliferation assay, Cell count analysis

㉢ 실험결과

◦ Figure 49A에서 보이는 것처럼, HDF 세포에서 control 군(no UVB; column 1)과 비교하여 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사 시 세포 생존율이 91%를 나타냈음(column 5). 한편, UVB 조사 없이 HDF 세포에 50 μl/ml 농도로 홍삼 열수 추출물, 홍삼-고순도 papain 추출물 또는 홍삼-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 생존율은 88%, 87%, 97%를 나타냈으며(columns 2-4), HDF 세포에 UVB plus 50 μl/ml 홍삼 열수 추출물, UVB plus 50 μl/ml 홍삼-고순도 papain 추출물 또는 UVB plus 50 μl/ml 홍삼-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 생존율은 78%, 84%, 80%를 나타냈음(columns 6-8).

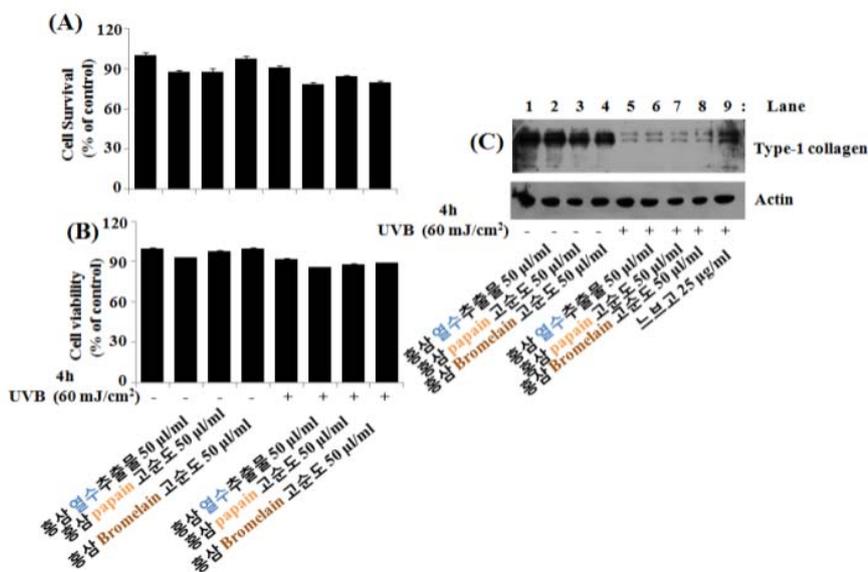


Fig. 49. 홍삼을 원물로 한 효소 처리 추출물의 주름 개선 효능

◦ Figure 49B에서 보이는 것처럼, HDF 세포에서 control 군(no UVB; column 1)과 비교하여 UVB

(60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사 시 세포 증식률은 92%를 나타냈음(column 5). UVB 조사 없이 HDF 세포에 50 μl/ml 농도로 홍삼 열수 추출물, 홍삼-고순도 papain 추출물 또는 홍삼-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 증식률은 92%, 97%, 99%를 나타냈으며(columns 2-4), HDF 세포에 UVB plus 50 μl/ml 홍삼 열수 추출물, UVB plus 50 μl/ml 홍삼-고순도 papain 추출물 또는 UVB plus 50 μl/ml 홍삼-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 증식률은 85%, 87%, 89%를 나타냈음(columns 6-8).

- Figure 49C에서 보이는 것처럼, 대조군(no UVB 및 no 시료 투여) HDF 세포내 높은 type-1 collagen 단백질 발현이 관찰되었음 (lane 1). 이때 대조군 HDF 세포 (lane 1) 및 50 μl/ml 농도의 홍삼 열수 추출물 (lane 2) 투여시킨 세포간 type-1 collagen 단백질 발현량에는 큰 차이가 없었음. 그러나 대조군 HDF 세포 (lane 1)와 비교 시 50 μl/ml 홍삼-고순도 papain 추출물 (lane 3) 또는 50 μl/ml 홍삼-고순도 bromelain 추출물 (lane 4) 투여시킨 HDF 세포내 type-1 collagen 단백질 발현량은 약간 감소하였음. 한편, 대조군 HDF 세포 (lane 1)와 비교하여 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사시킨 세포내 type-1 collagen 단백질 발현이 크게 감소되었음 (lane 5). 이때 50 μl/ml 홍삼-열수 추출물 투여 시 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen 단백질 발현 감소가 매우 약하게 저해되었음 (lane 6). 50 μl/ml 홍삼-고순도 papain 추출물 (lane 7) 또는 50 μl/ml 홍삼-고순도 bromelain 추출물 (lane 8) 투여는 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen 단백질 발현 감소를 막지 못하였음. 참고적으로 25 μl/ml 느브고 추출물 투여 시 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen 단백질 발현 감소가 강하게 억제되었음 (lane 9). 상기 실험조건에서 각 세포내 actin 단백질 발현량은 큰 차이를 보이지 않았음.

㉔ 녹두를 원물로 한 효소 처리 추출물의 주름 개선 효능

㉔ a) 실험내용

- HDF 세포에 no UVB, 시료 (녹두 열수 추출물, 녹두-고순도 papain 추출물 또는 녹두-고순도 bromelain 추출물) 단독 투여, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) 단독 조사, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) plus 녹두 열수 추출물, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) plus 녹두-고순도 papain 추출물 또는 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>) plus 녹두-고순도 bromelain 추출물을 병용 투여 후 각 세포내 피부주름 인자 type I collagen 단백질 발현량을 비교 분석하였음. 또한, 상기 실험조건의 HDF 세포를 대상으로 각 세포의 증식률 및 생존율 변화를 각각 비교 분석하였음.

㉔ b) 실험방법

: Western blot analysis, Cell proliferation assay, Cell count analysis

㉔ c) 실험결과

- Figure 50A에서 보이는 것처럼, HDF 세포에서 control 군(no UVB; column 1)과 비교하여 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사 시 세포 생존율이 91%를 나타냈음(column 5). 한편, UVB 조사 없이 HDF 세포에 50 μl/ml 농도로 녹두 열수 추출물, 녹두-고순도 papain 추출물 또는 녹두-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 생존율은 104%, 106%, 102%를 나타냈으며 (columns 2-4), HDF 세포에 UVB plus 50 μl/ml 녹두 열수 추출물, UVB plus 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물 또는 UVB plus 50 μl/ml 녹두-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 생존율은 85%, 95%, 87%를 나타냈음(columns 6-8).

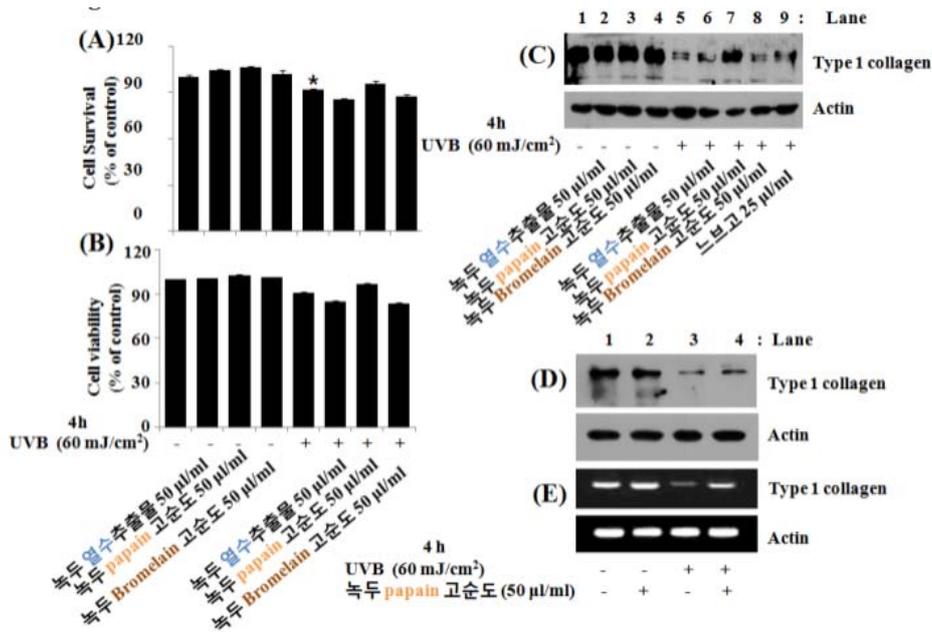


Fig. 44. 녹두를 원물로 한 효소 처리 추출물의 주름 개선 효능

- Figure 50B에서 보이는 것처럼, HDF 세포에서 control 군(no UVB; column 1)과 비교하여 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사 시 세포 증식률은 90%를 나타냈음(column 5). UVB 조사 없이 HDF 세포에 50 μl/ml 농도로 녹두 열수 추출물, 녹두-고순도 papain 추출물 또는 녹두-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 증식률은 100%, 102%, 101%를 나타냈으며(columns 2-4), HDF 세포에 UVB plus 50 μl/ml 녹두 열수 추출물, UVB plus 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물 또는 UVB plus 50 μl/ml 녹두-고순도 bromelain 추출물 처리 시 각 세포의 증식률은 84%, 96%, 83%를 나타냈음(columns 6-8).
- Figure 50C에서 보이는 것처럼, 대조군(no UVB 및 no 시료 투여) HDF 세포내 높은 type-1 collagen 단백질 발현이 관찰되었음 (lane 1). 한편, 대조군 HDF 세포 (lane 1) 및 50 μl/ml 녹두 열수 추출물 (lane 2), 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물 (lane 3) 또는 50 μl/ml 녹두-고순도 bromelain 추출물 (lane 4) 투여시킨 세포간 type-1 collagen 단백질 발현량에는 큰 차이가 없었음. 그러나 대조군 HDF 세포 (lane 1)와 비교하여 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사시킨 세포내 type-1 collagen 단백질 발현이 크게 감소되었음 (lane 5). 흥미롭게도 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물 (lane 7)은 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen 단백질 발현 감소를 강하게 억제하였음. 이와는 달리 50 μl/ml 녹두-열수 추출물 (lane 6) 또는 50 μl/ml 녹두-고순도 bromelain 추출물 (lane 8)은 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen 단백질 발현 감소를 막지 못하였음. 참고적으로 25 μl/ml 녹브고 추출물 투여 시 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen 단백질 발현 감소도 억제되었음 (lane 9). 상기 실험조건에서 각 세포내 actin 단백질 발현량은 큰 차이를 보이지 않았음.
- Figure 50D에서 보이는 것처럼, 대조군 HDF 세포 (lane 1)와 비교하여 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사시킨 세포내 type-1 collagen mRNA 발현이 크게 감소되었음 (lane 3). 그러나 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물은 HDF 세포내 UVB 매개 type-1 collagen mRNA 발현 감소를 강하게 억제하였음 (lane 4). 한편, 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물은 control (no UVB)

HDF 세포내 type-1 collagen mRNA 발현도 약간 증가시켰음 (lane 2).

㉔ 녹두-고순도 papain 추출물의 피부주름 개선 효능 관련 작용기전 규명

㉔ a) 실험내용

- HDF 세포에 no UVB, 녹두-고순도 papain 추출물 단독 투여, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 단독 조사, UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) plus 녹두-고순도 papain 추출물 병용 투여 후 각 세포내 (피부주름 인자 type I collagen 발현 조절 관련) 여러 신호전달 단백질 발현 및 활성 (인산화) 변화를 비교 분석하였음.

㉔ b) 실험방법: Western blot analysis

㉔ c) 실험결과

- Figure 51에서 보이는 것처럼, 대조군(no UVB 및 no 시료 투여) HDF 세포에서 (각 단백질 간 발현/활성(인산화) 차이는 있지만) ERK-1/2, JNK-1/2, p38 MAPK 및 c-JUN 단백질의 발현/인산화가 확인되었음 (lane 1). 대조군 HDF 세포와 비교하여 (lane 1), 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물 투여시킨 세포내 ERK-1/2, JNK-1/2, p38 MAPK 및 c-JUN 단백질의 발현/인산화는 큰 변화가 일어나지 않았음 (lane 2).

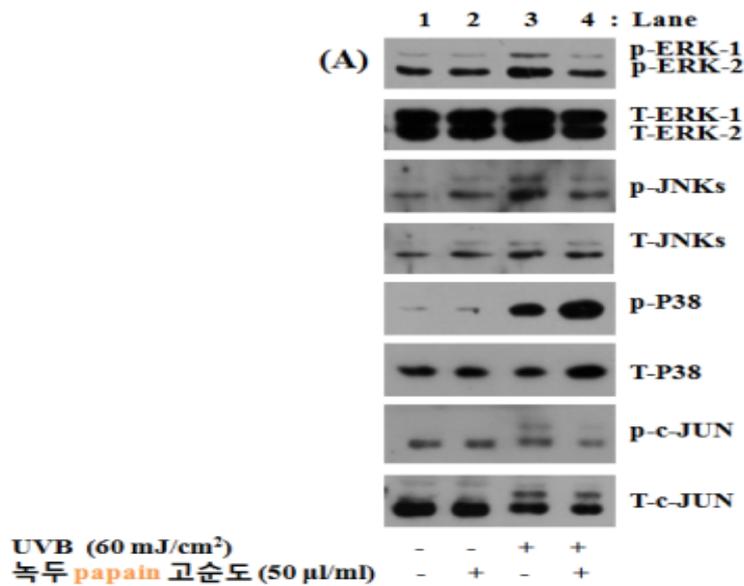


Fig. 51. 녹두-고순도 papain 추출물의 피부주름 개선 효능 관련 작용기전 규명

- 그러나 대조군 HDF 세포와 비교하여 (lane 1), UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>, 4 h) 조사시킨 세포내 ERK-1/2, JNK-1/2 및 p38 MAPK 단백질의 인산화 증가가 관찰되었음 (lane 3). 또한, 대조군 HDF 세포와 비교하여 UVB 조사시킨 세포내 c-JUN 단백질의 인산화도 약하게 증가되었음. 흥미롭게도 50 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물은 HDF 세포내 UVB 매개 ERK-1/2, JNK-1/2 및 c-JUN 단백질 인산화 증가를 크게 억제하였음 (lane 4). 이와는 달리 5 μl/ml 녹두-고순도 papain 추출물은 HDF 세포내 UVB 매개 p38 MAPK 단백질 인산화를 증가시켰음.
- 상기 실험조건의 세포내 ERK-1/2, JNK-1/2, p38 MAPK 및 c-JUN의 전체 단백질 발현량은 큰 변화가 없었음.

## 다. 제 2 협동기관 수행 연구 결과

[수출용 할랄 제품 인증 지원 및 개발 화장품의 DNA와 알코올 분석]

(수행기관 : 동국대학교 산학협력단)

### (1) 수출용 화장품의 제품 유형에 따른 할랄인증 기준 확인

#### (가) 국내 농산품에서 유래한 화장품 소재의 할랄인증 기준 확인

이슬람 율법을 기반으로 한 할랄인증규정집에 따르면 대부분의 과일이나 야채와 같은 식물은 할랄에 해당하기 때문에, 본 과제에서 선택한 국내산 당근과 느타리버섯은 할랄에 속한다고 볼 수 있다. 할랄인증규정집 내 Halal positive list of materials은 가공업에서 일반적으로 사용되는 재료들로 구성되어 있고 할랄재료만으로 이루어져 있다. 그 재료목록은 상업적 생산 규모에 사용되는 원료를 고려하여 LPPOM MUI의 연구에 기초하여 만들어졌다.

Halal positive list of materials에 나와 있는 재료들을 사용하는 회사는 다음과 같은 편리성을 얻을 수 있다.

- ① 신재료 선택시, Halal positive list of materials에 나와 있는 재료들은 사용전 LPPOM MUI 사용 승인이 필요 없다.
- ② 재료 입고 수령과정에서, Halal positive list of materials에 나와 있는 재료들의 재료명, 생산업체명 및 제조국 일치 검사가 필요 없다.
- ③ Halal positive list of materials 나와 있는 재료 사용 제품의 인증 등록 절차 시, 증빙 서류가 필요 없다. 예외 : 해당 재료가 재료명과 동일하지 않은 상품명을 사용할 경우, 재료의 설명서(문서)가 필요하다. 감사 진행 시 감사인의 필요에 따라 재료 증빙 서류가 필요하다.

Halal positive list of materials에는 No.11 식물성재료 - 건조/신선 식물성재료 항목에 신선 식물성 재료란 추가가공 하지 않은 식물. 건조 식물성 재료란 있는 그대로의 형태로 또는 분쇄/커팅 과정을 거쳐 첨가제나 보조재를 첨가하지 않고 자연적 또는 도구를 사용하여 열을 가해 건조시킨 재료를 말하며 1.과일 2.야채 3. 시리얼 4. 덩이줄기 식물성(tubers) 5. 견과류 6. 약용식물 7. 해초 식물성 이라고 명시되어 있으며, 따라서 본 연구의 주 재료인 당근 및 느타리버섯은 할랄인증을 받는 경우 문제가 될 것으로 보이지는 않는다. 하지만 단백질, 비타민과 같은 성분을 추출하는 과정에 있어서 사용하는 용매나 그 추출방식에 따라 추가적인 분석이 필요할 것으로 판단된다.

#### (나) 마스크팩 및 크림 제품에 대한 할랄인증 기준 확인

할랄인증규정집의 재료기준과 관련된 사항은 다음과 같이 명시되어 있다.

- ① 다음과 같은 재료는 사용해서는 안 된다  
: ㉠ 돼지고기 및 돼지고기 첨가물, ㉡ 알코올 음료, ㉢ 알코올이 함유된 식품, ㉣ 피, ㉤ 시체, ㉥ 인간의 신체 일부.  
㉦ 알코올음료는 포도주, 발효주, 증류수 등 사람을 취하게 하는 술을 말한다.  
㉧ 위 ①에서 언급한 허용되지 않는 비할랄 재료는, 일반적으로 사용되는 재료다. 일반적으로 사용하지 않는 개고기, 쥐고기, 악어고기 같은 경우도 재료로 사용해서는 안된다.

② 다음과 같은 재료를 포함한 재료를 사용해서는 안 된다: ㉠ 돼지고기 및 돼지고기 첨가물, ㉡ 알코올 음료, ㉢ 알코올이 함유된 식품, ㉣ 피, ㉤ 시체, ㉥ 인간의 신체일부.

㉠ 주재료 또는 첨가물로써 돼지고기 및 돼지고기 첨가물이 함유된 재료를 사용해서는 안 된다. 예를 들어, 화장품 재료에서 돼지 젤라틴 성분을 포함한 비타민재료, 또 다른 예로, 돼지 지방을 사용한 양념.

㉡ 보조재로써 돼지고기 및 돼지고기 첨가물이 함유된 재료를 사용해서는 안 된다. 예로, 아미노산 제품 생산을 위해 돼지 효소를 사용한 펩톤, 다른 예로, 돼지 지방 소포제를 사용한 방부제.

③ 돼지고기 또는 돼지고기 첨가물을 생산하는 생산 시설에서 재료를 생산해서는 안 된다.

④ 비할랄 재료 또는 불순물 (첨가물, 보조제가 불결할 경우)과 재료를 혼합하지 않는다.

⑤ 축산물은 할랄 가축만을 사용한다. 도살용 가축은 이슬람 율법(샤리아)에 따라 도살해야 한다. 도살장은 MUI의 할랄 인증서 또는 MUI에서 인정한 할랄 인증서를 갖춘 곳이어야 한다.

㉠ 할랄에 따라 도살해야 가축의 예로, 닭, 조류, 소, 염소 및 물소가 있다.

㉡ 할랄에 상관없이 도살이 가능한 가축의 예로, 생선 및 바다에서 나는 모든 수산물이 있다.

⑥ 미생물 재료 요건:

㉠ 미생물 재료는 사람에게 전염 및 감염시키면 안 된다.

㉡ 미생물 배지, 첨가물, 보조제는 돼지고기 또는 돼지고기 첨가물을 함유하지 않는다.

㉢ 미생물 재료는 미생물 배지에서 추출됨으로, 미생물 배지는 할랄 재료를 사용해야 한다.

㉣ 미생물 배지에서 추출된 미생물 재료가 돼지고기 및 돼지고기 첨가물이 포함되지 않더라도 비할랄 재료라면, 이슬람 율법(샤리아)에 따라 세척 과정을 거쳐야 한다.

㉤ 재조합 미생물을 이용한 미생물 재료는, 돼지 또는 인간의 유전자를 사용해서는 안 된다.

아래 Halal check sheet에서 보는 바와 같이 돼지, 개, 인체에서 유래한 성분은 비할랄(non-halal) 또는 하람(haram)으로 사용불가 하므로 이들에 대한 성분분석을 진행한다. 더불어 GMO(유전자재조합작물) 또한 할랄에 속하지 않으므로 본 과제의 목표(비-할랄 성분의 분석)에 따라 GMO 성분 분석도 진행한다.

### Checklist for Evaluating That Materials are Free From Animals and Its Derivatives.

If you answer "Yes" to any question below, please complete the questionnaire and return to Cosmax with complete details. Else, you only need to send the Certification.

Product Name : Luzasac 00

Question	Yes/No	Comments
Do you use any animal or its derivatives in the product Supplied to Cosmax		
If yes . is it from <b>pig(pork) or dog?</b>		
If not . What animal is it from?		
For Question 1.2. What part of animal, is the material from?		
Do you use any materials <b>from human example keratin, placenta etc.</b>		
Do you produce this material for Cosmax on the same equipment		
That use material from <b>pork,dog, human or wine alcohol or Liquor alcohol?</b>		
Does your facility manufacture any products containing pork, dog, human or wine alcohol or Liquor alcohol?		

Fig 1-1. Halal check sheet sample

(2) PCR 시스템을 이용한 비할랄 DNA 확인

[1차 년도] 돼지, 개, GMO, 인체 성분을 확인하는 PCR 시스템 개발

(가) PCR 반응을 위한 target gene 및 primer 탐색

본 연구에서 사용된 Oligonucleotide primer는 Table.1-1과 같다.

인체성분, 개, 돼지, GMO (35S promotor, Nos terminator)에 대하여 NCBI GenBank ([URL: http://www.nlm.nih.gov/](http://www.nlm.nih.gov/))을 통해 염기서열을 획득하였다.

Table 1-1. Oligonucleotide sequence of primers used in this study.

Target gene	Oligo name	sequence (5' →3')	size (bp)	GeneBank accessio no
Human	Human2	F : CTG GGC AAA TAG GGG GCA A R : AGG GTT GTG GAA CAT GAA GGG	575	D00269
	Human	F : AGG GTA TCT GGG CTC TGG R : GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT	186	
pig	Sus2	F : CCC ATT CGC CTC ACT CAC A R : GTT GTT GGC GGT TACGAG GA	403	AP003428.1
	Sus	F : GAC ATA GAC AAA ATT TCA TTT CAC C R : CAC CCC ATA TTA AAC CAG AAT GA	139	
Dog	Dog2	F : GCT CTC TCA ATG GCA CCT CC R : GTA TCG CAG CGC GTA GAA GA	422	AF064455.2
	Dog	F : CGC CCA TGT ATT ACT TCA TCT GTT GCC R : CAC GGC GAT GGC GCC CAG GAA	209	
GMO 35S promotor	35S2	F : ACG AGG AGC ATC GTG GAA AA	156	V00140.1
	35S	F : ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T R : AGG AAG TTC ATT TCA TTT GGA GAG G	101	
GMO Nos terminator	Nos2	F : TGA ATC CTG TTG CCG GTC TT	166	AJ237588.1
	Nos	F :GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG R : ACG CGA TAG AAA ACA AAA TAT AGC G	151	

(나) 인체성분(구강상피세포), 개, 돼지, GM작물의 chromosomal DNA extraction

구강상피세포, 식용개고기, 돼지고기, GM작물(GTS40-3-2)는 Power prep<sup>TM</sup> DNA extraction kit (Kogenebiotech, korea)를 이용하여 chromosomal DNA를 분리 및 정제하였다.

구강상피세포는 소금물(20ml)를 이용하여 입안을 약 2분간 헹군 후 뱉어낸 소금물을 13000rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액을 제거하여 pellet을 Sample로 사용하였고, 식용개고기, 돼지, GMO Sample은 각각 0.3g 칭량하였다. 각 sample에 lysis buffer A 400 $\mu$ l, lysis buffer B 40 $\mu$ l 첨가 후 Pro K, RNase 각각 10 $\mu$ l 씩 첨가한다. 용액을 부유시킨 뒤 Dry oven 65°C에서 1시간 반응시킨다.

Chloroform 400 $\mu$ l 첨가한 후 13000rpm에서 15분간 원심분리 진행 후, 상등액을 새로운 1.5ml eppendorf tube에 옮긴다. 옮겨진 용액에 Binding Buffer 와 iso-propanol이 1:1로 혼합되어 있는 용액 800 $\mu$ l 넣고 vortexing 한 후 column으로 옮긴다. Column으로 옮겨진 용액은 12000rpm에서 2분간 원심 분리하여 column을 통과시키고, 75% ethanol 600  $\mu$ l를 column에 통과시켜 washing 한 후, 12,000 rpm에서 2분 동안 빈 column을 centrifuge하여 건조시킨다. 건조시킨 column을 새로운 1.5ml eppendorf tube로 옮기고, TE buffer(Tris-EDTA buffer) 50 $\mu$ l를 떨어뜨린 후, 8,000 rpm에서 3분 동안 원심 분리하여 얻은 용액을 -20 $^{\circ}$ C에 보관해 두었다.

#### (다) 인체성분(구강상피세포), 개, 돼지, GMO(GTS 40-3-2) chromosomal DNA 증폭

DNA추출은 Kogene Biotech(Seoul, Korea)의 Power Prep DNA extraction kit를 이용 하였으며, Conventional PCR에 사용한 Taq DNA polymerase는 solgent사 제품을 사용하였다. Reaction volume은 총 25  $\mu$ l로서, 10배 농도의 reaction Buffer (25mM Mgcl2 mixed) 2.5  $\mu$ l, dNTP(10 mM) 0.5  $\mu$ l, 각 2F, 2Rprimer (10 pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l, Taq DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ l) 0.125  $\mu$ l, template DNA 1 $\mu$ l 첨가하고 최종 반응액이 25 $\mu$ l가 되도록 sterile water를 추가하였다.

PCR온도조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 56 $^{\circ}$ C 30초 (GMO : 60 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 30초를 1cycle로 하여 총 40cycles를 수행하였으며, 마지막단계로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 extension이 충분히 일어나도록 한다.

Thermal cycle이 끝난 반응액은 10x loading buffer(40% sucrose, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylencyanol)와 혼합하여 2% agarose gel에 주입하였다. TAE(Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)buffer를 running buffer로 사용하여 135v에서 25분 동안 전기영동을 한 뒤 UV상에서 비할랄 성분들의 증폭산물을 확인하였다.

#### (라) DNA 정제 및 DNA copy number 확인

##### ① Agarose gel에서 DNA회수

Agarose gel에서 DNA 회수법으로 PCR clean-up gel extraction kit (Macherey-Nagel, germany)를 이용하였다. 전기영동에 의해 증폭된 DNA의 size와 농도를 확인하고 agarose gel을 절단 하여 회수하였다. 미리 무게를 재어 둔 eppendorf tube에 절단된 gel을 넣어 무게를 측정 한 뒤, gel무게의 2배에 해당하는 gel extraction buffer를 넣고, 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하며 gel을 녹인다. gel이 녹은 buffer-용액을 column에 넣어 11000rpm에서 30초 동안 원심분리 한 뒤, washing buffer 700 $\mu$ l를 넣고 11000rpm에서 30초 동안 원심분리 한다. 여과액을 제거하고 빈column을 11000rpm에서 1분간 원심분리 한 뒤 column을 새로운 eppendorf tube에 옮겨서 TE buffer(Tris-EDTA buffer)를 50 $\mu$ l 떨어뜨린 후 상온에서 1분 간 방치한 뒤 11000rpm에서 1분간 원심분리 하여 DNA를 회수한다.

##### ② 인체성분, 개, 돼지, GMO의 DNA 농도 측정 및 DNA copy number

Gel extraction에서 얻은 DNA 농도를 확인하기 위하여 농도를 측정한다.

DNA의 농도 측정은 260nm의 UV-spectrophotometer(Jenway Co, Model 6705 UV)를 사용하여 측정한다.

농도는 (식 1)에 나타난 바와 같이 계산되며 결과값을 (식 2)에 대입하여 DNA copy number를 계산한다.

Table 2-1에 나타난 바와 같이 DNA농도의 결과 값의 정확성을 위하여 DNA의 원액과 2배, 3배를 희

석하여 DNA농도를 측정하고 평균값을 확인한 결과 인체성분(575bp) : 8.1(ng/ $\mu\ell$ ), 개(422bp): 57.5(ng/ $\mu\ell$ ), 돼지(403bp): 50.5(ng/ $\mu\ell$ ), GMO(35S promotor, 156bp): 26.3(ng/ $\mu\ell$ ), GMO(Nos terminator, 166bp): 36.9(ng/ $\mu\ell$ ) 농도가 나왔다. (식2)에 각각의 비할랄 성분의 DNA농도 값과 DNA의 길이(bp)를 대입하여 사람(575bp) :  $1.29 \times 10^{10}$ , 개(422bp) :  $1.24 \times 10^{11}$ , 돼지(403bp) :  $1.14 \times 10^{11}$ , GMO (35S promotor, 156bp):  $1.54 \times 10^{11}$ , GMO (Nos terminator, 166bp):  $2.02 \times 10^{11}$  copy number를 얻는다.

$$\text{농도(ng/\mu\ell)} = \text{흡광도 측정값} \times \text{회석비율} \times \text{DNA 측정 상수값(50)} \quad (\text{식 1})$$

$$\text{DNA copy number} = \frac{Xng \times 6.0221 \times 10^{23} (\text{molecules/mole})}{N \times 660g/\text{mole} \times 1 \times 10^9 \text{ng/g}} \quad (\text{식 2})$$

$X = dsDNA$ 의 양 (ng)  
 $N = dsDNA$ 의 길이 (bp)  
 $6.0221 \times 10^{23} =$  아보가드로 수  
 $660g/\text{mole} = 1bp dsDNA$ 의 평균질량

Table 2-1. 인체성분, 개, 돼지, GMO의 DNA 농도 및 DNA copy number

비할랄 성분	농도(ng/ $\mu\ell$ )	DNA copy number
인체성분 (575bp)	8.1(ng/ $\mu\ell$ )	$1.29 \times 10^{10}$
개 (422bp)	57.5(ng/ $\mu\ell$ )	$1.24 \times 10^{11}$
돼지 (403bp)	50.5(ng/ $\mu\ell$ )	$1.14 \times 10^{11}$
35S promotor (156bp)	26.3(ng/ $\mu\ell$ )	$1.54 \times 10^{11}$
Nos terminator (166bp)	36.9(ng/ $\mu\ell$ )	$2.02 \times 10^{11}$

(마) Second - PCR을 통한 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO) 검출한계확인

본 연구에서는 비할랄 성분에 해당하는 DNA를 매번 추출하는 번거로움과 시간을 절약하기 위하여 1회째의 PCR산물을 회석하여 주형으로 삼고 외측Primer의 안쪽에 설정된 내측Primer를 사용하여 2회째 PCR을 진행하는 Second-PCR로 진행하였다. 보다 많은 DNA확보하고 DNA copy수를 확인하여 검출한계를 확인한다. 정제된 DNA 20 $\mu\ell$  와 TE Buffer 180 $\mu\ell$ 를 십진 회석하고, 이를 template DNA로 사용하여 회석배수에 따른 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO)의 PCR 검출한계를 알아본다.

① 인체성분, 개, 돼지, GMO 십진 회석배수 DNA 증폭

PCR 조성은 0.2ml tube에 10X taq Reation Buffer (25mM Mgcl2 mixed) 2.5 $\mu\ell$ , each 10mM dNTP mix 0.5 $\mu\ell$ , 각 primer (10 pmol/ $\mu\ell$ ) 1 $\mu\ell$ , 십진회석한 template DNA 1 $\mu\ell$  와 solg<sup>TM</sup> taq DNA polymerase (5U/ $\mu\ell$ ) 0.125 $\mu\ell$  를 첨가하고 최종 반응액이 25 $\mu\ell$ 가 되도록 sterile water를 추가하였다.

PCR온도조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열한 후 95 $^{\circ}\text{C}$  20초, 56 $^{\circ}\text{C}$  20초 (GMO: 60 $^{\circ}\text{C}$ ) 72 $^{\circ}\text{C}$  30초를 1cycle로 하여 총 40cycles를 수행하였으며, 마지막단계로 72 $^{\circ}\text{C}$  3분 (GMO: 7분) 반응시켜 extension

이 충분히 일어나도록 한다.

Thermal cycle이 끝난 반응액은 10x loading buffer(40% sucrose, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylencyanol)와 혼합하여 2% agarose gel에 주입하였다. TAE(Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)buffer를 running buffer로 사용하여 135v에서 25분 동안 전기영동을 한 뒤 UV상에서 비할랄 성분들의 검출한계를 확인하였다.

② 인체성분, 개, 돼지, GMO의 십진 희석배수 DNA 검출한계 결과

㉓ 인체성분

본 연구 방법으로 진행된 PCR 반응액 5 $\mu$ l를 전기 영동한 결과로 Figure 1-1에 나타난 바와 같이 PCR산물은 186bp size DNA band로 gel 상에서 확인 가능하며, Figure 1-1과 Table 3-1에서 Human primer에 대한 Conventional PCR을 수행한 결과 십진 희석된 인체성분 DNA는 1.29 $\times$ 10<sup>3</sup> copies/tube 까지 검출 가능하였다.

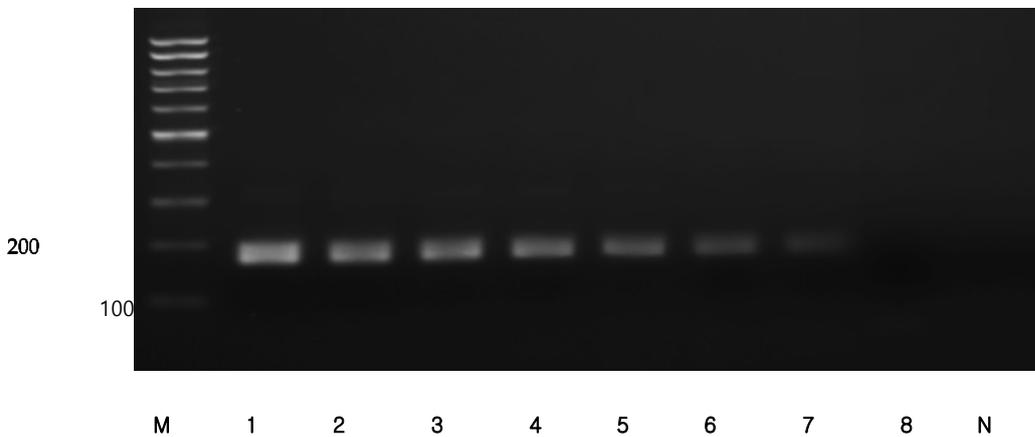


Figure 2-1. The result of PCR assays from Human DNA with Human primer

M : 100bp size marker , lanes 1-8: 1.29 $\times$ 10<sup>9</sup> copies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>8</sup> copies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>7</sup>copies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>6</sup> copies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>5</sup> Fcopies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>4</sup> copies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>3</sup>copies/tube, 1.29 $\times$ 10<sup>2</sup> copies/tube N: no template control

Table 3-1. The result of PCR assays from Human DNA with Human primer

(단위:copies/tube)

1.29 $\times$ 10 <sup>9</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>8</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>7</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>6</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>5</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>4</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>3</sup>	1.29 $\times$ 10 <sup>2</sup>
+	+	+	+	+	+	+	-

㉔ 개

본 연구 방법으로 진행된 PCR 반응액 5 $\mu$ l를 전기 영동한 결과로 Figure 2-1에 나타난 바와 같이 PCR산물은 209bp size DNA band로 gel 상에서 확인 가능하며, Figure 2-1와 Table 4-1에서 Dog primer에 대한 Conventional PCR을 수행한 결과 십진 희석된 Dog DNA는 1.24 $\times$ 10<sup>2</sup>copies/tube 까지 검출 가능하였다.

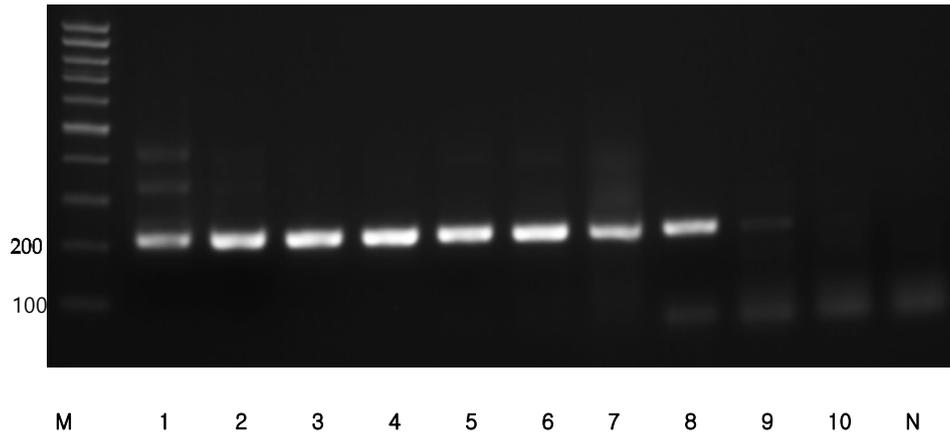


Figure 3-1. The result of PCR assays from Dog DNA with Dog primer

M : 100bp size marker , lanes 1-10:  $1.24 \times 10^{10}$  copies/tube,  $1.24 \times 10^9$  copies/tube,  $1.24 \times 10^8$  copies/tube,  $1.24 \times 10^7$  copies/tube,  $1.24 \times 10^6$  copies/tube,  $1.24 \times 10^5$  copies/tube,  $1.24 \times 10^4$  copies/tube,  $1.24 \times 10^3$  copies/tube,  $1.24 \times 10^2$  copies/tube,  $1.24 \times 10^1$  copies/tube N: no template control

Table 4-1. The result of PCR assays from Dog with Dog primer (단위 : copies/tube)

$1.24 \times 10^{10}$	$1.24 \times 10^9$	$1.24 \times 10^8$	$1.24 \times 10^7$	$1.24 \times 10^6$	$1.24 \times 10^5$	$1.24 \times 10^4$	$1.24 \times 10^3$	$1.24 \times 10^2$	$1.24 \times 10^1$
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

㊤ 돼지

본 연구 방법으로 진행된 PCR 반응액  $5\mu\text{l}$ 를 전기 영동한 결과로 Figure 3-1에 나타난 바와 같이 PCR산물은 139bp size DNA band로 gel 상에서 확인 가능하며, Figure 3-1과 Table 5-1에서 Pig primer에 대한 Conventional PCR을 수행한 결과 십진 희석된 Pig DNA는  $1.14 \times 10^3$  copies/tube 까지 검출 가능하였다.

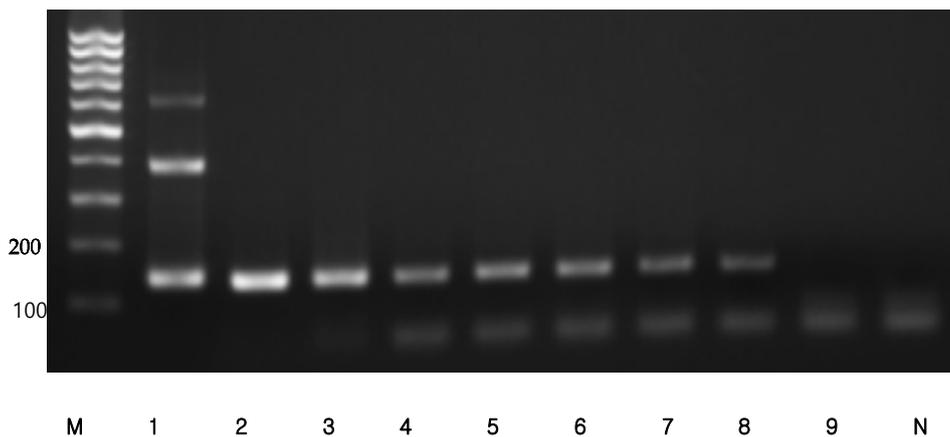


Figure 4-1. The result of PCR assays from Pig DNA with Pig primer

M : 100bp size marker , lanes 1-9:  $1.14 \times 10^{10}$  copies/tube,  $1.14 \times 10^9$  copies/tube,  $1.14 \times 10^8$  copies/tube,  $1.14 \times 10^7$  copies/tube,  $1.14 \times 10^6$  copies/tube,  $1.14 \times 10^5$  copies/tube,  $1.14 \times 10^4$  copies/tube,  $1.14 \times 10^3$  copies/tube,  $1.14 \times 10^2$  copies/tube N: no template control

Table 5-1. The result of PCR assays from Pig DNA with Pig primer (단위:copies/tube)

$1.14 \times 10^{10}$	$1.14 \times 10^9$	$1.14 \times 10^8$	$1.14 \times 10^7$	$1.14 \times 10^6$	$1.14 \times 10^5$	$1.14 \times 10^4$	$1.14 \times 10^3$	$1.14 \times 10^2$
+	+	+	+	+	+	+	+	-

㉞ GMO (35S Promotor)

본 연구 방법으로 진행된 PCR 반응액  $5\mu\text{l}$ 를 전기 영동한 결과로 Figure 4-1에 나타난 바와 같이 PCR산물은 101bp size DNA band로 gel 상에서 확인 가능하며, Figure 4-1와 Table 6-1에서 35S primer에 대한 Conventional PCR을 수행한 결과 십진 희석된 35S Promotor DNA는  $1.54 \times 10^4$  copies/tube까지 검출 가능하였다.

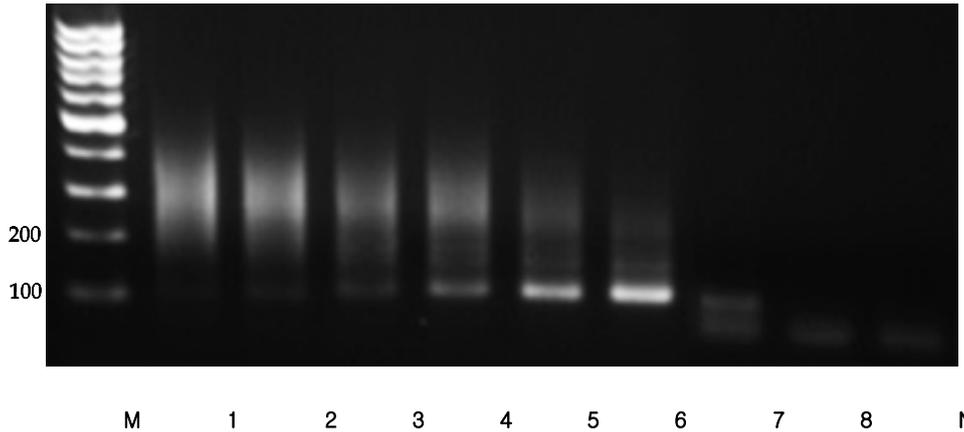


Figure 5-1. The result of PCR assays from 35S Promotor DNA with 35S Promotor primer

M : 100bp size marker , lanes 1-8:  $1.54 \times 10^{10}$ copies/tube,  $1.54 \times 10^9$ copies/tube,  $1.54 \times 10^8$ copies/tube,  $1.54 \times 10^7$ copies/tube,  $1.54 \times 10^6$ copies/tube,  $1.54 \times 10^5$ copies/tube,  $1.54 \times 10^4$ copies/tube,  $1.54 \times 10^3$ copies/tube, N: no template control

Table 6-1. The result of PCR assays from 35S promotor with 35S promotor primer

(단위:copies/tube)

$1.54 \times 10^{10}$	$1.54 \times 10^9$	$1.54 \times 10^8$	$1.54 \times 10^7$	$1.54 \times 10^6$	$1.54 \times 10^5$	$1.54 \times 10^4$	$1.54 \times 10^3$
+	+	+	+	+	+	+	-

㉞ GMO (Nos terminator)

본 연구 방법으로 진행된 PCR 반응액  $5\mu\text{l}$ 를 전기 영동한 결과로 Figure 5-1에 나타난 바와 같이 PCR산물은 151bp size DNA band로 gel 상에서 확인 가능하며, Figure 5-1와 Table 7-1에서 Nos primer에 대한 Conventional PCR을 수행한 결과 십진 희석된 Nos terminator DNA는  $2.02 \times 10^3$ copies/tube 까지 검출 가능하였다.

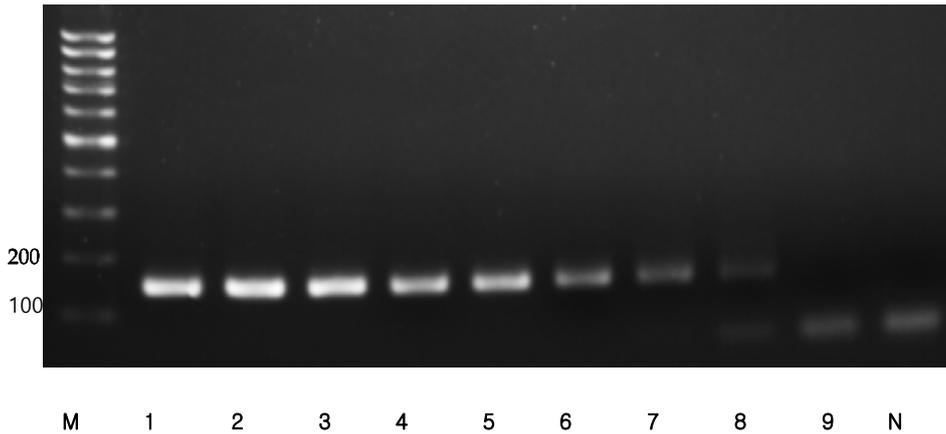


Figure 6-1. The result of PCR assays from Nos terminator DNA Nos terminator primer  
M : 100bp size marker , lanes 1-9:  $2.02 \times 10^{10}$  copies/tube,  $2.02 \times 10^9$  copies/tube,  $2.02 \times 10^8$  copies/tube,  $2.02 \times 10^7$  copies/tube,  $2.02 \times 10^6$  copies/tube,  $2.02 \times 10^5$  copies/tube,  $2.02 \times 10^4$  copies/tube,  $2.02 \times 10^3$  copies/tube,  $2.02 \times 10^2$  copies/tube N: no template control

Table 7-1. The result of PCR assays from Nos terminator DNA Nos terminator primer  
(단위:copies/tube)

$2.02 \times 10^{10}$	$2.02 \times 10^9$	$2.02 \times 10^8$	$2.02 \times 10^7$	$2.02 \times 10^6$	$2.02 \times 10^5$	$2.02 \times 10^4$	$2.02 \times 10^3$	$2.02 \times 10^2$
+	+	+	+	+	+	+	+	-

(바) 마스크팩 제품 유형(Sheet, Hydrogel type)에 따른 spiking 및 PCR test

① 마스크팩 제품 유형(Sheet, Hydrogel type)에 따른 DNA 추출 및 spiking PCR test

본 연구의 Spiking 시료를 선정하기 위해 시중에 판매되는 마스크팩 (Sheet, Hydrogel type)을 구매하여 용액을 falcon tube에 모은 후 eppendorf tube에 각각의 마스크팩 용액 90 $\mu$ l와 희석된 DNA용액 10 $\mu$ l를 혼합한 Sample을 준비한다.

Power prep<sup>TM</sup> DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출하고 추출된 DNA를 template DNA로 이용하여 비할랄 성분의 target gene을 증폭시키는 primer set (인체성분, 개, 돼지)를 사용한다. PCR 조성은 0.2ml tube에 10X taq Reation Buffer (25mM Mgcl2 mixed) 2.5 $\mu$ l, each 10mM dNTP mix 0.5 $\mu$ l, 각 primer (10 pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l, template DNA 1 $\mu$ l 와 solg<sup>TM</sup> taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l) 0.125 $\mu$ l 를 첨가하고 최종 반응액이 25 $\mu$ l가 되도록 sterile water를 추가하였다.

PCR cycle이 끝난 반응액은 10 x loading buffer(50% glycerol, 0.9% SDS, 0.05% Bromo phenol Blue)와 혼합하여 2% agarose gel에 주입한다. TAE(Tris-acetate, 1mM EDTA, PH8.0) buffer를 running buffer로 사용하여 125V에서 20분간 전기영동을 한 뒤 UV를 이용하여 증폭산물을 확인한다.

② 결과

추출된 마스크팩 (Sheet, Hydrogel type) DNA를 각각 인체성분, 개, 돼지 primer set 로 PCR반응을 진행하였다. figure4-1. 과 figure5-1.에서 나타난 바와 같이 본 연구에서 개와 돼지 DNA는 두 종류의 마스크팩에서 모두 검출되지 않았으나, Sheet-type 마스크 팩에서는 특이적인 인체성분 DNA band(186bp)가 증폭되었다.

이와 같은 결과를 살펴보았을 때 마스크팩의 종류에 따른 가공공정이 원인이 될 수 있다. Sheet-type의 경우 가공과정 중 사람이 Ample을 도포하는 작업이 있고 Hydrogel-type 팩 같은 경우 100% 기계공정으로 이루어진다. 이러한 요인으로 인해 Sheet-type의 팩에서 사람 DNA가 검출되었다고 추정할 수 있다.

앞으로 진행할 실험에서는 100% 기계공정으로 이루어지는 Hydrogel-type팩을 Sample로 사용하여 Spiking test를 진행할 예정이다.

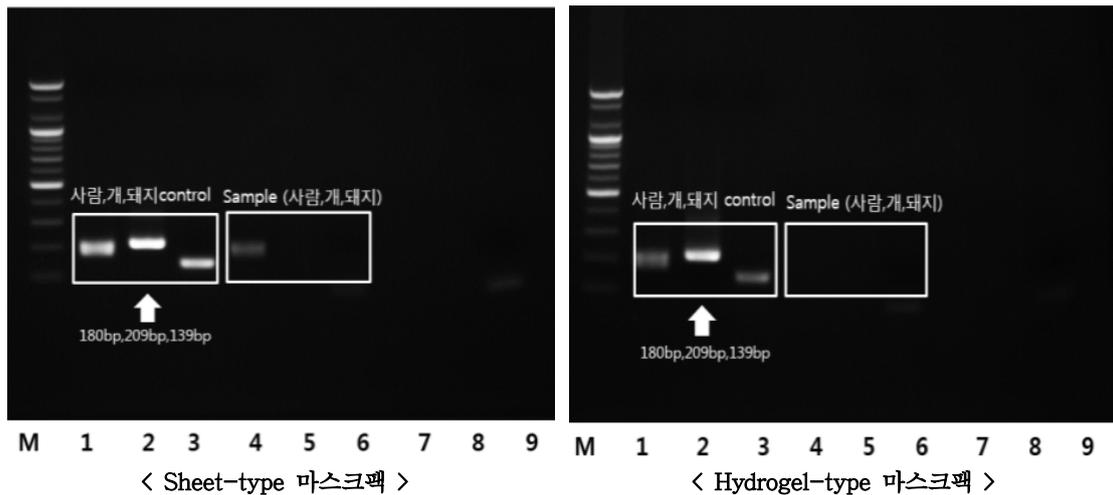


Figure 7-1. 마스크팩 제품유형(Sheet, Hydrogel type)에 따른 비합랄 성분 spiking PCR test

M :100bp size marker , lanes 1, 2, 3: Human, Dog, Pig positive control, lanes4, 5, 6: sample + Human primer set, sample + Dog primer set, sample + Pig primer set, lane 7, 8, 9: no template control (Human, Dog, Pig)

## (사) 마스크팩 제품에서 최적 DNA추출법 - Conventional PCR test

### ① 비합랄 성분 (인체성분, 개, 돼지, GMO)의 검출한계 확인

PCR assay에 있어서 사용하는 template DNA의 purity는 PCR 반응에 큰 영향을 미치므로 적절한 DNA 추출방법의 선택이 필요하다. DNA 추출방법은 비교적 고가이면서 시간이 걸리지만 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 DNA extraction kit 이용한다. kogene kit와 Qiagen stool kit, Nucleo spin food kit, TIANamp Genomic DNA Kit, Wizard DNA Kit 그리고 CTAB Method 총 6가지방법으로 추출한 PCR검출한계를 비교하였다. 시중에 판매되는 마스크팩 (Hydrogel type)용액 90 $\mu$ l와 십진 희석된 비합랄 성분 DNA10 $\mu$ l를 Spiking후 DNA를 추출하고 기존에 확립한 PCR조성과 단계로 진행하였다.

### ㉞ 인체성분

먼저 Kogene kit에서 십진 희석된 인체성분DNA를 Spiking하여 검출한계를 확인하고 나머지 5종의 Kit는 Kogene kit에서 검출된 한계의 앞쪽, 뒤쪽 DNA용액을 Spiking하여 검출한계를 알아보았다.

Table 8-1에 나타난 바와 같이 Stool kit로 추출한 방법이 1.28 $\times$ 10<sup>3</sup>copies/tube로 검출한계가 가장 우수하고 TIANamp DNA kit와 Kogene Kit가 1.28 $\times$ 10<sup>4</sup>copies/tube까지 검출되었고 Nucleo spin<sup>®</sup> Food, CTAB Method, Wizard<sup>®</sup> DNA kit는 1.28 $\times$ 10<sup>5</sup> copies/tube까지 검출되었다.

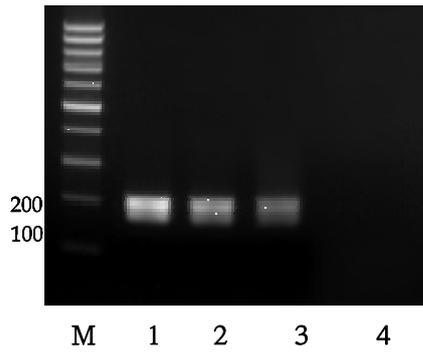


Figure 8-1. The result of PCR assays from Kogene Kit

Lane 1:  $1.28 \times 10^6$  copies/tube

Lane 2:  $1.28 \times 10^5$  copies/tube

Lane 3:  $1.28 \times 10^4$  copies/tube

Lane 4:  $1.28 \times 10^3$  copies/tube

Lane 5: no template control

M: 100bp size marker

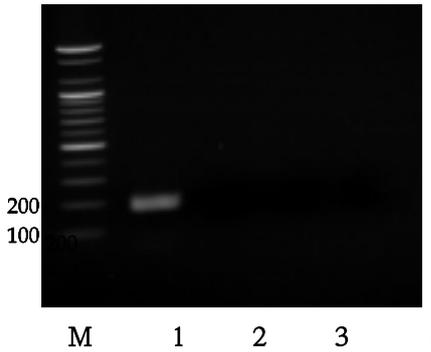


Figure 9-1. The result of PCR assays from CTAB method

Lane 1:  $1.28 \times 10^5$  copies/tube

Lane 2:  $1.28 \times 10^4$  copies/tube

Lane 3:  $1.28 \times 10^3$  copies/tube

Lane 4: no template control

M: 100bp size marker

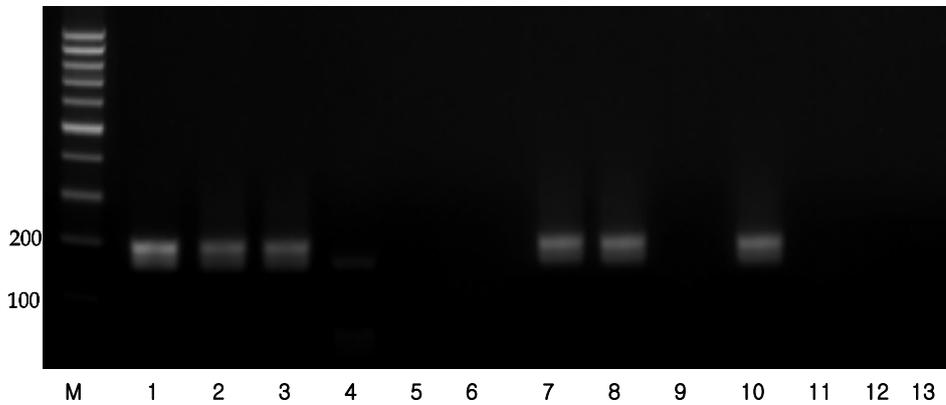


Figure 10-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (4종)

M : 100bp size marker , lanes 1, 2, 3 : stool kit lanes 4, 5, 6 : wizard kit, lanes 7, 8, 9 : TIAN kit, lanes 10, 11, 12 : Nucleo kit, lane 13 : no template control

Table 8-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (6종)

	$1.28 \times 10^5$ copies/tube	$1.28 \times 10^4$ copies/tube	$1.28 \times 10^3$ copies/tube
Kogene Kit	+	+	-
CTAB	+	-	-
QIAamp stool kit	+	+	+
Wizard® DNA kit	±	-	-
TIANamp DNA kit	+	+	-
Nucleo spin® Food	+	-	-

㉔ 개

먼저 Kogene kit에서 십진 희석된 Dog DNA를 Spiking하여 검출된 한계를 확인하고 나머지 5종의 Kit는 Kogene kit에서 검출된 한계의 앞쪽, 뒤쪽 DNA용액을 Spiking하여 검출한계를 알아보았다.

Table 9-1에 나타난 바와 같이 Stool kit로 추출한 방법이  $1.24 \times 10^2$ copies/tube로 검출한계가 가장 우수하고 TIANamp DNA kit와 Kogene Kit가  $1.24 \times 10^3$ copies/tube까지 검출되었고 Nucleo spin® Food와 CTAB Method는  $1.24 \times 10^4$ copies/tube까지 검출되었으며 Wizard® DNA kit는 Spiking한 범위 내에서 검출되지 않았다.

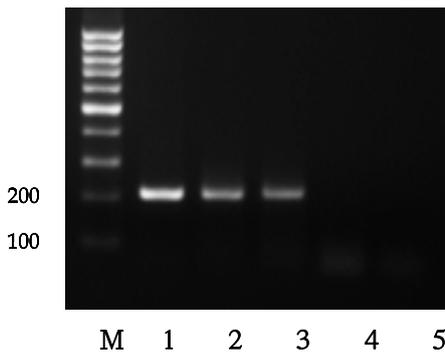


Figure 11-1. The result of PCR assays from Kogene Kit

Lane 1:  $1.24 \times 10^5$ copies/tube  
 Lane 2:  $1.24 \times 10^4$ copies/tube  
 Lane 3:  $1.24 \times 10^3$ copies/tube  
 Lane 4:  $1.24 \times 10^2$ copies/tube  
 Lane 5: no template control  
 M: 100bp size marker

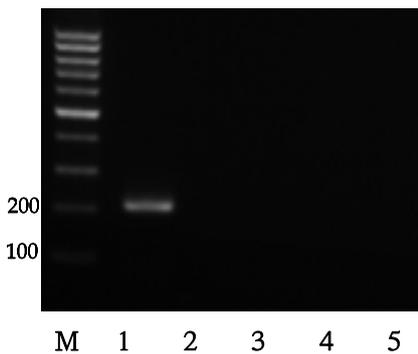


Figure 12-1. The result of PCR assays from CTAB method

Lane 1:  $1.24 \times 10^4$ copies/tube  
 Lane 2:  $1.24 \times 10^3$ copies/tube  
 Lane 3:  $1.24 \times 10^2$ copies/tube  
 Lane 4: no template control  
 M: 100bp size marker

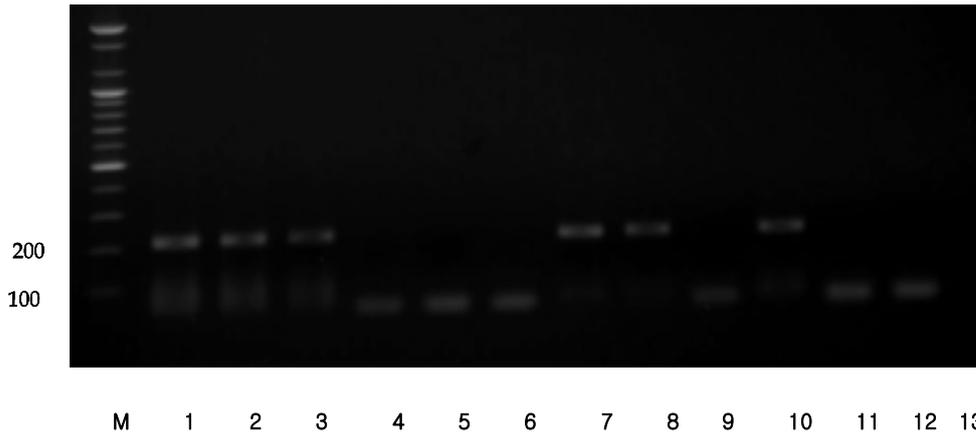


Figure 13-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (4종)

M : 100bp size marker , lanes 1, 2, 3 : stool kit , lanes 4, 5, 6 : wizard kit, lanes 7, 8, 9 : TIAN kit, lanes 10, 11, 12 : Nucleo kit , lane 13 : no template control

Table 9-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (6종)

	$1.24 \times 10^4$ copies/tube	$1.24 \times 10^3$ copies/tube	$1.24 \times 10^2$ copies/tube
Kogene Kit	+	+	-
CTAB	+	-	-
QIAamp stool kit	+	+	+
Wizard® DNA kit	-	-	-
TIANamp DNA kit	+	+	-
Nucleo spin® Food	+	-	-

㊤ 돼지

먼저 Kogene kit에서 십진 희석된 Pig DNA를 Spiking하여 검출된 한계를 확인하고 나머지 5종의 Kit는 Kogene kit에서 검출된 한계의 앞쪽, 뒤쪽 DNA용액을 Spiking하여 검출한계를 알아보았다.

Table 10-1에 나타난 바와 같이 Stool kit로 추출한 방법이  $1.14 \times 10^3$ copies/tube로 검출한계가 가장 우수하고 TIANamp DNA kit와 Kogene Kit가  $1.14 \times 10^4$ copies/tube까지 검출되었고 Nucleo spin® Food와 CTAB Method는  $1.14 \times 10^5$ copies/tube까지 검출되었으며 Wizard® DNA kit는 Spiking한 범위 내에서 검출되지 않았다.

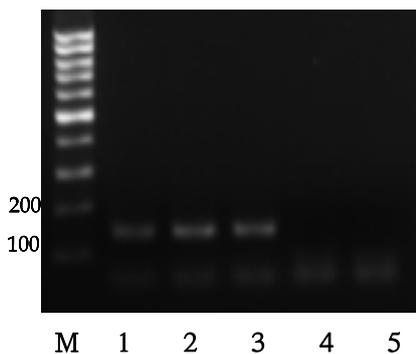


Figure 14-1. The result of PCR assays from Kogene kit

Lane 1:  $1.14 \times 10^6$ copies/tube

Lane 2:  $1.14 \times 10^5$ copies/tube

Lane 3:  $1.14 \times 10^4$ copies/tube

Lane 4:  $1.14 \times 10^3$ copies/tube

Lane 5: no template control

M: 100bp size marker

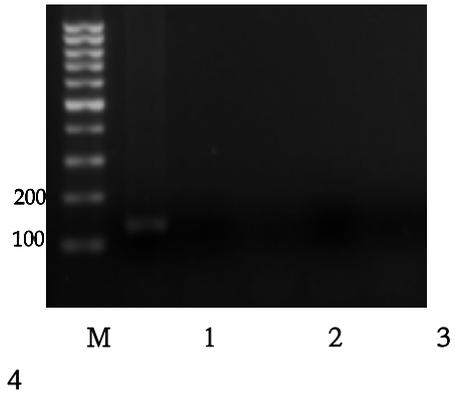


Figure 15-1. The result of PCR assays from CTAB Method

Lane 1:  $1.14 \times 10^5$  copies/tube  
 Lane 2:  $1.14 \times 10^4$  copies/tube  
 Lane 3:  $1.14 \times 10^3$  copies/tube  
 Lane 4: no template control  
 M: 100bp size marker

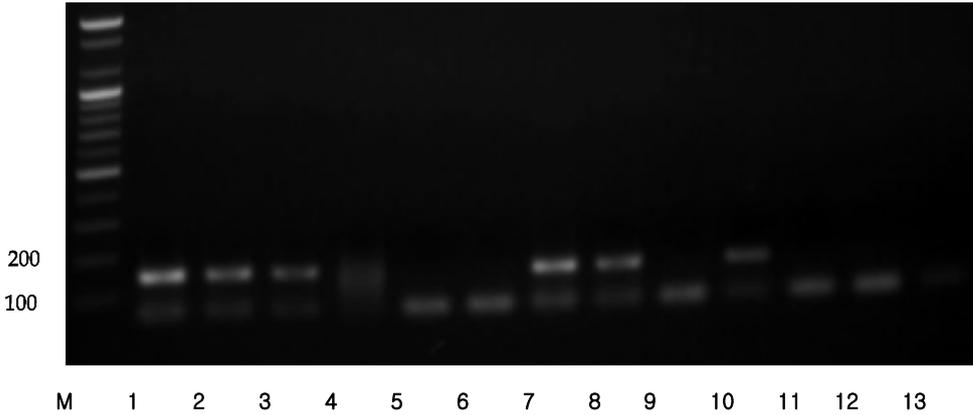


Figure 16-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (4종)

M : 100bp size marker , lane 1, 2, 3 : stool kit , lane 4, 5, 6 : wizard kit, lane 7, 8, 9 : TIAN kit, lane 10, 11, 12 : Nucleo kit ,lane 13 : no template control

Table 10-1. The result of PCR assays from Pig with Pig primer

	$1.14 \times 10^5$ copies/tube	$1.14 \times 10^4$ copies/tube	$1.14 \times 10^3$ copies/tube
Kogene Kit	+	+	-
CTAB	+	-	-
QIAamp stool kit	+	+	+
Wizard® DNA kit	-	-	-
TIANamp DNA kit	+	+	-
Nucleo spin® Food	+	-	-

㉔ GMO (35S promotor)

먼저 Kogene kit에서 십진 희석된 35S Promotor DNA를 Spiking하여 검출된 한계를 확인하고 나머지 5종의 Kit는 Kogene kit에서 검출된 한계의 앞쪽, 뒤쪽 DNA용액을 Spiking하여 검출한계를 알아 보았다.

Table 11-1에 나타난 바와 같이 Stool kit로 추출한 방법이  $1.54 \times 10^4$  copies/tube로 검출한계가 가장 우수하고 TIANamp DNA kit와 Kogene Kit가  $1.54 \times 10^5$  copies/tube까지 검출되었고 Nucleo spin® Food, CTAB Method, Wizard® DNA kit는  $1.54 \times 10^6$  copies/tube까지 검출되었다.

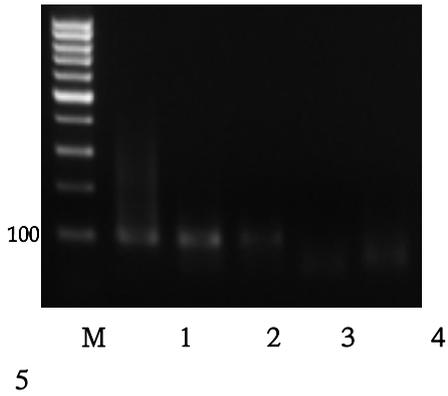


Figure 17-1. The result of PCR assays from Kogene kit

Lane 1:  $1.54 \times 10^7$  copies/tube

Lane 2:  $1.54 \times 10^6$  copies/tube

Lane 3:  $1.54 \times 10^5$  copies/tube

Lane 4:  $1.54 \times 10^4$  copies/tube

Lane 5: no template control

M: 100bp size marker

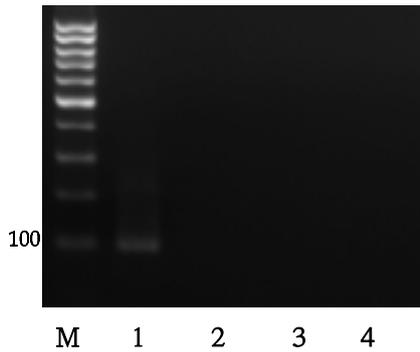


Figure 18-1. The result of PCR assays from CTAB Method

Lane 1:  $1.54 \times 10^6$  copies/tube

Lane 2:  $1.54 \times 10^5$  copies/tube

Lane 3:  $1.54 \times 10^4$  copies/tube

Lane 4: no template control

M: 100bp size marker

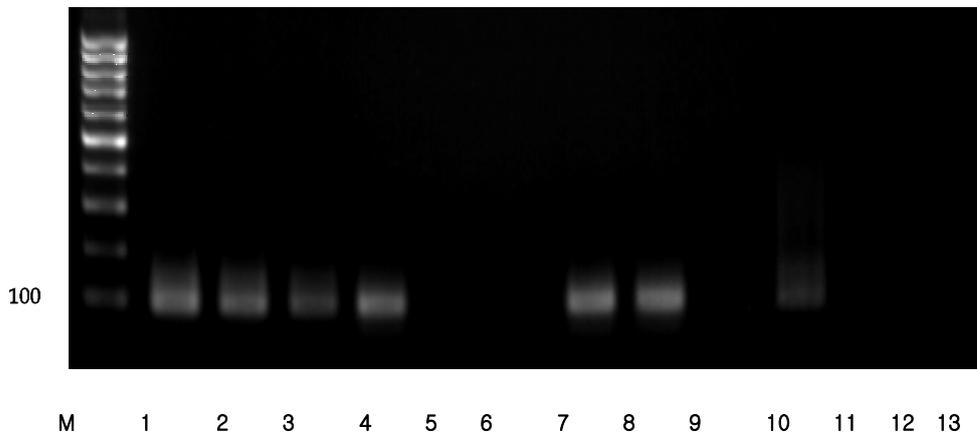


Figure 19-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (4종)

M : 100bp size marker , lane 1, 2, 3 : stool kit , lane 4, 5, 6 : wizard kit, lane 7, 8, 9 : TIAN kit, lane 10, 11, 12 : Nucleo kit , lane 13 : no template control

Table 11-1. The result of PCR assays from 35S promotor with 35S promotor primer

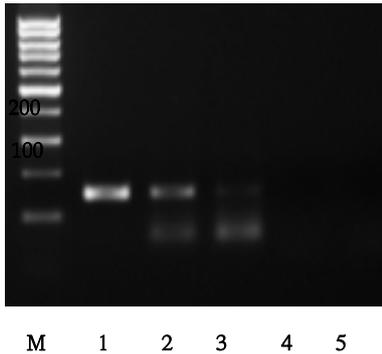
	$1.54 \times 10^6$ copies/tube	$1.54 \times 10^5$ copies/tube	$1.54 \times 10^4$ copies/tube
Kogene Kit	+	+	-
CTAB	+	-	-
QIAamp stool kit	+	+	+
Wizard® DNA kit	+	-	-
TIANamp DNA kit	+	+	-
Nucleo spin® Food	+	-	-

㉞ GMO (Nos terminator)

먼저 Kogene kit에서 십진 희석된 Nos terminator DNA를 Spiking하여 검출된 한계를 확인하고 나머지 5종의 Kit는 Kogene kit에서 검출된 한계의 앞쪽, 뒤쪽 DNA용액을 Spiking하여 검출한계를 알아 보았다.

Table 12-1에 나타난 바와 같이 Stool kit로 추출한 방법이  $2.02 \times 10^3$  copies/tube로 검출한계가 가장 우수하고 TIANamp DNA kit와 Kogene Kit, CTAB Method가  $2.02 \times 10^4$  copies/tube까지 검출되었고 Nucleo spin® Food, Wizard® DNA kit는  $2.02 \times 10^5$  copies/tube까지 검출되었다.

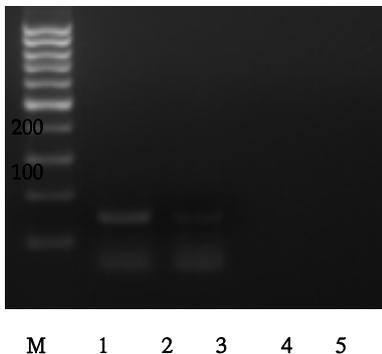
Figure 20-1. The result of PCR assays from Kogene kit



Lane 1:  $2.02 \times 10^6$  copies/tube  
 Lane 2:  $2.02 \times 10^5$  copies/tube  
 Lane 3:  $2.02 \times 10^4$  copies/tube  
 Lane 4:  $2.02 \times 10^3$  copies/tube  
 Lane 5: no template control

M: 100bp size marker

Figure 21-1. The result of PCR assays from CTAB



Lane 1:  $2.02 \times 10^5$  copies/tube  
 Lane 2:  $2.02 \times 10^4$  copies/tube  
 Lane 3:  $2.02 \times 10^3$  copies/tube  
 Lane 4: no template control

M: 100bp size marker

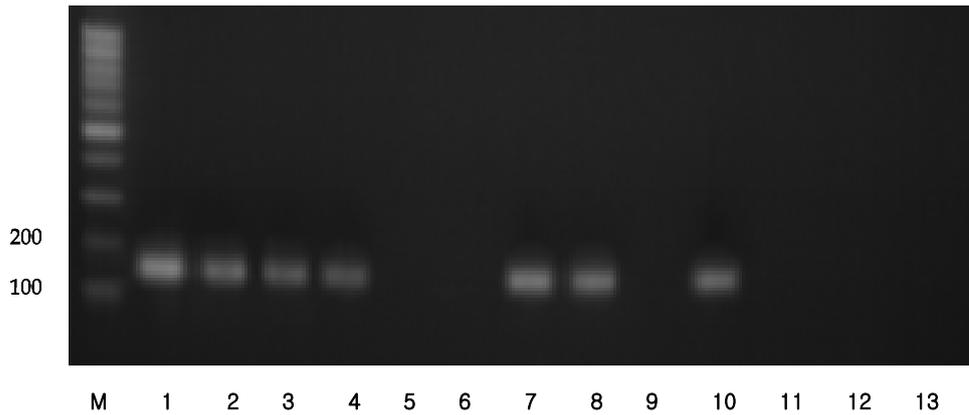


Figure 22-1. The result of PCR assays from DNA extraction kit (4종)

M : 100bp size marker , lane 1, 2, 3 : stool kit , lane 4, 5, 6 : wizard kit, lane 7, 8, 9 : TIAN kit, lane 10, 11, 12 : Nucleo kit , lane 13 : no template control

Table 12-1. The result of PCR assays from Nos terminator with Nos terminator primer

	$2.02 \times 10^5$ copies/tube	$2.02 \times 10^4$ copies/tube	$2.02 \times 10^3$ copies/tube
Kogene Kit	+	+	-
CTAB	+	±	-
QIAamp stool kit	+	+	+
Wizard® DNA kit	+	-	-
TIANamp DNA kit	+	+	-
Nucleo spin® Food	+	-	-

## ② 시료 형태에 따른 비할랄 성분의 PCR 검출한계

마스크팩 (Hydrogel type)용액에 비할랄 성분(인체성분, 돼지, 개, GMO) Spiking PCR 검출한계는 Stool DNA kit > Kogene Kit, TIANamp DNA kit 순으로 검출한계가 우세한 것을 확인하였다. 검출 한계가 높은 3가지 kit가 시료의 형태가 달라졌을때 DNA추출에 영향을 미쳐 검출 한계가 변화되는지 확인하기 위하여 (주) Chemland 1차 Sample - Liquid type (cream modeling mask gold)를 시료로 이용하여 비할랄 성분을 Spiking하여 검출한계를 알아보았다.

## ㉠ TIANamp Kit를 이용하여 DNA 추출 후 PCR test

먼저 빠른 시간과 저렴한 가격인 장점인 TIANamp DNA kit를 이용하여 Liquid type (cream modeling mask gold)에 비할랄 성분을 spiking하여 PCR test를 진행하였다. 이전 실험과는 다르게 figure 22-1를 살펴보면 Sample에 Haram DNA를 Spiking한 target band가 제대로 증폭된 것과 증폭되지 않은 것이 보인다. 이는 PCR 진행보다 DNA extraction 부분에서 문제가 발생된 것으로 추측된다. TIANamp DNA Kit Protocol을 살펴보면 시료를 lysis후 column에 바로 주입하는 방식인데 샘플이 걸쭉한type이기에 제대로 용해되지 않은 상태로 column에 시료를 주입하고 시료가 Binding column을 막는 역할을 하여 DNA추출에 방해가 된다.

시료 형태에 따라 DNA extraction에 영향을 주는 kit는 적합하지 않기에 TIANamp DNA Kit는 배제하기로 결정하였다.

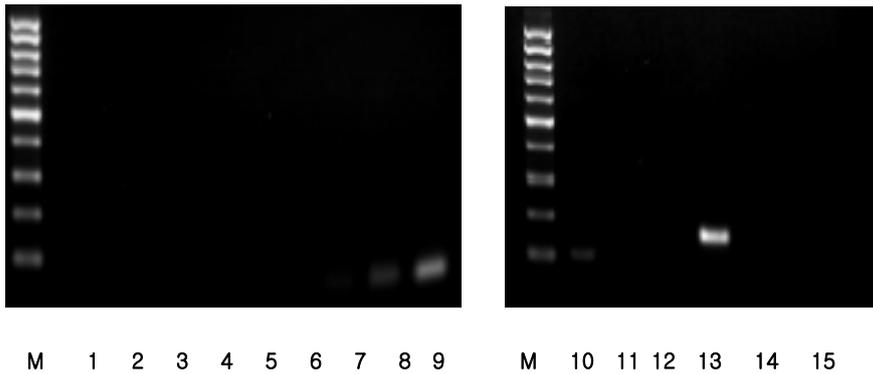


Figure 23-1. The result of PCR assays from TIANamp DNA Kit

M : 100bp size marker , lane1: Human DNA Spiking, lane2: Sample + Human primer, lane3: no template DNA, lane4: Dog Spiking, lane5: Sample + Dog Primer, lane6: no template DNA, lane7: Pig Spiking, lane8: sample + Pig primer, lane9: no template DNA, lane10: 35S promotor Spiking, lane11: Sample + 35S promotor primer, lane12: no template DNA, lane13: Nos terminator Spiking, lane14: Sample + 35S promotor primer, lane15: no template DNA

㉔ Chemland sample를 kogene kit와 stool kit비교

시료 형태에 따라 DNA extraction에 영향을 주는 kit는 적합하지 않기에 가장 감도가 우세한 Stool kit와 TIANamp Kit와 같은 검출한계를 보이는 Kogene Kit을 비교하였다.

Liquid type (cream modeling mask gold)에 비할랄 성분인 GMO(Nos terminator, 35S Promotor)를 spiking하여 PCR test를 진행하였다. figure 23-1에 나타난 바와 같이 Nos terminator는 QIAamp stool kit는  $2.02 \times 10^5$ copies/tube까지 검출가능하고 Kogene DNA Kit는  $2.02 \times 10^4$ copies/tube까지 검출가능하다. figure 24-1에 나타난 바와 같이 35S promotor는 QIAamp stool kit는  $1.54 \times 10^5$ copies/tube 까지 검출가능하고 Kogene DNA Kit는  $1.54 \times 10^4$ copies/tube까지 검출가능하다.

\* NOS terminator

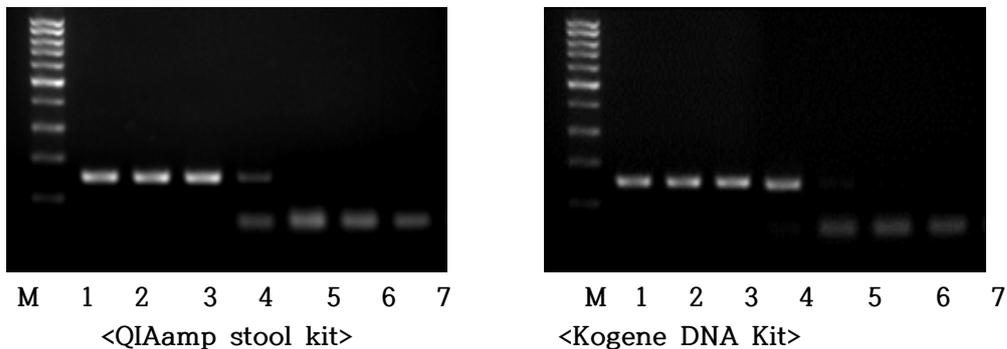


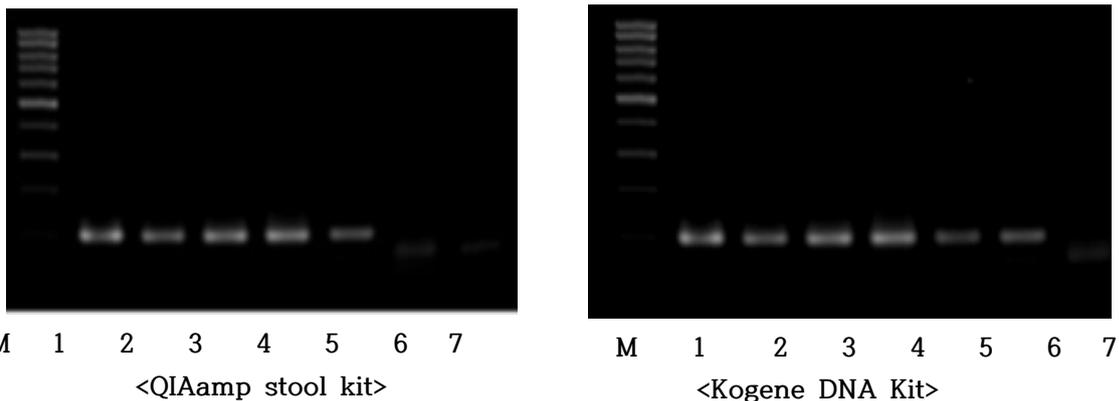
Figure 24-1. The result of PCR assays from Nos terminator with Nos terminator primer

Lane 1 :  $2.02 \times 10^5$ copies/tube - Positive control  
 Lane 2 :  $2.02 \times 10^4$ copies/tube - Positive control  
 Lane 3 :  $2.02 \times 10^3$ copies/tube - Positive control  
 Lane 4 :  $2.02 \times 10^5$ copies/tube Spiking  
 Lane 5 :  $2.02 \times 10^4$ copies/tube Spiking  
 Lane 6 :  $2.02 \times 10^3$ copies/tube Spiking  
 Lane 7 : no template DNA  
 M: 100bp

**Table 13-1. The result of PCR assays from Nos terminator with Nos terminator primer**

	$2.02 \times 10^5$ copies/tube	$2.02 \times 10^4$ copies/tube	$2.02 \times 10^3$ copies/tube
QIAamp stool kit	+	-	-
Kogene DNA kit	+	±	-

**\* 35S Promotor**



**Figure 25-1. The result of PCR assays from 35S promotor with 35S Promotor primer**

Lane 1 :  $1.54 \times 10^6$ copies/tube - Positive control  
 Lane 2 :  $1.54 \times 10^5$ copies/tube - Positive control  
 Lane 3 :  $1.54 \times 10^4$ copies/tube - Positive control  
 Lane 4 :  $1.54 \times 10^6$ copies/tube Spiking  
 Lane 5 :  $1.54 \times 10^5$ copies/tube Spiking  
 Lane 6 :  $1.54 \times 10^4$ copies/tube Spiking  
 Lane 7 : no template DNA  
 M: 100bp

**Table 14-1. The result of PCR assays from 35S promotor with 35S promotor primer**

	$1.54 \times 10^6$ copies/tube	$1.54 \times 10^5$ copies/tube	$1.54 \times 10^4$ copies/tube
QIAamp stool kit	+	+	-
Kogene DNA kit	+	+	+

(아) 마스크팩 제품에서 최적의 DNA extraction kit 선정

대체 소재와 마스크팩 완제품에서 최적의 DNA extraction Kit를 선정하여 DNA를 추출하기 위해서 Table 15에 나타난 바와 같이 금액, PCR 검출한계 (GMO기준), 소요시간을 고려하여 각각의 DNA extraction Kit를 비교하였다. 짧은 소요시간과 비교적 높은 감도를 보이는 TIANamp DNA kit에 대한 선호도가 높았으나 시료 형태에 따라 DNA extraction에 영향을 주는 kit는 적합하지 않기에 배제하였다. 가장 높은 감도를 보이는 Stool Kit와 TIANamp DNA Kit와 비슷한 검출한계를 보이는 Kogene DNA kit를 비교한 결과 DNA lysis후 유기용매를 처리하여 상등액을 채취하는 Protocol로 이루어지는 Kogene DNA Kit가 시료의 형태가 바뀌어도 검출한계의 변화가 적기에 이를 이번 연구의 DNA extraction kit로 선정하였다.

Table 15-1. 인체성분DNA에 대한 6종류 Kit의 PCR검출한계, 금액, 소요시간 비교

kit 종류	금액	규격	1prep당	PCR detection (copies/tube)	소요시간
Kogene DNA kit	₩300,000	100prep	₩3,000	$1.28 \times 10^4$	약 1시간 30분
QIAamp stool kit	₩313,000	50prep	₩6,260	$1.28 \times 10^3$	약 40분
Nucleospin® Food	₩300,000	50prep	₩6,000	$1.28 \times 10^5$	약 1시간 10분
TIANamp DNA kit	₩96,000	50prep	₩1,920	$1.28 \times 10^4$	약 30분
Wizard® DNA kit	₩240,000	100prep	₩2,400	$1.28 \times 10^5$	약 2시간 30분
CTAB	-	-	-	$1.28 \times 10^5$	약 2시간

(자) (주) Chemland Sample의 비할랄 성분 Conventional PCR detection

① (주) Chemland에서 제공된 1차 Sample의 비할랄 성분 Conventional PCR detection

(주) Chemland에서 1차 Sample로 Liquid type (cream modeling mask gold)과 powder type을 받았다. Liquid type (modeling mask glod)과 Powder type의 혼합물 (1:2)에Haram DNA Spiking 및 Kogene Kit를 이용하여 DNA 추출 후 Conventional PCR을 진행하였다. figure 25-1에 나타난 바와 같이 Liquid type (cream modeling mask gold)과 Powder type의 혼합물에서 비할랄 성분을 Spiking한 Positive control만 확인되고 Sample에서 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO)은 검출되지 않았다.

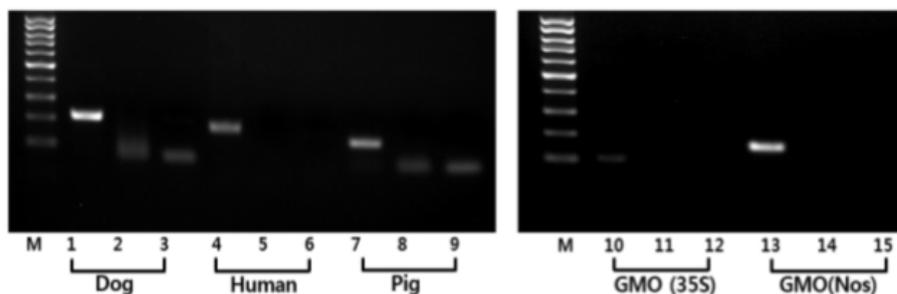


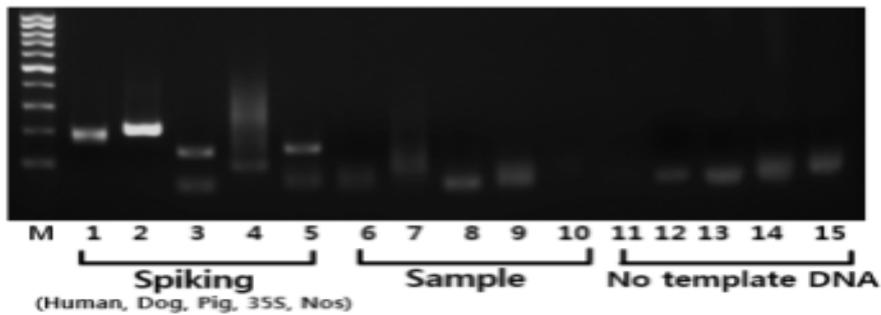
Figure 26-1. 1차 샘플에 비할랄 성분DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

Table 16-1. 1차 샘플에 비할랄 성분DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

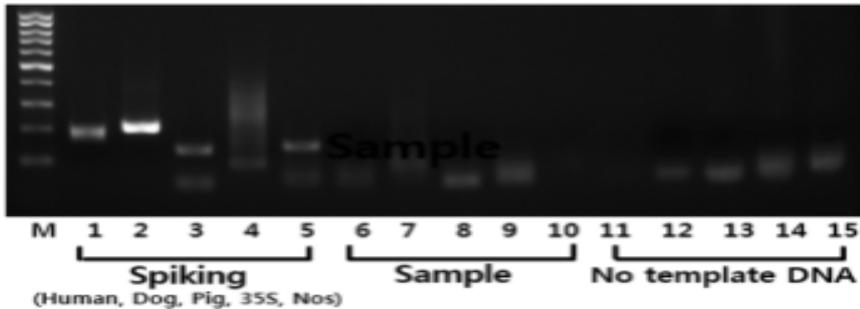
	Dog	Human	Pig	GMO (35S)	GMO (Nos)
Spiking	+	+	+	+	+
Sample	-	-	-	-	-

② (주) Chemland에서 제공된 2차 Sample의 비할랄 성분의 Conventional PCR detection

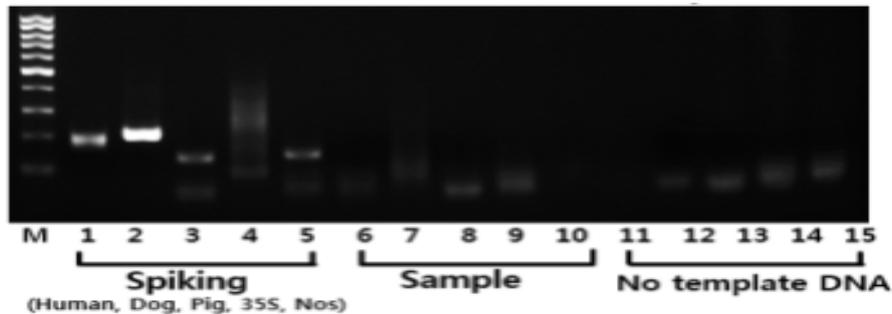
(주) Chemland에서 Powder type의 Carrot Amino Acid 추출물, 화장품성분만 포함된 Blank, Carrot Amino Acid가 0.5% 함유된 마스크팩을 받았다. 각각의 Powder와 D.W를 1:2비율로 혼합하여 Sample을 만들고 혼합된 Sample 90 $\mu$ l와 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO)를 10 $\mu$ l Spiking한 후 DNA를 추출하여 Positive DNA로 확인한다. 시료 3개의 성분에 비할랄 성분이 함유되어있는지 확인하기 위해 각각 Primer set를 사용하여 target gene이 증폭되는지 확인한다. figure 26-1에 나타난 바와 같이 Carrot Amino acid 추출물과 화장품성분만 포함된 Blank에서 비할랄 성분이 검출되지 않았다. 그리고 두 시료를 혼합한 Carrot Amino acid가 0.5% 함유된 마스크팩에서도 비할랄 성분이 증폭되지 않은 것으로 보아 혼합과정에서 비할랄 성분이 유입되지 않았다.



< Powder (Blank) >



< Carrot amino acid >



< Blank + 0.5% carrot Amino Acid 추출 분말 >

Figure 27-1. 2차 샘플에 비할랄 성분DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Tes

Table 17-1. 2차 샘플에 비할랄 성분DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

	Blank					Carrot amino acid 추출분말					Blank + 0.5% carrot Amino Acid 추출 분말				
	인체 성분	Dog	Pig	GMO (35S)	GMO (Nos)	인체 성분	Dog	Pig	GMO (35S)	GMO (Nos)	인체 성분	Dog	Pig	GMO (35S)	GMO (Nos)
Spiking	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sample	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

③ (주) Chemland에서 제공된 3차 Sample의 비할랄 성분의 Conventional PCR detection

(주) Chemland에서 3차 Sample로 식물성효소를 이용하여 제조된 추출물 8종 (당근 4종: PB20, PS20, BB20, BS20 느타리버섯 4종: PB20, PS20, BB20, BS20)과 대조군으로 (주) 켈텍에서 제조된 돈피콜라겐을 받았다.

\* Sample (당근 4종: PB20, PS20, BB20, BS20 느타리버섯 4종: PB20, PS20, BB20, BS20) Conventional PCR

제공된 Sample 8종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 Pig specific primer를 이용하여 비할랄 성분으로 대표적인 돼지 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 27-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 돼지 유래 추출물이 없는 것으로 확인된다.

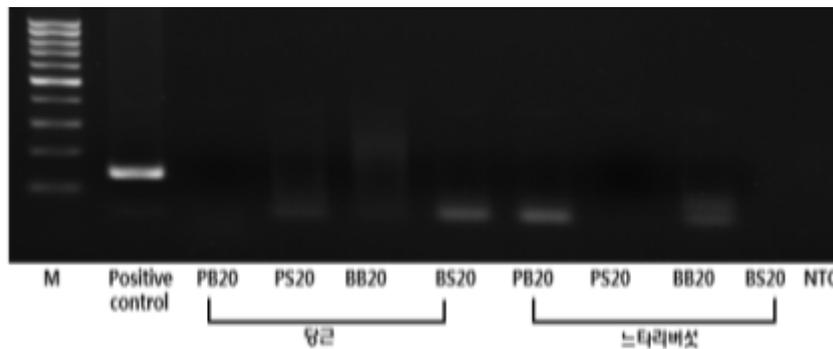


Figure 28-1. Sample(8종) PCR test with Pig - specific Primer set

Table 18-1. Sample(8종) PCR test with Pig - specific Primer set

Positive control	당근PB20	당근PS20	당근BB20	당근BS20	버섯PB20	버섯PS20	버섯BB20	버섯BS20
+	-	-	-	-	-	-	-	-

[2차년도] 당근, 느타리 버섯, 솔잎 추출물과 이를 함유한 크림 제품에서 PCR 시스템을 이용한 비할랄 DNA 확인

(가) 크림 제품에서 최적화된 PCR 시스템

본 연구에서는 1차 년도에 확립한 최적 Conventional PCR 시스템을 이용하여 크림제품에서의 비할랄

성분(돼지, 개, 인체성분, GMO)을 확인한다.

### ① 크립 제품에서 최적 DNA 추출법

이미 1차 년도 마스크팩 연구에서 비용, 시간, 감도 그리고 시료별 검출한계의 변화를 고려하여 가장 적합한 kit로 kogene DNA kit 선정했다, 따라서 이번 크립 제품 연구의 DNA extraction kit로도 kogene DNA kit 사용한다.

### (나) 당근, 느타리버섯, 솔잎 유래 추출성분(15종)의 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO) Conventional PCR detection

(주) Chemland에서 크립제품에 첨가될 추출물 15종의 샘플을 받았다. **Sample(당근 5종:** 당근 무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, **솔잎 5종:** 솔잎 무처리, 솔잎 파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, **느타리버섯 5종:** 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리)은 당근, 솔잎, 느타리버섯 추출물에 효소를 처리하지 않은 무처리군과 파파인과 브로멜라인 효소를 농도 별로(고농도, 저농도) 처리한 것이다. 각 샘플을 Haram DNA Spiking 및 Kogene Kit를 이용하여 DNA 추출 후 Conventional PCR을 진행한다. figure 2-6에 나타난 바와 같이 각 추출물에서 비할랄 성분을 Spiking한 Positive control만 확인되고 Sample에서 비할랄 성분 (인체성분, 개, 돼지, GMO)은 검출되지 않았다.

### ① (주) Chemland에서 제공된 1차 추출물 Sample의 개 DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 15종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 dog specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample 에는 비할랄 성분인 개 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

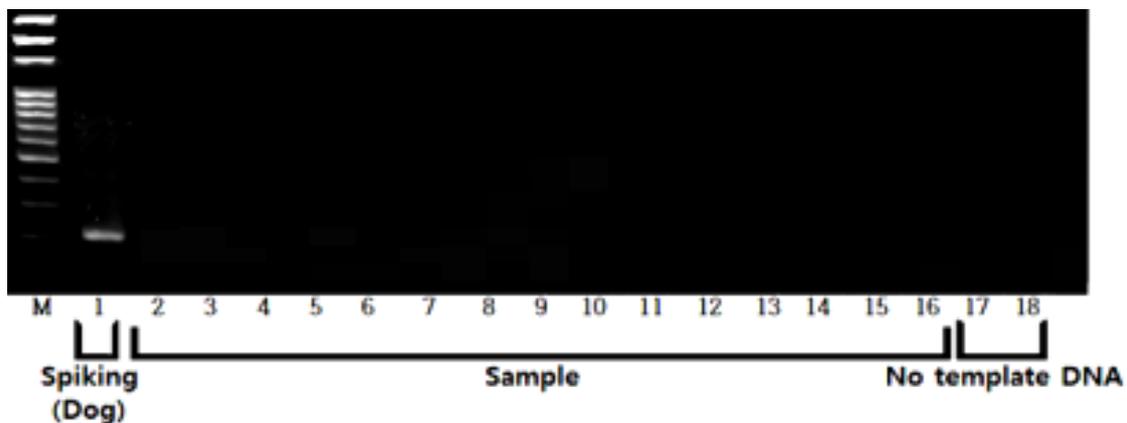


Figure 29-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(개) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : dog DNA spiked(positive control), lanes 2-16 : 당근무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, 솔잎무처리, 솔잎

파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리, land17-18 : no template DNA

Table 19-1. 추출물샘플(15종) PCR test with Dog - specific Primer set

Positive control (dog)	당근 추출물				솔잎 추출물				느타리버섯 추출물						
	무처리	파파인		브로멜라인		무처리	파파인		브로멜라인		무처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

② (주) Chemland에서 제공된 1차 추출물 Sample의 돼지 DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 15종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 pig specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 2-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 돼지 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

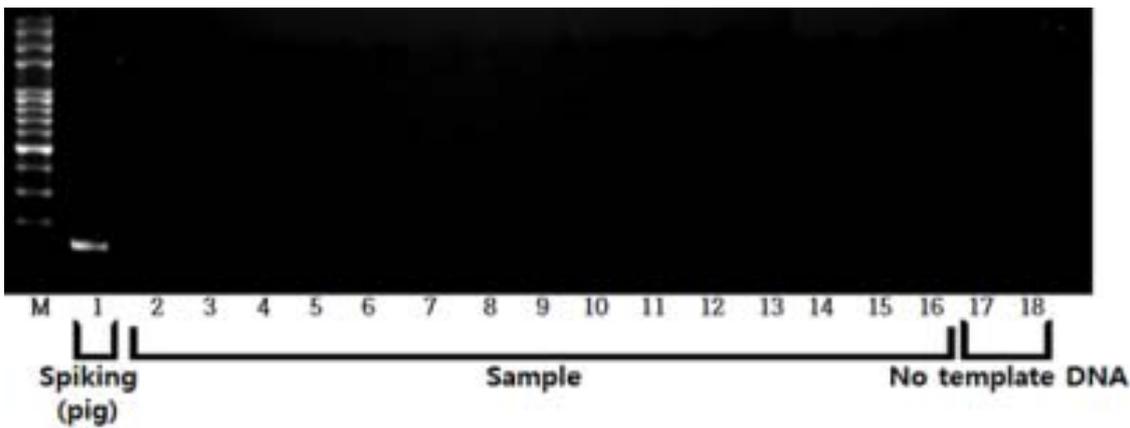


Figure 30-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(돼지) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : pig DNA spiked(positive control), lanes 2-16 : 당근무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, 솔잎무처리, 솔잎 파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리, land17-18 : no template DNA

Table 20-1. 추출물샘플(15종) PCR test with Pig - specific Primer set

Positive control (pig)	당근 추출물				솔잎 추출물				느타리버섯 추출물						
	무처리	파파인		브로멜라인		무처리	파파인		브로멜라인		무처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

③ (주) Chemland에서 제공된 1차 추출물 Sample의 인간 DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 15종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이

용하여 인간 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 3에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 인간 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

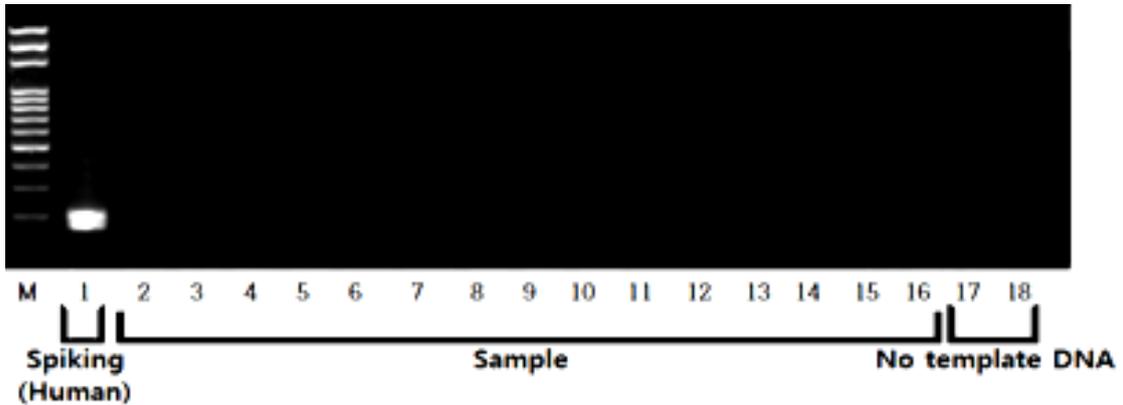


Figure 31-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(인간) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : human DNA spiked(positive control), lanes 2-16 : 당근무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, 솔잎무처리, 솔잎 파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리, lane17-18 : no template DNA

Table 21-1. 추출물샘플(15종) PCR test with Human - specific Primer set

Positive control (human)	당근 추출물				솔잎 추출물				느타리버섯 추출물						
	무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

④ (주) Chemland에서 제공된 1차 추출물 Sample의 GMO(35s) DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 15종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이용하여 35s target gene이 검출되는지 확인한다. figure 4-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(35s) 유래물질이 없는 것으로 확인된다.

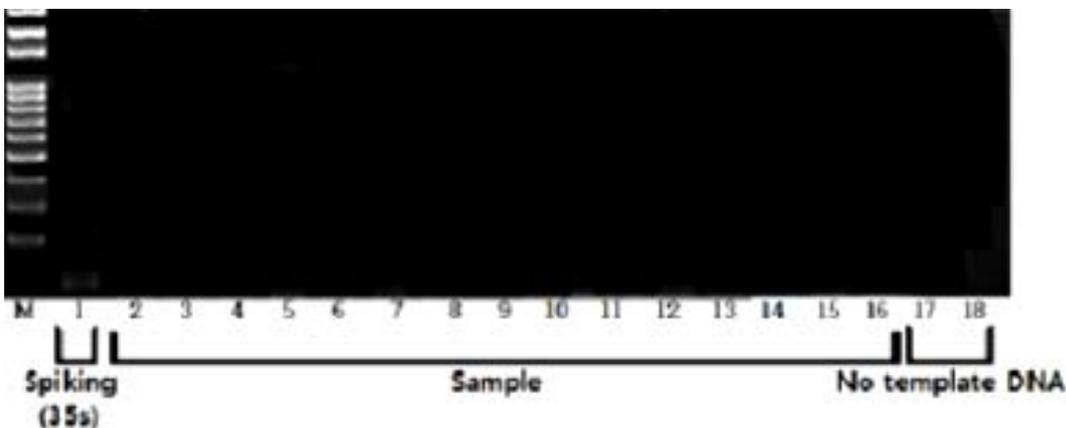


Figure 32-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(35s) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : 35s DNA spiked(positive control), lanes 2-16 : 당근무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, 솔잎무처리, 솔잎 파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리, land17-18 : no template DNA

Table 22-1. 추출물샘플(15종) PCR test with 35s - specific Primer set

Positive control (35s)	당근 추출물				솔잎 추출물				느타리버섯 추출물						
	무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

⑤ (주) Chemland에서 제공된 1차 추출물 Sample의 GMO(Nos) DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 15종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이용하여 Nos target gene이 검출되는지 확인한다. figure 5에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(Nos) 유래물질이 없는 것으로 확인된다.

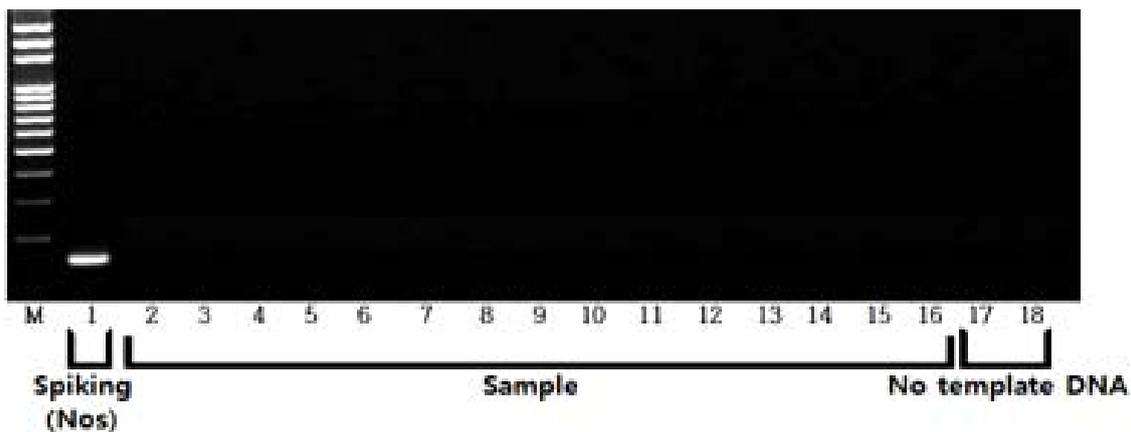


Figure 33-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(Nos) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Nos DNA spiked(positive control), lanes 2-16 : 당근무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, 솔잎무처리, 솔잎 파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리, land17-18 : no template DNA

Table 23-1. 추출물샘플(15종) PCR test with Nos - specific Primer set

Positive control (Nos)	당근 추출물				솔잎 추출물				느타리버섯 추출물						
	무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(다) (주) Chemland 크림제품(12종)의 비할랄 성분 Conventional PCR detection

(주) Chemland에서 크림제품에 첨가될 추출물 15종의 샘플을 받았다. Sample(당근 5종: 당근 무처리, 당근 파파인 고농도처리, 당근 파파인 저농도처리, 당근 브로멜라인 고농도처리, 당근 브로멜라인 저농도처리, 솔잎 5종: 솔잎 무처리, 솔잎 파파인 고농도처리, 솔잎 파파인 저농도처리, 솔잎 브로멜라인 고농도처리, 솔잎 브로멜라인 저농도처리, 느타리버섯 5종: 느타리버섯 무처리, 느타리버섯 파파인 고농도처리, 느타리버섯 파파인 저농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 고농도처리, 느타리버섯 브로멜라인 저농도처리)은 당근, 솔잎, 느타리버섯 추출물에 효소를 처리하지 않은 무처리군과 파파인과 브로멜라인 효소를 농도 별로(고농도, 저농도) 처리한 것이다. 각 샘플을 Haram DNA Spiking 및 Kogene Kit를 이용하여 DNA 추출 후 Conventional PCR을 진행한다. figure 2-6에 나타난 바와 같이 각 추출물에서 비할랄 성분을 Spiking한 Positive control만 확인되고 Sample에서 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO)은 검출되지 않았다.

① (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 개 DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 dog specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 6-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 개 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

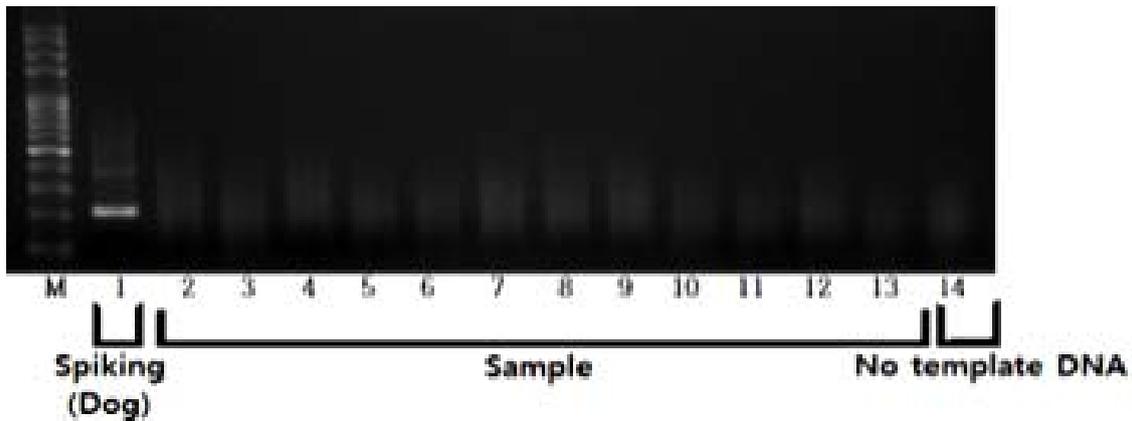


Figure 34-1. 크림제품(12종)에 비할랄 성분(개) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : dog DNA spiked(positive control), lanes 2-13 : Facial cream, Multi cream, Antiaging Cream, Carrot cream, Carrot ANFLA cream, Carrot SEL cream, Mushroom cream, Mushroom ANFLA cream, mushroom SEL cream, Pine Needles cream, Pine Needles ANFLA cream, Pine Needles SEL cream, land14 : no template DNA

Table 24-1. 크림제품(12종) PCR test with Dog - specific Primer set

Positive control (dog)	cream			carrot			Mushroom			Pine needles		
	Facial	Multi	Antiaging	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

② (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 돼지 DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 pig specific primer를 이용하여 돼지 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 7-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 돼지 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

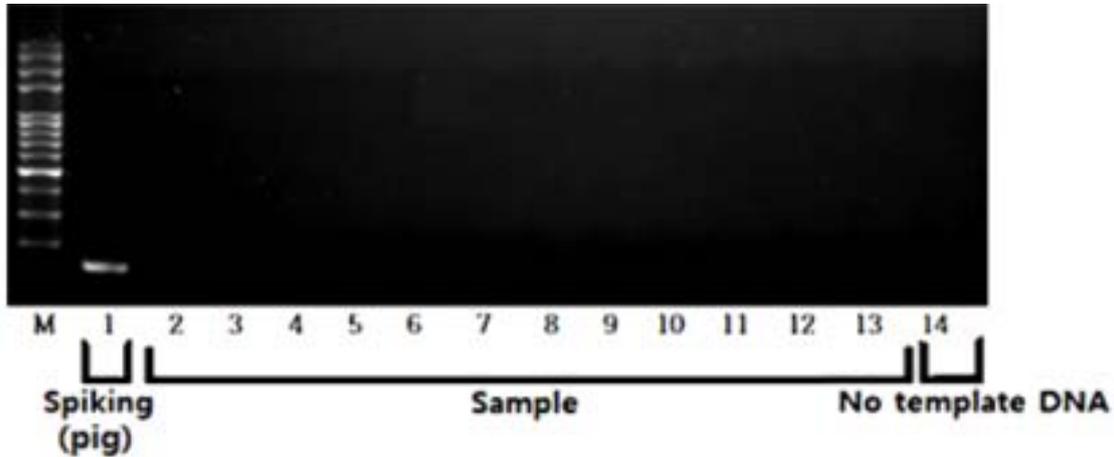


Figure 35-1. 크림제품(12종)에 비할랄 성분(돼지) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : pig DNA spiked(positive control), lanes 2-13 : Facial cream, Multi cream, Antiaging Cream, Carrot cream, Carrot ANFLA cream, Carrot SEL cream, Mushroom cream, Mushroom ANFLA cream, mushroom SEL cream, Pine Needles cream, Pine Needles ANFLA cream, Pine Needles SEL cream, lane 14 : no template DNA

Table 25. 크림제품(12종) PCR test with Pig - specific Primer set

Positive control (pig)	cream			carrot			Mushroom			Pine needles		
	Facial	Multi	Antiaging	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

③ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 인간 DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이용하여 인간 target gene이 검출되는지 확인한다. figure 8-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 인간 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

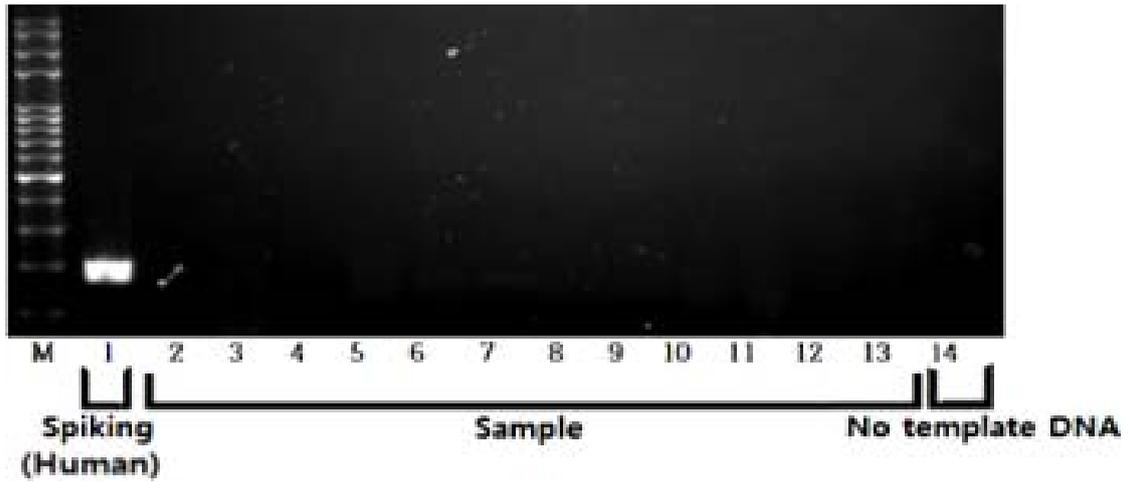


Figure 36-1. 크림제품(12종)에 비할랄 성분(인간) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Human DNA spiked(positive control), lanes 2-13 : Facial cream, Multi cream, Antiaging Cream, Carrot cream, Carrot ANFLA cream, Carrot SEL cream, Mushroom cream, Mushroom ANFLA cream, mushroom SEL cream, Pine Needles cream, Pine Needles ANFLA cream, Pine Needles SEL cream, land14 : no template DNA

Table 26-1. 크림제품(12종) PCR test with Human - specific Primer set

Positive control (human)	당근 추출물				솔잎 추출물				느타리버섯 추출물						
	무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

④ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 GMO(35s) DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 35s specific primer를 이용하여 35s target gene이 검출되는지 확인한다. figure 9-1에 나타난 바와 같이 Positive control1에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(35s) 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

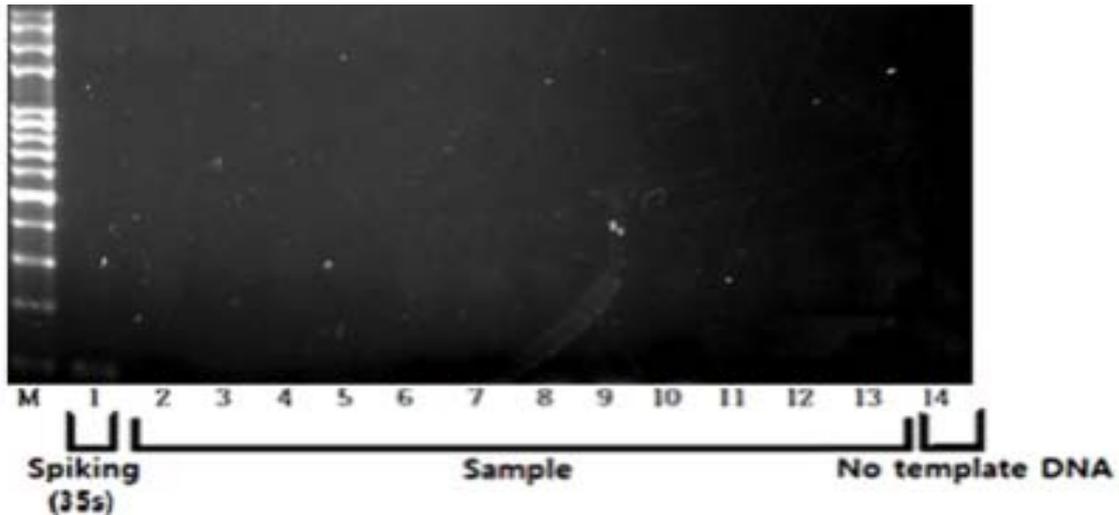


Figure 37-1. 크림제품(12종)에 비할랄 성분(35s) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : 35s DNA spiked(positive control), lanes 2-13 : Facial cream, Multi cream, Antiaging Cream, Carrot cream, Carrot ANFLA cream, Carrot SEL cream, Mushroom cream, Mushroom ANFLA cream, mushroom SEL cream, Pine Needles cream, Pine Needles ANFLA cream, Pine Needles SEL cream, land14 : no template DNA

Table 27-1. 크림제품(12종) PCR test with 35s - specific Primer set

Positive control (35s)	당근 추출물					솔잎 추출물					느타리버섯 추출물				
	무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

⑤ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 GMO(Nos) DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 Nos specific primer를 이용하여 Nos target gene이 검출되는지 확인한다. figure 10-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(Nos) 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

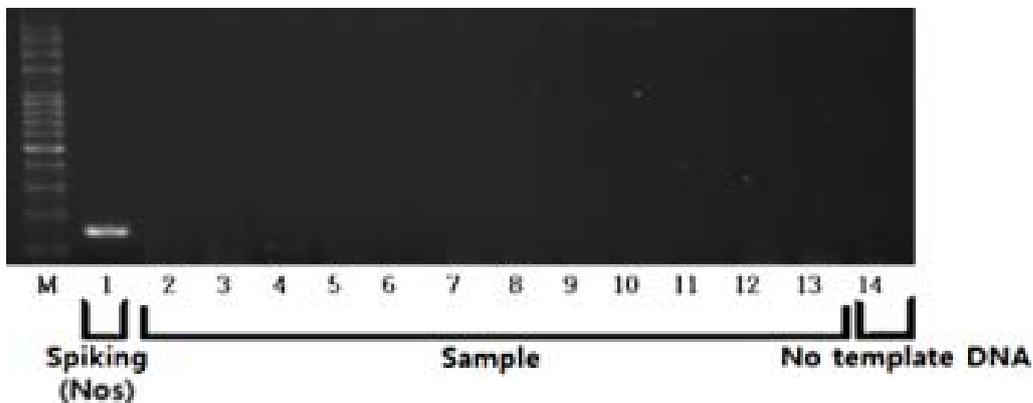


Figure 38-1. 크림제품(12종)에 비할랄 성분(GMO Nos) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Nos DNA spiked(positive control), lanes 2-13 : Facial cream, Multi cream, Antiaging Cream, Carrot cream, Carrot ANFLA cream, Carrot SEL cream, Mushroom cream, Mushroom ANFLA cream, mushroom SEL cream, Pine Needles cream, Pine Needles ANFLA cream, Pine Needles SEL cream, land14 : no template DNA

Table 28-1. 크림제품(12종) PCR test with Nos - specific Primer set

Positive control (Nos)	당근 추출물					솔잎 추출물					느타리버섯 추출물				
	무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인		무 처리	파파인		브로멜라인	
		고	저	고	저		고	저	고	저		고	저		
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[3차 년도] 녹두, 홍삼 추출물과 이를 함유한 크림 제품에서 PCR 시스템을 이용한 비할랄 DNA 확인

(가) 크림 제품에서 최적화된 PCR 시스템

본 연구에서는 1차 년도에 확립한 최적 Conventional PCR 시스템을 이용하여 크림제품에서의 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO)을 확인한다.

① PCR반응을 위한 target gene 및 primer과 DNA 추출법

연구에 사용된 Oligonucleotide primer와 DNA 추출법은 1, 2차 년도에서 설정한 것과 같다.

② 크림 제품에서 최적 DNA추출법

이미 1차년도 마스크팩 연구에서 비용, 시간, 감도 그리고 시료별 검출한계의 변화를 고려하여 가장 적합한 kit로 kogene DNA kit 선정했다, 따라서 이번 크림제품 연구의 DNA extraction kit로도 kogene DNA kit 사용한다.

(나) 홍삼, 녹두 유래 추출 성분 (6종)의 비할랄 성분 (인체성분, 개, 돼지, GMO) Conventional PCR detection

(주) Chemland에서 크림제품에 첨가될 추출물 6종의 샘플을 수령하였다. Sample(홍삼 3종: 홍삼 열수처리, 홍삼 파파인 처리, 홍삼 브로멜라인 처리, 녹두 3종: 녹두 열수처리, 녹두 파파인 처리, 녹두 브로멜라인 처리)은 홍삼과 녹두 추출물에 효소를 처리하지 않은 열수 처리군과 파파인과 브로멜라인 효소를 처리한 것이다. 각 샘플을 Haram DNA Spiking 및 Kogene Kit를 이용하여 DNA 추출 후 Conventional PCR을 진행한다. figure 1-5에 나타난 바와 같이 각 추출물에서 비할랄 성분을 Spiking한 Positive control만 확인되고 Sample에서 비할랄 성분 (인체성분, 개, 돼지, GMO)은 검출되지 않았다.

① (주) Chemland에서 제공된 홍삼, 녹두 추출물의 개 DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 6종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 dog specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 2-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 개유래

물질이 없는 것으로 확인된다.

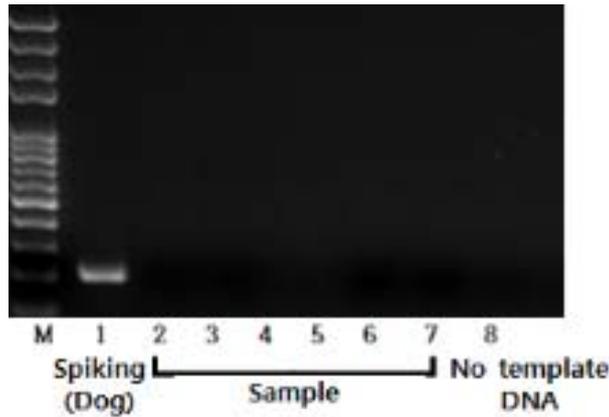


Figure 39-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(개) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : dog DNA spiked(positive control), lanes 2-7 : 홍삼 열수처리, 홍삼 파파인 처리, 홍삼 브로멜라인 처리, 녹두 열수처리, 녹두 파파인 처리, 녹두 브로멜라인 처리, lane 8 : no template DNA

Table 29-1. 추출물샘플(6종) PCR test with Dog - specific Primer set

Positive control (dog)	홍삼 추출물			녹두 추출물		
	무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-

② (주) Chemland에서 제공된 홍삼, 녹두 추출물의 돼지 DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 6종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 pig specific primer를 이용하여 돼지 target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 3-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 돼지 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

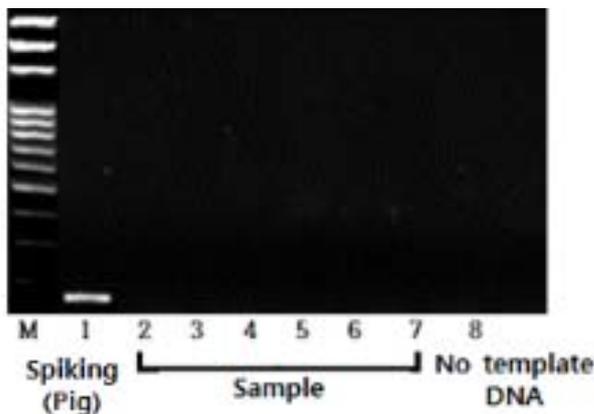


Figure 40-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(돼지) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Pig DNA spiked(positive control), lanes 2-7 : 홍삼 열수처리, 홍삼 파파인 처리, 홍삼 브로멜라인 처리, 녹두 열수처리, 녹두 파파인 처리, 녹두 브로멜라인 처리, lane 8 : no template DNA

Table 30-1. 추출물샘플(6종) PCR test with pig - specific Primer set

Positive control (pig)	홍삼 추출물			녹두 추출물		
	무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-

③ (주) Chemland에서 제공된 1차 홍삼, 녹두 추출물의 인간 DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 6종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이용하여 인간 target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 4-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 인간 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

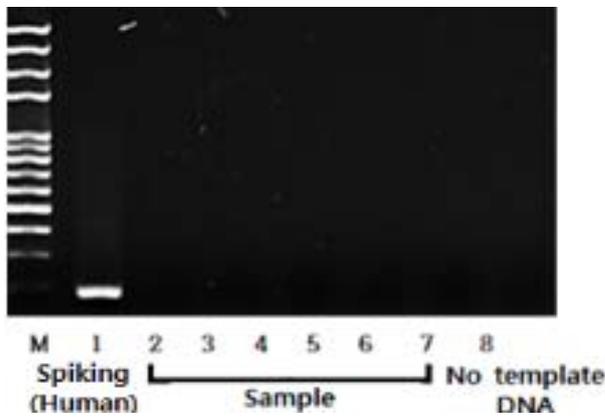


Figure 41-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(인체) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Human DNA spiked(positive control), lanes 2-7 : 홍삼 열수처리, 홍삼 파파인 처리, 홍삼 브로멜라인 처리, 녹두 열수처리, 녹두 파파인 처리, 녹두 브로멜라인 처리, lane 8 : no template DNA

Table 31-1. 추출물샘플(6종) PCR test with Human - specific Primer set

Positive control (Human)	홍삼 추출물			녹두 추출물		
	무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-

④ (주) Chemland에서 제공된 홍삼, 녹두 추출물의 GMO(35s) DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 6종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 35s specific primer를 이용하여 35s target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 5-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(35s) 유래물질이 없는 것으로 확인된다.

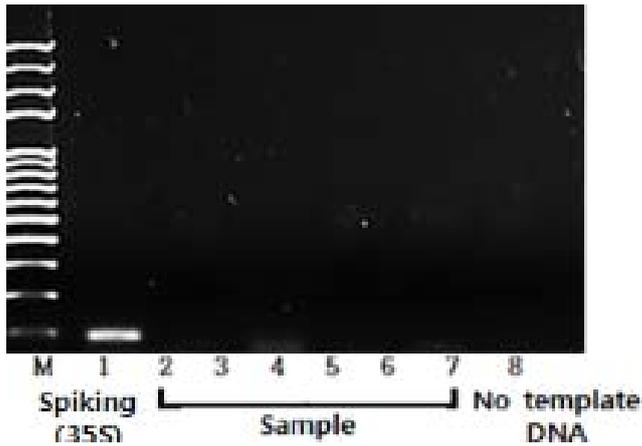


Figure 42-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(GMO-35s) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : GMO DNA spiked(positive control), lanes 2-7 : 홍삼 열수처리, 홍삼 파파인 처리, 홍삼 브로멜라인 처리, 녹두 열수처리, 녹두 파파인 처리, 녹두 브로멜라인 처리, lane 8 : no template DNA

Table 32-1. 추출물샘플(6종) PCR test with 35s - specific Primer set

Positive control (GMO-35s)	홍삼 추출물			녹두 추출물		
	무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-

⑤ (주) Chemland에서 제공된 홍삼, 녹두 추출물의 GMO(Nos) DNA Conventional PCR detection

제공된 추출물 Sample 6종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 Nos specific primer를 이용하여 Nos target gene이 검출되는지 확인한다. figure 5-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(Nos) 유래물질이 없는 것으로 확인된다.

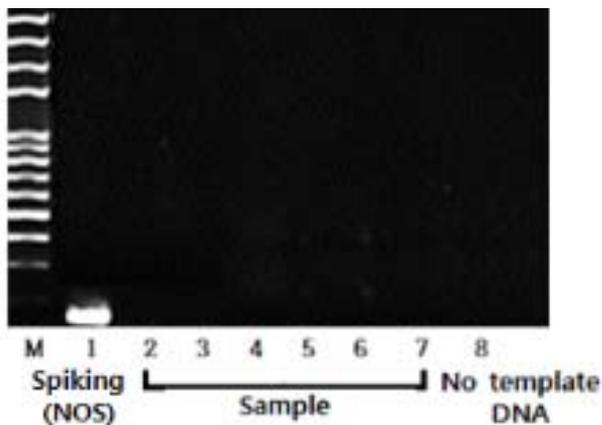


Figure 43-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(GMO-NOS) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : GMO DNA spiked(positive control), lanes 2-7 : 홍삼 열수처리, 홍삼 파파인 처리, 홍삼 브로멜라인 처리, 녹두 열수처리, 녹두 파파인 처리, 녹두 브로멜라인 처리, lane 8 : no

template DNA

Table 33-1. 추출물샘플(6종) PCR test with NOS - specific Primer set

Positive control (GMO-NOS)	홍삼 추출물			녹두 추출물		
	무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-

(다) (주) Chemland 크림제품(7종)의 비할랄 성분 Conventional PCR detection

(주) Chemland에서 홍삼, 녹두 추출물 6종을 함유하는 6가지 크림 샘플과 아무런 추출물이 들어가지 않은 기본 크림 샘플까지 총 7종의 크림샘플을 받았다. 각 샘플을 Haram DNA Spiking 및 Kogene Kit를 이용하여 DNA 추출 후 Conventional PCR을 진행한다. Figure 7-11에 나타난 바와 같이 각 추출물에서 비할랄 성분을 Spiking한 Positive control만 확인되고 Sample에서 비할랄 성분(인체성분, 개, 돼지, GMO)은 검출되지 않았다.

① (주)Chemland에서 제공된 크림제품(7종)의 개 DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 7종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 dog specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 7-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 개유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

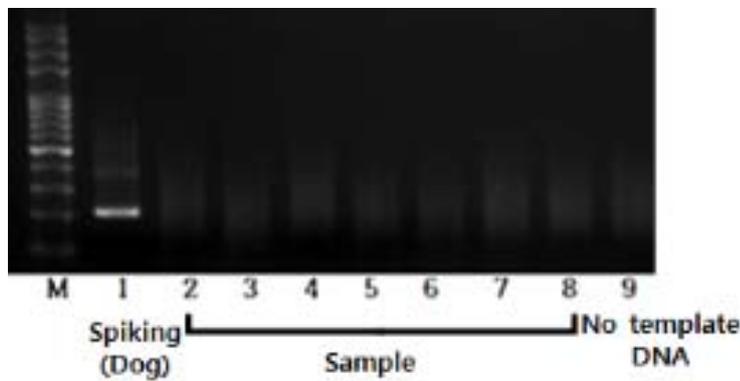


Figure 44-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(개) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Dog DNA spiked(positive control), lanes 2-8 : 추출물 무함유 크림, 홍삼 열수처리 크림, 홍삼 파파인 추출물 함유 크림, 홍삼 브로멜라인 추출물 함유 크림, 녹두 열수처리 함유 크림, 녹두 파파인 추출물 함유 크림, 녹두 브로멜라인 추출물 함유 크림, lane 9 : no template DNA

Table 34-1. 추출물샘플(7종) PCR test with Dog - specific Primer set

Positive control (dog)	크림	홍삼 추출물 함유 크림			녹두 추출물 함유 크림		
		무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-	-

② (주) Chemland에서 제공된 크립제품(7종)의 돼지 DNA Conventional PCR detection

제공된 크립제품 7종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 pig specific primer를 이용하여 돼지 target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 8에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 돼지 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

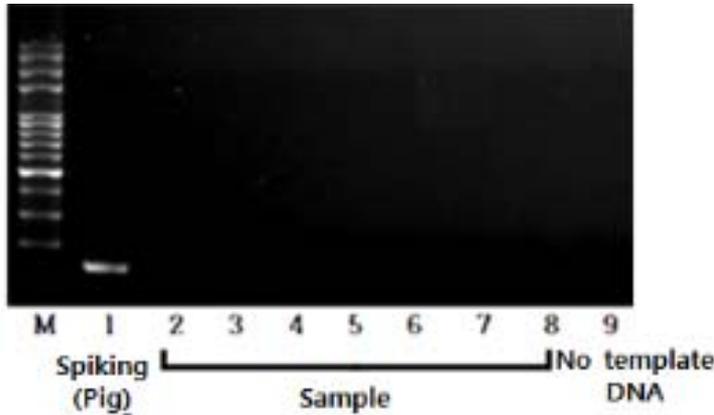


Figure 45-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(돼지) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Pig DNA spiked(positive control), lanes 2-8 : 추출물 무함유 크립, 홍삼 열수처리 크립, 홍삼 파파인 추출물 함유 크립, 홍삼 브로멜라인 추출물 함유 크립, 녹두 열수처리 함유 크립, 녹두 파파인 추출물 함유 크립, 녹두 브로멜라인 추출물 함유 크립, lane 9 : no template DNA

Table 35-1. 추출물샘플(7종) PCR test with Pig - specific Primer set

Positive control (Pig)	크립	홍삼 추출물 함유 크립			녹두 추출물 함유 크립		
		무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-	-

③ (주) Chemland에서 제공된 크립제품(7종)의 인간 DNA Conventional PCR detection

제공된 크립제품 7종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이용하여 인간 target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 9에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 인간 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

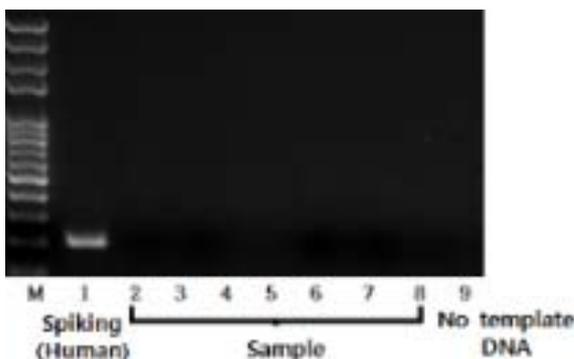


Figure 46-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(인간) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : Human DNA spiked(positive control), lanes 2-8 : 추출물 무함유 크림, 홍삼 열수처리 크림, 홍삼 파파인 추출물 함유 크림, 홍삼 브로멜라인 추출물 함유 크림, 녹두 열수처리 함유 크림, 녹두 파파인 추출물 함유 크림, 녹두 브로멜라인 추출물 함유 크림, lane 9 : no template DNA

Table 36-1. 추출물샘플(7종) PCR test with Human - specific Primer set

Positive control (human)	크림	홍삼 추출물 함유 크림			녹두 추출물 함유 크림		
		무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-	-

④ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(7종)의 GMO(35s) DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 7종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 35s specific primer를 이용하여 35s target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 10에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(35s) 유래 물질이 없는 것으로 확인된다.

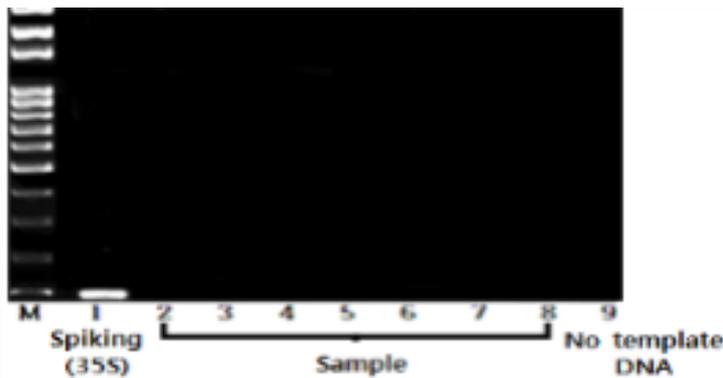


Figure 47-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(GMO-35s) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test

M : 100bp size marker , lane 1 : GMO 35s DNA spiked(positive control), lanes 2-8 : 추출물 무함유 크림, 홍삼 열수처리 크림, 홍삼 파파인 추출물 함유 크림, 홍삼 브로멜라인 추출물 함유 크림, 녹두 열수처리 함유 크림, 녹두 파파인 추출물 함유 크림, 녹두 브로멜라인 추출물 함유 크림, lane 9 : no template DNA

Table 37-1. 추출물샘플(7종) PCR test with GMO 35s - specific Primer set

Positive control (35s)	크림	홍삼 추출물 함유 크림			녹두 추출물 함유 크림		
		무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-	-

⑤ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(7종)의 GMO (Nos) DNA Conventional PCR detection

제공된 크림제품 7종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 Nos specific primer를 이용하여 Nos target gene이 검출되는지 확인한다. Figure 11-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 확인되었고 Sample에서는 band가 없는 것으로 보아 Sample에는 비할랄 성분인 GMO(Nos) 유

래 물질이 없는 것으로 확인된다.

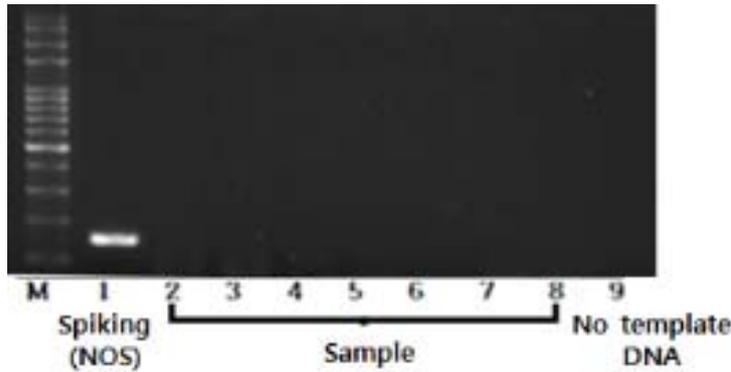


Figure 48-1. 추출물 샘플에 비할랄 성분(GMO-Nos) DNA spiking 및 DNA추출 후 PCR Test  
 M : 100bp size marker , lane 1 : GMO Nos DNA spiked(positive control), lanes 2-8 : 추출물 무함유 크립, 홍삼 열수처리 크립, 홍삼 파파인 추출물 함유 크립, 홍삼 브로멜라인 추출물 함유 크립, 녹두 열수처리 함유 크립, 녹두 파파인 추출물 함유 크립, 녹두 브로멜라인 추출물 함유 크립, lane 9 : no template DNA

Table 38-1. 추출물샘플(7종) PCR test with GMO Nos - specific Primer set

Positive control (NOS)	크립	홍삼 추출물 함유 크립			녹두 추출물 함유 크립		
		무 처리	파파인	브로멜라인	무 처리	파파인	브로멜라인
+	-	-	-	-	-	-	-

(3) real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석

[1차년도] 마스크팩 제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석

(가) real-time을 이용한 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO) 확인

Real-time PCR 분석을 위해 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO -Nos terminator)에 대한 primer와 probe에 서열은 1차년도에 설정한 것으로 실험하였다.

(나) 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO)의 real-time PCR 반응

real-time PCR 분석법에 의해 target gene이 감지되는 최적농도를 확인하기 위하여 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO)의 primer set와 probe를 이용하여 검출한계를 조사하였다.

① 돼지DNA의 sensitivity확인을 위한 real-time PCR 반응결과

Real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Pig primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C 15초, 60°C 1분 30초를 1

cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

돼지 DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.14copy/tube까지 검출이 가능하며 Conventional PCR보다 100배 더 민감한 것으로 확인된다. Figure 30-1에서 나타난 바와 같이 real-time PCR의 standard curve를 잡은 결과 기울기는 -3.557이며,  $R^2$ 는 0.999, Eff%은 91.08로 1 cycle 당  $2^n$ 으로 증폭되었는가에 대한 추정값이다.

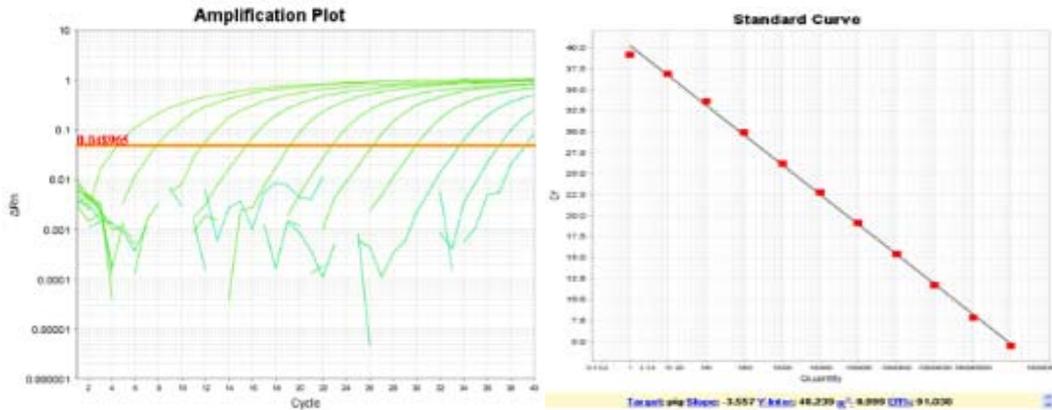


Figure 49-1. Sensitivity test of Pig primer with 10-fold serial dilutions

② 개 DNA의 sensitivity 확인을 위한 real-time PCR 반응결과

Real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix (Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Dog primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종 부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

real-time PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C 15초, 56°C 30초 72 °C 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

Dog DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.24copy/tube까지 검출이 가능하며 Conventional PCR보다 100배 더 민감한 것으로 확인된다. Figure 31-1에서 나타난 바와 같이 real-time PCR의 standard curve를 잡은 결과 기울기는 -3.606이며,  $R^2$ 는 0.999, Eff%은 89.372로 1 cycle 당  $2^n$ 으로 증폭되었는가에 대한 추정값이다.

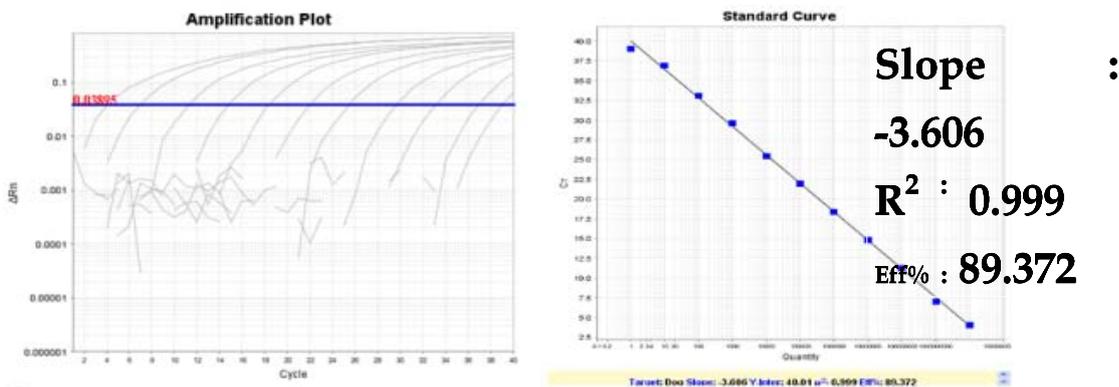


Figure 50-1. Sensitivity test of Dog primer with 10-fold serial dilutions

③ 인체성분 DNA의 sensitivity 확인을 위한 real-time PCR 반응결과

Real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix (Univeral PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Dog primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종 부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 95℃ 15초, 56℃ 30초 72℃ 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

인체성분 DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과  $1.29 \times 10^1$  copies/tube까지 검출이 가능하며 Conventional PCR보다 100배 더 민감한 것으로 확인된다. Figure 32-1에서 나타난 바와 같이 real-time PCR의 standard curve를 잡은 결과 기울기는 -3.528이며, R<sup>2</sup>는 0.995, Eff%은 92.071로 1 cycle 당 2<sup>n</sup>으로 증폭되었는가에 대한 추정 값이다.

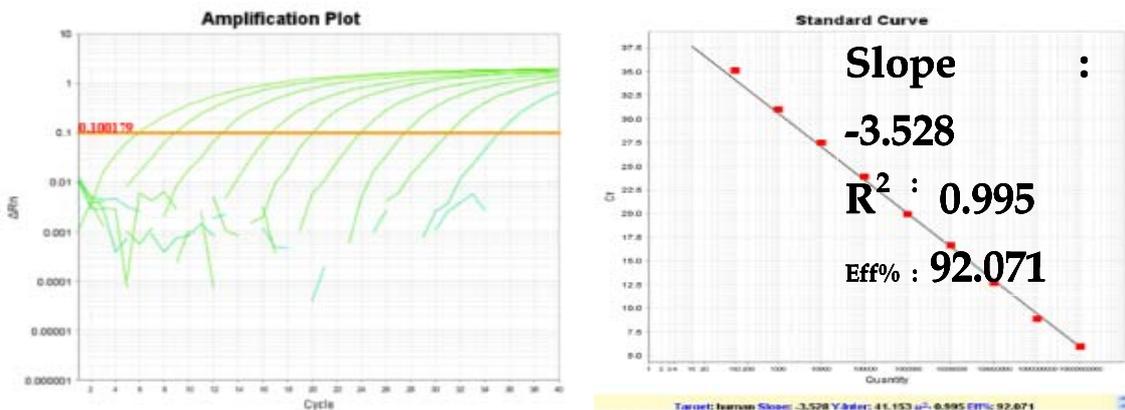


Figure 51-1. Sensitivity test of Human primer with 10-fold serial dilutions

④ GMO(Nos terminator)의 sensitivity 확인을 위한 real-time PCR 반응결과

real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Univeral PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Nos primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종 부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 95℃ 30초, 60℃ 30초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

GMO(Nos terminator)를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과  $2.02 \times 10^2$  copies/tube까지 검출이 가능하며 Conventional PCR보다 10배 더 민감한 것으로 확인된다. Figure 33-1에서 나타난 바와 같이 real-time PCR의 standard curve를 잡은 결과 기울기는 -3.964이며, R<sup>2</sup>는 1, Eff%은 78.768로 1 cycle 당 2<sup>n</sup>으로 증폭되었는가에 대한 추정값이다.

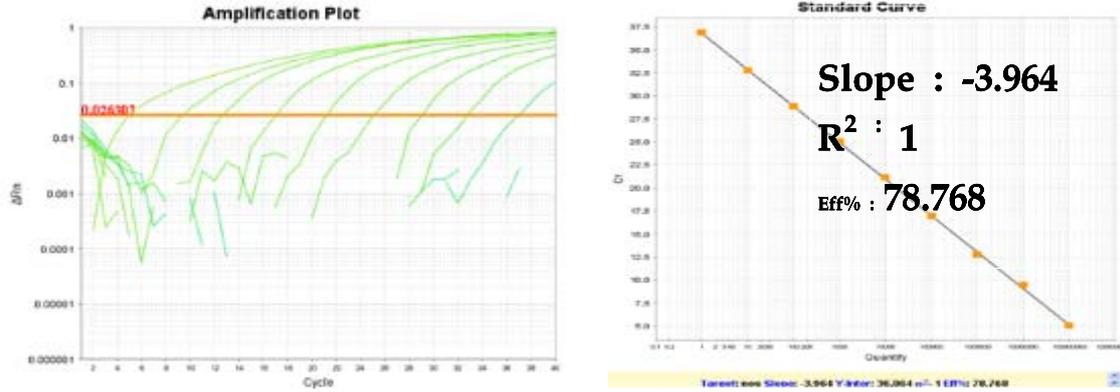


Figure 52-1. Sensitivity test of Nos primer with 10-fold serial dilutions

(다) 비할랄 성분 (돼지, 개, 인체성분, Nos terminator)의 Conventional PCR과 real-time PCR의 Sensitivity 비교

비할랄 성분 (돼지, 개, 인체성분, Nos terminator)을 십진 희석하여 Conventional PCR과 real-time PCR을 수행하였다. Table 20-1에 나타나는 바와 같이 돼지의 경우 Conventional PCR은  $1.14 \times 10^3$  copies/tube까지 검출하고 real-time PCR은 1.14copy/tube까지 검출하여 Conventional PCR보다 1000배 더 민감한 것으로 확인된다. 십진 희석된 개 DNA의 경우에는 Conventional PCR은  $1.24 \times 10^2$  copies/tube까지 검출하고 real-time PCR은 1.24copy/tube까지 검출하여 Conventional PCR보다 100배 더 민감한 것으로 확인되고, 십진 희석된 인체성분 DNA는 Conventional PCR은  $1.29 \times 10^3$  copies/tube까지 검출하고 real-time PCR은  $1.29 \times 10^1$  copies/tube까지 검출하여 Conventional PCR보다 100배 더 민감하다. 마지막으로 십진 희석된 GMO (Nos terminator) DNA는 Conventional PCR은  $2.02 \times 10^3$  copies/tube까지 검출하고 real-time PCR은  $2.02 \times 10^2$  copies/tube까지 검출하여 Conventional PCR보다 10배 더 민감한 것으로 확인된다. 4종의 비할랄 성분 모두 Conventional PCR보다 real-time PCR이 민감도가 우세한 것으로 확인된다.

Table 39-1. 비할랄 성분의 Conventional PCR와 real-time PCR의 Sensitivity 비교

비할랄 성분	Conventional PCR	real-time PCR
돼지	$1.14 \times 10^3$ copies/tube	1.14copy/tube
개	$1.24 \times 10^2$ copies/tube	1.24copy/tube
인체성분	$1.29 \times 10^3$ copies/tube	$1.29 \times 10^1$ copies/tube
GMO(Nos terminator)	$2.02 \times 10^3$ copies/tube	$2.02 \times 10^2$ copies/tube

[2차년도] 당근, 느타리버섯, 솔잎 추출물 및 이를 함유한 크림 제품에서 real-time PCR을 이용한 비할랄 DNA분석

(가) Real-time PCR을 이용한 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO) 확인

1차 년도에 설정한 primer와 probe를 이용하였다. Conventional PCR에 비해 real-time PCR의 감도가 10-100배 좋았다.

(나) (주) Chemland 크림제품(12종)의 비할랄 성분 real-time PCR detection

① (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 개 DNA real-time PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 dog specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. Real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix (Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Dog primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 95℃ 15초, 56℃ 30초 72℃ 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

Dog DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.24copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차년도 결과)

Figure 11-1과 Table 14-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 개유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

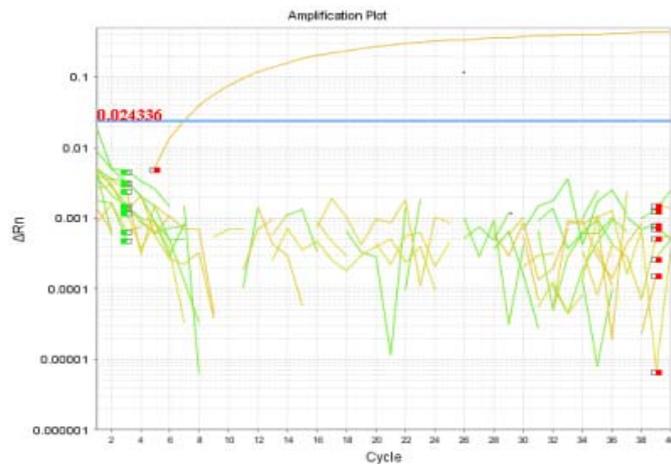


Figure 53-1. 크림제품(12종)의 비할랄 성분(개) real-time PCR test Result

Table 40-1. 크림제품(12종) PCR test with Dog - specific Primer set

	Positive control (dog)	cream			carrot			Mushroom			Pine needles		
		Facial	Multi	Antia ging	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL
Ct값	6.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no PCR product was formed

② (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 돼지 DNA real-time PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 pig specific primer를 이용하여 돼지 target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master

mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10  $\mu$ l, Pig primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1  $\mu$ l, template DNA 1  $\mu$ l를 넣은 후 최종부피가 20  $\mu$ l가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C 15초, 56°C 30초 72 °C 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

Pig DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.14copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차년도 결과)

figure 12-1과 Table 15-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 돼지유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

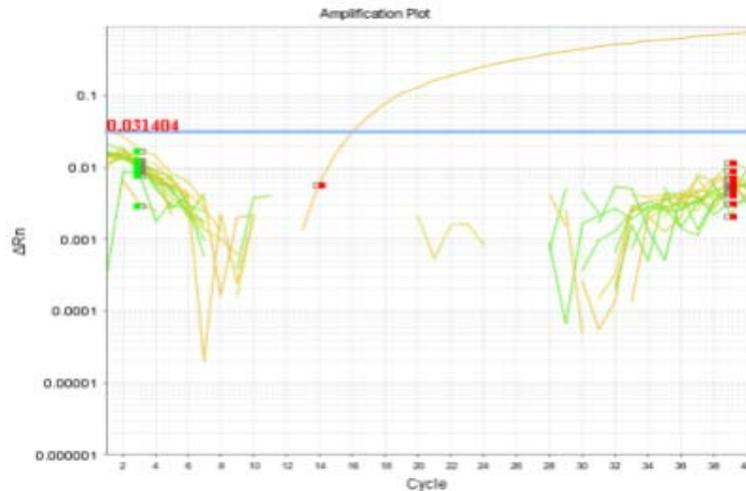


Figure 54-1. 크림제품(12종)의 비할랄 성분(돼지) real-time PCR test Result

Table 41-1. 크림제품(12종) PCR test with Pig - specific Primer set

	Positive control (pig)	cream			carrot			Mushroom			Pine needles		
		Facial	Multi	Antia ging	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL
Ct값	16.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no PCR product was formed

### ③ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 인간 DNA real-time PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 human specific primer를 이용하여 인간 target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10  $\mu$ l, Human primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1  $\mu$ l, template DNA 1  $\mu$ l를 넣은 후 최종부피가 20  $\mu$ l가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C 15초, 56°C 30초 72 °C 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

Human DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.29 copy/tube까지의 검출한계를 확

인하였다.(1차 년도 결과)

figure 13-1과 Table 16-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 DNA 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 인간유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

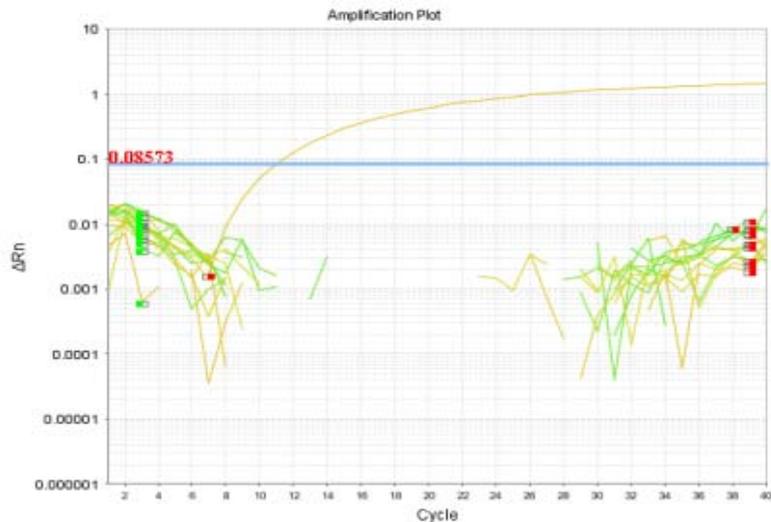


Figure 55-1. 크림제품(12종)의 비할랄 성분(인간) real-time PCR test Result

Table 42-1. 크림제품(12종) PCR test with Human - specific Primer set

	Positive control (Human)	cream			carrot			Mushroom			Pine needles		
		Facial	Multi	Antia ging	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL
Ct값	11.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no PCR product was formed

④ (주) Chemland에서 제공된 크림제품(12종)의 GMO(Nos) DNA real-time PCR detection

제공된 크림제품 12종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 Nos specific primer를 이용하여 GMO-Nos target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Nos primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C 30초, 60°C 30초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다.

Nos DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 2.02×10<sup>2</sup> copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차 년도 결과)

Figure 14-1과 Table 17-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 DNA 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 GMO-Nos유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

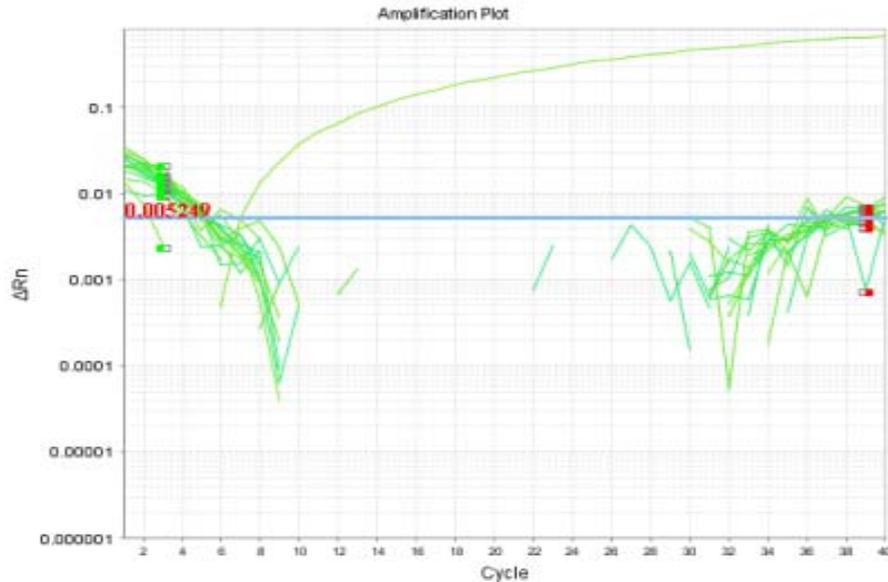


Figure 56-1. 크림제품(12종)의 비할랄 성분(GMO-Nos) real-time PCR test Result

Table 43-1. 크림제품(12종) PCR test with Nos - specific Primer set

	Positive control (Nos)	cream			carrot			Mushroom			Pine needles		
		Facial	Multi	Antia ging	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL	cream	ANFLA	SEL
Ct값	6.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no PCR product was formed

[3차 년도] 홍삼, 녹두 추출물과 이를 함유한 크림 제품에서 real-time PCR을 이용한 비할랄 DNA 분석

(가) Real-time PCR을 이용한 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO) 확인

real-time PCR 분석을 위해 사용된 비할랄 성분(돼지, 개, 인체성분, GMO -Nos terminator)에 대한 primer와 probe에 서열은 1, 2차년도에서 진행한 것과 동일하다.

(나) (주) Chemland 크림제품(12종)의 비할랄 성분 real-time PCR detection

① (주) Chemland에서 제공된 추출물 및 크림제품(13종)의 개 DNA real-time PCR detection

제공된 제품 13종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 dog specific primer를 이용하여 개 target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Dog primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 95℃ 15초, 56℃ 30초 72℃ 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. Dog DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.24copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차년도 결과) Figure 12-1과 Table 14-1에 나타난

바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 개유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

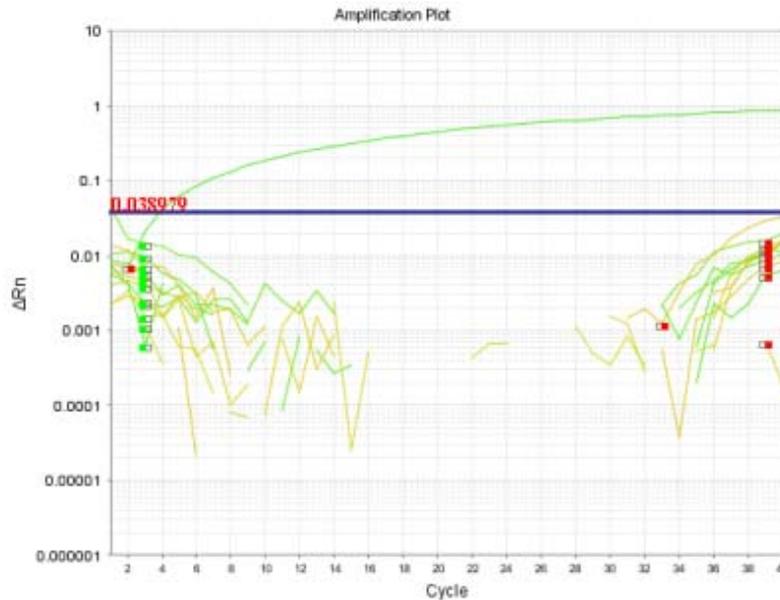


Figure 57-1. 추출물 및 크림제품(13종)의 비할랄 성분(개) real-time PCR test Result

Table 44-1. 추출물 및 크림제품(13종) PCR test with Dog - specific Primer set

	Positive control (Dog)	Red ginseng extract						Mung bean extract						
		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출		
		추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	
Ct값	17.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(-) no PCR product was formed

② (주)Chemland에서 제공된 추출물 및 크림제품(13종)의 돼지 DNA real-time PCR detection

제공된 제품 13종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 pig specific primer를 이용하여 돼지 target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Pig primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 95℃ 15초, 56℃ 30초 72℃ 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. Pig DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.14copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차 년도 결과)

Figure 13-1과 Table 15-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 돼지유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

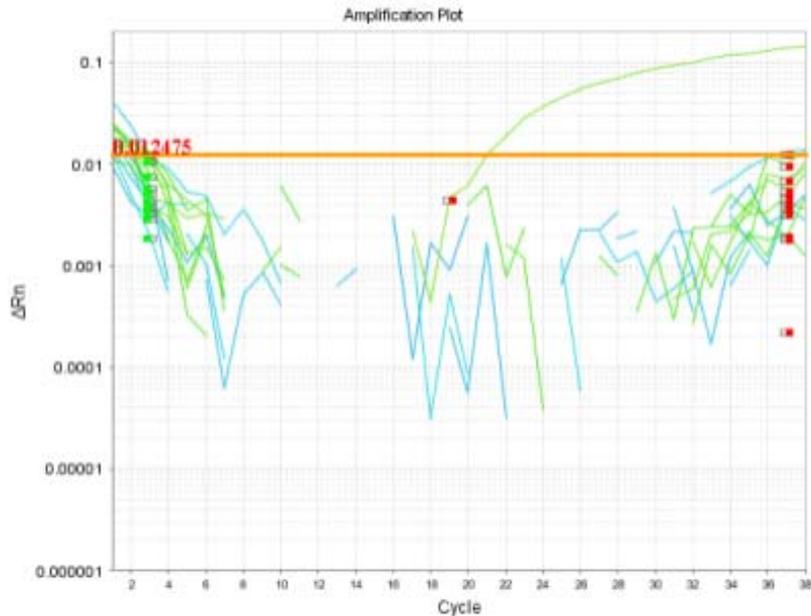


Figure 58-1. 추출물 및 크림제품(13종)의 비할랄 성분(돼지) real-time PCR test Result

Table 45-1. 추출물 및 크림제품(13종) PCR test with Pig - specific Primer set

	Positive control (Pig)	Red ginseng extract						Mung bean extract					
		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출	
		추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림
Ct값	21.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(-) no PCR product was formed

③ (주) Chemland에서 제공된 추출물 및 크림제품(13종)의 인간 DNA real-time PCR detection

제공된 제품 13종을 Kogene kit를 이용하여 DNA 추출 후 human specific primer를 이용하여 인간 target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Human primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C 15초, 56°C 30초 72 °C 27초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. Human DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과 1.29 copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차년도 결과)

Figure 14과 Table 16에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 DNA 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 인간유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

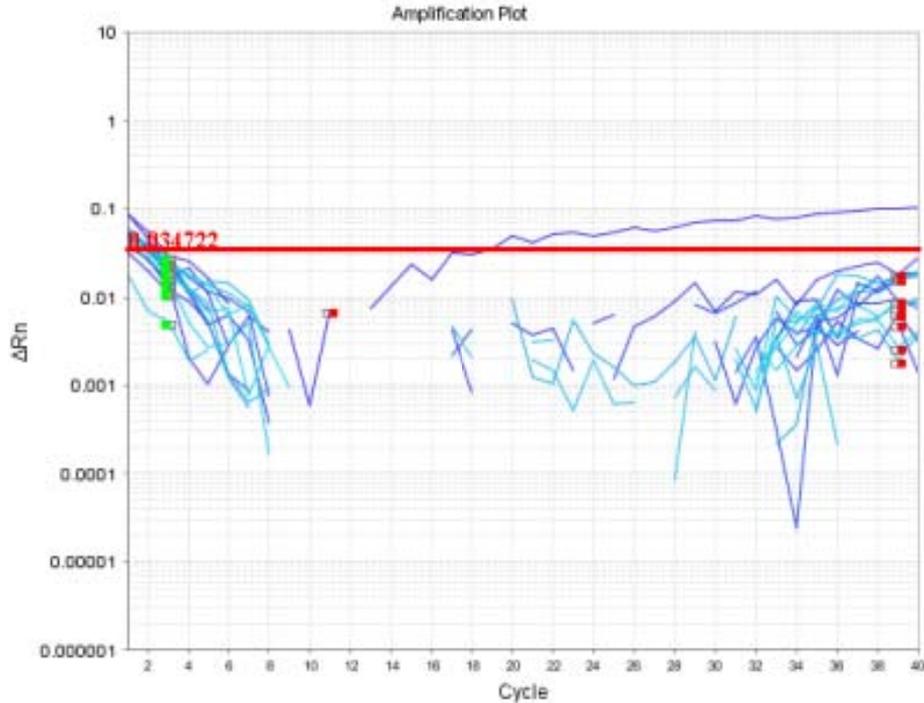


Figure 59-1. 추출물 및 크립제품(13종)의 비할랄 성분(인간) real-time PCR test Result

Table 46-1. 추출물 및 크립제품(13종) PCR test with Human - specific Primer set

	Positive control (Human)	Red ginseng extract						Mung bean extract					
		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출	
		추출물	크립	추출물	크립	추출물	크립	추출물	크립	추출물	크립	추출물	크립
Ct값	17.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(-) no PCR product was formed

④ (주) Chemland에서 제공된 추출물 및 크립제품(13종)의 GMO(Nos) DNA real-time PCR detection 제공된 제품 13종을 Kogene kit를 이용하여 DNA추출 후 Nos specific primer를 이용하여 GMO-Nos target gene이 검출되는지 확인한다. real-time PCR 분석은 Applied Biosystem사의 StepOne™ Real-time PCR system을 사용하여 수행하였다. 0.2 ml PCR strip tube에 2× master mix(Universal PCR Master Mix, ABI, USA) 10 μl, Nos primer set(10P mol)과 Probe(5P mol) 각각 1 μl, template DNA 1 μl를 넣은 후 최종부피가 20 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하여 반응액을 제조하였다.

Real-time PCR 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분 반응 후 95℃ 30초, 60℃ 30초를 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. Nos DNA를 십진 희석하여 real-time PCR을 수행한 결과  $2.02 \times 10^2$  copy/tube까지의 검출한계를 확인하였다.(1차년도 결과)

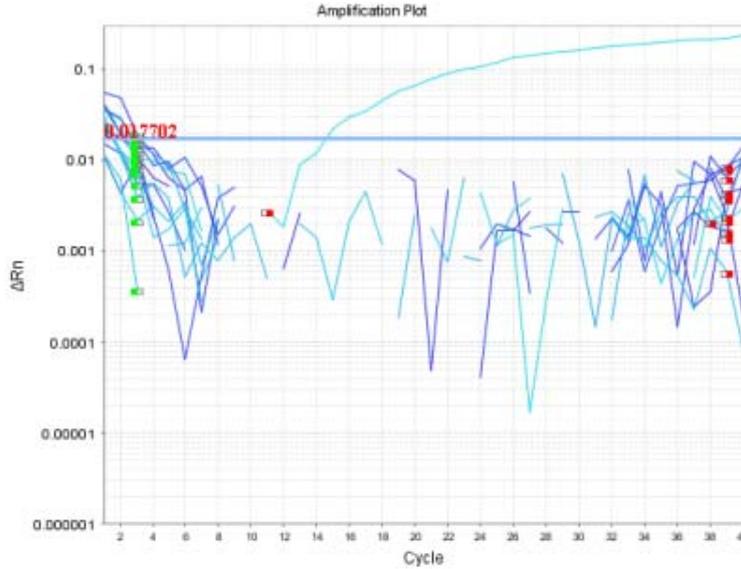


Figure 60-1. 추출물 및 크림제품(13종)의 비할랄 성분(GMO-Nos) real-time PCR test Result

Figure 15-1과 Table 17-1에 나타난 바와 같이 Positive control에서만 target gene이 증폭되었고 Sample은 DNA 증폭이 감지되지 않았다. 이 결과로 보아 (주) Chemland 크림제품에 비할랄 성분인 GMO-Nos유래 물질은 없는 것으로 확인된다.

Table 47. 추출물 및 크림제품(13종) PCR test with Nos - specific Primer set

	Positive control (Nos)	Red ginseng extract						Mung bean extract					
		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출		열수 추출		파파인 처리		브로멜라인 추출	
		추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림	추출물	크림
Ct값	14.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no PCR product was formed

#### (4) 화장품에서 알코올 분석

##### [1차 년도] 마스크팩 제품에서 알코올 분석

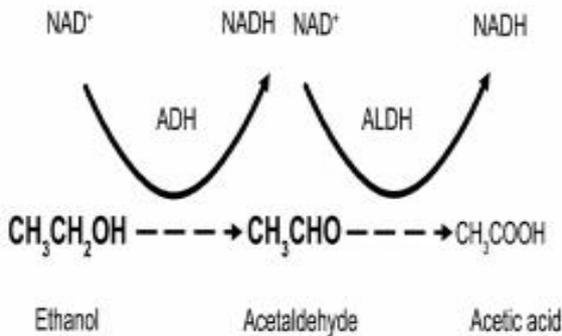
혼합물 중 특정 성분의 정량 및 정성 분석에 주로 쓰이는 Gas chromatography는 이동상 기체가 Column을 따라 흐르면서 분리되어 나오는 시간차 (Retention Time, RT)에 따라 혼합물을 분리하게 된다. 샘플 중 에탄올 성분의 검출을 위해 비슷한 RT를 가지는 내부표준물질을 설정한 뒤 기기와 분석 방법을 설정하고 실험 조건을 확립하였다. 분석에 사용할 Column을 결정하고 샘플의 전처리 조건을 확립한 후, 재현성, 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀성을 구하였다. 여러 결과를 통해 종합적으로 판단하여 본 방법이 알코올 분석에 적합하지 확인한 후, 주관기관인 Chemland로부터 제공받은 마스크팩 샘플 중 에탄올성분의 분석을 진행하였다.

##### (가) 효소를 이용한 모델링 마스크팩의 알코올의 분석

###### ① 분석법 확립(효소법)

계획서에 언급된 것처럼 일단 Alcohol dehydrogenase 및 acetaldehyde dehydrogenase를 이용하는 효소법을 연구에 적용하였다. 효소법은 두 단계의 효소 반응을 통하여 최종적으로 증가한 NADH의 양을 흡광도로 측정함으로써 샘플 중 에탄올의 양을 산출하는 방법이다. 효소를 이용한 방법의 간단한 모식도는 다음과 같고 실험 조건은 아래 표와 같다.

Figure 61. 효소를 이용한 알코올 분석법의 모식도



Wavelength	340 nm
Cuvette	1cm light path (glass or plastic)
Temp.	20~25°C
Final Volume	2.57mL
Sample Solution	0.25~12 $\mu\text{g}$ of ethanol per cuvette (in 0.1~2.00 ml sample)

Table 48-1. 효소를 이용한 알코올 분석법 조건

실험방법은 분석하고자 하는 시료에 ALDH와 buffer  $\text{NAD}^+$ 를 먼저 투입하여 흡광도를 측정한 것을 A(1)로 설정하였고, 그 후에 ADH를 연속으로 투입하여 반응시킨 후 측정한 흡광도를 A(2)로 설정하여 최종적으로 시료속의 알코올 농도를  $A(2) - A(1)$ 값인  $\Delta A$ 로 나타내어 Lambert-beer 관계식에 대입하여 흡광도로 농도를 구하였다.

측정된 흡광도로 에탄올의 농도를 계산할 때에는 Lambert-beer's law를 사용하였다.

$$C = \frac{V \times MW}{e \times d \times v \times 2} \times \Delta A \times F$$

$V$  = 최종 부피 (mL)  
 $MW$  = 에탄올의 물질량 (g/mol), 46.07  
 $e$  = 340nm에서의 NADH의 몰 흡광계수, 6300(1/mol x cm)  
 $d$  = 큐벳 길이, 1cm  
 $v$  = 사용한 샘플 양 (mL)  
 $2$  = 1mole의 에탄올에서 생성된 2mole의 NADH  
 $\Delta A$  =  $A_2 - A_1$   
 $F$  = Dilution Factor

자세한 실험방법은 아래의 표를 참고하여 진행하였다.

Table 49-1. 효소를 이용한 알코올 분석방법

Pipette into cuvette	Blank	Sample
Distilled Water	2.10 ml	2.00 ml
Sample	-	0.10 ml
Solution1 (Buffer)	0.20 ml	0.20 ml
Solution2 ( $\text{NAD}^+$ )	0.20 ml	0.20 ml
Solution3 (Aldehyde dehydrogenase)	0.05 ml	0.05 ml

피펫을 이용하여 위의 표와 같이 큐벳에 용액을 담고 각 용액이 잘 섞이도록 parafilm을 이용하여 큐벳을 덮고 흔들어 섞어 균질화한 후, 흡광도를 측정하고(A1) 약 2분 후에 Solution 4를 첨가하여 다음 반응을 진행하였다.

Solution4 (Alcohol dehydrogenase)	0.02mL	0.02mL
-----------------------------------	--------	--------

위와 같은 방법으로 용액을 잘 섞어 반응이 충분히 일어나도록 5분 정도 방치한 뒤 흡광도를 측정하였다(A2).

### ② 샘플의 전처리

효소법을 이용하여 샘플 중 에탄올을 정확하게 정량하기 위해서는 sample에 함유된 에탄올의 양이 검출 가능하도록 정해진 범위 내에 들어가도록 적절히 희석하는 것이 중요하였다. 샘플 0.1mL를 기준으로 검출할 수 있는 에탄올의 양이 0.25 $\mu$ g ~12 $\mu$ g 범위이기 때문에 최종적으로 샘플 중 알코올이 얼마나 함유되어 있는지에 상관없이 0.01~0.12g/L의 농도를 띠도록 샘플을 희석해주어야 했다. 샘플의 희석은 다음의 표와 같이 진행하였다.

Table 50. 효소를 이용한 알코올 분석 시 샘플의 희석

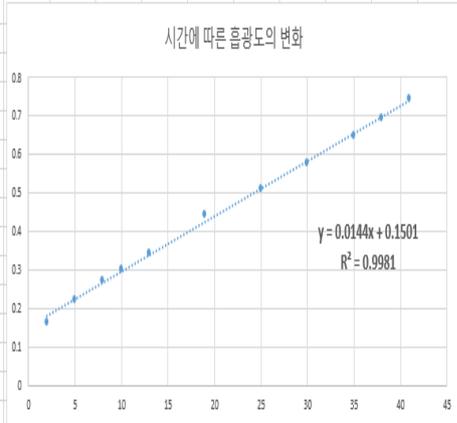
Estimated concentration of Ethanol(g/L)	Dilution with water	Dilution factor(F)
0.01 - 0.12	희석이 필요하지 않음	1
0.12 - 1.2	1+9	10
1.2 - 12.0	1+99	100
12.0 - 120	1+999	1000
>120	1+9999	10000

희석하는 단계에서 만약  $\Delta A$ 의 값이 0.1보다 작은 경우에는 Sample의 양을 늘리거나 희석을 덜 해야 했으며 샘플의 양이 늘어나도 샘플 중 포함된 Ethanol의 양이 일정한 범위 내에 속해야 하므로 희석하는 단계에서 희석 배수에 주의해야 했다.

### ③ 효소법의 보완사항

효소법을 이용하여 샘플 중 에탄올을 측정하는 방법은 반응완료까지 소요되는 시간이 5분정도로 짧으며 복잡한 전처리를 필요로 하지 않고 분석의 민감도가 높다는 장점이 있었다. 하지만 온도에 민감한 효소를 이용하는 반응이다보니 여러 샘플을 동시에 다루는 경우에 모든 샘플의 온도를 정해진 시간 동안 균일하게 맞춰주는 점이 어려웠고 이는 예상과는 다른 결과를 만들어냈다. 또한 시간에 따른 효소의 반응성이 균일하지 않아 같은 샘플을 이용하여 분석하는 경우에 그 값이 일정하지 않아 결과적으로 계산하여 나온 값이 일치하지 않았다. 특정 알코올 농도를 띠도록 자체적으로 제작한 샘플을 이용하여 예비 실험을 진행했을 때, 아래에서 보는 그래프와 같이 작은 온도 변화가 흡광도의 차이를 만들어냈고 이를 계산식에 대입하여 샘플 중 알코올 농도를 추정했을 때 실제로 사용한 알코올 샘플의 농도와 일치하지 않는 결과를 보였다.

시간	2	5	8	10	13	19	25	30	35	38	41
흡광도	0.162	0.22	0.269	0.301	0.342	0.441	0.511	0.577	0.647	0.693	0.744



시간	2	5	8	10	13	19	25	28	30	33	35	38	41
흡광도	0.172	0.233	0.313	0.355	0.411	0.515	0.620	0.691	0.736	0.785	0.826	0.873	0.932

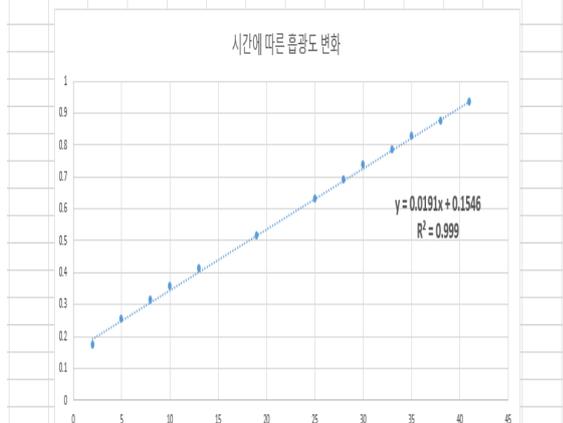


Figure 62-1. 효소법을 이용한 에탄올 분석 결과

위의 두 그래프는 효소법을 이용하여 샘플 중 에탄올 성분의 분석을 진행한 경우의 결과로 왼쪽의 경우는 30도에서 오른쪽은 37도에서 각각 진행한 결과이다. 같은 흡광도에 도달하기까지 30도에서는 25분이 걸렸고 37도에서는 20분이 채 걸리지 않았다. 이처럼 샘플을 분석하는 과정에서 매번 일정하게 온도를 유지하지 못한다면 최종적으로 측정된 흡광도 값( $\Delta A$ )이 달라지고 이는 실제와는 다른 에탄올 농도를 나타내게 된다. 따라서 효소법은 정확성을 요구하는 할랄인증을 받기 위한 분석법으로는 적합하지 않다고 판단하게 되었다.

또한 특정 농도를 띄는 에탄올 용액을 이용하여 시간에 따른 흡광도를 측정하여 분석의 기초가 되는 Standard curve를 작성하고 얻은 검량선을 토대로 분석하는 과정에서는, 얻은 결과값이 신뢰구간내에 들게 하기 위해서 한 샘플에 대해 최대 다섯 번의 회석을 한 후 실험을 진행해야했다. 샘플 중 함유된 에탄올의 농도가 특정범위 사이에 있어야만 최종적으로 결과 값을 산출하였을 때 신뢰할만한 결과로 인정할 수 있기 때문에, 분석할 샘플 중의 에탄올 농도를 모르는 경우에는 원액, 1/10, 1/100, 1/1000 그리고 1/10000배까지 회석을 한 후 작성된 검량선에 적용하여 결과 값을 내야하였다. 따라서 여러 샘플을 다루는 경우에 결과 산출 과정이 번거로워질 수 있고 시약이 낭비될 수 있다고 판단되었다. 타 분석법보다 기회비용이 적고 전처리가 필요 없어 빠르게 결과를 낼 수 있는 방법이라고 생각하여 분석법에 적용하려 했으나 차후 할랄인증을 위해서는 무엇보다도 정확성 높은 분석이 진행될 필요가 있다고 생각하여 기존에 많이 쓰이는 분석 방법인 Gas chromatography를 이용하여 분석을 진행하기로 결정하였다.

#### (나) GC를 이용한 모델링 마스크팩의 알코올 분석

혼합물 중 특정 성분의 정량 및 정성 분석에 주로 쓰이는 Gas chromatography는 이동상 기체가 Column을 따라 흐르면서 분리되어 나오는 시간차(RT)에 따라 혼합물을 분리하게 된다. 샘플 중 에탄올 성분의 검출을 위해 비슷한 RT를 가지는 내부표준물질을 설정한 뒤 기기와 분석 방법을 설정하고 실험 조건을 확립하였다. 분석에 사용할 Column을 결정하고 샘플의 전처리 조건을 확립한 후, 재현성, 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀성을 구하였다. 여러 결과를 통해 종합적으로 판단하여 본 방법이 알코올 분석에 적합한지 확인한 후, 주관기관인 Chemland로부터 제공받은 마스크팩 샘플 중 에탄올성

분의 분석을 진행하였다.

① GC Setting

사용한 GC는 Agilent사의 HP6890 model이며 기기 세팅은 다음과 같이 설정하였다.

Table 51-1. GC 분석 조건

GC oven	40°C에서 5분 holding 240°C까지 10°C/min 속도로 승온 240°C에서 9분 holding
Total running time	40분/cycle
GC Column Flow	1.0mL/min He (Constant flow)
GC Inlet Temperature	160°C
Split ratio	30:1
Column	DB-WAX(Agilent)

② FID detector

FID detector의 세팅 조건은 다음과 같이 설정하였다.

240°C, He 1mL/min, N2 30mL/min, air 400mL/min, H2 40mL/min
------------------------------------------------------------

③ Sample 전처리 조건 확립

Sample의 전처리는 다음과 같이 진행하였다. 제공받은 모델링 마스크팩 샘플 중 0.5g을 정량하여 추출용 용매 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 10mL와 섞는다. 1시간 동안 2000rpm에서 Stirring하여 성분을 추출하고 Centrifuge를 이용하여 1200rpm에서 10분동안 원심분리 한 후 상층액을 취하였다. 이를 Filter syringe(0.45um filter)를 사용하여 상층액을 한 번 거른 후, 걸러진 용액을 분석할 Sample로 이용하였다.

④ 결과

㉞ Standard curve 작성 및 R square값 확인

샘플의 분석 이전에 본 분석법의 신뢰성 확인을 위해 기초가 되는 분석을 진행하였다. 먼저 검량선의 작성을 위하여 일정한 농도를 띄는 에탄올 용액을 이용하여 진행하였다. 4차 증류수와 100% Ethanol시약을 이용하여 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm 그리고 200ppm의 농도를 띄는 에탄올 샘플을 제조하였다. 실험 결과의 정확성과 신뢰성을 위해서 분석하는 물질 외에 기준이 될 만한 Internal Standard(IS)를 선별하였다. 에탄올과 비슷한 특성을 나타내는 Methanol, Iso-butanol 그리고 2-propyl-alcohol을 이용하여 분석한 뒤 그 Peak를 비교하여 최종적으로 내부표준물질을 선정하였다. 에탄올의 Retention time인 5.6분과 큰 차이가 나지 않으면서 사용할 Column에 적합하여 peak의 흔들림 값이 적은 물질인 Iso-butanol을 최종적인 내부표준물질로 선정하였다. 검량선의 작성은 다음과 같이 진행하였다. 농도가 각각 다르게 설정된 5개의 에탄올 샘플에 같은 농도(20ppm)를 띄도록 내부표준

물질을 넣어주었다. 분석 후 얻어진 peak의 area값을 이용하여 검량선을 작성하였는데 이 때 Ethanol peak의 area의 직접 값이 아닌 Ethanol peak의 area 값과 Iso-butanol peak의 area값의 비율로써 검량선을 작성하였다.

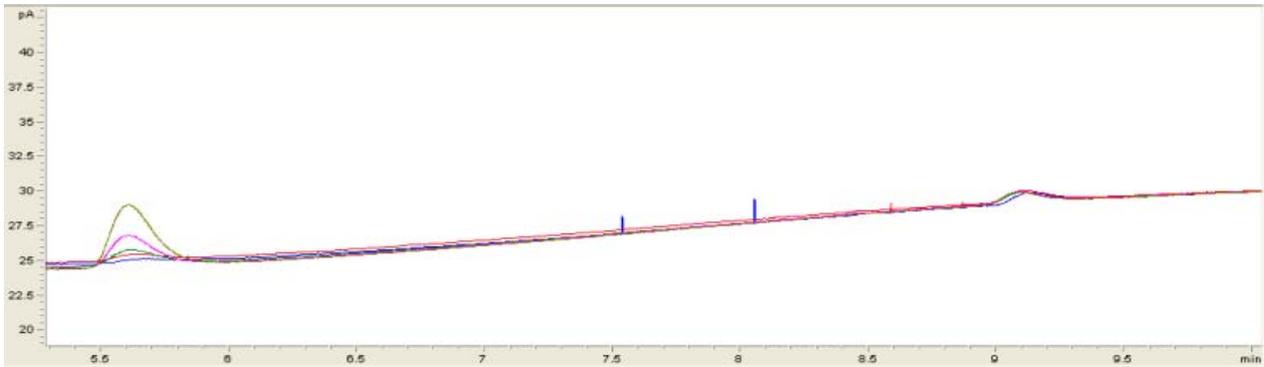


Figure 63-1. EtOH와 Iso-butanol의 standard chromatogram

위에서 보이는 peak와 같이 10ppm(Blue), 20ppm(Red), 50ppm(Green), 100ppm(Pink) 그리고 200ppm(Brown)까지 에탄올의 농도가 증가할수록 5.6분대에서 보이는 peak가 높아지는 것을 확인하였다. 또한 9.2분대의 peak는 20ppm을 띄도록 넣어준 내부표준물질, Iso-butanol의 peak인데 매 peak가 column의 흔들림 정도를 고려했을 때 매번 같은 area 값을 내는 것을 확인하였다. 얻어진 EtOH의 Area값을 Iso-butanol의 area의 값으로 나눈 후 그 값을 이용하여 검량선을 작성하였고 그 그래프는 아래와 같이 나타났다.

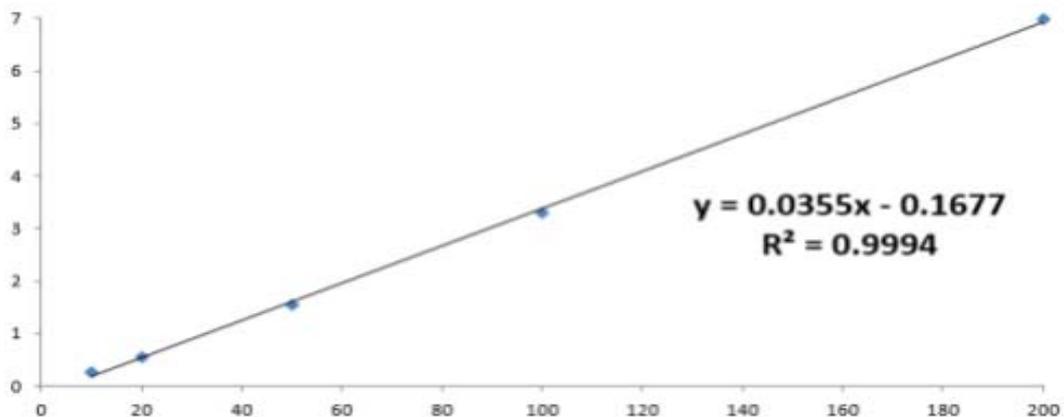


Figure 64-1. GC로 분석한 Ethanol standard curve

총 5개의 농도를 띄도록 에탄올 용액을 제조하여 분석을 진행하였고 10~200ppm의 농도 범위에서는 0.999 이상의 R square값을 얻어 신뢰성 있는 검량선을 얻을 수 있었다.

#### ㉔ 본 분석법의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 확인

실험의 재현성 및 정확성을 확인하기 위해 정량한계와 검출한계를 구하는 실험을 진행하였다. 실험방법은 기본적으로 반복실험을 바탕으로 하고 결과의 표준편차를 이용하여 값을 도출하는 Sigma법을 이용

하였다. 한계지점을 임의로 설정하고 그 농도 범위 근처에서 반복 실험을 진행하였다. 이번 분석에서는 10ppm 농도의 알코올 용액을 이용하여 총 5반복을 진행하였다. 검량선을 작성하는 과정에서처럼 결과로 얻은 EtOH peak의 area값을 Iso-butanol peak의 area값으로 나누어 ratio를 얻었다. 그 ratio의 표준편차를 구한 뒤 미리 작성된 검량선의 기울기 값(a)으로 나누어 주었다. 검량선의 기울기는 위에서 첨부한 검량선의 1차식에서의 a값인 0.0355을 말한다. 5반복하여 얻어진 결과 값은 다음과 같았다.

Table 52-1. GC의 LOD, LOQ 값

	1	2	3	4	5
<b>EtOH</b>	2.03393	2.25885	1.98229	2.25911	2.69098
<b>Iso-butanol</b>	8.38294	8.1021	7.95157	7.74198	7.85262
<b>Ratio</b>	0.2426273	0.2787981	0.2492954	0.2918	0.3426856

이후 정해진 방법을 따라 LOD와 LOQ를 산출하였다. 표준편차/Slope x 3.3은 LOD(검출한계), 표준편차/Slope x 10은 LOQ(정량한계)로써 결과를 얻을 수 있었다.

위의 표와 계산식을 바탕으로 본 GC 분석법의 LOD 와 LOQ를 구했을 때 그 값은 각각 3.72ppm 및 11.29ppm이었다. 이 값은 본 분석방법을 통해 정량 할 수 있는 에탄올의 최저 농도가 11.29ppm이라는 것과 에탄올의 함유 여부를 판단할 수 있는 정성적 분석의 한계가 3.72ppm이라는 것을 의미하였다.

㉔ 분석법의 Recovery(회수율) 및 Precision(정밀성) 확인

정확성 및 정밀성은 Spiking test를 바탕으로 진행하였다. 농도를 알고 있는 에탄올 용액(10ppm, 50ppm 그리고 100ppm)을 주관기관으로부터 제공받은 샘플에 고의적으로 넣어준 후, 최종적으로 그 샘플을 전처리 하고 GC분석 하여 최종적으로 얻은 peak와 예상했던 peak의 값을 비교하여 회수율과 정밀성의 값을 계산하였다. 이를 통해 본 분석법을 실제 샘플에 적용했을 때 결과 값이 저해를 받는지, 예상했던 area의 값이 얻어지는 지를 값으로 확인하였다. 아래의 표에서 보는 바와 같이 10ppm의 에탄올 용액을 샘플에 3번 Spiking해주었고 나온 area의 값을 비례적으로 적용하여 에탄올 농도를 구하여 보았을 때 각각 11.48, 11.77, 11.94 ppm의 값을 얻을 수 있었다. 얻어진 값의 평균을 구하여 100을 곱하면 평균 회수율이 얻어지며 이는 정확성의 값이 되는데 10ppm의 경우에는 117.32%의 결과가 나왔다. 마찬가지로 50ppm 농도의 에탄올 용액을 샘플에 고의적으로 Spiking해주었고 3반복 후 결과 값은 각각 48.51 47.55 44.84ppm으로 나타났다. 따라서 평균 회수율, 즉 정확성은 50ppm의 경우 93.93%으로 나타났다. 100ppm농도의 에탄올 용액을 Spiking해준 경우에는 94.47%의 정확성을 나타냈다. 정밀성은 정확성의 값으로 산출하는 값으로 회수율의 표준편차를 평균으로 나눈 후 100을 곱한 값으로 나타낸다. 본 실험법에서는 10ppm의 경우에는 1.97%, 50ppm의 경우에는 4.05% 그리고 100ppm의 경우에는 6.26%를 나타내었다. 종합적으로 보았을 때 정확성은 93.93~117.32%, 정밀성은 1.97~6.27%로 나타나 Validation 표준작업지침서상 기준인 80~120%(정확도), 20%이내(정밀성) 범위에 들어 분석법의 신뢰도에는 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 53-1. GC의 Recovery, Precision 값

Recovery	EtOH	Iso-butanol	Con(ppm)	Spike(ppm)	Recovery(%)	Recovery average(%)	Precision(%)
Original 10 ppm	2.15869	9.01928	11.48	10	114.82	117.32	1.97
	2.14063	8.57314	11.77	10	117.74		
	2.06690	8.08817	11.94	10	119.40		
Original 50 ppm-1	12.73050	8.20233	48.51	50	97.02	93.93	4.05
	12.12490	7.98810	47.55	50	95.09		
	11.69260	8.22313	44.84	50	89.68		
Original 100 ppm-1	24.68630	7.42742	98.48	100	98.48	94.47	6.27
	25.18860	7.67815	97.27	100	97.27		
	25.96940	8.83237	87.67	100	87.67		

⑤ 확립한 GC분석법을 이용한 모델링 마스크팩의 알코올 분석 결과



Figure 65-1. 샘플의 Chromatogram

주관기관으로부터 제공받은 모델링 마스크팩 샘플 중에 에탄올이 함유되어 있는지 알아보기 위하여 위에서 확립한 분석법을 실제로 적용하여 실험을 진행하였고 결과는 다음과 같았다.

본 실험의 검출한계가 3.72ppm이라는 것을 바탕으로 결과를 보았을 때 5.6분대에서는 어떤 peak도 발견되지 않았다. 20ppm의 농도를 띄게 하여 함께 넣어준 내부표준물질의 peak는 동일하게 같은 RT 값을 가지며 peak를 보였다. 따라서 제공받은 샘플에는 에탄올이 들어있지 않은 것으로 볼 수 있다.

[2차 년도] GC를 이용한 당근, 느타리버섯, 솔잎 추출물과 이를 함유한 크림 화장품의 알코올 분석

본 연구에서는 협약시 제출한 사업계획서의 내용을 바탕으로 주관기간인 케미랜드로부터 제공받은 당근 및 느타리버섯 추출물을 함유한 모델링마스크팩의 알코올 분석을 진행하였다. 진행한 분석방법으로 실험방법 및 조건을 확립한 후 샘플 분석을 진행하였다.

(가) GC Setting과 FID detector

GC와 FID detector의 세팅 조건은 1, 2차 년도와 같이 진행하였다.

(나) Sample 전처리 조건 확립

Sample의 전처리는 다음과 같이 진행하였다. 제공받은 모델링 마스크팩 샘플 중 0.5g을 정량하여 추출용 용매 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 10mL와 섞는다. 1시간 동안 2000rpm에서 Stirring하여 성분을 추출하고 Centrifuge를 이용하여 1200rpm에서 10분동안 원심분리 한 후 상층액을 취하였다. 이를 Filter syringe(0.45um filter)를 사용하여 상층액을 한 번 거른 후, 걸러진 용액을 분석할 Sample로

이용하였다.

## (다) 결과

### ① Standard curve 작성 및 R square값 확인

샘플의 분석 이전에 본 분석법의 신뢰성 확인을 위해 기초가 되는 분석을 진행하였다. 먼저 검량선의 작성을 위하여 일정한 농도를 띠는 에탄올 용액을 이용하여 진행하였다. 4차 증류수와 100% Ethanol시약을 이용하여 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm 그리고 200ppm의 농도를 띠는 에탄올 샘플을 제조하였다. 실험 결과의 정확성과 신뢰성을 위해서 분석하는 물질 외에 기준이 될 만한 Internal Standard(IS)를 선별하였다. 에탄올과 비슷한 특성을 나타내는 Methanol, Iso-butanol 그리고 2-propyl-alcohol을 이용하여 분석한 뒤 그 Peak를 비교하여 최종적으로 내부표준물질을 선정하였다. 에탄올의 Retention time인 5.6분과 큰 차이가 나지 않으면서 사용할 Column에 적합하여 peak의 흔들림 값이 적은 물질인 Iso-butanol을 최종적인 내부표준물질로 선정하였다. 검량선의 작성은 다음과 같이 진행하였다. 농도가 각각 다르게 설정된 5개의 에탄올 샘플에 같은 농도(20ppm)를 띄도록 내부표준물질을 넣어주었다. 분석 후 얻어진 peak의 area값을 이용하여 검량선을 작성하였는데 이 때 Ethanol peak의 area의 직접 값이 아닌 Ethanol peak의 area 값과 Iso-butanol peak의 area값의 비율로써 검량선을 작성하였다.

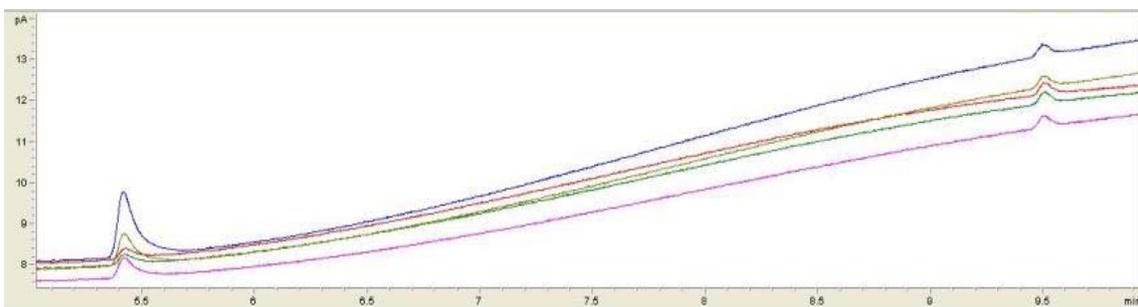


Figure 64-1. Ethanol and Iso-butanol peak of standard solution.

위에서 보이는 peak와 같이 10ppm(Blue), 20ppm(Red), 50ppm(Green), 100ppm(Pink) 그리고 200ppm(Brown)까지 에탄올의 농도가 증가할수록 5.4분대에서 보이는 peak가 높아지는 것을 확인하였다. 또한 9.5분대의 peak는 20ppm을 띄도록 넣어준 내부표준물질, Iso-butanol의 peak인데 매 peak가 column의 흔들림 정도를 고려했을 때 매 번 같은 area값을 내는 것을 확인하였다. 얻어진 EtOH의 Area값을 Iso-butanol의 area의 값으로 나눈 후 그 값을 이용하여 검량선을 작성하였고 그 그래프는 아래와 같이 나타났다.

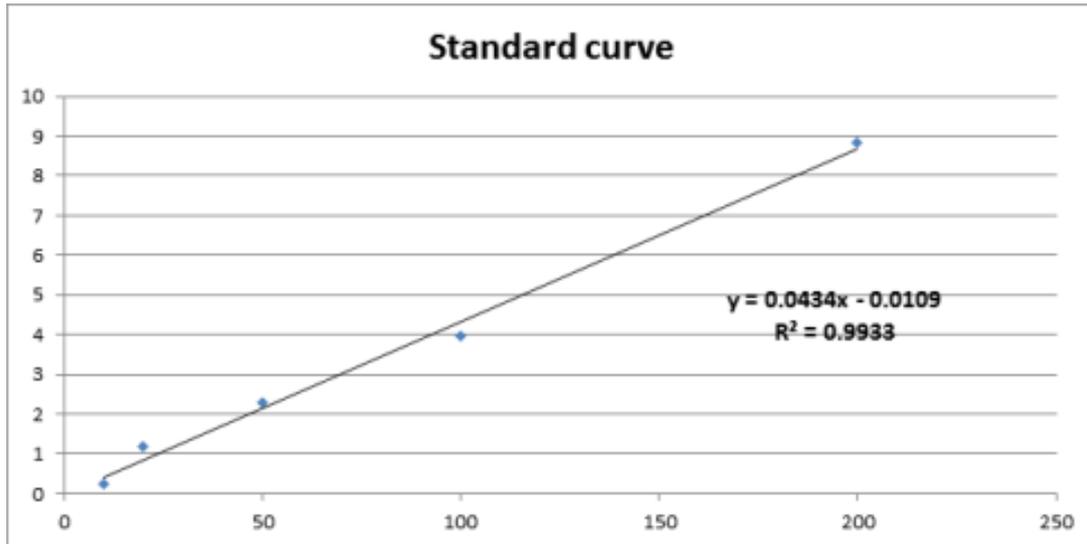


Figure 65-1. Standard curve

총 5개의 농도를 띄도록 에탄올 용액을 제조하여 분석을 진행하였고 10~200ppm의 농도 범위 에서는 0.99이상의 R square값을 얻어 신뢰성 있는 검량선을 얻을 수 있었다.

## ② 본 분석법의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 확인

실험의 재현성 및 정확성을 확인하기 위해 정량한계와 검출한계를 구하는 실험을 진행하였다. 실험방법은 기본적으로 반복실험을 바탕으로 하고 결과의 표준편차를 이용하여 값을 도출하는 Sigma법을 이용하였다. 한계지점을 임의로 설정하고 그 농도 범위 근처에서 반복 실험을 진행하였다. 이번 분석에서는 10ppm 농도의 알코올 용액을 이용하여 총 5반복을 진행하였다. 검량선을 작성하는 과정에서처럼 결과로 얻은 EtOH peak의 area값을 Iso-butanol peak의 area값으로 나누어 ratio를 얻었다. 그 ratio의 표준편차를 구한 뒤 미리 작성된 검량선의 기울기 값(a)으로 나누어 주었다. 검량선의 기울기는 위에서 첨부한 검량선의 1차식에서의 a값인 0.0434을 말한다. 5반복하여 얻어진 결과 값은 다음과 같았다.

Table 54-1. Peak area of standard solution (10 ppm of EtOH and Iso-butanol)

	1	2	3	4	5
<b>EtOH</b>	0.2906	0.24994	0.27893	0.2717	0.27306
<b>Iso-butanol</b>	1.00773	1.0726	1.08395	1.29113	1.34286
<b>Ratio</b>	0.28837	0.23302	0.25733	0.21043	0.20334

이후 정해진 방법을 따라 LOD와 LOQ를 산출하였다. 표준편차/Slope x 3.3은 LOD(검출한계), 표준편차/Slope x 10은 LOQ(정량한계)로써 결과를 얻을 수 있었다.

위의 표와 계산식을 바탕으로 본 GC 분석법의 LOD 와 LOQ를 구했을 때 그 값은 각각 **2.67ppm** 및 **8.09ppm**이었다. 이 값은 본 분석방법을 통해 정량 할 수 있는 에탄올의 최저 농도가 2.67ppm이라는 것과 에탄올의 함유 여부를 판단할 수 있는 정성적 분석의 한계가 8.09ppm이라는 것을 의미하였다.

### ③ 분석법의 Recovery(회수율) 및 Precision(정밀성) 확인

정확성 및 정밀성은 Spiking test를 바탕으로 진행하였다. 농도를 알고 있는 에탄올 용액(10ppm, 50ppm 그리고 100ppm)을 주관기관으로부터 제공받은 샘플에 고의적으로 넣어준 후, 최종적으로 그 샘플을 전처리 하고 GC분석 하여 최종적으로 얻은 peak와 예상했던 peak의 값을 비교하여 회수율과 정밀성의 값을 계산하였다. 이를 통해 본 분석법을 실제 샘플에 적용했을 때 결과 값이 저해를 받는지, 예상했던 area의 값이 얻어지는 지를 값으로 확인하였다. 아래의 표에서 보는 바와 같이 10ppm의 에탄올 용액을 샘플에 3번 Spiking해주었고 나온 area의 값을 비례적으로 적용하여 에탄올 농도를 구하여 보았을 때 각각 9.44, 8.77, 9.01 ppm의 값을 얻을 수 있었다. 얻어진 값의 평균을 구하여 100을 곱하면 평균 회수율이 얻어지며 이는 정확성의 값이 되는데 10ppm의 경우에는 90.72%의 결과가 나왔다. 마찬가지로 50ppm 농도의 에탄올 용액을 샘플에 고의적으로 Spiking해주었고 3반복 후 결과 값은 각각 41.90 42.56 42.73ppm으로 나타났다. 따라서 평균 회수율, 즉 정확성은 50ppm의 경우 84.79%로 나타났다. 100ppm농도의 에탄올 용액을 Spiking해준 경우에는 85.59%의 정확성을 나타냈다. 정밀성은 정확성의 값으로 산출하는 값으로 회수율의 표준편차를 평균으로 나눈 후 100을 곱한 값으로 나타낸다. 본 실험법에서는 10ppm의 경우에는 3.76%, 50ppm의 경우에는 1.03% 그리고 100ppm의 경우에는 1.73%를 나타내었다. 종합적으로 보았을 때 정확성은 84.79~85.59%, 정밀성은 1.03~3.76%로 나타나 Validation 표준작업지침서상 기준인 80~120%(정확도), 20%이내(정밀성) 범위에 들어 분석법의 신뢰도에는 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 55-1. Recovery and Precision

Recovery	EtOH	Iso-butanol	con(ppm)	Spike(ppm)	recovery(%)	Recovery average(%)	Precision(%)
Original 10 ppm	2.74663	6.53085	9.44	10	94.39	90.72	3.76
	2.53542	6.4789	8.77	10	87.66		
	2.53907	6.31669	9.01	10	90.11		
Original 50 ppm	11.70272	6.39697	41.90	50	83.80	84.79	1.03
	11.74253	6.32036	42.56	50	85.11		
	11.79305	6.3215	42.73	50	85.47		
Original 100 ppm	24.7173	6.65028	85.39	100	85.39	85.59	1.73
	24.75678	6.52553	87.16	100	87.16		
	24.66628	6.72744	84.23	100	84.23		

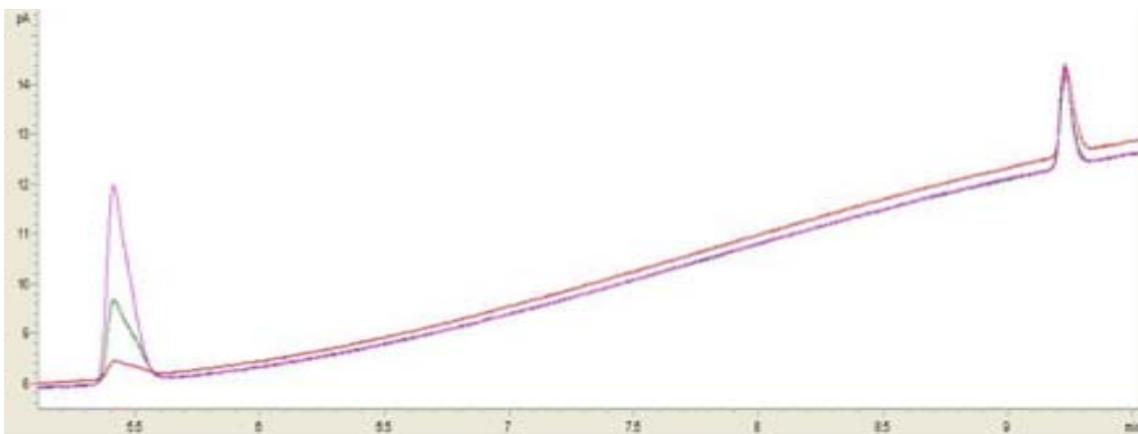
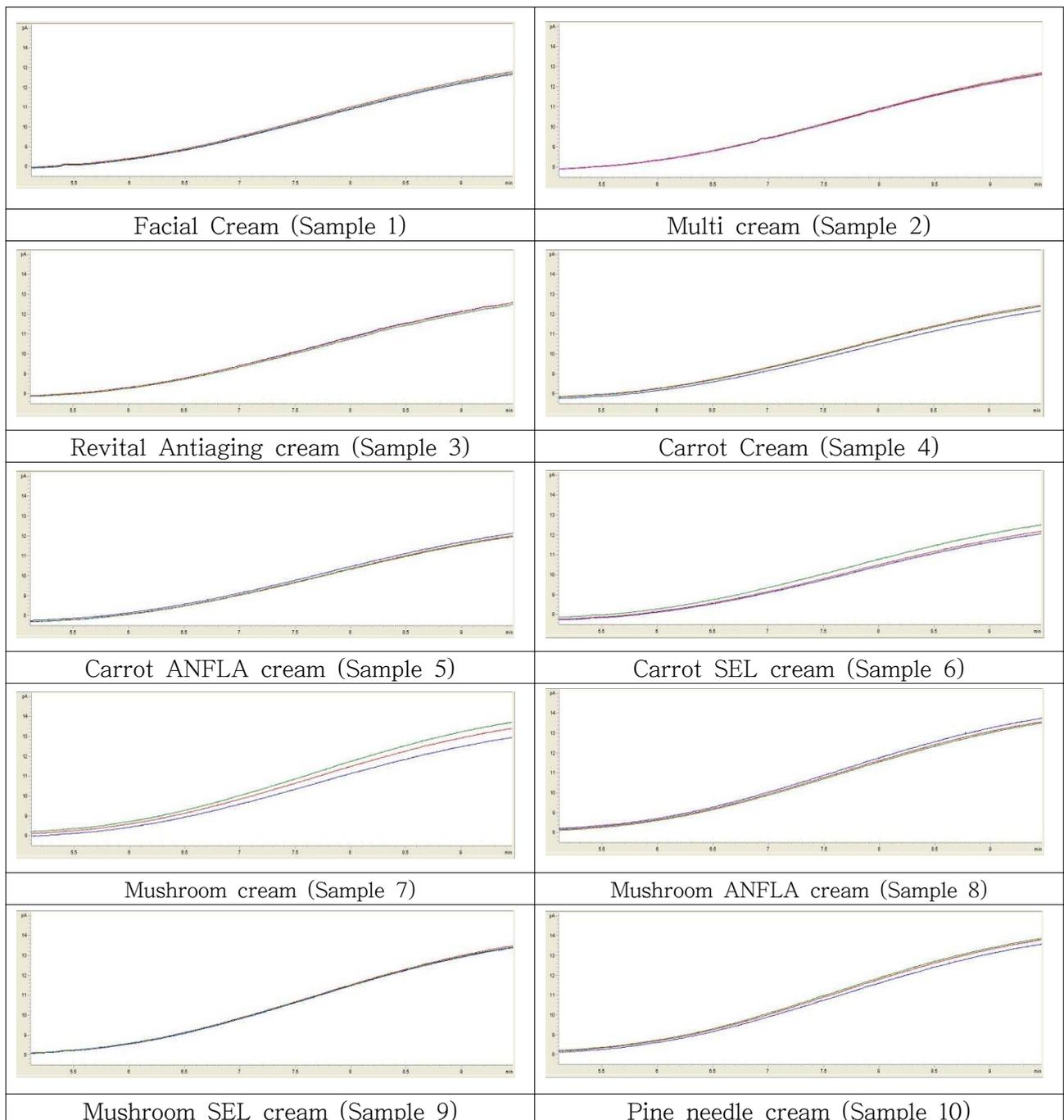


Figure 66-1. Peak area of spiked sample (10, 50, 100ppm of EtOH and 20ppm of iso-butanol)

④ 확립한 GC분석법을 이용한 크림제형 화장품의 알코올 분석 결과

주관기관으로부터 제공받은 모델링 마스크팩 샘플 중에 에탄올이 함유되어 있는지 알아보기 위하여 위에서 확립한 분석법을 실제로 적용하여 실험을 진행하였다. 샘플은 (주)Chemland에서 제공한 크림 제형 화장품 (12종)이었으며, 1: Facial Cream, 2: Multi Cream, 3: Revital Antiaging cream, 4: Carrot Cream, 5: Carrot ANFLA cream, 6: Carrot SEL cream, 7: Mushroom cream, 8: Mushroom ANFLA cream, 9: Mushroom SEL cream, 10: Pine needle cream, 11: Pine needle ANFLA cream, 12: Pine needle SEL cream [ANFLA: 브로멜라인 효소처리구, SEL: 파파인 효소 처리구] 순으로 GC 분석을 진행했다.



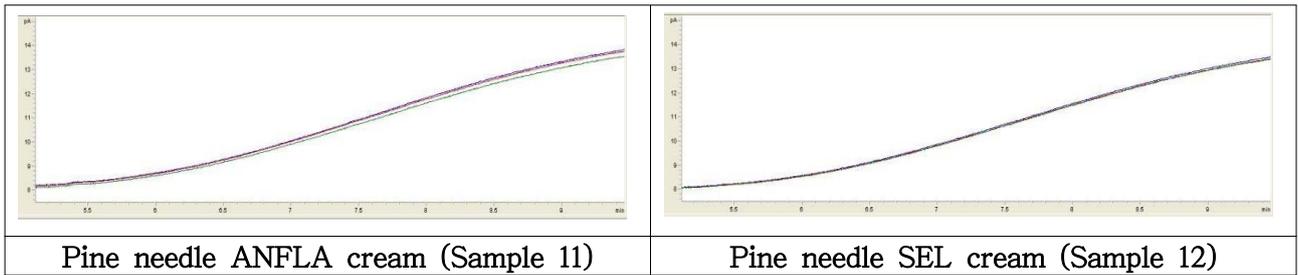


Figure 67-1. The results of Ethanol qualification by Gas Chromatography

본 실험의 검출한계가 2.67ppm이라는 것을 바탕으로 결과를 보았을 때 5.4분대에서는 Area를 나타내는 어떤 peak도 발견되지 않았다. 따라서 제공받은 샘플에는 에탄올이 들어있지 않은 것으로 결과를 처리하였다.

**[3차 년도] GC를 이용한 녹두, 홍삼 추출물과 이를 함유한 크림 화장품의 알코올 분석**

**(가) GC Setting**

사용한 GC는 Agilent사의 HP6890 model이며 기기 세팅 그리고 FID Detector의 조건은 1, 2차년도와 동일하게 진행하였다.

**(나) Sample 전처리 조건 확립**

Sample의 전처리는 다음과 같이 진행하였다. 제공받은 모델링 마스크팩 샘플 중 0.5g을 정량하여 추출용 용매 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 10mL와 섞는다. 1시간 동안 2000rpm에서 Stirring하여 성분을 추출하고 Centrifuge를 이용하여 1200rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 취하였다. 이를 Filter syringe(0.45um filter)를 사용하여 상층액을 한 번 거른 후, 걸러진 용액을 분석할 Sample로 이용하였다.

**(다) 결과**

**① Standard curve 작성 및 R square값 확인**

샘플의 분석 이전에 본 분석법의 신뢰성 확인을 위해 기초가 되는 분석을 진행하였다. 먼저 검량선의 작성을 위하여 일정한 농도를 띄는 에탄올 용액을 이용하여 진행하였다. 4차 증류수와 100% Ethanol시약을 이용하여 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm 그리고 200ppm의 농도를 띄는 에탄올 샘플을 제조하였다. 실험 결과의 정확성과 신뢰성을 위해서 분석하는 물질 외에 기준이 될 만한 Internal Standard(IS)를 선별하였다. 에탄올과 비슷한 특성을 나타내는 Methanol, Iso-butanol 그리고 2-propyl-alcohol을 이용하여 분석한 뒤 그 Peak를 비교하여 최종적으로 내부표준물질을 선정하였다. 에탄올의 Retention time인 5.6분과 큰 차이가 나지 않으면서 사용할 Column에 적합하여 peak의 흔들림 값이 적은 물질인 Iso-butanol을 최종적인 내부표준물질로 선정하였다. 검량선의 작성은 다음과 같이 진행하였다. 농도가 각각 다르게 설정된 5개의 에탄올 샘플에 같은 농도(20ppm)를 띄도록 내부표준물질을 넣어주었다. 분석 후 얻어진 peak의 area값을 이용하여 검량선을 작성하였는데 이 때 Ethanol peak의 area의 직접값이 아닌 Ethanol peak의 area 값과 Iso-butanol peak의 area값의 비율로써 검량

선을 작성하였다.

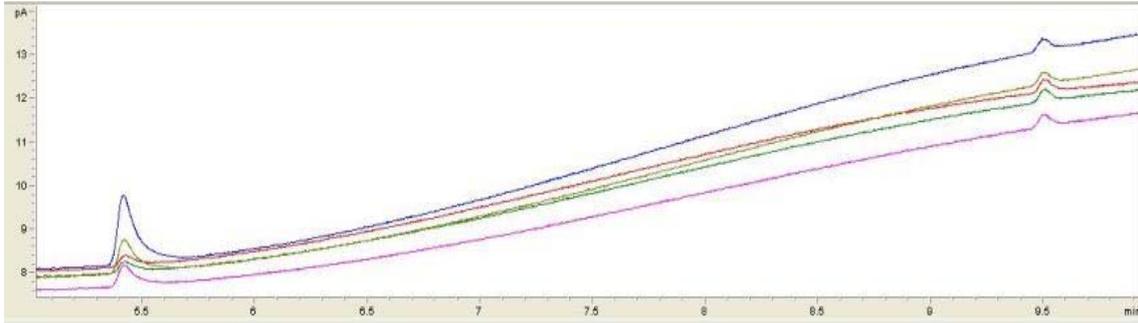


Figure 68-1. Ethanol and Iso-butanol peak of standard solution.

위에서 보이는 peak와 같이 10ppm(Blue), 20ppm(Red), 50ppm(Green), 100ppm(Pink) 그리고 200ppm(Brown)까지 에탄올의 농도가 증가할수록 5.4분대에서 보이는 peak가 높아지는 것을 확인하였다. 또한 9.5분대의 peak는 20ppm을 띄도록 넣어준 내부표준물질, Iso-butanol의 peak인데 매 peak가 column의 흔들림 정도를 고려했을 때 매 번 같은 area값을 내는 것을 확인하였다. 얻어진 EtOH의 Area값을 Iso-butanol의 area의 값으로 나눈 후 그 값을 이용하여 검량선을 작성하였고 그 그래프는 아래와 같이 나타났다.

총 5개의 농도를 띄도록 에탄올 용액을 제조하여 분석을 진행하였고 10~200ppm의 농도 범위에서는 0.99이상의 R square값을 얻어 신뢰성 있는 검량선을 얻을 수 있었다.

## ② 본 분석법의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 확인

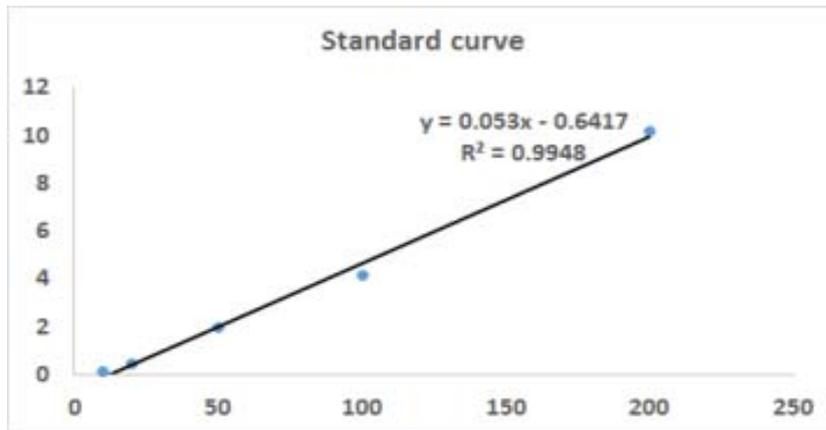


Figure 69-1. Ethanol and Iso-butanol Standard curve

실험의 재현성 및 정확성을 확인하기 위해 정량한계와 검출한계를 구하는 실험을 진행하였다. 실험방법은 기본적으로 반복실험을 바탕으로 하고 결과의 표준편차를 이용하여 값을 도출하는 Sigma법을 이용하였다. 한계지점을 임의로 설정하고 그 농도 범위 근처에서 반복 실험을 진행하였다. 이번 분석에서는 10ppm 농도의 알코올 용액을 이용하여 총 5반복을 진행하였다. 검량선을 작성하는 과정에서처럼 결과로 얻은 EtOH peak의 area값을 Iso-butanol peak의 area값으로 나누어 ratio를 얻었다. 그 ratio의 표준편차를 구한 뒤 미리 작성된 검량선의 기울기 값(a)으로 나누어 주었다. 검량선의 기울기는 위에서

첨부한 검량선의 1차식에서의 a값인 0.053을 말한다. 5반복하여 얻어진 결과 값은 다음과 같았다.

Table 56-1. Peak area of standard solution (10ppm of EtOH and Iso-butanol)

	1	2	3	4	5
EtOH	0.505	0.588	0.384	0.579	0.665
Iso-butanol	5.764	5.417	6.381	5.776	6.012
Ratio	0.087613	0.108547	0.06017866	0.100242	0.110612

이후 정해진 방법을 따라 LOD와 LOQ를 산출하였다. 표준편차/Slope x 3.3은 LOD(검출한계), 표준편차/Slope x 10은 LOQ(정량한계)로써 결과를 얻을 수 있었다.

위의 표와 계산식을 바탕으로 본 GC 분석법의 LOD 와 LOQ를 구했을 때 그 값은 각각 1.26ppm 및 3.83ppm이었다. 이 값은 본 분석방법을 통해 검출 할 수 있는 에탄올의 최저 농도가 1.26ppm이라는 것과 에탄올의 함유 여부를 판단할 수 있는 정량적 분석의 한계가 3.83ppm이라는 것을 의미하였다.

### ③ 분석법의 Recovery(회수율) 및 Precision(정밀성) 확인

정확성 및 정밀성은 Spiking test를 바탕으로 진행하였다. 농도를 알고 있는 에탄올 용액(10ppm, 50ppm 그리고 100ppm)을 주관기관으로부터 제공받은 샘플에 고의적으로 넣어준 후, 최종적으로 그 샘플을 전처리 하고 GC분석 하여 최종적으로 얻은 peak와 예상했던 peak의 값을 비교하여 회수율과 정밀성의 값을 계산하였다. 이를 통해 본 분석법을 실제 샘플에 적용했을 때 결과 값이 저해를 받는지, 예상했던 area의 값이 얻어지는 지를 값으로 확인하였다. 아래의 표에서 보는 바와 같이 10ppm의 에탄올 용액을 샘플에 3번 Spiking해주었고 나온 area의 값을 비례적으로 적용하여 에탄올 농도를 구하여 보았을 때 각각 11.75, 11.24, 11.70 ppm의 값을 얻을 수 있었다. 얻어진 값의 평균을 구하여 100을 곱하면 평균 회수율이 얻어지며 이는 정확성의 값이 되는데 10ppm의 경우에는 115.63%의 결과가 나왔다. 마찬가지로 50ppm 농도의 에탄올 용액을 샘플에 고의적으로 Spiking해주었고 3반복 후 결과 값은 각각 47.30, 47.40, 49.60 ppm으로 나타났다. 따라서 평균 회수율, 즉 정확성은 50ppm의 경우 96.09%으로 나타났다. 100ppm농도의 에탄올 용액을 Spiking해준 경우에는 91.86%의 정확성을 나타냈다. 정밀성은 정확성의 값으로 산출하는 값으로 회수율의 표준편차를 평균으로 나눈 후 100을 곱한 값으로 나타낸다. 본 실험법에서는 10ppm의 경우에는 2.41%, 50ppm의 경우에는 2.55% 그리고 100ppm의 경우에는 5.22%를 나타내었다. 종합적으로 보았을 때 정확성은 91.86~115.63%, 정밀성은 2.41~5.22%로 나타나 Validation 표준작업지침서상 기준인 80~120%(정확도), 20%이내(정밀성) 범위에 들어 분석법의 신뢰도에는 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 57-1. Method Validation 값

### ④ 확립한 GC분석법을 이용한 크림제형 화장품의 알코올 분석 결과

주관기관으로부터 제공받은 크림제형 화장품 샘플 중에 에탄올이 함유되어 있는지 알아보기 위하여 위에서 확립한 분석법을 실제로 적용하여 실험을 진행하였다. 샘플은 (주) Chemland에서 제공한 추출물 및 크림 제형 화장품 (13종)이었으며, 1: Cream, 2: 홍삼 열수 추출물 3:홍삼 브로멜라인 추출물, 4: 홍삼

파파인 추출물, 5: 녹두 열수 추출물, 6: 녹두 브로멜라인 추출물 7: 녹두 파파인 추출물, 8:홍삼 열수 추출물 함유 크림 9: 홍삼 브로멜라인 추출물 함유 크림, 10: 홍삼 파파인 추출물 함유 크림, 11: 녹두 열수 추출물 함유 크림, 12: 녹두 브로멜라인 추출물 함유 크림, 13: 녹두 파파인 추출물 함유 크림 순으로 GC 분석을 진행했다.

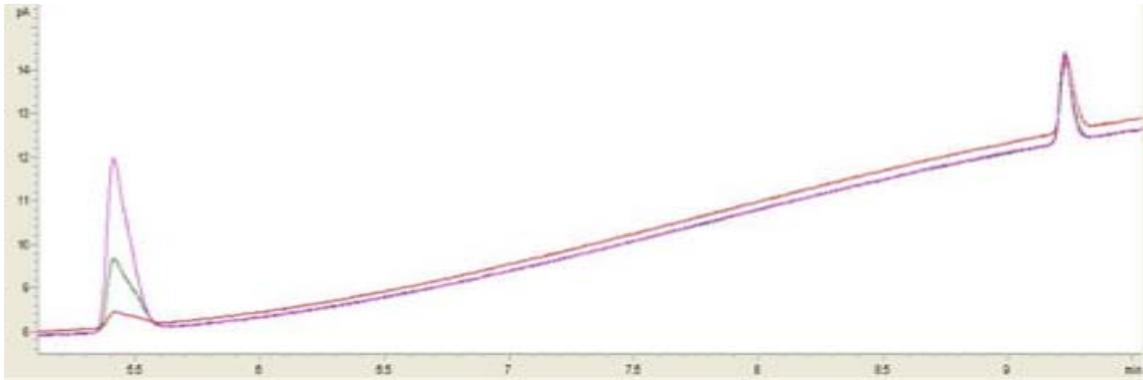
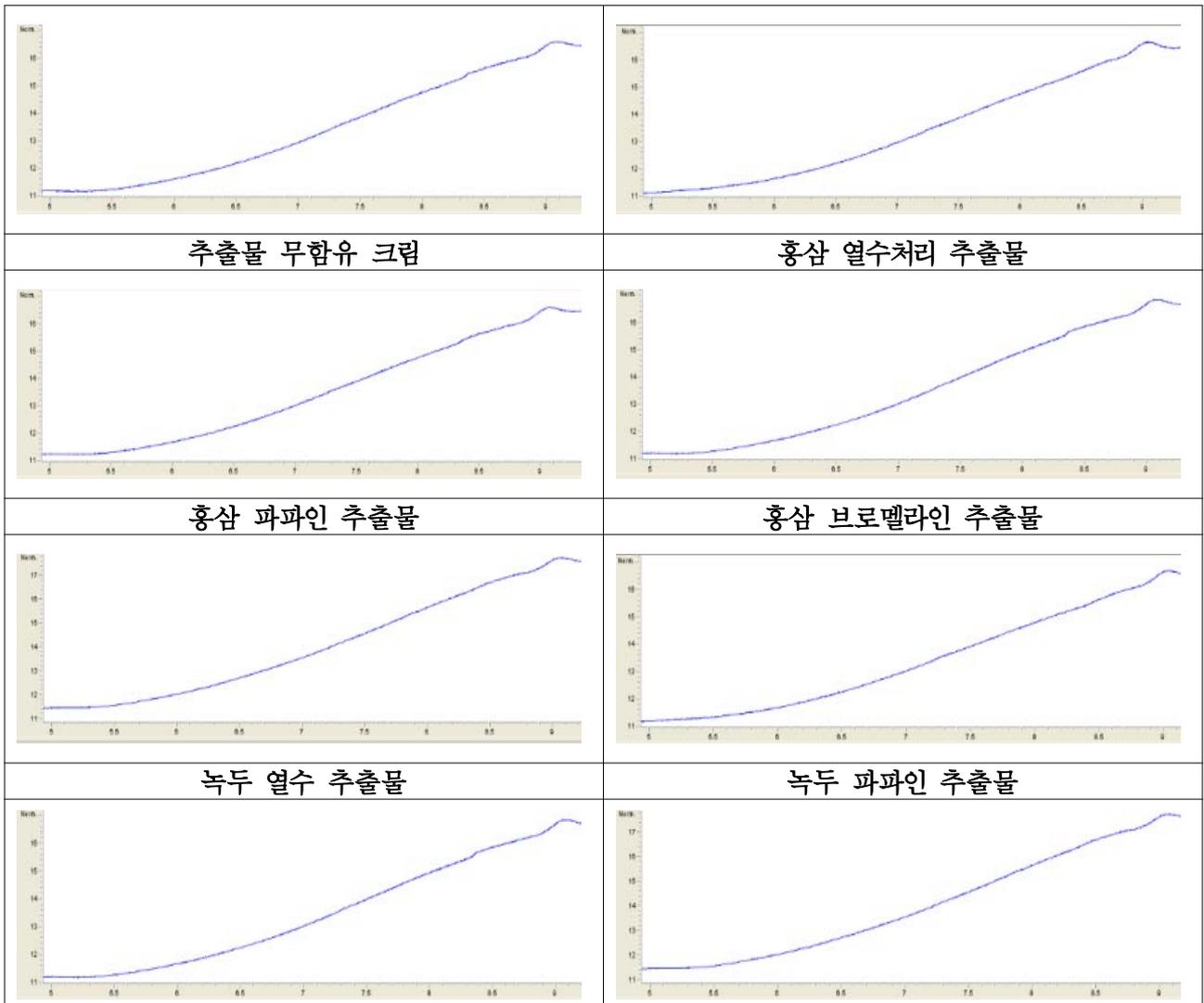


Figure 70-1. Peak area of spiked sample  
(10, 50, 100ppm of EtOH and 20ppm of Iso-butanol)



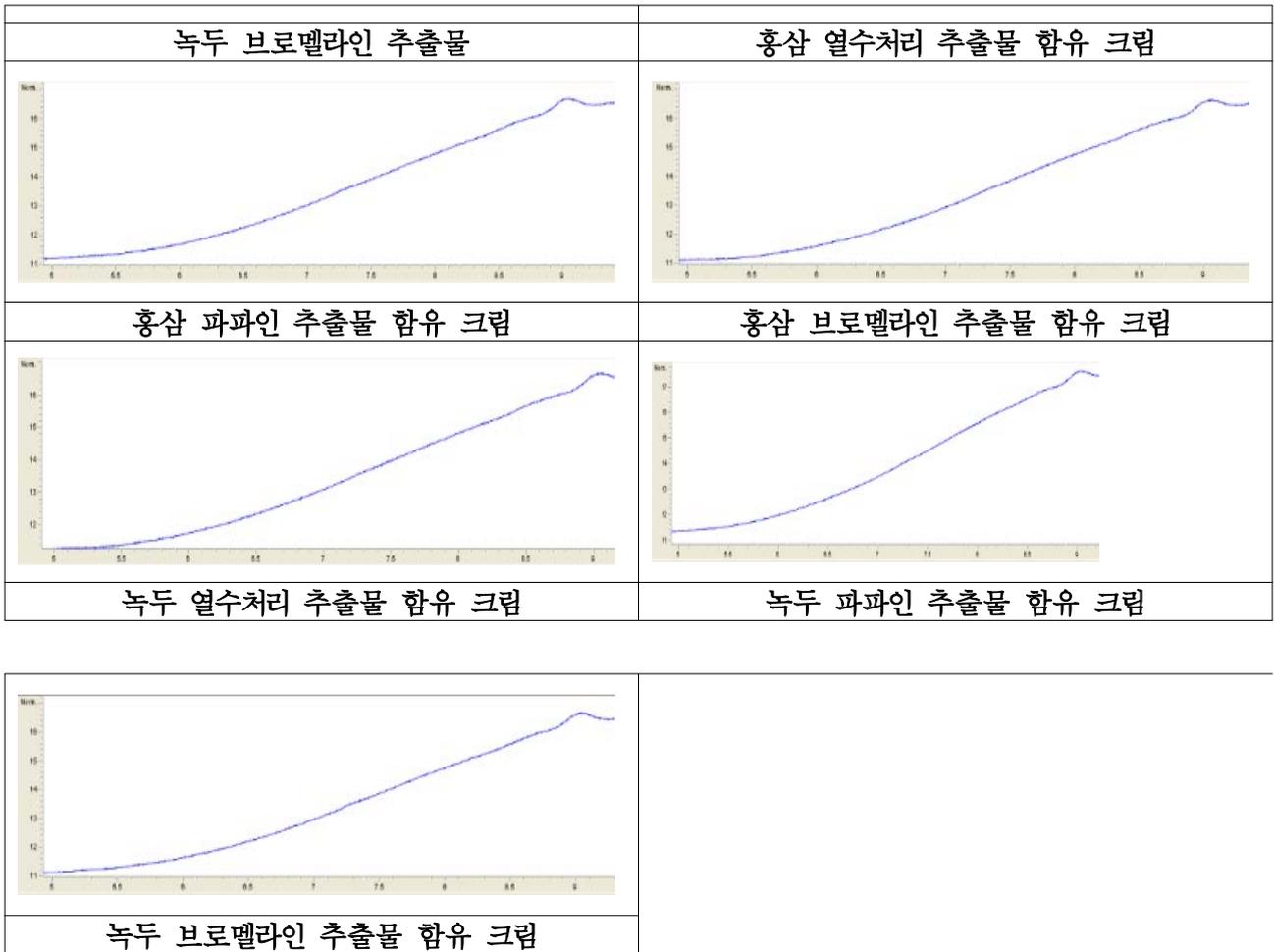


Figure. 71-1. The results of Ethanol qualification by Gas Chromatography

본 실험의 검출한계가 1.26ppm이라는 것을 바탕으로 결과를 보았을 때 5.4분대에서는 Area를 나타내는 어떤 peak도 발견되지 않았고 Internal standard인 Iso-butanol은 9.0분대에서 나타났다. 따라서 제공받은 13종의 샘플에는 에탄올이 들어있지 않은 것으로 결과를 처리하였다.

## 라. 연구개발 성과

### (1) 논문게재성과

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국가명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
01	Antioxidant and antimicrobial activities of trypsin-treated <i>Pinus densiflora</i> ethanol extract	J. Environ. Health Sci.	Ki-Eun Moon	44(3)	Korea	한국환경보건학회	비 SCI	2018. 06	
02	Antioxidant activity and anti-wrinkle effects for enzymatic hydrolysates of carrot extracts	J. Kor. Soc. Cosm.	Kyo-Hyun Park	24(4)	Korea	한국미용학회	비 SCI	2018. 08	
03	Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR	Applied Biological Chemistry	김유송	61(5)	Korea	한국응용생명화학학회	SCI	2018. 07.	
04	PCR Analysis for Halal Authentication of Cosmetics Containing Carrot, Oyster Mushroom and Pine Needle Extracts	Food engineering	장찬송	22(4)	Korea	한국식품산업공학회	비 SCI	2018. 11.	
05	Anti-wrinkle effect and mechanism of bromelain-treated <i>Pleurotus ostreatus</i> extract in human dermal fibroblasts						게재 예정		

### (2) 학술발표 성과

No	발표제목	발표 주관	주 발표자	발표일시	발표장
1	PCR을 이용한 당근, 느타리버섯, 솔잎 추출물이 첨가된 화장품의 할랄분석	한국식품과학회	장찬송	18. 06. 27	부산백스코

### (3) 특허 성과

No	특허명	출원번호	출원연도	출원인	출원국
01	당근, 느타리버섯, 솔잎의 효소처리 추출물과 이를 포함하는 기능성 화장료 조성물 및 그 제조방법	10-2017-0141231	2017년	이범주, 정순규, 김민태, 박수인, 이유나	대한민국
02	식물성 소재의 2단계 순차적 효소처리 추출물과 이를 포함하는 기능성 화장료 조성물 및 그의 제조 방법	10-2018-0075248	2018년	이범주, 정순규, 김민태, 박수인, 이유나	대한민국
03	홍삼과 녹두의 효소처리 추출물 및 이를 적용시킨 크립의 제조방법과 이를 포함하는 화장료 조성물	10-2018-0102014	2018년	이범주, 정순규, 김민태, 이유나, 김지원	대한민국

## 마. 연구 성과

### (1) 기술적 성과

#### (가) 경쟁사 기술과의 차별성

##### ① 효소처리 추출물

- 본 기술은 5종의 국내 농산 자원을 대상으로 효소 처리 추출물을 제조하고 이를 화장품 완제품에 적용한 후 할랄 인증 후 수출을 목표로 함
- 기존 타사 추출물의 경우 열수 추출만을 진행하기 때문에 용출된 성분이 단백질과 당류에 지나지 않음. 특히 단백질의 경우 거대 분자량의 고분자의 형태로 추출이 되기 때문에 화장품에 적용했을 경우 피부로의 흡수가 제한될 수 있음.
- 그러나 본 사업의 개발품은 열수 추출에서 멈추지 않고 식물성 유래 효소인 papain과 bromelain 등을 사용하여 추출물에 적용했기 때문에 보다 일반 열수 추출물에 비해 용출된 아미노산의 농도가 급격히 증가하였고, 이를 통해 단백질보다 비교적 분자량이 낮은 아미노산을 피부에 공급할 수 있는 장점이 있음
- 용출된 아미노산 역시 한가지 종류가 아닌 추출을 진행한 원물마다 서로 다른 과량이 아미노산이 추출되어 다양한 효능을 가진 화장품을 만들 수 있는 장점이 있음

##### ② 동물성 대체소재 및 화장품 개발

- 본 사업의 목표는 국내 농산 자원을 이용하여 기존 화장품 소재로 사용중인 동물성(돼지) 콜라겐의 대체 소재 개발에 관한 것. 이를 위해 앞서 언급한 국내 농산 자원을 원물로 한 효소처리 추출물을 개발하고 이를 크림 모델링 마스크와 크림에 적용하여 임상에 의한 보습력을 확인
- 임상 실험에 적용한 모든 완제품이 동물성 콜라겐을 적용한 것과 유사하거나 이보다 높은 보습력을 보였고, 그 보습력은 단기가 아닌 평가를 진행한 마지막 시간대까지 그 보습력이 일정하게 유지 되는 것을 확인
- 이로 본 사업을 통한 효소처리 추출물과 이를 적용한 화장품에 대해 임상평가 결과 기존 동물성 콜라겐을 사용한 것에 비해 우수한 보습력을 보여 그 효능면에서 우위를 알수 있었고, 이를 통해 동물성 소재를 사용할수 없는 할랄 시장으로의 진출 가능성을 확인

#### (나) 국내 최초 화장품 소재 및 화장품에 대한 인도네시아 할랄 인증

##### ① 추출물 할랄 인증

- 현재까지 식품의 경우에는 인도네시아의 할랄 인증기관인 LPPOM MUI로부터 할랄 인증을 받은 경우가 있으나, 국내에서 화장품 소재로 할랄 인증을 받은 사례는 없음
- 이에 주관기관인 (주) 케미랜드는 국내에서는 처음으로 인도네시아의 할랄 인증기관인 LPPOM MUI로부터 화장품 소재에 대한 할랄 인증을 수여받음
- 이의 할랄 인증을 통해 본 사업에서 진행한 크림 모델링 마스크 및 크림을 제외한 다양한 화장품에 대해서도 할랄 인증 소재를 사용할 수 있게 되었음

구분	No	할랄 인증 제품명	제품 설명
Extract [8 EA]	E1	Carrot SEL Extract	당근을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E2	Carrot ANFLA Extract	당근을 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물
	E3	Mushroom SEL Extract	느타리버섯을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E4	Mushroom ANFLA Extract	느타리버섯을 원물로 한 bromelain 처리 추출물
	E5	Red Ginseng SEL Extract	홍삼을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E6	Red Ginseing ANFLA Extract	홍삼을 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물
	E7	Bean SEL Extract	녹두를 원물로 한 papain 효소 처리 추출물
	E8	Bean ANFLA Extract	녹두를 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물

② 크림 모델링 마스크의 할랄인증

- 앞서 언급한 할랄인증 추출물을 적용한 8종 크림 모델링 마스크에 대해서도 이와 동일한 기관에서 할랄 인증을 취득

구분	No	할랄 인증 제품명	제품 설명
Cream Modeling Mask (Powder, Cream) [8 EA]	P1	Modeling Mask (Powder) for Carrot SEL	E1 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	P2	Modeling Mask (Powder) for Carrot ANFLA	E2 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	P3	Modeling Mask (Powder) for Mushroom SEL	E3 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	P4	Modeling Mask (Powder) for Mushroom ANFLA	E4 함유 크림 모델링 마스크 적용 powder
	CM1	Carrot SEL Modeling Mask (Cream)	E1 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream
	CM2	Carrot ANFLA Modeling Mask (Cream)	E2 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream
	CM3	Mushroom SEL Modling Mask (Cream)	E3 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream
	CM4	Mushroom ANFLA Modeling Mask (Cream)	E4 함유 크림 모델링 마스크 적용 cream

③ 크림의 할랄인증

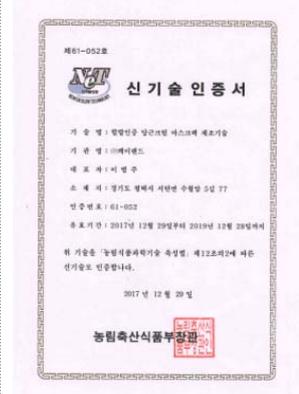
- 전 세계 화장품 중 가장 많이 사용되는 품목 중 하나인 크림을 대상으로 10종 제품에 대한 할랄 인증을 취득

구분	No	할랄 인증 제품명	제품 설명
Cream [10 EA]	C1	Carrot SEL Cream	E1 함유 크림
	C2	Carrot ANFLA Cream	E2 함유 크림
	C3	Mushroom SEL Cream	E3 함유 크림
	C4	Mushroom ANFLA Cream	E4 함유 크림
	C5	Pine Needle SEL Cream	솔잎을 원물로 한 papain 효소 처리 추출물 함유 크림
	C6	Pine Needle ANFLA Cream	솔잎을 원물로 한 bromelain 효소 처리 추출물 함유 크림
	C7	Red Ginseng SEL Cream	E5 함유 크림
	C8	Red Ginseing ANFLA Cream	E6 함유 크림
	C9	Bean SEL Cream	E7 함유 크림
	C10	Bean ANFLA Cream	E8 함유 크림

- 인도네시아 LPPOM MUI를 통한 화장품 소재 및 화장품에서의 할랄 인증은 국내에서 최초이기 때

문에 이들 제품군은 인도네시아 이 외에도 다양한 국가로의 수출이 기대되는 제품군임. 할랄인증 제품이라는 점이 타 국가 소비자들 이 볼 때 철저하게 관리되고 있다는 신뢰를 줄수 있기에 타 국가로 수출할 경우 마케팅 차원에서 많은 장점을 가진

(다) NET 신기술 인증 취득

	<b>구분</b>	<b>내용</b>
	인증명	NET 신기술 인증
	기술명	할랄인증 당근크림 마스크팩 제조 기술
	인증번호	61-052
	인증일	2017년 12월 29일
	인증기관	농림축산식품부
	유효기간	인증일로부터 2년

- 1차년도 개발 기술인 당근을 원물로 한 추출물 적용 크림 모델링 마스크 관련 기술을 2017년 농림축산식품부 주관 NET 신기술 인증에 신청하여 본 사업 기술을 통해 신기술로 인증받음
- 본 사업에서 목표로 한 효소처리 추출물과 이를 적용한 크림 모델링 마스크 제조 및 이를 통한 인도네시아 할랄 인증이 서로 유기적으로 결합하여 새로운 신기술로 인증 받음

(라) 국제 화장품 원료집 등재

- 미국 화장품 협회인 Personal Care Products Council (PCPC)에서 발간하는 국제 화장품 원료집 (International Cosmetic Ingredient Dictionary, ICID)에 당근을 원물로 한 Bromelain 처리 추출물과 느타리 버섯을 원물로 한 추출물의 등재 완료
- 등재가 완료된 제품명은 “HAS-floral Carrot Bromelain EX”, “HAS-floral Mushroom Bromelain EX” 이며, 이와 관련된 세부 사항은 아래 표에 기재

		<b>구분</b>	<b>내용</b>
July 27, 2018 M. Hwangsoo-Kang 11, Caejeong-ro, Gangseo-gu, Milyang-si, Gyeonggi-do, 10527 Republic of Korea IC: Application No. 2-04-2018-7819 Dear Mr. Hwangsoo-Kang: In reference to the ICID application which you submitted to the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INCI) for consideration to review and approve, the INCI name assigned to the trade name identified in the application is detailed on the abstract. Please note, the abstract information from your application as it appears in our data base will be published in the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook (ICID) and the Cosmetic Ingredient Handbook (CIH) if your application indicates the trade name is "not for publication." It is noted on the abstract and the CIH that the name will be published. It is important to carefully check the abstract for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be included in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. The web site contained on our responses should have to update the current status of your company's status. This communication will include any trade names and addresses, therefore it is important that you include accurate contact information for INCI name assignments. In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INCI for accuracy and may be subject to change when deemed necessary. Should you have any questions, please don't hesitate to contact us for further information. Sincerely, <i>Jeanette</i> Andrea M. Hwangsoo-Kang Director, Cosmetic Chemistry www.personalcareproducts.org	Page 2 July 27, 2018 Application No. 2-04-2018-7819 Submitted by: M. Hwangsoo-Kang 11, Caejeong-ro, Gangseo-gu, Milyang-si, Gyeonggi-do, 10527 Republic of Korea Manufactured By: CHEMLAND 11, Caejeong-ro, Gangseo-gu, Milyang-si, Gyeonggi-do, 10527 KOREA (SOUTH) Trade Name: HAS-floral Carrot Bromelain EX Assigned INCI Name: Water (and) Hydrolyzed Daucus Carrot Root Extract	Trade Name	HAS-floral Carrot Bromelain EX
		Application No.	2-04-2018-7819
		Assigned INCI Name	Water (and) Hydrolyzed Daucus Carrot Root Extract
		Manufactured By	CHEMLAND KOREA (SOUTH)

 <p>July 16, 2018</p> <p>Mr. Kyoungsoo KANG        IT, Cosmetics/Personal Care, Whangmyeong        Cheongryong-ro, Yongsu-gu        Seoul, Korea</p> <p>Re: Application No. 2-04-2018-7821</p> <p>Dear Mr. Kyoungsoo KANG:</p> <p>In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INCI) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is listed on the attachment.</p> <p>Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, the Web Color Dictionary (WCD), and the Cosmetics Online (COOL) if your application includes the trade name as "not for publication." It is noted on the attachment and the list will not be published.</p> <p>If it is required to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name, assignment and related category information will be prepared in our data base and will be included with the product in our change manufacturing. You will be contacted on an as-needed basis to update the current status of your ongoing filing. This communication will not be using trade names and addresses. However, it is important that you maintain accurate records of all INCI name assignments.</p> <p>In addition to a change in an INCI name assignment, a request to the INCI can be sent via email to my attention. The person should include the current INCI name, trade name, application number, registration status, and address of contact to support the petition, e.g., supporting competitive information, and/or manufacturing details, and complete the INCI name assignment.</p> <p>In addition, please be advised that INCI names are continuously reviewed by the INCI for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.</p> <p>Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.</p> <p>Sincerely,          Jennifer M. Kavanagh        Director, Cosmetic Chemistry        International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee</p>	 <p>July 16, 2018</p> <p>Application No. 2-04-2018-7821</p> <p>Submitted By:        Mr. Kyoungsoo KANG        IT, Cosmetics/Personal Care, Whangmyeong        Cheongryong-ro, Yongsu-gu        Seoul, Korea</p> <p>Manufactured By:        CHEMLAND        IT, Cosmetics/Personal Care, Whangmyeong        Cheongryong-ro, Yongsu-gu        Seoul, Korea</p> <p>Trade Name:        HAS-floral Mushroom Bromelain EX</p> <p>Assigned INCI Name:        Water (and) Hydrolyzed Pleurotus (Mushroom) Fruiting Body Extract</p>	구분	내용
Trade Name		HAS-floral Mushroom Bromelain EX	
Application No.		2-04-2018-7821	
Assigned INCI Name		Water (and) Hydrolyzed Pleurotus (Mushroom) Fruiting Body Extract	
Manufactured By		CHEMLAND KOREA (SOUTH)	

## (2) 경제적 성과

### (가) 모델링 마스크 제품 수출에 의한 매출 증대

- 2017년 8월부터 신규 모델링 마스크 제품에 대해 인도네시아 거래처에 판매 개시. 제품명은 “Green Clay 02” 외의 3종 제품으로 본 품목은 천연물 소재가 함유되어 있는 모델링 마스크로 현재 할랄 인증 제품 원료 목록에 있는 품목으로 개발되었음. 인도네시아 현지 고객사와의 의견 조율을 통해 본 제품을 개발하게 됨.
- 2018년 10월 현재 본 제품의 경우 할랄 인증을 받기 위해 추가 신청한 상태이며, 본 제품군에 첨가 되는 원료의 대부분은 할랄 인증받은 제품군과 중복되어 기존 제품군에 추가로 진행할 예정이므로 할랄 인증에 큰 변수는 없을 것으로 판단
- 이상 17년 8월부터 18년 9월까지 “Green Clay 02” 와 관련된 제품군의 매출액은 160 백만원임
- 작년 8월부터 현재까지 본 품목에 대해서도 꾸준히 매출이 진행되고 있어 추후에도 이들 품목에 대해 고정 물량의 매출이 발생될 것으로 예상

No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
No. 5	No. 6	No. 7	

(나) 고용 창출

- 본 사업을 통해 예정된 고용 창출 인력은 과제 종료시까지 4명, 과제 종료 후 5년차까지 17명으로 총 21명의 신규 고용인력을 창출할 계획을 세움
- 이중 2차년도에 2명 목표에 3명, 3차년도에는 2명 목표에 연구인력만 3명을 추가 고용. 총 6명을 신규 채용하여 고용 창출에 대한 목표는 모두 달성
- 신규 고용자에 대한 증빙자료는 아래 그림에 기재

2차년도			3차년도		

**바. 연구개발목표 대비 결과 총괄**

◦ 이상의 결과를 종합하여 협약 당시 목표로 선정했던 연구목표에 대한 결과를 아래 표에 기재

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	1				24			21			2	2							
1차 년도	목표	1				8														
	실적																			
2차 년도	목표	1				8			2											
	실적	1				12			3	2				1			1			
3차 년도	목표		1			8			2		2	2								
	실적	2				14			3	1	1	3	1				1	2		
소 계	목표	2	1			24			4		2	2								
	실적	3				26		160	6	3	1	3	1	1			2	2		
종료 1차년도																				
종료 2차년도																				
종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계	3					26		160	6	3	1	3	1	1			2	1		
합 계	3					26		160	6	3	1	3	1	1			2	1		

- 특허출원 : 총 3건 완료 (2차년도 1건, 3차년도 2건)
- 제품화 : 할랄인증을 통한 제품화 총 26건 완료 (2차년도 12건, 3차년도 14건)
- 수출액 : 제품명 "Green Clay 02" 외 3종 품목에 대해 인도네시아로 수출, 총 수출액 160 백만원
- 고용창출 : 2차년도, 3차년도 각 3명씩 총 6명의 신규인력 고용 창출
- 기술인증 : 2차년도 - 할랄인증 1건, NET 신기술 인증 1건, 3차년도 - 할랄인증 1건, 총 3건
- 논문 : SCI 논문 1건, 비SCI 논문 3건 게재완료, 1건 투고 준비중
- 학술발표 : 동국대학교 1건 (한국식품과학회, 2018년 06월)
- 교육지도 : 동국대학교 학생 지도 1건
- 홍보전시 : 화장품 원료 전시회 2건 (2차, 3차년도 각 1건씩 총 2건)
- 기타 (연구활용 등) - 미국 화장품 협회 발간 국제 화장품 원료집에 할랄인증원료 2종 등재 완료

## 사. 사업화 성과 및 매출 계획

### (1) 사업화 성과

◦ 이상의 결과를 바탕으로 아래의 표에 사업화 성과와 매출 실적을 기재

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	3 억원	
			향후 3년간 매출	6 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	2 억원	
			향후 3년간 매출	5 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			10 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			5 위

### (2) 매출 계획

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(백만원)		100		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			3	6.00	10.00
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		크림 모델링 마스크, 크림-에센스 모델링 마스크 클레이 모델링 마스크			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 가. 1차년도

◦ 최종목표 : 당근, 느타리 버섯 유래 성분을 이용한 마스크팩 개발 및 할랄인증과 수출

연구개발의 목표	연구개발의 내용	가중치 (%)	연구 달성 결과	달성도 (%)
<b>(제 1 세부)</b>  당근, 느타리 버섯 유래 추출성분 개발 및 이를 적용한 마스크팩 제품 개발, 본 제품의 할랄 인증 및 수출	1) 할랄 인증의 이해 및 국가별 선호 제품도 조사 - 할랄 인증 이해 및 할랄 인증 국가별 화장품 소재와 제품 선호도 조사	5	1) 할랄 인증 이해 및 국가별 선호 제품도 조사 - 할랄 제품 시장의 경우 단일국으로 인도네시아가 가장 큰 시장을 형성 - 할랄 인증국을 인도네시아로 결정	100
	2) 동물성 (돼지) 콜라겐 대체 소재 발굴 및 화장품 소재화 - 당근, 느타리 버섯 유래 추출성분 개발 (액상 또는 고농도 분말 소재화)	15	2) 파파인, 브로멜라인 등의 단백 분해 효소 적용 추출물 개발 - 추출물별 아미노산 분석 완료 - 추출 아미노산 농도 정량 완료	100
	3) 당근, 느타리 버섯 유래 추출성분 적용 마스크팩 개발 및 보습평가 (in vivo) - 기존 상용중인 돼지 콜라겐 적용 마스크팩과 당근, 느타리 버섯 소재 적용 제품간 효능 비교 - 당근, 느타리버섯을 원료로 한 추출물 적용 마스크팩의 보습평가 (in vivo) - 두 제품간 효능 검토에 의한 대체 가능성 확인 - 당근, 느타리 버섯 소재 적용 마스크팩 제품의 대량 생산 체계 확립	15	3) 추출성분 적용 마스크팩에 대한 보습력 임상 평가 - 서로 다른 마스크팩의 보습력 임상 평가 결과, 개발 마스크팩 모두 동물성 콜라겐 적용한 것과 보습력에서 차이가 없었음 - 당근을 원료로 한 브로멜라인 추출물 적용 마스크 대비 수분 보유도가 매 측정시간마다 높게 확인, 국내농산자원 유래 추출물은 동물성 콜라겐 대체 소재로 적합함을 확인	100
	4) 개발 제품에 대한 할랄 인증 및 수출 - 개발 제품의 할랄 인증 확인 - GCC (Gulf Cooperation Council) 국가 외 할랄 인증 국가에 대한 수출 가능국 검토 - 이들 국가별 수출화 전략 수립	15	4) 인도네시아 LPPOM MUI를 통한 할랄 인증 신청 - 국내 할랄인증 에이전트 계약완료 - 당근, 느타리버섯을 원료로 한 추출물 및 마스크팩의 할랄인증신청 완료	100
<b>(제 1 협동)</b>  당근과 느타리버섯 유래 추출성분을 이용한 항산화, 보습, 주름개선 효능평가	1) 항산화 평가 - DPPH법에 의한 항산화 활성 평가 - Superoxidase dismutase (SOD) 활성 측정 - 총 Polyphenol 함량 측정	15	1) 항산화 평가 - DPPH법 보다는 ABTS free radical 소거능을 측정하는 것이 효과적 - 당근과 느타리버섯 모두 브로멜라인 처리 시 항산화효능이 증가	100
	2) 주름개선 평가 - Collagenase 저해활성 - Elastase 저해활성 - Fibroblasts 세포주를 이용한 주름개선평가 (세포 내 MMP-1 저해활성 측정, 유전자 발현)	15	2) 주름개선 평가 - 당근과 느타리버섯 모두 브로멜라인 처리 시 Collagenase, Elastase의 저해활성이 증가 - Fibroblasts 세포주를 이용한 효소처리에 따른 당근의 주름개선평가를 위해 MMP-1, MMP-2, MMP-3, type I collagen의 유전자발현을 확인 - 브로멜라인 처리시 주름개선효과가 우수	100
<b>(제 2 협동)</b>  당근과 느타리버섯 유래 추출성분 이용 마스크팩 제품의 할랄 분석	1) 마스크팩 제품에 대한 할랄인증 기준 확인 - 할랄 제조공정 및 비할랄(non-halal) 성분 확인	5	1) 마스크팩 제품의 할랄인증 기준설정 - 비할랄 성분으로 돼지, 개, 사람, GMO DNA 선정	100
	2) 콜라겐 대체 소재 및 마스크팩 제품에서 DNA 추출 조건 확립 - 대체 소재와 완제품에서 최적 DNA 추출법 확인	5	2) DNA 추출 조건 및 PCR 시스템 확립 - 콜라겐 대체 소재 및 마스크팩 제품에서 DNA 최적 추출을 위해 Kogene kit 선정 - 상기 제품에서 PCR 분석결과, 비할랄 성분 DNA 미검출	100
	3) 마스크팩 제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석과 알코올 분석 - DNA 분석법으로 돼지, 개, GMO, 인체 성분 확인 - 효소법 또는 GC를 이용한 알코올 분석	10	3) 마스크팩 제품에서 real-time PCR 시스템 및 알코올 분석법 확립 - 마스크 팩에서 real-time PCR 분석 결과, 비할랄 성분 DNA (돼지, 개, 사람, GMO) 미검출 - GC를 이용한 알코올 분석법 확립	100
합계		100		

나. 2차년도

◦ 최종목표 : 당근, 느타리버섯, 솔잎 적용 추출물과 크림 개발 및 할랄인증과 수출

연구개발의 목표	연구개발의 내용	가중치 (%)	연구 달성 결과	달성도 (%)
(제 1 세부)  당근, 느타리 버섯, 솔잎 유래 추출성분 개발 및 이를 적용한 기능성 크림 개발, 완제품의 할랄 인증 및 수출	1) 당근, 느타리 버섯, 솔잎 적용 크림 제형의 할랄 국가별 선호도 확인 - 개발 제품군에 대한 수출 대상 후보국 선정	5	1) 당근, 느타리버섯, 솔잎을 이용한 화장품 소재의 추출 대상국 결정 - 인도네시아 LPPOM MUI를 통한 할랄 인증 결정, 진행완료	100
	2) 국내 농산 자원 활용 화장품 소재화 - 당근, 느타리 버섯, 솔잎 유래 추출성분 개발	10	2) 당근, 느타리버섯, 솔잎 적용 추출물의 성상, 아미노산 조성 확인 - 원료별, 효소 순도별 색상 차이 - 솔잎의 경우 브로멜라인 처리 추출물에서 추출 아미노산 농도가 더 높았음	100
	3) 상기 소재 적용 기능성 크림 제품 개발 - 일반 및 초미립 유화 공정 적용 크림 제품 개발 - 각 소재 적용 크림의 상안정도 확인 - 실온, 항온, cycling chamber 등 서로 상이한 온도 조건에서의 제품 안정도 확보 - 개발 크림의 보습평가 (in vivo)	10	3) 서로다른 원물의 추출물 적용 크림 제형 개발 - 초미립 유화 처리시 크림 안정성 저해하여 일반유화 제형으로 결정 - 서로다른 온도별 물리, 화학적 특성 확인, 실온 및 변온조건에서 보다 안정, 기능성분 정량시 일정수준 유지 - 동물성콜라겐 적용 제형에 비해 추출물 적용 크림의 보습력이 더 우수	100
	4) 기능성 크림에 대한 대량 생산 체제 확립 - 상기 소재별 적용 크림 제형간 대량 생산 체제 확립	10	4) 서로 다른 원물 적용 추출물 크림의 시제품화 - 모든 크림이 가혹조건에서 안정한 결과를 보여 시제품화 결정	100
	5) 개발 제품의 할랄 인증 및 개발 제품 수출 - 개발 제품의 할랄 인증 - 수출 대상국 결정 및 이들 국가에 대한 수출화 전략 수립	15	5) 화장품 소재 및 화장품에 대한 할랄 인증 완료 - 추출물 4종, 크림 모델링 마스크 8종 등 총 12종에 대한 할랄 인증 완료	100
(제 1 협동)  당근, 느타리버섯 유래 추출성분에 대한 항산화, 보습, 주름개선 효능 및 솔잎 추출물에 대한 항산화, 항균 및 미백평가	1) 항산화 평가 - DPPH법에 의한 항산화 활성 평가 - Superoxidase dismutase (SOD) 활성 측정 - 총 Polyphenol 함량 측정	10	1) 항산화 평가 - ABTS법, SOD 활성 측정, 총 Polyphenol 함량 측정에 의한 항산화 평가 - 솔잎의 파파인처리 시 항산화효능이 우수	100
	2) 항균 평가 - Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정	10	2) 항균 평가 - <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> 에 대해 항균평가를 실시 - 효소처리로 균 생성 억제 미미	100
	3) 미백 평가 - Mushroom tyrosinase 저해활성 측정 - Melanoma 세포주를 이용한 미백평가 (세포 내 멜라닌 함량 측정, 유전자 발현)	10	3) 미백 평가 - 효소 미처리 솔잎에 대한 Mushroom tyrosinase 저해활성 효과는 미미했음, 효소를 처리시에도 그 효능이 크게 상승하지 않음. - Melanoma 세포주를 이용한 미백평가에서 대체적으로 효능이 크게 높지 않았으나, 파파인과 브로멜라인 처리시 파파인의 미백효능이 더 우수	100
(제 2 협동)  당근과 느타리 버섯, 솔잎 유래 추출성분을 이용한 크림 제품의 할랄 분석	1) 크림 제품에 대한 할랄인증 기준 확인 - 할랄 제조공정 및 비할랄(non-halal) 성분 확인	5	1) 크림 제품의 할랄 인증 기준설정 - 비할랄 성분으로 돼지, 개, 사람, GMO DNA 선정	100
	2) 크림 제품에서 DNA 추출 조건 확립 - 완제품에서 최적 DNA 추출법 확인	5	2) DNA 추출 조건 및 PCR 분석 - 크림 제품에서 DNA 최적 추출을 위해 Kogene kit 사용 - 상기 제품에서 PCR 분석결과, 비할랄 성분 DNA 미검출	100
	3) 크림제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석과 알코올 분석 - DNA 분석법으로 돼지, 개, GMO, 인체 성분 확인 - 효소법 또는 GC를 이용한 알코올 분석	10	3) 크림제품에서 real-time PCR 및 알코올 분석 - 추출물 및 크림제품에서 real-time PCR 분석결과, 비할랄 성분 DNA (돼지, 개, 사람, GMO) 미검출 - 추출물 및 크림제품에서 알코올 미검출	100
합계		100		

다. 3차년도

◦ 최종목표 : 녹두, 홍삼 적용 추출물, 크립 개발 및 할랄인증과 수출

연구개발의 목표	연구개발의 내용	가중치 (%)	연구 달성 결과	달성도 (%)
<b>(제 1 세부)</b>  국내 농산 자원 적용 녹두, 홍삼 유래 추출성분 개발 및 이를 이용한 크립 제형 개발, 개발 제품군의 할랄 인증 및 수출	1) 녹두, 홍삼 소재 적용 제품군에 대한 할랄 국가별 선호도 확인 - 개발 제품군에 대한 수출 대상 후보국 선정	5	1) 녹두, 홍삼을 원물로 한 화장품 소재의 추출 대상국 결정 - 인도네시아 LPPOM MUI를 통한 할랄 인증 결정, 진행완료	100
	2) 녹두, 홍삼 유래 추출성분 개발 - 녹두 유래 단백질 추출 성분 개발 - 홍삼 유래 추출성분 개발	10	2) 녹두, 홍삼을 원물로 한 효소처리 추출물 개발 완료 - 파파인 처리 추출물의 추출 아미노산 농도가 높았음	100
	3) 상기 소재 적용 기능성 크립 제품 개발 - 일반 또는 초미립 유화 공정 적용 크립 개발 - 각 소재 적용 크립의 장기 안정도 검토 - 실온, 항온, cycling chamber 등 서로 상이한 온도 조건에서의 상안정도 확보 - 개발 크립의 보습평가 (in vivo)	10	3) 서로 다른 원물의 효소처리 추출물 적용 크립 제형 개발 완료 - 초미립 유화보다 일반 유화 제형의 경우 상안정성 및 색상에서 높은 안정성을 확인 - 상온 및 변온조건에서 보다 우세한 상안정도 확보 - 동물성콜라겐 적용 크립 대비 효소처리 추출물 적용 크립의 보습력이 우수	100
	4) 기능성 크립에 대한 대량 생산 체제 확립 - 상기 소재 적용 크립 제형간 대량 생산 체제 확립	10	4) 서로 다른 원물 적용 추출물 크립의 시제품화 - 모든 크립이 온도 가혹 조건에서 안정한 결과를 보여 시제품화 결정	100
	5) 개발 제품의 할랄 인증 및 수출 - 개발 제품의 할랄 인증 - 수출 대상국 결정 및 이들 국가에 대한 수출화 전략 수립	15	5) 추출물 및 크립의 할랄인증 완료 - 추출물 4종, 크립 10종의 추가 할랄 인증 완료 - 모델링 마스크팩 수출 완료	100
<b>(제 1 협동)</b>  녹두, 홍삼 유래 추출성분을 이용한 주름, 항산화, 미백평가	1) 주름개선 평가 - Collagenase 저해활성 - Elastase 저해활성 - Fibroblasts 세포주를 이용한 주름개선 평가 (세포 내 MMP-1 저해활성 측정, 유전자 발현)	10	1) 주름개선 평가 - 녹두, 홍삼에서 파파인 처리시 주름 개선 효과가 우수한 것을 확인	100
	2) 항산화 평가 - DPPH법에 의한 항산화 활성 평가 - Superoxidase dismutase (SOD) 활성 측정 - 총 Polyphenol 함량 측정	10	2) 항산화 평가 - ABTS법, SOD 활성 측정, 총 Polyphenol 함량 측정을 통해 항산화 평가를 실시하였고 - 녹두, 홍삼의 파파인 처리 시 항산화효능이 가장 높아졌음을 확인	100
	3) 미백 평가 - Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정 - Melanoma 세포주를 이용한 미백평가 (세포 내 멜라닌 함량 측정, 유전자 발현)	10	3) 미백 평가 - 녹두, 홍삼에서 파파인 처리시 미백효과가 증가하는 것으로 확인하였음	100
<b>(제 2 협동)</b>  녹두, 홍삼 유래 추출성분을 이용한 크립 제품의 할랄 분석	1) 녹두, 홍삼 유래 추출성분 함유 크립 제품에서 DNA 추출 조건 확립 - 소재 및 완제품에서 최적 DNA 추출법 확인	10	1) 녹두, 홍삼 유래 추출성분 함유 크립제품 PCR 분석 - 상기 제품에서 PCR 분석결과, 비할랄 성분 DNA 미검출	100
	2) 크립제품에서 real-time PCR을 이용한 할랄 DNA 분석과 알코올 분석 - DNA 분석법으로 돼지, 개, GMO, 인체 성분 확인 - 효소법 또는 GC를 이용한 알코올 분석	10	2) 크립제품에서 real-time PCR 시스템 및 알코올 분석 - 추출물 및 크립제품에서 real-time PCR 분석결과, 비할랄 성분 DNA (돼지, 개, 사람, GMO) 미검출 - 추출물 및 크립제품에서 알코올 미 검출	100
합계		100		

## 3-2. 후속연구의 필요성

### (1) 제품군 다각화

- 현재 화장품 소재 및 화장품에 대해 처음 계획했었던 할랄 인증을 받고 사업화도 진행되었음
- 지금까지 인증받은 할랄 제품군 이외의 다른 제품군에 대해서도 추가 할랄 인증을 받고 인증 제품군에 대한 수출이 필요

### (2) 인증국가 확대

- 현재까지는 인도네시아의 할랄 인증기관을 통해 할랄 제품으로 인증받음
- 인도네시아 이외의 다른 국가 (ex 말레이시아, GCC 국가 등)의 인증기관을 통해 할랄 인증을 받고 해당 국가로의 수출도 계획중

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### (1) 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

#### (가) 화장품 소재 및 화장품 마케팅

- 본 사업을 통해 효소처리 추출물에 대한 in vitro 효능을 확인하였음. 서로 다른 원물에 대해 갖고 있는 효능은 매우 다르기 때문에 본 사업의 in vitro 연구 결과를 바탕으로 국내 및 해외 마케팅의 제품 설명 자료로 활용 가능
- 최근 들어 화장품 업계에서 추출소재에 대한 관심도가 매우 높아지고 있음. 천연물 소재에 대한 관심이 높아짐에 따라 자연스럽게 추출물에 대해서도 그 효능 연구가 연구소 및 업체를 중심으로 진행되고 있음. 기초 화장품에 기존 사용하는 물 대신 추출물 소재를 활용한다면 보습능력을 포함한 다양한 효능을 기대할 수 있기 때문인 것으로 판단됨
- 국내 및 해외 업체로의 마케팅을 위한 제품 설명 자료로 활용할 예정

#### (나) 벌크 단위로의 판매

- 주관기관인 (주)케미랜드는 화장품 소재 업체로 해외 업체에 벌크 단위로 화장품 소재 및 제품의 수출이 가능.
- 인도네시아 이외의 국가로 판매할 경우 할랄 인증 마크를 붙일수는 없지만, LPPOM MUI를 통해 할랄인증 제품이라는 점을 마케팅시 부각한다면 이는 훌륭한 마케팅 자료가 될 것으로 판단
- 할랄 제품군에 대한 관심이 높아지면서 동남아시아를 비롯한 유럽 국가에서도 할랄 제품군의 수요는 점차 증가하고 있음. 그들은 종교적 차원에서 할랄 제품군에 관심을 갖는 것이 아니라 제품의 원료에서부터 제조, 포장 및 출하 과정에 이르기까지 할랄 인증 제품군은 철저하게 관리되고 있다는 점에 많은 관심을 가짐
- 이와 같은 점을 주 마케팅 포인트로 삼는다면 할랄 인증 받은 인도네시아 국가 이외의 다른 국가에

도 할랄 제품군에 대한 마케팅 효과를 높일 수 있음. 현재 국내 업체에서도 주관기관에서 인도네시아의 할랄인증을 국내 최초로 받았다는 점을 높이 평가하여 해당 업체와 미팅을 진행하고 있음. 국내 뿐 아니라 해외 업체에 대해서도 이와 같은 마케팅이 가능할 것으로 기대

## (2) 타 연구에의 응용

### (가) 타 정부사업으로의 확대

- 현재까지 주관기관인 (주)케미랜드는 기술정보진흥원 등 각 부처에서 진행하는 정부사업을 꾸준히 진행하고 있음. 본 사업에서의 연구 결과를 기반으로 다른 정부 사업으로도 응용이 가능할 것으로 기대됨.
- 본 사업의 경우 추출물에 대한 단백질 분해 효소 처리 후 아미노산 조성 및 함량 분석까지 진행되었으나, 각 효능을 나타내는 지표성분이 어떤 것인지도 추가 연구를 통해 규명할 수 있음. 이와 같은 연구가 진행될 수 있다면 효소 처리 추출물에 대한 심도있는 연구를 진행할 수 있을 것으로 판단됨

### (나) 기초 및 색조 화장품 제형으로의 적용

- 본 사업에서는 기초 화장품 중 크림과 모델링 마스크에 대한 연구를 진행하였음. 크림을 진행했던 이유는 국내 및 해외 업체에서 기초 화장품군 중 크림이 차지하는 비중이 가장 높기 때문임.
- 이후 제품의 다각화를 진행한다면, 에센스, 세럼, 로션 등의 유화 화장품군과 색조 메이크업 제품군에도 적용할 수 있을 것으로 판단. 특히 색조 메이크업 제품군 중 Sunscreen 제품군의 경우 물이 차지하는 비중이 제일 높기 때문에 기존 사용되는 물 대신 본 사업에서 개발한 효소 처리 추출물을 적용한다면 자외선 차단 효능 이외의 다른 효능들을 마케팅 요소로 부각이 가능할 것으로 판단
- 현재까지 보습력을 부여하기 위해서는 물이 아닌 오일 성분들을 많이 활용하였음. 피부에 대한 보습력을 높일수 있는 방법으로 피부를 차폐하여 피부속 수분이 밖으로 나가지 못하게 하는 방법과, 외부에서 피부 속으로 영양 성분을 공급하는 두 가지의 기작이 있음. 본 사업에서 개발한 효소처리 추출물의 경우 높은 분자량의 단백질을 아미노산으로 분해해서 아미노산의 농도가 높아졌기 때문에 앞에서 언급한 보습력을 높일수 있는 방법 중 두 번째에 해당될 수 있을 것으로 판단
- 실제 본 연구에서 추출물 소재와 동물성 콜라겐의 보습력 비교시 추출물 소재의 보습력이 우수함이 입증되었기 때문에 색조 화장품 군에서도 동일한 효능을 가질수 있을 것으로 기대

## 참고문헌

- (1) An SG. 2015. Halal Certification Manual In: HAS 23000.1. LPPOM MUI, Ini Halal Korea, Seoul, pp. 4-5
- (2) Alariaidh IA. 2008. Improved DNA extraction method for porcine contaminants, detection in imported meat to the Saudi market. Saudi J Biol Sci. 15: 225-229
- (3) Che Man YB, Aida AA, Raha AR, Son R. 2007. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction(PCR) for halal verification. Food Control. 18: 885-889.
- (4) Kim YS, Yu HK, Lee BZ, Hong KW. 2018. Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR. Appl Biol Chem. 61: 549-555
- (5) Lockley AK, Bardsley RG. 2000. DNA-based methods for food authentication. Trends Food Sci Technol. 11: 67-77.
- (6) Ministry of Food and Drug Administration. Korean Food Standards Codex. Available from: <http://www.foodsafetykorea.go.kr>. Accessed Jun. 27. 2018.
- (7) Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200. 1958.
- (8) Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26: 1231-1237. 1999.
- (9) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47: 469-474. 1974.
- (10) Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12: 239-243. 1912.
- (11) Wünsch E, Heidrich HG. Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 333: 149-151. 1963.
- (12) Cannell RJ, Kellam SJ, Owsianka AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Med 54: 10-14. 1988.
- (13) Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res 45: 1474-1478. 1985.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.