

116075-3

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002608-01

초고압효소융합기술을 이용한 홍삼 부산물의 기능성 다당체 개발 연구

최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

# 초고압효소융합기술을 이용한 홍삼 부산물의 기능성 다당체 개발 연구 최종보고서

2019.03.25.

주관연구기관 / (주)뉴트렉스테크놀러지  
협동연구기관 / 동국대학교산학협력단

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “초고압효소융합기술을 이용한 홍삼 부산물의 기능성 다당체 개발연구”  
(개발기간 : 2016.09.05 ~ 2018.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 03. 25.

주관연구기관명 : (주)뉴트렉스테크놀로지 (대표자)

협동연구기관명 : 동국대학교 산학협력단 (대표자) 김대영 (원)



주관연구책임자 : 김 성 한

협동연구책임자 : 신 한 승

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116075-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.01.01~ 2018.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	초고압효소융합기술을 이용한 홍삼부산물의 기능성 다당체 개발 연구			
연구책임자	김 성 한	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: - 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 27명 내부: 27명 외부: - 명	총 연구개발비	정부: 700,000천원 민간: 240,000천원 계: 940,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)뉴트렉스테크놀로지 동국대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명: 해당없음.			상대국 연구기관명: 해당없음.	
위탁연구	연구기관명: 해당없음.			연구책임자: 해당없음.	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁 번호	(5건) 1 2017-07-30 게재 2 2018-06-07 게재 외3건	(1건) 10-2018-014 1840									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

- 1차년도 연구의 목표는 홍삼부산물로부터 초고압 효소 융합기술을 적용하여 기능성 다당체 생산 및 다당체 함량 평가임.
- 2차년도 연구의 목표는 초고압 효소 융합 공정 시스템 구축을 위한 시설 설비 보완 및 기능성 다당체 생산을 통한 면역증진/피부효능 개선 평가임.
- 3차년도 연구의 목표는 초고압 효소 융합 기술을 이용한 홍삼부산물의 기능성 다당체 제품 개발 및 사업화 방안을 모색함.
- 본 연구 과제를 통한 연구개발 성과는 지식재산권(특허 출원) 1건, 기술이전 1건, 제품화 1건, 고용창출 1건, 논문 5건, 학술발표 6건을 달성함.

보고서 면수

89 페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 연구 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 폐기물로 버려지는 홍삼부산물을 이용한 기능성 다당체 개발 및 효능평가 연구를 통하여 현장적용 및 산업화의 기반 마련</li> </ul> <p>○ 연구 내용</p> <p>1차년도 : 홍삼부산물로부터 초고압 효소 융합기술을 적용하여 기능성 다당체 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료확보 및 초고압 효소 융합 기술을 이용한 다당체 추출기법 정립</li> <li>- 유용성분으로서 기능성 다당체의 효능 및 효용성 검토</li> <li>- 유효성분 및 기능성분 분석법 정립</li> <li>- 홍삼부산물의 기능성 다당체 개발을 위한 공정 표준화 작업</li> <li>- 홍삼부산물의 피부독성평가</li> </ul> <p>2차년도 : 초고압 효소 융합 공정 시스템 구축 및 실생산 공정 운용 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 다당체 추출기법 연구 결과에 따른 대량시스템 적용 검증</li> <li>- 초고압 효소 융합 공정 시스템에 따른 초고압 기기 및 추출기 등의 부품 장치 재정립</li> <li>- 초고압 효소 융합 기술의 표준 공정 연구</li> <li>- 작업 공정 및 순서, 재료, 처리조건 등을 공정표로 작성</li> <li>- 대량시스템 적용 후 다당체 수율 비교 분석</li> <li>- 홍삼부산물의 면역증진 효능평가 연구</li> <li>- 홍삼부산물의 피부기능개선 효능평가 연구</li> </ul> <p>3차년도 : 초고압 효소 융합 기술을 이용한 홍삼부산물의 기능성 다당체 제품 개발 및 사업화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발된 공정관리 기준을 적용하여 시제품 생산 계획 수립</li> <li>- 표준화된 기능성 다당체 원료로부터 식품 또는 비식품류(반려동물의 사료) 개발</li> <li>- 기능성 다당체를 활용한 제품화 전략 구축</li> <li>- 국내 내수 주요 업체에 적극적 영업을 실시</li> <li>- 주관기업의 미국 지사 유통망을 통한 해외시장 마케팅 구축</li> <li>- 시제품 제작을 위한 홍삼부산물의 독성 및 안전성 평가 확립</li> </ul>
------------------------	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지식재산권(특허 출원) 1건, 기술 이전 1건, 제품화 1건, 고용창출 1건</li> <li>○ 논문 5건, 학술발표 6건</li> </ul>			
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농·식품 생물 자원에 대한 원천기술 확보 및 후속 연구의 참고 자료로 활용</li> <li>○ 과학 기술과 농업의 부존자원 융·복합화를 통한 창조경제 기반의 신성장 전략으로 새로운 가치 창출</li> <li>○ 산성 다당체의 기능 성분을 활용할 수 있는 다양한 소재 개발로 홍삼의 이용 가능성을 극대화 시킬 수 있고, 홍삼제품의 다양성과 국내·외 시장 선점 및 수익성장출 기대</li> <li>○ 대부분 폐기되는 홍삼 부산물에 고부가가치 제품으로의 활용을 통해 농가 소득 증진, 관련 산업에서의 폐기 비용 절감 및 제품의 제조원가 감소</li> </ul>			
국문핵심어 (5개 이내)	홍삼 부산물	초고압효소 융합기술	산성다당체	식품
영문핵심어 (5개 이내)	Red ginseng byproducts	Enzyme-linked high pressure process (ELHPP) convergence technology	Acidic polysaccharides	Food

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

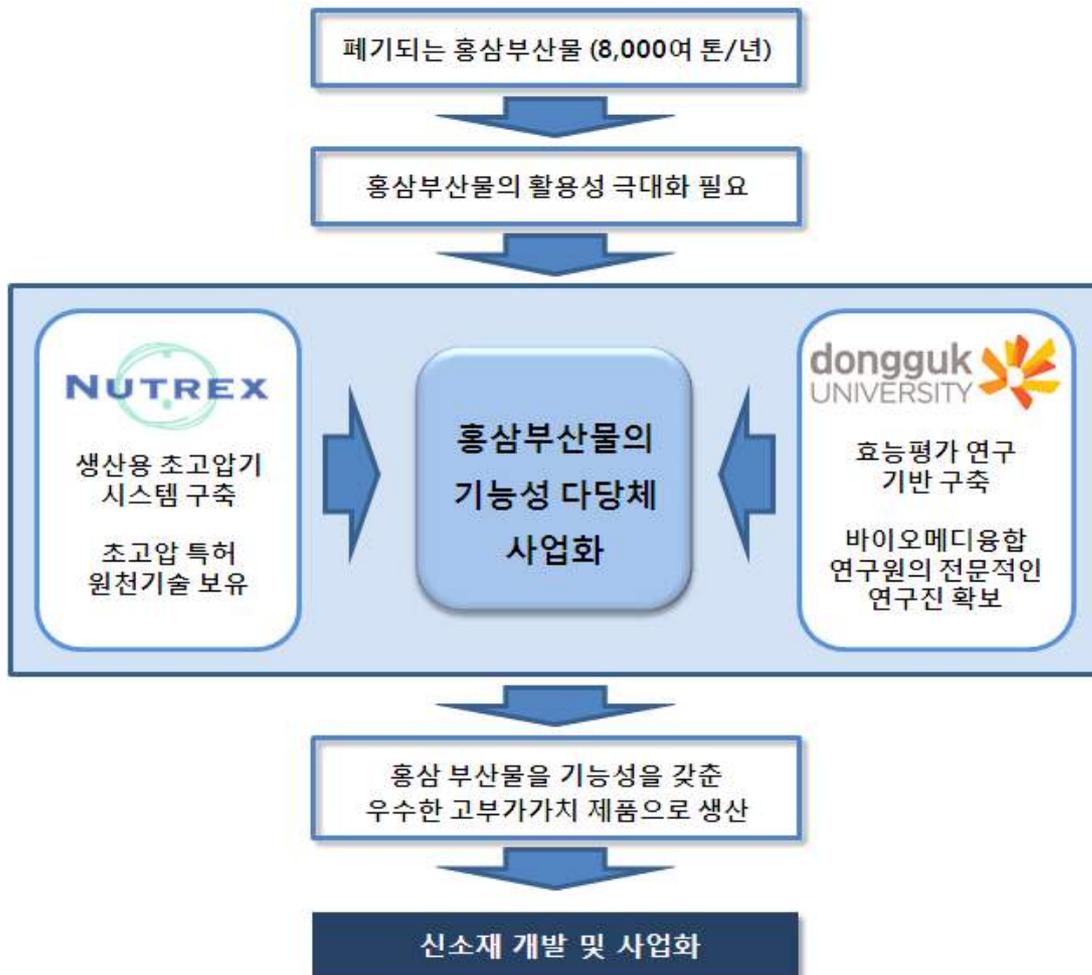
1. 연구개발과제의 개요 .....	7
1-1. 연구개발 목적 .....	7
1-2. 연구개발의 필요성 .....	8
1-3. 연구개발 범위 .....	20
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	21
2-1. 연구개발 추진전략 및 추진체계 .....	21
2-2. 연차별 연구내용 및 결과 .....	24
2-3. 연구개발 성과 .....	73
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	76
3-1. 목표 .....	76
3-2. 목표달성여부 .....	78
3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책 .....	84
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	85
붙임. 참고 문헌 .....	87

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

○ 초고압 효소 융합 기술(Enzyme-linked high pressure process convergence technology, EHHPP)을 이용하여 폐기물로 버려지는 홍삼부산물의 기능성 다당체를 개발 및 효능 평가 시험을 진행하며 이를 위한 생산용 시스템을 구축하여 현장적용 및 산업화함.



○ 주관기관인 (주)뉴트렉스테크놀러지는 지적소유권이 확보된 원천기술 “초고압을 이용한 신규한 인삼가공 방법” 특허 기술을 보유하고 있음. 기존 비가열 식품가공기술로서의 한계를 넘어 초고압기술을 우리나라 홍삼가공에 적용시킨 것으로 인삼가공에 있어 세계 최초의 방법이라 할 수 있음.

○ 초고압 기술을 사용하여 홍삼의 주성분인 ginsenoside를 비롯한 아미노산, 항산화 물질 등 생리활성 성분의 추출 수율을 크게 향상시켰으며, 이를 이용한 홍삼 농축액 등의 제품의 관능 품질을 향상시켜 소비자 기호도를 증가시킴.

○ (주)뉴트렉스테크놀러지는 최대압력 600 MPa, 200-liter vessel이 두 개인 dual-type 초고압기를 확보하여 운영하고 있음. (아래 사진)



<(주)뉴트렉스테크놀러지의 생산용 초고압기기(600 MPa, 200 L dual-type)>

○ (주)뉴트렉스테크놀러지는 식품가공 기술 뿐만 아니라 생명공학 기술 분야에서도 다수의 특허를 보유하고 있으며, 이를 기반으로 혁신적인 기능성 화장품/의약품 원료 등을 개발하고 있어, 본 과제 연구 결과를 응용해 융합적 연구 수행 및 사업화 추진이 가능함.

○ 농촌진흥청 보고에 의하면 홍삼 부산물은 연간 약 8천여톤(2012년 기준)이 생산되며, 일부 홍삼 부산물이 동물사료와 퇴비로 이용될 뿐 대부분은 폐기되고 있는 실정임.

○ 따라서 폐기물로 버려지는 홍삼부산물에 초고압 효소 융합기술(EHHPP)을 적용한다면 다양한 소재로 이용될 수 있는 기능성 다당체 제품을 생산할 수 있을 것으로 기대됨.

○ 초고압 효소 융합기술을 이용, 주관기관은 대량 생산공정 실용화 가능성을 시험하고, 최적 공정 조건을 설정함. 이후 현장실증을 진행하여 공정관리기준을 도출함으로써 효과적으로 사업화할 수 있도록 함.

○ 협동기관인 동국대학교는 주관기관과 협업을 통해 개발된 기술을 적용한 기능성 다당체를 제품화 할 수 있는 효능 및 메카니즘을 규명함.

**1-2. 연구개발의 필요성**

(1) 국내·외 기술현황

(가) 초고압 기술

○ 초고압 기술은 high pressure processing (HPP), high hydrostatic pressure (HHP) processing, ultra-high pressure (UHP) processing 등으로 불리며, 액체 또는 고체 식품을 포장하거나 포장하지 않은 상태로 100-900 MPa (mega pascal)의 정수압(hydrostatic

pressure)으로 압력 처리하는 것으로 정의할 수 있음.

○ 초고압 기술의 적용사례 및 처리효과

적용사례	처리효과
최소가공제품	풍미 및 조직감 보존, 살균
해산물, 신선한 야채류	비가열처리를 통한 살균
냉동식품	균일한 해동(세포손상방지)
육가공제품	육류의 숙성, 저장성, 조직특성, 맛 향상
즉석밥	소화율증가, 관능적 특성 향상, 유효성분의 증가(GABA)
기능성식품	유효성분의 추출 증대

○ 초고압은 최대 600 MPa (=6000 기압)을 유지할 수 있는 용기에 시료를 넣고 압력을 가하면 용기 내에 채워진 가압 media (물)이 압력에 의하여 부피가 감소하면서 초고압이 시료 모든 면에 균일하게 전달되어 성형, 살균, 압축 처리가 가능한 기술임.

○ 초창기 초고압 기술의 발전은 군사용 무기 개발로 이루어졌음. 대포 탄환이 더 멀리 날아가도록 더 높은 압력을 사용할 수 있는 대포를 디자인하면서 초고압 기술이 발전되었음.

○ 19세기 말에 처음으로 Hite (1899)에 의해 초고압이 미생물에 미치는 영향에 관한 실험이 시도되었고, 뒤이어 초고압이 식품의 물리적 특성에 어떠한 영향을 미치는 지에 대하여 보고되었음.

○ 압력이 식품의 물리적 또는 기능적 특성에 미치는 영향에 대한 연구들이 최근에 와서 수행되고 있지만, 초고압 관련 대부분의 연구들은 미생물의 불활성화에 초점을 두고 있음.

○ 초고압은 식품의 조리, 가공, 보존에 있어서 열처리와 비교되는데 기존의 열처리가 단백질 변성, 전분 호화, 효소 불활성화, 살균, 기생충 사멸 등에 이용되는 반면 초고압은 열처리의 장점을 대체로 유지하면서 비효소적 갈변, 비타민 파괴, 천연 향미의 손실과 같은 열처리에 의한 화학적 변화를 최소화한다는 점에서 차이가 있음.

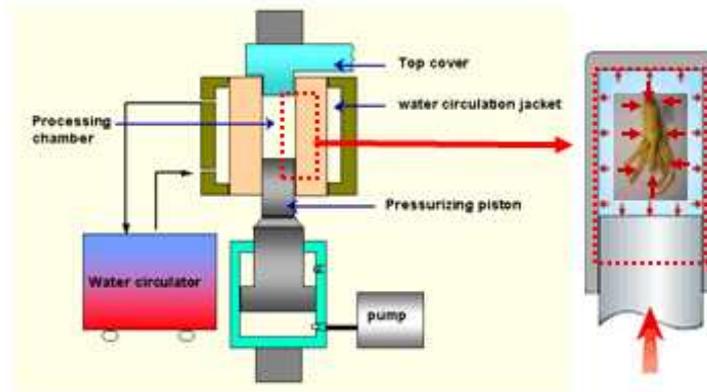
○ 1996년 Bruna *et al.*, 연구에 의하면 사과농축액이나 사과주스에서 발견된 Patulin은 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bysochlamys*에서 생성되는 독소 물질도 가열처리에 의해서는 유의적인 수준으로 감소되지 않았으나 사과주스에 압력을 300, 500, 800 MPa로 60분씩 처리했을 때에는 42, 53, 62%씩 독소가 줄어들었고 온도를 50°C로 올렸을 때에는 더욱 높은 살균 효과를 보임.

○ 1990년대 일본에서 잼, 주스 등 첫 상용화 제품이 출시됨. 과채주스, 잼, 젤리 외에 가공밥에 대한 초고압 기술 적용 역시 이루어졌으나 이는 미생물제어를 통한 저장성의 연장보다 압력에 의한 물성 변화를 주된 목적으로 함. 초고압 가공 잼의 경우 과실, 설탕, 펙틴 등의 혼합물을 상온에서 충전 밀봉한 후 고압처리 공정만으로 제조됨. 고압처리로 과실, 설탕, 펙틴의 혼합물의 젤리화가 촉진되고 과육에 당액이 침투되며, 살균이 동시에 이루어짐. 또한 전 공정이

비열처리로 진행되므로 열변성, 열분해 등이 발생되지 않고, 과일 본래의 신선한 향기 및 색이 유지됨.

○ 초고압 기술은 비가열 가공기술로서 산업적 적용이 빠르게 이루어지며 현재까지 신선함과 보존성을 강조하는 제품으로 시장을 확대하고 있음.

### 초고압 홍삼 제조방법



○ 지적 소유권이 확보된 원천기술 “초고압 인삼 가공 방법” 연구는 기존 비가열 식품가공기술로서의 한계를 넘어 초고압기술을 우리나라 홍삼가공에 적용시킨 것으로 인삼가공에 있어 세계 최초의 방법이라 할 수 있음.

### 증삼 vs. 초고압-증삼 공정 비교 (SEM사진)



○ 기존 재래식 방법에 의하여 홍삼을 제조할 때 발생하는 과열삼(찌는 과정에서 터짐), 내공(홍삼제조 후 내부에 구멍이 남음), 내백(홍삼화 되지 않아 흰색으로 남은 부분) 등의 홍삼 품질 저하요인은 종래의 기술로는 해결되지 않는 부분이었음. 지적소유권이 확보된 초고압기술을 활용하여 홍삼제조 공정 중 증삼하기 이전 단계에서 단시간 초고압처리를 함으로써 재래식 방법이 가진 홍삼의 불량요소 발생을 현저히 억제시킴.

○ 또한 관능적 요인 및 향미가 향상 되고 홍삼을 제조할 경우 사포닌을 비롯하여 인삼의 아미노산 등 유효성분의 추출효율이 향상됨으로써 이를 이용한 홍삼 농축액 등의 제품 품질을

우수하게 향상시키며 소비자들의 기대 부응함. 초고압기술은 우수한 고급 홍삼을 제조 할 수 있는 방법으로 초고압가공기술의 패러다임 전환이며, 식품산업에 대한 적용범위가 확대될 것으로 예상함.



비슷한 인삼 원료를 이용하여 제조한 결과 초고압 홍삼은 사진과 같이 기존 홍삼에 비하여 내공 및 균열 발생이 적고, 투명한 적갈색을 띄었으며, 인삼 향이 강하였다.

#### 나. 효소처리 기술

○ 효소는 생물이 만드는 단백질로서 화학반응을 촉진시키는 촉매임. 현재까지 알려진 효소의 종류는 약 3,000종이며 해마다 증가하는 경향을 보임. 이중 산업적 응용가능 효소는 150여종이며 상업적으로 생산되고 있는 효소는 60여종이 됨.

○ 효소의 상업적 이용은 1894년 소화제인 takaamylase가 *Aspergillus oryzae*의 배양에 의하여 생산된 이래  $\alpha$ -amylase와 동물에서 pancreatin, trypsin, chymotrypsin, 사람의 소변에서 urokinase와 식물체에서 protease등이 공정적으로 생산됨.

○ 식품 가공공정 중 발생하는 잎, 씨, 박, 껍질 등과 같은 부산물들은 주로 cellulose, hemicellulose, pectin등의 고분자들로 구성되는데, 이를 활용하기 위해서는 저분자화를 위한 가수분해 공정이 필수적임. 가수분해공정은 물리적 또는 화학적 방법 등을 이용한 처리 기술이 있으나 이로 인한 부가적으로 생성되는 물질들로 인해 2차 오염을 야기할 뿐만 아니라 에너지의 소모가 크고 고가의 기계들로 인해 비용이 증가한다는 단점이 있음. 이런 단점들 때문에 최근에는 주로 생물학적인 방법인 효소분해가 이용되어지고 있음. 효소는 특정 기질에만 선택적으로 반응하고 화학적 처리방법에 비해 분해 생성물이나 부산물 등의 생성이 적음. 또한 적은 양으로도 반응이 가능하고 효소의 종류나 효소활성에 영향을 주는 온도, pH, 반응시간, 기질의 농도 등에 의해 원하는 물질을 생산할 수 있음.

○ 전분에서 감미료 및 포도당 등의 개발은 효소적인 액화공정으로부터 시작되는데 이때 열안정성이 큰  $\alpha$ -amylase를 사용하게 됨.

○ Cellulase는 cellulose분자의 glycoside 결합을 가수분해하는 효소의 통칭으로 endo-cellulase, exo-cellulase 및 cellobiase로 나눌 수 있음. endo-cellulase가 cellulose의  $\beta$ -1,4 결합을 무작위로 가수분해하면 exo-cellulase가 cellulose 말단에 작용하여 cellobiose단위를 만들고 cellobiase가 cellobiose를 glucose로 최종 분해시킴. Pectinase,  $\beta$ -glucanase와 전분분해 효소와 같이 양조, 곡류 가공, 주스 제조, 알코올 발효시 사용됨. 일반적으로 식품용으로는 *A. niger*에서 분리하며 비식품용으로는 *Trichoderma viride*에서 생산함.

○ Hemicellulase는 맥주의 발효시 보리에서 유발되는  $\beta$ -glucan을 완전히 분해하고 맥아즙을 생산할 때 사용됨. 와인의 청징과 제빵 시에 품질을 개선하고자 사용함.

○ 펙틴 물질은 30,000~300,000의 분자량을 갖고 있는 heteropolysaccharide로서 galacturonan, rhamnagalacturonan, arabinan, galactan과 arabinogalactan이 주를 이루며 이중 최소 75%는 methoxyl group으로 치환되어 있음. 주쇄는  $\alpha$ -D-galacturonate가 1,4결합으로 결합되어 있고 부쇄(side chain)는 L-rhamnose가  $\beta$ -(1,2)  $\beta$ -(1,4)-bond로 결합하고 있음. 이들을 분해하는 효소는 esterase, 6개의 polygalacturonase와 4개의 lyase등이 보고되어 있음. 이 효소는 과일 야채가공, 와인, 커피, 차의 발효등에 사용되고 있는데 커피콩에서 점질물을 제거하고 펄프층을 제거할 때도 사용됨.

○ Pectinase, cellulase등의 효소들은 효모, 세균 또는 일부 고등식물 등에서 분리되며 일반적으로 식물조직의 세포벽이나 세포 사이를 연결해주는 펙틴을 분해하여 과실이나 야채의 조직을 연화시키고 당을 생산하거나 과일 가공 시에 주스의 생산 수율을 높이는데 주로 사용됨.

#### 다. 초고압효소 융합기술

○ 초고압과 효소 처리 기술을 수행한 연구 및 개발 예로는 효소 및 초고압을 이용한 홍삼 제조방법으로 기존의 수삼보다 조사포닌 함량 및 진세노사이드 함량 증가, 효소처리와 초고압 처리에 의한 콩나물 추출물의 항산화 활성, 일본 TOYO KOATSU사의 수산물(멸치)에 적용 등이 있음.

○ 홍삼 부산물은 수분 3.32%, 조지방 1.20%, 섬유소 15.36%, 조단백질 14.25% 및 회분 2.95%로 구성되어 있다는 보고가 있음(타사 '산란노계 생산성 향상을 위한 홍삼 부산물 활용방법' 과제 중 일부).

○ 추출 과정 중 용출되지 않고 홍삼 부산물에 함유된 산성다당체는 Pectin-like  $\alpha$ -1,4-polygalacturonan 골격을 갖는 분자량이 약 34,600인 물질임. pectin질의 함량은 계절에 따라 차이가 많은데 6년 근의 경우 4.46~6.11% 정도가 함유되어 있고 채취시기와 연근에 따라 차이가 나며 약 5~17% 정도 존재한다고 보고됨. pectin을 구성하고 있는 성분으로는 glucuronic acid, galacturonic acid과 같은 산성당은 56.9%함유되어 있으며 그 외 glucose, arabinose, rhamnose, galactose 같은 중성당은 28.3% 함유되어 있다고 함.

○ 본 연구는 초고압을 이용한 신규한 인삼가공 방법에 대한 원천기술과 이를 활용한 선행 연구 및 효소처리 기술을 기반으로 홍삼 추출물의 부산물로 발생하는 홍삼 부산물에 초고압 효소 융합 기술을 적용하여 홍삼 부산물에 다량 함유되어 있는 산성다당체를 추출하고 효능 검증 및 홍삼 부산물의 소재개발을 위한 고부가가치 사업화를 추진하고자 함.

○ 홍삼 부산물에 함유된 산성다당체의 추출수율 향상과 유용성분 함량 증대를 위하여 초고압 효소 융합기술은 분자량 10,000~15,000이상의 다당류 추출을 극대화할 수 있는 기술로 사료됨.

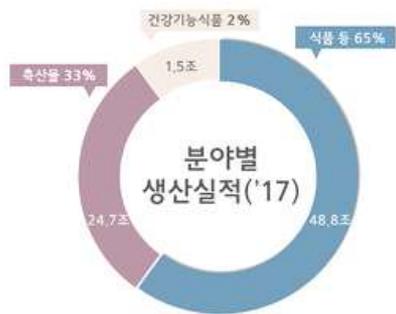
(2) 시장 현황

(가) 국내 식품산업 및 인삼, 홍삼 시장 현황

○ 식품의약품안전처는 '17년 국내 식품산업 생산실적은 약 75조 6백억 원으로 2016년 대비 2.4% 증가하였다고 밝힘. 2017년 식품산업 생산실적 주요 특징은 업종별 생산실적으로는 식품 제조·가공업이 54.8%, 식품별 생산실적으로는 돼지고기 포장육과 홍삼제품이 1위로 나타남.

○ 2017년 건강기능식품 분야 판매실적은 홍삼이 1조 358 억원으로 부동의 1위를 차지하였으며, 2016년 9,900 억원 대비 4.6% 증가 하였음. 2017년 건강기능식품 생산실적은 홍삼제품, 개별 인정형, 비타민 및 무기질, 프로바이오틱스, 밀크씨슬 추출물 순으로 많이 생산되었으며 상위 5개 품목이 전체 건강기능식품 생산 중 70% 이상을 차지함. [식약처, 2017년 식품·축산물·건강기능식품 생산실적 통계 참고자료]

(배출액, 단위 : 억원)



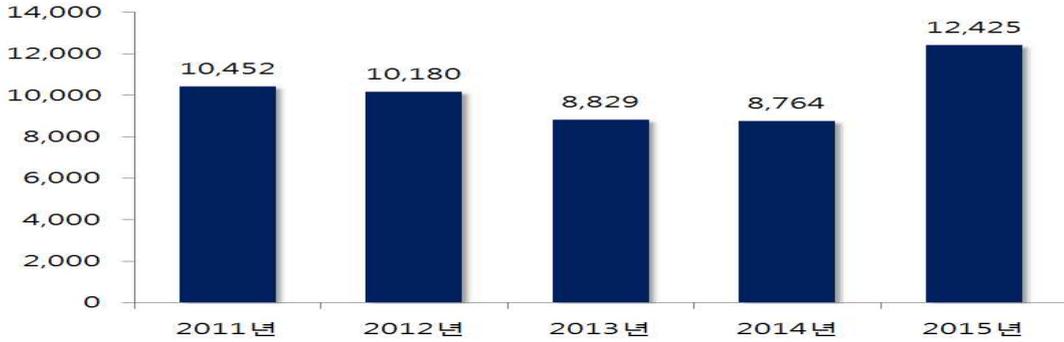
구분	2013	2014	2015	2016	2017
<b>홍삼</b>	5,869	6,330	6,943	9,900	10,358
전년대비 성장률(%)	△9.5	7.9	9.7	42.6	4.6
<b>개별인정형</b>	2,324	3,176	3,195	2,357	2,450
전년대비 성장률(%)	29.3	36.7	0.6	△26.2	3.9
<b>비타민 및 무기질</b>	1,747	1,415	2,079	1,843	2,259
전년대비 성장률(%)	6.1	△19.0	46.9	△11.4	22.6
<b>프로바이오틱스</b>	804	1,388	1,579	1,903	2,174
전년대비 성장률(%)	54.9	72.6	13.8	20.5	14.2
<b>밀크씨슬(카르두스 마리아누스) 추출물</b>	308	676	704	1,091	1,042
전년대비 성장률(%)	128.1	119.5	4.1	55.0	△4.5

○ 우리나라 인삼 제품류 시장은 출하액 기준으로 8,829 억원(2013), 8,764 억원(2014), 1조 2,425 억원(2015)으로 나타남. 다양한 제품 등장으로 2011년도부터 2015년까지 연평균 4.4% 증가하였음. 인삼/인삼제품류는 3년간(2013-2015) 농식품 수출 품목 1위로 2015년 기준 전체 신선 가공농식품 수출에서 차지하는 비중 2.5% 단일품목으로는 가장 높음.

\* 인삼류란 「인삼산업법」 제2조(정의)에서 인삼, 수삼, 홍삼, 태극삼, 백삼 및 그 밖의 인삼을 모두 포함

《인삼제품류 출하 현황》

(단위: 억원)



연도별 식품 및 식품첨가물 생산실적, 식품의약품안전처  
연도별 식품 및 식품첨가물 생산실적, 식품의약품안전처  
15년도 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016.08.11.

○ 2015년 인삼(신선)/인삼제품의 수출액은 1억 5,508만 달러, 수입액 412만 달러로 수출액의 비중이 높았다. [농림축산식품부, 식품저널뉴스 보도자료(2017.05.15.보도)]

(나) 홍삼 부산물을 활용한 고부가가치 개발 현황

○ 대부분의 홍삼제품은 홍삼을 물 또는 알코올로 가열 추출하여 추출물을 제조하고 있으며, 홍삼 추출물 제조과정에서 다량의 홍삼 부산물(홍삼추출물의 잔사물)은 홍삼에 대해 약 65%가 얻어짐.

○ 농촌진흥청 보고에 의하면 홍삼 부산물은 연간 약 8천여톤(2012년 기준)이 생산되며, 일부 홍삼 부산물이 동물사료와 퇴비로 이용될 뿐 대부분은 폐기되고 있는 실정임.

○ 농촌진흥청 보고에 따르면 홍삼 부산물을 병 느타리버섯 재배시 배지로 사용한 결과 느타리버섯 배지로 수입되는 면실박의 50%를 홍삼 부산물로 대체할 경우 일일 만병 기준 연간 4천 여 만원의 농가소득을 올릴 수 있으며 44억 원 상당의 외화절감 효과가 있는 것으로 추정함.

○ 홍삼 부산물에는 폴리아세틸렌 계통의 지용성 화합물과 산성 다당체 등 여러 가지 유효성분이 함유되어 있고, 상당한 양의 다당체가 용출되지 않고 함유되어 있다고 알려짐. 백삼과 홍삼, 홍삼 부산물의 일반성분을 비교한 연구에 의하면, 홍삼 부산물이 백삼과 홍삼과 비교하여 가장 높은 조섬유를 함유하고 있는 것으로 보고되었으며, 이는 홍삼 부산물이 다당체 추출 원료로의 타당성을 갖는다고 판단 할 수 있음.

Proximate compositions of white ginseng, red ginseng and red ginseng marc (%, w/w)			
Component	White ginseng (WG)	Red ginseng (RG)	Red ginseng marc <sup>1)</sup> (RGM)
Carbohydrate	75.0	72.4	72.1
Crude fiber	2.1	0.4	15.3
Crude protein	14.6	13.6	18.1
Crude lipid	2.7	2.3	1.8
Crude ash	4.6	4.2	6.5
Moisture	5.8	8.3	5.8

<sup>1)</sup>Red ginseng marc is a byproduct of alcohol extraction process of red ginseng.

[참고논문: 홍삼 부산물을 이용한 다당체 추출조건 최적화(2009)]

○ 특히 알코올 추출 홍삼 부산물에는 산성다당체의 함량이 높으며 이 산성다당체는 항암 및 면역활성이 높은 것으로 보고된 바 있으나, 온도 및 pH 등의 다당체 추출조건에 대한 기초적인 연구만 있을 뿐, 기술적인 수준이 부족함.

○ 다당체(Polysaccharide)는 수용액상에서 추출되고 총 추출물중의 60-70% 차지함. 단당류, 이당류, 삼당류, 그리고 다당류, 파낙산 A-U같은 다당체는 혈당수치 저하, 면역기능 촉진, 위궤양 억제 효과를 보임. 각국삼의 산성 다당체 함량을 비교한 결과 아래와 같음.

(표) 각국삼의 산성다당체 함량 비교<sup>a)</sup>(단위: O.D. at 525nm)

고려인삼 <sup>b)</sup>	전칠삼 <sup>c)</sup>	미국삼 <sup>d)</sup>	고려홍삼 <sup>b)</sup>
0.30	0.21	0.20	0.71

a) 80°C, 1시간동안 추출, b) P. ginseng, c) P. notoginseng, d) P.quinquefolius

\*한국인삼제품협회 자료 참고

○ KGC인삼공사는 홍삼 성분을 함유한 반려동물 건강식인 ‘지니펫’을 출시함. ‘지니펫’은 반려견의 우수한 기호성과 배변과 관련한 특허 출원 및 공개가 완료된 제품으로 6년근 홍삼 부산물(홍삼부산물)과 증삼농축액, 고품질 유기농 원료를 결합해 반려동물의 영양보급 및 면역력에 도움을 줄 수 있는 반려동물용 건강식임.



○ 홍삼 부산물을 식품으로 활용하는 일부 연구는 홍삼 부산물을 첨가한 식빵과 스펀지 케이크가 보고되어 있으며, 홍삼 부산물 추출물을 배지에 첨가하면 효모와 담자균의 생육이 향상되었다는 결과가 알려져 있음. 최근에는 홍삼 부산물을 산란계 사료와 버섯재배용 배지로 활용

가능함이 알려져 있으나, 대부분의 홍삼 부산물 활용은 매우 미미함.

(3) 지식 재산권 현황

(가) 초고압 효소 융합기술과 관련된 최근 국내외 논문 및 특허

기술	원료 또는 제품	처리조건	효과	국내/ 국외
초고압	옥수수전분	400MPa,15min	비가열방법을 이용한 전분의 물리화학적특성 비교	국내
	육가금류가공식품	200~500MPa, 2~10min	살균 및 저장성향상	국내
	이유식	550MPa,3min	물성변화에 영향력 없음	국내
	과일주스	100~500MPa, 10-60min	비가열방법을 이용한 살균 및 효소불활성화	국내
	조미오징어	400MPa,20min	살균 및 저장성 향상	국내
	쌀	500MPa,5min	물성변화 및 세균저감효과	국내
	간장소스	550MPa,3min	살균 및 품질향상효과	국내
	전복	100~500MPa,3 min	살균효과	국내
	비브리오	80-250MPa	세포막성분특성분석	국외
	비지	103~172MPa	영양성분및 추출수율개선	국내
	초고압 검색시 국내논문(학위논문포함)85건, 해외논문 1,327건 검색됨.			
초고압 효소 병합	돈태반콜라겐	200MPa Trypsin,pepsin 등	추출수율향상	국내
	마늘	100MPa,24hrs	기능성 평가	국내
	발아벼	30MPa,48hrs	기능성분 및 생리활성 증가	
	대두분말	100~600MPa, 1~15min Pepsin,Chymotrypsin	가수분해효과	국내
	콩나물	500MPa,3min	추출수율 및 효능활성증대	국내
	백년초	20~100MPa, 15~75min, 펙틴효소	추출수율 증대	
	장염비브리오	80~250MPa, Na + K + ATP 효소	효소 활성도 증가 및 세포막 구성성분변화	국외
	초고압, 효소 동시 검색시 국내논문(학위논문포함) 6건, 해외논문 1건 검색됨.			

발명명칭	출원인	등록일자	국가
초고압 조건 하 효소를 이용한 천연초 추출물의 제조 방법	(주)네오크레마	2014.06.19	한국
초고압 효소 처리를 통한 태반의 저분자화 방법	건국대학교산학협력단	2015.10.08	한국
아임계수 및 초고압 효소 처리에 의해 태반을 저분자화 하는 방법	건국대학교 산학협력단	2015.10.08	한국
초고압 저온 추출방법을 이용하여 녹용 또는 녹각으로부터 유효성분을 추출하는 방법	(주)디마퓨어텍	2013.11.27	한국
녹용 초고압추출발효 조성물 및 이의 제조방법	서승태	2014.10.01	한국
혈중 콜레스테롤 농도 저하 활성을 갖는 초고압 양과 추출물의 제조방법 및 그 양과 추출물을 유효성분으로 약학조성물 또는 건강기능식품 조성물	(재)전남생물산업진흥원	2014.11.24	한국
산뽕잎의 효소 분해물 제조방법 및 이를 이용한 산뽕잎 막걸리의 제조방법	농업법인주식회사 청산녹수	2012.06.18	한국
압력을 직접 처리하는 전처리 공정을 포함하는 효소적 생전분 가수분해방법	인제대학교 산학협력단	2013.08.09	한국
과열수증기조리법과 초고압 비가열살균법을 이용한 고품질의 간편편이식 제조방법	(주)다손	2013.09.11	한국
국내 특허 총 174건. 국외 특허는 거의 없음.			

(나) 홍삼부산물과 관련된 최근 국내외 논문

원료	연구내용	국내/국외
홍삼 부산 물	홍삼박을 첨가한 멥쌀과 현미참쌀죽의 품질특성	국내
	홍삼부산물이 스트레스에 대한 산란계 생체반응에 미치는 영향	국내
	기능성 사료첨가제 개발을 위한 인삼 및 농산부산물의 생리활성 평가에 관한 연구	국내
	홍삼부산물 검색시 국내논문(학위논문포함) 3건 검색됨.	

원료	발명명칭	출원인	출원일자	국가
홍삼박	과일박과 홍삼박을 이용한 증류주 및 그 제조 방법	최혜영 외	2012.03.19	한국
	발효 홍삼박 성분을 함유하는 기능성 액상사료 첨가제	영농조합법인 풍기인삼제조창 외 1	2012.06.28	한국
	홍삼박을 이용한 클렌징 화장료 조성물	(재)제주테크노파크 외	2012.09.25	한국
	홍삼박의 메탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물	(재)진안홍삼연구소	2012.10.26	한국
	홍삼박한지 및 그 제조방법	(주)농협홍삼	2013.01.31	한국
	미세캡슐화 홍삼박을 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제	영주시	2013.03.13	한국
	홍삼박의 유효성분을 함유하는 애완동물용 사료 조성물	(재)금산국제인삼약초연구소	2013.05.03	한국
	홍삼박 또는 여정실을 유효성분으로 함유하는 미백 조성물	(재)진안홍삼연구소	2013.05.15	한국
	홍삼박을 이용한 구운 떡의 제조방법	신양주영농조합법인	2013.12.31	한국
국내 특허 총 33건. 홍삼박과 관련된 국외 특허는 거의 없음.				

#### (4) 연구개발의 중요성

##### (가) 기술적 측면

○ 주관기관은 초고압기술을 이용한 홍삼원료 제조업체임. 주관기관이 보유한 원천기술 “초고압 인삼 가공 방법” 연구 특허는 기존 비가열 식품가공기술로서의 한계를 넘어 초고압기술을 우리나라 홍삼 가공에 적용시킨 것으로 인삼가공에 있어 세계 최초의 방법이라 할 수 있음.

○ 초고압과 효소 처리를 병행한 기술을 이용하여 천연물의 추출수율 및 효능검증에 대한 보고는 미미함. 기능적인 측면에서 추출수율 향상과 특정 유효성분의 함량을 극대화 하기위하여 초고압기술과 효소처리를 병용하여 홍삼 부산물의 기능성다당체를 추출한 후 효능 검증을 선행 연구로 수행함.

○ 사포닌과 더불어 산성다당체는 홍삼의 면역증진 체계에 미치는 영향이 큰 것으로 본 연구진의 사전연구에서 확인되었으며, 특히 재래식홍삼의 산성다당체와 비교하여 초고압홍삼의 산성다당체에서 면역증강 효능에 유의적인 차이를 나타내어 이에 대한 후속연구가 필요하다고 보여짐.

○ 또한 기존에 연구가 많이 진행된 산성다당체의 면역증강 효과뿐 아니라, 피부미용(미백, 항노화)효과에 대한 연구를 진행할 예정임.

○ 자원의 재활용 측면에서 그 속에 함유되어 있는 산성다당체를 추출하기 위해, 본 연구진으로부터 사전 연구된 초고압기술을 응용하여 홍삼 부산물의 다당체를 효율적으로 추출함으로써 기능성을 갖춘 우수한 식품 소재개발을 기대해 볼 수 있음.

○ 따라서, 본 연구에서는 홍삼제품 제조 및 가공 중 얻어지는 부산물의 산업적 활용성을 제고하고자 초고압 효소 융합기술(ELHPP)을 이용하여 높은 기능성을 갖는 산성다당체를 산업적 효용가치가 높은 소재로 개발하여 *in vitro*, *in vivo* 효능평가 연구를 통하여 면역증진/피부미용개선 및 예방 목적의 산업화를 추진하고자 함.

#### (나) 경제·산업적 측면

○ 본 과제를 통해 초고압 효소 융합기술을 이용한 기능성을 갖는 산성다당체를 개발. 사업화를 추진한다면 시장의 새로운 식품 소재개발 및 홍삼제품의 다양성과 이용 가능성을 극대화시킬 수 있으며 시장성을 확대 할 것으로 기대됨.

○ 현재 홍삼 농축액 추출 공정에서 대부분 활용되지 못하고 폐기되는 홍삼 부산물에 고부가가치 제품으로의 활용을 통해 농가 소득 증진과 관련 산업에서는 폐기비용을 절감하고 제품의 제조원가를 줄일 수 있는 경제적 효과도 기대됨.

#### (다) 사회·문화적 측면

○ 지난 2011년 이후 국내 홍삼제품 시장은 정체되고 있는 추세이며, 홍삼제품 업체 간의 경쟁이 치열해지면서 비슷한 컨셉의 제품들과 홍삼 브랜드의 난립으로 인한 시장의 성장성 저해로 보여짐.

○ 인삼, 홍삼은 대표적인 수출 효자상품으로 성장 가능성이 높은 고부가가치 상품으로도 각광 받았으나, 최근에는 산업규모가 위축되면서 생산·유통 등 전 부문에 대한 대대적인 혁신을 통해 경쟁력을 높여야 한다는 주장이 거세지고 있음.

○ 차별화된 홍삼제품 전략을 위해서는 기존의 사포닌 유효성분만을 활용했던 제품뿐 만 아니라, 홍삼에 함유되어 있는 활성성분을 적극적으로 이용하여 기준규격형제품은 물론이고, 기능성분을 활용할 수 있는 다양한 제품으로 개발하여 홍삼의 이용 가능성을 극대화시킬 수 있는 방안이 필요함.

○ 대부분의 홍삼제품은 홍삼을 물 또는 알코올로 가열 추출하여 추출물을 제조하고 있으며, 홍삼 추출물 제조과정에서 다량의 홍삼 부산물(홍삼추출물의 잔사물)은 홍삼에 대해 약 65%가 얻어짐.

○ 농촌진흥청 보고에 의하면 홍삼 부산물은 연간 약 8천여톤(2012년 기준)이 생산되며, 일부

홍삼 부산물이 동물사료와 퇴비로 이용될 뿐 대부분은 폐기되고 있는 실정임.

○ 국가과학기술정보센터 NDSL에 따르면, 홍삼유래 산성다당체의 경우, 항암, 면역력 증진, 아토피성 피부염 치료 및 개선, 고지혈증 개선 등 면역과 피부개선에 효과가 있는 것으로 보고되고 있음.

○ 자원의 재활용 측면에서 홍삼부산물 속에 함유되어 있는 산성다당체를 추출하기 위해, 본 연구진으로부터 사전 연구된 초고압기술을 응용하여 홍삼 부산물의 다당체를 효율적으로 추출함으로써 기능성을 갖춘 우수한 식품 소재개발을 기대해 볼 수 있음.

○ 부수적으로 홍삼 농축액 추출 공정에서 대부분 활용되지 못하고 폐기되는 홍삼 부산물에 초고압기술이 더해져서 과학기술과 농업의 부존자원 융·복합화를 통한 창조경제 기반의 신성장 전략으로 새로운 가치를 창출 함.

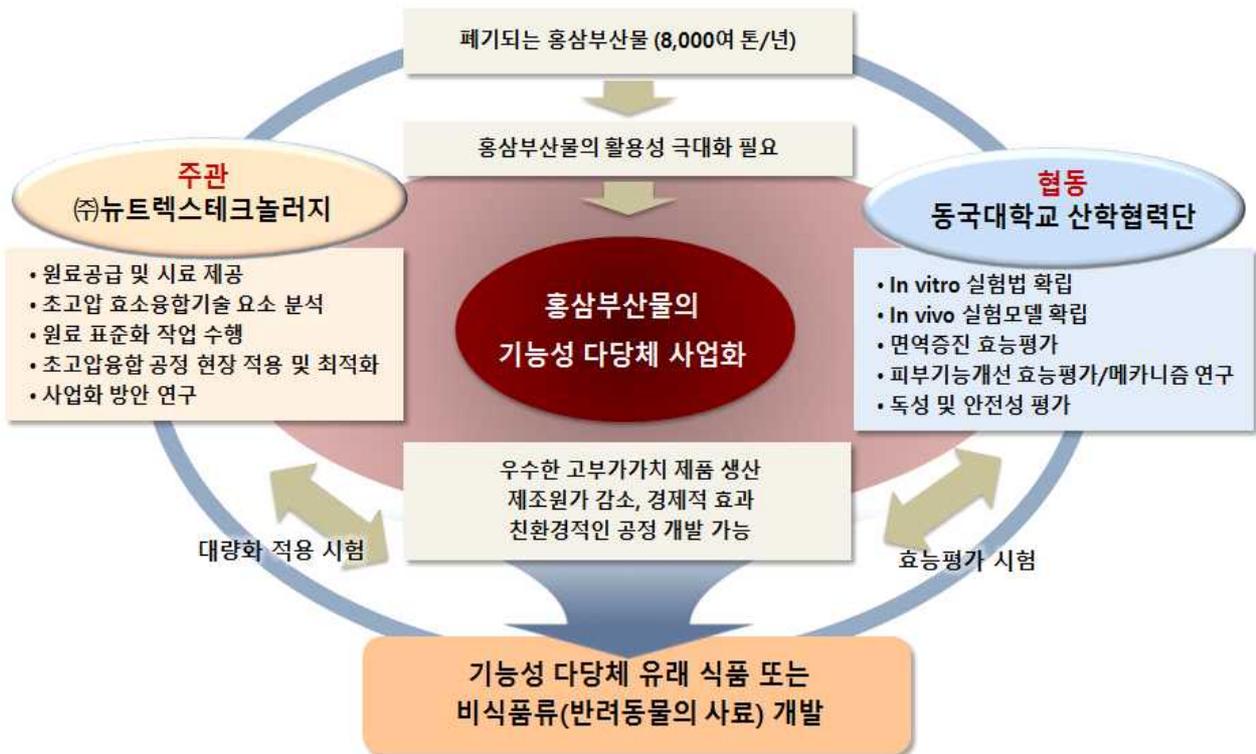
### 1-3. 연구개발 범위

구분	내용
연구 목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 폐기물로 버려지는 홍삼부산물을 이용한 기능성 다당체 개발</li> <li>○ 기능성 다당체를 이용한 면역증진 및 피부효능개선 평가 연구</li> <li>○ 개발된 기술을 대량생산 현장에 적용 및 사업화 기반 연구</li> </ul>
연구 범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 폐기물로 버려지는 홍삼부산물을 이용한 기능성 다당체 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료확보 및 초고압 효소 융합 기술을 이용한 다당체 추출기법 정립</li> <li>- 유효성분 및 기능성분 분석법 정립</li> <li>- 홍삼부산물의 기능성 다당체 개발을 위한 공정 표준화 작업</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 다당체를 이용한 효능평가 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용성분으로서 기능성 다당체의 효능 및 효용성 검토</li> <li>- 피부 세포주를 이용한 피부독성 평가</li> <li>- 피부미용개선 및 <i>In vitro</i> 피부효능평가</li> <li>- 면역증진 효능평가</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 다당체의 생물학적 안전성 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물실험을 이용한 <i>In vivo</i> 독성 및 안전성 평가</li> </ul> </li> <li>○ 개발된 기술을 대량생산 현장에 적용 및 사업화 기반 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 초고압 효소 융합 기술의 현장 적용을 통한 산업화 적합성 파악</li> <li>- 초고압 효소 융합 기술을 이용한 홍삼부산물의 기능성 다당체 추출 대량 생산 시스템 정립</li> <li>- 현장적용 후 대량 생산을 통한 사업화 방안 모색</li> <li>- 기능성 다당체의 안전성 평가 연구</li> </ul> </li> </ul>

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구개발 추진전략 및 추진체계

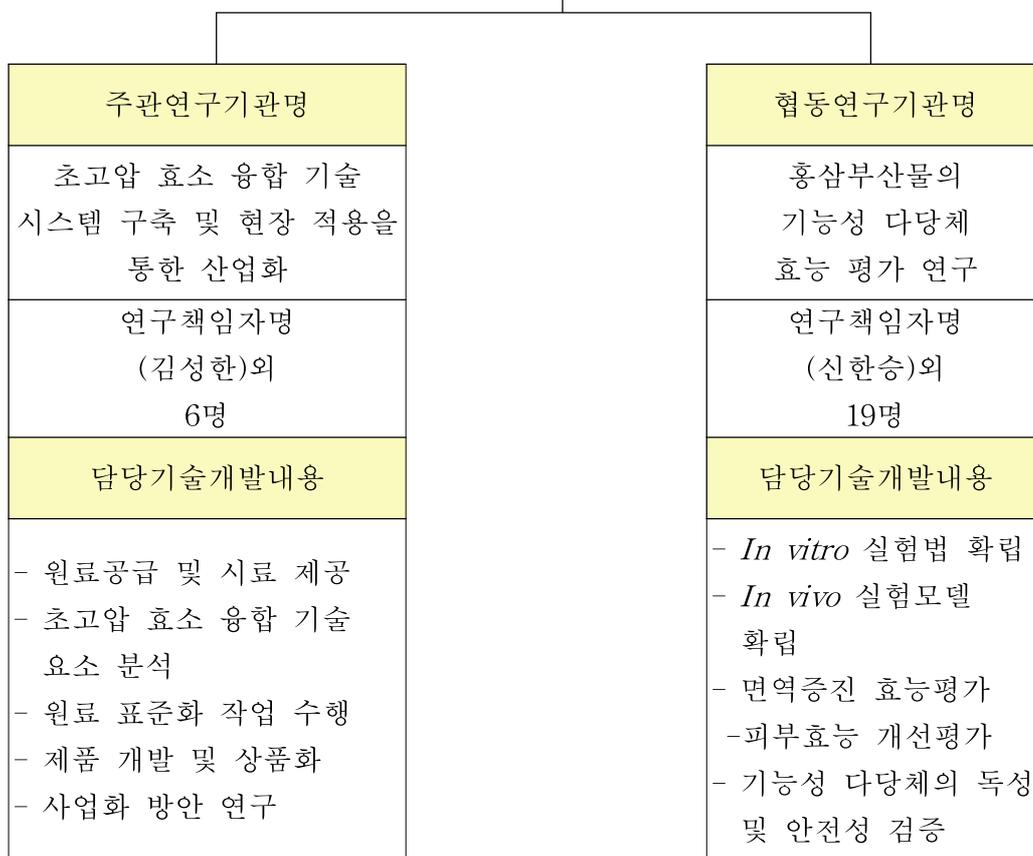
#### 가. 추진전략



나. 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	초고압 효소 융합 기술을 이용한 홍삼 부산물의 기능성 다당체 개발 연구	주관연구책임자 (김성한)외 총 26명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	1	7
대학	1	20



다. 추진일정

1차년도																
일련번호	연구 목표	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원/현금)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	개발기술을 적용하여 기능성 다당체 생산														44,000	김성한((주) 뉴트렉스 테크놀로지)
2	홍삼부산물 중 지표물질인 산성 다당체 함량평가															
3	홍삼부산물의 피부독성평가														60,000	신한승 (동국대학교 산학협력단)
2차년도																
1	초고압 효소 융합 공정 시스템 구축														140,000	김성한((주) 뉴트렉스 테크놀로지)
2	실생산 공정 운용 최적화															
3	홍삼부산물에 의한 피부 기능 개선 효능 평가														170,000	신한승 (동국대학교 산학협력단)
4	홍삼부산물의 면역증진 효능평가															
3차년도																
1	기능성 다당체 제품의 개발 및 상품화														160,000	김성한((주) 뉴트렉스 테크놀로지)
2	대량생산을 통한 사업화 방안 모색															
3	기능성 다당체의 면역증진효능/피부 효능개선 평가														150,000	신한승 (동국대학교 산학협력단)
4	기능성 다당체의 독성 및 안전성 평가 확립															

## 2-2. 연차별 연구내용 및 결과

### 가. 1차년도

#### 1) 홍삼부산물로부터 초고압 효소 융합기술을 적용하여 기능성 다당체 생산

##### 가) 연구수행 방법 및 내용

###### ① 실험재료

본 연구에 사용된 홍삼부산물은 홍삼을 물 또는 알코올 등의 용매로 추출하고 남은 잔사를 의미하며, 주관기관인 (주)뉴트렉스테크놀러지에서 홍삼추출물 제조과정에서 생성되는 부산물을 이용하였다. 시료는 홍삼부산물 다당체(RGBP), 초고압 홍삼부산물 다당체(HPP-RGBP), 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체(ELHPP-RGBP), 총 3가지 군으로 제조하여 준비하였다.

###### ② 홍삼부산물 다당체 추출물 시료 제조

HPP-RGBP 및 ELHPP-RGBP군은 홍삼추출물을 제조하고 남은 홍삼부산물을 550MPa의 압력에서 1분간 초고압처리한 후, 24시간 건조하여 시료로 사용하였다.

###### ③ 홍삼부산물의 다당체 추출 공정

건조한 홍삼부산물 20g에 20ml 증류수를 첨가하여 80℃에서 3시간 동안 열수 추출 하였다. 추출물을 여과한 후 얻은 추출액에 에탄올을 첨가하여 24시간 침지시키고, 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 침전물을 회수한 후 건조시켜 산성다당체 분석 및 효능평가용 시료로 사용하였다.

###### ④ 홍삼부산물의 효소처리

홍삼부산물에 2% 농도(건조한 홍삼부산물 기준)의  $\alpha$ -amylase, cellulase, pectinase, hemicellulase, xylanase 효소를 각각 첨가하여 효소별 최적 반응조건 따라 반응시켰다.

##### < 각 효소별 최적 반응조건 >

- $\alpha$ -amylase : 40℃에서 30분 반응
- cellulase : 40℃에서 30분 반응
- pectinase : 40℃에서 30분 반응
- hemicellulase : 50℃에서 2시간
- xylanase : 50℃에서 2시간

#### 2) 홍삼 부산물의 효소처리에 의한 산성 다당체 함량 및 수율 비교

##### 가) 연구수행 방법 및 내용

홍삼부산물로부터 추출한 다당체 시료 중 산성다당체 함량은 carbazole-sulfuric acid 방법으

로 측정하였다. 건조한 다당체 시료 0.03g에 증류수 10ml을 넣고 10배 희석하여 시료로 사용하였다. 시료 200ul 에 ethanol에 용해한 0.1% carbazole용액 80ul을 혼합한 후 sulfuric acid 1200ul 을 첨가하여 vortex 한 후 85°C로 예열된 water bath에서 15분 동안 반응 시킨다. 반응 시료액 1ml을 취하여 spectrophotometer를 이용하여 흡광도(525nm)를 측정하였다. 표준품은 galacturonic acid를 사용하여 표준곡선을 작성하고 이 값으로부터 홍삼 부산물에 함유된 산성 다당체 함량을 환산하였다.

① 홍삼부산물의 효소처리에 의한 산성다당체 함량 조사

각 효소처리에 따른 홍삼부산물의 산성다당체 함량을 조사한 결과는 Table 1. 와 같다. 홍삼 부산물에 초고압처리 후 효소를 처리하였을 때(ELHPP-RGBP군) 효소처리 전(HPP-RGBP군)에 비하여  $\alpha$ -amylase 처리 시 2%, hemicellulase 처리 시 25%, xylanase 처리 시 20%로 산성 다당체 함량이 감소하였으며, cellulase와 pectinase 처리 시 각각 31%, 7%로 증가한 것으로 나타났다. 초고압처리 후 효소 처리 하였을 때(ELHPP-RGBP군) 무처리군(RGBP)와 비교하여 hemicellulase와 xylanase 처리 시 산성다당체 함량이 9%, 3%로 감소하였고,  $\alpha$ -amylase 처리 시 19%, cellulase 처리 시 59%, pectinase 처리 시 30%로 산성다당체 함량이 증가한 것을 볼 수 있다. 따라서 홍삼부산물로부터 산성다당체를 얻을 수 있는 최적의 효소는 cellulase를 처리하는 것으로 확인되었으며, 이것은 cellulase 처리에 의해 홍삼부산물에 존재하고 있는 조직성분이 분해되어 산성다당체가 추출이 더 용이한 상태로 되어 추출효율이 증가되는 것으로 사료된다.

Table 1. 홍삼부산물의 효소처리에 의한 산성다당체 함량 비교

원료명	산성다당체 (mg/g)	초고압 삼부산물 대비 기준함량 (%)	홍삼부산물 대비 기준함량 (%)
홍삼부산물	13.63	-	-
초고압 홍삼부산물	16.57	-	122
초고압효소융합 홍삼부산물 ( $\alpha$ -amylase)	16.19	98	119
초고압효소융합 홍삼부산물 (cellulase)	21.64	131	159
초고압효소융합 홍삼부산물 (pectinase)	17.69	107	130
초고압효소융합 홍삼부산물 (hemicellulase)	12.37	75	91
초고압효소융합 홍삼부산물 (xylanase)	13.20	80	97

\* 산성다당체 함량(건조한 홍삼부산물 1g 기준)

② 홍삼부산물의 공정에 따른 다당체 수율

각 시료 공정에 따라 홍삼부산물로부터 추출된 다당체의 수율을 비교하기 위해 다당체 추출량을 조사하였다. 홍삼부산물의 다당체 수율은 추출을 위해 처음 투입된 홍삼부산물 중량대비 각 공정별로 회수된 다당체 추출물의 중량 백분율로 계산하였다(Table 2.). HPP-RGBP 및 ELHPP-RGBP군의 다당체 수율은 RBBP군과 비교하여 각각 약 20%, 36% 정도 증가하였다. 이는 초고압공정이 다당체 수율을 높이는 데 효과적임을 확인할 수 있다. 또한, 홍삼부산물의 효소처리에 따른 다당체 수율을 비교한 결과 ELHPP-RGBP군은 HPP-RGBP군 보다 높은 다당체 수율을 나타내어 효소처리가 다당체 추출에 효과적이며, 초고압효소융합기술이 홍삼부산물 다당체 수율을 극대화하기 위한 가장 효과적인 방법이라고 판단된다.

**Table 2. 홍삼부산물의 공정에 따른 다당체 수율 비교**

원료명	다당체 수율(%)	홍삼부산물 대비 기준함량(%)
홍삼부산물	5.08	-
초고압 홍삼부산물	6.06	119
초고압효소융합 홍삼부산물 (cellulase)	6.91	136

\* 다당체 수율(%) = 홍삼부산물로부터 추출한 다당체(g)/홍삼부산물(g)\*100

③ 초고압효소융합 기술을 이용한 홍삼부산물의 산성다당체 함량

공정처리에 따른 산성다당체 함량을 조사한 결과는 Table 3. 와 Fig. 1.과 같다. 산성다당체 함량은 ELHPP-RGBP군, HPP-RGBP군, RBBP군 순으로 높게 나타났으며, HPP-RGBP군은 RBBP군 보다 산성다당체 함량이 36% 증가하였고, ELHPP-RGBP군 또한 RBBP군 보다 산성다당체 함량이 58% 증가한 것으로 나타났다. 또한 ELHPP-RGBP군은 HPP-RGBP군 보다 산성다당체 함량 16% 증가한 것으로 관찰되었다. 이는 초고압 처리 시 홍삼부산물의 다당체 수율이 증가함으로써 산성다당체 함량이 증가되고, 초고압효소융합 처리시 초고압 및 효소처리가 홍삼부산물의 산성다당체의 추출을 극대화하여 더 효과적으로 작용되었음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 cellulase를 이용한 초고압효소융합 기술을 홍삼부산물의 산성다당체 추출기법으로 공정화하여 RBBP군, HPP-RGBP군, ELHPP-RGBP군을 비교하는 효능평가 실험을 진행하였다.

**Table 3. 홍삼부산물의 공정에 따른 산성다당체 함량 비교**

원료명	산성다당체(mg/g)	초고압 홍삼부산물 대비 기준함량(%)	홍삼부산물 대비 기준함량(%)
홍삼부산물	12.10		
초고압 홍삼부산물	16.49		136
초고압효소융합 홍삼부산물 (cellulase)	19.11	116	158

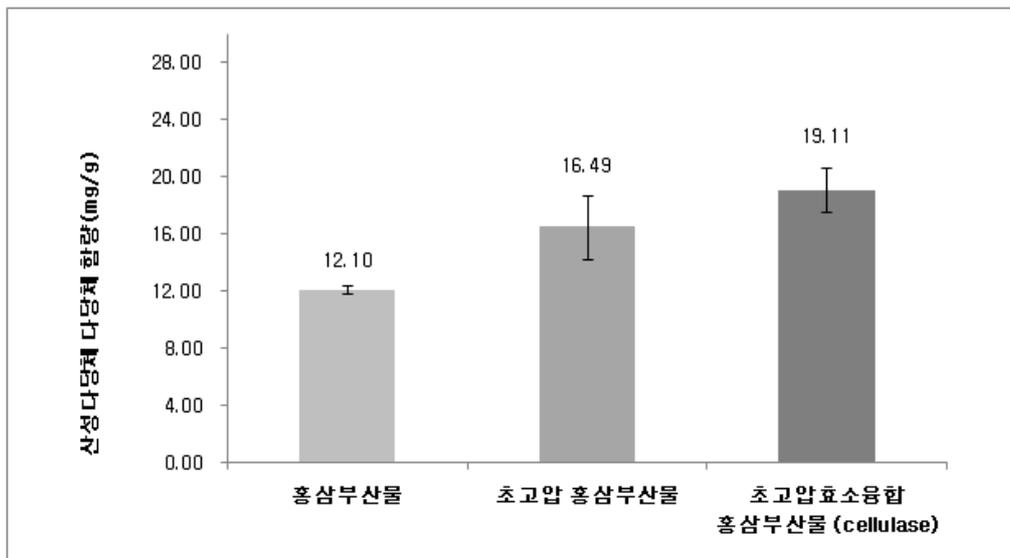


Fig. 1. 홍삼부산물의 공정에 따른 산성다당체 함량 비교

### 3) 홍삼부산물의 피부독성평가

#### 가) 연구수행 방법 및 내용

##### ① 세포 독성 평가

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay 및 Sulforhodamine B (SRB) assay로 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다. 또한 SRB는 세포의 단백질 성분에 붙어 반응하며 밝은 핑크색을 띠는 aminoxanthene 염료로 염기성 아미노기에 결합한다. 결합은 세포 질량에 비례한다. 독성 평가 방법은 다음과 같다. HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도별로 시료 처리 후, 24 h 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 µg/ml)과 0.4% SRB를 각각 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, MTT assay는 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였으며 SRB assay는 10mM trisbase에 녹여 540nm에서 측정하였다. 아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 음성대조군으로 하여 100% 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다. 시료를 처리하지 않은 조사군을 양성대조군으로 하였으며, 세포의 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

나) 연구 결과

① 피부 세포주를 이용한 *in vitro* 피부독성평가

피부세포주 중에서 인간 각질세포주인 HaCaT cell line을 이용하여 홍삼부산물의 세포 처리 농도를 결정하기위해 세포독성(MTT assay 및 SRB assay)실험을 실시하였다. 본 실험 결과를 통해 홍삼부산물 0.3mg 사용시 세포 생존률 80% 정도임을 알 수 있었다 (Fig. 2, 3). 따라서 피부세포주를 이용한 실험의 경우 0.3mg 이하로 사용하여 실험을 진행하였다.

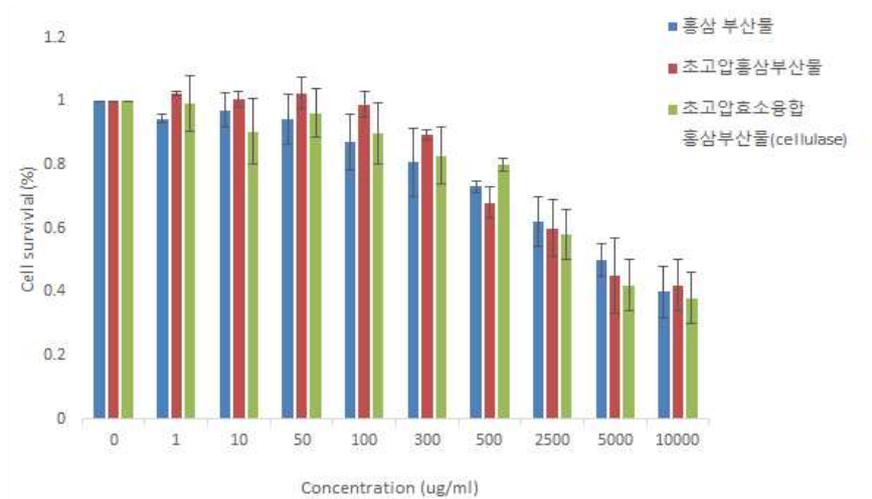


Fig. 2. 피부세포주를 이용한 세포 독성 실험 (MTT assay)

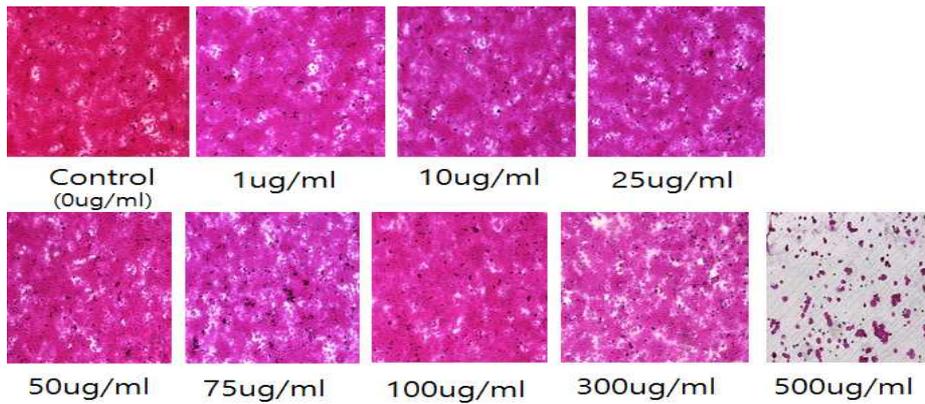


Fig. 3. 피부세포주를 이용한 세포 독성 실험 (SRB assay)

4) 홍삼 부산물 중 지표물질인 산성다당체 함량 평가

가) 연구수행 방법 및 내용

① HPLC를 이용한 기능성다당체 함량분석 조건 확립

산성다당체는 구성 당 중 갈락투론산(galacturonic acid) 조성이 높으므로, 갈락투론산의 함량 비교를 통해 기능성다당체 함량을 비교 분석하였다. 일반적으로 인삼으로부터 산성다당체를 추출하고, 강산으로 가수분해시켜 얻은 갈락투론산을 평가하였다. 분석 방법은 다음과 같다. High-performance liquid chromatography 장비를 사용하여 분석에 응용하였다. 이동상 용매로는 Methanol과 2.5mM의 Monopotassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 pH 2.8로 조정하여 사용하였으며 고정상으로는 Eclipse XDB-C18 (4.6mm i.d. 250mm, 5µm) 컬럼을 사용하였고, 40°C의 온도 조건에서 1.0 ml/min의 유속으로 195 nm에서 분석하였다 (Table 4). 또한 홍삼부산물 (주뉴트렉스테크놀로지로부터 홍삼부산물 다당체(RGBP), 초고압 홍삼부산물 다당체(HPP-RGBP), 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체-cellulase (ELHPP-RGBP), 총 3가지 균으로 제조된 샘플을 제공받아 함량 비교 분석에 사용하였다.

**Table 4. HPLC condition**

Column	C18 (4.6mm i.d. 250mm, 5µm)		
Column temperature	40 °C		
Detector	UV-Vis detector		
Wavelength	195nm		
Flow rate	1.0 ml/min		
Mobile phase	A: Methanol		
	B: 2.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH2.8)		
	B	0 min	90
		5 min	90
Injection volume	10.0 µL		

나) 연구 결과

① 홍삼 부산물 중 지표물질인 산성다당체 (D-galacturonic acid) 함량 평가

- HPLC를 이용한 기능성다당체 함량분석 조건 확립

HPLC를 통해 D-Galacturonic acid를 분석 한 결과 195nm의 파장에서 retention time 1분대에서 검출되었다 (Fig. 4). 농도 0.1-10 mg/mL 수준의 표준물질을 6가지 농도로 각각 제조하여 분석에 이용하였으며 분석결과에 따른 농도별 면적을 바탕으로 표준검량선을 확인한 결과 상관계수( $R^2$ )가 0.9983로 높은 직선성을 보였다 (Fig. 5).

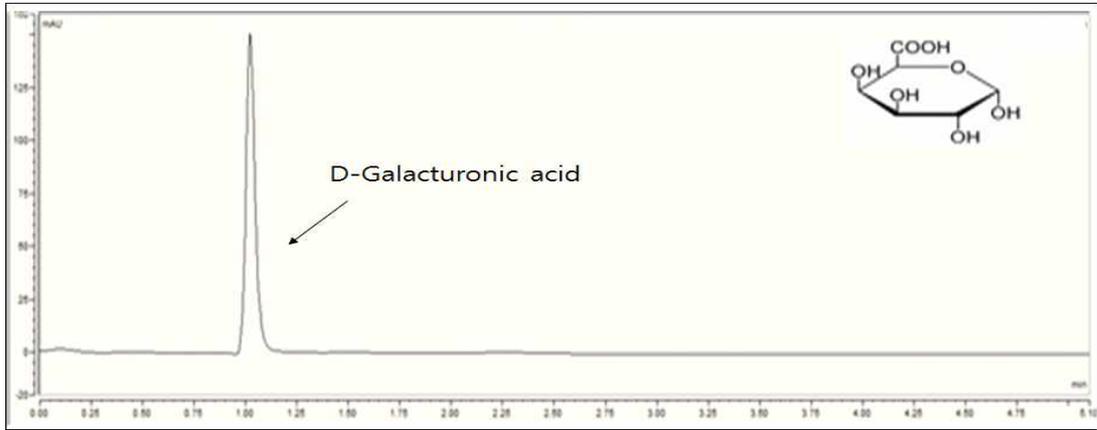


Fig. 4. 갈락투론산 크로마토그램

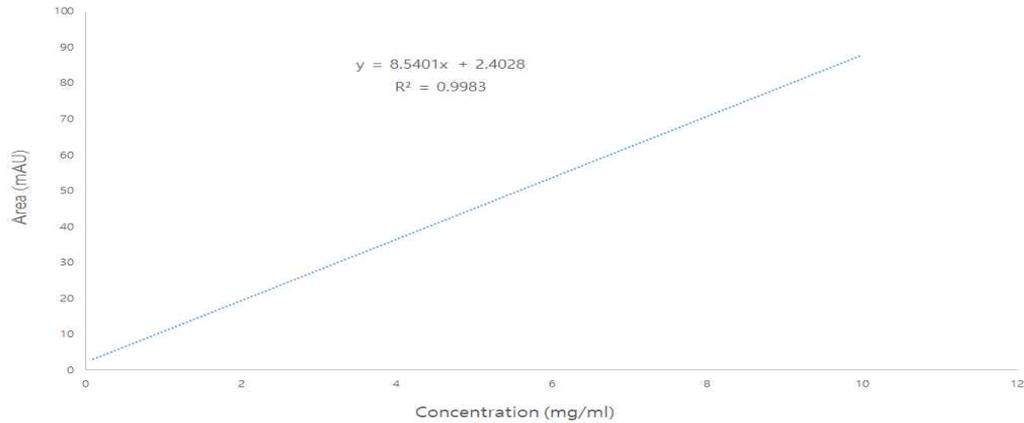


Fig. 5. 표준물질(갈락투론산)의 표준검량선

## 나. 2차년도

### 1) 기능성 다당체 수율 증대를 위한 실생산 공정 운용 최적화

#### 가) 연구수행 방법 및 내용

##### ① 실험재료

본 연구에 사용된 홍삼부산물은 홍삼을 물 또는 알코올 등의 용매로 추출하고 남은 잔사를 의미하며, 주관기관인 (주)뉴트렉스테크놀러지에서 홍삼추출물 제조과정에서 생성되는 부산물을 60℃, 24시간 건조한 시료가 홍삼부산물이며, 초고압홍삼부산물은 550MPa의 압력에서

1분간 초고압 처리 후 60℃, 24시간 건조하여 시료로 이용하였다.

② 초고압효소융합 홍삼부산물의 다당체 추출 (Scale-up실험)

건조한 홍삼부산물/초고압홍삼부산물 시료를 1cm 이하로 절단하여 각각 1kg에 10L 증류수를 첨가하여 80℃에서 3시간 동안 열수 추출 하였다. 추출물을 1마이크론 필터에 여과한 후 얻은 추출액에 에탄올(추출액의 2~3배량)을 첨가하여 4℃, 24시간 침지시킨다.

침지 후 원심 분리(4000rpm, 20분)하여 얻은 침전물을 회수하여 50℃ 이하에서 건조시킨 시료를 홍삼부산물 다당체(RGBP)/초고압 홍삼부산물 다당체(HPP-RGBP)로 하여 산성다당체 분석 및 효능평가 시료로 사용하였다. 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체(ELHPP-RGBP)는 초고압 홍삼부산물에 2% 농도(건조한 초고압홍삼 부산물 기준)의 Cellulase 효소를 첨가하여 pH 4.5~6.0, 50~60℃, 20분간 전처리(최적 반응조건) 후 홍삼부산물의 다당체 추출 공정을 시행한다. Cellulase 효소를 선택한 것은 1차 년도에 홍삼부산물의 효소별( $\alpha$ -amylase, cellulase, pectinase, hemicellulase, xylanase)처리에 의한 산성다당체 실험 결과 Cellulase 효소처리에 의한 함량이 가장 높게 나온 결과를 검토하여 본 실험에 적용하였다.

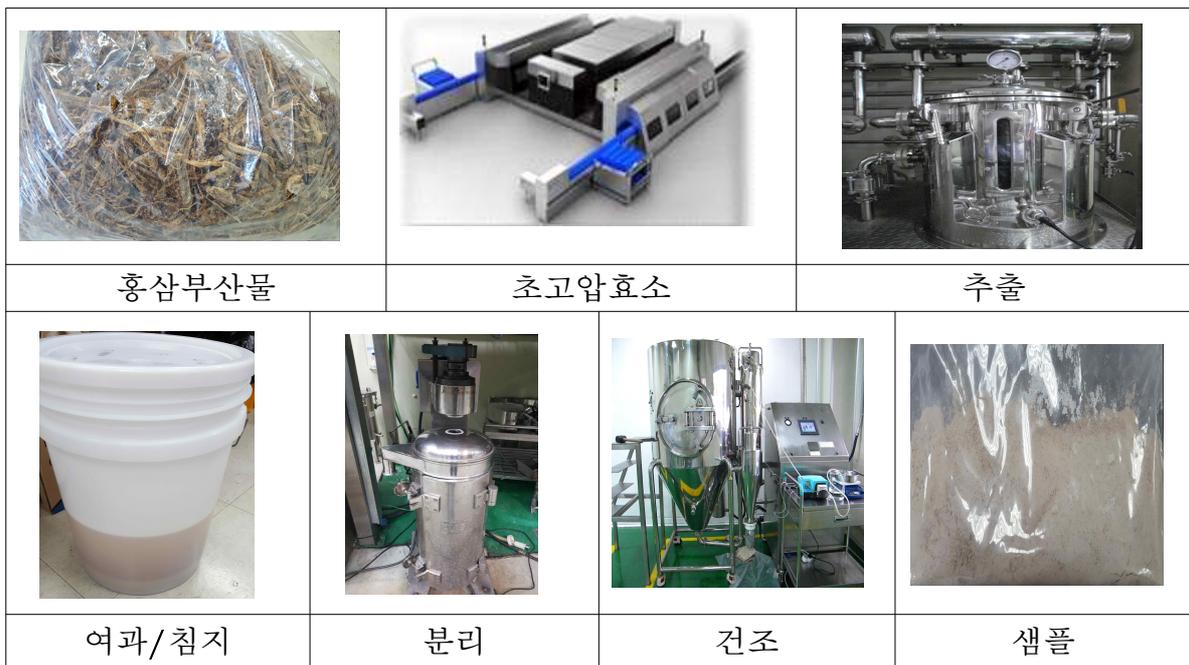
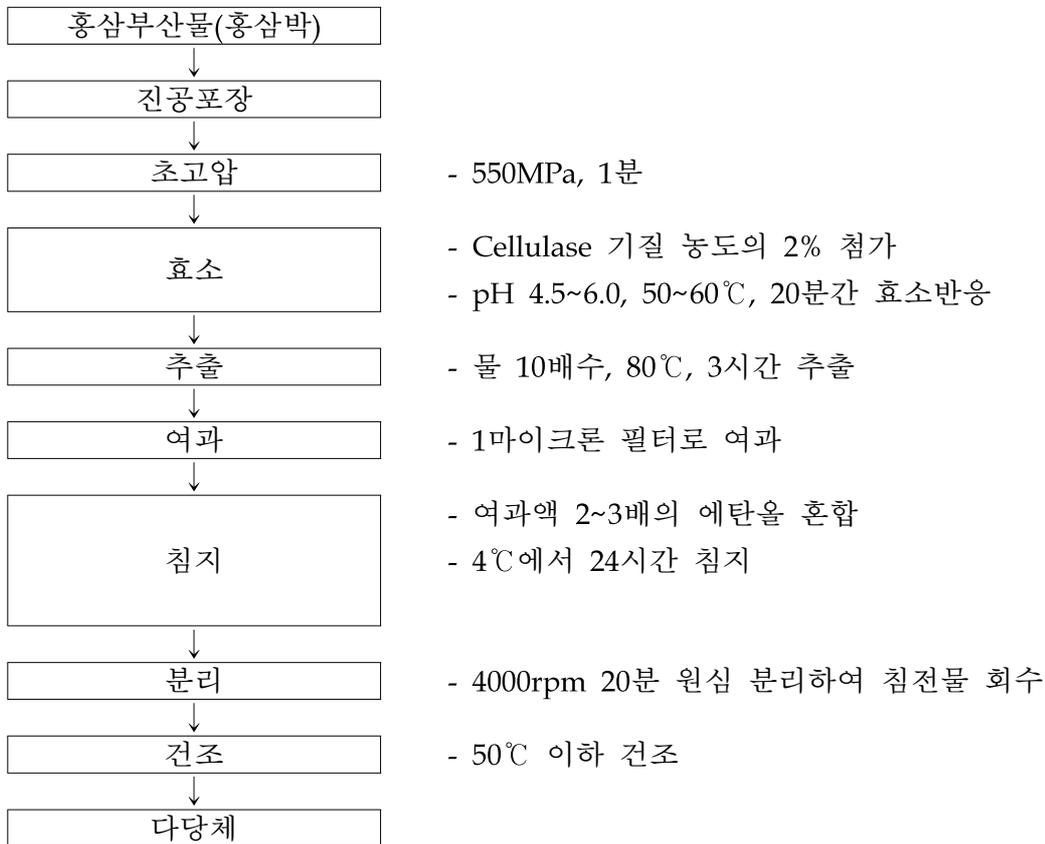
③ 초고압효소융합 홍삼부산물의 산성 다당체 함량 및 수율 비교

홍삼부산물로부터 추출한 다당체 시료 중 산성다당체 함량은 carbazole-sulfuric acid 방법으로 측정하였다. 건조한 다당체 시료 0.03g에 증류수 10mL을 넣고 10배 희석하여 시료로 사용하였다. 시료 200uL 에 ethanol에 용해한 0.1% carbazole용액 80uL을 혼합한 후 sulfuric acid 1200uL 을 첨가하여 vortex 한 후 85℃로 예열된 water bath에서 15분 동안 반응 시킨다. 반응 시료액 1mL을 취하여 spectrophotometer를 이용하여 흡광도(525nm)를 측정하였다. Blank는 ethanol을 사용하며, 표준품은 galacturonic acid를 사용하여 표준곡선 작성 후, 산성다당체 함량(mg/g)=시료용액 중 성분 농도(ug/mL)X전량(mL)X희석배수/시료량(g)X1000 계산식으로부터 홍삼 부산물에 함유된 산성다당체 함량을 계산하였다. 수율(%)은 원료로부터 추출한 다당체(g)/원료(g)X100 으로 계산하였다.

나) 연구 결과

① 기능성 다당체 수율 증대를 위한 실생산 공정 운용 최적화

<초고압효소융합기술을 이용한 홍삼부산물의 다당체 추출 공정도>



② 초고압효소융합 홍삼부산물의 수율 및 산성다당체 함량 비교

각 공정에 따라 홍삼부산물, 초고압 홍삼부산물, 초고압효소융합 홍삼부산물(cellulase)부터 추출된 다당체의 수율을 조사하였다. 각 원료의 다당체 수율은 추출을 위해 처음 투입된 원료 중량 대비 각 공정별로 회수된 다당체 추출물의 중량 백분율로 계산하였다(Table 1). 홍삼부

산물의 다당체 수율은 기존의 5.0% 에서 12.5%로 증가하였으며, 초고압홍삼부산물은 6.0% 에서 15.1%, 초고압효소융합홍삼부산물은 6.9%에서 17%로 Scale-up 후 수율이 2배 이상 모두 증가하였다. 이는 초고압공정 및 효소처리가 다당체 수율을 높이는데 효과적임을 확인할 수 있었다.

**Table 1. 초고압효소융합 홍삼부산물의 다당체 수율**

원료명	다당체 수율 (%)	Scale-up 후 다당체 수율(%)
홍삼부산물	5.0	12.5
초고압 홍삼부산물	6.0	15.1
초고압효소융합 홍삼부산물	6.9	17.0

시료 홍삼부산물, 초고압 홍삼부산물, 초고압효소융합 홍삼부산물(cellulase)의 산성 다당체 함량은 Table 2.와 같다. 기존 산성다당체 함량 보다 Scale-up 하였을 때 2배 이상 함량이 높게 나타났다. 홍삼부산물의 산성다당체 함량은 기존의 12.1 mg/g에서 35.40 mg/g 으로 증가 하였으며, 초고압홍삼부산물은 16.49 mg/g에서 40.90mg/g, 초고압효소융합홍삼부산물은 19.11 mg/g에서 45.30mg/g 으로 함량이 2배 이상 증가하였다. 1차년도 실험 결과와 동일하게 홍삼부산물에 비하여 초고압효소융합 홍삼부산물에 존재하는 조직성분이 초고압효소 처리에 의해 분해되어 수율을 향상시키고, 산성다당체 추출이 더 용이한 상태로 되어 함량이 증가한 것으로 사료된다.

**Table 2. 초고압효소융합 홍삼부산물의 산성다당체 함량**

원료명	산성다당체 함량 (mg/g)	Scale-up 후 산성다당체 함량 (mg/g)
홍삼부산물	12.1	35.4
초고압 홍삼부산물	16.4	40.9
초고압효소융합 홍삼부산물	19.1	45.3

## 2) 초고압 효소 융합 공정 시스템 구축을 위한 설비 보완 및 개선

### ① 초고압효소융합기술을 이용한 다당체 추출기법의 Scale up적용 검증

1차년도 연구에서는 시료 홍삼부산물 다당체(RGBP), 초고압 홍삼부산물 다당체(HPP-RGBP), 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체(ELHPP-RGBP), 총 3가지 균을 제조하여 산성다당체 함량 및 수율을 확인하였다. 또한 홍삼부산물에 초고압처리 후 효소별( $\alpha$ -amylase, cellulase, pectinase, hemicellulase, xylanase)처리에 따른 산성다당체 함량 결과 기존 홍삼부산

물 대비 Cellulase 효소의 함량이 가장 높게 나왔다. 그 결과를 바탕으로 2차 년도에는 Scale-up 실험을 수행하였으며, 시생산을 준비하고 있다.

② 초고압효소융합 홍삼부산물물의 다당체 추출공정 시스템 구축을 위한 기기설비 보완 및 부품 장치 개선

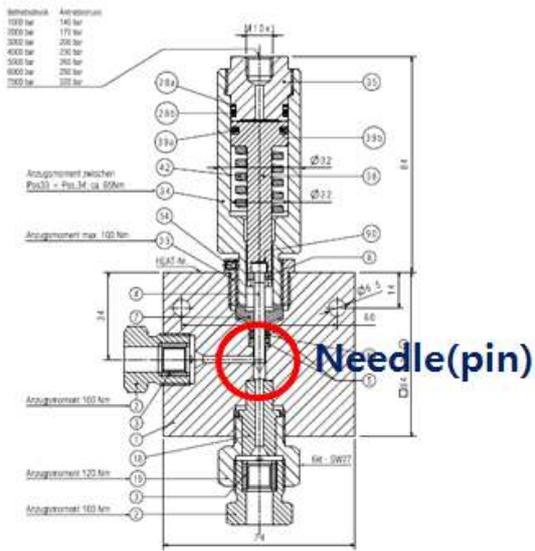
- 현재 (주)뉴트렉스테크놀러지는 최대압력 600 MPa, 200-liter vessel이 두 개인 dual-type 초고압기를 확보하여 운영하고 있다. (아래 사진)



<(주)뉴트렉스테크놀러지의 생산용 초고압기기(600 MPa, 200 L dual-type)>

- 고압밸브 내의 Pin은 압력을 올려줄 때 열고 닫힘을 조절하여 vessel내로 압력을 충전시켜주는 역할을 하며, 이 부분에 마모 또는 손상이 생길 경우 압력 상승시간 및 유지 기능이 손실된다.

- 기존 설비의 고압밸브의 경우 pin의 재질이 마모가 쉽게 발생하여 교체 주기가 이르며 이로 인한 생산 중 설비 점검 작업의 상당한 시간을 필요로 하므로 현재 부품 공급 업체 (Baotao Kefa)에 기존 pin의 재질상 문제 또는 고압 밸브 내부에서의 고정 문제가 있는지 문의 하였으며 다른 해외 Sitec 업체에도 문의를 한 상황이다.



<기존 설비 고압밸브>

<Sitec (Switzerland)>

- 초고압기 버켓 교체

기존에 사용한 초고압기 버켓은 재질이 견고하지 못해 깨짐이 발생하며, 내용물 처리 및 버켓 운반이 불편하여 새로 제작하였다. 제작한 버켓의 경우 기존의 단점을 보완하여 버켓 외, 내부를 견고하게 만들며 운반을 용이하게 하고, 초고압 처리시 내용물 터짐을 방지할 수 있게 제작 하였다.

기존 버켓(전)	제작 버켓(후)

3) 홍삼부산물의 면역증진 효능평가 연구

가) 연구수행 방법 및 내용

① 세포 독성 평가

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)로 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다. 결합은 세포 질량에 비례한다. 독성 평가 방법은 다음과 같다. HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건

으로 항은 배양한 후, 각 농도별로 시료 처리 후, 24 h 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 µg/ml)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다. 아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 음성대조군으로 하여 100% 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다. 시료를 처리하지 않은 조사군을 양성대조군으로 하였으며, 세포의 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

#### ② Nitrite Oxide(NO)의 생성 저해능 측정

RAW 264.7 cell을 96well plate에  $5 \times 10^5$ 으로 분주하여 배양 후 충분히 자란 상태가 되면 초고압 효소용합 홍삼부산물 다당체를 농도별(5, 10, 20, 40, 80 µg/mL)로 25 µL씩 분주하고 37°C에서 1 시간 배양한다. 그리고 LPS를 처리하여 유도시켜준 후 24시간 배양하여 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 취한다. 새 96well plates에 세포배양 상등액 50 µL와 Griess시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl ethylene diaminedihydrochloride in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 50 µL을 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 560 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 NaNO<sub>2</sub>를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 얻었다.

#### ③ 면역반응평가(아토피효능평가)

HaCaT 세포에서 케모카인의 측정은 cell ELISA를 이용하였다. 96 well plate에 HaCaT 세포를  $1 \times 10^4$  cells/plate 분주하여 배양한 후 충분히 자란 상태가 되었을 때 Serum free 배지로 배지를 바꿔주어 24시간을 더 배양하였다. 그리고 각 시료를 농도별로 1ml씩 첨가하여 1시간 배양하였고, TNF-α 10 ng/ml과 IFN-γ 10 ng/ml을 투여한 후 24 시간 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지만 따서 1.5ml Eppendorf tube에 모아 13000rpm, 4°C에서 10 분간 centrifuge하여 얻어진 상층액sample의 TARC, MDC 생합성량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 하였다. TARC와 MDC는 human enzym-linked immunosorbent assay(ELISA) kit를 이용하여 그 양을 측정하였다. TARC, MDC capture antibody를 ELISA kit에 분주하여 16간이상 실온에서 incubate 후 상등액을 버리고 PBS-Tween 20으로 3회 세척 후 1% Bovine serum albumin(BSA)/PBS를 각 well에 150 µL씩 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 제조사의 매뉴얼에 따라 standard를 제조하고 냉동보관해둔 sample을 해동하여 각 well 당 50 µL씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. 그리고 상등액을 버리고 PBS-Tween20으로 3번 세척 후 TRAC와 MDC의 detection antibody를 50 µL씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. HRP를 1% Bovine serum albumin(BSA)/PBS에 200:1로 희석하여 50 µL씩 분주하고 호일로 감싸 20분간 반응시킨다. Color reagent A,B를 1:1로 섞어 각 well당 50 µL씩 넣어 실온에서 20분간 발색시킨 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 동량 넣어 반응을 정지시키고 이를 컴퓨터가 부착된 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### ④ 면역증진효능평가

6주령 c57BL/6 mouse(female)에서 비장을 무균적으로 적출하여 분쇄해 세포를 유리시켰다. 분리된 현탁액을 세척하고 원심분리 하여 Tris-buffered ammonium chloride(NH<sub>4</sub> Cl, PH7.2)와 증류수에 현탁시켜 5

분간 처리하여 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 제거된 비장세포(splenocyte)를 Splenocyte 분리하여 96-well에  $2 \times 10^5$  cell/mL 로 분주하여 배양시켜 세포 증식능 측정에 사용하였다. 세포가 충분히 자라면 sample을 농도별로 처리한 후 48시간이 지난 후 Cell titer Glo 처리 하여 Luminescence 값을 측정하였다.

#### ⑤ 항산화 효능평가

##### - ABTS radical 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Roberta 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 이 방법은 ABTS의 색 변화를 관찰하는 것이다. ABTS는 potassium persulfate에 의해 전자를 잃어 짙은 청녹색을 띄지만, 항산화 물질의 전자공여능으로 색이 열리는 과정을 보고 항산화능을 측정하는 방법이다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 섞고, 상온에서 16시간 incubation 후 ABTS 양이온(ABTS+)을 형성시킨다. 그 후, 734 nm에서 흡광도의 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 희석하여 시험용액으로 제조하였다. 96well plate에 시료를 농도별로  $20 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 희석해둔 ABTS+시험용액을  $180 \mu\text{l}$ 를 가하여 6분 간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 시료를 녹인 용매인 DMSO를 대조군으로 다음의 식으로 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = \left( 1 - \frac{A_{\text{Test}}}{A_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

#### 나) 연구 결과

##### ① 세포 독성 평가

피부세포주 중에서 인간 각질세포주인 HaCaT cell line을 이용하여 홍삼부산물의 세포 처리 농도를 결정하기 위해 세포독성(MTT assay)실험을 실시하였다. 본 실험 결과를 통해 홍삼부산물 다당체 처리농도 150ug/ml 부터 세포 생존률이 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1). 따라서 피부세포주를 이용한 이후 실험의 경우 75ug/ml 이하로 사용하여 실험을 진행하였다. 그리고 홍삼부산물 다당체 시료(HC, HJ, HH)의 원료인 홍삼부산물 시료(H1, H2)에 대하여 추가 실험을 진행하였다. 실험결과, Fig. 2에서 볼 수 있는 것과 같이 다당체 시료보다 낮은 농도에서부터 독성을 나타내어 세포생존율이 80%이상인 20ug/ml 이하의 농도로 사용하여 실험을 진행하였다.

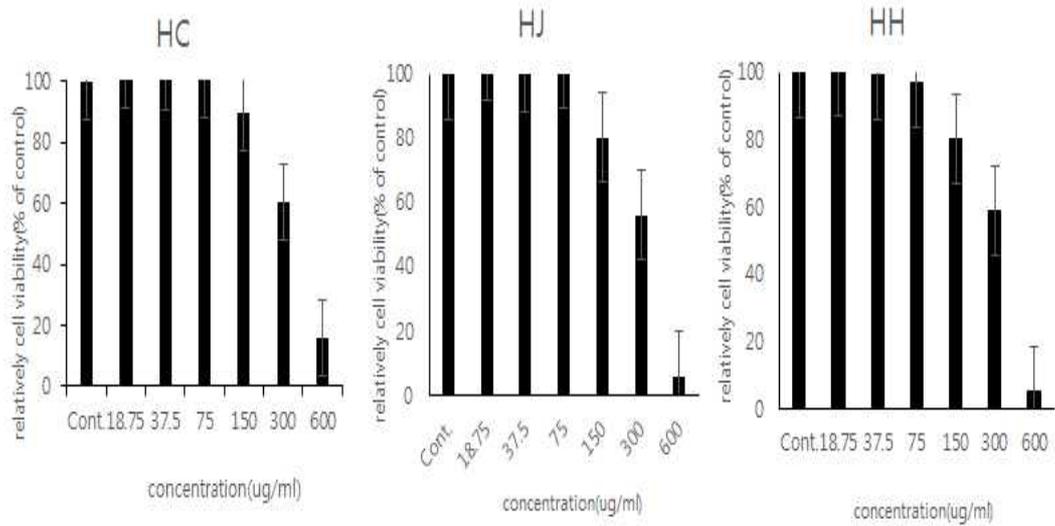


Fig. 1. MMT assay 결과 1

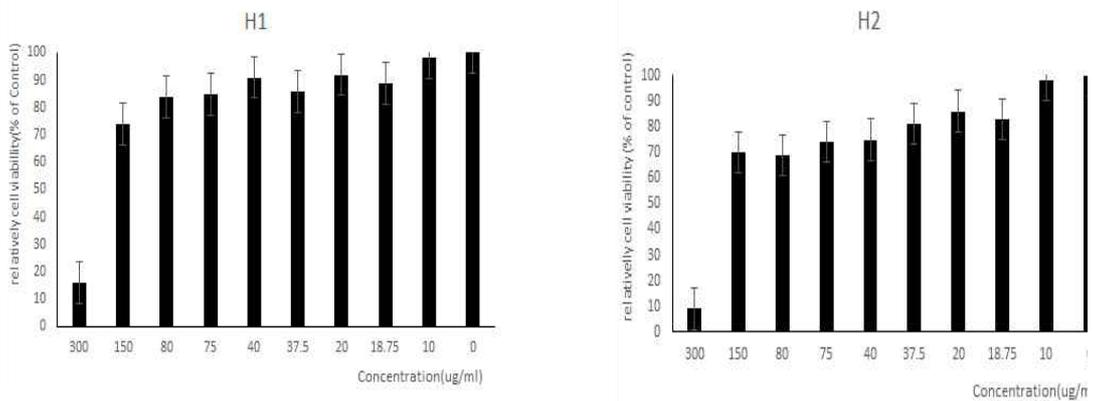


Fig. 2. MMT assay 결과 2

② Nitrite(NO)의 생성정도 측정

NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하며 농도에 따라 세포기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다. RAW 264.7 세포에 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하였을 때, 생성된 NO의 함량이 45  $\mu\text{M}$ 로 무처리군에 비해 9배 가까이 증가하였다. 또한 초고압 효소용해 홍삼부산물 다당체를 농도별(5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO의 양이 감소되는 것으로 나타났다.

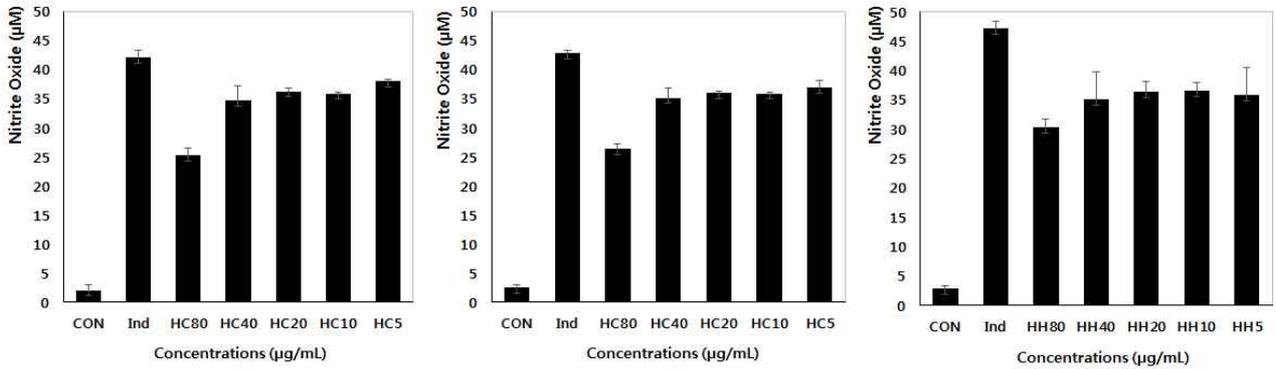


Fig. 3. Nitrite Oxide(NO) 생성 저해능 측정 결과

### ③ 면역반응평가(아토피효능평가)

아토피피부염은 피부에서 발생하는 면역학적 질환으로 알레르기 면역반응의 표적인 각질형성세포를 자극하여 발생한다. 각질형성세포에 존재하는 thymic stromal lymphopo(TSLP)는 포유류의 면역계를 구성하는 수지상세포를 자극해서 TARC와 MDC생성을 증가 시키는데 이러한 chemokine의 농도는 아토피피부염의 증상과 밀접한 연관성을 가지고 있다고 알려져 있다. 그러므로 각질형성세포의 TARC와 MDC의 생성감소량을 측정하여 아토피 억제효능을 확인 할 수 있다. 각질 형성 세포인 HCaT cell에 TNF- $\alpha$  및IFN- $\gamma$  처리를 통하여 TARC와 MDC의 과발현을 유도하였고 HC, HJ, HH 3가지의 sample을 농도별로 처리하여 배양 후 TARC와 MDC의 생성억제를 측정하였다. TARC와 MDC 결과 모두 Fig. 4, 5 에서 볼 수 있는 것과 같이 샘플의 모든 농도에서 감소하는 양상을 보였으며 80ug/ml를 처리하였을 경우 control보다 감소하였고, HH80ug/ml 처리군의 경우 다른 샘플과는 유의적인 감소 효과를 나타내었다.

따라서 시료가 TARC, MDC의 생성을 감소하는 결과를 나타내었으므로 아토피피부염에 효능을 가질 것으로 보인다.

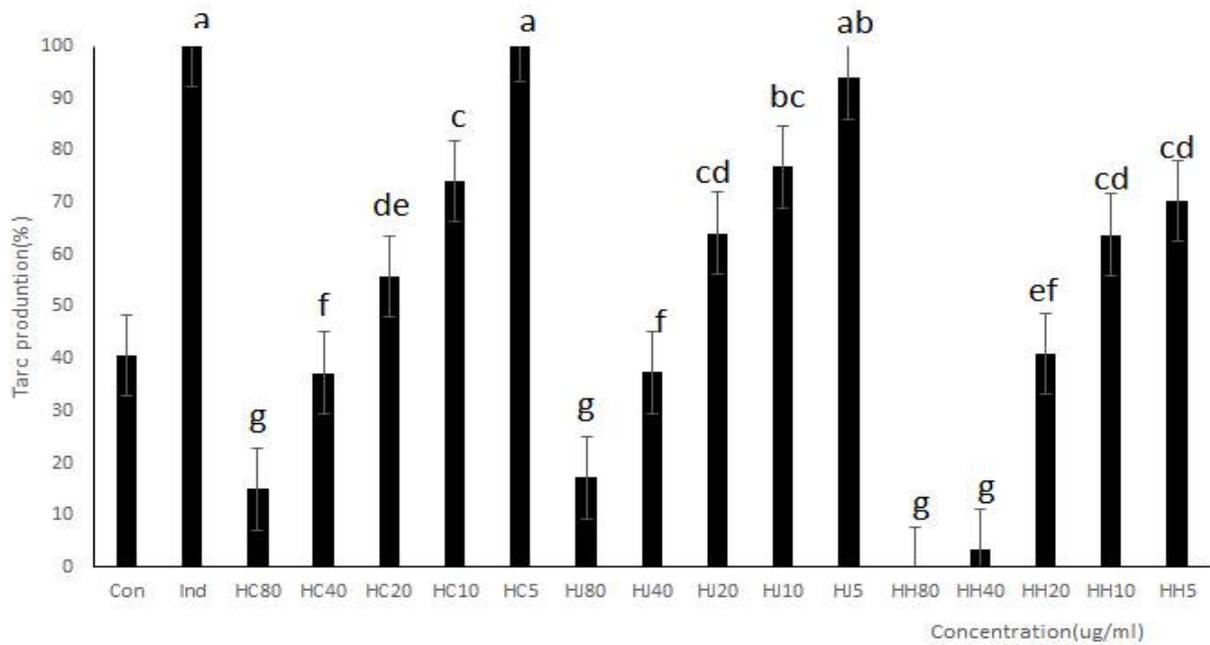


Fig. 4. 면역반응평가 결과-TARC

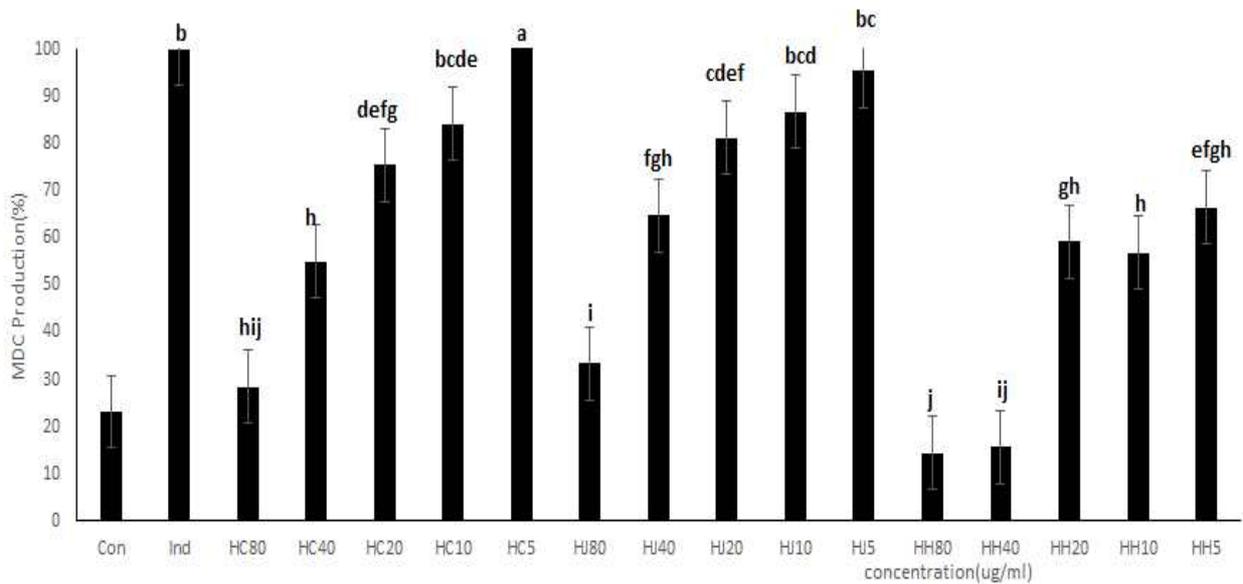


Fig. 5. 면역반응평가 결과-MDC

④ 면역증진효능평가

샘플의 첨가가 비장세포 증식능에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 6와 같다. HC, HJ, HH 모두 25ug/ml의 농도로 처리하였을 때는 대조구와 거의 차이를 보이지 않았고 100ug/ml로 처리하였을 때 역시 HC에서는 10%, HJ에서는 40%, HH에서는 35% 정도의 차이로 유의적인 차이를 얻지 못하였다.

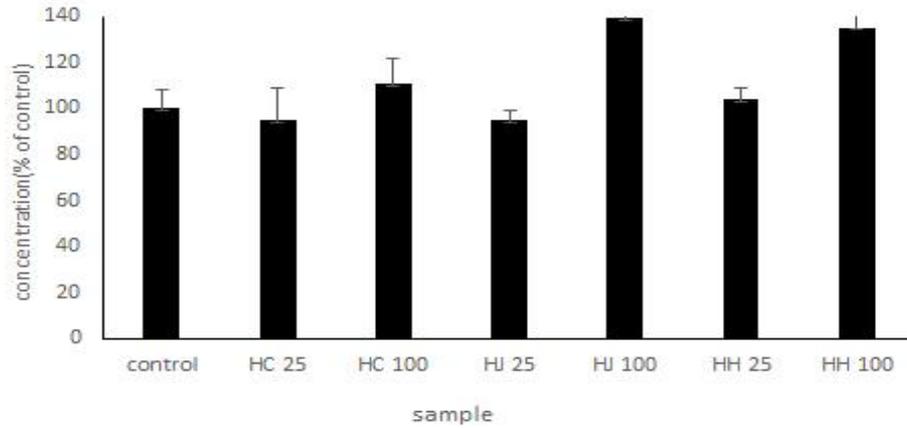


Fig. 6. 면역증진효능평가 결과

⑤ 항산화 효능평가

ABTS+ 라디칼 소거 활성법은 *in vitro*, *in vivo* 항산화능 측정에 널리 이용되고 있다. ABTS를 peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS+ 자유라디칼이 형성되면 추출물의 항산화력에 의해 ABTS+ 자유라디칼이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 데 이를 흡광도 수치로 나타내어 추출물의 항산화 활성을 평가할 수 있다. ABTS+ 라디칼 소거능의 경우 hydrogen donating antioxidants와 chain breaking antioxidants를 모두 측정할 수 있고, 친수성 물질과 소수성 물질의 항산화력 측정이 가능하므로 일반적으로 DPPH 라디칼 소거능 보다는 높은 활성을 나타낸다(Re et al., 1999). 본 실험결과에서도 DPPH radical 소거능 결과에서는 나타나지 않은 항산화능을 보였다. ABTS radical scavenging activity의 결과는 Fig. 7과 같은데 Sample 처리농도 10000μg/mL에서 HC는 약 172μmol Trolox equivalents, HJ는 약 161μmol Trolox equivalents, HH는 약 141μmol Trolox equivalents의 소거활성을 나타내었다.

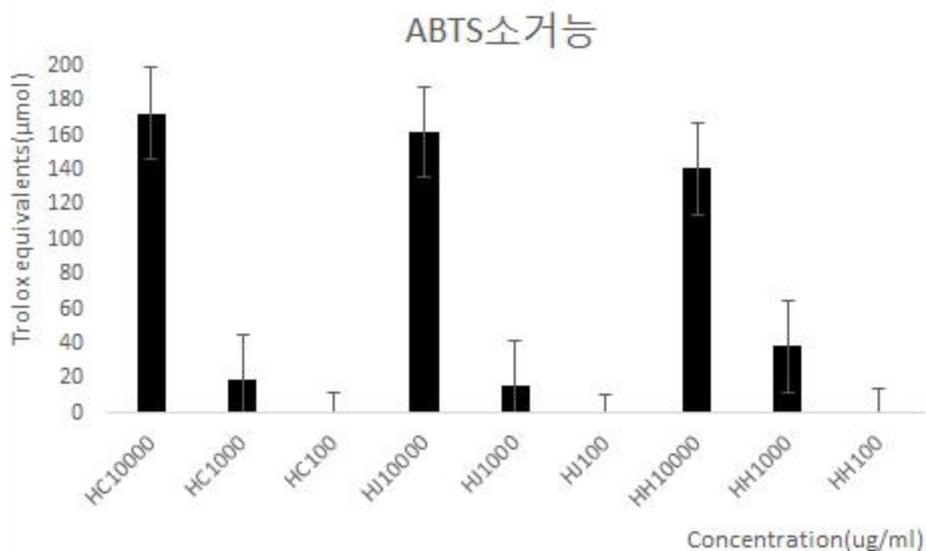


Fig. 7. ABTS 소거능 결과

#### 4) 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체의 피부기능개선 효능평가 연구

##### 가) 연구수행 방법 및 내용

###### ① 보습효능평가

HaCaT cell을  $8 \times 10^4$  /ml 농도로 6well plate에 seeding 하였다. 24시간 후에 serum-free DMEM으로 1번 washing 해준 후 serum-free DMEM으로 교체하고 24시간 더 배양하였다. 그리고 각 시료를 농도별로 1ml씩 처리하여주고 24h 후 배지만을 걷어내어 13000rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 후 상층액만 따서 ELISA 할때까지 냉동보관한다. 상층액은 1% Bovine serum albumin(BSA)/PBS로 50배 희석하여 sample로 사용하였고 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA assay를 수행하여 hyaluronic acid의 생성량을 측정하였다.

###### ② 타이로시나제 저해효능 평가

Tyrosinase 활성은 Kubo 등의 방법을 변형하여 사용 하였다. 반응 액의 총 부피는 300  $\mu$ L이며, 0.1M Sodium Phosphate Buffer (pH 6.5) 220 $\mu$ L, 각 농도별 Sample 20  $\mu$ L, 0.1 mM L-Tyrosine 40  $\mu$ L, 1,000unit/ml mushroom tyrosinase 20  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 15분 동안 반응시키고 얼음에 담근 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[ 저해율 (%) =  $100 - (B - B') / (A - A') * 100$  ]

A : Buffer + Tyrosinase 만의 흡광

A' : Buffer 만의 흡광

B : 시료 + Tyrosinase 만의 흡광

B' : 시료만의 흡광

###### ③ 주름개선효능평가

-Elastase 저해 활성 측정

HC, HJ, HH, H1, H2 sample을 D.W에 희석시켜 준비한 sample을 96 well plate에 농도별로 50 $\mu$ L를 분주한 후 100ug/ml DQ elastin working solution 50 $\mu$ L와 0.1U/ml elastase stock 100 $\mu$ L씩 분주하여 10분 단위로 120분 동안 plate reader을 사용하여 형광측정을 진행하였으며 2반복 측정하였다. (505nm/515nm, Number of flash: 5)

- Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 활성 저해능은 Invitrogen사의 EnzChek® Collagenase Assay Kit - 250-2000 Assays 시약을 구입하여 사용하였다. 기질인 1mg DQ collagen은 vial에 1.0mL의 D.W를 가해 DQ collagen stock solution(1mg/mL)을 만들고 일정한 비율로 희석하여 사용한다. Collagenase 효소 시약은 working solution으로 희석하여 0.2 unit/mL이 되도록 만든다. 실험에 사용할 시료는 농도가 0.02, 0.2, 2, 20 mg/mL가 되도록 제조하였고, 최종 농도가 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml 가 되도록 하여 실험하였다. 96well plate에 시료 50uL(대조군에는 시료를 녹인 용매인 증류수)와 DQ collagen 20uL를 넣었다. Sample blank 와 Control blank에는 reaction buffer 30uL, Test sample 과 Control에는 Collagenase 효소 시약 30uL를 가하고, 빛을 차단한 상태로 실온에서 1-2시간 동안 방치한 후 형광 강도 excitation wavelength 495nm 및 emission wavelength 515nm에서 ELAZA plate reader(SpectraMax

M2 & M2e Multi-Mode Microplate Reader. Molecular Devices Corporation. USA)로 형광 강도를 측정하였다.

**Collagenase 활성 저해능(%)**

$$= \left\{ 1 - \frac{(\text{Test sample} - \text{sample blank})}{(\text{control} - \text{blank control})} \right\} \times 100$$

나) 연구 결과

① 보습효능평가

보습효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HaCaT세포에 각 시료를 농도별로 처리하고, 배양후 배양액을 회수하여 ELISA kit를 이용하여 Hyaluronic acid(HA)의 생성량을 측정하였다. 결과는 Fig. 8에서 볼 수 있듯이 모든 sample에서 히알루론산의 생성량에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

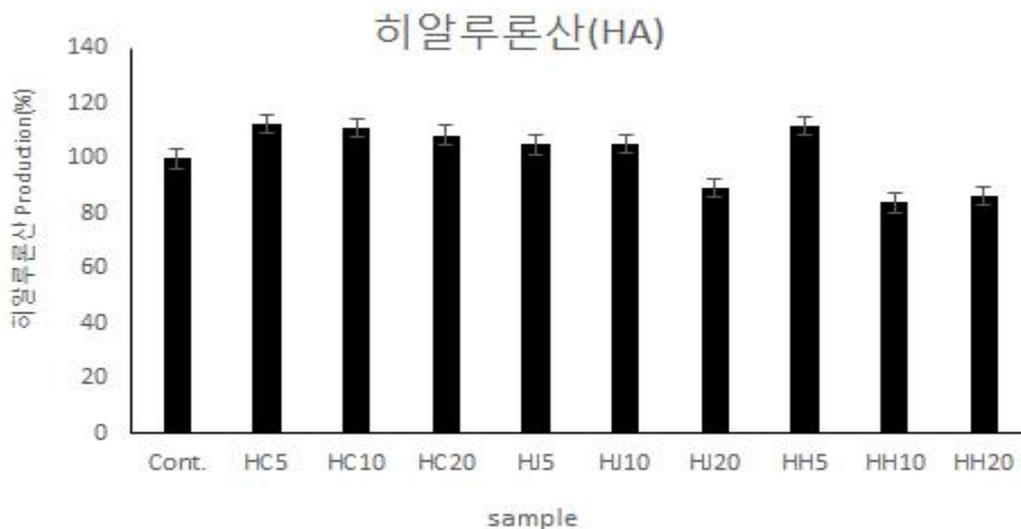


Fig. 8. 보습효능평가결과-히알루론산

② 타이로시나제 저해효능 평가

멜라닌 색소를 만드는 효소인 타이로시나제 (tyrosinase)의 생성을 저해하여 근원적으로 멜라닌 색소생성 억제를 통한 미백효과를 나타낼 수 있는지에 대한 효능평가를 진행하였으나 시료 5가지 모두에서 전혀 저해효능을 나타내지 않았다.

③ 주름개선효능평가

- Collagenase 저해활성 측정

콜라겐은 대부분 피부의 진피층에 존재하며, 피부 전체 건조중량의 약 70~80%를 차지하고

있어, 세포의 기질의 대부분을 차지하면서 피부를 지지하는 역할을 한다. 그러나 자연 노화에 따른 세포 활성의 감소와 같은 내적 요인에 의해 콜라겐의 생합성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스의 증가 및 태양 광선에 의한 활성 산소종의 증가와 같은 외적 요인에 의해 분해가 가속화되어 피부 기질이 파괴되면서 주름이 생성된다. 본 실험에서 홍삼박다당체 및 홍삼박 Sample에 대한 collagenase 저해활성을 측정된 결과 (Table 3.) 모든 sample에서 의미 있는 효능을 나타내지 못했다.

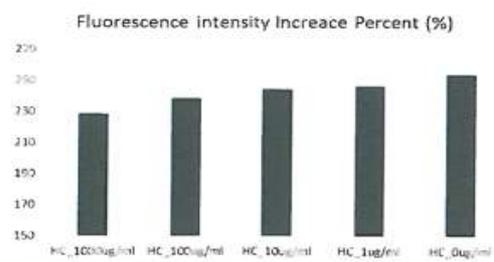
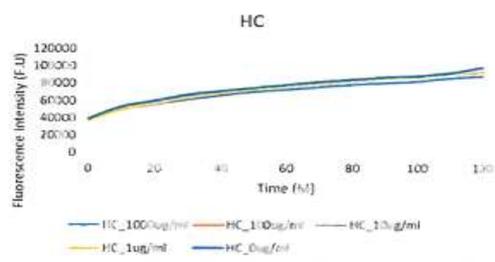
**Table 3. 주름개선효능평가결과1-Collagenase 저해**

Sample(mg/ml)		Collagenase(%)
H1	0.01	10.9 ± 2.0*
	0.1	15.5 ± 3.2*
	1	21.8 ± 3.8*
	10	27.0 ± 4.7*
H2	0.01	5.7 ± 7.9
	0.1	14.2 ± 3.0*
	1	4.7 ± 1.1
	10	3.5 ± 7.4
HC	0.01	-6.1 ± 1.8
	0.1	-13.6 ± 5.6
	1	-12.3 ± 2.9
	10	7.6 ± 7.4
HH	0.01	3.5 ± 8.1
	0.1	6.8 ± 5.5
	1	10.7 ± 5.2*
	10	26.6 ± 4.2*
HJ	0.01	3.9 ± 5.4
	0.1	15.4 ± 5.9*
	1	7.5 ± 5.6
	10	27.8 ± 7.7*

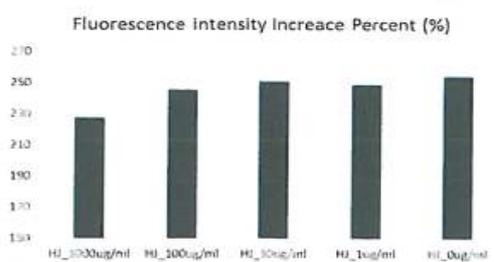
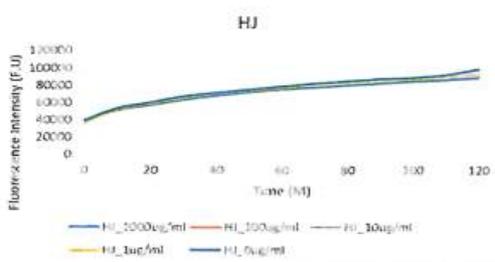
\* p<0.05, compared with control group.

- Elastase 저해 활성 측정

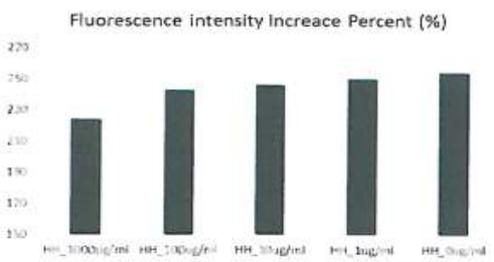
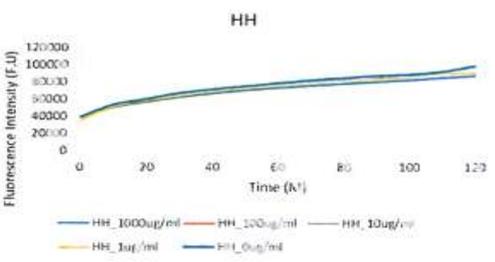
Elastase는 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소로 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수 분해 효소이다. 피부의 진피조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부의 그물망 구조 결합이 끊어짐으로, elastase가 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다. Elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내고, ursolic acid등이 elastase 저해제로 이용되고 있다. 이러한 주름 생성과 관련한 elastase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 9과 같은데 모든 sample에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.



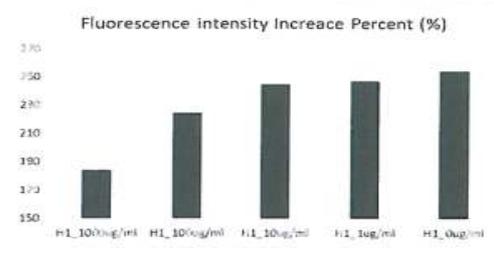
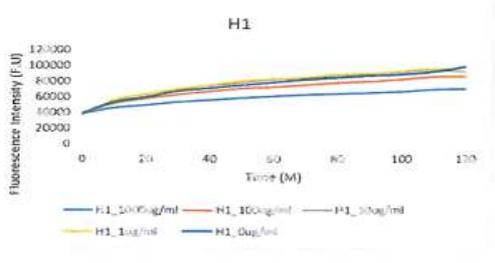
[Fluorescent intensity of HC, in DW]



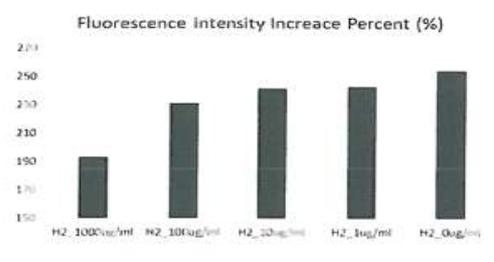
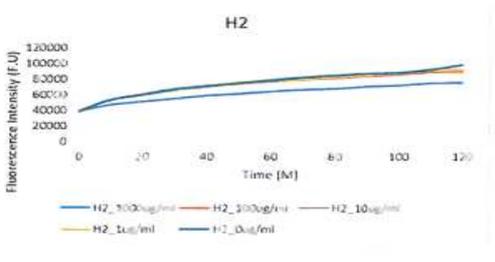
[Fluorescent intensity of HJ, in DW]



[Fluorescent intensity of HH, in DW]



[Fluorescent intensity of H1, in DW]



[Fluorescent intensity of H2, in DW]

Fig. 9. 주름개선효능평가결과-Elastase 저해

## 다. 3차년도

### 1) 기능성 다당체 제품의 개발 및 상품화

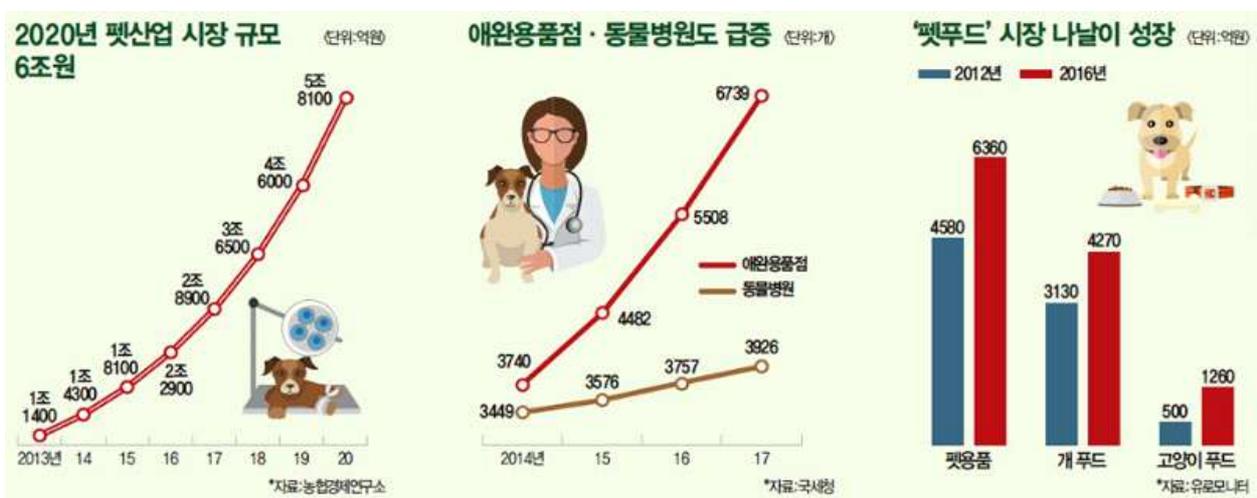
- 표준화된 기능성 다당체 원료로부터 비식품류(반려동물의 사료) 개발

#### 가) 연구수행 방법 및 내용

##### ① 반려동물 시장 현황

[국내 반려동물 시장 현황]

- 최근 5년간 반려동물 산업은 고령화, 1인 가구, 여가확대 등으로 2012년 9,000억 원에서 2015년 1조 8,000억 원으로 2배 증가하며 2020년 반려동물 산업의 시장 규모는 약 6조 원으로 성장을 기대함.
- 2016년 기준 국내 등록 반려동물은 97 만 마리(농림축산식품부 기준), 미등록 반려동물을 고려하면 150 만 마리 이상 추정함.
- 반려동물 보유가구 비율은 2010년 17.4%에서 2015년 21.8%로 5년간 4.4%증가함.
- ‘2017 반려동물 양육 실태 조사’에서 반려동물을 기르는 가구는 전체 가구 30.9%로 약 590 만가구로 추정함.(KB금융지주경영연구소) 반려동물 중 개가 82%정도 수준임.
- 반려동물 용품 관련 소매업 매출액이 2006년 1676 억 원에서 2014년 3848 억 원으로 증가함.
- 동물병원 카드결제 금액은 2012년 4628 억 원에서 2016년 7864 억 원으로 증가함.
- 펫코노미(Pet+Economy)는 생애주기에 따라 상품과 서비스가 세분화, 고급화 하는 추세임. 대표적인 분야는 ‘펫푸드’로 반려동물 건강에 대한 관심이 높아지며 국내 펫푸드 시장 50%이상을 해외 브랜드가 차지함.
- 국내 최초 신세계 계열사는 애완 토틸 솔루션 전문점을 표방한 ‘몰리스펫샵’ 브랜드 진입하여 미용, 수제간식 및 장난감 쇼핑을 가능하게 함.
- LG 생활건강 업체에서는 애완용품 브랜드 ‘시리우스’로 사료 이외에도 애완용 샴푸, 컨디셔너 등 생활용품들을 출시 함.
- 반려동물 카페를 넘어 호텔업계, 편의점, 가전업계, 가구업계에도 펫 산업 성장이 기대됨.



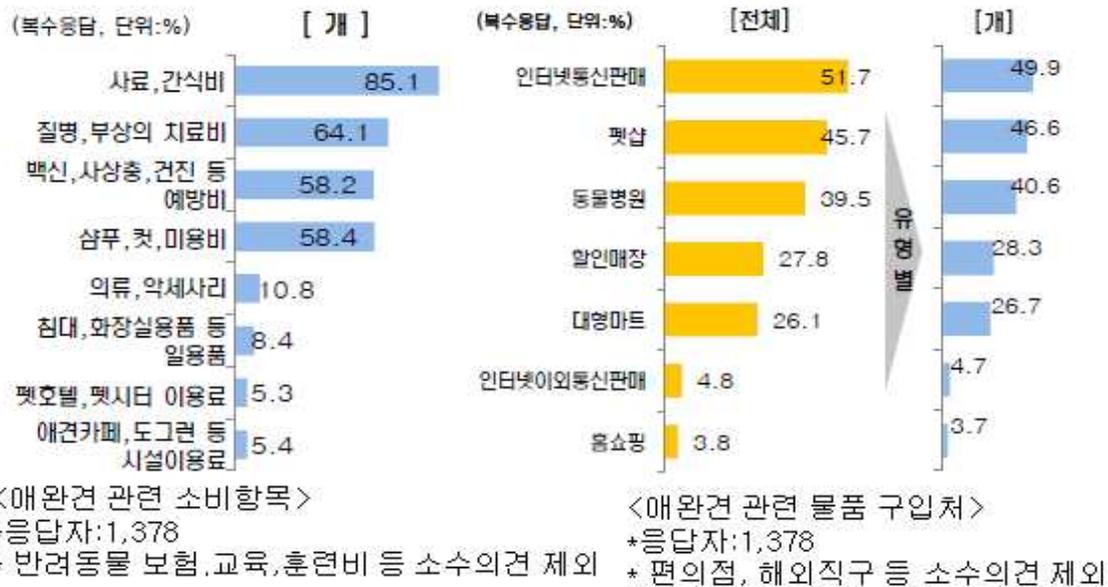
- 한국펫사료협회의 '2018년 반려동물에 대한 인식 및 양육 현황 조사'에 따르면 반려동물 관련 월평균 지출 비용 변화를 보면 월평균 5만원 이하의 지출 비중(29.8%)이 가장 높게 나타나며, 월 평균 비용은 14.5 만원으로 나타남. 1년간 사료 구입 지출액을 보면 20만원 초과가 33%로 가장 높게 나타났으며, 평균 26.7 만원으로 나타남.
- 2013년과 비교해보면 '20만원 미만'의 지출 비중은 감소한 반면, '20만원 이상'부터 지출이 증가하는 추세임.

(단위:%)

	조사연도	5만원 미만	5만~10만원미만	10만~20만원미만	20만~50만원미만	50만~100만원미만	100만원 이상	계
본조사(개나 고양이 양육)	2017년	11.6	29.6	20.2	20.9	8.7	9.0	100.0
인덕산비행	2013년	17.1	30.9	31.4	17.8	2.6	0.2	100.0

주1: 현재 개나 고양이를 양육하는 가구 전체 n=438      주2: 한국소비자인(2013)의 경우도 개나 고양이를 양육하는 가구만 조사

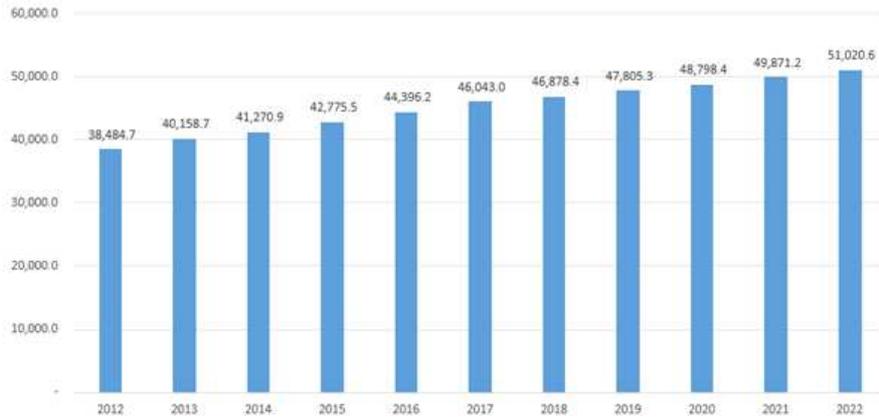
- 반려견 관련 지출 중 비용이 가장 많이 드는 항목은 사료, 간식비이며, '인터넷통신판매'를 통해 물품을 구입하는 경우가 가장 많음.



[국의 반려동물 시장현황]

- 2017-2018 미국 반려동물 제품 협회의 조사(American Pet Products Association National Pet Owners Survey)에 따르면, 미국 가구의 68%인 8460만 가구는 반려동물을 기르고 있음.
- 미국 가정에서 기르는 총 개의 수는 8970만 마리, 고양이의 수는 9420만 마리. 시장조사기관인 IBIS World는 반려동물의 개체 수가 2022년까지 지속적으로 증가할 것이라고 전망함.
- 2017년 미국 반려동물 시장 규모는 460억 4천만 달러로, 2016년 443억 9천만 달러에서 3.7% 성장
- 시장 분석 기관인 유로모니터 인터내셔널(Euromonitor International)은 2022년 반려동물 시장 규모를 510억 2천만 달러로 예측했으며, 이는 2017년에서 2022년 사이 연평균 2.1% 성장을 의미함.

미국 반려동물 시장 규모 및 전망  
(단위: 백만 달러)



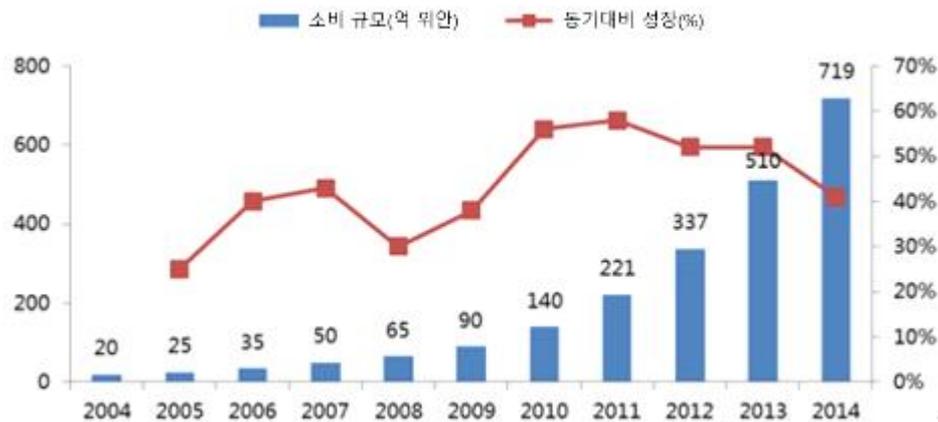
자료원: Euromonitor International(2018년 2월)

- 반려동물 시장에서 가장 큰 소비금액을 차지하는 것은 식품으로, 시장 규모는 306억 2천만 달러. 반려동물 용품이 136억 9천만 달러로 나타남.
  - 주요 업체는 네슬레 퓨리나(Nestle Purina)와 마스(Mars)로 각각 28.4%, 16.3%의 점유율 기록하며, 네슬레 퓨리나의 대표 브랜드는 퓨리나 프리스키(Purina Friskies)와 퓨리나원(Purina One), 마스의 대표 브랜드는 아이엠스(Iams)와 시저(Cesar)가 있음.
  - 반려동물 산업 트렌드의 키워드는 천연(Natural), 인증을 획득한(Certified) 제품으로 가족처럼 생각하는 반려동물의 건강과 웰빙을 유지하기 위한 노력으로 인공 색, 인공 향료가 들어가지 않은 천연 제품 수요 크게 증가함.
  - 합성 화학물질의 잠재적인 독성에 대한 우려와 환경에 대한 미국인들의 인식이 높아짐에 따라 천연 제품 선택하는 경향이 높아짐.
  - 그 예로는 천연 제품을 이용한 식품, 천연 미용제품, 반려동물용 천연 베틀, 진드기 살충제, 천연 섬유로 만든 장난감 등이 있음.
  - 식재료에 대한 소비자들의 관심이 높아져, 인증 받은 식품을 선호하는 경향이 강함.
- [ 자료원 : American Pet Products Association, NRF, IBIS World, Packaged Facts, Pet Product News, Euromonitor International, PetPlate, Barknatural, Green Pet food, Global Pet Expo, Super Zoo, Groom Expo, 달라스 무역관 의견 종합 ]
- 이전의 중국인들은 오락 및 소일거리 위주로 반려동물을 키웠기 때문에 전용식품 및 기타 관련 소비가 이루어지지 않았으나 최근 중국인들의 생활수준의 향상으로 반려동물 시장 변화의 바람이 불고 있음. 국제시장과 비교했을 때 비교적 시작은 늦으나 시장 규모에서 연평균 30% 이상 빠른 성장을 지속하고 있음.
  - 경제 성장과 개방 속도가 빠른 대도시를 위주로 대중들의 인식 수준이 올라가면서 애완동물은 점차 반려동물로 개념이 바뀌어가고 있으며, 관련 소비 증가의 욕구가 높아지고 있음.
  - 겨우민왕(狗民网)이 발표한 ‘2015년 중국 반려동물 주인 소비행위 보고’에 따르면, 현재 중국 내 99.8%의 반려동물 주인이 자신의 반려동물을 위해 비용을 지출하며, 대략 절반의 사람들이 월평균 100~500 위안 정도의 지출을 함.
  - 중국 내 반려동물 소비시장 규모가 확대되고 주인의 94.6%가 전용식품을 구매하고, 필수품 이외의 소비도 매년 증가하고 있음. 현재 반려동물 주인 중 5.1%가 자신의 반려동물을 위한

비용, 사진 촬영 등에 비용을 지출하고 있음.

- 중국 반려동물 산업의 발전은 크게 3개의 단계로 나뉘짐. 첫 번째는 발아기(1990~2000년), 두 번째는 발전태동기(2000~2008년), 세 번째는 고속발전기(2008년~현재)임.
- 거우민왕(狗民网)의 통계에 따르면, 2014년 중국 반려동물 산업의 소비규모는 719억 위안에 달했고, 2016년 최초로 1000억 위안을 돌파해 2020년에는 2000억 위안까지도 넘어설 것이라 예상하고 있음.

2004~2014년 중국 반려동물산업 소비규모 및 동기대비 증가속도



자료원: 중국산업정보망

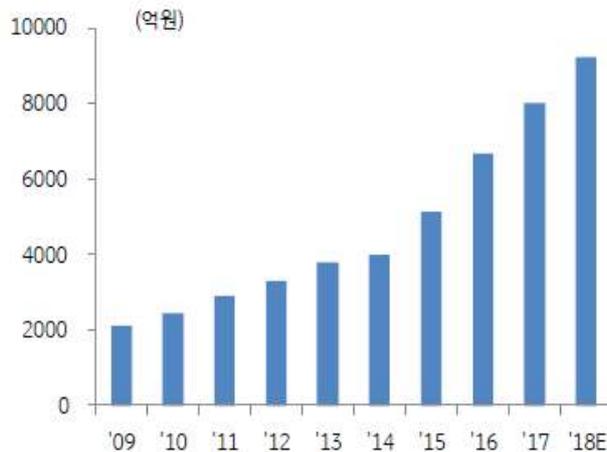
- 중국 반려동물산업 발전의 주요 특징은 2004년부터 2014년까지 10년 동안 중국의 반려동물 산업의 소비규모는 36배나 성장했고, 전용식품 및 용품, 미용보건, 동물병원 등의 제품 및 서비스 시장도 나날이 성장하고 있음.
- 반려동물산업이 주요 거점단지를 형성하고 있음. 쓰촨성 청두는 중국에서 제일 큰 반려견 양육지로, 반려동물 식품기업들이 모여들면서 반려동물식품 생산기지가 만들어짐. 광둥성은 이미 세계에서 제일 큰 관상어 양식 및 수족관 용품 생산지임. 저장성 윈저우는 아시아에서 제일 큰 반려견 가죽 치발기 생산지로 유럽, 미국, 일본 등 20여 개의 국가와 지역에 수출하고 있음.
- 해외기업 간의 치열한 경쟁임. 최근 중국 반려동물 관련 업종 기업들은 과거 대비 제품의 종합 품질 면에서 향상된 모습을 보이고 있으나 반려동물 식품의 경우, 현재 해외기업이 중국 시장 특히 고급제품 시장에서 절대적인 부분을 차지하고 있으며, 중국 기업은 대체로 중저가 시장을 점유하고 있음.
- 일본의 반려동물 시장은 2014년 1조4412억엔(13조9721억원)에서 2015년 1조4549억엔(14조 1061억원)으로 소폭 상승할 것으로 야노경제연구소가 전망함.. KB금융지주경영연구소 보고서는 2012년 기준 일본 전체 가구 중 16.8%가 개와 고양이 2000만 마리를 기르고 있는 것으로 추정함. [자료 : 농업경제연구소, 일본야노경제연구소]
- 미국과 일본 등 선진국에서는 한국보다 앞서 반려동물을 위한 미용·패션·호텔·장묘·보험 등 각종 서비스가 발달했으며 점차 세분화·전문화하는 추세임. 장묘 문화만 해도 미국에서는 수백 여개의 반려동물 묘지가 있고, 독일 에센과 브라운바흐 두 곳에는 사람과 반려동물을 합장할 수 있는 묘지가 있음. 일본에선 반려동물이 죽을 경우 친·인척까지 초청해 장례를 치르고 추모하며, 미리 들어놓은 보험으로 자신의 납골묘 옆에 자리를 만들어 놓고 나중에 죽은 반려동물

을 안치시키는 노인들도 있음.

② 반려동물의 사료 시장 현황

- 반려동물 사료 시장은 최근 5년간 연평균 19% 내외의 성장을 보였고, 2017년 약 8천 억원을 상회하는 것으로 추정함.
- 국내 반려동물 사료시장에서 수입산이 차지하는 비중이 높은 편이나 국내 생산 판매액 성장률이 더 높은 것으로 나타남.
- 반려동물 사료 안전성 문제로 인하여 유기농 인증제가 2017.06.03.부터 시행됨.
- 반려동물 사료 구입 시 중시하는 점에 대한 조사 결과 가격(54.8%), 건강케어기능(50.5%), 맛(49.3%) 순으로 나타남, 그 외 재료, 브랜드, 국산여부 순으로 나타남.

[국내 반려동물 사료시장 규모 추이]



자료: Kis-Value, 농촌진흥청, 한국과학기술정보연구원, KB경영연구소 재구성  
"2018 반려동물보고서"

- 국내·외 사료 판매업체 현황

업체명	브랜드 및 제품 특징	제품 사진
네슬레 퓨리나	-브랜드 '알포' -1936년 탄생한 브랜드로 높은 인지도와 재구매율을 보이며 반려견이 좋아하는 진한 고기맛으로 기호성을 높이며, 비타민, 미네랄, 필수아미노산 등을 첨가한 제품.	
CJ 제일제당	- 2013년 애완동물용 펫푸드 출시 - 브랜드 '오프레시(OFFRESH)'로 시장 진입 - 천연 동식물성 재료를 사용한 반려동물 맞춤(연령별 기능별) 설계	

<p>풀무원</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2014년 통곡물, 원육, 채소를 사용한 유기농 사료 ‘아미오 홀리스틱 (Amio Holistic)’ 출시</li> <li>- 풀무원의 무첨가 원칙을 그대로 적용하여 합성첨가물을 일체 첨가하지 않음</li> <li>- USDA(미국농무부 유기농 인증 마크)와 ECO CERT(유럽 유기농 인증 단체 인증마크)로부터 유기농 인증 획득한 천연원료 사용</li> </ul>	
<p>대한사료</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 여러 개의 펫푸드 브랜드 중 ‘이즈칸(Iskhan)’ 유명</li> <li>- 생 닭고기를 주원료로 사용하여 무곡물, 부원료 사용 함.</li> <li>- 연령별, 기능별 재료를 사용한 반려동물 맞춤 설계</li> </ul>	
<p>LG 생활건강</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-반려견 브랜드 ‘시리우스 윌’ (SIRIUS WILL) 성장 단계별 (피피용, 성견용, 노견용) 로 맞춤 원료를 사용하여 제품구성.</li> <li>- 천연령 홍삼 사용(홍삼박 원료 표기됨).</li> </ul>	
<p>정관장</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 홍삼 성분을 함유한 반려동물 건강식 ‘지니펫 (GINIPET)’ 출시</li> <li>- 6년근 홍삼박과 증삼농축액, 고품질 유기농 원료를 결합해 반려동물의 영양보급 및 면역력에 도움을 줄 수 있는 건강식 출시</li> <li>- 유기농(기본식, 아로니아, 유카함유)/홀리스틱(홍삼 &amp;오리또는연어) 군으로 사료 알갱이 크기(소형,중형)로 분류됨</li> </ul>	

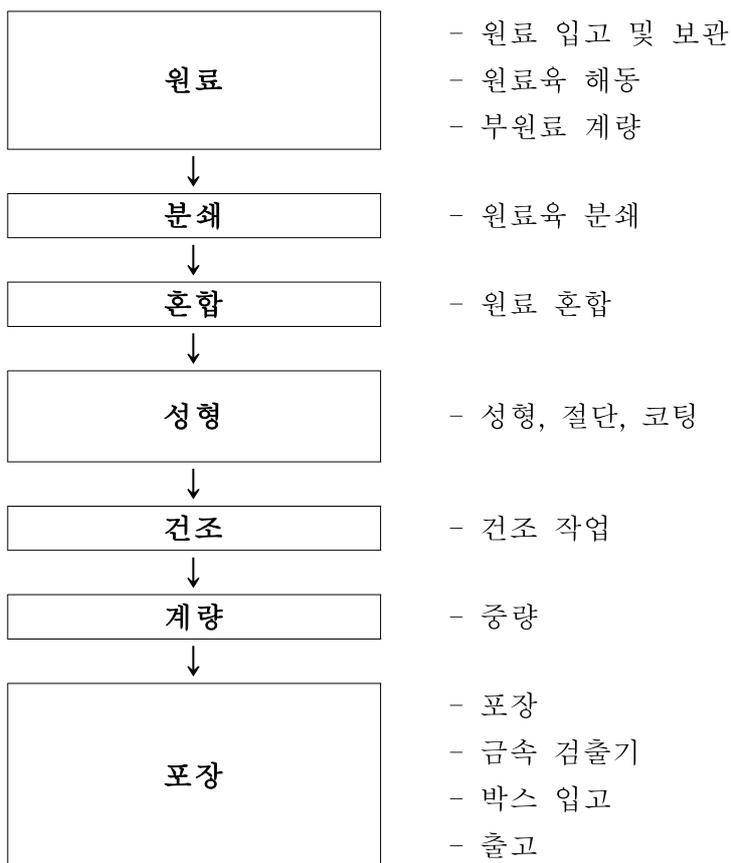
③ 기능성 다당체 원료- 제조방법

- 원료 : 홍삼은 원료로 적합한 것을 사용한다.
- 칭량 : 원료를 전자저울로 필요한 양만큼 칭량한다.
- 추출 : 원료를 추출기에 넣고 물 또는 주정을 5~10배로 투입한 후 60~98℃ 의 온도에서 4 시간 이상 3~5회 추출한다.
- 진공포장 : 추출된 홍삼을 진공포장한다.
- 초고압처리 : 초고압기기에서 550MPa에서 1분간 처리한다.
- 효소처리 : pH 4.5~6.0, 50~60℃, 10~30 분간 효소(cellulase) 반응한다.
- 추출 : 정제수 5~10배수, 70~90℃, 1~5시간 추출한다.
- 여과 : 1 마이크론 필터로 여과한다.
- 침지 : 여과액 2~3배의 주정을 혼합하여 1~20℃에서 16~28시간 침지한다.
- 농축 : 농축기에서 농축한다.
- 살균 : 85~95℃에서 30~90분간 살균한다.

- 분무건조 : 분무건조기에서 분무건조한다.
- 충전 : 식품 용기에 칭량하여 충전한다.
- 검사 및 포장 : 기준, 규격 검사 후 출하한다.

#### ④ 시제품(사료) 제조

- 시제품(사료) 제조 공정도



#### ⑤ 사료(시제품) 설문 조사

반려동물 사료의 설문조사는 애완동물을 대상으로 15마리 진행하였으며, 암컷과 수컷을 구별하지 않았다. 현재 섭취하고 있는 시판제품을 대조군으로 하여 샘플용 사료 섭취 후기를 조사하였다. 샘플 섭취 기간은 5일 이상으로 하며, 애완동물에 따라 처음에 새로운 사료에 대한 거부감이나 몸 상태가 좋지 않을 경우에는 기존사료에 섞어서 섭취할 수 있도록 하였다. 설문지의 각 문항별로 설문조사를 취합한 후 전체 응답자 대비 해당비율(%)로 나타내었다.

#### ⑥ 제품 명칭 및 디자인 개발

반려동물 사료 제품 명칭은 본 과제의 연구결과를 활용할 수 있으며, 제품의 특성을 잘 살릴 수 있게 표현하고자 하였다. 몇 가지 아이디어 중 애완동물들이 선호하며 시판제품으로도 많이 사용하는 고기류 중 ‘오리고기’와 반려동물들의 건강을 돕고 다른 제품들과 차별화 및 본 과제의 연구 결과를 활용할 수 있는 ‘홍삼’을 강조한 네임을 하고자 하였다.

패키지 디자인은 자사에서 기본 시안을 논의 한 후 디자인 전문가를 통하여 개발하였다.

나) 연구 결과

① 기능성 다당체 원료 - 품목제조보고

발급번호 : 1B16-HMDG-SN7T-U062-M89F



### 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 김성한	생년월일(법인번호) 1969년 02월 11일		
	주소 충청남도 금산군 추부면 송암로 135	전화번호 휴대전화	010 87289866	
영업소	명칭(상호) (주)뉴트렉스테크놀러지	영업등록번호 20140467087		
	소재지 충청남도 금산군 추부면 송암로 135			
제품정보	식품의 유형	기타 농산가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2014046708729
	제품명	총상 다당체 추출물		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뿔장애 기재		
	용도 용법	뿔장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	뿔장애 기재		
포장방법 및 포장단위	밀봉포장, 1kg, 5kg, 10kg, 20kg			
성상	연갈색의분말식품			
품목의 특성 <input type="checkbox"/> 고열량·저영양 식품 해당 여부    [ ]에 [ ]아니오 [O]해당 없음 <input type="checkbox"/> 알칼리성 식품 해당 여부    [ ]에 [O]아니오				
기타				
『식품위생법』 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.				
2018년 11월 14일 보고인 김성한				

**충청남도 금산군수 귀하**

품목보고번호	20140467087-29				
처리부서	주민복지지원실	처리자성명	강영훈	처리일자	2018년 11월 15일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

② 사료(시제품) 설문 조사 결과

반려견 15마리를 대상으로 반려견주들에게 사료 섭취 후 설문조사를 하였다. 설문 조사 항목으로는 반려견종과 몸무게, 나이를 질의 하였으며, 시제품의 평가 항목으로 1일 식사횟수, 1일 변 횟수, 식사량, 반려견의 변 뭉기 상태, 변 색깔, 털상태, 피부상태를 조사하였다. 5일 이상 사료 섭취를 권장하였으며, 반려견에 따라서는 새로운 사료에 대한 거부감이 생길 수 있기에 기존 섭취하고 있는 사료에 조금씩 섞어 섭취할 수 있도록 하였다.

각 항목별로 조사한 결과 1일 식사횟수와 변 횟수는 ‘1~2회’ 하는 것으로 나타났으며, 어린 강아지의 경우 소화 흡수율이 떨어져서 한꺼번에 많은 양을 주기보다 나누어 섭취하도록 하였다. 성견의 소화흡수율을 100%로 보았을 때, 6개월 미만의 강아지는 30~50% 정도 떨어진다고 한다.

식사량은 기존 사료와 차이 없이 ‘잘 먹는다’ 는 답변이 67%로 나타났다. 성장 연령에 따라서 1일 기준 평균 급여량은 생후 2~5개월 령은 체중의 3~5% 정도의 양을 3~4회 나누어 급여하며, 6~12개월 령은 체중의 3~4% 정도의 양을 1~2회 나누어 급여하는 것을 권장한다. 반려견들의 건강을 알아보는 척도 중 하나로 변의 뭉기는 ‘보통(67%)’답변이 가장 많이 나타났으며, 변 색깔은 ‘황색~갈색(33%)’보다 ‘짙은 갈색~검은색 계열(67%)’의 답변이 더 많이 나타났다. 건강한 변의 형태로 판단된다. 일반적인 건강한 변의

형태는 딱딱하지는 않고 견고하며 덩어리가 뭉쳐진 모양 또는 굴곡이 없는 매끈한 소지지 모양의 상태라고 한다. 수분이 많은 변의 경우 처리할 때 잔여물이 많이 남아 힘든 부분이 있다고 하였다. 털 상태는 ‘윤기 있음(67%)’ 답변이 가장 많았으며, 피부상태는 ‘건강함(83%)’ 답변이 가장 많았다. 사료의 알갱이 크기를 6mm로 하여 설문 조사를 시행하였는데, ‘알갱이 크기가 조금 더 컸으면 한다’ 는 의견이 있어 타사 제품 조사 및 제형을 고려하여 사료 알갱이 크기는 8mm 크기로 결정하였다.

사료(시제품) 설문 조사 결과 보고서																																																									
과제명	초고압효소 융합기술을 이용한 홍삼 부산물의 기능성 다당체 개발 연구																																																								
소속	(주) 뉴트렉스테크놀러지	보고일	2018.10.30																																																						
의뢰방법	자체조사	조사기간	2018.10.01.-2018.10.18																																																						
작성자	박은영	조사 대상 수	15마리	사료(샘플) 수 1 품목(제품명 미정)																																																					
조사목적	반려견 사료(시제품) 섭취 후 설문조사를 이용하여 추후 제품 개발 및 개선에 반영하고자 함																																																								
조사방식	반려견을 키우고 있는 반려견주들을 대상으로 설문지 및 사료(조사용)를 전달하고 설문지 작성 완료 후 결과를 확인함.																																																								
설문지 양식																																																									
조사 결과	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">항목</th> <th colspan="5">결과</th> </tr> <tr> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> <th>D</th> <th>E</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1일 식사횟수</td> <td>1~2회(100%)</td> <td>3회 이상</td> <td>자율급식</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1일 변 횟수</td> <td>1~2회(100%)</td> <td>3회 이상</td> <td>1회 미만</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>식사량</td> <td>아주 잘 먹음 (33%)</td> <td>잘 먹음(67%)</td> <td>먹기 싫어함</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>변 똥기상태</td> <td>딱딱함</td> <td>약간 딱딱함(16.5%)</td> <td>보통 (67%)</td> <td>약간 묽음(16.5%)</td> <td>묽음</td> </tr> <tr> <td>변 색깔</td> <td>황색~갈색(33%)</td> <td>짙은 갈색~검은색 계열(67%)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>털 상태</td> <td>윤기 있음(67%)</td> <td>보통(16.5%)</td> <td>푸석하고 윤기 없음(16.5%)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>피부 상태</td> <td>건강함(83%)</td> <td>보통(17%)</td> <td>자주 긁고 각질이 벗겨짐</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				항목	결과					A	B	C	D	E	1일 식사횟수	1~2회(100%)	3회 이상	자율급식			1일 변 횟수	1~2회(100%)	3회 이상	1회 미만			식사량	아주 잘 먹음 (33%)	잘 먹음(67%)	먹기 싫어함			변 똥기상태	딱딱함	약간 딱딱함(16.5%)	보통 (67%)	약간 묽음(16.5%)	묽음	변 색깔	황색~갈색(33%)	짙은 갈색~검은색 계열(67%)				털 상태	윤기 있음(67%)	보통(16.5%)	푸석하고 윤기 없음(16.5%)			피부 상태	건강함(83%)	보통(17%)	자주 긁고 각질이 벗겨짐		
항목	결과																																																								
	A	B	C	D	E																																																				
1일 식사횟수	1~2회(100%)	3회 이상	자율급식																																																						
1일 변 횟수	1~2회(100%)	3회 이상	1회 미만																																																						
식사량	아주 잘 먹음 (33%)	잘 먹음(67%)	먹기 싫어함																																																						
변 똥기상태	딱딱함	약간 딱딱함(16.5%)	보통 (67%)	약간 묽음(16.5%)	묽음																																																				
변 색깔	황색~갈색(33%)	짙은 갈색~검은색 계열(67%)																																																							
털 상태	윤기 있음(67%)	보통(16.5%)	푸석하고 윤기 없음(16.5%)																																																						
피부 상태	건강함(83%)	보통(17%)	자주 긁고 각질이 벗겨짐																																																						
기타 의견	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 알갱이 크기가 조금 더 컸으면 좋겠다.</li> <li>- 다른 사료보다 사료냄새가 좋다.</li> <li>- 사료를 잘 먹는다.</li> </ul>																																																								

③ 사료 성분 및 안전성 검사

- 사료의 일반성분(수분, 조단백질, 조지방, 조섬유, 조회분), 무기질(칼슘, 인), 곰팡이독소, 중금속, 농약, 멜라민, 미생물 등을 검사한 결과는 아래 표(사료검정증명서)와 같다. 일반성분 중 수분은 10.0% 이하, 조단백질 28.0% 이상, 조지방 7.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 9.5% 이하로 나왔다. 칼슘은 1.0% 이상, 인은 0.8% 이상으로 나왔다. 곰팡이 독소인 아플라톡신 및 오크라톡신은 불검출 되었으며, 중금속도 기준치 이하 및 불검출로 나왔다. 농약성분 분석결과 불검출이며, 멜라민과 살모넬라도 불검출로 나타났다. 동물용 의약품 첨가내용에 대한 사항으로 Maduramycin과 Salinomycin 분석한 결과 불검출로 나타나 동물용 의약품 첨가내용은 해당이 없는 것으로 나타났다.

[표. 사료검정증명서]

성분	실험 항목	실험 결과	검정방법
일반 성분	수분(%)	7.57	사료표준분석 1.1.가.
	조단백질(%)	30.02	사료표준분석 1.2.나.
	조지방(%)	8.29	사료표준분석 1.4.라.
	조섬유(%)	2.37	사료표준분석 1.3.
	조회분(%)	8.11	사료표준분석 1.5.
무기질	칼슘(%)	1.08	사료표준분석 4.19.
	인(%)	1.03	
곰팡이 독소	아플라톡신(ppb)	불검출	사료표준분석 7.1.라
	오크라톡신(ppb)	불검출	사료표준분석 7.3.나
중금속	납(ppm)	0.52	사료표준분석 4.19.
	카드뮴(ppm)	불검출	
	비소(ppm)	불검출	
	수은(ppm)	불검출	사료표준분석 5.5.
	크롬(ppm)	불검출	사료표준분석 4.19.
	불소(ppm)	13.65	사료표준분석 5.2.나.
농약	ethylenedibromide(ppm)	불검출	사료표준분석 8.6.
	dichlorvos(ppm)	불검출	
	diazinon(ppm)	불검출	
	chlorpyrifos-methyl(ppm)	불검출	
잔류 물질	멜라민(ppm)	불검출	사료표준분석 21.14.나.
미생물	살모넬라	불검출	사료표준분석 8.1
동물용 의약품	maduramycin(ppm)	불검출	사료표준분석 10.2.바.
	salinomycin(ppm)	불검출	

\* [사료관리법] 제 20조에 따라 검정을 의뢰한 결과임(한국사료협회사료기술연구소 의뢰).

④ 제품 명칭 및 디자인 개발

사료 관리법에 의한 표시사항은 제품명, 성분등록번호, 사료의 명칭, 사료의 용도, 종류, 형태, 동물용 의약품 첨가 내용, 원산지, 원재료명, 중량, 제조연월일 및 유통기한, 재포장 및 기타내용, 제조원, 판매원, 포장내질(내면), 등록성분량, 급여기준, 사료교체방법, 보관 및 주의사항 이 기입된다.



내포장지 (100g)

외포장지(1kg)

[제품의 특징]

- 홍삼 4% 함유로 면역력에 도움  
(홍삼박, 증삼농축액, 홍삼다당체추출물 함유)
- 오리고기 함유로 성장 및 혈액순환에 도움
- 5無 (글루텐, 방부제, GMO, 인공색소, 염분)
- 모든 건종의 반려견들이 씹어먹지 좋은 입자사이즈 8 mm

[최종 사진]



2) 현장적용 후 대량 생산을 통한 사업화 방안 모색

가) 생산 계획

구분		( 2019 년) 개발 종료 후 1년	( 2020 년) 개발 종료 후 2년	( 2021 년) 개발 종료 후 3년
국내	판매량(단위:kg)	2,000	4,000	8,000
	판매단가(원)	15,000원/kg	15,000원/kg	15,000원/kg
	국내매출액(백만원)	30	60	120

[추정근거]

- 추정 매출액 총액 (제품출시 이후 3년 기준) : 210 백만원
- 개발 제품 판매개시 시점은 2019년도.

(단위:백만원)

	1차년도 (2019)	2차년도 (2020)	3차년도 (2021)	합계
반려동물 사료의 시장규모 <sup>1)</sup>	1,132,800	1,348,100	1,604,200	4,085,100
예상 매출액	30	60	120	210

<sup>1)</sup> 반려동물 사료의 시장규모는 'KB 경영연구소-2018 반려동물보고서' 자료를 참고로 하여 작성하였음. 2017년도 약 8천억 원을 기준으로 하여 연평균 19%증가의 성장을 감안하여 시장규모를 추정함.

- 개발제품의 시장점유율을 제품출시 초기에는 매출보다 제품 런칭 및 마케팅 준비 등 제품 출시에 따른 준비 등으로 2차년도 이후 매출을 기대함.

- 2차년도 이후에는 국내 내수 주요 업체에 본격적인 공급 및 마케팅 강화로 적극적 영업 실시하여 점유율을 높임으로써 제품의 매출을 증가시킬 계획임.

나) 투자 계획

(단위 : 백만원)

항목		( 2019 년) 개발 종료 후 1년	( 2020 년) 개발 종료 후 2년	( 2021 년) 개발 종료 후 3년
판매관리비		1,000	1,100	1,200
자본적 지출	토지/건물/구축물	-	-	-
	시설 장치	5	7	10
	관리 해당 비용			
	기계 장치	4	5	6
	유지비 등			

[추정근거]

- 자사 매출원가 기준으로 10%를 판매관리비로 계획함.
- 시설 장치 관리 및 기계 장치 유지비 지출에 대한 비용 몇 년간 지출된 비용을 반영하여 계획함.

다) 사업화 현황 및 추진전략

- ① 주관기관(뉴트렉스테크놀로지)의 공장 증축
- 기업명 : (주) 뉴트렉스테크놀로지
  - 소재지 : 충남 금산군 추부면
  - 주요 내용 : 생산 공장(금산 소재지)을 증축함.
  - 이전 날짜 : 2017년
  - 기업 투자 금액 : 약 19억(건물 자산)

[공장 외부 및 내부 사진]



② 해외 사업화 추진

- 해외 바이어 미팅

일시 : 2018. 10.31-2018.11.02

장소 : 일본 도쿄

주요 내용

- 초고압 기술 적용된 시장 현황 조사
- 해외 시장으로의 수출 가능성 타진
- 일본 바이어 미팅을 통한 제품 개발 방향 회의



③ 온라인 홍보 및 판로 확보

- 온라인사이트 : [http://nutrex.co.kr/index\\_s.php](http://nutrex.co.kr/index_s.php)
- 쇼핑몰 오픈



④ 국내, 외 주요 거래 업체 현황 및 사업화 추진 전략

- 주관기관은 기본적으로 개발 결과를 산업화(매출)함에 있어 기본 원료 구입 및 매출이 일련의 체계된 운영조직을 보유하고 있으며, 개발 결과의 산업화에 있어 역시 유기적인 협력체계를 구축하고 있음.
- 홍삼 부산물로부터 개발되기 때문에 원가절감으로 인한 저비용 고부가가치 소재 개발로 접근에 용이함.
- 비식품류인 애완견 사료 개발을 비롯한 홍삼 부산물의 피부미용에 대한 기능성은 현재까지 연구된 홍삼의 기능성과의 차별성을 가지기 때문에 이에 대한 소비층을 확대할 수 있을 것으로 예상함..
- 기능성 원료 및 제품화 판매 전략은 기존 거래처 활용 및 연계된 연구 기관과의 지속적인 관계를 유지하며 추후 제품 개발을 진행하고자 함.
- 2011년 이후 약 100억 이상의 자사 매출액을 유지하고 있으며, 국내 및 해외 거래를 꾸준히 유지하고 있음.
- 기존의 해외 유통망을 통해 수출 판매까지도 기대해 볼 수 있음.

< 주관기관의 국내,외 주요 거래 업체 현황(2017년 기준)>

해당연도	구분	상 호	연간거래액 (단위:백만원)
2017	국내 및 해외 매출처	E사	15,048
		S사	270
		J사 (USA)	261
		계	15,579
2018(추정)	국내 및 해외 매출처	E사	15,100
		S사	300
		J사 (USA)	270
		계	15,670

<반려견 사료 제품 개발을 위한 상용화 능력 및 계획>

구분	구체적인 내용																					
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 상용화 형태 : 반려동물의 사료 개발</li> <li>○ 수요처 : 자체 영업에 의해 수요가능. 거래처를 통한 원료 및 제품 홍보</li> <li>○ 예상 단가 : 적절한 원가 중심의 제품 생산 (소비자가 예상가격 약 15,000원/kg)</li> <li>○ 개발 투입인력 및 기간 : 본 연구 과제를 통한 연구원 및 제품 생산의 각 분야 인력을 포함하여 총 40명 이상 필요함. 총 개발 기간은 3년. 개발제품 판매개시 시점은 2019년도.</li> </ul>																					
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 자체 원료 개발 가능</li> <li>○ 안정적인 원료와 부재료 공급 가능</li> <li>○ 사료 제품의 일부 원재료를 공급하여 사료제조업체를 통한 OEM 방식으로 제품 생산 계획</li> </ul> <p>&lt;표&gt; 홍삼 부산물의 원물 확보 및 제품화시 경제성 평가 (2018년 산출근거)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>순서</th> <th>구분</th> <th>경제성</th> <th>비고</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">1</td> <td>원료확보(홍삼 부산물)</td> <td>48톤/년</td> <td rowspan="2">생산수율 70 %내외 (일부품목해당)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">-산출근거 : 자사 홍삼가공(농축액) 원료 제조시 홍삼부산물 수율은 50% 내외</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td colspan="3">제품화 개발(기능성 확보)관련 경제성 평가</td> </tr> <tr> <td>2-1</td> <td>열수추출물(농축액,100%)</td> <td>68.6톤/년</td> <td rowspan="2">제품화 시 부형제로 사용 예정.</td> </tr> <tr> <td>2-2</td> <td colspan="2">잔사분리물</td> </tr> </tbody> </table>	순서	구분	경제성	비고	1	원료확보(홍삼 부산물)	48톤/년	생산수율 70 %내외 (일부품목해당)	-산출근거 : 자사 홍삼가공(농축액) 원료 제조시 홍삼부산물 수율은 50% 내외		2	제품화 개발(기능성 확보)관련 경제성 평가			2-1	열수추출물(농축액,100%)	68.6톤/년	제품화 시 부형제로 사용 예정.	2-2	잔사분리물	
순서	구분	경제성	비고																			
1	원료확보(홍삼 부산물)	48톤/년	생산수율 70 %내외 (일부품목해당)																			
	-산출근거 : 자사 홍삼가공(농축액) 원료 제조시 홍삼부산물 수율은 50% 내외																					
2	제품화 개발(기능성 확보)관련 경제성 평가																					
2-1	열수추출물(농축액,100%)	68.6톤/년	제품화 시 부형제로 사용 예정.																			
2-2	잔사분리물																					
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제품 개발 원료 및 판매 적용 : 2019년</li> <li>○ 단가 절감 및 상품화 작업 완료 : 2019년</li> </ul>																					

### 3) 기능성 다당체의 면역증진 효능/피부효능 개선평가

#### 가) 연구수행 방법 및 내용

##### ① 면역증진 효능평가 연구(피부과민면역반응 개선에 대한 *in vivo* 평가 )

5주령의 NC/Nga 마우스를 공급받아 대조군 및 각 실험군을 난피법으로 나눈 후 각 실험군은 10마리/cage씩 2cage에서 사육하였으며 사료와 물을 마음껏 섭취하도록 하며 온도는  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 습도  $60\pm 5\%$ 를 유지하고 12시간 간격으로 명암을 바꿔주었다. 실험식이 (초고압효소융합 홍삼 부산물 다당체 50, 200, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 사육하기 전 1주 동안 고형배합사료로 적응시켰다. 체중에 따라 난피법으로 5군으로 나눈 후 실험군은 실험식이를 4주간 공급하였다. 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 임상증상, 소양감 완화 효능과 아토피성피부염이 유도된 NC/Nga 마우스의 주요 증상인 귀 및 등 두께와 Dermatitis score 증가에 대한 개선 효능을 확인하였다.

##### ② 피부기능 개선 효능평가 연구(주름 개선에 대한 *in vitro* 평가 )

###### - MMP-1 collagenase의 발현 측정

피부노화 중 주름살 생성은 진피 내 세포의 기질단백질이 결핍되어 주름이 형성되는데, 피부 조직 내 교원질의 결핍은 주로 섬유아세포에서의 교원질 합성량이 감소되거나 교원질 분해효소에 의해 교원질 분해가 증가될 때 일어나므로 본 실험에서는 사람의 각질형성세포(Keratinocyte)인 HaCaT cell에 자외선을 조사하여 콜라겐을 분해하는 효소로 알려져 있는 MMP-1(matrix Metallo Proteinase-1)의 발현을 유도하고 시료의 MMP-1 발현 저해능을 확인하였다. MMP-1활성을 보기 위해 HaCaT 세포를  $1\times 10^6$  cells/well 농도로 6-well plate에 접종한 후 배양한다. 세포가 충분히 자라면 각 well에 시료를 5-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여  $\text{CO}_2$  배양기에서 1시간 배양 후, MMP-1의 활성을 높이기 위하여 solar UV를 29분간 조사하고 48시간 배양하였다. 이렇게 처리된 세포의 배양액을 수거하여 원심분리 후 상층액을 실험에 사용하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer(5% skim milk in TBST, sodium azide X)에서 배양시켰다. 1차 항체를 1:1,000으로 희석하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 2차 항체(rabbit)를 TBST에 1:5,000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 붙이고, 8분 간격으로 5회 washing 한 뒤 color reagent A,B를 1:1 비율로 섞어 부어 주고 Western imaging system 기기를 이용하여 단백질의 발현을 확인 및 정량하였다.

###### - MMP-1 collagenase mRNA의 정량

Total RNA는 Trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출된 2  $\mu\text{g}$  total RNA는 oligo dT 2  $\mu\text{g}$ , reverse transcriptase mix (Enzymomics, Korea)를 이용해서 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA와 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  primers (Bionic, Korea); 50 mM KCl (Biopure, Canada), 20 mM Tris/HCl pH 8.4 (Biopure), 0.8 mM dNTP (Takara, Japan), 0.5 U Extaq DNA polymerase (Takara), 3 mM  $\text{MgCl}_2$  (Takara), 1X SYBR green (Invitrogen)를 혼합하여 LinegeneK (BioER, China)을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 측정 후, normalization을 위해 동일  $\beta$ -actin 발현량

에 따른 MMP-1의 발현량을 계산하였다.

- AP-1 promoter의 전사활성 측정

초고압효소융합 홍삼부산물 다당체에 의한 MMP-1 유전자의 전사제어에 대한 영향을 분석하기 위하여 MMP-1 Luc (human MMP-1 promoter construct)을 사용하여 인간각질형성 세포에 AP-1 binding sequences (TGAC/GTCA)를 9시간 동안 형질전환 하였다. 이어 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체를 1시간 동안 처리하고 sUV를 조사한 뒤, luciferase 활성을 측정하였다. 이후 수확하여 1X luciferase lysis buffer (Promega, USA)로 세포를 용해하고, 4°C, 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. AP-1의 전사활성은 cell lysate와 luciferase reagent (Promega)를 혼합하여 나오는 발광량을 Veritas™ Microplate Luminometer (Turner BioSystems, USA)로 측정하였다.

나) 연구 결과

① 면역증진 효능평가 연구(피부과민면역반응 개선에 대한 *in vivo* 평가 )

초고압효소융합 홍삼부산물 다당체 (ELHPP-RGBP)가 아토피성 피부염 개선에 상승효과를 가지는지 여부를 확인하기 위해 아토피 실험 동물모델인 NC/Nga 마우스에서 아토피성 피부염과 같은 피부과민면역반응 증상에 대하여 효과를 평가하는 실험을 수행하였다. 아토피 실험 동물모델인 NC/Nga 마우스에 아토피 유발 물질인 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract, DFE)로 귀와 등 부위에 아토피성 피부염을 유발시킨 후 임상증상을 확인하기 위해 피부 상태(Ear and Dorsal thickness)와 이를 점수화시킨 피부염 지수 (Dermatitis score)를 평가하여 산출하였다. 실험동물은 총 40마리를 사용하였으며 8군으로 나누어 각 실험군을 5마리씩 배정하였다. 실험군은 DFE를 도포하지 않으면서 식염수를 경구투여한 정상군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 식염수를 경구투여한 아토피군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 ELHPP-RGBP(50 µg/mL, 식염수)를 경구투여한 시료 투여군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 ELHPP-RGBP(200 µg/mL, 식염수)를 경구투여한 시료 투여군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 ELHPP-RGBP(800 µg/mL, 식염수)를 경구투여한 시료 투여군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 RGBP(50 µg/mL, 식염수)를 경구투여한 시료 투여군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 RGBP(200 µg/mL, 식염수)를 경구투여한 시료 투여군 5마리, DFE 100 mg을 도포하면서 RGBP(800 µg/mL, 식염수)를 경구투여한 시료 투여군 5마리를 사용하였다. 모든 동물군에는 자유로운 식이와 식수를 제공하였다. 4주 동안 DFE 100 mg을 도포하여 아토피성 피부염을 유도하고 4주 동안 시료의 경구투여를 병행하여 실험한 결과, ELHPP-RGBP 투여를 병행한 실험군이 아토피성 피부염 증상을 개선시키는 것을 육안으로 확인할 수 있었고, RGBP 투여를 병행한 실험군보다 피부염 지수를 유의적으로 개선하였다. 귀와 등 부위의 피부 두께 측정 결과 또한 아토피성 피부염이 유도되어 두꺼워진 귀와 등 부위의 피부 두께가 ELHPP-RGBP의 경구투여에 의해 감소함을 확인할 수 있었고 RGBP 투여를 병행한 실험군보다 높은 효능을 보였다.

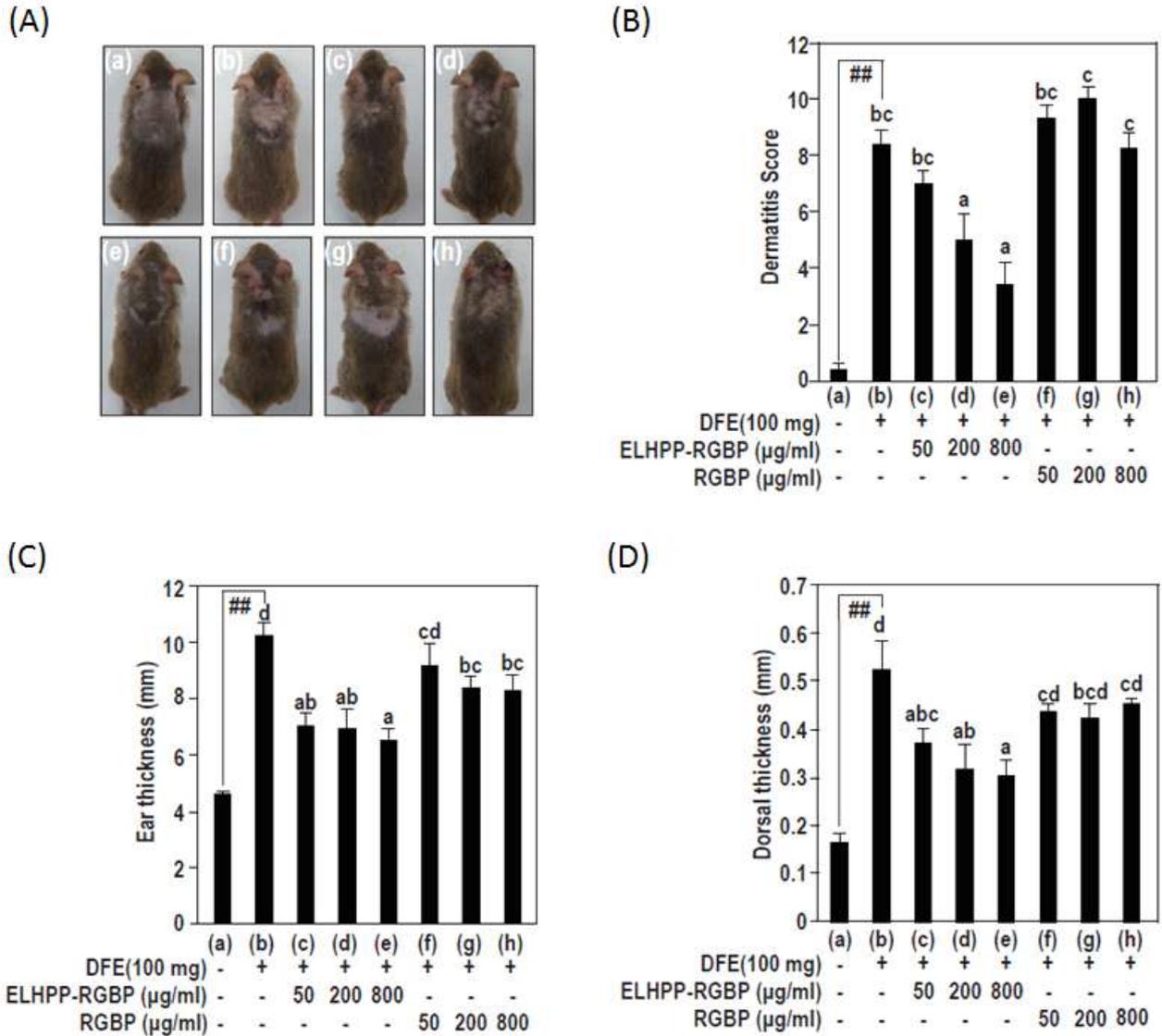


Fig. 1. DFE를 처리하여 아토피성 피부염을 유도한 NC/Nga 마우스에 대한 ELHPP-RGBP의 피부과민면역반응 개선 효능 평가.

(A) NC/Nga 마우스의 피부병변 사진 (a)정상군, (b)아토피군, (c)-(h)시료 투여군, (B) 피부염 지수 (Dermatitis scores), (C)-(D) 피부병변 부위(귀, 등)의 두께.

② 피부기능 개선 효능평가 연구(주름 개선에 대한 *in vitro* 평가)

초고압 및 효소를 융합 처리한 홍삼부산물 다당체 (ELHPP-RGBP)가 자외선에 의한 피부 주름 개선에 상승효과를 가지는지 여부를 확인하기 위해 인간각질형성세포 모델에서 MMP-1 단백질의 발현을 평가하는 실험을 수행하였다. ELISA leader 570 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 평균값을 산출하여 세포 독성을 평가하였다. 실험 결과, ELHPP-RGBP의 경우 80 µM까지 독성을 나타내지 않았고, 이를 바탕으로 추후 실험을 진행하였다. 인간 각질형성세포에 ELHPP-RGBP를 처리한 뒤, 태양광선의 자외선과 유사한 수준의 solar UV(25 KJ/m<sup>2</sup>)를 조사하여 MMP-1의 발현을 유도하고 Western blot을 통해 MMP-1의 단백질 발현을 측정하였다. 이어, ELHPP-RGBP가 MMP-1 mRNA 발현과 전사인자(Transcription factor)인 AP-1의 활성을 억제

하는지 여부를 평가함으로써 sUV에 의해 유도된 MMP-1 발현의 신호전달체계에 대한 ELHPP-RGBP의 작용기작을 규명하고자 하였다. 실험 결과, ELHPP-RGBP을 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리한 군에서 MMP-1 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. MMP-1의 mRNA 발현을 측정된 결과 또한, ELHPP-RGBP를 처리함에 따라 sUV에 의해 유도되는 MMP-1 발현 유전자의 합성이 저해되는 것을 확인할 수 있었고 이어, MMP-1 발현 유전자의 전사인자인 AP-1의 전사 활성을 측정된 결과, ELHPP-RGBP으로 인해 AP-1의 전사활성이 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 ELHPP-RGBP이 MMP-1의 전사인자인 AP-1의 활성을 저해함으로써 MMP-1의 발현을 억제하여 피부 내 콜라겐 함량을 유지하여 주름 형성을 예방하고 개선하는 효능이 있음을 입증하였다.

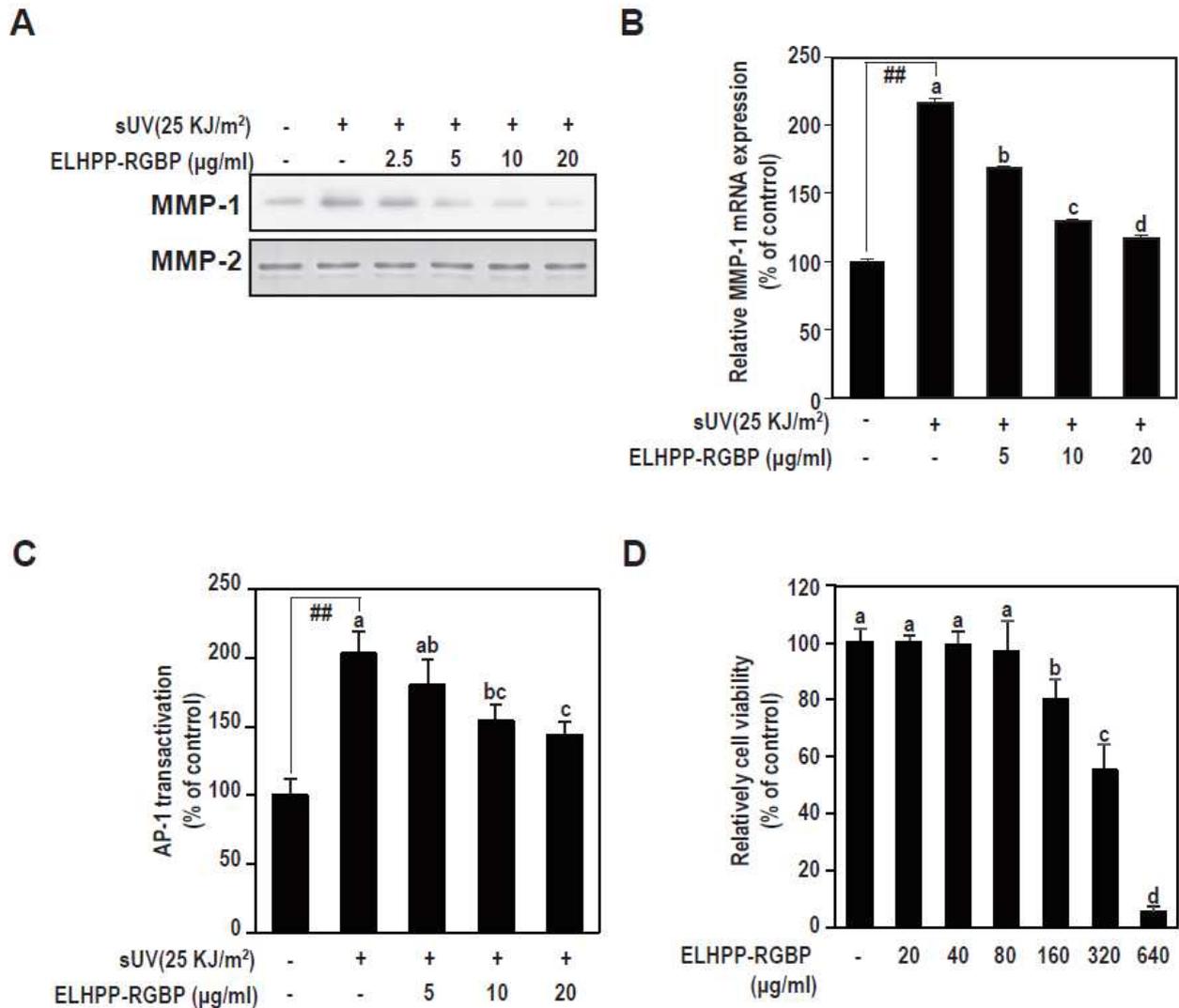


Fig. 2. sUV를 처리하여 MMP-1의 활성을 유도한 인간각질형성세포에 대한 ELHPP-RGBP의 주름 개선 효능 평가

ELHPP-RGBP의 (A) MMP-1 collagenase의 발현량, (B) MMP-1 collagenase mRNA의 정량, (C) AP-1 promoter의 전사활성, (D) 세포 독성 측정 결과.

#### 4) 기능성 다당체의 독성 및 안전성 평가 확립

##### 가) 연구수행 방법 및 내용

초고압효소융합 홍삼부산물 다당체의 독성 및 안전성 평가는 GMP기관인 (주)한국생물안전성 연구소(Korea Bio-Safety Institute, KBSI)에 피부자극성시험 및 급성경구독성시험을 의뢰하여 진행하였다.

##### ① 피부자극성 시험

New Zealand White계 토끼에 대한 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체의 피부자극성시험을 의뢰하였다. New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2018-4호)에 준하여 백색토끼로써 New Zealand White계 토끼 사용하였다. 실험동물은 초기시험 1마리, 확인시험 2마리를 사용하였다. 처리량은 처리 군별 공히 0.5 g으로 설정하였고 2\*3 cm 절개한 거즈를 이용하여 처리부위에 도포하고 증류수를 이용하여 습윤처리한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성 테이프와 Coban<sup>tm</sup> 으로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

##### - 일반중독증상 및 치사

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

##### - 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

##### - 처리부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유·무를 관찰하였고, 초기 시험은 확인시험 여부를 각각 3분, 1시간, 4시간 후 첩포를 제거한 뒤 피부 반응을 관찰하였다.

##### - 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고 결과에 대한 자극성은 [피부 1차 자극 표]의 자극성 기준에 따라 자극성을 판정하였다.

- 피부반응 평가표

<b>(1) 홍반과 가피형성</b>	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
명확한 홍반	2
중간정도부터 심한 홍반	3
심한 홍반과 홍반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성	4
<b>총 가능한 홍반과 가피 점수</b>	<b>4</b>
<b>(2) 부종형성 평점</b>	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 분명히 구별될 정도)	2
중간정도의 부종 (약 1 mm 정도 부어오른 상태)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
<b>총 가능한 부종 점수</b>	<b>4</b>

- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P.I.)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.I.)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.I.)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.I.)가 5.1 이상

② 급성경구독성 시험

SD-Rat(Sprague-Dawley, SD)(Specific Pathogen Free, SPF)에 대한 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체의 급성경구독성시험을 의뢰하였다. SD-Rat는 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성 시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2018-4호) 중 12-1-20. 급성경구독성시험법(급성독성등급법)에 준하여 랫드로써 SD-Rat를 사용하였다. 실험동물은 각 단계별 암컷 3마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 유성매직을 사용하여 각 개체의 미부에 표시하고, 사육상자에 개체식별 라벨을 부착하여 식별하였다. 처리량은 당연구소에서 유기농자재들의 시험한 자료들을 검토하여 1단계 시험에서 최고투여약량인 2000 mg./kg B.W.로 투여하였고, 투여 후 72시간 동안 치사 및 일반중독증상이 관찰되지 않아, 동일한 농도로 투여약량을 설정하여 2단계 시험을 실시하였다. 투여약량은 10 mL/kg B.W.로 랫드 경구투여용 존데 (Sonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여약량을 산출한 후, 경구투여 경로로 위내 1회에 한하여 강제 투여하였다.

- 일반중독증상 및 치사동물

처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사하였다.

- 체중 측정

시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고 생존한 동물에 한하여 투여 후, 3일, 7일, 실험종료일인 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

- 부검

실험종료일에 모든 개체에 대하여 부검을 실시하였다.

- 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 산출

급성경구독성 시험을 독성등급법에 의해 실시하여 LD<sub>50</sub>을 산출하였으며, 농약관리법 시행규칙 중 농약 등의 독성 및 잔류성 정도별 구분에 준하여 독성을 구분하였다.

③ 통계 처리

본 연구는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험한 결과로 통계처리는 분산분석 (ANOVA: analysis of variance)을 한 후,  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 중다범위검정(Duncan's multiple range test) 사후검정 방법에 따라 분석하였다.

나) 연구 결과

① 피부자극성 시험

- 일반중독증상 및 치사동물 수

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.

- 체중변화

시험물질 처리직전, 처리 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

- 피부반응의 평가

시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응평가표를 기준으로 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

- 자극성의 판정

피부반응평가표에 의해 1차 피부자극지수 (Primary Irritation Index, P.I.I.)를 산출한 결과, P.I.I.는 "0.0" 이었고 피부 1차 자극표에 의해 자극성을 구분하면 "없음" 이었다. 이상의 결과로부터 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

Table 1. Mortality and clinical signs

Number of animals	Days after treatment				Mortality
	0	1	2	3	
1	NOR <sup>a</sup>	NOR	NOR	NOR	0/3 <sup>b</sup>
2	NOR	NOR	NOR	NOR	
3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Body weight changes

Number of animals	Days after treatment (g)			
	0	2	3	Gain
1	2442.7	2483.3	2500.9	58.2
2	2123.7	2147.6	2173.0	49.3
3	2327.2	2345.6	2375.5	48.3
Mean	2297.9	2325.5	2349.8	51.9
S.D. <sup>a</sup>	161.5	168.8	165.5	-

a : Standard Deviation

Table 3. Evaluation of skin irritation (1/2)

Phases <sup>a</sup>	Number of animals	Sites	Days after treatment			
			0	1	2	3
Erythema & Eschar	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
Edema	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0

a : Time after topical treatment

Table 4. Evaluation of skin irritation (2/2)

Sites	Control sites				Test sites			
	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Phases <sup>a</sup>	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum <sup>b</sup>	0.0				0.0			
P.I.I. <sup>c</sup>	0.0				0.0			

a : Time after topical treatment  
 b : Sum of means at 24 and 72hr  
 c : P.I.I. (Primary Irritation Index) = Total/2

② 급성경구독성 시험

- 일반중독증상 및 치사동물

초고압효소융합 홍삼부산물 다당체는 1단계 및 2단계 시험 투여약량 2000 mg/kg B.W.에서 일반중독증상을 보이거나 치사한 개체가 관찰되지 않았다.

- 체중변화

1단계 및 2단계 시험군의 모든 시험동물은 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다.

- 부검소견

관찰종료 후 모든 단계의 시험동물을 CO<sub>2</sub> gas로 마취시켜 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

- 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>)

랫드에 대한 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체의 급성경구독성시험 결과, LD<sub>50</sub>값은 2000 mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법 시행규칙 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.

Table 5. Mortality and clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality	LD <sub>50</sub>
1	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3 <sup>a</sup>	>2000 ~ ≤5000 mg/kg B.W.
2	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3	

a : Number of dead animals/Number of tested animals

Table 6. Mean body weights

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	2000	Female	3	179.6 ± 6.3 <sup>a</sup>	201.8 ± 4.6	221.7 ± 8.2
2	2000	Female	3	191.1 ± 5.0	210.5 ± 4.9	228.9 ± 9.3

a : Mean ± standard deviation

Appendix 1. Mortality of rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Time / days after administration										
				Time					Days					
				30 min	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	1	2	3	4	5	
1	2000	Female	3	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2000	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Days after administration									
				6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	2000	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2000	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a : Number of dead animals

## Appendix 2. Clinical signs of rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration										
				Time					Days					
				30min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	2000	Female	1	NAD <sup>a</sup>	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	2000	Female	1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Days after administration										
				6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	2000	Female	1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	2000	Female	1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

a : No abnormality detected

## Appendix 3. Body weights

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)				
				0	3	7	14	Gain
1	2000	Female	1	182.0	190.0	201.4	228.8	46.8
			2	172.4	185.3	197.4	212.7	40.3
			3	184.3	191.7	206.5	223.7	39.4
Mean				179.6	189.0	201.8	221.7	42.2
S.D. <sup>a</sup>				6.3	3.3	4.6	8.2	-
2	2000	Female	1	186.9	202.8	206.7	237.5	50.6
			2	189.7	203.5	216.1	230.2	40.5
			3	196.6	201.5	208.8	219.1	22.5
Mean				191.1	202.6	210.5	228.9	37.9
S.D.				5.0	1.0	4.9	9.3	-

a : Standard Deviation

2-3. 연구개발성과

가. 1차년도

- 없음.

나. 2차년도

1) 국내의 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Solid state fermentative lignocellulolytic enzymes production, characterization and its application in the saccharification of rice waste biomass for ethanol production: An integrated biotechnological approach	Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers	Ganes h D.Sar atale	76 (51-58)	국외	Else vier	SCI	2017. 07.	ISSN 1876-1070

2) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	KOSFOST Internstional symposium and annual Meeting	장슬기	2017.06.23	제주 ICC	국내
2					
3					
4		여사의			

다. 3차년도

1) 국내의 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재 일	등록번호
1	Current advances in nanocarriers for biomedical research and their applications	Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	George Kerry Rout	online https://doi.org/10.1080	국외	SCI	2018.06.07	ISSN 2169-1401
2	Benefaction of probiotics for human health	Journal of food and drug analysis	Rout George Kerry	26			2018.02.02	ISSN 1021-9498
3	Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects	Journal of Nanobiotechnology	Jayanta Kumar Patra	-			2018.09.19	ISSN 1477-3155
4	Photo-mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Non-edible Accrescent Fruiting Calyx of Physalis peruviana L. Fruits and Investigation of its Radical Scavenging Potential and Cytotoxicity Activities	Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology	Jayanta Kumar Patra	188			2018.08.04	ISSN 1011-1344

2) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식품과학회	서정우	2018.06.28	부산 BEXCO	국내
2		장슬기	2018.06.29		

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록 인	등록 일	등록번 호	
1	홍삼부산물 의 고압효소추출물을 포함하는 조성물	대한민국	신한승,김중 은,김성한,박 은영	2018.11. 16	10-2018- 0141840				동국대6 0:(주)뉴 트렉스4 0

4) 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	통상실시	홍삼부산물 의 고압효소추출물 을 포함하는 조성물	(주)뉴트렉 스테크놀러 지	2018.11.23	선급기술료 :500만원(2018년)	

5) 사업화 현황(제품개발)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화 명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	기술이전 _사업화	시제품개발	국내	홍삼부 산물 및 성 체 다 당 체 를 이 용 한 동 물 의 사 료 개 발	애완동 사료 개발	(주)뉴 트렉스 테크놀 러지	-	-	-	-

6) 기타 (고용창출)

No	고용인원수	성과연도	인력양성 내용	이름	남/여구분	졸업구분	고용 업체명
1	1명	2018년	과제 참여 연구원으로 신규 고용	이미진	여	석사졸업	(주)뉴트렉스 테크놀러지

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

##### (1) 연차별 개발목표 및 내용

구분	연도	구분	연구개발의 목표	연구 내용
1차 년도	2016 년	제1세부 (주관)	홍삼부산물로부터 초고압 효소 융합기술을 적용하 여 기능성 다당체 생산	- 원료확보 및 초고압 효소 융합 기술을 이용 한 다당체 추출기법 정립(최적화된 효소선별) - 유효성분 분리 및 기능성분 분석법 정립 - 홍삼부산물의 기능성 다당체 개발을 위한 공정 표준화 작업
		제1협동	홍삼부산물의 피부 독성 평가  홍삼 부산물 중 지표물질 인 산성다당체 함량 평가	- 피부 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 피부 독성 평가  - HPLC를 이용한 기능성다당체 함량분석 조 건 확립 - HPLC를 이용한 기능성다당체 함량분석
2차 년도	2017 년	제1세부 (주관)	초고압 효소 융합 공정 시스템 구축을 위한 설비 보완 및 개선  기능성 다당체 수율 증대 를 위한 실생산 공정 운 용 최적화	- 기능성 다당체 추출기법 연구 결과에 따른 대량시스템 적용 검증 - 초고압 효소 융합 공정 시스템에 따른 초고 압 기기 및 추출기 등의 부품 장치 재정립  - 초고압 효소 융합 기술의 표준공정 연구 - 작업 공정 및 순서, 재료, 처리조건 등을 공 정표로 작성 - 대량시스템 적용 후 다당체 수율 비교 분석
		제1협동	홍삼부산물의 면역증진 효능 평가	- 면역관련 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 실험(관 련 유전자 및 단백질 분석) - <i>In vivo</i> 동물실험을 통해 면역관련 기능 증 진 실험
			홍삼부산물에 의한 피부 효능 개선 평가	- 주름개선 효능평가 - 피부 기초효능 평가 연구
3차 년도	2018 년	제1세부 (주관)	기능성 다당체 제품의 개 발 및 상품화	- 개발된 공정관리 기준을 적용하여 시제품 생산 계획 수립 - 표준화된 기능성 다당체 원료로부터 식품 또는 비식품류(반려동물의 사료) 개발

		현장적용 후 대량 생산을 통한 사업화 방안 모색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 다당체를 활용한 제품화 전략 구축</li> <li>- 국내 내수 주요 업체에 적극적 영업을 실시</li> <li>- 주관기업의 미국 지사 유통망을 통한 해외 시장 마케팅 구축</li> </ul>
	제1협동	기능성 다당체의 면역증진 효능/피부효능 개선 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부과민면역반응 개선에 대한 <i>in vivo</i>평가</li> <li>- 주름개선 효능평가</li> </ul>
		기능성 다당체의 독성 및 안전성 평가 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시제품 제작을 위한 생물학적 안전성 확보</li> <li>- 시제품의 효능 평가</li> </ul>

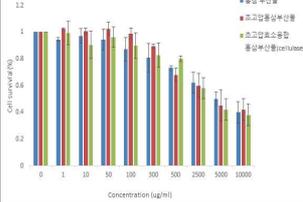
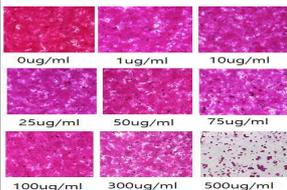
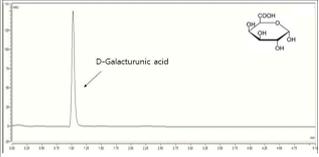
(2) 성과목표 및 평가방법(협약당시 연구개발계획서에 근거함)

(단위 : 건수)

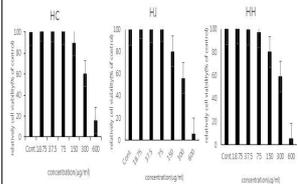
성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논2		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SC I	비 SC I						
<b>최종목표</b>	2	2		1	2	30 (백만원)	10 (백만원)	1				2		6					
1차년도														2					
2차년도												1		2					
3차년도	1			1	2			1				1		2					
소 계	1			1	2			1				2		6					
종료 1차년도	1	1				30 (백만원)													
종료 2차년도		1					10 (백만원)												
소 계	1	2				30 (백만원)	10 (백만원)												
<b>합 계</b>	2	2		1	2	30 (백만원)	10 (백만원)	1				2		6					

3-2. 목표 달성여부

(1) 연차별 성과목표 및 수행 내용

구분 (연도)	세부연구목표	비중 (%)	연구개발 수행내용	연구결과	달성도(%)
1차 년도 (2016)	홍삼부산물로부터 초고압 효소 융합기술을 적용하여 기능성 다당체 생산	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료확보 및 초고압 효소 융합 기술을 이용한 다당체 추출기법 정립 (최적화된 효소선별)</li> <li>- 유효성분 분리 및 기능성분 분석법 정립</li> <li>- 홍삼부산물의 기능성 다당체 개발을 위한 공정 표준화 작업</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료확보 및 초고압 효소 융합기술을 이용한 다당체 추출기법 정립</li> <li>- 유효성분 분리 및 기능성분 분석법 정립</li> <li>- 홍삼 부산물의 기능성 다당체 추출 공정표준화 작업</li> </ul>	100%
	홍삼부산물의 피부 독성 평가	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 피부독성 평가 (MTT assay and SRB assay)</li> </ul>	  <ul style="list-style-type: none"> <li>- HaCaT cell에 대하여 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체를 0.3mg 이내 처리 시, 80% 이상의 세포 생존률을 보임</li> <li>- 따라서 피부세포주를 이용한 향후 실험의 경우 시료를 0.3mg 이하로 사용하여 실험을 진행함</li> </ul>	100%
	홍삼 부산물 중 지표물질인 산성다당체 함량 평가	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC를 이용한 기능성다당체 함량분석 조건 확립</li> <li>- HPLC를 이용한 기능성다당체 함량분석</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 각각 6가지 농도로 제</li> </ul>	100%

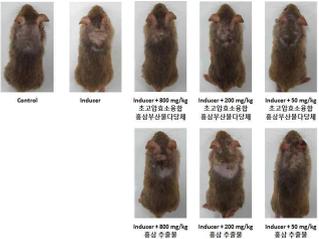
				조한 표준물질 이용함 - 표준검량선 확인 결과, 상관계수( $R^2$ )가 0.9983로 높은 직선성을 보임 - 195nm의 파장에서 retention time 1분대에서 검출됨	
--	--	--	--	---	--

2차 년도 (2017)	초고압 효소 융합 공정 시스템 구축을 위한 설비 보완 및 개선	25	- 기능성 다당체 추출 기법 연구 결과에 따른 대량시스템 적용 검증 - 초고압 효소 융합 공정 시스템에 따른 초고압 기기 및 추출기 등의 부품 장치 재정립	- 1차년도 연구를 바탕으로 Cellulase 효소를 이용한 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체 추출 공정의 Scale-up 실험 수행 - 공정에 필요한 기기설비 보완 및 부품 교체	100%
	기능성 다당체 수율 증대를 위한 실생산 공정 운용 최적화	25	- 초고압 효소 융합 기술의 표준공정 연구 - 작업 공정 및 순서, 재료, 처리조건 등을 공정표로 작성 - 대량시스템 적용 후 다당체 수율 비교 분석	- 초고압효소융합기술을 이용한 홍삼부산물의 다당체 추출 수행 - 작업공정도 작성 - Scale-up 적용 후 다당체 수율 비교	100%
	기능성 다당체의 면역증진 효능평가	25	- 면역관련 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 실험 (관련 유전자 및 단백질 분석) - <i>In vivo</i> 동물실험을 통해 면역관련 기능 증진 실험	 <p>           - RAW 264.7 cell에 대하여 LPS를 처리하여 Nitrite Oxide(NO)의 생성을 유도함            - 초고압효소융합 홍삼부산물 다당체를 농도별 (5, 10, 20, 40, 80 μg/mL)로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 Nitrite         </p>	100%  <i>In vivo</i> 동물실험은 3차년도 까지 연장됨.

				<p>Oxide의 생성이 감소함</p> <p>- HACaT cell에 대하여 TNF-<math>\alpha</math> 및 IFN-<math>\gamma</math> 처리를 통하여 TARC와 MDC의 과발현을 유도함 - 시료를 농도별로 처리하였을 때, 모든 농도에서 TARC와 MDC의 생성이 유의적으로 감소함</p>	
	기능성 다당체의 피부 효능 개선 평가	25	<p>- 피부 기초효능 평가 연구 - 주름개선 효능평가</p>	<p>- Hyaluronic acid 및 tyrosinase의 생성량 측정 결과, 유의적인 차이를 보이지 않음 - Collagenase 및 Elastase 저해 활성 측정 결과, 유의적인 차이를 보이지 않음</p>	100%

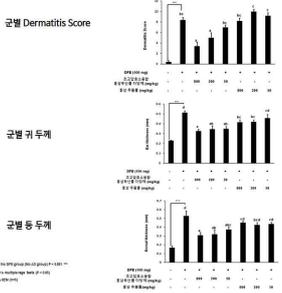
구분 (연도)	세부연구목표	비중 (%)	연구개발 수행내용	연구결과	달성도(%)
3차 년도 (2018)	기능성 다당체 제품의 개발 및 상품화	35	<p>- 개발된 공정관리 기준을 적용하여 시제품 생산 계획 수립 - 표준화된 기능성 다</p>	<p>- 반려동물 및 반려동물의 사료 시장 현황 조사 - 기능성 다당체 원료 제조</p>	100%

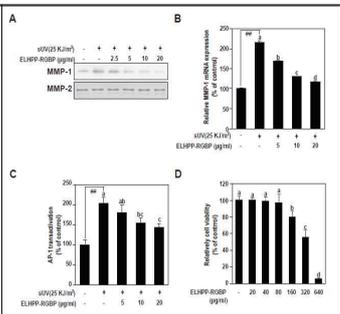
			<p>당체 원료로부터 식품 또는 비식품류(반려동물의 사료) 개발</p>	<p>- 기능성 다당체 원료로부터 반려동물의 사료 개발</p>	
<p>현장적용 후 대량 생산을 통한 사업화 방안 모색</p>	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 다당체를 활용한 제품화 전략 구축</li> <li>- 국내 내수 주요 업체에 적극적 영업을 실시</li> <li>- 주관기업의 미국지사 유통망을 통한 해외시장 마케팅 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사업화 계획 및 추진 전략</li> <li>- 제품 판로를 위한 인터넷 쇼핑몰 오픈</li> <li>- 국내 및 국외 협력업체를 통한 시장 마케팅 준비</li> </ul>	100%	
<p>기능성 다당체의 면역증진 효능/피부효능 개선 평가</p>	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i> 동물실험을 통해 피부과민면역반응 개선 평가 연구</li> <li>- 주름개선 효능 평가 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ELHPP-RGBP 투여를 병행한 실험군에서 아토피성 피부염 증상이 개선됨</li> <li>- 귀와 등 부위의 피부 두께 측정 결과, 아토피성 피부염이 유도되어 두꺼워진 귀와 등 부위의 피부 두께가 ELHPP-RGBP의 경구투여에 의해 감소함</li> </ul>	100%	



- ELHPP-RGBP 투여를 병행한 실험군에서 아토피성 피부염 증상이 개선됨

- 귀와 등 부위의 피부 두께 측정 결과, 아토피성 피부염이 유도되어 두꺼워진 귀와 등 부위의 피부 두께가 ELHPP-RGBP의 경구투여에 의해 감소함



				 <p>Figure A: Western blot showing MMP-1 and MMP-2 protein levels in response to ELHPP-RGBP treatment (0, 2.5, 5, 10, 20 μg/ml) with or without UV irradiation. Figure B: Bar graph of MMP-1 mRNA relative expression (% of control) vs ELHPP-RGBP concentration. Figure C: Bar graph of AP-1 transcription (% of control) vs ELHPP-RGBP concentration. Figure D: Bar graph of AP-1 activity (% of control) vs ELHPP-RGBP concentration.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ELHPP-RGBP을 처리한 군에서 MMP-1 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소함</li> <li>- MMP-1의 mRNA 발현을 측정된 결과 또한, ELHPP-RGBP를 처리함에 따라 sUV에 의해 유도되는 MMP-1 발현 유전자의 합성이 저해됨</li> <li>- ELHPP-RGBP을 처리한 군에서 AP-1의 전사활성이 농도 의존적으로 감소함</li> </ul>	
3차년도 (2018)	기능성 다당체의 독성 및 안전성 평가 확립	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>- New Zealand White 계 토끼에 대한 초고압효소용합 홍삼부산물 다당체의 피부자극성시험</li> <li>- SD-Rat( Specific Pathogen Free, SPF)에 대한 초고압효소용합 홍삼부산물 다당체의 급성경구독성시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부반응평가표에 의해 1차 피부자극지수 (Primary Irritation Index, P.I.I.)를 산출한 결과, P.I.I.는 “0.0” 이었고 피부 1차 자극표에 의해 자극성이 “없음”으로 구분되었음.</li> <li>- 이상의 결과로부터 초고압효소용합 홍삼부산물 다당체는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분됨</li> <li>- 랫드에 대한 초고압효소용합 홍삼부산물 다당체의 급성경구독성시험 결과, LD<sub>50</sub>값은 2000</li> </ul>	100%

				mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법 시행규칙 농 약 등의 독성 및 잔류성 정도별 구분에 의거 IV 급 (저독성)으로 구분되 었음	
--	--	--	--	--	--

(2) 연구개발 성과 및 평가방법

성과목표	자 체 평 가 결 과
특허출원 1건	- 특허출원 1건 달성 함.
기술실시(이전) 1건	- 기술실시 1건 달성 함.
사업화_제품화 2건	- 사업화 제품화 1건 달성 함.
사업화_고용창출 1건	- 사업화 고용창출 1건 달성 함.
SCI논문 2건	- SCI 논문 5건 달성 함.
학술발표 6건	- 학술발표 6건 달성 함.

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전 )		사업화					기 술 인 증	학술성과		교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 · 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
<b>최종목표</b>	<b>2</b>	<b>2</b>		<b>1</b>		<b>2</b>	<b>30</b> (백만원)	<b>10</b> (백만원)	<b>1</b>			<b>2</b>	<b>6</b>					
1차 년도	목표												2					
	실적												0					
2차 년도	목표											1	2					
	실적											1	4					
3차 년도	목표	1			1	2			1			1	2					
	실적	1			1	1			1			4	2					
소계	목표	<b>1</b>			<b>1</b>	<b>2</b>			<b>1</b>			<b>2</b>	<b>6</b>					
	실적	<b>1</b>			<b>1</b>	<b>1</b>			<b>1</b>			<b>5</b>	<b>6</b>					
종료 1차년도	1	1					30 (백만원)											

종료 2차년도		1					10 (백만원)											
소 계	1	2					30 (백만원)	10 (백만원)										
합 계	2	2		1		2	30 (백만원)	10 (백만원)	1			2		6				

### 3-3. 미달성 시 원인 및 차후대책

- 연구 수행기간 동안 성과목표의 대부분을 달성하였음.
- 기존의 연구목표는 기능성 다당체 원료로부터 식품, 기능성 식품 및 비식품류(반려동물사료, 이너뷰티)를 개발하고자 하였으나 제품 개발 및 사업화에 있어 원료인 홍삼부산물을 이용한 추출물을 이용하는 점에 있어 법적인 규제가 발생함.
- 식약처 고시(제2016-154호,2016.12.29.)에 따라 홍삼박은 식품에 첨가가 가능하나 건강기능식품으로 분류는 안되며, 식품 원료로 사용할 경우 기준 및 구비 요건, 제품에 대한 소비자들의 인식 등의 애로사항이 발생하여 연구수행 기한 내 기존의 연구목표에서 식품 또는 기능성 식품으로의 개발을 비식품류(반려동물사료) 개발목표로 변경하여 수행하였음.
- 사료관리법(개정 2017.04.01.)을 확인한 결과 홍삼박은 단미사료 중 식물성 사료에 해당되며 사료 종류는 제약부산물류로 구분되며, 사료의 원료로 사용 가능함을 확인 후 반려동물의 사료 개발에 관하여 연구를 수행하였음.
- 사업화에 있어 연구 수행기간동안 애완견사료 제품을 개발하였으며, 추후 연구수행결과를 바탕으로 화장품 소재로도 개발을 하고자 함.
- 연구 종료 1차 년도에는 특허 출원1건, 특허 등록1건 및 애완견 사료 제품으로 인한 매출 발생을 목표로 함.

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

- 본 발명은 초고압 및 효소를 융합 처리한 홍삼부산물물의 다당체 ELHPP-RGBP(Enzyme-linked High pressure process red ginseng byproduct polysaccharide)가 인간 각질형성세포에서 sUV로 유도된 MMP-1 발현 평가 실험 결과 우수한 피부 주름 개선 효과를 확인하였고, 뿐만 아니라 ELHPP-RGBP가 일반 홍삼부산물물의 다당체 대비 가장 좋은 아토피성 피부염 개선 효과를 갖는 것을 확인함으로써 초고압 및 효소를 융합 처리를 통해 홍삼부산물 다당체의 기능성이 증대하였음을 밝혔으며 이는 ELHPP-RGBP가 기능성 다당체로서 식품 조성물 및 화장품 조성물에 대한 신규 소재로의 활용 가치를 입증하였다.
- 뿐만 아니라, 안전성 평가 기관을 통해 동물모델을 대상으로 한 ELHPP-RGBP의 피부자극성 시험과 급성경구독성 시험을 의뢰한 결과, 피부자극성이 없고 급성경구독성의 LD50값은 2000 mg/kg B.W 초과로 ‘저독성’으로 구분되어 ELHPP-RGBP 소재의 안전성을 입증하였다.
- 이는 ELHPP-RGBP이 홍삼 유래 천연물 소재이기 때문에 합성 물질보다 안전성 면에서 우수하며, 경제성, 효능 면에서도 기존에 존재하는 피부 주름 개선용 식품 또는 화장품 소재 대비 더 우수하다는 점에서 이러한 ELHPP-RGBP을 함유하는 자외선에 의한 피부 주름 개선용 식품 조성물 및 화장품 조성물은 우수한 피부 주름 개선 효과를 나타낼 것으로 기대할 수 있다. 또한, ELHPP-RGBP을 함유하는 아토피성 피부염 개선용 화장품 조성물 및 치료용 약학 조성물은 우수한 아토피성 피부염 개선 효과를 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- 본 연구에서 개발한 ELHPP-RGBP는 홍삼 유래 천연물 소재이기 때문에 합성 물질보다 안전성 면에서 우수하며, 경제성, 효능 면에서도 기존에 존재하는 피부 주름 개선용 식품 또는 화장품 소재 대비 더 우수하다는 점에서 이러한 ELHPP-RGBP을 함유하는 자외선에 의한 피부 주름 개선용 식품 조성물 및 화장품 조성물은 우수한 피부 주름 개선 효과를 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- 아토피성 피부염의 치료는 사회적으로 중요한 과제이며 그 대안으로 부작용이 없는 치료제제의 개발은 과학 기술 발전에 크게 기여하리라 사료된다. 본 기술개발에서 파생되는 결과는 아토피 피부 질환 개선에 관련하여 학문적 및 임상적 치료법 연구에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.
- 부작용이 적은 아토피성 피부염 개선용 화장품 조성물 및 치료용 약학 조성물의 개발은 아토피 환자들의 치료뿐만 아니라 아토피로 인한 사회경제적 손실을 감소시키고, 수입에 의존하고 있는 기존의 치료 조성물들을 대체하여 지적 재산권 확보를 통해 국가적, 지역적 경제 이익 창출 및 국가 경쟁력을 높이는데 기여하였다.
- 실용화 및 제품화 연구에 앞서 타 기관의 연구결과 혹은 타 업체들의 연구들과의 차별화를 두

기 위하여 시장조사 뿐만 아니라 ELHPP-RGBP의 구성당 함량 분석 등 기초 자료가 필요하다고 판단되며 보다 정확한 지표물질 및 성분함량에 대하여 추후 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

- 추후, 식품 조성물과 화장품 조성물 및 치료용 약학 조성물 개발에 앞서 현재까지의 실험 결과와 동물모델을 사용한 효능 및 안전성 평가 결과를 바탕으로 ELHPP-RGBP 함유하는 가축 사료 조성물 개발 연구를 진행하여 가축 사료 조성물의 기능성 소재로서의 활용가치를 증명할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구의 결과는 추후 연구에 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.
- 세포모델 효능 평가 결과를 바탕으로 ELHPP-RGBP가 AP-1 전사인자에 어떻게 작용하는지에 대한 심화연구가 추후 필요할 것으로 사료된다. 심화 연구를 통해 ELHPP-RGBP 및 이를 포함하는 피부 주름 개선과 아토피성 피부질환 개선용 식품, 반려동물의 사료, 화장품 조성물 및 치료용 약학 조성물의 효과에 대해 더 확실히 검증 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 붙임. 참고문헌

1. Lee Jong-Won., Do Jae-Ho. Extraction Condition of Acidic Polysaccharide from Korean Red Ginseng Marc. *Journal of Ginseng Research*. (2002); 202-205.
2. Koo Eun Jin., Han Jae Kyung., Kim Yun Hee. The Effects on Anti-inflammatory Action in HaCaT Cells and Inhibiting Sebum Secretion in SEB-1 Cells by Gleditsiae Fructus Extract. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine*. (2016); 96-106.
3. Park Jang-Soon., Walnut Husk Ethanol Extract Possess Antioxidant Activity and Inhibitory Effect of Matrix Metalloproteinase-1 Expression Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Keratinocyte. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* Vol.11 No. 4;(2013) ;715-719.
4. Lee Sung-Gyu., Park Sun-Yeong., Hwang In-Cheol., Kang Hyun., Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Naturopathy* Vol.5(1&2);(2016) ;9-14.
5. Do Jae-Ho, Lee Hyung-Ok, Lee Seong-Kye, Jang Jin-Kyu, Lee Sung-Dong and Sung Hyun-Soon. Colorimetric Determination of Acidic Polysaccharide from *Panax ginseng*, its Extraction Condition and Stability. *Korean J. Ginseng Sci.* (1993); 139-144.
6. Choi You Jin and Hwang Keum Hee. Analysis of the Extraction Condition of Soluble Acidic Polysaccharides from Ginseng Marc. *Kor. J. Pharmacogn.* (2011); 82-88.
7. 이희정, 정현상, 박춘근, 이정훈, 박충범, 김종대, 최애진. 효소처리에 의한 참당귀 다당체 분리 연구. *산업식품공학*. (2014); 406-412.
8. 임가영, 마진열, 김건우, 최진국, 강동균, 권태룡, 장세영, 정용진. 4년근 인삼의 효소적 가수분해 조건에 따른 품질특성. *한국식품영양과학회지*. (2011); 229-234.
9. 광이성, 김은미. 고려인삼에서 분리한 조다당체 획분의 이화학적 특성. (1996); 389-392.
10. 장호민. 국내외 효소시장 현황 보고서.
11. Kang Tea-Hwa, Park Kyung-Jun and Kang Sung-Tae. Preparation of Ginseng Concentrate with High Content of Acidic Polysaccharide from White Tail Ginseng Marc. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* (2004); 736-740.
12. Kim Dong Chung and In Man-Jin. Potential of Red Ginseng Marc for Ethanol Production

as a Fermentation Medium. *J Appl Biol Chem.* (2013); 245-247.

13. 박근형, 조은혜, 손민희, 최선주, 김소영, 채희정. 초고압효소처리를 이용한 fucoidan의 저분자화 효과. 화학공학의 이론과 응용. (2008)
14. 광이성, 백인호. 홍삼산성다당체의 면역증진 기능성 최근 연구동향 리뷰. 고려인삼연구와 산업 5월호. (2010)
15. 이미현. 효소 및 초고압 처리에 따른 홍삼 ginsenosides 성분 변화에 관한 연구. 군산대학교 대학원 해양산업공학과 식품공학전공 학위논문. (2009)
16. 성혜미, 김숙정, 김경미, 윤수경, 정현정, 김태용, 위지향. 효소 처리와 초고압 처리에 의한 콩나물 추출물의 항산화 활성. 한국식품영양과학회지. (2014);1228-1235.
17. 식약처. 2017년 식품·축산물·건강기능식품 생산실적 통계.
18. 식품의약품안전처. 연도별 식품 및 식품첨가물 생산실적.
19. 농림축산식품부. 식품저널뉴스 보도자료(2017.05.15.보도)
20. 한국펫사료협회. 2018년 반려동물에 대한 인식 및 양육 현황 조사.
21. Kis-Value, 농촌진흥청, 한국과학기술정보연구원, KB경영연구소 재구성 '2018 반려동물 보고서'

주 의

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