

발간등록번호

11-1543000-000336-01

인삼소재 피부과학 응용사업단
(Skin science research center for ginseng material)

경희대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인삼소재 피부과학 응용사업단” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 경희대학교
주관연구책임자 : 이 태 후
연 구 원 : 이 돈 길
세부연구책임자 : 김 선 여
연 구 원 : 황 은 선
세부연구책임자 : 국 무 창
연 구 원 : 박 용 진
세부연구책임자 : 김 용 수
연 구 원 : 이 대 우
협동연구기관명 : 아모레퍼시픽
협동연구책임자 : 조 준 철
세부연구책임자 : 염 명 훈
연 구 원 : 이 옥 찬
협동연구기관명 : 한국인삼공사
협동연구책임자 : 조 병 구
세부연구책임자 : 김 석 창
세부연구책임자 : 장 동 필

요 약 문

I. 제 목 ; 인삼소재 피부과학 응용 사업단

(주관기관 ; 경희대학교, 연구책임자; 이태후 교수)

II. 연구개발의 목적 및 연구 결과 요약

II - i . 연구개발의 목적

▶ 본 사업단의 최종목표는 우리나라 인삼소재 관련 산업의 활성화를 위하여 피부적용용 국내외 경쟁력 있는 우수한 제품을 개발하고자 함. 즉, “인삼 소재 피부과학 응용 사업단”은 경희대학교에서 사전 연구를 통하여 개발된 핵심 연구 결과를 회사에 이전하여, 인삼 소재를 응용한 화장품 및 Beauty food 제품을 개발하여 수출 및 내수 판매를 통한 연 매출 100억 이상을 확보하는 것을 목표로 함.

- 첫째, ‘인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링 연구’를 통한 인삼 사포닌 소재 양산 시스템구축 및 화장품, 식품 개발을 위한 전임상 연구를 통한 2종 이상의 인삼 신기능 특허를 확보하고,

- 둘째, ‘인삼 사포닌 소재 주름 개선 기능성 화장품 및 양모 의약품 산업화’을 통하여 인삼 소재를 응용한 양모제 1종의 임상평가를 통한 제품 개발 및 기능성 화장품 소재 2종 이상의 임상평가를 통한 제품 개발 하고,

- 셋째, ‘효소처리 홍삼소재를 응용한 피부주름 개선에 도움이 되는 기능성 식품개발’을 통하여 인삼 소재를 응용한 Beauty 기능성 건강식품 1종의 임상평가를 통한 제품개발 및 의약품(천연물한방신약)소재 1종의 전임상단계 개발을 목표로 함.

▶ 본 사업단이 제시한 목표와 각 핵심 연구별 최종 개발 목표는 아래와 같다.

1. 효소처리 홍삼소재를 응용한 주름개선에 도움이 되는 기능성 식품개발 연구를 위하여 ① 효소처리 홍삼을 응용한 소재의 기능성 및 안전성 연구, ② 효소처리 홍삼 응용 Beauty Food 표준화 연구, ③ 효소처리 홍삼 응용 기능성 소재 제형화 연구를 목표로 하였으며,

2. 인삼 사포닌을 이용한 주름개선 기능성 화장품 및 양모 의약품 임상 및 응용제품의 개발 연구를 위하여 ① 인삼 사포닌 소재별 표준화 및 피부전달 연구, ② 인삼사포닌 응용 제형화 기반연구를 목표로 하였고,

3. 인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링연구를 위하여 ① 임상평가 프로세스관리 및 인삼소재 및 제품의 피부 및 모발 증진 효능연구, ② 인삼소재 및 제품의 피부기능 개선 효능검증 연구, ③ 사포닌전환기술을 응용한 미량사포닌의 양산시스템연구. ④ 발효인삼 및 발효홍삼 표준화 및 생산프로세싱연구를 목표로 하였다.

II-ii. 연구 결과 요약

▶ 본 사업단이 제시한 목표에 따른 연구결과를 핵심 연구별로 요약하면 아래와 같다.

1. 효소처리 홍삼소재를 응용한 피부주름 개선에 도움이 되는 기능성식품을 개발하는 것으로써
(1) 피부 주름 개선 효능 소재의 안전성 평가를 완료하였다.
(2) 피부 주름 개선 임상평가를 위한 시제품 생산을 완료하였다.
(3) 피부 주름 개선 임상평가를 완료하였으며, 개별인정형 기능성식품 인가를 위한 신청 자료를 준비 중에 있다.

2. 인삼 사포닌을 이용한 기능성 화장품 임상 및 응용제품의 개발과 관련된 주름개선 기능성 화장품 및 양모 기능 의약외품 소재를 개발하는 것으로써

(1) 기능성 화장품 및 의약외품 소재의 안전성 평가를 완료하였다.
(2) 주름개선 화장품(2건) 및 양모기능성 의약외품 임상평가를 위한 시제품 생산을 완료하였다.
(3) 주름개선 화장품 2건에 대한 임상평가를 완료하였으며, 그 중 1건에 대하여 개별인정형 화장품 인가를 위한 신청 자료를 준비 중에 있다.
(4) 양모기능성 의약외품 임상평가를 완료하였다.

3. 인삼소재 피부적용을 위한 신소재 발굴, 효능 및 기전 검증, 인삼 응용 소재의 양산시스템 확립과 관련된 기반 기술 구축을 구축 하는 것으로써

(1) 인삼 응용 소재 및 제품에 대한 피부 주름 개선, 모발성장 관련 효능 및 기전을 검증하였다.(관련 논문 16편 투고, 관련 특허 9편 출원, 1건 등록)
(2) 인삼 응용 소재의 양산을 위한 발효 시스템을 최적화 하였다.(관련 논문 11편 투고, 관련 특허 3편 출원, 미생물 균주 등록 82건, 기탁 264건)
(3) 산업화를 위한, Pilot 시스템 구축 및 최적 제조 공정 개발 등의 기술을 확립하였다.(관련 특허 2편 출원)

▶ 상기 과제들을 수행한 결과를 종합하여 논문 투고 8편 및 게재 19편, 특허 출원 14편 및 등록 1편을 완료하였으며, 신균주 등록은 82건을 확보하였고 기술이전은 대기업 ((주)아모레퍼시픽 1건(이전완료), (주)한국인삼공사 1건(이전 진행중)), 중소기업 2개회사 2건 이상 총 4건 (기술료 375,067천원) 에 대하여 기술이전을 실시하고 관련 제품의 식약처 인허가를 위한 자료 정리 및 관련 절차를 진행 중에 있으며, 각 기술 이전 기업은 이전된 기술을 응용하여 제품의 시장 출시를 준비 중에 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 장. 주름 개선 기능성 식품소재 및 제품의 개발

1. 주름 개선 관련 기능성 식품 소재 개발을 위한 소재의 효능 평가.
 - 1-1. in vitro assay - fibroblast, HDF-N 세포증식효과, MMP-1 TGF- β 발현양상, melanin 합성 저해, UVB에 대한 세포보호효과.
 - 1-2. in vivo assay - 피부두께측정, 피부 수분 함유량, 홍반지수, 멜라닌 합성량, 피부주름생성변화, 조직 내 콜라겐 변화, 노화관련 지표 단백질 발현(Procollagen type 1, MMP-1, TGF- β 1, elastin)확인.
2. 주름개선 기능성 식품 소재의 표준화 및 시제품의 양산 조건 확립.
 - 2-1. 효소처리를 통한 주름개선 기능성 식품소재의 표준화 (HPLC를 이용한 소재의 지표물질 확인, 지표물질의 batch 별 동등성 확인)
 - 2-2. 시제품 양산조건 확립을 위한 제형별 시생산 (환, 경질capsule, tablet, powder 등)
 - 2-3. 시제품의 조성비 확립
3. 주름개선 기능성 식품 소재의 안전성 시험 수행 결과
 - 3-1. 시료의 안전성 확인을 위한 단회 경구투여 시험, 13주 반복 경구투여 시험, 복귀돌연변이, 소핵 시험, 염색체 이상 시험 수행.
 - 3-2. 시료의 인체 투여 농도 설정을 위한 용량설정 근거 시험 수행.
4. 주름개선 기능성 식품 소재의 임상 시험 수행 결과
 - 4-1. 1차 유효성 평가 변수 SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS 확인
 - 4-2. 2차 유효성 평가변수 피부탄력, 피부수분, 경피 수분손실량 확인.
 - 4-3. 시제품의 임상 안전성 평가

제 2 장. 주름 개선 기능성 화장품소재 및 제품의 개발

1. 주름 개선 기능성 화장품 후보 소재 활성 평가
 - 1-1. in vitro assay - fibroblast, HDF-N 세포증식효과, MMP-1 TGF- β 발현양상, melanin 합성 저해, UVB에 대한 세포보호효과.
 - 1-2. in vivo assay - 피부두께측정, 피부 수분 함유량, 홍반지수, 멜라닌 합성량, 피부주름생성변화, 조직 내 콜라겐 변화, 노화관련 지표 단백질 발현(Procollagen type 1, MMP-1, TGF- β 1, elastin)확인.
2. 주름개선 기능성 화장품 소재 표준화 및 양산 조건 확립
 - 2-1. 3회 이상의 Batch 평가를 통해 생산되는 소재 동등성 확보 및 표준화 양산시스템 구축.
3. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가
 - 3-1. 표준화 최적소재에 대한 임상평가를 진행하기 위하여 최적 제형 개발조건 확립.

4. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 안전성 평가

- 4-1. KHY의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험
- 4-2. KHY의 토끼를 이용한 피부자극시험
- 4-3. KHY의 토끼를 이용한 안점막자극시험
- 4-4. KHY의 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Maximization법)
- 4-5. KHY의 기니픽을 이용한 광독성시험 결과
- 4-6. KHY의 기니픽을 이용한 광감작성시험(Adjuvant & Strip법) 결과

5. 주름 개선기능성 화장품 소재의 임상시험 평가

- 5-1. 2종의 임상시험용 시제품(크림type)을 제작하여 임상시험 대행 기관인 파마크로를 통한 임상평가

제 3 장. 양모기능성 의약외품 소재 및 제품의 개발

1. 양모 의약외품 소재 활성 평가

- 1-1. *in vitro* assay - 모발 관련 세포 증식률 및 NO 생성 억제 효능 확인
- 1-2. *in vivo* assay - 모발 성장 변화의 육안적 관찰 및 H&E 염색을 통한 조직학적 관찰

2. 양모 의약외품 소재 표준화 및 양산조건 확립

- 2-1. LC-MS를 이용한 활성물질 함량 및 성분 분석
- 2-2. 제조공정의 확립
- 2-3. 원료생산 동등성 관리

3. 양모 의약외품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가

- 3-1. 소재의 제형화와 안정성 평가
- 3-2. 샘플의 제형 조성과 안정성 평가

4. 양모 의약외품 소재의 안전성 평가

- 4-1. KHY의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험
- 4-2. KHY의 토끼를 이용한 피부자극시험
- 4-3. KHY의 토끼를 이용한 안점막자극시험
- 4-4. KHY의 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Maximization법)
- 4-5. KHY의 기니픽을 이용한 광독성시험 결과
- 4-6. KHY의 기니픽을 이용한 광감작성시험(Adjuvant & Strip법) 결과

5. 양모 의약외품 소재의 임상시험평가

- 5-1. 1종의 양모 의약외품을 제작하여 세명대학교에서 양모 의약외품 임상시험평가 진행.

제 4 장. 인삼소재 응용 기반 기술 개발

1. 사포닌의 표준품 확보와 사포닌 제조 공정 과정 확립
 - 1-1. 토양 및 누룩유래 균주의 Saponin 전환활성 탐색
 - 1-2. 균주유래 효소를 이용한 사포닌 전환

2. 유산균 등 식용균주의 Saponin 전환활성 탐색
 - 2-1. β -glucosidase activity역가 측정을 통한 균주의 전환 활성 탐색

3. 피부 개선을 위한 기능성 균주의 선별 및 이를 활용한 기능성 인삼 소재 개발 연구
 - 3-1. DPPH 및 tyrosinase 억제 활성 확인을 통한 피부 개선 기능성 균주 선별
 - 3-2. 피부 환경 개선능이 우수한 기능성 균주의 산업화 공정을 위한 작업 매뉴얼 및 주요 check list 작성.

IV. 연구개발결과

제 1 장. 주름 개선 기능성 식품소재 및 제품의 개발

1. 주름개선 기능성 식품 소재 확정(효소처리 홍삼)

- 1-1. Fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 홍삼 소재에서 20% 이상의 증식률을 확인하였고, UV-B에 대한 세포보호효과 및 피부 면역 반응인자인 IL-6 와 TGF- β 발현 억제효과를 확인하여 효소처리 홍삼의 광노화에 대한 주름 개선효과를 확인함.
- 1-2. 주름관련 생체 지표인 MMP-1의 생성을 억제, TGF- β 의 증가 활성을 나타냄으로써 UVB에 의한 광노화에 대한 보호 효과가 있음을 확인하고, 각질형성세포와 멜라닌형성세포 공동배 양에서 멜라닌 생합성을 억제함을 확인함.
- 1-3. 표피층의 두께는 광노화 유발로 인해 굵어진 표피가 효소처리홍삼 시료 식이공급한 모든 군에서 UVB조사군 대비 유의하게 얇아진 것을 확인함.
- 1-4. UVB 조사에 의해 감소된 수분함유량과 홍반지수, 멜라닌 합성량에서 효소처리 홍삼 0.06% 처리군이 정상대조군 수준으로 회복된 것을 확인하였고, 주름관련 지표단백질 MMP-1, procollagen type-1 및 TGF- β 1의 발현에도 효소처리 홍삼 0.06% 처리군이 정상대조군 수준의 발현을 보여 주름 개선에 효과가 있음을 확인함.

2. 주름개선 기능성 식품 소재의 표준화 및 시제품의 양산 조건을 확인한 결과

- 2-1. 홍삼발효물의 화학특성 조사 및 지표성분 확인 결과 지표물질을 진세노사이드-F2로 선택하고, 함량을 7mg/g 으로 설정 함.
- 2-2. 홍삼 + 20% 효소처리에서 F2가 최소농도 대비 과량 형성됨을 확인하였으며 lab-scale 및 batch test 에서 균일한 품질(7.89 \pm 0.45mg/g, CV 5.7%)을 확보함.
- 2-3. 주름개선 기능성 식품의 임상효능평가용 시제품 제형은 Tablet 제형으로 선정함.
- 2-4. 유효성분의 성인 1일 섭취량을 750mg/Tablet로 설계하여 본품과 위약군으로 제조함.

3. 주름개선 기능성 식품 소재의 안전성 시험 수행 결과

- 3-1. 복귀돌연변이, 소핵 시험, 염색체 이상 시험 결과 모두 이상이 없음을 확인함.
- 3-2. 단회 경구투여 시험, 13주 반복 경구투여 시험 결과 Rat의 치사량은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것을 확인.
- 3-3. 용량설정 근거 시험 결과 Rat 암수 5,000 mg/kg 투여 군에서 시험물질에 기인한 독성변화가 없는 것을 확인함.

4. 주름개선 기능성 식품 소재의 임상 시험 수행 결과

- 4-1. 1차 유효성 평가 변수 SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS 수치 변화와, 2차 유효성 평가변수 피부탄력, 피부수분, 경피 수분손실량에서 유의한 피부주름 개선효능을 확인함.
- 4-2. 시험 도중 시험에 영향을 줄 수 있는 다양한 변수가 있음에도 불구하고 유의한 변화를 보여주었으므로 피부 건강에 도움을 줄 수 있는 근거로 충분한 것을 확인함.
- 4-3. 시험기간 동안 의미 있는 이상반응이 없어 장기간 복용해도 안전한 제품임을 확인함.

제 2 장. 주름 개선 기능성 화장품소재 및 제품의 개발

1. 주름 개선 기능성 화장품 후보 소재 활성 평가
 - 1-1. fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 인삼 소재 2종에서 20% 이상의 증식률 및 UVB 에 대한 세포 보호 효과 확인함.
 - 1-2. Fibroblast에서 효소처리 인삼 소재 2종 UVB 조사 후, 대조군과 비교 MMP-1의 발현 감소 및 Procollagen type-1 발현 증가, TGF- β 1 증가 활성 확인을 통한 UVB에 의한 광노화 보호 효과 확인.
 - 1-3. 광노화가 유도된 hairless mice 모델에 효소처리 인삼 최적 소재 도포에 의한 피부 노화 (주름/보습) 개선 효과를 확인한 결과 표피의 두께가 효소처리 인삼 시료 식이공급 모든 군에서 UVB 조사군 대비 눈에 띄게 얇아짐을 확인하였고, MMP-1 발현 감소, Procollagen type 1, TGF- β 1 및 elastin 발현증가를 확인함.
2. 주름 개선 기능성 화장품 소재 표준화 및 양산 조건 확립
 - 2-1. 소재의 동등성을 확보와 표준화와 양산시스템의 구축 완료 및 임상평가를 위한 소재 양산하였음.
3. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가
 - 3-1. 표준화 최적소재에 대한 임상평가를 진행하기 위하여 최적 제형 개발조건을 확립하였음.
4. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 안전성 평가
 - 4-1. (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 KHY의 안전성을 평가함. 그 결과, 피부 감작성 및 광감작성을 제외한 결과에서 KHY의 안전성을 확인. 피부감작성 및 광감작성의 경우 양성반응을 확인함
5. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 임상시험 평가
 - 5-1. 주름 개선 활성 소재의 임상용 시제품 2종의 임상시험용 시제품(크림type)을 제작하여 임상시험 대행 기관인 파마크로를 통하여 임상평가를 완료.

제 3 장. 양모기능성 의약외품 소재 및 제품의 개발

1. 양모 의약외품 소재 활성 평가
 - 1-1. 모발 관련 세포의 증식률 및 NO 생성 억제 효능을 확인한 결과, 효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재(KHY)에서 약 50% 의 모발세포증식률을 확인하였고, 약 38% 의 NO 생성 억제율을 확인함.
 - 1-2. 모발 성장 관련 동물 실험 결과 KHY가 모성장기 촉진과 성장기 유지에 효과가 있음을 확인하였고, 모발의 밀도 및 굵기가 증가함을 확인하였음. 또한, 조직학적 변화에서도 모낭의 퇴화기 진입 지연과 모 성장기 촉진에 효과가 있음을 확인함.
2. 양모 의약외품 표준화 및 시제품의 양산 조건을 확인한 결과
 - 2-1 KHY를 양모 의약외품의 최적소재로 확정하고 대량 생산 조건을 확립함.
 - 2-2. 소재의 함량 및 성분을 LC-MS를 이용하여 분석.
 - 2-3. 양모 의약외품의 제조공정 확립.
 - 2-4. 원재료의 생산 공정 및 원료 동등성 분석조건 확립함.
 - 2-5 F2, C-K 다량함유한 사포닌 대량 생산 조건을 확립하였고, 최적제형조건을 선정함.

3. KHY의 안전성 시험 수행 결과

3-1. (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 KHY의 안전성을 평가함. 그 결과, 피부 감작성 및 광감작성을 제외한 결과에서 KHY의 안전성을 확인. 피부감작성 및 광감작성의 경우 양성반응을 확인함.

4. KHY의 임상시험평가

4-1. 세명대학교에서 임상시험평가를 완료 하였고, 1월 중 결과보고서 수령 예정.

제 4 장. 인삼소재 응용 기반 기술 개발

1. 사포닌의 표준품 확보와 사포닌 제조 공정 과정 확립

1-1. 사포닌 전환활성이 높은 토양균주 및 해당 균주 유래의 조효소를 이용한 인삼의 미량 사포닌을 확보하기 위한 연구하여 F2로 90% 전환 가능한 토양유래 균주의 THG-107번 선정 함.

1-2. 사포닌 전환 활성이 있는 누룩균주와 맥아추출물이 사포닌 전환에 시너지 효과를 확인함.

1-3. 누룩유래 효소를 이용하여 F2, C-K의 전환을 확인하였고, 이 전환된 소재를 기반으로 용해도를 이용한 간편한 방법만을 적용해서 98%이상 고순도의 인삼 사포닌 소재를 대량 생산할 수 있는 기반을 확보함.

2. 유산균 등 식용균주의 Saponin 전환활성 탐색

2-1.인삼의 사포닌을 형질 전환시키는 효능이 있으면서도 피부에 일정 이상의 기능이 있는 다양한 식용균주 및 대사산물을 탐색한 결과 베타글루코시다제 활성이 있는 유산균 균주 601종 확보함.

3. 피부 개선을 위한 기능성 소재의 선별 및 이를 활용한 기능성 인삼 소재 개발 연구

3-1. 문헌조사를 통하여 항산화 활성 및 미백 활성을 검토할 수 있는 rapid detection method를 확립 함.

3-2. 인삼 사포닌의 대사체 전환 활성이 우수하며, 항산화력 및 미백 활성 등 피부 환경을 개선시킬 수 있는, 김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides* D433을 본 과제에 적합한 균주 선정함.

3-3. 피부 환경 개선능이 우수한 기능성 소재의 산업화 공정 개발을 위해 개발된 소재의 산업적 적용을 위하여 어떠한 작업자라도 작업을 수행 할 수 있도록 작업 매뉴얼 및 주요 check list를 작성함.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 성과

1. 논문개재 성과

국제논문 (SCI) 22편, 비 SCI 논문 5편 이상 총 27편을 투고하여 출판게재 19편을 하였고 8편은 심사 중에 있으며, 아래 표는 본 사업단의 연구 결과와 직접적인 관계가 있는 대표적인 논문들 이다. (상세내역은 6장 논문성과 참조)

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013.10	Enzyme-processed Korean Red Ginseng extracts protects against skin damage induced by UVB irradiation in hairless mice	Eun sun Hwang,	Sun-Yeou Kim, Tae Hoo Yi		Journal of ginseng research	37(4)	국외	SCIE
2013.07	Pedobacter ginsenosidimutans sp. nov., with ginsenoside converting activity	Jung Eun Yang	Tae Hoo Yi, Moochang Kook		International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology		국외	SCI
2013.06	The inductive effect of ginsenoside F2 on hair growth by altering the WNT signal pathway in telogen mouse skin	Heon-Sub Shin, Sang-Yong Park	Tae Hoo Yi	Eun-Son Hwang, Don-Gil Lee, Hyun-Geun Song, Gafurjon Mavlonov	European Journal of Pharmacology		국외	SCI

2. 특허 성과

국내 특허 출원 15건, 우선권 심사 5건, 특허 등록 1건이 있으며, 아래 표는 본 사업단의 연구 결과와 직접적인 관계가 있는 대표적인 특허들 이다. (상세내역은 6장 특허성과 참조)

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	인삼 및 연교 추출물을	경희대학교	대한민국	10-2011	2012	아토피 질환	경희대	대한민	10-11

	함유하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물	산학협력단		-0103629	개선, 완화, 치료 또는 예방용 조성물	학 교 산 학 협 력 단	국	64390
2011	효소-처리 홍삼 추출물을 함유하는 피부노화방지 및 피부주름개선용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0091286				
2013	진세노사이드 F2의 함량이 증가된 발효 홍삼의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 발효 홍삼 추출물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0142825				

3. 기타 성과

- 국내·외 균주 등록기관에 신균주 등록 82건을 완료하였다.
- 기술이전 : 대기업 2건 ((주)아모레퍼시픽 1건), (주)한국인삼공사 1건), 중소기업 2개회사 2건 이상 총 4건에 대하여 기술이전을 실시하였다.

제 2 절 성과활용 계획

1. 기술이전을 통한 인삼소재 응용 기능성 제품 인허가 신청 (2014년)
2. 고부가가치 상품의 개발에 적용함
 - 인삼 소재를 응용한 기능성 화장품 및 의약외품 개발(2014~2015)
 - 홍삼 소재를 응용한 기능성식품의 제형 확대(2015년)

3. 국내외 판매를 통한 수익 창출(2015년)

(1) 아모레퍼시픽의 기능성 화장품 사업화 전략

- ①기술 이전을 통한 인삼 소재 기능성 신청(2014) 및 획득(2015)/ 양모 효능 소재 제품 적용
- ②목표 기능성: 인삼 응용 소재를 이용한 주름 개선 기능 확보
- ③목표 시장: 자사 브랜드 판매점 및 방문판매 망 활용
- ④예상매출: 안티에이징 화장품 단품(브랜드 미정) 출시로 인한 예상 매출 25억/년, 양모기능 헤어 세정제(브랜드 미정)출시로 인한 예상 매출 25억/년
- ⑤타겟제형: 안티에이징 화장품 1종 및 양모기능 헤어 세정제 1종 등 총 2종

(2) KGC (한국 인삼공사)의 기능성식품 사업화 전략

- ① 기술이전을 통한 인삼소재 개별인정형 신청 및 획득 (2014)

② 회사내 상품개발위원회 상정 (2014)

③ 목표 기능성 : 현재 홍삼의 5대기능성(면역, 항피로, 혈행개선, 기억력, 항산화)외 피부 건강 추가

- 특이점 : 기존의 5대 기능성은 모든홍삼회사에 고루 적용
효소전환 홍삼분말의 경우 KGC 독점 가능

④ 목표시장

국내 : 정관장 가맹점 혹은 방문판매 망 활용

⑤ 예상 매출 : 현재 홍삼정 매출액 1,000억의 5% 계상 약 50억원/년

⑥ 타겟제형 : 타블렛 1종

(3) (주)더마랩의 기능성 화장품 및 식품 원료 사업화 전략

① 기술이전을 통한 인삼소재 개별인정형 신청(2014) 및 획득 (2015)

② 목표 기능성 : 인삼 미량 사포닌을 이용한 피부 주름 개선 기능 확보

③ 목표시장 : 국내 기능성 화장품 판매 업체(LG 생활건강 등 대기업 및 중소기업)

④ 예상 매출 : 고부가가치 기능성 원료의 공급, 약 2억원/년

⑤ 타겟제형 : 안티에이징 화장품 1종

(2) 이태후생명과학(주) 기능성 식품 및 화장품 원료 사업화 전략

① 기술이전을 통한 인삼 및 천연물 소재 개별인정형 신청(2014) 및 획득 (2015)

② 목표 기능성 : 인삼 응용 소재를 이용한 양모 기능성 및 천연물 소재를 이용한 기타 기능성(면역, 관절염, 치주염 등) 추가

③ 목표시장 : 국내·외 기능성 식품 및 화장품 판매 업체(한국콜마 등 국내기업)

④ 예상 매출 : 고부가가치 기능성 원료의 공급, 약 2억원/년

⑤ 타겟제형 : 타블렛 또는 캡슐제 1종

Summary

I. Title ; Ginseng-based Dermatology Science Application Business Group

(Overseeing Institution ; Kyeonghee University,
Researcher in Charge ; Professor Yi Tae Hoo)

II. Purpose of the Research and Development & Summary of Results

II - i . Purpose of the Research and Development

▶ The ultimate goal of this business group is to develop competitive and outstanding products to be applied on skins so that Korea's ginseng-based industry can become stronger. Therefore, "Ginseng-based dermatology science application business group" aims to engage in advance studies at Kyeonghee University and transfer the core research results to corporations, so that cosmetics and beauty food products utilizing ginseng-based materials can be developed. Such products would be sold domestically or exported, to result in annual sales exceeding KRW 10 billion.

- First, establish a mass production system for ginseng saponin material through "Research on Mass Production and Effect Monitoring for Ginseng Material Skin Application" and secure patents for more than 2 types of ginseng's new functions through clinical research for cosmetics and food development

- Second, engage in product development of one type of hair growth product and two or more types of functional cosmetics products from clinical evaluation applying ginseng materials through "Ginseng Saponin Material Wrinkle Improvement Functional Cosmetics and Hair Growth Non-medicinal Product Industrialization," and;

- Third, develop one type of beauty functional health product applying ginseng material through clinical evaluation and one type of medicinal product (natural oriental medicine) at pre-clinical stage through "Development of functional food that can help improve skin wrinkles applying enzyme-processed ginseng materials."

▶ The goals suggested by this business group and final development goals by each key research are as follows:

1. In order to achieve development of functional food utilizing enzyme-processed ginseng materials to improve wrinkles, the following were set as the goals: ① Study of functionality and stability of materials utilizing enzyme-processed ginseng, ② Study of beauty food standardization using enzyme-processed ginseng, and ③ Formulating materials

with functionality to apply enzyme-processed red ginseng.

2. In order to engage in development of wrinkle improvement functional cosmetics product as well as clinical and applied product for hair growth in non-medicinal products using ginseng saponin, we aimed for ① standardization of ginseng saponin by material and research for skin transmission, and ② research based on tablet formulation of ginseng saponin applied.

3. Further, in order to engage in mass production for skin application of ginseng materials and effect monitoring, we aimed for the following: ① Clinical evaluation process management as well as skin and hair growth effectiveness research for ginseng materials and products, ② Ginseng-base and product's skin function improvement effect evaluation research, ③ Minimal saponin's mass production system research applying saponin conversion technology, and ④ Research of fermented ginseng and fermented red ginseng standardization and production processing.

II - ii . Summary of Research Results

► Summarizing the research results per the research goals presented by this business group is as follows:

1. By developing a functional food that can help improve skin wrinkles with enzyme-processed ginseng materials applied,

(1) Safety evaluation of skin wrinkle enzyme functional material has been completed;

(2) Production of sample products for clinical evaluation of skin wrinkle improvement has been completed;

(3) Skin wrinkle improvement's clinical evaluation has been completed; application materials for permits for individual recognition as functional food are currently being prepared

2. By engaging in clinical test of functional cosmetics applying ginseng saponin and related products, as well as related wrinkle-improvement functional cosmetics products and hair growth non-medicinal materials,

(1) We completed the safety test of functional cosmetics products and non-medicinal materials

(2) We completed sample product production for wrinkle improvement cosmetics (2 types) and clinical evaluation of hair growth non-medicinal products

(3) We completed clinical evaluation of 2 counts of wrinkle-improvement cosmetics products, and for one of the products, we are preparing application material for permit as an individual recognition type cosmetics.

(4) We completed clinical evaluation of non-medicinal product for hair growth function.

3. By identifying new ginseng-based materials to be applied on skin, assessing the effectiveness and function, establishing mass production system applying ginseng-based materials, and related base technologies,

(1) We verified the skin wrinkle improvement effect as well as effectiveness in hair growth for ginseng-based materials and products (Submitted 16 related research papers, applied for 9 related patents, and registered for 1).

(2) Optimized fermentation system for mass production of ginseng-application materials (Submitted 11 related research papers, applied for 3 related patents, registered 82 bacteria strains, and deposited 264 counts).

(3) Established technologies such as pilot system implementation and development of optimized manufacturing process for industrialization (applied for 2 counts of related patents)

► We aggregated the outcome of having performed the above listed subjects, and completed 8 submissions of research papers, listed 19 articles, applied for 14 patents and registered for 1. We secured 82 registrations of new strains. Regarding technology transfer, we performed a total of 4 counts: 1 to a large corporation (Amore Pacific Inc., transfer completed), 1 to Korean Ginseng Company Inc. (transfer underway), and 2 small- to medium-sized firms (technology fee KRW 375,067 thousands). We are currently summarizing data for permits and licenses from Korean FDA for related products and performing related procedures. As for the firms that received the technology, they are currently applying the technologies transferred to introduce related products in the market.

III. Details of Research and Development, and Scope

Section 1. Development of Wrinkle Improvement Functionality Food Materials and Products

1. Evaluation of Material Effectiveness for Development of Wrinkle-improvement Related Functional Products
 - 1-1. *in vitro* assay - fibroblast, HDF-N cell increase effect, MMP-1 TGF- β generation effect, melanin synthesis prevented, cell protection effect for UVB
 - 1-2. *in vivo* assay - Measuring skin thickness, skin moisture amount, erythema index, melanin synthesis volume, skin wrinkle generation change, change in collagen within organization, protein generation of indicators related to aging (Procollagen type 1, MMP-1, TGF- β 1, elastin) confirmed
2. Establish standardization of wrinkle-improvement functional product materials and conditions for mass production of sample products.
 - 2-1. Standardization of functional food materials for wrinkle improvement through enzyme processing (Confirm indicator materials utilizing HPLC, confirm equivalence of indicator materials by batch)
 - 2-2. Sample production by format to establish mass production conditions of sample products (pill, light capsule, tablet, powder etc)
 - 2-3. Establish composition ratio of sample products
3. Results of safety evaluation for wrinkle improvement functional food product materials
 - 3-1. Single oral intake test for verifying sample safety, repeated oral intake for 13 weeks, return mutation, micronuclear test, test of chromosome anomaly, etc.
 - 3-2. Carry out test on basis for setting concentration capacity for injection of samples into human bodies.
4. Clinical test performance evaluation of functional food materials for wrinkle improvement
 - 4-1. Confirm 1st validity evaluation variables: SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS
 - 4-2. Confirm 2nd validity evaluation variables: skin firmness, skin moisture, and moisture loss volume of light skin.
 - 4-3. Clinical safety evaluation of sample products

Section 2. Development of Cosmetics Materials and Products for Wrinkle Improvement Function

1. Evaluation of invigorating candidate materials for wrinkle improvement functional cosmetics products
 - 1-1. *in vitro* assay - fibroblast, HDF-N cell proliferation effect, MMP-1 TGF- β generation effect, melanin synthesis prevention, cell protection effect for UVB.
 - 1-2. *in vivo* assay - Measuring skin thickness, skin moisture amount, red spot index, melanin

synthesis volume, skin wrinkle generation change, change in collagen within organization, protein generation of indicators related to aging (Procollagen type 1, MMP-1, TGF- β 1, elastin) confirmed

2. Standardization of wrinkle improvement functional cosmetics and establishing conditions for mass production
 - 2-1. Secure material quality of products through at least 3 counts of batch evaluation, and implement standardized mass production system.
3. Product formation of cosmetics materials with wrinkle improvement functionality and evaluation of product stability
 - 3-1. Optimal product format development condition established to proceed with clinical evaluation for optimal material for standardization.
4. Safety evaluation of cosmetics materials with wrinkle improvement functionality
 - 4-1. Single count dermal injection toxicity testing using KHY's Sprague-Dawley rats
 - 4-2. Skin stimulation test using KHY's rabbits
 - 4-3. Internal membrane stimulation test using KHY's rabbits
 - 4-4. Skin sensitivity testing using KHY's guinea pigs (Maximization method)
 - 4-5. Phototoxicity testing results using KHY's guinea pigs
 - 4-6. Photosensitivity testing results using KHY's guinea pigs (Adjuvant & Strip method)
5. Evaluation of clinical tests for cosmetics materials for wrinkle improvement functions
 - 5-1. Produced 2 types of samples for clinical testing (cream type) and performed clinical tests through Pharmacro, a clinical testing agency

Section 3. Development of non-medicinal materials and products with hair growth functionality

1. Invigoration evaluation of non-medicinal material for hair growth
 - 1-1. *in vitro* assay - Effect of cell proliferation rate improvement related to hair and suppression of NO creation confirmed
 - 1-2. *in vivo* assay - Visible observation of changes in hair growth and organizational observation through H&E dyeing
2. Establish standardization of hair growth non-medicinal product and mass production condition
 - 2-1. Active material contents and composition analysis using LC-MS
 - 2-2. Establishing production process
 - 2-3. Management of raw material production equality
3. Product formulation of materials for non-medicinal hair growth and evaluation of stability for product formats
 - 3-1. Product formulation and stability evaluation of materials

- 3-2. Forming sample product formats and stability
- 4. Safety evaluation of non-medicinal materials for hair growth
 - 4-1. Single count dermal injection toxicity testing using KHY's Sprague-Dawley rats
 - 4-2. Skin stimulation test using KHY's rabbits
 - 4-3. Internal membrane stimulation test using KHY's rabbits
 - 4-4. Skin sensitivity testing using KHY's guinea pigs (Maximization method)
 - 4-5. Phototoxicity testing results using KHY's guinea pigs
 - 4-6. Photosensitivity testing results using KHY's guinea pigs (Adjuvant & Strip method)
- 5. Clinical test evaluation of non-medical products for hair growth
 - 5-1. Produce 1 type of hair growth non-medicinal product and proceed with clinical evaluation for non-medical product for hair growth at Semyeong University.

Section 4. Development of technology based on application of ginseng materials

- 1. Securing standard saponin products and establishing saponin production process
 - 1-1. Identify invigorating saponin conversion of soil and yeast originated strains
 - 1-2. Conversion to saponin utilizing strain-derived enzymes
- 2. Search ways to invigorate conversion of edible strains such as lactic acids into saponin
 - 2-1. Search ways to invigorate conversion of strains through measurement of β -glucosidase activities
- 3. Identify functional strains for skin improvements and research and develop functional ginseng utilizing these
 - 3-1. Identification of strains with potential to improve skin by confirming invigorated suppression of DPPH and tyrosinase
 - 3-2. Preparation of work manual and key checklist through industrial process development of functional strains with strong skin environment improving capacities.

IV. Research and Development Results

Section 1. Development of functional food materials and products for wrinkle improvement

1. Confirm wrinkle improvement functional food material (Enzyme-processed red ginseng)

1-1. Based on test results of fibroblast proliferation, enzyme-processed red ginseng materials had proliferation rate exceeding 20%. Also, cell protection effect for UV-B and the suppression effect of IL-6 and TGF- β , which are skin immunization reaction components, have been confirmed to result in wrinkle improvement effect of enzyme-processed red ginsengs against photo aging.

1-2. We confirmed suppressed generation of MMP-1, biological indicator related to wrinkles, and more active increase in TGF- β , thereby confirming protection effect from photo aging due to UVB. We also confirmed suppression of melanin synthesis at joint growth of dead skin cell generating cells and melanin generating skins.

1-3. With regards to skin thickness, we noted significant thinning of thickened skin through induced photo aging in all groups with enzyme-processed red ginseng included in meals compared to UVB control group.

1-4. From UVB research, we confirmed that the group processed with 0.06% red ginseng with enzyme processed had recovered to the normal level from decreased moisture volume, erythema index, and melanin synthesis volume. For wrinkle-related indicators which were protein MMP-1, procollagen type-1, and TGF- β 1 as well, we noted that the group with enzyme-processed red ginseng 0.06% group had a generation at the level of normal control group, thereby confirming that the processing was effective in wrinkle improvement.

2. Based on confirming the standardization of wrinkle improvement functionality food material and mass production conditions of sample products, we note the following:

2-1. Based on research of chemical properties of red ginseng ferment products and components of indicators, the indicator material is selected as ginsenoside-F2, and content volume was set as 7mg/g.

2-2. It was confirmed that ginseng + 20% enzyme processing led to over-generation of F2 compared to minimal volume. Under lab-scale and batch test, homogeneous quality (7.89 \pm 0.45mg/g, CV 5.7%) was secured.

2-3. With regards to sample product production type of wrinkle improvement functionality food, tablet form was selected.

2-4. Daily dose of valid content for adult was designed as 750mg/Tablet, and the main product as well as the placebo were produced.

3. Results of safety testing for wrinkle improvement functionality products

3-1. Confirmed that there were no anomalies after testing for return mutation, micro nucleus testing, and chromosome anomaly testing.

3-2. Based on single oral intake testing repeated for 13 weeks, the lethal dose for males and females both exceeded 5,000mg/kg.

3-3. Based on volume setting testing, it was confirmed that male and female rat groups with

5,000 mg/kg had no toxicity change due to test materials.

4. Clinical test results of food materials with wrinkle improvement functions

4-1. From value changes in first level validity evaluation variables SV600 (R3), SV600 (R5), and GPDS and 2nd validity evaluation variables skin firmness, moisture, and moisture loss volume at light skin, significant skin wrinkle improvement effects were confirmed.

4-2. While there are many variables that can impact the results during the test, significant changes were exhibited. As such, we confirmed that it provides sufficient basis to assist with skin health.

4-3. As there were no meaningful reaction during the testing period, it was confirmed that the product was safe for long-term intake.

Section 2. Development of cosmetics materials and products with wrinkle improvement functionalities

1. Wrinkle improvement functional cosmetics candidate material invigoration evaluation

1-1. Based on test results of fibroblast proliferation, two types of enzyme-processed ginseng materials had proliferation rate exceeding 20%. Also, cell protection effect for UV-B effect was confirmed.

1-2. After researching two types of UVB based on ginseng material with enzyme processed at Fibroblast, compared with control group, and confirmed decrease in MMP-1 generation and increase in Procollagen type-1, as well as increased activity of TGF- β 1. Accordingly, protection against photo aging effect was confirmed.

1-3. On hairless mice model with photo aging induced, skin aging through enzyme-processed optimal material (wrinkle/ moisture) improvement effect was confirmed. It was confirmed that the group with enzyme-processed ginseng meals provided had visibly thinner skin thickness compared to UVB control group, and decrease generation of MMP-1, Procollagen type 1, and TGF- β 1 as well as increased elastin were confirmed.

2. Standardization of wrinkle improvement functionality cosmetics material and establishing mass production conditions

2-1. Secure and standardize equality of materials, complete implementation of mass production system, and mass produce materials for clinical evaluation.

3. Product formation of cosmetics material with wrinkle improvement functionality and evaluation of product form stability

3-1. Optimal product format development conditions has been established to perform clinical evaluation of optimal materials for standardization.

4. Safety evaluation of cosmetics materials with wrinkle improvement functionality

4-1. We've engaged Bio Tox Tech Inc. to assess the safety of KHY. Based on the assessment, the safety of KHY was confirmed in results excluding skin sensitivity and photosensitivity. In

case of skin sensitivity and photosensitivity, positive reactions were confirmed

5. Clinical test evaluation of cosmetics materials with wrinkle improvement functionality

5-1 Produced two clinical sample products for wrinkle improvement material (cream type) and completed clinical testing through Pharmacro, a clinical testing agency.

Section 3. Development of non-medicinal materials and products with hair growth functionality

1. Evaluation of hair growth non-medicinal materials

1-1. After confirming the proliferation rate of cells related to hair and suppression of NO creation, hair cell growth rate of 50% in enzyme-processed ginseng saponin and oriental medicine complex materials (KHY) was confirmed, and NO generation suppression rate of 38% was confirmed.

1-2. Based on testing on animals with regards with hair growth, it was confirmed that KHY was effective in stimulating hair growth and maintaining the growth stage. Hair concentration and thickness also improved. Further, from organic change as well, it was confirmed that entering into the receding stage of hair follicle was delayed and hair growth was stimulated.

2. After standardizing the non-medicinal products for hair growth and conditions for mass production of sample products,

2-1 KHY is confirmed as the optimal material for non-medicinal hair growth, and established conditions for mass production.

2-2. The contents and volume of materials are analyzed using LC-MS.

2-3. Establish manufacturing process of non-medical hair growth product.

2-4. Establish production process of raw materials and raw material equality analysis conditions.

2-5 Large volume production conditions of saponin containing large volumes of F2, C-K established, and optimal production format is selected.

3. KHY's safety evaluation test results

3-1. We've engaged Bio Tox Tech Inc. to assess the safety of KHY. As a result, we verified KHY's safety from the outcomes with the exception of skin sensitization and light sensitization. In case of skin sensitization and light sensitization, positive reactions were confirmed.

4. KHY's clinical test evaluation

4-1. Semyeong University completed clinical test evaluation. Results report is planned to be received during January.

Section 4. Development of technology based on application of ginseng materials

1. Secure standard saponin product and establish saponin production process

1-1. Research to secure soil strains with high saponin conversion, and the small volume of

saponin included in ginseng using the enzymes included in the strain, to select strain THG-107 from soil-originated strains that can be converted 90% to F2.

1-2. Synergistic effects confirmed for yeast strains with saponin conversion activities and malt extracts

1-3. Conversion of F2 and C-K was confirmed using yeast-originated enzymes. Based on these converted materials, simple methods using solubility were applied to secure the basis for mass production of ginseng saponin materials with purity level exceeding 98%.

2. Identify invigoration of saponin conversion for edible bacteria such as lactic acid

2-1. After identifying various edible strains and metabolic products with the effect to change the format of ginseng's saponin as well as certain level of functions for the skin, identified 601 types of lactic acid strains with invigoration for beta-glucose.

3. Identify functional materials for skin improvement and research & development of functional ginseng product utilizing these

3-1. From document research, established rapid detection method that can be considered to revitalize anti-oxidation and whitening.

3-2. *Leu. mesenteroides* D433, extracted from Kimchi, which has outstanding conversion for ginseng saponin's metabolic matter and can improve anti-oxidation, whitening, and improve skin environment, was selected as the strain appropriate for this project.

3-3. For commercial application of materials that have been developed with high capacity for skin environment improvement, task manual and key check list are prepared so that any task performer can fulfill the assignments

V. Research Results and Plans to Utilize the Results

Section 1. Research Results

1. Research paper submission outcome

A total of 27 pieces have been submitted (SCI 22, non-SCI 5) and published 19 pieces. Remaining 8 pieces are currently under review. The below table lists representative research papers directly related to the research results of this business group (For details, refer to Section 6, Research Paper Outcome).

2. Patent results

There are 15 domestic patent applications, 5 counts of priority right evaluation, and 1 count of patent registration. The below table lists representative patents directly related to the research results of this business group (Refer to Section 6. Patent Results for details).

3. Other successes

- Completed registration of 82 new strains at domestic and foreign strain registration institutions.
- Technology transfer : We performed technology transfer to a total of 4 entities: 2 to large corporations (Amore Pacific Inc., Korean Ginseng Company Inc., and 2 small- to medium-sized firms.

Section 2. Plans to Utilize the Results

1. Apply for permits and licenses to use functional products applying ginseng-based materials through technology transfer (2014)
2. Applied to development of high value-added products
 - Development of functional cosmetics and non-medicinal products utilizing ginseng materials (2014~2015)
 - Enlargement of sizes of functional foods utilizing red ginseng materials (2015)
3. Generate profit through domestic and foreign sales (Year 2015)
 - (1) Amore Pacific's functional cosmetic product commercialization strategy
 - ① Apply (2014) and acquire functionality of ginseng-based materials through technology transfer/ Apply materials with hair growth effect on products

- ② Target functionality : Improve on wrinkles using ginseng-based materials
- ③ Target market : Utilize own brand stores and visitation sales network
- ④ Projected sales : Projected sales of single anti-aging cosmetics product (Brand TBD) at KRW 2.5 billion/ year, Projected sales of hair-growth functional hair cleanser (Brand TBD) at KRW 2.5 billion/ year
- ⑤ Target format : Total of 2, with 1 count of anti-aging cosmetics product and one count of hair-growth functional hair cleanser

(2) KGC(Korea Ginseng Company)'s functional food business strategy

- ① Application (2014) for individual recognition type of ginseng materials through knowledge transfer and acquisition (2015)
- ② Raise up the item to product development committee within the company (2014)
- ③ Target functionality : Current 5 functionalities of red ginseng (immunization, anti-fatigue, improve circulation, improve memory, anti-oxidation) plus skin health

- Items to note : Existing 5 functionalities are evenly applied on all red ginseng firms

In case of red ginseng powders for enzyme conversion, KGC can monopolize

- ④ Target market
Domestic : Use franchise stores of “Jeongkwon-jang” or visitation sales network
- ⑤ Projected sales : 5% of current red ginseng extract sales (KRW 100 billion), or KRW 5 billion/ year
- ⑥ Target product form : 1 type of tablet

(3) Functional cosmetics product and food raw material business type strategy for The Dermalab Inc.

- ① Application (2014) for individual recognition type of ginseng materials through knowledge transfer and acquisition (2015)
- ② Target functionality : Secure wrinkle improvement functionality using minimal ginseng saponin
- ③ Target market : Domestic functional cosmetics product selling entities (Large corporations such as LG Life and Health as well as small-to-medium sized businesses)

④ Projected sale : Supplying high value-added functional raw material, roughly KRW 200 million/ year

- ⑤ Target product : One type of anti-aging cosmetics product

(4) YTH Life Sciences Inc.'s functional food and cosmetics raw material

commercialization strategy

- ① Application (2014) for individual recognition type of ginseng and natural lifeform materials through knowledge transfer and acquisition (2015)
- ② Target functionality : Hair growth functionality using ginseng-based materials and other functionalities using rare living organism (immunization, arthritis, periodontitis, etc.)
- ③ Target market : Domestic and foreign functional food and cosmetics product sales entities (Domestic firms such as Korean Colma, etc)
- ④ Projected sales : Supplying high value-added functional raw material, roughly KRW 200 million/ year
- ⑤ Target product : 1 type of tablet or capsule type pill

목 차

제 1 장 서론	26
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	26
제 2 절 국내외 기술개발 현황	30
제 2 장. 주름개선 기능성 식품 소재 및 제품의 개발	33
제 1 절. 주름개선 기능성 식품 후보 소재 활성 탐색	34
제 2 절. 주름개선 기능성 식품 소재 표준화 및 양산 조건 확립	46
제 3 절. 주름개선 기능성 식품 소재의 안전성 평가	60
제 4 절. 주름개선 기능성 식품 소재의 임상시험 평가	64
제 3 장. 주름개선 기능성 화장품 소재 및 제품의 개발	68
제 1 절. 기주름개선 기능성 화장품 후보 소재 활성 탐색	69
제 2 절. 주름개선 기능성 화장품 소재 표준화 및 양산 조건 확립	77
제 3 절. 주름개선 기능성 화장품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가	88
제 4 절. 주름개선 기능성 화장품 소재의 안전성 평가	92
제 5 절. 주름개선 기능성 화장품 소재의 임상시험 평가	96
제 4 장. 양모 의약외품 소재 및 제품의 개발	98
제 1 절. 양모 의약외품 소재 후보 소재 활성 탐색	98
제 2 절. 양모 의약외품 소재 표준화 및 양산 조건 확립	105
제 3 절. 양모 의약외품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가	111
제 4 절. 양모 의약외품 소재의 안전성 평가	115
제 5 절. 양모 의약외품 소재의 임상시험 평가	119
제 5 장. 인삼소재 응용 기반 기술 개발	121
제 1 절. 토양 및 누룩유래 균주의 Saponin 전환활성 탐색	121
제 2 절. 유산균 등 식용균주의 Saponin 전환활성 탐색	132
제 3 절. 피부 환경 개선을 위한 기능성 소재의 선별 및 이를 활용한 기능성 인삼 소재의 개발	140
제 6 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	149
제 7 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	150
제 8 장 참고문헌	162

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

1. 기술적 측면

▶ 한방 소재에 대한 해외 수출 증대

한방 소재에 대한 연구는 외국에 비해 상대적으로 경쟁력이 충분하며 특히, 인삼은 우리나라의 대표적인 한약재로서 세계시장에서도 그 가치를 인정하고 있음. 신소재의 수입대체 및 글로벌화 할 수 있는 특정 진세노이드의 생산, 피부질환 개선 효능 및 작용 기작을 규명하여 고부가가치 맞춤형 진세노사이드 제품 개발을 위한 원천기술을 자체적으로 개발하고 발전시킴으로써 기업 매출의 극대화를 이룰 수 있음.


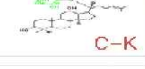
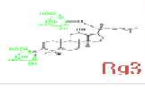

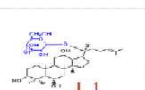
▶ 인삼의 피부관련 기능성 제품

기능성 제품 효능 연구의 타겟은 면역, 고혈압, 당뇨, 성기능, 피부 미용 등 다양하게 적용될 수 있지만 면역과 관련된 난치성 피부질환을 포함한 피부 및 미용 관련 분야는 다른 영역에 비하여 부가가치와 시장성이 큰 것으로 기대되고 있음. 특히 마이너 사포닌이 피부의 재생효과, 주름개선 효과 등이 있다고 알려지면서 화장품, 인삼 관련 기능성 식품, 천연물 의약품기업체들의 개발 수요가 증가하고 있음.

▶ 인삼의 유명세와 판매량 (세계 10조 매출/연)에 비하면 ginsenoside의 연구는 상대적으로 저조한 실정인데 그 이유는 특정 진세노사이드의 획득이 어렵기 때문이다. 자연계에 천연으로 존재하는 major ginsenoside 들은 그 연구가 어느 정도 진척되어 있지만 minor ginsenoside들은 얻을 수 있는 방법이 어렵기 때문에 약리효과에 대한 연구가 미비하고 여러 미량 ginsenoside들의 각각 약리효과에 대한 비교는 전무한 실정임.

▶ 인삼 미량 사포닌은 인삼 중 함량에 따라 major ginsenoside와 minor ginsenoside 두 가지로 분류하는데, 그 중 major ginsenoside인 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re 및 Rg1은 총 사포닌의 90%이상을 차지하고 특히 PPD타입의 4가지 major ginsenoside인 Rb1, Rb2, Rc와 Rd가 총 사포닌의 50-70%를 차지하지만 major ginsenoside는 고분자 구성성분과 연결되어 있어 인체에 섭취 후 체내에 흡수가 되지 못하지만 사람의 장내에 서식하는 특유의 미생물에 의해 가수분해 되어 여러 개 당이 떨어져 minor ginsenoside 형태인 ginsenoside Rg3, Rh1, Rh2 와 compound K로 전환되면 쉽게 흡수가 되어 항암활성, 면역증가, 혈액개선, 치매방지 등에서 탁월한 약효를 나타낸다는 것이 밝혀짐.

Published efficacies of minor ginsenosides onto skin disease area

	Title	Efficacy	Journal
 12	1 Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901, compound K) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin	Antitumor, Anti-inflammatory	Carcinogenesis 2005 26(2):359-367
 C-K	2 Antiallergic Activity of Ginseng and its Ginsenosides	Antiallergic	Planta Med 2003; 69: 518-522
 Rg3	3 Effect of ginsenoside Rb1 and compound K in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis	Anti-inflammatory, improvement of dermatitis & psoriasis	International Immunopharmacology 5 (2005) 1183-1191
 Rh2	4 Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronana in hairless mouse skin	Improvement of xerosis & wrinkle	Biochemical and Biophysical Research Communications 316 (2004) 348-355
 Rg1	5 Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-κB activation and tumor promotion	Antitumor for skin cancer	Mutation Research 523-524 (2003) 75-85

2. 경제·산업적 측면

▶ 천연물 응용 화장품

○ 최근 세계적으로 화장품 소재가 자연적, 천연적 선호추세에 발맞춰 천연성분을 사용하는 시장 규모 확대되고 있음, 세계 천연성분 사용 시장은 100억 달러 규모이며 천연물을 주성분으로 한 미국 화장품 시장은 2002년 말 연매출 45억 달러 규모로 성장. <뉴욕 타임즈>와 <뉴트리션 비즈니스 저널> 등의 자료에 의하면 천연물을 주성분으로 한 미국의 화장품 및 피부 관리제품 시장은 지난 5년간 평균 10% 가 넘는 고속 성장을 기록.

○ 기능성 화장품은 약사법에 의해 규제를 받아 왔으나 2000년 7월 1일부터 별도로 화장품법이 제정, 공포되면서 화장품의 제조, 수입, 판매 등이 새롭게 규정됨으로서 새로운 법규에 따른 기능성 화장품의 연구 및 개발이 필요하며 이는 국민 보건 향상과 산업 발전에 크게 기여할 것임.

○ 헤어케어나 구강 케어 제품에도 기능성화장품이 존재하지만 피부를 대상으로한 기초화장품이 기능성 화장품의 주류를 이루고 있는 실정임. 이러한 시점에서 미래의 화장품 개발은 유효성과 안전성이 뛰어난 고기능성을 추구해야함.

○ 기존의 화장품은 단지 피부미용 및 아름다워 보이고자 하는 측면에서의 연구개발에 중점이 두어졌으나 앞으로는 기능성 화장품(Cosmeceutical)으로 약리활성의 개념이 함축된 보다 적극적인 개념의 바이오 화장품(Biocosmetics)개발이 주축을 이룰 것임.

○ 화장품 개발방향은 소비자 욕구의 다양화와 관련 기술 등의 발달로 인하여, 피부미화, 청결 등의 단순한 효능에서, 이제 고기능, 다기능을 갖는 제품들의 개발로 변화되고 있음. 또한 화장품 산업은 단순한 가공의 개념에서 이제는 과학의 종합적인 응용으로 이루어진 정밀화학 산업으로 고부가가치를 창출할 수 있는 첨단 미래형 산업으로 변화될 것임.

○ 또한, 세계적인 소재 기술 보유로 제품의 기술 진입장벽 구축 및 세계 기능성 화장품시장을 주도하고 소재의 국산화를 통해 심각한 수위에 있는 무역 역조 해소 및 기술적 경쟁력 확보로 국가 경쟁력을 한차원 높일 수 있음. 이러한 점에 근거할 때 인삼 소재를 응용한 항노화 조절 기능성 화장품 및 식품 산업군으로 앞으로 폭발적인 산업군을 형성할 예정임.

▶ 뷰티 관련 식품, 천연물의약품

○ 최근 2009 화장품 시장의 전망은 좀더 세분화되고 진화되는 에코시장이 주를 잡고 있음. 앞으로도 이 부분에 대해서는 상당기간 시장에서 자리 매김을 할 것임. 즉 오가닉 인증 일반화에 따른 오가닉 차별화에 대한 요구도 강화, 프레스티지 시장에서 에코와 안티에이징의 크로스 오버 예상 및 하이테크 놀로지를 이용해 식물에서 추출한 안티에이징성분을 오가닉과 결합하여 피부에 자극은 없애고 안티에이징 효과를 누리는 개념의 화장품 시장은 극대화 될 것임. 즉 안티에이징의 뷰티전반에 걸친 광범위한 확대 예상되고 DNA, RNA, 인공피부 부산물 등 원자단위까지 접근하고 이러한 것에 부응하여 안티에이징용 메이크업 제품, 바디, 클렌저, 음료에까지 확대되어 일상화될 것임.

○ 미국의 리서치전문기관인 DRI의 조사에 따르면 BT 산업은 첨단산업 중 가장 높은 연평균 20% 이상의 성장이 전망되는 등 미래 유망산업임. 특히 생물공학기술(BT)과 식품산업 기술간 융합으로 맞춤형 기능성식품, 생리활성 물질의 정제 및 생산, 특정질병예방 식품, 노화조절 식품 및 면역기능개선 제품 등의 식품가공기술과 관련된 신기술의 발전은 사회 흐름과 소비자의 트렌드에 맞는 새로운 제품의 개발을 가능케 함. 앞으로 널리 보급되리라 예상되는 기능성 식품과 관련된 기술로서 미세캡슐화, 초고압, 나노기술, NDS(Nutrient Delivery System)등이 있으며, 식품에 함유되어 있는 생리활성물질의 효율적인 이용을 통해 '재료'중심에서 '기능' 중심으로 이동하고 있는 건강지향적 식품소비 문화에 부합하는 식품개발이 이루어질 것이라 예상됨. 또한, 앞으로 식품산업의 발전을 위해서는 국제 경쟁에 대비하여 차별화된 제품 개발기술을 바탕으로, 경쟁우위를 확보해 나가야 할 것임.

3. 사회·문화적 측면(공공성 포함)

▶ 고령사회 도래와 함께 건강장수 및 웰빙(well-being)에 대한 사회적 요구가 절실하여 세계적으로 바이오융합기술을 기반으로 하는 고부가가치 기능성 화장품 및 식의약품의 글로벌 마켓은 계속 확대될 전망이다.

▶ 2009년 4월 각국의 생물자원에 대한 접근과 활용에 따른 이익공유를 담은 'Bonn 가이드라인'이 합의되면서, 천연자원의 활용과 그에 따른 이익창출에 국제적 관심이 고조되고 있음 [Bonn Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of the Benefits Arising out of their Utilization, COP 6 Decision VI/24, ABS (Access and benefit-sharing as related to genetic resources)]. 아울러 합성 소재의 부작용이 속출됨에 따라 천연물 소재에 대한 기대감이 급부상되고 있으며, 미국, 유럽 등 선진국에서도 천연물소재 기능성 제품 개발에 대한 관심도가 증가하고 있음.

4. 연구개발의 필요성 종합

▶ 한국은 인삼의 종주국이라 하지만 실제로 세계 시장에서의 점유율은 계속 하강하고 있으며 홍삼의 브랜드만으로는 세계시장에서 그 위상을 지켜내기가 어려운 실정이다. 이를 극복하기 위한 새로운 돌파구는 기능성 제품을 개발을 통하여 가능할 것임.

인삼소재를 응용한 기능성 제품의 개발은

- 첫째, 인삼, 홍삼, 발효인삼, 발효홍삼에 함유된 진세노사이드의 정확한 성분 함량의 정량과 표준화,
- 둘째, 생리활성이 뛰어나다고 알려져 있는 고순도의 특정 마이너 진세노사이드를 의약품 수준으로 개발하거나 특정 진세노사이드들이 일정이상 함유되도록 가공기술을 개발하고 전임상/임상을 통하여 기능성제품화하고,
- 셋째, 발효강국인 대한민국에서 효소발효로 만들어지는 특정 마이너 진세노사이드를 다량 함유하도록 발효시켜서 제조된 대사산물을 전임상/임상 효능 검증을 통한 개발이 필요한 실정임.

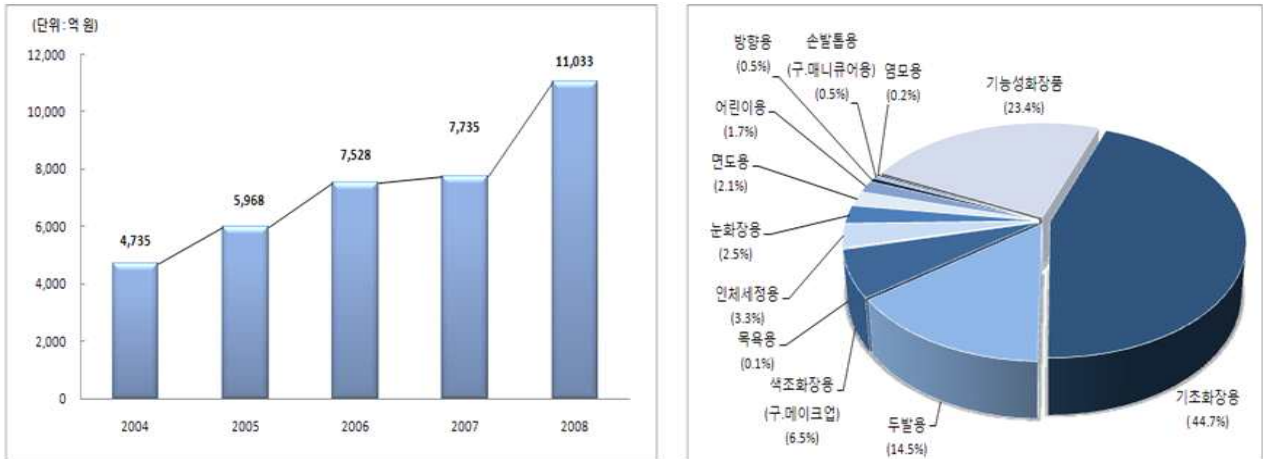
- ▶ 인삼은 효과가 뛰어난 약리효능의 상당부분이 특정 미량사포닌에 주로 있다고 알려져 있음. 우리 선조들이 전통적으로 홍삼과 같이 찌거나 전통 누룩이나 된장균주를 이용하여 발효시킨(효삼) 것은 원시적인 단계의 인삼사포닌의 형질전환 기술이라고 할 수 있음. 인삼사포닌의 형질전환은 크게 유기산 같은 것을 처리하는 산처리 방법과 홍삼과 같이 찌는 물리적 처리방법, 발효를 이용한 생물학적 처리방법이 있음.
- ▶ 인삼미량사포닌 가공에서 산 처리는 이성질체가 생겨서 원하지 않은 약리활성을 나타낼 수 있는 문제가 있으며, 물리적인 처리방법은 특정사포닌만을 선택적으로 전환하기 어렵다. 그러나 발효를 이용하여 인삼미량사포닌을 전환하면 표준화가 가능하고 순도를 높일 수 있으며 대량생산이 가능함.

제 2 절 국내외 기술개발 현황

가. 국내기술동향

▶ 화장품 시장 현황

- 국내 화장품 시장 현황은 기능성 화장품에 대한 수요의 급증 추세
- 2008년에는 전년대비 42.6% 수준으로 성장하여 1조원을 넘음
- 기능성 화장품과 두발용 화장품의 시장점유율은 38%에 육박함



자료출처 : 대한화장품협회, 화장품 생산실적 자료

▶ 기능성 식품 시장 현황

- 2008년 건강기능식품 업소는 전년대비 약 16.6% 증가한 58,570개로 조사되었다. 분류별로는 일반관매업이 54,538개(93%)로 판매업소의 비중이 대부분이었으며, 전체 제조업체를 포함한 제조업체가 356개(약 1%), 수입업체가 2,395개(약 4%)로 판매업체 중심의 산업구조를 보이고 있음.
- 2008년도 건강기능식품의 생산량은 약 12,944 톤으로 전년대비 약 18% 증가한 반면 생산액은 5,886 억 원으로 전년대비 약 18% 감소하였다. 따라서 전체 식품생산액에서 건강기능식품이 차지하는 비중도 2007년 약 2.2%에서 2008년에는 약 1.5%로 축소되었음.

자료출처 : 2009 식품산업 분석 보고

나. 국외기술동향

- '07년 기준 세계 바이오산업시장 규모는 약 2.5조 달러 [식품산업 1.6조 달러, 제약산업 0.7조 달러, 화장품산업 0.2조 달러]로 추정되며¹⁾, 이는 자동차시장 1.6조 달러보다 크며, IT시장 2.8조 달러 정도로 큰 규모이며²⁾ 부가가치가 매우 큰 특징을 가짐.

- ▶ 전 세계 고부가가치 천연물 바이오시장은 생산기술의 향상보다 고부가가치 부여를 위한 첨단기술에 더 큰 가치를 부여.

1) '08 보건산업백서, 한국보건산업진흥원

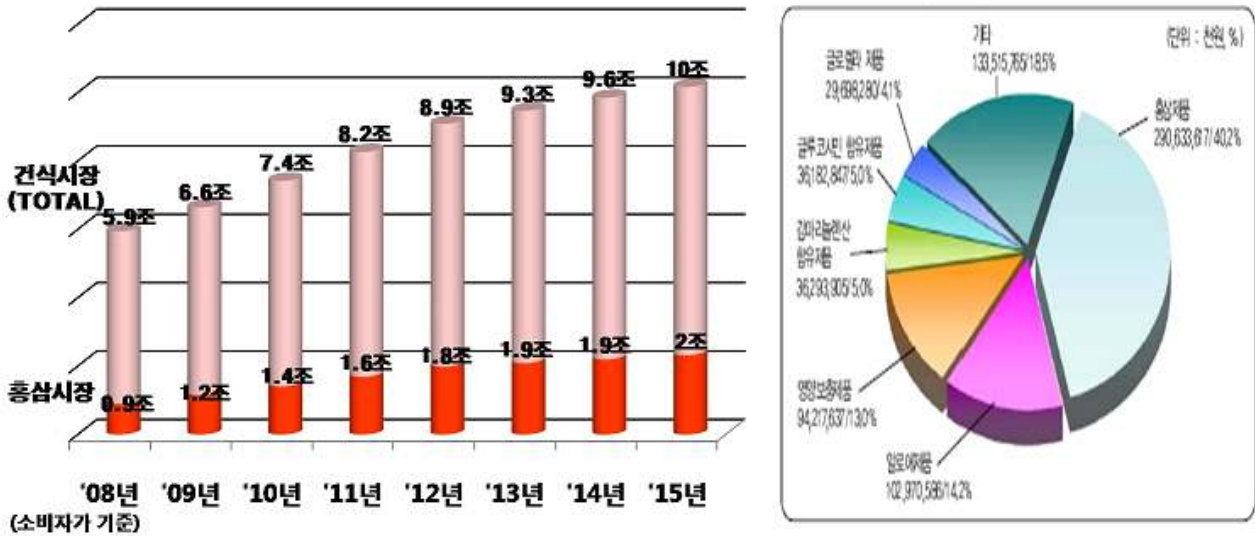
2) "식품산업발전 종합대책", 농림수산식품부, 2008

3) Euromonitor International, 2007

제품명	진사나(Ginsana)	StriVectin	Tebonin
제조사	Pharmaton (Swiss) - 베링거 인겔하임의 자회사	Kline Becker(USA)	Schwabe (Germany)
매출	연간수출액 \$ 30억 (우리나라 인삼 수출액 \$1억)	\$0.64억 (USA market)	\$2억
주요성분	인삼 사포닌	올리고펩타이드	은행잎추출물 (한국산)
성공 전략	표준화 과학적 기능성 입증	신소재 개발 신기술 도입	표준화 과학적 기능성 입증
			

다. 향후 전망

▶ 인삼관련산업은 1차·2차산업의 특성을 모두 지니는 것으로 생산자, 연구자, 제품 개발자 및 마케팅 기업과의 유기적인 관계가 지속적되어야만 세계시장에서 성공할 수 있을 것으로 생각됨. 인삼관련산업은 소비패턴을 가공된 인삼관련제품으로 유도하며, 경쟁지향적 시장구조를 통하여 시장의 효율성을 증대시키고, 국제경쟁력을 강화시키기 위한 산업구조의 효율화 방안이 모색되어야 함, 대부분 국내 인삼생산량의 50%정도가 수삼 및 건삼의 형태로 이용되고 있으며, 나머지 50%를 1차 가공 및 2차 가공하여 소비되고 있음. 수삼의 경우 수출이 불가능하기 때문에 나머지 가공제품가운데 수출량을 제외하면 국내의 대부분 수삼의 형태로 소비되는 것임. 따라서 인삼가공제품에 대한 홍보가 적극적으로 수행된다면 시장의 성장 잠재력은 매우 큼.



▶ 인삼소재 응용한 산업에 대한 전망은 국제 경쟁력을 갖춘 제품이 개발된다면 매우 밝다고 할 수 있음. 즉 인삼은 우리나라의 농가 경제에 크게 기여하는 주요작물이며 수출 유망 품목으로써 발전의 잠재력이 매우 큼. 인삼의 약리효능이나 재배에 관한 연구는 많이 수행되었으나 시설에 관한 연구는 매우 부족하여 재해로 인한 시설피해를 자주 겪고 있는 실정임. 현재 전국적으로 인삼재배 농가에서 이용되

고 있는 관행 해가림 구조는 해가림 구조의 개선만으로 25%이상의 증수를 기대할 수 있음. 해가림 자재는 인삼재배에 최적규격을 정하여 규격화된 자재를 생산 보급함으로써 작업의 효율성을 높이고 자재에 소요되는 비용의 절감이 가능할 것임. 인삼은 우리나라의 전통산업으로 품질에 있어서 세계최고의 수준에 달해있음. 그러나 품질상의 우위에도 불구하고 최근 중국, 미국, 캐나다 등 새로운 경쟁자의 출현으로 세계시장 및 우리나라에서의 시장경쟁력이 크게 약화되고 있기 때문에 인삼 관련 시장의 개방에 따른 적극적인 대책이 필요함.

▶ 한국은 인삼의 종주국이라 하지만 실제로 세계 시장에서의 점유율은 계속 하강하고 있으며 홍삼의 브랜드만으로는 세계시장에서 그 위상을 지켜내기가 어려운 실정임. 이를 극복하기 위한 새로운 돌파구는 기능성 제품을 개발을 통하여 가능할 것임. 인삼소재를 응용한 기능성 제품의 개발은 첫째, 인삼, 홍삼, 발효인삼, 발효홍삼에 함유된 진세노사이드의 정확한 성분 함량의 정량과 표준화, 둘째, 생리활성이 많다고 알려져 있는 고순도의 특정 마이너 진세노사이드를 의약품 수준으로 개발하거나 특정 진세노사이드들이 일정이상 함유되도록 가공기술을 개발하고 전임상/임상을 통하여 기능성제품화하고, 셋째, 발효강국인 대한민국에서 효소발효로 만들어지는 특정 마이너 진세노사이드를 다량 함유하도록 발효시켜서 제조된 대사산물을 전임상/임상 효능 검증을 통한 개발을 진행해야 할 것임.

라. 기술동향 분석 결론

본 과제 수행을 통하여 도출되는 인삼소재는 수입 의존적인 기능성 원료 시장에 대하여 수입대체 효과를 기대할 수 있으며, 인삼소재를 응용한 미용 화장품, 기능성식품, 의약품을 개발하여 국내외 인삼산업의 수익성 창출에 기여하고, 의약품, 식품, 화장품 산업 전반의 R&D기반을 확충하고 1차 생산기반(인삼재배) 확충 농가소득 증대 및 인삼을 연구개발 시 획득된 R&D Know-How는 다른 농산물에도 확산되어 천연물의약품, 식품, 화장품 산업에서 국내 농산물 자원의 기반연구로써 응용될 수 있음.

제 2 장 주름개선 기능성식품 소재 및 제품의 개발

1. 주름개선 기능성 식품을 개발하기 위해 최적 소재로 홍삼 유래 소재를 선택
 - 1-1. Fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 홍삼 소재에서 20% 이상의 증식률을 확인하였고, UV-B에 대한 세포보호효과 및 피부 면역 반응인자인 IL-6 와 TGF- β 발현 억제효과를 확인하여 효소처리 홍삼의 광노화에 대한 주름 개선효과를 확인함.
 - 1-2. 주름관련 생체 지표인 MMP-1의 생성을 억제, TGF-beta1 증가 활성을 나타냄으로써 UVB에 의한 광노화에 대한 보호 효과가 있음을 확인하고, 각질형성세포와 멜라닌형성세포 공동배양에서 멜라닌 생합성을 억제함을 확인함.
2. 주름개선 기능성 식품 소재의 표준화 및 양산 조건을 확인한 결과
 - 2-1. 홍삼발효물의 화학특성 조사 및 지표성분 확인 결과 지표물질을 진세노사이드-F2로 선택하고, 함량을 7mg/g 으로 설정 함.
 - 2-2. 홍삼 + 20% 효소처리에서 F2와 C-K가 최소농도 대비 과량 형성됨을 확인하였으며 lab-scale 및 scale-up에서 균일한 품질을 확보함.
3. 주름개선 기능성 식품 개발을 위한 활성 평가를 한 결과
 - 3-1. 표피층의 두께는 광노화 유발로 인해 얇아진 표피가 효소처리홍삼 시료 식이공급한 모든 군에서 UVB조사군 대비 유의하게 얇아진 것을 확인.
 - 3-2. UVB 조사에 의해 감소된 수분함유량과 홍반지수, 멜라닌 합성량에서 효소처리 홍삼 0.06% 처리군이 정상대조군 수준으로 회복된 것을 확인하였고, 주름관련 지표단백질 MMP-1, procollagen type-1 및 TGF- β 1의 발현에도 효소처리 홍삼 0.06% 처리군이 정상대조군 수준의 발현을 보여 주름 개선에 효과가 있음을 확인.
4. 주름개선 기능성 식품 임상평가용 시제품의 표준화 및 양산 조건을 확인한 결과
 - 4-1. 주름개선 기능성 식품의 임상효능평가용 시제품 제형은 Tablet 제형으로 선정함.
 - 4-2. 유효성분의 성인 1일 섭취량을 500mg/Tablet로 설계하여 본품과 위약군으로 제조함.
 - 4-3. 홍삼발효 추출 농축 분말의 진세노사이드 함량은 총 15.05 mg/g 이었는데, 이중 프로토파낙사트리올(PPT)계 사포닌 함량이 6.20 mg/g, 프로토파낙사디올(PPD)계 사포닌 함량이 8.85 mg/g 수준으로, PPD계 사포닌 함량이 PPT계 사포닌보다 높은 경향을 보임.
5. 주름개선 기능성 식품 소재의 안전성 시험 수행 결과
 - 5-1. 복귀돌연변이, 소핵 시험, 염색체 이상 시험 결과 모두 이상이 없음을 확인함.
 - 5-2. 단회 경구투여 시험 결과 Rat의 치사량은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것을 확인.
 - 5-3. 용량설정 근거 시험 결과 Rat 암수 5,000 mg/kg 투여 군에서 시험물질에 기인한 독성변화가 없는 것을 확인함.
 - 5-4. 13주 반복경구투여 시험 결과 암수 5,000 mg/kg 용량에서 무해한 것을 확인함.
6. 주름개선 기능성 식품 소재의 임상 시험 수행 결과
 - 6-1. 1차 유효성 평가 변수 SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS 수치 변화와, 2차 유효성 평가변수 피부탄력, 피부수분, 경피수분손실량에서 유의한 피부주름 개선효능을 확인함.
 - 6-2. 시험 도중 시험에 영향을 줄 수 있는 다양한 변수가 있음에도 불구하고 유의한 변화를 보여 주었으므로 피부 건강에 도움을 줄 수 있는 근거로 충분한 것을 확인함.
 - 6-3. 시험기간동안 의미 있는 이상반응이 없어 장기간 복용해도 안전한 제품임을 확인함.

제 1 절. 주름개선 기능성식품 후보 소재 활성 탐색

1. 주름개선 기능성 식품 소재 개발을 위한 홍삼 소재 및 한약재 유래 소재의 효능 평가 (*in vitro*)

Fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 홍삼 소재에서 20% 이상의 증식률을 확인하였고, UV-B에 대한 세포보호효과 및 피부 면역 반응인자인 IL-6 와 TGF- β 발현 억제효과를 확인하여 효소처리 홍삼의 광노화에 대한 주름 개선효과를 확인함.

1-1. 피부 미백에 도움을 주는 효과

1) Protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) 및 진세노사이드가 멜라닌 생합성에 미치는 영향.

가) 마우스 멜라닌형성세포주 (Melan-a)

인삼소재 PPD 및 PPT이 melanocytes에서 melanin 생성과 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, murine melanocytes 세포주인 melan-a 세포에 각각의 검체를 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양한 세포에서 melanin contents 및 세포독성을 확인 한 결과, 대조군(control)과 비교하여 PPD 및 PPT 모두 melanin contents에는 큰 변화가 없었으나, 세포 생률도는 PPD 및 PPT 모두 농도 의존적으로 약 20%의 세포 증식을 확인하였다.

나) 사람 멜라닌형성세포주 (MNT-1)

인삼소재 ginsenoside 계열 Rh1, Rh2, Rg2, Rg3, F2 (60%) 및 F2 (98%)와 PPD 및 PPT가 human melanoma 세포주에서 melanin 생성과 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, human melanoma 세포주인 MNT-1 세포에 각각의 검체를 0.01, 0.1, 1 및 10 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양한 세포에서 melanin contents 및 세포독성을 확인한 결과는, 대조군(control)과 비교하여 ginsenoside Rh2 0.01 및 10ug/ml의 농도에서 약 20%의 세포 증식률을 보였으며, ginsenoside F2 68% 및 98%의 시료10ug/ml의 농도에서 약 40% 및 45%의 세포 독성을 보였다. PPD 및 PPT 10ug/ml의 농도에서 약 12% 및 15% melanin contents의 증가를 확인하였다.

1-2. 멜라닌형성세포와 각질형성세포의 공동배양에서 인삼소재를 처리하였을 때 melanin 생성에 미치는 영향.

인삼소재 ginsenoside 계열 Rh1, Rh2, Rg2, Rg3, F2 (60%) 및 F2 (98%)와 PPD 및 PPT가 melanocytes-keratinocytes의 co-cultures system에서 melanin 생성과 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, melanocytes 세포주인 melan-a 세포와 HaCaT 세포를 1:5의 비율로 배양하여 각각의 검체를 0.1, 1 및 10 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양한 세포에서 melanin contents를 확인 한 결과, 대조군(control)과 비교하여 PPT 0.1, 1 및 10 ug/ml의 농도에서 약 92.27 \pm 1.73%, 80.03 \pm 1.15% 및 74.96 \pm 6.12% 의 농도 의존적인 melanin contents 감소 효과를 확인하였다.

1-3. 홍삼소재의 피부 면역 (nitric oxide, IL-6)에 미치는 영향.

인삼소재 ginsenoside 계열 Rh1, Rh2, Rg2, Rg3, F2(60%) 및 F2(98%)와 PPD 및 PPT가 keratinocytes 세포주에서 NO 생성과 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, human keratinocytes 세포주인 HaCaT 세포에 각각의 검체를 0.01 및 0.1 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양하여 얻은 조건배지에서 NO와, 염증 반응에 관여 하는 Cytokine인 Interleukin-6 및 TNF- α 를 정량분석 한 결과, IL-6 와 TNF- α 의 발현은 모두 억제하여 염증

반응을 억제하는 것을 확인하였다.

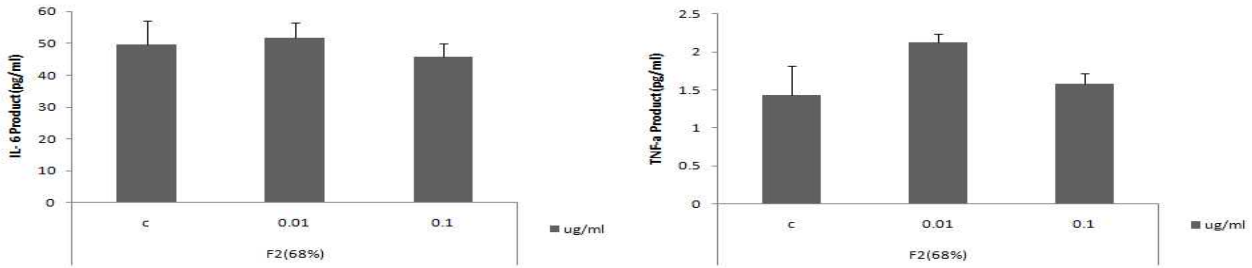


그림 1. HaCaT 세포에서 F2 를 0.01 및 0.1 ug/ml의 농도로 처리하여 염증 반응에 관여 하는 Cytokine인 Interleukin-6 과 TNF- α 의 발현량을 정량 분석한 결과.

1-4. Protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) 및 진세노사이드의 ER stress 보호 효과 및 면역 (IL-6)에 미치는 영향

인삼소제 ginsenoside 계열 Rh1, Rh2, Rg2, Rg3, F2(60%) 및 F2(98%)와 PPD 및 PPT가 Thapsigargin으로 ER stress를 유도한 keratinocytes 세포주에서 세포독성과 염증 반응에 관여 하는 Cytokine에 미치는 영향을 알아보기 위해, human keratinocytes 세포주인 HaCaT 세포에 각각의 검체를 0.01, 0.1, 1 및 10 ug/ml의 농도로 전 처리한 후 thapsigargin 0.5uM로 ER stress를 유발 하였다. 이에 인삼소제 각각의 검체가 ER stress에 대한 보호 효과가 있는 지 확인하고자 한다. 다음의 조건으로 배양하여 얻은 조건배지에서 Interleukin-6 를 정량분석 하였으며, 그 결과는 도 11과 같다. 도 10의 결과로 인삼소제 검체들의 keratinocytes 세포주의 세포생물도에 미치는 영향을 확인할 수 있다. Thapsigargin 0.5uM로 ER stress를 유발시킨 control군은 60.46 \pm 10.55%의 생물도로 normal 대조군 100.00 \pm 4.34% 대비 약40%의 세포독성을 보였고, IL-6의 생성은 normal 대조군 27.49 pg/ml이며, ER stress를 유발시킨 control군은 141.12 pg/ml으로 normal 대비 약 110pg/ml의 증가 양상을 보인다. Ginsenoside Rg2를 1ug/ml의 농도로, Ginsenoside F2 68% 0.01, 0.1 및 1ug/ml의 농도로 전처리하고 ER stress를 유발시킨 군에서는 74.10 \pm 0.09%의 세포 생물도와 86.15 \pm 0.83, 86.66 \pm 0.07 및 86.04 \pm 0.03%의 세포 생물도를 보여 ER stress를 유발시킨 대조군(control)의 생물도에 비하여 Ginsenoside Rg2 처리군은 약 14%의 증식률, Ginsenoside F2 68% 처리군은 약 26%의 증식률을 보인다. 또한 ginsenoside Rh1, Rh2, PPD 및 PPT 시료를 전처리하고 ER stress를 유발시킨 군에서는 단독으로 ER stress를 유발시킨 대조군(control) 보다 IL-6의 생성량이 억제되는 양상을 보이며, 특히 PPD 10ug/ml의 농도로 전처리하고 ER stress를 유발시킨 군에서 39.82 pg/ml 으로, ER stress를 유발시킨 대조군(control)이 141.12 pg/ml의 생성량임에 대비하여 약 101 pg/ml의 유의한 감소 양상을 보인다. 위의 결과를 토대로 PPD 화합물의 keratinocytes 세포에서 thapsigargin 으로 유발된 ER stress에 대한 보호효과를 확인하였다.

1-5. 피부 주름에 도움을 주는 효과

피부 노화는 나이가 먹어감에 따라 자연적으로 발생하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 UV, Stress, 활성산소, 화학약품 등 외부의 자극에 의해 발생하는 외인성 노화가 있다. 이중 외인성 노화는 주원인이 햇빛에 의한 노화로 광노화(photo aging)라 불린다.

주름 및 탄력감소는 피부 진피 층의 collagen 및 elastin과 관련 있으며, 탄력섬유인 collagen은 진피의 75%이상 차지하고 있어 collagen의 감소는 피부 노화와 밀접한 관계를 가진다. 특히 진피 중에는 Type I collagen 이 70%이상 차지하는 반면 type III collagen은 15%만 존재하여, 피부에서 collagen의 연구는 type I collagen의 발현을 측정함으로써 알 수 있으며, collagen은 dermal fibroblast에서 procollagen이라 불리는 전구체로 합성된다. 또한, collagen 및 elastin이 분해 되면 피부의 두께가 얇아지고 피부는 탄력을 잃게 된다.

피부의 표피 및 진피에 존재하여 피부 조직을 구성하는 조직세포인 fibroblast의 수적 감소 및 증식속도 감소, 세포사멸 등에 의해 피부 조직의 복원능력 저하가 누적 될 경우 피부조직의 손상이 일어나게 된다.

따라서, 본 연구진은 인삼사포닌 등이 fibroblast의 세포증식 활성 및 피부의 주름 및 탄력에 관여하는 collagen과 elastin의 합성 등을 평가하고, 그 결과를 바탕으로 기능성 화장품 개발의 기초자료로 사용될 수 있는지를 탐색하고 그 가능성을 밝히고자 인삼사포닌과 한약재 추출물을 가지고 Human Dermal Fibroblast 세포를 이용하여 세포증식 효과 및 관련 인자들의 생성 등을 조사하여 피부 주름 완화 및 탄력 증진 효과를 확인 하였다.

1) Protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) 및 진세노사이드가 procollagen, metalloprotease (MMP) 발현에 미치는 영향

UVB조사 및 인삼소재 PPD 및 PPT를 처리한 fibroblasts 세포주에서 주름관련 생체 지표인 MMP-1 및 MMP-3의 생성과 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, normal human dermal fibroblast 세포주인 NHDF 세포에 각각의 검체를 1, 10 및 100 ng/ml 1, 10 및 100 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양하여 얻은 조건 배지에서 MMP-1과 MMP-3를 정량분석 하였고 세포 독성을 확인 하였으며, 그 결과는 도 14 및 도 15와 같다. 도 14의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, UV를 자극하지 않은 NHDF 세포주에 PPD 처리 시 세포독성은 보이지 않으며 MMP-1 생성은 1 및 10 ng/ml의 저농도에서 감소되는 양상을 확인하였고, PPT를 처리한 군에서는 1ug/ml의 농도에서 52.43±3.71ng/ml의 생성량으로 대조군(normal) 77.99±2.23ng/ml의 생성량에 대비하여 약 25ng/ml 감소하였다. 또한 UVB 144mJ/cm²의 자극을 가한 후 PPT를 처리한 군에서도 1ug/ml의 농도에서 175.30±10.71ng/ml의 생성량으로 UVB 대조군(control) 194.61±10.70ng/ml의 생성량에 대비하여 약 19ng/ml 감소하였다. MMP-3의 생성은 역시 PPT 1ug/ml의 농도에서 UV 자극을 주지 않았을 때 112.55±6.65 ng/ml로 대조군(normal) 140.49±16.70 ng/ml의 생성량에 대비하여 약 27ng/ml 감소하였음. 세포증식, 분화에 관여 하는 cytokine인 TGF-beta1의 증가는 주름 관련 생체 지표인 procollagen type1의 생성을 자극한다고 알려져 있다. 본 실험에서 TGF-beta1은 UVB자극을 주지 않은 군 및 UVB자극을 준 군 모두에서 PPD 및 PPT 처리시 농도 의존적인 증가 양상을 보임. 특히 PPD 100ug/ml의 농도에서 대조군 대비 약 6배 이상 증가 함. 위의 결과로 보아 PPD 및 PPT는 TGF-beta1 생성을 크게 자극하며, 또한 PPT 1ug/ml는 주름 관련 생체 지표인 MMP-1 및 MMP-3를 감소 활성을 가지고 있다고 사료된다.

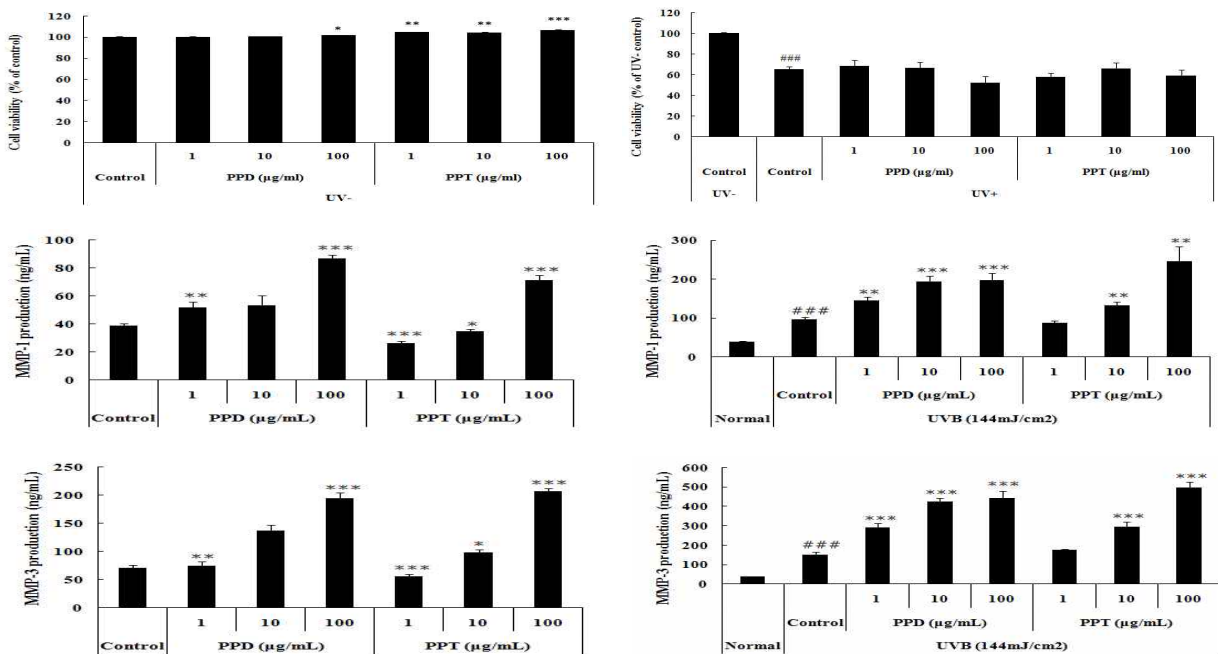


그림 2. UVB를 조사한 NHDF 세포에서 인삼유래 화합물인 PPD 및 PPT를 1, 10, 100 ug/ml의 농도로 처리하여 세포 독성, MMP-1 및 MMP-3 생성을 확인한 결과 .

2) Protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) 및 진세노사이드가 섬유아세포와 각질형성세포주 공동

배양에서 주름 (MMP-1, TGF- β 1) 및 면역 (nitric oxide, IL-1 β)에 미치는 영향

Keratinocytes-fibroblasts의 co-cultures system에서 UVB조사 및 ginsenoside F2(68%)를 처리한 후 주름관련 생체 지표인 MMP-1 및 TGF-beta1의 생성과 NO 및 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, keratinocytes 세포주인 HaCaT 세포와 fibroblast 세포주인 NHDF 세포를 1:1의 비율로 배양하여 ginsenoside F2를 0.01, 0.05 및 1 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양하여 얻은 조건배지에서 MMP-1, TGF-beta1 및 NO를 정량분석 하였고 세포 독성을 확인 하였으며, 그 결과는 도 17, 18 및 도 19와 같다. 도 16의 결과에 의하면, ginsenoside F2가 세포독성은 유발하지 않으나, UVB 자극에 의한 세포독성을 막지 않았다. NO의 생성은 ginsenoside F2 0.01ug/ml의 농도에서 UV 자극을 주지 않았을 때 23.76uM로 대조군(normal) 27.54uM의 생성량에 대비하여 약 4uM 감소하였다. 염증반응에 관여하는 cytokine인 IL-1beta와 IL-6의 생성은 위의 조건으로 배양하여 얻은 조건배지에서 정량분석 하였으며, 그 결과는 도 17 및 18과 같다. IL-1beta의 생성은 UV 자극 및 UVB 100mJ/cm², 144mJ/cm²로 자극을 주었을 때 모두 ginsenoside F2를 처리하였을 때 억제 되는 양상을 보였고, 특히 UVB 144mJ/cm²의 자극 시에는 IL-1beta의 생성이 농도 의존적으로 감소하였다. 검체 1ug/ml의 농도 처리시에는 UVB 대조군 대비 3배 이상의 감소로 가장 큰 감소 효과를 보인다. 또한 IL-6의 생성은 UVB 100mJ/cm² 및 144mJ/cm²의 처리시 UVB대조군의 1351.21pg/ml 및 1391.40pg/ml의 생성량 대비 ginsenoside F2 검체 0.01ug/ml 농도에서 1056.41pg/ml 및 1221.11pg/ml의 생성량을 보여 약 300pg/ml 및 170pg/ml의 감소를 보인다. MMP-1 생성은 UVB 144mJ/cm²의 자극을 가한 후 ginsenoside F2을 1 ug/ml의 농도로 처리한 군의 생성량이 약 150ng/ml 로써 UVB 대조군(control)의 약 200ng/ml 생성량 대비 감소하였다. 세포증식, 분화에 관여 하는 Cytokine인 TGF-beta1의 증가는 주름관련 생체 지표인 procollagen type1의 생성을 자극한다고 알려져 있다. 도 18의 결과에 따르면, TGF-beta1 은 UVB 144mJ/cm²로 자극을 준 군에서 ginsenoside F2 처리시 0.01 및 0.05ug/ml의 농도에서 100.46pg/ml 및 101.90pg/ml 생성하였고, 이는 대조군(normal) 86.42pg/ml 비하여 약 15pg/ml 증가하였다. 위의 결과로 보아 ginsenoside F2 은 NO생성을 억제하며, 염증반응에 관여하는 cytokine의 생성을 억제하는 효과가 있음을 확인 하였다. 또한 주름관련 생체 지표인 MMP-1의 생성을 억제, TGF-beta1 증가 활성을 가지고 있으므로 UVB에 의한 광노화에 대한 보호 효과 역시 확인하였다.

2. 피부 주름 개선 기능 소재 발굴을 위한 홍삼 소재 및 복합처방소재의 효능 평가 (*in vitro*)

주름개선 기능성 식품을 개발하기 위해 다양한 홍삼소재 및 복합처방소재를 이용하여 효능실험 결과

1. Fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 홍삼과 맥아를 혼합한 소재에서 20% 이상의 증식률을 확인하였고, UV-B를 조사한 경우에는 UV-B에 대한 세포보호효과 확인.
2. 효소처리 홍삼과 맥아를 혼합한 시료에서 최적의 효과를 나타내는 것으로 확인.

2-1. 피부 주름에 도움을 주는 효과

1) 섬유아세포(Fibroblast) 증식효과의 시험 결과

홍삼 및 한약재 추출물의 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 24시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 Red Ginseng의 경우는 0.01, 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 117.96 ± 2.08 , 108.67 ± 3.98 , 120.39 ± 1.38 , 111.52 ± 3.00 % 증가하는 것을 보여 세포 증식 촉진 효과가 있음을 확인하였다. 또한, Red-Ginseng Enzyme의 경우 역시, 0.01, 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 118.37 ± 4.34 , 108.45 ± 1.94 , 113.25 ± 2.71 , 125.16 ± 5.10 % 증가하는 것을 확인 하였다. 인삼과 한약재 추출물의 혼합물의 경우도 섬유아세포의 증식에 효과가 있는 것을 확인 하였다.

또한, UV B를 조사한 후 24시간 후의 섬유아세포의 세포증식률을 확인한 결과, UV B를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우는 UV B를 조사하지 않은 군에 비하여 세포증식률이 70% 정도로 감소한 반면, Red-Ginseng의 경우는 0.01, 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 93.34 ± 1.69 , 89.87 ± 5.57 , 91.54 ± 2.04 , 88.81 ± 5.20 %의 세포증식률을 나타내었다. Red-Ginseng Enzyme의 경우는 0.01, 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 91.02 ± 2.17 , 88.309 ± 3.03 , 92.07 ± 2.29 , 96.89 ± 1.68 %의 세포증식률을 나타내었으며, 한약재 추출물과의 혼합물 또한, UV B를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우 보다 세포증식에 효능이 있음을 확인 하였다.

홍삼 및 한약재 추출물을 혼합한 혼합물이 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 48시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 Red Ginseng의 경우, 120% 이상 증가하는 것을 확인하였으며, 한약재 추출물과 혼합물의 경우, Red ginseng + Forsythia의 1 : 3 및 3 : 1의 혼합비로 처리한 경우에 각각 123.31 ± 2.42 , 128.67 ± 1.71 , Red ginseng + Crataegus의 1 : 3의 혼합비로 처리한 경우에 120.83 ± 3.34 %가 증가 되어 섬유아세포의 증식에 효과가 있는 것을 확인 하였다.

홍삼 및 한약재 추출물을 혼합한 혼합물이 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 48, 72시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 Red Ginseng과 Red Ginseng Enzyme의 경우 120% 가까이 증가하는 것을 확인하였으며, 한약재 추출물과 혼합물의 경우에는 120% 이상 증식하는 것을 확인 하였다.

또한, UVB를 조사한 후 48, 72시간 후의 섬유아세포의 세포증식률을 확인한 결과, UV B를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우는 UV B를 조사하지 않은 군에 비하여 세포증식률이 70% 정도로 감소한 반면, Red Ginseng, Red Ginseng Enzyme의 경우는 10 ppm의 농도에서 80% 이상의 세포 증식률을 나타내었다. 한약재 추출물과의 혼합물 또한, UV B를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우 보다 세포증식에 효능이 있음을 확인 하였다.

2) HDF-N Cell을 이용한 피부 주름 개선 효능 실험 결과 (*in vitro*)

위의 결과들을 바탕으로 홍삼과 효소처리 홍삼 및 맥아 추출물의 혼합물이 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 48시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 홍삼의 경우는 1 ppm의 농도에서 104.11 ± 2.04 % 증가하는 것을 보였으며, 맥아의

경우 0.1 ppm의 농도에서 105.05 ± 2.20 % 증가하는 것을 확인 하였다. 또한, 효소처리 홍삼의 경우에는 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 101.25 ± 1.65 , 102.11 ± 4.19 , 108.63 ± 1.44 % 증가하는 것을 확인 하였다. 그리고, 효소처리 홍삼과 맥아 추출물의 혼합물의 경우에는 각각을 1:1의 중량비로 혼합하여 처리하였을 때 1, 10 ppm의 농도에서 107.56 ± 9.14 , 112.39 ± 5.28 %의 세포증식률이 확인되어 홍삼, 효소처리 홍삼 또는 맥아를 단독으로 처리하였을 때보다 섬유아세포의 증식에 더 효과가 있음을 확인 하였다.

72시간 후의 세포증식률을 확인한 결과에서도 홍삼 (0.1 ppm : 107.95 ± 3.04 %), 맥아 (10 ppm : 102.44 ± 4.92 %), 효소처리 홍삼 (10 ppm : 115.13 ± 2.09 %)에 비하여 효소처리 홍삼 과 맥아 추출물의 혼합물을 1: 1의 중량비로 혼합하여 처리한 것의 10 ppm의 농도에서 117.03 ± 3.37 %의 증가율을 보여 각각의 추출물을 단독으로 처리하였을 때 보다 섬유아세포의 증식에 더 효능이 있는 것을 확인 하였다.

또한, UV B를 조사한 후 48시간 후의 섬유아세포의 세포증식률을 확인한 결과, UV B를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우는 UV B를 조사하지 않은 군에 비하여 세포증식률이 75% 정도로 감소한 반면, 홍삼의 경우는 1 ppm의 농도에서 97.17 ± 2.37 % 로 나타났으며, 맥아의 경우 10 ppm의 농도에서 85.16 ± 2.87 % 로 나타났다. 또한, 효소처리 홍삼의 경우에는 1, 10 ppm의 농도에서 101.27 ± 2.15 , 114.29 ± 1.76 % 증가하는 것을 확인 하였다. 그리고, 효소처리 홍삼과 맥아 추출물의 혼합물의 경우에는 각각을 1:1의 중량비로 혼합하여 처리하였을 때 1, 10 ppm의 농도에서 105.54 ± 1.27 , 117.17 ± 2.97 %의 세포증식률이 확인되어 홍삼, 효소처리 홍삼 또는 맥아를 단독으로 처리하였을 때보다 섬유아 세포의 증식에 더 효과가 있음을 확인 하였다.

72시간 후의 세포증식률을 확인한 결과에서도 홍삼 (10 ppm : 106.01 ± 1.26 %), 맥아 (0.1 ppm : 110.03 ± 2.28 %), 효소처리 홍삼 (10 ppm : 113.85 ± 0.992 %)에 비하여 효소처리 홍삼 과 맥아 추출물의 혼합물을 1: 1의 중량비로 혼합하여 처리한 것의 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 113.11 ± 7.75 , 115.94 ± 4.29 , 119.59 ± 6.98 %의 증가율을 확인하였다. 이러한 결과는 효소처리 홍삼과 맥아 추출물의 혼합물이 자외선에 의한 피부의 손상을 예방하여 주름의 생성을 억제할 수 있는 가능성을 확인하였다.

3) 섬유아세포(Fibroblast)에서의 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 발현량 확인 결과

자외선이 피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으키게 된다. 이러한 광노화가 일어나게 되면 collagen을 합성하는 전구체인 procollagen의 양은 감소하게 되고, collagen 분해 효소인 MMP-1 등의 양이 증가하게 되어 주름이 생기며 피부 노화가 진행 되게 된다.

본 연구에서는, 섬유아세포에 UV B를 조사하여 광노화와 같은 자극을 주어 MMP-1 등의 발현을 증가시킨 후, 홍삼 및 한약재 추출물을 같은 자극을 주 MMP-1 및 Type-1 Procollagen의 발현량에 미치는 영향을 확인 하였다.

RT-PCR을 통하여 홍삼 추출물 및 한약재 추출물, 그리고 홍삼과 한약재 혼합물을 처리하여 MMP-1 및 Type-1 Procollagen의 발현량에 미치는 영향을 확인한 결과 홍삼과 한약재 추출물을 처리하였을 경우, UV B를 조사한 후, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, MMP-1의 발현은 감소시키며 Type-1 Procollagen 발현은 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다. 아래의 그림에서 Red Ginseng Enzyme + Crata. 의 경우에 MMP-1의 발현을 현저하게 감소시킴과 동시에 Type-1 Procollagen 발현은 뚜렷하게 증가시키는 것을 볼 수 있다.

이러한 결과는, 홍삼과 한약재 추출물의 혼합물이 피부의 광노화를 예방하고, 피부의 손상을 방지하는 효과가 있음을 나타낸다.

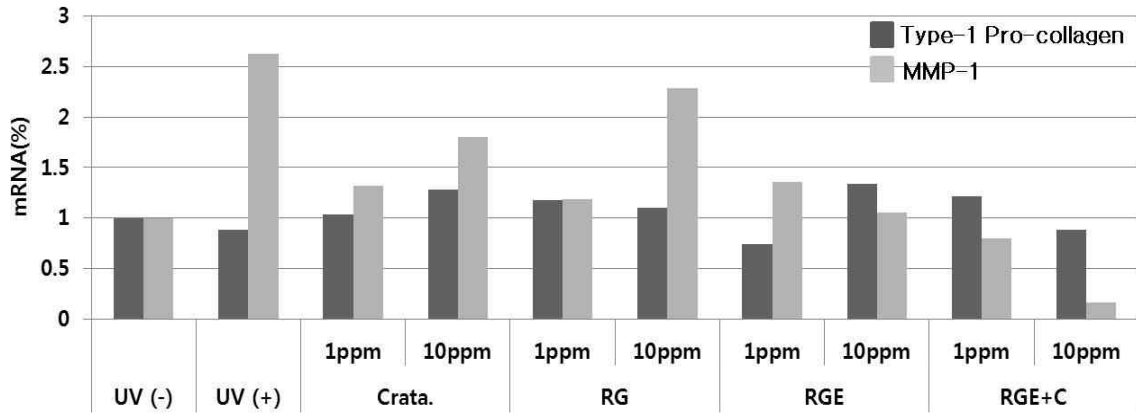
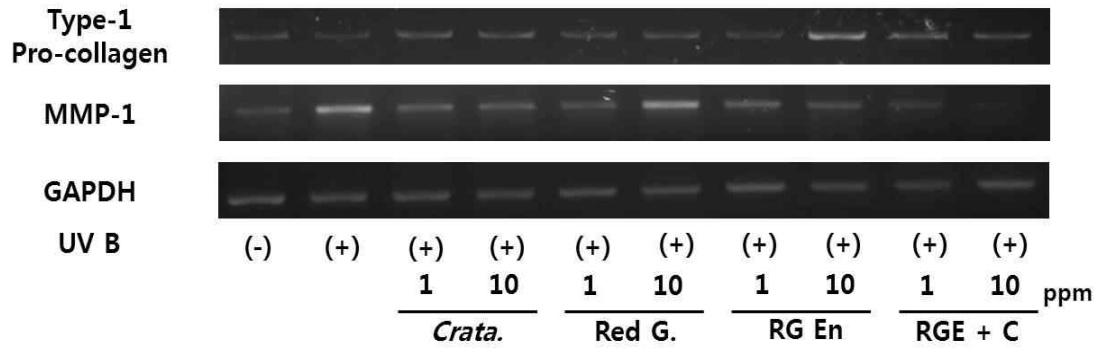


그림 3. UV B를 조사한 HDF-N 세포에서 홍삼 및 한약재 추출물을 1, 10 ppm의 농도로 처리하여 48시간 후의 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 mRNA 발현량을 확인한 결과. (Crata. : 산사 추출물, Red G : 홍삼 추출물, RG En : 효소처리 홍삼 추출물, RGE+C : 효소처리 홍삼 및 산사 혼합물)

3. *In vivo* 활성 평가: 광노화가 유도된 hairless mice 모델에서 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 피부 노화 (주름/보습) 개선 효과

주름개선 기능성 식품 개발을 위한 활성 평가를 한 결과

1. 표피층 두께는 광노화 유발로 인해 얇아진 표피가 효소처리홍삼 시료 식이공급 모든 군에서 UVB조사군 대비 눈에 띄게 얇아졌음을 확인.
2. 주름관련 지표단백질 MMP-1, procollagen type-1 및 TGF-β1의 발현에도 효소처리 홍삼군이 정상대조군 수준의 효과 확인.
3. UVB조사에 의해 감소된 수분함유량과 단백질 발현이 효소처리홍삼 0.06% 군에서 정상대조군 수준의 회복 효과 확인.
4. 광자극에 의해 두드러지는 홍반지수 및 멜라닌 생성량 역시 효소처리홍삼 0.06% 군에서 가장 크게 감소함을 확인.

3-1. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 식이효율 및 동물의 무게 변화

자외선 조사와 함께 효소처리홍삼 소재 식이 공급을 실시 한 후, 이에 따른 체중증가, 식이 섭취율 및 식이 효율에 미치는 영향을 측정한 결과, 각 군 간의 식이 효율은 크게 차이하지 않았다. 동물의 무게 역시 군 간의 큰 차이 없이 동등한 수준으로 증가하였다.

표 1. 식이구성표 (g/kg dry diet)

Group Ingredient	실험군				
	UV- (n=10)	UV+ (n=10)	RG1 (n=10)	RG2 (n=10)	RG3 (n=10)
Casein	230	230	230	230	230
L-cystine	3	3	3	3	3
Corn oil	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50	50
vitamin mix	10	10	10	10	10
mineral mix	35	35	35	35	35
Sucrose	200	200	200	200	200
Corn starch	372	372	367	362	347
효소처리 홍삼	-	-	1.5	3	6
자외선 조사 유무	무	유	유	유	유

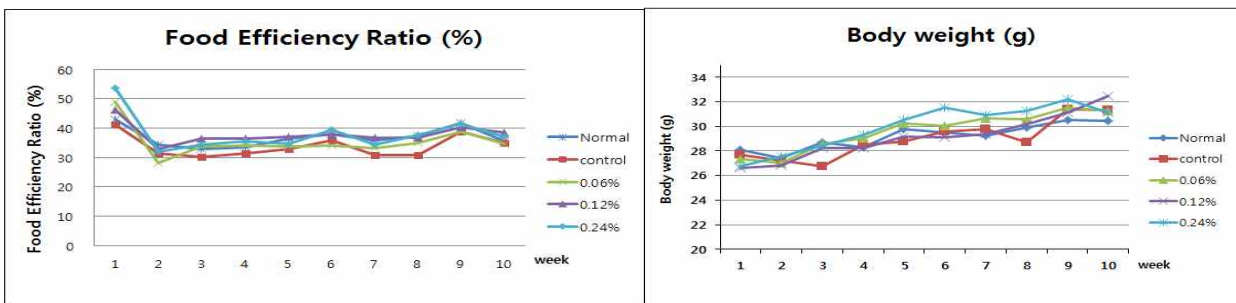


그림 4. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 홍삼 소재를 0.06, 0.12 및 0.24%의 농도로 배합한 식이 섭취 효율 및 동물의 무게를 측정한 결과.

3-2. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 표피 홍반 지수, 멜라닌 함유량 및 표피 수분 함유량 변화

자외선에 노출되면 피부에 색소침착이 일어나는데, 이는 멜라닌의 비정상적인 과잉생성의 결과이다. 멜라닌은 자외선에 대해 방어역할을 하지만 과잉생성 될 시에는 기미 등의 과색소침착의 질환으로 나타난다. 또한 피부 홍반의 정도는 피폭된 자외선에 의존하며, 보다 강한 자외선에 노출되면 홍반이 생길 뿐 아니라 통증, 부종, 수포 등도 발생할 수 있다. 본 실험에서 11주간 자외선 조사와 함께 10주간 효소처리홍삼 소재 식이 공급을 실시 한 후, 표피의 홍반 및 멜라닌 함유량의 변화를 측정 한 결과, 자외선 무처리군 대비 자외선 조사군 (UVB control)의 홍반지수 및 멜라닌 함유량이 크게 증가하였고, 홍반지수의 경우 효소처리홍삼의 식이 공급 0.06%, 0.12% 및 0.24% 군 모두 자외선 조사군 보다 감소한 것을 확인하였다. 또한 멜라닌 생성량은 효소처리홍삼 0.06%군에서 가장 큰 폭으로 감소하였다. 그 외에도 멜라닌 생성량이 효소처리홍삼의 식이 공급 0.06%, 0.12% 및 0.24% 군 모두 자외선을 조사하지 않은 정상 대조군보다 적거나 비슷한 수준으로 감소한 것을 확인하였다. 수분 함유량 역시 효소처리홍삼 소재 0.06% 함유 식이를 공급한 군에서 수분 함유량이 가장 크게 증가 되었으며, 이는 정상 대조군보다 더 높은 수준으로 나타났다. 또한 효소처리홍삼 0.12% 및 0.24% 식이 공급 군에서도 자외선 조사군 (UVB control) 보다 높은 수분 함유량을 기록하였다. 위의 결과로부터 효소처리 홍삼 소재는 적은 양의 공급만으로도 자외선 조사에 의한 피부 표피 홍반 지수개선, 멜라닌 과생성 및 피부 수분 보호에 탁월한 효과가 있는 것으로 사료된다.

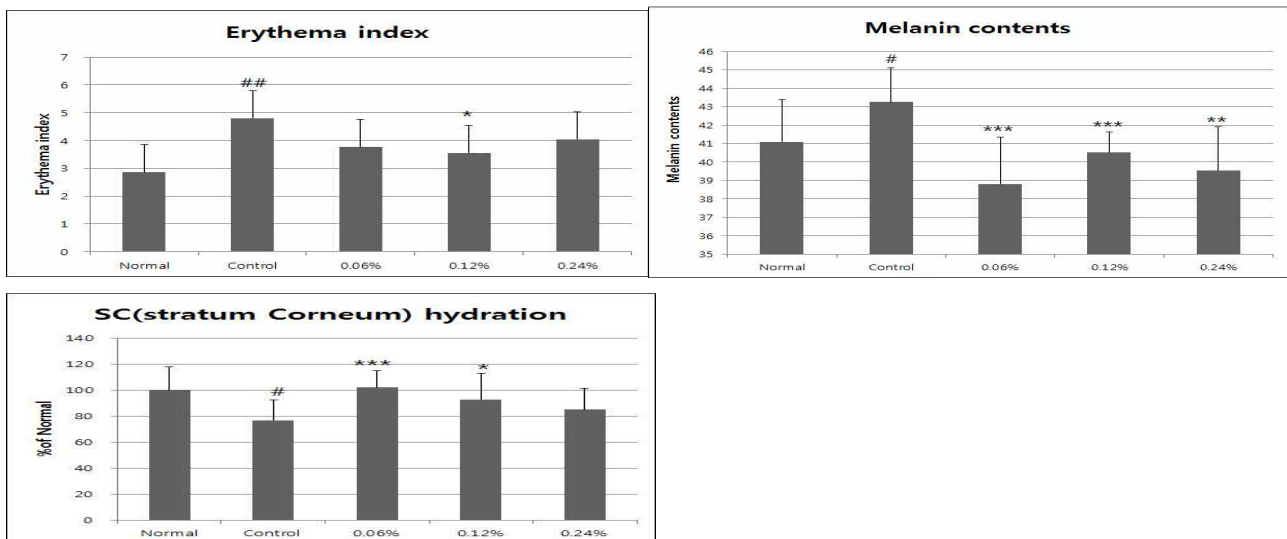


그림 5. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 홍삼 소재를 0.06, 0.12 및 0.24%의 농도로 배합한 식이 섭취 후 피부 홍반지수, 멜라닌 생성량 및 수분 보유량을 측정 한 결과

3-3. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 피부의 주름 생성 변화

11주간 자외선 조사와 함께 10주간 효소처리 홍삼 도포 후 피부의 주름형성을 관찰한 결과, 자외선을 조사UVB control군은 정상대조군에 비하여 깊고 굵은 세로 주름이 형성되었으나, 효소처리홍삼 0.06% 식이 공급 군은 정상대조군과 비슷한 수준으로 주름이 많이 형성되지 않았다. 그러나 효소처리홍삼 0.12% 및 0.24%군은 UVB조사군과 비슷하게 깊고 굵은 주름이 생성되었다.

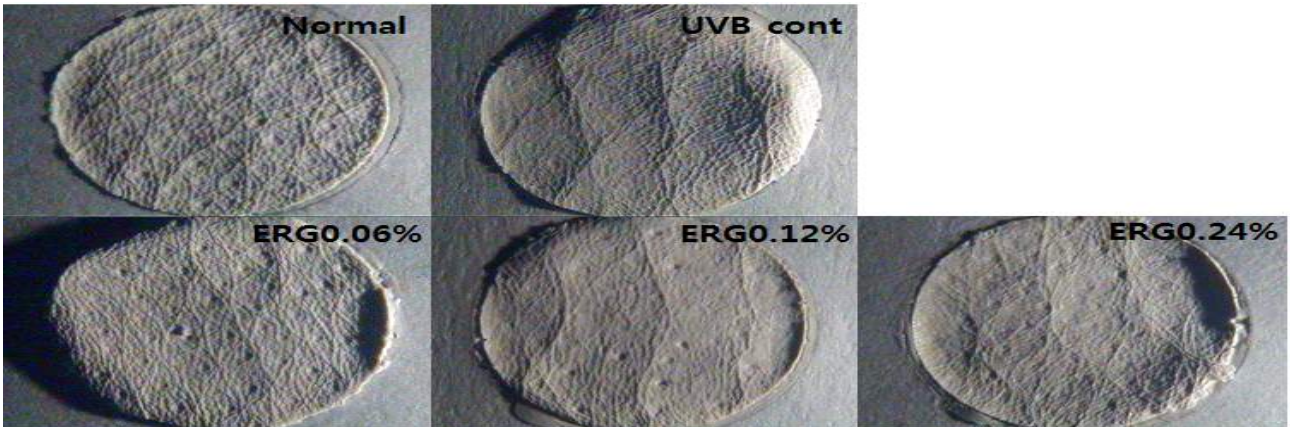


그림 6. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 홍삼 소재를 0.06%, 0.12% 및 0.24%의 농도로 배합한 식이 섭취 후 주름 형성에 미치는 효과. (Normal) 자외선 무처리군 (UVB control) 자외선 조사군 (ERGO.06%) 자외선조사+효소처리홍삼0.06% (ERGO.12%) 자외선조사+효소처리홍삼0.12% (ERGO.24%) 자외선조사+효소처리홍삼0.24%

3-4. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 표피 두께 변화

자외선 조사에 의해 피부 표피에서 각질화가 발생하며 이러한 결과로 표피의 두께는 비정상적으로 증식한다. 11주간 자외선 조사와 함께 10주간 효소처리 홍삼 도포 후 H&E 염색을 이용하여 표피 증식 변화를 확인한 결과 자외선을 조사(UVB control)군은 정상대조군(Normal)에 비하여 표피의 증식이 증가하였다. 이에 반하여 효소처리홍삼 식이 공급 군은 0.06%, 0.12% 및 0.24%의 모든 군에서 자외선 조사군 대비 표피 증식이 현저하게 감소하였으며 이는 정상 대조군과 비슷한 수준임을 확인하였다.

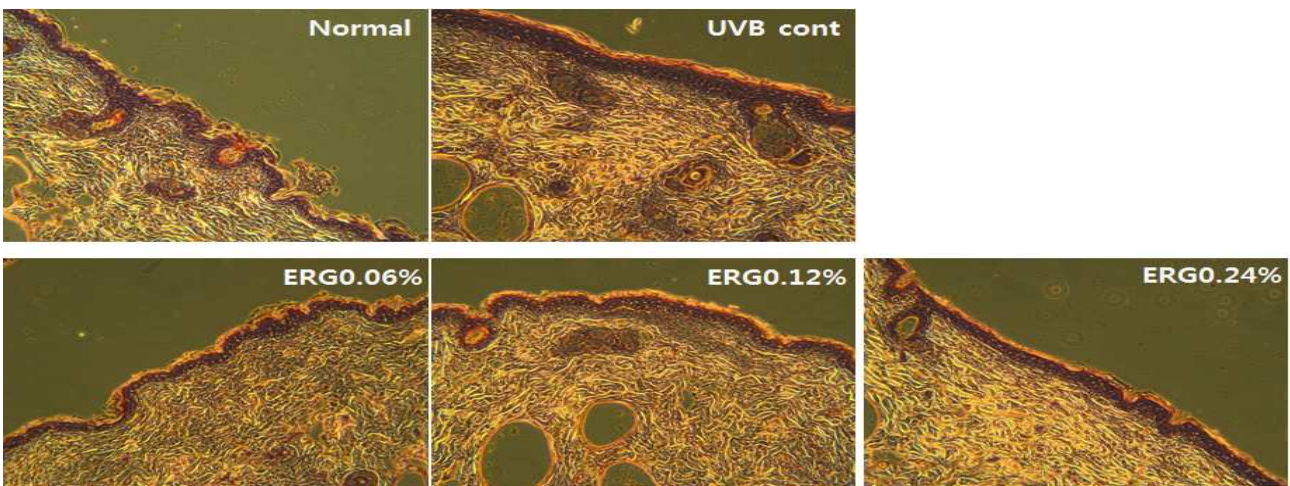


그림 7. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리홍삼 소재를 0.06% 0.12% 및 0.24% 농도로 배합한 식이 섭취 후 H&E 염색법을 이용하여 표피 두께를 관찰한 결과

3-5. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 피부 조직 내 콜라겐 변화

피부는 70%가 콜라겐(collagen)으로 이루어져 있고, 연골의 50%, 뼈의 유기물 중 80%가 콜라겐으로 이루어져 있다. 연령이 증가함에 따라 콜라겐이 점차 줄어들게 되고, 그 결과 주름이 생기며 관절과 뼈, 머리카락에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 보통 connective tissue로부터 세포를 구분하기 위하여 Masson trichrome 염색을 하면 콜라겐은 파란색으로 염색이 된다. 본 연구에서는 UVB 광노화에 유도 동물 모델에서의 피부의 콜라겐 양을 측정하기 위하여 Masson trichrome으로 염색한 결과 UVB control군에서는 normal군에 비하여 콜라겐 양이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다. 그러나 효소처리홍삼 0.06%군에서 UVB control군 대비 콜라겐 양이 가장 많이 증가하였다. 효소처리홍삼 0.12%군에서도 콜라겐 양이 증가하였으나, 효소처리홍삼 0.24%군은 콜라겐 양이 크게 증가함을 발견할 수 없었다. 이러한 결과로 바탕으로 효소처리홍삼 0.06%인 가장 저농도의 식이 공급이 자외선에 의한 콜라겐 파괴를 크게 억제하므로 광노화에 의한 피부 광노화를 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

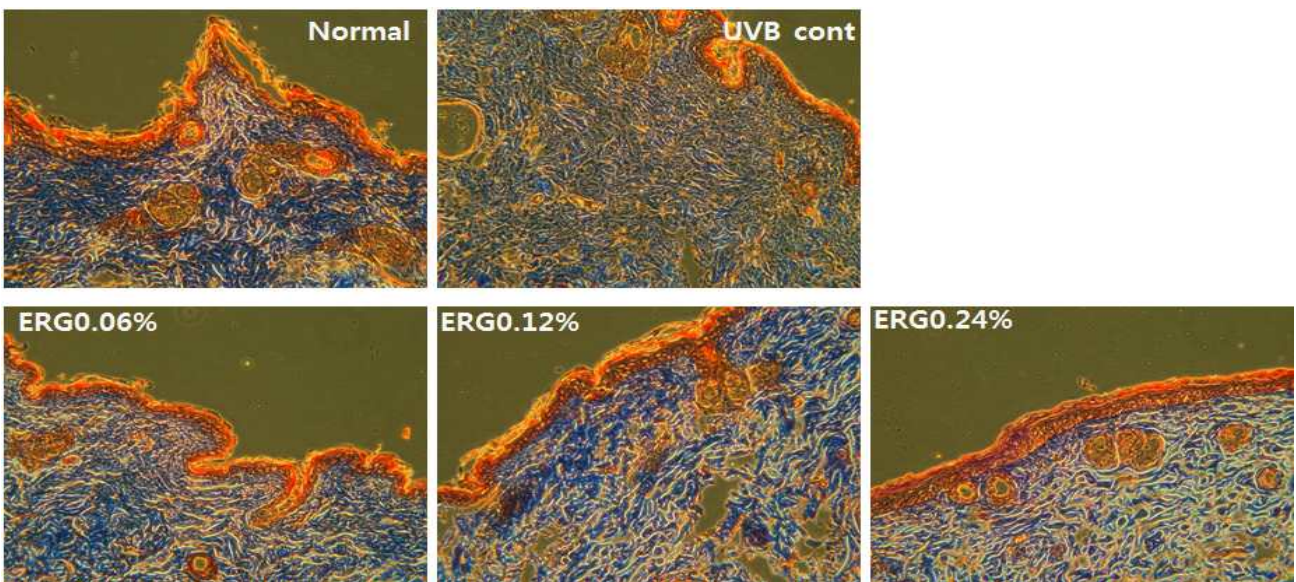


그림 8. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리홍삼 소재를 0.06% 0.12% 및 0.24% 농도로 배합한 식이 섭취 후 Masson trichrome 염색법을 이용하여 표피 두께를 관찰한 결과

3-6. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 피부 조직 내 노화관련 지표 단백질 변화

11주간 자외선 조사와 함께 10주간 효소처리홍삼 소재 식이 공급 후 취한 무모생쥐의 피부에서 노화관련 지표 단백질 변화의 발현을 확인하였다. 그 결과, 무처리군 대비 UVB control군의 MMP-1 발현은 증가하였고, procollagen type 1 및 TGF- β 1의 발현은 감소하였다. 그러나 UVB를 조사하고 효소처리홍삼 소재를 식이 공급한 군들의 MMP-1, procollagen type 1 및 TGF- β 1의 단백질 발현은 UVB control 대비 효과가 있는 것을 확인하였다. MMP-1 단백질 발현은 효소처리홍삼 0.06% 및 0.24% 식이 공급군에서 UVB control군 대비 확연하게 감소하였고, procollagen type 1 단백질 발현은 효소처리홍삼 0.12% 및 0.24% 공급군에서 UVB control군 뿐만 아니라 정상 대조군에 비하여도 확연하게 증가하였다. Procollagen type 1의 생합성에 영향을 미친다고 알려져있는 TGF- β 1의 단백질 발현은 효소처리홍삼 0.06% 함유인 가장 저 농도에서 크게 증가함을 확인 하였다. 또한 이러한 단백질 발현 양상은 UVB 무처리군 수준과 같거나 그 이상으로 회복되는 것으로 보아, 효소처리홍삼 소재의 식이 공급은 광노화에 대한 피부 보호 효과가 뛰어난 것으로 사료된다.

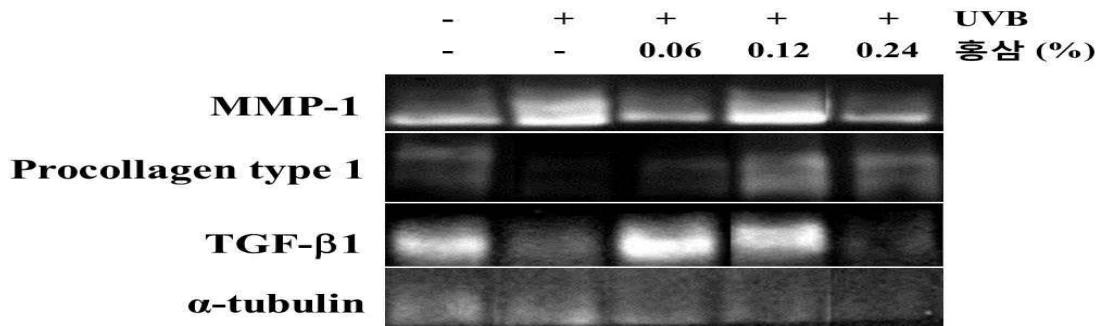


그림 9. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리홍삼 0.06%, 0.12% 및 0.24%의 농도로 함유된 소재를 식이 공급하여 피부 내 노화관련 지표 단백질의 변화를 관찰한 결과

3-7. 효소처리홍삼 식이 공급에 의한 피부 조직 내 보습관련 지표 단백질 변화

11주간 자외선 조사와 함께 10주간 효소처리홍삼 소재 식이 공급 후 취한 무모생쥐의 피부에서 보습관련 지표 단백질인 filaggrin과 그의 전구체인 profilaggrin의 발현을 피부 진피층과 표피층에서 확인하였다. 그 결과, 피부 진피층 및 표피층에서 무처리군 대비 UVB control군의 filaggrin 및 profilaggrin의 발현은 감소하였다. 그러나 UVB를 조사하고 효소처리홍삼 소재를 식이 공급한 군의 filaggrin 및 profilaggrin의 단백질 발현은 UVB control 대비 효과가 있는 것을 확인하였다. 특히 표피층에서 효소처리홍삼 0.06% 식이 공급 군에서 UVB control군 대비 filaggrin 및 profilaggrin의 발현이 가장 크게 증가하였고, 이러한 양상은 UVB 무처리 정상 대조군의 발현 수준보다 더욱 크게 나타났다. 그러나 진피층에서 filaggrin 및 profilaggrin의 발현량은 표피층의 발현량보다 전체적으로 적게 나타났다. 그럼에도 불구하고, UVB control군 보다는 filaggrin 및 profilaggrin의 발현량이 증가함을 알 수다. 위의 결과로 보아 효소처리홍삼 식이 공급은 0.06%의 가장 저 농도 수준에서 광노화에 의한 피부 건조증에 효과가 있고, 이는 보습제로 효소처리홍삼을 활용할 수 있는 근거가 된다.

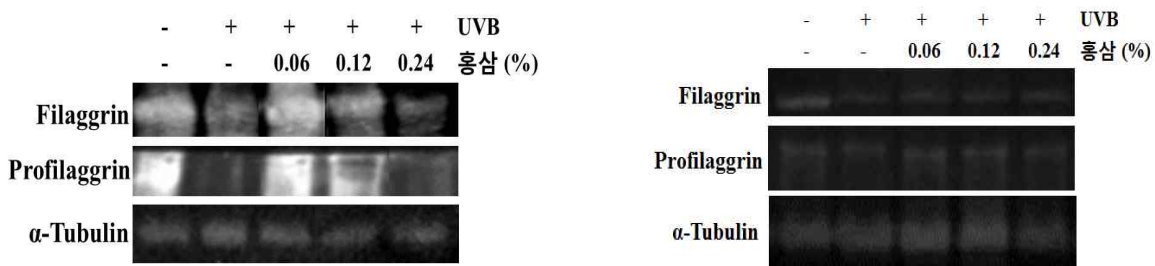


그림 10. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리홍삼 0.06%, 0.12% 및 0.24%의 농도로 함유된 소재를 식이 공급하여 피부 표피층(좌) 및 진피층(우)의 보습 관련 지표 단백질의 변화를 관찰한 결과

제 2 절 주름개선 기능성식품 소재 표준화 및 양산 조건 확립

주름개선 기능성 식품 소재의 표준화 및 양산 조건을 확인한 결과

1. 홍삼의 효소처리에 의한 뷰티진 제조공정 확립 결과

- 1-1. 홍삼분말에 효소를 첨가하여 제조하는 방법 확립.
- 1-2. Batch test를 통한 균일한 품질을 확보하였음.

2. 뷰티진의 지표성분 함량기준 설정 결과

- 2-1. 홍삼분말을 효소처리 시 PPD계 주종사포닌으로부터 생성되는 주요 전환사포닌이 진세노사이드-F2임을 확인, 지표물질로 F2를 선정
- 2-2. 지표성분인 진세노사이드-F2의 함량기준을 ① 농축액C (30°Bx 기준): 3.3 mg/g 이상, ② 엑기스분말-1: 6.3 mg/g 이상으로 설정함.

3. 주름개선 기능성 식품 임상평가용 시제품의 표준화 및 양산 조건을 확인한 결과

- 3-1. 기능성 피부미용제품(주름개선) 개발을 위한 임상효능평가용 시제품 제조를 위한 제형은 타블렛 제형으로 선정하였음.
- 3-2. 유효성분의 성인 1일 섭취량을 감안하여 750mg/Tablet로 설계하여 본품과 위약군으로 제조하였음.

1. 홍삼의 효소처리에 의한 뷰티진 제조공정

홍삼의 효소처리에 의한 뷰티진 제조공정 확립 결과

1. 홍삼분말에 효소를 첨가하여 제조하는 것이 제품화에 유리한 조건임을 확인함.
2. 뷰티진 제조공정 : p55의 그림 참조.
3. Batch test를 통한 균일한 품질을 확보하였음.

가. 재료

- 1) 40 mesh 크기의 홍삼분말(세미)
- 2) 누룩 균주로부터 분리한 효소
- 3) 말토덱스트린(Malto-dextrin)

나. 방법

- (1) 홍삼분말 1 kg에 물 10 L를 넣고 효소를 가한 후 55℃에서 24시간 반응시켰다.
- (2) 반응액을 90℃로 승온시켜 효소활성을 정지시킨 후 55℃로 방냉하고 이를 다시 10~15℃로 냉각시켰다.
- (3) 효소처리액을 원심분리하여 상정액과 침전물로 구분하였다.
- (4) 상정액을 30°Bx 농도로 감압 농축하였다. (→ 농축액A)
- (5) 침전물에 100배 양의 50% 주정을 가하고 85℃에서 4시간 동안 환류 추출한 후 여과하였다. (→ 농축액B)
- (6) 농축액A와 농축액B를 한데 합치고 30°Bx 내외가 되도록 감압 농축하였다. (→ 농축액C)
- (7) 농축액 C 에 적당량의 말토덱스트린을 첨가하고 잘 혼합한 후 분무 건조하였다.(→ BF-원료)

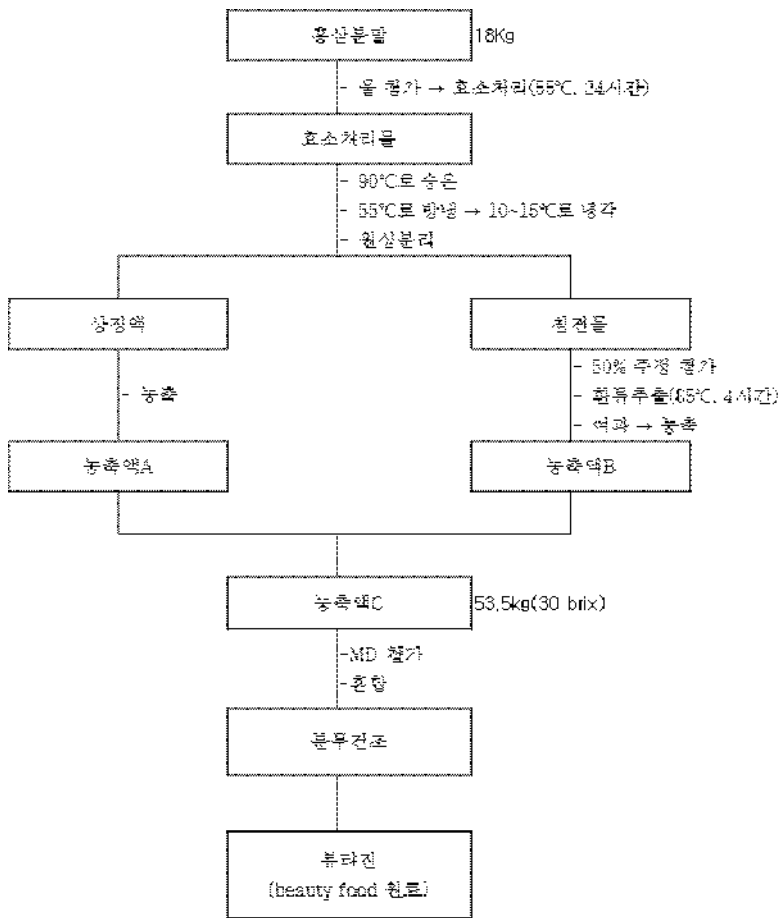


그림 11. 뷰티진 (Beauty food 원료) 제조공정 흐름도

다. 결과

1) batch 생산 결과

표 2. 공정과정에 따른 무게변화 측정 5batch

		①(kg)	②(kg)	③(kg)	④(kg)	⑤(kg)
효소반응	효소반응전	8.1692	8.1474	8.191	8.174	8.194
	효소반응후	8.1732	8.1448	8.1906	8.1454	8.162
상징액	농축 전 상징액	6.8948	7.0116	6.587	7.0062	6.9854
	농축 후 상징액	1.3264	1.4452	1.604	1.4346	1.6834
침전물	추출전(50% EtOH첨가후)	10.8326	10.2992	10.7214	10.212	10.2726
	침전물 추출 후	10.8256	10.2974	10.706	10.1434	10.2634
	농축 전 (여과 후)	7.4298	7.1918	7.9504	7.4804	8.0438
	농축 후	1.4528	1.1232	1.1976	1.121	1.4648

표 3. 공정과정에 따른 시간측정 5batch

		①(시:분)	②(시:분)	③(시:분)	④(시:분)	⑤(시:분)
상징액	원심분리	0:30	0:32	0:31	0:35	0:36
	농축	8:00	7:30	8:15	8:30	8:20
침전물	침전물추출	4:00	4:00	4:00	4:00	4:00
	70°C 여과	5:50	6:00	6:20	5:30	6:30
	농축	5:00	5:30	5:20	4:50	5:15

표 4. 공정에 따른 결과물-5batch

30 Brix 농축액(홍삼)		
Batch No.	무게 (kg)	부피 (L)
①	2.7718	2.5
②	3.0112	2.7
③	3.111	2.78
④	3.3416	3
⑤	3.3998	3.02

2) 공정 결과물에 대한 HPLC data

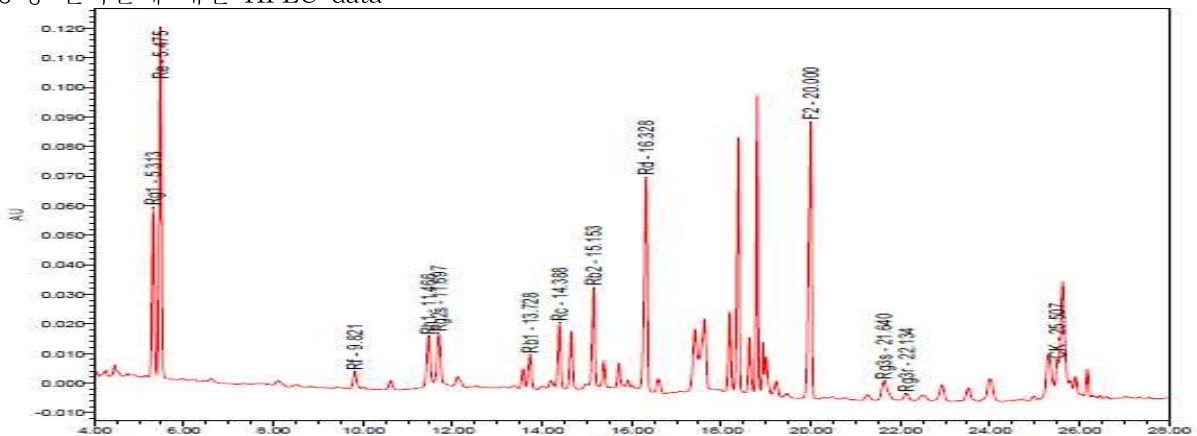


그림 12. 제조한 뷰티진의 HPLC 를 이용한 사포닌 성분 확인

진세노 사이드 Rg1, Re, Rf, Rh1, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd, F2 및 미량의 Rg3-S, Rg3-R 와 C-K를 확인

2. 뷰티진의 지표성분 함량기준 설정

뷰티진의 지표성분 함량기준 설정 결과

1. 홍삼분말을 효소처리 시 PPD계 주종사포닌으로부터 생성되는 주요 전환사포닌이 진세노사이드-F2임을 확인하고
3. 지표성분인 진세노사이드-F2의 함량기준을 ① 농축액C (30°Bx 기준): 3.3 mg/g 이상, ② 엑기스분말-1: 6.3 mg/g 이상으로 설정함.

2-1. 뷰티진의 batch별 제조방법

- 1) Lab scale 제조시험 → 5 batch 제조
 - 원재료: 홍삼분말 1 kg
 - 생산물질
 - ① 효소처리 홍삼으로부터 추출하여 제조한 농축액C (30°Bx)
 - ② 농축액C에 말토덱스트린을 첨가하고 혼합 및 분무 건조하여 제조한 뷰티진
 - ③ BF-원료를 함유하는 환(丸) 제형
 - 시험항목: 사포닌
- 2) Scale-up 제조시험 → 3 batch (Lab scale의 6배 수준)
 - 원재료: 홍삼분말 6 kg
 - 생산물질: 효소처리한 홍삼으로부터 추출하여 제조한 농축액C에 말토덱스트린을 첨가하고 혼합, 분무 건조하여 제조한 엑기스분말-1
 - 시험항목: 사포닌

2-2. 결과 및 고찰

1) 뷰티진의 batch별 사포닌 함량

*- 효소처리한 홍삼으로부터 추출하여 농축액C를 제조한 후 batch별로 사포닌 함량을 조사한 결과, 진세노사이드-F2 함량이 4.21±0.48 mg/g 수준으로 가장 높았고 진세노사이드-Rg1, -Re 및 -Rd 함량도 비교적 높았으며 PPD계 주종사포닌인 진세노사이드-Rb1 함량은 낮은 경향을 나타내었다. (표5 참조)

- 홍삼효소처리 농축액C의 사포닌 조성비는 진세노사이드-F2 (36.1%) > 진세노사이드-Re (22.3%) > 진세노사이드-Rd (11.1%) > 진세노사이드-Rg1 (10.4%) > 진세노사이드-Rb2 (4.1%) > 진세노사이드-Rg2 (3.9%) > 진세노사이드-Rh1 (3.2%) > 진세노사이드-Rg3 (3.0%) > 진세노사이드-Rc (2.3%) > 진세노사이드-Rb1 (1.9%) > 진세노사이드-Rf (1.0%) > 컴파운드-K (0.7%)의 순으로 진세노사이드-F2 조성비가 가장 높았다.

→ 이 결과는 본 연구에서 누룩 균주로부터 분리한 효소를 홍삼분말에 처리하여 반응시킬 때 사용한 조건이 PPT계 주종사포닌보다는 PPD계 주종사포닌(특히 진세노사이드-Rb1)의 분해에 더 적합하며 PPD계 주종사포닌으로부터 생성되는 주요 전환사포닌은 진세노사이드-F2임을 말해 준다.

* - 홍삼효소처리 농축액C의 Lab scale 제조 시 batch에 따른 진세노사이드-F2 함량의 변이는 CV 11%수준을 나타내었다.

→ 홍삼으로 제조한 건강기능식품의 지표성분(진세노사이드-Rg1+Rb1) 함량범위가 '표시량 80~150%'인 점을 고려할 때 홍삼효소처리 농축액C의 batch에 따른 진세노사이드-F2 함량의 변이(CV 11%)는 상당히 낮은 수준인데, 이 결과는 본 연구에서 설정한 조건으로 뷰티진을 제조할 경우, 매번 제조할 때마다 품질이 상당히 균일하게 유지될 수 있음을 말해 준다.

표 5. 홍삼효소처리 농축액C의 Lab scale 제조 시 batch별 사포닌 함량

Ginsenoside	농축액C 중 함량 (mg/g)					평균±표준편차	조성(%)
	Batch-1	Batch-2	Batch-3	Batch-4	Batch-5		
Rg1	1.16	1.21	1.18	1.30	1.23	1.21 ± 0.05	10.4
Re	2.60	2.70	2.55	2.63	2.53	2.60 ± 0.07	22.3
Rf	0.13	0.13	0.10	0.12	0.11	0.12 ± 0.01	1.0
Rh1	0.37	0.37	0.39	0.38	0.36	0.37 ± 0.01	3.2
Rg2	0.45	0.46	0.44	0.46	0.44	0.45 ± 0.01	3.9
Rb1	0.29	0.34	0.23	0.11	0.13	0.22 ± 0.10	1.9
Rb2	0.52	0.67	0.59	0.29	0.31	0.47 ± 0.17	4.1
Rc	0.27	0.39	0.37	0.15	0.14	0.26 ± 0.12	2.3
Rd	1.43	1.60	1.53	0.95	0.99	1.30 ± 0.31	11.1
Rg3	0.34	0.36	0.36	0.33	0.34	0.35 ± 0.01	3.0
Rh2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	-
F2	3.86	3.89	3.89	4.91	4.51	4.21 ± 0.48 (CV 11.1%)	36.1
CK	0.08	0.07	0.12	0.09	0.07	0.09 ± 0.02	0.7
합계	11.51	12.19	11.76	11.73	11.16	11.67 ± 0.38	100.0

2) 홍삼효소처리 엑기스분말-1의 batch별 사포닌 함량 (Scale-up 제조시험)

- 홍삼효소처리 농축액C에 일정량의 말토덱스트린을 첨가한 후 혼합, 분무 건조하여 엑기스분말-1을 제조하고 batch별로 사포닌 함량을 조사한 결과, Lab scale 제조시험의 경우와 마찬가지로 진세노사이드-Rg1, -Re, -Rd 및 -F2 함량이 높고 진세노사이드-Rb1 함량은 낮은 경향을 나타내었다. (표6 참조)

표 6. 홍삼효소처리 엑기스분말-1의 scale-up 제조 시 batch별 사포닌 함량

Ginsenoside	엑기스분말-1 중 함량 (mg/g)				조성(%)
	Batch-1	Batch-2	Batch-3	평균±표준편차	
Rg1	3.64	3.64	3.83	3.70 ± 0.11	9.2
Re	8.79	8.83	8.15	8.59 ± 0.38	21.2
Rf	0.59	0.57	0.43	0.53 ± 0.09	1.3
Rh1	1.11	1.09	1.25	1.15 ± 0.08	2.8
Rg2	1.57	1.54	1.46	1.52 ± 0.06	3.8
Rb1	2.63	2.58	1.42	2.21 ± 0.68	5.5
Rb2	4.16	3.99	3.22	3.79 ± 0.51	9.4
Rc	2.95	2.70	2.14	2.60 ± 0.41	6.4
Rd	7.69	7.66	6.81	7.39 ± 0.50	18.2
Rg3	0.95	1.08	0.92	0.98 ± 0.07	2.4
Rh2	불검출	불검출	불검출	불검출	-
F2	7.56	7.72	8.40	7.89 ± 0.45 (CV 5.7%)	19.5
CK	0.08	0.07	0.19	0.11 ± 0.07	0.3
합계	41.74	41.47	38.22	40.48 ± 1.96	100.0

- 엑기스분말C의 사포닌 조성비는 진세노사이드-Re (21.2%) > 진세노사이드-F2 (19.5%) > 진세노사이드-Rd (18.2%) > 진세노사이드-Rb2 (9.4%) > 진세노사이드-Rg1 (9.2%)의 순으로, 진세노사이드-Re 조성비가 가장 높았고 진세노사이드-F2 및 -Rd 조성비도 비교적 높았다.

- 엑기스분말C의 scale-up 제조 시 batch에 따른 진세노사이드-F2 함량의 변이는 CV 5.7% 수준을 나타내었다.

→ 이 결과는 본 연구에서 설정한 조건으로 뷰티진을 제조할 경우, 매번 제조할 때마다 품질이 매우 균일하게 유지될 수 있음을 말해 준다.

3) 뷰티진의 지표성분과 그 함량기준

가) 뷰티진의 지표성분

- 뷰티진에는 진세노사이드-F2, -Rg1, -Re 및 -Rd가 비교적 많이 함유되어 있으나, 진세노사이드 -Rg1과 -Re는 원재료(홍삼분말-세미)에 원래 함유되어 있던 PPT계 주종사포닌으로서 효소반응 과정에서 거의 분해되지 않은 성분이므로 뷰티진의 특징적인 성분이라고 보기 어려우며 진세노사이드-Rd는 원재료(홍삼분말-세미)에 함유되어 있는 PPD계 주종사포닌(예: 진세노사이드-Rb1, -Rb2 및 -Rc)이 효소반응과정에서 분해될 때 생성되는 중간물질로서 또 다른 사포닌으로 다시 전환될 가능성이 높으므로 뷰티진의 지표성분으로 설정하기에는 무리가 있다. 이에 비하여 진세노사이드-F2도 PPD계 주종사포닌으로부터 생성되는 전환사포닌이지만 그 함량이 비교적 높고 batch에 따른 함량 변이가 CV 11% (Lab scale), 5.7% (scale-up) 수준으로 비교적 적으며 선행 연구(2009) 및 과제 개시초기 탐색적연구 결과를 통하여 피부미용 효과를 일차적으로 확인한 바 있으므로 뷰티진의 지표성분으로 설정하는 것이 타당하다고 판단됨

나) 뷰티진의 지표성분 함량기준

- 농축액C의 Lab scale 제조시험 및 엑기스분말-1의 scale-up 제조시험을 통하여 얻은 batch별 진세노사이드-F2 함량 측정값의 평균에 80%를 곱하여 지표성분 함량기준으로 설정하였다. (표7 참조)
- (1) 지표성분: 진세노사이드-F2
- (2) 함량기준
 - 농축액C (30°Bx 기준): 3.3 mg/g 이상
 - 엑기스분말-1: 6.3 mg/g 이상
- (3) 시험방법: HPLC법 (건강기능식품공전 홍삼 항에 준함)

표 7. 뷰티진의 지표성분 함량기준

구분	지표성분	함량기준	비고
농축액C (30°Bx)	진세노사이드-F2	3.3 mg/g 이상	경희대 제조 (Lab scale - 5 batch)
엑기스분말-1	진세노사이드-F2	6.3 mg/g 이상	경희대 제조 (Scale-up - 3 batch)

3. 임상효능평가용 시제품제조

주름개선 기능성 식품 임상평가용 시제품의 표준화 및 양산 조건을 확인한 결과

1. 기능성 피부미용제품(주름개선) 개발을 위한 임상효능평가용 시제품 제조를 위한 제형은 타블렛 제형으로 선정하였음.
2. 유효성분의 성인 1일 섭취량을 감안하여 750mg/Tablet로 설계하여 본품과 위약군으로 제조하였음.

3-1. 시료처리 및 조제

홍삼분말에 10배량의 정제수를 첨가하여 약 2시간동안 Homo Mixer를 이용하여 혼합 후 55℃에서 24시간동안 효소처리한다. 효소처리물을 90℃로 승온 후 55℃로 방냉한 다음 10~15℃로 냉각 후 원심분리한다. 원심분리한 상징액을 농축하고 침전물에 10배량의 50% 주정을 첨가하여 85℃에서 40분간 환류추출 후 여과, 농축하여 농축액을 합한다. 농축액 동량의 말토덱스트린을 혼합 후 분무, 건조하여 원료홍삼농축액 분말로 사용한다.

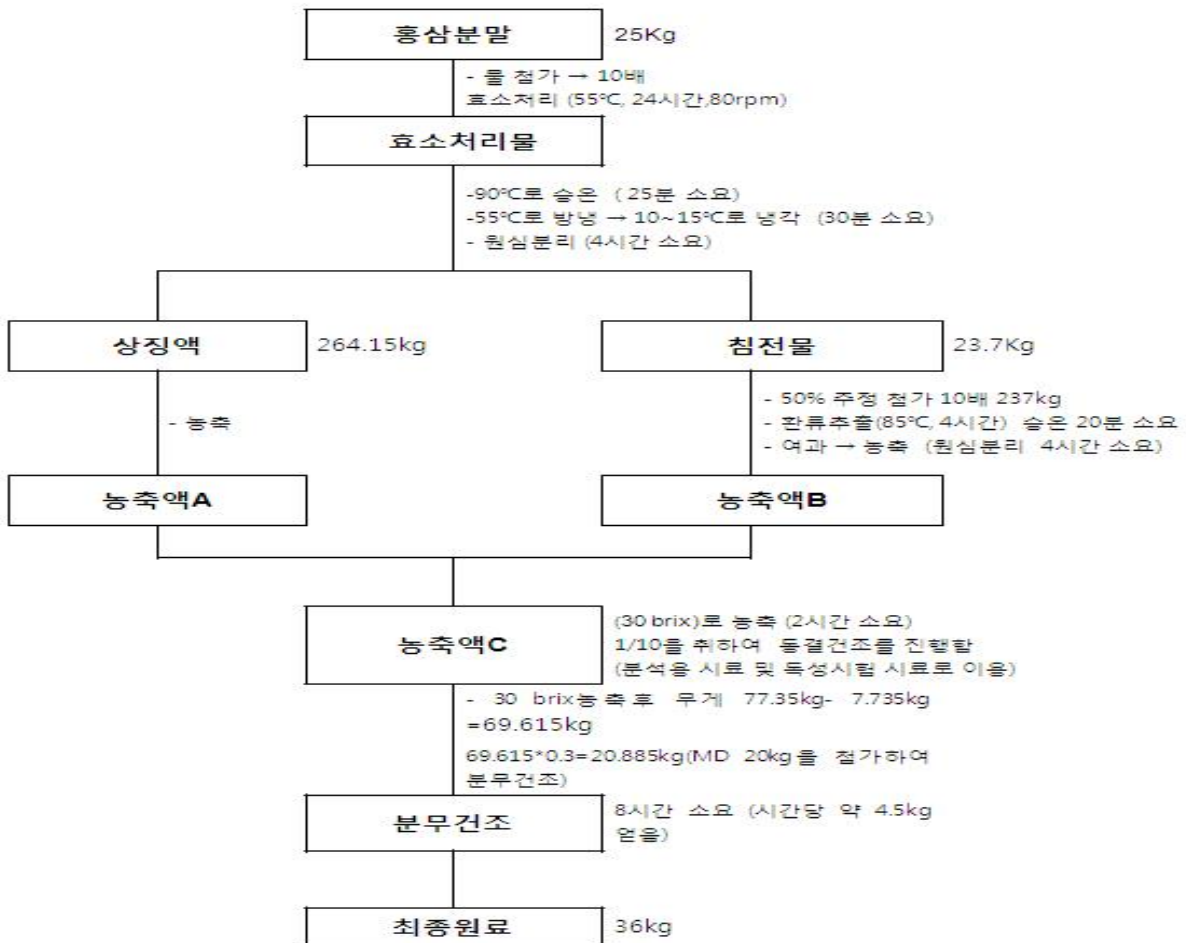


그림 13. 시료제조 공정도

3-2. 타블렛 제조(시제품)

원료 홍삼농축액분말에 결정셀룰로오스, 텍스트린, 말티톨시럽분말, 이산화규소, HPMC, 글리세린지방산에스테르를 정밀하게 칭량하여 혼합 후 70% 에탄올로 반죽하여 Speed Mixer를 통하여 과립화한다. 과립을 수분함량 5% 내외까지 건조 후 총량대비 1.5%에 해당하는 스테아린산마그네슘을 첨가, 균일하게 혼합한다. 혼합된 과립을 연속식 타정기를 이용하여 500mg타블렛을 타정하고 6 Tablet씩 PTP포장한다. PTP포장 후 흡습방지를 위하여 실리카겔팩을 동봉한 알루미늄/폴리에틸렌 접착 파우치로 60Tablet씩 포장 및 소지함 포장한다.

* Placebo(위약군)

결정셀룰로오스, 카라멜색소, 치자황색소, 유당분말, 말티톨시럽분말, HPMC, 글리세린지방산에스테르를 정밀하게 칭량한 후 혼합한다. 70% 에탄올을 이용하여 혼합 후 Speed Mixer를 이용하여 과립화한다. 과립을 수분함량 5% 이하까지 건조시킨 다음 총량대비 1.5%에 해당하는 스테아린산마그네슘을 첨가, 균일하게 혼합한다. 혼합된 과립을 연속식타정기를 이용하여 500mg 타블렛을 타정 후 6 Tablet씩 PTP 포장한다. PTP포장 후 흡습방지를 위하여 실리카겔을 동봉한 알루미늄/폴리에틸렌 접착파우치로 60 Tablet씩 포장 및 소지함 포장한다. 시험식품 및 대조식품의 배합조성을 다음과 같다.

표 8. 시험식품의 성분 구성표

	1정 중(mg)	함유율(%)
BG11001	250.0	41.7
결정셀룰로오스	88.4	14.7
텍스트린	150	25.0
말티톨시럽분말	96	16.0
스테아린산마그네슘	9	1.5
이산화규소	3.0	0.5
HPMC	3.3	0.550
글리세린지방산에스테르	0.3	0.050
합계	600.0	100.0

표 9. 대조식품의 성분 구성표

	1정 중(mg)	함유율(%)
결정셀룰로오스	210	35.0
카라멜색소	1.32	0.22
치자황색소	0.78	0.13
유당분말	331.5	55.25
말티톨시럽분말	43.5	7.25
스테아린산마그네슘	9.3	1.550
HPMC	3.3	0.550
글리세린지방산에스테르	0.3	0.05
합계	600.0	100.0



그림 14. 임상효능평가용 시제품 및 위약의 PTP 포장 모습



그림 15. 알루미늄/폴리에틸렌 접착과우치 및 최종 포장 모습

3-3. 인체시험 포장지 표시내용

본제품은 “인체적용시험용” 임

시험자번호 :

제품명 : 홍삼효소전환 복합물

원재료 및 함량 : 1정 600mg 중 홍삼효소전환 복합물 250mg, 텍스트린 등

내용량 : 600mg/정, 6정/PTP, 10PTP/Pouch, 3 Pouch + 3 PTP, 총 198정/Box

섭취방법 : 1일 3회, 1회 1정씩 아침, 점심, 저녁 식사 전에 물과 함께 드십시오.

보관방법 : 직사광선, 습기가 많은 곳을 피하여 서늘한 곳에 보관하시고 파우치 개봉 후에는 밀폐시켜 보관하세요.

제조번호 : BG11001

사용기한 : 2013년 4월 7일까지

제조원 : 한국푸드팜(주) 충북 음성군 대소면 대풍리 25-5

원료공급처 : (주)한국인삼공사 대전광역시 유성구 가정로 22

“본제품은 인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다”

4. 1개월 안정성 시험 결과

가. 보관 조건

- 40℃, 75% 상대습도 Humidity chamber에 보관

나. 수분 함량

- 초기 수분함량(3.9%)과 최종 수분함량의 (3.81%)차이가 없었으므로 1개월 경과시 안정한 양상을 관찰됨.

다. ginsenoside 함량

표 10. 임상제품의 ginsenoside 함량

시료명	시험항목		시험방법	비고
	ginsenosides	mg/g		
임상시험용 tablet	Rg1	1.29	자체 SOP	
	Re	2.04		
	Rf	0.11		
	Rh1	0.39		
	Rg2s	0.34		
	Rb1	0.29		
	Rc	0.33		
	Rb2	0.66		
	Rd	1.77		
	Rg3s	0.23		
	Rg3r	0.07		
	Rh2s	불검출		
	F2	2.56		

라. 미생물

- 1개월 경과 시, 일반세균 및 대장균시험 결과 음성으로 나타나, 안정한 결과를 보임

5. 원료 표준화

5-1. 연구범위

1차년도(2010) 연구에서 홍삼을 효소로 처리한 후 홍삼효소처리엑기스를 제조하고 적당량의 말토덱스트린을 첨가하여 잘 혼합하고 분무 건조하여 Beauty food 원료를 제조하는 방법을 도출한 바 있다.

2차년도에는 Beauty food 원료의 피부효능에 관한 임상시험용 시료를 타블렛 제형으로 조제한 후 화학 특성을 조사할 목적으로 다음 몇 가지 시험을 수행하였다.

1) 홍삼발효추출농축분말의 품질 평가

- 진세노사이드 함량: Rg1, Re, Rf, Rh1, Rg2(S), Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3(S), Rg3(R), Rh2(S), F2
- 미생물 검사: 일반세균 및 대장균군
- 중금속 함량: 납, 비소, 카드뮴 및 수은

2) 임상효능평가용 시제품(= Beauty food 원료 타블렛)의 품질 평가

- 진세노사이드 함량: Rg1, Re, Rf, Rh1, Rg2(S), Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3(S), Rg3(R), Rh2(S), F2
- 영양성분 함량: 수분, 회분, 조지방, 지방산(포화지방, 불포화지방, 트랜스지방), 콜레스테롤, 조단백질, 탄수화물, 칼로리, 나트륨, 칼슘, 철, 유리당(galactose, glucose, fructose, sucrose, lactose, maltose)
- 미생물 검사: 일반세균 및 대장균군
- 농약잔류량: Azoxystrobin 등 240종
- 중금속 함량: 납, 비소, 카드뮴 및 수은

5-2. 홍삼발효추출농축분말의 품질 평가

1) 재료

(1) 홍삼발효추출농축분말

2) 방법

(1) 진세노사이드 함량 분석

- 건강기능식품공전(2011) 중 홍삼에 적용하는 방법에 준하여 시료를 전처리한 후 한국인삼공사 분석연구팀 자체 SOP에 준하여 진세노사이드-Rg1, -Re, -Rf, -Rh1, -Rg2(S), -Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Rg3(S), -Rg3(R), -Rh2(S), -F2 등을 UPLC/PDA로 분석하였다.

(2) 미생물 검사

- 식품의 기준 및 규격 제2011-62호에 준하여 일반세균 및 대장균군을 검사하였다.

(3) 중금속 함량 분석

- 생약 등의 잔류오염물질 기준 및 시험방법(2011)에 준하여 납, 비소, 카드뮴 및 수은을 분석하였다.

3) 결과 및 고찰

(1) 홍삼발효추출농축분말의 진세노사이드 함량

- 홍삼발효추출농축분말의 진세노사이드 함량은 총 15.05 mg/g 이었는데, 이중 프로토포파낙사트리올(PPT)계 사포닌 함량이 6.20 mg/g, 프로토포파낙사디올(PPD)계 사포닌 함량이 8.85 mg/g 수준으로, PPD계 사포닌 함량이 PPT계 사포닌보다 높은 경향이였다. (표1 참조)
- 개별 사포닌 함량은 진세노사이드-F2가 3.45 mg/g로 가장 높았고 진세노사이드-Re, 진세노사이드

드-Rd, 진세노사이드-Rg1 등도 2~3 mg/g 수준으로 비교적 높은 반면에 진세노사이드-Rb1, -Rb2, -Rc 및 -Rf 함량은 낮은 경향을 나타내었다.

- 진세노사이드-F2는 PPD계 주종사포닌인 진세노사이드-Rb1, -Rb2, -Rc 또는 -Rd가 가수분해될 때 생성되는 화합물로서 3번 탄소 위치와 20번 탄소 위치에 각각 글루코스 한 분자씩 결합되어 있는 구조로 이루어져 있다.

표 11. 홍삼발효추출농축분말의 진세노사이드 함량 패턴

Ginsenoside		함량 (mg/g)
PPT계 사포닌	Rg1	2.05
	Re	2.96
	Rf	0.12
	Rh1	0.59
	Rg2	0.48
소계		6.20
PPD계 사포닌	Rb1	0.39
	Rb2	0.96
	Rc	0.81
	Rd	2.81
	Rg3	0.43
	Rh2	불검출
	F2	3.45
	소계	
전체		15.05

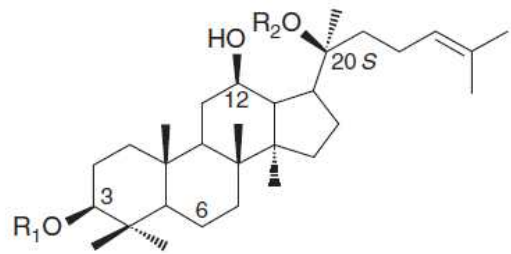


그림 16. 진세노사이드-F2의 구조 (R1 = R2 = -Glc; Christensen, 2009)

(2) 홍삼발효추출농축분말의 미생물 검사

- 홍삼발효추출농축분말의 미생물 검사 결과는 다음과 같다. 일반세균은 검출되지 않았으며 대장균군은 음성이었다.

표 12. 홍삼발효추출농축분말의 미생물 검사 결과

미생물	검사 결과
일반세균	0 cfu/g
대장균군	음성

- (3) 홍삼발효추출농축분말의 중금속 함량 ; - 홍삼발효추출농축분말의 중금속 함량을 조사한 결과 납, 비소, 카드뮴 및 수은은 모두 검출되지 않았다.

표 13. 홍삼발효추출농축분말의 중금속 함량

중금속	함량 (mg/kg)	규제기준* (mg/kg)
납 (Pb)	불검출	5 이하
비소 (As)	불검출	3 이하
카드뮴 (Cd)	불검출	0.3 이하
수은 (Hg)	불검출	0.2 이하

*생약 등의 중금속 기준 및 시험방법(2011).

5-3. 임상효능평가용 시제품(= Beauty food 원료 타블렛)의 품질

1) 재료

(1) Beauty food 원료 타블렛

- 제3 핵심과제 제3 세부과제에서 임상효능평가용 시제품으로 제조한 타블렛

2) 방법

(1) 진세노사이드 함량 분석

- 건강기능식품공전(2011) 중 홍삼에 적용하는 방법에 준하여 시료를 전처리한 후 한국인삼공사 분석연구팀 자체 SOP에 준하여 진세노사이드-Rg1, -Re, -Rf, -Rh1, -Rg2(S), -Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Rg3(S), -Rg3(R), -Rh2(S), -F2 등을 UPLC/PDA로 분석하였다.

(2) 영양성분 함량 분석

- 식품공전(2011) 방법에 준하여 수분, 회분, 조지방, 지방산(포화지방, 불포화지방, 트랜스지방), 콜레스테롤, 조단백질, 탄수화물, 칼로리 등을 분석하였다.

(3) 미생물 검사

- 식품의 기준 및 규격 제2011-62호에 준하여 일반세균 및 대장균군을 검사하였다.

(4) 농약잔류량 분석

- 식품공전(2011)에 규제기준이 명시되어 있는 잔류농약을 포함하여 한국인삼공사 안전성연구소 자체 SOP에 준하여 총 240종의 잔류농약을 분석하였다.

(5) 중금속 함량 분석

- 생약 등의 잔류오염물질 기준 및 시험방법(2011)에 준하여 납, 비소, 카드뮴 및 수은을 분석하였다.

3) 결과 및 고찰

(1) Beauty food 원료 타블렛의 진세노사이드 함량

- Beauty food 원료 타블렛의 진세노사이드 함량은 총 9.98 mg/g 이었는데, 이중 프로토파낙사트리올(PPT)계 사포닌 함량이 4.14 mg/g, 프로토파낙사디올(PPD)계 사포닌 함량이 5.84 mg/g 수준으로, PPD계 사포닌 함량이 PPT계 사포닌보다 높은 경향이였다. (표 14 참조)
- 개별 사포닌 함량은 진세노사이드-F2가 2.44 mg/g로 가장 높았고 진세노사이드-Re, 진세노사이드-Rd, 진세노사이드-Rg1 등도 1~2 mg/g 수준으로 비교적 높은 반면에 진세노사이드-Rb1, -Rb2, -Rc 및 -Rf 함량은 비교적 낮은 경향을 나타내었다.

(2) Beauty food 원료 타블렛의 영양성분 함량

- Beauty food 원료 타블렛의 영양성분 함량은 표 15에서 보는 바와 같다.

(3) Beauty food 원료 타블렛의 미생물 검사

- Beauty food 원료 타블렛의 미생물 검사 결과는 표 16에서 보는 바와 같다. 일반세균은 검출되지 않았으며 대장균군은 음성이었다.

표 14. Beauty food 원료 타블렛의 진세노사이드 함량 패턴

Ginsenoside		함량 (mg/g)
PPT계 사포닌	Rg1	1.31
	Re	2.01
	Rf	0.09
	Rh1	0.36
	Rg2	0.37
소계		4.14
PPD계 사포닌	Rb1	0.26
	Rb2	0.62
	Rc	0.46
	Rd	1.80
	Rg3	0.26
	Rh2	불검출
	F2	2.44
소계		5.84
전체		9.98

표 15. Beauty food 원료 타블렛의 영양성분 함량

영양성분	함량	칼로리
수분	4.79%	
회분	3.15%	
조지방	0.41%	
포화지방	0.00%	
지방산	불포화 지방	0.00%
	트랜스 지방	0.00%
콜레스테롤	0.00%	
조단백질	5.26%	
탄수화물	86.39%	

370.29 kcal/100g

표 16. Beauty food 원료 타블렛의 미생물 검사 결과

미생물	검사 결과
일반세균	0 cfu/g
대장균군	음성

(4) Beauty food 원료 타블렛의 농약잔류량

- Beauty food 원료 타블렛의 농약잔류량을 조사한 결과 Azoxystrobin, Bifenthrin, Boscalid, Captan, Chlorothalonil, Clethodim, Cyfluthrin, Cyprodinil, Deltamethrin, Diazinon, Dimethomorph, Fenhexamid, Fluazinam, Fluopicolide, Imidacloprid, Iprodion, Metalaxyl, Methomyl, Oxadixyl, Pyraclostrobin, Pyriproxyfen, Sethoxydim, Thiamethoxam, Trifloxystrobin, Trifluralin 등 식품공전(2011)에서 규제하고 있는 잔류농약을 포함한 240종의 잔류농약이 모두 검출되지 않았다.

(5) Beauty food 원료 타블렛의 중금속 함량

- Beauty food 원료 타블렛의 중금속 함량을 조사한 결과 납, 비소 및 카드뮴은 검출되지 않았고 수은 검출수준은 규제기준치에 비하여 매우 낮았다.

표 17. Beauty food 원료 타블렛의 중금속 함량

중금속	함량 (mg/kg)	규제기준* (mg/kg)
납 (Pb)	불검출	5 이하
비소 (As)	불검출	3 이하
카드뮴 (Cd)	불검출	0.3 이하
수은 (Hg)	0.002	0.2 이하

*생약 등의 중금속 기준 및 시험방법(2011).

제 3 절 주름개선 기능성식품 소재의 안전성 평가

효소전환 홍삼 추출물의 안전성 시험 수행 결과

1. 복귀돌연변이 시험 결과 균주의 유전자 돌연변이 유발성이 없는 것으로 판단함.
2. 소핵 시험 결과 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 판단함.
3. 염색체 이상 시험 결과 CHL/IU 세포에서 염색체이상을 유발하지 않은 것으로 판단함.
4. 단회 경구투여 시험 결과 Rat의 치사량은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단함.
5. 용량설정 근거 시험 결과 Rat 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 기인한 독성변화는 인정되지 않아, 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg, 저용량은 1,000 mg/kg 으로 설정해도 될 것으로 판단함.
6. 13주 반복경구투여 시험 결과 암수 5,000 mg/kg 용량에서 독성변화가 관찰되지 않아 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단함.

1. 효소전환 홍삼 추출물의 안전성 시험 수행 결과

1-1. 복귀돌연변이 시험 결과 요약

시험물질 효소전환 홍삼분말의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주) 및 트립토판 요구성 대장균 (WP2uvrA(pKM101) 균주)을 이용하여 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우에 대해 각각 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기위해 용량설정 시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화 비존재하의 TA100 및 TA1537균주에서는 1,250 µg/plate이상, TA1535균주에서는 5,000 µg/plate에서 관찰되었다. 대사활성화 비존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101)균주, 대사활성화 존재하의 모든 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다.

시험물질의 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였고, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

표 18. 돌연변이 유발 균주 리스트

균주명	S9, mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100, TA1537	-	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
TA1535	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
TA100, TA1535, TA1537	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

본시험의 결과, 시험 물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이 콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 효소전환 홍삼분말은 유전자 돌연변이 유발성이 없는 것으로 판단되었다.

1-2. 소핵 시험 결과 요약

시험물질 효소전환 홍삼분말의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구 투여하여 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위해 5,000, 2,500, 1,000, 500 및 250 mg/kg의 용량으로 용량 설정시험을 실시한 결과, 모든 용량에서 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본시험은 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2,500 및 1,250mg/kg의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군에는 주사용수를, 양성대조군에는 Mitomycin C를 설정하였다. 검체제작 설정 시험에서는 용량 설정 시험에서 설정된 최고 용량(5,000 mg/kg)을 투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵 유발 빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰시간대에서 소핵 유발 빈도는 증가되지 않았다. 따라서, 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 설정하였다.

시험물질 군에서는 다염성 적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵 다염성 적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 증가는 관찰되지 않았다. 또한, 총적혈구에 대한 다염성 적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 없었다. 양성대조군에서는 다염성 적혈구 중 소핵 다염성 적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 시험물질 효소전환 홍삼분말은 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

1-3. 염색체 이상 시험 결과 요약

본 시험은 시험물질 효소전환 홍삼분말의 염색체이상 유발성 유무를 검토하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 실시하였다.

세포증식억제시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화 비존재하에서는 모든 용량에서 세포증식을 50% 이상 억제하는 용량은 관찰되지 않았고, 대사활성화 존재하에서는 시험물질에 의한 세포독성은 관찰되지 않았다. 연속처리법의 대사 활성화 비존재하에서는 세포독성이 관찰되어 50% 세포증식 억제용량 (Inhibition concentration 50%: IC50)을 산출한 결과, 3518.9 µg/mL이었다. 시험물질의 침전은 모든 처리계열에서 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성화 비존재하에서는 5,000 µg/mL을 최고용량으로 하고, 5,000 µg/mL 용량에서 40% 이상의 세포증식억제가 관찰되었기 때문에 200개의 분열 중기상 세포를 관찰할 수 있는 3용량을 확보하기 위해 이하 3용량의 시험물질 군을 설정하고, 대사활성화 존재하에서는 5,000 µg/mL을 최고용량으로 설정하고 이하 2용량의 시험물질군을 설정하였다. 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서는 3,500 µg/mL을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비 존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발 작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

이상의 결과로부터 시험 조건하에서 효소전환 홍삼분말은 염색체이상을 유발하지 않은 것으로 판단된다.

1-4. 단회 경구투여 시험 결과 요약

본 시험은 시험물질인 효소전환 홍삼분말을 Sprague-Dawley 계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여시

나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다. 군구성은 시험물질 5,000mg/kg의 용량 및 대조군(주사용수)의 2군으로 하고, 암수 각각 5마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사 시켜 부검하였다. 암수 5,000mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

일반증상에 있어서, 암수 5,000mg/kg 투여군에서 투여당일에 점액변 또는 설사가 관찰되었고, 투여 후 1일에 점액변이 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에 있어서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 효소전환 홍삼분말을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

1-5. 용량설정 근거 시험 결과 요약

본 시험은 효소전환 홍삼분말을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 4주간 반복경구 투여하여, 13주 반복투여 독성시험 시 용량설정 근거로 사용하고자 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,000, 2,000 및 5,000 mg/kg 의 3개의 용량과 대조군(주사용수)의 4군으로 하고, 암수 각 군당 5마리에 4주간 경구 투여하였다. 관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중측정 및 사료섭취량 측정을 실시하고, 관찰기간 종료후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안, 암수 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 점액변이 관찰되었다. 체중변화, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서, 암수 시험물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 영향은 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사 결과, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상으로, 효소전환 홍삼분말을 4주간 반복 경구 투여한 결과, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 기인한 독성변화는 인정되지 않았다. 따라서 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg, 저용량은 1,000 mg/kg 으로 설정해도 될 것으로 판단된다.

1-6. 13주 반복경구투여 시험 결과 요약

시험은 효소전환 홍삼분말을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 13주간 반복투여시에 대한 안전성을 평가하고자 실시하였다. 시험물질은 1,000, 2,000 및 5,000mg/kg 의 3개의 용량으로 암수 각 군당 10마리에 13주간 경구 투여하였다. 또한 대조군(주사용수)을 설정하여 암수 각 10마리에 13주간 경구 투여하였다.

관찰기간 동안 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안, 암수 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.


관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 점액변, 연변 또는 설사가 관찰되었다.

체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서, 암수 시험물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사결과, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다.

이상으로, 효소전환 홍삼분말에 대한 암수 랫드를 이용한 13주 경구 반복투여 독성시험을 실시한 결과, 암수 5,000 mg/kg 용량에서 독성변화가 관찰되지 않아 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg

을 상회하는 것으로 판단된다.


 Biototech

최종보고서 (안)

효소결합 총상분말의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: B11876

㈜바이오텍스
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양정리 686-2 오창과학산업단지내

 Biototech

최종보고서 (안)

효소결합 총상분말의 포유류 배양세포를 이용한
염색제이상시험

시험번호: B11877

㈜바이오텍스
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양정리 686-2 오창과학산업단지내


 Biototech

최종보고서(안)

효소결합 총상분말의 랫드를 이용한
4주 반복 경구투여 용량결정시험

시험번호: B11874

㈜바이오텍스
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양정리 686-2 오창과학산업단지내

 Biototech

최종보고서 (안)

효소결합 총상분말의 마우스를 이용한 소액시험

시험번호: B11878

㈜바이오텍스
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양정리 686-2 오창과학산업단지내

 Biototech

최종보고서 (안)

효소결합 총상분말의 랫드를 이용한
13주 반복 경구투여 독성시험

시험번호: B11875

㈜바이오텍스
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양정리 686-2 오창과학산업단지내

제 4 절 주름개선 기능성식품 소재의 임상시험 평가

효소전환 홍삼 추출물의 인체 적용 시험 수행 결과

- 1차 유효성 평가 변수인 SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS 수치 변화에서 유의한 피부주름 개선 효능을 확인
- 2차 유효성 평가변수인 피부탄력수치의 증가를 확인하였고, 피부수분과 수분 손실량에서 위약대비 유의한 효능이 있음을 확인함.
- 만 40~60세의 임신 가능성이 없는 비수유부 여성에게서 홍삼 효소전환 분말 복합물(BG11001)을 이용하여, 피부건강(주름 개선, 탄력 회복)에 도움을 주는 “beauty food”을 이용한 인체적용시험으로 시험에 영향을 줄 수 있는 다양한 변수가 있음에도 불구하고 유의한 변화를 보여주었으므로 피부 건강에 도움을 줄 수 있는 근거로 충분할 것으로 판단됨.
- 시험기간동안 의미 있는 이상반응이 없어 장기간 복용해도 안전한 제품으로 판단됨.

1. 인체 적용 시험 수행 결과

1차 유효성 평가 변수인 SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS 수치 변화에서 BG11001군의 통계적으로 유의성 있는 차이는 시험식품인 BG11001이 피부 주름에 개선을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 또한 2차 유효성 평가변수인 피부탄력 Cutometer(R2), 피부탄력 Cutometer(R5), 피부수분(Corneometer), 경피수분손실량(Tewameter) 중 피부탄력 Cutometer (R2), 피부탄력 Cutometer (R5), 수치 변화에서 24주간의 복용에 따른 계절적 한계가 있었음에도 불구하고 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. 피부수분(Corneometer), 경피수분손실량(Tewameter)에서는 통계적으로 유의하지 않지만 24주에는 기저치와 비슷한 정도의 피부 수분 함유량 및 경피수분손실량을 보인 반면 위약군은 통계적으로 유의성 있는 급격한 수분 감소 및 수분 손실량 경향을 보였다.

결론적으로 본 연구는 만 40~60세의 임신 가능성이 없는 비수유부 여성에게서 홍삼 효소전환 분말 복합물(BG11001)을 이용하여, 피부건강(주름 개선, 탄력 회복)에 도움을 주는 “beauty food”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험으로 습도가 높고 자외선이 강한 여름에 시작하여 춥고 건조한 계절인 겨울에 종료한 점, 연령 증가에 따른 피부 노화, 운동, 평소 섭취하는 음식, 생활 환경 및 피부에 직접 도포하는 방식이 아닌 장기간 복용하여 체내흡수 및 대사를 통해 2차적으로 피부에서 그 효과를 관찰한 점 등 시험에 영향을 줄 수 있는 다양한 변수가 있음에도 불구하고 유의한 변화를 보여주었으므로 피부 건강에 도움을 줄 수 있는 근거로 충분할 것으로 판단된다. 또한 특별하거나 임상적으로 의미 있는 이상반응이 없어 장기간 복용해도 안전한 제품으로 판단된다.

1. 명칭 : 홍삼 효소전환 분말 복합물(가칭 BG 11001)을 이용하여, 피부건강 (주름개선, 탄력 회복)에 도움을 주는 “beauty food”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
2. 시험책임자 : 세명대학교부속제천한방병원 피부이비인후과 김희택 교수
3. 시험 실시기관 : 세명대학교부속제천한방병원, 충북 제천시 세명로 65번지
4. 인체적용시험의 목적 : 여성 피험자에서 홍삼 효소전환 분말 복합물(가칭 BG11001)을 1.8g/day을 6개월간 투여했을 때 피부건강(주름 개선, 탄력 회복)에 효과 및 안전성을 평가하고자 한다.

5. 시험설계 : 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
6. 피험자수 : 최종 평가가능 예수 70예(시험군: 35명, 위약군: 35명), 10% 탈락률 고려시 군당 49예
총 98예
7. 연구대상 : 만 40~60세의 임신 가능성이 없는 비수유부 여성
8. 선정기준 : 선정기준 (대상피험자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)
 - 1) 연령: 만 40세 이상 ~만 60세 미만 여성
 - 2) 이학적 검사상 눈가에 주름이 있고, global photo damage score가 2-6에 해당하는 피험자
 - 3) 현재 피부주름개선, 피부탄력증진의 목적으로 기능성 화장품을 사용하거나 건강 기능성 식품 또는 이와 유사한 제품을 복용하고 있지 않는 피험자
 - 4) 기질적 질환이 없는 건강한 피험자
 - 5) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 피험자
9. 제외기준 : 다음 어느 하나라도 해당되는 피험자는 본연구에 참여할 수 없다
 - 1) 약물 과민성 기왕력이 있는 환자
 - 2) 3개월 내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 피험자
 - 3) 심질환(심부전, 협심증, 심근경색)이 있는 피험자
 - 4) 조절되지 않는 고혈압 피험자 (> SBP 145mmHg 또는 < DBP 90mmHg)
 - 5) 약성중양, 협우각 녹내장(narrow angle glaucoma) 또는 폐질환이 있는 피험자
 - 6) 심한 신기능 장애나 간기능장애가 있는 피험자 (serum creatinine>2.0mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase >정상 상한치 \diamond 2.5)
 - 7) 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 피험자 (정신분열증, 간질, 알콜중독, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)
 - 8) 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 피험자
 - 9) 최근 3개월 이내에 경구/주사제인 스테로이드제제, 호르몬제 또는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 및 피부에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 인체시험에 참여한 경험이 있는 피험자
 - 10) 기타 금지된 치료(인슐린, 항우울제, 항세로토닌제, 바비투레이트, 항정신병약, 남용우려가 있는 약물)를 받고 있는 피험자
 - 11) 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부외형제를 1개월 이상 사용한 피험자
 - 12) 민감성, 과민성 피부를 가진 피험자
 - 13) 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 피험자
 - 14) 연구 시작 전 6개월 내에 피부박피술, 주름제거술 등을 받은 피험자
 - 15) 임신부, 수유부, 임신 계획이 있거나 적절한 피임방법 ((예)경구용 피임약, 호르몬이식, 자궁내 기구, 콘돔, 살정제) 선택에 동의하지 않는 가임 여성 피험자
 - 16) 인체시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 피험자

10. 시험식품원료명 : 홍삼 효소전환 분말 복합물(가칭 BG 11001)

11. 대조식품명 : 위약(Placebo)

12. 투여방법 및 투여기간 : 모든 약물은 아침, 점심, 저녁 총 3회 식전 1정씩 (1.8g/day), 6개월간 경구 투여한다.

13. 시험기간 : 각 피험자별 총 26주(스크리닝 2주, 약제투여기간 24주)가 소요되며 전체 약98명의 대상 피험자를 모집하는데 필요한 기간은 약 12주 이상 예상되므로, 총 인체시험 실시기간은 최초 모집 시점부터 약 36주 이상 소요될 것으로 예상된다.

14. 평가방법 :

- 유효성(efficacy)

- ① 1차 유효성 평가 (Primary endpoint): 눈가 주름의 개선 정도
기기 SV600을 이용한 눈가 주름의 개선 정도를 평가인체 적용 시험자에 의한 육안 평가 및 눈가주름 시험부위에 대한 모사판 제작, 사진 측정도 점수화 하여 피부 주름 개선 정도를 함께 평가
- ② 2차 유효성 평가 (Secondary endpoint):
 - Cutometer를 이용한 탄력개선효과 평가
 - Tewameter를 이용한 경피수분손실량 회복효과(TEWL) 평가
 - Corneometer 이용한 피부수분 개선 효과 평가

- 안전성(safety)

- 시험약제 투여 전과 투여 중, 투여 12주 후에 실험실적 검사, 활력 징후측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.

15. 결과 :

1차 유효성 평가 변수인 SV600 (R3), SV600 (R5), GPDS 수치 변화에서 BG11001군의 통계적으로 유의성 있는 차이는 시험식품인 BG11001이 피부주름에 개선을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 또한 2차 유효성 평가변수인 피부탄력 Cutometer(R2), 피부탄력 Cutometer(R5), 피부수분(Corneometer), 경피수분손실량(Tewameter) 중 피부탄력 Cutometer (R2), 피부탄력 Cutometer (R5), 수치 변화에서 24주간의 복용에 따른 계절적 한계가 있었음에도 불구하고 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. 피부수분(Corneometer), 경피수분손실량(Tewameter)에서는 통계적으로 유의하지 않지만 24주에는 기저치와 비슷한 정도의 피부 수분 함유량 및 경피수분손실량을 보인 반면 위약군은 통계적으로 유의성 있는 급격한 수분 감소 및 수분 손실량 경향을 보였다.

결론적으로 본 연구는 만 40~60세의 임신 가능성이 없는 비수유부 여성에게서 홍삼 효소전환 분말 복합물(BG11001)을 이용하여, 피부건강(주름 개선, 탄력 회복)에 도움을 주는 “beauty food”의 기능성 및 안전성을 평가하기 인체적용시험으로 습도가 높고 자외선이 강한 여름에 시작하여 춥고 건조한 계절인 겨울에 종료한 점, 연령 증가에 따른 피부 노화, 운동, 평소 섭취하는 음식, 생활 환경 및 피부에 직접 도포하는 방식이 아닌 장기간 복용하여 체내흡수 및 대사를 통해 2차적으로 피부에서 그 효과를 관찰한 점 등 시험에 영향을 줄 수 있는 다양한 변수가 있음에도 불구하고 유의한 변화를 보여주었으므로 피부 건강에 도움을 줄 수 있는 근거로 충분할 것으로 판단된다. 또한 특별히 거나 임상적으로 의미 있는 이상반응이 없어 장기간 복용해도 안전한 제품으로 판단된다.

인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서 Clinical Study Report

홍삼 효소전환 분말 복합물(BG11001)을 이용하여, 피부건강(주름 개선, 탄력 회복)에 도움을 주는 "beauty food"의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study to the efficacy and safety of "Red ginseng enzyme-treated powder complex(BG11001)" in healthy subject skin(Anti-wrinkle, elasticity)

세명대부속제천한방병원

2013 년 09 월 30 일

CONFIDENTIAL

본 최종보고서의 관련된 정보는 기밀사항입니다.
본 시험결과보고서는 대한국인삼공사와 제약사로부터의 기밀 서류입니다. 수정한다는 것은 공개적으로는 가능하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험을 보고하기 위한 심사위원회(IRB) 또는 윤리위원회에서의 사용을 제외하고는 누설하지 않겠다는 데 대한 동의가 필요합니다. IRB에게는 비밀의 유지가 요구되며, 본 기밀사항입니다. 대한국인삼공사와 제약사로부터의 동의 없이 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

Protocol No. BG11001-01
Clinical Study Report (ver1.0)

CONFIDENTIAL

 한국인삼공사

CLINICAL STUDY REPORT

인체적용시험 제목 (Study Title)	홍삼 효소전환 분말 복합물(BG11001)을 이용하여, 피부건강(주름 개선, 탄력 회복)에 도움을 주는 "beauty food"의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 제품 (Investigational Product)	홍삼 효소전환 분말 복합물(BG11001)
인체적용시험 디자인 (Study Design)	단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 책임자 (Principle Investigator)	세명대학교부속제천한방병원 한방민이비인후과 피부과 김희택 교수
인체적용시험담당자	세명대학교부속제천한방병원 강 다혜 전문수련의 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 김 용 민 책임연구원
인체적용시험 실시기관	세명대학교부속제천한방병원, 충북 제천시 세명로 65번지
연구지원기관 (Sponsor)	대한국인삼공사 대전광역시 서구 둔산동 926
의뢰자의 담당자 (Contact at Sponsor)	대한국인삼공사 조 병 구 박사
IRB 승인일 (IRB Approval Date)	최초: 2012년 06월 30일 1차변경: 2012년 08월 20일
인체적용시험 시작일 (Study Initiation Date)	2012년 07월 02일 (First patient screened)
인체적용시험 종료일 (Study Completion Date)	2013년 01월 18일 (Last patient completed)

제 3 장 주름개선 기능성 화장품 소재 및 제품의 개발

1. 주름 개선 기능성 화장품 후보 소재 활성 평가

1-1. 주름 개선 기능성 화장품 소재 활성 평가

가. 주름개선 기능성 화장품 개발에 이용된 다양한 인삼 소재 및 복합처방소재의 효능 관련 기능성 소재 탐색 결과

① Fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 인삼 소재 2종 에서 20% 이상의 증식률을 확인하였고, UVB를 조사한 경우에는 UVB에 대한 세포 보호 효과 확인하였음.

② Fibroblast에서 효소처리 인삼 소재 2종이 UVB를 조사한 후, 대조군과 비교하여 MMP-1의 발현은 감소시키며, Procollagen type-1 발현은 증가시키는 것을 확인하였음.

③ Fibroblast에서 효소처리 인삼 소재 2종이 TGF-beta1 증가 활성 확인을 통해 UVB에 의한 광노화 보호 효과가 있음을 확인함.

1-2. 주름 개선 기능성 화장품 최적 소재 활성 평가

가. 최적 소재 활성 탐색을 통하여 최적 소재를 2종을 확정하고 관련 특허를 출원함.

나. 주름개선 기능성 화장품 소재의 효능을 평가한 결과

① UVB를 조사하고 효소 처리 인삼 시료를 처리 하였을 때 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, MMP-1의 발현은 감소하나, Procollagen type 1의 발현은 영향을 미치지 않음.

② 효소 처리 인삼 시료가 collagen 생합성을 저해시키는 영향보다, collagen을 분해시키는 MMP-1의 활성을 저해시키는 효능을 나타냄으로써, 피부섬유아세포의 UVB 조사에 따른 노화에 보호 효과가 있음을 확인함.

1-3. In vivo 활성 평가: 광노화가 유도된 hairless mice 모델에 효소처리 인삼 최적 소재 도포에 의한 피부 노화 (주름/보습) 개선 효과

가. 주름개선 기능성 화장품 소재의 효능을 평가한 결과

① 표피층 두께는 광노화 유발로 인해 얇아진 표피가 효소처리 인삼 시료 식이공급 모든 군에서 UVB 조사군 대비 눈에 띄게 얇아졌음을 확인.

② 효소처리 인삼 1% 및 5% 처리군의 MMP-1 발현은 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인하였고, Procollagen type 1, TGF-β1 및 elastin의 발현은 효소처리 인삼 군에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인.

③ 단백질 발현 양상은 UVB 무처리군 수준과 같거나 그 이상으로 회복되는 것으로 보아, 효소처리 인삼의 광노화에 대한 보호 효과가 뛰어난 것을 확인.

2. 주름 개선 기능성 화장품 소재 표준화 및 제형 안정성 평가 양산 조건 확립

- 최적 소재 활성 탐색을 통하여 최적 소재를 2종을 확정하고 관련 특허를 출원 함.

- 제품을 양산하기 위하여 3회 이상의 Batch 평가를 통하여 생산되는 소재의 동등성을 확보하고 표준화와 양산시스템의 구축을 완료하고 임상평가를 위한 소재를 양산하였음.

- 표준화 최적소재에 대한 임상평가를 진행하기 위하여 최적 제형 개발조건을 확립하였음.

3. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 안전성 평가

3-1. KHY의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험 결과 개략의 치사량은 암수 모두 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.

3-2. KHY의 토끼를 이용한 피부자극시험 결과 토끼의 피부에서 자극성이 없는 것으로 판단됨.

3-3. KHY의 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과 토끼의 안에 대해서 '무자극물'로 판단된다. 또한, 안자극성에 대한 세안효과가 확인됨.

3-4. KHY의 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Maximization법) 결과 기니피그에서 감작률은 '0%'로, 감작등급은 'I'의 '매우 약함'으로 분류되어, 피부감작성이 없는 물질로 판단됨.

3-5. KHY의 기니픽을 이용한 광독성시험 결과 광독성이 없는 물질로 판단됨.

3-6. KHY의 기니픽을 이용한 광감작성시험(Adjuvant & Strip법) 결과 광감작률은 '0%'로, 감작등급은 'I'의 '매우 약함'으로 분류되어, 광감작성이 없는 물질로 판단됨.

4. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 임상시험 평가

표준화 최적소재에 대한 임상평가를 진행하기 위하여 주름 개선 활성 소재의 임상용 시제품 2종의 임상시험용 시제품(크림 type)을 제작하여 임상시험 대행 기관인 파마크로를 통하여 임상평가를 완료하였고, 인체적용시험 결과 “크림 2와 3(가칭)”는 제품 사용 12주차에서 모사판의 화장분석 결과 및 육안평가에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 이를 근거로 “크림 2와 3(가칭)”는 사용 12주 후 주름개선효과가 있음을 확인하였다.

제 1 절. 주름 개선 기능성 화장품 소재 활성 평가

- 주름개선 기능성 화장품을 개발하기 위해 다양한 인삼 소재 및 복합처방소재를 이용하여 효능 관련 기능성 소재를 탐색한 결과

1. Fibroblast 증식효과 실험 결과 효소처리 인삼 소재 2종 에서 20% 이상의 증식률을 확인하였고, UVB를 조사한 경우에는 UVB에 대한 세포보호 효과 확인하였음.
2. Fibroblast에서 효소처리 인삼 소재 2종이 UVB를 조사한 후, 대조군과 비교하여 MMP-1의 발현은 감소시키며, Procollagen type-1 발현은 증가시키는 것을 확인하였음.
3. Fibroblast에서 효소처리 인삼 소재 2종이 TGF-beta1 증가 활성 확인을 통해 UVB에 의한 광노화 보호 효과가 있음을 확인함.

1. 주름 개선 기능성 화장품 소재 활성 탐색 결과

1-1. 주름 개선 기능성 화장품 소재 활성 평가

가. HDF-N Cell을 이용한 피부 주름 개선 효능 실험 결과

피부 노화는 나이가 먹어감에 따라 자연적으로 발생하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 UV, Stress, 활성산소, 화학약품 등 외부의 자극에 의해 발생하는 외인성 노화가 있다. 이중 외인성 노화는 주원인이 햇빛에 의한 노화로 광노화(photo aging)라 불린다.

주름 및 탄력감소는 피부 진피 층의 collagen 및 elastin과 관련 있으며, 탄력섬유인 collagen은 진피의 75%이상을 차지하고 있어 collagen의 감소는 피부 노화와 밀접한 관계를 가진다. 특히 진피 중에는 Type I collagen 이 70%이상 차지하는 반면 Type III collagen은 15%만 존재하여, 피부에서 collagen의 연구는 Type I collagen의 발현을 측정함으로써 알 감소는 며, collagen은 Dermal Fibroblast에서 procollagen이라 불리는 전구체로 합성된다. 또한, collagen 및 elastin이 분해되면 피부의 두께가 얇아지고 피부는 탄력을 잃게 된다.

피부의 표피 및 진피에 존재하여 피부 조직을 구성하는 조직세포인 Fibroblast의 수적 감소 및 증식속도 감소, 세포사멸 등에 의해 피부 조직의 복원능력 저하가 누적 될 경우 피부조직의 손상이 일어나게 된다.

따라서, 본 연구진은 인삼사포닌 등이 Fibroblast의 세포증식 활성 및 피부의 주름 및 탄력에 관여하는 collagen과 elastin의 합성 등을 평가하고, 그 결과를 바탕으로 기능성 화장품 개발의 기초 자료로 사용될 수 있는지를 탐색하고 그 가능성을 밝히고자 인삼사포닌과 한약재 추출물을 가지고 Human Dermal Fibroblast 세포를 이용하여 세포증식 효과 및 관련 인자들의 생성 등을 조사하여 피부 주름 완화 및 탄력 증진 가능성을 탐색 하였다.

1) 섬유아세포(Fibroblast) 증식효과의 시험 결과

인삼 및 한약재 추출물의 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 24시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 Ginseng의 경우는 0.01, 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 117.88 ± 0.35 , 115.64 ± 3.01 , 115.74 ± 5.97 , $116.13 \pm 1.21\%$ 증가하는 것을 보여 세포 증식 촉진 효과가 있음을 확인하였다. 또한, Ginseng Enzyme의 경우 역시, 0.01, 0.1, 1, 10 ppm의 농도에서 122.25 ± 2.02 , 113.73 ± 1.03 , 113.47 ± 1.04 , $112.24 \pm 1.85\%$ 증가하는 것을 확인 하였다. 인삼과 한약재 추출물의 혼합물의 경우도 섬유아세포의 증식에 효과가 있는 것을 확인 하였다.

또한, UVB를 조사한 후 24시간 후의 섬유아세포의 세포증식률을 확인한 결과, UVB를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우는 UVB를 조사하지 않은 군에 비하여 세포증식률이 70% 정도로 감소한 반면, Ginseng의 경우는 0.01, 0.1 ppm의 농도에서 102, 101%의 세포증식률을 나타내었다. Ginseng Enzyme의 경우는 0.01 ppm의 농도에서 105%의 세포증식률을 나타내었으며, 한약재 추출물과의 혼합물 또한, UVB를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우 보다 세포증식에 효능이 있음을 확인 하였다.

인삼 및 한약재 추출물을 혼합한 혼합물이 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 48시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 Ginseng의 경우 110% 이상, Ginseng Enzyme의 경우 120% 가까이 증가하는 것을 확인하였으며, 한약재 추출물과 혼합물의 경우도 섬유아세포의 증식에 효과가 있는 것을 확인 하였다.

또한, UVB를 조사한 후 48시간 후의 섬유아세포의 세포증식률을 확인한 결과, UVB를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우는 UVB를 조사하지 않은 군에 비하여 세포증식률이 70% 정도로 감소한 반면, Ginseng의 경우는 10 ppm의 농도에서 106%의 세포증식률을 나타내었다. Ginseng Enzyme의 경우는 10 ppm의 농도에서 115%의 세포증식률을 나타내었다. 한약재 추출물과의 혼합물 또한, UVB를 조사한 후 시료를 처리하지 않은 대조군의 경우 보다 세포증식에 효능이 있음을 확인 하였다.

인삼 및 홍삼 그리고 한약재 추출물을 혼합한 혼합물이 인간 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 시행한 결과, 48시간 후 세포증식률은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 인삼과 한약재 추출물을 혼합한 경우에 120% 이상 증가하는 것을 확인하였으며, 한약재 추출물을 단독으로 처리하였을 때 보다 세포증식률이 더 증가한 것을 확인 하였다.

2) 섬유아세포(Fibroblast)에서의 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 발현량 확인 결과

자외선이 피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으키게 된다. 이러한 광노화가 일어나게 되면 collagen을 합성하는 전구체인 Procollagen의 양은 감소하게 되고, collagen 분해 효소인 MMP-1 등의 양이 증가하게 되어 주름이 생기며 피부 노화가 진행 되게 된다.

본 연구에서는, 섬유아세포에 UVB를 조사하여 광노화와 같은 자극을 주어 MMP-1 등의 발현을 증가시킨 후, 인삼 및 한약재 추출물을 처리하였을 때 MMP-1 및 Type-1 Procollagen의 발현량에 미치는 영향을 확인 하였다.

RT-PCR을 통하여 인삼 추출물의 MMP-1 및 Type-1 Procollagen의 발현량에 미치는 영향을 확인한 결과 인삼 추출물을 처리하였을 경우, UV B를 조사한 후, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, MMP-1의 발현은 감소시키며 Type-1 Procollagen 발현은 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다. 아래의 그림에서 Ginseng Enzyme의 경우에 MMP-1의 발현을 현저하게 감소시킴과 동시에 Type-1 Procollagen 발현은 뚜렷하게 증가시키는 것을 볼 수 있다.

이러한 결과는, 인삼 추출물이 피부의 광노화를 예방하고, 피부의 손상을 방지하는 효과가 있음을 보여 준다.

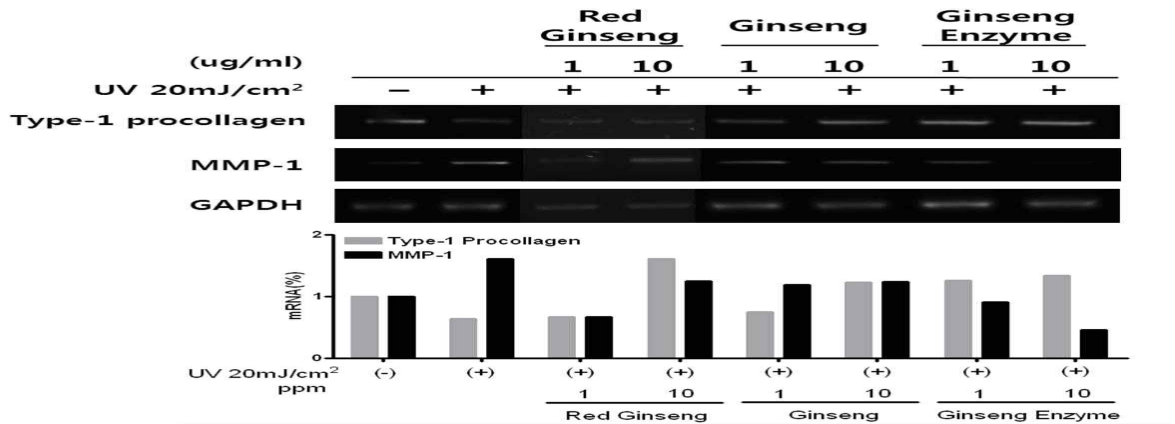


그림 17. UVB를 조사한 HDF-N 세포에서 홍삼, 인삼 및 한약재 추출물을 1, 10 ppm의 농도로 처리하여 48시간 후의 Type-1 Procollagen 및 MMP-1의 mRNA 발현량을 확인한 결과. (Red Ginseng. : 홍삼 추출물, Ginseng : 인삼 추출물, Ginseng Enzyme : 효소처리 인삼 추출물)

3) 동물 모델 실험을 위한 최적 시료 탐색을 위하여 Human Fibroblast 세포주인 NHDF cell에 인삼 enzyme 시료를 처리하였을 때 세포독성, 주름관련 지표 MMP-1 및 TGF-beta1에 미치는 영향

In vivo 동물 모델 실험을 위한 최적 시료 탐색을 위하여 UVB조사 및 인삼 enzyme을 처리한 Fibroblasts 세포주에서 주름관련 생체 지표인 MMP-1의 생성과 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해, Normal Human Dermal Fibroblast 세포주인 NHDF 세포에 검체를 1, 10 및 50 ug/ml의 농도로 처리한 후 배양하여 얻은 조건배지에서 MMP-1를 정량분석 하였고 세포 독성을 확인 하였다. 도 20의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, UV를 자극하지 않거나 UVB를 자극한 NHDF 세포주에 인삼 enzyme 처리 시 세포 생률도에는 큰 영향을 미치지 않았다. MMP-1 생성은 UVB 144mJ/cm²의 자극을 가한 후 인삼 enzyme을 처리한 군에서 UVB 대조군(control) 대비 감소하는 양상을 보였고, 특히 50ug/ml의 농도에서 135.03±13.23ng/ml의 생성량으로 UVB 대조군(control) 143.63±48.65ng/ml의 생성량에 대비하여 약 8ng/ml 감소하였다. 세포증식, 분화에 관여 하는 cytokine인 TGF-beta1의 증가는 주름관련 생체 지표인 Procollagen type1의 생성을 자극한다고 알려져 있다. 본 실험에서 TGF-beta1 은 UVB 자극을 주지 않은 군 및 UVB 자극을 준 군에서 인삼 enzyme 처리 시 1 및 10ug/ml의 농도에서 농도 의존적으로 증가하였다. 위의 결과로 보아 인삼 enzyme은 주름관련 생체 지표인 MMP-1의 생성을 억제, TGF-beta1 증가 활성을 가지고 있으므로 UVB에 의한 광노화에 대한 보호 효과가 있다고 사료된다.

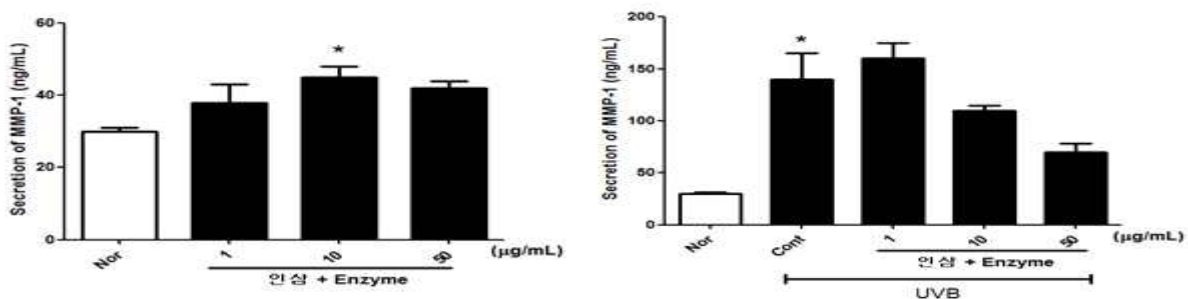


그림 18. NHDF 세포에서 효소 처리한 인삼 시료를 1 및 10 ug/ml의 농도로 처리하여 세포 독성, MMP-1 및 TGF-beta1 생성을 확인한 결과.

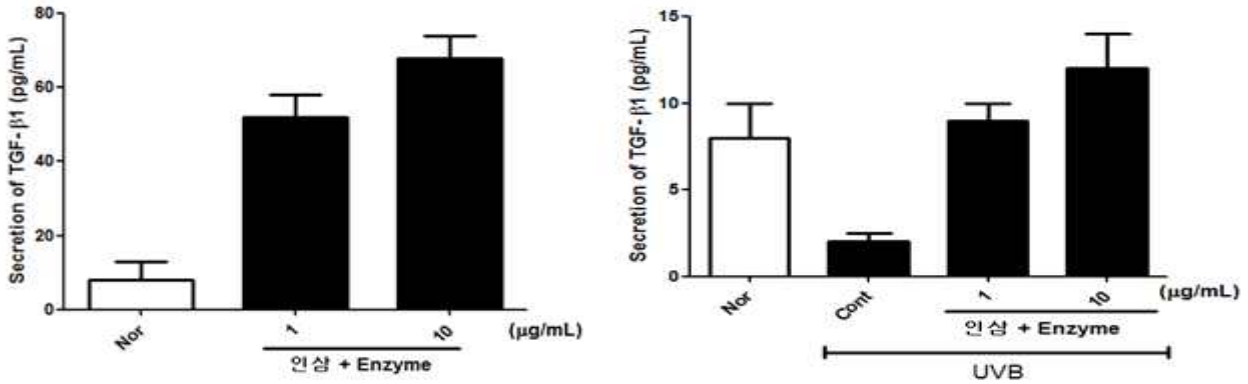


그림 19. TGF-beta1 은 UVB 자극을 주지 않은 군 및 UVB 자극을 준 군에서 인삼 enzyme 처리시 1 및 10ug/ml의 농도에서 농도 의존적으로 증가하였음.

1-2. 주름개선 기능성 화장품 소재 활성 평가

주름개선 기능성 화장품 소재의 효능을 평가한 결과

1. UVB를 조사하고 효소 처리 인삼 시료를 처리 하였을 때 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, MMP-1의 발현은 감소했지만, Procollagen type 1의 발현은 영향을 미치지 않음을 확인.
2. 효소 처리 인삼 시료가 collagen 생합성을 저해시키는 영향보다, collagen을 분해시키는 MMP-1의 활성을 저해시키는 효능을 나타냄으로써, 피부섬유아세포의 UVB 조사에 따른 노화에 보호 효과가 있음을 확인함.

가. Normal Human Dermal Fibroblasts 세포인 NHDF 단일 배양에서 UVB 조사 및 효소처리 인삼을 처리하였을 때 세포독성 및 주름관련 지표 MMP-1 및 TGF-beta1 등의 생성에 미치는 영향

주름 및 탄력감소는 피부 진피 층의 collagen 및 elastin과 관련 있으며, 탄력섬유인 collagen은 진피의 75%이상 차지하고 있어 collagen의 감소는 피부 노화와 밀접한 관계를 가진다. collagen 및 elastin이 분해 되면 피부의 두께가 얇아지고 피부는 탄력을 잃게 된다. 특히 진피 중에는 Type I collagen 이 70%이상 차지하는 반면 Type III collagen은 15%만 존재 한다. 따라서 피부에서 collagen의 연구는 Type I collagen의 발현을 측정함으로써 알 수 있으며, collagen은 Dermal Fibroblast에서 Procollagen이라 불리는 전구체로 합성된다. 세포증식, 분화에 관여 하는 cytokine인 TGF-beta1의 증가는 주름관련 생체 지표인 Procollagen Type1의 생성을 자극한다고 알려져 있다.

또한 자외선이 피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으키게 된다. 이러한 광노화가 일어나게 되면 collagen을 합성하는 전구체인 Procollagen의 양은 감소하게 되고, collagen 분해 효소인 MMP-1 등의 양이 증가하게 되어 주름이 생기며 피부 노화가 진행 되게 된다.

피부의 표피 및 진피에 존재하여 피부 조직을 구성하는 조직세포인 Fibroblast의 수적 감소 및 증식속도 감소, 세포사멸 등에 의해 피부 조직의 복원능력 저하가 누적 될 경우 피부조직의 손상이 일어난다고 알려져 있다.

따라서, 본 연구팀은 Fibroblast에 UVB를 조사하여 광노화와 같은 자극을 주어 광노화의 지표인 MMP-1의 생성을 증가시키고, Procollagen Type1의 합성을 저해 시키는 피부 광노화 모델을 확립하였다. 이후 UVB조사 in vitro모델에서 효소 처리 인삼 시료 처리에 따른 fibroblast에 미치는 영향을 확인

하고 관련 지표들의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

즉, Normal Human Dermal Fibroblast 세포인 NHDF를 배양하여 검체를 처리하고 얻은 배지에서 MMP-1 및 Procollagen Type 1의 생성량을 확인한 결과 UVB를 조사하고 효소 처리 인삼 시료를 처리하였을 때 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, MMP-1의 발현을 감소시켰다. 그러나 Procollagen Type 1의 발현은 영향을 미치지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 효소처리 인삼 시료는 세포 독성에 큰 영향을 미치지 않음을 확인 하였다.

이러한 결과로 효소 처리 인삼 시료가 collagen 생합성을 저해시키는 영향보다, collagen을 분해시키는 MMP-1의 활성을 저해시키는 효능을 나타냄으로써 피부섬유아세포의 UVB 조사에 따른 노화에 보호 효과가 있음을 확인 하였다.

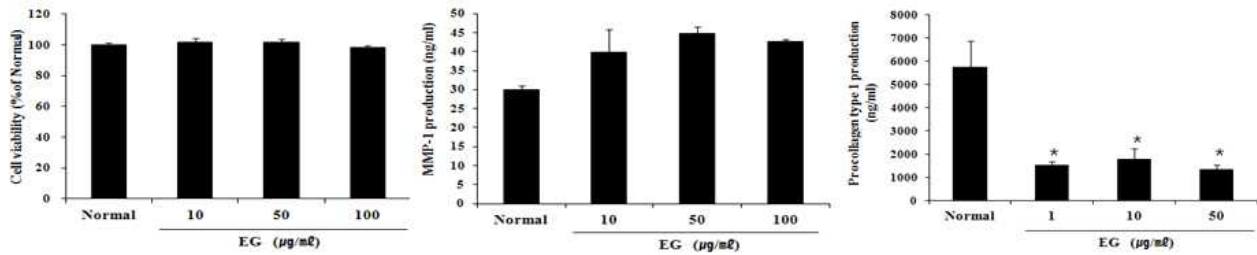


그림 20. NHDF 세포에서 효소처리 인삼 소재를 10, 50 및 100 ug/ml의 농도로 처리하여 세포 증식, MMP-1 생성 및 Procollagen type 1의 생성을 확인한 결과

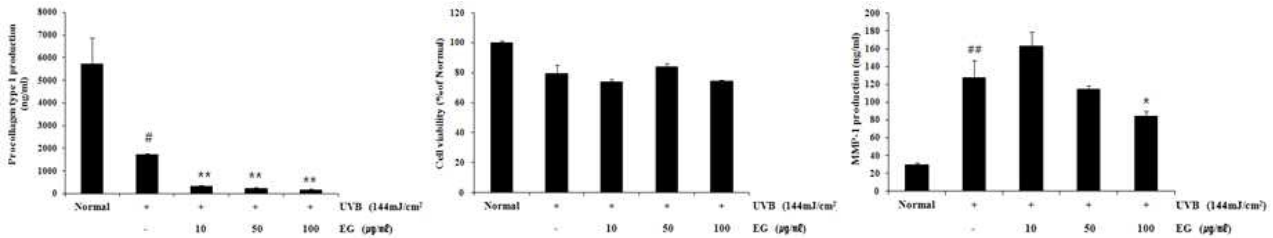


그림 21. NHDF 세포에서 UVB를 144mJ/cm²조사한 후 효소처리 인삼 소재를 10, 50 및 100 ug/ml의 농도로 처리하여 세포 증식, MMP-1 생성 및 Procollagen type 1의 생성을 확인한 결과

1-3. In vivo 활성 평가: 광노화가 유도된 hairless mice 모델에 효소처리 인삼 최적 소재 도포에 의한 피부 노화 (주름/보습) 개선 효과

주름개선 기능성 화장품 소재의 효능을 평가한 결과

1. 표피층 두께는 광노화 유발로 인해 얇아진 표피가 효소처리 인삼 시료 식이공급 모든 군에서 UVB 조사군 대비 눈에 띄게 얇아졌음을 확인.
2. 효소처리 인삼 1% 및 5% 처리군의 MMP-1 발현은 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인하였고, Procollagen type 1, TGF-beta1 및 elastin의 발현은 효소처리 인삼 군에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인.
3. 단백질 발현 양상은 UVB 무처리군 수준과 같거나 그 이상으로 회복되는 것으로 보아, 효소처리 인삼의 광노화에 대한 보호 효과가 뛰어난 것을 확인.

가. 효소처리 인삼 도포에 의한 표피 수분 함유량 변화

3주간 효소처리 인삼을 피부 도포에 따른 체중증가, 식이 섭취율 및 식이 효율에 미치는 영향을 측정 한 결과, 각 군간의 통계적인 유의성은 관찰할 수 없었다. 3주간의 시료 도포 후 정상대조군 UV-군의 수분 보유량이 자외선 조사군인 UV+군을 비롯한 모든 실험군에 비해 높았다. 자외선 조사와 함께 효소처리 인삼 1%, 5% 및 positive control로 사용된 retinyl palmitate 1%의 시료 도포 군들은 UVB control 군에 비해 높아진 것으로 보아 보습 증진의 효과가 확인되었으며, 특히 효소처리 인삼 5% 처리군은 positive control에 대비하여도 보습 증진 효과가 더욱 뛰어난 것으로 확인되었다.

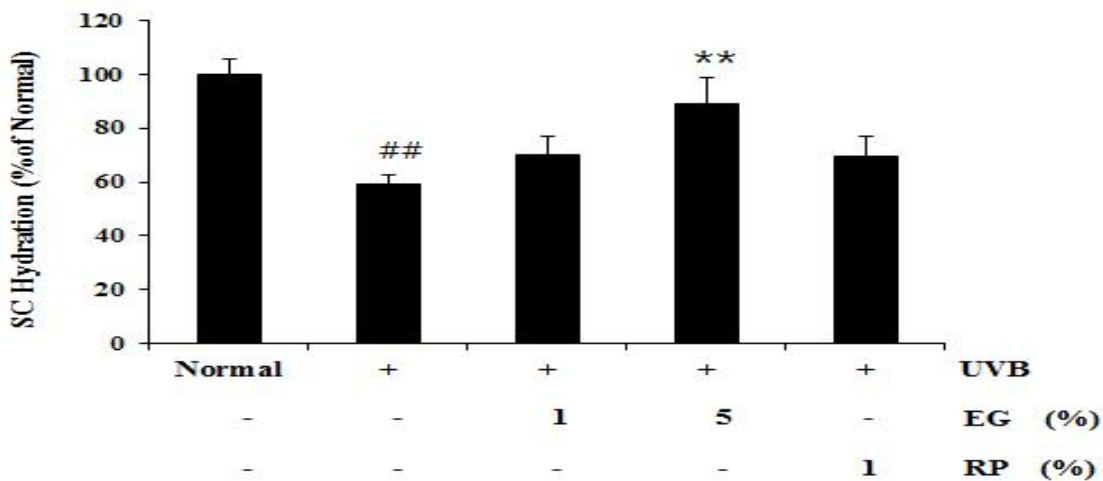


그림 22. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 인삼 소재를 1 및 5%의 농도로 처리하여 수분 보유량을 측정한 결과

나. 효소처리 인삼 도포에 의한 피부의 주름 생성 변화

4주간 자외선 조사와 함께 3주간 효소처리 인삼 도포 후 피부의 주름형성을 관찰한 결과, 자외선을 조사 UVB control군은 정상대조군에 비하여 굵은 세로 주름이 형성되었고, 시료 처리에 따라 굵은 세로주름은 상대적으로 감소되었으나 그 효과는 positive control인 retinyl palmitate보다는 우수한 효과를 나타내지 못함을 확인하였다.

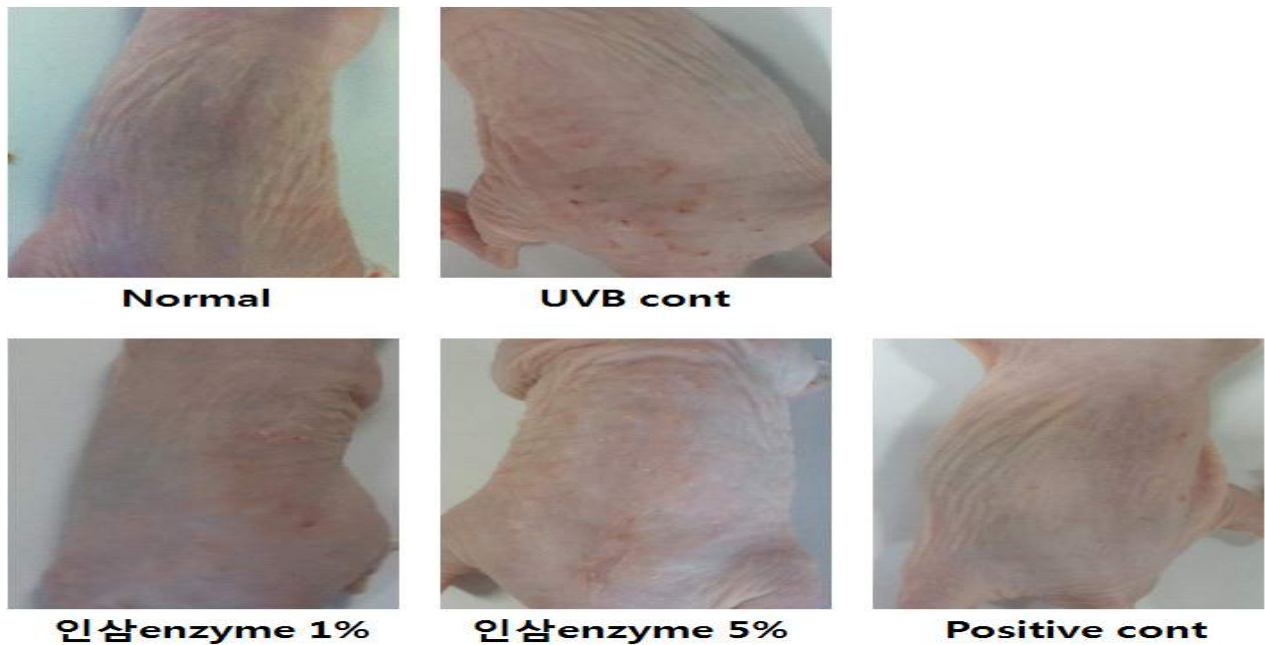


그림 23. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 인삼 소재를 1% 및 5%의 농도로 처리하여 주름 생성을 확인한 결과

다. 효소처리 인삼 도포에 의한 표피 두께 변화

4주간 자외선 조사와 함께 3주간 효소처리 인삼 도포 후 H&E 염색을 이용하여 표피 증식 변화를 확인한 결과 자외선을 조사(UV+)군은 정상대조군에 비하여 표피의 증식이 증가하였으나, 이에 반하여 시료 처리 군은 표피 증식이 정상 대조군과 비슷한 수준으로 감소하는 것으로 나타났다.

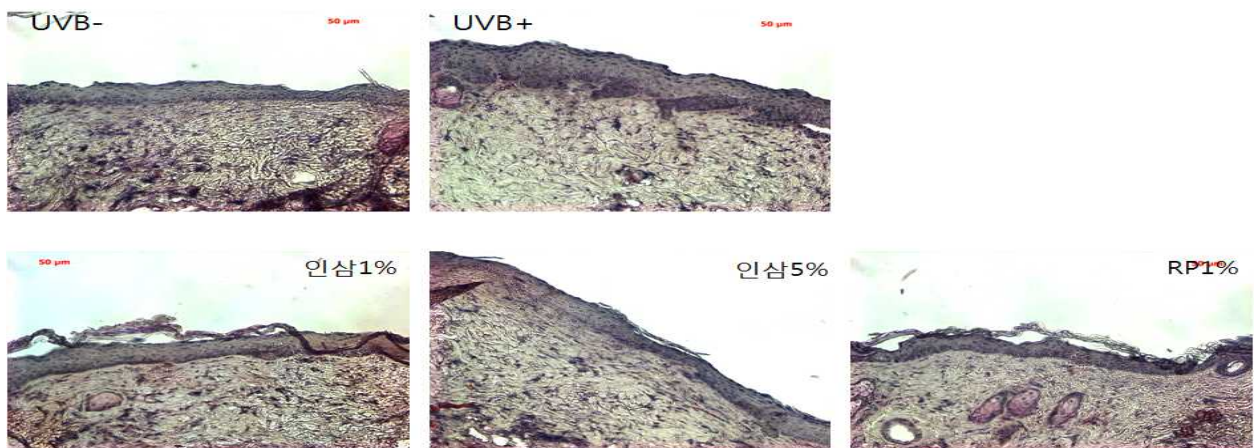


그림 24. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 인삼 소재를 1 및 5%의 농도로 처리하여 표피 두께를 관찰한 결과

라. 효소처리 인삼 도포에 의한 피부 조직 내 콜라겐 변화

피부는 70%가 콜라겐(collagen)으로 이루어져 있고, 연골의 50%, 뼈의 유기물 중 80%가 콜라겐으로 이루어져 있다. 연령이 증가함에 따라 콜라겐이 점차 줄어들게 되어 주름이 생기며, 콜라겐의 감소는 관절과 뼈, 머리카락에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 보통 connective tissue로부터 세포를 구분하기 위하여 Masson trichrome 염색을 하면 콜라겐은 파랑색으로 염색이 된다. 본 연구에서는 UVB 광노화에 유도 동물 모델에서의 피부의 콜라겐 양을 측정하기 위하여 Masson trichrome으로 염색한 결과 UVB control군에서는 normal군에 비하여 콜라겐 양이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였고, 특히 효

소처리 인삼 5%군은 Positive control 군인 retinyl palmitate군과 비슷한 수준으로 콜라겐 함량이 회복 되는 것을 확인할 수 있었다.

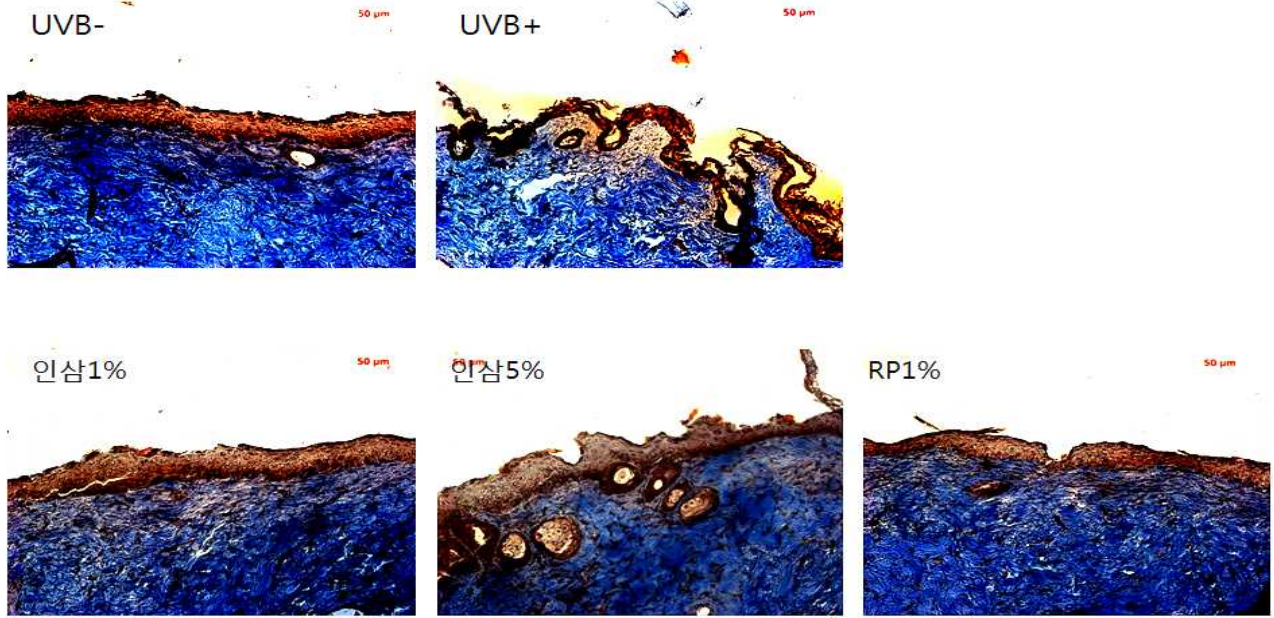


그림 25. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 인삼 소재를 1 및 5%의 농도로 처리하여 피부 조직 내 콜라겐 변화를 관찰한 결과

마. 효소처리 인삼 도포에 의한 피부 조직 내 노화관련 지표 단백질 변화

4주간 자외선 조사와 함께 3주간 효소처리 인삼 도포 후 취한 무모생쥐의 피부에서 노화관련 지표 단백질 변화의 발현을 확인하였다. 그 결과, 무처리군 대비 UVB control군의 MMP-1 발현은 증가하였고, Procollagen type 1, TGF-beta1 및 elastin의 발현은 감소하였다. 그러나 효소처리 인삼 1% 및 5% 처리군의 MMP-1 발현은 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인 하였고, Procollagen type 1, TGF-beta1 및 elastin의 발현은 효소처리 인삼군에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 이러한 단백질 발현 양상은 UVB 무처리군 수준과 같거나 그 이상으로 회복되는 것으로 보아, 효소처리 인삼의 광노화에 대한 보호 효과가 뛰어난 것으로 사료된다.

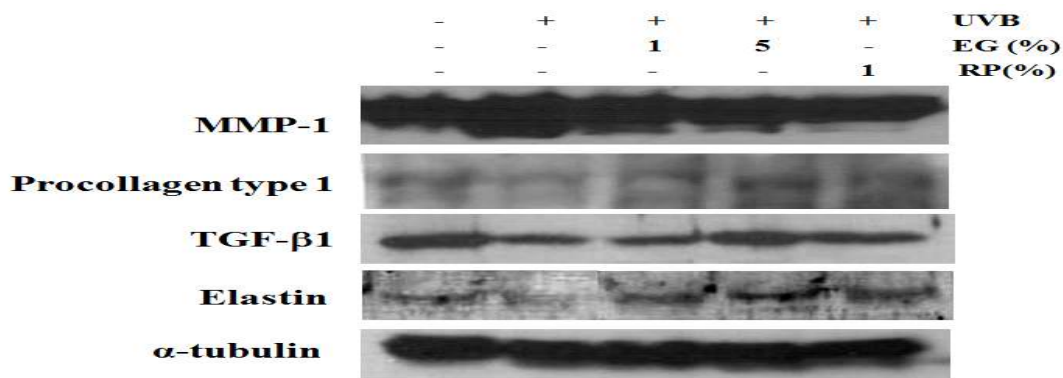


그림 26. UVB를 조사한 광노화 무모생쥐에 효소처리 인삼 소재를 1 및 5%의 농도로 처리하여 피부 내 노화관련 지표 단백질의 변화를 관찰한 결과

제 2 절 주름개선 기능성 화장품 소재 표준화 및 양산 조건 확립

주름개선 기능성 화장품 소재 표준화 및 양산 조건

- 최적 소재 활성 탐색을 통하여 최적소재를 2종을 확정하고 관련 특허를 출원 함.
- 제품을 양산하기 위하여 3회 이상의 Batch 평가를 통하여 생산되는 소재의 동등성을 확보하고 표준화와 양산시스템의 구축을 완료하고 임상평가를 위한 소재를 양산하였음.

1. 제품 시료에 대한 F2와 C-K의 함량 및 성분 분석(LC-Mass)

1-1. 소재의 성분 LC-MS 분석 결과

-인삼소재에 함유 되어있는 사포닌은 Rg1, Re, R1, Rc, Rd, F1, F2, C-K이며 3회의 반복 시험에서 모두 동일한 결과를 보여 주었으므로 이는 매번 제조 할 때마다 품질이 고르게 나타나고 있음을 확인할 수 있었음.

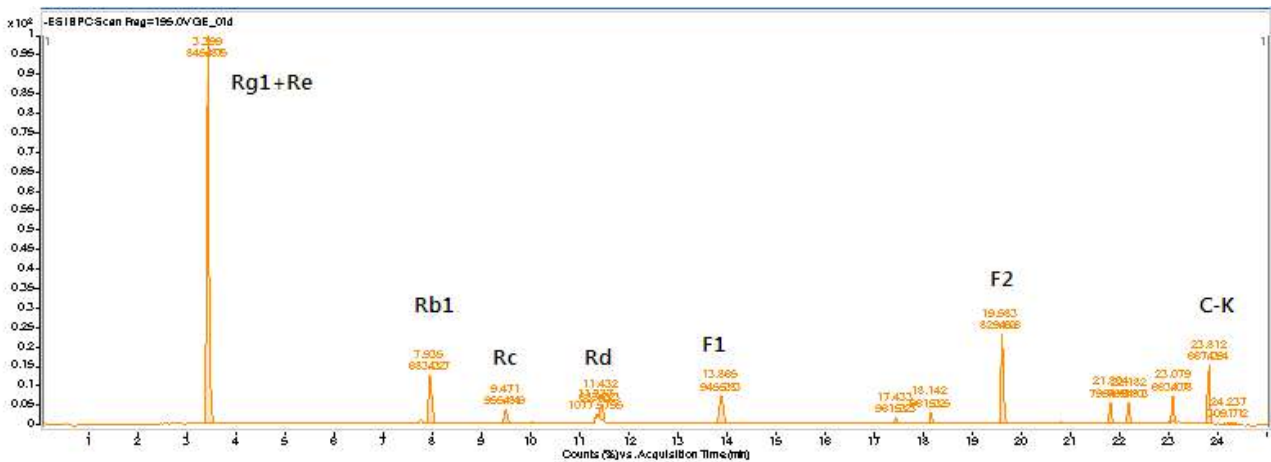


그림 27. 주름개선 기능성 화장품 소재의 LC-MS 분석 data

1-2. 미량 사포닌 F2와 C-K의 함량분석

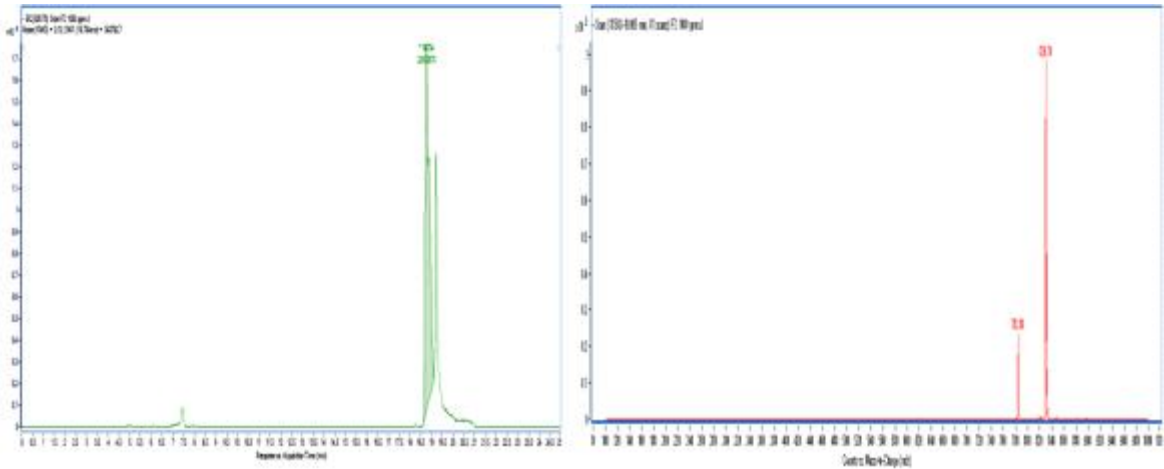


그림 28. F2 standard 분자량 및 peak 면적 측정(1000ppm). 좌: EIC(829.70) 우: m.w (829.70)

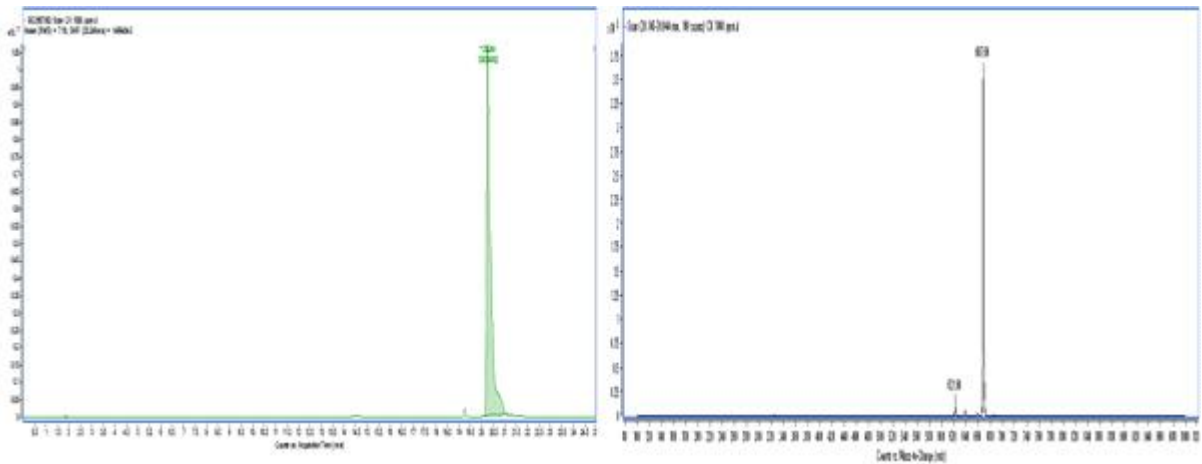


그림 29. C-K standard 분자량 및 peak 면적 측정(1000ppm), 좌 : EIC(667.60) 우 : m.w.(667.60)

1) 효소처리 인삼

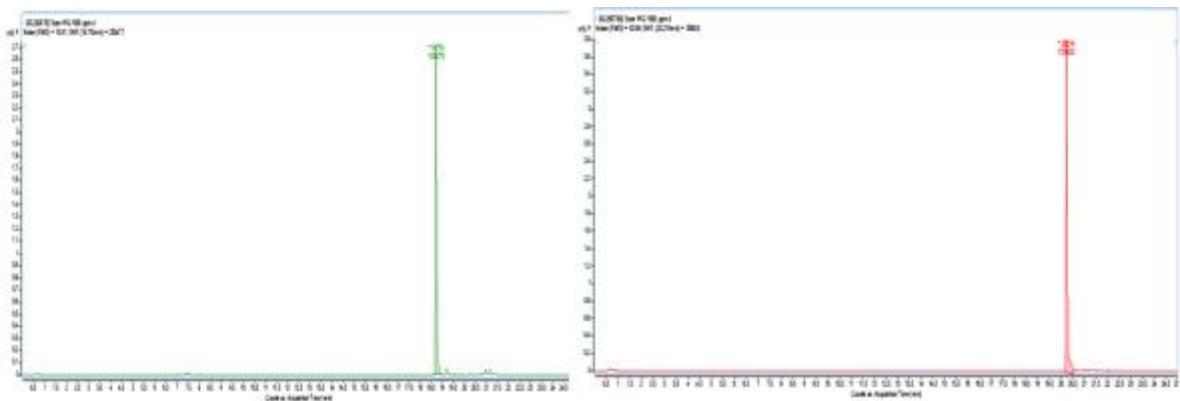


그림 30. 효소처리 인삼의 LC-MS 분석 data. 좌 : 효소처리 인삼의 F2 함량(1000ppm) 우: 효소처리 인삼의 C-K 함량(1000ppm)

2) 효소처리 인삼유래 사포닌(국내산)

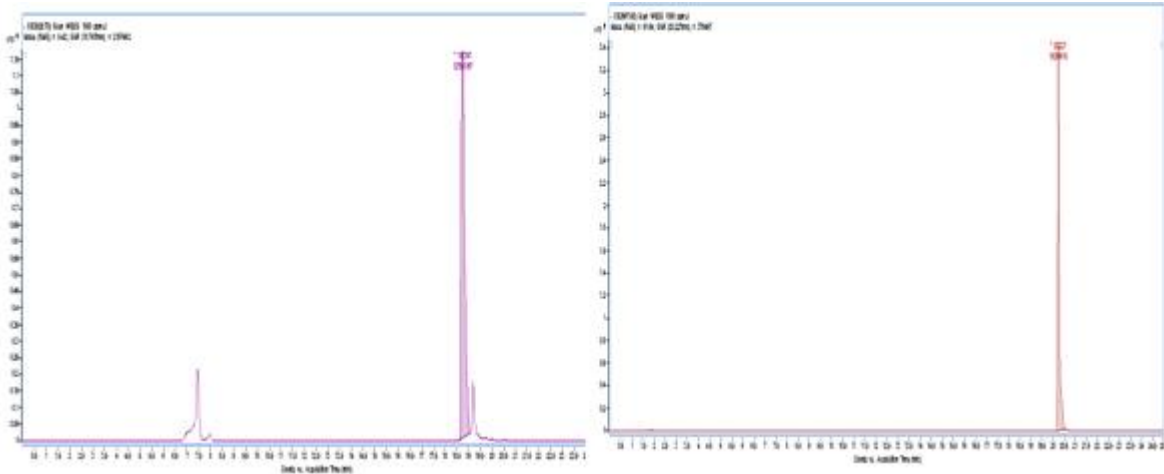


그림 31. 효소처리 인삼유래 사포닌의 LC-MS 분석 data. 좌 : 효소처리 인삼의 F2 함량(1000ppm) 우: 효소처리 인삼의 C-K 함량(1000ppm)

표 19. 효소처리 인삼 및 인삼유래 사포닌의 F2와 C-K의 함량(정량계산)

	농도 ppm	injection (ul)	분석된 시료 양	적분 값 (EIC)	%
C-K	1000	2	2ug	129524932	100
F2	1000	2	2ug	22932675	100

				C-K	%
인삼	1000	2	2ug	1729655	1.335383832
사포닌	1000	2	2ug	19289615	14.8925884

				F2	%
인삼	1000	2	2ug	1256773	5.480272144
사포닌	1000	2	2ug	12753197	55.61146704

주름개선 기능성 화장품 소재(효소처리 인삼) 및 양모기능 의약품(효소처리 사포닌)의 제조 공정에 따른 결과물로 미량 사포닌인 F2 및 C-K의 함량을 분석한 결과 주름개선 기능성 화장품 소재인 효소처리 인삼은 인삼 전체 중 F2의 함량이 5.4%로 나타났으며 C-K는 1.3%로 확인되었다.

2. 주름개선 기능성 화장품(효소처리 인삼)의 제조공정 확립

가. 주름개선 기능성 화장품(효소처리 인삼)의 제조 공정

국내산(풍기) 인삼분말 1 kg에 물 10 L를 넣고 효소를 가한 후 55℃에서 24시간 반응시킨 후 반응액을 90℃로 승온시켜 효소활성을 정지시킨다. 10L의 주정을 가하여 70℃에서 4시간 동안 추출 후, 추출액을 여과한다. 여액을 30brix 내외가 되도록 감압 농축한다. 농축액을 동결 건조 한다.

1) 효소반응 방법

각각의 재료(상기 방법에 의해 제조된 사포닌)에 enzyme를 첨가하고, 이를 50mg/ml 의 water solution 으로 제조한 후 55℃, 24hr 반응 후, n-BuOH 동량 첨가하여 추출한다.

2) 공정에 따른 주름개선 기능성 화장품(효소처리 인삼)의 제조 결과

표 20. 공정과정에 따른 무게변화 측정 3batch

		①(kg)	②(kg)	③(kg)
효소반응	효소 반응 전	8.2692	8.1974	8.294
	효소 반응 후	8.3732	8.2437	8.375
추출	추출 전	17.1257	16.8975	17.0467
	추출 후	17.0255	16.87	16.9658
여과	여과 전	17.0255	16.87	16.9658
	여과 후	14.0247	12.957	13.6742
농축	농축 전	14.0247	12.957	13.6742
	농축 후	3.8256	3.2141	3.9654

-상기 제조 공정에 따른 무게 측정결과 거의 동일한 결과를 나타냈음을 확인 하였다. 이 결과는 본 연구에서 설정한 조건으로 화장품 원료를 제조할 경우, 매번 제조할 때마다 품질이 매우 균일하게 유지될 수 있음을 말해 준다.

3. 국내산 인삼으로 부터 조사포닌의 생산 공정 및 원료 동등성 분석조건 확립

가. 조사포닌의 제조 방법

- 1) 국내산 인삼을 40mesh로 분쇄한다.
- 2) 추출하고자 하는 시료무게의 10배의 80% 메탄올 또는 에탄올을 이용하여 24시간 냉침 추출을 2회 반복하여 추출물을 얻고, 여과 후 농축 한다.
- 3) 농축물을 증류수에 녹이고 에테르를 가하여 분배추출한 후 하층(물층)을 취한다.

=> 에테르 분획

- 4) 물층에 물포화-부탄올 10L를 가하여 분배추출한 후 부탄올층을 취한다. =>부탄올 분획1
- 5) 하층(물층)에 물포화-부탄올 10L를 가하여 분배추출한 후 상층(부탄올층)을 취한다.
이 조작을 1회 더 반복한다. => 부탄올 분획 2
- 6) 상층(부탄올층)을 감압 농축한다. ---> 조사포닌



그림 32. 인삼 조사포닌의 제조 방법

나. 동등성 관리를 위한 조사포닌의 성분 분석 연구(HPLC-UV)

- 원료의 표준품 관리 가능한 5개의 peak를 선정함.(Rg1+Re, Rb1, Rc, Rb2, Rd)
- 동등성 기준: 유사도 R>0.9 이상

1) 성분 분석 방법

반응물의 수포화부탄올 추출용액을 감압농축한 후 HPLC용 메탄올에 용해하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. Column은 Sun fire ODS (250× 4.6 mm, ID 5 μm, waters)을 사용하였으며 Waters Empower software를 사용하여 분석 하였다. sample 주입량은 30 μl, 이동상은 증류수(solvent A)와 acetonitrile (solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.2 ml/min, UV detector로 203 nm 에서 측정하였다. Gradient 조건은 solvent A/solvent B, 83/17, 70/30, 62/38, 40/60, 35/65, 15/85, 0/100, 83/17; run time, 0-20, 20-30, 30-35, 35-40,40-45, 45-50, 50-54, 54-65 min로 하였다.

2) 결과

원료의 표준품 관리 가능한 6개의 peak.(Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rd)를 선정하여 원료의 생산에 따른 동등성관리 방법을 확립하였다. 인삼 사포닌의 메이저 성분인 Rg1과 Re는 26%, Rb1은 24%, Rb2는

11%, Rc는 22%, Rd는 6%를 기준으로 하여 이와 유사도 $R > 0.9$ 이상을 동등성 기준으로 설정하였다.

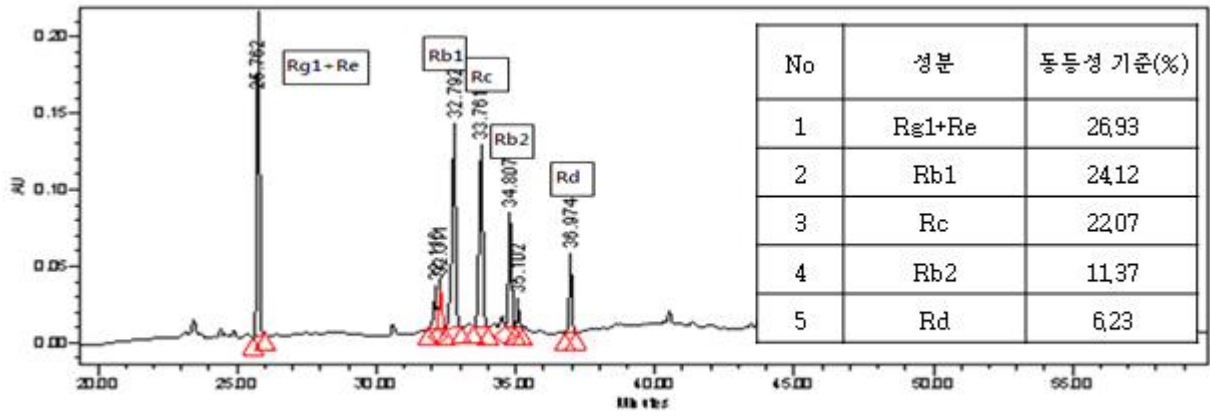


그림 33. 표준품의 품질 동등성관리를 위한 HPLC 분석 data

4. 효소처리 사포닌의 제조공정 확립

- 국내산 인삼 사포닌으로부터 효소처리 인삼 사포닌 원료 생산.
- 미량 사포닌(F2, C-K) 증가 확인

상기 조사포닌의 제조법에 의해 제조된 사포닌에 enzyme을 첨가하고, 이를 50mg/ml 의 water solution 으로 제조한 후 55°C, 24hr 반응 후, 효소처리물을 90°C로 승온 후 55°C로 방냉한 다음 10-15°C 로 냉각 후 수포화 부탄올을 동량 첨가하여 분획을 진행 한다. 사포닌이 추출된 부탄올층만을 취하여 농축하여 잔여 부탄올을 제거한 후 원료로 이용한다. 동등성 확인을 위하여 Batch test를 실시하였다. 1 batch당 500g의 조사포닌을 이용하여 효소처리를 진행 함.

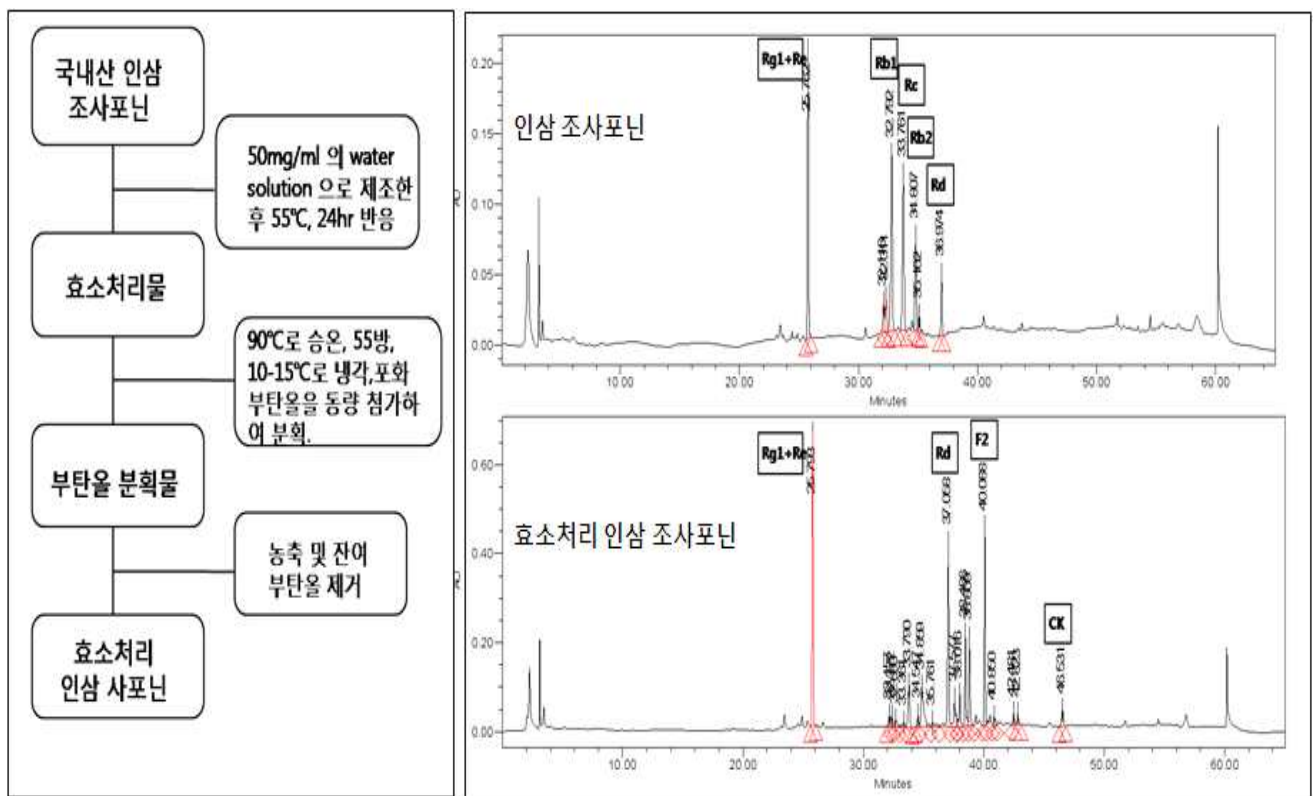


그림 34. 효소처리 인삼 사포닌의 제조 방법 및 미량 사포닌 증가 확인

가. 원료생산 동등성 관리를 위한 성분 분석 연구(HPLC-UV)

- 원료의 동등성 관리를 위하여 관리 가능한 3개의 peak를 선정함(Rg1+Re, Rd, F2).
- Batch 간의 동등성(R>0.9 이상) 확인 완료.

반응물의 수포화부탄올 추출용액을 감압농축한 후 HPLC용 메탄올에 용해하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. Column은 Sun fire ODS (250 \times 4.6 mm, ID 5 μm , waters)을 사용하였으며 Waters Empower software를 사용하여 분석 하였다. sample 주입량은 30 μl , 이동상은 증류수(solvent A)와 acetonitrile (solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.2 ml/min, UV detector로 203 nm 에서 측정하였다. Gradient 조건은 solvent A/solvent B, 83/17, 70/30, 62/38, 40/60, 35/65, 15/85, 0/100, 83/17; run time, 0-20, 20-30, 30-35, 35-40,40-45, 45-50, 50-54, 54-65 min로 하였다. 결과는 아래의 표와 같다.

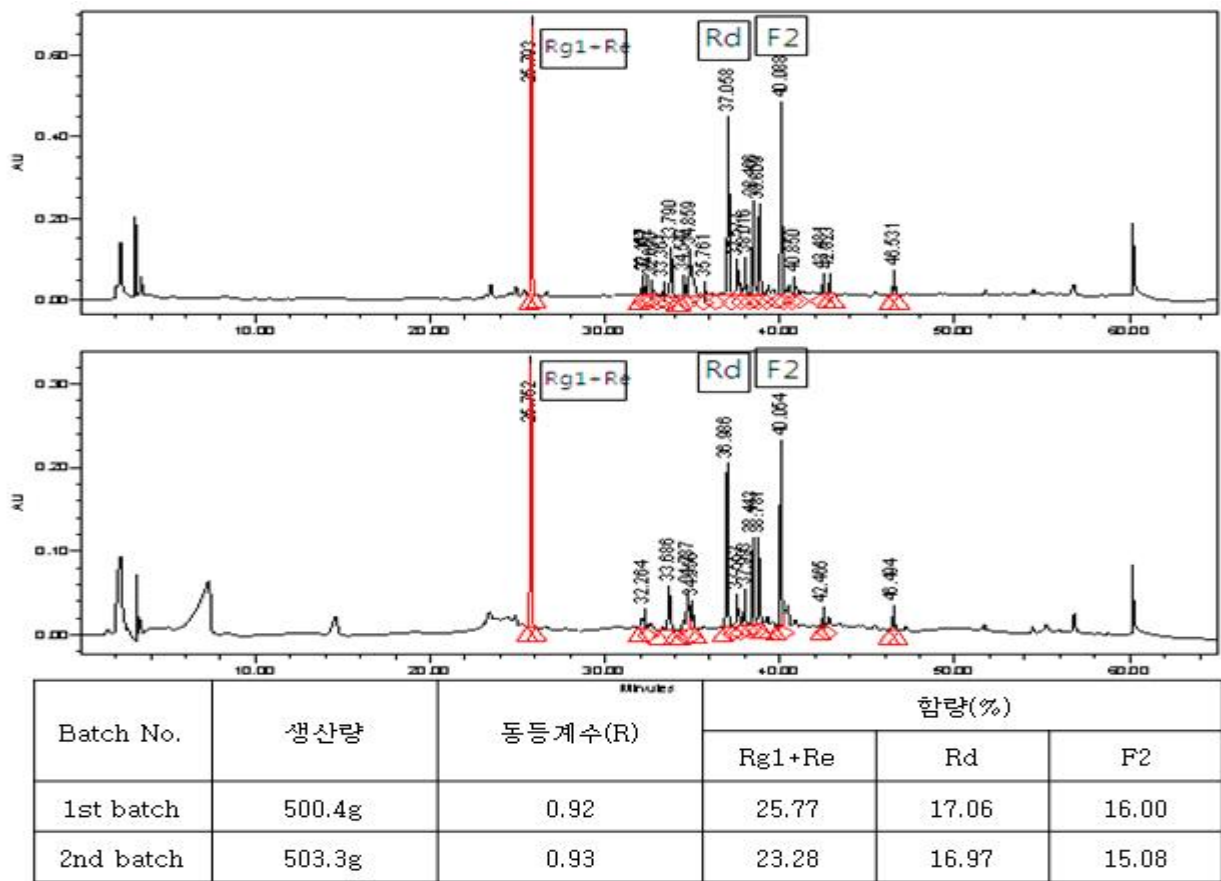


그림 35. Batch 별 품질 동등성관리를 위한 HPLC 분석 data

나. 최종 원료의 미량 사포닌(F2, C-K)의 정량 (LC/MS)

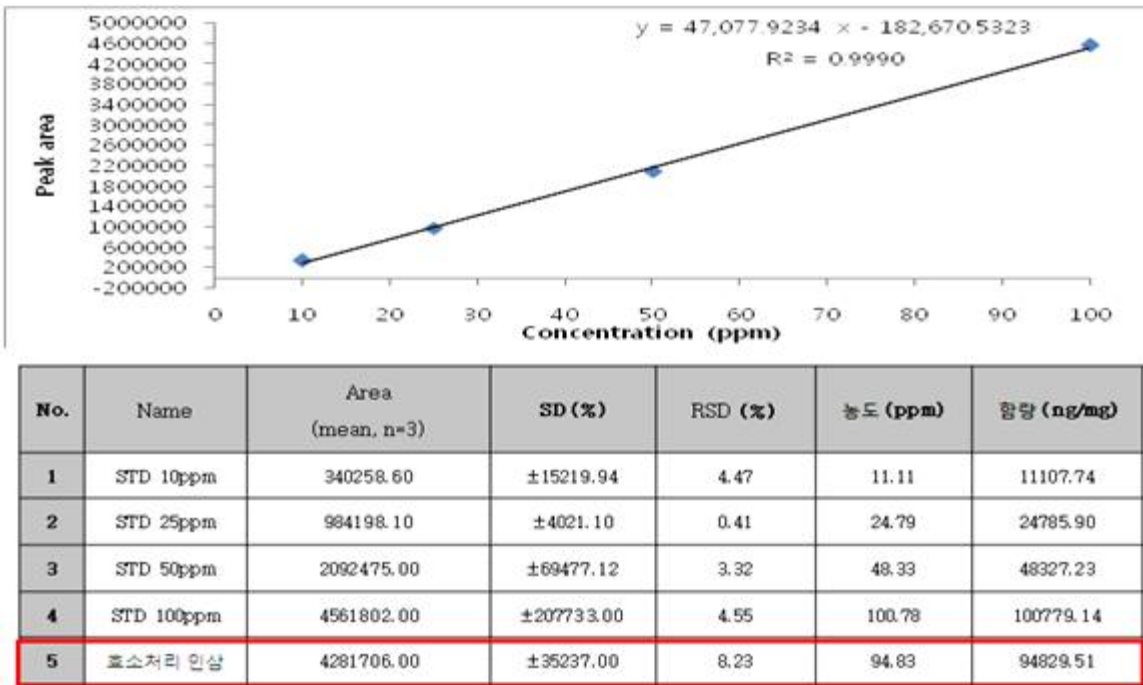


그림 36. F2 정량분석 결과

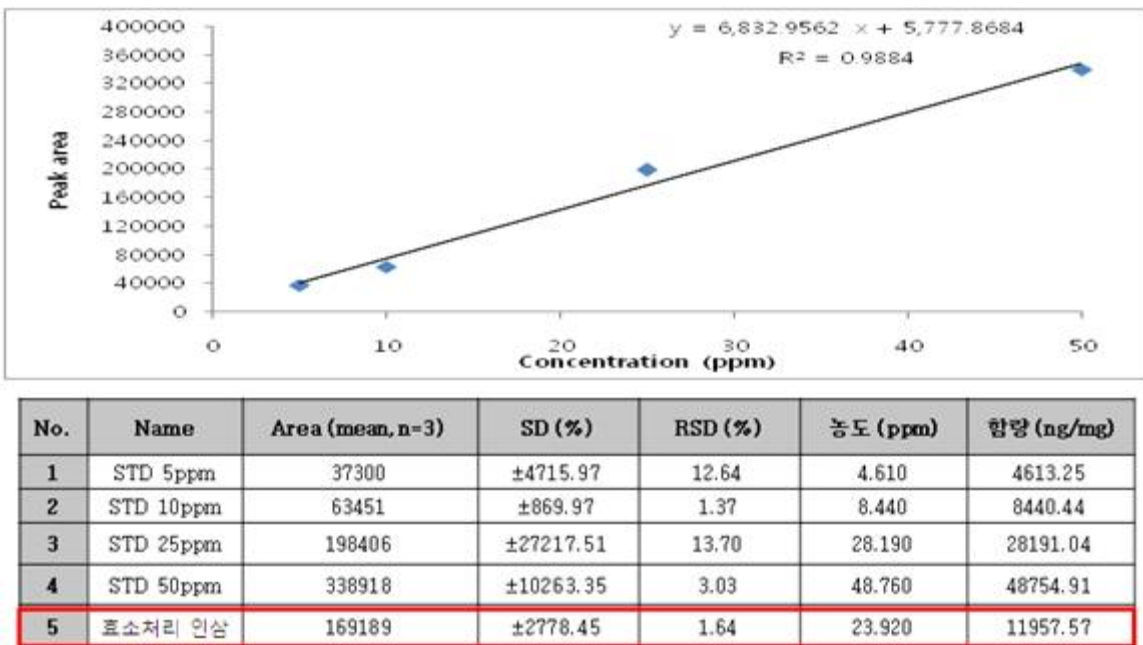


그림 37. CK 정량분석 결과

5. 미량 사포닌 F2 및 C-K의 대량 생산 및 LC/MS를 이용한 정량분석

본 연구팀은 1차년도에 미량 사포닌을 대량 양산하고자 화학적 방법 및 생물학적 방법을 이용한 다양한 사포닌 제조 공정 과정을 구축하였다. 이러한 제조 공정과정을 바탕으로 2차년도에도 미량 사포닌인 F2를 20g 이상 확보하였고 C-K는 30g 이상 확보 하였다.

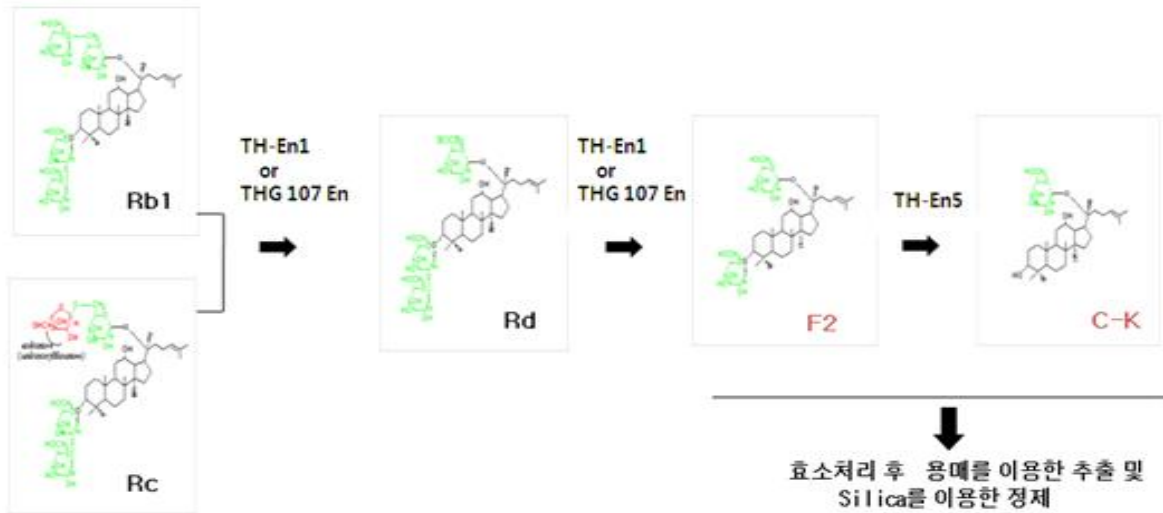
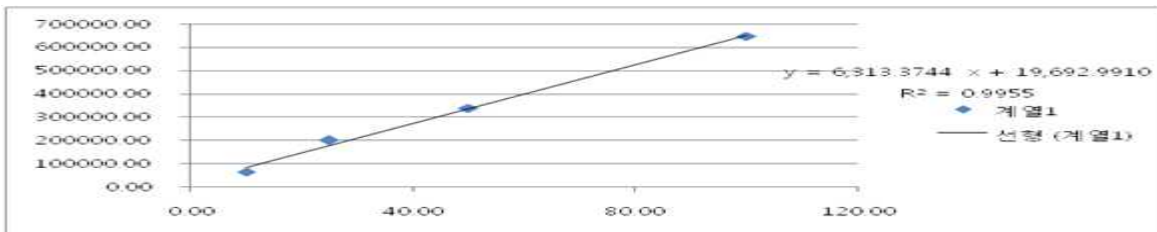


그림 38. 확보된 효소를 이용한 F2 및 C-K생산 제조공정 예

가. F2의 생산 및 순도 분석 결과

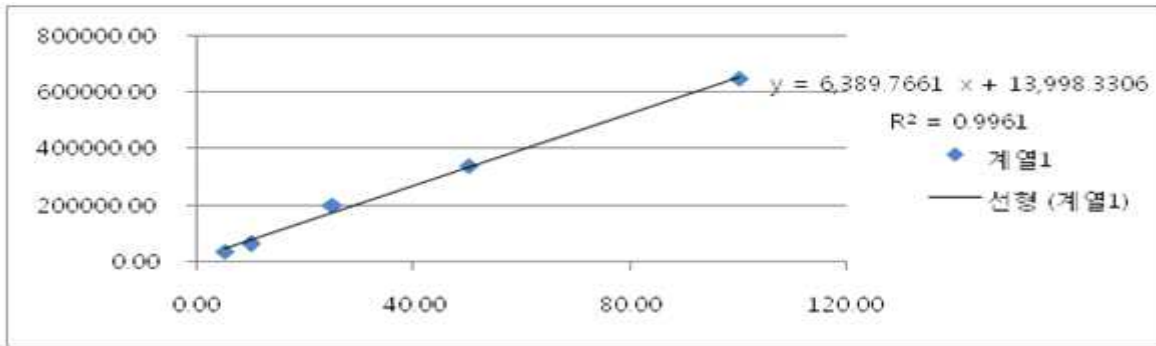


No.	Name	Area	농도(ppm)	(ng/L)	%	확보량(g)
1	10.00	340258.57	11.11	11107.7	-	-
2	25.00	984198.08	24.79	24785.9	-	-
3	50.00	2092475.38	48.33	48327.2	-	-
4	100.00	4561801.50	100.78	100779.1	-	-
5	sample1	3720012.35	82.90	82898.4	82.90	2.06
6	sample2	3940210.00	87.58	87575.7	87.58	2.28
7	sample3	4375926.00	96.83	96830.9	96.83	2.16
8	sample4	4663966.50	102.95	102949.3	102.9	1.08
9	sample5	2049922.63	47.42	47423.4	47.42	1.25
10	sample6	4020150.20	89.27	89273.7	89.27	2.06
11	sample7	1806134.00	42.24	42244.9	42.24	10.16
12	sample8	5283176.25	116.10	116102.1	106.1	1.4



그림 39. 사포닌 전환 효소 및 정제 기술을 이용하여 확보된 F2

나. C-K의 생산 및 순도 분석 결과



No.	Name	Area	농도(ppm)	(ng/L)	%	확보량(g)
1	5.00	37301.00	3.65	3646.9	-	-
2	10.00	63451.32	7.74	7739.4	-	-
3	25.00	198406.54	28.86	28859.9	-	-
4	50.00	338918.67	50.85	50850.1	-	-
5	100.00	645969.69	98.90	98903.6	-	-
6	C-K 1	507240.17	77.19	77192.4	77.19	10
7	C-K 2	371898.93	56.01	56011.5	56.01	20

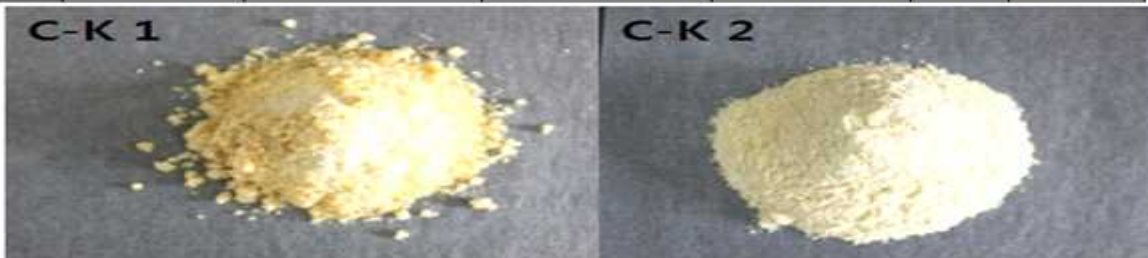


그림 40. 사포닌 전환 효소 및 정제 기술을 이용하여 확보된 C-K

제 3 절 주름개선 기능성 화장품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가

주름개선 기능성 화장품

- 표준화 최적소재에 대한 임상평가를 진행하기 위하여 최적제형 개발조건을 확립하였음.

1. 주름 개선 기능성 화장품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가

1-1. 안정화 메커니즘 개발

가. Biopolymer에 의한 안정화

인삼 유래 주름 개선 소재는 바이오폴리머와 인삼 유래 주름 개선 소재간의 수소결합을 하게 함으로써 1차로 안정화 한다. 이렇게 안정화한 원료는 옅은 황색은 띄는 투명한 액상으로 원료자체로는 상당히 안정한 편이다. 하지만, 화장품 제형에 직접 투입하는 것은 많은 문제가 있어 특수한 가용화 제형 이외에는 사용이 불가하다.

나. Polyester에 의한 2차 안정화

1차 안정화한 인삼 유래 주름 개선 소재를 화장품 용도로 폭 넓게 사용하기 위하여 Polyester-1으로 Capsulation 2차 안정화를 하였다. 이렇게 제조한 원료는 수분산 상태의 Nano-Particle로서 pH는 3.9이며, 원료뿐 아니라 가용화, 유화 제형에서 안정하다

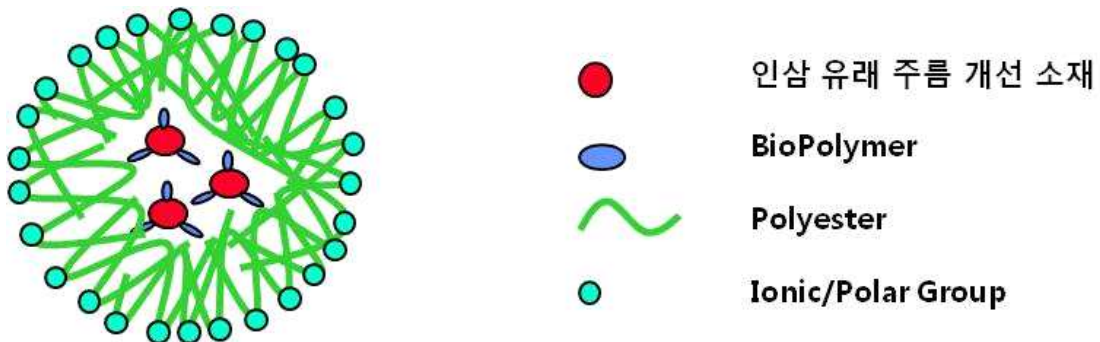


그림 41. 안정화 메커니즘 모식도

1-2. 임상용 샘플 제형 조성

표 21. 임상 시제품의 성분비

No.	INCI NAME	컨트롤	샘플
1	Cetostearyl Alcohol	1.80	1.80
2	Stearic Acid	0.50	0.50
3	Glyceryl Stearate	0.50	0.50
4	Cetearyl Glucoside/ Cetearyl Alcohol	1.00	1.00
5	Arachidyl Glucoside/ Arachidyl Alcohol/ Behenyl Alcohol	0.50	0.50
6	Mangifera Indica(Mango) Seed Butter	0.50	0.50
7	Butyrospermum park II (Shea Butter)	0.50	0.50
8	Caprylic/ Capic Triglyceride	4.00	4.00
9	Hydrogenated Polydecene	3.00	3.00
10	Cetyl Ethylhexanoate	3.00	3.00
11	Dimethicone	1.00	1.00
12	Tocopheryl Acetate	0.50	0.50
13	Cyclomethicone	4.00	4.00
14	D.I.WATER	62.93	62.43
15	Disodium EDTA	0.02	0.02
16	Trehalose	1.00	1.00
17	C12-16 Alcohols	0.50	0.50
18	Hexanediol	2.00	2.00
19	Glycerin	2.00	2.00
20	Butylene Glycol	10.00	10.00
21	Xanthan Gum	0.10	0.10
22	Polyacrylate-13	0.50	0.50
23	인삼 - 효소처리		0.50
24	Fragrance	0.15	0.15

1-3. 임상용 샘플 제형 제조 방법

- ① 오일파트 I (1~11) 를 칭량하여 Agi Mixer 로 65~70℃ 까지 가운 한다.
- ② 물 파트(14~21)를 칭량하여 Agi Mixer로 60~65℃ 까지 가운 한다.
- ③ 오일파트II(12~13)를 칭량하여 따로 놓아둔다.
- ④ 가운 한 물 파트에 오일파트 I 과 II을 차례로 투입하면서, Homo Mixing 한다.
(RPM 6500~7000, 4min)
- ⑤ ④에 22, 23~25(각 샘플 별), 26을 넣고 Homo Mixing 한다.
(RPM 6500~7000, 3min)
- ⑥ 탈기 후, 냉각한다.

1-4. 임상용 샘플 기초 물성

표 22. 점도 및 pH


	컨트롤	샘플
점도 (실온, 27.5℃)	35	15
pH	5.07	4.64
실험결과		

표 23. 안정도, 변색 · 변취

	컨트롤	샘플
안정도	양호	양호
변색	+	+
변취	+	+
실험결과		

- 안정도는 고온(45도), 냉온, 실온에서 약 한달 간 관찰함.
- “+”로 변색, 변취의 정도를 나타냄.
- +(안정) ↔ +++(불안정)

제 4 절 주름개선 기능성 화장품 소재의 안전성 평가

가. KHY의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험 결과 요약

본 시험의 조건하에서 효소처리인삼사포닌을 랫드에 단회 경피투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.

나. KHY의 토끼를 이용한 피부자극시험 결과 요약

본 시험 조건하에서 시험물질 효소처리인삼사포닌은 토끼의 피부에 대해서 자극성이 없는 것으로 판단됨.

다. KHY의 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과 요약

본 시험 조건하에서 시험물질 효소처리인삼사포닌은 토끼의 안에 대해서 '무자극물'로 판단된다. 또한, 안자극성에 대한 세안효과가 확인됨.

라. KHY의 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Maximization법) 결과 요약

본 시험 조건하에서 시험물질 효소처리인삼사포닌의 감작률은 '0%'로, 감작등급은 'I'의 '매우 약함'으로 분류되어, 피부감작성이 없는 물질로 판단됨.

마. KHY의 기니픽을 이용한 광독성시험 결과 요약

본 시험 조건하에서 시험물질 효소처리인삼사포닌은 광독성이 없는 물질로 판단됨.

바. KHY의 기니픽을 이용한 광감작성시험(Adjuvant & Strip법) 결과 요약

본 시험 조건하에서 시험물질 효소처리인삼사포닌의 감작률은 '0%'로, 감작등급은 'I'의 '매우 약함'으로 분류되어, 광감작성이 없는 물질로 판단됨.

1. 효소전환 인삼 추출물의 안전성 시험 수행 결과

가. 효소처리 인삼 사포닌의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험 결과 요약

본 시험은 시험물질 효소처리 인삼 사포닌을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여하였을 때, 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

시험물질인 효소처리 인삼 사포닌을 1000, 1500 및 2000 mg/kg 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경피투여한 후 2 주간의 사망률 및 일반증상 관찰, 체중변화, 육안적 부검소견 관찰을 실시하여 부형제대조군과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 2000 mg/kg 투여군 암컷에서 코주위오염이 Day 1-2에 2 레 관찰되었다.
3. 체중변화 관찰 결과, 모든 시험물질 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
4. 부검소견 관찰 결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 효소처리 인삼 사포닌을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여 하였을 때, 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 2000mg/kg을 상회하는 것으로 판단하였다.

나. 효소처리 인삼 사포닌의 토끼를 이용한 피부자극시험 결과 요약

본 시험은 시험물질 효소처리 인삼 사포닌에 대한 피부자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 수컷 토끼의 건강피부(비찰과피부) 및 찰과피부에 시험물질을 적용한 후 무처리 적용한 건강피부(비찰과피부) 및 찰과피부와 비교 평가하였다. 시험 결과는 다음과 같다.

1. 시험기간 중 시험물질의 적용에 기인한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 시험물질 적용에 기인한 체중의 이상은 관찰되지 않았다.
3. 시험물질 적용 후 피부반응 관찰 결과 시험물질 적용부위 및 비적용부위의 1 차 피부자극지수는 각각 “0.11” 과 “0” 이었다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건하에서 효소처리 인삼 사포닌의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험 결과 비자극성 물질로 평가되었다.

다. 효소처리인삼사포닌의 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과 요약

본 시험은 시험물질 효소처리인삼사포닌에 대한 안점막자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White 계 수컷 토끼의 안점막에 시험물질을 적용한 후 무처치한 안점막과 비교 평가 하였다. 시험결과는 다음과 같다.

1. 시험기간 중 시험물질의 적용과 관련한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 시험물질 적용과 관련한 체중변화는 관찰되지 않았다.
3. 시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 세안군 및 미세안군 모두 아무런 변화도 관찰되지않았다.
4. 시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 급성 안점막 지수인 I.A.O.I.(The Index of Acute Ocular Irritation)는 전 관찰기간 동안 세안군 및 미세안군 모두 0으로 비자극성으로 평가되었다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건하에서 시험물질 효소처리인삼사포닌의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과는 무자극물로 평가되었다.

라. 효소처리 인삼 사포닌의 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Buehler법) 결과 요약

본 시험은 시험물질 효소처리 인삼 사포닌의 피부감작성을 평가하기 위하여 Hartley계 기니픽을 이용하여 시험하였다. 시험방법으로는 시험물질(70 %)을 적용하여 감작 및 야기한 후, 야기처치 제거 후 24, 48 및 72 시간의 피부반응을 평가하여, 이를 기초로 피부감작성을 평가하였다. 피부반응 및 피부감작성을 비교 평가하기 위해 부형제대조군 및 양성대조군을 두었다. 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.
3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 피부감작성 평가 결과, 부형제대조군 및 시험물질투여군에서는 0 %의 감작율을 보여 ‘매우약함’(I 등급)으로 평가되었다.

반면, 양성대조군은 100 %의 감작율을 보여 ‘매우강함’(V 등급)으로 평가하였다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건 하에서 시험물질 효소처리 인삼 사포닌의 피부감작율은 70 % 농도에서 ‘매우약함’(I 등급)으로 판정하였다.

마. 효소처리 인삼 사포닌의 기니픽을 이용한 광독성시험 결과 요약

본 시험은 Hartley계 기니픽을 이용하여 시험물질 효소처리 인삼 사포닌의 UV조사에 의한 광독성을 조사하기 위하여 시험물질을 70 % 농도로 시험물질투여군에 적용하여 부형제대조군 및 양성대조군과 비교하였다. 사용동물 수는 군당 5 마리로 하였고, 시험기간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 UV 조사 후 24, 48 및 72 시간째 피부반응을 관찰하였다. 시험결과는 다음과 같았다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.
3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 광독성 평가 결과, 시험물질의 투여에 의한 피부반응에서 어떤 증상도 관찰되지 않았다. 허나, 양성대조물질의 경우에는 피부에 뚜렷한 홍반 및 경도의 부종이 관찰되었다.


이상의 결과로 보아, 본 시험 조건 하에서 시험물질 효소처리 인삼 사포닌은 70 %의 농도에서 광독성이 없는 것으로 판단하였다

바. 효소처리 인삼 사포닌의 기니픽을 이용한 광감작성시험(Harber법) 결과 요약

본 시험은 시험물질 효소처리 인삼 사포닌의 광감작성을 평가하기 위하여 Hartley계 기니픽을 이용하여 실험하였다. 실험방법으로는 시험물질을 70 % 농도로 감작시키고 70 % 농도로 야기한 후, 24, 48 및 72 시간의 피부반응을 평가하여, 이를 기초로 광감작성을 평가하였다. 피부반응 및 광감작성을 비교 평가하기 위해 부형제 및 양성대조군을 두었다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.
3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 광감작성 평가 결과, 부형제 및 시험물질투여군에서는 0 %의 광감작용을 보여 '매우약함' (I 등급)으로 평가되었다. 반면, 양성대조군은 100 %의 광감작용을 보여 '매우강함'(V등급)으로 평가하였다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건 하에서 시험물질 효소처리 인삼 사포닌의 광감작용은 70 % 농도에서 광감작성이 없는 '매우약함'(I 등급)으로 평가하였다.



최종보고서

KHY의 토끼를 이용한 피부자극시험

시험번호: B13245

㈜바이오텍스틱
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양청리 686-2 오창과학산업단지내




최종보고서

KHY의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단위 공포투여 독성시험

시험번호: B13244

㈜바이오텍스틱
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양청리 686-2 오창과학산업단지내




최종보고서

KHY의 토끼를 이용한 안검막자극시험

시험번호: B13246

㈜바이오텍스틱
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양청리 686-2 오창과학산업단지내




최종보고서

KHY의 기니피그를 이용한 피부감작성시험
(Maximization법)

시험번호: B13247

㈜바이오텍스틱
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양청리 686-2 오창과학산업단지내




최종보고서

KHY의 기니피그를 이용한 광역성시험

시험번호: B13248

㈜바이오텍스틱
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양청리 686-2 오창과학산업단지내



최종보고서

KHY의 기니피그를 이용한 광각작성시험
(Adjvant & Strip법)

시험번호: B13249

㈜바이오텍스틱
우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 양청리 686-2 오창과학산업단지내

제 5 절 주름개선 기능성 화장품 소재의 임상시험 평가

주름개선 기능성 화장품

- 표준화 최적소재에 대한 임상평가를 진행하기 위하여 주름 개선 활성 소재의 임상용 시제품 2종의 임상시험용 시제품(크림type)을 제작하여 임상시험 대행 기관인 파마크로를 통하여 임상평가를 완료하고, 각 기능성 소재의 주름 개선 효과를 확인하였음.

1. 주름 개선 기능성 화장품 소재 2의 피부 주름개선 효과 시험 연구

- 본 시험은 “크림 2(소재 2)”를 평가하기 위하여 수행되었다.
- 본 시험에서는 만 30세 ~ 65세 사이의 한국인 여성 피험자 23명을 대상으로 12주간 시험을 수행하였으며 중도 탈락자는 1명으로 총 참여 피험자는 22명이었다.
- 제품의 주름개선효과를 평가하기 위해 매일 2회씩 아침, 저녁 세안 후 시료를 도포하도록 하였으며 제품 도포 전, 제품 도포 후 4주, 제품 도포 후 8주, 제품 도포 후 12주에 Visiometer를 이용한 화상분석을 실시하고 육안평가 및 사진 촬영, 설문조사를 통하여 주름을 평가하였다.
- 인체적용시험 결과 (주)파마크로에 개발한 “크림 2(소재 2)”는 제품 사용 12주차에서 모사판의 화상분석 결과 및 육안평가에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 이를 근거로 파마크로의 “크림 2(소재 2)”는 사용 12주 후 주름개선효과가 있음을 알 수 있었다.
- 피험자에 의한 자가 설문평가에서는 통계적으로 유의한 수준의 주름개선 효과를 보이지 않았다.
- 제품의 안전성 평가 결과 피부과 전문의에 의한 이상반응 평가와 피험자에 의한 자가 설문 평가 결과를 미루어 보아 안전한 제품임을 알 수 있었다.

2. 주름 개선 기능성 화장품 소재 3의 피부 주름개선 효과 시험 연구

- 본 시험은 “크림 3(소재 3)”을 평가하기 위하여 수행되었다.
- 본 시험에서는 만 30세 ~ 65세 사이의 한국인 여성 피험자 22명을 대상으로 12주간 시험을 수행하였으며 중도 탈락자는 1명으로 총 참여 피험자는 21명이었다.
- 제품의 주름개선효과를 평가하기 위해 매일 2회씩 아침, 저녁 세안 후 시료를 도포하도록 하였으며 제품 도포 전, 제품 도포 후 4주, 제품 도포 후 8주, 제품 도포 후 12주에 Visiometer를 이용한 화상분석을 실시하고 육안평가 및 사진 촬영, 설문조사를 통하여 주름을 평가하였다.
- 인체적용시험 결과 “크림 3(소재 3)”은 제품 사용 12주차에서 숙련된 연구원에 의한 육안평가와 Visiometer를 이용한 주름분석 결과 시험제품의 사용 전후 비교에서 시험제품이 대조제품에 비해 12주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)의 주름개선 효과가 관찰 되었음
- 제품의 안전성 평가 결과 피부과 전문의에 의한 이상반응 평가와 피험자에 의한 자가 설문 평가 결과를 미루어 보아 안전한 제품임을 알 수 있었다.

주름개선 화장품의 인체적용시험 연구보고서

(주)파마크로의
“크림 2(가칭)”의
피부 주름개선 효과 시험 연구

2011년 12월 09일

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

주름개선 화장품의 인체적용시험 연구보고서

(주)파마크로 의
“크림3”의
피부 주름개선 효과 시험 연구

2011년 12월 09일

세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

II. 요약문

요 약 문	
목적	“크림 2(가칭)”의 주름개선효과 평가를 위한 인체적용시험
시 료	시험 시료: (주)파마크로의 “크림 2(가칭)” 시료의 구성: 시료 도포: 1일 2회 아침, 저녁으로 세안 후 지정된 눈가에 적당량 을 도포
시험 일정	시작일: 2011년 8월 23일 / 종료일: 2011년 11월 17일
시험 기준	식품의약품안전청고시 제2009-166호
시험 부위	양쪽 눈가
시험 인원	22명
의 퇴 자	파마크로
연구 수행자	세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터
연구 책임자	백중연
평가 방법	Skin-Visioner SV600(Courage+Khazaka Electronic, Germany) 를 이용한 조사판의 주름 경량 분석
유효성 결과	숙련된 연구원에 의한 육안평가와 Visioner를 이용한 주름분석 결과 시험제품의 사용 전후 비교에서 시험제품이 대조제품에 비해 12주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)의 주름개선 효과가 관찰 되었음
안전성 결과	시험기간 동안 특별한 피부 이상반응은 보고되지 않아 안전한 제품 으로 확인되었음
연구 관리번호	II-6164-A
보고서 관리번호	SMC-111209-8023
시료 관리번호	제품A(시험제품): 11-WR0022, 제품B(대조제품): 11-WR0024
보고서 작성일	2011년 12월 09일

II. 요약문

요 약 문	
목적	“크림3”의 주름개선효과 평가를 위한 인체적용시험
시 료	시험 시료: (주)파마크로 의 “크림3” 시료의 구성: 시료 도포: 1일 2회 아침, 저녁으로 세안 후 지정된 눈가에 적당량 을 도포
시험 일정	시작일: 2011년 08월 30일 / 종료일: 2011년 11월 22일
시험 기준	식품의약품안전청고시 제2009-166호
시험 부위	양쪽 눈가
시험 인원	21명(추적관찰 불가능의 이유로 탈락한 피험자는 1명으로 최종 피 험자 수는 20명)
의 퇴 자	(주)파마크로
연구 수행자	세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터
연구 책임자	백중연
평가 방법	Skin-Visioner SV600(Courage+Khazaka Electronic, Germany) 를 이용한 조사판의 주름 경량 분석
유효성 결과	숙련된 연구원에 의한 육안평가와 Visioner를 이용한 주름분석 결과 시험제품의 사용 전후 비교에서 시험제품이 대조제품에 비해 12주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)의 주름개선 효과가 관찰 되었음
안전성 결과	시험기간 동안 특별한 피부 이상반응은 보고되지 않아 안전한 제품 으로 확인되었음
연구 관리번호	II-6165-A
보고서 관리번호	SMC-111209-8024
시료 관리번호	제품A(시험제품): 11-WR0023, 제품B(대조제품): 11-WR0024
보고서 작성일	2011년 12월 09일

제 4 장 양모 의약외품 소재 및 제품의 개발

1. 양모 의약외품을 개발하기 위한 가능성 소재를 스크리닝한 결과

-모발 관련 세포의 증식률을 확인한 결과 효소처리 인삼사포닌과 한약재 추출물을 혼합한 시료인 KHO-5와 KHY가 50% 이상의 증식률로 효과가 탁월함을 확인하였음.

- NO 생성 억제 효능을 확인한 결과 효소처리 인삼사포닌과 한약재 추출물을 혼합한 시료인 KHO-5와 KHY가 90% 이상의 NO생성 억제율을 보여 효과가 탁월함을 확인하였음.

2. 양모 의약외품을 개발하기 위한 *in vivo* 동물 모델에서의 효능을 확인한 결과

-효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재가 모성장기 촉진과 성장기 유지에 효과가 있음을 확인하였음.

-효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재가 모발의 밀도 및 굵기가 증가함을 확인하였음.

-효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재가 조직학적 변화에서도 모낭의 퇴화기 진입 지연과 모성장기 촉진에 효과가 있음을 확인하였음.

3. 양모 의약외품 개발

-세포 활성 평가 및 마우스를 이용한 육안적, 조직학적 모발 성장 효과 확인을 통해 인삼 사포닌과 한약재 추출물 혼합 소재(KHO-05 및 KHY)를 양모 의약외품의 최적소재로 확정하고 대량 생산 조건을 확립함.

4. 양모 의약외품 최적 제형 개발

- 식품유래 효소를 이용한 PPD 계열의 사포닌 F2, C-K 다량함유한 사포닌 대량 생산 조건을 확립한 상태이며 최적제형조건을 개발 완료하였음.

5. KHY의 안전성평가

- (주)바이오독스텍에 의뢰하여 KHY의 안전성을 평가함. 경피투여독성실험, 피부자극실험, 안점막 자극실험, 피부감작성시험, 광독성시험, 광감작성시험 위 항목들에 대하여 안전성 평가를 시행함.

6. KHY의 임상시험평가

-세명대학교에서 임상시험평가 완료. 1월 중 결과 나올 예정.

제 1 절. 양모 의약외품 소재 활성 확인

1. 양모 의약외품 소재 활성 확인

1-1. 양모 및 육모 기능성 화장품 소재 발굴을 위한 인삼 소재 및 한약재 복합 처방 소재 활성평가

- 양모 및 육모 기능성 화장품을 개발하기 위해 다양한 인삼 소재 및 복합처방소재를 이용하여 효능 관련 가능성 소재를 스크리닝한 결과

1. 모발 관련 세포의 증식률을 확인한 결과 효소처리 인삼사포닌과 한약재 추출물을 혼합한 시료인 KHO-5와 KHY가 50% 이상의 증식률로 효과가 탁월함을 확인하였음.

2. NO 생성 억제 효능을 확인한 결과 효소처리 인삼사포닌과 한약재 추출물을 혼합한 시료인 KHO-5와 KHY가 90% 이상의 NO생성 억제율을 보여 효과가 탁월함을 확인하였음.

가. KHT, KHO 및 KHY의 모발 및 염증 관련 세포 활성 평가 (*in vitro*)

1) KHT, KHO 및 KHY의 모발관련 세포 증식 효능 확인

인간 모유두세포 (HHDPC), 각질형성세포 (HaCaT)를 사용하여 KHT, KHO 및 KHY 시료에 의한 Cell Proliferation 증가율을 확인하였다(그림 11~22) KHT-1~5, KHO-1~6 및 KHY에 대한 모유두 세포 (HHDPC)와 각질 형성 세포(HaCaT)의 증식률을 MTT assay를 통하여 세포 활성도를 나타낸 것이다.

KHT, KHO 및 KHY 시료의 농도는 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 사용하여 MTT assay를 통해 cell proliferation을 측정된 결과, control과 비교하였을 때, KHT-1 시료 처리에 의한 HHDPC 증식률은 40% HaCaT 증식률은 35% 증가하였고, KHT-2는 40% 및 35%, KHT-3는 25% 및 48%, KHT-4는 20% 및 50%, 마지막으로 KHT-5는 34% 및 18% 증가하였다.

KHO-1에 의해 HHDPC 증식률이 50% HaCaT 증식률이 40% 증가하였고, KHO-2는 각각 35%, KHO-3은 각각 34% 및 68%, KHO-4는 각각 40% 및 20% 증가하였다. KHO-5에 의해 HHDPC의 증식률이 44% HaCaT의 증식률이 38% 증가하였고, KHO-6에 의해 HHDPC의 증식률이 43% HaCaT의 증식률이 47% 증가하였으며, KHY에 의해 HHDPC의 증식률이 39% HaCaT의 증식률이 41% 증가한 것을 알 수 있다.

또한, 발모제로 알려진 Minoxidil 및 Finasteride와 모발 관련 세포 증식 효능과 비교하여도 KHT, KHO 및 KHY의 증식률이 10%~50% 이상 증식률이 증가함을 알 수 있다.

위 결과를 통해 인간 모유두세포 (HHDPC), 각질형성세포 (HaCaT)의 활성도를 확인한 결과, 풍기인삼 사포닌과 옷, 연교 추출물을 혼합한 시료 KHO-5 및 KHY가 육모 및 양모 기능성 소재로 적합함을 확인하였다.

2) Raw 264.7 cell을 통한 NO 생성 억제 확인

Murine macrophage Raw 264.7을 이용하여, KHT, KHO 및 KHY와 염증 반응을 유도하는 LPS를 처리하여, 생성되는 염증 산물 중의 하나인, NO의 생성량을 확인하였다. 자극에 의하여 과량 생성된 NO는 염증성 질환을 초래하는 것으로 알려져 있다. LPS를 처리하여 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 측정하였고, 각각의 KHT, KHO 및 KHY시료를 동시 처리하여 NO 생성이 억제되는지 확인하였다..

그림 1 에서 보는 바와 같이 KHT-1의 경우 음성대조군인 LPS 처리군에 비하여 86% NO생성을 억제하였고, 양성대조군인 항염작용 약품으로 사용되고 있는 dexamethasone과 비교하여도 44%의 NO생성 억제 효능을 보였고, KHT-2는 음성대조군과 비교하여 89%의 NO생성 억제 효능을 보였고, 양성대조군과 비교하여 42%의 LPS로 유도된 NO생성 억제 효능을 보였고, KHT-3은 각각 83% 및 33%, KHT-4는 각각 73% 및 23%, KHT-5는 79% 및 17%의 NO생성 억제 효능을 보였다.

또한, KHO-1의 경우 음성대조군인 LPS 처리군에 비하여 95% NO생성을 억제하였고, 양성대조군인 항염작용 약품으로 사용되고 있는 dexamethasone과 비교하여도 37%의 NO생성 억제 효능을 보였고, KHO-2는 음성대조군과 비교하여 86%의 NO생성 억제 효능을 보였고, 양성대조군과 비교하여 24%의 LPS로 유도된 NO생성 억제 효능을 보였고, KHO-3은 각각 90% 및 40%, KHO-4는 각각 80% 및 30%의 NO생성 억제 효능을 보였다.

KHO-5는 음성대조군과 비교하여 92%의 NO생성 억제 효능을 보였고, 양성대조군과 비교하여 33%의 LPS로 유도된 NO생성 억제 효능을 보였고, KHO-6은 각각 87.5% 및 22%, KHY는 각각 90% 및 38%의 NO생성 억제 효능을 보였다.

모발관련 세포 증식 효과와 NO생성 억제 효능 확인을 통해, KHO-5 및 KHY에서 강력한 모발 세포 증식 및 항염작용을 보인다 할 수 있고, 또한 기능성 화장품 제품 개발을 위한 원료의 단가 부분에서도 경쟁력을 갖추고 있다.

1-2. 인삼 소재 및 한약재 복합 최적 처방 소재의 *in vivo* 동물 모델에서의 효능 확인

- 양모 및 육모 기능성 화장품을 개발하기 위해 효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 최적 처방의 *in vivo* 동물 모델에서의 효능을 확인한 결과
- 1. 효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재가 모성장기 촉진과 성장기 유지에 효과가 있음을 확인하였음.
- 2. 효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재가 모발의 밀도 및 굵기가 증가함을 확인하였음.
- 3. 효소처리 인삼사포닌과 한약재 복합 소재가 조직학적 변화에서도 모낭의 퇴화기 진입 지연과 모성장기 촉진에 효과가 있음을 확인하였음.

가) 육안적 관찰

본 실험에 적용하는 C57BL/6 마우스 탈모모델은 탈모와 관계된 각종 연구와 실험에 제일 일반적으로 적용되는 모델이다. 7주령 마우스의 등쪽 털에 wax-rosin 혼합물을 바른 후 잡아 당겨서 털을 제거하면 동시에 모발이 성장기로 유도되며 이때 적절한 약물을 처리하면 성장기모발이 더욱 잘 자라는지 (모발 성장 증가; raising proliferation rates) 확인할 수 있다.

일반적인 C57BL/6 마우스의 피부색 변화는 7일째 anagen 5기에 진입하면서 회색빛에서 검은색으로 바뀌기 시작하여 11일에서 14일째에는 anagen 6기로서 가장 활발하게 모발 성장이 진행되는 시기이다. *In vitro* 결과에서 강력한 모발 세포 증식 및 NO생성 억제 효능을 확인한 KHO-5 및 KHY 도포 그룹의 경우(그림 35, 36), depilation 후 7일째 피부색은 회색빛으로 다른 그룹과 유사하게 모발주기가 진행되었지만, 9일째 짧은 털이 등을 덮으면서 음성대조군에 비하여 약 1-2일 정도의 모성장기 촉진 효과를 나타냈고 양성대조군인 minoxidil 그룹과도 비슷한 속도의 모성장기가 진행되었다. C57BL/6마우스의 피부색이 회색빛으로 변하는 건 휴지기에서 성장기로 돌아감을 뜻한다. 마우스의 모성장기를 약 1-2일 앞당겼다는 것은, KHO-5 및 KHY 시료가 모성장기 촉진과 성장기 유지에 유의적인 효과가 있음을 알 수 있었다.



	Control	Minoxidil	KHO-05 (mg/ml)	
			50	100
Day 5				
Day 7				
Day 9				

그림 42. C57BL/6 마우스에서 KHO-05에 의한 모발 성장 변화의 육안적 관찰



그림 43. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 성장 변화의 육안적 관찰

제모모델을 통한 성장기 유도 후, KHO-05 및 KHY를 처리한 피부의 접촉식 피부촬영장치를 사용하여 모발의 밀도와 굵기의 변화를 확인하였다. KHO-05 및 KHY에 의한 모발의 밀도 및 굵기의 변화를 확인한 결과, 대조군 및 양성대조군(Minoxidil 투여그룹)에 비하여 모발의 밀도 및 굵기가 모두 증가한 것을 확인함.

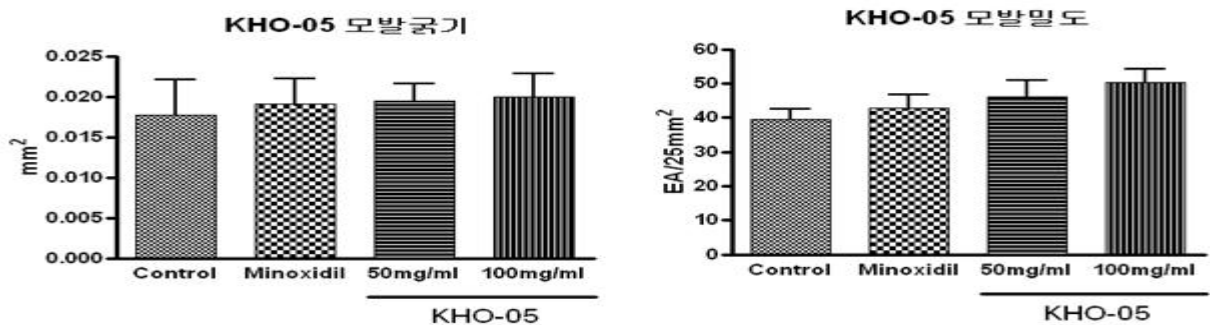


그림 44. C57BL/6 마우스에서 KHO-05에 의한 모발 굵기 및 밀도 변화 확인

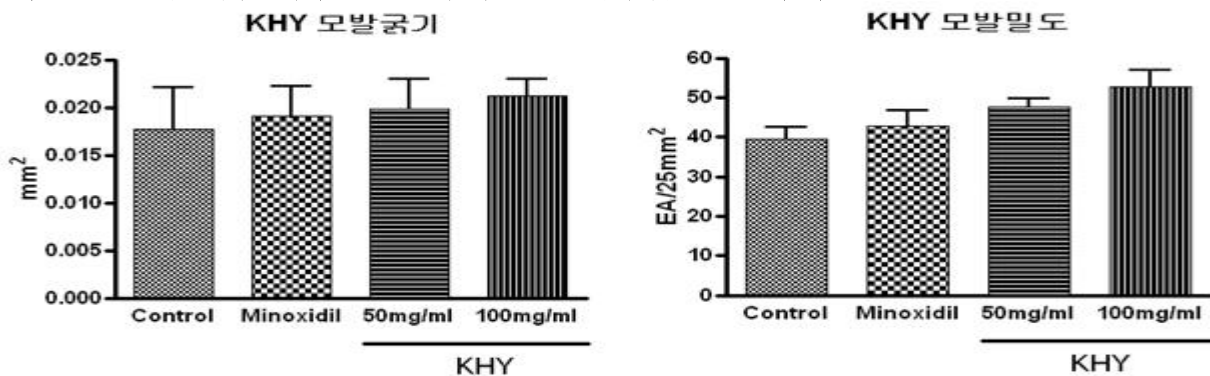


그림 45. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 굵기 및 밀도 변화 확인

나) 조직학적 관찰

좀 더 객관적인 자료를 얻기 위하여 Hematoxylin & Eosin 염색으로 현미경 검사를 실시하였다. 피부 내 모낭(hair follicle)의 변화, 피부 두께 및 조직의 변화를 관찰하기 위하여, 12 일째에 각 군의 마우스를 치사시킨 후, 등 쪽 피부의 발모된 부위의 조직을 채취하여 4% 포르말린 용액으로 고정하였다. 고정 후, 수세, 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, 7 μ m의 절편을 제작하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 마우스 depilation 후 12일째 희생한 마우스의 조직 검사 시 KHO-05 및 KHY 추출물이 대조군보다 모낭의 길이와 크기 및 수에서 큰 차이를 보였다. 음성대조군에 비하여 모낭의 길이가 길어져 성장기의 모낭 형태를 나타냈고, 모낭의 수와 bulb의 크기에서도 유의성 있는 증가를 보였다. 양성대조군에 비하여서도 모낭의 길이 및 굵기에서 유의성 있는 증가를 보였다. 이를 통해, KHO-05 및 KHY 추출물이 육안적 평가뿐만 아니라, 조직학적 변화에서도 모낭의 퇴화기 진입 지연과 모성장기 촉진 효과에 효과적임을 알 수 있었다.

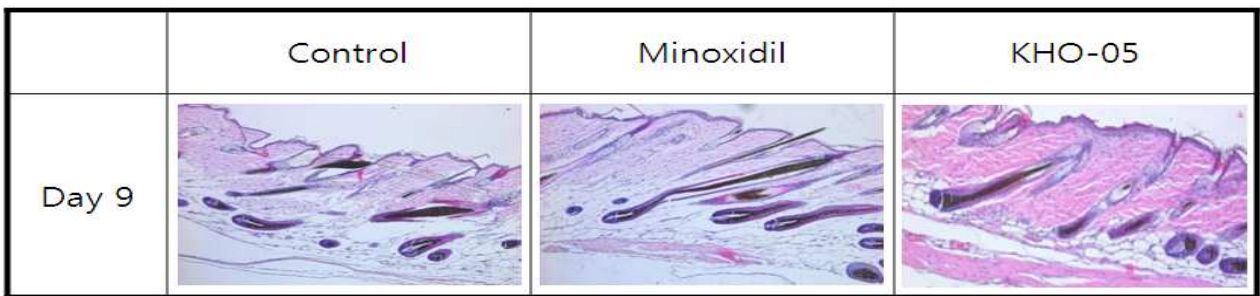


그림 46. C57BL/6 마우스에서 KHO-05에 의한 모발 성장 변화의 조직학적 관찰

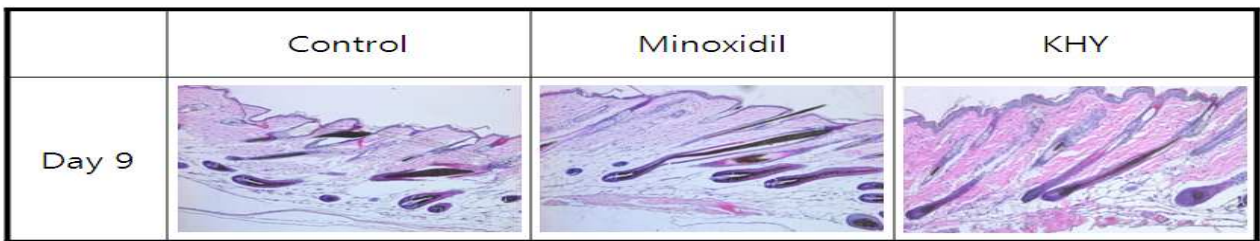


그림 47. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 성장 변화의 조직학적 관찰

1-3. 양모 및 육모 기능성 화장품 최적 소재 활성평가

양모 및 육모 기능성 화장품을 개발하기 위한 소재의 효능을 확인한 결과

1. 모발 관련 세포의 증식률을 확인한 결과 효소처리 인삼사포닌과 한약재 추출물을 혼합한 시료인 KHY가 50% 이상의 증식률로 효과가 탁월함을 확인하였음.
2. 마우스의 모발 성장기 촉진 효능을 확인한 결과 효소처리 인삼사포닌과 한약재 추출물을 혼합한 시료인 KHY가 대조군에 비해 육안적, 조직학적 결과로 휴지기 모발을 성장기로 유도하는 효과가 탁월함을 확인하였음.

가. KHY의 모발 관련 세포 활성 평가 (*in vitro*)

1) KHY의 모발관련 세포 증식 효능 확인

인간 모유두세포 (HHDPC), 각질형성세포 (HaCaT)를 사용하여 KHY 시료에 의한 Cell Proliferation 증가율을 확인하였다 (그림 8.). KHY에 대한 모유두 세포(HHDPC)와 각질 형성 세포(HaCaT)의 증식률

을 MTT assay를 통하여 세포 활성도를 나타낸 것이다.

KHY 시료의 농도는 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 사용하여 MTT assay를 통해 cell proliferation을 측정된 결과, control과 비교하였을 때, KHY 시료 처리에 의한 HHDPC 증식률은 56% HaCaT 증식률은 52% 증가하였다.

또한, 효소처리 인삼 사포닌에 의해 HHDPC 증식률이 40% HaCaT 증식률이 30% 증가하였고, 한방소재는 증식률이 각각 38%, 30% 증가한 것을 알 수 있다.

위 결과를 통해 인간 모유두세포 (HHDPC), 각질형성세포 (HaCaT)의 활성도를 확인한 결과, 효소처리 인

나. KHY 소재의 동물 모델 활성 평가 (*in vivo*)

1) 육안적 관찰

본 실험에 적용하는 C57BL/6 마우스 탈모모델은 탈모와 관계된 각종 연구와 실험에 제일 일반적으로 적용되는 모델이다. 모발 주기 중 휴지기에 있는 7주령 마우스의 등쪽 털에 제모기를 이용하여 털을 제거한 후, 약물을 처리하여 모발 주기 중 휴지기에 있는 모발을 성장기로 유도 하는지 확인할 수 있다.

일반적인 C57BL/6 마우스는 15주 이후에 휴지기를 끝내고 성장기로 진입을 하며 모발이 자라나기 시작하는데, KHY 소재를 도포한 그룹의 경우 (그림 9.), 도포 후 4주차 때부터 성장기로 진입하여 모발이 자라나기 시작하면서 8주차가 되었을 때는 대조군과 비교하였을 때 대부분의 마우스가 성장기로 진입하여 모발이 많이 자라난 결과를 나타내었다. 효소처리 인삼 사포닌과 한방소재만 도포한 그룹과 비교 하여도 KHY를 도포한 마우스 그룹이 2주 이상 빠르게 휴지기에서 성장기로 진입한 결과를 보였다. **마우스의 모주기 중 휴지기에서 성장기로 빠르게 진입 한다는 것은, KHY 시료가 모성장기 촉진과 성장기 유지에 유의적인 효과가 있음을 알 수 있다.**



그림 48. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 성장 변화의 육안적 관찰

제모 모델을 통한 성장기 유도 후, KHY를 처리한 피부의 접촉식 피부촬영장치를 사용하여 모발의 밀도와 굵기의 변화를 확인하였다. KHY에 의한 모발의 밀도 및 굵기의 변화를 확인한 결과, 대조군, 효소처리 인삼 사포닌 및 한방소재에 비하여 모발의 밀도 및 굵기가 모두 증가한 것을 확인 하였다.

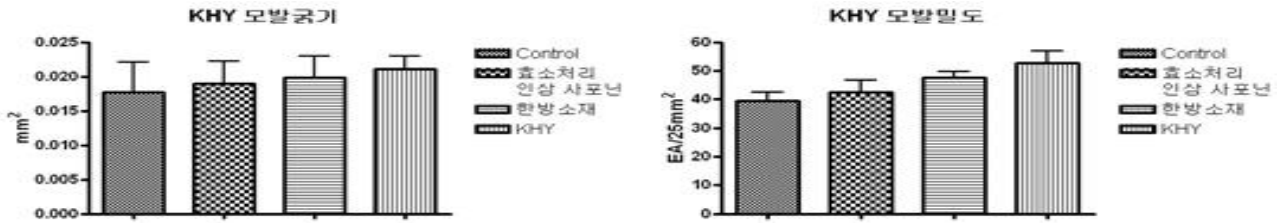


그림 49. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 굵기 및 밀도 변화 확인

2) 조직학적 관찰

좀 더 객관적인 자료를 얻기 위하여 Hematoxylin & Eosin 염색으로 현미경 검사를 실시하였다. 피부 내 모낭(hair follicle)의 변화, 피부 두께 및 조직의 변화를 관찰하기 위하여, 8주 짜에 각 군의 마우스를 치사시킨 후, 등 쪽 피부의 발모된 부위의 조직을 채취하여 4% 포르말린 용액으로 고정하였다. 고정 후, 수세, 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고, 5 μ m의 절편을 제작하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 마우스 제모 후 8주째 희생한 마우스의 조직 검사 시, KHY 시료 도포군이 대조군보다 모낭의 길이와 크기 및 수에서 큰 차이를 보였다. 음성대조군에 비하여 모낭의 길이가 길어져 성장기의 모낭 형태를 나타냈고, 모낭의 수와 bulb의 크기에서도 유의성 있는 증가를 보였다. 양성대조군에 비하여서도 모낭의 길이 및 굵기에서 유의성 있는 증가를 보였다. 이를 통해, KHY 시료 도포군이 육안적 평가뿐만 아니라, 조직학적 변화에서도 모성장기 촉진 효과에 효과적임을 알 수 있었다.

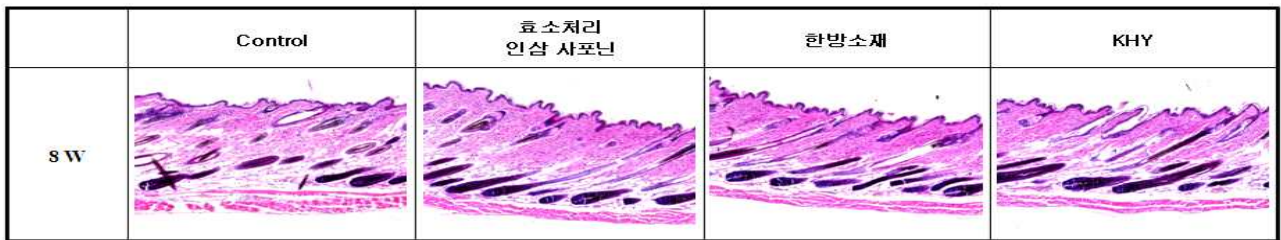


그림 50. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 성장 변화의 조직학적 관찰 결과

3) 기전 탐색

8주간 KHY 소재를 도포한 후, 희생한 마우스의 조직을 채취한 후 모발세포 사멸 관련 지표 단백질 변화의 발현을 확인하였다. 그 결과, 모발세포 사멸 방지 인자인 Bcl-2의 발현 양상은 증가하였고, 모발세포 사멸 인자인 Bax의 발현 양상은 감소하였다. 특히, 효소처리 인삼사포닌과 한방소재 처리군과 비교하여 KHY를 처리한 마우스 조직에서 Bcl-2 발현 증가 및 Bax 발현 감소 효과가 뛰어나게 나타났다.

모발세포 사멸 관련 지표 단백질 발현 양상을 통해 KHY가 모발세포 사멸에 의한 퇴화기로의 진입 방지 효과가 있다고 사료된다.

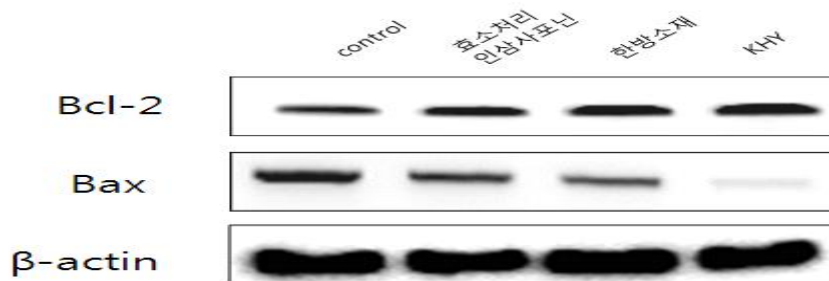


그림 51. C57BL/6 마우스에서 KHY에 의한 모발 세포 사멸 방지 기전 확인

제 2 절 양모 의약외품 소재 표준화 및 양산 조건 확립

양모기능 의약외품의 소재 표준화 및 양산조건 확립

- 세포 활성 평가 및 마우스를 이용한 육안적, 조직학적 모발 성장 효과 확인을 통해 인삼 사포닌과 한약재 추출물 혼합 소재(KHO-05 및 KHY)를 양모기능 의약외품의 최적소재로 확정하고 대량 생산 조건을 확립함.

1. 양모기능 의약외품 (효소처리 사포닌)의 제조공정 확립

1-1. 양모기능 의약 외품(효소처리 사포닌)의 제조공정

상기의 효소처리 인삼의 방법으로 1차 제조를 진행한 후, 농축물을 증류수 10L에 녹이고 에테르 10L를 가하여 분배추출한 후 하층(물층)을 취한다. 물층에 에테르 10L를 가하여 분배추출한 후 하층(물층)을 취한다. => 에테르 분획

물층에 물포화-부탄올 10L를 가하여 분배추출한 후 상층(부탄올층)을 취한다. => 부탄올 분획 1

-하층(물층)에 물포화-부탄올 10L를 가하여 분배추출한 후 상층(부탄올층)을 취한다. 이 조작을 1회 더 반복한다. => 부탄올 분획 2

부탄올층을 한 데 모으고 증류수 3L를 가한 후 분배추출한다. => 부탄올 분획 3

상층(부탄올층)을 감압 농축한다. ---> Crude Saponin

1) 효소반응 방법

각각의 재료(상기 방법에 의해 제조된 사포닌)에 enzyme을 첨가하고, 이를 50mg/ml 의 water solution 으로 제조한 후 55℃, 24hr 반응 후, n-BuOH 동량 첨가하여 추출한다.

2) 공정에 따른 양모기능 의약품 (효소처리 사포닌의) 3-batch 반복실험 결과

표 24. 공정과정에 따른 무게변화 측정 3batch

		①(kg)	②(kg)	③(kg)
에테르 분획	분획 전	19.542	19.6147	18.9775
	분획 후 (물층)	11.5071	11.125	10.9554
부탄올 분획 1	분획 전	19.7071	19.325	19.1554
	분획 후 (부탄올층)	9.7475	9.5586	9.425
부탄올 분획 2	분획 전	18.1487	17.7412	17.8983
	분획 후 (부탄올층)	8.9207	8.7752	8.8529
부탄올 분획 3	분획 전	22.6629	21.3338	21.2779
	분획 후	19.1578	18.6554	17.9843
농축	농축 전	19.1578	18.6554	17.9843
	농축 후	0.166	0.18	0.2

-상기 제조 공정에 따른 무게 측정결과 거의 동일한 결과를 나타냈음을 확인 하였다. 이 결과는 본 연구에서 설정한 조건으로 화장품 원료를 제조할 경우, 매번 제조할 때마다 품질이 매우 균일하게

유지될 수 있음을 말해 준다.

2. 국내산 인삼으로 부터 조사포닌의 생산 공정 및 원료 동등성 분석조건 확립

가. 조사포닌의 제조 방법

- 1) 국내산 인삼을 40mesh로 분쇄한다.
- 2) 추출하고자 하는 시료무게의 10배의 80% 메탄올 또는 에탄올을 이용하여 24시간 냉침 추출을 2회 반복하여 추출물을 얻고, 여과 후 농축 한다.
- 3) 농축물을 증류수에 녹이고 에테르를 가하여 분배추출한 후 하층(물층)을 취한다.

=> 에테르 분획

- 4) 물층에 물포화-부탄올 10L를 가하여 분배추출한 후 부탄올층을 취한다. =>부탄올 분획1
- 5) 하층(물층)에 물포화-부탄올 10L를 가하여 분배추출한 후 상층(부탄올층)을 취한다.
이 조작을 1회 더 반복한다. => 부탄올 분획 2
- 6) 상층(부탄올층)을 감압 농축한다. ---> 조사포닌

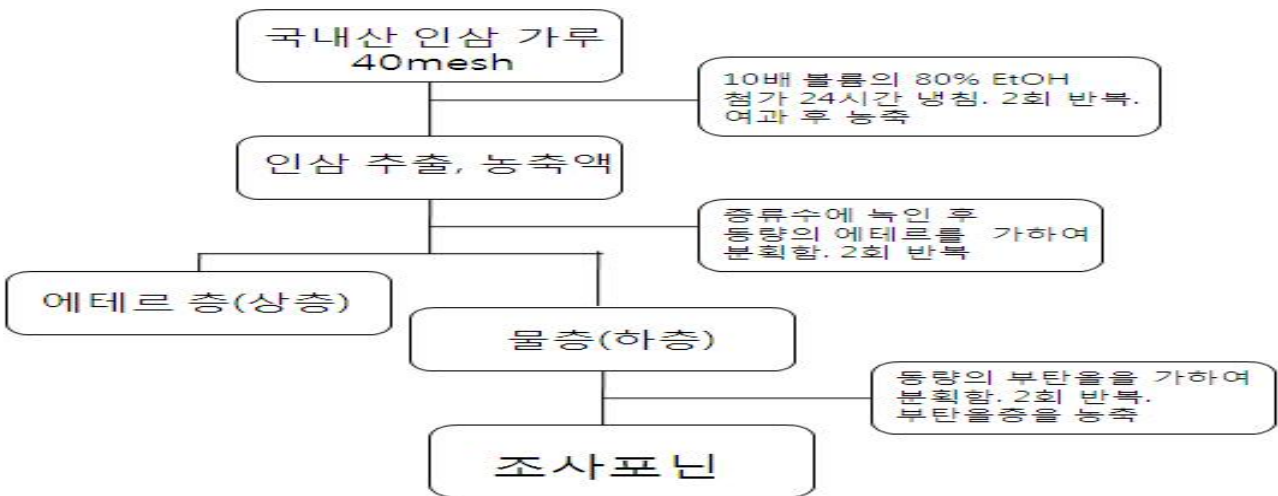


그림 52. 인삼 조사포닌의 제조 방법

나. 동등성 관리를 위한 조사포닌의 성분 분석 연구(HPLC-UV)

- 원료의 표준품 관리 가능한 5개의 peak를 선정함.(Rg1+Re, Rb1, Rc, Rb2, Rd)
- 동등성 기준: 유사도 R>0.9 이상

1) 성분 분석 방법

반응물의 수포화부탄올 추출용액을 감압농축한 후 HPLC용 메탄올에 용해하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. Column은 Sun fire ODS (250× 4.6 mm, ID 5 μm, waters)을 사용하였으며 Waters Empower software를 사용하여 분석 하였다. sample 주입량은 30 μl, 이동상은 증류수(solvent A)와 acetonitrile (solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.2 ml/min, UV detector로 203 nm 에서 측정하였다. Gradient 조건은 solvent A/solvent B, 83/17, 70/30, 62/38, 40/60, 35/65, 15/85, 0/100, 83/17; run time, 0-20, 20-30, 30-35, 35-40,40-45, 45-50, 50-54, 54-65 min로 하였다.

2) 결과

원료의 표준품 관리 가능한 6개의 peak.(Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rd)를 선정하여 원료의 생산에 따른 동등성관리 방법을 확립하였다. 인삼 사포닌의 메이저 성분인 Rg1과 Re는 26%, Rb1은 24%, Rb2는 11%, Rc는 22%, Rd는 6%를 기준으로 하여 이와 유사도 R>0.9 이상을 동등성 기준으로 설정하였다.

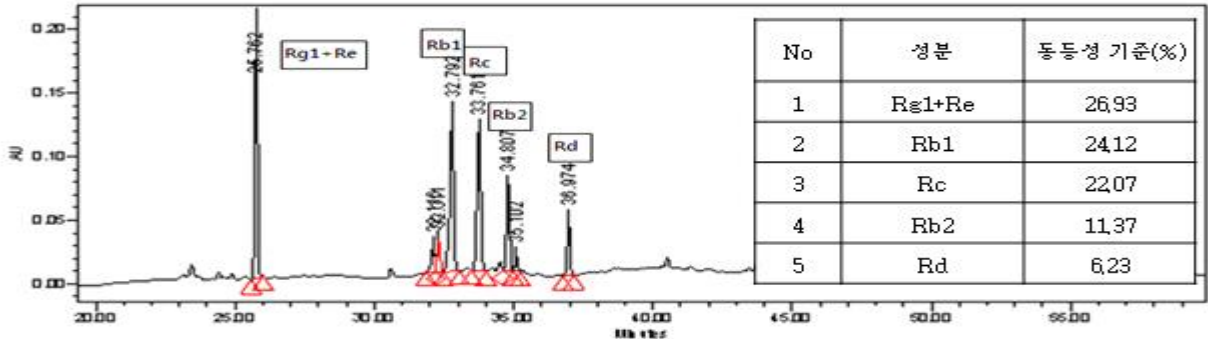


그림 53. 표준품의 품질 동등성관리를 위한 HPLC 분석 data

4. 효소처리 사포닌의 제조공정 확립

- 국내산 인삼 사포닌으로부터 효소처리 인삼 사포닌 원료 생산.
- 미량 사포닌(F2, C-K) 증가 확인

상기 조사포닌의 제조법에 의해 제조된 사포닌에 enzyme을 첨가하고, 이를 50mg/ml 의 water solution 으로 제조한 후 55°C, 24hr 반응 후, 효소처리물을 90°C로 승온 후 55°C로 방냉한 다음 10-15°C 로 냉각 후 수포화 부탄올을 동량 첨가하여 분획을 진행 한다. 사포닌이 추출된 부탄올층만을 취하여 농축하여 잔여 부탄올을 제거한 후 원료로 이용한다. 동등성 확인을 위하여 Batch test를 실시하였다. 1 batch당 500g의 조사포닌을 이용하여 효소처리를 진행 함.

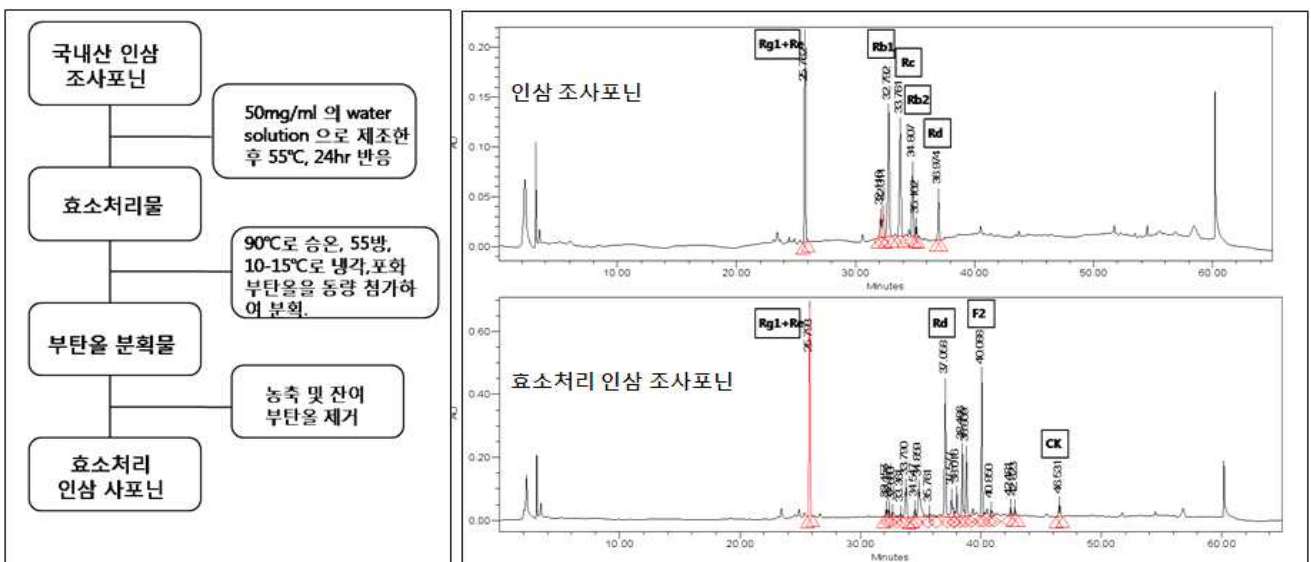


그림 54. 효소처리 인삼 사포닌의 제조 방법 및 미량 사포닌 증가 확인

가. 원료생산 동등성 관리를 위한 성분 분석 연구(HPLC-UV)

- 원료의 동등성 관리를 위하여 관리 가능한 3개의 peak를 선정함(Rg1+Re, Rd, F2).
- Batch 간의 동등성(R>0.9 이상) 확인 완료.

반응물의 수포화부탄올 추출용액을 감압농축한 후 HPLC용 메탄올에 용해하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. Column은 Sun fire ODS (250 \times 4.6 mm, ID 5 μm , waters)을 사용하였으며 Waters Empower software를 사용하여 분석 하였다. sample 주입량은 30 μl , 이동상은 증류수(solvent A)와 acetonitrile (solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.2 ml/min, UV detector로 203 nm 에서 측정하였다. Gradient 조건은 solvent A/solvent B, 83/17, 70/30, 62/38, 40/60, 35/65, 15/85, 0/100, 83/17; run time, 0-20, 20-30, 30-35, 35-40,40-45, 45-50, 50-54, 54-65 min로 하였다. 결과는 아래의 표와 같다.

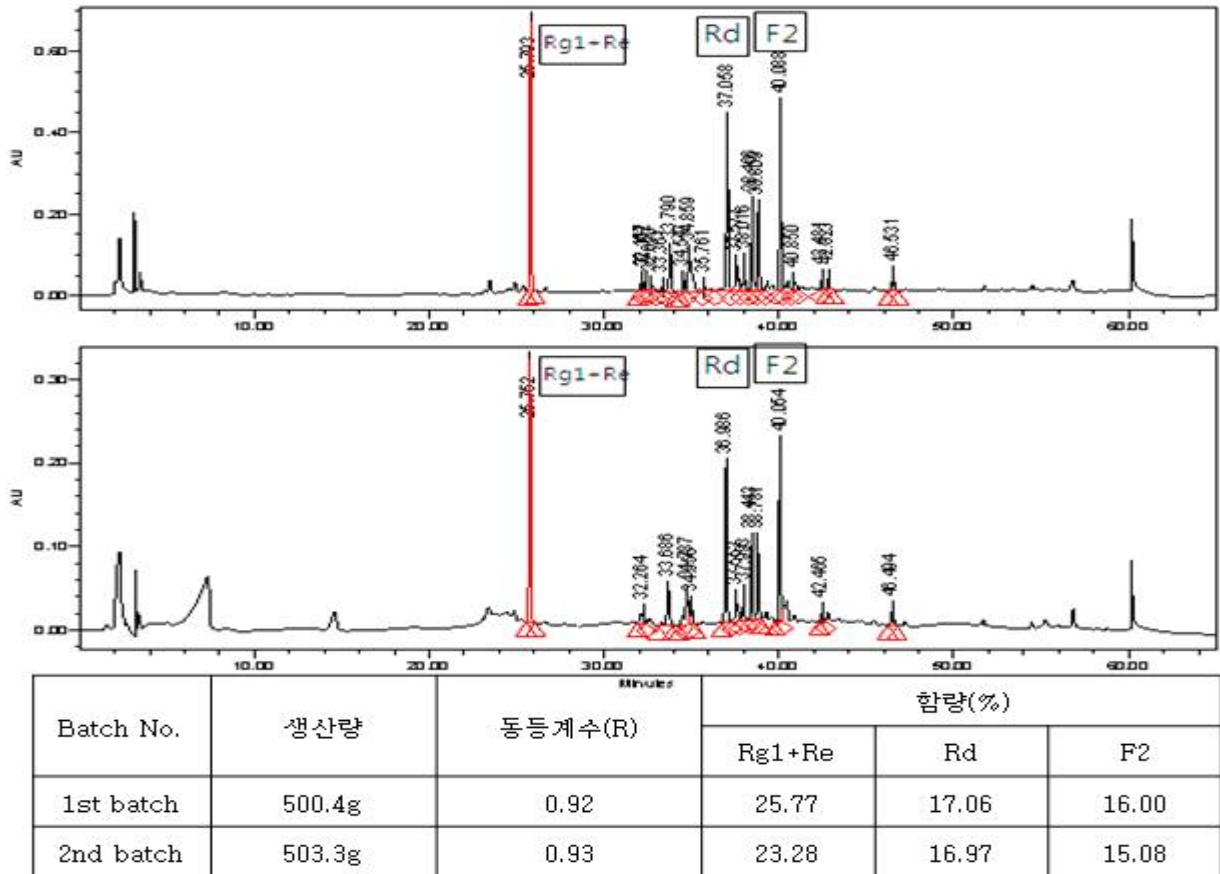


그림 55. Batch 별 품질 동등성관리를 위한 HPLC 분석 data

5. 미량 사포닌 F2 및 C-K의 대량 생산 및 LC/MS를 이용한 정량분석

본 연구팀은 1차년도에 미량 사포닌을 대량 양산하고자 화학적 방법 및 생물학적 방법을 이용한 다양한 사포닌 제조 공정 과정을 구축하였다. 이러한 제조 공정과정을 바탕으로 2차년도에도 미량 사포닌인 F2를 20g 이상 확보하였고 C-K는 30g 이상 확보 하였다.

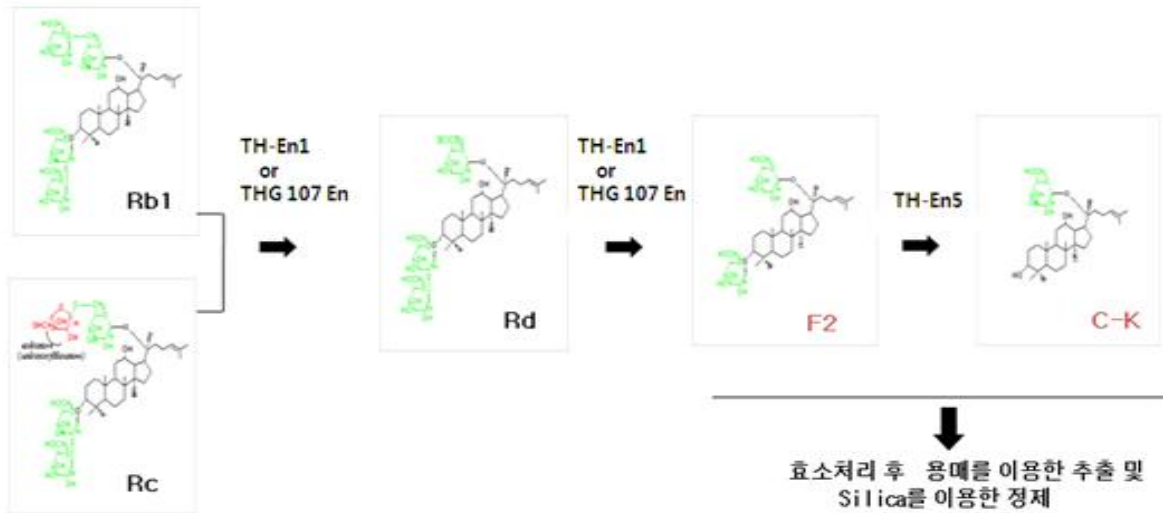
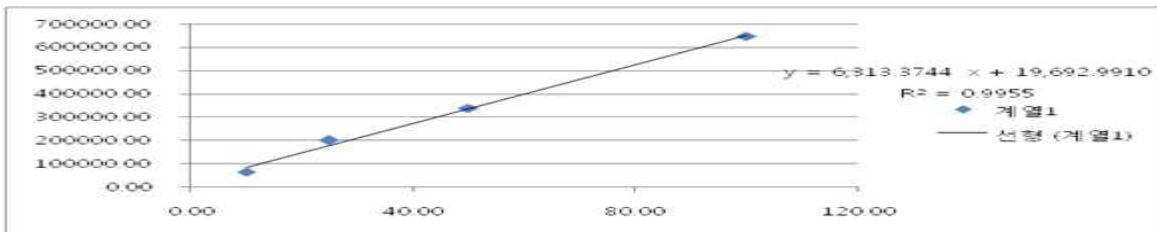


그림 56. 확보된 효소를 이용한 F2 및 C-K생산 제조공정 예

가. F2의 생산 및 순도 분석 결과

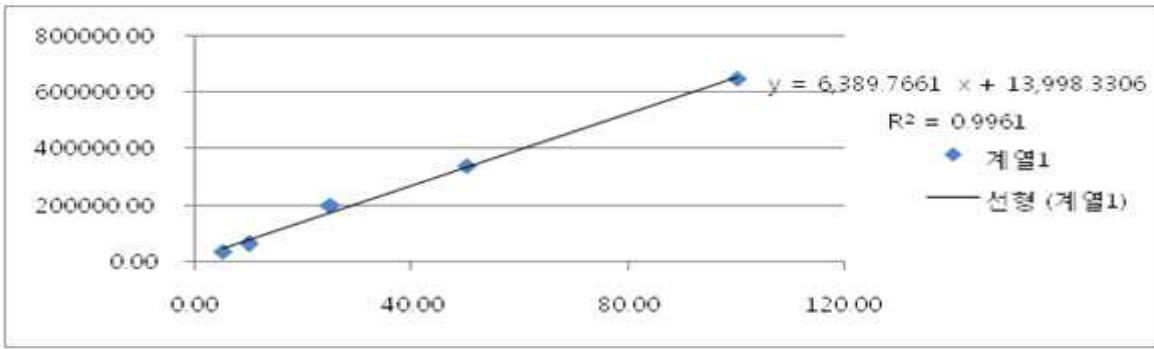


No.	Name	Area	농도(ppm)	(ng/L)	%	확보량(g)
1	10.00	340258.57	11.11	11107.7	-	-
2	25.00	984198.08	24.79	24785.9	-	-
3	50.00	2092475.38	48.33	48327.2	-	-
4	100.00	4561801.50	100.78	100779.1	-	-
5	sample1	3720012.35	82.90	82898.4	82.90	2.06
6	sample2	3940210.00	87.58	87575.7	87.58	2.28
7	sample3	4375926.00	96.83	96830.9	96.83	2.16
8	sample4	4663966.50	102.95	102949.3	102.9	1.08
9	sample5	2049922.63	47.42	47423.4	47.42	1.25
10	sample6	4020150.20	89.27	89273.7	89.27	2.06
11	sample7	1806134.00	42.24	42244.9	42.24	10.16
12	sample8	5283176.25	116.10	116102.1	106.1	1.4



그림 57. 사포닌 전환 효소 및 정제 기술을 이용하여 확보된 F2

나. C-K의 생산 및 순도 분석 결과



No.	Name	Area	농도(ppm)	(ng/L)	%	확보량(g)
1	5.00	37301.00	3.65	3646.9	-	-
2	10.00	63451.32	7.74	7739.4	-	-
3	25.00	198406.54	28.86	28859.9	-	-
4	50.00	338918.67	50.85	50850.1	-	-
5	100.00	645969.69	98.90	98903.6	-	-
6	C-K 1	507240.17	77.19	77192.4	77.19	10
7	C-K 2	371898.93	56.01	56011.5	56.01	20

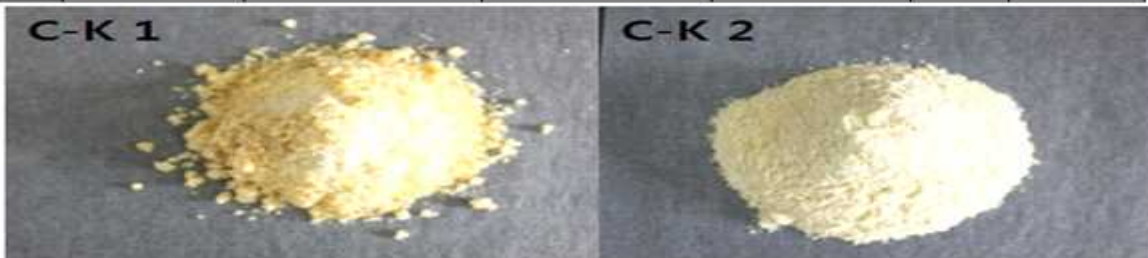


그림 58. 사포닌 전환 효소 및 정제 기술을 이용하여 확보된 C-K

제 3 절 양모 의약외품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가

양모 의약외품 소재의 제형화 및 제형 안전성 평가 결과

- 식품유래 효소를 이용한 PPD 계열의 사포닌 F2, C-K 다량함유한 사포닌 대량 생산 조건을 확립한 상태이며 최적제형조건(미스트 형태의 액상제형)을 개발 완료하였음.

1. 양모 의약외품 소재의 제형화 및 제형 안정성 평가

1-1. 소재의 제형화

인삼유래 양모 관련 소재 3종(G1~G3)에 대해 1~5% 함량 범위에서 제형화 가능 여부를 검토하였다. 사용된 처방은 일반적으로 탈모방지 및 양모제에서 사용하는 미스트 형태의 제형에 적합하도록 액상 제형에 대해 검토하였으며 하기와 같이 검토를 진행하였다.

표 25. 탈모방지 및 양모제의 제형화.

성분	처방-1	처방-2	처방-3	처방-4	처방-5	처방-6	처방-7	처방-8	처방-9
G-1	1.0	3.0	5.0	-	-	-	-	-	-
G-2	-	-	-	1.0	3.0	5.0	-	-	-
G-3	-	-	-	-	-	-	1.0	3.0	5.0
정제수	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100
에탄올	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
피이지 -60 경 화피마 자유	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

G-1 : 효소처리 인삼사포닌 + 한약추출물 1

G-2 : 효소처리 인삼사포닌 + 한약추출물 2

G-3 : 효소처리 인삼사포닌 + 한약추출물 3

제형화 가능 여부의 평가는 인삼유래 소재를 사용하여 액상 제형을 구현하였을 때, 다음의 3가지 항목에 대해 평가하였으며, 전문가 5명이 5단계 기준으로 평가하여 최종적 평균이 3점 이상이 되어야만 제품으로서 가능한 것으로 판단하였다.

- 1) 향취
- 2) 사용감 : 끈적임, 이물감
- 3) 자극감 : 따가움, 가려움

평가 결과는 하기 표와 같으며, 결론적으로 G-1의 인삼유래 성분은 1% 이하에서만 사용 가능하며, G-2는 3%, G-3는 5%의 함량까지 사용 가능한 것으로 판단되었다.

표 26. 제형화 소재의 향취, 사용감, 자극감 결과

항목	처방-1	처방-2	처방-3	처방-4	처방-5	처방-6	처방-7	처방-8	처방-9
향취	4	3	2	4	3	2	5	4	3
사용감	4	3	3	4	3	2	5	4	3
자극감	4	3	2	5	4	4	5	5	4

1-2. 소재의 안정성

인삼유래 양모 관련 소재 3종(G1~G3)에 대해 1~5% 함량 범위에서 제형 안정화 가능 여부를 검토하였다. 사용된 처방은 일반적으로 탈모방지 및 양모제에서 사용하는 미스트 형태의 제형에 적합하도록 액상 제형에 대해 검토하였으며 하기와 같이 검토를 진행하였다.

G-1 : 효소처리 인삼사포닌 + 한약추출물 1

G-2 : 효소처리 인삼사포닌 + 한약추출물 2

G-3 : 효소처리 인삼사포닌 + 한약추출물 3

제형의 안정화 가능 여부의 평가는 인삼유래 소재를 사용하여 액상 제형을 구현하였을 때, 다음의 3가지 항목에 대해 평가하였으며, 1개월, 3개월 경과 후의 변화에 대해 관찰하여 최종적으로 안정화 정도를 평가하였다.

- 1) 향취 : 향의 변취 여부
- 2) 색상 : 외관 색변화 여부
- 3) 분리 : 침전물의 석출 또는 내용물 분리 여부

평가 결과는 하기 표와 같으며, 결론적으로 G-1의 인삼유래 성분은 5% 이상의 함량 사용시 분리의 문제로 사용 불가하며, G-2의 인삼유래 성분도 5% 이상의 함량 사용시 외관 색변화로 인해 사용 불가한 것으로 판단되었다.

표 27. 의약외품 제형의 안정성.

항목	성분	처방-1	처방-2	처방-3	처방-4	처방-5	처방-6	처방-7	처방-8	처방-9
1개월	변취	○	○	△	○	○	△	○	○	△
	외관	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	분리	○	△	△	○	○	○	○	○	○
3개월	변취	○	○	△	○	○	△	○	△	△
	외관	○	○	△	△	△	X	△	△	△
	분리	△	△	X	○	○	△	○	○	○

○ : 양호, △ : 일부 변화는 있으나 수용 가능, X : 변화로 인해 수용 불가



그림 59. G-2 인삼유래 성분의 3개월 후 외관 변화 (좌로부터 처방-4, 처방-5, 처방-6)



그림 60. G-1 인삼유래 성분 처방-3의 분리 변화 (좌로부터 제조 직후, 1개월, 3개월)

1-3. 샘플 제형 조성

표 28. 의약품 시제품의 제형 조성

No.	INCI NAME	컨트롤	샘플
1	WATER	75.25	74.75
2	ALCOHOL	15	15
3	BUTYLENE GLYCOL	3	3
4	PEG-60 HYDROGENATED CASTOR OIL	1	1
5	Glycerin	5	5
6	L-MENTHOL(합성)	0.01	0.01
7	THEOBROMA CACAO (COCOA) SEED EXTRACT	0.1	0.1
8	KHY		0.5
9	Disodium EDTA	0.02	0.02
10	CITRIC ACID	0.01	0.01
11	CYANOCOBALAMIN	0.05	0.05
12	AMMONIUM ACRYLOYLDIMETHYLTAURATE/VP COPOLYMER	0.55	0.55
13	FRAGRANCE	0.01	0.01

1-4. 샘플의 안정성

인삼유래 양모 관련 샘플에 대해 제형 안정화 가능 여부를 검토하였다. 사용된 제형은 일반적으로 탈모방지 및 양모제에서 사용하는 미스트 형태의 제형에 적합하도록 액상 제형에 대해 검토하였으며 하기와 같이 검토를 진행하였다.

제형의 안정화 가능 여부의 평가는 인삼유래 소재를 사용하여 액상 제형을 구현하였을 때, 다음의 3가지 항목에 대해 평가하였으며, 1개월 경과 후의 변화에 대해 관찰하여 최종적으로 안정화 정도를 평가하였다.

- 1) 향취 : 향의 변취 여부
- 2) 색상 : 외관 색변화 여부
- 3) 안정도 : 1개월 경과 후 제형의 상태

평가 결과는 하기 표와 같으며, 결론적으로 변색, 변취 및 안정도 모두 양호한 상태로 제형의 안정성을 확인하였다.

	컨트롤	샘플
비중 (실온, 27.5℃)	0.960	0.961
pH	6.01	5.98
안정도	양호	양호
변색	+	+
변취	+	+
실험결과		

그림 61. 의약외품 시제품의 안정성

- 안정도는 실온에서 약 한달 간 관찰함.
- “+”로 변색, 변취의 정도를 나타냄.
- +(안정) ↔ +++(불안정)

제 4 절 양모 의약외품 소재의 안전성 평가

양모 의약외품 소재의 안전성 평가

- ㈜바이오독스텍에 의뢰하여 KHY의 안전성을 평가함. 평가항목은 경피투여독성실험, 피부자극실험, 안점막자극실험, 피부감작성시험, 광독성시험, 광감작성시험 이었고 그 결과, 피부 감작성 및 광감작성을 제외한 결과에서 KHY의 안전성을 확인하였고, 피부감작성과 광감작성 결과에서는 자극을 할수 있는 물질로 확인되었다..

1. KHY의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험

1-1. 실험방법

KHY를 Sprague-Dawley 계 암수 6주령 랫드에 단회 경피투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 2,000mg/kg의 용량 및 대조군의 2군으로 하고, 암수 각각 5마리씩 단회 경피투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중특정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

1-2. 실험결과

-암수 2,000mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

-KHY를 랫드에 단회 경피투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

2. KHY의 토끼를 이용한 피부자극시험

2-1. 실험방법

KHY의 피부자극시험을 11주령의 수컷 NZW 토끼 3마리를 사용해서 검토하였다.

토끼의 경배부위에 좌·우 각 2부위, 합 4부위의 투여부위를 설정하고, 그 중 2부위를 비찰과부위, 그 외 2부위를 찰과부위로 하였다. 시험물질원말 0.5g을 각 1개의 비찰과 및 찰과부위의 시험물질투여부위에 적용하여 24시간 폐쇄칩포하였다. 투여 후 24, 48 및 72시간에 'Draize의 피부반응 평가표'에 따라서 피부반응을 평가하고, 투여 후 24 및 72시간에 대한 1차피부자극지수 (Primary Skin Irritation Index, P.I.I.)를 구하여 피부자극성을 판정하였다.

2-2. 실험결과

-시험물질투여부위 및 무처치대조부위의 비찰과 및 찰과부위에서 투여 후 24, 48 및 72시간에 홍반 및 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다. 시험물질의 1차피부자극지수 (P.I.I.)는 '0'이었다.

-관찰기간 중, 모든 동물에서 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

-이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 KHY는 토끼의 피부에 대해서 자극성이 없는 것으로 판단된다.

3. KHY의 토끼를 이용한 안점막자극시험

3-1. 실험방법

시험물질 KHY의 안자극시험을 11주령의 수컷 NZW 토끼 6마리를 사용해서 검토하였다.

비세안군은 토끼 3마리의 우안 결막낭 내에 시험물질원말 0.1g을 투여하고, 투여 후 1, 24, 48 및 72시간에 각막, 홍채 및 결막등의 안구병변을 관찰하였다. 세안군은 별도의 3마리의 토끼를 사용해서 비세안군과 동일하게 투여하고, 투여 30초 후에 세안한 후, 세안효과를 확인하였다. 'Draize의 안구병변의 등급'에 따라서 시험물질의 안점막자극을 평가하고, Guollot의 '안점막자극 평가표'를 참조해서 안점막자극의 정도를 분류하였다.

3-2. 실험결과

-비세안군에서 시험물질투여 후 1 및 24시간에 결막발적 (평점 1) 및 결막부종 (평점 1)이 관찰되었으나, 투여 후 48시간에 모두 소실되었다. 비세안군의 I.A.O.I. (Index of Acute Ocular Irritation)는 '4.0'으로, '무자극물'로 분류되었다.

-세안군에서는 시험물질투여 후 1시간에 결막발적 (평점 1) 및 결막부종 (평점 1)이 관찰되었으나, 투여 후 24시간에 모두 소실되었다. 세안군의 I.A.O.I.는 '4.0'으로, 비세안군과 비교하면 안자극성의 소실시간에서 차이가 있으므로 안자극성에 대한 세안효과가 확인되었다.

-관찰기간 중, 각 군의 모든 동물에서 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

-이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 **시험물질 KHY는 토끼의 안에 대해서 '무자극물'로 판단된다. 또한, 안자극성에 대한 세안효과가 확인되었다.**

4. KHY의 기니픽을 이용한 피부감작성시험 (Maximization법)

4-1. 실험방법

시험물질 KHY의 피부감작성시험을 Hartley계 기니픽을 사용하여 Maximization법1)으로 검토하였다. 군 구성은 시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 합 3군 (각 5마리)으로 하였다. 또한, 예비시험의 경피 투여 부위에서 홍반, 부종등의 피부반응이 확인되지 않았기 때문에, 2차감작 24시간 전에 양성대조군을 제외한 각 군의 감작부위에 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 도포하였다.

-시험물질군은 25% 시험물질을 피내투여해서 1차감작하고, 100% 시험물질을 48시간 폐색칩포하여 2차감작하였다. 100% 시험물질 및 주사용수로 24시간 폐색칩포하여 야기한 결과, 야기 패치제거 후 24 및 48시간에 100% 시험물질의 야기부위에서 평점 2의 홍반 (야기 패치제거 후 48시간에 scaling동반)이 모든 동물에서 관찰되었다. 주사용수의 야기부위에서는 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

4-2. 실험결과

-음성대조군은 주사용수로 1차 및 2차감작하고, 100% 시험물질 및 주사용수로 야기한 결과, 모든 관찰 시간에 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-양성대조군은 0.1 및 1% 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)으로 각각 1차 및 2차감작하고, 0.1% CDNB 및 olive oil로 야기한 결과, 모든 관찰시간에 0.1% CDNB의 야기부위에서 평점 3의 강한 홍반 및 부종이 모든 동물에서 관찰되었다. Olive oil의 야기부위에서는 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-관찰기간 중, 각 군의 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

-이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 **시험물질 KHY의 감작률은 '100%'로, 감작등급은 'V'의 '매우 강함'으로 분류되어, 피부감작성이 있는 물질로 판단된다.**

5. KHY의 기니픽을 이용한 광독성시험

5-1. 실험방법

시험물질 KHY의 피부에 대한 광독성 유·무 및 그 정도를 Hartley계 기니픽을 이용해서 검토하였다. 군 구성은 시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 합 3군 (각 5마리)으로 하였다.

시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 제모한 기니픽의 등부 피부에 좌·우 각 1부위, 합 2부위의 2×2 cm의 투여부위를 설정하였다. 시험물질군에는 50% 시험물질을, 음성대조군에는 주사용수를, 양성대조군에는 0.1% 8-Methoxypsoralen (8-MOP)을 0.05 mL씩 각 투여부위에 개방도포하였다. 투여 약 30분 후 좌측을 광조사부위, 우측을 비광조사부위로해서 최종에너지가 약 10 J/cm²이 되도록 UV-A를 조사하였다. 광조사 후 24, 48 및 72시간에 피부반응을 평가하고, 광독성 유·무를 판정하였다.

5-2. 실험결과

-시험물질군은 50% 시험물질의 투여부위에서 광조사 후 24, 48 및 72시간에, 광조사 유·무에 관계없이 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-음성대조군은 주사용수의 투여부위에서 모든 관찰시간에, 광조사 유·무에 관계없이 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-양성대조군은 모든 관찰시간에, 0.1% 8-MOP의 투여부위의 광조사부위에서 홍반 (평균 3 ~ 4) 및 부종 (평균 4)이 모든 동물에서 관찰되었으나, 비광조사부위에서는 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-관찰기간 중, 각 군의 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

-이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 **시험물질 KHY은 광독성이 없는 물질로 판단된다.**

6. KHY의 기니픽을 이용한 광감작성시험 (Adjuvant & Strip법)

6-1. 실험방법

시험물질 KHY의 광감작성을 Hartley계 기니픽을 이용해서 Adjuvant & Strip법¹⁾으로 검토하였다. 군 구성은 시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 합 3군 (각 5마리)으로 하였다. 투여 0일에 감작부위 네 모서리에 주사용수-FCA 유화액을 피내주사한 후, 감작부위를 stripping하였다. 시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 감작부위에 각각 50% 시험물질, 주사용수 및 1% chlorpromazine (CP)을 개방도포한 후, UV-A를 조사하였다. Stripping, 개방도포 및 UV-A 조사를 1일 1회, 5일간 연속해서 실시하였다. 투여 21일에 시험물질군 및 음성대조군에는 50% 시험물질 및 주사용수를, 양성대조군에는 0.1% CP 및 ethanol을 야기부위에 개방도포한 후, UV-A를 조사하여 야기하였다. 야기 광조사 후 24 및 48시간에 피부반응을 평가하였다.

6-2. 실험결과

-시험물질군은 야기 광조사 후 24 및 48시간에, 50% 시험물질의 광조사부위에서 평균 2의 홍반이, 비광조사부위에서는 평균 1의 홍반이 모든 동물에서 관찰되었다.

-음성대조군은 모든 관찰시간에, 50% 시험물질 및 주사용수의 야기부위에서 광조사 유·무에 관계없이 홍반, 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-양성대조군은 모든 관찰시간에, 0.1% CP의 광조사부위에서 평균 3의 홍반 및 평균 3의 부종이 모든 동물에서 관찰되었으나, 비광조사부위에서는 홍반, 부종 등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다. Ethanol의 야기부위에서는 광조사 유·무에 관계없이 홍반, 부종 등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

-관찰기간 중, 각 군의 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

-이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 50% KHY는 비광조사부위보다 광조사부위에서 강한 피부반응이 확인되었으므로, 광감작성이 있는 물질로 판단된다.

제 5 절 양모 의약외품 소재의 임상시험 평가

KHY의 임상시험평가

-세명대학교에서 임상시험평가 진행 완료, 통계처리가 늦어져 2월 중에 결과 도출 예정.

1. 임상시험의 명칭 : 남성형 중등도 탈모 환자에서 YTH-005의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험
2. 임상시험 책임자 : 세명대학교부속제천한방병원 한방안이비인후피부과 김희택 교수
3. 임상시험 실시기관 : 세명대학교부속제천한방병원 충북 제천시 세명로 65번지
4. 임상시험의 목적 : 남성형 중등도 탈모 환자에서 YTH-005의 탈모방지 및 양모와 관련된 유효성 및 안전성을 평가하고자 하였다.
5. 시험설계 : 단일기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험
6. 대상자수 : 최종 평가가능 예수 58명 (YTH-005군: 29명, 위약군: 29명), 20%의 탈락을 고려 시 군당 36명 총 72명 이었으며, YTH-005군에 36명, 위약군에 36명이 등재 되었으나, 위약군에서 1명 중도 탈락하여 전체 71명이 임상시험을 완료하였다.
7. 연구대상 : 만 18 세 이상, 만 54 세 이하의 안드로겐성 탈모증으로 진단된 남성
8. 선정기준 : 선정기준 (대상 대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 했었다)
 - 1) 만 18세 이상, 만 54세 이하의 안드로겐성 탈모증으로 진단된 남성
 - 2) Basic and specific (BASP) 분류에 의해 basic type은 M2 이상 또는 C2 이상 또는 U1 이상, specific type은 V1 이상 또는 F1 이상으로 진단된 남성 안드로겐성 탈모증 환자
 - 3) 연구기간 동안 특별한 모발용품이나 모발관리 및 조작을 하지 않을 환자
 - 4) 연구기간 동안 동일한 머리 모양을 유지할 환자
 - 5) 본 임상시험의 개요를 설명 받고 본 시험의 동의서에 서명한 자
9. 제외기준 : 제외기준 (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다.)
 - 1) 최근 6개월 사이에 시험 결과에 영향을 줄만한 심각한 신장(serum creatinine>2.0mg/dL) 또는 심장 질환 또는 기타 조절되지 않는 만성 질환인 고혈압(140/90mmHg), 당뇨(공복혈당 160mg/dL 이상) 등이 있는 자
 - 2) 감염성 피부 질환이 있는 자
 - 3) 6개월 내 외과적 수술을 받은 경험이 있는 자
 - 4) 모발 이식술, 두피 축소술 등의 탈모에 대한 외과적 처치를 받은 적이 있는자
 - 5) 경구 Dutasteride(탈모치료제)를 사용한 적이 있는 자
 - 6) 최근 1개월간 경구 Finasteride (탈모치료제)를 복용하고 있는 자
 - 7) 최근 1개월간 국소 발모제 및 양모, 욱모제를 도포하고 있는 자
 - 8) 최근 1개월간 다음 약물을 복용하고 있는 자: 스테로이드, 세포사멸제, 혈관확장제, 항고혈압제, 항진간제, 베타수용체 차단제, 기관지 확장제, 이노제, spironolactone, cimetidine, diazoxide, cyclosporine, ketoconazole (단, 용량 변동 없이 시험 참여 전부터 복용하고 있다면 연구자 판단에 따라 허용하였다.)
 - 9) 최근 1개월간 국소 스테로이드 제제를 두피에 도포하고 있는 자
 - 10) 심한 지루성 피부염, 두피 건선, 두피 감염 등으로 시험 물질 도포에 지장이 있을 것으로 판단되는 자
 - 11) 안드로겐성 탈모증 이외에 원형 탈모증, 휴지기 탈모증, 반흔성 탈모증 등의 다른 탈모 질환이 있는

환자

- 12) 약물 또는 알코올 남용의 정신과적 질환이 있는 자
- 13) 인삼이나 인삼 꽃, 열매 또는 다른 종류의 식물 꽃에 대한 알려진 과민반응을 가진 자
- 14) 심한 간 기능 장애(ALT, AST >정상 상한치 2배)가 있는 자
- 15) 3개월 이내에 다른 임상시험용 의약품을 복용한 자
- 16) 침, 뜸, 한약, 마사지 등 두피를 위한 치료를 받고 있는 자
- 17) 인삼, 국화 등 시험제품과 관련이 있는 건강기능식품을 복용하고 있는 자
- 18) 임상시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 시험자가 부적합하다고 판단한 자

10. 시험제품명 : YTH-005(효소처리 인삼사포닌 국화물)

11. 대조제품명 : 위약(Placebo)

12. 투여방법 및 투여기간 : 임상시험용제품은 1일 3회(아침 세정 후, 저녁 식후, 취침 전) 1회 4번씩 탈모 부위에 도포하고 손으로 가볍게 3분간 마사지 하게 하였다. 8주간 하루 약 1.67ml씩 사용하게 하였다.

● YTH-005 사용군

시험제품을 1일 3회(아침: 세정 후, 저녁 식후, 취침 전), 1회 4번씩 탈모 부위에 도포하고 손으로 가볍게 3분간 마사지 시행. 8주간 하루 약 1.67ml씩 16주간 사용하였다.

● 위약(Placebo) 사용군

시험제품을 1일 3회(아침: 세정 후, 저녁 식후, 취침 전), 1회 4번씩 탈모 부위에 도포하고 손으로 가볍게 3분간 마사지 시행. 8주간 하루 약 1.67ml씩 16주간 사용하였다.

13. 시험기간 : 각 대상자 별로 스크리닝 2주, 약제투여 후 16주가 소요되었으며, 전체 72명 대상자의 전체 시험기간은 2013년 5월 20일 ~ 2013년 11월 08일로 약 25주간 진행하였다.

14. 평가방법 :

유효성 (efficacy)

① 1차 유효성 평가 (Primary endpoint):

탈모 부위에서 확대 사진 기술(Phototrichogram)에 의해 확인되는

- 제품 사용 전후의 총 모발 수의 개선율

② 2차 유효성 평가 (Secondary endpoint):

아래에 평가 변수를 포함하여 모발 개선 평가에 필요한 변수를 측정하였다.

- 제품 사용 전 후의 총 모발 두께의 개선율
- 8, 16주째의 모발 증식 변화에 대한 대상자 평가
- 8, 16주째의 사진 촬영에 의한 연구자 평가

15. 안전성 (safety)

• 시험제품 투여 전과 투여 중, 투여 16주 후에 실험실적 검사, 활력 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.

• 평가 시점마다 설문조사와 연구자의 관찰에 의해 주관적 자극감과 객관적 자극 등 두피 안전성을 평가하였다.

제 5 장 인삼소재 응용 기반 기술 개발

1. 사포닌의 표준품 확보와 사포닌 제조 공정 과정 확립

- 1-1. 사포닌 전환활성이 높은 토양균주 및 해당 균주 유래의 조효소를 이용한 인삼의 미량 사포닌을 확보하기 위한 연구하여 F2로 90% 전환 가능한 토양유래 균주의 THG-107번 선정함.
- 1-2. 사포닌 전환 활성이 있는 누룩균주와 맥아추출물이 사포닌 전환에 시너지 효과를 확인함.
- 1-3. 누룩유래 효소를 이용하여 F2, C-K의 전환을 확인하였고, 이 전환된 소재를 기반으로 용해도를 이용한 간편한 방법만을 적용해서 98%이상 고순도의 인삼 사포닌 소재를 대량 생산할 수 있는 기반을 확보함.

2. 유산균 등 식용균주의 Saponin 전환활성 탐색

인삼의 사포닌을 형질 전환시키는 효능이 있으면서도 피부에 일정 이상의 기능이 있는 다양한 식용균주 및 대사산물을 탐색한 결과 베타글루코시다제 활성이 있는 유산균 균주 601종 확보함.

3. 피부 환경 개선을 위한 기능성 소재의 선별 및 이를 활용한 기능성 인삼 소재 개발 연구

- 3-1. 문헌조사를 통하여 항산화 활성 및 미백 활성을 검토할 수 있는 rapid detection method를 확립함.
- 3-2. 인삼 사포닌의 대사체 전환 활성이 우수하며, 항산화력 및 미백 활성 등 피부 환경을 개선시킬수 있는, 김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides* D433을 본 과제에 적합한 균주 선정함.
- 3-3. 피부 환경 개선능이 우수한 기능성 소재의 산업화 공정을 개발을 위해 개발된 소재의 산업적 적용을 위하여 어떠한 작업자라도 작업을 수행 할 수 있도록 작업 매뉴얼 및 주요 check list를 작성함.

제 1 절 토양 및 누룩유래 균주의 Saponin 전환활성 탐색

다양한 사포닌의 표준품을 확보와 사포닌 제조 공정 과정을 구축하여, 대량의 고순도 F2 C-K를 확보 하였다.

- 다양한 사포닌의 표준품을 확보하여 각 기업으로부터 요구되는 최적 효능의 인삼소재를 개발하고 제조공정을 및 양산시스템을 통한 미량 사포닌 대량생산을 위하여 표 1과 같이 사포닌 표준품을 확보하였고, 미량 사포닌을 대량 양산하고자 화학적 방법 및 생물학적 방법을 이용한 다양한 사포닌 제조 공정 과정을 구축하였다. 이에 대한 사포닌 제조 공정 관련은 아래 표2에 간략히 정리 하였다 또한 생물학적 전환방법과 사포닌 제조공정 및 양산시스템을 통하여 대량의 고순도 F2및 C-K를 확보 하였다.

표 29. 사업단의 보유 사포닌 표준품

No.	Saponin	R1	R2	Formula	분자량	Column2
1	Rh4	H	Glc	C36H60O8	620	PPD-H2O-cis
2	Rk3	H	Glc	C36H60O8	620	PPD-H2O-trans
3	Rh2(S)	Glc	H	C36H62O8	622	PPD-20(S)
4	C-K	-	glu	C36H62O8	622	
5	Rh2(R)	glu	-	C36H62O8	622	
6	Rh1(S)	Glc	H	C36H62O9	638	PPT
7	F1	H	Glc	C36H62O9	638	PPT
8	Rh1(R)	H	Glc	C36H62O9	638	PPD-20(R)
9	C-Mc	-	glu-ara(f)	C41H70O12	754	
10	C-Y	-	glu-ara(p)	C41H70O12	754	
11	F4(Rg4)	H	Glc2-Rha	C42H70O12	766	PPD-H2O-cis
12	Rg5	Glc2-Glc	OR2=H	C42H70O12	766	PPD-H2O-cis
13	Rg6	H	Glc2-Rha	C42H70O12	766	PPD-H2O-trans
14	Rk1	Glc2-Glc	OR2=H	C42H70O12	766	PPD-H2O-trans
15	Rg3(S)	Glc2-Glc	H	C42H72O13	784	PPD-20(S)
16	Rg2(S)	Glc2-Rha	H	C42H72O13	784	PPT
17	Rg2(R)	H	Glc2-Rha	C42H72O13	784	PPD-20(R)
18	Rg3(R)	Glc2-Glc	OR2=H	C42H72O13	784	PPD-20(R)
19	F2	glu	glu	C42H72O13	784	
20	Rg1	Glc	Glc	C42H72O14	800	PPT
21	Rf	Glc2-Glc	H	C42H72O14	800	PPT
22	Rs3(S)	Glc2-Glc6-Ac	H	C44H74O34	827	PPD-20(S)
23	Rs3(R)	Glc2-Glc6-Ac	OR2=H	C44H72O33	827	PPD-20(R)
24	C-Mc1	glu	glu-ara(f)	C47H80O17	917	
25	C-Mx1	glu	glu-xyl	C47H80O17	917	
26	C-O	glu	glu-ara(p)	C47H80O17	917	
27	Rd	Glc2-Glc	Glc	C48H82O18	947	PPD-20(S)
28	Re	Glc2-Rha	Glc	C48H82O18	947	PPT
29	Gyp17	glu	glu-glu	C48H82O18	947	
30	R1	glu-glu	xyl	C48H82O18	947	
31	Rb2	Glc2-Glc	Glc6-Ara(p)	C53H90O22	1079	PPD-20(S)
32	Rb3	Glc2-Glc	Glc6-Xyl	C53H90O22	1079	PPD-20(S)
33	Rc	Glc2-Glc	Glc6-Ara(f)	C53H90O22	1079	PPD-20(S)
34	Rb1	Glc2-Glc	Glc6-Glc	C54H92O25	1109	PPD-20(S)

표 30. 사포닌 제조공정 표준화 및 파일럿 생산시스템을 통하여 확보한 사포닌

No.	Saponin	Purity(%)	보유량(g)	제조공정
1	F2	95	10g	양산공정 확보
		65	10g	양산공정 확보
2	C-K	90	10g	양산공정 확보
		95	50g	양산공정 확보
3	Rb1	80	10g	양산공정 확보
4	Rc+Rd	62+12	5g	섞여있는 것
5	Rd	92	20g	양산공정 확보

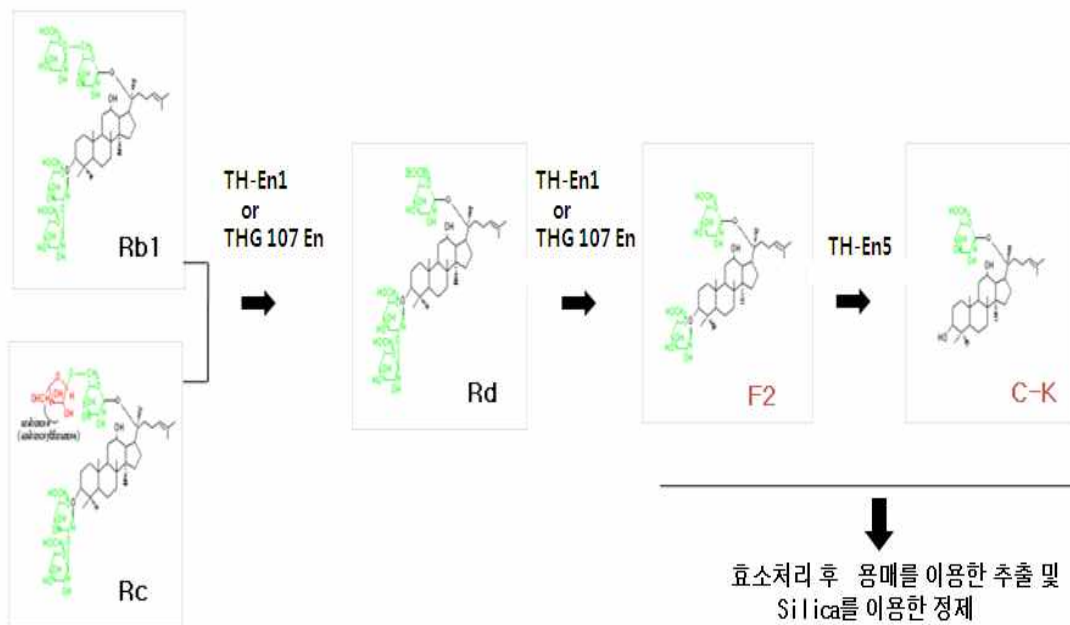


그림 62. 효소를 이용한 F2 및 C-K생산 제조공정 예

- 상기 그림은 누룩유래 효소(TH-En1,TH-En5) 및 토양유래 균주의 효소(THG 107 En)를 이용한 F2 및 C-K를 생산 하는 공정도 이다.

1. 토양유래 박테리아 및 박테리아의 조효소를 이용한 saponin 사포닌 전환 연구

사업단의 원활한 연구개발을 진행하기 위하여 다량의 사포닌을 확보할 필요성을 확인하고, 사포닌 표준품을 개발하기 위하여 상대적으로 사포닌 전환활성이 높은 토양균주 및 해당 균주 유래의 조효소를 이용한 인삼의 미량 사포닌을 확보하기 위한 연구를 진행 하였다.

토양으로부터 800여종의 박테리아를 순수 분리 하였고, 분리한 균주를 대상으로 β -glucosidase 활성평가를 통해 300여종의 β -glucosidase 활성이 있는 균주를 확보하였다. 그 중 활성이 강한 균주를 대상으로 사포닌 전환활성 검증을 진행 하였으며, 그 결과 약 50종의 사포닌 전환활성이 있는 균주를 최종 확보하였고 그 중 전환 활성이 가장 강하면서도 신종균주로 확인된 4종의 균주 (THG-15, THG-A18, THG-45, THG-107)를 대상으로 사포닌 전환 활성을 재검토한 결과 1일차에서 THG-107번 균주가 다른 균주 및 균주를 처리하지 않은 것(control)과 비교하였을 때 TLC상에서 Rb1과 Rc의 spot은 확인되지 않았고 Rd도 상당부분 전환된 것으로 확인되었다. 또한 기존에 존재하지 않았던 많은 양의 F2가 새롭게 생성된 것으로 보아 균주에 의해 상당부분 존재 하였던Rb1과 Rc 및 Rd는 F2로 전환되었음을 예측 할 수 있었다. 균주 배양 2일차에서는 THG-45번을 제외한 THG-15, THG-A18, THG-107번 균주가 모두 Rb1과 Rc및 Rd를 주로 F2로 전환시킴을 확인 할 수 있었고 약간의 C-K도 확인되었다. 이 결과를 바탕으로 THG-107번 균주가 가장 빠른 시간 내에 major saponin인 Rb1과 Rc및 Rd를 minor saponin, 특히 F2로 상당부분 전환시키는 ginsenosidase 활성이 가장 강하다고 판단되어 이 균주의 효소를 이용한 사포닌 전환활성 평가 연구를 진행하였다.

표 31. 토양유래 균주 중 전환활성이 가장 빠르면서 신종균주로 확인된 4종의 균주를 이용한 사포닌 전환활성 합량 비교표.

saponin	합량(%)								
	발효 전	발효 후 1일차				발효 후 2일차			
		45	15	107	18	45	15	107	18
C-K	-	-	0.84	-	-	4.31	5.56	3.15	1.43
F2	-	1.3	1.43	67.34	1.52	20.26	61.38	73.28	65.26
Rd	31.18	30.89	28.5	16.4	31.24	22.47	14.95	12.74	18.39
Rc	26.79	26.77	25.4	-	25.79	9.49	-	-	-
Rb1	46.19	45.03	42.5	-	46.19	39.21	-	-	-

표 32. 등록 토양 균주

균주명	Accession No.	Similarity(%)	KACC No.
Pedobacter sp. nov., THG-DR3	KC252614	97.96%	KACC 17172
Burkholderia sp. nov., THG-DR1	KC252619	98.72%	KACC 17169
Microbacterium sp. nov., THG-C26	JX997973	98.51%	KACC 17124
Microbacterium sp. nov., THG-C31	JX997974	98.87%	KACC 1712
Chryseobacterium sp. nov., THG-C4-1	JX843771	97.65%	KACC 16985
Flavobacterium sp. nov., THG-107	JN196130	99.10%	KACC 16219
Sphingomonas sp. nov., THG-DT81	KC252615	97.97%	KACC 17173
Arthrobacter sp. nov., THG-GM18	KF150696	98.50%	KACC 17531
Arthrobacter sp. nov., THG-GM14	KF381508	98.49%	KACC 17648
Terrabacter sp. nov. THG-e54	KF314196	98.58%	KACC 17589
Pedobacter sp. nov., THG-G12	KF150693	97.51%	KACC 17529
Pedobacter sp. nov., THG-T11	KF532135	95.92%	KACC 17660
Brachy bacterium sp. nov., THG-DL23	KC252616	98.46%	KACC 17174
Pseudomonas sp. nov., THG-DR11	KC252617	98.58%	KACC 17167
Ochrobactrum sp. nov., THG-DT39	KC252620	98.83%	KACC 17170
Bacillus sp. nov., THG-b518	KF314192	99.16%	KACC 17585
Microbacterium sp. nov., THG-a52	KF314189	98.72%	KACC 17582
Arthrobacter sp. nov., THG-b23	KF314190	97.73%	KACC 17583
Arthrobacter sp. nov., THG-b514	KF314191	98.13%	KACC 17584
Arthrobacter sp. nov., THS-d23	KF314193	98.94%	KACC 17586
Arthrobacter sp. nov., THG-e16	KF314194	98.65%	KACC 17587
Herbaspirillum sp. nov., THG-e31	KF314195	98.23%	KACC 17588
Lysobacter sp. nov., THG-A13	KF483861	98.53%	KACC 17646
Arthrobacter sp. nov., THG-NB4	KF483862	98.50%	KACC 17647
Rhodanobacter sp. nov., THG-DD7	KF532124	98.38%	KACC 17650
Flavobacterium sp. nov., THG-DJ7	KF532125	97.72%	KACC 17651
Chryseobacterium sp. nov., THG-EP9	KF532126	97.51%	KACC 17652
Chryseobacterium sp. nov., THG-TY14	KF532129	97.74%	KACC 17655
Chryseobacterium sp. nov., THG-T6	KF532131	98.63%	KACC 17656
Pseudomonas sp. nov., THG-EP13	KF532127	98.73%	KACC 17653
Pseudomonas sp. nov., THG-T1	KF532133	98.80%	KACC 17659
Stenotrophomonas sp. nov., THG-EP20	KF532128	98.74%	KACC 17654
Microbacterium sp. nov., THG-KL4	KF532130	97.85%	KACC 17657
Xanthomonas sp. nov., THG-T15	KF532132	97.82%	KACC 17658
Sphingobacterium sp. nov., THG-T14	KF532134	98.22%	KACC 17661

2. 토양유래 균주의 (THG-107번 균주) 조효소를 이용한 F2의 생산 .

- 효소액을 PPD의 30%(v/v)로 처리하여 사포닌 전환을 확인한 결과, PPD 계열의 메이저 사포닌 특히 Rb1, Rb2, Rc, Rd가 형질 전환율은 평균 90% 이상으로 F2로 전환된 것을 확인할 수 있었다.

2-1. 실험 방법

(1) 균주선정 및 조효소의 조제 방법

상기미량 사포닌을 확보를 위한 대표균주 선정을 통하여 F2의 생산이 탁월한 균주(Flavobacterium sp. THG-107 NCBI JN196130, KACC 16291)의 효소를 이용하여 사포닌 전환 연구를 진행하였다.

조효소의 조제는 균주를 R2A broth에 접종하여 27°C, 180 rpm의 shaking incubator에서 48 시간 동안 전 배양하여 균 배양액을 얻었다. -4°C에서 10,000×g로 10 분 원심분리 하여 상층액을 제거한 후 침전된 세포만을 얻었다. -potassium phosphate buffer (pH 7)를 첨가 (1/100, v/v)하여 세포를 부유물로 만든 후, -Sonicator를 이용해 세포를 파쇄하고, 이를 다시 4°C에서 10,000×g로 10 분 원심분리 하여 상층액만을 취하여 조효소액으로 사용하였다.

(2) 조효소액과 기질과의 반응

- PPD mixture(Rb1, Rb2, Rc, Rd)를 10,000 ppm의 농도로 0.5M Potassium phosphate buffer pH7.0 에 녹였다.-상기 (2)와 같은 방법으로 조제한 효소액을 PPD의 20%와 30%로 처리하여 27°C shaking incubator에서 24시간 동안 배양하여 전환 활성을 확인 하였다.

2-2. 결과

조효소액을 PPD의 30%(v/v)로 처리하여 27°C shaking incubator에서 12 시간 동안 배양하여 사포닌 전환을 확인한 결과, THG-107번 균주의 효소는 PPD계열의 주종 사포닌을 주로F2로 90%이상 전환시키는 결과를 나타내었다, 이는 상기 균주로 실험한 결과 값과 같음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 기반으로 효소를 이용하여 순도 90%이상의 F2를 5g이상 확보하였다.

표 33. 효소를 이용한 진세노사이드 전환

Ginseno side	% area	
	반응 전	반응 후
Rb1	47.52	
Rc	15.92	
Rb2	8.27	
Rd	28.30	5.81
F2		94.18
C-K		

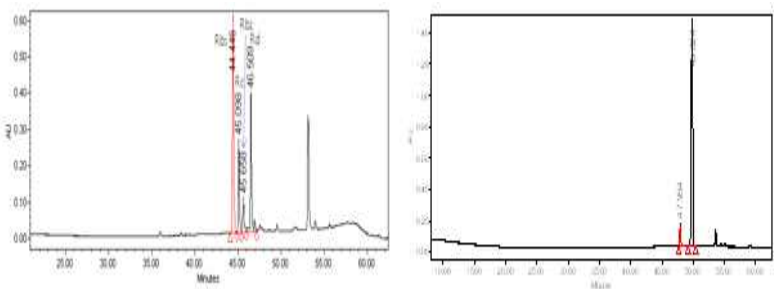


그림 63. 효소 처리 전후의 진세노사이드 HPLC 패턴 변화

3. 맥아 및 누룩유래 균주를 이용한 사포닌 전환 연구

- 본 연구진은 사포닌 전환 활성이 있는 누룩균주와 맥아 추출물이 사포닌 전환에 시너지 효과를 낼 것으로 기대하고 본 실험을 진행하였으며, 그 결과 시너지 효과를 확인하였고 그에 따른 적절한 반응 조건과 결과를 도출하였음.

1) 시판되는 맥아 추출물에서는 사포닌 전환을 나타내지 않아 맥아의 추출물이 포함하는 맥아의 조효소가 사포닌 전환에 활성이 있다는 것을 확인하였음.

2) 누룩 유래 균주와 맥아 추출물의 혼합 발효에 가장 적합한 PPD 농도는 500 ppm으로 PPD 계열의 major saponin이 63% 이상 F2 및 C-K로 전환된 것을 확인하였음. (전환율은 TLC Data를 Quantity One® soft[Bio-Rad]의 Density tools로 추정된 수치임)

3) 누룩 유래 균주와 맥아 추출물의 혼합 발효를 대량(사포닌 15g 이상)으로 시행한 결과, 20% 이상 F2 및 C-K로 전환되었지만 기존 소량으로 진행할 때(F2, C-K로 전환율 약 70%)보다 효율이 떨어진 것을 확인하였음.

3-1. 맥아의 조효소를 이용한 방법

(1) 방법

가) 조효소(맥아 추출물)의 조제 방법

1g의 맥아 가루에 중량대비 20%의 수분을 가한 뒤 5ml의 0.14M NaCl/ 50mM potassium phosphate (pH 5.0~6.0) buffer (1X)를 혼합하고, 1시간 동안 추출하였음. 여과지에 한번 거르고, 그 여과액을 다시 syringe filter(0.45um) 하여 여과 되어 나온 액을 취하였음. 이 과정 중에 다음과 같이 변형하여 추출한 조효소액 활성을 비교하였음

표 34. 맥아 조효소 추출 단계

	Malt preparing	Extraction [1hr]	Filtration
1	70°C, 1hr	Shaking	Centrifuge
2	70°C, 1hr	Shaking	Syringe filter
3	70°C, 1hr	Fixation	Centrifuge
4	70°C, 1hr	Fixation	Syringe filter
5	-	Shaking	Centrifuge
6	-	Shaking	Syringe filter
7	-	Fixation	Syringe filter
8	-	5X buffer 70°C 1hr	Centrifuge
9	-	5X buffer 70°C 1hr	Syringe filter

나) 시판되는 malt extract의 ginsenosides 전환 활성

시중에 유통되는 배지 'Malt extract'로도 ginsenosides 전환이 가능하다면, 복잡한 맥아 추출 과정을 하지 않아도 되므로 시행하였음. 맥아 추출물을 제조회사 별(MB cell 과 OXOID)로 0.5%, 1%, 5% 농도의 배지를 만들고 PPD 500ppm으로 37°C, 3시간 반응시켰으며, 각각 filter 한 것과 안 한 것을 비교 실험 하였음.

다) 조효소액과 기질과의 반응

중국산 ginsenosides mixture(Rb1, Rb2, RC, Rd, Rg1 등)를 50,000 ppm의 농도로 3차 증류수에 녹이고 syringe filter(0.2um)한다. 상기 (가)와 같은 방법으로 조제한 효소액을 PPD 500ppm으로 처리하여 37°C incubator에서 3일 ~2주 동안 반응시켜 전환 활성을 확인 하였으며, 반응이 끝난 후, n-BuOH 동량 첨가하여 추출하였음.

라) PPD 농도별 및 누룩 유래 균주의 혼합 발효에 의한 진세노사이드 전환 활성

조효소 반응에 첨가할 PPD의 농도를 결정하기 위하여 맥아 추출물에 다른 농도 (500 ug/ml, 1000 ug/ml)의 PPD를 첨가하여 진세노사이드 전환을 비교하였음.

(2) 결과

가) 추출 방법에 따른 맥아 조효소의 진세노사이드 전환 활성

맥아 추출물 제조 3단계(Malt preparing, Extraction, Filtration)에 영향을 미치는 요인을 알고 가장 적절한 제조방법을 찾기 위한 상기 실험 결과, 대부분 좋은 활성을 나타냈음. 특히, 추출 전 맥아의 Autoclave 처리 유무에 따른 차이에서는 autoclave 한 것 보다는 안 한 것이, 추출 단계에서 초음파분쇄 추출 이외의 방법 [shaking , 정체, autoclave]으로 시행한 경우엔 모두 좋은 활성을 나타냈으며, 추출 후 여과 과정에서는 원심분리를 하는 것보다 syringe filter(0.2um)한 샘플이 ginsenosides biotransformation 에 보다 큰 활성을 가졌음.

표 35. 효소 처리 방법별 saponin 전환 결과

saponin	함량(%)									
	발효 전	발효 후								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
C-K	-	3.6	10.54	3.88	9.95	2.98	3.65	3.09	1.4	1.16
F2	-	30.45	33.4	31.22	32.56	27.31	30.95	37.3	29.37	30.16
Rg1	20.76	2.88	3.6	5.47	3.9	7.4	8.91	4.65	10.44	12.5
Rd+Re	44.14	24.68	9.93	26.55	21.87	23.9	20.97	16.3	20.38	21.46
Rc	21.35	-	-	-	-	-	-	-	2.56	2.87

나) PPD 농도별 맥아 조효소 진세노사이드 전환 활성

PPD 농도가 증가할수록 전환 효율이 감소하는 것으로 나왔으며 이러한 저해는 누룩 유래 균주의 발효에 의해서도 해제되지 않았음. 맥아 추출물에 PPD 500ppm을 혼합하였음. 균주는 접종하지 않았지만 major saponin으로만 이루어진 발효 전과 비교해 보면 약간의 major saponin이 남아 있을 뿐 대부분 F2로 전환되는 양상을 보였음. 맥아 추출물에 PPD 500ppm을 혼합하고, 균주를 접종(0.5%) 하였음. major saponin으로만 이루어진 발효전과 비교해 보면 대부분의 major saponin이 minor saponin인 F2와 C-K로 전환되어 본 실험의 경우의 수 중 가장 좋은 활성을 나타냈음. 맥아 추출물에 PPD 1000ppm을 혼합하고, 균주를 접종(0.5%) 하였음. major saponin으로만 이루어진 발효전과 비교해 보면 major saponin이 minor saponin인 F2로 전환되는 것을 확인하였음. 맥아 추출물에 PPD 2000ppm을 혼합하고, 균주를 접종(0.5%) 하였음. major saponin으로만 이루어진 발효전과 비교해 보면 일부 major saponin이 minor saponin인 F2로 약간 전환되는 것을 확인하였음.

다) 균주와 맥아 혼합 발효

균주와 맥아 혼합 발효는 맥아 추출물을 만들어 실험하는 액상발효와 맥아 자체를 발효에 이용하는 고상발효 두 가지로 수행하였음. 누룩에서 분리한 Aspergillus sp. 균주를 이용하여, 맥아 혹은 맥아 추출

물과 혼합하고 이를 이용하여 ginsenosides를 전환 시키는데 시너지 효과를 내는 목적이 있음.



그림 64. PPD 농도와 누룩 유래 균주의 혼합 발효에 의한 진세노사이드 전환. 1, PPD 500 ppm 2, PPD 500 ppm, 누룩 균주 접종 3, PPD 1000 ppm, 누룩 균주 접종 4, 2000 ppm, 누룩 균주 접종

(1) 결과

1) Aspergillus 균주와 맥아 추출물을 이용한 혼합 액상 발효

각기 다른 ginsenosides 전환 활성을 나타내는 6가지 Aspergillus sp. 균주이며, 대부분 major saponin 을 F2 혹은 C-K로 전환시켰으며 2번 균주의 진세노사이드 전환율은 표와 같았음.

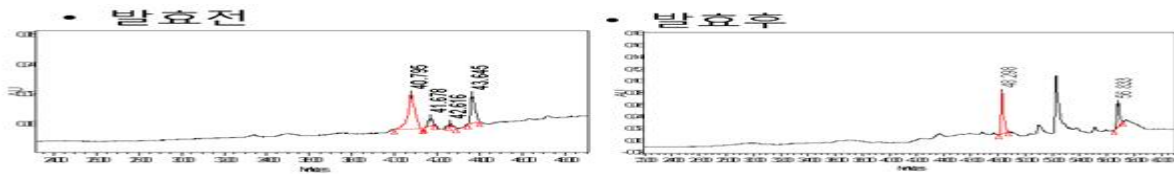


그림 65. 맥아추출물과 진세노사이드 전환 Aspergillus 균주 혼합 발효에 의한 진세노사이드 F2와 C-K 전환.

라) 대량 발효

(1) 결과

30 L 대량 발효에서 Rb1, Rc 등이 약 20%가 F2로 전환되었으며 일부 C-K로 전환된 것을 확인하였음.

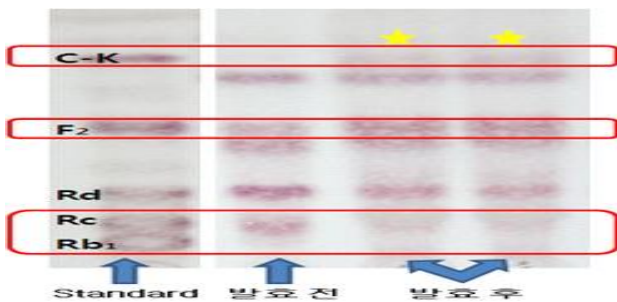


그림 66. 30 L 발효에서 진세노사이드 전환 양상

4. 누룩유래 효소를 이용한 사포닌 전환 연구

- 본 사업단은 PPD 계열의 고분자량 사포닌을 F2와 C-K로 전환하는 최적 식용 균주와 효소 및 방법을 확보하였으며 특히 TH-En1효소는 주로 F2로 전환되며 이때의 최대 전환율은 50% 이상이 됨을 확인하였다. 또한 효소 TH-En5번 효소 및 균주TH-Y13등은 C-K로 주로 전환되며 이때의 최대 전환율은 60% 이상임을 확인하였다.
- 상기 전환된 소재를 기반으로 용해도를 이용한 간편한 방법만을 적용해서 98%이상 고순도의 인삼 사포닌 소재를 대량 생산할 수 있는 기반을 확보하였다.

4-1. 누룩유래 효소의 선정

가) 실험방법

(1) 소재의 종류

누룩유래 균주로 부터 분리한 TH-En1,TH-En2,TH-En3,TH-En4,TH-En5 및 중국 대학에서 제공받은 PPD mixture(Rb1, Rb2, RC, Rd)

나) 상기 방법에 따른 결과

PPD mixture(Rb1, Rb2, RC, Rd)를 이용하여 5개의 효소를 동일한 농도로 처리한 후 전환TLC를 이용하여 전환 활성을 확인한 결과, 1,2,4,5번 효소가 매우 높은 전환활성을 나타냈으며, 활성은 En1>En5>En4>En2>En3 순이었다. 그중 F2로의 전환 활성이 높고, 메이저 사포닌을 최대한 많이 전환시키는 목적에 부합하는 효소1번을 최적 효소로 선정하고 이 효소를 이용하여 추가적인 연구를 진행 하였다.

표 39. 누룩유래 효소 처리를 통한 사포닌 함량 변화 결과

saponin	함량(%)					
	반응 전	반응 후				
		En1	En2	En3	En4	En5
C-K	-	29.67	15.48	-	19.45	14.75
F2	-	48.2	37.99	1.89	35.52	23.67
Rd	31.18	8.38	16.86	38.23	18.35	27.38
Rc	26.79	5.4	2.58	49.64	35.57	12.84
Rb1	46.19	-	1.73	8.32	-	3.45

4-2. 선정된 누룩유래 효소를 이용한 사포닌 전환연구.

가).실험 방법

(1) 소재의 종류

- 인삼 [국내산], 인삼 Crude Saponin [국내산], 홍삼정 Crude Saponin [국내산], 골드베이스 Crude Saponin [국내산], PPD 계열 Saponin [중국산 1], PPD 계열 Saponin [중국산 2], PPD 계열 Saponin [국내산]

(2) 효소 반응 방법

○인삼

인삼을 20-40 mesh로 분쇄하여 제조. 인삼무게 대비 20%의 효소, 인삼무게대비 10배의 물에 녹여 잘 혼합한다. 혼합물을 55℃ 에서 24시간 반응시킨다. 반응 후 홍삼무게대비 10배의 EtOH을 첨가 (50%EtOH 20배 추출진행을 위함) 하여 70℃에서 4시간 환류 추출 한다. 추출 후 여과를 거쳐 농축하여 EtOH을 제거한 후 동결건조를 진행 한다.

○사포닌

각각의 재료(상기 방법에 의해 제조된 사포닌)에 enzyme을 첨가하고, 이를 50mg/ml 의 water solution 으로 제조한 후 55℃, 24hr 반응 후, n-BuOH 동량 첨가하여 추출한다.

1) 상기 실험에 의한 결과 확인

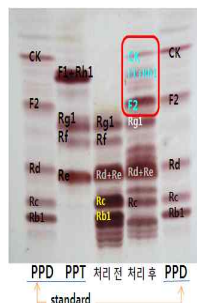
효소처리 전 인삼에 함유되어 있는 메이저 사포닌 (Rb1, Rc, Rd, Re, Rg1) 중 PPD계열의 메이저 사포닌(Rb1, Rc, Rd)이 주로 PPD계열의 마이너 사포닌인 F2와 C-K로 전환됨을 예측할 수 있었다.또한 PPT계열의 메이저 사포닌인 Re 가 Rg1을 경로하여 F1 및 Rh1으로 전환됨을 예측 할 수 있었다.

이는 crude enzyme 내에 Rb1, Rc, Rd,를 F2와 C-K로전환시키는 β-D-glucopyranosidase, α-L-arabinopyranosidase 및 α-L-arabinofuranosidase 및 R전체 인삼 중에 들어 있는 진세노사이드 이외의 기타 성분이 효소 반응을 저해하는 지를 확인하기 위하여 전체 인삼을 분쇄하여 효소 반응에 사용하였다. 인삼으로부터 용액으로 추출된 사포닌이 효소에 의하여 전환되는 것을 확인하였다. 따라서, e를 F1와 Rh1으로 전환시킬 수 있는 α-rhamnosidase, β-D-glucopyranosidase가 다량 함유되어 있음을 예측할 수 있었다.

1) - 1.효소처리 인삼의 사포닌 변화 결과 1) - 2. 인삼 crude saponin [국내산]



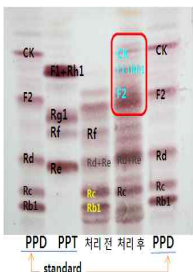
saponin	함량(%)		변화량(%)	
	처리 전	처리 후		
C-K	-	5.16	↑	5.16
F2	-	27.60	↑↑	27.60
Rg1	21.77	20.07	↓	1.7
Rd+Re	36.12	47.16	↑↑	11.04
Rc	21.35	-	↓↓	21.35
Rb1	20.76	-	↓↓	20.76



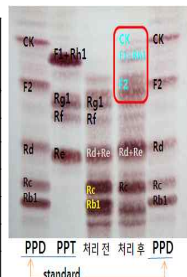
saponin	함량(%)		변화량(%)	
	처리 전	처리 후		
C-K	-	5.27	↑	5.27
F1+Rh1	-	5.54	↑	5.54
F2	-	18.24	↑↑	18.24
Rg1	15.97	17.02	↑	1.25
Rf	9.40	-	↓	9.40
Rd+Re	24.37	41.24	↑↑	16.87
Rc	22.72	14.91	↓	7.81
Rb1	28.29	-	↓↓	28.29

1) - 3. 홍삼 crude saponin(1)

1) - 4. 홍삼 crude saponin(2)



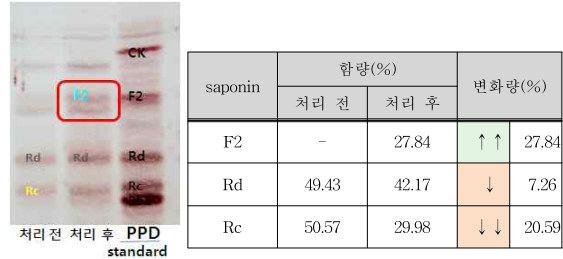
saponin	함량(%)		변화량(%)	
	처리 전	처리 후		
C-K	-	13.36	↑	13.36
F1+Rh1	-	7.96	↑	7.96
F2	-	25.76	↑	25.76
Rf	22.18	-	↓	22.18
Rd+Re	22.38	39.13	↑	16.75
Rc	33.27	18.35	↓	14.92
Rb1	22.77	-	↓	22.77



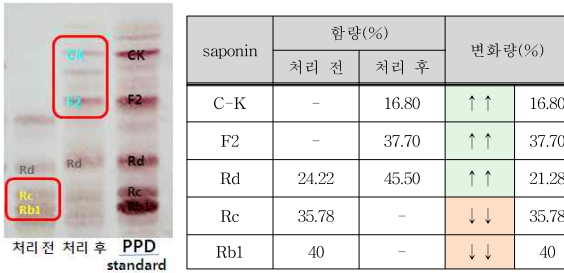
saponin	함량(%)		변화량(%)	
	처리 전	처리 후		
C-K	-	6.41	↑	6.41
F1+Rh1	-	7.26	↑	7.26
F2	-	40.78	↑↑	40.78
Rg1	20.22	-	↓↓	20.22
Rf	12.60	-	↓	12.60
Rd+Re	14.51	27.17	↑↑	12.66
Rc	25.27	18.38	↓	6.89
Rb1	25.27	-	↓	25.27

1) - 5. PPD 계열 saponin [중국산 1]

1) - 6. PPD 계열 saponin [중국산 2]



1) - 7. PPD 계열 saponin [국내산]



4-3. 단일 미량 사포닌 Rb1과 누룩유래 효소를 이용한 사포닌 전환연구.

기질을 Rb1으로 하여 누룩유래 균주의 효소를 이용하여 전환활성을 확인해본 결과 효소의 농도에 따라 F2 및 C-K를 다량 양산할 수 기반을 확보하였다.

상기 전환된 소재를 기반으로 용해도를 이용한 간편한 방법만을 적용해서 98% 이상 고순도의 인삼 사포닌 소재를 대량 생산할 수 있는 기반을 확보하였으며 2차년도 이후에는 기업이 요구할 경우에는 추가적인 개발을 진행할 예정이다.

1) 실험방법

누룩유래 효소 TH-En1 및 TH-En를 첨가하고, 이를 50mg/ml의 water solution으로 제조한 후 55°C, 24hr 반응 후, n-BuOH 동량 첨가하여 추출하였으며 이를 TLC 및 HPLC를 이용하여 확인하였다.

2) 실험방법에 따른 결과

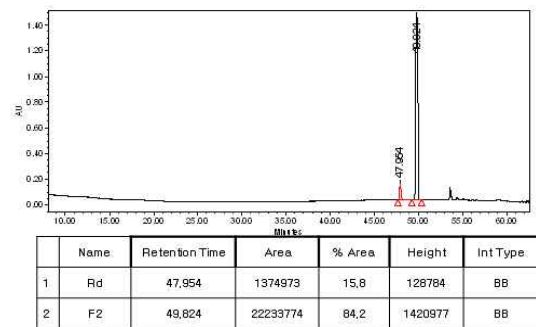
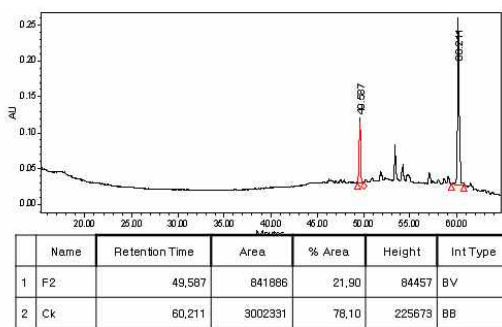


그림 67. TH-En5를 이용한 미량사포닌의 생산

그림 68. TH-En1를 이용한 미량사포닌의 생산

제 2 절 유산균 등 식용균주의 Saponin 전환활성 탐색

1. 본 사업단의 연구개발사업을 진행하기 위한 기업과의 협의를 통하여 시장에서 요구하는 식품 및 화장품은 유산균을 비롯한 식용균주 혹은 해당 균주에서 유래한 대사산물을 응용하여 가공한 인삼소재가 더욱 산업화에 유리할 것으로 판단함.
2. 인삼의 사포닌을 형질전환시키는 효능이 있으면서도 피부에 일정 이상의 기능이 있는 유산균주를 비롯한 다양한 식용균주 및 대사산물을 탐색한 결과 베타글루코시다제 활성이 있는 유산균 균주 601종 확보하고, 신종 유산균 4종을 확보하여 신종균주에 대하여 균주은행에 등록을 완료함.
3. 신종균주 및 사포닌 전환활성이 있는 유산균주는 2차년도부터 피부면역관련 기능성 식품 및 화장품의 개발의 핵심 소재로 적용될 예정임.

1. 김치로 부터의 β -glucosidase 활성* 및 Saponin 전환활성 균주의 탐색

*major saponin의 베타 결합을 가진 당을 분해하여 minor saponin으로 전환시키면 분자량이 작아져 saponin의 체내 흡수가 용이해 짐. 따라서 minor saponin을 생산하는 균은 β -glucosidase활성을 반드시 가져야 하므로 β -glucosidase 활성균주를 탐색한 결과 000를 얻었음

1-1. 실험 진행 순서

: 시료의 확보 > 균주의 분리 > esculin test > 종균배양 > PPD접종 > TLC분석

*TLC 전개용매: chloroform : methanol : water = 65 : 35 : 10

*발색시약: 10% sulfuric acid(with MeOH)

← PPD standard와 균주를 넣지 않은 PPD mixture blank의 TLC발색 sample.

C-K

F2

Rd

Rc

Rb1

분자량이 작고, 비극성에 가까울수록 Spot이 위쪽에서 발색 됨.

즉, F2 C-K등이 minor하다고 볼 수 있음. Saponin 전환활성 측정을 위해 첨가한 major saponin은 PPD계열인 Rb1, Rc, Rd mixture이며 균에 의해 minor로의 전환이

Standard blank 이루어지면 spot이 위로 이동함을 확인하였음.

1-2. 실험 결과

1) 균주 확보 내역

표 40. 샘플별 균주 확보 내역

도말그룹	sample 개수	Isolated	β -glucosidase	saponin 전환 활성
A	김치 23	703	15	7
B	김치 27, 요구르트 1, 막걸리 1, 젓갈 2	326	10	3
C	막걸리 5, 젓갈1	12	0	0
D	김치 33	436	2	2
E	김치 10	57	20	0
F	김치 4	115	44	4

G	김치 12	211	71	0
H	김치 16	121	26	0
I	김치 3	47	27	0
J	김치 3	54	30	0
K	김치10	62	8	0
L	김치10	67	23	0
M	김치16	197	19	0
N	김치13	277	45	0
O	김치25	333	61	0
P	요구르트1	29	13	0
Q	김치 3	5	0	0
R	김치 11	174	65	1
S	김치5	4	3	3
T	김치 4	48	2	2
U	김치 5	41	4	4
V	김치 4	23	22	14
W	김치 20	170	48	0
X	김치14	34	34	11
Y	김치 5	123	6	1
Z	김치 5	32	3	3
sum	김치241, 막걸리6, 요구르트 2, 젓갈 3	3701	601	55

2) PPD를 이용한 사포닌 전환 테스트 결과

표 41. 김치 유래 사포닌 전환균주 탐색 결과

sample 개수	Isolated	β -glucosidase균	saponin 전환 활성균
김치241, 막걸리6, 요구르트 2, 젓갈 3	3701	601	55

- 총 시료 수: 251종 (김치 241, 막걸리5, 요구르트 2, 젓갈 3)
- 분리균주(β -glucosidase activity 측정 균): 3701 주
- 베타 글루코시다아제 활성균주 : 601주
- 사포닌 전환 균주 : 55 주

1-3. 김치 유래 유산균 Crude enzyme 실험 결과

1) β -glucosidase activity역가 측정

: 추출한 crude enzyme의 단백질량을 측정하여 같은 양을 Esculin(1g/L)과 Ferric citrate (:0.5g/L) 수용액에 접종하여 초기 OD값과 48시간 후 OD값을 비교하여 측정.

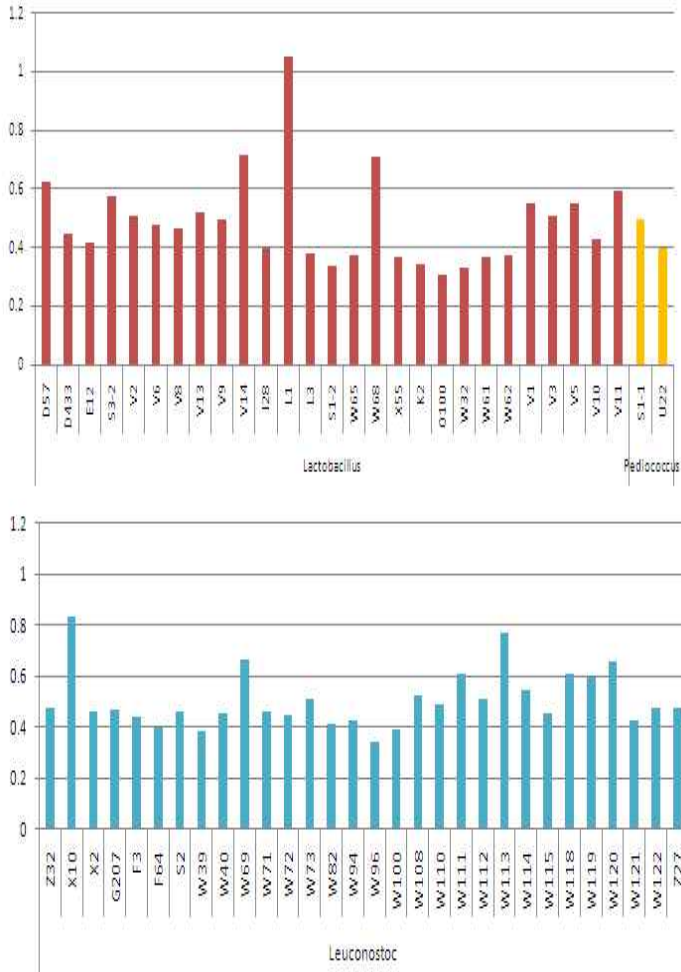


그림 69. 추출한 crude enzyme의 베타글루코시다아제 활성 역가를 도표로 나타낸 모습.

표 42. Esculin(1g/L)과 Ferric citrate (0.5g/L) 수용액을 이용한 베타글루코시다아제 역가 측정에 의한 순위.

activity	균주명	activity	균주명
1	L1	31	G207
2	X10	32	X2
3	W113	33	W71
4	V14	34	S2
5	W68	35	W115
6	W69	36	W40
7	W120	37	D433
8	D57	38	W72
9	W118	39	F3
10	W111	40	V10
11	V11	41	W121
12	W119	42	W94
13	S3-2	43	E12
14	V1	44	W82
15	V5	45	U22
16	W114	46	I28
17	W108	47	F64
18	V13	48	W100
19	W73	49	L3
20	W112	50	W39
21	V3	51	W65
22	V2	52	W62
23	V9	53	W61
24	S1-1	54	X55
25	W110	55	K2
26	V6	56	W96
27	Z27	57	S1-2
28	Z32	58	W32
29	W122	59	O100
30	V8	60	Z21

베타글루코시다아제(β -glucosidase)활성과 사포닌 전환활성의 상관관계를 알아보기 위해, β -glucosidase 활성이 높은 순서로 10개의 균을 선발하여(L1, X10, W113, V14, W68, W69, W120, D57, W118, W111) 사포닌 전환활성을 비교함.

베타글루코시다아제 활성이 있어야 사포닌을 전환할 수 있는 것은 명확하나, 베타글루코시다아제 활성이 높다고 해서 사포닌 전환이 더 잘 이루어지지 않는다는 것을 확인하였음.

→ 베타글루코시다아제 활성균주 중 사포닌 전환이 가장 잘 된 8번(D57)균주를 이용 다음 실험을 진행.

2) Crude enzyme의 saponin 전환 활성 검정

진세노사이드 Rb1을 *Lactobacillus brevis* sp. D57에서 추출한 Crude enzyme에 처리하여 48시간 후 전환활성을 검정하였다.

MRS 배지 및, 1/2 MRS 배지, 1/4 MRS 배지, 1/8 MRS배지에 각각 균주를 배양하였으며, 배지 첨가량이 적을수록 crude enzyme의 활성이 더 좋은 것으로 판단되었음.

1-4. 베타글루코시다아제 활성이 있는 균주의 16s rRNA sequencing 결과

- Leuconostoc 속 유산균의 16s rRNA sequencing 결과

표 43. Leuconostoc sp. 균주의 16s rDNA 염기서열 분석에 의한 염기서열이 가장 유사한 균주와 유사도.

grou	No.	sample No.	pSequence	Accession	Similarity
Z	32	sm 32	Leuconostoc citreum KM20	DQ489736	99.847
X	10	김치 216	Leuconostoc inhae IH003(T)	AF439560	98.498
X	2	김치 216	Leuconostoc kimchii IMSNU 11154(T)	CP001758	99.247
G	207	김치 84	Leuconostoc mesenteroides subsp. dextransicum NRIC 1539(T)	AB023246	100
F	3	김치 70	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.728
F	64	김치 72	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.729
S	2	김치 200	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	39	김치 150	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.03
W	40	김치 150	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	69	김치 156	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	71	김치 156	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	72	김치 156	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.739
W	73	김치 156	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	82	김치 159	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	94	김치 159	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.867
W	96	김치 159	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.851
W	100	김치 160	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.799
W	108	김치 161	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.679
W	110	김치 161	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	111	김치 161	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.804
W	112	김치 161	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.733
W	113	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.762
W	114	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	115	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.817
W	118	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	119	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100
W	120	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.809
W	121	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.822
W	122	김치 163	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	99.83
Z	27	sm 27	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293(T)	CP000414	100

- Lactobacillus속 유산균의 16s rRNA sequencing 결과

표 44. *Lactobacillus* sp. 균주의 16s rDNA 염기서열 분석에 의한 염기서열이 가장 유사한 균주와 유사도.

group	No.	sample No.	Sequence	Accession	Similarity
D	57	김치29	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14687(T)	EF120367	99.733
D	433	김치59	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14687(T)	EF120367	99.735
E	12	김치61	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14687(T)	EF120367	99.354
S	3_2	김치 200	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14687(T)	EF120367	99.866
V	2	김치 201	<i>Lactobacillus koreensis</i> DCY50(T)	FJ904277	99.258
V	6	김치 201	<i>Lactobacillus koreensis</i> DCY50(T)	FJ904277	99.341
V	8	김치 202	<i>Lactobacillus koreensis</i> DCY50(T)	FJ904277	99.211
V	13	김치 202	<i>Lactobacillus koreensis</i> DCY50(T)	FJ904277	99.309
V	9	김치 202	<i>Lactobacillus parabrevis</i> LMG 11984(T)	AM158249	100
V	14	김치 202	<i>Lactobacillus parabrevis</i> LMG 11984(T)	AM158249	100
I	28	김치 105	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	100
L	1	김치 116	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	100
L	3	김치 116	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	100
S	1_2	김치 200	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	100
W	65	김치 154	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	99.868
W	68	김치 154	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	100
X	55	김치 187	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558(T)	D79211	99.868
K	2	김치 106	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	100
O	100	김치 162	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	100
W	32	김치 149	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.822
W	61	김치 153	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.868
W	62	김치 153	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	100
Z	21	sm 21	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	100
V	1	김치 201	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> DSM 20017(T)	AY204893	99.834
V	3	김치 201	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> DSM 20017(T)	AY204893	99.855
V	5	김치 201	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> DSM 20017(T)	AY204893	99.835
V	10	김치 202	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> DSM 20017(T)	AY204893	99.725
V	11	김치 202	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> DSM 20017(T)	AY204893	99.869

- *Pediococcus*속 유산균의 16s rRNA sequencing 결과

표 45. *Pediococcus* sp. 균주의 16s rDNA 염기서열 분석에 의한 염기서열이 가장 유사한 균주와 유사도.

group	No.	sample No.	Sequence	Accession	Similarity
S	1_1	김치 200	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336(T)	AJ305321	99.481
U	22	213	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336(T)	AJ305321	99.607

* 베타글루코시다아제 활성균주 601종 중 60종의 16s rRNA sequence 결과 30종의 Leuconostoc속 유산균과 28종의 Lactobacillus속 유산균 그리고 2종의 Pediococcus속 유산균이 있는 것으로 확인하였음.

* Sequence분석이 완료된 유산균 중 Similarity 99%이하의 유산균 신균주 4종에 대한 NCBI 균주 등록 및 KACC 기탁하였음.

표 46. 유산균 신균주 4종의 NCBI 등록번호와, KACC 기탁번호.

No.	균주 명	NCBI No.	KACC No.
X10	Leuconostoc kyungheense THK-X10	JN128638	16238
W39	Leuconostoc yonginsis THK-W39	JN128641	16237
V2	Lactobacillus kyungheense THK-V2	JN128639	13235
V8	Lactobacillus yonginsis THK-V8	JN128640	16236

2. 전통 장류로 부터 β-glucosidase 활성 및 Saponin 전환활성 균주의 탐색

전통 발효식품인 된장에서 균주를 탐색하여 1131종의 균주를 순수 분리하여 β-glucosidase 활성을 테스트 한 결과 340종의 β-glucosidase 활성을 가진 균주를 확보하였고 인삼 발효에 유용하고 사포닌 전환 활성을 가지는 72종 동정 완료하고 그중 3종의 신종균주를 확인하였음.

2-1. 실험방법 요약

1) 실험 진행 순서

시료의 확보 > 균주의 분리 > esculin test > 종균배양 > PPD접종 > TLC분석

* β-glucosidase 활성을 가진 균주의 stock 확보

-25% glycerol TSA 배지 이용.

2-2. 실험 결과

● β-glucosidase 활성을 가진 균주의 선별 결과

Esculin disc test를 통하여 β-glucosidase 활성을 가진 균주 340개를 확보함.

표 47. 전통 장류에서 분리한 베타글리코시다아제 활성 균주

도말 그룹	도말한 날짜	sample 개수	사용배지	균 개수	β-glucosidase 활성 균 개수
A	11월 09일	장류1~8	LB agar(도말), YM(도말), NA	120	40
B	11월 16일	장류1~9	TSA	239	48
C	12월 03일	장류9~23, 기타13, 김치33,36	TSA, BCP	243	58
D	12월 30일	장류24,25, 기타15	TSA	76	29
E	01월 04일	장류27, 기타 16,17,18	TSA	113	43
F	01월 14일	장류33~37	TSA	196	63
G	01월 17일	장류28~33	TSA	80	26
H	02월 14일	장류38~43, 기타18	TSA	64	33
I	03월 15일	장류1~23, 기타 20-1주	TSA + Esculin	103	0

J	03월 15일	장류1~23, 기타 20-1주	minimal Agar	204	0
K	03월 22일	장류1~23, 기타 20-2주	minimal Agar	219	0
L	03월 29일	장류1~23, 기타 20-3주	TSA + Esculin	56	0
M	03월 29일	장류1~23, 기타 20-3주	minimal Agar	110	0
			계	1823	340

3) 선별 된 균주의 Ginsenosides 전환 능력 검증 결과

I) 사포닌 전환활성을 가지는 장류 유래 균주의 16s rRNA sequencing 결과

표 48. Bacillus 속 균주의 16s rDNA 염기서열 분석에 의한 염기서열이 가장 유사한 균주와 유사도.

Group	No.	Sample No.	Sequence	Accession No.	Simil (%)
C	180	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
C	195	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
C	200	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus atrophaeus JCM 9070(T)	AB021181	100
C	203	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus atrophaeus JCM 9070(T)	AB021181	100
C	209	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
C	220	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
C	233	장류9~23,기타13, 김치33,36	Paenibacillus jamilae CECT 5266(T)	AJ271157	100
C	237	장류9~23,기타13, 김치33,36	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	7	장류28~33	Paenibacillus polymyxa IAM 13419(T)	D16276	99.355
G	9	장류28~33	Paenibacillus jamilae CECT 5266(T)	AJ271157	99.484
G	10	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	11	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	14	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	15	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	17	장류28~33	Paenibacillus jamilae CECT 5266(T)	AJ271157	99.621
G	18	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	19	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	20	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	29	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	99.876
G	36	장류28~33	Bacillus licheniformis ATCC 14580(T)	AE017333	100
G	37	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	43	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	44	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	54	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	56	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	57	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	61	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	63	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	69	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	74	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	77	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100
G	80	장류28~33	Bacillus vallismortis DSM 11031(T)	AB021198	100

3. 전통 누룩으로부터 β -glucosidase 활성 및 Saponin 전환활성 균주의 탐색

전통 발효식품인 된장에서 균주를 탐색하여 200종의 균주를 순수 분리하여 β -glucosidase 활성을 테스트 한 결과 70종의 β -glucosidase 활성을 가진 균주를 확보하였고 사포닌 전환이 가능한 28종을 선별하였으며, 인삼 발효에 유용하고 마이너 사포닌으로 전환이 유리한 12종에 대하여 동정 완료하였음.

3-1 실험 결과

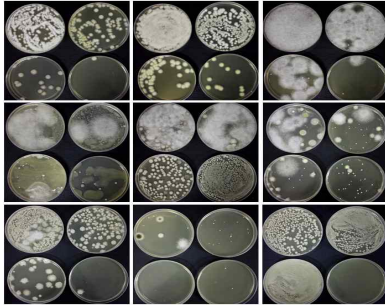


그림 70. 누룩으로부터 균주의 분리

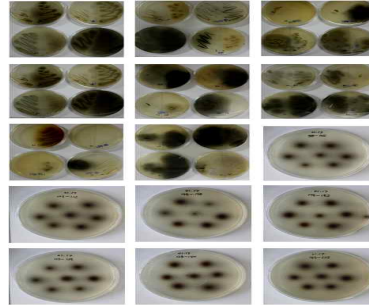


그림 71. β -glucosidase 활성 스크리닝

- 총 20개의 시료를 수집하여 균주를 분리하였으며, 육안적으로 다르다고 판단되는 200종의 균주를 순수 분리하여 β -glucosidase 활성을 테스트 한 결과 70종의 β -glucosidase 활성을 가진 균주를 확보하였고 이를 이용하여 PPD 전환 활성을 평가하였다.

3) PPD(protopanadiol)을 이용한 사포닌 전환능력 확인 결과

누룩으로부터 β -glucosidase 활성을 가진 균주를 확보한 후 PPD를 이용하여 사포닌 전환 테스트를 실시한 결과 사포닌 전환 능력이 뛰어난 28종의 균주를 확보할 수 있었다.

4) 마이너 사포닌으로 전환이 유리한 누룩유래 균주 12종에 대한 ITS sequencing 결과

표 49. 누룩유래 균주 12종에 대한 ITS sequencing 결과

Strain Name	Type Strain	Accession No.	Similarity(%)
THN 2-3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	JF754466.1	99
THN 2-11	<i>Lichtheimia ramosa</i>	HQ285667.1	99
THN 16	<i>Aspergillus flavus</i>	FJ654480.1	100
THN 17	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	HQ285666.1	100
THN 19	<i>Aspergillus oryzae</i>	HQ285588.1	100
THN 21	<i>Aspergillus flavus</i>	AM745114.1	100
THN 26	<i>Aspergillus oryzae</i>	HM572296.1	99
THN 33	<i>Aspergillus flavus</i>	FJ654480.1	100
THN 53	<i>Mucor indicus</i>	FN650641.1	100
THN 1	<i>Aspergillus flavus</i>	HQ340106.1	99
THY 1	<i>Aspergillus oryzae</i>	HM143899.1	99
THY 13	<i>Aspergillus oryzae</i>	HQ285586.1	99

제 3 절. 피부 개선을 위한 기능성균주의 선별 및 이를 활용한 기능성 인삼 소재의 개발

▶ 피부 개선을 위한 기능성 소재의 선별 및 이를 활용한 기능성 인삼 소재 개발 연구를 진행한 결과

1. 소비자들의 기능성 소재에 대한 needs와 수요에 따른 피부 환경 개선 기능성 천연 소재를 선별하기 위해 문헌조사를 통해 항산화 활성 및 미백 활성을 검토할 수 있는 rapid detection method를 확립함.
2. 확립된 rapid detection method를 이용하여 기확보된 식물성 유산균 등 다양한 소재의 기능성을 검정하여 김치 유래 유산균인 *Leuconosotc mesenteroides* D433등 피부 환경 개선능이 우수한 균주를 선정함.
3. 피부 환경 개선능이 우수한 기능성 균주의 산업화 공정 개발을 위해 개발된 균주의 산업적 적용을 위하여 어떠한 작업자라도 작업을 수행 할 수 있도록 작업 매뉴얼 및 주요 check list를 작성하였음.

선행연구에서 미생물 발효에 의해 고분자 사포닌이 저분자 사포닌으로 전환이 이루어짐을 확인하고, 이러한 다양한 사포닌의 혼합물이 피부미용 효과를 나타낸다는 사실을 일차 확인한 바 있다.

당해 연도인 3차년도에서는 먼저 피부 미용 효과를 증진 시킬 수 있는 천연 유래 소재를 검토하고, 김치 등에서 분리한 유산균 등의 식물성 미생물에 의한 액체 발효 공정에서 마이너 진세노사이드 생성 가능성을 확인 한 후 인삼 발효 시스템의 최적화 공정을 확립하고 산업화 매뉴얼을 개발하기 위하여 다음과 같이 문헌조사를 거쳐 아래와 같은 시험을 수행하였다.

- (1) 문헌 조사를 통한 피부 효능 소재 선별 실험법 확립
- (2) 피부 효능 활성 검토를 위한 소재의 전처리 방법 확립
- (3) 확립된 전처리 방법에 따른 피부 미용 효과의 검정 및 소재 선별
- (4) 인삼 발효의 최적 균주 선별 및 이를 활용한 최적 배양 조건 확립
- (5) 확립된 배양 조건을 활용한 산업화 매뉴얼 작성

▶ 피부 환경 개선능이 우수한 소재의 선별

피부환경 개선에 관한 논문 및 특허 등의 문헌 조사를 통하여 천연 항산화 소재 및 미백 소재의 탐색에 관한 연구 방법을 확립하고 일차년 선행 연구를 통하여 확보된 다수의 식물성 유산균 및 효모 등의 다양한 미생물 소재를 확립된 검증 방법을 통하여 피부 개선능이 미생물 우수한 소재를 선정하였음.

1. 활성 검토를 위한 균주의 전처리 방법 확립

미생물의 기능성은 효소에 의한 발현, 세포막 구성성분에 의한 발현, 발효 중 생성물에 의한 발현 등, 그 기원이 다양하다. 또한 각 미생물의 특성에 따라 효소의 발현 위치, cell wall의 구성성분, 발효 중 생성물의 성장 및 함량이 각각 차이가 있으며 이에 따른 활성 또한 상이하므로, 실험에 사용한 식물성 미생물 60 종을 소재의 전처리 방법에 따라 각각 분획하여 시료의 양상 및 활성 발현에 대해 실험을 진행

하였다.

가. 재료

MRS broth(Difco, USA), *Lactobacillus·Leuconostoc·Pediococcus* 속의 식물성 유산균 60종 및 *Saccharomyces* 속의 효모 20종.

나. 방법

MRS broth에서 24시간동안 종균 배양한 균주를 새로운 MRS broth에 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간동안 배양한 배양액을 분획하여 실험을 진행하였으며 각 분획은 그림 3.2.1과 같이 획득하였다. 3.1.에서 최종 선정된 피부 기능성 측정 실험법인 DPPH assay와 tyrosinase inhibition assay로 각각 항산화력과 미백활성을 측정하였다.

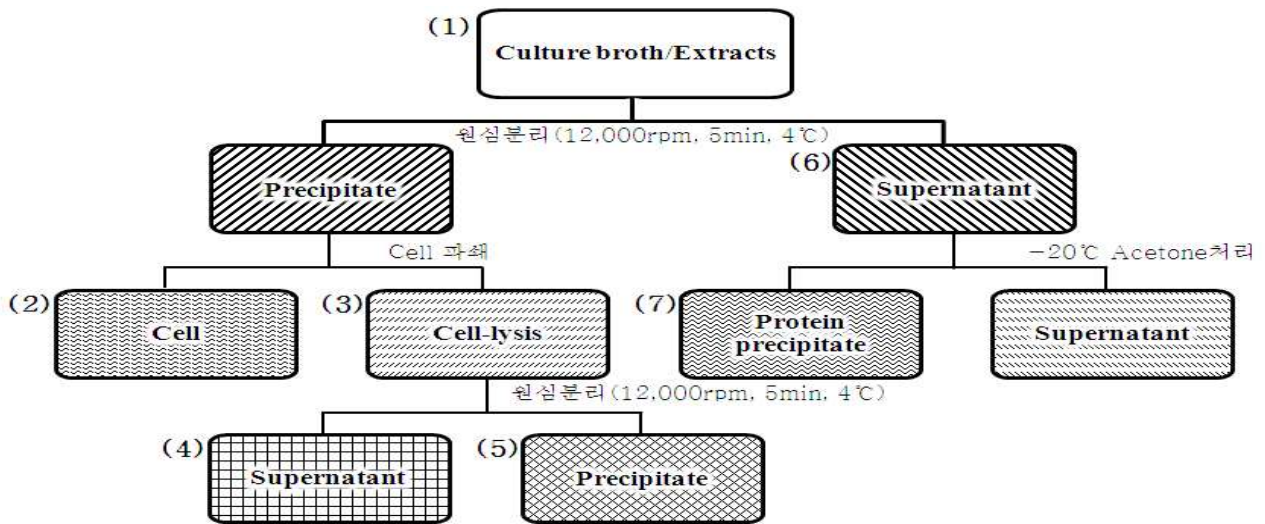


그림 72. 피부기능성 평가용 소재 획득 방법.

피부기능성 평가용 소재 획득 방법을 정리하면 다음과 같다.

(1) 균주배양액(cell-free)

(2) 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 하층부를 0.85% NaCl 용액으로 두 번 씻어내어 잔류한 MRS broth를 제거한 cell

(3) (2)를 초음파 cell 파쇄기를 이용하여 파쇄물

(4) (3)을 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액

(5) (3)을 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 하층부

(6) 균주 배양액을 12,000rpm에서 5분 간 원심분리하여 얻은 상층액

(7) (6)에 -20℃ 아세톤을 4배 부피만큼 넣어 4℃에서 30분간 침전 시킨 후 아세톤을 제거한 침전물

다. 결과 및 고찰

▶ 각 분획별 시료의 성상은 그림 1.3.1에 표기한 분획에 따르면 다음과 같다.

(1) MRS broth의 고유한 색체인 담갈색 액체에 아이보리색 cell이 현탁되어 있는 형태. 침전을 형성.

(2) 맑은 액체에 아이보리색 cell이 현탁되어 있는 상태. 침전을 형성.

(3) (2)와 비슷한 색택을 보임. 약간의 점성이 있음.

(4) 맑은 액체 상태. 침전을 형성하지 않음.

(5) (2)와 비슷한 색택을 보임.

(6) 담갈색 액체 상태. 침전을 형성하지 않음.

(7) 암갈색의 점성이 강한 액체. 침전을 형성하지 않음.

2. 전처리 방법에 따른 피부미용 효과의 검증

1-1. 피부활성 기능성 균주의 DPPH결과 확인

항산화활성 검증 시료의 전처리 방법을 선정하기 위하여 *Leuconostoc mesenteroides* D433 균주를 이용해 다섯가지 분획물(cell-lysis, precipitate of cell-lysis, supernatant of cell-lysis, cell, Protein precipitate, culture supernatant)을 가지고 본 실험을 진행 하였다.

가장 활성이 높게 측정된 분획은 protein precipitate분획으로, 균 배양액을 원심분리한 후 상층액을 수거하여 단백질을 침전시킨 분획이다. 다음으로 culture supernatant 분획과, cell 분획이 활성이 높은 것으로 측정되었으며, cell-lysis 분획이 활성이 가장 낮은 것으로 측정되었다. 이를 바탕으로 상기 유산균 시료는 cell 안쪽 분획 보다는 cell자체 혹은 cell 바깥으로 분비하는 물질에 항산화 활성이 있는 것으로 확인

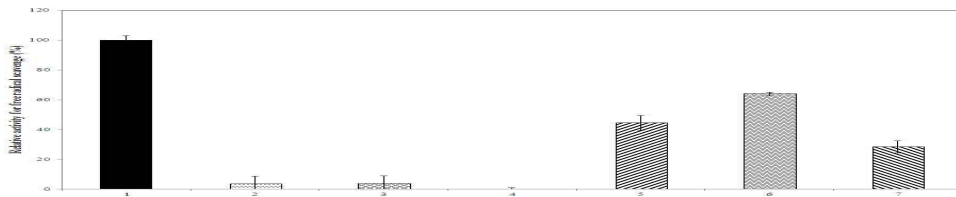


그림 73. DPPH assay를 통한 분획 별 항산화 활성 검증결과.

1. Control (kojic acid 100µg/mL), 2. cell-lysis, 3. precipitate of cell-lysis, 4. supernatant of cell-lysis, 5. cell of strain D433, 6. protein precipitate, 7. culture supernatant of strain D433.

(2) Tyrosinase inhibition assay

타이로시나아제는 L-tyrosine이 L-DOPA로 전환되는 과정을 촉진시키며, L-DOPA는 다시 dopaquinone으로 전환된다. Dopaquinone은 산화되어 leukdopachrome을 거쳐 dopachrome으로 빠르게 전환되며 dopachrome에 의해 melanin이 생성된다.

타이로시나아제 활성 억제 실험은 미백활성 측정 방법으로 가장 널리 수행되고 있는 실험으로 기질이 tyrosinase에 의하여 생성하는 dopachrome 양을 측정하는 방법이다. 기질로 쓰이는 물질은 L-tyrosine과 L-dopa 두가지 형태가 주로 쓰이며, 본 실험에서는 L-tyrosine을 기질로 하여 실험을 진행하였다. 미백 활성 검증 시료의 전처리 방법을 선정하기 위하여 *Leu. mesenteroides* D433 균주를 이용해 다섯가지 분획물(cell-lysis, precipitate of cell-lysis, supernatant of cell-lysis, cell, Protein precipitate, culture supernatant, 그림. 3.1. 피부기능성 평가용 소재 획득 방법)을 가지고 본 실험을 진행 하였다. 미백활성 측정 결과는 그림 1.3.5에 도표로 나타내었다.

가장 활성이 높게 측정된 분획은 항산화 활성 실험에서와 같이 protein precipitate분획으로, 균 배양액을 원심분리한 후 상층액을 수거하여 단백질을 침전시킨 분획이다. 나머지 4가지 분획에서는 활성의 차이가 유의하지 않았다.

▶ 상기 실험에서 DPPH assay 및 tyrosinase inhibition assay법을 이용해 피부 효능에 관련한 실험물의 제조방법에 대해 연구하였다. 가장 활성이 우수한 분획물은 유산균 발효물을 처리하여 원심분리한 후 상층액의 단백질을 침전시킨 시료였으며, 가장 활성이 저조한 시료는 배양된 cell을 파쇄하여 세포 내 단백질을 추출 한 경우 인 것으로 나타났다.

또한, cell 파쇄물의 경우 파쇄 공정에 의한 실험 소요 시간이 길어지며, 배양액을 이용할 경우 유산균 배양 배지인 MRS broth 자체의 색상에 의해 OD값 측정 시 에러사항이 있었다. 따라서 가공 공정이 간편하면서, 안정적인 데이터를 도출 할 수 있는 시료인 cell (배양물을 원심분리 한 후 하층부를 따로 모

은 것)을 피부 효능 관련 실험물로 사용하기로 하고 다음 실험을 진행하였다.

3. 확립된 전처리 방법에 따른 피부미용 효과의 검정

확립된 시료 전처리 방법에 따라 보유 균주의 항산화 활성과 미백활성을 측정한 결과는 하단에 도표로 나타났다. 1차년도에 분리한 균주를 이용한 DPPH assay에서 항산화력이 우수한 균주는 D433, F45, W69등이었으며, tyrosinase inhibition assay를 통해 미백 효과를 검토한 결과, D57, D433, F3, R40, S1, W32, W33, V8 등이 우수한 결과를 보였다.

이들 중 사포닌 전환 활성이 우수한 균주는 D57, D433, W69, S1, W32, V8 으며 이러한 결과를 종합하여 볼 때, D433이 가장 우수한 피부 증진 능을 가진 것으로 사료된다.

▶ 상기 실험을 통하여 항산화력 및 미백 활성 등 피부 환경을 개선시킬 수 있는 미생물 후보균으로서 김치 등에서 분리한 *Leu. mesenteroides* D433이 최종 선정되었으며, 본 균주는 인삼 사포닌의 대사체 전환 활성이 우수한 균주로 본 과제에 적합한 균주로 판단되어 최종 선정하였다.

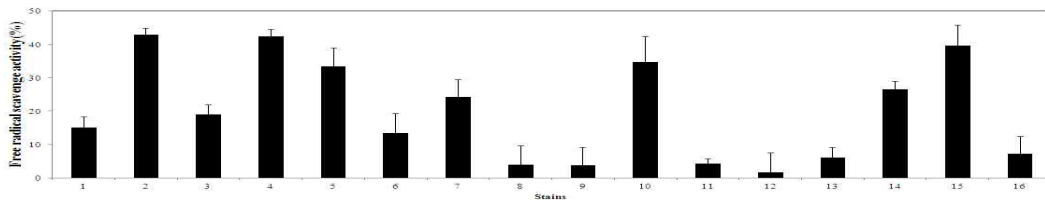


그림 74. DPPH assay를 통한 각 균주의 항산화 활성 측정 결과.

1. Strain D57, 2. Strain D433, 3. Strain F3, 4. Strain F45, 5. Strain F64, 6. Strain R80, 7. Strain S1, 8. Strain U22, 9. Strain V8, 10. Strain V10, 11. Strain V14, 12. Strain W32, 13. Strain W33, 14. Strain W65, 15. StrainW69, 16. Strain Z27.

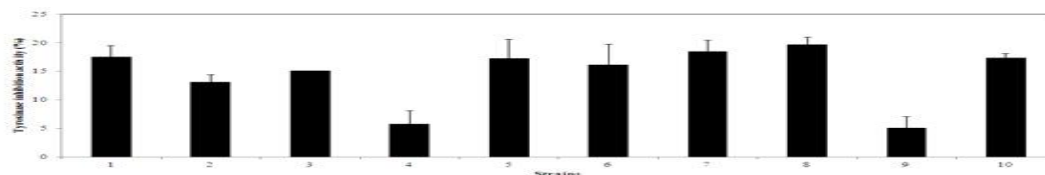


그림 75. Tyrosinase inhibition assay를 이용한 각 균주의 미백활성 측정 결과.

1. Strain D57, 2. Strain D433, 3. Strain F3, 4. Strain F45, 5. Strain R50, 6. Strain S1, 7. Strain W32, 8. Strain W33, 9. Strain W69, 10. Strain V8.

4. 인삼 발효에 적합한 균주 최종 선별

▶ 인삼발효에 적합한 균주를 최종 선별하고 최종 제품의 제작을 위해 사포닌 전환 유산균주를 이용하여 발효유 생산에 적합한 균주를 선별하기 위한 시험을 진행하였다.

가. 재료

표 55. 사포닌 전환 유산균주 5 종

D57	D433	F3	D437	V8
Leuconostoc mesenteroides subsp. suionicum	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides	Lactobacillus brevis	Lactobacillus yonginensis

나. 방법

MRS broth에서 15시간동안 종균배양한 균주를 새로운 whole milk broth 및 skim milk broth에 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 15시간 배양한 후, 균주 생육 정도 및 관능 평가를 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

사포닌 전환이 우수한 유산균주 5주를 이용하여 전지 분유 및 탈지 분유 배지에 접종 배양한 결과 모든 균주가 모든 배양 조건에서 생육되었다.

배양을 위한 배지 조성으로는 각 전지 분유 및 탈지 분유는 8%, 0.5%의 설탕 첨가하여 배양 하였다. 모든 배지의 초기 pH는 pH 7.05로 시작하였으며, 2일간의 배양 후 젖산에 생성에 의한 pH 저하가 관찰되었다(표 8). 이러한 결과로 미루어 전지 및 탈지 분유 배지를 이용한 발효유 제작에 있어서 배양 문제는 없는 것으로 보인다.

이를 이용하여 20명의 전문 평가요원으로 구성된 관능 평가단을 구성하여 관능평가를 수행하였다. 발효유의 관능평가 요소는 5점법을 이용하였으며, 평가항목으로는 발효유의 색, 향과 맛을 검토하였다. 평가 결과는 표 9와 그림 8에 나타났다. 모든 발효 균주에 있어서 전지 분유가 탈지 분유보다는 우수한 평가를 받았다. 이러한 원인으로서는 전지 분유내 함유된 지방질에 의한 고소한 맛에 기인하는 것으로 판단된다. 이들 균주 중 *Lactobacillus yonginensis* THG-V8 는 본 연구과제를 통하여 분리하여 신균주로 보고된 균주 (*Lactobacillus yonginensis* sp. nov., a lactic acid bacterium with ginsenoside converting activity isolated from Kimchi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 3274 - 3279) 로 그 의미가 크다고 할 수 있다.

하지만 이러한 자체 개발 균주로의 발효유의 제작에 있어서 맛과 향의 경쟁력이 기존 발효유와 비교했을 때, 현저하게 떨어진다고 판단되므로, 본 연구자들은 발효유의 향과 맛에 경쟁력을 갖출 수 있도록 다양한 유산균 스타터를 검토하여 *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*등을 선별하였다.

발효유의 풍미를 증진시키기 위하여, 전지 분유 및 탈지 분유에서 3균주의 혼합 배양을 수행하였다. 전지분유에서의 발효는 24시간 발효에서 전지분유의 맛과 향이 시간이 지날수록 떨어지는 특징이 있으며 pH의 변화가 거의 없었다. 반면에 탈지 분유를 이용한 배양에서는 9시간까지 특이한 변화가 없었으나 배양 24시간 후에 맛과 향이 급격히 떨어져 본 연구자들이 분리하여 선별된 사포닌 전환 유산균 보다 관능적으로 기호도가 현저히 낮아졌다. 이러한 원인으로서는 탈지 분유에서의 배양 24시간에서 pH가 5.8로 선별된 사포닌 전환 유산균 보다 생육이 빨리 일어나 기호도가 낮아진 것으로 보인다.

표 56. 사포닌 전환 균주의 전지 및 탈지 분유에서의 최종 pH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Initial pH	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05	7.05
Final pH	5.65	5.01	5.53	5.37	5.68	4.87	5.74	4.79	5.06	5.46
Broth	Whole milk	Skim milk	Whole milk	Skim milk	Whole milk	Skim milk	Whole milk	Skim milk	Whole milk	Skim milk
Microbe	D57	D57	D433	D433	F3	F3	D437	D437	V8	V8

표 57. 사포닌 전환 균주의 전지 및 탈지 분유에서의 관능 평가 결과

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average
Color	3.1	2.2	2.6	1.8	3.8	2.8	3	2	3.2	3.3	2.78
Flavor	3.1	3.4	3	2	3.3	2.4	3	0.7	2.4	1.2	2.45
Taste	2.9	2.8	2.3	1.6	2.6	2.8	3.1	0.1	2.9	0.4	2.15
Average	3.0	2.8	2.6	1.8	3.2	2.7	3.0	0.9	2.8	1.6	

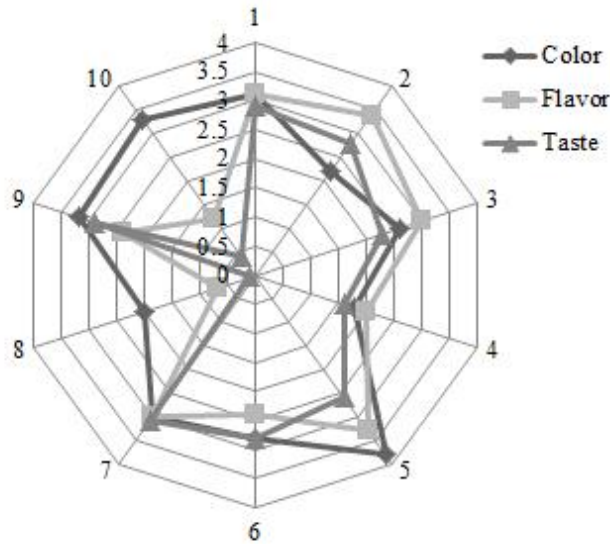


그림 76. 사포닌 전환 균주의 전지 및 탈지 분유에서의 관능 평가 결과.

따라서 본 연구자들은 사포닌 함유 발효유를 제작하기 위해 선별된 사포닌 전환 균주를 기존의 발효 혹은 효소 전환 방법을 이용하여 사포닌 대사체를 회수 한 후, 이를 *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* 등의 혼합 유산균 스타터를 전지 분유에서 12 시간 동안 발효한 발효유에 적당한 농도를 첨가하는 것이 관능적으로 우수할 뿐 만 아니라, 그 효능 또한 확보할 수 있는 것으로 보인다.

5. 산업화 매뉴얼 및 check list 작성

▶ 피부 환경 개선능이 우수한 기능성 소재의 산업화 공정 개발

선정된 피부 소재 및 확립된 인삼 발효 공정을 검토하여 이후 산업적 생산이 가능하도록 작업 매뉴얼 작성 및 check list 등을 작성하고 생성 공정에 대하여 고찰함.

본 연구 과제를 통하여 최종적으로 선정된 *Leu. mesenteroides* D433은 그 발효물이 항산화력 및 미백효과가 다른 유사균에 비하여 우수한 균으로 판단된다. 뿐만 아니라, 인삼 사포닌 추출물을 이용하여 사포닌 대사체 전환을 검토하였을 때, *Leu. mesenteroides* D433은 다른 유산균들에 비하여 우수한 전환 능력을 보였다.

선행된 연구에서 보여주듯이 *Leu. mesenteroides* D433의 최적화 및 저가형 배지를 본 연구를 통하여 구축하였으나, 산업화를 위해서는 구성원 중 누구든지 작업을 수행하였을 때, 균일한 발효물이 생성되어야 한다.

이를 위해서는 *Leu. mesenteroides* D433에 맞는 배양 및 발효 관리 지침서인 작업 매뉴얼과 그에 맞는 check list가 요구된다. 따라서 *Leu. mesenteroides* D433의 발효를 위한 전배양, 종균 배양, 본배양에 필요한 작업 매뉴얼을 작성하였다(그림 9). 일반적으로 전배양은 종균배양에 필요한 균의 관리에 속하므로, 전배양의 이전 단계에서는 균주의 본관에서 시작되며, 일반적으로는 동결 건조에 의한 분말상 혹은 -70°C 에서 보관하는 glycerol stock 상태로 존재한다. 본관중인 시료는 본 배양에 앞서 2~3차례의 계대 배양을 요구하며, 이 경우 일반적인 증균 배지인 MRS 배지를 이용하여 한천 배지 또는 액체 배지 상에서 수행한다. 뿐만 아니라, 계대중인 균체를 회수하여 현미경 관찰 및 균주의 성상을 확인함으로써 균주의 오염 등을 확인하는 것이 필수이다.

전배양 과정 중에 오염 유무를 확인하고 충분한 계대배양을 통해 균체의 활성을 유지하고 나서는 본 배양에 접종될 종균을 배양해야 하며, 이 단계에서부터 최적화된 배지를 사용하는 것이 유리하다. 전배양 및 본 배양에서의 살균은 80°C 에서 15분간 이루어지는데, 일반적인 멸균 온도인 121°C 에 비하여 낮은 온도이지만, 일반적인 영양세포들은 이 정도의 열처리만으로도 살균이 가능하다. 하지만, 주변 환경 혹은 배지 성분에 포자가 혼입될 수 있는 경우에는 같은 열처리 조건을 2~3회 반복하여 간헐적인 살균법을 활용하는 것이 유리하다. 본 배양은 균체의 생육이 우선 되는 것이 아니라 사포닌 전환에 그 초점이 맞추어져 있다. 선행되어진 실험을 통하여 일반적으로 사포닌 전환이 가능한 발효 시간은 수일이 걸리는 것으로 보이며, 이러한 경우에는 교차 오염 등의 2차 오염이 예상되므로 오염 방지가 필수적이다.

균의 배양에서 온도와 pH는 매우 중요한 요소이므로 관리 지침에 있는 온도 30°C 와 약산성 및 중성의 pH 범위 (pH 6.5 내외)를 지켜 발효하는 것이 중요하다. 일반적으로 유산균은 통성 혐기성 균으로 산소의 공급이 필요 없으며, 교반 또한 필요하지 않다. 하지만 대량 생산에 있어서 교반은 균체와 기질의 침전을 억제하고, 기질의 표면적을 넓히는 효과가 있으므로, 약한 교반(대략 50rpm) 이 요구된다.

전배양의 배양 시간은 9시간 내외에서 종결하는 것이 유리하다. 이러한 이유로는 실험실 배양을 통해 확인한 결과, 최적화된 저가형 배지에서 균체의 생육이 9시간에 정지되는 것을 확인하였으며, 12시간부 24시간 이내에 효소 활성이 최대로 유지되는 것으로 보아 전배양은 9시간에서 마무리하는 것이 유리하다. 반면에 본배양의 경우에는 사포닌 전환에 그 초점이 맞추어져 있으므로 20시간 이상 배양 하면서 그 과정중에 시료를 분석하므로써 종결 시점을 확인하는 것이 바람직하다.

그림 10.에서는 배지 첨가량, 온도 등의 발효 전후에 작업자가 숙지하고 확인해야 할 요인들을 분석하여 명시하였다. 일반적으로 숙련된 작업자라도 다양하고 다수의 작업을 수행할 경우 실수를 할 수 있기 때문에 산업화에 있어서 이러한 check list는 매우 중요하다.

마지막으로 발효 준비, 발효 과정 및 발효 결과를 정리하는 보고서 양식을 작성하였다. 이러한 보고서는 batch 공정을 진행하면서 작성하여 관리함으로써 사후 문제 발생 시 원인 파악에 귀중한 자료이므로 보고서 작성은 매우 중요하다.

▶ 선정된 피부 소재 및 확립된 인삼 발효 공정을 검토하여 이후 산업적 생산이 가능하도록 작업 매뉴얼 작성 및 check list 등을 작성하였음.

인삼 사포닌 대사체 전환 작업 매뉴얼

1. 종균 배양

① 전 배양

- 배지: Lactobacilli MRS broth (Difco, USA)
- 온도: 30℃
- 정치배양, ~12hr 배양
- -70℃에서 보관 상태에서 2~3회 계대배양 전 배양으로 사용

② 종균배양

- 종균 배양용 배지

성분	첨가량 (w/v)
Sucrose	0.5 %
Yeast extracts	1.5 %
Crude saponin	50ppm
Sodium acetate	0.1%
Manganese sulfate	0.005 %
Potassium phosphate	0.2%

- 배지 살균 조건: 80℃, 15min
- 미리 준비된 종균배양 용 배지에 전배양액을 접종 (1~10%, v/v)
- 온도: 30℃
- 교반 속도: 50rpm (발효기 배양의 경우)
- ~9 hr 배양
- 초기 pH 6.5 내외 (발효 중 pH control 없음)

2. 본 발효

① 본 발효

- 본 발효용 배지

성분	첨가량 (w/v)
Sucrose	0.5 %
Yeast extracts	0.5 %
Crude saponin/인삼 분말	200ppm
Sodium acetate	0.1%
Manganese sulfate	0.005 %
Potassium phosphate	0.2%

- 배지 살균 조건: 80℃, 15min
- 미리 준비된 종균배양 액을 접종 (1~10%, v/v)
- 온도: 30℃
- 교반 속도: 50rpm (발효기 배양의 경우)
- 20 hr ~ 배양
- 초기 pH 6.5 내외 (발효 중 pH control 없음)

그림 77. 인삼 사포닌 대사체 전환 작업 매뉴얼

Check lists

			담 당	과 장	이 사	대표이사
공정	항목		결과	확인	비고	
전 배양	최종 OD	0.8~				
	최종 pH	5.0±0.5				
종균 배지	설탕	0.5%				
	효모 추출물	0.5%				
	Crude saponin	50ppm				
	Sodium acetate	0.1%				
	Manganese sulfate	0.005%				
	액 량					
종균 배지 살균	온도	80℃				
	시간	15min				
종균 배양	발효 온도	30℃				
	발효 시간	9hr				
	최종 OD	1.0~				
	최종 pH	5.0±0.5				
	액 량					
본 배지	설탕	0.5%				
	효모 추출물	0.5%				
	Crude saponin	200ppm				
	Sodium acetate	0.1%				
	Manganese sulfate	0.005%				
	액 량					
본 배지 살균	온도	80℃				
	시간	15min				
본 배양	발효 온도	30℃				
	발효 시간	12hr				
	최종 OD	1.0~				
	최종 pH	5.0±0.5				
	액 량					
살균	온도	80℃				
	시간	15min				
균체 제거	배양액 량					
	최종 pH					
	고형분량					
기타						

그림 78. 인삼 사포닌 대사체 전환 작업 check list 양식.

발효 보고서

				담 당	과 장	이 사	대표이사
발효목적				발효책임자			
종균 배양	균주 명			종균 발효일			
	발효액 량	발효 시간		발효온도			
	교반 속도	통기 량		초기 pH			
	배지조성 (%)						
	결과 및 고찰						
본 배양	본 배양일	발효시간		발효액 량			
	발효온도	교반 속도		통기 량			
	배지조성 (%)						
	최종 균 수	최종 pH		최종 OD			
	비 고						
총 합							

그림 79. 인삼 사포닌 대사체 전환 작업 보고서 양식

제 6 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (주제)	핵심연구목표	달성도 (%)	기술발전 기여도
효소처리 홍삼을 응용한 피부 주름 개선에 도움이 되는 기능 식품개발	효소처리 홍삼을 응용한 소재의 기능성 및 안전성 평가	100%	효소처리 홍삼을 이용하여 독성평가를 실시하여 안전성을 확인하였으며, 주름 개선 임상시험을 진행하여 효소처리 홍삼의 기능성을 확인하여, 차후 주름 개선 기능 건강기능 성식품의 개발에 기여함.
	효소처리 홍삼을 응용한 Beauty Food 표준화 확립		효소처리 홍삼의 지표물질을 확립하고 표준화 하여 기능 성식품 개발에 기여함.
	효소처리 홍삼을 응용한 기능성 소재 제형화 연구		효소처리 홍삼을 이용한 제품을 개발하고 이의 제조공정 및 제형을 확립하여 건강기능성식품 개발에 기여함.
인삼 사포닌을 이용한 기능성 화장품 임상 및 응용제품의 개발	기능성 화장품 및 의약외품 소재의 기능성 및 안전성 평가	100%	인삼 사포닌을 이용하여 독성평가를 실시하여 화장품 및 의약외품 소재로의 안전성을 확인하였으며, 주름 개선 임 상시험 및 양모 효능 임상시험을 진행하여 인삼 사포닌의 기능성을 확인하여, 차후 관련 제품의 개발에 기여함.
	인삼사포닌 응용 제형화 기반 확립		인삼 사포닌을 이용한 제품을 개발하고 이의 제조공정 및 제형을 확립하여 기능성화장품 및 의약외품 개발에 기여 함.
	인삼 사포닌 소재별 표준화 연구		인삼 사포닌 응용 소재의 지표물질을 확립하고 표준화 하 여 기능성화장품 및 의약외품 개발에 기여함.
인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링 연구	임상평가 프로세스관리 및 인삼소재 및 제품의 피부 및 모발 증진 효능연구	100%	인삼 및 홍삼 응용 소재를 이용하여 피부 주름 개선 및 양모 효능을 검증하여 새로운 기능성 물질을 탐색하여 관 련 산업화의 기반을 조성함. 또한, 피부 주름 개선 및 양 모 기능 평가를 위한 임상평가 프로세스를 관리함으로써 제품개발에 기여함.
	인삼소재 및 제품의 피부기능 개선 효능검증 연구		각종 인삼 소재 및 제품의 피부관련 기능 개선 효능을 검 증하여 인삼소재를 응용한 연구 분야를 다양화 하는데 기 여함.
	사포닌전환기술을 응용한 미량사포닌의 양산시스템연구		인삼 및 홍삼의 효능 물질인 미량사포닌을 양산하기 위한 최적 조건을 확립함으로써 인삼 및 홍삼을 응용한 원료의 개발과 기능성 제품의 개발에 기여함.
	인삼소재 표준화 및 생산프로세싱연구		인삼 및 홍삼 응용 소재의 지표물질을 확립하여 표준화하 고, 최적 제조공정을 확립하여 기능성 제품의 개발에 기여 함.

제 7 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 중생 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	4						4	2	
	달성	4					13	4	2	
2차년도	목표	5	1					6	1	
	달성	5	1				20	6	1	
3차년도	목표	6	2					8	3	
	달성	5	0				49	11	2	
계	목표	15	3					20	6	
	달성	15	1				82	22	5	

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타	
활용건수	목표	2	4			3	1
	달성	4	4*			3	1

* 기술이전에 따른 이전기술 실시 상품화 예정.

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012.01	Anti-cancer effect of ginsenoside F ₂ against glioblastoma in xenocraft model in SD rats	Ji Yon Shin, Jung Min Lee	Tae-Hoo Yi	Heon Sub Shin, Sang Yong Park, Jung Eun Yang,	J. Ginseng Research	36(1)	국외	SCI
2013.07	Pedobacter ginsenosidimutans sp. nov., with ginsenoside converting activity	Jung Eun Yang	Tae Hoo Yi, Moochan g Kook		International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology		국외	SCI
2011.08	Forsythiae fructus and its active component, arctigenin, provide neuroprotection by inhibition of neuroinflammation	Ji-Ho Park, Ye-Ji Hong	Sun Yeou Kim	Eunjung Moon, Seul-A Kim	Biomolecules & Therapeutics	19(4)	국내	SCIE
2011.08	Protective effect of Puerariae Radix on ovariectomy-induced bone loss in rats	Jeong A Park	Sun Yeou Kim	Sung Ok Lee, Eunjung Moon, Seong Cheol Lim, Min Hyoung Cho	Korean Journal of Pharmacognosy	17(3)	국내	SCIE
2013.11	Sphingobacterium ginsenosidimutans sp. nov., isolated from soil of a ginseng field.	Heung Min Song, Jung Eun Yang	Tae Hoo Yi,		journal of gen. appl. Microbiology	59(5)	국외	SCIE
2012.08	Phenolic constituents from the rhizomes of Acorus gramineus and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities	Ki-Hyun Kim, Eun-Jung Moon, Sun-Yeou Kim	Kang-R o Lee		Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	22	국외	SCI
2012.03	6-Shagaol, a ginger product, modulates	Sang-Keun Ha,	Sun-Yeou Kim		Neuropharmacology	63	국외	SCI

	neuroinflammation: A new approach to neuroprotection	Eun-Jung Moon						
2012.06	A substituted 3,4-dihydropyrimidinone derivative prevents inflammation mediated neurotoxicity; role in microglial activation in BV-2 cells	Oh-Wook Kwon, Eun-Jung Moon	Sun-Yeou Kim		Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	22	국외	SCI
2012.09	Pedobacter kyungheensis sp. nov., with ginsenoside converting activity	Jung-Eun Yang, Ji-Yeon Shin, Sang-Yong Park, Eun-Ji Yi	Tae-Hoo Yi		The Journal of general and applied microbiology	58(4)	국외	SCI
2012.09	Ginsenoside Rb1 modulates level of monoamine neurotransmitters in mice frontal cortex and cerebellum in response to immobilization stress	Sang-Hee Lee	Sun-Yeou Kim		Biomolecules & Therapeutics	20(5)	국외	SCIE
2012.09	Lactobacillus yonginsis sp. nov., a lactic acid bacterium with ginsenoside converting activity isolated from Kimchi	Eun-Ji Yi, Jung-Eun Yang, Moo-Chang Kook	Tae-Hoo Yi		International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	63(9)	국외	SCI
2012.09.11	김치에서 분리한 Lactobacillus brevis THK-D57에 의한 인삼 사포닌의 생물학적 전환	Eun-Ji Yi, Tae-Hoo Yi	Moo-Chang Kook		Korean Journal of Food and Nutrition	25(3)	국내	비SCI
2013.06.10 (revision)	The inductive effect of ginsenoside F2 on hair growth by altering the WNT signal pathway in telogen mouse skin	Heon-Sub Shin, Sang-Yong Park	Tae-Hoo Yi	Eun-Son Hwang, Don-Gil Lee, Hyun-Geun Song,	European Journal of Pharmacology		국외	SCI

				Gafurjon Mavlonov				
2013.10.02 (revision)	Ginsenoside F2 reduces hair loss by controlling apoptosis through the SCAP and TGF- β pathways in a DHT-induced mouse model	Heon-Sub Shin, Sang-Yong Park	Tae-Hoo Yi	Eun-Son Hwang, Don-Gil Lee, Gafurjon Mavlonov	Biological & Pharmaceutical Bulletin		국외	SCI
2013.08.09 (revision)	The hair loss protective effects of Luteolin against DHT-induced mouse model	Sang-Yong Park, Heon-Sub Shin	Tae-Hoo Yi	Hyun-Geun Song, Tae-Youp Lee	Skin Pharmacology and Physiology		국외	SCI
2013.07.29 (revision)	The androgenic alopecia protective effects of forsythiaside-A and the molecular regulation in a mouse model	Heon-Sub Shin, Sang-Yong Park	Tae-Hoo Yi	Hyun-Geun Song, Eun-Son Hwang, Don-Gil Lee	Phytotherapy Research		국외	SCI
2013.10	<i>Dyella kyungheensis</i> sp. nov., isolated from the soil of a cornus fruit field	Heung-Min Son	Tae-Hoo Yi, MooChang Kook	Jung-Eun Yang, Eun-Ji Yi, YongJin Park, Kyung-Hwa Won, Ju-Han Kim, Chang-Kyun Han	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	63(Pt 10)	국외	SCI
2013.10	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> sp. nov., a bacterium with ginsenoside converting activity isolated from soil of a ginseng field	Heung-Min Son	Tae-Hoo Yi, MooChang Kook	Jung-Eun Yang, YongJin Park, Chang-Kyun Han, Song-Gun Kim	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	63(Pt 10)	국외	SCI
2013.12	<i>Chryseobacterium gwangjuense</i> sp. nov., isolated from soil	YongJin Park	Tae-Hoo Yi, MooChang Kook	Heung-Min Son, Eun-Hee Lee, Gafurjon T.	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	63(pt1 2)	국외	SCI

				Mavlonov , Hun-Sub Shin				
2013.08.09 (revision)	Microbacterium kyunghense sp. nov and Microbacterium jejuense sp. nov., isolated from salty soil	MooChang Kook, Heung-Min Son	Tae-Hoo Yi		International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		국외	SCI
2013.12.18 (accept)	Taibaiella koreensis sp. nov., isolated from soil of a ginseng field	Heung-Min Son, MooChang Kook	Tae-Hoo Yi	Ju-Han Kim	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		국외	SCI
2013.10	Enzyme-processed Korean Red Ginseng extracts protects against skin damage induced by UVB irradiation in hairless mice	Eun sun Hwang,	Sun-Yeo u Kim, Tae Hoo Yi		Journal of ginseng research	37(4)	국외	SCIE
2013.08 (accept)	Effect of oral administration of fucosterol from Hizikia fusiformis on DNCB-induced Atopic Dermatitis in NC/Nga mice	Eun sun Hwang,	Sun-Yeo u Kim		Food Science and Biotechnology		국외	SCIE
2013.09 (revision)	Enzyme-modified Panax ginseng inhibits UVB-induced skin aging through the regulation of procollagen type I and MMP-1 expression	Eun sun Hwang,	Sun-Yeo u Kim		Food & Function		국외	SCI
2013.08 (revision)	Protective effects of Vigna angularis water extracts against UVB-exposed skin aging in vitro and	Eun sun Hwang,	Sun-Yeo u Kim		Journal of medicinal food		국외	SCI

	in vivo							
2013.09 (revision)	Protective effects of gallic acid against UVB-mediated skin aging in vitro and in vivo	Eun sun Hwang,	Sun-Yeou Kim		Phytotherapy Research		국외	SCI
2013.12 (revision)	Sphingomonas kyeonggiense sp. nov., isolated soil of a ginseng field	Heung-Min Son, MooChang Kook	Tae-Hoo Yi	Hanh T.H Tran	Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology		국외	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2010	염증성 질환 개선, 완화, 치료 또는 예방용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0126537	2012	아토피 질환 개선, 완화, 치료 또는 예방용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-1164390
2011	효소-처리 홍삼 추출물을 함유하는 피부노화방지 및 피부주름개선용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0091286					
2011	아스퍼질러스 나이지의 배양액에서 분리한 인삼 사포닌 전환활성을 갖는 효소, 이의 제조방법, 이를 이용한 효소처리 인삼 추출물, 효소처리 인삼 추출물의 제조	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0091287					
2011	효소-처리 홍삼 추출물 및 맥아 추출물을 함유하는 피부노화방지 및 피부주름개선용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0092034					
2011	인삼 및 산사 추출물을 포함하는 피부미용 개선용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0094492					
2011	인삼 및 연교 추출물을 함유하는 탈모방지 또는 발모 촉진용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0103629					
2011	인삼 및 톳 추출물을 함유	경희대학교	대한민국	10-2011-					

	하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물	산학협력단		0103630					
2011	아토피 질환 개선, 완화, 치료 또는 예방용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0130964					
2012	신규한 유산균 용인시스 T HK-V8 및 이를 이용한 사포닌의 저분자화 방법	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0096417					
2013	진세노사이드 F2를 포함하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0106492					
2013	진세노사이드 F2의 함량이 증가된 발효 홍삼의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 발효 홍삼 추출물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0142825					
2013	포시티아사이드-에이를 포함하는 탈모방지 또는 발모촉진용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0106476					
2013	신규 류코노스톡 메센테로이데스 THK-D433T 및 이를 이용한 사포닌의 저분자화 방법	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0123233					
2013	신종균 크리세오박테리움 THG-C4-1 및 이를 이용한 지페노사이드 17 생산 방법	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0141305					
2014	카테킨 배당체를 유효성분으로 함유하는 피부 보습 및 주름 개선용 조성물	경희대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0004359					

라. 기술료 징수 현황

- 연구개발과제명 : 인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링 연구
총 연구개발비 : 1,188,000,000 원
(정부출연금액 : 1,078,000,000원, 참여기업부담금액 : 110,000,000원)
기술료 징수액 : 148,158,360원 (정부출연금액의 16.362 %)
기술사용기간 : 8 년 (2013 년 ~ 2021 년)
계약당사자
(갑) 주관연구기관 : 경희대학교 산학협력단
(을) 실시기업(참여기업) : 아모레퍼시픽(주)
- 연구개발과제명 : 인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링 연구
총 연구개발비 : 1,188,000,000 원
(정부출연금액 : 1,078,000,000원, 참여기업부담금액 : 110,000,000원)
기술료 징수액 : 60,654,400 원 (정부출연금액의 6.68 %)
기술사용기간 : 8 년 (2013 년 ~ 2021 년)
계약당사자
(갑) 주관연구기관 : 경희대학교 산학협력단

(을) 실시기업(참여기업) : 이태후생명과학(주)

3. 연구개발과제명 : 인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링 연구

총 연구개발비 : 1,188,000,000 원

(정부출연금액 : 1,078,000,000원, 참여기업부담금액 : 110,000,000원)

기술료 징수액 : 148,094,800 원 (정부출연금액의 16.31 %)

기술사용기간 : 8 년 (2013 년 ~ 2021 년)

계약당사자

(갑) 주관연구기관 : 경희대학교 산학협력단

(을) 실시기업(참여기업) : 한국인삼공사(주)

4. 연구개발과제명 : 인삼소재 피부적용을 위한 양산 및 효능모니터링 연구

총 연구개발비 : 1,188,000,000 원

(정부출연금액 : 1,078,000,000원, 참여기업부담금액 : 110,000,000원)

기술료 징수액 : 18,160,000 원 (정부출연금액의 2 %)

기술사용기간 : 8 년 (2013 년 ~ 2021 년)

계약당사자

(갑) 주관연구기관 : 경희대학교 산학협력단

(을) 실시기업(참여기업) : (주)더마랩

마. 사업화 현황 (계획)

1. 기술이전을 통한 인삼소재 응용 기능성 제품 인허가 신청 (2014년)

2. 고부가가치 상품의 개발에 적용함

- 인삼 소재를 응용한 기능성 화장품 및 의약외품 개발(2014~2015)

- 홍삼 소재를 응용한 기능성식품의 제형 확대(2015년)

3. 국내외 판매를 통한 수익 창출(2015년)

(1) 아모레퍼시픽의 기능성 화장품 사업화 전략

①기술 이전을 통한 인삼 소재 기능성 신청(2014) 및 획득(2015)/ 양모 효능 소재 제품 적용

②목표 기능성: 인삼 응용 소재를 이용한 주름 개선 기능 확보

③목표 시장: 자사 브랜드 판매점 및 방문판매 망 활용

④예상매출: 안티에이징 화장품 단품(브랜드 미정) 출시로 인한 예상 매출 25억/년, 양모기능 헤어 세정제(브랜드 미정)출시로 인한 예상 매출 25억/년

⑤타겟제형: 안티에이징 화장품 1종 및 양모기능 헤어 세정제 1종 등 총 2종

(2) KGC (한국 인삼공사)의 기능성식품 사업화 전략

① 기술이전을 통한 인삼소재 개별인정형 신청 및 획득 (2014)

② 회사내 상품개발위원회 상정 (2014)

③ 목표 기능성 : 현재 홍삼의 5대기능성(면역, 항피로, 혈행개선, 기억력, 항산화)의 피부건강 추가

- 특이점 : 기존의 5대 기능성은 모든홍삼회사에 고루 적용

효소전환 홍삼분말의 경우 KGC 독점 가능

④ 목표시장

국내 : 정관장 가맹점 혹은 방문판매 망 활용

⑤ 예상 매출 : 현재 홍삼정 매출액 1,000억의 5% 계상 약 50억원/년

⑥ 타겟제형 : 타블렛 1종

(3) (주)더마랩의 기능성 화장품 및 식품 원료 사업화 전략

- ① 기술이전을 통한 인삼소재 개별인정형 신청(2014) 및 획득 (2015)
- ② 목표 기능성 : 인삼 미량 사포닌을 이용한 피부 주름 개선 기능 확보
- ③ 목표시장 : 국내 기능성 화장품 판매 업체(LG 생활건강 등 대기업 및 중소기업)
- ④ 예상 매출 : 고부가가치 기능성 원료의 공급, 약 2억원/년
- ⑤ 타겟제형 : 안티에이징 화장품 1종

(2) 이태후생명과학(주) 기능성 식품 및 화장품 원료 사업화 전략

- ① 기술이전을 통한 인삼 및 천연물 소재 개별인정형 신청(2014) 및 획득 (2015)
- ② 목표 기능성 : 인삼 응용 소재를 이용한 양모 기능성 및 천연물 소재를 이용한 기타 기능성(면역, 관절염, 치주염 등) 추가
- ③ 목표시장 : 국내·외 기능성 식품 및 화장품 판매 업체(한국콜마 등 국내기업)
- ④ 예상 매출 : 고부가가치 기능성 원료의 공급, 약 2억원/년
- ⑤ 타겟제형 : 타블렛 또는 캡슐제 1종

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
15	2	8	5		8	7	15		

(2) 장·단기 연수지원 성과

해당사항 없음

(3) 산업기술인력 양성 성과

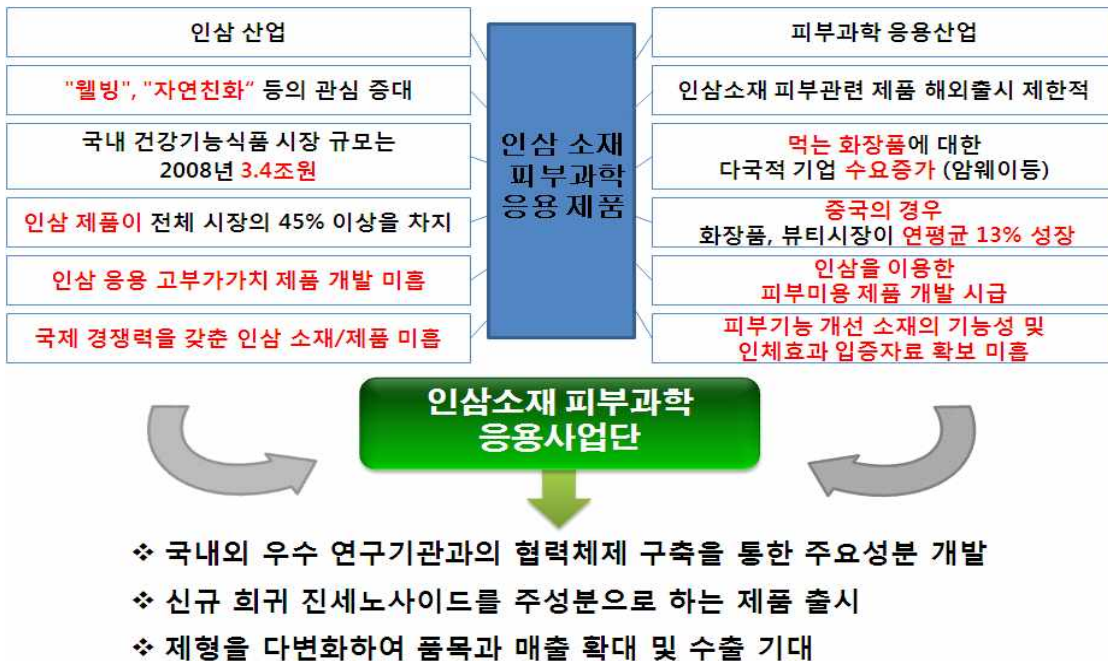
본 과제 기간동안 총 15명의 학위취득자가 발생하였으며, 그중 박사 2명 모두 산업체에 연구소장으로 취직하여 연구활동에 전념하고 있으며, 석사 8명중 4명은 박사과정으로 진학하였고, 2명은 국 공립기관의 연구원으로, 2명은 취직하였음. 학사 5명은 모두 석사과정으로 진학하여 연구활동에 전념하고있음.

사. 경제사회 파급효과

- 인삼 생산액('07, 7,990억원)은 농업 총생산액의 2.3%이지만 단일 품목으로 10위의 중요한 소득작물이다. 농산물 생산액(23조 4천억원)으로 비교하면 3.4%의 비중과 단일품목 5위의 비중을 차지하며 10a당 소득은 쌀의 4배로 고소득 작물임.
- 그러나 인삼 경작농가당 경작규모가 영세하고, 기계화가 낮아 농기계 이용률이 저조하며, 재배특성상 인력 의존형 경작으로 인한 노임이 상승하여 생산비가 많이 소요된다. 고려인삼의 생산비용은 21,317원/kg으로 중국 3,590

원/kg의 5.9배, 미국 6,444원/kg의 3.3배, 캐나다 8,604원/kg의 2.5배이다. 한국 고려인삼의 10a당 수량은 504kg/10a로서 중국과 캐나다보다 매우 낮아 생산비를 증가시키는 요인이 되고 있음.

- 인삼을 Beauty 관련 기능성 화장품, 식,의약품으로 개발하여 부가가치를 높여서 해외에 한국의 인삼을 응용한 기능성 제품을 진출함을 목표로 한다. 이를 통하여 농가, 농민단체등의 생산자에게 새로운 소비원 창출함으로써 총량적으로 인삼 소비를 진작시켜 농가 신수익 창출에 기여할 수 있음.
- 전통산업인 인삼산업은 현재 많은 지자체에서 핵심 산업으로 육성 중에 있으며, 본 연구사업단과 유기적인 협력 관계를 통해 재배면적이 많은 인삼 재배 지자체에 새로운 활력이 될 것으로 기대됨.
- 기능성화장품 원료와 건강기능식품의 원료는 대부분 수입에 의존하고 있어 인삼 기능성 화장품, 식품,의약품의 개발은 수입대체효과는 물론 경쟁력 있는 수출품목이 될 것으로 기대되며, 천연물로 개발하였다 하여도 합성이나 수입원료를 사용하므로 농가에는 별 소득이 없었으나, 인삼을 이용한 기능성원료의 경우 국내에서 재배한 인삼을 사용하여 추출하기 때문에 국내 산업의 발전에 이바지할 것으로 기대됨.
- 인삼 특정 사포닌 기능성에 대한 산업재산권 획득으로 소재 및 완제품의 기술수출이 가능함.



아. 언론홍보

1. 전북일보. 2011.09.13 -----<http://www.jjan.kr/news/articleView.html?idxno=411288>
2. 국토일보. 2013.12.09 ----- <http://www.ikld.kr/news/quickViewArticleView.html?idxno=35729>
3. 에코저널. 2013. 12.14.
-----http://www.ecojournal.co.kr/special_view.html?uid=78908&cpage=1&special=&point=1

5. 구매금액이 3천만원 이상인 기자재 구매현황

5-1. Preparation HPLC System (Prep-LC)

장비등록번호	NFEC-2012-03-158299	등록일자	2012-03-27
한글명	자외선 검출기		
영문명	Preparation HPLC System		

기본정보			
고정자산관리번호	153708900000019	연구시설·장비구분	주장비
취득방법	구매	모델명	A50531
제작사	Knauer	제작국가	독일
취득금액(원)	45,800,000	취득일자	2011-06-22
활용범위	공동활용허용가능	장비용도	분석

5-2. High speed counter current Chromatography(HSCCC)

장비등록번호	NFEC-2013-06-180028	등록일자	2013-04-24
한글명	고체역류크로마토그래피		
영문명	High speed counter current Chromatography		

기본정보			
고정자산관리번호	201202210048	연구시설·장비구분	주장비
취득방법	구매	모델명	TBE-1000A
제작사	Tauto	제작국가	중국
취득금액(원)	48,000,000	취득일자	2012-02-20
활용범위	공동활용서비스가능	장비용도	분석

5-3. High performance liquid chromatography(HPLC)

장비등록번호	NFEC-2013-08-182346	등록일자	2013-08-26
한글명	액체 크로마토그래프		
영문명	High performance liquid chromatography(HPLC)		

기본정보			
고정자산관리번호	1-52604700-000024	연구시설·장비구분	주장비
취득방법	구매	모델명	e2695
제작사	Waters	제작국가	미국
취득금액(원)	49,000,000	취득일자	2013-05-24
활용범위	공동활용허용가능	장비용도	분석

6. 연구 성과 활용 계획

1. 기술이전을 통한 인삼소재 응용 기능성 제품 인허가 신청 (2014년)

2. 고부가가치 상품의 개발에 적용함

- 인삼 소재를 응용한 기능성 화장품 및 의약외품 개발(2014~2015)
- 홍삼 소재를 응용한 기능성식품의 제형 확대(2015년)

3. 국내외 판매를 통한 수익 창출(2015년)

(1) 아모레퍼시픽의 기능성 화장품 사업화 전략

① 목표시장

- 국내 : 화장품 시장 (기초화장품), 해외 : 중국, 미국, 동남아 등

② 시장 예측(국내외 한방화장품 시장 : 2조원 예측)

- 인삼응용 화장품 시장 : 약 5000억(각 시장별 20%) 예상
- 현재 인삼응용 화장품 매출액 1000억의 1% 계상 약 10억원/년

③ 적용 가능 예상 제품라인

- 안티에이징 화장품 1종, 모공 or 아토피 화장품 1종

(2) KGC (한국 인삼공사)의 기능성식품 사업화 전략

① 기술이전을 통한 인삼소재 개별인정형 신청 및 획득 (2014)

② 회사내 상품개발위원회 상정 (2014)

③ 목표 기능성 : 현재 홍삼의 5대기능성(면역, 항피로, 혈행개선, 기억력, 항산화)외 피부건강 추가

- 특이점 : 기존의 5대 기능성은 모든홍삼회사에 고루 적용
효소전환 홍삼분말의 경우 KGC 독점 가능

④ 목표시장

국내 : 정관장 가맹점 혹은 방문판매 망 활용

⑤ 예상 매출 : 현재 홍삼정 매출액 1,000억의 5% 계상 약 50억원/년

⑥ 타겟제형 : 타블렛 1종

(3) (주)더마랩의 기능성 화장품 및 식품 원료 사업화 전략

① 기술이전을 통한 인삼소재 개별인정형 신청(2014) 및 획득 (2015)

② 목표 기능성 : 인삼 미량 사포닌을 이용한 피부 주름 개선 기능 확보

③ 목표시장 : 국내 기능성 화장품 판매 업체(LG 생활건강 등 대기업 및 중소기업)

④ 예상 매출 : 고부가가치 기능성 원료의 공급, 약 2억원/년

⑤ 타겟제형 : 안티에이징 화장품 1종

(2) 이태후생명과학(주) 기능성 식품 및 화장품 원료 사업화 전략

① 기술이전을 통한 인삼 및 천연물 소재 개별인정형 신청(2014) 및 획득 (2015)

② 목표 기능성 : 인삼 응용 소재를 이용한 양모 기능성 및 천연물 소재를 이용한 기타 기능성(면역, 관절염, 치주염 등) 추가

③ 목표시장 : 국내·외 기능성 식품 및 화장품 판매 업체(한국콜마 등 국내기업)

④ 예상 매출 : 고부가가치 기능성 원료의 공급, 약 2억원/년

⑤ 타겟제형 : 타블렛 또는 캡슐제 1종

제 8 장 참고문헌

1. 이정란, 임은진. 국내 탈모관리 시장의 분석 및 전망. 대한피부미용학회지. 7(1): 153-161. (2009)
2. 한국보건산업진흥원 화장품 산업 분석 보고서. (2008)
3. 한국의약품 수출입 협회 Facts & Survey Report. (2008)
4. Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 13: 343-348. (2005)
5. Kwon OS, Pyo HK, Oh YJ, Han JH, Lee SR, Chung JH, Eun HC, Kim KH. Promotive effect of minoxidil combined with All-trans retinoic acid (tretinoin) on human growth in vitro. *J. Korean Med Sci.* 22: 283-289. (2007)
6. Paus R, Foitzik K. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *International Society of Differentiation.* 72: 489-511. (2004)
7. Paus R, Sven MR, Carina VDV, Marcus M, Stefan E, Gao L, Udo H, Kerstin F, Lars M, Bori H. A Comprehensive Guide for the Recognition and Classification of Distinct Stages of Hair Follicle Morphogenesis. *The Society for Investigative Dermatology.* 113(4): 523-532. (1999)
8. Roh SS, Kim CD, Lee MH, Hwang SL, Rang MJ, Yoon YK. The hair growth promoting effect of *Sophora flavescens* extract and its molecular regulation. *Journal of Dermatological Science.* 30: 43-49. (2002)
9. Sven MR, Rossiter H, Paus R, Handjiski B, Peters EMJ, Murphy JE, Mecklenburg L, Kupper TS. Overexpression of Bcl-2 Protects from Ultraviolet B-Induced Apoptosis but Promotes Hair Follicle Regression and Chemotherapy-Induced Alopecia. *American Journal of Pathology.* 156 (4): 1395-1405. (2000)
10. Bae EA, Han MJ, Kim EJ, Kim DH. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. *Arch Pharm Res* 27: 61-67. (2004)
11. Cheng LQ, Kim MK, Lee JW, Lee YJ, Yang DC. Conversion of major ginsenoside Rb1 to ginsenoside F2 by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnol Lett* 28: 1121-1127. (2006)
12. Jung JS, Shin JA, Park EM, Lee JE, Kang YS, Min SW, Kim DH, Hyun JW, Shin CY, Kim HS. Anti-inflammatory mechanism of ginsenoside Rh1 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of the protein kinase A pathway and hemoxygenase-1 expression. *J Neurochem* 115: 1668-1680. (2010)
13. Leung KW, Wong AS. Pharmacology of ginsenosides: a literature review. *Chin Med* 5: 20. (2010)
14. Yoon JH, Choi YJ, Lee SG. Ginsenoside Rh1 suppresses matrix metalloproteinase-1 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 679: 24-33. (2012)
15. Lee HS, Hwang SY. Effects of DCS®Hair Tonic on Hair growth promotion in an Alopecia Model of C57BL/6 Mice. *The Korean Society for Aesthetics and Cosmetics.* 7, 131-141, (2009)
16. Won CH, Yoo HG, Kwon OS, et al. Hair growth-promoting effects of adipose tissue-derived stem cells. *J Dermatol Sci.* 57, 134-137, (2009)
17. Stout SM, Stumpf JL. Finasteride treatment of hair loss in women. *Ann Pharmacother.* 44, 1090-1097, (2010)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.