

발간등록번호

11-1543000-002481-01

고장초 추출물을 활용한 피부미용개선 기능성 식품소재 개발 최종보고서

2019. 01. 25.

주관연구기관 / (주)비티씨
협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단
협동연구기관 / 계명대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고장초 추출물을 활용한 피부미용개선 기능성 식품소재 개발”(개발기간 : 2015.10.23. ~ 2018.10.22.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.12.05.

주관연구기관명 : (주)비티씨

김 태 영

제1 협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

이 범 석

제2 협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

남 재 열

주관연구책임자 : 문 주 명

제1 협동연구책임자 : 김 한 근

제2 참여기관책임자 : 양 선 아

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	115009-3	해당 단계 연구 기간	2017.10.23.~ 2018.10.22.	단계 구분	3차년도/ 3차년도
연구 사업명	중 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부 사업명	-			
연구 과제명	대 과제명	고장초 추출물을 활용한 피부미용개선 기능성 식품소재 개발			
	세부 과제명	-			
연구 책임자	문주명	해당단계 참여 연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	해당단계 연구 개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 39명 내부: 39명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)비티씨 경희대학교 산학협력단 계명대학교 산학협력단			참여기업명 (주)비티씨	
위탁 연구	연구기관명:	-		연구책임자:	-
대표성과:				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> - 고장초의 기능(지표)물질 분리 및 품질관리 시험법 개발 - 고장초 효소처리 추출공정 최적화 및 생산방법 정립 - In vitro 실험에서 고장초 효소처리 추출물의 항산화, 미백, 항염, 항알러지, 보습, 주름개선 효능을 확인 - In vivo 실험에서 고장초 효소처리 추출물 섭취군이 피부의 표피층 및 상피세포에 긍정적인 영향을 주면서 주름수 감소 효과를 나타냄 - 인체적용시험에서 수분량, 피부탄력, 피부 두께 등 각종 지표에서 개선되는 효과를 보임 - 개별인정신청 자료 작성 및 신청 완료 				총 151 page	

〈 요약 〉

		D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고장초 추출물의 항염, 항알러지, 미백 및 주름개선 유효물질과 유사 활성물질을 함유하고 있는 미래식품용 피부건강 기능성 식품소재 개발 ○ 고장초 주정추출물의 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청 (식약처) ○ 고장초 등 벼과식물 복합물을 이용한 피부건강용 건강지향식품 개발 ○ 고장초 주정추출물 및 복합물의 마케팅 전략 수립 및 시장진출 ○ 관련 농가 연계(유희농 이용 계약재배로 토지와 인력의 효율적 활용)를 통한 산업화로 지역 농가 활성화에 기여 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능(지표)물질 분리 및 품질관리를 위한 시험법 개발 완료 ○ 고장초 추출 조건 확립 (용매 농도, 온도, 시간, 함량 등) ○ 고장초 추출물의 항산화, 미백, 항염 효과를 보임. ○ 고장초 원재료 표준화(수율, 가격, 함량, 효능 등)로 인해 고장초 원산지를 경산, 영천산으로 선정. ○ 고장초 추출물의 효소처리 조건 확립과 그에 대한 Tricin 함량 증가를 확인함으로써 최종 생산방법 확립 ○ In vivo UVB 조사에서 고장초 추출물 섭취군이 피부의 표피층 및 상피세포에 긍정적인 영향을 주면서 주름수 감소 효과를 나타냄. ○ 인체적용시험용 시제품 생산 및 함량 재현성 확보로 인한 생산 공정 최적화 완료 ○ 인체적용시험에서 수분량, 피부탄력, 피부 두께 등 각종 지표에서 개선되는 효과를 보임. ○ 개별인정신청 자료 작성 및 신청 완료 ○ 각종 해외 마케팅을 통한 이너뷰티 고장초 추출물 제품 홍보 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성물질 고함유 신규 피부건강 증진 기능성 식품 소재 확보 ○ 현재 식품 산업에 활용이 낮은 고장초를 기능성 원료로 개발함으로써 고부가가치 창출 ○ 활성물질 고함유 신규 기능성 식품소재 개발 및 고부가가치 신소재 개발 핵심 기술 확보 ○ 새로운 피부건강 기능성식품 소재를 개발함으로써 국내 1조4000억원의 기능성 식품시장에서 경쟁력 확보 및 수입대체 효과 ○ 기능성화장품 소재로도 활용 가능하여 수입의존도가 높은 화장품 원료산업에 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료 개발 및 표준화된 한방자원을 이용하여 동 분야의 해외시장 경쟁력 증대 ○ 본 과제에서 규명된 활성 물질의 구조를 바탕으로 활성을 갖는 물질의 합성 등에 응용될 수 있음 				
중심어 (5개 이내)	벼과식물	고장초	기능성식품	주름	민감성피부

〈 SUMMARY 〉

		D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of functional foods including anti-inflammatory, anti-allergic, whitening and anti-wrinkle virtue of <i>Zizania latifolia</i> extract ○ Application for the approval of health functional foods (KFDA) ○ Development of health functional food using gramineae and <i>Zizania latifolia</i> compound ○ Establishing marketing strategies and advancing market for based main products and compounds ○ Contributing the revitalization of local farms to contracts with related farms(efficiently utilising land and manpower) 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of method validation and separation of functional materials ○ Establishment of the <i>Zizania latifolia</i> extraction conditions (containing concentration, temperature, time, content, etc.) ○ <i>Zizania latifolia</i> extract has antioxidants, whitening and anti-inflammatory efficacy. ○ After standardizing raw materials at the beginning of <i>Zizania latifolia</i> considering yield, price, content, and efficacy, the country of origin is selected as Gyeongsan and Yeongcheon. ○ Establishing the final production method by setting the enzyme processing condition of the <i>Zizania latifolia</i> extract and verifying the increase in the tricin content. ○ In the <i>in vivo</i> UVB study, a group of <i>Zizania latifolia</i> extracts has a positive effect on the skin's surface layer and upper skin cells, while reducing wrinkles. ○ Completed streamline manufacturing process due to reproduce the content and clinical trial pilot plant. ○ Clinical trial test showed improvement in various indicators such as moisture content, elasticity of skin and thickness of skin. ○ Individual recognition data completion and application ○ Promote the products of inner-beauty through various overseas marketing 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Securing functional food materials for promoting new skin health with high active substances ○ Development high value-added products that underutilized in the food industry as a functional material ○ Development of a new functional food material with high active substance and core technology for developing high value-added new materials ○ Securing competitiveness in the functional food market by developing new materials for skin health market ○ Improving competitiveness in the overseas market by developing excellent materials through the utilization of domestic natural resources ○ Can be applied to composition of active substances based on the structure of the active materials identified in this project 				
Keywords	Gramineae	<i>Zizania latifolia</i>	Functional food	Wrinkle	Sensitive skin

< Contents >

1. Introduction	1
1.1. Purpose of the study	1
1.2. Background of the study	3
1.3. Scope of the study	23
2. Global R&D status	30
3. Experimental contents and results	37
3.1. Materials and methods	37
3.2. Time schedule of the experiment	58
3.3. Experimental results	59
4. Achievement rate and contribution to the related industry	136
4.1. Achievement rate	136
4.2. Contribution rate to related industry	143
5. Plan of experimental results	143
6. Foreign scientific and technological information collected during the process of study	146
7. Confidential rate of the research results	147
8. Facility and equipment registered to national science & technology general information system	147
9. Safety measures applied to the laboratory	147
10. Representative research results	148
11. Others	149
12. References	149

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1.1. 연구개발 목적	1
1.2. 연구개발의 필요성	3
1.3. 연구개발 범위	23
2. 국내외 기술개발 현황	30
3. 연구수행 내용 및 결과	37
3.1. 실험방법	37
3.2. 추진일정	58
3.3. 연구수행결과	59
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	136
4.1. 목표달성도	136
4.2. 관련분야 기여도	143
5. 연구결과의 활용계획	143
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	146
7. 연구개발결과의 보안등급	147
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설, 장비 현황 ...	147
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ...	147
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	148
11. 기타사항	149
12. 참고문헌	149

1. 연구개발과제의 개요

D-03

1-1. 연구개발 목적

가. 연구개발의 최종 목표

- 본 연구팀의 선행연구를 통하여 우수한 활성이 확인된 고장초 추출물의 항염, 항알러지, 미백 및 주름개선 유효물질과 유사 활성물질을 함유하고 있는 벼과식물을 바탕으로, 환경변화에 따라 수요 증가가 예상되는 미래식품용 피부건강 기능성 식품소재를 개발하고 산업화하고자 함.



그림 2. 연구 목표

나. 주요 내용

- (1) 고장초 함유 소재 최적 대량추출 공정 확립
- (2) 표준화 원료의 지표, 활성성분 분리, 분석
- (3) 활성성분, 표준 원료에 대한 기능성 평가 및 기전 연구 (*in vitro*)
- (4) 기능성 원료의 동물을 이용한 효능 평가 (민감성 피부염, 미백, 피부노화 관련 *in vivo* 활성)
- (5) 고부가가치 피부건강 증진 식품 시제품 개발 및 산업화
- (6) 피부건강 증진 기능성 원료의 인체적용시험을 통한 기능성 규명
- (7) 효능 극대화를 위한 고장초 함유 복합소재 활용 고부가가치식품 산업화
- (8) 원료 및 제품의 안전성 관련 품질 검사(계명대 국가공인 검사기관 인프라 활용 중급속, 농약, 유해미생물, 영양성분 등 분석)
- (9) 식약처 기능성 인정 신청자료 작성
- (10) 논문, 특허 등의 전임상 자료를 활용한 홍보, 마케팅 전략 수립 및 유통 확보를 통한 고부가가치식품 출시에 따른 사업 기간 내의 주관기업의 매출 증대

다. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2015	원료 및 제조공정 표준화 (1세부)	○ 원재료 표준화 · 산지별 특성 비교

			<ul style="list-style-type: none"> · 원재료 기준 및 시험법 확립 ○ 추출조건 확립 · 용매, 온도, 시간, 건조방법 등 ○ 시험법 재연성 확립 및 표준화 · 시험법 밸리데이션 ○ 분말화 공정개발 · 열풍, 분무, 동결, 진공건조 · 적정 부형제 선발
		피부개선 활성성분 (flavonolignan) 정량 분석법 정립 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지표성분의 조제 ○ 지표성분의 HPLC 및 LC/MSMS 분석법 확립 ○ 미백 및 보습효과를 나타내는 물질 및 고장초 추출물과 복합 원료의 정성, 정량분석을 통한 원료 표준화
		고장초 함유 소재의 피부생리활성 평가(in vitro), 원료의 품질평가 (2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고장초 함유 소재의 기본 활성 평가 · 항산화, 항염, 항알러지 활성 측정 ○ 미백효능 검증 · Tyrosinase 억제활성 측정(mushroom tyrosinase 및 melanoma cell 이용) · 멜라닌 생성 억제활성 ○ 피부주름 개선 활성 측정 · Fibroblast cell을 이용한 세포증식능, procollagen 합성, MMPs 발현, collagenase 억제활성 측정 ○ 원료, 소재의 안전성 평가 · 농약, 중금속, 위해미생물 검사
2차 년도	2016	인체적용시험용 시제품 생산 및 건강지향식품 개발 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공정최적화 · 추출 → 농축 → 건조 → 제제 · 공정 단계별 기능(지표)물질 이행률, 최종 수율 계산 및 실측 ○ 대량생산 공정개발(Scale Up) · 1, 5, 10kg 생산 · 대량생산별 지표물질 이행률 측정 ○ 인체적용시험 시제품 생산 · 일반식품 품목허가 ○ 건강지향식품 개발(1건 이상) ○ 제형화 연구, 안정성 평가 및 유통기간 설정 · 생체이용률을 고려한 제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 기초 분말 용출률 측정 - 각종 제제 개발 및 용출률 측정 - Cyclodextrin 포접 실험을 통해 용출을 증대 (30분 이내 85%이상 용출 확보) · 음료, 과립 등 다양한 제형 개발 · 안정성 평가: 장기보존, 가속, 가혹시험
		고장초로부터 분리된 생리활성 물 질 flavonolignan 외에 벼과 식물	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생리활성 물질의 추출 및 분획물 조제 ○ 생리활성 물질의 추적분리

3차 년도	2017	로부터 피부개선 활성 물질 분리 및 구조 규명 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리된 화합물의 기기분석 및 구조 확인 동정
		표준화 소재의 미백, 피부노화 개선평가(in vivo), (시)제품의 품질 평가 (2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미백기능 평가 <ul style="list-style-type: none"> · 자외선 조사에 의한 유색 guinea pig의 색소침착 억제 및 개선평가 ○ 노화방지 평가 <ul style="list-style-type: none"> · 자외선 조사에 의한 hairless mouse의 피부주름, 조직염색, collagen/MMP1, 13 발현 등 측정 ○ 민감성 피부 개선 효과 평가 <ul style="list-style-type: none"> · 아토피 피부염 유발 마우스를 이용한 혈청 IgE, histamine, cytokines 등 측정 ○ 개발 고부가가치 (시)제품의 품질평가 <ul style="list-style-type: none"> · 농약, 중금속, 위해미생물, 영양성분 검사
		건강기능식품 기능성원료 인정 신청서 작성 및 건강지향식품 개발 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 안정성 평가 및 유통기간 설정 ○ 건강기능식품 기능성원료 인정 신청서 작성 <ul style="list-style-type: none"> · 기원, 개발경위, 국내외 인정/사용현황 · 제조방법 및 그에 관한 자료 · 원료 특성 자료 · 기능(지표)성분 규격 및 시험방법 · 유해물질 규격 및 시험방법 · 안전성 자료 · 기능성 자료 · 섭취량 및 섭취 시 주의사항 · 의약품과 같거나 유사하지 않음 자료 ○마케팅 전략 수립 <ul style="list-style-type: none"> · 국내외 영업전략 개발 · 국내외 전시회 참가 ○건강지향식품 개발(1건 이상) <ul style="list-style-type: none"> · 제형 및 제제 결정 · 일반식품 품목허가 취득
		소재 개별인정을 위한 유효성분 함유 음료에 대한 인체 피부 임상 연구 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 음료 복용 후 인체 피부 보습개선, 피부 주름개선, 피부미백개선 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> · Corneometer를 이용한 피부보습 평가 · Visiometer를 이용한 피부주름개선 평가 · Spectrometer를 이용한 피부미백개선 평가 · 육안평가, 기기평가, 설문 및 피부이상반응 평가
		활성물질/소재의 작용기전 규명 (2협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성물질 및 최종 소재에 대한 작용기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> · MAPKs(p38, cFos, c-Jun, JNK, AP-1 등) 발현 측정-Western blot, PCR · Cytokines, SOD, CAT 등 관련 조절인자 측정-ELISA, assay kit ○ 제품의 품질평가

1-2. 연구개발의 필요성

가. 고장초를 비롯한 벼과식물 활용 기능성식품소재 개발 및 산업화 - 친환경/건강/경쟁력

있는 기능성 식품에 대한 요구도 증가

(1) 줄(줄풀, 고장초)

- 줄은 고장초(菰蔣草, 줄풀을 뜻하는 한자어)의 순우리말
- 학명 *Zizania latifolia (Griseb.) Turcz. ex Stapf*
- 중국명: 茭白, 일본명: マコモ
- 국가생물종지식정보시스템(산림청)의 줄(고장초) 자료

기본정보

주소복사 | 상세정보 스크랩 | VoiceEye코딩생성



- 식물명: 줄 [줄풀]
- 학명: *Zizania latifolia (Griseb.) Turcz. ex Stapf*
- 분류군: Gramineae(벼과)
- 일어: マコモ
- 영문:

이미지출력 | 이미지보기

기본정보 | 본문도 | 중차정보

일반정보

개화기

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

꽃색:

분포: ▶한국, 중국, 일본, 동남아시아, 러시아에 분포한다. ▶전국적으로 분포한다.

형태: 여러해살이풀이다.

크기: 꽃대는 높이 1-2m이다.

그림 3. 국가생물종지식정보시스템(산림청)의 줄(고장초) 자료

줄기: 곧게서며 기부의 마디에서 막뿌리가 나온다. 줄은 녹색이며 매끄럽다.

뿌리: 진흙 속에서 굵고 짧은 근경과 짧은 줄기가 옆으로 길게 뻗으면서 번식하여 군집을 이룬다.

잎: 잎은 길이 50-100cm, 폭 2-3cm로서 납작하고 두꺼우며 곧게 서고 잘잘하며 기부는 점차 가늘어지면서 엽초로 된다. 엽초는 갓송줄로서 두꺼우며 털이 없다. 잎혀는 세모진모양으로서 백색이고 막줄이며 끝이 둔하거나 뾰족하다.

꽃: 꽃대는 높이 1-2m로서 8-9월에 길이 30-50cm의 큰 원뿔모양꽃차례가 발달하며 가지는 반음생하고 갈라지는 곳에 털이 있다. 雌小穗는 원부분에 선상 피침형으로 달리며 길이 2-3cm로 1개의 암꽃으로 되고 연한 활록색이며 끝에 긴 까락이 있고 호영과 내영의 2개로 된다. 호영은 두껍고 5맥이 있으며 끝에 14-20mm의 까락이 있고 내영은 호영과 길이가 같으며 3맥이 있다. 雄小穗는 밑부분에 달리고 연한 자줏빛이 돌며 길이 6mm 정도로서 좁은 피침형이고 끝이 뾰족하지만 까락이 없으며 호영, 내영 및 6개의 수술로 된다.

생육환경: ▶넙기나 못, 늪에서 크게 무리지어 자란다.

이용방안: ▶곡수병의 기생으로 불룩하게 된 줄기를 고백(菰白)이라 하여 쌀과 같이 식용한다. ▶잎은 도롱이, 차양 및 자리를 만드는 데에 쓰인다. ▶菰核(군핵)은 교백, 根莖 및 根은 菰根(고근), 과실은 菰米(고미)라고 하며 약용한다. ①고백 ①약효: 熱毒(열독)을 풀어 주고 止癩瘡(지반갈), 利二便(이이변)의 효능이 있다. ②類熱(번열), 消渴(소갈), 黃疸(황달), 痢疾(이질), 赤目(적목), 風痛(풍창)을 치료하고 酒毒(주독)을 해소한다. ③용법/용량: 30-60g을 달여서 복용한다. ④菰根(고근) ①약효: 화상, 肺胃癰熱(강위고열), 多尿(다뇨)를 치료한다. ②용법/용량: 신선한 것 60-90g을 달여서 복용한다. <외용> 燒存性(소존성)으로 구어 분말하여 調布(조포)하다. ③菰米(고미) ①9-10월에 성숙한 과실을 따서 외피를 제거하고 햇볕에 말린다. ②성분: 엽과에는 단백질, 지방유, 탄수화물, 灰分(회분)이 함유되어 있다. ③약효: 止渴(지갈), 解熱(해열), 調臟胃(조장위)의 효능이 있다. 심장병을 치료하고 또 이뇨제도 된다. ④용법/용량: 9-15g을 달여서 복용한다.

그림 4. 국가생물종지식정보시스템(산림청)의 줄(고장초) 자료

(2) 고장초 판매현황

- 고장초는 고장초, 줄풀 등의 이름으로 약재상에서 판매되고 있음
- 가격은 100g 기준 3,000 ~ 4,500원 정도로 거래되고 있음
- 2015년 5월 TV조선의 “내 몸 사용 설명서”라는 프로그램에서 피부 가려움 개선 등 피부질환에 효과적인 식물소재로 소개된 후 판매량이 증가하고 있음

(3) 고장초 국내 재배 현황

- 국내 풀향기 영농조합에서 재배 농장을 가지고 고장초를 재배하고 있음.
- 계약 재배 시 연간 최소 5톤 이상의 물량이 공급 가능함을 확인.
- 고장초는 국내 자연 환경에서 매우 잘 서식하는 특징이 있어 국내 여러 한약재 공급 업체로부터 쉽게 구매 가능함.

그림 5. 고장초 국내 재배 현황

(4) 고장초 식품 허가 현황

- 출풀(고장초)은 모든 부위가 식용으로 허가되어 있음

원재료	이명	학명	용역명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
출풀 (Mudwort, Bastard plantain)	거미출풀	<i>Limonium aquaticum</i> Linne				
출	출풀, 고박, 고순	<i>Zizania latifolia</i> (Griseb.) Turcz. ex Stapf <i>Zizania caduciflora</i> (Turcz.) Hand.-Mazz. ex Trin. (이명)		출기 / 미 / 질		

그림 6. 식품의약품안전처 고장초 등재 현황

(5) 벼과식물

- 고장초에 함유된 대표적인 이차대사산물은 tricinin과 tricinin derivatives 임.
- 이들은 고장초 뿐만 아니라 벼과식물인 갈대, 억새, 벼에도 존재한다고 알려져 있음.
- 벼과식물에는 이러한 물질 외에도 고장초에 없는 다른 기능성 성분들이 다수 존재함.
- 고장초와 벼과 식물을 혼합하여 기능성분의 시너지 효과를 얻을 수 있음.

(6) 벼과식물 활용 식품소재 개발 현황

- 벼과식물 생산현황

2012	Rice	Red pepper	Chinese cabbage
Cultivated area (ha)	849,172	45,459	13,408
Production (1000 ton)	4,006	104	1,298
Amount (thousand million won)	8,870	2,814	1,217

그림 7. 벼과식물 생산현황

- 국내 관련기술 현황 : 벼 (*Oryza sativa* L.) 뿌리에서 보고된 화합물 [Ref. 1]
 - momilactone A; 항균 활성
 - stigmastenone
 - stigmasta-4,22-dien-3-one
 - ergosterol peroxide; 항염증 활성
 - smilaside A : 미백활성
 - ligraminol B

나. 피부건강 관련 식품소재 개발 및 산업화 현황

(1) 사회, 생활 및 경제 환경 변화에 대한 대비

- 국내 노인인구는 빠른 속도로 증가하고 있는데 지난 2000년 전체인구의 7.2%를 차지 하던 65세 이상 고령인구는 오는 2017년에는 14.0%, 2026년에는 20.8%로 확대되는 등 가파른 성장세를 보이고 있음.
- 한국보건산업진흥원이 실시한 바이오산업 관련설문에서는 전 세계적으로 20~30대 젊은 세대의 주요관심이 '항노화'인 것으로 나타났음.
- 항노화와 연관된 피부건강 관련하여 특히, 주름에 대한 관심은 우리나라를 비롯한 아시아인이 큰 관심을 갖고 있는 것으로 나타났는데, 국내 소비자 중 65%는 주름에 대해 가장 높은 관심도를 보였고, 인도가 61%, 중국이 58%로 그 뒤를 이음.
- 이와 같은 고령화인구의 증가 및 경제적 성장에 따른 삶의 질 향상에 대한 관심 증가에 따라 질병의 치료보다는 예방을 위한 제품과 장기복용 시에도 안전한 소재에 대한 수요가 늘고 있으며, 또한 원인이 다양하고 복잡한 만성질환인 피부노화 예방과 개선을 위한 소재의 경우 실제적인 효능 발현을 위해서는 피부건강 관련 복합적 다기능 소재를 활용한 제품 개발이 필요함.
- 세계적으로 사회 환경의 급변에 따른 스트레스 및 미세먼지 등의 오염물질들이 증가하면서 효능이 검증된 피부건강 훼손 예방 및 생리활성 증진을 위한 안전한 소재와 제품의 필요성은 확대될 것임.
- 한-미, 한-유럽, 한-중 FTA에 의한 농축산물 수입개방에 의해 국내 농축산업 기반 붕괴의 우려가 높아지고 있으므로 새로운 산업 농가환경을 대비하고 농산물 자원의 고부가가치화에 대한 지원이 필요함.

(2) 최근 세계적으로 고부가가치의 기능성 뷰티푸드 시장 활성화

- 최근 동안, 안티에이징(anti-aging)에 대한 관심과 이미 한류를 견인하는 품목으로 자리 잡아 한층 소비 규모가 커진 뷰티시장은 다양화 되고 다기능의 화장품 출시와 특히 내면적인 아름다움을 추구하는 이너뷰티(Inner beauty)트렌드가 확산되면서 미래의 피부영양, 피부건강의 관심과 이너뷰티트렌드 시대의 성장이 눈에 띈.
- 남녀노소 불문한 미용에 대한 관심의 증대와 미용과 식품의 일체성이라는 의식 변화로 인해 뷰티푸드(피부건강 증진 식품)는 새로운 블루오션으로 성장
- 시장 초기에는 다이어트에 도움이 되는 제품이 주를 이뤘지만 이후에는 콜라겐, 코엔자임Q10, 히알루론산, 피크노제놀 등의 뷰티 고기능성 원료를 중심으로 한 미용식품의

영역이 형성되기 시작되었으며, 달맞이꽃 종자유 유래 감마리놀렌산의 경우 피부노화를 예방하고 아토피와 건조증 같은 피부질환 개선 등에 폭넓게 사용되고 있음.

- 최근에는 피부보습, 항산화, 탄력, 슬리밍, 미백 등 바르는 화장품의 기능을 그대로 갖춘 다양한 제품이 등장하며 시장 확대 주도
- 일본의 이너뷰티 시장이 2천 42억 5천만 엔(현재 환율 기준 2조 3천 157억 원) 시장 규모로 안정적인 성장세를 보이고 있다. 이에 비해 한국은 15분의 1규모지만 높은 성장률이 예측됨.
- 일본의 종합 기획 센터 오사카는 최근 지난 4월부터 6월에 걸쳐 실시한 미용 식품(이너뷰티) 시장에 대한 조사 결과에 따르면 2012년 일본 미용 식품 시장은 전년 대비 3.1% 증가한 2천 42억 5천만 엔으로 나타남.
- 시장 성장의 요인으로는 스틱 젤리 등 새로운 제형의 개발과 플라센타 등의 신성분의 발견에 있는 것으로 분석됨. 또한 피부미용, 노화방지, 미백, 차가운 체질 개선 등 4가지 분야로 나뉘어 고른 성장을 보이고 있음. 분야별로는 서플리먼트가 1929억 엔으로 대부분을 차지하고 있으며 새로운 제형인 스틱젤리가 88.5억 엔으로 2위를 차지했으며, 간식류의 가공식품이 25억 엔 시장으로 확인됨.
- 한국의 이너뷰티 시장도 작지만 순조롭게 성장하고 있음. 업계 자료에 따르면 2012년도 국내 이너뷰티 시장의 시장 규모는 1천 500억으로 이너뷰티 강국인 일본에 비해선 아직 15분의 1 규모에 그침. 하지만 지속적으로 성장하고 신소재 개발 요구가 증가될 것으로 예상됨.
- 한국의 이너뷰티 시장은 대부분의 매출이 콜라겐과 히알루론산 등 피부 미용에 집중되어 있는 편이지만 최근에는 미백 등 새로운 분야로 확대되고 있음. 또한 아모레퍼시픽과 LG생활건강, CJ 등 대기업과 화장품 기업, 제약회사까지 합세해 다양한 신제품이 출시되고 있는 추세임.

(3) 국내 관련기술 현황

(가) 건강기능식품과 건강지향식품의 차이

	건강기능식품	건강지향식품
원료	개별인정형 원료	식품의 원료
기능성 및 효능 표시	질병명은 표기할 수 없으나, 식약청에서 지정한 기능에 대한 내용 표기 가능 (2012년 현재 총 24가지 기능성 분야 표기 가능하며, 3등급으로 구분하여 기능성 내용 표기)	불가능
섭취	1일 섭취량이 정해져있으며, 제품에 표기되어 있음	권장량은 있으나, 특별하게 제한을 두지 않음
판매	일반 식품과는 분리하여 매대를 설치해야 함 건강기능식품 판매 허가를 받아야 판매 가능	식품 판매업체에서 판매
제형	정제, 캡슐, 환, 과립, 약상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등 12가지 제형이 있으며, 2008년부터 제형의 규제가 삭제되어 그 외 다양한 제형 개발 가능 (예: 두부 등)	음료, 쿠키, 껌, 캔디, 떡, 두부 등 다양한 유형 판매 가능
인증	식약청으로부터 건강기능식품 마크	특별한 인증 없음

(나) 건강기능식품 및 건강기능식품 시장에서 마케팅의 중요성

- 국내 기능성식품 시장은 유통라인에 따라 소비자의 제품 선호도가 크게 다름
- 유사 기능의 원료 및 기능성 식품도 마케팅 역량에 따라 제품의 판매량이 크게 달라질 수 있음
- 따라서 유통구조 및 특성을 파악하고 소비자 니즈를 분석하여 시장에 접근하는 것이 성공에 큰 영향을 미침
- 우수한 효능의 원료를 개발하는 것도 중요하지만, 적법한 범위에서 제품의 차별화된 장점을 부각시키고 각 유통채널별로 적합한 제품을 개발하여 판매하는 전략의 구축이 매우 중요함
- 국내 식품 유통 채널의 다양성

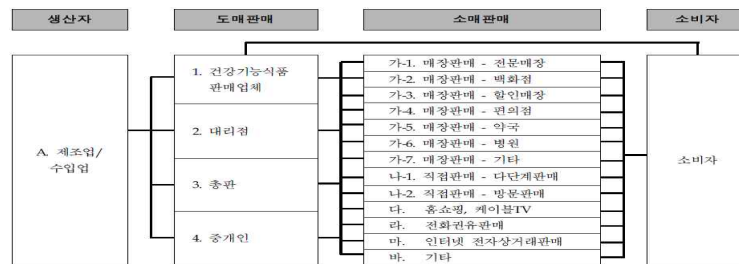


그림 8. 국내 식품 유통 채널의 다양성

- 2010년 기준 건강기능식품 유통채널별 매출 점유율은 다단계(38.4%)와 방문판매(21.4%)가 매출의 절반 이상을 차지하였으며, 그 다음으로는 전문매장(15.4%), 홈쇼핑(5.9%), 백화점(4.8%), 인터넷(4.6%)로 조사되었음
- 2012년 이후 전문매장 및 인터넷 판매가 빠르게 성장하고 있으며 실버세대의 IT 접근성이 증가하고 있으므로 새롭게 변화되는 경향을 파악한 틈새시장 공략 및 제품 개발안 구상이 필요함
- 주관기업(주)비티씨의 수출 전문 역량 : 국내 시장의 한계 극복을 위해 필요
 - Gencor, SanF등 다양한 해외 partnership 구축
 - 국·내외 전시회 참가 및 홍보
 - Gencor를 통한 돌외일 주정 추출분말의 수출 실적
- (다) 피부건강, 피부미용은 여러 수단에 의해 피부의 신진대사 및 생리활성을 촉진시키고, 영양공급을 통해 건강하고 아름다운 피부를 관리하는 행위임. 피부에 직접적인 처리를 하는 화장품분야와 피부에 도움이 되는 유효성분을 함유한 식품을 섭취함으로써 주름 개선을 비롯한 피부미용 효과를 얻으려는 ‘inner beauty’ 개념을 기반으로 하는 건강기능식품의 분야가 있음(Kim EA 2007; Park CS 2007)
- (라) 피부미용 관련 건강기능식품은 피부를 구성하고 있는 표피, 진피, 피하조직을 유지하고, 나이에 따른 내인성 노화, 자외선에 의해 유발되는 외인성 노화를 개선하는데 유효한 기능성 식품임(Kim EA 2007; Kim 등 2009; Lee 등 2008)
- (마) 2011년 현재 고시형 건강기능식품에는 엽록소, 알로에, 스쿠알렌, 베타 카로틴 등 4종이며, 개별인정형 건강기능식품에는 소나무껍질추출물, 홍삼, 사상자, 산수유 복합추출물, N-아세틸 글루코사민, 곤약 추출물, 콜라겐효소 분해 펩타이드, 히알우론산

나트륨, 쌀겨 추출물, 지초추출분말 등 8종이 있으나, 다른 분야에 비해 비교적 적은 편임(국회법률정보시스템 2011; Lee 등 2011)

(바) 피부미용 관련 건강기능식품 분야는 크게 발전하고 있는 기능성 화장품에 비해 관심이나 연구가 적은 편이지만, 표피의 개선으로는 한계가 있기 때문에 식품을 통한 섭취로 진피층을 유지함으로써 피부미용을 개선하는 이 분야의 전망은 밝다고 할 수 있음.

(4) 관련기술 경제적·산업적 중요성

- 2004년 1월 전면 시행된 건강기능식품법률에 따라 기능성이 과학적으로 검증된 제품만이 상품으로 시장에 출시할 수 있음.
- 기능성 소재 또는 생리활성소재를 개발하기 위해 과학적 연구를 수행하고 이를 제품화하는 과정에서 기능성, 안전성 및 안정성에 관한 원천기술력 확보를 통해 관련 산업분야에 파급효과 창출 가능.
- 줄풀(고장초)은 전통적으로 민간에 사용되어 왔고 약재상에서 판매되고는 있으나, 고장초의 효능과 안전성에 관한 관련 기술개발, 상품개발이 거의 전무한 상태이므로 시기적절한 연구로 기능성, 안전성이 검증된 부가가치 높은 상품을 개발할 수 있음.

다. 관련기술에 대한 신청연구팀의 선행연구결과

(1) 고장초 추출물의 미백활성 및 활성 물질 규명

(가) 고장초 추출물의 멜라닌 생성 억제능 확인 실험

- B16-F0 melanocyte의 triclin glycoside에 대한 세포 독성 평가 결과, 5 ppm 밑의 농도에서 세포 독성이 나타남을 확인하였으며, 본 데이터를 기초로 고장초 추출물의 농도를 독성이 없는 0.5, 1, 5 ppm으로 선정함.
- α -MSH로 멜라닌 과생성이 유도된 B16-F0 melanocyte의 triclin glycoside에 대한 멜라닌 생성 억제 평가 결과, triclin glycoside의 농도 의존적으로 멜라닌 생성 억제가 나타나는 것을 확인하였음. 이 때, 대조군으로, 알부틴(Albutin)을 이용하였으며, 알부틴(20, 100 μ M)을 처리하였을 때 멜라닌의 생성이 80%에서 63%로 감소됨을 확인함으로써 양성대조군으로 활용 가능하다고 판단하였음.

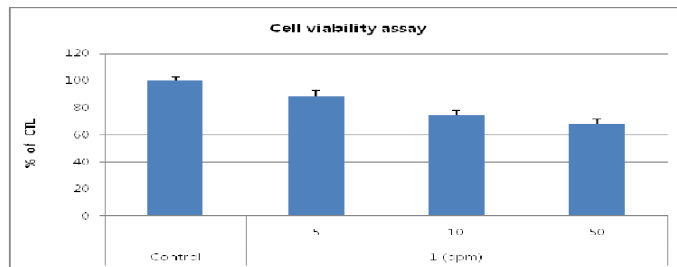


그림 9. 멜라닌 세포의 생존 능력

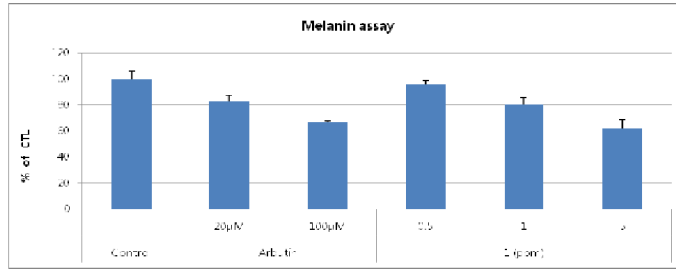


그림 10. 단일 물질(Tricin glycoside)의 멜라닌 생성 억제능

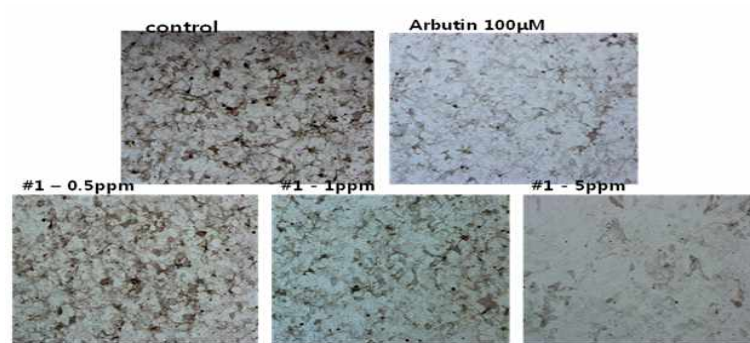


그림 11. 단일 물질(Tricin glycoside)의 멜라닌 생성 억제 세포 사진

(나) 미백 활성 물질 분리 및 구조 규명

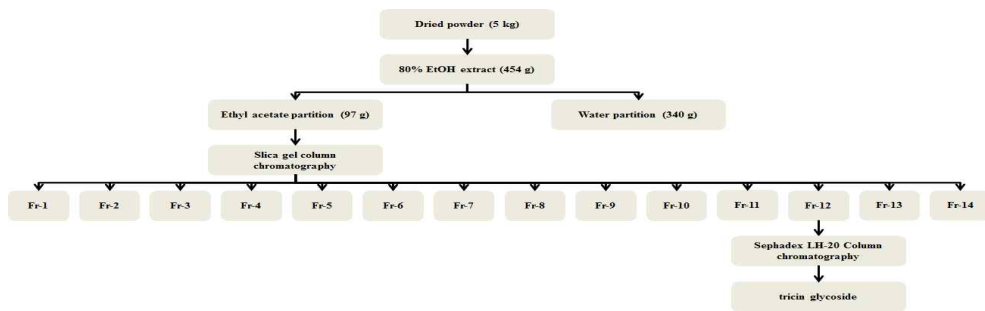


그림 12. Tricin glycoside 분리 모식도

그림 13. 미백 활성 물질 (Tricin glycoside)

- 특허 출원: 고장초 추출물을 포함하는 미백 조성물 및 그 제조 방법 : 특허등록 제 10-2014-0011440호(2014.01.29.)

(2) 고장초의 주름 개선 활성 및 활성 물질 규명

(가) 프로콜라겐 생합성 촉진 실험

- 24시간 배양시킨 섬유아세포를 PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 1회 세

척 후 무혈청 DMEM 배지(serum free -Dulbecco's Modified Eagle Medium) (WelGENE, Inc. 한국)로 교환하여 6 시간 동안 배양하였음. 섬유아세포의 배지를 제거하여 PBS로 1회 세척 한 후 무혈청 DMEM 배지(WelGENE, Inc. 한국)에, DMSO에 녹인 추출물 및 분획을 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 희석하고 200 μ l씩 처리하여 72시간 동안 배양하였음. 배양액을 수거하여 프로콜라겐(procollagen)을 측정하였다. 프로콜라겐(procollagen)은 프로콜라겐 생합성 정도를 측정할 수 있는 프로콜라겐 타입 I-펩타이드 EIA 키트(procollagen Type I C-Peptide EIA, Takara Biomedical Co., Japan)을 사용하여 사용법에 따라 측정하였음. 대조군으로는 고장초 추출물 및 분획을 첨가하지 않은 배지(media)에 섬유아세포 배양한 것과 성장촉진인자(TGFbeta)가 포함된 배지에 섬유아세포를 배양한 것을 사용하였음.

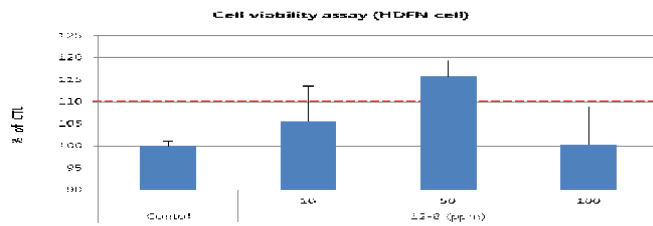


그림 14. 단일 물질(Salcolin B)의 세포독성 효과

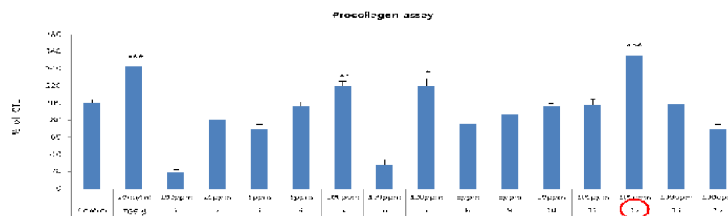


그림 15. 단일 물질(Salcolin B)의 프로콜라겐 생합성 능력

(나) 주름 개선 활성 물질 분리 및 구조 규명

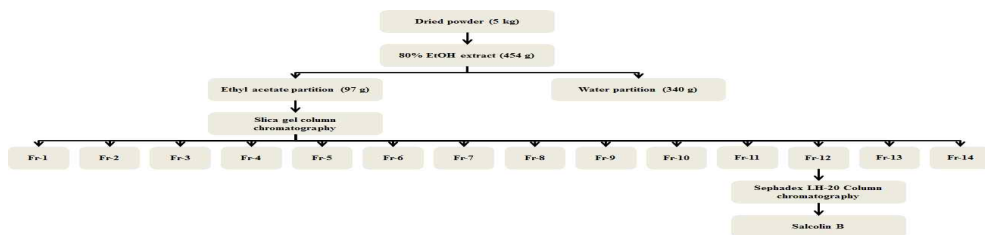


그림 16. Salcolin B 분리 모식도

그림 17. 주름 개선 활성 물질 (Salcolin B)

- 특허 출원: 고장초 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 조성물 : 특허등록 제

10-2015-0024387호(2014.01.29.)

(3) 고장초의 항염·항알러지 효능평가

(가) 고장초 추출물 및 분획의 항알러지 활성(*in vitro*)

- 고장초의 항알러지 효능을 비만세포 활성화에 따른 히스타민 분비 및 알러지 유발 사이토카인 분비 억제 활성으로 평가하였음.
- 고장초 메탄올, 에탄올 및 분획에 대하여 비만세포주 RBL-2H3 세포를 antigen으로 활성화시켜서 beta-hexosaminidase(histamine 마커) 방출을 유도하여 이에 대한 억제 효과를 측정.
- 추출물은 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도의존적으로 beta-hexosaminidase 방출을 억제하였으며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50% 이상의 억제활성을 나타냈다. 추출물의 세포에 대한 독성은 나타나지 않았음. 또한, 5가지 분획 중 chloroform층과 ethylacetate층에서 높은 억제활성을 확인하였으며, ethyl-acetate층에서는 독성이 나타나지 않았음.
- 비만세포 활성화에 따른 전염증인자인 TNF- α 분비도 추출물의 농도 의존적으로 억제되었으며, 활성화에 따른 탈과립에 대해서도 억제 활성을 확인하였음.

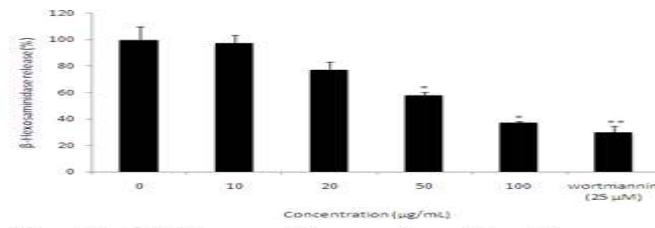


그림 18. Inhibitory effects of methanol extract from *Zizania latifolia* on β -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA. RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were sensitized with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight and pretreated with varying doses of methanol extract from *Z. latifolia* for 10 min. Cells were stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DNP-BSA for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of β -hexosaminidase in culture media. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments. *Values are significantly different from control ($*p<0.05$, $**p<0.01$).

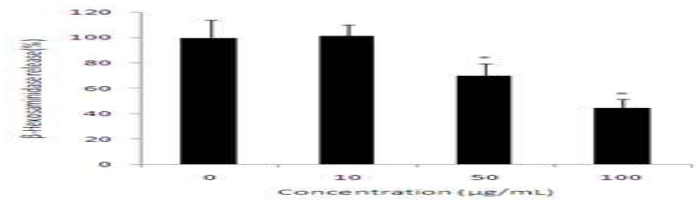


그림 19. Inhibitory effects of 70% ethanol extract from *Zizania latifolia* on β -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA. RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were sensitized with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight and pretreated with varying doses of 70% ethanol extract from *Z. latifolia* for 10 min. Cells were stimulated with 10 μ g/mL of DNP-BSA for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of β -hexosaminidase in culture media. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments. *Values are significantly different from control (* $p < 0.05$).

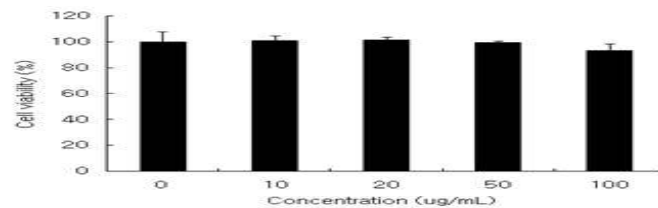


그림 20. Cytotoxic effects of methanol extract from *Zizania latifolia* on RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells (3×10^4 cells) were cultured with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. After treatment with varying doses of methanol extract from *Z. latifolia*, cells were cultured for 12h. The cytotoxicity of methanol extract from *Z. latifolia* on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments.

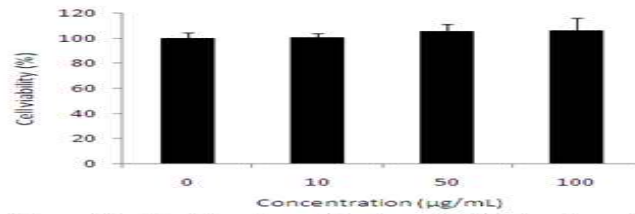


그림 21. Cytotoxic effects of 70% ethanol extract from *Zizania latifolia* on RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells (3×10^4 cells) were cultured with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. After treatment with varying doses of 70% ethanol extract from *Z. latifolia*, cells were cultured for 12h. The cytotoxicity of 70% ethanol extract from *Z. latifolia* on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments.

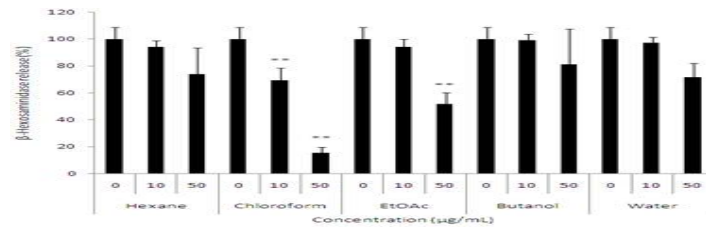


그림 22. Inhibitory effect of each fraction from *Zizania latifolia* on β-hexosaminidase released from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA. RBL-2H3 cells (2×10^5 cells) were sensitized with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight and pretreated with varying doses of each fraction from *Z. latifolia* for 10 min. Cells were stimulated with 10 µg/mL of DNP-BSA for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of β-hexosaminidase in culture media. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments. *Values are significantly different from control (** $p < 0.01$).

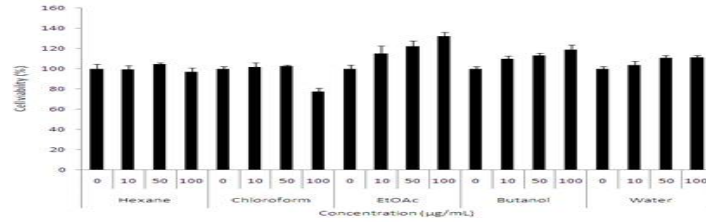


그림 23. Cytotoxic effects of each fraction from *Zizania latifolia* on RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells (3×10^4 cells) were cultured with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. After treatment with varying doses of each fraction from *Z. latifolia*, cells were cultured for 12h. The cytotoxicity of each fraction from *Z. latifolia* on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments.

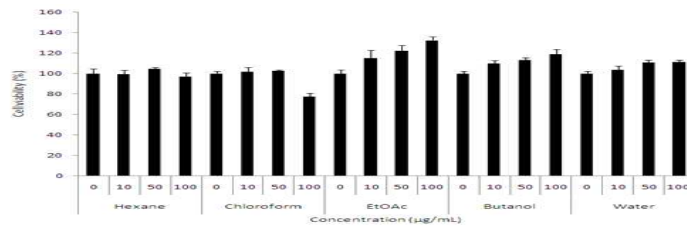


그림 24. Cytotoxic effects of each fraction from *Zizania latifolia* on RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells (3×10^4 cells) were cultured with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. After treatment with varying doses of each fraction from *Z. latifolia*, cells were cultured for 12h. The cytotoxicity of each fraction from *Z. latifolia* on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean \pm S.D. of three different experiments.

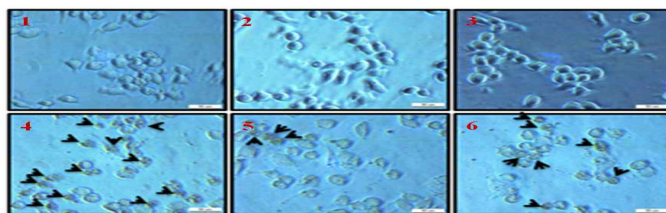


그림 25. Light microphotographs using inverted microscopy (magnification $\times 600$) of RBL-2H3 cells without (1, 2, 3) or with (4, 5, 6) treatment of 50 $\mu\text{g/mL}$ compound 48/80 for 40 min. The *Zizania latifolia* methanol extract were pretreated for 10 min (2, 5:100 $\mu\text{g/mL}$, 3, 6:50 $\mu\text{g/mL}$) prior to the stimulation with compound 48/80. Arrow shows degranulated cells

- 논문게재: 한국식품과학회지 41, 717-721(2009), ‘고장초의 항알레르기 효과’, 양선아 외
- 특허등록: ‘고장초 추출물을 함유하는 알러지 개선용 조성물’(제10-1181321호, 2012.9.4.), 출원인: 계명대학교 산학협력단, 발명인: 양선아 외

(나) 항알러지 및 항염증 활성물질 분석

- 고장초 에탄올 추출물이 높은 항알러지 활성을 나타냈으며, 대식세포주 RAW264.7를 LPS로 자극하여 염증인자인 nitric oxide 생성에 대한 효과를 측정 한 결과도 억제 활성이 매우 높게 나타나 활성물질 분석을 진행함.
- 고장초 ethyl-acetate 분획으로부터 activity-guided fractionation를 반복 실시한 결과, 고장초에서 처음 발견되는 5가지 활성물질을 얻었으며 그 중 가장 활성이 뛰어난 신규 활성을 분리, 구조 동정하였음.

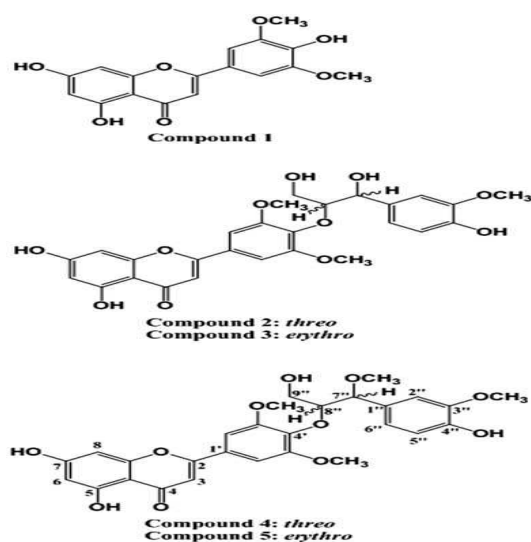


그림 26. Chemical structures of the isolated compounds 1 - 5 from the *Z. latifolia*.

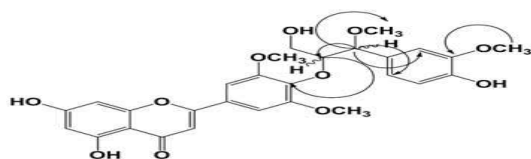


그림 27. Key gHMBC correlations for compound 5.

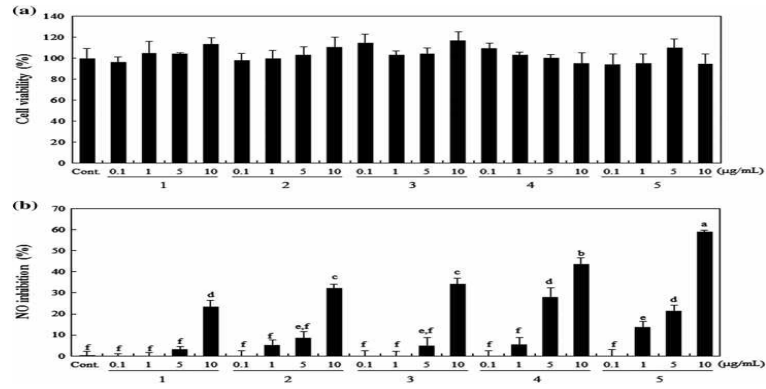


그림 28. Cytotoxicity and inhibitory effects of compounds from *Z. latifolia* on NO production from RAW 264.7 cells stimulated by LPS).

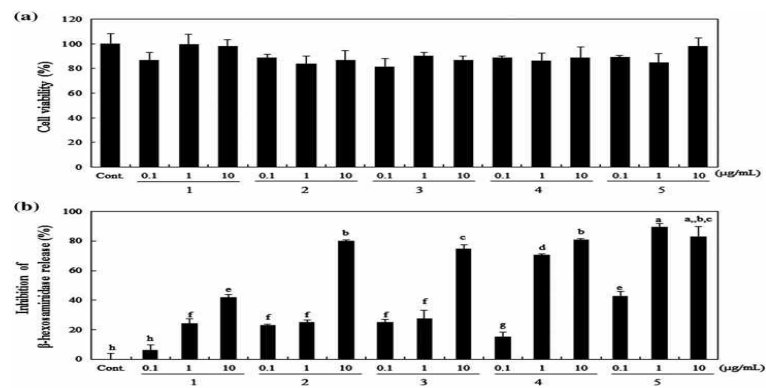


그림 29. Cytotoxicity and inhibitory effects of compounds from *Z. latifolia* on β -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA.

- 논문게재: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79 (5), 700-706 (2015), Tricin derivatives as anti-inflammatory and anti-allergic constituents from the aerial part of *Zizania latifolia*, 방면호, 양선아 외.
- 특허출원: 2015.8.17., 신규한 트리신 유도체 및 이의 의약적 용도, 10-2015-0115492

(4) 고장초로부터 유효물질 분리

(가) 고장초 추출물의 지표 물질 선정 및 정성, 정량 분석

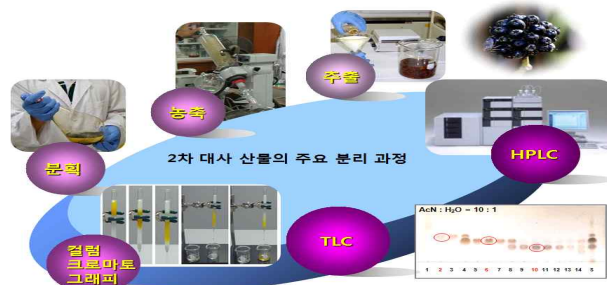


그림 30. 2차 대사 산물의 주요 분리 과정

< MS condition >

- Ion Source : ESI (negative mode)
- Fragmentor : 195 V
- Gas Temp. : 350 °C
- Gas Flow : 10 L/min
- Capillary Volt. : 4 kV
- Nebulizer : 60 psi



그림 33. LC/MS

compound	Range (mg/L)	Conversion equation ^{a)}	r ²	LOD ^{b)} (mg/L)	LOQ ^{c)} (mg/L)	고장초 MeOH 추출물 함량 (mg/g)
1	0.1~10	y=11532.1050x+1125.2411	0.9972	0.0003	0.001	1.05

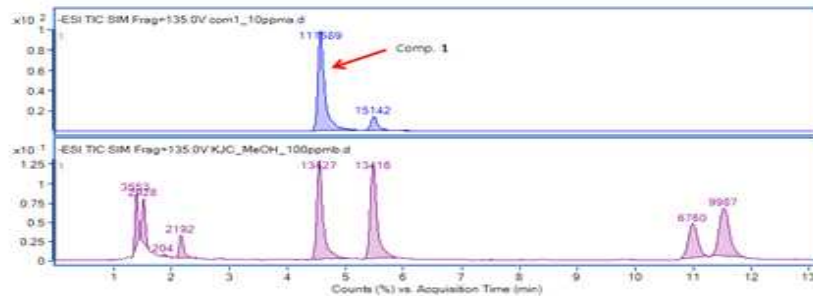
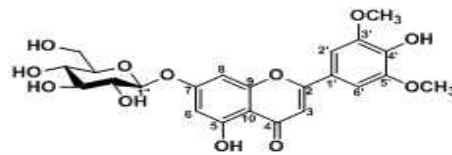


그림 34. 고장초 추출물의 지표 물질 선정 및 정성, 정량 분석

※ ^{a)}y=peak area, x: concentration of analyte (mg/L). ^{b)} LOD, limit of detection. ^{c)} LOQ, limit of quantification

(5) 천연물 활성물질 분석 관련 주요 연구 (경희대 김한근)

- (가) 배추심으로부터 피부 개선 물질 분리 및 구조 규명 (대상(주): '14.02~'14.10.)
- (나) prep-HPLC를 이용한 농약 성분 정제 실험 (동부한농(주):'13.02~'13.08.)
- (다) 기업지원 사업으로 LC/MSMS 및 HPLC를 이용한 정성 정량 분석 경험 다수

(6) 기능성 식품 소재 및 제품 개발 관련 주요 연구 (계명대 양선아)

- (가) 염증 및 알러지 개선용 기능성 제품 개발 (농림부과제: '08.12~'11.12, 총괄책임- 최종 최우수과제 선정)

① 지식재산권 12건

- ㉞ 개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 및 알러지 예방 및 치료용 조성물 : 특허등록 제 10-1144117호(2012.05.02.)
- ㉟ 간 기능 보호 및 개선용 미나리발효액 및 그 제조방법 : 특허등록 제 10-1245191호(2013.03.13.)
- ㊱ 생약 추출물을 함유하는 알러지 개선용 조성물 : 특허등록 제 10-1152654호(2012.05.29.) 외 9건

② 논문 12건(5 SCI, 7 비 SCI)

- ㉔ Hepatoprotective effects of fermented field water-dropwort (*Oenanthe javanica*) extract and its major constituents. Food Chem. Toxicol., 67, 154-160 (2014).
- ㉕ Inhibitory effects of actinidiamide from *Actinidia polygama* on allergy and inflammation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76, 289-293 (2012).
- ㉖ Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. Food Chemistry. 136, 1047-1054 (2013).
- ㉗ 개다래 초임계 박추출물이 염증 및 동맥경화에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 42, 475-480(2010). 외 8건

(나) 생강과식물의 인지기능개선 효능 및 작용기전 연구(연구재단: '11.05~'14.04, 책임자)

① 지식재산권 1건

- ㉔ 향 건망증 및 기억력 증진용 울금발효액 제조방법 : 특허등록 제 10-1480250 (2014.12.31.)

② 논문 6건(3 SCI, 3 비SCI)

- ㉔ 생강 분획의 gingerols 분석 및 초임계 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지. 43, 469-474(2011).
- ㉕ 생강, 울금, 강황 추출물의 항산화 효과, AChE 억제활성 및 GABA 함량. 한국식품영양과학회지. 41, 1395-1401(2012).
- ㉖ 3,5-Bis(aminopyrimidinyl)indole Derivatives: Synthesis and Evaluation of Pim Kinase Inhibitory Activities. Bull. Korean Chem. Soc. 35, 2123-2129 (2014). 외 3건

(다) 인지기능 향상 한방발효 소재 발굴 및 산업화 (지식경제부: '11.12~'13.11, 세부책임)

① 지식재산권 5건


- ㉔ 신규한 락토바실러스 헬베티커스 RMK85 균주 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법 : 특허등록 제 10-1402028호(2014.05.26.)
- ㉕ 락토바실러스 플랜타룸 K154를 이용한 GABA 증진 발효 식물 추출물 제조방법 : 특허등록 제 10-1402031호(2014.05.26.)
- ㉖ 락토바실러스 헬베티커스 RMK85를 이용한 GABA 증진 발효 식물 추출물 제조방법 : 특허등록 제 10-1407231호(2014.06.09.) 외 2건

② 논문 3건(1 SCI, 2 비SCI)

- ㉔ 10가지 식용식물 추출물의 가바, 글루탐산 함량, 아세틸콜린에스테라제 억제 및 라디칼 소거능 비교. 한국식품과학회지. 44, 447-451(2012). 외 2건

(7) 건강기능식품 기능성 원료 개발 및 마케팅 [주관기관: (주)BTC]

(가) 기업개요

 BTC 기능성식품소재 전문기업 (주)비티씨	
대표	김태영

주소	경기도 안산시 상록구 해안로 705 기술고도화동 703호 (기업부설연구소: 913호)	
설립일	2006.05.29	
자본금	2억 3천만원	
사업분야	<ul style="list-style-type: none"> · B2B 형식 건강기능식품 원료 수출입 · 건강기능식품/건강지향식품 생산 컨설팅 · 벤처제조업 	
기업인증	<ul style="list-style-type: none"> · 기업부설연구소(제2010112817호0) · 기술혁신형 중소기업 (이노비즈, 제120602-02067호) · 경영혁신형 중소기업 (메인비즈, 제 120802-04114호) · ISO22000 · 벤처기업인증 (제2014100193호) · 수출유망중소기업(제12경기-225호) · 경기유망중소기업(제2014-028호) · 기능성원료 인증 (돌외잎주정추출물, 가르시니아, 오메가-3, 감마리놀레산 등) 	
지식 재산권	· 국내 특허 7건 등록	
	등록번호	발명의 명칭
	제 10-0866504 호	홍삼 발효용 미생물 및 발효홍삼을 함유하는 식품 조성물
	제 10-0910176 호	쓴맛이 마스킹 된 인삼 건강식품 조성물
	제 10-0949247 호	가공인삼 또는 가공인삼 추출물의 제조방법
	제 10-0965385 호	홍삼 발효용 미생물, 이를 이용한 발효홍삼의 제조방법
	제 10-0970455 호	초고압을 이용한 추출물의 제조방법
	제 10-1168381호	녹차 가수분해물의 면역기능 증강 및 식품 조성물 제조 방법
	제 10-1222677 호	녹차 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화, 피부미백, 항 노화용 조성물
	· 해외 특허 1건 등록, 2건 출원	
출원번호	발명의 명칭	
(미국) NO. 13/ 282,256	Immune activation of green tea hydrolysate and method for preparing food composition containing the same	
(중국) CN 102470155	Method for producing novel <i>Gynostemma pentaphyllum</i> extracts having increased amounts of damulin A and damulin B and pharmaceutical composition for treating metabolic diseases using the same	
(독일) DE 112009005072 T5	Verfahren zur Herstellung eines Extrakts von <i>Gynostemma pentaphyllum</i> mit erhöhten Gehalten an Damulin A und Damulin B sowie pharmazeutische Zusammensetzungen davon zur Behandlung des metabolischen Syndroms	
· 상표권: BTC, FermenGIN, Fatabolizer 등 3건		

(나) (주)비티씨 보유 건강기능식품 개별인정형 원료 현황

No.	제품명	인정일	매출	기능	주요 납품처 및 완제품 유형
1	돌외잎주정 추출분말	2013.01.31	(연평균) 1,780,390천원	1) 체지방감소에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능2등급)	Gencor(수출), 서흥(국내) / 하드캡셀
2	EPA·DHA 함유 유지	2014.10.16	(연평균) 191,171천원	1) 기억력 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	알피코프, 노바 렉스 등 연질캡셀
3	감마리놀레산 함유 유지	2015.04.09	(연평균) 54,720천원	1) 면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급) 2) 월경 전 변화에 의한 불편한 상태 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)	서흥 연질캡셀

(다) (주)비티씨 주요 고시형 건강기능식품 원료 현황

- ① 국내 주요 제품, 판매량 및 거래처
- ② 키토산

- 매출: 연평균 619,700천원
- 주요 납품처: 코스맥스바이오 등

㉠ 알로에

- 매출: 연평균 643,400천원
- 주요 납품처: 종근당건강, 용진 등

㉡ 홍삼/발효홍삼 농축액, 분말

- 매출: 연평균 865,848천원
- 주요 납품처: 코스맥스바이오, 광동제약, 인성제약, 서흥 등

㉢ 그 외 건강기능식품 원료 취급 현황

<p>발효 홍삼 Fermented Ginseng</p> <p>발효 홍삼(당근 추출물 포함)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: Ferrous gluconate, Ferrous sulfate, Ferrous fumarate, Ferrous lactate, Ferrous gluconate, Ferrous sulfate, Ferrous fumarate, Ferrous lactate ▶ 용도: 건강기능식품 원료 	<p>돌외잎주정추출분말 Dollobiobongjujeongchuchulbunmal powder</p> <p>돌외잎 주정추출물 분말 (정제)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: Dollobiobongjujeongchuchulbunmal powder ▶ 용도: 건강기능식품 원료 	<p>시금치엑스TRACT Spinach Extract</p> <p>시금치 엑스TRACT (분말)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: Spinach Extract ▶ 용도: 건강기능식품 원료
<p>녹차유래효소처리리디당 Green tea-derived polysaccharides from Green tea</p> <p>녹차 유래 효소처리 리디당</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: Green tea-derived polysaccharides from Green tea ▶ 용도: 건강기능식품 원료 	<p>홍소처리녹차추출물 Redox-treated green tea extract</p> <p>홍소처리 녹차 추출물</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: Redox-treated green tea extract ▶ 용도: 건강기능식품 원료 	<p>약 60여종 이상의 건강기능식품 기능성식품 원료소재 취급</p>
<p>오메가3 Omega-3</p> <p>오메가3 (정제)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: Omega-3 ▶ 용도: 건강기능식품 원료 	<p>L-테아닌 L-Theanine</p> <p>L-테아닌 (정제)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 원료: L-Theanine ▶ 용도: 건강기능식품 원료 	

그림 36. 취급중인 건강기능식품 기능성식품 원료 소재

② 해외 주요 제품 및 거래처

㉠ Gencor(미국)

- 주요 취급 제품: 식물 추출물
- BTC 주 납품품목: 돌외잎주정추출분말
- 주요 납품처: GNC, LifeExtension, Swanson 등

(라) 매출 및 수출 역량

① 수출유망중소기업 선정

- 수출유망중소기업(제12경기-225호) (2015.06.01.~2017.05.31.)



그림 37. 매출 및 수출 역량

(마) 주요 연구기반

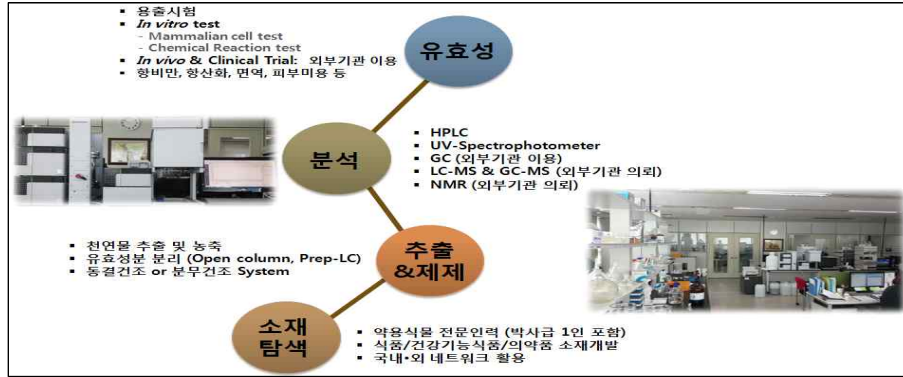


그림 38. 주요 연구기반

1-3. 연구개발 범위

가. 주관연구기관 (1세부)

(1) 연구목표

- 고장초 주정추출물의 원료 표준화 및 제조공정표준화
- 고장초 주정추출물의 기준 및 시험법 확립
- 고장초 주정추출물의 안정성 평가 및 유통기간 설정
- 고장초 주정추출물의 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청 (식약처)
- 고장초 함유 벼과식물 복합물을 이용한 피부건강용 건강지향식품 개발
- 고장초 주정추출물 및 복합물의 마케팅 전략 수립 및 시장진출

(2) 연구내용

(가) 기능(지표)물질 시험법

- ① 선행연구에서 구축된 기능(지표)물질 시험법 재현성 확립
- ② 시험법 표준화 (재현성, 편리성 등 고려)

(나) 추출조건확립

- ① 기본 추출 조건: 70% 주정(에탄올), 20배수, 60℃, 6시간, 1차 추출
- ② 선발 기준
 - ㉠ 추출 수율
 - ㉡ 기능(지표)물질의 함량
 - ㉢ 분석 조건 하에서 검출되는 기타 성분의 함량
- ③ 추출 용매 설정
 - ㉠ 에탄올(주정) 30, 50, 70%
- ④ 추출 온도 설정
 - ㉠ 60, 80 ℃
- ⑤ 추출시간 설정
 - ㉠ 2, 4, 6시간

⑥ 농축 및 건조방법 확립

㉠ 감압농축

㉡ 동결건조, 열풍건조, 진공건조, 분무건조 중 제형에 적합한 건조방법 확립

(다) 원재료 표준화

① 사용소재의 정확한 분류 및 식물학적 특성 정리

② 원재료와 유사한 식물 종 조사 및 식물학적 특성 정리

③ 원재료의 관능평가 기준서 작성

④ 산지별 원재료의 건조감량, 묽은에탄올엑스함량, 추출수율, 기능(지표)물질 함량, 기타 성분 함량 분석

㉠ 건조감량 측정 (건강기능식품공전 참조)

- 분쇄한 원재료를 재빨리 분쇄하여 지름 2 mm 이하로 넓게 편 다음 수분측정기를 이용하여 건조감량(수분함량)을 측정한다.

㉡ 묽은 에탄올 엑스 함량 측정법 (대한민국약전외한약(생약)규격집 참조)

- 분석용 검체 약 2.3 g을 정밀하게 달아 적당한 플라스크에 넣음
- 묽은에탄올 70 mL를 넣어 때때로 흔들어서 5 시간 침출
- 다시 16 ~ 20 시간 방치한 다음 여과
- 플라스크 및 잔류물은 여액이 100 mL로 될 때까지 묽은에탄올로 씻음
- 여액 50 mL를 수욕에서 증발건조하고 105 °C에서 4 시간 건조하여 데시케이터(실리카겔)에서 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 칭량하고 회석하여 묽은에탄올엑스의 양으로 함
- 건조감량에서 얻은 값에서 건조물로 환산한 검체량에 대한 엑스함량(%)을 산출한다.

㉢ 추출수율

- 최적 추출조건에서의 추출 수율 비교

㉣ 기능(지표)물질 함량 분석법

- 최적 추출조건로 추출한 산지별 원재료의 기능(지표)물질의 함량을 분석한다.
- 기능(지표)물질의 함량은 제1협동과제에서 개발된 방법을 이용하여 분석한다.

㉤ 기타 성분 함량평가

- 최적 추출조건로 추출한 산지별 원재료의 기능(지표)물질 이외의 검출되는 물질들의 함량을 분석한다.
- 기타물질의 분석은 제1협동과제에서 개발된 방법을 이용하여 분석한다.

⑤ 원재료의 기준 및 시험법 작성

㉠ 상기 분석한 원재료의 특징을 바탕으로 기준 및 시험법을 작성한다.

㉡ 원재료의 기준 및 시험법은 건강기능식품공전, 대한민국약전, 대한민국약전외한약(생약)규격집“을 참고하여 설정한다.

(라) 시험법 밸리데이션

- ① Method validation 실시를 통해 시험법의 타당성 검증
- ② 분석항목 및 허용기준

평가항목		허용기준
(1) 시스템적합성	RT	RSD 1.0%이하
	면적비	RSD 5.0%이하 (*식약처 제시 기준 따름)
(2) 특이성		주피크에 간섭 없음 Unknown peak가 관찰되지 않음
(3) 직선성		결정계수(r^2):0.99이상
(4) 정밀성	반복성	RT RSD 1.0%이하
		면적비 RSD 15.0%이하
(5) 정확성		회수율 $\pm 20\%$ 이내
(6) 검출한계		노이즈의 3배
(7) 정량한계		노이즈의 10배

㉠ 시스템 적합성

- 직선성 확인시험에서의 100% 용액을 분석방법에 따라 조작하고, 기능(지표) 물질에 해당하는 상대유지시간(이하 RT)과 피크의 면적비를 구한다.
- 6회 주입하였을 때 피크 면적비 RSD(%)는 5.0% 이하, RT의 RSD(%)는 1.0% 이하일 때 적합한 것으로 판정한다.

㉡ 특이성

- Blank에서 기능(지표)물질 분석에 영향을 줄 수 있는 피크를 관찰하고, 각각의 RT를 확인한다.
- Blank: 메탄올을 필터(0.45 μ m)여과하여 시험방법에 따라 시험한다.
- 기능(지표)물질: 기능(지표)물질 20.0mg 취하여 메탄올 20mL로 한다. 이 액의 일부를 취하여 50mL 정량플라스크에 넣고 표선한 다음 필터(0.45 μ m)여과하여 시험방법에 따라 시험한다.

㉢ 직선성

- 기능(지표)물질 20.0mg을 취하여 메탄올 20mL로 표선한다. (표준원액)
- 상기 표준원액을 각 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5mL 취하여 50mL 정량플라스크에 넣고 표선하여 희석액 ①, ②, ③, ④, ⑤ 용액을 제조
- 상기 희석액을 필터 (0.45 μ m) 여과하여 시험에 사용한다.
- 3회 시험했을 때 결정계수(R^2)의 값이 0.99이상임을 확인한다.

㉣ 정밀성

- 일정 농도의 기능(지표)물질 용액 6개를 제조하여 시험
- 기능(지표)물질의 RT RSD(%)는 1.0% 이하, 면적값 RSD(%)는 5.0% 이하임을 확인

㉤ 정확성

- 상기 희석액 중 3농도의 용액을 대상으로 3회 반복시험
- 평균 회수율이 $100 \pm 20.0\%$ 이내임을 확인

㉞ 검출한계 및 정량한계 (범위)

- 기능(지표)물질이 검출될 수 있는 최소농도를 확인 (검출한계)
- 주어진 분석조건에서 정확성과 정밀성을 보장할 수 있는 농도 확인 (정량한계)
- 검출한계: 노이즈의 3배 또는 아래의 식에 의하여 결정
$$DL = 3.3 \times \sigma / S$$
 (σ : 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)
- 정량한계: $DL = 10 \times \sigma / S$ (σ : 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

(마) 분말화 공정 개발

- ① 산업화를 위한 분무건조방법 개발
 - ㉠ 인입온도, 배기온도, 유속 등 공정조건과 분말크기 비교
 - ㉡ 최종 제제를 고려한 최종 carrier 탐색
- ② 분무건조가 적합하지 않을 경우 부형제 흡착에 의한 분말화 공정 개발

(바) 제제 개발

- ① 생체이용률을 고려한 제제 개발
 - ㉠ 기초 분말 용출률 측정
 - ㉡ 각종 제제 개발 및 용출률 측정
 - ㉢ Cyclodextrin 포접 실험을 통해 용출을 증대 (30분 이내 85%이상 용출 확보)
- ② 완제품 제조공정을 감안한 제제화
 - ㉠ 흐름성, 타정성, 충전성, 봉해 등을 고려한 제제 개발
 - ㉡ 입자분포, 입자밀도, 안식각, 정제 강도/경도, 정제 및 캡슐 봉해도 측정
- ③ 다양한 제형 개발
 - ㉠ 일반 식품 사업화를 위한 음료, 과립 제형 개발
 - ㉡ 개별인정 사업화를 위한 정제 또는 캡슐제(경질, 연질) 개발

(사) 공정 최적화

- ① 추출 → 농축 → 건조 → 제제에 이르는 전 공정을 세밀하게 조절
- ② 각 공정 단계별 기능(지표)물질의 이행률, 최종수율 계산 및 실측
 - ㉠ 각 공정별 샘플 취득, 건조 및 분석
 - ㉡ 최소 동일 조건 3 Lot 생산 후 균질하게 평가될 때 공정을 확정
- ③ 동물시험용 시료 생산

(아) 안정성 시험

- ① 표준품 안정성 시험
 - ㉠ pH, UV, 습도, 온도별 가혹조건 설정하여 표준품의 안정성 시험
 - ㉡ 시험법에 의하여 용액상태로 녹인 후 안정성 시험 (빛, 시간, 온도)
- ② 추출분말, 제형화된 제제의 안정성 시험

- ㉔ 항온·항습기를 이용하여 40 ℃, 상대습도 75% 조건 하에서 가속시험 개시
- ㉕ 25 ℃ 이하의 보관소에서 장기보존시험 시작
- ③ 개별인정형 원료 및 건강지향식품의 유통기간 설정
 - ㉔ 유통기간의 설정은 식약청에서 고시한 ‘의약품 등의 안정성 시험 기준’에 준하여 실시
 - ㉕ 장기보존시험과 가속시험을 통해 유통기간을 설정
 - ㉖ 장기보전 및 가속시험의 조건은 식약청의 가이드라인을 준수
- ㉖ 장기보존시험

- 검체 수 : 3 롯트 이상

- 보존조건 : 25 ± 2 ℃ / 상대습도 60 ± 5%

- 시험기간 : 12개월 이상을 원칙으로 하며, 36개월을 목표로 함

- 측정시기 : 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 간격, 12개월부터는 6개월 간격, 24개월부터는 12개월 간격

- 시험항목 :

- 물리·화학적 시험: 색상, 냄새, 기능(지표)물질 변화, 유연물질 발생 등

- 미생물학적 시험: 미생물의 증식 유무 판별

- 시험회수 : 각 시험 항목별로 3회 이상 실시하여 그 평균치를 기재

- ㉖ 가속시험

- 검체 수 : 3롯트 이상 (장기보존시험과 동일)

- 보존조건 : 40 ± 2℃ / 상대습도 75 ± 5%

- 시험기간 : 6개월 이상을 원칙으로 함

- 측정시기 : 0, 1, 3, 6, 12, 18, 24개월

- 시험항목 :

- 물리·화학적 시험: 색상, 냄새, 함량 변화, 유연물질 발생 등

- 미생물학적 시험: 미생물의 증식 유무 판별

- 추가시험: 가속시험에서 유의한 변화가 발생할 경우 시행

- 중간조건인 30±2℃ / 상대습도 60±5% 에서 1년간의 안정성 평가 가속시험에서의 유의성 있는 변화의 기준

- 한 롯트에서 품목별 시험 기준보다 5% 이상의 함량변화 발생 규격치를 초과하는 변성물질이 검출된 경우

(자) Scale Up

- ① 원재료 건물 중 기준 1kg, 5kg, 10kg 규모의 전 공정 실시

- ② 추출량 증가에 의한 공정별 기능(지표)물질 이행률 측정

(차) 기능성 인정 인체시험용 시료 제작

- ① 용출률이 향상된 제제를 선택하여 정제 또는 캡슐제형 개발

② 봉해시험, 용출시험

(카) 일반식품 소재 사업화 제품 생산

① 동물시험 결과를 활용한 사업화를 위한 제형 및 제제 결정

② 일반식품 품목허가 취득

③ 제품 생산 및 판매

(타) 개별인정 서류 작성

① 제출자료 목록

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본
2. 기원, 개발경위, 국내외 인정·사용현황 등에 관한 자료
3. 제조방법 및 그에 관한 자료
4. 원료의 특성에 관한 자료
5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
7. 안전성에 관한 자료
8. 기능성내용 및 그에 관한 자료
9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

② 식약처 모듬토의

㉠ 과제 시작단계부터 식약처와 지속적으로 협의

㉡ 기능성 요구사항 점검

㉢ 독성 등 제출자료 적합성 확인

㉣ 동물 및 인체적용시험 방법 및 시험항목 설정

㉤ 제출서류 점검

(파) 마케팅

① 국내 영업

㉠ B to B (서흥, 한국인삼공사(KGC), 코스맥스바이오 등)

② 전시회 참가

㉠ 국내 전시: FI Korea , 각종 포럼 및 학술 스폰서

㉡ 해외 전시: 스위스, 미국, 일본 등 전시회 참가

나. 세부연구기관(1협동)

(1) 연구목표

- 벼과 식물에 대하여 flavonolignans 정량 분석법 정립
- 고장초 및 벼과식물 후보소재에 대한 지표(유효)성분 정량분석을 통한 최적 소재 조성 설정
- 고장초 추출물을 이용한 피부개선 기능성 원료에 대한 임상 연구

(2) 연구내용

(가) 지표성분의 HPLC 및 LC/MSMS 분석법 확립

- ① HPLC 및 LC/MS를 이용하여 분석 조건을 설정
- ② 분석조건 (HPLC: ODS, silica gel, amine 등 column 종류 및 크기, 용출용매, 유속, 검출기; LC/MSMS: column 종류 및 크기, 용출용매, 유속, mass conditions) 확립.
- ③ LC/MSMS를 이용한 정성 정량 분석
- ④ Validation을 통한 수치의 객관화 : 정밀성, 정확성, 특이성, 직선성, LOD, LOQ.
- ⑤ 함량이 많은 화합물을 지표 성분으로 지정

(나) 생리활성 물질 분리

- ① 생리활성 소재를 80% MeOH 또는 70% EtOH을 이용하여 실온에서 추출 후 농축
- ② 농축물을 EtOAc, n-BuOH 및 H₂O을 이용하여 용매 분획물 조제
- ③ 혹은 활성화합물의 물리화학적 특성을 이용하여 용매 분획시 용매 조건 조정
- ④ 활성분획으로부터 Silica gel, Sephadex LH-20, RP-silica gel 등의 각종 matrix를 적절히 이용하고, 다양한 용출용매로 column chromatography를 실시한다.
- ⑤ 단일 성분을 LPLC, MPLC 또는 Prep-HPLC 를 이용하여 순수하게 정제
- ⑥ 단일성분의 표준화된 데이터 (mp, 비선광도, IR, MS, NMR data 등)분석을 통하여 구조를 규명
- ⑦ 표준물질 생산 및 제공

(다) 임상연구내용

- ① 임상을 통한 보습 효능 평가: 제품섭취에 따른 피부 보습효능 평가
 - ㉠ 각질량 변화 측정: Black D-squame and Image pro[®] plus
 - ㉡ 수분량 변화 측정: Corneometer[®]
 - ㉢ 경피수분증발량 (TEWL) 측정
- ② 임상을 통한 피부 주름개선 효능 평가: 제품섭취에 따른 피부 주름개선효능 평가
 - ㉠ 육안평가, 설문평가
 - ㉡ Replica 제작, 영상분석을 통한 주름개선 효능평가
- ③ 임상을 통한 미백개선 효능 평가: 제품섭취에 따른 미백개선 효능 평가
 - ㉠ 육안평가, 설문평가
 - ㉡ 피부색 변화 측정: Spectrophotometer[®]를 이용한 ITA value 측정

다. 세부연구기관(2협동)

(1) 연구목표

- 고장초 추출물을 활용한 표준화 원료의 피부건강 관련 활성(*in vitro*, *in vivo*) 검증, 작용기전 규명 및 원료, (시)제품의 안전성평가

(2) 연구내용

- (가) 기본 활성평가(항산화/ 항염/ 항알러지 효과)

- ① 항산화: DPPH, ABTS 라디칼 소거능, ferric reducing antioxidant power 측정
- ② 항염증: 대식세포주 RAW264.7 자극에 의한 염증 인자(NO, PGE2, cytokine류) 생성 억제 활성 평가
- ③ 항알러지: 비만세포주 RBL-2H3 활성화에 따른 알러지 유발인자(histamine, cytokine류) 방출 억제 활성 평가

(나) 미백 효능 검증

- ① Tyrosinase 억제효과: mushroom tyrosinase 활성저해 측정
- ② Melanoma cell B16F10을 이용
 - ㉠ Tyrosinase 억제활성 측정
 - ㉡ Melanin 생성 억제효과 측정

(다) 주름 개선 효능 검증

- ① Human fibroblast CCD-986SK cell을 이용
 - ㉠ 세포증식능 측정
 - ㉡ Procollagen 합성능 측정
 - ㉢ MMPs(Matrix metalloproteinase) 발현 억제 평가
 - ㉣ Collagenase 저해활성 측정

(라) 동물을 이용한 피부건강 증진 효능 검증

- ① 미백기능 평가: 표준화 시료를 경구 투여(하루 1회, 8주 투여)하여 색소 침착의 방지 및 조기 개선 효과를 평가
 - ㉠ 자외선 조사 후 매주 피부색 측정(육안, Chromameter, 조직 염색): 유색 guinea pig 이용
- ② 노화방지 평가: 자외선으로 유발된 노화피부 방지 및 개선 효과 평가
 - ㉠ 자외선 조사에 의한 피부상태, 조직염색(일반관찰, 표피층 두께 관찰), collagen/MMP1, 13 단백질 발현, 피부탄력(cutometer) 등 측정: Hairless mouse 이용
- ③ 아토피 피부염 억제능 평가: NC/Nga 마우스 이용, 아토피 피부염 유발에 대한 억제 효과 측정
 - ㉠ 마우스 혈청 내 total IgE 함량, histamine, cytokines 등 측정

(마) 원료 및 (시)제품의 품질평가(계명대 TMR센터, 국가공인 분석기관 연계)

- ① 안전성 평가: 잔류농약, 중금속, 위해미생물, 기본 영양성분 분석

2. 국내외 기술개발 현황

	D-04
2-1. 특허 분석	
가. 특허 분석에 따른 출원 동향 분석	

- ‘피부건강 기능성 식품 소재 개발’과 관련하여 출원연도별 출원동향을 살펴본 결과, 2000년부터 2010년까지 출원건수가 꾸준히 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 2010년에 487건으로 출원활동이 가장 활발하였으며 2011년에 395건으로 출원건수가 다소 감소하는 것으로 나타났으나, 2013년까지 꾸준히 증가하는 추세를 보임
- 2014년과 2015년에 출원건수가 급격히 감소하는 것은 출원미공개 특허가 존재하기 때문인 것으로 판단됨

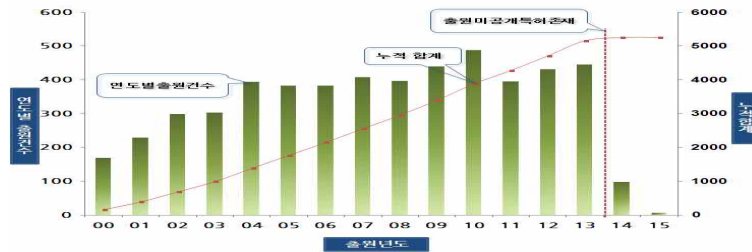


그림 39. [피부건강 기능성 식품 소재 개발] 관련 연도별 특허 출원 동향

- ‘피부건강 기능성 식품 소재 개발’과 관련하여 국가별/연도별 출원동향을 살펴보면, 미국이 1,708건으로 전체 출원건수 중 51%의 점유율을 차지하고 있는 것으로 조사됨. 한국 841건(25%), 일본 577건(17%) 및 유럽 211건(7%)이 그 뒤를 잇고 있음
- 미국과 한국은 2000년부터 2013년까지 출원건수가 꾸준히 증가하는 것으로 조사된 반면, 일본은 2006년 유럽은 2010년을 기점으로 출원건수가 다소 감소하는 것으로 조사됨
- 한국은 2000년부터 2006년까지 일본의 출원건수보다 적은 것으로 조사되었으나, 2007년을 기점으로 연구진행이 활발히 이루어짐에 따라 출원건수가 역전되는 것을 확인할 수 있음

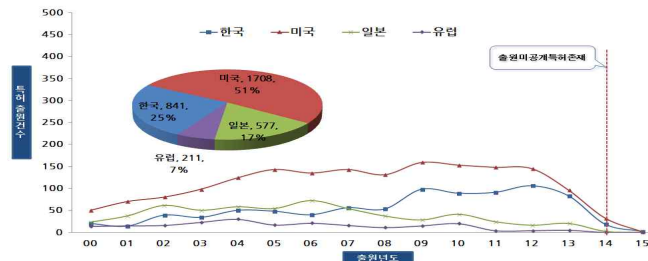


그림 40. [피부건강 기능성 식품 소재 개발] 관련 국가별/연도별 출원 동향

- ‘피부건강 기능성 식품 소재 개발’과 관련하여 기술별/연도별 출원동향을 살펴보면, 피부질환 기능성식품 관련 특허 3,337건 64%, 보습, 주름 및 미백 기능성식품 관련 특허는 1,918건 36%로 조사되었음
- 피부질환 기능성식품과 보습, 주름 및 미백 기능성식품의 연도별 출원동향은 2000년부터 2013년까지 출원건수가 다소 감소하는 연도도 있지만, 대체적으로 꾸준히 증가하는 추세를 보이고 있음

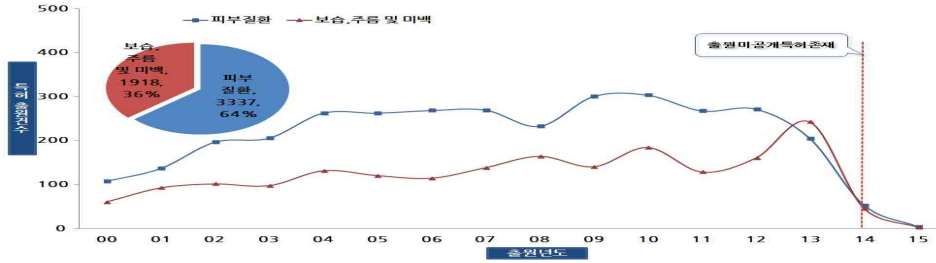


그림 41. [피부건강 기능성 식품 소재 개발] 관련 기술별/연도별 출원동향

- 피부질환 기능성식품 관련 주요출원인을 살펴보면, 최다 출원인으로 한국의 한국식품연구원이 조사되었으며, 그 뒤를 스위스의 Nestec S.A., 아일랜드의 Amarin Pharmaceuticals Ireland가 잇고 있음
- 보습, 주름 및 미백 기능성식품 관련 출원인을 살펴보면, 최다 출원인으로 한국의 엘지생활건강이 조사되었으며, 그 뒤를 일본의 NOEVIR, 한국의 바이오스펙트럼이 잇고 있음
- 두 기술분야 모두 한국의 출원인이 강세를 보이고 있으며, 한국 출원인 대부분이 연구원 또는 대학교로 조사되었음

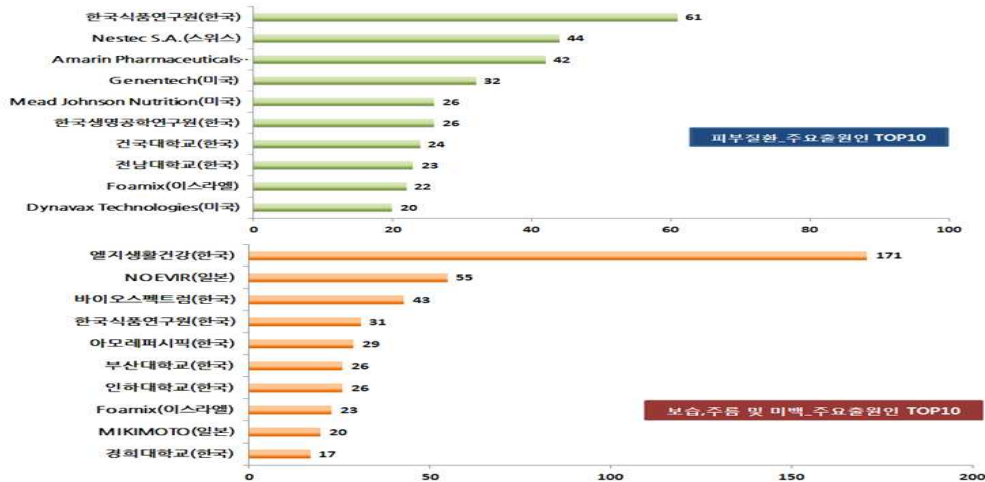


그림 42. [피부건강 기능성 식품 소재 개발] 관련 기술별 주요출원인 TOP 10

나. 특허 분석 결과

- 기존 특허는 피부건강관련 식품 또는 음료에의 이용 관련하여 콜라겐, 유산균, 약초, 버섯 등을 소재로 하여 개발한 기능성 식품이 주된 내용임. 본 연구과제에서는 표준화된 원료에 대한 멀티 타케팅 기능 검증 방향으로 연구를 추진하여 물질, 제법 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 특히 대부분의 특허는 생리활성이 있는 식물의 원료화에만 그치고 있어 실제적인 상품화가 이루어지고 있지 않으므로 본 과제를 통해 기능성이 우수한 고부가가치식품을 개발할 계획임

2-2. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품 생산 및 시장 현황

- 국내 이너뷰티 시장은 약 3천억원 규모 (2015년, 약업신문)

- 여성들의 뷰티에 대한 지식과 관심도 증가에 따라 이너뷰티 트렌드가 지속적으로 확산되고 있음 (연 평균 성장률 10~15%/ 2015년 약업신문)
- 주요 이너뷰티 제품: 콜라겐, 식이섬유, 히알루론산, 비타민 등 (2015년, 약업신문)
- 콜라겐의 흡수문제와 천연물 유래 물질에 대한 소비자 니즈 증가로 인하여 새로운 식물성 소재 개발에 대한 연구가 급증하고 있음 (2015년, 약업신문)
- 건강기능식품이 일시적인 유행이 아닌 라이프스타일의 일부로 자리잡으면서 이너뷰티 제품도 꾸준히 성장세를 보이고 있음(2014년, Nutradex)
- 고령화시대 도입에 따라 장년층의 사회활동이 증가하면서 중장년 여성층을 중심으로 이너뷰티 제품에 관심이 증가하고 있음
- 아모레퍼시픽을 중심으로 뷰티에 헬스를 접목한 건강한 아름다움 관련 이너뷰티 제품들이 기획되고 있음
- 국내 이너뷰티 산업은 선진국 대비 국내 시장 비중이 낮은 편으로 분석되고 있으며, 향후 높은 성장이 기대됨(보건산업진흥원, 2014)
- 이너뷰티의 타겟은 주로 보습, 미백이었으나, 최근에는 안티에이징, 비만, 헤어 영역을 포괄하는 메디컬뷰티 사업이 확장되고 있음(2014년, 뉴스데일리)
- 기존 건강기능식품 제품은 주로 정제형으로 출시되었으나, 이너뷰티 제품은 젤리, 츄어블, 분말, 차 등의 다양한 유형으로 출시되는 것이 특징임
- 건강기능식품 업계의 선두주자는 CJ제일제당으로 이너비 등의 제품군이 있으며, 일반식품 업계에서는 현대약품의 미에로 뷰티 등이 있음
- 국내 주요제품

업체명	대표제품	내용
아모레퍼시픽	슈퍼콜라겐 (앰플)	▶ 슈퍼콜라겐: 2011년 2000억원 이상 판매 ▶ 에스라이트슬리머DX
CJ 제일제당	이너비 (앰플, 음료, 정제)	▶ 이너비: 히알루론산 주성분 ▶ 음료, 캡슐, 앰플 형태 ▶ 2011년 이너비 매출은 200억원

- 기존에는 드럭스토어, 건강기능식품 매장 등에서 건강기능식품 코너의 일부로 이너뷰티 제품을 판매하고 있었으나, 최근에는 화장품 전용 매장에서 뷰티푸드를 함께 판매하는 형태도 생겨나고 있으며, 점차 증가될 것으로 예측됨



그림 43. 로드샵 이니스프리의 뷰티푸드 판매 현황

- 국내 건강기능식품 원료 중 이너뷰티 소재 인증 현황 (2015년, 식약처)
 - 피부 관련 개별인정형과 고시형 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황

No.	기능성 내용	고시형	개별인정형
1	피부 보습에 도움을 줄 수 있음	포스파티딜세린, N-아세틸글루코사민 (총 2건)	히알루론산, 저분자콜라겐 펩타이드, 히알루론산 나트륨, 프로바이오틱스 HY7714, 밀배유추출물, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드, Collactive 콜라겐펩타이드, 곤약갑자추출물, 민들레 등 복합추출물, 쌀겨추출물, 옥수수배아추출물, 지초추출분말, 콩·보리 발효복합물 (총 12건)
2	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음	감마리놀렌산 함유 유지	과채유래유산균, Lactobavillus sakei probio65 (총 2건)
3	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함	-	프로바이오틱스 ATP (총 1건)
4	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는 데 도움을 줄 수 있음	포스파티딜세린	핑거루트 추출분말, 저분자콜라겐 펩타이드, 프로바이오틱스 HY7714 (총 3건)
5	햇볕 또는 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하는 데 도움을 줄 수 있음	-	소나무껍질추출물 등 복합물, 홍삼·사상자·산수유 복합추출물 (총 2건)
6	피부와 점막을 형성하고 기능성을 유지하는데 필요	비타민 A, 베타카로틴 (총 2건)	-
7	피부건강·항산화에 도움을 줄 수 있음	엽록소 함유 식물	-
8	피부건강·항산화·면역력 증진에 도움을 줄 수 있음	클로렐라	-
9	피부건강·항산화·혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	스피루리나	-
10	피부건강·장건강·면역력 증진에 도움을 줄 수 있음	알로에 겔	-

그림 44. 피부 관련 개별인정형과 고시형 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황

- 현재 식약처에서 인정하고 있는 이너뷰티 식품소재의 health claim은 1) 피부 보습에 도움을 줄 수 있음, 2) 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강 유지에 도움을 줄 수 있음, 3) 면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음 등 총 3가지 분류임
- 주름개선에 대해서는 health claim을 허가하지 않으며, 다수의 제품들이 주름개선으로 홍보하고 있으나, 적법한 health claim은 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강 유지에 도움을 줄 수 있음으로 허가받고 있음

(2) 국외 제품 생산 및 시장 현황

(가) 중국 (中國國際美容网, 인터넷 자료종합, 코트라 우한 KBC 등, 2014~2015년)

- 이너뷰티 초기단계이지만, 피부건강에 대한 사회의 관심이 급증하고 있음
- 향후 5년간 연간 시장성장률 35% 이상으로 예측되고 있음
- 이너뷰티 시장 규모는 2014년 기준 3조원(한화)에 달하며, 매년 평균 20억씩 성장하고 있음 (中商情報网, 2014)
- 중국인은 미백과 보습에 관심이 많았으며, 최근에는 미세먼지, 황사 등으로 피부질환 환자가 증가하면서 이너뷰티 제품 수요가 같이 증가하고 있음
- 글로벌 코스메틱 브랜드 L'Oreal과 글로벌 식품회사 Nestle가 합자 설립한 뉴트리코스메틱스 브랜드 Inneov 중국 진출 (Kotra, 2010)
- Inneov는 2011년 중국 진출 후 시장성장률이 낮아 2013년 철수했으나, 수요가 증가하여 2014년 재진출하였음 (2015, 데일리코스메틱)
- Inneov의 주요 제품은 1) 주름개선용 보충제, 2) 자외선으로 인한 피부손상 억제제가

있음(2014년, 매경 MKDB플러스)

- 중국의 이너뷰티 시장은 한국보다 세분화되어 있으며, 화려한 메이크업보다 건강한 피부를 중요시하므로 이너뷰티에 관한 관심이 높음 (2014년, KOTRA)
- 중국에서는 이너뷰티 제품은 먹는 화장품의 개념이 아닌 피부에 좋은 건강보건식품으로 인식되고 있음 (2014년, KOTRA)
- 중국 진출을 위해서는 ‘보건식품허가증’이 필요하며, 절차가 까다롭고, 시간과 비용이 많이 드는 단점이 있음 (2014년, KOTRA)
- 중국의 주요 이너뷰티 제품 (一号店, Kotra, 2014)

기업명	주성분	원산지	상품	비고
Fanci	콜라겐	일본		상품명: Fanci 무형가 콜라겐 드링크 용량: 50ml 가격: 29위안 내외 기능: 피부 노화방지
颜如玉 (빈두위)	콜라겐	중국		상품명: 빈두위 콜라겐 드링크 용량: 50ml 가격: 20위안 내외 기능: 피부 노화방지
Lumi	콜라겐	대만		상품명: Lumi 콜라겐 분말 용량: 10g 가격: 150위안 내외 기능: 피부 노화방지
NeoCell	히알루론산	미국		상품명: NeoCell 히알루론산 용량: 60g 가격: 180위안 내외 기능: 피부 보습
ORGANIKA	히알루론산	캐나다		상품명: ORGANIKA 히알루론산 용량: 30g 가격: 100위안 내외 기능: 피부 보습
BLUBIO	OPC	독일		상품명: OPC 100 용량: 100g 가격: 100위안 내외 기능: 피부 타백

그림 45. 중국의 주요 이너뷰티 제품

(나) 일본

- 전세계적으로 뷰티 서플먼트(beauty supplements) 시장이 가장 큼
- 이너뷰티 제품군의 총 산업규모가 1조 5000억 이상
- 인기미용소재인 콜라겐은 578억엔에서 557억엔, 히알루론산은 320억엔에서 290억엔으로 규모가 축소되었음 (2014년, Nutradex)
- 콜라겐은 시장 포화상태로 파악되지만 여전히 많이 사용되고 있고 꾸준히 판매되는 소재임
- 콜라겐을 중심으로 한 피부 탄력 제품이 강세였으나, 최근에는 뷰티푸드 섭취를 통한 바다 슬리밍이 유행 (2015년, TvN)
- 식물유래 소재의 수요 및 매출이 증가하고 있으며, 미용소재도 식품유래 제품이 강세를 보이고 있음(2014년 Nutradex)
- 기존에는 피부미용만을 강조하였으나, 최근에는 기능소재의 복합을 통해 수면개선+피부미용 또는 피부미용+정장효과 등 피부미용을 중심으로 다른 기능성을 추가한 복합 기능성 제품의 매출이 증가하고 있음(2015년, Nutradex)
- 일본의 신규 피부미용 소재
 - 국화꽃엑스: 건강한 피부 유지를 위한 단백질인 피브로넥틴의 발현 증가
 - 프로테오글리칸: 연어, 상어, 오징어 유래제품. 세포 매트릭스 형성을 통한 신체조직 유지
 - 코코넛오일: 다이어트 및 구강관리

- 양파(퀘르세틴): 항알레르기 작용. 아토피 환자

(다) 동남아

- 아직까지는 이너뷰티 시장이 크지 않음 (비타푸드, 2014)
- 한류 등으로 한국 코스메틱에 관한 관심 및 수요 증가 (2015년, 뉴데일리경제)
- LG생활건강은 2014년부터 동남아시아에서 이너뷰티 사업 강화 예정 (2014년, 뷰티누리)

나. 제품 및 시장분석 향후 연구계획

- 국내 및 국외시장 분석결과 콜라겐, 히알루론산 등의 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 정체기에 접어들었음
- 최근에는 식물유래 신규 피부미용 소재에 대한 연구가 증가하고 있으며, 소비자 또한 식물유래 제품을 선호하는 경향을 보임
- 한국의 경우, 약 3천억원의 시장규모로 전체 건기식의 20% 정도를 상회하는 수준을 유지하고 있으나, 콜라겐과 히알루론산 등 특정 소재에 집중되었고, 해당 소재가 소비자가 원하는 식물유래추출물과는 거리가 있어 매출이 정체되어 있는 상황
- 피부건강을 위한 식물유래추출물로는 보습에 도움을 주는 밀배유추출물, 곤약감자추출물, 민들레 등 복합추출물, 쌀겨추출물, 옥수수배아추출물, 지초추출분말, 콩/보리 발효복합물과 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지시킬 수 있는 핑거루트 추출분말, 소나무껍질추출물 등 복합물, 홍삼/사상자/산수유 복합추출물 등이 있으나 해당원료가 건강기능식품시장에서 차지하는 비율은 낮음
- 그러나 핑거루트추출분말은 국내에서도 인지도가 상승 중이며, 일본으로 판매되고 있는 등 일부 소재에 대해서는 소비자 수요가 증가함 (2014, 피부기능식품 연구회 심포지움)
- 본 연구팀에서는 상기 내용을 종합하여 피부건강에 대해서는 소비자의 관심은 꾸준히 증가하고 있으나, 1) 특정소재에 집중되어 있었고, 2) 초기 이너뷰티제품 판매 단계에서 해당 소재를 섭취했을 때 소비자의 기대보다 효과가 낮거나 늦게 나타나는 경향이 있어 소비자 신뢰도가 낮아졌으며, 3) 식물유래추출물에 대해서는 다른 소재에 비하여 시장에서의 프로모션 등의 부진으로 인하여 매출성장이 두드러지지 않았다고 파악하였음
- 주관연구기관인 (주)비티씨는 2013년 돌외잎주정추출물을 개별인정받은 바 있으며, 해당 소재는 2013년 시장 점유율 3%, 개별인정형 원료 생산실적 총 5위로 단기간에 높은 매출을 기록한 바 있음.
- 주관기관에서는 기존 개별인정형 원료 마케팅 노하우를 이용하여 신규 개발된 이너뷰티 소재를 국내외 프로모션할 예정임
- 최근에는 복합 기능성에 대한 소비자 수요가 증가하고 있으며, 특히 피부 미용소재 분야에서는 보습 뿐 아니라, 다른 기능이 추가된 제품에 대한 소비자 수요가 증가하고 있음 (SBS, 2015; 장업신문, 2015 등)
- 특히 주관기관에서 개별인정을 보유하고 있는 기존 뷰티(슬리밍)제품인 돌외잎주정추출분말과 피부미용소재인 감마리놀렌산 등을 이용하여 기능성 원료의 응용을 통한 복합 기능성 건강기능식품 개발을 유도하여 매출 성장을 추진할 예정임

3. 연구수행 내용 및 결과

D-05

가. 실험방법

(1) 기능(지표)물질 분리 및 품질관리를 위한 시험법 개발

(가) 기능(지표)물질 분리 방법

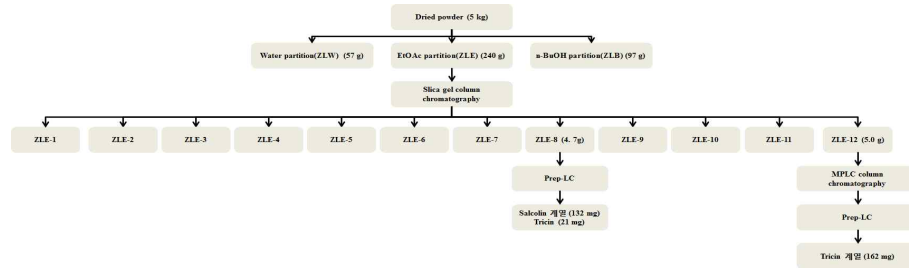


그림 46. Tricin 및 Salcolin 분리 방법

(나) 분리한 활성물질들을 확인하기 위한 동시 분석법

[LC-MS/MS 분석법]

Instrument	Agilent Technologies 6410 Triple Quad (LC-MS/MS)		
Column	C18 (kromasil 21 mm × 100 mm, 2.7 μm)		
Solvent	A=0.1% formic acid in DW, B=0.1% formic acid in MeCN		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	75	25
	8	75	25
	15	66	34
	20	66	34
	23	0	100
	26	0	100
	28	75	25
30	75	25	
Flow rate	0.4 mL/min		
Ionization mode	350 nm		
Gas temp.	350 °C		
Capillary volt.	4000 V		
Nebulizer	40 psig		
Pragmentor	190 V		

(다) 품질관리를 위한 기능(지표)물질 시험법 개발

- ① peak symmetry: 피크의 대칭성값 1에 근접
- ② Tailing factor: 미국약전(USP) 기준 0.5 이상, 2.0 이하
- ③ Retention time: RSD (%) 값이 자사기준인 1% 이내

(2) 추출 조건 확립

(가) 고장초 원재료의 특성 확인: 원재료의 특성 파악 및 추출조건을 설정 기준 마련

(나) 추출방법 설정조건

- ① 추출원물: 7~9월에 수확하고 1~2 cm로 세절된 고장초
- ② 추출용매: 10, 30, 50, 70, 90% EtOH

③ 추출시간: 2시간, 4시간, 6시간, 8시간

④ 추출온도: 60 °C, 80 °C

⑤ 건조방법: 동결건조, 열풍건조, 진공건조, 분무건조 중 제형에 적합한 건조방법 확립

(다) 고장초 추출물 내의 활성물질 10종의 동시 분석 방법

① 시료의 전처리 방법

㉠ 각 추출물들을 MeOH을 가하여 3,000 ppm 농도로 조제.

㉡ 10종의 standard의 화합물들을 MeOH과 pyridine을 이용하여 stock solution을 조제.

㉢ 각 standard의 stock solution을 이용하여 standard mixture를 조제.

㉣ MeOH을 가하여 standard mixture를 0.5 ppm ~ 100 ppm 농도 범위로 조제.

㉤ 조제된 추출물 시료들과 standard mixture를 분석.

② 분석방법은 [LC-MS/MS 분석법]을 참고

(라) 고장초 추출물의 항염증 효능평가 방법

① 세포 배양

㉠ Seeding (1×10^5 cell/well, 96-well cell culture plate)

㉡ Incubation (37°C, 5% CO₂, 24 hrs)

㉢ 배지 11 mL + LPS stock solution (1 mg/mL) 22 µL mixing

㉣ 96-well cell culture plate의 medium 제거 후, LPS solution 100 µL injection

㉤ Sampling (100, 250, 500 µg/mL), Incubation (37°C, 5% CO₂, 24 hrs)

② 세포 생존율 확인(MTT measurement)

㉠ MTT solution (5 mg/mL) 10 µL injection

㉡ Incubation (37°C, 5% CO₂, 4 hrs)

㉢ 배지 제거 후, 100% DMSO 100 µL injection, 5 min reaction

㉣ ELISA reader 기기(550 nm)로 absorbance 측정

③ 항염증 효능 확인(NO measurement)

㉠ 상층액 100 µL를 96-well plate에 분주

㉡ Griess reagent (2.5% phosphoric acid + 1% sulfanilamide + 0.1% N-(1-Naphtyl) ethylenediamine, distilled water mass up) 100 µL injection, 1 ~ 2 min reaction

㉣ ELISA reader 기기(540 nm)로 absorbance 측정

(마) 고장초 추출물의 항산화 효능평가 방법

① DPPH 라디칼 소거능 평가

㉠ Preparation (0.15 M DPPH solution)

㉡ 96-well plate에 다른 농도(0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 µg/mL) 고장초 추출물 sampling

㉣ 각 well 당 40 µL의 DPPH solution mixing

- ㉠ Room temperature에서 30 min reaction (암실 조건)
- ㉡ ELISA reader 기기(517 nm)로 absorbance 측정
- ② ABTS 라디칼 소거능 평가
 - ㉠ 14 mM ABTS + 4.9 mM potassium persulfate 용액 (1:1, v/v)을 혼합 후 상온, 24 h 방치
 - ㉡ Working solution 980 μ L와 다양한 농도의 sample 20 μ L을 혼합하여 10분간 암소 방치
 - ㉢ ELISA reader 기기(734 nm)에서 absorbance 측정
- ③ 총 폴리페놀(polyphenol) 함량 측정
 - ㉠ Preparation : 2-fold Folin reagent, 10% Na₂CO₃
 - ㉡ 96-well plate에 다른 농도의 고장초 추출물 sampling (Volume : 60 μ L)
 - ㉢ 3 min 정지, 10% Na₂CO₃ solution 60 μ L reaction, Reaction (30°C, 60 mins)
 - ㉣ ELISA reader 기기(700 nm)로 측정
- ④ 총 플라보노이드(flavonoid) 함량 측정
 - ㉠ 1.5 mL tube에 80% EtOH 1.08 mL, 10% aluminum nitrate 30 μ L, 1 M potassium acetate 30 μ L reaction
 - ㉡ Sampling (volume 500 μ L), 상온에서 40 mins reaction
 - ㉢ ELISA reader 기기(415 nm)로 측정
- (바) 고장초 추출물의 미백 효능평가 방법
 - ① melanin 생성 억제 효능 평가
 - ㉠ Seeding (5×10^5 cell/well, 6-well plate), Incubation (37°C, 5% CO₂, 24 hrs)
 - ㉡ 배지 제거 후, 100 nM α -MSH과 100 μ M IBMX가 배합된 배지 3 mL injection
 - ㉢ Sampling (250 μ g/mL) & Incubation (37°C, 5% CO₂, 48 hrs)
 - ㉣ 배지 제거 후, 1x PBS solution으로 3회 세척, 데워진 1x PBS solution을 이용하여 cell collection
 - ㉤ Centrifugation (13,000 rpm, 4°C, 10 mins), 상등액 제거 후, 1 N NaOH solution (with 10% DMSO) 150 μ L injection, Incubation (60°C, 1 hr)
 - ㉥ 현탁 후, ELISA reader 기기(405 nm)로 absorbance 측정
 - ② cellular tyrosinase 억제 효능 평가
 - ㉠ Seeding (5×10^5 cell/well, 6-well plate), Incubation (37°C, 5% CO₂, 24 hrs)
 - ㉡ 배지 제거 후, 100 nM α -MSH과 100 μ M IBMX가 배합된 배지 3 mL injection
 - ㉢ Sampling (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 μ g/mL), Incubation (37°C, 5% CO₂, 48 hrs)
 - ㉣ 데워진 1x PBS solution을 이용하여 cell collection, Centrifugation (12,000 rpm, 4°C, 10 mins) & 상등액 제거

- ㉔ 1% Triton X-100 [with 100 mM sodium phosphate (pH 6.8)] 100 μ L injection
- ㉕ Incubation (-80°C, 30 mins) & centrifugation (12,000 rpm, 4°C, 30 mins), Incubation (37°C, 1 hr)
- ㉖ Optical density measurement (490 nm)
- ③ mushroom tyrosinase 활성 저해 측정
 - ㉗ 96-well plate에 희석한 sample 100 μ L injection, 2.5 mM L-DOPA 80 μ L를 각 well에 injection
 - ㉘ Preincubation (37°C, 10 mins), Mushroom tyrosinase (1500 units/mL) 20 μ L reaction
 - ㉙ Incubation (RT, 10 mins) or control 값이 1.0이 되는 시점까지 reaction
 - ㉚ ELISA reader 기기(475 nm)로 optical density 측정

(3) 원재료 표준화

(가) 사용 소재의 분류 및 식물학적 특성 관련자료 검색 및 정리

- ① 국가생물종지식정보시스템(산림청)의 줄 풀(고장초) 자료 인용

(나) 원재료의 수집 조건:

- ① 생산량 및 판매량이 많아 물품을 안정적으로 공급할 수 있는 원재료
- ② 원산지 및 생산방법을 확인할 수 있는 원재료

(다) 품질확인 방법

- ① 소재의 효능 평가

㉛ 기본 활성 평가(항산화/항염증 효과)

- 항염증: Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW264.7 대식세포주의 항염증 측정
- 항산화: DPPH, ABTS 라디칼 소거능, polyphenol, flavonid contents 측정

㉜ 미백 효능 평가

- Melanoma cell (B16-F0)을 이용: tyrosinase 억제 활성, melanin 생성 억제 효과
- Tyrosinase 억제 효과: mushroom tyrosinase 활성 저해 측정

㉝ 주름 개선 효능 평가

- Human fibroblast cell (CCD-986sk)을 이용: 세포증식능, procollagen 합성능 측정, Collagenase 저해 활성 측정, MMP-1 합성 측정

② 관능평가(자사 기준)

㉞ 자사 원재료 담당자의 원재료 확인 및 관능평가

㉟ 건조감량(수분): 대한민국약전 일반시험법 건조감량시험법 참조

㊱ 묽은에탄올엑스 함량: 대한민국약전 일반시험법 엑스 함량 중 묽은에탄올엑스 함량 참조

③ 지표물질의 함량시험

㉓ 고장초는 따로 정해진 규격방법이 없어 자사의 기능(지표)물질 시험법 연구과정에서 개발된 방법으로 시험

- 고장초 50g에 70% 에탄올 1500g (30배수, w/w)을 넣어 80℃의 열풍건조기에서 6시간 동안 고압열풍추출
- 850µm와 75µm의 국제규격의 표준체로 원물을 걸러낸 후 추출액을 취하여 58℃에서 감압농축 후 동결건조하여 수분을 제거, 추출분말을 제조
- 검액 조제: 상기 추출분말 2mg/ml의 농도로 메탄올에 녹여 30분간 초음파수조에서 추출한 후 0.45µm필터로 여과하여 사용
- 지표물질(표준물질): Tricin으로 설정, 상기 물질을 메탄올에 녹여 시험에 사용
- 검액과 지표물질을 HPLC로 분석하여 Tricin의 함량을 측정

④ 고장초 원산지 선정시험

㉔ 추출시험 방법

	추출 용매 (w/w)	고장초 칭량 (g)	온도(℃)	시간(hr)
경북 영천	70% EtOH	50	80	6
경기 화성				
충북 충주				
경북 경산				

㉕ 산지별 추출물 함량 분석 방법

- 시료의 전처리, 기기 설정 조건 ‘고장초 추출물 내의 활성물질 10종의 동시 분석 방법’과 동일

㉖ 산지별 추출물 미백효능 시험 방법

- melanin 생성 억제 효능 평가 참고 (가)-(2)-(바)-①

(4) 시험법 밸리데이션

(가) HPLC 분석조건

Instrument	Agilent Technologies 1260 (HPLC)		
Column	C18 (SUPELCO Discovery® 250 mm × 4.6 mm, 5 µm)		
Solvent	A=0.15% H ₃ PO ₄ in DW, B=Methanol		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	80	20
	3	80	20
	3.1	50	50
	8	50	50
	8.1	45	55
	20	45	55
	20.1	15	85
	30	15	85
	30.1	80	20
45	80	20	
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection vol.	10 µL		
Wave length	350 nm		
temp.	30 ℃		

(나) 세부 분석항목 및 허용기준

평가항목		허용기준
시스템적합성	RT	RSD 1.0% 이하
	면적 비	RSD 5.0% 이하
특이성		주 피크에 간섭 없음, Unknown peak가 관찰 안됨.
직선성		결정계수(r^2): 0.998이상
정밀성	반복성	RSD 평균 5.0% 이하
	재현성	RSD 평균 5.0% 이하
정확성		평균회수율 100±10.0% 이내
검출한계		계산식 DL= 3.3×σ/S
정량한계		계산식 QL= 10.0×σ/S

(5) 분말화 공정 개발

(가) 동결건조 샘플 제조

- ① 기존 자사제품들의 동결건조 방법을 채택하여 고장초 추출물을 10~20 Brix 사이로 농축하고 동결건조하여 샘플을 제조

(나) 분무건조 조건 확립

- ① SD 온도 155℃로 고정
- ② 에어속도 변화에 따른 최적 조건 확립
- ③ 주입 유량 변화에 따른 최적 조건 확립
- ④ 부형제(덱스트린) 첨가에 따른 분말의 변화 관찰

(다) 건조 방법 및 부형제 첨가에 따른 항염증 효능 시험 방법

- ① 건조 방법에 따른 항염증 측정
- ㉠ 항염증 측정 실험 방법 참조 (가)-(2)-(라)-①, ②, ③)

(6) 효소처리 추출조건 확립

(가) 공정 선별 기준: 추출 수율, 기능(지표)물질의 함량, 분석조건하에서 검출되는 기타 성분의 함량을 취합하여 가장 효율적인 공정을 선정.

(나) 효소 선정:

- ① 추출원물: 기존과 동일한 고장초 원물 사용
- ② 효소반응 방법:
 - ㉠ 추출: 열수추출 80℃ 1시간
 - ㉡ 효소반응: 다양한 효소를 활용하여 효소반응
 - ㉢ 추출: 70% 발효주정 80℃ 4시간
 - ㉣ 건조: 동결건조

(다) 효소반응 공정 최적화:

- ① 선정된 효소를 활용하여 반응시간을 4시간, 8시간, 12시간, 16시간, 24시간 처리하여 피부 건강 활성 및 기능(지표)물질의 함량 비교.
- ② 최적의 효소반응 시간 설정.

(라) 고장초 효소처리추출분말의 항염증 및 미백 효능 시험 방법

- ① 고장초 효소처리 추출분말의 항염증 측정

㉔ 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-(2)-(라)-①, ②, ③)

② 고장초 효소처리 추출분말의 미백 효과 측정

㉔ 미백 효과 측정 실험 방법 참조 (가.-(2)-(바)-①, ②, ③)

(7) 효소처리 추출공정 최적화

(가) 효소처리 추출조건 확립 연구에서 얻은 결과로 최종 선정된 고장초에 PlantaseTL 효소 16시간 처리방법으로 3반복 추출 시험.

(나) HPLC를 활용하여 Tricin함량 분석을 진행, 기능(지표)물질의 이행률 및 최종수율의 변화 재현성 확인.

① HPLC 분석방법

Instrument	Agilent Technologies 1260 (HPLC)		
Column	C18 (SUPELCO Discovery® 250 mm × 4.6 mm, 5 μm)		
Solvent	A=0.15% H ₃ PO ₄ in DW, B=Methanol		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	80	20
	3	80	20
	3.1	50	50
	8	50	50
	8.1	45	55
	20	45	55
	20.1	15	85
	30	15	85
30.1	80	20	
45	80	20	
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection vol.	10 μL		
Wave length	350 nm		
temp.	30 °C		

(다) 선발기준: 3Lot 샘플의 수율 및 Tricin 함량이 평균값으로부터 ±120% 범위 내로 지정.

(8) 대량생산 공정개발(Scale Up)

(가) 최적화된 방법을 통하여 1kg 생산을 각 3Lot씩 진행.

(나) 기존까지의 추출방법은 1차 추출에서 기질대비 15배수(w/w)로 진행되었지만 1kg 추출에서 정제수 15배수로는 고장초 원물이 다 들어가지 않아 20배수로 조정.

(다) 최종적으로 아래와 같은 추출방법으로 대량생산 공정개발 시험을 진행.

	원물 size	칭량 (g)	1차 추출	효소투입량 (g)	온도 (°C)	시간 (hr)	2차 추출
1kg scale	2mm	1000	정제수 기질대비 20배수(w/w) 80°C, 1hr	PlantaseTL 기질대비 0.6%(w/w)	35	16	70% EtOH 15배수(w/w) 80°C, 4hr

(라) 기능(지표)물질의 분석방법

① Tricin 분석방법 참조 (가.-(7)-(가)-②-㉔)

(마) 고장초로부터 분리된 10가지 활성물질에 대한 정량분석 방법.

① 10종 활성물질 분석방법 참조 (가.-(1)-(나))

(바) 대량생산 공정을 적용한 고장초 효소처리 추출분말의 항염증 효능 평가 방법

① 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-(2)-(라)-①, ②, ③)

(사) 고장초 효소처리 추출분말의 주름 개선 효능 평가(in vitro)

① 고장초 효소처리 추출분말의 Human dermal fibroblast (HDF)에 대한 세포생존율

㉠ Seeding (80% confluence, 100 mm cell culture plate)

㉡ Sampling (10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) & 1시간 pre-incubating

㉢ Washing 후 UVB 노출(10 mJ/cm^2) & sampling (10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

㉣ Incubation (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 24 hrs)

㉤ MTT (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리 후 4시간 반응

㉥ 배지 제거 후 DMSO로 포르마잔을 녹이고 absorbance (550 nm) 측정

② 고장초 효소처리 추출분말의 콜라겐 생성 측정

㉠ Seeding (80% confluence, 100 mm cell culture plate)

㉡ Sampling (10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) & 1시간 pre-incubating

㉢ Washing 후 UVB 노출(10 mJ/cm^2) & sampling (10, 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

㉣ Incubation (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 24 hrs) & 상등액 20 μL 채취

㉤ Antibody-POD conjugated solution 100 μL 를 Antigen-POD plate(96 well)에 주입 후, 세포 상등액 20 μL reaction

㉥ Incubation (37 $^{\circ}\text{C}$, 3 hrs) & 배지 제거 후, cold PBS 400 μL 로 3회 세척

㉦ Substrate solution (TMBZ) 100 μL injection 후 상온 반응, 20 ~ 30 mins

㉧ ELISA reader 기기(405 nm)로 absorbance 측정

③ 고장초 효소처리 추출분말의 콜라겐 분해효소(MMP-1, 2, 3, 9, 13) 측정

㉠ '고장초 효소처리 추출분말의 콜라겐 생성 측정' 방법과 동일, primary antibody (anti-MMP-1,2,3,9,13) 사용

(아) 고장초 효소처리 추출분말의 민감성 피부 개선 효능 평가(in vitro) 방법

① 고장초 효소처리 추출분말의 세포생존율 측정

㉠ RBL-2H3 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 세포로 분주.

㉡ 37 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서 다양한 농도의 화합물을 처리.

㉢ 48시간 후, 각 웰에 MTT(5 mg/mL) 100 μL 을 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 배양.

㉣ 100 μL 의 DMSO를 각 웰에 첨가하여 세포를 용해.

㉤ 플레이트를 실온에서 5분간 유지시키고 multiwell spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정.

② 고장초 효소처리 추출분말의 β -hexosaminidase release 억제 측정

㉠ RBL-2H3 cell line seeding (2×10^5 cell/well, 24 well plate), anti-DNP IgE (450 ng/mL) treated, 37 $^{\circ}\text{C}$, overnight

㉡ Siraganian buffer washing, incubating buffer (160 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 min), Added 25 μL

0.1 M citrate buffer (pH 4.5), 37°C, 1 hr

㉞ Added 200 μ L 0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.0

㉞ ELISA reader (405 nm) absorbance 측정

③ 고장초 효소처리 추출분말의 IL-4 발현 측정

㉞ RBL-2H3 cell line seeding (2 × 10⁵ cell/well, 24 well plate), anti-DNP IgE (450 ng/mL) treated, 37°C, overnight

㉞ Siraganian buffer washing, incubating buffer (160 μ L, 37°C, 20 min), ELISA plate (nati-IL-4 coating) treated, 1 hr

㉞ Primary antibody 100 μ L treated(1 hr), secondary antibody 100 μ L treated(1 hr), TMBZ substrate solution 100 μ L(1 hr), Stop solution 100 μ L

㉞ ELISA reader (405 nm) absorbance 측정

④ 고장초 효소처리 추출분말의 TNF- α 발현 측정

㉞ IL-4 발현 측정과 실험 방법 동일, ELISA plate(anti-TNF- α coating) 사용

(자) 고장초 효소처리 추출분말의 보습 효능 평가(in vitro) 방법

① 고장초 효소처리 추출분말의 세포생존율 측정

㉞ Seeding (80% confluence, 100 mm cell culture plate)

㉞ Sampling (10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml) & 1시간 pre-incubating

㉞ Washing 후 UVB 노출(10 mJ/cm²) & sampling (10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml)

② 고장초 효소처리 추출분말의 hyaluronic acid 측정

㉞ Seeding (80% confluence, 100 mm cell culture plate)

㉞ Sampling (10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml) & 1시간 pre-incubating

㉞ Washing 후 UVB 노출(10 mJ/cm²) & sampling (10, 25, 50, 100, 250 μ g/ml)

(9) 동물시험

(가) Experimental design of animals

Group	Dose (mg/kg)	Design	Number
1 N	-	D.W. p.o.	9
2 C	-		9
3 Z50	50	고장초 (<i>Zizania latifolia Turcz</i>) 가수분해	9
4 Z150	150	추출물. p.o.	9
5 Z300	300		9
6 T	0.3	Tricin p.o.	9
7 R	-	Retinoic acid (0.05%, 50 μ l), 일주일 3회 피부도포	9

* 본 연구는 (주)동남의화학연구원 동물실험위원회 (SEMI, Institutional Animal Care and Use committee)의 방침 및 법규에 따라 진행 되었음. (윤리승인번호: SEMI-16-13)

(나) 광노화 피부 유발 및 시료투여

① 주름개선효능 동물실험 일정 개략도

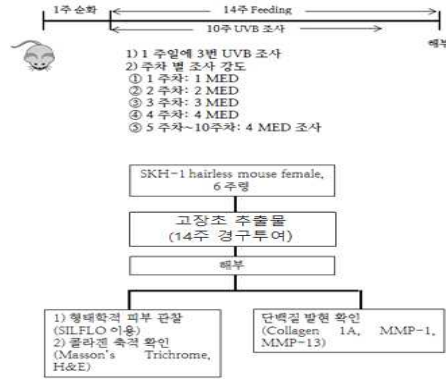


그림 47. 주름개선 동물실험 일정요약

(다) 피부주름의 형태학적 관찰

- ① 피부주름 양상 관찰은 실험동물을 5주~14주째 디지털 카메라로 등 표면을 사진 촬영을 한 후, SILFLO (Flexico developments LTD. Tokyo, Japan) silicone rubber impression material로 개체의 동일 등 부위 피부 주름의 replica를 제작하여 microscope로 촬영한 후 주름의 양상을 실험 군별로 비교 관찰함.

(라) 피부의 조직학적 관찰

① H&E staininig

- ㉠ 절취한 피부조직을 10% formalin에 넣어 조직을 고정한 후 수세하고 60%에서 100% alcohol로 순차적으로 탈수하여 파라핀에 포매하고 block을 만듦. 이것을 rotary microtome을 사용하여 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin으로 염색한 후 광학현미경 (Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰함.

② Masson's trichrome

- ㉠ 절취한 피부 조직을 실온에서 10% 중성포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투 과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 4 μ m 두께로 절편을 만들어 실온에서 Bouin 용액에 하룻밤 담그고 Masson'trichrome 염색 후 진피층 내 교원섬유 (collagen fiber)의 양과 형태를 광학현미경으로 관찰함.

(마) 피부 조직 Western blot

- ① 피부 조직 20 mg을 cell lysis buffer 200 μ L에 넣은 후 homogenizer를 이용하여 조직을 파쇄한 후 800 rpm, 10 sec 원심분리하여 상층액만 사용함.
- ② 24시간 ice incubation 한 뒤 14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20 min 원심분리하고 Bradford assay를 이용하여 단백질을 정량하고, SDS-PAGE (Poly acrylamide Gel Electrophoresis) 진행함.
- ③ Semi-dry transfer system (Bio-Rad, USA)를 이용하여 PVDF (Polyvinylidene fluoride) membrane에 이동시킨 후 5% skim milk를 함유한 Blocking buffer (5% skim milk, 1 \times TBST buffer)를 1시간 동안 처리함.
- ④ 1 \times TBST buffer로 10 min, 3회 washing 후, Primary antibody인 Collagen 1A, MMP-1, MMP-13, TNF- α , IL-6 (SantaCruz, USA)를 처리한 후 4 $^{\circ}$ C overnight

반응시켜, 1× TBST buffer로 10 min, 3회 washing 함. Western Blot detection kit (Abfrontier, WEST SAVE GOLD, Korea)를 이용하여 membrane과 반응시킨 후 Chemi-Doc (BIORAD XRS system, USA)장비를 이용하여 발현 정도를 관찰 하였으며, β-actin (SantaCruz, USA)으로 보정하여 비교함.

(10) 일반식품 소재 사업화 제품 생산

(가) 위탁업체인 (주)삼우다연에 위탁하여 시제품 생산

(나) 각 공정 단계별 1L의 추출물 샘플을 취하여 추출 공정단계별 기능(지표)물질 이행률 및 최종 수율 계산

(다) 취득 샘플 구간

추출 과정	샘플 취득량
1차 열수 추출 후 (ST1)	1L
16시간 효소처리 후(ST2)	1L
2차 에탄올 수용액 추출 후(ST3)	1L
덱스트린 투여 전 농축액(ST4)	1L

(라) 공정 단계별 취한 샘플을 동결건조 후 분말화하여 Tricin함량 분석 및 기능(지표)물질 이행 및 최종 수율 계산하는데 사용

(11) 시제품의 품질평가

(가) 시제품을 한국기능식품연구원에 영양성분 및 유해성분 검사 의뢰

① 영양성분 및 유해성분 검사 의뢰

제품명	식품 유형 (재질)	검체량	포장 단위	보관방법	제조일자나 유통기한 또는 제조번호	시험의뢰 항목
고장초 효소처리 추출분말	분말	600g	200g	실온	BZI10-1808-01 BZI10-1808-02 BZI10-1808-03	납, 카드뮴, 총수은, 총비소, 열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 회분, 나트륨, 성장, 수분, 대장균, 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT) - 14개 항목

② 지표성분(Tricin) 함량 분석 의뢰

제품명	식품 유형 (재질)	검체량	포장 단위	보관방법	제조일자나 유통기한 또는 제조번호	시험의뢰 항목
고장초 효소처리 추출분말	분말	600g	200g	실온	BZI10-1808-01 BZI10-1808-02 BZI10-1808-03	효소처리고장초추출분말 지표성분(Tricin) 함량 분석

(12) 임상시험 및 제품화를 위한 제형화 연구

(가) 제품의 분말화 및 제형화가 가능한 위탁업체를 선정

(나) 타정과 캡슐 등의 제형화한 샘플의 용출률 측정하여 최적의 제형을 선정

(13) 안정성 시험

(가) 장기보존시험(실측시험) 실험 방법

① 저장조건

㉠ 상온, 본사 창고에 보관

② 시험기간 및 측정시기

㉔ 총 36 개월 (유통기한 설정: 3 년 기준)

2017 년	2018 년	2019 년	2020 년	2021 년
12 월	6, 12 월	6, 12 월	6, 12 월	6 월

㉕ 가이드라인을 참고할 경우 7 개월 단위로 시행하여도 무방하나, 정확성을 위해 6 개월 단위로 조정함.

③ 시험횟수

㉔ 실험주기마다 1 회 단일 포장을 1 개 실험군으로 하여 무작위 최소 3 개의 검체로 3 반복 수행.

④ 실험재료

㉔ 고장초효소처리추출분말, 투명 비닐 지퍼백, 알루미늄 지퍼백, 실리카겔, fiber drum

⑤ 원료 포장 방법

㉔ 시료의 오염 및 이염을 최소한으로 줄이기 위해 샘플을 소분하기 전에 시료 분취용 스푼, 글러브 등을 70% EtOH로 충분히 소독한다.

㉕ 조심스럽게 원료 7 g 씩 투명 비닐 지퍼백에 넣은 후 최대한 공기를 빼낸다.

㉖ 위의 포장된 샘플을 다시한번 알루미늄 지퍼백에 넣은 후 실리카겔을 한 개 넣어준다.

㉗ 진공포장기를 이용하여 진공 포장, 실링 및 라벨링하여 보관 조건에서 가속시험을 실시한다.

㉘ 주기별 분석을 위해 개봉한 저장용 샘플은 사용 후 폐기한다.

(나) 가속시험 실험 방법

① 저장조건

㉔ 저장 온도 (45 ± 2 °C), 상대 습도 ($75 \pm 5\%$), (항온항습기 사용)

② 시험기간 및 측정시기

㉔ 총 9 개월 (유통기한 설정: 3년)

㉕ 최초 실험 시행 후 1 개월 단위로 총 10회 진행함.

2017 년	2018 년	* 둘째주 화요일
12 월	1 ~ 9 월	

㉖ 가이드라인을 참고할 경우 1.8 개월 단위로 시행하여도 무방하나, 실험의 편리와 정확성을 위하여 1 개월 단위로 조정함.

③ 시험횟수

㉔ 실험주기마다 1 회 단일 포장을 1 개 실험군으로 하여 무작위 최소 3 개의 검체로 3 반복 수행.

④ 실험재료

㉔ 고장초효소처리추출분말, 투명 비닐 지퍼백, 알루미늄 지퍼백, 실리카겔, fiber drum

⑤ 원료 포장 방법

㉔ 시료의 오염 및 이염을 최소한으로 줄이기 위해 샘플을 소분하기 전에 시료 분취용 스푼, 글러브 등을 70% EtOH로 충분히 소독.

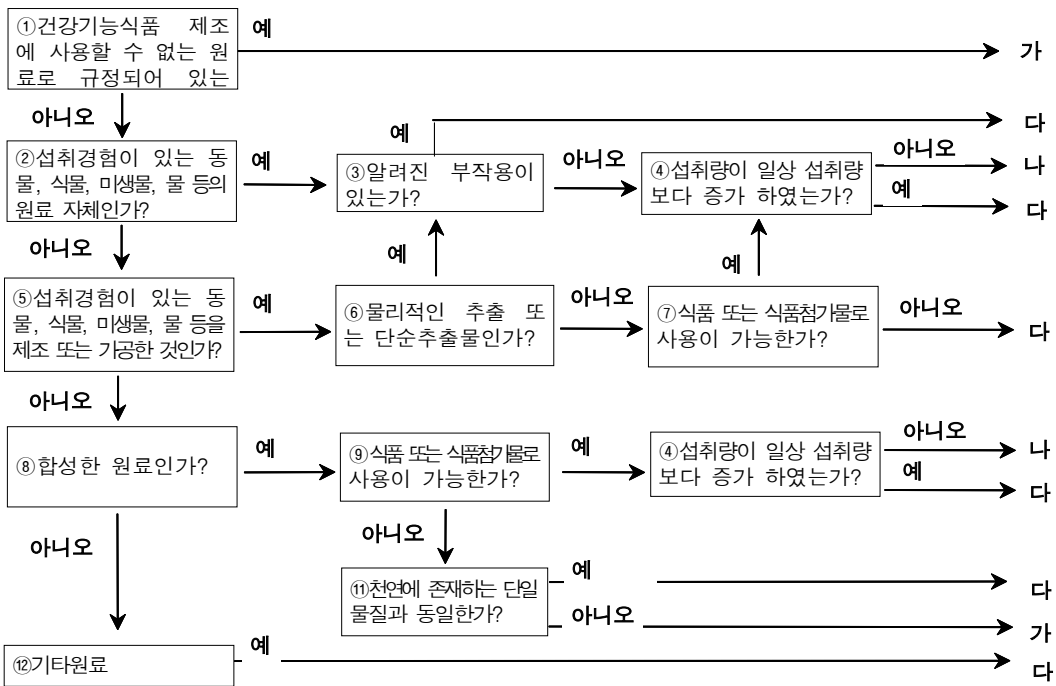
- ㉔ 조심스럽게 원료 7 g 씩 투명 비닐 지퍼백에 넣은 후 최대한 공기 제거.
- ㉕ 위의 포장된 샘플을 다시한번 알루미늄 지퍼백에 넣은 후 실리카겔을 한 개 투입.
- ㉖ 진공포장기를 이용하여 진공 포장, 실링 및 라벨링하여 보관 조건에서 가속시험 실시.
- ㉗ 주기별 분석을 위해 개봉한 저장용 샘플은 사용 후 폐기.

(다) 평가방법

- ① 성상
- ② 수분 함량
- ③ 지표(유효)성분 함량

(14) 안전성 시험

(가) 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도 (제14조 제7호 나목 관련)



(나) 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√		
섭취 근거 자료		√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료		√	√
섭취량평가자료		√	√
인체적용시험자료			√
독성시험자료			√

(15) 임상시험

(가) 의뢰기관 및 시험기관

구분	의뢰기관	시험기관
기관명	(주)비티씨	경희대학교 피부생명공학센터 임상연구소
주소	경기도 안산시 상록구 해안로 705 기술고도화동 703호	경기도 수원시 영통구 광교로 147 경기바이오센터 5F
전화	031-500-4295	031-888-6184

팩 스	031-500-4296	031-888-6173
E-mail	twkim@btcbio.com	clinic@khu.ac.kr
Homepage	http://www.btcbio.com/	http://www.skinbio.org/
시험모니터 & 시험책임자	김 태 우 / 수석연구원	박 철 중 / 피부과전문의

(나) 인체적용시험 지침

본 시험은 GCP (Good Clinical Practices) 규정, 건강기능식품의 기능성 평가 가이드 (식품의약품안전처 2014.01)를 기초하여 시험을 기획하며 시험 진행, 자료 수집, 결과 분석은 경희대학교 피부생명공학센터의 규정 및 프로토콜 조항을 준수하도록 한다.

(다) 시험 방법

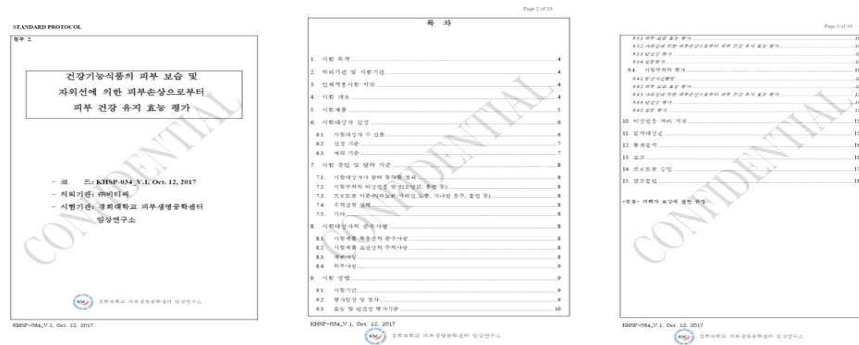


그림 49. IRB 심사 자료

(16) 개별인정 신청

(가) 아래의 인정신청 제출서류 항목 작성

- ① 제출자료 전체의 총괄 요약본
- ② 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- ③ 제조방법 및 그에 관한 자료
- ④ 원료의 특성에 관한 자료
- ⑤ 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료
- ⑥ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- ⑦ 안전성에 관한 자료
- ⑧ 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- ⑨ 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- ⑩ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

(17) 마케팅

- (가) VITA FOODS EUROPE (Geneva) 기능식품박람회 참가
- (나) VITA FOODS ASIA (Singapore) 기능식품박람회 참가
- (다) HI JAPAN (Tokyo) 기능식품박람회 참가

(18) 혼합소재 선정

- (가) 역사 및 갈대 추출물의 피부건강 관련 벼과식물 혼합소재 가능성 시험

① 역세 및 갈대로부터 이차대사산물 분리 방법

㉠ Open column chromatography를 이용한 물질 분리 정제

- 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O를 이용하여 분배 추출
- 관련 분획으로부터 silica gel, octadecyl silica gel, Sephadex LH-20 등의 각종 matrix를 적절히 이용하고, 다양한 용출용매로 column chromatography 실시
- TLC pattern과 10% H₂SO₄의 발색시약을 이용하여 발색된 양상에 따라 소분획을 나누는 과정을 반복 실시
- 3종의 matrix를 이용한 open column chromatography를 이용해 순수하게 분리, 정제
- 위에서 얻어진 화합물에 대하여 silica gel, octadecyl silica gel, 및 NH₂-silica gel TLC, HPLC 및 NMR을 이용하여 순도를 검정
- 주요 지표성분을 각각 10 mg 이상씩 정제

㉡ Preparative HPLC를 이용한 물질 분리 정제

- 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O를 이용하여 분배 추출
- 상기 추출물을 TLC로 분석 : Silica gel, octadecyl silica gel 사용
- 특이 지표성분을 선발
- 특이 성분을 preparative HPLC로 분리 정제
- 위에서 얻어진 화합물에 대하여 SiO₂, ODS 및 NH₂-silica gel TLC, HPLC 및 NMR을 이용하여 순도를 검정

② 역세 및 갈대로부터 분리된 화합물 구조규명 방법

㉠ 물리화학적 성상의 관찰, 기기분석 자료의 해석

- 분리한 화합물에 대해서 UV detection (254, 365 nm)과 TLC plate상의 10% H₂SO₄ 등의 발색시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 화합물의 골격군을 예상
- 측정 항목: melting point, 선광도 및 CD 측정, UV spectrum, IR spectrum, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT NMR, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, HMBC, NOE, NOESY

③ 역세 및 갈대로부터 분리한 물질의 항염증 효능 시험 방법

㉠ 역세 및 갈대로부터 분리한 물질에 대한 RAW264.7 macrophage의 항염증 평가

- 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-)(2)-(라)-①, ②, ③)

(나) 미강(쌀겨) 추출물의 피부건강 관련 베타카로틴 혼합소재 가능성 시험

① 미강(쌀겨)의 유산균 발효를 통한 GABA 함량 증가방법 개발

㉠ 전분분해 효소처리 진행한 미강배지 제조방법

- 100g미강과 1kg 증류수를 2L bottle에 넣어 제조.
- 액화효소(BAN 480L®, Novozymes) 3ml 첨가 후 70°C 1hr 반응.
- 당화효소(Dextrozyme® DX 1.5X, Novozymes) 3ml 첨가 후 60°C 1hr 반응.
- L-glutamic acid 10g(1%) 첨가 후 pH 측정.

- pH 보정 시험균은 pH 6.5로 보정. (중탄산 나트륨 사용)
- pH 보정 없는 시험균은 따로 보정을 하지 않음.
- 121°C, 15분 멸균. 발효 전 분석용 샘플링.

㉠ 전분분해 효소처리 진행하지 않은 미강배지 제조방법

- 100g 미강과 1kg 증류수를 2L bottle에 넣어 제조.
- L-glutamic acid 10g(1%) 첨가 후 pH 측정.
- pH 보정 시험균은 pH 6.5로 보정. (중탄산 나트륨 사용)
- pH 보정 없는 시험균은 따로 보정을 하지 않음.
- 70°C 25분 살균. 발효 전 분석용 샘플링.

㉡ 전배양액 제조방법

- Clean bench에서 50ml Falcon tube에 샘플 라벨링은 한다.
- 멸균한 MRS broth 30ml을 3개의 50ml Falcon tube에 분주 후 *L. brevis* M2와 *L. plantarum*의 균주 stock을 넣고 온도 30°C, 120rpm shaking 조건에서 진탕배양기에 16hr 배양.
- 배양한 균주 tube는 3000rpm 15분 Centrifuge.
- Clean bench에 옮겨 균주 pellet을 확인 후 상등액을 버린다.
- 균주 tube에 MRS broth를 10ml 씩 첨가하여 pellet을 풀어준 후 1개의 tube에 포집.
- 10^{-1} ~ 10^{-9} 희석배수로 희석하여 생균수 측정 샘플을 준비한다.
- MRS agar에 라벨링을 하고 샘플별 2개의 petri dish에 희석한 생균수 측정 샘플을 spreading.
- 30°C incubator에서 overnight 한 후 colony counting 하여 평균을 계산한다.
- 희석배수를 곱하여 생균수 CFU/ml 계산.

㉢ 발효 방법

- 멸균한 미강배지를 Clean bench에 넣는다.
- 생균수 측정된 균주는 1×10^9 CFU/ml 농도로 희석.
- 미강배지에 균주 5%(v/v) 첨가 후 진탕배양기에 35°C, 50rpm으로 배양, 15hr 발효.
- 발효 완료 후 Clean bench로 옮긴다.
- 15ml Conical tube에 샘플 라벨링을 하고 2ml 샘플링하여 냉장보관한다. (발효 후 생균수 측정용)
- 미강 발효한 삼각 플라스크를 고압증기멸균기에 넣고 121°C, 15분에 멸균한다.
- 멸균한 샘플은 0.1 µm filter 를 이용하여 필터한다.
- 미강발효액은 100ml 샘플병에 넣고 pH를 측정한다.
- pH 측정 후 Deep freezer에 보관한다.
- 보관한 미강발효액은 동결건조 한다.

- ② 고장초 미강 혼합소재에 대한 RAW264.7 macrophage의 항염증 효능 평가 방법
 - 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-(2)-(라)-①, ②, ③)
- ③ 고장초 미강 혼합소재에 대한 B16-F0 melanocyte의 미백 효능 평가 방법
 - 미백 효과 측정 실험 방법 참조 (가.-(2)-(바)-①, ②, ③)
- ④ 고장초 미강 혼합소재에 대한 RBL-2H3 mast cell의 항알러지 효능 평가 방법
 - 항알러지 효과 측정 실험 방법 참조 (가.-(8)-(가)-⑧)
- ⑤ 미강으로부터 이차대사산물 분리 방법
 - ㉞ Open column chromatography를 이용한 물질 분리 정제
 - ‘역세 및 갈대로부터 이차대사산물 분리방법’ 참조 (가.-(18)-(가)-①-㉞)
 - ㉟ Preparative HPLC를 이용한 물질 분리 정제
 - ‘역세 및 갈대로부터 이차대사산물 분리방법’ 참조 (가.-(18)-(가)-①-㉟)
- ⑥ 미강으로부터 분리된 화합물 구조규명 방법
 - ㉞ 물리화학적 성상의 관찰, 기기분석 자료의 해석
 - ‘역세 및 갈대로부터 분리된 화합물 구조규명 방법’ 참조 (가.-(18)-(가)-②-㉞)

(다) 조릿대 및 밀싹 추출물의 피부건강 관련 벼과식물 혼합소재 가능성 시험

- ① 조릿대 및 밀싹 추출 방법
 - ㉞ 실험의 사용될 시료의 종류

	구분	비고
실험원료	1) 조릿대 (경북 영천) - 특이사항: 잎과 줄기가 혼합된 상태 비율: (잎 20% : 줄기 80%) 2) 밀싹 분말 (경북 영천)	- (주)푸른들판에서 구매 (각 원료 5kg 보유 중) - 조릿대의 경우 잎과 줄기를 따로 분리 추출하여 더 좋은 부위를 선정하는 실험도 병행해야 함.
추출방법	1) 기본 추출 방법 (열수추출, 50%EtOH 추출) 2) 효소처리 추출 방법 (고장초 효소처리 추출방법과 동일법)	- 연구소에서 실험 scale로 진행 (원료 100g 기준으로 진행) - 기본 추출 방법: 열수 추출물과 에탄올 추출물의 활성을 비교하여 각 원료의 최적추출조건을 확인하기 위함. - 효소처리 추출 방법: 고장초와 동시에 추출을 진행하기 위해 각 원료의 효소처리 후 활성변화 및 유효성분의 함량변화를 알아보기 위함. - 추출조건 최적화 실험은 본 실험에서 선정될 원료 한 가지에 대해 추후에 진행 예정.

㉞ 추출 방법

	용매	온도(℃)	시간(hr)	농축	건조
밀싹 열수추출	정제수 1000g	80	4	15Brix	동결건조
밀싹 에탄올추출	50%(w/w) 발효주정 1000g				
조릿대 열수추출	정제수 1000g				
조릿대 에탄올추출	50%(w/w) 발효주정 1000g				

- ② 조릿대 및 밀싹 추출물 *in vitro* 시험 방법
 - ㉞ 조릿대 및 밀싹 추출물의 β -hexosaminidase release 억제 측정
 - 항알러지 효과 측정 실험 방법 참조 (가.-(8)-(가)-⑧)
 - ㉟ 조릿대 및 밀싹 추출물의 LPS에 의해 염증이 유도된 RAW264.7 macrophage에 대한 세포 생존율 측정

- 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-2)-(라)-①, ②, ③)

㉔ 조릿대 및 밀싹 추출물의 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포의 nitric oxide 생성 측정

- 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-2)-(라)-①, ②, ③)

㉕ 조릿대 및 밀싹 추출물의 nitric oxide 생성 측정(면역 증강)

- 항염증 측정 실험 방법 참조 (가.-2)-(라)-①, ②, ③)

(19) 혼합소재 기능(지표)물질 선정 및 품질관리를 위한 시험법 개발

(가) 기능(지표)물질 분리 선정을 위한 문헌 조사

① 효소처리 고장초 추출물에서 확인하였던 주름개선, 미백, 항알러지 중 효능을 나타내는 활성물질을 지표물질로 선정

② 시중에서 확보가 용이한 물질로 선정

(나) 조릿대로부터 이차대사산물 분리 및 구조 규명 방법

① Open column chromatography를 이용한 물질 분리 정제

- '억새 및 갈대로부터 이차대사산물 분리방법' 참조 (가.-18)-(가)-①-㉔)

② Preparative HPLC를 이용한 물질 분리 정제

- '억새 및 갈대로부터 이차대사산물 분리방법' 참조 (가.-18)-(가)-①-㉕)

③ 물리화학적 성상의 관찰, 기기분석 자료의 해석

- '억새 및 갈대로부터 분리된 화합물 구조규명 방법' 참조 (가.-18)-(가)-②-㉔)

(다) 품질관리를 위한 기능(지표)물질 시험법 개발

① peak symmetry: 피크의 대칭성 값 1에 근접

② Tailing factor: 미국약전(USP) 기준 0.5 이상, 2.0 이하

③ Retention time: RSD (%) 값이 자사기준인 1% 이내

(20) 혼합소재 추출공정 최적화

(가) 추출방법 설정조건

① 추출원물: 1~2 cm로 세절된 조릿대 잎

② 추출용매: 30, 50, 70, 95% 발효주정

③ 추출시간: 4시간, 6시간, 8시간

④ 추출온도: 60 °C, 80 °C

(21) 혼합소재 분말화 공정 개발

(가) 동결건조 샘플 제조

① 기존 자사제품들의 동결건조 방법을 채택하여 고장초 추출물을 10~20 Brix 사이로 농축하고 동결건조하여 샘플을 제조

(22) 혼합소재 원산지 선정

(가) 추출시험 방법

	추출 용매 (w/w)	조릿대 칭량 (g)	온도(℃)	시간(hr)
경북 영천	70% EtOH	50	80	6
강원도 인제				
경남 거창				
제주 서귀포				

(나) 산지별 추출물 함량 분석 방법

① p-coumaric acid 분석 방법

Instrument	Agilent Technologies 1260 (HPLC)		
Column	Poroshell 120EC-C18 (4.6 x 50 mm, 2.7 μm)		
Solvent	A=0.1% H ₃ PO ₄ in DW, B=Acetonitrile		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	85	15
	5	85	15
	5.1	20	80
	7	20	80
	7.1	85	15
	10	85	15
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection vol.	4 μL		
Wave length	280 nm		
temp.	40 ℃		

(23) 혼합소재 대량생산 공정개발

(가) 최적화된 방법을 통하여 1kg 생산을 각 3Lot씩 진행.

(나) 아래와 같은 추출방법으로 대량생산 공정개발 시험을 진행.

	원물 size	칭량 (g)	용매	온도 (℃)	시간 (hr)
1kg scale	1~2cm	1000	70% 발효주정 기질대비 20배수(v/w)	80	6

(다) 기능(지표)물질의 분석방법

① p-coumaric acid 분석방법 참조 (가)-(22)-(나)-①)

(24) 혼합소재 시너지 효과 시험

(가) 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 주름개선 평가

① 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 human dermal fibroblast에 대한 세포 독성 평가

㉞ 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(8)-(사)-①, ②, ③)

② 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포 보호 평가

㉞ 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재(1:2, 2:1, 1:1)로 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(8)-(사)-①, ②, ③)

③ 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 콜라겐 생성능 평가

㉞ 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재(1:2, 2:1, 1:1)로 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(8)-(사)-①, ②, ③)

(25) 작용기전 평가

(가) 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 human dermal fibroblast에 대한 세포 독성 평가

① 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(8)-(사)-①, ②, ③)

(나) 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포 보호 효과

① 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포 보호 효과를 측정하기 위해 MTT assay를 이용하였음.

② 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(23)-(가)-①, ②, ③)

(다) 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 콜라겐 secretion 측정

① 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 콜라겐 secretion을 측정하기 위해 procollagen type-I ELISA kit를 이용하였음.

② 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(8)-(사)-①, ②, ③)

(라) 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 metalloproteinase family (MMPs) secretion 측정

① 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 MMPs secretion을 측정하기 위해 human MMP-1, 2, 3, 9, 13 ELISA kit를 이용하였음.

② 주름 개선 효능 실험 방법 참조 (가)-(8)-(사)-①, ②, ③)

(마) 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포내 활성 산소 저해 효과

① 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포내 활성 산소 저해 효과를 관찰하기 위해 DCF-DA를 이용하였음.

② 먼저, 24-well cell culture plate에 human dermal fibroblast (1×10^5 cells/well)로 분주하고 80~90% 채워질때까지 배양함. 이 후, 고장초 효소처리 추출분말과 triclin을 농도별로 처리하고 1시간 반응 후, 10 mJ/cm^2 의 UVB를 조사하고 동일한 농도로 시료를 재처리함. 48시간 반응 이후, $25 \mu\text{M}$ 의 DCF-DA ROS indicator probe를 30분간 처리함. PBS로 3회 washing 후, 세포내 활성 산소는 fluorescence microscopy로 관찰함.

(바) 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 antioxidant enzyme (SOD1, HO-1) 단백질 발현

① 고장초 효소처리 추출분말과 triclin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 antioxidant enzyme (SOD1, HO-1)의 발현을 측정하기 위해 western blot analysis 수행.

② 먼저, 100 mm cell culture plate에 human dermal fibroblast가 80~90% 채워질때까지 배양함. 이 후, 고장초 효소처리 추출분말과 triclin을 농도별로 처리하고 1시간 반응 후, 10 mJ/cm^2 의 UVB를 조사하고 동일한 농도로 시료를 재처리함. 48시간 반응 이후, PBS로 washing하여 불순물을 제거하고 RIPA buffer (0.15 M NaCl , 1% Triton X-100, 1% sodium deoxychloride, 0.1% SDS, 0.05 M Tris-HCl, 0.02 M EDTA, pH 7.5)를 이용, cell lysis함. RIPA buffer에 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor를 첨가하여 사용하

였음. Lysate는 원심분리(13,000 rpm, 10 mins)하여 불순물을 다시 제거하여 순수 protein 만 포집함. Protein은 BCA assay를 이용, 정량하여 사용하였음.

- ③ 30 µg의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 SDS-PAGE를 수행함 (120 V, 1시간 40분). SDS-PAGE 이후, PVDF membrane에 transfer하고(100 V, 1시간), 5% skim milk에 1시간 blocking함. Primary antibody (SOD1, HO-1, 1:200 dilution with 5% skim milk, β-Actin, 1:1000 dilution with 5% skim milk)를 처리하여 4°C에서 overnight하고 TBS로 3회 washing 함. Secondary antibody (SOD1, HO-1; rabbit, β-Actin; mouse, 1:1000 dilution with 5% skim milk)를 1시간, 상온에서 처리하고 TBS로 3~4회 washing 함. ECL chemiluminescent substrate를 선반응한 후, gel documentation 을 이용하여 단백질의 band를 관찰, 측정함.

(사) 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 MAPK signaling 단백질 발현

- ① 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 MAPK signaling protein (phosphorylated Akt, JNK, ERK, p38)의 발현을 측정하기 위해 western blot analysis를 수행함.
- ② 단백질 발현 실험 방법 참조 (가.-(24)-(바)-③)
- ③ Primary antibody (p-Akt, p-JNK, p-ERK, p-p38, Akt, JNK, ERK, p38, 1:200 dilution with 5% skim milk, β-Actin, 1:1000 dilution with 5% skim milk), Secondary antibody (p-Akt, p-JNK, p-ERK, p-p38, Akt, JNK, ERK, p38; rabbit, β-Actin; mouse, 1:1000 dilution with 5% skim milk)

(아) 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 AP-1 signaling 단백질 발현

- ① 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 AP-1 signaling (c-Fos, phosphorylated c-Jun)의 발현을 측정하기 위해 western blot analysis를 수행함.
- ② 단백질 발현 실험 방법 참조 (가.-(24)-(바)-③)
- ③ Primary antibody (c-Fos, c-Jun, p-c-Jun, 1:200 dilution with 5% skim milk, β-Actin, 1:1000 dilution with 5% skim milk), Secondary antibody (c-Fos, c-Jun, p-c-Jun; rabbit, β-Actin; mouse, 1:1000 dilution with 5% skim milk)

(자) 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 NF-kB signaling 단백질 발현

- ① 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 NF-kB signaling (phosphorylated IκBa, p65, IKKα/β)의 발현을 측정하기 위해 western blot analysis를 수행함.
- ② 단백질 발현 실험 방법 참조 (가.-(24)-(바)-③)
- ③ Primary antibody (p-IκBa, p-p65, IKKα/β, IκBa, p65, IKKα, IKKβ, 1:200 dilution with 5% skim milk, β-Actin, 1:1000 dilution with 5% skim milk), Secondary antibody (p-p65, IKKα/β, p65, IKKα, IKKβ; rabbit, p-IκBa, IκBa, β-Actin; mouse, 1:1000

dilution with 5% skim milk)

(26) 혼합소재로 일반식품 소재 사업화 제품 생산

(가) 위탁업체인 (주)삼우다연에 위탁하여 시제품 생산

(나) 각 공정 단계별 1L의 추출물 샘플을 취하여 추출 공정단계별 기능(지표)물질 이행률 및 최종 수율 계산

(다) 취득 샘플 구간

추출 과정	샘플 취득량
50% 발효주정 추출 (ST1)	1L
농축 후 건조 (ST2)	1L

(라) 공정 단계별 취한 샘플을 동결건조 후 분말화하여 *p*-coumaric acid 함량 분석 및 기능(지표)물질 이행 및 최종 수율 계산하는데 사용

나. 추진일정

일련 번호	연구내용	추진 일정												
		1 (11)	2 (12)	3 (1)	4 (2)	5 (3)	6 (4)	7 (5)	8 (6)	9 (7)	10 (8)	11 (9)	12 (10)	
1	기능(지표)물질 분리 및 품질관리를 위한 시험법 개발 (1차)				■	■								
2	추출 조건 확립 (1차)					■	■	■						
3	원재료 표준화 (1차)						■	■	■					
4	시험법 밸리데이션 (1차)								■	■				
5	분말화 공정 개발 (1차)									■	■			
6	효소처리 추출조건 확립 (1차)										■	■	■	
7	효소처리 추출공정 최적화 (2차)	■	■											
8	대량생산 공정개발(Scale up) (2차)		■	■										
9	In vivo 시험 (2차)	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
10	일반식품 소재 사업화 제품 생산 (2차)										■	■	■	
11	시제품의 품질평가 (2차)												■	■
12	임상시험 및 제품화를 위한 제형화 연구 (3차)	■												
13	안정성 시험	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
14	안전성 시험													
15	임상시험 (3차)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

16	개별인정 신청 (3차)																		
17	마케팅 (3차)																		
18	혼합소재 선정 (3차)																		
19	혼합소재 기능(지표)물질 선정 및 품질관리를 위한 시험법 개발 (3차)																		
20	혼합소재 추출공정 최적화 (3차)																		
21	혼합소재 분말화 공정 개발 (3차)																		
22	혼합소재 원산지 선정 (3차)																		
23	혼합소재 대량생산 공정개발 (3차)																		
24	혼합소재 시너지 효과 시험 (3차)																		
25	고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 주름개선 작용기전 평가 (3차)																		
26	혼합소재로 일반식품 소재 사업화 제품 생산 (3차)																		

다. 연구수행결과

(1) 기능(지표)물질 분리 및 품질관리를 위한 시험법 개발

(가) 기능(지표)물질 10종 분리 결과

- ① Tricin
- ② Tricin-7-O- β -dusrn D-glucopyranose
- ③ Salcolin A
- ④ Salcolin B
- ⑤ Tricin-4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl) ether 7-O- β -D-glucopyranose
- ⑥ Tricin-4'-O-(erythro- β -guaiacylglyceryl) ether 7-O- β -D-glucopyranose
- ⑦ Tricin-4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl) ether 7''-O- β -D-glucopyranose
- ⑧ Tricin-4'-O-(erythro- β -guaiacylglyceryl) ether 7''-O- β -D-glucopyranose
- ⑨ Salcolin C
- ⑩ Salcolin D

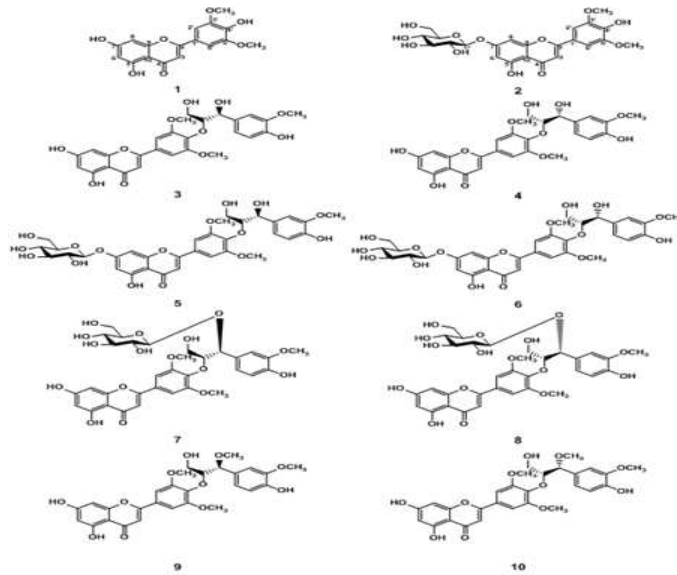


그림 50. 분리된 기능(지표)물질 10종 구조

(나) 분리한 활성물질들을 확인하기 위한 동시 분석법 확립

① LC/MSMS 분석결과

㉠ LC/MSMS Chromatogram

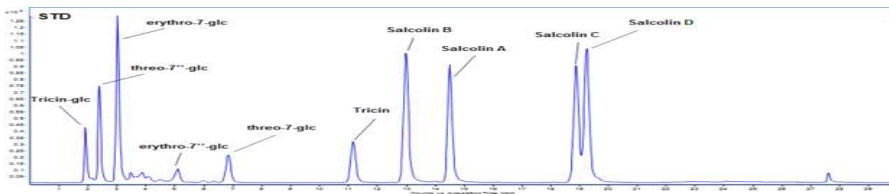


그림 51. LC/MSMS Chromatogram

㉡ Calibration curve

Compound ^{a)}	Regression equation ^{a)}	Linear range ^{a)} ($\mu\text{g/mL}$) ^{b)}	Correlation coefficient ^{c)} (R^2) ^{b)}
Tricin-glc ^{c)}	$y = 4,824.3770x + 6.3224$	1-10 ^{c)}	0.9998 ^{c)}
threo-7''-glc ^{c)}	$y = 7,075.4208x - 475.6885$	1-10 ^{c)}	1.0000 ^{c)}
erythro-7-glc ^{c)}	$y = 15,833.6557x + 1,282.8361$	1-10 ^{c)}	1.0000 ^{c)}
erythro-7''-glc ^{c)}	$y = 1,127.5375x - 5.2222$	1-100 ^{c)}	1.0000 ^{c)}
threo-7-glc ^{c)}	$y = 3,408.6257x + 373.8852$	1-10 ^{c)}	0.9995 ^{c)}
Tricin ^{c)}	$y = 4,132.2427x + 2,103.4126$	0.5-100 ^{c)}	0.9999 ^{c)}
Salcolin B ^{c)}	$y = 24,444.2896x + 1,451.6776$	1-10 ^{c)}	0.9993 ^{c)}
Salcolin A ^{c)}	$y = 19,978.5792x + 1,936.3552$	1-10 ^{c)}	0.9995 ^{c)}
Salcolin C ^{c)}	$y = 14,275.2268x + 1,240.9016$	1-10 ^{c)}	1.0000 ^{c)}
Salcolin D ^{c)}	$y = 16,585.5574x + 1,930.3607$	1-10 ^{c)}	1.0000 ^{c)}

그림 52. 분리된 기능(지표)물질 10종 Calibration curve

㉢ 고장초 추출물 내의 10종 성분 함량 확인

- 선행연구에서는 salcolin C, D도 검출이 되었으나 본 연구에서는 해당 물질이 검출되지 않았음.
- 원산지 또는 수확시기에 따른 변화일 것으로 사료됨.

EtOH (%)	EtOH(), 80°C, 6h (mg/g)				
	10%	30%	50%	70%	90%
Tricin	0.42	6.88	8.74	10.43	12.58

Tricin-Glc	-	0.39	0.67	0.85	0.99
threo-7-Glc	-	0.86	0.79	0.94	1.14
threo-7-Glc"	-	0.78	1.27	1.58	1.82
erythro-7-Glc	-	0.3	0.44	0.6	0.67
erythro-7-Glc"	-	0.64	0.74	0.78	0.89
salcolin-A	0.1	0.58	0.67	0.75	1.02
salcolin-B	0.15	0.61	0.62	0.68	0.9
salcolin-C	-	-	-	-	-
salcolin-D	-	-	-	-	-

(다) 품질관리를 위한 기능(지표)물질 선정 및 시험법 개발

① 지표물질 선정

㉠ 지표물질은 Tricin으로 선정함.

㉡ 선정 사유

- Tricin은 선행실험에서 분리한 고장초 활성물질 10종 중 하나이며 다른 활성물질들에 비해 비교적 다량 함유하고 있음.
- Tricin을 제외한 나머지 9종은 Tricin derivative 이므로 온도와 pH에 의해 안정성이 보장되지 않으므로, 추출온도 및 추후 연구할 혼합물의 종류와 완제품의 성상에 따라 함량이 크게 달라질 수 있음.
- Tricin 표준품은 Tricin derivative 표준품보다 상업적으로 비교적 많이 판매하고 있어 구하기가 용이함.

② 지표물질 특성 정리

Name	Tricin	Chemical Structure
Systematic name	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; 3',5'-O-Dimethyltricetin; 4',5,7-Trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone	
Cas No.	520-32-1	
Molecular Formular	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	
Molecular weight	330.29 Da	
Appearance	yellow powder	
Melting point	289 ~ 291 °C	
Solvent	DMSO, Methanol, chloroform, Ethyl Acetate, Dichloromethane, Acetone	
UV-vis (λmax)	330, 350nm (Tricin in methanol)	

③ 지표물질 시험법 개발

㉠ HPLC 분석방법 문헌 검색

- Tricin analysis from Wheat Leaves

참고논문	A Reverse-Phase HPLC Method for Tricin Separation from Wheat Leaves Marc Estiarte, Josep Penuelas, Salvador Canigueral, Isidre Casals		
컬럼	Nucleosil 120, C-18, 10 μ m, 250 x 4.6 mm, analytical column (Tracer) Carbon loading:11%, pore size:120 \AA , surface area:200m ² /g		
이동상	A=20mM H ₃ PO ₄ inDW,B=methanol		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	100	0
	2	50	50
	5	45	55
	20	45	55
온도	30 °C		
파장	350 nm		
유속	1.5 ml/min		
주입량	40 μ l		
Sample	Wheat Leaves		
Diluted solvent	Methanol		

▪ Tricin analysis from Hull, husk

컬럼	Mightysil RP-18 GP column, 3.5 μ m, 250 x 4.6 mm, analytical column (Tracer) Carbon loading:20%, pore size:12.5nm, surface area:-		
이동상	A=Acetonitrile, B=1% Acetic acid in DW		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	15	85
	25	15	85
	25.1	40	60
	60	40	60
	60.1	15	85
	75	15	85
온도	25 °C		
파장	330 nm		
유속	1.0 ml/min		
주입량	20 μ l		
Sample	Hull, husk		
Diluted solvent	Methanol		

▪ Flavonoids analysis from Alfalfa

컬럼	Eurospheer PD 82 column		
이동상	A=1%phosphoric acid in DW, B=1%phosphoric acid in 40% acetonitrile		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	65	35
	60	0	100
온도	25 °C		
파장	350 nm		
유속	1.0 ml/min		
주입량	-		
Sample	Alfalfa		
Diluted solvent	Methanol or MeOH-DMSO(1:1)		

▪ Analysis method of Tricin (Chem Face)

컬럼	-		
이동상	A=Acetonitrile, B=1%Acetic acid in DW = 25 : 75		
온도	25 °C		
파장	330 nm		
유속	1.0 ml/min		
주입량	-		
Sample	Tricin		

Diluted solvent	Chloroform, Dichloromethane, Ethyl Acetate, DMSO, Acetone, etc.
-----------------	---

- Tricin analysis from Leaves의 시험법이 고장초 추출물로부터 Tricin peak의 분리가 가장 수월하여 해당 시험법을 참고하여 적합한 시험법 개발.

㉞ 수정 보완한 시험법

- 표준용액 조제
 - Tricin 표준품 2 mg을 칭량하고 HPLC 용 Methanol을 가하여 20 mL로 한 것을 Stock solution으로 한다.
 - Tricin Stock solution을 2.5 mL 덜어 MeOH로 10 mL의 표선을 맞춘 것을 Tricin Standard solution으로 한다.
- 검액 조제
 - 70% 에탄올 고장초농축액(52.4 Brix) 800 mg을 칭량하여 100 mL 광구병에 넣고 HPLC용 Methanol 40 mL로 녹인 후 30 분간 sonication 한 것을 Sample Stock solution으로 한다.
 - Sample stock solution 10 mL과 MeOH 10 mL을 넣고 볼텍스 믹서로 혼합한 것을 고장초 검액으로 한다.
 - Sample stock solution 10 mL과 Tricin Stock solution 5 mL, MeOH 5 mL을 넣고 볼텍스 믹서로 혼합한 것을 Spiked sample로 한다.

▪ 분석방법

Instrument	Agilent Technologies 1260 (HPLC)		
Column	C18 (SUPELCO Discovery® 250 mm × 4.6 mm, 5 μm)		
Solvent	A=0.15% H ₃ PO ₄ in DW, B=Methanol		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	80	20
	3	80	20
	3.1	50	50
	8	50	50
	8.1	45	55
	20	45	55
	20.1	15	85
	30	15	85
	30.1	80	20
45	80	20	
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection vol.	10 μL		
Wave length	350 nm		
temp.	30 °C		

- 분석결과
 - Spiking test Chromatogram

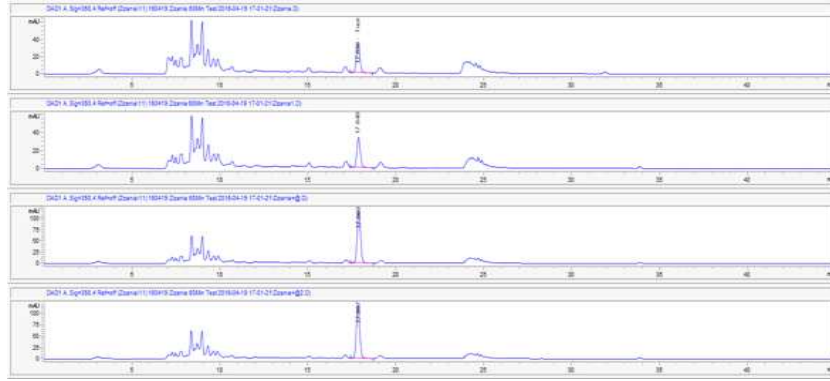


그림 54. Spiking test Chromatogram

1) zizania sample 1, 2) zizania sample 2, 3) spiked sample 1, 4) spiked sample 2

- Spiking test Chromatogram overlap

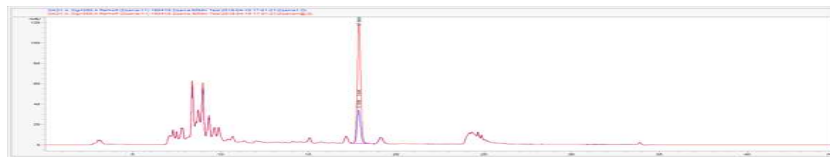


그림 55. Spiking test Chromatogram overlap

1) Blue: zizania sample 1, 2) Red: spiked sample 1

- 분석결과 Table

	Rt	Area	Height	Symmetry	Tail Factor
Zizania sample 1	17.826	469.1	33.6	0.878	1.0928
Zizania sample 2	17.849	460	33	0.868	1.0928
Spiked sample 1	17.869	1593	117.8	0.908	1.0684
Spiked sample 2	17.857	1588.9	117.1	0.906	1.0677

■ 결론

- peak symmetry 0.868 ~ 0.908 로 peak의 대칭성이 잘 나타남.
- Tailing Factor 1.0677 ~ 1.0928 로 peak의 분리능이 우수함.
- Retention Time(RT) 값의 RSD(%)가 0.1%로 안정적임.
- 위 분석법은 고장초 추출물로부터 Tricin을 분석함에 있어 적합하다고 판단함.

(2) 추출 조건 확립

(가) 원재료의 특성 조사 및 선발기준 선정

① 고장초 원재료의 분쇄 시험

- ㉠ 고장초 원재료는 1.5 ~ 2 cm 정도로 세절되어 시중에 판매되고 있지만 이 원재료는 세절이 되었어도 무게대비 부피를 많이 차지하기 때문에 2 mm 정도의 size로 분쇄하여 부피를 줄이는 것이 효율적인 것으로 판단됨.
- ㉡ 판매업체에서는 2 mm 분쇄를 해주지 않으므로 지속적 분쇄를 위한 분쇄장비를 익산공장에 설치하였으며 대량 분쇄를 위한 분쇄업체도 확보함.

② 추출조건에서 2회 추출의 효율성 확인

- ㉢ 70% 주정을 용매로 80℃에서 6시간 추출 후 재탕 4시간을 진행하여 효율성 확인.

㉔ 고장초 초탕의 수율은 약 11 ~ 13% 인 것에 비하여 재탕의 수율은 2 ~ 3% 미만으로 효율성이 낮음.

③ 고장초 추출물의 건조방법 확인

㉔ 고장초 추출물을 동결건조 시 분말화가 용이하지만 분말의 입자 및 밀도를 고정시키기 힘들.

㉔ 고장초 추출물을 진공건조 시 고농축 되면서 건조되어 분말화가 힘들고 색상이 어두움.

㉔ 고장초 추출물을 분무건조 시 조절 조건에 따라 분말의 입자 및 밀도, 색상까지도 동일하게 제조 가능하지만 고온을 활용한 건조로 활성물질 함량에 변화가 발생함.

④ 결론

㉔ 고장초 원재료를 2 mm 분쇄를 통한 부피감소의 효율 확보.

㉔ 2회 추출은 효율이 낮으므로 1회 추출만 진행.

㉔ 건조방법은 실험적인 측면에서 동결건조를 활용하되 생산적인 측면에서는 제품의 동일성을 위해 진공건조를 고려하기로 함.

(나) 추출방법 설정조건

① 추출용매의 농도비율별 시험

㉔ 수율 비교

- 추출 수율은 50% 주정에서 가장 높음. 70% 주정 또한 차이가 크지 않음.

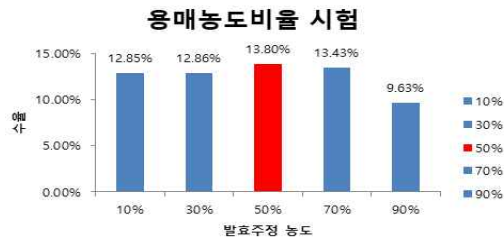


그림 56. 용매농도 비율 시험

㉔ 유효성분 10종의 함량 비교

- 추출용매의 주정 농도가 높아질수록 유효성분의 함량이 높아지는 경향을 보임.

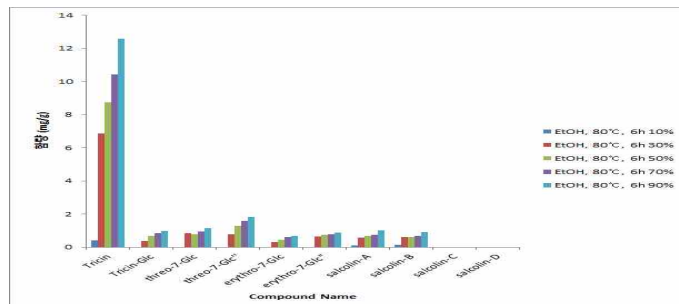


그림 57. 용매 농도별 유효성분 10종의 함량 비교

㉔ 항염증 효능 평가

- 추출용매의 주정 농도가 높아질수록 항염증 효능이 높아지는 것을 확인함. 특히,

저농도에서 70% 주정추출물이 다른 농도에 비해 효능이 높음.

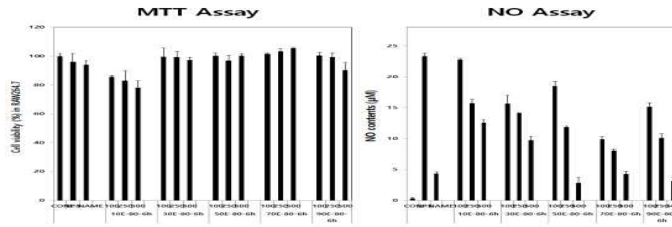


그림 58. 용매 농도별 샘플 MTT & NO assay 결과

㉠ 결론

- 수율은 13.8%의 수율로 50% 주정 추출물이 가장 높으나 70% 주정 추출물도 13.43%로 크게 차이는 없음.
- 10종의 활성성분 분석 결과, salcolin-C와 salcolin-D는 검출되지 않았으며, 나머지 검출된 8가지 성분이 모두 90% 주정에서 가장 많이 추출되었지만 70% 주정 추출물도 90% 주정 추출물과 비교했을 때 차이가 크진 않음.
- NO production 결과, 100, 250 µg/ml 투입 시 70% 주정 추출물의 활성이 가장 좋았으며, 500 µg/ml 투입 시, 50% 주정 추출물의 활성이 가장 좋음.
- 위의 결과를 취합하면 수율은 50%와 70% 주정 추출물이 가장 좋았고, NO production 결과는 낮은 농도에서 70% 주정 추출물이 좋았으며, 활성 성분은 90% 주정 추출물이 가장 좋지만 70% 주정 추출물과 큰 차이는 없으므로 수율과 활성성분의 함량 및 항염증 효능이 복합적으로 좋은 70% 주정의 용매를 최적의 추출용매로 결정함.

㉡ 추출시간의 변화 시험

㉢ 수율 비교

- 추출 시간이 증가함에 따라 수율이 비례하여 증가하지만 6시간 이후로는 증가폭이 확연히 줄어드는 것을 확인함.



그림 59. 추출시간에 따른 수율 변화

㉣ 유효성분 10종의 함량 비교

- 추출 시간이 증가함에 따라 유효성분 함량도 증가하지만 6시간 이후로는 오히려 감소하는 경향을 보임.

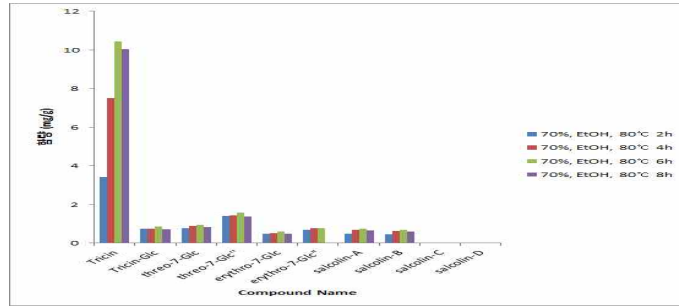


그림 60. 추출 시간에 따른 유효성분 10종의 함량

㉔ 항염증 효능 평가

- 추출 시간이 증가함에 항염증 효능도 증가하지만 6시간 이후로는 저농도에선 오히려 감소하는 경향을 보임.

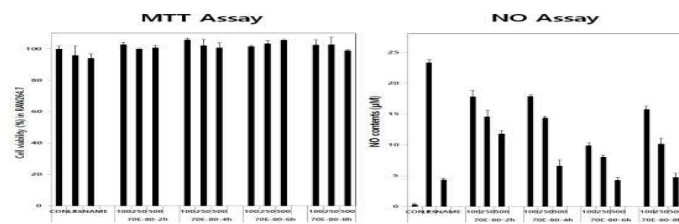


그림 61. 추출 시간 샘플 MTT & NO assay

㉕ 결론

- 수율은 13.55%로 8시간 추출물이 가장 좋으나 6시간 추출물의 13.43%와 크게 차이는 없음.
- 10종의 활성성분 분석결과 salcolin-C와 salcolin-D는 검출이 안 되었으며 나머지 검출된 8가지 성분이 모두 6시간 추출에서 가장 많이 추출되었고 특이한 점은 8시간에서는 오히려 함량이 감소하는 경향을 보임.
- NO production 결과, 100, 250, 500 µg/ml 투입 시 모두 6시간 추출물의 활성이 가장 좋게 나타남.
- 위의 결과를 취합하면 수율은 6시간과 8시간 추출물이 가장 좋았고, 항염증 효능 결과는 모든 농도에서 6시간 추출물이 좋았으며 활성 성분도 모두 6시간 추출물이 가장 좋았으므로 모든 조건을 충족시키는 **6시간 추출을 최적의 추출시간**으로 선정함.

③ 추출온도의 변화 시험

㉖ 수율 비교

- 추출온도가 증가함에 따라 수율이 높아짐.

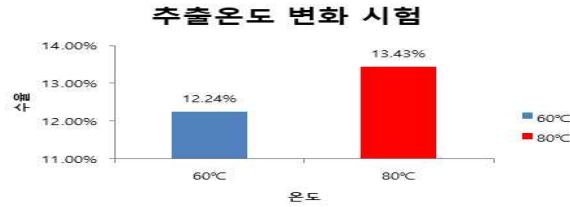


그림 62. 추출온도 변화 시험

㉠ 유효성분 10종의 함량 비교

- 추출온도가 증가함에 따라 활성성분들의 함량이 미비한 변화를 보였지만 Tricin의 함량은 확연하게 증가함.

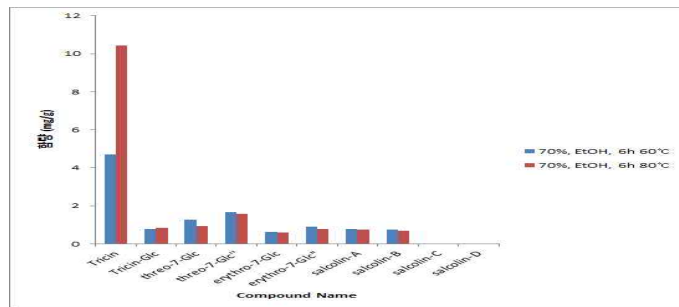


그림 63. 추출온도에 따른 샘플 함량 비교

㉠ 항염증 효능 평가

- 60°C에 비해 80°C 추출이 더 좋은 항염증 효능을 나타냄.

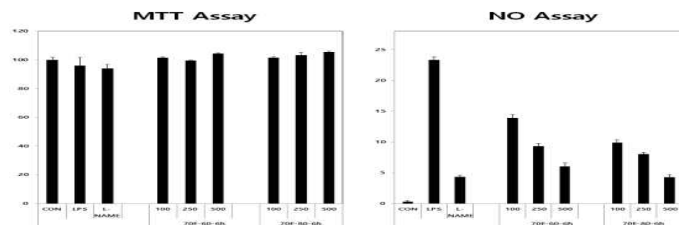


그림 64. 추출온도에 따른 샘플 MTT & NO assay

㉠ 결론

- 수율은 13.43%의 수율로 80°C 추출물이 높음.
- 10종의 활성성분 분석결과 salcolin-C와 salcolin-D는 검출 되지 않았으며, 나머지 검출 된 8가지 성분 중 Tricin과 Tricin-glc는 80°C 추출물에서 더 높고, 나머지 6종은 60°C 추출물에서 더 높음.
- NO production 결과, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 투입 시 모두 80°C 추출물의 활성이 가장 좋게 나타남.
- 위의 결과를 취합하면 수율 및 항염증 효능 결과는 80°C 추출물이 가장 좋았고, 활성물질은 미비하게나마 60°C 추출물이 높은 것이 있지만 Tricin은 큰 차이로 80°C에서 높았기에 온도를 80°C로 선정함.
- 최종 추출공정 최적화의 결론은 아래와 같음.

추출 용매	추출 온도	추출 시간
70% EtOH	80℃	6시간

(다) 최적화 방법으로 추출한 고장초 추출물의 항산화 효능 평가

① 효능평가 결과

- ㉠ polyphenol 및 flavonoid가 많이 함유되어 있어 항산화 효능이 우수할 것으로 판단됨.
- ㉡ 항산화 효능(DPPH, ABTS 라디컬 소거능) 결과, 고장초 추출물의 항산화 효능이 우수함을 보임.

Sample	DPPH 라디컬 소거능 (IC ₅₀ , µg/mL)	ABTS 라디컬 소거능 (IC ₅₀ , µg/mL)	Polyphenol contents (µg/mg)	Flavonoid contents (µg/mg)
70E-80-6h	6.74 ± 0.15	78.5 ± 0.87	310.9 ± 9.12	113.8 ± 1.87

㉢ 따라서 활성 산소에 의한 항노화 효능이 우수할 것으로 판단됨.

(라) 최적화 방법으로 추출한 고장초 추출물의 미백 효능 평가

① Melanin 생성 억제 효능 평가

㉠ MTT assay

- 500 µg/mL의 농도 이상에서는 세포독성이 나타남.

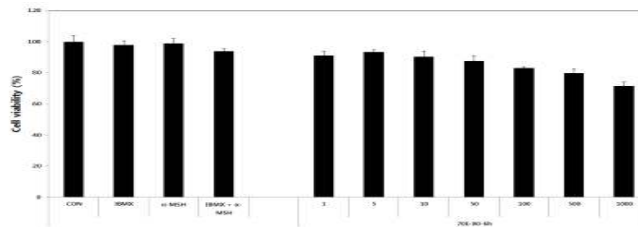


그림 65. 고장초 추출물의 MTT assay

㉡ Cellular Melanin Content (%)

- 고장초 추출물의 처리 농도에 따라 유의적으로 melanin 억제 효능이 나타남.

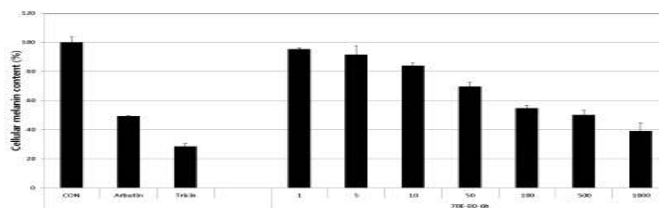


그림 66. 고장초 추출물의 Cellular Melanin Content

㉢ 결론

- B16-F0 melanoma cell 내부에 생성된 melanin의 억제 효능을 측정한 결과, control에 대비하여 두 고장초 추출물의 농도에 비례하여 감소함을 보임.
- 최적화된 조건으로 추출한 고장초 추출물은 500 µg/mL의 농도에서 미백 효능이 적정함을 나타냄.
- 특히, 표준 시료인 arbutin에서의 미백 효능이 50% 이상임을 감안하였을 경우, 고장

초 추출물의 미백 효능이 실제로 사용 가능하다고 판단됨.

- 식약청 인증 미백 기능성 고지 원료는 닥나무 추출물, 알부틴, 에칠아스코빌에텔, 유용성 감초 추출물로 명시되어 있으며, 본 연구에서는 알부틴을 미백 기능성 비교군으로 사용하였음.
- 고장초 추출물의 활성 성분인 tricin의 경우 약 76% 이상의 미백 효능을 보였으므로 고장초 추출물의 미백 효능은 활성 성분에서 비롯됨을 알 수 있음.

② Cellular Tyrosinase 생성 억제 효능 평가

㉠ Tyrosinase activity (%)

- 100 µg/mL 처리군에는 효능이 나타나지 않았으나 500 µg/mL 처리군에서는 확연한 Tyrosinase activity 효능이 나타남.

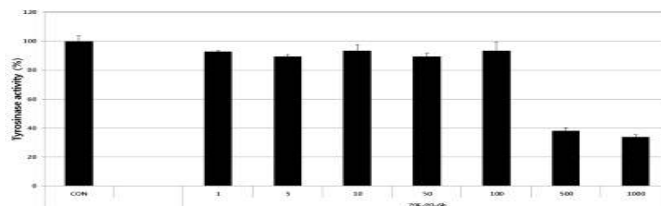


그림 67. 고장초 추출물의 Tyrosinase activity

㉡ 결론

- 세포내 tyrosinase 효소 활성 측정 결과, 500 µg/mL의 농도에서 활성 억제가 감소함을 나타냄으로써 세포내 멜라닌 생성 억제 효능의 농도와 유사한 경향성이 나타남.
- 이는 고장초 추출물의 성분이 B16-F0 melanoma cell 내부의 tyrosinase 효소의 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제함.

③ Mushroom tyrosinase 활성 저해 측정

㉠ Tyrosinase inhibition (%)

- 고장초 추출물의 처리 농도에 따라 유의적으로 Tyrosinase inhibition 효능이 나타남.

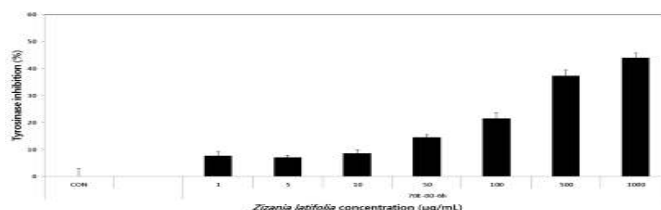


그림 68. 고장초 추출물의 Tyrosinase inhibition

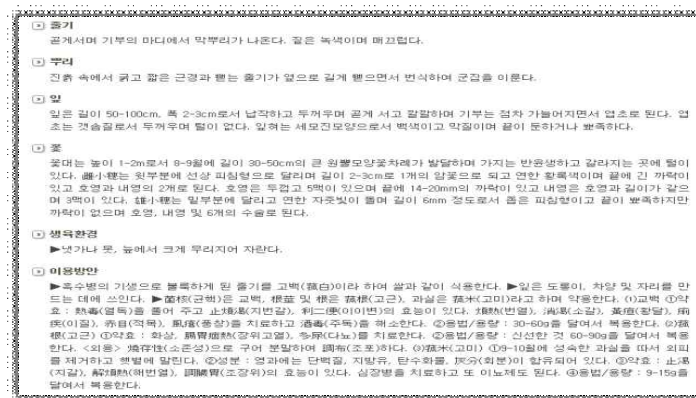
㉡ 결론

- tyrosinase 효소 활성 저해 효능 평가 결과, 고장초 추출물 농도에 비례하여 억제능이 증가함을 확인함.
- 따라서 고장초 추출물은 tyrosinase 효소 활성을 저해함으로써 dopachrome의 생성을 억제, 이는 멜라닌 합성 경로를 방해하여 미백 효능을 보임.

(3) 원재료 표준화

(가) 사용 소재의 분류 및 식물학적 특성 관련자료 검색 및 정리

- ① 소재의 분류 및 식물학적 특성 조사: (국가생물종지식정보시스템(산림청)의 줄 풀(고장초) 자료 인용)
- ㉠ 식물명: 줄(줄풀, 고장초)
- ㉡ 학명: *Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. ex Stapf
- ㉢ 중국명: 茭白
- ㉣ 일본명: マコモ
- ㉤ 국가생물종지식정보시스템(산림청)의 줄(고장초) 자료



(나) 원재료의 수집 조건:

- ① 원산지별 수집
 - ㉠ 시중에 판매되고 있는 고장초의 원산지는 경북이 가장 많았으며 그 외에 경기, 충북, 제주가 있었음.
 - ㉡ 국내에 유통되고 있는 고장초 대부분은 자연산을 채취 및 가공하여 판매 중.
 - ㉢ 본 연구에서는 경북 영천, 경기 화성, 충북 충주, 경북 경산에서 채취한 고장초를 연구 재료로 선정함.
- ② 재배기간 별 수집
 - ㉠ 본 연구에서 수집한 고장초는 경북영천 8월, 경기화성 7월, 충북충주 5~8월, 경북

경산 6~7월에 수확한 제품임.

③ 고장초 구입 현황

㉠ kg 당 가격을 환산한 결과, 가격 경쟁력은 경북 경산에서 수확한 고장초가 가장 우수.

Lot No.	구분	포장단위	가격	원/kg
YC-1508	경북 영천	5kg	73,500	14,700
HS-1507	경기 화성	1kg	17,000	17,000
CJ-15058	충북 충주	1kg	33,000	33,000
KS-15067	경북 경산	1kg	20,000	20,000

(다) 품질확인

① 관능평가(자사 기준)

㉠ 고장초는 공지된 관능평가지침이 없으므로 자사에서 개발하여 사용함.

㉡ 관능평가를 비교해본 결과 참가 인원에 따른 고장초의 평가는 다르지만 개개인이 원산지별 평가한 내용은 큰 차이가 없었음.

② 건조감량(수분): 대한민국약전 일반시험법 건조감량시험법

㉠ 경북 영천산이 5.4%로 가장 낮음.

③ 묽은에탄올엑스 함량: 대한민국약전 일반시험법 엑스 함량 중 묽은에탄올엑스 함량

㉠ 묽은에탄올엑스를 이용한 추출 수율은 충북 충주산이 가장 많고(17.05%), 경북 영천산이 가장 낮음(11.98%).

Lot No.	구분	건조감량(%)	묽은에탄올엑스 수율(%)
YC-1508	경북 영천	5.4	11.98
HS-1507	경기 화성	6.3	13.45
CJ-15058	충북 충주	6.5	17.05
KS-15067	경북 경산	7.1	12.50

④ 지표물질의 함량시험

㉠ 지표물질인 Tricin 함량은 경북 경산에서 가장 높았으며, 충북 충주산에서 가장 낮음.

㉡ Tricin 함량은 충북 충주를 제외한 나머지 3곳이 1.83~1.9로 비슷함.

Lot No.	구분	추출수율(%)	Tricin 함량(mg)	
			추출물 1g	고장초 1g
YC-1508	경북 영천	10.74	1.83	0.19
HS-1507	경기 화성	11.18	1.82	0.20
CJ-15058	충북 충주	12.73	0.88	0.11
KS-15067	경북 경산	10.66	1.90	0.20

⑤ 육안확인 및 보관방법

㉠ 원산지별 고장초 원재료 사진

경북 영천	경기 화성
-------	-------



㉔ 고장초 입고 후 관리방법

- 입고 될 때 포장되어 있던 비닐에 담겨있는 상태로 창고에 보관
- 사용할 양을 적당량 덜어 중간 사이즈 지퍼백에 담아 필요할 때마다 사용



그림 75. 고장초 관리

㉕ 결론

- 건조감량은 원산지에 따라 최대 1.7%정도 차이가 나타났으므로 원재료를 구입하기 전 품질관리를 통하여 적합한 범위의 원재료를 골라 사용할 필요가 있음.
- 묽은에탄올엑스의 고형분 함량은 원재료의 줄기부분이 다량 포함되어있을 경우 함량이 증가되므로 품질관리를 통하여 적합한 범위 설정의 필요성이 있음.
- 지표물질함량은 줄기부분이 많이 포함된 충북 충주산이 0.88 mg/g으로 가장 낮았으며 경북 경산이 1.90 mg/g으로 가장 높았음 (추출물 g대비)

(라) 원재료의 규격 및 시험법 설정

항목	기준	시험법
성상(관능평가)	적합	BTC 고장초 원재료 관능평가
건조감량	8.5% 이하	대한민국약전외한약(생약)규격집
묽은에탄올엑스 함량	9.5% 이상	대한민국약전외한약(생약)규격집
Tricin 함량	1.4 mg/g 이상 2/2 mg/g 이하	검체: 원재료50g + 70%에탄올(30배수, w/w) →80℃, 6시간 HPLC: BTC 별규 기준 설정 계산: 범위설정(80%~120%) 최소량: (1.6999+1.9199)/2×0.8=1.44 최대량: (1.6999+1.9199)/2×1.2=2.18

(마) 고장초 원산지 선정

① 산지별 추출물 수율 비교

- 충북 충주 산지를 제외한 다른 산지들은 3Lot 추출에 대한 재현성을 확보함.

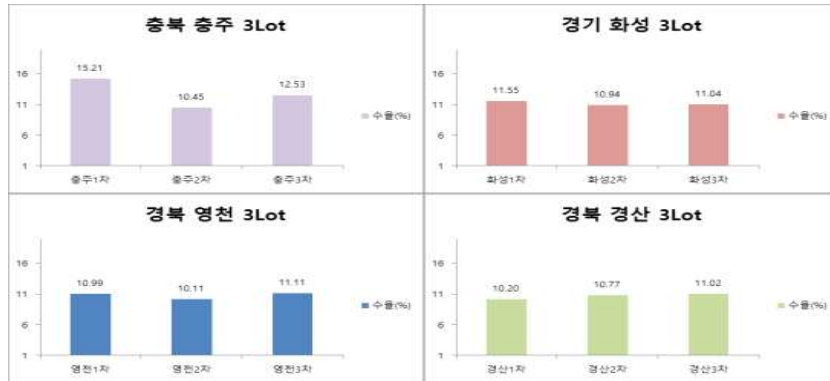


그림 76. 산지별 고장초 추출 수율

② 3Lot 평균 수율 비교

- 충북 충주군을 제외한 다른 군의 추출 수율은 10~11%로 유사하였음.

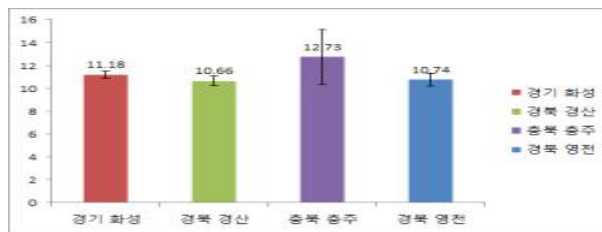


그림 77. 산지별 고장초 3 Lot 평균 수율

㉞ 결론

- 상기 실험에서 충북 충주산은 줄기부분을 많이 함유하면 수율이 더 많이 나올 수 있다는 것을 간접적으로 보여주며 원재료 칭량 시 줄기의 양에 따라 3Lot추출물의 수율 편차에 영향을 끼친 것으로 사료됨.
- 충북 충주를 제외한 나머지 3곳의 추출 수율의 재현성은 뛰어남.
- 평균 추출물의 수율을 비교하면 재현성이 좋지 못한 충북 충주산을 제외한 경기 화성, 경북 경산, 경북 영천산 중에 경기 화성산의 수율이 가장 높게 나타나지만 3곳 모두 수율이 ± 0.5 % 차이로 그 차이가 크지 않음.

③ 산지별 추출물 지표성분 함량 비교

㉞ Tricin 정량 분석 결과 (해당 결과는 Tricin을 직접 분리하여 얻은 표준품으로 분석을 진행하였으며 표준품의 순도가 높지 않아 경향성 파악에만 활용함)

	area	mg/mg	Total (mg/50g)	meam±SD
영천1	138,921	3.66	20,130	23,797±3188
영천2	186,225	5.02	25,351	
영천3	173,489	4.66	25,910	
충주1	52,262	1.18	8,980	14,174±4525
충주2	117,394	3.05	15,952	
충주3	109,122	2.81	17,591	

경산1	189,561	5.12	26,112	27,844±6401
경산2	156,990	4.18	22,488	
경산3	232,284	6.34	34,933	
화성1	183,837	4.95	28,611	26,443±1878
화성2	172,962	4.64	25,381	
화성3	171,184	4.59	25,337	

④ 산지별 추출물 melanin 생성 억제 효능

- 각 원산지의 Lot 별 melanin 생성 억제 효능을 확인하였으며 경북 경산, 영천의 고장초 추출물이 다른 산지에 비해 효능이 높음을 확인함.

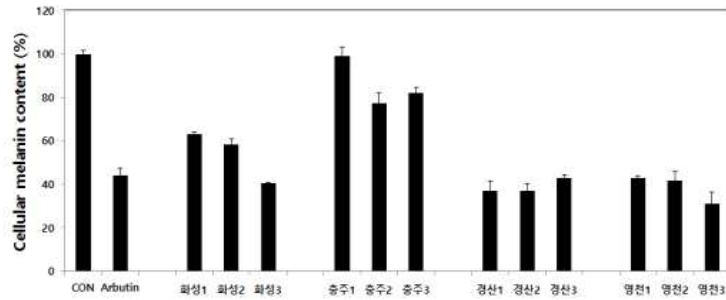


그림 78. 산지별 고장초 추출물 melanin 생성 억제 효능

㉞ 결론

- 충주산을 제외한 나머지 3곳의 수율은 10~11%정도로 비슷하였으며 재현성 또한 표준편차 0.5이하로 훌륭함.
- 고장초의 지표 물질로 선정된 triclin 함량분석을 통하여 추출수율 대비 기능성 물질의 함량을 확인하기 위하여 triclin에 대한 함량분석을 진행하였음. 그 결과 경산이 원산지인 고장초에서 가장 높게 확인되었음.
- 미백 효능 분석 결과, 고장초 원물은 경산 혹은 영천산을 사용하는 것이 바람직하다고 판단되며, 고장초 추출물의 미백 효능은 고장초의 활성 성분에 의한 세포 내 tyrosinase를 억제함으로써 melanin 생성을 저해시키는 효과로 미백에 효능이 있음을 알 수 있음.
- 위 내용을 취합한 결과 경산, 영천산이 가장 좋았으며 상업적 면에서 둘의 가격을 확인해 봤을 때 경산은 1 kg 당 20,000원 영천은 1 kg 당 14,700원으로 영천이 더 저렴하여 최종적으로 경북 영천산을 선정하였음.

(4) 시험법 밸리데이션

(가) 시스템적합성

구분	Tricin	
	Retention Time	Peak Area
1	18.371	140.6540
2	18.399	141.4031
3	18.418	142.9943
4	18.436	143.3853
5	18.478	141.3528
6	18.503	143.4448

평균	142.21	18.434
표준편차	1.21	0.0493
RSD(%)	0.85	0.2674

(나) 특이성

	Retention Time	Peak Area
Tricin (표준용액)	18.523	140.9702
Zizania (시험용액)	18.533	92.1333

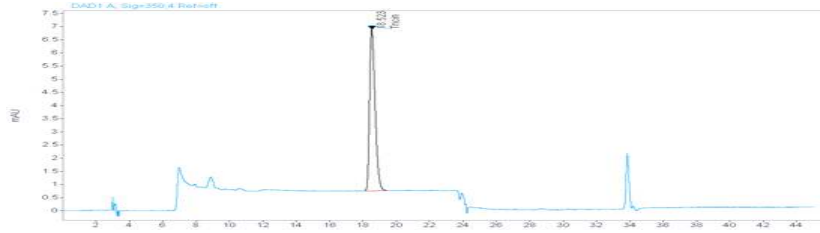


그림 79. 표준용액의 HPLC 크로마토그램

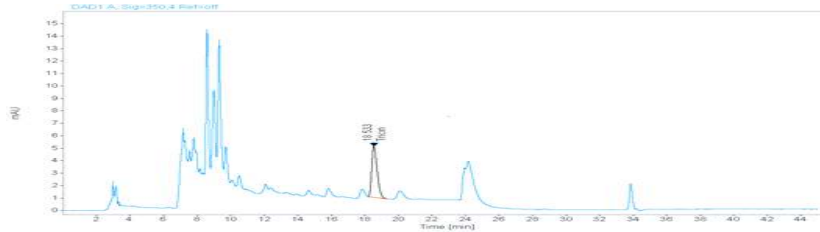


그림 80. 시험용액의 HPLC 크로마토그램

(다) 정확도

	검체량 (이론농도 mg/g)		
	70 mg (2.8481 mg/g)	100 mg (2.3802 mg/g)	130 mg (2.0772 mg/g)
1	2.8058 (98.51%)	2.3410 (98.35%)	2.0928 (100.75%)
2	2.8425 (99.80%)	2.3385 (98.24%)	2.1046 (101.32%)
3	2.8470 (99.96%)	2.3237 (97.62%)	2.1084 (101.50%)
합량별 평균회수율(%)	99.42	98.07	101.19
전체 평균회수율(%)	99.56		
회수율 구간(%)	97.62 ~ 101.75		

(라) 정밀도

① 반복성

	검체량		
	70 mg	100 mg	130 mg
1	1.2539	1.2634	1.2449
2	1.2323	1.2586	1.2443
3	1.2444	1.2561	1.2542
4	1.2516	1.2582	1.2540
5	1.2577	1.2595	1.2305
분석값(mg/g)	1.2480	1.2592	1.2456
RSD(%) [검체 측정값]	0.8029	0.2128	0.7756
평균 RSD(%)	0.5971		

② 재현성

	실험자	
	A	B
1	1.2560	1.2380
2	1.2566	1.2487
3	1.2458	1.2506
4	1.2410	1.2341
5	1.2555	1.2333
분석값(mg/g)	1.2528	1.2458
RSD(%) [검체 측정값]	0.4840	0.5437
평균 RSD (%)	0.5139	

(마) 정량한계

1		2		3	
함량 (µg/ml)	피크 면적 (Area)	함량 (µg/ml)	피크 면적 (Area)	함량 (µg/ml)	피크 면적 (Area)
0.7733	27.8179	0.7733	28.1869	0.7733	27.6445
2.3199	84.2415	2.3199	85.0842	2.3199	83.5389
3.8665	142.2074	3.8665	140.3768	3.8665	139.6118
7.7330	284.9381	7.7330	284.4792	7.7330	285.4040
15.466	570.5757	15.466	568.5251	15.466	566.4622
기울기	36.9581	기울기	36.8042	기울기	36.7488
y절편	- 0.9652	y절편	- 0.6630	y절편	- 1.1271
기울기 평균(s)	36.8370		y절편의 표준편차(σ)	0.2356	
정량한계 (10×σ/S)	0.0639		검출한계 (3.3×σ/S)	0.0211	

(바) 직선성

① 검량선 data

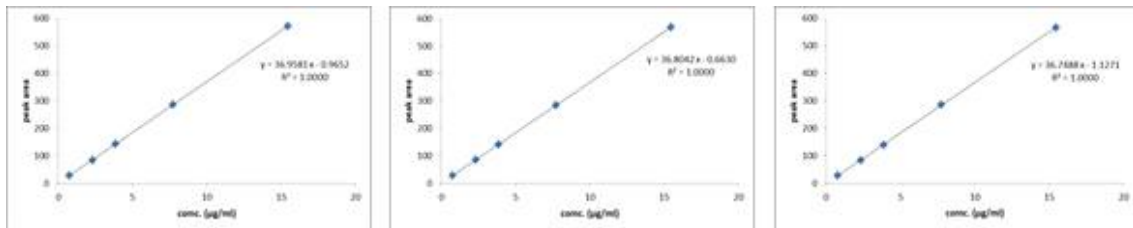


그림 81. Tricin calibration curve

Tricin 1차 검량선	이론농도 (µg/ml)	보정농도 (µg/ml)	Tricin Peak area		
			1차	2차	3차
1	1	0.7733	27.8179	28.1869	27.6445
2	3	2.3199	84.2415	85.0842	83.5389
3	5	3.8665	142.2074	140.3768	139.6118
4	10	7.733	284.9381	284.4792	285.404
5	20	15.466	570.5757	568.5251	566.4622
Slope			36.9581	36.804	36.7488
Intercept			- 0.9652	- 0.6630	- 1.1271
Correlation coefficient			1.0000	1.0000	1.0000

② 1 ~ 3차 검량선 데이터 평균

Tricin	평균
기울기	36.8370
y 절편	-0.9185
결정계수(r^2)	1.0000

(사) 결과 요약

평가항목		허용기준	결과	판정
시스템 적합성	RT	RSD 1.0%이하	0.85%	적합
	면적비	RSD 5.0%이하	0.27%	적합
특이성		주피크에 간섭 없음, Unknown peak가 관찰 안됨.	-	적합
직선성		결정계수(r^2):0.998이상	1.0000	적합
정밀성	반복성	RSD 평균 5.0%이하	0.60%	적합
	재현성	RSD 평균 5.0%이하	0.51%	적합
정확성		평균회수율 100±10.0% 이내	99.56%	적합
검출한계		계산식 $DL = 3.3 \times \sigma / S$	0.0211	-
정량한계		계산식 $QL = 10 \times \sigma / S$	0.0639	-

(5) 분말화 공정 개발

(가) 동결건조

- ① 동결건조 시 아래와 같이 입자가 고르지 못하지만 추후에 원료 분쇄기를 활용하면 원하는 입자 사이즈로 조정이 가능함.



그림 82. 동결건조 된 고장초 추출분말

(나) 분무건조

- ① 유량변화에 따른 분말 상태 관찰



그림 83. 유량변화에 따른 고장초 추출분말의 건조형태

㉞ 결론

- 적정 유량은 60 RPM이 최적이라고 판단됨.

- ② 에어 유속에 따른 분말 상태 관찰



그림 84. 에어유속 변화에 따른 고장초 추출분말의 건조형태

㉑ 결론

- 분말의 입자가 너무 고우면 밀도가 낮아 추후 포장에 불리한 점이 발생할 것으로 사료되어 0.4 Mpa의 에어속도를 최적의 조건으로 선정함.

㉒ 부형제 첨가에 따른 분말 상태 관찰



그림 85. 부형제 첨가에 따른 고장초 추출분말의 건조 형태

㉑ 결론

- 8번과 9번 모두 분말화가 무난한 상태이며 위 sample 및 부형제를 투입하지 않은 군과 흡습정도를 실험 진행.

㉒ 부형제 첨가에 따른 흡습 정도 관찰



그림 86. 부형제 첨가에 따른 흡습

㉑ 결론

- 흡습 정도는 20 분 경과 시 1 번 sample 함습도: 15.6% , 8 번 sample 함습도: 10.2% , 9 번 sample 함습도: 6.4% 로 덱스트린 첨가량에 비례하여 흡습정도가 감소함.
- 모든 sample이 60 분경과시 함습도가 20%가 넘고 확연한 차이를 보임.
- 밀봉이 잘 된 상태에서는 2 주 후에도 함습도 차이가 약 2% 정도만 있으며 분말의 흐름성도 변화가 없었음.

(다) 건조방법 및 부형제 첨가에 따른 항염증 효능 시험

① MTT measurement result table

- 모든 처리군에서 세포독성은 없는 것으로 확인함.

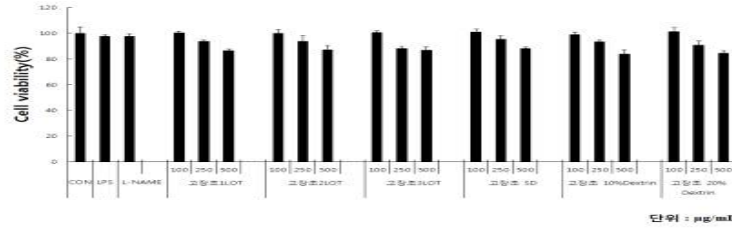


그림 87. 부형제 및 건조방법에 따른 샘플 Cell viability

② NO measurement result table

- 분무(SD)건조는 동결건조보다 NO 억제의 효능이 떨어지는 것을 확인함.

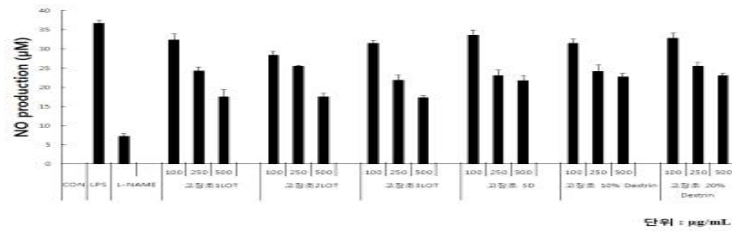


그림 88. 부형제 및 건조방법에 따른 샘플 NO assay

㉠ 결론

- 항염증 효능 결과,

: SD건조물은 동결 건조물보다 항염증 효능이 감소함. 이는 고장초 추출물 내부의 활성물질(tricin & tricin derivative)의 열에 의한 분해가 원인일 것으로 추정됨.

: 텍스트린 첨가물은 텍스트린 첨가량에 따라 항염증 효능이 감소함. 이는 텍스트린 첨가량에 따라 동일 투입 대비활성성분의 총량이 감소하여 생긴 결과로 사료됨.

(6) 효소처리 추출조건 확립

(가) 적정효소 선정 시험

① 다양한 효소반응에 대한 추출 수율

- 효소처리를 하지 않은 군보다는 단일효소 처리군이, 단일효소를 처리하는 것보다는 복합효소의 처리하는 것이 추출물 수율 증대에 도움이 됨.

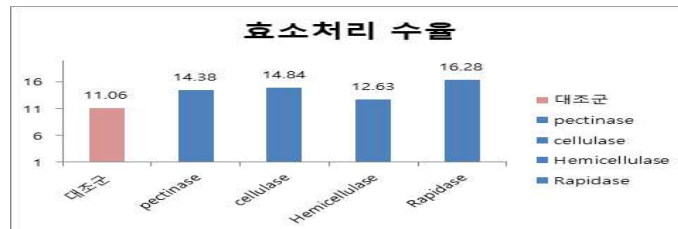


그림 89. 고장초 추출물 효소처리 수율

㉠ 결론

- 추출물의 고형분 수율은 고장초주정추출물(대조군)에 비하여 효소처리군이 대체로

증가함.

- 그 중에서도 Rapidase C80 max의 복합효소를 활용하였을 때 다른 군에 비하여 수율의 증대가 높은 것을 확인하였음.

② 다양한 방법의 고장초 효소처리 추출분말의 Melanin 생성 저해 효능

- 기존 주정 추출물보다 효소처리군의 Melanin 생성 저해효능이 낮아지는 것을 확인되었지만 pectinase 처리군을 제외한 다른 효소처리군들은 그 변화가 미비함.

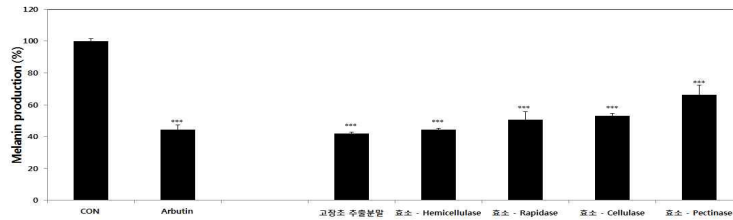


그림 90. 고장초 효소처리 추출분말 Melanin 생성 저해

㉠ 결론

- 고장초 효소처리별 B16-F0의 melanin의 생성 억제를 측정한 결과, pectinase군을 제외한 모든 효소처리군에서 약 50% 이상의 멜라닌 생성 억제가 확인됨.
- 고장초주정추출물(대조군)의 활성이 가장 좋은 결과로 도출되었으나 Pectinase 효소를 제외한 각 효소간의 효능차이가 약 2 ~ 7% point 차이로 미미하기 때문에 상업적인 용도를 고려하여 수율이 가장 높았던 Rapidase C80 max 효소를 최종적으로 확정.

(나) Rapidase C80 max 효소의 단종으로 유사효소인 Plantase TL 효소반응 시험

① 효소반응 시간에 따른 수율 변화

- 효소처리 시간에 따른 수율증가는 8시간 이후로는 증가폭이 크지 않으며 오히려 24시간 처리군에서는 수율이 감소함을 확인함.

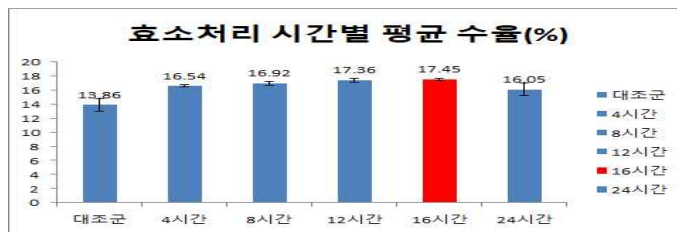


그림 91. Plantase TL 처리 시간별 수율

② 효소반응 시간에 따른 Tricin 함량 변화

㉠ 추출물 g에 대한 Tricin 함량

- 효소처리 시간에 따른 Tricin의 함량은 유의적으로 증가함.

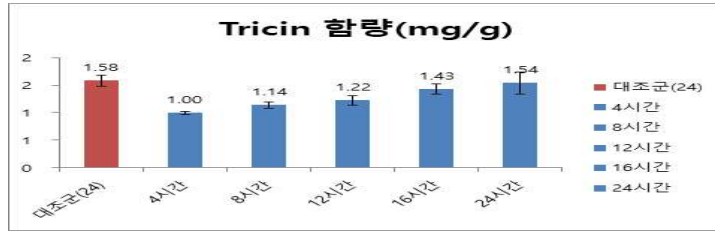


그림 92. Plantase TL 처리 시간에 따른 Tricin 함량

㉔ 추출물 수율에 대한 Tricin 총량

- 효소처리 시간에 따른 Tricin의 총량은 유의적으로 증가하다가 24시간 처리군에서 오히려 감소함.

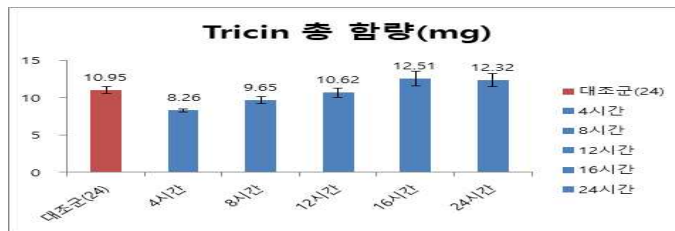


그림 93. Plantase TL 처리에 따른 Tricin 총 함량

㉕ 결론

- 고장초주정추출물(대조군)에 비하여 Plantase TL 효소처리 추출물이 시간이 지남에 따라 점진적으로 수율이 증가됨. 16시간 효소처리 추출물의 수율이 3.59% point 더 높은 것을 확인.
- 대조군의 수율이 12시간 이전 샘플보다 2% point가량 증가된 이유는 단순 에탄올 추출물이 아닌 24시간 효소처리 과정과 동일 시 되는 추출방법에서 효소 투입구간만 제외한 것이므로 방치한 시간에 따른 수율증가도 있을 수 있음. 하지만 동시간대인 24시간 군으로 효소처리 유무만 봤을 때 수율의 증가는 확실히 있는 것을 알 수 있음.
- 효소처리 시간에 따라 수율이 증가되지만 특이적으로 24시간 효소처리 시 수율이 오히려 유지 또는 감소하는 경향이 확인되므로 최대 효소처리 시간은 24시간 미만으로 최적화를 해야 함.
- Tricin 함량 분석 결과 대조군에 비하여 g당 함량은 9.49% 감소하였지만 추출물 수율 대비 총 Tricin 함량은 12.47% 증가된 것을 확인. 이 결과로 효소처리에 의해 증가된 수율이 불필요한 성분만을 증가시킨 것이 아닌 유효성분 중 하나인 Tricin도 증가 시켰다는 것을 확인할 수 있음.

㉖ 고장초 효소처리 추출분말의 항염증 효능

- 효소처리 시간이 증가함에 따라 항염증 효능도 유의적으로 증가하는 경향이지만 16시간 이후로는 변화가 미비함.

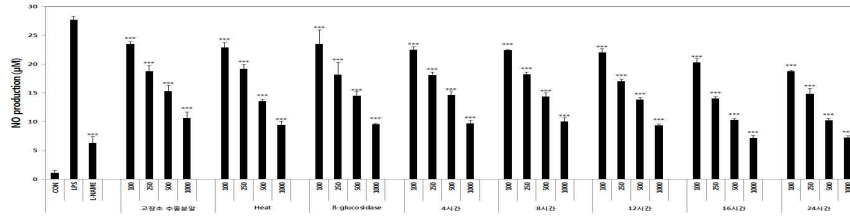


그림 94. 고장초 효소처리 추출분말 NO 생성 저해

④ 고장초 효소처리 추출분말의 Melanin 생성 저해 효능

- Melanin 생성 저해 효능은 16시간 효소처리 군에서 특히 높게 나타남.

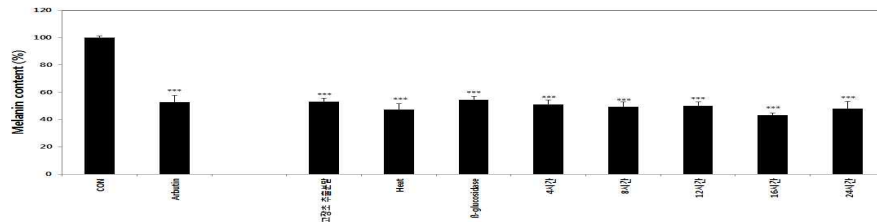


그림 95. 고장초 효소처리 추출분말 Melanin 생성 저해

㉠ 결론

- 고장초 효소처리군(plantase)의 시간별 NO 생성 억제 측정 결과, 16시간 처리시 가장 좋은 항염증 억제 효능을 나타냄(IC₅₀: 466.62 µg/ml)
- 고장초 효소처리군(plantase)의 시간별 멜라닌 생성 억제 측정 결과, 16시간 처리시 가장 좋은 미백 효능을 나타냄(250 µg/ml 농도에서 43.27%의 멜라닌 생성)
- 고장초 고형분 수율, 고형분 수율대비 Tricin 총량, 항염증 효능, 미백 효능의 모든 결과가 Plantase TL 16시간 효소반응에서 최대로 발현됨.
- 위 결과를 토대로 최종 추출방법은 아래와 같이 선정.

	원물 size	1차 추출	효소투입량 (g)	효소처리온도 (°C)	효소처리시간 (hr)	2차 추출
Plantase 16hr	2mm	정제수 원물대비 15배수 (w/w), 80°C, 1hr	기질대비 0.6%(w/w)	35	16	70%EtOH 원물대비 15배수 (w/w), 80°C, 4hr

(7) 효소반응 추출공정 최적화

(가) 3반복 효소반응 공정 재현성 확인 실험

① 3반복 효소반응 수율

- 고장초 효소처리 추출물을 3Lot 생산하여 수율의 재현성을 확인함.

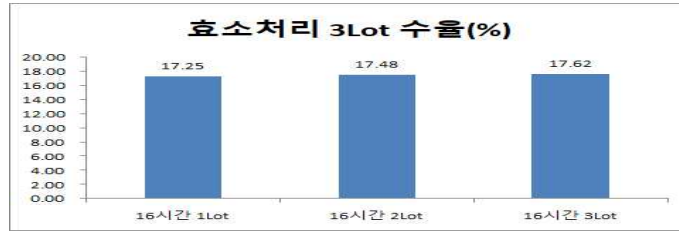


그림 96. 3Lot 생산 수율 비교

② 3반복 효소반응 Tricin 함량

- 고장초 효소처리 추출물을 3Lot 생산하여 Tricin 함량의 재현성을 확인함.

㉠ 추출물 g에 대한 Tricin 함량

㉡ 추출물 수율에 대한 Tricin 총량

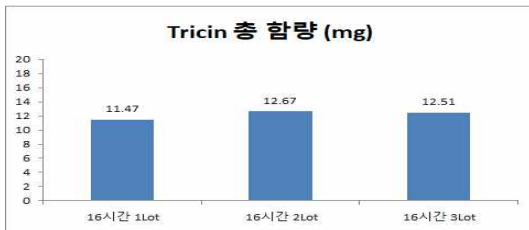


그림 97. 3Lot 생산 Tricin 총 함량 비교

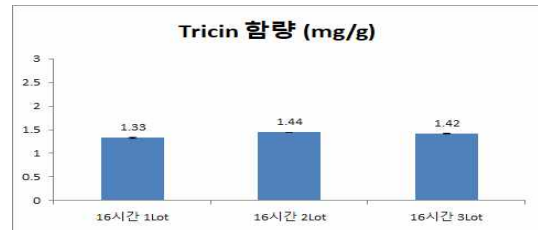


그림 98. 3Lot 생산 Tricin 함량 비교

㉢ 결론

- 3Lot 추출물 수율의 평균은 17.45%였으며 RSD(%)값은 1.05%로 재현성 확보.
- 3Lot 함량의 평균은 1.3962 mg/g, RSD(%)값은 4.463%로 자사 기준에 적합.
- 3Lot 추출 및 3반복 분석을 통하여 최종 효소처리 추출 조건 최적화 함.

(8) 대량생산 공정개발(Scale Up)

(가) Scale Up에 따른 변화 확인

① 고장초 50 g 과 1 kg 효소반응에 따른 수율 변화

- 고장초 효소처리 추출공정의 Scale Up에 따른 수율의 재현성을 확인함.

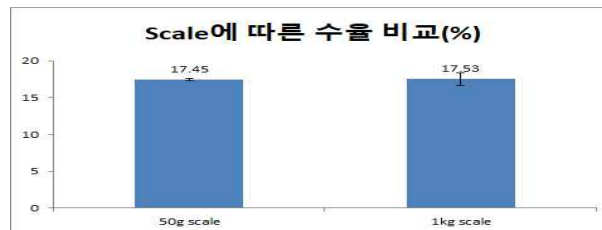


그림 99. 추출 Scale에 따른 수율 변화

② 고장초 50 g 과 1 kg 효소반응에 따른 Tricin 함량 변화

- 고장초 효소처리 추출공정의 Scale Up에 따른 Tricin 함량의 재현성을 확인함.

㉠ 1 kg 추출물 Dextrin 환산 함량

㉡ 50 g 과 1 kg 추출물 Tricin 함량 비교

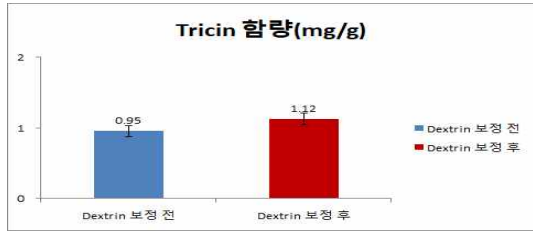


그림 100. Dextrin 환산 전 후의 Tricin 함량 변화

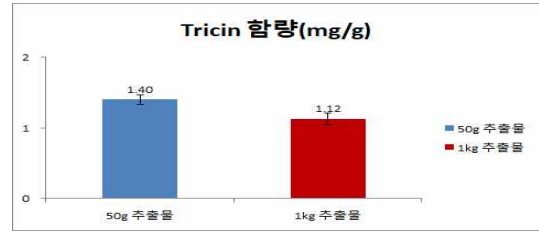


그림 101. 추출 Scale에 따른 Tricin 함량 변화

㉔ 결론

- 고장초 추출물의 함량은 Scale up과정에서 0.45% Scale up한 추출물이 더 높았지만 큰 차이는 없었음.
- Tricin의 함량차이는 Scale up 샘플이 20% 함량이 감소한 것을 확인함. 해당 원인으로서는 효소처리 과정에서 교반을 진행하지 않았기 때문인 것으로 사료됨.
- 교반을 적용한 효소반응 공정으로 재확인.

(나) 3반복 효소반응 공정(효소반응 시 교반 적용) 재현성 확인 실험

① 고장초 50 g 과 1 kg 및 1 kg 교반 샘플의 수율 비교

- 고장초 효소처리 추출공정(교반 적용)의 Scale Up에 따른 수율의 재현성을 확인.

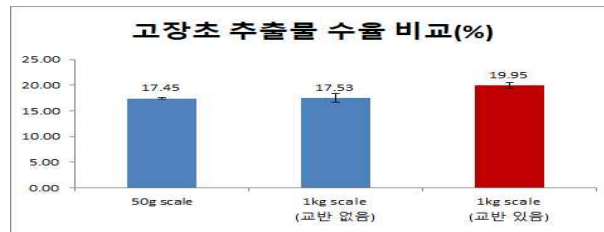


그림 102. 교반 유무에 따른 수율 변화

② 고장초 50 g 과 1 kg 및 1 kg 교반 샘플의 Tricin 함량 변화

- 고장초 효소처리 추출공정(교반 적용)의 Scale Up에 따른 Tricin 함량의 재현성을 확인함.

㉕ Tricin의 함량 비교

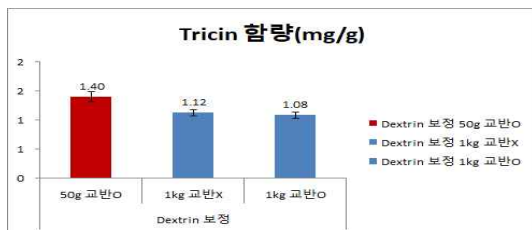


그림 103. 교반 유무에 따른 Tricin 함량 변화

㉖ Tricin의 총량 비교

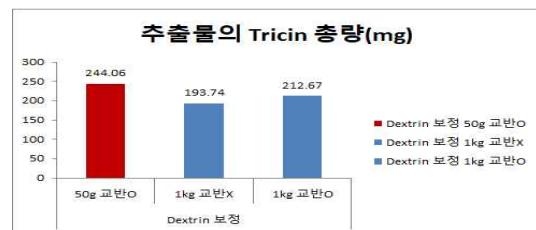


그림 104. 교반 유무에 따른 Tricin 총량 변화

㉔ 결론

- 효소처리 진행 시 교반의 유무에 따라 최종 고형분이 12.13% 차이가 나며 교반을 진

행했을 때 더 증가 되는 것을 확인함.

- 효소처리 진행 시 교반을 진행한 경우 진행하지 않은 샘플보다 g당 Tricin의 함량이 3.57% 낮아졌지만 수율에 따른 Tricin의 총량은 8.9%가 증가 되는 것을 확인함.
- scale up이 되면서 Tricin의 함량이 낮아지는 경향이 있는 것으로 확인 되었으며 해당 추출물의 활성물질 변화와 in vitro 실험 결과에 따라 최종 생산방법을 확립.

(다) 3반복 효소반응 공정(효소반응 시 교반 적용) 추출물의 10종 활성물질 함량 비교

① 검정곡선

Samples	Regression equation	Linear range (mg/mL)	Correlation coefficient (R ²)
tricin-7-glycoside	$y = 1,043,132.4810x + 403,297.1560$	0.5-10	0.9998
tricin-4'-threo-7-glycoside	$y = 672,823.1834x + 1,013,944.0604$	0.5-50	0.9967
tricin-4'-erythro-7-glycoside	$y = 747,253.9864x + 1,303,853.9810$	0.5-50	0.9953
tricin-4'-erythro-7''-glycoside	$y = 709,493.8073x + 436,106.9626$	0.5-50	0.9992
tricin-4'-threo-7''-glycoside	$y = 311,992.5730x + 56,398.9787$	0.5-50	0.9993
tricin	$y = 2,021,745.4431x + 444,702.4679$	0.5-10	0.9999
salcolin A	$y = 2,145,979.3615x + 74,192.4475$	0.5-10	1.0000
salcolin B	$y = 4,712,708.7534x - 6,467.9658$	0.5-5	0.9999
salcolin C	-	-	-
salcolin D	-	-	-

② 각 추출물별 물질 함량

화합물	함량 (µg/mg)		
	70%, 80도, 6h.	90%, RT, 6h.	enzyme (plantase)
tricin-7-glycoside	0.40	0.21	N.D.
tricin-4'-threo-7-glycoside	1.30	0.58	N.D.
tricin-4'-erythro-7-glycoside	1.10	0.30	N.D.
tricin-4'-erythro-7''-glycoside	1.30	0.16	0.63
tricin-4'-threo-7''-glycoside	3.84	0.96	2.22
tricin	1.62	0.22	0.91
salcolin A	0.66	0.24	1.14
salcolin B	0.32	0.10	0.50
salcolin C	N.D.	N.D.	N.D.
salcolin D	N.D.	N.D.	N.D.

㉠ 결론

- LC-MS 분석 결과 Tricin, tricin-7-glycoside, tricin-4'-threo-7-glycoside, tricin-4'-erythro-7-glycoside, tricin-4'-erythro-7''-glycoside, tricin-4'-threo-7''-glycoside의 함량은 감소하며 salcolin A, salcolin B의 함량은 증가 되는 것을 확인함.

(라) 3반복 효소반응 공정(효소반응 시 교반 적용) 추출물의 항염증 효능 평가

- 3반복 효소반응 생산 공정에 따른 추출물의 항염증 효능 재현성 확인.

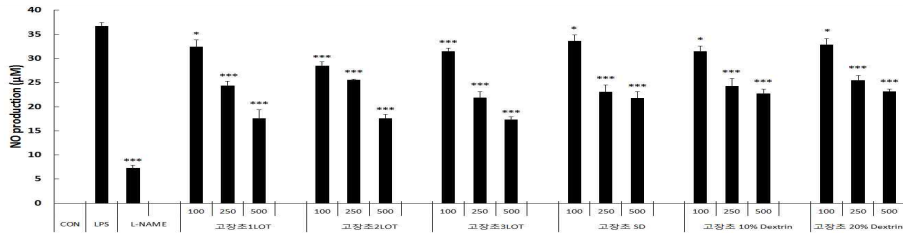


그림 105. 3Lot 추출물 및 부형제 첨가물의 NO production 억제능 비교

(마) 효소반응 공정(효소반응 시 교반 적용) 추출물의 주름개선 효능 평가

① Human dermal fibroblast (HDF)에 대한 세포생존율 결과

- 고장초효소처리추출분말 처리농도에 대한 세포독성은 없는 것으로 확인.

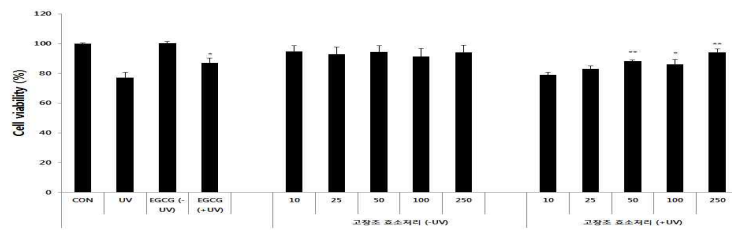


그림 106. Human dermal fibroblast cell viability

② 콜라겐 생성능 결과

- 고장초효소처리추출분말 처리농도에 따라 유의적으로 콜라겐 생성능이 증가함.

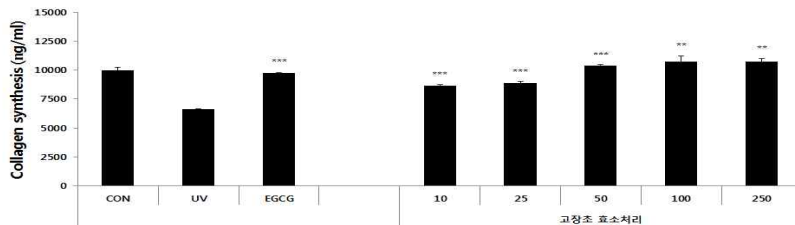


그림 107. 고장초효소처리추출분말의 Collagen synthesis 효능

③ 콜라겐 분해효소(MMP-1,2,3,9,13) 억제 결과

㉠ MMP-1 분해효소 억제 효과

- 고장초효소처리추출분말 농도에 따라 유의적으로 MMP-1 분해효소 억제 효능이 증가함.

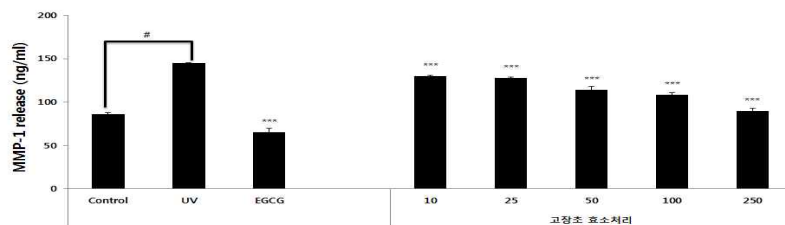


그림 108. 고장초효소처리추출분말의 MMP-1 release 억제능

㉡ MMP-2 분해효소 억제 효과

- 고장초효소처리추출분말 저농도 처리구간에서부터 MMP-2 분해효소 억제 효능 나

타났으며 농도 변화에 따라서는 효능의 증감이 뚜렷하지 않음.

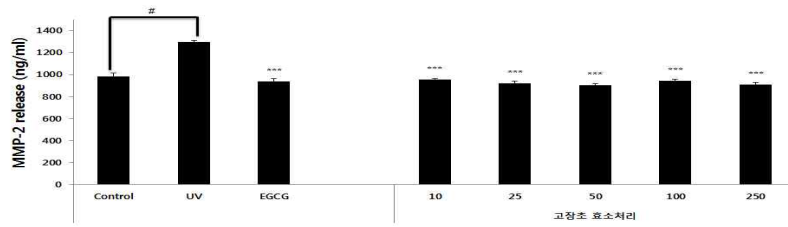


그림 109. 고장초효소처리추출분말의 MMP-2 release 억제능

㉔ MMP-3 분해효소 억제 효과

- 고장초효소처리추출분말 저농도 처리구간에서부터 MMP-3 분해효소 억제 효능 나타났으며 농도 변화에 따라서는 효능의 증감이 뚜렷하지 않음.

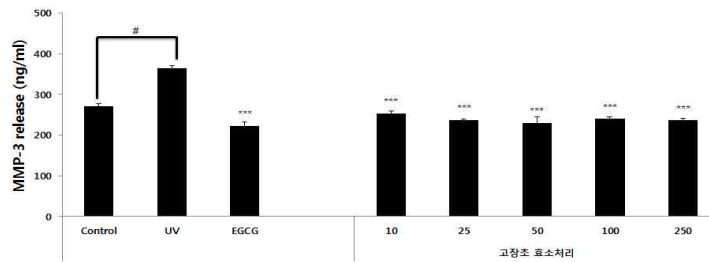


그림 110. 고장초효소처리추출분말의 MMP-3 release 억제능

㉕ MMP-9 분해효소 억제 효과

- 고장초효소처리추출분말 처리농도에 따라 유의적으로 MMP-9 분해효소 억제 효능이 증가하였으며 50 µg/mL의 농도 이후부터는 증감이 뚜렷하지 않음.

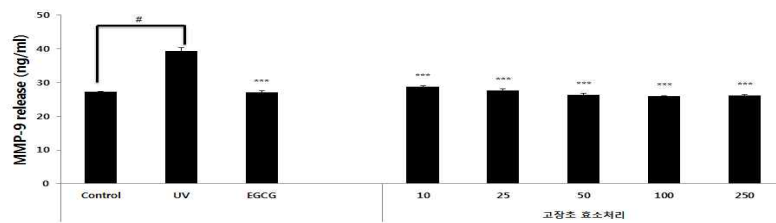


그림 111. 고장초효소처리추출분말의 MMP-9 release 억제능

㉖ MMP-13 분해효소 억제 효과

- 고장초효소처리추출분말 저농도 처리구간에서부터 MMP-13 분해효소 억제 효능 나타났으며 농도 변화에 따라서는 효능의 증감이 뚜렷하지 않음.

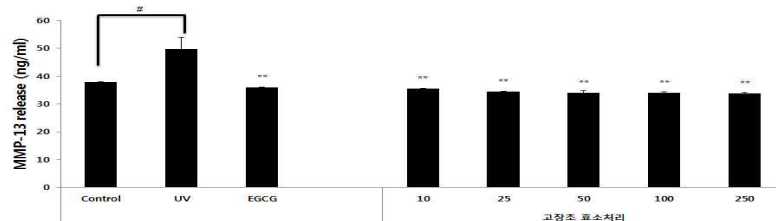


그림 112. 고장초효소처리추출분말의 MMP-13 release 억제능

(바) 3반복 효소반응 공정(효소반응 시 교반 적용) 추출물의 민감성 피부개선 효능 평가

① RBL-2H3 cell에 대한 세포생존율 측정

- 처리 농도에 따른 세포독성은 없는 것으로 확인.

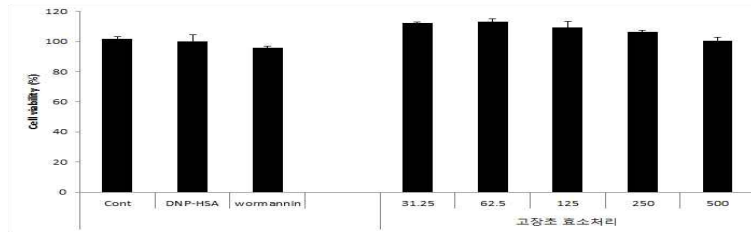


그림 113. RBL-2H3 cell viability

② β -hexosaminidase release 억제 측정 결과

- 고장초효소처리추출분말 처리농도에 따라 유의적으로 β -hexosaminidase release 억제 효능이 증가함.

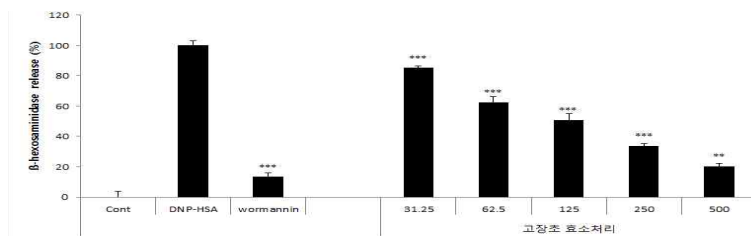


그림 114. 고장초효소처리추출분말의 β -hexosaminidase release 억제능

③ IL-4 발현 측정 결과

- 고장초효소처리추출분말 처리농도에 따라 유의적으로 IL-4 발현 억제 효능이 증가하였으나 250 μ g/mL의 농도 이후부터는 증감이 뚜렷하지 않음.

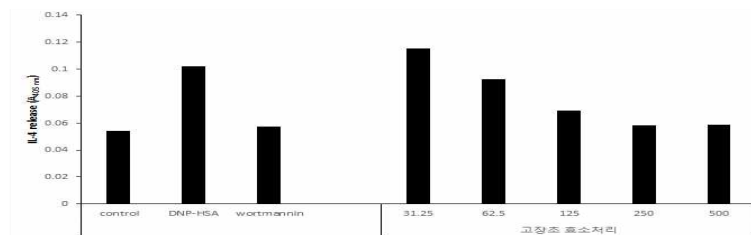


그림 115. 고장초효소처리추출분말의 IL-4 release 억제능

④ TNF- α 발현 측정 결과

- 고장초효소처리추출분말 처리농도에 따라 유의적으로 TNF- α 발현 억제 효능이 증가하였으나 125 μ g/mL의 농도 이후부터는 증감이 뚜렷하지 않음.

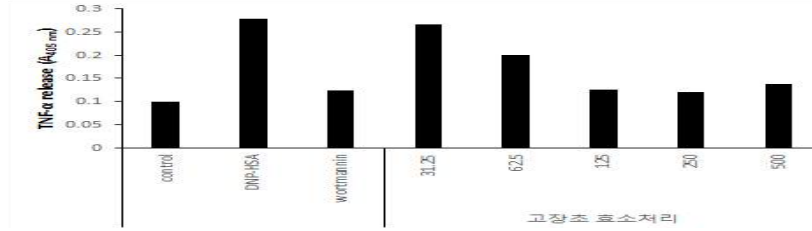


그림 116. 고장초효소처리추출분말의 TNF-α release 억제능

(사) 3반복 효소반응 공정(효소반응 시 교반 적용) 추출물의 보습 효능 평가

① 세포생존율 측정 결과

- 고장초 효소처리균을 10, 50, 100, 250 µg/mL의 농도로 HaCaT keratinocyte에 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았음.

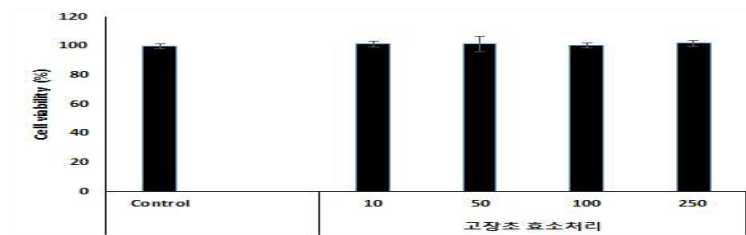


그림 117. HaCaT cell viability

② hyaluronic acid 측정 결과

- 고장초 효소처리균의 히알루론산 생성능을 측정한 결과, 농도 의존적으로 히알루론산 생성이 증가됨.

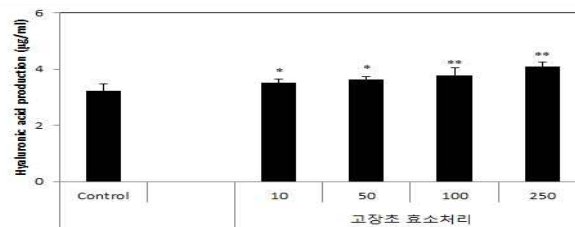


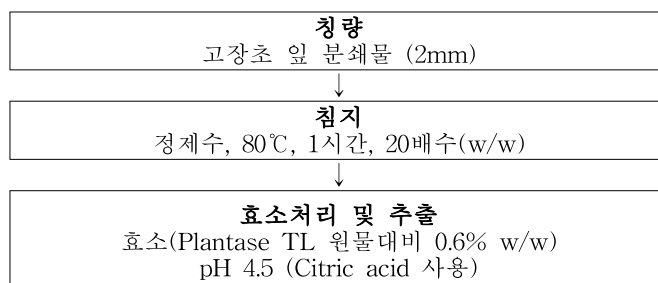
그림 118. 고장초효소처리추출분말의 hyaluronic acid 생성능

(아) 결론

- ① 교반을 통한 효소처리 진행 시 수율이 12.13% 더 증가
- ② 교반을 통한 효소처리 진행 시 Tricin의 g당 함량은 감소, 수율 대비 총량은 증가
- ③ LC-MS 분석 결과 효소처리 진행 시 에탄올 추출물보다 salcolin A, salcolin B의 함량은 증가 다른 종류의 Tricin 배당체 및 유도체는 감소
- ④ 대량생산 공정으로 추출한 고장초 1, 2, 3 LOT에서의 효능 차이는 없었으며, 안정적인 분말화를 유도하기 위한 dextrin 사용에도 효능에 큰 차이가 없음을 확인.
- ⑤ 고장초 효소반응 대량생산 공정의 재현성을 확보.
- ⑥ Control군과 UVB조사군 간 사멸율은 22.92%로 측정되었으며, positive control인 EGCG에 서는 독성이 없음. 그리고 UVB 조사 후 EGCG를 처리하였을때 UVB조사군

보다 세포사멸율이 10.02% 회복됨. 고장초 효소처리군에 대한 세포 독성은 없었으며 (10 ~ 250 µg/ml), UVB 조사 후 고장초 효소처리군을 처리한 군에서는 농도가 높아질수록 UVB에 대한 세포 사멸율이 점진적으로 감소됨을 보임. 이는 고장초 효소처리군이 UVB에 대한 손상을 억제 또는 완화시켜주는 것으로 판단됨.

- ⑦ MMP-1 측정 결과, 컨트롤군보다 UVB 조사군에서 40.62% 증가하였으며, EGCG에서는 normal 상태보다 감소함을 확인함. 또한, 고장초 효소처리군에서는 농도비례적으로 MMP-1 방출량이 감소, 250 µg/ml에서는 컨트롤군과 유사한 수치까지 감소함.
- ⑧ MMP-2 측정 결과, 컨트롤군에 비해 UVB조사군이 약 24.27% 증가하였으며, EGCG 또한 control 군까지 수치가 감소함. 고장초 효소처리군을 다양한 농도로 처리한 결과, 10 µg/ml의 농도에서부터 컨트롤군과 유사한 경향을 나타냄. MMP-3와 MMP-9, MMP-13에서도 동일한 경향을 나타냄.
- ⑨ 따라서, 고장초 효소처리 추출분말은 UVB가 조사되어 콜라겐 생성이 감소하고 콜라겐 분해 효소가 증가된 HDF에 대하여 효과적으로 콜라겐, 주름인자에 좋은 영향을 줌.
- ⑩ 고장초 효소처리 추출분말의 RBL-2H3 mast cell에 대한 세포 독성 평가 결과, 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았음.
- ⑪ 고장초 효소처리 추출분말의 β-hexosaminidase 방출 억제능 평가 결과, 고장초 효소처리 추출분말의 농도에 따라 β-hexosaminidase 방출이 억제됨을 알 수 있었음.
- ⑫ 따라서, 고장초 효소처리 추출분말은 DNP-HSA (substrate)에 의해 유도되는 알러지를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있음.
- ⑬ 고장초 효소처리 추출분말의 IL-4 발현 억제 평가 결과, 고장초 효소처리 추출분말의 농도에 따라 농도의존적, 유의적으로 감소됨을 알 수 있었음. IL-4는 RBL-2H3의 알러지를 유도하였을 때 발현되는 인자로서 항알러지 효능의 biomarker로 사용함.
- ⑭ 고장초 효소처리 추출분말의 IL-4 발현 억제 평가 결과, 고장초 효소처리 추출분말의 농도에 따라 농도의존적, 유의적으로 감소됨을 알 수 있었음. TNF-α는 염증반응인자로서 RBL-2H3의 알러지를 유도하였을 때 발현되는 biomarker로 사용함.
- ⑮ HaCaT keratinocyte에 고장초 효소처리군을 농도별로 처리하였을 때, 외부로 방출되는 히알루론산의 양이 점차적으로 증가됨을 확인할 수 있었음. Control에서는 3.2 µg/mL의 히알루론산을 방출한 것에 비해 고장초 효소처리군을 100, 250 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 각각 3.8, 4.1 µg/mL의 히알루론산 생성을 나타냄으로써 고장초 효소처리군의 보습 효과가 있음을 확인함.
- ⑯ 최종 추출물의 지표물질 및 활성물질 함량, in vitro 효능평가를 바탕으로 최종 대량생산 공정을 확립하였으며 공정은 다음과 같음.





(9) 동물시험

(가) 피부주름의 형태학적 관찰

- ① UVB 조사 시간이 지날수록 C군은 피부표면이 건조해지며, 홍반반응을 거쳐 차츰 피부표면에 잔주름이 굵은 주름으로 그 수가 증가함.
- ② 반면에 10주간 고장초 50 mg/kg, 150 mg/kg 투여한 Z50, Z150군의 등 표면은 UVB 조사에도 불구하고 홍반현상 및 각질 형성이 C군보다 현저히 줄었으며, 주름의 수가 적게 생성되거나 유지되는 것을 확인함. 한편 Z300 투여군의 경우 C군 보다 UVB 조사로 굵은 주름 수는 적었으나, 각질 및 피부손상 (홍반현상)이 관찰됨.

㉠ 등표면 육안 관찰 결과

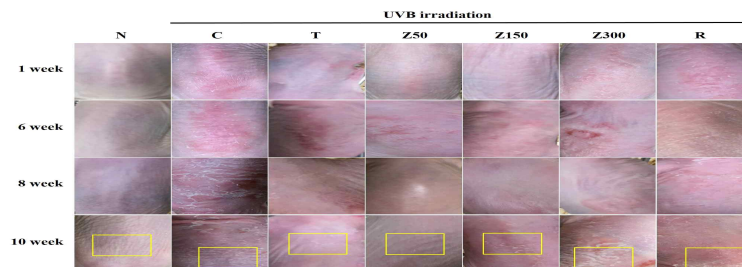


그림 119. 처리군에 따른 등표면 사진

㉡ SILFLO 현미경 관찰

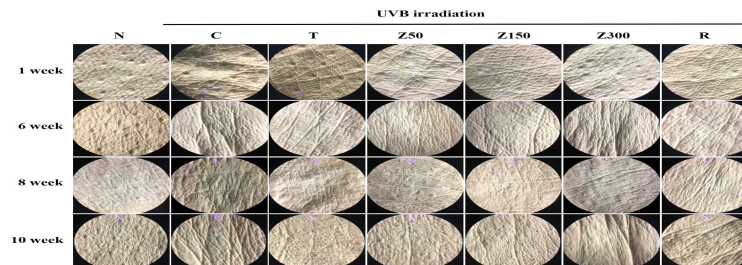


그림 120. 처리군에 따른 등표면 현미경 사진

- ③ 본 연구에서 SILFLO를 사용·제작된 모사판의 피부주름 양상을 관찰한 결과, UVB 를 조사한 C군은 주름의 두께가 굵고 간격이 좁고 주름이 깊게 형성되었고 14주간 고장초 추출물 50 mg/kg, 150 mg/kg을 투여한 Z50, Z150군은 C군 대비하여 상대

적으로 주름이 덜 형성되거나, 주름의 두께가 얇고 선이 가는 것을 확인함.

- ④ 한편 retinoic acid 0.05%를 피부 도포한 P군과 Tricin 2 mg/kg을 투여한 T군의 경우, UVB 조사 8주차까지 C군 대비하여 상대적으로 주름이 덜 형성되었으나, UVB조사 10주차에 이르러 Retinoic acid 0.05% 피부 도포한 R군은 주름이 깊어졌으며 주름의 수도 많아지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 고장초 추출물 300 mg/kg 투여군(Z300군) 에서는 앞서 등 표면 관찰결과와 같이 SILFLO 현미경 관찰에서도 굵은 주름이 관찰됨.
- ⑤ 이를 고려해 볼 때, UVB 10주 조사에도 불구하고 고장초 50 mg/kg, 150 mg/kg 시료투여는 SKH-1 hairless 마우스 표피 각질형성세포에 효과적으로 작용하여 피부 주름 형성 예방에 도움이 될 것으로 사료됨.

(나) 체중 및 ALT, AST serum, 수분 함량 측정

- ① N군, C군, 나머지 시료 처리 군에서 체중변화가 모두 정상범위로 나타남.
- ② 독성을 평가하기 위해 시료 투여 14주째 모든 동물을 CO₂가스 마취 후, 개복하여 복부 대동맥에서 혈액을 채취하여 Serum의 AST, ALT 검사함. 그 결과 14주간 시료투여에도 불구하고 군간 유의차가 발생하지 않았으며 모두 정상범위로 확인됨.
- ③ 사육기간 종료 전(10주 후) SKH-1 hairless mouse의 수분함량 측정 결과, UVB 조사 시 건조가 확인되었으며 positive control인 retinoic acid와 비교하였을 때 고장초 효소처리 추출분말의 함량과는 상관없이 수분이 회복됨을 나타냄.
- ㉠ SKH-1 hairless mouse의 체중 및 ALT, AST serum 측정 결과

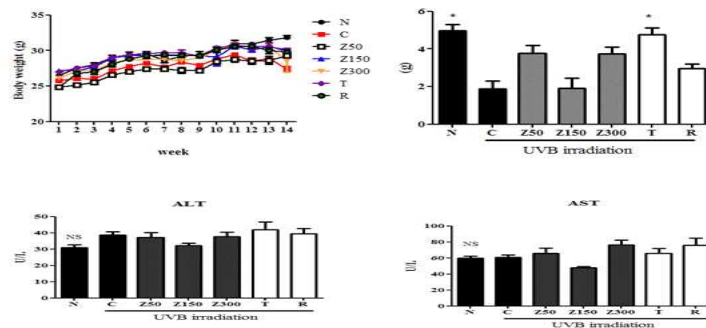


그림 121. SKH-1 hairless mouse의 체중 및 ALT, AST serum 측정

- ㉡ SKH-1 hairless mouse의 10주 후(사육기간 종료) 수분함량 측정 결과

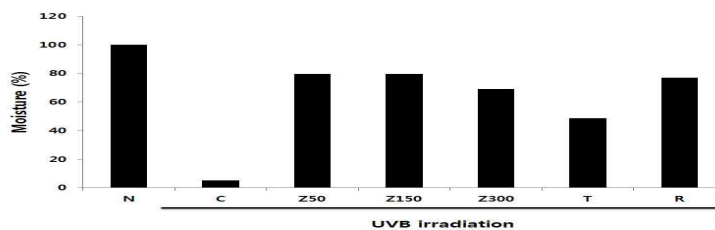


그림 122. SKH-1 hairless mouse의 사육기간 종료 후 수분함량 측정

(다) 피부의 조직학적 관찰

① H&E staining

- ㉞ C군은 10주간 UVB처리로 표피의 상피세포 층이 매우 두꺼워졌으며 (화살표 표시), 표피 및 진피층 모두 건조가 유도되었고, 탄력 섬유층이 변성됨. 이에 비해 14주간 고장초 50 mg/kg, 150 mg/kg 처리한 Z50군, Z150군은 C군에 비해 상피세포층이 현저히 감소한 것을 H&E염색 40배, 100배 확대 사진 모두 확인함.
- ㉟ 아울러 진피층 내 탄력 섬유가 C군과 대비하여 조밀해진 모습을 확인함. 이는 앞서 등표면 및 SILFLO로 피부 표면의 형태학적 관찰결과와 일치하는 결과로 일정 농도의 고장초 추출물 투여는 표피층 및 상피세포에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료됨.

- 피부 조직의 H&E staining 결과

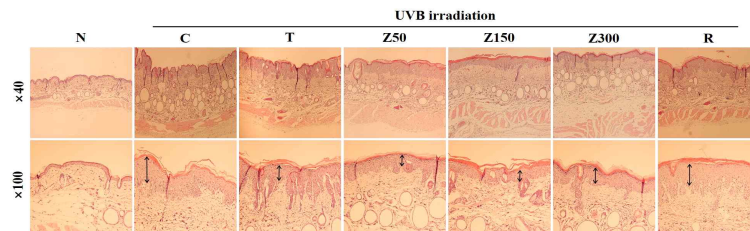


그림 123. 피부 조직의 H&E staining 결과

② Masson's trichrome

- ㉞ UVB를 조사하지 않은 N군의 진피층에서 aniline blue에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었으나, UVB를 10주간 조사한 C군의 교원섬유는 aniline blue에 미약하게 염색됨.
- ㉟ UVB를 조사하면서 14주간 고장초 추출물을 투여한 결과 고장초 추출물 투여군에서, 특히 Z50군의 진피 층에서 C군에 비하여 aniline blue에 강하게 염색된 교원 섬유가 관찰됨. 이는 14주간 고장초 추출물 투여 (고장초 50 mg/kg, 150 mg/kg 투여)로 장기간 과량의 UVB 조사에도 불구하고 피부 조직 내 콜라겐 층을 유지시켰으며, 피부 주름 형성을 효과적으로 차단하여 교원질 섬유구조 형태를 조밀하게 유지시킨 것으로 사료됨.

- 피부 조직의 Masson's trichrome 결과

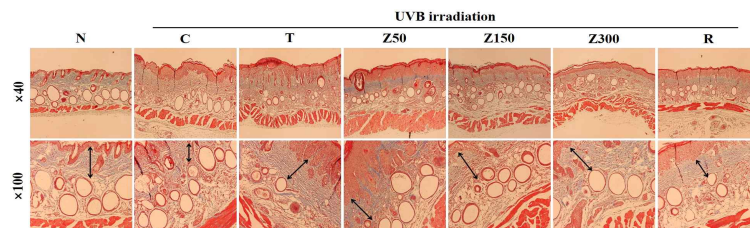


그림 124, 피부조직의 Masson's trichrome 결과

(라) 피부 조직 Western blot

- ① UVB 조사에도 불구하고 고장초 추출물 투여 군에서는 Collagen 1A의 발현 양이 C군 대비 모두 증가한 것을 확인할 수 있었음. 특히 고장초 추출물 150 mg/kg을 투여한 Z150군은 $p < 0.001$ 유의수준으로 Collagen 1A 발현양이 증가함을 확인함.

- ② 콜라겐을 분해하는 효소로 알려진 MMP-1, MMP-13의 단백질 발현을 확인한 결과, UVB를 조사한 C군에서 MMP-1, MMP-13의 발현양이 증가하였으나 MMP-1의 발현양은 Z50군에서 $p < 0.05$ 유의수준으로 발현양이 감소하였으며, MMP-13의 발현양 또한 Z50군, Z150군에서 모두 $p < 0.05$ 유의 수준으로 감소하였음. 한편 R군은 C군보다 MMP-1, 13의 발현양이 많이 증가해 retinoic acid를 일주일 3번 바르는 것으로 콜라겐 합성 및 분해효소 기전에 영향을 미치지 못함.
- ③ 결과를 종합하여 볼 때, 과량의 자외선 조사로 콜라겐 분해효소인 MMP-1, MMP-13 단백질 발현이 증가하고 콜라겐 합성 효소인 Collagen 1A 발현이 감소한 것이 14주간의 고장초 추출물 (Z50군, Z150군) 처리로 인하여 Collagen 1A의 발현양은 증가하고, MMP-1, 13의 발현을 감소시켜 피부 주름 형성억제에 도움을 주는 것으로 사료됨.

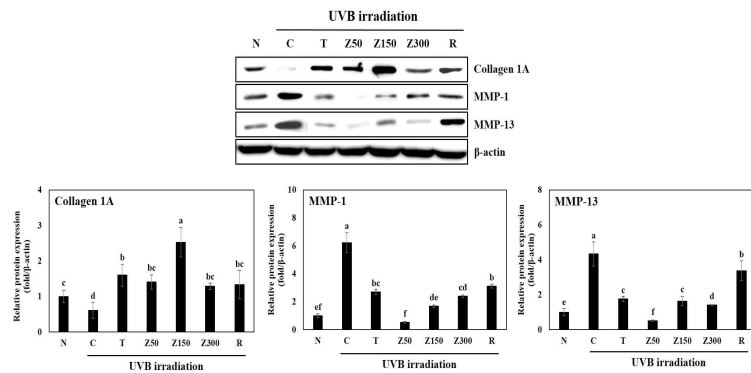


그림 125. 피부 조직 단백질의 Collagen 1A, MMP-1, 13에 대한 western blot 결과

(10) 일반식품 소재 사업화 시제품 생산

(가) (주)삼우다연에서 시제품의 위탁 생산

① 생산 과정



(주)삼우다연 공장 정면사진



(주)삼우다연 공장 추출 농축실 입구



추출 농축실 전경



고장초 추출이 진행되었던 추출탱크



고장초 원물 투입



추출 완료 후 농축탱크로 이송



동결건조 된 시제품의 미분쇄 전 상태

열수 추출 후 효소처리시 교반 과정



농축 탱크로의 이송 후 농축 전 교반



동결건조 된 시제품 포장

(나) 공정 단계별 Tricin 이행률 측정

① Lab scale 추출물 공정단계별 분석 결과

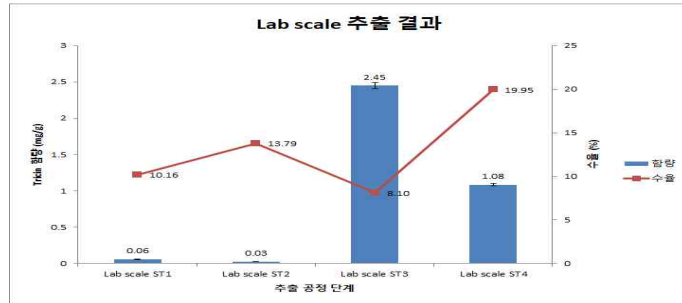


그림 136. Lab scale 추출물 결과

㉠ Lab scale ST1 = 효소처리 전 열수 침지 샘플, ㉡ Lab scale ST2 = 효소처리 후 샘플, ㉢ Lab scale ST3 = 효소처리 후 남은 잔사에 에탄올 추출 샘플, ㉣ Lab scale ST4 = 최종 샘플

② 생산된 시제품의 공정단계별 분석 결과

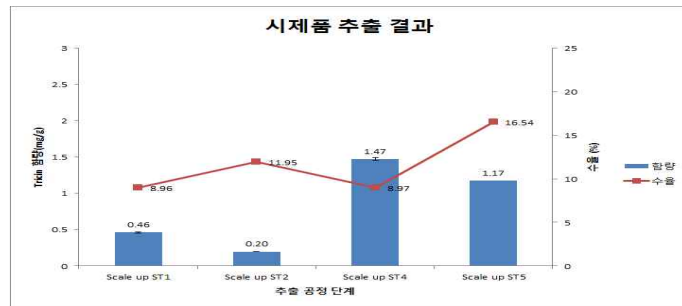


그림 137. 시제품 추출 결과

㉠ Lab scale ST1 = 효소처리 전 열수 침지 샘플, ㉡ Lab scale ST2 = 효소처리 후 샘플, ㉢ Lab scale ST3 = 효소처리 후 남은 잔사에 에탄올 추출 샘플, ㉣ Lab scale ST4 = 최종 샘플

③ 결론

㉠ Lab scale 샘플과 공장에서 대량으로 생산한 샘플의 추출 수율과 Tricin 함량 변화의 경향성이 유사함을 확인함.

- ㉔ Lab scale에서는 열수 침지 및 효소처리 추출물에서 Tricin이 0.03~0.06 mg/g으로 거의 추출되지 않는 경향이 있고 대량으로 생산한 샘플의 경우 동일 단계에서 보다 많은 6~7 배인 0.2~0.46 mg/g이 추출된 것을 확인함. 또한, Lab scale에서는 에탄올 재탕부분에서 2.45 mg/g으로 높은 Tricin 추출률을 보였지만 대량으로 생산한 샘플의 경우 비교적 적은 1.47 mg/g이 추출됨을 확인하였다. 이는 Lab scale에서의 열수 및 효소처리 추출 시 공장 scale에 비하여 교반의 차이가 클 것으로 사료되며 에탄올 추출에서는 초기 열수 침지에서 Tricin이 얼마나 추출되었는지에 따라 함량이 변화하는 것으로 사료됨.
- ㉕ 최종 샘플의 수율이 Lab scale 19.95% 에서 공장 scale 16.54% 로 감소한 이유는 필터에 사용된 망의 사이즈가 Lab scale은 75 um, 공장 scale은 20 um로 차이가 있기 때문인 것으로 사료됨.
- ㉖ 최종적으로 나온 Tricin의 함량은 Lab scale은 1.08 mg/g, 공장 scale은 1.17 mg/g으로 Tricin의 이행률은 108.3% 임을 확인하였으며 함량기준인 ±120% 임을 감안하면 재현성이 확보됨.

(11) 시제품의 품질평가

(가) 영양성분 검사 결과

- 평균 열량 292 kcal / 100 g, 탄수화물 58%, 조지방 2%, 조단백질 10%, 수분 6.1%, 회분 23.3%, 나트륨 407.1 mg / 100 g

그림 138. 시제품 영양성분 검사 결과

(나) 유해물질 검사 결과

- 납 0.2188 mg/kg, 총비소 0.7157 mg/kg, 카드뮴 0.0761 mg/kg, 총수은 0.0043 mg/kg, 대장균 음성, 잔류농약(DDT, BHC, aldrin, dieldrin, endrin) 음성

그림 139. 시제품 유해물질 검사 결과

(다) Tricin 함량 검사 결과

- 평균 1.24 mg/g



그림 140. 시제품 Tricin 함량 검사 결과

(12) 임상시험 및 제품화를 위한 제형화 연구

(가) 제품의 분말화 및 제형화가 가능한 위탁업체를 선정

① 위탁업체는 전북생물산업진흥원으로 선정하였음.

(나) 제품의 성격에 맞는 제형화 및 임상제품 제작

② 제형은 캡슐로 선정하여 전북생물산업진흥원에서 임상제품을 제작함.

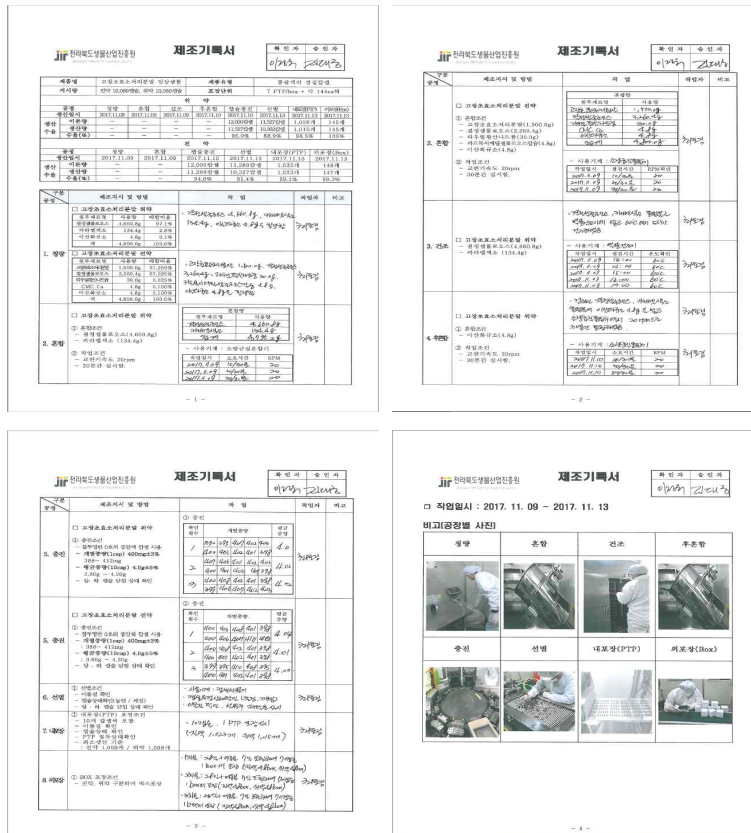


그림 141. 효소처리고장초추출분말 캡슐 제조지시서

③ 제작된 임상제품 포장

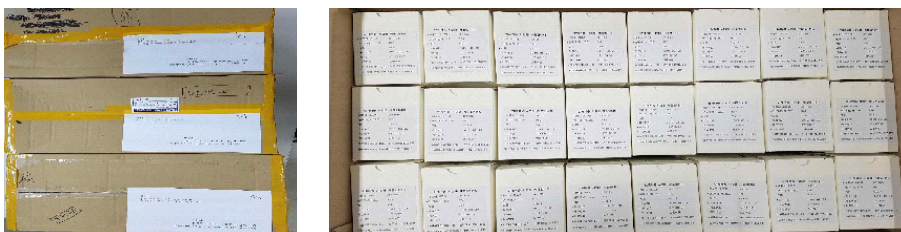


그림 142. 효소처리고장초추출분말 캡슐의 임상제품으로 포장 상태

(13) 안정성 시험

(가) 장기보존시험(실측시험) 결과

① 장기보존시험 Tricin 함량 분석

- 장기보존용 샘플을 각각 둘째 주 화요일에 취득하여 함량 분석 진행, 2회 차(6개월)까지 함량의 큰 변화가 없는 것을 확인.

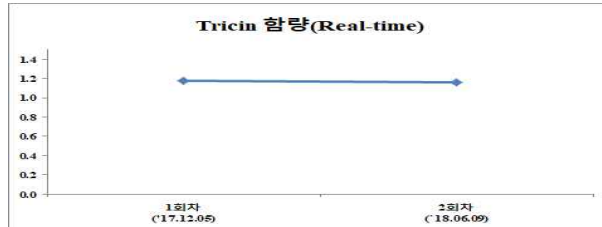


그림 143. Tricin 장기보존시험 함량 분석

② 장기보존시험 함량 분석에 대한 검증

- 장기보존시험 샘플 함량 분석을 위한 표준품의 직선성($R^2=0.9997$) 및 평균 RSD(0.4374)을 확인.

(나) 가속시험 결과

① 가속시험 Tricin 함량 분석

- 가속시험용 샘플을 각각 둘째 주 화요일에 취득하여 함량 분석 진행, 10회 차(10개월)까지 함량의 큰 변화가 없는 것을 확인.

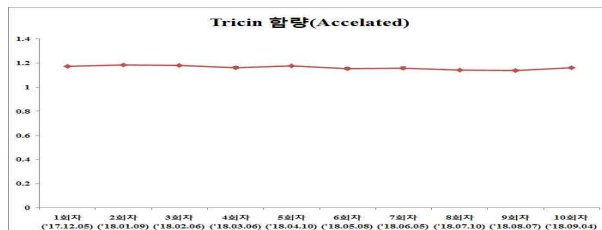


그림 144. Tricin 가속시험 함량 분석

② 가속시험 함량 분석에 대한 검증

- 가속시험 샘플 함량 분석을 위한 표준품의 직선성($R^2=0.9987$) 및 평균 RSD(0.5703)을 확인.

(다) 유통기한 설정 근거

- ‘식품, 축산물 및 건강기능식품의 유통기간 설정실험 가이드라인’을 참고하여, 12개월의 가속시험에서 안정한 결과로 예상 유통기한은 24개월로 표기 가능할 것으로 사료됨.

(14) 안전성 시험

(가) 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 제출서류 검토

① 건강기능식품 기능성원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도

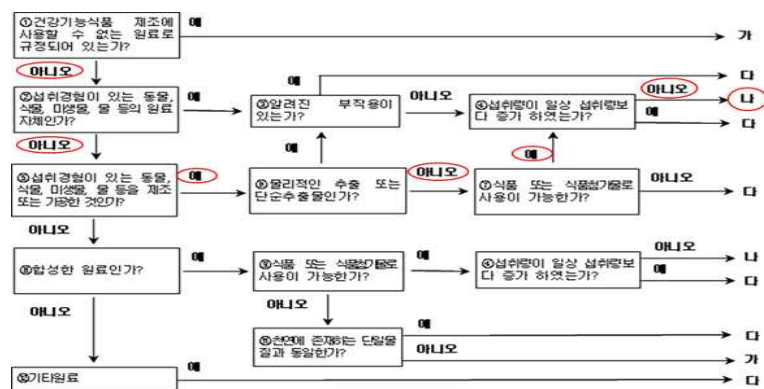


그림 145. 안전성 평가를 위한 의사결정도

㉢ 의사결정도 ‘나’에 해당됨.

㉣ 제출되어야 하는 서류

- 섭취 근거 자료.
- 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료.
- 섭취량 평가 자료.

① 섭취근거 정보

㉢ 국내 외 인정 및 허가 현황

- 국내 인정 및 허가 현황

: 식품공전에 원재료명 - 줄, 원재료 분류 - 식물, 식품원료 사용가능 여부 - 줄기, 잎, 씨앗으로 명시되어 있음.

- 국외 정부기관의 인정 현황

: 고장초 잎 및 줄기는 일본 FOSHU 후생 노동성 식품 안전부 [2013.7 판]에 기타 야채로 등재

: 대만 식약처(TFPA) 식품 영양 데이터베이스에 야채로 등재

: 중국 의약품 데이터베이스에 고장초 등록되어 있으며, 식용 가능 원료로 등재




㉣ 국내 외 사용 현황


- 국내 사용 현황

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취 시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
	줄फल환	(주)토종마을	12 g	-	-	식품	-	줄फल90%, 소맥분(밀10%)100%
	줄फल환	조은약초	9 g	그림1. 참조	-	식품(기타 가공품)	-	줄फल95%, 밀분5%
	고장초	약초홍삼사랑	-	-	-	차로 섭취	-	-

	지리산 줄फल환	지리산한방식 품(주)	-	-	-	식품	-	줄फल90%, 참쌀10%
---	-------------	----------------	---	---	---	----	---	------------------

- 국외 사용 현황

유통국	제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취 시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
일본		에치젠 마코모	司辻校一	5 g/일	그림2. 참조	-	보충제	-	-
일본		마코모	Wild rice, Inc.	-	-	-	건강보조 식품	-	-
일본		バック マコモ	Natural health, Inc.	-	-	-	건강차	-	-

<table border="1"> <tr><td>제품명</td><td>줄फल환</td></tr> <tr><td>내용량</td><td>200g</td></tr> <tr><td>식품의유형</td><td>기타가공품</td></tr> <tr><td>등록번호</td><td>2018004211961</td></tr> <tr><td>소분명</td><td>조은인초 (서울시 동대문구 역삼시로82,2층)</td></tr> <tr><td>유형</td><td>[유종건강관리원(국가명)]</td></tr> <tr><td>원재료명</td><td>제올라이트 유종 - 29%</td></tr> <tr><td>(원산지 및 함량)</td><td>줄फल(국산) 95%, 일본(미국산) 5%</td></tr> <tr><td>유통기한</td><td>유통기한 없음</td></tr> <tr><td>제조원</td><td>한이랑</td></tr> <tr><td>제조방법</td><td>① 조사광선 및 고온건조공정을 거쳐 보관합니다. ② 중간 분쇄 및 정제 후 내용물을 공출합니다 ③ 공출물 후는 2차 분쇄를 실시하여 정제 후 포장합니다.</td></tr> <tr><td>유통기한</td><td>포장일로부터 2년(상온 별도냉장) 유통기한 기준 6개월~1년 이내 상산의 상온 순차적용을 합니다.</td></tr> <tr><td>소비자 상담 및 반응</td><td>조은약초(본사) 02-2138-7789, 또는 상용 구입처</td></tr> </table>	제품명	줄फल환	내용량	200g	식품의유형	기타가공품	등록번호	2018004211961	소분명	조은인초 (서울시 동대문구 역삼시로82,2층)	유형	[유종건강관리원(국가명)]	원재료명	제올라이트 유종 - 29%	(원산지 및 함량)	줄फल(국산) 95%, 일본(미국산) 5%	유통기한	유통기한 없음	제조원	한이랑	제조방법	① 조사광선 및 고온건조공정을 거쳐 보관합니다. ② 중간 분쇄 및 정제 후 내용물을 공출합니다 ③ 공출물 후는 2차 분쇄를 실시하여 정제 후 포장합니다.	유통기한	포장일로부터 2년(상온 별도냉장) 유통기한 기준 6개월~1년 이내 상산의 상온 순차적용을 합니다.	소비자 상담 및 반응	조은약초(본사) 02-2138-7789, 또는 상용 구입처	
제품명	줄फल환																										
내용량	200g																										
식품의유형	기타가공품																										
등록번호	2018004211961																										
소분명	조은인초 (서울시 동대문구 역삼시로82,2층)																										
유형	[유종건강관리원(국가명)]																										
원재료명	제올라이트 유종 - 29%																										
(원산지 및 함량)	줄फल(국산) 95%, 일본(미국산) 5%																										
유통기한	유통기한 없음																										
제조원	한이랑																										
제조방법	① 조사광선 및 고온건조공정을 거쳐 보관합니다. ② 중간 분쇄 및 정제 후 내용물을 공출합니다 ③ 공출물 후는 2차 분쇄를 실시하여 정제 후 포장합니다.																										
유통기한	포장일로부터 2년(상온 별도냉장) 유통기한 기준 6개월~1년 이내 상산의 상온 순차적용을 합니다.																										
소비자 상담 및 반응	조은약초(본사) 02-2138-7789, 또는 상용 구입처																										
국내 제품 표시 내용 샘플	국외 제품 표시 내용 샘플																										

② 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용, 독성 등) DB 검색 정보

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
Toxnet	(<i>Zizania latifolia</i>) And (safety or adverse or toxic)	3	X	X
Pubmed	(<i>Zizania latifolia</i>) And (safety or adverse or toxic)	7	X	X
PDRhealth	' <i>Zizania latifolia</i> '	X	X	X
Natural Medicines	' <i>Zizania latifolia</i> '	X	X	X
한국학술문헌정보센터	(<i>Zizania latifolia</i>) And (safety or adverse or toxic)	3	X	X
US FDA poisonous plant database	' <i>Zizania latifolia</i> '	X	X	X
FSANZ	' <i>Zizania latifolia</i> '	X	X	X
JECDB	' <i>Zizania latifolia</i> '	X	X	X

③ 섭취량 평가 정보

㉠ 제시한 일일섭취량 : '효소처리 고장초 추출분말'로서 250 mg/일.

㉡ 고장초는 국내에서 일반식품으로 섭취되고 있으며, 일일 섭취 제한량이 따로 설정되어 있지 않음.

㉢ 국내 12 g/일, 국외(일본) 5 g/일로 일일섭취량을 제시하였고, 국내에 판매중인 백장생, 토종마을 사 및 고려립상의전의 줄फल가루는 각각 4~9 g/일, 6~15 g/일, 8~10 g/일

로 (주)비티씨의 효소처리 고장초 추출분말의 수율(16%) 환산 시, 250 mg/일은 1.25 g/일로 기존 섭취량보다 낮은 섭취량임.

㉔ 동물실험 결과 유효농도인 50 mg/kg에 체표면적 대비 환산계수(0.08)와 성인체중(60 kg)을 곱하여 약 250 mg/일로 이를 일일섭취량으로 설정함.

④ 인체적용시험 정보

㉕ 피부 및 전신 안전성 평가, 혈액검사를 통한 안전성 평가를 통해 알려지 반응 혹은 생물화학적 부작용에 대한 검사를 진행함. (이상반응사례(피부 상태 및 전신상태), Total protein, albumin, total bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), 총콜레스테롤, 중성지방, 혈당, blood urea nitrogen, creatinine, hemoglobin)

㉖ 시험 물질 섭취 시, 별다른 부작용 발생 없음.

㉗ 안전성 평가를 위한 인체적용시험 요약

디자인	대상자(탈락율)	시험물질 섭취량/섭취기간	안전성지표	결과	비고
Randomized, placebo-controlled, Double blind	대상자 선정: 30~60세 얼굴 피부특성이 건성이면서 눈가에 주름을 가진 한국인, 제외기준: 피부질환, 내분비계 질환, 임신 대상자이거나, 관련 의약품 복용자 및 알레르기 반응 피험자(2.1%)	1) 시험물질: 효소처리 고장초 추출분말 - 섭취량: 250 mg/일, 하루 2캡슐 경구복용 - 섭취기간: 12주 복용	1) 이상반응사례 (피부 및 전신상태) 2) Total protein 3) albumin 4) total bilirubin 5) aspartate aminotransferase (AST) 6) alanine aminotransferase (ALT) 7) 총콜레스테롤 8) 중성지방 9) 혈당 10) blood urea nitrogen 11) creatinine 12) hemoglobin	부작용 없음	임상 최종 보고서

(나) 독성시험 계획

① 국내 개별인정에 관련하여 식용근거 및 보완자료를 통하여 독성시험 자료 제출은 면제가 가능하겠으나, 해외 수출을 위한 GRAS 등재 목표로 추가 독성실험을 계획 및 진행 중.

② 독성시험 업체는 (주)바이오톡스텍으로 선정하여 시험계약 완료 및 실험 진행 중.

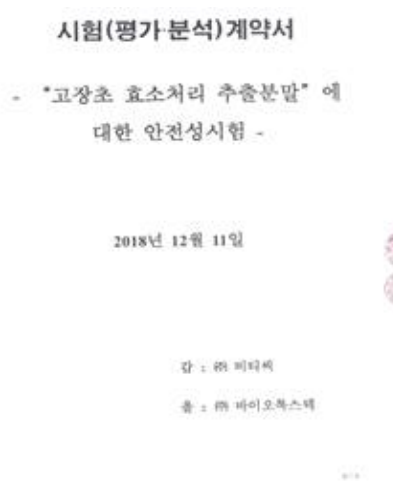


그림 155. 독성시험 계약서

(15) 임상시험

(가) 인체적용시험 최종보고서 요약본

과제명	[고장초 추출물 함유 식품]의 피부 보습 및 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강 유지 효능 평가		
시험번호	KHUSBC 2017-025	시험기간	2017.10.23.~2018.02.28
의뢰기관/ 모니터	(주)비티씨 / 김태우		
시험수행기관/ 시험담당자	경희대학교 피부생명공학센터 / 이시내		
시험책임자	박철중		
제품명칭	시험군: 고장초 추출물 함유 식품 대조군: 고장초 추출물 미함유 식품		
시험방법	<ul style="list-style-type: none"> - 시험대상자: 만 30~60세의 얼굴 피부특성이 건성이면서 눈가에 주름을 가진 한국인 성인 96명 - 평가시점: 제품 복용 전(0W), 제품 4주 복용 후(4W), 제품 8주 복용 후(8W), 제품 12주 복용 후(12W) - 제품복용방법: 일일 2캡슐(아침, 저녁) 충분한 물과 함께 경구복용 - 평가부위: 좌측 또는 우측의 뺨 부위 및 눈가, 전박 내측 - 평가항목: 피부 수분량, 경피수분손실량, 피부결 인자, 육안평가, 주름 인자, 피부 탄력 인자, 피부 두께, 진피치밀도, BMI, 체중, 식이조사, 안전성 평가, 설문 평가, 혈액 검사 		
시험결과	<p>1. 시험대상자 본 시험의 시험대상자 96명 중 1명(No. 96)이 중도 탈락(탈락기준: ③프로토콜 미준수), 1명(No. 37)이 결과 분석에서 제외(탈락기준: ⑤기타)되어 최종 94명이 결과분석에 포함되었다. 시험군으로 시험대상자 47명이 포함되었으며, 평균 연령은 42.7세, 최고 연령은 53세, 최저연령은 34세였다. 대조군으로 시험대상자 47명이 포함되었으며, 평균 연령은 43.4세, 최고 연령은 53세, 최저연령은 34세였다.</p> <p>2. 분석대상자군 - PP군: 중도탈락자 2명 제외한 모든 시험대상자 94명으로 시험군 47명, 대조군 47명이 포함되었다. - 이상치 제외 군: FAS군 중 동일 회차 반복측정 시 한 변수 내 측정값이 10% 이상의 차이가 발생하거나(No. 20, 92), 수분량 및 주름 관련 평가항목의 초기 측정값이 정규분포하지 않는 이상치를 보이는 시험대상자(No. 12, 14, 15, 17, 20, 21, 22, 39, 41, 47, 61, 70, 88, 92)를 제외한 시험대상자 80명으로 시험군 42명, 대조군 38명이 포함되었다.</p> <p>3. PP군의 측정 및 분석 결과 <ul style="list-style-type: none"> ➢ 복용 전과 후 시점 비교 <ul style="list-style-type: none"> - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위와 전박 내측 피부 수분량이 개선됨 - 시험군은 제품 복용 후 뺨 부위 경피수분손실량에 변화 없었으나 대조군은 개선됨 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 전박 내측 경피수분손실량에 변화 없음 - 시험군 제품 복용 후 눈가 피부 거칠기가 증가하였으나 대조군은 변화 없음 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 눈가 주름 육안평가 점수가 개선됨 - 시험군 제품 복용 후 눈가 주름 개수와 면적이 개선되었으나 주름의 깊이와 길이가 증가하였고 대조군은 눈가 주름 개수와 면적이 개선되었으나 주름의 깊이가 증가함 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위 피부 탄력이 개선됨 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위 피부 두께가 증가함 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위 진피치밀도에 변화 없음 - 시험군 제품 복용 후 체중과 BMI에 변화 없었으나 대조군은 체중과 BMI가 증가함 - 시험군과 대조군 모두 시험 기간 동안 식이량이 보통보다 낮았음 ➢ 복용 후 변화 군간 비교 <ul style="list-style-type: none"> - 뺨 부위와 전박 내측 피부 수분량 변화율에 군간 차이 없음 - 뺨 부위와 전박 내측 경피수분손실량 변화율에 군간 차이 없음 - 눈가 피부 거칠기 변화율에 군간 차이 없음 - 눈가 주름 육안평가 점수 변화율에 군간 차이 없음 - 시험군이 대조군보다 눈가 주름 개수 개선율이 높았으나 주름의 평균 깊이, 주름의 볼륨, 주름의 길이는 대조군이 시험군보다 개선율이 높았음 - 뺨 부위 피부 탄력 변화율에 군간 차이 없음 </p>		

	<ul style="list-style-type: none"> - 뺨 부위 피부 두께와 진피치밀도 변화율에 군간 차이 없음 - 체중과 BMI 변화율, 식이량에 군간 차이 없음 <p>4. 이상치 제외군의 측정 및 분석 결과</p> <p>➢ 복용 전과 후 시점 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위와 전박 내측 피부 수분량이 개선됨 - 시험군은 제품 복용 후 뺨 부위 경피수분손실량에 변화 없었으나 대조군은 개선됨 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 전박 내측 경피수분손실량에 변화 없음 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 눈가 피부 거칠기가 증가 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 눈가 주름 육안평가 점수가 개선됨 - 시험군 제품 복용 후 눈가 주름 개수와 면적이 개선되었으나 주름의 깊이와 길이가 증가하였고 대조군은 눈가 주름 개수와 면적이 개선되었으나 주름의 깊이가 증가함 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위 피부 탄력이 개선됨 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위 피부 두께가 증가함 - 시험군과 대조군 모두 제품 복용 후 뺨 부위 진피치밀도에 변화 없음 - 시험군 제품 복용 후 체중과 BMI에 변화 없었으나 대조군은 BMI가 증가함 <p>➢ 복용 후 변화 군간 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> - 뺨 부위와 전박 내측 피부 수분량 변화율에 군간 차이 없음 - 뺨 부위와 전박 내측 경피수분손실량 변화율에 군간 차이 없음 - 눈가 피부 거칠기 변화율에 군간 차이 없음 - 눈가 주름 육안평가 점수 변화율에 군간 차이 없음 - 시험군이 대조군보다 눈가 주름 개수, 주름 면적 개선율이 높았음 - 뺨 부위 피부 탄력 변화율에 군간 차이 없음 - 뺨 부위 피부 두께와 진피치밀도 변화율에 군간 차이 없음 - 체중과 BMI 변화율에 군간 차이 없음
결론	<p>(주)비티씨에서 의뢰한 [고장초 추출물 함유 식품]의 피부 보습 및 자외선에 의한 피부손상으로 부터 피부 건강 유지 효능 평가 결과, 시험제품 복용 후 피부 수분량이 개선(보습) 되었으나 대조제품과 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 단, 수분량 및 주름 관련 인자의 초기 측정값이 정규분포 하지 않는 이상치를 제외한 경우 눈가주름의 개선이 확인되었다.</p>

(나) 임상시험 눈가주름 개선 객관적 검증

① 통계적 유의성 검증 결과

Variables	Baseline	4 weeks	8 weeks	12 weeks	F-value _e	P-value _‡
눈가 주름 육안평가 (score)						
Control group	5.4±1.3	5.5±1.3	5.3±1.3	5.2±1.3	0.37	0.778
Case group	5.4±1.3	5.4±1.3	5.2±1.3	5.1±1.3		
Avg. wrinkle depth (µm)						
Control group	34.5±6.7	34.8±6.3	34.3±5.3	35.0±5.7	0.64	0.591
Case group	37.6±6.1	37.8±5.9	38.3±7.0	39.2±6.9		
Mean depth biggest wrinkle (µm)						
Control group	43.0±13.7	42.3±10.9	43.3±13.4	43.6±11.3	0.10	0.961
Case group	46.8±13.9	46.6±17.8	48.7±22.6	47.6±14.1		
Max. depth biggest wrinkle (µm)						
Control group	124.0±56.0	121.1±40.0	126.0±52.7	126.0±45.1	0.18	0.913
Case group	129.2±52.4	128.5±62.7	138.0±68.1	129.7±46.1		
Wrinkle count (Number)						
Control group	103.4±30.8	101.2±30.2	101.2±30.4	101.2±30.3	2.78	0.042
Case group	109.8±19.4	106.9±19.3	106.2±20.1	106.5±19.1		

Wrinkle volume(mm³)						
Control group	1.3±0.4	1.3±0.4	1.3±0.3	1.3±0.4	0.42	0.736
Case group	1.5±0.3	1.4±0.3	1.4±0.3	1.5±0.4		
Wrinkle area(mm²)						
Control group	36.4±7.8	35.7±8.0	36.5±7.8	36.4±7.6	3.38	0.019
Case group	38.6±4.3	38.0±4.6	37.8±4.4	38.4±4.7		
Wrinkle area (%)						
Control group	14.8±2.3	14.5±2.4	14.8±2.3	14.8±2.2	3.31	0.021
Case group	15.3±0.8	15.1±1.0	15.0±0.9	15.3±1.0		
Length of wrinkles (μm)						
Control group	72.8±16.8	76.1±16.3	76.5±16.8	76.1±16.5	3.18	0.029
Case group	77.8±9.4	83.0±10.9	81.3±10.6	80.1±9.8		

: 통계적 유의성 검증 결과 **Wrinkle count (Number)**, **Wrinkle area (mm²)**, **Wrinkle area (%)**, **Length of wrinkles (μm)**에서 유의성이 있음이 확인 됨.

② Wrinkle count를 예로 들어 측정 주차 간 다중비교 실시 방법

㉠ 대조군

: 대조군의 주름 개수를 비교하여 보면, 0주차(1) 103.37개에서 4주차(2)에 101.21개로 유의하게 감소하여 8주차(3), 12주차(4)에도 각각 101.21개, 101.18개로 0주차에 비해 주름 개수가 유의하게 작았으며(p<0.001), 4주차, 8주차, 12주차의 주름 개수에는 큰 차이가 없었음.

대응변 비교 ^a						
측도: MEASURE_1						
(I) Wrinkle_count	(J) Wrinkle_count	평균차이(I-J)	표준오차	유의확률 ^c	차이에 대한 95% 신뢰구간 ^d	
					하한	상한
1	2	2.158 [*]	.279	.000	1.594	2.722
	3	2.158 [*]	.314	.000	1.521	2.795
	4	2.184 [*]	.274	.000	1.629	2.740
2	1	-2.158 [*]	.279	.000	-2.722	-1.594
	3	.000	.333	1.000	-.675	.675
	4	.026	.310	.933	-.601	.654
3	1	-2.158 [*]	.314	.000	-2.795	-1.521
	2	.000	.333	1.000	-.675	.675
	4	.026	.389	.946	-.762	.815
4	1	-2.184 [*]	.274	.000	-2.740	-1.629
	2	-.026	.310	.933	-.654	.601
	3	-.026	.389	.946	-.815	.762

추정 주변 평균을 기준으로
^{*} 평균차이는 .05 수준에서 유의합니다.
a. gr = 0
c. 다중비교를 위한 수정: 최소유의차 (수정하지 않은 상태와 동일합니다.)

㉔ 시험군

: 시험군도 대조군과 마찬가지로 0주차(복용 전) 109.79개에서 4주차 106.88개로 유의하게 감소하여(p<0.001), 8주차, 12주차도 4주차와 유사한 수치를 유지하였음.

대응별 비교 ^a						
측도: MEASURE_1						
(I) Wrinkle_count	(J) Wrinkle_count	평균차이(I-J)	표준오차	유의확률 ^c	차이에 대한 95% 신뢰구간 ^c	
					하한	상한
1	2	2.905 [*]	.342	.000	2.214	3.596
	3	3.548 [*]	.384	.000	2.771	4.324
	4	3.286 [*]	.346	.000	2.586	3.985
2	1	-2.905 [*]	.342	.000	-3.596	-2.214
	3	.643	.427	.140	-.219	1.505
	4	.381	.406	.354	-.439	1.201
3	1	-3.548 [*]	.384	.000	-4.324	-2.771
	2	-.643	.427	.140	-1.505	.219
	4	-.262	.417	.534	-1.105	.581
4	1	-3.286 [*]	.346	.000	-3.985	-2.586
	2	-.381	.406	.354	-1.201	.439
	3	.262	.417	.534	-.581	1.105

추정 주변 평균을 기준으로
^{*} 평균차이는 .05 수준에서 유의합니다.
a. gr = 1
c. 다중비교를 위한 수정: 최소유의차 (수정하지 않은 상태와 동일합니다.)

(16) 개별인정 신청

(가) 개별인정 신청자료 총괄 요약본

항 목	1. 주요 내용	
1. 원료명	효소처리 고장초 추출분말	
2. 원재료	고장초 건조시료(학명 : <i>Zizania latifolia</i> , 사용부위 : 잎, 줄기)	
3. 기능 (지표)성분	지표성분 : 트리신(Tricin)	
4. 제조 공정	원재료 칭량→열수 침지→냉각→효소 반응→효소 불활성화→여과→잔사 주정 추출→여과→추출물 혼합→감압농축→부형재 첨가→살균→건조→건조물 분쇄→포장→품질검사 및 출고→신청원료	
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 갈색의 분말 2) 트리신 (기능 또는 지표성분) : 1.1 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1.0 이하 4) 총비소(mg/kg) : 10.0 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1.0 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	자사 시험법 분석 컬럼 : SUPELCO Discovery® C18 (4.6 mm I.D x 250 mm, 5 μm)
	규격 외 (잔류농약)	토양에 잔류되어 있는 잔류농약의 함량을 확인하기 위한 5종의 잔류농약 수치 확인(DDT, BHC, aldrin, dieldrin, endrin)하였으며, 음성 결과 확인.

6. 안전성	의사결정도	현재 국내외 일반식품으로 상용 섭취중인 제품으로, 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상섭취량보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 '나'에 해당
	섭취 근거	<p><인정현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 국내 : 식품공전에 '줄'로 등재 ◦ 대만 : 식품 영양 데이터베이스에 야채로 등재 ◦ 중국 : 의약품 데이터베이스에 고장초 등록되어 있으며, 식용 가능 원료로 등재 ◦ 일본 : 고장초 잎 및 줄기는 일본 FOSHU 후생 노동성 식품 안전부 [2013.7 판]에 기타 야채로 등재 <p><사용현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 국내 : 일반식품으로 국내에서 판매 ◦ 대만, 중국, 일본 등 : 신청원료 함유 제품이 대량유통
	안전성 정보	◦ 부작용에 대한 사례 발견되지 않음.
	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 250 mg/일 - 국내 사용제품에서 유사원료의 일일 섭취량 : 6~15 g/일 - 국외(일본) 사용제품에서 유사원료의 일일 섭취량 : 5 g/일 ◦ 고장초 추출물 원물로 환산 시, 1.25 g/일에 해당 ◦ 고려립상의전 문헌에 의한 통상섭취량 : 8~10 g/일 ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등) 3배 이내임.
	인체적용 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 인체적용시험 최종보고서 결과 자료 - 이상반응사례(피부 상태 및 진신 상태)에 대한 부작용 없음. - 혈액학적 안전성 지표에 대한 부작용 및 독성이 나타나지 않음.
	독성 시험	해당 없음.
	기타 사항	없음.
	섭취 시 주의사항	없음.
7. 기능성	신청 기능성	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강 유지
	신청 일일섭취량	효소처리 고장초 추출분말로서 250 mg/일
	시험관시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 인체유래 섬유아세포(HDF), 시험물질 효소처리 고장초 추출분말 0.1, 0.5, 1, 10, 25, 50, 100, 250 µg/ml, 트리신 10, 50, 100 ng/ml - UVB에 의해 유도된 HDF의 세포 독성이 효소처리 고장초 추출분말 25 µg/ml, 트리신 10 ng/ml에서부터 회복(p<0.05) - UVB에 의해 유도된 HDF의 콜라겐 합성 저해능이 효소처리 고장초 추출분말 0.1 µg/ml, 트리신 10 ng/ml에서부터 회복(p<0.05) - UVB에 의해 유도된 HDF의 MMP-1, 2, 3, 9, 13 분비 증가량이 효소처리 고장초 추출분말 0.5 µg/ml, 트리신 10 ng/ml에서부터 억제 (p<0.05) - UVB에 의해 유도된 HDF의 HO-1, SOD1 발현 저해능이 효소처리 고장초 추출분말 10 µg/ml, 트리신 10 ng/ml에서부터 회복(p<0.05) - UVB에 의해 유도된 HDF의 NF-κB, AP-1 활성 증가가 효소처리 고장초 추출분말 10 µg/ml, 트리신 10 ng/ml에서부터 감소(p<0.05) - UVB에 의해 유도된 HDF의 MAPK, AKT 활성 증가가 효소처리 고장초 추출분말 10 µg/ml, 트리신 10 ng/ml에서부터 감소(p<0.05) <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 마우스 유래 대식세포(RAW 264.7), rat 유래 호염기 세포(RBL-2H3), 트리신 0.1, 1, 5, 10 µg/ml - LPS에 의해 유도된 RAW 2647 세포의 NO 생성량이 트리신 10 µg/ml 처리 시, 감소(p<0.05) - LPS에 의해 유도된 RBL-2H3 세포의 β-hexosaminidase 생성량 증가가 트리신 10 µg/ml 처리 시, 감소(p<0.05)
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ SKH-1 누드 마우스(6주령), 시험물질 효소처리 고장초 추출분말 50, 150, 300 mg/kg, 트리신 0.3 mg/kg (wt/wt), 14주, 경구투여 - 현미경을 통한 형태학적 관찰에서 대조군에 비해 시험물질 투여군에서 1주부터 주름 개선 효과가 확인되었고, 10주 동안 투여 시에도 주름 개선효과가 나타남. - SILFLO를 이용한 피부 관찰에서 대조군에 비해 시험물질 투여군에서 1주부터 주름 개선 효과가 확인되었고, 10주 동안 투여 시에도 주름 개선효과가 나타남. - 10주간 효소처리 고장초 추출분말 투여 시, H&E 염색을 통한 조직면역화학적 실험을 통해 표피 과형성 및 주름 갯수가 대조군에 비해 시험물질 투여군에서 개선 효과가 나타남. - 10주간 효소처리 고장초 추출분말 투여 시, Masson's trichrome 염색을 통한 조직

		<p>면역화학적 실험을 통해 교원섬유(collagen fiber)가 대조군에 비해 시험물질 투여군에서 개선 효과가 나타남.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10주간 효소처리 고장초 추출분말 투여 시, western blotting을 통한 피부 조직 내, collagen 1A 발현양은 대조군 대비 시험물질 투여군에서 증가($p<0.05$), MMP-1, MMP-13 발현양은 대조군 대비 시험물질 투여군에서 감소 효과가 나타남($p<0.05$). <p>[유사원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ <i>Zip13</i> KO mice (4주령), 시험물질 고장초 추출물 사료 내 30% 함유, 12주, 사료를 통한 경구투여 - 고장초 추출물을 섭취 시, 콜라겐 섬유량이 피부 조직 내에서 증가 ($p<0.05$)
	인체적용 시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 건강한 성인($n=80$명(전체 94명 중 대상자 제외 기준에 해당하는 14명 제외)), 250 mg/일, 12주(randomized, placebo controlled, double blinded) - 주름 개수, 주름 면적 유의적 감소(대조군 대비, $p<0.05$) <p>※인체적용시험기관 : 경희대학교 피부생명공학센터, 시험책임자 : 박철중</p>
	기타 사항	- 없음.

(나) 개별인정 신청 접수증

2018. 11. 16. 식품안전나라

접수증

접수번호: 20181017050 접수일시: 2018.11.14

신청사유명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
신청번호	5585145
신청인 (대표 또는 대리인)	김태영(20100017007)
제시예정일	2019.05.09
제시주관부서	식품의약품안전평가원 영양기능영양과
안내사항	본 방문신청의 경우에는 교정료 없이 하는 민원실에 본 접수증을 제출하셔야 하며, 본문의 신청번호는 대리인만 접수하는 방문신청 제시서류에 인공자국을 수정하실 수 없습니다.
수수료	1,000,000

위 신청의 민원을 접수하였습니다.

그림 158. 개별인정 신청 접수증

(17) 마케팅

(가) VITA FOODS EUROPE (Geneva) 참가 보고서

① 전시회 리뷰

㉠ 참가방식: 직접, 단독참가

㉡ 참가목적: 신제품 홍보, 신규 Distributor 확보, 해외고객/해외공급사 대면미팅

㉢ 부스번호: K110

㉣ 부스사진



(나) VITA FOODS ASIA (Singapore) 참가 보고서

① 전시회 리뷰

㉠ 참가방식: 직접, 단독참가

㉡ 참가목적: 신제품 홍보, 신규 Distributor 확보, 해외고객/해외공급사 대면미팅

㉔ 부스번호: F19

㉕ 부스사진



(다) HI JAPAN (Tokyo) 참가 보고서

① 전시회 리뷰

㉔ 참가방식: 직접, SAN-F와 공동 참가

㉕ 참가목적: 신제품 홍보, 신규 Distributor 확보, 해외고객/해외공급사 대면미팅

㉖ 부스번호: 1-212

㉗ 부스사진



(18) 혼합소재 선정

(가) 억새 및 갈대 추출물의 피부건강 관련 벼과식물 혼합소재 가능성 시험

① 억새 및 갈대 추출물로 부터 물질분리

㉔ 억새 이차대사산물 분리

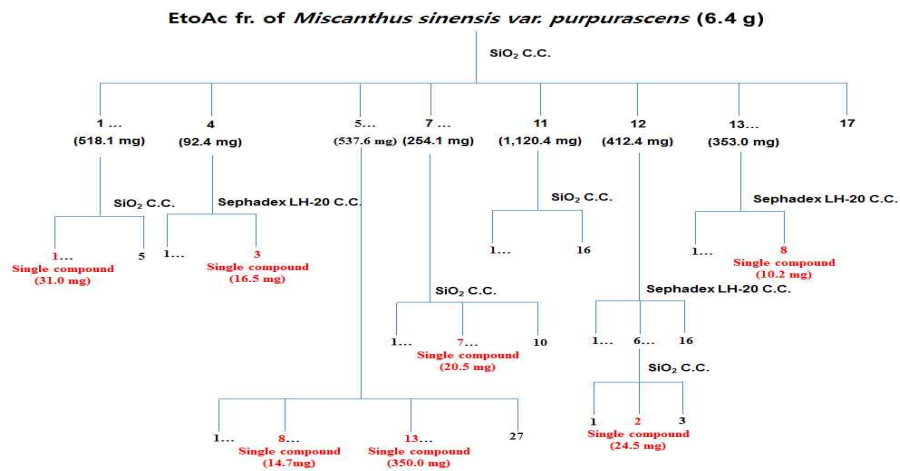


그림 162. EtOAc fr.로부터 분리 과정

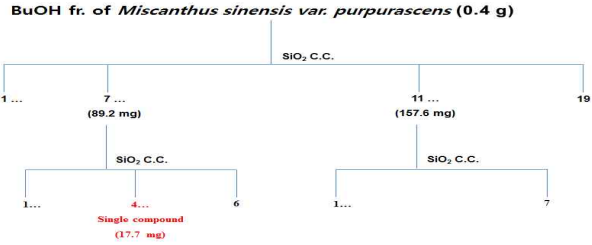


그림 163. BuOH fr.로부터 분리 과정

㉞ 갈대 이차대사산물 분리

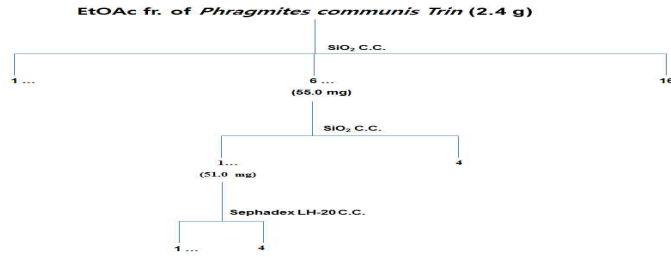


그림 164. EtOAc fr.로부터 분리 과정

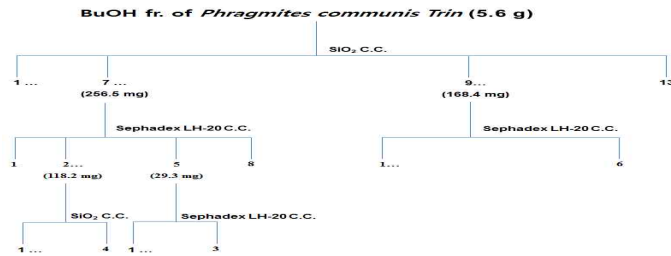


그림 165. BuOH fr.로부터 분리 과정

② 역새 및 갈대로부터 분리 된 이차대사산물 구조규명 결과

㉞ 역새 이차대사산물 구조규명

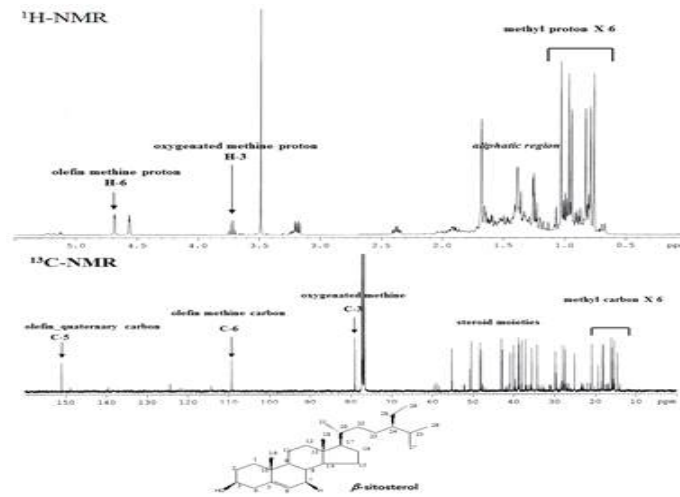


그림 166. 역새EtOAc fr._4_3

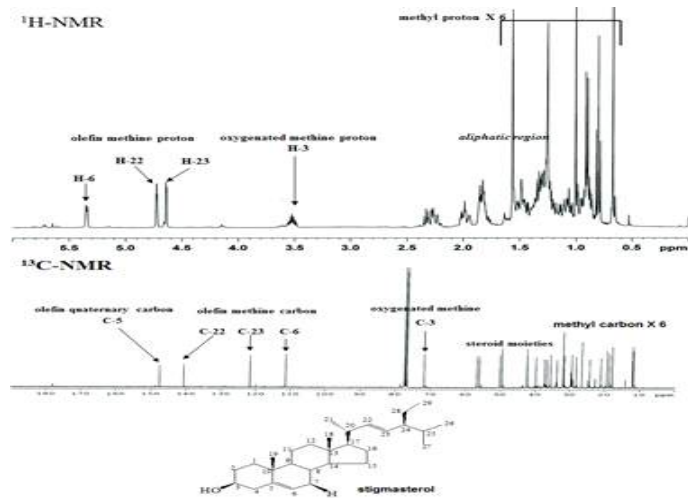


그림 167. 역새EtOAc fr._7_7

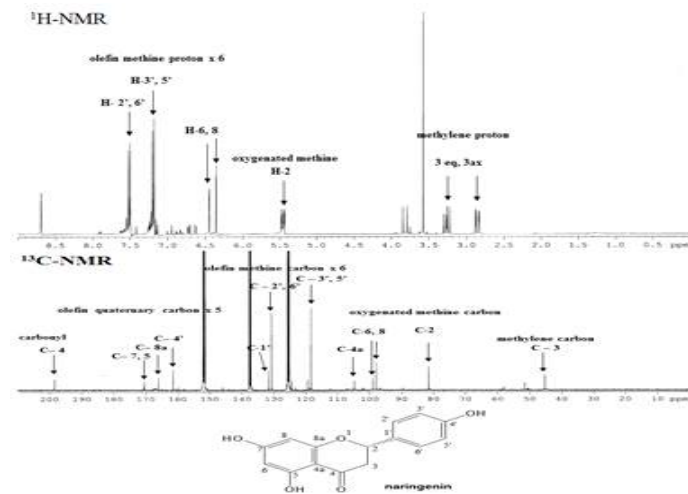


그림 168. 역새EtOAc fr._12_6_2

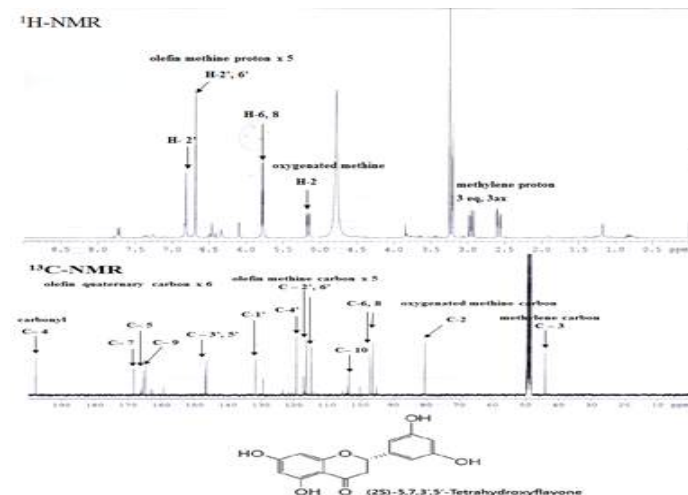


그림 169. 역새EtOAc fr._13_8

③ 역새 및 갈대로부터 분리한 물질의 항염증 효능 시험 결과

㉞ 역새로부터 분리한 물질에 대한 RAW264.7 macrophage의 항염증 효과

- 억제 분리물질들은 NO 생성 억제 효능이 없는 것으로 확인.

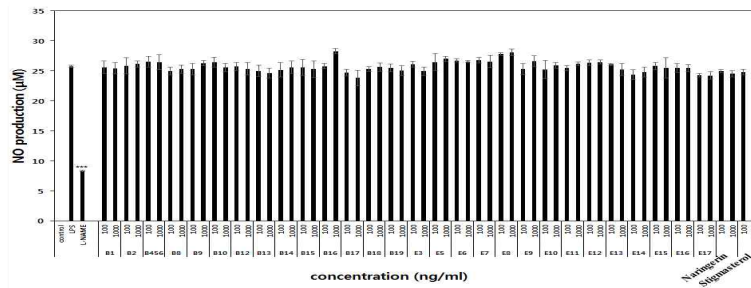


그림 170. 억제로부터 분리한 물질들의 NO 억제능

- 결론

: 경희대학교에서 분리한 억제 추출물 물질 28종 및 지표성분으로 파악되는 naringerin, stigmasterol의 항염증 효능 평가 결과, 전 농도에서 항염증 효과가 없음을 확인하였기 때문에, 혼합소재로써 억제를 배제하였음.

(나) 미강(쌀겨) 추출물의 피부건강 관련 베타카로틴 혼합소재 가능성 시험

- ① 미강(쌀겨)의 유산균 발효
- ② 생균수 측정 결과

	생균수(CFU/ml)	발효 접종 균수
<i>Lactobacillus plantanum</i>	13.5X10 ⁹	1X10 ⁸ CFU/ml
<i>Lactobacillus brevis</i> M2	21X10 ⁹	1X10 ⁸ CFU/ml

- 각 균주의 생균수를 측정한 후 동일 농도로 희석하여 미강배지에 5%씩 접종하였음.

- ③ 전분분해 효소처리에 따른 pH와 성장 변화



그림 171. 효소처리에 따른 전분분해 육안 관찰

전분 분해효소 처리	pH
전	6.29
후	6.06

- 전분 분해효소 처리 후 pH 감소와 미강의 전분이 분해되어 탁도가 달라짐.
- 전분 분해효소 처리의 궁극적인 목적은 필터 시 막힘 문제를 해결하기 위함.

- ④ 발효에 따른 pH와 생균수 변화

발효 전 6.06		pH	
시간(h)	L-glutamic acid	<i>L.brevis</i>	<i>L.plantarum</i>
0	0.5	5.41	5.19
	1	4.55	4.68
	3	3.66	3.53
24	0.5	3.96	3.45
	1	3.92	3.47
	3	3.49	3.39
48	0.5	3.63	3.31
	1	3.66	3.31
	3	3.37	3.29
72	0.5	3.71	3.30
	1	3.61	3.28
	3	3.38	3.20
96	0.5	3.62	3.28
	1	3.66	3.23
	3	3.25	3.14

- L-glutamic acid 첨가량에 상관없이 배양 시간에 따라 pH가 감소함이 관찰되었음.
- 배양에 따른 pH 감소는 수소이온 농도의 증가를 가져와 GAD에 의한 glutamate의 GABA 전환 시 필요한 proton을 제공해주게 됨. 따라서 L-glutamic acid 존재 하에서 필요한 proton이 공급되면 GAD는 L-glutamic acid를 이용하여 GABA를 생성하게 될 것임. GABA 생성과 더불어 proton이 감소하면 pH는 다시 증가하게 될 것임.

㉔ 생균수 시험

L-glutamic acid	균주	발효 시간 별				
		0	24	48	72	96
0.5g	<i>L. brevis</i> M2	4X10 ⁷	35X10 ⁸	10X10 ⁸	20X10 ⁸	15X10 ⁸
1g			50X10 ⁸	20X10 ⁸	10X10 ⁸	20X10 ⁸
3g			1.3X10 ⁸	1X10 ⁸	3.5X10 ⁸	2X10 ⁸
0.5g	<i>L. plantarum</i>	2X10 ⁷	20X10 ⁸	55X10 ⁷	1X10 ⁷	*
1g			20X10 ⁸	15X10 ⁸	*	*
3g			10X10 ⁷	40X10 ⁷	*	30X10 ⁷

* 1X10⁹cells/CFU이하

- 발효 진행 시간별로 생균수 측정한 결과 0~24시간에서 대수증식기를 지나 정지기에 접어든 것으로 확인됨.
- 발효 전 L-glutamate 첨가량에 따라 pH가 감소한 후 pH 보정이 되지 않아 낮은 pH 상태에서 유산균의 성장이 저해 되었을 가능성이 있을 것으로 예상됨. 유산균 성장 최적 조건이 아니었을 것으로 예상됨. 공정상 pH 보정이 필요함을 확인하였음.
- 적정 균주가 선정되면 추후 균주의 최적 성장을 측정을 위한 생장곡선 측정할 예정.

㉕ HPLC를 이용한 GABA 생성함량 분석

㉖ *L. brevis* M2에 의한 GABA 생산에서 L-glutamate와 GABA 함량변화

- *L. brevis* M2에 의한 미강발효물 중 GABA 생산에 관한 그래프를 나타내었음. 발효 시간이 지날수록 L-glutamate가 감소하여 소비되었음을 확인할 수 있음. 그러나 L-glutamate 감소 대비 GABA 생성량이 크지 않은 것으로 보여 GABA가 아닌 다른 물질로 전환되었을 것으로 예상.

- GABA 생성량은 L-glutamate 1g 첨가하였을 때 발효시간에 따라 가장 많이 증가함을 확인하였음. pH 보정하여 재실험하여 결과 확인할 필요가 있음.
- 0hr조건에서도 GABA 생성량이 확인되어 추가 확인시험을 진행하였음. 기존 미강배지에는 0.8mg/g의 GABA가 함유되어 있었음을 확인하였고 균 접종 후 Autoclave 하였던 샘플이 0hr이지만 GABA 생성이 되었음. L-glutamate가 Autoclave 하여 전환되었는지 분석한 결과 Not Detected 되었음. 미생물 배양액과 배지 내 0.2mg 소량의 L-glutamate 함량이 포함되어 있었으나 0hr 결과에 영향을 미칠 정도는 아님.

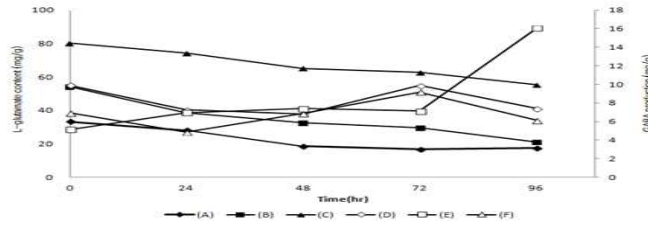


그림 172. *L. brevis* M2에 의한 GABA 생산에서 L-glutamate와 GABA 함량변화

GABA production by *L. brevis* M2 in rice bran broth at different time and MSG concentrations. (A)(B)(C) for L-glutamate contents. (D)(E)(F) for GABA production. (A) and (D) ; L-glutamate 0.5g, (B) and (E) ; L-glutamate 1g, (C) and (F) ; L-glutamate 3g.

㉠ *L. plantarum*에 의한 GABA 생산에서 L-glutamate와 GABA 함량변화

- *L. plantarum*에 의한 미강발효물 중 GABA 생산에 관한 그래프를 나타내었음. 발효 시간이 지날수록 L-glutamate가 감소하여 소비되었음을 확인할 수 있음. 그러나 L-glutamate 감소 대비 GABA 생성량이 크지 않은 것으로 보여 GABA가 아닌 다른 물질로 전환되었을 것으로 예상.
- GABA 생성량은 L-glutamate 첨가량과 상관없이 발효 시간이 지날수록 감소함.

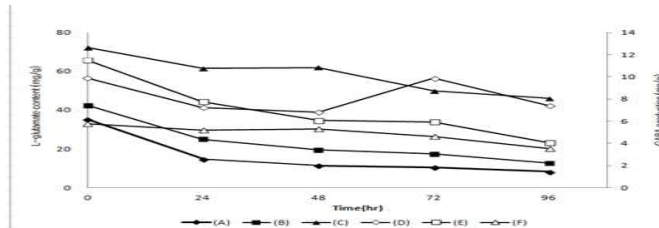


그림 173. *L. plantarum*에 의한 GABA 생산에서 L-glutamate와 GABA 함량변화

GABA production by *L. plantarum* in rice bran broth at different time and MSG concentrations. (A)(B)(C) for L-glutamic acid contents.(D)(E)(F) for GABA production. (A) and (D) ; MSG 0.5g, (B) and (E) ; MSG 1g, (C) and (F) ; MSG 3g.

㉠ L-glutamate와 GABA 함량 분석 결과 정리

검체명	잔여 Glutamate (mg/g)	GABA 함량 (mg/g)	전환율 (%)	검체명	잔여 Gutamate 함량(mg/g)	GABA 함량(mg/g)	전환율 (%)
균 0% MSG 0%	2.0033	0.8305	-	배지 단일	3.3323	0.2693	-

미강발효 Enzyme O	2.2360	0.8764	-	미강발효 Enzyme X	3.8929	2.0028	-
GABA_500ppm	N.D	900.6774	-	MSG_0.5g	435.0920	N.D	-
전배양액 단일	3.0530	0.2485	-	MSG_0.5g_ Autoclave	393.8479	N.D	-
전배양액+MSG	414.0237	N.D	-	전배양액+MSG _Autoclave	446.1377	N.D	-
<i>L. brevis</i> M2 균주 발효 후				<i>L. plantarum</i> 균주 발효 후			
brevis_0hr_MS G 0.5g	33.2081	9.8935	166.50	plantrum_0hr_MS G 0.5g	35.1424	9.5997	239.54
brevis_24hr_M SG 0.5g	28.0095	7.2466	65.05	plantrum_24hr_M SG 0.5g	14.7685	6.0104	24.65
brevis_48hr_M SG 0.5g	18.4735	6.8255	33.01	plantrum_48hr_M SG 0.5g	11.4819	4.9570	17.92
brevis_72hr_M SG 0.5g	16.7056	9.8905	44.07	plantrum_72hr_M SG 0.5g	10.4653	4.4404	15.48
brevis_96hr_M SG 0.5g	17.5310	7.3998	34.23	plantrum_96hr_M SG 0.5g	8.3182	3.3457	10.85
brevis_0hr_MS G 1.0g	54.3233	5.1390	24.44	plantrum_0hr_MS G 1.0g	42.5140	11.5027	35.03
brevis_24hr_M SG 1.0g	38.7314	6.9719	19.04	plantrum_24hr_M SG 1.0g	24.9690	7.7585	15.40
brevis_48hr_M SG 1.0g	32.5364	7.3804	17.24	plantrum_48hr_M SG 1.0g	19.3929	6.0683	10.84
brevis_72hr_M SG 1.0g	29.4847	7.1283	15.54	plantrum_72hr_M SG 1.0g	17.3499	5.9293	10.22
brevis_96hr_M SG 1.0g	21.0936	16.0467	29.58	plantrum_96hr_M SG 1.0g	12.6000	4.0651	6.48
brevis_0hr_MS G 3.0g	80.3102	6.9664	6.00	plantrum_0hr_MS G 3.0g	72.4090	5.7468	4.63
brevis_24hr_M SG 3.0g	74.2657	4.8632	3.98	plantrum_24hr_M SG 3.0g	61.5761	5.2067	3.86
brevis_48hr_M SG 3.0g	65.1031	6.8909	5.25	plantrum_48hr_M SG 3.0g	62.0002	5.2868	3.93
brevis_72hr_M SG 3.0g	62.7763	9.1846	6.87	plantrum_72hr_M SG 3.0g	49.8032	4.6108	3.14
brevis_96hr_M SG 3.0g	55.2141	6.1429	4.35	plantrum_96hr_M SG 3.0g	46.1027	3.5240	2.34

- 결론

- : 발효 시간이 지남에 따라 pH가 감소하였으나 L-glutamate 첨가량에 따라 pH가 감소한 상태에서 발효가 진행되어 유산균 성장 최적 pH가 아니었을 것으로 예상됨.
- : 생균수 역시 발효가 진행되면서 감소함을 보임.
- : 발효가 진행됨에 따라 L-glutamate 함량이 감소하는 반면 GABA는 크게 생성됨을 확인되지 않았음.
- : 우선적으로 GABA의 증감에 따른 활성을 확인해 보기 위해 아래와 같이 시험시료를 제조하여 계명대학교 산학협력단에 활성시험을 요청하고, 활성 여부에 따라 추가적인 공정개발의 진행 여부를 판단.

구분	Sample 에 포함되는 비율(%)					
	1	2	3	4	5	6
고장초 추출물	100	0	0	0	50	50
미강 추출물	0	100	0	0	50	0
미강발효추출물 (GABA함량 증가)	0	0	100	0	0	50
미강 에탄올 추출물	0	0	0	100	0	0

- : 고장초 효소처리 추출물은 동물시험에 사용한 샘플과 동일.
- : 미강 추출물은 미강 원료 100g에 정제수 1kg을 투입하고 4시간 추출.
- : 미강 발효 추출물 (GABA 함량 높은 것)은 미강 100g에 정제수 1kg을 투입하고

L-glutamic acid 1% 첨가하고 *L. brevis* M2로 96hr 발효.

: 미강 에탄올 추출물은 미강 100g에 50%발효주정 1kg을 투입하고 4시간 추출.

③ 미강(쌀겨)의 효능평가

㉞ 고장초 미강 혼합소재에 대한 RAW264.7 macrophage의 항염증 효과

- 전 농도에서 독성은 발견되지 않았으며, 고장초 주정추출물, 미강 에탄올 추출물에서 농도의존적으로 항염증 효능이 나타남. 하지만, 미강 열수 추출물, 고장초 미강 혼합추출물, 미강 발효물, 고장초 미강 발효물에서 항염증 효능이 나타나지 않았음. 원인은 미강 에탄올 추출물을 발효에 사용한 것이 아니라 미강 열수 추출물을 사용하였기 때문으로 사료됨.

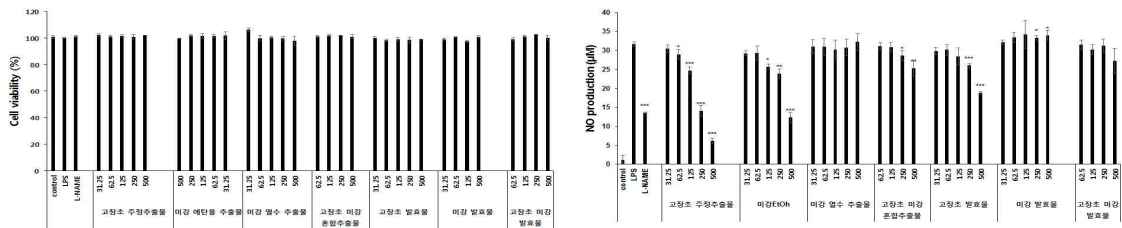


그림 174. 고장초 미강 혼합소재의 RAW264.7 cell viability 및 NO production 억제능 측정 결과

㉟ 고장초 미강 혼합소재에 대한 B16-F0 melanocyte의 미백 효과

- 전 농도에서는 독성이 나타나지 않았으며, 멜라닌 생성 억제 및 티로시나아제 억제 효과가 전 시료에서 농도의존적으로 나타남을 확인함. 따라서, 고장초와 미강 혼합소재의 미백 효과에 대한 시제품 타게팅이 가능할 것으로 사료됨.

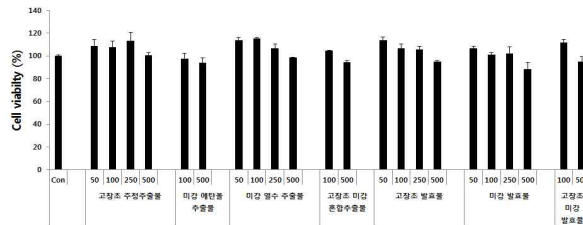


그림 175. 고장초 미강 혼합소재의 B16-F0 cell viability 측정 결과

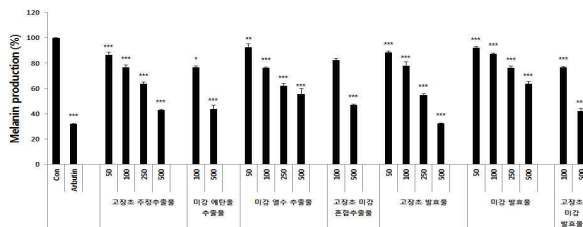


그림 176. 고장초 미강 혼합소재의 Melanin production 억제능 측정 결과

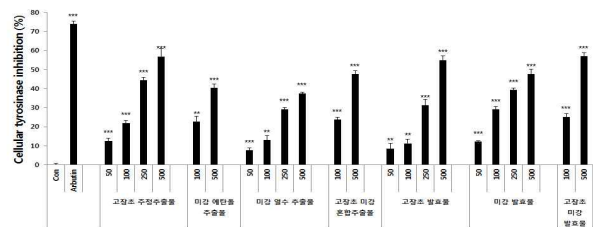


그림 177. 고장초 미강 혼합소재의 Cellular tyrosinase inhibition 효능 측정 결과

㊱ 고장초 미강 혼합소재에 대한 RBL-2H3 mast cell의 항알러지 효과

- 전 시료에서의 독성은 나타나지 않았으며, 미강 에탄올 및 열수 추출물에서의 β

-hexosaminidase 방출 억제 효과가 측정되지 않았음. 또한, 고장초 미강 발효물에서의 감소는 고장초 고유의 β -hexosaminidase 방출 억제라고 판단됨.

- 따라서, 고장초 미강 혼합소재의 민감성 피부(항알러지) 식품 소재로서의 활용성이 낮다고 평가됨.

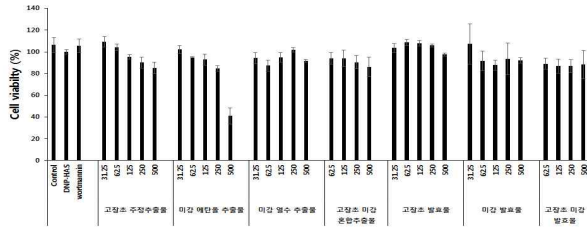


그림 178. 고장초 미강 혼합소재의 RBL-2H3 mast cell viability 측정 결과

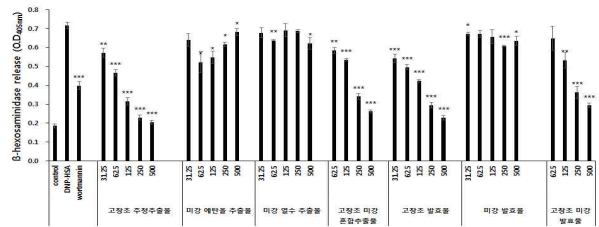


그림 179. 고장초 미강 혼합소재의 β -hexosaminidase release 억제능 측정 결과

③ 미강(쌀겨) 추출물로 부터 물질분리

㉠ 미강(쌀겨) 이차대사산물 분리

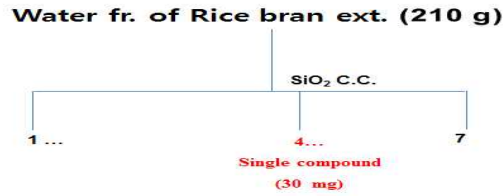


그림 180. water fr.로부터 분리 과정

㉡ 미강(쌀겨)의 이차대사산물 구조규명

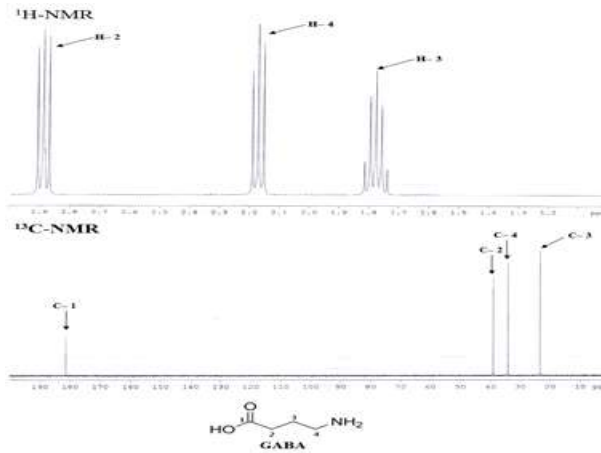


그림 181. 미강 water fr._3

(다) 조릿대 및 밀싹 추출물의 피부건강 관련 베타아민 혼합소재 가능성 시험

① 조릿대와 밀싹의 추출 수율 결과

- 두 원재료 모두 50% 주정 추출물에서 수율이 더 증대하였으며 특히 밀싹의 경우 그 증가폭이 높음.

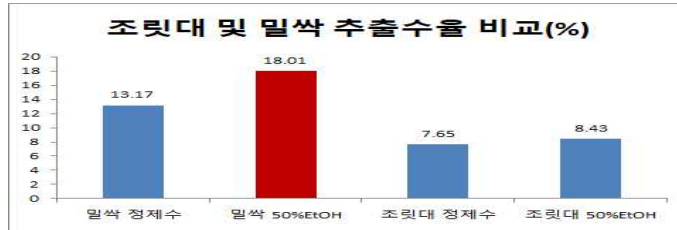


그림 182 조릿대 및 밀싹 추출물의 수율 비교

② 조릿대 및 밀싹 추출물 항알러지 효능 확인

㉠ RBL-2H3 mast cell에 대한 조릿대 및 밀싹 추출물의 세포생존율 측정 결과

- 밀싹 에탄올 추출물에서 독성이 나타남. 따라서, 밀싹 에탄올 추출물은 소재로써 가능성이 없다고 판단됨.

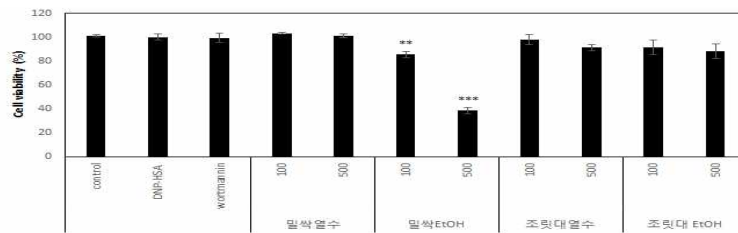


그림 183. 조릿대 및 밀싹추출물의 RBL-2H3 mast cell viability 측정 결과

㉡ 조릿대 및 밀싹 추출물의 RBL-2H3 cell β -hexosaminidase release 억제능 측정 결과

- 밀싹 에탄올 추출물과 조릿대 에탄올 추출물에서 항알러지 효능 확인. 하지만, 밀싹 에탄올 추출물은 세포 독성으로 인해 사용이 불가능하다고 판단되므로 조릿대 에탄올 추출물을 혼합소재로 사용하기를 권장함.

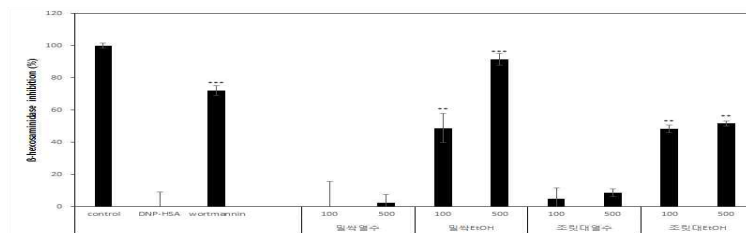


그림 184. 조릿대 및 밀싹 추출물의 β -hexosaminidase release 억제능 측정 결과

③ 조릿대 및 밀싹 추출물 항염증 효능 확인

㉠ LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 대한 조릿대 및 밀싹 추출물의 세포생존율 측정 결과

- 모든 추출물에서 독성이 나타나지 않았음.

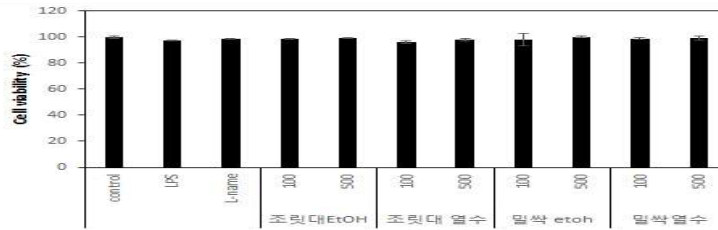


그림 185. 조릿대 및 밀착 추출물의 RAW264.7 cell viability 측정 결과

㉔ 조릿대 및 밀착 추출물의 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포의 NO 측정 결과

- LPS에 의해 염증이 유도된 군에 비해 조릿대 에탄올 추출물(100 µg/ml)에서 29.26%, 500 µg/ml에서 95.1%의 NO 생성 억제능과 밀착 에탄올 추출물(100 µg/ml)에서 14.52%, 500 µg/ml에서 56.44%의 NO 생성 억제능)에서 농도가 증가함에 따라 염증이 완화됨을 확인함. 밀착 열수 추출물의 경우, LPS가 유도된 군보다 NO 생성이 더 증강된 것을 확인할 수 있는데, 이는 밀착 열수 추출물이 면역 증진 효능이 있기 때문에 NO 생성능이 추가적으로 증강된다고 판단됨. L-NAME는 iNOS의 단백질을 억제하는 물질로써 positive control로 사용함(250 µM에서 63.18%의 NO 생성 억제능).

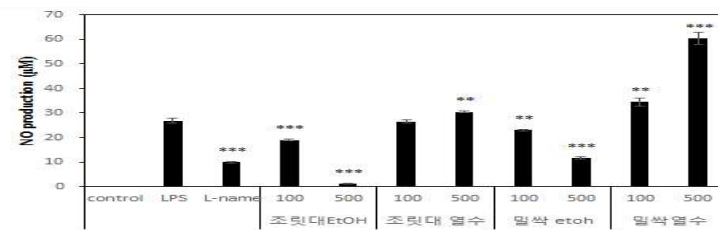


그림 186. 조릿대 및 밀착 추출물의 NO production 억제능 측정 결과

㉕ 조릿대 및 밀착 추출물의 RAW264.7 microphage에 대한 세포 생존을 측정 결과

- 모든 추출물에서 독성이 나타나지 않았음.

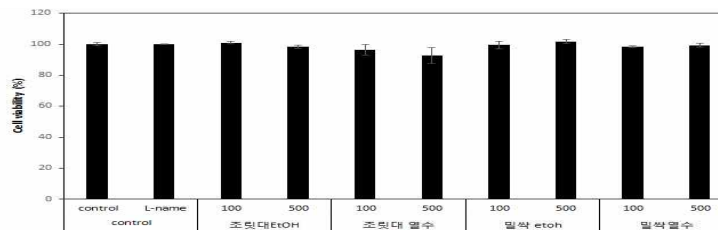


그림 187. 조릿대 및 밀착 추출물의 RAW264.7 cell viability 측정 결과

㉖ 조릿대 및 밀착 추출물의 nitric oxide 생성 측정 결과

- 조릿대 열수 추출물(100 µg/ml에서 26.06 µM, 500 µg/ml에서 23.31 µM의 NO 생성능)과 밀착 열수 추출물(100 µg/ml에서 34.06 µM, 500 µg/ml에서 60.71 µM의 NO 생성능)에서 농도가 증가함에 따라 면역 증진 효능이 나타남.

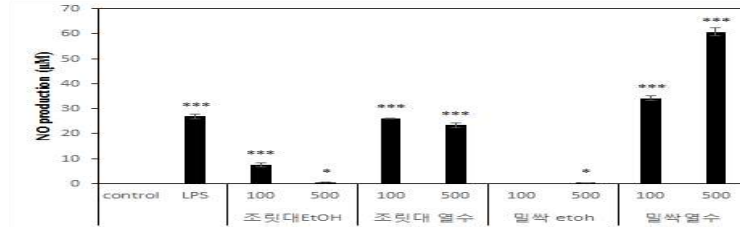


그림 188. 조릿대 및 밀싹 추출물의 NO production 억제능 측정 결과

(라) 결론

- ① 억제 및 갈대 추출물은 항염증 효능이 없는 것으로 보아 주름, 항알러지 등의 효능이 나타날 가능성이 희박하여 고장초와 혼합소재로써 부적합하다고 판단함.
- ② 미강(쌀겨)의 추출물은 에탄올 추출물에서 미백의 효능이 나타났으나 고장초에 비해 현저히 낮은 활성을 띄고 항염증 효능이 없는 것으로 보아 주름, 항알러지 등의 효능이 나타날 가능성이 희박하여 고장초와 혼합소재로써 부적합하다고 판단함.
- ③ 밀싹 에탄올 추출물에서 항알러지 효능은 나타났지만 세포독성이 나타나고 밀싹 열수 추출물은 면역 증강 효능은 있으나 항염증 효능이 나타나지 않았으므로 혼합소재로써 활용이 불가능할 것으로 사료되며, 조릿대 에탄올 추출물은 항알러지, 항염증 효능에 대한 검증이 완료되었으므로 혼합소재로써 타당하다고 판단됨.

(19) 혼합소재 기능(지표)물질 선정 및 품질관리를 위한 시험법 개발

(가) 기능(지표)물질 분리 선정을 위한 문헌 조사

- ① 조릿대의 활성효능 관련 문헌
 - ㉠ 조릿대 관련 문헌 조사 결과 조릿대 줄기와 잎의 추출물이 항산화 및 항균활성을 갖는다는 것을 확인하였으며 효소처리고장초추출물의 기전 중 항산화 관련 기전도 있었으므로 시너지 효과의 가능성을 확인하였음.
 - ㉡ 조릿대 내에 *p*-coumaric acid가 함유되어있다는 문헌을 확인하였으며 이 물질이 미백에 효능이 있다는 또 다른 문헌의 내용도 확보함.
- ② 시중에서 확보가 용이한 물질로 선정
 - ㉢ *p*-coumaric acid는 1 g에 21,000원으로 저렴하게 구매가 가능하며 primary reference standard 로 50 mg에 406,000원으로 타 표준품에 비해 저렴하게 구매가 가능함.
 - ㉣ 조릿대 추출물에 함유되어 있으며 미백에도 효능이 있고 시중에서 구매가 용이한 *p*-coumaric acid를 지표물질로 선정함.

(나) 조릿대 추출물로부터 이차대사산물 분리 및 구조규명

- ① 조릿대 EtOAc fr.로부터 이차대사산물 분리

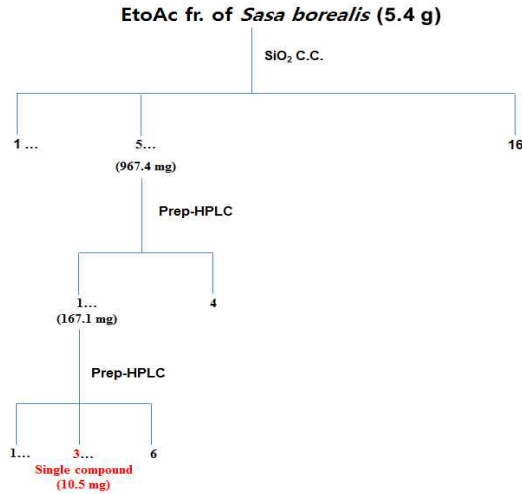


그림 189. EtOAc fr.로부터 분리 과정

② 조릿대 이차대사산물 구조규명

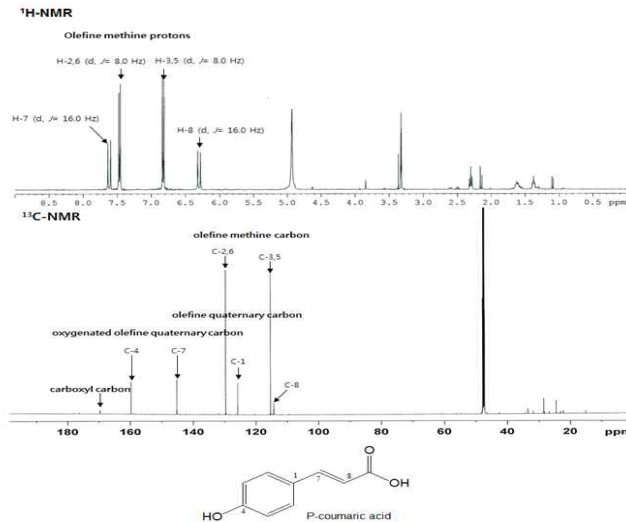


그림 190. 조릿대 EtOAc fr._5_1_3

(다) 품질관리를 위한 기능(지표)물질 시험법 개발

① 분석방법

㉞ 본 연구소에서 타 연구에 활용하였던 *p*-coumaric acid 분석방법을 조릿대 추출물에 맞추어 변형한 방법으로 개발하였음.

Instrument	Agilent Technologies 1260 (HPLC)		
Column	Poroshell 120EC-C18 (4.6 x 50 mm, 2.7 μm)		
Solvent	A=0.1% H ₃ PO ₄ in DW, B=Acetonitrile		
	Time/min	A(%)	B(%)
	0	85	15
	5	85	15
	5.1	20	80
	7	20	80
7.1	85	15	
10	85	15	
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection vol.	4 μL		
Wave length	280 nm		
temp.	40 °C		

② 분석결과

㉑ *sasa borealis* Chromatogram

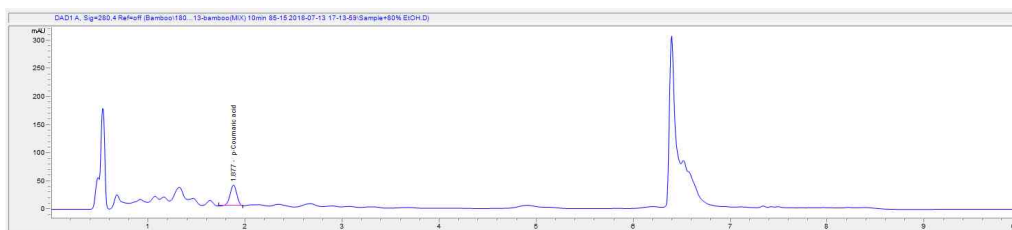


그림 191. 조릿대 추출물로부터 *p*-coumaric acid 분석한 chromatogram

㉒ Spiking test Chromatogram

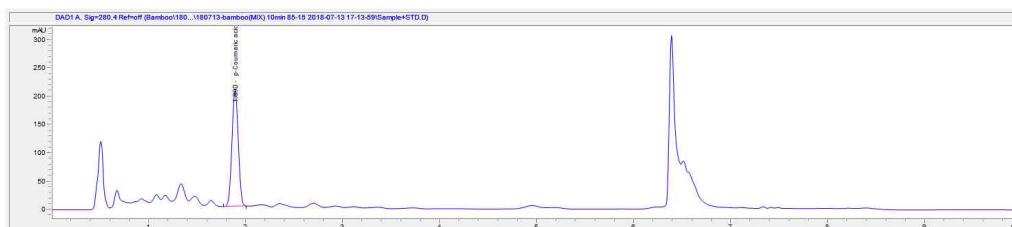


그림 192. 조릿대 추출물에 *p*-coumaric acid를 첨가한 시료를 분석한 chromatogram

㉓ Spiking test Chromatogram overlap

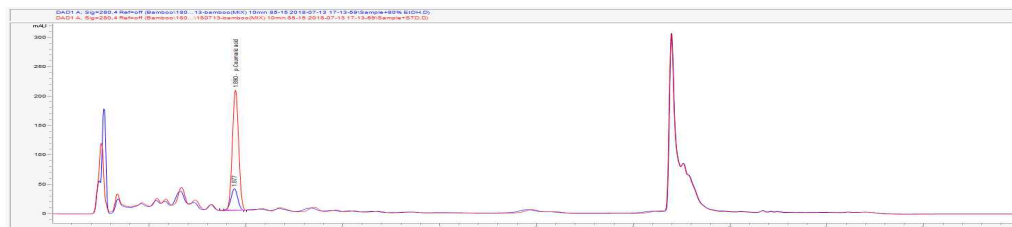


그림 193. ㉑와 ㉒의 chromatogram overlap

㉔ 분석결과 Table

	Rt	Area	Height	Symmetry	Tail Factor
<i>sasa borealis</i>	1.877	180.7	36.9	1.058	0.966
Spiking sample	1.890	928.1	205.6	0.966	1.023

③ 결론

- ㉞ peak symmetry 0.966 ~ 1.058 로 peak의 대칭성이 잘 나타남.
- ㉟ Tailing Factor 0.966 ~ 1.023 fh peak의 분리능이 우수함.
- ㊱ Retention Time(RT) 값의 RSD(%)가 0.4%로 안정적임.
- ㊲ 위 분석법은 고장초 추출물로부터 *p*-coumaric acid를 분석함에 있어 적합함.

(20) 혼합소재 추출공정 최적화

(가) 추출방법 설정조건

① 추출용매의 농도비율별 시험

㉞ 수율 비교

- 추출 수율은 50% 주정조건에서 가장 높았으며 30, 70% 주정조건 또한 차이가 크지 않음.



그림 194. 용매농도에 따른 수율 변화

㉟ 유효성분의 함량 비교

- 추출용매의 주정 농도가 높아질수록 유효성분의 함량이 높아지는 경향을 보임.

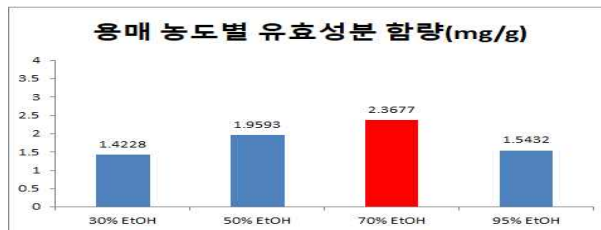


그림 195. 용매농도에 따른 *p*-coumaric acid 함량 변화

㊱ 결론

- 수율은 13.07%로 50% 주정 추출물이 가장 높으나 30% 주정 추출물은 12.82%, 70% 주정 추출물도 12.52%로 크게 차이는 없음.
- 유효성분 분석 결과, 70% 주정 추출물에서 *p*-coumaric acid의 함량이 가장 높음.
- 위의 결과를 종합하여 용매는 70%의 주정으로 선정함.

② 추출시간의 변화 시험

㉞ 수율 비교

- 추출 시간이 증가함에 따라 수율이 비례하여 증가하지만 6시간과 8시간의 효율은 4시간과 6시간의 효율의 절반정도로 확인됨.

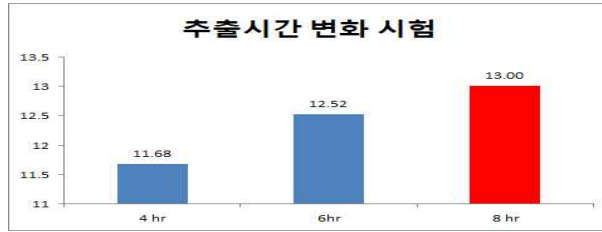


그림 196. 추출시간에 따른 수율 변화

㉠ 유효성분의 함량 비교

- 추출 시간이 증가함에 따라 유효성분 함량도 증가하지만 6시간 이후로는 감소함.

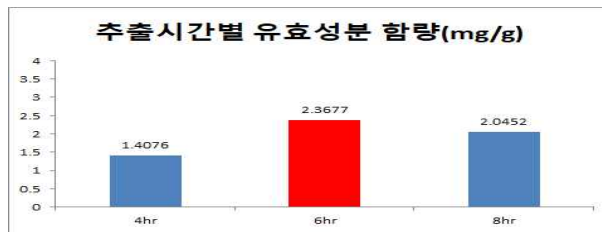


그림 197. 추출시간에 따른 *p*-coumaric acid 함량 변화

㉡ 결론

- 수율은 13.00%로 8시간 추출물이 가장 좋으나 6시간과 8시간 사이의 효율은 4시간과 6시간 사이 효율의 절반정도로 떨어짐.
- 유효성분 분석 결과, 6시간 추출에서 *p*-coumaric acid의 함량이 가장 높음.
- 위의 결과를 종합하여 추출시간은 6시간으로 선정함.

③ 추출온도의 변화 시험

㉠ 수율 비교

- 추출온도가 증가함에 따라 수율이 높아짐.

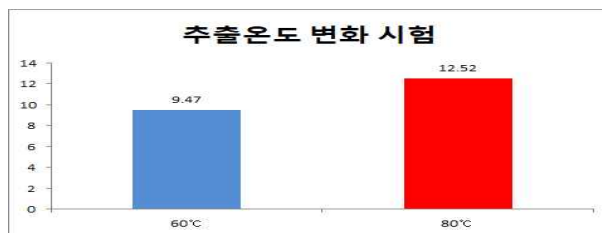


그림 198. 추출온도에 따른 수율 변화

㉠ 유효성분의 함량 비교

- 추출온도가 증가함에 따라 활성성분들의 함량이 증가함.

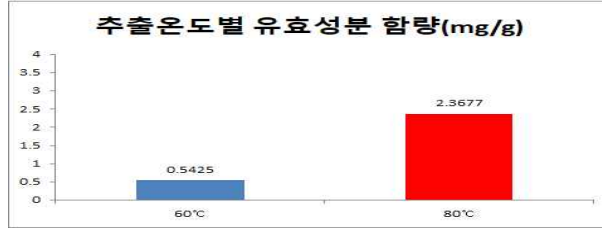


그림 199. 추출온도에 따른 *p*-coumaric acid 함량 변화

㉔ 결론

- 수율은 12.52%로 80°C 추출물이 높음.
- 유효성분 분석 결과, 80°C 추출에서 *p*-coumaric acid의 함량이 가장 높음.
- 위의 결과를 종합하여 추출온도는 80°C로 선정함.
- 최종 추출공정 최적화의 결론은 아래와 같음.

추출 용매	추출 온도	추출 시간
70% 발효주정	80°C	6시간

(21) 혼합소재 분말화 공정 개발

(가) 동결건조 샘플 제조

- ① 기존 자사제품들의 동결건조 방법을 채택하여 고장초 추출물을 10~20 Brix 사이로 농축하고 동결건조하여 샘플을 제조

(22) 혼합소재 원산지 선정

(가) 산지별 추출물 수율 비교

- ① 경남 거창에서 재배한 조릿대의 추출 수율이 가장 높음.

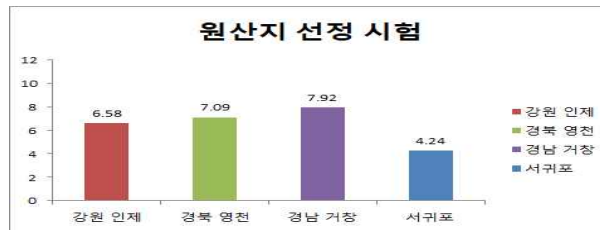


그림 200. 원산지에 따른 수율 변화

② 결론

- 경남 거창에서 재배한 조릿대의 추출 수율이 가장 높으나 서귀포산 조릿대를 제외하고는 큰 차이가 없음.
- 서귀포산 조릿대에서는 다른 산지의 제품보다 줄기의 양이 더 많았으며, 그로 인한 수율 차이일 것으로 사료됨.

(나) 산지별 추출물 지표성분 함량 비교

- ① *p*-coumaric acid 정량 분석 결과

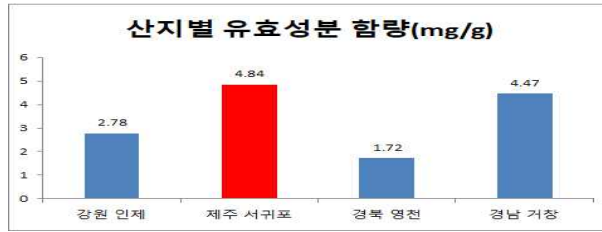


그림 201. 원산지에 따른 *p*-coumaric acid 함량 변화

② 결론

- 제주 서귀포산 조릿대가 *p*-coumaric acid 함량이 가장 높았으나 경남 거창 조릿대와 큰 차이는 없음.
- 제주 서귀포산의 조릿대 추출 수율이 경남 거창의 것보다 46.46%가 낮은 것을 감안하여 최종 원산지는 경남 거창산으로 선정하였음.

(23) 혼합소재 대량생산 공정개발

(가) Scale Up에 따른 변화 확인

① 조릿대 50 g 과 1 kg 효소반응에 따른 수율 변화

- ㉠ 조릿대 주정 추출공정의 Scale Up에 따른 수율의 재현성을 확인함.

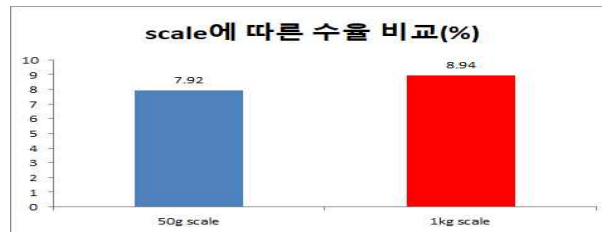


그림 202. 추출 scale에 따른 수율 변화

② 고장초 50 g 과 1 kg 효소반응에 따른 Tricin 함량 변화

- ㉠ 조릿대 주정 추출공정 Scale Up에 따른 *p*-coumaric acid 함량의 재현성을 확인함.

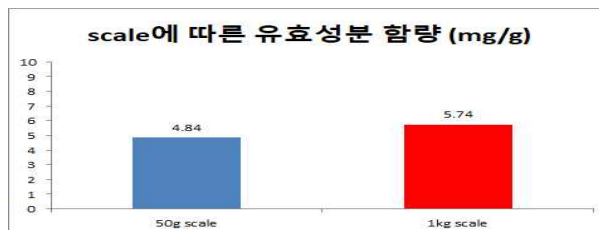


그림 203. 추출 scale에 따른 *p*-coumaric acid 함량 변화

㉠ 결론

- 조릿대 추출물의 수율은 Scale up과정에서 1.02% point 더 증가하였음.
- *p*-coumaric acid의 함량은 Scale up 샘플이 15.67%증가하였음.
- Scale up 결과 추출 수율과 유효성분의 함량이 모두 소폭 증가하였음.
- 추출 수율의 증가로 가격단가 경쟁력 확보에 도움이 되고 유효성분의 증가로 활

성측면에서 보다 유효한 결과가 도출 될 것으로 사료됨.

(24) 혼합소재 시너지 효과 시험

(가) 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 주름개선 평가

- ① 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 human dermal fibroblast에 대한 세포 독성 평가
- ㉠ 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았음.

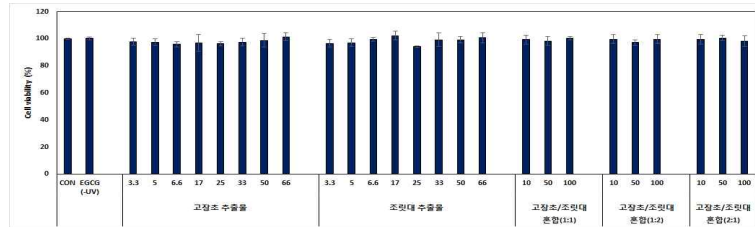


그림 204. 고장초와 조릿대 추출물 혼합소재의 human dermal fibroblast cell viability 측정 결과

- ② 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포 보호 효과
- ㉠ 고장초 추출물은 17 $\mu\text{g/mL}$ 에서, 조릿대 추출물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서부터 세포 생존율이 증가하였으며, 혼합소재의 경우 조릿대 추출물 함량이 높은 고장초/조릿대 혼합(1:2)에서는 세포 보호 효과가 미미함을 알 수 있으며, 고장초의 함량이 증가된 고장초/조릿대 혼합(1:1)과 고장초/조릿대 혼합(2:1)에서 우수한 세포 보호 효과가 나타남.

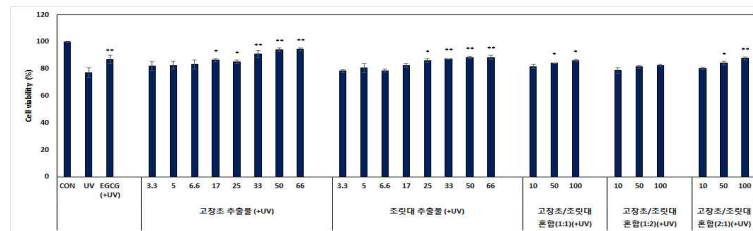


그림 205. 고장초와 조릿대 추출물 혼합소재의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast cell viability 측정 결과

- ③ 고장초, 조릿대 추출물 및 혼합소재의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 콜라겐 생성능 평가
- ㉠ 고장초, 조릿대 추출물에서 17 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 콜라겐 생성이 증가됨을 확인하였으며, 고장초의 함량이 높은 고장초/조릿대 혼합(1:1), 고장초/조릿대 혼합(2:1)에서 콜라겐 합성이 증가됨을 알 수 있음. 혼합소재에 대한 주름개선 시너지 효과는 나타나지 않음.

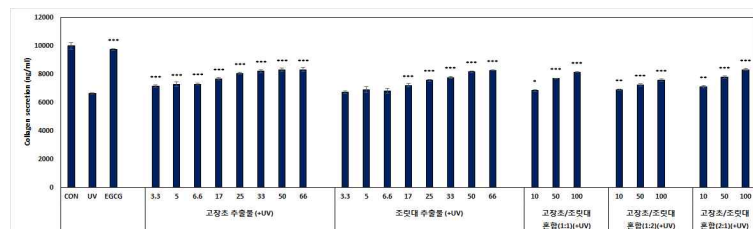


그림 206. 고장초와 조릿대 추출물 혼합소재의 collagen production 효능 결과

(25) 작용기전 평가

(가) 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 주름개선 작용기전 평가

- ① 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 human dermal fibroblast에 대한 세포 독성 평가
- ㉠ 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았음.

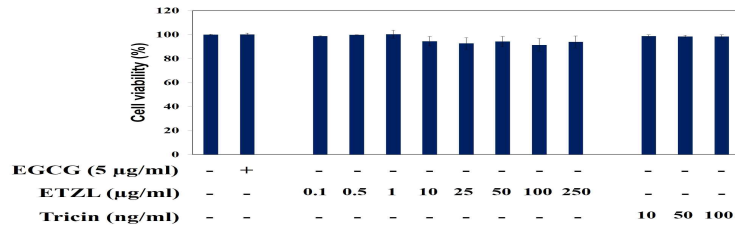


그림 207. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 human dermal fibroblast cell viability 측정 결과

- ② 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포 보호 효과
- ㉠ UVB 조사군에서 23%의 세포 사멸이 일어났으며, 고장초 효소처리 추출분말 또는 tricin을 농도별로 처리하였을 때 세포 생존율이 점진적으로 증가되는 것을 확인함.

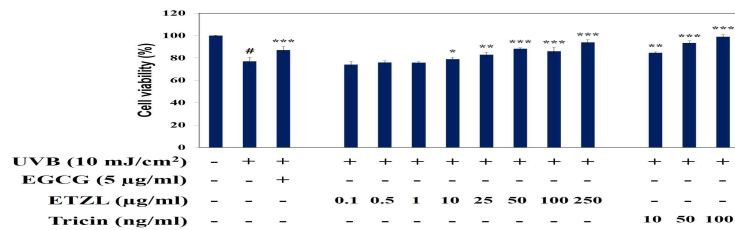


그림 208. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast cell viability 측정 결과

- ③ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 콜라겐 secretion 측정
- ㉠ UVB 조사군에서 0.75배의 콜라겐 secretion을 나타냈으며, 고장초 효소처리 추출분말 또는 tricin을 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 각각 1.56, 1.36배의 콜라겐 secretion의 증가함.

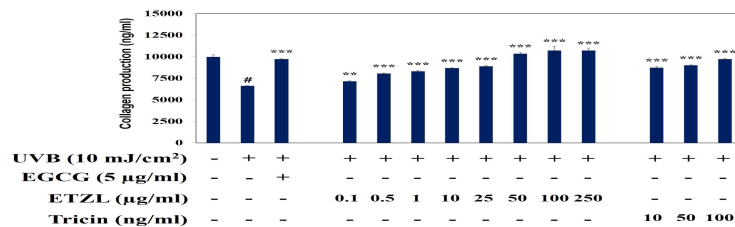


그림 209. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 collagen production 효능 결과

- ④ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 metalloproteinase family (MMPs) secretion 측정

㉔ UVB 조사군에서 168.6%, 132.0%, 134.4%, 145.2%, 130.2%의 증가율을 나타냈으며, 고장초 효소처리 추출분말을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각 132.7%, 92.2%, 84.7%, 97.1%, 90.2%의 MMPs secretion이 나타남. Tricin을 50 ng/mL 의 농도로 처리하였을 때, 126.0%, 101.0%, 93.5%, 107.9%, 90.5%의 MMPs secretion 감소함.

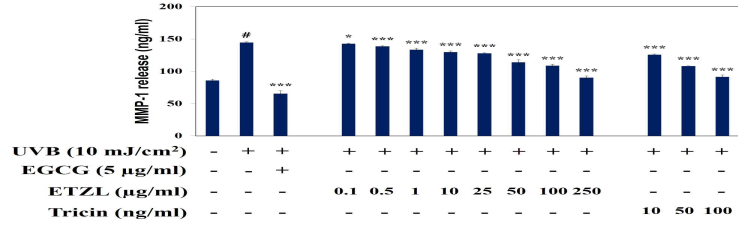


그림 210. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 MMP-1 release 억제능 측정 결과

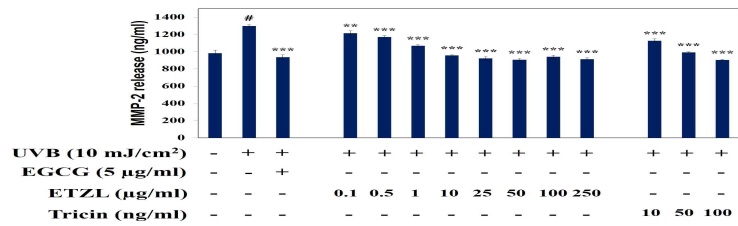


그림 211. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 MMP-2 release 억제능 측정 결과

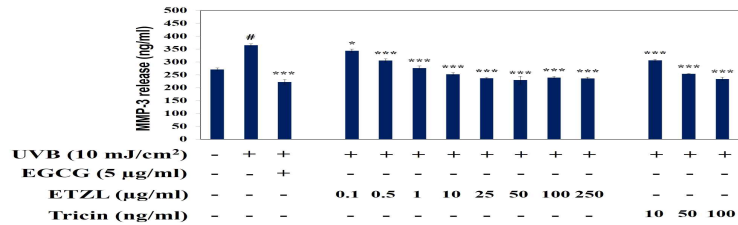


그림 212. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 MMP-3 release 억제능 측정 결과

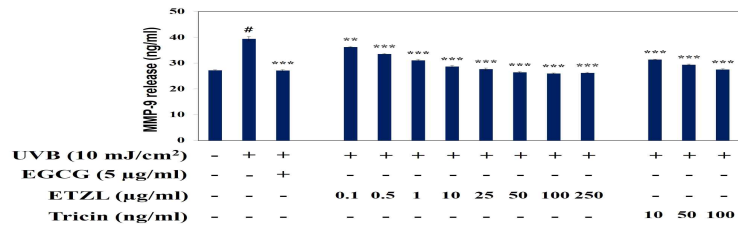


그림 213. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 MMP-9 release 억제능 측정 결과

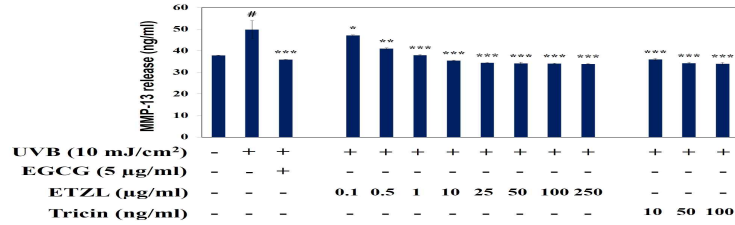


그림 214. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 MMP-13 release 억제능 측정 결과

- ⑤ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 세포내 활성 산소 저해 효과
- ㉠ UVB 조사군에서 활성 산소가 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 고장초 효소처리 추출분말을 처리하였을 때 농도의존적으로 활성 산소의 감소를 나타냄. Tricin을 50 ng/mL의 농도로 처리하였을 때, 세포내 활성 산소가 감소됨을 확인하였음.

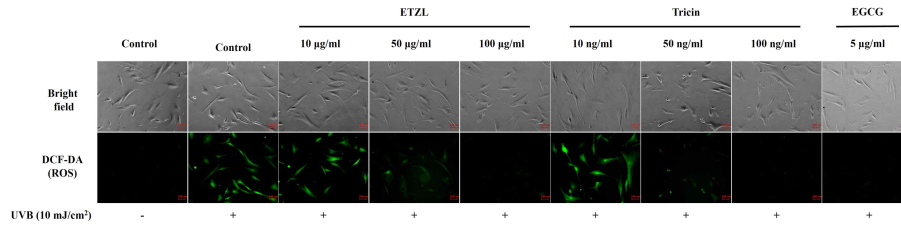


그림 215. 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 세포 내 활성 산소 저해 효과

- ⑥ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 antioxidant enzyme (SOD1, HO-1) 단백질 발현
- ㉠ UVB 조사군에서 두 단백질의 발현이 증가되며, 고장초 효소처리 추출분말을 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 SOD1, HO-1의 단백질 발현이 각각 1.9, 2.0배 증가되는 것을 확인하였음.

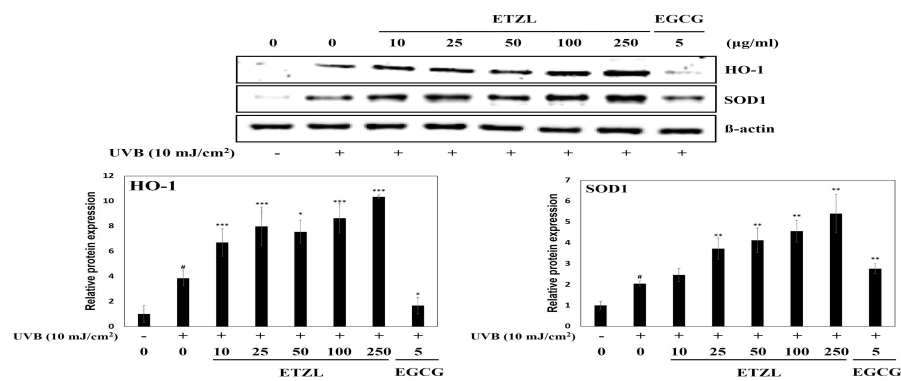


그림 216. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 HO-1, SOD1 발현량 측정 결과

- ㉠ UVB 조사군에서 두 단백질의 발현이 증가되며, tricin을 50 ng/mL의 농도로 처리하였을 때 SOD1, HO-1의 단백질 발현이 각각 1.4, 1.5배 증가되는 것을 확인하였음.

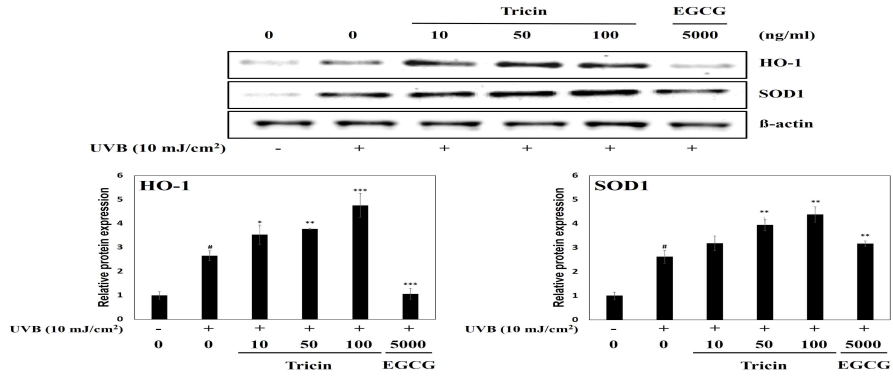


그림 217. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 각 단백질 발현량 측정 결과

- ⑦ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 MAPK signaling 단백질 발현
- ⑧ UVB 조사군에서 인산화된 Akt, JNK, ERK, p38이 과발현되는 것을 확인하였으며, 고장초 효소처리 추출분말을 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 80.7%, 43.6%, 55.2%, 83.3%로 감소하였음.

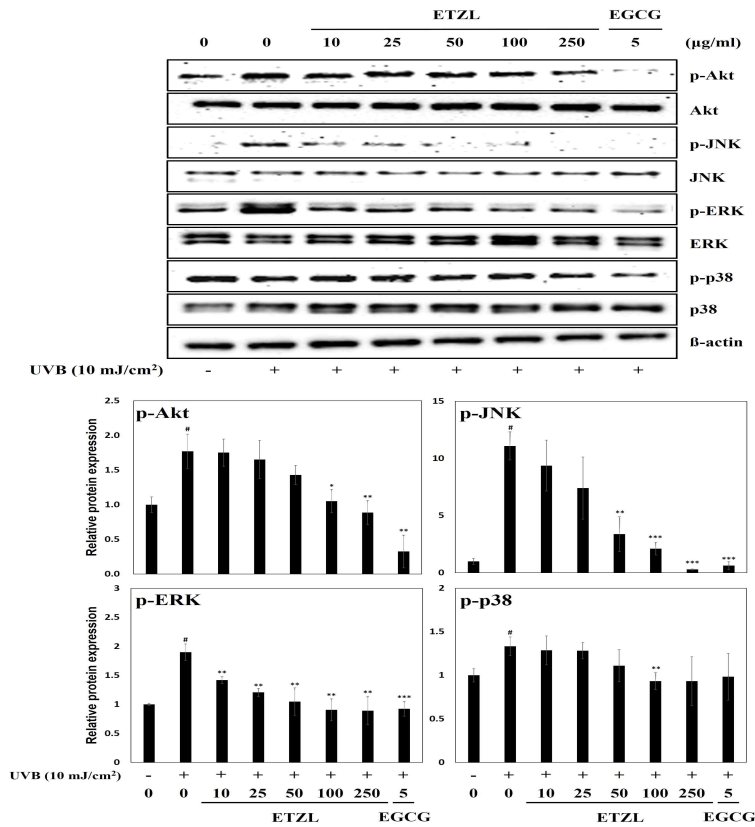


그림 218. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 p-Akt, p-JNK, p-ERK, p-p38 발현량 측정 결과

- ⑨ UVB 조사군에서 인산화된 Akt, JNK, ERK, p38이 과발현되는 것을 확인, tricin을 50 ng/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 43.9%, 55.8%, 60.5%, 60.1%로 감소함.

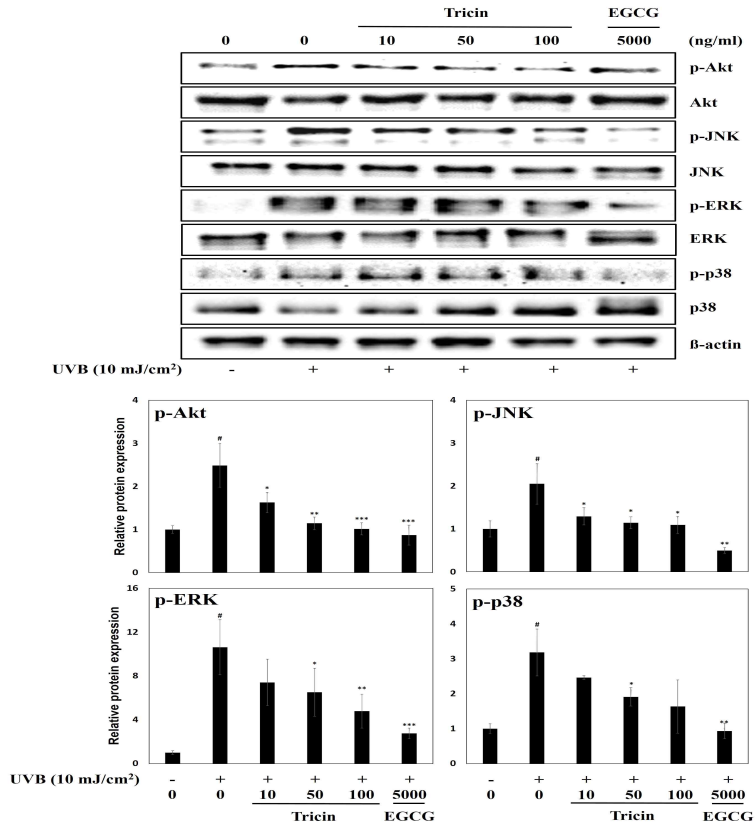


그림 219. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 p-Akt, p-JNK, p-ERK, p-p38 발현량 측정 결과

- ⑧ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 AP-1 signaling 단백질 발현
- ㉞ UVB 조사군에서 c-Fos와 인산화된 c-Jun이 과발현되는 것을 확인하였으며, 고장초 효소처리 추출분말을 50 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 47.2%, 33.1%로 감소함.

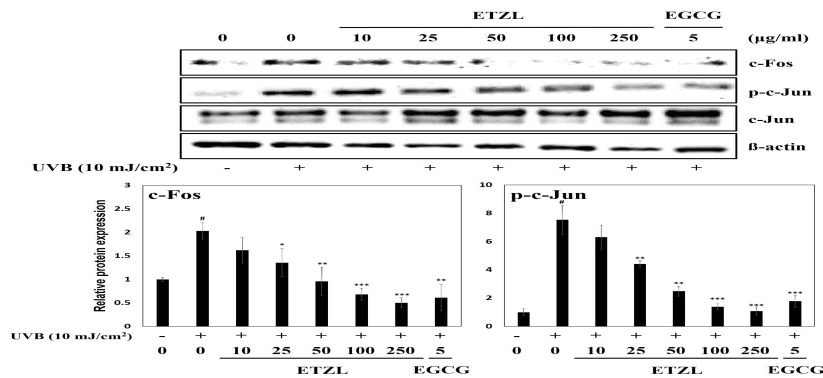


그림 220. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 c-Fos, p-c-Jun 발현량 측정 결과

- ㉞ UVB 조사군에서 c-Fos와 인산화된 c-Jun이 과발현되는 것을 확인하였으며, tricin을 50 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 57.5%, 36.3%로 감소함.

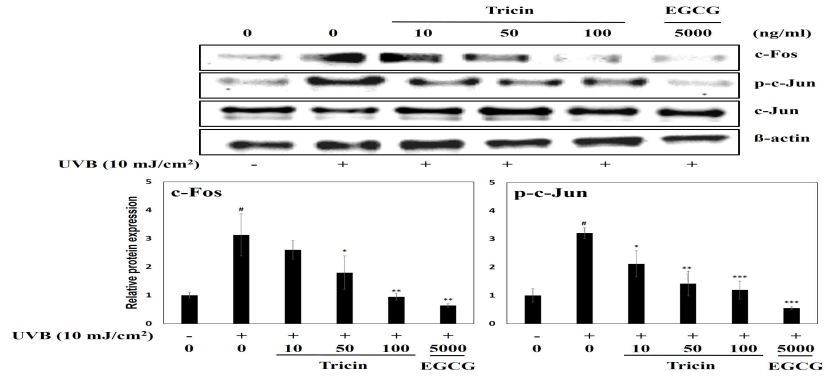


그림 221. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 c-Fos, p-c-Jun 발현량 측정 결과

- ㉑ 고장초 효소처리 추출분말과 tricin의 UVB가 조사된 human dermal fibroblast에 대한 NF- κ B signaling 단백질 발현
- ㉒ UVB 조사군에서 인산화된 I κ B α , p65와 IKK α / β 가 과발현되는 것을 확인하였으며, 고장초 효소처리 추출분말을 50 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 45.4%, 40.8%, 31.3%로 감소하였음. UVB 조사군에서의 I κ B α 의 발현이 16.8%로 감소되었으며, 고장초 효소처리 추출분말을 50 μ g/mL로 처리하였을 때 81.8%로 증가함.

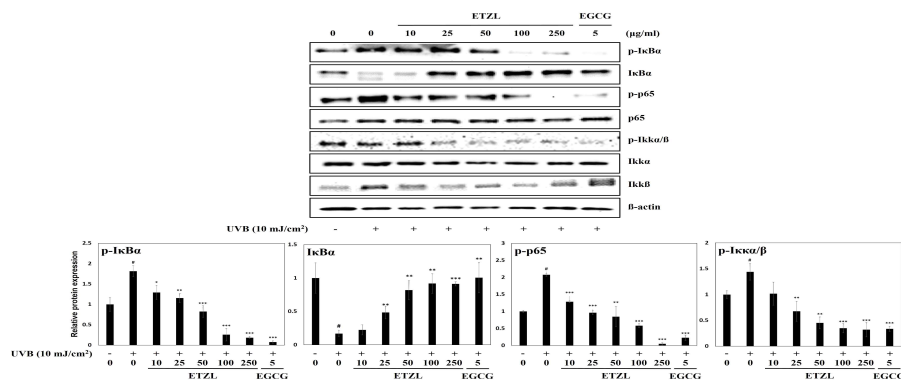


그림 222. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 p-I κ B α , I κ B α , p-p65, p-IKK α / β 발현량 측정 결과

- ㉓ UVB 조사군에서 인산화된 I κ B α , p65와 IKK α / β 가 과발현되는 것을 확인하였으며, tricin을 50 ng/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 49.4%, 66.9%, 52.5%로 감소하였음. UVB 조사군에서의 I κ B α 의 발현이 16.8%로 감소되었으며, tricin을 50 ng/mL로 처리하였을 때 49.3%로 증가함.

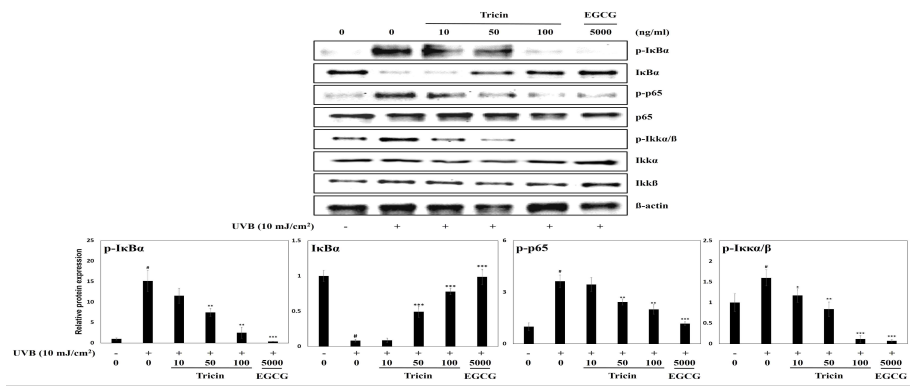


그림 223. 고장초 효소처리 추출분말 처리 농도에 따른 p-IkBa, IkBa, p-p65, p-IKkα/β 발현량 측정 결과

(26) 혼합소재로 일반식품 소재 사업화 제품 생산

(가) 위탁업체인 (주)삼우다연에 위탁하여 시제품 생산

(나) 각 공정 단계별 1L의 추출물 샘플을 취하여 추출 공정단계별 기능(지표)물질 이행률 및 최종 수율 계산

(다) 취득 샘플 구간

추출 과정	샘플 취득량
50% 발효주정 추출 (ST1)	1L
농축 후 건조 (ST2)	1L

(라) 공정 단계별 취한 샘플을 동결건조 후 분말화하여 p-coumaric acid 함량 분석 및 기능(지표)물질 이행 및 최종 수율 계산하는데 사용

(가) (주)삼우다연에서 시제품의 위탁 생산

① 생산 과정



(주)삼우다연 공장 정면사진



조릿대 원재료 투입



케이지 수송



조릿대 추출 및 농축



농축액 보관



동결건조

(나) 공정 단계별 *p*-Coumaric acid 이행률 측정

① Lab scale 추출물 공정단계별 분석 결과

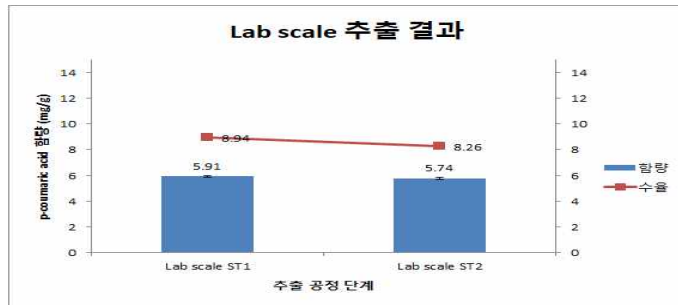


그림 230. Lab scale 추출공정별 수율 및 함량 비교

㉠ Lab scale ST1 = 50% 발효주정 추출물, ㉡ Lab scale ST2 = 농축 후 동결건조

② 생산된 시제품의 공정단계별 분석 결과

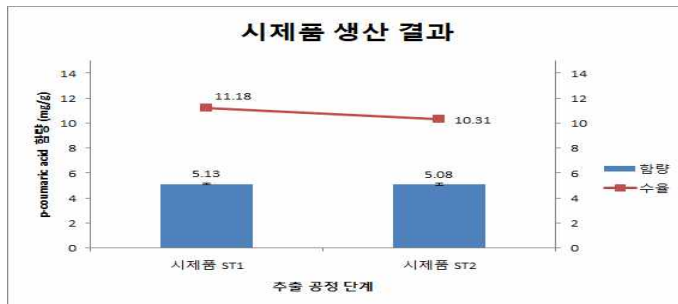


그림 231. 시제품 생산공정별 수율 및 함량 비교

㉢ 시제품 ST1 = 50% 발효주정 추출물, ㉣ 시제품 ST2 = 농축 후 동결건조

③ 결론

- ㉠ Lab scale과 시제품 생산의 공정별 수율 및 *p*-coumaric acid의 함량을 비교하였을 때 최종 농축액 기준, 시제품 생산 샘플이 수율은 19.88% 증가하였고 *p*-coumaric acid 함량은 11.49% 감소하였음.
- ㉡ 이는 scale이 증가함에 따라 수율이 증가되는 기존 경향과 유사하며 수율 증가에 따른 유효성분의 상대적인 감소가 원인일 것으로 사료됨.
- ㉢ 최종적으로 *p*-coumaric acid의 함량은 Lab scale은 5.74 mg/g, 시제품은 5.08 mg/g으로 이행률은 88.5% 임을 확인하였으며, 오차범위가 ±120% 임을 감안하면 재현성은 확보되었으나 기준을 시제품의 함량으로 적용하는 것이 적합할 것으로 사료됨.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

			D-06
4-1. 목표달성도			
세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
원재료 표준화 - 산지별 특성 비교 - 원재료 기준 및 시험법 확립	3	3	<p>연구내용: 사용소재의 분류 및 식물학적 특성 관련자료 검색 및 정리, 원재료 수집조건 설정, 원재료의 규격 및 시험법 설정, 고장초 원산지 선정의 실험을 완료.</p> <p>자체평가: 해당하는 목표의 연구를 성실히 수행하여 달성하였음.</p>
추출조건 확립 - 용매, 온도, 시간, 건조방법 등	5	5	<p>연구내용: 원재료의 특성 조사 및 선발기준 선정, 추출방법 설정 조건(용매 농도, 온도, 시간)의 실험을 완료하였으며, 해당 실험들은 일반 추출로써 수율이 낮아 추가적으로 적정효소 선정 시험, 효소반응 시간 설정의 실험을 진행 및 완료.</p> <p>자체평가: 효소처리 조건 확립연구는 연구 목적이 아닌 상업적인 측면을 고려한 추가 실험이기 때문에 초과달성이 되었다고 사료됨.</p>
시험법 재현성 확립 및 표준화 - 시험법 벨리데이션	3	3	<p>연구내용: 시험법 벨리데이션, 공인기관 분석법 검증 완료. 시험법 벨리데이션의 경우 기존 일반 추출방법으로 초기에 완료하였으나 평가단의 의견을 반영하여 효소처리 고장초 추출분말로써 재실험을 진행하여 추가 시험법 벨리데이션을 완료함.</p> <p>자체평가: 시험법 벨리데이션은 초기 목표로 설정되어 있기 때문에 재실험을 진행하였다고 하여 초과달성이 되었다고 보기는 어렵지만, 정확한 데이터를 확보하기 위해 추가 연구를 진행하였으므로 연구개발 수행의 성실도가 높다고 사료됨.</p>
분말화 공정개발 - 열풍, 분무, 동결, 진공건조 - 적정 부형제 선발	1	1	<p>연구내용: 일반적으로 공장에서 생산이 가능한 동결건조, 분무건조의 설정 조건 확립, 분말화 완료 후 흡습성에 대해 관찰하여 부형제인 텍스트린의 첨가량 설정 완료.</p> <p>자체평가: 열풍, 분무, 동결, 진공건조의 방법 중 일반적으로 생산업체에서 활용하는 공정방법인 분무, 동결건조를 채택하여 실험 진행 및 결과를 도출하였고, 적정 부형제의 선발 및 투입량을 결정하여 최종 제품 생산에 이바지함.</p>
지표성분의 조제	3	3	<p>연구내용: 고장초의 활성성분 10종 (Tricin, Tricin배당체 및 유도체)의 분리, 혼합소재인 억새, 발효 미강, 조릿대의</p>

			<p>활성물질을 분리함. 고장초의 경우 10종의 활성물질을 각각 정량 분석이 가능할 수 있도록 물질을 분리하여 활용하였으며 혼합소재의 물질들은 물질 분리를 통한 지표물질 선정에 활용되었음.</p> <p>자체평가: 고장초 지표성분인 Tricin 뿐만 아니라 이외의 9종 활성 성분에 대한 지표성분 조제를 통한 정량분석까지 진행되었고, 추가로 혼합소재 선정을 위한 각 소재들의 물질 동정 및 분리까지 진행되었기 때문에 연구개발 수행의 성실도가 높다고 사료됨.</p>
지표성분의 HPLC 및 LC/MSMS 분석법 확립	3	3	<p>연구내용: 고장초로부터 분리된 10종의 활성물질 동시 분석방법(LC/MSMS), 지표성분 품질관리를 위한 Tricin 분석방법(HPLC)를 개발 완료.</p> <p>자체평가: 지표성분 분석을 위한 분석법 개발뿐만 아니라 활성물질 10종에 대한 동시분석법을 개발하였고 이를 활용하여 추출공정 조건에 따른 10종의 활성성분 변화와 각 성분의 증감에 따른 효능도 확인하여 더 정밀한 추출공정 최적화가 가능하였기 때문에 본 연구는 성실히 진행되었다고 할 수 있음.</p>
미백 및 보습효과를 나타내는 물질과 고장초 추출물과 복합 원료의 정성, 정량분석	3	3	<p>연구내용: 최종보고서에 작성된 바와 같이 추출공정 최적화, 원산지 선정, 효소처리 조건 확립 등 모든 연구개발 과정에서 고장초 활성물질 10종에 대한 분석실험이 이루어졌으며 각 공정조건 설정에 기여함. 또한, 혼합소재 선정에 있어서도 필요 물질에 따라 정량분석을 진행하였고 혼합소재에 대한 추출공정 최적화에 기여함.</p> <p>자체평가: 지표로 선정된 물질뿐만 아니라 여러 활성물질을 함께 정량분석을 하여 보다 정밀한 연구결과 도출을 유도하였으며 혼합소재의 추출공정 최적화 실험에서도 활용을 하는 등 많은 연구에서 해당 실험을 진행하였기 때문에 성실히 진행되었다고 할 수 있음.</p>
고장초 함유 소재의 기본 활성 평가 - 항산화, 항염, 항알러지 활성 측정	1	1	<p>연구내용: 최종보고서에 작성된 바와 같이 추출공정 최적화, 원산지 선정, 효소처리 조건 확립 등 모든 연구개발 과정에서 항염, 항산화, 항알러지 효능을 측정하였고 각 공정조건 설정에 높은 기여를 함.</p> <p>자체평가: 최종 선정된 공정으로 제조된 샘플만을 실험한 것이 아닌 초기의 조건 설정에서부터 지속적인 활성평가를 통하여 여러 추출 조건 등을 설정하였기에 성실히 진행되었다고 할 수 있음.</p>

<p>미백효능 검증 - Tyrosinase 억제활성 측정 - 멜라닌 생성 억제 활성</p>	3	3	<p>연구내용: 최종보고서에 작성된 바와 같이 추출공정 최적화, 원산지 선정, 효소처리 조건 확립 등 모든 연구개발 과정에서 미백 효능을 측정하였고 각 공정조건 설정에 높은 기여를 함.</p> <p>자체평가: 최종 선정된 공정으로 제조된 샘플만을 실험한 것이 아닌 초기의 조건 설정에서부터 지속적인 활성평가를 통하여 여러 추출 조건 등을 설정하였기에 성실히 진행되었다고 할 수 있음.</p>
<p>피부주름 개선 활성 측정 - Fibroblase cell을 이용한 세포증식능, procollagen 합성, MMPs 발현, Collagenase 억제활성 측정</p>	3	3	<p>연구내용: 최종보고서에 작성된 바와 같이 추출공정 최적화, 원산지 선정, 효소처리 조건 확립 등 모든 연구개발 과정에서 피부주름개선 효능을 측정하였고 각 공정조건 설정에 매우 높은 기여를 함.</p> <p>자체평가: 최종 선정된 공정으로 제조된 샘플만을 실험한 것이 아닌 초기의 조건 설정에서부터 지속적인 활성평가를 통하여 여러 추출 조건 등을 설정하였기에 성실히 진행되었다고 할 수 있음. 또한, 혼합소재의 시너지 측정을 위한 추가 실험을 진행하였으므로 이 부분은 초과달성이 되었다고 사료됨.</p>
<p>원료, 소재의 안전성 평가 - 농약, 중금속, 위해미생물 검사</p>	4	4	<p>연구내용: 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 제출서류 검토 결과 본 제품은 의사결정도 '나'에 해당되어 독성시험 면제가 가능함. 유해물질 검사는 시제품을 통하여 확인 완료.</p> <p>자체평가: 독성시험 면제에 대한 증빙서류를 첨부하여 개별인정 신청서류에 제출하였으나, 해당 제품이 해외에 인기가 많아 자사 내부적으로 독성시험을 진행하고 있음. 이를 고려하면 성실히 수행되었다고 할 수 있음.</p>
<p>공정최적화 - 추출, 농축, 건조, 제제 - 공정 단계별 기능(지표)물질 이행률, 최종 수율 계산 및 실측</p>	3	3	<p>연구내용: 3반복 효소반응 공정에서 재현성을 확인함</p> <p>자체평가: 3반복을 통한 효소반응 공정에서 추출 수율 및 지표성분 함량의 재현성을 확보하였기 때문에 큰 문제없이 완료됨.</p>
<p>대량생산 공정개발(Scale up) - 1, 5, 10kg 생산 - 대량생산별 지표물질 이행률 측정</p>	3	2	<p>연구내용: 1kg의 scale로 3반복 대량생산을 실시하여 lab scale의 결과를 비교검토 하였으며 그 결과 교반 진행했을 때 수율이 기존보다 증가하였고 이에 비해 Tricin의 함량은 감소하는 경향이 나타남. 하지만, 본 결과에 대해 활성의 차이를 확인하였을 때는 scale up군과 lab scale군의 활성이 유사하였음.</p> <p>자체평가: 대량생산 공정개발 시 1, 5, 10kg을</p>

			<p>생산하여 데이터를 확보하려 하였으나 기기설비의 한계로 1kg까지만 진행된 것은 감점의 요인이 될 수 있으나, 수율 및 함량의 변화뿐만 아니라 피부건강 활성까지 체크하여 scale up에 따른 모든 주요 포인트에 대해 확인하였기 때문에 효소처리 진행 시 교반을 진행한다는 설정을 추가 할 수 있었고 이에 본 실험을 성실히 수행하였다고 할 수 있음.</p>
<p>인체적용시험 시제품 생산 - 일반식품 품목허가</p>	5	5	<p>연구내용: 시제품 위탁생산 결과 최종 product에 대한 결과 수치는 수율이 감소한 것 이외는 재현성을 확보하였음. 수율 감소의 원인은 필터망을 lab scale에서는 75um를 사용하였고, 시생산에서는 20um를 사용한 것이 원인인 것으로 사료됨.</p> <p>자체평가: 수율에서의 손해는 보았으나 이는 scale up의 문제보다 사용한 필터망의 문제가 컸고, 나머지 변수들은 모두 기준 내에 들어왔기 때문에 재현성이 확보되었다고 볼 수 있음. 또한, 제품의 영양성분 및 유해성분의 검사도 진행하여 기준 및 규격을 확보하였고 이에 본 실험은 성실히 수행되었다고 할 수 있음.</p>
<p>건강지향식품 개발(1건 이상)</p>	3	3	<p>연구내용: 고장초효소처리추출분말의 일반식품품목허가를 받음.</p> <p>자체평가: 고장초 제품의 마케팅 및 판매를 위한 일반식품품목허가를 받아 건강지향식품 개발 1건의 성과를 달성하였음.</p>
<p>제형화 연구, 안정성 평가 및 유통기간 설정 - 생체이용률을 고려한 제제 개발 - 음료 과립 등 다양한 제형 개발 - 안정성 평가: 장기보존, 가속, 가속시험</p>	3	2	<p>연구내용: 임상시험을 위한 제형화 연구는 전북생물산업진흥원에 위탁으로 진행되었음. 제형은 캡슐로 선정하여 임상제품을 제조함. 장기보존, 가속시험의 안정성 평가를 진행하고 있음.</p> <p>자체평가: (주)비티씨는 완제품 판매가 아닌 원료의 판매가 주된 업체이므로 다양한 제품은 추후에 마케팅의 일환으로써 진행 될 계획이고 현재는 음료 제형 개발을 위한 계획을 세우고 있음. 또한, 원료로서의 안정성 평가(장기, 가속 시험)를 진행 중이고 장기보존 시험은 6개월, 가속 시험은 10개월까지 결과를 도출하였으며 지표성분의 함량변화 또한 유지되었기에 제품 개발에 문제는 없을 것으로 사료됨.</p>
<p>생리활성 물질의 추출 및 분획물 조제</p>	3	3	<p>연구내용: 고장초 혼합소재의 선정을 위해 억새, 갈대, 미강, 밀싹, 조릿대의 추출 및 분획물을 조제하였음.</p> <p>자체평가: 각각의 추출은 기본 추출조건인 60%발효주정의 조건으로 추출을 진행하여</p>

			추출물을 제조하였고 이에 활성물질을 분리하기 위한 분획물을 제조하였음. 많은 소재를 실험하기 위해 초기 추출조건은 간략하게 하여 진행하였으며 활성을 확인한 뒤 실제로 활성이 나타난 조릿대의 경우 추출조건을 다시 최적화하는 실험을 진행하였기 때문에 이 부분에서는 초과달성으로 사료됨.
생리활성 물질의 추적분리	3	3	연구내용: 앞서 진행되었던 추출물 및 분획물로부터 생리활성 물질의 추적 분리를 하였으며 위의 소재 중 익새, 미강, 조릿대의 물질을 분리하였음. 자체평가: 물질분리 실험은 선정된 조릿대 하나의 소재로만 진행하여도 연구 성과의 달성을 할 수 있었지만 보다 정확한 연구데이터의 확보를 위해 가능한 소재의 분리실험을 진행하였기에 이는 연구를 성실히 실행하였다고 할 수 있음.
분리된 화합물의 기기분석 및 구조 확인 동정	3	3	연구내용: 앞서 진행되었던 단일로 분리한 물질들의 구조 동정을 하여 지표성분 설정에 활용함 자체평가: 구조 동정 실험은 선정된 조릿대 하나의 소재로만 진행하여도 연구 성과의 달성을 할 수 있었지만 보다 정확한 연구데이터의 확보를 위해 가능한 소재의 분리실험을 진행하였기에 이는 연구를 성실히 실행하였다고 할 수 있음.
미백기능 평가(in vivo) - 자외선 조사에 의한 유색 guinea pig 의 색소침착 억제 및 개선평가	-	-	연구내용: 건강기능식품으로 미백기능성을 인정받은 선례가 없어 가능성을 높이기 위한 전략으로 주름개선을 중점적으로 확인하는 실험을 진행함. 자체평가: 건강기능식품의 피부건강 가이드라인을 참고하면 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강 유지 및 보습의 효능에 대한 것만 제시하고 있어, 건강기능식품으로써 개별인정을 받기 수월한 기능성인 주름개선을 선정하여 실험하였음.
노화방지 평가(in vivo) - 자외선 조사에 의한 hairless mouse 의 피부주름, 조직염색, collagen/MMP1 발현 등 측정	6	6	연구내용: 식약처 피부건강 가이드라인의 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강 유지의 기능성 바이오마커를 참고한 동물실험 설계 및 실험을 진행하여 유의적인 효능을 확인하였음. 자체평가: 식약처 가이드라인 및 여러 Ref.를 참고하여 실험계획을 세웠으며 그 결과 또한 유의적으로 도출하였기 때문에 본 연구는 성실히 수행되었다고 할 수 있음.
민감성 피부 개선 효과 평가(in vivo) - 아토피 피부염 유발 마우스를	-	-	연구내용: 건강기능식품으로 민감성 피부개선 기능성을 인정받은 선례가 없어 가능성을 높이기 위한 전략으로 주름개선을

<p>이용한 혈청 IgE, histamine, cytokines 등 측정</p>			<p>중점적으로 확인하는 실험을 진행함.</p> <p>자체평가: 건강기능식품의 피부건강 가이드라인을 참고하면 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강 유지 및 보습의 효능에 대한 것만 제시하고 있어, 건강기능식품으로써 개별인정을 받기 수월한 기능성인 주름개선을 선정하여 실험하였음.</p>
<p>개발 고부가가치 시제품의 품질평가 - 농약, 중금속, 위해미생물, 영양성분 검사</p>	2	2	<p>연구내용: 임상시험에 활용하기 위한 시제품의 생산을 하였고 본 제품의 농약, 중금속, 위해미생물, 영양성분의 위탁시험을 하여 결과서를 받음. 실험결과 회분 및 나트륨의 함량이 높았지만 규격에 벗어나는 정도는 아니었으며 3Lot의 품질평가를 통하여 기준 및 규격의 확립에 활용함.</p> <p>자체평가: 시제품 3Lot에 대한 품질평가를 하여 재현성을 확보하였고 본 제품의 기준 및 규격을 확립하였기에 문제없이 수행되었다고 할 수 있음.</p>
<p>안정성 평가 및 유통기간 설정</p>	2	2	<p>연구내용: 앞서 진행하였던 안정성 평가의 연장으로 3차년도까지 계획을 세웠으며 장기보존, 가속시험의 안정성 평가를 진행하고 있음.</p> <p>자체평가: 원료로써의 안정성 평가(장기, 가속 시험)를 진행 중이고 장기보존 시험은 6개월, 가속 시험은 10개월까지 결과를 도출하였으며 지표성분의 함량변화 또한 유지되었기에 제품 개발에 문제는 없을 것으로 사료됨.</p>
<p>건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서 작성</p>	10	10	<p>연구내용: 본 과제를 통한 in vitro, in vivo, 임상시험, 안전성 자료 등을 활용하여 건강기능식품 개별인정 신청서 작성 및 제출함.</p> <p>자체평가: 과제를 하며 진행되었던 모든 실험을 체계적인 계획수립을 통하여 유의적인 결과를 도출하였고 모든 결과를 취합하여 성공적으로 개별인정 신청을 완료할 수 있었기에 성실히 수행했다고 할 수 있음.</p>
<p>마케팅 전략 수립</p>	5	5	<p>연구내용: VITA FOODS EUROPE과 ASIA, HI JAPAN 전시회에 효소처리고장초추출분말을 전시 및 홍보하였음.</p> <p>자체평가: 모든 전시회에서 자사 내부 제품과 비교하였을 때 가장 관심과 질문이 많았던 제품은 40%의 비율로 효소처리고장초추출분말이 차지하였음. 해외에서 어니뷰티 소재에 대한 관심이 매우 크며 고장초 제품의 논문자료 및 샘플을 요청하는 곳도 다수였음. 현재 해외에 판매를 진행하기 위해 GRAS</p>

			<p>등재를 목적으로 한 독성실험을 자사 내부에서 따로 진행 중이며 이는 마케팅에 필요한 자료 확보를 위한 추가적인 실험진행이지만 그 단계가 초기이기 때문에 초과달성으로 분류하지는 않고 해당 목표를 위해 성실히 수행하였다고 할 수 있음.</p>
건강지향식품 개발(1건 이상)	3	3	<p>연구내용: 고장초와 조릿대의 혼합소재로 일반식품 품목허가를 받음.</p> <p>자체평가: 해당 제품은 현재 일반식품이지만 시너지 효과의 실험을 통해 추후 기능성 식품까지 개발을 목적으로 하고 있으며 목적은 달성하였음.</p>
인체적용시험	8	8	<p>연구내용: 임상시험 결과 피부 수분량과 눈가주름이 유의적으로 개선되었음을 확인함.</p> <p>자체평가: 효소처리고장초추출분말 단일 소재를 활용하여 자체 임상 설계로 활성화에 유의적인 결과를 얻어 개별인정 신청까지 진행되었음. 이는 임상시험의 유의적인 결과가 없었으면 불가능 했기에 본 실험항목이 성실하게 수행된 결과라 할 수 있음.</p>
활성물질 및 최종 소재에 대한 작용기전 연구	5	5	<p>연구내용: 작용기전 연구에 대한 마커확인 실험을 완료하여 ROS관련 주름억제 메카니즘을 밝혔음.</p> <p>자체평가: 작용기전에 대한 체계적인 연구를 통하여 논문 게재와 학술발표까지 진행되었기 때문에 이는 본 연구를 성실하 수행하지 않으면 얻을 수 없는 결과물이라고 사료됨</p>
제품의 품질평가	1	0	<p>연구내용: 고장초와 조릿대의 혼합소재로 등록된 일반식품의 시제품에 대한 품질평가를 진행하려 하였으나 단순 혼합비율로 시너지 효과가 크지 않아 추가적인 실험이 필요하다고 사료되어 다양한 혼합배율을 선정 계획이며, 앞서 진행된 실험에서 주름개선 관련한 효능은 시너지가 크지 않은 것으로 확인되어 다른 기능성의 활성화도 확인 계획임.</p> <p>자체평가: 혼합소재 제품에 대한 품질평가를 진행하기 위해선 혼합소재의 시제품 생산이 진행되어야 하는데 앞서 설명한 바와 같이 추가적인 연구가 필요한 상황에서 목표달성을 위해 무의미한 제품 품질평가는 진행되어선 안 된다고 판단하여 일정이 미룸.</p>
합계	100	97	

4-2. 관련분야 기여도

○ 본 연구를 통한 고장초 효소처리추출분말은 아직 국내에서의 파급효과가 크지는 않지만 독성이 없고 주름 개수 개선 및 보습능력이 우수하여 국내 및 해외의 이너뷰티 소재로써 새로운 제품군을 형성할 것으로 판단되며 1조 4천억 국내 건강기능식품 시장에서 큰 파급 효과를 가져올 것으로 기대하고 있음. 또한, 해외에서 이너뷰티에 관심이 높다는 것을 직접적으로 확인 하였기 때문에 중국 및 일본 등의 새로운 시장에 진입할 수 있을 것으로 기대하고 있음. 이와 같이 국내와 해외에서의 관심 큰 이너뷰티 시장에 초기 진출하기 위하여 본 제품의 인허가를 진행중에 있음. 제품 출시 후 해외 시장에 진입하기 위해 GRAS 원료 등재를 계획하고 있으며, 이를 위해서 자사 자원을 이용하여 독성시험을 계획하고 진행하고 있음. 국내 및 해외시장에서 고장초 효소처리 추출분말이 이너뷰티 제품으로 등록될 경우 이는 국내 천연소재를 활용한 해외시장을 선점한 최초 사례가 될 것이라 판단 함. 또한 제품의 상용화를 위해 국내 재배농가와와의 상생 및 국내 농업의 큰 발전에 기인할 것으로 기대하고 있음.

5. 연구결과의 활용계획

D-07

5-1. 사업화 전략

가. 사업화 추진전략

(1) 형태/규모

- (가) 상용화 형태 : 피부건강기능식품 원료 및 고장초를 함유하는 일반식품
- (나) 수요처 : 국내 기존거래처 및 해외 기존파트너, 신규파트너
- (다) 예상 단가 : kg당 300,000원

(2) 상용화 능력 및 자원보유

- (가) 국내영업: 기존거래처 [서흥캡슐, 노바렉스 등 10여개 중점고객 + 홈쇼핑 판매]
- (나) 해외영업: 기존파트너 [Gencor(글로벌), San F(일본), Unify Chemical(태국) 등 파트너]
- (다) 해외 신규파트너 발굴 [사전조사, 동남아시아/Halal시장, 중남미시장]
- (라) 원료수급: 실험 결과상으로 경북 영천산이 최종 원산지로 선정되었기 때문에 본사 구매팀에서 경북 영천시에 고장초 계약재배에 관련하여 추천 농가가 있는지 문의 및 추진 중.

또한, 경북 영천에서 불가능 할 시 현재 상업적으로 농가에서 고장초가 재배되고 있는 경기 지역의 농가와 계약재배 협약 추진 계획.

경기 화성산의 경우 경북 영천산과 지표성분의 함량 및 수율에 대해서는 모든 부분이 유사하였고, 효능은 더 좋았기 때문에 최종 원료로 선정 가능 할 것.

[사후 매출액에 대한 원재료 수급 방안 계획]

	5억 매출	15억 매출	30억 매출	50억 매출	80억 매출	
제품 필요량	1,667 kg	5,001 kg	10,002 kg	16,670 kg	26,672 kg	
원재료 필요량	11,114 kg	33,342 kg	66,684 kg	111,140 kg	177,824 kg	
산지별 수급량	경북 영천	5,000 kg	5,000 kg	5,000 kg	5,000 kg	-
	경기 화성	10,000 kg	15,000 kg	15,000 kg	15,000 kg	-
	제주도	3,000 kg	3,000 kg	3,000 kg	3,000 kg	-
	기타 산지	-	15,000 kg	15,000 kg	15,000 kg	-
	스마트팜	-	-	50,000 kg	100,000 kg	200,000 kg

(3) 상용화 계획 및 일정

2019년	2020년	2021년	2022년	2023년
Launching 준비				
Global 시장 진입				
		Global 시장 성숙		
			현지화 전략	

(가) Online 마케팅: SNS, 전용 Homepage, 수출 Site (트레이드코리아, 고비즈 코리아 등)

- ① SNS, 홈페이지, 트위터, 블로그 등을 통한 홍보를 실시하여 차별성을 부각
- ② Blind Test 및 효능시험에 대한 홍보로 소비자들에게 객관성 부여
- ③ 홈페이지를 통한 제품 체험수기 모집 등 소비자가 참여하는 체험 마케팅 실시
- ④ 국내외 식품 관련 매체에 광고 및 기사를 작성하여 신제품 홍보 전략 구축
- ⑤ 현재 홍보 중인 식품 저널과 뉴트라텍스에 광고 및 기사 작성

(나) 전용 디자인 개발: 동남아시아용, Haral시장용, 중남미용

(다) 국내전시회 출품: FI Korea, 국제건강산업박람회 등 전시회 출품

(라) 해외전시회 출품: Vita Food(스위스), SupplySide West(미국), CPHI(중국)등 출품

5-2. 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. BM 수립 배경

(1) 사회, 생활 및 경제환경 변화에 대한 대비

(가) 고령화인구의 증가 및 경제적 성장에 따른 삶의 질 향상에 대한 관심 증가에 따라 질병의 치료보다는 예방을 위한 제품과 장기복용 시에도 안전한 소재에 대한 수요가 늘고 있으며, 또한 원인이 다양하고 복잡한 만성질환인 피부노화 예방과 개선을 위한 소재의 경우 실제적인 효능 발현을 위해서는 피부건강 관련 복합적 다기능 소재를 활용한 제품 개발이 필요함.

(나) 세계적으로 사회 환경의 급변에 따른 스트레스 및 미세먼지 등의 오염물질들이 증가하면서 효능이 검증된 피부건강 훼손예방 및 생리활성 증진을 위한 안전한 소재와 제품의 필요성은 확대 될 것임.

(2) 관련기술 경제적, 산업적 중요성

(가) 기능성 소재 또는 생리활성소재를 개발하기 위해 과학적 연구를 수행하고 이를 제품화하는 과정에서 기능성, 안전성 및 안정성에 관한 원천기술력 확보를 통해 관련

산업분야에 파급효과 창출 가능.

(나) 줄폴(고장초)은 전통적으로 민간에 사용되어 왔고 약재상에서도 판매되고는 있으나, 고장초의 효능과 안전성에 관한 관련 기술개발, 상품개발이 거의 전무한 상태이므로 시기적절한 연구로 기능성, 안전성이 검증된 부가가치 높은 상품을 개발 할 수 있음.

나. BM 목표 및 핵심 경쟁요인

(1) BM 목표

(가) 활성물질 고함유 신규 피부건강 증진 기능성 식품 소재 확보.

(나) 현재 식품 산업에 활용이 낮은 고장초를 기능성 원료로 개발함으로써 고부가가치 창출.

(다) 활성물질 고함유 신규 기능성 식품소재 개발 및 고부가가치신소재 개발 핵심 기술 확보.

(라) 새로운 피부건강 기능성식품 소재를 개발함으로써 국내 1조 4000억원의 기능성 식품시장에서 경쟁력 확보 및 수입대체 효과.

(마) 기능성화장품 소재로도 활용 가능하여 수입의존도가 높은 화장품 원료산업에 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료개발 및 표준화된 한방자원을 이용하여 동 분야의 해외시장 경쟁력 증대.

(2) BM 목표 및 핵심 경쟁요인

(가) BM 목표

① 활성물질 고함유 신규 피부건강 증진 기능성 식품 소재 확보.

② 현재 식품 산업에 활용이 낮은 고장초를 기능성 원료로 개발함으로써 고부가가치 창출.

③ 활성물질 고함유 신규 기능성 식품소재 개발 및 고부가가치신소재 개발 핵심 기술 확보.

④ 새로운 피부건강 기능성식품 소재를 개발함으로써 국내 1조 4000억원의 기능성 식품시장에서 경쟁력 확보 및 수입대체 효과.

⑤ 기능성화장품 소재로도 활용 가능하여 수입의존도가 높은 화장품 원료산업에 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료개발 및 표준화된 한방자원을 이용하여 동 분야의 해외시장 경쟁력 증대.

(나) 핵심 경쟁 요인

① 시장 초기에는 다이어트에 도움이 되는 제품이 주를 이뤘지만 이후에는 피부노화를 예방하고 아토피와 건조증 같은 피부질환 개선 등에 폭 넓게 사용되고 있음.

② 최근에는 피부보습, 항산화, 탄력, 슬리밍, 미백 등 바르는 화장품의 기능을 그대로 갖춘 다양한 제품이 등장하며 시장확대를 주도함.

다. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황

- ① 시장 초기에는 다이어트에 도움이 되는 제품이 주를 이뤘지만 이후에는 콜라겐, 코엔자임Q10, 히알루론산, 피크노제놀 등의 뷰티 고기능성 원료를 중심으로 한 피부노화를 예방하고 아토피와 건조증 같은 피부질환 개선 등에 폭 넓게 사용되고 있음.
- ② 최근에는 피부보습, 항산화, 탄력, 슬리밍, 미백 등 바르는 화장품의 기능을 그대로 갖춘 다양한 제품이 등장하며 시장 확대를 주도함.
- ③ 한국의 이너뷰티 시장은 대부분의 매출이 콜라겐과 히알루론산 등 피부 미용에 집중되어 있는 편이지만 최근에는 미백 등 새로운 분야로 확대되고 있음. 또한 아모레퍼시픽과 LG생활건강, CJ등 대기업과 화장품 기업, 제약회사까지 합세해 다양한 신제품이 출시되고 있는 추세임.

라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

- (가) 벼과식물의 피부건강관련 과학적 근거 마련과 복합건강기능식품 섭취로 피부노화 예방과 개선을 통하여 보다 건강하고 만족한 고령사회 구현에 도움.
- (나) 주요 고객층은 피부노화 방지에 관심이 많은 30~50대 여성으로 추측.

(2) BM의 수익창출 방안

- (가) 다기능 식품개발과 사업화 가능.
- (나) 고장초 유래 기능성분의 보습, 주름개선, 미백 민감성 피부 개선 효능을 가진 멀티기능성 소재를 개발하고, 이를 이용하여 다양한 형태의 수요 맞춤형 건강기능성 소재의 상품화를 통한 내수촉진 및 수출 경쟁력 제고.
- (다) 고장초 기능성 검증과 기능성분 작용기작 연구로 식·의약 소재화
- (라) 스포츠 음료 등 제형 다양화를 통한 판매 루트 개발
- (마) 고장초를 주 소재로 한 바르는 화장품 원료 개발
- (바) 체지방/항산화 효과가 있는 BTC 보유 소재와의 복합제 개발
- (사) 확보된 유효성분의 천연물 신약으로의 개발 범위 확대
- (아) 현재 일반적인 주름개선 기능성 식품은 식약처 가이드라인에 따라 UVB를 통한 주름 유도 모델을 사용하여 효능을 확인하지만, 고장초효소처리추출분말을 활용하여 UVA 관련 신규작용기전의 연구를 통한 타사 제품과의 차별성을 확보할 계획

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ 지표물질 표준품 분석, validation 정량분석법 수집 <ul style="list-style-type: none"> - ICH guideline 참고 ○ 관련 자료 예시 	

<p style="text-align: center;">3AQ13a ■</p> <p style="text-align: center;">VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY (*)</p> <p>Guideline Title: Validation of Analytical Procedures: Methodology Legislative basis: Directive 75/318/EEC as amended Date of first adoption: December 1986 Date of entry into force: For studies commencing after June 1997 Last revised 1998 ICH Q2(R) CMP(ICH)281/95 Previous titles/other references: Additional Notes: This note for guidance concerns test procedures used in documentation submitted in accordance with Part 2, sections A, P of the Annex to Directive 75/318/EEC as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a medicinal product. This guideline is complementary to, and should be read in conjunction with, the guideline on Validation of Analytical procedures: Definitions and Terminology.</p> <p style="text-align: center;">CONTENTS</p> <p>INTRODUCTION 1. SPECIFICITY 2. LINEARITY 3. RANGE 4. ACCURACY 5. PRECISION 6. DETECTION LIMIT 7. QUANTIFICATION LIMIT 8. ROBUSTNESS 9. SYSTEM SUITABILITY TESTING</p> <p style="text-align: right;">107</p>	<p style="text-align: center;">3AQ16a ■</p> <p style="text-align: center;">STABILITY TESTING OF NEW ACTIVE SUBSTANCES AND MEDICINAL PRODUCTS (*)</p> <p>Guideline Title: Stability Testing of New Active Substances and Medicinal Products (*) Legislative basis: Directive 75/318/EEC as amended Date of first adoption: October 1985 Date of entry into force: For applications submitted after 1/1/1988 Last revised 1993 ICH Q1A: Stability Testing of New Drug Substances and Products, HE2312/92, CMP(ICH)308/94 Previous titles/other references: Additional Notes: This note for guidance concerns the application of Part 2, sections C and F of the Annex to Directive 75/318/EEC as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a new medicinal product. This guideline replaces those sections of the CPMSP guideline entitled Stability tests on Active Ingredients and Finished Products which refer to new active substances and medicinal products containing new active substances.</p> <p style="text-align: center;">CONTENTS</p> <p>PREAMBLE OBJECTIVE SCOPE ACTIVE SUBSTANCE PRODUCT ANNEX 1</p> <p style="text-align: right;">127</p>	<p style="text-align: center;">3AQ17a ■</p> <p style="text-align: center;">C. CONTROL OF STARTING MATERIALS (C. ACTIVE SUBSTANCES)</p> <p style="text-align: center;">C.1.1 Specification and Routine Tests</p> <p>Table 1. Specification and routine tests for starting material of Korean red ginseng powder capsule.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Test parameters</th> <th>Test method</th> <th>Specification/limit</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Identification</td> <td>Ph. Eur. 01/2002:1523 (Ginseng) - 2007/PhEur.C</td> <td>As described in Ph. Eur. 01/2002:1523 - Identification.C.</td> </tr> <tr> <td>Loss on drying</td> <td>Ph. Eur. 2.3.32</td> <td>≤ 8.0%</td> </tr> <tr> <td>Total ash</td> <td>Ph. Eur. 2.4.16</td> <td>≤ 5.0%</td> </tr> <tr> <td>FCI insoluble sub</td> <td>Ph. Eur. 2.8.1</td> <td>≤ 0.0%</td> </tr> <tr> <td>Foreign matter</td> <td>Ph. Eur. 2.8.2</td> <td>≤ 0.0%, 100 g sample used</td> </tr> <tr> <td>Content of 98% ethanol-soluble material</td> <td>J Ph. C.1.1.2.3</td> <td>≥ 18.0%</td> </tr> <tr> <td>Assay</td> <td>Ph. Eur. 01/2002:1523</td> <td>≥ 64% ethanol-ginsenosides Rb₁ and Rg₁, calculated with reference to the dried drug</td> </tr> <tr> <td>Microbiological quality</td> <td>Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 2.6.2</td> <td>Category 3b</td> </tr> <tr> <td>Aflatoxin*</td> <td>HPLC/fluorescence spectrophotometry C.1.1.2.3</td> <td>M1: 0.05 µg/kg M2: 2.0 µg/kg Total aflatoxins: 4.0 µg/kg</td> </tr> <tr> <td>Pesticides</td> <td>Test method according to SAN 14880/100.34 & 100.01/97 C.1.1.2.4</td> <td>Ph. Eur. 2.8.13</td> </tr> <tr> <td>Heavy metals</td> <td>Ph. Eur. 2.8.2 & 21 (modified) C.1.1.2.5</td> <td>Ph. 5 mg/kg Cd: 0.5 mg/kg Hg: 0.1 mg/kg Calculated in the dried powder</td> </tr> <tr> <td>Radioactivity*</td> <td>Determination of the activity concentration of gamma ray emitting radionuclides (ICRU, 1997) C.1.1.2.6</td> <td>≤ 600 Bq/kg</td> </tr> </tbody> </table> <p><small>J Ph.: Jap. Pharmacopoeia; Ph. Eur.: Eur. Pharmacopoeia. *As analysed every ten batches.</small></p> <p style="text-align: right;">17 Version Aug. 2014</p>	Test parameters	Test method	Specification/limit	Identification	Ph. Eur. 01/2002:1523 (Ginseng) - 2007/PhEur.C	As described in Ph. Eur. 01/2002:1523 - Identification.C.	Loss on drying	Ph. Eur. 2.3.32	≤ 8.0%	Total ash	Ph. Eur. 2.4.16	≤ 5.0%	FCI insoluble sub	Ph. Eur. 2.8.1	≤ 0.0%	Foreign matter	Ph. Eur. 2.8.2	≤ 0.0%, 100 g sample used	Content of 98% ethanol-soluble material	J Ph. C.1.1.2.3	≥ 18.0%	Assay	Ph. Eur. 01/2002:1523	≥ 64% ethanol-ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ , calculated with reference to the dried drug	Microbiological quality	Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 2.6.2	Category 3b	Aflatoxin*	HPLC/fluorescence spectrophotometry C.1.1.2.3	M1: 0.05 µg/kg M2: 2.0 µg/kg Total aflatoxins: 4.0 µg/kg	Pesticides	Test method according to SAN 14880/100.34 & 100.01/97 C.1.1.2.4	Ph. Eur. 2.8.13	Heavy metals	Ph. Eur. 2.8.2 & 21 (modified) C.1.1.2.5	Ph. 5 mg/kg Cd: 0.5 mg/kg Hg: 0.1 mg/kg Calculated in the dried powder	Radioactivity*	Determination of the activity concentration of gamma ray emitting radionuclides (ICRU, 1997) C.1.1.2.6	≤ 600 Bq/kg
Test parameters	Test method	Specification/limit																																							
Identification	Ph. Eur. 01/2002:1523 (Ginseng) - 2007/PhEur.C	As described in Ph. Eur. 01/2002:1523 - Identification.C.																																							
Loss on drying	Ph. Eur. 2.3.32	≤ 8.0%																																							
Total ash	Ph. Eur. 2.4.16	≤ 5.0%																																							
FCI insoluble sub	Ph. Eur. 2.8.1	≤ 0.0%																																							
Foreign matter	Ph. Eur. 2.8.2	≤ 0.0%, 100 g sample used																																							
Content of 98% ethanol-soluble material	J Ph. C.1.1.2.3	≥ 18.0%																																							
Assay	Ph. Eur. 01/2002:1523	≥ 64% ethanol-ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ , calculated with reference to the dried drug																																							
Microbiological quality	Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 2.6.2	Category 3b																																							
Aflatoxin*	HPLC/fluorescence spectrophotometry C.1.1.2.3	M1: 0.05 µg/kg M2: 2.0 µg/kg Total aflatoxins: 4.0 µg/kg																																							
Pesticides	Test method according to SAN 14880/100.34 & 100.01/97 C.1.1.2.4	Ph. Eur. 2.8.13																																							
Heavy metals	Ph. Eur. 2.8.2 & 21 (modified) C.1.1.2.5	Ph. 5 mg/kg Cd: 0.5 mg/kg Hg: 0.1 mg/kg Calculated in the dried powder																																							
Radioactivity*	Determination of the activity concentration of gamma ray emitting radionuclides (ICRU, 1997) C.1.1.2.6	≤ 600 Bq/kg																																							

7. 연구개발결과의 보안등급

D-09
○ 일반과제 - 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조 4에 해당되지 않음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당사항 없음								

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		코드번호	D-11	
[주관기관/1세부, (주)비티씨]				
1. 안전점검				
1) 안전점검은 (주)비티씨 기업부설연구소의 표준작업수순서(Standard Operating Procedures, SOP) 중 안전관리 규정에 의하여 실시한다.				
2) 주관기관 및 참여기관의 주요 안점점검 체계는 아래와 같으며, 매월 연구실 유해요인을 점검하여 연구실 유해성 등급, 취급시간 등급, 위험가능성 등급, 관리수준 등을 점검한다.				
3) 안전관리 책임자: 문주명 연구소장				
4) 안전관리 담당자: 구명서 책임연구원				
5) 월 1회 안전점검 회의 실시 및 연구실 안전점검				
6) 안전관리 점검체계				
<p>Step 1.</p> <p>담당: 연구를 수행하는 자 시기: 연구 개시 및 종료</p> <p style="text-align: center;">매일 점검</p>	→	<p>Step 2.</p> <p>담당: 연구담당자 기준: 표준작업수순서 점검: 연구책임자</p> <p style="text-align: center;">매월 점검</p>	→	<p>Step 3.</p> <p>연구원 안전교육 안전교육 후 단체 안전점검 필요시 외부 정밀점검 의뢰</p> <p style="text-align: center;">연 2회 점검</p>

2. 정밀안전진단실시

연구실 정밀안전진단 또한 각 연구기관의 표준작업수순서(Standard Operating Procedures, SOP)에 따라 수행한다. 정밀점검은 연 1회 단체 안전점검 후 시행하는 것이 기본으로 하지만 월간 점검을 통하여 연구책임자가 정밀점검이 필요하다고 생각될 경우 수시로 진행한다.

정밀안전진단은 대한산업보건협회 등 전문기관 상담을 통하여 진행한다.
3. 참여연구원의 교육훈련
 - 1) (주)비티씨 기업부설연구소의 안전관리 규정에 의하여 담당업무 종사 전 8시간, 연구 내용 변경시 2시간 이상의 안전관리교육을 실시
4. 참여연구원의 건강검진실시
 - 1) 참여연구원은 연 1회 이상 전문기관에서 특수건강검진을 실시
(연구활동종사자 건강검진 실시기준(교육과학부)에 준하여 연구원이 취급하는 위험물질의 수준에 따라 산업안전보건법 시행규칙 제102조에 따라 특수건강진단기관의 지정요건에 따른 의료기관에서 건강검진을 실시하도록 한다.)
5. 참여연구원의 보험가입
 - 1) 모든 참여연구원 산재보험 가입
6. 연구 수행에 필요한 연구실 안전 확보 계획
 - 1) 전문기관의 작업환경측정 실시
 - 2) 개인용 보호장비 추가 구입
 - 3) 밀폐형 시약장 설치
7. 안전 교육, 훈련 이행 실적
 - 1) 월 1회 연구책임자 안전 교육
 - 2) 분기별 전체 실험실 이용자 교육

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관 명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Inhibitory effect of <i>Zizania latifolia</i> chloroform fraction on allergy-related mediator production in RBL-2H3 cells	계명대 학교	협동	Food Science and Biotechnology	0.786	2017.3.30.	중복사사	SCIE/ 2회 인용
2	논문	Volatile compounds and antiproliferation effects of <i>Dendropanax morbiêra</i> on HepG2 cells	계명대 학교	협동	Journal of Life Science	-	2017.4.27.	중복사사	비SCI
3	논문	Protection against UVB-induced wrinkle formation in SKH-1 hairless mice: Efficacy of tricin isolated from enzyme-treated <i>Zizania latifolia</i> extract	계명대 학교	협동	Molecules	3.098	2018.9.4.	중복사사	SCIE
4	논문	Anti-inflammatory and anti-allergic effects of phlorotannins from <i>Ecklonia cava</i>	계명대 학교	협동	Journal of Life Science	-	2018.10.11.	단독사사	비SCI

5	논문	Protection effects of the ethanol extract of <i>Elaeagnus umbellata</i> leaves on α -MSH-induced melanin production in B16-F0 and UVB-induced damage in CCD-986sk cells	계명대학교	협동	Food Science and Technology Research	0.376	2018.10.27. (투고일)	중복사사	SCIE
---	----	--	-------	----	--------------------------------------	-------	-------------------	------	------

11. 기타사항

	D-13
○ 해당사항 없음	

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"> ○ 젊은 여성 위한 건강기능식품 키워드 ‘SPRING’, 2014. 04. 03. 약업신문 ○ 미래의 화장품을 보다...트윈 코스메틱과 안티 에이징, 2014. 07. 31. 데일리코스메틱 ○ 중국, 먹어서 예뻐지는 화장품, “이너뷰티: 시장 성장세!”, 2014. 05. 02. 하나로신문 ○ 中, 화장품을 먹는다? 이너뷰티 트렌드 확산, 2010. 12. 28. KOTRA & KOTRA 해외시장 뉴스 ○ 2014 중국 화장품 시장, 2005년 이래 가장 낮은 성장률 기록, 2014. 02. 17. 데일리코스메틱 ○ 잘 먹어야 예뻐진다는데...‘먹는 화장품’ 이너뷰티 경쟁 뜨겁다, 2014. 06. 09. 매일경제 ○ 중국, 먹어서 예뻐지는 화장품 ‘이너뷰티’시장 성장세, 2014. 04. 30. KOTRA & KOTRA 해외시장뉴스 ○ 먹어서 예뻐지는 ‘이너뷰티’ 시대 성큼, 2014. 06. 19. 뷰티누리 ○ 식품의약품안전처, 화장품 인체적용시험 및 효력시험 가이드라인, 2015. 08 제정. ○ 식품의약품안전처, 건강기능식품 인체적용시험 설계 안내서, 2012. 01 제정. ○ 식품의약품안전처, 건강기능식품 기능성 평가 가이드, 2014. 12 제정. ○ H Cai, EA Hudson, P Mann, RD Verschoyle, P Greaves, MM Manson, WP Steward and AJ Gescher. Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent triclin in human-derived breast cancer cells <i>in vitro</i> and in nude mice <i>in vivo</i>. <i>British Journal of Cancer</i> (2004) 91, 1364-1371 ○ Hong Cai, Mohammad Al-Fayez, Richard G. Tunstall, Sharon Platton, Peter Greaves, William P. Steward, and Andreas J. Gescher. The rice bran constituent triclin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in <i>Apc^{Min}</i> mice. <i>Mol Cancer Ther</i> (2005) 4(9), 1287-92 ○ Eunson Hwang, Taek Hwan Lee, Sang-Yong Park, Tae Hoo Yi and Sun Yeou Kim. Enzyme-modified <i>Panax ginseng</i> inhibits UVB-induced skin aging through the regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. <i>Food Funct</i> (2014) 5, 265 ○ Brahim Chaqour, Sophie Seit�, Karine Coutant, Anny Fourtanier, Jacques-Paul Borel, Georges Bellon. Chronic UVB- and all-trans retinoic-acid-induced qualitative quantitative changes in hairless mouse skin. <i>Photochemistry and Photobiology B: Biology</i> (1995) 28, 125-135 		

- Kyung Ok Lee, Sang Nam Kim and Young Chul Kim. Anti-wrinkle Effects of Water Extracts of Teas in Hairless Mouse. *Toxicol. Res.* (2014) 30(4), 283-289
- Sungkyung Kim, Hyun-In Oh, and Jae-Kwan Hwang. Oral Administration of Fingerroot (*Boesenbergia pandurata*) Extract Reduces Ultraviolet B-induced Skin Aging in Hairless Mice. *Food Sci. Biotechnol.* (2012) 21(6), 1753-1760
- Chieh-Chen Huang, Wen-Bin Wu, Jia-You Fang, Han-Sun Chiang, Shao-Kuan Chen, Bing-Huei Chen, Ying-Ting Chen and Chi-Feng Hung. (-)-Epicatechin-3-gallate, a Green Tea Polyphenol Is a Potent Agent Against UVB-induced Damage in HaCaT Keratinocytes. *Molecules* (2007) 12, 1845-1858
- CLAUDE SALIOU, MANABU KITAZAWA, LAURA MCLAUGHLIN, JIAN-PING YANG, JOHN K. LODGE, TOSHIFUMI TETSUKA, KEIJI IWASAKI, JOSIANE CILLARD, TAKASHI OKAMOTO and LESTER PACKER. ANTIOXIDANTS MODULATE ACUTE SOLAR ULTRAVIOLET RADIATIONINDUCED NF-KAPPA-B ACTIVATION IN A HUMAN KERATINOCYTE CELL LINE. *Free Radical Biology & Medicine* (1999) 26(1/2), 174-183
- Anggakusuma, Yanti, Jae-Kwan Hwang. Effects of macelignan isolated from *Myristica fragrans* Houtt. on UVB-induced matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 in HaCaT cells. *Dermatological Science* (2010) 57, 114-122
- Myung-Suk Kim, Ga-Hui Oh, Min-Ji Kim and Jae-Kwan Hwang. Fucosterol Inhibits Matrix Metalloproteinase Expression and Promotes Type-1 Procollagen Production in UVB-induced HaCaT Cells. *Photochemistry and Photobiology* (2013) 89, 911-918
- Yong Pil Hwang, Kyo Nyeo Oh, Hyo Jeong Yun, Hye Gwang Jeong. The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *Dermatological Science* (2011) 61, 23 - 31
- Myungsuk Kim, Young Gyun Park, Hee-Ju Lee, Sue Ji Lim, and Chu Won Nho. Youngiasides A and C Isolated from *Youngia denticulatum* Inhibit UVB-Induced MMP Expression and Promote Type I Procollagen Production via Repression of MAPK/AP-1/NF-κB and Activation of AMPK/Nrf2 in HaCaT Cells and Human Dermal Fibroblasts. *Agric Food Chem.* (2015) 63(22), 5428-38
- So Ra Kim, Yu Ri Jung, Hye Jin An, Dae Hyun Kim, Eun Ji Jang, Yeon Ja Choi, Kyoung Mi Moon, Min Hi Park, Chan Hum Park, Ki Wung Chung, Ha Ram Bae, Yung Whan Choi, Nam Deuk Kim, Hae Young Chung. Anti-Wrinkle and Anti-Inflammatory Effects of Active Garlic Components and the Inhibition of MMPs via NF-κB Signaling. *PLoS One.* (2013) 8(9), e73877
- A-Rang Im, Kung-Woo Nam, Jin Won Hyun and Sungwook Chae. Phloroglucinol Reduces Photodamage in Hairless Mice via Matrix Metalloproteinase Activity Through MAPK Pathway. *Photochemistry and Photobiology* (2016) 92, 173 - 179
- Hoe-Yune Jung, Jae-Cheon Shin, Seon-Min Park, Na-Ri Kim, Wonjung Kwak, Bo-Hwa Choi. *Pinus densiflora* extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type

I procollagen expression. *Toxicology Reports* (2014) 1, 658 - 66

- A-Rang Im, Sung Hum Yeon, Jung Seung Lee, Key An Um, Young-Joon Ahn and Sungwook Chae. Protective effect of fermented *Cyclopia intermedia* against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes. *BMC Complement Altern Med.* (2016) 16, 261
- Yong Pil Hwang, Hyung Gyun Kim, Jae Ho Choi, Eun Hee Han, Kwang-il Kwon, Young Chun Lee, Jun Min Choi, Young Chul Chung, Tae Cheon Jeong, Hye Gwang Jeong. Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF- κ B/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *Food and Chemical Toxicology* (2011) 49, 3374 - 382
- Hisashi K.N. et., al., contribution of momilactone A and B to rice alleopathy, *journal of plant physiology*, 167, 787-791, 2010.
- G.Primavera and E. Berardesca. Clinical and instrumental evaluation of a food supplement in improving skin hydration. *International Journal of Cosmetic Science*, 2005;27:199-204.
- K.Neukam, S.De Spirt, W.Stahl, M.Bejot, J.-M.Maurette, H.Tronnier, U.Heinrich. Supplementation of Flaxseed Oil Diminishes Skin Sensitivity and Improves Skin Barrier Function and Condition. *Skin Pharmacology and physiology*, 2011;24:67-74.
- Bazin, R. and Flament, F.. *Skin Aging Atlas. Vol 2. Asian type* MED'COM publishing, Paris. France 2009.
- Esther Boelsma, Lucy PL van de Vijver, R Alexandra Goldbohm, Ineke AA Klopping-Ketelaars, Henk FJ Hendriks, and Len Roza. Human skin condition and its associations with nutrient concentrations in serum and diet^{1,2}. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003;77:2: 348-355.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.