

발간등록번호

11-1543000-000858-01

미선나무의 민간전래 효과를 활용한 고기능성 피부미용 및
면역강화 소재 기술 개발

(Development of high valuable functional material for skin
care and immunity Enhancement using traditional remedies
of *Abeliophyllum distichum*)

중원대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미선나무의 민간전래 효과를 활용한 고기능성 피부미용 및 면역강화 소재 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 1월 20일

주관연구기관명 : 중원대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박 재 호

세부연구책임자 : 강 윤 중

협동연구기관명 : 우리나라영농조합법인

협동연구책임자 : 권 순 복

요 약 문

I. 제 목

미선나무의 민간전래 효과를 활용한 고기능성 피부미용 및 면역강화 소재 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 전 세계적으로 1속 1종인 우리나라 특산식물인 미선나무의 생물학적 작용기전 탐색하고 분자적 수준에서 작용기작을 구명하여 한방 기능성 산업화 소재로서의 유용성 검증 을 통해 충북 괴산 지역을 대표하는 새로운 약용식물의 발굴을 통한 신기능성 산업화 소재로 개발하여 지역 경제발전에 큰 역할을 하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발

- 미선나무 부위별(잎, 줄기, 뿌리, 꽃) 추출물의 일반성분 및 기능성 성분 분석
- 미선나무 소재의 산업화 적용을 위한 효과적 추출 model 개발
- 미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 *in vitro* & *in vivo* system 계에서 생리활 성 효과 구명
- 다양한 기능성 산업화 적용을 위한 미선나무 복합소재 연구

2. 미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 규명

- 미선나무 추출물의 *in vitro* system 을 활용한 염증 및 면역강화 효과 규명
- 미선나무 추출물의 *in vivo* system 을 활용한 염증 및 면역강화 효과 규명
- 산업화를 위한 미선나무 추출물의 안정성 규명 및 소재화 연구

3. 미선나무 추출물을 활용한 제품화 기술 및 대량 증식기술 개발

- 미선나무 추출기법 및 추출공정 표준화 연구 개발
- 미선나무 추출물을 이용한 피부미용 시제품 개발
- 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 면역력강화 기능성 사료 시제품 개발
- 미선나무의 대량번식을 위한 증식기법 연구

IV. 연구개발결과

1. 미션나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발

- 미션나무 부위별(잎, 줄기, 뿌리, 꽃) 총페놀성 화합물, 플라보노이드, 비타민 C 함량은 잎에서 가장 높았다.
- 미션나무의 추출 용매별 항산화 활성은 80% EtOH > 100% EtOH > 50% EtOH > 100% 물 순으로 높게 나타났다.
- 미션나무의 추출물의 tyrosinase와 melanin 생합성 저해활성에 의한 부위별 미백효과는 잎에서 가장 높았다.
- 미션나무의 추출물의 elastase저해 활성에 의한 부위별 주름개선 효과는 잎에서 가장 높았다.
- 미션나무 부위별 추출물은 산화적 및 자외선에 의한 DNA 손상억제 효과가 나타났다.
- 미션나무 부위별 추출물은 UV-B에 의해 야기되는 정상세포의 사멸을 억제하였다.

2. 미션나무 추출물의 항염증 등 면역효과 규명

- 미션나무 부위별 추출물 (가지, 꽃, 잎)은 각각 대식세포주인 Raw264.7 및 미세아교세포주인 BV2 세포에서 LPS에 의한 염증반응인 NO 생성과 PGE2 발현을 억제하였으며, 사이토카인 TNF- α 와 IL-6의 분비를 억제하였다.
- 미션나무 부위별 추출물 (가지, 꽃, 잎)은 각각 대식세포주인 Raw264.7 및 미세아교세포주인 BV2 세포에서 LPS에 의한 염증반응 억제시 MAPK와 NF κ B 신호전달 경로를 통하여 염증 반응을 억제하였다.
- 미션나무 추출물은 in vivo system인 마우스 대장에서 DSS를 이용하여 유도한 장염 발생을 억제하였다.
- 미션나무 추출물은 본 연구에서 사용한 농도 범위 내에서 세포 수준 안전성을 가지고 있음을 확인하였다.

3. 미션나무 추출물을 활용한 제품화 기술 및 대량 증식기술 개발

- 미션나무 기능성 원료 생산화를 위한 추출기법 및 추출공정 표준화 하였다.
- 미션나무 추출물을 함유한 샴푸 시제품을 개발 하였다.
- 미션나무를 주원료로 가공분말을 활용한 면역력강화 기능성 사료 시제품을 개발하였다.
- Auxin계 식물 성장조절제를 활용한 미션나무의 대량번식을 위한 증식기법을 완료하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 특허 및 논문

- 1) 특허출원 1건, 특허출원 2건 준비중
- 2) 국외논문(SCIE) 1편 게재, 국외논문 3편 국내논문 1편, 투고중학술발표 7건

2. 미션나무 추출물을 활용한 샴푸 및 면역강화 기능성 사료 양산화

SUMMARY

(영문요약문)

I. Research Title

Development of high valuable functional material for skin care and immunity Enhancement using traditional remedies of *Abeliophyllum distichum*

II. The purpose and need for research and development

In this study, we explore the biological mechanisms of action and investigate the mechanism of action of *Abeliophyllum distichum* which is traditional endemic plant of Goesan area in Korea. Furthermore, we try to verify the availability of *Abeliophyllum distichum* as herbal functional industrial materials. This novel functional materials will be play a major role in local economic development

III. Research contents and scope

1. Analysis of functional materials from *Abeliophyllum distichum* and development of technology to produce high valuable cosmetic materials

- Analysis of common and functional components from *Abeliophyllum distichum* extracts (leaf, stem, root, flower)
- Development of effective extraction model for industrial application of *Abeliophyllum distichum*
- Identification of bio-active effects of extracts for functional cosmetic applications
- Research of combined materials of *Abeliophyllum distichum* for various industrial application

2. Investigation of the anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* extracts

- Investigation of the anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* extracts using *in vitro* system
- Investigation of the anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* extracts using *in vivo* system
- Investigation of cytotoxicity of *Abeliophyllum distichum* extracts for industrial application

3. Development of commercialization and mass propagation technology using *Abeliophyllum distichum* extracts

- Research for Standardization of extract method and extract process using *Abeliophyllum distichum*
- Development of cosmetic prototype using *Abeliophyllum distichum* extracts
- Development of functional feed prototype using *Abeliophyllum distichum* powder
- Development of methods for mass propagation of *Abeliophyllum distichum*

IV. Results

1. Analysis of functional materials from *Abeliophyllum distichum* and development of technology to produce cosmetic materials

- Contents of phenolics, flavonoids, and vitamin C were highest in the leaves compared to other parts (flower, stem, root) in *Abeliophyllum distichum*
- Antioxidant activity of *Abeliophyllum distichum* extracts based on solvents as follows:
80% EtOH > 100% EtOH > 50% EtOH > 100% H₂O
- Leaf extract shows highest whitening effect by inhibition of tyrosinase and melanin biosynthesis
- Leaf extract shows highest anti-wrinkle effect by inhibition of elastase
- *Abeliophyllum distichum* extracts show inhibitory effect against DNA damage caused by oxidation or UV exposure
- *Abeliophyllum distichum* extracts suppress apoptosis of normal cells caused by UV-B

2. Investigation of the anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* extracts

- *Abeliophyllum distichum* extracts (stem, flower, leaf) suppress NO production and expression of PGE₂, TNF- α , and IL-6 in LPS treated Raw264.7 and BV2 cells
- *Abeliophyllum distichum* extracts suppress inflammation via inhibition of MAPK and NF κ B pathway in LPS treated Raw264.7 and BV2 cells
- *Abeliophyllum distichum* extracts suppress colitis in DSS treated mouse model
- *Abeliophyllum distichum* extracts show no significant cytotoxicity in the concentration range of this research

3. Development of commercialization and mass propagation technology using *Abeliophyllum distichum* extracts

- Extraction method and extraction process using *Abeliophyllum distichum* were standardized

for production of functional materials

- Shampoo prototype containing *Abeliophyllum distichum* extracts was successfully developed
- Functional feed prototype using *Abeliophyllum distichum* powder was successfully developed
- Development of method for mass propagation of *Abeliophyllum distichum* using Auxin-based plant growth regulators was completed

V. Research accomplishment and future plan

1. Patents and research papers

- 1) 1 patent application, 2 patent applications in progression
- 2) 1 research article (SCIE) published
 - 3 SCI level international articles and 1 domestic research article in submission
 - 7 proceedings published

2. Production of shampoo and functional feed using *Abeliophyllum distichum* extracts

CONTENTS
(영 문 목 차)

I. Outline of the study.....9

II. Current status of technology.....14

III. Research methods and results

 1. Analysis of functional materials from *Abeliophyllum distichum* and development of technology to produce high valuable cosmetic materials19

 2. Investigation of the anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* extracts39

 3. Development of commercialization and mass propagation technology using *Abeliophyllum distichum* extracts.....52

IV. Output from this study.....82

V. Results of Current Research and Future Plan for Application.....84

VI. References.....85

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제 1절	미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발.....	19
제 2절	미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 규명.....	39
제 3절	미선나무 추출물을 활용한 제품화 기술 및 대량 증식기술 개발.....	52
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	82
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	84
제 6 장	참고문헌.....	87

제 1 장 연구개발과제의 개요

* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 전 세계적으로 1속 1종인 우리나라 특산식물인 미선나무의 생물학적 작용기전 탐색하고 분자적 수준에서 작용기작을 구명하여 한방 기능성 산업화 소재로서의 유용성 검증을 통해 충북 괴산 지역을 대표하는 새로운 약용식물의 발굴을 통한 신기능성 산업화 소재로 개발하여 지역 경제발전에 큰 역할을 하고자 한다.

1. 국내 연구개발의 필요성

1) 기술적인 측면

- 본 연구는 기존에 연구되지 않았던 미선나무의 시기별, 부위별 추출물과 향기성분에 대해 in vitro & in vivo system 계에서 생물학적 특성을 체계적으로 연구하여 비 식품소재로서의 제품화 방안을 모색하고, 향후 식품소재 개발에 있어 기술적으로 중요한 자료를 제공하고자 한다.
- 기존 미선나무 잎 추출물의 항암과 항염증 효과는 대장암세포(HT29)의 증식 억제와 실험동물을 이용한 특정 효소억제에 의한 단순하고 현상학적 연구뿐이다.
- 또한 미선나무의 기능성 소재개발을 위한 활성물질의 탐색과 분리정제에 관한 연구와 생리적인 측면의 작용기작 및 세포내 흡수기작 및 작용성에 관한 연구는 전무한 실정이다.
- 미선나무의 부위별 약리효능 규명과 더불어 유효성분의 탐색과 분리·정제된 천연의 성분으로부터 생물학적 검정이 필요하다.
- 본 연구책임자의 선행 연구에 의하면 미선나무 꽃 추출물은 여러 가지 항산화 활성을 나타내고 있으며 특히, 항산화 효과에 의한 DNA손상 억제 활성이 나타났다.
- 미선나무는 특유의 향을 지니고 있음에도 불구하고 꽃의 방향성이나 정유성분에 관한 연구는 전무하다.
- 미선나무는 전통적으로 조선육도목이라고하며, 이는 조선시대의 육도 즉 전국에 흔히 분포되어 자생되는 나무이라는 의미이나 현재 개체수가 많이 줄어든 이유는 극히 미미한 씨앗의 발아와 천연기능성성분의 기능적 효과에 의한 훼손 때문으로서 다양한 연구와 보존 기술이 개발되지 않으면 천연기능성성분이 함유된 미선나무의 전통적 민간전래 우수기술이 그대로 사라질 위기에 처해 있는 실정임.
- 전통적으로 내려오는 미선나무의 효능은 자생지 주변 및 인근지역의 활용 사례를 직접 방문조사하여 아래와 같이 기재하였음.

표 1. 지역주민의 미선나무 활용사례

민간요법	주소	사용성격	사용내용
음식물 냄새 제거 및 연육 작용	충북 괴산군 사리면 사당리 959-2, 모래재가든 043) 836-7399	돼지고기, 닭고기, 오리고기 등에 미선나무 추출물을 넣고 재워 굽거나 찌면 육류 특유의 냄새가 없고, 특유의 향과 부드러운 육질을 즐길 수 있어서 향신채 대신 사용하고 있다.	충북 괴산군 사리면 사당리 959-2에서 모래재가든을 운영하는 안병숙님은 시어머니께서 이어오신 미선나무 추출물 활용법을 전수받아 김치의 보존기간 연장 및 식품요리의 다양한 기본소스용으로 활용하고 있다.
가축 및 가금류의 질병 예방	충북 괴산군 사리면 중흥리 293 043) 838-5234	소, 돼지, 닭, 염소 가축 및 가금류에 미선나무를 삶은 액을 사료와 함께 먹임으로서 염증, 바이러스로 인한 폐사를 현저하게 줄이는 역할을 하고 있다.	충북 괴산군 사리면 중흥리 293번지에서 한우농장을 경영하는 김운경님은 아버지께서 활용하시던 미선나무추출물 효과를 확실하게 확인하게 된 계기는 2011년 1월 구제역으로 살처분 반경내에 있었음에도 구제역이 발병되지 않았다.
냄새 제거와 해충구제	충북 괴산군 사리면 사당리 849-1, 043) 836-7050	냄새 제거 및 파리, 모기, 빈대, 이 등의 해충 구제를 위하여 화장실, 두엄, 마굿간에 미선나무 추출액을 살포하여 해충구제 및 탈취용으로 활용되고 있다.	충북 괴산군 사리면 사당리 849-1번지에서 돼지농장을 운영하시는 최병조님은 미선나무의 분말가루를 사료와 혼합하여 사육하여 구제역의심증상이 발현되었지만 음성으로 판정되는 결과를 2011년 1월에 확인하였다. 또한 돼지농장의 냄새와 해충방제에도 탁월한 효과를 확인하였다.
식욕부진 배탈 설사약	충북 괴산군 청안면 부흥리 600 043) 832-9195	여름철 식욕부진 배탈, 설사 등의 발생 시 치료를 위해 아침이슬을 맞은 음건된 미선나무를 달여서 음용하고 있다.	충북 괴산군 청안면 부흥리 600번지에 거주하시는 강대성님은 미선나무 추출물을 가족들에게 상시 음용케함으로써 자신의 건강은 물론 가족의 건강을 챙기시고 계셨다.
여성질환	충북 괴산군 청천면 부흥리 160-4 043) 832-9039	그늘에서 말린 미선나무를 일정한시간 가열 용출한 후 음용하여 여성의 냉 및 염증 질환에 효과적 처방으로 사용되었다.	충북 괴산군 청안면 부흥리 160-4번지에 거주하시는 김임구님은 시어머니로부터 구두로 전해온 미선나무를 노동 후 심신이 피로하고 면역력이 약해졌을때 음건된 미선나무를 추출하여 음용하여 왔으며, 여성질환에도 효과가 좋다고 설명을 하였다
염증질환	충북 청주시 울량동 삼성A 101-108	찰과상 및 타박상으로 인한 염증질환에 미선나무 잎을 갈아 바르면 염증으로 인한 2차 감염을 예방하는 용도로 사용되었다.	충북 청주시 울량동 삼성A 101-108에 거주하시는 박순아님은 시어머니로부터 구두로 전해온 미선나무를 가정상비용으로도 활용하였다. 찰과상 및 타박상으로 인한 염증질환에 미선나무 잎을 찧어 바름으로서 염증 제거에 탁월한 효능을 발휘하였다.



- 이와 같이 생태부존 자원 중 우리나라에서만 자생하는 세계 유일의 물푸레나무과 1속1종 희귀수종인 미선나무에는 다양한 천연의 기능성물질이 포함되어 있으며 민간에서 활용되고 있는 실정이나 과학적 근거가 매우 미흡하므로 미선나무 전래기술의 고찰을 통하여 미선나무추출물의 천연건강기능성분을 보다 세밀하고, 정밀하게 분석함으로써 천연 기능성물질을 확보하고, 신물질에 대한 명확한 검증을 거쳐 산업화될 수 있는 과학기술이 반드시 필요함.
- 이에 다양한 기능성을 지닌 미선나무 추출물을 새로운 분자적 접근방식에 의한 미선나무의 특정 기능성 소재 및 방향성 물질의 항산화 효과, DNA손상, apoptosis 및 종양 발달억제, 항염증 효과 및 항노화의 예방적 작용기전을 구명하여 효율적이고 독창적인 기능성 소재의 개발이 필요하다.

2)경제·산업적인 측면

- 미선나무를 관상용 뿐만 아니라 일부 약효능이 알려지면서 차와 술을 상품화 하기위해 지역대학의 연구에 관심이 높아지고 있는 실정이다.
- 특히 미선나무는 괴산군을 상징하는 꽃으로 지역축제로 승격시키기 위해 매년 지역민들을 중심으로 미선나무 전시회겸 축제를 개최하고 있다.
- 또한 괴산군이 미선나무를 보존하고 생태관광 자원화를 위해 2012년부터 “미선향 테마파크’ 조성사업(10억원)을 진행 중이다.
- 미선나무 추출물의 생물학적 유용성 입증은 기존의 미선나무의 희귀성 뿐만 아니라 산업화 소재로서의 우수성과 우리나라 고유자원의 보존 및 개발의 중요성을 각인시키는 계기가 될 것이다.
- 식물 유래 천연 정유 및 페놀성물질은 화장품, 향료산업 소재로 이용이 가능하고, 기존 한방 소재와 복합적으로 원료개발을 통해 한방바이오산업 발전에 기여할 것이다.
- 본 연구를 통해 개발된 미선나무의 기능성 소재는 피부미용 및 기능성 사료 소재 뿐만 아니라 건강기능보조식품의 개발에 활용되어 국민건강증진에 기여할 것이며, 우리나라 특산 식물을 활용한 기능성 신소재 개발은 고부가가치의 창출로 국가 경제에 기여할 수 있을 것이다.
- 따라서 미선나무 추출물 및 방향성 정유성분의 생물학적 작용기전 연구를 통한 항산화 및 비정상적 전달 억제물질의 소재 개발과 방향성 신소재의 생물학적 유용성 입증은 지역농가의 소득증대 뿐만 아니라 우리나라를 상징 하는 고부가가치의 기능성 소재 개발로 인해 국가 경제 발전에 크게 기여할 것으로 사료 된다.
- 미선나무 안정적으로 공급받기 위하여 증식기법과 재배기술을 보급하고, 미선나무 재배

농가의 안정적 수입원을 위해서 다양한 미선나무 추출물의 파생상품 개발이 시급한 실정임. 따라서 미선나무의 증식보급과 제품생산으로 농가의 안정적 소득원을 확보하고 다양한 상품화 방안을 마련할 경제·산업적 필요성이 절실함.

제 2절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구목표

- 미선나무 추출물의 *in vitro* & *in vivo* system 계에서 생리활성 효과 구명
- 미선나무의 일반성분 및 기능성 성분 분석
- 미선나무 천연물질 추출기법 및 추출공정 표준화 기술 개발
- 미선나무 기능성 추출물을 활용한 피부미용 및 생체 면역 기능성 소재의 개발
- 미선나무 대량증식기법 및 재배기술 개발

2. 연구내용

[1세부과제] 미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발

- 미선나무 부위별(잎, 줄기, 뿌리, 꽃) 추출물의 일반성분 및 기능성 성분 분석
- 미선나무 소재의 산업화 적용을 위한 효과적 추출 model 개발
- 미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 *in vitro* & *in vivo* system 계에서 생리활성 효과 구명
- 다양한 기능성 산업화 적용을 위한 미선나무 복합소재 연구

[2세부과제] 미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 규명

- 미선나무 추출물의 *in vitro* system 을 활용한 염증 및 면역강화 효과 규명
- 미선나무 추출물의 *in vivo* system 을 활용한 염증 및 면역강화 효과 규명
- 산업화를 위한 미선나무 추출물의 안정성 규명 및 소재화 연구

[1협동과제] 미선나무 추출물을 활용한 제품화 기술 및 대량 증식기술 개발

- 미선나무 추출기법 및 추출공정 표준화 연구 개발
- 미선나무 추출물을 이용한 피부미용 시제품 개발
- 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 면역력강화 기능성 사료 시제품 개발
- 미선나무의 대량번식을 위한 증식기법 연구

제 3절 연구개발에 대한 기대성과

1. 기술적인 측면

- 추출물을 활용한 식의약계통의 응용성 제품화 기술 확보
- 천연기능성성분의 평가기술개발
- 미션나무 추출물의 in vitro 및 모델동물을 이용한 기능성 검정 원천기술 확보
- 천연물소재의 제제화 기술 확보에 따른 연구개발의 모델화
- 미션나무의 천연기능성성분에 대한 추출기술, 산업화 원천기술 확보
- 미션나무의 증식원천기술의 확보로 산업화를 위한 기반기술 마련함
- 미션나무 소재의 안전성 확보를 통한 식품소재 적용의 원동력 확보

2. 경제·산업적인 측면

- 미션나무추출물의 활용한 기능성 제품 소재 개발로 농가소득 증대
- 미션나무를 식·의약품 상품개발로 당뇨병 및 합병증 예방
- 기능성 식·의약품 소재의 도출 및 작용기작 연구결과는 유명학회 및 학술지에 발표를 통한 검정
- 산업재산권(유용물질특허, 제조특허) 확보, 기업에의 기술이전을 통한 사업화
- 항바이러스계 기능성 사료개발로 농가의 경쟁력 증대, 수출증대에 기여함
- 미션나무의 증식기술개발로 농가소득증대

3. 상품화 및 사업화 계획

- 지역 축제(미션나무축제) 및 시설(미션향테마파크, 생태숲, 자연휴양림)을 통한 제품 홍보
- 미션나무 대량증식 보급할 수 있는 증기기관 시설확대,
- 심포지움 및 학회를 통한 제품의 우수성 홍보
- 미션나무의 항바이러스 기능성 사료생산 공장 설립
- network구축을 통한 독점적인 상품 공급 및 매출액 증대

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 현황

- 미선나무(*Abeliophyllum distichum*)는 열매의 모양이 부채를 닮아(尾扇:미선) 미선나무로 불리는 관목이며 우리나라에서만 자라는 한국 특산식물이다.
- 또한 미선나무는 세계에서 단 1속 1종 밖에 없는 희귀식물이며, 현재 환경부는 미선나무를 보호 야생 식물로 지정하고 있으며, 각각의 자생지를 다음과 같이 천연기념물로 지정하여 보호하고 있다.
- 천연기념물 제14호 - 진천의 미선나무 자생지(해제됨)
- 천연기념물 제147호 - 괴산의 미선나무 자생지
- 천연기념물 제220호 - 괴산 추점리의 미선나무 자생지
- 천연기념물 제221호 - 괴산 울지리의 미선나무 자생지
- 천연기념물 제364호 - 영동 매천리의 미선나무 자생지
- 천연기념물 제370호 - 부안의 미선나무 군락지
- 미선나무 자생지 천연기념물 5곳 중 3곳이 본 지역(충북 괴산)에 분포되어 있으며, 최근 몇몇 괴산지역민들에 의해 개체수 증가에 대한 연구와 보급이 활발히 진행되고 있다.
- 지난 2014년 9월 강원도 평창에서 개막한 ‘제12차 생물다양성협약 당사국 총회’에서 반달가슴곰, 수달, 왕오색나비와 함께 미선나무가 홍보대사로 선정되었다. 이 홍보대사들에겐 산이(반달가슴곰), 물이(수달), 하늘이(왕오색나비), 들이(미선나무)라는 예쁜 이름도 있다. 이 이름은 각 생물의 서식지를 뜻하는 것으로, 이 서식지를 하나로 모으면 완전한 지구가 만들어진다는 함축적인 의미를 담고 있다. 현재 이 4종의 생물들은 국민들에게 생물다양성협약 당사국총회의 의미를 전달하고 생물다양성 보전의 중요성을 알리는 역할을 하고 있다.
- 미선나무는 이른 봄 개나리 꽃모양으로 흰색꽃이 총상화서로 달린다. 최근 개체수의 증가를 위한 재배과정에서 분홍색, 상아색, 노란색의 꽃이 드물게 나타나고 있다.
- 미선나무는 희귀종이라는 인식과 특이적 향을 지닌 흰색 꽃의 매력으로 관상학적 가치가 매우 높아 정원수나 분재를 목적으로 일부 재배되고 있으며, 자생지 및 재료의 희귀성에 의해 관련 연구의 대부분이 생태학적 특성과 개체군 증식을 위한 식물조직배양학적 연구로 한정되어 있음.
- 그러나 미선나무 잎 추출물의 항암 및 항염증에 관한 특허가 최근 등록되었으나, 산업화에 적용하기 위한 구체적인 연구는 전무한 실정이다.
- 방향성 식물은 육식중심의 현대 식생활 패턴의 균형을 조절하고, 신체적·정신적 조절기

능을 강화하여 피로회복, 진정, 스트레스 해소, 미용효과, 나아가 병을 이기는 건전 생활로 현대인을 유도하는 중요한 매개체로 이용됨(Cao and Prior, 1997).

- 최근 국민 소득의 향상에 따른 생활양식의 변화로 외국산 향장품(향수, 화장품 원료, 포프리, 목욕제, 향종이 등)의 수입이 급증하고 있음.
- 최근 화장품 기술에 의약기술을 접목시킨 기능성 화장품인 코스메슈티컬(화장품과 의약품의 합성어) 시장이 급속히 확대되고 있음.
- 한국보건산업진흥원 「미래식품과학기술예측에 따르면, 기능성 신소재 기술은 기능성 및 신소재 탐색기술, 기능성 규명 및 평가기술, 기능성 및 신소재 생산 공정기술로 평가되며, 국내기술은 선진국 대비 기술수준은 약 65%에 위치하며, 선진국과 2년의 기술격차를 보이고 있음.
- 현대인들의 생활 수준의 향상과 더불어 질병의 치료 및 예방에 있어 기존의 합성 약품에 비해 천연 식물재료를 이용한 활용법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 또한 오래전부터 전해져 내려오는 한방이나 민방의 방법에 의한 천연 약재의 효능 및 활용법에 의해 기능성 식품 및 화장품의 개발과 소비가 급속히 높아지고 있는 실정이다.
- 따라서 미션나무를 고부가 가치의 농업 및 산업화 소재로 활용하기 위한 체계적인 생물학적 활성 규명과 제품화 방안 제시는 새로운 고부가가치의 약용작물의 개발과 더불어 세계적 유일의 종인 미션나무를 우리나라 고유의 천연자원임을 알리는 기회가 될 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종 목표

- 미선나무의 부위별, 시기별 추출물 생리활성 탐색 및 일반성분 분석
- 미선나무 추출물의 피부미용 및 항염증 효과에 대한 생화학적 작용기전 구명
- 미선나무 추출물의 산업화를 위한 대량증식 및 추출기법 확립
- 미선나무 추출물을 활용한 피부미용 및 면역강화 기능성 사료 시제품 개발

2. 연구개발 목표의 성격

본 연구는 전 세계적으로 1속 1종인 우리나라 특산식물인 미선나무의 생물학적 작용기전 탐색하고 분자적 수준에서 작용기작을 구명하여 한방 기능성 산업화 소재로써의 유용성 검증을 통해 충북 괴산 지역을 대표하는 새로운 약용식물의 발굴을 통한 신기능성 산업화 소재로 개발하여 지역 경제발전에 큰 역할을 하고자 한다.

3. 연차별 연구목표와 내용

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용
1차 년도	2013	<p>[1세부과제] 미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무 부위별(잎, 줄기, 뿌리, 꽃) 추출물의 일반성분 및 기능성 성분 분석 ○ 미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 in vitro & in vivo system 계에서 생리활성 효과 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무추출물의 용매조건 및 추출조건 확립 ○ 미선나무 소재의 산업화 적용을 위한 효과적 추출 model 개발 ○ 미선나무추출물의 생물학적 활성검정 <ul style="list-style-type: none"> -항산화성분 함량 분석 (polyphenol 함량) -추출물의 항산화 효과 간이 측정 (DPPH test, Lecithin oxidation system,) -세포주를 이용한 추출물의 항산화 효과 검정 (항산화효소의 측정-SOD, GPx) ○미선나무 추출물의 미백효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> -Tyrosinase 저해 활성 -Melanin 생합성 저해 측정
		<p>[2세부과제] 미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무 추출물의 in vitro system 을 활용한 항염증 등 면역효과 규명 ○ 미선나무 추출물의 in vivo system 을 활용한 항염증 등 면역 효과 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ○마우스 대식세포주 Raw264.7 및 인간 대식세포주인 THP-1 등을 이용한 염증 관련 지표 변화 분석 <ul style="list-style-type: none"> - NO (Nitric Oxide) 생성 측정 - PGE2/TNF-a 분비 변화 측정 - COX-2 발현량 측정 - 대식세포가 분비하는 사이토카인 측정 ○ 미선나무 추출물의 세포 수준 안정성 평가 (cytotoxicity test 등)
		<p>[1협동과제] 미선나무추출 공정 표준화 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무 추출기법 및 추출공정 표준화 연구 개발 ○ 미선나무의 대량번식을 위한 증식기법 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무 잎과 열매의 가공을 통한 추출공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 추출용매 선정 및 부위별 추출성분 분석 ○ 미선나무의 기능성 성분의 효과적인 추출기법 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 추출용매, 용출시간, 온도, 최적화기법 도출 ○ 미선나무 추출물의 품질유지 및 향상 기능 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 일정한 유효성분의 유지 ○ 미선나무의 대량번식을 위한 증식기법 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 미선나무 터널재배 안개분무를 활용 녹지삽의 대량번식 구명 - 생장조절제 농도별 미선나무 발근에 미치는 영향 - 온습도 환경변화에 의한 미선나무 발근에 미치는 영향 연구 - 기존의 번식법 비교를 통하여 발근율의 비교평가

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용
2차 년도	2014	<p>[1세부과제] 미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 in vitro & in vivo system 계에서 생리활성 효과 구명 ○ 다양한 기능성 산업화 적용을 위한 미선나무 복합소재 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○미선나무 추출물의 주름개선효과 검증 -Elastase 저해 활성 측정 ○UV에 의해 야기되는 DNA 손상 억제 및 정상세포 사멸 억제력 평가 ○기능성 소재 함유 다중 에멀전 안정성 및 안전성 검토
		<p>[2세부과제] 미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무 추출물의 in vivo system 을 활용한 항염증 등 면역효과 규명 ○ 산업화를 위한 미선나무 추출물의 안정성 규명 및 소재화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○비만세포를 이용한 염증 억제 효능 분석 ○위염 또는 장염 유발 생쥐를 이용한 미선나무추출액의 항염증 효능 검증 ○ 미선나무 추출물의 세포계 및 동물모델을 이용한 효능 평가
		<p>[1협동과제] 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 피부미용제품 및 면역력강화 기능성 사료개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 기능성 피부미용 시제품개발 ○ 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 면역력강화 기능성 사료 시제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미선나무의 잎과 줄기를 활용한 가공방법 연구 ○ 미선나무 잎과 줄기의 가공분말의 미용소재 제형화 연구 ○ 미선나무 잎과 줄기의 가공분말 노출에 따른 폐사율, 육질 면역력 효과 연구 ○ 미선나무 잎과 줄기의 가공분말의 용이한 섭취를위한 입상의 사료개발연구

제 2 절 연구 방법 및 결과

제 2-1절 미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발

1.미선나무 부위별(잎, 줄기, 뿌리, 꽃) 추출물의 일반성분 및 기능성 성분 분석

1) 미선나무 소재화를 위한 효과적 추출 조건 확립

본 연구에서는 미선나무 부산물을 이용한 추출 방법별 항산화 활성을 비교를 통하여 미선나무 소재의 산업화 적용을 위한 효과적 추출 모델을 확립하고자 한다.

-시료 추출 방법

미선나무 부산물(잎과 가지가 포함된 부분)을 100g을 각 추출 용매(100% 물, 50% EtOH, 80% EtOH, 100% EtOH) 1L를 가해 48시간 동안 교반 추출하여 상등액을 취한 뒤 감압 농축과 동결건조를 통해 시료를 건조한 다음 항산화 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

-항산화 활성 실험방법

가) DPPH와 free radical 소거 활성

DPPH 라디칼 소거활성 측정은 cuvette내에 농도별 시료와 300 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액을 (흡광도가 1.0이 되도록 용액을 희석) 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응 후 515nm에서 대조구와의 흡광도 차이에 의하여 측정한다.

나) ABTS free radical 소거 활성

ABTS 라디칼 소거활성은 Van den Berg 등(2000)의 방법에 의해 측정한다. ABTS 농도는 734nm에서 1.500가 되도록 조제 하였고, 농도별 시료용액과 실온에서 10분간 반응 후 대조구와의 흡광도 차이에 의하여 활성을 측정한다.

추출시료의 항산화 활성은 DMSO가 처리된 대조구와 | 비교하여 각 free radical(DPPH, ABTS)의 50%를 제어시키는 값인 IC₅₀ 값으로 환산한다.

다) Hydroxyl 라디칼 소거능

각 추출물의 hydroxyl 라디칼 소거 능은 Smirnoff and Cumbes (1989)방법에 따라 FeSO₄와 H₂O₂의 Fenton 반응에 의해 생성된 Hydroxyl 라디칼에 의해 가 가수분해 되는 정도를 통해 측정한다. 1.5 mM FeSO₄와 6 mM H₂O₂ (3.5 : 5)의 37 $^{\circ}$ C에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μ l와 농도별 시료 40 μ l를 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 약 30 분간 반응시킨다.

반응 후 200 mM sodium salicylate 200 μ l를 첨가 한 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정한다. Positive control로 합성 항산화제인 ascorbic acid를 동일한 방법으로 실험하여 추출물이 가지는 소거능과 비교 하였고 다음 식으로 소거능(%)을 구한다.

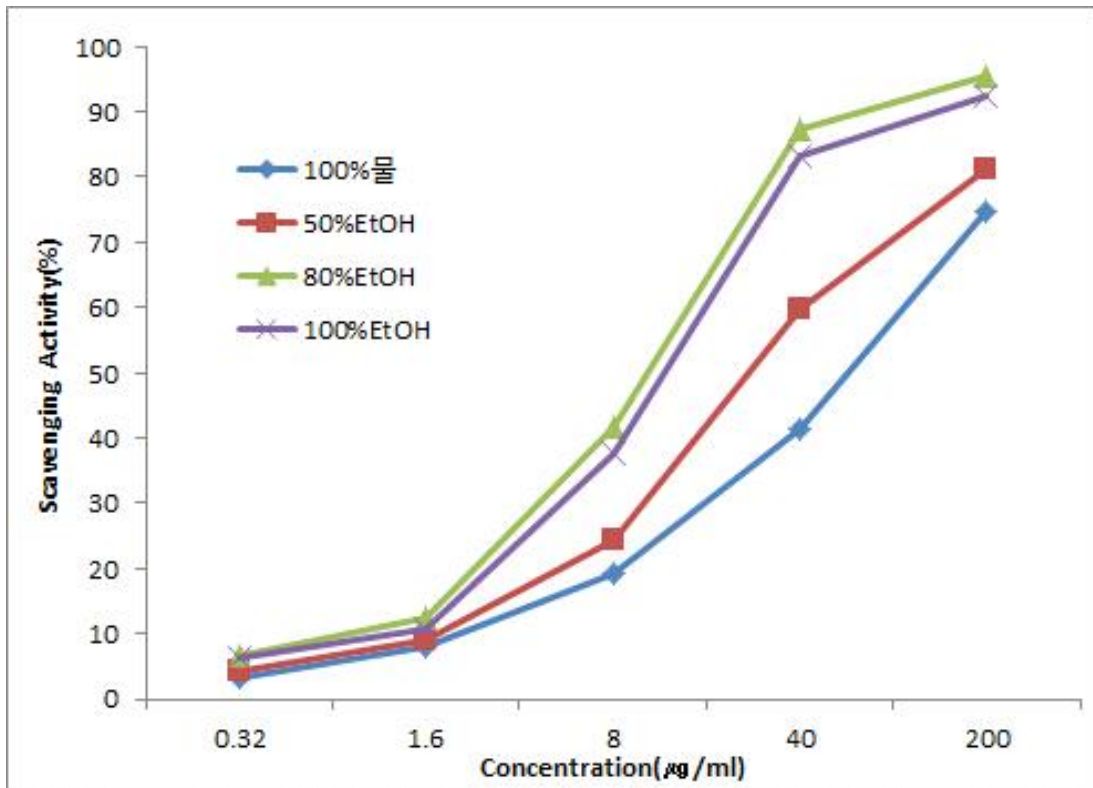
$$\text{소거능(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

라) Fe^{2+} Chelating 활성

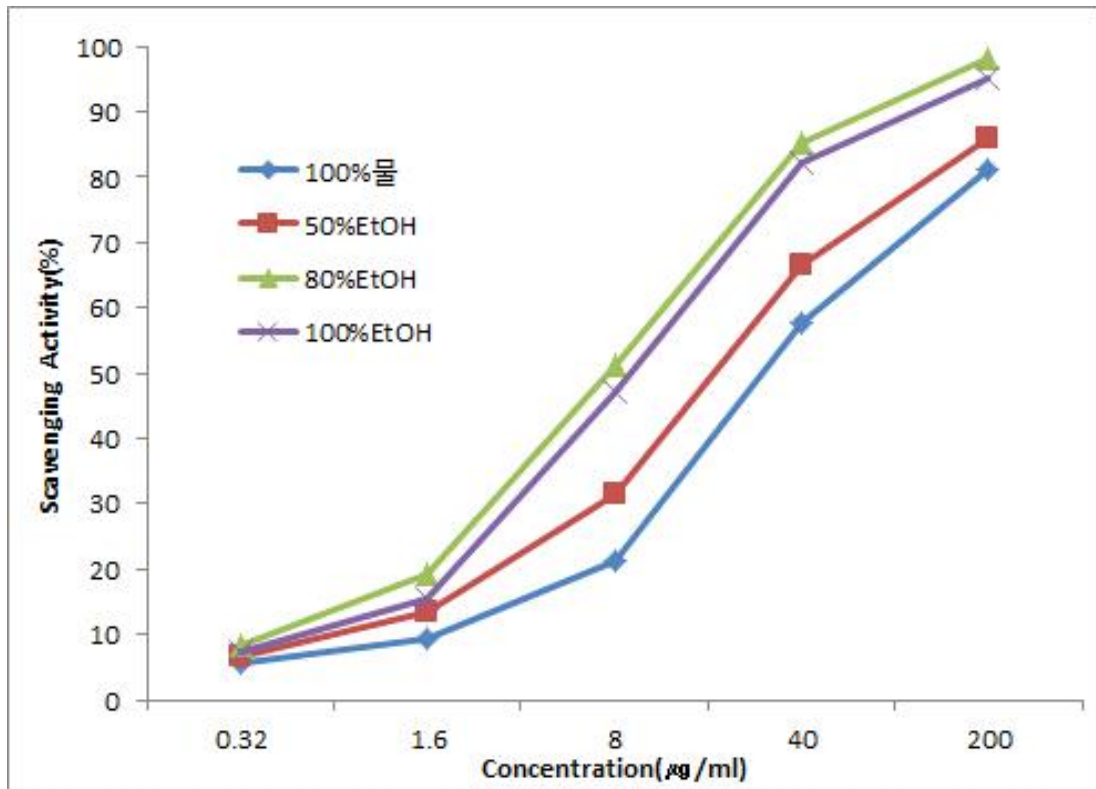
각 추출물의 iron-chelating 활성은 Hus (2006) 방법에 의해 측정한다. 2 mM FeCl_2 60 μ l, 농도별 시료 40 μ l와 증류수 700 μ l를 혼합한 후 상온에서 약 10분간 반응 시킨다. 반응 후 5 mM ferrozine을 첨가하여 Fe^{2+} -ferrozine complex를 유도하기 위해 상온에서 약 5분간 반응 시킨다. 반응 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정한다. Positive control로 iron chelating제인 deferoxamine을 동일한 방법으로 실험하여 추출물이 가지는 chelating 능과 비교 하였고 다음 식으로 chelating 능(%)을 구한다.

$$\text{chelating 능(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

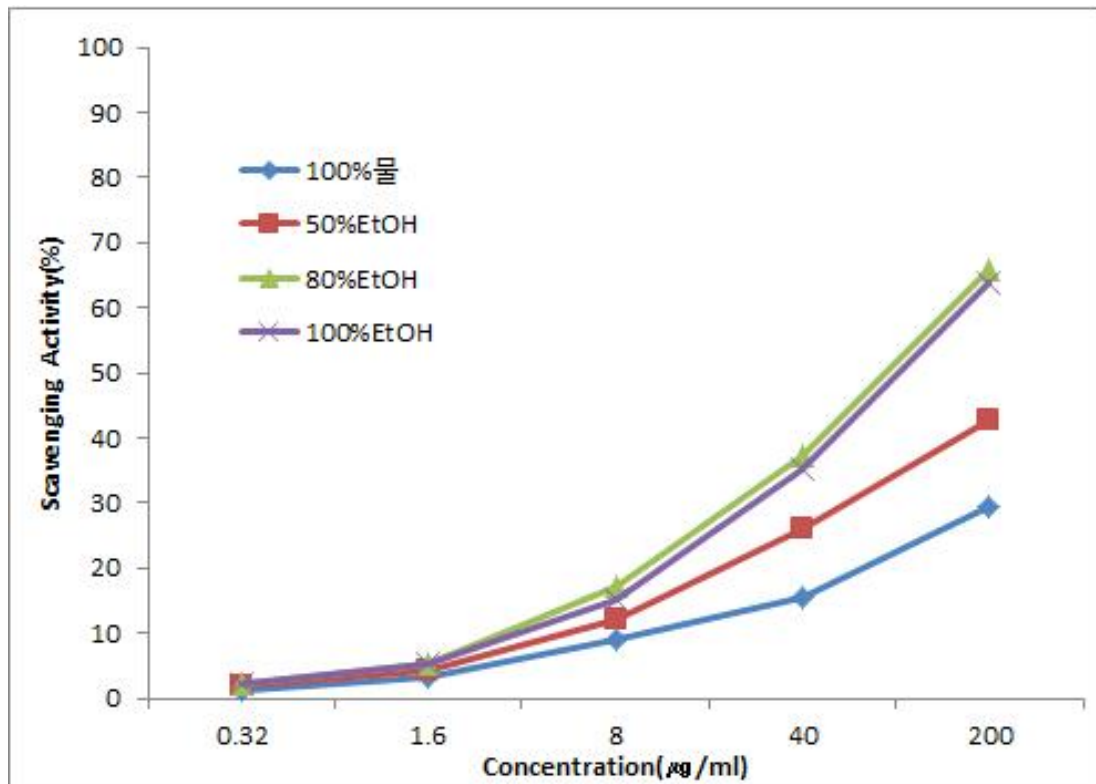
-추출 용매별 항산화 활성 결과



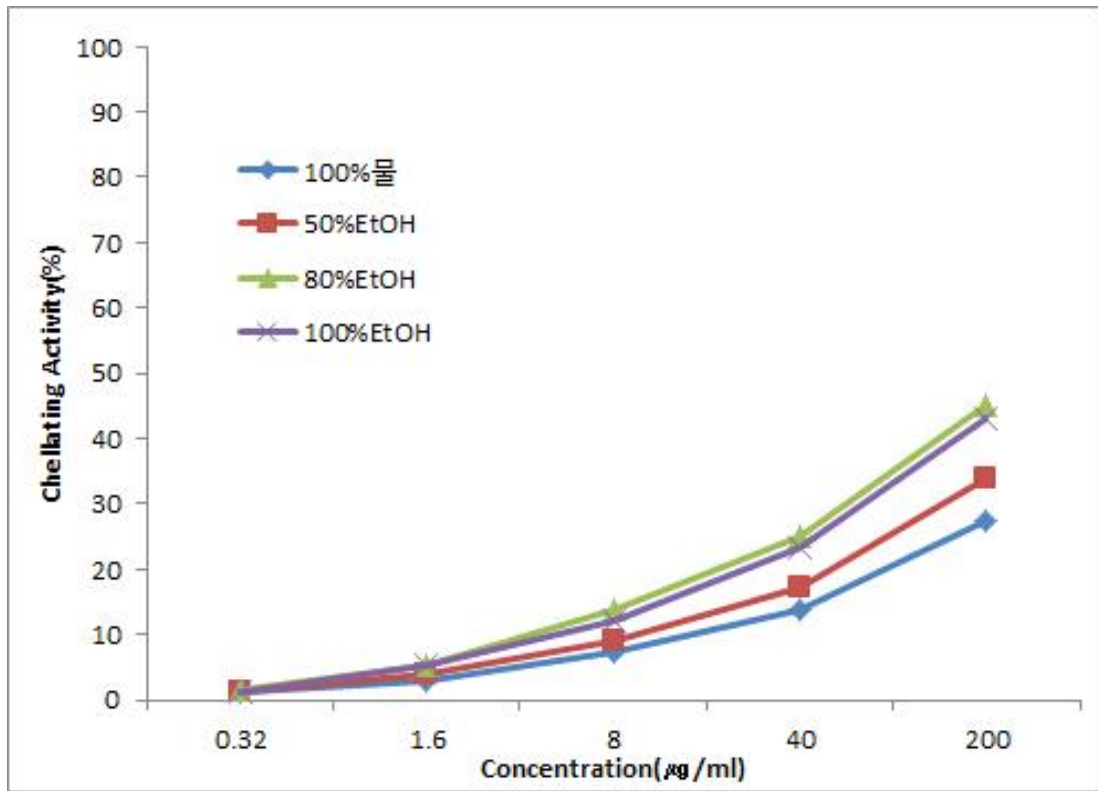
(A)



(B)



(C)



(D)

그림1. 미선나무 부산물의 추출 조건별 항산화 활성 비교

(A) : DPPH 소거활성, (B) : ABTS 소거활성, (C) : Hydrogen peroxide 소거활성, (A) : Fe²⁺ 킬레이팅활성

DPPH, ABTS, Hydrogen peroxide 소거활성 그리고 Fe²⁺ 킬레이팅활성을 이용하여 각 추출물의 농도별 항산화 활성을 비교 하였다(그림 1). DPPH와 ABTS 소거활성은 각 추출물들 200 µg/ml에서 매우 높은 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 특히 80%와 100% EtOH 추출물은 90% 이상 소거활성을 나타내었다. DPPH와 ABTS는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 검증한다.

동일한 농도에서 Hydrogen peroxide 소거활성과 Fe²⁺ 킬레이팅활성은 DPPH와 ABTS에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었으나, 추출물의 농도 의존적으로 활성이 높게 나타났다. Fe²⁺ 이온은 세포내에서 산화물 형성에 관여하는 결정적인 물질로서 지질 과산화를 촉진시킨다(1). 따라서 과생성된 Fe²⁺ 이온의 적절한 제거는 지질 과산화를 억제할 수 있는 중요한 요인 중에 하나이다.

추출 용매별 추출물의 농도 200 µg/ml 일 때 항산화 활성은 80% EtOH > 100% EtOH > 50% EtOH > 100% 물 순으로 높게 나타났다.

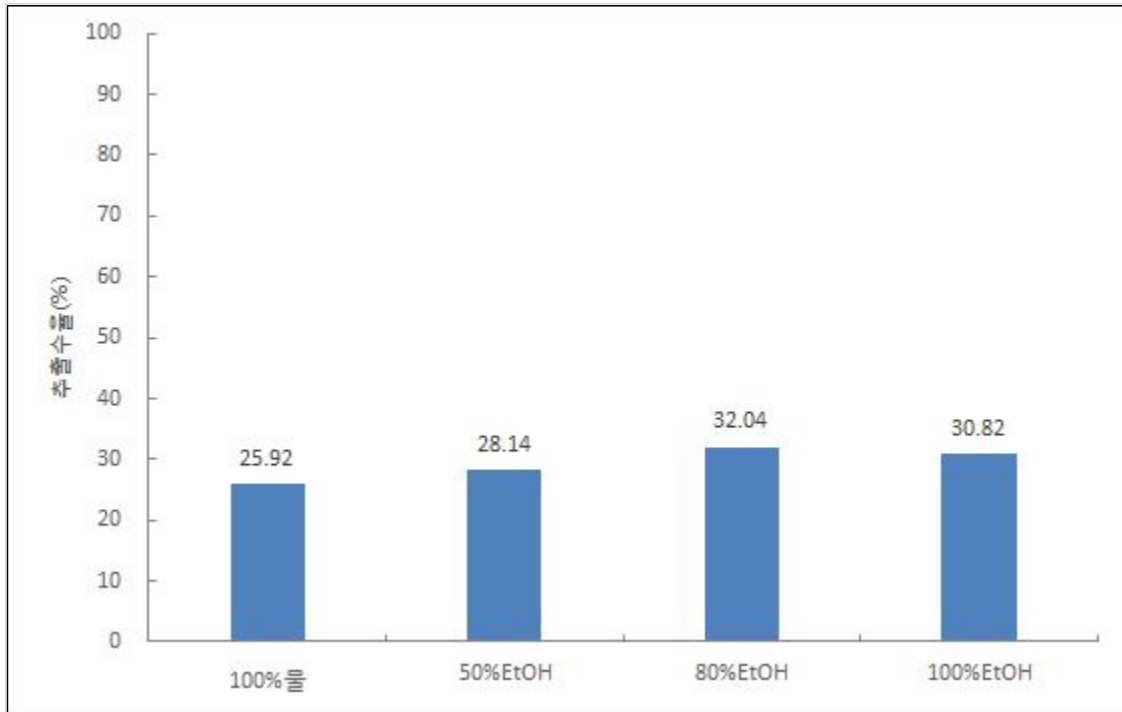


그림2. 미선나무 부산물의 추출 조건별 추출수율

미선나무 부산물의 추출 조건별 수율을 환산한 결과(그림 2), 80% EtOH > 100% EtOH > 50% EtOH > 100% 물 순으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 추출 용매별 항산화 활성 결과와 동일한 양상을 보이고 있다. 따라서 미선나무를 항산화효과를 기초로 한 기능성 소재의 추출하기 위한 용매는 80% 수준의 알콜성 용매가 가장 적합한 것으로 사료된다.

2.미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 생리활성 효과 구명

1) 미선나무 부위별 항산화 효과 검증

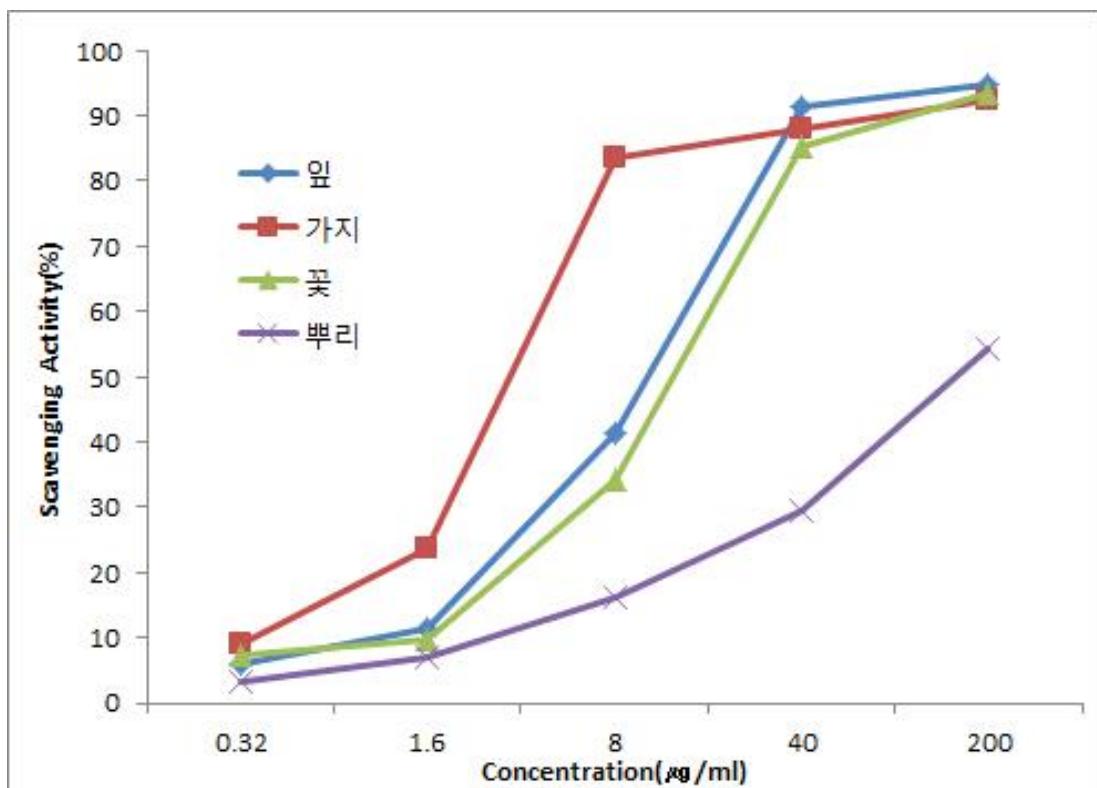
미선나무의 잎, 가지, 꽃을 분리하여 상기의 추출용매중 가장 효율적인 80% EtOH를 이용하여 추출하고 농축하여 항산화 활성 비교를 통해 부위별 이용성을 탐색하였다.

미선나무의 각 부위별 추출물의 항산화 활성을 비교한 결과(그림 3), DPPH 소거활성은 가지 추출물이 잎과 꽃 추출물에 비해 추출물의 낮은 농도에서 활성이 다소 높게 나타 났으나, 추출물의 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 92.23, 94.72, 93.41%로 유사하게 매우 높은 소거 활성을 나타 내었다. 그리고 뿌리 추출물은 잎, 줄기, 꽃에 비해 매우 낮은 DPPH와 ABTS 소거 활성을 나타내었다.

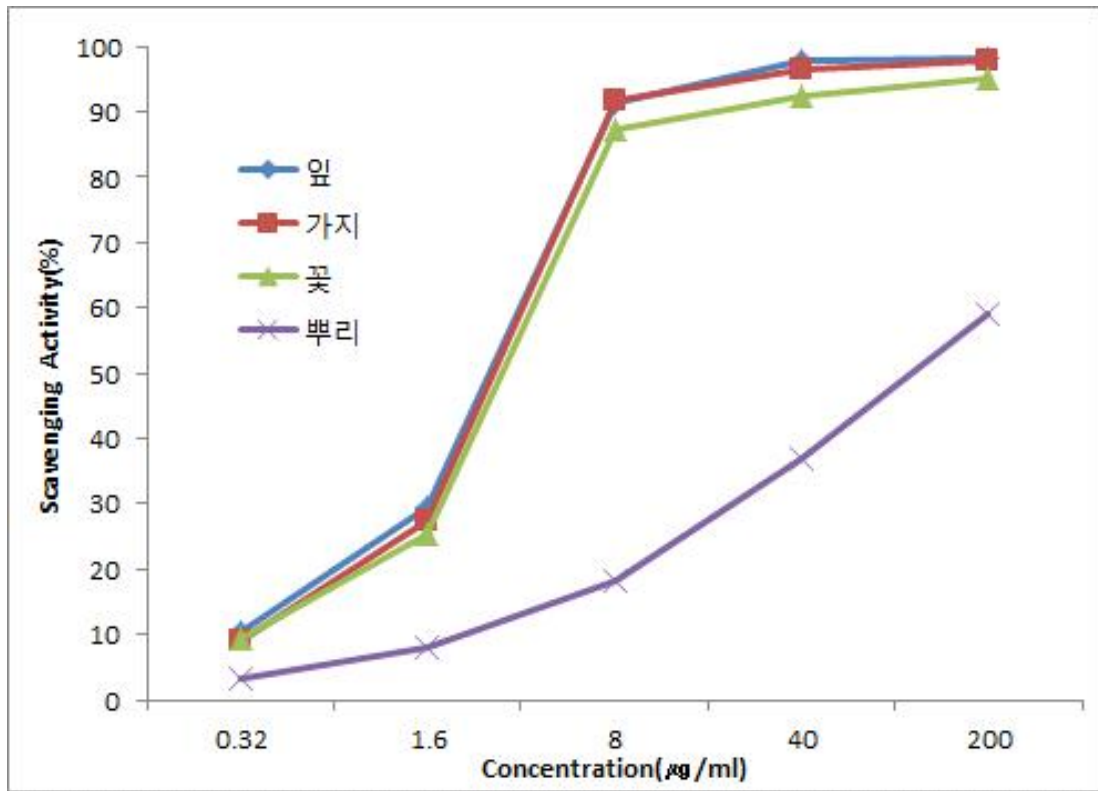
각 추출물의 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 Hydrogen peroxide 소거활성은 꽃, 잎, 가지 뿌리 순으로 각 72.34%, 43.12% 38.72%, 19.31%의 소거 활성을 나타내어 꽃이 다른 부위에 비해 Hydrogen peroxide 소거활성이 다소 높게 나타났다.

Fe^{2+} 킬레이팅 활성은 각 추출물의 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 꽃, 잎, 가지 뿌리 순으로 각 32.72%, 32.45%, 25.71%, 14.21% 킬레이팅 활성을 나타내었다.

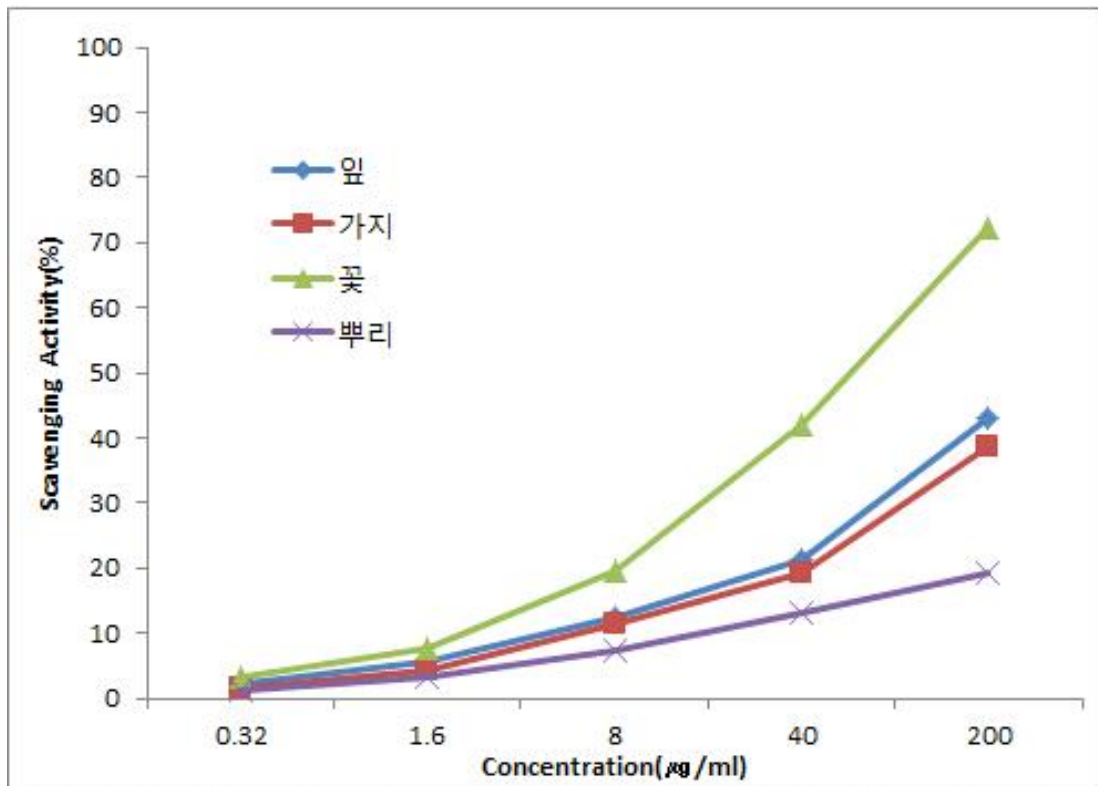
따라서 미선나무의 각 부위별 80% EtOH 추출물의 항산화 활성은 꽃>잎>가지>뿌리 순으 로 높은 것으로 나타났다.



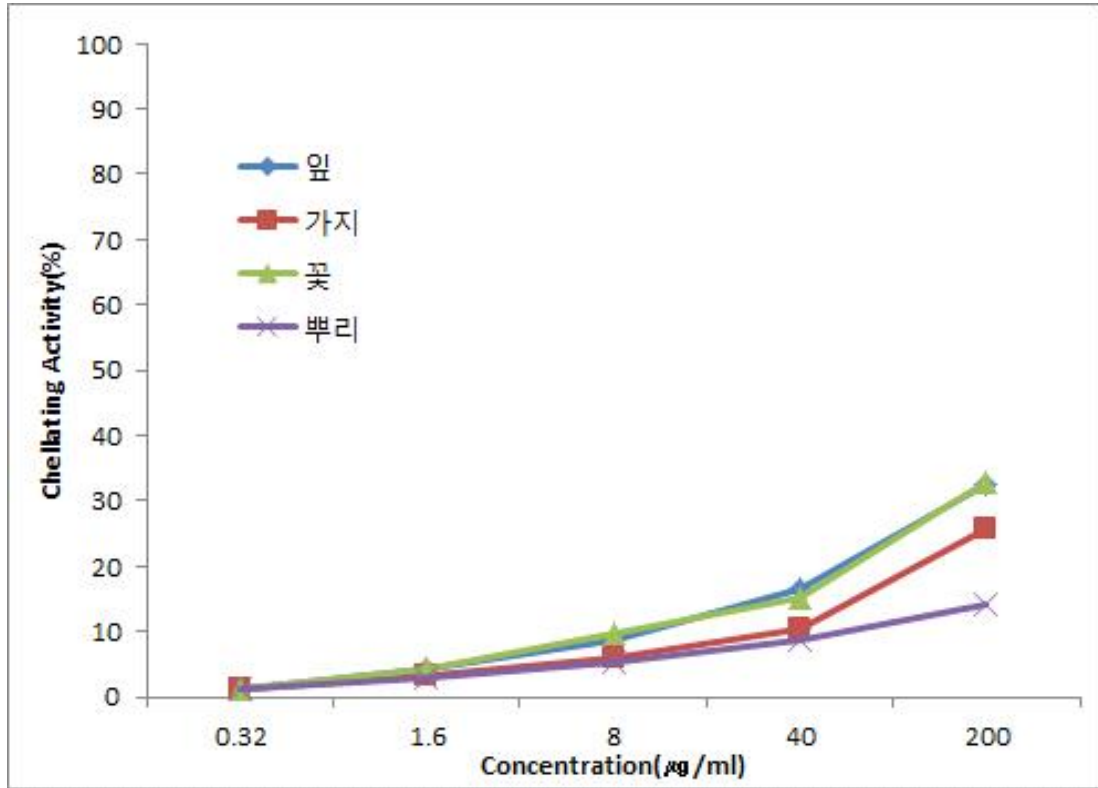
(A)



(B)



(C)



(D)

그림 3. 미선나무 부위별 항산화 활성 비교

(A) : DPPH 소거활성, (B) : ABTS 소거활성, (C) : Hydrogen peroxide 소거활성, (A) : Fe²⁺ 킬레이팅활성

2)미선나무 부위별 기능성 성분 분석

식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사 산물의 하나인 페놀성 화합물은 phenolic hydroxyl group 때문에 단백질 또는 효소 단백질, 기타 거 대분자들과의 결합하는 성질, 항산화 효과, 항균 효과, 2가 금속과의 결합력을 가진다. 일반적으로 페놀성 화합물들은 phenolic acid 및 comarin류, Flavonoid류 그리고 탄닌류 등 3그룹으로 나뉘며, 그 구조에 따라 이화학적인 성질 및 생리적 기능이 달리 나타난다(2~8).

따라서 본 연구에서는 미선나무의 부위별 기능성 성분을 비교하기 위해 총페놀, 총 플라보노이드, 비타민C 함량을 분석하였다.

-기능성 성분 분석방법

가)총 페놀성 화합물

총 페놀 화합물 함량은 Folin-denis 방법으로 비색 정량하였다. 각 추출물은 메탄올에 10mg/ml 농도로 녹인 시료 1ml와 Folin시약 1ml를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤, 10%

Na₂CO₃용액 1ml를 혼합한 후 실온에서 1시간 정치한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 화합물의 함량은 tannic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

나)총플라보노이드함량

시료용액 0.2 mL에 1 N NaOH 0.6 mL와 diethylene glycol 4 mL를 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

다)비타민 C 함량

비타민C 함량은 Jagot and Dani(9)의 방법을 참고하여 측정하였다. 건조시료 0.5g에 증류수 10ml 넣은 후, 4500rpm으로 20분간 원심분리하여 추출하였다. 추출물을 filter paper로 걸러낸 후, 200µl와 trichloroacetic acid(TCA) 800µl를 넣고 3000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액 500µl와 증류수 1.5ml, Folin 200µl를 넣고 혼합한 후 10분간 상온에서 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 760nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 Ascorbic acid로 정량 직선방정식을 사용하였다.

-기능성 성분 분석결과

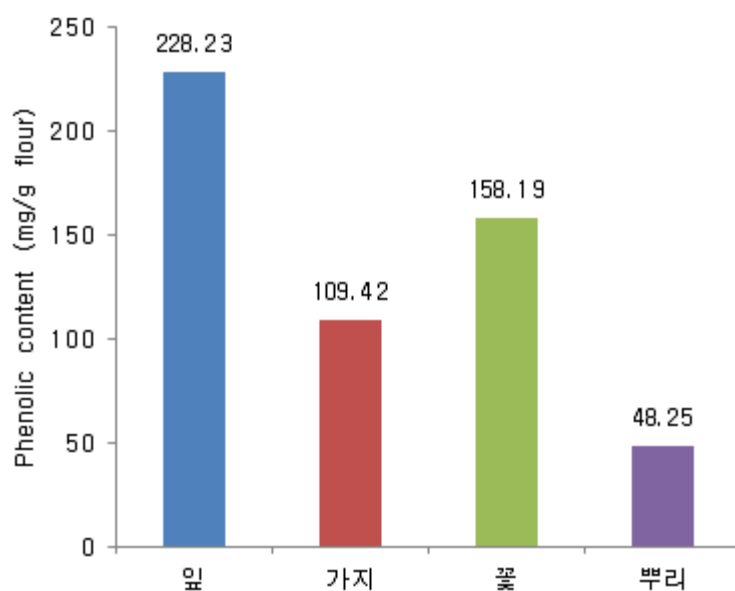


그림 4. 미선나무 부위별 총 페놀 함량

미선나무의 부위별 총페놀 함량을 분석한 결과(그림 4), 잎, 꽃, 가지, 뿌리 순으로 각 228.23, 158.19, 109.42, 48.25 mg/g 으로 잎에서 가장 높은 총 페놀 함량을 나타내었다.

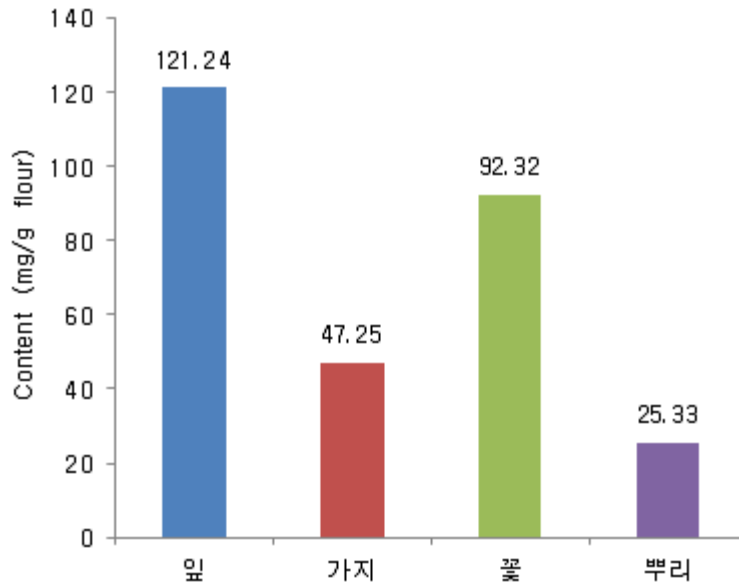


그림 5. 미선나무 부위별 총 플라보노이드 함량

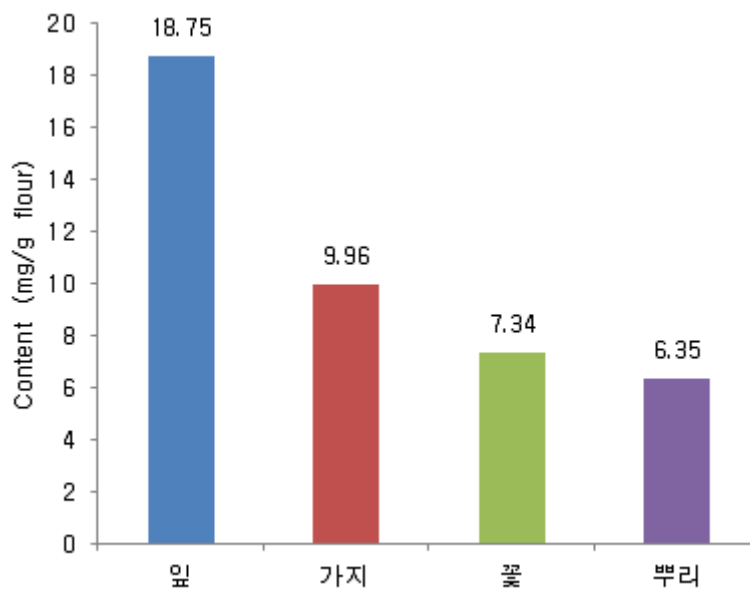


그림 6. 미선나무 부위별 비타민 C 함량

미선나무의 부위별 플라보노이드 함량을 분석한 결과(그림 5), 잎, 꽃, 가지, 뿌리 순으로 각 121.24, 92.32, 47.25, 25.33 mg/g 으로 잎에서 가장 높은 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

미선나무의 부위별 비타민 C 함량을 분석한 결과(그림 6), 잎, 가지, 꽃, 뿌리 순으로 각 18.75, 9.96, 7.34, 6.35 mg/g 으로 잎에서 가장 높은 비타민C 함량을 나타내었다.

상기 결과에 의하면, 미선나무의 부위별 기능성 함량은 잎에서 가장 높았고, 비타민 C를 제외하고 꽃, 가지, 뿌리 순으로 높은 함량을 나타내었다.

3)미선나무 추출물의 미백효과 검증

자외선에 대한 방어 작용으로 합성되는 멜라닌(melanin)은 과도하게 합성이 되면 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 왔다(10-12). Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 세포 내 melanosome에서 tyrosinase 효소의 연속적 산화반응으로 생합성 된다(13). Tyrosinase는 melanin 생합성과정의 key enzyme으로 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리 함유 효소이다. Tyrosine은 tyrosinase에 의하여 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine(LDOPA)로, L-DOPA를 dopaquinone으로 산화가 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone으로 산화되어 최종적으로 중합에 의해 melanin이 생합성 된다(14).

본 연구에서는 미선나무의 부위별 추출물의 미백효과를 검증하기 위해 Tyrosinase의 저해 활성과 피부 흑색종 세포로부터 melanin 생합성 저해 활성을 측정 하였다.

- 미백효과 분석방법

가) Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법에 따라 측정한다. 반응구는 1/15 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA을 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정한다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타낸다.

나) Melanin 생합성 저해 측정

피부 흑색종 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등의 방법에 따라 측정한다. DMEM 배지로 배양된 흑색종 세포주를 100 mm culture dish에 2×10^6 cells/dish가 되게 분주

하고, 24시간 배양 후 시료를 농도 별로 조제하여 2 mL 첨가 후 2일째에 인산완충액 (pH 7.4)으로 세척한다. 그 다음 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확 한 세포를 1×10^6 세포 당 1 mL의 5% TCA로 처리한다. 그 다음 2500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:EtOH (1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리한 후 ether 1 mL로 세척 건조시킨다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 가하여 56°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 470 nm에서 흡광도를 측정한다. Melanin 생합성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타낸다.

-미선나무 부위별 추출물의 미백효과 결과

가) Tyrosinase 저해 활성

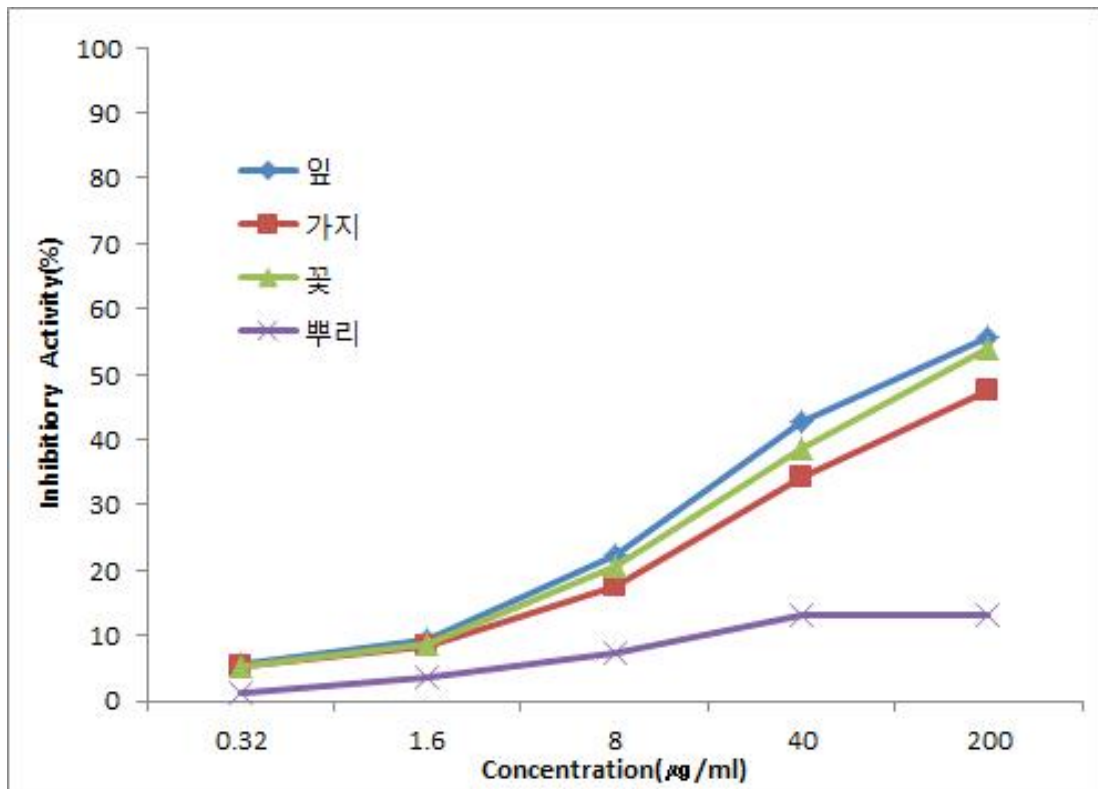


그림 7. 미선나무 부위별 추출물의 Tyrosinase 저해활성

미선나무 부위별 추출물의 Tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과(그림 7), 뿌리 추출물은 잎, 가지, 꽃 추출물에 비해 다소 낮은 저해 활성을 나타내었다. 각 추출물의 농도 의존적으로 Tyrosinase 저해 활성이 나타났다. 잎, 가지, 꽃, 뿌리 추출물의 농도 200 µg/ml일 때 각 55.62%, 47.44%, 53.54%, 13.25%의 Tyrosinase 저해 활성이 나타났다.

나) Melanin 생합성 저해 측정

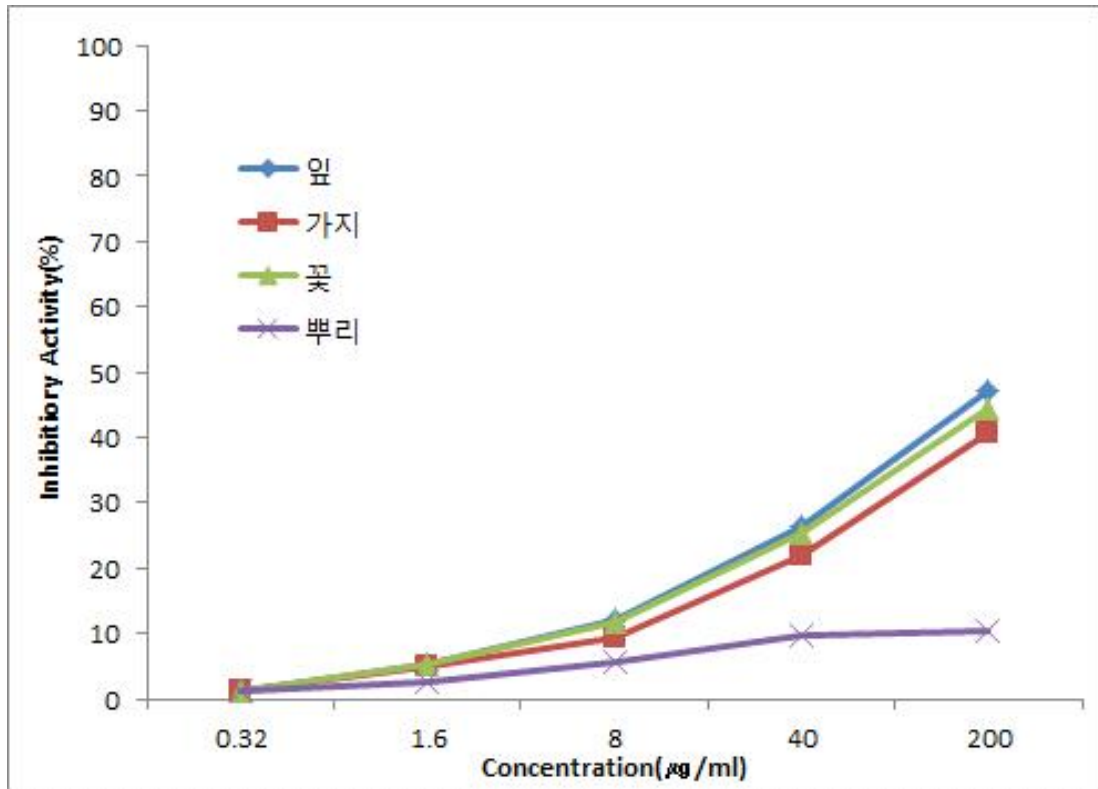


그림 8. 미선나무 부위별 추출물의 Melanin 생합성 저해활성

미선나무 부위별 추출물의 Melanin 생합성 저해 활성을 측정한 결과(그림 8), 뿌리 추출물은 잎, 가지, 꽃 추출물에 비해 다소 낮은 저해 활성을 나타내었다. 각 추출물의 농도 의존적으로 Melanin 생합성 저해 활성이 나타났다. 잎, 가지, 꽃, 뿌리 추출물의 농도 200 µg/ml일 때 각 47.29%, 40.79%, 44.27%, 10.26%의 Melanin 생합성 저해 활성이 나타났다.

따라서 미선나무 뿌리 추출물을 제외한 잎, 가지, 꽃 추출물은 Melanin 생합성 저해 효과가 나타났으며, 그중 잎 추출물의 효과가 가장 높았다.

4)미선나무 추출물의 주름개선 효과 검증

Elastin은 collagen과 함께 진피조직을 형성하는 단백질로,피부탄력성은 진피조직의 두께로 결정된다. Collagen이나 elastin의 형성 억제 또는 파괴증가는 피부탄력성을 저하시켜 주름살의 원인이 되고 있다(15, 16).따라서 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 억제함으로써,주름 생성을 억제하려는 많은 연구가 시도되었다(17).

-미선나무 부위별 추출물의 Elastase 저해 활성 측정

Porcine pancreas elastase저해 활성 측정은 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p- nitoanilide를 사용하여 37℃에서 20분간 p-nitoanilide의 생성량을 405 nm에서 측정한다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 elastase(2.5 U/mL)용액 0.5 mL을 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3- p-nitoanilide(0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정한다.

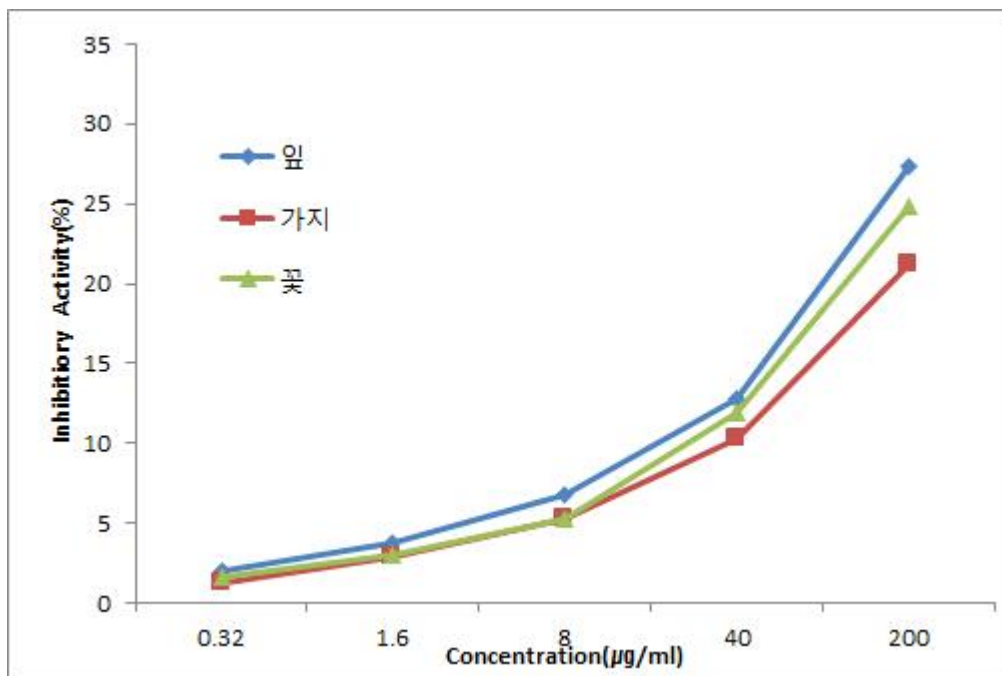


그림 9. 미선나무 부위별 추출물의 Elastase 저해활성

미선나무 부위별 추출물의 Elastase 저해 활성을 측정한 결과(그림 9), 잎, 가지, 꽃 순으로 저해 활성이 높았다.. 각 추출물의 농도 의존적으로 Elastase 저해 활성이 나타났다. 잎, 가지, 꽃, 뿌리 추출물의 농도 200 µg/ml일 때 각 27.39%, 21.25%, 24.84%의 Elastase 저해 활성이 나타났다.

-미선나무 부위별 추출물의 UV에 의해 야기되는 엘라스틴 손상억제력 평가

NIH 3T3 세포를 incubator (37°C, 5%-CO₂)에서 24시간동안 배양한다. 24시간 후 각 추출물을 농도별로 처리한 후 1시간 동안 배양한다. 1시간 후 UV를 추출물이 처리된 세포에 조사한다. UV 처리 후 세포로부터 cell lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출한다. 세포로부터 추출된 동일 단백질로부터 엘라스틴 Precipitation Buffer를 이용하여 엘라스틴을 10분 동안 침전시킨다. 침전된 엘라스틴을 엘라스틴 Dye Reagent를 이용하여 90분 동안 shaking시키면서 염색시킨다. 염색 후 Dye Dissociation Reagent를 이용하여 염색된 엘라스틴으로부터 염색약을 분리한다. 분리 후 ELISA plate reader (513nm)를 이용하여 Optical Density를 측정한다. 시료 처리에 따른 엘라스틴 손상 억제력은 무처리구와 UV만 처리구에 대한 손상 억제력을 환산하였다.

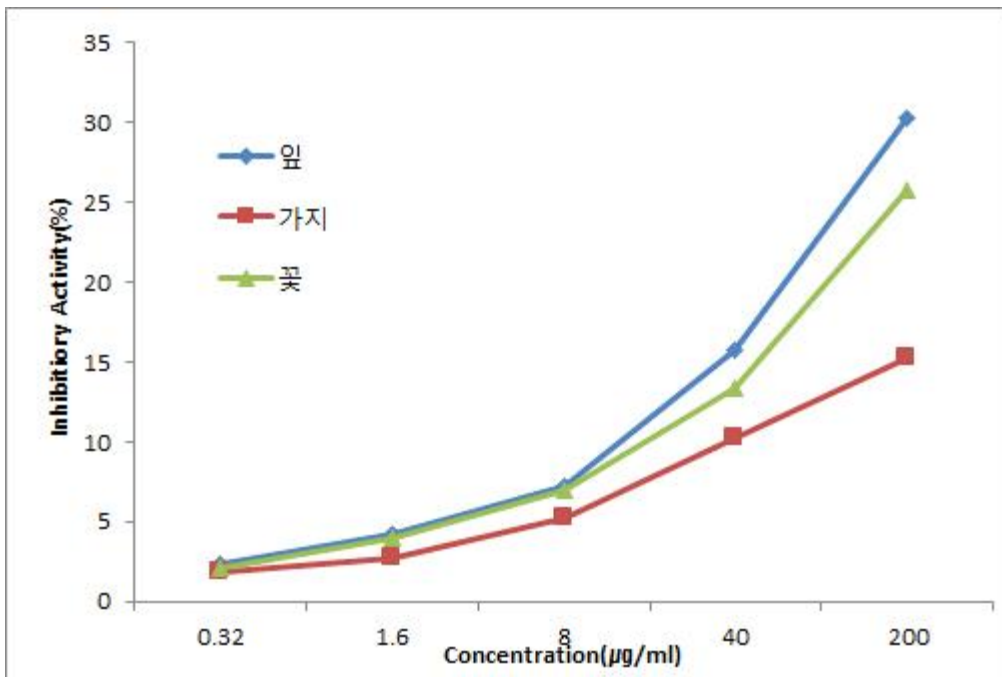


그림 10. 미선나무 부위별 추출물의 Elastin 손상억제력

미선나무 부위별 추출물의 엘라스틴 손상 억제 활성을 측정한 결과(그림 10), 잎, 가지, 꽃 순으로 저해 활성이 높아 Elastase 저해 활성과 동일한 패턴을 나타내었다.. 각 추출물의 농도 의존적으로 엘라스틴 손상억제 활성이 나타났다. 잎, 가지, 꽃, 뿌리 추출물의 농도 200 µg/ml일 때 각 30.26%, 15.26%, 25.82%의 Elastase 저해 활성이 나타났다.

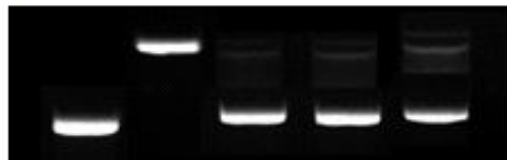
따라서 미선나무 잎, 가지, 꽃 추출물의 주름 개선 효과는 가지와 꽃에 비해 잎 추출물의 활성이 높은 것으로 나타났다.

4)미선나무 부위별 추출물의 DNA 손상억제 효과

가) ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay

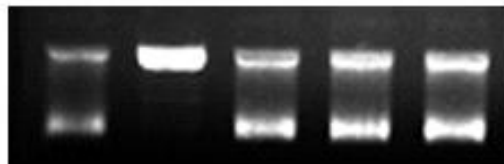
미선나무 부위별 추출물의 산화적 ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage 억제활성은 Jung(18) 등의 방법으로 측정되었다. plasmid DNA의 super-coiled 형태가 open-circular와 linear 형태로 변환되는 정도는 산화적 DNA 손상 지표로 사용되어왔다(18). 1.5 mM FeSO_4 와 6 mM H_2O_2 (3.5 : 5)의 37 °C에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μl 와 농도별 시료 40 μl 를 혼합한 후 37 °C에서 약 30분 동안 반응시켰다. 30분 후 반응 혼합물 20 μl 와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μl 를 다시 혼합하여 37 °C에서 약 30분간 재반응 시켰다. 5 μl 버퍼(50% glycerol(v/v), 40 mM EDTA and 0.05% bromophenol blue)를 첨가하고 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 사진 촬영하였다.

추출물(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	잎	가지	꽃
FeSO_4	-	+	+	+	+



(A)

추출물(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	잎	가지	꽃
FeCl_2	-	+	+	+	+



(B)

그림 11. 미선나무 부위별 추출물의 산화적 손상에 의한 DNA 보호효과

미선나무 부위별 추출물의 산화적 손상에 의한 DNA 보호 효과를 확인한 결과(그림 11), 각 추출물의 농도 농도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 FeSO_4 (A) 와 FeCl_2 에 의한 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 의 손상 억제 효과가 매우 높은 것으로 나타났다.

나) 미선나무 부위별 추출물의 UV에 의해 야기되는 DNA 손상억제력 평가

마우스 피부 섬유아세포 NIH 3T3 세포주(2×10^6)를 6 well plate에서 약 24시간 동안 배양하였다. 미선나무 잎 추출물을 농도별로 첨하고 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후 UV를 추출물이 처리된 세포에 조사한다. UV처리 후 각각의 세포를 채취한 후 Plasmid Extraction Kit를 이용하여 DNA를 추출한다. DNA 추출 후 각각 세포의 DNA를 1% agrose gel을 이용하여 DNA 전기영동을 실시한다. DNA가 전기영동된 gel을 ethidium bromide로 염색한 다음 DNA 손상 정도를 측정한다.

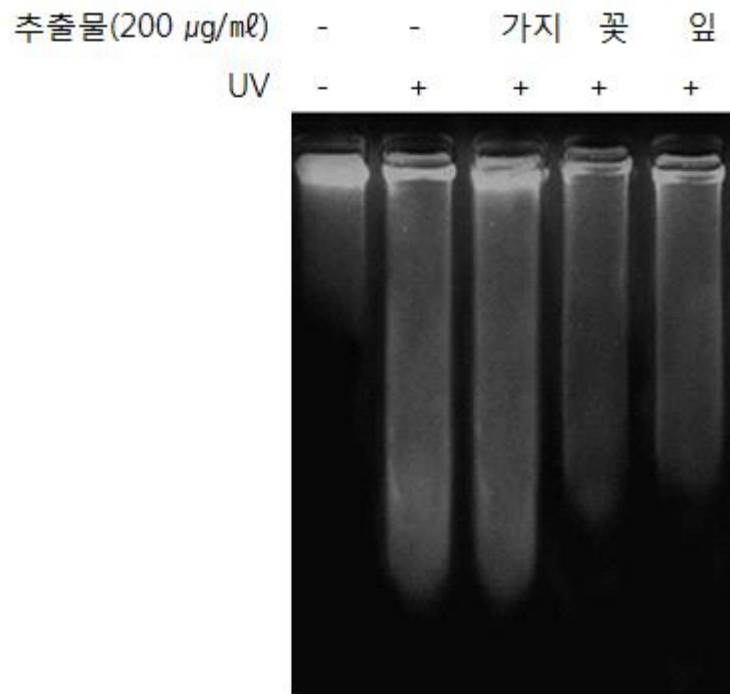


그림 12. 미선나무 부위별 추출물의 UV 손상에 의한 DNA 보호효과

미선나무 부위별 추출물의 UV-B에 의해 야기되는 세포내 DNA 손상억제 효과를 확인한 결과 (그림 12), 가지와 꽃에 비해 잎 추출물이 세포내 UV에 의해 야기되는 DNA 손상억제 효과가 높은 것으로 나타났다.

따라서 상기 결과에 의하면 미선나무 잎, 가지, 꽃 추출물은 산화적 DNA 손상에 매우 효과적이며, 또한 잎 추출물은 가지와 꽃 추출물에 비해 UV에 의해 야기되는 DNA 손상억제 효과가 높은 것으로 나타났다.

5) UV에 의해 야기되는 DNA 손상억제 및 정상세포 사멸 억제력 평가

NIH 3T3 세포를 incubator (37°C, 5%-CO₂)에서 24시간동안 배양한다. 24시간 후 각 추출물을 처리한 후 incubator (37°C, 5%-CO₂)에서 1시간 동안 배양한다. 1시간 후 UV를 각 추출물이 처리된 세포에 조사한다. UV처리 후 각각의 세포로부터 cell lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출한다. 추출된 단백질을 12% Tris-Tricine gel (Bio-Rad)을 이용하여 전기영동 및 Hybond-ECL membrane (Amersham)을 이용하여 transblot을 실시한다. Immunoblot 분석을 위해 phospho-H2AX, p21, 그리고 cyclin D1에 대한 1차 antibody 와 HRP-labeled된 anti-rabbit IgG secondary antibody를 사용하여 각각의 발현되는 단백질 수준을 측정한다.

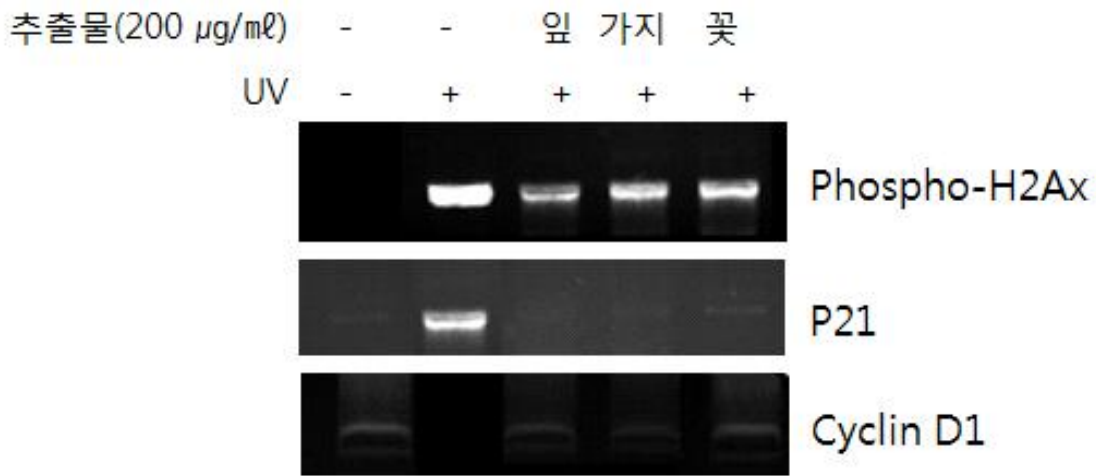


그림 13. 미선나무 부위별 추출물의 UV에 의한 DNA 손상억제 및 정상세포 사멸 억제력

미선나무 부위별 추출물의 UV에 의한 DNA 손상억제 및 정상세포 사멸 억제력을 확인한 결과(그림 13), 미선나무 잎, 가지, 꽃 추출물은 DNA 손상 지표로 알려진 Phospho H2AX 발현을 억제하였으며, 세포 사멸을 조절하는 단백질인 p21의 발현을 감소시켰으며 세포 생육을 조절하는 cyclin D1의 발현을 증가시켜 UV-B에 의해 야기되는 정상세포의 사멸을 억제하였다.

6) 시제품의 활성 안정화 검증 안전성 검토

- 협동 연구기관에서 제작한 미선나무 추출물 함유 샴프 및 사료의 기능성에 대한 활성 안정화 검증을 위해 상기 기술되었던 항산화 측정 방법에 의해 추출물의 활성 안정화 검증을 실시하였다. 샴프내의 추출물 함유량을 고려하여 ml당 10, 50, 100, 200, 500 ul의 농도로 항산화 활성을 측정 하였으며, 사료는 ml당 10, 50, 100, 200, 500 ug의 농도로 항산화 활성을 측정 하였다.

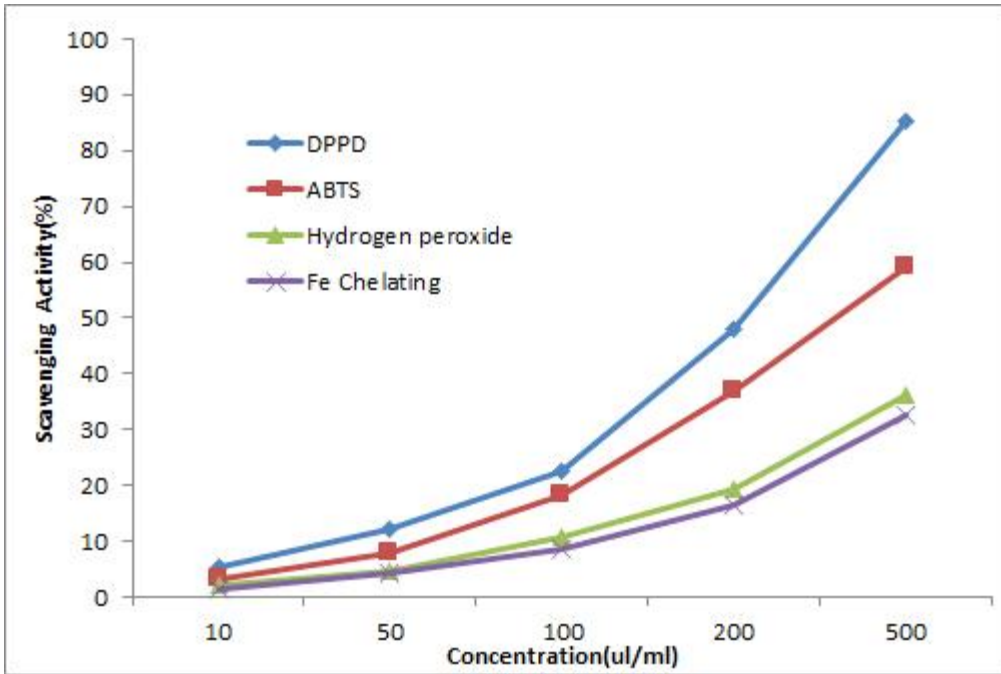


그림 14. 미선나무 추출물 함유 샴프 시제품의 항산화 활성

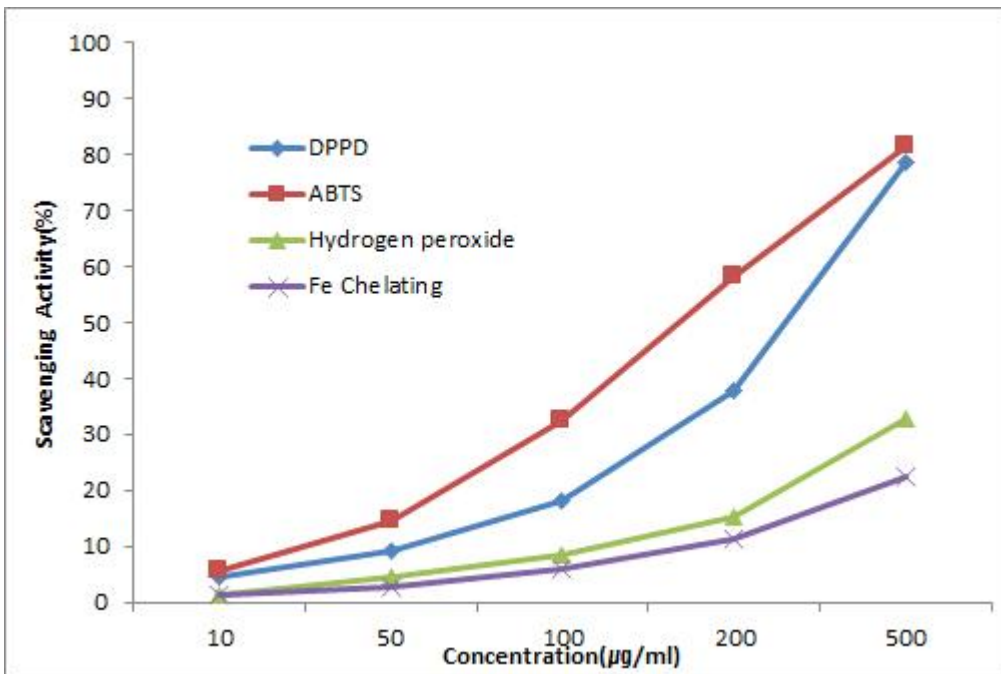


그림 15. 미선나무 추출물 함유 사료 시제품의 항산화 활성

미선나무 함유 시제품(삼프, 사료)의 항산화 활성(그림 14, 15)은 전술된 미선나무 추출물에 비해 활성이 다소 낮으나, 고농도에서 매우 높은 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 미선나무 추출물이 제형화 되어 시제품의 상태에서도 높은 항산화 활성을 나타내었다.

-시제품의 안전성을 검증하기 위해 각 시제품을 NIH3T3세포를 이용하여 MTT assay를 통해 세포 독성을 확인한 결과(그림 16), 부산물의 주정추출물과 미선나무 삼프 및 사료에서 세포 독성이 나타나지 않았다.

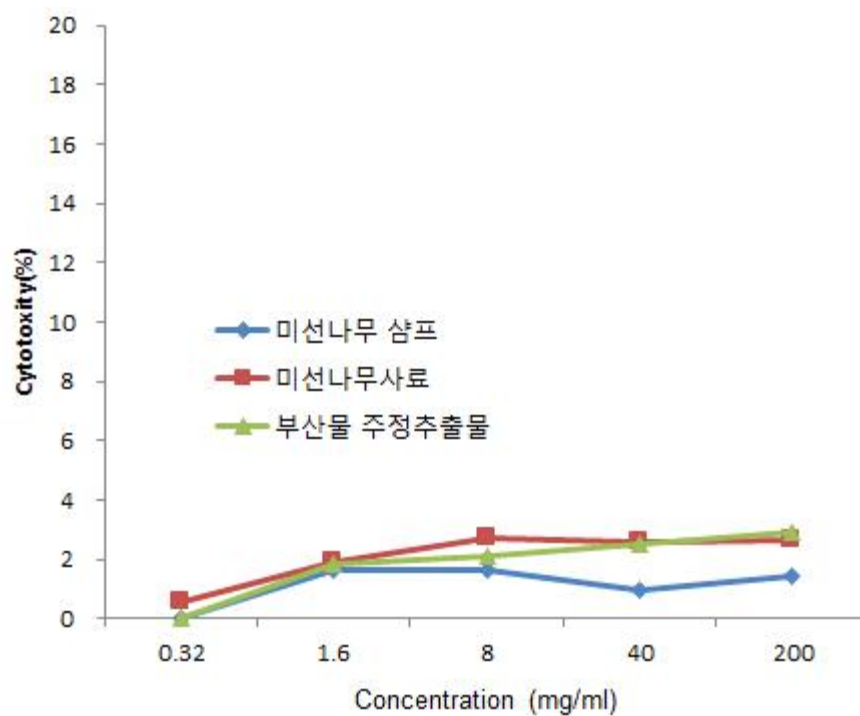


그림 16. 미선나무 추출물 함유 시제품의 세포독성

제 2-2절 미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 구명

1. 미선나무 부위별 추출물의 NO (Nitric Oxide) 생성 억제 효능

; NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 NO₂, nitrite, nitrate로 변한다. 그리스 시약 (griess reagent: 0.5%의sulfanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및0.5%의 naphthylethyleneamine)은 nitrite와 화학 반응하여 보라색의 azo-dye를 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에 azo-dye의 농도로부터 nitrite의 농도를 추정하기 위해 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성정도를 비교하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험하였다. LPS 1 µg/ml를 단독 혹은 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 시료와 함께 배지에 담아 각well 에 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 세포 배양 상등액 100µl을 채취하여 여기에 그리스 시약 100µl을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정 NO 생성을 비교하였다.

제1세부과제에서 항산화 등의 생리 효능 확인 과정에서 우수한 효능을 보인 용매인 ethyl acetate로 미선나무의 부위별 추출물을 준비한 후 이를 이용하여 생쥐 대식세포주인 Raw264.7을 사용하여 전염증 물질인 NO의 생성에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 잎과 꽃, 가지, 잎 추출물이 유사한 비율로 NO 생성을 억제하였고, 뿌리 추출물의 경우 다소 낮은 효능을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (그림 1).

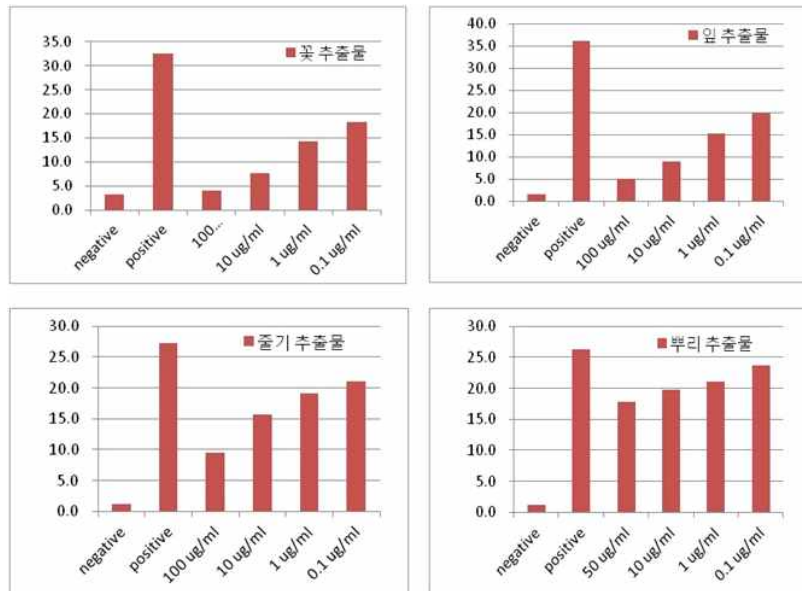


그림 1. 미선나무 부위별 추출물의 NO 생성 억제 효능

2. 미선나무 부위별 추출물의 PGE2 생성 억제 효능

; 세포배양액 내의 PGE2의 분비량은 ELISA-kit를 이용하여 측정하였다. 먼저, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate에 anti-mouse PGE2 mAb를 분주하여 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline-TWEEN (PBST)로 세척하고, 10% Fetal bovine serum (FBS) 용액으로 blocking하였다. PBST로 세척한 뒤, 배양 상층액을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse PGE2 mAb와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 암반응 시키고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

미선나무의 부위별 추출물을 준비한 후 이를 이용하여 생쥐 대식세포주인 Raw264.7을 사용하여 세포내 염증 매개 분자인 PGE2 (prostaglandin E2)의 생성에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과는 NO의 경우와 마찬가지로 잎과 꽃 추출물이 가장 높은 비율로 PGE2 생성을 억제하였고, 줄기 추출물의 경우 다소 낮은 효능을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 뿌리 추출물의 경우에도 NO 생성을 유의적으로 억제하였으나 그 비율은 다른 부위 추출물에 비해 낮은 것으로 나타났다. (그림 2)

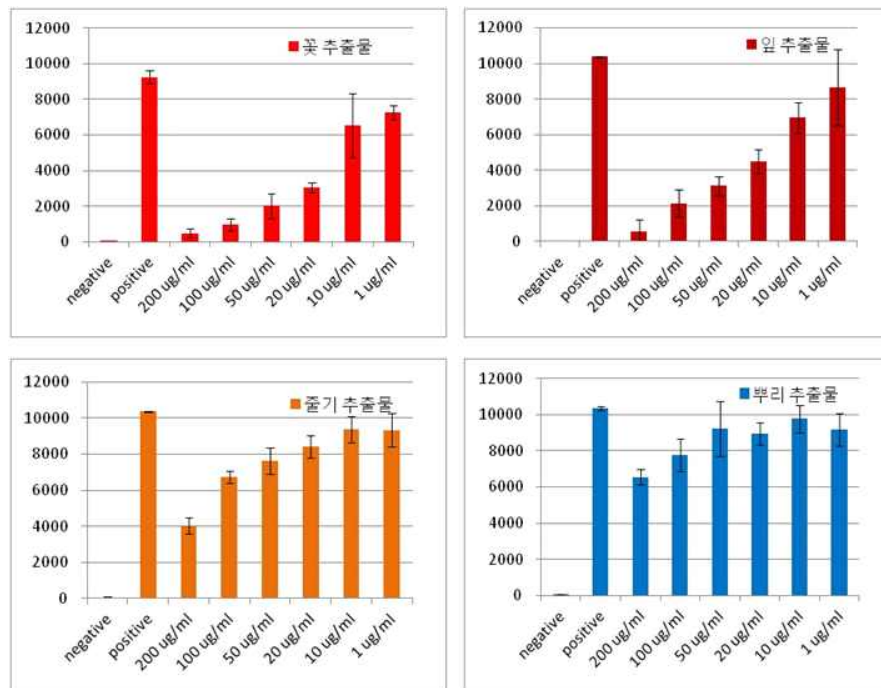


그림 2. 미선나무 부위별 추출물의 PGE2 생성 억제 효능

3. 미선나무 가지 추출물의 항염증 효능 규명

; 세포배양액 내의 IL-6 및 TNF- α cytokine의 분비량을 ELISA-kit를 이용하여 측정하였다. 먼저, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate에 anti-mouse IL-6 및 TNF- α mAb를 분주하여 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline-TWEEN (PBST)로 세척하고, 10% Fetal bovine serum (FBS) 용액으로 blocking하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정하였던 것과 동일한 배양 상층액을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF- α , IL-6 mAb와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 암반응 시키고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

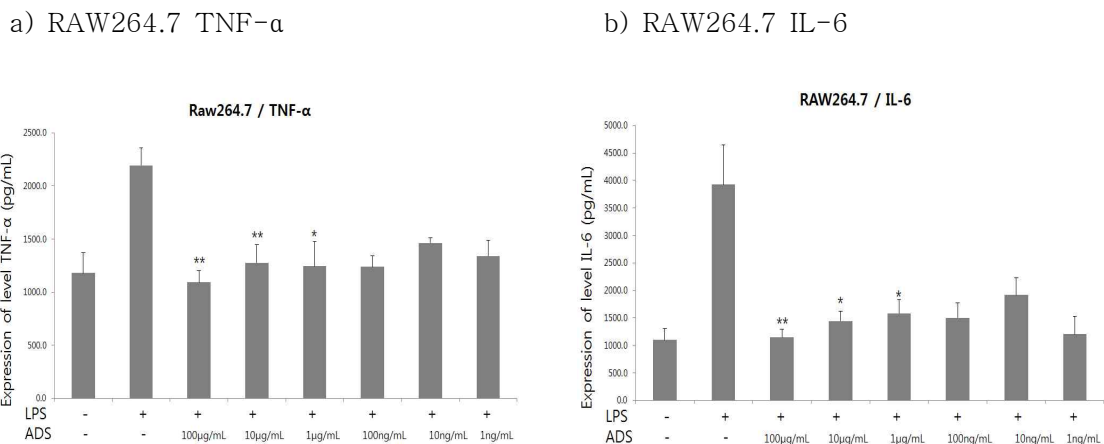


그림 3. 미선나무 가지 추출물 처리 후 Raw264.7 세포에서 TNF- α 와 IL-6 발현 변화

상기 기술한 ELISA 방법을 사용하여 LPS를 처리한 RAW264.7 세포에서 TNF- α 와 IL-6의 발현에 따른 미선나무 가지 추출물의 효능을 확인하였다. RAW 264.7에 미선나무 가지 추출물을 각각 100 μ g/mL, 10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 100ng/mL, 10ng/mL 1ng/mL 농도로 1시간 처리한 후, LPS 1 μ g/mL를 24시간 처리하여 pro-inflammatory mediators 생성을 유발하였다. LPS를 처리 후 RAW 264.7 세포에서 미선나무 가지 추출물을 처리한 세포와 추출물을 처리하지 않은 세포와의 TNF- α , IL-6 발현량에 차이를 보였다. TNF- α 의 경우 모든 추출물에 농도에서 LPS 대조군에 비해 약 2배 정도 감소하고 있고 추출물 농도에 따라 100 μ g/mL는 약 2배, 10 μ g/mL는 약 1.7배, 1 μ g/mL 약 1.7배로 발현량

이 유의적으로 감소를 확인 하였다 (그림 3a). IL-6의 경우 LPS를 처리 했을 때 LPS를 처리하지 않는 대조군에 비해 약 4배정도 증가 하였으며 추출물 농도에 따라 100µg/mL는 약 3.4배, 10µg/mL는 약 2.7배, 1µg/mL는 약 2.4배 발현량이 유의적으로 감소됨을 확인 하였다 (그림 3b).

동일한 방법으로 LPS를 처리한 BV2 세포에서 TNF-α와 IL-6의 발현에 따른 미선나무 가지 추출물의 효능을 확인하였다. BV2 세포에 추출물을 100µg/mL, 10µg/mL, 1µg/mL, 100ng/mL, 10ng/mL, 1ng/mL를 1시간 처리한 후, LPS 100ng/mL를 24시간 처리하여 pro-inflammatory mediators 생성을 유발하였다. BV2 세포에서 LPS를 처리한 대조군은 아무것도 처리하지 않은 대조군 보다 평균 3.5배 가량 그 발현량이 증가하였고, 추출물을 LPS와 함께 각각 100µg/mL, 10µg/mL, 1µg/mL, 100ng/mL, 10ng/mL, 1ng/mL의 농도로 처리했을 경우 발현량의 감소를 확인 할 수 있었다. 또한 각각의 농도를 살펴보면 100µg/mL는 약 8배, 10µg/mL는 약 5배, 10µg/mL 약 3.8배 발현량이 유의적으로 감소를 확인 하였다 (그림 4a). IL-6의 경우 추출물 농도에 따라 100µg/mL는 약 40배, 10µg/mL는 약 2.5배 발현량이 유의적으로 감소를 확인 하였다 (그림 4b).

a) BV2 TNF-α

b) BV2 IL-6

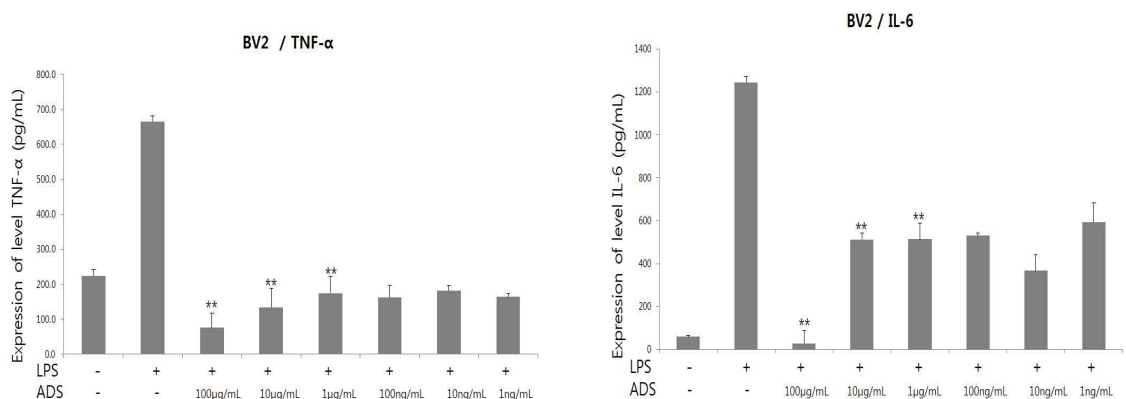


그림 4. 미선나무 가지 추출물 처리 후 BV2 cells의 TNF-α와 IL-6의 발현 변화

염증성 사이토카인이 억제되는 분자 기전을 확인하기 위하여 세포내 신호전달 단백질의 변화를 western blot hybridization 방법으로 확인하였다. Raw264.7 또는 BV2 세포주를 이용하여 culture dish에 배양한 뒤 sample 처리를 한 다음 24시간 후에 PBS로 세척한 후 원심분리 하여 세포를 수집하고, RIPA buffer를 사용하여 cell lysate를 제조 하였다. 세포 lysate에 함유된 단백질의 양은 Bradford 법으로 측정하였다. 분리한 단백질 20 µg을 10%

polyacrylamide를 함유한 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane으로 120 V에서 1시간 electroblot을 실시하여 단백질 밴드를 transfer 하였다. 이어 PVDF membrane을 5% skim milk에서 1시간 두어 blocking을 수행한 후, primary antibody를 첨가하여 4°C에서 overnight하였다. 이 후 tris-buffered saline + tween 20 (TBST)로 세 번 세척한 뒤 secondary antibody를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 TBST로 세 번 세척한 후 ECL kit와 반응시켜 image analyzer를 이용하여 단백질 밴드를 확인하였다.

우선 대식세포주인 Raw264.7 세포에서 미선나무 추출물 처리에 따른 MAPK 및 NF-κB Pathway 연관 단백질의 발현을 비교하였다. Raw264.7세포에 LPS를 처리 하였을 때 p38의 인산화가 증가되었고, 미선나무 가지 추출물을 LPS와 동시에 100μg/mL, 10μg/mL, 1μg/mL, 100ng/mL의 농도호 각각 처리하였을 때 P38의 인산화가 억제되는 효과를 확인할 수 있었다. 마찬가지로 NF-κB의 활성을 조절하는 IκB의 단백질의 발현과 인산화 정도를 확인한 결과 미선나무 가지 추출물을 함께 처리했을 경우 LPS 단독으로 처리한 대조군에 비해 pIκB의 발현이 유의적으로 감소됨을 확인 할 수 있었다 (그림 5).

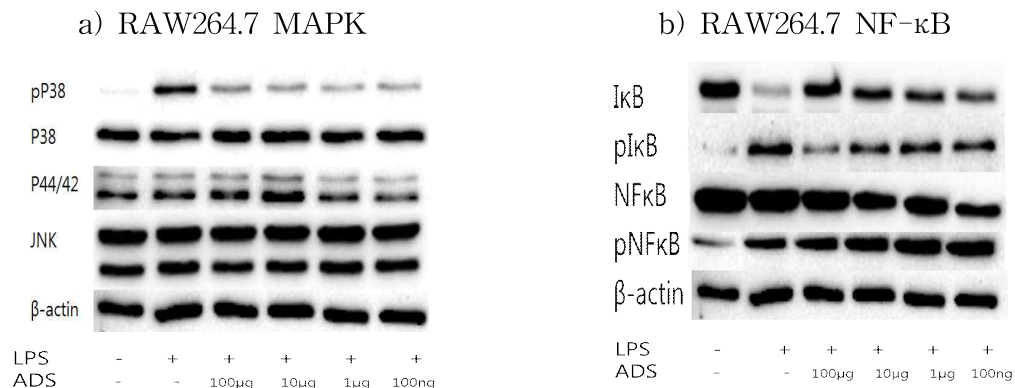


그림 5. Raw264.7 cell에서 미선나무 가지 추출물 처리에 따른 MAPK 및 NF-κB Pathway 연관 단백질의 발현 변화 비교

한편 BV2세포에서 추출물을 처리 하였을 때에도 Raw264.7 세포의 경우와 같이 p38의 인산화를 억제하는 것을 확인하였다. 마찬가지로 미선나무 가지 추출물을 100μg/mL, 10μg/mL 농도로 처리하였을 때, pIκB의 발현 또한 유의적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다. 그리고 pNF-κB의 발현량도 미선나무 가지 추출물의 100μg/mL, 10μg/mL 처리 농도에서 감소됨을 확인 할 수 있었다 (그림 6).

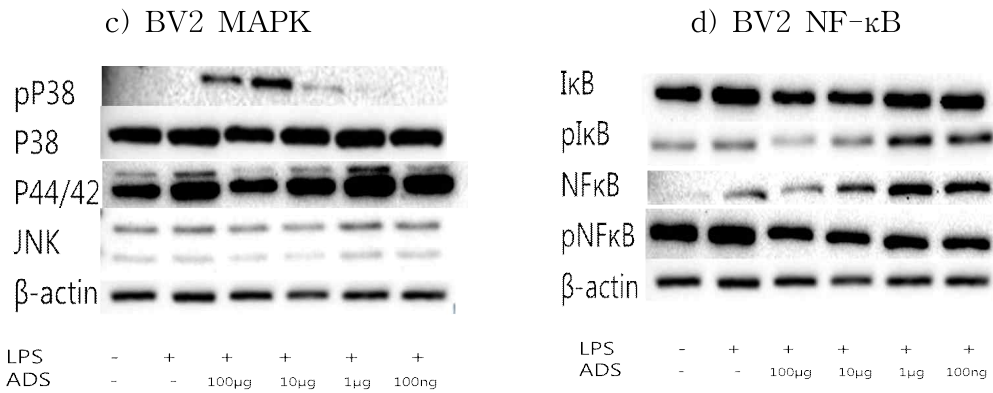


그림 6. Raw264.7 cell에서 미선나무 가지 추출물 처리에 따른 MAPK 및 NF-κB Pathway 연관 단백질의 발현 변화 비교

4. 미선나무 꽃 추출물의 항염증 효능 규명

; 세포배양액 내의 IL-6 및 TNF-α cytokine의 분비량을 ELISA-kit를 이용하여 측정하였다. 먼저, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate에 anti-mouse IL-6 및 TNF-α mAb를 분주하여 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline-TWEEN (PBST)로 세척하고, 10% Fetal bovine serum (FBS) 용액으로 blocking하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정하였던 것과 동일한 배양 상층액을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α, IL-6 mAb와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 암반응 시키고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대식세포인 Raw264.7 세포에 LPS를 처리한 후, TNF-α와 IL-6의 분비량을 측정하였다. TNF-α 분비량은 LPS를 단독으로 처리할 경우 음성 대조군에 비해 약 3배 증가하는 결과를 보였고, 미선나무 꽃 추출물을 함께 처리할 경우 100μg/ml에서는 5배, 10μg/ml에서는 2배, 그 이하 농도에서는 약 1.5배 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 IL-6 분비량은 LPS를 단독으로 처리할 경우 음성 대조군에 비해 약 1,000배의 차이로 증가한 결과를 보였고, 미선나무 꽃 추출물을 함께 처리할 경우 100μg/ml는 282배, 10μg/ml는 49배 등으로 농도에 연관하여 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (그림 7)

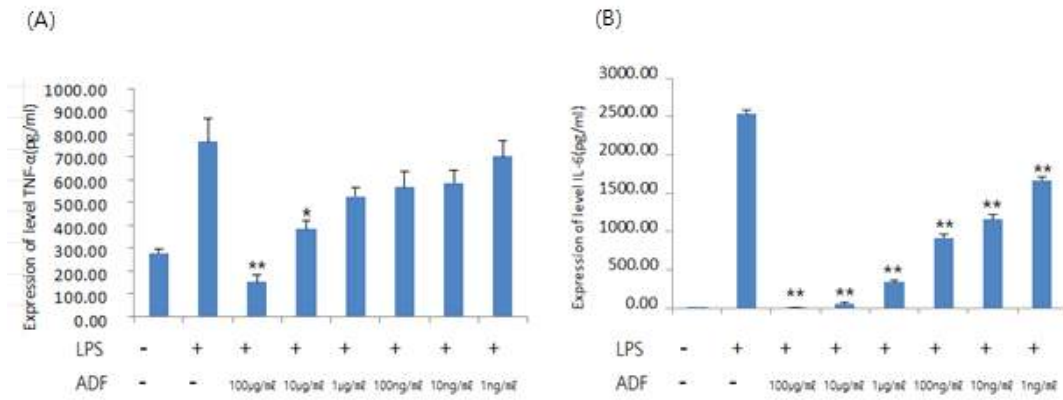


그림 7. Raw264.7 세포에서 미선나무 꽃 추출물에 의한 염증성 사이토카인인 TNF- α (A)와 IL-6 (B) 분비량 변화

다음으로 Microglial cell에서의 염증 사이토카인 생성 억제에 미선나무 꽃 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해, BV2 세포에 농도별 (100 μ g/ml-1ng/ml) 추출물을 처리 후 LPS (1 μ g/ml)를 처리하고 분비량을 측정하였다. LPS를 유도한 BV₂세포에서 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 분비량 결과는 그림 8에 나타났다. 추출물을 LPS와 함께 첨가한 실험 군에서는 100 μ g/ml~1ng/ml 농도 모두에서 LPS만 처리된 양성대조군에 비해 상당히 낮아진 사이토카인 분비량을 보였다. 비율로 보면, TNF- α 분비량의 경우 LPS를 단독으로 처리할 경우 음성 대조군에 비해 4배 정도 발현이 증가하였고, 미선나무 꽃 추출물 동시 처리 시, 100 μ g/ml에서는 4배, 10 μ g/ml~1ng/ml에서는 약 3배 가량 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 IL-6 분비량의 경우에는 LPS를 단독으로 처리할 경우 음성 대조군에 비해 약 25배 정도 발현양이 증가하였고, 미선나무 꽃 추출물을 함께 처리하였을 때 100 μ g/ml에서는 약 50배, 10 μ g/ml~1ng/ml 농도에서는 약 4배로 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (그림 8).

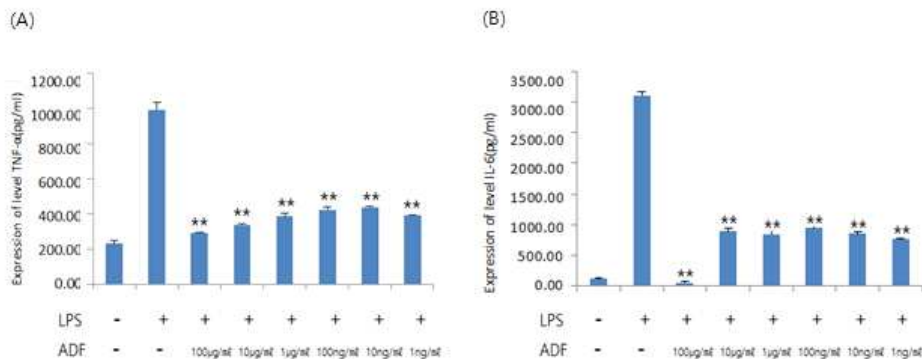


그림 8. BV2 세포에서 미선나무 꽃 추출물에 의한 염증성 사이토카인인 TNF- α (A)와 IL-6 (B) 분비량 변화

염증 유도 물질인 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 표면의 Toll-like receptor 4를 자극하여 하부 세포신호전달경로인 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 활성화를 유도한다. MAPK 중 extracellular signal-regulated kinase(ERK)와 P38은 LPS로 자극된 iNOS 유도와 대식세포의 NO 생성에 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있다. 세포증식이나 분화를 조절하는 MAPK에는 P38 kinases(P38), extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK)가 있다. LPS로 염증 반응이 유도된 Raw264.7 세포에 추출물을 처리한 다음 MAPK의 활성도를 단백질 정량 분석법(western blot)으로 측정하였다 (그림 9). 이를 확인하기 위해 Raw264.7 세포에 농도별 추출물 (100 μ g/ml~100ng/ml)을 30분 처리 후 LPS (100ng/ml)를 1시간 처리하고 각 단백질의 발현량을 측정하였다.

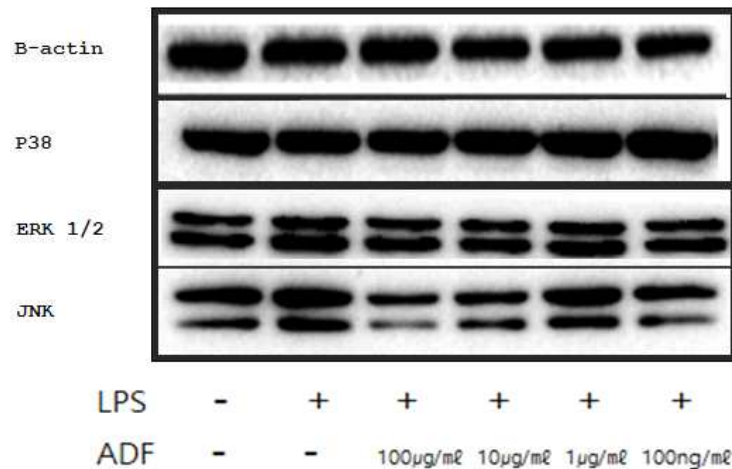


그림 9. Raw264.7 세포에서 미선나무 꽃 추출물이 MAPK pathway에 미치는 영향

이 후, LPS로 염증 반응이 유도된 BV2 세포에서 유전자 발현의 억제 정도를 알아보기 위해, MAPK인 P38, ERK1/2, JNK의 활성을 비교하여 단백질 정량 분석법(western blot)으로 확인하였다 (그림 10). 이를 확인하기 위해 BV₂세포에 농도별 추출물(100 μ g/ml~100ng/ml)을 30분 처리 후 LPS(100ng/ml)를 1시간 처리하고 발현량을 측정하였다. 미선나무 꽃 추출물이 MAPK의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과, 인산화된 pP38에서 LPS만 처리된 군에 비해 추출물을 처리할 경우 발현 억제 효과를 확인하였다.

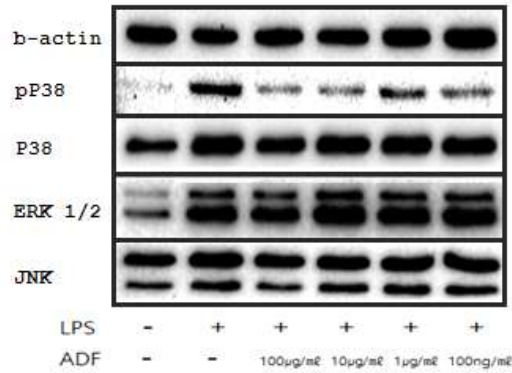


그림 10. BV2 세포에서 미선나무 꽃 추출물이 MAPK pathway에 미치는 영향

염증 관련 세포에서 LPS에 의해 유도되는 nuclear factor kappa-B (NF- κ B)는 사이토카인 반응, 염증, 세포성장 조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자로 외부 자극과 산화 스트레스가 체내 산화환원의 불균형을 유도하는 LPS에 의해 활성화되고, 염증관련 유전자들을 발현시킨다. 또한 inhibitory kappa B (IkB)와 결합한 상태로 불활성 형태로 세포질에 존재하던 NF- κ B는 IkB의 인산화로 인하여 유리되어 핵으로 이동함으로써 COX-2, iNOS와 같은 다양한 염증성 매개체의 발현을 유도하게 된다. NF- κ B는 염증이 유도되지 않을 경우에 IkBa와 결합된 상태로 세포질에 존재하여 염증매개물질관련 유전자 전사를 활성화시킬 수 없지만, LPS 및 TNF- α 에 의한 신호전달이 활성화되면 IkBa가 분해되고 NF- κ B가 핵으로 이동하여 염증매개물질 유전자의 프로모터에 존재하는 NF- κ B에 결합하여 전사를 활성화 시킨다. NF- κ B의 활성이 저해 여부를 확인하기 위하여 Raw264.7 세포에 농도별 추출물(100 μ g/ml~100ng/ml)을 처리 후 LPS(100ng/ml)를 처리하고 단백질 발현량을 측정하였다(그림 11). 인산화된 IkBa는 LPS만 처리한 군에 비해 미선나무 꽃 추출물을 처리한 군이 억제되는 것을 확인하였으며, 특히 100 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 유의적인 발현 억제 효과를 나타내었다.

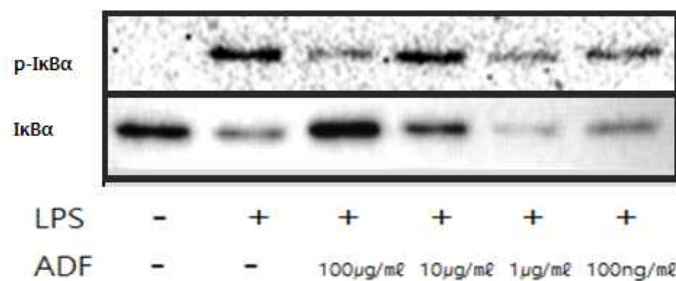


그림 11. Raw264.7 세포에서 미선나무 꽃 추출물이 NF- κ B pathway에 미치는 영향

BV2 세포에서도 NF- κ B의 활성이 저해되는지 확인하기 BV2세포에 농도별로 추출물 (100 μ g/ml~100ng/ml)을 30분 처리 후 LPS (100ng/ml)를 1시간 처리하고 발현량을 측정하였다 (그림 12). 인산화된 I κ B α 는 LPS만 처리한 군에 비해 미선나무 꽃 추출물을 처리한 군이 억제되는 것을 확인하였으며, 특히 100 μ g/ml, 10 μ g/ml와 1 μ g/ml에서 유의적인 발현 억제 효과를 나타내었다.

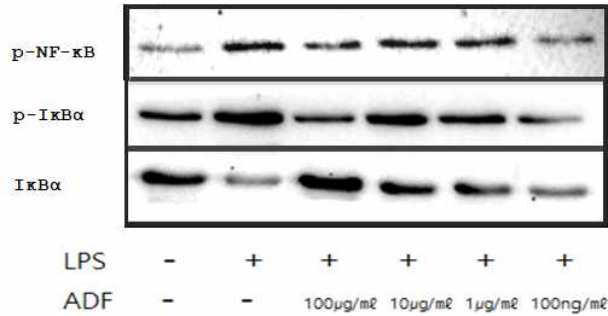


그림 12. BV2 세포에서 미선나무 꽃 추출물이 NF- κ B pathway에 미치는 영향

5. 미선나무 잎 추출물의 항염증 효능 규명

; LPS를 처리한 RAW264.7 세포에서 TNF- α 와 IL-6의 발현에 따른 미선나무 잎 추출물의 효능을 확인하였다. RAW 264.7에 추출물을 100 μ g/mL, 10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 100ng/mL, 10ng/mL 1ng/mL를 1시간 처리한 후, LPS 1 μ g/mL를 24시간 처리하여 pro-inflammatory mediators 생성을 유발하였다. LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 미선나무 잎 추출물을 처리한 세포와 추출물을 처리하지 않은 세포와의 TNF- α , IL-6 발현량에서 차이를 보였다. TNF- α 와 IL-6 분비량 모두 추출물 처리 농도에서 LPS 양성 대조군에 비해 유의적으로 감소하고 있음을 확인하였다 (그림 13).

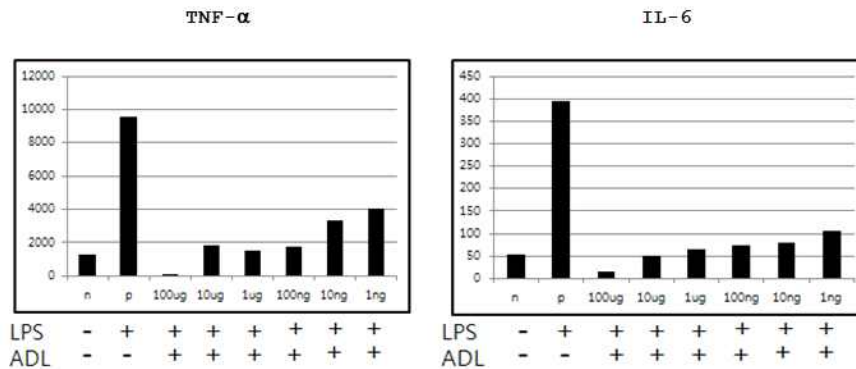


그림 13. Raw264.7 세포에서 미선나무 잎 추출물에 의한 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 분비량의 변화

LPS를 처리한 BV2 세포에서 TNF- α 와 IL-6의 발현에 따른 미선나무 잎 추출물의 효능을 확인하였다. RAW 264.7에 추출물을 100 μ g/mL, 10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 100ng/mL, 10ng/mL 1ng/mL를 1시간 처리한 후, LPS 1 μ g/mL를 24시간 처리하여 pro-inflammatory mediators 생성을 유발하였다. LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 미선나무 잎 추출물을 처리한 세포와 추출물을 처리하지 않은 세포와의 TNF- α , IL-6 발현량에서 차이를 보였다. TNF- α 와 IL-6 발현 모두 추출물 처리 농도에서 LPS 대조군에 비해 유의적으로 감소하고 있음을 확인하였다(그림 14).

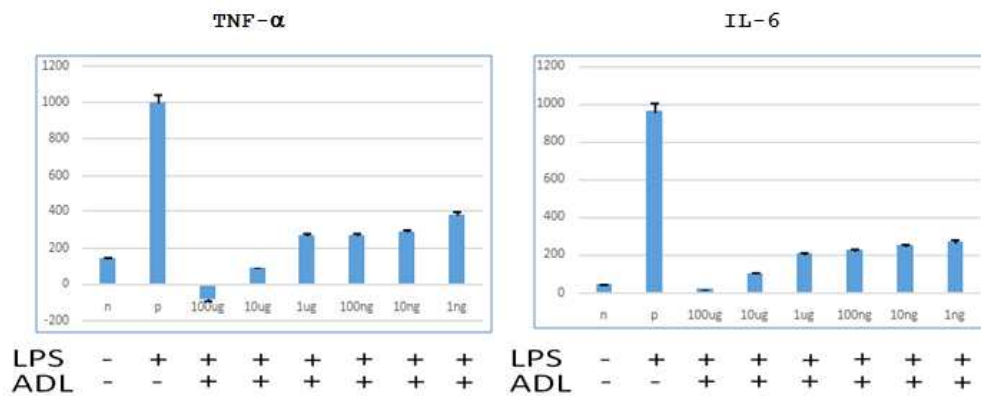


그림 14. BV2 세포에서 미선나무 잎 추출물에 의한 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 분비량의 변화

미선나무 잎 추출물 역시 가지 및 꽃 추출물과 마찬가지로 Raw264.7 세포와 BV2 세포 모두에서 MAPK pathway와 NF- κ B pathway의 주요 단백질 발현을 저해함을 확인할 수 있었다 (data not shown).

6. 미선나무 추출물의 세포 안정성 규명

; 미선나무 전추출물의 세포 안전성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다 (그림 15). RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수 성장을 하는 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2×10^5 /ml의 밀도로 배양하며 여러 가지 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, spectrophotometer를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의

생존율은 어떠한 처치도 가하지 않은 control cells과의 비율로 나타내었다. [즉, $viability(\%) = 100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$]

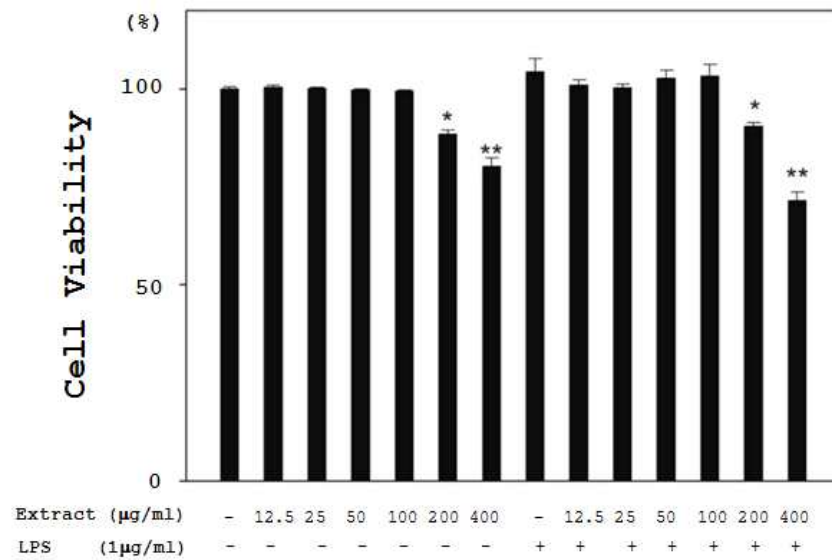


그림 15. Raw264.7 세포에서 미선나무 전추출물에 의한 세포독성

상기 결과와 같이 본 연구에서 사용된 농도에서는 아무런 세포독성 효과를 보이지 않았으며, 향후 산업화 소재로 사용할 경우 본 연구에서 확인한 범위의 농도를 지표로 사용할 수 있을 것이다.

7. 동물 모델을 이용한 미선나무 추출물의 장염 관련 효능 분석

; 미선나무 전추출물의 이용하여 동물모델에서 장염 관련 효능을 규명하기 위하여 DSS 투여를 통한 인위적 장염 유도 방법을 사용하였다. B6 마우스에 인위적으로 장염을 유발하기 위하여 5% DSS를 식수에 녹여 1주일 이상 지속적으로 투여하였다. DSS 투여 사흘 이후부터 미선나무 전추출물을 0, 1, 100 (ug/ml)의 농도로 식수에 함께 섞어 먹였다. 10일이 경과한 후 마우스를 희생하고 대장 조직을 H&E로 염색하여 장상피 부위의 염증 정도를 확인하였다. 희생한 생쥐의 대장 조직을 염색하여 비교한 결과 추출물을 100ug/ml로 함께 투여한 경우가 염증의 정도가 가장 낮은 것을 알 수 있었다. 이 경우 조직의 손상 정도는 다른 실험군에 비하여 확연히 개선된 것을 알 수 있었다 (그림 16).

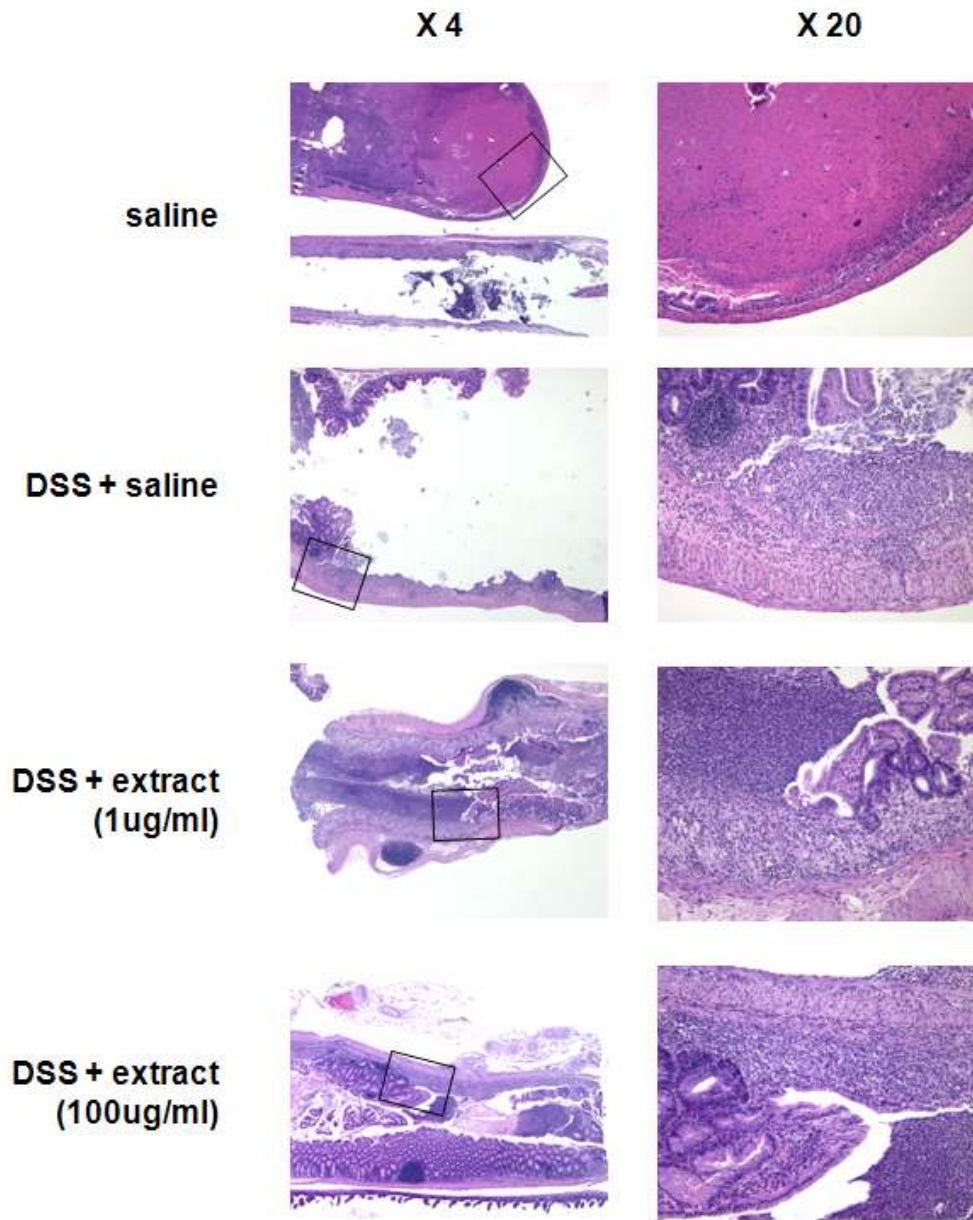


그림 16. 미선나무 추출물이 DSS에 의한 생쥐 대장 조직의 염증 손상에 미치는 영향

제 3절 미선나무추출 공정 표준화 연구

1) 미선나무 추출기법 및 추출공정 표준화 연구 개발

미선나무에 대한 항산화 및 항염증에 관한 다양한 연구가 진행중이지만, 미선나무의 기능성을 연구하는데 있어 지표물질에 대한 연구는 전무하다. 그 동안 미선나무의 희소성으로 인하여 기본적인 성분 분석이 없는 상황에서 연구가 시작되었으며, 항암, 항염 및 알레르기에 효능이 있다는 기존 특허에 착안하여 미선나무에는 항산화 활성이 좋은 flavonoid계의 성분을 함유할 것으로 사된다. 본 연구팀의 선행 연구결과 미선나무 추출물로부터 flavonoid계 성분들을 분석하였다. 그 결과, flavonoid 성분들 중 rutin이 가장 많이 검출되었다.

미선나무의 rutin의 생리활성에 관한 연구가 전무하기 때문에 rutin이 주된 활성물질이라는 근거는 없으나, 여러 번의 실험을 걸쳐 flavonoid성분 중 가장 많은 양을 함유한 rutin을 지표 성분으로 설정 하였으며. 이에 대한 생리활성 연구는 꾸준히 이루어져야 한다고 사료 됩니다. 따라서 본 연구에서는 미선나무 추출공정에 따른 표준화 공정을 개발하기 위해 미선나무의 주된 활성 물질이라고 여겨지는 Rutin을 지표물질로 선정하고, 제 1세부과제에서 확립된 미선나무 추출방법을 modify하여 주정 추출로부터 Rutin을 분석하여 표준화 공정을 개발 하고자 한다.

○미선나무 부산물 추출 표준화 공정

미선나무의 부산물을 동결 건조한 후 분쇄기를 이용하여 분말화 한다. 미선나무 부산물 분말 100g에 70 % 주정 900mL를 가하고 25℃에서 24시간 추출(shaking)한 후 30분 동안 8,000 × g 에서 원심분리기 (Beckman, USA, CA)를 이용하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 상등액 만을 모아 감압농축한 후 동결 건조하였다.



그림 3-1. 미선나무 잎 주정추출 방법

○ 표준용액의 제조

표준물질 Rutin 약 10 mg을 정밀하게 달아 70 % Methanol에 녹인후 sonication하여 표준용액으로 사용한다. 이를 적절히 희석해서 Working solution 으로 사용한다.

○ 시험물질의 제조

(1) 동결건조한 미선나무 주정추출물 약 100 mg을 정밀하게 취하고 1mL 70% 주정으로 녹여 사용한다.

(2) 0.45 um Syringe filter로 여과 후 시험용액으로 한다.

○ 기기분석조건

Detector	UV detector (285 nm)		
Column	YMC-ODS AM C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 um)		
	A : 0.1 % Acetic acid in DW		
	B : 0.1 % Acetic acid in Acetonitrile : DW = 75 : 25		
Gradient	Retention time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	88	12
	18	78	22
	28	72	28
	35	62	38
	48	52	48
	54	32	68
	58	0	100
	60	0	100
	62	88	12
67	88	12	
Injection volume	10 ul		
Flow rate	1.0 mL/min		
Temperature	35℃		
Run time	67 min		

○ 계산식

$$\text{Rutin 함량 (mg/100g)} = \frac{\text{시험용액농도 (ug/ml)} \times \text{용액량 (ml)} \times \text{표준품 순도}}{\text{시료채취량 (g)} \times 1000}$$

○ 미선나무 주정추출물 중 Rutin 함량

가. 표준용액의 검량선 확인

Rutin 표준품의 Stock solution 을 메탄올로 제조한 후 이를 희석하여 농도별 Working solution을 만들어 표준용액의 검량선을 작성하였다. Rutin 100 mg을 취하여 70 % 메탄올 1 mL에 녹인 후 이를 희석하여 농도 100 ug/mL ~ 1 mg/mL 사이의 4농도에서 확인하였으며 이 때 상관계수 R2 = 0.9997 로 나타났다. 또한 약 26.9분에서 표준용액과 시험용액에서 동일한 Retention time에 Peak가 나타남을 확인할 수 있었으며, 스펙트럼 패턴도 일치함을 확인할 수 있었다.

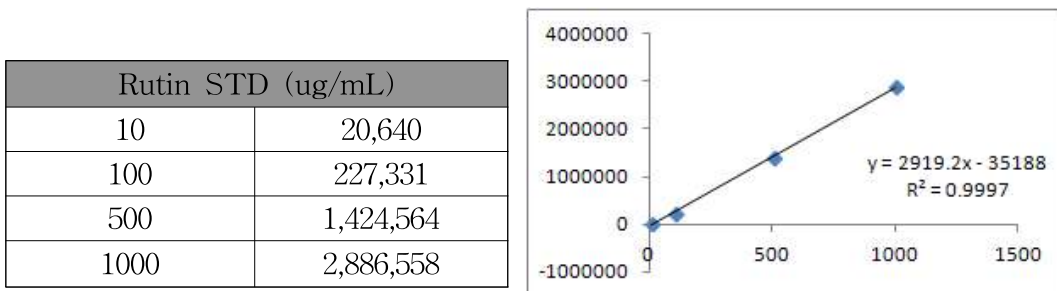


그림3-2. Rutin 표준용액의 STD curve

나. 미선나무 주정추출물 중 Rutin함량

미선나무 주정추출물 중 Rutin의 함량을 측정한 결과, 반복간 및 시표 채취량을 달리하여 분석하였을 때 Rutin함량이 약 434.39 ± 42.70 mg/100g 으로 분석되었다.

표3-1. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램

미선나무 주정추출물 Area	y = 2919.2x - 35188 (ug/mL)	초기 0.1g/mL (mg/100g)	Average (mg/100g)	S.D.
1144740	404.20	404.20	434.39	42.70
1321014	464.58	464.58		

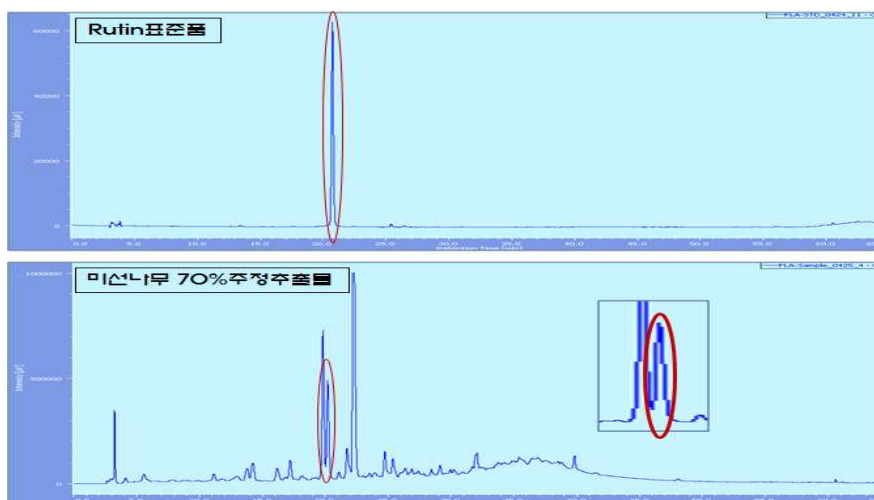


그림3-3. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램

<첨부3-1> 루틴 검사 성적서

제 D2013050143 호		검 사 성 적 서	
검체명	미선나무	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	한국식품연구원	성 명
	주소	경기 성남시 분당구 백현동 516	
제조번호		접수년월일	2013-05-06
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2013050143
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 회			
시험항목		결과	검사담당자
루틴(mg/g)		27.21mg/g	강동희
분석방법-업체제공			
2013 년 5 월 20 일 한국기능식품연구원			
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 031-628-2100 FAX(031)628-0400-1			



2) 미선나무 잎 및 줄기의 기본 분석

-실험방법

(1) 일반성분

동결 건조된 미선나무 잎과 줄기분의 일반성분은 AOAC방법에 의하여 분석하였다. 수분은 105℃에서 상압 건조하여 측정하였고, 조단백은 micro-Kjeldahl 으로 측정하였으며 질소계수 6.25를 사용하여 환산하였다. 조지방은 시료를 Soxhlet 장치를 사용하여 65℃에서 8시간 petroleum ether로 추출하였다. 회분은 550℃ 직접 회화법을 사용하여 측정하였다.

(2) Total carotenoids 측정

동결 건조된 미선나무 잎과 줄기분말 0.1 g을 50 mL benzene을 가한뒤 실온에서 1시간 동안 교반한 후 원심분리하여 상등액을 모은 뒤에 100 mL로 정용하여 용액의 흡광도를 UV/Vis 분광광도계 (V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 483 nm에서 흡광도를 측정하였고 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Carotenoids (mg/100g)} = \frac{\text{Absorbance} \times \text{vol.} \times 1000}{E_{1\text{mL}}^{1\%} (2400) \times \text{Sample weight (g)}}$$

(3) Total phenolic compounds 함량의 측정

동결 건조된 미선나무 잎과 줄기분말 1 g에 70% methanol 9 mL를 가한 후 25℃에서 15 시간동안 추출한 후 10분동안 12,000 rpm에서 원심분리기 (Beckman, USA, CA)를 이용하여 고형분을 제거하여 상등액만을 Crude 시료로 사용하였다. Crude 시료용액 1 mL을 시험관에 취하고 여기에 Folin-ciocalteau reagent 0.1 mL을 가한 뒤 혼합하여 실온에 방치한 다음, Na₂CO₃ 포화용액 0.2 mL을 가하여 혼합한다. 그 후에 증류수 2 mL을 가하여 희석하고 실온, 암조건에서 1시간 방치한 후 원심분리하여 상등액만을 취한 후 725 nm에서 UV spectrophotpmeter로 흡광도를 측정하여 정량하였다.

정량을 위한 검량선은 Caffeic acid (sigma) 1 mg을 70% methanol 1mL에 용해시켜 2, 4, 6, 8, 10 ug/mL에 되도록 조제한 후 시료용액과 같은 방법으로 처리하여 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

(4) Total flavonoids 함량의 측정

위와 같은 방법으로 추출한 Crude 시료용액 0.5 mL을 시험관에 취하여 여기에 diethyl glycol 5 mL을 가하여 혼합한 후 1N-NaOH 0.5 mL을 가한 후 37℃ 수조에서 1시간 방치시킨다. 그 후에 420 nm에서 UV spectrophotpmeter로 흡광도를 측정하여 정량하였다.

정량을 위한 검량선은 Rutin (sigma) 1 mg을 70% methanol 1 mL에 용해시켜 25, 50, 100, 150, 200, 250 ug/mL에 되도록 조제한 후 시료용액과 같은 방법으로 처리하여 420 nm

에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

(5) Phenolic compounds & flavonoids HPLC 분석

동결건조된 미선나무 잎과 줄기분말 1 g에 70% 주정 29 mL를 가하고 25 °C에서 24시간 추출한 후 30분 동안 8,000 × g에서 원심분리기 (Beckman, USA, CA)를 이용하여 고형분을 제거하였다. 원심분리된 상등액만을 모아 0.45 um syringe filter 하여 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 미선나무 잎과 줄기분말에 함유된 flavonoids를 HPLC를 통하여 분석하고, 정량하였다. column은 YMC ODS-AM (250mm×4.6mm I.D. 5um)을 사용하였고, 이동상은 A: 0.1% acetic acid in water, B: 0.1% acetic acid in ACN : Water = 75 : 25로 A를 0 min - 88%, 18 min - 78%, 28 min - 72%, 35 min - 62%, 48 min - 52%, 54 min - 32%, 58 min - 0%로 2분정도 흘러 준 뒤에 다시 처음 상태로 복귀하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min 이었고, 시료주입량은 20 uL, column의 온도는 35°C로 사용하였으며 285 nm에서 분석하였다. 표준물질 Gallic acid, Caffeic acid, Rutin, Apigenin-7-glucoside, Naringin (sigma) 을 사용하여 정량하였다.

(6) 수용성비타민 동시분석

① Thamin (Vt B1) & Riboflavine (Vt B2)의 추출

동결건조된 미선나무 잎과 줄기분말 10 mg에 water 1 mL를 가하고 70 ~ 80°C에서 20분간 추출한 다음 실온에서 식힌 후에 10분 동안 12,000 × rpm에서 원심분리기 (Hanil Science - MICRO 17R, Korea)를 이용하여 고형분을 제거하였다. 원심분리된 상등액만을 모아 0.45. um syringe filter 하여 실험에 사용하였다.

② Ascorbic acid (Vt C), Nicotinic acid, Nicotinamide, Pyridoxine, Folic acid의 추출

동결건조된 미선나무 잎과 줄기분말 50 mg에 4 % metaphosphoric acid 7 mL를 가하고 4°C에서 2시간 동안 추출한 다음 10분 동안 9,000 × g에서 원심분리기 (Beckman, USA, CA)를 이용하여 고형분을 제거하였다. 원심분리된 상등액만을 모아 0.45. um syringe filter 하여 실험에 사용하였다.

③ 수용성 비타민의 HPLC 분석

본 실험에서는 동결건조된 미선나무 잎과 줄기분말에 함유된 Vitamin를 HPLC를 통하여 분석하고, 정량하였다. Column은 Capcell Pak C18 column (4.6mm×250mm I.D. 5um)을 사용하였고, 이동상은 A : 1.25mM PIC B7(1-heptanesulfonic acid sodium salt) + 1 % acetic acid in water, B: 1.25mM PIC B7 + 1 % acetic acid in methanol : water = 60 : 40, A를 0 min - 100 % , 44 min - 0 %로 3분 정도 흘러 준 뒤에 다시 처음상태로 복귀하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min 이었고, 시료주입량은 20 uL, column의 온도는 40°C로 사용하였으며 280 nm에서 분석하였다. 표준물질 Ascorbic acid (Vt C), Nicotinic acid,

Nicotinamide, Pyridoxine, Thiamin hydrochloride, Riboflavine, Folic acid (sigma)를 사용하여 정량하였다.

(7) 당 분석

동결 건조된 미선나무 잎과 줄기분말 2 g에 water 40 mL를 가하여 voltex mixer로 2분간 추출한 후 상층액을 0.45 µm filter (PVDF, Whatman)로 거른 후 HPLC에 주입하여 분석하였다. 표준물질은 fructose, glucose와 sucrose를 사용하였다. Jasco(Japan)사의 HPLC system를 이용하였으며 column은 Prevail carbohydrate ES (5 µm, 4.6×250 mm, Grace)을 사용하고 Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)로 이용하여 drift tube temperature 60°C, spray chamber temperature 30°C에서 측정하였고, column temperature은 30°C이고, injection volume은 10 µL이었으며 flow rate는 1.0 mL/min이었다.

(8) 무기질 조성 분석

미선나무 분말을 용해용액 (HNO₃ : H₂O₂ = 5 : 1(v/v)) 30 mL을 가한 다음 가열 판(100°C)에서 3시간 동안 용해시키고 1 mL로 농축시킨 후, 증류수를 가하여 100 mL로 정용하였다. 유도결합 플라즈마 방출 분광기 (ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer)을 이용하여 시료의 무기질 함량을 측정하였다.

-실험결과

(1) 미선나무 잎 및 줄기의 일반성분

미선나무의 잎 및 줄기의 일반성분은 표 2와 같다. 미선나무 잎의 수분함량은 7.77%로 줄기의 6.41%에 비해 높았다. 미선나무 잎의 회분은 3.88%로 줄기에 비해 적었지만, 조단백은 11.09%로 줄기의 9.19%에 비해 많았다.

<표 2> 미선나무 잎, 줄기에서의 일반성분 함량

미선나무	수분(%)	조회분(%)	조단백(%)
잎	7.77	3.88	11.09
줄기	6.41	5.61	9.19

(2) 미선나무 잎, 줄기에서의 총 카로티노이드 함량

미선나무 잎 및 줄기의 총 카로티노이드 함량은 표 3과 같다. 총 카로티노이드의 양은 미선나무 잎의 0.21 ± 0.01(mg/g)보다는 줄기에 0.36 ± 0.03(mg/g)로 더 많이 함유하고 있다.

<표 3> 미선나무 잎, 줄기에서의 총 카로티노이드 함량

미선나무	잎	줄기
Total carotenoids (mg/g)	0.21 ± 0.01	0.36 ± 0.03

(3) 미선나무 잎, 줄기에서의 총 페놀화합물의 함량

미선나무 잎 및 줄기의 총 페놀화합물의 함량은 표 4와 같다. 미선나무 잎의 총 페놀화합물의 함량은 89.78 ± 0.30(mg/g)로 줄기의 44.64 ± 0.84(mg/g)보다 더 많았다.

<표 4> 미선나무 잎, 줄기에서의 총 페놀화합물의 함량

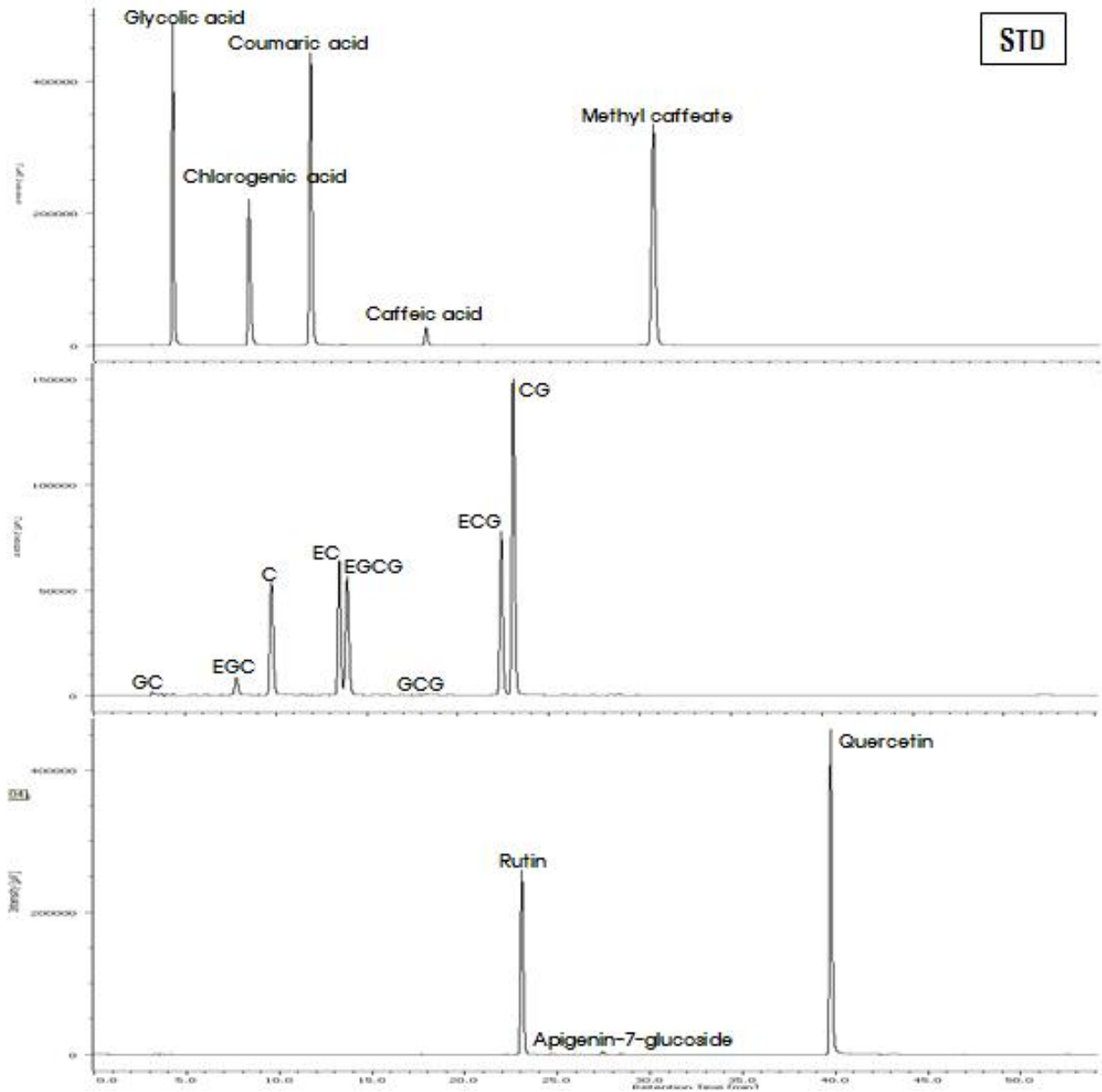
미선나무	잎	줄기
Total phenolic compounds (mg/g)	89.78 ± 0.30	44.64 ± 0.84

(4) 미선나무 잎, 줄기에서의 총 플라보노이드의 함량

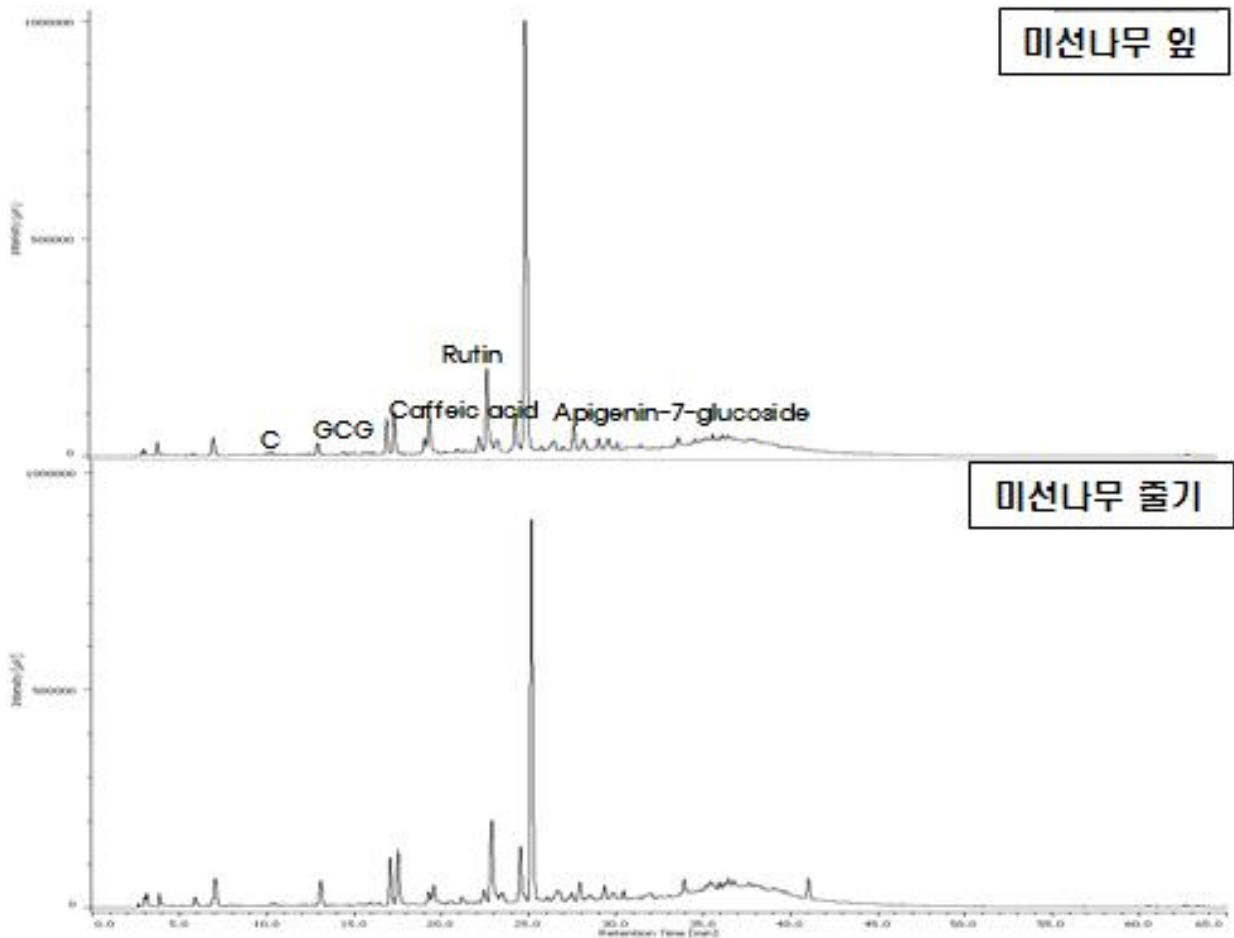
미선나무 잎 및 줄기의 총 플라보노이드의 함량은 표 5와 같으며 플라보노이드 표준물질의 크로마토그램과 미선나무 잎 및 줄기에서의 플라보노이드 크로마토그램은 그림 4와 그림 5와 같다. 미선나무 잎의 총 플라보노이드의 함량은 4.07 ± 0.21 (mg/g)이며 줄기에서는 검출되지 않았다.

<표 5> 미선나무 잎, 줄기에서의 총 플라보노이드의 함량

미선나무	잎	줄기
Total Flavonoids (mg/g)	4.07 ± 0.21	ND



<그림 4> 플라보노이드 표준물질의 크로마토그램

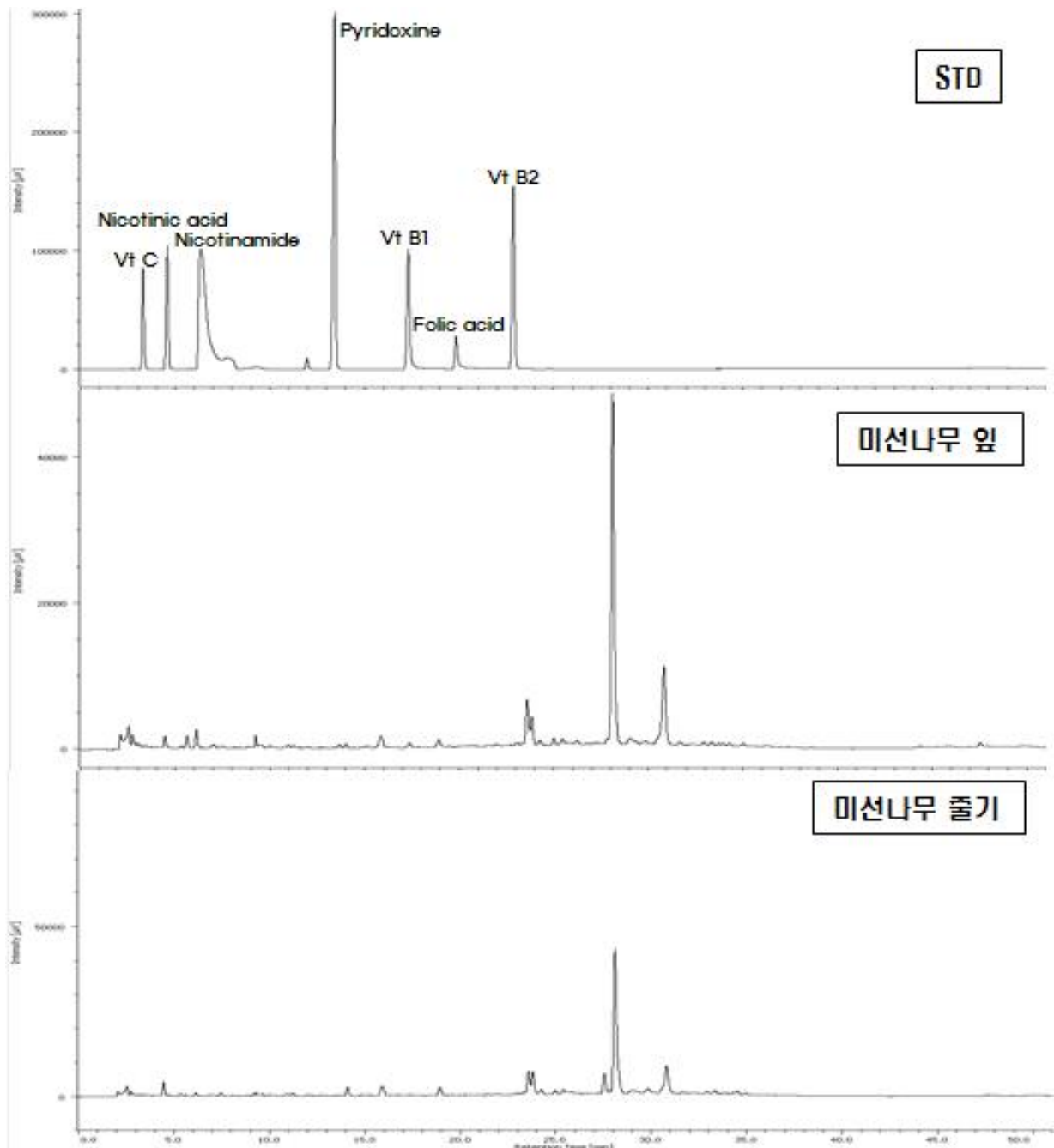


<그림 5> 미선나무 잎, 줄기에서의 플라보노이드 크로마토그램

(5) 미선나무 잎 및 줄기에서의 수용성비타민 분석

미선나무 잎 및 줄기에서의 수용성비타민의 크로마토그램은 그림 6과 같다.

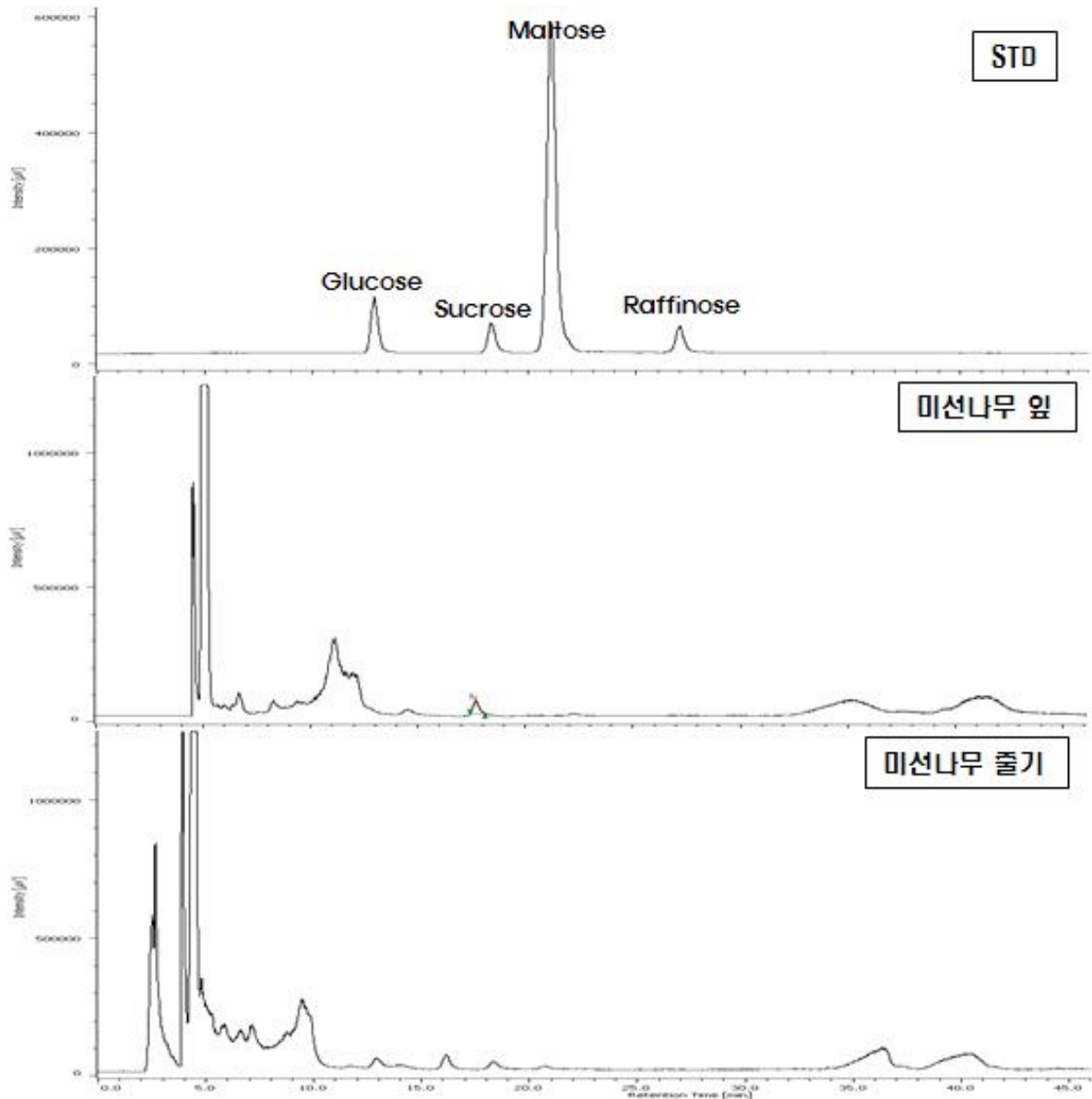
미선나무 잎과 줄기의 수용성 비타민 함량은 거의 없는 것으로 나타났다. 이것은 미선나무 시료를 보관 가공하는 중에 많이 손실된 것으로 사료된다.



<그림 6> 미선나무 잎 및 줄기에서의 수용성비타민 크로마토그램

(6) 미선나무 잎 및 줄기에서의 당 분석

미선나무 잎 및 줄기의 당의 크로마토그램은 그림 7과 같다. 분석 결과 미선나무의 잎 및 줄기에서의 당은 glucose와 sucrose만이 약간 검출되었다.



<그림 7> 미선나무 잎 줄기에서의 당 크로마토그램

(7) 무기질 조성 분석

미선나무의 잎 및 줄기의 무기질 조성은 표 6과 같다. 미선나무 잎은 줄기에 비해 전반적으로 무기질 함량이 높았다. 미선나무의 잎의 칼슘의 함량은 699.45로 줄기의 함량 265.25에 비해 많았다. 미선나무 잎의 철분, 나트륨, 마그네슘의 양도 줄기보다 더 많은 함량을 보였다.

<표 6> 무기질 함량 (mg/100)

미선나무	Ca	Fe	Na	Mg
잎	699.45	37.86	5.09	154.27
줄기	265.25	6.20	3.27	47.14

<첨부 3-2> 시제품 제작



미선나무 추출물 샴푸 제조 표준서 (우리나무영농조합법인)

- 지방산 : 스테아릭 에씨드 10%
계면활성제 : 소듐 라우레스 설페이드 10%
 암모늄 아우레스 설페이드 10%
 트리에탄올 아민라우릴 설페이드 10%
알칼리제 : 포타슘하이드로 사이드 4%
 칼슘하이드록 사이드 1%
미네랄제제 : 마그네슘 설페이드 1%
 징크 설페이드 1%
식물 : 미선나무 잎 추출물 10%
 미선나무 꽃 추출물 10%
PH 조절 : 씨드릭 에씨드
보습제 : 소르비톨 10%
 글라이신 10%
정제수 : 12.7%
방부제 : 에타놀, 메치파라벤 0.01%
향료 : 0.01%

2) 미선나무의 대량번식을 위한 증식기법 연구

미선나무는 열매의 모양이 꼭 용왕이나 옥황상제 곁에서 시녀가 커다란 부채를 천천히 흔드는 모양을 연상케 하여 미선(美扇)이라 불리며 지며 그래서 그런지 꽃말도 “선녀”라 한다.



부채 모양의 미선나무 열매

반달모양의 종자

이렇게 미선나무는 우리나라에 있으면서 세계유일의 특산 식물인 것이다. 미선나무는 꽃의 색깔에 따라 상아색 백색 분홍색을 띄고 있어 꽃의 색깔에 따라 3종류로 분류하기도 하며, 열매의 모양에 따라 둥근 미선으로 분류하기도 한다.

우리나무영농조합법인 연구팀이 전국 자생지 천연기념물로 지정된 미선나무 군락지를 답사한 결과 대부분 자생지는 너무 보호 위주로 관리가 되어 자생지 내에 잡목들이 그대로 방치된 것을 확인 할 수 있었다. 이것은 미선나무가 상대적 경쟁에서 사라질 위기가 있어 그렇게 관리중이다.

미선나무 특성상 다른 종에 비하여 씨앗의 발아가 상대적으로 낮고 생육도 처지기 때문에 도태될 우려가 높다. 도태를 막기 위하여는 미선나무주변의 잡목을 부분 제거함으로써 경쟁에 있어 우위를 점유해야 자연 도태를 막을 수 있기 때문이다.

식물학자에 따라서는 군락지 보호는 인위적으로 하지 말고 자연 상태로 나두는 것을 권한다. 그러나 식물간 자연경쟁에 있어서 생육이 월등한 식물이 결국 모든 지역을 점유함으로써 결국 점유에 밀려난 종은 결국 도태되어 멸종의 위기에 직면 할 수밖에 없다.

천연기념물로 지정된 대개의 식물들은 인간의 훼손에 의한 남획의 탓으로 파괴되는 수도 있지만, 식물 간 중 경쟁이나 외래종 등의 유입으로 종간 군락지 경쟁에서 도태 되어 사라진 식물도 있기 때문이다.

군락지를 답사 확인한 결과로는 종자 채집이 어렵고 특히 발아에 있어 상당히 실생 번식이 어렵다는 결론을 내렸다. 따라서 대량증식의 방법으로 가장 보편적인 삼목 증식을 선택하였다.

삼목증식의 방법으로 우선 삼수의 소재를 구하는 것이 선행되어야 하며삼수는 법인 소유

의 미선나무포지에서 채취하였다.

삼목의 성공률을 높이기 위하여 식물연구기관에서 사용하는 생장호르몬 IAA, IBA, NAA, GAS(지베리닌), 사이토키닌 5종류를 구입하여 연구를 실시하였다. 실험기간은 녹지삼의 대량 번식이 목적임으로 삼수가 경화되는 7월 15일을 선택하여 터널재배방법과 온실상태 2가지를 선택하였다.

○ 미선나무 증식 연구의 재료 및 방법

이 실험의 공시 재료는 청천면 삼락리 소재 본 조합의 미선나무포지에서 채취하였고 삼수의 길이는 3개의 눈을 기준으로 삼아 12cm내외의 크기로 조제한 후 사질양토, 마사토, 질석, 펄라이트를 삼목 용토로 하여 일반 비가림 시설(스프링쿨링설치) 및 천안연암대학 분재온실에서 실시하였다.

본 조합이 일반 농가가 가지고 있는 스프링클러가 설치된 비가림 시설에 실험을 실시한 목적은 향후 본 실험의 성공한 결과를 대중적으로 쉽게 접근이 가능 할 수 있게 하기 위함이었다.



미선나무 녹지삼수 채취 및 삼수조제

녹지삼목의 경우 3마디를 기준 삼수 조제를 하고 첫째 마디 앞만 남기고 나머지 잎은 제거한 후 생장 호르몬별로 20개씩 삼수를 삼목하였다.

삼상은 비닐로 밀폐시켜 처리한 경우와 일반 온실의 경우 2가지로 하였다.

삼목상의 습도는 일반 농가의 비닐하우스이기 때문에 삼상의 밀폐처리로 습도를 어느 정도 유지하였고, 처음부터 차광막으로 약 80% 햇빛을 차광하여 고온도가 형성되지 않도록 관리하고 한여름철을 감안 내부 온도는 스프링클러를 활용 오전 9시부터 오후 5시까지 안개분무를 실시하였다.

○ 생장호르몬제의 농도처리 방법

삼목 시기는 녹지삼의 경우임으로 목질부가 경화되는 7.15일 실시하였다.

생장호르몬제는 IAA, IBA, NAA, GAS(지베리닌), 사이토키닌을 사용하였다. 처리농도는 무처리, 500배, 1000배, 2000배로 하였다.

생장조절제 IAA, IBA, NAA, GAS(지베리닌), 사이토키닌은 순간 침지법을 사용하여 3cm를 1분간 용액에 침전되도록 하였다.



- 농도별 삼수 식물 성장호르몬 1분 침지 -

농도별 성장조절제 침지 처리 후 건조된 삼수는 삼상에 식재하기 전 미리 준비한 황토를 바른 후 다시 건조시킨 후 삼수를 식재 하였다.

이때 식재 시 삼수 끝 발근이 되는 목질부가 상처가 나는 경우가 있어 미리 소독제로 삼수 심을 자리에 구멍을 낸 후 삼수를 조심스럽게 식재 하였으며, 식재가 끝난 후 충분히 물을 뿌려 준 후 관리 하였다.

○ 삽목용토가 발근에 미치는 영향

미선나무를 농도별(무처리, 500배, 1000배, 200배)로 IAA, IBA, NAA, GAS(지베리닌), 사이토키닌을 처리한 후 발근에 미치는 영향을 조사하였다.



1) 터널방식의 마사토 삽목 결과(13. 10. 01)

삽 수	처리농도(PPM)	발근	무발근	백분율 (%)	비 고
20	NAA 500	18	2	90	
	IAA 500	16	4	80	
	IBA 500	16	4	80	
	GAS 500	17	3	85	
	Cytokinin 500	17	3	85	
	NAA 1000	16	4	80	
	IAA 1000	15	5	75	
	IBA 1000	15	5	75	
	GAS 1000	16	4	80	
	Cytokinin 1000	16	4	80	
	NAA 2000	15	5	75	
	IAA 2000	14	6	70	
	IBA 2000	14	6	70	
	GAS 2000	15	5	75	
Cytokinin 2000	15	5	75		
20	무처리	12	8	60	

마사토에서의 녹지삽의 경우 식물생장호르몬 처리결과 저 농도 NAA500에서 약 90%의 발근율을 보여준다



2) 터널방식의 펄라이트 삽목결과(13. 10 .01)

삽 수	처리농도(PPM)	발근	무발근	백분율 (%)	비 고
20	NAA 500	18	2	90	
	IAA 500	17	3	85	
	IBA 500	16	4	80	
	GAS 500	17	3	85	
	Cytokinin 500	17	3	85	
	NAA 1000	16	4	80	
	IAA 1000	15	5	75	
	IBA 1000	15	5	75	
	GAS 1000	16	4	80	
	Cytokinin 1000	16	4	80	
	NAA 2000	14	6	70	
	IAA 2000	13	7	65	
	IBA 2000	13	7	65	
	GAS 2000	14	6	70	
Cytokinin 2000	14	6	70		
20	무처리	11	9	55	

펄라이트에서의 녹지삽의 경우 식물생장호르몬 처리결과 저 농도에서 NAA500 약 90%의 발근율을 보여준다



3) 터널방식의 사실양토 삼목결과(13. 10 .01)

삼 수	처리농도(PPM)	발근	무발근	백분율 (%)	비 고
20	NAA 500	18	2	90	
	IAA 500	17	3	85	
	IBA 500	17	3	85	
	GAS 500	18	2	90	
	Cytokinin 500	18	2	90	
	NAA 1000	16	4	80	
	IAA 1000	15	5	75	
	IBA 1000	15	5	75	
	GAS 1000	16	4	80	
	Cytokinin 1000	16	4	80	
	NAA 2000	14	5	70	
	IAA 2000	13	6	65	
	IBA 2000	13	6	65	
	GAS 2000	14	5	70	
Cytokinin 2000	14	6	70		
20	무처리	12	8	60	

사실양토에서의 녹지삼의 경우 식물생장호르몬 처리결과 저 농도에서 NAA500,GAS500, Cytokinin 500 약 90%의 발근율을 보여준다.



4) 터널방식의 질석 삽목결과(13. 10. 01)

삽 수	처리농도(PPM)	발근	무발근	백분율 (%)	비 고
20	NAA 500	4	16	20	
	IAA 500	5	15	25	
	IBA 500	5	15	25	
	GAS 500	4	16	20	
	Cytokinin 500	5	15	25	
	NAA 1000	4	16	20	
	IAA 1000	5	15	25	
	IBA 1000	5	15	25	
	GAS 1000	4	16	20	
	Cytokinin 1000	5	16	25	
	NAA 2000	3	17	15	
	IAA 2000	4	16	20	
	IBA 2000	3	17	15	
	GAS 2000	4	16	20	
Cytokinin 2000	4	16	20		
20	무처리	2	18	10	

질석의 경우 녹지삽은 과습에 의하여 생장호르몬의 농도와 관계없이 저조한 25%의 발근율을 보여준다.



5) 일반온실 마사토 삼목결과(13. 10. 01)

삼 수	처리농도(PPM)	발근	무발근	백분율 (%)	비 고
20	NAA 500	11	9	55	
	IAA 500	10	10	50	
	IBA 500	10	10	50	
	GAS 500	11	9	55	
	Cytokinin 500	12	8	60	
	NAA 1000	9	11	45	
	IAA 1000	9	11	45	
	IBA 1000	10	10	50	
	GAS 1000	9	11	45	
	Cytokinin 1000	10	10	50	
	NAA 2000	9	11	45	
	IAA 2000	8	12	40	
	IBA 2000	7	13	35	
	GAS 2000	8	12	40	
Cytokinin 2000	8	12	40		
20	무처리	7	13	35	

일반온식의 경우 마사토에서의 녹지삼은 평균 50%의 발근율을 보여준다.



○ 녹지삽의 터널재배를 통한 대량증식 방법구명

위의 5) 실험결과에서 보듯이 터널재배가 아니 경우 상당히 다른 발근 데이터를 보여주고 있다. 또한 위의 4)에서 보듯이 터널재배라 하더라도 용토와 과습에 따라 서로 다른 발근율을 보여주고 있다.

7월의 녹지삽의 경우 발근에 미치는 성장조절제의 영향으로 NAA500의 경우 90%의 높은 발근율을 보여주고 있음을 알 수 있었다. 그리고 호르몬처리와 무 처리한 상태에 있어 발근을 비교한 결과 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다.

미선나무 대량 증식에 있어 터널재배 삽목 시 식물 성장호르몬 처리는 발근율을 상당히 높임으로서 대량 증식의 길을 열 수 있었다.



녹지삽 터널재배 시 내부 온도를 낮추기 위한 스프링클러 분무

3) 미선나무 주원료 가공분말 활용 기능성 사료첨가제 개발

현황 및 문제점

- 미선나무 꽃 채취 후 기능성 물질인 미선나무 잎·줄기의 활용방안의 일환으로 한돈의 사료첨가제를 통한 비육돈의 연구방향 설정 등은 전무한 상태임
- 일부 양돈농가에서 최근 미선나무 분말을 이용하여 비육돈의 면역력을 통한 설사병 방지 등 및 소취제거를 위해 급여하고 있으나, 정확한 근거없이 급여하고 있고 구체적인 투여량 등의 설정 등은 전혀 이루어지지 않고 있음
- 미선나무 잎·줄기를 활용한 비육돈의 생산성 향상을 위한 급여방법, 급여기간등의 브랜드화를 통한 농가 현장의 요구는 많이 있었으나 미선나무의 회귀성과 원물부족으로 연구가 전혀 이루어진바가 없음

2. 연구과제 개발의 배경 및 내용

- 괴산군은 미선나무 꽃축제를 통해 지역특성화 사업인 미선나무 생산을 통한 농가부와 소득을 창출하고 있으나 그 파급효과는 미미한 상태임
- 미선나무 재배농가는 꽃축제를 통한 조정수로서의 판매를 기대하였으나 건설경기 부진 등 새로운 건설현장 공급부족으로 판매에 어려움이 있음
- 미선나무 기능성 효과를 통한 부산물을 이용 비육돈 사료첨가제를 개발 1차산업과 2차산업의 시너지를 통한 3차산업의 연계 소재를 검토
- 비육돈의 면역력제고와 증체를 위한 사료첨가제로 미선나무 잎·줄기를 활용 시범 농가를 선정하여 사양시험 착수

3. 기존 영농활용기술과의 연계

- 대부분의 사육농가는 면역력증대나 소취제거를 위해 생균제를 활용하고 있으나, 그 효과는 미미함으로 지역 특화식물을 통한 차별화를 시도
- 미선나무 잎·줄기의 급여량등 정확한 사양시험이 이루어진바 없고, 일부 한돈 농가에서는 잎·줄기를 건조하여 가루로 만들어 급여하고 있음.

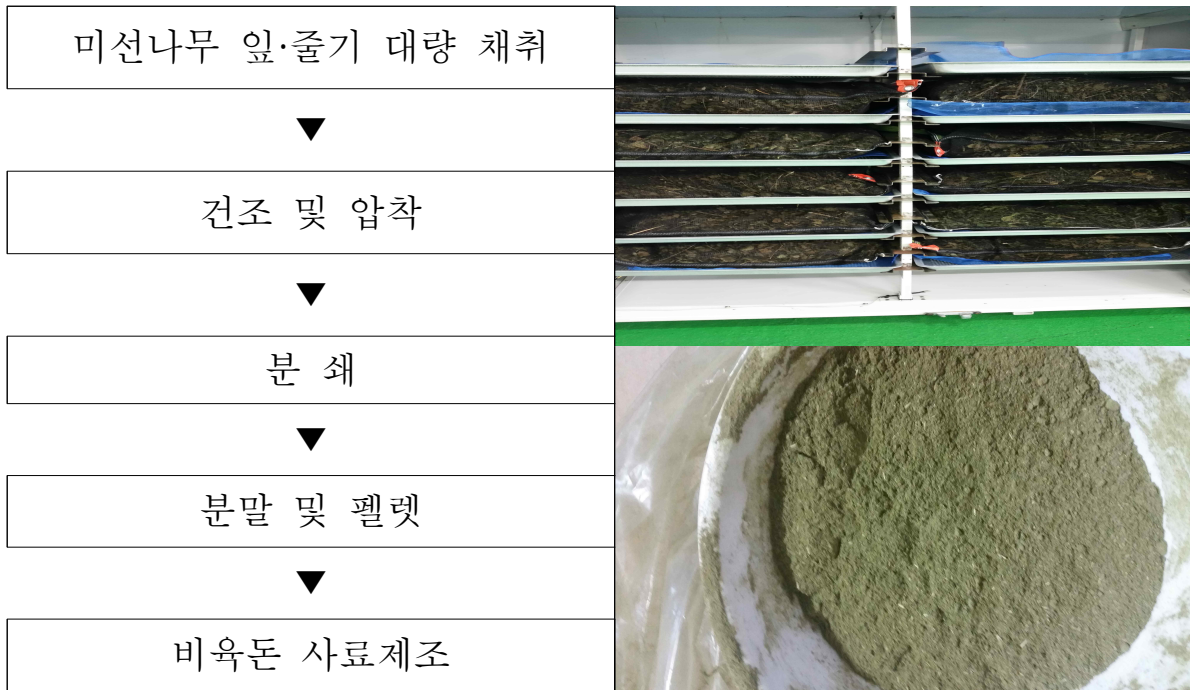
4. 개발기술의 활용 가능 지역

- 전국 미선나무 재배농가 및 비육돈을 생산하는 모든 한돈 농가
- 생물다양성 협약에 따라 미선나무는 우리나라 고유종으로서 외국에서 생산판매의 경우 로알티등 비용문제가 발생으로 우리나라가 독점 할 수 있는 대표적인 사료첨가제로 개발이 가능

5. 기술개발의 내용

- 가. 미선나무 잎·줄기활용 사료첨가제 제조

- 미선나무 잎·줄기를 첨가한 이유비육돈용 사료 제조



- 제조된 분말 및 펠릿상태



나. 미선나무 사료첨가제 사양실험

- 사료첨가제의 실험구별 일자별 증체량

(단위:kg)

구 분		1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	대조구
이 유 차돈기 (7.20일)	A	30	31	29	31
	B	31	31	32	32

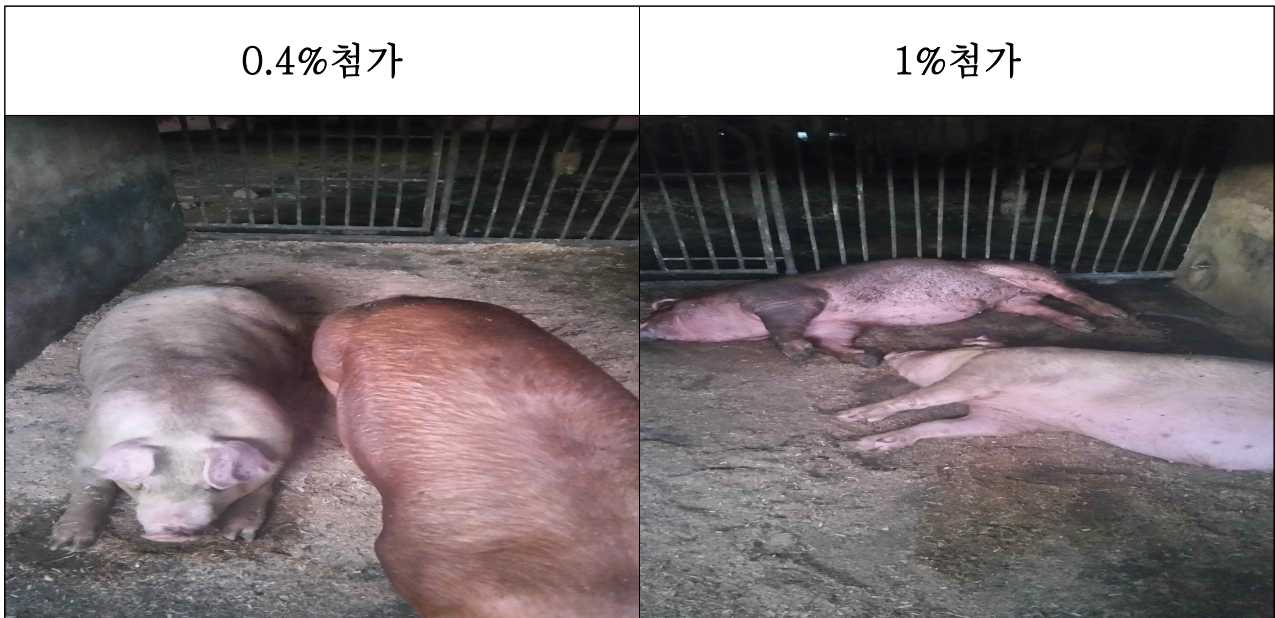
(단위:kg)

구 분		1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	대조구
비육전기 (9.11일)	A	81	79	89	66
	B	84	76	78	74

(단위:kg)

구 분		1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	대조구
비육전기 (9.20일)	A	100	98	92	77
	B	104	90	93	84

- 9.20일자 생육상태



- 도체중량

구 분		1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	대조구
도체중 (9.30일)	A	117	111		
	B	113	108		

구 분		1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	대조구
도체중 (10.13일)	A			128	102
	B			123	98

- 사육일수

구 분		1%첨가 (1790)	사육 일수	0.4%첨가 (1791)	사육 일수
5.14일 출 생	A(도축일)	9.30일	138	9.30일	138
	B(도축일)	9.30일	138	9.30일	138

구 분		0.2%첨가 (1790)	사육 일수	대조구	사육 일수
5.14일 출 생	A(도축일)	10.13일	151	10.13일	151
	B(도축일)	10.13일	151	10.13일	151

다. 미션나무 사료첨가제 실험 성적

구 분	1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	대조구
사육일수	138	138	151	151
체중(kg)	115±2.5	110±2.5	125±2.5	100±2.5
일일평균증체량(g)	833	797	827	662

6. 미선나무 사료첨가제 기대효과

가. 미선나무 잎·줄기 생산원가

- 미선나무포지 10a당 약3톤의 잎·줄기 수확
- 건조 시 약 900kg의 건물생산추정(건조율 30%)
- 원물 1kg 구입가격 : 5,000*900kg = 4,500,000원
- 일반 농작물 10a당 조수익(1,200,000원)의 약 4배의 농가수익
- 미선나무 잎·줄기 kg당 가공단가 = 25,000원

나. 경제성 분석(두당 비용분석)

구 분	1%첨가 (1790)	0.4%첨가 (1791)	0.2%첨가 (시험구)	비 고
단축사육일수	42	42	29	
사료단가*3kg	500*3	500*3	500*3	
기간단축 사료비 (a)	63,000	63,000	43,500	
총 사료량(250kg) /미선나무 첨가률	2.5	1	0.5	
첨가제 가격 (b)	62,500	25,000	12,500	
추가사료 절감액 (a-b)	500	38,000	31,000	

- 미선나무 잎·줄기 사료첨가제 실증실험 결과 0.4%의 첨가제 투여시 1두당 38,000원의 비용절감 효과가 나타남
- 위 추가사료 절감액 비교 시 0.4%의 사료첨가제시 비용절감 효과가 가장 높게 나타남
- 위 실험 과시 일반 한돈 농가의 미선나무 0.4% 첨가제 투여 시 한돈 1회 회전율이 1년기준 2회전인데 비해, 2.5회전까지 가능함.

발급번호 제 14-C-2081 호

시험
 분석

성 적 서

① 의 뢰 인	성 명	우리나무영농조합법인	사업자등록번호 (법인등록번호)	317-81-16355
	주 소	367-845 충북 괴산군 청천면 삼락리 235		
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	돼지고기 4점		
	시 험 개 요	전단력, 가열감량, 육색, pH, 지방산 시험방법에 준함		
	용 도			

③ 분석(시험) 성적 : 분석결과는 붙임과 같음

「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여
2014년 10월 16일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.

2014년 10월 27일

농업기술실용화재단 이사장



분석결과

○ 이화학적 특성

시료명		1790	1791	시험구	대조구
분석항목명					
	전단력 (kg/0.5inch ²)	2.99	2.81	3.23	4.85
	가열감량(%)	28.57	39.09	32.85	32.65
육색(CIE)	L	60.81	65.67	52.20	51.85
	a	9.02	9.90	7.51	8.32
	b	5.40	6.54	3.16	3.10
	pH	5.59	5.56	5.55	5.48

○ 지방산

(단위:%)

시료명		1790	1791	시험구	대조구
지방산					
	Myristic acid(C14:0)	1.40	1.39	1.26	1.33
	Palmitic acid(C16:0)	23.80	24.69	23.35	25.44
	Palmitoleic acid(C16:1n7)	3.09	2.54	2.82	3.46
	Stearic acid(C18:0)	12.23	12.38	11.77	12.10
	Oleic acid(C18:1n9)	50.89	49.15	49.78	47.97
	Vaccenic acid(C18:1n7)	0.00	0.00	0.00	0.00
	Linoleic acid(C18:2n6)	6.85	8.19	9.25	7.81
	γ-Linoleic acid(C18:3n6)	0.04	0.06	0.08	0.13
	Linolenic acid(C18:3n3)	0.39	0.47	0.49	0.41
	Eicosenoic acid(C20:1n9)	1.01	0.84	0.93	0.82
	Arachidonic acid(C20:4n6)	0.29	0.28	0.26	0.55
	Eicosapentaenoic acid(EPA) C20:5n3)	0.00	0.00	0.00	0.00
	Docosatetraenoic acid(C22:4n6)	0.00	0.00	0.00	0.00
	Docosahexaenoic acid(DHA) C22:6n3)	0.00	0.00	0.00	0.00
	합 계	100.00	100.00	100.00	100.00
	포화 지방산	37.43	38.47	36.39	38.86
	불포화 지방산	62.57	61.53	63.61	61.14
	-단가	54.99	52.53	53.53	52.24
	-다가	7.57	9.00	10.08	8.90

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도

제1세부	미선나무의 기능성 물질 분석 및 피부미용 소재화 기술 개발	달성도
1차년도 (2012년)	○ 미선나무 부위별(잎, 줄기, 뿌리, 꽃) 추출물의 일반성분 및 기능성 성분 분석	100
	○ 미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> system 계에서 생리활성 효과 구명	100
2차년도 (2013년)	○ 미선나무 부위별 추출물의 기능성 피부미용 소재로써 <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> system 계에서 생리활성 효과 구명	100
	○ 다양한 기능성 산업화 적용을 위한 미선나무 복합소재 연구	100
종료 후	SCI 논문 1편 게재, 국내논문 2편 게재; 특허 출원 및 등록(1)	투고 진행중

* 관련 data 및 확립된 연구방법으로 SCI 논문 1편 게재 하였으며, 국내 논문 2편은 투고 중임. 특허의 경우 연구 결과를 바탕으로 타 세부 과제와 연계하여 추진 중인 상황임.

제2세부	미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과 규명	달성도
1차년도 (2012년)	○ 미선나무 추출물의 <i>in vitro</i> system 을 활용한 항염증 등 면역효과 규명	100
	○ 미선나무 추출물의 <i>in vivo</i> system 을 활용한 항염증 등 면역효과 규명	100
2차년도 (2013년)	○ 미선나무 추출물의 <i>in vivo</i> system 을 활용한 항염증 등 면역효과 규명	100
	○ 산업화를 위한 미선나무 추출물의 안정성 규명 및 소재화 연구	100
종료 후	SCI 논문 2편 게재, 국내논문 1편 게재; 특허 출원 및 등록(1)	투고 진행중

* 논문은 현재 SCI 3편 투고 중이며, 특허의 경우 연구 결과를 바탕으로 타 세부 과제와 연계하여 추진 중인 상황임.

제2세부	미선나무추출물을 활용한 피부미용제품 및 항바이러스계 사료 및 증식기술의 개발	달성도
1차년도 (2012년)	○ 미선나무 추출기법 및 추출공정 표준화 연구 개발	100
	○ 미선나무의 대량번식을 위한 증식기법 연구	100
2차년도 (2013년)	○ 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 기능성 피부미용 시제품개발	100
	○ 미선나무를 주원료로 가공분말을 활용한 면역력강화 기능성 사료 시제품 개발	100
종료 후	SCI 논문 1편게재, 국내논문 1편 게재; 특허 출원 및 등록(1)	투고 진행중

* “미선나무 가축사료 및 그 제조방법”에 대한 특허 1건 출원 하였으며, 논문은 현재 SCI 1 편, 국내논문 1편 투고 중임.

제 2 절 학술발표 및 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Extracts of <i>Abeliophyllum distichum</i> Inhibitors the Production of Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines in LPS-stimulated Raw264.7 cell		강윤중		대한 면역학회지		국내	학술 대회 발표
2013	Antioxidant Activities of Branches Extracts from <i>Abeliophyllum distichum</i>		박재호		한국자원식물 학회지		국내	학술 대회 발표
2014	미선나무 부위별 항산화 활성 및 B16F10 세포의 멜라닌 형성 억제 효과		박재호		한국자원식물 학회지		국내	학술 대회 발표
2014	<i>Abeliophyllum distichum</i> -induced reduction of cell viability is mediated by activating transcription factor 3 in human colorectal cancer cells	박재호			한국자원식물 학회지		국내	학술 대회 발표
2014	Anti-inflammatory effects of ethyl acetate extract from <i>Abeliophyllum distichum</i> stem		강윤중		대한 면역학회지		국내	학술 대회 발표
2014	Anti-inflammatory activity of ethyl acetate extract from <i>Abeliophyllum distichum</i> flower		강윤중		대한 면역학회지		국내	학술 대회 발표
2014	Evaluation of anti-inflammatory effects of ethyl acetate extract from <i>Abeliophyllum distichum</i> leaf		강윤중		대한 면역학회지		국내	학술 대회 발표
2014	Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (<i>Morus alba</i> L.) root bark	박재호			BMC Complement ary and Alternative Medicine	14(200)	국외	SCIE
	발명의 명칭	출원일자		출원번호		출원인		
2014	미선나무 가축사료 및 그 제조방법	2015. 1. 22		10-2015-0010729		우리나무영농 조합법인		

제 3 절 관련 분야에의 기여도

1. 미선나무는 괴산의 지역적 상징성을 가진 자원으로써 기능성 산업화 소재개발을 통한 고부가가치화 기여

- 미선나무는 희귀종이라는 인식으로 인해 식물학적으로 매우 높은 평가를 받고 있으며, 특이적인 향과 꽃의 매력으로 관상학적 가치가 매우 높게 평가 되고 있다.
- 최근 미선나무의 효능과 관련된 특허가 몇몇 기업에 의해 등록이 되어 있으나, 구체적으로 산업화를 진행하거나 학술적 가치가 높은 연구는 진행되지 않았다.
- 본 연구를 통해 미선나무의 기능성 물질 분석과 피부미용 소재화 기술개발을 통해 비식품 산업화 소재로써의 가치가 높게 평가되었다.
- 또한 미선나무 추출물의 항염증 등 면역효과에 대한 분자적 기전을 규명하고 세포수준의 안전성을 입증함으로써 향후 식품 및 약용작물로써의 활용 가능성을 제시하였다.

2. 연계산업 추진 및 지역 상징성 자원화

- 본 연구 주관연구 책임자와 협동연구기관이 참여하여, 2014년 향토산업 육성사업(사업명: 괴산미선나무를 활용한 산업화 및 관광사업화)에 선정되어 추진중이며, 본 연구와 연계한 기능성 소재화 및 제품 양산화를 추진 중이다.
- 또한 미선나무의 역사성, 지역성, 기능성을 홍보하여 괴산지역을 상징하는 자원을 브랜드화하여 관광산업과 연계하여 농가 및 지역 경제 발전에 크게 이바지 할 것으로 사료된다.
- 2015년 세계 유기농 산업엑스포가 괴산에서 개최됨에 따라 여러 효능과 기능성을 가진 미선나무는 괴산의 청정 이미지 뿐만 아니라 지역을 대표할 수 있는 소재이다.

3. 식품소재로써의 활용화

- 현재 미선나무는 화장품 소재로써의 활용은 가능하나 식품소재로의 활용은 불가능하다.
- 본 연구결과의 기능성 및 안전성에 대한 data는 향후 식품원료 등록을 위한 기초적 자료를 제공할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 제품 개발 및 상품화

- 미선나무의 미백 및 주름 개선 효과를 활용한 화장품 및 기능성 피부미용 제품을 생산을 위한 기반 구축(항산화 효과를 활용한 피부미용 제품, 항염증 효과를 활용한 아토피 개선 화장품 등)
- 피산 미선나무 사업단과 연계한 미선나무를 이용한 비식품계열 제품 생산 가능함(항균제, 부산물을 활용한 비료생산 등)
- 최근 구제역으로 인해 전국적으로 축산농가가 매우 어려운 실정이다. 본 연구결과를 활용하여 건강하고 육질좋은 가축 생산을 위한 무항생제 사료 개발을 위한 기초적 자료 제공

2. 특허, 논문 확보 계획

- 미선나무 재배 부산물을 활용한 면역강화 기능성 사료(특허 출원 진행중)
- 미선나무 부위별 항산화 활성 및 피부기능성 활성(한국자원식물학회, 투고 진행중)
- 미선나무 추출물의 세포 수준 항염증 효능 규명 (해외 SCI 저널 투고 진행중)
- 미선나무 추출물의 동물 모델에서의 장염 관련 효능 규명 (해외 SCI 저널 투고 진행중)

<유사기술 회피방안>

- 미선나무 추출물을 함유하는 화장료 조성물

상기의 특허 내용은 미선나무 가지부분만을 70% 에탄올로 추출하여 일반적인 시험법에 의해 피부미용 효과를 검증 하여 출원한 내용으로, 기존 미선나무 연구(본연구자 포함하는 연구진)에서 미선나무의 부위별(잎, 가지, 꽃) 항산화 활성이 상이하게 나타나고 있다. 따라서 본 연구에서는 미선나무를 부위별로 구분하고, 에탄올 농도별 추출물의 항산화 활성과 수율을 검증하여 추출조건을 확립하였다.

- 미선나무 발효물질을 이용한 화장용품용 조성물

본 연구는 미선나무를 미부미용소재로써의 효율적 활용을 위해 미선나무 부위별(잎, 꽃, 가지) 효과적 추출방법을 모색하고, 부위별 피부미용효과를 검증하여 시제품을 생산하는 과제로써 기존의 기술에 있어 원료 생산의 차별성이 있으며, 미부미용 검증법에 대해 좀더 객관적인 결과를 도출 함으로써 미선나무를 이용한 새로운 소재생산 및 피부미용소재로써의 기술로 인정받을 수 있을거라 사료됨.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌

1. Huang X, Dai J, Fournier J, Ali AM, Zhang Q, Frenkel K. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002;32:84-92.
2. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 1989;28:1057-60.
3. Hus B, Coupar IM, Ng K. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm. *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*. 2006;98:317-28.
4. Jung Y, Surh Y. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;30:1407-17.
5. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1198-1200.
6. Halliwell B. Drug antioxidant effect: A basis for drug selection. *Drug*. 1991;42:569-605.
7. James FC, Maryanne D, Thomas GC. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Imm. Meth.* 2002;265:1-2
8. Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM. Antioxidant properties of butein isolated

- from *Dalbergia odorifera*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1998;1392:291-9.
9. Jagot, S.K. and H.M. Dani. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry* 127: 178-182.
 10. Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, and Fuller BB (1990) The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J Invest Dermatol* 95, 9 - 15
 11. Yang MJ, Lim SJ, Ahn HS, Kim MA, and Ahn RM (1999) Inhibitory effects of chestnut bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Korean J Env Hlth Soc* 25, 37 - 43.
 12. Kwak JH, Seo UK, and Han YH (2001) Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16, 220 - 3.
 13. Hashiguchi, H. and Takahashi, H. (1976) Inhibition of copper containing enzymes, tyrosinase and dopamin β -hydroxylase, by L-Mimosine. *Mol. Pharmacol.* 13, 362-367.
 14. Lopez, J. N. R., Tudela, J., Varon, R., Carmona, F. G., and Canovas, F. G. (1992) Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 3901-3810.
 15. 정재훈, 2008, 수종의 한약재의 Tyrosinase와 Elastase활성 억제 효과에 대한 실험적 연구. 경원대 대학원, 석사학위논문.
 16. Lee S.Y., An J.H., Cho H.Y., 2003, Isolation and characterization of MMP-1inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* bungeinfibroblast cellline HS68cells. *J Kor Soc Agric Chem Biotechno*, 45(1):60-65.
 17. Lee K.K., Kim J.H., Cho J.J., Choi J.D., 1999, Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Inter J Cosm Sci*, 21(2), 71-82
 18. Jung, Y. and Y. Surh. 2001. Oxidative DNA damage and cytotoxicity unduced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic. Biol. Med.* 44:1407-1417.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업 기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.